

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo fitoquímico e biológico do cambucá
Plinia edulis (Vell.) Sobral - Myrtaceae

Tati Ishikawa

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato

Co-orientador:

Prof. Tit. Massayoshi Yoshida

São Paulo
2008

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

I79es Ishikawa, Tati
Estudo fitoquímico e biológico do cambucá *Plinia edulis* (Vell.)
Sobral - Myrtaceae / Tati Ishikawa. -- São Paulo, 2008.
205p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Kato, Edna Tomiko Myiake

Co-orientador: Yoshida, Massayoshi

1. Mirtaceas : Farmacognosia 2. Produtos naturais I. T. II.
Kato, Edna Tomiko Myiake, orientador. I. Yoshida, Massayoshi
co-orientador.

615.3234 CDD

Tati Ishikawa

Estudo fitoquímico e biológico do cambucá
Plinia edulis (Vell.) Sobral - Myrtaceae

Comissão Julgadora
da
Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato
Orientadora/Presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de 2008.

**Janus****Universidade de São Paulo****RELATÓRIO DE DEFESA**

Aluno: 9138 - 3639662 - 2 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Tati Ishikawa no Programa: Fármaco e Medicamentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 10 dias do mês de novembro de 2008, no(a) Auditório realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Tati Ishikawa, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Estudo fitoquímico e biológico do cambucá *Plinia edulis* (Vell.) Sobral - Myrtaceae"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da Unidade	Resultado
Edna Tomiko Myiake Kato	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Massayoshi Yoshida	Titular	IQ - USP	Aprovado
Geraldo Alves da Silva	Titular	IAL - Externo	Aprovado
Helena Onishi Ferraz	Titular	FMU - Externo	Aprovado
Eliana Aparecida Varanda	Suplente	UNESP - Externo	Aprovado

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Elisabete Claro de Souza Paiva _____, lavrei o presente relatório, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) examinadores. São Paulo, aos 10 dias do mês de novembro de 2008.

Massayoshi Yoshida

Geraldo Alves da Silva

Helena Onishi Ferraz

Eliana Aparecida Varanda

Edna Tomiko Myiake Kato

Presidente da comissão julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

O título foi homologado pela Comissão de Pós-Graduação em 11/11/2008 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Fármaco e Medicamentos obtido no Programa Fármaco e Medicamentos - Área de concentração: Insumos Farmacêuticos.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

*Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis

Ao Lucas, por não me deixar desistir nunca, meu profundo amor e gratidão.

A minha família, pelo apoio e incentivo.

Vocês são os grandes responsáveis pela realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Edna Tomiko Myiake Kato pela orientação e apoio. Por me permitir ousar e esbravejar sem perder a paciência.

Ao Prof. Massayoshi Yoshida pelos ensinamentos, incentivo, confiança, carinho e por acreditar em mim.

Aos amigos “unespianos” Raquelita, Vanessa, Sandra Márcia, Adriana, Ferds, Smu, Loren, Fabi, Chris, Lú e agregadas Andreza e Ana Flávia por todo o apoio e incentivo. Sem vocês o que seria de mim?

A todos os companheiros de laboratório, especialmente André, Rá e Biba por agüentarem as minhas lamentações, choros e surtos psicóticos e me estenderem a mão sempre.

Ao Caio por toda a ajuda em momentos cruciais do meu caminho.

A família que me recebeu de braços abertos nesta jornada: Odilon, Zilah, Thiago, Matheus e Júlia (e todos os gatos e cachorros agregados).

A todos os trindadeiros, que me auxiliaram e abriram seus quintais para a coleta.

Ao funcionário Roberto de Jesus Honório pelo auxílio e amizade e aos técnicos Kátia e Charles por toda a ajuda.

À Profa. Inês pela realização das análises de RMN.

Aos Professores do Departamento de Farmácia Paulo Chanel, Vicente, Telma e Elfi pelo apoio e contribuições científicas.

À Profa. Sílvia Berlanga por me estender a mão, sendo sempre solidária e a todos os alunos do Laboratório de Patologia, em especial à Cris, Tânia e Diogo pela colaboração nos ensaios antioxidantes.

À Profa. Olga Higa e à Dra. Andréa Rodas pela colaboração na realização dos testes de citotoxicidade.

Ao Prof. Wagner Villegas e a todo o pessoal do Núcleo de Produtos Naturais da UNESP – Araraquara, especialmente Carol, Márcio, Ana, Daniel e Clenilson pela colaboração nos estudos fitoquímicos.

Ao Prof. João Ernesto de Carvalho e a toda a sua equipe, em especial à Ana pela colaboração na realização dos ensaios anti-tumorais.

À Profa. Eliana Varanda e a todos do Laboratório de Microbiologia da UNESP – Araraquara, especialmente à Mari e Vanessa, pessoas que iluminaram o meu caminho nos ensaios de mutagenicidade.

À Profa. Maria Luiza Faria Salatino e Dra. Cláudia Maria Furlan do Instituto de Biociências da USP por toda a ajuda concedida.

Ao Prof. Paulo Moreno e a todos os seus alunos pelas contribuições e disponibilização do laboratório.

À Ingrid e à Sabrina por toda a ajuda, ensinamentos e contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Massuo e aos seus alunos pela companhia durante meu trajeto.

Ao Prof. Dr. Norberto Pepporine Lopes pelas contribuições científicas ao trabalho.

À Silvana e a todo o pessoal do biotério da FCF-USP pela disponibilização dos animais e salas para a realização dos ensaios biológicos.

À Dra. Lúcia Rossi pela identificação da espécie.

Aos bibliotecários, Ângelo, Adriana e, em especial, à Leila Aparecida, pela ajuda e revisão bibliográfica.

Aos funcionários Bete, Luís, Elaine e Jorge por toda ajuda e simpatia.

A todos os professores que me incentivaram na figura especial do Prof. Alberto Cavaleiro, meu primeiro orientador de iniciação científica.

Aos animais que concederam suas vidas para a realização dos ensaios biológicos e a todas as demais pessoas que tornaram a realização deste trabalho possível.

Apoios financeiros: Conselho Nacional de Tecnologia e Pesquisa (CNPq) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO	09
2.1. Myrtaceae	11
2.2. Úlceras Pépticas	27
2.3. Câncer	31
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Materiais e Equipamentos Empregados	43
4.1.1. Instrumentos	43
4.1.2. Solventes, Ácidos e Bases	44
4.1.3. Sais, Reagentes e Padrões	45
4.1.4. Cultura Celular e Bacteriana	46
4.1.5. Colunas e Placas Cromatográficas	47
4.2. Animais	48
4.3. Coleta e Identificação da Espécie Vegetal	48
4.4. Material Botânico	49
4.5. Extrato Etanol/Água (70%) Liofilizado (EEAL)	49
4.6. Partição do EEAL	50
4.7. Análise Fitoquímica da Fração de Hexano (FH)	50
4.7.1. Cromatografia em Coluna de FH	50
4.7.2. Cromatografia em Coluna de FH2, FH3 e FH4	51

	Páginas
4.7.3. Análise Espectrométrica de FH2-42, FH2-48, FH3-18, FH3-20, FH4-13 e FH4-16	52
4.7.4. Análise de FH2-42 por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	53
4.8. Análise Fitoquímica da Fração de Acetato de Etila	53
4.8.1. Cromatografia em Coluna de FA	53
4.8.2. Análise Espectrométrica de FA-57, FA-66, FA-80, FA-90 e FA-147	54
4.9. Doseamentos nas Frações Polares (FA e FM)	56
4.9.1. Fenóis Totais	56
4.9.1.1. Preparo do Reagente de Folin-Ciocalteu	56
4.9.1.2. Preparo da Solução de Carbonato de Sódio	57
4.9.1.3. Curva Padrão de Ácido Gálico	57
4.9.1.4. Doseamento	58
4.9.1.5. Cálculo	58
4.9.2. Taninos	59
4.9.2.1. Preparo da Solução de BSA	59
4.9.2.2. Preparo da Solução de SDS	59
4.9.2.3. Preparo do Reagente Cloreto Férrico	60
4.9.2.4. Curva Padrão de Ácido Tânico	60
4.9.2.5. Doseamento	61
4.9.2.6. Cálculo	61
4.9.3. Flavonóides	62

	Páginas
4.9.3.1. Preparo da Solução de Metenamina	62
4.9.3.2. Preparo da Solução de Cloreto de Alumínio	62
4.9.3.3. Preparo da Solução Metanólica de Ácido Acético	63
4.9.3.4. Determinação de Água	63
4.9.3.5. Doseamento	64
4.9.3.6. Cálculo	65
4.10. Atividade Antioxidante	65
4.10.1. Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> - Ensaio com DPPH	65
4.10.1.1. Preparo da Solução 0,3 mM de DPPH	66
4.10.1.2. Preparo das Amostras	66
4.10.1.3. Ensaio	67
4.10.1.4. Cálculo	67
4.10.2. Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> - Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio (ORAC)	68
4.10.2.1. Preparo da Solução Tampão Fosfato 75 mM (pH 7,0)	68
4.10.2.2. Preparo da Solução de Fluoresceína Sódica 40 nM	69
4.10.2.3. Preparo da Solução de AAPH 153 mM	69
4.10.2.4. Preparo das Soluções de Padrão Trolox	69
4.10.2.5. Preparo das Amostras	70

	Páginas
4.10.2.6. Ensaio	70
4.10.2.7. Cálculo	71
4.11. Atividade Antiúlcera Aguda	72
4.11.1. Avaliação Dose/Resposta do EEAL	72
4.11.1.1. Preparo das Amostras	72
4.11.1.2. Ensaio	73
4.11.2. Avaliação das Frações e do Ácido ursólico	73
4.11.2.1. Preparo das Amostras	74
4.11.2.2. Ensaio	74
4.11.3. Cálculo	75
4.11.4. Análise Estatística	75
4.12. Citotoxicidade	76
4.12.1. Citotoxicidade de Células CHO	76
4.12.1.1. Preparo do Corante	76
4.12.1.2. Preparo das Amostras	77
4.12.1.3. Cultura das Células	77
4.12.1.4. Ensaio	78
4.12.1.5. Cálculo	79
4.12.1.6. Análise Estatística	79
4.12.2. Citotoxicidade de Células Tumorais	80
4.12.2.1. Preparo do Meio de Cultura	80
4.12.2.2. Preparo do Corante	80
4.12.2.3. Preparo das Amostras	81

	Páginas
4.12.2.4. Cultura das Células	81
4.12.2.5. Ensaio	82
4.12.2.6. Análise dos Resultados	83
4.13. Mutagenicidade – Teste de Ames	85
4.13.1. Preparo dos Meios de Cultura	85
4.13.2. Preparo da Fração S9	86
4.13.3. Preparo das Amostras	87
4.13.4. Preparo dos Inóculos	87
4.13.5. Ensaio	88
4.13.6. Análise dos Resultados	89
5. RESULTADOS	91
5.1. Análise Fitoquímica da Fração de Hexano	93
5.1.1. Análise Espectrométrica de FH2-42, FH2-48, FH3-18, FH3-20, FH4-13 e FH4-16	93
5.2. Análise Fitoquímica da Fração de Acetato de Etila	104
5.2.1. Análise Espectrométrica de FA-57, FA-66, FA-80, FA-90 e FA-147	104
5.3. Doseamentos de Fenóis Totais, Taninos e Flavonóides nas Frações Polares (FA e FM)	114
5.4. Atividade Antioxidante	116
5.4.1. Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> - Ensaio com DPPH	116
5.4.2. Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> - Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio (ORAC)	118

	Páginas
5.5. Atividade Antiúlcera Aguda	120
5.5.1. Avaliação Dose/Resposta do EEAL	120
5.5.2. Avaliação das Frações e do Ácido ursólico	122
5.6. Citotoxicidade	124
5.6.1. Citotoxicidade de Células CHO	124
5.6.2. Citotoxicidade de Células Tumorais	126
5.7. Mutagenicidade – Teste de Ames	134
6. DISCUSSÃO	137
7. CONCLUSÕES	169
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
ANEXOS	197
ANEXO I. Normas Específicas da CPG da FCF-USP	197
ANEXO II. Ficha do Aluno Emitida pelo FenixWeb	201
ANEXO III. Currículo Lattes	203
ANEXO IV. Aval do Comitê de Ética em Pesquisa	205

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Domínio da Mata Atlântica conforme Decreto 750/93	04
Figura 2. Venda mundial de fitoterápicos em 2001	05
Figura 3. <i>Plinia edulis</i>	07
Figura 4. Cunzeagina A	23
Figura 5. Friedelina	27
Figura 6. Ácido 3 β -hidróxi-19 α -metil-urs-20-eno-28-óico	27
Figura 7. Esquema da secreção de ácido clorídrico	29
Figura 8. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes	32
Figura 9. Fluxograma do isolamento de substâncias	55
Figura 10. Estruturas da β -amirina, do ácido oleanólico, do ácido maslínico, do ácido ursólico e do ácido corosólico identificados na fração hexano	94
Figura 11. Estruturas do lupeol e do β -sitosterol identificados na fração hexano	94
Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C da fração FH2-42	95
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C da fração FH2-48	95
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C da fração FH3-18	96
Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da fração FH3-20	96
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C da fração FH4-13	97
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C da fração FH4-16	97
Figura 18. Cromatograma à gás da fração FH2-42	102
Figura 19. Espectro de massas do pico 1 do cromatograma à gás da fração FH2-42	102

	Páginas
Figura 20. Espectro de massas do pico 2 do cromatograma à gás da fração FH2-42	103
Figura 21. Proposta de fragmentação do pico 1 do cromatograma à gás da fração FH2-42	103
Figura 22. Proposta de fragmentação do pico 2 do cromatograma à gás da fração FH2-42	104
Figura 23. Estruturas do galato de etila, do ácido gálico, da quercitrina, da miricitrina e da quercetina identificados na fração de acetato de etila	105
Figura 24. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-57	106
Figura 25. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-66	107
Figura 26. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-80	108
Figura 27. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-90	109
Figura 28. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-147	110
Figura 29. Gráfico do padrão de ácido gálico utilizado no doseamento de fenóis totais	115
Figura 30. Gráfico do padrão de ácido tânico utilizado no doseamento de taninos	115
Figura 31. Gráfico da atividade antioxidante da rutina, do extrato etanol/água (70%) liofilizado de <i>Plinia edulis</i> e das frações de acetato de etila e de metanol no ensaio com o DPPH	117
Figura 32. Gráfico das curvas do decaimento da fluorescência na presença de diferentes concentrações do padrão de Trolox no ensaio ORAC	119
Figura 33. Gráfico das curvas do decaimento da fluorescência na presença de diferentes concentrações do extrato etanol/água (70%) liofilizado no ensaio ORAC	119
Figura 34. Gráfico do padrão de Trolox utilizado na avaliação da atividade antioxidante no ensaio ORAC	120
Figura 35. Avaliação dose/resposta da Área Total de Lesão	121

	Páginas
Figura 36. Avaliação dose/resposta da Área Relativa de Lesão	122
Figura 37. Avaliação da Área Total de Lesão das frações e do ácido ursólico	123
Figura 38. Avaliação da Área Relativa de Lesão das frações e do ácido ursólico	123
Figura 39. Citotoxicidade da solução aquosa de DMSO, do extrato etanol/água (70%) liofilizado e das frações de acetato de etila e de metanol no ensaio com cultura de células CHO	125
Figura 40. Citotoxicidade do extrato etanol/água (70%) liofilizado no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas	126
Figura 41. Citotoxicidade da fração de hexano no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas	127
Figura 42. Citotoxicidade da fração de diclorometano no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas	128
Figura 43. Citotoxicidade da fração de acetato de etila no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas	128
Figura 44. Citotoxicidade da fração de metanol no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas	129
Figura 45. Citotoxicidade da doxorubicina no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas	130
Figura 46. Estruturas do ácido glicirrético e da carbenoxolona	142
Figura 47. Estrutura da deloxolona	148
Figura 48. Estrutura do astragalosídeo IV	149
Figura 49. Esquema da reação do DPPH via transferência de um átomo de hidrogênio	152
Figura 50. Esquema da reação do DPPH via transferência de elétrons	153
Figura 51. Princípio do ensaio para avaliação da capacidade de absorção do radical de oxigênio	154
Figura 52. 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-dicloridrato (APPH)	154

	Páginas
Figura 53. Fluoresceína sódica	154
Figura 54. Núcleo fundamental de flavonóides e sua numeração	157
Figura 55. Esquemas das reações possíveis de flavonas e flavonóis com cloreto de alumínio	159

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 - Flavonóis identificados em Myrtaceae	15
Tabela 2 - Flavonas identificadas em Myrtaceae	18
Tabela 3 - Flavanonas identificadas em Myrtaceae	19
Tabela 4 - Diidroflavonóis identificados em Myrtaceae	20
Tabela 5 - Chalconas identificadas em Myrtaceae	21
Tabela 6 - Diidrochalconas identificadas em Myrtaceae	21
Tabela 7 - Antocianinas identificadas em Myrtaceae	22
Tabela 8 - Catequinas identificadas em Myrtaceae	22
Tabela 9 - Isoflavonas identificadas em Myrtaceae	23
Tabela 10 - Triterpenos com esqueleto lupano e norlupano identificados em Myrtaceae	24
Tabela 11 - Triterpenos com esqueleto oleanano identificados em Myrtaceae	25
Tabela 12 - Triterpenos com esqueleto ursano identificados em Myrtaceae	26
Tabela 13 - Triterpenos com esqueleto ursadieno identificados em Myrtaceae	26
Tabela 14 - Dados do espectro de RMN de ^{13}C da fração FH2-42	98
Tabela 15 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C das frações FH2-48 e FH3-18	99
Tabela 16 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C das frações FH3-20 e FH4-13	100
Tabela 17 - Dados do espectro de RMN de ^{13}C da fração FH4-16	101

	Páginas
Tabela 18 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-57	111
Tabela 19 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-66	111
Tabela 20 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-80	112
Tabela 21 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-90	113
Tabela 22 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração FAP-147	114
Tabela 23 - Teores de fenóis totais, flavonóides e taninos nas frações de acetato de etila e de metanol	116
Tabela 24 – Concentração da rutina, do EEAL e das frações de acetato de etila e de metanol com capacidade antioxidante de 50 % (CE_{50}) no ensaio com DPPH	117
Tabela 25 – Concentração do EEAL e das frações de acetato de etila e de metanol com citotoxicidade de 50% em relação ao controle (DL_{50}) no ensaio com cultura de células CHO	125
Tabela 26 – Avaliação da citotoxicidade do EEAL e da fração de hexano em linhagens neoplásicas humanas	131
Tabela 27 – Avaliação da citotoxicidade das frações de diclorometano e de acetato de etila em linhagens neoplásicas humanas	132
Tabela 28 – Avaliação da citotoxicidade da fração de metanol e da doxorubicina em linhagens neoplásicas humanas	133
Tabela 29. Avaliação da atividade mutagênica no ensaio de Ames com as linhagens TA97a e TA98 de <i>Salmonella typhimurium</i>	134
Tabela 30. Avaliação da atividade mutagênica no ensaio de Ames com as linhagens TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i>	135

RESUMO

ISHIKAWA, T. **Estudo fitoquímico e biológico do cambucá - *Plinia edulis* (Vell.) Sobral – Myrtaceae**. 2008. 203 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Plinia edulis (Myrtaceae), espécie arbórea popularmente conhecida como cambucá, é nativa da Mata Atlântica brasileira. Apesar do emprego na medicina tradicional em diversas moléstias, incluindo distúrbios gástricos, não existem estudos relacionando as atividades biológicas e os constituintes químicos da espécie. Esta tese relata a avaliação da gastroproteção, da atividade antioxidante, da citotoxicidade e da mutagenicidade do extrato etanol/água de folhas de *P. edulis* e das frações. Com o objetivo de correlacionar os metabólitos secundários com a eficácia da droga vegetal na medicina tradicional, o extrato foi submetido à partição e posterior fracionamento cromatográfico. O extrato apresentou atividade gastroprotetora significativa em modelo de indução de úlceras por etanol acidificado em ratos em doses de 100, 200 e 400 mg/kg via oral, sendo mais ativo que o fármaco de referência lansoprazol. Entre as frações, a hexânica (100 mg/kg p.o.) foi a mais eficaz, mas apresentou menor atividade do que o extrato bruto. A gastroproteção do ácido ursólico também foi avaliada, mas embora outros triterpenos sejam conhecidos como gastroprotetores, o ácido ursólico (50 mg/kg p.o.) reduziu a área lesionada, mas não apresentou atividade significativa no modelo empregado. O extrato não evidenciou mutagenicidade na concentração de 20 mg/placa no Ensaio de Ames e apresentou atividade antioxidante pronunciada, com CE₅₀ de 5,75 µg/mL no ensaio com DPPH e valor de ORAC de 3.948 µmol de Trolox/g de extrato. O extrato e as frações foram avaliados quanto à citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas de UACC62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI 460 (pulmão), OVCAR03 (ovário), PC-03 (próstata), HT-29 (cólon), 786-0 (rins), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos) e linhagem de células normais de ovário de hamster chinês (CHO) *in vitro*. O extrato e as frações apresentaram citotoxicidade seletiva dose-dependente em células cancerígenas e atividade proliferativa em células normais. A partir das frações de hexano e acetato de etila foram identificados β-amirina, lupeol, β-sitosterol, ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido maslínico, ácido corosólico, galato

de etila, ácido gálico, quercitrina, miricitrina e quercetina por meio de análises espectrométricas. Estes resultados dão suporte à utilização popular desta espécie e estão provavelmente associados à presença dos flavonóides e triterpenos identificados no extrato.

Palavras-chave: *Plinia edulis*. antiúlcera. citotoxicidade. triterpenos. flavonóides.

ABSTRACT

ISHIKAWA, T. **Phytochemical and Biological Studies of “cambucá” - *Plinia edulis* (Vell.) Sobral – Myrtaceae**. 2008. 203 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Plinia edulis (Myrtaceae), an arboreous species popularly known as “cambucá”, is native in Brazilian Atlantic Rain Forest. Despite its traditional uses in many diseases, which include gastric disorders, no reports are available on the relationship between the biological activities of its extract and its chemical constituents. This thesis reports the evaluations of the the aqueous ethanol extract of leaves of *P. edulis* and its fractions on gastroprotective effect, antioxidant capacity, cytotoxicity and mutagenicity of. In order to correlate the secondary metabolites and the efficacy of the crude drug in traditional medicine, the extract was submitted to solvent partition followed by chromatographic fractionation. The extract exhibited significant gastroprotective effect on HCl/ethanol-induced ulcers in rats at doses of 100, 200 and 400 mg/kg p.o., even more active than the reference drug lansoprazole. Among the fractions, the hexane fraction (100 mg/kg p.o.) was the most effective, but showed lower activity than the crude extract. In addition, the gastroprotective effect of ursolic acid was evaluated. Although others triterpenes are well known as gastroprotective agents, ursolic acid (50 mg/kg p.o.) reduced the lesion area, but did not show significant activity on this model. The extract did not show mutagenicity at the concentration of 20 mg/plate in the Ames test and exhibited high antioxidant activity, with EC₅₀ of 5.75 µg/mL on the DPPH assay and ORAC value of 3948 µmol Trolox/g of extract. The extract and its fractions were evaluated for cytotoxic activity against human tumour cell lines as UACC62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI 460 (lung, non-small cells), OVCAR03 (ovarian), PC-03 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal), NCI-ADR (breast expressing phenotype multiple drugs resistance) and CHO (Chinese Hamster Ovary) normal cell line *in vitro*. The extract and its fractions showed selectively dose-dependent cytotoxicity against cancer cells and proliferative activity in normal cells. The hexane and ethyl acetate fractions yielded β-amyrin, lupeol, β-sitosterol, oleanolic acid, ursolic acid, maslinic acid, corosolic acid, ethyl gallate, gallic acid, quercitrin, myricitrin and quercetin, which were identified based on

spectrometric analyses. These results provide scientific support to the traditional use of this species, which are probably associated with the flavonoids and triterpenoids identified in the extract.

Keywords: *Plinia edulis*. antiulcer. cytotoxicity. triterpenoids. flavonoids.

Introdução

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, mesmo em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.

Martin Luther King

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na cura de enfermidades é provavelmente tão antiga quanto à própria humanidade (LIPP, 2002). Até o início do século XX, aproximadamente 80% dos medicamentos eram de origem vegetal e até os dias de hoje a flora apresenta-se potencialmente importante como fonte para a obtenção de substâncias biologicamente ativas e de moléculas protótipo para a síntese de um grande número de fármacos (MC CHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

A recente implementação da fitoterapia no sistema de saúde do país destaca a importância desta ferramenta na complementação dos tratamentos existentes, tendo em vista a grande disposição da população brasileira em utilizar produtos medicinais de origem vegetal (DI STASI, 2007).

No entanto, o insuficiente investimento financeiro em ciência e tecnologia e uma legislação que, ao invés de favorecer estudos na área, ajuda a inibir a atividade de pesquisadores, contribuem para o volume reduzido de pesquisas envolvendo plantas medicinais da flora nacional (PIVETTA, 2006; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Considerando-se o Brasil como representante de uma das maiores diversidades vegetais do mundo, com elevado número de espécies endêmicas (TONHASCA Jr., 2005), é um contra-senso a estimativa de que apenas 10% das espécies brasileiras empregadas na medicina tradicional foram estudadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A perda crescente de informações sobre espécies nativas, causada pela progressiva destruição, tanto dos vegetais como da própria cultura tradicional,

agrava ainda mais a escassez de estudos na área de plantas medicinais (ALMEIDA, 2003).

Restam hoje menos de 10% de remanescentes da Mata Atlântica brasileira e este número continua a diminuir (Figuras 1 e 2) (WUETHRICH, 2007). Os índices alarmantes de desmatamento, a megadiversidade e a alta taxa de endemismo tornaram este conjunto de ecossistemas uma prioridade de conservação mundial (MYERS et al., 2000).

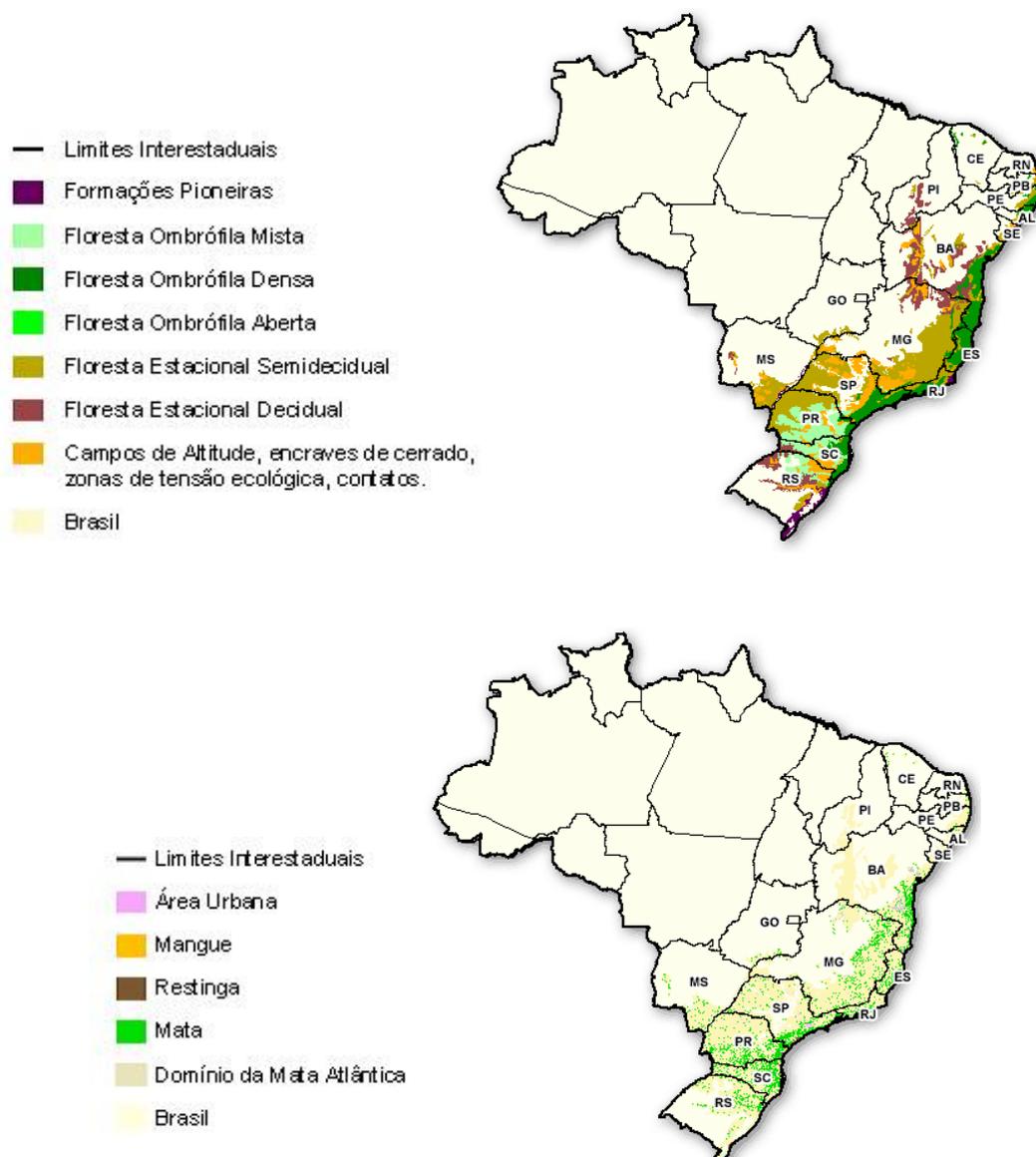


Figura 1. Domínio da Mata Atlântica conforme Decreto 750/93: área original e situação atual. Imagem: SOS Mata Atlântica (2008).

Do ponto de vista econômico, o mercado de fitoterápicos mundial em 2001 movimentou cerca de 19,6 bilhões de dólares, dos quais aproximadamente 12% (2,3 bilhões de dólares) foram arrecadados somente pelo Japão e apenas 3% foram obtidos por todos os países da América do Sul (figura 3) (FUNARI; FERRO, 2005).

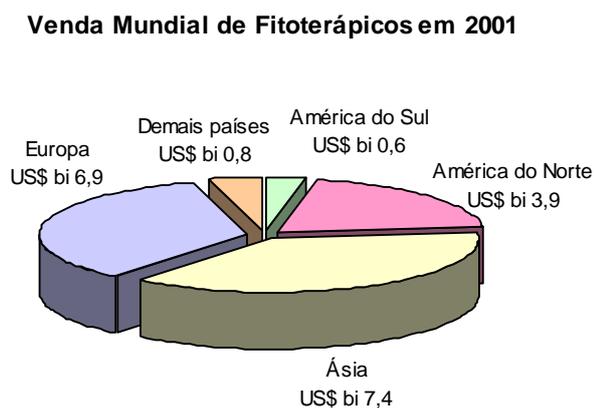


Figura 2. Venda mundial de fitoterápicos em 2001. Valores expressos em bilhões de dólares (adaptado de Funari e Ferro, 2005).

A ausência de políticas públicas para produção de medicamentos fitoterápicos e a quase inexistência de instrumentos para a interação entre universidades e indústrias farmacêuticas nacionais podem ser explicações possíveis para a deficiência na obtenção de divisas com a venda destes produtos no Brasil (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A espécie selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, *Plinia edulis*, é nativa e endêmica da mata atlântica brasileira, com ocorrência do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (LORENZI et al., 2006). É considerada vulnerável à extinção (INSTITUTO DE BOTÂNICA, 2008) e conhecida popularmente como cambucá, cambucá verdadeiro e cambucazeiro (LORENZI, 1992; CORRÊA, 1926).

A palavra cambucá é de origem tupi-guarani (DICIONÁRIO BRASILEIRO, 1976; BUENO, 1968). Sua etimologia representa a união de ka'a (árvore, erva, mata) e puka (abrir-se), fazendo referência aos frutos que se partem quando maduros (BUENO, 1968; BOUDIN, 1966).

Eugenia edulis Vellozo (INDEX KEWENSIS, 1995; LORENZI, 1992; SOBRAL, 1985), *Marlierea edulis* Niedenzu (SOBRAL, 1985), *Myrciaria edulis* (Vellozo) Skeels (SOBRAL, 1985), *Myrciaria plicato-costata* Berg. (LORENZI, 1992) e *Rubachia glomerata* Berg. (SOBRAL, 1985) constam como sinônimos científicos.

P. edulis apresenta de 5 a 10 metros de altura, tronco curto, copa densa e piramidal, sendo conveniente para o paisagismo, embora seu crescimento seja lento (figura 4). Pode ainda ser empregada em reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas (LORENZI et al., 2006; LORENZI, 1992).

Os frutos de cambucá, fixados nos caules e ramos, são muito saborosos para consumo *in natura*, sendo apreciados por várias espécies de pássaros (figura 4) (LORENZI, 1992). São considerados benéficos à saúde, sendo empregados na medicina popular como tônicos, antitérmicos, antigripais, diuréticos e hipoglicemiantes (CRAVO, 2003; DONATO, 2003; GONSALVES, 2002; CRUZ, 1979).

As cascas dos frutos são utilizadas no preparo de xaropes para tosses e coqueluches pela população nativa da Ilha Grande (RJ) (MACIEL; CARDOSO, 2003). As folhas da espécie também são usadas, sob forma de infusos, no tratamento de afecções da garganta por populações caiçaras dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

P. edulis também é utilizada no tratamento de distúrbios gástricos e diarreia (CRAVO, 2003; NASCENTE, 2008; GONSALVES, 2002) e apresentou resultados promissores em estudos anteriores envolvendo o extrato liofilizado de folhas, especialmente no que se refere às atividades antiúlcera e antioxidante (ISHIKAWA, 2004; ISHIKAWA; KATO; BACCHI, 2003).

O extrato etanol/água (70%) apresentou atividade gastroprotetora extremamente significativa em relação ao controle, em modelo de indução por etanol acidificado (ISHIKAWA; KATO; BACCHI, 2003). Além disso, não foram observados efeitos tóxicos por via oral em camundongos em uma dose de até 5g/kg do extrato (ISHIKAWA et al., 2008).

Do ponto de vista fitoquímico, a espécie foi muito pouco estudada. Na literatura e bancos de dados consultados foram encontrados relatos apenas sobre a composição do óleo volátil de *P. edulis*, caracterizado majoritariamente por sesquiterpenos (APEL et al., 2006), e sobre a presença de pectinas nos frutos (BELESKI-CARNEIRO et al., 2000).



Figura 3. *Plinia edulis*: hábito e ramo frutificado.

Revisão

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

2. Revisão

2.1. Myrtaceae

Os insetos são os principais componentes da diversidade do planeta, apresentando entre 5 e 10 milhões de espécies (TONHASCA Jr., 2005).

Nas florestas tropicais, ao contrário do que ocorre em florestas temperadas, onde o vento é o principal agente de polinização, mais de 90% de plantas que produzem flores são polinizadas por animais, sobretudo insetos, tendo em vista que a exuberante vegetação nos trópicos representa um importante obstáculo para a transferência de pólen (TONHASCA Jr., 2005).

Enquanto atuam positivamente para a multiplicação da flora na Mata Atlântica, agindo como polinizadores, os insetos são também os principais herbívoros das florestas tropicais, consumindo de 8 a 12% de toda matéria verde (TONHASCA Jr., 2005).

O impacto predatório exercido pelos insetos herbívoros, maior nas florestas tropicais do que nas temperadas, pode ter contribuído no desenvolvimento do metabolismo secundário da flora da Mata Atlântica (TONHASCA Jr., 2005).

Metabólitos secundários vegetais fornecem produtos que, embora não sejam necessariamente essenciais, garantem vantagens adaptativas para a planta (SANTOS, 2007).

Aos triterpenos, por exemplo, são atribuídas propriedades de proteção contra herbivoria (SIMÕES; SPITZER, 2007; PUNGITORE et al., 2005; THOISON et

al., 2004) e adaptação ao estresse salino (OKU et al., 2003). Existem evidências de que alguns insetos seqüestram triterpenos das plantas para defenderem-se de seus predadores (PLASMAN et al., 2001).

Os flavonóides, além de protegerem os vegetais de herbívoros e microrganismos, promovem atração de polinizadores, atuam como agentes alelopáticos e protegem contra raios ultravioleta e visível (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

A riqueza dos metabólitos secundários, segundo Harborne (1988), ocorre pelo simples fato de que as plantas geralmente não se deslocam em relação ao substrato em que se encontram e, portanto, não respondem ao ambiente pelas vias possíveis aos animais. Isto torna a diversidade molecular de produtos naturais muito superior à de produtos derivados de síntese (MC CHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; GUERRA; NODARI, 2007).

Apenas considerando os terpenos, são conhecidas, até os dias atuais, aproximadamente 30.000 substâncias, entre as quais se destacam os esqueletos triterpênicos com mais de 4.000 estruturas já identificadas (DZUBAK et al., 2006).

Os flavonóides também representam uma das classes de produtos naturais mais importantes e diversificadas, com mais de 4.200 estruturas diferentes conhecidas, número que continua a crescer (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Por serem fatores de interação entre organismos, flavonóides e triterpenos, freqüentemente encontrados em Myrtaceae (ITO et al., 2004), apresentam geralmente atividades farmacológicas importantes, despertando o interesse como fonte promissora para obtenção de moléculas úteis ao homem (GUERRA; NODARI, 2007; SANTOS, 2007).

Os flavonóides parecem reduzir a incidência de diversas patologias, tais como câncer, aterosclerose, osteoporose e mal de Alzheimer (USTUN et al., 2006).

Aos triterpenos são atribuídas propriedades antiinflamatórias, gastro e hepatoprotetoras, analgésicas, antimicrobianas, hipocolesterolêmicas, antivirais e antitumorais, entre outras (DZUBAK et al., 2006; SUDHAHAR; KUMAR; VARALAKSHMI, 2006; TOLSTIKOVA et al., 2006; CHENG et al., 2005; URECH et al., 2005).

Myrtaceae compreende em torno de 100 gêneros e 3.500 espécies distribuídas principalmente na América tropical e Austrália (APG II, 2003; JOLY, 1985; BARROSO, 1984). Na Mata Atlântica da Ilha do Cardoso, em Cananéia (SP), Melo (1993) observou predominância de espécies da família. Fato semelhante foi relatado por Mantovani (1993) na Juréia (SP).

Embora ainda seja predominante, com a destruição da composição florística original, diversas mirtáceas estão ameaçadas e um levantamento, apenas da flora paulista, apontou 55 espécies da família vulneráveis à extinção (INSTITUTO DE BOTÂNICA, 2008).

Entre os gêneros com ocorrência na floresta pluvial atlântica, destaca-se *Plinia*, representado por cerca de 20 espécies com distribuição na América Central, do Caribe ao Brasil (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Apesar dos inúmeros relatos de utilização popular, a literatura sobre composição química ou atividades farmacológicas de espécies de *Plinia* é escassa. Theoduloz et al. (1988), estudando *P. rivularis* e *P. trunciflora*, verificaram que os extratos polares destas plantas, constituídos de misturas complexas de flavonóides, apresentaram atividade inibitória sobre a enzima xantina oxidase.

Serafin et al. (2007) observaram potente analgesia de extratos polares obtidos de *P. glomerata*, atribuindo esta atividade a derivados do ácido flavanelágico.

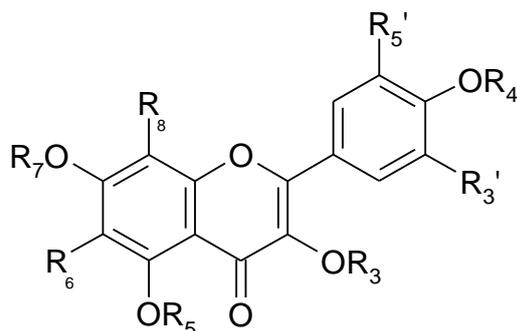
A partir de órgãos aéreos de *P. pinnata* foram isolados diversos polifenóis conhecidos, assim como duas substâncias inéditas: um diidroflavonol (3-O- α -ramnopiranosil-5,7,2',5'-tetraidróxi-flavananol) (Tabela 4) e um triterpeno (2 α ,3 β ,23,30-tetraidróxi-olean-12-eno) (Tabela 11) (MENDEZ et al., 1997; 1994).

Em Myrtaceae são mais comuns flavonóis do que flavonas (AMARAL et al., 2001). Flavonóides C-metilados com pouca ou nenhuma oxigenação do anel B parecem ser distintivos da família (MUSTAFA; PERRY; WEAVERS, 2005; WOLLENWEBER et al., 2000). A presença destes tipos de estruturas indica que as mirtáceas são quimicamente primitivas, apresentando baixo nível evolutivo (AMARAL et al., 2001; GOTTLIEB; BORIN, 1998).

Em relação aos triterpenos, os ácidos não glicosilados com esqueleto ursano, oleanano e lupano (FRIGHETTO et al., 2005) são mais comuns em Myrtaceae, embora saponinas triterpênicas já tenham sido descritas na família (GALLO et al., 2006; DJOUKENG et al., 2005; JUNGES et al., 1999).

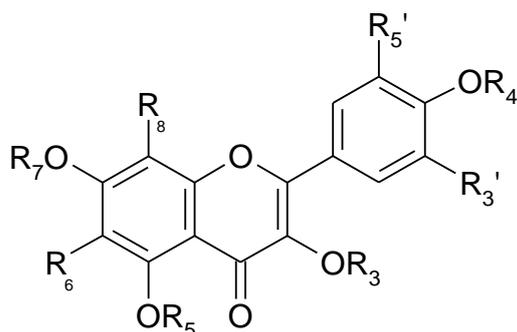
As tabelas e figuras a seguir consistem em um levantamento sobre os flavonóides e triterpenos encontrados em Myrtaceae.

Tabela 1 - Flavonóis identificados em Myrtaceae (continua).



