



# Comparação da bioatividade do entrecasco e diferentes formulações de pau d'arco (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC)

Tânia Cristina de São Pedro Pires

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais

Orientado por

**Isabel Cristina F.R. Ferreira**

**Ana Maria Pinto Carvalho**

**Lillian Bouçada de Barros**

Bragança

Outubro 2014

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho, só foi possível com a colaboração de algumas pessoas a quem deixo aqui o meu agradecimento:

À Professora Doutora Isabel Ferreira, à Professora Doutora Ana Maria Carvalho e à Doutora Lillian Barros pela orientação, disponibilidade e paciência que sempre me disponibilizaram.

Aos meus amigos Mário Cancela e Alexandra Morais pela constante presença nos momentos importantes da minha vida e pelas conversas que foram fundamentais para me manterem motivada e consequentemente contribuíram para a realização do trabalho.

Ao meu namorado, Gilberto Ferraz, pelo amor, carinho, compreensão, apoio, incentivo e constante encorajamento a fim de prosseguir a elaboração deste trabalho.

E por fim, a toda a equipa que trabalhou comigo e que direta ou indiretamente contribuíram para esta longa caminhada.

## Resumo

Pau d'arco é o nome popular da espécie *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC, (família Bignoniaceae) nativa da floresta Amazónica e outras regiões tropicais da América do Sul e América Latina. Esta planta tem sido utilizada com fins medicinais há vários séculos, sendo o entrecasco (camada mais interna da casca do tronco) aplicado no tratamento da dor, artrite, inflamação da glândula da próstata, febre, disenteria, furúnculos, úlceras e vários tipos de cancro; atualmente, o entrecasco é comercializado seco para infusões, comprimidos ou xaropes. Este trabalho teve como principal objetivo a validação científica do uso tradicional através da avaliação da bioatividade do entrecasco de pau d'arco (extrato metanólico e infusão) e de duas formulações diferentes também à base do entrecasco da mesma planta (comprimido e xarope). A atividade antioxidante foi avaliada em ensaios *in vitro* de determinação de efeitos captadores de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais, enquanto que a atividade antitumoral (capacidade de inibição de crescimento celular) foi determinada em quatro linhas celulares: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). A citotoxicidade para células normais (não-tumorais) foi avaliada utilizando uma cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). Foi ainda efetuada a caracterização química da amostra de entrecasco de pau d'arco pela análise dos seus macronutrientes, valor energético e determinação cromatográfica de açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e tocoferóis. A atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi maior no xarope e menor na infusão. O xarope e o extrato metanólico apresentaram também os melhores resultados de poder redutor e de capacidade de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno, podendo estes resultados estar relacionados com a maior quantidade de fenóis que se verificou nessas amostras.

O extrato metanólico revelou efeito inibitório sobre a linha celular NCI-H460. As restantes amostras testadas (infusão, comprimidos e xarope) não apresentaram qualquer efeito nas linhas celulares utilizadas. Nenhuma das amostras apresentou toxicidade em células PLP2.

Os macronutrientes mais abundantes no entrecasco de pau d'arco foram os glícidos, que contribuem significativamente para o valor energético determinado. Na análise dos açúcares livres foram detetados frutose, glucose e sacarose, sendo a glucose o açúcar mais abundante. Foram também identificados cinco ácidos orgânicos diferentes (ácidos oxálico, málico, cítrico,

sucínico e fumárico), sendo o ácido oxálico o mais abundante. Foram identificados vinte e um ácidos gordos, sendo os ácidos oleico, palmítico, linoleico e linolénico os que apresentaram maior expressividade. Os ácidos gordos insaturados (monoinsaturados + polinsaturados) predominaram sobre os ácidos gordos saturados. Foram também identificados e quantificados  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferóis.

## Abstract

Pau d'arco is the common name of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC species (Bignoniaceae), native of the Amazon rainforest and other tropical regions of South America and Latin America. This plant has been used in traditional medicine for many centuries, being the inner bark used in the treatment of pain, arthritis, inflammation of the prostate, fever, dysentery, boils, ulcers and different types of cancer; nowadays, it is marketed as dry material (bark) for infusions, pills and syrups.

The main objective of the present work was to validate scientifically the popular use through the bioactivity of pau d'arco bark (methanolic extract and infusion) and of two different formulations (pills and syrup) also based on the same plant-material. The antioxidant activity was evaluated by *in vitro* assays testing free radicals scavengers, reducing power and inhibition of lipid peroxidation in brain homogenates. The antitumor activity (ability to inhibit cell growth) was determined in four cell lines: MCF-7 (breast carcinoma), NCI-H460 (lung carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma). The cytotoxicity for normal cells (non-tumor cells) was assessed using a primary culture of porcine liver cells (PLP2). Furthermore, the sample was chemically characterized regarding macronutrients, energy and chromatographic determination of sugars, organic acids, fatty acids and tocopherols.

The scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals was higher in the syrup and lower in the infusion. Syrup and methanolic extract showed the best results in reducing power and capacity to inhibit  $\beta$ -carotene bleaching; these results may be related to the highest amount of phenolics found in these samples.

Methanolic extract showed inhibitory effect on NCI-H460. The remaining samples tested (infusion, pills and syrup) showed no effect on the cell lines used. None of the samples showed toxicity in PLP2.

Carbohydrates were the most abundant macronutrients in pau d'arco bark, which contribute significantly to the energy determined. In sugars analysis, fructose, glucose and sucrose were detected, glucose being the most abundant sugar. Five different organic acids were also identified (oxalic, malic, citric, succinic and fumaric acids), being oxalic acid the most abundant. Twenty-one fatty acids were identified, and oleic, palmitic, linoleic and linolenic

acids showed the highest expression. Unsaturated fatty acids (monounsaturated + polyunsaturated) predominated over saturated fatty acids.  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherols were also identified and quantified.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	2
Resumo .....	3
Abstract .....	5
Índice de figuras .....	9
Índice de Tabelas .....	10
Lista de Abreviaturas .....	11
<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1 Caracterização botânica de <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) (Pau d'arco).....	13
1.1.1 Família Bignoniaceae.....	14
1.1.2 Género <i>Tabebuia</i> Gomes ex A.P. de Candolle .....	14
1.1.3 <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.).....	15
1.2 Propriedades medicinais e compostos bioativos de <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Pau d'arco) .....	16
1.2.1 Compostos com atividade antifúngica .....	17
1.2.2. Compostos com atividade antioxidante, antitumoral e antibacteriana .....	18
1.2.3. Compostos com atividade antiproliferativa.....	19
1.2.4. Compostos com atividade anti-inflamatória.....	20
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>21</b>
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>22</b>
3.1. Padrões e Reagentes .....	22
3.2. Material vegetal e preparação das amostras .....	22
3.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	23
3.3.1. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH.....	23
3.3.2. Poder redutor .....	24
3.3.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno .....	24
3.3.4. Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	25
3.4. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade .....	25
3.4.1. Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas .....	25
3.4.2. Hepatotoxicidade em células não tumorais .....	26
3.5. Compostos bioativos .....	27
3.5.1. Fenóis totais .....	27
3.5.2. Flavonoides totais.....	27
3.6. Caracterização química do pau d'arco .....	28

3.6.1. Macronutrientes e valor energético .....	28
3.6.2. Açúcares .....	28
3.6.3. Ácidos orgânicos .....	29
3.6.4. Ácidos gordos .....	29
3.6.5. Tocoferóis .....	30
3.7. Análise estatística.....	30
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>31</b>
4.1. Propriedades bioativas .....	31
4.1.1. Atividade antioxidante e compostos bioativos .....	31
4.1.2. Atividade antitumoral.....	34
4.2. Composição química.....	35
4.2.1. Macronutrientes, açúcares livres e ácidos orgânicos.....	35
4.2.2. Ácidos gordos e tocoferóis .....	36
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>39</b>
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>41</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Inflorescências e espécie adulta de <i>Tabebuia impetiginosa</i> ( Fonte:Juliana Capuzzo, 2011). .....	15
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do lapachol (1) e $\beta$ -lapachona (2). Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, $C_{15}H_{14}O_3$ , Massa molar 242,2738 g/mol; conhecido desde 1858, foi o primeiro composto natural isolado a partir de <i>T. impetiginosa</i> , e é conhecido por ser a quinona mais abundante na família Bignoniacea (Thomson, 1971). $\beta$ -Lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona, $C_{15}H_{14}O_3$ , Massa molar 242,2738 g/mol); é um isómero do lapachol, em primeiro lugar obtido por tratamento ácido do lapachol mas mais tarde descrito como um produto natural também de <i>Tabebuia</i> sp. (Thomson, 1971; de Oliveira et al., 1993). .....	17
<b>Figura 3.</b> Diversos compostos encontrados em <i>T. impetiginosa</i> . 3: Estrutura geral de nafto[2,3- <i>b</i> ] furano-4,9-dionas: $R_1 = H, R_2 = COCH$ , $R_1 = H, R_2 = CH(OH)CH_3$ ; $R_1 = OH, R_2 = COCH_3$ ; $R_1 = OH, R_2 = CH(OH)CH_3$ , $R_1 = H, R_2 = C(CH_3) = CH_2$ .4: Estrutura geral de antraquinona. 5: Estrutura geral da 2-hidroximetilantroquinona. 6: Estrutura geral dos dialdeídos derivados de ciclopentenos. 7: Ácido antraquinona-2-carboxílico. ....	18
<b>Figura 4.</b> Estrutura química de (-)-5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i> ]furano-4,9-diona (1) e, (-)-8-hidroxi-2-(1-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i> ]furano-4,9-diona (2). .....	19
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do glicósido iridoide.....	20

