

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

DIONEZINE DE FÁTIMA NAVARRO

**ESTUDO QUÍMICO, BIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO DAS ESPÉCIES
Allamanda blanchetti e *Allamanda schottii* Pohl PARA A OBTENÇÃO DE
FRAÇÕES E MOLÉCULAS BIOATIVAS DE POTENCIAL TERAPÊUTICO**

**FLORIANÓPOLIS
2005**

DIONEZINE DE FÁTIMA NAVARRO

**ESTUDO QUÍMICO, BIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO DAS ESPÉCIES
Allamanda blanchetti e *Allamanda schottii* Pohl PARA A OBTENÇÃO DE
FRAÇÕES E MOLÉCULAS BIOATIVAS DE POTENCIAL TERAPÊUTICO**

**Trabalho apresentado a Universidade
Federal de Santa Catarina como
requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto
Yunes**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Vilma Edite
Heizen**

**FLORIANÓPOLIS
2005**

DEDICATÓRIA

Os anjos não moram só no céu...

Existem alguns, que pela imensidão do seu amor, Deus permite que desçam à terra e emprestem suas asas para aqueles que eles amam possam alçar seu vôo mais pleno...

Durante toda minha vida tive o anjo mais amoroso.... mais iluminado ... que sempre acreditou em mim e foi a **força maior** para que eu vencesse todos os meus desafios...

MINHA MÃE.... Minha mãezinha querida... (in memorian)

À você, meu anjo querido, eu dedico este trabalho

Na esfera de vida que estiver receba o meu obrigada.... obrigada... obrigada e todo MEU AMOR...

Dedico também à você **meu amado paizinho** (in memorian), que com sua presença de luz, iluminou tantas vezes meu caminho incerto...

DEDICO ESTE TRABALHO

Às minhas filhas **Francine e Tacyana**, presenças fiéis , amorosas e constantes em todos os momentos...

Presenças que preencheram minhas tantas ausências que me fizeram acreditar nesta conquista.

Vocês são a fonte e a essência do meu viver...

AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, que pela sua infinita bondade que me deu forças e esperança nos momentos mais difíceis da minha caminhada

Meu agradecimento MAIOR e mais verdadeiro à Ângela e ao Cechinel pelo constante incentivo e carinho, por terem sido **sempre** o meu rumo... o meu norte... o meu **porto seguro**.... além de serem amigos maravilhosos

À TODOS os meus familiares : Tacyana, Francine, Gustavinho, Josmael, Regina, Audrey, Zaclis, Rui, Rodrigo, Pedro Henrique, Laurita, Giovana, Gabriela, Sueli, Michele por sempre estarem do meu lado me incentivando e me fazendo crer no meu potencial

À minha amiga, Rosi, que sempre foi a irmãzinha do coração, nos momentos de vitória ou dificuldades

À UFSC, Pós Graduação em Química, Central de Análises, Laboratório Estrutura-Atividade, PCIDT, CAPES e CNPq pelo apoio técnico-científico

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas (UEPG), PROPESP (Pós Graduação-UEPG), CEPE , Prof. Vitoldo pelo apoio e compreensão recebidos. Em especial, meu agradecimento ao Prof. Dr. Altair Justino, Prof. Dra. Fabiana Mansani Pereira, Nilza, Nhara Marcondes, Mira e Paulo Vitor Farago, pelas valiosas contribuições e demonstrações de amizade que me permitiram concluir meu trabalho com serenidade

Ao prof. Franco della Monache, por sua constante e prestativa amabilidade, na dificuldades técnicas encontradas

Aos professores que compuseram a Banca Examinadora (Prof. Dra. Tomoe Nakashima, Prof. Dr. Mauro Laranjeira, Prof. Dra. Inês, Prof. Dra. Verinha Frescura, Prof. Dra.Vilma Heinzen, Prof. Dr. Rosendo Yunes), pelas contribuições e sugestões construtivas que certamente melhoraram a qualidade deste estudo

Aos colegas de laboratório Lousiane, Paula, Cris, Niero, Salete, Amauri , Marcela pelos bons momentos de convivência

Aos grandes amigos de Florianópolis Alexandro, Betina, Ângelo, Sandra, Aninha, Ana Carla, Erica e Roberto, Loli, Danti, Ana, Geraldo, Leôncio e Júlia, Valdete, Jorge, Rejane, Carlos Taboada por terem sido sempre o meu oásis

Aos meus amigos do Paraná, que mesmo distante, sempre acreditaram e torceram pela minha vitória : Silvana e Carlos, Su, Ivan, Verinha, Celisa e Jesus, Eliana, Isolde, Jô, Alice, Márcio

Ao João Carlos, que pelo seu carinho sempre me fez sentir uma vencedora

RESUMO

Inúmeras espécies vegetais ornamentais brasileiras estão ao longo dos anos sendo validadas cientificamente em função do seu potencial terapêutico. O gênero *Allamanda* é detentor de inúmeras atividades terapêuticas, motivo que levou ao estudo das espécies vegetais *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii*, pouco relatadas na literatura. O presente trabalho estabeleceu um perfil comparativo entre as 2 espécies em estudo, envolvendo processos de extração, isolamento, purificação e identificação dos constituintes químicos da *A. blanchetti* e *A. schottii*. Das partes aéreas (caules e folhas) da *A. blanchetti* foram isolados os compostos β -sitosterol e estigmasterol, canferol, quercitrina, canferol-3-O- β -ramnosídeo e 5,7,4'-trihidroxi-isoflavona. Das raízes foram isolados a plumericina, o ácido-*p*-hidroxi-cinâmico e a eudesmina. Nas suas flores foi encontrado o ácido ursólico. A partir de extrato etanólico das folhas e caules da *A. schottii* foi isolado uma mistura de esteróis (β -sitosterol e estigmasterol), os iridóides olumericina e plumierídeo, o ácido ursólico e a escopoletina. As raízes promoveram o isolamento da plumericina, escoparona, isoplumericina e o composto 1,-(3,4-dimetoxi-etano-1,2) diol. Todos esses compostos foram identificados e elucidados estruturalmente por análises espectroscópicas (IV, RMN ^1H e ^{13}C). Foram também avaliadas nas 2 espécies atividade antimicrobiana, atividade antiparasitária, atividade antiviral, atividade leishmanicida, ação tripanomicida e atividade antileucêmica. Embora as 2 espécies tenham apresentado resultados significativos, a *A. schottii* é detentora de melhores resultados farmacológicos, quando se avaliou os extratos e frações nas atividades antimicrobiana, atividade antiparasitária, atividade antiviral e muito expressivos quanto ao seu potencial leishmanicida, tripanomicida e atividade antileucêmico.

ABSTRACT

Various Brazilian decorative plant species have been validated throughout time because of their healing potential. The *Allamanda* genus has many therapeutic activities that led to study of the species *Allamanda blanchetti* and *Allamanda schottii*, rarely mentioned in literature. This essay establishes a comparative outline between both species studied, involving extraction, isolation, purification and identification of chemical components of *A. blanchetti* and *A. schottii*. From *A. blanchetti*'s aerial parts (stem and leaves), the components β -sitosterol e estigmasterol, kaempferol, quercitrin, kaempferol-3-O- β -ramnoside and 5,7,4'-trihydroxy-isoflavone were isolated. From the roots, the plumericin, the acid-*p*-hydroxy-cinamic e a eudesmin and its flowers the ursolic acid was found. From the leaves' and stem's ethanolic extract of *A. schottii*, a mixture of sterols (β -sitosterol and estigmasterol), the iridoid plumericin and plumieride, the ursolic acid, the scopoletin were isolated. The roots provided the isolation of plumericin, scoparone, isoplumericin and the compound 1,3,4-trimethoxyethane-1,2 diol. All those compounds were identified structurally clarified through spectroscopic analysis (IR, RMN ^1H and ^{13}C). Antimicrobial activity, antiparasitic activity, antiviral activity, anti-leishmanicide activity, tripanomicide action and antileucemic activity also evaluated both species. Although both species have presented significant results, *A. schottii* have the best pharmacological results when extracts and fractions in antimicrobial, antiparasitic and antiviral activities were evaluated and quite impressive results with relation to its leishmanicide, tripanomicide and antileucemic potential.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

GERAL.....	1
1.1. Histórico.....	1
.....	5
.....	6
1.2. Algumas plantas medicinais de potencial terapêutico.....	13
1.3. Fitofármacos com potencial antitumoral.....	13
.....	15
1.4. Potencial leishmanicida de espécies vegetais.....	15
.....	16
1.4.1. Formas clínicas de leishmanioses.....	19
.....	22
1.4.2. Fármacos utilizadas no tratamento.....	26
.....	26
1.4.3. Espécies vegetais com atividade anti-leishmania.....	27
.....	29
1.5. Plantas Medicinais : um mercado promissor.....	32
.....	33
1.5.1. Importância de Plantas Brasileiras.....	34
.....	35
1.5.2. Bioprospeção: Protótipos naturais e síntese de novos análogos.....	36
.....	36
1.6. Fatores que interferem na qualidade do material vegetal.....	37
.....	37
1.6.1. Estabilidade dos Princípios Ativos.....	38
.....	38
1.6.2. Variáveis que determinam a concentração de P.A. naturais.....	38
.....	38
1.7. Regulamentação sobre Plantas Medicinais.....	39
.....	39
1.8. Biodirecionamento para obtenção de substâncias ativas de origem Vegetal.....	39
.....	39
.....	40
1.8.1. Etnofarmacologia X seleção da espécie.....	41
.....	42
1.8.2. Identificação botânica.....	42
.....	43
.....	43
1.8.3. Coleta e.....	43
.....	44

secagem.....	45
1.8.4. Operações extrativas utilizadas para isolamento de compostos ativos.....	46
1.8.4.1. Maceração.....	46
.....	46
1.8.4.2. Percolação.....	48
.....	49
1.8.4.3. Turbólise ou turboextração.....	49
1.8.4.4. Microondas.....	51
.....	51
1.8.4.5. Ultrasons.....	52
.....	59
1.8.4.6. Extração por fluido supercrítico.....	59
1.8.4.7. Microextração em fase sólida (SPME).....	61
.....	62
1.8.5. Principais métodos utilizados para separação de constituintes químicos naturais.....	65
.....	66
1.8.5.1. Partição líquido-líquido.....	69
.....	69
1.8.5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	70
.....	72
1.8.5.3. Cromatografia em coluna (CC).....	74
1.8.5.4. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	74
.....	75
1.8.5.5. Cromatografia preparativa de força centrífuga.....	75
1.8.5.6. Cromatografia pelo uso de coluna “flash”.....	76
.....	77
1.8.5.7. Cromatografia gasosa (CG).....	77
.....	78
1.8.5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência ou alta pressão (HPLC).....	82
1.8.6. Caracterização de constituintes químicos.....	82
.....	83
1.8.6.1. Reveladores.....	85
.....	85
1.9. Identificação de compostos ativos.....	86
1.9.1. Ensaio qualitativo e quantitativo.....	87
.....	87
1.10. Novas metodologias usadas como ferramentas no planejamento	

Racional de fármacos.....	88
	89
2.	90
OBJETIVOS	92
.....	93
2.1. Objetivos gerais.....	93
2.2. Objetivos específicos	96
.....	97
	97
	98
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS PLANTAS EM ESTUDO	10
3.1 Sinopse da família Apocyanaceae.....	10
	1
3.2. Considerações gerais sobre o gênero <i>Allamanda</i>	10
3.3. Revisão dos principais grupos químicos encontrados no gênero <i>Allamanda</i>	4
.....	10
.....	4
3.3.1. Iridóides.....	10
.....	5
3.3.2. Flavonóides.....	10
.....	8
3.3.3. Cumarinas.....	
.....	
3.3.4. Lignanas e neolignanas.....	11
	0
3.3.5. Derivados do isopreno.....	11
	0
3.3.6. Saponinas.....	11
.....	7
	11
3.4. Revisão bibliográfica da <i>Allamanda cathartica</i>	81
	20
3.4.1. Características botânicas.....	12
	3
3.4.2. Estudos fitoquímicos anteriores.....	13
	0
3.4.3. Estudos farmacológicos anteriores.....	13
	0
	13
3.5. Revisão bibliográfica da <i>Allamanda blanchetti</i>	2
	13
3.5.1. Características botânicas.....	4
	13
3.5.2. Estudos fitoquímicos anteriores.....	6
	13
3.5.3. Estudos farmacológicos anteriores.....	8

3.6.Revisão bibliográfica da <i>Allamanda schottii</i>	14
3.6.1.Características	0
botânicas.....	14
3.6.2.Estudos fitoquímicos	0
anteriores.....	14
3.6.3.Estudos farmacológicos	3
anteriores.....	14
	3
4.PARTEEXPERIMENTAL	14
.....	14
4.1. Materiais e métodos	6
	14
4.2. Análise do Perfil fitoquímico preliminar entre as espécies em estudo	3
4.3. Material vegetal : <i>Allamanda blanchetti</i>	14
	9
4.3.1.Coleta e identificação	
botânica.....	14
4.3.2.Obtenção de extratos para análise	9
fitoquímica.....	14
4.3.3.Ensaios fitoquímicos comparativos entre as espécies jovem e espécie adulta	9
da <i>A.blanchetti</i>	15
	0
4.3.4.Fracionamento dos extratos etanólicos brutos	15
4.3.5.Isolamento e Purificação dos constituintes químicos das folhas e caules de	4
<i>A.blanchetti</i>	15
	5
.....	15
4.3.5.1. Fração	9
hexânica.....	16
4.3.5.2. Fração	2
AE.....	16
4.3.6. Isolamento e Purificação dos constituintes químicos da fração AE das raízes de	6
<i>A.blanchetti</i>	16
	9
4.3.6.1. Fração AE	16
.....	9
4.3.7. Isolamento e Purificação dos constituintes químicos da fração hexânica das flores da	16
<i>A.blanchetti</i>	9
4.3.8. Comparação das diversas técnicas extrativas em folhas de <i>A. blanchetti</i>...	16
	9
4.4. Material vegetal: <i>Allamanda schottii</i>	17
	5
4.4.1.Coleta e identificação	17
botânica.....	5
4.4.2. Obtenção dos extratos para análise	17
fitoquímica.....	9

4.4.3. Isolamento e Purificação dos constituintes químicos das folhas e caules de <i>A. schottii</i>	18
4.4.3.1. Fração DCM : AE.....	3
4.4.4. Isolamento e Purificação dos constituintes químicos das raízes de <i>A. schottii</i>	18
4.4.5.1. Fração Hexano.....	8
4.4.5.2. Fração DCM.....	19
4.4.5. Comparação das técnicas extrativas em folhas de <i>A. schottii</i>	2
4.5. Testes biológicos e farmacológicos	19
4.5.1. Atividade antimicrobiana.....	2
4.5.2. Atividade anti-parasitária contra piolho <i>Menopon gallinae</i>	19
4.5.2.1. Testes – primeira etapa	4
4.5.2.2. Testes – segunda etapa	19
4.5.3. Atividade antiviral.....	8
4.5.4. Atividade anti-leishamania.....	19
4.5.4.1. Atividade anti-leishamania frente a <i>L. amazonensis</i>	9
4.5.4.2. Atividade anti-leishamanicida frente a <i>L. chagasi</i>	20
4.5.5. Atividade tripanomicida.....	4
4.5.6. Atividade anti-leucêmica	20
4.6. Controle de qualidade sazonal	5
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Resultados do perfil fitoquímico preliminar entre as 3 espécies estudadas.....	9
5.2. Material vegetal : <i>Allamanda blanchetti</i>	21
5.2.1. Processo de extração.....	1

5.2.2. Ensaio comparativos do perfil fitoquímico entre espécie jovem e adulta da	21
<i>A. blanchetti</i>	5
<i>A. blanchetti</i>	21
5.2.3. Fracionamento, isolamento e purificação dos constituintes químicos	7
<i>A. blanchetti</i>	21
..	9
<i>A. blanchetti</i>	22
..	1
5.2.4. Identificação dos compostos químicos isolados de folhas e caules da	22
<i>A. blanchetti</i>	2
..	22
..	5
5.2.4.1. Fração hexânica.....	22
5.2.4.1.1. Mistura 53-63 H- β -sitosterol + estigmasterol	7
.....	23
.....	0
5.2.4.2. Fração AE.....	23
5.2.4.2.1. Composto 59-73 AE - canferol.....	1
5.2.4.2.2. Composto 37(9) AE- isoquercitrina	23
.....	4
.....	23
.....	9
5.2.4.2.4. Composto 25-33 AE - canferol- 3-O- β -ramnosídeo	24
.....	3
5.2.4.2.5. Composto 41(9) AE – 5,7,4 trihidroxi-isoflavona	24
.....	7
5.2.5. Identificação dos compostos químicos isolados de raízes da <i>A. blanchetti</i>	24
5.2.5.1. Fração AE.....	8
5.2.5.1.1. Composto 10B 30-76 - plumericina.....	
5.2.5.1.2. Composto 10C 78-120 - plumericina.....	
5.2.5.1.3. Composto 10E 165-203 ácido - <i>p</i> - hidroxí cinâmico.....	9
5.2.5.1.4. Composto FG 12 AE - eudesmina.....	23
5.2.6. Identificação do composto químico isolado das flores da <i>A. blanchetti</i>	24
5.2.6.1. Composto 15H 53-70 – ácido ursólico.....	25
5.2.6.2. Compostos em fase de identificação.....	29
5.2.7. Comparação das técnicas extrativas em folhas de <i>A. blanchetti</i>	33
5.3. Material vegetal : <i>Allamanda schottii</i>	35
5.3.1. Identificação dos compostos químicos isolados das folhas e	40
	53

caules da <i>A.schottii</i>	54
.....	
5.3.2.1. Fração DCM: AE.....	55
5.3.2.1.1. Mistura 58-75 - β -sitosterol + estigmasterol	56
.....	
5.3.2.1.2. Composto Col 80-106 - plumericina.....	57
5.3.2.1.3. Composto 24-37 - escopoletina.....	58
5.3.2.1.4. Composto Col 9 A- ácido ursólico	60
.....	68
5.3.2.1.5. Composto AE- 89 - plumierído	71
.....	75
5.3.4. Identificação dos compostos químicos isolados das raízes da <i>A.schottii</i> ...	77
5.3.4.1. Fração hexânica.....	91
5.3.4.1.1. Composto 29-31 - β -sitosterol + estigmasterol.....	94
5.3.4.2.2. Fração DCM.....	95
5.3.4.2.2.1. ASR 16-31 - plumericina.....	10 3
5.3.4.2.2. Composto 44-48 - isoplumericina.....	10
5.3.4.2.3. Composto ASR 21-22 – 1-(3,4-dimetoxifenil) etano-1,2 (diol).....	7
5.3.4.2.4. Composto ASR 28-30 – escoparona).....	12 4
5.3.5. Compostos isolados em fase de identificação	
5.3.6. Comparação das técnicas extrativas em folhas de <i>A.</i> <i>schottii</i>	12 7
5.4. Resultados dos testes biológicos e farmacológicos	12 8
5.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>A. blanchetti</i> contra microorganismos da cavidade oral.....	12 9 13
5.4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana – CIM.....	0 15
5.4.3. Avaliação da atividade antifúngica – método da diluição.....	1 15
5.4.4. Resultado obtido com o método da <i>N.</i> <i>crassa</i>	3 15
5.4.5. Atividade anti-parasitária contra piolhos <i>Menopon</i> <i>gallinae</i>	5
5.4.6. Atividade antiviral.....	15

5.4.7. Atividade anti-leishamania. contra <i>L. amazonensis</i>	6 15
5.4.8. Atividade anti-leishamania. contra <i>L. chagasi</i>	7 16
5.4.9. Atividade tripanocida.....	0 16
5.4.10. Atividade antileucêmica.....	3 16
5.5. Controle de qualidade sazonal.....	4 16
6.	7
CONCLUSÕES	17
7. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO TRABALHO	1
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
	2
	17
	3
	17
	6
	17
	7
	17
	8
	18
	1
	18
	1
	18
	4
	18
	5
	18
	7
	19
	5
	19
	6
	19
	7
	20
	0
	20
	1
	20
	2
	20
	7
	20

ÍNDICE DE FIGURAS

	8
	21
	0
	21
	0
Figura 1 – Classificação de agentes antineoplásicos e seus mecanismos de ação	
Figura 2 – Esquema da síntese da artemisina a partir da pulegona.....	21
Figura 3 - Esquema da síntese da progesterona a partir da diosgenina.....	7
Figura 4 – Esquema da síntese dos prostanóides A e B a partir do safrol.....	22
Figura 5 – Análise do perfil cromatográfico (CG) da fração DCM de <i>C. zedoaria</i> coletada no mês de janeiro (1) e mês de agosto (2).....	6 23 3
Figura 6 – Procedimentos gerais para obtenção de compostos biologicamente ativos.....	
Figura 7 – Fatores que interferem no processo de secagem.....	23
Figura 8 – Esquema geral de partição e separação provável de metabólitos secundários.....	5
Figura 9 – Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados no gênero <i>Allamanda</i> (iridóides).....	23 6
Figura 10 - Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados no gênero <i>Allamanda</i> (iridóides).....	
Figura 11 - Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados no gênero <i>Allamanda</i> (flavonóides e cumarinas).....	23 7
Figura 12 - Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados no gênero <i>Allamanda</i> (esteróides).....	
Figura 13 - Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados no gênero <i>Allamanda</i> (terpenóides).....	
Figura 14 Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados no gênero <i>Allamanda</i> (lignanas)	
Figura 15 – Esquema da biossíntese dos iridóides.....	
Figura 16 – Estruturas tetra, penta e hexacíclicas de saponinas.....	
Figura 17 – Foto da <i>Allamanda cathartica</i>	06
Figura 18 – Foto da <i>Allamanda blanchetti</i>	22 3
Figura 19 – Foto da <i>Allamanda</i>	

<i>schottii</i>				
Figura 20 – Fracionamento do extrato EtOH das folhas e caules (verão) da <i>A. blanchetti</i>				22 4
.....				
Figura 21 - Fracionamento do extrato EtOH das raízes (verão) da <i>blanchetti</i>				A.
Figura 22 - Fracionamento do extrato EtOH das flores (outono) da <i>blanchetti</i>				A.
Figura 23 – Fracionamento do extrato EtOH das folhas e caules (verão) da <i>schottii</i>				A.
Figura 24 - Fracionamento do extrato MeOH das raízes (outono) da <i>schottii</i>				A.
Figura 25 –Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1).....				
Figura 26 – Placas de microtitulação utilizadas para avaliar a inibição de efeito citotático.....				
Figura 27 – Ensaio colorimétrico do MTT e leitura em ELISA.....				
Figura 28 – Mecanismo do MTT.....				
Figura 29 – Vírus da raiva.....				
Figura 30 - Espectro de IV da mistura (KBr) AE.....				53-63
Figura 31 – Espectro de RMN ¹ H da mistura 53-63H.....				
Figura 32 - Espectro de IV(KBr) do composto AE.....				59-73
Figura 33 - Espectro de RMN ¹ H do composto AE.....				59-73
Figura 34 - Espectro de RMN ¹³ C do composto AE.....				59-73
Figura 35 - Espectro de RMN ¹ H do composto 37(9) AE.....				
Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H do composto AE.....				25-33
Figura 37 - Espectro de RMN ¹³ C do composto AE.....				25-33
Figura 38 – Espectro RMN ¹ H do composto AE.....				41(9)
Figura 39 - Espectro de IV do composto AE.....				10B 30-76
Figura 40 - Espectro de RMN ¹ H do composto AE.....				10B 30-76

Figura 41 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 10B	30- 17
76.....	
Figura 42 - Espectro de IV do composto 10E	165-
203.....	
Figura 43 - Espectro de RMN ¹ H do composto 10E	165- 18
203.....	
Figura 44 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 10E	165-
203.....	
Figura 45 - Espectro de RMN ¹ H do composto FG	12 32
AE.....	
Figura 46 - Espectro de RMN ¹³ C do composto FG	
12AE.....	45
Figura 47 - Espectro de IV do composto 15H	53-
70.....	
Figura 48 - Espectro de RMN ¹ H do composto 15H	53- 79
70.....	
Figura 49 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 15H	53-
70.....	11
Figura 50 - Espectro de IV do composto	24- 9
37.....	
Figura 51 - Espectro de RMN ¹ H do composto	24-
37.....	
Figura 52 - Espectro de RMN ¹³ C do composto	24-37 14
.....	2
Figura 53 - Espectro de IV do composto	AE
89.....	
Figura 54 - Espectro de RMN ¹ H do composto	AE 14
89.....	4
Figura 55 - Espectro de RMN ¹³ C do composto	AE
89.....	
Figura 56 - Espectro de RMN ¹ H do composto	ASR 44- 14
48.....	6
Figura 57 - Espectro de RMN ¹ H composto	21-22
.....	
Figura 58 - Espectro de RMN ¹ H do composto	ASR 28-
30.....	14
Figura 59 -Curvas de crescimento do <i>Fusobacterium nucleatum ss</i>	7
<i>nucleatum</i> monitorados em densidade ótica = 630 nm	
e expostos a diferentes concentrações de extrato bruto de	
flores de	A. 15
<i>blanchetti</i>	8
Figura 60 - Atividade antiviral dos extratos e frações da <i>A. blanchetti</i>	
e <i>A. schottii</i> contra o Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-	
1).....	16
Figura 61 - Efeito tripanocida de diferentes frações de <i>A. schottii</i> contra	5
formas	
epimastigotas de <i>T.cruzi</i> cepa Y	
Figura 62 - Efeitos dos extratos etanólicos de raízes, folhas e caules	
da <i>A. blanchetti</i> em células endoteliais do cordão umbilical	
(HUVEC), medula óssea (BMEC) e na linhagem de células	17

leucêmicas K562 em cultura avaliado com uso do reagente	4
MTS.....	
Figura 63 - Efeitos dos extratos etanólicos de raízes, folhas e caules da <i>A. schottii</i> em células endoteliais do cordão umbilical (HUVEC) , medula óssea (BMEC) e na linhagem de células leucêmicas K562 em cultura avaliado com uso do reagente	18
MTS.....	2
Figura 64 - Efeitos dos compostos isolados (plumierídeo, canferol, isoquercitrina e ácido-p-OH-cinâmico) <i>A. schottii</i> na linhagem de células leucêmicas K562 em cultura avaliado com uso do reagente	18
MTS.....	6
	8

18
9

19
0

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	19
Gráfico 1 – Tipos de câncer mais incidentes ate 2002 para população brasileira	1
Gráfico 2 - Atividade antiparasitária da <i>A. blanchetti</i> contra o <i>Menopon galinae</i>	19
Gráfico 3 - Atividade antiparasitária da <i>A. schottii</i> contra o <i>Menopon galinae</i>	7
	20
	3
	21
	2
	21
	2
	21
	6

	21 8
	21 9
	22 0
	22 7
ÍNDICE DE TABELAS	22 8
Tabela 1 – Alguns medicamentos de uso clínico obtidos a partir de espécies vegetais	22 9
.....	23 1
Tabela 2 – Nutraceuticos mais vendidos nos EUA.....	
Tabela 3 – Valores comerciais de alguns fármacos de origem vegetal.....	24 0
Tabela 4 – Projeção de alguns dos mais importantes vendidos mundialmente até o ano de 2002, cujos grupos estruturais são derivados de espécies medicinais.....	24 1
Tabela 5 – Normatização para medicamentos fitoterápicos de acordo com a RDC 48.....	
Tabela 6 – Exemplos de reações químicas de caracterização de constituintes vegetais.....	

Tabela 7 – Espécies de *Allamanda* estudadas quimicamente e seus compostos isolados de seus respectivos órgãos.....

Tabela 8 – Formas farmacêuticas de *A. blanchetti* e *A. schottii* e tipos de tratamento utilizados no combate a pediculose de aves.....

Tabela 9 – Ensaio fitoquímico comparativo por CCD entre *A. cathartica*, *A. blanchetti* e *A. schottii* (raiz, caule, folha, flor).....

Tabela 10 – Rendimento dos extratos brutos obtidos a partir de órgãos secos de

A. blanchetti.....

Tabela 11- Frações obtidas a partir dos extratos brutos de *A. blanchetti* (fase adulta).....

Tabela 12 – Ensaio fitoquímico por CCD entre *A. blanchetti* adulta e jovem (raiz, caule, folha e flor).....

Tabela 13 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) ^1H e ^{13}C para o composto 59-73 AE e dados da literatura para o canferol.....

Tabela 14 - Valores de deslocamentos químicos (ppm) ^1H e ^{13}C para o composto 25-33 AE e dados da literatura para o canferol -3-0- β -ramnosídeo

Tabela 15 - Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H ^{13}C para o composto 10B 30-76 e dados da literatura para a plumericina

Tabela 16 - Deslocamentos químicos (ppm) ^1H para o composto FG 12 AE e dados da literatura para a eudesmina

Tabela 17 - Deslocamentos químicos (ppm) ^1H e ^{13}C para o composto 25-33 AE e dados da literatura para a eudesmina

.....

Tabela 18 - Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H ^{13}C para o composto 15H-53-70 e dados da literatura para o ácido ursólico

Tabela 19 – Rendimentos obtidos de diversas técnicas extrativas de folhas *in*

natura de *A. blanchetti*

.....

Tabela 20 - Rendimentos dos extratos brutos a partir de órgãos secos de *A.*

schottii

.....

Tabela 21 - Rendimentos das frações obtidas a partir de extrato bruto dos caules

folhas de *A. schottii*

.....

Tabela 22 – Dados de para RMN ^1H e ^{13}C para o composto 24-37 e dados da literatura para a escopoletina.....

Tabela 23 - Deslocamentos químicos (ppm) ^1H e ^{13}C para o composto AE 89 e dados da literatura para o plumierídeo

.....

Tabela 24- Rendimentos obtidos em diversas técnicas extrativas a partir de folhas *in natura* de *A. schottii*.....

Tabela 25- Rendimentos obtidos em diversas técnicas extrativas a partir de de folhas desidratadas de *A. schottii*.....

Tabela 26 - **Identificação (ATCC) e sensibilidade dos microrganismos ao extrato**

de *A. blanchetti* (flores-outono) nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 ug/mL.....

Tabela 27 - Média de inibição (mm) do “screening” de extratos e frações *A. blanchetti* e

A. schottii, em meio sólido.....

Tabela 28 - Média dos halos de inibição (mm) da CIM dos extratos

brutos da raiz e do
caule de *A. schottii*, em meio
sólido.....

Tabela 29 - Média dos halos de inibição (mm) da CIM dos extratos
brutos da raiz
e do caule de *A. schottii*, em meio
sólido.....

Tabela 30 - Resultados dos índices de seletividade dos extratos testados
para raiva (cepa
PV) em células
McCoy.....

Tabela 31 - Diminuição das formas promastigotas de *L. amazonensis*
frente à fração
DCM de *A.*
schottii.....

Tabela 32 - Diminuição das formas promastigotas de *L. amazonensis*
frente à fração
DCM de *A.*
schottii.....

Tabela 33 – Frações de *A. schottii* frente à formas promastigotas
de *L.*
chagasi.....

Tabela 34 – Percentual de rendimento de cada fração da *A. schottii*, nas
diversas estações do ano de 2004
.....

Tabela 35– Percentual de rendimento de cada fração da *A. schottii*, nas
diversas estações do ano de 2003
.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – acetato de etila

Al₂O₃ – alumina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Anti-PAF – Anti fator de agregação plaquetária

AR – Argentina

ANOVA- Análise de Variância

BMEC- Células endoteliais de medula espinhal

BuOH - butanol

CC – Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CLAE (HPLC) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG – Cromatografia gasosa

CHCl₃ – clorofórmio

CIM (MIC) – Concentração Inibitória Mínima

CIPOI – Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância

CP – Coluna Preparativa

d- duplete

DCM - diclorometano

DMSO – dimetil sulfóxido

ETOH - etanol

ESCOP – Cooperativa Científica Européia de Especialistas

FDA – Food Drug Administration

GC /MS - espectrofotômetro de massa acoplado a cromatografia gasosa

HEX - Hexano

HIV - Imuno Deficiência Adquirida

HUVEC - ANOVA- Análise de Variância

BMEC- Células endoteliais de medula espinhal

KB- Célula Cancerígena

K562- Células de Linhagem leucêmica

KBr – Brometo de potássio

KOH – hidróxido de potássio

IV – Infra Vermelho

m- multiplete

MeOH - metanol

MHz – mega hertz

mL - mililitro

NIQFAR – Núcleo de Investigações Químico- Farmacêutica

Nm - nanômetro

OMS (WHO) – Organização Mundial de Saúde

P.A. Princípio Ativo

pH – Potencial de hidrogênio

ppm – partes por milhão

RDC – Resolução Deliberativa

Rf – fator de retenção

RMN ¹³ C- Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN ¹ H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

SiO₂ – sílica

SNC – Sistema Nervoso Central

SPME – Micro extração em fase sólida

μg - micrograma

μm - micrón

μL – microlitro

t - tripleto

UNICAMP – Universidade de Campinas

TMS – tetra metil silano

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – ultra violeta

USA (EUA) – Estados Unidos da América

v - deformação axial

φ - diâmetro interno

δ - deformação angular

% - porcentagem

< - menor

> - maior

δ- Deslocamento Químico em ppm

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Em paralelo à súbita explosão de descobertas científicas e tecnológicas, a história das plantas como medicamentos, continuou desenvolvendo-se discreta, independente e de forma revitalizada, constituindo-se ao longo dos séculos o grande suporte terapêutico para o homem.^{1, 2, 3} Pode-se, então, afirmar que a utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a história do próprio homem.⁴

A História relata o uso de plantas medicinais desde a Antiguidade, com o uso da beladona, ópio, ginseng, acônito, quina, alho, sene, cânfora, entre outras, sendo que as primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este documento, encontrado perto da pirâmide de Ramsés II, descreve 700 receitas utilizando-se drogas de natureza animal e vegetal⁵. Documentos sumerianos já descreviam as propriedades da papoula.⁶

Há 5000 anos já era usada, na China, uma planta conhecida como *Ma Huang*, uma espécie de éfedra. Hoje, a efedrina (**3**), obtida a partir da *Ephedra sinica*, é consagrada pela sua ação antiasmática, hipotensiva e anti-hemorrágica.^{4, 7}

O grande desafio do último século tem sido desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial clínico. Nesta escalada ascendente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera, por ora, 252 medicamentos essenciais e básicos à saúde humana, sendo que 11% são viabilizados a partir de espécies vegetais, ditas medicinais. Entre 529

medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), órgão que regulamenta os medicamentos, 39% são obtidos a partir de produtos naturais.^{4,8,9}

Ainda que a biologia molecular, fármacos obtidos por modelos computacionais e avanços na pesquisa de genomas ofereçam alternativas viáveis à produção de novos medicamentos, as espécies vegetais constituem uma estratégia para a inovação farmacêutica e competitividade do setor, tendo em vista a singularidade estrutural dessas substâncias, efetividade terapêutica e expectativas de patenteabilidade devido a parcerias científicas entre a indústria farmacêutica e instituições de ensino e pesquisa¹⁰. Estudos exaustivos ao longo dos anos, em áreas multidisciplinares, viabilizaram o isolamento de inúmeras moléculas bioativas, hoje utilizadas com efetividade na clínica convencional, como alguns exemplos mostrados na tabela 1.

