

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANÁLISE FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE PLANTAS
MEDICINAIS SELECIONADAS DA FLORA CATARINENSE: *Aleurites*
moluccana, *Bauhinia microstachya* E *Marrubium vulgare*.

CHRISTIANE MEYRE DA SILVA BITTENCOURT

FLORIANÓPOLIS – SC
DEZEMBRO/2003

CHRISTIANE MEYRE DA SILVA BITTENCOURT

ANÁLISE FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE PLANTAS
MEDICINAIS SELECIONADAS DA FLORA CATARINENSE: *Aleurites
moluccana*, *Bauhinia microstachya* E *Marrubium vulgare*.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação e
Química da Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do título de Doutora em Química
Orgânica.

Orientador: Prof^o. Dr. Valdir Cechinel Filho
Co-orientador: Prof^o Dr. Rosendo Augusto Yunes

Florianópolis – SC
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
2003

CHRISTIANE MEYRE DA SILVA BITTENCOURT

ANÁLISE FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE PLANTAS
MEDICINAIS SELECIONADAS DA FLORA CATARINENSE: *Aleurites
moluccana*, *Bauhinia microstachya* E *Marrubium vulgare*.

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do título de Doutora em Química
Orgânica no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho - UNIVALI
ORIENTADOR

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes - UFSC
CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Faruk J. Nome Aguilera
COORDENADOR DO CURSO

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Emídio V. L. da Cunha - UFPB
RELATOR

Prof. Dr. Brás H. de Oliveira - UFPR

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento - UFSC

Prof. Dr. Miguel S. B. Caro - UFSC

Prof. Dr. Ricardo J. Nunes – UFSC

Florianópolis, 08 de dezembro de 2003

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao grande amigo e orientador Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, pela orientação deste trabalho, pela confiança em mim depositada, e principalmente por sua amizade. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Rosendo A. Yunes, pela co-orientação deste trabalho, carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache, pelo grande auxílio prestado, atenção e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente, iluminando e guiando meus passos.

Ào meu grande amor, Roger, pelo carinho, apoio, estímulo e principalmente paciência.

Aos meus pais, Paulo e Lourdes e meu irmão Júnior, pelo amor, incentivo e força para superar os obstáculos encontrados.

Aos meus sogros, Laureano e Lela, pela valorização e carinho.

À Andrea, Enzozinho, Milene, Gabi e Vi pelo carinho e momentos de descontração

Aos professores Dr. Adair R. S. Santos, Dr. Valfredo Schelemper e Msc. Fátima de campos Buzzi, pelos ensaios farmacológicos.

Aos professores Dr. Ademir Reis e Dra Leila da Graça Amaral pela classificação das plantas abordadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Miguel Caro pelas análises espectroscópicas.

Ao Sr. Carlos Picolli, pelo fornecimento do material vegetal.

As grandes amigas Angela e Paula, pela carinhosa amizade e contribuições neste trabalho.

Aos amigos do laboratório, pela força e carinho: Dione, Rosi, Julieta, Louisiane, Jacks, Tiago, Louise, André, Paulo, Grazi e Tânia.

À todos os professores e funcionários do Depto. de Química, que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos professores membros da banca.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ASPECTOS GERAIS	1
1.2. ESTUDO BIO-DIRECIONADO	4
1.3. MÉTODOS USUAIS E MODERNOS DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS.....	9
1.4. CONTROLE DE QUALIDADE DE PREPARAÇÕES VEGETAIS	14
1.4.1. VARIABILIDADE DE PREPARAÇÕES VEGETAIS.....	16
1.4.2. CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES VEGETAIS	17
1.4.3. PADRONIZAÇÃO E EFICÁCIA DE PREPARAÇÕES VEGETAIS.....	18
1.5. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ORIGEM NATURAL	19
1.6. FÁRMACOS ORIUNDOS DE PRODUTOS NATURAIS.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS PLANTAS EM ESTUDO.....	28
2.1. <i>Aleurites moluccana</i>	28
2.1.1. GÊNERO <i>Aleurites</i> : ASPECTOS BOTÂNICOS.....	28
2.1.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Aleurites</i>	31
2.2. <i>Bauhinia microstachya</i>	38
2.2.1. GÊNERO <i>Bauhinia</i> ASPECTOS BOTÂNICOS.....	38
2.2.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Bauhinia</i>	40
2.3. <i>Marrubium vulgare</i>	43
2.3.1. GÊNERO <i>Marrubium</i> : ASPECTOS BOTÂNICOS	43
2.3.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>Marrubium vulgare</i>	44
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. PARTE EXPERIMENTAL	49
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.2. MATERIAL VEGETAL: <i>Aleurites moluccana</i>	50
4.2.1. COLETA.....	50
4.2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA	50
4.2.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ESTUDO COMPARATIVO DAS DIFERENTES PARTES DA PLANTA.....	51
4.2.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	51
4.2.5. ESTUDO COMPARATIVO DAS DIFERENTES PARTES DE <i>A. moluccana</i>	55
4.3. MATERIAL VEGETAL <i>Bauhinia microstachya</i>	55
4.3.1. COLETA.....	55
4.3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	55
4.3.2.1. <i>Isolamento e purificação dos constituintes da fração AcOEt</i>	56
4.4. MATERIAL VEGETAL: <i>Marrubium vulgare</i>	60
4.4.1. COLETA.....	60
4.4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	60
4.4.2.1. <i>Isolamento e purificação dos constituintes do precipitado metanólico e da fração DCM</i>	61
4.5. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS	65
4.5.1. REAÇÃO DE REDUÇÃO DA MARRUBIINA.....	65
4.5.2. REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA MARRUBIINA	66
4.5.3. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DA MARRUBIINA.....	66
4.5.4. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO MR-2	67
4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	69
4.6.1. ATIVIDADE ANALGÉSICA	69
4.6.1.1. <i>Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ac. acético 0,6% em camundongos</i>	69
4.6.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1. <i>Aleurites moluccana</i>	71

5.1.1. EXTRAÇÃO	71
5.1.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>A. moluccana</i>	71
5.1.2.1. Sólido AM-1	72
5.1.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS CASCAS DE <i>A. moluccana</i>	77
5.1.3.1. Composto AM-2	77
5.1.3.2. Composto AM-3	82
5.1.4. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES PARTES DA PLANTA.....	85
5.3. <i>Bauhinia microstachya</i>	90
5.3.1. EXTRAÇÃO	90
5.3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>B. microstachya</i> 90	
5.3.2.1. Composto BM-0	91
5.3.2.2. Composto BM-1	93
5.3.2.3. Composto BM-2	98
5.3.2.4. Composto BM-3	103
5.3.2.5. Composto BM-4	108
5.3.3. ATIVIDADE ANALGÉSICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>B. microstachya</i>	113
5.4. <i>Marrubium vulgare</i>	115
5.4.1. EXTRAÇÃO	115
5.4.2. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO ISOLADO DAS FOLHAS DE <i>M. vulgare</i>	115
5.4.3. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA MARRUBIINA E SEU DERIVADO ÁCIDO MARRUBÍNICO.....	120
5.4.3.1. Reação de redução da marrubiina.....	122
5.4.3.2. Reação de hidrólise da marrubiina	124
5.4.3.3. Reação de esterificação da marrubiina.....	128
5.4.3.4. Reação de esterificação do composto MR-2	129
5.4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DOS COMPOSTOS OBTIDOS ATRAVÉS DE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA MARRUBIINA	137
6. CONCLUSÕES.....	139
6.1. <i>Aleurites moluccana</i>	139
6.2. <i>Bauhinia microstachya</i>	139
6.3. <i>Marrubium vulgare</i>	140
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
8. ANEXOS.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários isolados da <i>A. montana</i>	32
Tabela 2. Metabólitos secundários isolados da <i>A. fordii</i>	32
Tabela 3. Metabólitos secundários isolados da <i>A. moluccana</i>	32
Tabela 4. Metabólitos secundários isolados de <i>B. forficata</i>	40
Tabela 5. Metabólitos secundários isolados de <i>B. splendens</i>	41
Tabela 6. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^{13}C para o AM-1 e dados da literatura para o 3 β -OH, β -amirina, 3 β -OH, α -amirina, 3-oxo, 28-COOMe metilursonato (α -amirina) e 3-oxo, 28-COOMe (β -amirina) e 3-oxo ¹⁷²	76
Tabela 7. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AM-2 e dados da literatura para o espruceano ¹⁷³	80
Tabela 8. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para AM-3 e dados da literatura para o 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (ácido atrárico) ¹⁷⁶	85
Tabela 9. Rendimentos dos extratos e frações obtidas de diferentes partes de <i>A. moluccana</i>	86
Tabela 10. Efeito antinociceptivo dos compostos de <i>A. moluccana</i> , aspirina e paracetamol, contra contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético em camundongos.	88
Tabela 11. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para BM-1 e dados da literatura para o kaempferol 3- <i>O</i> -ramnosil ¹⁸³	95
Tabela 12. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para BM-2 e dados da literatura para a quercetrina ¹⁸³	103
Tabela 13. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para BM-3 e dados da literatura para a miricitrina ¹⁹⁷	108
Tabela 14. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para BM-4 e dados da literatura para epicatequina 3- <i>O</i> -(4-metil)-galato ²⁰⁰	112
Tabela 15. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para M e dados da literatura para marrubiina ¹⁴⁸	119
Tabela 16. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para MR-1 e dados da literatura para marrubeno ²⁰⁵	124
Tabela 17. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para MR-2 e dados da literatura para marrubiina ¹⁴⁸	128
Tabela 18. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para MR-6 e dados da literatura para marrubiina ¹⁴⁸	132
Tabela 19. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para MR-9 e dados da literatura para marrubiina ¹⁴⁸	136
Tabela 20. Efeito antinociceptivo da marrubiina e derivados no modelo do ácido acético em camundongos via i.p.	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos ¹⁷	5
Figura 2. Partição e separação provável dos metabólitos secundários ¹⁷	8
Figura 3. <i>Aleurites moluccana</i>	30
Figura 4. Estruturas moleculares de alguns compostos isolados de <i>Aleurites montana</i>	33
Figura 5. Estruturas de alguns compostos isolados de <i>Aleurites fordii</i>	34
Figura 6. Estruturas de alguns compostos isolados de <i>Aleurites moluccana</i>	36
Figura 7. <i>B. microstachya</i> (Raddi.) Macbr.	39
Figura 8. Estruturas de alguns compostos isolados de <i>B. forficata</i>	41
Figura 9. Estruturas de alguns compostos isolados de <i>B. splendens</i>	42
Figura 10. <i>Marrubium vulgare</i> ^d	44
Figura 11. Estruturas de alguns compostos isolados de <i>M. vulgare</i>	45
Figura 12. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Aleurites moluccana</i>	52
Figura 13. Fracionamento do extrato metanólico das cascas de <i>Aleurites moluccana</i>	54
Figura 14. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Bauhinia microstachya</i>	58
Figura 15. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Bauhinia microstachya</i>	59
Figura 16. Fracionamento do extrato MeOH PP das folhas de <i>Marrubium vulgare</i>	63
Figura 17. Fracionamento do extrato DCM das folhas de <i>Marrubium vulgare</i>	64
Figura 18. Cromatograma gasoso do AM-1 . Condições de análise: T _{coluna LM-1} = 40°C, T _{injetor} = 280°C, T _{detector} = 320°C.	73
Figura 19. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AM-1	74
Figura 20. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AM-1	75
Figura 21. Espectro no IV (pastilha de KBr) do AM-2	78
Figura 22. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AM-2 . Expansão da região dos hidrogênios olefínicos e aromáticos (6,67~5,13 ppm) e da região do hidrogênio no C-3 (3,32~3,27 ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida. ...	79
Figura 23. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AM-2	81
Figura 24. Espectro no IV (pastilha de KBr) do AM-3	83
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AM-3	84
Figura 26. Espectro de RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AM-3	84
Figura 27. Efeito antinociceptivo de extratos metanólicos obtidos das diferentes partes de <i>A.</i> <i>moluccana</i>	89
Figura 28. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do BM-0	92
Figura 29. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do BM-1	94
Figura 30. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-1 . Expansão da região dos hidrogênios da ramnose (4,6~2,5 ppm) e da região dos hidrogênios do anel B (8,4~2,2 ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida, respectivamente. 96	96
Figura 31. Espectro de RMN- ¹³ C/APT (75 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-1	97
Figura 32. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do BM-2	99
Figura 33. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-2 . Expansão da região dos hidrogênios da hexose (6,3~1,4 ppm) e dos hidrogênios do anel B e A (8,0~6,6 ppm). Deslocamentos expressos em Hz.	101
Figura 34. Espectro de RMN- ¹³ C/APT (75 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-2	102
Figura 35. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do BM-3	104
Figura 36. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-3 . Expansão da região dos hidrogênios do anel A e B (7,9~6,6 ppm) e dos hidrogênios da hexose (4,7~4,2 ppm). Deslocamentos expressos em Hz.	106
Figura 37. Espectro de RMN- ¹³ C/APT (75 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-3	107
Figura 38. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-4 . Expansão da região dos hidrogênios do anel C (4,5~3,0 ppm) e dos hidrogênios do galato (6,7~6,5 ppm). Deslocamentos expressos em Hz.	110
Figura 39. Espectro de RMN- ¹³ C/APT (75 MHz, C ₅ D ₅ N/TMS) do BM-4	111

Figura 40. Efeito antinoceptivo dose – dependente causado pelo extrato metanólico da <i>Bauhinia microstachya</i> administrada por via intraperitoneal sobre as contorções abdominais causadas pelo ácido acético em camundongos.....	113
Figura 41. Efeito antinoceptivo causado pelos compostos BM-2 (painel A) e BM-3 (painel B) extraídos da <i>Bauhinia microstachya</i> administrados por via intraperitoneal sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.	114
Figura 42. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do M	117
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ /TMS) do M	118
Figura 44. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ /TMS) do M	119
Figura 45. Algumas das modificações estruturais propostas com a marrubiina e seu derivado, o ácido marrubínico.....	121
Figura 46. Reação de redução da marrubiina (M).....	122
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ /TMS) do MR-1	123
Figura 48. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ /TMS) do MR-1	123
Figura 49. Reação de hidrólise da marrubiina (M).	125
Figura 50. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) de MR-2	125
Figura 51. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆ /TMS) do MR-2	126
Figura 52. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, DMSO-d ₆ /TMS) do MR-2	127
Figura 53. Reação de esterificação da marrubiina (M).....	129
Figura 54. Reação de esterificação com o composto MR-2	130
Figura 55. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) de MR-6	130
Figura 56. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ /TMS) do MR-6	131
Figura 57. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ /TMS) do MR-6	133
Figura 58. Reação de esterificação do MR-2	134
Figura 59. Reação de esterificação do MR-2	134
Figura 60. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) do MR-9	135
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H (acetona-d ₆ , 200 MHz, TMS) de MR-9	136
Figura 62. Modelo de dor induzido pelo ácido acético 0,1 % (v. ip) de marrubiina e derivados (10 mg/kg) em camundongos. Cada grupo representa a significância de seis experimentos e as barras verticais o número de contorções abdominais em camundongos com o controle.	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	Attached proton test
CC	Cromatografia em coluna
CCD (TLC)	Cromatografia em camada delgada (Thin Layer Chromatography)
CCD/OPLC	Cromatografia em camada sob pressão
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa - Espectrometria de massa
CLAE (HPLC)	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Pressure Liquid Chromatographic)
CL-EM	Cromatografia líquida - Espectrometria de massa
CL-RMN	Cromatografia líquida – Ressonância magnética nuclear
CL-UV-EM	Cromatografia líquida acoplada a ultra violeta e espectrometria de massa
COLOC	Correlation spectroscopy via long-range couplings
COSY	Espectrometria bidimensional de correlação homonuclear a 3 ligações
d	Dublete
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dublete
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DI ₅₀	Dose inibitória de 50%
DMA-AMD	Desenvolvimento múltiplo automatizado
FDA	Food and drugs administration
H	Hexano
HETCOR	Espectrometria bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação
IM	Inibição máxima
INADEQUATE	Incredible natural-abundance double-quantum excitation
INEPT	Insensitive nuclei enhanced polarization
Ip	Intro peritoneal
IV	Infra vermelho
m	Multiplete
NOE	Efeito overhauser nuclear
OMS/WHO	Organização mundial de saúde
PA	Pró-análise
Rf	Fator de retenção
RMN- ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singlete
sl	Singlete largo
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultra violeta
δ	Deslocamento químico em ppm
φ	Diâmetro

RESUMO

O presente trabalho envolveu especialmente a extração, o isolamento e a identificação de constituintes químicos presentes nas plantas *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare*. Dando continuidade aos estudos realizados anteriormente com a planta *A. moluccana*, da fração hexânica obtida das folhas foi isolada e identificada uma mistura de triterpenos, α e β -amirinona (~1:1), sendo pela primeira vez relatado no gênero *Aleurites*. Das cascas desta planta obteve-se o espruceanol e o ácido atrárico, os quais ainda não haviam sido relatados para o gênero *Aleurites*. Foi realizado um estudo comparativo com as diferentes partes (raiz, caule, flor, casca, folha e semente) de *A. moluccana* com a finalidade de verificar qual a melhor parte da planta, em termos de rendimento, atividade biológica e constituição química, visando um futuro fitofármaco. Verificou-se que as folhas, além de apresentar um bom rendimento e atividade antinociceptiva, foram evidenciados compostos bioativos, anteriormente detectados, que contribuem para a atividade final do extrato. Da planta *B. microstachya* foram obtidos cinco compostos fenólicos, galato de metila (1), kaempferol 3-*O*-ramnosil (2), quercetina 3-*O*-ramnosil (3), miricetina 3-*O*-ramnosil (4) e epicatequina 3-*O*-galato (5), os quais não haviam sido anteriormente encontrados no gênero *Bauhinia*. O extrato metanólico e os compostos (3) e (4) apresentaram significativo efeito analgésico quando testados no modelo de dor induzida pelo ácido acético em camundongos, resultados que justificam, ao menos em parte, o uso na medicina popular desta planta para o tratamento de processos dolorosos. Considerando o ótimo rendimento e a atividade farmacológica promissora da marrubiina, a partir das partes aéreas de *M. vulgare*, foram realizadas modificações estruturais na busca de compostos mais ativos. Obtêve-se êxito na redução da função lactônica da marrubiina, na formação do ácido marrubiínico, na obtenção de dois derivados esterificados do ácido marrubiínico, os quais apresentaram efeito analgésico marcante em camundongos. Dentre os compostos testados o ácido marrubiínico apresentou uma maior atividade analgésica, sugerindo a continuidade destes estudos, uma

vez que o mesmo pode ser obtido com alto rendimento através da hidrólise da marrubiina. Os resultados permitem confirmar a presença de vários princípios ativos nas plantas estudadas, justificando o seu uso medicinal e possibilitando estudos de modificação estrutural na busca de substâncias mais potentes e seletivas.

ABSTRACT

The present work describes the extraction, isolation and identification of the chemical constituents from *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* and *Marrubium vulgare*. Following the previous studies with *A. moluccana*, the study of hexanic fraction allowed to the isolation and identification of a mixture of triterpenes, α and β -amyrinone ($\sim 1:1$), which has been isolated from the genus *Aleurites* for the first time. From the barks of this plant were obtained spruceanol and atraric acid, which were not previously found in this genus. The comparative study of different parts (root, stem, flower, bark, leaf and seed) of *A. moluccana* had the aim of identifying what the better part of the plant, regarding the yield, biological activity and chemical composition. The results showed that the leaves exhibit the best yield and antinociceptive effects, suggesting that this part could be explored to become a phytomedicine in the future. From *B. microstachya* five phenolic compounds were isolated: methyl gallate (1), kaempferol 3-*O*-rhamnosyl (2), quercetin 3-*O*-rhamnosyl (3), myricetin 3-*O*-rhamnosyl (4) and epicatechin 3-*O*-gallate (5), which were not yet described in the genus *Bauhinia*. The methanolic extract and compounds (3) and (4), when analysed against writhing test in mice, showed an important analgesic activity, justifying, at least partially, the use of this plant in folk medicine to treat dolorous processes. Considering the high yield and promising pharmacological activity of marrubiin, isolated from *M. vulgare*, some structural modifications were performed in order to obtain more active compounds. It was obtained success in the reduction of the lactonic function, in the formation of marrubiinic acid and esterified derivatives, which exhibited significant analgesic effect against writhing test in mice. Marrubiinic acid showed the better activity and yield, suggesting that it could be used in the future as model to obtain new and potent analgesic agents. In summary, the results confirmed the presence of several active compounds in the studied plants, justifying their medicinal use as well as the finding of some marrubiin derivatives with analgesic potential.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

O uso da medicina tradicional vêm ao longo dos anos ganhando reconhecimento global. Não somente as plantas medicinais continuam sendo utilizadas em países em desenvolvimento, mas também em países onde a medicina convencional é predominante¹. Dados de 2000 revelam que o mercado mundial de fitoterápicos faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha o maior mercado mundial². O interesse em medicamentos oriundos de plantas deve-se a algumas razões como por ser a medicina convencional de fácil acesso e de baixo custo pode levar ao uso abusivo e mesmo incorreto por parte da população levando à efeitos indesejáveis, além de muitos outros problemas³. O potencial das plantas como pesquisa na busca por novos medicamentos, com novos modos de ação, alta seletividade e atividade é ainda inexplorado, uma vez que, entre cerca de 250.000 – 350.000 espécies de plantas existentes no mundo, somente pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e biologicamente, aproximadamente 35.000, e menos que 2500 tem sido caracterizados como metabólitos secundários^{4,5}. Dados recentes revelaram que dentre as florestas tropicais, as quais possuem um valor estimado de 500.000 espécies de plantas, menos de 1% tem sido pesquisada para atividade medicinal⁶.

A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas, onde constatou-se que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos em todo mundo, originam-se de plantas, sendo 121 compostos ativos utilizados em uso comum³. De 252 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo são fármacos sintéticos obtidos de fonte natural^{3,7}. Ainda de acordo com a OMS, aproximadamente 80% da população mundial utiliza medicamentos tradicionais, básicos para a saúde, a maioria envolvendo uso de

extrato de plantas ou compostos ativos isolados das mesmas⁸. Vários produtos naturais isolados de plantas superiores, após vários estudos, tornaram-se agentes clínicos. Como exemplos pode-se citar os antimalários quinina e quinidina isolados da *Cinchona* spp., digoxina, um glicosídeo cardíaco, obtido da planta *Digitalis* spp., atropina da *Atropa belladonna*, morfina e codeína da *Papaver somniferum* além de muitas outras⁹. O maior impacto de fármacos derivados de plantas foi na área de antitumorais, onde o taxol, isolado da planta *Taxus brevifolia*, vincristina e vinblastina da *Catharanthus roseus*, tem melhorado drasticamente a efetividade da quimioterapia contra alguns tipos de câncer¹⁰.

Ao abordar o tema produtos naturais deve-se ter bem claro certos conceitos. Planta medicinal é a planta utilizada para aliviar, prevenir e curar certas doenças ou distúrbios fisiológicos; a preparação fitofarmacêutica é um medicamento manufaturado obtido exclusivamente de plantas, já o fitofármaco é um produto preparado seguindo procedimentos legais e que tenha sido caracterizado em termos de sua eficácia, segurança e qualidade^{3,4}.

Durante o século 20, a busca por novos compostos bioativos a partir de plantas voltou-se para a síntese destes compostos e seus análogos, principalmente utilizando a medicina combinatória e design computacional de fármacos. Apesar dos avanços da química, biologia molecular, pesquisa de genomas, as plantas medicinais permanecem ainda como uma importante alternativa de estudos, principalmente devido a sua grande diversidade química, sendo considerada a melhor fonte de produtos para a saúde humana e aliada à efetividade das plantas, dos efeitos colaterais apresentados com o uso de fármacos comerciais e o desenvolvimento da ciência e tecnologia surgida com a interação entre indústrias e universidades. Seguindo este pensamento, o futuro dos fármacos, oriundos de plantas, requer a utilização de métodos seguros para o isolamento, caracterização e exploração de métodos qualitativos e quantitativos que possam contribuir para uma eficiente descoberta, desenvolvimento e comercialização de fitoterápicos. Aliado a isto, existe a necessidade de utilizar sistemas regulatórios que garantam a segurança e atividade destes fitoterápicos e

estudos toxicológicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos possibilitando a designação de dosagens racionais¹¹.

O êxito da pesquisa na química de produtos naturais depende do grau de interação de um grupo de pesquisa multidisciplinar nos quais fitoquímicos, botânicos sistemáticos, farmacologistas, toxicologistas, bioquímicos, médicos e microbiologistas (avaliação biológica dos extratos, frações e compostos isolados das plantas) corroboram na tentativa de validar plantas medicinais, propiciando o conhecimento real da diversidade química, visando a obtenção de novos agentes clínicos^{9,12}.

1.2. ESTUDO BIO-DIRECIONADO

O expressivo crescimento da pesquisa de produtos naturais nos últimos anos, deve-se principalmente ao rápido avanço de técnicas de isolamento e análise dos compostos bioativos em plantas e pela facilidade da busca de informações em vários sistemas de bases de dados^{2,13}. A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais através do isolamento e identificação dos metabólitos secundários, assim chamados os produtos naturais isolados das plantas. Estes metabólitos secundários são de ocorrência restrita em grupos taxonômicos, com grande diversidade química, não sendo essenciais para o crescimento e vida do vegetal, mas desempenhando importante papel na resistência contra pestes, doenças e injúrias que possam influenciar a sobrevivência das espécies vegetais no seu ecossistema¹⁴.

A natureza tem desenvolvido uma enorme diversidade de metabólitos secundários durante séculos de evolução por uma ampla variedade de vias metabólicas disponíveis no metabolismo primário, essencial ao crescimento e vida da planta. Muitos metabólitos secundários são formados por sequência de reações análogas ao metabolismo primário, o que torna a natureza vegetal numa fonte inesgotável de substâncias úteis, revelado por dados onde cerca de 100.000 substâncias oriundas de plantas são conhecidas e estima-se que aproximadamente 4.000 novas são descritas a cada ano^{15,16}.

A quimiodiversidade resulta de modificações em partes específicas do ciclo biossintético, podendo ser por introdução de substituintes, novos grupos funcionais, isomerizações, abertura de anel ou acoplamento de diferentes metabólitos secundários¹⁴.

Diante desta ampla diversidade química, surge a necessidade de se utilizar métodos de extração que possam funcionar como verdadeiros filtros de distintas classes de compostos relativa as suas aptidões e características.

O intuito da pesquisa nesta área consiste especialmente na identificação dos princípios ativos das plantas medicinais, investigação dos extratos e frações quanto a sua eficácia e constância da atividade identificada e o isolamento destes

compostos, sua determinação estrutural, podendo por conseguinte serem sintetizados, modificados ou extraídos de forma mais eficiente. A Figura 1 ilustra algumas etapas básicas que podem ser seguidas quando se deseja obter princípios ativos de plantas¹⁷.

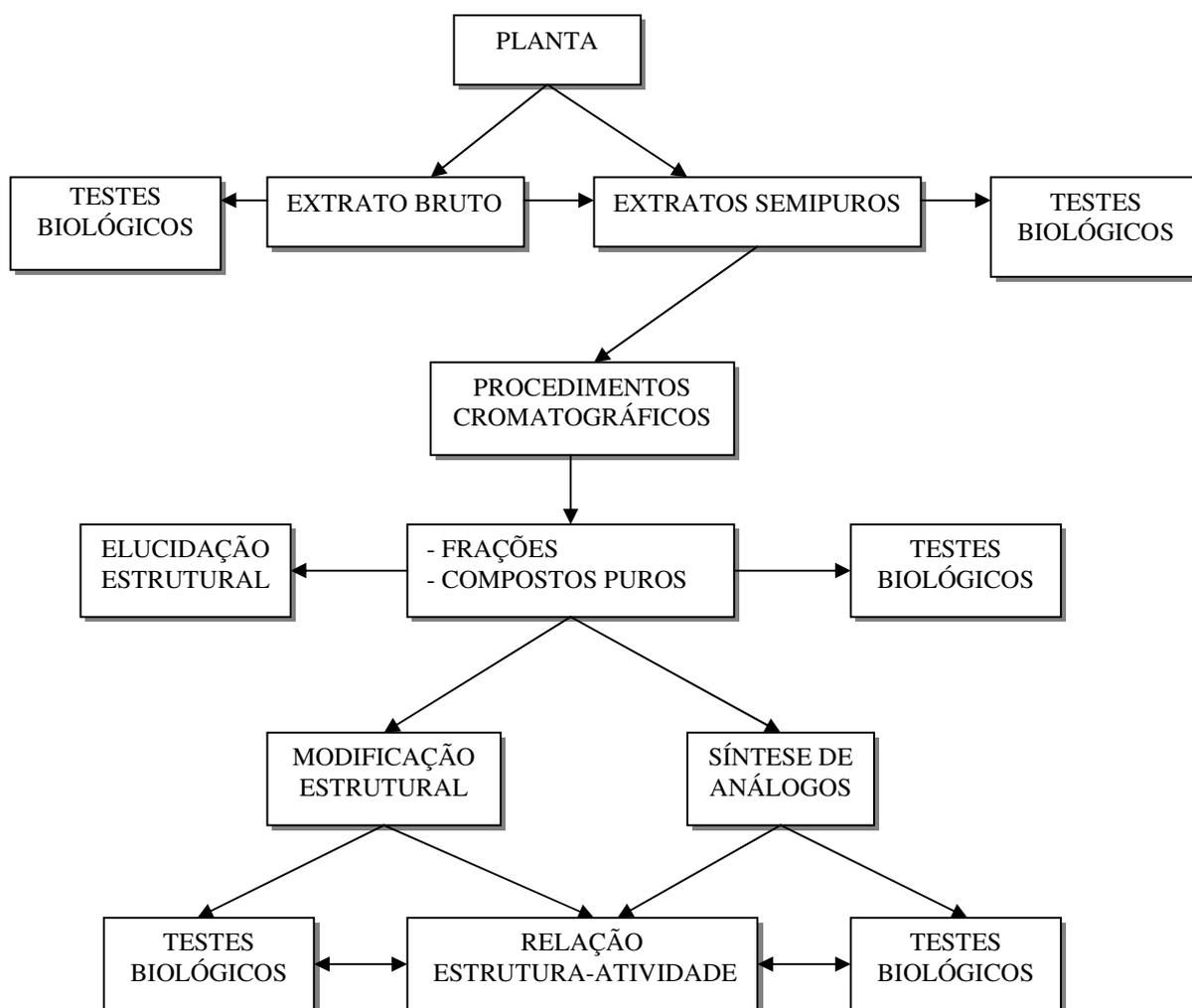


Figura 1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos¹⁷.

Após a escolha adequada da planta a ser estudada, tratamento adequado durante a coleta e a armazenagem do material vegetal segue-se então ao método prático de extração dos compostos bioativos.

- Seleção da Planta

A escolha da planta a ser abordada no estudo deve ser feita de forma cuidadosa, observando seu uso e forma de administração na medicina popular e possíveis efeitos tóxicos observados.

Aliado a isto, faz-se necessário o conhecimento e experiência da população/cultura ou informações sobre a composição química, relacionado ao gênero ou família e dos possíveis compostos com atividade química e farmacológica definidas presentes na planta em estudo.

Realizada a escolha da planta a ser estudada a mesma deverá ser submetida a identificação botânica, sendo uma amostra armazenada em um herbário servindo como material de referência. Para evitar contaminação do material vegetal e promover a estabilização, o mesmo deve ser seco à temperatura ambiente, em local arejado e adequado, ou estufa (40°C)^{3,17-19}.

- Isolamento de compostos ativos

A preparação do material vegetal a ser investigado é de extrema importância para os procedimentos seguintes de separação e purificação, com o intuito de promover o isolamento de compostos ativos de forma efetiva, com alto valor terapêutico e remoção de materiais indesejáveis (clorofila, cera, taninos, etc.).

Existem várias técnicas de preparação de um material vegetal para realização de técnicas de extração e análise. Um dos métodos mais divulgados utilizados na área de produtos naturais é a extração inicial com solvente de baixa polaridade, obtendo-se componentes lipofílicos ou o uso de solventes mais polares (MeOH, EtOH), seguida por partição que permite a obtenção de frações de polaridades diferentes. A filtração também pode ser considerada, uma vez que possibilita a remoção de material insolúvel, podendo este então ser submetido a futura purificação através de cromatografia em coluna aberta²⁰.

Outra técnica de preparação é a fase sólida, técnica simples onde utiliza um adsorvente. Dependendo do tipo de adsorvente, troca iônica, fase reversa, permite

uma maior ou menor interação com a amostra vegetal, favorecendo o fracionamento ou purificação da amostra^{20,21}.

Entre as modernas técnicas para a preparação e análise de plantas medicinais estão a extração por fluido supercrítico, extração ultrasônica e extração líquido pressurizado. A extração por fluido supercrítico, utilizada por muitos anos para a extração de compostos voláteis, consiste na extração a partir de um sólido ou líquido, utilizando um solvente imiscível, no caso dióxido de carbono, o qual é uma das vantagens em relação aos demais que utilizam solventes perigosos à saúde²². Esta técnica permite uma atuação rápida e otimizada, uma vez que pode-se variar o volume de fluxo e pressão²¹.

A extração através do uso de microondas baseia-se no aquecimento do solvente ou mistura de solventes a serem utilizados na extração de forma a acelerar a extração reduzindo assim o consumo de solventes orgânicos. Outro método que também utiliza aquecimento como forma de melhorar a capacidade dos solventes de dissolver os analitos é a extração líquido pressurizado, que como o próprio nome diz, utiliza a pressão no sentido de manter o solvente líquido a altas temperaturas. Estes métodos podem utilizar solventes desde a água até mais polares, dentre os solventes orgânicos, como o metanol. O único inconveniente destas duas últimas técnicas que utilizam a temperatura para promover efetividade na extração, é a possibilidade de degradação de certos compostos²¹.

A extração ultrasônica, outra técnica de preparação de um material vegetal, seria a utilização de energia ultrasônica sob os ingredientes ativos no solvente. Este método vem sendo utilizado principalmente para a extração de óleos essenciais²¹.

São inúmeros os métodos descritos para a preparação de extratos vegetais visando melhorar a extração e possibilitando a descoberta de novos compostos ativos, uma vez que geralmente os compostos presentes em maiores concentrações na planta é que são realmente isolados pela fitoquímica. Deve-se haver uma coerência na escolha de métodos a serem empregados com alta eficiência, seletividade e fácil manuseio.

Dentro de nosso grupo de pesquisa escolheu-se o procedimento, indicado a seguir, devido aos excelentes resultados obtidos com diversas plantas.

Uma vez escolhida a planta, esta deve ser seca e estabilizada e submetida à trituração, facilitando a extração subsequente com solvente orgânico e partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, promovendo assim a separação de compostos em diferentes classes químicas, como observado na Figura 2¹⁷. Em cada etapa de extração são obtidos extratos e frações que são submetidas à avaliação farmacológica, o que impulsionará aos estudos futuros. Esta etapa requer habilidade e inovação, para garantir que o composto isolado esteja na sua mais pura forma, possibilitando adequada caracterização química e biológica, determinando o sucesso ou insucesso da investigação. É de extrema importância que todos os passos químicos experimentais estejam devidamente descritos.

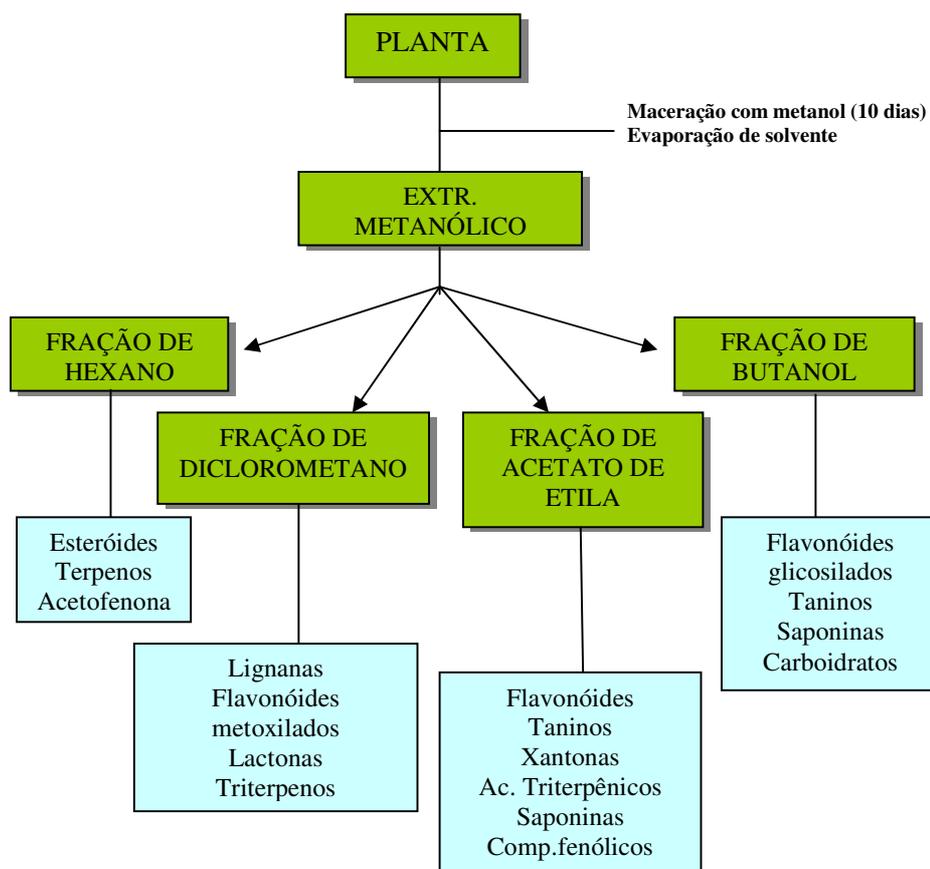


Figura 2. Partição e separação provável dos metabólitos secundários¹⁷.

O método demonstrado acima possibilita a separação e subsequente isolamento de vários constituintes químicos, com exceção dos alcalóides. Estes devido a presença do átomo de nitrogênio em sua estrutura, conferindo um caráter básico, necessitam de um método específico para o isolamento efetivo. Um dos métodos de extração é a utilização de uma base para a conversão do sal em base livre, seguida por extração com solvente orgânico e submetida à purificação com utilização de uma solução ácida diluída¹⁶.

Outras técnicas utilizadas para o isolamento de compostos bioativos, de uma maneira geral, é o método que emprega uma fase estacionária (sílica gel), que promove filtração do extrato alcoólico, sendo subsequente submetido à análise farmacológica preliminar, seguida de procedimentos para o isolamento dos compostos bioativos¹⁷. Um outro método utiliza combinação de técnicas como CLAE acoplada ao UV (CLAE-UV) e também CLAE acoplada com EM (CLAE-EM), que permite uma rápida detecção, proporcionando informações preliminares dos constituintes e da natureza do extrato²³. Estas técnicas permitem a identificação de metabólitos que estão em pequenas concentrações no extrato total e juntamente com a cromatografia líquida acoplada com ressonância magnética nuclear (CL-RMN) à determinação estrutural dos constituintes químicos²³.

1.3. MÉTODOS USUAIS E MODERNOS DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS

O processo de isolamento, purificação e identificação de compostos de uma mistura de um material vegetal, envolvem várias etapas de separação, requerendo equipamentos especializados e principalmente habilidade. Para isto, a cromatografia tem lugar de merecido destaque no que se refere à separação, identificação e quantificação de compostos. A cromatografia é um método físico de separação, na qual os compostos a serem separados são distribuídos entre duas

fases, uma fase fixa de grande área superficial denominada fase estacionária e outra, um fluido que percola através dela, chamada de fase móvel²⁴. No âmbito técnico, o problema de um controle de qualidade de um produto natural está centrado no fato que os mesmos são misturas complexas contendo constituintes químicos em variadas concentrações, tornando assim muitas vezes este controle inacessível.

CCD – Cromatografia em Camada Delgada:

Uma das técnicas mais simples de cromatografia planar e nem por isso dispensável é o uso da cromatografia em camada delgada (CCD), um método de escolha que permite o monitoramento e otimização nos processos de avaliação fitoquímica, bem como biossintético, de baixo custo, rápido e fácil manuseio, permitindo a escolha da fase estacionária e sistema de solventes, forma de detecção e visualização dos compostos isolados. Esta técnica vem sendo bastante aplicada nos processos fitoquímicos como na cultura de *callus* de diferentes espécies, separação de alcalóides e muitas classes de compostos^{25,26}.

CCP/OPLC - Cromatografia em Camada sob Pressão:

Outro método de cromatografia planar e que é considerado recente técnica para a separação e caracterização de extratos e compostos é a cromatografia em camada sob pressão (CCP/OPLC—Over Pressured Layer Chromatography), método planar, o qual utiliza camada de sílica (SiO_2) ou alumina (Al_2O_3) onde, sob condições de fluxo forçado de eluente ocorre o desenvolvimento rápido da amostra. Esta técnica percorre num tempo curto, podendo utilizar pequenas quantidades de amostra (50-100 mg) de mistura complexa com bons resultados na separação de alcalóides e compostos fenólicos²⁷.

DMA-AMD - Desenvolvimento Múltiplo Automatizado:

Outro método é o Desenvolvimento Múltiplo Automatizado (DMA-AMD – Automated Multiple Development), o qual envolve cromatografia em placa, com etapas de secagem entre cada eluição, utilizando solventes com gradiente de polaridade decrescente. É utilizado para a separação de alcalóides, óleos essenciais e compostos fenólicos, trabalhando-se com pequenas quantidades²⁷.

CC – Cromatografia em Coluna:

Para a separação de compostos em larga escala, um método clássico e amplamente utilizado é a cromatografia em coluna aberta (CC), que utiliza colunas de diferentes tipos e dimensões, obtendo-se bons resultados pela possibilidade de variação da fase estacionária, bem como da fase móvel, principalmente no isolamento dos compostos em altas concentrações na planta em estudo²⁸. Para aumentar a velocidade de separação foi desenvolvido um método de cromatografia de adsorção simples, rápido e eficiente para a purificação de compostos, como os alcalóides isolados da *Rauvolfia bahiensis*²⁹. O sistema é a cromatografia flash, de baixo custo e fácil operação, mas que requer alguns cuidados com as amostras a serem analisadas, principalmente na presença de compostos sensíveis à contaminação²⁰.

Chromatotron:

Entre as técnicas preparativas de separação cromatográfica, a utilização da cromatografia preparativa de força centrífuga se faz presente, mas parece limitado frente a algumas restrições desta técnica. O Chromatotron, como também é chamado, é um sistema composto de uma placa circular de cromatografia em camada delgada e um motor inclinado o que permite mais eficiência na coleta dos compostos ou frações. O eluente é adicionado no centro da placa, capaz de liberar 1-10 mL/min. e passar através da camada sob a influência da força centrífuga²⁰. Este método tem sido aplicado na separação de vários produtos naturais, incluindo saponinas, flavonóides e saponinas hidrolisáveis^{20,22,30}.

Cromatografia de Contra Corrente em Gotas :

Um outro método para a separação de compostos ativos é a Cromatografia de contra corrente em gotas, que consiste de um tipo de cromatografia líquido-líquido, podendo ser imiscíveis ou na forma de solução, consistindo de 200-600 colunas de tubo de vidro silanizados interconectados em série por tubos capilares de teflon, envolvendo campo gravitacional. As gotas de líquido da fase móvel passam através da coluna preenchendo a fase estacionária. Dependendo da escolha do solvente, as gotas passam de forma ascendente ou descendente

através da coluna; como a fase móvel se move através da coluna em forma de gotas, a turbulência promove eficiente particionamento do soluto entre as duas fases pela diferença do coeficiente de partição da amostra²⁰. Este método é empregado quando métodos de adsorção cromatográfica, na análise de frações polares, leva a uma adsorção irreversível ou decomposição de substâncias lábeis; proporciona boa resolução e reprodutibilidade, mas é um método lento de análise. Encontram-se usos na separação de polifenóis, triterpenos glicosilados, esteróides glicosilados e saponinas esteroidais³⁰.

CG - Cromatografia Gasosa:

A cromatografia gasosa (CG), é um método usado para separar componentes de uma solução e medir sua quantidade relativa. É uma técnica útil para compostos orgânicos que não decompõem à altas temperaturas (até aproximadamente 310°C), possibilitando a análise de compostos obtidos em pequena quantidade da planta (microgramas)^{31,32}. A pureza da amostra também pode ser avaliada com o uso da cromatografia a gás. Este método é um instrumento analítico utilizado para identificação de compostos, mais voláteis, como sesquiterpenos, fenóis, hidrocarbonetos, carotenos, álcoois lineares e triterpênicos, esteróis, além de muitos outros que possam ser compatíveis com o sistema de separação^{32,33}. A cromatografia gasosa pode ser combinada com espectrometria de massa (CG-EM) para separar compostos na amostra de acordo com seu ponto de ebulição. Esta técnica vem sendo utilizada como método sensível na identificação de alcalóides tropânicos na planta *Datura candida*, quantificação de fitoesteróides, detecção de várias classes de terpenos e em outras análises^{34,35}. Uma das desvantagens a um outro método de separação (CLAE-EM/HPLC-MS), é a necessidade de derivatização dos compostos com o objetivo de aumentar sua volatilidade²⁶.

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:

Uma das técnicas mais atuais em termos de separação, caracterização e detecção, bem como controle final da pureza do composto isolado, é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC-High Performance Liquid Chromatography) que utiliza colunas contendo um suporte e uma fase

estacionária (sílica gel, alumina, etc) que oferece resistência ao fluxo da fase móvel, sendo assim, fazendo-se necessário a utilização de pressão, distinguindo-se assim das demais, que utilizam a força gravitacional para a separação dos compostos^{22,36}. Dentre as vantagens, que este sistema oferece, pode-se citar a possibilidade de separação de compostos, em baixas concentrações na planta, tempo curto de análise, fase móvel e estacionária com ampla faixa de polaridade, de modo que a seletividade no processo de separação possa ser ajustada, além da minimização de decomposição de compostos instáveis na amostra^{16,20,22}. Este método vem sendo amplamente utilizado como na quantificação de alcalóides, caracterização de compostos fenólicos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, naftoquinonas, alcalóides, cumarinas³⁶⁻⁴¹. A CLAE acoplada ao ultravioleta (CLAE-UV) fornece informações do tipo de constituinte, este requer a presença de grupos cromóforos na molécula, sobre oxidação, no caso de polifenóis. A CLAE associada à espectrometria de massa (CLAE-EM), sendo um método sensível de análise molecular, fornece informações do peso molecular dos compostos, empregada, por exemplo, na detecção do taxol, alcalóides, flavonóides, xantonas. Esta técnica está sendo utilizada como complementar à CG na análise de compostos não voláteis de alto peso molecular em amostras complexas, buscando maior sensibilidade e seletividade na análise^{2,26,42}. A CLAE-RMN é um instrumento já conhecido, mas não muito aceito devido à falta de sensibilidade, sendo que, recentes progressos, têm impulsionado seu uso²³. Por haver certas incompatibilidades entre CLAE e EM, onde este último usa de alto vácuo, altas temperaturas, baixa velocidade ao contrário da CLAE, sendo assim necessárias adaptações para o uso desta técnica^{23,43}.

Estas técnicas, utilizando mais de um instrumento de análise, também chamadas de hífenadas, estão surgindo como uma seqüência automatizada de análises, permitindo extração e análise de forma mais seletiva e complementar, gerando uma grande quantidade de informações. Exemplos destas análises são CL-UV-EM, CL-UV-RMN, CL-EM-EM, fornecendo maiores detalhes estruturais, como características dos fragmentos⁴⁴⁻⁴⁶.

Uma das áreas que a cromatografia gasosa e CLAE se fazem presentes, é no que se refere ao controle de qualidade, caracterização e padronização de amostras, avaliando o conteúdo do componente ativo e seu rendimento e também empregadas na avaliação quanto à variação da composição química durante o crescimento da planta²³.

Não existe uma única técnica capaz de solucionar o problema de separação de compostos de uma mistura, ou fração e até mesmo purificação dos compostos, requerendo a combinação de várias técnicas, mesmo que complementares, para se obter o composto puro. Todos os métodos têm suas vantagens e desvantagens, e o método apropriado precisa ser cuidadosamente selecionado para se obter o composto ativo devidamente isolado, purificado e caracterizado.

1.4. CONTROLE DE QUALIDADE DE PREPARAÇÕES VEGETAIS

A partir do século XIX até os dias de hoje, a química tem se tornado parte importante e inquestionável, levando à descoberta e desenvolvimento de novos compostos com muitas de aplicações. Como base neste sucesso, a química tem desenvolvido uma série de métodos práticos e confiáveis de isolamento, identificação e quantificação para a análise de compostos na área acadêmica, da saúde, meio ambiente e tecnologia. Neste contexto, o uso da medicina tradicional e de plantas vem ganhando reconhecimento global. Sem um completo controle de qualidade não se pode determinar se o composto bioativo está realmente presente na preparação vegetal, se a dosagem é apropriada, se existe adulteração, outras substâncias ou contaminantes^{47,48}.

Surge, então, a necessidade de direcionar os estudos para o desenvolvimento de métodos de otimização e padronização para a produção e avaliação de um material apropriado para o consumo, buscando pesquisas científicas e clínicas no intuito de investigar a qualidade, segurança e eficiência do uso de produtos naturais, sua pureza, identidade e estabilidade^{12,49-51}.

A dificuldade de regulamentação de plantas medicinais, visto que o processo legal troca de país para país, é particularmente um desafio dado ao

desenvolvimento da medicina tradicional por diferentes culturas, em diferentes regiões, sem desenvolvimento de padrões internacionais e métodos apropriados de avaliação, e por este motivo, poucas preparações a partir de plantas medicinais tem sido avaliadas quanto a sua eficácia e segurança^{1,50}. Nos EUA, plantas medicinais estão classificadas como integrantes da classe de suplementos alimentares e como os mesmos não requerem prova de eficácia, segurança, nem padrões de controle de qualidade, conseqüentemente preparações vegetais não sofrem rigorosos controles como os fármacos⁸. Ao contrário, países como Alemanha, França, Inglaterra, Canadá, Austrália e Korea, obrigam a utilização de métodos seguros e padronizados de qualidade de manufaturados vegetais⁸. Na Korea, o controle de qualidade baseia-se na inspeção da identidade, pureza e caracterização dos compostos, envolvendo exame macroscópico (embalagem, características organolépticas, apresentação, materias estranhos) e microscópicos (análise da parede celular do vegetal) e inspeção analítica utilizando técnicas como CCD (TLC), CLAE (HPLC), CG-EM, CL-EM e espectrofotometria^{19,47}.