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Caracterização botânica da <i>Tabebuia impetigosa</i> (Ruiz de la Torre, 2006). .....	13
<b>Tabela 2.</b> Atividade antioxidante (valores de EC <sub>50</sub> , mg/ml) e composição em compostos bioativos (fenóis, mg EAG/g extrato, e flavonoides, mg EC/g extrato) das diferentes preparações de pau d'arco (valores médios $\pm$ SD, n = 3). .....	31
<b>Tabela 3.</b> Avaliação da atividade antitumoral (valores GI <sub>50</sub> , $\mu$ g/ml) das diferentes preparações de pau d'arco (valores médios $\pm$ SD, n = 3). .....	35
<b>Tabela 4.</b> Composição em macronutrientes (g/100 g), valor energético (kcal/100 g), açúcares (g/100 g) e ácidos orgânicos (g/100 g) da amostra de pau d'arco (valores médios $\pm$ SD, n = 3). .....	36
<b>Tabela 5.</b> Composição em ácidos gordos (percentagens relativas) e tocoferóis (mg/100 g) da amostra de pau d'arco (valores médios $\pm$ SD, n = 3). .....	37

## Lista de Abreviaturas

A549	Linha celular de adenocarcinoma de pulmão
Abs	Absorvância
ACR	Atividade captadora de radicais
DAD/ESI-MS	Detetores de díodos/Espetrometria de Massa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
DSHEA	<i>Dietary Supplement Health and Education</i>
dw	Massa seca
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor e inibição da peroxidação lipídica
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GI <sub>50</sub>	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
HBSS	Solução salina de Hank's
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HL- 60	Linha celular de leucemia promielocítica humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HuO9	Linha celular de Osteossarcoma
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário

MIC	Concentração mínima inibitória (Minimum inhibitory concentration)
MS	Espetrometria de massa
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão
nd	Não detetado
PC-3	Linha celular da próstata
PDA	Detetor de fotodíodos
RI	Índice de refração
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
SAFE	4-metoxibenzaldeído, 4-metoxifenol, álcool 4-metoxibenzílico e 1,2- propanodiol
SD	Desvio padrão
SOD	Enzima superóxido dismutase
SRB	Sulforodamina B
EC	Equivalentes de catequina
EAG	Equivalentes de ácido gálico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
V	Vestígios
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
U1-Mel	Melanoma maligno radio-resistente
UV	Radiação ultravioleta

## 1. Introdução

### 1.1. Caracterização botânica de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) (Pau d'arco)

Pau d'arco é o nome popular de uma árvore da família das Bignoniaceae (Asteridas, Eudicotiledóneas) nativa da floresta Amazónica e outras regiões tropicais da América do Sul e América Latina. Pode crescer até aos 30 m de altura e a base do tronco pode ter 80 cm de diâmetro. O género *Tabebuia* inclui cerca de 100 espécies, a maioria grandes árvores de floração vistosa que são comuns nas paisagens das cidades sul-americanas e até das regiões mais temperadas. Trata-se de uma planta muito usada em fitoterapia sob a designação de pau d'arco, ipê-roxo e ipê-lapacho. A *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) é conhecida pelas suas atraentes flores roxas sendo muitas vezes chamada de "lapacho roxo". Tem várias sinonímias, como por exemplo, *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. e *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos que se referem à mesma espécie (Amaral et al. 2012).

**Tabela 1.** Descrição taxonómica de *Tabebuia impetiginosa* (Ruiz de la Torre, 2006).

Família	Bignoniaceae
Género	<i>Tabebuia</i>
Espécie	<i>Impetiginosa</i>
Sinónimos	<i>Tabebuia avellanadae</i> , <i>T. ipê</i> , <i>T. nicaraguensis</i> , <i>T. schunkeuigoi</i> , <i>T. serratifolia</i> , <i>T. altissima</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>Gelsemium avellanadae</i> , <i>Handroanthus avellanadae</i> , <i>H. impetiginosus</i> , <i>Tecoma adenophylla</i> , <i>Tecoma avellanadae</i> , <i>Tecoma eximia</i> , <i>Tecoma impetiginosa</i> , <i>Tecoma integra</i> , <i>Tecoma ipe</i> . <i>Tabebuia avellanadae</i> , <i>T. ipê</i> , <i>T. nicaraguensis</i> , <i>T. schunkeuigoi</i> , <i>T. serratifolia</i> , <i>T. altissima</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>Gelsemium avellanadae</i> , <i>Handroanthus avellanadae</i> , <i>H. impetiginosus</i> , <i>Tecoma adenophylla</i> , <i>Tecoma avellanadae</i> , <i>Tecoma eximia</i> , <i>Tecoma impetiginosa</i> , <i>Tecoma integra</i> , <i>Tecoma ipe</i> . <i>T. serratifolia</i> , <i>T. altissima</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>Gelsemium avellanadae</i> , <i>Handroanthus avellanadae</i> , <i>H. impetiginosus</i> , <i>Tecoma adenophylla</i> , <i>Tecoma avellanadae</i> , <i>Tecoma eximia</i> , <i>Tecoma impetiginosa</i> , <i>Tecoma integra</i> , <i>Tecoma ipe</i> .
Nomes comuns	Pau D'Arco, ipê, ipê roxo, lapacho, tahuari, taheebo, ipê, ipê-contra-sarna, <i>Tabebuia ipê</i> , taju
Parte usada	Entrecasco (parte viva da periderme, sobretudo câmbio suberoso), e madeira

### ***1.1.1. Família Bignoniaceae***

Esta família compreende cerca de 110 géneros e 800 espécies, e está distribuída, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais. O género com maior número de espécies é *Tabebuia* sensu lato com aproximadamente 100 espécies. Estudos moleculares realizados em 2007 conduziram a uma profunda revisão do género e produziram alterações na classificação, reduzindo o número de espécies de *Tabebuia*, visto que algumas das anteriores foram incluídas no género *Handroanthus*.

Surgem nos seus habitats sob a forma de arbustos, lianas ou árvores. A epiderme das bignoniáceas é recoberta por tricomas variados, quase sempre simples. As folhas normalmente compostas por folíolos têm inserção opostas, sem estípulas. As inflorescências são do tipo cimosas ou racemosas e as flores são hermafroditas, com simetria zigomorfa, grandes e exuberantes. O cálice tem sépalas unidas e a corola é bilabiada. Os estames são didinâmicos (ou seja, dois grandes e dois pequenos). Existe quase sempre um quinto estame reduzido a estaminódio. O ovário é súpero, de dois carpelos soldados, tem placentação axilar com muitos óvulos para cada lóculo e é sincárpico. Às vezes pode identificar-se a presença de um disco nectarífero rodeando a base do ovário (Ruiz de la Torre, 2006).

Os frutos de Bignoniaceae são cápsulas que podem ser do tipo septicida ou loculicida. Em alguns casos o fruto pode ser uma baga ou pode ser seco e indeiscente. As sementes quase sempre são achatadas, mas podem ser aladas ou cheias de tricomas. A polinização ocorre com o auxílio de abelhas, pássaros, vespas, borboletas e morcegos. Já a dispersão acontece principalmente por anemocoria, ou seja, pelo vento (Ruiz de la Torre, 2006).

### ***1.1.2. Género Tabebuia Gomes ex A.P. de Candolle***

Este género é constituído por arbustos ou árvores grandes. Folhas digitadas, raramente simples, com 3-9 folíolos inteiros ou dentados. Flores em panículas terminais, às vezes reduzidas a racimos de poucas flores, ou ainda menos frequente flores solitárias. As flores são muito abundantes, vistosas, amarelas, brancas, rosa, vermelhas, púrpura. O caliz apresenta-se em forma campanular ou tubular, truncado, bilabiado ou com 5 lóbulos. A corola tubular pode surgir afunilada ou tubular, sem pelos ou, pubescente no exterior do tubo, que é reto ou pouco curvado, ligeiramente bilabiado. (Ruiz de la Torre, 2006).

### 1.1.3. *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.)



**Figura 1.** Inflorescências e espécie adulta de *Tabebuia impetiginosa* ( Fonte:Juliana Capuzzo, 2011).

O nome vulgar é pau d’arco ou lapacho rosado do noroeste; é uma árvore que pode crescer até 20 a 30 m com um tronco até 80 cm de diâmetro, com fuste reto, de cerca de 10 m desde o solo até às ramificações mais baixas, ritidoma (camada mais externa da casca, assente sobre o entrecasco) de cor pardo-escuro, avermelhado, gretado mas muito resistente. Copa cónica em massa largamente volumosa com ramos isolados. Folhas digitadas, caducas, opostas, com pecíolo comprido com 3-5-7 folículos largamente pedicelados, oval-oblongos ou lanceolados, até 16x9 cm, com poucos dentes na parte apical, sendo maiores os superiores: foliação em setembro. As flores são precoces e abundantes, hermafroditas, cálice pubescente, campanulado com 5 dentes pequenos e desiguais de 1-2 mm. A corola gamopétala, rosada, cor de amora ou branca, de 4-5 cm de comprimento, com tubo campanulado e limbo bilabiado, com 2 lóbulos curtos ereto-patentes na parte superior, e na parte inferior 3 lóbulos compridos, patentes, todos os 5 ondulados, a fauce interna da corola mais escura, com tonalidade amarelada raiada de púrpura; 4 estames didinâmicos e um estaminódio; ovário súpero, bilocular, multiovulado, com estilete simples. Cápsula pendula, subcilíndrica, de 20-40 x 2-2,5 cm, com numerosas sementes espalmadas, aladas, de cor castanha (Ruiz de la Torre, 2006).

