



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

**Isolamento de inibidores de proteases a partir de
cultura de células vegetais com actividade
antimalárica**

Tânia Solange Vieira Paz

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Faro, Setembro 2009

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

Isolamento de inibidores de proteases a partir de cultura de células vegetais com actividade antimalárica

Tânia Solange Vieira Paz

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Dissertação orientada por:

Doutora Ana Domingos

Professora Doutora Sara Raposo

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Emília Costa da FERN e ao Doutor Carlos Novo do INETI pela cedência das instalações, equipamentos e materiais necessários à realização deste trabalho, um muito obrigado.

Agradeço ainda às coordenadoras, Doutora Ana Domingos e Professora Doutora Sara Raposo pelo tempo, disponibilidade e principalmente pela paciência que demonstraram.

Um agradecimento especial ao Doutor Fernando Cardoso do INETI e à Doutora Carla Rodrigues do ICAT que em muito contribuíram para este trabalho.

Agradeço ainda a todo o pessoal do Departamento de Biotecnologia do INETI pelo carinho com que me receberam, tornaram muito mais fácil a minha estadia.

Agradeço ainda à Cátia e à Felícia pela amizade e carinho com que me receberam em casa todos aqueles meses, um beijo enorme.

Agradeço aos meus amigos pelo tempo descontraído que me proporcionaram, sem eles os problemas seriam demasiado pesados.

Agradeço à melhor mãe do mundo pela força e carinho com que me apoiou, mesmo em tempos difíceis para ambas, e aos meus irmãos e sobrinha pelo entusiasmo quando o meu estava a diminuir.

Ao Rui, agradeço por ter sido bom ouvinte e pelas palavras de apoio nos momentos em que tudo parecia correr mal.

A todos, um obrigado muito sincero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1.1 MALÁRIA – CONTEXTO HISTÓRICO	1
1.2 CICLO DE VIDA DO PARASITA	2
1.3 MALÁRIA: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA.....	4
1.4 CONTROLO DA MALÁRIA.....	5
1.5 TERAPIA DA MALÁRIA.....	6
1.5.1 FÁRMACOS SINTÉTICOS ANTIMALÁRICOS.....	7
1.5.2 ALGUMAS PLANTAS COM ACTIVIDADE ANTIMALÁRICA.....	9
1.6 ESPÉCIES EM ESTUDO.....	11
1.6.1 <i>Ailanthus altissima</i>	11
1.6.2 <i>Catharanthus roseus</i>	12
1.6.3 <i>Leucojum aestivum</i>	12
1.6.4 <i>Ranunculus multifidus</i>	12
1.6.5 <i>Vernonia myriantha</i>	13
1.6.6 <i>Pittosporum viridiflorum</i>	13
1.6.7 <i>Phyllanthus niruri</i>	13
1.6.8 <i>Mercurialis annua</i>	14
1.6.9 <i>Euphorbia peplus</i>	14
1.6.9.1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	14
1.6.9.2 TERPENÓIDES	15
1.7 CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS.....	15
1.8 PROTEASES.....	17
1.8.1 PAPAÍNA E TRIPSINA.....	17

2. OBJECTIVOS.....	19
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1 ESTABELICIMENTO DE <i>CALLI</i>	20
3.1.1 ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES E FOLHAS.....	20
3.1.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES	21
3.1.3 INDUÇÃO DE <i>CALLI</i>	21
3.1.4 SUSPENSÃO CELULAR	23
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRACTOS VEGETAIS	23
3.3 AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	24
3.3.1 ESPECTROFLUORIMETRIA.....	24
3.5.2 GEL POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	26
3.6 TESTE DA TOXICIDADE	27
3.7 GC-MS.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 ESTABELECIMENTO DE <i>CALLI</i>	30
4.2 AVALIAÇÃO DA ACÇÃO INIBIDORA DE EXTRACTOS VEGETAIS.....	31
4.2.1 OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE TWINING	32
4.2.2 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DOS EXTRACTOS VEGETAIS	34
4.2.3 EXTRACÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES	40
4.3 GEL POLIACRILAMIDA.....	44
4.4 TESTE DE TOXICOLOGIA.....	46
4.5 GC-MS.....	49
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7. ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: <i>Plasmodium falciparum</i> destruindo os glóbulos vermelhos.....	2
Figura 2: Mosquito do género <i>Anopheles</i>	2
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no insecto e no Homem	4
Figura 4: Distribuição mundial do risco de malária pelo <i>P. falciparum</i> , em 2007.	5
Figura 5: <i>Ailanthus altíssima</i>	11
Figura 6: <i>Catharanthus roseus</i>	12
Figura 7: <i>Leucojum aestivum</i>	12
Figura 8: <i>Ranunculus multifidus</i>	12
Figura 9: <i>Vernonia myriantha</i>	13
Figura 10: <i>Pittosporum viridiflorum</i>	13
Figura 11: <i>Phyllanthus niruri</i>	13
Figura 12: <i>Mercurialis annua</i>	14
Figura 13: <i>Euphorbia peplus</i>	14
Figura 14: Fitoclima em fotoperíodo 16h luz/ 8h escuro.....	22
Figura 15: Agitador mecânico.....	23
Figura 16: Seleccção da concentração de papaína a utilizar no estudo a partir de uma solução stock de papaína 1000 µg/ mL em tampão PBS pH 7.2..	32
Figura 17: Seleccção da concentração de tripsina a utilizar no estudo a partir de uma solução stock de tripsina 100 µg/ mL em tampão 100mM Tris pH 8.5..	33
Figura 18: SDS-PAGE 10% (v/v) com gelatina 0,1% (p/p).....	45
Figura 19: SDS-PAGE 10% (v/v) com gelatina 0,1% (p/v)	45
Figura 20: Percentagem de mortos de <i>Artemia salina</i> em função da concentração de extracto de <i>Euphorbia peplus</i> (µg/mL) em metanol.	47
Figura 21: Recta de tendência dos valores da fase exponencial e sua equação	48

Tabela 1: Selecção da concentração de papaína.....	32
Tabela 2: Selecção da concentração de tripsina	33
Tabela 3: Inibição da papaína na presença de extracto de <i>calli</i> de <i>Ailanthus altissima</i>	34
Tabela 4: Inibição da papaínana na presença de extracto de <i>calli</i> de <i>Catharanthus roseus</i>	35
Tabela 5: Inibição da papaínana na presença de extracto de folhas frescas e secas de <i>Euphorbia peplus</i>	36
Tabela 6: Inibição da tripsina na presença de extracto de folhas frescas e secas de <i>Euphorbia peplus</i>	37
Tabela 7: Inibição da papaínana na presença de extractos de <i>calli</i> , caule e raízes de <i>Euphorbia peplus</i>	38
Tabela 8: Inibição da tripsina na presença de extractos de <i>calli</i> , caule e raízes de <i>Euphorbia peplus</i>	39
Tabela 9: Inibição da papaínana na presença dos extractos, em diferentes solventes, de <i>calli</i> de <i>Euphorbia peplus</i>	41
Tabela 10: Influência do DMSO na actividade do extracto de <i>calli</i> de <i>E.peplus</i>	42
Tabela 11: Inibição da papaínana na presença de extractos, em diferentes solventes, de folhas frescas de <i>Euphorbia peplus</i>	43
Tabela 12: Influência do PVP insolúvel na actividade de folhas frescas de <i>E.peplus</i>	44

ABREVIATURAS

a.C - antes de Cristo

d.C - depois de Cristo

D.D.T. - dicloro-difenil-tricloroetano

DL₅₀ - dose letal para 50 % da população

DMAPP - pirofosfato de dimetilalilo

DMSO - ácido dimetil sulfóxido

FITC - isotiocianato de fluoresceína

G6PD - glucose-6-fosfato desidrogenase

IPP - pirofosfato de isopentenilo

KIN - cinetina

MS - meio Murashige e Skoog

NAA - ácido naftalenoacético

PBS – tampão salino fosfato

PfATP6 - *Plasmodium* ATPase de cálcio

PVP - polivinilpirrolidona insolúvel

SDS - sulfato dodecil de sódio

SERCA - Retículo Sarco/Endoplasmico de cálcio ATPase

2,4 –D - ácido 2,4 diclorofenoxiacético

RESUMO

A malária é uma das doenças tropicais infecciosas causada pelo parasita protozoário unicelular do género *Plasmodium*. É uma doença endémica em 105 países, responsável por 300 a 500 milhões de casos clínicos anualmente, causando a morte de mais de um milhão de pessoas. Devido ao aumento da resistência de alguns parasitas aos fármacos sintéticos têm vindo a ser desenvolvidos estudos no sentido de encontrar novos fármacos naturais, nomeadamente extractos de plantas.

O presente trabalho teve como principal objectivo analisar a actividade inibitória, através da cultura *in vitro*, que os *calli* das diferentes espécies testadas apresentavam face a duas proteases, uma protease cisteínica e uma protease serínica, papaína e tripsina respectivamente, e identificar os componentes com acção inibitória.

Neste tipo de estudo são utilizadas, normalmente, partes da planta como folhas, raízes, caules e sementes, contudo, a flora portuguesa não possui todas as espécies em estudo. Podemos encontrar apenas *Ailanthus altissima*, *Mercurialis annua* e *Euphorbia peplus*. Como forma de contornar esta dificuldade, procedeu-se ao estabelecimento *in vitro* de *calli* e de culturas de células em suspensão das diferentes espécies em estudo. Assim sendo, através da cultura *in vitro*, pretendeu-se analisar a actividade inibitória que os *calli* das diferentes espécies testadas apresentavam face a duas proteases, uma protease cisteínica e uma protease serínica, papaína e tripsina respectivamente, e identificar os componentes com acção inibitória.

Para determinar a actividade inibitória dos extractos de *calli*, efectuaram-se ensaios fluorimétricos e ensaios de deteção de actividade em géis de poli-acrilamida. Os resultados de fluorimetria sugerem que o extracto de *calli* de *Ailanthus altissima* possui actividade inibitória enquanto que o extracto de *Catharanthus roseus* não demonstra inibir as proteases do extracto. A actividade proteolítica da papaína é inibida na presença do extracto de folhas frescas de *Euphorbia peplus* após extracção com diferentes solventes orgânicos, mas não ocorre inibição do extracto proveniente de *calli* desta espécie. No entanto, para o extracto de folhas frescas de *E. peplus*, extraído

em Tris-EDTA, não se verificou uma inibição da actividade em relação à papaína 500 µg/mL.

A inibição da actividade enzimática da protease papaína em presença de extractos de *Euphorbia peplus* obtidos com diferentes solventes foi também avaliada em gel de poliacrilamida contendo gelatina. Verificou-se que os extractos extraídos com diferentes solventes na presença de protease papaína, apresentaram uma redução da sua actividade enzimática.

Foi avaliada a actividade citotóxica do extracto de folhas frescas de *E. peplus* utilizando o teste de toxicidade no qual se obteve um valor DL50 (concentração letal de 50% da população) de 90,5 µg/mL. Este é um valor que indica alguma toxicidade por parte do extracto. A identificação dos inibidores foi efectuada através de uma análise GC-MS com a qual não foi possível identificar compostos constituintes de *E. peplus*.

Uma vez que os métodos utilizados não revelaram resultados conclusivos, serão utilizados futuramente outros métodos e/ou dosagens.

PALAVRAS-CHAVE: *Euphorbia peplus*, inibidores de proteases, malária, extractos vegetais, fluorimetria.

ABSTRACT

Malaria is an infectious tropical disease caused by unicellular protozoan parasite of the genus *Plasmodium*. It is an endemic disease in 105 countries, accounting for 300 to 500 million clinical cases annually, causing the death of over a million people. Due to the increased resistance of some pests to synthetic drugs have been developed studies to find new natural drugs, including plant extracts.

This work had as main objective to analyze the inhibitory activity by *in vitro* culture, the *calli* of different species were tested against the two proteases, a cysteine protease and a serine protease, papain and trypsin respectively, and identify the components with action injunction.

In this type of study is usually used, as parts of the plant, leaves, roots, stems and seeds. However, the portuguese flora did not have all species in the study, in which we can only find *Ailanthus altissima*, *Euphorbia peplus* and *Mercurial annua*. As a way to circumvent this difficulty, it was established *calli in vitro* and suspension cultures of cells from different species used in the study. Thus, through *in vitro* culture, we've tried to analyze the inhibitory activity of *calli* from different species against two proteases, a cysteine protease and a serine protease, papain and trypsin respectively, and identify the components injunction.

To determine the inhibitory activity of extracts from *calli*, a fluorimetric test and the detection of activity on polyacrylamide gels were used. The results of fluorimetric assays suggests that the extract of *calli* of *Ailanthus altissima* has inhibitory activity while the extract of *Catharanthus roseus* does not show to inhibit the proteases of the extract. The proteolytic activity of papain is inhibited in the presence of the extract from fresh leaves of *Euphorbia peplus* after extraction with different organic solvents, but the inhibition of the extract is not caused by *calli* of this species. However, the extract of fresh leaves of *E. peplus*, extracted in Tris-EDTA, do not show inhibition of papain activity. Inhibition of activity of papain in the presence of extracts from *Euphorbia peplus* obtained with different solvents was also evaluated in a polyacrylamide gel

containing gelatin. In the presence of the extracts extracted with different solvents, papain showed a reduction of its enzymatic activity.

We evaluated the cytotoxic activity of the extract of fresh leaves of *E. peplus* using a toxicity test which returned a value LD50 (lethal concentration of 50% of the population) of 90.5 g / mL. This is a value that indicates some toxicity from the extract.

The identification of inhibitors was carried out using a GC-MS analysis with which we could not identify the *E. peplus* constituent compounds.

Since the methods used did not reveal conclusive results, other methods will be used in future.

KEY WORDS: *Euphorbia peplus*, proteases inhibitors, malaria, plant extracts, fluorimetric

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA – CONTEXTO HISTÓRICO

A malária é uma doença que persegue o homem desde a pré-história. Originada provavelmente no Continente Africano, conhecido como o "Berço da Humanidade", acompanhou a saga migratória do ser humano pelas regiões do Mediterrâneo, Mesopotâmia, Índia e Sudeste Asiático. Apesar de a associação com a malária ser incerta, existem referências a febres sazonais e intermitentes em textos religiosos e médicos bastante antigos, entre os assírios, chineses e indianos, que relacionavam a doença à punição de deuses e presença de maus espíritos. No século V a.C., na Grécia, Hipócrates foi o primeiro médico a descartar a superstição e relacionar a doença às estações do ano ou aos locais frequentados pelos doentes. Também foi o primeiro a descrever detalhadamente o quadro clínico da malária e algumas das suas complicações. Depois dele, no século II d.C., diversos médicos gregos e romanos deixaram várias referências sobre a doença, que ocorria em epidemias cíclicas na Grécia, Itália e diversas partes da Europa, onde era conhecida como "Febre Romana".

Durante 1500 anos, pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a doença e seu tratamento. Somente no século XVII padres jesuítas observaram que as populações indígenas da América do Sul utilizavam a casca de uma árvore nativa para o tratamento de alguns tipos de febre. O seu uso espalhou-se rapidamente pela Europa e passou a ser conhecido como "pó dos jesuítas" e a árvore de onde era extraído recebeu o nome de Cinchona, em 1735. O princípio activo, o quinino, foi isolado pela primeira vez em 1820. Somente no final do século XIX, quando bacteriologistas e patologistas investigaram as causas de diversas doenças infecciosas, com a observação de alterações mórbidas em órgãos e tecidos, assim como o papel de insectos na transmissão de algumas doenças, é que o conhecimento sobre a malária passou por um período de importantes descobertas [1].

A malária, também conhecida por maleita, febre intermitente, paludismo, impaludismo, febre terça ou febre quarta, é uma doença infecciosa causada por

um parasita protozoário unicelular do género *Plasmodium*. Existem mais de 100 espécies destes protozoários mas somente quatro são responsáveis por esta doença em humanos: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*. O parasita mais letal é o *P. falciparum* que destrói os glóbulos vermelhos. A doença é caracterizada por ataques de febre, acima de 40°C, acompanhados por fortes dores de cabeça, arrepios, náuseas, algum delírio, vômitos e dores gástricas [2], assim como lesões no fígado, no baço e em outros órgãos, além de anemia profunda devido à destruição maciça dos glóbulos vermelhos que são utilizados pelo *Plasmodium* [3].

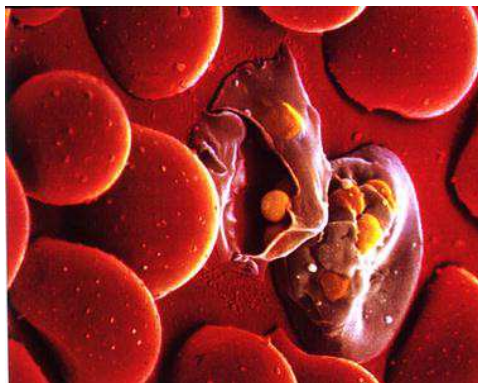


Figura 1: *Plasmodium falciparum* destruindo os glóbulos vermelhos [4]

1.2 CICLO DE VIDA DO PARASITA

Em 1880, o médico do exército francês Charles Alphonse Laveran, trabalhando na Argélia, foi o primeiro a observar e descrever parasitas da malária no interior de glóbulos vermelhos humanos. Em 1897, o médico britânico Ronald Ross, na Índia, tornou possível a elucidação do modo de transmissão, encontrando formas do parasita da malária no interior de um mosquito que tinha entrado em contacto com um portador da doença. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento do parasita da malária no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* foi obtido posteriormente graças aos investigadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 [1].

Hoje em dia sabe-se que a malária é transmitida através da picada do mosquito do género *Anopheles*, por transfusão de sangue ou, mais dificilmente, por partilha de agulhas e seringas infectadas com o *Plasmodium*. Apenas o mosquito fêmea transmite a doença pois

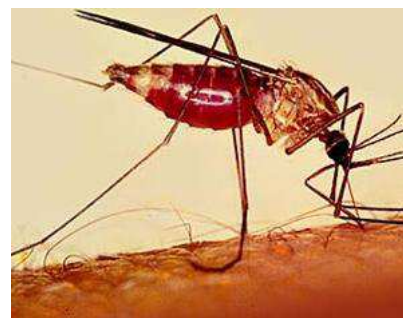


Figura 2: Mosquito do género *Anopheles* [5]

necessita de sangue para o amadurecimento dos seus ovos, enquanto que, o macho se alimenta de néctar e sumos provenientes de plantas, não participando assim na transmissão da doença [2]. A fêmea do mosquito *Anopheles* ao ingerir sangue de um hospedeiro contendo as formas sexuadas do parasita (gametócitos) inicia uma fase sexuada no interior do seu estômago com a fecundação e formação de um ovo ou zigoto. Posteriormente, o zigoto migra através da camada única de células do estômago do mosquito, posicionando-se entre esta e a sua membrana basal. Deste modo, por esporogonia, resultam centenas de formas infecciosas (esporozoítos) que migram para as glândulas salivares do insecto, as quais poderão, no momento da picada, ser inoculadas no hospedeiro [1]. Quando o mosquito pica num segundo hospedeiro, injecta parasitas com a sua saliva que invadem o fígado, onde se multiplicam e amadurecem entre 2 a 4 semanas. Posteriormente abandonam o fígado e invadem os glóbulos vermelhos. Os parasitas multiplicam-se dentro dos glóbulos vermelhos induzindo o seu rebentamento [2].

Como acima se descreveu, quando o mosquito pica o hospedeiro injecta uma pequena quantidade de saliva que serve basicamente como um anticoagulante. Após uma nova multiplicação de forma assexuada (esquizogonia eritrocítica), em ciclos variáveis (de 24 a 72 horas dependendo do tipo de *Plasmodium*), cada parasita produz entre 8 a 32 novos exemplares, em média e de acordo com a espécie envolvida. Depois de alguns ciclos (3 ou 4) surgem os sintomas da doença. Este intervalo que vai desde a picada infectante até o início dos sintomas é chamado de período de incubação. O período de incubação dura em média 15 dias (Figura 3).

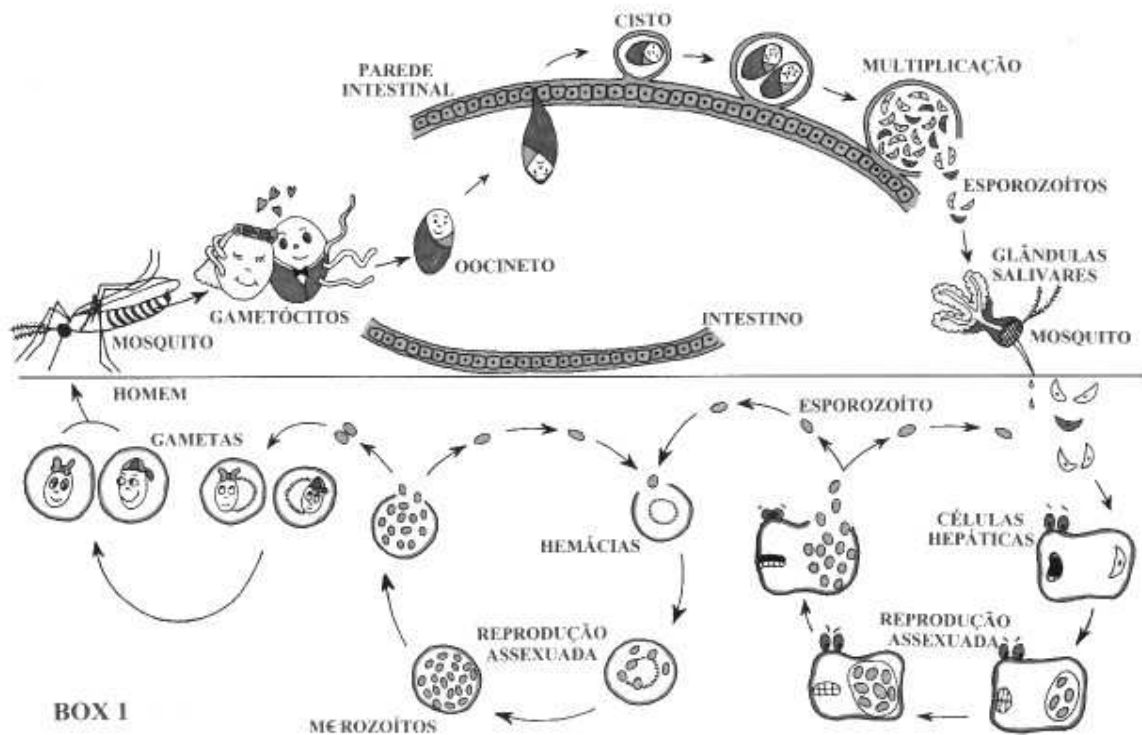


Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium* no insecto e no Homem [6].

1.3 MALÁRIA: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA

A malária é um das doenças infecciosas mais estudadas no mundo, sendo no grupo das doenças tropicais a mais importante. É uma doença endémica em 105 países, sendo responsável por 300 a 500 milhões de casos clínicos anualmente, assim como pela morte de mais de um milhão de pessoas por ano. Atinge toda a população causando a morte principalmente em crianças e grávidas. Notou-se ainda que em certas zonas não - endémicas o número de casos de malária aumentou devido a imigrantes e viajantes com origem em países de zonas de risco. A malária está frequentemente associada à carência de condições sócio-económicas e de serviços de saúde, pelo que apresenta maior prevalência em países sub-desenvolvidos nomeadamente em países tropicais e subtropicais [3]. Cerca de 40% da população vive em zonas de risco (Figura 4).

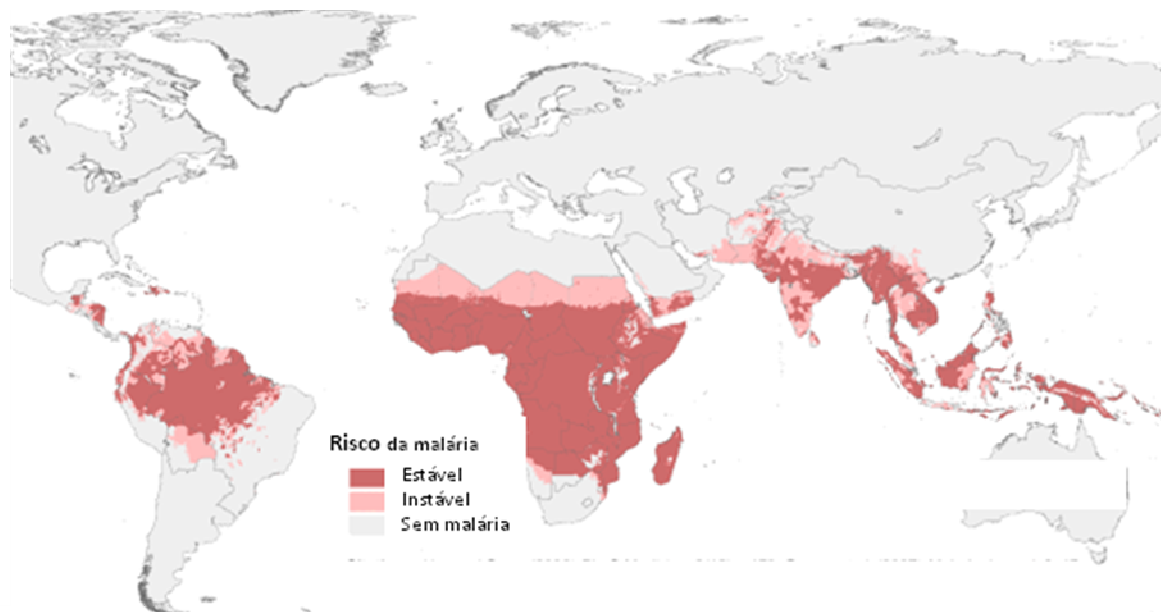


Figura 4: Distribuição mundial do risco de malária pelo *P. falciparum*, em 2007 [7].

Estudos recentes sugerem que, com o aquecimento global do planeta, a malária pode futuramente aumentar a sua incidência e alargar as suas áreas endémicas no globo terrestre.

Sendo esta doença tão mortal e com possibilidade de ressurgir na Europa, nomeadamente em Portugal, Espanha, Itália e Grécia, devido a alterações climáticas [8], é importante o estudo de novas drogas mais eficazes e de menores custos.

1.4 CONTROLO DA MALÁRIA

Durante a primeira metade do século XX muitas pesquisas eram dedicadas ao controlo da malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de locais onde o insecto transmissor se pudesse reproduzir, o que se mostrou bastante eficiente em algumas situações. O maior exemplo foi a eliminação da infestação pelo *Anopheles gambiae*, mosquito de origem africana e talvez o melhor vector da doença no mundo, que no final de 1930 invadiu a região nordeste do Brasil [1].

Têm sido tomadas muitas medidas de controlo para a prevenção da malária, de modo a combater a sua elevada mortalidade. As estratégias para a prevenção passam pelo controlo das populações de mosquitos através de: drenagem de valas e charcos, as fêmeas dos mosquitos deixam de ter mais local apropriado para a postura; criação de peixes larvófagos, isto é, que se alimentam de larvas dos mosquitos, produz bons resultados; utilização de repelentes químicos e de redes mosquiteiras nas janelas impedem que os mosquitos se aproximem do homem; evitar a acumulação de pneus velhos, latas, vasos e outros recipientes que armazenam água, possibilitando a reprodução do mosquito. Certas árvores, como o eucalipto, podem ser usadas como plantas drenadoras, porque absorvem muita água do solo. Não havendo água estagnada, como anteriormente se referiu, as fêmeas do mosquito não terão local adequado para a postura. Finalmente, a educação sanitária e o tratamento à base de medicamentos (alcalóides) são medidas indispensáveis [3].

1.5 TERAPIA DA MALÁRIA

O tratamento adequado da malária é, hoje em dia, o principal alicerce para o controle da doença. O tratamento do paciente com malária deve ser precedido de informações sobre os seguintes aspectos: gravidade da doença; espécie de *Plasmodium*; idade do paciente; historial de exposição anterior à infecção e susceptibilidade dos parasitas aos antimaláricos convencionais.

Para o tratamento da malária em que a espécie responsável pela infecção é o *Plasmodium vivax* é geralmente utilizado a cloroquina, e primaquina.

Para o tratamento da malária em que a espécie é o *Plasmodium falciparum* é geralmente utilizado o quinino, e primaquina [9].

Recentemente alguns países afectados já incluem no seu plano nacional de prevenção os derivados de artemisina.

1.5.1 FÁRMACOS SINTÉTICOS ANTIMALÁRICOS

Como descrito no ponto anterior os sintomas da doença podem ser atenuados por ingestão de fármacos sintéticos.

Os fármacos antimaláricos podem ligar-se a proteínas presentes no sangue, formando complexos que são tóxicos para o parasita. O quinino foi pela primeira vez isolado da casca de árvore tropical "cinchona", em 1820. Este produto natural é um alcalóide, composto por átomos de azoto básicos, e foi o primeiro composto encontrado com actividade contra a malária [10].