Num outro contexto, a tendência crescente por dietas suplementares obtidas a partir de plantas medicinais, impulsiona atualmente a uma demanda maior por nutracêuticos, uma vez que, a padronização e eficácia de novos produtos foram introduzidas. Apesar de óticas polêmicas quanto a controle de qualidade, validações clínicas e as regulamentações diferenciadas impostas pelo FDA, os suplementos de origem vegetal possuem um grande número de simpatizantes, sendo os de maior demanda nos USA indicados na tabela 2.⁸

Tabela 1 – Alguns Medicamentos de uso clínico obtido a partir de espécies vegetais. ¹¹

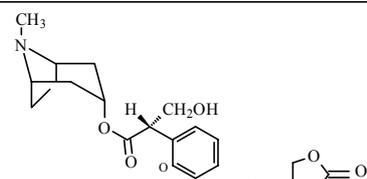
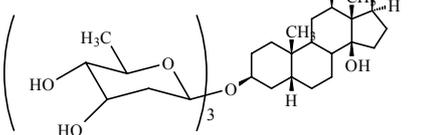
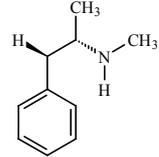
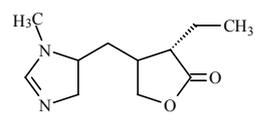
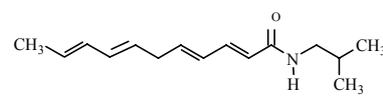
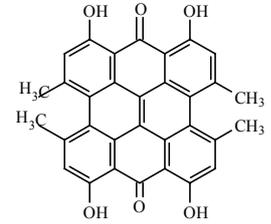
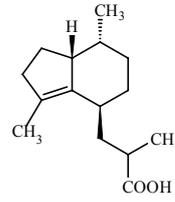
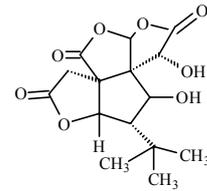
Planta	Atividade Terapêutica	Princípio Ativo	Estrutura Química
<i>Atropa belladonna</i>	Antiespasmódica	Atropina (1)	
<i>Digitalis lanata</i>	Disritmias cardíacas Cardiotônica	Digoxina (2)	
<i>Ephedra sinica</i>	Asma e febre do feno	Efedrina (3)	
<i>Pilocarpus Jaborandi</i>	Tratamento de glaucoma	Pilocarpina (4)	
<i>Echinacea angustifolia</i>	Imunestimulante Antiinflamatória	Amida alifática (5)	
<i>Hypericum perforatum</i>	Antidepressiva Inibição da monoamina oxidase	Hipericina (6)	
<i>Valeriana officinalis</i>	Ansiolítica, tranquilizante indução do sono	Ácido valerênico (7)	
<i>Ginkgo biloba</i>	Vaso dilatador periférico Antioxidante	Bilobalideo (8)	

Tabela 2 - Nutracêuticos mais vendidos nos EUA.⁸



***Panax ginseng*, L.A**

Mey (ginseng)

1. raízes
2. Fadiga e estress, colesterol, diabetes desordens gastro – intestinais
3. ginsenosides, panaxans, sesquiterpenos

Serenoa repens

Small (saw palmetto)

- fruto
- Hiperplasia benigna de próstata
- β sitosterol isoquercitina kaempferol

***Allium sativa* L.**

alho

- bulbo
- hipertensão, diabetes arteriosclerose infecções respiratórias
- aliina, alicina ajoens

***Hydrastis canadensis* L.**

rizoma, raízes

- diarréia, constipação infecção respiratória e gastrointestinal
- hydrastina, berberine canadine



***Silybum foeniculaceum*
Gaertn**

1. Sementes maduras
2. desordens hepáticas problemas de lactação
3. apigenina, dosgenina taxifolina, quercitina

***Tanacetum parthenium*
Schultz**

- erva inteira enxaquecas processos inflamatórios
- lactonas sesquiterpenicas

***Cimicifuga racemosa*
Nutt**

- raízes sintomas da menopausa dismenorréias
- isoflavonas triterpenos glicosilados

-----1=
parte usada

2= indicações comuns- uso

3= grupos químicos presentes

1.2 ALGUMAS PLANTAS MEDICINAIS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

Além das alternativas anteriormente citadas, é muito expressivo o número de medicamentos disponíveis na terapêutica moderna desenvolvidos a partir de plantas medicinais, como por exemplo: a escopolamina (sedativo), quinina (antimalárico), eugenol (analgésico tópico), cafeína (estimulante do sistema nervoso central)¹¹, azadiraquitina (fagorepelente), morfina (analgésico)⁶, reserpina (tranquilizante)³ entre outros.

O leque de abrangência de patologias que podem ser tratadas com espécies vegetais é surpreendente quando estatisticamente comprovadas. Entre os efeitos mais significantes para doenças do nosso século, destaca-se a cumarina (+) Canolideo A (*Callophylum teysannii*), o qual têm mostrado ser agente efetivo contra o vírus HIV-1, inclusive aquele resistente ao AZT e outros nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa. É considerado de grande importância para o tratamento da AIDS.¹²

A forskolina, um diterpeno encontrado na planta indiana *Coleus forskolii*, demonstrou inicialmente atividade hipotensora e cardiotônica. No entanto, o derivado semi-sintético, a colforsina dapronato mostrou maior potencial hemodinâmico em doenças cardíacas e processos asmáticos, aumentando a expectativa de cura a pacientes portadores de tais enfermidades.¹³

Também, foi significativa a ação do psoralem (81), uma cumarina isolada da *Psorelea corylifolia* com emprego no vitiligo, enfermidade que até bem pouco tempo não havia tratamentos que oportunizassem melhoras significativas.¹⁴

Ainda, a erradicação de processos dolorosos, talvez o maior desafio de todos os tempos, foi subsidiado por muito tempo em hipnoanalgésicos como a morfina e codeína, ambos extraídos da papoula, porém alcalóides considerados de grande dependência química. No entanto, pesquisadores australianos descobriram a top1, uma variação normal da *Papaver somniferum* (papoula) que através de outros alcalóides, a tebaína e a oripavina, possibilitou a

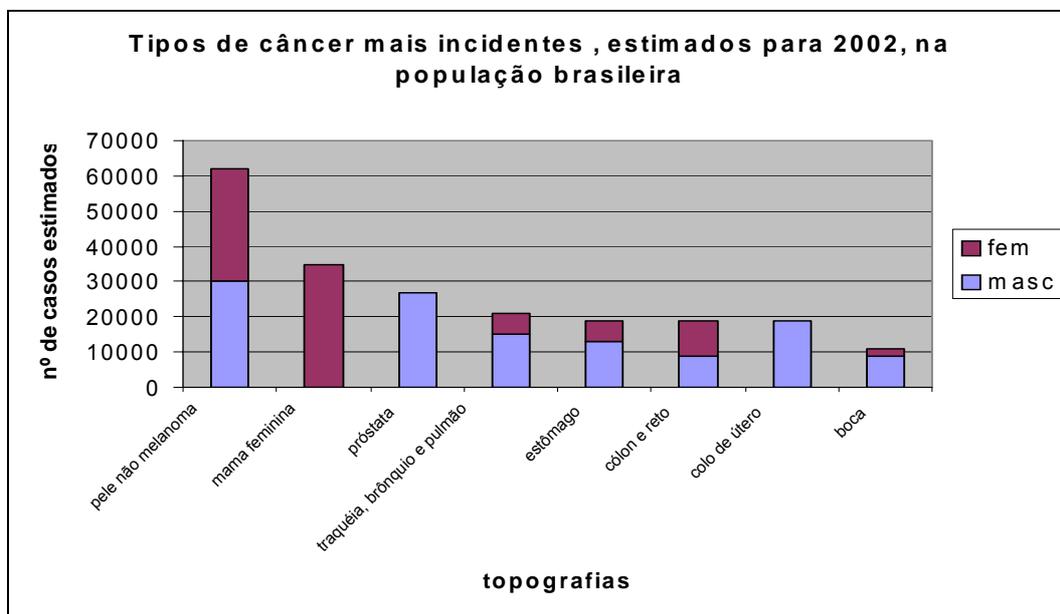
produção de analgésicos que não contenham em sua resina opiácea, a morfina, composto bioativo que vicia .¹⁵

1.3 FITOFÁRMACOS COM POTENCIAL ANTITUMORAL

Inúmeras espécies vegetais têm evidenciado propriedades terapêuticas em diversos tipos de tumores, como será constatado durante esta revisão da literatura. Os resultados positivos encontrados nos levam a reflexão de novas e possíveis perspectivas com plantas medicinais pouco estudadas.

Dados estatísticos da OMS (Organização Mundial de Saúde), apontam o câncer como sendo a 3^a causa de óbitos do mundo, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano.

Gráfico 1 – Tipos de câncer mais incidentes ate 2002 para população brasileira



No Brasil, é a 2^a causa de mortes e as estimativas registraram em 2002, cerca de 337.535 casos novos e 122.600 óbitos. ¹⁶ O gráfico acima demonstra as estimativas por topografias e por sexo de câncer mais incidentes no Brasil em 2002.

A erradicação de processos tumorais constitui um dos grandes desafios da medicina contemporânea, e hoje resultados animadores estão sendo efetivados em diversas espécies vegetais, motivo que leva muitos pesquisadores a este tipo de investigação. ^{6, 16, 17}

O câncer é uma doença caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular¹⁸. As alterações que geram as neoplasias (terminologia atual do câncer) podem ocorrer em genes especiais denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignidade de células normais, que ao se diferenciarem nos tecidos onde se encontram originam células patológicas, chamadas de cancerígenas. ¹⁶

Os tipos convencionais de tratamento para neoplasias são: os processos cirúrgicos, a radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X e até prótons e mésons pi negativos) e quimioterapia, através de muitos medicamentos não seletivos causadores de inúmeros efeitos colaterais. ¹⁹

Mais recentemente têm-se usado a fotorradiação, que permite a destruição com maior seletividade pelo uso de radiação específica com fluorescência (λ de 620-640 nm), que, no entanto, é restrita a tumores superficiais. ²⁰

Um outro tratamento antineoplásico utilizado atualmente é o estímulo das próprias defesas do organismo, através da imunoterapia com o interferon α , interleucina-2 e BCG (*Bacillus Calmette Guerin*), cuja ação, no entanto, se limita somente a células cancerosas residuais resultantes de cirurgias ou outros tratamentos. ²¹

A maioria dos tratamentos citados ou fármacos antineoplásicos atuam de forma não específica ou causam acentuada toxicidade ao paciente.^{22,7}

De 1981 a 2002, são relatados na literatura, 79 novos medicamentos com atividade antitumoral, sendo que 9 destes medicamentos são de origem natural e 21 deles foram obtidos de forma semisintética, utilizando-se produtos naturais como protótipos.²³

Neste contexto, as plantas continuam sendo importantes no descobrimento de novos fármacos bem como fornecedoras de princípios bioativos ou medicamentos semi-sintéticos ou sintéticos baseados em compostos secundários de plantas.^{16, 11}

Existem diversos mecanismos que envolvem a proliferação e inibição de processos tumorais, no entanto, segundo uma classificação usual, a presença de alguns grupos químicos obtidos a partir de espécies vegetais, coloca as plantas medicinais em evidência, num contexto importante dentro da classificação de agentes antineoplásicos, como pode ser observado na figura 1.²⁴

Um dos maiores impactos no tratamento de processos tumorais, deve-se ao taxol **(9)**, um diterpenóide taxano derivado de *Taxus brevifolia* (teixo ocidental) e *Taxus baccata* (teixo europeu) registrado nos EUA para tratamento de câncer ovariano e comercialmente conhecido como Paclixatel®.²⁵

São muitos os mecanismos, pelos quais atuam os diversos antineoplásicos existentes na clínica convencional, como são mostrados na figura 1. Os alcalóides e taxóis, extraídos de muitas espécies vegetais, ao inibir a polimerização do microtúbulos celulares, proporcionam atividade anticancerígena e se instalam como um prisma a mais na busca da erradicação deste tipo de enfermidade.

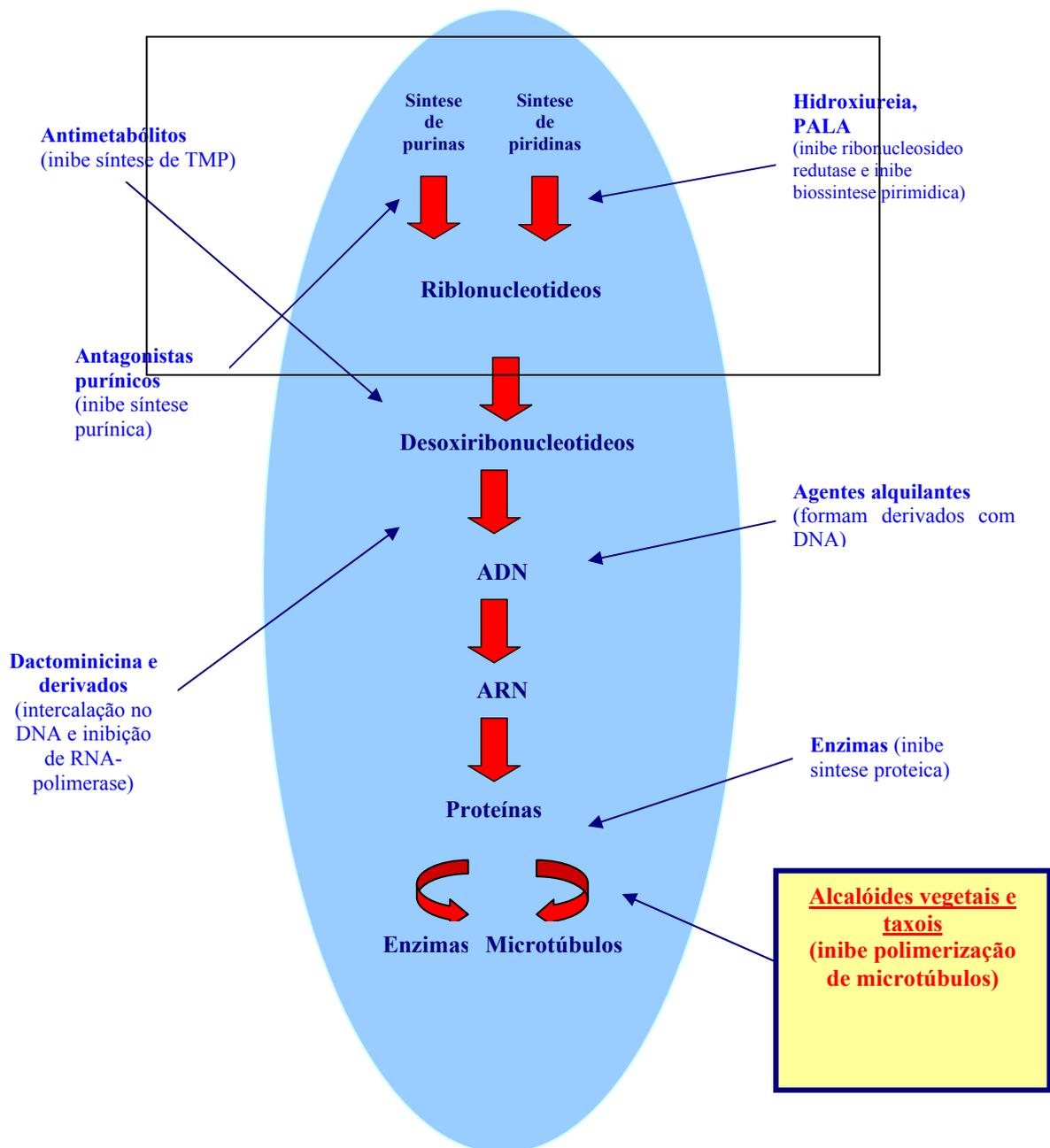
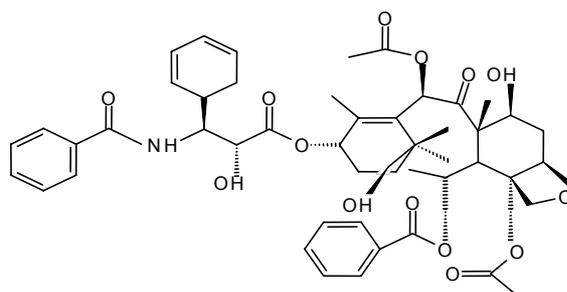


Figura 1. Classificação de agentes antineoplásicos e seus mecanismos de ação¹⁶

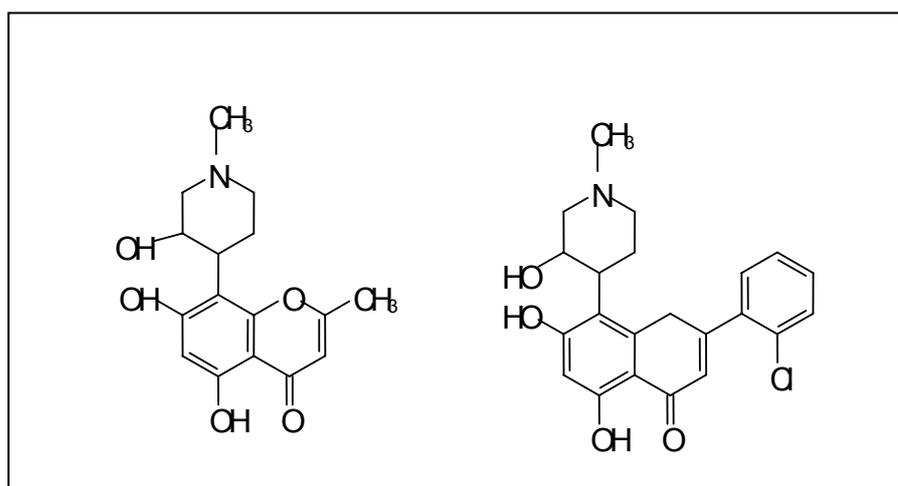


Taxol (9)

O etoposídeo (VP-16) e teniposida (VN-26), compostos semi-sintéticos derivados da podofilotoxina, obtidos da raiz da *Podophyllum* sp, tem ação reconhecida no tratamento de carcinomas testiculares, carcinomas pulmonares e leucemias não-linfocíticas.¹¹ Estes fitoconstituintes agem pelo bloqueio e inibição da enzima topoisomerase II, o que promove lesão do DNA.^{19, 24}

Na família Meliaceae, duas espécies já contribuíram de forma significativa em ensaios antitumorais, com o isolamento dos composto flavopiridol (*Dysoxylum binectafereum*) (10) e rohtukine (11) (*Amoora rohituka*), onde ambos provocaram a inibição do crescimento de células tumorais em carcinomas de mamas, próstata e células hematopoiéticas neoplásicas.

26,11



flavopiridol (10)

rohtukine (11)

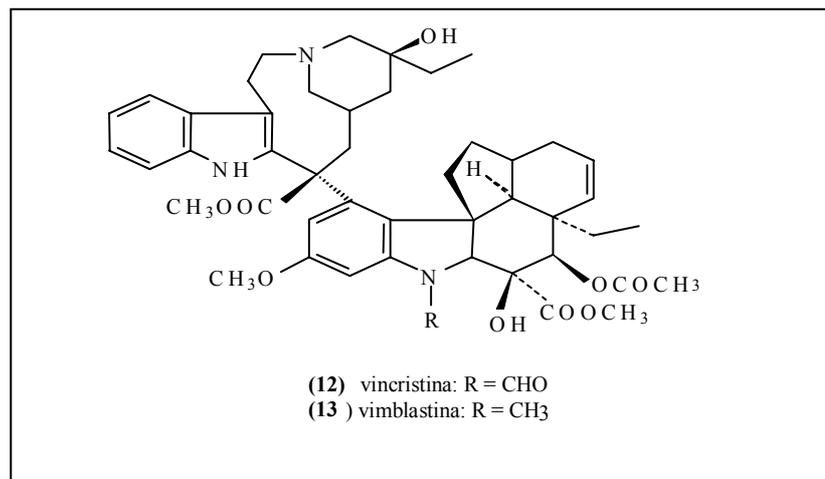
Recentemente, foi registrado nos EUA, um medicamento (a nabilona) derivado do tetrahidrocanabinol (princípio ativo da *Cannabis sativa*) para tratamento de náuseas associadas ao tratamento quimioterápico de câncer.²⁵

O ácido elágico e tocoferóis também têm sido avaliados como protótipos de agentes anti-mutagênicos e preventivos de tumores.²⁷

Estudos comprovaram que o alcalóide fagaronine (*Fagara zanthoxyloides*) demonstrou significativa atividade antileucêmica na leucemia linfocítica P-388 e leucemia linfocítica L-1210^{28, 29}, a campotecina (*Camptotheca acuminata*) provocou inibição da enzima topoisomerase I, com ação citotóxica em tumores de mama³⁰, o sesquiterpeno 7-hidróxi-3,4-diidro-cadalina (*Heterotheca inuloides*) apresentou ação citotóxica contra várias linhagens de tumores sólidos e em 350 casos investigados, o uso de *Allium sativum* provocou inibição do desenvolvimento de carcinomas mamários.²⁹

A biodiversidade brasileira contribui em pesquisa de processos antineoplásicos, com a espécie *Tabebuia cassinoides*, de onde foram isolados pela primeira vez naftoquinonas ativas contra a leucemia linfocítica P-388.³¹

A partir de uma pequena planta conhecida como vinca, a *Cantharantus roseus* G. Don foram isolados os alcalóides vincristina (**12**) e vimblastina (**13**), sendo a vincristina (**12**), parte importante do esquema terapêutico para remissão de leucemias linfocíticas agudas em adultos e crianças, carcinomas de mama, ovário, cérvix, leucemia linfoblástica e mielocítica, mieloma e mielomonocítia.¹⁶



A vimblastina **(13)** é utilizada no tratamento de neuroblastoma, câncer de testículo, bexiga, pulmão e linfoma de Hodgkins, com atividade antitumoral similar a vincristina **(12)** ^{16, 25, 32}. Também, a efetividade da quimioterapia tem melhorado de forma expressiva em alguns tipos de tumores quando se utilizou a vincristina **(12)** e vimblastina **(13)**. ²⁵

Da família Apocynaceae, inúmeros compostos têm apresentado resultados promissores em diversos testes laboratoriais anticancerígenos como, por exemplo, a allamandina **(24)**, um iridóide lipofílico isolado da espécie *Allamanda cathartica*, quando testado como inibidor tumoral, apresentou significativa atividade *in vivo* contra leucemia P-388 em ratos e *in vitro* contra células derivadas do carcinoma humano do nasofaríngeal (KB) ^{33, 34}, fato este que nos motivou a investigações nesta área com outras espécies do gênero *Allamanda*, como será mostrado na sequência do trabalho.

Os dados acima apresentados demonstram que existe uma ampla utilização clínica de agentes antineoplásicos oriundos de espécies vegetais, o que comprova a enorme importância desta classe de fitofármacos e corrobora o grande interesse acadêmico e tecnológico no desenvolvimento de novos análogos mais efetivos e menos tóxicos. ¹⁶

1.4 POTENCIAL LEISHMANICIDA DE ALGUMAS ESPÉCIES VEGETAIS

Rastrear espécies vegetais biologicamente ativas contra leishmaniose tem sido um dos grandes propósitos de determinados grupos de pesquisa em todo mundo. As leishmanioses são consideradas doenças endêmicas em 88 países e 4 continentes e são incluídas pela OMS entre as 6 principais doenças tropicais do mundo. A prevalência mundial é estimada em 12 milhões de indivíduos infectados e 350 milhões expostos ao risco de adquirirem a doença ³⁵. No Brasil, as leishmanioses ocorrem em quase todos os estados. O Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35 000 novos casos de leishmaniose tegumentar e 4 000 de leishmaniose visceral. ³⁶

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares, digenéticos que apresentam 2 formas morfológicas : promastigotas, encontradas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e outra forma, a amastigota, representada por parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados. ³⁷

1.4.1 Formas clínicas de leishmanioses

Dependendo da espécie do parasita e do estado imunológico do hospedeiro, as formas amastigotas de *Leishmania* podem resultar em diferentes formas clínicas, que podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar e visceral. ³⁸

O ciclo do parasita no hospedeiro vertebrado começa quando o inseto vetor exercer novamente o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado (o homem ou outro reservatório), inoculando as formas promastigotas presente no trato digestivo anterior, probóscida, faringe e esôfago. No local onde ocorreu a picada do inseto, as formas

promastigotas injetadas são fagocitadas principalmente pelos macrófagos teciduais. Dentro dos macrófagos, as formas promastigotas se transformam rapidamente em amastigotas, adaptando-se às novas condições fisiológicas e resistindo a ação destruidora dos lisossomos, e multiplicando-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. Esgotando-se a resistência, a membrana do macrófago se rompe liberando as amastigotas, sendo novamente fagocitadas, iniciando no local uma reação inflamatória.^{39, 40}

A leishmaniose tegumentar americana pode ser agrupada em três formas clínicas básicas: I-) leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por uma infecção confinada na derme, com formação de úlceras únicas ou múltiplas, com a epiderme ulcerada, sendo causadas normalmente pelas espécies *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. guyanenses* e *L. laisoni*; II-) leishmaniose mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões na derme com úlceras, podendo ocorrer lesões metastáticas com invasão de mucosas e da cartilagem, sendo causada pelas espécies *L. brasiliensis* e *L. guyanensis*; e III-) leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada por uma infecção confinada na derme, formando nódulos não ulcerados, tendo disseminação por todo corpo, sendo causada pela espécie *L. amazonensis*.

A leishmaniose tegumentar no velho mundo apresenta três agentes etiológicos principais: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, e *L. (L.) aethiopica*, e é caracterizada por lesões ulceradas sejam crônicas ou simples podendo evoluir a LCD no caso de *L. (L.) aethiopica*.⁴¹

A leishmaniose visceral (LV) popularmente conhecida como “calazar” é causada por parasitas pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* o qual apresenta três agentes etiológicos principais, a *Leishmania donovani*, a *Leishmania infantum* e a *Leishmania chagasi*. Esta doença acomete as vísceras do hospedeiro, e os órgãos mais ricos em células do SMF são mais densamente afetados, tais como a medula óssea, baço, fígado e linfonodos, embora macrófagos infectados ocasionais possam ser encontrados em todos os tecidos incluindo o sangue, pele, pulmões, rins, testículos, meninges e outros.⁴¹

1.4.2 Fármacos utilizados no tratamento

As drogas mais utilizadas no tratamento das leishmanioses são representadas pelos antimônios pentavalentes: antimônio de meglumina (glucantime) e o estibogluconato de sódio (pentostan), sendo que o mais utilizado no Brasil é o glucantime. São fármacos muito tóxicos e muitos pacientes não respondem bem a estes tratamentos, porém continuam sendo usados em muitos países.³⁸

Outro medicamento usado é a anfotericina B, que por ser um antiparasítico muito potente é nefrotóxico e apresenta muitos efeitos colaterais, requer internação hospitalar do paciente na maioria das vezes, a fim de se administrar o medicamento.⁴²

No Brasil, o Ministério da saúde registrou 14 mortes causadas pelo uso de antimoniais em 2000 e o número aumentou para 17 em 2001.⁴³

1.4.3 Espécies vegetais com atividade anti-leishmania

Moléculas bioativas obtidas de algumas espécies vegetais estão sendo usadas em muitos países para amenizar esta doença⁴⁴. Popularmente muitas receitas caseiras são utilizadas no Brasil. Existem relatos no Estado da Bahia, onde já foram identificadas 49 plantas sendo utilizadas no tratamento de lesões cutâneas causadas por *Leishmania*. Entre elas, as fibras da casca do côco (*Cocos nucifera*) apresentaram atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Nesses ensaios, macrófagos infectados demonstraram uma redução de 44% na carga parasitária e um aumento de 182% na produção de ácido nítrico, agente responsável pela morte intracelular de amastigotas.⁴⁵

1.5 PLANTAS MEDICINAIS: UM MERCADO PROMISSOR

Dados recentes comprovam que os fitomedicamentos, num panorama mundial, são responsáveis por 6% do faturamento de todo segmento de medicamentos.¹²

Segundo a OMS esta realidade ocorre ao fato de que, 85% da população mundial (aproximadamente 5,5 bilhões de pessoas) utilizam-se de plantas medicinais para tratamento de enfermidades básicas⁴⁶, e por este motivo nas últimas décadas, têm-se observado um aumento expressivo no mercado dos medicamentos fitoterápicos em todo o mundo, especialmente nos países industrializados.^{47, 48, 49}

Segundo estimativa feita pela PhytoPharm Consulting, em Berlim, até o ano de 2007, os medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais devem movimentar cerca de US\$ 47 bilhões anualmente. Ainda de acordo com esta estimativa, acredita-se que os EUA podem vir a se tornar o maior mercado de medicamentos fitoterápicos do mundo, sendo responsáveis por uma participação de US\$ 20 bilhões. Em segundo lugar viria a Europa com US\$ 14 bilhões, em terceiro a Ásia com US\$ 10 bilhões, enquanto os demais países, incluindo o Brasil, seriam responsáveis pelo restante.⁵⁰

O investimento das indústrias e setores governamentais em pesquisa, com o objetivo de validação de novos fitomedicamentos se amplia a atuação deste setor no mercado¹². Como exemplo disto, o Aché Laboratórios investe R\$ 7 milhões por ano desde 2003 em pesquisa e desenvolvimento de novos fitoterápicos. Em 2004, a empresa adquiriu a Asta Médica e adicionou ao seu portfólio, dois medicamentos à base de plantas: um fitomedicamento para descompensações cérebro-vasculares (Dinaton)[®] e outro para afecções de pele e dermatites (Kamillosan)[®]. Um outro fitomedicamento desenvolvido pela Aché para tratar sintomas da

pós-menopausa (Soyfemme)[®], que utiliza fitohormônios como compostos bioativos faturou R\$ 670 milhões em 2004 e com projeção de 800 milhões para o ano de 2005. ¹²

Entre as várias razões que proporcionam o rápido crescimento do mercado internacional e o interesse da população pelos medicamentos fitoterápicos, pode ser mencionada a preferência dos consumidores por terapias naturais; a preocupação em relação aos efeitos colaterais observados com os medicamentos sintéticos; crença errônea de que os medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais; a tendência da população em acreditar que os medicamentos fitoterápicos podem ser efetivos nos tratamentos de doenças quando os medicamentos sintéticos têm falhado; a tendência para a automedicação; a existência de estudos científicos para alguns produtos fitoterápicos comprovando sua eficácia clínica, segurança e menor custo. ⁵⁰

Se por um lado, existe a busca da população por medicamentos naturais devido aos enfoques acima citados, existe também uma tendência do mercado farmacêutico em intensificar o isolamento de substância bioativas, uma vez que, seus valores comerciais são altamente significativos e rentáveis, onde os alcalóides da vinca, espantosamente, podem custar até 20 mil dólares o grama, como podemos observar na tabela 3. ⁴

Tabela 3 – Valores comerciais de alguns fármacos de origem vegetal

FÁRMACO	US
Codeína	650 / Kg
Morfina	1 250 / Kg
Ésteres fórbico	2 000 / g
Alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina)	5 000 / g 20 000 / g
Taxol	1 250 / ampola

Em consequência da expressiva demanda do mercado mundial de medicamentos fitoterápicos as pesquisas têm validado cientificamente muitas espécies vegetais ^{49, 51}. O

interesse das grandes empresas farmacêuticas por esse mercado certamente irá resultar a curto e médio prazo, em melhoria substancial da qualidade desses produtos, bem como na provável confirmação da eficácia clínica e da segurança dos mesmos, pelo fato delas possuírem larga experiência no desenvolvimento de medicamentos, sobretudo, por possuírem recursos para custear esses estudos⁵⁰. A tabela 4 mostra a ascendência da demanda mundial de compostos bioativos derivados de espécies vegetais.

Tabela 4 - Projeção de alguns dos mais importantes medicamentos vendidos mundialmente até o ano de 2002, cujos grupos estruturais são derivados de espécies medicinais.⁸

Nome	Tipo	Origem	Uso Terapêutico
Alcalóides - vendas em 2002 - US\$ 4 045 milhões			
Atropina, hisciamina e Escopolamina	Alcalóides tropânicos	<i>Solanaceus</i> spp	Anticolinérgico
Campotecina	alcalóides indólicos	<i>Camptotheca acuminata</i>	Antineoplásico
Capsaicina	alcalóide fenilalquil-amina	<i>Capsicum</i> spp.	Analgésico tópico
Codeína, morfina	alcalóides opióides	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico, antitussígeno
Cocaína	alcalóides da coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Anestésico local
Colchicina	alcalóides isoquinólicos	<i>Colchium autumnale</i>	Antireumático
Emetina	alcalóides isoquinólicos	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Antiamoébio
Galantamina	alcalóides isoquinólicos	<i>Leucojum aestivum</i>	Inibidor da colinesterase
Nicotina	alcalóides pirrolidínicos	<i>Nicotiana</i> spp	Terapia de cessação do fumo
Phisostigmina	alcalóides indólicos	<i>Physostigma venenosum</i>	Colinérgico
Pilocarpina	alcalóides imidazólicos	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Colinérgico
Quinina	alcalóides quinólicos	<i>Cinchona</i> spp.	Antimalárico
Quinidina	alcalóides quinólicos	<i>Cinchona</i> spp.	Depressor cardíaco
Reserpina	alcalóides indólicos	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo
Tubocurarina	alcalóides isoquinólicos	<i>Chondodendron tomentosum</i>	Relaxante muscular
Vimblastina, vincristina	alcalóides indólicos	<i>Strychnos toxifera</i>	Antineoplásico
Yohimbina	alcalóides indólicos	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Apocyanaceae</i>	Afrodisíaco
Terpenos e esteróides – vendas em 2002 – US\$ 12 400 milhões			
Artemisina	lactonas sesquiterpênicas	<i>Artemisia annua</i>	Antimalárico
Diosgenina, hecogenina	esteróides	<i>Discorea</i> spp.	Contraceptivo oral
Estigmasterol	diterpenos	<i>Taxus brevifolia</i>	Antineoplásico
Taxol e outros taxóides			
Glicosídeos – vendas em 2002 – US\$ 9 230 milhões			
Digoxina, digitoxina	glicosídeos esteroidais	<i>Digitalis</i> spp.	Cardiotônico
Senosídeos A e B	glicosídeos antracênicos	<i>Cassia angustifolia</i>	Laxativo
Outros e misturas – vendas em 2002 – US\$ 5 014 milhões			
Ipeca	mistura de alcalóides da ipeca e outros compostos	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Emético
Podofilotoxina	lignanas	<i>Podophyllum peltatum</i>	Antineoplásico

1.5.1 Importância das plantas brasileiras

A flora brasileira possui a maior diversidade genética vegetal do planeta e acredita-se que das 250 mil espécies catalogadas em todo mundo, cerca de 120 mil delas ocorrem no Brasil.^{4, 52}

Apesar de não haver estatísticas precisas sobre o mercado brasileiro, estima-se que o mercado brasileiro de fitomedicamentos obteve faturamento estimado em R\$ 400 milhões em 2004 em relação a um valor de R\$ 350 milhões no ano de 2003¹², e a previsão é de US\$ 1 bilhão (anual) para os próximos 10 anos, atribuindo-se a matéria prima-vegetal um percentual de 2 a 5% deste valor, podendo-se considerar que os produtores dessa matéria- prima recebem por ano cerca de 20 a 35 milhões de dólares⁵⁰. No Brasil, o segmento respondeu por 3 a 4% do faturamento anual do setor farmacêutico em 2004.¹²

Um problema grave na comercialização de plantas medicinais no Brasil ou a possibilidade de exportação é a falta de status do material vegetal que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, sendo que por ora, fica uma perspectiva de exportação de plantas medicinais brasileiras *in natura* como matéria-prima básica para países, que já dominam as tecnologias de fabricação e que necessitam de matéria prima-vegetal para produção de medicamentos ou fitocosméticos.⁵³

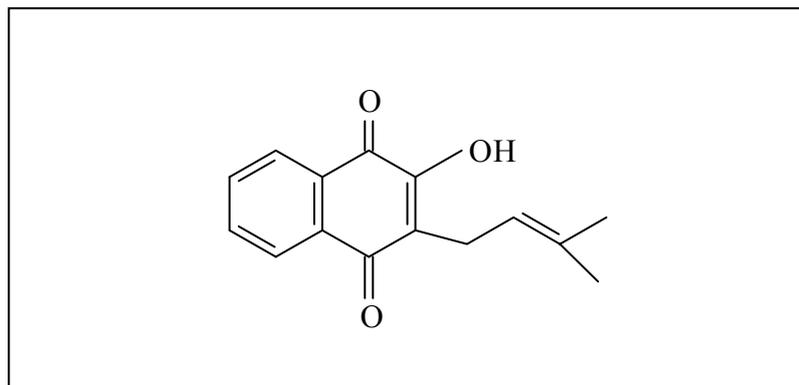
Ainda não existe no setor, a concorrência com medicamentos sintéticos ou genéricos, porque não há no mercado genéricos de fitoterápicos, e os sintéticos, ao invés de disputarem espaço, são complementares aos medicamentos de origem vegetal.¹²

No entanto, o isolamento biomonitorado de constituintes químicos de espécies vegetais brasileiras tem oportunizado expectativas promissoras para a indústria farmacêutica.