## 1.2. Propriedades medicinais e compostos bioativos de *Tabebuia impetiginosa* (Pau d'arco)

Ao longo dos séculos, as plantas têm sido a principal fonte de fármacos usados na cura ou alívio de várias doenças (Saklani et al., 2008). Na América, diferentes ervas com propriedades terapêuticas, juntamente com vários outros remédios tradicionais, são geralmente classificadas sob o título de "medicina alternativa". O pau d'arco tem sido utilizado com fins medicinais há vários séculos e, por exemplo, a sua casca interna ou entrecasco tem sido utilizada no tratamento da dor, da artrite, da inflamação da glândula da próstata, febre, disenteria, furúnculos, úlceras e uma grande variedade de tipos de cancro, sendo hoje comercializado sobretudo em comprimidos, material seco (casca interna ou entrecasco) para infusões ou tinturas.

Estes extratos são tradicionalmente usados no tratamento de úlceras, sífilis, problemas gastrointestinais, candidíase, cancro, diabetes, prostatite, constipação e alergias (Park et al., 2006). Mais recentemente, Melo et al. (2011) descreveu vários usos etnobotânicos de plantas medicinais utilizadas no Brasil mostrando efeitos anti-tumorais específicos. Entre 84 espécies estudadas, *T. impetiginosa* foi a segunda mais citada para o tratamento ou prevenção de cancro e tumores.

As evidências sobre os efeitos biológicos de extratos de plantas são cada vez maiores. No entanto, os componentes químicos podem ter ações mutagénicas, teratogénicas ou até mesmo carcinogénicas (Santos et al., 2008). Se um composto tóxico estiver presente, ele pode interagir com o DNA das células, conduzindo a lesões genéticas em regiões de importância fundamental para o ciclo celular e apoptose, podendo conduzir a processos neoplásicos (Santos et al., 2008). *T. impetiginosa* tem mostrado atividade contra linhas tumorais humanas: cancro da próstata (DU-145, PC-3, LNCaP) (Li et al., 1995, Huang et al., 1999), leucemia promielocítica humana (HL-60), carcinoma da mama (MCF-7: WS8) (Wuerzberger et al., 1998), carcinoma do ovário, carcinoma da laringe (Boothman et al., 1989), melanoma maligno radio-resistente (U1-Mel) (Boothman et al., 1989), adenocarcinoma de pulmão (A549), carcinoma cervical (HeLa) e osteossarcoma (HuO9) (Simamura et al., 2003).

Nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) registou o uso do pau d'arco como um suplemento dietético (FDA, 1999), "utilizado para aliviar as condições e sintomas de cancro". Esse suplemento dietético, como definido pela *Dietary Supplement Health and Education* (DSHEA) em 1994, é um produto tomado por via oral que contém um "ingrediente alimentar" destinado a completar a dieta.

Qualquer que seja a composição ou a apresentação de um suplemento dietético, o DSHEA coloca-os na categoria geral de alimentos, e não fármacos, e requer que todos os suplementos possam ser classificados como um suplemento dietético.

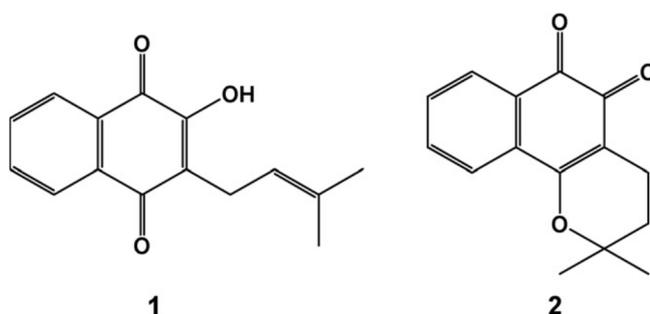
A casca interna do pau d'arco contém um elevado número de compostos naturais, entre os quais: flavonoides (Blatt et al., 1996), dialdeídos derivados de ciclopenteno (Koyama et al., 2000), ácido benzóico e derivados de benzaldeído (Wagner et al., 1989), quinonas (Sharma et al., 1988), furanonafotoquinonas (Zani et al., 1991), naftoquinonas e antraquinonas (Thomson, 1971).

Das 18 quinonas mais relevantes registados até à data, lapachol e  $\beta$ -lapachona (**Figura 2**) são de alguma importância clínica uma vez que têm sido relacionados com a atividade farmacológica da infusão de pau d'arco (Oswald, 1993).

### 1.2.1. Compostos com atividade antifúngica

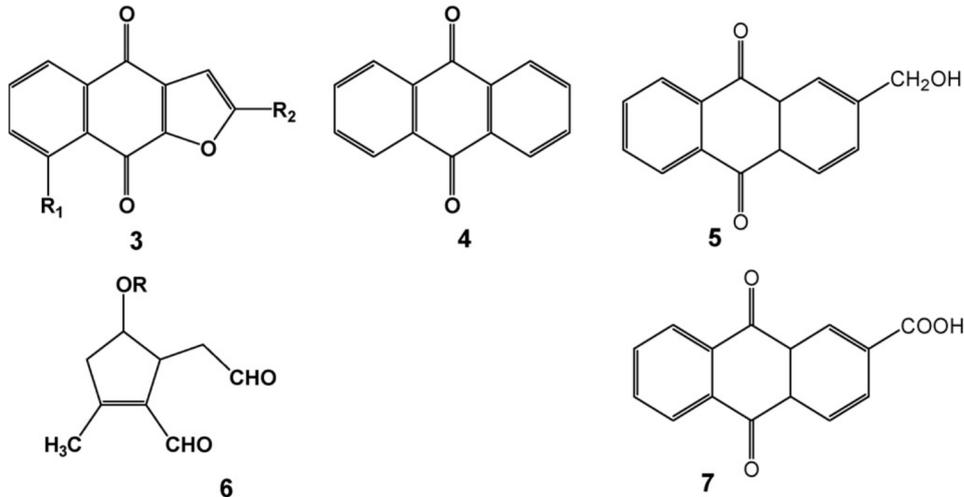
As naftoquinonas são metabolitos secundários difundidos na natureza e desempenham importantes funções fisiológicas em animais e plantas. O lapachol e a  $\beta$ -lapachona (**Figura 2**), foram encontrados em espécies de *Tabebuia*, e mostraram efeitos relevantes contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*, sendo mesmo mais ativos do que o padrão, cetoconazol. A lapachona apresenta, no entanto maior atividade antifúngica do que o lapachol (Guiraud et al., 1994).

Existem também várias naftoquinonas com propriedades inibidoras do transporte de eletrões e desacopladoras da fosforilação oxidativa (Howland, 1963).



**Figura 2.** Estrutura química do lapachol (1) e  $\beta$ -lapachona (2). Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona,  $C_{15}H_{14}O_3$ , Massa molar 242,2738 g/mol; conhecido desde 1858, foi o primeiro composto natural isolado a partir de *T. impetiginosa*, e é conhecido por ser a quinona mais abundante na família Bignoniacea (Thomson, 1971).  $\beta$ -Lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona,  $C_{15}H_{14}O_3$ , Massa molar 242,2738 g/mol); é um isómero do lapachol, em primeiro lugar obtido por tratamento ácido do lapachol mas mais tarde descrito como um produto natural também de *Tabebuia* sp. (Thomson, 1971; de Oliveira et al., 1993).

Outros compostos identificados em *T. impetiginosa* são nafto[2,3-*b*]furano-4,9-dionas (furanonaftaquinonas) e antraceno-9,10-dionas (antraquinonas) (Steinert et al, 1995;. Steinert e Rimpler, 1996). Alguns deles são apresentados na **Figura 3**.



**Figura 3.** Diversos compostos encontrados em *T. impetiginosa*. 3: Estrutura geral de nafto[2,3-*b*] furano-4,9-dionas: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = COCH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH(OH)CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = COCH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH(OH)CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = C(CH<sub>3</sub>) = CH<sub>2</sub>. 4: Estrutura geral de antraquinona. 5: Estrutura geral da 2-hidroximetilantroquinona. 6: Estrutura geral dos dialdeídos derivados de ciclopentenos. 7: Ácido antraquinona-2-carboxílico..

### 1.2.2. Compostos com atividade antioxidante, antitumoral e antibacteriana

Diversos compostos isolados a partir de *T. impetiginosa* incluem compostos voláteis, nomeadamente, 3,4-dimetoxibenzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina) e 4-metoxibenzaldeído (Wagner et al., 1989). Park et al. (2004) descreveram também a extração de compostos voláteis por técnicas diferentes: evaporação assistida com solvente (SAFE)- 4-metoxibenzaldeído, 4-metoxifenol, álcool 4-metoxibenzílico e 1,2-propanodiol; destilação sob pressão reduzida, seguido por extração líquido-líquido contínua (DRP-LLE)- 4-metoxibenzaldeído, 4-metoxifenol, 5 (2-propenil)-1,2,3-trimetoxibenzeno (elemicina) e 1-metoxi-4-(1E)-1 ropenilbenzeno-(trans- anetol).

