

Identificação do Flavonóide 7,4'-Dimetoxi-Quercentina- 3-O-B-D-Glicopiranosídeo e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Frutos

Guilhermina C. Nascimento, Antônio C. S. Menezes & Elizangela P. P. Lacerda

Estudos fitoquímicos feitos com diferentes espécies do gênero *Erythroxylum* (pertencente à família Erythroxylaceae) levaram ao isolamento de vários metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides que apresentam atividades anti-oxidantes, anti-cancerígenas, atividade anti-inflamatória dentre outras. O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o estudo fitoquímico das frações do extrato metanólico das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, visando o isolamento e identificação de substâncias, bem como avaliar a atividade antitumoral das células K562 de leucemia mielóide crônica do extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*.

Palavras-chave: *Erythroxylum deciduum*, 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, atividade antitumoral.

Phytochemical studies made with different species of *Erythroxylum* (belonging to the family Erythroxylaceae) led to the isolation of several secondary metabolites such as flavonoids and alkaloids, and tannins, terpenes and phenylpropanoids activities that have anti-oxidant, anti-carcinogenic, anti-inflammatory activity among other. The present work was aimed at providing the phytochemical study of fractions of the methanol extract of leaves of *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, aiming at the isolation and identification of substances, as well as evaluating the antitumor activity of K562 cells from chronic myeloid leukemia methanol extract of fruits of *E. deciduum*.

Keywords: *Erythroxylum deciduum*, antitumor activity, 7,4'-dimethoxy-quercentin-3-O-β-D-glucopyranoside.

Introdução

Estudos fitoquímicos feitos com diferentes espécies do gênero *Erythroxylum* (pertencente a família Erythroxylaceae que é uma das mais representativas do cerrado brasileiro) levaram ao isolamento de vários metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides que apresentam atividades anti-oxidantes, anti-cancerígenas, anti-inflamatória dentre outras^{1,2,3}.

Várias espécies *Erythroxylum* possuem propriedades medicinais, como as populares coca (*E. coca Lamk.* e *E. novogranatense* (D.Morris) Hieron.) e suas variedades as mais conhecidas e estudadas devido à presença de alcalóides em suas folhas⁴, onde a cocaína (Figura 1), pode chegar até 2% da folha de massa seca⁵, que foi empregada como anestésico local em pequenas cirurgias^{6,7}.

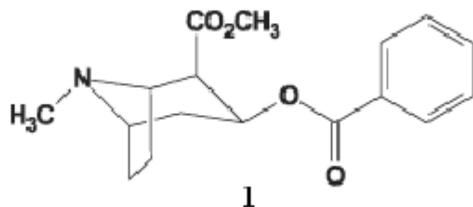
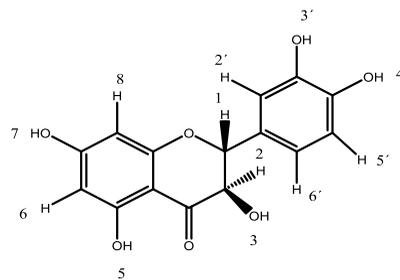


Figura 1. Fórmula estrutural da Cocaína

Na região do Alto Rio Grande, MG, *Erythroxylum campestre* e *Erythroxylum tortuosum* vêm sendo usados como fitoterápicos. Suas raízes são utilizadas na forma de infuso como laxante, enquanto a casca do caule da espécie *E. tortuosum* é indicada como adstringente no caso de hemorragias, também na forma de infuso⁸. Johnson (1998) identificou nas espécies *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* e *E. coca var. ipadu* os seguintes flavonóides⁹:

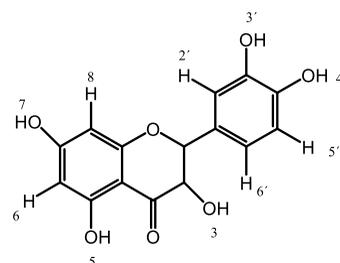
- Taxifolin, presente na fração polar do extrato foliar seco de *E. c. var. ipadu* (Figura 2), que apresenta atividades: inativação de substâncias citotóxicas e efeito anti-oxidante¹⁰, efeito anti-diabetes¹¹, efeito anti-oxidante, radicais livres que protegem a peroxidação lipídica, a redução do teor de lipoproteínas de baixa densidade no fígado e soroefeito anti-tumoral¹² e efeito anti-mutagênico¹³, efeito anti-viral¹⁴ dentre outros.



	3'	4'	3	5	7
<i>. E. c. var. ipadu 1</i>	OH	OH	H	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. c. var. ipadu 3</i>	H	TetraAcil 1 Ramnosil 1	OH	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. c. var. ipadu 4</i>	OH	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. c. var. ipadu 5</i>	OH	TetraAcil 1 Ramnosil	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	OH
<i>. E. c. var. ipadu 6</i>	OH	TetraAcil 1 Ramnosil	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	TetraAcil 1 Ramnosil

Figura 2. Fórmula estrutural da Taxifolin

*Quercentina (Figura 3) presente na fração polar do extrato das folhas de *E. c. var. ipadu* e *E. n. var. truxillense*, que apresenta atividade anti-tumoral¹², atividade anti-inflamatória¹⁵, bem como atividade anti-mutagênica¹⁶.



	3'	4'	3	5	7
<i>. E. c. var. ipadu 2</i>	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	H	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. n. var. truxillense 1</i>	Ramnosil	OH	Glucosil	OH	Acetil Ramnosil

Figura 3. Fórmula estrutural da Quercentina

*Fisetina (Figura 4), presente na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*, possui atividade anticarcinogênica¹⁷, efeito anti-alérgico, atividade antioxidante¹⁸.