Na Amazônia, a espécie *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), popularmente chamada de “sacaca” é muito utilizada em diversas patologias. Estudos fitoquímicos com esta planta levaram a descoberta de novos diterpenos com esqueleto clerodano (desidrocrotonina, *trans* cajucarina B) e isolamento dos já conhecidos *trans*-crotonina, *cis* cajucarina, cajucarinolídeo e o triterpeno ácido acetil aleuritólico⁵⁴. Ensaios farmacológicos sobre o sistema gastrointestinal corroboraram o uso popular desta espécie no tratamento de disfunções gástricas e digestivas, atribuídos ao composto *trans*-desidrocrotonina. Este diterpeno também foi o responsável pela ação antiestrogênica, atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antigenotóxica, avaliadas *in vivo* em diversos modelos experimentais.^{54,55}

Apletora de atividades biológicas já descritas para a *trans*-desidrocrotonina, associada ao extenso uso popular da *C. cajucara*, além de sua relativa abundância na espécie, aponta-se este diterpeno como potencial protótipo para o desenvolvimento de novas drogas.¹⁰

Outras evidências experimentais sobre atividades antitumoral, antimalárica, tripanossomicida e antimicrobiana do lapachol (**14**) e outras prenilnaftoquinonas biogeneticamente relacionadas, motivaram um interesse mundial pelo gênero *Tabebuia*, levando ao reconhecimento de um novo tipo estrutural, as furanonaftoquinonas¹⁰. De outra espécie brasileira, a *Tabebuia cassinoides*, foram isoladas pela primeira vez furanonaftoquinonas, que apresentaram atividade *in vitro* contra leucemia linfocítica P-388 e citotoxicidade para células KB³¹ e efeito tripanossomicida *in vitro* sobre tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*⁵⁶. Do ponto de vista da química medicinal, o lapachol representou um protótipo para a síntese de uma série de 2-hidroxil-3-alkil-1,4-naftoquinonas levando ao desenvolvimento da atovacona que foi introduzida na terapêutica da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, em indivíduos portadores do vírus HIV.⁵⁷



Lapachol (14)

Apesar da biodiversidade brasileira apresentar expectativas animadoras para a química medicinal, a indústria fitofarmacêutica no Brasil não pode ser competitiva a nível nacional ou internacional devido à falta investimentos consistentes para os ensaios de comprovação científica das plantas usadas popularmente. Há falta de uma política definida, permanente e comprometida, e uma ausência de real integração interdisciplinar das diversas áreas do conhecimento.²⁷

Porém, através de parcerias entre laboratórios nacionais, grandes desafios começam a ser vencido e começa a surgir a perspectiva de conquistas no mercado fitoterápico. Um exemplo animador neste contexto é a reativação do laboratório Aché no Brasil, que hoje conta com a produção de 104 produtos e que após ter comprado o laboratório Asta Médica (2003) vai investir \$ 20.000,00 para acomodar linhas de produção de medicamentos líquidos e semi-sólidos. Com previsão de finalizar as obras na metade de 2006, a intenção da nova unidade é acomodar a produção de uma de suas maiores apostas: o Acheflam®, um antiinflamatório fitoterápico, o primeiro do gênero, que já recebeu o registro da ANVISA.

Este medicamento é detentor de muitas expectativas na área farmacêutica, uma vez que em 1991, o Jornal do Brasil já noticiava que “afinal, o Brasil produz seu primeiro

remédio” graças a um convênio da USP, UNICAMP e Laboratórios Aché (Jornal do Brasil, 1991). Somente 14 anos depois é que surge a possibilidade de concretização da produção de um medicamento com tecnologia totalmente nacional.

Obtido a partir de uma planta nativa brasileira muito utilizada pelos índios caiçaras, a *Cordia verbenaceae* (conhecida popularmente como erva baleeira), devido a ação de seus flavonóides artemetina I e II, constitui-se um antiinflamatório tópico de grande efetividade nos processos reumáticos, nevrálgicos, artrite e de nível competitivo com os antiinflamatórios convencionais. Uma das grandes vantagens deste fitoterápico é não provocar lesões gástricas, afirmam Sertié e colaboradores, reponsáveis pela descoberta da atividade antiinflamatória desta planta (1986). O Acheflan® em sua versão tópica deve chegar ao mercado em junho deste ano e a versão oral está prevista para daqui a 2 anos.⁵⁸

1.5.2 Bioprospeção: protótipos naturais e síntese de novos compostos análogos

Das 42 novas substâncias descobertas em 1992, com atividades biológicas importantes, um total de 18 eram produtos naturais ou derivados¹⁰. E, dentre os reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento moléculas protótipos, possibilitando o delineamento e planejamento racional de novos fármacos e adicionalmente substâncias como muscarina, fisosgmina, canabinóides, iombina, colchicina, ésteres de forbol, procaína, cloroquina, tropicamida, são importantes ferramentas de investigações em farmacologia, fisiologia e bioquímica.⁶ A Química Medicinal se dedica hoje, a estudar as razões moleculares de ação de fitofármacos, relação entre a estrutura química e atividade farmacológica, a partir de dados obtidos da Análise Estrutural, da Bioquímica, da Biologia Molecular bem como de cálculos Mecânico-Quânticos possibilitando realizar a modelagem molecular de fármacos.

Com modelos tridimensionais e uso de programas computacionais se permite determinar propriedades estéricas e eletrônicas de estruturas parciais ou substituintes de possíveis fármacos, em relação a sua interação com um receptor conhecido²⁷. Neste contexto, é notável o acúmulo de substâncias enantiomericamente puras apresentadas pelas plantas, o que levou a indústria farmacêutica a intensificar a investigação com produtos quirais e à descoberta de novos fármacos cardiovasculares, antibióticos, hormônios, antiinflamatórios e antitumorais enantioméricos obtidos a partir de manipulação molecular.^{11,627}

Na correlação estrutura química / atividade biológica, a simples introdução de um substituinte pode atingir várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural e propriedades farmacocinéticas, cuja análise poderá orientar as sínteses a serem seguidas e programas computacionais otimizam estas possibilidades.²⁷

Inúmeras classes de diferentes produtos naturais têm sido empregadas como matéria prima para a síntese de diferentes substâncias bioativas⁵⁹. Alguns derivados terpênicos como a pulegona (**15**) têm sido empregadas como matéria prima em síntese, como ilustrado no esquema da figura 2, para obtenção da artemisinina (**16**), derivado sesquiterpênico com importantes propriedades antimaláricas.^{60,61}

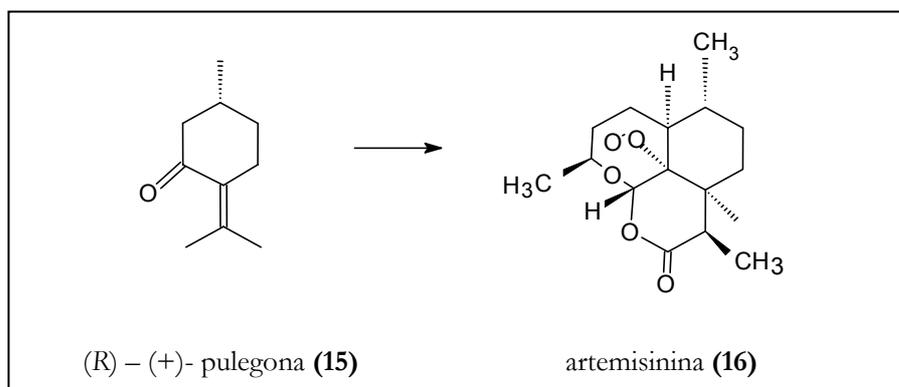


Figura 2. Esquema obtenção da artemisinina (**16**) a partir da pulegona (**15**).⁵⁹

Derivados 4-hidroxi cumarínicos originaram o dicumarol, um anticoagulante que interfere na ação da vitamina K, descoberto em 1945 pela indústria farmacêutica Abbot e Lilly.⁵⁹

A pílula anticoncepcional feminina é um marco muito representativo no âmbito de compostos análogos obtidos a partir de produtos naturais, uma vez que, alguns esteróides, entre eles, a progesterona, hormônio esteroideal (17), foi obtida a partir de saponinas, como a diosgenina (18), isolada do cactus do altiplano mexicano, *Dioscorea macrostachya*, conhecido como “cabeza de negro”^{59, 62} como mostra a figura 3.

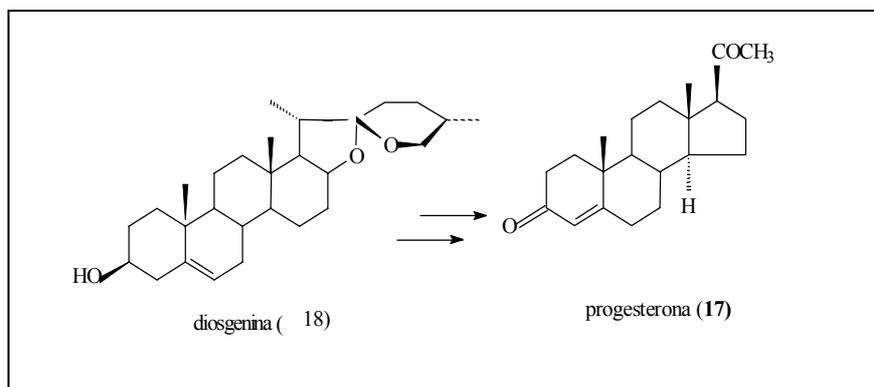


Figura 3 – Esquema obtenção da progesterona (17) a partir da diosgenina (18)

O ácido hidnocárpico, produto natural brasileiro e principal componente químico do óleo de sapucainha (*Carpotroche brasiliensis*) foi empregado como matéria-prima na síntese estereosseletiva de diversos análogos homólogos de prostanglandinas da série 11-desoxi-PGE.⁶³

A significância da contribuição de produtos naturais para a síntese de novos fármacos está bem demarcada pelo emprego do safrol (19), como matéria prima para a síntese de novos prostanóides híbridos (A) e (B), compostos importantes que fazem a inibição seletiva de enzimas da cascata do ácido aracdônico, cuja inibição evita processos dolorosos e

inflamatórios, sendo portanto, os prostanóides de grande utilidade para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como é evidenciado no esquema da figura 4. ^{64, 65}

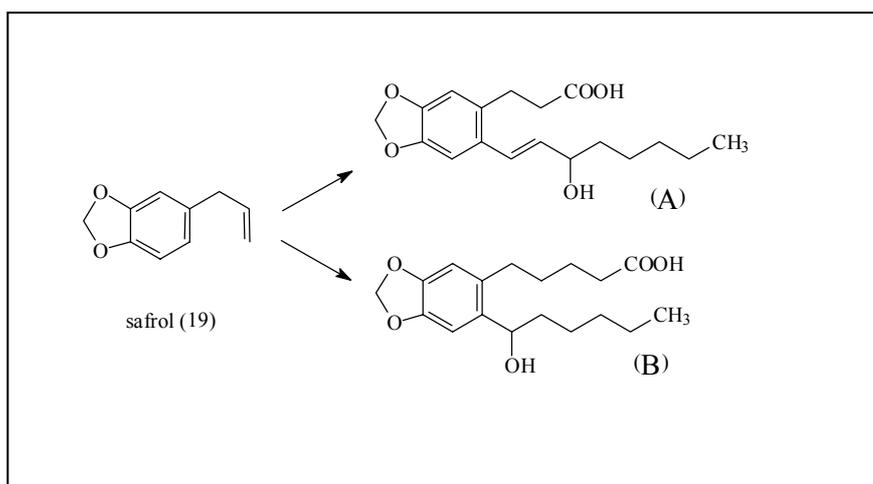


Figura 4– Esquema da obtenção dos prostanóides (A) e (B) a partir do safrol (19) ^{64, 65}

Com outra planta brasileira, a *Xylopiá frutescens*, rica em diterpenos caurânicos, os quais já demonstraram atividades antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica, anti-HIV, antifertilizante, hipotensora e antiinflamatória, estudos realizados concluíram que substâncias dessa classe podem constituir protótipos moleculares. Sob a ótica da relação estrutura-atividade, quando, com estes diterpenos caurânicos avaliou-se a atividade antibiótica frente a cultura de muitas bactérias, os investigadores chegaram a conclusão que, os compostos que apresentavam uma lactona, ou carbonila conjugada com dupla ligação, tinha sua atividade antimicrobiana incrementada, em comparação com os demais derivados caurânicos avaliados. Tais relatos tornam esse grupo promissor, e viabiliza a otimização de grupos químicos mais específicos. ⁶⁶

1.6 FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL

Entende-se por qualidade, o conjunto de critérios que caracterizam uma matéria-prima para o uso ao qual se destina. A partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para a matéria prima, e considerando-se um planejamento racional com controle do processo de produção, a qualidade do produto final estará em grande parte assegurada.⁶⁷

Os fatores críticos para o emprego de espécies medicinais, que possam ser utilizadas como medicamentos, envolvem especialmente dificuldades de controle de qualidade, segurança e eficácia destes produtos, bem como monitoramento de sua pureza, identidade e estabilidade^{50,68,69}. Os itens que se seguem, se respeitados podem assegurar uma confiabilidade maior na matéria prima vegetal passível de ser transformada em medicamento.

1.6.1 Estabilidade dos princípios ativos

Apesar do desenvolvimento de inúmeros métodos confiáveis de isolamento, elucidação e quantificação para a análise de fitoconstituintes, os referenciais de padronização em plantas medicinais deixam ainda a desejar, e esta insuficiência informativa se deve ao fato da grande variabilidade de composição química em determinada espécie, manejo agrícola, fatores intrínsecos e extrínsecos, durante as diversas fases de seu processamento.⁶⁸

Quando o assunto é controle de qualidade de plantas medicinais observa-se nuances diferenciadas dos conceitos com o passar dos tempos. Quando houve uma retomada da conscientização do controle de qualidade como norma de conduta prevalecia a avaliação da

eficiência analítica, com estudos da sensibilidade analítica, especificidade, exatidão e reprodutibilidade dos métodos utilizados.⁷⁰

Atualmente, este conceito é muito mais amplo e prevê referenciais que induzam a confiança da qualidade. Qualidade esta, que deve passar por diversas etapas do processo como: coleta, preparação da amostra, preparação do material, eficácia de métodos quantitativos, validação dos resultados, interpretação e registros, para que possa servir de parâmetros para estudos posteriores.⁷¹

Dados estatísticos demonstram que, os equipamentos mais utilizados e confiáveis para um efetivo controle de qualidade envolvem instrumentação cromatográfica, como CLAE (HPLC), CG, CCD, além de dados espectroscópicos dos fitoconstituintes presentes no material vegetal ou extratos em análise^{70,72,73,74}. A qualidade almejada só se concretiza quando os suportes estão alicerçados em bases científicas e técnicas já comprovadas experimentalmente. Estabelecidos esses critérios, o emprego de protocolos de análise, permitindo o acompanhamento e a documentação de todos os procedimentos é fundamental para o asseguramento e o gerenciamento da qualidade.⁷¹

1.6.2 Variáveis que determinam a concentração de princípios ativos naturais.

Durante os processos extrativos, a variabilidade de constituintes químicos detectados numa planta, seja quantitativo ou qualitativo, depende de muitos fatores⁸. O ambiente físico, através dos estímulos proporcionados pelo meio, fatores genéticos, condições de secagem e estocagem são as determinantes do acréscimo, diminuição ou até ausência de determinados metabólitos secundários bioativos.^{68,75,72,76}

Cada variedade botânica possui uma faixa própria de temperatura mais favorável à germinação, ao crescimento e a produção de seus compostos. O termo-período, ou seja, a

diferença de temperatura entre o dia e a noite faz com que algumas plantas acelerem seu crescimento e a floração torna-se mais abundante, pois a migração dos produtos elaborados pela fotossíntese durante o dia é favorecida.^{76,77}

As plantas também respondem às modificações na proporção de luz e escuridão dentro de um ciclo de 24 horas. Este comportamento é chamado fotoperiodismo. Em muitas espécies o fotoperíodo é o responsável pelo crescimento vegetativo, floração e produção de metabólitos. Em geral, as plantas de dias curtos são as de origem tropical, e de dia longos, são oriundas de regiões temperadas. É devido a este fenômeno que muitas plantas européias não florescem no Brasil.^{76,77}

O grau de umidade do ar influencia na transpiração e o teor de umidade do solo, determina a absorção de água e nutrientes, afetando decisivamente o desenvolvimento⁷⁶. Solanáceas como *Datura*, *Atropa* e *Hyosciamus* quando mantidas sob stress hídrico apresentaram maior teor de alcalóides.⁷⁷

A altitude é importante fator modificador do clima de uma localidade, pois a medida que aumenta a altitude diminui a temperatura, interferindo no ciclo da planta. O *Taraxacum officinale* quando cultivado em grandes altitudes produz folhas pequenas, hastes de inflorescências curtas, raízes muito compridas e plantas em manejo agrícola em baixas altitudes apresentam maior teor de alcalóides.⁷⁸

Outros fatores, como pH do solo, condições de crescimento, nutrientes do solo, método de coleta (data, hora, etc), parte da planta utilizada, fase de desenvolvimento no momento da coleta, secagem e transporte, interações entre plantas, presença de microorganismos, podem afetar diretamente a concentração dos compostos químicos de cada espécie.^{75,72,76,79}

A variação sazonal, ou seja, a coleta de plantas em diversas épocas ou estações do ano, é um fator muito significativo, no percentual e produção de metabólitos secundários.^{68,80}

Como exemplo, podemos citar trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório, os quais verificaram que o curcumenol (**20**), um sesquiterpeno isolado da espécie *Curcuma zedoaria* apresentou significativa ação analgésica em diversos modelos de dor ⁸⁰. Em amostras coletadas no mês de janeiro e agosto do mesmo ano o perfil cromatográfico (CG) indicou claramente a diferença entre os constituintes químicos, sugerindo que os compostos 3, 4, e 5 presentes na amostra coletada em agosto (2) são formados a partir dos compostos 1 e 2, presentes apenas na amostra coletada no mês de janeiro, conforme pode ser observado na figura 5. ⁸⁰

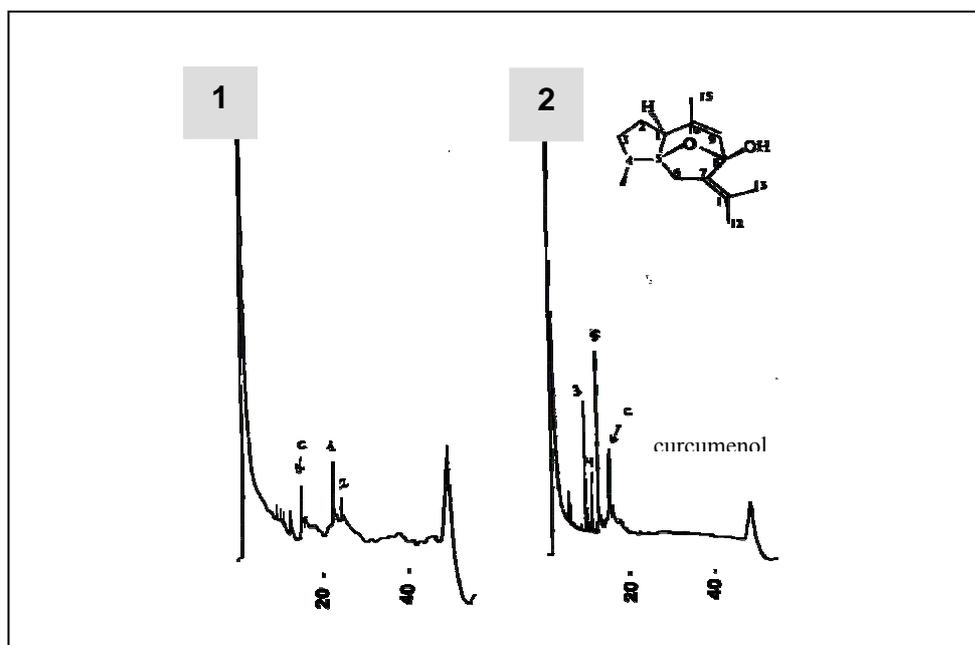


Figura 5- Análise do perfil cromatográfico (CG) da fração diclorometano de *C. zedoaria* coletada no mês de janeiro (1) e mês de agosto (2) ⁸⁰

1.7 REGULAMENTAÇÃO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS

Para a viabilização da qualidade total, é necessário incluir nos programas de pesquisas com plantas medicinais, regulamentações nacionais e internacionais, referências dos

procedimentos e materiais, bem como correlação entre os parâmetros analisados e a finalidade a que se destina.⁷¹

A dificuldade de regulamentação reside, principalmente no fato, de que, o processo legal de normatizações é inerente a cada país, constituindo-se, pois, um grande desafio, dado ao desenvolvimento de padrões internacionais e métodos apropriados de avaliação.⁵⁰

Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada baseada na concentração de um P.A. único ou através de substância(s) marcadora(s) presente em um extrato. Estes compostos químicos recebem o nome de fitomarcadores ou marcadores químicos e são eles que direcionam a padronização dos extratos vegetais, ao se considerar um determinado percentual como limite mínimo ou máximo aceitáveis dentro de uma espécie vegetal.⁴

Outro método capaz de assegurar a uniformidade de ação de um fitoterápico, no qual a atividade pode ser atribuída a vários constituintes, é determinar a atividade de um extrato, através de métodos farmacológicos e clínicos e, em seguida rastrear seu perfil químico qualitativo e quantitativo dos constituintes majoritários. Assim, espera-se que outros extratos com o mesmo perfil desenvolvam atividades fisiológicas idênticas.⁸¹

A esta metodologia dá-se o nome de fitoequivalência e por dificuldades desta natureza, poucas preparações, a partir de plantas medicinais, têm sido avaliadas quanto a sua eficácia e segurança.^{50, 82}

Para a validação de fitoterápicos, além do estudo randomizado, duplo cego e testes clínicos, outro aspecto relevante, sem dúvida, é a padronização da atividade farmacológica, com protocolos específicos, de modo a assegurar dosagens corretas e inerentes a cada experimento.⁵⁰

Apesar de muitas especulações que possam regulamentar a utilização de fitoterápicos, somente a partir de 1993, é que a OMS, se posicionou neste cenário e propõe algumas regulamentações, como a que prevê roteiros sobre segurança e eficácia de ervas medicinais

envolvendo testes clínicos em humanos (1993), controle de qualidade de matérias primas vegetais (1998) com apresentação de 28 monografias de espécies vegetais úteis na terapêutica.^{49,82, 83}

A partir destas premissas, a Europa se organizou e fundou a Cooperativa Científica Européia de Especialistas (ESCOP) oficializando 50 monografias de espécies vegetais. A Alemanha se fortalece com a formação de uma comissão independente de especialistas, porém ligada a Agência Federal de Saúde, a chamada Comissão E. Esta comissão aprovou mais de 200 monografias, levando a tornar adeptos da Fitoterapia 87% de médicos europeus, o que resultou um percentual 62% de prescrições médicas. Nos EUA (a partir de 1994), os produtos fitoterápicos são comercializados como suplementos alimentares, e portanto, não testados com o rigor exigido para os medicamentos⁴⁸. No entanto, o EUA é atualmente um dos países que mais investem nesta área e segundo o National Cancer Institute é o país que mais submete amostras a este instituto.⁴

As normas legais brasileiras relativas ao registro e comercialização, ao estudo da eficácia e segurança de fitoterápicos estão contidas nas Portarias 116/SVS /1996 (normas para o estudo da eficácia e toxicidade de fitoterápicos), portaria 8/ CIPLAN/1998 (implantação da prática de Fitoterapia nos serviços de saúde) e RESOLUÇÃO RDC 17/ ANVISA/2000 (dispõe sobre o registro de fitoterápicos).^{84, 85, 86}

No mês de março de 2004 foi criada a RESOLUÇÃO RDC 48/ ANVISA que revoga a RDC 17 e tem por objetivo atualizar a normatização de registro de medicamentos fitoterápicos, onde se preconiza como prioritários itens demonstrados na tabela 5.⁸⁷

Tabela 5 – Normatização para medicamentos fitoterápicos de acordo com a RDC 48.⁸⁷

ÍTEMS PRIORITÁRIOS PARA NORMATIZAÇÃO DE FITOTERÁPICOS	
1	Abrangência a medicamentos cujos P.A. sejam exclusivamente derivados de drogas vegetais
2	Apresentação de bulas com dados pertinentes
3	Prazo de validade monitorado por estudos de estabilidade acelerada e longa duração
4	Relatório completo de produção (segundo as Boas Práticas de Fabricação e Controle – BPFC/ ANVISA)
5	Relatório descritivo de controle de qualidade desde a matéria vegetal até o produto acabado (físico-químico, químico, biológico e microbiológico)
6	Laudos de identificação botânica por profissional habilitado
7	Avaliação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica, toxicologia clínica) e eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e clínica) Segundo as exigências do Conselho Nacional de Saúde
8	Levantamento bibliográfico etnofarmacológico e técnico-científico
9	Formulários de registro com dados da empresa e funcionários

1.8 BIODIRECIONAMENTO PARA OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS DE ORIGEM VEGETAL.

Quando a proposta é se estudar uma planta medicinal, o biodirecionamento tem como objetivo investigar nos extratos e frações, os possíveis princípios ativos, oportunizar seu isolamento, elucidação estrutural, síntese ou modificação estrutural e possíveis atividades farmacológicas, cujas etapas básicas são ilustradas na figura 6.⁸⁸

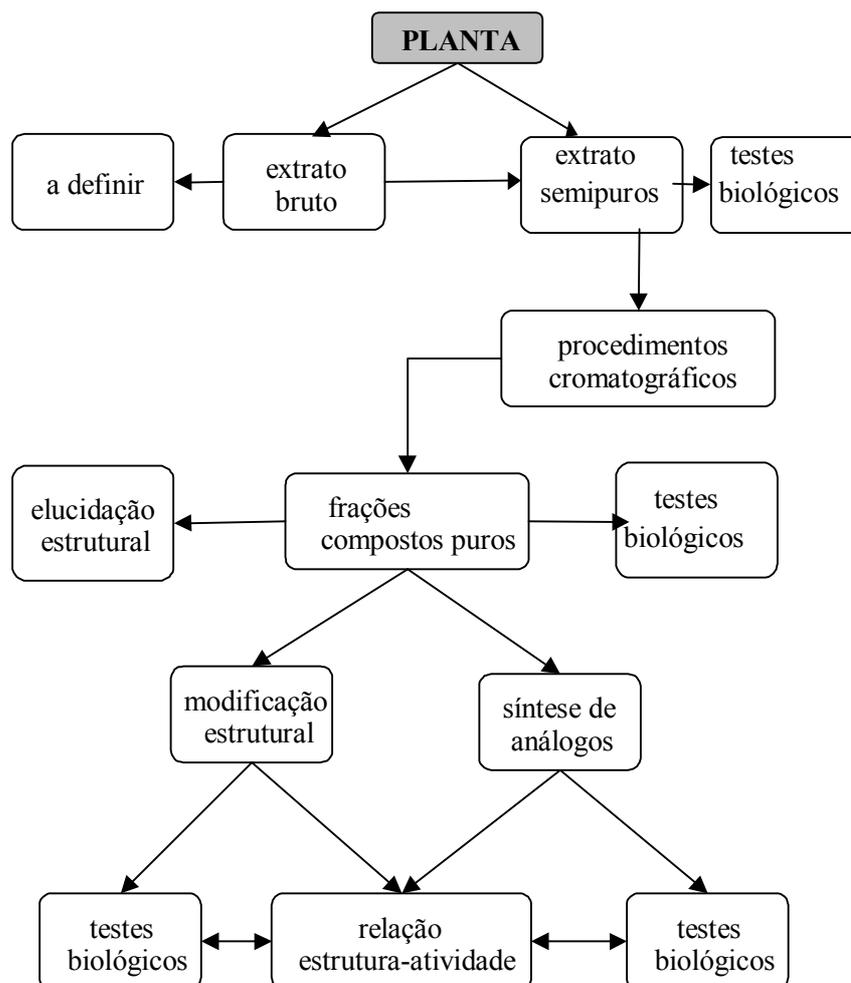


Figura 6 - Procedimentos gerais para obtenção de compostos biologicamente ativos.⁸⁸

1.8.1 Etnofarmacologia x Seleção da Espécie.

A definição de uma espécie vegetal para estudos químicos e farmacológicos deve ser orientada pelas informações etnofarmacológicas, botânicas e químico-taxonômicas.⁸⁹

Várias abordagens para seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura^{90,91} e dentre elas três tipos, são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica – escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma classe química de substâncias em um gênero

ou família; c) abordagem etnofarmacológica – seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico.^{54,92}

Dentre estas 3 abordagens, o conhecimento popular deve ser considerado a mais importante ferramenta para a escolha da espécie vegetal, para o estudo químico, o qual busca respostas terapêuticas⁹⁰. Como estratégia para a investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto a população que faz uso da flora medicinal com estudos químicos/farmacológicos a fim de se comprovar cientificamente, os resultados obtidos pela experimentação popular^{54,93}. O método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses em relação às atividades farmacológicas e as substâncias ativas responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas pelo uso na medicina tradicional.^{54,93,94}

A seleção de espécies vegetais para a pesquisa, depois de monitorada pela informação botânica, pode se constituir um valioso atalho para a validação científica, já que seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto a sua efetividade terapêutica.^{91,93}

1.8.2 Identificação botânica

Assim que a espécie vegetal for selecionada para estudos posteriores, a sua classificação botânica e preparação de exsicata em herbários reconhecidos oficialmente, são fatores que subsidiam cientificamente o material a ser estudado. Ao se preparar uma exsicata, deve-se ter o cuidado de anotar dados, que futuramente podem servir de direcionamento a possíveis ensaios de reprodutibilidade, como: o local e data da coleta, o nome do coletor, a parte da planta a ser usada no estudo, o nome popular, as indicações da medicina popular, o tipo de planta (árvore, arbusto, trepadeira, etc) e uma foto da planta inteira.⁵⁴

1.8.3 Coleta e secagem

A etapa da coleta do material vegetal é um dos suportes mais importantes, quando se busca qualidade em plantas a serem utilizadas em estudos posteriores. Critérios como diferenciação de procedimentos de espécie para espécie vegetal, hora do dia, época do ano, parte da planta a ser coletada, luminosidade, temperatura, estágio de desenvolvimento, umidade relativa do ar, são marcadores decisivos para a obtenção de teor de princípios ativos almejados em cada espécie⁹⁵. Além disso, existem nas plantas muitos sistemas enzimáticos próprios, que mesmo depois da coleta das mesmas podem continuar ativos e degradar princípios ativos importantes²⁷. Portanto, existem prioridades que devem ser relevantes no momento da secagem e devem ser questionados, como mostra a figura 7 :

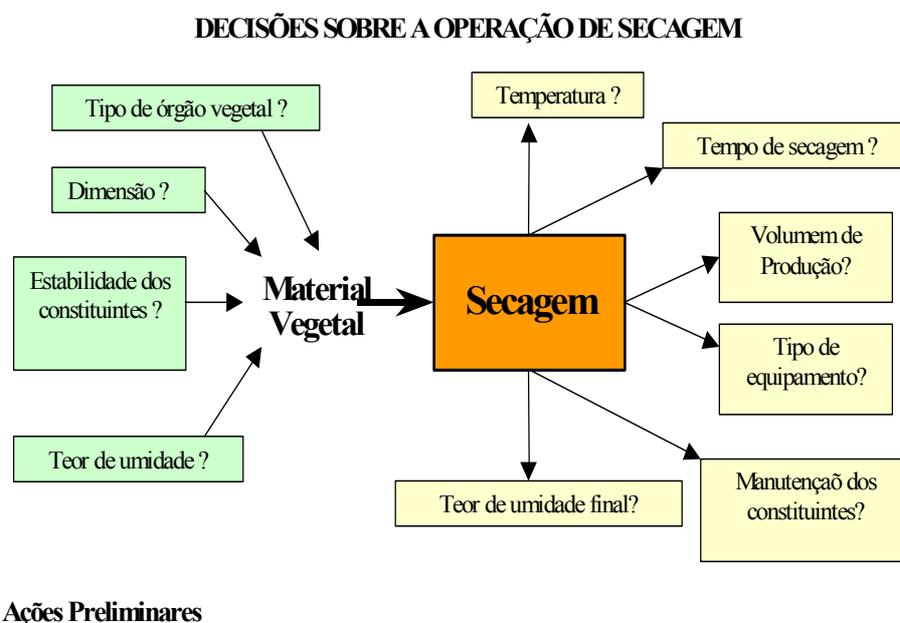


Figura 7 – Fatores que interferem no processo de secagem.⁹⁶

1.8.4 Operações extrativas utilizadas para isolamento de compostos ativos.

A seletividade dos compostos ativos almejados durante o processo de isolamento, vai depender, em grande parte, das operações de transformação da matéria vegetal, técnicas de extração e sobretudo, dos parâmetros de solubilidade na relação solvente/soluto ⁹⁷. Entre as técnicas extrativas priorizadas na busca de compostos ativos em plantas medicinais destacam-se: a maceração, percolação, turbólise, arraste de vapor, destilação, fluido super crítico e mais modernamente usa-se a micro extração em fase sólida.

A extração inicial através de um processo de maceração com um solvente de baixa polaridade consiste em um método, entre os usuais no âmbito de produtos naturais, bastante utilizado para obtenção de compostos de caráter lipofílico ⁹⁶. Frações de polaridades crescentes podem ser obtidas por técnicas de particionamento, utilizando-se sistemas de líquidos extratores de maior polaridade.

1.8.4.1 Maceração

A maceração é um processo estático, não exaustivo, fortemente dependente do tipo de farmacógeno, da seletividade do líquido extrator e solubilidade dos compostos-alvo. Realizada em temperatura ambiente, recipiente fechado, durante um período pré-estabelecido, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento total da matéria prima vegetal, seja devido, a saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. ^{98,99}

Diversas variações desta operação podem ser realizadas com a intenção, essencialmente, de aumentar a efetividade da extração como é o caso da digestão (maceração

a quente), maceração dinâmica (feita sob agitação constante), maceração escalonada e remaceração.¹⁰⁰

Este processo fica restrito quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, plantas com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas. Apesar dos inconvenientes apresentados, ainda é uma das técnicas extrativas mais usuais devido a simplicidade e custos reduzidos.¹⁰¹

1.8.4.2 Percolação

A percolação, ao contrário da maceração é um processo dinâmico, onde se faz o arrastamento do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento da planta através o gotejamento lento do material. Também permite obter soluções extrativas mais concentradas, gradiente de polaridade, economia do líquido extrator e tempo relativamente curto⁹⁹. A percolação, é indicada em processos extrativos de substâncias farmacologicamente, muito ativas, presentes em pequena quantidade ou pouco solúveis.¹¹

É um processo pouco recomendável para plantas com elevado teor de substâncias solúveis e as que aumentam a viscosidade durante o processo. A extração de Soxhlet, em nível laboratorial, também não deixa de ser um tipo de percolação cíclica, com destilação simultânea e reaproveitamento do solvente.^{11,101}

1.8.4.3 Turbólise ou turboextração

Outra técnica que resgata compostos químicos, é a turbólise ou turbo extração, que resulta da aplicação de elevadas forças de cisalhamento em rotações de 5000 a 2000 rpm. Este processo, porém, gera problemas com substâncias voláteis, libera calor que pode interferir em

processos metabólicos, sendo portanto, recomendado apenas quando se tratar de materiais de elevada dureza ou muito fibrosos como caules, raízes, rizomas ou lenhos.^{99, 101}

1.8.3.4 Microondas

A extração por microondas e por líquido pressurizado utiliza solventes de muitas polaridades e a temperatura como suporte, na qual o aquecimento do solvente é viabilizado pelo uso contínuo da pressão. A temperatura apressa a extração, mas poderá em alguns casos, promover degradações inconvenientes como a hidrólise ou racemizações indesejáveis.^{11,102}

1.8.4.5 Ultrasons

Ultrasons constituem-se processos extrativos, onde se utilizam correntes de alta frequência, que promovem com mais efetividade a fragmentação das estruturas e membranas celulares do material vegetal, liberando com mais facilidade os constituintes químicos.¹¹

1.8.4.6 Extração por Fluido Supercrítico

A maioria dos métodos convencionais de extração possui pouca seletividade sobre a grande gama de compostos químicos. Muitas vezes, ao se buscar os metabólitos secundários de interesse terapêutico, acaba-se extraíndo compostos sem qualquer interesse farmacológicos, inertes ou até mesmo compostos que interferem na estabilidade dos extratos¹⁰². Portanto, quando se deseja uma efetividade e agilidade na extração, costuma-se utilizar o Fluido Supercrítico, por ser uma técnica de maior rapidez, usar um solvente imiscível, o dióxido de carbono. Além de evitar resíduos, este solvente não possui toxicidade, é barato, não inflamável e isento de corrosividade e também preserva a saúde e o meio ambiente.^{102,103}

Esta técnica viabiliza otimização no processo extrativo, uma vez que pode ajustar parâmetros como a temperatura, volume de fluxo e pressão para a realidade específica de cada situação menor tempo e facilidade de eliminar o solvente com extração seletiva.^{102, 104, 103 105}

1.8.4.7 Microextração em fase sólida (SPME)

Uma técnica relativamente nova (década de 90) é a Microextração por Fase Sólida (SPME), onde a extração se realiza através de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida e recoberta por um fino filme de polímero ou carvão ativado, o qual é mergulhado na amostra, procedendo dessa forma uma microextração.^{106, 107, 108}

1.8.5 Principais métodos utilizados para separação de constituintes químicos naturais.

Ao visualizar a obtenção de compostos bioativos numa planta, deve-se priorizar a preservação de sua integridade química e farmacológica, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico⁹⁶. Para alcançar estes objetivos, as técnicas específicas, direcionadas e validadas de separação de fitoconstituintes, se constituem a ferramenta essencial para a concretização desta meta. São muitos os métodos usados para a separação de compostos químicos vegetais. Entre eles encontramos:

1.8.5.1 Partição líquido-líquido

Depois de finalizada a etapa de extração, o passo sequencial é uma semi-purificação dos compostos químicos, que pode ser realizada utilizando uma partição líquido-líquido com

solventes de polaridade crescente, que resultará em separação provável dos principais metabólitos secundários como pode ser observado na figura 8.