Devido a problemas de falsificação e adulterações de produtos fitoterápicos, o Ministério da Saúde do Brasil editou uma norma visando estabelecer regras quanto ao registro de medicamentos fitoterápicos e rígidos parâmetros de qualidade, segurança e eficácia terapêutica, surgindo assim a resolução RDC nº 17 (Brasil, 2000) e em abril de 2000 a RDC nº 33 veio complementá-la estabelecendo exigências sobre boas práticas de fabricação e controle de qualidade de ingredientes manipulados nas farmácias de manipulação^a. Para a realização do controle de qualidade de alguns produtos fitoterápicos o Brasil dispõe de um material escrito que contém as especificações mínimas da qualidade de produtos farmacêuticos, desde a matéria-prima até a embalagem, a Farmacopéia Brasileira. Infelizmente são poucos os fitoterápicos descritos na farmacopéia dificultando o controle de qualidade de forma adequada e reprodutível.

Nem o guia de boas práticas laboratoriais, ou de boas práticas de produção, nem as autoridades regulamentares estipulam quais técnicas

^awww.anvisa.gov.br

cromatográficas e métodos devem ser utilizados quando se deseja realizar um controle de qualidade para um produto⁵². Pesquisas realizadas neste sentido demonstram que os equipamentos necessários para um correto controle de qualidade envolvem instrumentação cromatográfica como CLAE (HPLC), CG, CCD, além de dados espectroscópicos dos constituintes presentes no extrato ou material vegetal^{37,40,52-54}. A CLAE tem prestado grande auxílio na padronização permitindo verificar o perfil cromatográfico do extrato, tornando possível à averiguação das substâncias presentes e ou responsáveis pela atividade farmacológica e a cromatografia gasosa tem sido um valioso instrumento na padronização de muitas plantas medicinais^{36,37,40,55}.

Muitas contribuições relacionadas com a atividade, eficácia e toxicidade de plantas medicinais têm sido publicadas, mas a identidade e qualidade dos materiais vegetais não têm sido demonstradas. Portanto, a significância desses estudos e sua reprodutibilidade ainda são limitados⁵².

O conceito inicial de controle de qualidade foi concentrado especialmente na avaliação da eficiência analítica, isto é, teste da sensibilidade analítica e especificidade, bem como da exatidão e reprodutibilidade dos métodos. Mais tarde, este conceito foi expandido para confiança da qualidade, o qual inclui resultados, incluindo preparação da amostra, coleta, processamento do material, eficiência da medição, validação dos resultados, bem como seu relatório e interpretação. Uma nova expansão deste modelo tem nos levado a noção de administração da qualidade, o qual enfoca sobre os benefícios para a sociedade. Para a total qualidade é necessário incluir regulamentações nacionais e internacionais, referência dos procedimentos e dos materiais⁵¹.

1.4.1. VARIABILIDADE DE PREPARAÇÕES VEGETAIS

Atualmente, a forma de padronização de plantas medicinais continua insuficiente e esta ausência de informações, de como proceder, pode ser facilmente compreendida por razões de variabilidade dos constituintes presentes em uma planta⁴⁹. Dependendo de sua origem, das condições de crescimento,

como constituintes no solo, variação sazonal, influência climática, data de coleta, os constituintes químicos podem diferenciar intensamente, quanto à qualidade e quantidade de metabólitos secundários bioativos, de uma amostra para outra, além das condições de secagem e estocagem^{49,54,56}. Padronização, otimização e controle completo das condições de crescimento podem garantir uma produção qualitativa controlada de muitos compostos derivados de plantas⁷.

Outro problema que pode acontecer seria interações da planta a ser utilizada com outras e até com microorganismos. A polaridade do solvente usado durante a extração, o modo de extração e a instabilidade da composição química da preparação são fatores que podem influenciar na estabilidade do material vegetal e ser freqüentemente controlados quando a natureza dos constituintes químicos são conhecidos através da caracterização e padronização^{49,53}.

Para a padronização qualitativa dos extratos, os procedimentos cromatográficos dão bons resultados, garantindo que o extrato corresponde ao nome do extrato, permite a exclusão ou descoberta de adulterações ou reconstrução dos extratos e garantem que nenhuma degradação tenha ocorrido durante o processo extrativo^{53,54}.

1.4.2. CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES VEGETAIS

A caracterização de um material vegetal, o qual pode conter princípios ativos conhecidos, desconhecidos ou uma mistura de várias plantas, requer a combinação de dois ou mais métodos cromatográficos, incluindo dados espectroscópicos^{18,50,53}.

Baseado em definições da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), composto caracterizado é um constituinte de uma parte da planta que pode ser usado para garantir a identidade ou qualidade da preparação fitoquímica, não sendo necessariamente responsável pelos efeitos terapêuticos ou biológicos da planta⁴⁷.

Quando se tem uma preparação vegetal com os constituintes conhecidos, a caracterização é feita com estes compostos, a cromatografia qualitativa é

complementada com a determinação quantitativa dos princípios ativos, utilizando CLAE e CG, obtendo-se assim uma correlação entre a quantidade dos compostos presentes e sua eficácia terapêutica ou farmacológica; além disto utiliza-se a CCD para analisar este mesmo extrato na sua forma aquosa, analisando se todos os compostos presentes são solubilizados no mesmo meio⁵⁴. Em preparações que não se conhece a totalidade dos constituintes químicos, compostos líderes podem ser usados para a caracterização, não estando relacionados com a atividade do extrato, mas sendo compostos “marcadores” do extrato, característico ou no caso de existir alguma evidência de que um composto esteja contribuindo para a atividade, este deve ser considerado para a análise⁵⁷. Neste caso pode-se utilizar CLAE, CG ou CCD^{50,54}. Um exemplo da utilização dessas três técnicas como forma de realizar um controle de qualidade foi o estudo com uma planta medicinal chinesa conhecida como Beimu, espécie *Fritillaria*, onde alcalóides isosteroidais são os principais compostos bioativos e que podem variar de espécie para espécie⁵⁸.

A utilização de preparações vegetais contendo misturas de diferentes plantas é baseada no conhecimento de que possam existir efeitos sinérgicos e antagonistas, o que não são cientificamente muito bem avaliados^{21,22}. Neste caso a caracterização química pode ser realizada utilizando-se CLAE, CLAE-EM ou CG-EM⁵⁴.

1.4.3. PADRONIZAÇÃO E EFICÁCIA DE PREPARAÇÕES VEGETAIS

É bem conhecido que a eficácia terapêutica de um material vegetal geralmente está relacionado não a um simples grupo de compostos, como por exemplo alcalóides da *Atropa belladonna*, mas por vários grupos de constituintes. Neste caso a análise química deve ser confirmada não somente por um simples composto, mas caracterizada de forma mais completa possível⁵⁶. Um exemplo de padronização realizada com uma planta é a análise do *Hypericum perforatum*, conhecida com St. John's wort (erva de São João), utilizada como um antidepressivo natural⁵⁹. Estudos, realizados com esta planta, consideraram que

os compostos hipericina e pseudohipericina são os principais constituintes na planta e tem sido utilizados como alvo de todos os métodos para a análise desta planta, principalmente para a padronização dos extratos⁵⁹. Vários métodos analíticos foram utilizados para o monitoramento do composto principal, com atividade na planta e caracterização do extrato, como CLAE, UV e CCD e os resultados revelaram que as técnicas usadas estavam em acordo e revelaram alta significância⁵⁹.

Para a caracterização e padronização de um material vegetal, técnicas cromatográficas podem ser usadas somente se múltiplas determinações forem executadas, para que possa garantir com exatidão a estabilidade da composição dos extratos, garantindo também a constância da atividade do extrato⁵². A padronização não é somente uma operação analítica e não termina com a identificação e análise dos constituintes principais. Padronização significa um grupo de informações necessárias para garantir não somente sua constância química, mas também sua eficácia⁵⁶. Somente se um controle de qualidade for rigidamente aplicado a um produto natural, podem estes produtos realmente competir com os medicamentos sintéticos já existentes.

1.5. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ORIGEM

NATURAL

Uma vez isolado um composto segue-se então à sua identificação estrutural; este processo requer um acúmulo de dados de numerosas técnicas que possibilitará assimilação e fornecimento da estrutura química.

As técnicas básicas, de elucidação estrutural de produtos naturais, mudaram muito pouco nos últimos 10 anos. Para as análises utiliza-se do infravermelho (IV), espectroscopia de hidrogênio e carbono (RMN-¹H e ¹³C), espectrometria de massa e rotação ótica. O avanço destas pesquisas concerne em estratégias empregadas para a elucidação estrutural, em termos de sua estrutura, como estereoquímica relativa e absoluta^{26,60}.

Técnicas atuais empregadas para a suplementação das análises por ressonância magnética nuclear são RMN- ^{13}C com DEPT (intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização), INEPT, APT, COSY (espectroscopia de correlação ^1H - ^1H), HETCOR (heterocorrelação entre espectro de ^1H e ^{13}C), também chamado de HOMCOR 2D, HMBC (conectividade de múltiplas ligações heteronuclear), NOE (efeito nuclear overhauser), INADEQUATE, experimento que envolve determinação da correlação entre ^{13}C - ^{13}C adjacentes, mas muito pouco utilizado devido a restrita quantidade natural de ^{13}C em moléculas e devido ao seu alto custo, além de muitas outras técnicas^{26,35,60}.

Além destas técnicas pode-se empregar a difração de raios-X, e, neste caso, a condição requerida para a análise é a disposição da amostra em cristal adequado, possuir uma estrutura cristalina, podendo assim avaliar a estereoquímica real da substância, obter informações da forma tri-dimensional, ângulos e comprimento das ligações^{61,62}.

IV – Espectroscopia no Infravermelho:

A espectrometria no infravermelho (IV) é a técnica que abrange no espectro, a região de 4000 a 400 cm^{-1} , dando informações das características da molécula como um todo, de seus grupamentos funcionais, que dão origem a bandas que ocorrem na mesma frequência, independente da estrutura da molécula⁶⁰.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear:

Para se estabelecer a constituição química de uma molécula é necessário o conjunto de dados estruturais como ressonância magnética nuclear, que permite determinar a conectividade de cada ligação C-C e C-X na molécula. No caso de uma molécula complexa, ou que não tenha dados na literatura que possam ser debatidos, faz-se necessário o uso de técnicas suplementares que possam fornecer maiores detalhes sobre a estrutura e mesmo comprová-la, mediante diversos tipos de correlação.

A espectroscopia de correlação (COSY), fornece um espectro 2D, o qual dá um a visão global das correlações ^1H - ^1H , no caso de homonuclear, através dos

“cross peaks” e HC COSY, correlação ^1H - ^{13}C que estão diretamente ligados, conseqüentemente não fornece informações sobre os carbonos quaternários, mas para se obter esta informação, utiliza-se o espectro COLOC, onde se obtém sinais adicionais, indicando acoplamento à longa distância^{22,63,64}.

Um experimento também utilizado para a determinação da estereoquímica de um composto e bastante utilizado na elucidação de produtos naturais é o NOE-diferencial, o qual permite mostrar a correlação dos prótons no espaço, através da irradiação seletiva de um ^1H , subtraindo o espectro normal do espectro e com incremento no sinal do ^{13}C ao qual está diretamente ligado ao próton²². Este efeito Overhauser Nuclear (NOE), também ocorre com hidrogênios que não estão ligados diretamente, mas estão espacialmente próximos⁶⁵. Este procedimento é muito útil na distinção de estereoisômeros, configuração de ligações dupla-trisubstituídas e configuração da molécula⁶⁰.

Como o espectro de RMN- ^{13}C fornece os deslocamentos químicos dos vários tipos de carbono, presentes na molécula, mas não distingue entre CH_3 , CH_2 , CH ou C , neste caso utiliza-se a técnica APT (teste dos hidrogênios ligados), que fornece o número de átomos de ^1H diretamente ligados a cada carbono em um espectro de ^{13}C , evidenciados pela forma com que se apresentam os picos, como no caso de CH_3 e CH , ambos para baixo, como sinais negativos e os CH_2/C como sinais positivos²².

Um método mais sensível para esta análise é a escolha de DEPT, que fornece espectro com fase positiva e negativa⁶³. Neste, obtém-se quatro subespectros, um com os sinais de todos os carbonos protonados e os demais apresentando os sinais dos CH , CH_2 e CH_3 , respectivamente, entretanto os átomos de carbono quaternário, por não estarem ligados diretamente, não são observados⁶⁶. Para avaliar correlações de átomos de carbonos e seus respectivos prótons, existe a espectro HETCOR (^1H - ^{13}C COSY), que correlaciona os carbonos e os prótons diretamente ligados, prótons vizinhos, no caso das ligações apresentarem distantes de 2-3 ligações, ligações ^2J ou ^3J , utiliza-se HETCOR Long Range (ou HMBC)²².

EM – Espectrometria de Massa:

Uma das técnicas, não menos importante, aplicada a muitos sistemas complexos e também utilizada como complementar é a espectrometria de massa (EM), que ajuda a estabelecer a fórmula molecular através da informação do peso molecular juntamente com informações das fragmentações características da molécula, utilizando bombardeamento de elétrons, ionização química, entre outras^{60,67}.

Depois de verificada a pureza do composto isolado, sua estrutura determinada por métodos espectroscópicos, tendo então a estrutura bem definida e com bom rendimento durante sua obtenção, a síntese total ou parcial, bem como preparação de derivados ou análogos pode ser tomada como etapa seguinte e mesmo a modulação da atividade biológica e definição da relação estrutura-atividade podem ser avaliados.

1.6. FÁRMACOS ORIUNDOS DE PRODUTOS NATURAIS

Historicamente, produtos naturais têm impulsionado a pesquisa de novos medicamentos, produzindo poderosos compostos biologicamente ativos, os quais podem e tem servido como compostos líderes. Aproximadamente 1/3 de todos os fármacos aprovados pela FDA (Food and Drugs Administration) utilizados na medicina convencional tem sua origem de plantas⁸. Um exemplo foi a descoberta da penicilina, a partir do fungo *Penicilium*, que induziu à busca por agentes antibióticos, da atropina e quinina a partir de plantas^{49,68}. Estudos revelam que atualmente cerca de 120 substâncias puras, isoladas de plantas, em geral através de indicações da medicina popular e estudos fitoquímicos bio-direcionados, são usadas com finalidades terapêuticas⁶⁹.

Plantas medicinais estão se tornando cada vez mais populares em países desenvolvidos como resultado da insatisfação com a medicina convencional, e devido a este fenômeno, a indústria farmacêutica, juntamente com institutos de pesquisa, vem desenvolvendo estudos direcionados para a descoberta de novas

substâncias que possam substituir os tradicionais medicamentos, sem os efeitos adversos^{2,3,56,70}.

Um estudo realizado com a avaliação dos efeitos psicodinâmicos e farmacodinâmicos, os quais corroboram para o efeito terapêutico, comprovou que a eficácia de um medicamento está mais relacionado com o componente psicodinâmico, que incorpora o valor que o paciente dá à terapia com plantas medicinais, o que envolve uma maior segurança por parte do usuário, além de tolerabilidade e aceitabilidade da medicina natural, em alguns casos ocorrendo até a diminuição dos efeitos adversos que se fazem presentes na terapia convencional⁷¹.

Outro fator que alguns pesquisadores tem levado em consideração ao buscar novas opções de medicamentos de origem vegetal, é o conceito etnobotânico, que agrega informações de plantas medicinais, em diferentes regiões, analisando o modo de uso, sua preparação, aplicação e aspectos gerais sobre as doenças da região em estudo⁷². Neste estudo ficou identificado que a integração dos dados etnobotânicos com os estudos fitoquímicos e farmacológicos contribui para um melhor entendimento do modo de ação de importantes produtos naturais. Como exemplo de importante êxito da etnomedicina pode-se citar dois agentes anti-infecciosos maláricos a quinina **(1)** e artemisinina **(2)** isolados das plantas *Chincona succiruba* e *Artemisia annua*, respectivamente^{5, 73,74}.

Existe uma grande necessidade da utilização de pesquisas científicas para a busca de novas substâncias, com específicos modos de ação e em um particular receptor, dado à imensa expansão de numerosas doenças. As áreas de atuação envolvem a busca por moléculas que possam interferir no processo do câncer, atuar como anti-infecciosos, controle de doenças tropicais, regulação de fertilidade, processos inflamatórios e na alergia, hepatoproteção e atividade imunomoduladora⁷⁴.

Nesta busca incessante de novos fármacos, não deve-se deixar de mencionar um dos medicamentos mais promissores, originário de plantas, o diterpeno taxol **(3)**, isolado da *Taxus brevifolia*, sendo desenvolvido atualmente pelo Instituto Nacional do Câncer e pela Companhia Bristol-Myer Squibb, como

medicamento comercial^{15,73,75}. Esta descoberta impulsionou ainda mais a busca por substâncias ativas, neste contexto, podemos também citar a descoberta da hipericina (**4**), isolado da *Hypericum perforatum*, que além de exercer efeito antidepressivo, exibe atividade antiretroviral, atividade esta de suma importância visto a expansão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), dentro desta linha de pesquisa tem-se o alcalóide tetrahidroxindolizínico, castanospermina (**5**), isolado da *Castanospermum australe*^{8,59,74,76}. No campo de fármacos que atuam sobre o sistema nervoso central podemos mencionar a morfina (**6**), um alcalóide com propriedades analgésicas, utilizado nos mais diversos tipos de dores severas^{50,77}.

Na pesquisa por novas substâncias cardiovasculares temos a forscolina (**7**), que exibiu diminuição da pressão sanguínea, além de apresentar efeito antiespasmódico e empregado no tratamento do glaucoma. Os efeitos benéficos dos extratos das plantas *Digitalis purpurea* e *lanata* levaram ao uso da digitoxina (**8**) e digoxina (**9**) na medicina cardiovascular e hoje são conhecidos como glicosídeos cardíacos⁷⁸. No controle do desenvolvimento populacional, surgem novos fármacos utilizados como contraceptivos como o sesquiterpeno dimérico gossipol (**10**), obtido da espécie *Gossypium*⁷⁴.

Uma das áreas de pesquisa de compostos bioativos visa obter novas formas de tratamento da diabetes, uma doença que acomete grande parte da população, e neste sentido foi observada atividade antidiabetes na acarbose, um complexo de oligossacarídeos, isolados da *Actinoplanes* sp⁷⁶. Novas substâncias, oriundas de plantas medicinais, vêm ganhando grande dimensão e incentivando cada vez mais a pesquisa por medicamentos que possam contribuir no tratamento ou na cura das enfermidades que acometem a população, como no tratamento de doenças do sistema sanguíneo, como leucemia, anemia e outras desordens, e que tem surgido grande progresso⁷⁹. Muitos flavonóides, isolados de plantas, tem demonstrado uma série de aplicações, como antialérgicos, antivirais, antiinflamatórios, ação vasodilatadora e principalmente atividade antioxidante⁸⁰⁻⁸². Muitas destas atividades estão principalmente relacionadas com a estrutura

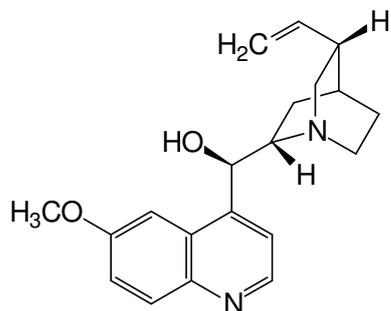
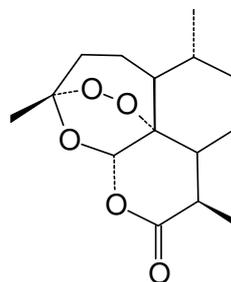
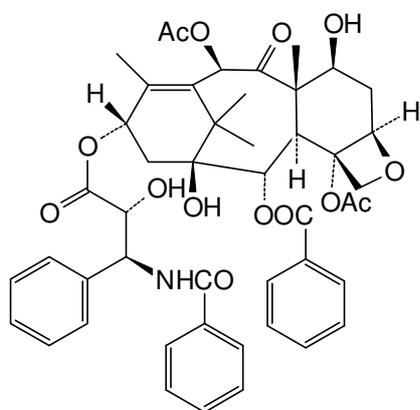
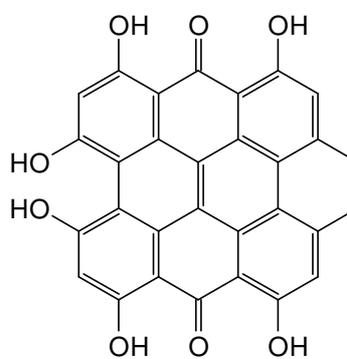
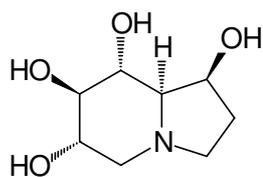
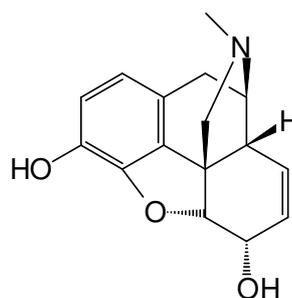
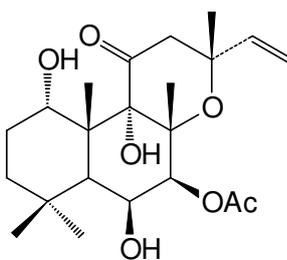
destes compostos fenólicos, onde a variação em sua molécula, como adição de açúcares, e grupamento hidroxila pode variar a atividade biológica^{80, 83}.

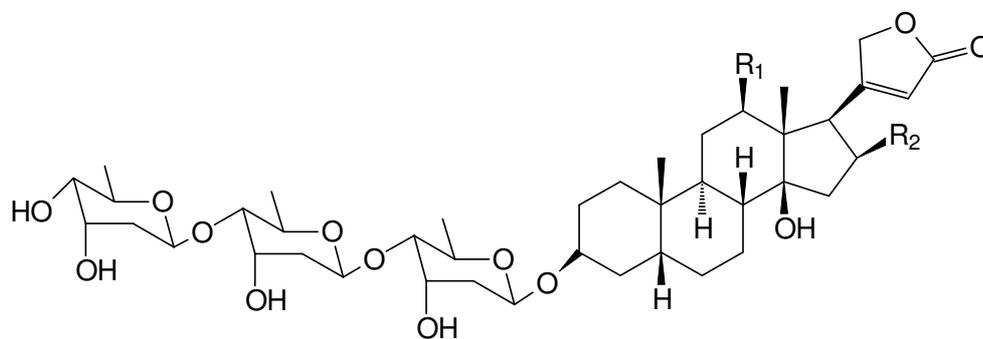
Outra classe de compostos que tem apresentado importantes atividades são os fitoesteróides, dentre estas, atuando na diminuição do nível de colesterol no organismo, atividade antiinflamatória e muitas outras^{80, 82,84}.

Atualmente existe uma preocupação, principalmente em nossos laboratórios da pesquisa, juntamente com o auxílio de farmacologistas, à busca de substâncias que possam contornar processos crônicos dolorosos, visando a obtenção de efetivos e potentes analgésicos. Descobertas recentes de substâncias antinociceptivas incluem os alcalóides, terpenos, esteróides e flavonóides^{4, 28,83-85}.

Todas as atividades apresentadas pelos distintos grupos de substâncias isoladas de plantas estão de uma certa forma relacionadas com a origem biossintética. Muitos trabalhos têm evidenciado existir uma relação intrínseca entre a atividade biológica e estrutura do composto. Grupos fenólicos, historicamente têm apresentado principalmente atividade antioxidante, mas também atividade antimicrobiana, como o exibido pela miricitina e kaempferol e antiinflamatório para o kaempferol; os terpenóides, também conhecidos como isoprenóides, relacionados com atividade antioxidante, uma outra classe são os fitoesteróides, como o β -sitosterol e seus correspondentes glicosilados, os quais apresentam atividade antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imunomoduladora. Já os alcalóides relacionados com atividade antineoplásica, principalmente⁸⁶.

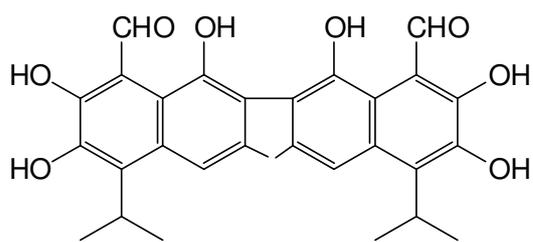
Ainda que exista uma ampla variedade de compostos ativos de origem natural que possam ser relacionados futuramente como medicamentos, existem muitos caminhos ainda para percorrer e obstáculos a serem vencidos para se chegar realmente a um medicamento comercial. A dificuldade está centrada principalmente em métodos farmacológicos apropriados e ensaios biológicos que possam predizer uma certa eficácia clínica da substância em estudo⁷⁴.

**Quinina (1)****Artemisinina (2)****Taxol (3)****Hipericina (4)****Castanospermina (5)****Morfina (6)****Forscolina (7)**



Digitoxina (8) R₁=R₂=H

Digoxina (9) R₁=OH, R₂=H



Gossipol (10)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS PLANTAS EM ESTUDO

Dentro de um programa de obtenção de moléculas farmacologicamente ativas a partir de produtos naturais, desenvolvidos entre o laboratório de produtos naturais/UFSC e o Núcleo de Investigações Químico-farmacêutico (NIQFAR)/UNIVALI, optou-se inicialmente pela investigação da planta *Aleurites moluccana* (Euphorbiaceae) conhecida popularmente pelo nome “Nogueira-da-Índia” ou “Nogueira-de-Iguape”, amplamente utilizada na medicina popular contra diversas enfermidades e por estudos desenvolvidos anteriormente terem indicado bons resultados fitoquímicos e biológicos, o que conduz a dar continuidade aos estudos visando comprovar seu uso na medicina popular⁸⁷.

Será realizada também análise fitoquímica e farmacológica de *Bauhinia microstachya* (Raddi.) Macbr. além de modificações estruturais da marrubiina, composto isolado com alto rendimento da planta *Marrubium vulgare*.

2.1. *Aleurites moluccana*

2.1.1. GÊNERO *Aleurites*: ASPECTOS BOTÂNICOS

A família Euphorbiaceae consiste de plantas herbáceas, arbustos ou árvores que geralmente produzem um látex lenhoso, são espécies originárias da Ásia Tropical e Ilhas do Pacífico, encontradas no Brasil em áreas tropicais, largamente cultivadas no litoral, podendo também ser encontradas em zonas temperadas⁸⁸. Esta família contém aproximadamente 7000 espécies com 317 gêneros⁸⁹. Investigações prévias, realizadas com esta família, tem verificado a presença principalmente de lipídeos, terpenóides, alcalóides e hidrocarbonetos⁹⁰. Estudos revelam a importância desta família na alimentação, medicina, bem como à nível industrial^{91,92}.

Dentre os vários gêneros pertencentes à Euphorbiaceae, podem ser citados como os de maior importância, devido a diversidade, aplicação e interesse

econômico: *Euphorbia*, *Croton*, *Phyllanthus*, *Jatropha*, *Sapium*, *Ricinus*, *Aleurites*^{88,89}. O gênero *Aleurites* subdivide-se em *A. trisperma*, *A. cordata*, *A. montana*, *A. fordii*, *A. montance*, *A. rockinghamensis*, além da *A. moluccana*, a qual é abordada neste estudo⁹²⁻⁹⁸⁵.

A *A. moluccana* L. (Willd.) (Fig. 3), (Euphorbiaceae), é uma árvore exótica, natural da Indonésia e largamente cultivada no Estado de Santa Catarina. É relativamente grande, com folhas longo-pecioladas, com revestimento estrelado-tomentoso curtas, quase farinoso-ferrugíneo, mais tarde glabras, simples ou 3-5-7-lobuladas, até 20cm de comprimento; flores em regra monóicas, raramente dióicas, alvas, pequenas e numerosas, pétalas nas flores masculinas lânceo-ovaladas e nas femininas linguiformes, em ambas com 7-9 mm de comprimento; frutos por fora carnosos, glabros e de ápice aguçados, de 5-6 cm de diâmetro; possui de 1 a 2 sementes, globular-comprimidas; as amêndoas contém aproximadamente 60% de óleo graxo^{92,98-100}.

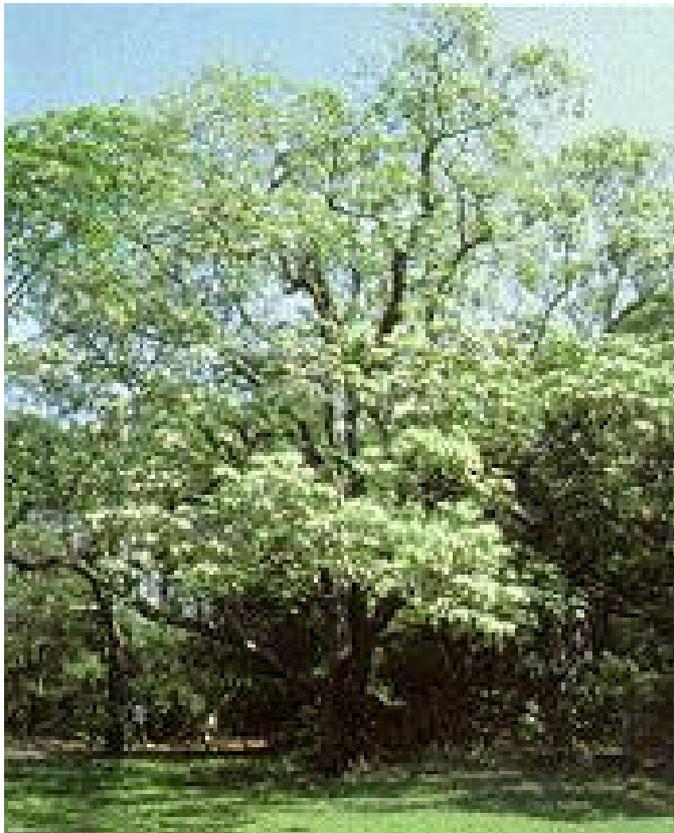


Figura 3. *Aleurites moluccana*^b.

^bwww.esalq.usp.br/Trilhas/medicina/am19.htm; www.hear.org/pier/almol.htm.

A *A. moluccana* é uma planta medicinal ocorrendo em várias regiões do Brasil, introduzida da Índia e aclimatada desde São Paulo até o Rio Grande do Sul, conhecida popularmente como “Nogueira-de-Iguape”, “Nogueira-da-Índia” ou simplesmente “Nogueira”; sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, tais como: febre, inflamações, asma, conjuntivite, hepatite, dores de cabeça, úlceras, diarreia, gonorréia e também utilizada como antitumoral, estimulante laxativo e sudorífero e antireumático^{92,99-102}.

Estudos recentes com o extrato de acetone/diclorometano das cascas de *A. moluccana* evidenciaram atividade contra vírus HIV (AIDS) e o extrato aquoso apresentou atividade moderada¹⁰³. O extrato metanólico obtido das folhas de *A. moluccana* revelou atividade anticolesterolêmica¹⁰⁴.

Estudos realizados anteriormente em nossos laboratórios evidenciaram consideráveis efeitos biológicos, justificando, ao menos em parte, seu amplo uso na medicina popular^{83,84,105}.

- *Aleurites moluccana* Linnaeus (Willdenow)^{106,107}

Sinônimo: *Aleurites triloba* J. R. & G. Forst, *Croton moluccanus* L., *Jatropha moluccana*.

Nomes vulgares: nogueira, nogueira-de-iguape, noz-da-índia, nogueira-de-bancul, nogueira-da-índia.

Lugar de origem: nativa da Malásia, Índia e Polinésia.

Fenologia: Floresce de novembro até abril em Santa Catarina.

Área de dispersão: Santa Catarina: Municípios de Florianópolis, Itajaí e Tijucas.

2.1.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO GÊNERO *Aleurites*

Até o momento três espécies pertencentes ao gênero *Aleurites* foram estudadas quanto a seus constituintes químicos, das quais foram isoladas, principalmente, esteróis, taninos, hidrocarbonetos e flavonóides, como pode ser observado nas Tabelas 1 a 3.

As estruturas e a nomenclatura de alguns compostos isolados do gênero *Aleurites*, estão indicados nas Figuras 4-6.

Tabela 1. Metabólitos secundários isolados da *A. montana*.

Composto	Parte da planta	Referências
Friedelin	Cascas	Misra & Khastgir, 1970 ⁹³
β -sitosterol (11)	Cascas	Misra & Khastgir, 1970 ⁹³
3 β -acetoxi metil aleuritolato (12)	Cascas	Misra & Khastgir, 1970 ⁹³
Ácido betulínico	Cascas	Misra & Khastgir, 1970 ⁹³
Ácido aleuritólico (13)	Cascas	Misra & Khastgir, 1970 ⁹³

Tabela 2. Metabólitos secundários isolados da *A. fordii*.

Composto	Parte da planta	Referências
5, 6, 7-trimetoxicumarina (14)	Caule	Fozdar <i>et al.</i> , 1989 ⁹⁶
Aleuritin (15)	Caule	Fozdar <i>et al.</i> , 1989 ⁹⁶
Aleurinin A (16)	Folhas	Nonaka <i>et al.</i> , 1990 ¹⁰⁸
Aleurinin B (17)	Folhas	Nonaka <i>et al.</i> , 1990 ¹⁰⁸
Aleurinin C (18)	Folhas	Nonaka <i>et al.</i> , 1990 ¹⁰⁸
Corilagin (19)	Folhas	Nonaka <i>et al.</i> , 1990 ¹⁰⁸
Geranin (20)	Folhas	Nonaka <i>et al.</i> , 1990 ¹⁰⁸ Taniguchi <i>et al.</i> , 2002 ¹⁰⁹
Ácido Chebulágico (21)	Folhas	Nonaka <i>et al.</i> , 1990 ¹⁰⁸
Diterpeno Éster 12-O-hexadecanoil-16-hidroxi-forbol-13acetato (22)	-	Ito <i>et al.</i> , 1983 ¹¹⁰ , Matsuda <i>et al.</i> , 1986 ¹¹¹

Tabela 3. Metabólitos secundários isolados da *A. moluccana*.

Composto	Parte da planta	Referências
Moretenone (23)	Folhas, Caules	Hui & Ho, 1968 ⁹⁰
Moretenol	Folhas	Hui & Ho, 1968 ⁹⁰
α -amirina (24)	Folhas	Hui & Ho, 1968 ⁹⁰

β -sitosterol (11)	Folhas, Caules	Hui & Ho, 1968 ⁹⁰
Moluccanim (25)	Caules	Shamsuddin <i>et al.</i> , 1988 ¹¹²
13- <i>O</i> -miristil-20- <i>O</i> -acetil-12-deoxiforbol (26)	-	Satyanarayana <i>et al.</i> , 2001 ¹¹³
Ácido acetil aleurítico (27)	Cascas	Meyre-Silva <i>et al.</i> , 1997 ¹⁰⁵
Swertisina (28)	Folhas	Meyre-Silva <i>et al.</i> , 1997 ¹⁰⁵
Mistura de α,β -amirina (29)	Folhas	Meyre-Silva <i>et al.</i> , 1998 ⁸⁴
<i>n</i> -Hentriacontano (30)	Folhas	Meyre-Silva <i>et al.</i> , 1998 ⁸⁴
Mistura de estigmasterol, β -sitosterol e campesterol (31)	Folhas	Meyre-Silva <i>et al.</i> , 1998 ⁸⁴
2''- <i>O</i> -Ramnosilswertisina (32)	Folhas	Meyre-Silva <i>et al.</i> , 1999 ⁸³

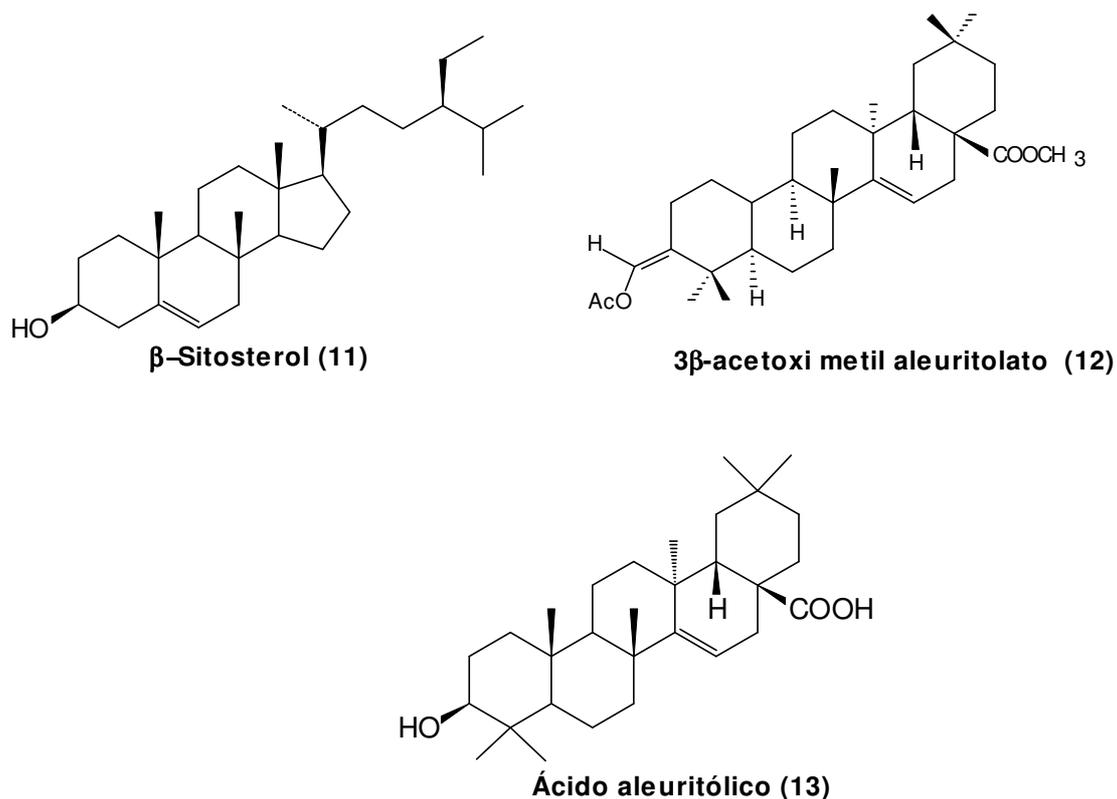
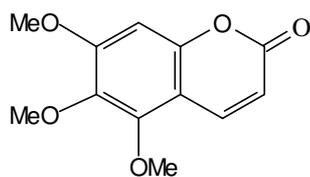
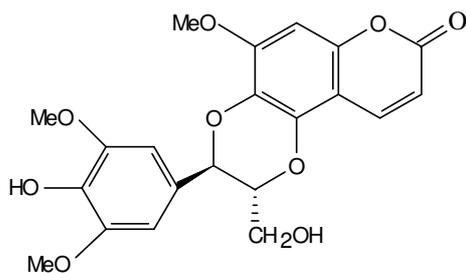
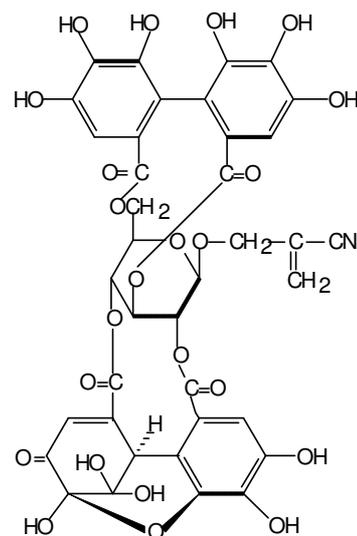
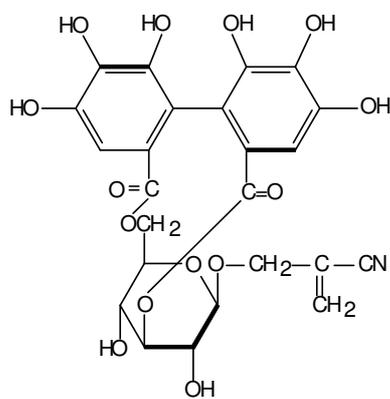
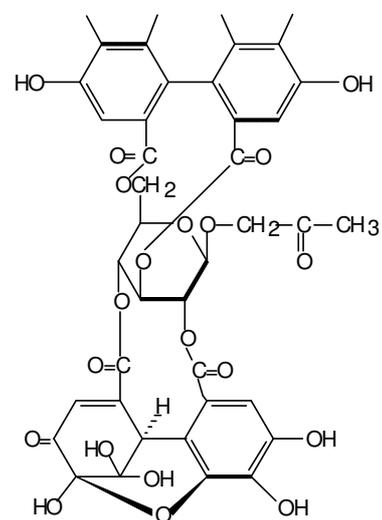
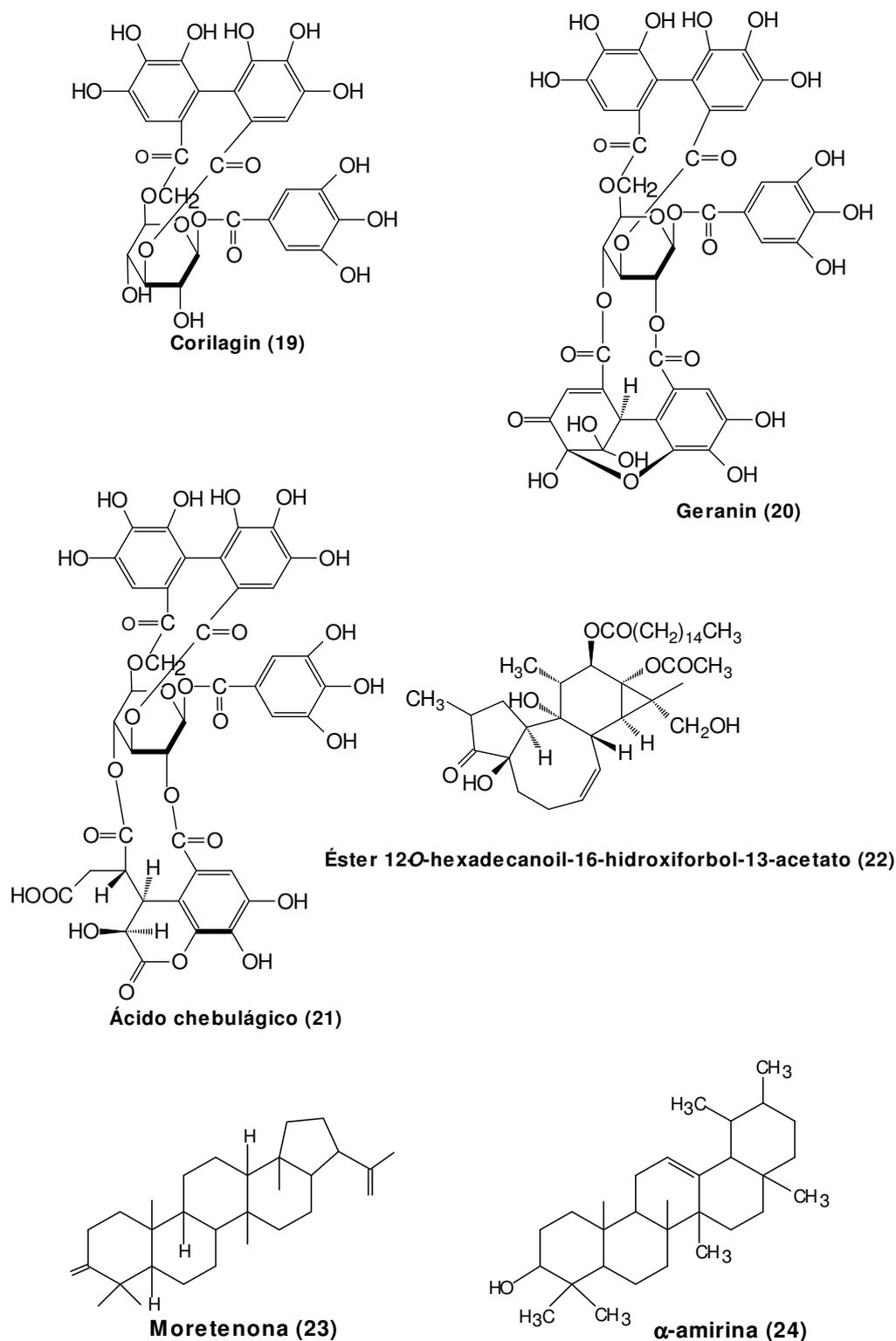


Figura 4. Estruturas moleculares de alguns compostos isolados de *Aleurites montana*.

**5, 6, 7-Trimetoxicumarina (14)****Aleuritin (15)****Aleurinin A (16)****Aleurinin B (17)****Aleurinin C (18)****Figura 5.** Estruturas de alguns compostos isolados de *Aleurites fordii*.



Continuação Figura 5. Estruturas de alguns compostos isolados de *Aleurites fordii*.

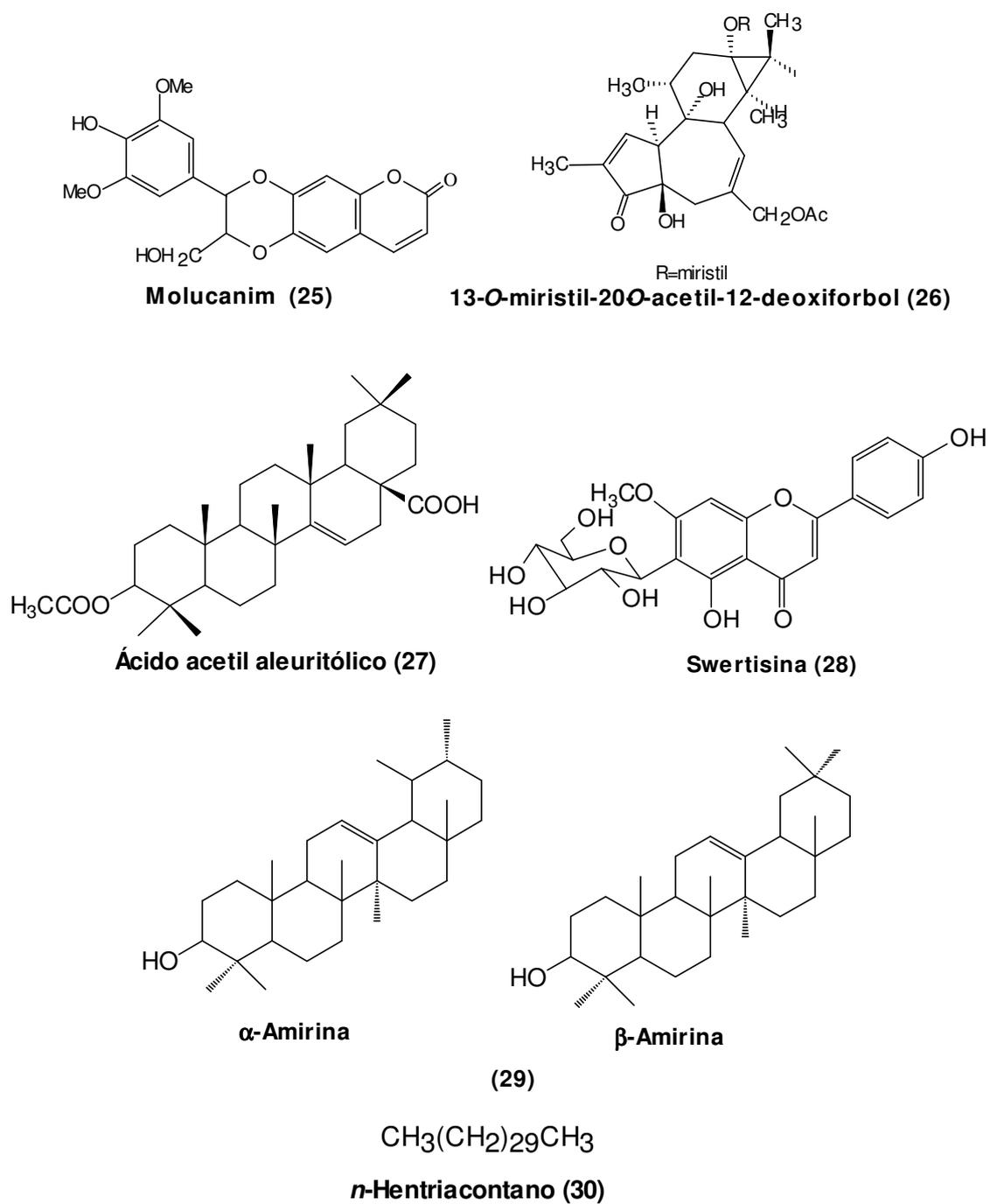
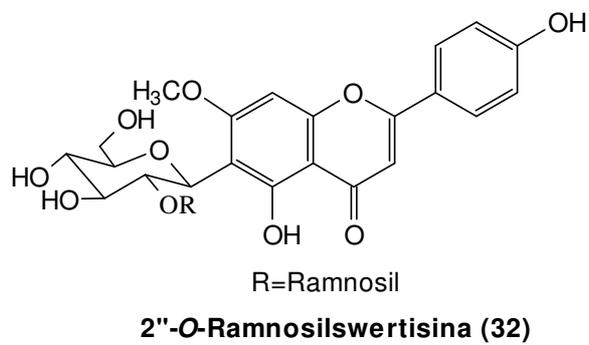
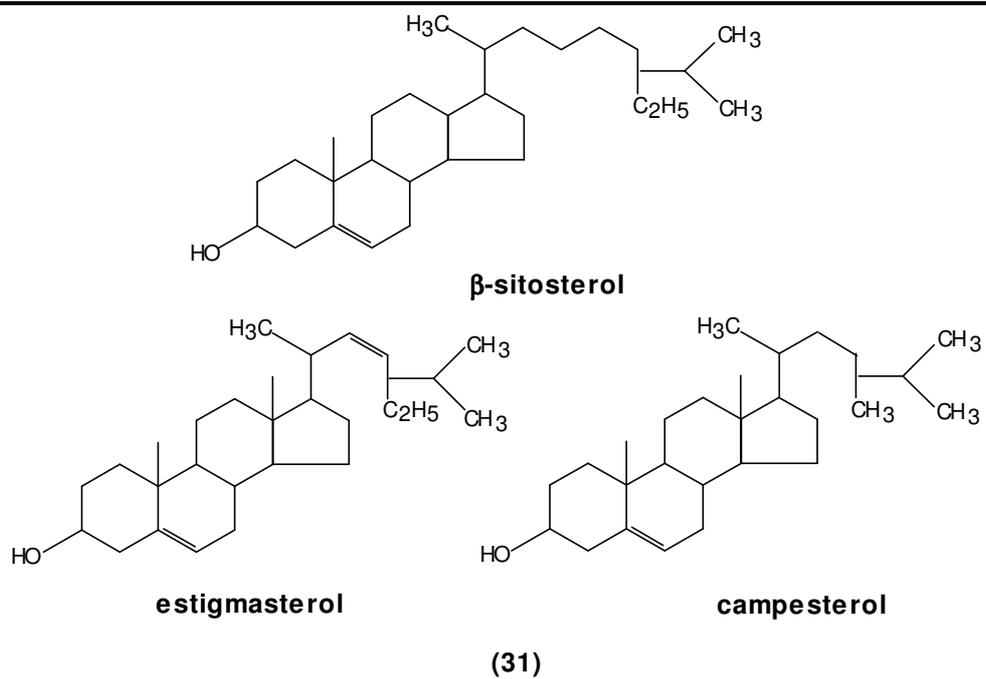


Figura 6. Estruturas de alguns compostos isolados de *Aleurites moluccana*.



Continuação Figura 6. Estruturas de alguns compostos isolados de *Aleurites moluccana*.