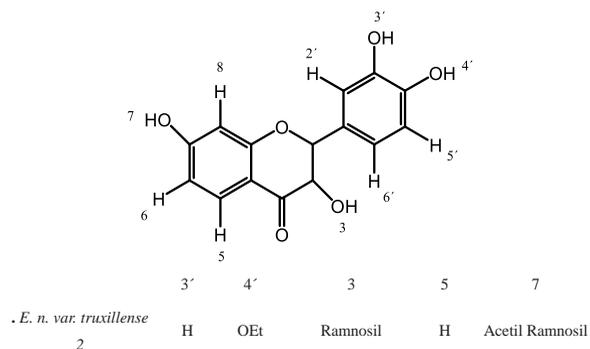


Figura 4: Fórmula estrutural da Fisentina

*Kaempferol (Figura 5) encontrado na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*, apresenta atividade anti-inflamatória¹⁹, atividade antioxidante, antialérgico, antiistamínico, inibidor de ciclooxigenase²⁰.

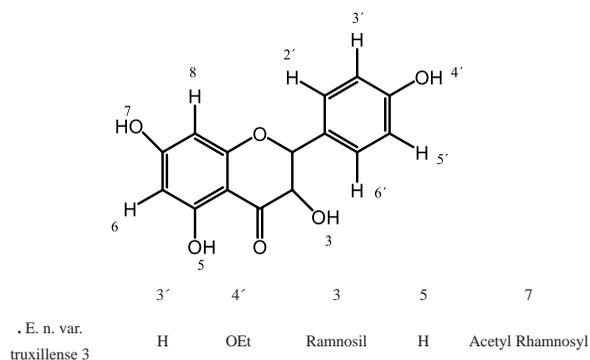


Figura 5. Fórmula estrutural da Kaempferol

*diidroxikaempferol (Figura 6) verificada na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*.

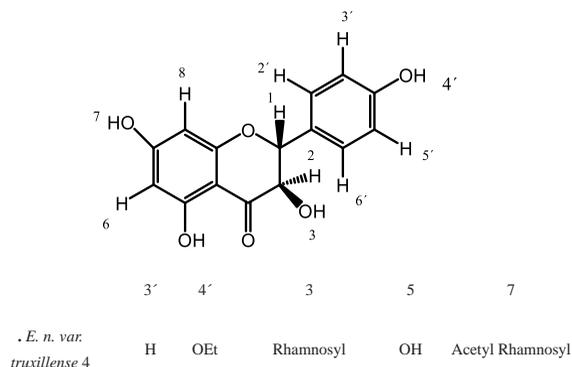


Figura 6. Fórmula estrutural da Diidroxikaempferol

Além disso, encontrou-se um novo flavonóide, Kaempferol ramnosil diglicosilado, isolado das folhas *Erythroxylum coca var. ipadu Plowman*, cultivadas na Amazônia, denominada kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo (Figura 7). Atualmente cultivado em áreas colombianas e é útil como marcador taxonômico²¹.

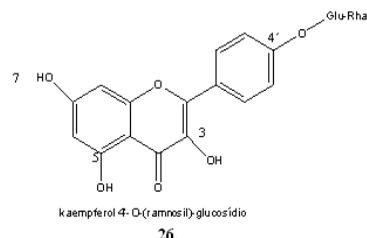


Figura 7. Kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo

Já o flavonóide glicosilado, foi isolado do caule de *Erythroxylum novogranatense*, e esta estrutura foi elucidada baseada no espectro de massa e RMN-¹H como (+)-catechin 3-O- α -L-ramnopiranosídeo. Numa base semelhante, de produtos químicos e provas espectroscópicas, a presença de ombuin 3-O-rutinosídeo foi estabelecida. Além disso, a ocorrência do biflavonóide procianidina (foi demonstrada pela caracterização de B1 e B3 como os primeiros representantes do tipo proantocianidina no gênero. As estruturas estão descritas na Figura 8²².

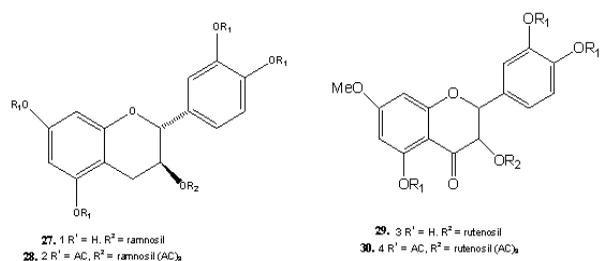


Figura 8. Flavonóide glicosilado do caule de *Erythroxylum novogranatense*.

COLODEL *et al.* (2004) estudaram os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da intoxicação natural pelos frutos de *Erythroxylum deciduum* em ovinos, que ocorreu de janeiro a março de 2004 no município de Lagoa Vermelha, RS. Os autores verificaram que a ingestão espontânea de frutos da planta vinha sendo a

causa de mortandade dos animais. Além disso, os frutos administrados por via oral nos ovinos foram tóxicos em dose única de 60g/Kg ou quando fracionado em pelo menos 4 doses de 17g/Kg a cada 12 horas. Os principais sinais clínicos nos animais intoxicados, natural e experimentalmente, foram neurológicos e caracterizados por ataxia, hiperexcitabilidade e tremores musculares que se pronunciavam durante o manejo. Próximo à morte, os ovinos apresentavam dispnéia com respiração abdominal e cianose²³.

Como o câncer é uma patologia que representa um dos principais problemas do mundo, causando temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, viu-se a necessidade de se realizar o estudo da atividade antitumoral na planta *Erythroxylum deciduum*, pois esta atividade é uma característica do gênero *Erythroxylum*.

Produtos Naturais e Atividade Anticancerígena

Nos últimos 20 anos, alguns fármacos introduzidos na terapêutica, foram fundamentais para o ressurgimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente. Podendo citar os quimioterápicos para o câncer, como a vimblastina (31) e a vincristina (32) extraídas da espécie *Cataranthus roseus*, drogas utilizadas no tratamento de tumores hematológicos, o etoposídeo (33), o teniposídeo (34) e o taxol (35), (Figura 15)²⁴.