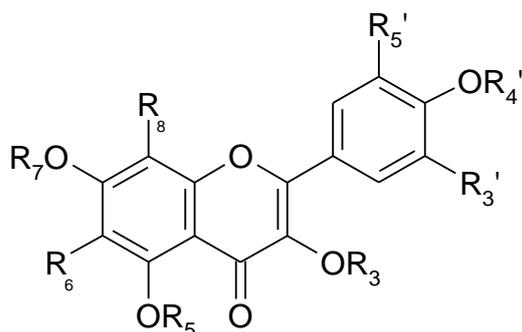
Nome	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Referência
<i>Agliconas</i>									
canferol	H	H	H	H	H	H	H	H	SHAN et al., 2005
quercetina	H	H	H	H	H	OH	H	H	AMARAL et al., 2001
miricetina	H	H	H	H	H	OH	H	OH	TIMBOLA et al., 2002
pinoquercetina	H	H	CH ₃	H	H	OH	H	H	ITO et al., 2004
7-metóxi-canferol	H	H	H	CH ₃	H	H	H	H	SON et al., 2006
3-metóxi-quercetina	CH ₃	H	H	H	H	OH	H	H	CAMPOS; WEBBY; MARKHAM, 2002
ramnetina	H	H	H	CH ₃	H	OH	H	H	LEE et al., 2006
ramnazina	H	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	LEE et al., 2006
8-desmetil-latifolina	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H	WOLLENWEBER et al., 2000
3,7,3'-trimetóxi-pinoquercetina	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	WOLLENWEBER et al., 2000
3,5-dimetóxi-gossipetina	CH ₃	CH ₃	H	H	OH	OH	H	H	HUSSEIN et al., 2003
3,5,3'-trimetóxi-miricetina	CH ₃	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	OH	HUSSEIN et al., 2003
<i>Monoglicosídeos</i>									
3-O- α -arabinosil-canferol	L-arabosila	H	H	H	H	H	H	H	HUSSEIN et al., 2003
3-O- β -galactosil-canferol	D-galactosila	H	H	H	H	H	H	H	MAHMOUD et al., 2002
3-O- β -glicosil-canferol	D-glicosila	H	H	H	H	H	H	H	RUBILAR et al., 2006
quercitrina	L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	H	GALLO et al., 2006
3-O- β -glicosil-quercetina	D-glicosila	H	H	H	H	OH	H	H	PARK et al., 2004
3-O- β -galactosil-quercetina	D-galactosila	H	H	H	H	OH	H	H	JOSEPH; PICHON-PRUM; RAYNAUD, 1989

Tabela 1 - Flavonóis identificados em Myrtaceae (continuação).



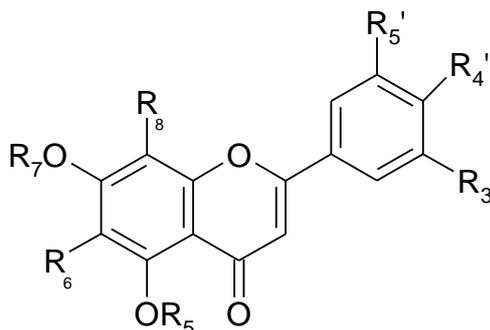
Nome	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Referência
<i>Monoglicosídeos</i>									
guajaverina	L-arabinosila	H	H	H	H	OH	H	H	YOSHIKAWA et al., 1998
reinoutrina	D-xilosila	H	H	H	H	OH	H	H	RUBILAR et al., 2006
3-O-β-(6"-galoil-glicosil)-quercetina	(2"-O-galoil)-D-glicosila	H	H	H	H	OH	H	H	MAHMOUD et al., 2002
3-O-β-(6"-galoil-galactosil)-quercetina	(2"-O-galoil)-D-galactosila	H	H	H	H	OH	H	H	PICHON-PRUM et al., 1989
3-O-α-arabinosil-5-galoil-quercetina	L-arabinosila	galoil	H	H	H	OH	H	H	TORRES-MENDOZA et al., 2006
miricitrina	L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	OH	YOSHIKAWA et al., 1998
3-O-α-arabinosil-miricitrina	L-arabinosila	H	H	H	H	OH	H	OH	SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1996
3-O-β-galactosil-miricitrina	D-galactosila	H	H	H	H	OH	H	OH	ITO et al., 2004
3-O-β-glicosil-miricitrina	D-glicosila	H	H	H	H	OH	H	OH	PARK et al., 2004
3-O-β-xilosil-miricitrina	D-xilosila	H	H	H	H	OH	H	OH	RUBILAR et al., 2006
desmantina-1	(2"-O-galoil)-L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	OH	YOSHIKAWA et al., 1998
3-O-β-(6"-galoil-galactosil)-miricitrina	(2"-O-galoil)-D-galactosila	H	H	H	H	OH	H	OH	PICHON; JOSEPH; RAYNAUD, 1993
3-O-(4"-acetil)-α-ramnosil-miricitrina	(4"-acetil)-L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	OH	TIMBOLA et al., 2002
3-O-α-3"acetil-arabinosil-miricitrina	(3"-acetil)-L-arabinosila	H	H	H	H	OH	H	OH	TORRES-MENDOZA et al., 2006
3-O-α-3",5"-diacetil-arabinosil-miricitrina	(3",5"-diacetil)-L-arabinosila	H	H	H	H	OH	H	OH	TORRES-MENDOZA et al., 2006

Tabela 1 - Flavonóis identificados em Myrtaceae (conclusão).



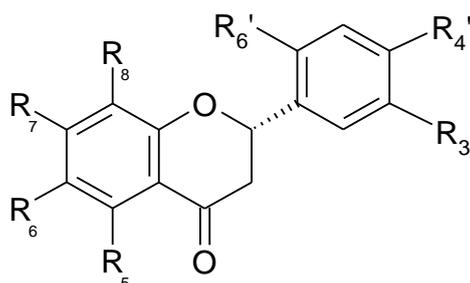
Nome	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	Referência
<i>Monoglicosídeos</i>									
3-O-β-glicosil-isoramnetina	D-glicosila	H	H	H	H	CH ₃	H	H	SON et al., 2006
mearnsitrina	L-ramnosila	H	H	H	H	OH	CH ₃	OH	YOSHIKAWA et al., 1998
5-O-β-glicosil-3,8-dimetóxi-gossipetina-	CH ₃	D-glicosila	H	H	OCH ₃	OH	H	H	HUSSEIN et al., 2003
<i>Diglicosídeos</i>									
rutina	D-glicosil-L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	H	PARK et al., 2004
dirramnosil-quercetina	L-ramnosila	H	H	L-ramnosila	H	OH	H	H	RUBILAR et al., 2006
3-O-rutinosil-miricetina	D-glicosil-L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	OH	VAISHNAV; SAHU, 2006
3-O-rutinosil-isoramnetina	D-glicosil-L-ramnosila	H	H	H	H	CH ₃	H	H	VAISHNAV; SAHU, 2006
3-O-robinosil-miricetina	D-galactosil-L-ramnosila	H	H	H	H	OH	H	OH	VAISHNAV; SAHU, 2006
dirramnosil-miricetina	L-ramnosila	H	H	L-ramnosila	H	OH	H	OH	RUBILAR et al., 2006

Tabela 2 - Flavonas identificadas em Myrtaceae.



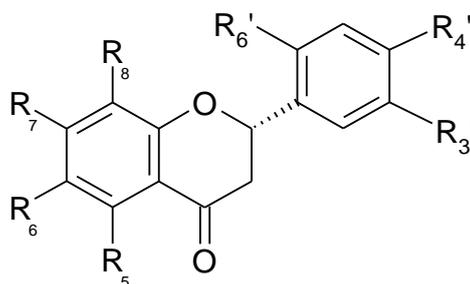
Nome	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Referência
<i>Agliconas</i>								
luteolina	H	H	H	H	OH	OH	H	CAMPOS; WEBBY; MARKHAM, 2002
tricetina	H	H	H	H	OH	OH	OH	CAMPOS; WEBBY; MARKHAM, 2002
6,8-dimetil-apigenina	H	CH ₃	H	CH ₃	H	OH	H	WOLLENWEBER et al., 2000
tectocrisina	H	H	CH ₃	H	H	H	H	AMARAL et al., 2001
6-metil-tectocrisina	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H	AMARAL et al., 2001
8-metil-tectocrisina	H	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H	AMARAL et al., 2001
5,7-dimetóxi-flavona	CH ₃	H	CH ₃	H	H	H	H	HAEBERLEIN; TSCHIERSCHE; SCHAEFER, 1994
6-metil-5,7-dimetóxi-flavona	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H	HAEBERLEIN; TSCHIERSCHE; SCHAEFER, 1994
5-hidróxi-6,8-dimetil-7-metóxi-flavona	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	H	HAEBERLEIN; TSCHIERSCHE; SCHAEFER, 1994
eucaliptina	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	H	WOLLENWEBER et al., 2000
8-desmetil-eucaliptina	H	CH ₃	CH ₃	H	H	OCH ₃	H	WOLLENWEBER et al., 2000
8-desmetil-sideroxilina	H	CH ₃	CH ₃	H	H	OH	H	SARKER et al., 2001
sideroxilina	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	OH	H	WOLLENWEBER et al., 2000

Tabela 3 - Flavanonas identificadas em Myrtaceae (continua).



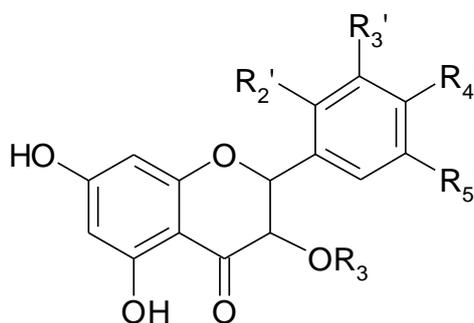
Nome	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	R _{6'}	Referência
<i>Agliconas</i>								
5,7-diidróxi-flavanona	OH	H	OH	H	H	H	H	HOANG; NGUYEN, 2006
naringenina	OH	H	OH	H	H	OH	H	LEE et al., 2006
eriodictiol	OH	H	OH	H	OH	OH	H	LEE et al., 2006
6,8-diidróxi-5-metil-flavanona	CH ₃	OH	H	OH	H	H	H	HOANG; NGUYEN, 2006
criptostrobina	OH	H	OH	CH ₃	H	H	H	CANNON; MARTÍN, 1977
desmetoxi-mateucinol	OH	CH ₃	OH	CH ₃	H	H	H	CANNON; MARTÍN, 1977
6-metóxi-flavanona	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	HOANG; NGUYEN, 2006
pinostrobina	OH	H	OCH ₃	H	H	H	H	CANNON; MARTÍN, 1977
5-hidróxi-6-metil-7-metóxi-flavanona	OH	CH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	HAEBERLEIN; TSCHIER SCH; SCHAEFER, 1994
5-hidróxi-6,8-dimetil-7-metóxi-flavanona	OH	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	H	HOANG; NGUYEN, 2006
7-hidróxi-6,8-dimetil-5-metóxi-flavanona	OCH ₃	CH ₃	OH	CH ₃	H	H	H	YE; LU; WEI, 2004
6-metil-7-metóxi-naringenina	OH	CH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H	WOLLENWEBER et al., 2000
8-metil-7-metóxi-naringenina	OH	H	OCH ₃	CH ₃	H	OH	H	WOLLENWEBER et al., 2000
6,8-dimetil-7-metóxi-naringenina	OH	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	OH	H	WOLLENWEBER et al., 2000
5,7-dimetóxi-flavanona	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	H	HOANG; NGUYEN, 2006
6-metil-5,7-dimetóxi-flavanona	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	HAEBERLEIN; TSCHIER SCH; SCHAEFER, 1994
8-formil-5,7-diidróxi-6-metil-flavanona	OH	CH ₃	OH	CHO	H	H	H	YE; LU; WEI, 2004
8-formil-5-hidróxi-6-metil-7-metóxi-flavanona	OH	CH ₃	OCH ₃	CHO	H	H	H	YE; LU; WEI, 2004

Tabela 3 - Flavanonas identificadas em Myrtaceae (conclusão).



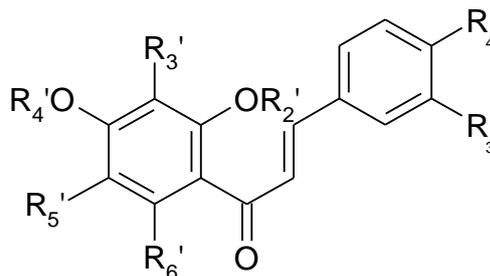
Nome	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	R _{6'}	Referência
<i>Monoglicosídeo</i>								
miriciatrina I	OH	CH ₃	O-D-glicosila	CH ₃	OH	H	OH	YOSHIKAWA et al., 1998
<i>Diglicosídeo</i>								
hesperetina	OH	H	O-D-glicosil-L-ramnosila	H	OH	OCH ₃	H	MARTÍN et al., 1999

Tabela 4 - Diidroflavonóis identificados em Myrtaceae.



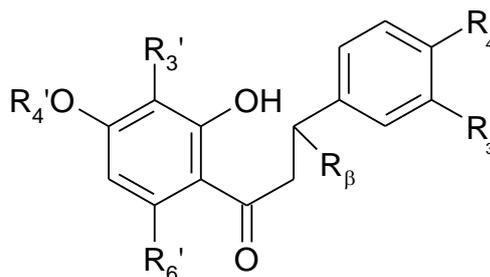
Nome	R ₃	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Referência
<i>Aglicona</i>						
taxifolina	H	H	OH	OH	H	LEE et al., 2006
<i>Monoglicosídeos</i>						
3-O- α -ramnosil-diidrocanferol	L-ramnosila	H	H	OH	H	LEE et al., 2006
3-O- α -ramnosil-5,7,2',5' tetraidróxi-flavanol	L-ramnosila	OH	H	H	OH	MENDEZ et al., 1994

Tabela 5 - Chalconas identificadas em Myrtaceae



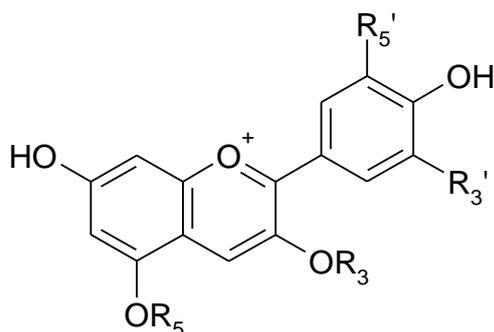
Nome	R ₃	R ₄	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆ '	Referência
<i>Agliconas</i>								
calitropsina	OH	OH	H	H	CH ₃	H	H	BEUTLER et al., 1993
2',4'-dihidróxi-3'-metil-6'-metóxi-chalcona	H	H	H	CH ₃	H	H	OCH ₃	MUSTAFA; PERRY; WEAVERS, 2005
2',6'-dihidróxi-3'-metil-4'-metóxi-chalcona	H	H	H	CH ₃	CH ₃	H	OH	MUSTAFA; PERRY; WEAVERS, 2005
2',4'-dihidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxi-chalcona	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	OCH ₃	YE; LU; WEI, 2004
2'-hidróxi-3'-metil-4',6'-dimetóxi-chalcona	H	H	H	CH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	AMOR et al., 2005
3'-formil-4',6'-dihidróxi-5'-metil-2'-metóxi-chalcona	H	H	CH ₃	CHO	H	CH ₃	OH	YE; LIU; WEI, 2007
<i>Diglicosídeo</i>								
metil-chalcona-hesperidina	OH	OCH ₃	CH ₃	H	D-glicosil-L-ramnosila	H	OH	MARTÍN et al., 1999

Tabela 6 - Dihidrochalconas identificadas em Myrtaceae.



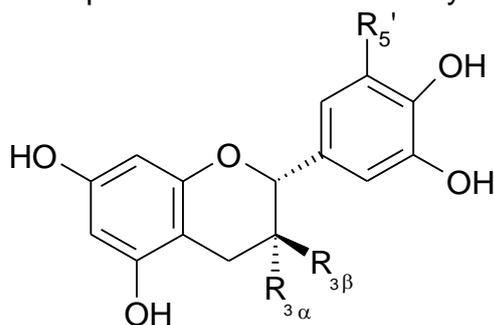
Nome	R ₃	R ₄	R _β	R ₃ '	R ₄ '	R ₆ '	Referência
dihidrocalitropsina	OH	OH	H	H	H	H	BEUTLER et al., 1993
β-hidróxi-chalcona	H	H	OH	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	MAYER, 1993

Tabela 7 - Antocianinas identificadas em Myrtaceae.



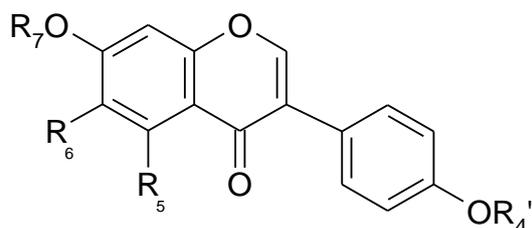
Nome	R ₃	R ₅	R _{3'}	R _{5'}	Referência
<i>Monoglicosídeos</i>					
3-glicosil-pelargonidina	D-glicosila	H	H	H	LOWRY, 1976
3- glicosil -cianidina	D-glicosila	H	OH	H	LOWRY, 1976
3- glicosil -delfinidina	D-glicosila	H	OH	OH	LOWRY, 1976
3- glicosil -peonidina	D-glicosila	H	OCH ₃	H	LOWRY, 1976
3- glicosil -malvidina	D-glicosila	H	OCH ₃	OCH ₃	LOWRY, 1976
<i>Diglicosídeos</i>					
3,5-diglicosil-pelargonidina	D-glicosila	D-glicosila	H	H	LOWRY, 1976
3,5-diglicosil-cianidina	D-glicosila	D-glicosila	OH	H	LOWRY, 1976
3,5-diglicosil-peonidina	D-glicosila	D-glicosila	OCH ₃	H	LOWRY, 1976
3,5-diglicosil-malvidina	D-glicosila	D-glicosila	OCH ₃	OCH ₃	LOWRY, 1976

Tabela 8 - Catequinas identificadas em Myrtaceae.



Nome	R _{3α}	R _{3β}	R _{5'}	Referência
epicatequina	OH	H	H	RUBILAR et al., 2006
galocatequina	H	OH	OH	BELLOSTA et al., 2003
3-O-galato-epigalocatequina	O-galoila	H	OH	HUSSEIN et al., 2003

Tabela 9 - Isoflavonas identificadas em Myrtaceae.



Nome	R ₅	R ₆	R ₇	R ₄ '	Referência
<i>Agliconas</i>					
daidzeína	H	H	H	H	LAPCÍK et al., 2005
genisteína	OH	H	H	H	LAPCÍK et al., 2005
formononetina	H	H	H	CH ₃	LAPCÍK et al., 2005
isoformononetina	H	H	CH ₃	H	LAPCÍK et al., 2005
biochanina A	OH	H	H	CH ₃	LAPCÍK et al., 2005
prunetina	OH	H	CH ₃	H	LAPCÍK et al., 2005
<i>Monoglicosídeos</i>					
daidzina	H	H	D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
genistina	OH	H	D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
ononina	H	H	D-glicosila	CH ₃	LAPCÍK et al., 2005
sissotrina	OH	H	D-glicosila	CH ₃	LAPCÍK et al., 2005
glicitina	H	OCH ₃	D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-malonato-daidzina	H	H	(2''-O-maloil)-D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-malonato-genistina	OH	H	(2''-O-maloil)-D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-malonato-glicitina	H	OCH ₃	(2''-O-maloil)-D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-acetato-daidzina	H	H	(2''-O-acetil)-D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-acetato-genistina	OH	H	(2''-O-acetil)-D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-acetato-ononina	H	H	(2''-O-acetil)-D-glicosila	CH ₃	LAPCÍK et al., 2005
6''-O-acetato-glicitina	H	OCH ₃	(2''-O-acetil)-D-glicosila	H	LAPCÍK et al., 2005

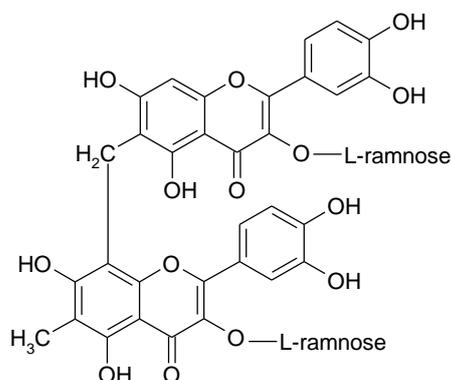
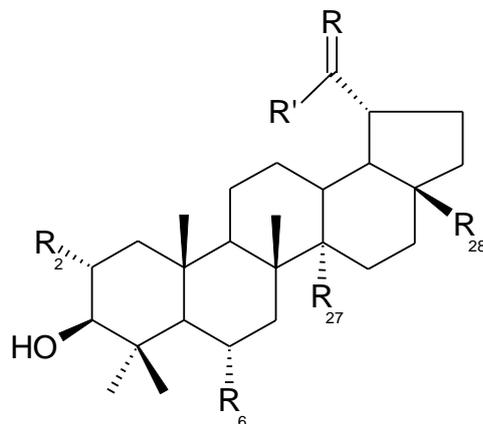


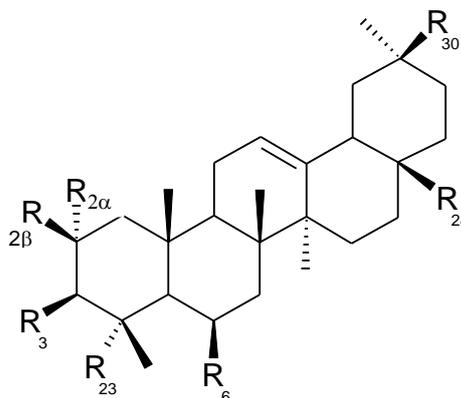
Figura 4. Cunzeagina A: Biflavonóide identificado em Myrtaceae (ITO et al., 2004).

Tabela 10 - Triterpenos com esqueleto lupano e norlupano identificados em Myrtaceae.



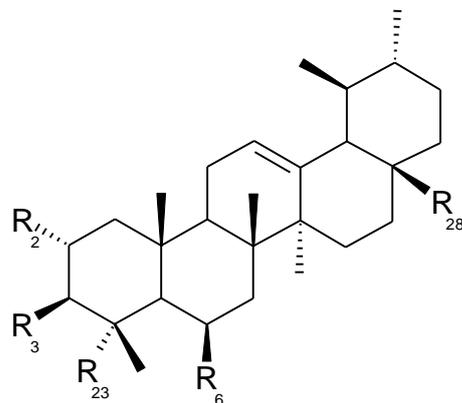
Nome	R ₂	R ₆	R ₂₇	R ₂₈	R	R'	Referência
<i>Triterpenos</i>							
lupeol	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₂	CH ₃	FERNÁNDEZ et al., 2001
ácido betulínico	H	H	CH ₃	COOH	CH ₂	CH ₃	SETZER et al., 2000
ácido 6 α -hidróxi-betulínico	H	OH	CH ₃	COOH	CH ₂	CH ₃	LUNARDI et al., 2001
ácido platânico	H	H	CH ₃	COOH	O	CH ₃	LUNARDI et al., 2001
ácido melalêucico	H	H	COOH	COOH	CH ₂	CH ₃	VIEIRA et al., 2004
betulina	H	H	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₂	CH ₃	VIEIRA et al., 2004
ácido afitólico	OH	H	CH ₃	COOH	CH ₂	CH ₃	AGUIRRE et al., 2006
<i>Monoglicosídeo</i>							
29-hidroxiplatan-28-ato de β -D-glicosila	H	H	CH ₃	COO-D-glicosila	O	CH ₂ OH	JUNGES et al., 1999

Tabela 11 - Triterpenos com esqueleto oleanano identificados em Myrtaceae.



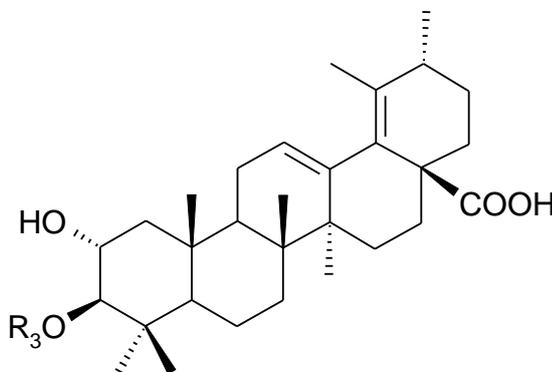
Nome	R _{2α}	R _{2β}	R ₃	R ₆	R ₂₃	R ₂₈	R ₃₀	Referência
<i>Triterpenos</i>								
β-amirina	H	H	OH	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	GALLO et al., 2006
acetato da β-amirina	H	H	OOCCH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	KUIATE et al., 2007
ácido oleanólico	H	H	OH	H	CH ₃	COOH	CH ₃	SON et al., 2006
ácido maslínico	OH	H	OH	H	CH ₃	COOH	CH ₃	SON et al., 2006
ácido arjunólico	OH	H	OH	H	CH ₂ OH	COOH	CH ₃	VIEIRA et al., 2004
ácido terminólico	OH	H	OH	OH	CH ₂ OH	COOH	CH ₃	DJOUKENG et al., 2005
acetato do ácido oleanólico	H	H	OOCCH ₃	H	CH ₃	COOH	CH ₃	SETZER et al., 2000
ácido-2α-hidroxi-oleanólico	OH	H	OH	H	CH ₃	COOH	CH ₃	DJOUKENG et al., 2005
oleanolato de metila	H	H	OH	H	CH ₃	COOCH ₃	CH ₃	WU; HUANG, 2006
2α,3β,23,30-tetraidroxi-olean-12-eno	OH	H	OH	H	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ OH	MENDEZ et al., 1997
<i>Monoglicosídeos</i>								
2α,3β,6β-triidroxi-olean-12-eno-28 ato de β-D-glicosila	OH	H	OH	OH	CH ₃	COO-D-glicosila	CH ₃	GALLO et al., 2006
2α,3β,23α-triidroxi-olean-12-eno-28 ato de β-D-glicosila	OH	H	OH	H	CH ₂ OH	COO-D-glicosila	CH ₃	DJOUKENG et al., 2005
quebulosídeo II	OH	H	OH	OH	CH ₂ OH	COO-D-glicosila	CH ₃	GALLO et al., 2006

Tabela 12 - Triterpenos com esqueleto ursano identificados em Myrtaceae.



Nome	R ₂	R ₃	R ₆	R ₂₃	R ₂₈	Referência
<i>Triterpenos</i>						
α -amirina	H	OH	H	CH ₃	CH ₃	GALLO et al., 2006
ácido ursólico	H	OH	H	CH ₃	COOH	COURTNEY; LASSAK; SPEIRS, 1983
acetato do ácido ursólico	H	OOCCH ₃	H	CH ₃	COOH	VIEIRA et al., 2004
cumarato do ácido ursólico	H	<i>O-p</i> -cumaroil	H	CH ₃	COOH	SETZER et al., 2006
ácido madecássico	OH	OH	OH	CH ₂ OH	COOH	GALLO et al., 2006
ácido asiático	OH	OH	H	CH ₂ OH	COOH	AGUIRRE et al., 2006
ácido corosólico	OH	OH	H	CH ₃	COOH	AGUIRRE et al., 2006
obtusina	H	OH	H	CH ₂ OOCCH ₂ H ₂ (4-hidroxifenil)	COOH	BEGUM; SIDDIQUI; HASSAN, 2002
<i>Monoglicosídeo</i>						
2 α ,3 β ,23 α -triidroxiurs-12-eno-28 ato de β -D-glucopiranosila	OH	OH	H	CH ₂ OH	COO-D-glicosila	DJOUKENG et al., 2005

Tabela 13 - Triterpenos com esqueleto ursadieno identificados em Myrtaceae.



Nome	R ₃	Referência
ácido goreichico I	H	BEGUM; SIDDIQUI; HASSAN, 2002
Ácido guajavanóico	<i>p</i> -E-cumaroil	BEGUM; SIDDIQUI; HASSAN, 2002

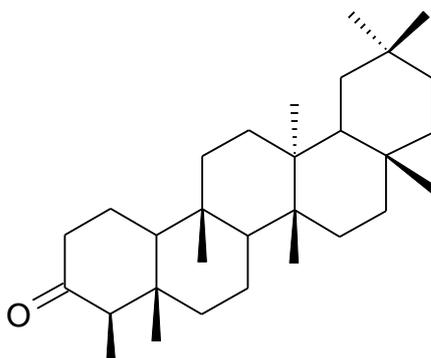


Figura 5. Friedelina - triterpeno com esqueleto de friedelano identificado em Myrtaceae (COURTNEY; LASSAK; SPEIRS, 1983).

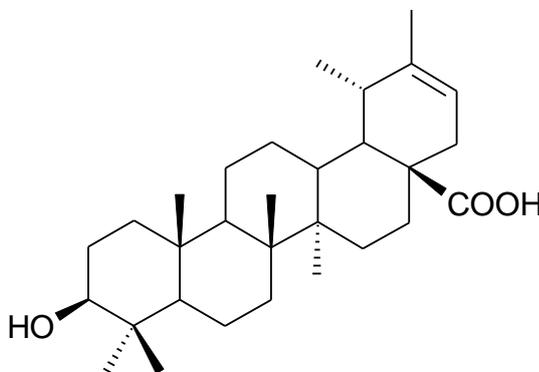


Figura 6. Ácido 3β-hidróxi-19α-metil-urs-20-eno-28-óico – triterpeno com esqueleto de urs-20-eno identificado em Myrtaceae (LOBO-ECHEVERRI et al., 2005).

2.2. Úlceras Pépticas

Estima-se que as úlceras pépticas afetem 5% da população global (AJAIKUMAR et al., 2005). No Brasil os dados não são precisos, mas nos Estados Unidos estatísticas apontam que em 2003, 14,5 milhões de pessoas foram afetadas por esta patologia e que o índice de mortalidade em 2002 foi superior a 4 mil mortes, com mais de 400 mil internações no mesmo ano (UNITED STATES, 2008).

As úlceras tornaram-se uma patologia dos tempos modernos, relacionadas a uma dieta inapropriada e estilo de vida estressante (ANDREO et al., 2006). Além disso, o crescente consumo de álcool e antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) observado nos dias de hoje aumentou o risco de incidência da doença (OLALEYE; FAROMBI, 2006).

A etiologia das úlceras não foi completamente estabelecida e parece estar relacionada a um desequilíbrio entre os mecanismos agressores (ácido e pepsina) e protetores da mucosa gastrintestinal (bicarbonato, mucina, prostaglandinas, óxido nítrico e outros peptídeos e fatores de crescimento) (GOODMAN et al., 2007; ARRIETA et al., 2003).

Entre os mecanismos agressores, a secreção de ácido clorídrico pelas células parietais é particularmente importante na etiologia das úlceras pépticas e, portanto, mecanismos reguladores são alvos específicos para a ação de fármacos (RANG et al., 2008).

A secreção de ácido clorídrico ocorre quando, no interior da célula parietal, o ácido carbônico, formado a partir da água e do dióxido de carbono por intermédio da anidrase carbônica, dissocia-se em íons hidrogênio e bicarbonato. O bicarbonato é então trocado pelo íon cloro presente no plasma, que por sua vez é ativamente transportado para os canalículos existentes nas células parietais que se comunicam com a luz das glândulas gástricas e, portanto, com a luz do estômago. A secreção do íon cloro é acompanhada de íon potássio, o qual em seguida é trocado por íon hidrogênio por intermédio de uma K^+/H^+ -ATPase (figura 8) (RANG et al., 2008).

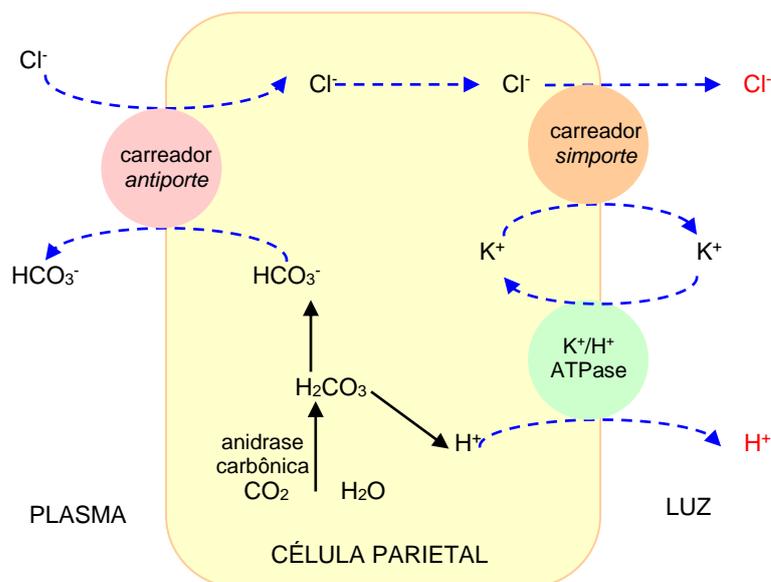


Figura 7. Esquema da secreção de ácido clorídrico pela célula parietal gástrica (adaptado de Rang et al., 2008).

A gastrina, a acetilcolina e a histamina são citadas como os principais mediadores químicos que regulam a secreção ácida (RANG et al., 2008).

A gastrina é o mais potente indutor da secreção de ácido e age sobre os receptores CCK2 de forma indireta, induzindo a liberação de histamina, e de forma direta sobre as células parietais, estimulando a K^+/H^+ -ATPase (GOODMAN et al., 2007).

A acetilcolina estimula diretamente a secreção de ácido gástrico agindo nos receptores muscarínicos M_3 presentes na membrana das células parietais. Indiretamente atua promovendo liberação de histamina e gastrina (GOODMAN et al., 2007).

A histamina, por sua vez, ativa os receptores H_2 nas células parietais, estimulando a secreção ácida (RANG et al., 2008).

Um importante fator envolvido na agressão da mucosa consiste na infecção por *Helicobacter pylori*, bactéria gram negativa associada à formação de

úlceras pépticas e diversas outras patologias, tais como gastrite e câncer gástrico (USTUN et al., 2006).

H. pylori diminui a produção de somatostatina, substância que inibe a secreção de ácido gástrico por meio de supressão da liberação da gastrina (GOODMAN et al., 2007). Além disso, esta bactéria diminui também os fatores protetores da mucosa, reduzindo a produção duodenal de bicarbonato (GOODMAN et al., 2007).

O muco, os íons bicarbonato e as prostaglandinas configuram como os principais agentes de proteção da mucosa gástrica, que apresenta ainda outros componentes de defesa, tais como o óxido nítrico e a capsaicina.

O muco, secretado por células epiteliais superficiais, forma com o bicarbonato, um gel que protege a superfície da mucosa estomacal da ação do suco gástrico, criando um gradiente de pH 6-7 na superfície mucosa enquanto que na luz estomacal o pH é de 1 a 2 (GOODMAN et al., 2007).

As prostaglandinas endógenas atuam na proteção do estômago contra vários agentes agressores, mantendo a integridade da mucosa e acelerando a cura de lesões causadas por estresse (RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

As prostaglandinas E_2 e I_2 são inibidoras da secreção de ácido, além de estimularem a liberação de muco e bicarbonato e promoverem a dilatação dos vasos sanguíneos da mucosa (GOODMAN et al., 2007; RANG et al., 2008).

O álcool e AINEs inibem a formação das prostaglandinas, diminuindo a secreção de muco e bicarbonato e predispondo ao desenvolvimento de doença ácido-péptica (GOODMAN et al., 2007).

O óxido nítrico promove regulação do fluxo sanguíneo local e das secreções de ácido, de muco e de bicarbonato (NAVARRETE et al., 2005). Inibe a adesão de leucócitos na microcirculação gastrintestinal e conseqüentemente acelera a cicatrização de úlceras gástricas (OLALEYE; FAROMBI, 2006).

Além disso, existem evidências de que o óxido nítrico atua como antioxidante na disfunção da mucosa induzida por etanol ou indometacina e ocasionada por reperfusão isquêmica ou outras condições inflamatórias do trato gastrintestinal (DENIZBASI et al., 2000).

Observou-se que os neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina exercem um papel crucial na integridade do estômago (OLIVEIRA et al., 2004b). A capsaicina, ao se ligar às terminações nervosas na mucosa gástrica promove aumento no fluxo sanguíneo, além de um aumento da secreção de muco e bicarbonato (OLIVEIRA et al., 2004b).

O tratamento das úlceras pépticas é atualmente promovido com a utilização de inibidores da bomba de prótons (mais comumente empregados) e de antagonistas dos receptores de histamina H₂, além da erradicação do *H. pylori* com a utilização de agentes antimicrobianos (RANG et al., 2008).

2.3. Câncer

Em 2005, o câncer causou a morte de 7,6 milhões de pessoas, 13% de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo (BRASIL, 2008). Estima-se ainda que em 2020, 60% dos 15 milhões de novos casos anuais de câncer

acometerão pessoas que vivem em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

No Brasil, estima-se que ocorrerão mais de 466 mil novos casos de câncer em 2008 (estatística válida também para 2009), com maior incidência de câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil novos casos), tumores de próstata e de mama feminina (Figura 8) (BRASIL, 2008).

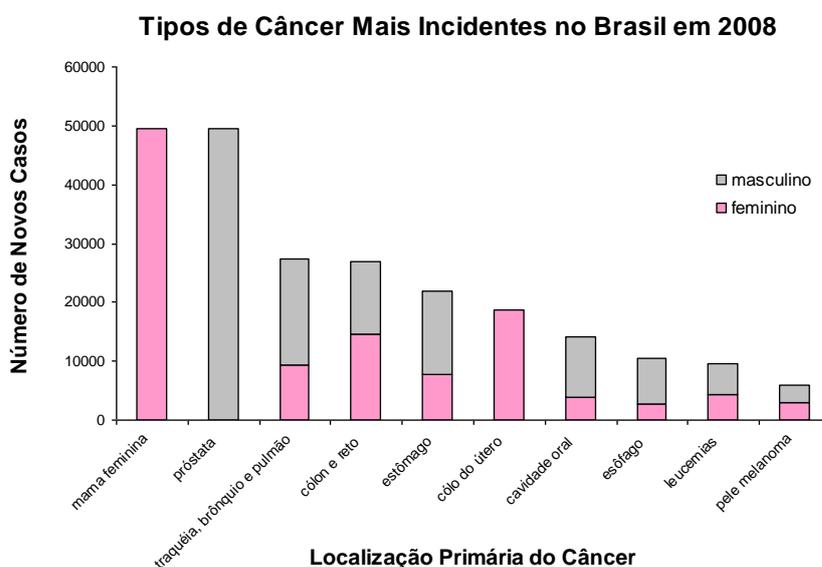


Figura 8. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para o ano de 2008, com exceção de câncer de pele não melanoma (adaptado de Brasil, 2008).

A etiologia do câncer é extremamente complexa e consiste em uma inter-relação de inúmeros fatores de risco, tanto genéticos como ambientais (SERAFINI et al., 2006).

O câncer caracteriza-se pela multiplicação descontrolada de formas anormais das próprias células corporais (VILE, 1992). As células cancerosas apresentam propriedades de proliferação descontrolada, desdiferenciação e perda de função, além de poder de invasão e de disseminação em outras partes do corpo (metástases) (RANG et al., 2008).

As características celulares anormais são um reflexo de alterações dos padrões de expressão gênica nas células cancerosas em função de mutações genéticas associadas a danos no DNA, estresse oxidativo ou inflamações crônicas (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

As mutações genéticas podem ocasionar o desenvolvimento de câncer por meio da transformação de proto-oncogenes em oncogenes ou inativação dos genes supressores tumorais (anti-oncogenes) (CARMELIET; JAIN, 2000).

Os proto-oncogenes, em condições normais, controlam a divisão, a apoptose e diferenciação celular. Por ação de alguns tipos de vírus ou substâncias carcinogênicas, são convertidos em oncogenes, conferindo a propriedade de proliferação descontrolada nas células cancerosas (RANG et al., 2008).

Com a multiplicação celular anormal, há necessidade de formação de novos vasos sanguíneos para a nutrição das células neoplásicas em um processo denominado angiogênese (ALMEIDA, V. et al., 2005).

As células do câncer são geralmente menos especializadas nas suas funções do que suas correspondentes normais e podem acarretar, portanto, perda das funções nos tecidos invadidos, ocasionando falência do órgão atingido e, em último caso, morte do indivíduo (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Os genes supressores tumorais ou anti-oncogenes presentes nas células normais são capazes de suprimir alterações malignas e, sendo assim, mutações que causem perda da função destes podem ser determinantes na carcinogênese (VILE, 1992).

A carcinogênese em geral ocorre lentamente, sendo dividida em três estágios de desenvolvimento: iniciação, promoção e progressão (ALMEIDA, V. et al., 2005).

O estágio de iniciação consiste na fase inicial onde as células estão geneticamente alteradas pela ação de um agente onco-iniciador, mas ainda não é possível detectar um tumor clinicamente (ALMEIDA, V. et al., 2005).

No estágio de promoção os agentes cancerígenos denominados de oncopromotores agem sobre as células geneticamente alteradas, transformando-as em malignas por meio de um processo lento e gradual (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Finalmente, a progressão do câncer caracteriza-se por um estágio de multiplicação descontrolada irreversível, onde o câncer instalado evolui até o desenvolvimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Existem inúmeros tipos de câncer que podem ser classificados de acordo com o tipo de célula normal que deu origem à neoplasia (classificação primária) (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Desta forma, os tipos de câncer podem ser classificados como carcinomas (são os mais comuns e originam-se de células que revestem o corpo); sarcomas (malignidade dos tecidos de suporte); linfomas (originam-se de linfócitos); leucemia (malignidade de células da medula óssea que produzem glóbulos brancos); mielomas (malignidade de células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos); tumores de células germinativas (desenvolvem-se a partir de células de testículos ou ovários); melanomas (malignidade dos melanócitos); gliomas (originam-se a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal) e neuroblastomas (tumor geralmente pediátrico derivado de células malignas embrionárias) (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Atualmente o tratamento do câncer é principalmente realizado por meio de excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (RANG et al, 2008). Mais

recentemente tem sido empregada a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia, além de terapia combinada, associando-se mais de um tipo de tratamento (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Caso não haja metástase, a excisão cirúrgica associada, por exemplo, à radioterapia têm alcançado sucesso em ao menos um terço dos pacientes (ALMEIDA, V. et al., 2005) e a fotorradiação tem sido eficaz no tratamento de tumores superficiais, assim como a imunoterapia tem sido empregada como técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente na destruição de células cancerosas residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (ALMEIDA, V. et al., 2005).

Entretanto, quando a neoplasia é caracterizada pela presença de metástases, é necessária uma abordagem sistêmica com a utilização de quimioterápicos (ALMEIDA, V. et al., 2005).

A maioria dos agentes antineoplásicos citotóxicos utilizados no tratamento do câncer afetam o processo de divisão celular (antiproliferativos), afetando conseqüentemente todos os tecidos normais do corpo que se dividem rapidamente (RANG et al, 2008).

Desta forma, agentes antiproliferativos causam efeitos tóxicos gerais graves, tais como mielossupressão com conseqüente diminuição da resistência a infecções, deficiência na cicatrização, alopecia, lesão do epitélio gastrintestinal, depressão do crescimento em crianças, esterilidade e teratogenicidade. Além disso, praticamente todos os agentes citotóxicos causam náuseas e vômitos intensos, dificultando a adesão do paciente ao tratamento e podem ainda tornarem-se carcinogênicos e causarem lesão renal (RANG et al, 2008).

Neste contexto, faz-se necessária a busca por novos fármacos no tratamento de neoplasias malignas, mais específicos e menos tóxicos, além da

necessidade de ampliação do conhecimento das bases moleculares do câncer, que possam fornecer subsídios para novas terapias gênicas (MENDELSON et al., 2001).

Justificativa e Objetivos

*Acima da verdade estão os deuses. A nossa ciência é uma falhada cópia da certeza
com que eles sabem que há o universo.*

Ricardo Reis

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora *P. edulis* seja nativa, ameaçada de extinção, usada na medicina tradicional e tenha apresentado resultados interessantes em ensaios preliminares, estudos que correlacionem a composição química da espécie e as atividades observadas não foram reportados na literatura até o presente momento.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo o estudo fitoquímico e biológico de *P. edulis*, sob propósitos específicos:

- 3.1. Isolar e identificar substâncias possivelmente responsáveis pelas atividades farmacológicas;
- 3.2. Quantificar fenóis totais, flavonóides e taninos nas frações polares do extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL);
- 3.3. Avaliar a capacidade antioxidante do EEAL fracionado;
- 3.4. Avaliar a atividade antiúlcera aguda do EEAL fracionado e de substâncias isoladas a partir do mesmo;
- 3.5. Avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade do EEAL fracionado.