2.2. *Bauhinia microstachya*

2.2.1. GÊNERO *Bauhinia* ASPECTOS BOTÂNICOS

A família Leguminosae é a terceira mais numerosa entre as famílias de plantas superiores, compreendendo mais de 600 gêneros, que reúnem mais de 13.000 espécies, encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais¹¹⁴. São plantas que vão desde grandes árvores, arbustos, ervas e também trepadeiras, sendo que muitas delas possuem importância na economia como alimento (soja), árvores florestais, condimentos e plantas ornamentais¹¹⁵.

Esta família compreende 3 importantes subfamílias, diferenciadas segundo sua estrutura floral: Caesalpinoideae, Papilionoideae (Faboideae) e Mimosoideae¹¹⁴.

Dentre os vários gêneros integrantes desta família e subfamília Caesalpinoideae, encontra-se o gênero *Bauhinia*, compreendendo aproximadamente cerca de 300 espécies, encontradas em áreas tropicais¹¹⁶. Muitas plantas deste gênero são usadas na medicina tradicional como analgésica, antidiabética, antiinflamatória, antimicrobiana, antimalárial e diurético¹¹⁷⁻¹²⁰. Estudos fitoquímicos e farmacológicos indicaram que plantas, deste gênero, são constituídas principalmente de glicosídeos esteroidais, triterpenos, lactonas e flavonóides¹¹⁶.

Embora muitos compostos tenham sido isolados e identificados em algumas espécies do gênero *Bauhinia*, quase não existem estudos relatados na literatura que relacionem tais compostos com sua atividade biológica. No entanto, o uso medicinal das plantas deste gênero pela população tem revelado excelentes resultados e aos poucos estudos científicos vem comprovando a eficácia em vários modelos experimentais, justificando o uso na medicina popular¹¹⁶.

As principais espécies do gênero *Bauhinia* compreendem *B. splendens*, *B. forficata*, *B. manca*, *B. rufescens*, *B. cheitantha*, *B. candicans*, *B. championis*, *B. guainensis*, *B. purpurea*, *B. racemosa*, *B. reticulata*, *B. thonninguii*, *B.*

uruguayensis, *B. vahlii*, *B. megalandra*, *B. variegata*, *B. tarapotensis*, *B. malabarica*, e *B. microstachya*, a qual é abordada neste estudo¹¹⁶⁻¹²².

A *B. microstachya* (Fig.7), planta conhecida popularmente como cipó-escada, escada de jabuti ou escada de macaco está amplamente distribuída na região sul do Brasil e ainda no Uruguai, Argentina e Paraguai¹²³. Suas folhas e cascas são usadas na medicina popular contra diversas patologias incluindo infecções, inflamações, diabetes, afecções do trato urinário e respiratório e processos dolorosos⁹⁵. Esta planta apresenta caule muito extenso, até 20 metros, casca fina, escura, folhas alternas, pecioladas com nervuras e gavinhas na base da inflorescência; folhas bilobadas, lóbos ovado-obtusos; flores ferrugine, fruto vagem sésil, curto, até 6 centímetros de comprimento⁹⁵.



Figura 7. *B. microstachya* (Raddi.) Macbr^c.

^chttp://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?w3till=MOA-02467_001.jpg.

A planta *B. microstachya* foi selecionada para este estudo devido a sua utilização na medicina popular, ocorrência em Santa Catarina e pela ausência de dados fitoquímicos e biológicos. O objetivo deste estudo será a obtenção de subsídeos que possam validar o uso desta matéria-prima como medicamento, e assim, contribuir para a obtenção de resultados que possibilitem a produção no futuro de novos fitoterápicos.

- *Bauhinia microstachya* (Raddi.) Macbr.

Família: Leguminosae

Sub-família: Caesalpiniaceae

Sinônimos: *Bauhinia bahiensis* (Bong), *Bauhinia langsdorffiana* (Bong), *Schnella microstachya* (Raddi).

Nomes vulgares: escada-de-macaco, cipó-escada, unha de boi, escada-de-jabuti

2.2.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO GÊNERO *Bauhinia*

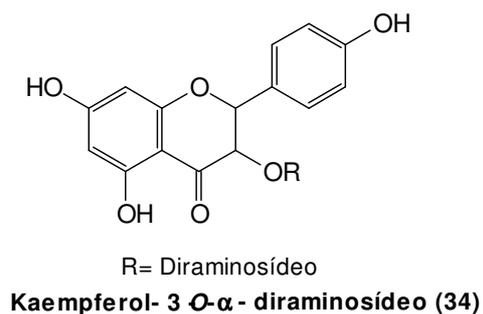
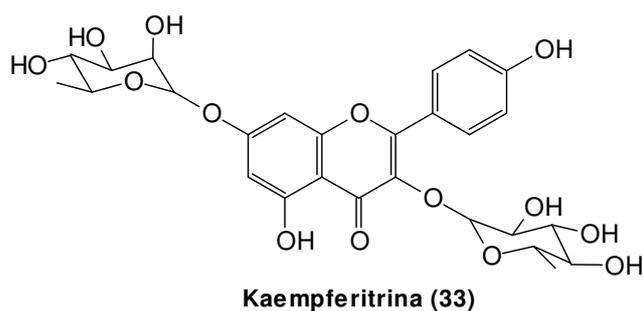
Algumas espécies do gênero *Bauhinia* foram e estão sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente. Várias classes de compostos orgânicos tem sido isolados e identificados, incluindo lactonas, flavonóides, terpenóides, esteróides, taninos, triterpenos e quinonas. Como este gênero é composto de várias espécies, sendo as mesmas relatadas em recente artigo, nesta revisão será dado ênfase somente a duas espécies, já estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, *B. forficata* e *B. splendens*^{120-122,124}.

Tabela 4. Metabólitos secundários isolados de *B. forficata*.

Composto	Parte da planta	Referências
Kaempferitrina (33)	Folhas	Silva <i>et al.</i> , 2000 ¹²⁴
Sitosterol	Folhas	Silva <i>et al.</i> , 2000 ¹²⁴
Kaempferol-3-O- α -diraminosídeo (34)	Folhas	Souza <i>et al.</i> , 1998 ¹²⁵

Tabela 5. Metabólitos secundários isolados de *B. splendens*.

Compostos	Parte da planta	Referências
Sitosterol	Folhas	Laux <i>et al.</i> , 1985 ¹²⁶
Estigmasterol	Folhas	Laux <i>et al.</i> , 1985 ¹²⁶
Ácido esteárico	Folhas	Laux <i>et al.</i> , 1985 ¹²⁶
Bausplendina (35)	Folhas	Laux <i>et al.</i> , 1985 ¹²⁶
Quercetina (36)	Folhas	Cechinel-Filho <i>et al.</i> , 1995 ¹²²
Rutina (37)	Folhas	Cechinel-Filho <i>et al.</i> , 1995 ¹²²
Galato de etila (38)	Folhas	Cechinel-Filho <i>et al.</i> , 1995 ¹²²

**Figura 8.** Estruturas de alguns compostos isolados de *B. forficata*.

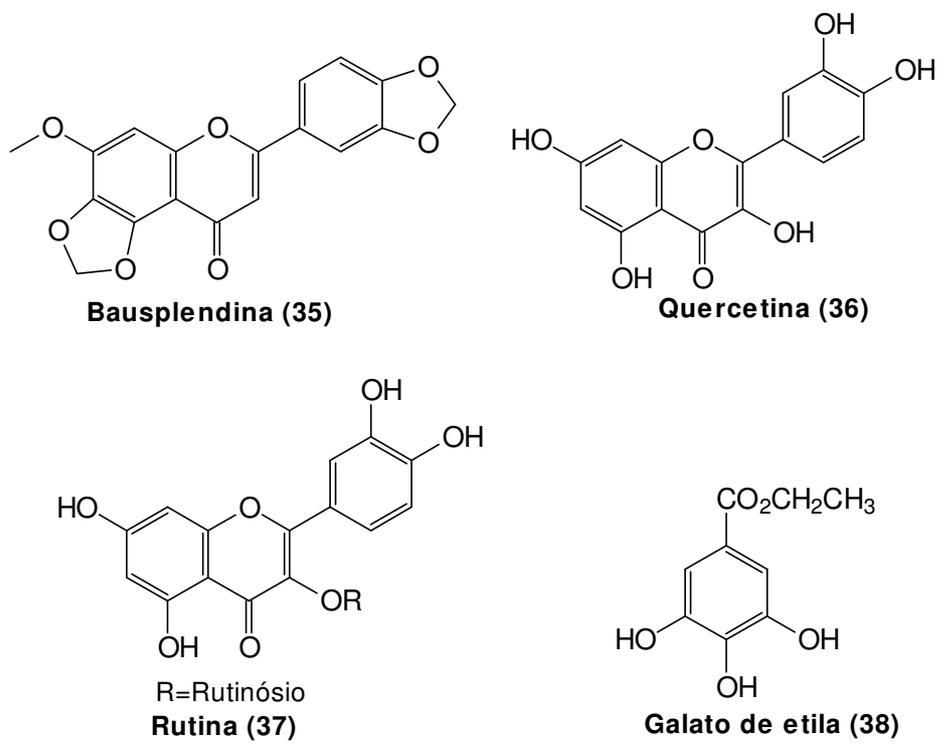


Figura 9. Estruturas de alguns compostos isolados de *B. splendens*.

2.3. *Marrubium vulgare*

2.3.1. GÊNERO *Marrubium*: ASPECTOS BOTÂNICOS

A família Labiatae (Lamiaceae) é composta por 200 gêneros com aproximadamente 3.200 espécies distribuídas em todo o mundo. São geralmente plantas herbáceas ou arbustivas¹¹⁴.

Os gêneros mais importantes inclusos nesta família são: *Acinos*, *Ajuga*, *Ballota*, *Calamintha*, *Lavandula*, *Leonorus*, *Menta*, *Micromeria*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Thymus*, *Melissa*, *Phlomis*, *Marrubium* e muitos outros¹²⁷.

Aproximadamente 40 espécies do gênero *Marrubium* são conhecidas; dentre estas a espécie *Marrubium vulgare* vem sendo bastante investigada com relação a estudos fitoquímicos e biológicos¹²⁸.

A *Marrubium vulgare* (Fig. 10), é conhecida pela população pelo nome de marroio, marroio-branco, marroio-comum e maromba, sendo usada em forma de chás como estimulante, antiespasmódica e febrífura. Suas raízes são indicadas como diuréticas e nas doenças do fígado e rins^{95,129,130}. É uma planta herbácea, com caule quadrangular, 40-60 cm de altura, possui folhas ovais-arredondadas de 4-5 cm de comprimento, com base estreita e ápice obtuso e flores em pseudo verticilos de 20-50 flores, localizadas nas axilas das folhas superiores. Pode ser encontrada em maior abundância nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo⁹⁵.

- *Marrubium vulgare*

Família: Labiatae

Sinônimos: *Marrubium album* Car. et. Lag.

Nomes vulgares: Marroio branco, marroio, malva de sapo



Figura 10. *Marrubium vulgare*^d.

Vários estudos com relação à atividade biológica têm sido realizados com *M. vulgare* demonstrando efeito como hipoglicemiante, hipotensivo, antioxidante, antiinflamatório, ação colerética e utilizado também no tratamento da asma¹³¹⁻¹³⁵.

Estudos realizados anteriormente no NIQFAR evidenciaram que o extrato hidroalcolico, obtido das partes aéreas de *Marrubium vulgare*, apresenta efeito antiespasmódico, antidiabético e analgésico, e o composto majoritário, a marrubiina, apresentou atividade analgésica no modelo experimental testado¹³⁶⁻¹³⁹.

2.3.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Marrubium vulgare*

Estudos fitoquímicos realizados com esta espécie tem revelado a presen^dça de uma variedade de compostos, como alcalóides, esteróides, lactonas, terpenos, taninos, açúcares e vitamina C. Alguns dos compostos isolados de *M. vulgare*

^dwww.botanical-online.com/fotomarrubiumvulgare.htm

foram apigenina (39), apigenina 7-O-glucosídeo, apigenina 7-lactato, luteolina (40), luteolina 7-O-β-D-glucosídeo, luteolina 7-lactato, quercetina 3-O-α-L-ramnosil-glucosídeo, isoquercitrina, ácido ursólico (41), ácido gálico (42), ácido cafeico (43), ácido cafeoil maleico (44), vulgarol, limoneno (45), bisabolol, α-pineno (46), β-pineno, perigerinol, β-sitosterol, estigmasterol, vitexina, acteosídeo (47), forsitosídeo (48), arinariosídeo (49), balotetrosídeo (50), marrubosídeo (51), marrubosídeo peracetilado (52) pré-marrubiina (53), marrubiina (54)¹⁴⁰⁻¹⁴⁷. Estudos tem sido realizado na busca de métodos baratos e eficazes de obtenção da marrubiina, como a utilização de quitina, um biopolímero natural, que promove a obtenção com alto rendimento¹⁴⁸.

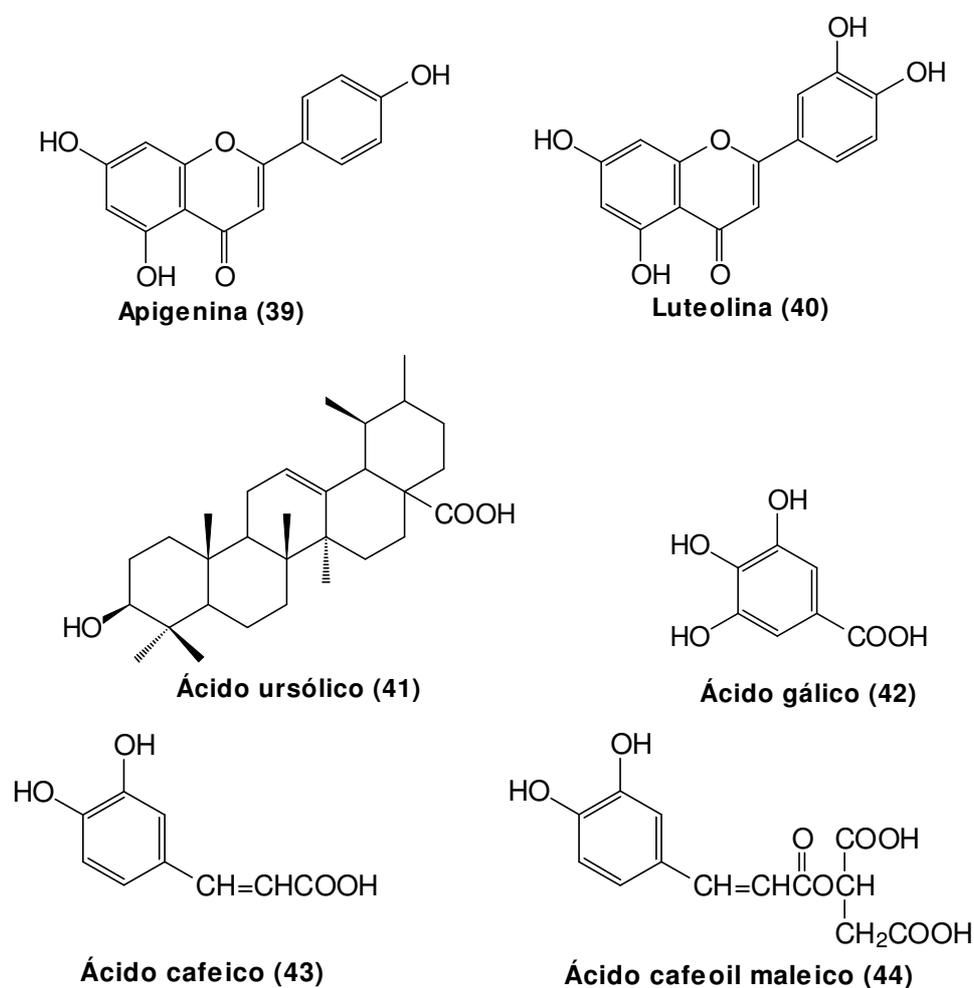
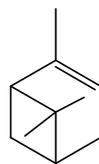


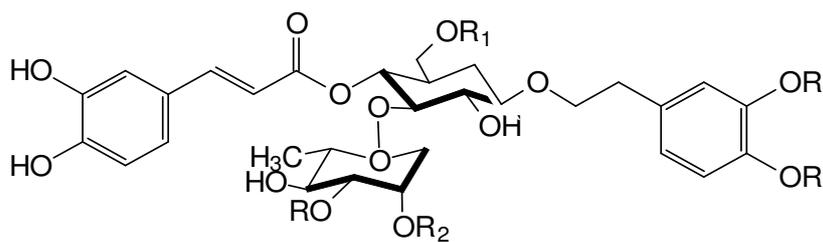
Figura 11. Estruturas de alguns compostos isolados de *M. vulgare*.



Limoneno (45)



α-Pineno (46)

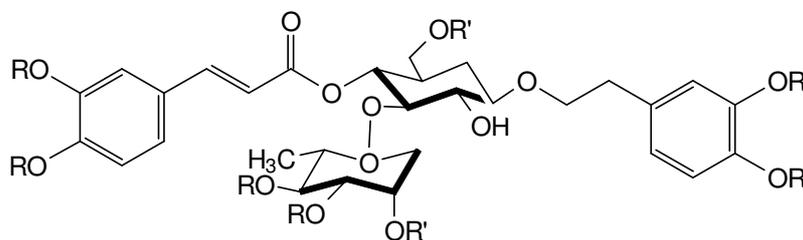
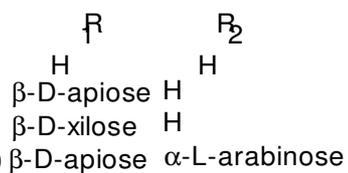


Acteosídeo (47)

Forsitosídeo (48)

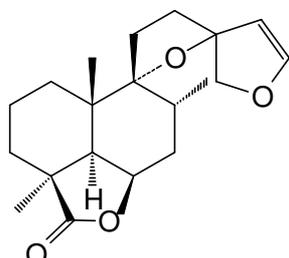
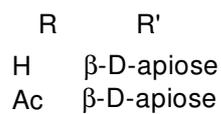
Arenariosídeo (49)

Baloletrosídeo (50)

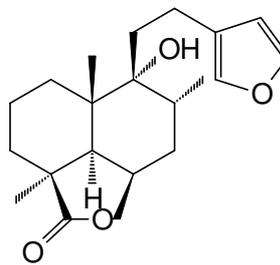


Marrubosídeo (51)

Marrubosídeo peracetilado (52)



Pré-marrubiina (53)



Marrubiina (54)

Continuação Figura 11. Estruturas de alguns compostos isolados de *M. vulgare*.

Muitas espécies da família Lamiaceae são conhecidas por produzir grandes quantidades de terpenóides¹⁴⁹⁻¹⁵³. A planta *M. vulgare* é conhecida por acumular grandes quantidades de diterpenos labdano furanos, especialmente pré-marrubiina e seu derivado marrubiina¹⁵⁴. Este diterpenóide foi primeiramente isolado em 1842 por J. A. McMaken da planta *M. vulgare* como um sólido cristalino, de sabor amargo, insolúvel em clorofórmio. Mais tarde sua fórmula foi identificada como C₂₀H₂₈O₄ e considerado um artefato formado de seu precursor, a pré-marrubiina, durante a extração^{154,155}. Com o intuito de elucidar a constituição química da marrubiina, várias reações foram realizadas, muitas sem resultado e algumas, como desidratação, hidrogenação, hidrólise e oxidação, permitiram comprovar a natureza secundária do grupamento hidroxila, o qual participa da formação do anel lactona, a configuração γ - da lactona e a orientação do carbono 9, orientação esta em alfa, chegando-se a sua estereoquímica em 1968¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.

Apesar das várias reações realizadas com a marrubiina, somente em 1994 foi conduzida a redução, utilizando NaLiH₄, com o objetivo de avaliar biologicamente o produto obtido desta redução¹⁵⁹. Foi demonstrado recentemente que este composto possui efeito antinociceptivo no modelo experimental testado¹⁶⁰.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais do presente trabalho consistem em estudar fitoquimicamente e biologicamente algumas plantas medicinais brasileiras selecionadas, como: *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare*, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas usuais e de modelos experimentais "in vivo" em camundongos, além de estudos de modificação molecular da marrubiina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar testes biológicos com os extratos, frações e compostos puros obtidos das plantas em estudo.
2. Isolar, identificar e determinar estrutura química dos compostos presentes nas plantas *Aleurites moluccana* e *Bauhinia microstachya*.
3. Realizar estudo fitoquímico e farmacológico comparativo nas diferentes partes (folhas, flores, cascas, raízes e caules) da planta *A. moluccana*.
4. Realizar modificação molecular sobre compostos majoritários ativos (marrubiina, de *Marrubium vulgare*), na tentativa de se obter compostos mais potentes e seletivos.
5. Determinar o perfil cromatográfico das diferentes épocas de coleta de *A. moluccana* através das técnicas de CCD e CG, juntamente com dados de espectro de massas, para futuro processo de controle de qualidade.
6. Comparar a atividade dos extratos, frações e compostos puros com fármacos disponíveis no mercado.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Nas cromatografias em coluna (CC), fêz-se o uso de sílica gel (0,063-0,200 mesh) Merck como suporte. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material absorvido. As eluições foram feitas com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. As frações foram reunidas conforme a semelhança de R_f (fator de retenção) observada pelo perfil cromatográfico obtido pela cromatografia em camada delgada (ccd), utilizando-se sílica gel 60 GF 254 da Merck e visualização através de luz ultravioleta ($\lambda=254$ e 366 nm) e pulverização com reveladores específicos.

O perfil cromatográfico de todos os extratos e compostos foi examinado por CCD utilizando placas de alumínio de $200 \mu\text{m}$ de espessura recoberta por sílica, Merck, com vários sistemas de solventes. Reagentes específicos empregados para a análise incluem anisaldeído sulfúrico (para terpenos e esteróis), cloreto férrico, FeCl_3 (compostos fenólicos), Dragendorff (alcalóides) e reagentes gerais tais como ácido sulfúrico/metanol, câmara de iodo e uso de radiação ultravioleta^{161,162}.

Os espectros na absorção do infravermelho (IV) foram obtidos através de um espectrômetro Perkin-elmer FT-16-PC, em pastilha de KBr. A referência utilizada foi absorção em 1028 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram realizados em espectrômetro BRUKER AC-200F (200 MHz-UFSC) ou VARIAN GEMINI 300 (300 MHz do Instituto di Chimica UCSC, Roma) tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Todos os solventes utilizados eram solventes deuterados.

A análise de Cromatografia Gasosa (CG) foi realizada com o equipamento Shimadzu, modelo 14A, com detector de ionização de chama (FID), integrados num processador EG 300, equipada com uma coluna de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, utilizando polimetilsiloxano como fase estacionária (coluna LM-1). As amostras

foram introduzidas utilizando-se o modo “splitless” (1 min, 1,5 µl volume injetado), temperatura do detector de 320°C e temperatura programada de 40°C a 150°C, 12°C/min. e 150°C a 310°C, 5°C/min. (isoterma de 10 min.). O hidrogênio foi utilizado como gás carreador. Os dados foram processados usando programa de cromatografia (Microquímica-SC). Os compostos padrões foram anteriormente isolados da mesma planta em análise^{67,87}.

4.2. MATERIAL VEGETAL: *Aleurites moluccana*

4.2.1. COLETA

Para dar continuidade aos estudos fitoquímicos com *A. moluccana*, coletou-se 1,8 kg de folhas no município de Tijucas, em maio de 1999 e 1,5 kg de cascas no município de Itajaí, em agosto de 1998, sendo a mesma identificada pelo Professor Ademir Reis, Departamento de Botânica (UFSC). Uma excicata encontra-se depositada no Herbarium Barbosa Rodrigues (HBR), na cidade de Itajaí-SC, sob nº VCFilho 001.

Raízes (69g), caules (66g), flores (20g), cascas (166g), folhas (54g) e sementes (95g) de *A. moluccana* foram coletadas em fevereiro de 1998, em Itajaí-SC, para a realização do estudo comparativo entre as diferentes partes da planta.

4.2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

As folhas de *A. moluccana* foram secas, pulverizadas e extraídas por maceração com metanol (PA) à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 40°C até um volume desejado, suspenso em água e então sucessivamente particionado com hexano (H), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) para obtenção das respectivas frações. As cascas sofreram o mesmo procedimento descrito acima, distinguindo-se apenas no fracionamento, onde utilizou-se somente diclorometano e acetato de etila.

4.2.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ESTUDO COMPARATIVO DAS DIFERENTES PARTES DA PLANTA

As diferentes partes de *A. moluccana* foram cortadas em pequenos pedaços, secas à temperatura ambiente e extraídas separadamente com metanol por 10 dias. Subseqüentemente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para obtenção dos respectivos extratos metanólicos. Uma alíquota de cada extrato (50 mg) foi extraída durante 5 dias com 5 mL de diclorometano para futuras análises cromatográficas. Uma vez que somente o extrato metanólico obtido das folhas deu reação positiva para flavonóides por ccd, este foi submetido à extração com acetato de etila.

4.2.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A partir das folhas secas à temperatura ambiente e cortadas em pequenos pedaços, foi obtido o extrato metanólico, pela extração com metanol PA durante 10 dias, o qual foi particionado com solventes de polaridade crescente para obtenção das frações de hexano, diclorometano e acetato de etila (Fig. 12) ¹¹.

Dando continuidade aos estudos anteriores realizados com a *A. moluccana*, realizou-se uma nova investigação sobre a fração hexânica⁸⁷. Esta fração chamada Hex-Folhas (8,45 g) foi submetida à cromatografia em coluna, (ϕ 4,5 cm) de sílica gel (50 g), método cromatográfico previamente descrito, empacotada com hexano e eluída com hexano gradualmente enriquecida com acetato de etila^{163,164}. Foram coletadas 98 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração Hex-Folhas 69-78 49-60 70-81, eluída com hexano:acetato de etila 95:5 (560 mg), foi recromatografada em coluna (ϕ 2,0 cm) de sílica gel (3,5 g), empacotada e eluída com benzeno. Foram coletadas 30 frações de 20 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração 15-22, isolou-se um sólido (38,6 mg) denominado de **AM-1**, solúvel em diclorometano.

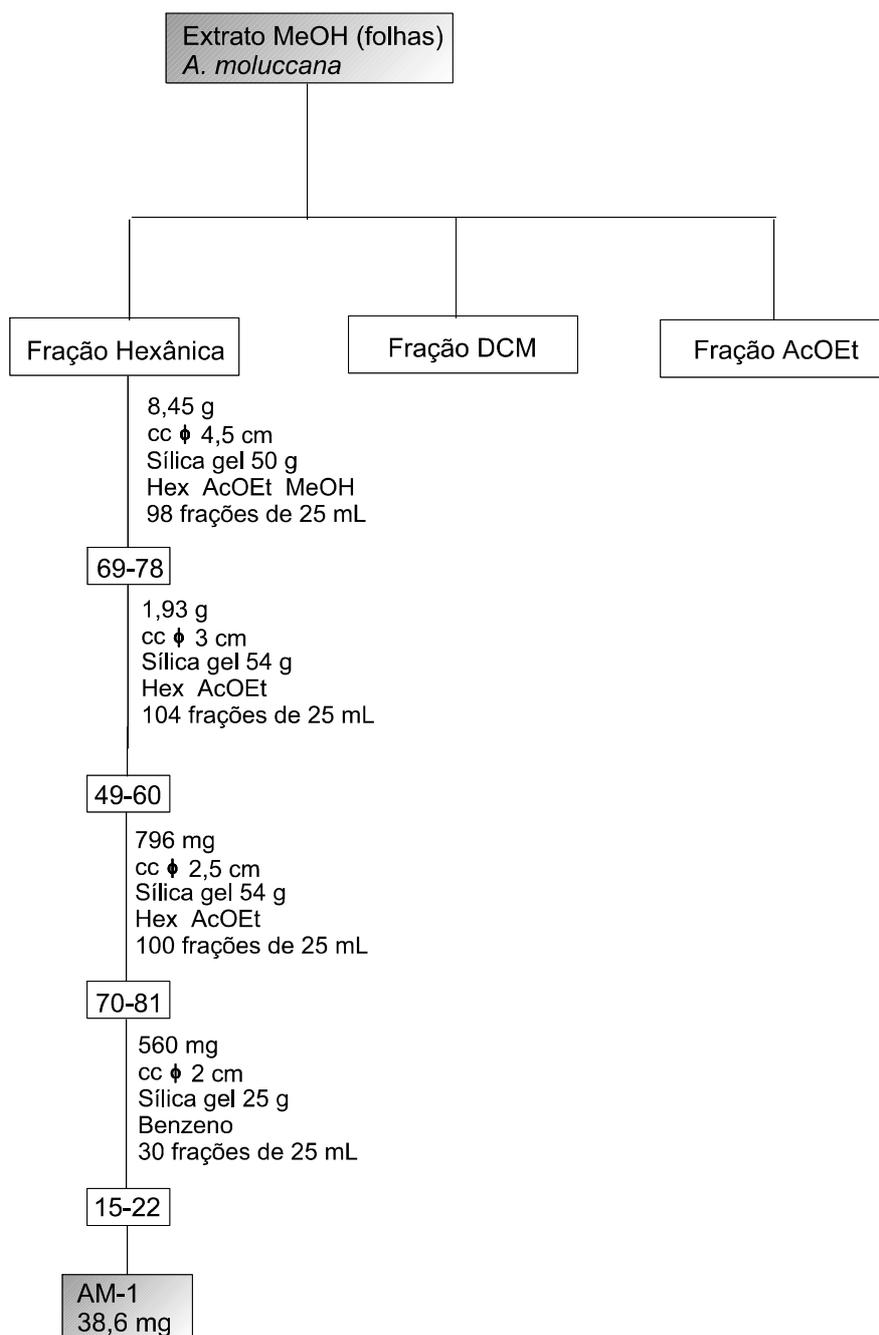


Figura 12. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Aleurites moluccana*.

As cascas obtidas de *A. moluccana* (1,5 g) sofreram o mesmo procedimento de secagem das folhas, sendo as mesmas trituradas e submetidas à extração com metanol, à temperatura ambiente, por cerca de 10 dias. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida e sucessivamente particionado com diclorometano e acetato de etila (Fig. 13).

A fração diclorometano chamada de DCM-Cascas (660 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 3,5 cm) de sílica gel (31,48 g), empacotada com hexano e eluída com hexano enriquecido gradualmente com acetato de etila. Foram coletadas 115 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DCM-Cascas 84-86, eluída com hexano:acetato de etila 7:3, isolou-se um óleo (14,3 mg) que foi denominado de **AM-2**.

A fração DCM-Cascas 54-58, eluída com hexano:acetato de etila 9:1 (38 mg), foi recromatografada em coluna (ϕ 2,0 cm) de sílica gel (1,58 g), empacotada e eluída com hexano:acetona 95:5. Foram coletadas 54 frações de 20 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração 54-58, 8-10, isolou-se o composto ácido acetil aleuritólico, anteriormente isolado desta planta¹⁶⁵. Da fração DCM-Cascas 54-58 19-25, eluída com hexano:acetato de etila 95:5, isolou-se um sólido branco (10,4 mg), solúvel em diclorometano, que foi denominado de **AM-3**.

Todos os compostos foram devidamente identificados utilizando-se técnicas espectroscópicas usuais e os dados comparados com os da literatura, conforme será demonstrado no decorrer do trabalho.

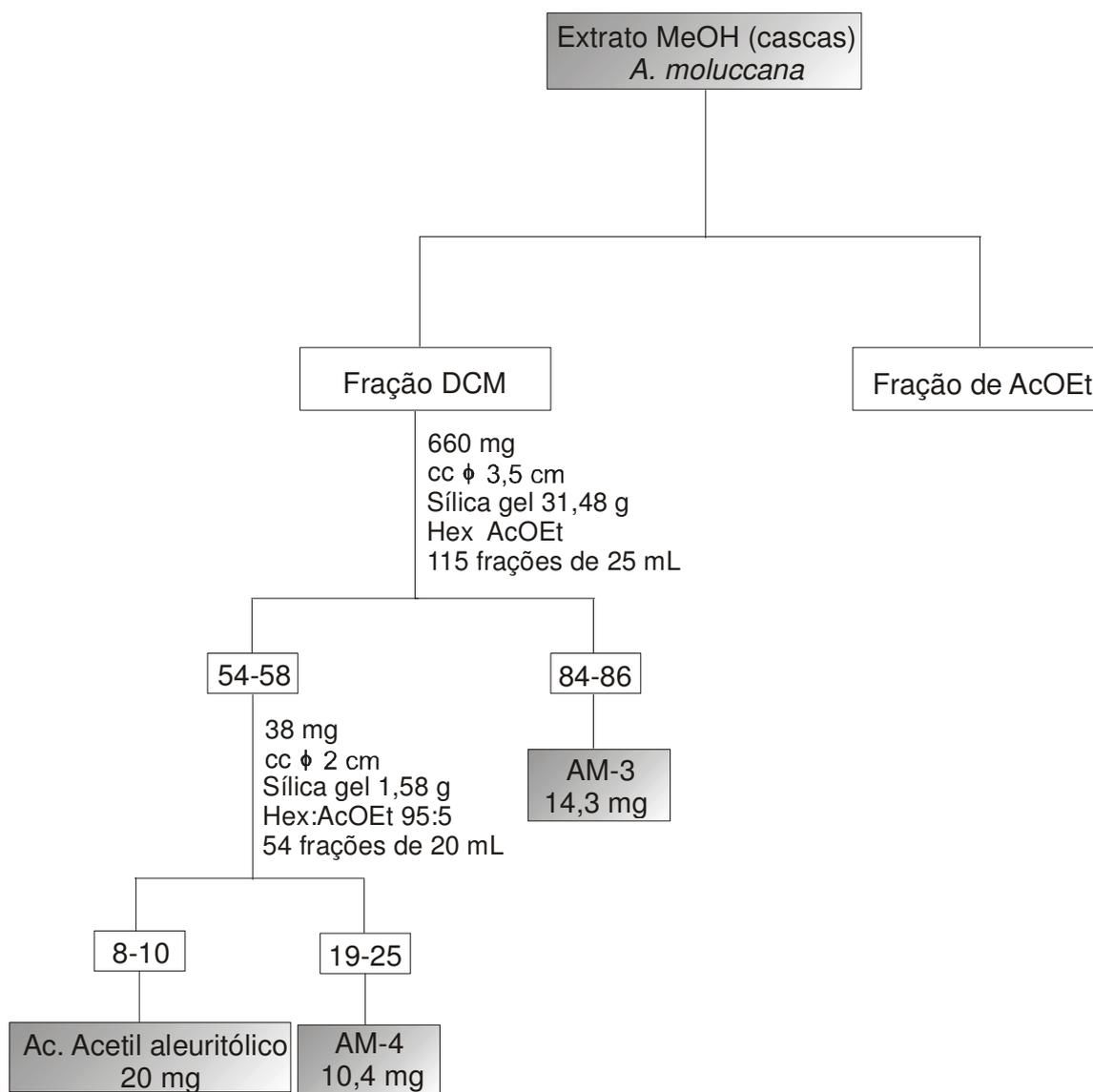


Figura 13. Fracionamento do extrato metanólico das cascas de *Aleurites moluccana*.

4.2.5. ESTUDO COMPARATIVO DAS DIFERENTES PARTES DE *A. moluccana*

As diferentes partes de *A. moluccana* foram cortadas em pequenos pedaços, secas à temperatura ambiente e extraídas separadamente com metanol por 10 dias. Subseqüentemente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para obtenção dos respectivos extratos metanólicos. Uma alíquota de cada extrato (50 mg) foi extraída durante 5 dias com 5 mL de diclorometano para futuras análises cromatográficas. Uma vez que somente o extrato metanólico obtido das folhas deu reação positiva para flavonóides por ccd, este foi submetido à extração com acetato de etila. Os compostos padrões estigmasterol, β -sitosterol, α e β -amirina, swertisina e 2"-*O*-ramnosilswertisina, foram previamente isolados das folhas e o ácido acetil aleuritólico, isolado das cascas de *A. moluccana*^{83,84,87,105}.

4.3. MATERIAL VEGETAL *Bauhinia microstachya*

4.3.1. COLETA

As folhas de *Bauhinia microstachya* foram coletadas na cidade de Urussanga, Santa Catarina, em fevereiro de 1999 e abril de 2000 e identificada pelo Prof. Dr. Ademir Reis do Depto. de Botânica, UFSC. Uma excicata encontra-se depositada no Herbarium Barbosa Rodrigues (Itajaí) sob n° VC Filho 021.

4.3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO

As folhas de *Bauhinia microstachya* foram secas, pulverizadas (primeira coleta: 600 g / segunda coleta: 1000 g) e extraídas por maceração com metanol à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado a pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 50-60°C até um volume desejado, suspenso em água e então sucessivamente particionado com hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), para a obtenção das respectivas frações.

4.3.2.1. Isolamento e purificação dos constituintes da fração AcOEt

Os procedimentos utilizados para o fracionamento da fração AcOEt podem ser visualizados na Fig. 14.

OBS. Só foram relatadas as colunas de onde isolaram-se compostos, porém para todos os extratos, muitas outras colunas foram feitas, das quais não obteve-se sucesso na purificação.

A fração AcOEt, obtida das folhas de *B. microstachya* da primeira coleta, chamada AE-1 (2,83 g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 2,5 cm) de sílica gel (58,87 g), empacotada com clorofórmio:metanol (CHCl_3 :MeOH) 95:5 e eluída com CHCl_3 :MeOH com aumento gradativo de polaridade. Foram coletadas 144 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

Da fração AE-1 9-20, eluída com CHCl_3 :MeOH 95:5 e 90:10 isolou-se o composto **BM-0** (41 mg).

A fração AE-1 24-29, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 (0,26 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm) de sílica gel (4,94 g), empacotada com CHCl_3 :MeOH 95:5, e eluída com CHCl_3 :MeOH 95:5 e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 145 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração de 24-29 46-54, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 e 80:20, isolou-se o composto **BM-1** (12 mg).

A fração AE-1 24-29 23-28, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 (0,13 g) , foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm) de sílica gel (4,75 g), empacotada com CHCl_3 :MeOH 95:5, e eluída com CHCl_3 :MeOH 95:5 e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 103 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração de 24-29 23-28 49-60, eluída com CHCl_3 :MeOH 80:20, isolou-se o composto **BM-1** (8 mg).

A fração AE-1 35-62, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 e 80:20 (1,36 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 3,0 cm) de sílica gel (10 g), empacotada com CHCl_3 :MeOH 95:5, e eluída com CHCl_3 :MeOH 95:5 e gradualmente enriquecida

com metanol. Foram coletadas 123 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração 35-62 28-45, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 e 80:20, isolou-se o composto **BM-2** (81 mg). Da fração 35-62 50-55, eluída com CHCl_3 :MeOH 80:20, isolou-se o composto **BM-3** (20 mg).

A fração AcOEt, obtida das folhas de *B. microstachya* da segunda coleta, chamada AE-2 (5,10 g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 3,0 cm) de sílica gel (8,57 g), empacotada com CHCl_3 :MeOH 95:5 e eluída com CHCl_3 :MeOH com aumento gradativo de polaridade (Fig. 15). Foram coletadas 78 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

Da fração AE-2 20-29, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 e 80:20, isolou-se o composto **BM-0** (35 mg).

A fração AE-2 37-51, eluída com CHCl_3 :MeOH 80:20 (2,65 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm) de sílica gel (8,02 g), empacotada com CHCl_3 :MeOH 95:5, e eluída com CHCl_3 :MeOH 95:5 e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 94 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração AE-2 37-51 30-35, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 e 80:20, isolou-se o composto **BM-1** (7,2 mg). Da fração AE-2 37-51 37-38, eluída com CHCl_3 :MeOH 80:20, isolou-se o composto **BM-2** (12 mg).

A fração AE-2 37-51 39-54, eluída com CHCl_3 :MeOH 80:20 e 70:30 (2,0 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 3,0 cm) de sílica gel (11,43 g), empacotada com CHCl_3 :MeOH 90:10, e eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 78 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração AE-2 37-51 39-54 19-31, eluída com CHCl_3 :MeOH 90:10 (1,76 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm) de sephadex LH-20 (6,84 g), empacotada com MeOH, e eluída com MeOH:H₂O 90:10. Foram coletadas 55 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

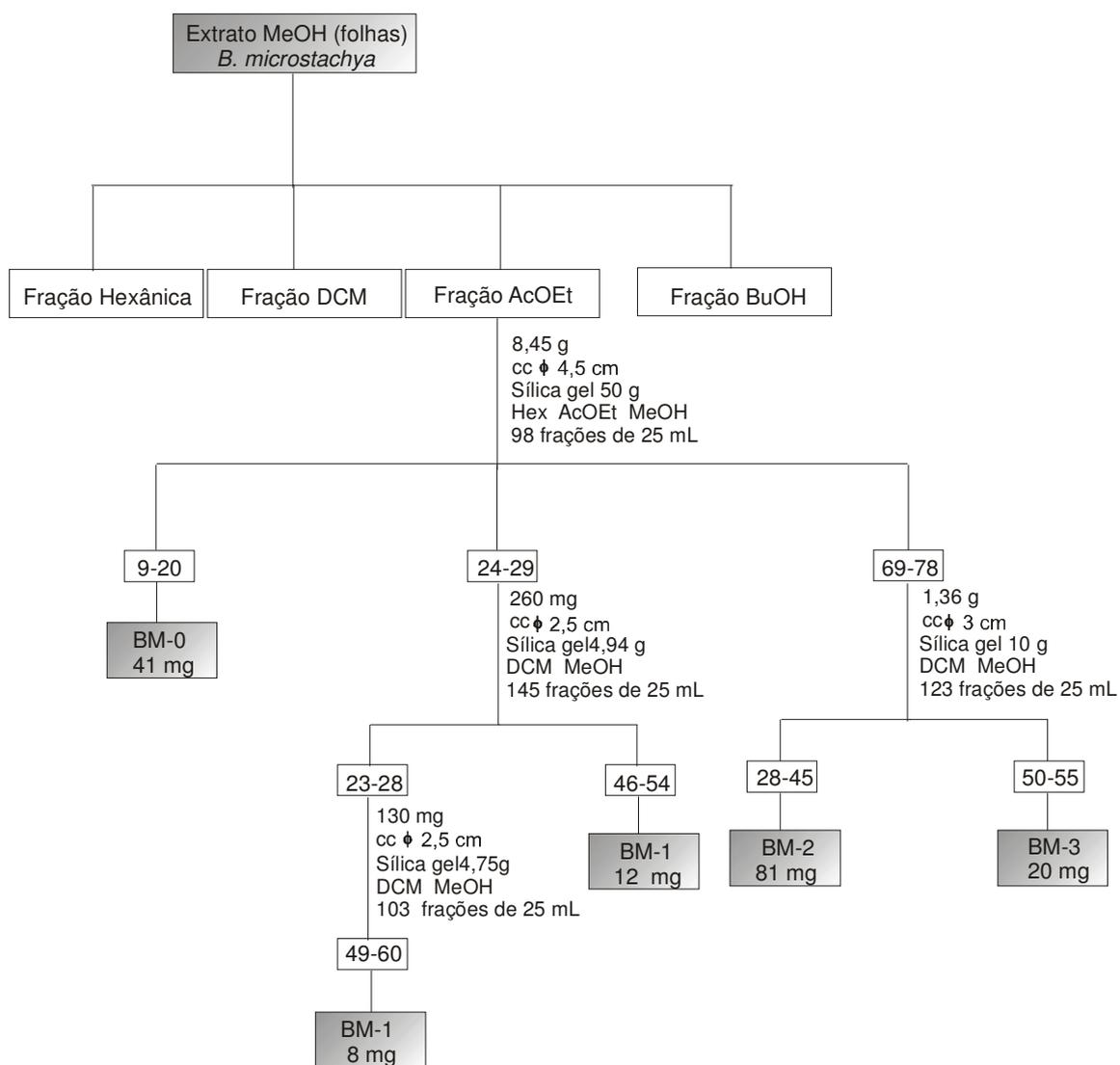


Figura 14. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia microstachya*.

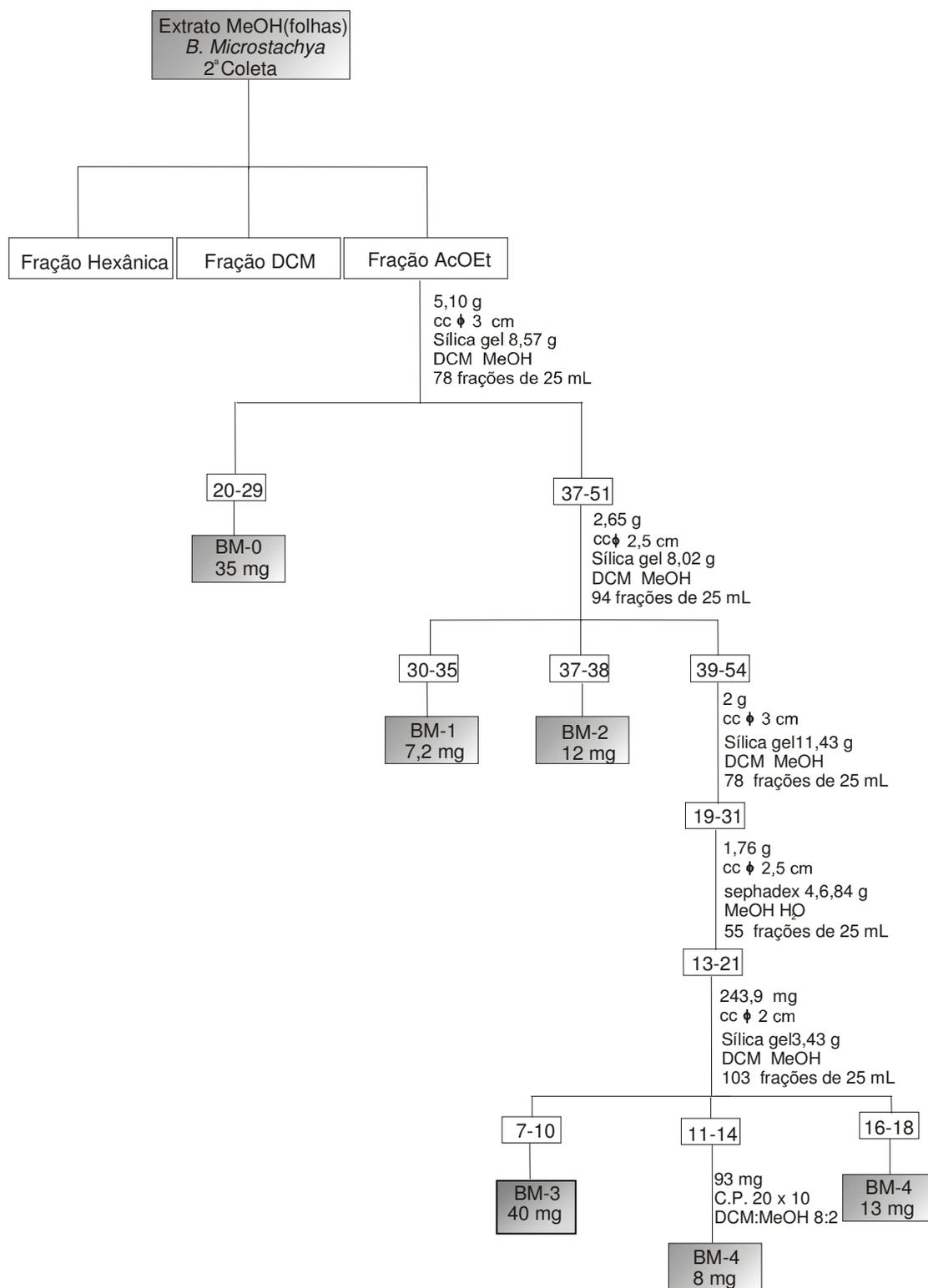


Figura 15. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia microstachya*.

A fração AE-2 37-51 39-54 19-31 13-21, eluída com MeOH:H₂O 90:10 (243,9 mg) foi recromatografada em coluna (ϕ 2,0 cm) de sílica gel (3,43 g), empacotada com CHCl₃:MeOH, e eluída com CHCl₃:MeOH 85:15 e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 55 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração AE-2 37-51 39-54 19-31 13-21 7-10, eluída com CHCl₃:MeOH 85:15 isolou-se o composto **BM-3** (40 mg). Da fração AE-2 37-51 39-54 19-31 13-21 16-18, eluída com CHCl₃:MeOH 85:15 e 80:20 isolou-se o composto **BM-4** (13 mg).

A fração AE-2 37-51 39-54 19-31 13-21 11-14, eluída com MeOH:H₂O 85:15 (93 mg) foi recromatografada em placa preparativa de sílica gel (20:10 L x A), solubilizada em MeOH à quente. Foram feitas 4 aplicações em cinco placas preparativas de vidro. As cinco placas foram eluídas três vezes com CHCl₃:MeOH 80:20. Raspou-se cada fração das placas e reagrupou-se as que apresentavam semelhança por c.c.d. As frações foram solubilizadas em CHCl₃:MeOH 80:20 e filtradas em papel filtro. Da AE-2 37-51 39-54 19-31 13-21 11-14 isolou-se o composto **BM-4** (8 mg).

4.4. MATERIAL VEGETAL: *Marrubium vulgare*

4.4.1. COLETA

As folhas de *Marrubium vulgare* foram coletadas na cidade de Bom Retiro, Santa Catarina, em junho de 2000 e identificada pela Profa. Leila da Graça Amaral do Depto. de Botânica, UFSC. Uma excicata encontra-se depositada no Herbarium Flor (Florianópolis) sob n^o 4725.

4.4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As folhas de *M. vulgare* foram secas (1,5 Kg), pulverizadas e extraídas por maceração com metanol (PA) à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 70°C até um volume

desejado com o intuito de promover a transformação da pré-marrubiina à marrubiina, a qual será utilizada para futuras modificações estruturais^{149.150}. O extrato concentrado foi suspenso em água e então sucessivamente particionado com hexano (H), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), para obtenção das respectivas frações.

4.4.2.1. Isolamento e purificação dos constituintes do precipitado metanólico e da fração DCM

Os procedimentos utilizados para o fracionamento podem ser visualizados na Fig. 16 e 17.

Durante o processo de concentração do extrato metanólico, foi utilizada temperatura superior ao utilizado normalmente, com o intuito de obter o composto marrubiina formado durante este processo a partir da pré-marrubiina, composto natural presente na planta. Obteve-se a formação de um precipitado que era constituído principalmente de marrubiina, esta fração foi inicialmente nomeada de MeOH PP. O restante do extrato metanólico concentrado foi submetido ao fracionamento com hexano, diclorometano e acetato de etila.

A fração MeOH PP (13,97 g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 5,0 cm) de sílica gel (34,2 g), empacotada com hexano:acetato de etila 95:5 e eluída com H:AcOEt com aumento gradativo de polaridade. Foram coletadas 325 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. As frações 142-228 foram lavadas com éter etílico obtendo-se o composto **M** (1,19 g)

A fração MeOH PP 229-320 eluída com hexano:acetato de etila 7:3 (5,15 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 4,0 cm) de sílica gel (55,78 g), empacotada com H:AcOEt, e eluída com H:AcOEt 80:20 e gradualmente enriquecida com acetato de etila. Foram coletadas 156 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração MeOH PP 229-320 14-25 isolou-se o composto **M** (1,80 g).