Outro exemplo de agente antineoplásico é a camptotecina (36, Figura 9), isolado por Wall, Wani e colaboradores em 1966, extraída de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata*^{25,26}.

A ESPÉCIE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* A. ST.-HILL

A *Erythroxylum deciduum*, conhecida popularmente como cocão, baga-de-pomba, fruta de pomba, concon, (figuras 10 e 11) é uma árvore de grande porte, podendo chegar até 8 metros de altura, dotada de copa alongada e densa. Tronco curto e cilíndrico, de 20-35cm de diâmetro, com casca grossa e finamente fissurada de maneira um pouco oblíqua em relação ao eixo do fuste. No Brasil, essa espécie encontra-se do Piauí e Nordeste

até Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, em várias formações vegetais. Também na Argentina e Paraguai²⁷.

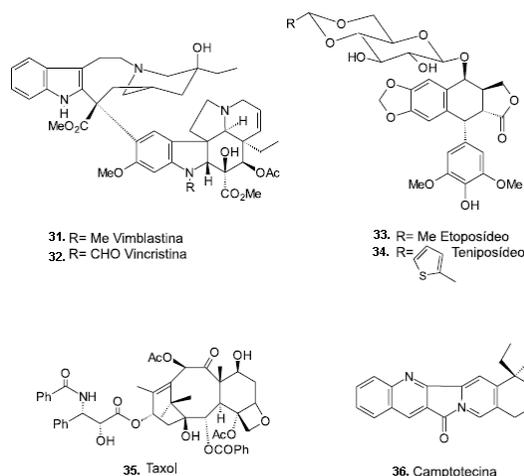
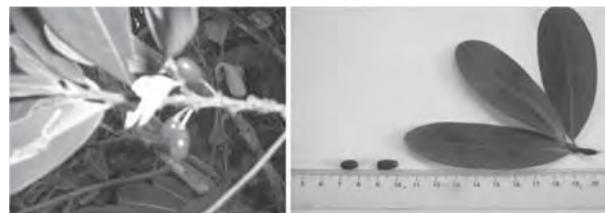


Figura 9. Alguns modelos e fármacos antineoplásicos importantes da terapêutica moderna



Figuras 10 e 11. Fotos de *E. deciduum*, Campus UEG, Anápolis,GO, NASCIMENTO, G. C., novembro de 2006.

E. deciduum floresce dos meses de agosto-outubro junto com o surgimento de novas folhas. Os frutos amadurecem de outubro a janeiro. A madeira é indicada para pequenas obras de construção civil, marcenaria leve, esquadrias, obras de torno e cabo de ferramentas. Os frutos são muitos consumidos por várias espécies de pássaros. A árvore pode ser empregada para arborização de ruas estreitas e sob redes elétricas. Também recomendada para reflorestamentos preservacionistas²⁷.

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o estudo fitoquímico das frações do extrato metanólico das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, visando o isolamento e identificação de substâncias, bem como avaliar a atividade antitumoral das células K562 de leucemia mielóide crônica do extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*.

Materiais e Métodos

Erythroxylum deciduum – coleta

As folhas (979 g) e frutos (75,2 g) da planta *Erythroxylum deciduum* foram coletados no mês de novembro de 2006, no Campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG) na cidade de Anápolis-GO, Brasil. Sendo identificados pela Prof^a Dr^a. Mirley Luciene dos Santos de Biologia, da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG. E as exsiccatas do material vegetal foram depositadas no herbário desta Unidade, cujos números de tombo são 5274, 5275 e 5276.

Obtenção dos extratos brutos

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C durante 48h, depois pulverizadas em moinho de facas. Em seguida colocou-as em erlenmeyers de 2L e o extrato foi extraído a frio com metanol P.A. durante 5 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes. Ademais o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida numa temperatura de 40°C, fornecendo o extrato bruto metanólico das folhas (EBMF).

Já os frutos frescos foram macerados com almofariz e pistilo, extraídos a frio inicialmente com hexano em erlenmeyer de 500 mL, durante 5 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes. Após a extração exaustiva com hexano, o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida numa temperatura de 40°C, fornecendo o extrato bruto hexânico das folhas. Depois, passou-se a extrair com metanol por 5 dias durante 3 vezes, repetindo-se o processo que realizou-se anteriormente com hexano.

Fracionamento dos extratos brutos com celulose

O extrato metanólico das folhas de *E. deciduum* (EDFM) foi fracionado por cromatografia em coluna, utilizando-se celulose microcristalina D, como fase estacionária, com o intuito de se retirar os pigmentos, e eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Obtiveram-se as seguintes frações das folhas: hexânicas (EDFM-H), diclorometânica (EDFM-D), acetato de etila (EDFM-A), bem como metanólica (EDFM-M)²⁸.

O método de separação utilizado para o isolamento da substância foi a cromatografia de adsorção em sílica gel.

Fracionamento da fração metanólica das folhas de E. deciduum

Da fração EDFMM após ter evaporado todo o solvente, foi pesado 30,0g, em seguida, esta foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de diclorometano/metanol (2:8) e eluída com essa mistura de solventes em polaridade crescente até 100% de metanol. Coletou-se 122 frações, reunidas em 07 novas frações, de acordo os Rf observados nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) após serem reveladas com vanilina.

A amostra EDFMM (31-40 = F-1) foi recristalizada com metanol P.A., filtrada com pressão reduzida, obtendo-se sólido amarelo amorfo. Ademais a mesma foi submetidas à Ressonância Magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C.