A estrutura de quinona (incluindo antraquinonas e naftoquinonas) parece estar relacionada com atividades antitumorais e antimicrobianas (O'Brien, 1991; Boik, 2001). A atividade biológica da estrutura de quinona está relacionada com a capacidade da quinona aceitar elétrões,

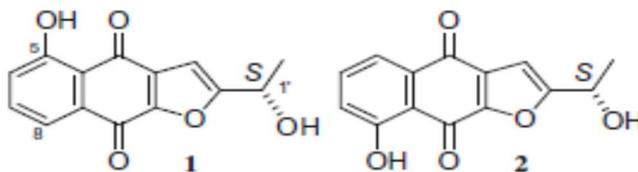
formando aniões ou espécies dianião e, assim, estimulando a produção intracelular de radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ROS) (Dubin et al., 1990; Fry et al., 1992).

A formação de ROS envolve redutases celulares (isto é, NADH: citocromo b5 redutase, e NADPH: redutase do citocromo P450), que reduz o radical quinona ao intermediário instável e altamente reativo, semiquinona, que forma radicais muito reativos (Castellanos et al., 2009). A formação destes radicais livres inicia um ciclo redox, que resulta na formação de superóxido. Este superóxido pode ser reduzido pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogénio e, em seguida, os radicais hidroxilo podem ser formados pela redução de ferro - através da reação de Fenton (Buettner, 1993).

Um análogo do lapachol, “furanonaftoquinona”, foi isolado a partir da casca da árvore de pau d’arco e revelou um valor de MIC significativamente inferior contra *Helicobacter pylori* ( Lee et al., 2004).

### 1.2.3. Compostos com atividade antiproliferativa

Para além de todos os compostos já descritos anteriormente, outros compostos foram caracterizados (Sousa et al., 2009) (**Figura 4**), nomeadamente naftoquinonas isoladas a partir de plantas de *T. impetiginosa*, que apresentam uma importante atividade antiproliferativa. Apresentaram capacidade para suprimir o crescimento de linhas celulares tumorais humanas incluindo PC-3 (próstata), A549 (pulmão) e MCF-7 (mama). O composto 1 demonstrou atividade antiproliferativa contra as três linhas celulares muito mais elevada do que a  $\beta$ -lapachona.



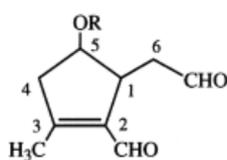
**Figura 4.** Estrutura química de (-)-5-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (1) e, (-)-8-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (2).

A comparação entre 1 e 2 mostra que a posição de um grupo hidroxilo ligado ao anel aromático, também afeta a sua capacidade para suprimir o crescimento das linhas celulares tumorais. Assim, a presença de um grupo hidroxifenólico no C-5 parece desempenhar um papel importante no aumento do efeito antiproliferativo.

Para além do efeito antiproliferativo, o composto 1 pode ser utilizado como preventivo na atividade cancerígena.

#### 1.2.4. Compostos com atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória de *T. impetiginosa* é atribuída à presença de 2 dialdeídos ciclopentenos. O composto 1 cuja fórmula molecular é  $C_{17}H_{18}O_5$ , apresentou sinais no espectro de infravermelho característicos da presença de um éster, aldeído conjugado, aldeído simples e anel aromático. O composto 2 foi considerado como 2-formil-5-(3', 4'- dimetoxibenzoiloxi)-3-metil-2- ciclopenteno-1-acetaldeído. Desta forma os compostos 1 e 2 seriam os produtos da hidrólise do glicósido iridoide (**Figura 5**) (Koyama et al., 2000).



R

1 R = 4'-methoxybenzoyl

2 R = 3',4'-dimethoxybenzoyl

**Figura 5.** Estrutura química do glicósido iridoide.

## 2. Objetivos

O pau d'arco (*Tabebuia impetiginosa*, vulgarmente também conhecida como ipê Roxo e pertencente à família Bignoniaceae) pode ser usado como suplemento alimentar com uma ação estimulante do sistema imunitário, tendo efeito analgésico e anti-infeccioso. É descrito como sendo útil em caso de diabetes, bem como em situações degenerativas (neoplasias) provavelmente pela sua ação antioxidante. Efetivamente o stresse oxidativo e a falta de defesas antioxidantes endógenas têm sido relacionados com as doenças crónicas mencionadas.

Assim, este trabalho teve como objetivos:

1- Avaliar a bioatividade do entrecasco de pau d'arco (extrato metanólico e infusão) e de duas formulações diferentes à base da mesma planta (comprimido e xarope).

A atividade antioxidante foi avaliada em ensaios *in vitro* de determinação de efeitos captadores de radicais livres, poder redutor, inibição da descoloração de  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais.

A atividade antitumoral (capacidade de inibição de crescimento celular) foi avaliada em quatro linhas celulares: MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2. A citotoxicidade foi avaliada utilizando uma cultura primária de células de fígado de porco (PLP2).

2- Determinar a caracterização química da amostra de entrecasco de pau d'arco pela análise dos macronutrientes, valor energético e determinação cromatográfica de açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e tocoferóis.

3- Validar por meio dos resultados obtidos os usos tradicionais e as propriedades medicinais popularmente atribuídas à espécie em estudo.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Padrões e Reagentes

Os solventes *n*-hexano 95%, acetonitrilo 99% e acetato de etilo 99,98%, grau HPLC, foram adquiridos à Fisher Scientific (Loures, Portugal). O solvente metanol, grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Todos os outros solventes usados eram de grau analítico: metanol e éter etílico, da marca Lab-Scan, tolueno e ácido sulfúrico, da marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na Sigma, assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares (L (+)-arabinose, D(-)-frutose, L-fucose, D(+)-galactose, D(+)-glucose anidra, lactose mono-hidratada, maltose mono-hidratada, maltulose mono-hidratada, D(+)-manitol, D(+)-manose, D(+)-melezitose, D(+)-melibiose mono-hidratada, D(+)-rafinose penta-hidratada, L(+)-ramnose mono-hidratada, D(+)-sacarose, D(+)-trealose, D(+)-turanose e D(+)-xilose), padrões de ácidos orgânicos (ácido oxálico, quinico, málico, ascórbico, cítrico, succínico e fumárico), padrões de tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e os padrões utilizados nos ensaios da atividade antioxidante: trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico e (+)-catequina. O tocol racémico, 50 mg/ml foi fornecido pela Matreya (Pleasant Gap, Pensilvânia, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

#### 3.2. Material vegetal e preparação das amostras

O material vegetal, entrecasco de pau d'arco, ou seja a parte mais interna da casca da árvore, formada por tecido vivo, foi obtido comercialmente numa erva-nária; por facilidade de expressão, o termo genérico “casca” por vezes usado neste trabalho, deve ser entendido como correspondente a casca interna ou entrecasco.

Preparou-se uma infusão e um extrato metanólico a partir da casca. Para além destes dois extratos, foram também avaliadas outras formulações farmacêuticas, nomeadamente

comprimidos e xarope que tinham na sua constituição extratos secos de casca da mesma espécie. O comprimido tem na sua constituição os seguintes ingredientes: *T. impetiginosa* (pau d'arco, extrato seco 5:1 da casca), celulose microcristalina (diluente), amido modificado de milho (aglutinante), fosfato dibásico de cálcio anidro, dióxido de silício (antiaglomerante) e estearato de magnésio (lubrificante). O xarope é constituído por: água purificada, *T. impetiginosa* (casca de pau d'arco 10%), ácido cítrico (regulador de acidez), sorbato de potássio, benzoato de sódio e galhato de propilo (conservante), aspartame, ciclamato de sódio e sacarina sódica (edulcorante).

Para a preparação da infusão, à amostra (1 g) foi adicionada água destilada (200 ml) previamente fervida (placa de aquecimento, VELP scientific) e deixou-se repousar durante 5 min e posteriormente, filtrou-se em papel Whatman nº 4.

Para obtenção do extrato metanólico, a amostra (4 g) foi submetida a uma extração sólido-líquido com 40 ml de metanol em placa de agitação (a 25 °C a 150 rpm), durante 1h e posteriormente filtrada através de papel Whatman nº 4. O resíduo sólido obtido foi re-extraído sob as mesmas condições. Os extratos líquidos combinados foram evaporados num evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) a 40 °C. O extrato obtido foi redissolvido em metanol, para a avaliação da atividade antioxidante de forma a obter uma solução com concentração de 20 mg/ml e em água, para a avaliação da atividade antitumoral, de forma a obter uma solução com concentração de 8 mg/ml.

Os comprimidos foram sujeitos a uma pulverização, posteriormente foram diluídos em 100 ml de água e filtrados por vácuo.

O xarope foi diluído de forma a obter uma concentração final do extrato de 94 µg/ml.