A fração MeOH PP 229-320 26-35, eluída com hexano:acetato de etila 7:3 (1,27 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 4,0 cm) de sílica gel (11,45 g), empacotada com DCM, e eluída com DCM e gradualmente enriquecida com MeOH. Foram coletadas 56 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração MeOH PP 229-320 26-35 10-22 isolou-se o composto **M** (477,3 mg).

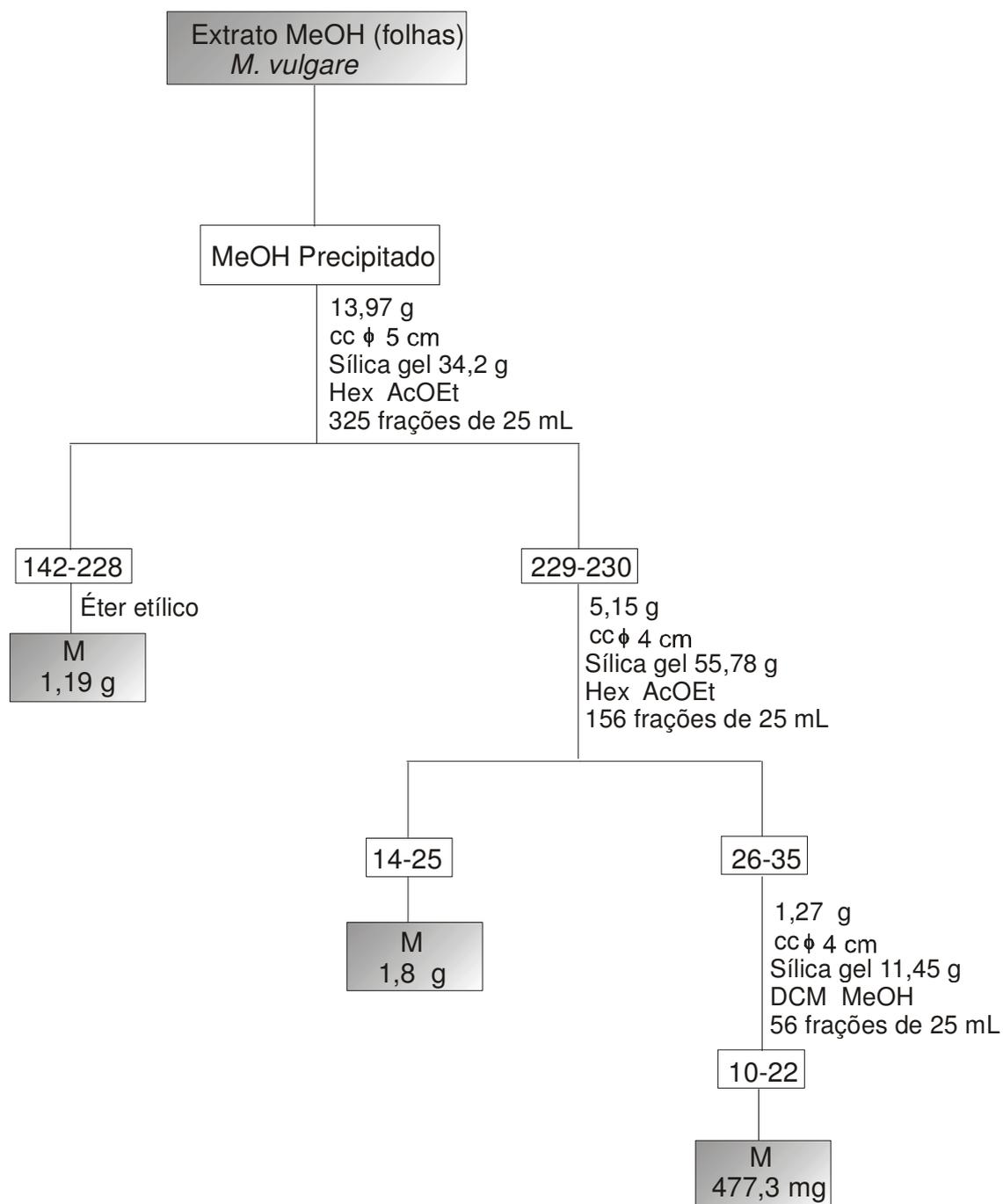


Figura 16. Fracionamento do extrato MeOH PP das folhas de *Marrubium vulgare*.

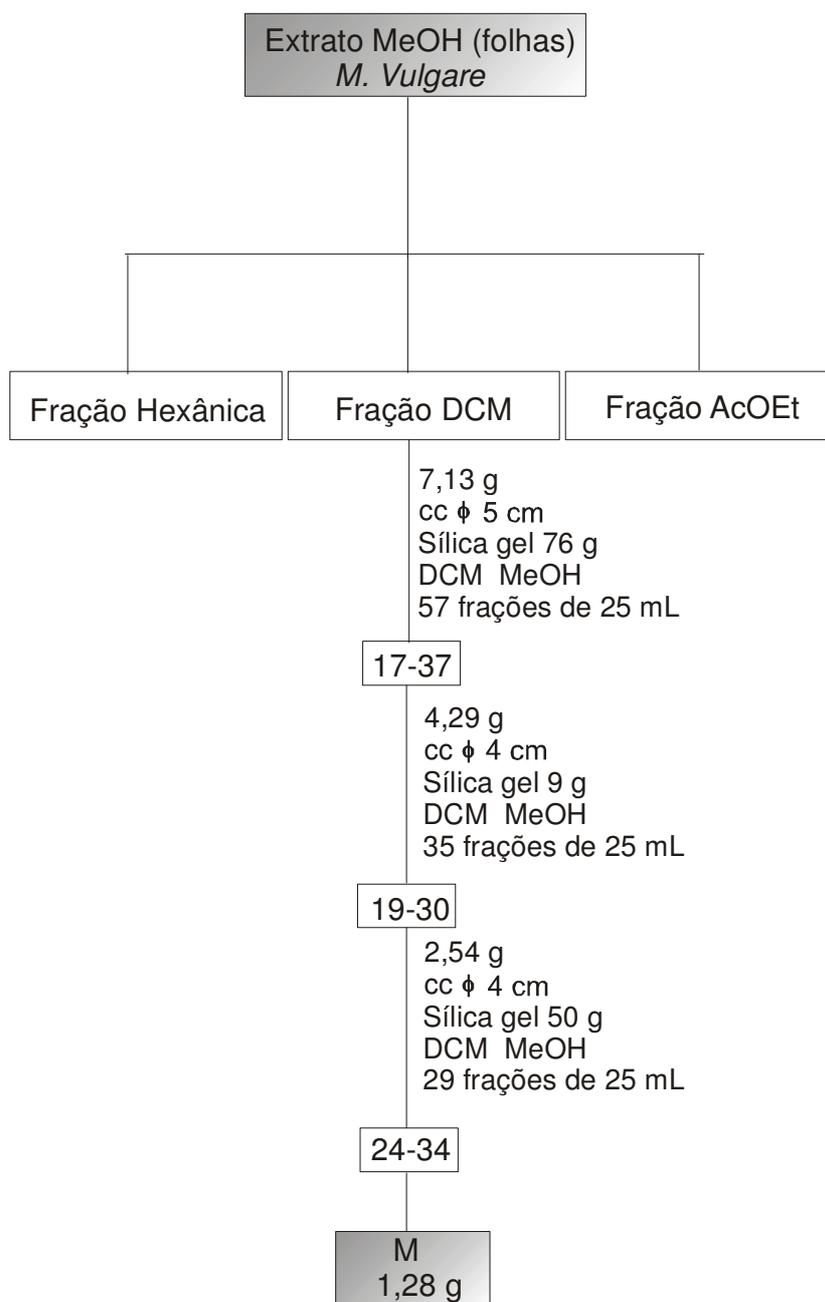


Figura 17. Fracionamento do extrato DCM das folhas de *Marrubium vulgare*.

A fração DCM (7,13 g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 5,0 cm) de sílica gel (76 g), empacotada com DCM e eluída com DCM:MeOH com

aumento gradativo de polaridade. Foram coletadas 57 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DCM 17-37 eluída com hexano:acetato de etila 7:3 (4,29) foi recromatografada em coluna (ϕ 4,0 cm) de sílica gel (9 g), empacotada com DCM, e eluída com DCM e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 35 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DCM 17-37 19-30 eluída com hexano:acetato de etila 7:3 (2,54 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 4,0 cm) de sílica gel (9 g), empacotada com DCM, e eluída com DCM e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 29 frações de 25 mL cada. Da fração DCM 17-37 19-30 24-34 isolou-se o composto **M** (1,28 g). O rendimento total de marrubiina a partir de 1,5 kg de planta foi de 0,31%.

Obs. Só foram relatadas as colunas de onde se isolou o composto **M**.

4.5. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

4.5.1. REAÇÃO DE REDUÇÃO DA MARRUBIINA

A metodologia usada foi similar à descrita por TABOADA¹⁵⁹, com pequenas modificações.

50 mg (0,150 mmol) de marrubiina foram solubilizados em 1 mL de THF anidro e adicionados gota a gota a um balão de 25 mL de 2 bocas contendo no total 4 mL de THF anidro, atmosfera de nitrogênio e hidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4) (0,151 mmol), sob agitação magnética por 3 horas. À mistura reacional foi adicionada água e extraído com diclorometano (3 X 15 mL). Na fase orgânica foi adicionado MgSO_4 anidro, filtrado e evaporado o solvente.

O produto obtido (57 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se o composto desejado (20 mg) denominado **MR-1**, solúvel em diclorometano, com P.F. 142-144°C.

4.5.2. REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA MARRUBIINA

A metodologia utilizada foi similar à descrita por HARDY¹⁵², com pequenas modificações.

50 mg (0,150 mmol) de marrubiina foram refluxados com 12 mg de hidróxido de potássio (0,214 mmol), 0,5 mL de água destilada e 2 mL de 2-etoxietanol (etileno glicol monoetil éter) (20,689 mmol) por 12 horas. À mistura reacional foi adicionado água e HCl, ocorrendo a formação de um precipitado, o qual foi filtrado em papel filtro, obtendo-se um composto puro (40,7 mg) denominado **MR-2**, solúvel em acetona, com P.F. 178-179 °C.

4.5.3. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DA MARRUBIINA

a) Método 1

A metodologia usada foi similar à descrita por FUJIOKA¹⁶⁵, com pequenas modificações.

50 mg (0,150 mmol) de marrubiina foram mantidos sob agitação com 1,25 mL de piridina (15,506 mmol) com 1,25 mL de Ac₂O (13,235 mmol), adicionado gota a gota. Após 10 horas de reação, a mistura reacional foi mantida sob refluxo por 10 horas. À mistura reacional foi adicionado água e extraído com acetato de etila 3 X 15 mL. Na fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado o solvente. Por análise em c.c.d, a fase orgânica apresentou uma única mancha.

O produto obtido, um óleo (43 mg) foi denominado **MR-3**, solúvel em acetato de etila. O produto obtido foi submetido inicialmente à análise por c.c.d. juntamente com padrão de marrubiina e apresentou semelhança de Rf. O composto foi então submetido à análise espectroscópica para sua identificação.

b) Método 2

A metodologia usada foi similar à descrita por FUJIOKA¹⁶⁵, com pequenas modificações.

50 mg (0,150 mmol) de marrubiina foram mantidos sob agitação com 1,25 mL de piridina (15,506 mmol) com 0,3 mL de cloreto de benzoíla (2,595 mmol), adicionado gota a gota por 12 horas. À mistura reacional foi adicionado água e extraído com acetato de etila 3 X 15 mL. Na fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado o solvente. Por análise em c.c.d, a fase orgânica apresentou uma única mancha.

O produto obtido, um óleo (15 mg) foi denominado **MR-4**, solúvel em diclorometano. O produto obtido foi submetido inicialmente à análise por c.c.d. juntamente com padrão de marrubiina e apresentou semelhança de Rf. O composto foi então submetido à análise espectroscópica para sua identificação.

c) Método 3

A metodologia usada foi similar à descrita por FUJIOKA¹⁶⁵, com pequenas modificações.

50 mg (0,150 mmol) de marrubiina foram mantidos sob agitação com 1,25 mL de piridina (15,506 mmol) com 0,3 mL de cloreto de acetila (4,231 mmol), adicionado gota a gota. Após 18 horas foi adicionado mais 0,3 mL de cloreto de acetila e mantida sob refluxo por 4 horas . À mistura reacional foi adicionado água e extraído com diclorometano 3 X 15 mL. Na fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado o solvente.

O produto obtido (212 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um óleo (15 mg) denominado **MR-5**, solúvel em diclorometano. Este composto foi submetido à análise espectroscópica.

4.5.4. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO **MR-2**

a) Método 1:

A metodologia usada foi similar à descrita por JOHNSTONE¹⁶⁸, com pequenas modificações.

50 mg (0,143 mmol) de **MR-2** foram mantidos sob agitação com 2,0 mL de acetona anidra (27,586 mmol), 20 mg de hidróxido de potássio (0,352 mmol) e 0,02 mL de brometo de benzila (1,684 mmol) por 3 horas. À mistura reacional foi adicionado água e extraído com diclorometano 3 X 15 mL e 2 X com acetato de etila. Nas fases orgânica foram adicionados MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado os solventes.

O produto obtido das duas fases orgânicas foram agrupadas (32 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um composto (27,1 mg), um óleo, denominado **MR-6**, solúvel em diclorometano. Este composto foi submetido à análise espectroscópica.

b) Método 2:

A metodologia usada foi similar à descrita por JOHNSTONE¹⁶⁸, com pequenas modificações.

50 mg (0,143 mmol) de **MR-2** foram mantidos sob agitação com 2,0 mL de acetona, 20 mg de hidróxido de potássio (0,352 mmol) e 0,1 mL de iodometano (1,606 mmol) por 30 minutos. À mistura reacional foi adicionado água e extraído com diclorometano 3 X 15 mL e 2 X com acetato de etila. Nas fases orgânicas foram adicionados MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado os solventes.

O produto obtido da extração com diclorometano (41 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um composto (10,5 mg), um sólido, denominado **MR-7**, solúvel em diclorometano. Este composto foi submetido à análise espectroscópica.

c) Método 3:

A metodologia usada foi similar à descrita por JOHNSTONE¹⁶², com pequenas modificações.

50 mg (0,143 mmol) de **MR-2** foram mantidos sob agitação com 2 mL de acetona anidra, 20 mg de hidróxido de potássio (0,352 mmol) e 0,025 mL de 1-bromobutano (0,143 mmol) por 2 horas e refluxada por 1 hora. À mistura reacional foi adicionado água, acidificado com HCl e extraído com com acetato de etila 3 X

15 mL. Na fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado o solvente.

O produto, obtido da extração com diclorometano, (20 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um composto (5,2 mg), um sólido, denominado **MR-8**, solúvel em diclorometano. Este composto foi submetido à análise espectroscópica.

d) Método 4:

A metodologia usada foi similar à descrita por JOHNSTONE¹⁶⁸, com pequenas modificações.

50 mg (0,143 mmol) de **MR-2** foram refluxados com 2,5 mL de acetona, 60 mg de carbonato de potássio (0,429 mmol) e 0,03 mL de sulfato de dimetila (0,315 mmol) por 3 horas. À mistura reacional foi adicionado água, acidificado com HCl e extraído com acetato de etila 3 X 15 mL. Na fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro, filtrado e evaporado o solvente. Por análise em c.c.d, a fase orgânica apresentou uma única mancha.

O produto obtido, um sólido (46,7 mg) foi denominado **MR-9**, solúvel em acetona. Este composto foi submetido à análise espectroscópica.

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.6.1. ATIVIDADE ANALGÉSICA

4.6.1.1. *Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ac. acético 0,6% em camundongos*

Os camundongos foram mantidos sob temperatura e iluminação controlada, com ração e água “ad libitum” (água à vontade). A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se o teste de contorções com ácido acético (0,6 %, via intraperitoneal), que promove contorções no músculo abdominal^{170, 171}.

Os animais foram pré-tratados com diferentes extratos ou compostos (3-60 mg/kg), 30 min. antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de NaCl (0,9 %) (10 mL/kg). Todos os experimentos foram realizados à 20-22°C. As contorções abdominais foram quantificadas durante 20 minutos. A atividade analgésica foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais em relação ao grupo controle.

4.6.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados para os testes de atividade antinociceptiva são apresentados como médias \pm S.E.M., exceto para os valores de DI_{50} (a dose de extratos e compostos que reduzem a resposta nociceptiva por 50 % relativo ao valor do controle) as quais são reportadas como médias geométricas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança de 95 %. Os valores de DI_{50} foram determinados por regressão linear dos experimentos individuais usando a regressão linear do software GraphPad (GraphPad Software, CA). A significância estatística entre os grupos foi feita pela Análise de Variância ANOVA, seguida pelo Teste de Comparação Múltiplo Dunnett's. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativo de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Aleurites moluccana*

5.1.1. EXTRAÇÃO

Para a extração dos metabólitos secundários de *A. moluccana* foi utilizada a metodologia descrita por CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998¹⁷.

Inicialmente as folhas, após secagem a temperatura ambiente, foram pulverizadas e extraídas por maceração com metanol por 10 dias. Após evaporação do solvente, o extrato bruto foi particionado com hexano, diclorometano e acetato de etila. Para dar continuidade aos estudos anteriores realizados com esta planta, realizou-se uma investigação com a fração hexânica, a qual foi submetida a métodos cromatográficos, previamente descritos, como cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, eluída com hexano:acetato de etila, com aumento gradativo de polaridade.

As cascas obtidas de *A. moluccana* foram submetidas à extração com metanol e após a remoção do solvente, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida e sucessivamente particionado com diclorometano e acetato de etila.

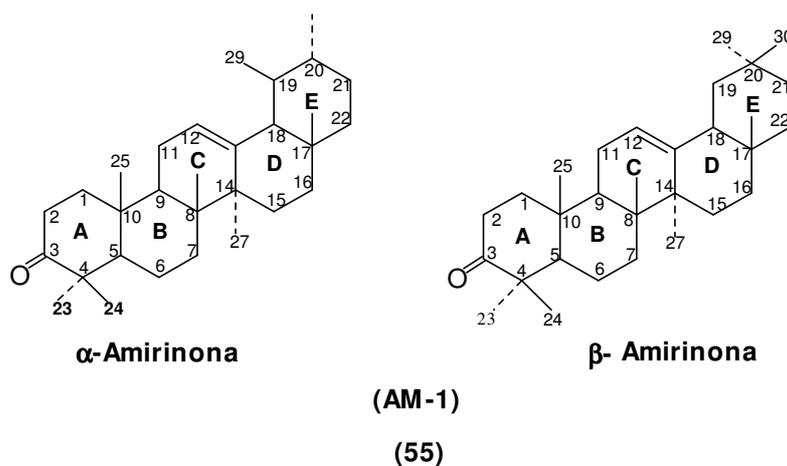
A fração de diclorometano foi cromatografada em coluna de sílica gel, eluída com hexano:acetato de etila com aumento gradativo de polaridade e monitoramento das frações por cromatografia em camada delgada (c.c.d.).

5.1.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *A. moluccana*

As investigações químicas com as folhas de *A. moluccana* levaram ao isolamento dos triterpenos α e β -amirinona (**AM-1**) (**55**). Estes compostos não haviam sido isolados e ou identificados de plantas do gênero *Aleurites*.

5.1.2.1. Sólido **AM-1**

O sólido **AM-1 (55)** foi isolado da fração hexânica do extrato metanólico obtido das folhas de *A. moluccana*, após cromatografia em coluna, como um óleo, solúvel em clorofórmio. As estruturas foram confirmadas através das análises espectroscópicas de RMN- ^1H e ^{13}C , como sendo uma mistura de α,β -amirinona e comparado com dados na literatura de $3\beta\text{-OH}$, α -amirina, $3\beta\text{-OH}$, β -amirina, 3-oxo, 28-COOME (β -amirina) e 3-oxo, 28-COOME metilursonato, demonstrado nas Figuras 19 e 20¹⁷². O uso de CG, juntamente com amostra padrão, indicou quantidades similares de ambos os compostos (aproximadamente 1:1), como observado na Figura 18. Não foram encontrados dados na literatura para sua atividade biológica, sendo esta a primeira vez identificado no gênero *Aleurites*.



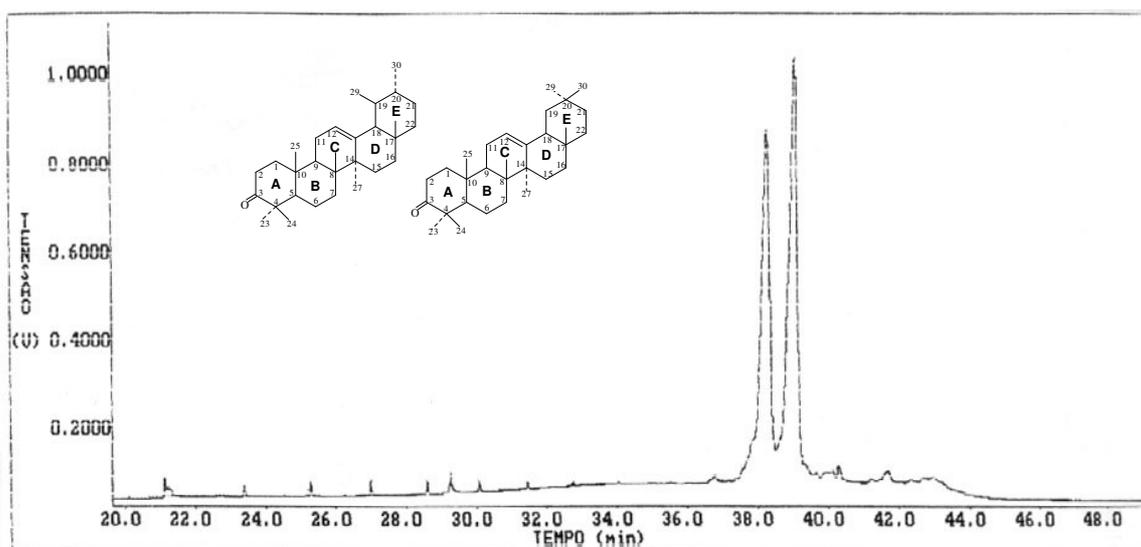


Figura 18. Cromatograma gasoso do **AM-1**. Condições de análise: $T_{\text{coluna LM-1}} = 40^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{injetor}} = 280^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{detector}} = 320^{\circ}\text{C}$.

Através da cromatografia gasosa verifica-se a mistura de aproximadamente 1:1 de β e α -amirina, respectivamente como demonstrado na Figura 18.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 19 e 20) indicam que o composto é um triterpeno da série oleanano.

No espectro de RMN ^1H observam-se sinais duplicados devido a mistura de β e α -amirina. Na região entre δ 5,15-5,20 apresentam sinais referentes ao hidrogênio no C-12 de β e α -amirina, respectivamente. Sinais dos prótons no C-2, próximos ao grupo carbonila, são observados na região de δ 2,25-2,6.

A Tab. 6 mostra os valores de deslocamentos químicos de ^{13}C para o 3 β -OH, α -amirina, 3 β -OH, β -amirina, 3-oxo, 28-COOMe (β -amirina) e 3-oxo, 28-COOMe metilursonato (α -amirina) e valores obtidos para o **AM-1**.

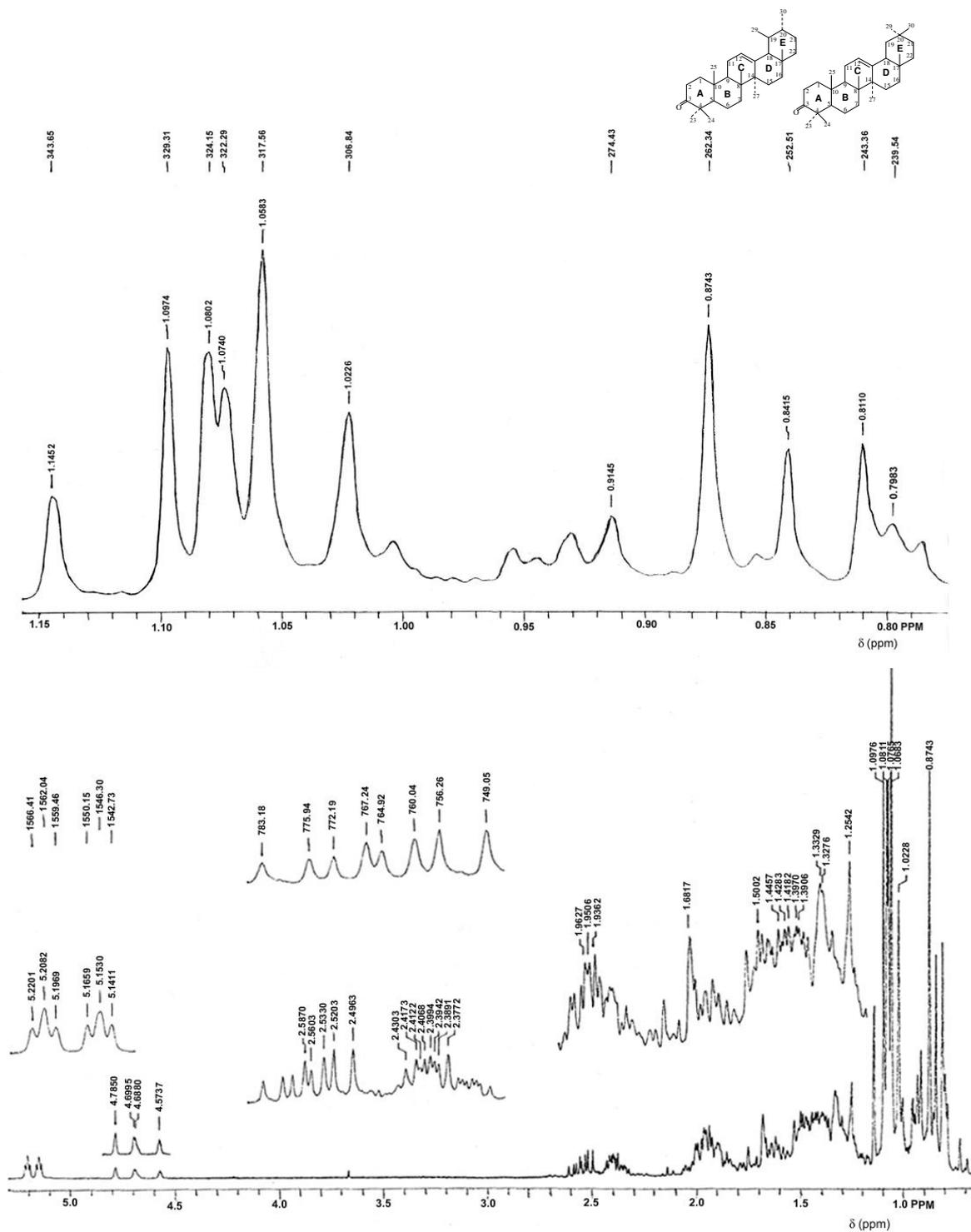


Figura 19. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) do AM-1.

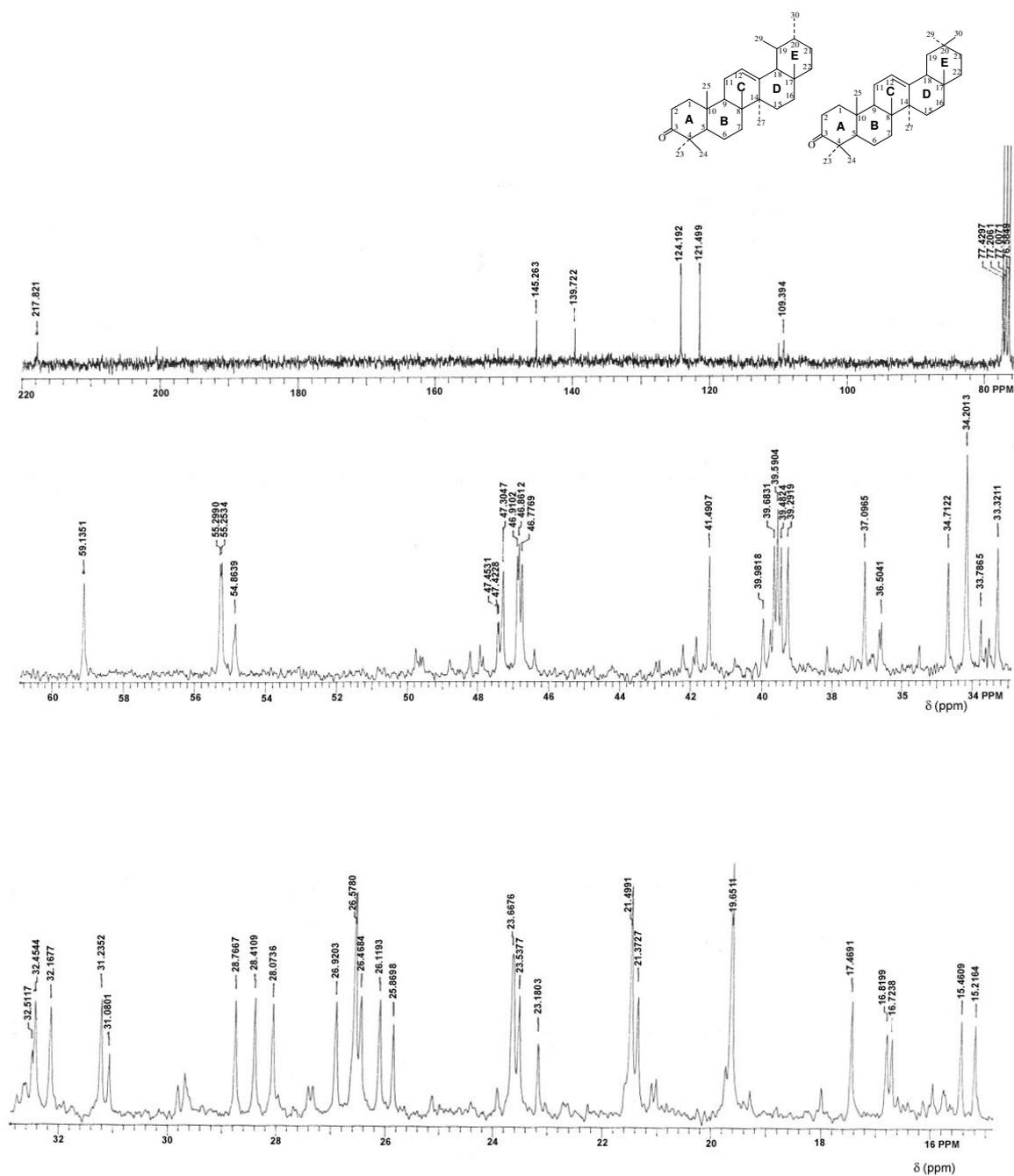


Figura 20. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) do **AM-1**.

Os grupos metilenos e metinos encontram-se na região entre δ 2,10-1,4 e as metilas entre δ 1,25-0,8.

Os dados obtidos pela análise de RMN- ^{13}C do **AM-1** mostram-se semelhantes aos do anel B, C, D e E do 3 β -OH, α -amirina e 3 β -OH, β -amirina. Já a análise do anel A os sinais apresentam-se semelhantes aos do 3-oxo, 28-COOMe (β -amirina) e 3-oxo, 28-COOMe metilursonato (α -amirina).

Tabela 6. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^{13}C para o **AM-1** e dados da literatura para o 3 β -OH, β -amirina, 3 β -OH, α -amirina, 3-oxo, 28-COOMe metilursonato (α -amirina) e 3-oxo, 28-COOMe (β -amirina) e 3-oxo¹⁷².

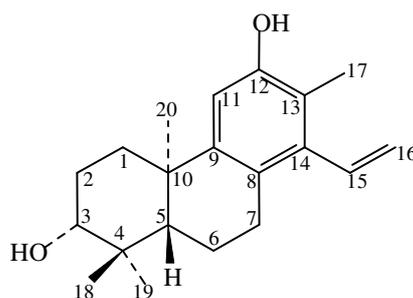
Posição	AM-1 ^{13}C δ	3 β -OH, β -amirina ^{13}C δ ¹⁷²	3 β -OH, α -amirina ^{13}C δ ¹⁷²	3-oxo 28- COOMe metilursonato (β -amirina) ^{13}C δ ¹⁷²	3-oxo, 28- COOMe (α -amirina) ^{13}C δ ¹⁷²
1	39,4	38,7	38,7	39,1	39,4
2	34,7	27,3	27,2	34,1	34,2
3	217,3	79,0	78,3	217,6	217,8
4	47,4	38,8	38,7	47,4	47,4
5	55,2/55,3	55,3	55,2	55,3	55,4
6	19,6	18,5	18,3	19,6	19,7
7	32,5	32,8	32,9	32,2	32,6
8	39,3	38,8	40,0	39,3	39,1
9	46,7/46,8	47,7	47,7	46,0	46,8
10	36,6/ 6,6	37,6	36,9	36,7	36,6
11	23,5/ 3,1	23,6	23,3	23,0	23,6
12	124,1/ 121,5	121,8	124,3	122,1	125,4
13	139,7/ 145,2	145,1	139,3	143,8	138,4
14	42,0/ 1,9	41,8	42,0	41,8	42,2
15	28,8/ 6,5	26,2	28,7	27,7	28,1
16	26,1/ 6,9	27,0	26,6	23,5	24,3
17	33,7/ 2,4	32,5	33,7	46,7	48,2
18	59,1/ 7,3	47,4	58,9	41,4	53,0
19	39,6/46,9	46,9	39,6	45,8	39,0
20	39,5/31,2	31,1	39,6	30,6	38,9
21	34,7	34,8	31,2	33,8	30,7
22	37,1/41,5	37,2	41,5	32,3	36,7
23	25,6	28,2	28,1	26,4	26,6
24	21,5	15,5	15,6	21,4	21,5
25	15,4/15,2	15,6	15,6	14,9	15,2
26	16,7/16,8	16,9	16,8	16,7	16,9
27	23,5/25,9	26,0	23,3	25,8	23,5
28	28,1/28,4	28,4	28,1	-	178,0
29	17,5/33,3	33,3	17,4	33,0	17,1
30	21,4/23,6	23,7	21,3	23,6	21,2
Solvente	CDCl ₃ 75 MHz				

5.1.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS CASCAS DE *A. moluccana*

As investigações químicas com as folhas de *A. moluccana* levaram ao isolamento do diterpeno **AM-2** espruceanol (**56**) e do **AM-3** ácido atrárico (**57**).

5.1.3.1. Composto **AM-2**

O composto **AM-2** (**56**), de aspecto oleoso, foi isolado da fração de diclorometano do extrato metanólico das cascas de *A. moluccana*, após cromatografia em coluna. A estrutura foi confirmada através das análises de IV, RMN-¹H e ¹³C (Figura 21-23) como espruceanol e comparado com dados obtidos na literatura^{173,174}.



Espruceanol
(AM-2)
(56)

O espectro de I.V. (Fig. 21) apresenta bandas de absorção em 3400 cm⁻¹ referente a deformação axial de O-H, deformação axial de C=C em 1650 cm⁻¹ e deformação axial C-O em 1040 cm⁻¹.

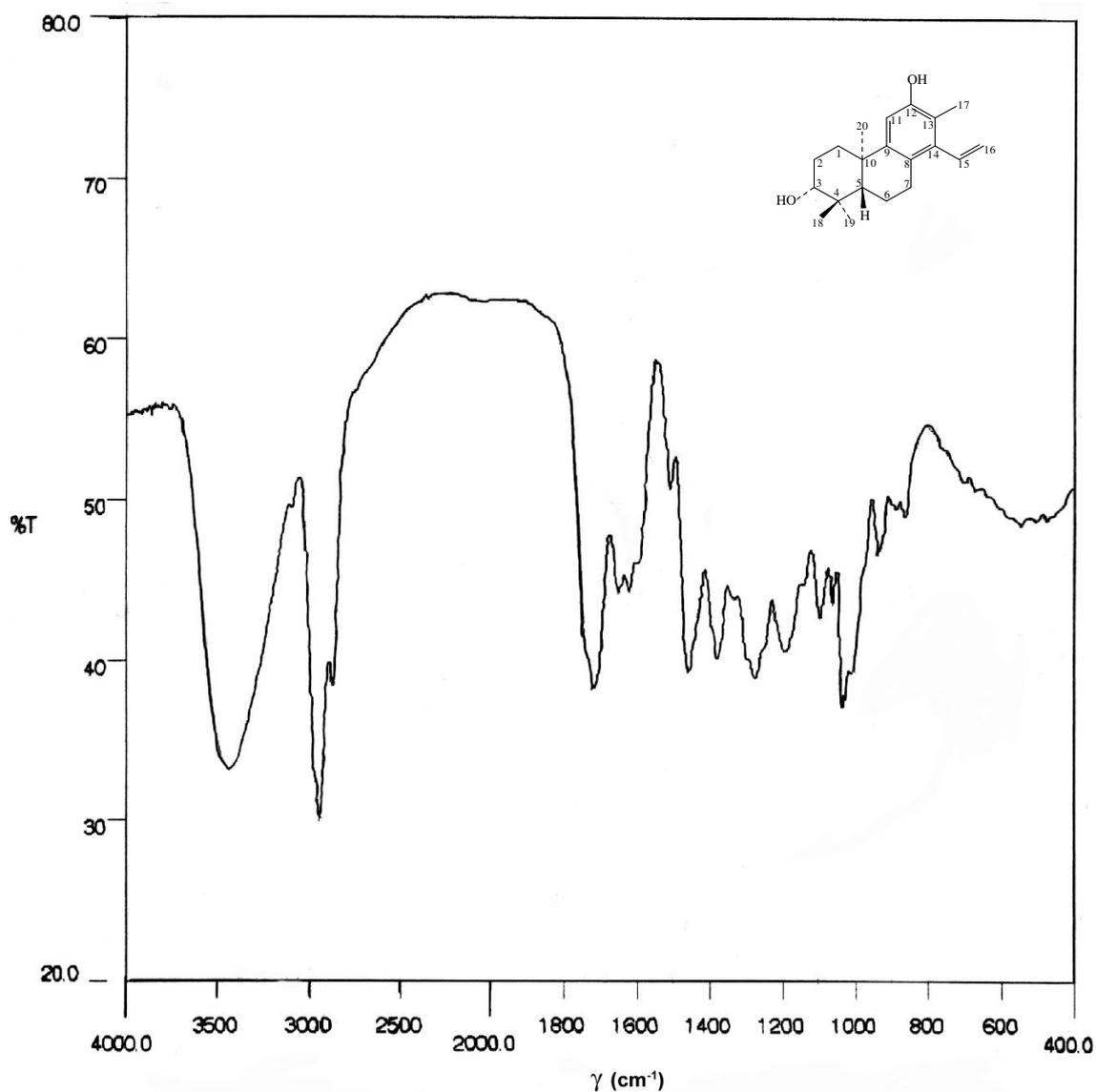


Figura 21. Espectro no IV (pastilha de KBr) do **AM-2**.

As atribuições de RMN ^1H e ^{13}C (Fig.22 e 23), estão dispostas na Tab. 7.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 22 e 23) indicam que o composto **AM-2** possui o esqueleto cleistantano semelhante ao espruceanol. Observam-se sinais representados como singletes em δ 0,88, 1,06, 1,20 e 2,19, referentes as quatro metilas 18, 19, 20 e 17, respectivamente. O sinal para o grupo álcool secundário não benzílico é verificado em δ 3,30 dd e o próton aromático em δ 6,67 .

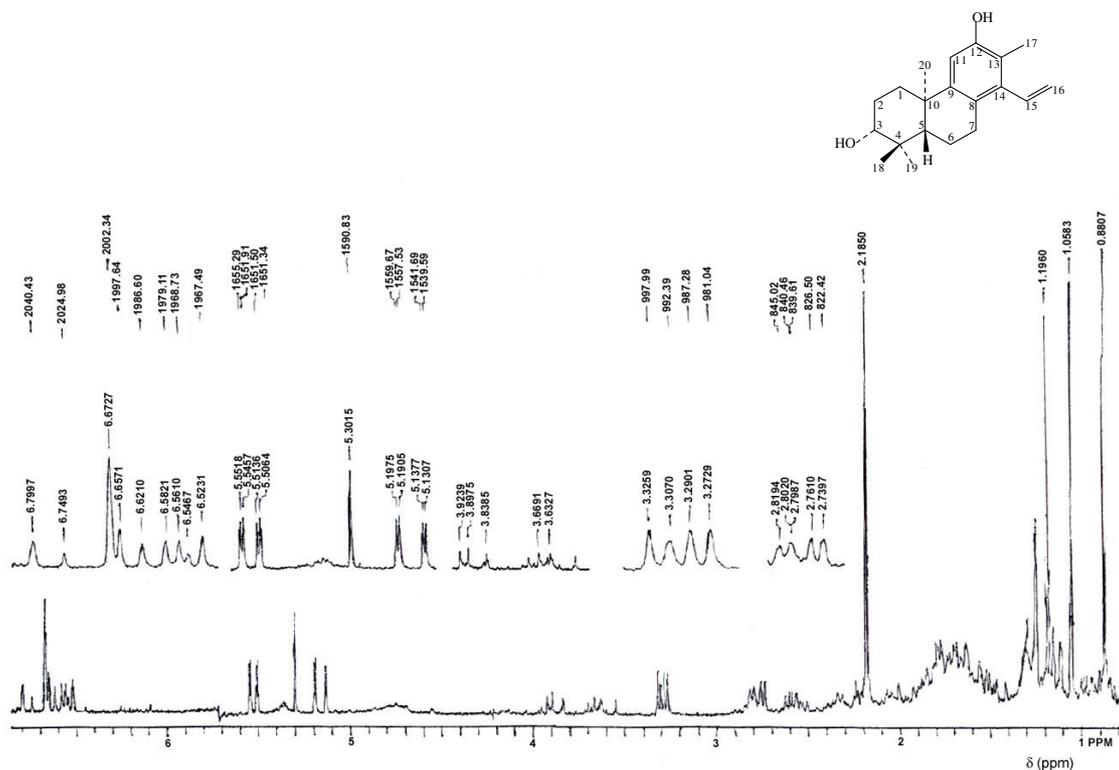


Figura 22. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do **AM-2**. Expansão da região dos hidrogênios olefínicos e aromáticos (6,67~5,13 ppm) e da região do hidrogênio no C-3 (3,32~3,27 ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida.

Tabela 7. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o **AM-2** e dados da literatura para o espruceanol¹⁷³.

Posição	AM-2 ^1H δ mult. J (Hz)	AM-2 ^{13}C δ	Espruceanol ^1H δ ¹⁷³ J (Hz)
1	1,80	28,0 / CH ₂	
2	1,21-1,50	37,3 CH ₂	
3	3,30 dd (J=10,6 e 5,4)	78,7 CH	3,29 dd (J=7,5 e 5,7)
4	-	38,87	
5	1,30 m	49,32 CH	
6	-	18,9 CH ₂	
7	2,78 dd	29,3 CH ₂	3,14 m
8	-	125,1	
9	-	147,7	
10	-	37,6	
11	6,67 s	109,6 CH	6,65 s
12	-	151,9	3,45 s
13	-	119,1	
14	-	139,2	
15	6,57 dd (J=17,9 e 11,4)	135,4 CH	6,59 dd (J=17,7 e 11,3)
16	5,53 dd (J=11,4 e 2,2) / 5,16 dd (J=17,9 e 2,1)	119,5 CH ₂	4,97-5,62 m
17	2,19 s	12,8 CH ₃	2,17 s
18	0,88 s	15,3 CH ₃	0,87 s
19	1,06 s	28,1 CH ₃	1,05 s
20	1,20 s	24,8 CH ₃	1,19 s
Solvente	CDCl ₃ 300 MHz	CDCl ₃ 75 MHz	CDCl ₃ 300 MHz

Pelo espectro de RMN de ^{13}C observa-se δ 151,9 referente ao carbono do grupo hidroxila ligado ao anel aromático no C-12 e δ 78,7 referente ao carbono ligado à hidroxila no C-3. Observam-se ainda sinais característicos de grupamento vinílico em δ 135,4 e 119,5 ppm

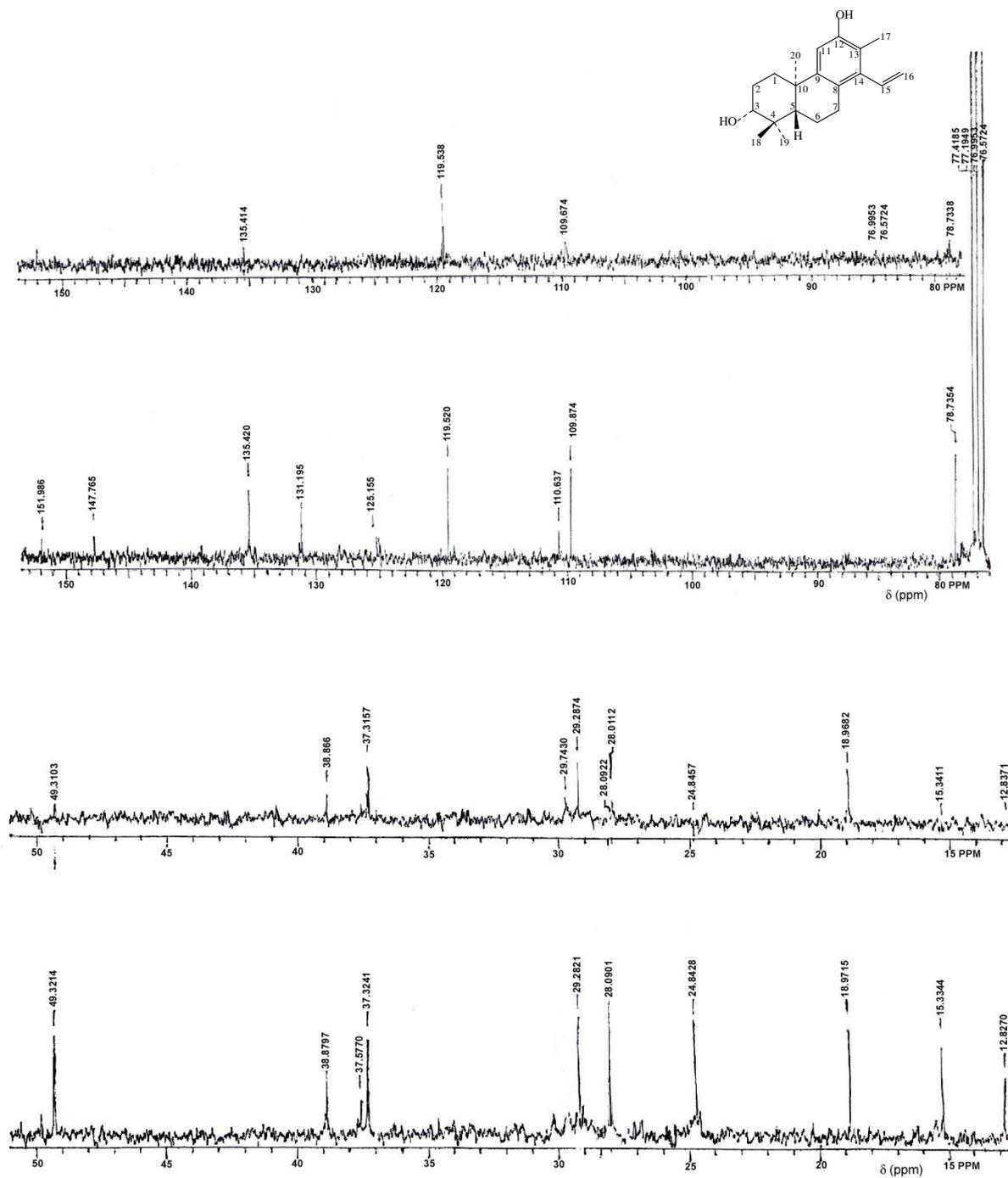
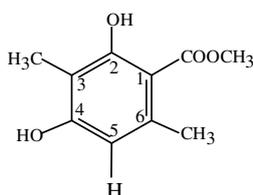


Figura 23. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3/TMS) do AM-2.

O composto espruceanol foi isolado e identificado pela primeira vez da planta *Cunuria spruceana* em 1979¹⁷³ e pela segunda vez obtido da planta *Jatropha divaricata* em 2001¹⁷⁴. Apesar de ter sido isolado anteriormente, o espruceanol trata-se de um diterpeno da série rara de cleistanol, sendo esta a terceira vez isolado em plantas superiores e a primeira vez reportado no gênero *Aleurites*. Não foram encontrados dados na literatura sobre possível efeito biológico deste composto

5.1.3.2. Composto **AM-3**

O composto **AM-3 (57)** foi isolado da fração de diclorometano do extrato metanólico das cascas de *A. moluccana*, após cromatografia em coluna, como um sólido branco, solúvel em clorofórmio, com P.F 141-143°C. A estrutura foi confirmada através das análises de IV, RMN ¹H e ¹³C (Figuras 24-26) como 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (ácido atrárico) e comprovado com dados na literatura¹⁷⁵.



Ácido atrárico

(AM-3)

(57)

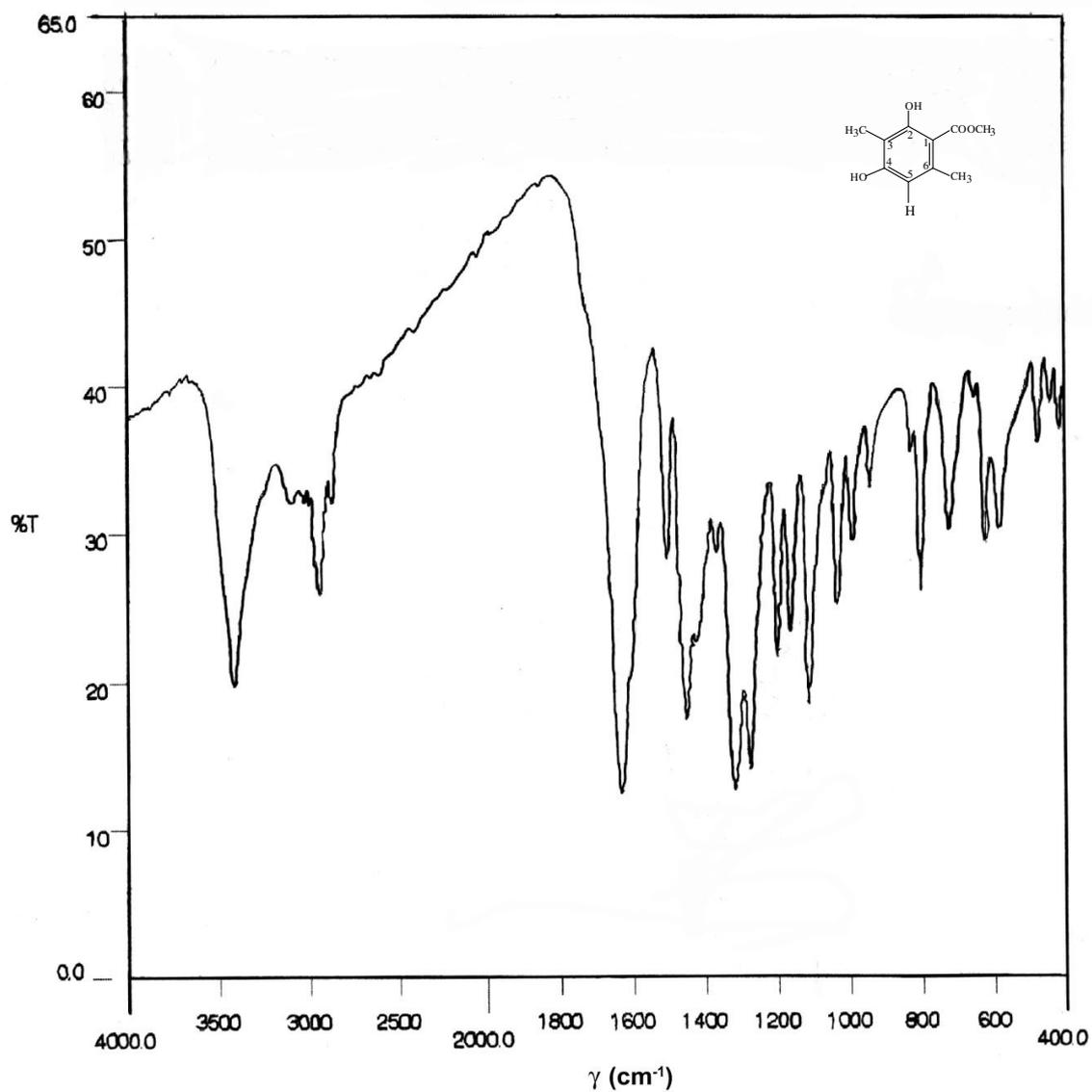


Figura 24. Espectro no IV (pastilha de KBr) do **AM-3**.