Teste para alcalóides

Foi realizado teste para verificação da presença de alcalóides nas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtidas das folhas de *E. deciduum*, através de cromatografia em camada delgada – CCD, utilizando-se fase móvel Diclorometano/Metanol 5% e cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ MERC, em béqueres de 50 mL e como revelador o o reagente Dragendorff.

Preparação da fração vegetal e drogas controle para o teste de atividade antitumoral in vitro e citotoxicidade dos frutos

Para o ensaio de atividade antitumoral e citotóxica foram pesados 10 mg da fração metanólica dos frutos de *Erythroxylum deciduum* (EDFrM) a qual foi dissolvida em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com Dimetil sulfóxido (DMSO) à 0,1 %. Posteriormente a EDFrM foi submetido à agitação vigorosa para dissolução completa, e por fim esterilizado em membranas de 0,22 µm. Após a diluição, o pH foi estabelecido em 7,2.

Como drogas controles foram utilizadas Taxol e Ciclofosfamida que foram dissolvidas em meio RPMI 1640.

LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS, OBTENÇÃO E CULTIVO

Para a realização do ensaio biológico com o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil

brometo de tetrazolium (MTT) foi utilizada a linhagem tumoral estabelecida K-562 (Leucemia mielóide crônica). As células K562 foram cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás, onde foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 M L-Glutamina, 100IU/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina à 37°C, 5% CO₂ segundo protocolo estabelecido pela Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC).

Ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica da célula K562) com o extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*

Para avaliar a atividade citotóxica e anti-tumoral da fração EDFrM foi utilizado o método colorimétrico (MTT). O princípio deste método descrito por Mosman (1983) consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, em que as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o MTT levando à quebra desta molécula bem como sua redução, produzindo assim o azul de formazan. Para o teste de redução do MTT, 2x10⁵ de células K562 foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença de EDFrM em concentrações variando de 0,039 a 5 mg. mL⁻¹ ou ciclofosfamida e taxol na concentração de 5 mg. mL⁻¹. Após o tratamento as células foram incubadas por 24 h em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹, e seguido 3hs, foram acrescentados 50 µL de SDS a 10% diluído em HCL/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro utilizando-se filtro de interferência de 550 nm.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados, sendo considerado como diferença significativa valores onde o p-value era menor que 0,05 (p<0,05). Foram considerados significativos percentuais de citotoxicidade superiores a 30%.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância nos indica que há uma diferença entre as médias, mas ela não diz qual média que difere. Existem procedimentos específicos chamados

de procedimentos de comparação múltipla, para testar as diferenças entre as médias específicas seguindo uma análise de variância. Dentre os testes mais conhecidos destacamos o teste Tukey que, está baseado na amplitude total estudada e pode ser usado para comparar todos os pares de contrastes que envolvem diferenças de médias e foi utilizado para Ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica frente a célula K562)²⁹.

Resultados e Discussões

Resultados da extração

Foram obtidos os extratos brutos metanólicos das folhas EDFM (168,3 g) 17,1% e dos frutos EDFrM (0,7 g) 0,93% de *E. deciduum*.

Resultados do fracionamento dos extratos brutos com celulose

A (Tabela 1) abaixo descreve a quantidade inicial do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*, bem como os valores obtidos das subfrações: hexânica, diclorometânica, acetato de etila e metanólica após o fracionamento com celulose.

Tabela 1. Resultados das partições do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*.

Extrato metanólico	Fração	Código	Quantidade
Folhas 168,3g	Hexano	EDFMH	14,9g
	Diclorometano	EDFMD	12,2g
	Acetato de etila	EDFMA	3,4g
	Metanólico	EDFMM	77,4g

Fracionamento da fração metanólica das folhas de *E. deciduum* utilizando-se sílica gel

Verifica-se na (Figura 12) as 122 frações, reunidas em 7 novas frações com suas respectivas massas, obtidas de 30,0 g de EDFMM que foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de diclorometano/metanol (2:8) conforme descrito no procedimento. É interessante ressaltar a amostra F-1 se apresentou como sólido amarelo amorfo.

Fracionamento, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos

A fração metanólica EDFMM (77,4 g) foi submetida

à cromatografia em coluna de adsorção em sílica gel, com gradientes metanol/diclorometano. Após as frações serem coletadas em frascos coletores de 10 mL, foram analisadas, através de CCD e, depois de terem sido revelados com vanilina, foram reunidas, baseadas nos seus Rf.

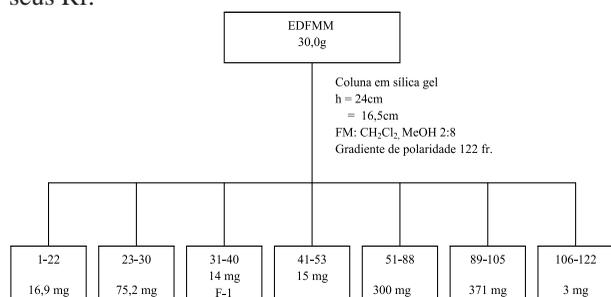


Figura 12. Fracionamento da fração do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*

Logo após foi feita análise espectroscópica através da Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C utilizando como solvente o DMSO para EDFMM (31-40 F-1). Depois da interpretação dos espectros, identificou-se o flavonóide 7,4'- dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (F1).

Identificação estrutural do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (F-1) por RMN de ^1H e de ^{13}C

O sólido amorfo amarelo da fração polar do extrato das folhas de *E. deciduum* foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C . Os resultados desta análise são apresentados a seguir:

No espectro de RMN de ^1H (F-1, Figura 13, figura 14 e Tabela 2) observou-se na região de hidrogênios aromáticos, um duplo dubleto em δ 7,61 ppm referente ao hidrogênio H-6' (J=2,0 e 9,0 Hz); dubleto em δ 7,63 ppm referente ao hidrogênio H-2' (J=2,0 Hz) e em δ 6,86 ppm referente ao hidrogênio H-5' (J= 9,0 Hz). Além de dois dubletos largos em 6,42 e 6,22 ppm atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 respectivamente.