Materiais e Métodos

*Aventurar-se causa ansiedade, mas deixar de arriscar-se é perder a si mesmo... e
aventurar-se no sentido mais elevado é precisamente tomar consciência de si
próprio.*

Soren A Kierkgaard

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e Equipamentos Empregados

4.1.1. Instrumentos

Para trituração da droga vegetal empregou-se moinho de facas e martelos da marca Thomas. Para liofilização dos extratos e frações foi utilizado liofilizador da marca Edwards e para concentrar extratos e frações empregou-se rotavapor da Büchi a 40-45 °C operando sob pressão reduzida.

A tamisação foi realizada empregando-se tamis nº 40, abertura de 0,417 mm, marca Tyler.

Nos processos cromatográficos utilizou-se bomba peristáltica Pharmacia, modelo P1-18-1110-91 e coletor automático Redifrac (Pharmacia).

Para centrifugação das amostras foi utilizada centrífuga de bancada com capacidade de seis tubos da Bio Agency modelo DW-41.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em equipamento Bruker modelo DPX-300 (operando em 300 MHz para RMN de ^1H e 75 MHz para RMN de ^{13}C).

Os espectros de massa foram obtidos utilizando-se cromatógrafo à gás equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25

mm de diâmetro acoplado à um analisador de massas CG-MS-Shimadzu 14B/QP-5050A com analisador tipo quadrupolo operando por impacto eletrônico (IE) a 70 eV.

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro da Shimadzu, modelo UV-mini-1240 utilizando-se cubetas de vidro. Para os ensaios em cultura de células, utilizou-se placa de 96 poços com volume de 200 μ L (Corning) e leitor de microplacas ELx 800 Reader (MTX Lab Systems) (células tumorais) ou MR4000 (Dynatech) (CHO).

As medidas de pH foram realizadas por meio de pH-metro modelo 654 acoplado a eletrodo de vidro combinado modelo EA-120 da Metrohm.

Os procedimentos sob condições estéreis foram realizados em fluxo laminar Veco, classe IIB2.

As análises de fluorescência foram realizadas em placas de 96 poços com volume de 200 μ L (Fisher Scientific) e leitor de placas Multi-Detection Microplate Reader Synergy (Biotek) com excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20).

4.1.2. Solventes, Ácidos e Bases

Os solventes empregados na extração, partição e processos cromatográficos em coluna foram devidamente tratados e destilados segundo procedimentos usuais (VOGEL, 1988). Para as análises por cromatografias em camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (CLAE) e gasosa (CG) foram utilizados solventes grau P.A. das marcas Merck, Carlo Erba e Synth ou gás de

pureza 5. Nas análises por CLAE e preparo de tampões foi utilizada água Milli-Q. Para as análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizados solventes deuterados das marcas Aldrich e Cil.

Nas determinações colorimétricas e demais ensaios *in vivo* e *in vitro* foram utilizados álcoois, ácidos, trietanolamina, anisaldeído e anidrido acético grau P.A. da Merck.

No ajuste de pH foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico grau P.A. da Merck.

Nos ensaios *in vivo* foi utilizada água filtrada e Tween 80 (Labsynth) para preparo das amostras.

4.1.3. Sais, Reagentes e Padrões

Foram utilizados sais grau P.A. da Merck para o preparo de todos os tampões e nos ensaios colorimétricos. Os reagentes e padrões difenilboriloxietilamina (NP), polietilenoglicol (PEG), metenamina, ácido gálico, ácido tânico, albumina do soro bovino (BSA), dodecil sulfato de sódio (SDS), radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH), fluoresceína sódica, 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-dicloridrato (AAPH), ácido-6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) e ácido ursólico apresentavam grau analítico da Sigma-Aldrich. Foram empregados rutina da Sankyo e lansoprazol da Hexal.

4.1.4. Cultura Celular e Bacteriana

As células de ovário de hamster chinês (CHO) foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC CHO K1). As linhagens celulares tumorais são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) norte-americano.

Foram utilizadas as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley.

A fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas aroclor 1254 (S9) foi obtida da Moltox.

Na solubilização das amostras foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) da Sigma. Foram utilizados meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB), solução salina tamponada (PBS), tampão de Hank's e tripsina, todos da Gibco ou Dubelco.

A gentamicina, sulforrodamina B (SRB) e Trizma base utilizadas apresentavam grau analítico Sigma. O corante supravital tetrazólio (MTS) e o metassulfato de fenazida (PMS) utilizados são da Promega e a doxorubicina da Boehringer-Ingelheim. Foi utilizado ácido tricloroacético (TCA) da Merck.

Foram utilizados β -nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADP), D-glicose-6-fosfato, L-histidina monoidratada e D-biotina da Sigma. Empregou-se caldo nutriente Oxoid n. 2 e Bacto Agar Difco.

A 4-nitrodifenilenodiamina (NPD), azida sódica, daunomicina e 2-antramina foram obtidas da Sigma.

4.1.5. Colunas e Placas Cromatográficas

Nos processos cromatográficos em coluna, foram empregados gel de sílica 60G, partículas de 63-210 μm (Merck), e Sephadex LH-20, partículas de 25-100 μm (Pharmacia).

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em placas de gel de sílica F₂₅₄ sobre suporte de alumínio (Merck e Sorbent).

As placas preparativas foram confeccionadas utilizando-se gel de sílica PF₂₅₄, tamanho de partícula 5-40 μm (Merck), em suspensão em água destilada, aplicado sobre placas de vidro formando camadas de 1 mm de espessura.

Para revelação das placas cromatográficas empregou-se visualização no ultravioleta (254 e 360 nm) com ou sem aspensão dos seguintes reveladores:

- solução de ácido sulfúrico 25% (25 mL de ácido em 100 mL de solução aquosa) e aquecimento a 100 °C;
- solução de anisaldeído sulfúrico (0,85 mL de anisaldeído, 85 mL de metanol, 10 mL de ácido acético e 5 mL de ácido sulfúrico) e aquecimento a 100 °C.;
- reagente de Lieberman-Burchard (5 mL de anidrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico e 50 mL de etanol) e aquecimento a 100 °C;

- solução de NP/PEG (100 mg de NP e 500 mg de PEG em 20 mL de metanol) (WAGNER, 1996; STAHL, 1969).

4.10. 4.2. Animais

Nos ensaios *in vivo* foram utilizadas ratas Wistar Hannover pesando entre 150 e 180g provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.3. Coleta e Identificação da Espécie Vegetal

O material vegetal foi coletado em Trindade, 2º Subdistrito de Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. Os ramos, floridos e/ou frutificados, foram preparados visando a obtenção de exsiccatas. A espécie foi identificada pela Dra. Lúcia Rossi e a exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, tendo sido registrada como SP-356.472.

4.4. Material Botânico

As folhas de *P. edulis* empregadas no preparo do extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL) foram coletadas no período da tarde, no mês de janeiro e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40-45 °C. A seguir, foram reduzidas a pó semifino (FARMACOPÉIA, 1959) em moinho de facas e martelos.

4.5. Extrato Etanol/Água (70%) Liofilizado (EEAL)

A droga vegetal pulverizada e tamisada foi submetida à percolação segundo método descrito na Farmacopéia Brasileira (1959).

Em um percolador, 2.870 g do pó da droga foram mantidos em maceração com etanol 70% por 24 horas. Foi realizada a percolação com fluxo de 3 mL/min usando o mesmo solvente como extrator (30 L.). A solução hidroetanólica foi concentrada em evaporador rotativo para a eliminação do etanol e em seguida foi liofilizada.

O extrato foi homogeneizado por meio de tamis e armazenado em dessecador (975,0 g).

4.6. Partição do EEAL

Cem gramas do EEAL foram solubilizados em 1000 mL de metanol/água (1: 1) e a solução foi submetida à extração em funil de separação com 330 mL de hexano. A partição foi repetida por 3 vezes com porções de 330 mL de solvente. A solução hidrometanólica foi rotavaporada para retirada do hexano residual e submetida ao mesmo processo de partição usando-se como extratores o diclorometano e o acetato de etila.

As soluções obtidas foram concentradas em rotavapor, assim como a solução metanol/água. A água restante desta solução foi liofilizada.

Foram obtidas as frações de hexano (FH) (4,60 g), de diclorometano (FD) (2,99 g), de acetato de etila (FA) (15,86 g) e de metanol (FM) (72,96 g).

4.7. Análise Fitoquímica da Fração de Hexano (FH)

4.7.1. Cromatografia em Coluna de FH

Três gramas de FH foram submetidos à cromatografia em coluna de gel de sílica 60 G. A cromatografia foi realizada em funil de Büchner (diâmetro interno de 15 cm e altura de 10 cm) sob vácuo. Utilizaram-se como eluentes misturas de

solventes de polaridades crescentes: hexano, hexano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3) e acetato de etila.

Foram obtidas as frações FH1 (66,6 mg), FH2 (1438,3 mg), FH3 (341,0 mg), FH4 (310,3 mg) e FH5 (571,1 mg).

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica utilizando-se diferentes fases móveis (hexano/acetato de etila 99:1, 9:1, 8:2 e 7:3; clorofórmio/metanol 99:1, 9:1, 8:2) e reveladas com ácido sulfúrico 25% e aquecimento.

Após a avaliação do perfil cromatográfico das cinco frações, selecionaram-se as frações FH2, FH3 e FH4 para continuidade dos processos cromatográficos.

4.7.2. Cromatografia em Coluna de FH2, FH3 e FH4

A fração FH2 (1438,3 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica 60 G. A coluna apresentava diâmetro interno de 2,5 cm e altura de 50 cm. Utilizaram-se como eluentes misturas de solventes de polaridades crescentes: hexano, hexano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3) e acetato de etila. Foram obtidas 62 frações (FH2-01 a FH2-62).

As frações FH3 (341,0 mg) e FH4 (310,3 mg) foram submetidas à cromatografia em coluna, separadamente, usando o mesmo adsorvente descrito anteriormente. Cada coluna apresentava diâmetro interno de 1 cm e altura de 40 cm. Utilizaram-se como eluentes misturas de solventes de polaridades crescentes: para

a fração FH3: hexano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3; 6:4) e acetato de etila, obtendo-se 25 frações (FH3-01 a FH3-25); para a fração FH4: hexano/acetato de etila (8:2; 7:3; 6:4; 5:5) e acetato de etila, obtendo-se 25 frações.

Todas as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica utilizando-se diferentes fases móveis (hexano/acetato de etila 99:1, 9:1, 8:2 e 7:3; clorofórmio/metanol 99:1, 9:1, 8:2). As placas foram visualizadas no ultravioleta (254 e 360 nm) e reveladas por aspensão de ácido sulfúrico 25% ou reagente de Liebermann-Burchard seguido de aquecimento.

As frações FH3-18, FH3-20, FH4-13 e FH4-16 foram submetidas a purificações em placas preparativas de gel de sílica 60G usando como fase móvel clorofórmio/metanol (98:2 e 90:10).

Depois de purificadas, foram selecionadas as frações FH2-42 (235,0 mg), FH2-48 (34,9 mg), FH3-18 (16,4 mg), FH3-20 (17,6 mg), FH4-13 (12,7 mg) e FH4-16 (15,8 mg) para a realização de análise por ressonância magnética nuclear de próton e de carbono 13. A fração FH2-42 foi também submetida à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Figura 9).

4.7.3. Análise Espectrométrica de FH2-42, FH2-48, FH3-18, FH3-20, FH4-13 e FH4-16

As análises das frações FH2-42, FH2-48 e FH3-18 foram realizadas empregando-se clorofórmio deuterado. Para análise da fração FH4-13 foi utilizada

uma mistura de clorofórmio deuterado e metanol deuterado e para análises das frações FH3-20 e FH4-16 foi utilizada piridina deuterada como solvente.

4.7.4. Análise de FH2-42 por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As condições empregadas na análise foram: injetor automático: 150 °C, temperaturas programadas: 60 °C (2 minutos), 60 - 250°C (10 °C/minuto), 250 °C (10 minutos).

4.8. Análise Fitoquímica da Fração de Acetato de Etila (FA)

4.8.1. Cromatografia em Coluna de FA

Três gramas de FA foram solubilizados em 3 mL de metanol e a solução foi centrifugada. O sobrenadante recolhido foi centrifugado mais duas vezes. A solução livre de precipitado foi então submetida à cromatografia em permeação em gel em coluna de vidro (diâmetro interno de 2 cm e altura de 80 cm) empacotada com Sephadex LH-20. O metanol utilizado como solvente foi bombeado na coluna

por meio de bomba peristáltica a um fluxo de 0,5 mL/min. As frações com aproximadamente 2 mL foram coletadas em coletor automático.

Foram obtidas 197 frações e após a avaliação do perfil cromatográfico selecionaram-se as frações FA-57 (33,3 mg), FA-66 (157,1 mg), FA-80 (41,2 mg), FA-90 (37,4 mg) e FA-147 (47,3 mg) para a realização de análise por RMN de ^1H e de ^{13}C .

4.8.2. Análise Espectrométrica de FA-57, FA-66, FA-80, FA-90 e FA-147

Os espectros foram obtidos utilizando-se dimetilsulfóxido deuterado como solvente.

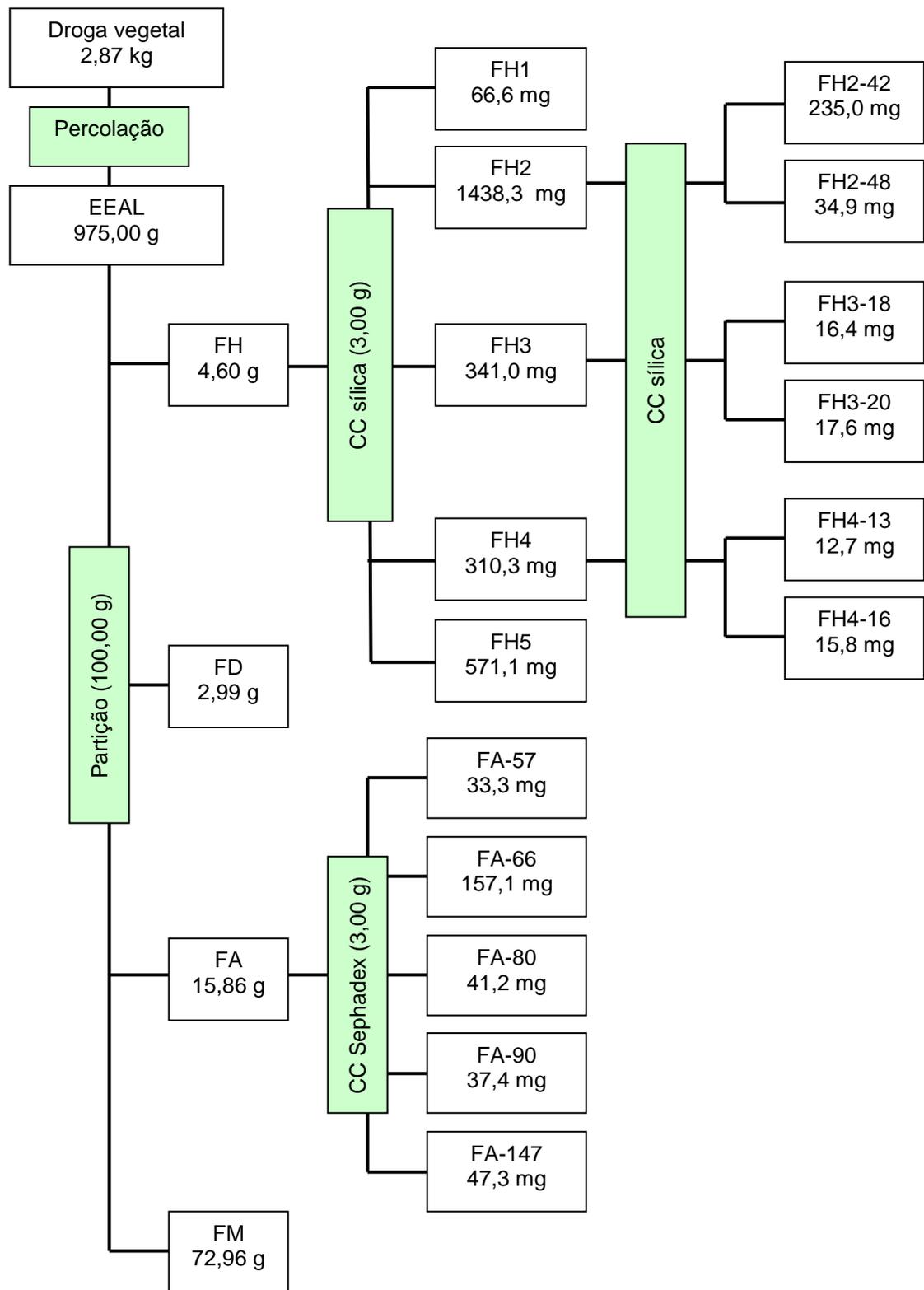


Figura 9. Fluxograma do isolamento de substâncias a partir da droga vegetal constituída de folhas secas de *Plinia edulis*. EEAL: extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis*; FH: fração de hexano; FD: fração de diclorometano; FA: fração de acetato de etila; FM: fração de metanol; CC: cromatografia em coluna.

4.9. Doseamentos nas Frações Polares (FA e FM)

4.9.1. Fenóis Totais

O doseamento de fenóis totais foi realizado conforme preconizado por Waterman e Mole (1994), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Foram utilizadas as frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM). A porcentagem de fenóis totais de cada fração foi calculada em relação ao ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

4.9.1.1. Preparo do Reagente de Folin-Ciocalteu

Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 70 mL de água destilada, adicionaram-se 10 g de tungstato de sódio, 2,5 g de ácido fosfomolibdico, 10 mL de ácido clorídrico concentrado e 5 mL de ácido ortofosfórico 85%. Refluxou-se por 10 horas sob aquecimento com pérolas de vidro e foram acrescentados 15 g de sulfato de lítio. Adicionaram-se algumas gotas de bromo líquido até que a solução final ficou com uma coloração amarela. A solução foi fervida na capela para retirada do excesso de bromo e então transferida para um balão volumétrico de 100 mL e completada com água destilada.

4.9.1.2. Preparo da Solução de Carbonato de Sódio

Vinte gramas de carbonato de sódio anidro foram solubilizados com água destilada em um balão volumétrico de 100 mL.

4.9.1.3. Curva Padrão de Ácido Gálico

Dez miligramas de ácido gálico foram solubilizados em 80 mL de água destilada. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água (100 µg/mL). Em balões volumétricos de 50 mL foram adicionados 30 mL de água destilada e acrescentados de 0,25 mL a 3,0 mL da solução do padrão (concentrações de 25 a 300 µg de ácido gálico por balão). Em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os volumes dos balões foram completados com água destilada e as soluções foram mantidas em repouso por 2 horas. As absorvâncias foram lidas em 760 nm.

4.9.1.4. Doseamento

Foram dissolvidos 100 mg da fração de acetato de etila (FA) em 40 mL de etanol 70%. A solução foi transferida para balão volumétrico e o volume foi completado para 50 mL utilizando-se o mesmo solvente. Cem microlitros desta solução foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL contendo 30 mL de água destilada. A solução foi agitada e em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e depois de 1 minuto foram adicionados 7,5 mL da solução saturada de carbonato de sódio. O volume foi completado com água destilada e a solução permaneceu em repouso por duas horas antes da leitura da absorbância a 760 nm. Utilizaram-se as amostras sem adição do reagente Folin-Ciocalteu como branco.

O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se 100 mg da fração de metanol (FM).

4.9.1.5. Cálculo

A média das leituras em triplicatas foi confrontada com os dados da curva padrão de ácido gálico e o cálculo da porcentagem de fenóis totais foi baseado na equação de linearidade da reta do padrão.

4.9.2. Taninos

O doseamento de taninos foi realizado conforme preconizado por Waterman e Mole (1994), baseado na precipitação com albumina do soro bovino (BSA). Foram utilizadas as frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM). A porcentagem de taninos de cada fração foi calculada em relação ao ácido tânico. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

4.9.2.1. Preparo da solução de BSA

Em um béquer 1,64 g de acetato de sódio foram solubilizados em aproximadamente 80 mL de água. O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi transferida para um balão volumétrico e completada com água para 100 mL. Nesta solução foram solubilizados 994,5 mg de cloreto de sódio e 100 mg de BSA.

4.9.2.2. Preparo da Solução de SDS

Em um béquer contendo 60 mL de água foi solubilizado 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS). Acrescentou-se 5 mL de trietanolamina e 20 mL de

isopropanol. A solução foi transferida para balão volumétrico e completou-se o volume com água destilada para 100 mL.

4.9.2.3. Preparo do Reagente Cloreto Férrico

Uma massa de 162,5 mg de cloreto férrico (Merck) foi solubilizada em 100 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,01 N.

4.9.2.4. Curva Padrão de Ácido Tânico

Quinhentos miligramas de ácido tânico foram solubilizados em 80 mL de metanol 50%. A solução foi transferida para balão volumétrico e o volume acertado com o mesmo solvente para 100 mL. Diluições foram feitas para obtenção de concentrações de 0,10 a 0,85 mg/mL, utilizando-se o metanol 50% como solvente. Em tubos de ensaio, 1 mL de cada uma das soluções de ácido tânico foi misturado com 2 mL da solução de BSA. Após 10 minutos a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 4 mL da solução de SDS em cada tubo. O material foi ressuspensão com auxílio de vórtex e adicionou-se 1 mL de reagente de cloreto férrico em cada tubo. Após 15 minutos as absorbâncias foram lidas em 520 nm.

4.9.2.5. Doseamento

Foram dissolvidos 100 mg da fração de acetato de etila (FA) em 80 mL de metanol 50%. A solução foi transferida para balão volumétrico e o volume foi completado para 100 mL utilizando-se o mesmo solvente. Um mililitro desta solução foi misturado a 2 mL da solução de BSA em tubo de ensaio. Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada por 10 minutos à 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 4 mL da solução de SDS. O material foi ressuspensão com auxílio de vórtex e adicionou-se 1 mL de reagente cloreto férrico em cada um dos tubos. Depois de 15 minutos as absorvâncias foram lidas a 520 nm utilizando-se as amostras sem adição de cloreto férrico como branco.

O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se 100 mg da fração de metanol (FM).

4.9.2.6. Cálculo

A média das leituras em triplicatas foi confrontada com os dados da curva padrão de ácido tânico e o cálculo da porcentagem de taninos foi baseado na equação de linearidade da reta do padrão.

4.9.3. Flavonóides

O doseamento de flavonóides foi realizado conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL, 2003). Foram utilizadas as frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM). A porcentagem de flavonóides de cada fração foi calculada em relação à quercetina. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

4.9.3.1. Preparo da Solução de Metenamina

Dissolveu-se 0,1 g de metenamina em água e o volume foi completado para 20 mL com o mesmo solvente.

4.9.3.2. Preparo da Solução de Cloreto de Alumínio

Dissolveram-se 2 g de cloreto de alumínio em metanol e o volume foi completado para 100 mL utilizando-se o mesmo solvente.

4.9.3.3. Preparo da Solução Metanólica de Ácido Acético

Em um balão volumétrico de 100 mL, foram adicionados 5 mL de ácido acético e o volume foi completado com metanol.

4.9.3.4. Determinação de Água

Meio grama de cada fração foi levado à estufa a 100-105 °C, separadamente, por 5 horas. Após resfriamento em dessecador, as frações foram pesadas até que a massa entre as pesagens não diferisse em mais de 5 mg em 3 pesagens consecutivas. A determinação de água foi calculada em porcentagem em relação à massa da amostra inicial através da fórmula:

$$Pd = 100 - (mf \times 100 / mi)$$

onde: Pd = determinação de água em porcentagem; mi = massa inicial da amostra em gramas; mf = massa final da amostra, após a secagem, em gramas.

4.9.3.5. Doseamento

Uma massa de 0,1 g da fração de acetato de etila (FA) foi aquecida à fervura sob refluxo durante 30 minutos com 20 mL de acetona, 1 mL da solução de metenamina e 2 mL de ácido clorídrico. A mistura foi filtrada por algodão para balão volumétrico de 100 mL. O resíduo da amostra e o algodão foram extraídos mais duas vezes usando-se porções de 20 mL de acetona com aquecimento à fervura sob refluxo por 10 minutos. Os filtrados foram reunidos no balão e o volume foi completado para 100 mL com acetona.

A 20 mL da solução obtida foram adicionados 20 mL de água e 15 mL de acetato de etila, em funil de separação. A fase de acetato de etila foi recolhida e procederam-se mais 3 extrações empregando-se porções de 10 mL de acetato de etila. Após a reunião das fases de acetato de etila, foram realizadas 2 lavagens com porções de 50 mL de água. A fase orgânica foi completada com acetato de etila em balão volumétrico de 50 mL (solução mãe).

A 10 mL da solução mãe foi adicionado 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio e o volume foi completado para 25 mL em balão volumétrico com a solução metanólica de ácido acético. Foi preparada uma solução de comparação (branco) diluindo-se 10 mL da solução mãe a 25 mL em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético.

Após 30 minutos foi lida a absorvância da amostra a 425 nm, utilizando-se a solução sem a adição do cloreto de alumínio como branco.

O mesmo procedimento para o doseamento de flavonóides foi realizado partindo-se de 0,2 g da fração metanólica (FM).

4.9.3.6. Cálculo

O teor de flavonóides foi calculado em porcentagem como quercetina através da equação:

$$\% \text{ flavonóides} = \frac{A \times 62.500}{500 \times m \times (100 - Pd)}$$

onde: A = absorvância da amostra a 425 nm; m = massa da amostra em gramas; Pd = determinação de água da amostra em porcentagem.

4.10. Atividade Antioxidante

4.10.1. Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* - Ensaio com DPPH

O radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) é um radical livre estável à temperatura ambiente que produz uma solução violácea em etanol. Em presença de substâncias antioxidantes, a solução etanólica torna-se incolor, podendo-se avaliar o potencial antioxidante das amostras colorimetricamente (GORINSTEIN et al., 2003; LEE et al., 2003; MASUDA et al., 2003).

O ensaio foi realizado empregando-se o extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL) e as frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM).

4.10.1.1. Preparo da Solução 0,3 mM de DPPH

Em um béquer contendo 80 mL de etanol foram adicionados 11,8 mg de DPPH sob agitação até completa dissolução. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com etanol.

4.10.1.2. Preparo das Amostras

Cem miligramas do EEAL foram solubilizados em etanol para volume de 100 mL em balão volumétrico (1 mg/mL). Volumes diferentes desta solução foram diluídos com etanol para obtenção de amostras de EEAL nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 10 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado com a rotina.

Para as frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) foram obtidas soluções de concentrações de 10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1 µg/mL utilizando-se etanol como solvente.

4.10.1.3. Ensaio

A 1 mL da solução de DPPH foram adicionados 2,5 mL das soluções de amostras. Após 30 minutos a temperatura ambiente, as absorvâncias foram medidas a 518 nm, utilizando-se etanol para calibrar o aparelho (MENSOR et al., 2001).

A solução usada como branco foi obtida adicionando-se 1 mL de etanol a 2,5 mL da solução das amostras em diferentes concentrações. A solução controle foi obtida através da adição de 1 mL da solução de DPPH a 2,5 mL de etanol (MENSOR et al., 2001).

4.10.1.4. Cálculo

A atividade antioxidante (AA%) expressa em porcentagem, foi calculada em relação aos controles, aos quais não foram adicionadas as amostras, a partir de uma média de 3 leituras.

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

onde AA% = atividade antioxidante medida em porcentagem; Abs_{amostra} = Absorbância da amostra; Abs_{branco} = Absorbância do branco; Abs_{controle} = Absorbância do controle (MENSOR et al., 2001).

Através da equação da reta de linearidade do gráfico foi obtida a concentração do extrato, da rutina e de cada fração com atividade antioxidante de 50% em relação ao controle (CE₅₀), adotando-se valores de $r^2 \geq 0,9$.

4.10.2. Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* - Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio (ORAC)

No método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), radicais peroxila reagem com um indicador fluorescente para formar um composto não fluorescente. Na presença de substâncias antioxidantes o tempo e o grau de inibição da oxidação são medidos durante a reação por fluorescência (HUANG et al., 2002).

O ensaio foi realizado empregando-se o extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL).

4.10.2.1. Preparo da Solução Tampão Fosfato 75 mM (pH 7,0)

Em um béquer com aproximadamente 200 mL de água foram adicionados 1,59 g de fosfato sódico monoidratado, 1,03 g de fosfato dissódico. O pH foi ajustado para 7,0, a solução foi transferida para balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água.

4.10.2.2. Preparo da Solução de Fluoresceína Sódica 40 nM

Um miligrama de fluoresceína sódica foram solubilizados em 1 mL de solução tampão. A 602 μL desta solução foram adicionados 3,398 mL de tampão.

4.10.2.3. Preparo da Solução de AAPH 153 mM

Em 2 mL de solução tampão foram solubilizados 82,98 mg de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-dicloridrato (AAPH).

4.10.2.4. Preparo das Soluções de Padrão Trolox

Um miligrama de Trolox foram solubilizados em 1 mL de tampão. A 100 μL desta solução foram adicionados 300 μL de tampão (solução 100 μM de Trolox). Sucessivas diluições com tampão foram feitas para obtenção de soluções de Trolox a 50 μM , 25 μM , 12,5 μM e 6,25 μM .

4.10.2.5. Preparo das Amostras

Três miligramas e meio de EEAL foram solubilizados em 2 mL de acetona/água (50%). Esta solução foi agitada em vórtex até completa solubilização. Volumes diferentes desta solução foram diluídos com solução tampão para obtenção de amostras de EEAL nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 17,5 µg/mL, 15 µg/mL, 12,5 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL.

4.10.2.6. Ensaio

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 25 µL da solução de EEAL nas diferentes concentrações ou 25 µL de soluções do padrão Trolox e 150 µL de fluoresceína.

A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após este período adicionaram-se 25 µL da solução de AAPH. A placa foi agitada por 10 segundos em velocidade alta no próprio equipamento e a leitura foi efetuada com sensibilidade de 60 *bottom* durante uma hora a cada minuto.

O branco consistiu em 200 µL de tampão fosfato e, no controle positivo, o Trolox foi substituído pelo mesmo tampão. Os poços externos àqueles que estavam sendo lidos foram preenchidos com 300 µL de água.

As análises foram realizadas em triplicatas, com exceção do padrão de Trolox que foi submetido a nove análises em duplicatas para validação do método (RIVELLI et al., 2008).

4.10.2.7. Cálculo

O valor final é calculado através da equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área sob a curva de decaimento de fluorescência (AUC). Sendo expresso o resultado em micromoles equivalentes de Trolox/g da amostra. A área sob a curva foi calculada conforme a equação (BIOTEK, 2007):

$$AUC = 1 + f_1 / f_0 + f_2 / f_0 + f_3 / f_0 + \dots + f_n / f_0$$

onde AUC = área sob a curva; f_0 : leitura da fluorescência inicial (t = 0 minutos); f_n = leitura da fluorescência de cada amostra (t = n minutos).

O valor relativo de ORAC foi calculado conforme a equação:

$$\frac{(AUC_{\text{amostra}} - AUC_{\text{branco}})}{(AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{branco}})} \times \frac{\text{molaridade Trolox}}{\text{concentração amostra}}$$

4.11. Atividade Antiúlcera Aguda

Todos os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas sob protocolo nº 128.

A avaliação da atividade antiúlcera foi efetuada através do modelo de indução com ácido clorídrico e etanol (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004).

4.11.1. Avaliação Dose/Resposta do EEAL

O ensaio foi realizado empregando-se o extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL).

4.11.1.1. Preparo das Amostras

O EEAL foi solubilizado em água nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL. O lansoprazol foi solubilizado em água na concentração de 3 mg/mL. As soluções foram mantidas sob agitação, em agitador magnético durante a administração.

4.11.1.2. Ensaio

Os animais foram divididos em grupos com n de 7. As ratas foram mantidas em jejum durante 12 horas. Em seguida, foram administradas doses do EEAL ou do lansoprazol em um volume de 10 mL/kg aos animais por via oral (doses de 100, 200 e 400 mg/kg do EEAL e de 30 mg/kg do lansoprazol). Como controle negativo foi administrado o mesmo volume de água (10 mL/kg).

Trinta minutos depois, foi administrado, via oral, 1 mL de HCl 0,3M em etanol 60% como agente ulcerogênico. Após uma hora, os animais foram mortos em cuba de gás carbônico. Seus estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e fixados entre placas de vidro para avaliar as ulcerações.

4.11.2. Avaliação das Frações e do Ácido ursólico

O ensaio foi realizado empregando-se o extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL), as frações de hexano (FH), de diclorometano (FD), de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) e o ácido ursólico.

4.11.2.1. Preparo das amostras

O EEAL, as frações de hexano (FH), de diclorometano (FD), de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) foram solubilizados em uma solução de Tween 80 (5% em água) na concentração de 10 mg/mL. O lansoprazol e o ácido ursólico foram solubilizados na mesma solução aquosa de Tween 80 nas concentrações de 3 mg/mL e 5 mg/mL respectivamente. As soluções foram mantidas sob agitação, em agitador magnético durante a administração.

4.11.2.2. Ensaio

Os animais foram divididos em grupos com n de 7. As ratas foram mantidas em jejum durante 12 horas. Em seguida, foram administradas doses do EEAL, das frações, do ácido ursólico ou do lansoprazol em um volume de 10 mL/kg aos animais por via oral (doses de 100 mg/kg do EEAL e das frações, de 50 mg/kg do ácido ursólico e de 30 mg/kg do lansoprazol). O grupo controle recebeu o mesmo volume de solução de Tween 80 (5% em água) (10 mL/kg).

Trinta minutos depois, foi administrado, via oral, 1 mL de HCl 0,3M em etanol 60% como agente ulcerogênico. Após uma hora, os animais foram mortos em cuba de gás carbônico. Seus estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e fixados entre placas de vidro para que as ulcerações fossem avaliadas.

4.11.3. Cálculo

A avaliação das ulcerações foi realizada através de dois parâmetros: Área Total de Lesão e Área Relativa de Lesão.

A Área Total de Lesão foi calculada somando-se as áreas de todas as úlceras e foi expressa em mm². Para a medida das áreas foi utilizado o programa Image Pro Plus.

A Área Relativa de Lesão foi calculada através da fórmula:

$$ARL = ATL/AT \times 100$$

onde ARL = Área Relativa de Lesão expressa em porcentagem; ATL = Área Total de Lesão em mm²; AT = Área Total do estômago em mm².

4.11.4. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através de análise de variância, com nível crítico igual ou menor a 0,05 (5%) para rejeição da hipótese de nulidade, seguido de Tukey (SOKAL; ROHLF, 1969). Os dados expressos em porcentagem (Área Relativa de Lesão) foram previamente transformados em arcosseno para posterior análise estatística.

4.12. Citotoxicidade

4.12.1. Citotoxicidade de Células CHO

A citotoxicidade do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL) e das frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) foi avaliada em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) conforme preconização da ISO 10993-5 (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1992). A citotoxicidade do DMSO utilizado na diluição das amostras também foi avaliada.

4.12.1.1. Preparo do Corante

O corante supravital tetrazólio (MTS), por ação de desidrogenases presentes nas células biologicamente ativas, é bio-reduzido, transformando-se em formazam, um produto solúvel no meio de cultura e cuja concentração pode ser avaliada por absorvância. Sendo assim, A quantidade de formazam produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas (PROMEGA CORPORATION, 2007).

Separadamente, 200 µg de MTS e 90 µg de metassulfato de fenazida (PMS) foram solubilizados em 100 µL de solução salina tamponada (PBS) (soluções

0,2% de MTS e 0,09% de PMS). Aos 100 μ L da solução de MTS foram adicionados 5 μ L da solução de PMS (20:1). Esta solução final foi utilizada como corante.

4.12.1.2. Preparo das Amostras

O EEAL foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de uma solução na concentração de 100 mg/mL. O pH da solução foi medido para garantir amostras com pH superior a 5,5. Em ambiente estéril, a solução foi filtrada em membrana esterilizante e volumes diferentes foram diluídos com solução tampão para obtenção de amostras de EEAL nas concentrações: de 1,95 μ g/mL a 500 μ g/mL.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para as frações FA e FM. O DMSO foi diluído com tampão nas mesmas condições empregadas para as amostras para concentrações finais de 0,02% a 5,00% (v/v).

4.12.1.3. Cultura das Células

As culturas de CHO foram obtidas por incubação a 37 °C em ambiente úmido, em meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (SFB) e atmosfera de 5% de CO₂. Após propagação celular em monocamada, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS.

Para o destacamento das células da garrafa de cultura, foi adicionada solução de tripsina a 0,25%. Em seguida as células foram transferidas para tubo plástico, centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. As células foram então ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular foi ajustada para ~60.000 células/mL.

4.12.1.4. Ensaio

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 50 μ L de suspensão celular (~3.000 células) e 50 μ L das soluções das amostras (EEAL, FA e FM) nas diferentes concentrações ou 50 μ L de soluções de DMSO utilizadas para diluição das amostras. O branco de cada amostra consistiu em 50 μ L da amostra e 50 μ L do meio de cultura. O controle negativo consistiu em 50 μ L da suspensão celular e 50 μ L de meio de cultura (viabilidade celular 100%). Como branco das leituras foi utilizado 100 μ L de meio de cultura, sem adição da suspensão celular (DOS SANTOS et al., 2006).

Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas.

A microplaca foi incubada a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido por 72 horas. Passado o período de incubação, adicionaram-se 20 μ L do corante. A placa foi novamente incubada por duas horas e as absorbâncias foram medidas a 490 nm, comparativamente ao branco (meio de cultura).

4.12.1.5. Cálculo

A viabilidade celular expressa em porcentagem, foi calculada em relação aos controles, aos quais não foram adicionadas as amostras, a partir de uma média de 4 leituras.

$$VC = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}}$$

onde VC = viabilidade celular medida em porcentagem; $Abs_{amostra}$ = absorbância da amostra; Abs_{branco} = absorbância do branco de cada amostra; $Abs_{controle}$ = absorbância do controle.

Através da equação da reta de linearidade do gráfico foi obtida a concentração do EEAL, FA e FM com citotoxicidade de 50% em relação ao controle (DL_{50}), adotando-se valores de $r^2 \geq 0,9$.

4.12.1.6. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através de análise de variância, com nível crítico igual ou menor a 0,05 (5%) para rejeição da hipótese de nulidade, seguido de Tukey (SOKAL; ROHLF, 1969).

4.12.2. Citotoxicidade de Células Tumorais

A citotoxicidade do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL) e das frações de hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e metanol (FM) foi avaliada em cultura de células tumorais humanas conforme preconizado por Monks et al. (1991).

Foram selecionadas linhagens neoplásicas humanas de leucemia (K-562), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), cólon (HT-29), ovário (OVCAR-03) e rim (786-0) (DENNY et al., 2008).

4.12.2.1. Preparo do Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado consistiu de meio RPMI com 10% de SFB e gentamicina (50 µg/mL).

4.12.2.2. Preparo do Corante

A sulforrodamina B (SRB) é um corante protéico que se liga aos aminoácidos nas células previamente fixadas com ácido tricloroacético. Desta forma,

a concentração de SRB medida por absorvância é diretamente proporcional ao número de células vivas (MONKS et al., 1991).

Em 100 μ L de uma solução aquosa de ácido acético a 1% foram solubilizados 400 μ g de SRB.

4.12.2.3. Preparo das Amostras

O extrato (EEAL), as frações (FH, FD, FA e FM) e a doxorubicina foram solubilizados em DMSO na concentração de 100 mg/mL. Para adição nas culturas celulares, estas soluções foram diluídas no mínimo 400 vezes em meio de cultura, evitando a citotoxicidade do DMSO. As concentrações finais das amostras foram de 0,50 μ g/mL a 500 μ g/mL.

4.12.2.4. Cultura das Células

As culturas celulares foram obtidas por incubação a 37 °C em ambiente úmido, em meio de cultura e atmosfera de 5% de CO₂. Com exceção da K-562, que cresce em suspensão, após propagação celular em monocamada, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com tampão de Hank's.

Para o destacamento das células da garrafa de cultura, foi adicionada solução de tripsina a 0,25%. As células foram então ressuspensas em meio de

cultura e as concentrações celulares foram ajustadas de acordo com a preconização do NCI: ~40.000 células/mL (NCI-460 e UACC-62), ~45.000 células/mL (PC-03), ~50.000 células/mL (786-0, HT-29 e NCI-ADR), ~60.000 células/mL (K-562 e MCF-7) e ~70.000 células/mL (OVCAR-03).

4.12.2.5. Ensaio

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 μ L de suspensão celular em suas respectivas densidades de inoculação. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, em ambiente úmido e atmosfera de 5% de CO₂, para readaptação ao ambiente.

Uma placa controle (T0), para cada uma das culturas celulares, foi fixada através da adição de 50 μ L de uma solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 50% em cada poço para determinação da quantidade de células no momento da adição das amostras. Para a cultura de K-562 adicionaram-se 50 μ L de uma solução aquosa de TCA 80%.

Nas demais placas, foram adicionados 100 μ L das amostras nas diferentes concentrações (EEAL, FH, FD, FA e FM). O branco de cada amostra consistiu em 100 μ L da amostra e 100 μ L do meio de cultura. O controle negativo consistiu em 100 μ L da suspensão celular e 100 μ L de meio de cultura (viabilidade celular 100%). O controle positivo consistiu 100 μ L de suspensão celular e 100 μ L de diferentes concentrações de doxorrubicina. Como branco das leituras foi utilizado 200 μ L de meio de cultura, sem adição da suspensão celular.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A microplaca foi incubada a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido por 48 horas. Passado o período de incubação, as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm e adicionaram-se 50 µL de solução aquosa de TCA 50% ou TCA 80% (K-562). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C.

Depois de fixadas, as placas foram lavadas com água destilada para remoção do TCA, meio de cultura, SFB e amostras residuais. Após secagem à temperatura ambiente, adicionaram-se 50 µL do corante em todos os poços e as placas foram novamente incubadas a 4 °C por 30 minutos.

As placas foram novamente lavadas com uma solução aquosa de ácido acético 1%, o resíduo da solução de lavagem foi removido e realizou-se nova secagem à temperatura ambiente.

Adicionaram-se 150 µL de uma solução aquosa de Trizma base (10 µM, pH 10,5) em cada poço e as placas foram submetidas a ultra-som por 5 minutos. As absorbâncias foram medidas a 540 nm, comparativamente ao branco (meio de cultura).