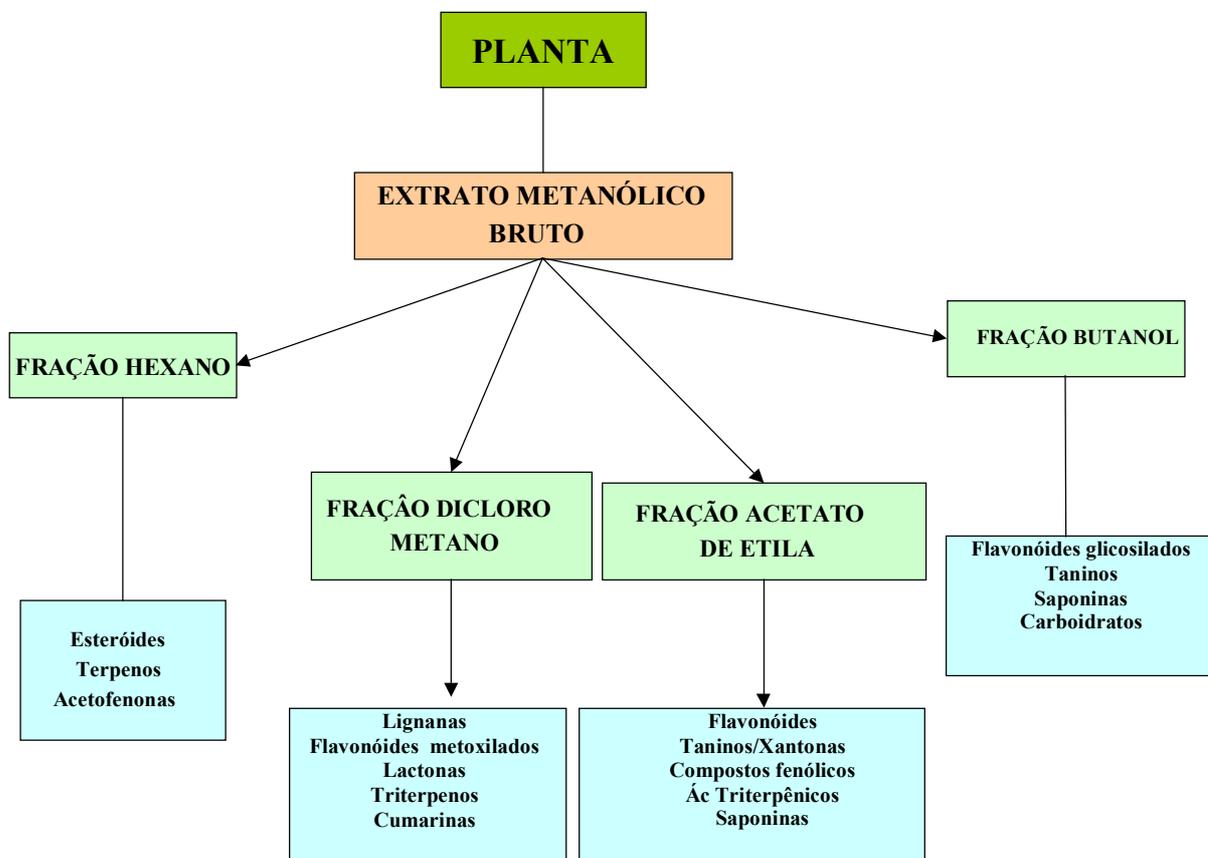


Figura 8 - Esquema geral de partição e separação provável de metabólitos secundários. ^{88, 27}

1.8.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Dentre os usuais métodos de análise, a cromatografia ocupa sem dúvida, um lugar de merecido destaque no que concerne à separação, identificação e quantificação de espécies químicas. ¹⁰³

A cromatografia compreende um grupo diversificado que permite separar componentes muitos semelhantes de misturas complexas, no qual a amostra é transportada por uma fase móvel podendo ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária, imiscível e fixa ¹⁰³. Como consequência dessas

diferenças de mobilidade, os componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ ou quantitativamente.^{109, 102}

Os métodos planares de Cromatografia incluem Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Papel (CP) e Eletrocromatografia¹⁰³. A fase móvel desloca-se através da fase estacionária por ação de capilaridade, algumas vezes assistida por potencial elétrico ou gravitacional.¹⁰³

A CCD apesar de sua simplicidade, baixo custo, tem a vantagem de ser rápida e de simples execução. É uma técnica eficaz que possibilita o monitoramento e otimização durante a avaliação do perfil fitoquímico e biossintético, possibilitando a observação dos compostos em isolamento⁹². Alguns profissionais da área adotam a posição de que os experimentos de camada delgada sempre devem preceder os experimentos de cromatografia em coluna, porque, em termos teóricos os tipos de fases móvel e estacionária e as aplicações da CCD e CC são notavelmente similares.¹⁰³

1.8.5.3 Cromatografia em Coluna (CC)

A Cromatografia em Coluna (CC), uma das técnicas mais utilizadas, é um processo de separação entre duas fases, uma sólida uma líquida, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade, onde o equilíbrio dinâmico é estabelecido entre a concentração do soluto em duas fases. A mistura a ser separada é submetida a um sistema crescente de polaridade¹⁰³. O fluxo do solvente deve ser contínuo e os diferentes componentes da mistura vão se deslocar com velocidades distintas dependendo da sua afinidade relativa pelo adsorvente (grupos polares interagem melhor com o adsorvente e também com o eluente). Assim a capacidade de um determinado eluente em arrastar um composto adsorvido na CC depende quase diretamente da polaridade do solvente em relação ao composto. Em geral, os compostos

apolares passam através da coluna, com uma velocidade maior do que os compostos polares, porque os primeiros têm menor afinidade com a fase estacionária.^{109, 11}

A fase móvel utilizada em CC deve ser previamente determinada por CCD e as fases estacionárias incluem Sílica (SiO_2), de caráter fracamente ácido e empregado na separação de compostos lipofílicos como, aldeídos, fenóis, cetonas, ácidos graxos, alcalóides, terpenos, esteróides¹⁰². A Alumina (Al_2O_3), é outra fase estacionária que pode ser usada, possui caráter alcalino. O sephadex, que é outra fase estacionária usada com frequência, onde a separação se faz por diferença de peso molecular. São retidas, através do processo de migração diferencial, as moléculas menores, deixando passar na mesma velocidade do solvente as moléculas maiores, do que as malhas do polímero.^{109, 110}

1.8.5.4 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

A Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), considerada também uma excelente ferramenta, constitui-se uma técnica eficiente na separação de compostos com R_f muito próximos e que possam ser visualizados sob a ação da lâmpada UV. A desvantagem desta técnica é a perda de rendimento inerente à interação dos compostos com a fase estacionária.¹¹⁰

1.8.5.5 Cromatografia Preparativa de Força Centrífuga- Cromatotron

A Cromatografia Preparativa de Força Centrífuga, também chamada Cromatotron, consiste num sistema de placa circular de CCD inclinada, o que permite a maior eficácia no escoamento e coleta dos compostos. Tem o poder de purificar compostos com R_f (fator de

retenção) muito próximos, baixo consumo de solventes e é usado para isolamento de saponinas, saponinas hidrolizáveis e flavonóides.^{109, 110, 111}

1.8.5.6 Cromatografia “flash”

A Coluna “flash” é um outro tipo de cromatografia de baixo custo e fácil manuseio, similar a CC comum, por empregar a mesma sílica da CC de granulometria fina, com a diferença de utilizar uma bomba de pressão para promover a agilidade do processo. A coluna “flash”, requer cuidados com compostos sensíveis à contaminação (por ser lento o tempo de contato) e a possibilidade de degradação de compostos pouco estáveis.^{110, 111}

1.8.5.7 Cromatografia Gasosa (CG)

Na Cromatografia Gasosa (CG), um dos métodos mais usuais de separação, a amostra é vaporizada e injetada numa coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel. Ao contrário, da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito. Sua única função é transportar o analito através da coluna.¹⁰³

A Cromatografia Gasosa está baseada em uma fase estacionária sólida, na qual a retenção dos analitos é consequência de adsorção física. São utilizados gases quimicamente inertes como o hélio, nitrogênio e hidrogênio para fazer o processo de arraste e a escolha dos gases são frequentemente ditada pelo tipo de detector utilizado.^{112,113}

A Cromatografia Gasosa, é útil na separação de compostos orgânicos, que não entrem decomposição a temperaturas inferiores a 310°C, para separação de certos compostos gasosos de baixo peso molecular.^{103,112, 113}

É comum usar este procedimento, para identificar compostos voláteis como sesquiterpenos, compostos fenólicos, hidrocarbonetos carotenos, álcoois lineares e triterpenos esteroidais.¹¹³

A Cromatografia Gasosa está acoplada frequentemente a técnicas seletivas de espectroscopia como CG/EM, por exemplo, usado em estudos de rastreamento de metabólitos secundários em espécies vegetais.¹⁰³

1.8.5.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou Alta Pressão (CLAE/HPLC)

Um dos mais novos métodos básicos usados como técnica analítica de separação, com a intenção de caracterização, detecção e separação, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou Alta Pressão (CLAE ou HPLC- do inglês - High Performance Liquid Chromatography). As razões expressivas para a eleição deste método, é a sua alta sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas precisas, sua adequação à separação de compostos não voláteis ou termicamente frágeis, e acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria^{103,114}. Também pode ser usado com fins preparativos, para separar compostos presentes em concentrações muito pequenas com curto tempo de análise, e pelo fato da fase móvel e estacionária possuir um amplo espectro de polaridade no qual a seletividade no processo de separação pode ser otimizado e ajustado.^{103,104}

Este método possibilita a seu acoplamento a outras técnicas de detecção, como índice de refração, espectroscopia de UV, a espectroscopia de massas, e RMN.^{92,103,115}

1.8.6 Caracterização de constituintes químicos.

O prévio conhecimento de determinados grupos químicos das espécies vegetais, pode disponibilizar ou não o seu uso como medicinal. Algumas marchas fitoquímicas são de grande importância, quando se quer conhecer previamente a composição química do vegetal afim de que não se perca tempo, trabalho ou investimentos desnecessários em usar uma planta, cuja presença ou índices de compostos bioativos estejam fora dos padrões exigidos⁶⁴. A tabela 6, mostra algumas reações químicas importantes que determinam o conhecimento da composição química vegetal.

Tabela 6- Exemplos de reações químicas de caracterização de constituintes vegetais.⁶⁴

Constituintes Analisados	Reações químicas inespecíficas	Reações químicas específicas
Alcalóides (tropânicos)	Reação de Mayer Reação de Dragendorff	Reação de Waisicly Reação de Otto (indólicos)
Alcalóides (indólicos)	Reação com ácido pícrico	-
Heterosídeos (cardenólídeo)	Reação de Salkowski	Reação de Kedde (cardenólídeo)
Cardiotônicos	Reação de Liebermann-Burchard (núcleo esteroidal)	Reação de Keller Killiani (desoxioses)
Flavonóides	Reação de Shinoda Reação de Pew	Reação de Wilson T (flavonóis) Redução com boro-hidreto de Sódio (flavononas)
Antraquinonas	Reação de Borntrager Reação de Shouteten	-
Taninos	Reação com cloreto férrico Reação com vanilina clorídrica	Precipitado com gelatina Precipitação com Acet.Chumbo Precipitação com sais de Alcalóides
Esteróides	Reação de Liebermann-Bourchard	-

1.8.6.1 Reveladores

Os reveladores, como vetores importantes para detecção de grupos químicos devem ser representados pelos universais e específicos, ou aqueles já consagrados classicamente como é o caso do anisaldeído sulfúrico, vapores de iodo, solução de ácido sulfúrico, vanilina sulfúrica, lâmpadas de curto e longo comprimento de ondas (254 –366 nm), sulfato cérico, cloreto férrico (grupos fenólicos), hidróxido de potássio 10% EtOH (cumarinas), Dragendorff (alcalóides), Libermann- Bouchard (grupos esteroidais), ninhidrida (aminoácidos), reativo de Mayer, indicadores fluorescentes, etc.^{64, 116}

1.9. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS

A elucidação de grupos estruturais obtidos durante os processos de isolamento pode ser realizada através de diversas técnicas.

1.9.1 Ensaios Qualitativos e Quantitativos

Assim que um composto seja isolado, o passo sequencial é a sua elucidação estrutural, através de informações espectroscópicas e espectrométricas, processos que exigem uma variabilidade muito grande de técnicas sofisticadas. A avaliação espectral através de Infravermelho (IV), Ultravioleta (UV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ¹H, ¹³C, Espectrofotômetro de Massa (EM)^{117,118} podendo-se incluir técnicas mais sofisticadas de RMN (NOE, COSY, DEPT, HECTOR, etc)⁹², uso de Cristalografia de raio X (estereoquímica)¹¹⁹ e índice de refração e rotação ótica, possibilitam a proposição da estruturas moleculares.

O primeiro método para elucidação quase sempre, é a espectroscopia no Infravermelho (IV), o qual fornece informações características da molécula e permite a possível identificação

dos seus grupos funcionais. O IV mostra um rico agregado de bandas de absorção situadas nas regiões de 4000 a 400 cm^{-1} , resultante da incidência numa molécula de luz infravermelha de mesma frequência, com absorção de energia e aumento da amplitude das vibrações de estiramento e deformação. O IV é utilizado, além de identificação de estruturas de substâncias orgânicas, para comparação de substâncias, verificação do grau de pureza de uma substância e acompanhamento de reações.¹¹⁷

A espectrometria de massas é uma outra poderosa técnica analítica usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e para elucidar a estrutura e propriedades químicas de moléculas. Um espectro de massas é um gráfico contendo as massas dos fragmentos carregados positivamente (incluindo o íon molecular) nas suas concentrações relativas. O mecanismo desta técnica é o bombardeamento de uma substância através de um feixe de elétrons, com energia suficiente para ionizar a molécula. Os íons moleculares e fragmentos (+) positivos produzidos são acelerados numa câmara de vácuo através de um campo eletrostático e rádio frequência sendo registrada na base da razão massa-carga.¹¹⁷

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é a forma de espectroscopia que proporciona um maior acervo de informações estruturais. Tal técnica é baseada na absorção de energia, na faixa da radiofrequência, por núcleos atômicos (e.g., ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ^{39}K , etc) que possuem um momento magnético (i.e. momento de dipolo magnético, spin nuclear \neq zero e quadrupolo elétrico), quando submetidos a um campo magnético estacionário.^{120,121}

Este sistema permite a análise de pequenas quantidades de compostos puros, com grande precisão em escala de miligramas ou microgramas.¹¹⁷

Existem atualmente técnicas suplementares de RMN que subsidiam as análises, facilitando a identificação estrutural. Entre elas temos o COSY, (espectroscopia de correlação), o qual viabiliza um espectro 2D e proporciona uma visão global das correlações

^1H - ^1H e HC COSY, que é a correlação ^1H - ^{13}C , os quais estão diretamente ligados. No entanto, esta técnica não fornece informações para acoplamentos a longa distância.^{122,123}

Para a determinação da estereoquímica, costuma-se utilizar o NOE diferencial, o qual permite determinar a correlação de prótons no espaço¹²⁴ usado na diferenciação de estereoisômeros, configuração de ligações dupla e trissubstituídas. Para tanto, se procede a irradiação seletiva de um ^1H , que possibilita a amostragem da correlação de prótons no espaço e realça o sinal do ^{13}C , ao qual está diretamente ligado ao próton.^{122,123,124}

As correlações de átomos de carbono e seus respectivos prótons podem ser determinadas por HECTOR (^1H - ^{13}C), HMBC (conectividade de múltiplas ligações heteronuclear) em caso de acoplamentos a pequena distância e HECTOR Long Range para acoplamentos a longa distância (^2J e ^3J).²⁷

O DEPT é uma técnica também bastante utilizada constituída por conjunto de espectros de ^{13}C , apresentando sinais de todos os carbonos protonados (CH , CH_2 CH_3) onde, os átomos de carbono quaternário que não estão ligados diretamente, não são visíveis no espectro.^{124, 125}

1.10 NOVAS METODOLOGIAS USADAS COMO FERRAMENTAS NO PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.

A evolução medicamentosa vem ocorrendo de forma avassaladora, quando se busca a descoberta de novas moléculas bioativas. Os processos clássicos cedem a vez à metodologias mais sofisticadas, mais emergentes e mais otimizadas ¹²⁶ como por exemplo técnicas da Química Combinatória que objetivam a bioprospecção e que possibilita marcha analítica em larga escala onde, até 100 mil compostos possam ser testados, quanto a sua atividade biológica num só dia ¹²⁷. Este é um grande salto, em termos de agilidade, uma vez que até 1990 só se poderia testar de 50 a 100 compostos por ano ¹²⁷. Ainda, consegue-se, identificar compostos com atividade biológica similar, mas com estruturas químicas diferentes e também identificar grupos de compostos direcionados à marcha analítica biológica ou ainda desenhar uma coleção combinatória com diversos compostos. ^{110,12}

Para se otimizar a atividade de um composto biologicamente ativo, pode-se pela inserção de um ou mais grupamentos químicos ou substituição de um determinado substituinte, potencializar e/ou interferir num efeito farmacológico da molécula, no tempo de ação e potência das mesmas ¹²⁹. A modernidade trouxe técnicas computacionais sofisticadas, de grande valia na determinação de parâmetros eletrônicos e estéricos da conformação estrutural bioativa das moléculas ^{126, 130}, através do paradigma QSAR (Relações Quantitativas entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica), sendo possível realizar a modelagem molecular tridimensional de fármacos ¹²⁶ e utilização de substituintes de possíveis fármacos em relação a sua interação com um receptor conhecido. Esta abordagem está sendo muito importante na pesquisa de fármacos para inúmeras doenças, inclusive a AIDS. ^{131,132}

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais do presente trabalho consistem em isolar e identificar os componentes químicos presentes nas espécies vegetais *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* através de técnicas cromatográficas e espectrométricas e avaliar biologicamente seus extratos e compostos isolados em modelos experimentais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Isolar e identificar a estrutura química dos compostos presentes nos extratos e frações das raízes, caules, folhas e flores das espécies *A. blanchetti* e *A. schottii*

2.2.2. Realizar estudo fitoquímico comparativo nas diferentes partes das plantas (raiz, caule, folha e flor) *A. blanchetti* e *A. schottii*

2.2.3. Realizar os testes biológicos com os extratos, frações obtidas e compostos isolados com a finalidade de avaliar sua atividade, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, leishmanicida, tripanocida e antileucêmica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS PLANTAS EM ESTUDO

3.1.SINOPSE DA FAMÍLIA APOCYANACEAE A.L. de JUSSIEU

A família Apocyanaceae, importante entre os vegetais superiores, encontra-se distribuída de maneira preponderante em regiões tropicais e semitropicais, sendo poucas de zona temperada. Compreende aproximadamente 200 gêneros, com mais de 2000 espécies. Esta família é representada por árvores, arbustos, ervas, cipós e trepadeiras.^{133, 134, 135, 136}

Sua corola é representada por uma só peça, dividida em partes iguais, porém torcidas ou cortadas de maneira que, não possui nenhum plano de simetria. Suas flores podem ser pequenas, e também grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas e diclamídeas. Possuem folhas em geral opostas e fruto seco capsular ou indeiscente (*Thevetia*) ou então frutículos secos deiscentes e sementes aladas (*Aspidosperma*), pilosas (*Nerium*), ou não (*Allamanda*).^{137, 135, 138, 139}

Quimicamente, algumas espécies da família Apocyanaceae já foram estudadas e seus compostos químicos majoritários estão representados por diversos glicosídeos e alcalóides tóxicos localizados em todos os órgãos da planta. Muitas espécies produzem também princípios amargos e substâncias resinosas que são encontradas no seu látex leitoso.^{134, 135, 138} Caracterizam-se ainda por produzir diversos tipos de iridóides, glicosídeos cardiotônicos e grupos esteroidais.¹³⁶

Muitos gêneros desta família são relatados na literatura devido a importantes atividades terapêuticas, como por exemplo, o gênero *Catharantus*, cujos alcalóides vincristina (12) e vimblastina (13) são utilizados no tratamento de sarcoma de Kaposi, leucemia

linfoblástica aguda infantil, câncer de ovário e testículo.¹³⁹ Entre os glicosídeos de relevância farmacológica foram isolados ovabaina, acocantherina, thevetina, oleandrina, neriina nos gêneros *Thevetia* e *Nerium*, bem como os célebres alcalóides da *Rawolfia serpentina*, espécie originária da Índia e reconhecida pela sua ação hipotensora.¹³⁶ Desta família, ainda foi isolado do gênero *Strophantus*, um glicosídeo cardiotônico, o estrofantó, consagrado pelo seu uso em tratamentos de distúrbios cardíacos e também úteis, como precursor da cortisona.¹³⁶

Ainda nesta família, o gênero *Allamanda*, apesar de possuir poucas espécies, tem contribuído expressivamente para a clínica terapêutica através de moléculas bioativas importantes para o tratamento de diversas enfermidades como imunodeficiência tipo I (HIV – 1) e inibição de processos tumorais.^{140, 141}

3.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Allamanda*

Dentre os arbustos trepadores da família Apocyanaceae, destaca-se o gênero *Allamanda*, nativo da parte quente das Américas, sendo representado por espécies de flores grandes e amarelas, e encontradas como plantas ornamentais de jardins.^{135, 138}

O gênero *Allamanda* compreende 12 espécies distribuídas pela parte tropical da América, e 4 outras espécies são cultivadas na Índia como plantas ornamentais¹⁴². No Brasil, são encontradas 10 espécies, distribuídas por todo território nacional¹⁴³. As mais comuns são a *Allamanda cathartica* (flores grandes e amarelas), *Allamanda blanchetti* (flores grandes de coloração rosa/arroxeadas) e *Allamanda schottii* (flores pequenas e amarelas).¹³⁴

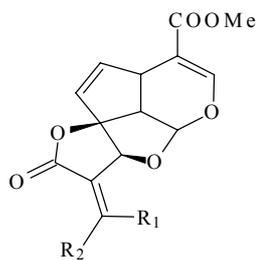
Poucos trabalhos foram encontrados na literatura sobre as espécies *A. blanchetti* e *A. schottii* e todos de enfoque químico. As espécies *A. nerifolia* e *A. cathartica* são as espécies mais estudadas até o momento, quanto aos seus constituintes químicos e ensaios farmacológicos, dos quais foram isolados esteróides, terpenóides,^{144, 145, 147} flavonóides,¹⁴⁷

lignanas,¹⁴⁸ cumarinas,¹⁴⁸ e iridóides^{144, 149, 142, 150, 151} óleos essenciais¹⁵² que demonstraram atividades bactericida, fungicida, alelopáticas e antileucêmicas, infertilidade, ação antinematodal e antidermatófito.^{143, 144, 149, 150, 151, 148, 153, 154, 155}

Durante a revisão da literatura, a maioria dos estudos encontrados foi sobre a *A. cathartica* e poucos trabalhos em data recente.

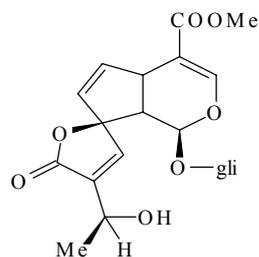
A estrutura e nomenclatura dos compostos isolados no gênero *Allamanda* estão dispostas nas figuras: figuras 9 e 10: iridóides (estruturas de **21-45**); figura 11: flavonóides (**46-48**), figura 12: esteróides (**49-51**), figura 13: terpenóides (**52-56**); figura 14: lignanas (**57-65**) e cumarinas (**66-68**).

IRIDOIDES

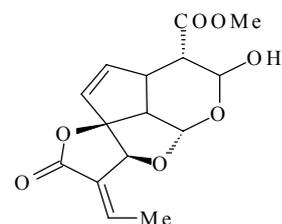


21) Plumericina
R₁ = Me, R₂ = H

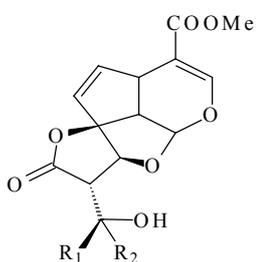
22) Isoplumericina
R₁ = H, R₂ = Me



23) Plumierideo

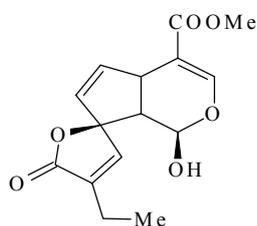


24) Allamandina

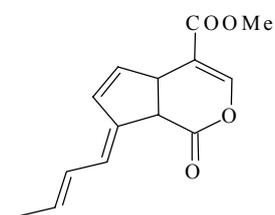


25) Allamandicina
R₁ = Me, R₂ = H

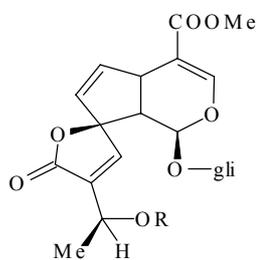
26) Allamandicina
R₁ = H, R₂ = Me



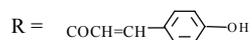
27) Allandina



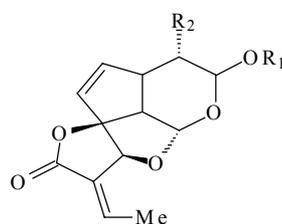
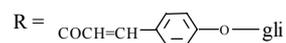
28) Fulvoplumierina



29) Cumarato de plumierideo

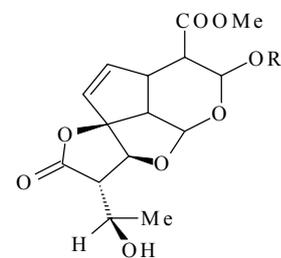


30) Glicosil cumarato de plumierideo
(protoplumericina)



31) Allancina
R₁ = R₂ = H

32) 3-O-metilallancina
R₁ = Me, R₂ = H



33) Allamancina
R = H

34) 3-O-metilallamancina
R = Me

Figura 9 – Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados do gênero *Allamanda* (iridóides)

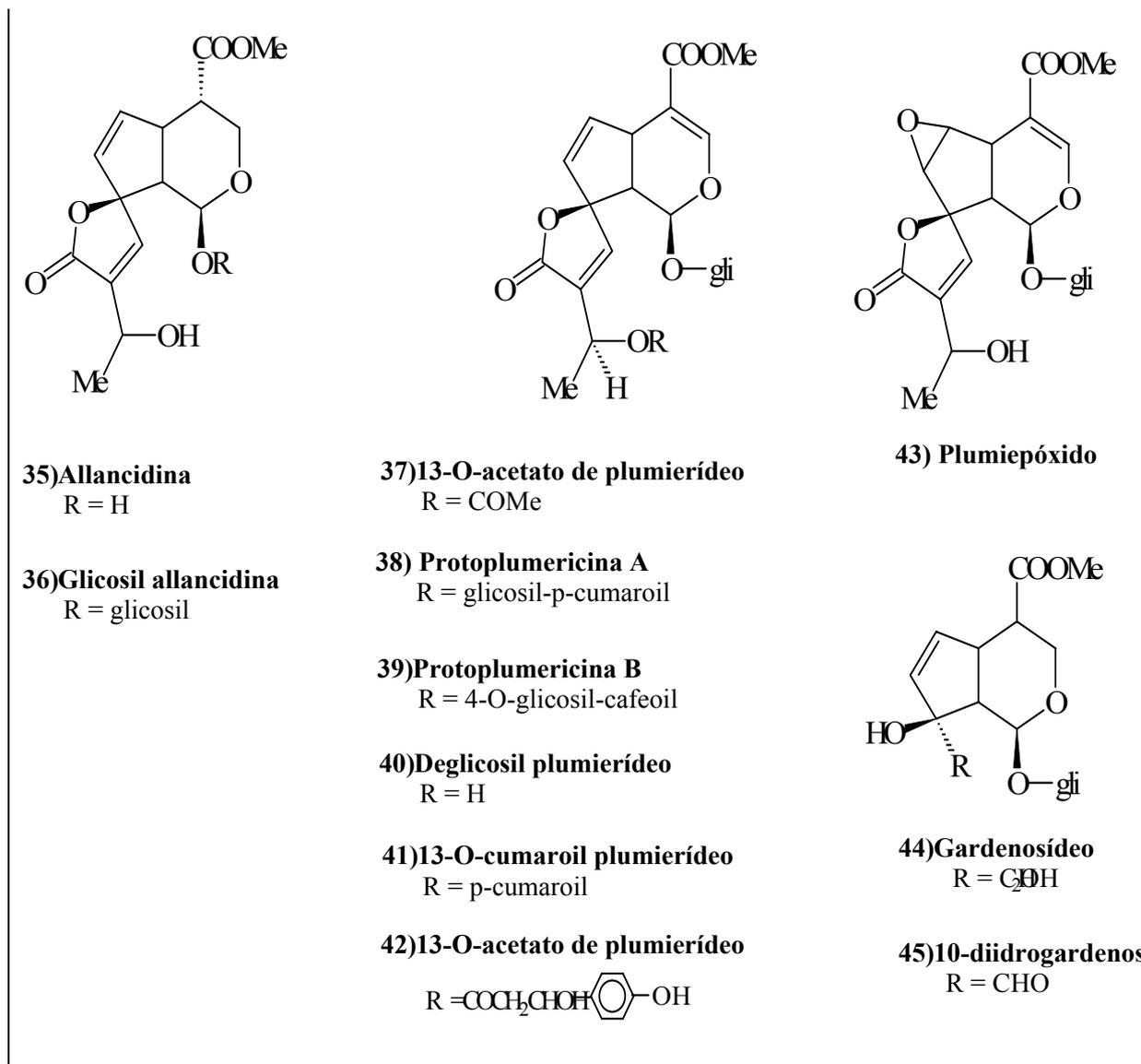
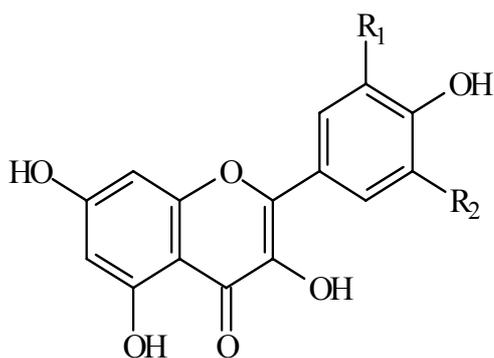


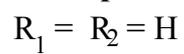
Figura 10 - Estruturas e nomenclaturas de constituintes químicos isolados no gênero

Allamanda (iridóides)

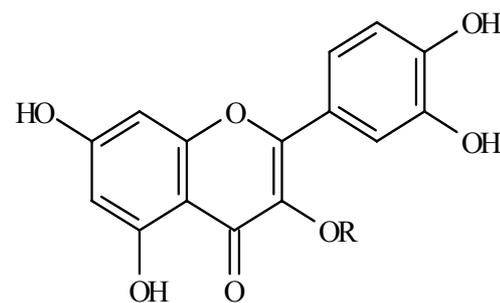
FLAVONÓIDES



46) Kaempferol



47) Quercetina



48) Rutina

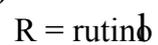


Figura 11 - Estruturas e nomenclaturas de constituintes químicos isolados no gênero

Allamanda (flavonóides)

Figura 12- Estruturas e nomenclaturas de constituintes químicos isolados no gênero *Allamanda* (esteróides)

Figura 13 – Estruturas e nomenclaturas dos constituintes químicos isolados do gênero *Allamanda* (terpenóides)

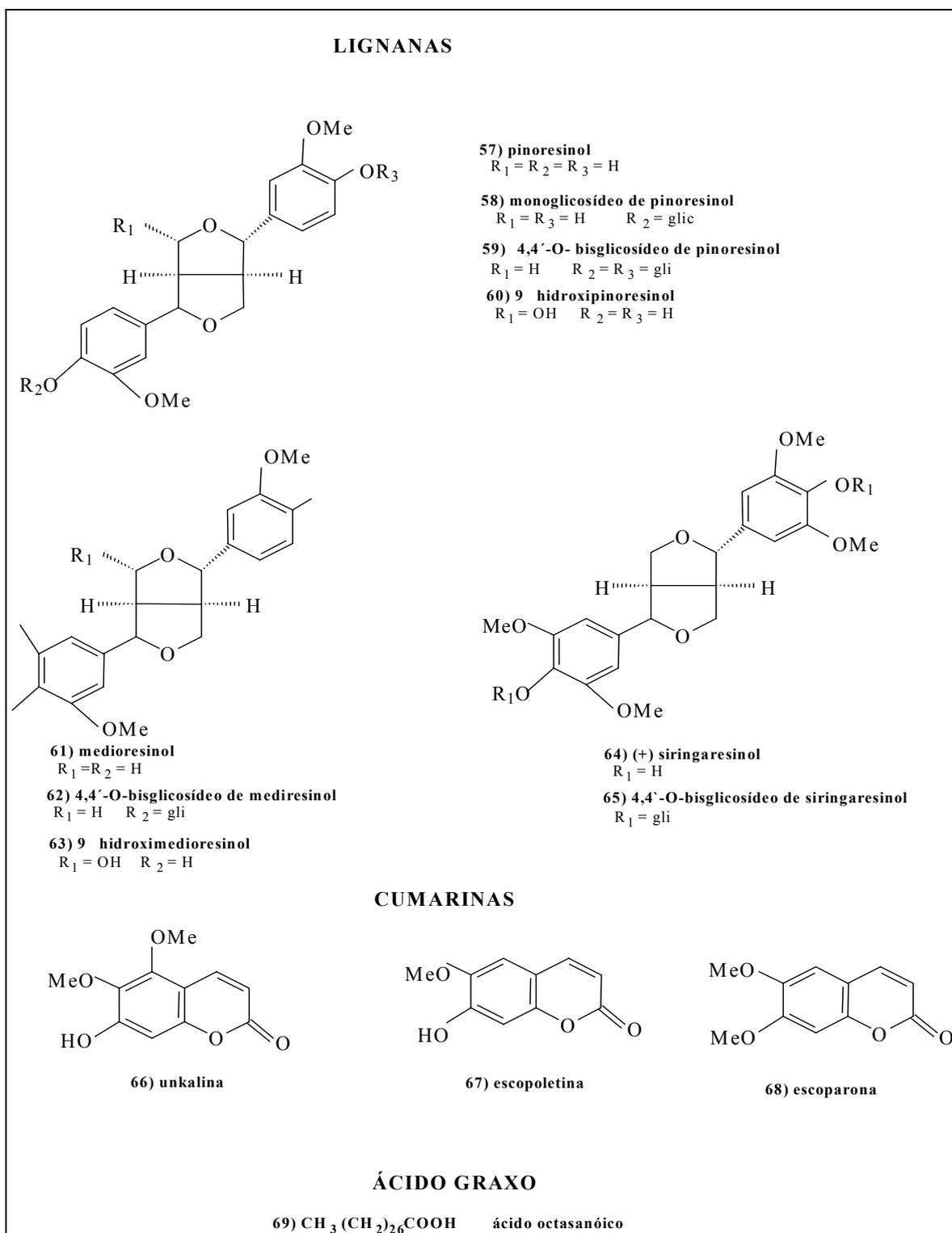


Figura 14 – Estrutura e nomenclatura dos constituintes químicos isolados no gênero

Allamanda (lignanas e cumarinas)

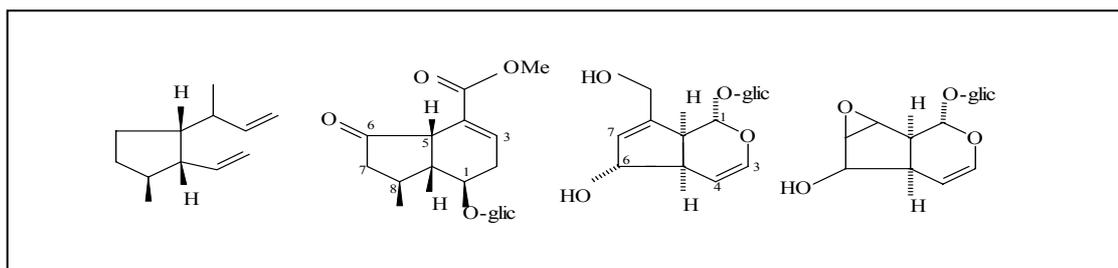
3.3. REVISÃO DOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS ENCONTRADOS NO GÊNERO *Allamanda*

No gênero *Allamanda* já foram encontrados diversos grupos químicos de expressiva atividade farmacológica. Na sequência do trabalho, será realizada uma descrição dos principais grupos químicos já estudados neste gênero, nos quais diversos metabólitos secundários foram isolados, identificados e testados farmacologicamente.