A presença de multipletos relativos a hidrogênios carbinólicos, na região entre δ 3,0 e 3,8 ppm e um dubleto para cada substância, absorvendo em δ 5,5 ppm (J = 7,6 Hz;), atribuído ao hidrogênio anomérico, sugere a existência de unidade de açúcar ligado a este flavonóide, o valor da constante de acoplamento em torno de 7,6 Hz

entre os hidrogênios H-1'' (α) e H-2'' (β) indica um ângulo diedro de 0 – 20° ou 150 – 180 °, entre esses hidrogênios, o que sugere que o açúcar está ligado ao flavonóide pela face β . O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15 e Tabela 3) desta substância, apresenta, sinais com deslocamentos químicos próximos a δ 177,4 ppm típico de carbonilas queladas em flavonóides³⁰.

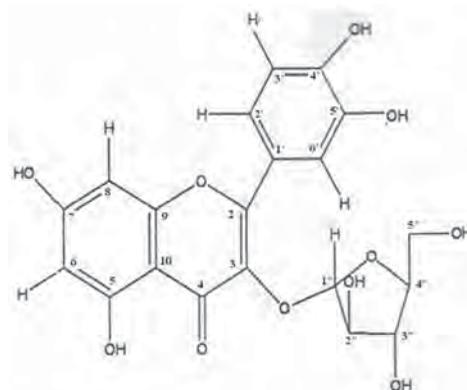


Figura 13. Fórmula estrutural do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo

A ocorrência de cinco sinais na região entre δ 61,4 e 77,8 ppm, e um sinal em δ 101,5 ppm referente ao carbono anomérico vem confirmar a existência de uma unidade de açúcar no flavonóide.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1

H	F-2
6	6,42 d (1,4 Hz)
8	6,22 d (1,4 Hz)
2'	7,63 d (2,0 Hz)
3'	-
5'	6,86 d (9,0 Hz)
6'	7,61 dd (2,0 e 9,0 Hz)
Açúcar	
1''	5,5 d (7,6 Hz)
2'' a 6''	3,0 – 3,8 m
-Ome	3,86 (s)

A unidade do açúcar presente é evidenciada através dos dados característicos observados no espectro RMN de ^{13}C glicopiranosídeo (F-1) está ligado ao flavonóide.

Além disso, as análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e posterior comparação com os dados descritos na literatura resultou na identificação do flavonóide quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (F-1) ³¹.

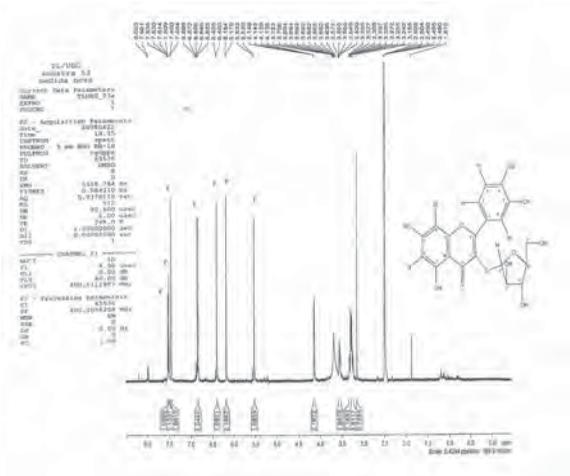


Figura 14. Espectro de RMN ^1H do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz)

Resultados do teste de alcalóides nas frações de folhas de *Erythroxyllum deciduum*

O gênero *Erythroxyllum* é caracterizado pela presença de alcalóides e flavonóides, constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário de vegetais. O teste para verificação de alcalóides, utilizando o reagente de Dragendorff (específico para alcalóides), apresentou resultado negativo para todas as frações metanólica, diclorometânica, hexânica e acetato de etila das folhas de *E. deciduum*. Então se concluiu que não há presença de alcalóides nesta planta, apesar deste metabólito secundário ser um marcador taxonômico deste gênero. Porém não podemos afirmar que nenhuma planta *E. deciduum* não apresente alcalóide, pois pode-se inferir que haja diferença sazonal ou até mesmo estação do ano na qual a planta foi coletada.

Avaliação da atividade citotóxica da fração metanólica do extrato dos frutos (EDFrM) de *Erythroxyllum deciduum* sobre a linhagem tumoral K562

Para análise dos tratamentos observados através do método colorimétrico MTT, conforme descrito na metodologia, e das drogas padrões, foi realizada uma análise descritiva para se ter indícios da diferença entre os tratamentos. Em seguida fez-se uma análise de

variância com planejamento aleatorizado com um único fator que comprovasse esta diferença entre os mesmos, e a partir do teste de Tukey foi possível comprovar quais amostras eram realmente diferentes. E foi aceito que o tratamento possui citotoxicidade significativa somente se apresentasse valores superiores a 30% ²⁹.

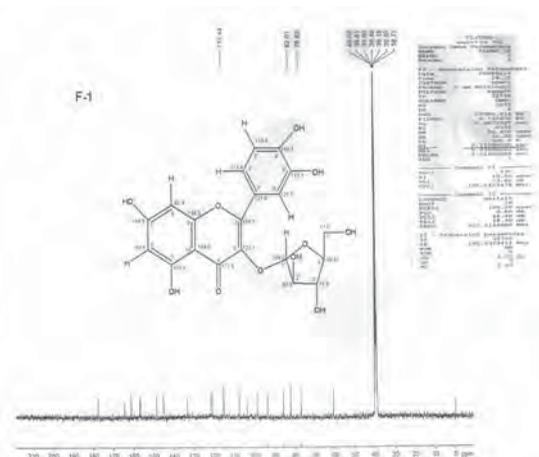


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz)

As médias das densidades óticas (DO) encontradas na placa realizada através do método MTT, estão demonstradas na Tabela 4, juntamente com o percentual de crescimento e de citotoxicidade, conforme concentrações da fração dos extratos de EDFrM para tratamento sobre as células K562. Através dos resultados apresentados neste trabalho, verificou-se que a fração metanólica de EDFrM apresentou citotoxicidade elevada sobre as células tumorais, quando comparados com o percentual das drogas controles.