Dificuldades no fornecimento do quinino durante a Primeira Guerra Mundial estimularam investigadores alemães no sentido da obtenção de antimaláricos sintéticos, culminando com o desenvolvimento da primaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934). Paralelamente, foram desenvolvidos estudos para a síntese de substâncias com acção insecticida, que apresentaram seu auge em 1942, com a obtenção por Paul Muller do composto dicloro-difenil-tricloroetano (D.D.T.), que apresentava grande actividade insecticida, grande poder residual e baixo custo [1].

O controlo de muitas ilhas do Pacífico pelos Japoneses durante a segunda guerra mundial veio a aumentar a procura do quinino para o tratamento de soldados Americanos aí colocados. Foi nesta altura (1944) que dois químicos Americanos, Robert B. Woodward (Prémio Nobel da Química em 1965) e William von Eggers Doering, conseguiram sintetizar com sucesso o quinino em laboratório. Ao longo dos anos o quinino foi sendo substituído por fármacos sintéticos como a primaquina, a cloroquina e a mefloquina. No entanto, com a recente resistência de vários parasitas a estes fármacos mais modernos, o quinino poderá ser mais uma vez uma promessa no tratamento da malária.

A primaquina, uma das drogas sintéticas mas utilizada no tratamento da doença, é absorvida rapidamente quando tomada por via oral e a sua concentração máxima no plasma ocorre dentro de 1 a 3 horas após a sua administração, com um tempo de meia vida de cerca de 5 horas. É rapidamente metabolizada no fígado e somente uma pequena porção é excretada na urina sem modificação. Foram descritas duas vias metabólicas da primaquina. A primeira envolve a formação de 5-hidroxiprimaquina e 5-hidroxi-

metilprimaquina tendo ambos os metabólitos acção antimalárica. Dado o rápido metabolismo da primaquina, torna-se necessário impedir a formação de compostos secundários sem actividade antimalárica. Uma das medidas que tem vindo a ser aplicada é a acilação do grupo amino terminal com aminoácidos e péptidos que também actuam como unidades transportadoras da primaquina. Uma outra estratégia para retardar a metabolização da primaquina consiste no uso de derivados acilados modificados por ciclização, formando-se por exemplo, 4-imidazolidinonas, por reacção com compostos carbonílicos.

Outras desvantagens da utilização da primaquina, principalmente quando administrada em grandes doses, consistem nas reacções adversas que estão relacionadas com o efeito da primaquina nos elementos formados no sangue e medula óssea, resultando em leucopenia, anemia, supressão da acção mielóide e metemoglobinémia. A acção hemolítica, destruidora de células, da primaquina aumenta em doentes com deficiência na enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Esta enzima protege os glóbulos vermelhos quando existe uma situação de stresse provocada por infecção ou por certos fármacos [10].

Poucas são as drogas sintéticas eficientes e seguras clinicamente como a cloroquina, mas devido à recente resistência do *P. falciparum* a melhor droga para o tratamento a infecção continua a ser o quinino (ou quinidino intravenoso), embora a resistência ao quinino tem aumentado sobretudo na Ásia, especialmente na Tailândia, possui alguma toxicidade. A amodiaquina, usada no tratamento de resistência à cloroquina em países desenvolvidos, é um pouco tóxica e também são comuns casos de resistência. A mefloquina é igualmente utilizada no tratamento de casos em que ocorra resistência à cloroquina mas o seu uso é limitado devido à toxicidade e ao elevado custo para países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, o seu uso é proibido devido à neurotoxicidade da dose necessária ao tratamento. Fansidar, uma combinação de sulfadoxina e pirimetamina deixou de ser recomendado para o tratamento da infecção por causa da toxicidade dermatológica, da lenta acção embora o seu uso tem sido importante nos países sub-desenvolvidos devido ao seu baixo custo nos casos de resistência à

cloroquina. O uso profilático da mefloquina e do Fansidar vai diminuir consideravelmente devido à resistência a drogas por parte do *Plasmodium* que já se verifica em partes da Ásia [11].

Torna-se portanto, bastante importante o estudo de novas drogas e como as sintéticas têm desvantagens a nível clínico e económico e uma vez que os resultados com drogas extraídas de plantas têm sido promissores, é provável que uma droga eficiente, mesmo nos casos de resistência à cloroquina, possa provir de plantas.

1.5.2 ALGUMAS PLANTAS COM ACTIVIDADE ANTIMALÁRICA

Com a recente resistência de alguns parasitas aos fármacos sintéticos, e uma vez que, estes possuem efeitos secundários indesejáveis, foram desenvolvidos estudos no sentido de encontrar novos fármacos naturais.

No Quênia, a maioria das pessoas, principalmente as das zonas rurais, usam medicamentos tradicionais para tratar muitas doenças incluindo a malária. Devido à resistência do *P. falciparum* à cloroquina novas drogas têm sido desenvolvidas a partir de plantas conhecidas pela sua actividade antiplasmodial. Foram estudadas no Quênia, em 2007, vinte e cinco espécies de vinte e um géneros e 16 famílias. As famílias mais referenciadas foram a *Celestraceae*, *Leguminosae* e *Rubiaceae*. Três espécies foram pela primeira vez estudadas para o tratamento da malária: *Maytenus putterlickioides*, *Warburgia stuhlmannii* e *Pentas bussei* [12].

Estudos realizados, na República Democrática do Congo em 2004, demonstram a actividade antimalária de sete extractos etanólicos de plantas medicinais. Verificou-se ainda que, a actividade antiplasmodial dessas espécies, *Cassia occidentalis*, *Euphorbia hirta*, *Garcinia kola*, *Phyllanthus niruri*, *Vernonia amygdalina*, *Tetracera poggei*, *Morinda morindoides*, pode estar relacionada com a presença de terpenos, esteróides, cumarinas, flavonóides, ácido fenólico, linhanos, xantonas e antroquinonas [13].

No mesmo ano, a actividade antimalária de xantonas de *Calophyllum caledonicum* e *Garcinia vieillardii* foi estudada numa estirpe de *Plasmodium*

falciparum com resistência à cloroquina. Também foi estudada a relação entre a actividade antimalária e a estrutura molecular das xantonas [14].

Tendo em conta o elevado número de casos de malária por *P. falciparum* resistente à cloroquina, em São Tomé e Príncipe investigou-se a actividade antimalária de plantas medicinais usadas na Medicina Tradicional, assim como o desenvolvimento de novos compostos que possam ser usados para o controlo da malária, nomeadamente compostos activos contra *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina. A planta *Tithonia diversifolia* foi submetida a ensaios fitoquímicos, por ser a que apresentou os melhores resultados de actividade antimalária e simultaneamente apresentar garantias de inocuidade, relativamente aos resultados de toxicidade, pelo que poderá servir de base para um futuro desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos [15].

Ultimamente, ensaios realizados com a artemisinina, extraída da *Artemisia annua*, têm dado resultados encorajadores. A *Artemisia annua* é uma planta chinesa utilizada na medicina tradicional há séculos para tratar a febre e a malária. Até há pouco tempo, pensava-se que o contacto da substância com o parasita do paludismo fazia com que a mesma libertasse radicais livres, os quais atacavam e destruíam a membrana celular do parasita. Investigadores britânicos apresentam uma explicação diferente, sugerindo que o mecanismo que ocorre é bastante complexo. A artemisinina age, de facto, bloqueando a acção da SERCA (Ca^{2+} TPase do retículo sarcoplásmico, PfATP6), essencial para bombear o cálcio de e para as células do parasita. Sabe-se que, para o equilíbrio molecular, todas as células complexas necessitam desse bombeamento [16]. A artemisinina e os seus derivados têm sido sintetizados e submetidos a rigorosos testes clínicos. Estes compostos que já têm sido utilizados em algumas áreas, são potentes e de rápida acção e eficientes nos casos de resistência do *Plasmodium* à cloroquina. Uma vez que a reincidência da infecção depois do tratamento é comum, a artemisinina e seus derivados devem ser administrados em combinação com outra droga [17].

1.6 ESPÉCIES EM ESTUDO

O sucesso de drogas antimaláricas de origem vegetal como o quinino, e mais recentemente a artemisina, intensificou o estudo de espécies de plantas como novos agentes antimaláricos [18].

Neste estudo pretende-se analisar a actividade inibitória de proteases por parte de espécies como *Ailanthus altissima*, *Catharanthus roseus*, *Leucojum aestivum*, *Ranunculus multifidus*, *Vernonia myriantha*, *Pittosporum viridiflorum*, *Phyllanthus niruri*, *Mercurialis annua* e *Euphorbia peplus*.

1.6.1 *Ailanthus altissima*

Espécie da família Simaroubaceae, vulgarmente conhecida por Árvore-do-céu, Ailanto ou Espantalobos. A Árvore-do-céu é uma planta nativa do norte da China. Foi introduzida na Europa em 1751 por um padre jesuíta francês que a trouxe de Nanquim para a Inglaterra. Devido ao seu crescimento rápido e alta tolerância a factores adversos como a pobreza do solo e a poluição, é



Figura 5: *Ailanthus altissima* [19]

considerada uma espécie invasora em regiões de clima temperado, nomeadamente na Europa e América do Norte [20]. Esta família possui quassinóides, derivados dos triterpenos, que apresentam actividade antitumoral, antimalárica e contra a leucemia linfocítica, com óptimos resultados nos casos de cancro com resistência multidrogas. *Ailanthus altissima* possui o quassinóide 6 α -tigloiloxichaparrinona, já referenciado como antineoplástico, que evidencia ainda elevada actividade antimalárica [21]. É usada também em doenças como gonorreia, febres, ejaculação precoce, disenterias e doenças oftalmológicas e ainda possui acção anti-séptica, bactericida e vermícida [22].

1.6.2 *Catharanthus roseus*

Uma das espécies da família *Apocynaceae*, também conhecida por *Vinca rosea*, *Ammocallis rosea* e *Lochnera rosea*, vulgarmente chamada de Vinca. Nativa de Madagáscar porém, foi também cultivada em áreas subtropicais e tropicais. Na medicina chinesa, extractos da planta têm sido usados no tratamento de doenças como a diabetes, malária, leucemia e doença de Hodkin. Pode ser perigosa se consumida oralmente devido ao seu poder alucinogénico [23].



Figura 6: *Catharanthus roseus* [24]

1.6.3 *Leucojum aestivum*

É uma espécie da família *Amaryllidaceae*, vulgarmente conhecida por Floco de Neve de Verão ou Lírio de Londres. Nativa da europa, encontra-se desde os Pirinéus á Rússia, e actualmente também na costa este da América do Norte. Esta espécie possui 19 alcalóides, sendo um deles, a galantamina, um inibidor importante no tratamento da doença de Alzheimer [25] e ainda com actividade antimalárica comprovada [26]. É uma espécie bastante tóxica por isso deve ser evitada a sua ingestão [27].



Figura 7: *Leucojum aestivum* [28]

1.6.4 *Ranunculus multifidus*

Esta espécie pertence à família *Ranunculaceae*. Esta espécie é usada no tratamento de diarreias, desinterias, problemas pulmonares, sendo também um bom repelente e desparasitante [29].



Figura 8: *Ranunculus multifidus* [30]

1.6.5 *Vernonia myriantha*

É uma espécie da família *Asteracea* encontrada na África tropical e sul-africano, também conhecida por *Vernonia ampla*, *Vernonia podocoma*, *Vernonia stipulacea*, *Vernonia subuligera* [31]. O seu uso no tratamento de febres da malária já foi referenciado em 1994 [32].



Figura 9: *Vernonia myriantha* [33]

1.6.6 *Pittosporum viridiflorum*

Esta espécie pertence à família *Pittosporaceae*. Encontra-se na floresta da África do Sul, mas também na África mais tropical, Índia e Arábia. A infusão ou decoção são utilizadas no tratamento de dores de estômago, abdominais e febres. Seca, o pó da raiz ou casca adicionados à cerveja são ainda utilizados como afrodisíacos [34].



Figura 10: *Pittosporum viridiflorum* [35]

1.6.7 *Phyllanthus niruri*

É uma espécie da família *Euphorbiaceae*, vulgarmente chamada de Chanca ou Quebra pedra. Nativa da Floresta Amazónica pode ser encontrada em outras áreas tropicais como Bahamas, Índia e China. Grande parte da planta é constituída por flavonóides, alcalóides, terpenóides, linhanos, polifenóis, taninas, coumarinas e saponinas. Extractos desta espécie demonstraram ter efeitos terapêuticos como anti-hepatóxicos, anti-hipertensivos, anti-HIV, anti-hepatite B [36], e antimalárico, assim como no tratamento de febres, pedras dos rins, cálculos biliares e espasmos musculares [37].



Figura 11: *Phyllanthus niruri* [38]

1.6.8 *Mercurialis annua*

Esta espécie pertence à família *Euphorbiaceae*, vulgarmente conhecida por Mercurial. Encontra-se em campos cultivados, em muros e entulhos. Na medicina tradicional é utilizada fresca e toda a planta é laxante e, em grandes doses, purgativa, além disso, bom diurético recomendado na hidropisia, especialmente o suco. Utilizada também em lombrigas intestinais e hemorróides incipientes. Detém a secreção do leite das lactantes, utilizado em verrugas e outras infecções da pele [39].



Figura 12: *Mercurialis annua* [40]

1.6.9 *Euphorbia peplus*

Mais uma espécie também da família *Euphorbiaceae* vulgarmente chamada de Ésula-redonda, conhecida pelo seu látex que causa irritação na pele e olhos. Esta espécie encontra-se um pouco por toda a Europa, norte de África e Ásia. Tem na sua constituição flavonóides, antraquinonas, esteróides e triterpenos. Era usada tradicionalmente como purgante, expectorante, anti-inflamatório mas também pro-inflamatório e antipirético [41]. Estudos recentes apontam ainda uma actividade anticancerígena.



Figura 13: *Euphorbia peplus* [42]

1.6.9.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

A expressão “compostos fenólicos” abrange um vasto conjunto de compostos em que se encontra presente um anel aromático substituído por um ou mais grupos hidroxilo. Biossinteticamente os compostos fenólicos podem provir da via do xiquimato ou da via do acetato. Por vezes os compostos de estrutura

mais complicada podem ser formados da união de dois fragmentos fenólicos provindo cada um deles de uma via diferente, como é o caso dos flavonóides. Os flavonóides constituem um dos maiores grupos de metabolitos secundários. Pertecem ainda a este grupo, compostos fenólicos, o ácido fenólico, as cumarinas, benzoquinonas, xantonas, antraquinona e linhanos [43].

1.6.9.2 TERPENÓIDES

Os terpenóides são uma família numerosa de compostos muito diversos que se encontra distribuída por todos os seres vivos. Os terpenóides, que também podem ser designados por terpenos ou isoprenóides, são formados pela união de unidades com 5 átomos de carbono. Todos os terpenóides (com algumas excepções) são moléculas cujo esqueleto possui um número de átomos de carbono múltiplo de 5: C5, C10, C15, C20,....., C40. As duas unidades que dão origem a todos os terpenos são o pirofosfato de isopentenilo (IPP) e o pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP).

Compostos pertencendo à família dos terpenóides estão largamente difundidos: sementes, folhas, flores, raízes e troncos de plantas superiores, em bolores, fungos, e líquenes. Os esteróides, subconjunto desta família de compostos, encontram-se presentes em todos os animais, plantas e na maioria dos microrganismos. Pertencem também a esta família os dipeternóides, presentes em óleos e vernizes, e os tripeternóides [44].

1.7 CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS

Neste trabalho utilizou-se a cultura celular para a obtenção de extractos de diversas espécies de plantas.

Suspensões celulares consistem em agregados celulares e células dispersas em meios líquidos, sob agitação. O crescimento celular pode ser avaliado pelas mudanças das taxas de divisão em fases definidas. No início as células dividem-se lentamente (fase lag), posteriormente ocorrem fases de rápido crescimento (exponencial e linear) e por fim, as células tendem a taxas menores de divisão por efeito de competição (fase estacionária). Segundo

Street (1997), através da subcultura de uma amostra destas células, é possível reiniciar a cultura e este procedimento pode ser mantido indefinidamente. Suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de *callus* friáveis ou outros tecidos que possam originar linhagens celulares organogénicas ou embriogénicas [45]. O crescimento de *calli* é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente, quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular [46]. A possibilidade da manipulação e do cultivo de células em escala comercial pode exigir o uso de biorreatores. Para suspensões celulares vegetais, os meios de cultura são praticamente idênticos àqueles exigidos para a obtenção de *calli* e incluem macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas e um adequado balanço de reguladores de crescimento [45].

Uma das vantagens da sua utilização é a possibilidade de estudar fenómenos, inacessíveis em tecidos intactos, o controlo das condições ambientais (pH, temperatura, concentração de O₂ e CO₂), a obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas, economia de reagentes e tempo e o conhecimento do comportamento e função de uma população isolada de células. Por outro lado, existe um gasto elevado de material, as condições de crescimento da cultura precisam ser bem conhecidas, pode ocorrer instabilidade de cultura celular e perda de características e torna-se difícil a extrapolação para o modelo de organismo intacto. Existem ainda alguns limites à sua utilização. São necessários operadores experientes (com conhecimentos da técnica em condições assépticas), ocorre perda de características fenotípicas e por isso há uma necessidade do uso de marcadores e ocorre ainda instabilidade das células (sobretudo em linhas celulares imortais).

Normalmente aplica-se a cultura celular para a produção de vacinas anti-virais, compreensão de fenómenos de neoplasia, estudos imunológicos e em ensaios de fármacos e cosméticos *in vitro* [47].

1.8 PROTEASES

O tratamento e controlo da malária estão fortemente limitados pela crescente resistência do parasita, em especial o *Plasmodium falciparum*, às drogas existentes. Novos agentes antimaláricos, direccionados para novos alvos, são considerados urgentes no tratamento e controlo da doença.

Potenciais alvos para as drogas contra o *P. falciparum* são as proteases que, entre outras funções, hidrolisam a hemoglobina para fornecer aminoácidos para a síntese proteica do parasita, interrompendo o desenvolvimento do *P. falciparum*. Várias proteases participam no processo, incluindo as proteases cisteínicas e serínicas.

Neste sentido têm vindo a ser identificados inibidores com propriedades aceitáveis para uma nova droga antimalárica [48]. Têm sido usados inibidores de proteases para elucidar a sua função no processo de infecção da malária. A inibição destas proteases pode bloquear o desenvolvimento do parasita pelo que têm sido desenhados e sintetizados inibidores destas enzimas.

Em estudos realizados com inibidores de proteases cisteínicas ocorre uma inibição na ruptura do eritrócito, e a inibição de proteases serínicas promove um bloqueio na invasão do eritrócito [49]. Como referido anteriormente, as proteases das classes aspárticas, cisteínicas e serínicas estão envolvidas na ruptura de eritrócitos. Proteases cisteínicas podem ainda estar envolvidas no ciclo sexual do parasita, no mosquito [50].

1.8.1 PAPAÍNA E TRIPSINA

Os termos protease, proteinase e peptidase referem-se a um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas.

A papaína e a tripsina são proteases bem conhecidas tendo sido publicados muitos trabalhos científicos onde estas duas proteases são referenciadas. Deste modo, são utilizadas com frequência como controlo ou em estudos comparativos.

A papaína é o constituinte activo do látex da fruta tropical papaia, *Carica papaya L.* (Caricaceae). A papaína é um membro da classe de enzimas protease cisteínica. A papaína tem actividade endopeptidase, amidase e esterase. A *Carica papaya L.* é, há muito tempo, utilizada na medicina tradicional. O látex tem sido usado no tratamento verrugas e cancro, as folhas para dores nos nervos e os frutos para feridas infectadas e tumores maligno [51]. Estudos revelam que os inibidores de proteases cisteínicas sintéticas, como a papaína, têm actividade antimalária [52], podendo desta forma ser um novo alvo para uma nova terapia da doença [53].

No caso das proteases serínicas, o mecanismo baseia-se em um ataque nucleofílico das ligações peptídicas por uma serina. Entre as serino proteases mais bem estudadas figuram as enzimas digestivas quimotripsina e tripsina, ambas sintetizadas e secretadas pelo pâncreas exócrino sob a forma inactiva (zimógenos ou zimogênios) [54].

Os inibidores de tripsina mais estudados pertencem às famílias *Solanaceae*, *Leguminosae* e *Gramineae*, por representarem importantes fontes de alimentos [55].

2. OBJECTIVOS

Devido à crescente resistência do *Plasmodium* às drogas sintéticas e, uma vez que são conhecidas drogas provenientes de plantas com elevada actividade antimalária, como é o caso do quinino e da artemisinina, pretendem-se estudar a actividade inibitória de algumas espécies de plantas.

Neste tipo de estudo são utilizadas, normalmente, partes da planta como folhas, raízes, caules e sementes. Dado que o crescimento de algumas das plantas utilizadas se torna difícil devido ao seu porte, ao tempo de germinação e de crescimento e no caso da *Ailanthus altissima*, por ser uma invasora a sua plantação é proibida em território nacional, procedeu-se ao estabelecimento *in vitro* de *calli* e de culturas de células em suspensão das diferentes espécies em estudo.

Neste trabalho foram utilizadas diferentes espécies com o objectivo de identificar a presença de compostos com capacidade de inibir a actividade de proteases. O objectivo deste trabalho foi, através da cultura *in vitro*, analisar a actividade inibitória que os *calli* das diferentes espécies testadas apresentavam face a duas proteases, uma cisteínica e outra serínica, papaína e tripsina respectivamente e identificar os componentes com acção inibitória.

A actividade inibitória dos extractos foi testada em proteases pois é conhecido que proteases das classes aspárticas, cisteínicas e serínicas estão envolvidas no processo de infecção da malária e sabe-se ainda que proteases cisteínicas podem estar envolvidas no ciclo sexual do parasita, no mosquito.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 ESTABELICIMENTO DE CALLI

Procedeu-se ao estabelecimento de *calli in vitro* a partir folhas e de explantes de folhas obtidas após germinação de sementes em condições de assépcia.

3.1.1 ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES E FOLHAS

Efectuou-se a esterilização das sementes e folhas para que se evitasse a contaminação do material biológico utilizado.

As sementes de *Catharanthus roseus* foram lavadas com água destilada estéril. Colocou-se em contacto com umas gotas de anti-fúngico Mycostatin à temperatura ambiente durante 30 minutos sob agitação. Lavou-se com água estéril e fez-se uma rápida imersão em etanol 70% (v/v). Posteriormente, colocou-se as sementes numa solução a 10% (p/v) de hipoclorito de cálcio com Tween 80 a 0,05% (p/v) durante 30 minutos. Lavou-se novamente com água estéril [56].

Colocaram-se as sementes de *Ailanthus altissima* e *Phyllanthus niruri* numa solução de hipoclorito de sódio (2,5% (p/v) cloro activo) com 2- 3 gotas de Tween 20 durante 30 minutos. Lavou-se, posteriormente, com água destilada estéril, três vezes, durante 10 minutos.

Às sementes de *Euphorbia peplus*, *Mercurialis annua*, *Ranunculus multifidus*, *Leucojum aestivum*, *Vernonia myriantha*, *Pittosporum viridiflorum*, adicionou-se etanol a 70% (v/v), agitou-se em vortex, durante 5 minutos. Removeu-se o etanol e lavou-se com água estéril. Adicionou-se 5 – 7 mL de uma solução 20% (v/v) lixívia com duas gotas de Tween 20, agitou-se no vortex, durante 10

minutos. Lavou-se quatro vezes com água destilada estéril durante 5 minutos cada lavagem. Removeu-se toda a água [57].

Após cortar as folhas de *Euphorbia peplus*, lavou-se em água corrente de modo a retirar o máximo de contaminantes possíveis. Adicionou-se igualmente uma solução 5% (v/v) lixívia com umas gotas de Tween 80 durante 10 minutos. Lavou-se quatro vezes com água destilada estéril durante 5 minutos cada lavagem. Removeu-se toda a água.

3.1.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Após esterilização as sementes foram colocadas em meio de cultura apropriado para que ocorresse a germinação.

As sementes de *C. roseus*, *A. altissima* e *P. niruri* foram inoculadas em meio Murashige e Skoog (meio MS, anexo I). Foram mantidas no escuro a 24°C até à oclusão dos cotilédones, sendo então transferidas para um fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro (1400 lux).

Para a germinação das sementes de *E. peplus*, *M. annua*, *R. multifidus*, *L. aestivum*, *V. myriantha*, *P. viridiflorum* onde foi utilizado um meio de cultura simples (anexo II). Após a solidificação do meio, adicionaram-se os antibióticos sobre o meio de cultura e espalhou-se com uma ansa: gentamicina 50mg/L, cefotaxima 100mg/L e nistatina 100mg/L. Após 4 dias colocaram-se as sementes neste meio mas sem os antibióticos para que não houvesse inibição do crescimento. As condições de fotoperíodo foram as referidas anteriormente.

3.1.3 INDUÇÃO DE CALLI

O crescimento de *calli* é importante para induzir variação somaclonal e em estudos fisiológicos, principalmente, quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular. Neste trabalho os *calli*

obtidos foram utilizados na análise de inibição das espécies em estudo na actividade proteolítica das duas proteases anteriormente referidas.

Após esterilização do meio MS sólido suplementado com ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) 1mg/L e cinetina (KIN) 1mg/L [58], deixou-se arrefecer até solidificar. Partes de folhas de plântulas de *C. roseus*, *A. altissima* e *P. niruri* foram então colocadas no meio.

Utilizaram-se placas de Petri com meio de cultura MS suplementado com ácido naftalenoacético (NAA) 1mg/L, agar 7,5 g/L, sacarose 10g/L a pH 5,8 – 6,2. Após solidificar adicionou-se os antibióticos e espalhou-se com uma ansa: gentamicina 50mg/L, cefotaxima 100mg/L e nistatina 100mg/L. Colocaram-se as sementes de *E. peplus*, *M. annua*, *R. multifidus*, *L. aestivum*, *V. myriantha*, *P. viridiflorum* no meio de cultura e, após 4 dias foram mudadas para o mesmo meio mas sem antibióticos.

O *calli* destas espécies foi repicado a cada 7 dias para que o meio de indução não fosse esgotado de modo a obter maior quantidade de *calli* e para evitar contaminações. Para tal, numa câmara de fluxo laminar, retirou-se uma porção do *calli* e colocou-se em dois outros frasco com o mesmo meio que o anterior.

Todo o material foi colocado em fotoperíodo 16 horas luz/ 8 horas escuro e todas as operações foram efectuadas em condições de assépsia.



Figura 14: Fitoclina em fotoperíodo 16h luz/ 8h escuro

3.1.4 SUSPENSÃO CELULAR

As suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de *calli* friáveis ou outros tecidos que possam originar linhagens celulares organogénicas ou embriogénicas.

Após algumas semanas, quando a quantidade de *calli* foi considerada suficiente para iniciar uma suspensão celular, retirou-se todo o *calli* de *C. roseus* e colocou-se num erlenmeyer com meio MS líquido estéril. Colocou-se sob agitação 100 rpm à temperatura de 23°C num agitador mecânico.

Após duas semanas, repicou-se a suspensão celular. Em condições de assépsia, numa câmara de fluxo laminar, dividiu-se o conteúdo de um erlenmeyer por dois outros que continham meio MS líquido estéril.



Figura 15: Agitador mecânico

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRACTOS VEGETAIS

Para a obtenção dos diferentes extractos vegetais recorreu-se ao uso de diferentes técnicas de ruptura celular, a sonicação e a maceração.

Procedeu-se à filtração das células de *C. roseus* para separação e lavagem do meio de cultura. Após filtração sob vácuo da suspensão celular, colocou-se por cada grama de células de *C. roseus* 1 mL de tampão de extracção Tris 50mM contendo EDTA 1 mM a pH 8.3. Procedeu-se à ruptura das células por sonicação a 12 microns, cerca de 30 segundos (Sonicator VibraCell). Adicionou-se 10% (p/p) de PVP insolúvel, agitou-se durante uma hora a 4°C. Centrifugou-se a 10000 rpm, 15 minutos e recolheu-se o sobrenadante, sendo este o extracto que será usado nos ensaios a efectuar.

Os extractos de *E. peplus*, provenientes de folhas secas, folhas frescas, caule e raízes, foram obtidos por maceração.

Diferentes partes da planta (folhas, caules e raízes) foram lavadas em água corrente de modo a retirar o máximo de contaminantes. Posteriormente foram lavadas três vezes com água destilada estéril, durante 5 minutos cada lavagem. Removeu-se toda a água.

Em diferentes almofarizes colocaram-se as folhas secas, folhas frescas, caules e raízes; e adicionou-se azoto líquido e macerou-se até à obtenção de um pó. Colocou-se num copo de precipitação as folhas secas, 40mL de tampão de extracção (Tris 50 mM contendo 1 mM EDTA, pH 8.3) e 10% (p/p) de PVP insolúvel e levou-se a agitar durante uma hora a 4°C. Centrifugou-se a 10000 rpm por 15 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Nas folhas frescas, caules e raízes o procedimento foi semelhante mas o volume de tampão foi de 10 mL pois a massa era cerca de 4 vezes menor que a das folhas secas.