3.3.1. IRIDÓIDES

Os iridóides no gênero *Allamanda* podem ser considerados os grupos químicos de maior significância quanto às atividades farmacológicas que provocaram. Os iridóides são monoterpenos lactônicos, constituintes de óleos essenciais, bicíclicos (C₁₀), derivados biossinteticamente do monoterpeno geraniol e que apresenta como estrutura básica comum um ciclopentapirano denominado iridano, denominação atribuída, por ter sido detectado pela primeira vez em formigas do gênero *Iridomirmex*.¹⁵⁶

Estes compostos podem encontrar-se como estruturas abertas (secoiridóides) ou fechadas (iridóides), geralmente na forma heterosídica e na maioria das vezes como glicosídeo: plumeirídeo (**23**), verbenalina (**58**), aucubina (**59**), nedosídeo (**60**) ou não glicosilados: iridodial (**57**), plumericina (**21**), allamandina (**24**).¹⁵⁷



iridodial (**57**) verbenalina (**58**) aucubina (**59**) nedosídeo (**60**)^{158, 159, 160, 161}

Muitas plantas que possuem os iridóides em sua composição química são empregadas devido às suas propriedades farmacêuticas, porque aos heterosídeos iridóides são atribuídas diversas atividades sedativas, tranquilizantes e indutores do sono, (como ex: a valeriana e genciana). Também são importantes suas atividades antiinflamatórias, analgésicas, antibacterianas, antifúngicas, antitumorais e outras que serão descritas na revisão bibliográfica do gênero *Allamanda*.^{157, 148, 162, 149, 163, 164}

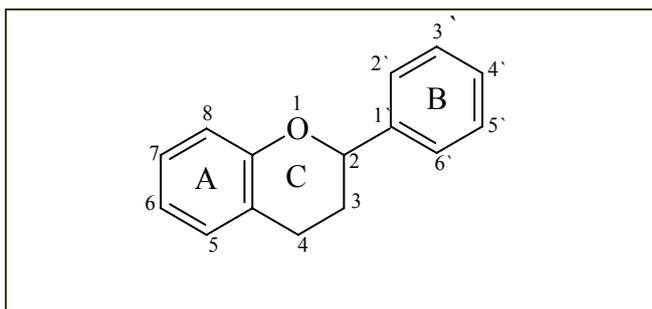
A biossíntese dos iridóides, a partir do geraniol pode ser observado na figura 15.

3.3.2. FLAVONÓIDES

Um grande número de flavonóides já foi isolado no gênero *Allamanda*.

Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e até o momento são conhecidos mais de 4200 flavonóides.¹⁶⁶ Pode-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto a maioria é representada pelo núcleo flavano, que é constituído de 15 átomos de carbono arranjados em 3 anéis ($C_6C_3C_6$), com a existência de 2 fenilas ligadas pela cadeia de 3 carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são denominadas de A, B e C, conforme a estrutura abaixo.¹⁶⁷

São polifenóis derivados da γ -cromona (benzo - γ - pirano) com um fenil na posição 2. Os átomos de carbono dos núcleos A, B e C recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e seguidos de uma linha (') para o núcleo B.¹⁶⁶



Núcleo fundamental dos flavonóides

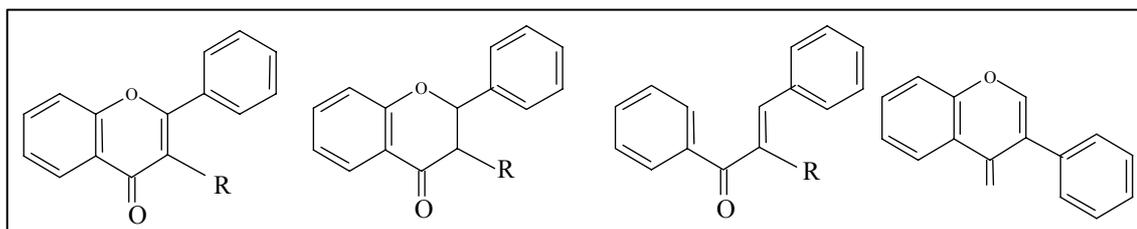
Os flavonóides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (geralmente a glicose). Esta forma conjugada

também é conhecida como heterosídeo. Quando o flavonóide não tem açúcar, é chamado de aglicona ou genina.¹⁶⁶

Os flavonóides são metabólitos secundários dos vegetais e sua biossíntese se realiza por 2 rotas: via ácido-chiquímico e via acetato, ou então, resultante da combinação das duas rotas biosintéticas.¹⁵⁶

A presença de flavonóides em espécies vegetais, parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, fungos, e bactérias), e seus pigmentos servem de atração a agentes polinizadores.

Inúmeras funções são atribuídas aos flavonóides: ação antiinflamatória, antioxidante, estrogênica, antitumoral, antiviral, antiespasmódica, aumento da resistência da parede de vasos sanguíneos, diminuição de riscos de doenças coronarianas e atividade alelopática.¹⁶⁸



Flavona R = H (**74**) Flavonol R = OH (**75**) Chalcona (**76**) Isoflavona R = OH (**77**)

3.3.3. CUMARINAS

No gênero *Allamanda* algumas cumarinas foram elucidadas estruturalmente.

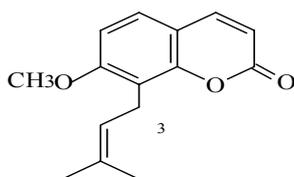
Aproximadamente 1300 cumarinas já foram isoladas de produtos naturais. Este grupo químico é encontrado com muita frequência em espécies vegetais, mas é relatada também a sua ocorrência em bactérias e fungos¹⁷⁰. Do ponto de vista estrutural, são consideradas lactonas do ácido-*o*-hidroxi-cinâmico (2H1-benzopiran-2-ona), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2-benzopirona). A terminologia cumarina é originária do cumaru, nome

popular caribenho da planta *Amburana cearensis* A. C. Smith e no norte Brasil, o cumaru é chamado de fava-tonka, cujas sementes contém 1 a 3% de cumarina.¹⁷¹

Com exceção da 1,2- benzopirona, todas as cumarinas são substituídas por um grupo OH na posição 7. A 7-hidroxi-cumarina, também conhecida como umbeliferona, é a precursora das cumarinas 6,7-di-hidroxiladas e 6,7,8-tri-hidroxiladas. Esses grupos hidroxilas podem ser metilados ou glicosilados. Além disso, também é comum a prenilação em várias posições do esqueleto cumarínico, podendo originar as pirano ou furanocumarinas lineares ou angulares. Abaixo estão relacionadas os principais tipos de cumarinas.¹⁷⁰

CUMARINAS SIMPLES

$R_1 = R_3 = H, R_2 = OCH_3$ (herniarina)



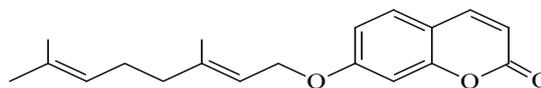
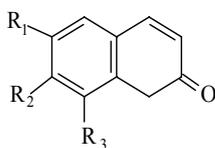
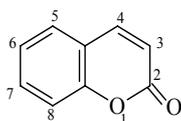
$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$ (umbelliferona)

$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$ (esculetina)

Cumarina(1,2-benzopirona) (78)

$R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$ (escopoletina)

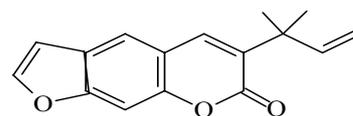
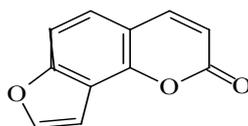
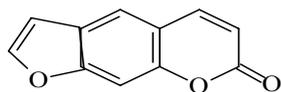
$R_1 = O\text{-glic}, R_2 = OH, R_3 = H$ (esculina)



(ostol) (79)

Cumarina O-prenilada (aurapteno) (80)

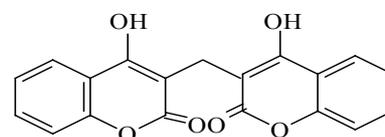
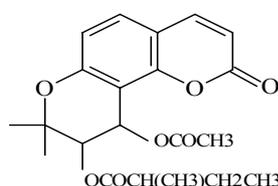
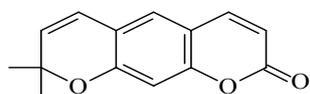
FURANOCUMARINAS



Linear (psoraleno) **(81)** angular (angelicina) **(82)** linear prenilada (chalepensisina) **(83)**

PIRANOCUMARINAS

CUMARINA DIMÉRICA



Linear (xantiletina) **(84)**

angular (visnadina) **(85)**

dicumarol **(86)**

Quanto a sua biogênese, as cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um dos seus primeiros precursores o ácido *p*-hidroxi-cinâmico (ácido-*p*-cumárico), que é hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação). O derivado *orto*-hidroxilado sofre isomerização fotocatalizada da ligação dupla (E→Z). O isômero Z lactoniza-se espontaneamente, produzindo a umbeliferona. A prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8 do derivado 7-hidroxi-cumarina é o passo inicial na biogênese das furano e piranocumarinas. A maioria das cumarinas deriva biogeneticamente da via do ácido

chiquímico, porém um número significativo delas parece derivar de uma via mista (ácido chiquímico e acetato).¹⁷⁰ Às cumarinas são atribuídas atividades terapêuticas importantes como: ação anticoagulante (dicumarol), imunossupressora, relaxante vascular, hipotensora (escoparona), vasodilatadora (ostol), espasmolítica (escopoletina) e *in vitro* (os calanolídeos), promoveram inibição da replicação do vírus HIV-1.^{172,173, 174, 175}

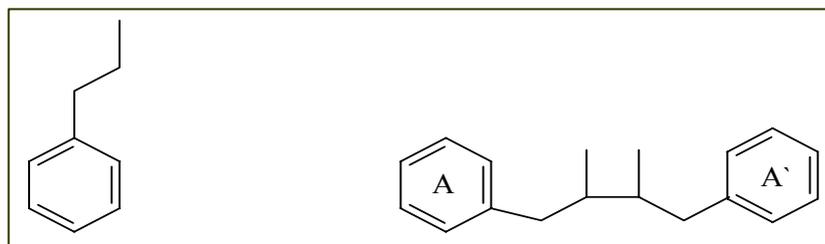
Os relatos da literatura demonstram o isolamento das cumarinas escopoletina e escoparona da *A.cathartica* e unkalina das raízes da *A.schottii*.^{164, 176}

3.3.4. LIGNANAS – Metabólitos dímeros C₆C₃

No gênero *Allamanda*, as lignanas isoladas (pinoresinol, medioresinol e siringaresinol) foram na quase totalidade encontrada espécie *A. nerifolia*.^{177, 164}

As lignanas são micromoléculas dímeras, cujo termo foi introduzido em 1940, para nominar uma classe de compostos de origem vegetal, que são formados através do acoplamento oxidativo de unidades *p*-hidroxi-fenilpropanos, como os álcoois cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos. Também pode ocorrer com monômeros como o álcool coniferílico ou álcool sinapílico, formando moléculas dímeras.

As lignanas apresentam duas unidades de C₆ e C₃. (fenilpropano) ligados pelos



carbonos β e β' da cadeia lateral.¹⁶⁹

Estrutura básica das lignanas

Os lignóides, que é uma designação genérica, que caracteriza micromoléculas possui o esqueleto formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C_6-C_3) n , sendo n restrito a poucas unidades, 1,2,3. Os lignóides subdividem-se em diversos grupos.

As neolignanas foram nominadas a partir de 1978, com a finalidade de designar dímeros oxidativos de alil fenóis e de propenil fenóis, nas quais as unidades C_6-C_3 encontram-se ligadas por outras posições que não as β e β' , não apresentando o carbono γ -oxigenado.¹⁷⁸

O elevado número de lignanas e neolignanas distribuídas no reino vegetal, e graças a expressiva ação antimicrobiana, antifúngica, inseticida, antiinflamatória, anti-hepatotóxica, antileucêmica, anti-PAF (fator antiagregante plaquetário) e antialérgica têm despertado grande interesse biológico em muitos ensaios químicos e farmacológicos.^{179, 180}

3.3.5. DERIVADOS DO ISOPRENO

(produtos da via mevalonato)

O mevalonato é formado da condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula da acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutari-CoA que é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é então convertido em isopentil-pirofosfato, ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula

isopentenil-pirofosfato e seu isômero formam *trans*-geranil-pirofosfato, a partir do qual forma-se os demais terpenos.^{181, 182}

Novas ligações cabeça-cauda entre *trans*-geranil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultarão em sesquiterpenos (15 carbonos) e diterpenos (20 carbonos). Já a ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (15C) dará origem ao esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides.¹⁷⁴

Os triterpenos (30C) originam-se majoritariamente do epoxiesqualeno e em menor número da ciclização do próprio esqualeno, enquanto os esteróides (27C) podem ser considerados metabólitos secundários dos triterpenos. Dentre os triterpenos e esteróides de origem vegetal, de grande importância estão as saponinas.¹⁸¹

3.3.6. SAPONINAS

As saponinas têm seu nome derivado do latim *sapo*, *saponis* que significa sabão, em virtude de possuírem propriedades tensoativas, formando espuma persistente após agitação e também propriedades detergentes. A maioria das saponinas possui propriedades hemolíticas, uma vez que, alteram a permeabilidade das membranas biológicas produzindo toxicidade para animais de sangue frio. Por esta razão, algumas plantas que contêm estes princípios ativos têm sido empregada desde a antiguidade na arte de pescar.^{183, 181, 184}

As saponinas são detentoras de interesse farmacêutico em 2 níveis. Por um lado, devido a sua atividade farmacológica e aplicação direta na terapêutica e por outro, porque podem ser utilizadas indiretamente como precursores de anticoncepcionais orais e na farmacotécnica são bastante utilizadas como tensoativos naturais.¹⁸³

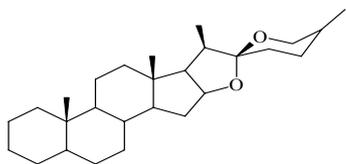
São compostos com estrutura heterosídica e em geral a união ao açúcar se realiza sobre a OH do C-3 e em alguns casos se estabelece uma esterificação adicional em outras moléculas

glucídicas através do grupo ácido situado sobre o C-28. A partir de rearranjos as saponinas podem originar triterpenos tetracíclicos e triterpenos pentacíclicos.¹⁷⁷

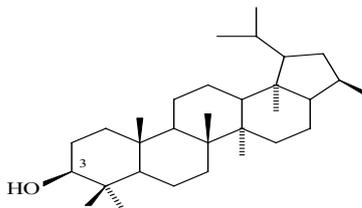
Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em 3 grupos: α -amirina, β -amirina e lupeol. As saponinas do tipo β -amirina (conhecidas também como oleananos) apresentam 2 metilas em C-20 e o tipo α -amirina (ou ursanos) apresentam 1 metila em C-20 e outra em C-19 e todos apresentam um OH no carbono 3.

As saponinas do tipo lupeol diferem estereoquimicamente daquelas acima citadas. Além disso, ao quinto anel (E) possui 5 carbonos, não sendo hexagonal como nas outras saponinas triterpênicas^{182, 185}. As saponinas geralmente hexacíclicas e com 27 átomos de carbono (espirostanos) (**87**) se localizam em plantas Monocotiledôneas e as triterpênicas com 30 átomos de carbono, tetracíclicos (damarano) (**88**) ou pentacíclicas (lupanos -**90**, oleananos-**89** e ursanos) são encontradas com maior facilidade em Dicotiledôneas, Pteridófitas e alguns animais marinhos.¹⁸⁵ As diferentes estruturas de saponinas tetra, penta e hexacíclicas são observadas na figura 16.

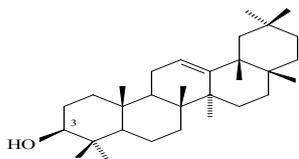
Muitos dos efeitos farmacológicos atribuídos a saponinas triterpênicas, estão relacionados com sua capacidade de permeabilizar membranas biológicas (atividade hemolítica). Outras atividades clínicas são relatadas como: atividade antiviral, citotóxica (antitumoral), espermicida, analgésica, expectorante, antihemorróida e antiinflamatória.^{186,183,}



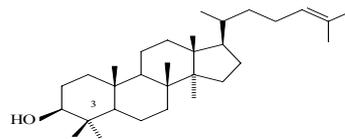
Espirostano (**87**)



Damarano (**88**)



Oleanano (89)



Lupano (90)

Figura 16 - Estruturas tetra, penta e hexacíclicas de saponinas

3.4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA *Allamanda cathartica* L.

A espécie *A.cathartica* é a mais estudada no gênero e por este motivo achamos conveniente fazer a sua revisão bibliográfica.

Nome científico: *Allamanda cathartica*

Sinônimo: *Allamanda cathartica* var. *hendersonii* (L.H. Bailey e Raffill)

Allamanda herndersoni (Bull e Dombrain)

Nomes vulgares: dedal de dama, alamanda amarela, carolina, alamanda da flor grande, alamanda purgante, orélia, quatro patacas amarela

Fenologia: floresce e dá frutos em quase todo ano

Área de dispersão: litoral norte, nordeste, leste e sudeste do Brasil.

Cultivada em todos os países tropicais e quase selvagens em grande parte da América tropical ^{137, 134, 187}

3.4.1. Características botânicas

Trepadeira lactescente, semilenhosa ou arbusto grande, apesar de tropical tolera pouco o frio. Multiplica-se por estacas cortadas na primavera-verão. Nas regiões de origem produzem

bastante sementes. É frequentemente cultivada em jardins e caramanchões por causa de suas grandes, abundantes e vistosas flores amarelas.¹³⁴

Possui folhas verticiladas (3-5 cm), curto pecioladas, oblongo-obovais ou elípticas, em geral brilhantes na face superior, nervuras principais na parte de baixo. As inflorescências são hirsutas, com brácteas mínimas claras. Sépalas verde-claras, largamente ovais, corola amarela afunilada. Os frutos (4-5 cm de comprimento, 4 cm de largura), espinhos com 15 mm de comprimento. As sementes são obovais, 15-20 mm de comprimento por 15 mm de largura e 1,5 mm de grossura.^{187, 134}

3.4.2. Estudos fitoquímicos anteriores

No gênero *Allamanda*, a *A. cathartica* (figura 17) é a espécie mais cultivada e estudada até o momento.¹⁸⁸

Ao seu látex obtido após lesão, são atribuídas diversas virtudes medicinais. A literatura etnofarmacológica relata que essa espécie é usada há muito tempo na medicina popular, onde se utiliza a infusão das folhas como catártico, a decocção dos caules e folhas como hidragogo muito enérgico, em doses mínimas exerce ação antihelmíntica e violentamente emética, se ingerida em altas dosagens. O látex também se mostrou purgativo, porém se ingerido em doses maiores provoca significativa toxicidade.^{189, 190} Na China existem relatos de seu uso como abortiva.^{189, 191} Os indígenas das Guianas utilizavam o decocto de sua casca deixada algum tempo ao sol como febrífugo, em aplicação tópica, esfregando-o no corpo.¹⁹²

As flores e raízes são usadas pela população em forma de suco para combater afecções do baço e casos de intoxicação saturnina (cólica de pintores ou cólica do chumbo). Ainda existem relatos que o decocto tem sido utilizado no combate a escabiose e pediculose.^{134, 189,}

Em 1954, foi publicado o primeiro trabalho sobre *A cathartica* apontando o isolamento do ácido ursólico **(53)** de suas folhas.¹⁹³ Na sequência, muitos outros trabalhos foram publicados registrando o isolamento dos flavonóides canferol **(46)**¹⁹⁴ e quercetina **(47)** das flores¹⁹⁵, β -sitosterol **(49)**, β -amirina **(52)** e ácido ursólico **(53)** dos caules e folhas¹⁴⁴ e dos caules e raízes foram isolados os iridóides plumericina **(21)** e isoplumericina **(22)**.¹⁴⁵

Outros trabalhos foram desenvolvidos, com relatos de isolamento da allamandina **(24)**, isoallamandina, allancina **(31)**, 3-O-metil allancina **(32)**, allamancina **(33)**, 13-O-acetato metil allamancina, allancidina **(35)**, glicosil allancindina **(36)**, 13-O-acetato de plumierídeo **(37)**, protoplumericina A **(38)**, protoplumericina B **(39)**, deglicosil-plumierídeo **(40)**, 13-O-cumaroil plumierídeo **(41)**, plumiepóxido **(43)**, gardenosídeo **(44)**, 10-diidrogardenosídeo **(45)** (ABE et al,1984) e algumas lignanas.¹⁴⁶ Em 1974, KUPCHAN³³ e colaboradores isolam e elucidam estruturalmente a allamandina **(24)**.

Ainda foram isolados, protoplumericina **(38)**¹⁵⁰, β -sitosterol **(49)**, 5,6-diidroestigmasterol **(50)**, sitosterona **(51)**, β -amirina **(52)** e ácido octasanóico **(68)**.¹⁴²



Figura 17 – *Allamanda cathartica*

A partir de extrato das flores foram isolados, β -sitosterol (**49**), lupeol (**54**), acetato de lupeol (**55**) e trifolina (**56**).¹⁷⁶

No ano de 2000, foi isolado das flores da *A. cathartica*, compostos voláteis como o linalol, dendrolasina e β -cariofileno.¹⁵²

3.4.3. Estudos farmacológicos anteriores

O primeiro ensaio da atividade farmacológica desta espécie foi realizado por JEWERS e colaboradores que ao utilizarem o extrato das raízes em éter de petróleo, éter etílico e clorofórmio observaram que provocava toxicidade em ratos (1971)¹⁴⁷. Estes mesmos autores isolaram desta espécie, o ácido ursólico (**53**) e os iridóides plumierídeo (**23**), plumericina (**21**) e isoplumericina (**22**).

Os constituintes químicos isolados, allanerosídeo, cumarato de plumierídeo (**29**), glicosil cumarato de plumierídeo (**30**), 13-O-acetato de plumierídeo (**37**) e plumierídeo (**23**), demonstraram atividade inibitória no crescimento de planta.¹⁹⁶

Atividade antifúngica também foi constatada para o extrato metanólico das flores, sendo o responsável por esta ação o composto allamanosídeo¹⁴⁸ e atividade algicida, foi relatada para os iridóides cumarato de plumierídeo (**29**) e glicosil cumarato de plumierídeo (**30**).¹⁴⁸

Em 1986, KEWIN e PATTENDEN, comprovam a atividade antifúngica e antibacteriana da plumericina (**21**).¹⁹⁷

Outros compostos como a plumericina (**21**), isoplumericina (**22**), allamandina (**24**), allancina (**31**), pinosinol (**57**), escopoletina (**67**) e escoparona (**68**) demonstraram efetividade inibitória em células tumorais de câncer de seio, cólon, pulmão e melanomas, o que sugere possíveis e promissores estudos futuros em outras espécies.^{33, 163, 164}

Mais recentemente (1997) KADER e colaboradores ¹⁹⁸ ao estudar a família Apocyanaceae, da fração acetato de etila da *A. cathartica* foram isolados os iridóides bioativos plumericina (**21**), isoplumericina (**22**) e da espécie *Himatanthus fallax* foram isolados o plumierídeo (**23**), pinoresinol (**57**), matairesinol e uma nova lignana 7-(R)- metóxi-8-epi-matairesinol.

Foi comprovada também a atividade antinematocida de extratos de *A. cathartica* ¹⁹⁹ e em testes de infertilidade houve resposta satisfatória quando foi administrado 15 mg ao dia em ratos machos por um período de 60 dias.

E, em estudos de Etnofarmacologia são relatados a neutralização da hemorragia causada pela cobra *Bothrops atrox* Venom, ao se utilizar extratos de *A. cathartica* ²⁰⁰.

O gênero *Allamanda* ainda pode contribuir de forma significativa através de compostos que exercem atividade antiviral, como é o caso do iridóide fulvoplumierina (**28**), que em ensaios realizados por 2 grupos de pesquisa: TAN e colaboradores (1991) e KARDONO e colaboradores (1990),¹⁶³ onde ambos os trabalhos, demonstraram efetividade contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).

Porém, entre os trabalhos mais relevantes do gênero *Allamanda* é importante salientar que, em investigações com inibidores tumorais a partir de produtos naturais, o iridóide allamandina (**24**), obtido do extrato etanólico de raízes de *Allamanda cathartica* demonstrou significativa efetividade *in vivo*, quando testada em ratos, contra a leucemia P-388 e *in vitro* contra células derivadas de carcinoma humano do nasofaríngeal (KB) ^{163, 33}.

3.5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA *Allamanda blanchetti*

Nome científico: *Allamanda blanchetti*, A. DC

Sinônimo: *Allamanda violaceae* (Gardner e Fielding)

Nomes vulgares: alamanda roxa, alamanda rosa, alamanda de jacobina

Fenologia: floresce na primavera e verão

Área de dispersão: cultivada em todos os países tropicais . No Brasil é encontrada em quase todo litoral e zonas quentes do país ^{134, 189}

3.5.1. Características botânicas

Arbusto semilenhoso, escandente de ramos pilosos e folhas verticiladas, sésseis, nativo do norte do Brasil. Possui ramagem longa, com folhas elípticas ovaladas, cerosas de cor verde opaca, com 8-16 cm de comprimento. Inflorescências com flores roxas na espécie típica, campanuladas, mas com variedades que vão do branco creme ao amarelado e róseo arroxeado, por segregação genética nas plantas obtidas por sementes. São plantas de pleno sol, conduzidas como trepadeiras ornamentais revestindo grades, cercas e portais. Planta tropical que não tolera o frio e podem ser multiplicadas tanto por estacas, como por sementes. Contém suco acre. ¹³⁴

3.5.2. Estudos fitoquímicos anteriores

A *A. blanchetti* constitui-se uma espécie pouco estudada quimicamente (figura 18). Na revisão bibliográfica a literatura relata apenas 3 trabalhos. O primeiro relata o isolamento dos iridóides plumericina (**21**), isoplumericina (**22**)²⁰¹. O segundo descreve o isolamento da cumarina 5,6-dimetoxi-7-hidroxi (unkalina) (**66**), a qual foi obtida de extratos preparados a partir de suas raízes¹⁷⁶. E o último estudo, aponta a investigação da composição química das flores da *A. blanchetti* onde foram isolados e e identificados estruturalmente, o β -sitosterol (**49**), lupeol (**54**), acetato de lupeol (**55**) e trifolina (**56**)¹⁹⁴.



Figura 18– *Allamanda blanchetti*

3.5.3. Estudos farmacológicos anteriores

Na revisão da literatura não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse algum ensaio biológico ou farmacológico da *A. blanchetti*.

3.6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA *Allamanda schottii*

Nome científico: *Allamanda schottii* Pohl

Nomes vulgares: alamanda da flor pequena

Fenologia: flores e frutos presentes em quase todo ano, de preferência na primavera

Área de dispersão: encontrada com frequência no estado do Rio de Janeiro e Bahia. No

estado de Santa Catarina é o planta cultivada para fins ornamentais^{187, 202, 203}

3.6.1. Características botânicas

A denominação dessa espécie de *Allamanda* é dedicada ao coletor H. W. Schott (1794-1865), jardineiro chefe imperial de Viena¹⁸⁷.

A *A. schottii* é considerada planta exótica (figura 19), por vezes crescendo em forma sub-spontânea em capoeiras pela fuga do cultivo. No seu habitat natural, cresce de preferência perto dos rios. Constitui-se arbusto grande e bastante utilizado em jardins como espécie ornamental, por possuir semelhança com a *A. cathartica*, sendo aquela de flores de tamanho menor. Caracteriza-se por possuir ramos levemente pilosos, folhas verticiladas de 3-5 cm, quase sésseis, elípticas e sem brilho. Possui inflorescências curto-peludas, com brácteas lineares de 3 cm de comprimento. Suas sépalas são verde-securas, estreitamente ovais, com flores amarelo-citrino onde mostram corola amarela escuro por dentro e listrada por fora. Seus frutos medem 3,5-4 cm de comprimento por 2-3,5 cm de largura e os espinhos medem 10 mm de comprimento. As sementes são elípticas-orbiculares, de cor marrom e

abrigam-se dentro da cápsula espinhosa, características botânicas que podem ser observadas na figura 19 ¹⁸⁷.

3.6.2. Estudos fitoquímicos anteriores

Na revisão bibliográfica, a literatura relata pouquíssimos trabalhos realizados com esta espécie vegetal. Ensaio realizado com extratos obtidos a partir de suas flores evidenciaram o isolamento do plumierídeo (23), cumarato de plumierídeo (29), glicosil cumarato de plumierídeo (30), canferol (46), quercitina (47), rutina (48), β -sitosterol (49) e β -amirina (52) ^{194, 195}.

O outro trabalho, relata o isolamento da isoplumericina (22), plumericina (21), alamandina (24) e alancina (31), todos iridóides obtidos a partir de extratos de caules da *A. schottii*. ¹⁶⁴



Figura 19 - *Allamanda schottii*

3.6.3. Estudos farmacológicos anteriores

O levantamento bibliográfico, não relatou nenhum estudo biológico ou farmacológico com a *A. schottii*.

Baseado em dados confiáveis da literatura, tanto a espécie *A. blanchetti* como *A. schottii*, são portadoras de um leque infinito de investigação fitoquímica, uma vez que são reduzidos os estudos de isolamento e identificação, e qualquer resultado biológico ou farmacológico que se obtenha de qualquer uma das duas espécies, será até o momento, considerado inédito nas 2 espécies.

Com a intenção de se comparar, de forma objetiva as 4 espécies do gênero *Allamanda*, a tabela 7 mostra os diferentes compostos químicos já isolados de cada espécie

Continuação

Espécie Composto	<i>Allamanda cathartica</i>				<i>Allamanda neriifolia</i>				<i>Allamanda schottii</i>				<i>Allamanda blanchetti</i>				Referências
	R	C	F	FI	R	C	F	FI	R	C	F	FI	R	C	F	FI	
44) gardenosídeo																	145
45) 10-diidro-gardenosídeo																	145
46) kaempferol																	194, 193
47) quercetina																	194, 193
48) rutina																	163, 193, 194
49) β sitosterol																	141, 143, 174, 194, 193
50) 5,6-diidro estigmasterol																	141
51) sitosterona																	141
52) β amirina																	141, 143, 193, 194
53) ácido ursólico																	143, 145, 192
54) lupeol																	174, 193,
55) acetato de lupeol																	174, 193
56) trifolina																	174, 193
57) pinoresinol																	163, 33, 197, 162
58) monoglicosídeo de pinoresinol																	175
59) 4,4'-O- bisglic. de pinoresinol																	175
60) 9 α hidroxi-pinoresinol																	175
61) medioresinol																	175
62) 4,4'-O-bisglicosídeo medioresinol																	175
63) 9 α hidroxi medioresinol																	175
64) (+)siringaresinol																	175
65) 4,4'-O-bisglic. siringaresinol																	175
66) unkalina																	174
67) escopoletina																	163, 33, 162
68) escoparona																	163, 33, 162
69) ácido octasanóico																	200, 141
Linalol																	151
Dendrolasina																	151
β cariofileno																	151

Legenda: R – raiz C – caule F – folhas FI – flores

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O perfil cromatográfico preliminar dos extratos e compostos puros obtidos foi realizado em CCD, com placas de sílica gel 60 GF 254, de 20 μm de espessura e preparadas sobre folhas de alumínio, de procedência Merck e vários sistemas de eluentes. Os reveladores químicos específicos empregados nos procedimentos em camada delgada incluem anisaldeído sulfúrico (detecção de terpenos e esteróides), solução de cloreto férrico a 3% em etanol (compostos fenólicos), Dragendorff (alcalóides), solução etanólica de KOH a 10% (cumarinas e lignanas) e reveladores universais como ácido sulfúrico/metanol e câmara de iodo.

Para visualização da fluorescência dos compostos rastreados por CCD, utilizou-se de radiação ultravioleta Minerallight ($\lambda = 254$ e 366 nm).

Nas cromatografias em coluna, utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) de granulometria 70-230 mesh ($\phi = 0,063-0,20$ mm). O diâmetro e altura das colunas foram escolhidos de acordo com a quantidade do material a ser cromatografado. O sistema de eluição foi realizado com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos através de espectrofotômetro 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 (^1H 300

MHz; ^{13}C da Universidade Cattolica de Sacro Cuore UCSC/ Roma) tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou próprio solvente. Todos os solventes utilizados eram solventes deuterados. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm).

Os extratos foram concentrados em rotavapor BUCH RE-120 e acoplado a B.M. com controle de temperatura. Os extratos, frações e compostos foram pesados em balança analítica SHIMADZU LIBROR-AEG-220 e SHIMADZU LIBROR EB-330D. Os solventes foram de pureza analítica Merck e Reagen.

4.2. ANÁLISE DO PERFIL FITOQUÍMICO PRELIMINAR DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

A fim de se avaliar as diferenças na composição química da *A. cathartica* (bastante estudada), *A. blanchetti* e *A. schottii*, as quais possuem poucos estudos químicos; como um primeiro passo do trabalho, realizou-se um estudo cromatográfico comparativo (CCD) entre as três espécies.

Foram coletadas raízes, caules, folhas e flores das três espécies numa mesma localidade (Campus Universitário–UFSC) da cidade de Florianópolis – SC em 2003 (verão). Optou-se por coletar as três espécies de uma mesma região, a fim de se evitar possíveis interferências quanto a tipo de solo, pH, nutrientes ou condições climáticas diversificadas.

A coleta realizou-se em dia ensolarado e na seqüência, as partes vegetais das três espécies (100g de cada espécie vegetal) foram reduzidas a pequenos fragmentos e desidratadas separadamente a temperatura ambiente, em local arejado. Posteriormente cada

parte foi reduzida a pó grosseiro e submetidas separadamente a processo extrativo pelo método da maceração com etanol por 10 dias, ao abrigo da luz, calor e umidade.

O extrato bruto de cada parte de cada planta, foi obtido após evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório à temperatura inferior a 50°C. Os extratos brutos, na sequência, foram suspensos em água e particionados em solventes de polaridade crescente, originando as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O rastreamento de possíveis grupos químicos com as frações obtidas foi realizado através de CCD, com sistemas de eluentes de polaridade crescente, reveladores usuais e padrões previamente isolados. Os grupos químicos rastreados foram terpenos e esteróides (anisaldeído sulfúrico), flavonóides (cloreto férrico), alcalóides (Dragendorff), cumarinas e lignanas (KOH 10%). Os padrões autênticos utilizados no experimento foram o plumierídeo, plumericina, ácido ursólico, canferol, rutina, quercetina e quercitrina, fitoconstituintes isolados anteriormente na espécie *A. cathartica*.^{34, 142, 146, 148, 150, 151, 163, 164 176}

Os resultados da detecção dos grupos químicos e metabólitos secundários investigados nas 3 espécies, são demonstrados na tabela 9, página 142.

4.3. MATERIAL VEGETAL : *Allamanda blanchetti*

4.3.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Para dar início ao estudo visando o isolamento de compostos da espécie *A. blanchetti* foram realizadas 2 coletas diferentes : uma coleta da planta adulta e outra coleta da planta jovem, com a finalidade de estabelecer-se um parâmetro comparativo do perfil fitoquímico

entre as 2 espécies em idades cronológicas diferentes, para que em estudos posteriores se pudesse direcionar e otimizar as futuras coletas.

Tais coletas não foram realizadas no Campus Universitário da UFSC- Florianópolis, uma vez que nesta localidade a quantidade de planta existente era reduzida e em trabalhos posteriores haveria a necessidade de volumes maiores que possibilitassem o processo de isolamento de fitoconstituintes.

Coletou-se então, da planta adulta: folhas (297,60 g), caules (368,78 g), raízes (198,40 g) e flores (143,70 g), na localidade Ponta do Sambaqui (Florianópolis-SC). A coleta deu-se em dia ensolarado, às 15h do mês de fevereiro de 2002, sendo que esta planta já possuía 2 anos de cultivo. A outra coleta feita com a planta jovem, com 3 meses de cultivo, foi adquirido na loja Prosar (Florianópolis-SC), onde foram coletados folhas (24,24 g), caules (81,50 g) e raízes (18,15 g). Todas as amostras foram utilizadas para um estudo comparativo entre os órgãos das 2 plantas e em idades diferentes. As espécies coletadas foram identificadas botanicamente pelo professor Oscar Benigno Isa, do Herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí – SC), onde uma exicata encontra-se depositada sob número de referência **HBR 52524**.

4.3.2. OBTENÇÃO DE EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

As flores da planta adulta coletadas foram imediatamente (*in natura*) colocadas para macerar em etanol (P.A), em recipiente fechado ao abrigo da luz, calor e umidade, por um período de 10 dias.

Os outros órgãos representados pelas folhas, caules e raízes, tanto da planta adulta como da planta jovem, separadamente foram reduzidos a pequenos fragmentos e colocados para desidratar à temperatura ambiente. Depois de secos, foram pulverizados e separadamente

submetidos à maceração exaustiva com etanol (P.A.) por 10 dias em recipiente fechado, ao abrigo da luz, calor e umidade.