O espectro no I.V. (Fig. 24) apresenta bandas de absorção em 3404 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H, estiramento de grupos metila em 2926 cm^{-1} , banda de deformação axial de C=O em 1628 cm^{-1} , deformação axial de C=C do anel em 1502 , 1440 e 1366 cm^{-1} e deformação axial de C-O em 1110 cm^{-1} .

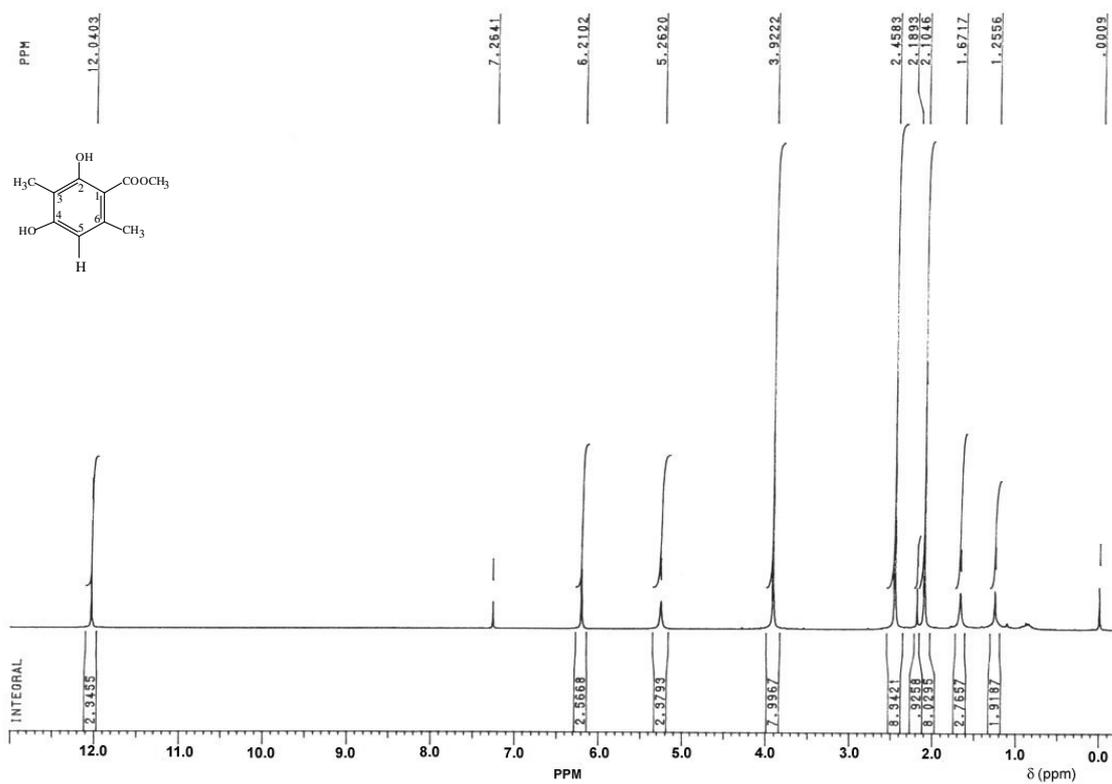


Figura 25. Espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃/TMS) do AM-3.

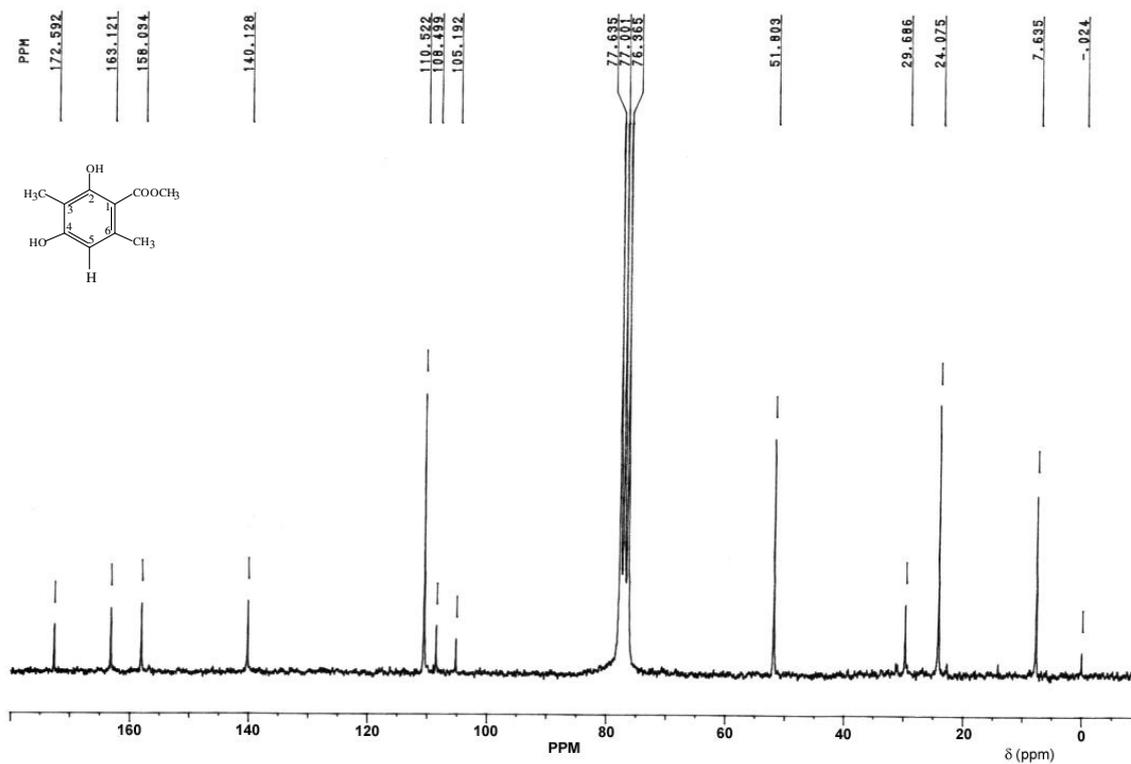


Figura 26. Espectro de RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃/TMS) do AM-3.

Tabela 8. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para **AM-3** e dados da literatura para o 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (ácido atrárico)¹⁷⁶.

Posição	AM-3 ^1H δ mult.	AM-3 ^{13}C δ / APT	Ác. atrárico ^1H δ mult. ¹⁷⁶	Ác. atrárico ^{13}C δ ¹⁷⁶
1	-	105,19/C	-	105,4
2	-	163,12/C	-	163,0
3	-	108,5/C	-	108,8
4	-	158,0/C	-	160,2
5	6,21 s	110,5/CH	6,20 s	110,7
6	-	140,1/C	-	140,2
OCH ₃	3,93	51,8	3,93	51,7
C=O	-	172,6	-	171,5
C2-OH	12,04 s	-	12,08 s	-
C3-Me	2,10 s	7,6	2,08 s	7,6
C4-OH	5,26 s	-	5,0 s	-
C6-Me	2,45 s	2,5	24,07	23,9
Solvente	CDCl ₃ 200 MHz	CDCl ₃ 50 MHz/75 MHz	CDCl ₃ 300 MHz	CDCl ₃ 75 MHz

Os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (Fig.25 e26) indicam que o composto **AM-3** é o 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (ácido atrárico). O espectro de RMN ^1H foi bastante simples, constituindo de sinais de OH em δ 12,04 e 5,26, sinal do hidrogênio aromático em δ 6,21, sinal do grupamento éster metílico em δ 3,92 e dois grupos metílicos aromáticos em δ 2,45 e 2,10.

O 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (ácido atrárico) foi isolado pela primeira vez em 1971¹⁷⁶ e recentemente da planta *Frullania brasiliensis*¹⁷⁷, porém está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Aleurites*. Não foram encontrados dados na literatura a respeito da atividade biológica para este composto.

5.1.4. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES PARTES DA PLANTA

A cromatografia em camada delgada (ccd) e cromatografia gasosa (CG) são valiosos instrumentos utilizados para padronização e caracterização de plantas medicinais¹⁷⁸. Ambos métodos foram aplicados para verificar a

composição química das diferentes partes da planta, a qual contém uma constituição variável em relação aos distintos órgãos.

A Tabela 9 mostra os rendimentos dos extratos ou frações estudadas. Altos rendimentos foram obtidos quando folhas e flores foram usados. CCD comparativa dos extratos, utilizando vários eluentes e reagentes, juntamente com CG indicaram, como esperado, que eles contêm diferentes constituintes ou concentrações.

Tabela 9. Rendimentos dos extratos e frações obtidas de diferentes partes de *A. moluccana*.

Partes da planta	Rendimentos (%) dos extratos ou frações				
	MeOH	DCM ^a	DCM ^b	AcOEt ^a	AcOEt ^b
Raízes	2,05	0,016	0,78	-	-
Caules	1,37	0,02	1,54	-	-
Flores	4,12	0,05	1,20	-	-
Cascas	0,91	0,012	1,32	-	-
Folhas	4,83	0,031	0,66	0,002	0,04
Sementes	2,70	0,025	0,94	-	-

^a Em relação ao peso inicial das amostras

^b Em relação ao extrato metanólico

Analisando os resultados obtidos e comparando com os compostos obtidos em trabalhos anteriores com esta planta indicaram que **swertisina (28)** e seu derivado **2''-O-ramnosilswertisina (32)** estão presentes somente nas folhas de *A. moluccana*⁸⁷. Estudos anteriores demonstraram que **swertisina** possui potente efeito e atividade antinociceptiva dose-dependente quando analisado no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético^{84,87}. Este composto, juntamente com triterpenos, **β** e **α-amirina (29)** e a mistura de esteróis, **estigmasterol**, **β-sitosterol** e **campesterol (31)**, contribuem para a atividade antinociceptiva anteriormente verificada para o extrato hidroalcoólico obtido das folhas desta planta^{84,87,105}. O **ácido acetil aleuritólico (27)**, um triterpeno, o qual possui atividade analgésica e antimicrobiana, foi encontrado nas cascas e raízes, enquanto os esteróis stigmasterol e β-sitosterol estão presentes em todas partes

da planta, exceto nas raízes¹⁷⁹. Nos extratos obtidos dos caules e folhas foram também indicados os triterpenos, os quais são os compostos majoritários de *A. moluccana*.

A administração intraperitoneal, nos animais, dos extratos metanólicos obtidos das diferentes partes da *A. moluccana* (0,003-1 mg/kg), 30 minutos antes da injeção do ácido acético, produziu potente e significativa inibição das contorções abdominais. Como pode ser visto na Figura 27, o efeito antinociceptivo foi confirmado em todas as partes da planta testadas. Os extratos das raízes, caules, cascas, flores, folhas e sementes demonstraram valor de DI_{50} de 0,014 (0,0051-0,037), 0,008 (0,005-0,01), 0,013 (0,005-0,035), 0,082 (0,05-0,19), 0,04 (0,03-0,05) e 0,86 (0,57-1,32) mg/kg, respectivamente, com inibição máxima (%) de 98, 87, 85, 93, 86 e 97, respectivamente.

O extrato metanólico do caule de *A. moluccana* foi o mais ativo. Entretanto, o extrato obtido das sementes demonstrou baixo efeito antinociceptivo no modelo testado. Quando comparado com alguns medicamentos utilizados na clínica, tais como **aspirina** ou **paracetamol**, o extrato dos caules demonstrou ser muito mais potente (Tabela 10). A mistura de β e α -amirina causou inibição de ~ 21% a 1 mg/kg, via i.p., quando analisada no mesmo modelo experimental.

Estes resultados sugerem que outros compostos ativos estão agindo como antinociceptivo ou existe efeito sinérgico permitindo o aumento da potência do extrato, o qual contém muitos compostos.

Tabela 10. Efeito antinociceptivo dos compostos de *A. moluccana*, aspirina e paracetamol, contra contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético em camundongos.

Tratamento	DI ₅₀ (mg/kg)	IM (%)
α,β -Amirina	0,79 (0,63-1,01)	84 \pm 3
Swertisina	Inativo	Inativo
2''-O-Ramnosilswertisina*	5,1 (4,2-6,2)	92 \pm 4
<i>n</i> -Hentriacontano	0,016 (0,012-0,017)	94 \pm 6
Ácido Acetil Aleuritólico**	21,6 (15,0-31,2)	76 \pm 5
β -Sitosterol***	9 (3,5-23,2)	54 \pm 2
Estigmasterol***	16 (13,6-20,3)	42 \pm 1
Aspirina	24 (13-44)	35 \pm 2
Paracetamol	19 (16-23)	38 \pm 1
Raízes	0,014 (0,005-0,037)	98
Cascas	0,013 (0,005-0,035)	85
Flores	0,082 (0,05-0,19)	93
Caules	0,008 (0,005-0,01)	87
Folhas	0,04 (0,03-0,05)	86
Sementes	0,86 (0,57-1,32)	97

(Meyre-Silva *et al.*, 1998⁸⁴).

** (Peres, 1997¹⁷⁹).

*** (Niero, 1993¹⁸⁰; Santos *et al.*, 1995¹⁷¹)

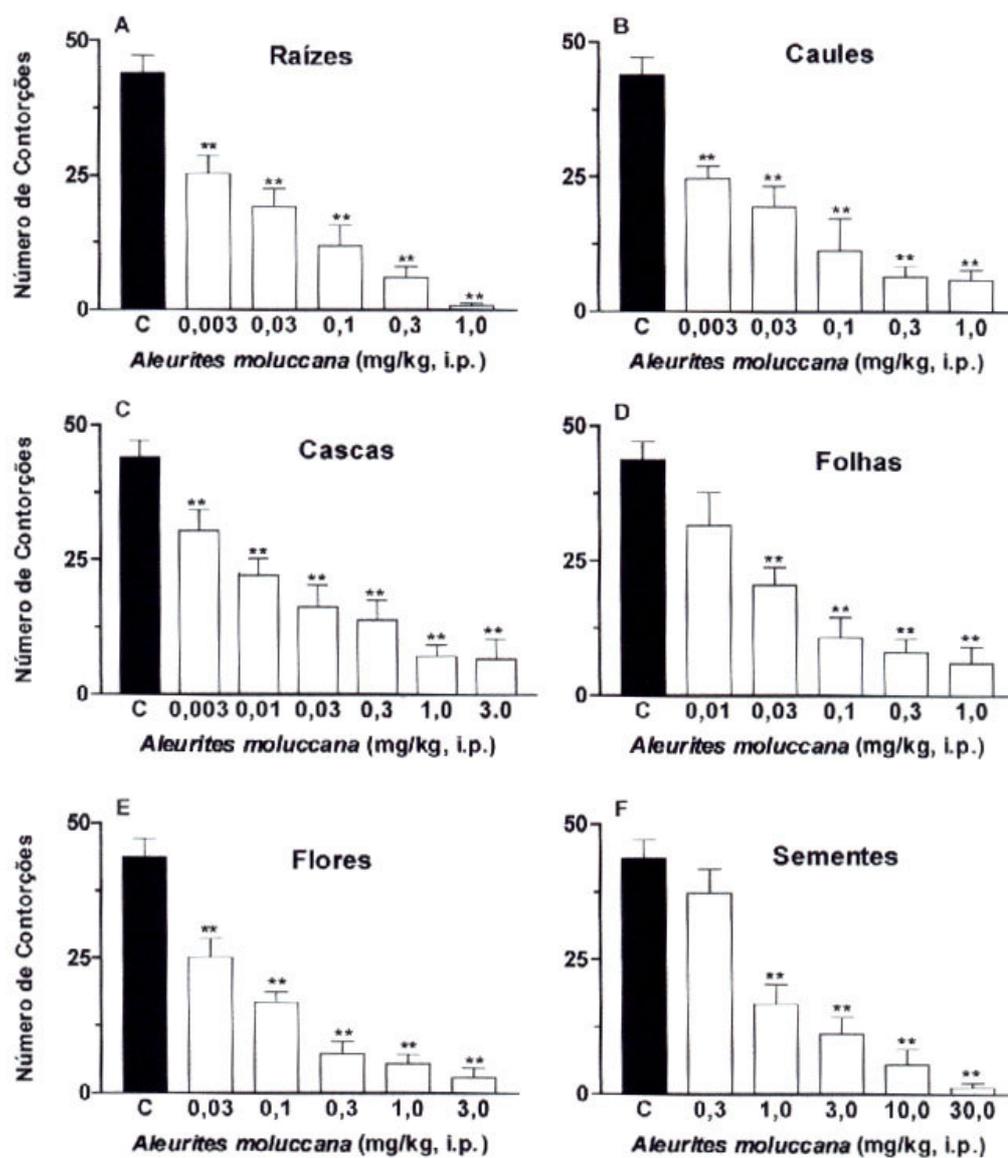


Figura 27. Efeito antinociceptivo de extratos metanólicos obtidos das diferentes partes de *A. moluccana*.

5.3. *Bauhinia microstachya*

5.3.1. EXTRAÇÃO

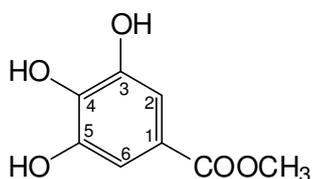
Para a extração dos metabólitos secundários de *B. microstachya* foi utilizada a metodologia descrita por CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998¹⁷.

As folhas de *B. microstachya* secas à temperatura ambiente e trituradas foram submetidas à maceração com metanol por 10 dias. Após remoção do solvente, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida e sucessivamente particionado com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Optou-se em trabalhar com a fração de acetato de etila devido aos testes farmacológicos apresentarem-se promissores para esta fração e por apresentar um bom perfil cromatográfico. Esta fração foi então submetida à procedimentos cromatográficos.

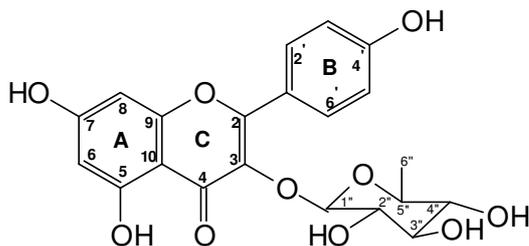
Pela necessidade de se isolar maior quantidades dos compostos para continuidade da análise biológica, realizou-se uma segunda coleta da planta utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita.

5.3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *B. microstachya*

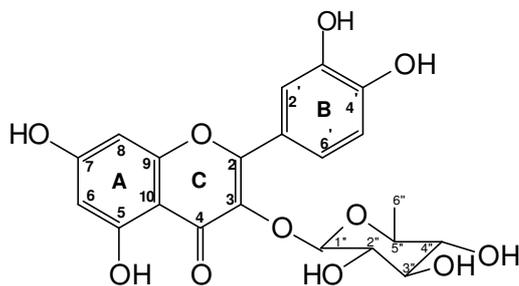
As investigações químicas com as folhas de *B. microstachya* levaram ao isolamento dos compostos fenólicos **BM-0** galato de metila (**58**), **BM-1** Kaempferol 3-*O*-ramnosil (**59**), **BM-2** quercitrina (**60**), **BM-3** miricitrina (**61**) e **BM-4** epicatequina-3-*O*-galato (**62**).



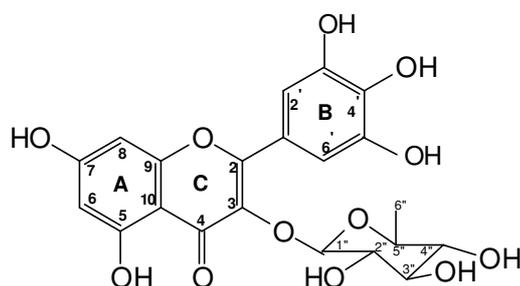
(BM 0)
Galato de metila (58)



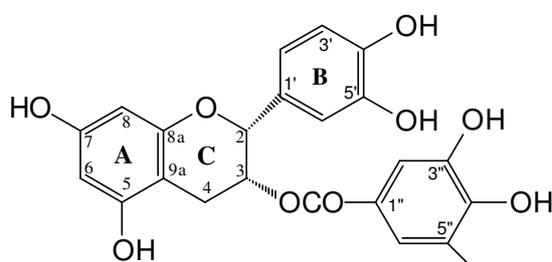
(BM 1)
Kaempferol - 3-O- ramosil (59)



(BM 2)
Quercetina - 3 O- ramosil (60)
(Quercitrina)



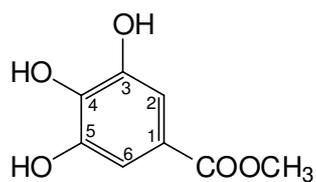
(BM 3)
Miricetina - 3 O- ramosil (61)
(Miricitrina)



(BM 4)
Epicatequina - 3-O- galato (62)

5.3.2.1. Composto **BM-0**

O composto **BM-0 (58)** foi isolado da fração de acetato de etila do extrato metanólico da *B. microstachya*, após cromatografia em coluna, como um sólido branco, solúvel em metanol, com ponto de fusão de 200-202 °C. A sua estrutura foi confirmada através das análises de I.V., RMN ¹H e ¹³C como galato de metila e através de c.c.d com amostra autêntica de galato de metila, isolado em nossos laboratórios de outras plantas.



(BM 0)
Galato de metila (58)

O espectro de I.V. (Fig. 28) apresenta bandas de deformação axial de O-H em 3366 cm^{-1} , deformação axial de C-H de metila em 2960 cm^{-1} , deformação axial de C=C em 1618 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} referente à C=O.

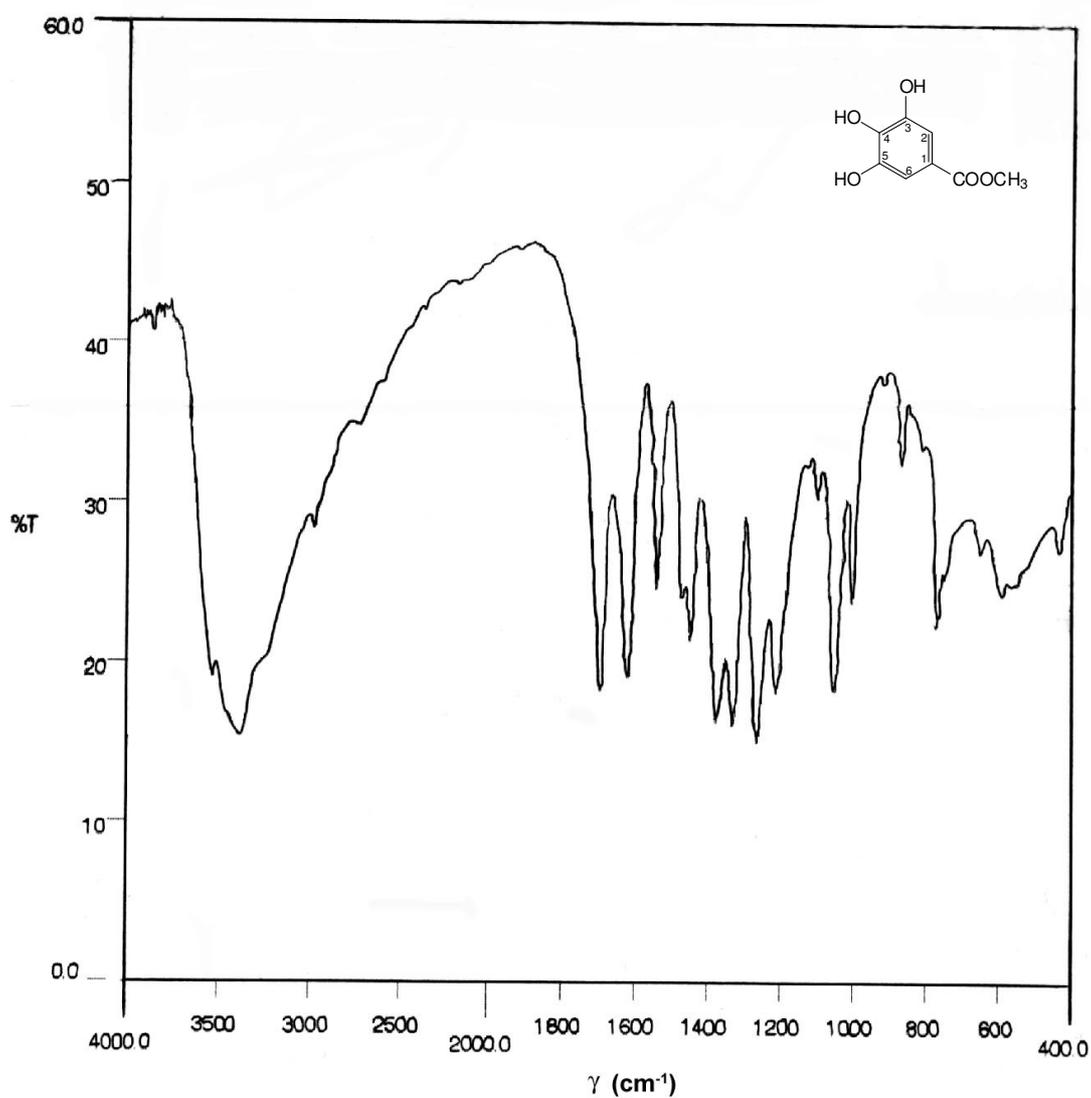
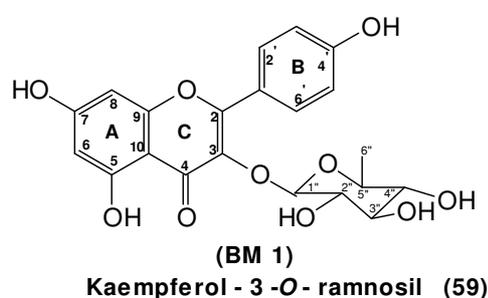


Figura 28. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do **BM-0**.

Este composto tem sido isolado de várias plantas como derivado do ácido gálico e apresenta atividade antibacteriana e antiviral ¹⁷¹. Estudos, com o gênero *Phyllanthus* têm evidenciado a presença de galato de metila e galato de etila, ambos obtidos da planta como artefatos produzidos durante processo de obtenção dos extratos utilizando metanol e etanol, respectivamente ¹⁷².

5.3.2.2. Composto **BM-1**

O composto **BM-1 (59)** foi isolado da fração de acetato de etila do extrato metanólico da *B. microstachya*, após cromatografia em coluna, como um sólido amarelo, solúvel em metanol, com ponto de fusão de 230-231 °C. A sua estrutura foi confirmada através das análises de I.V., RMN ¹H e ¹³C como kaempferol-3-O-ramnosil e a partir da técnica de hidrólise para a identificação de flavonóides ^{183,184}.



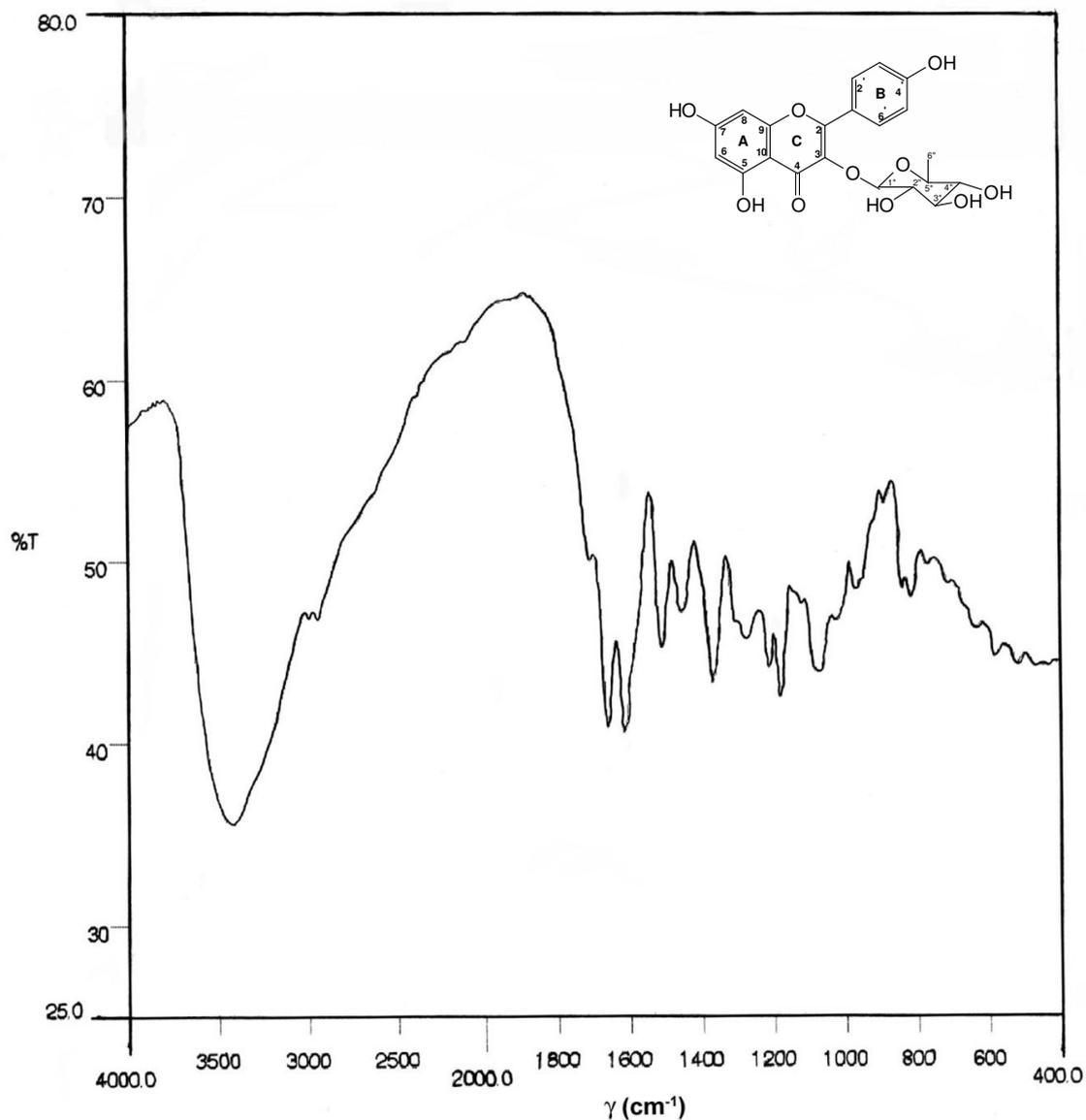


Figura 29. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) do **BM-1**.

O espectro de I.V. (Fig. 29) apresenta bandas de deformação axial de O-H em 3400 cm^{-1} , deformação axial de C=O em 1656 cm^{-1} e deformação axial de C=C em 1610 cm^{-1} .

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C , apresentados na Tab. 11 (Fig. 30 e 31) indicam que o composto **BM-1** é um flavonóide O-

glicosilado. Pelo espectro de RMN ^1H observa-se um singlete largo em δ 13,4 referente à hidroxila OH-5, H-2' e 6' aparecem em δ 8,10, H-3' e 5' aparecem em δ 7,2, H-6 e 8 em δ 6,73. Na região entre δ 6,3-1,5 aparecem sinais dos hidrogênios do açúcar ligado ao O no C-3. O hidrogênio H-1" ligado ao carbono anomérico aparece como um sinal largo em 6,32 ppm. Na região de 4,6~4,4 ppm encontram-se os sinais dos hidrogênios H-2", 3" , 4" e 5" e na região de δ 1,45 ppm os hidrogênios do grupo metila presente na ramnose.

Tabela 11. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para **BM-1** e dados da literatura para o kaempferol 3-*O*-ramnosil¹⁸³.

Posição	BM-1 δ ^1H J (Hz)	BM-1 δ ^{13}C / APT	Kaempferol 3- <i>O</i> - ramnosil δ $^1\text{H}^{183}$ J (Hz)	Kaempferol 3- <i>O</i> - ramnosil δ $^{13}\text{C}^{183}$
2	-	157,48	-	159,3
3	-	134,97	-	136,2
4	-	178,80	-	179,6
5-OH	13,40	162,76	-	163,3
6	6,76 d (J= 2,01)	99,57/CH	6,30 d (J= 2,0)	99,8
7	-	165,73	-	165,9
8	6,71 d (J= 2,19)	94,36/CH	6,48 d (J= 2,0)	94,7
9	-	157,49	-	158,6
10	-	103,61	-	105,9
1'	-	122,55	-	122,6
2'	8,08	131,65/CH	7,86 d (J= 8,6)	131,9
3'	7,27	116,14/CH	7,03 d (J= 8,7)	116,5
4'	-	161,45	-	161,6
5'	7,18	115,97/CH	7,03 d (J= 8,7)	116,5
6'	8,05	131,26/CH	7,86 d (J= 8,6)	131,9
1"	6,32	103,61	5,47	103,5
2"	4,50	73,03-71,77/CH	4,31	71,9
3"	4,63-4,59 dd (J= 2,85 e 3,03)	73,03-71,77/CH	3,80	72,1
4"	4,30 m	73,03-71,77/CH	3,42	73,2
5"	4,42 m	73,03-71,77/CH	3,40	72,0
6"	1,43-1,45 d (J= 6,05)	18,12/CH	1,01	17,6
Solvente	Piridina-d ₅ 300 MHz	Piridina-d ₅ 75 MHz	CD ₃ OD 600,13 MHz	CD ₃ OD 150,93 MHz

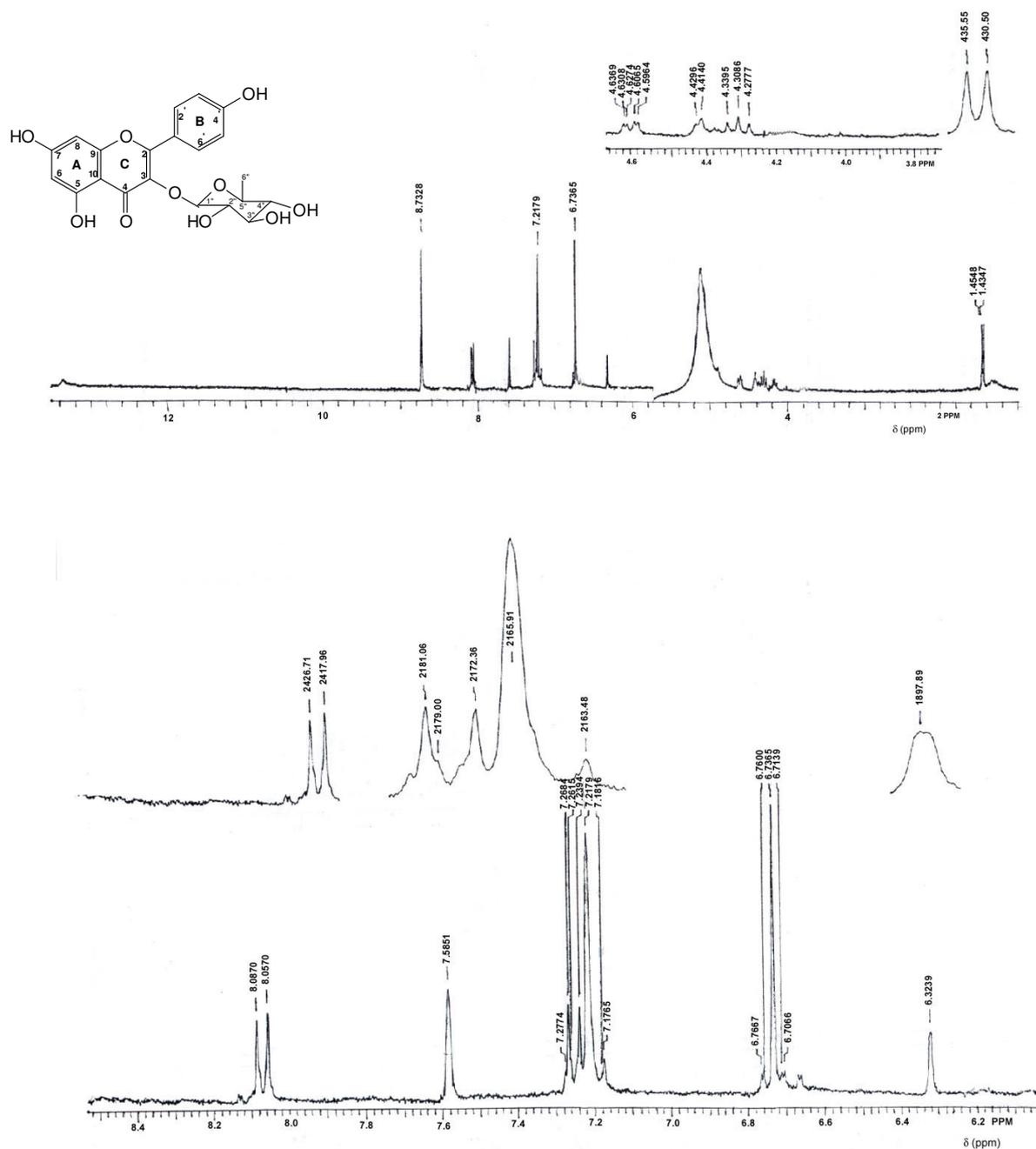


Figura 30. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ /TMS) do **BM-1**. Expansão da região dos hidrogênios da ramosa (4,6~2,5 ppm) e da região dos hidrogênios do anel B (8,4~2,2 ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida, respectivamente.

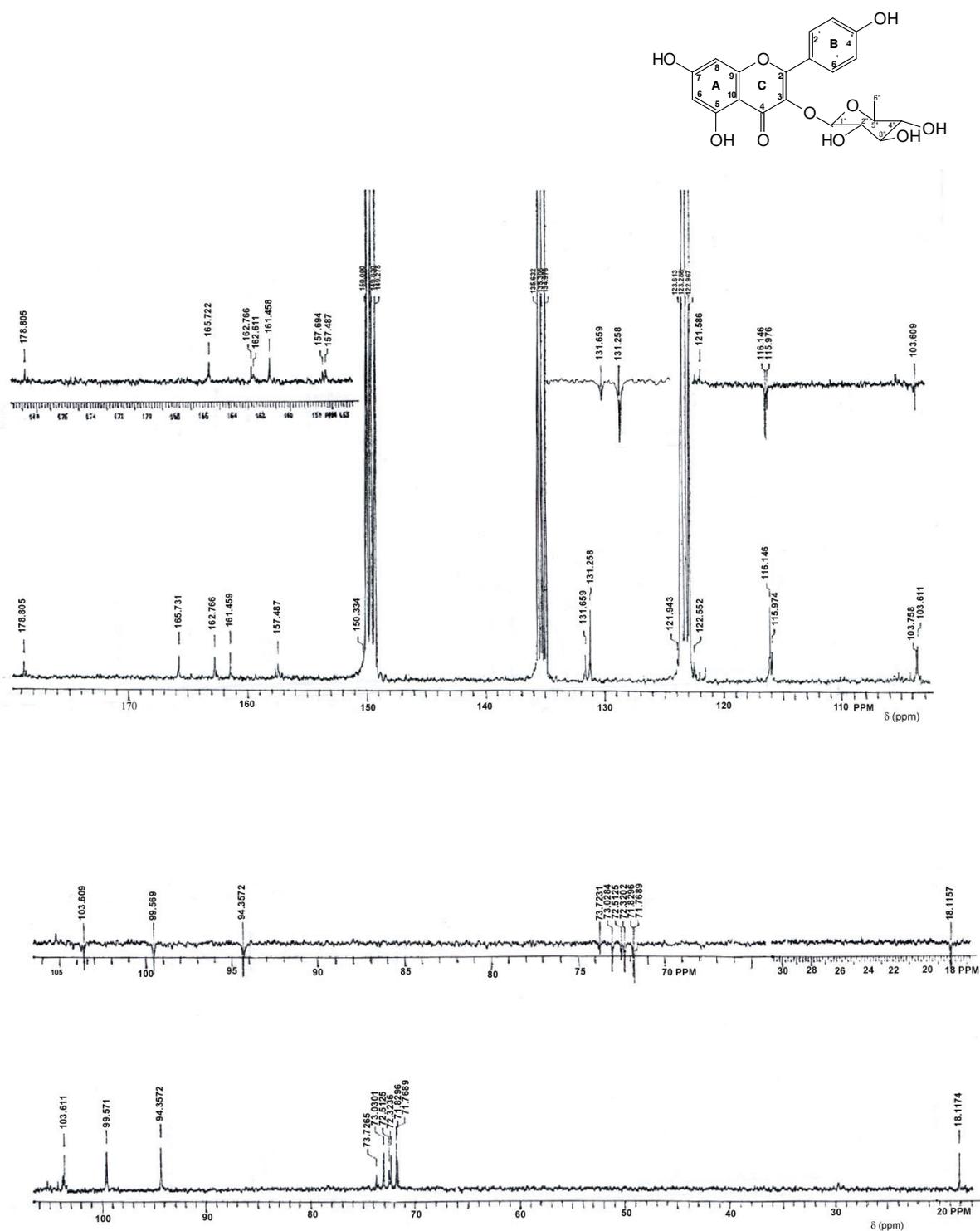


Figura 31. Espectro de RMN- ^{13}C /APT (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ /TMS) do **BM-1**.

No espectro de RMN ^{13}C (Fig. 31) observam-se 21 sinais referentes aos carbonos presentes no composto, sendo os deslocamentos na região de 73,7~71,7 ppm atribuídos aos carbonos da hexose, ramnose, C-2", 3", 4" e 5" , em 103,6 ppm carbono anomérico e em 18,1 ppm referente ao carbono da metila.

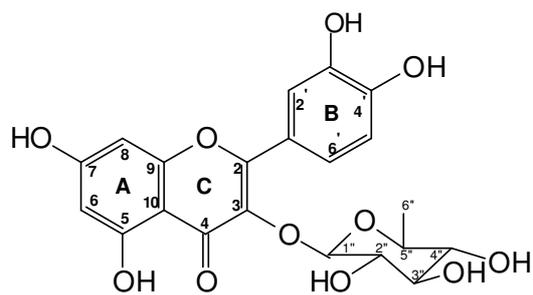
Os sinais positivos observados no espectro de APT indicam carbonos quaternários ou secundários.

O flavonóide kaempferol (3, 5, 7, 4'-OH), parte aglicona, tem sido encontrado em várias espécies do gênero *Bauhinia* com diferentes açúcares ligados. Este é o primeiro relato do isolamento no gênero *Bauhinia* do kaempferol com açúcar ramnose ligado ao O no C-3.

Dados na literatura tem demonstrado atividade antiinflamatória e antioxidante para a parte aglicona (kaempferol), atividade esta relacionada à presença dos grupos hidroxilas nos carbonos C-4', 5 e 7 e da dupla ligação entre C-2 e 3¹⁸⁵. O kaempferol também exibiu atividade antibacteriana, antiviral, alelopática, antioxidante e hipoglicemiante¹⁸⁶⁻¹⁹¹. No entanto, não foram evidenciados estudos biológicos anteriores com o composto **BM-1**.

5.3.2.3. Composto **BM-2**

O composto **BM-2 (60)** foi isolado da fração de acetato de etila do extrato metanólico da *B. microstachya*, após cromatografia em coluna, como um sólido amarelo, solúvel em metanol, com ponto de fusão de 179-181 °C. A sua estrutura foi confirmada através das análises de I.V., RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 32-34) como quercetina-3-O-ramnosil.



(BM 2)
Quercetina - 3 O - ramnosil (60)
(Quercitrina)

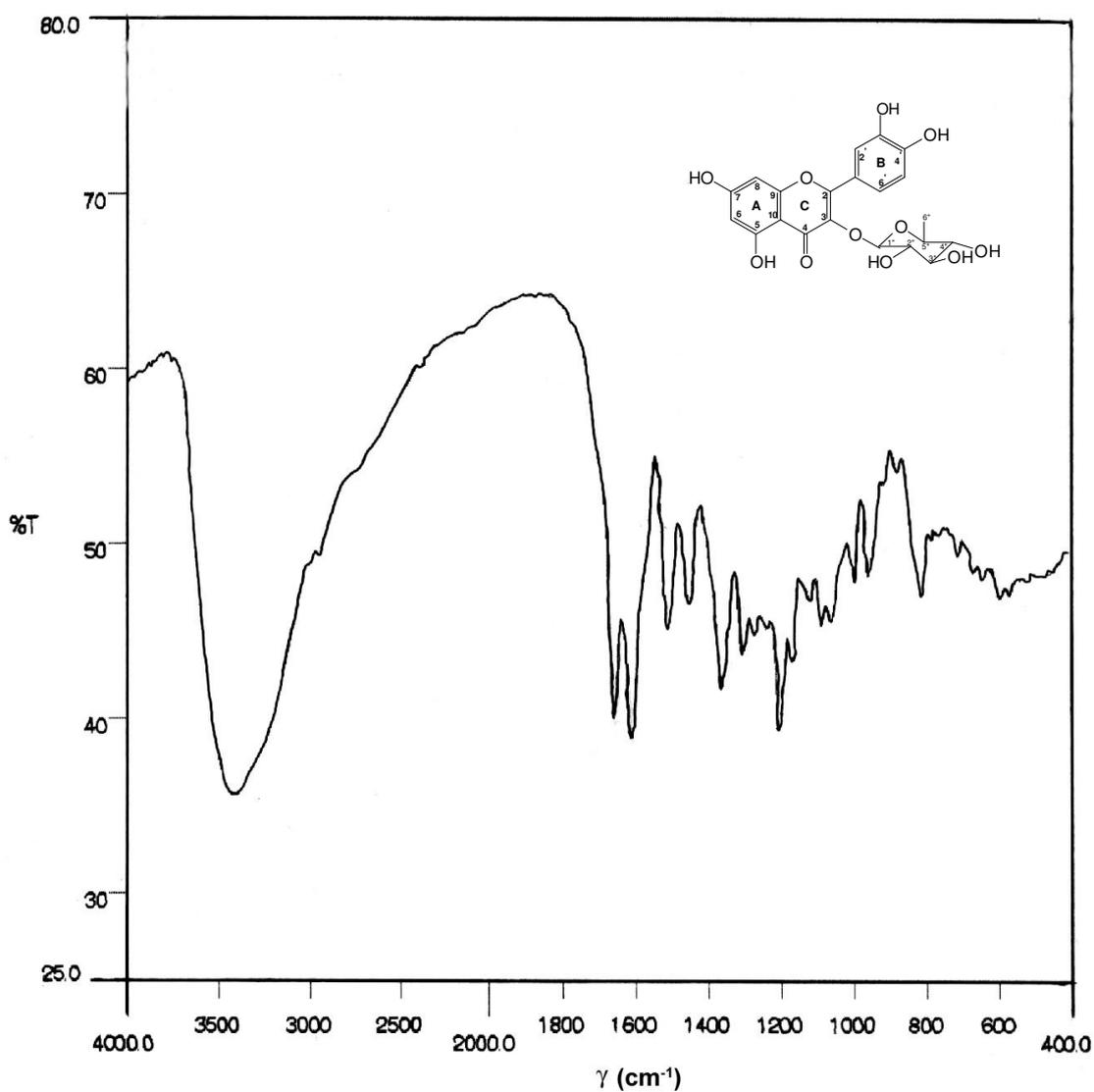


Figura 32. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do **BM-2**.

Os valores de I.V. (Fig. 32) são praticamente os mesmos sinais do composto **BM-1**, com pequenas alterações e o espectro de RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 33 e 34) diferencia pela adição de uma hidroxila no C-3', no anel B, apresentando modificações nos deslocamentos dos carbonos próximos a esta hidroxila.

No espectro de RMN ^1H se observa sinal largo em δ 13,4, referente à hidroxila OH-5, enquanto os hidrogênios H-2' e 6' aparecem em δ 8,04, H-6 e 8 em δ 6,72 e 6,67, em δ 7,35 H-5'. Na região entre δ 6,29-1,49 aparecem sinais dos hidrogênios do açúcar ligado ao O no C-3. O espectro de ^{13}C demonstra semelhança ao espectro obtido para o **BM-1**, com exceção do C-3' que apresentou sinal em δ 147,1 referente a uma hidroxila adicional no anel B.