Para realizar uma extracção com solventes orgânicos pesou-se 200 µg de folhas maceradas em azoto líquido ou 300 µg de *calli* de *E. peplus* para tubos Falcon 15 mL. Em cada tubo adicionou-se 10 mL de um solvente deixou-se permanecer por 24 horas em tubo fechado. Recolheu-se o solvente e secou-se ao ar dentro da "hotte". Os tubos contendo água e Tris-EDTA foram liofilizados. Posteriormente, adicionou-se 70 µL de DMSO (ácido dimetil sulfóxido) e agitou-se de modo a remover todos os resíduos de extracto das paredes do tubo. Adicionou-se 3 mL de Tris-EDTA, 50 mM Tris contendo 1 mM EDTA, pH 8.3, e centrifugou-se a mistura. O sobrenadante foi recolhido para efectuar o estudo.

3.3 AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA

3.3.1 ESPECTROFLUORIMETRIA

Com o objectivo de se verificar a presença de inibidores nos extractos obtidos anteriormente recorreu-se a uma técnica de espectroscopia de fluorescência em que se usou como fluorocromo o FITC. Este processo permite quantificar a

actividade proteolítica em diferentes amostras e, por conseguinte, avaliar o nível de inibição da sua actividade.

A actividade proteolítica da suspensão celular foi determinada pelo método de Twining (1984). Utilizou-se como substrato a caseína derivatizada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 1% (p/v). O FITC é considerado um bom marcador para proteínas por apresentarem elevada fluorescência, após reacção com os grupos amina destas. O complexo formado, FITC-caseína, é igualmente considerado um bom substrato para muitas proteases, por ser solúvel, fisiologicamente idêntico a outros substratos, fácil de preparar, estável quando armazenado e pouco dispendioso [59].

Preparação do substrato FITC 1% (p/v):

Dissolveu-se 1g de caseína em 100 mL de tampão carbonato 50 mM, pH 9,5, contendo 150 mM NaCl. À solução obtida, adicionou-se 40 mg de FITC, originando uma solução alaranjada que foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, durante 3 horas. Os grupos de FITC que não reagiram, permanecendo livres, foram removidos através de quatro diálises: duas, em suspensão de carvão activado a 4°C; uma, em tampão 50 mM Tris pH 8,5, seguida de uma última em tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,2. A concentração foi ajustada para 1% (p/v) de proteína pela adição de 50 mM Tris/HCl pH 7,2, até um volume final de 100 mL.

Com o objectivo de se relacionar os valores de fluorescência obtidos para as protease cisteínicas e serínicas, papaína e tripsina, respectivamente, com as concentrações destas, preparou-se uma curva padrão para cada uma destas enzimas.

A partir de uma solução stock de papaína 1000 µg/ mL em tampão PBS pH 7.2 preparou-se uma curva padrão sendo as concentrações entre os 100 e as 1000 µg/ mL.

A solução stock de tripsina 100 µg/ mL foi efectuada com tampão 100mM Tris pH 8.5 e a sua curva padrão com valores de concentração entre os 0.005 e 5 µg/ mL.

Ensaio de actividade proteolítica:

Em cada tubo *ependorf* colocou-se 30 μL de tampão (PBS pH 7.2 para a papaína e 100mM Tris pH 8.5 para tripsina), 10 μL de amostra e 10 μL de substrato.

Para o controlo positivo e negativo (B+ e B-), adicionou-se 40 μL de tampão e 10 μL do substrato. Foram a incubar a 37°C durante 30 minutos.

Retiraram-se do banho os tubos *ependorfs* e adicionou-se, a cada tubo, 100 μL de TCA 5% (p/v), para parar a reacção, excepto no controlo positivo, no qual foi adicionado 100 μL de tampão 500mM Tris-HCl pH 8.5.

Centrifugaram-se as amostras a 10000rpm durante 5 minutos e retirou-se 100 μL para tubos de ensaio contendo 2.9 ml de tampão 500 mM Tris-HCL pH 8.5.

Procedeu-se à leitura dos valores de fluorescência num espectrofluorímetro Hitachi 3000 onde os comprimentos de onda de emissão e de excitação foram de 525 e 495 nm, respectivamente. Os parâmetros do espectrofluorímetro foram: abertura do feixe 3 nm, velocidade 60 nm/min e resposta 2 sec.

Para o ensaio das amostras procedeu-se do mesmo modo mas adicionou-se 10 μL de extracto celular e a quantidade de tampão (PBS pH 7.2 para a papaína e 100mM Tris pH 8.5 para tripsina) foi de apenas 20 μL .

Incubou-se durante 30 minutos adicionando-se posteriormente o substrato. Incubou-se novamente durante 30 minutos.

3.5.2 GEL POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A capacidade de inibição dos extractos vegetais obtidos em presença da papaína ou da tripsina foi ainda avaliado em gel de poliacrilamida contendo gelatina.

Para avaliar a actividade proteolítica utilizou-se uma técnica sensível que foi desenvolvida por Hussien e Dowdle [60]. Esta técnica, para além de possibilitar estimar o peso molecular de proteínas, avaliar a actividade proteolítica das amostras, se na matriz for introduzida uma proteína. As proteínas são desnaturadas inicialmente em sulfato dodecil de sódio (SDS), separando-se

dentro do sistema SDS - electroforese gel poliacrilamida (PAGE) contendo na matriz, gelatina. Depois da electroforese, o SDS é removido das proteínas por intermédio de lavagens com uma solução de Tris contendo Triton. O gel é incubado com tampão sob óptimas condições para proteólise da gelatina. Depois de remover o tampão, o gel é então corado. Após a remoção do excesso de corante as áreas digeridas aparecem como zonas claras num fundo azul-escuro impregnado de gelatina. A massa molecular de proteinases pode ser calculada então pela sua migração em relação às de proteínas padrão, técnica de Weber e Osborn [61].

Preparação das amostras:

Num tubo *ependorf* colocou-se 10 μ L de enzima com 10 μ L de extracto celular e incubou-se durante 30 minutos, a 37°C. Após a incubação juntou-se 10 μ L de tampão de aplicação e aplicou-se no gel.

No final da separação, o gel foi retirado do suporte e procedeu-se a 3 lavagens de 15 minutos cada, com uma solução de 50 mM Tris pH 6,8 e 0,05% (v/v) Triton 100X. O gel foi incubado *overnight* em 50 mM Tris pH 6,8. Retirou-se a solução e corou-se com Coomassie Blue R 250 e posteriormente descorou-se com uma solução 30 % metanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v).

3.6 TESTE DA TOXICIDADE

Desde sempre as plantas têm sido utilizadas como medicamentos no tratamento de várias doenças. Nos nossos dias a sua importância tem aumentado significativamente pois têm demonstrado ser fontes de drogas altamente eficientes. Contudo, muitas plantas são conhecidas pela sua toxicidade. Por esta razão as plantas medicinais devem ser sujeitas em paralelo a estudos que permitam determinar a sua acção farmacológica e a sua toxicidade.

Artemia salina é um invertebrado da fauna marinha utilizado em ensaios laboratoriais para determinar a toxicidade. A toxicidade de uma dada amostra é

avaliada através de uma estimativa da concentração letal de 50% da população (DL_{50}). Este método tem sido utilizado em vários estudos de toxinas e extractos de plantas [62].

O teste de mortalidade de *A. salina* foi efectuado para analisar a actividade citotóxica dos extractos. A vantagem desta técnica é a sua simplicidade de execução e rapidez, a cultura pode ser mantida por muito tempo, não é dispendiosa, a quantidade de extracto utilizado é mínima e os ovos de *A. salina* podem ser facilmente adquiridos. Um aspecto importante é que é aceite em muitos países mesmo os que têm leis rigorosas acerca da utilização de animais para ensaios farmacológicos [63].

Pesou-se 0,9 gramas de uma mistura de sal e ovos de *A. salina* para um frasco de cultura com 75cm² que continha 25 mL de água Millipore. Incubou-se a 27°C durante 48 horas, de modo que os ovos de *A. Salina* eclodissem [64]. Colocou-se numa proveta a solução e deixou-se repousar durante 15 minutos. Retiraram-se os ovos à superfície com uma pipeta de Pasteur.

Neste ensaio utilizou-se o extracto de *E. pepplus*, extraído com metanol, e efectuaram-se várias diluições com meio de cultura (água marinha 38g/L, pH 9) de *A. salina*. Para o branco positivo preparou-se uma solução de cromato de potássio 32 µg/mL e como branco negativo utilizou-se meio de cultura de *A. salina*.

Numa placa de 96 poços colocou-se nos poços centrais colocou-se 150 µL de extracto e 150 µL de *A. salina* em água marinha. Nos poços laterais e circundantes foi colocada água destilada de forma a todos os poços exteriores utilizados com amostra tenham as mesmas condições de temperatura e humidade, e nos poços Contou-se o número de mortos em cada poço para tempo zero ($t=0$). Incubou-se novamente a 27°C durante 24 horas e voltou-se a contar o número de mortos. Adicionou-se então 50 µL de ácido acético de modo a matar todos os microrganismos e efectuou-se nova contagem a fim de saber o número total de indivíduos por poço [65].

3.7 GC-MS

A análise GC-MS foi realizada com um cromatógrafo a gás HP 5890 equipado com um split HP GC 5890 / splitless (Agilent Technologies, E.U.A.) e interligados por uma linha de transferência de CG para um espectrómetro selectivo de massa VG Massa Lab Trio 1 (VG, Reino Unido).

A coluna cromatográfica foi um GC DB-5MS (30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro com 0,30 μm de espessura, Agilent Technologies, E.U.A.). O gás de arraste foi hélio.

O programa de temperatura do forno GC foi de 60 °C (3 min) até 300 °C a 5 °C/min, em seguida, mantido por 5 minutos, como relatado em Rojas et al., 2008. A pressão transportadora utilizada foi de 10 psi e a temperatura do injetor de 250 °C. A linha de transferência de CG foi mantida em 320 °C. O espectrómetro de massas foi operado no modo electrão ião positivo (EI +). A energia dos electrões foi de 70 eV. A fonte MS foi mantida em 250 °C. A média da área do pico cromatográfico ($n = 3$) de cada composto voláteis identificado foi aceite sempre que o desvio padrão não ultrapassasse 5%. A identificação foi realizar por comparação de espectros com a recolha de impacto de eletrões (EI espectros de massa), NIST Mass Spectra Library (NIST / EPA / NIH, E.U.A.)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTABELECIMENTO DE CALLI

Um dos objectivos deste trabalho, como inicialmente se referiu, foi a obtenção de *calli* a partir de plântulas obtidas por germinação de sementes. Deste modo as sementes e algumas das plantas germinaram após algumas semanas. Tendo sido o caso de *Catharanthus roseus* e *Ailanthus altissima*. Após a germinação colocaram-se folhas das plântulas obtidas em meio de indução de *calli*. Não se verificaram contaminações durante todo o processo.

As sementes de *Phyllanthus niruri* só germinaram passados alguns meses, e apenas se obteve uma plântula de folhas muito finas. Efectuou-se o mesmo procedimento para a indução de *calli*, mas não se conseguiu a obtenção de *calli* de *P. niruri*.

Os *calli* de *A. altissima* apresentavam um aspecto denso constituído por um aglomerado gelatinoso de células enquanto que os *calli* de *C. roseus* eram constituídos por um aglomerado pouco denso de células pouco friável. Foi por isso necessário cortar em pequenos pedaços o *calli* de *C. roseus* para iniciar a suspensão celular, tendo esta sido estabelecida com sucesso. A produção de células em suspensão em larga escala tem sido apontada como solução viável para contornar o problema de baixa produtividade de vinblastina, vincristina (0,0005%) assim como de outras substâncias de interesse farmacológico [66]. No que diz respeito ao *calli* de *A. altissima*, não se iniciou a suspensão celular pois a obtenção da quantidade necessária de *calli* foi morosa, utilizou-se nos ensaios os *calli* obtidos.

Na espécie *Euphorbia peplus* foi possível visualizar o início da formação de *calli* poucas semanas após a sua indução a partir de folhas. Ocorreram algumas contaminações mas grande parte dos explantes produziu *calli*.

As sementes de *E. peplus*, *Mercurialis annua*, *Ranunculus multifidus*, *Leucojum aestivum*, *Vernonia myriantha*, *Pittosporum viridiflorum* não germinaram, não tendo sido possível a obtenção de *calli*.

É possível que, uma vez que as sementes foram adquiridas em França e transportadas até Portugal, que a sua viabilidade tenha diminuído devido a deficientes condições de armazenamento no transporte. Outra possibilidade é que algumas espécies levam muito tempo até germinarem, mesmo *in vitro* e com condições favoráveis, devido ao elevado período de dormência [67]. Possivelmente os meios de cultura utilizados na germinação (meio MS e meio simples) não despertaram a dormência das sementes. Uma forma de quebrar a dormência destas poderia ter sido através de um choque térmico às sementes. O facto de não ter ocorrido germinação ou indução de *calli*, pode ainda dever-se à fase de esterilização ter sido muito agressiva para as sementes e assim o embrião ter sido danificado.

Conseguiu-se o estabelecimento com sucesso de *calli* a partir de sementes de *C. roseus*, *A. altissima* e *calli* de folhas de *E. peplus* para obtenção dos extractos onde irão incidir os estudos subsequentes.

4.2 AVALIAÇÃO DA ACÇÃO INIBIDORA DE EXTRACTOS VEGETAIS

Os extractos vegetais foram obtidos para averiguar a sua capacidade de inibir a actividade proteolítica dado que essa característica poderá ser indicadora de actividade antimalárica [68].

Utilizaram-se as proteases papaína e tripsina por serem bastante estudadas e comercialmente acessíveis. Estas proteases serviram de base de trabalho para os ensaios de inibição que a seguir se apresentam. Os resultados são expostos na forma de tabela. As tabelas representam assim os resultados obtidos para cada extracto vegetal em presença de papaína ou tripsina, conforme os ensaios, onde o B+ representa o branco positivo aplicado no método de Twining.

4.2.1 OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE TWINING

A análise das amostras foi realizada de acordo com o método de Twining para diferentes concentrações de papaína e de tripsina de modo a encontrar uma zona de linearidade (20% do valor do branco positivo). Esse será o valor que irá corresponder à concentração de papaína e de tripsina a utilizar uma vez que o método só é fiável até esse valor [59]. Os resultados encontram-se sob a forma de gráficos, figura 16 e 17. O método foi otimizado de modo a encontrar as concentrações ideais para prosseguir o estudo.

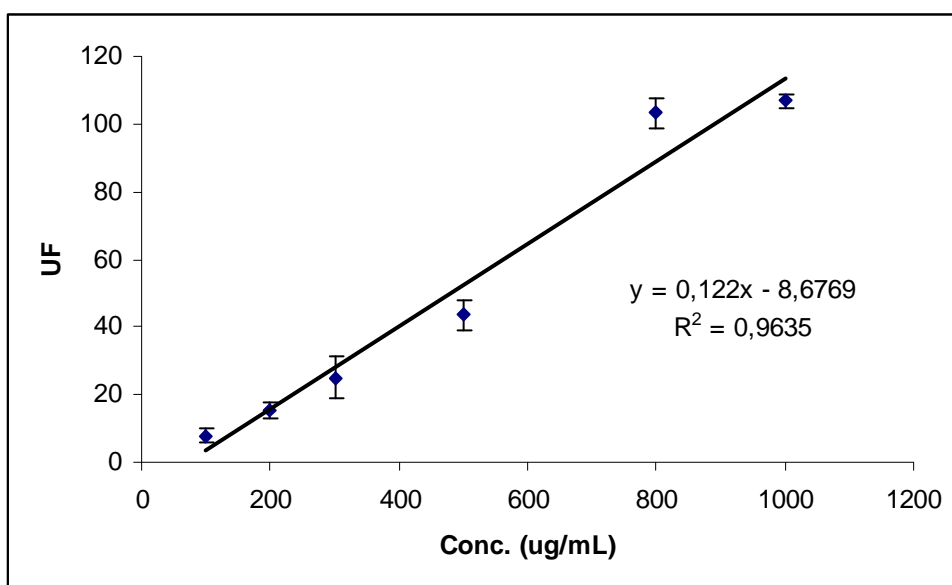


Figura 16: Seleção da concentração de papaína a utilizar no estudo a partir de uma solução stock de papaína 1000 µg/ mL em tampão PBS pH 7.2. As concentrações variaram entre os 100 e as 1000 µg/ mL. UF (unidades de fluorescência) em função da concentração de papaína em µg/mL. O valor do branco positivo (B+) corresponde a 512,2 UF.

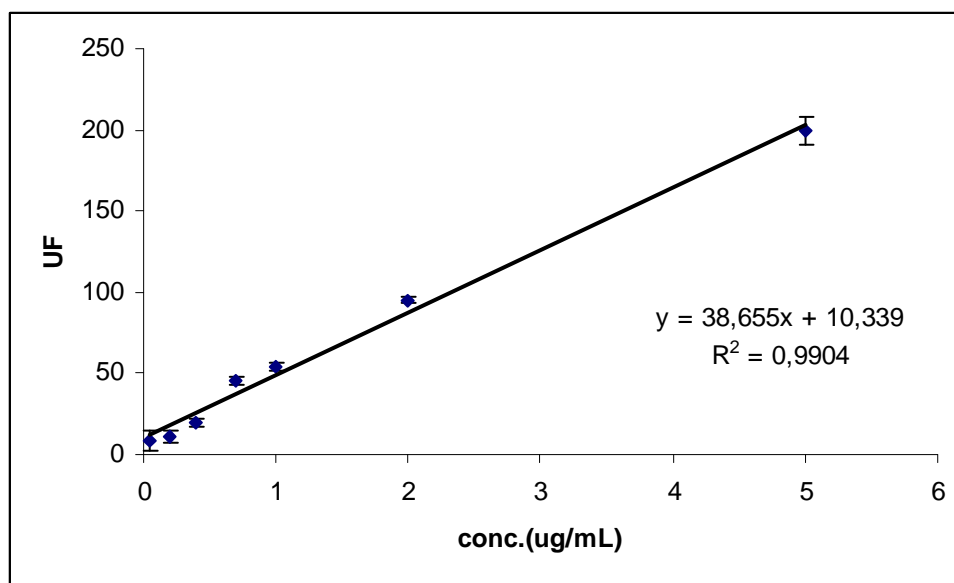


Figura 17: Seleção da concentração de tripsina a utilizar no estudo a partir de uma solução stock de tripsina 100 µg/ mL em tampão 100mM Tris pH 8.5. As concentrações variaram entre os 0.005 e 5 µg/ mL. UF (unidades de fluorescência) em função da concentração de tripsina em µg/mL. O valor do branco positivo (B+) corresponde a 656,1 UF.

O valor pretendido será cerca de 20% da média do valor do B+. Para a papaína 20% do valor do B+ corresponde a 111,1 UF. Uma vez que se trata de valores relativos, a concentrações mais próximas foi 800 µg/mL de papaína. Para a tripsina, 20% do valor do B+ corresponde a 120,8 UF sendo que os valores mais próximos dessa percentagem correspondem a uma concentração entre 2 e 5 µg/mL de tripsina.

Para a continuação do estudo, e por se tratar de valores relativos, a concentração utilizada de papaína foi 800 µg/mL, mas uma vez que o valor desta encontrava-se demasiado próximo dos 20% do valor do B+ optou-se também por utilizar uma outra concentração 500 µg/mL. Para a avaliação da actividade inibitória sob a tripsina os valores de concentração utilizados foram 2 e 5 µg/mL de tripsina.

Com os valores de concentração de papaína e tripsina encontrados procedeu-se então ao estudo da actividade das espécies vegetais em estudo, *C. roseus*, *A. altissima* e *E. peplus*.

4.2.2 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DOS EXTRACTOS VEGETAIS

Após determinação das concentrações de papaína e tripsina a usar nos ensaios subsequentes, procedeu-se à avaliação da capacidade inibitória dos diferentes extractos vegetais sob estas enzimas proteolíticas.

Os resultados de actividade das leituras efectuadas encontram-se nas tabelas 1 e 2, para a papaína e para a tripsina, respectivamente.

Tabela 1: Avaliação da acção inibidora em presença de papaína do extracto de *calli* de *A. altissima*

Papaína em diferentes concentrações 500 e 800 µg/mL (P500 e P800, respectivamente); *calli* de *A. altissima* (*calli*) e papaína nas diferentes concentrações na presença de *calli* de *A. altissima* (*calli*/P500 e *calli*/P800). O branco positivo corresponde a 238,9 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
P500	55,9	6,8
P800	95,7	23
<i>calli</i>	2,4	0,7
<i>calli</i> /P500	32,1	0,7
<i>calli</i> /P800	50,3	20

Os resultados da tabela 1 sugerem que os *calli* de *A. altissima* não possuem actividade uma vez que os valores são baixos, ou seja não apresentam actividade proteolítica. Verificou-se também que existe uma diminuição da actividade da papaína, em ambas as concentrações, 500 e 800 µg/mL (P500 e P800), quando em contacto com o extracto de *calli* (*calli*/P500 e *calli*/P800).

Estes resultados são indicadores de uma diminuição na actividade da papaína, o que aponta para a existência de inibidores no extracto vegetal de *A. altissima*. Uma vez que certos tipos de quassinóides da família desta espécie possuem actividade antimalárica, e esta espécie possui catorze quassinóides [69], possivelmente o inibidor pertence a esta família.

Os resultados obtidos foram confirmados através da realização de novo ensaio, confirmando-se a diminuição da actividade da papaína na presença de extracto de *calli* de *A. altissima*.

Idênticos ensaios foram realizados para o extracto de *calli* de *Catharanthus roseus*. Os valores encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2: Avaliação da acção inibidora em presença de papaína do extracto de *calli* de *C. roseus*

Papaína em diferentes concentrações 500 e 800 µg/mL (P500 e P800, respectivamente); *calli* de *C. roseus* (*calli*) e papaína nas diferentes concentrações na presença de *calli* de *C. roseus* (*calli*/P500 e *calli*/P800). O branco positivo corresponde a 344,3 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
P500	65,9	13,3
P800	126,2	8,7
<i>calli</i>	0,8	0,8
<i>calli</i> /P500	68,4	21,2
<i>calli</i> /P800	122,9	22,9

Os resultados da tabela 2 sugerem que o extracto de *calli* não possui actividade proteolítica uma vez que os valores são baixos. Com base nos resultados verificou-se que não ocorre diminuição da actividade da papaína, em ambas as concentrações, quando em contacto com o extracto de *calli* de *C. roseus* (*calli*/P500 e *calli*/P800), ou seja os valores são próximos dos valores de actividade da papaína a diferentes concentrações sem o extracto (P500 e P800).

Os resultados não evidenciam uma diminuição na actividade da papaína, o que sugere que o extracto vegetal de *calli* de *C. roseus* não possui inibidores da papaína. Tendo esta espécie princípios activos conhecidos pelas suas características terapêuticas, alcalóides, muito utilizados na medicina tradicional, principalmente a vinblastina, vincristina e ajmalcina, e uma vez que existem em baixa concentração na planta (0,0005%), é possível que não tenham sido detectados com o método usado [70]. Provavelmente, será necessário uma maior concentração de extracto de *calli*, proveniente da suspensão celular, para continuar o estudo de actividade desta espécie. Dado que o processo de obtenção de *calli* é moroso e não foi possível obter quantidade suficiente de extracto, não foi possível continuar com o estudo desta espécie.

O processo de estabelecimento dos *calli* de *A. altissima* e *C. roseus* foi um processo moroso, o que condicionou a continuação dos ensaios com estas espécies. Devido a estas condicionantes, optou-se por prosseguir o estudo de avaliação da inibição com uma espécie pouco estudada e que existe na flora portuguesa, a *Euphorbia peplus*. Uma das razões por se ter optado por esta planta foi a facilidade de obtenção do material e na altura em que decorreram os ensaios experimentais esta planta encontrava-se em abundância, coincidindo com a altura da floração, visto ser uma espécie sazonal. A principal razão para a sua inclusão neste estudo deve-se ao facto de pertencer à família *Euphorbiaceae*. Esta família é conhecido por possuir muitas espécies com características terapêuticas, como é exemplo *Mercurialis annua*, e algumas mesmo com actividade antimalárica, com é o caso das espécies *Phyllanthus niruri* [37] e *Euphorbia hirta*.

Para prosseguir o estudo, idênticos ensaios foram realizados para o extracto de folhas secas e frescas de *E. peplus*. Os valores encontram-se descritos na tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da acção inibidora em presença de papaína dos extractos de folhas frescas e secas de *E. peplus*

Papaína em diferentes concentrações 500 e 800 µg/mL (P500 e P800, respectivamente); extracto de folhas frescas e secas de *Euphorbia peplus* (FF e FS, repectivamente) e papaína nas diferentes concentrações na presença de folhas frescas e secas de *E. peplus* (FF/P500, FF/P800, FS/P500 e FS/P800). O branco positivo corresponde a 156,9 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
P500	44,9	3,6
P800	72,7	6
FF	0	1,6
FS	0	0,5
FF/P500	1,6	0,4
FF/P800	3,3	0,2
FS/P500	0	0,6
FS/P800	0,7	1,5

De acordo com os valores apresentados na tabela 3 podemos verificar que os extractos de folhas frescas (FF) e as folhas secas (FS) de *E. peplus* não apresentam actividade proteolítica. É ainda de referir que os valores registados

em relação às folhas secas são ligeiramente superiores que o das folhas frescas. Resultados semelhantes foram obtidos por Domingos *et al* (2000) com ensaios com *Centaurea calcitrapa*. Pelos resultados de fluorescência, observou-se que a papaína nas concentrações de 500 µg/mL e 800 µg/mL apresenta valores de 44,9 e 72,7 UF, respectivamente. Quando esta protease é adicionada aos extractos de folhas frescas e de folhas secas de *E. peplus*, verifica-se uma inibição considerável da actividade proteolítica, sendo praticamente cem por cento de inibição, tanto no caso dos extractos de folhas frescas como nos extractos de folhas secas.

Estes resultados, que apresentam uma quebra considerável na actividade da papaína, sugerem a existência de inibidores no extracto vegetal de *E. peplus*.

Testou-se igualmente a actividade da tripsina, coma execução de ensaios de actividade idênticos (tabela 4).

Tabela 4: Avaliação da acção inibidora em presença de tripsina dos extractos de folhas frescas e secas de *E. peplus*

Tripsina em diferentes concentrações 2 e 5 µg/mL (T2 e T5, respectivamente); extracto de folhas frescas e secas de *Euphorbia peplus* (FF e FS, repectivamente) e tripsina nas diferentes concentrações na presença de folhas frescas e secas de *E. peplus* (FF/T2, FF/T5, FS/T2 e FS/T5). O branco positivo corresponde a 188,3 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
T2	4	0,9
T5	14,2	1
FF	0	1,1
FS	0	1
FF/T2	0	0,2
FF/T5	0	0,4
FS/T2	0	0,6
FS/T5	0	0,4

Tal como no ensaio anterior, os extractos de folhas frescas e secas, não apresentam actividade proteolítica.

A tripsina nas concentrações testadas, 2 e 5 µg/mL, apresentam respectivamente, valores de 4 e 14,2 UF. Quando adicionou-se os extractos de folhas frescas e secas, observou-se a inibição total da actividade da tripsina.

Estes resultados sugerem, tal como no caso da papaína, diminuição na actividade da tripsina, que poderá ser devido à presença de inibidores no extracto vegetal de *E. peplus*.

Todos os resultados obtidos foram confirmados com a realização de novos ensaios.

Procedeu-se ao estudo da actividade inibitória usando outras partes de *E. peplus* como sendo o caule, a raiz e o *calli* estabelecidos.

Tabela 5: Avaliação da acção inibidora em presença de papaína dos extractos de *calli*, caule e raízes de *E. peplus*

Papaína em diferentes concentrações 500 e 800 µg/mL (P500 e P800, respectivamente); extracto de extractos de *calli*, caule e raízes de *Euphorbia peplus* (*calli*, caule e raízes, repectivamente) e papaína nas diferentes concentrações na presença de extractos de *calli* (P500/*calli*, P800/*calli*), caule (P500/caule, P800/caule) e raízes (P500/raiz, P800/raiz) de *E. peplus*. O branco positivo corresponde a 205,5 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
P500	96,7	4,32
P800	171,1	23,94
Calli	0	0,01
Caule	1,4	0,11
Raiz	2,7	1,41
P500/ <i>calli</i>	75,2	45,67
P800/ <i>calli</i>	112,3	56,34
P500/caule	65,9	3,95
P800/caule	137,9	36,07
P500/raiz	120,3	11,23
P800/raiz	250,7	68,91

De acordo com os valores apresentados na tabela 5 podemos verificar que, os *calli*, o caule e raiz de *E. peplus* apresentam actividade proteolítica reduzida uma vez que os valores determinados são praticamente nulos.

Nos ensaios de avaliação da actividade da papaína com a adição dos extractos de *E. peplus*, verificou-se que os valores de actividade proteolítica diminuem, de acordo com os dados da tabela 5, quando se adiciona extracto de *calli* (P500/*calli*, P800/*calli*) e de caule, às soluções de papaína. Os resultados obtidos sugerem que ocorreu inibição da actividade proteolítica da papaína. Para os valores de actividade proteolítica da papaína com extractos de raiz

(P500/raiz, P800/raiz), verifica-se que estes são superiores aos da papaína sem extracto não sendo conclusivos estes valores.