4.12.2.6. Análise dos Resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias das amostras subtraídas de seus respectivos brancos. Os resultados obtidos foram analisados considerando-se:

- atividade proliferativa: $(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) > Abs_{controle}$;
- atividade citostática: $Abs_{controle} > (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \geq Abs_{T0}$;
- atividade citocida: $(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) < Abs_{T0}$;

Para amostras que apresentaram atividade citostática a porcentagem de inibição do crescimento (IC) foi calculada como média de três leituras por meio da fórmula:

$$IC = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco} - Abs_{T0}) \times 100}{(Abs_{controle} - Abs_{T0})}$$

Para amostras que apresentaram atividade citocida a IC foi calculada como média de três leituras por meio da fórmula:

$$IC = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco} - Abs_{T0}) \times 100}{(Abs_{T0})}$$

onde, $Abs_{amostra}$ = absorbância da amostra; Abs_{branco} = absorbância do branco de cada amostra; $Abs_{controle}$ = absorbância do controle; Abs_{T0} = absorbância do controle da placa T0 (dia da adição das amostras).

As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% de forma dose-dependente.

Para cada amostra e cada linhagem neoplásica foram determinadas faixas de concentração que promoveram inibição do crescimento de 50% (IC_{50}) inibição total do crescimento (ITC) e morte celular de 50% (DL_{50}).

4.13. Mutagenicidade – Teste de Ames

Empregou-se o Teste de Ames para avaliar o potencial mutagênico do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL).

O teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens mutantes de *Salmonella typhimurium* incapazes de crescerem na ausência de histidina. Na presença de substâncias mutagênicas, estas linhagens passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (ZEIGER, 2001).

A adição de enzimas metabolizadoras (Fração S9) obtidas de fígado de ratos visa promover a identificação de substâncias mutagênicas de ação indireta, que necessitam de metabolização para tornarem-se mutagênicas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

4.13.1. Preparo dos Meios de Cultura

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983).

O caldo nutriente foi preparado solubilizando-se 0,75 g de caldo em 30 mL de água.

O ágar glicose foi prepara com a solubilização de 20 g de glicose e 15 g de Bacto ágar em 980 mL de água destilada. O Meio Vogel Bonner foi preparado

acrescentando-se 1,0 g de sulfato de magnésio heptaidratado, 10,0 g de ácido cítrico, 17,5 g de fosfato de sódio e amônio e 50,0 g de fosfato de potássio dibásico a 67 mL de água aquecida a 45 °C.

O ágar mínimo glicosado (AMG) usado nos ensaios foi preparado misturando-se 980 mL de ágar glicose e 20 mL de meio Vogel Bonner.

O ágar de superfície (top-ágar) foi preparado adicionando-se 0,5 g de cloreto de sódio e 0,6 g de Bacto ágar a 100 mL de água destilada. A esta mistura acrescentou-se 10 mL de solução aquosa de L-histidina (960 µg/mL) e D-biotina (123 µg/mL).

Os meios de cultura preparados foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

4.13.2. Preparo da Fração S9

Em recipiente mantido em banho de gelo, misturou-se 19,75 mL de água estéril, 25 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4), 2 mL de solução aquosa de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADP) 0,1 M (76,54 mg/mL), 250 µL de solução aquosa de D-glicose-6-fosfato 1 M (282,1 mg/mL), 500 µL de solução aquosa de cloreto de magnésio 0,4 M (81,3 mg de cloreto de magnésio hexaidratado/mL), 500 µL de solução aquosa de cloreto de potássio 1,65 M (123 mg/mL) e a fração S9 diluída em 2 mL de água estéril.

A fração foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio, preparada sempre imediatamente antes do uso e utilizada por um período não excedente a 3 horas do preparo.

4.13.3. Preparo das Amostras

O DMSO foi empregado na solubilização de todas as amostras. O EEAL foi solubilizado até o limite de solubilidade (200 mg/mL).

Para os ensaios sem ativação metabólica, foram utilizados como controles positivos a 4-nitro-1,2-fenilenodiamina (NPD) (100 µg/mL) para as linhagens TA97a e TA98, azida sódica (12,5 µg/mL) para a linhagem TA100 e daunomicina (30 µg/mL) para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado a 2-antramina (12,5 µg/mL) para todas as linhagens.

4.13.4. Preparo dos Inóculos

Foram utilizadas as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (SANTOS et al., 2006).

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade de cultura de estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente e incubada a 37 °C,

por 12 a 16 horas, em banho-maria sob agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

4.13.5. Ensaio

Foram testadas 5 diferentes concentrações de EEAL: 20 mg/placa, 15 mg/placa, 10 mg/placa, 5 mg/placa e 2,5 mg/placa. Em tubos de ensaio, diferentes concentrações de EEAL, de DMSO (100 μ L) ou de soluções dos controles positivos (100 μ L) foram misturados a 500 μ L de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) e 100 μ L de cultura bacteriana. Os tubos foram incubados por 20-30 minutos a 37 °C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 500 μ L da fração S9.

Após a incubação, adicionaram-se em cada tubo 2 mL de top-ágar, contendo traços de L-histidina e D-biotina. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo AMG. Após solidificação do top-ágar, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C.

Realizou-se então a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.13.6. Análise dos Resultados

Os dados da mutagenicidade foram analisados pelo programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, na Carolina do Norte, por intermédio da Dra. Maria Inês Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise da variância (ANOVA) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. Para a análise subsequente dos dados foi selecionado o modelo Bernstein (Bernstein et al, 1982).

Além da análise de variância foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste dividido pela média do número de revertentes na placa do controle negativo (reversões espontâneas).

As amostras foram consideradas mutagênicas quando a RM foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose-resposta entre as doses testadas e o número de revertentes induzidos.

Os resultados foram considerados negativos quando as amostras não induziram aumento significativo no número de revertentes, comparativamente ao controle e as RM foram todas menores que 2.

Quando houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle negativo, mas a RM foi menor que 2, as amostras foram consideradas como causadoras de indícios de mutagenicidade. Isso significa dizer

que a amostra apresenta capacidade de ocasionar danos ao DNA, mas nas condições empregadas, sua mutagenicidade não foi efetiva.

Resultados

Não entendo. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, do modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um simples de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo.

Clarice Lispector

5. RESULTADOS

5.1. Análise Fitoquímica da Fração de Hexano (FH)

5.1.1. Análise Espectrométrica de RMN e de Massas de FH2-42, FH2-48, FH3-18, FH3-20, FH4-13 e FH4-16

Através da análise dos dados obtidos nos espectros de massas, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura foram identificadas a β -amirina e o lupeol em mistura (FH2-42), o β -sitosterol (FH2-48), o ácido oleanólico (FH3-18), o ácido ursólico (FH3-20), o ácido maslínico (FH4-13) e o ácido corosólico (FH4-16). As estruturas das substâncias identificadas podem ser observadas nas figuras 10 e 11 e os espectros de RMN de ^{13}C nas figuras 12 a 17. Os dados de deslocamentos químicos obtidos estão expressos nas Tabelas 14-17.

O cromatograma à gás da fração FH2-42 pode ser observado na figura 18, apresentando dois picos (1 e 2) de maior abundância. Nas figuras seguintes observam-se os espectros de massas e respectivas propostas de fragmentos dos picos observados.

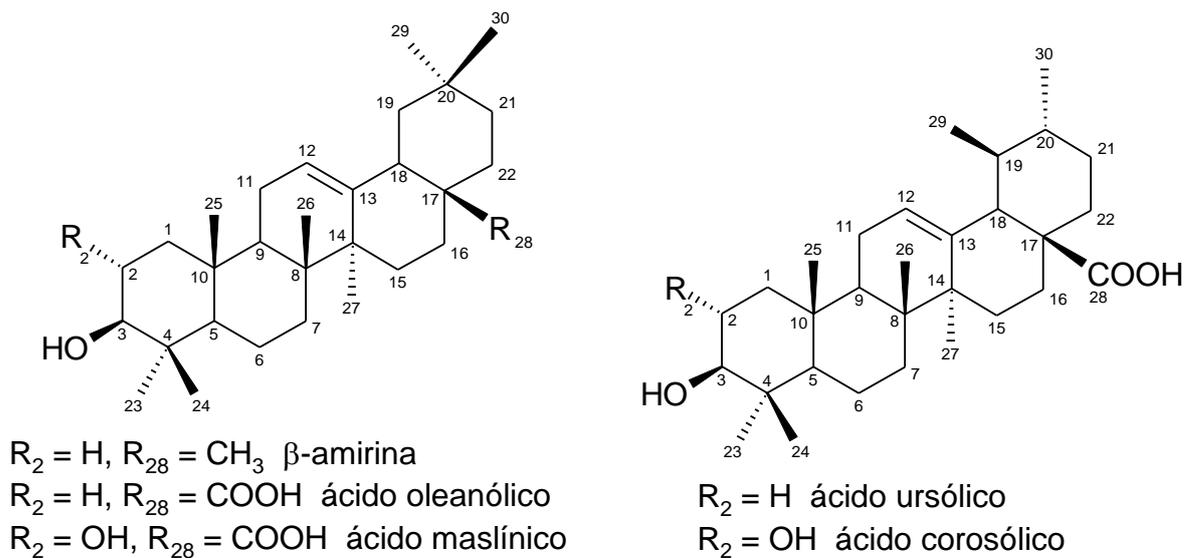


Figura 10. Estruturas da β -amirina (FH2-42), do ácido oleanólico (FH3-18), do ácido maslínico (FH4-13), do ácido ursólico (FH3-20) e do ácido corosólico (FH4-16) identificados na fração hexano de *Plinia edulis*.

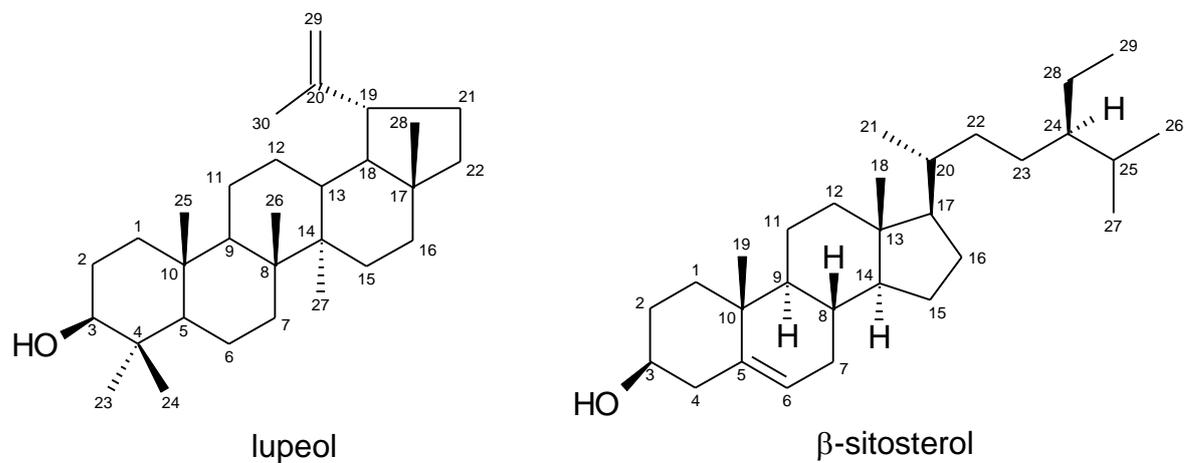


Figura 11. Estruturas do lupeol (FH2-42) e do β -sitosterol (FH2-48) identificados na fração hexano de *Plinia edulis*.

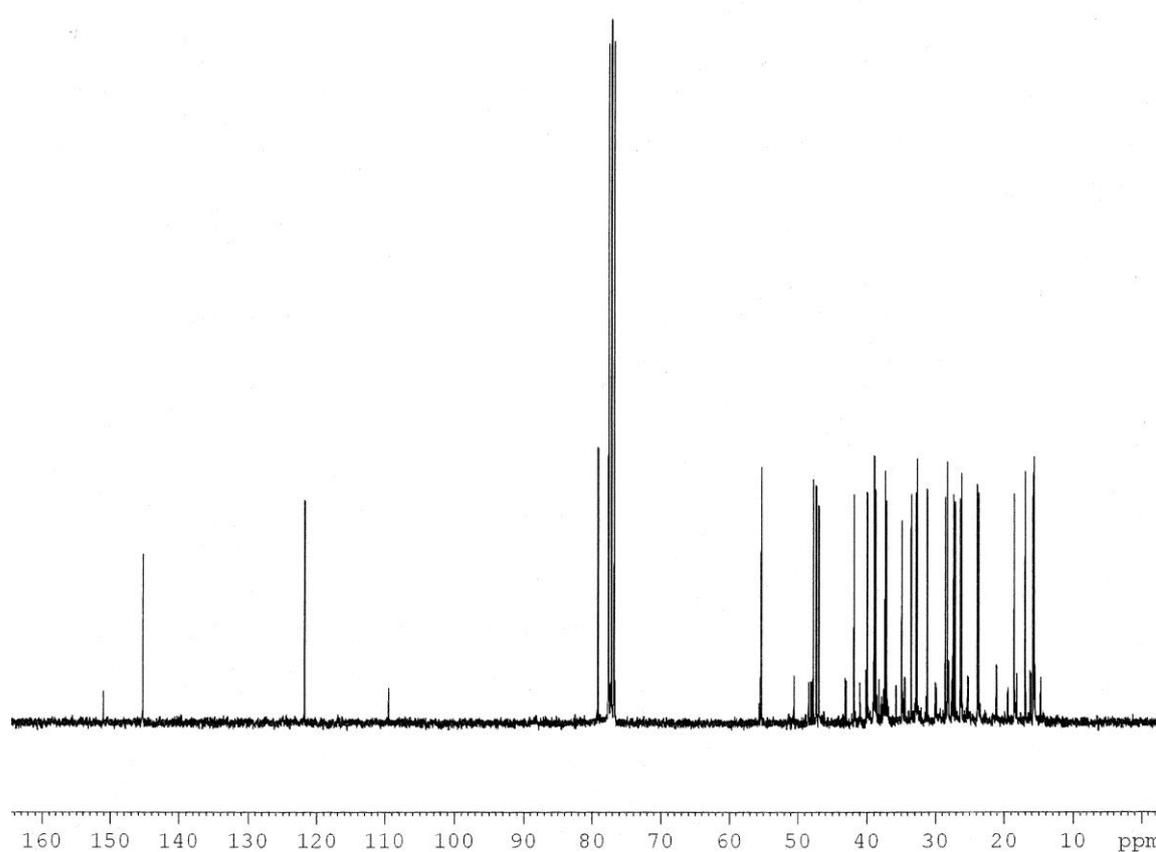


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) da fração FH2-42 de *Plinia edulis*.

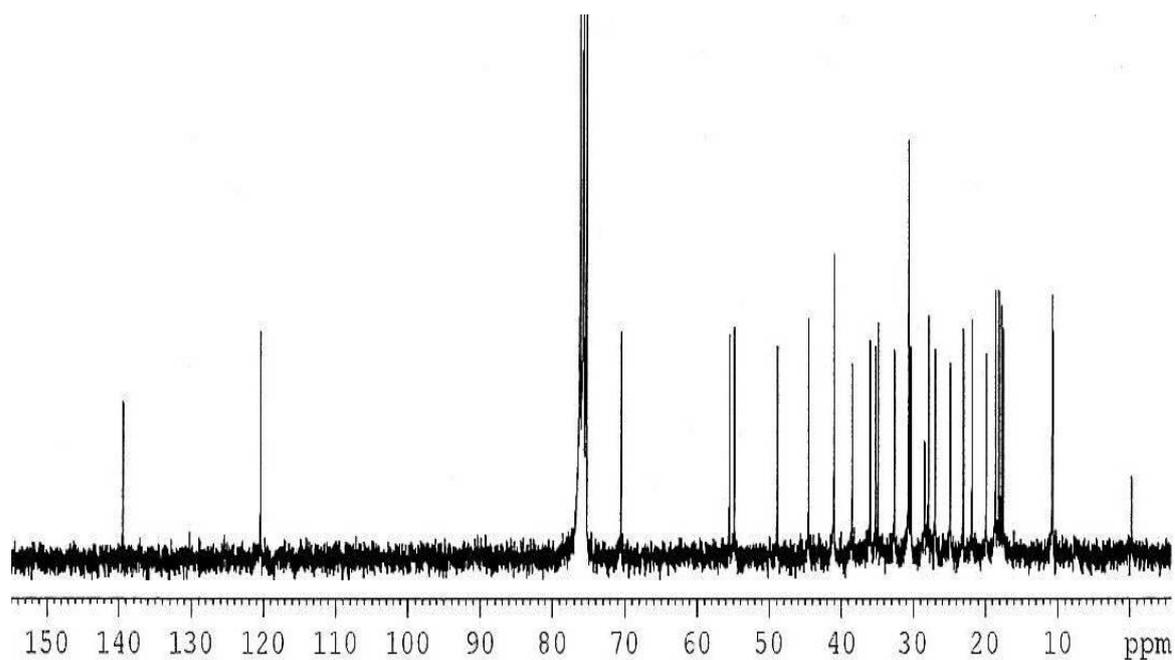


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) da fração FH2-48 de *Plinia edulis*.

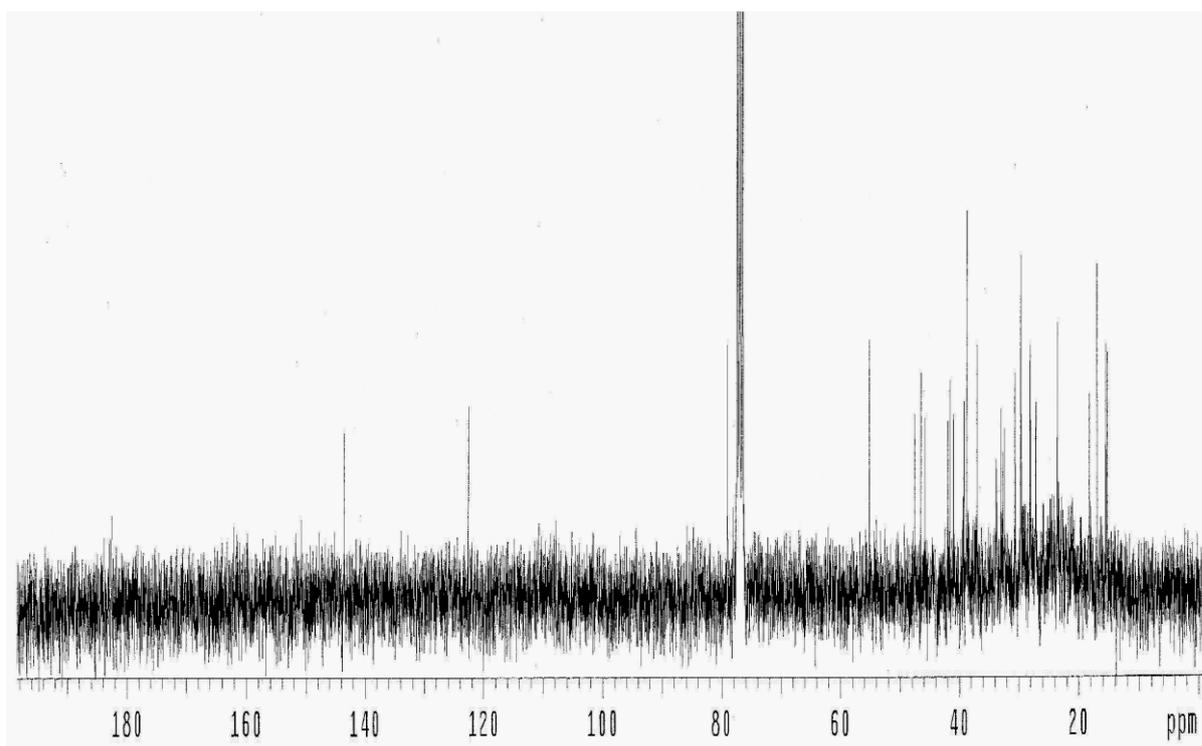


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) da fração FH3-18 de *Plinia edulis*.

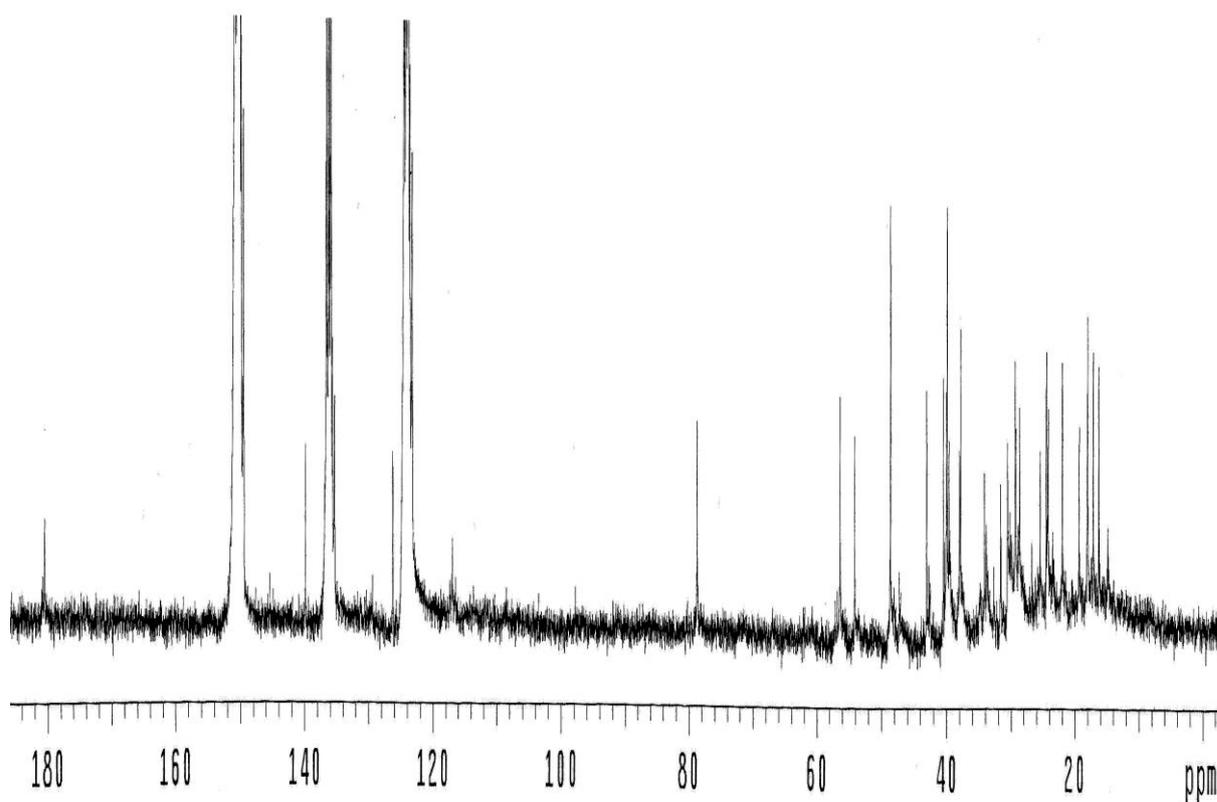


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; piridina- d_5) da fração FH3-20 de *Plinia edulis*.

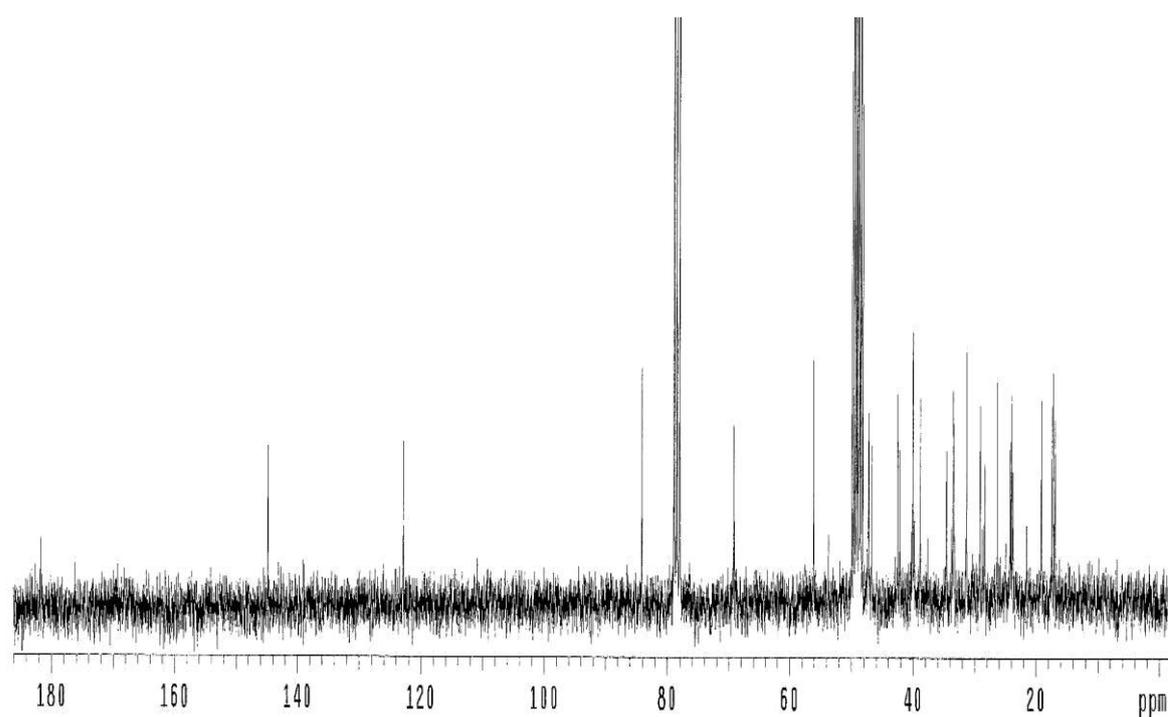


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3 e CD_3OD) da fração FH4-13 de *Plinia edulis*.

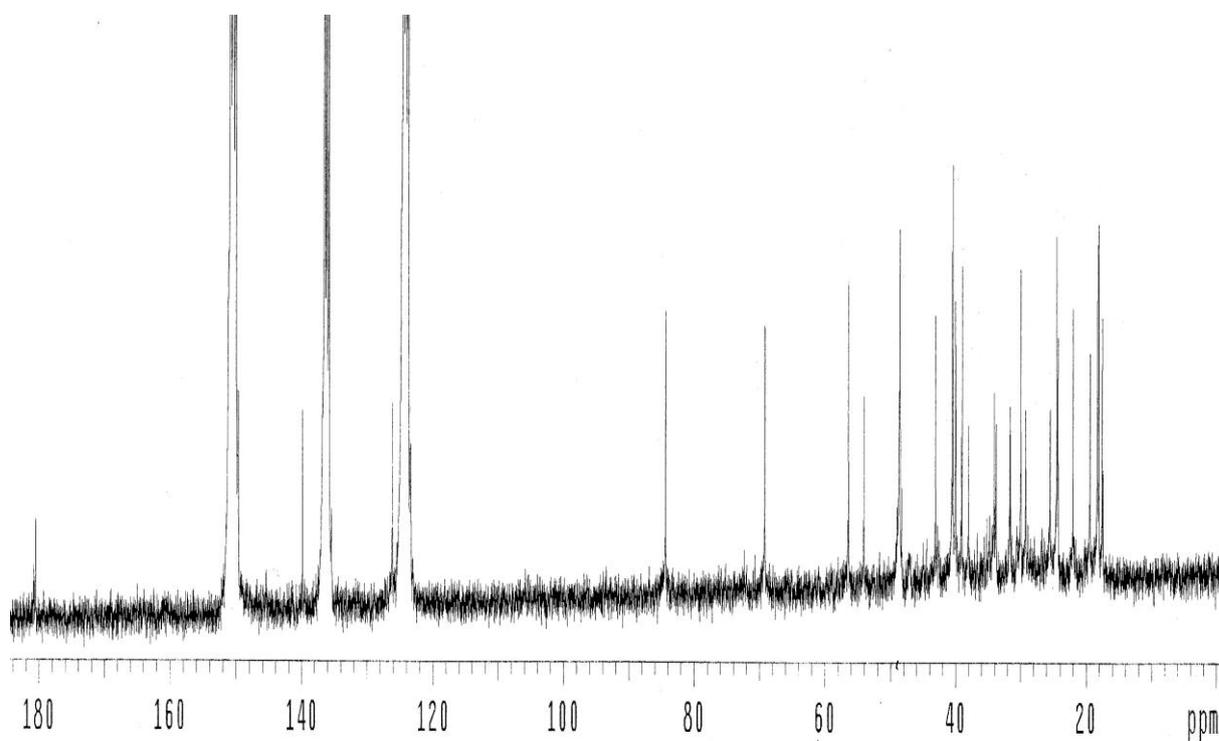


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; piridina- d_5) da fração FH4-16 de *Plinia edulis*.

Tabela 14. Dados (ppm) do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) da fração FH2-42 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	FH2-42	β -amirina		lupeol
		(MAHATO; KUNDU, 1994)	FH2-42	(MAHATO; KUNDU, 1994)
1	38,8	38,7	38,7	38,7
2	27,4	27,3	27,4	27,4
3	79,0	79,0	78,9	78,9
4	38,8	38,8	38,8	38,8
5	55,3	55,3	55,3	55,3
6	18,4	18,5	18,3	18,3
7	32,6	32,8	34,2	34,2
8	38,8	38,8	40,8	40,8
9	47,6	47,7	50,4	50,4
10	37,7	37,6	37,3	37,1
11	23,7	23,6	20,9	20,9
12	121,7	121,8	25,1	25,1
13	145,2	145,1	38,0	38,0
14	41,7	41,8	42,8	42,8
15	26,1	26,2	27,3	27,4
16	26,9	27,0	35,5	35,5
17	32,5	32,5	42,9	43,0
18	47,2	47,4	48,2	48,2
19	46,8	46,9	47,9	47,9
20	31,1	31,1	150,8	150,9
21	34,7	34,8	29,8	29,8
22	37,1	37,2	39,9	40,0
23	28,1	28,2	28,0	28,0
24	15,5	15,5	15,3	15,4
25	15,6	15,6	16,1	16,1
26	16,8	16,9	15,9	15,9
27	26,0	26,0	14,5	14,5
28	28,4	28,4	18,0	18,0
29	33,3	33,3	109,3	109,3
30	23,7	23,7	19,3	19,3

Tabela 15. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) das frações FH2-48 e FH3-18 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	FH2-48	β -sitosterol (KOVGANKO; KASHKAN; BORISOV 2000)	FH3-18	ácido oleanólico (MAHATO; KUNDU, 1994)
1	37,3	37,3	38,7	38,5
2	31,7	31,6	27,7	27,4
3	71,8	71,8	79,0	78,7
4	42,3	42,3	38,7	38,7
5	140,8	140,8	55,2	55,2
6	121,7	121,7	18,3	18,3
7	31,9	32,1	33,0	32,6
8	31,9	32,1	39,3	39,3
9	50,1	50,2	47,9	47,6
10	36,5	36,5	37,0	37,0
11	21,1	21,1	23,6	23,1
12	39,8	39,8	122,6	122,1
13	42,1	42,3	143,6	143,4
14	56,8	56,8	41,6	41,6
15	24,3	24,3	28,1	27,7
16	28,2	28,3	23,6	23,4
17	56,1	56,1	46,5	46,6
18	11,9	12,0	41,0	41,3
19	19,3	19,1	45,9	45,8
20	36,1	36,2	30,7	30,6
21	18,8	18,8	33,8	33,8
22	33,9	34,0	32,4	32,3
23	26,0	26,2	29,7	28,1
24	45,8	45,2	15,5	15,6
25	29,1	29,2	15,3	15,3
26	19,0	18,9	17,0	16,8
27	19,3	19,1	25,9	26,0
28	23,1	23,1	182,6	181,0
29	11,8	11,9	32,6	33,1
30			23,6	23,6

Tabela 16. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz) das frações FH3-20 (em piridina- d_5) e FH4-13 (em CD_3OD e CDCl_3) de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	FH3-20	ácido ursólico (SEEBACHER et al., 2003)	FH4-13	ácido maslínico (TANAKA; VIDOTTI; SILVA, 2003)
1	39,2	39,2	48,1	48,1
2	28,2	28,2	69,1	69,5
3	78,2	78,2	84,1	84,5
4	39,6	39,6	40,1	40,5
5	55,9	55,9	56,1	56,7
6	18,9	18,8	19,1	19,5
7	33,6	33,7	33,5	33,9
8	40,0	40,1	38,8	39,2
9	48,1	48,1	<i>n.o.</i>	49,0
10	37,4	37,5	38,8	39,2
11	23,7	23,7	24,0	24,0
12	125,7	125,7	122,8	123,6
13	139,3	139,3	144,8	145,5
14	42,6	42,6	42,1	42,6
15	28,9	28,8	28,4	28,8
16	25,0	25,0	24,0	24,0
17	48,1	48,1	47,3	47,7
18	53,6	53,6	42,5	42,7
19	39,6	39,5	47,2	47,2
20	39,4	39,4	31,3	31,6
21	31,1	31,1	34,6	34,9
22	37,3	37,4	33,4	33,8
23	28,9	28,8	29,1	29,3
24	16,6	16,5	17,0	17,0
25	15,7	15,7	17,2	17,1
26	17,6	17,5	17,4	17,4
27	24,0	24,0	23,9	23,9
28	179,7	179,7	181,7	180,0
29	17,5	17,5	33,3	33,5
30	21,5	21,4	23,9	23,9

n.o.: não observado devido aos sinais do solvente (CD_3OD).

Tabela 17. Dados (ppm) do espectro de RMN de ^{13}C (75,5 MHz; piridina- d_5) da fração FH4-16 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	FH4-16	ácido corosólico (WEN et al., 2005)
1	48,0	48,0
2	68,6	68,6
3	83,8	83,8
4	39,8	39,8
5	55,9	55,9
6	18,8	18,9
7	33,2	33,5
8	40,0	40,1
9	47,7	47,5
10	38,4	38,5
11	23,9	23,8
12	125,5	125,5
13	139,3	139,3
14	42,5	42,6
15	28,8	28,7
16	24,9	24,9
17	48,0	48,1
18	53,5	53,6
19	39,4	39,4
20	39,5	39,5
21	30,9	31,1
22	37,4	37,5
23	29,3	29,4
24	17,6	17,7
25	16,9	17,0
26	17,4	17,5
27	23,9	23,9
28	179,9	179,9
29	21,4	21,4
30	17,4	17,5

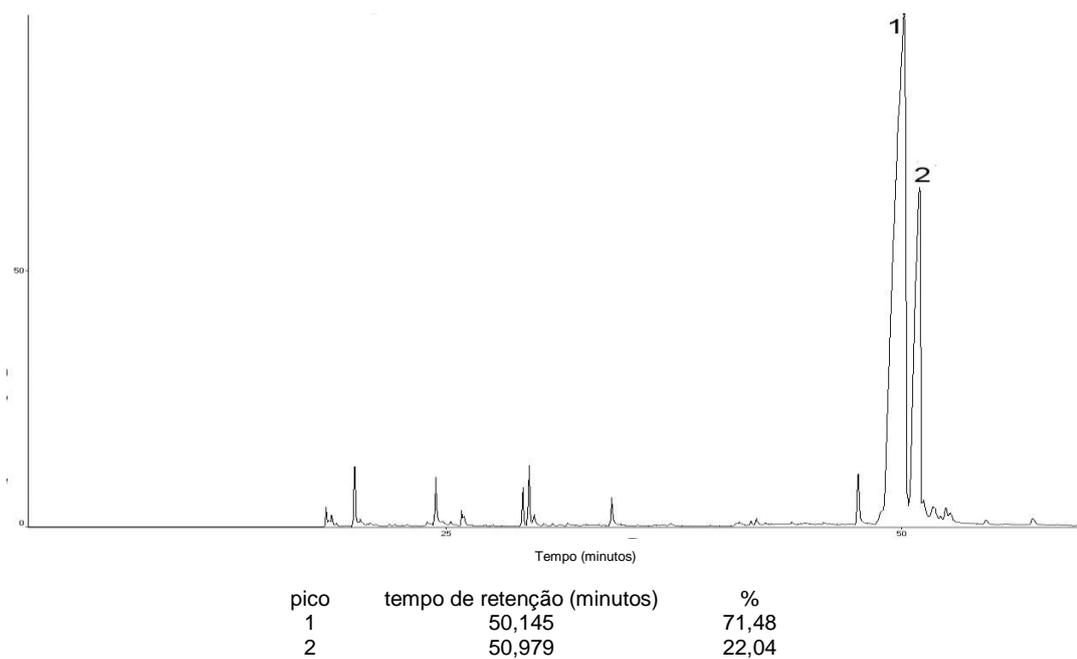


Figura 18. Cromatograma à gás da fração FH2-42 de *Plinia edulis*.

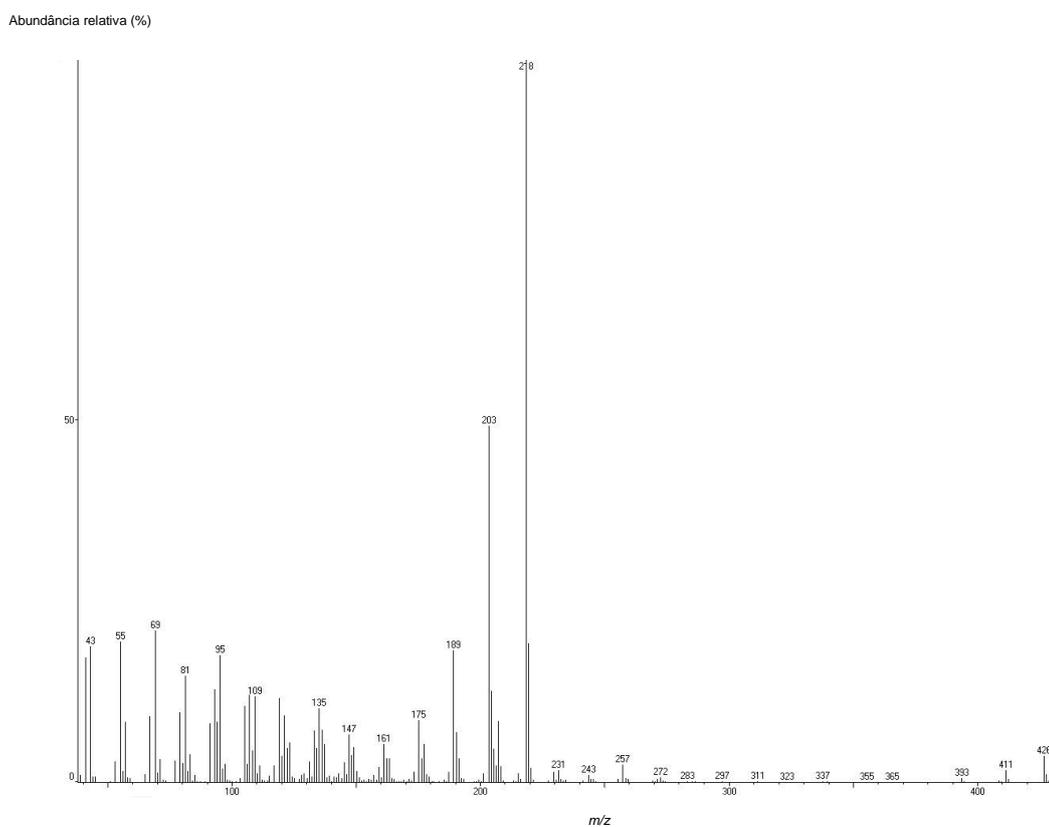


Figura 19. Espectro de massas por impacto eletrônico (70 eV) do pico 1 do cromatograma à gás da fração FH2-42 de *Plinia edulis*.

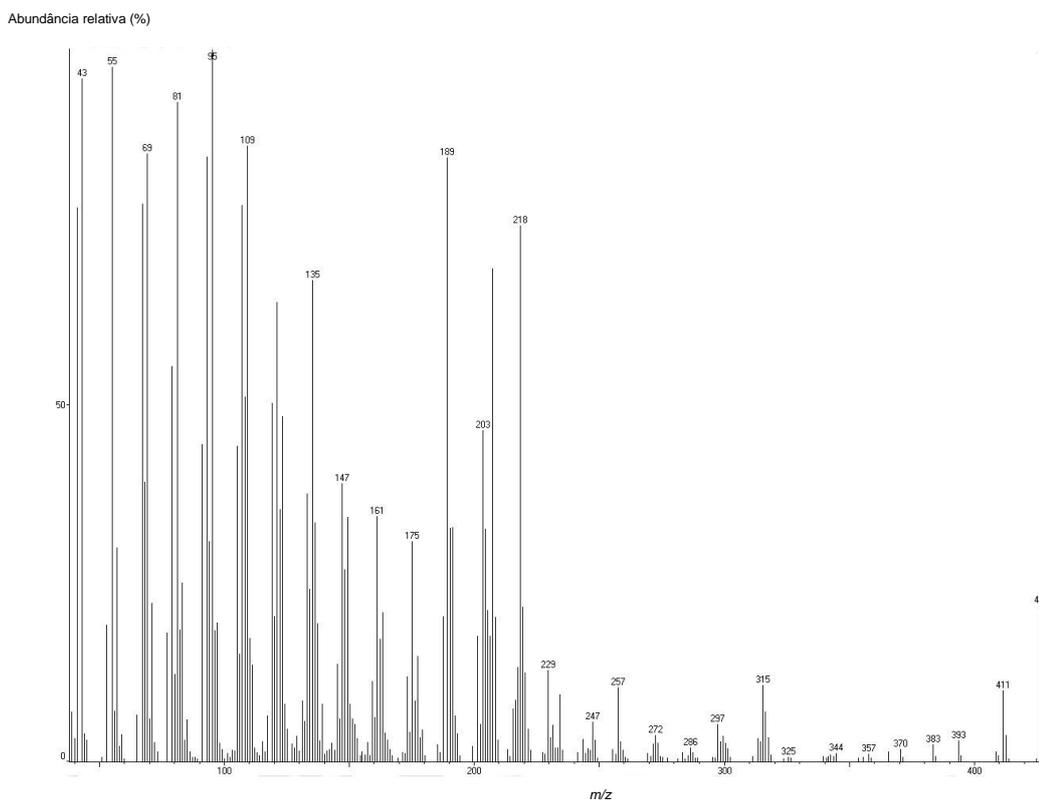


Figura 20. Espectro de massas por impacto eletrônico (70 eV) do pico 2 do cromatograma à gás da fração FH2-42 de *Plinia edulis*.