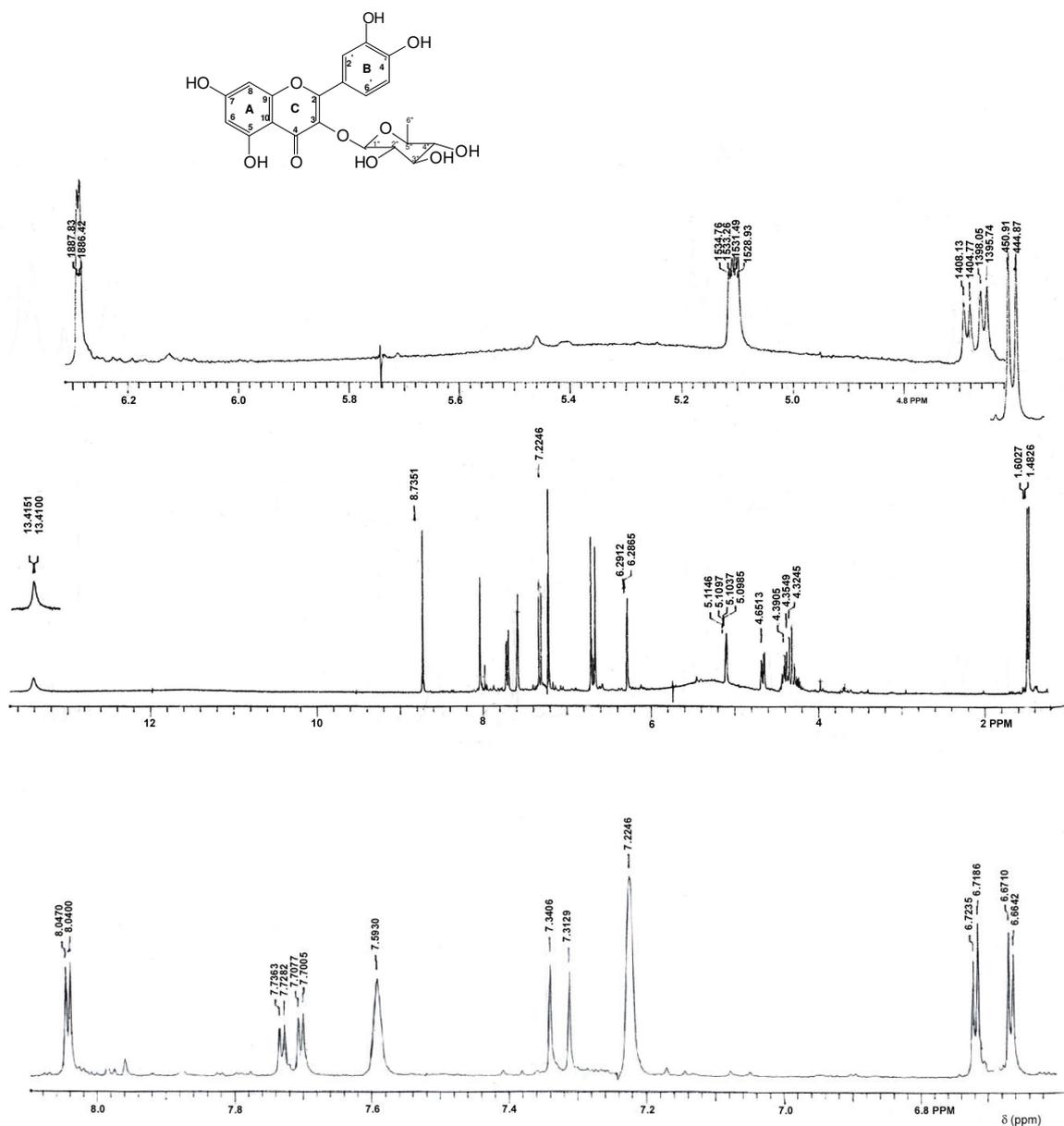


Figura 33. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{TMS}$) do **BM-2**. Expansão da região dos hidrogênios da hexose (6,3~1,4 ppm) e dos hidrogênios do anel B e A (8,0~6,6 ppm). Deslocamentos expressos em Hz.

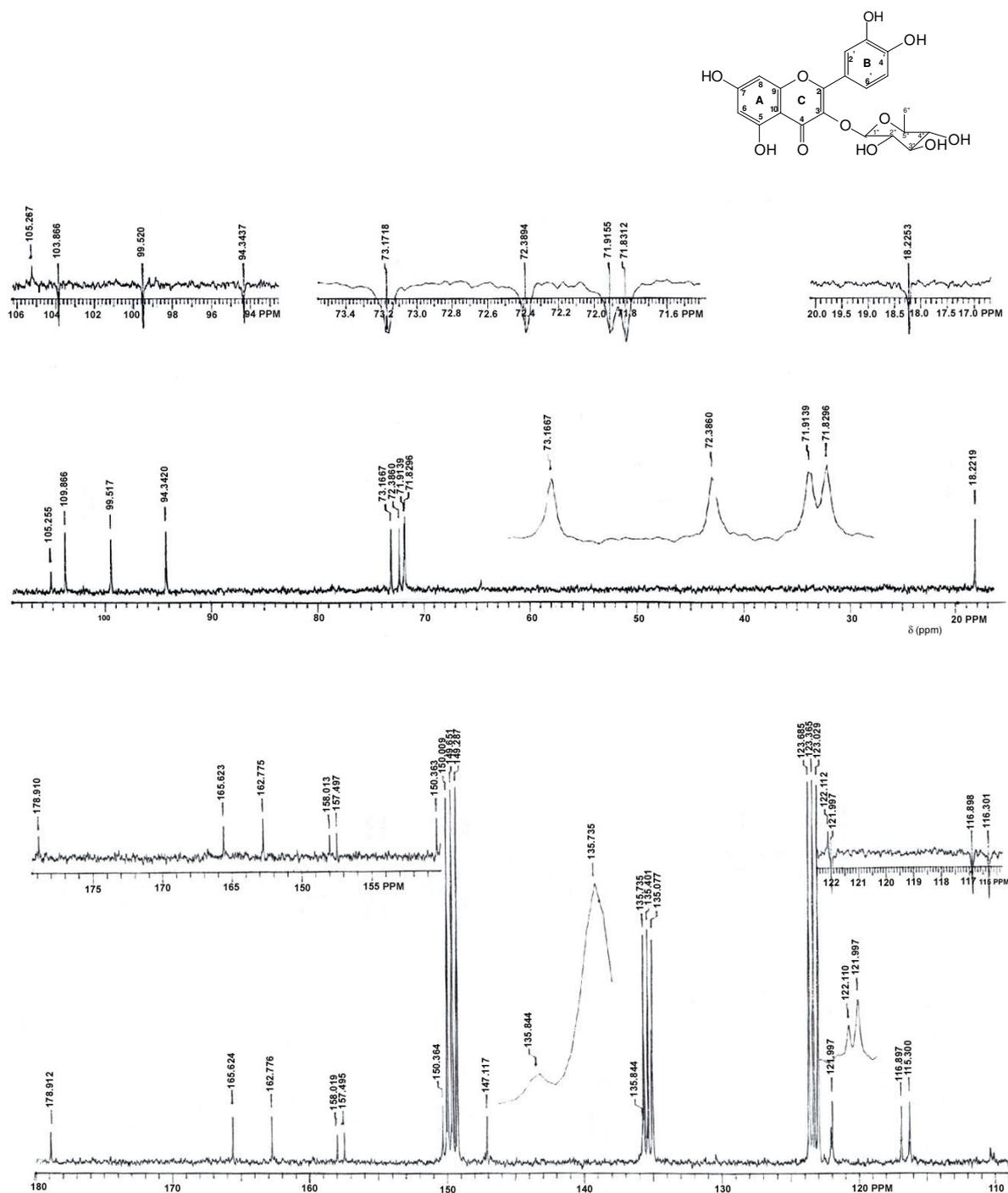


Figura 34. Espectro de RMN- ^{13}C /APT (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N/TMS}$) do **BM-2**.

Tabela 12. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para **BM-2** e dados da literatura para a quercetrina¹⁸³.

Posição	BM-2 δ ^1H mult. J (Hz)	BM-2 δ ^{13}C / APT	Quercetrina δ $^1\text{H}^{183}$ J (Hz)	Quercetrina δ $^{13}\text{C}^{183}$
2	-	157,49	-	158,6
3	-	135,84	-	136,3
4	-	178,91	-	179,7
5	13,41	162,77	-	163,3
6	6,72 d (J= 2,0)	99,52/CH	6,32 d (J= 2,0)	99,8
7	-	165,62	-	165,9
8	6,67 d (J= 2,0)	94,34/CH	6,49 (J= 2,0)	94,7
9	-	158,01	-	159,3
10	-	105,25	-	105,9
1'	-	122,11/CH	-	122,9
2'	8,04 d (J= 2,1)	116,30/CH	7,46 d (J= 2,3)	116,9
3'	-	147,12	-	146,4
4'	-	150,36	-	149,8
5'	7,34- 7,31 d (J= 8,3)	116,90/CH	7,03 d (J= 8,2)	116,4
6'	7,73-7,70 dd (J= 8,3 e 2,1)	121,99/CH	7,43 dd (J= 8,2 e 2,3)	123,0
1''	6,29 d (J= 1,4)	103,87/CH	5,48 d (J= 1,6)	103,6
2''	5,11-5,5,09 dd (J= 1,5 e 2,5)	73,16/CH	4,34 dd (J= 1,6 e 3,0)	72,1
3''	4,65 dd (3,3 e 9,0)	72,39/CH	3,87 dd (J= 3,2 e 9,5)	72,1
4''	4,32 t	71,91/CH	3,46 t (J= 9,5)	73,3
5''	4,35 m	71,83/CH	3,55 dd (J= 9,5 e 6,2)	71,9
6''	1,50 d (J= 6,0)	18,22/CH ₃	1,07 d (J= 6,2)	17,7
Solvente	Piridina-d ₅ 300 MHz	Piridina-d ₅ 75 MHz	CD ₃ OD 600,13 MHz	DMSO-d ₆ 150,93 MHz

O composto **BM-2** identificado como quercetrina (quercetina 3-*O*-ramnosil) tem sido encontrado em muitas plantas, sendo que no gênero *Bauhinia* foi somente isolado o flavonóide quercetina com outro açúcar no C-3¹¹⁶. Dados da literatura relatam atividade hipotensiva, antiviral, antiinflamatória, anti-diarréica e antioxidante para este composto¹⁹¹⁻¹⁹⁶.

5.3.2.4. Composto **BM-3**

O composto **BM-3 (61)** foi isolado da fração de acetato de etila do extrato metanólico da *B. microstachya*, após cromatografia em coluna, como um sólido branco, solúvel em metanol, com ponto de fusão de 194-196 °C. A sua estrutura foi confirmada através das análises de I.V., RMN ^1H e ^{13}C como miricetina-3-*O*-ramnosil.

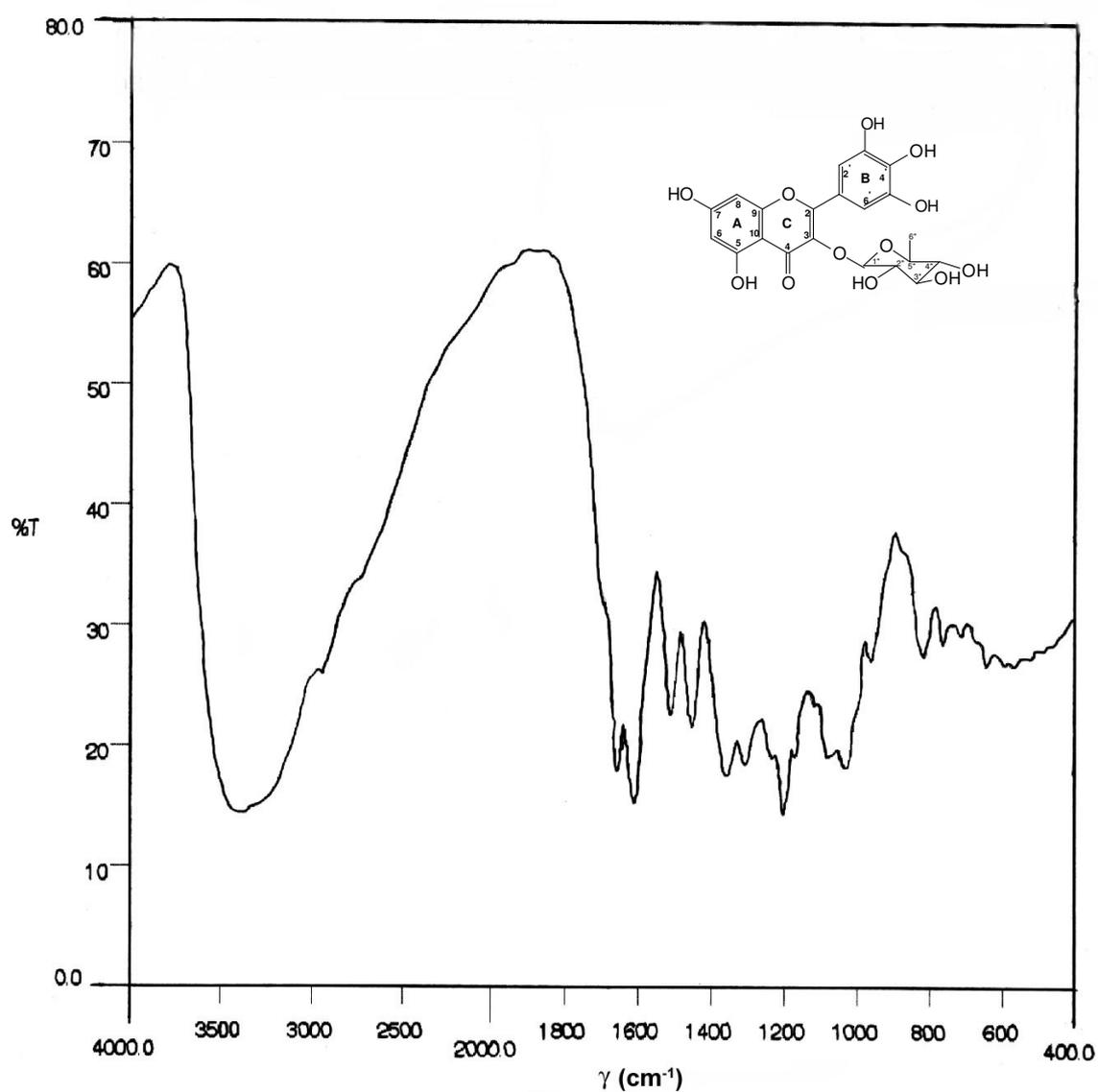
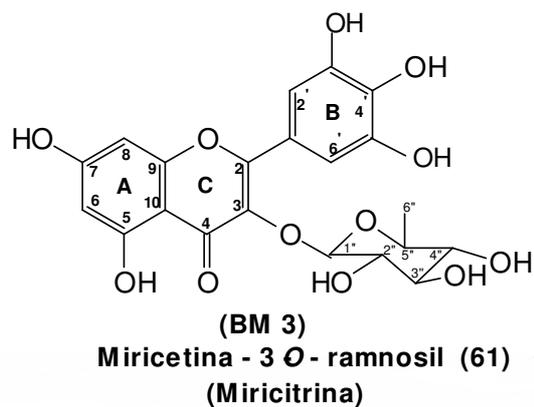


Figura 35. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do **BM-3**.

O espectro de I.V. (Fig. 35) apresenta bandas de deformação axial de O-H em 3380 cm^{-1} , deformação axial de C=O em 1654 cm^{-1} e deformação axial de C=C em 1610 cm^{-1} .

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e $^{13}\text{C}/\text{APT}$ (Fig. 36 e 37) apresentados na Tabela 13 indicam que o composto **BM-3** é um flavonóide *O*-glicosilado. Analisando ambos espectros e comparando com os dados obtidos para o **BM-2**, observa-se mudança significativa de valores referentes ao H-6' e ao C-5' e 6', indicando a adição de um grupo hidroxila no C-5', no anel B.

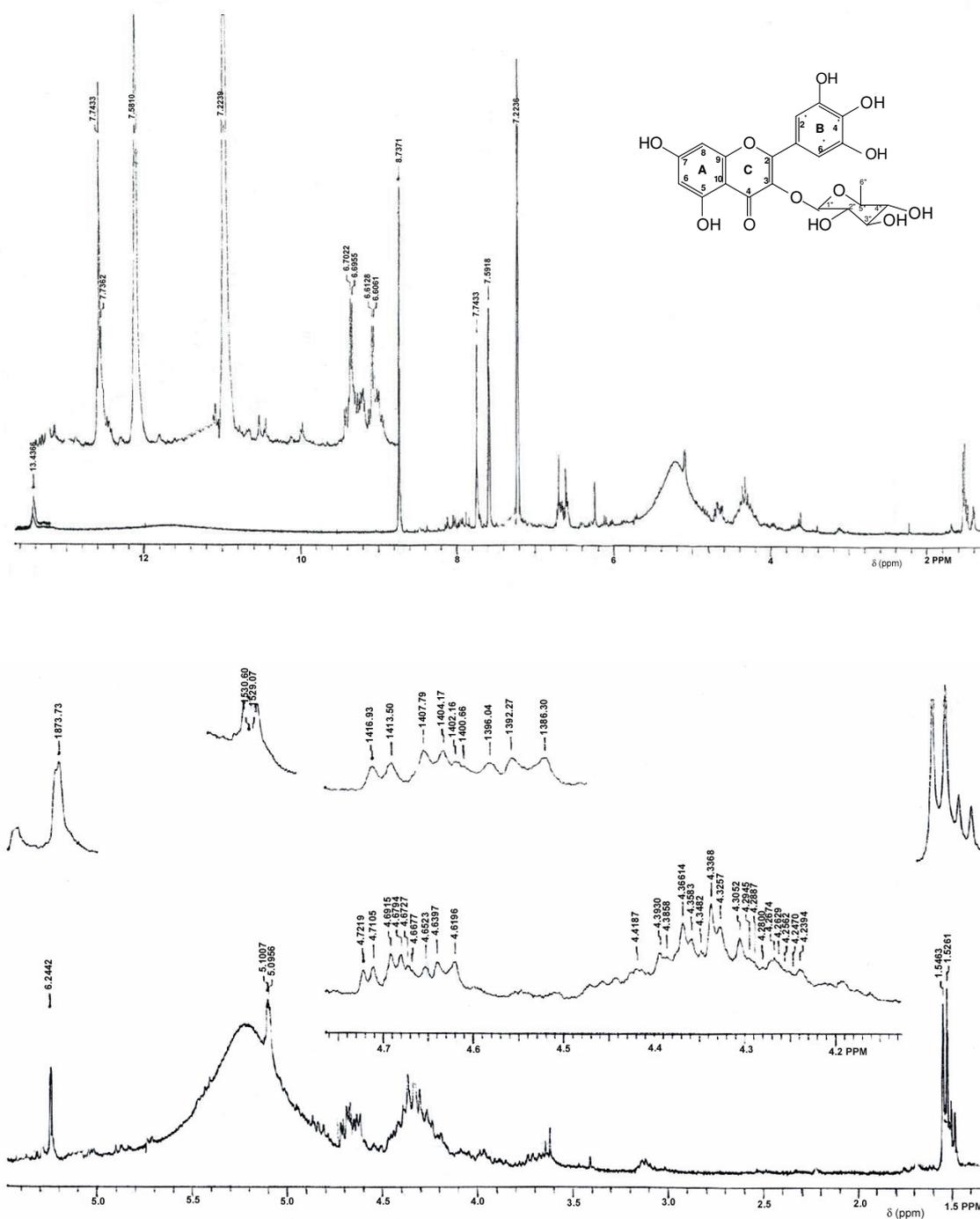


Figura 36. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{TMS}$) do **BM-3**. Expansão da região dos hidrogênios do anel A e B (7,9~6,6 ppm) e dos hidrogênios da hexose (4,7~4,2 ppm). Deslocamentos expressos em Hz.

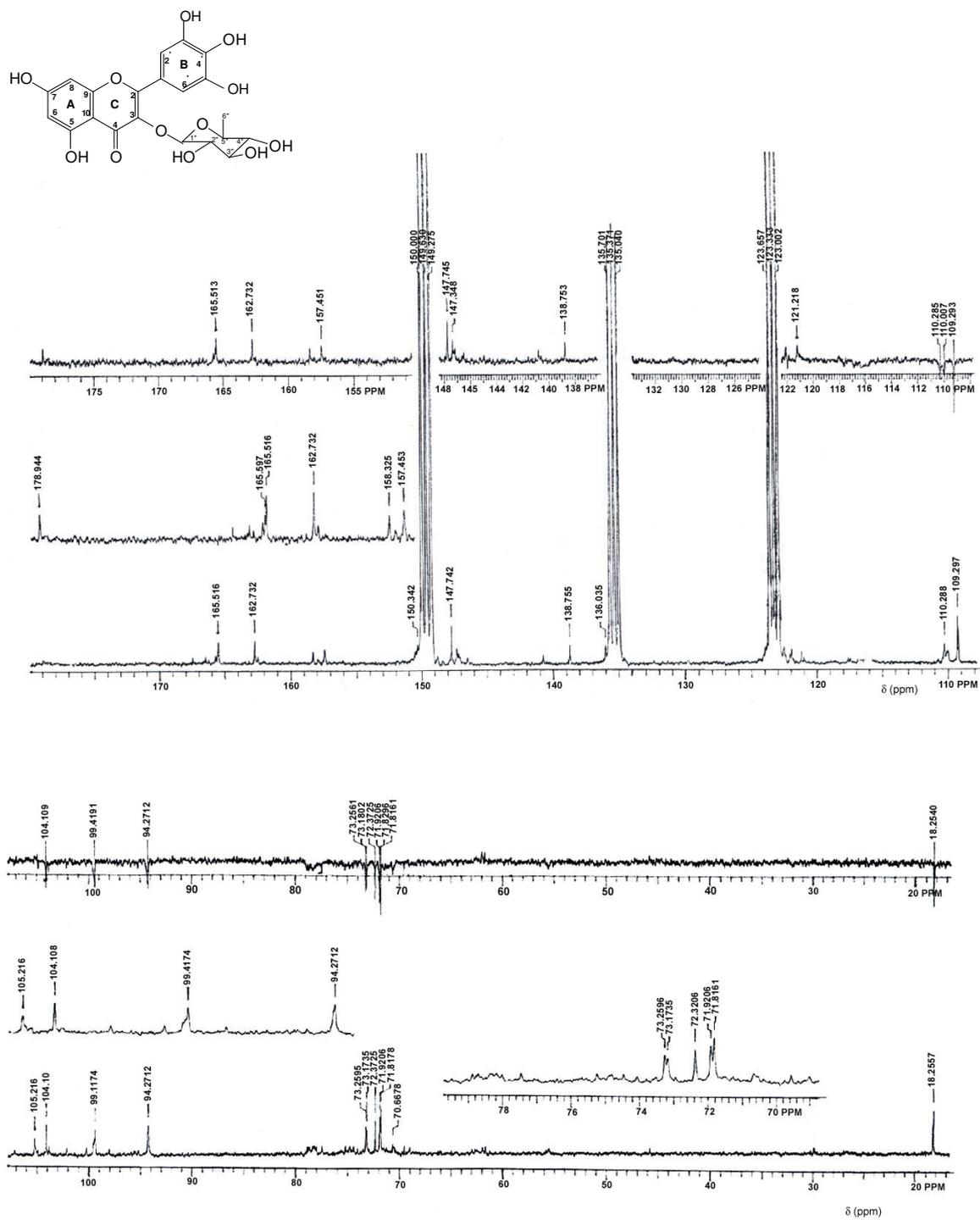


Figura 37. Espectro de RMN- ^{13}C /APT (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ /TMS) do **BM-3**.

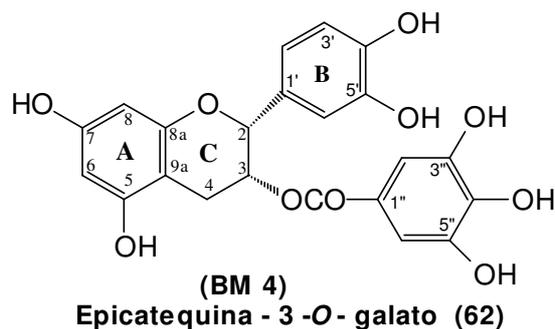
Tabela 13. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para **BM-3** e dados da literatura para a miricitrina¹⁹⁷.

Posição	BM-3 δ ^1H mult. J (Hz)	BM-3 δ ^{13}C / APT	Miricitrina δ $^1\text{H}^{197}$ J (Hz)	Miricitrina δ $^{13}\text{C}^{197}$
2	-	157,45	-	157,5
3	-	136,03	-	136,0
4	-	178,94	-	178,9
5-OH	13,4	162,73	13,40	162,7
6	6,61 d (J= 2,01)	99,42/CH	6,33 d (J= 1,9)	99,5
7	-	165,52	-	165,7
8	6,70 d (J= 2,02)	94,27/CH	6,49 d (J= 1,9)	94,8
9	-	158,32	-	158,3
10	-	105,22	-	105,1
1'	-	110,29	-	110,3
2'	7,74 s	109,30/CH	7,07 s	109,3
3'	-	147,74/CH	-	147,8
4'	-	138,75/CH	-	138,8
5'	-	147,74/CH	-	147,8
6'	7,74 s	109,29/CH	7,07 s	109,3
1''	6,24	104,11/CH	6,25 m	104,1
2''	5,10 d (J= 1,5)	73,26/CH	5,11 m	73,3
3''	4,72 dd (9,1 e 3,5)	72,47/CH	4,74 dd (J= 9,0 e 3,0)	72,3
4''	4,34 t	71,92/CH	4,34 t (J= 9,0)	72,0
5''	4,63 m	71,82/CH	4,65 m	71,8
6''	1,54 d (J= 6,0)	18,25/CH ₃	1,53 d (J= 6,0)	18,3
Solvente	Piridina-d ₅ 300 MHz	Piridina-d ₅ 75 MHz	Piridina-d ₅ 300 MHz	Piridina-d ₅ 75 MHz

Apesar deste flavonóide ter sido isolado de plantas superiores, esta é a primeira vez reportado no gênero *Bauhinia*. Dados na literatura revelaram atividade antioxidante¹⁹⁸.

5.3.2.5. Composto **BM-4**

O composto **BM-4 (62)** foi isolado da fração de acetato de etila do extrato metanólico da *B. microstachya*, após cromatografia preparativa, como um sólido branco, solúvel em metanol. A sua estrutura foi confirmada através das análises de RMN ^1H e ^{13}C como epicatequina-3-O-galato e por comparação com dados na literatura para epicatequina¹⁹⁹⁻²⁰¹.



Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C /APT (Fig. 38 e 39), apresentados na Tabela 14 indicam que o composto **BM-4** é um flavonóide.

Pelo espectro de RMN ^1H observa multiplete referente ao CH_2 -4 em δ 3,5, em δ 5,4-5,5 aparecem os sinais referentes aos hidrogênios 2 e 3. Na região de δ 6,5-6,6 aparecem os sinais dos hidrogênios 1'' e 6'', que fazem parte do radical galato no carbono 3 da estrutura. No espectro de RMN ^{13}C verifica-se a presença do sinal do carbono da carbonila do radical galato em δ 166,5 e em δ 107,1 referente ao CH -2'' e 6'', em δ 140,6 aos carbonos de OH -4'' e em δ 147,2-147,6 OH -5'' e 3''.

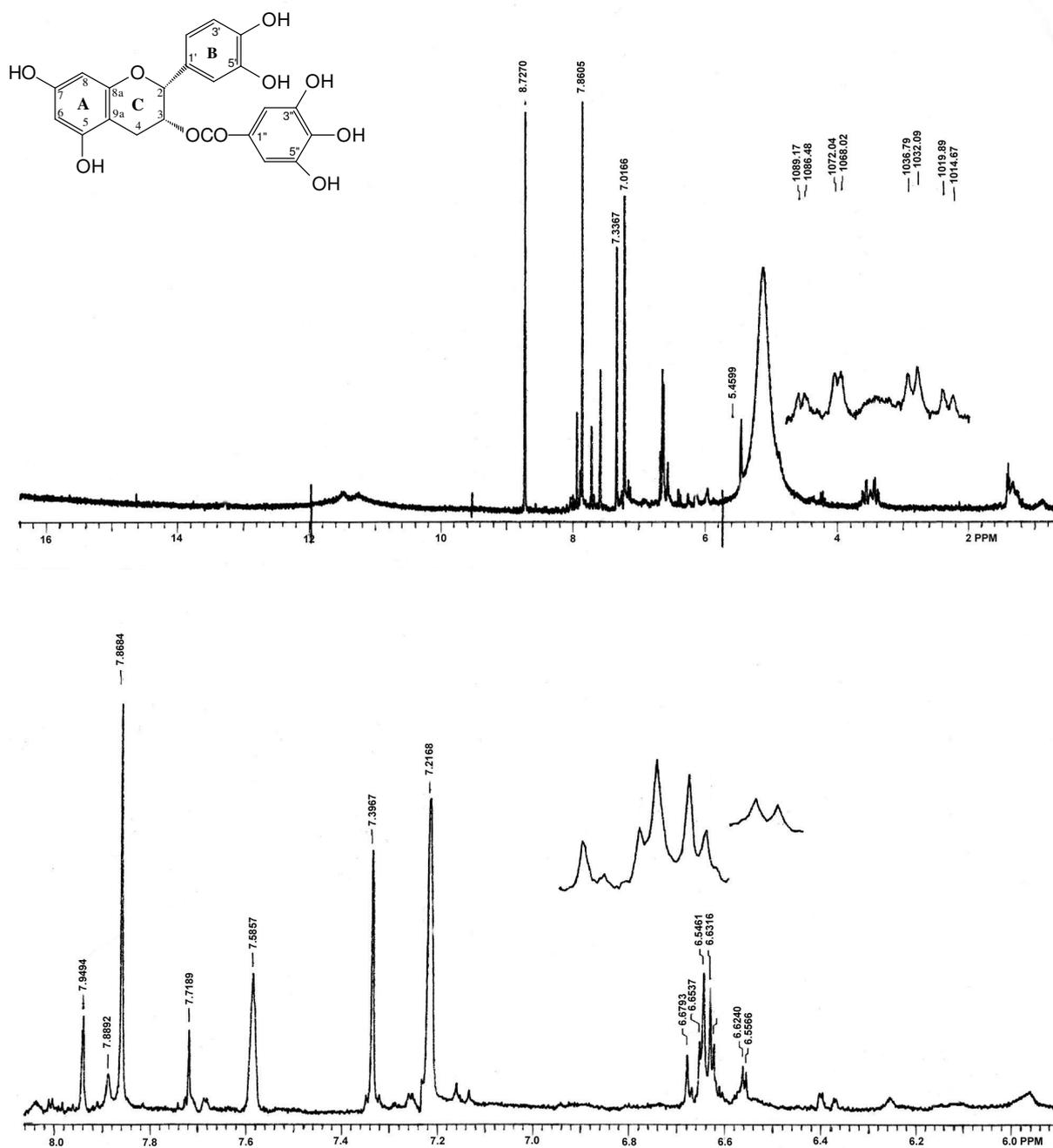


Figura 38. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{TMS}$) do **BM-4**. Expansão da região dos hidrogênios do anel C (4,5~3,0 ppm) e dos hidrogênios do galato (6,7~6,5 ppm). Deslocamentos expressos em Hz.

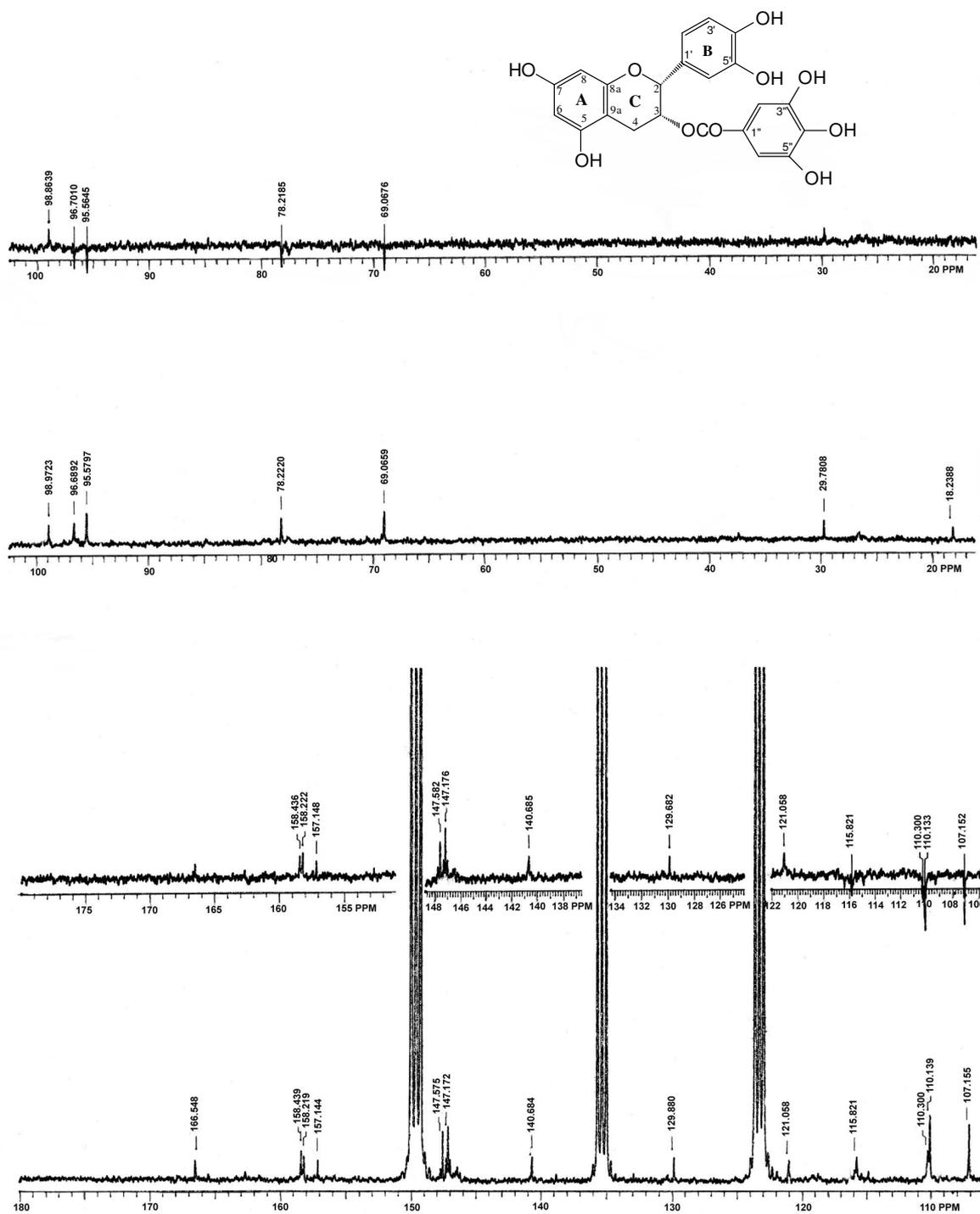


Figura 39. Espectro de RMN- ^{13}C /APT (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N/TMS}$) do **BM-4**.

Tabela 14. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C para **BM-4** e dados da literatura para epicatequina 3-*O*-(4-metil)-galato²⁰⁰.

Posição	BM-4 δ ^1H mult.	BM-4 δ ^{13}C / APT	Epicatequina 3- <i>O</i> - (4- CH_3)-galato δ ^1H mult. ²⁰⁰ J (Hz)	Epicatequina 3- <i>O</i> - (4- CH_3)-galato δ ^{13}C mult. ²⁰⁰
2	5,46	78,22/CH	5,16 s	77,8
3	5,50	69,06/CH	5,59 m	70,1
4	3,5 8m	29,71	2,89-3,24 m	26,4
5	-	158,44 ^c	-	156,7
6	6,63 ^a	95,56	6,07 s ^e	95,5
7	-	158,22 ^c	-	157,3
8	6,65 ^a	96,70	6,07 s ^e	96,4
8a	-	157,1 ^c	-	157,4
9a	-	96,90	-	98,6
1'	-	129,88	-	130,9
2'	7,30	115,82	6,93 dd (J= 8,0 e 2,0)	118,6
3'	-	110,30	6,87 d (J= 8,0)	115,7
4'	-	147,57 ^d	-	145,3
5'	-	147,17	-	145,3
6'	7,30 ^b	107,15	7,09 d (J= 2,0)	114,7
-COO-	-	166,55	-	166,3
1''	-	121,06	-	126,1
2''	7,86 ^c	107,15/CH	7,0 s	109,8
3''	-	149,60 ^c	-	151,1
4''	-	140,68	-	140,6
5''	-	149,00 ^c	-	151,1
6''	7,86 ^c	107,15/CH	7,0 s	109,8
Solvente	Piridina-d ₅ 300 MHz	Piridina-d ₅ 75 MHz	Me ₂ CO-d:D ₂ O 100 MHz	Me ₂ CO-d:D ₂ O 25,05 MHz

a,b,c,d,e Sinais podem estar trocados

O composto epicatequina tem sido isolado de muitas plantas, sendo esta a primeira vez reportado para o gênero *Bauhinia* e apresentado atividade antidiabética e antioxidante^{201,202}. O **BM-4** identificado como sendo epicatequina-3-*O*-galato tem sido isolado da planta *Castanea sativa* e demonstrado atividade como hormônio de plantas e atividade antitumoral^{203,204}.

5.3.3. ATIVIDADE ANALGÉSICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *B. microstachya*

O extrato metanólico de *B. microstachya* e alguns compostos obtidos das folhas foram submetidos à análise farmacológica através do modelo do ácido acético, anteriormente descrito, com o intuito de analisar o efeito antinociceptivo em camundongos.

A análise farmacológica do extrato metanólico das folhas de *B. microstachya* (Fig. 40) indicou considerável inibição de forma dose-dependente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético quando administrado via i.p., com DI_{50} de 7,9 mg/kg e inibição máxima de $94 \pm 4\%$ ⁸⁵.

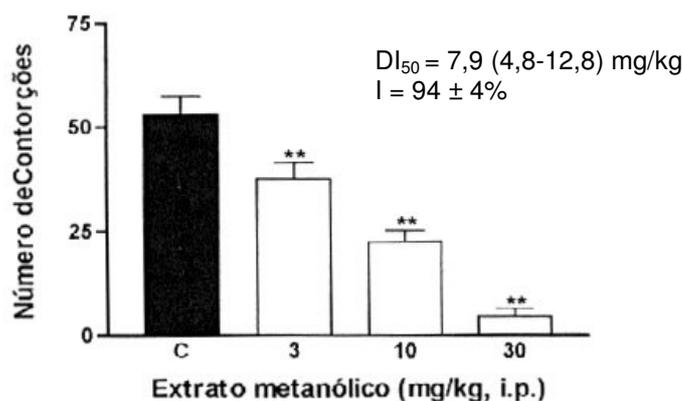


Figura 40. Efeito antinociceptivo dose – dependente causado pelo extrato metanólico da *Bauhinia microstachya* administrada por via intraperitoneal sobre as contorções abdominais causadas pelo ácido acético em camundongos.

Da fração de acetato de etila isolaram-se cinco compostos fenólicos. Somente o composto **BM-2** e **BM-3** foram submetidos à análise farmacológica por possuírem quantidades adequadas para o experimento (Fig. 41). Cabe salientar que esta é a primeira vez que esta sendo reportado atividade antinociceptiva e isolados no gênero *Bauhinia*. O composto **BM-2**, identificado como quercitrina, inibiu de forma dose-dependente as contorções abdominais em camundongos,

com DI_{50} de 2,4 mg/kg, sendo bem mais ativo que o extrato metanólico. Quando comparados com alguns compostos como aspirina e paracetamol, o composto **BM-2** foi mais ativo, no modelo testado. Por outro lado o composto **BM-3** (miricitrina) causou moderada atividade, inibindo 54 % as contorções abdominais. Considerando a diferença estrutural entre estes dois compostos, na qual o **BM-3** apresenta uma hidroxila a mais, talvez a polaridade esteja influenciando a atividade analgésica⁸⁵.

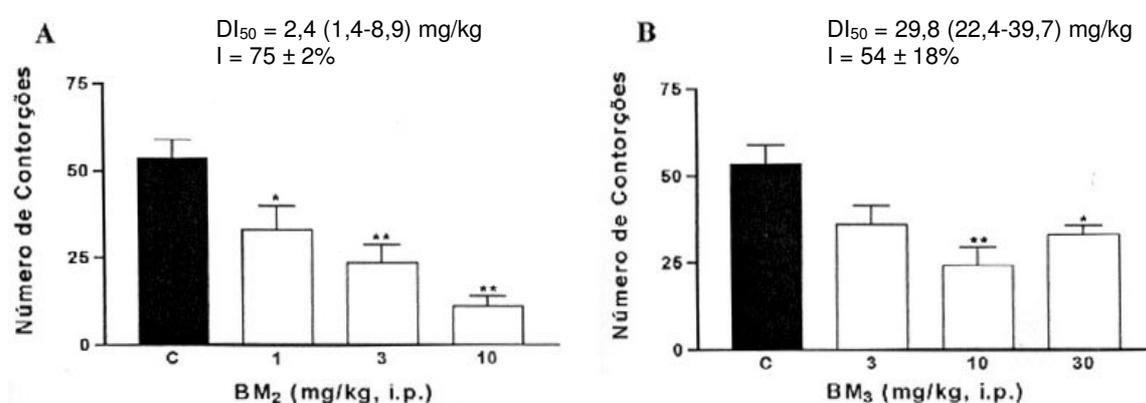


Figura 41. Efeito antinoceptivo causado pelos compostos **BM-2** (painel A) e **BM-3** (painel B) extraídos da *Bauhinia microstachya* administrados por via intraperitoneal sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Os resultados sugerem que as folhas de *B. microstachya* produzem princípios ativos fenólicos, os quais exercem efeitos analgésicos em camundongos, justificando ao menos em parte, seu uso na medicina popular para o tratamento de processos dolorosos.

5.4. *Marrubium vulgare*

5.4.1. EXTRAÇÃO

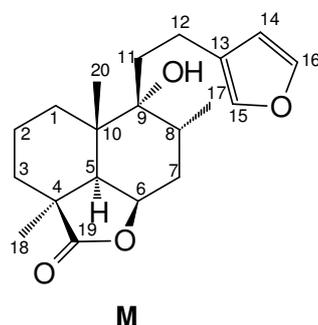
Para a extração do principal constituinte, a marrubiina, de *M. vulgare* foi utilizada a metodologia descrita por CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998¹⁷.

As folhas de *M. vulgare* secas à temperatura ambiente, trituradas, foram submetidas à maceração com metanol por 10 dias. Após remoção do solvente, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida sob altas temperaturas com o intuito de favorecer a formação da marrubiina a partir da pré-marrubiina. Após este procedimento ocorreu a formação de um precipitado, o qual foi separado para análise cromatográfica em coluna de sílica gel e o restante do extrato foi sucessivamente particionado com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Optou-se inicialmente em trabalhar com o precipitado obtido da etapa de concentração do extrato metanólico visto à alta quantidade do composto marrubiina, identificado por cromatografia em camada delgada com padrão correspondente. Esta fração foi então submetida à procedimentos cromatográficos utilizando coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila e posterior uso de DCM:MeOH, ambos com aumento gradativo de polaridade

Pela necessidade de se isolar maior quantidade dos compostos para dar continuidade aos estudos de modificação estrutural visando a análise da relação estrutura-atividade, realizou-se análise cromatográfica em coluna de sílica gel com a fração de diclorometano do extrato metanólico, observando-se através de c.c.d. a presença do composto marrubiina.

5.4.2. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO ISOLADO DAS FOLHAS DE *M. vulgare*

Os procedimentos cromatográficos com as folhas de *M. vulgare* levaram ao isolamento do composto **M (54)**, marrubiina.



O composto **M** foi isolado do precipitado obtido a partir da concentração do extrato metanólico de *M. vulgare*, após cromatografia em coluna de sílica gel, e procedimentos de recristalização como um sólido branco, com ponto de fusão de 162-164 °C. A sua estrutura foi confirmada através de I.V., RMN ^1H e ^{13}C e comparada com dados da literatura para marrubiina e co-c.c.d. com amostra autêntica isolada anteriormente em nossos laboratórios¹⁴⁴.

O espectro de I.V. (Fig. 42) apresenta banda de deformação axial de O-H em 3468 cm^{-1} , deformação axial de C-H de metila em 2940 cm^{-1} e deformação axial em 1740 cm^{-1} referente à carbonila C=O de lactona.

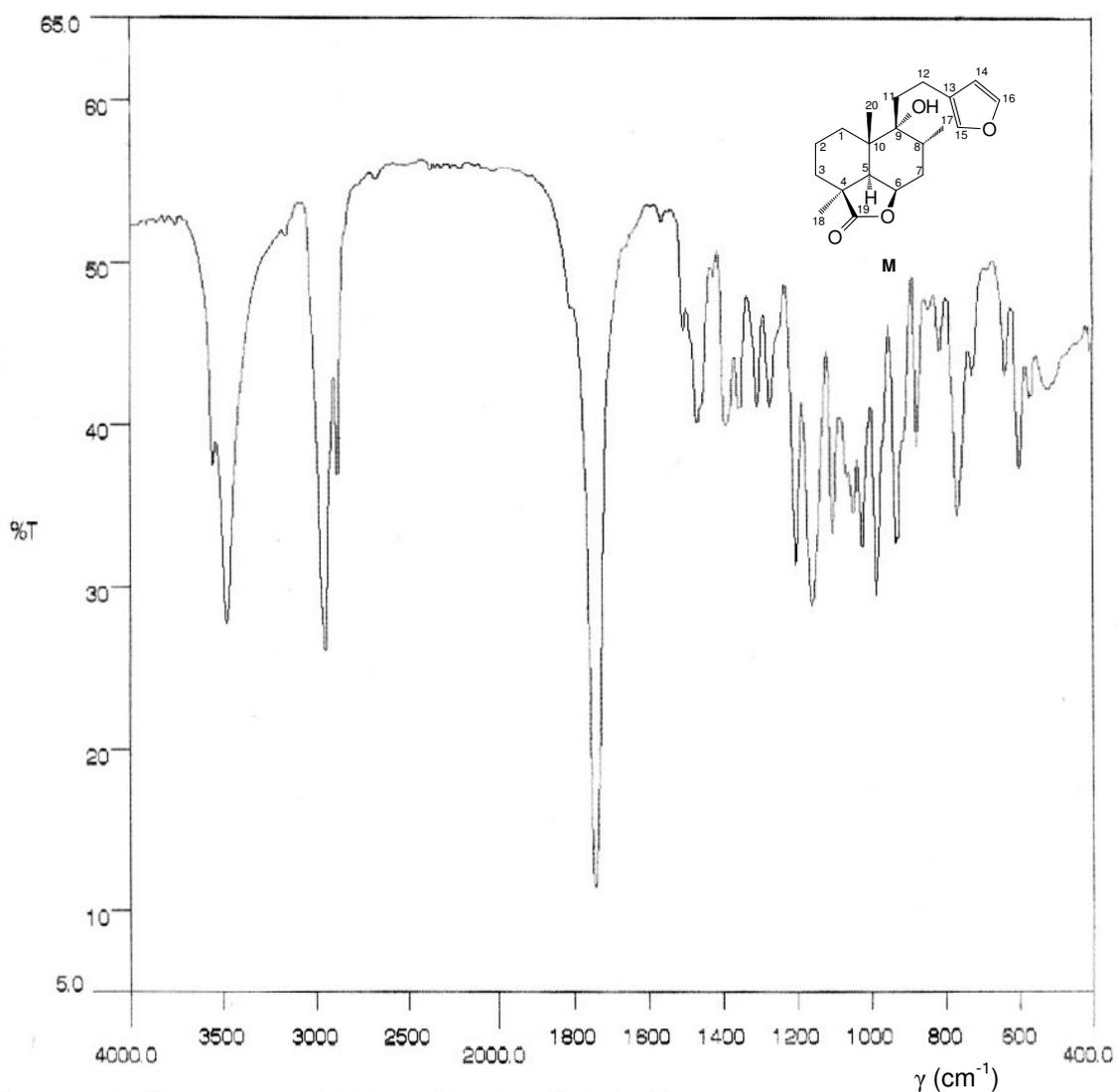


Figura 42. Espectro no I.V (pastilha de KBr) do **M**.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 43 e 44), apresentados na Tabela 15, indicam que o composto **M** trata-se de um diterpeno labdano. Pelo espectro de RMN ^1H observam-se hidrogênios olefínicos em δ 7,35, 7,22 e 6,27, referentes aos H-15, 16 e 14, respectivamente. Em δ 4,74 aparece um triplete referente ao H-6 contendo o grupamento lactônico. Na região entre δ 2,57-1,4 aparecem sinais referentes aos hidrogênios metino e metileno e em δ 1,28, 1,05 e 0,94 estão as metilas 18, 20 e 17, respectivamente. Os sinais dos grupos metileno e metino encontram-se na região de δ 1,0-2,5 ppm.

Os valores obtidos para o composto **M** estão de acordo com os dados para marrubiina¹⁴⁸.

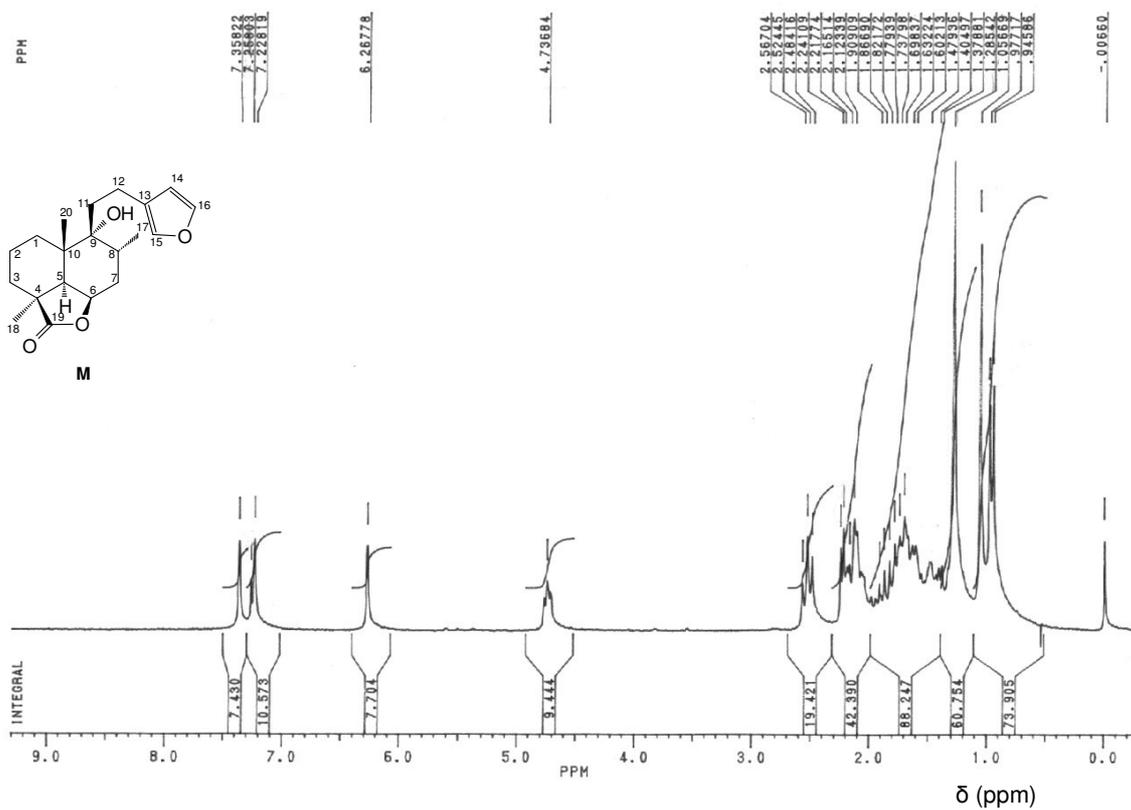


Figura 43. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃/TMS) do **M**.