É possível que tenha ocorrido um erro durante a realização deste ensaio. Assim sendo, relativamente à actividade do extracto de raiz de *E. peplus* nada se pode afirmar a partir deste ensaio de actividade.

Novo ensaio foi realizado de modo a verificar a actividade dos extractos de *calli*, caule e raízes de *E. peplus* em relação à tripsina.

Tabela 6: Avaliação da acção inibidora em presença de tripsina dos extractos de *calli*, caule e raízes de *Euphorbia peplus*

Tripsina em diferentes concentrações 2 e 5 µg/mL (T2 e T5, respectivamente); extracto de extractos de *calli*, caule e raízes de *Euphorbia peplus* (*calli*, caule e raízes, respectivamente) e tripsina mas diferentes concentrações na presença de extractos de *calli*, caule e raízes *E. peplus* (T2/*calli*, T5/*calli*, T2/caule, T5/caule, T2/raiz, T5/raiz). O branco positivo corresponde a 262,5 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
T2	1,5	0,39
T5	8,7	1,26
Calli	0	1,19
Caule	0	1,28
Raiz	0	0,54
T2/ <i>calli</i>	0	0,33
T5/ <i>calli</i>	0	0,08
T2/caule	0	3,41
T5/caule	0	0,26
T2/raiz	0	0,72
T5/raiz	2,5	1,24

De acordo com os valores apresentados na tabela 6 podemos verificar que, o *calli*, o caule e raiz de *E. peplus* não demonstram actividade proteolítica.

No ensaio de actividade da tripsina com a adição dos extractos de *E. peplus* verificou-se que os valores da actividade proteolítica diminuem após a adição dos extractos provenientes de *calli* (T2/*calli*, T5/*calli*) e de caule (T2/caule, T5/caule) de *E. peplus*, em relação aos valores da Tripsina sem qualquer extracto nas duas concentrações testada, 2 e 5 µg/mL.

Estes resultados sugerem uma inibição da actividade da tripsina parecendo indicar que também o *calli*, caule e raízes possuem um efeito inibidor sob as proteases.

4.2.3 EXTRACÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES

Na medicina tradicional, eram preparados extractos ou pastas de várias plantas utilizando água. A água ou etanol ou metanol são utilizados em grande parte dos extractos para extrair os princípios activos das plantas. Outros solventes podem ser utilizados para o mesmo efeito. Um estudo de 2008 forneceu dados importantes acerca da extracção para uma grande variedade de plantas, dando uma noção do tipo de substância a extrair com determinado solvente [71].

Para os ensaios que se seguem, as amostras de *calli* e folhas de *E. pepplus* foram extraídas com diferentes solventes para avaliar a actividade dos extractos na presença de uma protease, a papaína.

Para identificar a natureza dos inibidores presente nos diferentes extractos utilizou-se o mesmo método anteriormente descrito mas o solvente da extracção variou. Foram então utilizados diferentes solventes orgânicos: metanol, etanol, propanol, butanol, acetona, clorofórmio, dietil éter e solvente inorgânico: água a 100°C.

A análise foi efectuada apenas com a papaína pois os resultados anteriores sugerem que o efeito dos extractos em relação à tripsina demonstra um comportamento semelhante ao da papaína, relativamente à actividade proteolítica.

Para estes ensaios decidiu-se apenas utilizar uma concentração desta protease, 500 µg/mL (P500), que se encontra como demonstrado na zona de linearidade do método.

Aquando da evaporação dos solventes com os extractos colocou-se também a mesma quantidade de solvente puro de modo a verificar se estes possuíam impurezas que fossem interferir no método. Verificou-se que, após a evaporação, não restou qualquer resíduo.

Tabela 7: Efeito sob a actividade proteolítica da papaína dos extractos de *calli* de *E. peplus*, em diferentes solventes.

Papaína 500 µg/mL (P500); extracto de extractos de *calli* de *Euphorbia peplus* (*calli*) em tampão Tris-EDTA (50 mM Tris contendo 1 mM EDTA, pH 8.3) e papaína mas diferentes concentrações na presença de extractos de *calli* de *E. peplus* em tampão Tris-EDTA (50 mM Tris contendo 1 mM EDTA, pH 8.3) mas extraídos com diferentes solventes: metanol (PM), etanol (PE), propanol (PP), butanol (PB), clorofórmio (PC), acetona (PA), Éter dietílico (PDE), água a 100°C (PH). O branco positivo corresponde a 195,0 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
P500	66,3	5,41
<i>E. peplus</i>	0	0,61
PM	88,3	3,67
PE	101,4	1,66
PP	63,3	1,37
PB	57,9	13,24
PC	83,4	11,21
PA	62,5	12,47
PDE	77,8	14,48
PH	69,3	17,65

Os resultados da tabela 7 sugerem que o extracto de *calli* de *E. peplus* extraído com Tris-EDTA 100 mM (*E. peplus*) não possui actividade proteolítica.

Os resultados obtidos para o extracto de *calli* de *E. peplus* nos diferentes solventes, demonstraram que os extractos cujos solventes eram o metanol, etanol, clorofórmio, éter dietílico, e água a 100°C possuem valores de actividade relativa ligeiramente superiores ao da papaína a 500 µg/mL.

Em relação aos restantes solventes, o propanol, o butanol e a acetona não se pode considerar uma diminuição da actividade da papaína uma vez que os valores de actividade relativa estão muito próximos do valor de actividade da papaína.

Pode ter ocorrido um erro no método mas como os valores estão muitos próximos, dentro da mesma concentração, alguma substância poderá estar a mascarar os resultados. Este método pode, como se afirmou anteriormente, ser afectado por substâncias presentes em extractos vegetais.

Dever-se-ia ter realizado ensaios para avaliar a acção dos solventes puros na actividade da papaína, sem os extractos, para analisar a sua interferência nos resultados de actividade.

Dado que neste ensaio se utilizou DMSO para remover todos os resíduos de extracto das paredes do tubo, como descrito anteriormente e, face aos resultados obtidos, foi desenhado um novo ensaio para testar a influência deste composto nos resultados do teste de actividade.

Tabela 8: Influência da presença de DMSO na actividade do extracto de *calli* de *E. peplus*

Papaína 500 µg/mL sem e com a adição de DMSO (P500 e P500/DMSO, respectivamente); extracto de *calli* de *Euphorbia peplus* (*calli*) e papaína 500 µg/mL sem e com a adição de DMSO na presença *calli* de *E. peplus* (P/*calli* e P/DMSO/*calli*, respectivamente). O branco positivo corresponde a 261,3 UF.

ensaio	UF	desvio padrão
P500	89,7	7,56
P500/DMSO	76,1	0,97
<i>calli</i>	0	0,88
P/ <i>calli</i>	247,6	11,56
P/DMSO/ <i>calli</i>	149	23,97

Os resultados de actividade da tabela 8 sugerem que os *calli* de *E. peplus*, como já anteriormente observado, não apresentam actividade proteolítica.

No ensaio de actividade em que se pretende avaliar a influência do DMSO, pode verificar-se que os valores de actividade aumentam significativamente (P/DMSO/*calli*) em relação à papaína 500 µg/mL (P500) mas o valor é um pouco inferior ao obtido sem o DMSO (P/*calli*). Embora nos valores obtidos se verifique a existência de um grande desvio padrão, o DMSO parece não ter influenciar nos resultados de actividade.

O ensaio de actividade foi repetido tendo sido obtidos resultados semelhantes.

Dado que os resultados obtidos com os extractos de *calli* nos diferentes solventes não mostraram inibição de actividade proteolítica da papaína, a protease escolhida para este ensaio, decidiu-se repetir os ensaios mas desta vez usando folha de *E. peplus* nos diferentes solventes orgânicos e inorgânico.

Tabela 9: Inibição da papaína na presença de extractos de folhas frescas de *E. peplus* em diferentes solventes

Papaína 500 µg/mL (P500); extracto de extractos de folhas frescas de *Euphorbia peplus* (*E.peplus*) em tampão Tris-EDTA (50 mM Tris contendo 1 mM EDTA, pH 8.3) e papaína mas diferentes concentrações na presença de extractos de folhas frescas de *E. peplus* em tampão Tris-EDTA (50 mM Tris contendo 1 mM EDTA, pH 8.3) mas extraídos com diferentes solventes orgânicos: metanol (PM), etanol (PE), propanol (PP), butanol (PB), clorofórmio (PC), acetona (PA), Éter dietílico (PDE), e solvente inorgânico: água a 100°C (PH). O branco positivo corresponde a 242,9 UF.

ensaios	UF	desvio padrão
P500	43,4	3,08
<i>E.peplus</i>	0,4	0,27
PT	54,5	4,41
PM	5,3	0,45
PE	9,8	3,85
PP	10,1	4,63
PB	11,9	1,21
PC	12,2	0,83
PA	20,6	2,42
PDE	16,6	1,7
PH	12,3	1,16

Como se pode observar na tabela 9, a actividade proteolítica da papaína é inibida na presença do extracto de folhas frescas de *E. peplus* após extracção com diferentes solventes. No entanto, para o extracto de folhas frescas de *E. peplus*, extraído em Tris-EDTA, não se verificou uma inibição e nem um aumento significativo da actividade em relação à papaína 500 µg/mL (P500).

Face a estes resultados e dado que às amostras iniciais foi adicionado PVP insolúvel (polivinilpirrolidona), como referido no capítulo “material e métodos” decidiu-se analisar a possibilidade de interferência do PVP insolúvel nos resultados finais.

Tabela 10: Influência da presença de PVP insolúvel na actividade de folhas frescas de *E. pepplus*

Papaína 500 µg/mL (P500); extracto de folhas frescas de *E. pepplus* sem e com a adição de PVP (E e E/PVP, respectivamente) e papaína 500 µg/mL na presença *calli* de *E. pepplus* sem e com a adição de PVP (PE e PE/PVP, respectivamente). O branco positivo corresponde a 218,9 UF.

Ensaio	UF	desvio padrão
P500	22,8	2,99
E	1,9	0,16
E/PVP	0	0,01
PE	28,6	1,38
PE/PVP	0	0,18

Os resultados da tabela 10 sugerem que o PVP diminui os valores de actividade proteolítica. Isto ocorre tanto nos ensaios sem o extracto (E e E/PVP) como nos que possuem extracto de *E. pepplus* (PE e PE/PVP).

Após a análise de todos os resultados de actividade proteolítica obtidos pelo Método de Twining, podemos referir que os mesmos sugerem a interferência de compostos no método. Como foi referido anteriormente os compostos contendo fenol podem interferir no método e como foi referido no capítulo da introdução a espécie em estudo, *E. pepplus*, possui flavonóides e antraquinonas que pertencem à família dos compostos fenólicos.

4.3 AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA POR GEL POLIACRILAMIDA

A actividade enzimática da protease papaína foi também avaliada em gel de poliácridamida contendo gelatina 0,1% (p/p). Deste modo foi também avaliado, com este método, a capacidade de inibição dos extractos obtidos com diferentes solventes na presença daquela protease.

As amostras foram aplicadas no gel. Depois da electroforese, o SDS foi removido após sucessivas lavagens. O gel foi incubado a 37°C com tampão sob condições óptimas para que ocorra proteólise da gelatina. Depois de remover o tampão, o gel foi então corado. Após a remoção do excesso de corante apareceram áreas digeridas como zonas claras num fundo azul-escuro impregnado de gelatina.

De modo a otimizar o método, efectuaram-se géis com diversas concentrações de papaína e determinou-se que a concentração a utilizar seria papaína 5 µg/mL, pois era a que, não sendo demasiado concentrada, tornava os resultados mais claros. Optimizou-se também o gel relativamente à sua percentagem e decidiu-se utilizar gel a 10% (v/v) com gelatina 0,1% (p/v).



Figura 18: SDS-PAGE 10% (v/v) com gelatina 0,1% (p/p)

Cada poço corresponde papaína 5 µg/mL com 10 µL de extracto em diferentes solventes orgânicos: 1- sem extracto, 2 – metanol, 3- etanol, 4- propanol, 5 – butanol, 6 – acetona, 7 – clorofórmio, 8 – dietil éter, 9 – água fervida.

Com a figura 18 podemos verificar que os poços 2, 4 e 9, cujos solventes utilizados são metanol, propanol e água fervida, respectivamente, são os menos intensos. Isto é, são os poços que sugerem uma diminuição da actividade.

Efectuou-se novo gel para verificar os resultados anteriores. Neste novo gel a papaína é mais concentrada para que pudéssemos analisar a inibição perante esta nova variável.

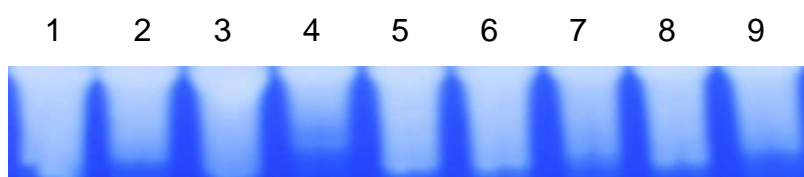


Figura 19: SDS-PAGE 10% (v/v) com gelatina 0,1% (p/v)

Cada poço corresponde a papaína 50 µg/mL com 10 µL de extracto em diferentes solventes orgânicos: 1- sem extracto, 2 – metanol, 3- etanol, 4- propanol, 5 – butanol, 6 – acetona, 7 – clorofórmio, 8 – dietil éter, 9 – água fervida.

Na figura 19 com o aumento de concentração da papaína não é tão visível a redução da sua actividade por parte do extracto de *E. peplus*.

Podemos verificar que os poços 2, 4 e 9 cujos solventes utilizados são o metanol, propanol e água fervida respectivamente, são os que sugerem uma redução da banda de actividade, como observado na figura 18.

Estes resultados de inibição estão de acordo com os ensaios anteriores (método de Twining) onde ocorria uma inibição de actividade da papaína com o extracto obtido com metanol, propanol e água a 100°C. Os restantes solventes não sugerem uma inibição significativa da actividade.

De acordo com um estudo anterior, na extracção dos elementos activos das plantas com diferentes solventes orgânicos, quando são utilizadas fracções de metanol os compostos resultantes desta extracção são os terpenóides, flavonóides, polifenóis e taninos. Relativamente às extracções com fracção de água os compostos comuns nestas extracções são os taninos [72], uma vez que são solúveis em água e acetona, insolúveis em éter puro e clorofórmio e precipitados com sais de metais pesados [73], antrocianinas e saponinas.

A espécie em estudo, *E. peplus*, possui na sua constituição flavonóides, antraquinonas, esteróides e triterpenos [41] e uma vez que o metanol extrai terpenóides e flavonoídes deve-se analisar o extracto para verificar o que foi realmente extraído, uma vez que ocorreu uma inibição de actividade da papaína com este solvente.

4.4 TESTE DE TOXICOLOGIA

Várias espécies de plantas têm sido utilizadas como drogas altamente eficientes no tratamento de muitas doenças embora possuam toxicidades elevadas. Por esta razão é extremamente importante determinar não só a acção farmacológica mas também a sua toxicidade.

Neste trabalho efectuou-se um teste toxicológico com o intuito de determinar a concentração de *E. peplus* letal para 50% da população de *A. salina* (DL₅₀).

O teste realizou-se com o extracto de *E. peplus* em metanol, uma vez que, foi o solvente que demonstrou uma maior inibição de papaína, durante os ensaios de fluorometria e no ensaio de actividade em gel.

Após incubação de *A. salina* com o extracto nas condições descritas anteriormente, contou-se o número de mortos.

Os resultados obtidos podem ser observados na figura 20 em que se registou a percentagem de mortos de *A. salina* em função da concentração de extracto de *E. peplus*.

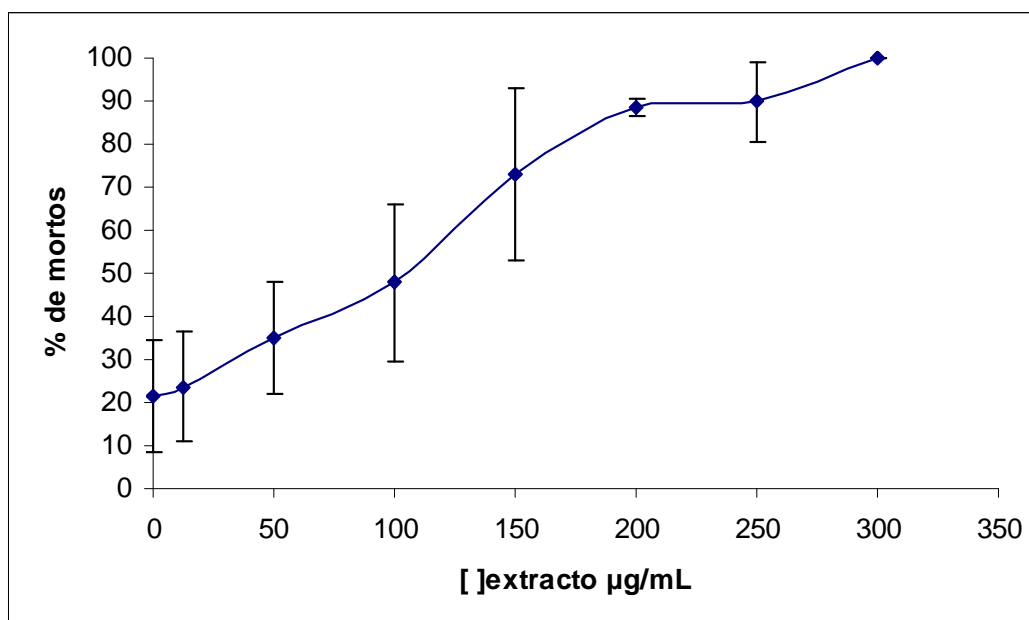


Figura 20: Percentagem de mortos de *Artemia salina* em função da concentração de extracto de *Euphorbia peplus* ($\mu\text{g/mL}$) em metanol.

A figura 20 sugere que a mortalidade está directamente proporcional ao aumento de concentração [74]. Existe uma fase onde o crescimento é mais acentuado (fase exponencial) até cerca de 90% de mortos e após esta fase dá-se um abrandamento do crescimento (fase estacionária).

Os valores da fase exponencial foram utilizados para a construção de uma recta de tendência para que, com a equação da recta, se obtenha o valor de

dose letal 50 (DL₅₀), isto é, a concentração de extracto para a qual metade da população morre.

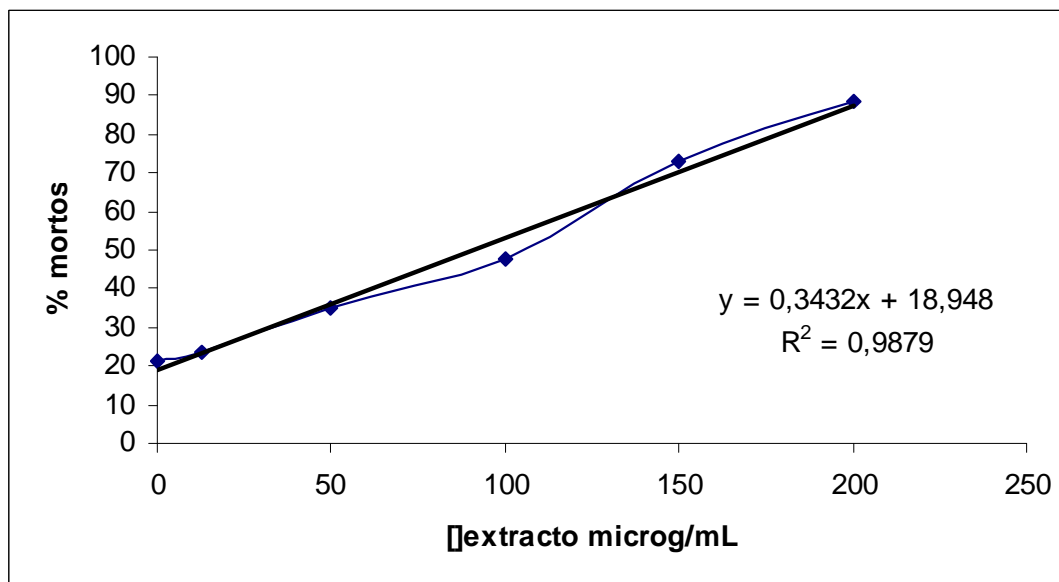


Figura 21: Recta de tendência dos valores da fase exponencial e sua equação

Obteve-se, deste modo, a equação da recta de regressão linear. Com a equação da recta do gráfico determinou-se que a concentração de extracto de *E. peplus*, em metanol, na qual 50% de *Artemia salina* morreram foi de 90,5 µg/mL. Este é um valor que indica que o extracto de folhas frescas de *E. peplus* possui toxicidade [74]. Assim sendo este extracto não poderia ser utilizado como droga sem mais estudos e sem identificar os compostos com actividade citotóxica.

Futuros ensaios passariam pela identificação dos compostos com maior actividade citotóxica no extracto, isto é, seria necessário isolar vários compostos do extracto e testar cada um deles.

Os dados apresentados correspondem à média de cada ensaio e foram repetidos tendo sido obtido um valor de concentração idêntico.

4.5 GC-MS

Para a identificação dos compostos do extracto de *E.pelus* efectuou-se uma análise de GC-MS pois é a melhor técnica para identificação de flavonóides e terpenóides fornecendo ainda dados sobre a estrutura [75].

Após a análise dos cromatogramas (anexo IV) verificou-se que os compostos identificados não pertencem à família dos terpenóides, flavonóides, antraquinonas ou esteróides [41]. Os compostos identificados não são relevantes uma vez que, nesta técnica, não passam de ruído.

Assim sendo, não foi possível identificar com os solventes utilizados, compostos das famílias referenciadas na literatura como relacionadas com a actividade antibiótica ou bioestática o que sugere que a concentração de compostos era muito baixa ou a extracção destes não foi eficaz.

5. CONCLUSÃO

Um dos objectivos deste trabalho foi a obtenção de *calli* a partir de plântulas obtidas por germinação de sementes. O estabelecimento de *calli* foi obtido com sucesso em sementes de *C. roseus* e *A. altissima*, mas o material resultante foi pouco em ambas as espécies. Com *P. niruri* ocorreu germinação das sementes mas numa fase muito avançada do estudo, não se conseguindo obter *calli* a tempo de prosseguir o estudo. O *calli* de *E. peplus* foi obtido com sucesso a partir de folhas desta espécie.

Na avaliação da acção inibidora de extractos vegetais verificou-se que *calli* de *A. altissima* possui acção inibitória, mas o estudo não prosseguiu devido à pequena quantidade de material. Quanto a partes de *E. peplus*, caule, raízes e folhas, podemos referir que se verificou inibição da actividade proteolítica. Novos testes devem ser realizados devido à interferência do PVP nos resultados obtidos. A acção inibitória mais significativa foi verificada nos extractos obtidos com diferentes solventes orgânicos.

A avaliação da actividade inibitória de extractos de folhas de *E. peplus* extraídos com diferentes solventes também foi testada em gel de poliacrilamida onde foi verificada a inibição da protease por parte dos extractos.

No que respeita à avaliação toxicológica, podemos referir que o extracto revelou alguma toxicidade pelo que novos ensaios deverão ser realizados.

Para identificar o inibidor foi escolhido o método GC-MS com o qual não se obteve resultados significativos.

Uma vez que os métodos utilizados não foram conclusivos, outros métodos poderiam ser utilizados. Por exemplo, a avaliação de actividade proteolítica das duas proteases com outro substrato [53]. Outro estudo possível seria baseado na inoculação dos extractos em murganhos infectados com *Plasmodium* e avaliar a capacidade dos extractos para diminuir/combater a infecção [51]. Futuramente pretende-se repetir este ensaio com condições optimizadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto_malaria_pro.htm
(consultado em 27.10.2008)
- [2] <http://www.manualmerck.net/?url=/artigos/%3Fid%3D210%26cn%3D1738>
(consultado a 21.06.2008)
- [3] <http://www.sero.who.int/en/section10/section21/section334.htm> (consultado a 16.09.2008)
- [4] http://images.google.pt/imgres?imgurl=http://www.jyi.org/articleimages/1183/originals/img0.jpg&imgrefurl=http://universoemequilibrio.blogspot.com/2008/04/resumo-para-p2-reino-protista.html&usg=__ZMbEOmoiYRJR20164g7AdanLz0U=&h=300&w=382&sz=23&hl=pt-PT&start=7&tbnid=bACHra7f8Va1JM:&tbnh=97&tbnw=123&prev=/images%3Fq%3Dgl%25C3%25B3bulos%2Binfectedos%2Bcom%2Bo%2Bplasmodium%26gbv%3D2%26hl%3Dpt-PT%26sa%3DG
(consultado em 10.12.2008)
- [5] http://3.bp.blogspot.com/_jHiPGQxAOKA/SiF6sBTv3oI/AAAAAAAAACWI/n36qkbJ8v_8/s1600-h/malaria.jpg (consultado em 10.12.2008)
- [6] http://images.google.pt/imgres?imgurl=http://www.geocities.com/SiliconValley/Drive/5014/valle1.jpg&imgrefurl=http://www.geocities.com/SiliconValley/Drive/5014/branci2.html&usg=__xbkrBMtCYA2gJpkFGiZoALDcGQg=&h=420&w=624&sz=60&hl=pt-PT&start=2&tbnid=y1G4qdSjKieMfM:&tbnh=92&tbnw=136&prev=/images%3Fq%3DCiclo%2Bde%2Bvida%2Bdo%2BPlasmodium%26gbv%3D2%26hl%3Dpt-PT (consultado em 05.11.2008)
- [7] http://images.google.pt/imgres?imgurl=http://rs.resalliance.org/wp-content/uploads/2008/03/map_pflimits.gif&imgrefurl=http://rs.resalliance.org/2008/03/04/global-and-national-malaria-maps/&usg=__DK2AO0j0uC6-gUtEH51E3fWKZTE=&h=319&w=600&sz=29&hl=pt-PT&start=13&um=1&tbnid=PoOTBtFKzkizhM:&t

bnh=72&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3Dmap%2Bplasmodium%2Bin%2Bthe%2Bworld%2Bmalaria%2B2008%26hl%3Dpt-PT%26rlz%3D1W1GGLL_en%26sa%3DN%26um%3D1 (consultado em 16.06.2009)

[8] <http://www.ami.org.pt/default.asp?id=p1p211p215p515p516&l=1> (consultado em 21.06.2008)

[9] http://www.pdamed.com.br/doiinfpar/pdamed_0001_0047_01300.php (consultado em 27.10.2008)

[10] Azevedo, J. (2004) "Estudo da síntese de fármacos antimaláricos derivados do salicilaldeído". Tese de doutoramento, Universidade do Porto, Portugal.