Os extratos etanólicos obtidos de todos os órgãos das 2 coletas, tiveram seu solvente evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, em temperatura entre 50 e 60°C, para obtenção de seus respectivos extratos, os quais foram guardados em dessecador para evitar contaminações. Da planta adulta se obteve: 16,02 g de extrato das raízes, 22,04 g de extrato dos caules, 46,70 g de extrato das folhas e 23,12 g de extrato das flores. Da planta jovem os pesos obtidos foram: extrato raízes (1,81 g), folhas (5,37 g) caules (7,79 g). A porcentagem de rendimento de cada extrato bruto pode ser observada na tabela 10, página 144.

Na sequência do trabalho, apenas os extratos da *A.blanchetti* (fase adulta) foram suspensos em água e sucessivamente particionados com Hex, DCM, AE e BuOH, originando as respectivas frações. Com os valores em massa obtidos de todas as frações citadas e de todos os órgãos da *A. blanchetti* foram calculados os percentuais de rendimento (massa) de cada fração, os quais são mostrados na tabela 11, página 145.

4.3.3. ENSAIOS FITOQUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE ESPÉCIE JOVEM E ESPÉCIE ADULTA DA *A.blanchetti*

Inúmeras vezes, durante uma investigação fitoquímica, para dar continuidade ou concluir-se um trabalho, há necessidade de se fazer mais de uma coleta da espécie em estudo e frequentemente, não se encontra a planta com a mesma idade cronológica. Neste estudo, com o objetivo de se averiguar, se existem diferenças significativas na composição química de um planta jovem (3 meses de cultivo) e uma planta adulta (2 anos de cultivo), realizou-se

um ensaio comparativo por CCD, com os extratos brutos obtidos de todos os órgãos da *A. blanchetti*. Utilizou-se para esta triagem, reveladores universais e reveladores específicos para flavonóides, terpenos, alcalóides, cumarinas, lignanas, grupos esteroidais e UV visível. Também foram utilizados padrões autênticos de quercetina, plumierídeo, plumericina, estigmasterol, β -sitosterol, campesterol e ácido ursólico, porque a literatura cita como compostos já isolados neste gênero.^{142, 144, 146, 147, 149, 150, 164, 175, 191, 194, 195, 196}

Os grupos químicos detectados neste rastreamento encontram-se na tabela 12 da página 147.

4.3.4. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS

Uma vez feita a triagem dos principais grupos químicos presentes na espécie em estudo, optou-se pela escolha da planta adulta da *A. blanchetti* para a realização do isolamento dos seus fitoconstituintes. O motivo que levou a escolha da planta nesta idade cronológica, foi o fato de se ter obtido uma quantidade maior em massa de seus extratos, o que teoricamente oportunizaria uma extração de metabólitos secundários em concentração suficiente para a elucidação espectroscópica e testes biológicos.

Com o objetivo de resgatar compostos bioativos da *A. blanchetti*, os extratos brutos obtidos de todos os órgãos (pesos já citados na página 144) da *A. blanchetti* (planta adulta) foram suspensos em água e então, sucessivamente particionados em solventes imiscíveis (líquido-líquido) em escala de polaridade crescente. A partição não apresentou emulsão e as frações obtidas foram: hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AE) e butanol (BuOH). O único órgão que não se conseguiu obter a fração BuOH foi a raiz, uma vez que, houve aderência energética ao funil de separação, a qual foi solubilizada somente com EtOH, dando origem a nova fração: resíduo etanólico da raiz.

Os pesos das frações obtidas a partir de extratos brutos da planta adulta, estão descritos na tabela 11, página 145.

4.3.5. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS E CAULES DA *A. blanchetti*

Quando monitorados por CCD, o perfil químico do extrato bruto dos caules e folhas do verão foram idênticos, sendo por este motivo, reunidos os extratos dos 2 órgãos antes da partição líquido-líquido. Para o isolamento de possíveis metabólitos secundários da *A. blanchetti* foram escolhidas, as frações hexano e AE, por apresentarem bom perfil cromatográfico.

O fluxograma de procedimentos utilizados para o fracionamento das 2 frações está descrito na figura 8, página 40.

Durante o desenvolvimento do trabalho, só serão relatadas as colunas que depois de cromatografadas originaram compostos puros. No entanto, foram realizadas inúmeras colunas, das quais não se obteve sucesso na purificação. Na sequência serão demonstrados os constituintes químicos isolados da fração hexânica e fração AE das folhas e caules da *A. blanchetti*.

4.3.5.1. Fração Hexânica

A partir de 4,70 g da fração hexânica oriunda de folhas e caules (verão) da *A. blanchetti*, submeteu-se a amostra à cromatografia em coluna (ϕ 3cm, altura = 26cm,) de sílica gel (91,42 g), empacotada com hexano e eluída com hexano: AE, com aumento gradativo de polaridade. Foram coletadas 143 alíquotas de 25 mL cada. As frações foram reunidas por similaridade e a

seguir observadas por CCD. Da fração H-53-63, eluída com Hex:AE (80:20), isolou-se o composto **53-63H** (14 mg), que após lavagem com AE/MeOH e MeOH, apresentou-se como cristal branco.

4.3.5.2. Fração AE

Uma alíquota (4,97 g) da fração AE, obtida das folhas e caules da *A. blanchetti* foi submetida à CC (ϕ 3 cm, altura = 29 cm), de sílica gel (128,30 g), empacotada com clorofórmio CHCl₃: MeOH (95:05) e eluída com aumento gradativo de polaridade. Foram coletadas 101 frações de 25 mL cada. Depois de monitoradas por CCD, as frações com semelhança de R_f foram reunidas e recromatografadas. Das frações reunidas 59-73, eluídas com CHCl₃: MeOH (90:10), (85:15) e (80:20), isolou-se o composto **59-73AE** (64,1 mg), de cor amarela e que apresentou no UV longo (366 nm) coloração lilás forte.

A fração AE-101 (2,69 g) obtida nesta CC inicial, foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm, altura = 36 cm), de sílica gel (41 g), empacotada com CHCl₃ e eluída com CHCl₃: MeOH 98:02 e gradualmente enriquecida com MeOH. Foram coletadas 110 frações de 25 mL. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças de R_f, sendo que estes ficaram muito próximos e não se purificou nada. A fração AE 80-101 (oriunda da fração AE 101-91,5 mg) empacotada com CHCl₃ eluída com CHCl₃ : MeOH (98:02) e gradualmente enriquecida com MeOH, foi recromatografada em coluna (ϕ 1,2 cm, altura = 16 cm), de sílica gel (8 g). Desta CC coletou-se 63 alíquotas de 25 mL cada. Monitoradas por CCD, as frações similares foram reunidas. Das frações 25-33 (111 mg) eluídas com CHCl₃: MeOH (95:05) e (90:10), foi isolado um composto puro codificado como **25-33AE**. Das frações reunidas 34-48 foi isolado o composto **34-48AE** (41,6 mg). Com a fração AE -101 foi realizada ainda mais uma CC, com as frações reunidas 79-85, eluída com CHCl₃ : MeOH (80:20) e (70:30), recromatografada em coluna (ϕ 2 cm), altura = 22 cm, de sílica gel (40g), a qual foi

empacotada com CHCl_3 e eluída com CHCl_3 : MeOH (95:05) e gradualmente enriquecida com MeOH foi isolado o composto **37(9)AE** (26 mg) e também um sólido branco amorfo da fração 41, que foi chamado de **41(9)AE** (12 mg) O esquema de isolamento dos constituintes químicos do extrato EtOH das folhas e caules da *A. blanchetti* encontram-se na figura 20.

4.3.6. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FRAÇÃO AE DAS RAÍZES DA *A. blanchetti*

Com as raízes (verão) obtidas da *A. blanchetti* (198,40 g), realizou-se o mesmo procedimento de secagem das partes aéreas, sendo as mesmas mecanicamente trituradas e submetidas à extração com EtOH, à temperatura ambiente por 10 dias. O extrato obtido (16,02 g) foi concentrada sob pressão reduzida a temperatura inferior a 60°C e sucessivamente particionado com Hex, DCM, AE. As frações obtidas foram guardadas em dessecador.

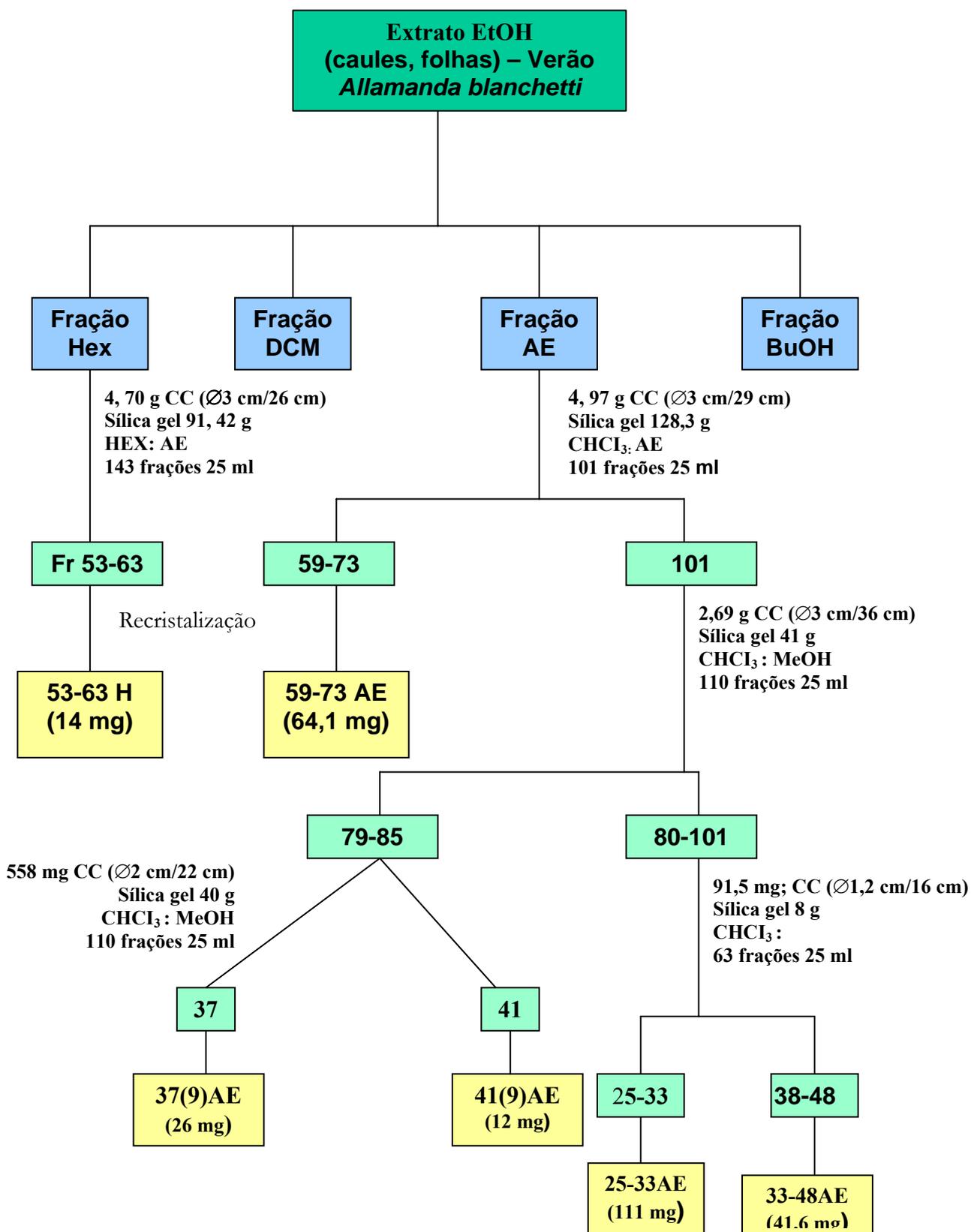


Figura 20 - Fracionamento do extrato EtOH das folhas e caules (verão) da *A. blanchetti*

4.3.6.1. Fração AE

A fração AE, chamada AE-raízes (3,34 g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 1,2 cm, altura = 22 cm), de sílica gel (109,6 g), empacotada com Hex: AE (95:05) e enriquecida gradualmente com AE. Foram coletadas 286 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade de Rf e observadas por CCD.

A partir da fração 120 até a fração 286, quando monitorados no UV longo (366 nm), detectou-se manchas azuis fluorescentes de cor muito intensa, características de cumarinas. Afim de comprovação, as plaquinhas de CCD foram reveladas com KOH: EtOH 5% no UV longo e as manchas azuis se intensificaram. Desta CC algumas frações foram reunidas por apresentarem Rf semelhantes e certo grau de pureza (30-76, 78-120, 122-164 e 165-203) que a seguir sofreram alguns procedimentos de purificação (recristalização com diversos solventes) obtendo-se dessa forma, sólidos amorfos que foram nominados de: **10B30-76**; **10C78-120**; **10D122-164** e **10E165-203** respectivamente. A fração 10C78-120 (10,3 g), eluída com Hex: AE (80:20) e que se apresentava como cristal amarelo (com algumas impurezas), com intuito de purificá-la melhor foi lavada com CHCl₃: MeOH e por último MeOH, as impurezas se solubilizaram originando cristais claros. Foi filtrada e guardada separadamente a água-mãe.

A fração 10B30-76 (86 mg), eluída com Hex: AE (80:20), apresentou-se como cristais brancos amarelados. Foi recristalizado com Hex: AE + 2 gotas de MeOH e conseguiu-se obter um cristal branco puro. Filtrou-se e a água-mãe foi guardada separadamente.

A fração 10E165-203 (64 mg), eluída com Hex: AE (50:50), quando observada em CCD apresentou-se como uma única mancha e cor turva no frasco de vidro. Após recristalização com Hex/AE (90:10), o composto tornou-se um cristal de cor clara. .

Ainda, as frações reunidas 204-216 (20 mg), eluída com AE e que apresentavam um aspecto resinoso de cor amarelada passaram por um procedimento de purificação, a fim de se eliminar a resina, onde foi utilizados AE + aquecimento e posteriormente várias

recristalizações com hexano. Retirou-se e guardou-se o sobrenadante, e os cristais obtidos, quando monitorados por CCD e UV longo apresentaram uma mancha azul muito forte. Esta fração foi nominada de **10F204-216** que posteriormente foi reunida à fração **10G217-233** (93,2 g), devido a similaridade de Rfs das 2 frações. Foram posteriormente, as 2 frações recromatografadas em placa preparativa de sílica gel 20:20 (L X A), ativada 2 horas em estufa. Estas 2 amostras foram solubilizadas em acetona e MeOH e com auxílio de um capilar foram feitas diversas aplicações em toda linha horizontal da placa. A eluição foi feita com CHCl₃: AE (90:10). Finalizada a eluição, observou-se a placa no UV longo e raspou-se com estilete cada fração obtida. Reagrupou-se alíquotas semelhantes e isolou-se um composto chamado de **FG-12AE** (10,2 mg). O fluxograma de isolamento dos constituintes do extrato EtOH das raízes da *A. blanchetti* são mostrados na figura 21.

4.3.7. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FLORES DA *A. blanchetti*

A partir de flores adultas (outono – 143,70 g) obtidas de *A. blanchetti* preparou-se um extrato bruto EtOH, nas mesmas condições de secagem e extração que as folhas, caules e raízes. O extrato bruto EtOH concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a seguir foi particionado em Hex, DCM, AE e BuOH, cujos rendimentos encontram-se na página 145. A fração BuOH devido a problemas de contaminação foi descartada.

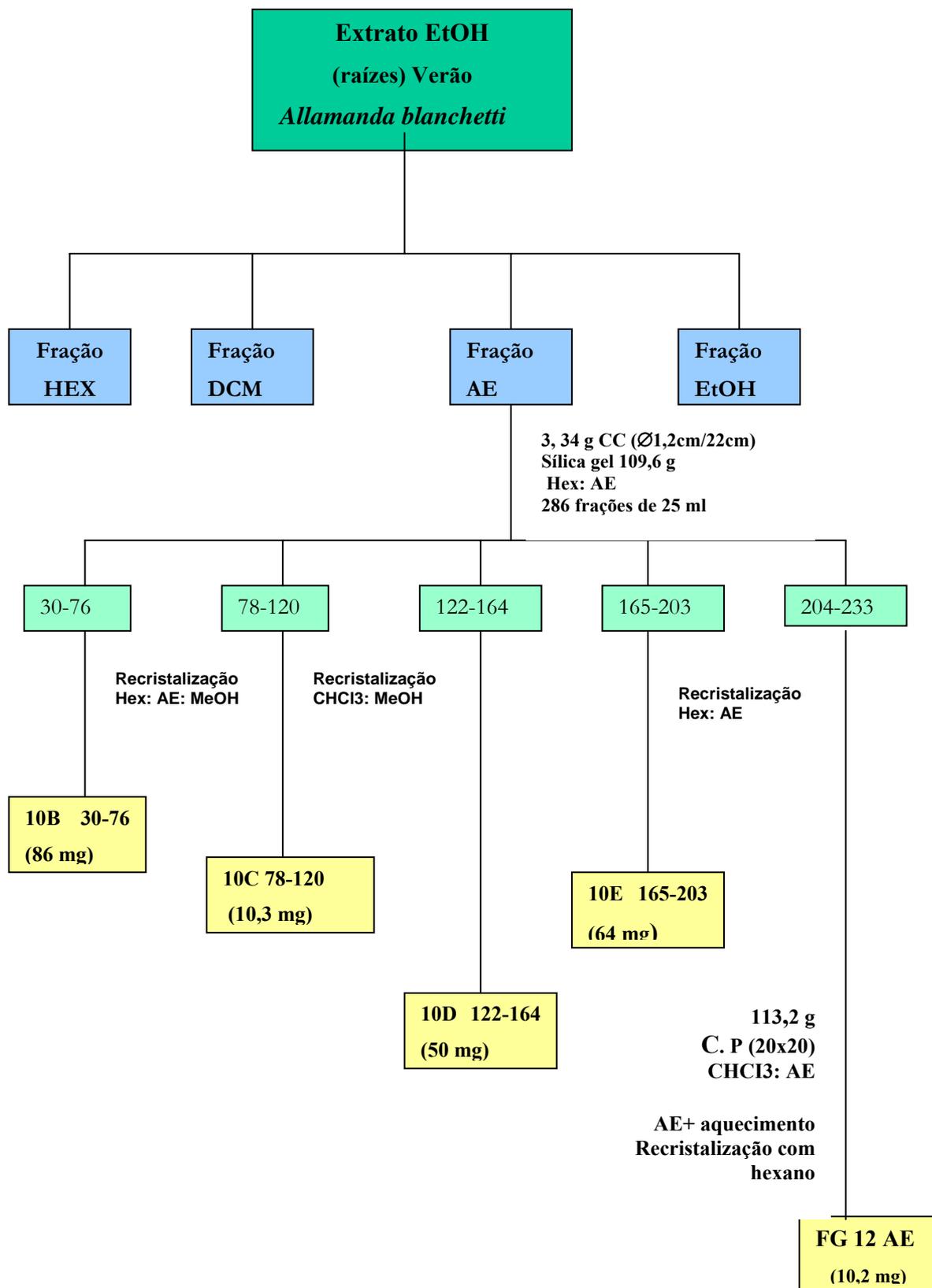


Figura 21– Fracionamento do extrato EtOH das raízes (verão) da *A. blanchetti*

A fração DCM (1,19g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 2,5 cm, altura = 35 cm), de sílica gel (51,08 g), empacotada com hexano e enriquecida gradualmente com AE. Foram coletadas 101 alíquotas de 25 mL cada. As frações foram reunidas por semelhança de Rfs e observadas por CCD. As frações reunidas 53-70 apresentaram certo grau de pureza e uma mancha de grande concentração quando eluída com Hex:AE (70:30) (2 vezes) e revelada com anisaldeído sulfúrico e aquecimento. Com objetivo de purificação lavou-se a amostra diversas vezes com hexano e após filtração obteve-se um pó branco cristalino (5,1 mg), chamado de **15H53-70**. Com as frações Hex e AE das flores, apesar de se ter efetuado inúmeras CC não foi possível o isolamento de algum composto. A figura 22 mostra o fracionamento do extrato EtOH das flores (outono) da *A. blanchetti*.

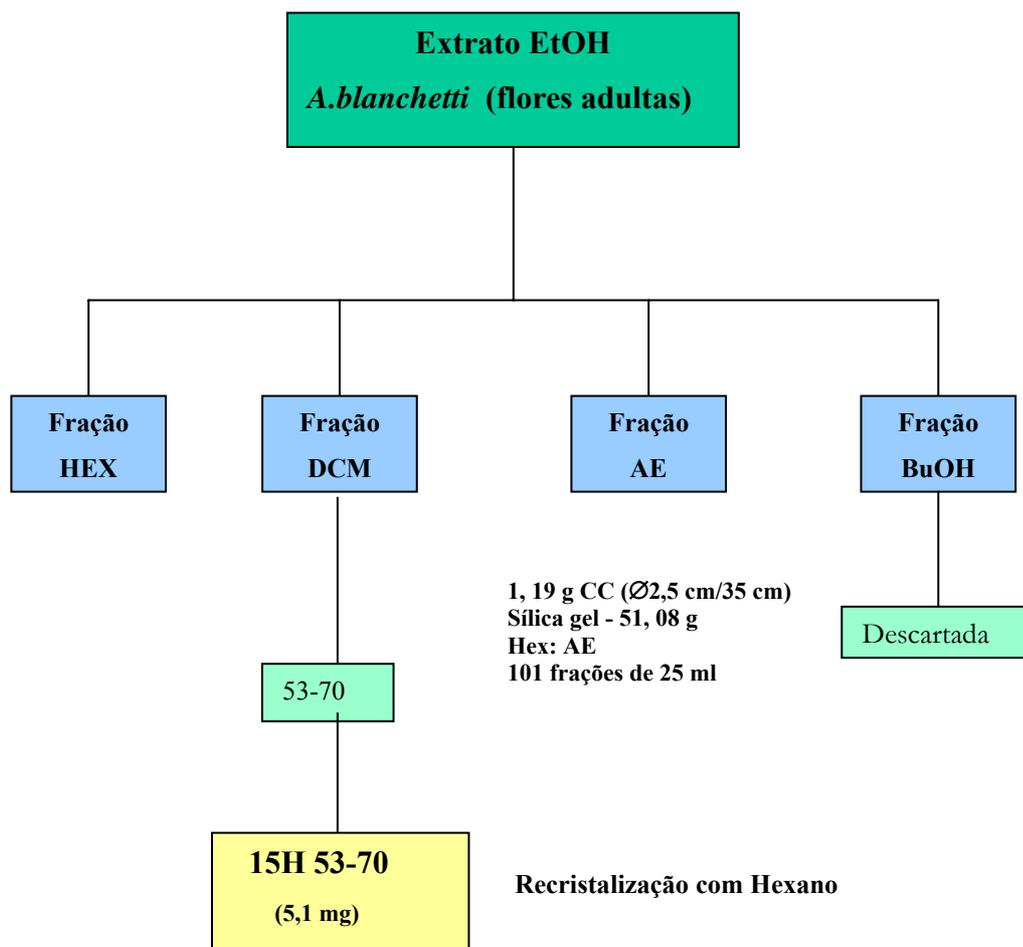


Figura 22 – Fracionamento do extrato EtOH das flores (outono) da *A.blanchetti*

4.3.8. COMPARAÇÃO DE DIVERSAS TÉCNICAS EXTRATIVAS EM FOLHAS DE *Allamanda blanchetti* PARA OBTENÇÃO DE PARÂMETROS FITOQUÍMICOS

A obtenção de compostos bioativos de plantas medicinais está diretamente ligada a muitos fatores interativos, sendo o método de extração um parâmetro determinante em muitos casos.¹⁰²

Apesar da maceração ser a técnica extrativa mais frequentemente utilizada em laboratórios de Fitoquímica que visem isolamento de compostos biologicamente ativos, existem outros processos já relacionados nas páginas 37-39, que com suas vantagens e desvantagens podem se tornar uma opção na rotina experimental para o isolamento de fitoconstituintes.^{99,101}

Na tentativa de otimizar a melhor técnica de extração dos compostos químicos da espécie *A. blanchetti*, foi realizado um ensaio, utilizando-se métodos usuais de extração em folhas da espécie estudada, com monitoramento em massa obtida e rastreamento por CCD, a fim de detectar seus compostos, os quais tiveram como suportes reveladores usuais e padrões autênticos.

Foi coletada no mês de abril de 2004, no Campus Universitário da UFSC, às 15 horas, dia ensolarado, 100 g de folhas e *in natura*, o material foi reduzido a pequenos fragmentos e a seguir submetido aos seguintes processos de extração: **1.** Maceração por 3 dias. **2.** Percolação com maceração prévia de 6 horas e gotejamento de 10 gotas por minuto. **3.** Turbo extração utilizando-se aparelho de alta rotação por tempo de 45 minutos.

4. Extração através de ultrasons e tempo pré-determinado de 25 minutos. Todos os processos utilizaram como líquido extrator o metanol.

Após o procedimento de extração de cada método, todos os extratos obtidos sofreram evaporação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 60°C.

Com todos os extratos, na sequência, foram realizados um perfil fitoquímico comparativo através de monitoramento por CCD e padrões autênticos de quercetina, plumericina, plumierídeo, ácido ursólico, mistura de estigmasterol, β -sitosterol e reveladores específicos para terpenos e esteróides (anissaldeído sulfúrico), grupos fenólicos (cloreto férrico), alcalóides (Dragendorff), cumarinas e lignanas (KOH 10%). Os resultados do melhor método de extração, para rastrear a composição química da planta estão relacionados na página 189.

4.4. MATERIAL VEGETA6: *Allamanda schottii*

4.4.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Visando-se um estudo biodirecionado com a *A. schottii* para que se pudessem estabelecer parâmetros, quanto as possíveis diferenças químicas em épocas do mesmo ano, foram realizadas coletas em 3 estações do ano de 2002 (verão, outono e primavera). Todas as coletas foram realizadas no Campus Universitário da UFSC, em dia ensolarado a partir das 11 horas da manhã. Na estação verão foi coletado raízes (540,33 g), caules e folhas (931,22 g). Na estação outono foi coletado raízes (302 g), caules e folhas (909,46 g) e sementes (700 g). Na estação primavera coletou-se folhas e caules (2,12 kg), flores (73,210 g) e sementes (1,049 kg). As espécies vegetais coletadas foram identificadas pelo professor Oscar Benigno Isa.

Uma excicata encontra-se depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí – SC) onde recebeu o número de referência **HBR 52525**.

Num perfil cromatográfico (CCD) preliminar, detectou-se semelhanças entre caules e folhas, motivo que levou a reunir os 2 órgãos vegetais.

4.4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

Todos os órgãos coletados na estação verão da *A. schottii* (raízes, caules, folhas, flores e sementes), depois de reduzidos a pequenos fragmentos, foram colocados separadamente para dessecar a temperatura ambiente, em local fechado por aproximadamente 3 semanas. Depois de secas, todas as partes foram pulverizadas separadamente e submetidas à maceração exaustiva com EtOH (partes aéreas e raízes) e MeOH (sementes) por 10 dias, também separadamente. Como foi dito na página 86, as flores foram colocadas imediatamente para macerar, quando se fez a coleta da *A. blanchetti*, porque durante este processo, as flores escureceram rapidamente, motivo que levou a realização da maceração com as flores *in natura*. No entanto, neste caso da coleta da *A. schottii* não foi observado esta reação de oxidação e então as flores coletadas foram colocadas para desidratar ao mesmo tempo com os demais órgãos.

Os extratos brutos de todos os órgãos, foram obtidos através de evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório e temperatura inferior a 60°C e guardados em dessecador para evitar possíveis contaminações. Uma alíquota de 77,61 g de extrato bruto de caules e folhas foi submetida a uma coluna de filtração e então sucessivamente particionado com Hex, DCM, AE e BuOH, para a obtenção das respectivas frações. Este particionamento não é o mesmo particionamento líquido-líquido realizado com a *A. blanchetti* onde, primeiramente o extrato bruto foi suspenso em água. Neste caso da *A.*

schottii foi feito uma coluna de filtração apenas com hexano e depois se particionou o extrato bruto com Hex: DCM (50:50), DCM 100%, DCM : AE (50:50), AE 100%, AE : BuOH (50:50) e BuOH 100%.

Os procedimentos utilizados para a obtenção das diversas frações (Hex, Hex:DCM, DCM, DCM:AE, AE e AE: BuOH), onde se preferiu uma coluna de filtração ao invés de uma partição líquido-líquido foi em função de 2 motivos: a) quando na partição piloto (procedimento onde se usa uma pequena quantidade do material para direcionar os futuros ensaios), o extrato bruto das partes aéreas da *A. schottii* apresentou uma emulsão muito acentuada quando particionado com eluentes imiscíveis (suspensão em água); b) a outra razão foi, que em alguns trabalhos com a *A. cathartica*, os autores dão preferência a uma coluna de filtração e através dela já foram isolados um número significativo de compostos puros.¹⁴⁶

Coluna de filtração

A coluna de filtração acima citada, que originou as frações trabalhadas com a *A. schottii* foi realizada com uma alíquota de 90,54 g de extrato EtOH de caules e folhas (verão) submetida a CC (ϕ 8,5 cm, altura 18,5 cm) de sílica gel (562 g) e empacotada com hexano. A seguir foi utilizado um sistema de eluentes da seguinte forma: Hex: DCM 50:50, DCM 100%, AE:BuOH 50:50, AE 100%, AE:BuOH 50:50, BuOH 100% e MeOH 100%.

As frações foram coletadas em alíquotas de 100 mL e a seguir evaporadas em evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção das respectivas frações. Foram coletadas 136 frações de 100 mL cada.

A seguir, com os extratos brutos e frações semipurificadas obtidos, foi calculado o percentual de rendimento de cada um, cujos valores podem ser observados nas tabelas 20 e 21, das páginas 190 e 191.

4.4.3. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DE CAULES E FOLHAS DA *A. schottii*

Antes de se começar o isolamento e purificação dos compostos químicos dos caules e folhas da *A. schottii* comparou-se por CCD, os extratos brutos obtidos dos diversos órgãos da *A. schottii* e chegou-se à conclusão que os caules e folhas possuíam o mesmo perfil fitoquímico, motivo que levou a reunir estes 2 extratos.

Também, estabeleceu-se um parâmetro comparativo (CCD) entre os órgãos da *A. schottii* nas estações verão e outono e concluiu-se que, as raízes do verão e outono eram fitoquimicamente muito semelhantes. No entanto, ao se comparar os caules e folhas com as raízes das 2 estações, constatou-se diferenças no perfil químico, razão pela qual se trabalhou com os extratos separadamente.

Para o isolamento dos metabólitos secundários da *A. schottii*, foram escolhidas a fração DCM/AE (50:50) (verão), obtida da coluna de filtração por apresentarem um bom perfil cromatográfico.

Muitas CC foram realizadas, no entanto, só serão relatadas neste trabalho, aquelas que originaram compostos puros ou semipuros.

4.4.3.1. Fração DCM:AE

Uma alíquota da fração DCM: AE (9,26 g) obtida a partir de extrato bruto de caules e folhas (verão), foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 5 cm, altura = 28 cm), de sílica gel (200 g), empacotada com DCM e eluída com DCM, gradualmente enriquecida com AE.

Foram coletadas 105 frações de 125 mL cada. As frações foram reunidas conforme semelhanças e observadas por CCD.

As frações 24-53 (3,47g) eluídas com DCM: AE (50:50), foram recromatografadas em coluna (ϕ 3 cm. altura = 19 cm), de sílica gel (45,82 g), empacotada com Hex:DCM 70:30 e eluída com hex e solventes de polaridade crescente. Foram coletadas 181 frações de 25 mL cada. As frações obtidas foram reunidas conforme similaridade de Rfs e observadas por CCD. Da fração 58-75 eluída com DCM: AE (30:70), isolou-se um sólido branco (20 mg) solúvel em acetona e denominado de **Col 6-58-75**.

Da fração 80-106 eluída com DCM: AE (98:02), isolou-se um sólido amorfo (56,5 mg), solúvel em acetona e chamado de **Col 6-80-106**.

As frações 120-142 (671 mg) eluída com DCM: AE (90:10) foram recromatografadas em coluna (ϕ 2 cm, altura = 20,5 cm), de sílica gel (25 g), empacotada com DCM e eluída em DCM, gradualmente enriquecida com EtOH. Foram coletadas 54 alicotas de 25 mL cada. De acordo com suas semelhanças, as frações foram reunidas e observadas por CCD. Da fração 1-18 eluída DCM: MeOH (95:05) isolou-se um cristal branco transparente (28,2 mg) solúvel em acetona e denominado **Col 1-18**.

Da fração 24-35 eluída com DCM: MeOH (90:10), isolou-se um sólido branco (14,5 mg), solúvel em acetona e nominado como **Col 8-24-37**.

As frações 38-41 (145 mg) foram recromatografadas em placa preparativa de sílica gel (20 x 20/L x A) e eluídas com DCM: MeOH (80:20). Depois da eluição e observadas por UV visível (366 nm) raspou-se cada fração da placa separadamente e agruparam-se as que apresentavam Rfs semelhantes, depois de monitoradas por CCD. Cada fração foi solubilizada em acetona e como uma das frações apresentou certa pigmentação, adicionou-se pequena porção de carvão ativado + hexano + aquecimento. As 3 amostras obtidas foram filtradas com papel filtro e desta foram foram isolados 3 compostos amorfos de cor clara que foram

chamados de **Col 9-A**, **Col 9-B** e **Col 9-C**. O composto Col 9-A, quando observado no UV longo (366 nm) apresentou cor azul fuorescente muito acentuada.

As frações 54-90 (3,8 g) eluídas com DCM: AE (70:30) foram recromatografadas em coluna (ϕ 3,5 cm, altura = 21 cm), de sílica gel (38 g), empacotada com DCM e eluída com DCM, gradualmente enriquecida com AE. Foram coletadas 105 frações de 50 mL cada. As subfrações foram reunidas pela similaridade e observadas por CCD. Destas subfrações, a fração 61-105 (926 mg) eluída Hex: DCM (85:05) foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm, altura = 20 cm), de sílica gel (30,02 g), empacotada com hexano e eluída com hexano, gradualmente enriquecida com DCM .

Coletou-se 122 frações de 25 mL cada. As subfrações foram reunidas e da fração 89 eluída com DCM: EtOH (95:05), isolou-se cristal branco, solúvel em clorofórmio e nominado de **AE 89** (12 mg).

O fluxograma de fracionamento do extrato EtOH dos caules e folhas (verão) da *A. schottii* está demonstrado na figura 23.