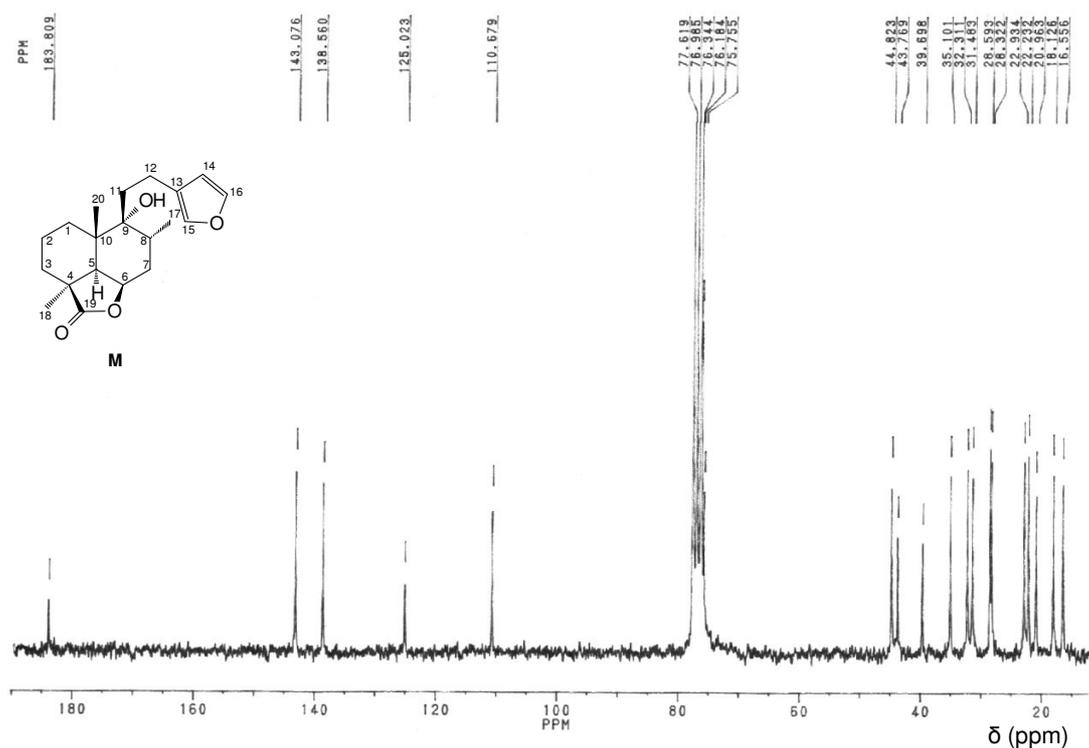


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3/TMS) do **M**.

Tabela 15. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para **M** e dados da literatura para marrubiina¹⁴⁸.

Posição	M ^1H δ mult.	M ^{13}C δ	Marrubiina ^1H δ ¹⁴⁸	Marrubiina ^{13}C δ ¹⁴⁸
1	1,69	28,6	1,68	28,7
2	1,74	18,1	1,72	18,2
3	2,12	28,3	2,11	28,4
4	-	43,7	-	43,8
5	2,21 d	44,8	2,21	44,9
6	4,73 t	76,2*	4,72	76,2
7	31,4	31,5	2,13	31,6
8	32,3	32,3	2,12	32,4
9	-	75,7*	-	75,8
10	-	39,7	-	39,8
11	1,82	35,1	1,88	35,2
12	2,52	20,9	2,51	21,0
13	-	125,0	-	125,0
14	6,26 sl	110,7	6,25	110,7
15	7,36 sl	143,1	7,34	143,1
16	7,22 sl	138,6	7,21	138,6
17	0,95 d	16,5	0,95	16,6
18	1,28 s	22,9	1,27	23,0
19	-	183,8	-	183,8
20	1,05 s	22,2	1,04	22,3
Solvente	CDCl_3 200 MHz	CDCl_3 50 MHz	CDCl_3 500 MHz	CDCl_3 125 MHz

* Sinais podem estar trocados

5.4.3. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA MARRUBIINA E SEU DERIVADO ÁCIDO MARRUBÍINICO

As modificações realizadas na marrubiina e seu derivado, o ácido marrubíinico, representadas na Figura 45, não tiveram como objetivo principal o rendimento, mas sim a obtenção de quantidades suficientes dos produtos modificados para a realização dos testes farmacológicos visando um estudo da relação estrutura-atividade biológica.

Todas as rotas sintéticas utilizadas neste trabalho já foram reportadas na literatura, com pequenas modificações. A seguir, serão discutidos alguns aspectos considerados relevantes observados nas reações utilizadas.

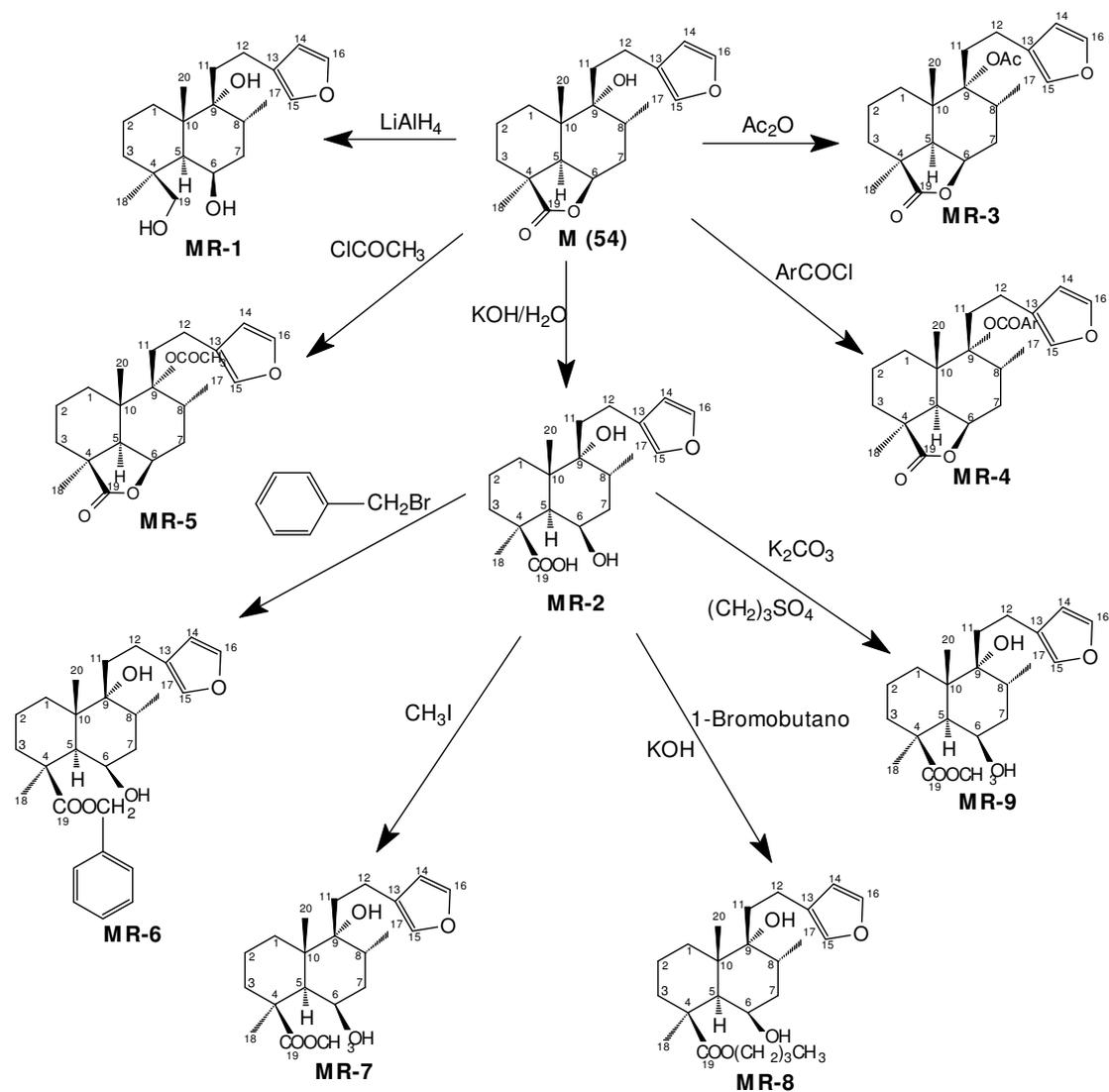


Figura 45. Algumas das modificações estruturais propostas com a marrubiina e seu derivado, o ácido marrubínico.

5.4.3.1. Reação de redução da marrubiina

O grupo lactônico da marrubiina (**M**) foi reduzido utilizando-se LiAlH_4 como agente redutor, como demonstrado abaixo na Fig. 46. Na reação obteve-se uma mistura de compostos que foi cromatografada em coluna, obtendo **MR-1 (63)**, com rendimento de 70 %. Este composto já havia sido isolado da *M. vulgare* e obtido por síntese, tendo apresentado atividade vasorelaxante e analgésica^{153,160,205}.

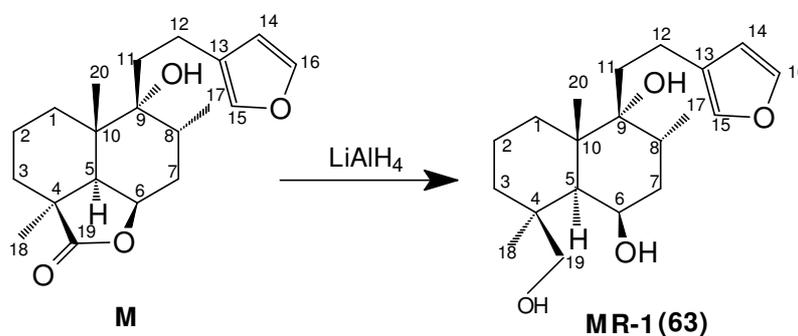


Figura 46. Reação de redução da marrubiina (**M**).

Pelo espectro de RMN ^1H (Fig. 47) observa-se uma alteração considerável, quando comparado com o espectro da marrubiina, no H-19 (δ 3,14-4,25) e H-18 (δ 1,27), evidenciando a alteração ocorrida nesta parte da molécula. Os sinais dos grupos metilenos e metinos encontram-se na região de δ 1,0-2,5 ppm.

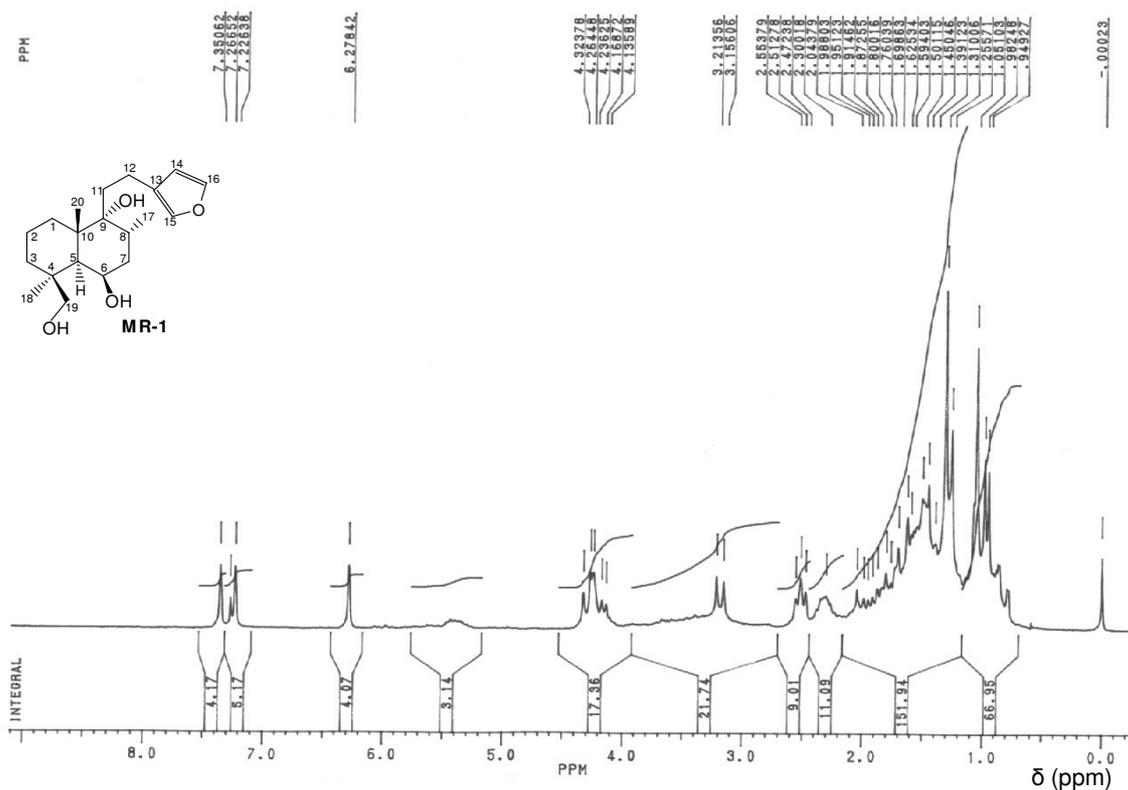


Figura 47. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃/TMS) do MR-1.

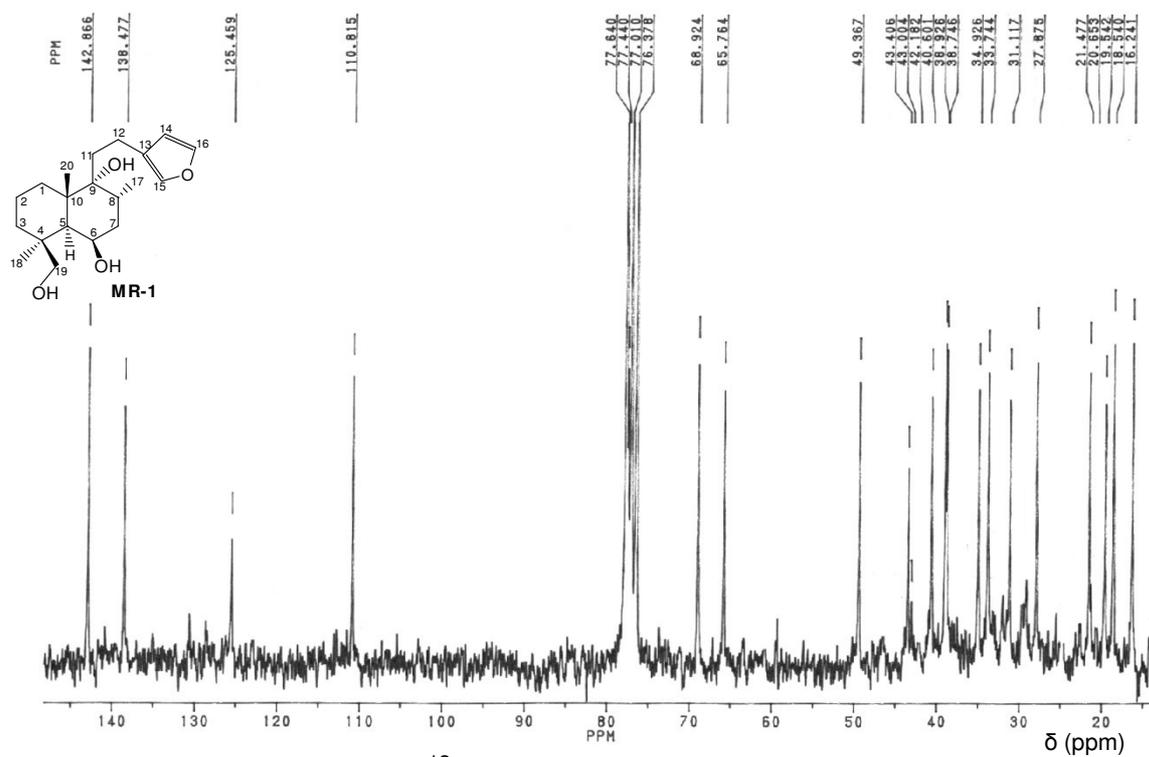


Figura 48. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃/TMS) do MR-1.

A Tabela 16 mostra os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 47 e 48) obtidos e dados da literatura para o marrubenol.

Tabela 16. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para **MR-1** e dados da literatura para marrubenol²⁰⁵.

Posição	MR-1 ^1H δ mult.	MR-1 ^{13}C δ	Marrubenol ^1H δ mult. ²⁰⁵	Marrubenol ^{13}C δ ²⁰⁵
1	1,1-1,5	33,7	1,4-1,5 m	33,8
2	1,1-1,5	18,5	1,38-1,49 m	18,5
3	1,1-1,5	40,6	1,11-1,35 m	40,7
4	-	38,7	-	38,9
5	-	49,4	1,52 d	49,3
6	4,17 dd	65,8	4,18 d	65,9
7	-	38,9	1,47 m, 1,64 dd	38,9
8	2,30 m	31,2	2,25 m	31,1
9	-	77,0	-	77,0
10	-	43,4	-	43,4
11	-	34,9	1,7-1,9 m	34,9
12	2,51 m	21,5	2,45 m	21,5
13	-	125,4	-	125,4
14	6,27 sl	110,8	6,21 sl	110,8
15	7,35 sl	142,9	7,28 sl	142,9
16	7,22 sl	138,5	7,17 sl	138,5
17	0,94	16,2	0,91 s	16,2
18	1,31	27,9	0,99 s	27,9
19	3,14 d- 4,26 d	68,9	3,14 d- 4,25 d	69,1
20	1,05	19,5	1,25 s	19,6
Solvente	CDCl_3 200 MHz	CDCl_3 50 MHz	CDCl_3 400,13 MHz	CDCl_3 100,62 MHz

5.4.3.2. Reação de hidrólise da marrubiina

O grupo lactônico da marrubiina (**M**) foi hidrolizado utilizando-se $\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$, conforme demonstrado abaixo na Fig. 49. Na reação obteve-se um precipitado identificado como **MR-2 (64)**, com rendimento de 94 %. Este composto havia sido obtido por síntese e tem demonstrado atividade colerética^{135,157}.

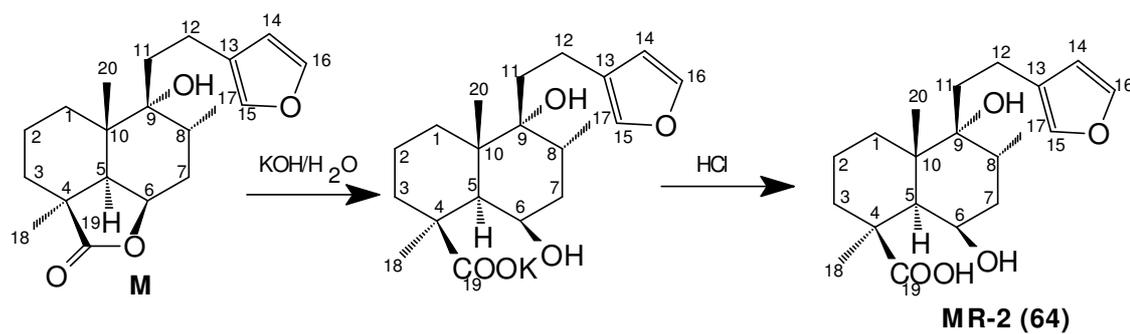


Figura 49. Reação de hidrólise da marrubiina (**M**).

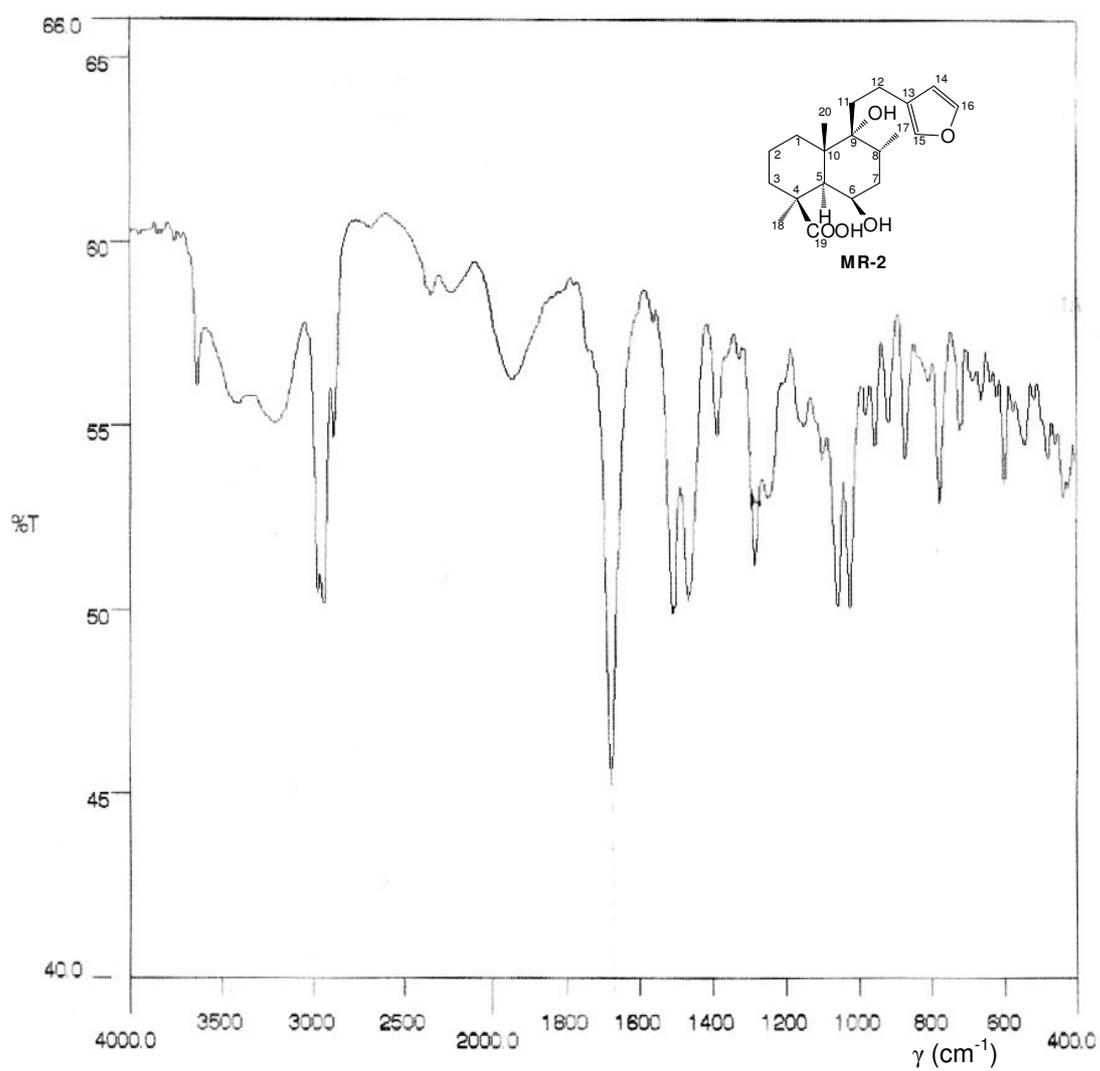


Figura 50. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) de MR-2.

O espectro no I.V. (Fig.50) apresenta banda larga de deformação axial de hidroxila de ácido carboxílico em 3622 cm^{-1} e banda de deformação axial de OH em 3190 cm^{-1} . Estes sinais, juntamente com a alteração do sinal da carbonila para 1676 cm^{-1} evidenciam que ocorreu a hidrólise, sendo obtido o produto desejado.

Pelo espectro de RMN ^1H (Fig. 51) pode-se observar sinal do hidrogênio ácido em $\delta 14,0$ e hidrogênio do grupo hidroxila no C-6 em $\delta 6,8$.

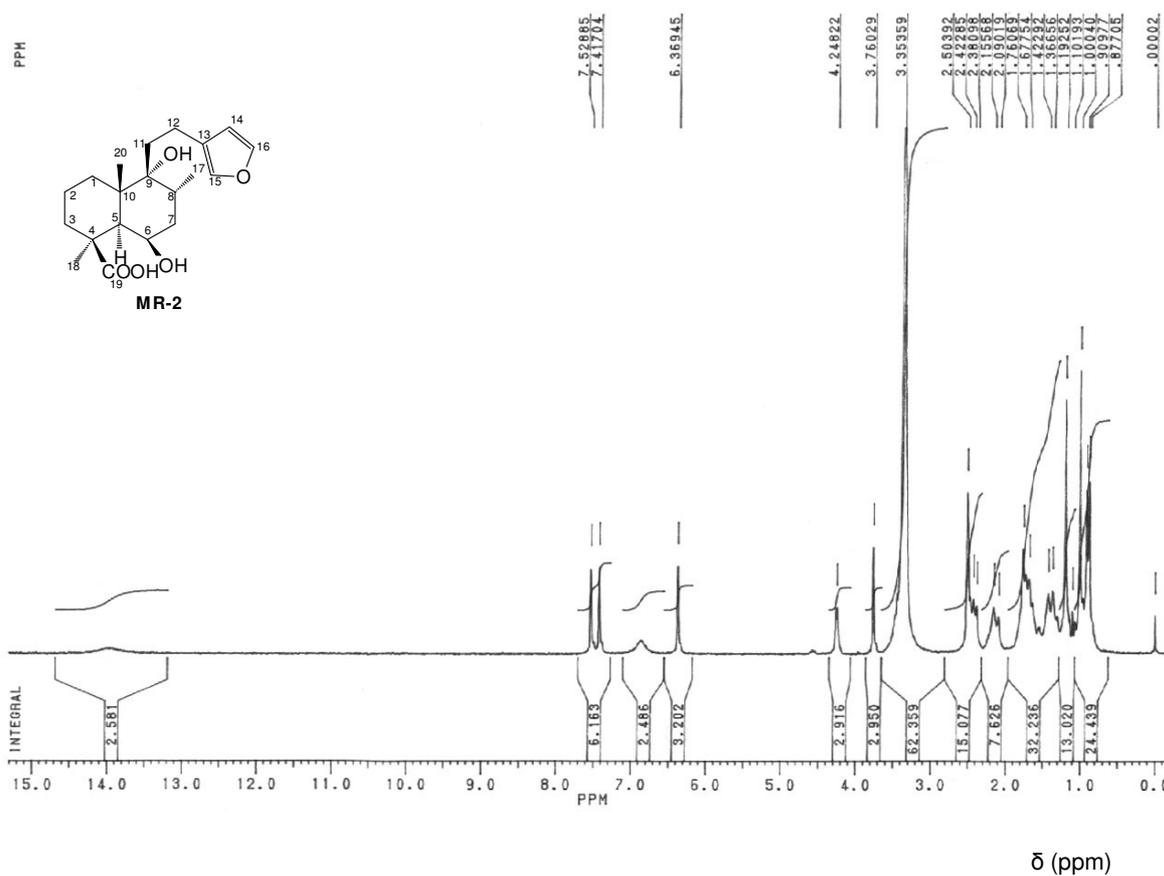


Figura 51. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 /TMS) do **MR-2**.

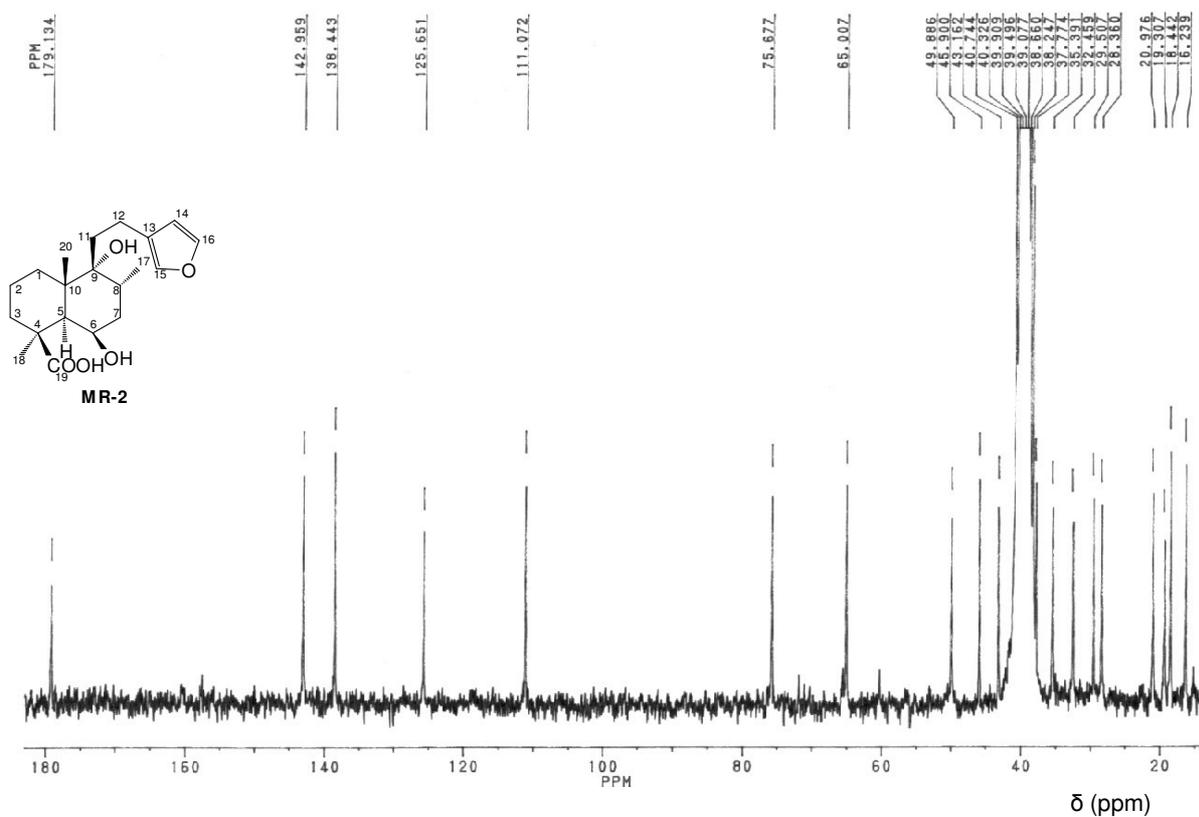


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{TMS}$) do **MR-2**.

A Tabela 17 mostra os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 51 e 52) obtidos para o **MR-2** e dados da literatura para marrubiina.

Tabela 17. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para **MR-2** e dados da literatura para marrubiina¹⁴⁸.

Posição	MR-2 ^1H δ mult.	MR-2 ^{13}C δ	Marrubiina ^1H δ ¹⁴⁸	Marrubiina ^{13}C δ ¹⁴⁸
1	1,68	28,3	1,68	28,7
2	1,42	18,4	1,72	18,2
3		28,3	2,11	28,4
4	-	43,1	-	43,8
5	2,38	45,9	2,21	44,9
6	4,2 sl	65,0	4,72	76,2
7	2,15	29,5	2,13	31,6
8	2,0	32,4	2,12	32,4
9	-	75,7	-	75,8
10	-	37,7	-	39,8
11	1,76	35,2	1,88	35,2
12	2,50	19,3	2,51	21,0
13	-	125,6	-	125,0
14	6,36 sl	111,0	6,25	110,7
15	7,52 sl	142,9	7,34	143,1
16	7,41 sl	138,4	7,21	138,6
17	0,90-0,87	16,2	0,95	16,6
18	1,19	18,4	1,27	23,0
19	13,9	179,1	-	183,8
20	1,0	20,9	1,04	22,3
Solvente	DMSO-d ₆ 200 MHz	DMSO-d ₆ 50 MHz	CDCl ₃ 500 MHz	CDCl ₃ 125 MHz

5.4.3.3. Reação de esterificação da marrubiina

Foram feitas várias tentativas de acetilação do grupo OH da marrubiina (**M**). Utilizou-se anidrido acético e cloreto de benzoíla, porém não se obteve resultados positivos.

a) Método 1:

Nesta reação o derivado esterificado da marrubiina era o produto desejado pela reação com Ac₂O e piridina, conforme demonstrado abaixo (Fig. 53). Não foi observada a formação do produto nas condições experimentais utilizadas. Através de análise espectroscópica obteve-se a marrubiina.

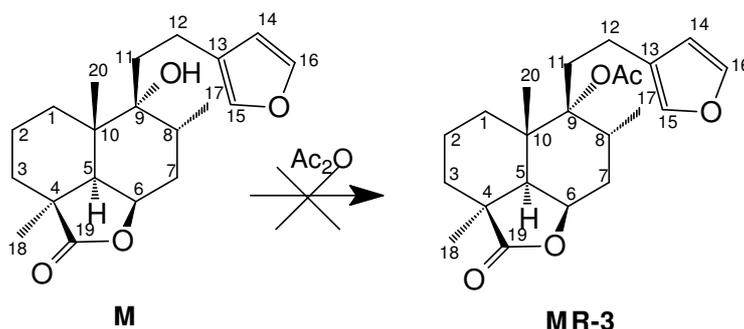


Figura 53. Reação de esterificação da marrubiina (**M**).

b) Método 2:

Nesta reação esperou-se a obtenção do derivado acetilado da marrubiina pela reação com cloreto de benzoíla e piridina, conforme demonstrado acima. Não foi observado a formação do produto nas condições experimentais utilizadas. Através de análise espectroscópica obteve-se a marrubiina.

c) Método 3:

Nesta reação esperou-se a obtenção do derivado acetilado da marrubiina pela reação com cloreto de acetila. Na reação obteve-se uma mistura que foi cromatografada em coluna, não se conseguindo purificar o composto desejado, devido a formação de uma mistura complexa. Provavelmente a presença de grupo volumoso na proximidade do sítio da reação reduza a velocidade de esterificação e como se trata de um álcool terciário menos reativo, o que dificulta ainda mais a reação²⁰⁶. Esta reação deverá ser repetida partindo-se de maiores quantidades do material de partida para proporcionar a obtenção de quantidades adequadas do produto para sua purificação e elucidação.

5.4.3.4. Reação de esterificação do composto MR-2

a) Método 1:

O composto **MR-2** obtido através da hidrólise da marrubiina (**M**) e devidamente identificado foi submetido a esterificação do grupo carboxílico utilizando-se brometo de benzila, conforme demonstrado abaixo na Fig. 54. Na

reação obteve-se uma mistura que foi purificada por cromatografia em coluna, formando um óleo denominado **MR-6 (65)**, com rendimento de 45 %.

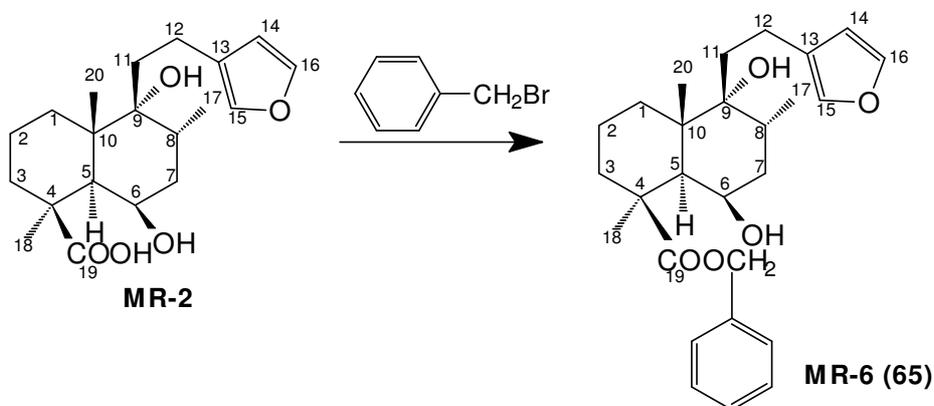


Figura 54. Reação de esterificação com o composto **MR-2**.

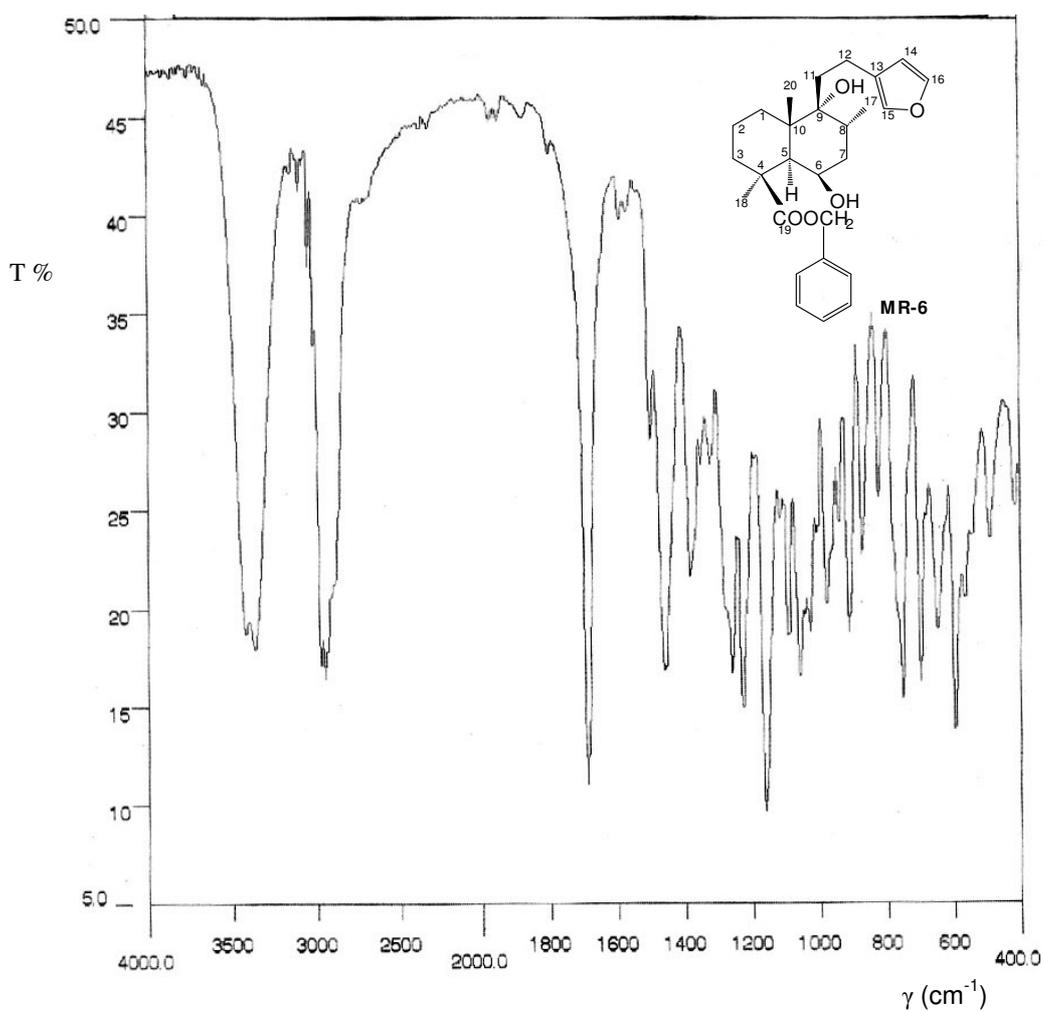


Figura 55. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) de **MR-6**.

No espectro no I.V. (Fig. 55) observa-se absorção intensa na região de 3410 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H, região aromática $=C-$ em 3088 cm^{-1} , harmônicas ou frequências de combinação em $2000-1800\text{ cm}^{-1}$ e em 1636 cm^{-1} deformação axial de C=O, C=C aromática em 1588 cm^{-1} , deformação angular fora do plano de $=C-H$ em 750 cm^{-1} .

No espectro de RMN ^1H (Fig. 56) observa-se diferença significativa no hidrogênio-6 em $\delta\ 7,36$ e hidrogênios do CH_2 , inserido após modificação química, em $\delta\ 5,19$, demonstrando que a reação foi efetuada. Os sinais dos grupos metilenos e metinos encontram-se na região de $\delta\ 1,0-2,5\text{ ppm}$.

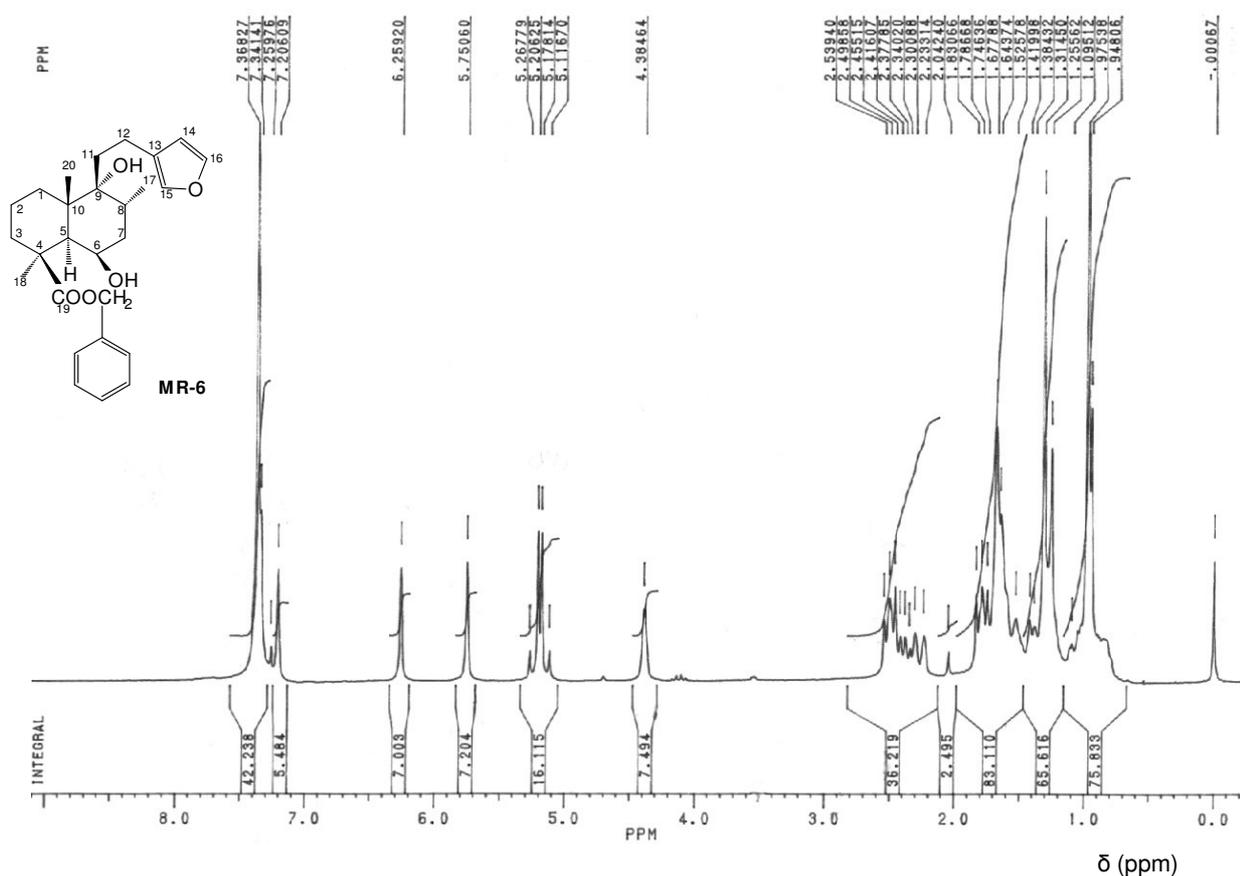


Figura 56. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3/TMS) do MR-6.

No espectro de RMN ^{13}C (Fig. 57) observam-se sinais referentes aos hidrogênios aromáticos na região de $\delta\ 135,9-129,1$ e sinal de carbonila de função

éster em δ 183,8, evidenciando a modificação química para a obtenção do composto **MR-2**.

As atribuições de RMN ^1H e ^{13}C estão apresentadas na Tabela 18, bem como os valores de marrubiina usados para efeito de comparação.

Esta foi a primeira vez da obtenção do derivado esterificado do ácido marrubínico.

Tabela 18. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para **MR-6** e dados da literatura para marrubiina¹⁴⁸.

Posição	MR-6 ^1H δ mult.	MR-6 ^{13}C δ	Marrubiina ^1H δ ¹⁴⁸	Marrubiina ^{13}C δ ¹⁴⁸
1	1,67	30,3	1,68	28,7
2	1,74	19,5	1,72	18,2
3	2,04	30,0	2,11	28,4
4	-	44,3	-	43,8
5	1,31	47,0	2,21	44,9
6	4,38	68,2	4,72	76,2
7		31,1	2,13	31,6
8		33,7	2,12	32,4
9	-	77,0	-	75,8
10	-	39,0	-	39,8
11	1,83	36,0	1,88	35,2
12	2,54	20,4	2,51	21,0
13	-	126,1	-	125,0
14	6,26	111,5	6,25	110,7
15	7,34	143,5	7,34	143,1
16	7,20	139,1	7,21	138,6
17	0,94	16,9	0,95	16,6
18	1,31	19,5	1,27	23,0
19	-	181,6	-	183,8
20	1,25	22,0	1,04	22,3
CH ₂	5,10 dd	65,8	-	-
	7,36-7,26	135,8-129,1	-	-
Solvente	CDCl ₃ 200 MHz	CDCl ₃ 50 MHz	CDCl ₃ 500 MHz	CDCl ₃ 125 MHz

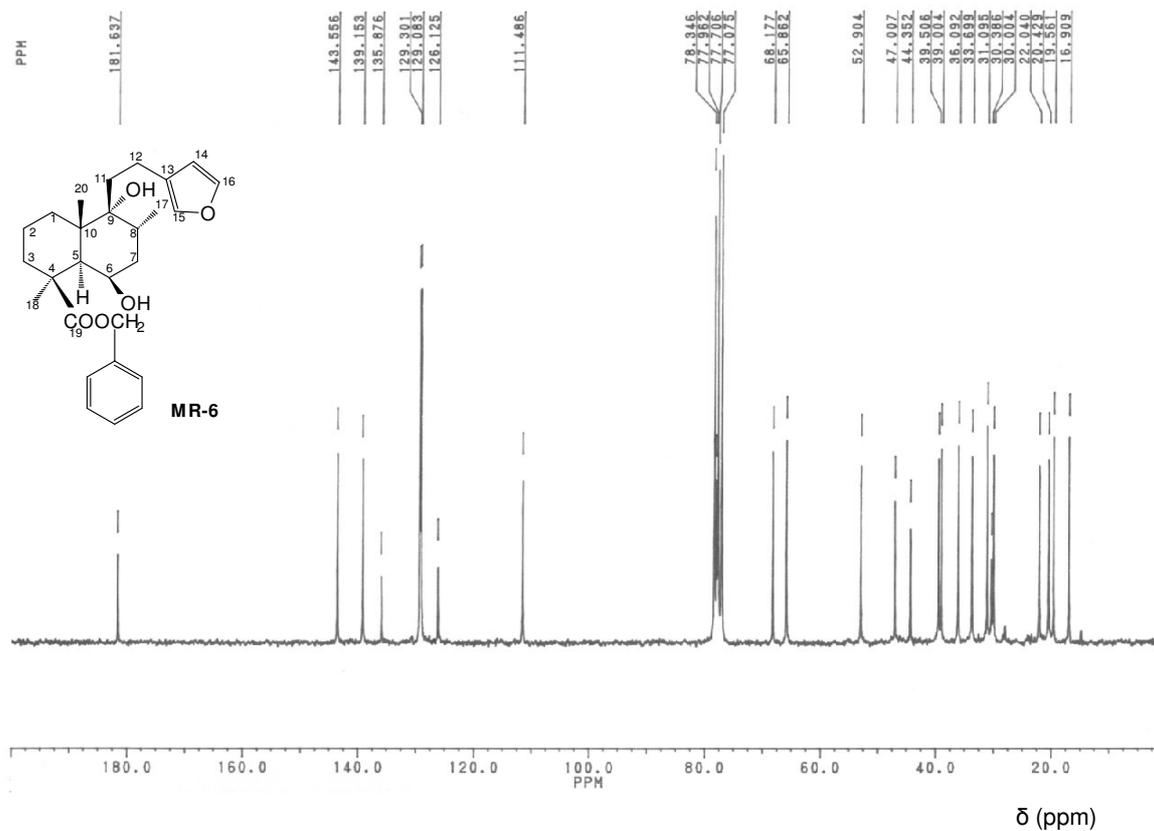


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3/TMS) do **MR-6**.

b) Método 2

O composto **MR-2** foi submetido à esterificação do grupo carboxílico utilizando-se iodometano, como demonstrado abaixo na Fig. 58. Na reação obteve-se uma mistura que foi purificada por cromatografia em coluna, rendendo um sólido denominado inicialmente de **MR-7**.

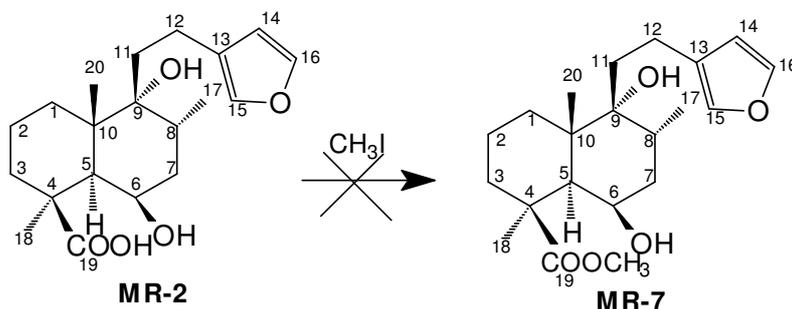


Figura 58. Reação de esterificação do **MR-2**.

Pela análise de RMN ^1H , obteve-se a marrubiina como produto da esterificação do **MR-2**.

c) Método 3:

O composto **MR-2** foi submetido a esterificação do grupo carboxílico utilizando-se 1-bromobutano. Pela análise de RMN ^1H obteve-se a marrubiina e não o produto esperado **MR-8**.

d) Método 4:

O composto **MR-2** foi submetido à esterificação do grupo hidroxila utilizando-se carbonato de potássio e dimetil sulfato, como demonstrado abaixo na Fig. 59. Na reação obteve-se uma mistura que foi purificada por cromatografia em coluna, obtendo-se um sólido denominado inicialmente de **MR-9 (66)**, com rendimento de 50,4 %.

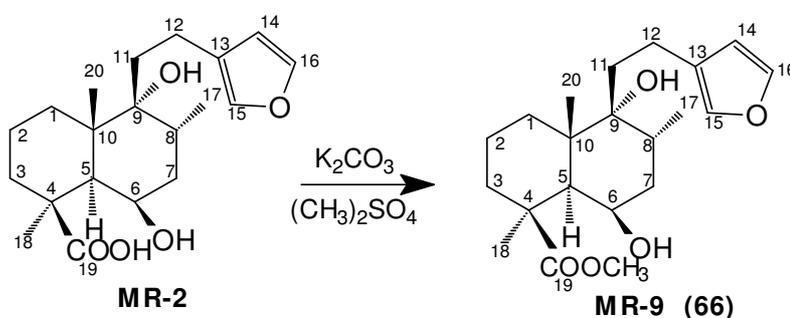


Figura 59. Reação de esterificação do **MR-2**.

O espectro de IV (Fig. 60) evidenciou alteração na região de 3400 cm^{-1} , quando comparado ao espectro do **MR-2**, indicando que ocorreu alteração na porção ácida do composto, agora esterificado e apresentado deformação axial de O-H em 3.420 cm^{-1} .

No espectro de RMN ^1H (Fig. 61) observa-se o sinal adicional em δ 3,76 do grupamento metoxi, evidenciando que o produto foi obtido. Os sinais dos hidrogênios dos grupos metilenos e metinos encontram-se na região de δ 1,0-2,5 ppm.