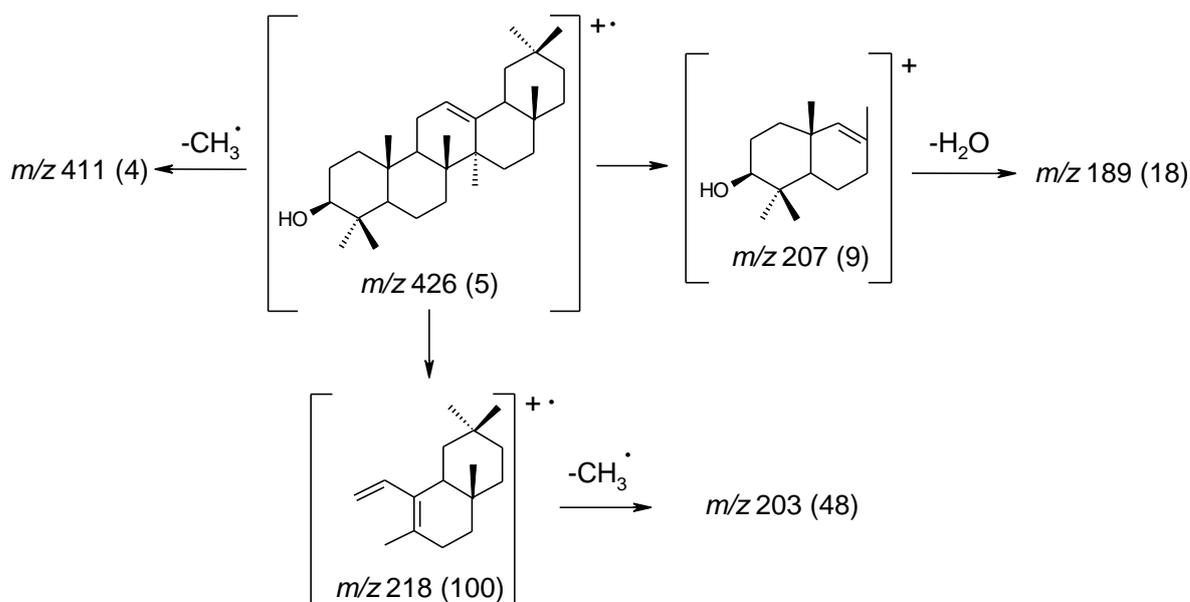


Figura 21. Proposta de fragmentação do pico 1 do cromatograma à gás da fração FH2-42 de *Plinia edulis*. Relação massa/carga (m/z) seguida da intensidade relativa em porcentagem, entre parênteses (ASSIMOPOULOU; PAPAGEORGIU, 2005).

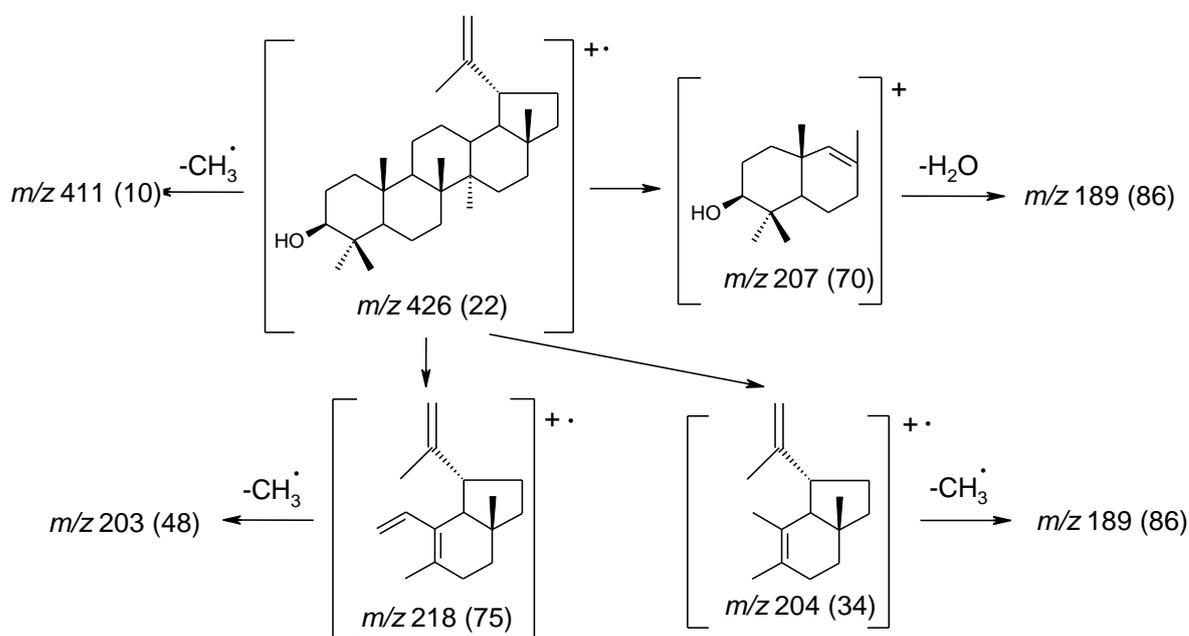


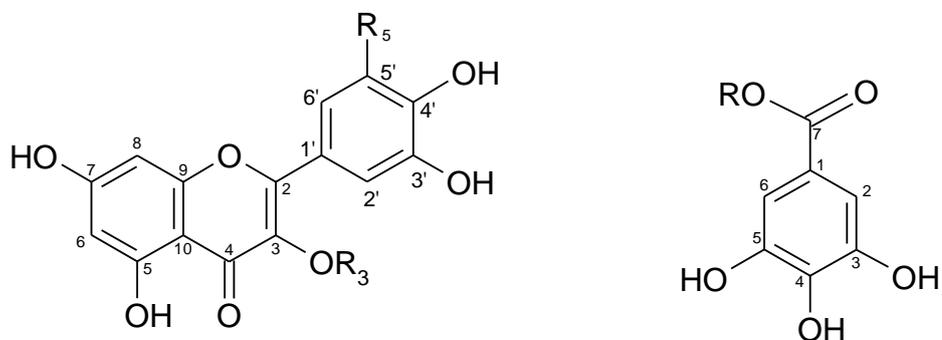
Figura 22. Proposta de fragmentação do pico 2 do cromatograma à gás da fração FH2-42 de *Plinia edulis*. Relação massa/carga (m/z) seguida da intensidade relativa em porcentagem, entre parênteses (HEINZEN et al., 1996).

5.2. Análise Fitoquímica da Fração de Acetato de Etila (FA)

5.2.1. Análise Espectrométrica de RMN de FA-57, FA-66, FA-80, FA-90 e FA-147

Através da análise dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura foram identificados o galato de etila (FA-57), o ácido gálico (FA-66), a quercitrina (FA-80), a miricitrina (FA-90) e a quercetina (FA-147). As estruturas das substâncias identificadas podem ser observadas na figura 23 e os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C nas figuras

24 a 28. Os dados de deslocamentos químicos obtidos estão expressos nas Tabelas 18-22.



$R_3 = H, R_5 = H$ quercetina
 $R_3 = \text{ramnose}, R_5 = H$ quercitrina
 $R_3 = \text{ramnose}, R_5 = OH$ miricitrina

$R = H$ ácido gálico
 $R = CH_2CH_3$ galato de etila

Figura 23. Estruturas do galato de etila (FA-57), do ácido gálico (FA-66), da quercitrina (FA-80), da miricitrina (FA-90) e da quercetina (FA-147) identificados na fração de acetato de etila de *Plinia edulis*.

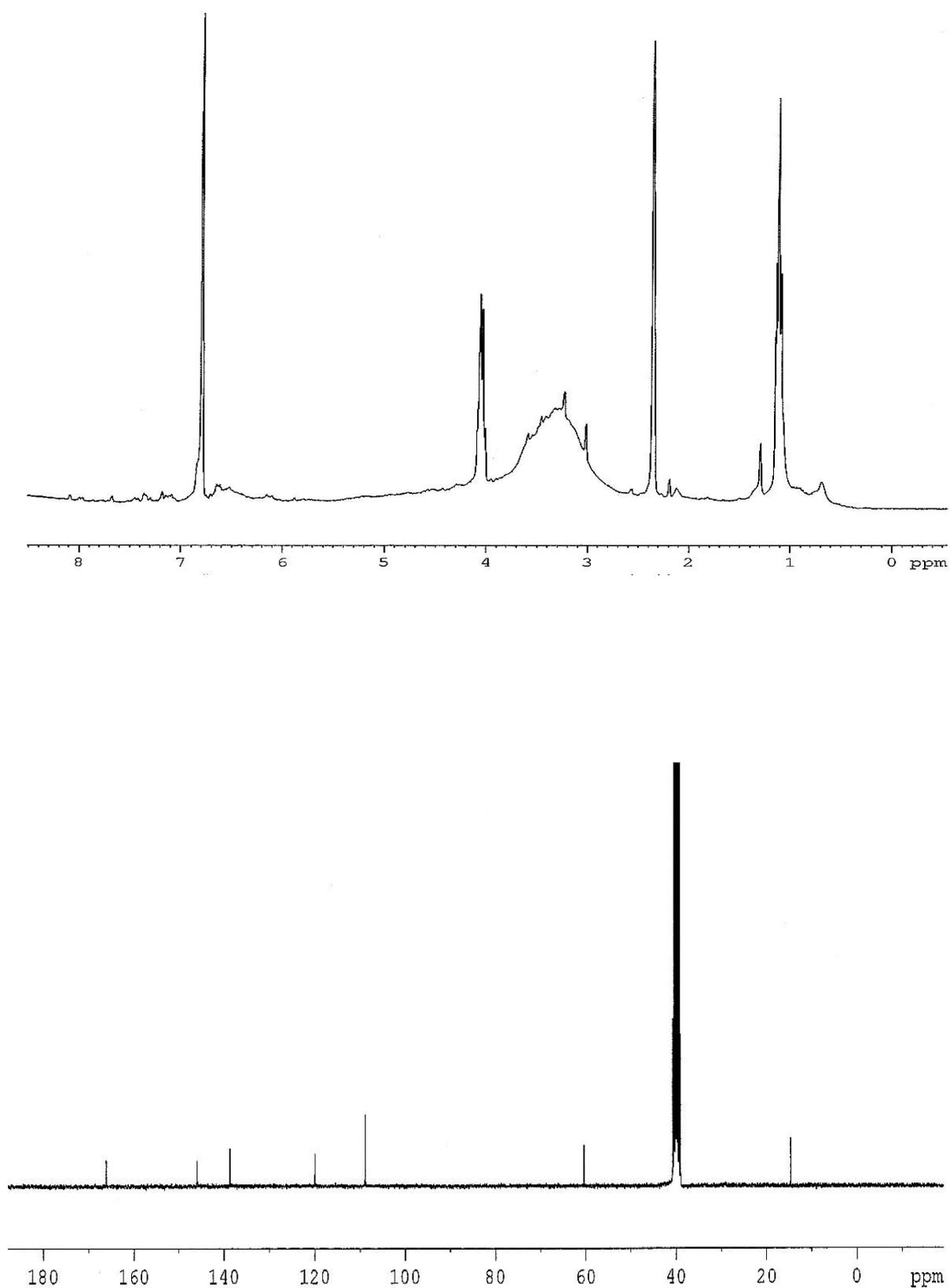


Figura 24. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ da fração FAP-57 de *Plinia edulis*.

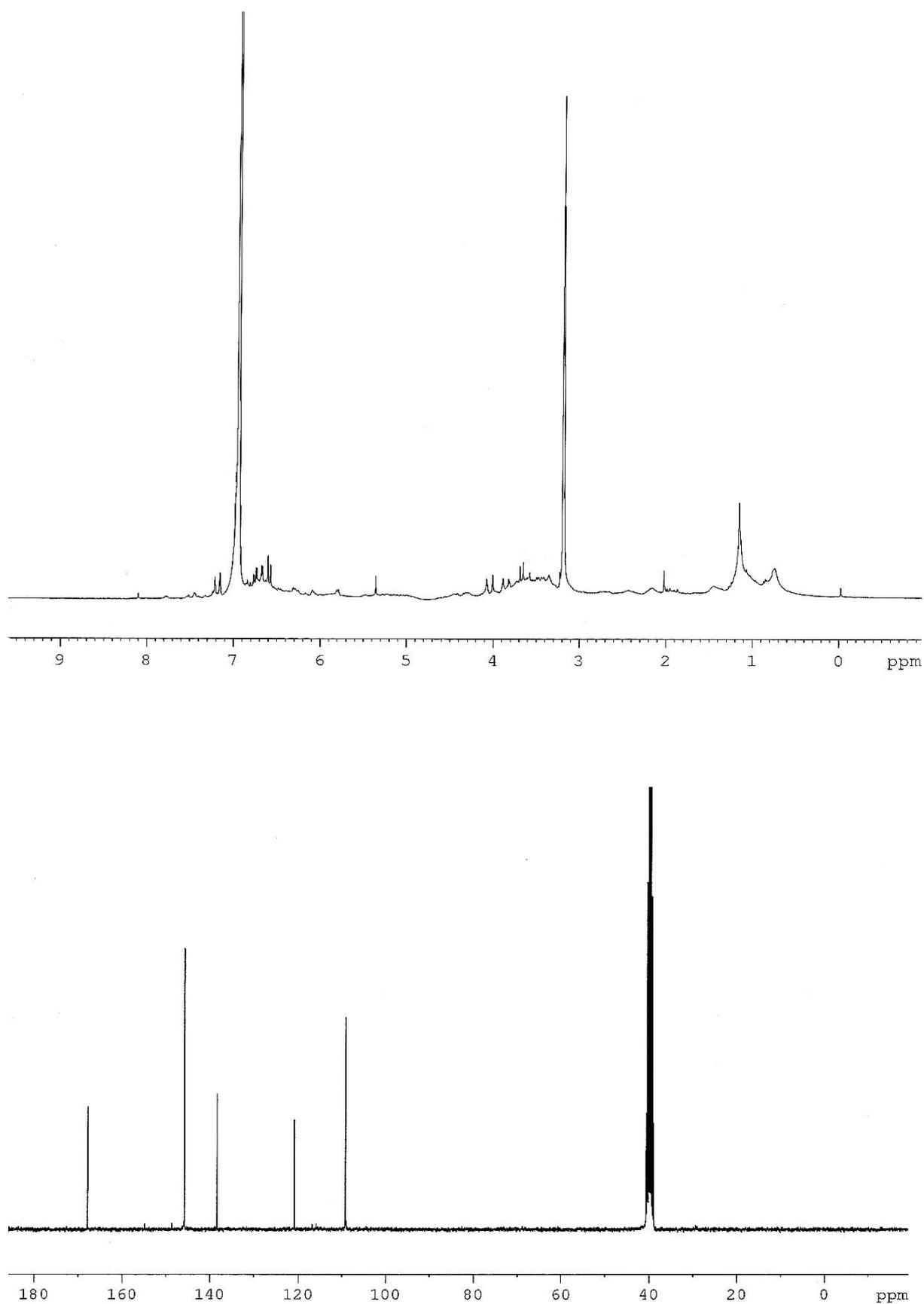


Figura 25. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ da fração FAP-66 de *Plinia edulis*.

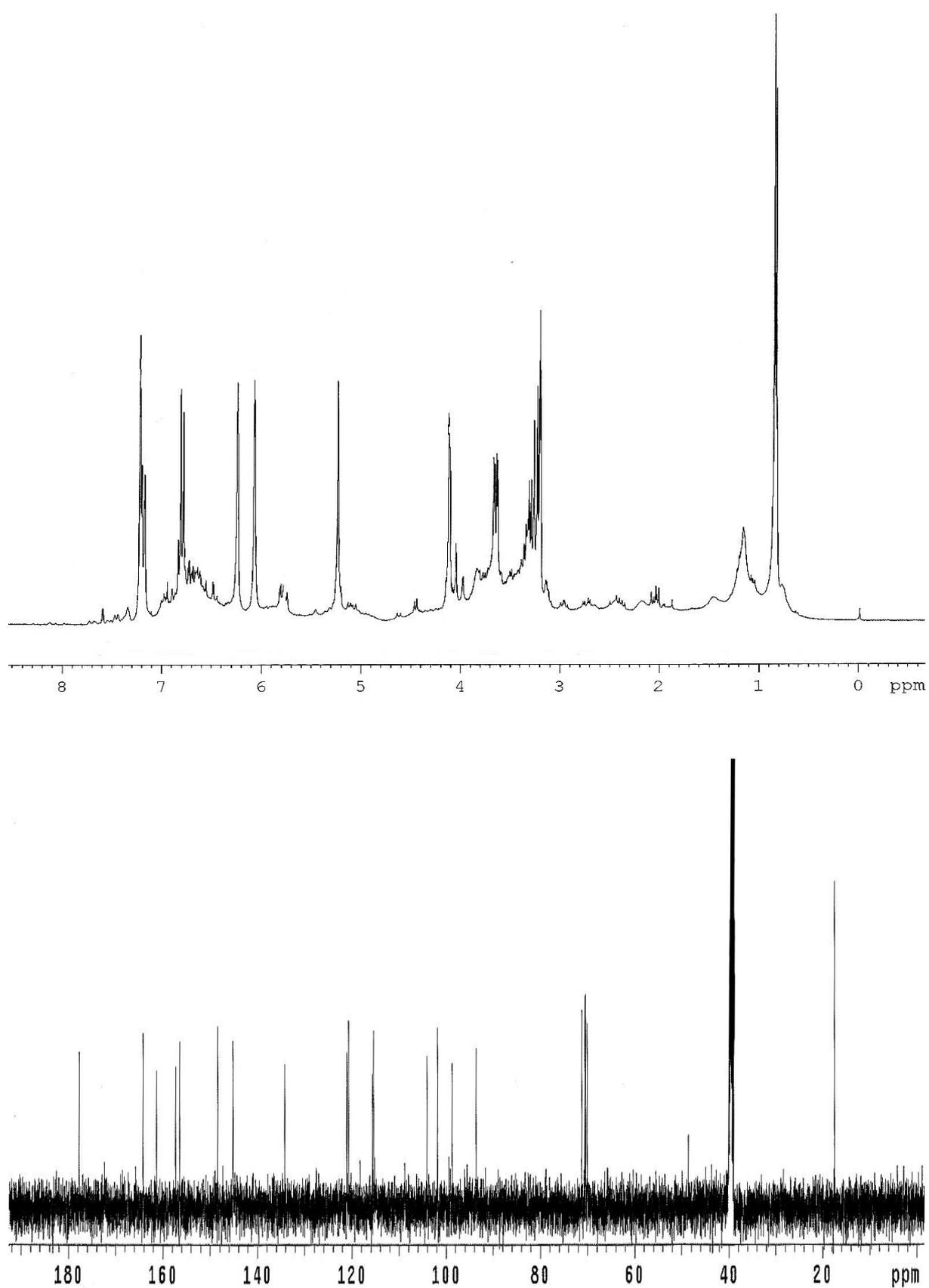


Figura 26. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ da fração FAP-80 de *Plinia edulis*.

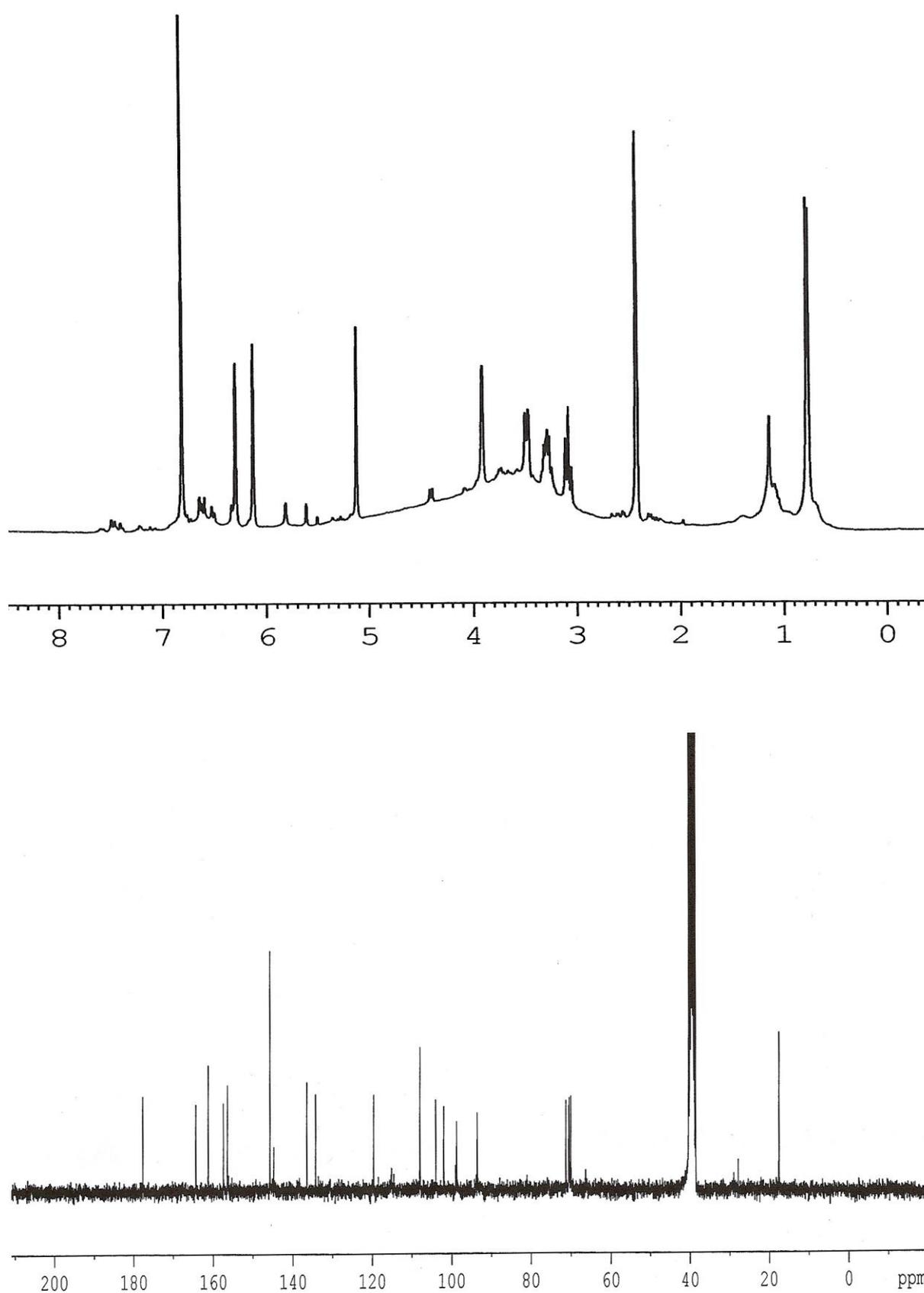


Figura 27. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ da fração FAP-90 de *Plinia edulis*.

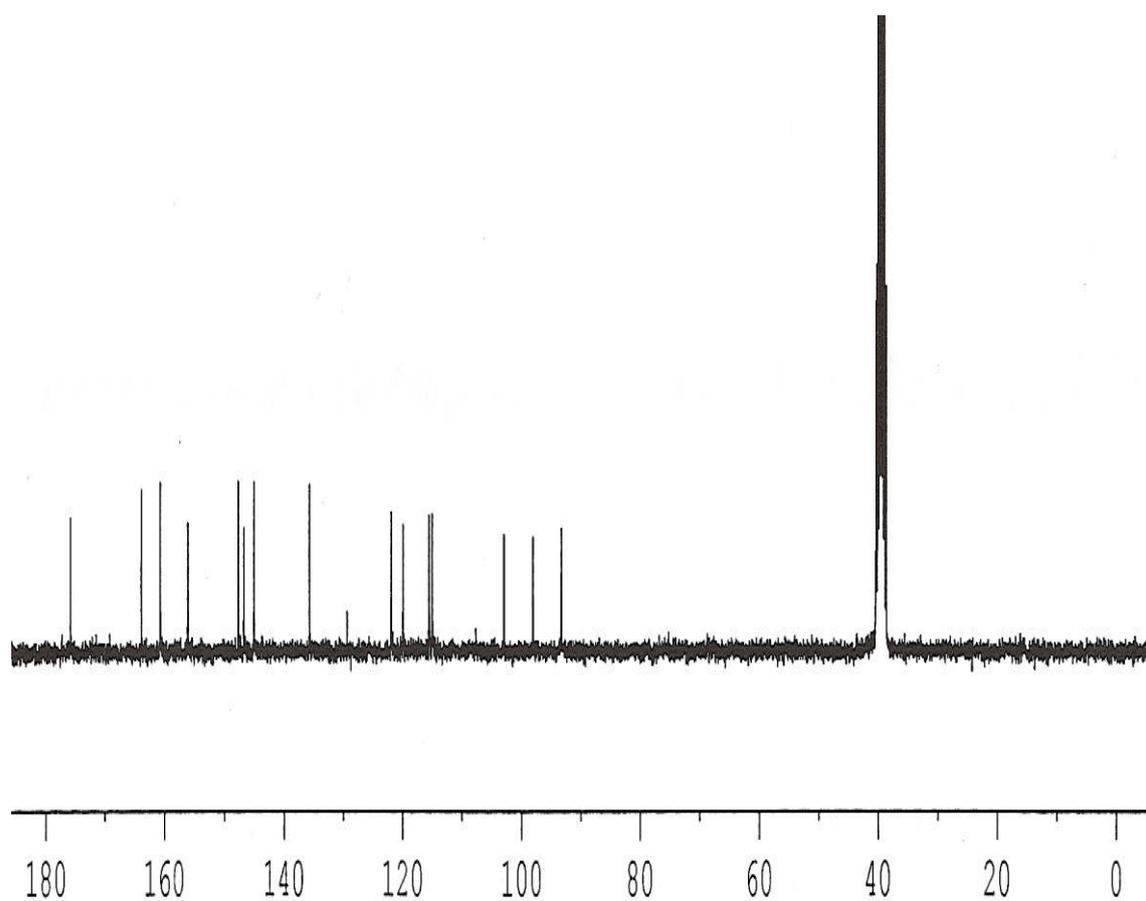
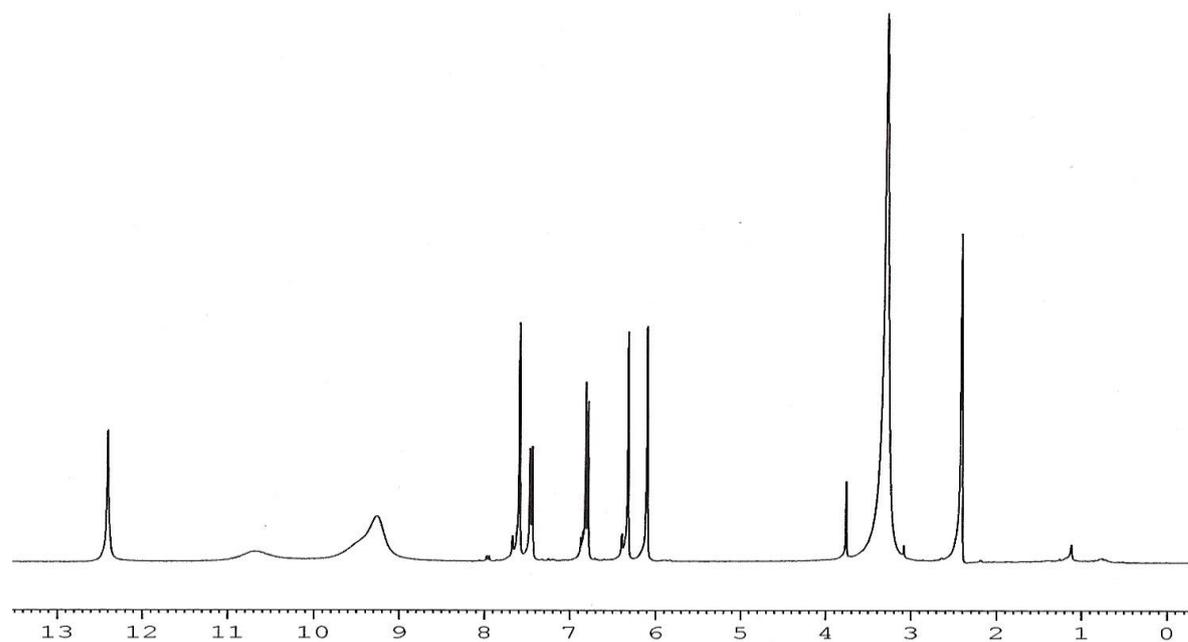


Figura 28. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ da fração FAP-147 de *Plinia edulis*.

Tabela 18. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em DMSO- d_6 da fração FAP-57 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	^1H FAP-57*	galato de etila (CERUKS et al., 2007)	^{13}C FAP-57	galato de etila (CERUKS et al., 2007)
1	-	-	120,0	119,4
2	6,80 s	6,92 s	109,0	108,6
3	-	-	146,0	145,6
4	-	-	138,8	138,4
5	-	-	146,0	145,6
6	6,80 s	6,92 s	109,0	108,6
7	-	-	166,3	166,4
8	4,06 q (7,0)	4,18 q (7,2)	60,5	60,0
9	1,12 t (7,0)	1,25 t (7,2)	14,7	14,3

* δ_{H} multiplicidade (J em Hz); s = singlete; t = tripleto; q = quarteto.

Tabela 19. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em DMSO- d_6 da fração FAP-66 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	^1H FAP-66*	ácido gálico (ALMEIDA, S. et al., 2005)	^{13}C FAP-66	ácido gálico (ALMEIDA, S. et al., 2005)
1	-	-	120,9	120,7
2	6,78 s	7,08 s	109,2	109,1
3	-	-	145,9	145,1
4	-	-	138,5	138,3
5	-	-	145,9	145,1
6	6,78 s	7,08 s	109,2	109,1
7	-	-	168,0	169,1

* δ_{H} multiplicidade (J em Hz); s = singlete.

Tabela 20. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em DMSO- d_6 da fração FAP-80 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	^1H FAP-80*	quercitrina (BILIA et al., 1996)	^{13}C FAP-80	quercitrina (BILIA et al., 1996)
2	-	-	156,5	156,4
3	-	-	134,3	134,4
4	-	-	177,8	177,7
5	-	-	157,3	157,0
6	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,20 <i>d</i> (2,1)	98,7	98,6
7	-	-	164,2	164,0
8	6,38 <i>d</i> (2,0)	6,36 <i>d</i> (2,1)	93,6	93,5
9	-	-	161,3	161,2
10	-	-	104,1	104,2
1'	-	-	120,8	120,3
2'	7,29 <i>d</i> (2,0)	7,33 <i>d</i> (2,1)	115,5	115,4
3'	-	-	145,2	145,1
4'	-	-	148,5	148,3
5'	6,86 <i>d</i> (8,5)	6,93 <i>d</i> (8,3)	115,7	115,8
6'	7,24 <i>dd</i> (2,0; 8,5)	7,30 <i>dd</i> (2,1; 8,3)	121,1	121,0
ramnose				
1''	5,25 <i>d</i> (1,5)	5,35 <i>d</i> (1,8)	101,9	101,9
2''	3,15 - 3,97 <i>m</i>	3,20 - 3,82 <i>m</i>	70,4	70,4
3''	3,15 - 3,97 <i>m</i>	3,20 - 3,82 <i>m</i>	70,6	70,6
4''	3,15 - 3,97 <i>m</i>	3,20 - 3,82 <i>m</i>	71,2	71,5
5''	3,15 - 3,97 <i>m</i>	3,20 - 3,82 <i>m</i>	70,1	70,1
6''	0,82 <i>d</i> (6,0)	0,95 <i>d</i> (6,2)	17,5	17,3

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); *d* = dubleto; *dd* = duplo dubleto; *m* = multipleteo.

Tabela 21. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em DMSO- d_6 da fração FAP-90 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	^1H FAP-90*	miricitrina (BRACA et al., 2003)	^{13}C FAP-90	miricitrina (BRACA et al., 2003)
2	-	-	156,5	158,2
3	-	-	134,3	134,4
4	-	-	177,8	178,0
5	-	-	161,3	163,2
6	6,18 <i>d</i> (2,0)	6,12 <i>d</i> (2,0)	98,8	99,6
7	-	-	164,4	165,4
8	6,35 <i>d</i> (2,0)	6,38 <i>d</i> (2,0)	93,6	94,5
9	-	-	157,5	157,5
10	-	-	104,0	105,2
1'	-	-	119,6	121,7
2'	6,86 <i>s</i>	7,08 <i>s</i>	107,9	109,4
3'	-	-	145,8	146,8
4'	-	-	136,5	137,2
5'	-	-	145,8	146,8
6'	6,86 <i>s</i>	7,08 <i>s</i>	107,9	109,4
ramnose				
1''	5,17 <i>d</i> (1,5)	5,32 <i>d</i> (1,8)	102,0	102,4
2''	3,13 - 3,96 <i>m</i>	3,27 - 3,89 <i>m</i>	70,4	70,8
3''	3,13 - 3,96 <i>m</i>	3,27 - 3,89 <i>m</i>	70,6	71,0
4''	3,13 - 3,96 <i>m</i>	3,27 - 3,89 <i>m</i>	71,3	71,8
5''	3,13 - 3,96 <i>m</i>	3,27 - 3,89 <i>m</i>	70,1	70,5
6''	0,82 <i>d</i> (6,0)	0,98 <i>d</i> (6,5)	17,6	17,3

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); *s* = singleto; *d* = dubleto; *m* = multipeto.

Tabela 22. Dados (ppm) dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ da fração FAP-147 de *Plinia edulis* comparados à literatura.

Carbono	^1H FAP-147*	quercetina (HARBORNE, 1994)	^{13}C FAP-147	quercetina (HARBORNE, 1994)
2	-	-	146,8	146,9
3	-	-	135,7	135,8
4	-	-	175,8	175,9
5	12,41 (OH)	12,45 (OH)	160,7	160,8
6	6,11 <i>d</i> (1,4)	6,20 <i>d</i> (2,1)	98,2	98,3
7	-	-	163,9	164,0
8	6,33 <i>d</i> (1,4)	6,42 <i>d</i> (2,1)	93,3	93,5
9	-	-	156,1	156,2
10	-	-	103,0	103,1
1'	-	-	122,0	122,1
2'	7,60 <i>d</i> (1,4)	7,69 <i>d</i> (2,1)	115,1	115,2
3'	-	-	145,1	145,1
4'	-	-	147,7	147,7
5'	6,81 <i>d</i> (8,5)	6,90 <i>d</i> (8,5)	115,6	115,7
6'	7,46 <i>dd</i> (1,4; 8,5)	7,55 <i>dd</i> (2,1; 8,5)	120,0	120,1

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); *d* = dubleto; *dd* = duplo dubleto.

5.3. Doseamentos de Fenóis Totais, Taninos e Flavonóides nas Frações Polares (FA e FM)

A fração de acetato de etila (FA) obtida por partição do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* apresentou teores superiores de fenóis totais e flavonóides comparativamente à fração de metanol (FM), enquanto que FM apresentou maior quantidade de taninos. Os teores estão expressos na Tabela 23.

As figuras 29 e 30 ilustram as retas de linearidade dos padrões de ácido gálico e de ácido tânico com as equações dos gráficos e valores de r^2 para cálculo do teor de fenólicos totais e taninos, respectivamente.

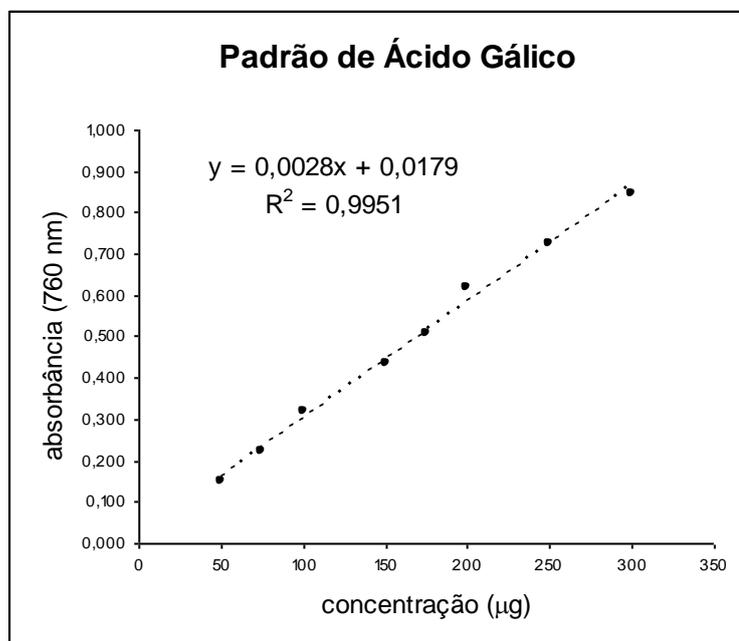


Figura 29. Gráfico do padrão de ácido gálico utilizado no doseamento de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

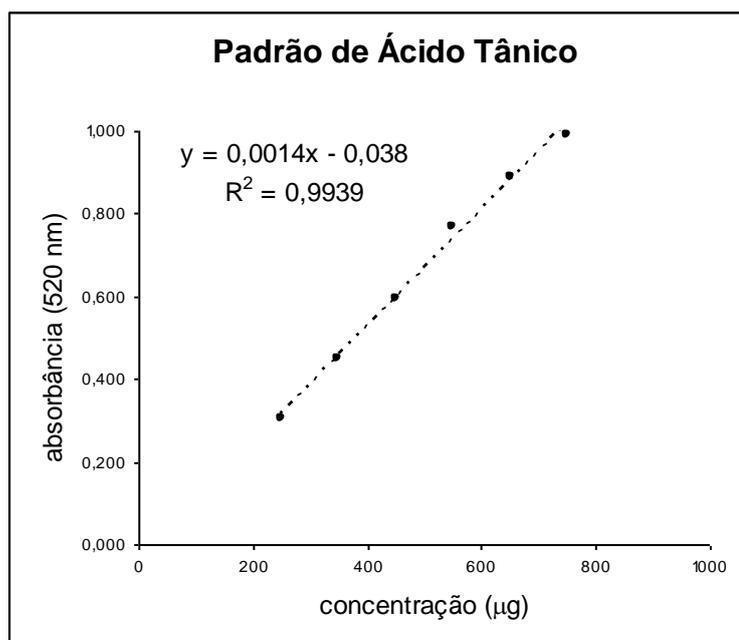


Figura 30. Gráfico do padrão de ácido tânico utilizado no doseamento de taninos pelo método de precipitação com albumina do soro bovino.

Tabela 23 – Teores de fenóis totais, flavonóides e taninos nas frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) de *Plinia edulis*.

	FA	FM
Fenóis Totais	52,16 ± 0,36%	45,26 ± 0,92%
Flavonóides	10,81 ± 0,08%	0,07 ± 0,01%
Taninos	28,31 ± 0,15%	43,90 ± 0,22%

5.4. Atividade Antioxidante

5.4.1. Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* - Ensaio com DPPH

Tanto o extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL) como as frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) apresentaram atividade antioxidante superiores a da rutina utilizada como padrão no ensaio com o DPPH. A FA e FM apresentaram atividade antioxidante superiores a do EEAL.

A tabela 24 expressa a concentração efetiva 50% (CE₅₀) da rutina, do EEAL, da FA e da FM com os respectivos valores de desvio padrão, enquanto que a figura 31 mostra o gráfico da atividade antioxidante das amostras.

Tabela 24 – Concentração da rutina, do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL) e das frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) com capacidade antioxidante de 50 % (CE₅₀) no ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH).

	CE ₅₀ (µg/mL)	Desvio Padrão (µg/mL)
rutina	7,92	0,51
EEAL	5,75	0,37
FA	2,49	0,14
FM	2,49	0,11

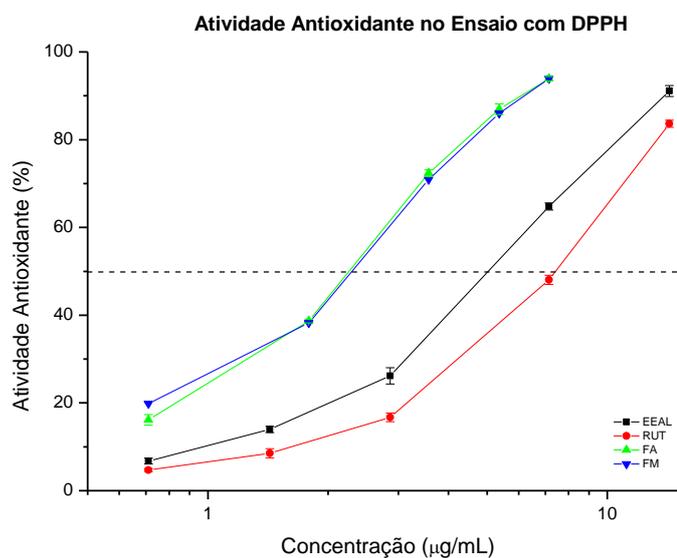


Figura 31. Gráfico da atividade antioxidante da rutina (RUT), do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL) e das frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) no ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH). A atividade antioxidante expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

5.4.2. Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* - Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio (ORAC)

Tendo em vista que o valor de ORAC é sempre calculado em equivalentes de Trolox, a validação do método e a obtenção da equação da reta do padrão de Trolox são fundamentais para a avaliação da amostra.

Tanto o Trolox como o EEAL protegeram a fluoresceína, como observado nas curvas de cinética de decaimento da fluorescência, de forma dependente da concentração (Figuras 32 e 33). A concentração mais alta do EEAL (20 $\mu\text{g/mL}$) apresentou proteção total da fluoresceína por mais de 10 minutos, antes que a intensidade de fluorescência começasse a decair, enquanto que a concentração mais baixa (5 $\mu\text{g/mL}$) protegeu a fluoresceína por apenas alguns segundos.

A figura 34 ilustra a reta de linearidade do padrão de Trolox com valor de r^2 e com a equação do gráfico para cálculo do valor relativo de ORAC que, para o EEAL foi de $3948 \pm 225 \mu\text{mol de Trolox/g de extrato}$.

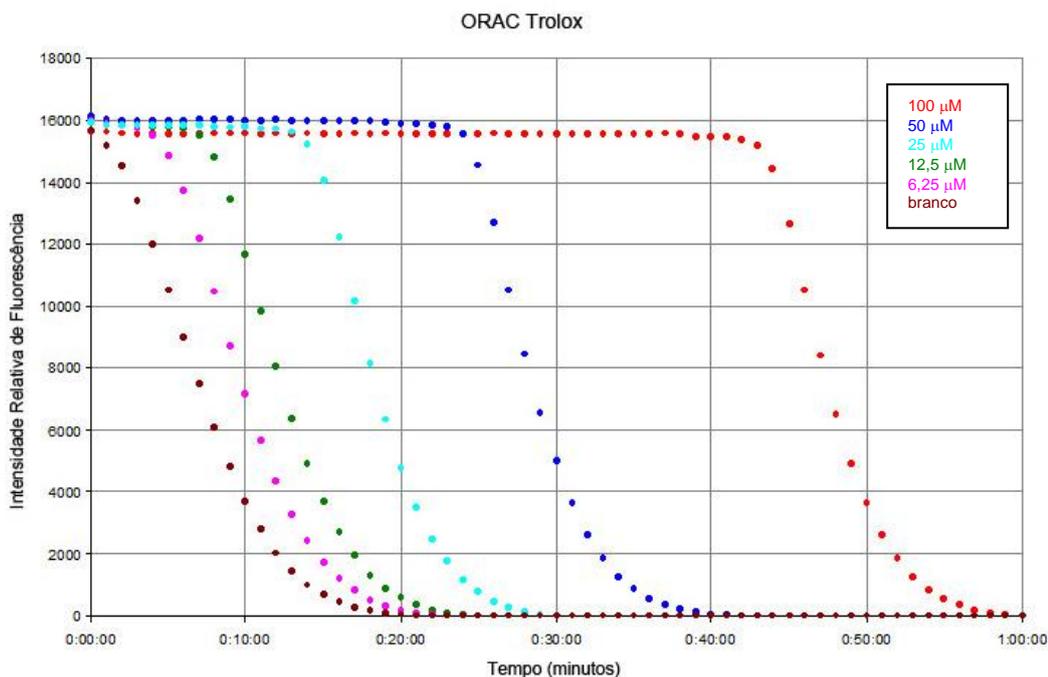


Figura 32. Gráfico das curvas do decaimento da fluorescência na presença de diferentes concentrações do padrão de Trolox no ensaio da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC).