[11] <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/rosenth.htm> (consultado em 13.01.2009)

[12] Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Mungai, G.M., Njagi, E.N.M. (2007) "Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast". *Journal of ethnopharmacology* 114(3): 377-386

[13] Tona, L., Cimanga, K., Mesia, K., Musuamba, C. T., Bruyne, T. D., Apers, S. (2004) "In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants". *Journal of ethnopharmacology* 93(1): 27-32

[14] Hay, A. E., Helesbeux, J. J., Duval, O., Labaied, M., Grellier, P., Richomme, P. (2004) "Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*". *Life sciences* 75(25): 3077-3085

[15] http://www2.iict.pt/archive/doc/Microsoft_Word_-_Investigacao_de_Plantas_AntimalaricasIICT_MCM.pdf (consultado em 05.11.2008)

[16] http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_news/lqes_news_cit/lqes_news_2003/lqes_news_novidades_291.html (consultado em 05.11.2008)

[17] <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/rosenth.htm> (consultado em 13.01.2009)

[18] Saxena, S., Pant, N., Jain, D. C., Bhakuni, R. S., (2003) "Antimalarial agents from plant sources". *Current science* 85 (9): 1314-1329

[19] http://pt.wikipedia.org/wiki/Ailanthus_altissima (consultado em 19.02.2009)

[20] <http://hezarbareshgh.blogfa.com/post-821.aspx> (consultado em 10.02.2008)

[21] Almeida, M. M. B., Arriaga, Â. M. C., dos Santos, A. K. L., Lemos, T. L. G., Braz-Filho, R., Vieira, I. J. C. (2007). "Ocorrência e actividade biológica de quassinóides da última década" *Química nova* 30 (4): 935-951

[22] <http://www.worldagroforestrycentre.org/Sea/Products/AFDbases/AF/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=1786#Identity> (consultado em 20.06.2009)

[23] http://en.wikipedia.org/wiki/Rosy_Periwinkle (consultado em 17.02.2009)

[24] <http://www.traderscity.com/board/products-1/offers-to-sell-and-export-1/catharanthus-roseus-madagascar-periwinkle-vinca-rosa-buy-from-cultivator-13673/> (consultado a 30.03.2009)

[25] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18069233?dopt=Abstract> (consultado em 17.02.2009)

[26] Tener, B., Orhan, I., Satayavivad, J. (2003) "Antimalarial Activity Screening of Some Alkaloids and the Plant Extracts from Amaryllidaceae" *Phytotherapy research* 17:1220–1223

- [27] Sener, B., Bingo, F., Erdogan, I., Bowers, W.S., Evans, P.H. (1998) "Biological activities of some Turkish medicinal Plants" Pure and applied chemistry 70 (2): 403-406
- [28] http://www.wholesale-pots.com/acatalog/Bulbs_By_Taylors_Bulbs.html (consultado em 10.02.2008)
- [29] http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.UPWTA.4_764&pgs=&cookieSet=1 (consultado em 17.02.2009)
- [30] <http://www.steenboknaturereserve.org.za/flowers/index.html> (consultado em 10.02.2008)
- [31] http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=158430 (consultado em 17.02.2009)
- [32] http://www.metafro.be/prelude/view_reference?ri=VM%20k (consultado em 19.02.2009)
- [33] www.plantzafrica.com/planttuv/vernonglabra.htm (consultado em 10.02.2008)
- [34] <http://www.plantzafrica.com/plantnop/pittosporumvirid.htm> (consultado em 17.02.2009)
- [35] <http://www.plantzafrica.com/plantnop/pittosporumvirid.htm> (consultado em 10.02.2008)
- [36] <http://www.ingentaconnect.com/content/rpsgb/jpp/2006/00000058/00000012/art00001?token=005110cd405847447b23562f7c40386f3120634c4833757e6f3f2f2730673f582f6bec3e210cee161> (consultado em 17.02.2009)
- [37] <http://herbalguides.com/guides/chanca-piedra> (consultado em 17.0.2.2009)

[38] www.indianetzone.com/2/phyllanthus.htm (consultado em 10.02.2008)

[39] <http://www.asturnatura.com/especie/mercurialis-annua.html> (consultado em 17.02.2009)

[40] <http://foroantiguo.infojardin.com/showthread.php?t=133208> (consultado em 10.02.2008)

[41] <http://www.ann.com.au/herbs/Monographs/euphp.htm> (consultado em 05.11.2008)

[42] www.dq.fct.unl.pt/qoa/research.html (consultado em 10.02.2008)

[43] Araújo, M. (2005) Química analítica aplicada aos produtos naturais. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal

[44] <http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm> (consultado em 20.03.2009)

[45] <http://www.scielo.br/pdf/cr/v27n1/a09v27n1.pdf> (consultado em 20.03.2009)

[46] <http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v11n4/artigo05.pdf> (consultado em 20.06.2009)

[47] <http://www.medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2005/culturacelular.ppt> (consultado em 20.03.2009)

[48] Lee, B. J., Singh, A., Chiang, P., Kemp, S. J., Goldman, E. A., Weinhouse, M. I., Vlasuk, G. P., Rosenthal, P. J. (2003) "Antimalarial Activities of Novel Synthetic Cysteine Protease Inhibitors" *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12): 3810-3814

- [49] Pandey, K. C., Singh, N., Arastu-Kapur, S., Bogyo, M., Rosenthal, P. J. (2006) "Falstatin, a Cysteine Protease Inhibitor of Plasmodium falciparum, Facilitates Erythrocyte Invasion" PLoS Pathogens 2 (11): 1031-1041
- [50] Caldeira, R., Martins, T. M., Silveira, H., Rosário, V. E. do, Novo, C., Domingos, A. (2009) "Chabaupain-1 a Cysteine protease can be detected in protein midgut extracts of plasmodium infected Anopheles mosquitoes"
- [51] www.thieme-connect.com/ejournals (consultado em 19.08.2008)
- [52] Lee, B. J., Singh, A., Chiang, P., Kemp, S. J., Goldman, E. A., Weinhouse, M. I., Vlasuk, G. P., Rosenthal, P. J. (2003) "Antimalarial Activities of Novel Synthetic Cysteine Protease Inhibitors" Antimicrobial agents and chemotherapy, 47 (12): 3810-3814
- [53] Sijwal, P. S., Kato, K., Seydel, K. B., Gut, J., Lehman, J., Klemba, M., Goldberg, D. E., Miller, L. H., Rosenthal, P. J., (2004) "Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites" 101 (23): 8721-8726
- [54] <http://www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/proteases2.htm> (consultado em 12.12.2008)
- [55] Sousa, D. M. M., Amorim, T. M. L. Sales, M. P. Vidal, M. S. (2006) "Identificação de Genótipos de Algodão (*Gossypium* spp.) Quanto à Presença de Inibidores de Proteases" Estudo de Biologia 28 (65): 97-103
- [56] http://books.google.pt/books?id=LZWOfRnR1qYC&pg=PA181&lpg=PA181&dq=calcium+hypochlorite+disinfection+seeds+tween+ethanol+70%25&source=bl&ots=8YIERRkHdM&sig=jAoKujh3xSNpSe43qgiFoOKsP-8&hl=pt-PT&ei=HgxOSvrxF-HRjAfPja2qBQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4 (consultado em 10.02.2008)

- [57] http://repositorio.up.pt/aberto/bitstream/10216/9722/3/4575_TM_01_P.pdf (consultado em 19.06.2008)
- [58] da Silva, R. L., Sousa, C., dos Santos, R. P., Miranda, R. M. (2003) "Regeneração *in vitro* de explantes de segmentos nodais de *Catharanthus roseus* sob diferentes combinações de auxina e citocinina" *Agronomia* 37 (1): 50 – 54
- [59] Twining, S.S. (1984) "Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes" *Analytical chemistry* 143: 30 - 34
- [60] Heussen C., Dowdle E.B. (1980) "Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates". *Analytical biochemistry* 1080 (102) 196 –202
- [61] Weber, K., Osborn, M. (1969) "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis". *Biological chemistry* 244, 4406–4412)
- [62] Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., Buela, L. I. (2001) "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts". *Phytomedicine* 8 (5): 395–400
- [63] Ruebhart, D. R., Cock, I. E., Shaw, G. R. (2007) "Brine Shrimp Bioassay: Importance of Correct Taxonomic Identification of *Artemia* (Anostraca) Species". RUEBHART, COCK, AND SHAW: 555-560
- [64] Krishnaraju, A. V., Rao, T. V. N., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H. S., Subbaraju, G. V. (2005) "Assessment of Bioactivity of indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay". *International journal of applied science and engineering* 3 (2): 125-134

[65] Wanyoike, G.N., Chhabra, S.C., Lang'at-Thoruwa, C.C., Omar, S.A. (2004) "Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenyan medicinal plants" *Journal of ethnopharmacology* 90: 129–133

[66] <http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/Cultura%20de%20tecidos%20de%20plantas%20medicinais.PDF> (consultado em 26.06.2009)

[67] <http://www.tissuequickplantlabs.com/paphgermination.htm> (consultado em 26.02.2009)

[68] Coppi, A., Cabinian, M., Mirelman, D., Sinnis, P. (2006) "Antimalarial Activity of Allicin, a Biologically Active Compound from Garlic Cloves" *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50 (5): 1731–1737

[69] <http://siaibib01.univali.br/pdf/Vania%20Floriani%20Noldin.pdf> (consultado em 26.02.2009)

[70] http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/33/TDE-2008-09-24T062006Z-1367/Publico/texto%20completo.pdf (consultado em 26.02.2009)

[71] Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., (2008) "Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery" *Oxford Journals* 24 Jun 2008

[72] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Tanino> (consultado em 12.12.2008)

[73] Andrade-Neto, V. F., et all (2004) "Antimalarial Activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) Ethanol Extracts From Wild Plants Collected in Various Localities or Plants Cultivated in Humus Soil" *Phytoterapy research* 18: 634–639

[74] Pisutthanan, S. *et all* (2004) "Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae" *Naresuan university journal* 2004; 12(2): 13-18

[75] http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_07_7.pdf (consultado em 12.08.2008)

[76] http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WFH-4K9C6S4-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=947519486&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=25af64fffc2e177cf4c8474b7aabec05 (consultado em 20.06.2009)

7. ANEXOS

I. Meio de cultura MS

Macronutrientes (solução stock 8X)

Composição	quantidades g/L
KNO ₃	15,2
NH ₄ NO ₃	13,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	352
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,96
KH ₂ PO ₄	1,36

Micronutrientes (solução stock 200X)

Composição	quantidades g/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,46
ZnSO ₄ .4H ₂ O	1,72
H ₃ BO ₃	1,24
KI	0,166
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005

Fe-EDTA (solução stock 100X)

Composição	quantidades g/L
Na ₂ EDTA	3,72
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78

II. Meio de cultura simples

composição	quantidades g/L
Ca(NO ₃).4H ₂ O	1,8881
KNO ₃	0,506
KH ₂ PO ₄	0,136
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,244
Fe-EDTA	0,005
agar	7

III. SDS-Page

Composição do gel de separação 10% com gelatina 0,1%

Composição	quantidade
Acril Bisacul	3,3 mL
Tris pH 8,8 [3 M]	1250 µL
SDS 10%	100 µL
APS 10%	50 µL
TEMED	20 µL
água destilada	5,3 mL

Composição do Stacking gel 4 %

Composição	quantidade
Acril Bisacul	443 µL
Tris pH 8,8 [0,5 M]	833 µL
SDS 10%	33 µL
APS 10%	16,7 µL
TEMED	3,3 µL
água destilada	2 mL

IV. Tampão PBS pH 7,2

Composição	quantidade (g)
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24

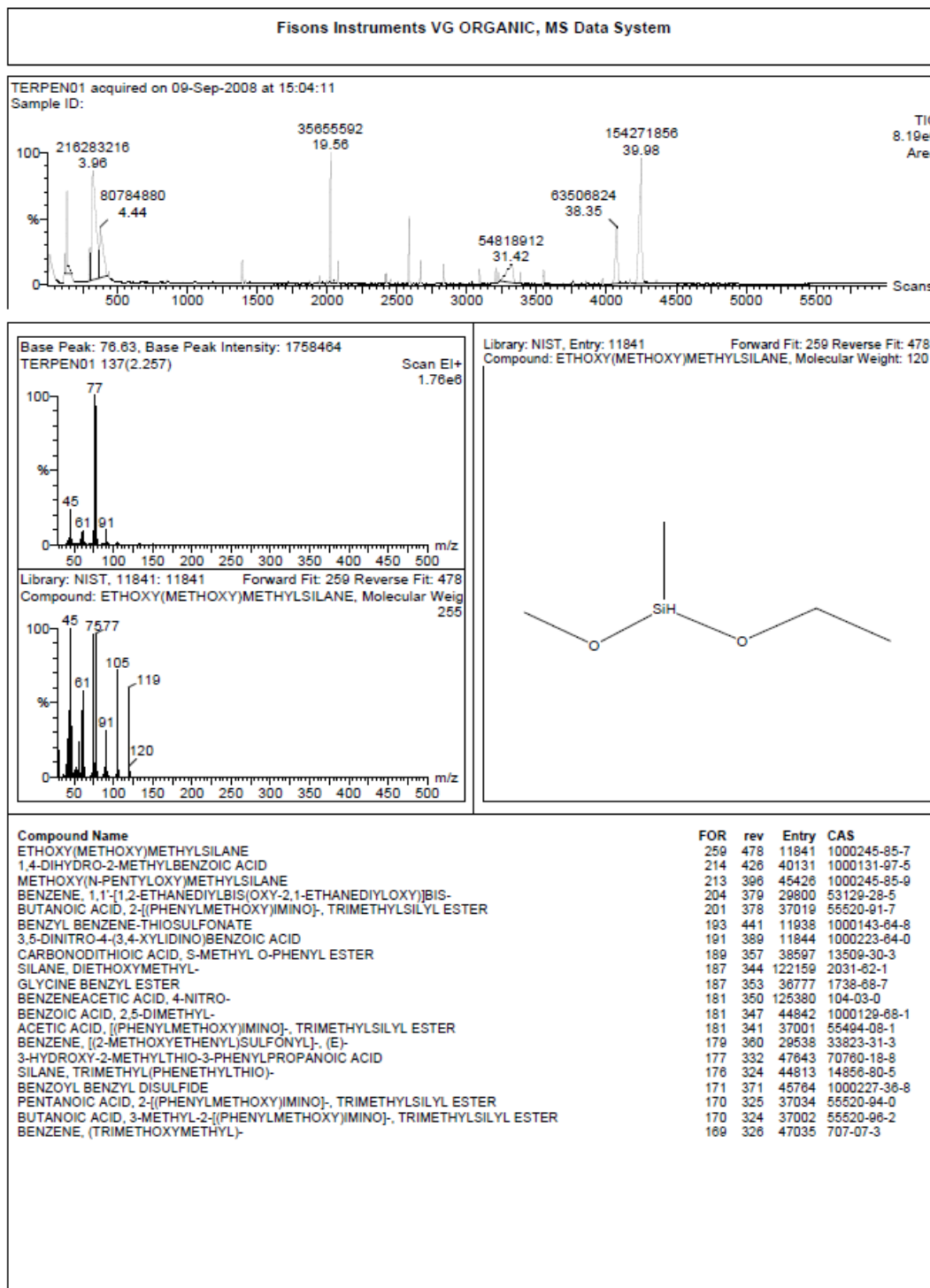
Dissolveu-se em 800 mL de água destilada.

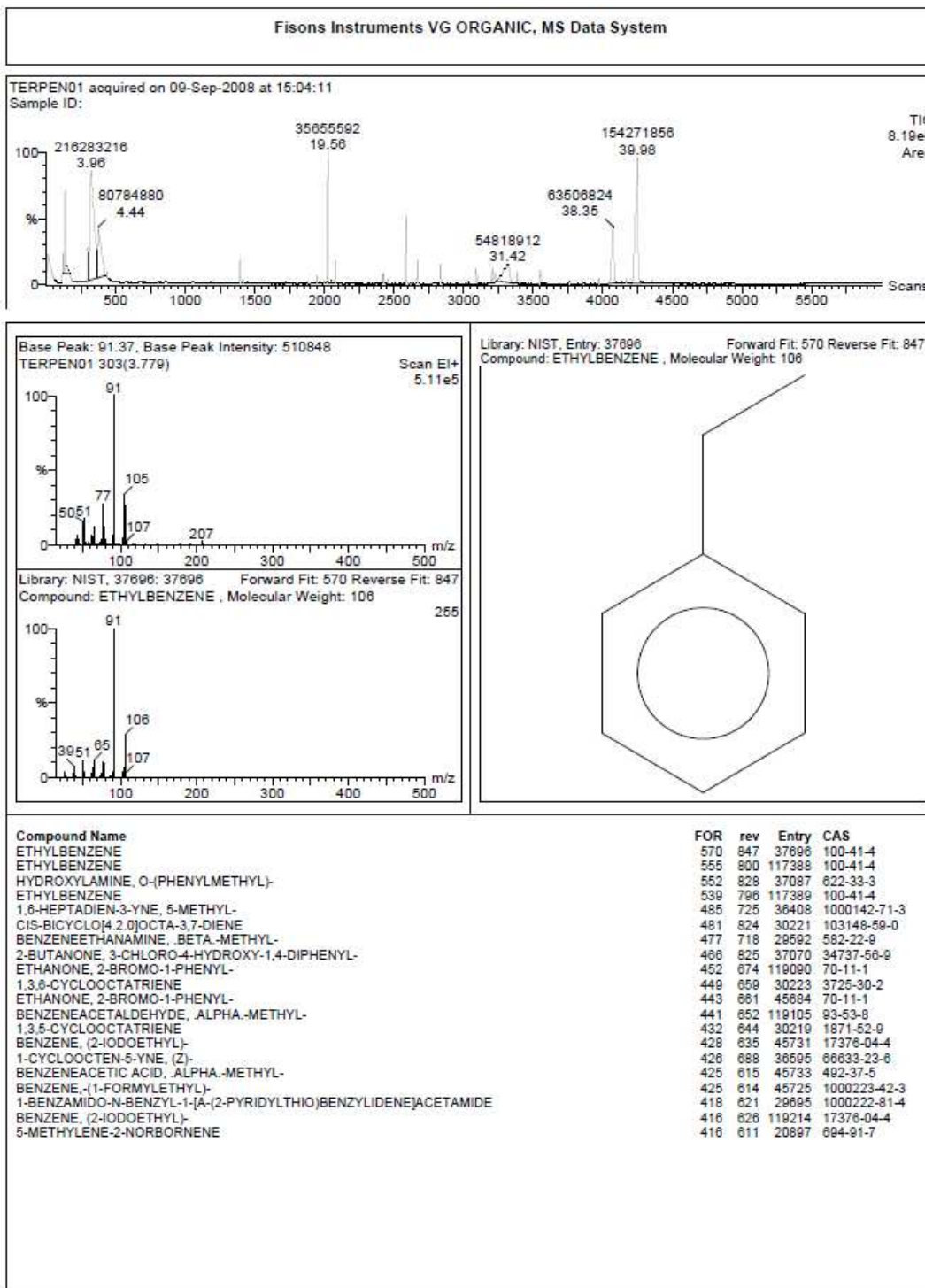
Ajustou-se o pH para 7,2 com HCl ou NaOH.

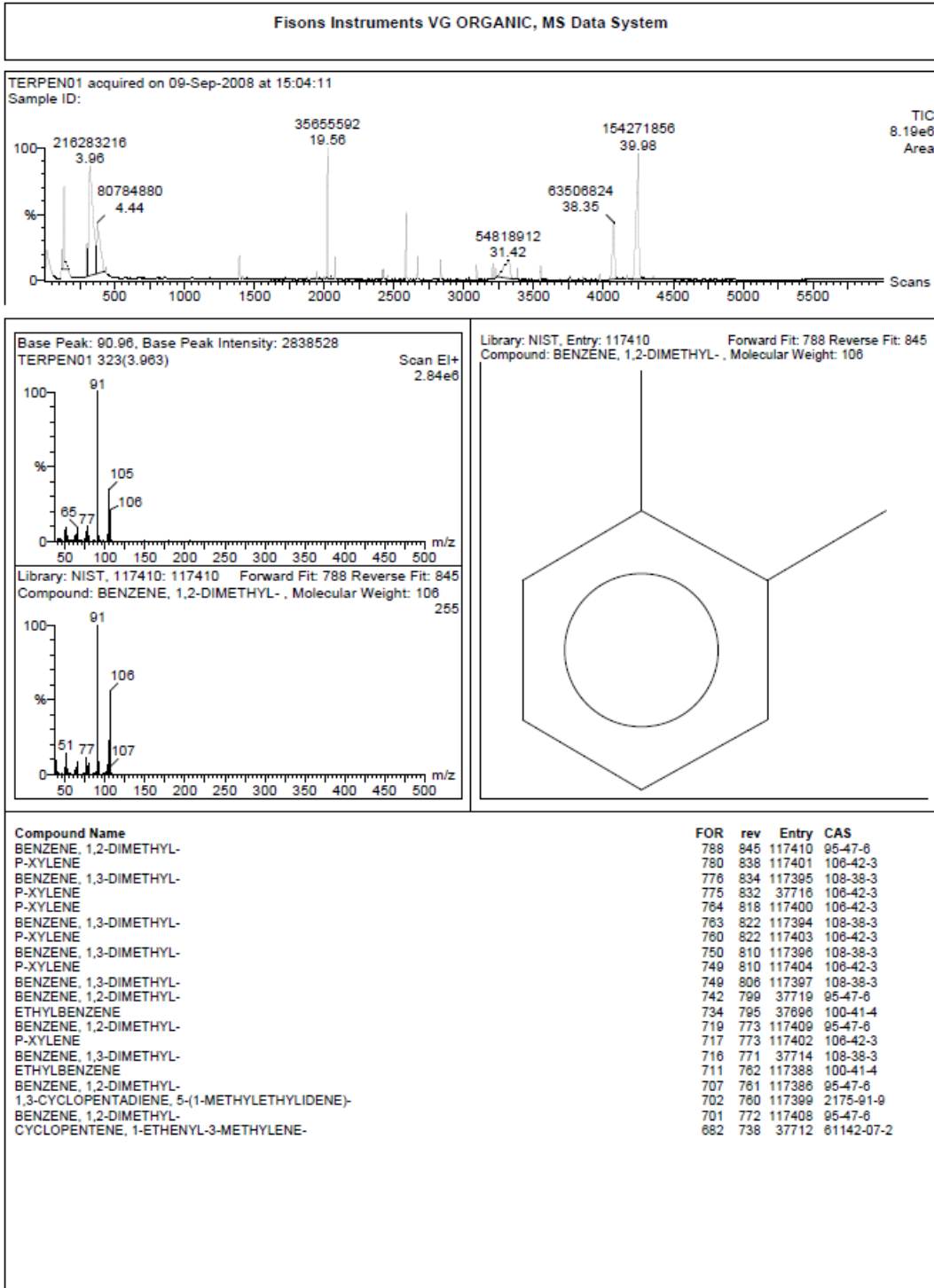
Adicionou-se água destilada até perfazer 1 litro.

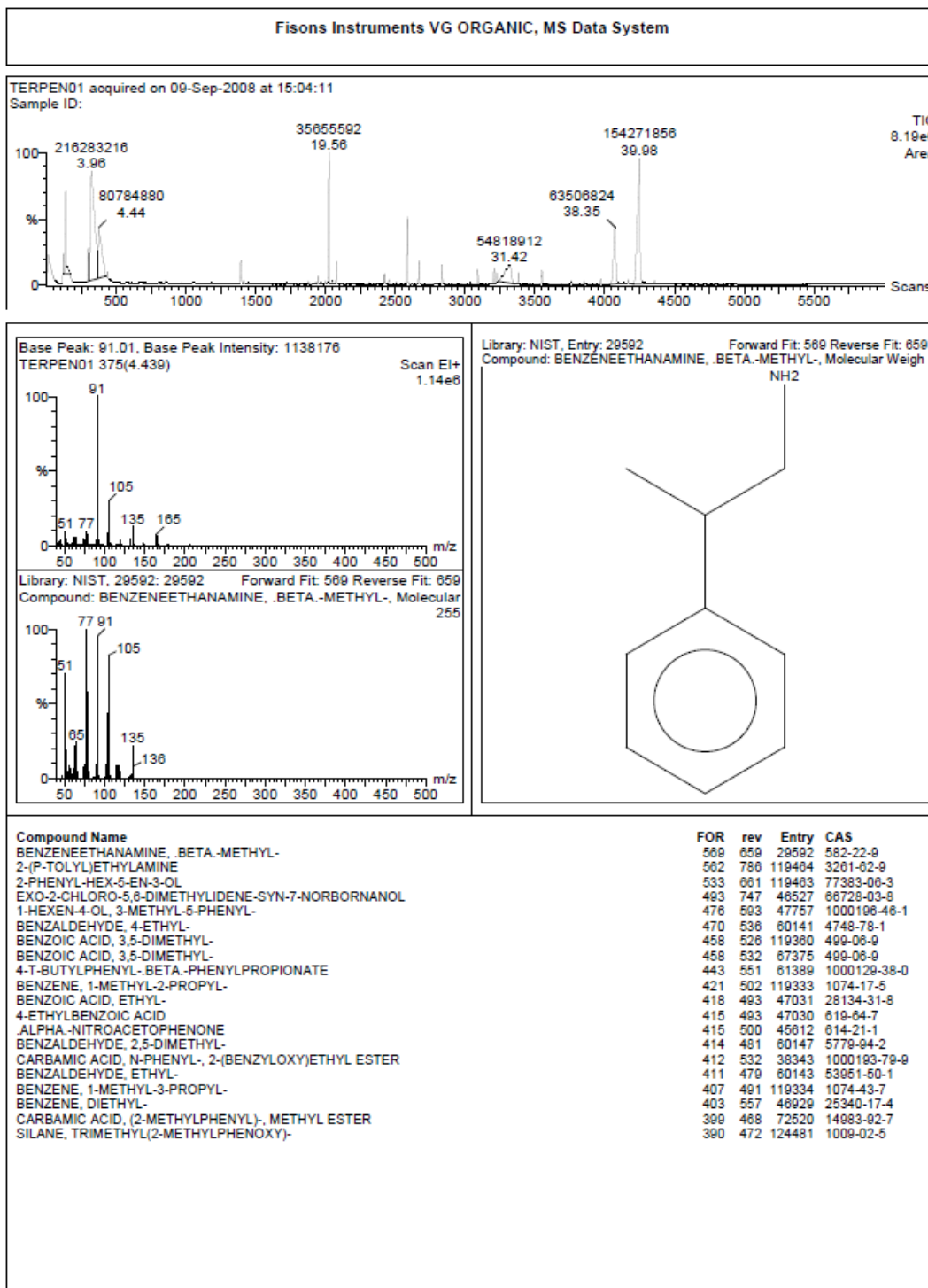
Esterilizou-se solução tampão através de autoclavagem durante 20 minutos a 121°C.