A partir destas soluções iniciais foram preparadas várias soluções com concentrações diferentes, a partir do método das diluições sucessivas. Estas soluções foram utilizadas na realização dos diferentes ensaios de avaliação da bioatividade.

### **3.3. Avaliação da atividade antioxidante**

#### ***3.3.1. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH***

A atividade captadora de radicais DPPH foi monitorizada utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, EUA). Todas as diluições das amostras, previamente preparadas (30 µl), foram colocadas nos diferentes poços das

microplacas (96 poços) e posteriormente foram adicionados 270 µl de uma solução de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l). A mistura foi colocada no escuro durante cerca de 30 min e a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 515 nm. A atividade captadora do radical (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução DPPH utilizando a fórmula  $\% ACR = [(Abs_{DPPH} - Abs_s) / Abs_{DPPH}] \times 100$  onde  $Abs_{DPPH}$  corresponde à absorvância da solução de DPPH e  $Abs_s$  à absorvância da solução de DPPH na presença do extrato. O valor de  $EC_{50}$  (concentração efetiva de extrato responsável pela captação de 50% de radicais DPPH) foi calculado por interpolação gráfica da percentagem de ACR em função da concentração do extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

### **3.3.2. Poder redutor**

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes concentrações das amostras (0,5 ml) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/l, pH 6,6, 0,5 ml) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 ml). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 ml). A mistura (0,8 ml) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 ml) e cloreto férrico (0,1% w/v, 0,16 ml), a absorvância foi medida a 690 nm. A concentração de extrato que fornece 0,5 de absorvância ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

### **3.3.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno**

Preparou-se uma solução por dissolução de  $\beta$ -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). Transferiram-se 2 ml desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml) e agitou-se vigorosamente. Transferiu-se uma alíquota (4,8 ml) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações das amostras (0,2 ml). Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo, mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero. A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:  $(\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno após 2 h de ensaio} / \text{conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100$ . A concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) foi calculada por interpolação a partir

do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno em função da concentração de extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

### ***3.3.4. Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)***

Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*; com cerca de 150 kg de peso), dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 ml) do sobrenadante com as diferentes concentrações das amostras (0,2 ml), FeSO<sub>4</sub> (10  $\mu$ M; 0,1 ml) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 ml) a 37 °C durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 ml), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 ml). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min para remoção de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA) - TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $[(A - B)/A] \times 100\%$ , onde A e B era a absorvância do controlo e da solução com o extrato, respetivamente. A concentração de extrato correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

## **3.4. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade**

### ***3.4.1. Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas***

Foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cancro de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas em cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor e 2 mM de glutamina (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), a 37 °C, em incubadora com temperatura humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> (HF 151, Heal Force) (Guimarães et al., 2013). Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70). Retirou-se o meio de cultura de cada caixa de cultura com as respetivas linhas celulares. Adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2 ml) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (1,5

ml). A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante 3 min para desagregação das células. Adicionou-se rapidamente meio de cultura (3 ml) para inativar a tripsina. Pipetou-se a suspensão celular para um tubo de falcon estéril para centrifugar (1200 rpm, 5 min.). Retiraram-se 50 µl de suspensão e adicionaram-se 50 µl de solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer.

Cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada ( $7,5 \times 10^3$  células/poço para MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) numa placa de 96 poços. Adicionaram-se 5 diluições das amostras (10 µl) em cada poço, juntamente com o volume de células calculado anteriormente. Perfez-se o volume de cada poço com meio de cultura. As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 48h até ao teste da sulforodamina B (SRB). Neste teste, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µl), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 µl) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µl, pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (referido anteriormente). Utilizou-se elipticina como padrão. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

### **3.4.2. Hepatotoxicidade em células não tumorais**

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2 (*porcine liver primary cell culture*). O procedimento foi descrito anteriormente pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho (Abreu et al., 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio de invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram tratadas com

diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o teste SRB descrito anteriormente. Utilizou-se elipticina como padrão. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

### **3.5. Compostos bioativos**

#### **3.5.1. Fenóis totais**

Os fenóis totais foram estimados com base no procedimento descrito por Wolfe et al. (2003) com algumas modificações. A uma alíquota da solução de cada amostra (0.5 ml), adicionou-se *Folin-Ciocalteu* (2.5 ml, previamente diluído em água 1:10 v/v) e carbonato de sódio (75 g/l, 2 ml). Centrifugou-se a mistura durante 15 s e deixou-se repousar durante 30 min a 40 °C para desenvolvimento da cor. A absorvância foi medida a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado para o cálculo da curva padrão (0,05-0,8 mM;  $y = 1,683x + 0,044$ ;  $R^2 = 0,999$ ), e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de extrato.

#### **3.5.2. Flavonoides totais**

Os flavonoides totais foram determinados pelo método de Jia et al. (1999), com algumas modificações. Uma alíquota (0,5 ml) da solução de cada amostra foi misturada com água destilada (2 ml) e, posteriormente, com solução de NaNO<sub>2</sub> (5%, 0,15 ml). Após 6 min, adicionou-se a solução de AlCl<sub>3</sub> (10%, 0,15 ml) e deixou-se repousar durante 6 min. Adicionou-se uma solução de NaOH (4%, 2 ml) e água destilada até perfazer o volume final de 5 ml. Em seguida, a solução foi completamente misturada e deixada repousar durante 15 min. A intensidade da cor rosa foi medida a 510 nm. (+) Catequina foi utilizada para calcular a curva padrão (0,0156-1,0 mM;  $y = 0,98766x - 0,0008$ ;  $R^2 = 0,999$ ) e os resultados foram expressos em mg de (+)-catequina equivalente (CE) por g de extrato.

### **3.6. Caracterização química do pau d'arco**

#### **3.6.1. Macronutrientes e valor energético**

Para determinação da composição química das amostras, analisou-se humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas, utilizando os procedimentos AOAC (1995). As proteínas totais ( $N \times 6,25$ ) foram estimadas pela técnica macro-Kjeldahl. Os lípidos totais foram determinados após extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração a  $660 \pm 15$  °C. Os glúcidos foram calculados por diferença:  $100 - (\text{g proteínas} + \text{g lípidos} + \text{g cinzas})$ . A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação: Energia (Kcal) =  $4 (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 (\text{g lípidos})$ .

#### **3.6.2. Açúcares**

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2010a) com algumas modificações. Cada uma das amostras (1 g) foi enriquecida com melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/ml) e foi extraída com 40 ml de etanol aquoso 80%, a 80 °C, durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion K240R-2003) a 15,000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de lípidos foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 ml de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 ml. Os açúcares foram determinados usando o HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35 °C. O sistema de HPLC estava equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6×250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetoneitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 ml/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em g por 100 g de massa seca.

### 3.6.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados após um procedimento previamente descrito por Pereira et al. (2013). As amostras (2 g) foram extraídas por agitação com 25 ml de ácido metafosfórico (25 ° C a 150 rpm) durante 45 min e, filtradas através de papel Whatman N ° 4. Posteriormente, a amostra foi filtrada através de filtros de nylon de 0,2 µm. A análise foi realizada utilizando uma série Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation). A separação foi conseguida através de uma (Phenomenex), coluna de fase inversa C18 SphereClone (5 µm, 250 mm×4,6 mm), termostaticado a 35 ° C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 ml/min. A deteção foi levada a cabo num PDA, utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda. Os ácidos orgânicos encontrados foram quantificados por comparação da área dos seus picos registados a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de produtos comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

### 3.6.4. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Barros et al. (2010a), e após o seguinte processo de trans-esterificação. A massa obtida por extração em Soxhlet foi misturada com 5 ml de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 ° C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 ml de água desionizada, para obter a separação das fases. A FAME foi recuperada com 3 ml de éter etílico em agitação no *vortex*; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um *vial* com teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 µm Milipore. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m×0,32 mm×0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 ° C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 ° C/min até 125 ° C, 5 ° C/min até 160 ° C, 20 ° C/min até 180 ° C, 3 ° C/min até 200 ° C, 20 ° C/min até 220 ° C que permaneceu durante 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 ml/min (0,61 bar), medido a 50 ° C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 ° C. Para cada análise, injetou-se 1 µl da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram

processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

### **3.6.5. Tocoferóis**

Os tocoferóis foram determinados segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros et al. (2010b). Antes do processo de extração, adicionou-se à amostra (500 mg) uma solução BHT em hexano (10 mg/ml; 100 µl) e uma solução de PI em hexano (tocol: 50 µg/ml; 400 µl). As amostras foram homogeneizadas com metanol (4 ml) no vortex (1 min). Posteriormente, adicionou-se hexano (4 ml) e homogeneizou-se novamente no vortex durante 1 min. Seguidamente, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 ml), homogeneizou-se (1 min) e centrifugou-se (5 min, 4000g). O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para um *vial*. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano. Os extratos combinados foram levados à secura sob corrente de azoto, re-dissolvidos em 2 ml de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro descartável LC de 0,22 µm, transferidos para um *vial* de injeção âmbar e analisados no HPLC. O equipamento de HPLC consistia num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer), um desgaseificador Smartline 5000, um amostrador automático AS-2057 2500 e um detetor de fluorescência FP-2020 (Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (250×4,6 nm) YMC Waters operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 ml/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

### **3.7. Análise estatística**

Utilizaram-se três amostras de cada formulação e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios e desvios padrão correspondentes (SD). Os resultados foram analisados por uma análise de variância (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com  $\alpha = 0.05$ . Este tratamento estatístico foi realizado por SPSS v. 20.0.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Propriedades bioativas

#### 4.1.1. Atividade antioxidante e compostos bioativos

As diferentes preparações de pau d'arco estudadas mostraram possuir atividade antioxidante (Tabela 2), avaliada a partir de quatro ensaios *in vitro* diferentes: atividade captadora de radicais de DPPH, poder redutor, inibição da descoloração de  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). A origem dos radicais e o mecanismo de reação dos antioxidantes é fundamental na escolha dos métodos para a avaliação da capacidade antioxidante (Prior et al. 2005; Guimarães et al. 2010).