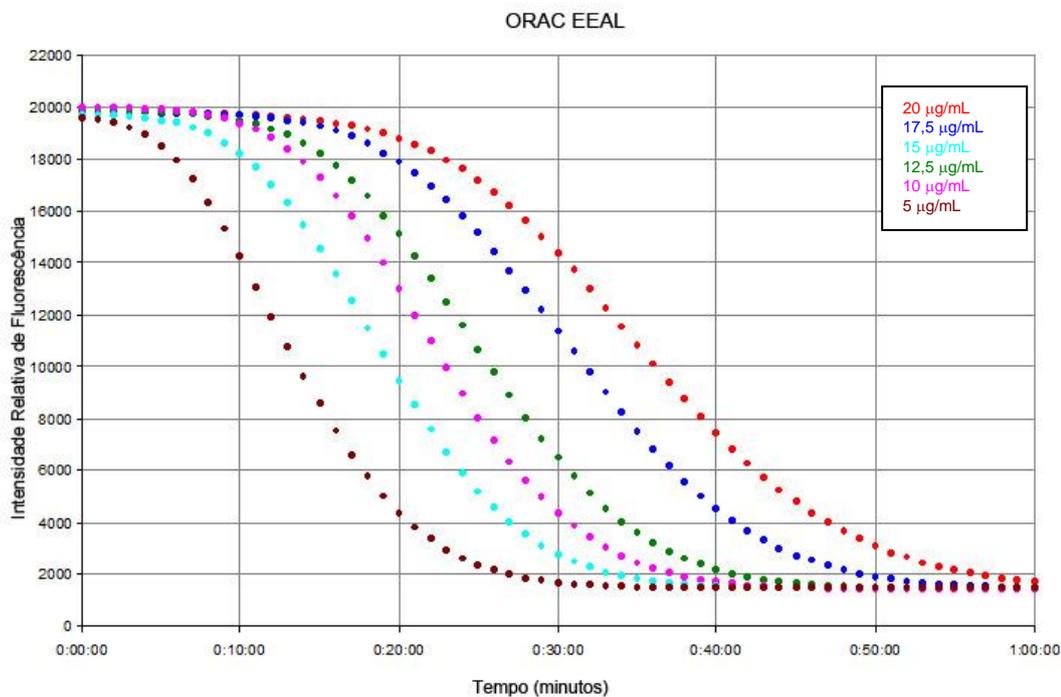


Figura 33. Gráfico das curvas do decaimento da fluorescência na presença de diferentes concentrações do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL) no ensaio da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC).

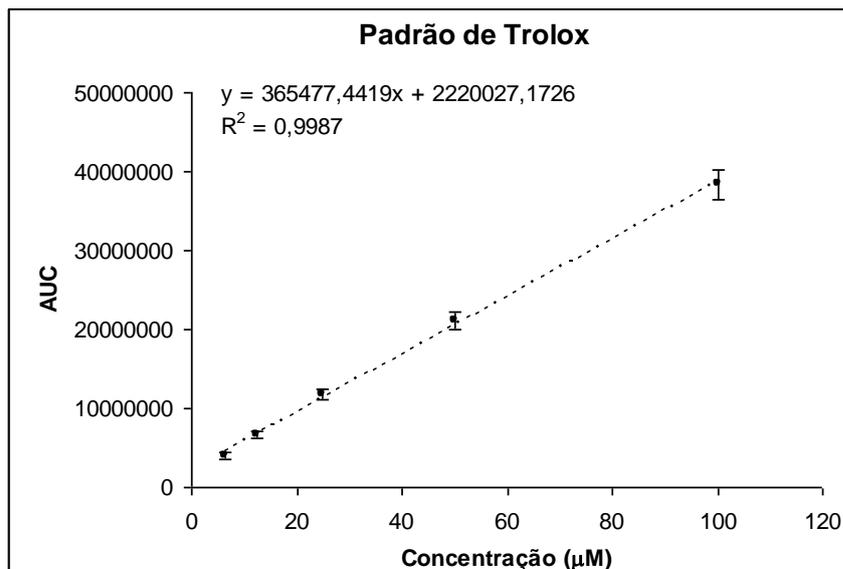


Figura 34. Gráfico do padrão de Trolox utilizado na avaliação da atividade antioxidante no ensaio da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC). AUC = Área sob a curva de decaimento de fluorescência.

5.5. Atividade Antiúlcera Aguda

5.5.1. Avaliação Dose/Resposta do EEAL

Na avaliação da atividade antiúlcera aguda, o extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL) apresentou atividade protetora extremamente significativa nas três doses empregadas, em relação ao grupo controle, considerando a Área Total de Lesão e a Área Relativa de Lesão ($p < 0,001$) (Figuras 35 e 36).

Não foi verificada diferença significativa entre as doses utilizadas (100, 200 e 400 mg/kg). Em todas as concentrações, o EEAL apresentou maior atividade

protetora comparativamente ao lansoprazol, sendo que na maior dose utilizada (400 mg/kg), houve diferença significativa comparativamente ao padrão ($p < 0,05$) (Figuras 35 e 36).

O extrato de *P. edulis*, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, foi capaz de reduzir a Área Total de Lesão em 73,82%, 88,64% e 98,11% e reduziu a Área Relativa de Lesão em 73,68%, 89,47% e 100,00% comparativamente ao controle no modelo utilizado.

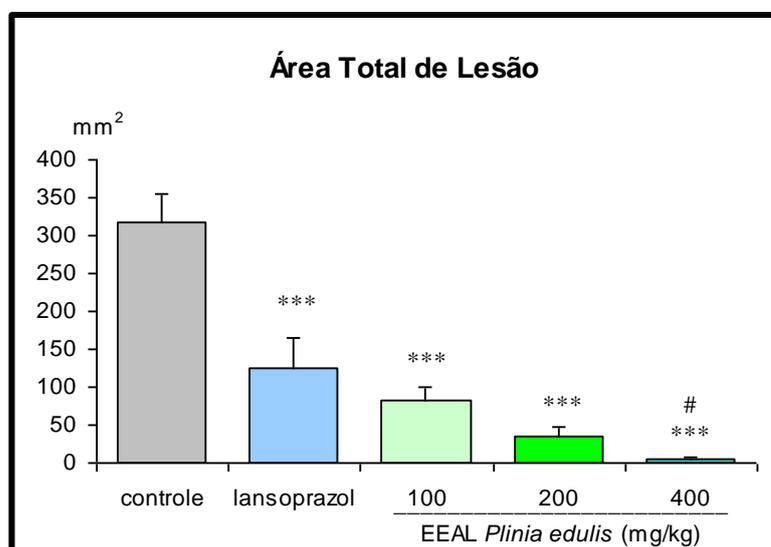


Figura 35. Avaliação dose/resposta da Área Total de Lesão no ensaio antiúlcera agudo com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol após a administração via oral de água (controle), 30 mg/kg de lansoprazol, 100, 200 e 400 mg/kg de extrato etanol/água liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL). Os valores são expressos como a média \pm erro padrão ($n = 7$). *** $P < 0,001$ = resultado extremamente significativo comparativamente ao controle. # $P < 0,05$ = resultado significativo comparativamente ao lansoprazol.

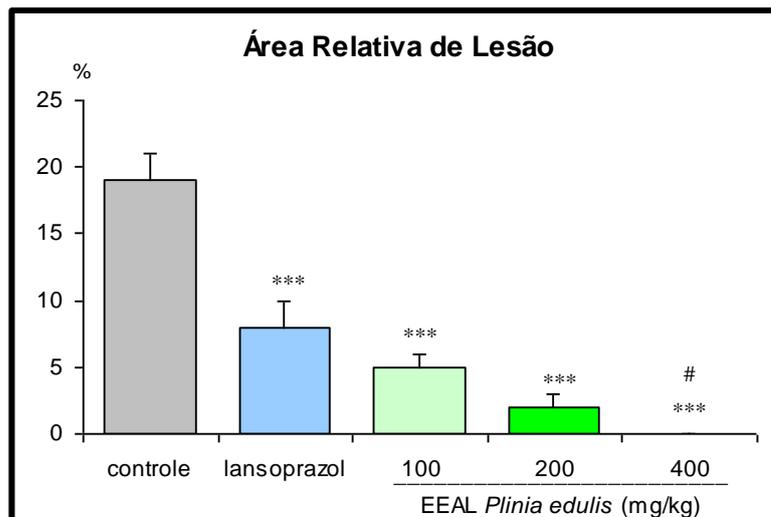


Figura 36. Avaliação dose/resposta da Área Relativa de Lesão no ensaio antiúlcera agudo com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol após a administração via oral de água (controle), 30 mg/kg de lansoprazol, 100, 200 e 400 mg/kg de extrato etanol/água liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL). Os valores são expressos como a média \pm erro padrão (n = 7). ***P < 0,001 = resultado extremamente significativo comparativamente ao controle. #P < 0,05 = resultado significativo comparativamente ao lansoprazol.

5.5.2. Avaliação das Frações e do Ácido ursólico

Entre as frações analisadas, a de hexano (FH) apresentou maior eficácia tanto em relação à avaliação da área total de lesão (redução de 68,08%) como na avaliação da área relativa de lesão (redução de 65,02%) (Figuras 37 e 38), com atividade muito significativa comparativamente ao controle (P < 0,01). As frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) apresentaram atividade significativa (P < 0,05) comparativamente ao controle em ambos os parâmetros avaliados. Embora os animais tratados com o ácido ursólico e com a fração de diclorometano (FD) tenham apresentado redução na área total de lesão (26,06% e 43,32% respectivamente), os resultados não foram estatisticamente diferentes do grupo controle.

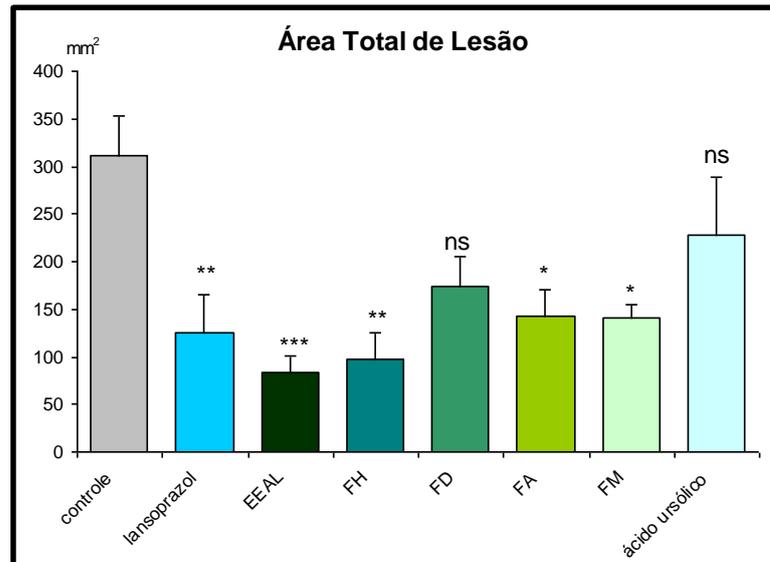


Figura 37. Avaliação da Área Total de Lesão das frações de *Plinia edulis* e do ácido ursólico no ensaio antiúlcera agudo com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol após a administração via oral de água (controle), 30 mg/kg de lansoprazol, 50 mg/kg de ácido ursólico e 100 mg/kg de extrato etanol/água liofilizado (EEAL) e das frações de hexano (FH), de diclorometano (FD), de acetato de etila (FA) e de metanol (FM). Os valores são expressos como a média \pm erro padrão (n = 7). Os asteriscos indicam o nível de significância comparativamente ao controle. ***P < 0,001; ** P < 0,01; *P < 0,05.

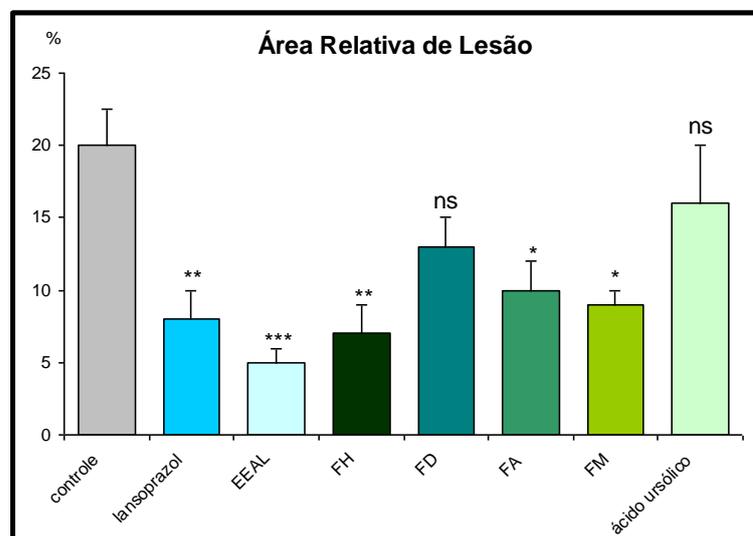


Figura 38. Avaliação da Área Relativa de Lesão das frações de *Plinia edulis* e do ácido ursólico no ensaio antiúlcera agudo com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol após a administração via oral de solução aquosa de Tween 80 (5%) (controle), 30 mg/kg de lansoprazol, 50 mg/kg de ácido ursólico e 100 mg/kg de extrato etanol/água liofilizado (EEAL) e das frações de hexano (FH), de diclorometano (FD), de acetato de etila (FA) e de metanol (FM). Os valores são expressos como a média \pm erro padrão (n = 7). Os asteriscos indicam o nível de significância comparativamente ao controle. ***P < 0,001; ** P < 0,01; *P < 0,05.

5.6. Citotoxicidade

5.6.1. Citotoxicidade a Células CHO

A citotoxicidade da solução aquosa de DMSO usada na diluição das amostras (controle) foi significativa até a concentração final de 0,31% de DMSO. Deste modo, a citotoxicidade das amostras só foi avaliada nas diluições subseqüentes do EEAL e das frações FA e FM (concentração final máxima de 15,63 $\mu\text{g/mL}$).

As amostras apresentaram perfis de citotoxicidade muito semelhantes, embora o EEAL tenha se apresentado ligeiramente mais tóxico, seguido de FM e FA. A Tabela 25 apresenta os valores de DL_{50} obtidos e a Figura 39 apresenta as curvas de citotoxicidade das amostras.

Nas concentrações menores (0,98 $\mu\text{g/mL}$ e 1,95 $\mu\text{g/mL}$), todas as amostras apresentaram atividade proliferativa extremamente significativa ($P < 0,001$) comparativamente ao controle (solução aquosa de DMSO usada nas diluições das amostras) e o mesmo ocorreu na concentração final de 3,91 $\mu\text{g/mL}$ de FA (Figura 39).

Tabela 25 – Concentração do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL) e das frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) com citotoxicidade de 50% em relação ao controle (DL₅₀) no ensaio com cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO)

	DL ₅₀ (µg/mL)	Desvio Padrão (µg/mL)
EEAL	3,68	0,32
FA	9,68	0,26
FM	5,90	0,46

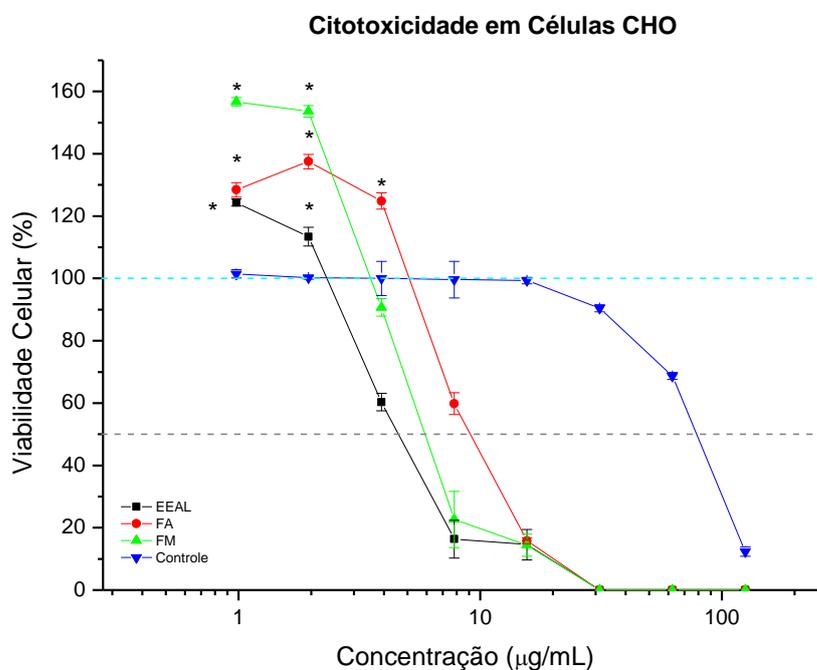


Figura 39. Citotoxicidade da solução aquosa de DMSO usada na diluição das amostras (controle), do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL) e das frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) no ensaio com cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de quatro leituras \pm desvio padrão. *P < 0,001 = resultado extremamente significativo comparativamente ao controle.

5.6.2. Citotoxicidade a Células Tumorais

As Figuras 40 a 45 representam os gráficos de concentração-resposta do EEAL, das frações obtidas por partição e do padrão de doxorrubicina sobre as linhagens tumorais, relacionando a porcentagem de crescimento das células e a concentração de extrato utilizado.

Na concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ o EEAL apresentou atividade citostática apenas para a linhagem de mama (MCF-7). Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) o EEAL apresentou atividade citostática com inibição do crescimento superior a 50% para a linhagem neoplásica de pulmão (NCI-460) e com inibição do crescimento de 100% para leucemia (K-562). Nesta concentração apresentou atividade citocida para todas as outras linhagens (Figura 40).

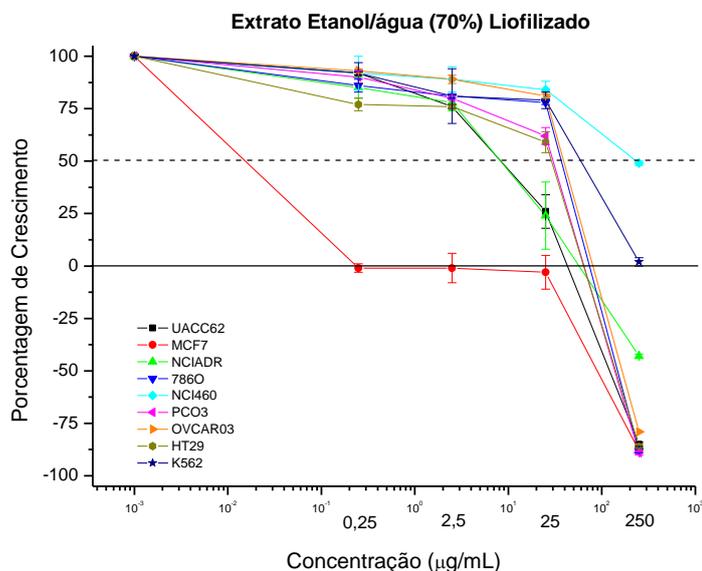


Figura 40. Citotoxicidade do extrato etanol/água (70%) liofilizado de *Plinia edulis* (EEAL) no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

A fração FH apresentou, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, atividade citostática com inibição do crescimento superior a 50% para 786-0 e atividade citocida para MCF-7. Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) a FH apresentou atividade citostática com inibição do crescimento abaixo de 50% para NCI-ADR e NCI-460 e com inibição do crescimento de 100% para K-562, apresentando atividade citocida para todas as outras linhagens (Figura 41).

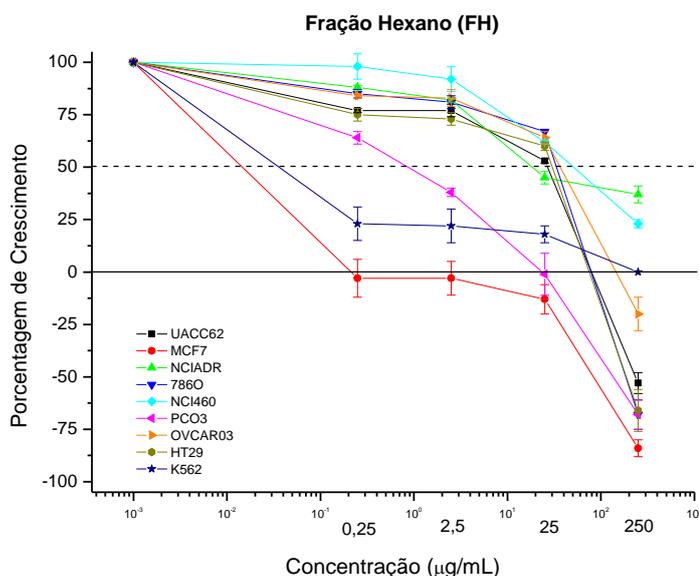


Figura 41. Citotoxicidade da fração de hexano de *Plinia edulis* (FH) no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

Na concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ a fração FD apresentou atividade citostática para K-562 e atividade citocida para MCF-7. Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) FD apresentou atividade citocida para todas as linhagens (Figura 42).

A fração FA apresentou, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, atividade citostática com inibição do crescimento de 100% apenas para MCF-7. Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) a FA apresentou atividade citostática com inibição do crescimento abaixo de 50% para K-562 e OVCAR-03 e com inibição do crescimento

de 100% para NCI-460, apresentando atividade citocida para todas as outras linhagens (Figura 43).

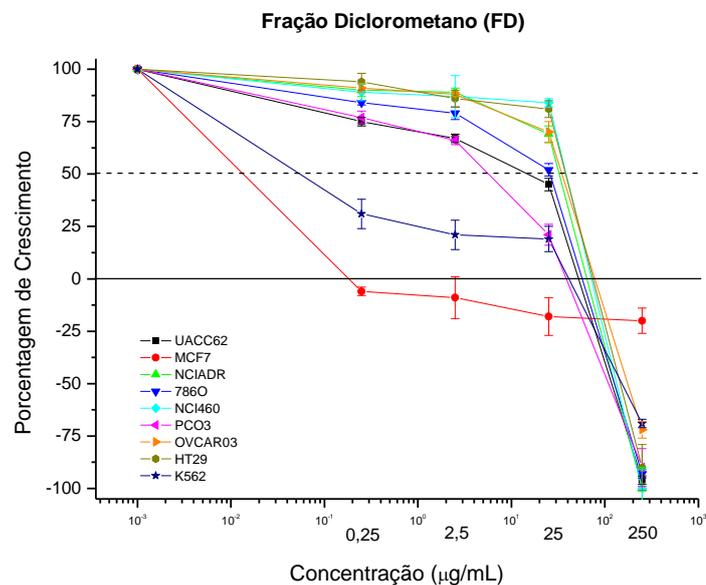


Figura 42. Citotoxicidade da fração de diclorometano de *Plinia edulis* (FD) no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

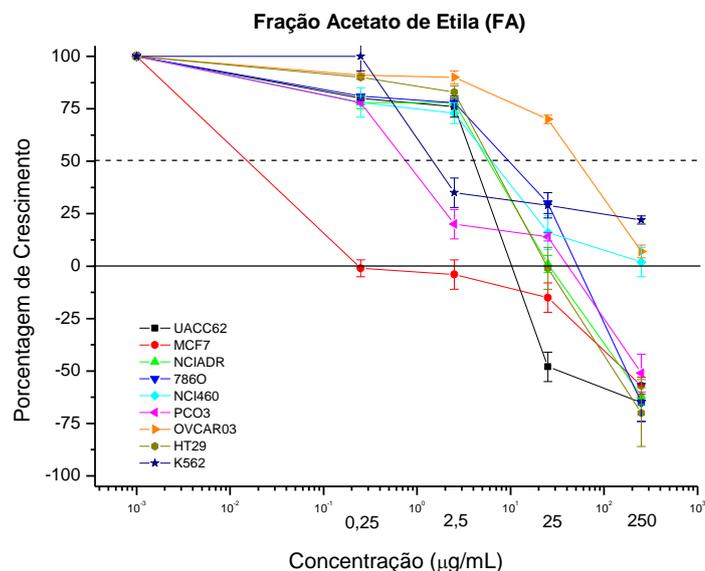


Figura 43. Citotoxicidade da fração de acetato de etila de *Plinia edulis* (FA) no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

Na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ a fração FM apresentou atividade citostática para UACC-62 e MCF-7. Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) FM apresentou atividade citocida para todas as linhagens, com exceção de K-562 (Figura 44).

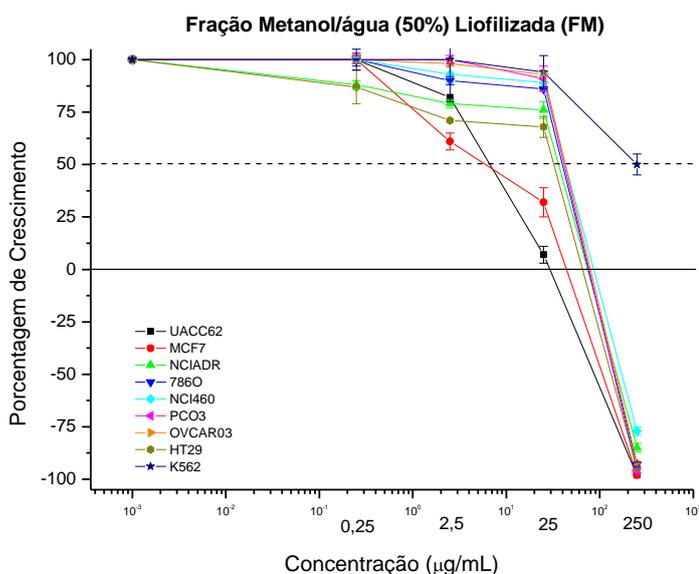


Figura 44. Citotoxicidade da fração de metanol de *Plinia edulis* (FM) no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

A doxorrubicina apresentou, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, atividade citostática para UACC-62, 786-0, PCO-03 e K-562 e atividade citocida para MCF-7. Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade citocida para todas as linhagens, com exceção de OVCAR-03 (Figura 45).

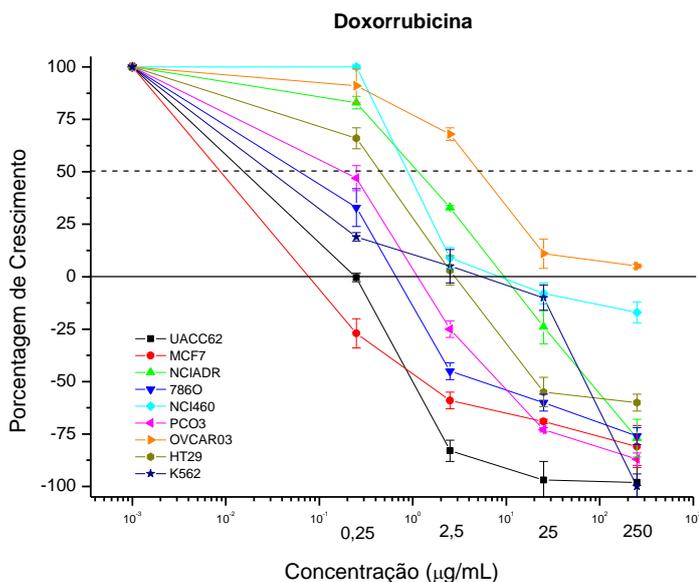


Figura 45. Citotoxicidade da doxorrubicina no ensaio com cultura de células neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A viabilidade celular expressa em porcentagem foi calculada como média de três leituras \pm desvio padrão.

As Tabelas 26-28 expressam as faixas de concentração que promoveram inibição do crescimento de 50% (IC_{50}) inibição total do crescimento (ITC) e morte celular de 50% (DL_{50}) para cada linhagem celular e cada amostra.

Tabela 26 – Avaliação da citotoxicidade do extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL) e da fração de hexano (FH) de *Plinia edulis* em linhagens neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562).

Linhagens	Inibição do Crescimento 50% (IC ₅₀) (µg/mL)	Inibição Total do Crescimento (ITC) (µg/mL)	Dose Letal 50% (DL ₅₀) (µg/mL)
EEAL			
UACC-62	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
MCF-7	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,001 < ITC < 0,25	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-ADR	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	DL ₅₀ > 250
786-0	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-460	25 < IC ₅₀ < 250	ITC > 250	DL ₅₀ > 250
PC-03	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
OVCAR-03	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
HT-29	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
K-562	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	DL ₅₀ > 250
FH			
UACC-62	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
MCF-7	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,001 < ITC < 0,25	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-ADR	2,5 < IC ₅₀ < 25	ITC > 250	DL ₅₀ > 250
786-0	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-460	25 < IC ₅₀ < 250	ITC > 250	DL ₅₀ > 250
PC-03	0,25 < IC ₅₀ < 2,5	2,5 < ITC < 25	25 < DL ₅₀ < 250
OVCAR-03	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	DL ₅₀ > 250
HT-29	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
K-562	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	25 < ITC < 250	DL ₅₀ > 250

Destaque para as linhagens em que ocorreu atividade mais pronunciada.

Tabela 27 – Avaliação da citotoxicidade das frações de diclorometano (FD) e de acetato de etila (FA) de *Plinia edulis* em linhagens neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562).

Linhagens	Inibição do Crescimento 50% (IC ₅₀) (µg/mL)	Inibição Total do Crescimento (ITC) (µg/mL)	Dose Letal 50% (DL ₅₀) (µg/mL)
FD			
UACC-62	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
MCF-7	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,001 < ITC < 0,25	DL ₅₀ > 250
NCI-ADR	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
786-0	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-460	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
PC-03	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
OVCAR-03	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
HT-29	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
K-562	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
FA			
UACC-62	2,5 < IC ₅₀ < 25	2,5 < ITC < 25	25 < DL ₅₀ < 250
MCF-7	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,001 < ITC < 0,25	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-ADR	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
786-0	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-460	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	DL ₅₀ > 250
PC-03	0,25 < IC ₅₀ < 2,5	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
OVCAR-03	25 < IC ₅₀ < 250	ITC > 250	DL ₅₀ > 250
HT-29	2,5 < IC ₅₀ < 25	2,5 < ITC < 25	25 < DL ₅₀ < 250
K-562	0,25 < IC ₅₀ < 2,5	ITC > 250	DL ₅₀ > 250

Destaque para as linhagens em que ocorreu atividade mais pronunciada.

Tabela 28 – Avaliação da citotoxicidade da fração de metanol (FM) de *Plinia edulis* e da doxorubicina (padrão) em linhagens neoplásicas humanas de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), próstata (PC-03), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K-562).

Linhagens	Inibição do Crescimento 50% (IC ₅₀) (µg/mL)	Inibição Total do Crescimento (ITC) (µg/mL)	Dose Letal 50% (DL ₅₀) (µg/mL)
FM			
UACC-62	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
MCF-7	2,5 < IC ₅₀ < 25	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-ADR	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
786-0	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
NCI-460	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
PC-03	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
OVCAR-03	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
HT-29	25 < IC ₅₀ < 250	25 < ITC < 250	25 < DL ₅₀ < 250
K-562	25 < IC ₅₀ < 250	ITC > 250	DL ₅₀ > 250
doxorubicina			
UACC-62	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,001 < ITC < 0,25	0,25 < DL ₅₀ < 2,5
MCF-7	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,001 < ITC < 0,25	0,25 < DL ₅₀ < 2,5
NCI-ADR	0,25 < IC ₅₀ < 2,5	2,5 < ITC < 25	25 < DL ₅₀ < 250
786-0	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,25 < ITC < 2,5	2,5 < DL ₅₀ < 25
NCI-460	0,25 < IC ₅₀ < 2,5	2,5 < ITC < 25	DL ₅₀ > 250
PC-03	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,25 < ITC < 2,5	2,5 < DL ₅₀ < 25
OVCAR-03	2,5 < IC ₅₀ < 25	ITC > 250	DL ₅₀ > 250
HT-29	0,25 < IC ₅₀ < 2,5	2,5 < ITC < 25	2,5 < DL ₅₀ < 25
K-562	0,001 < IC ₅₀ < 0,25	0,25 < ITC < 2,5	25 < DL ₅₀ < 250

Destaque para as linhagens em que ocorreu atividade mais pronunciada.

5.7. Mutagenicidade – Teste de Ames

Nos ensaios de Ames, o EEAL apresentou-se como causador de indícios de mutagenicidade para as linhagens TA97A e TA98 com e sem ativação metabólica. No entanto, em todos os experimentos realizados, o EEAL não foi efetivamente mutagênico em nenhuma das concentrações empregadas. As tabelas 29 e 30 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 29. Avaliação da atividade mutagênica no ensaio de Ames com as linhagens TA97a e TA98 de *Salmonella typhimurium* expostas a 5 diferentes doses do extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL) de *Plinia edulis*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica. Os valores são expressos pela média do número de revertentes ($n = 3$) \pm desvio padrão e pela razão de mutagenicidade (RM) (valor entre parênteses).

Concentração de EEAL (mg/placa)	nº de revertentes/placa (RM)			
	TA97a		TA98	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Controle negativo	107 \pm 1	214 \pm 13	25 \pm 2	77 \pm 6
20,0	192 \pm 3 (1,8)**	209 \pm 9 (1,0)	31 \pm 5 (1,3)	101 \pm 2 (1,3)*
15,0	195 \pm 13 (1,8)*	295 \pm 4 (1,4)**	48 \pm 2 (1,9)**	90 \pm 4 (1,2)
10,0	180 \pm 7 (1,7)**	263 \pm 8 (1,2)*	42 \pm 2 (1,7)**	89 \pm 2 (1,2)
5,0	166 \pm 7 (1,6)**	328 \pm 6 (1,5)**	30 \pm 2 (1,2)	88 \pm 1 (1,1)
2,5	175 \pm 10 (1,6)*	301 \pm 8 (1,3)**	25 \pm 2 (1,0)	69 \pm 1 (0,9)
Controle positivo	1716 \pm 69	1547 \pm 27	2509 \pm 46	1352 \pm 66

Controle negativo: dimetilsulfóxido (100 μ L/placa); Controle positivo: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (10,0 μ g/placa) (-S9) e 2-antramina (0,13 μ g/placa) (+S9). *P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA).

Tabela 30. Avaliação da atividade mutagênica no ensaio de Ames com as linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* expostas a 5 diferentes doses do extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL) de *Plinia edulis*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica. Os valores são expressos pela média do número de revertentes ($n = 3$) \pm desvio padrão e pela razão de mutagenicidade (RM) (valor entre parênteses).

Concentração de EEAL (mg/placa)	nº de revertentes/placa (RM)			
	TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Controle negativo	144 \pm 5	127 \pm 7	244 \pm 24	363 \pm 9
20,0	115 \pm 7 (0,8)	136 \pm 7 (1,1)	237 \pm 9 (1,0)	380 \pm 8 (1,0)
15,0	156 \pm 11 (1,1)	133 \pm 8 (1,1)	280 \pm 8 (1,1)	320 \pm 13 (0,9)
10,0	121 \pm 1 (0,8)	133 \pm 4 (1,1)	296 \pm 18 (1,2)	363 \pm 15 (1,0)
5,0	131 \pm 7 (0,9)	137 \pm 6 (1,1)	373 \pm 4 (1,5)	353 \pm 17 (1,0)
2,5	126 \pm 4 (0,9)	124 \pm 5 (1,0)	313 \pm 12 (1,3)	354 \pm 13 (1,0)
Controle positivo	784 \pm 7	1696 \pm 62	2324 \pm 119	1637 \pm 20

Controle negativo: dimetilsulfóxido (100 μ L/placa); Controle positivo: azida sódica (1,3 μ g/placa) para TA 100 (-S9); mitomicina (0,5 μ g/placa) para TA102 (-S9); 2-antramina (0,13 μ g/placa) (+S9).

Discussão

“Às vezes tenho a impressão de que escrevo por simples curiosidade intensa. É que, ao escrever, eu me dou as mais inesperadas surpresas. É na hora de escrever que muitas vezes fico consciente de coisas, das quais, sendo inconsciente, eu antes não sabia que sabia.”

Clarice Lispector

6. DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm contribuído com diferentes compostos para o tratamento de úlceras pépticas tais como a carbenoxolona, gefarnato e a teprenona (SÁNCHEZ et al., 2006). Neste sentido, pode-se afirmar que o reino vegetal oferece uma fonte inesgotável para a descoberta de novos fármacos e de moléculas protótipo para a síntese de substâncias antiulcerogênicas ou, ainda, que sirvam como adjuvantes às terapias existentes (ARRIETA et al., 2003; BORRELLI; IZZO, 2000).

Mirtáceas empregadas em hiperacidez estomacal e úlceras submetidas a estudos *in vivo* e *in vitro* confirmam a eficácia de espécies da família na gastroproteção e no combate ao *Helicobacter pylori* (LI et al., 2005; MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004; SANDOVAL; MELCHOR; OKUHAMA, 2001; HOEHNE, 1939).

P. edulis, embora utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gástricos (CRAVO, 2003; NASCENTE, 2008; GONSALVES, 2002) foi pouco estudada quimicamente (APEL et al., 2006; BELESKI-CARNEIRO et al., 2000). As mirtáceas, por sua vez, apresentam classes de substâncias de interesse farmacológico, tais como flavonóides, taninos e triterpenos que podem ser relacionadas ao uso como antiulcerogênico (SÁNCHEZ et al., 2006; PARK et al., 2004).

Assim, a abordagem quimiosistemática e etnofarmacológica conduziu a realização dos estudos de gastroproteção, utilizando-se o modelo de indução com etanol acidificado. Na tentativa de mimetizar condições agudas de agressão à

mucosa e promover a formação de úlceras gástricas, este modelo é amplamente utilizado (OLIVEIRA et al., 2004a).

Neste ensaio, é avaliada a atividade gastroprotetora de extratos vegetais (SUFFREDINI, BACCHI e SERTIÉ, 1999). O etanol, agente agressor, remove a camada de muco, expondo a mucosa ao suco gástrico e induzindo à formação de úlcera, enquanto o ácido clorídrico apenas acelera o processo (RANG et al., 2008; SUFFREDINI, BACCHI e SERTIÉ, 1999).

O ácido clorídrico e o etanol participam também de outros mecanismos na formação de lesões da mucosa, como a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, que contribui para o desenvolvimento de hemorragia e necrose. O conjunto dessas ações resulta em um aumento do fluxo de íons sódio e potássio, aumento da secreção de pepsina e perda de íons de hidrogênio e histamina para o lúmen gástrico (BATISTA et al., 2004).

Na avaliação da atividade gastroprotetora de *P. edulis*, o modelo foi padronizado com o uso de ratas, já que a escolha do sexo dos animais parece não influenciar a formação de úlceras induzidas por etanol acidificado (GUARALDO; SERTIÉ; BACCHI, 2001; SUFFREDINI; BACCHI; SERTIÉ, 1999).

A escolha das doses utilizadas para esse ensaio antiúlcera baseou-se na literatura (MARTINS; LIMA; RAO, 2002; LIU et al., 2001; PAIVA et al., 1998) e na sugestão de doses correlacionadas ao uso tradicional apresentada por Schmeda-Hirschmann e Yesilada (2005), que preconizam a utilização de doses de 100 a 300 mg/kg de extratos brutos por via oral.

Os antagonistas dos receptores H₂ de histamina, como, por exemplo, a cimetidina e a ranitidina, inibem a secreção de ácido estimulada pela gastrina, acetilcolina e histamina; conseqüentemente, reduzem a secreção de pepsina, devido

à diminuição do volume do suco gástrico (RANG et al., 2008). Estes fármacos são, portanto, inativos no modelo experimental utilizado, tendo em vista que o indutor é o próprio etanol acidificado administrado por via oral (SUFFREDINI; BACCHI; SERTIÉ, 1999).

Desta forma, o fármaco usado como referência para o ensaio foi o lansoprazol, um inibidor da bomba de prótons que atua por meio da inibição irreversível da K^+/H^+ -ATPase, inativo em pH neutro mas que se acumula preferencialmente em áreas de pH muito baixos, onde é ativado (RANG et al., 2008).

A secreção de ácido só é reiniciada após a síntese de novas moléculas da bomba e inserção na membrana parietal. Assim, os inibidores da bomba de prótons promovem a inibição prolongada da secreção ácida, independente de outros fatores estimulantes (GOODMAN et al., 2007).

Embora nenhuma das frações tenha apresentado maior atividade que o extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL) no modelo utilizado, selecionou-se a fração de hexano (FH), com a segunda maior atividade gastroprotetora, para o fracionamento em coluna.

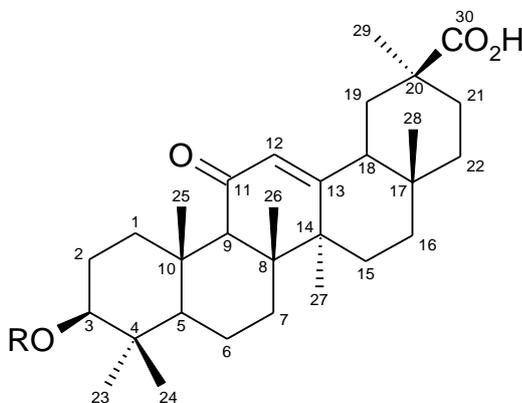
A presença dos triterpenos isolados e identificados em FH é coerente com a pressão predatória e os solos ricos em cloreto de sódio da Mata Atlântica, na qual *P. edulis* foi coletada (TONHASCA Jr., 2005), além de justificar a atividade gastroprotetora de FH.

Os triterpenos apresentam atividade antiúlcera em vários modelos *in vivo*, o que sugere diferentes mecanismos envolvidos na gastroproteção (SÁNCHEZ et al., 2006; RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

Estudos indicam que a atividade gastroprotetora de triterpenos está relacionada a um aumento dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica

(capacidade cicatrizante, aumento do conteúdo de prostaglandinas e aumento da resistência ao estresse oxidativo) e não a uma diminuição dos fatores de agressão, como a secreção gástrica (SÁNCHEZ et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004a; RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

Um dos fármacos pioneiros no tratamento de úlceras gástricas, a carbenoxolona (Figura 46), um derivado de triterpeno, tem como principal mecanismo de ação o aumento de prostaglandinas devido à inibição das enzimas catalíticas 15-hidroxi-PG-desidrogenase e 13-PG-redutase (RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003). Outros fatores, tais como o conteúdo de óxido nítrico e de glutatona reduzida, parecem contribuir na atividade (NAVARRETE et al., 2005).



ácido glicirrético: R = H
carbenoxolona: R = CO(CH₂)₂CO₂H

Figura 46. Estruturas do ácido glicirrético e da carbenoxolona.