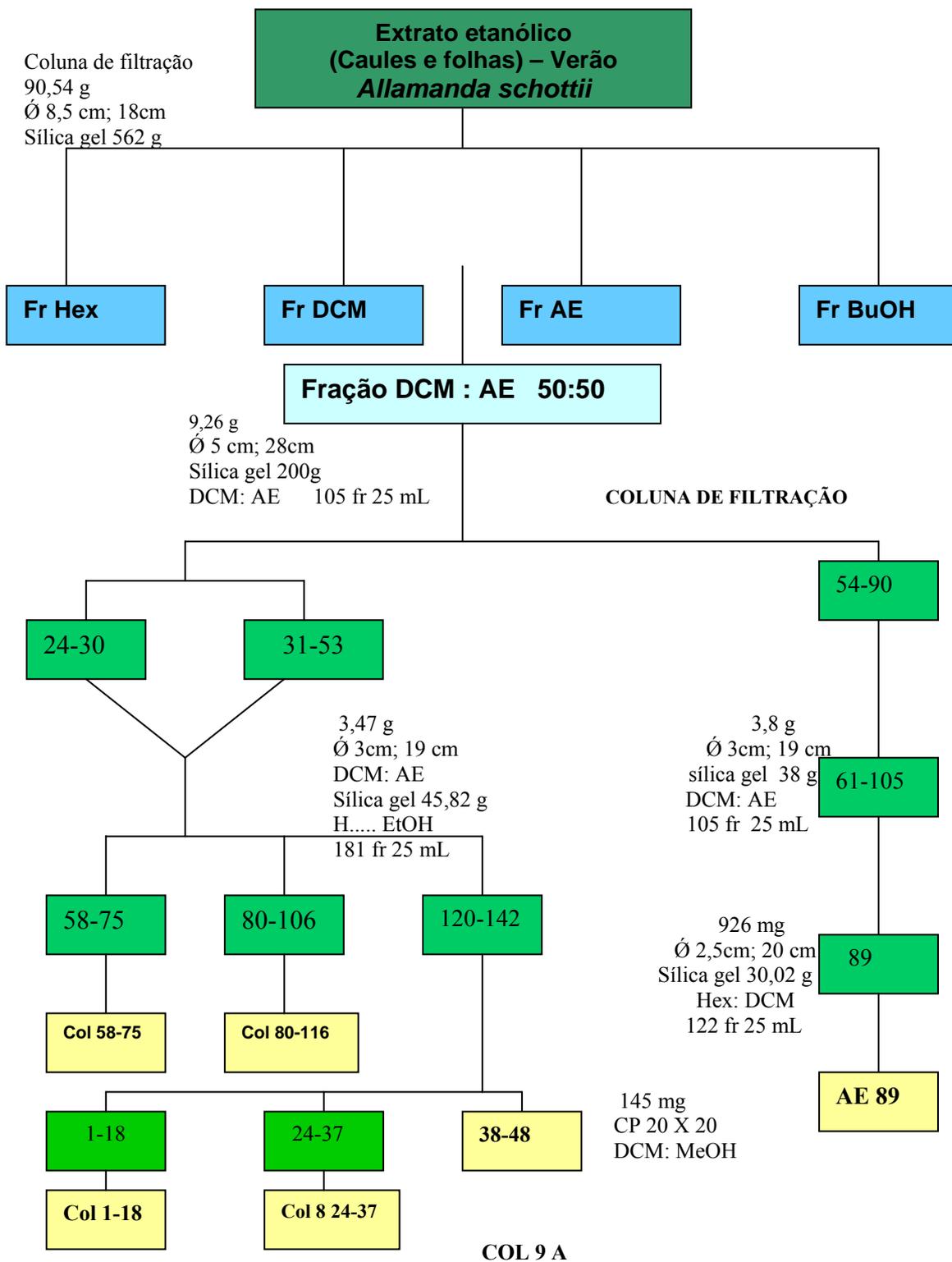


Figura 23 – Fracionamento do extrato EtOH (verão) dos caules e folhas da *A schottii*

4.4.4. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DAS RAÍZES DA *A. schottii*

As raízes da *A. schottii* coletadas no Campus Universitário Trindade da UFSC (Florianópolis-SC), na estação outono, em dia ensolarado, foram reduzidas a pequenos fragmentos e colocadas para secar em local arejado por um período de 3 semanas. Depois de completamente desidratadas, foram pulverizadas e submetidas a processo de extração, por maceração exaustiva com MeOH, a temperaturas ambiente, ao abrigo da luz, calor e umidade por um período de 7 dias. O extrato obtido foi concentrado a pressão reduzida em evaporador rotatório à temperatura de 40°C até volume desejado (21,16 g). Na sequência, o extrato metanólico obtido foi suspenso em água e sofreu uma partição líquido-líquido com solventes imiscíveis de polaridade crescente, obtendo-se dessa forma as frações semipurificadas de Hex (3,28 g), DCM (5,36 g) e AE (4,42 g). As fases orgânicas obtidas foram evaporadas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura média de 40°C e posteriormente mantidas em dessecador.

As frações escolhidas para isolamento dos metabólitos secundários da *A. schottii* foram as frações DCM e AE.

4.4.4.1 Fração Hexano

Preparou-se uma pastilha com 0,66 g da Fração Hex, a qual foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 2 cm) com sílica gel, sendo o sistema de eluentes utilizado hexano e acetona, com aumento gradativo da polaridade. Foram coletadas 100 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças

observadas por CCD utilizando-se anisaldeído sulfúrico como revelador. Através desta técnica foi possível verificar a presença de estigmasterol e ou sitosterol na fração 29-31 (23 mg) quando se utilizou padrão autêntico. Desta coluna foram isolados cristais nas subfrações ASR FH **20-25** (13 mg), **37-39** (17 mg), que foram enviados para análise em RMN de ^1H e ^{13}C .

4.4.4.2 Fração DCM

A fração DCM (2,0 g) foi cromatografada em coluna (Φ 3 cm) com sílica gel, e submetida ao sistema de eluente hex/acetona, com aumento gradativo de polaridade. Foram coletadas 100 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações resultantes desta coluna foram analisadas por CCD, sendo reveladas com anisaldeído sulfúrico, e agrupadas de acordo com semelhanças observadas.

Algumas frações obtidas apresentavam-se praticamente puras. Procedeu-se a recristalização e lavagem destas com mistura de solventes. A fração **16-31** formou cristais (22 mg) que foram enviados para análise em RMN ^1H e ^{13}C .

As subfrações 44-48 (0,415 g) foram recromatografadas em coluna (Φ 1,5 cm) utilizando-se sílica gel (20 g). O sistema de eluentes utilizado foi hex e acetona, com gradativo aumento de polaridade. Foram recolhidas 60 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por CCD utilizando-se anisaldeído sulfúrico como revelador. Foram enviadas à análise em RMN de ^1H e ^{13}C , desta coluna, as subfrações **19**, **25-27**, **28-30**, **31-37**, por apresentarem considerável grau de pureza.

A fração 50-87 (0,534 g) foi recromatografada em coluna (Φ 1cm) de sílica gel (9,55 g), empacotada com hex, e eluída com hex e acetona com aumento gradativo de polaridade.

Foram coletadas 70 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por CCD. Desta coluna a fração **ASR 21-22** (48 mg) apresentou-se praticamente pura; procedeu-se a lavagem com mistura de acetona e hex. A fração 88-96 (0,776 g) foi recromatografada em coluna (ϕ 2 cm) de sílica gel (14,17 g), empacotada com clorofórmio e eluída com clorofórmio e gradualmente enriquecida com metanol. Foram coletadas 70 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por CCD. O fluxograma de isolamento das raízes de *A. schottii* pode ser observado na figura 24.

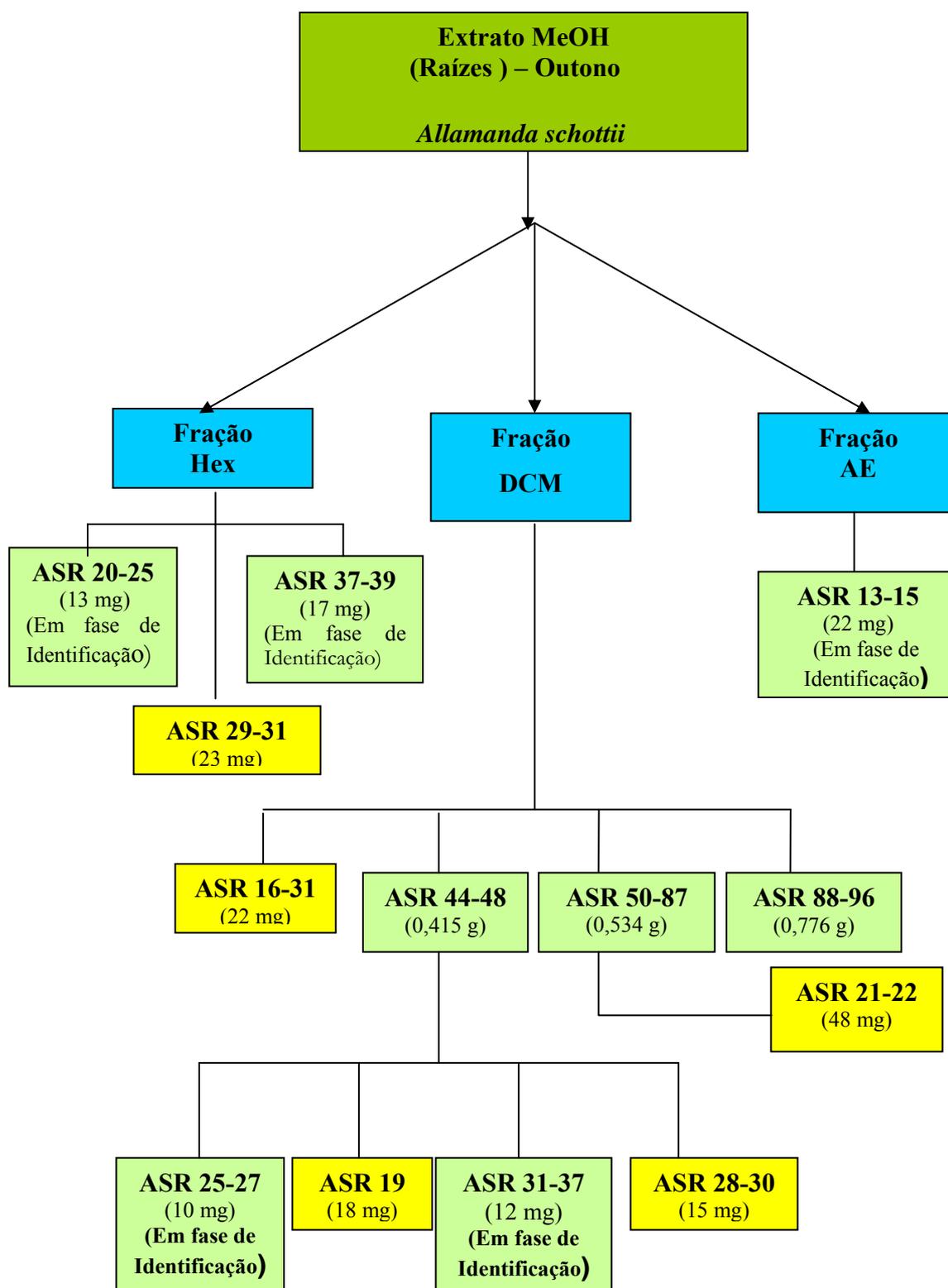


Figura 24- Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico das raízes da *Allamanda schottii*.

4.4.5. COMPARAÇÃO DE DIVERSAS TÉCNICAS EXTRATIVAS EM FOLHAS DE *A.schottii* PARA OBTENÇÃO DE PARÂMETROS FITOQUÍMICOS

Com a mesma intenção de se comparar os diversos processos extrativos que podem ser utilizados numa investigação fitoquímica, como foi feito com a *A. blanchetti*, (descrição na página 96), foi também realizado o mesmo ensaio, com a *A. schottii*. No entanto, para este estudo utilizou-se algumas variáveis, como a adição de mais um processo extrativo: maceração por 10 dias. A intenção foi avaliar se, um tempo maior de contato da planta com o líquido extrator, poderia promover resultados diferentes.

Este estudo foi um pouco além daquele que foi feito com a *A. blanchetti*, porque neste foram avaliadas 2 formas de extração: extração com a planta fresca e outro teste, utilizando-se plantas desidratadas, a fim de comparar possíveis diferenças.

O ensaio consistiu em se utilizar métodos usuais de extração em folhas da *A. schottii* com monitoramento em massa obtido e também o rastreamento por CCD de fitoconstituintes, que teve como suportes, reveladores usuais e padrões autênticos.

Foi coletado no mês de abril de 2004, no Campus Universitário da UFSC, às 15 horas, em dia de sol, 100 g de folhas e ainda *in natura*, o material foi reduzido a pequenos fragmentos e a seguir submetidos aos seguintes processos de extração: **1.** Maceração por 3 dias. **2.** Percolação com maceração prévia de 6 horas e gotejamento de 10 gotas por minuto. **3.** Turbo extração que se utilizou aparelho de alta rotação por 45 minutos. **4.** Extração através de ultrasons e tempo pré-determinado de 25 minutos. Todos os processos utilizaram como líquido extrator o metanol.

Uma outra alíquota de 100g de folhas foram coletadas no mesmo dia e hora, e colocadas para desidratar em local arejado e temperatura ambiente. Depois de secas, o

material foi reduzido a pequenos fragmentos e submetidos aos seguintes processos de extração: **1.** Maceração por 3 dias. **2.** Maceração por 10 dias. **3.** Percolação com maceração prévia de 6 horas e gotejamento de 10 gotas por minuto. **4.** Turbo extração em aparelho de alta rotação por 45 minutos. **5.** Processo extrativo através de aparelho de ultrasons e tempo pré-determinado de 25 minutos. Todos os processos utilizaram como líquido extrator o metanol.

Após o procedimento de extração de cada método, todos os extratos obtidos, separadamente, sofreram evaporação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 60°C.

O perfil fitoquímico comparativo foi realizado em todos os extratos obtidos, através de monitoramento por CCD e padrões autênticos de quercetina, plumericina, plumierídeo, ácido ursólico, estigmasterol, β -sitosterol, campesterol e reveladores específicos para terpenos e esteróides, grupos fenólicos, alcalóides, cumarinas e lignanas.

Os resultados do melhor método de extração quanto à detecção de grupos químicos e os rendimentos em massa de cada processo extrativo estão demonstrados na tabela 19 e na página 189.

4.5. TESTES BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

No rastreamento realizado na literatura quanto às possíveis atividades farmacológicas e biológicas das espécies *A. blanchetti* e *A. schottii* não foi encontrado nenhum ensaio. O fato, de serem inexistentes registros de qualquer atividade farmacológica nas espécies estudadas, oportuniza um leque de possibilidades terapêuticas e qualquer resultado encontrado estará pela primeira vez sendo abordado e discutido.

Na busca de possíveis aplicações clínicas futuras para os extratos e frações de *A. blanchetti* e *A. schottii*, realizou-se inúmeros ensaios biológicos e farmacológicos.

Os testes, então realizados com as duas espécies foram:

1. atividade antimicrobiana (antibacteriana e anti-fúngica)
2. atividade antimicrobiana contra germes patogênicos da microbiota oral
3. atividade antiparasitária contra o *Menopon gallinae*
4. atividade leshmanicida
5. atividade tripanomicida
6. atividade antiviral
7. atividade antileucêmica.

4.5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana, das 2 espécies estudadas foi realizada através de parceria com 3 universidades, em 3 ensaios diferentes:

a. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA da *A. blanchetti* CONTRA MICROORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

O ensaio foi realizado pelo **The Forsyth Institute / Harvard University Universidade de Harvard** (Boston–EUA) cujo objetivo foi testar atividade antibacteriana contra germes patogênicos da microbiota oral.

O “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) publicou uma série de normas para a realização de testes de susceptibilidade de microrganismos e concluiu que estes testes deveriam ser utilizados para serem determinadas as atividades antimicrobianas de novos compostos.²⁰⁴ Em relação a esta necessidade microrganismos normalmente encontrados na cavidade oral causando processos infecciosos foram cultivados e testados contra extrato bruto das flores da *Allamanda blanchetti* coletadas no mes de outubro. Os microrganismos criopreservados a -80°C foram mantidos, cultivados e submetidos aos testes contra a amostra da planta medicinal no *The Forsyth Institute/Harvard University/Boston/USA*. Para os experimentos as bactérias foram inoculadas em placas de ágar micoplasma, enriquecidas com sangue de carneiro a 5% e 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de menadiona previamente filtrada e esterilizada. As placas foram incubadas por 7 dias a 35°C , em um ambiente de 80% N_2 , 10% CO_2 and 10% H_2 ²⁰⁵. Após este período colônias foram semeadas em 2% de meio micoplasma (BBL), mantidas em condição de anaerobiose e transferidas para microplacas de 96-poços para os ensaios antimicrobianos.^{206, 207} O extrato da planta medicinal foi dissolvido em água destilada e deionizada obtendo-se as concentrações de 0, 1,

2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/ml, e controles com os meios de cultura sem amostras da planta medicinal e sem inoculação microbiana. Todas as amostras que receberam 0,1ml dos inóculos microbianos bem como os respectivos controles foram incubados, com o crescimento microbiano monitorado em leitora de microplacas na densidade ótica de 630 nm a 0, 94 e 476 h. Todas as microplacas foram mantidas a 35 °C, em ambiente com 80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂. Os resultados de sensibilidade foram expressos em concentração mínima inibitória (CMI), isto é, a mínima concentração da planta medicinal que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicatas e se as concentrações testadas não inibiram o crescimento bacteriano, os microrganismos foram classificados como não-sensíveis ao extrato da planta medicinal nas concentrações testadas. As cepas testadas foram: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (serotypes a), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (serotypes b), *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces odontolyticus* (serotype I), *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium saburreum*, *Fusobacterium nucleatum* ss *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* ss *vincentii*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella morbillorum*, *Neisseria mucosa*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella melanogenica*, *Propionibacterium acnes* (serotypes I), *Propionibacterium acnes* (serotypes II), *Selenomonas noxia*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivariu*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus vestibularis*.

b. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS A PARTIR DA *A. blanchetti* e *A. schottii*

Os testes biológicos foram realizados pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Micologia.

Para esta atividade da *A. blanchetti* foram testados extratos brutos da raiz, caule e folhas e as frações Hex, AE e DCM de cada órgão das 2 espécies. Para a *A. schottii* foram utilizados extrato bruto de raiz, caule, folha, semente e flor e as frações Hex e DCM.

O solvente utilizado foi dimetilsulfóxido (DMSO) numa proporção até 10 %. Os extratos foram testados na concentração a partir de 5000 µg/mL até 78 µg/mL. As frações foram testadas na concentração a partir de 3000 µg/mL até 40,8 µg/mL.

Os microorganismos usados nos ensaios microbiológicos para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram as bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923)-(Sa) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228)-(Sep), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC- 27853)-(Pa) e os fungos: *Micrococcus luteus* (ATCC-9341)-(Ml), *Candida albicans* (ATCC-76645)-(Ca1), *Candida albicans* (FCF-243)-(Ca2), *Candida guilliermondii* (LM-06)-(Cg), *Candida stellabidea* (LM-41)-(Cs), *Candida parapsilosis* (LM-1E)-(Cp), *Candida tropicalis* (LM-100)-(Ct), *Trichosporon inkin* (LM-267)-(Ti), *Cryptococcus neoformans* (LM-570)-(Cn), *Trychophyton rubrum* (LM-105, LM-108)-(Tr), *Trychophyton mentagrophytes* (LM-103)-(Tm), *Penicillium* (FCF169)-(Pe), *Fusarium* (LM-03)-(Fu), *Aspergillus flavus* (LM-828)-(Afl), *Microsporium canis* (LM-828)-(Mc) e *Microsporium parasiticus* (LM-129)-(Ap).

As cepas foram obtidas no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As mesmas foram mantidas em ágar Muller-Hinton (Merck) e ágar Sabourand dextrose (DIFCO) nas temperaturas ambientes (28-30 °C) 4 °C. Os meios de cultura para as bactérias foi ágar Muller-Hinton e ágar Sabourand dextrose para os fungos.

Os ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações seguiram a metodologia de BAWER et al, 1966; CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000 e NCCLS, 2000.^{208, 209, 210, 211}

A suspensão de cada cepa foi feita a partir de repiques recentes. Foram preparados em solução salina 0,85%, estéril. As mesmas foram comparadas à uma suspensão de sulfato de bário, tubo 0,5 de Escala McFarland e ajustada para 90% de T no espectrofotômetro Leitz (340-800 nm), contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL.

Primeiramente foi feito um “screening” para avaliar a atividade biológica de cada espécie vegetal, utilizando-se a técnica de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa. Em placas de Petri, descartáveis e estéreis (90 X 10 mm/Craw), foi depositado um mL de suspensão da cada cepa. Em seguida, foi adicionado 20 mL de cada meio sólido, fundido e resfriado a 45-50 °C. Foi feito homogeneização de forma lenta, juntamente com o inóculo. As placas foram deixadas em repouso por 30 minutos para a solidificação dos meios de cultura. Foram feitas as cavidades com 6 mm de diâmetro com cânulas de vidro esterilizadas. Em seguida, se depositou 50 µL de cada produto solubilizado em suas devidas concentrações. Os ensaios foram incubados a 37 °C por 24-48 horas para bactérias e leveduras; à temperatura ambiente durante 7-14 dias para fungos filamentosos.

Decorrido o tempo de incubação foi feita a leitura dos resultados. Foi considerado positivo, quando o produto inibiu o crescimento do microorganismo produzindo um halo igual ou

superior a 10 mm de diâmetro. E só foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima-CIM, quando o halo de inibição foi superior a 14 mm de diâmetro.

A determinação da CIM foi feita pelo método das diluições seriadas em tubos, usando meio sólido. Foi preparada uma série de tubos de ensaio 100 X 15 mm (em duplicata). Foi adicionado no 1º tubo, 6 mL do meio sólido fundido e resfriado a 45-50 °C, contendo 30 mg de cada extrato ou 18 mg de cada fração. A partir dos tubos n° 2, o volume do meio de cultura era igual a 3 mL. Portanto, de cada primeiro tubo, foi repassado 3 mL para o tubo n° 2 e assim por diante, até obter as diluições dos extratos e frações desejadas. Em seguida, os tubos contendo o meio de cultura e os produtos diluídos, foram inclinados até solidificação total. Na sequência, foram inoculados 10 µL de cada suspensão dos microorganismos.

Em paralelo, foram feitos controle com cada microorganismo e antimicrobiano padrão, cloranfenicol a 30 µg e cetoconazol a 50 µg, ambos da CECON/SP. O sistema foi incubado a 37 °C, por 24-48 horas para bactérias e leveduras, à temperatura ambiente para fungos filamentosos.

Após o tempo de incubação, foi feita a leitura dos resultados. Foi considerado positivo, o produto que inibiu o crescimento total do microorganismo, não sendo observado nenhuma colônia na superfície do meio (-) em comparação com o controle do microorganismo (+).

c. Atividade ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE RAÍZES DA *A. schottii*

Os testes foram realizados pela **Universidade Nacional de Rosário** - Bioquímica y Farmácia -Rosario -Argentina

***Método da diluição**

Para esta análise foi utilizado o extrato bruto de raízes de *A. schottii*.

O extrato foi testado pelos fungos relacionados abaixo, pelo método de diluição, a fim de se determinar a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento destes patógenos, ou seja, a CIM (Concentração Inibitória Mínima- $\mu\text{g/mL}$).²¹²

O método da diluição usado neste ensaio incorporou o extrato bruto de raízes de *A. schottii* em meio sólido (caldo) e a seguir procedeu as diluições da amostra original e a cada uma das quais, se inoculou um fungo a ser testado. Se determinou a Concentração Inibitória Mínima pela menor concentração que inibiu o crescimento do microorganismo. Este método tem a vantagem de ser quantitativo e poder ser usado tanto com amostras solúveis em água como lipofílicas.²¹³ O ensaio pode ser estendido quando se querem obter informações sobre a concentração fungicida mínima.²¹⁴

As cepas utilizadas e suas respectivas abreviaturas foram: *Candida albicans* (ATCC-10231)-(Ca), *Candida tropicalis* (C131)-(Ct), *Cryptococcus neoformans* (ATCC-32264)-(Cn), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC-9763)-(Sc), *Aspergillus fumigatus* (ATCC-26934)-(Afu), *Aspergillus flavus* (ATCC-9170)-(Afl), *Aspergillus niger* (ATCC-9092)-(Na), *Microsporium canis* (C-112)-(Mc), *Microsporium gypseum* (C-115)-(Mg), *Epidermophyton floccosum* (C-114)-(Ef), *Trychophyton rubrum* (C137-2000)-(Tr) *Trychophyton mentagrophytes* (ATCC9972)-(Tm).

* **Bioensaio da *Neurospora crassa***

Foi realizada também, por este grupo de pesquisa o estudo do mecanismo de inibição da parede celular antifúngica através *Neurospora crassa*, que se constitui um fungo filamentosos que quando está em presença de inibidores da parede celular fúngica e em certas condições (37°C e meio osmótico) cresce como protoplasto (sem parede celular), as quais microscopicamente mostram mal formações (hifas muito curtas e ramificadas).²¹⁵ Estas podem se pode visualizar macroscopicamente num ensaio de difusão

em ágar, onde os discos com os extratos a provar se põe sobre a superfície de placas de ágar inoculados com os esporos da *N. crassa*. Os halos produzidos pelos compostos que inibem a parede celular fúngica aparecem salpicados, enquanto que os antifúngicos que não interagem com a parede produzem zonas claras de inibição. Este ensaio evita o inconveniente de ter que olhar ao microscópio as colônias para detectar mal formação de hifas.^{215, 216} Baseado neste método foi realizado o bioensaio da *N. crassa* com os extratos brutos de raízes de *A. schottii*.

4.5.2. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA O PIOLHO *Menopon gallinae*

Durante a revisão da literatura sobre o gênero *Allamanda*, foi constatado abordagens etnofarmacológicas sobre o uso tópico do decocto das folhas da *Allamanda cathartica* no controle da escabiose e pediculose.^{134, 191}

Como a *A. blanchetti* e *A. schottii* possuem perfil cromatográfico semelhante à *A. cathartica* (página 142) buscou-se confirmar clinicamente, se o uso tópico dessas 2 espécies, provocava alguma atividade piolhícida, como preconiza a medicina popular. Para tanto, buscou-se rastrear atividade antiparasitária no combate ao piolho *Menopon gallinae*.

O teste antiparasitário foi realizado em duas etapas, onde a primeira etapa utilizou somente o uso tópico de diversas formas farmacêuticas da *A. schottii*, que é a forma mais utilizada pela medicina popular. A segunda etapa oportunizou formas de ingestão oral (água e alimentação) e índices de toxicidade provocados formas farmacêuticas testadas.

4.5.2.1. Testes – primeira etapa

Foram selecionadas 228 galinhas infestadas na propriedade rural Doce Encanto, localizada no município de Santa Rosa de Lima (SC) e monitoradas pela CIDASC (Companhia Integrada de Desenvolvimento Rural de Santa Catarina) Florianópolis –SC .

O material vegetal a ser utilizado no estudo, consistiu de extrato bruto de raízes de *A blanchetti* e *A schottii*, previamente preparados em nosso laboratório que no momento do uso foram diluídos a 0,5% em água. A outra forma farmacêutica foi decocto (cozimento por 15 minutos em veículo aquoso) de caules e folhas a 20% das espécies vegetais em estudo e preparados no momento do uso.

As partes aéreas (caules e folhas) de *A blanchetti* e *A schottii* utilizadas, foram coletadas no dia anterior do ensaio e fervidas com água (20%) em panela tampada por 15 minutos.

Deu-se preferência à utilização da planta fresca, ao invés da seca, porque essa é a forma que se utiliza popularmente.

A utilização da solução aquosa (0,5%) do extrato bruto, foi motivada pelo fato de ser uma forma bastante concentrada (obtida em laboratório por técnicas descritas anteriormente). Dessa forma, foi possível comparar-se um fitoterápico obtido por técnicas laboratoriais com a forma caseira utilizada pela população.

O ensaio constitui em se dividir o número de animais (228) em 6 grupos de 38 aves, as quais foram identificadas com fitas coloridas diferentes em seus pés, sendo que cada cor correspondia ao tratamento recebido.

Antes do recebimento do tratamento foi avaliado o índice de infestação, escolhendo-se para esta avaliação as áreas de maior incidência do ectoparasita (locais mais quentes—como, por exemplo, embaixo das asas). Procedeu-se a contagem por cm². Foi feita a média de contagem de diversos animais e o percentual foi de 30 parasitas por cm².

O tratamento consistiu em se utilizar as espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* em diversas formas farmacêuticas e duas formas de aplicação tópica : banho e pulverização. As formas farmacêuticas utilizadas, partes da planta e tipo de aplicação são mostrados na tabela 8.

Tabela 8 - Formas farmacêuticas de *A. blanchetti* e *A. schottii* e tipo de tratamentos utilizados no combate a pediculose de aves

PLANTA	FORMA FARMACÊUTICA	PARTE DA PLANTA	APLICAÇÃO
<i>A. blanchetti</i>	Solução aquosa 0,5% (extrato bruto)	Raiz	Banho
<i>A. blanchetti</i>	Solução aquosa 0,5% (extrato bruto)	Raiz	Pulverização
<i>A. blanchetti</i>	Decocto a 20%	Caules e folhas	Pulverização
<i>A. schottii</i>	Solução aquosa 0,5% (extrato bruto)	Raiz	Banho
<i>A. schottii</i>	Solução aquosa 0,5% (extrato bruto)	Raiz	Pulverização
<i>A. schottii</i>	Decocto a 20%	Caules e folhas	Pulverização

As formas de aplicação nos animais tratados foram o banho e a pulverização, por se tratar de métodos usualmente utilizados para uso veterinário no caso de pediculose.

Todas as formas farmacêuticas utilizaram água como veículo e foi realizada uma aplicação diária por 2 dias consecutivos. No terceiro dia foi reavaliado o índice da infestação, com recontagem do número de ácaros por cm², cujos resultados se encontram, nas páginas 223 e 224. A seqüência de fotos do experimento encontram-se no anexo 1.

4.5.2.2. Testes – segunda etapa

Os resultados obtidos na primeira etapa do experimento foram bastante significativos, o que nos motivou a continuar o experimento, sob outra ótica de avaliação.

Para dar continuidade à especulação da atividade antiparasitária do gênero *Allamanda*, deu-se preferência à espécie vegetal *A schottii*, uma vez que com a *A. blanchetti* foram obtidos os mesmos resultados (primeira etapa).

Este ensaio está em fase de desenvolvimento na Estação Experimental da EPAGRI, na cidade de Campos Novos – SC. No estudo estão sendo avaliados os índices de redução de parasitas, através da ingestão oral de extratos de *A schottii*, por meio de ração nebulizada e água de beber contendo o material vegetal.

A escolha de metodologia baseia-se no fato de que, muitas vezes os parasitas infestantes, por terem uma alimentação hematófoga (se alimentando do sangue da ave) são mais facilmente eliminados se a medicação for colocada na água de beber e na sua dieta alimentar diária. No final do ensaio será realizado exame histológico, para se avaliar o efeito cumulativo e possível toxicidade dos extratos em estudo.

*** Triagem das aves em estudo**

Em primeiro lugar se procedeu a identificação do(s) piolho(s), a contagem para se observar o índice de infestação e o local de maior incidência dos piolhos (debaixo da asa, região da cloaca, dorso, peito, etc). Foram utilizadas 50 aves separadas em 5 lotes de 10 galinhas cada uma. Identificou-se cada lote amarrando uma fita de cor diferente nos pés das aves em estudo. Os lotes a serem avaliados, foram assim distribuídos:

Lote 1 Galinhas – 10 aves

Uso de infusão de *Allamanda schottii* na água do bebedouro durante 10 dias

* infusão de 300g em 1000mL de água.. Deixar esfriar tampado. Deixar as galinhas com restrição hídrica e colocar o infuso na água de beber.

Lote 2 Galinhas – 10 aves

Uso de infusão de *Allamanda schottii* na dieta alimentar durante 10 dia

* infusão de 300g em 100–200mL de água. Deixar esfriar tampado. Fazer a nebulização com o chá na ração. Deixar as galinhas com restrição alimentar. Oferecer a mistura.

Lote 3 Galinhas – 10 aves

Uso de extrato de *Allamanda schottii* na água do bebedouro durante 10 dias

- 5 mL de extrato bruto na água . Deixar as galinhas com restrição hídrica.

Lote 4 Galinhas – 10 aves

Uso de extrato de *Allamanda schottii* na dieta alimentar durante 10 dias

- Mosturar 5 mL de extrato na água Fazer a nebulização da mistura na ração. Deixar as galinhas com restrição alimentar. Oferecer a mistura

Lote 5 Galinhas – 10 aves

Testemunha - Durante o experimento não utilizar medicamento

*** Coleta de Material histológico**

Primeira coleta

A primeira coleta de material para exame histopatológico – será efetivado no 11º dia do experimento. No 11º dia serão abatidas 30% das galinhas. Será coletado o material de todas as galinhas como vísceras (coração, fígado, rim, pulmão, moela, pró-ventrículo, intestino delgado e grosso, cérebro) e musculatura da coxa. Os cortes histológicos com 1 cm de espessura por 2 cm de superfície serão fixados em mistura de formol (1 parte de formol para 9 partes de água) com volume de líquido equivalente a 10 vezes o volume de amostra coletada

Segunda coleta

A segunda coleta de material para histopatológico dar-se á no 18º dia do experimento e será repetido o procedimento da primeira coleta

Terceira coleta

A terceira coleta de material para histopatológico dar-se-á no 33º dia do experimento e será repetido o procedimento da primeira coleta.

Na seqüência, todas as amostras serão remetidas para o exame histopatológico.

Alguns cuidados importantes foram observados durante o estudo como: não deixar resto de comida (ração) de um dia para outro (evitando-se dessa forma que algum animal se alimente em maior quantidade que outro); rastreamento diário de possíveis efeitos colaterais provocados pelo tratamento, (como por exemplo, observação diária da postura da ave - corpo mole pode ser sinal de fraqueza) ou aparecimento de diarréias.

Cada grupo de aves ficou confinado a uma área restrita e diariamente se observou se houve reinfestação. Se por acaso, ocorreu, foi registrado em quantos dias houve a reinfestação e em que idade cronológica do animal aconteceu (jovem ou adulto). Também será observado que em que idade, as aves foram mais sensibilizadas pela ingestão da medicação.

4.5.3. ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os ensaios para avaliação da atividade antiviral foram realizados pelo Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFSC

*** Amostras testadas**

Neste estudo, se testaram:

1. Extrato bruto etanólico de folhas de *A. blanchetti* – vírus da herpes HSV-1

- 2.Extrato bruto etanólico de caules de *A. blanchetti* – vírus da raiva cepa PV
- 3.Extrato bruto etanólico de raízes de *A. blanchetti* – vírus da raiva cepa PV
- 4.Extrato bruto etanólico de folhas de *A.schottii*- vírus da herpes HSV-1
- 5.Extrato bruto etanólico de flores de *A.schottii*- vírus da herpes HSV-1
- 6.Extrato bruto etanólico de folhas de *A.schottii*- vírus da raiva cepa PV
- 7.Extrato bruto etanólico de flores de *A.schottii*- vírus da raiva cepa PV
- 8.Frações Hex, DCM, BuOH e EtOH de folhas de *A.schottii*–vírus da herpes HSV-1
- 9.Frações Hex, DCM, BuOH e EtOH de flores de *A.schottii*–vírus da herpes HSV-1

*** Culturas celulares e vírus**

Foram utilizadas células VERO (ATCC:CCL81), que são culturas contínuas de fibroblastos do macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), escolhidas por serem permissivo ao Herpesvírus Simplex tipo 1 (HSV-1) e para o vírus da raiva foram selecionadas cepas PV testadas em células McCoy.

*** Meio de cultura e outros reagentes**

O meio de cultura utilizado foi o MEM (Sigma) e adicionado ao meio soro fetal bovino 10% para o crescimento e 5% para manutenção das células, e uma mistura comercial (Gibco BRL) de antibióticos e antifúngico para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos e leveduras, além da solução de tripsina (Sigma) para o descolamento das células do suporte físico.

*** Vírus**

Os vírus utilizados nos experimentos serão Herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1), das cepas KOS e 29R (Universidade de Rennes, França) que são resistentes ao Aciclovir e vírus da raiva em cepas PV testadas em células McCoy

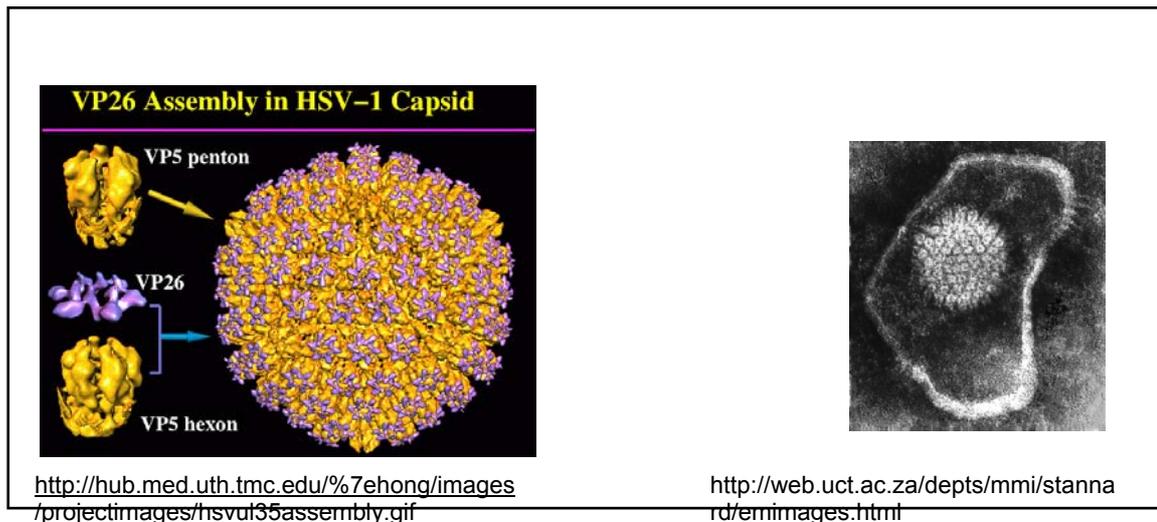


Figura 25 - Herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1)

*** Preparo das suspensões-estoques virais**

As suspensões virais foram inoculadas em frasco de cultura de 75cm² contendo uma monocamada de células VERO, cultivadas em 10 mL de meio 199, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngicos, tendo sido tripsinizadas 24h antes da infecção. Primeiramente o meio de cultura foi aspirado da garrafa e a monocamada celular será lavada 3X com PBS; inoculado 1 mL da suspensão viral em questão e incubado - o período de incubação do HSV-1 é de 1h, a 37° C em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 ml do meio sem SFB foi adicionado. A incubação foi realizada nas mesmas condições acima relatadas. O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação: 18h para o HSV-1. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80° C e descongelado a 37° C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada a 350 Xg, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi alíquotado em tubos estéreis e armazenados a -80° C para posterior utilização. As metodologias utilizadas para os inúmeros ensaios das atividades antivirais são baseadas em ensaios preconizados por Reed e Muench (1938)²¹⁷, Streiss (1998)²¹⁸, Takeuchi (1991)²¹⁹, Sidwell (1971)²²⁰, Machida et al (1979)²²¹, Sidwell e colaboradores (1986)²²².