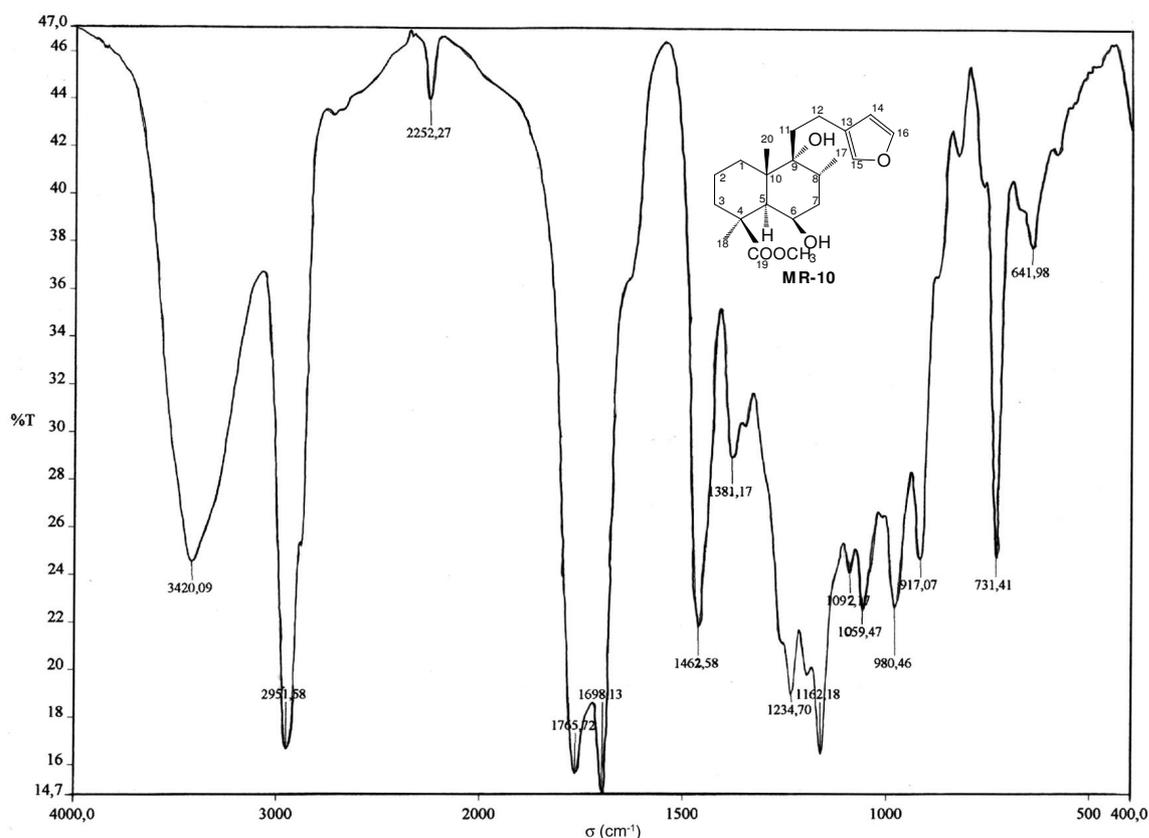


Figura 60. Espectro no I.V. (pastilha de KBr) do **MR-9**.

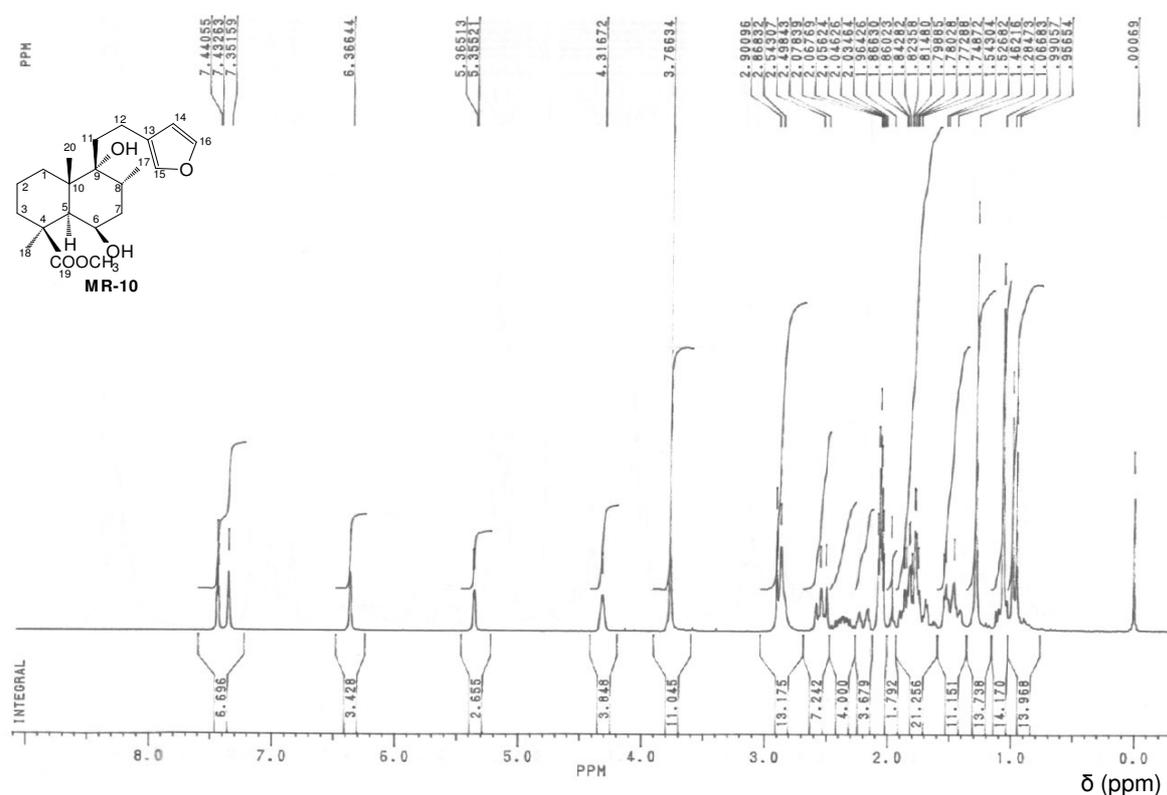


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (acetona- d_6 , 200 MHz, TMS) de **MR-9**.

Tabela 19. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para **MR-9** e dados da literatura para marrubiina¹⁴⁸.

Posição	MR-9 ^1H δ mult.	Marrubiina ^1H δ^{148}	MR-2 ^1H δ mult.
1	1,74	1,68	1,68
2	1,46	1,72	1,42
3		2,11	
4	-	-	-
5	2,49	2,21	2,38
6	4,31	4,72	4,2 sl
7	2,07	2,13	2,15
8	2,03	2,12	2,0
9	-	-	-
10	-	-	-
11	1,77	1,88	1,76
12	2,54	2,51	2,50
13	-	-	-
14	6,36	6,25	6,36 sl
15	7,44	7,34	7,52 sl
16	7,35	7,21	7,41 sl
17	0,94-0,97 d	0,95	0,90-0,87
18	1,28	1,27	1,19
19	-	-	13,9
20	1,06	1,04	1,0
OCH_3	3,7	-	-
Solvente	Acetona- d_6 200 MHz	CDCl_3 500 MHz	DMSO-d_6 200 MHz

5.4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DOS COMPOSTOS OBTIDOS ATRAVÉS DE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA MARRUBIINA

Algumas modificações químicas foram realizadas com a marrubiina, composto majoritário na planta *M. vulgare* e seu derivado, o ácido marrubínico, obtido com alto rendimento através da hidrólise da marrubiina. O objetivo destas modificações foi a busca de compostos mais ativos para futuros estudos de correlação estrutura, atividade biológica e consequente obtenção de um protótipo de fármaco. Neste sentido, a atividade antinociceptiva da marrubiina (**M**), do ácido marrubínico (**MR-2**), **MR-6** e **MR-9** foi analisada no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético via i.p., em camundongos, e comparados com fármacos utilizados na clínica como a aspirina e o paracetamol.

Todos os compostos exibiram atividade antinociceptiva, inibindo as contorções abdominais, como demonstrado na Figura 62 (Tabela 20). Analisando as inibições máximas dos quatro compostos testados, apresentados na tabela 20, verifica-se um aumento da atividade quando se realiza a hidrólise da marrubiina para a obtenção do ácido marrubínico (**MR-2**), já os demais compostos com modificações estruturais apresentaram redução na atividade antinociceptiva, mas quando comparados com fármacos com atividade antiinflamatória e analgésica verifica-se um pequeno aumento na inibição das contorções abdominais. O composto **MR-6** foi obtido através da modificação do grupamento ácido para éster benzílico, neste caso com um aumento na hidrofobicidade da molécula. Modificação similar foi aplicada na acetofenona, xantoixilina, isolada da planta *Sebastiania schottiana* onde evidenciou-se aumento da atividade farmacológica²⁰⁷.

O composto **MR-9** foi obtido através da esterificação da hidroxila do grupamento ácido do **MR-2**, o que resultou em um pequeno aumento no efeito analgésico, quando comparados com fármacos analgésicos utilizados na clínica. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm comprovado o mesmo efeito²⁸.

Os resultados preliminares demonstram a importância do grupamento ácido e da hidroxila de serem mantidos para uma efetiva atividade analgésica. Estes resultados nos estimulam a uma investigação mais detalhada deste composto **MR-2**.

Tabela 20. Efeito antinociceptivo da marrubiina e derivados no modelo do ácido acético em camundongos via i.p.

COMPOSTOS	INIBIÇÃO (%)
Marrubiina (M) (54) (1)	92 ± 1
Marrubenol (MR-1) (63) ^a	80 ± 2
Ácido marrubíinico (MR-2) (64)(2)	94 ± 0,8
MR-6 (65) (3)	44,1 ± 2
MR-9 (66) (4)	48 ± 1
Aspirina (5)	35 ± 2

^aBRAND *et al.*, 1999¹⁶⁰

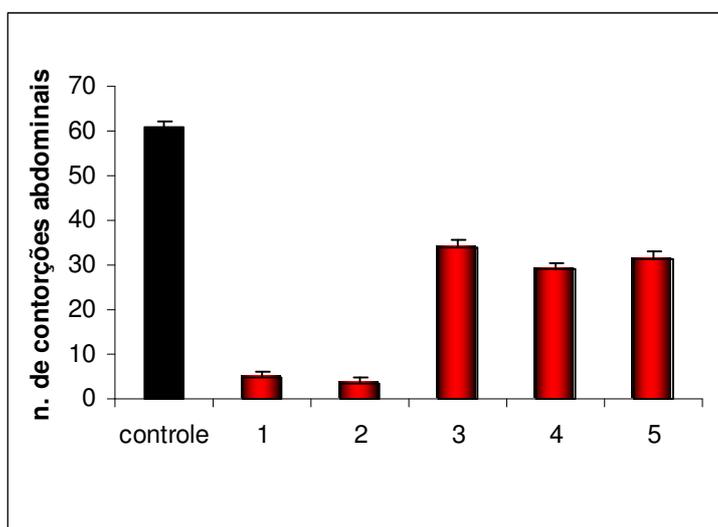


Figura 62. Modelo de dor induzido pelo ácido acético 0,1 % (v. ip) de marrubiina e derivados (10 mg/kg) em camundongos. Cada grupo representa a significância de seis experimentos e as barras verticais o número de contorções abdominais em camundongos com o controle.

6. CONCLUSÕES

6.1. *Aleurites moluccana*

Os estudos químicos e biológicos realizados com *A. moluccana* permitiram as seguintes conclusões:

Estudos Químicos:

- a) Dando continuidade aos estudos realizados anteriormente com *A. moluccana*, da fração hexânica obtida do extrato metanólico das folhas foi isolado a mistura de triterpenos, denominada β e α -amirinona. Este composto foi isolado pela primeira vez no gênero *Aleurites* e não foram encontrados dados na literatura sobre sua atividade biológica.
- b) Da fração de CH_2Cl_2 das cascas de *A. moluccana* foram obtidos o espruceanol, um diterpeno e o ácido atrárico. Ambos compostos não haviam sido encontrados em plantas do gênero *Aleurites*, nem testados quanto à atividade biológica.
- c) O estudo comparativo, realizado com as diferentes partes da planta, revelaram diferença na constituição química, bem como na atividade antinociceptiva, atividade esta relacionada aos compostos isolados, identificados e anteriormente avaliados^{83,84}. As folhas demonstraram um bom rendimento, atividade analgésica e variedade de constituintes químicos.

6.2. *Bauhinia microstachya*

Os estudos químicos e farmacológicos realizados com a planta *B. microstachya* permitiram as seguintes conclusões:

Estudos Químicos:

- a) Da fração de AcOEt obtida a partir do extrato metanólico das folhas de *B. microstachya* foram obtidos cinco compostos de natureza fenólica. O galato de metila tem sido isolado de várias plantas como derivado do ácido gálico ou como artefato após uso de metanol como solvente extrator¹⁸². Foram isolados três flavonóides, kaempferol 3-*O*-ramnosil, quercitina 3-*O*-ramnosil e miricetina

3-*O*-ramnosil, diferenciados pelo número de hidroxilas no anel B da estrutura fundamental. Esses flavonóides ainda não haviam sido relatados para o gênero *Bauhinia*. Outro flavonóide, a epicatequina 3-*O*-galato, foi obtido, sendo a primeira vez isolado no gênero *Bauhinia*.

Estudos biológicos:

- a) Estudos anteriores com o galato de metila (**BM-0**) tem evidenciado efeito analgésico, e por este motivo não foi incluído nos estudos farmacológicos¹⁷⁵. O kaempferol 3-*O*-ramnosil (**BM-1**) por ter sido isolado pequena quantidade, não foi estudado biologicamente. Os compostos quercetina 3-*O*-ramnosil (**BM-2**) e miricetina 3-*O*-ramnosil (**BM-3**) apresentaram atividade antinociceptiva quando testados no modelo de dor induzido pelo ácido acético em camundongos, sendo que o composto **BM-2**, neste modelo, foi mais ativo. Os dois compostos são semelhantes e diferem somente pela adição de uma hidroxila no composto **BM-3**, sugerindo que este aumento na polaridade esteja influenciando a atividade analgésica.
- b) Os resultados obtidos neste trabalho para a *B. microstachya* são importantes sob o ponto de vista químico e medicinal, visto que os compostos fenólicos são os responsáveis pela atividade antinociceptiva apresentada pelo extrato metanólico das folhas, confirmando o uso desta planta no tratamento de diversas patologias.

6.3. *Marrubium vulgare*

Estudos Químicos:

- a) Do precipitado obtido a partir da concentração do extrato metanólico da folhas de *M. vulgare* e da fração de DCM foi obtido a marrubiina, como composto majoritário, com rendimento de 0,31%.
- b) Devido à atividade biológica apresentada anteriormente pela marrubiina¹³⁸ foram realizadas modificações estruturais visando otimizar o efeito analgésico verificado. Obtêve-se sucesso na redução da lactona para a formação do marrubenol, na obtenção do ácido marrubínico, a partir da hidrólise da

marrubiina, na obtenção do derivado esterificado do ácido marrubínico e na formação do derivado metilado do ácido marrubínico, sendo os dois últimos derivados foram obtidos pela primeira vez. As demais reações não levaram aos produtos esperados, talvez por ser a estrutura um pouco complexa, com poucos grupos funcionais disponíveis para reação.

Estudos biológicos:

- a) A marrubiina (**M**) e o marrubenol já haviam sido avaliados anteriormente e apresentaram atividade antinociceptiva no modelo de dor induzido pelo ácido acético^{196,197}. O ácido marrubínico (**MR-2**) quando testado no modelo do ácido acético apresentou-se mais ativo que a marrubiina (**M**). Os compostos obtidos através da esterificação do grupamento ácido do **MR-2**, **MR-6** e **MR-9**, inibiram as contorções abdominais, sendo menos ativos que a marrubiina (**M**) e o ácido marrubínico (**MR-2**), mas quando comparados com fármacos utilizados na clínica, como aspirina e paracetamol, apresentaram uma maior inibição.
- b) Os resultados mostram que tanto a marrubiina como seus derivados possuem importantes ações analgésicas, sendo o ácido marrubínico (**MR-2**) mais eficaz no modelo testado, o que nos estimula a realizar estudos futuros de correlação estrutura atividade para a obtenção de um protótipo de fármaco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- WHO drug information. Herbal medicine, 14, 4, 2000.
- 2- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. **Quim. Nova**, 25, 1, 45-61, 2002.
- 3- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39, 603-613, 2001.
- 4- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V. AND YUNES, R. A.. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.**, 14, 401-418, 2000.
- 5- VLIETINCK, A. J. Idiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present And Future**, 2000. The Netherlands: Phytoconsult, 2000.
- 6- DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKANAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, 73, 69-91, 2002.
- 7- RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYLSKY, S.; LLIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I. AND FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnol.**, 20, 12, 522-531, 2002.
- 8- SARDESAI, V. M. Herbal medicines: Poisons or potions? **J. Lab. Clin. Med.**, 139, 6, 343-348, 2002.

- 9- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, 56, 3, 237-243, 2001.
- 10- KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacol. Sin.**, 24, 1, 7-21, 2003.
- 11- BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, F. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **Phytomedicine**, 9, 1, 1-33, 2002.
- 12- DIXON, R. A. Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. **Phytochemistry**, 57, 145-148, 2001.
- 13- WRIGLEY, S.; HAYS, M.; THOMAS, R.; CHRYSTAL, E. **Phytochemical diversity. A source of new industrial products**. Cambridge: Thomas Graham House, 1997.
- 14- VERPOORTE, R. AND ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. The Netherlands: Kluwer Academic Published, 2000.
- 15- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Quim. Nova**, 17, 5, 401-445, 1994.
- 16- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade, UFSC, 2000.
- 17- CECHINEL-FILHO, V & YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacêuticos ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Quim. Nova**, 21, 1, 99-105, 1998.

- 18- PLOTKIN, M. J. Global phytochemistry: the ethnobotanist view. **Phytochemistry**, 56, 117-120, 2001.

- 19- BAST, A.; CHANDLER, F. R.; CHOY, P. C.; DELMULLE, L. M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S. B. A.; KELLER, K.; KOEMAN, J. H.; PETERS, P.; PRZYREMBEL, H.; REE, E. M.; RENWICK, A. G.; VERMEER, I. T. M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Env. Toxicol. Pharmacol.**, 12, 195-211, 2002.

- 20- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative chromatography techniques**. New York: Verlag berlim Heidelberg, 1997.

- 21- HUIE, C. W. A review of modern sample preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Anal. Bioanal. Chem.**, 373, 23-30, 2002.

- 22- YUNES, ROSENDO AUGUSTO & CALIXTO, JOÃO BATISTA. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

- 23- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L. AND RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Med.**, 63, 2-10, 1997.

- 24- HOUGHTON, P. J. AND RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**. London: Chapman & Hall, 1998.

- 25- CISOWSKI, W.; DEMBINSKA-MIGAS, W.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; LUCZKIEWICZ, M.; MIGAS, P.; MATYSIK, G. AND SOCZEWINSKI, E. Application of planar chromatography to analysis of secondary metabolites in callus cultures of different plant species. **J. Planar Chromatogr.**, 11, 441-446, 1998.

- 26- CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, 40, 6, 1585-1612, 1995.
- 27- GALAND, N.; POTHIER, J.; DOLLET, J.; VIEL, C. OPLC and AMD, recent techniques of planar chromatography: their interest for separation and characterization of extractive and synthetic compounds. **Fitoterapia**, 73, 2, 121-134, 2002.
- 28- GECHINEL-FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Quim. Nova**, 23, 5, 1-6, 2000.
- 29- BRAGA, R. M.; KATO, L.; KOCH, I.; KOHN, L. K.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Phytochemistry and antiproliferative study of Apocynaceae: *Rauwolfia bahiensis*. In: **22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products**, São Carlos: UFSCar, 2000. PPA-043.
- 30- BARTON, D. & OLLIS, W. D. **Advances in medicinal phytochemistry**. Ed. John Libbey, 1986.
- 31- KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. USA: CRC, 1999.
- 32- LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.
- 33- LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing food. **J. Chromatogr. A**, 881, 105-129, 2000.
- 34- AI, J. Rapid measurement of free phytosterols in tobacco by short-column GC/MS/MS. **J. Agric. Food Chem.**, 45, 3932-3935, 1999.

- 35- PHILLIPSON, J. D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, 38, 6, 1319-1343, 1995.
- 36- CIMPAN, G. AND GOCAN, S. Analysis of medicinal plants by HPLC: Recent approaches. **J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.**, 25, 13-15, 2225-2292, 2002.
- 37- GU, ZHE-MING; ZHOU, D.; LEWIS, N. J.; WU, J.; JOHNSON, H. A.; MACLAUGHLIN, J. L. AND GORDON, J. Quantitative evaluation of annonaceous acetogenins in monthly samples of paw paw (*Asimina triloba*) twigs by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Phytochem. Anal.**, 10, 32-38, 1999.
- 38- OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Isolation and determination of betulinic acid in *Doliocarpus schottianus*. In: **22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products**. São Carlos: UFSCar, 2000. PPA-040.
- 39- DONATO, R.; PEREIRA, R. C.; EPIFÂNIO, R. D. A.; CAVALCANTI, D. N.; TEXEIRA, V. L. Isolation and quantification of diterpenes from Brazilian brown alga. *Dictyota menstrualis*. In: **22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products**. São Carlos: UFSCar, 2000. PPA-007.
- 40- LISIEUX, R.; JACOME, R. P.; OLIVEIRA, A. B. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria Montana* M. (Bolsa-de-Pastor). **Quim. Nova**, 22, 2, 175-177, 1999.
- 41- SIEGENTHALER, P.; NEUENSCHWANDER, M. Sesquiterpenes from *Petasites hybridus* (furanopetasin chemovar): separation, isolation and quantification of compounds from fresh plant extracts. **Pharmac. Acta Helv.**, 72, 57-67, 1997.

- 42- WOLFENDER, J. L.; MAILLARD, M. AND HOSTETTMANN, K. Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analyses of crude plant extracts containing phenolic and terpenes glycosides. **J. Chromatogr.**, 647, 183-190, 1993.
- 43- SLIMESTAD, R. AND HOSTETTMANN, K. Characterization of phenolic constituents from juvenile and mature needles of Norway spruce by means of high performance liquid chromatographic-mass spectrometry. **Phytochem. Anal.**, 7, 42-48, 1996.
- 44- TOMER, K. B. Separations combined with mass spectrometry. **Chem. Rev.**, 101, 297-328, 2001.
- 45- KASSEL, D. B. Combinatorial chemistry and mass spectrometry in the 21st century drug discovery laboratory. **Chem. Rev.**, 101, 255-267, 2001.
- 46- VLIETINCK, A. J. The future of phytochemistry in the new millennium In: **2000 years of natural products research. past, present and future**. Ed. Teus J. C. Luijendijk, Phytoconsult, 2000.
- 47- CHOI, D. W.; KIM, J. H.; CHO, S. Y.; KIM, D. H.; CHANG, S. Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, 181-182, 581-586, 2002.
- 48- KNEIFEL, W.; GZECH, E.; KOPP, B. Microbial contamination of medicinal plants – A review. **Planta Med.**, 68, 5-15, 2002.
- 49- MITSCHER, L. A.; PILLAI, S. AND SHANKEL, D. M. Some transpacific thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. **J. Food Drug Anal.**, 8, 4, 229-234, 2000.
- 50- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33, 2, 179-189, 2000.

- 51- DATI, F.; BRAND, B. Standardization activities for harmonization of test results. **Clinica Chimica Acta**, 297, 239-249, 2000.
- 52- RENGER, B. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. **J. Chromatogr.**, 746, 167-176, 2000.
- 53- KARLSEN, J. In: THE MEDICINAL PLANT INDUSTRY. **Quality control and instrumental analysis of plant extracts**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991, 99-105.
- 54- BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, 2, 3, 193-199, 1996.
- 55- VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ("guaco") leaves by capillary gas chromatography. **Phytochem. Anal.**, 8, 74-77, 1997.
- 56- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, 71, 58-65, 2000.
- 57- BRESCIANI, L. F. V.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. **Nat. Prod. Lett.**, 14, 4, 247-254, 1999.
- 58- LIN, G.; LI, P.; LI, S.; CHAN, S. Review: Chromatographic analysis of Fritillaria isosteroidal alkaloids the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional chinese medicinal herb. **J. Chromatogr. A**, 935, 321-338, 2001.
- 59- MULINACCI, N., BARDAZZI, C., ROMANI, A., PINELLI, P., VINCIERI, F., CONSTANTINI, A. HPLC-DAD and TLC-densitometry for quantification

- of Hypericin in *Hypericum perforatum* L. extracts. **Chromatographia**, 49, 3/4, 197-201, 1999.
- 60- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. E. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 1994.
- 61- WHISTON, C. **X-ray methods**. London: Willey & Sons, 1987.
- 62- COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Introduction and overview**. In: **Bioactive natural compounds**, Ed. Colegate, S. M., Molyneux, R.J.: CRC Press, USA, 1993.
- 63- GONZALEZ-SIERR, M.; KHALID, S. A.; DUDDECK, H. Interpretation of two-dimensional NMR spectra: a pedagogical approach. **Fitoterapia**, lx, 2, 99-102, 1989.
- 64- DEROME, A. E. The use of NMR spectroscopy in the structure determination of natural products: Two-dimensional methods. **Nat. Prod. Rep.**, 111-140, 1989.
- 65- MOGHADASIAN, M. H. Pharmacological properties of plant sterols. In vivo and in vitro observations. **Life Sci.**, 67, 605-615, 2000.
- 66- SADLER, I. H. The use of NMR spectroscopy in the structure determination of natural products: One-dimensional methods. **Nat. Prod. Rep.**, 101-127, 1988.
- 67- BIERBAUM, V. M. Introduction: Frontiers in mass spectrometry. **Chem. Rev.**, 101, 2, 209-210, 2001.
- 68- WERMUTH, KOGA, KONING & METCALF. **Medicinal chemistry for the 21st century**. UK: Blackwell Scientific Publications, 1992.

- 69- KINGHORN, D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert. Opin. Pharmac.**, 3, 2, 77-79, 2002.
- 70- CRAHAM, L. P. **An introduction to medicinal chemistry**. New York: Oxford University Press Inc., 1995.
- 71- SCHULZ, V. The psychodynamic and pharmacodynamic effects of drugs: a differentiated evaluation of the efficacy of phytotherapy. **Phytomedicine**, 7, 1, 73-81, 2000.
- 72- HEINRICH, M. Ethnobotany and its role in drug development. **Phyther. Res.**, 14, 479-488, 2000.
- 73- PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural source. **Med. Res. Rev.**, 18, 5, 333-346, 1998.
- 74- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, 30, 12, 3864-3874, 1991.
- 75- CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Quim. Nova**, 18, 5, 460-467, 1995.
- 76- SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, 61, 1053-1071, 1998.
- 77- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, 8, 310-322, 2001.
- 78- CLARK, A. M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharmac. Res.**, 13, 8, 1133-1141, 1996.
- 79- MILES, D. H.; NGUYEN, C. L.; MILES, D. H. Utilization of natural products for treatment of blood diseases. **Curr. Med. Chem.**, 5, 421-440, 1998.

- 80- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, 63, 1035-1042, 2000.
- 81- HARBORNE, J. B.L; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55, 481-504, 2000.
- 82- KANO, R.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; AKAGI, M. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. **Phytomedicine**, 7, 4, 297-302, 2000.
- 83- MEYRE-SILVA, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; DELLE-MAONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Isolation of C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. **Planta Med.**, 65, 293-294, 1999.
- 84- MEYRE-SILVA, C.; MORA, T. C.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves (L.) Willd. **Phytomedicine**, 5, 2, 109-113, 1998.
- 85- MEYRE-SILVA, C.; DELLE-MONACHE, F.; SANTOS, A. R. S.; SCHMELING, L. O.; GADOTTI, V. M.; LIZ, F.; CECHINEL-FILHO, V., V. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Mcbr. (Leguminosae). **Z. Naturforsch. C.**, 56, 939-942, 2001.
- 86- DILLARD, C. J AND GERMAN, J. B. Phytochemical: nutraceuticals and human health. **J. Sci. Food Agric.**, 80, 1744-1756, 2000.
- 87- BITTENCOURT, C. M. S. **Determinação de princípios ativos presentes na *Aleurites moluccana* L. (Willd.) (Euphorbiaceae)**. 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Centro de Ciências Físico e Matemáticas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- 88- Canoe plants of ancient Hawaii: Kukui. Disponível em: <<http://www.hawaiin-ation.org/canoe/kukui.html>> Acessada em 11 dezembro 1997.
- 89- WEBSTER, G. L. Classification of the euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botan. Garden**, 81, 1, 3-32, 1994.
- 90- HUI, W. H. & HOI, C. T. An Examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. **Aust. J. Chem.**, 21, 1675-7, 1968.
- 91- GNECCO, S.; PÉREZ, C.; BITTNER, M.; BECERRA, J. Y SILVA, M.. Distribucion de n-alcanos en especies chilenas pertenecientes a la família Euphorbiaceae. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, 41, 229-233, 1996.
- 92- VILLALOBOS, M. J. P. & CASTELLANOS, E. C. La família Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. **Grasas y Aceites.**, 43, 1, 39-44, 1992.
- 93- MISRA, D. R.; KHASTGIR, H. N. Chemical investigation of *Aleurites moluccana* and the estrutura of Aleuritolic acid - a new triterpene acid. **Tetrahedron.**, 26, 12, 3017-3021, 1970.
- 94- CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 4 ed.. Rio de Janeiro: Bertrand, 1964, 560.
- 95- CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 5, 1984, 294-295.
- 96- FOZDAR, B. I.; KHAN, S. A.; SHAMSUDDIN, T.; SHAMSUDDIN, K. M.; KINTZINGER, J. P. Aleuritin, a coumarinolignoid, and a coumarin from *Aleurites fordii*. **Phytochemistry**, 28, 9, 2459-2461, 1989.
- 97- AGARWAL, R.; MUSTAFA, J.; GUPTA, A.; OSMAN, S. M. Oil rich euphorbiaceae seeds with high contents of linoleic acid. **Fett. Wissench. Technologie-Fat Science Technol.**, 97, 526-527, 1995.

- 98- FORSTER, P. I. A taxonomic revision of *Aleurites* J. R. Forst. and G. Forst. (euphorbiaceae) in Australia and New Guinea. **Muelleria**, 9, 5-13, 1996.
- 99- DUKE, James A.. **Handbook of medicinal herbs**. U.S.A.: CRC Press, 1991, 29.
- 100- STUPPY, W.; VAN WELZEN P. C.; KLINRATANA, P.; POSA, M. C. T. Revision of the genera *Aleurites*, *Reutealis* and *Vernicia* (Euphorbiaceae). **Blumea**, 44, 1, 73-98, 1999.
- 101-LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol**, 49, 23-32, 1995.
- 102- HOPE, B. E.; MASSEY, DG.; FOURNIER-MASSEY, G. Hawaiian materia medica for asthma. **Hawaii Med.**, 56, 6, 160-166, 1993.
- 103- APERS, S.; BARONIKOVA, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J.; PIETERS, L. **Phytochemical investigation on an antivirally active fraction of *Aleurites moluccana* husk**. In: 2000 YEARS OF NATURAL PRODUCTS RESEARCH-PAST, PRESENT AND FUTURE, 330, 1999, Amsterdam.
- 104- PEDROSA, R. C.; MEYRE-SILVA, C.; CECHINEL-FILHO, V.; BENASSI, J. C.; OLIVEIRA, F. L.; ZANCANARO, V.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R. A. Hypolipidaemic activity of methanolic extract of *Aleurites moluccana*. **Phytother. Res.**, 16, 765-768, 2002.
- 105- MEYRE-SILVA, C. M.; MORA, T. C.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J. YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V.. A triterpene and a flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana* L. (Willd.) (Euphorbiaceae). **Acta Farm. Bon**, 16, 3, 169-72, 1997.

- 106- *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Disponível em: <<http://www.guiaverde.com/arboles/Aleuritesmoluccana.html>>. Acessada em 18 Junho 2001.
- 107- Pacific island ecosystems at risk (Pier). Invasive plant species: *Aleurites moluccana* (L.) Willd., Euphorbiaceae. Micronesia, v. 6, 1970. Disponível em: <<http://www.hear.org/pier/almol.html>>. Acessada em 18 de Junho 2001.
- 108- NONAKA, G.; HAYASHI, M.; TANAKA, T.; SAIJO, R. AND NISHIOKA, I.. Isolation and characterization of cyanogenic ellagitannins, aleurinins A and B, and a related O-glycosidic ellagitannin, aleuritin C, from *Aleurites fordii* Hemsley. **Pharmac. Society**, 38, 4, 861-865, 1990.
- 109- TANIGUCHI, S.; VECHI, K.; KATO, R.; ITO, H.; HATANO, T.; YAZAKI, K.; YOSHIDA, T. Accumulation of hydrolyzable tannins by *Aleurites fordii* callus culture. **Planta Med.**, 68, 1145-1146, 2002.
- 110- ITO, Y.; YANASE, S.; TOKUDA, H.; KISHISHITA, M.; OHIGASHI, H.; HIROTA, M.; KOSHIMIZU, K. Epstein-barr virus-activation by tung oil, extracts of *Aleurites-fordii* and its diterpene ester 12-O-hexadecanoyl-16-hidroxyphorbol-13-acetate. **Cancer Lett.**, 18, 1, 87-95, 1983.
- 111- MATSUDA, S.; NAKAO, Y.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K.; ITO, Y. Plant-derived diterpene esters enhance HTLV-I-induced colony formation of lymphocytes in co-culture. **Int. J. Cancer**, 38, 859-865, 1986.
- 112- SHAMSUDDIN, T.; RAHMAN, W.; KHAN, A. S.; SHAMSUDDIN, K. M.; KINTZINGER, J. P. Moluccanin, a coumarinolignoid from *Aleurites moluccana*. **Phytochemistry**, 27, 6, 1908-1909, 1988.
- 113- SATYANARAYANA, P.; KUMAR, K. A.; SINGH, S. K.; RAO, G. N. A new phorbol diester from *Aleurites moluccana*. **Fitoterapia**, 72, 304-306, 2001.

- 114- JOLY, A. B. **Botânica: Chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil: baseadas em chaves de Franz Thonner**. SP: Nacional, 3^a ed., 1977.
- 115- Família fabaceae.
Disponível em:<http://www.puc.cl/sw_edu/hortalizas/html/fabaceae.html>.
Acessada em 27 de janeiro 2003.
- 116- DA SILVA, K.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova**, 25, 3, 449-454, 2002.
- 117- BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; BIBARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. **J. Nat. Prod.**, 64, 892-895, 2001.
- 118- SAVI, A. O. S.; BREVIGLIERI, E.; BELLA CRUZ, A.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Rev. Biol. Trop.**, 44, 3/ 45, 1, 601-603, 1996-1997.
- 119- KITTAKOOP, P.; KIRTIKARA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimalarial pre-racemosols A and B., possible biogenetic precursors of racemosol from *Bauhinia malabarica* Roxb. **Phytochemistry**, 55, 349-352, 2000.
- 120- VIANA, E. P.; SANTA-ROSA, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S.; SANTOS, L. S. Constituents of the stems bark of *Bauhinia guianensis*. **Fitoterapia**, 70, 111-112, 1999.
- 121- YADATA, R. N. ; TRIPATHI, P. A novel flavone glycoside from the stem of *Bauhinia purpurea*. **Fitoterapia**, 71, 88-90, 2000.

- 122- CECHINEL-FILHO, V.; BREVIGLIERI, E.; WILLIAN FILHO, A.; SANTOS, A. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. **Rev. Bras. Farm.**, 76, 4, 115-117, 1995
- 123- SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 5^a ed., UFSC, Florianópolis-SC, 1998.
- 124- DA SILVA, K.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Z. Naturforsch**, 55, 478-480, 2000.
- 125- SOUZA, E.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATI, M. G. VI Encontro de Química da Região Sul da Sociedade Brasileira de Química, Maringá-Pr, Brasil, 1998.
- 126- LAUX, D. O.; STEFAN, G. M.; GOTTLIEB, O. R. Bausplenden dimethylenodioxyflavone from *Bauhinia splendens*. **Phytochemistry**, 24, 1081, 1985.
- 127- Família Labiatae. Disponível em:
</http://www.botanical-online.com/familialabiadeasangles.htm.> Acessada em 27 de janeiro 2003.
- 128- TELEK, E.; TOTH, L.; BOTZ, L.; MATHE, I. Chemical tests with *Marrubium* species. Official data on marrubii herba in Pharmacopoeia Hungarica VII. **Acta Pharm. Hung.**, 67, 1, 31-37, 1997.
- 129- BALMÉ, F. **Plantas Medicinai**s. São Paulo: Ed. Hemus Ltda, Brasil, 1982.
- 130- CIRILO, V. K. **Manual de Plantas Medicinai**s. 44^aed. . Francisco Beltrão : Ed. Assesoar, 1993.

- 131- ROMÁN, R. R.; ALARCÓN-AGUILAR, F.; LARA-LEMUS, A.; FLORES-SAENZ, J. L. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. **Arch. Med. Res.**, 23, 1, 59-64, 1992.
- 132- BALLERO, M.; SOTGIU, A. M.; PIV, G. Empirical administration of preparations of *Marrubium vulgare* in the asthmatic syndrome. **Biomedical Lett.**, 57, 31-36, 1998.
- 133- WEEL, K. G. C.; VENSKUTONIS, P. R.; PUKALSKAS, A.; GRUZDIENE, D.; LINSSEN, J. P. H. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L.) grown in Lithuania. **Fett-Lipid**, 101, 10, 395-400, 1999.
- 134- EL BARDAI, S.; LYOUSSE, B.; WIBO, M.; MOREL, N. Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. **Clin. Exp. Hypertens.**, 23, 4, 324-343, 2001.
- 135- KREJEI, I. AND ZADINA, R. Choleric action of marrubiin and marrubic acid. **Planta Med.**, 7, 1-7, 1959.
- 136- SCHLEMPER, V.; RIBAS, A.; NICOLAU, M. CECHINEL-FILHO, V. Antiespasmic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. **Phytomedicine**, 3, 211-216, 1996.
- 137- NOVAES, A. P.; ROSSI, C.; POFFO, C.; PRETTI JÚNIOR, E.; OLIVEIRA, A. E.; SCHLEMPER, V.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; BURGER, C. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. **Therapie**, 56, 427-430, 2001.
- 138- DE JESUS, R. A. P.; CECHINEL-FILHO, V.; OLIVEIRA, A. E.; SCHLEMPER, V. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, 7, 2, 111-115, 1999.

- 139- SOUZA, M. M.; DE JESUS, R. A. P.; CECHINEL-FILHO, V.; SCHLEMPER, V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, 5, 3, 103-107, 1998.
- 140- PORRAT, H.; LE MEN, J. Distribution of ursolic acid among the Labiatae. **Ann. Pharm. Franç.**, 11, 190-192, 1953.
- 141- PAUDLER, W. W.; WAGNER, S. Major alkaloid of *Marrubium vulgare*. **Chem. Ind. (London)**, 42, 1693-1694, 1963.
- 142- NICHOLAS, H. J. Isolation of marrubiin, a sterol and a sesquiterpenes from *Marrubium vulgare*. **J. Pharm. Sci.**, 53, 8, 859-899, 1964.
- 143- HENDERSON, M. S.; McCRINDLE, R. J. Premarrubiin, a diterpenoid from *Marrubium vulgare* L. **J. Chem. Soc. C**, 15, 2014-2015, 1969.
- 144- NAWWAR, M. A. M.; EL-MOUSALLAMY, A. M. D.; BARAKAT, H. H.; BUDDRUS, J.; LINSCHIED, M. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. **Phytochemistry**, 28, 11, 3201-3206, 1989.
- 145- DE VICENZI, M.; MAIALETTI, F.; DESSI, M. R. *Marrubium vulgare* L. **Fitoterapia**, LXVI, 3, 207, 1995.
- 146- SAHPAZ, S.; HENNEBELLE, T.; BAILLEUL, F. Marruboside, a new phenylthanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. **Nat. Prod. Lett.**, 16, 3, 195-199, 2002.
- 147- SAHPAZ, S.; GARBACKI, N.; TITS, M.; BAILLEUL, F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. **J. Ethnopharmacol.**, 79, 389-392, 2002.
- 148- SAVONA, G.; BRUNO, M.; RODRÍGUEZ, B. Preperegriene, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium friwaldskyanum*. **Phytochemistry**, 23, 1, 191-192, 1984.

- 149- RODRIGUES, C.; SAVI, A. O. S.; SCHLEMPER, V.; REYNAUD, F.; CECHINEL-FILHO, V. An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Chromatographia**, 47, 7/8, 449-450, 1998.
- 150- HATAM, N. A. R.; POZEL, A.; SEIFERT, K. Polyodonine, a prefulanis labdane diterpene from *Marrubium polydon*. **Phytochemistry**, 40, 5, 1575-1576, 1995.
- 151- ÇALIS, I.; HOSNY, M.; KHALIFA, T.; RUEDI, P. Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. **Phytochemistry**, 31, 10, 3624-3626, 1992.
- 152- ÇITOGLU, G. S.; AKSIT, F. Occurrence of marrubiin and labdanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. **Biochem. Syst. Ecol.**, 30, 885-886, 2002.
- 153- KNOSS, W.; ZAPP, J. Accumulation of furanic labdane diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonureis cardiaca*. **Planta Med.**, 64, 357-361, 1998.
- 154- NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicines**. London: The pharmaceutical press, 1996.
- 155- APPLETON, R. A.; FULKE, J. W. B.; HENDERSON, M. S.; ACCRINDLE, R. The stereochemistry of marrubiin. **J. Chem. Soc. (C)**, 1943-1948, 1967.
- 156- GHIGI, E. The constitution of marrubiin. I. Preliminary experiments. **Gazz. Chim. Ital.**, 81, 336-350, 1951.
- 157- HARDY, D. G.; RIGBY, W.; MOODY, D. P. Marrubiin. Part I. Oxidation products. **J. Chem Soc.**, 2955-2964, 1957.
- 158- MANGONI, L.; ADINOLFI, M. The stereochemistry of marrubiin. **Tetrahedron Lett.**, 3, 269-273, 1968.

- 159- TABOADA, J.; CAMINO, M.; GIL, N. M.; CAMPOS, E.; GUERRERO, C. Actividad como antialimentario de la marrubiina y um producto de reduccion. **Rev. Latinoamer. Quim.**, 23, 3, 120-125, 1994.
- 160- BRAND, K.; ZAMPIROLLO, V.; SCHLEMPER, V.; CECHINEL-FILHO, V.; KNOSS, W. **Analgesic effects of furanic labdane diterpenes from *Marrubium vulgare***. In: 2000 YEARS OF NATURAL PRODUCTS RESEARCH, 1999, Amsterdam.
- 161- MARINI-BETTÓLO, G. B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M.. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. **J. Chromatogr.**, 213, 113-127, 1981.
- 162- UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica**. Fondo Editorial, Lima-Peru, 1994, 255-267.
- 163- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988, 72-85.
- 164- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Ceará: EUFC, 1988, 101-106.
- 165- FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y. Anti-aids agents, 11. betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and The anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **J. Nat. Prod.**, 57, 2, 243-247, 1994.
- 166- BUNNET, J. F.; DAVIS, G. T.; TANIDA, H. Elimination reactions of benzyldimethylcarbiny chloride. E2 reactions leaning toward E1. **J. Amer. Chem. Soc.**, 84, 1606-1614, 1962.
- 167- WILLSON, F. G.; WHEELER, T. S. Benzylaniline. **Org. Syn. Coll.**, 1, 102-104, 1941.

- 168- JOHNSTONE, R. A. W.; ROSE, M. E. A rapid, simple and mild procedure for alkylation of phenols, alcohols, amides and acids. **Tetrahedron**, 35, 2169-2173, 1979.
- 169- WHEELER, F. S. Flavone. **Org. Synth. Coll.**, 4, 478, 1963.
- 170- COLLIER, H. D. J.; DINNEN, L. C.; JOHNSON, C. A., SCHNEIDER, C.. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 32, 295-310, 1968.
- 171- SANTOS, A. R. S., NIERO, R., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R. A., PIZZOLATTI, M. G., DELLE MONACHE, F., CALIXTO, J. B.. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Med.**, 61, 329-332, 1995.
- 172- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.; ¹³C NMR spectra of pentacyclic Triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, 37, 1517-1575, 1994.
- 173- GUNASEKERA, S. P.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Potential anticancer agents. XIV. Isolation of spruceanol and montanin from *Cunuria spruceana* (Euphorbiaceae). **J. Nat. Prod.**, 42, 658-662, 1979.
- 174- DENTON, R. W.; HARDING, W. W.; ANDERSON, C. I.; JACOBS, H.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. New diterpenes from *Jathropa divaricata*. **J. Nat. Prod.**, 64, 829-831, 2001.
- 175- COOKE, R. G.; DOWN, J. G. Methyl 2,4-Dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate. **Aust. J. Chem.**, 24, 1257-65, 1971.
- 176- SONDHOLM, E. G.; HUNECK, S. ¹³C NMR-spectra of licher depsides, depsidones and depsones. **Chem. Scripta**, 18, 233-236, 1981.

- 177- BARDON, A.; MITRE, G. B.; KAMIYA, N.; TOYOTA, M. AND ASAKAWA, Y. Eremophilanoids and other constituents from the Argentine liver-wort *Frullania brasiliensis*. **Phytochemistry**, 59, 205-213, 2002.
- 178- VILEGAS, J. H. Y., LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C. High resolution gas chromatography analysis of espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* and *M. aguiifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phyther. Res.**, 8, 241-244, 1994.
- 179- PERES, M. T. L. P. **Estudos de compostos ativos (biológicos e farmacológicos) de *Croton urucurana* Baillon. Avaliação do efeito alelopático de extratos *Gleichenia pectinata* Willd. (PR.) e de seus aleloquímicos.** Florianópolis, 1997. Tese (Doutorado em química orgânica) – Programa de Pós-graduação em química, UFSC, 1997.
- 180- NIERO, R. **Isolamento e identificação de compostos do *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico; correlação estrutura-atividade.** Florianópolis, 1993. (Dissertação de Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 181- BINUTU, O. A.; CORDEL, G. A. Gallic acid derivatives from *Mezoneuron benthamianum* leaves. **Pharm. Biol.**, 38, 4, 284-286, 2000.
- 182- CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. A review of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. **Med. Res. Ver.**, 8, 4, 225-257, 1998.
- 183- FOSSEN, T.; LARSEN, A.; KIREMIRE, B. T.; ANDERSEN, O. M. Flavonoids from blue flowers of *Nymphala caerulea*. **Phytochemistry**, 51, 1133-1137, 1999.
- 184- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification.** New York: Academic Press Inc, 1982. 113 .

- 185- WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; BOOREN, A. M.; GRAY, I.; DEWITT, D. L. Cyclooxygenase active bioflavonoids from *Balaton* (TM) tast cherry and their structure activity relationships. **Phytomedicine**, 7, 1, 15-19, 2000.
- 186- BASILE, A.; SORBO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; COBIANCHI, R. C.; VUOTTO, M. L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, 71, 110-116, 2000.
- 187- BLONSKA, M.; CZUBA, Z. P.; KROL, W. Effect of flavone derivatives on interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA expression and IL-1 β protein synthesis in stimulated raw 264.7 macrophages. **Scand. J. Immunol**, 57, 162-166, 2003.
- 188- MARFAK, A.; TROUILLAS, P.; ALLAIS, D.; CHAMPAVIER, Y.; CALLISTE, C.; DUROUX, J. Radiolysis of kaempferol in water/methanol mixtures. Evaluation of antioxidant activity of kaempferol and products formed. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 1270-1277, 2003.
- 189- CETTO, A. A.; WIEDENFELD, H.; REVILLA, M. C.; SERGIO, I. A. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, 72, 1-2, 129-133, 2000.
- 190- MITROCOTSA, D.; MITAKU, S.; AXARLIS, S.; HARVALA, C.; MALAMAS, M. Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus. **Planta Med.**, 66, 377-379, 2000.
- 191- NOVOA, B. E.; CESPEDES, A. C.; DE GARCIA, L. A.; OLARTE, C. J. E. Quercitrin a flavonoid with hypotensive activity obtained from *Croton-glabbellus*. **Rev. Colomb. Cienc. Químico-Farmacêutica**, 4, 2, 7-14, 1985.

- 192- MUCSI, I.; GYULAI, Z.; BELADI, I, Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures. **Acta Microbiol. Hungar.**, 39, 2, 137-147, 1992.
- 193- TAGUCHI, K.; HAGIWARA, Y.; KAJIYAMA, K.; SUZUKI, Y. Pharmacological studies of *Houttuyniae* herba: the anti-inflammatory effect of quercitrin. **Yakugaku Zashi**, 113, 4, 327-333, 1993.
- 194- GALVEZ, J.; CRESPO, M. E.; JIMENEZ, J.; SUAREZ, A.; ZARUELO, A. Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, 45, 2, 157-159, 1993.
- 195- MEDINA, F. S.; VERA, B.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sci.**, 70, 3097-3108, 2002.
- 196- LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Cryosophyllum cainito* L. (Star apple). **J. Agric. Food Chemistry**, 50, 1379-1382, 2002.
- 197- COMPAGNONE, R. S.; SUAREZ, A. C.; DELLE MONACHE, F. Myricetina 3-O-rhamnosil de los hojas y ramas of *Coccoloba dugandiana*. **Rev. Colomb. Quím.**, 24, 2, 65-68, 1995.
- 198- HOPIA, A.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, 76, 1, 139-144, 1999.
- 199- FOO, L. Y.; NEWMAN, R.; WAGHORN, G.; McNARBB, W. C.; ULYATT, M, J, Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. **Phytochemistry**, 41, 2, 617-624, 1996.

- 200- HASHIMOTO, F. NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds LVI. Isolation of four new acylated flavan-3-ols from *Oolong* tea (1). **Chem. Pharm. Bull**, 35, 2, 611-616, 1987.
- 201- RIZVI, S. I.; ZAID, M. A. Insulin-like effect of (-) epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 28, 9, 776-778, 2001.
- 202- NEIVA, T. J. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. **Phytother. Res.**, 13, 7, 597-600, 1999.
- 203- MÉNDEZ, J.; MATO, M. C. Methyl gallate and related polyphenols as auxin protectors. **Phytochemistry**, 44, 1, 41-43, 1997.
- 204- ITO, H.; KOBAYASHI, E.; LI, S. H.; SUGITA, D.; KUBO, N.; SHIMURA, S.; ITOH, Y.; NISHINO, H.; YOSHIDA, T. Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 8, 2400-3, 2002.
- 205- EL BARDAI, S.; MOREL, N.; WIBO, M.; FABRE, N.; LLABRES, G.; LYOUSSE, B.; QUETIN-LECLERCQ, J. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Planta Med.**, 69, 75-77, 2003.
- 206- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 10^aed., Fund. Calouste Gulbenkian, 1993, 1639.
- 207- CECHINEL-FILHO, V. **Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química-atividade biológica**. Florianópolis, 1995. 165 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Programa de Pós-graduação em Química, UFSC, 1995.

8. ANEXOS

Segue em anexo, trabalhos científicos publicados, com a participação do autor em periódicos, durante o desenvolvimento deste trabalho.