Uma mistura de α - e β -amirinas apresentou atividade significativa na redução de ulcerações induzidas por etanol, com gastroproteção de 50,7% comparativamente ao grupo controle em uma dose de 100 mg/kg (NAVARRETE; TREJO-MIRANDA; REYES-TREJO, 2002). No mesmo ensaio, o β -sitosterol foi

ainda mais ativo, com gastroproteção de 85,7%, na mesma dose de 100 mg/kg (NAVARRETE; TREJO-MIRANDA; REYES-TREJO, 2002).

Outro triterpeno, o ácido oleanólico, apresentou gastroproteção significativa (88,8%) comparativamente ao grupo controle, em uma dose de 30 mg/kg em ensaio com indução de etanol (ARRIETA et al., 2003). Nos ensaios de indução de úlcera por ligação de piloro, por aspirina e por etanol acidificado, a atividade apresentada também foi muito significativa ($P < 0,01$) na proteção dos estômagos de animais tratados com doses de 50 a 200 mg/kg (ASTUDILLO; RODRÍGUEZ; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2002).

No modelo de indução de úlceras crônicas por ácido acético, o ácido oleanólico foi capaz de promover a diminuição das lesões, com taxas de remissão de 54,5% e 76,0% em doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente (RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

Tendo em vista que o ácido oleanólico apresenta atividade antiúlcera nos modelos que empregam aspirina e indometacina, foi proposto que o mecanismo de ação possa relacionar-se ao aumento nos níveis de prostaglandinas *in vivo* (RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

O etanol, empregado no modelo de indução de úlceras, diminui os níveis de tióis não protéicos (na forma de glutathiona reduzida) nos tecidos do estômago, e a manutenção destes níveis parece ser importante na gastroproteção, considerando que estes compostos são substratos para radicais livres (OLIVEIRA et al., 2004a). A diminuição desses níveis pode ser ocasionada por oxidação da glutathiona por metabólitos tóxicos gerados após a indução por etanol, ou ainda pela ligação da glutathiona ao acetaldeído formado por meio da oxidação do agente necrosante pela atividade da enzima álcool desidrogenase (LA CASA et al., 2000).

A redução dos níveis de glutathione pode aumentar o dano gerado pela peroxidação lipídica ocasionada pelo etanol, promovendo acúmulo de espécies reativas de oxigênio na mucosa gástrica (OLALEYE; FAROMBI, 2006).

Na indução de úlceras por etanol, o conteúdo de glutathione de ratos previamente tratados com triterpenos aumentou, o que evidencia outro mecanismo de ação possivelmente envolvido na gastroproteção desta classe de substâncias (ARRIETA et al., 2003).

Adicionalmente, a atividade gastroprotetora de triterpenos parece envolver, ao menos parcialmente, a ativação de neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina (OLIVEIRA et al., 2004b).

Estudando a gastroproteção provocada pela α -amirina e β -amirina, Oliveira et al. (2004b) constataram que a atividade antiúlcera foi muito significativa, relativamente ao controle em uma dose de 100 mg/kg da mistura em modelo de indução por etanol em camundongos.

No entanto, a gastroproteção foi sensivelmente diminuída em camundongos dessensibilizados com uma dose neurotóxica de capsaicina, comprovando que, no caso destes triterpenos, a ativação dos neurônios aferentes sensíveis à capsaicina está relacionada à atividade antiulcerogênica no modelo utilizado (OLIVEIRA et al., 2004b).

Embora triterpenos estruturalmente semelhantes ao ácido ursólico, como as α - e β -amirinas e o ácido oleanólico tenham reportada atividade gastroprotetora em diferentes modelos de avaliação de ulceração (OLIVEIRA et al., 2004b; RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003), incluindo o modelo de indução por etanol acidificado (SÁNCHEZ et al., 2006), o ácido ursólico diminuiu

as lesões ulcerativas, mas não apresentou atividade significativa comparativamente ao grupo controle.

Tendo em vista que diversos triterpenos como a α - e β -amirinas, os ácidos oleanólico, ursólico e glicirrético, além do lupeol, apresentam atividade antioxidante em modelos de lipoperoxidação, a gastroproteção destas substâncias pode estar relacionada, ao menos parcialmente, à resistência ao estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2004a; RODRÍGUEZ; ASTUDILLO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

Assim, outros triterpenos isolados da fração hexano, como o ácido maslínico, ácido corosólico, ácido ursólico, além do ácido oleanólico, podem contribuir na atividade gastroprotetora por mecanismos adicionais.

Montilla et al. (2003), estudando o ácido maslínico, observaram que a capacidade antioxidante *in vitro* deste triterpeno é mediada não apenas pela prevenção do estresse oxidativo causado por tetracloreto de carbono no plasma, como pela inibição da formação de radicais hidroxilas. Além desse, o ácido maslínico foi capaz de inibir a formação de óxido nítrico, prevenindo o estresse oxidativo em cultura celular (MARTÍN et al., 2006).

O ácido corosólico também apresentou atividade antioxidante *in vivo*, sendo capaz de melhorar o metabolismo lipídico anormal e aumentar os níveis de antioxidantes no sangue, além de reduzir o estresse oxidativo (YAMAGUCHI et al, 2006).

Em modelos de lipoperoxidação não-enzimática *in vitro* empregando o AAPH como agente oxidante, o ácido ursólico e o ácido oleanólico apresentaram maior atividade antioxidante do que o α -tocoferol ($P < 0,05$), além de mostrarem capacidade seqüestrante do ânion super-óxido, efeito quelante, atividade redutora e

inibição da enzima xantina oxidase de forma significativa (YIN; CHAN, 2007). Além disso, os dois ácidos evidenciaram atividade em relação a radicais livres, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico e inibição de formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (CEFARELLI et al., 2006). Ensaios *in vivo* confirmam a capacidade antioxidante dos ácidos oleanólico e ursólico (SOMOVA et al., 2003).

Na avaliação da atividade antioxidante do lupeol, da β -amirina e dos ácidos ursólico e oleanólico, constatou-se proteção de quase 70% em relação à oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em ensaios *in vitro* (ANDRIKOPOULOS et al., 2003). O lupeol, adicionalmente, apresentou atividade antioxidante *in vivo*, reduzindo o número de espécies reativas de oxigênio e aumentando os níveis de antioxidante no sangue (SUDHAHAR et al., 2007; SUDHAHAR; KUMAR; VARALAKSHMI, 2006; SUDHARSAN et al, 2005; NAGARAJ; SUNITHA; VARALAKSHMI, 2000).

A re-epitelização, após danos na mucosa, é relacionada à cicatrização das lesões e, desta forma, substâncias capazes de promover a proliferação de células epiteliais são extremamente importantes no processo de cura de úlceras gástricas (SÁNCHEZ et al., 2006).

Além de aumentar o conteúdo de prostaglandinas em cultura de células gástricas epiteliais humanas, o ácido oleanólico, assim como outros triterpenos, estimulou a proliferação de fibroblastos *in vitro* (SÁNCHEZ et al., 2006). Assim, pode-se supor que a cicatrização das úlceras gástricas *in vivo* pode ser um dos mecanismos de ação desta classe de substâncias (SÁNCHEZ et al., 2006).

De fato, o EEAL apresentou atividade proliferativa extremamente significativa comparada ao controle em culturas de células CHO.

Associa-se a atividade proliferativa de triterpenos à presença do grupo hidroxila na posição C-3 β (SÁNCHEZ et al., 2006). Além de existirem evidências de que a presença de um grupamento hidroxila no carbono 3 é importante para a atividade gastroprotetora de triterpenos (OLIVEIRA et al., 2004b).

O grupo carboxílico em C-28 parece estar relacionado a um aumento da capacidade gastroprotetora (SÁNCHEZ et al., 2006), enquanto a presença de oxigênio em C-11 pode ser um indicativo de atividade mineralocorticoide, um dos efeitos indesejáveis da carbenoxolona (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

Estudos demonstram que o ácido glicirrético e a carbenoxolona (figura 46) inibem a 5 β -redutase, uma importante enzima regulatória do metabolismo de cortisol e aldosterona, o que pode provocar, em humanos, redução do *clearance* dos corticosteróides e aumentar o tempo de meia-vida do cortisol, ocasionando um aumento da atividade biológica do mesmo (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

Este mecanismo seria ocasionado por uma competição entre o oxigênio no carbono 11 do ácido glicirrético e da carbenoxolona e o oxigênio do carbono 3 dos esteróides corticais pelo sítio de ativação da enzima redutora (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

Conseqüentemente, pacientes com edema e hipertensão são submetidos a minucioso acompanhamento médico com a administração de altas doses da carbenoxolona por tempo prolongado (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

Desta forma, a ausência de oxigênio em C-11 parece ser um indicativo da atividade gastroprotetora livre dos efeitos indesejáveis de retenção de sódio (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998). Este é o caso da atividade da deloxolona (Figura 47), um triterpeno semi-sintético com atividade gastroprotetora *in vivo* semelhante à

da carbenoxolona, sem, no entanto, apresentar aumento da pressão arterial por efeito mineralocorticoide (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

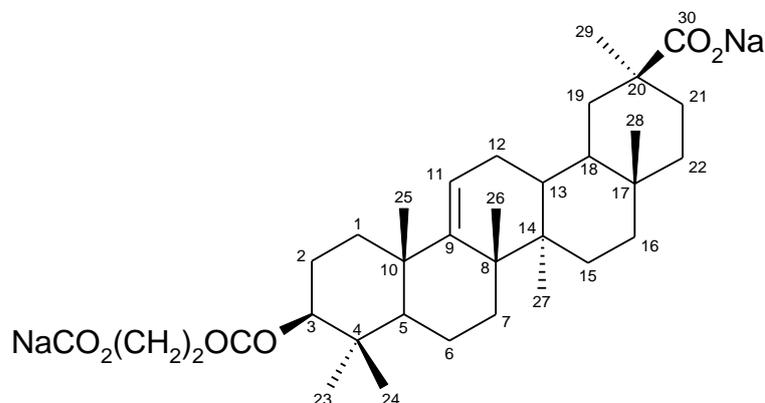


Figura 47. Estrutura da deloxolona.

A carbenoxolona e a deloxolona administradas a voluntários sadios em um estudo duplo-cego mostraram aumento na produção e no conteúdo de prostaglandina E_2 no suco gástrico dos pacientes do grupo tratado comparativamente aos do grupo controle. Este fato dá suporte à hipótese de que a citoproteção pode ser decorrente do aumento dos níveis gástricos de prostaglandina E_2 (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998). E, com a administração da deloxolona, foram observados menos efeitos indesejáveis de alteração de massa corporal, hematócrito, conteúdo de sódio e proteínas plasmáticas em relação aos pacientes que receberam carbenoxolona (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

Os triterpenos identificados em *P. edulis* (figuras 10 e 11) apresentam o grupo hidroxila em 3β e ausência de oxigênio em C-11, o que pode indicar atividade antiulcerogênica sem o pseudo-aldosteronismo observado para a carbenoxolona e o ácido glicirrético. Além disso, os ácidos oleanólico, ursólico, maslínico e corosólico apresentam grupo carboxílico em C-28, o que pode representar um adicional na atividade gastroprotetora.

A administração da saponina astragalosídeo IV (Figura 48) e de carbenoxolona reduziu a gastroproteção em ratos tratados previamente com um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase no modelo de indução por etanol (NAVARRETE et al., 2005; ARRIETA et al., 2003). Assim, neste modelo de indução a atividade antiúlcera de saponinas e de triterpenos pode estar associada à presença de óxido nítrico na mucosa gástrica (NAVARRETE et al., 2005; ARRIETA et al., 2003).

Os triterpenos isolados e identificados em folhas de *P. edulis* e a propriedade afrogênica de seu extrato aquoso reforçam a sugestão de presença de saponinas no extrato, detectadas anteriormente na triagem fitoquímica, o que pode contribuir para a gastroproteção observada em modelo de indução por etanol acidificado (ISHIKAWA, 2004).

Além da participação do óxido nítrico, a atividade gastroprotetora de saponinas parece estar relacionada a outros fatores de proteção da mucosa, como o aumento da secreção de muco, tendo em vista que estas substâncias parecem não promover inibição da secreção ácida (BORRELLI; IZZO, 2000).

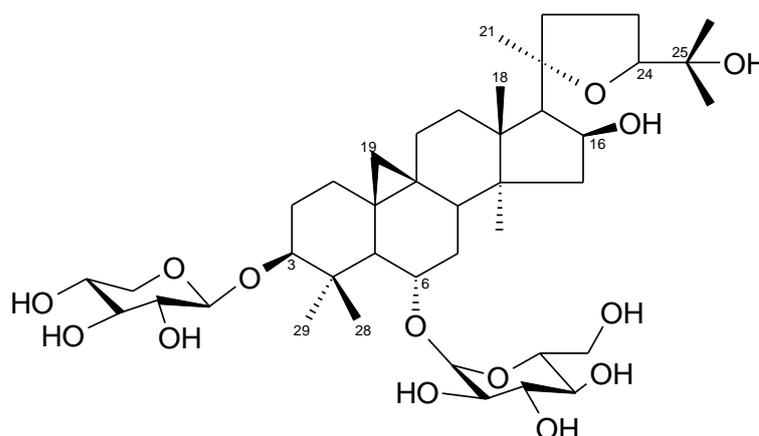


Figura 48. Estrutura do astragalosídeo IV.

O aumento do conteúdo de prostaglandinas e a estimulação da secreção de muco e bicarbonato são relatados como mecanismos de ação antiulcerogênica dos flavonóides (PARK et al., 2004; LEWIS; SHAW, 2001; LA CASA et al., 2000).

Os flavonóides, identificados na fração de acetato de etila (FA), diferentemente dos triterpenos, apresentam mecanismos antiulcerogênicos associados não só ao aumento da proteção gástrica, mas também a uma diminuição dos fatores de agressão da mucosa (PARK et al., 2004).

Esta classe de substâncias é capaz de promover a inibição da bomba de prótons (REYES-CHILPA et al., 2006; DI CARLO et al., 1999) e reduzir a secreção de histamina (PARK et al., 2004). Apresentam ainda atividade antibiótica a *Helicobacter pylori* (USTUN et al., 2006; BAE; HAN; KIM, 1999; BEIL; BIRKHOLZ; SEWING, 1995).

Os flavonóides têm propriedades estabilizantes de membrana e alguns são capazes de proteger a mucosa gástrica contra diferentes agentes necrosantes (LA CASA et al., 2000; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA; MARTÍN; MOTILVA, 1994; IZZO et al., 1994; MARTÍN et al., 1994).

Em modelos experimentais de úlcera gástrica induzida por estresse e ligação de piloro, assim como em modelo de indução por etanol e etanol acidificado, a quercetina foi capaz de prevenir a formação das lesões ulcerativas, aumentando as glicoproteínas na mucosa gástrica (COSKUN et al., 2004; MARTÍN et al., 1998; DI CARLO et al., 1999; 1994; IZZO et al., 1994; MARTÍN, MOTILVA; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, 1993; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, MARTÍN; MARHUENDA, 1992; MARTÍN et al., 1988).

Além disso, a quercetina, administrada por via oral por 14 dias consecutivos à indução de úlceras por injeção de ácido acético, promoveu remissão

das mesmas e reduziu as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) na mucosa ulcerada (SUZUKI et al., 1998).

A glutathione peroxidase é uma enzima que desempenha importante papel na eliminação de peróxido de hidrogênio e outros hidróxi-peróxidos na mucosa gástrica. A inibição desta enzima observada em modelos de indução por etanol pode, portanto, ocasionar um acúmulo de H₂O₂ nas células parietais, agravando o estresse oxidativo associado à formação de úlceras gástricas (LA CASA et al., 2000).

Embora não tenha aumentado os níveis de glutathione em modelo de indução por etanol *in vivo*, a quercetina foi capaz de promover um aumento dose-dependente na atividade da glutathione peroxidase (MARTÍN et al., 1988). O mesmo foi observado para a rutina (LA CASA et al., 2000).

Outro grupo de substâncias evidenciadas em *P. edulis* pode contribuir na sua ação farmacológica: os taninos, presentes em teor elevado na fração de metanol (FM), também apresentam atividade antiulcerogênica, correlacionada ao aumento da proteção da mucosa gástrica (BORRELLI; IZZO, 2000). Estas substâncias têm a capacidade de formar complexos com proteínas, promovendo a proteção da mucosa estomacal contra a ação de bactérias, irritação química e mecânica com conseqüente cicatrização da úlcera sob a camada protetora formada (BORRELLI; IZZO, 2000).

Embora os triterpenos e flavonóides identificados no EEAL possam desempenhar um importante papel, assim como saponinas e taninos identificados na triagem (ISHIKAWA, 2004), a gastroproteção de *P. edulis* deve-se provavelmente à ação sinérgica de diferentes classes de substâncias, tendo em vista que nenhuma das frações apresentou melhores resultados do que o próprio extrato bruto.

Na indução de úlceras gástricas por etanol e etanol acidificado, a vasoconstrição venosa acompanhada de rápida dilatação arteriolar provocam a formação de espécies reativas de oxigênio (LA CASA et al., 2000).

A reatividade dos radicais formados provoca um ataque aos constituintes celulares essenciais, promovendo a formação de compostos tóxicos, tais como epóxidos, aldeídos e novas espécies reativas de oxigênio, o que induz severas alterações celulares, provocando a morte celular (LA CASA et al., 2000). Substâncias capazes de inibir a formação ou de capturarem radicais livres formados são, desta forma, agentes antiulcerogênicos potenciais (LA CASA et al., 2000).

Estando relacionadas, a avaliação da atividade antioxidante e antiúlcera gástrica ocorreram de forma concomitante. Foram utilizados diferentes modelos para avaliar a capacidade antioxidante: DPPH, ORAC e Folin-Ciocalteu.

Devido principalmente à sua simplicidade, o ensaio mais utilizado para determinar atividade antioxidante de extratos e substâncias de origem natural é a reação com o 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) (BUTKOVÍČ; KLASINC; BORS, 2004).

Neste ensaio o radical pode ser neutralizado de duas formas: estabilização via transferência de um átomo de hidrogênio (Hydrogen Atom Transfer ou HAT) (Figura 49) ou por redução direta via transferência de elétrons (Single Electron Transfer ou SET) (Figura 50) (ZHANG; JI, 2006; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

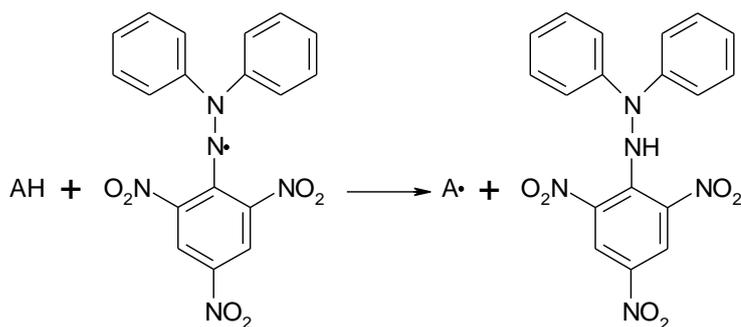


Figura 49. Esquema da reação do DPPH via transferência de um átomo de hidrogênio (Hydrogen Atom Transfer ou HAT); AH = qualquer doador de hidrogênio (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

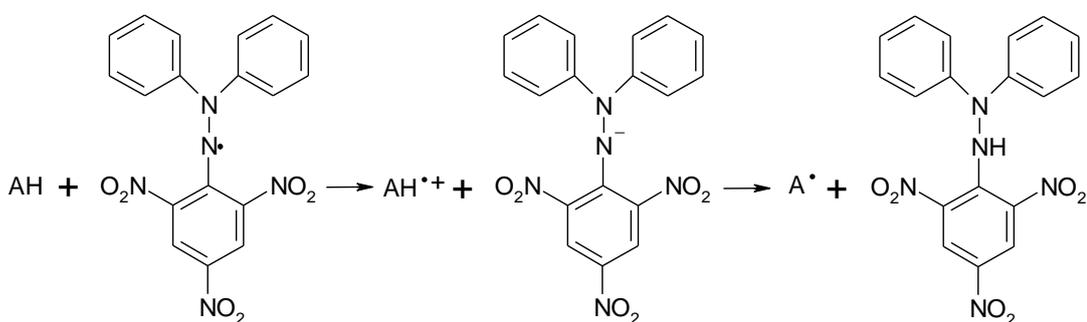


Figura 50. Esquema da reação do DPPH via transferência de elétrons (Single Electron Transfer ou SET); AH = qualquer doador de hidrogênio (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A desvantagem deste ensaio é que o DPPH é um radical nitrogenado estável que não apresenta qualquer similaridade com radicais envolvidos na peroxidação lipídica e onde a acessibilidade estérica é determinante na reação (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Portanto, muitos antioxidantes que reagem rapidamente com radicais peroxila podem não reagir com o DPPH devido a impedimentos estéricos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Sendo assim, apenas o EEAL e as frações polares foram testados neste modelo, já que não é um método de escolha para avaliação de antioxidantes lipofílicos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O método ORAC, por sua vez mede a inibição da oxidação induzida por radicais peroxila e, desta forma, reflete uma clássica atividade antioxidante via

transferência de um átomo de hidrogênio (HAT) (Figura 51) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A reação é iniciada pela decomposição térmica de azo-compostos, tais como o AAPH (Figura 52) (HUANG et al., 2002). Os radicais formados reagem com um composto fluorescente, como por exemplo, a fluoresceína sódica (Figura 53), formando um produto não fluorescente que é então quantificado (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Até o presente, é o único método que considera o grau e o tempo de inibição em uma mesma avaliação (HUANG et al., 2002).

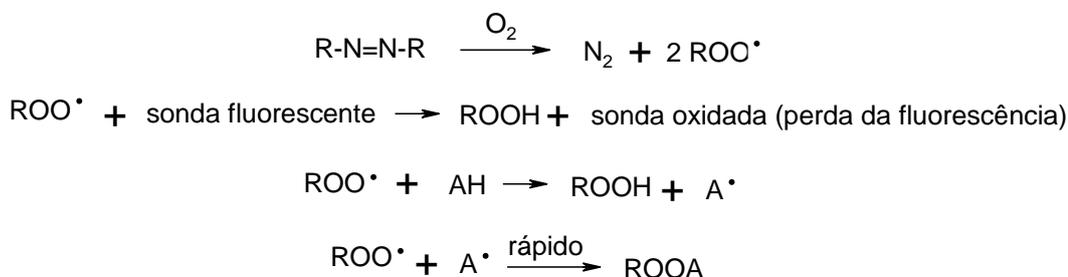


Figura 51. Princípio do ensaio para avaliação da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC); AH = qualquer doador de hidrogênio; ROO[•] = espécie reativa de oxigênio (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

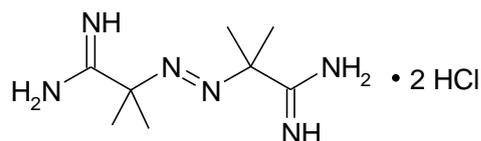


Figura 52. 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-dicloridrato (AAPH) usado como fonte de radicais livres no ensaio para avaliação da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC).

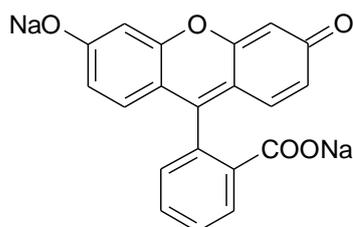


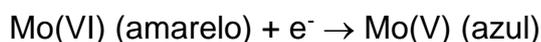
Figura 53. Fluoresceína sódica usada como sonda fluorescente no ensaio para avaliação da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC).

O ensaio ORAC fornece uma fonte controlável de radicais peroxila que mimetizam as reações de lipoperoxidação em alimentos e sistemas fisiológicos e pode ser adaptado para avaliar tanto antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Embora um impedimento para a realização de ORAC seja a necessidade de fluorímetro, equipamento mais caro e sofisticado nem sempre disponível nos laboratórios de pesquisa, o método tem sido amplamente aceito como uma ferramenta para medir a atividade antioxidante das mais diversas amostras, entre elas extratos vegetais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado não só para quantificar fenóis totais nas frações polares do extrato, mas também para avaliar a atividade antioxidante das mesmas, tendo em vista que o mecanismo básico do método consiste em uma reação de oxi-redução (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Neste ensaio, a atividade antioxidante ocorre por redução direta via transferência de elétrons (Single Electron Transfer ou SET), onde os fenóis são oxidados sob condições alcalinas enquanto o reagente heteropoliânion molibdotungstosfórico ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ e $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) é reduzido a uma solução azulada (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; WATERMAN; MOLE, 1994):



O método de Folin-Ciocalteu é simples, sensível e preciso, e embora apresente algumas desvantagens tal como a interferência de substâncias não fenólicas na reação de oxi-redução (açúcares, aminoácidos, vitaminas e minerais), é uma ferramenta útil na quantificação de fenóis e na avaliação da capacidade

antioxidante de extratos vegetais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; WATERMAN; MOLE, 1994).

Nos três ensaios utilizados, o EEAL apresentou elevada atividade em relação às substâncias de referência. Contrariamente ao ocorrido com a gastroproteção, na avaliação da capacidade antioxidante no modelo com o DPPH, houve um aumento da atividade das frações FA e FM comparativamente ao EEAL.

Estes resultados estão em acordo com os obtidos em ensaios anteriores, nos quais o EEAL, avaliado em relação à capacidade antioxidante em modelo de lipoperoxidação espontânea em cérebro de ratos, apresentou atividade pronunciada, maior do que o α -tocoferol utilizado como referência (ISHIKAWA, 2004).

Na avaliação da CE_{50} no modelo que emprega o DPPH, tanto o EEAL ($CE_{50} = 5,75 \mu\text{g/mL}$) quanto as frações avaliadas FA e FM ($CE_{50} = 2,49 \mu\text{g/mL}$) apresentaram maior atividade antioxidante do que a rutina ($CE_{50} = 7,92 \mu\text{g/mL}$). Esta substância, comumente empregada com propósitos medicinais, foi utilizada como referência (MENSOR et al., 2001).

No ensaio ORAC o EEAL ($3948 \pm 225 \mu\text{mol}$ de Trolox/g de extrato) apresentou atividade antioxidante superior à quercetina ($2134 \pm 45 \mu\text{mol}$ de Trolox/g de quercetina ou $7,06 \pm 0,15$ de Trolox equivalentes) (HUANG et al., 2002). A capacidade antioxidante também foi maior comparativamente a outras substâncias isoladas do EEAL, como o ácido gálico ($233 \pm 24 \mu\text{mol}$ de Trolox/g de ácido gálico), quercitrina ($2587 \pm 300 \mu\text{mol}$ de Trolox/g de quercitrina) e miricitrina ($2461 \pm 423 \mu\text{mol}$ de Trolox/g de miricitrina) (SOUZA et al, 2007).

Por muitos anos tem sido demonstrada a atividade antioxidante dos flavonóides, que parece envolver uma série de mecanismos de ação, incluindo a

estabilização dos radicais livres e a complexação com íon metálico (BUTKOVÍČ; KLASINC; BORS, 2004; LARSON, 1997).

Grande parte dos flavonóides apresenta alta atividade antioxidante e anti-radicalar que depende do arranjo de grupos funcionais no núcleo fundamental (CUNHA, 2005).

A relação estrutura-atividade anti-radicalar de flavonóides é influenciada, principalmente, pelas substituições no anel B, embora múltiplas substituições no anel A desempenhem importante função na reação de transferência do átomo de hidrogênio (Figura 54) (CUNHA, 2005; BUTKOVÍČ; KLASINC; BORS, 2004).

Além disso, a hidroxila em C-3 no anel C parece aumentar a estabilidade do flavonóide radical formado, provocando forte influência na capacidade de seqüestrar radicais livres, pois torna a molécula planar. Entretanto, a ausência de substituinte promove uma leve torção no anel B, reduzindo a atividade antioxidante (BUTKOVÍČ; KLASINC; BORS, 2004).

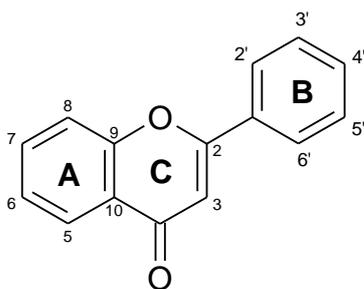


Figura 54. Núcleo fundamental de flavonóides.

Os taninos são outra classe de substâncias com pronunciada atividade antioxidante. São capazes de seqüestrar radicais livres e podem complexar com íons metálicos, tais como ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio e cálcio, entre outros (SANTOS; MELLO, 2007).

Os taninos, assim como os flavonóides, interceptam as espécies reativas de oxigênio, formando complexos estáveis. São capazes de inibir a formação de radicais de ânion superóxido assim como dos radicais DPPH, sendo possivelmente importantes na prevenção e no tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos (SANTOS; MELLO, 2007; HASLAM, 1996).

Os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes levaram à caracterização das classes de substâncias presentes nas frações e realizou-se, assim, o doseamento de taninos e flavonóides nas frações polares do extrato.

O método empregado na quantificação de flavonóides totais nas frações polares do extrato de *P. edulis* foi o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL, 2003) para caules de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) e baseia-se na hidrólise ácida de flavonóides O-glicosilados e posterior reação com cloreto de alumínio (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) (Figura 55).

A quantificação dos taninos nas frações polares baseou-se na propriedade que esta classe de substâncias tem de precipitar proteínas. A vantagem do método que utiliza a albumina do soro bovino é que, diferentemente de outras técnicas bioquímicas de precipitação de proteínas, as medições de absorvância não são feitas no sobrenadante, mas sim no precipitado ressuspenso, evitando-se assim problemas com a turbidez da solução (WATERMAN; MOLE, 1994).

O elevado teor de flavonóides, assim como os resultados observados nos ensaios antiúlcera e de citotoxicidade em células CHO conduziram ao fracionamento em coluna da fração de acetato de etila (FA).

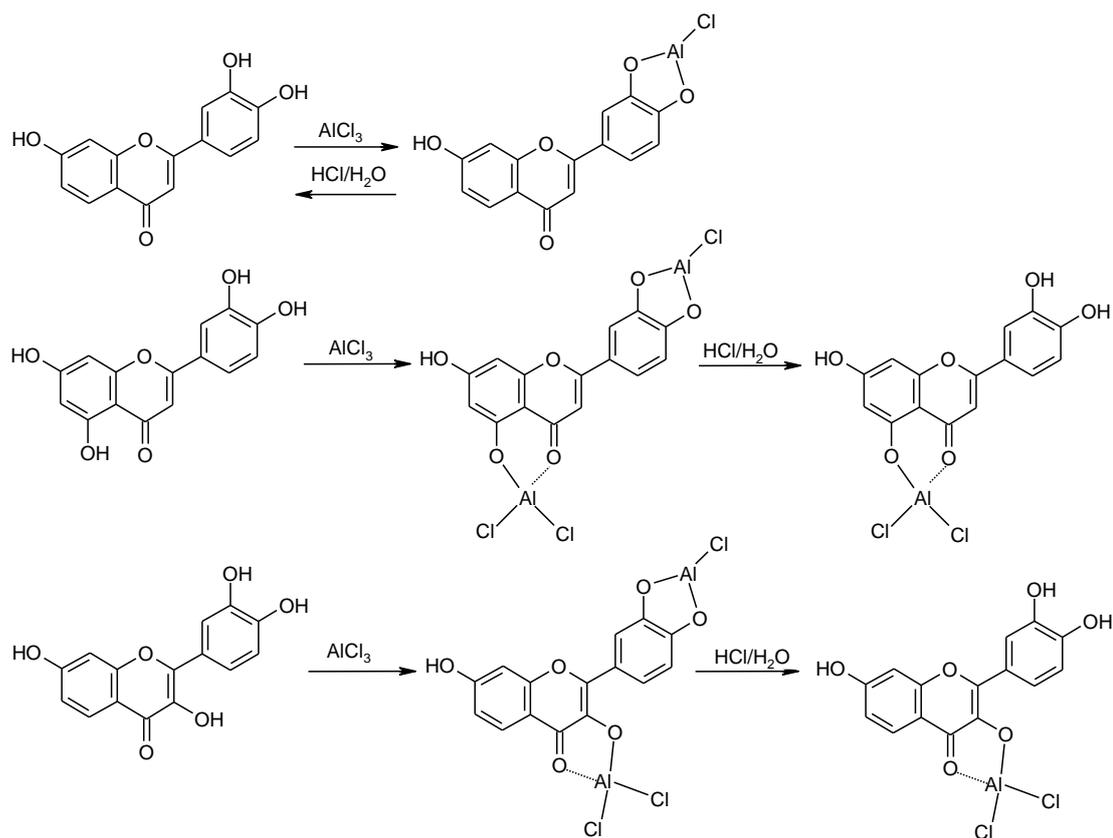


Figura 55. Esquemas das reações possíveis de flavonas e flavonóis com cloreto de alumínio, na presença ou ausência de ácido.

O oxigênio é a base da vida aeróbia. Pesquisas demonstram que os oxidantes exercem papel fundamental em processos como respiração mitocondrial, detoxificação microssomal, fagocitose, renovação da membrana, síntese de prostaglandinas e destruição de microrganismos patogênicos por fagócitos (LANGSETH, 1995; FREI, 1994; MIQUEL; QUINTANILHA; WEBER, 1989).

Contraditoriamente, o oxigênio pode gerar subprodutos oxidantes altamente reativos, que promovem danos em diversos tipos de macromoléculas celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos (LANGSETH, 1995).

O estresse oxidativo (condição bioquímica caracterizada por um desequilíbrio entre níveis relativamente altos de espécies reativas tóxicas,

especialmente espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e mecanismos de defesas antioxidantes do organismo) contribui para o acúmulo de mutações no genoma e, conseqüentemente está intimamente associado à carcinogênese (OZBEN, 2007; THOMPSON, 2006; TOYOKUNI, 2006).

Alguns exemplos que fundamentam essa hipótese são a infecção crônica por *Helicobacter pylori* associada à alta incidência de câncer de estômago, exposição à radiação ultravioleta como fator de risco para câncer de pele e radiação γ associada à ocorrência de leucemia (TOYOKUNI, 2006).

De fato, evidências apontam que os pacientes com câncer apresentam níveis de espécies reativas de oxigênio maiores e menor atividade de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase e glutathione peroxidase comparativamente a indivíduos saudáveis (OZBEN, 2007).

A atividade antioxidante extremamente elevada observada nos diferentes ensaios, bem como a identificação de flavonóides e triterpenos no extrato de *P. edulis*, conduziram à realização dos testes de citotoxicidade em nove diferentes linhagens de células neoplásicas humanas.

Dados consistentes apontam que o uso concomitante de substâncias antioxidantes na radio e quimioterapia não só aumentam a eficácia dos tratamentos convencionais, como diminuem os efeitos colaterais (OZBEN, 2007).

Experimentos revelam que a ingestão de antioxidantes induz apoptose seletiva de células cancerosas, previne a angiogênese e metástases, podendo servir como um adjuvante na terapia do câncer (OZBEN, 2007).

Além do uso como adjuvantes, antioxidantes poderiam ser usados em indivíduos saudáveis, na prevenção primária do câncer, inibindo mutações por meio de bloqueio ou competição com as espécies reativas de oxigênio e nas prevenções

secundária (câncer em estágio inicial de desenvolvimento) e terciária (pacientes após a terapia), inibindo a iniciação, promoção e progressão da doença (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Inúmeros polifenóis agem como quimiopreventivos, reduzindo a incidência de diferentes tipos de neoplasias (PSAHOULIA et al., 2007). O ácido gálico, por exemplo, apresentou atividade antiproliferativa em diferentes linhagens neoplásicas humanas de leucemia, câncer de mama, câncer de próstata e osteosarcoma (SALEEM et al., 2002; SAKAGUCHI et al., 1999).

Os flavonóides apresentam pronunciada atividade anticâncer (USTUN et al., 2006). A quercetina inibiu de forma significativa o crescimento de células de câncer de próstata muito agressivo e moderadamente agressivo, sem, no entanto, apresentar alteração no ciclo celular de fibroblastos não tumorais (NAIR et al., 2004). A mesma apoptose seletiva foi verificada em células de câncer de fígado e de ossos, sem alteração de células hepáticas e osteoclastos normais (FERRER et al., 2006; SON et al., 2004).

A quercetina é capaz de proteger as células do dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, além de prevenir a transformação maligna induzida por lipopolissacarídeo e TPA (13-acetato de 12-O-tetradecaoilforbol) (CHEN et al., 2006).

Sugere-se que a atividade anticâncer da quercetina está relacionada à capacidade que este flavonóide tem de significativamente inibir a expressão de oncogenes específicos, enquanto aumenta a expressão de vários genes supressores tumorais (PSAHOULIA et al., 2007; NAIR et al., 2004).

Embora a quercetina apresente potente atividade antiproliferativa em diversas linhagens tumorais, a glicosilação, como, por exemplo, na quercitrina e na

rutina, parece remover a atividade apoptótica e de prevenção na formação de neoplasias (CHEN et al., 2006; SHEN et al., 2003; MANTHEY; GUTHRIE, 2002).

A literatura que reporta a atividade antitumoral de triterpenos frente a inúmeras linhagens de células neoplásicas humanas é vasta e consistente (DZUBAK et al, 2006) e parece estar relacionada não só com o aumento da expressão de anti-oncogenes, mas também com a inibição da expressão de oncogenes (SALEEM et al., 2005a; 2005b).

Em estudos *in vitro* e *in vivo*, os triterpenos foram capazes de promover a diferenciação de células na fase de promoção do tumor e causar apoptose seletiva de células neoplásicas, e, sendo assim, esta classe de substâncias poderia ser utilizada na prevenção e/ou intervenção nos casos de câncer (SALEEM et al., 2005a; 2005b).

Em estudos *in vitro*, a β -amirina apresentou potente atividade frente a diferentes linhagens de células neoplásicas humanas de câncer de cólon, assim como moderada atividade em células de pulmão (DONG; HE; LIU, 2007; ONO et al., 2004).

Segundo Yoshida et al. (2005), parece não haver diferença na atividade antiproliferativa de triterpenos com esqueleto oleanano e ursano. De fato, o ácido maslínico e o ácido ursólico apresentaram atividade igualmente potente frente às células neoplásicas humanas de adenocarcinoma gástrico e carcinoma de útero (YOSHIDA et al., 2005).

A presença de um grupo hidroxila em C-2 também não parece alterar a atividade antitumoral. Os ácidos corosólico e ursólico apresentaram atividade antiproliferativa semelhante em células humanas de leucemia, de câncer gástrico, de câncer de mama, de câncer cervical e de carcinoma hepático (MA et al., 2005). Os

ácidos maslínico e oleanólico inibiram a proliferação e induziram a apoptose de forma similar em células de câncer de cólon (JUAN et al., 2006).

A presença do grupo carboxílico nos triterpenos ácidos, por sua vez, parece ser importante na permeabilidade da membrana e conseqüente atividade citotóxica em linhagens neoplásicas (AMICO et al., 2006).

De fato, os ácidos oleanólico, ursólico e corosólico identificados no EEAL de *P. edulis* apresentaram atividade antitumoral em cultura de células de leucemia (HL-60), carcinoma hepático (Hep-G2) e câncer de mama (MCF-7), com valores de DL₅₀ de 12-48 µM (AKIHISA et al., 2006).

Além disso, os ácidos oleanólico e ursólico foram capazes de induzir a apoptose e inibir o crescimento de diversas linhagens de células de leucemia, com índices de inibição do crescimento superiores a 90% na concentração de 5 µg/mL (URECH et al., 2005).

Os ácidos corosólico e maslínico também apresentaram pronunciada atividade frente a células Caco-2 de câncer de cólon humano (HE; LIU, 2007). Mostraram ainda inibição da proliferação e indução de apoptose em uma das formas mais agressivas de câncer, o astrocitoma, por meio da regulação de espécies reativas de oxigênio e ativação da caspase-3 (MARTÍN et al., 2007).

O ácido maslínico também mostrou atividade antiproliferativa seletiva, induzindo apoptose e diferenciação de células de diferentes linhagens de câncer de cólon, sem, no entanto, provocar alteração no ciclo celular ou morte de células não tumorais intestinais (REYES et al., 2006).

O lupeol, por sua vez, apresenta atividade antiproliferativa referenciada em inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro*, com capacidade antitumoral seletiva, ou seja, promovendo a diferenciação e apoptose de células neoplásicas sem alterar o ciclo

celular de células não neoplásicas (CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008; SALEEM et al., 2005b).

Sugere-se que a atividade anticâncer do lupeol também está relacionada com a inibição da expressão de oncogenes e ativação dos anti-oncogenes (CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008; KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2007; SALEEM et al., 2005a; 2005b).

Além disso, tem sido reportado que o lupeol é capaz de induzir a diferenciação e inibir a proliferação de células de melanoma, além de induzir a reconstituição da epiderme (KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2008). De fato, a aplicação tópica de lupeol antes da indução de câncer em camundongos, em diferentes modelos, inibiu a formação de edema, hiperplasia e a incidência de neoplasias (KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2008).

Diversos são os exemplos de fármacos de origem natural utilizados como antitumorais, tais como vimblastina, vincristina, taxol e etoposídeo (MANN, 2002). A importância da pesquisa de produtos naturais com atividade antineoplásica fica evidente quando observa-se que aproximadamente 60% dos compostos anticancerígenos e 75% de fármacos utilizados no tratamento de doenças infecciosas são de origem natural ou derivados de produtos naturais (MC CHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

No extrato de *P. edulis* foram identificados triterpenos e flavonóides com reconhecida atividade antitumoral, o que pode justificar, ao menos parcialmente, a citotoxicidade observada no ensaio com as nove linhagens de células neoplásicas humanas. É importante ressaltar que os resultados indicam uma seletividade do extrato e das frações, pelas células de câncer de mama (MCF-7), com valores de

inibição do crescimento de 50% (IC₅₀) que variaram de 0,001 a 0,25 µg/mL, com exceção da fração de metanol (FM).

Além disso, a fração de acetato de etila (FA), da qual foram isolados flavonóides como a quercetina, apresentou atividade citostática pronunciada em praticamente todas as culturas neoplásicas, com valores de IC₅₀ de 0,001 a 25 µg/mL, com seletividade para as linhagens de câncer de mama, próstata e leucemia.

A fração de hexano (FH), apresentando triterpenos com reconhecida atividade tumoral como o lupeol, também mostrou elevada atividade citostática com seletividade para as linhagens neoplásicas humanas de mama, próstata e leucemia, com valores de IC₅₀ de 0,001 a 2,5 µg/mL.

A fração de diclorometano apresentou a mesma seletividade de FA e FH, enquanto o EEAL foi seletivo para as células de câncer de mama, mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos e melanoma.

Entre todas as frações, a que apresentou menor citotoxicidade foi a FM, com valores de IC₅₀ entre 2,5 e 25 µg/mL em linhagens neoplásicas de mama e melanoma.

Os resultados de citotoxicidade obtidos em cultura de células tumorais conduziram à avaliação de citotoxicidade de células não neoplásicas de ovário de hamster chinês (CHO) para avaliação da toxicidade *in vitro* do EEAL. A baixa solubilidade das frações de hexano (FH) e de diclorometano (FD) impediu a avaliação das mesmas.