Analisando os resultados apresentados na (Tabela 4), pode-se dizer que há indícios de que o taxol apresenta uma porcentagem de citotoxicidade de 91,74%, ou seja, é muito eficaz no tratamento de leucemia mielóide crônica. Já a ciclofosfamida forneceu um resultado menos satisfatório quando comparada ao taxol e as frações dos extratos de EDFrM, nas concentrações que variam de 0,62 a 5,0 mg. mL⁻¹, pois evidenciou-se uma porcentagem de 40,3% de citotoxicidade, destruindo uma quantidade menor de células tumorais.

Os resultados deste teste são apresentados na (Figura 16) para a fração metanólica dos frutos de *Erythroxyllum deciduum* nas concentrações de 0,039 a 5,0 mg.mL⁻¹

sobre a linhagem tumoral do K562, que apresentaram citotoxicidade elevada sobre as células tumorais, quando comparados com o percentual dos controles positivos Taxol (100%) e Ciclofosfamida, na concentração 5,0 mg. mL⁻¹. É interessante ressaltar que as frações dos extratos nas concentrações que variam de 0,3 a 5,0 mg. mL⁻¹ possuem maior eficiência que a ciclofosfamida. Ademais, pode-se sugerir que as células se mostraram dose-dependente das frações de EDFrM, pois o aumento da citotoxicidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração das mesmas.

Tabela 3. Dados de RMN de ¹³C (100 MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1

C	F-2	Literatura AGRAWAL et al., 1989
C-2	157,1	156,5
C-3	134,4	133,7
C-4	178,2	177,6
C-5	161,4	161,3
C-6	98,7	98,8
C-7	165,9	164,2
C-8	92,9	93,6
C-9	157,1	156,5
C-10	105,6	104,2
C-1'	123,0	121,4
C-2'	112,1	115,2
C-3'	146,3	144,8
C-4'	150,9	148,5
C-5'	116,4	116,5
C-6'	122,1	121,6
C-1''	101,5	101,4
C-2''	74,7	74,3
C-3''	76,9	76,8
C-4''	70,4	70,3
C-5''	77,8	77,5
C-6''	61,4	61,3

Verificou-se também que, quando a concentração da fração do extrato de EDFrM aumentava de 0,075 para 5,0 mg.mL⁻¹, aumentava-se gradativamente a porcentagem de citotoxicidade, indicando que há diferença relevante

entre as concentrações dos mesmos. Porém, como foi aceito que o tratamento possui citotoxicidade satisfatória, somente se apresentasse valores superiores a 30%, as frações com concentrações de 0,15, 0,0075 e 0,03 mg.mL⁻¹ demonstraram-se ineficazes nesta análise. Em seguida, para averiguar se estas diferenças entre os tratamentos são realmente significativas, fez-se a comparação entre as médias dos dados através da análise de variância, e as diferenças exatas entre os tratamentos foram quantificadas através do teste de Tukey, conforme descrito na (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de Variância e Teste de Tukey entre as frações metanólicas e os padrões adotados

	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor de p
Tratamento	12	2.68749	0.22396	129.77	<2.2e-16
Amostras mg. mL-1		Diferença		Valor de p	
Ciclofosfamida-Taxol-0.7		0,44033		0,0000000	
EDFrM 5.0-Taxol-0.75		0,15233		0,0066800	
EDFrM 2.5-Taxol-0.75		0,17367		0,0014000	
EDFrM 1.25-Taxol-0.75		0,24533		0,0000073	
EDFrM 0.62-Taxol-0.75		0,36700		0,0000000	
EDFrM 0.3-Taxol-0.75		0,44000		0,0000000	
EDFrM 5.0-ciclofosfamida		-0,28800		0,0000004	
EDFrM 2.5-ciclofosfamida		-0,26667		0,0000017	
EDFrM 1.25-ciclofosfamida		-0,19500		0,0002867	
EDFrM 0.62-ciclofosfamida		-0,07333		0,6237200	
EDFrM 0.3-ciclofosfamida		-3,33E-04		1,0000000	
EDFrM 2.5-EDFr5.0		0,02133		0,9999800	
EDFrM 1.25-EDFr5.0		0,09300		0,2865400	
EDFrM 0.62-EDFr5.0		0,21467		0,0000671	
EDFrM 0.3-EDFr5.0		0,28767		0,0000004	
EDFrM 0.15-EDFr5.0		0,44900		0,0000000	
EDFrM 0.075-EDFr5.0		0,47900		0,0000000	
EDFrM 0.03-EDFr5.0		0,45367		0,0000000	
EDFrM 1.25-EDFr2.5		0,07167		0,6547800	
EDFrM 0.62-EDFr1.25		0,12167		0,0554500	
EDFrM 0.3-EDFr0.62		0,07300		0,6299600	
EDFrM 0.15-EDFr0.3		0,16133		0,0034700	
EDFrM 0.075-EDFr0.15		0,03000		0,9993100	
EDFrM 0.03-EDFr0.075		-0,02533		0,9998700	

Como pode ser visto na (Tabela 5) há diferença significativa entre os tratamentos, pois o valor de p

Tabela 5. Distribuição dos valores de densidade ótica e suas médias, desvio padrão, coeficiente de variação, porcentagem de crescimento e porcentagem de citotoxicidade conforme concentrações da fração do extrato metanólico de *E. deciduum* sobre células K562, bem como das drogas padrão.