**Tabela 2.** Atividade antioxidante (valores de  $EC_{50}$ , mg/ml) e composição em compostos bioativos (fenóis, mg EAG/g extrato, e flavonoides, mg EC/g extrato) das diferentes preparações de pau d'arco (valores médios  $\pm$  SD, n = 3).

	Extrato	Infusão	Comprimido	Xarope
Atividade captadora de DPPH	0,68 $\pm$ 0,03c	16,68 $\pm$ 0,58a	5,63 $\pm$ 0,19b	0,30 $\pm$ 0,05d
Poder redutor	0,27 $\pm$ 0,01c	6,78 $\pm$ 0,84a	3,45 $\pm$ 0,03b	0,26 $\pm$ 0,00c
Inibição descoloração $\beta$ -caroteno	0,23 $\pm$ 0,04c	10,72 $\pm$ 3,53a	3,37 $\pm$ 0,83b	0,26 $\pm$ 0,02c
Inibição TBARS	0,14 $\pm$ 0,01c	1,60 $\pm$ 0,02b	1,87 $\pm$ 0,02a	0,02 $\pm$ 0,00d
Fenóis	247,50 $\pm$ 8,93a	8,11 $\pm$ 0,24d	14,54 $\pm$ 0,90c	29,43 $\pm$ 0,56b
Flavonoides	71,12 $\pm$ 4,42a	1,67 $\pm$ 0,02d	4,32 $\pm$ 0,13c	9,31 $\pm$ 0,12b

A atividade antioxidante foi expressa como valores de  $EC_{50}$ , o que significa que os valores mais elevados correspondem a menor poder redutor ou potencial antioxidante. EAG e EC significam equivalentes de ácido gálico e catequina, respetivamente.  $EC_{50}$ : Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorbância para o ensaio do poder redutor. Trolox: valores de  $EC_{50}$  41,43  $\mu$ g/ml (poder redutor), 41,68  $\mu$ g/ml (atividade captadora DPPH), 18,21  $\mu$ g/ml (inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno) e 22,84  $\mu$ g/ml (inibição TBARS). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A atividade captadora de radicais de DPPH foi maior no xarope ( $EC_{50} = 0,30$  mg/ml) e menor na infusão ( $EC_{50} = 16,68$  mg/ml) (**Tabela 2**).

O DPPH é um radical de azoto estável, está disponível comercialmente e tem uma cor roxa. Neste método, os radicais de DPPH, que absorvem a 515 nm são, em parte, neutralizados pelos compostos antioxidantes, resultando uma diminuição da absorvância do sistema reacional ao referido comprimento de onda (Antolovich et al. 2002; Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2010). Quando uma solução de DPPH (X) é misturada com uma substância que pode ceder um átomo de hidrogénio (AH), ocorre a seguinte reação que explica a perda da cor (Guimarães et al. 2010).



O xarope e o extrato metanólico apresentaram os melhores resultados para o poder redutor ( $EC_{50} = 0,26$  mg/ml e  $0,27$  mg/ml, respetivamente **Tabela 2**). Mais uma vez, a infusão apresentou o pior valor ( $EC_{50} = 6,78$  mg/ml).

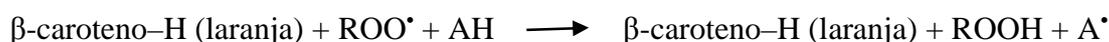
Neste ensaio, foi medida a transformação do  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Os antioxidantes presentes causam a redução do  $Fe^{3+}$ /complexo ferricianeto ( $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ ) à forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ). Assim, em função do poder redutor das amostras, a coloração amarela da solução sofre alteração entre os tons de verde ou azul (Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2010), o que pode ser medido espectrofotometricamente a 700 nm. Para determinar o poder redutor (ciclo redox) das substâncias testadas, estas são postas em contacto com um determinado metal responsável pela produção de radicais livres e, em alguns casos, pela regeneração dos antioxidantes:



Onde L é o ligante seletivo não ferroso cromogénico que produz a coloração (azul da prússia) da espécie  $Fe^{2+} - L$  como resultado da reação redox em questão; a espécie oxidante é  $Fe^{3+} - L$  ou  $Fe(CN)_6^{3-}$  (quando se utiliza ferricianeto como reagente) (Guimarães et al., 2010).

Tal como no ensaio do poder redutor, o extrato metanólico e o xarope revelaram maior capacidade para inibir a descoloração do  $\beta$ -caroteno que pode ser medida por espectrofotometria a 470 nm ( $EC_{50} = 0,23$  mg/ml e  $0,26$  mg/ml, respetivamente; **Tabela 2**). A infusão continuou a demonstrar o menor potencial antioxidante ( $EC_{50} = 10,72$  mg/ml).

Neste ensaio o  $\beta$ -caroteno sofre uma descoloração rápida na ausência de um antioxidante, uma vez que o radical livre ácido linoleico ataca a molécula do  $\beta$ -caroteno, que perde as ligações duplas e, conseqüentemente, perde a sua cor alaranjada característica. O  $\beta$ -caroteno é extremamente sensível à oxidação mediada por radicais livres de ácido linoleico (Gutierrez et al. 2006; Guimarães et al. 2010). Os antioxidantes podem dar átomos de hidrogénio para eliminar os radicais e impedir a descoloração de carotenoides:



Os antioxidantes podem neutralizar qualquer radical livre que se formem no âmbito do sistema (p.e., o radical livre linoleato), inibindo a descoloração do  $\beta$ -caroteno (Jayaprakasha et al. 2001; Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2010). Assim, a absorção diminuiu rapidamente nas amostras desprovidas de antioxidantes, enquanto na presença de um antioxidante, mantêm a cor mantendo, assim, a absorção por um período maior de tempo.

No ensaio TBARS foi o xarope que originou melhor atividade ( $EC_{50} = 0,02$  mg/ml; **Tabela 2**), enquanto que os comprimidos revelaram o pior potencial antioxidante ( $EC_{50} = 1,87$  mg/ml).

Este ensaio mede o malonaldeído (MDA) formado a partir da oxidação de ácidos gordos insaturados. A formação de MDA a partir de ácidos gordos com menos de três duplas ligações (p.e. o ácido linoleico) ocorre através da oxidação secundária de compostos carbonílicos (p.e. non-2-enal) (Fernández et al. 1997; Guimarães et al. 2010). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um pigmento rosa (TBARS), que é medido espectrofotometricamente a 532 nm (Ng et al. 2000; Guimarães et al. 2010). A peroxidação lipídica, uma consequência do *stress* oxidativo, está associada à perda progressiva do potencial da membrana aumentando, assim, a permeabilidade da membrana e, conduzindo, finalmente, à morte celular. A formação de TBARS em homogeneizados de cérebro é uma consequência da peroxidação lipídica. Portanto, os valores  $EC_{50}$  mais baixos (**Tabela 2**) obtidos para o ensaio de TBARS na presença da planta estudada são muito promissores. De facto, o cérebro é considerado altamente sensível aos danos oxidativos, uma vez que, consome uma quantidade significativa de oxigénio, é relativamente deficiente em defesas antioxidantes, é rico em substratos oxidáveis como ácidos gordos polinsaturados e catecolaminas (Chong et al. 2005) e

é rico em iões de metais de transição como o ferro, geralmente envolvidos em reações catalisadas por metais que levam à formação de espécies reativas de oxigénio (Ali et al. 2004). A maior atividade antioxidante demonstrada pelo extrato metanólico e pelo xarope de pau d'arco em todos os ensaios, está certamente relacionada com o maior teor em fenóis e flavonoides observado nestas amostras. A mesma concordância pode ser observada entre as menores concentrações de fenóis e flavonoides da infusão e a sua pior atividade antioxidante. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Silva et al., 2007). Estudos realizados anteriormente demonstram que o isolamento de substâncias que apresentam grupos hidroxilo fenólicos na sua constituição, apresentam uma elevada capacidade antioxidante (Maorong et al., 2013).

#### ***4.1.2. Atividade antitumoral***

O extrato metanólico demonstrou efeito inibitório sobre o crescimento de diferentes linhas celulares tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), tendo sido mais eficaz na linha celular de carcinoma do pulmão (NCI-H460,  $GI_{50} = 76,67$  mg/ml) (**Tabela 3**). As restantes amostras testadas, infusão, comprimidos e xarope não apresentaram qualquer efeito nas linhas celulares utilizadas.

Nenhuma das amostras apresentou toxicidade em células não-tumorais (culturas primárias de células do fígado, PLP2).