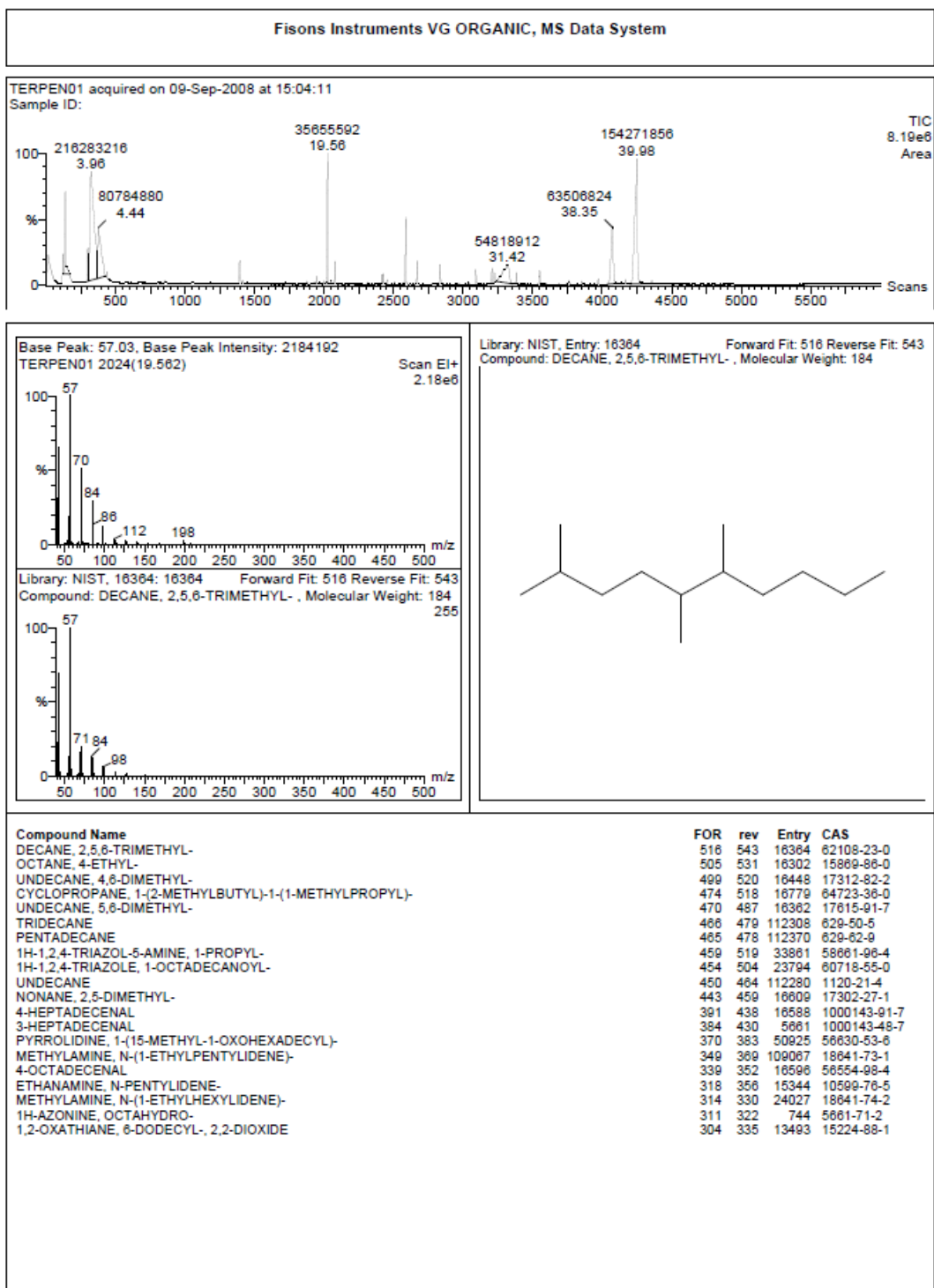
V. Cromatogramas de GC-MS

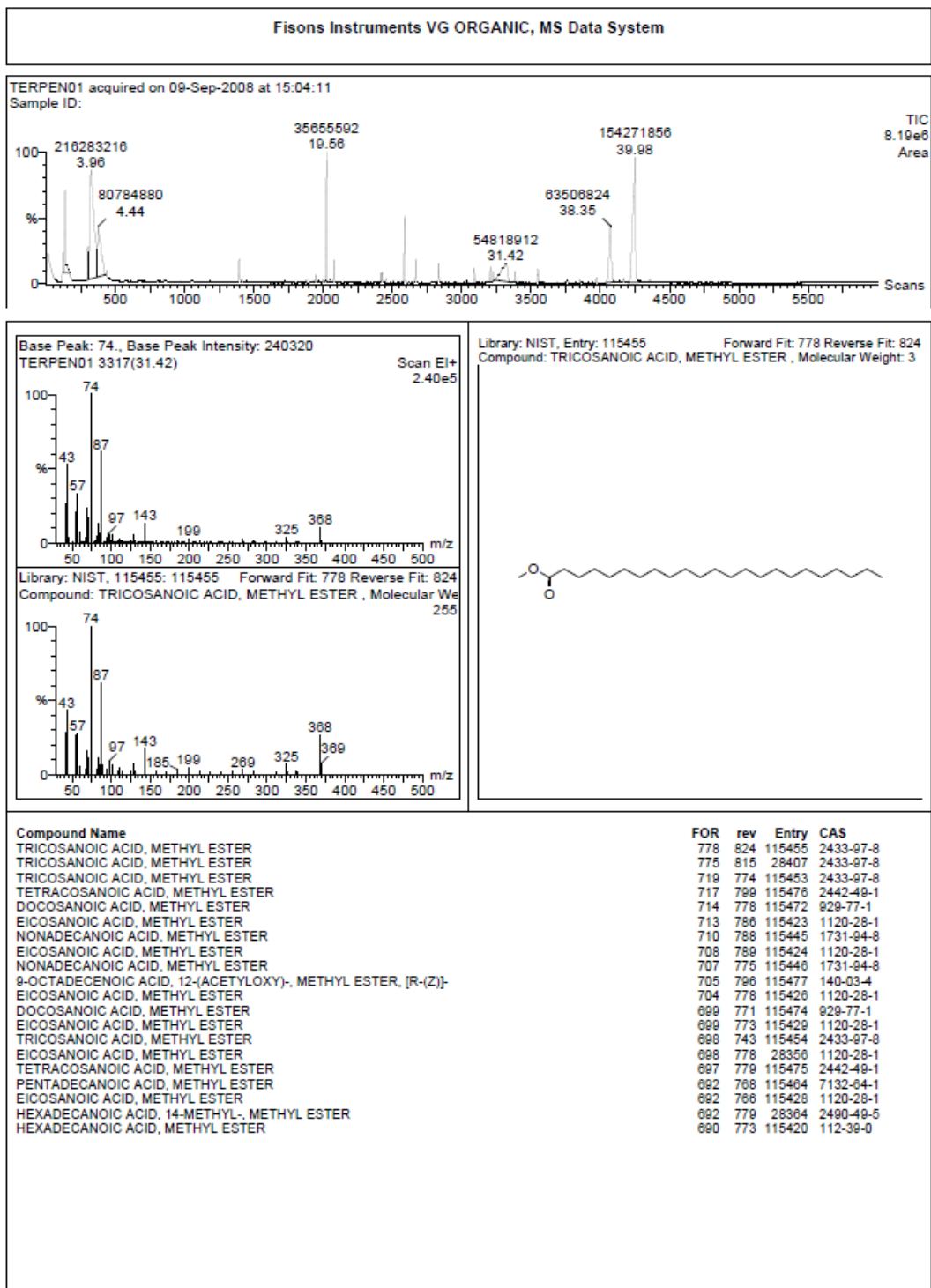


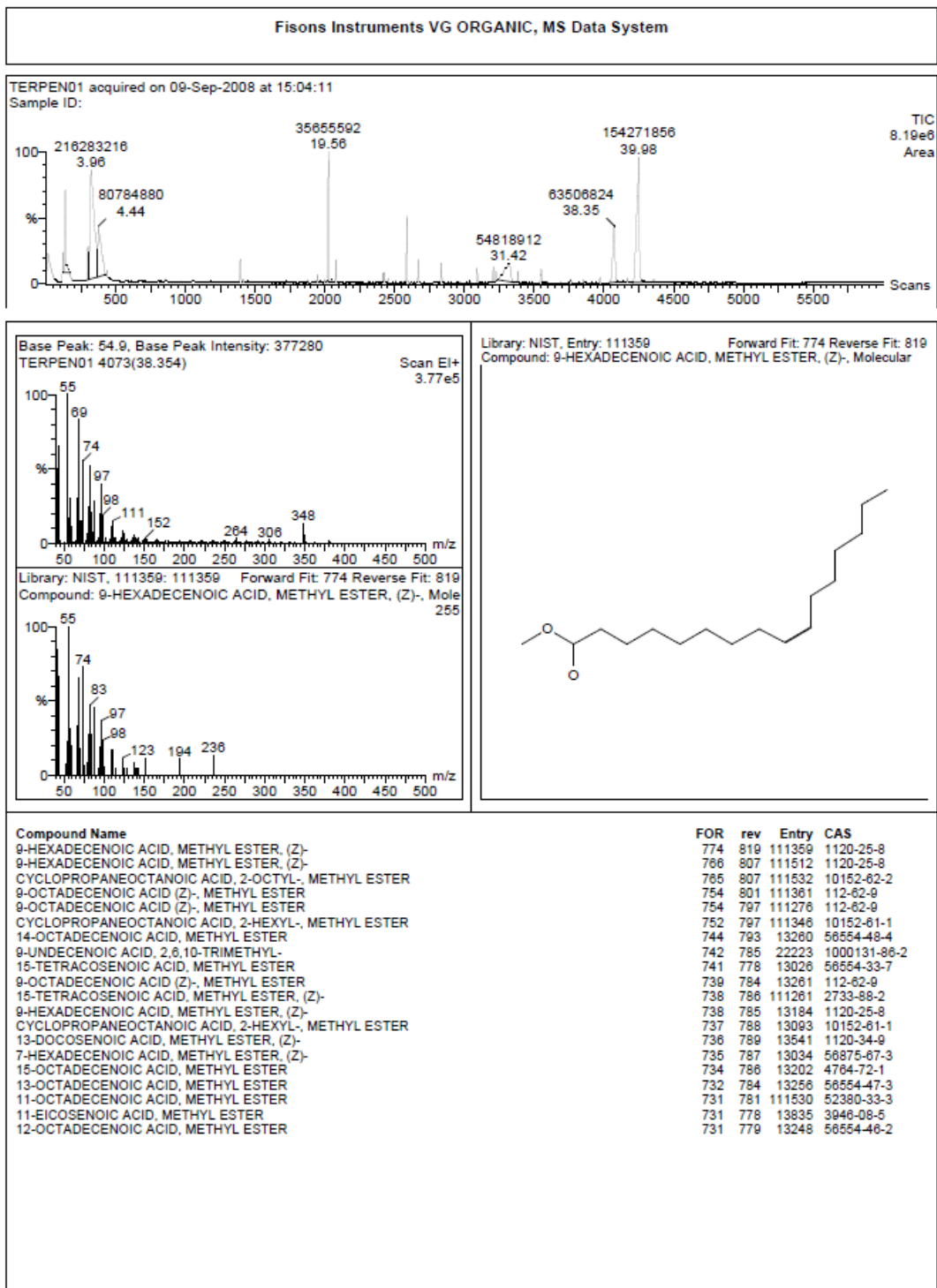


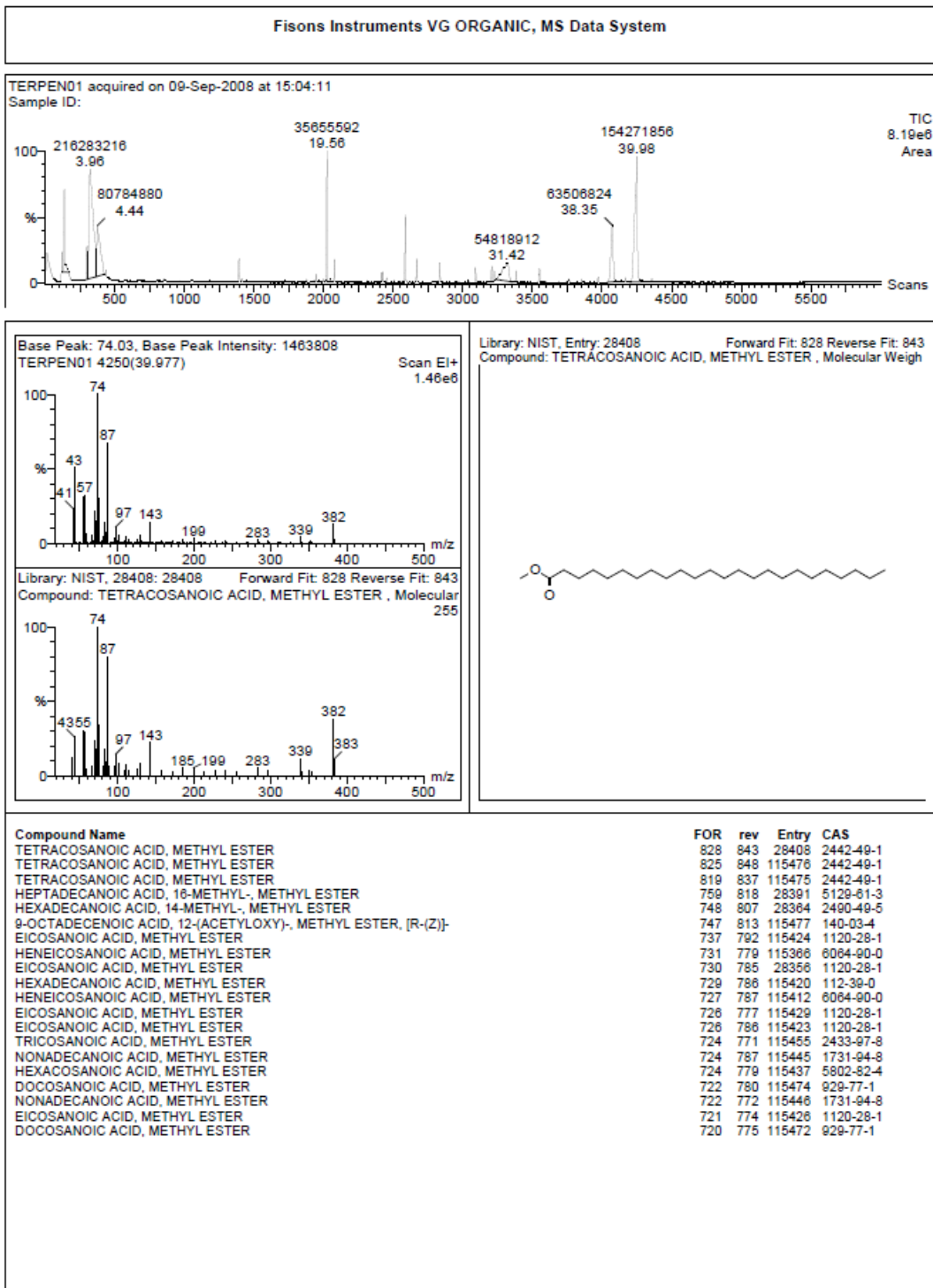




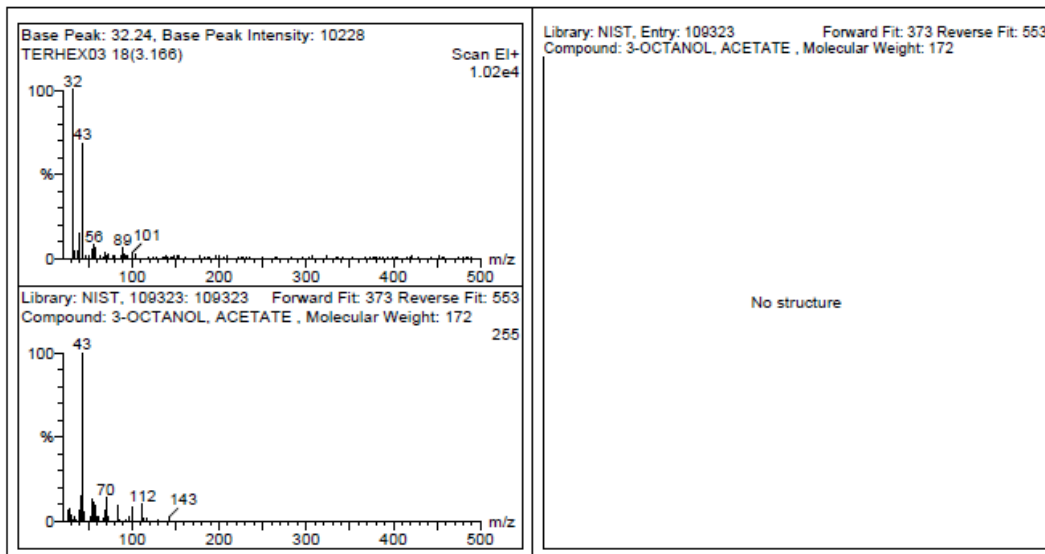
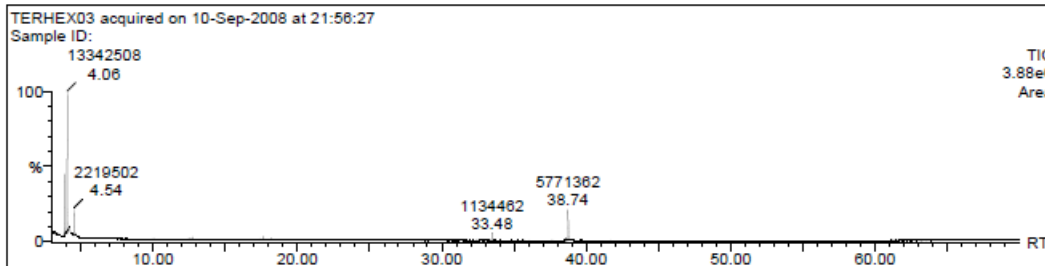






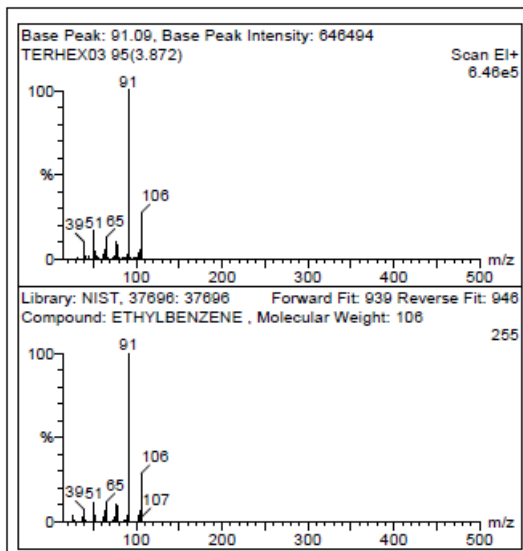
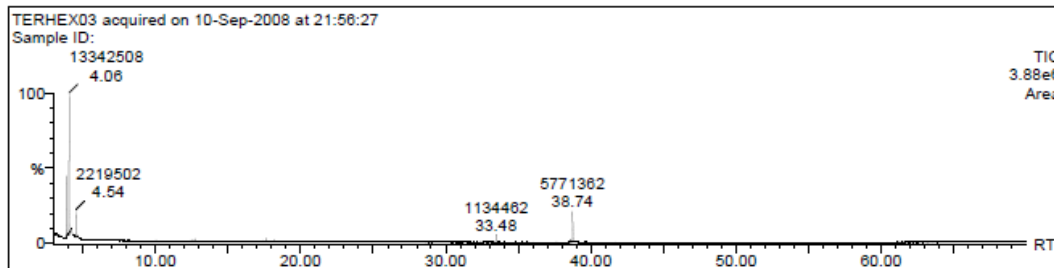


Fisons Instruments VG ORGANIC, MS Data System



Compound Name	FOR	rev	Entry	CAS
3-OCTANOL, ACETATE	373	553	109323	4864-61-3
ACETIC ACID, 1,1-DIMETHYLETHYL ESTER	369	534	109591	540-88-5
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, HEXYL ESTER	355	498	109933	2349-07-7
3-ACETOXPENTADECANE	335	498	4233	1000245-82-1
3-ACETOXYDODECANE	325	468	5441	1000245-81-1
3-ACETOXYTRIDECANE	319	552	4229	1000245-81-3
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, HEXYL ESTER	314	508	109360	2349-07-7
HEXYL ISOPROPYL SUCCINATE	310	511	7713	1000223-35-4
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, BUTYL ESTER	289	385	109936	97-87-0
2-TRIFLUOROACETOXYDODECANE	286	391	4153	1000245-46-9
3-TETRADECANOL ACETATE	279	463	7774	1000131-32-6
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, HEPTYL ESTER	273	377	4335	2349-13-5
BUTANOIC ACID, HEXYL ESTER	272	389	6284	2839-63-6
1-ACETYL-2,2,4-TRIMETHYL-4-PHENYL-1,2,3,4-Tetrahydroquinoline	270	393	4220	1000224-97-6
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, HEPTYL ESTER	259	372	110133	2349-13-5
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, 2-ETHYL-3-HYDROXYHEXYL ESTER	256	361	114627	74367-31-0
1-OCTANAMINE, N-METHYL-N-NITRO-	256	343	10671	54789-28-5
3-TRIFLUOROACETOXYDODECANE	256	369	1708	1000245-47-0
1,3-DIOXOLANE, 2-ETHYL-2-METHYL-	255	382	35311	126-39-6
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, DECYL ESTER	254	361	7292	5454-22-8

Fisons Instruments VG ORGANIC, MS Data System

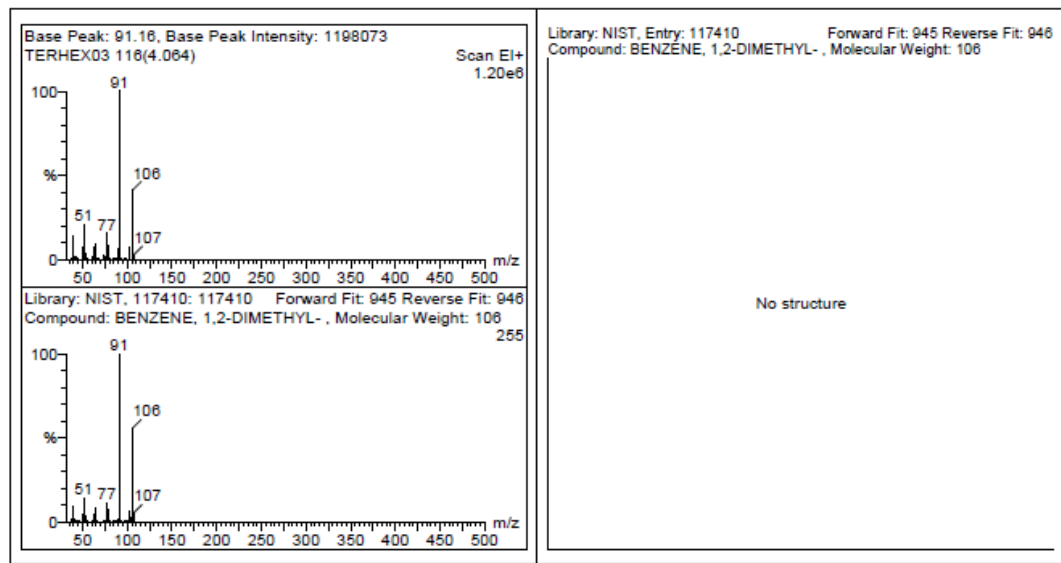
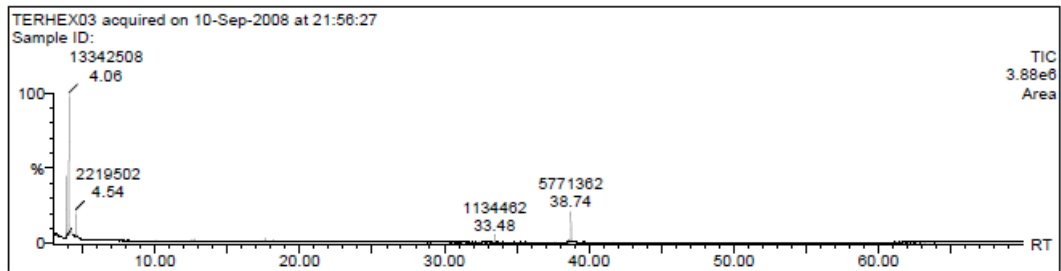


Library: NIST, Entry: 37696 Forward Fit: 939 Reverse Fit: 946
 Compound: ETHYLBENZENE, Molecular Weight: 106

No structure

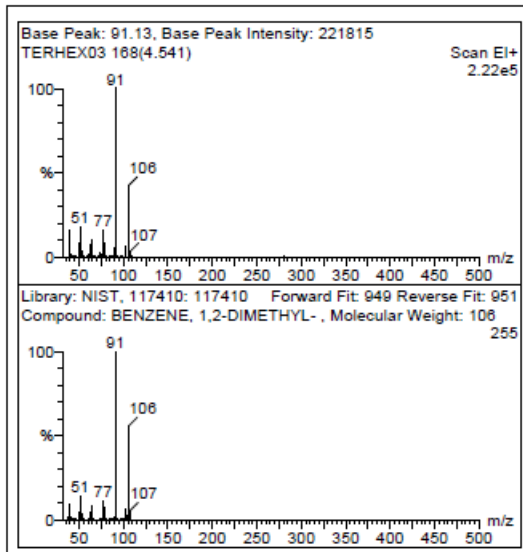
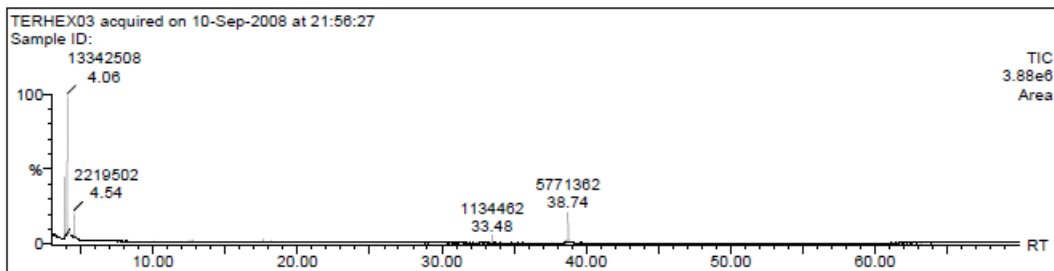
Compound Name	FOR	rev	Entry	CAS
ETHYLBENZENE	939	946	37696	100-41-4
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	925	926	117410	95-47-6
ETHYLBENZENE	915	921	117403	106-42-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	915	919	117388	100-41-4
ETHYLBENZENE	913	918	117396	108-38-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	912	914	117389	100-41-4
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	911	913	37719	95-47-6
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	907	909	117397	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	897	901	117404	106-42-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	893	896	117386	95-47-6
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	889	893	117394	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	886	887	117395	108-38-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	883	885	37716	106-42-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	881	894	117408	95-47-6
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	879	882	117409	95-47-6
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	879	882	117401	106-42-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	877	880	117400	106-42-3
1,3-CYCLOPENTADIENE, 5-(1-METHYLETHYLIDENE)-	873	876	117399	2175-91-9
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	871	873	37714	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	863	866	117402	106-42-3

Fisons Instruments VG ORGANIC, MS Data System



Compound Name	FOR	rev	Entry	CAS
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-	945	946	117410	95-47-6
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-	930	932	117397	108-38-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	926	928	37719	95-47-6
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	924	927	117404	106-42-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	922	925	117394	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	919	942	117396	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	918	942	117403	106-42-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	918	921	117400	106-42-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	918	921	117395	108-38-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	915	919	117401	106-42-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	915	919	37716	106-42-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-P-XYLENE	909	911	117409	95-47-6
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	909	911	37714	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-P-XYLENE	903	905	117402	106-42-3
CYCLOPENTENE, 1-ETHENYL-3-METHYLENE-	889	892	37712	61142-07-2
2,4-OCTADIYNE	862	875	36881	2809-71-4
2,4-OCTADIYNE	853	874	117240	2809-71-4
1,6-HEPTADIEN-3-YNE, 5-METHYL-	831	837	36408	1000142-71-3
BICYCLO[2.1.1]HEX-2-ENE, 2-ETHENYL-	821	827	37118	1000221-36-9
BENZENE, (NITROMETHYL)-	819	823	37519	622-42-4

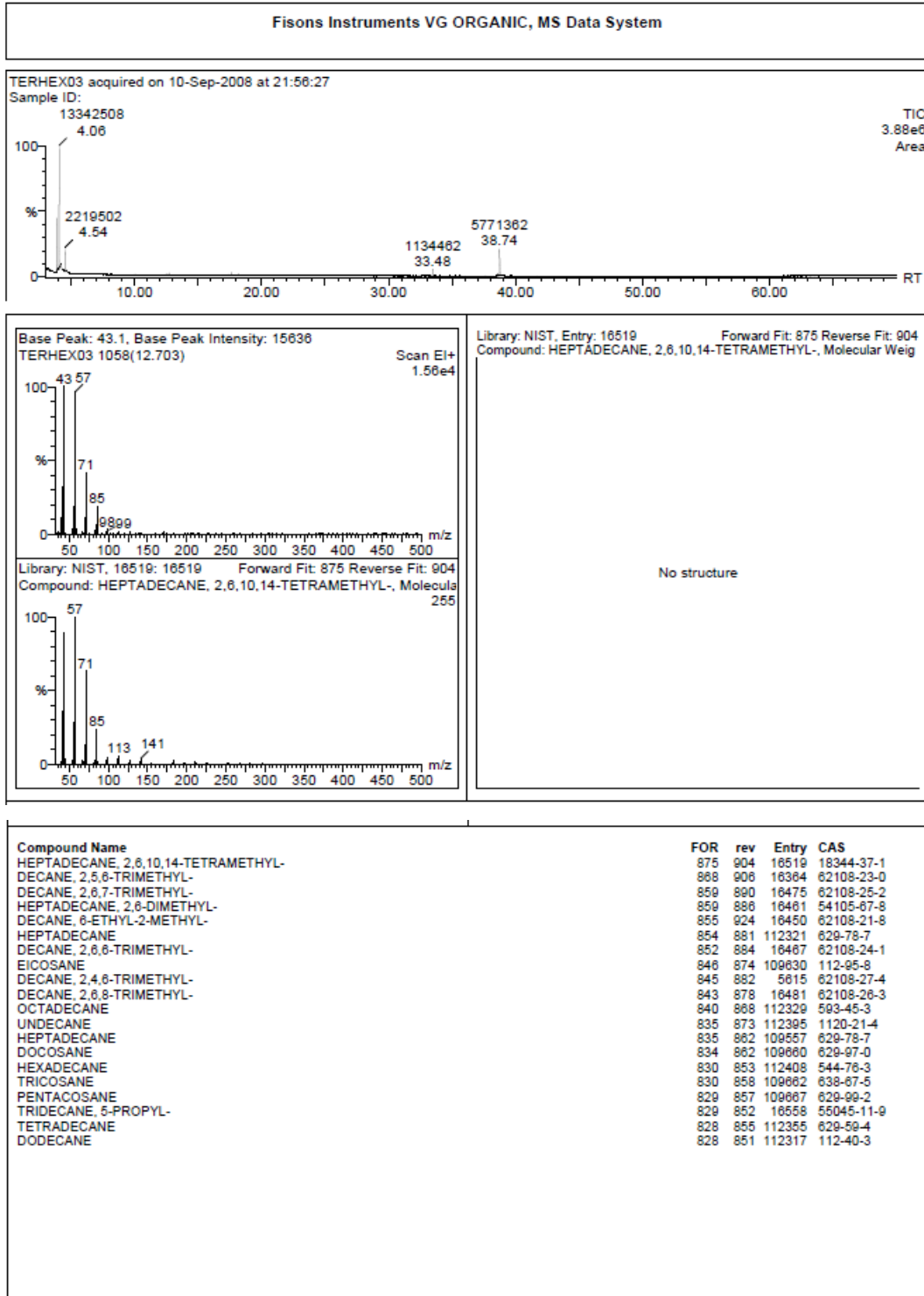
Fisons Instruments VG ORGANIC, MS Data System



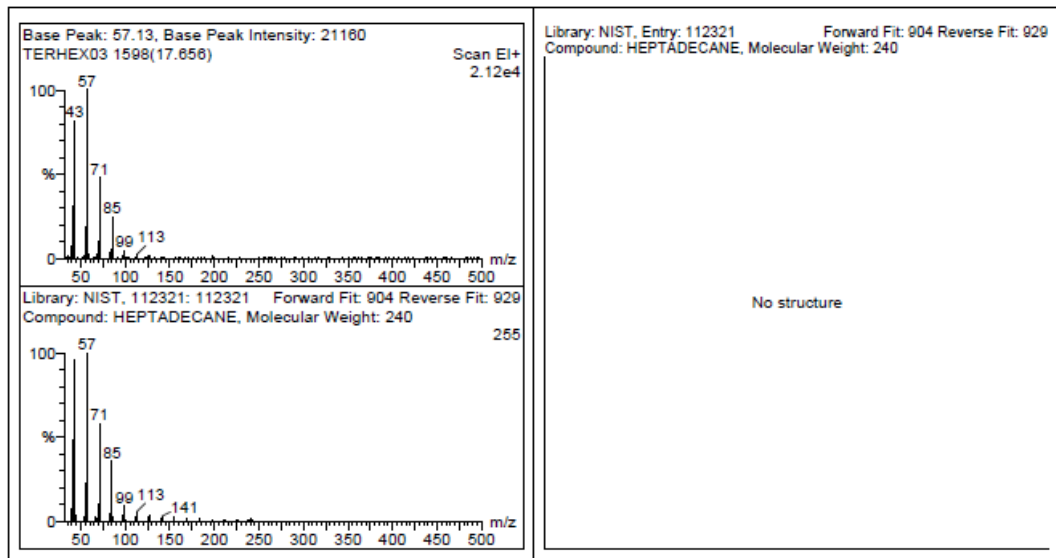
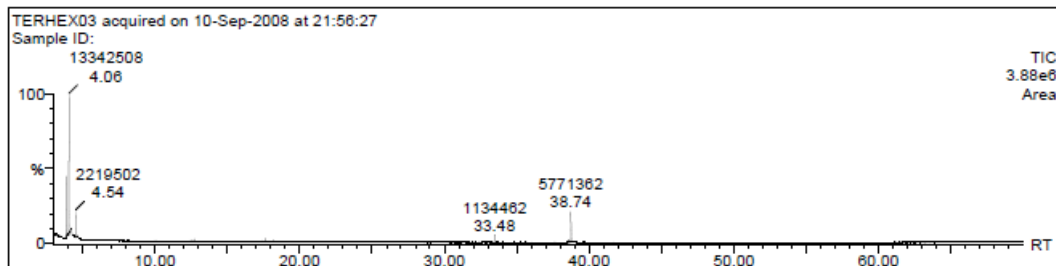
Library: NIST, Entry: 117410 Forward Fit: 949 Reverse Fit: 951
 Compound: BENZENE, 1,2-DIMETHYL-, Molecular Weight: 106