Descrição	DO1	DO2	DO3	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação	% de crescimento	% de citotoxicidade
Branco (meio)	0,157	0,172	0,174	0,168	0,009	5,542	-	-
Meio cell	0,954	0,913	0,905	0,924	0,026	2,845	-	-
SDS 10%	0,060	0,066	0,078	0,068	0,009	13,478	-	-
Taxol 0.5mg/mL	0,132	0,155	0,129	0,139	0,014	10,258	-	91,74
Ciclofosfamida 0.5mg/mL	0,562	0,577	0,598	0,579	0,018	3,123	-	40,3
EDFrM 5.0 mg/mL	0,265	0,317	0,291	0,291	0,026	8,935	26,05	73,95
EDFrM 2.5 mg/mL	0,284	0,323	0,330	0,312	0,025	7,936	28,54	71,46
EDFrM 1.25mg/mL	0,354	0,369	0,429	0,384	0,040	10,335	36,92	63,08
EDFrM 0.62mg/ml	0,515	0,527	0,475	0,506	0,027	5,385	51,13	48,87
EDFrM 0.3 mg/mL	0,641	0,660	0,435	0,579	0,125	21,564	59,66	40,34
EDFrM 0.15mg/mL	0,740	0,732	0,748	0,740	0,008	1,081	78,50	21,50
EDFrM								
0.075mg/mL	0,803	0,759	0,748	0,770	0,029	3,779	82,01	17,99
EDFrM 0.03mg/mL	0,719	0,779	0,736	0,745	0,031	4,153	79,05	20,95

apresentou um valor de 2.2×10^{-16} , assumindo o nível de significância de 5%. Além disso, há evidência que realmente existe diferença relevante entre as porcentagens de citotoxicidade, quando se compara o taxol com a ciclofosfamida, pois seu valor de p é ($p < 0,05$). Como também, pode ser averiguado que o taxol difere significativamente das concentrações da fração do extrato de EDFrM, que variam de 0,3 a 5,0 mg.mL⁻¹ e difere da ciclofosfamida em concentrações da fração do extrato de EDFrM, que variam de 1.25 a 5,0 mg. mL⁻¹. comprovando-se que há realmente um elevado potencial anti-tumoral destas frações.

Porém, quando se comparam as concentrações das frações dos extratos de EDFrM de 5,0 mg. mL⁻¹ com 2,5 e 1,25 mg. mL⁻¹, percebe-se que não há diferença significativa entre eles, pois os mesmos apresentam valores de p superiores a 5% ($p > 0,05$), ou seja, pode-se utilizar para destruir as células tumorais a concentração de 1,25 mg. mL⁻¹, já que esta é semelhante a concentração de 5,0 mg. mL⁻¹ da fração do extrato em questão.

A (Tabela 5) também mostra que não existe diferença relevante entre as concentrações 0.3 e 0.62 mg. mL⁻¹, 0.075 e 0.15 mg. mL⁻¹, 0.03 e 0.075 mg. mL⁻¹, pois seus valores de p são muito superiores a 5%.

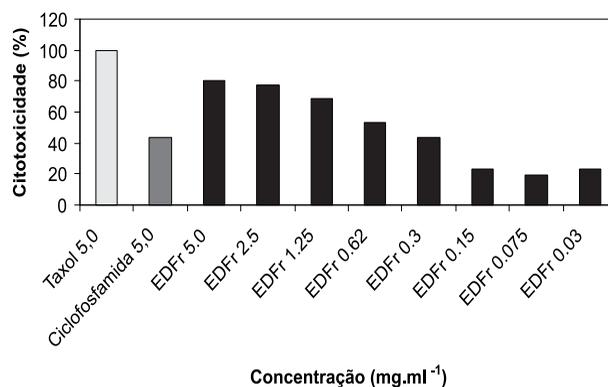


Figura 16. Percentual de citotoxicidade da fração metanólica *in vitro* sobre células tumorais de leucemia mielóide crônica K562, comparada com o taxol e a ciclofosfamida.

Mediante esses dados, os testes realizados *in vitro* para se verificar o possível potencial antitumoral da fração metanólica, obtida dos frutos de *Erythroxylum deciduum*, revelam ter atividade antineoplásica significativa frente ao modelo experimental utilizado. Com exceção das concentrações de 0,03 a 0,3 mg . mL⁻¹ da fração metanólica, as demais concentrações apresentaram citotoxicidade acima de 50%.

Assim fica demonstrada a importância da triagem

de extratos vegetais quanto às atividades biológicas, o que possibilita aos pesquisadores uma orientação no sentido de utilizar os melhores métodos de extração de substâncias com estas atividades em plantas para posterior isolamento e identificação química, além de concentrações otimizadas para que o extrato tenha sua máxima eficiência contra células tumorais. Até o presente momento, a literatura apresenta apenas 2 artigos referentes a esta espécie, já mencionados na revisão bibliográfica, porém nenhum sobre estudo dos constituintes químicos e possível potencial citotóxico e antitumoral. Viu-se então a necessidade de realização de mais estudos para se averiguar os potenciais terapêuticos e citotóxicos que a planta apresenta e não há dados na medicina popular.

Conclusão

O estudo fitoquímico das folhas de *E. deciduum* levou ao isolamento e identificação do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo obtido da fração metanólica (EDFMM) (31-40 F-1), substância já conhecida, mas não relatadas nesta espécie. Estudos da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica) demonstraram que há um elevado potencial citotóxico das frações metanólicas dos frutos de *E. deciduum*. Além disso, pode-se dizer que a fração do extrato a 5,0 mg. mL⁻¹ foi mais eficaz que a droga controle ciclofosfamida na mesma concentração, porém menos eficaz que o taxol. Não há presença de alcalóides nesta planta, apesar deste metabólito secundário ser um marcador taxonômico deste gênero, logo, pode-se inferir que haja diferença sazonal ou até mesmo estação do ano na qual a planta foi coletada.