**Tabela 3.** Avaliação da atividade antitumoral (valores  $GI_{50}$ ,  $\mu\text{g/ml}$ ) das diferentes preparações de pau d'arco (valores médios  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

Atividade Antitumoral	Extrato	Infusão	Comprimidos	Xarope	Elipticina
MCF-7 (carcinoma de mama)	110,76 $\pm$ 5,33	>400	>400	>400	1,21 $\pm$ 0,02
NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	76,67 $\pm$ 7,09	>400	>400	>400	1,03 $\pm$ 0,09
HeLa (carcinoma cervical)	93,18 $\pm$ 1,46	>400	>400	>400	0,91 $\pm$ 0,11
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	83,61 $\pm$ 6,61	>400	>400	>400	1,10 $\pm$ 0,09
<b>Hepatotoxicidade</b>					
PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco)	>400	>400	>400	>400	2,29 $\pm$ 0,18

A atividade antitumoral foi expressa como valores de  $GI_{50}$ , o que significa que os valores mais elevados correspondem a menor potencial antitumoral.  $GI_{50}$ : Concentração de extrato correspondente a 50% de inibição do crescimento das células.

Estudos realizados, atribuem esta atividade antitumoral do pau d'arco à presença de quinonas (lapachol e  $\beta$ -lapachona) na sua constituição, já identificadas (Junior et al. 2007).

## 4.2. Composição química

### 4.2.1. Macronutrientes, açúcares livres e ácidos orgânicos

Nos dias de hoje, os consumidores exigem informações mais detalhadas sobre o valor nutricional e ingredientes que constituem os alimentos. Além disso, requerem novas formulações consistentes com as mais recentes recomendações em termos de saúde. Assim, além da composição em macronutrientes e micronutrientes habituais, parece também importante fornecer informações sobre a composição em compostos bioativos e capacidade antioxidante dos alimentos (Hassimoto *et al.*, 2009).

Os macronutrientes (glícidos, proteínas e lípidos) são maioritários na dieta de um indivíduo, fornecendo energia e nutrientes essenciais necessários ao crescimento e sobrevivência. Os micronutrientes (nomeadamente vitaminas ou minerais) são necessários em quantidades muito pequenas para orquestrar um conjunto de funções fisiológicas, mas não podem ser produzidos pelo próprio organismo. Os não-nutrientes ativos (compostos químicos encontrados em certos

alimentos que não são essenciais às funções do organismo, mas melhoram a saúde tendo um papel ativo ou protetor) são também, juntamente com os nutrientes, muito importantes na dieta humana.

Na análise nutricional, determinaram-se proteínas, lípidos, cinzas e glícidos, e identificaram-se os perfis individuais de açúcares e ácidos gordos por técnicas cromatográficas.

Identificaram-se os perfis individuais de açúcares e de ácidos gordos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI) e cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID), respetivamente.

Os macronutrientes mais abundantes foram os glícidos (77,94g/100g), que contribuem significativamente para o valor energético (392,50 kcal/100g) determinado (**Tabela 4**).

Na análise dos açúcares livres foram detetados frutose, glucose e sacarose, sendo a glucose o açúcar mais abundante (**Tabela 4**).

Foram também identificados cinco ácidos orgânicos diferentes (ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido fumárico), sendo o ácido oxálico o mais abundante (0,21 g/100 g, **Tabela 4**). O ácido málico e o ácido fumárico foram encontrados apenas em quantidades vestigiais.

**Tabela 4.** Composição em macronutrientes (g/100 g), valor energético (kcal/100 g), açúcares (g/100 g) e ácidos orgânicos (g/100 g) da amostra de pau d'arco (valores médios  $\pm$  SD, n = 3).

Macronutrientes		Açúcares livres		Ácidos orgânicos	
Cinzas	9,79 $\pm$ 0,38	Frutose	0,25 $\pm$ 0,01	Ácido oxálico	0,21 $\pm$ 0,01
Proteínas	5,94 $\pm$ 0,02	Glucose	0,53 $\pm$ 0,04	Ácido málico	v
Lípidos	6,33 $\pm$ 0,01	Sacarose	0,10 $\pm$ 0,01	Ácido cítrico	0,11 $\pm$ 0,02
Glícidos	77,94 $\pm$ 0,26	Total	0,88 $\pm$ 0,04	Ácido succínico	0,15 $\pm$ 0,02
Energia	392,50 $\pm$ 1,09			Ácido fumárico	v
				Total	0,47 $\pm$ 0,05

v- vestígios; valores expressos numa base de massa seca.

#### 4.2.2. Ácidos gordos e tocoferóis

Foram identificados vinte e um ácidos gordos, sendo o ácido oleico (C18:1n9; ácido gordo monoinsaturado), o ácido palmítico (C16:0), o ácido linoleico (C18:2n6; ácido gordo polinsaturado) e o ácido linolénico (C18:3n3; ácido gordo polinsaturado) os que apresentaram

maior expressividade (**Tabela 5**). Os ácidos gordos insaturados (MUFA + PUFA; 52,29%) predominaram sobre os ácidos gordos saturados (47,68%).

Foram também identificados e quantificados duas isoformas de tocoferóis ( $\alpha$ - e  $\gamma$ ) sendo que houve maior expressividade do  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabela 5.** Composição em ácidos gordos (percentagens relativas) e tocoferóis (mg/100 g) da amostra de pau d'arco (valores médios  $\pm$ SD, n = 3).

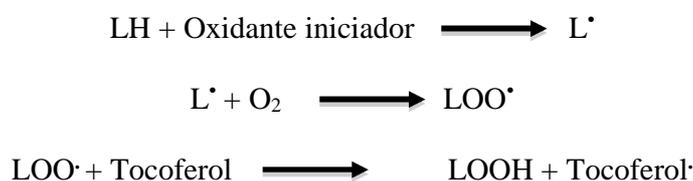
Ácidos gordos		Ácidos gordos	
C4:0	2,31 $\pm$ 0,28	C18:1n9	32,51 $\pm$ 0,32
C6:0	0,99 $\pm$ 0,01	C18:2n6	11,00 $\pm$ 0,02
C8:0	0,79 $\pm$ 0,01	C18:3n3	9,40 $\pm$ 0,06
C10:0	1,76 $\pm$ 0,04	C20:0	2,34 $\pm$ 0,09
C12:0	1,23 $\pm$ 0,03	C20:1	0,87 $\pm$ 0,09
C13:0	0,05 $\pm$ 0,00	C20:3n3+C21:0	0,45 $\pm$ 0,04
C14:0	3,35 $\pm$ 0,02	C22:0	1,52 $\pm$ 0,14
C15:0	0,93 $\pm$ 0,01	C23:0	0,91 $\pm$ 0,01
C16:0	17,86 $\pm$ 0,16	C24:0	1,97 $\pm$ 0,17
C16:1	0,12 $\pm$ 0,03	SFA	47,68 $\pm$ 0,16
C17:0	2,28 $\pm$ 0,13	MUFA	33,49 $\pm$ 0,01
C18:0	7,38 $\pm$ 0,13	PUFA	18,83 $\pm$ 0,18
Tocoferóis			
$\alpha$ -Tocoferol	2,07 $\pm$ 0,17		
$\gamma$ -Tocoferol	0,24 $\pm$ 0,01		
Total	2,31 $\pm$ 0,17		

Ácido butírico (C4:0); ácido capríco (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0), ácido tridecanóico (C13:0); ácido mirístico (C14:0), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9), ácido linoleico (C18:2n6), ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosenóico (C20:1), ácido 17-eicosatrienóico e ácido heneicosanóico (C20:3n3 + C21:0), ácido beénico (C22:0), ácido tricosanóico (C23:0), ácido lignocérico (C24:0). SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados. Valores de tocoferóis expressos numa base de massa seca.

Vitamina E é um termo muito usado para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, ou seja, tocoferóis e tocotrienóis, que compartilham uma estrutura comum. A vitamina E é composta por oito compostos químicos:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - tocoferóis e quatro tocotrienóis correspondentes. É um antioxidante natural importante nos alimentos,

especialmente nos ricos em ácidos gordos polinsaturados. Devido ao seu papel como agente captador de radicais livres, a vitamina E protege o corpo humano contra anomalias degenerativas, e principalmente em caso de cancro, bem como em doenças cardiovasculares (Ferreira et al. 2009).

A vitamina E reage com os radicais peroxilo produzidos a partir de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos da membrana ou lipoproteínas para produzir um hidroperóxido lipídico estável. Agem como antioxidantes, dando um átomo de hidrogénio aos radicais peroxilo das moléculas de lípidos insaturados, formando um radical hidroperóxilo e tocoferoxilo, que reage com outros radicais formando ligações estáveis (Ferreira et al. 2009).



Esta vitamina desempenha um papel relevante a nível intracelular uma vez que, quando presente em baixas concentrações, se verifica um aumento da fragilidade da membrana e da suscetibilidade ao ataque de radicais livres, o que torna a vitamina E um dos mais importantes antioxidantes. As suas isoformas estão, ainda, envolvidas em processos anti-tumorais a nível dos tecidos (Nesaretnam *et al.*, 1995).

O  $\alpha$ -tocoferol é o vitâmero que apresenta maior atividade biológica, sendo um eficaz captador de radicais livres.