No structure

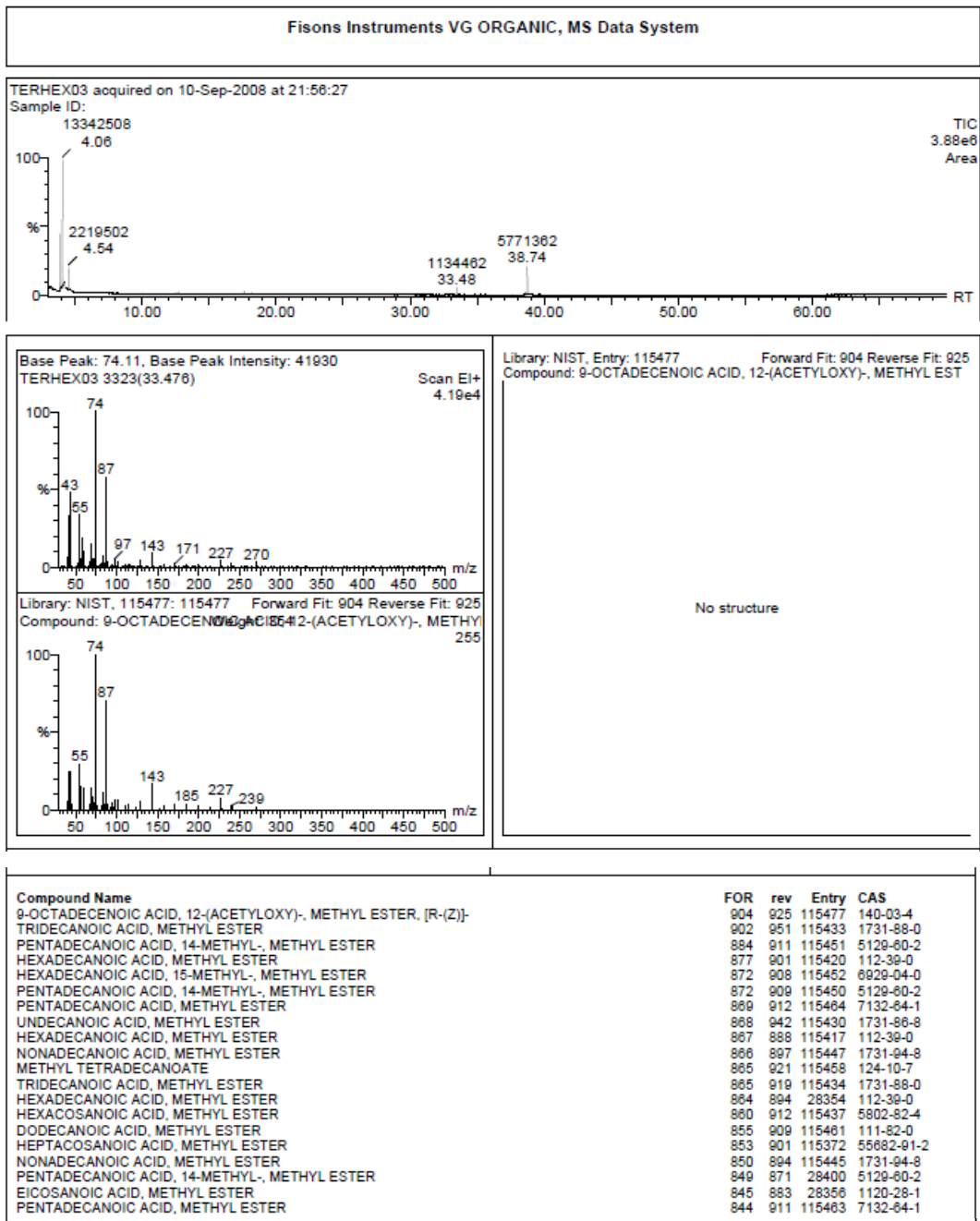
Compound Name	FOR	rev	Entry	CAS
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-	949	951	117410	95-47-6
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-	932	936	117397	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-	928	932	117394	108-38-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-	928	932	37719	95-47-6
P-XYLENE	928	931	117404	106-42-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-	923	948	117396	108-38-3
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-	923	926	117395	108-38-3
P-XYLENE	922	948	117403	106-42-3
P-XYLENE	921	924	117401	106-42-3
P-XYLENE	920	924	37716	106-42-3
P-XYLENE	919	923	117400	106-42-3
1,3-CYCLOPENTADIENE, 5-(1-METHYLETHYLIDENE)-	916	921	117399	2175-91-9
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-	915	919	117386	95-47-6
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-	913	917	117409	95-47-6
BENZENE, 1,3-DIMETHYL-	911	915	37714	108-38-3
P-XYLENE	905	909	117402	106-42-3
BENZENE, 1,2-DIMETHYL-	901	932	117408	95-47-6
ETHYLBENZENE	900	924	37696	100-41-4
ETHYLBENZENE	896	900	117388	100-41-4
CYCLOPENTENE, 1-ETHENYL-3-METHYLENE-	891	895	37712	61142-07-2

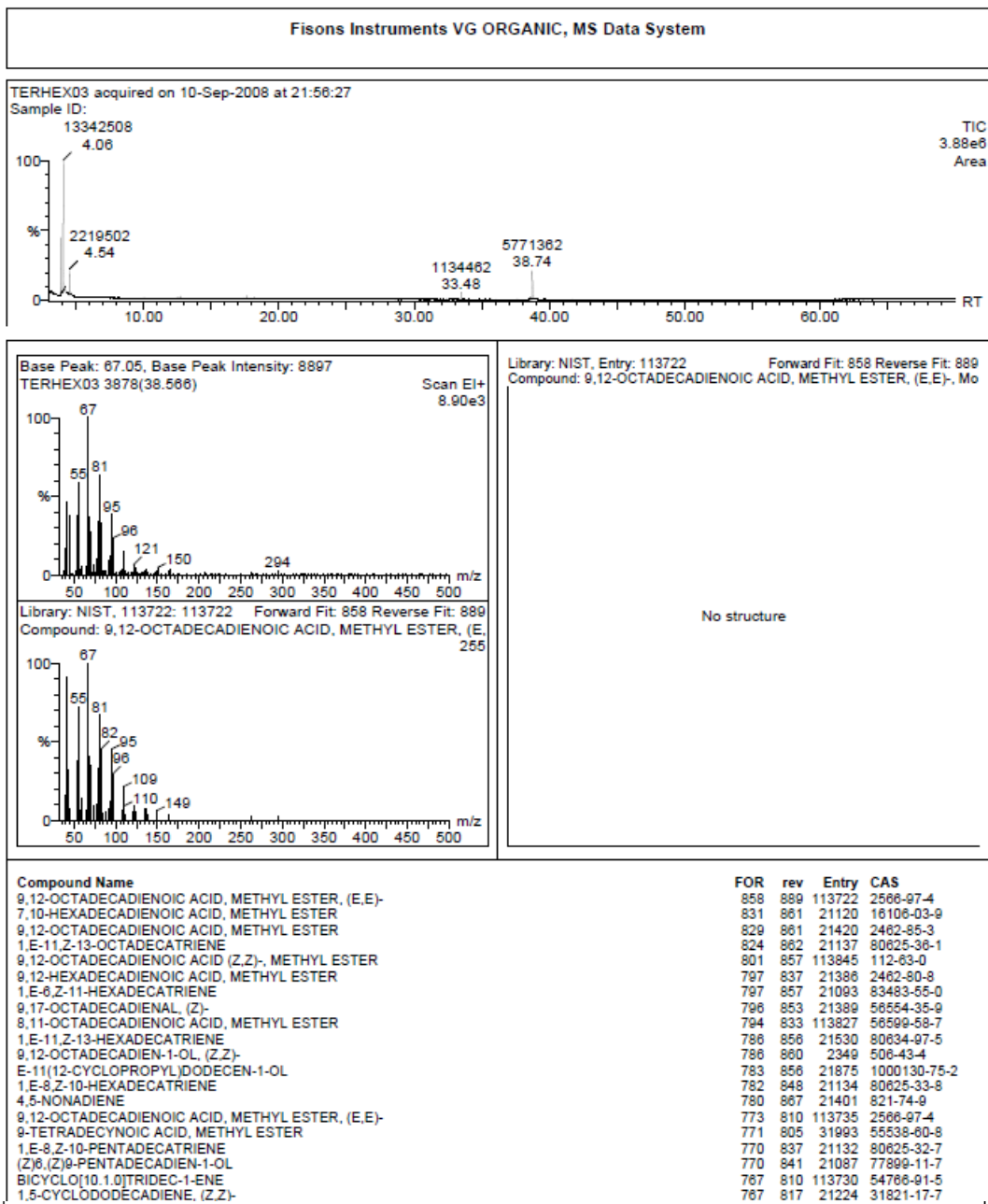


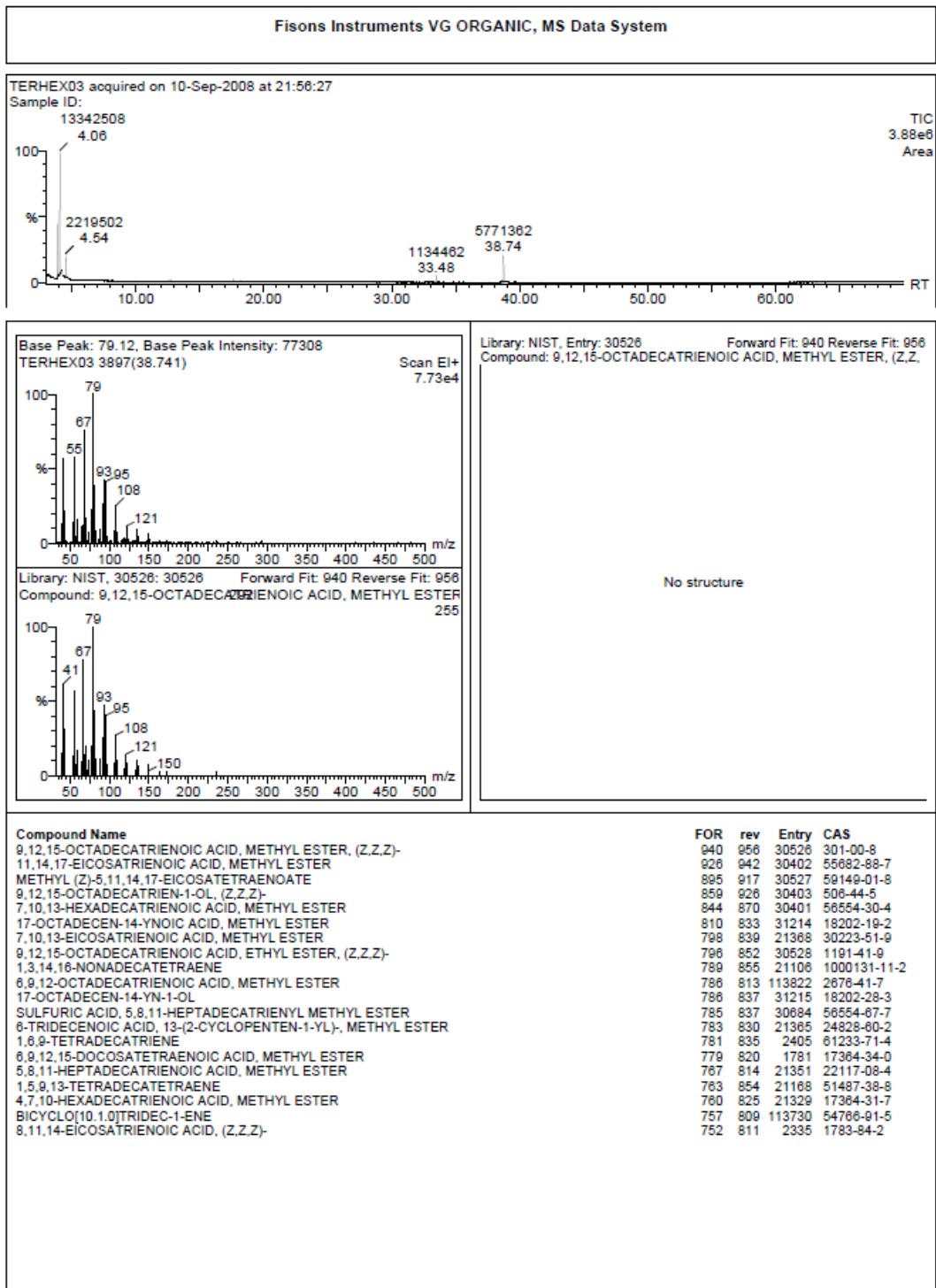
Fisons Instruments VG ORGANIC, MS Data System

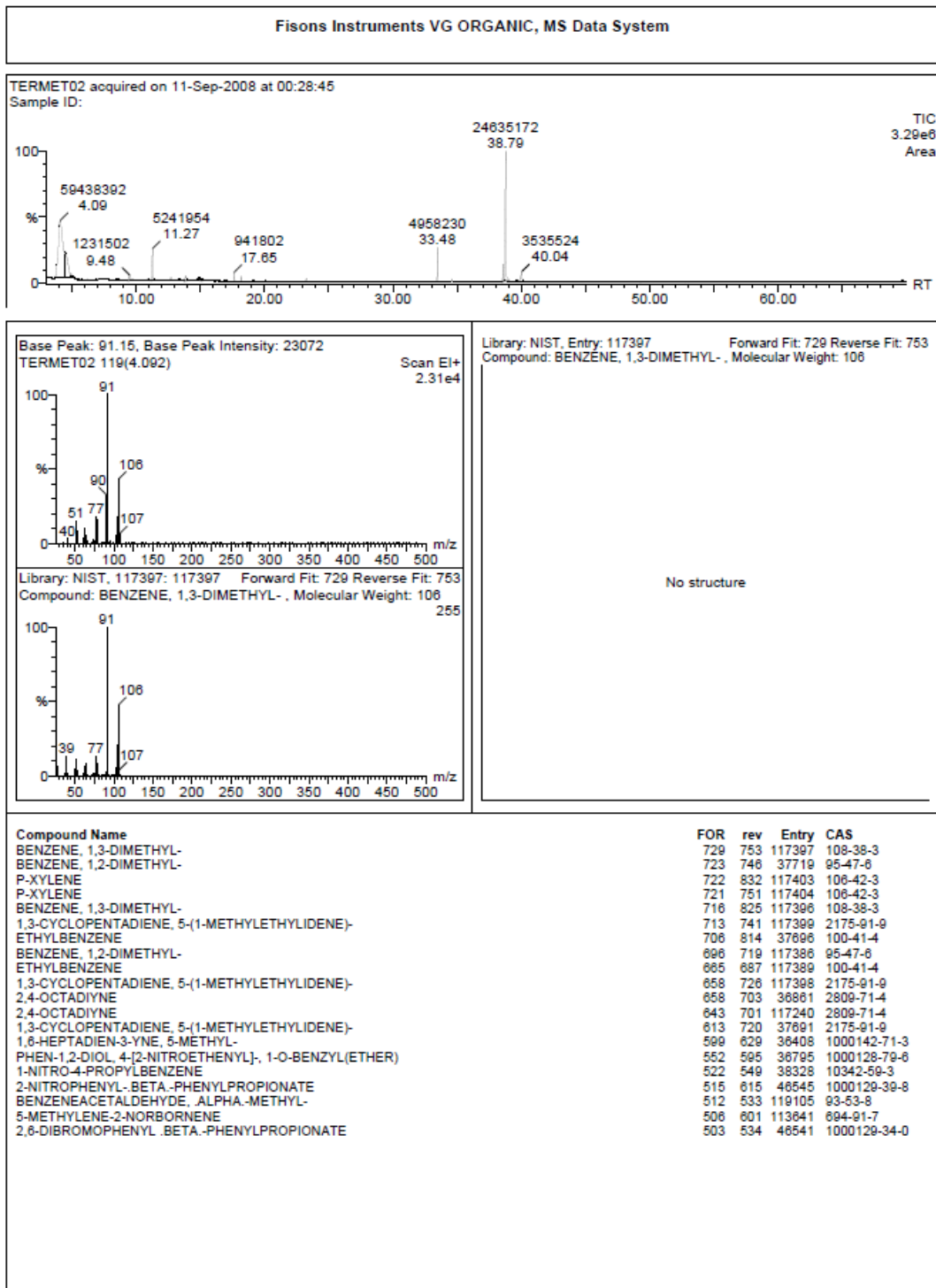


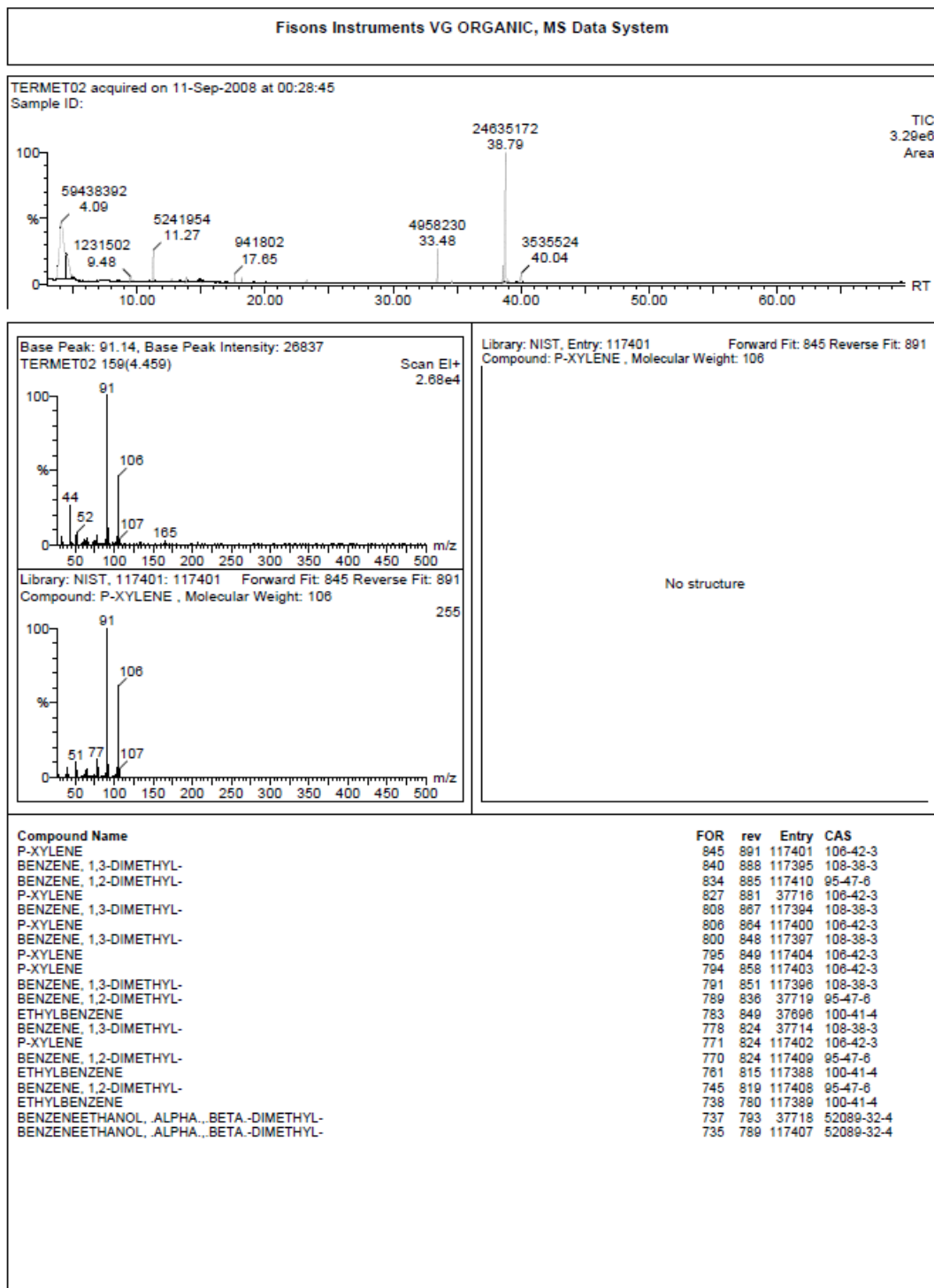
Compound Name	FOR	rev	Entry	CAS
HEPTADECANE	904	929	112321	629-78-7
EICOSANE	897	922	109630	112-95-8
OCTADECANE	896	921	112329	593-45-3
HEPTADECANE, 2,8-DIMETHYL-	894	923	16481	54105-67-8
TETRADECANE	891	930	112358	629-59-4
HEPTADECANE, 2,6,10,14-TETRAMETHYL-	889	929	16519	18344-37-1
HEPTADECANE	888	913	109557	629-78-7
DECANE, 2,6,8-TRIMETHYL-	888	924	16481	62108-26-3
DOCOSANE	887	912	109660	629-97-0
DECANE, 6-ETHYL-2-METHYL-	887	953	16450	62108-21-8
DECANE, 2,6,7-TRIMETHYL-	886	918	16475	62108-25-2
PENTACOSANE	884	909	109667	629-99-2
TRICOSANE	884	908	109662	638-67-5
DECANE, 2,6,8-TRIMETHYL-	883	920	16467	62108-24-1
DECANE, 2,4,6-TRIMETHYL-	880	920	5615	62108-27-4
HENEICOSANE	877	921	109656	629-94-7
DECANE, 2,5,6-TRIMETHYL-	877	920	16364	62108-23-0
TRIDECANE, 5-PROPYL-	876	899	16558	55045-11-9
OCTACOSANE	872	916	109620	630-02-4
TRICOSANE	871	915	109661	638-67-5