Referências Bibliográficas

1. Evans, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylum*. *J. Ethnopharmacol.* 3, 265-277. **1981**.
2. Ansel, S. M., Pegel, K. H., Taylor, D. A. H., **1993**. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. *Phytochemistry* 32, 953-959.
3. Nakamura, A. T. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de três espécies de *Erythroxylum* P.Browne (Erythroxylaceae); Dissertação de Mestrado; Instituto de Biociências de Botucatu; Universidade Estadual Paulista, **2003**.
4. Bieras, A.C. Sajo, M.G. Ontogenia foliar de três espécies de *Erythroxylum* P.Browne (Erythroxylaceae) ocorrentes no cerrado; Revista Brasileira de Botânica; 27:71-77, **2004**
5. Plowman, T., Rivier, L. Cocaine and cinnamoylcocaine content of *Erythroxylum* species. *Ann. Bot.* 51, 641-659. **1983**.
6. Bohm, B. A.; Ganders, F. R. & Plowman, T. Byosystematics and evolution of cultivated coca (*Erythroxylaceae*). *Systematic Botany*; 7: 121-133. **1982**.
7. Griffin, W.J., LIN, G.D., 2000. *Phytochemistry* 53, 623.
8. Rodrigues, V. E.G. Carvalho, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado do Alto Rio Grande-Minas Gerais; *Ciências Agrotécnicas, Lavras*, v.25, n.1, p. 102-123, jan./fev., **2001**.
9. Johnson, E.L.; Schmidt, W. F., Norman, H. A. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. *Biochemical Systematics and ecology*, n. 26, p. 743- 759, mar. **1998**.
10. Tukavkina, N.A., Rulenko, I.A., Kolesnik, Y.A. *Voprosy Pitaniya Feb. P.33* - Natural flavonoids - food antioxidants and biologically active additives. **1996**.
11. Haraguchi, H., Ohmi, I., Fukuda, A., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O., Chou, W.H. Apr. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci Biotechnol Biochem*;61(4): 651-654. **1997**.
12. Chu, S. C., Hsieh, Y. S., Lin, J.Y. Feb. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*;55(2): 179-183. **1992**.
13. Huang, M.T., Wood, A.W., Newmark, H.L., Sayer, J.M., Yagi, H., Jerina, D.M., Conney, A.H. Dec. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*;4(12):1631-1637. **1983**.
14. Biziagos, E., Crance, J.M., Passagot, J., Deloince, R. May Effect of antiviral substances on hepatitis A virus replication in vitro. *J Med Virol*;22(1):57-66. **1987**.
15. Schwartz, A., Middleton, E. Jr. Apr. Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacology*;7(2):115-126. **1984**.
16. Bjeldanes, L.F., Chang, G.W. Aug. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 5;197(4303):577-578. **1977**.
17. Lu, X., Jung, J., Cho, H. J., Lim, Y., Lee, H. S., Chun, H. S., Kwon, Y., Park, J. H. December. Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *American Society for Nutrition J. Nutr.* 135:2884-2890. **2005**.
18. Troup, G.J., Huttona, D.R., O'dea, L., Langfordb, S.J. Epr and Antioxidant Efficiency studies of Resveratrol, Quercitin and Fisetin. *Proceedings – 31st annual condensed matter and materials meeting*. **2007**.
19. Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M.,

- Moilanen, E. 2007. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- κ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation* Volume 2007 (2007), Article ID 45673, 10 pages doi:10.1155/2007/45673.
20. Duke J. A. *Journal of Medicinal Food Biological Activity Summary for Cocoa* (Theobroma cacao L.) June 1, 3(2): 115-119. doi:10.1089/109662000416302. Herbal Vineyard, Inc., 8210 Murphy Road, Fulton, MD 20759. Volume 3, number 2. Mary Ann Liebert, Inc. 2000.
21. Johnson, E. L.; Schmidt, W. F.; Emche, S. D.; Mossoba, M. M.; Musser, S. M. kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca*. Var. ipadu. *Biochemical Systematics and Ecology* 31. 59-67. 2003.
22. Bonefeld, M., Friedrich, H., Kolodziej. (+) -Catechin 3 Rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. *Phytochemistry*, Vol.25, nº 5, pp1205-1207. 1986.
23. Colodel, E. M. et al. Intoxicação por *Erythroxylum decuduum* (Erythroxylaceae) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24(3): 165-168 jul./set. 2004.
24. Pinto, A. C. Silva, D. H. S. Bolzani, V. S. Lopes, N. P., Epifanio, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova* vol.25, Supl. 1, 45-61 São Paulo. Maio 2002.
25. Wall, M.E.; Wani, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol* 1996; 51:239-54.
26. OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J.; *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 129.
27. LORENZI, H. 2000. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** (3.ed.).Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.2, 352.p.
28. GAMBOA, T.P.R. **Estudo Químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoeae batatas* em associação ao controle de formigas cortadeiras *Atta sexdens* e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.** Tese de doutorado, PPGQ-UFSCar, São Carlos-SP, 2001, 269 p.
29. MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**, 4ª edição. Rio de Janeiro. RJ, LTC, 2004.
30. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. G.; MORRIL E. T. C. **Spectrometric Identification of organic compounds.** ISBN 0471134570, 6. Ed. John Wiley e Sons, 1998.
31. AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc., 304-342, 1989.

Guilhermina C. Nascimento^{1*},
Antônio C. S. Menezes¹, Elizangela
P. P. Lacerda²

¹Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, CP 459, Anápolis.GO.

²Universidade Federal de Goiás, CP 131, Goiânia, GO.

*e-mail: guilherminaquimica@hotmail.com