## 5. Conclusões

A realização deste trabalho permitiu fazer a avaliação da bioatividade da casca de pau d'arco (extrato metanólico e infusão) e de duas formulações diferentes também à base de extratos da casca da mesma espécie (comprimido e xarope).

A atividade antioxidante foi avaliada em ensaios *in vitro* de determinação de efeitos captadores de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais. A atividade antitumoral (capacidade de inibição de crescimento celular) foi avaliada em quatro linhas celulares: MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2. A citotoxicidade foi avaliada utilizando uma cultura primária de células de fígado de porco (HepG2). Foi ainda caracterizada quimicamente a amostra de casca de pau d'arco pela análise dos macronutrientes, valor energético e determinação cromatográfica de açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e tocoferóis.

A atividade captadora de radicais de DPPH foi maior no xarope e menor na infusão. O xarope e o extrato metanólico apresentaram os melhores resultados de poder redutor e de capacidade de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno, podendo estes resultados estar relacionados com um com o galhato de propilo (éster de ácido gálico) utilizado como conservante no xarope. A infusão continuou a demonstrar o menor potencial antioxidante.

No ensaio TBARS foi o xarope que originou melhor atividade ( $EC_{50} = 0,02$  mg/ml; **Tabela 2**), enquanto os comprimidos revelaram o pior potencial antioxidante ( $EC_{50} = 1,87$  mg/ml).

O extrato metanólico revelou efeito inibitório sobre a linha celular de carcinoma do pulmão (NCI-H460). As restantes amostras testadas (infusão, comprimidos e xarope) não apresentaram qualquer efeito nas linhas celulares utilizadas. Nenhuma das amostras apresentou toxicidade em células não-tumorais (PLP2).

Os macronutrientes mais abundantes foram os glícidos, que contribuem significativamente para o valor energético determinado. Na análise dos açúcares livres foram detetados frutose, glucose e sacarose, sendo a glucose o açúcar mais abundante. Foram também identificados cinco ácidos orgânicos diferentes (ácidos oxálico, málico, cítrico, sucínico e fumárico), sendo o ácido oxálico o mais abundante. Os ácidos málico e fumárico foram encontrados apenas em quantidades vestigiais. Foram identificados vinte e um ácidos gordos, sendo os ácidos oleico palmítico, linoleico e linolénico os que apresentaram maior expressividade. Os ácidos gordos

insaturados (monoinsaturados + polinsaturados) predominaram sobre os ácidos gordos saturados. Foram também identificados e quantificados  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferóis.

Em suma, confirma-se o interesse do pau d'arco (*Tabebuia impetigosa*) enquanto espécie utilizada na medicina alternativa, visto que neste estudo se demonstrou que tem possibilidades para ser utilizado com diferentes finalidades, e se comprovou o seu potencial antioxidante e antitumoral.

## 6. Bibliografia

Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegas, F., Chaves, R., Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3- aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 5800-5806.

Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1-15.

Amaral, D.D., Vieira, I.C.G., Salomão R.P., Almeida S.S., Jardim M., (2012). The status of conservation of urban forests in eastern Amazonia. *Brazilian Journal of Biology* 72, 257-265.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84, 551-562.

AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2010a). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* 120, 247–254.

Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010b). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT* 43, 544-550.

Blatt, C.T.T., dos Santos, M., Salatino, A. (1996). Flavonoids of *Tabebuia caraiba* (Bignoniaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 24, 89-89.

Boik, J. (2001). Nonflavonoid Phenolic Compounds. *Natural Compounds in Cancer Chemotherapy*. Oregon Medical Press, Princeton, 286.

Boothman, D.A., Trask, D.K., Pardee, A.B. (1989). Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumour cells by beta-lapachone, an activator of topoisomerase I. *Cancer Research* 49, 605–612.

Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300, 535–543.

Castellanos, J.R.G., Prieto, J.M. Heinrich, M. (2009). Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)- A global ethnopharmacological commodity? *Journal of Ethnopharmacology* 121, 1-13

Chong, Z.Z., Li, F., Maiese, K. (2005). Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology* 75, 207-246.

Dubin, M., Fernández, V.S., Stoppani, A.O. (1990). Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Biochemical Pharmacology* 39, 1151–1160.

Fry, M., Pudney, M. (1992). Site of action of the antimalarial hydroxynaphthaquinone- 2-[trans-4-(49-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochemical Pharmacology* 43, 1545-1553.

FDA (1999). Economic characterization of the dietary supplement industry. Final Report. Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States Food and Drug Administration.

Fernández, J., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-Lopez, J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* 59, 345-353.

Guimarães, R., Barros L., Duenas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, R.P.M.J., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry* 136, 947-954.

Guiraud, P., Steiman, R., Campos-Takaki, G.M., Seigle-Murandi, F., Bouchberg, M. (1994). Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and lapachone. *Planta Medica* 6, 373–374.

Gutierrez, R.M.P., Luna, H.H., Garrido, S.H. (2006). Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *Journal of the Chilean Chemical Society* 51, 883-886.

Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I. Lajolo, F.M. (2009). Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 394–396.

Howland, J.L. (1963). The reversibility of inhibition by 2-heptyl-4-hydroxyquinolin- N-oxide and 2-hydroxy-3-(3-methylbutyl)-1,4-naphthoquinone of succinate oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 73, 665–667.

Huang, L., Pardee, A. (1999).β- lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Molecular Medicine* 5, 711-720

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* 73, 285-290.

Jia, Z., Tang, M., Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64, 555-559.

Junior, E., Sousa, M., Pinto, A., Pinto, M., Goulart, M., Barros, F. (2007). Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor-  $\beta$ -lapachone and nor-  $\alpha$ -lapachone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15, 7035-7041.

Koyama, J., Morita, I., Tagahara, K., Hirai, K. (2000). Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 53, 869-872.

Lee, H.K., Lee, H.B., Kim, C.S., Ahn, Y.J. (2004). Anti-*Helicobacter pylori* activity of methanol extracts from Korean native plant species in Jeju island. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 47, 91–96.

Li, C., Wang, C., Pardee, A., (1995) Induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Research* 55, 3712-3715.

Maorong, S., Tomihisa, O., Fumihide, T., Shouwen, J. (2013). Bioactive phenylpropanoid glycosides from *Tabebuia avellanae*. *Molecules* 18, 7336-7345.

Melo, J.G., Santos, A.G., Amorim, E.L.C., Nascimento, S.C., Albuquerque, U.P. (2011). Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-14.

Nesaretnam, K., Guthrie, N., Chambers, A. F. & Carroll K.K. (1995). Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids*, 30, 1139-1143.

Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science* 66, 709-723.

O'Brien, P.J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 80, 1-41.

Oswald, E.H. (1993). Lapacho. *British Journal of Phytotherapy* 3, 112–117.

Park, B.S., Lee, K.W., Takeoka, G.R. (2004). Comparison of three sample preparation methods on the recovery of volatile from Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). *Flavour and Fragrance Journal* 19, 287–292.

Park, B.S., Lee, H.K., Lee, S.E., Piao, X.L., Takeoka, G., Ahn, Y.J., Kim, J.H. (2006). Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 255-262.

Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty-five species of food and medicinal plants. *Food Analytical Methods* 6, 1337-1344.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290-4302.

Ruiz de la Torre, J.. (2006). *Flora Mayor*. Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autonomo Parques Naturales, Direccion general para la biodiversidade, Madrid, 1476-1477.

Saklani, A., Kutty, S.K. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today* 13, 161-171.

Santos, R.A., Cabral, T.R. Cabral, I.R. Antunes, L.M.G., Andrade C.P., Cardoso, P.C.S., Bahia, M.O., Pessoa, C., Nascimento, J.L.M., Burbano, R.R., Takahashi, C.S. (2008). Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. *Biocell* 32, 195-200.

Sharma, P.K., Khanna, R.N., Roatghi, B.K., Thomson, R.H. (1988). Tecomaquinone-III - a new quinone from *Tabebuia pentaphylla*. *Phytochemistry* 27, 632-633.

Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101, 1012-1018.

Simamura, E., Hirai, K.I., Shimada, H., Pan, J., Koyama, J. (2003). Mitochondrial damage prior to apoptosis in furanonaphthoquinone treated lung cancer cells. *Cancer Detection and Prevention* 27, 5–13.

Sousa, N.C., Rezende, A.A.A. da Silva, Guterres, R., Graft, Z., Kerr, U., Spanó, M. (2009). Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa* (Lamiales, Bignoniaceae) on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology* 32, 2, 382-388.

Steinert, J., Khalaf, H., Rimpler, M. (1995). HPLC separation and determination of naphthol[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *Journal of Chromatography A* 693, 281–287.

Steinert, J.K.H, Rimpler, M. (1996). High-performance liquid chromatographic separation of some naturally occurring naphthoquinones and anthraquinones. *Journal of Chromatography A* 723, 206–209.

Thomson, R.H. (1971). Naphtaquinones. Naturally Occurring Quinones. Academic Press, London,203.

Wagner, H., Kreher, B. (1989). Structure determination of new isomeric naphtho 2,3-b furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-inept technique. *Helvetica Chimica Acta* 72, 659-667.

Wuerzberger, S., Pink, J.J., Planchon, S.M. (1998). Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. *Cancer Research* 58, 1876–1885.

Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 609-614.

Zani, C.L., De oliveira, A.B., Olivera, G. (1991). Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. *Phytochemistry* 30, 2379-2381.