Nas concentrações empregadas na avaliação da citotoxicidade em cultura de células CHO (0,98 a 1,95 µg/mL), o EEAL e a fração de acetato de etila (FA) apresentaram atividade proliferativa extremamente significativa comparada ao controle, sem indícios de citotoxicidade. Nas linhagens tumorais, foram capazes de

inibir totalmente o crescimento das células de câncer de mama em concentrações inferiores às citotóxicas para as células normais (0,001 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$).

Além disso, FA apresentou atividade citotóxica para linhagens de câncer de próstata e leucemia com valores de IC_{50} entre 0,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Na cultura de células não neoplásicas, mostrou atividade proliferativa extremamente significativa em uma concentração de até 3,91 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando assim uma possível seletividade na apoptose de células cancerosas sem alteração do ciclo celular de células normais.

Como mencionado anteriormente, triterpenos e flavonóides apresentaram atividade antiproliferativa seletiva de células tumorais, sem alteração de tecidos normais (FERRER et al., 2006; SALEEM et al., 2005b). Além disso, os triterpenos apresentam atividade proliferativa que foi relacionada à capacidade de cicatrização das úlceras gástricas e reconstituição da epiderme (KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2008; SÁNCHEZ et al., 2006).

Visando ainda avaliar a segurança do uso de *P. edulis* pela população e baseando-se na consistente literatura a respeito do potencial mutagênico de alguns flavonóides, o EEAL foi avaliado quanto à mutagenicidade.

O teste de Ames é amplamente aceito na identificação de substâncias capazes de promover danos genéticos que possam ocasionar mutações (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). No ensaio são empregadas linhagens de *Salmonella typhimurium* com diferentes mutações pré-existentes criadas para responderem a substâncias mutagênicas que agem por mecanismos diferenciados (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Sendo assim, as cepas TA98 e TA97a detectam compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA por inserção (TA97a) ou

deleção (TA98) de nucleotídeo (mutações do tipo *frameshift*), enquanto que a TA100 detecta substâncias que promovem mutação por substituições de pares de bases (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A cepa TA102 pode ser revertida por agentes mutagênicos que promovem transições ou transversões de pares de bases e que causam danos oxidativos, além de detectar agentes *cross-linking*, tais como a bleomicina e mitomicina (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O EEAL de *P. edulis* apresentou indícios de mutagenicidade para as cepas TA97a e TA98, aumentando de forma significativa o número de revertentes em concentrações que variaram de 2,5 a 20 mg/placa. No entanto, a razão de mutagenicidade foi inferior a dois em todas as concentrações empregadas. A cepa TA97A é sensível aos mutágenos detectados em ensaios com a TA98, tendo em vista que respondem a substâncias que agem por mecanismo semelhante (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Sendo assim, era de se esperar que o índice de mutagenicidade observado em uma das cepas se reproduzisse na outra.

A quercetina presente no EEAL tem sido alvo de inúmeros estudos para avaliação da mutagenicidade, e embora tenha sido demonstrado dano genético ocasionado por este flavonóide em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, seu papel na mutagênese ainda é objeto de controvérsia, tendo em vista que a literatura que reporta atividade antimutagênica da quercetina é vasta (SANNOMIYA et al., 2007; EDENHARDER; GRÜNHAGE, 2003).

Embora nos ensaios realizados o EEAL não tenha apresentado sinais de toxicidade *in vivo* (ISHIKAWA, 2004), os indícios de mutagenicidade observados no Teste de Ames reforçam o cuidado no uso de grandes quantidades de extratos de *P. edulis*.

Os triterpenos e flavonóides identificados no extrato etanol/água (70%) liofilizado de *P. edulis* (EEAL), assim como a pronunciada atividade antiúlcera gástrica observada nos ensaios realizados, corroboram a utilização popular da espécie no tratamento de distúrbios gástricos.

Quanto ao uso de folhas do cambucá por populações caiçaras para o tratamento de afecções de garganta, tosses e coqueluches, pode estar relacionado com a atividade antiinflamatória de triterpenos e flavonóides encontrados em *P. edulis*, amplamente descrita na literatura e ainda com a atividade antitussígena de triterpenos observada em estudos *in vivo* (DZUBAK et al., 2006; JU et al., 2006; DI CARLO et al., 1999).

Conclusões

No final, conservaremos somente o que amamos, amaremos somente o que compreendermos, compreenderemos somente o que nos é ensinado.

Baba Dioum.

7. CONCLUSÕES

Esperamos com este trabalho contribuir para o conhecimento de *P. edulis*, uma espécie nativa brasileira em risco de extinção e ainda, despertar o interesse sobre a fitoquímica de uma planta tão pouco conhecida. Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 7.1. A partir do extrato etanol/água (70%) liofilizado (EEAL) foram identificadas 12 substâncias: β -amirina, lupeol, β -sitosterol, ácidos oleanólico, ursólico, maslínico, corosólico, galato de etila, ácido gálico, quercitrina, miricitrina e quercetina;
- 7.2. As frações de acetato de etila (FA) e de metanol (FM) obtidas por partição do EEAL apresentaram teores de 52,16% e 45,26% de fenóis totais, 10,81% e 0,07% de flavonóides e 28,31% e 43,90% de taninos, respectivamente;
- 7.3. No modelo com DPPH, FA e FM apresentaram pronunciada atividade antioxidante, superior a da rutina utilizada como padrão, com valores de CE_{50} de 2,49 $\mu\text{g/mL}$; no mesmo ensaio, o EEAL apresentou CE_{50} de 5,75 $\mu\text{g/mL}$ e potente capacidade de absorção do radical oxigênio com valor relativo de ORAC de 3948 μmol de Trolox/g de extrato;
- 7.4. Na avaliação da gastroproteção, o EEAL apresentou atividade extremamente significativa ($P < 0,001$) comparativamente ao controle, na dose de 100 mg/kg, com redução de 73,82% da área total de lesão (ATL); entre as frações obtidas, a de hexano (FH) apresentou maior atividade, com redução da ATL de 68,08%; no entanto, em nenhuma das frações foi observado resultado tão

expressivo como o do EEAL, sugerindo atividade antiúlcera gástrica por sinergismo dos componentes do extrato; embora o ácido ursólico tenha reduzido a ATL em 26,06% este resultado não foi diferente estatisticamente do grupo controle ($P \geq 0,05$);

- 7.5.** Em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO), o EEAL e as frações FA e FM apresentaram citotoxicidade concentração-dependente com valores de DL_{50} de 3,68 $\mu\text{g/mL}$, 9,68 $\mu\text{g/mL}$ e 5,90 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; tanto o EEAL como as frações polares apresentaram atividade proliferativa extremamente significativa comparativamente ao controle nas menores doses avaliadas (0,98 $\mu\text{g/mL}$ e 1,95 $\mu\text{g/mL}$);
- 7.6.** O EEAL e as frações obtidas a partir do mesmo apresentaram atividade antiproliferativa pronunciada dose-dependente em 9 linhagens diferentes de células tumorais humanas em concentrações de 0,001 a 250 $\mu\text{g/mL}$; o EEAL apresentou seletividade para câncer de mama, mama com fenótipo resistente a múltiplos fármacos e melanoma com valores de IC_{50} de 0,001 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto FH e FA apresentaram seletividade para linhagens de mama, próstata e leucemia com valores de IC_{50} de 0,001 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$;
- 7.7.** No ensaio de Ames, o EEAL apresentou indícios de mutagenicidade para as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97A e TA98, com e sem ativação metabólica, nas concentrações de 2,5 a 20,0 mg/placa, sem apresentar, no entanto, mutagenicidade efetiva nas cepas e concentrações empregadas.

Referências Bibliográficas

Não feito, não perfeito, não completo.

Não satisfeito nunca, não contente.

Não acabado, não definitivo:

Eis aqui um vivo.

Eis-me aqui.

Lenine e Carlos Rennó.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.150, de 17 de junho de 2003**. Aprova o Fascículo 4 da Parte II, da 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira, em anexo, elaborado pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira-CPRFB, instituída pela Portaria n.12, de 20 de janeiro de 2000. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17575&word=>. Acesso em: 20 out. 2003.

AGUIRRE, M.C.; DELPORTE, C.; BACKHOUSE, N.; ERAZO, S.; LETELIER, M.E.; CASSELS, B.K.; SILVA, X.; ALEGRÍA, S.; NEGRETE, R. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.5673–5677, 2006.

AJAIKUMAR, K.B.; ASHEEF, M.; BABU, B.H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.171–176, 2005.

AKIHISA, T.; KAMO, S.; UCHIYAMA, T.; AKAZAWA, H.; BANNO, N.; TAGUCHI, Y.; YASUKAWA, K. Cytotoxic activity of *Perilla frutescens* var. japonica leaf extract is due to high concentrations of oleanolic and ursolic acids. **Journal of Natural Medicines**, v.60, p.331-333, 2006.

ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; MARTÍN, M.J.; MARHUENDA, E. Gastric anti-ulcer activity of silymarin, a lipoxygenase inhibitor, in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.44, p.929-931, 1992.

ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; MARTÍN, M.J.; MOTILVA, V. Antiulcer and gastroprotective effect of quercetin: a gross and histologic study. **Pharmacology**, v.48, p.56-63, 1994.

ALMEIDA, M.Z. **Plantas medicinais**. 2.ed. Salvador: EDUFBA, 2003. 216p.

ALMEIDA, S.C.X.; LEMOS, T.L.G.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Química Nova**, v.28, p.57-60, 2005.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPEZ, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.

AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M.; BESSA, W.S.; BARNES, R.A.; KAPLAN, M.A.C.; WESSJOHANN, L.A. Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.653-654, 2001.

AMICO, V.; BARRESI, V.; CONDORELLI, D.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Antiproliferative terpenoids from almond hulls (*Prunus dulcis*): identification and structure activity relationships. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.810-814, 2006.

AMOR, E.C.; VILLASENOR, I.M.; GHAYUR, M.N.; GILANI, A.H.; CHOUDHARY, M.I. Spasmolytic flavonoids from *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry. **Zeitschrift fur Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v.60, p.67-71, 2005.

ANDREO, M.A.; BALLESTEROS, K.V.R.; HIRUMA-LIMA, C.A.; ROCHA, L.R.M.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.431-441, 2006.

ANDRIKOPOULOS, N.K.; KALIORA, A.C.; ASSIMOPOULOU, A.N.; PAPAPEORGIU, V.P. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. **Phytotherapy Research**, v.17, p.501-507, 2003.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v.21, p.565-567, 2006.

APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.41, p.399-436, 2003.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v.69, p.905-909, 2003.

ASSIMOPOULOU, A.N.; PAPAPEORGIU, V.P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. **Biomedical Chromatography**, v.19, p.285-311, 2005.

ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.54, p.583-588, 2002.

BAE, E.A.; HAN, M.J.; KIM, D.H. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their methabolites. **Planta Medica**, v.65, p.442-443, 1999.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1984. 277 p.

BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.A.; MAGRI, L.P.; TOMA, W.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.328-332, 2004.

BEGUM, S.; HASSAN, S.I.; SIDDIQUI, B.S.; SHAHEEN, F.; GHAYUR, M.N.; GILANI, A.H. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. **Phytochemistry**, v.61, p.399–403, 2002.

BEGUM, S.; SIDDIQUI, B.S.; HASSAN, S.I. Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves. **Natural Product Letters**, v.16, p.173-177, 2002.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K.F.R. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittel-Forschung**, v.46, p.697-700, 1995.

BELESKI-CARNEIRO, E.B.; ALQUINI, Y.; REICHER, F. Pectins from the fruit of Myrtaceae. In: MATTOSO, L.H.C.; FROLLINI, E.; LEÃO, A., eds. **Natural polymers and composites**. São Pedro: UNESP, EMBRAPA, USP, 2000. p.162-165. (Proceedings of the Third Internacional Symposium on Natural Polymers and Composites, São Pedro, 2000).

BELLOSTA, S.; DELL'AGLI, M.; CANAVESI, M.; MITRO, N.; MONETTI, M.; CRESTANI, M.; VEROTTA, L.; FUZZATI, N.; BERNINI, F.; BOSISIO, E. Inhibition of metalloproteinase-9 activity and gene expression by polyphenolic compounds isolated from the bark of *Tristanopsis calobuxus* (Myrtaceae). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, p.1440-1448, 2003.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v.97, p.267-281, 1982.

BEUTLER, J.A.; CARDELLINA, J.H.; GRAY, G.N.; PRATHER, T.R.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R.; LIN, C.M.; HAMEL, E.; CRAGG, G.M. Two new cytotoxic chalcones from *Calythropsis aurea*. **Journal of Natural Products**, v.56, p.1718-1722, 1993.

BILIA, A.R.; CIAMPI, L.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, p.199-204, 1996.

BIOTEK. Tech Resources. Application Notes. **Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assays with Synergy™ HT Multi Detection Microplate Reader (2005-08-17)**. Disponível em: http://www.biotek.com/resources/tech_res_detail.php?id=161. Acesso em: 1 mai. 2007.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, p.581-591, 2000.

BOUDIN, M.H. **Dicionário de tupi moderno**: (dialeto tembé-tênêthar do alto do rio Gurupi). Presidente Prudente: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Presidente Prudente, 1966. 342 p.

BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6689-6695, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Publicações. Estimativa de câncer. **Estimativa 2008**: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>. Acesso em: 01 fev. 2008.

BUENO, S. **Grande dicionário etimológico-prosódico da língua portuguesa**. São Paulo: Saraiva, 1968. 8v.

BUTKOVÍČ, V.; KLASINC, L.; BORS, W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2816-2820, 2004.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R. The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in Myrtaceae pollen. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v.57, p.944-946, 2002.

CANNON, J.R.; MARTÍN, P.F. The flavanones of *Agonis spathulata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v.30, p.2099-2101, 1977.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v.407, p.249-257, 2000.

CEFARELLI, G.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; IZZO, A.; MASTELLONE, C.; PACIFICO, S.; PISCOPO, V. Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened Cv. Annurca apple fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.803-809, 2006.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v.30, p.597-599, 2007.

CHATURVEDI, P.K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v.263, p.1-13, 2008.

CHEN, T.J.; JENG, J.Y.; LIN, C.W.; WU, C.Y.; CHEN, Y.C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. **Toxicology**, v.223, p.113-126, 2006.

CHENG, M.J.; LEE, K.H.; TSAI, I.L.; CHEN, I.S. Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.1915-1920, 2005.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1926. 3v.

COSKUN, O.; KANTER, M.; ARMUTCU, F.; CETIN, K.; KAYBOLMAZ, B.; YAZGAN, O. Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acute gastric ulcer. **European Journal of General Medicine**, v.1, p.37-42, 2004.

COURTNEY, J.L.; LASSAK, E.V.; SPEIRS, G.B. Leaf wax constituents of some myrtaceous species. **Phytochemistry**, v.22, p.941-949, 1983.

CRAVO, A.B. **Frutas e ervas que curam**: usos, receitas e dosagem. 7.ed. Curitiba: Hemus, 2003. p.58.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Civilização Brasileira, 1979. 599p.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. 670p.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v.591, p.8-15, 2005.

DENIZBASI, A.; YAGEN, C.; OZTURK, M.; YEGEN, B. Role of nitric oxide in gastric injury induced by hemorrhagic shock in rats. **Pharmacology**, v.61, p.106-112, 2000.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M.E.; RUIZ, A.L.T.G.; AMARAL, M.C.E.; BITTRICH, V.; KOHN, L.K.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F.; CARVALHO, J.E.; FOGGIO, M.A. antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. **Phytotherapy Research**, v.22, p.127-130, 2008.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.64, p.337-353, 1999.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Effect of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v.8, p.42-45, 1994.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais**: verdades e mentiras. São Paulo: UNESP, 2007. 133p.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

DICIONÁRIO BRASILEIRO da língua portuguesa. 2.ed. São Paulo: Mirador Internacional, 1976. 2v.

DJOUKENG, J.D.; ABOU-MANSOUR, E.; TABACCHI, R.; TAPONDJOU, A.L.; BOUDA, H.; LONTSI, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p.283-286, 2005.

DONATO, A.M. **Myrtaceae**: anatomia foliar de cinco espécies nativas com potencial medicinal e/ou econômico. São Paulo, 2003. 199p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

DONG, M.; HE, X.; LIU, R.H. Phytochemicals of black bean seed coats: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidative activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.6044-6051, 2007.

DOS SANTOS, K.S.C.R.; COELHO, J.F.J.; FERREIRA, P.; PINTO, I.; LORENZETTI, S.G.; FERREIRA, E.I.; HIGA, O.Z.; GIL, M.H. Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v.310, p.37-45, 2006.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**, v.23, p.394-411, 2006.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, R. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research**, v.540, p.1-18, 2003.

FARINA, C.; PINZA, M.; PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. **Farmaco**, v.53, p.22-32, 1998.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 1265p.

FERNÁNDEZ, A.; ÁLVARES, A.; GARCÍA, M.D.; SÁENS, M.T. Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol. **Farmaco**, v.56, p.335-338, 2001.

FERRER, E.G.; SALINAS, M.V.; CORREA, M.J.; NASO, L.; BARRIO, D.A.; ETCHEVERRY, S.B.; LEZAMA, L.; ROJO, T.; WILLIAMS, P.A.M. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.11, p.791-801, 2006.

FREI, B., ed. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. 588p.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R.M.; SILVA, A.M.P.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high-speed countercurrent chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.16, p.411-414, 2005.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.178-182, 2005.

GALLO, M.B.C.; DA SILVA, F.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F. New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, p.279-288, 2006.

GONSALVES, P.E. **Frutas que curam**. São Paulo: MG, 2002. 184 p.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. **Goodman and Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. 1821p.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; ČÍŽ, M.; GLIGELMO-MIGUEL, N.; HARUENKIT, R.; PARK, Y.S.; JUNG, S.T.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.154-159, 2003.

GOTTLIEB; O.R.; BORIN, M.R.M.B. Evolution of Angiosperms via Modulation of Antagonisms. **Phytochemistry**, v.49, p.1-15, 1998.

GUARALDO, L.; SERTIÈ, J.A.A.; BACCHI, E.M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.191-195, 2001.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 13-28.

HAEBERLEIN, H.; TSCHIERSCH, K.P.; SCHAEFER, H.L. Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity for the benzodiazepine receptor characterized by structure-activity relationships and in vivo studies of a plant extract. **Pharmazie**, v.49, p.912-922, 1994.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3.ed. London: Academic Press, 1988. 325p.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids**: advances in research since 1986. London; New York: Chapman & Hall, 1994. 676p.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: a possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.

HE, X.; LIU, R.H. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.4366-4370, 2007.

HEINZEN, H.; VRIES, J.X.; MOYNA, P.; REMBERG, G.; MARTINEZ, R.; TIETZE, L.F. Mass Spectrometry of Labelled Triterpenoids: Thermospray and Electron Impact Ionization Analysis. **Phytochemical Analysis**, v.7, p.237-244, 1996.

HOANG, V.L.; NGUYEN, Q.T. Chemical compositions of *Syzygium Jambos* (Linn) Alston. Ly Va Sinh Hoc, Vietnam, v. 9, p. 20-23, 2004. *apud SciFinder Scholar*, 2006.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado, 1939. p.212-214.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; PRIOR, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (orac) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4437-4444, 2002.

HUSSEIN, S.A.M.; HASHEM, A.N.M.; SELIEM, M.A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A.M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v.64, p.883–889, 2003.

INDEX KEWENSIS plantarum phanerogamarum. Oxford: Clarendon Press, 1995. 2v.

INSTITUTO DE BOTÂNICA. Jardim Botânico de São Paulo. Legislação Ambiental. **Resolução SMA 48**: lista oficial das espécies da flora do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção. Disponível em: <http://www.ibot.sp.gov.br/legislacao/legislacao.htm>. Acesso em: 01 fev. 2008.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices, part 5, tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, Geneva, 1992.

ISHIKAWA, T.; DONATINI, R.S.; DIAZ, I.E.C.; YOSHIDA, M.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.527-529, 2008.

ISHIKAWA, T. **Estudo farmacognóstico do cambucá: *Plinia Edulis* (Vell.) Sobral - Myrtaceae**. São Paulo, 2004. 128 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ISHIKAWA, T.; KATO, E.T.M.; BACCHI, E.M. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade antiúlcera de *Plinia edulis* Vell. Sobral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p.100, res.FM51, 2003.

ITO, H.; KASAJIMA, N.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; YOSHIDA, T. Dimeric flavonol glycoside and galloylated C-glucosylchromones from *Kunzea ambigua*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.411-415, 2004.

IZZO, A.A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Antiulcer effects of flavonoids. Role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, v.8, p.179-181, 1994.

- JOLY, A.B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. 7.ed. São Paulo: Nacional, 1985. 777 p.
- JOSEPH, M.I.; PICHON-PRUM, N.; RAYNAUD, J. Flavonoid heterosides of the leaves of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Pharmazie**, v.42, p.142, 1989.
- JU, J.; ZHOU, L.; LIN, G.; LIU, D.; WANG, L.; YANG, J. Studies on constituents of triterpene acids from *Eriobotrya japonica* and their anti-inflammatory and antitussive effects. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, Beijing, v.38, n.10, p.752-757, 2003. *apud SciFinder Scholar*, 2006.
- JUAN, M.E.; WENZEL, U.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; DANIEL, H.; PLANAS, J.M. Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, v.136, p.2553-2557, 2006.
- JUNGES, M.J.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; RODRIGUES FILHO, E. The use of ^{13}C and ^1H -NMR in the structural elucidation of a new *nor*-lupane triterpene. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.10, p.317-320, 1999.
- KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. **Carcinogenesis**, v.28, p.233-239, 2007.
- KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, p.475-510, 2008.
- KOVGANKO, N.V.; KASHKAN, Z.N.; BORISOV, E.V. ^{13}C NMR spectra of functionally substituted 3- β chloroderivatives of cholesterol and β -sitosterol. **Chemistry of Natural Compounds**, v.36, p.595-598, 2000.
- KUIATE, J.R.; MOUOKEU, S.; WABO, H.K.; TANE, P. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v.21, p.149-152, 2007.
- LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTÍN, M.J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1/2, p.45-53, 2000.
- LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.
- LANGSETH, L. **Oxidants, antioxidants, and disease prevention**. Brussels: ILSI, 1995. 24p. (ILSI Europe Concise Monograph Series).
- LAPCÍK, O.; KLEJDUS, B.; KOKOSKA, L.; DAVIDOVÁ, M.; AFANDI, K.; KUBÁN, V.; HAMPL, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.983-992, 2005.
- LARSON, R.A. **Naturally occurring antioxidants**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. 195 p.

LEE, I.Y.; YUN, B.S.; KIM, J.P.; CHUNG, S.H.; SHIM, G.S.; YOO, I.D. Antioxidative compounds isolated from the stem bark of *Eucalyptus globulus*. Saengyak Hakhoechi, Korea, v.29, p.163-168, 1998. *apud SciFinder Scholar*, 2006.

LEE, S.E.; SHIN, H.T.; HWANG, H.J.; KIM, J.H. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1041-1047, 2003.

LEWIS, D.A.; SHAW, G.P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.95-100, 2001.

LI, Y.; XU, C.; ZHANG, Q.; LIU, J.Y.; TAN, R.X. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.329-333, 2005.

LIPP, F.J. **O simbolismo das plantas**: cura e harmonia – simbolismo, rituais e tradições no oriente e no ocidente. Köln: Taschen, 2002. 184p.

LIU, X.M., ZAKARIA, M.N.M., ISLAM, M.W., RADHAKRISHNAN, R., ISMAIL, A., CHEN, H.B., CHAN, K., AL-ATTAS, A. Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of *Calligonum comosum* in rats. **Fitoterapia**, v.72, p.487-491, 2001.

LOBO-ECHEVERRI, T.; RIVERO-CRUZ, J.F.; SU, B.N.; CHAI, H.B.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; SWANSON, S.M.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, A.D. Constituents of the leaves and twigs of *Calyptanthus pallens* collected from an experimental plot in Southern Florida. **Journal of Natural Products**, v.68, p.577-580, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 351 p.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarum, 2006. 640 p.

LOWRY, J.B. Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families. **Phytochemistry**, v.15, p.513-516, 1976.

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; DA SILVA, C.C.; SHUQUEL, I.T.A.; BASSO, E.A.; VIDOTTI, G.J. Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, p.180-183, 2001.

MA, C.M.; CAI, S.Q.; CUI, J.R.; WANG, R.Q.; TU, P.F.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, p.582-589, 2005.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MACIEL, A.C.; CARDOSO, N. **Cura, sabor e magia nos quintais da Ilha Grande**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 2003. 104 p. (Coleção Ilha Grande, 1).

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, p.1517-1575, 1994.

MAHMOUD, I.I.; MOHARRAM, F.A.; MARZOUK, M.S.A.; LINSCHIED, M.W.; SALEH, M.I. Polyphenolic constituents of *Callistemon lanceolatus* leaves. **Pharmazie**, v.57, p.494-496, 2002.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p.143-148, 2002.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5837-5843, 2002.

MANTOVANI, W. **Estrutura e dinâmica da floresta atlântica na Juréia, Iguape**. São Paulo, 1993. 126p. Tese de Livre Docência – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

MARKMAN, B.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*, **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.55-57, 2004.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.113, p.173-215, 1983.

MARTÍN, A.M.; VÁZQUEZ, R.D.L.P.; FERNÁNDEZ-ARCHE, A.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. **Free Radical Research**, v.40, p.295-302, 2006.

MARTÍN, M.J.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARHUENDA, E.; DELGADO, F. Anti-ulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Ditrichia viscosa* (L.) W. Greuter, in rats. **Phytotherapy Research**, v.2, p.183-186, 1988.

MARTÍN, M.J.; LA-CASA, C.; ALARCON-DE-LA-LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v.53, p.82-88, 1998.

MARTÍN, M.J.; MARHUENDA, E.; PÉREZ GUERRERO, C.; FRANCO, J.M. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rat. **Pharmacology**, v.49, p.144-150, 1994.

MARTÍN, M.J.; MOTILVA, V.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Quercetin and naringenin: effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. **Phytotherapy Research**, v.7, p.150-153, 1993.

MARTÍN, R.; CARVALHO, C.; IBEAS, E.; HERNÁNDEZ, M.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; NIETO, M.L. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. **Cancer Research**, v.67, p.3741-3751, 2007.

MARTÍN, T.; RUBIO, B.; VILLAESCUSA, L.; FERNÁNDEZ, L.; DÍAZ, A.M. Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*. **Pharmaceutical Biology**, v.37, p.28–31, 1999.

MARTINS, D.T., LIMA, J.C., RAO, V.S. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p.427-431, 2002.

MASUDA, T.; INABA, Y.; MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUCHI, H.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; NISHIZATO, S.; NONAKA, A. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1831-1838, 2003.

MAYER, R. A β -hydroxychalcone from *Leptospermum scoparium*. **Planta Medica**, v.59, p.269-271, 1993.

MC CHESNEY, 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.

MELO, M.M.R.F. **Composição florística e estrutura de trecho de mata atlântica de encosta na ilha do Cardoso (Cananéia, SP, Brasil)**. São Paulo, 1993. 104p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

MENDELSON, J.; HOWLEY, P.M.; ISRAEL, M.A.; LIOTTA, L.A. **The molecular basis of cancer**. 2.ed. London: W.B. Saunders, 2001, 700 p.

MENDEZ, J.; HASEGAWA, M.; BILIA, A.N.; MORELLI, I. 5,7,2',5'-Tetrahydroxydihydroflavonol 3-rhamnoside from *Plinia pinnata*. **Phytochemistry**, v.36, p.1087-1088, 1994.

MENDEZ, J.; HASEGAWA, M.; MORELLI, I.; BILIA, A.N. A new triterpene from the twigs of *Plinia pinnata*. **Fitoterapia**, v.68, p.461-462, 1997.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MIQUEL, J.; QUINTANILHA, A.T.; WEBER, H. **Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v.1.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, p.757-766, 1991.

- MONTILLA, M.P.; AGIL, A.; NAVARRO, M.C.; JIMÉNEZ, M.I.; GARCÍA-GRANADOS, A.; PARRA, A.; CABO, M.M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. **Planta Medica**, v.69, p.472-474, 2003.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29-60, 2000.
- MUSTAFA, K.A.; PERRY, N.B.; WEAVERS, R.T. Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideros* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.1049-1059, 2005.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NAGARAJ, M.; SUNITHA, S.; VARALAKSHMI, P. Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene, on the lipid peroxidation and antioxidant status in rat kidney after chronic cadmium exposure. **Journal of Applied Toxicology**, v.20, p.413-417, 2000.
- NAIR, H.K.; RAO, K.V.K.; AALINKEEL, R.; MAHAJAN, S.; CHAWDA, R.; SCHWARTZ, S.A. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.63-69, 2004.
- NASCENTE, A.S. Uso medicinal de frutas. In: BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Empresa Brasileira de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Rondônia. **Artigos Técnicos**. Disponível em: http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/uso_medic.htm. Acesso em: 01 mar. 2008.
- NAVARRETE, A.; ARRIETA, J.; TERRONES, L.; ABOU-GAZAR, H.; CALIS, I. Gastroprotective effect of astragaloside IV: role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.1059-1064, 2005.
- NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J.L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.383-388, 2002.
- OKU, H.; BABA, S.; KOGA, H.; TAKARA, K.; IWASAKI, H. Lipid composition of mangrove and its relevance to salt tolerance. **Journal of Plant Research**, v.116, p.37-45, 2003.
- OLALEYE, S.B.; FAROMBI, E.O. Attenuation of indomethacin- and HCl/ethanol-induced oxidative gastric mucosa damage in rats by kolaviron, a natural biflavonoid of *Garcinia kola* seed. **Phytotherapy Research**, v.20, p.14-20, 2006.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; JR., RCPL; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum*: in mice and rats. **Pharmacological Research**, v.49, p.105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; SANTOS, K.A.; MARÍNS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective effect of the mixture of α - and β - amyirin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v.70, p.780-782, 2004b.

ONO, M.; KOTO, M.; KOMATSU, H.; IGOSHI, K.; KOBAYASHI, H.; ITO, Y.; NOHARA, T. Cytotoxic triterpenes and sterol from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*). **Food Science and Technology Research**, v.10, p.56-59, 2004.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, p.2181-2196, 2007.

PAIVA, L.A.F., RAO, V.S.N., GRAMOSA, N.V., SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.73-78, 1998.

PARK, S.; HAHM, K.B.; OH, T.Y.; JIN, J.H.; CHOUE, R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.49, p.384-394, 2004.

PICHON, N.; JOSEPH, M.I.; RAYNAUD, J. Myricetin 3- β -D-(6"-O-galloyl)galactoside from *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.26, p.86-90, 1993.

PICHON-PRUM, N.; RAYNAUD, J.; DEBOURCHIEU, L.; JOSEPH, M.J. Presence of an acylated glycoside of quercetin in the leaves of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Pharmazie**, v.44, p.508-509, 1989.

PIVETTA, M. A norma do campo fechado. **Pesquisa FAPESP**, v.124, p.30-31, 2006.

PLASMAN, V.; PLEHIERS, M.; BRAEKMAN, J.C.; DALOZE, D.; BISEAU, J.C.; PASTEELS, J.M. Chemical defense in *Platyphora kollari* Baly and *Leptinotarsa behrensi* Harold (Coleoptera: Chrysomelidae). Hypotheses on the origin and evolution of leaf beetles toxins. **Chemoecology**, v.11, p.107-112, 2001.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 4290-4302, 2005.

PROMEGA CORPORATION. Technical Resources. Protocols. Cell Viability, signaling and drug screening assays. **CellTiter 96^R Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay**. Disponível em: <http://www.promega.com/tbs/tb169/tb169.html>. Acesso em: 01 jan. 2007.

PSAHOULIA, F.H.; MOUMTZI, S.; ROBERTS, M.L.; SASAZUKI, T.; SHIRASAWA, S.; PINTZAS, A. Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. **Carcinogenesis**, v.28, p.1021-1031, 2007.

PUNGITORE, C.R.; GARCÍA, M.; GIANELLO, J.C.; SOSA, M.E.; TONN, C.E. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.433-443, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829 p.

REYES, F.J.; CENTELLES, J.J.; LUPIÁÑEZ, J.A.; CASCANTE, M. (2 α ,3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. **FEBS Letters**, v.580, p.6302-6310, 2006.

REYES-CHILPA, R.; BAGGIO, C.H.; ALAVEZ-SOLANO, D.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; KAUFFMAN, F.C.; SANCHEZ, R.I.; MESIA-VELA, S. Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.167-172, 2006.

RIVELLI, D.P.; ROPKE, C.D.; ALMEIDA, R.L.; SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.H.; WASICKY, A.; KATO, E.T.M.; BACHI, E.M.; BARROS, S.B.M. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de *Passiflora* sp. (maracujá) avaliada por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay). **Cosmetic and Toiletries**, 2008. [No Prelo].

RODRÍGUEZ, J.A.; ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. **Pharmacological Research**, v.48, p.291-294, 2003.

RODRÍGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C.; SÁNCHEZ, M.; YÁÑEZ, T.; RAZMILIE,I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective activity of a new semisynthetic solidagenone derivative in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.265-271, 2005.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; IHL, M.; SCHEUERMANN, E.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M.J. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.59-64, 2006.

SAKAGUCHI, N.; INOUE, M.; ISUZUGAWA, K.; OGIHARA, Y.; HOSAKA, K. Cell-inducing activity by gallic acid derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.22, p.471-475, 1999.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HÄRKÖNEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.327-336, 2002.

SALEEM, M.; KAUR, S.; KWEON, M.H.; ADHAMI, V.M.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. **Carcinogenesis**, v.26, p.1956-1964, 2005a.

SALEEM, M.; KWEON, M.H.; YUN, J.M.; ADHAMI, V.M.; KHAN, N.; SYED, D.N.; MUKHTAR, H. A novel dietary triterpene lupeol induces Fas-mediated apoptotic death of androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumor growth in a xenograft model. **Cancer Research**, v.65, p.11203-11213, 2005b.

SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIE, I.; YÁÑEZ, T.; RODRÍGUEZ, J.A. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro - in vivo relationships. **Life Sciences**, v.79, p.1349-1356, 2006.

SANDOVAL, M.; MELCHOR, V.; OKUHAMA, N. Antioxidant and biological properties of *Myrciaria dubia*: role in cytoprotection. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, suppl.1, p.S37, abstr.92, 2001.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.P.; FIGUEIREDO, M.E.; RODRIGUES, C.M.; DOS SANTOS, L.C.; DOS SANTOS, F.V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I.M.S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.319-326, 2007.

SANTOS, I.R. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. p.403-434.

SANTOS, F.V.; COLUS, I.M.S.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1585-1589, 2006.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. p.615-656.

SARKER, S.D.; BARTHOLOMEW, B.; NASH, R.J.; SIMMONDS, M.S.J. Sideroxylin and 8-demethylsideroxylin from *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.759-762, 2001.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ZUNIGA, J.; DUTRA-BEHRENS, M.; RABERMEHL, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v.10, p.260-262, 1996.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.61-66, 2005.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Spectral assignments and reference data - Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.41, p.636-638, 2003.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; DE SOUZA, M.M.; FISCHER, L.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Bioactive phenolic compounds from aerial parts of *Plinia glomerata*. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v.62, p.196-200, 2007.

SERAFINI, M.; VILLANO, D.; SPERA, G.; PELLEGRINI, N. Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. **Nutrition and Cancer**, v.56, p.232–240, 2006.

SETZER, W.N.; SETZER, M.C.; BATES, R.B.; JACKES, B.R. Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, North Queensland, Australia. **Planta Medica**, v.66, p.176-177, 2000.

SETZER, W.N.; ROZMUS, G.F.; SETZER, M.C.; SCHMIDT, J.M.; VOGLER, B.; REEB, S.; JACKES, B.R.; IRVINE, A.K. Bioactive principles in the bark of *Pilidiostigma tropicum*. **Journal of Molecular Modeling**, v.12, p.703–711, 2006.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

SHEN, S.C.; CHEN, Y.C.; HSU, F.L.; LEE, W.R. Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase-3 cascade. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.89, p.1044-1055, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, P.E. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.35-40, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. p.467-495.

SOBRAL, M. Alterações nomenclaturais. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, v.63, p.1-4, 1985.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: W. H. Freeman, 1969. 776 p. (A Series of books in biology).

SOMOVA, L.I.; SHODE, F.O.; RAMNANAN, P.; NADAR, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.299-305, 2003.

SON, K.H.; KWON, S.Y.; KIM, H.P.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. **Natural Product Sciences, Korea**, v.4, p. 263-267, 1998. *apud SciFinder Scholar*, 2006.

SON, Y.K.; LEE, K.Y.; KOOK, S.H.; LEE, J.C.; KIM, J.G.; JEON, Y.M.; JANG, Y.S. Selective effects of quercetin on the cell growth and antioxidant defense system in normal versus transformed mouse hepatic cell lines. **European Journal of Pharmacology**, v.502, p.195-204, 2004.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas Mata Atlântica**. Disponível em: <http://www.sosma.org.br/index.php?section=atlas&action=atlas>. Acesso em: 01 fev. 2008.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; DA SILVA, M.N.; ARRUDA, M.S.P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, p.1276-1280, 2007.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography: a laboratory handbook**. 2ed. Berlin: Springer-Verlag, 1969. 1041p.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S.A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sciences**, v.78, p.1329-1335, 2006.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S.A.; VARALAKSHMI, P; SUNDARAPANDIYAN, R. Mitigating role of lupeol and lupeol linoleate on hepatic lipemic-oxidative injury and lipoprotein peroxidation in experimental hypercholesterolemia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.295, p.189-198, 2007.

SUDHARSAN, P.T.; MYTHILI, Y.; SELVAKUMAR, E.; VARALAKSHMI, P. Cardioprotective effect of pentacyclic triterpene, lupeol and its ester on cyclophosphamide-induced oxidative stress. **Human & Experimental Toxicology**, v.24, p.313-318, 2005.

SUFFREDINI, I.B.; BACCHI, E.M.; SERTIÉ, J.A.A.A. Antiulcer action of *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) Sota. **Journal of Ethnopharmacology**, v.65, p.217-223, 1999.

SUZUKI, Y.; ISHIHARA, M.; SEGAMI, T.; ITO, M. Anti-ulcer effects of antioxidants, quercetin, α -tocoferol, nifedipine and tetracycline in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.78, p.435-441, 1998.

TANAKA, J.C.A., VIDOTTI, G.J., SILVA, C.C. A new tormentic acid derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.475-478, 2003.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, p.179-183, 1988.

THOISON, O.; SÉVENET, T.; NIEMEYER, H.M.; RUSSELL, G.B. Insect antifeedant compounds from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio*. **Phytochemistry**, v.65, p.2173-2176, 2004.

THOMPSON, H.J. Oxidative DNA damage and cancer risk Assessment. **Journal of Nutrition**, v.136, p.2693S–2694S, 2006.

TIMBOLA, A.K.; SZPOGANICZA, B.; BRANCOA, A.; MONACHEB, F.D.; PIZZOLATTI, M.G. A new flavonol from leaves of *Eugenia Jambolana*. **Fitoterapia**, v.73, p.174-176, 2002.

TOLSTIKOVA, T.G.; SOROKINA, I.V.; TOLSTIKOV, G.A.; TOLSTIKOV, A.G.; FLEKHTER, O.B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.32, p.37-49, 2006.

TONHASCA Jr., A. **Ecologia e história natural da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 197 p.

TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, J.; ORTEGA-BARRIA, E.; HELLER, M.V.; CAPSON, T.L.; MCPHAIL, K.; GERWICK, W.H.; CUBILLA-RIOS, L. Weakly antimalarial flavonol arabinofuranosides from *Calycolpus warszewiczianus*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.826-828, 2006.

TOYOKUNI, S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, p.1373-1377, 2006.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Digestive Diseases (NDDIC). Statistics. Digestive Diseases Statistics for the U.S. Specific Diseases. **Peptic ulcer**. Disponível em: <http://digestive.niddk.nih.gov/statistics/statistics.htm#specific>. Acesso em: 01 mar. 2008.

URECH, K.; SCHER, J.M.; HOSTANSKA, K.; BECKER, H. Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album*, L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.101-109, 2005.

USTUN, O.; OZÇELIK, B.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.457-461, 2006.

VAISHNAV, M.M.; SAHU, D.P. Flavonol glycoside from *Syzygium cumini* root. *Journal of the Institution of Chemists, India*, v. 77, p. 26-32, 2005. *apud SciFinder Scholar*, 2006.

VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; PAULA, V.F.; NASCIMENTO, E.A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). **Química Nova**, v.27, p.536-539, 2004.

VILE, R.G. **Introduction to the molecular genetics of cancer**. Chichester; New York: Wiley, 1992. 209 p. (Molecular medical science series).

VOGEL, A.I. **Química orgânica: análise orgânica qualitativa**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1988. 3v.

WAGNER, H. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ed. Berlin: Springer, 1996. 384p.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 238 p.

WEN, X.; SUN, H.; LIU, J.; WU, G.; ZHANG, L.; WU, X.; NI, P. Pentacyclic triterpenes. Part 1: The first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.4944-4948, 2005.

WOLLENWEBER, E.; WEHDE, R.; DORR, M.; LANG, G.; STEVENS, J.F. C-methylflavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. **Phytochemistry**, v.55, p.965-970, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes and projects. Media Center. Cancer. Fact sheets. Cancer. **Fact sheet n.297**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>. Acesso em: 01 fev. 2006.

WU, W.N.; HUANG, C.H. Structural elucidation of glucosides and triterpenes by API-ionspray MS and tandem MS/MS spectrometry. Chinese Pharmaceutical Journal, Taipei, v. 57, p. 17-27, 2005. *apud* **SciFinder Scholar**, 2006.

WUETHRICH, B. Reconstructing Brazil's Atlantic Rainforest. **Science**, v.315, p.1070-1072, 2007.

YAMAGUCHI, Y.; YAMADA, K.; YOSHIKAWA, N.; NAKAMURA, K.; HAGINAKA, J.; KUNITOMO, M. Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. **Life Sciences**, v.79, p.2474-2479, 2006.

YE, C.L.; LU, Y.H.; WEI, D.Z. Flavonoids from *Cleistocalyx operculatus*. **Phytochemistry**, v.65, p.445-447, 2004.

YE, C.L.; LIU, Y.H.; WEI, D.Z. Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4',6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methylflavanone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, p.553-559, 2007.

YIN, M.C.; CHAN, K.C. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7177-7181, 2007.

YOSHIDA, M.; FUCHIGAMI, M.; NAGAO, T.; OKABE, H.; MATSUNAGA, K.; TAKATA, J.; KARUBE, Y.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; MIHASHI, K.; FUJIOKA, T. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.173-175, 2005.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.46, p.113-119, 1998.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? **Mutation Research**, v.492, p.29-38, 2001.

ZHANG, H.Y.; JI, H.F. How vitamin E scavenges DPPH radicals in polar protic media. **New Journal of Chemistry**, v.30, p.503-504, 2006.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. p.577-614.