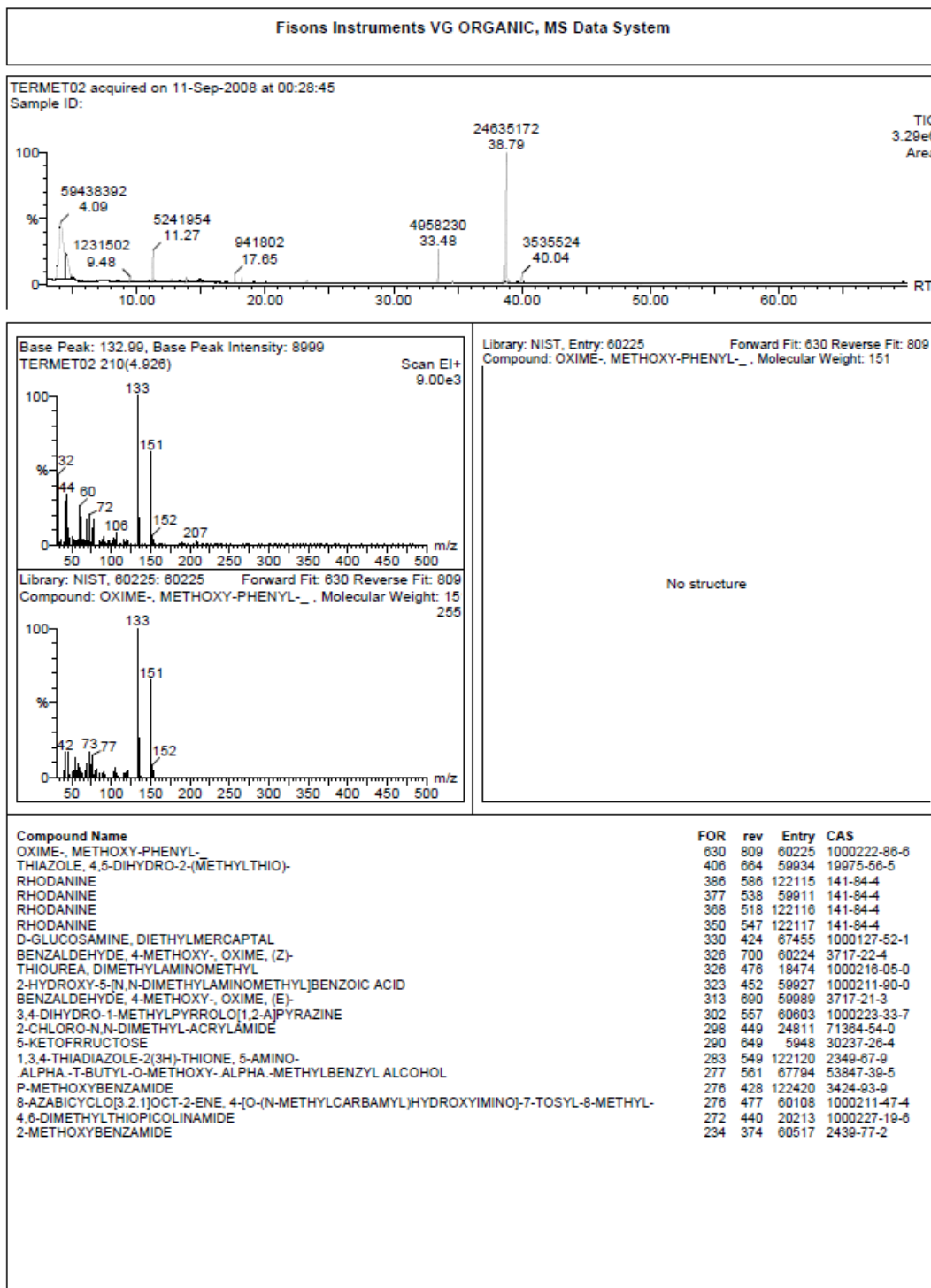


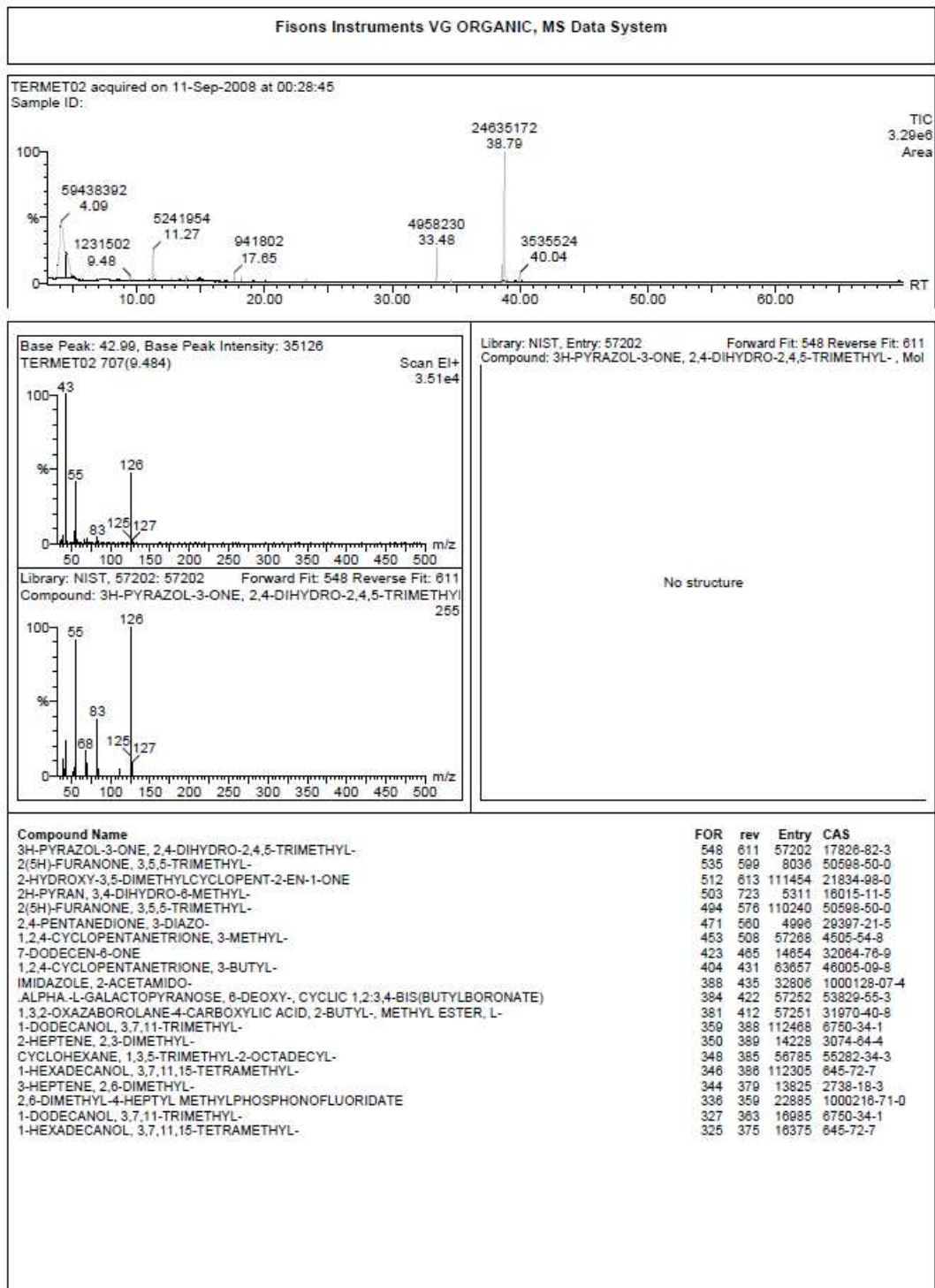


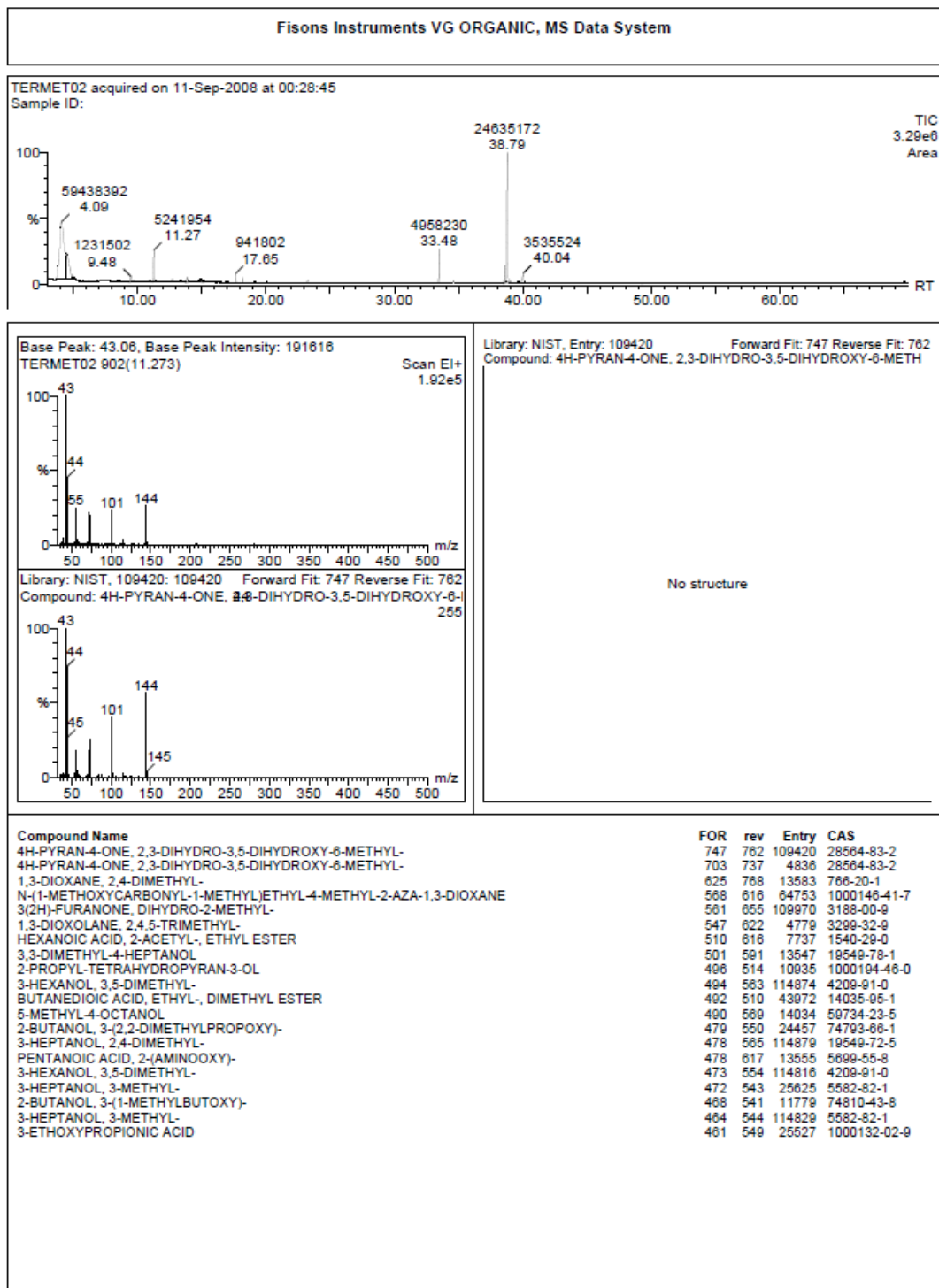


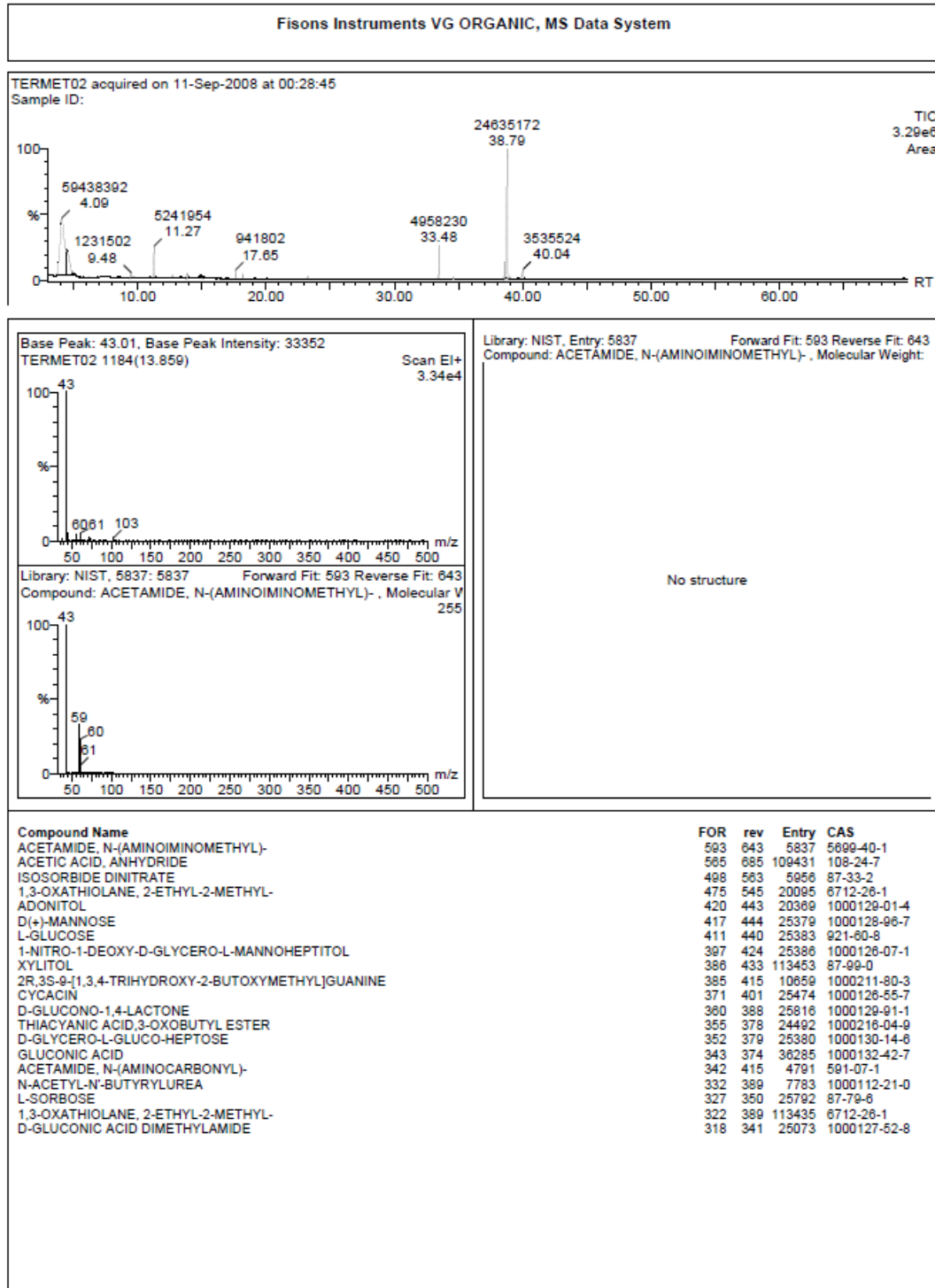


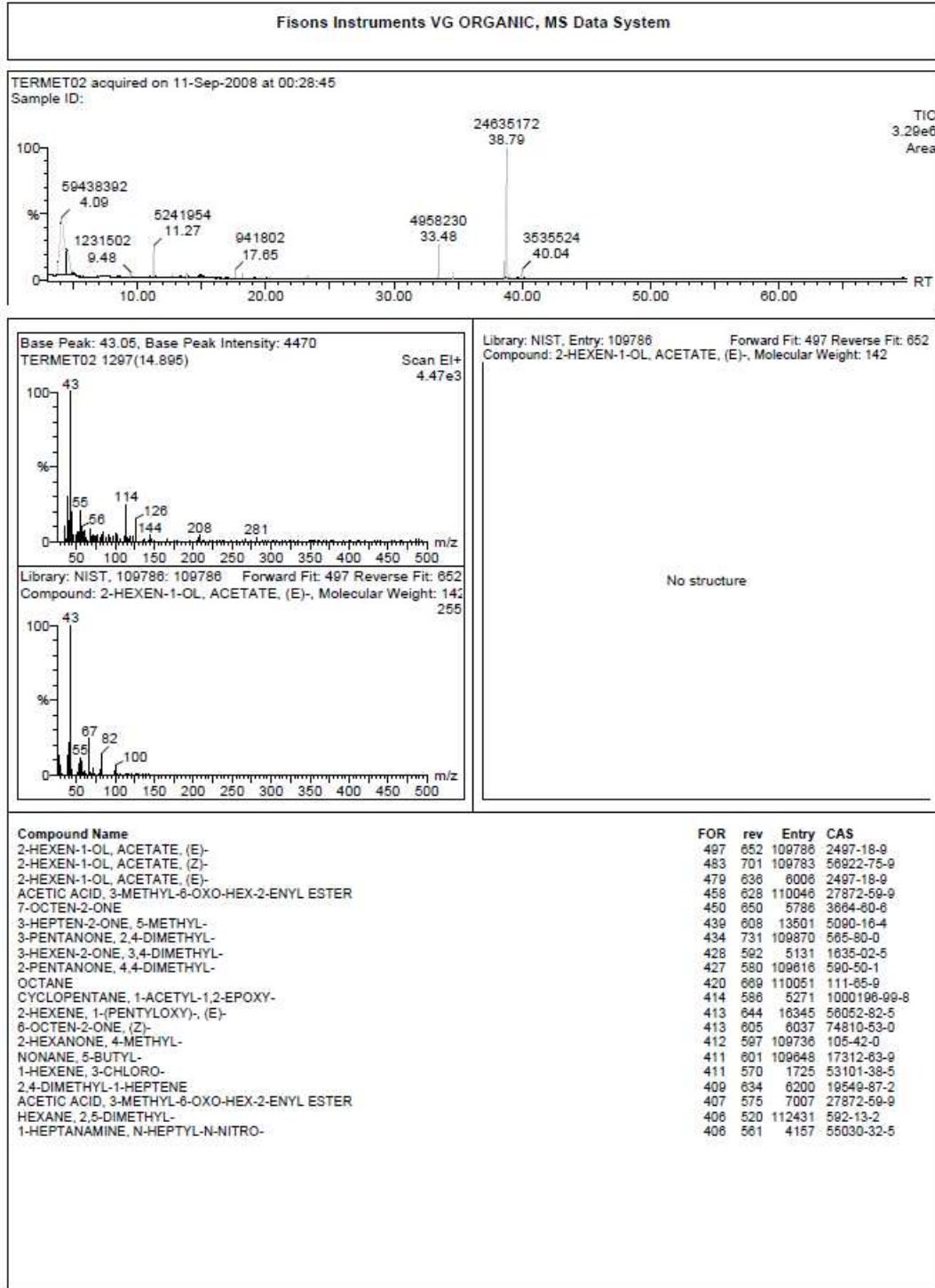


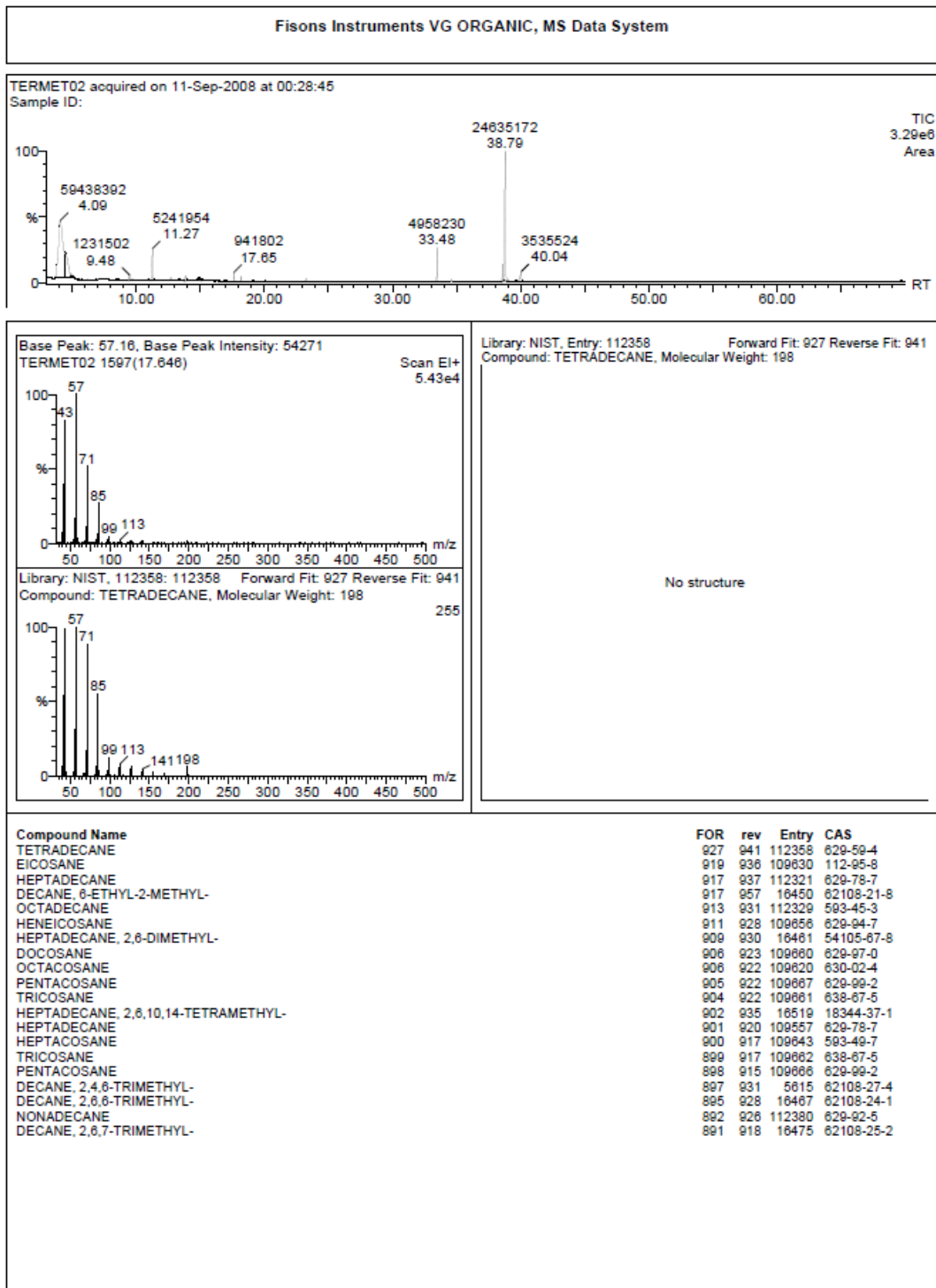


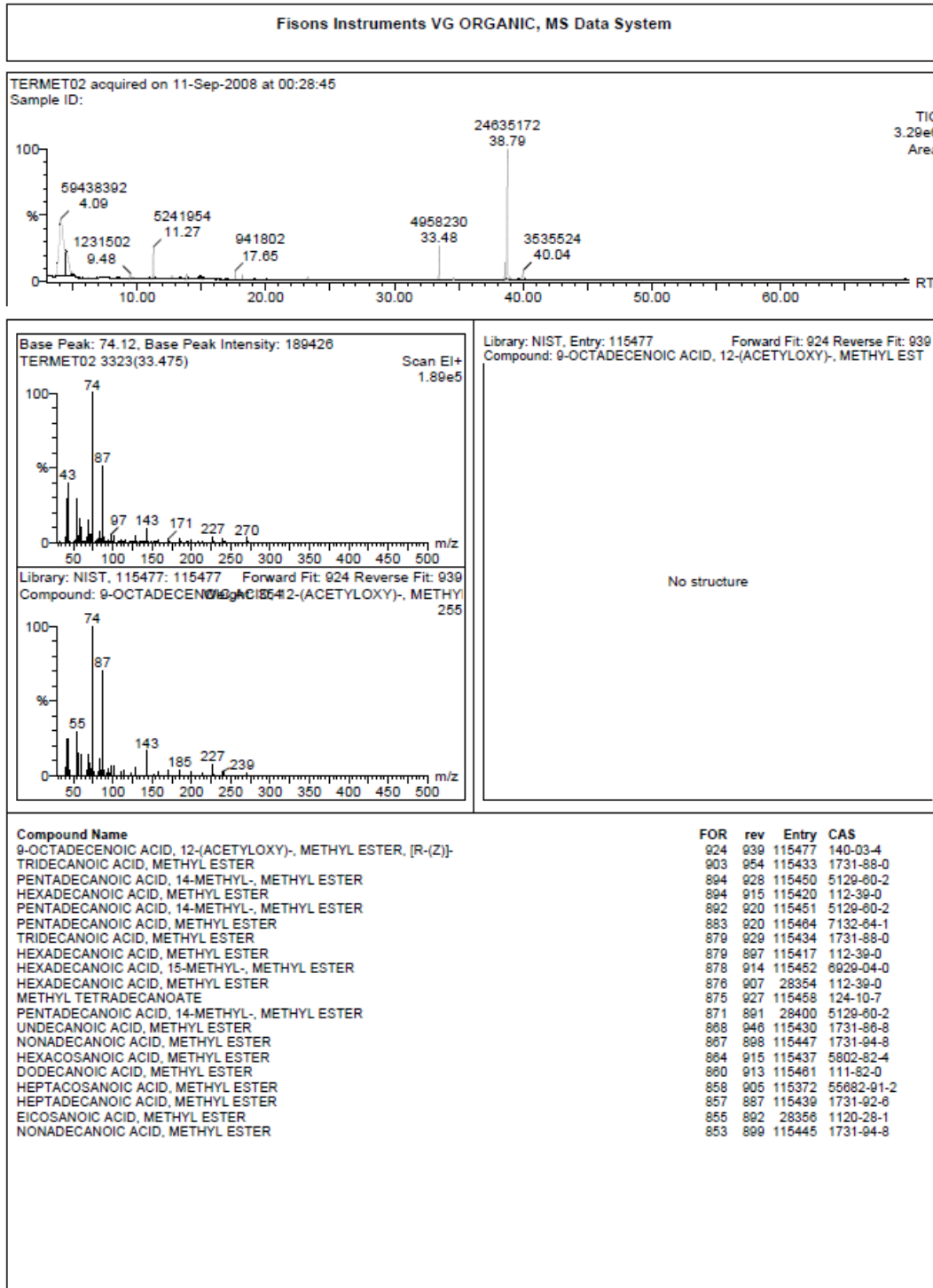


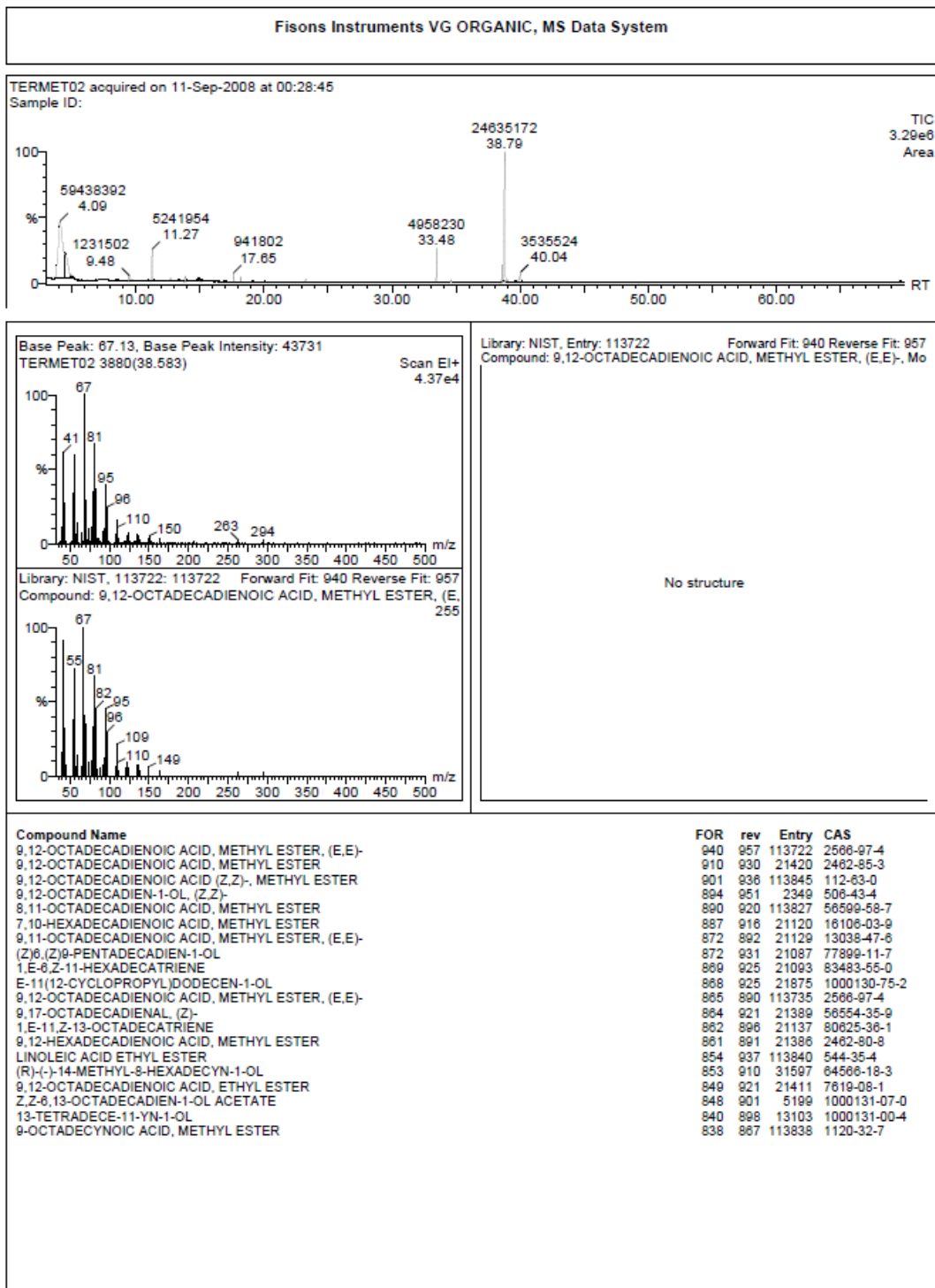




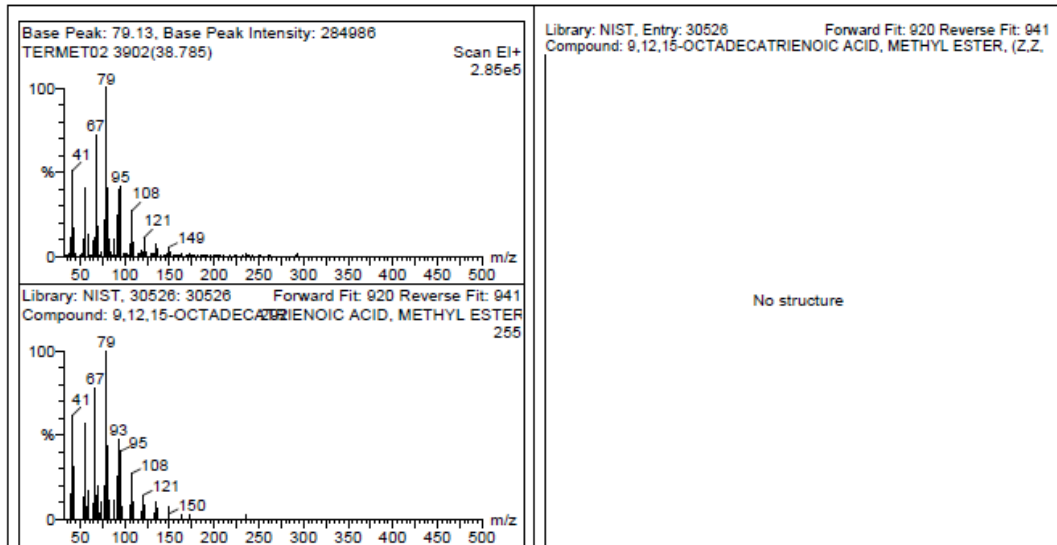
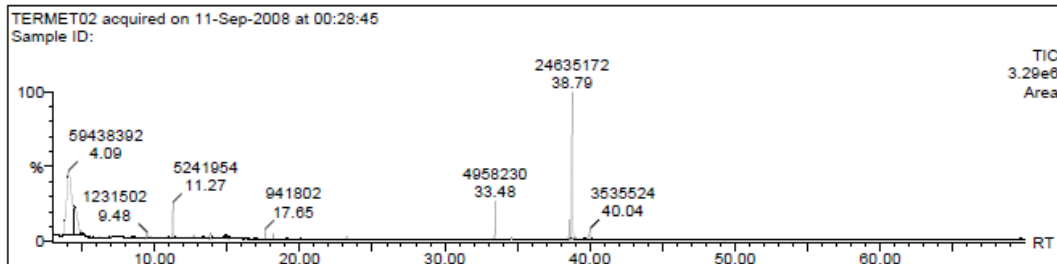








Fisons Instruments VG ORGANIC, MS Data System



Compound Name	FOR	rev	Entry	CAS
9,12,15-OCTADECATRIENOIC ACID, METHYL ESTER, (Z,Z,Z)-	920	941	30526	301-00-8
11,14,17-EICOSATRIENOIC ACID, METHYL ESTER	899	923	30402	55682-88-7
METHYL (Z)-5,11,14,17-EICOSATETRAENOATE	868	901	30527	59149-01-8
9,12,15-OCTADECATRIEN-1-OL, (Z,Z,Z)-	802	925	30403	506-44-5
7,10,13-HEXADECATRIENOIC ACID, METHYL ESTER	847	873	30401	58554-30-4
1,3,14,16-NONADECATETRAENE	816	877	21106	1000131-11-2
1,6,9-TETRADECATRIENE	799	848	2405	61233-71-4
SULFURIC ACID, 5,8,11-HEPTADECATRIENYL METHYL ESTER	789	841	30684	56554-67-7
17-OCTADECEN-14-YN-1-OL	785	835	31215	18202-28-3
9,12,15-OCTADECATRIENOIC ACID, ETHYL ESTER, (Z,Z,Z)-	774	831	30528	1191-41-9
17-OCTADECEN-14-YNOIC ACID, METHYL ESTER	773	805	31214	18202-19-2
5,8,11-HEPTADECATRIENOIC ACID, METHYL ESTER	771	827	21351	22117-08-4
1,2-BIS(BICYCLO[2.2.1]HEPTYL-2)ETHANE	770	827	21574	1000215-83-1
CYCLODODECYNE	769	824	21346	1129-90-4
1,3-CYCLODODECADIENE, (E,Z)-	767	818	30536	1129-92-6
7,10,13-EICOSATRIENOIC ACID, METHYL ESTER	765	814	21368	30223-51-9
1,5,9,13-TETRADECATETRAENE	763	852	21168	51487-38-8
BICYCLO[10.1.0]TRIDEC-1-ENE	761	810	113730	54766-91-5
6-TRIDECENOIC ACID, 13-(2-CYCLOPENTEN-1-YL)-, METHYL ESTER	755	808	21385	24828-60-2
CIS-4-METHYL-EXO-TRICYCLO[5.2.1.0(2.6)]DECANE	750	800	21450	1000215-29-2