*** Determinação do título infeccioso viral**

O título infeccioso do Herpes vírus simplex tipo 1 e do vírus da raiva cepa PV foram quantificados pelo valor recíproco da diluição dos vírus que têm a capacidade de infectar 50% das células hospedeiras inoculadas, e expresso como a dose infectante a 50% do tecido celular (TCID₅₀) por mL. A metodologia utilizada para estimar o TCID₅₀ foi aquela preconizada por Reed e Muench²¹⁷. O TCID₅₀ não revela quantas unidades infecciosas podem estar presentes na amostra, mas somente se esta dose ou diluição produzirá ECP em cerca de 50% das unidades experimentais (no caso, cada cavidade). A partir desse valor estimado pode-se calcular a multiplicidade de infecção (MOI), que é a relação entre o título infeccioso e a quantidade de células. A titulação do HSV-1 e da cepa PV foram feitas pelo método das diluições-limite. Foi preparada uma série de diluições de 1:10 a partir de uma suspensão viral com título determinado, que adicionadas a placas de 96 cavidades com tapetes celulares previamente formados. A placa incubada a 37° C, em estufa de CO₂ durante 72h e observada diariamente ao microscópio invertido. Após os cálculos o valor obtido foi fornecido em TCID₅₀/mL.

*** Estudo da citotoxicidade**

Avaliação da citotoxicidade pelas técnicas: avaliação das alterações morfológicas através de microscopia²¹⁸ e pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).²¹⁹

*** Avaliação das alterações morfológicas através de microscopia**

A citotoxicidade se traduz pela desorganização do tapete celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células, e conseqüente aparecimento de alterações morfológicas quando as células são expostas a agentes externos.²¹⁸

Uma suspensão de células VERO contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL, foi obtida através de tripsinização de um frasco de cultura celular e foi distribuída em placa de 96 cavidades (100 µL por cavidade). Após incubação de 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂, foram adicionadas diferentes concentrações de diferentes extratos e frações preparadas a partir de *A. blanchetti* e *A. schottii*. O meio da placa foi descartado por aspiração e as diluições foram transferidas para a placa. Foram feitos controles celulares apenas com Meio Mínimo Essencial (MEM). As placas foram incubadas por 72 h, nas mesmas condições descritas acima, e as alterações morfológicas acompanhadas no microscópio invertido diariamente.

*** Viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)**

Uma suspensão de células VERO contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL, foi distribuída em placa de 96 cavidades (100 μ L /cavidade). Após incubação de 24 h, 37° C, em estufa de CO₂, o meio MEM foi substituído por diluições dos extratos. As placas foram incubadas por 72 h, nas mesmas condições descritas acima. O meio foi substituído por 50 μ L da solução de MTT (1mg/mL em meio 199) e a placa foi incubada por 4 h. O meio com MTT foi então retirado e substituído por 100 μ L de DMSO para solubilizar o formazan. A leitura foi feita a 540 nm em leitor tipo ELISA.

*** Estudo da atividade antiviral *in vitro***

O estudo da atividade antiviral *in vitro* foi realizado pelo teste de inibição do efeito citopático viral, pelo ensaio colorimétrico do MTT e pela ação virucida.

*** Inibição do efeito citopático viral**

Esta metodologia permite estimar, com relação aos controles virais, os percentuais de inibição do efeito citopático viral provocados por cada concentração de cada substância testada. Para cada uma delas é construído um gráfico de percentual de inibição do efeito citopático viral em função das concentrações da substância em questão. A concentração que diminui em 50% o efeito citopático é assim estimada e é chamada de CE₅₀ (concentração efetiva a 50%).

Quanto maior o IS, mais promissora é sua atividade antiviral, dando indicação de que seria viável a realização posterior de estudos mais detalhados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tanto os valores de CC50 quanto de CE50 representam a média de três experimentos independentes +- desvio padrão da media, e foram obtidos através de análise de regressão linear.

Técnica:

Uma suspensão de células VERO contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL foi preparada e distribuída nos 96 poços de uma placa de microtitulação (100 μ L/poço). Após 24h, a 37 °C, formou-se um tapete celular uniforme. Foram adicionados simultaneamente 100 μ L dos extratos em estudo, em diferentes concentrações e 100 μ L da suspensão viral. Os controles virais (que atestam a virulência da suspensão viral utilizada), os controles das soluções das substâncias (que testemunham a ausência de citotoxicidade do produto testado,

na concentração utilizada), os controles realizados com aciclovir e os controles celulares foram preparados e adicionados na mesma placa de microtitulação. Em todos os experimentos as leituras foram efetuadas no microscópio invertido e a destruição do tapete celular pelo efeito citopático provocado pelos vírus foi comparada com os controles. A inibição do efeito citopático foi avaliada de acordo com as proposições de Sidwell & Hufmann (1971)²²⁰; Machida et al (1979)²²¹ e Sidwell (1986).²²²

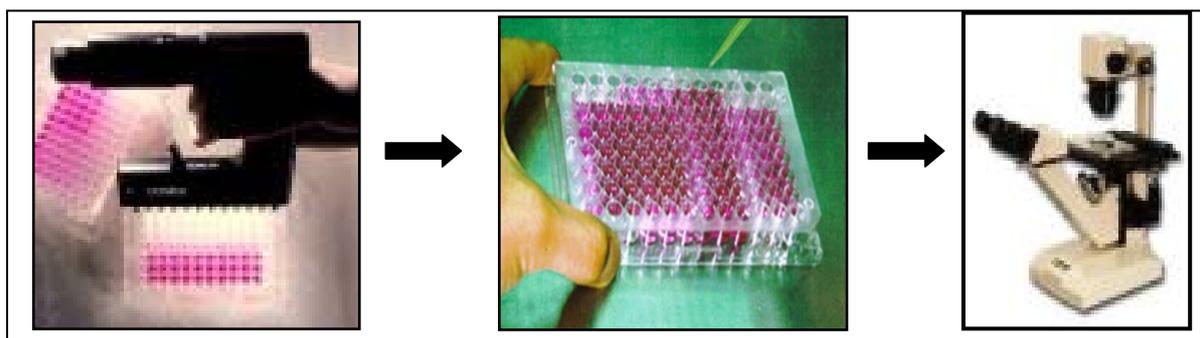


Figura 26 - Placas de microtitulação utilizadas para avaliar a inibição do efeito citopático

* Ensaio colorimétrico do MTT

A avaliação antiviral foi realizada da mesma forma que para a citotoxicidade, porém, com adição das suspensões virais.

Uma suspensão de células VERO contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL, foi distribuída em placa de 96 cavidades (100 μ L /cavidade). Após incubação de 24h, a 37°C, em estufa de CO₂, o meio MEM foi substituído por diluições dos extratos e 100 μ L de suspensões dos diferentes vírus em estudo. Foram realizados controles virais (100 μ L da suspensão viral + 100 μ L de meio), controles celulares (200 μ L de meio) e controles positivos de inibição do HSV-1 (100 μ L da suspensão viral + 100 μ L de solução de aciclovir 2,5; 5,0 e 10 μ g/mL); os demais vírus não dispõem de controle positivo de inibição. As placas foram incubadas por quatro dias para o HSV-1. O meio foi substituído por 50 μ L da solução de MTT (1mg/mL em meio 199) e a placa foi incubada por 4 h. O meio com MTT então retirado e substituído por 100 μ L de DMSO para solubilizar o formazan. A leitura foi feita a 540 nm em leitor tipo ELISA.

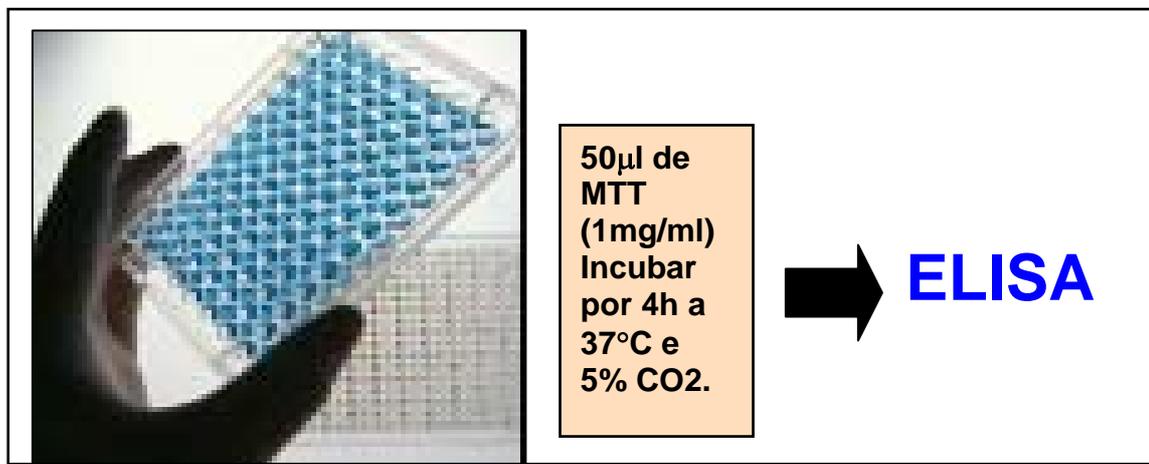


Figura 27 - Ensaio colorimétrico do MTT para leitura em Elisa

*** Delineamento experimental**

Nos experimentos, foi utilizado o delineamento de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos, onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental (placas de 96 cavidades e/ou 12 cavidades) e os tratamentos foram as diferentes concentrações de diferentes extratos e frações preparadas a partir de *A. blanchetti* e *A. schottii*, frente a diferentes linhagens celulares, no caso da citotoxicidade, ou frente a diferentes tipos de vírus, quando da avaliação da atividade antiviral. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades e as repetições (três) ficaram em placas diferentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

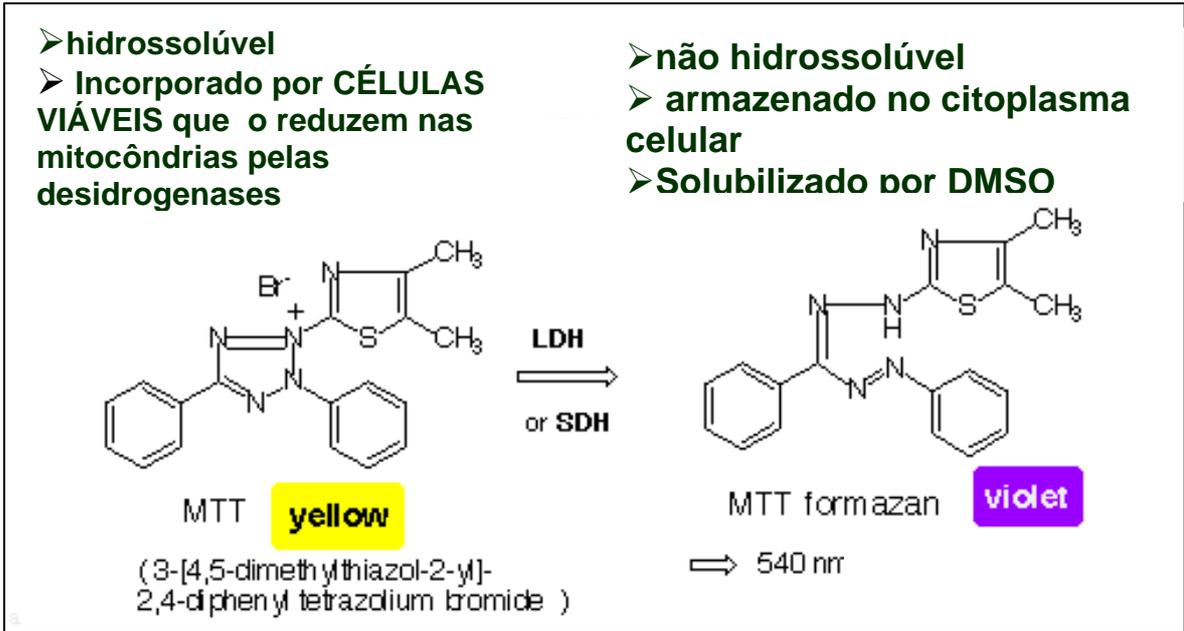


Figura 28 – Mecanismo do MTT (sal de tetrazolium)

Ainda, nesse experimento foi avaliada a atividade antiviral dos extratos de *A. schottii* contra o vírus da raiva cepa PV, mostrado na figura seguinte.

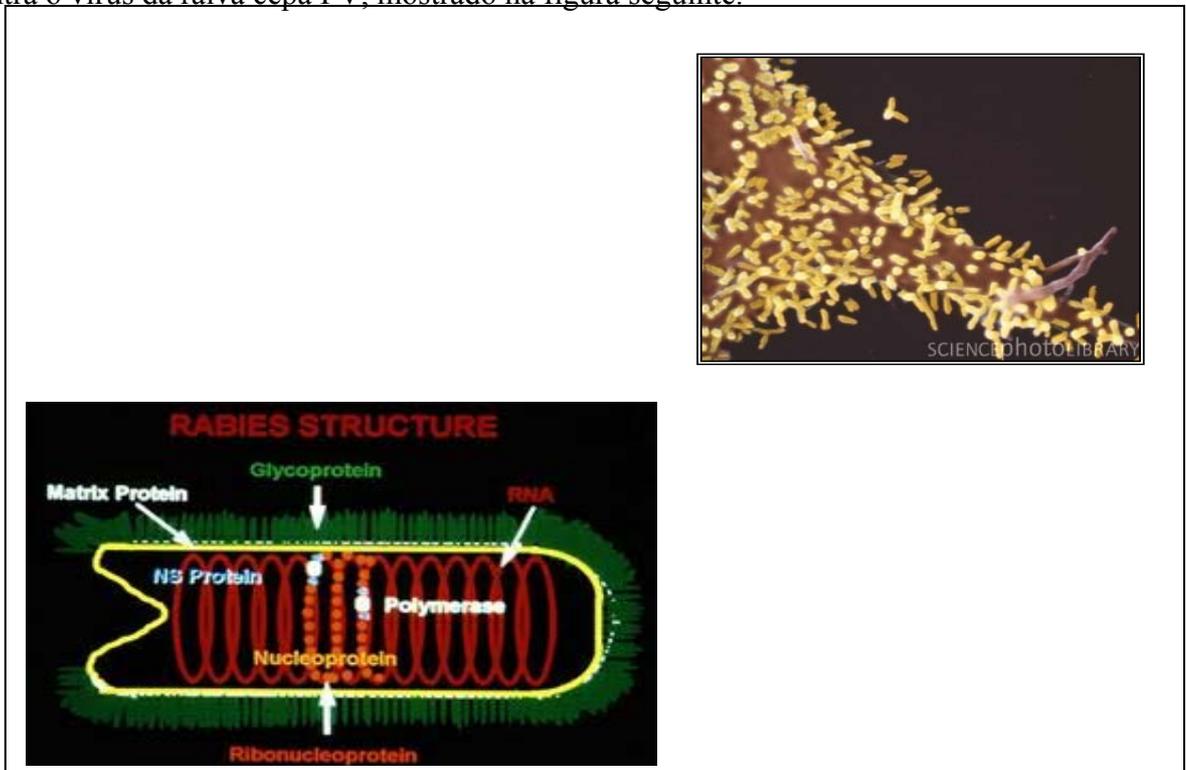


Figura - 29 - Vírus da raiva

4.5.4. ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA

Na tentativa de se buscar a possibilidade de outras aplicações terapêuticas, foi avaliada a atividade antileishmania de diversas frações de *A.schottii* (diversos órgãos) por 2 gupos de pesquisa diferentes:

4.5.4.1. ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM *L. amazonensis*

Avaliação da atividade antileishmania das frações DCM e Hexano a partir de raízes de *A.schottii*, sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia do departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)– João Pessoa- Paraíba

*** Frações testadas**

Após screening das diversas frações de raízes de *A. schottii*, as que se mostraram mais ativas, foram as frações Hex e DCM, motivo que levou a serem testadas em diversas concentrações e avaliadas em tempos diferentes. Com a fração Hexânica só foi realizada a análise na concentração de 250 µg/mL, enquanto que, com a fração DCM foram avaliadas diversas concentrações: 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50µg/mL e 75µg/mL.

*** Parasitas e sua manutenção *in vitro***

Foram utilizadas formas promastigotas da cepa IFLA/BR/67/PH8 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolada do flebotômio *Lutzomyia flaviscutellata* em Utinga, no estado do Pará, Brasil, em 1967. Os parasitas foram mantidos em meio de cultura NNN/BHI,

incubados a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e repicados a cada 7 dias de cultivo. Foram utilizados parasitas com no máximo 20 repiques sucessivos. A metodologia usada para este ensaio foi a preconizada por Napolitano.²²³

Análise do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* em meio de cultura contendo diferentes concentrações das frações DCM e hexânica de *A. schottii

Para o monitoramento do crescimento das formas promastigotas, os parasitos foram repicados para tubos contendo meio NNN/BHI com diferentes concentrações das frações diclorometano e hexânica de *Allamanda schottii*, com inóculo inicial de 1×10^6 promastigotas/ml. Paralelamente, como controle, foi analisado o crescimento do parasita na ausência destes compostos. As promastigotas foram incubadas a 26°C , e a cada 24 horas de cultivo eram retiradas alíquotas das suspensões, diluídas em solução isotônica (10,5 g de ácido cítrico; 7,0 g de NaCl; 5,0 ml de formol e 1000 ml de H_2O bidestilada) e quantificadas em câmara de Neubauer. A quantificação foi feita por contagem direta do número de células por campo em microscópio óptico com aumento de 40x. A média da contagem era utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1,0 ml de cultura. O cálculo era feito utilizando a fórmula:

$\text{N}^{\circ} \text{ de parasitas} = \text{média dos 4 quadrantes} \times \text{o inverso da diluição da amostra} \times 10^4$

Foi quantificado o crescimento das formas promastigotas na presença e ausência das diferentes concentrações das frações vegetais. Considerando como 100% o crescimento observado no controle (ausência das frações), foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento das promastigotas na presença das frações vegetais. Paralelamente as formas promastigotas de *Leishmania* eram avaliadas sob microscopia óptica.

*** Análise estatística**

O crescimento do parasita na ausência e presença das frações foi comparado utilizando o teste de T de “Student”. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.5.4.2. ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM *Leishmania chagasi*

Ainda, em relação á atividade leishmanicida, foi realizado um outro ensaio pelo Laboratório de Microbiologia e Protozoologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)- Florianópolis- SC

*** Frações testadas**

Avaliação da atividade antileishmania foram realizadas com raízes (fração DCM, AE e BuOH), caules (fração Hex, DCM e AE), folhas (fração Hex e DCM), flores (fração Hex e DCM) e sementes (fração Hex, DCM e AE) de *A.schottii* frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

*** Parasitos**

Formas promastigotas de (cepa MHOM/BR/74/PP75), foram cultivadas a 27°C em meio Schneider acrescido de 5% de SBF. Os parasitos foram obtidos na fase exponencial de crescimento, lavados duas vezes em PBS e suspendidos em meio Schneider e a concentração ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL.

As frações foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) puro na concentração de 50 mg/ml e mantidas em temperatura ambiente.

*** Avaliação in vitro da atividade tripanocida das frações de *A. schottii* contra formas epimastigotas de *L. chagasi***

Para a triagem inicial das frações, raízes (fração DCM, AE e BuOH), caules (fração Hex, DCM e AE), folhas (fração Hex e DCM), flores (fração Hex e DCM) e sementes (fração Hex, DCM e AE) os ensaios foram realizados em microplacas de culturas de 96 orifícios Nunc[®], nas concentrações de 1000 e 100 µg/ml adicionando-se 20 µl das frações a 180 µl do meio contendo os parasitos. Como controle, os parasitos foram mantidos na ausência de drogas, na presença de 1% de DMSO e benzinidazol na concentração de 10 µg/ml para *Leishmania*. Após adição dos compostos, as amostras foram homogeneizadas e mantidas a 28°C por 72 horas e, a seguir, as placas foram avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitos. Após homogeneização com auxílio de micropipetador, o número de parasitos viáveis foi determinado através da contagem em câmara de Neubauer. As frações ativas foram avaliadas como descrito acima, nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 µg/ml. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes com o objetivo de avaliar a estabilidade das frações e determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), segundo metodologia de Tome (1994)

²²⁴Os resultados dos testes estão descritos na página 230.

4.5.5. ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Na busca de possível atividade contra o mal de Chagas, no laboratório de Microbiologia e Parasitologia (MIP - UFSC) os seguintes ensaios:

- a) Triagem das diversas frações raízes de *A. schotti* frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y

b) Determinação dos IC_{50} das diversas frações de *A. schottii* contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y.

*** Frações testadas**

a) As frações testadas de *A. schottii* frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y foram: raízes-DCM e AE; caules-Hex, DCM e AE; folhas-Hex e DCM; flores-Hex e DCM e sementes -Hex, DCM e AE

*** Parasitos**

Formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas a 27°C em meio LIT (liver infusion tryptosome) contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). Os parasitos foram obtidos na fase exponencial de crescimento, lavados duas vezes em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4 a 1 500 xg/10 minutos e suspensos em meio LIT a concentração ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL.

As frações foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) puro na concentração de 50 mg/ml e mantidas em temperatura ambiente.

*** DETERMINAÇÃO DA IC_{50}**

A metodologia utilizada foi preconizada por Tome (1994)²²⁴. Para a triagem inicial das frações, os ensaios foram realizados em microplacas de culturas de 96 orifícios Nunc[®], nas concentrações de 1000 e 100 µg/ml adicionando-se 20 µl das frações a 180 µl do meio contendo os parasitos. Como controle, os parasitos foram mantidos na ausência de drogas, na presença de 1% de DMSO e benznidazol na concentração de 100µg/ml para *T. cruzi*. Após adição dos compostos, as amostras foram homogeneizadas e mantidas a 28°C por 72

horas e, a seguir, as placas foram avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitos. Após homogeneização com auxílio de micropipetador, o número de parasitos viáveis foi determinado através da contagem em câmara de Neubauer.

As frações ativas foram avaliadas como descrito acima, nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1µg/ml. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes com o objetivo de avaliar a estabilidade das frações e determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀).

4.5.6. ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA

*** Análise do potencial antileucêmico**

Estudos anteriores com o gênero *Allamanda* evidenciaram que o iridóide lipofílico allamandina, quando testado como inibidor tumoral apresentou expressiva efetividade contra a leucemia P-388 em ratos e *in vitro* contra células derivadas do carcinoma humano nasofaríngeal (KB).^{33, 34}

Objetivando evidências para uma possível atividade antileucêmica nas espécies *A. blanchetti*, *A. cathartica* e *A. schottii*, foram testados extratos brutos das 3 espécies através do CIPOI-Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância/UNICAMP (Campinas-SP) e Centro Infantil Boldrini – Departamento de Bioquímica, Campinas-SP.

*** Extratos testados**

Neste ensaio, foram testados os extratos brutos etanólicos de raízes, caules, folhas e flores da *A. blanchetti* e o extrato bruto etanólico de raízes, caule e folhas da *A. schottii* em

células endoteliais de medula espinhal (BMEC), células da veia umbilical endotelial e células da linhagem leucêmica K562.

* **Compostos isolados testados**

Alguns compostos químicos isolados também foram testados. Entre estes, testou-se o canferol, plumierídeo, isoquercitrina e ácido-*p*-OH cinâmico em células da linhagem leucêmica K562.

* **Isolamento e cultura de células**

Células endoteliais da medula espinhal (**BMEC**) foram isoladas de um doador. As amostras foram esterilizadas usando CD105 microporos (Milteny), de acordo com as especificações do fornecedor. As células CD105 positivas foram mantidas em meio de cultura EGM2-MV medium (Clonetics) a 37°C e 5% CO₂. Células com 2 a 5 passagens pela membrana filtrante foram utilizadas nos experimentos.

Células HP180 (**HUVEC**) da veia umbilical endotelial humana foram obtidas de BioWhittaker (Walkersville, MD) e mantidas em meio de cultura EGM2-MV medium (BioWhittaker). Células de linhagem leucêmica **K562** foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) e estocadas em meio RPMI (Invitrogen) suplementadas com 10% FBS (fetal bovine serum) (Harlan, Indianapolis, IN).

* **Ensaio MTS**

Células da cultura BMEC ou HP180 foram triplicadas. Foram adicionadas 3000 células em cada um dos 96 poços da placa, com 100 µL do meio de cultura EGM2-MV medium (BioWhittaker).

Das células K562, foram distribuídas 25000 em cada um dos 96 poços, com 100 µL de RPMI, suplementadas com 10% FBS. Após incubação por uma noite, 25 µL de extrato etanólico das raízes da *A. schottii*, nas concentrações 8 µg/mL, 80 µg/mL, e 400 µg/mL, foram adicionados em triplicata. A proliferação e viabilidade celular nos diferentes tempos de incubação foram avaliadas através da adição 25 µL do reagente MTS (Promega). Após 2-3

horas de incubação, a absorbância foi medida a 490nm e o número de células calculado pela comparação com a curva padrão.

* Estudos de Proliferação Celular

A proliferação das células foi medida por incorporação de [³H]-timidina. Em média 10⁵ células das linhagens de células K562, BMEC e HUVEC foram adicionadas em cada um dos 96 poços, com meio de cultura RPMI (Sigma R5382) contendo 10% de FBS, totalizando um volume final de 200 µL em cada poço, permanecendo nestas condições durante 24 horas. As culturas foram mantidas (para crescimento exponencial) a 37°C em atmosfera umidificada (99%) com 10 % de dióxido de carbono. Após a incubação (24 h), foi adicionado [³H]-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) 1µCi/poço (concentração final), onde as células serão incubadas por mais 18 h. O conteúdo de cada poço foi coletado e recuperado em um filtro de fibra de vidro. Após a adição do fluido de cintilação, a síntese do DNA incorporado-³H]-timidina foi medida em triplicata usando cintilação líquida automática (Packard BioScience Company) e foi normalizado contra os números correspondentes de células. As metodologias acima utilizadas foram baseadas em dados repassadas pelo fornecedor de MTS (Promega).

4.6. CONTROLE DE QUALIDADE SAZONAL

O controle de qualidade sazonal teve como finalidade a avaliação da variabilidade qualitativamente e quantitativamente dos metabólitos secundários da *A. schottii* nas diversas estações dos anos 2003 e 2004, ao se utilizar frações semipurificadas de diversas polaridades.

Foram coletados raízes, folhas, caules e sementes da *A. schottii* em todas as estações do ano (verão, outono, primavera e inverno) de 2 anos consecutivos: 2003 e 2004, sendo que as sementes só foram coletadas no ano de 2004.

Todas as coletas foram realizadas em dia ensolarado, depois das 10 h da manhã e antes das 16 horas, no Campus Univsersitário da UFSC (Trindade – Florianópolis – SC).

Durante as coletas de todas as estações dos 2 anos, teve-se o cuidado de se proceder a coleta sempre na metade de cada estação, com a finalidade de se estabelecer um parâmetro cronológico. Após a coleta de cada órgão, separadamente cada um deles foi reduzido a pequenos fragmentos e levado a secagem em lugar arejado, a temperatura ambiente até completa desidratação.

Após a secagem, para a obtenção do cada extrato bruto de cada órgão nas diversas estações, foram colocados exatamente 10 g de planta seca solvente de polaridade crescente, começando-se pelo hexano. As frações posteriores a serem obtidas foram DCM, AE e BuOH.²²⁵

O procedimento extrativo utilizado foi maceração por 5 dias, em local fechado e ao abrigo da luz e umidade. Iniciou-se usando para extração do extrato bruto de todos os órgãos o hexano, que após 5 dias de maceração foi retirado e volatilizado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 60°C. Com o resíduo obtido colocou-se o próximo solvente (DCM), deixou-se macerar por 5 dias e assim sucessivamente.

Com todas as frações obtidas de cada órgão da *A. schottii*, (raiz, caule e folhas) de todas as estações do ano de 2003, após evaporação completa do solvente, foi calculado o percentual de rendimento de cada fração. Da mesma forma, foram calculados os percentuais de rendimento de cada órgão da *A. schottii* (raiz, caule, folha, flores e sementes) e cada estação do ano, cujos resultados encontram-se na tabela 34 e 35 das páginas 240 e 241.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS DO PERFIL FITOQUÍMICO PRELIMINAR ENTRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS

Ao comparar fitoquimicamente, por CCD extratos brutos e frações das raízes, folhas, caules e flores da *A. cathartica*, *A. blanchetti* e *A. schottii*, utilizando-se reveladores usuais e padrões autênticos, relacionados na página 84, os resultados obtidos sugerem semelhanças na composição química das 3 espécies. Na tabela 9, no entanto, apesar da similaridade cromatográfica, o extrato bruto da *A. schottii* apresenta 2 manchas distintas a mais que os extratos brutos das outras espécies. Os compostos fenólicos estão presentes em folhas de *A. cathartica* e em todos os órgãos das 2 outras espécies. Terpenos e esteróides foram detectados também em todas as espécies. Não foram detectados alcalóides. As cumarinas foram observadas em todas as raízes das espécies estudadas.

O canferol, quercetina e rutina foram detectados nas flores das 3 espécies, sendo que a quercetina na *A. blanchetti* apareceu somente nas suas folhas. O canferol foi detectado também nas folhas e caules da *A. blanchetti* e a plumericina foi encontrada nos caules e raízes da *A. cathartica* e *A. schottii* e em todos os órgãos da *A. blanchetti*.

O plumierídeo foi detectado nas raízes e partes aéreas das 3 espécies e quando observado no UV (366 nm) produziu fluorescência característica de cumarinas, em forma de cor azulada intensa e fluorescente. Tal suspeita foi confirmada ao se revelar placas de CCD com KOH 10% em etanol.

Os resultados obtidos sugerem algumas diferenças na composição química de diferentes órgãos das 3 espécies analisadas no gênero *Allamanda*, motivo que levou a proposição de estudos posteriores e mais conclusivos. A fim de se ter uma visualização mais objetiva e instantânea deste perfil fitoquímico realizado entre as 3 espécies, será demonstrado na tabela abaixo os resultados do rastreamento dos grupos químicos e comparação com padrões autênticos. Ainda será mostrado na sequência do trabalho, diferenças mais expressivas do perfil de uma mesma espécie (*A.blanchetti*) ao se comparar fitoquimicamente a mesma planta em idades cronológicas diferentes (jovem e adulta) e coletada em localidades diferentes da mesma cidade. Os resultados podem se apresentar significativamente diferentes, como pode ser observado na página 147.

Os dados obtidos pela marcha sistemática analítica da tabela 9 nos oferece uma noção da composição química das 3 espécies de *Allamanda* e algumas semelhanças entre elas. Embora a CCD seja um valioso instrumento para oportunizar o conhecimento prévio e natureza química das substâncias presentes nas plantas em estudo, ela é uma técnica apenas de visualização qualitativa dos grupos rastreados. Este é um fator limitante em análises fitoquímicas, onde se desejem também a quantificação dos fitoconstituintes encontrados.⁹

Porém, como a nossa intenção não era não tinha como prioridade a quantificação e sim a detecção de grupos químicos comuns ou diferenciados às espécies estudadas, consideramos que esta marcha sistemática analítica foi uma ferramenta importante no processo de escolha dos grupos químicos a serem isolados. Também ofereceu um direcionamento, facilitando dessa forma, a escolha de sistemas de eluentes e reveladores a serem utilizados nas diversas etapas do processo extrativo.

Tabela 9 - Ensaio fitoquímico comparativo por CCD entre *A. cathartica*, *A. blanchetti* *A schottii* (raiz, caule, folha, flor)

GRUPO QUÍMICO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR	<i>Allamanda cathartica</i>	<i>Allamanda blanchetti</i>	<i>Allamanda schottii</i>
Terpenos E esteróides	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ todos órgãos	⊕ todos órgãos	⊕ todos órgãos
Plumierídeo	DCM: MeOH 90:10	Anisaldeído	⊕ raízes	⊕ raízes ⊕ folhas, caules	⊕ raízes ⊕ folhas, caules
Plumericina	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ folhas, caules	⊕ todos órgãos	⊕ Caules,raízes
Estigmasterol / Sitosterol	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ caules, raízes	⊕ todos órgãos	⊕ todos órgãos
Ácido ursólico	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ todos órgãos	⊕ todos órgãos	⊕ todos órgãos
Rutina	AE: Acetona: Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ todos órgãos	⊕ flores	⊕ flores
Quercitrina	AE: Acetona: Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ flores	⊕ folhas	⊕ flores
Grupos fenólicos	AE : Acetona: Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ flores	⊕ todos órgãos	⊕ todos órgãos
Quercetina	AE : Acetona: Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ todos órgãos ⊕ flores	⊕ folha	⊕ flores
Kaempferol	AE : Acetona: Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ flores	⊕ flores ⊕ caules, folhas	⊕ flores
Alcalóides	DCM : MeOH 90:10	Dragendorff	■ todos órgãos	■ todos órgãos	■ todos órgãos
Cumarinas	CCl ₃ :AE 80:20	KOH 10% + UV visível	⊕ raiz	⊕ raiz	⊕ raiz
Legenda: ⊕ presente ■ ausente					

5.2. MATERIAL VEGETAL: *Allamanda blanchetii*

Como foi relatado na página 85, o material vegetal da *A. blanchetii* utilizado para o isolamento de seus metabólitos secundários foi procedente da localidade de Sambaqui – Florianópolis –SC e não do Campus Universitário – UFSC, uma vez que havia necessidade de grandes volumes da planta e no Campus Universitário, a quantidade era insuficiente.

Após, coleta e secagem de todos os órgãos (raiz, caules, folhas e flores) da *A. blanchetii* de planta jovem e adulta e correta identificação botânica iniciou as técnicas extrativas para o isolamento e obtenção dos metabólitos secundários da espécie em estudo. As flores, foram os únicos órgãos que não passaram pelo processo de secagem e foi colocada para macerar *in natura*, porque durante a coleta apresentaram alto poder de oxidação (escureceram rapidamente) e tais reações químicas podem alterar, deteriorar ou promover a formação de novos compostos deste material, que não os seus originais.⁹⁶

5.2.1. Processo de extração

A técnica extrativa escolhida para obtenção dos metabólitos secundários da *A. blanchetii* foi baseada em metodologia descrita por Niero e colaboradores (2003) mostrados na figura 6.⁸⁸

Os extratos etanólicos brutos foram obtidos a partir dos diversos órgãos secos e pulverizados da planta jovem e adulta, os quais foram posteriormente macerados separadamente com EtOH por 10 dias. Após remoção do solvente, os extratos foram

concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Os rendimentos de cada extrato bruto (planta adulta e planta jovem) estão descritos na tabela 10.

Tabela 10 – Rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir de órgãos secos da *A. blanchetti*

PLANTA ADULTA			
Órgão	Massa / planta seca (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento (%)
Raiz	198,40	16,02	8,07
Caule	368,78	22,04	5,97
Folha	297,60	46,70	15,6
Flores	143,70	23,12	16,08
PLANTA JOVEM			
Raiz	18,15	1,81	9,97
Caule	81,50	7,79	9,55
Folha	24,24	5,37	22,37

Na proposição de avaliar os rendimentos de extratos brutos dos diversos órgãos da planta jovem e adulta, é importante salientar, que este é apenas um trabalho inicial de controle de qualidade entre idades cronológicas diferentes. A nossa intenção foi apenas qualitativa e em neste primeiro momento não se teve a pretensão de se quantificar exatamente os dados. Por este motivo é que se partiu de massas diferentes de cada órgão para a preparação dos extratos. No entanto, depois desta avaliação preliminar é intenção no futuro se dar continuidade a este tipo de controle, levando-se em conta parâmetros mais rígidos, como: mesma massa vegetal de cada órgão, volume igual de líquido extrator, mesma época do ano e mesmo lugar da coleta de cada órgão vegetal e utilizar-se de padrões de referência interna, objetivando o rastreamento dos possíveis metabólitos secundários através de CG ou HPLC.

De acordo com a tabela 10, os rendimentos dos extratos obtidos sugerem um percentual maior em massa, quando se usa a extração com a planta jovem, para todos os órgãos. Na planta adulta, o melhor rendimento (em massa) se verifica com o extrato bruto das flores. E ao se comparar todos os órgãos numa mesma espécie e idades cronológicas

diferentes, a conclusão que se chegou é que as folhas rendem 100% (em massa) a mais do que os demais órgãos, tanto na planta jovem como adulta, valor este que pode ser atribuído ao alto índice de clorofila presente neste órgão vegetal.⁷⁸

Após, particonamento do extrato bruto de todos os órgãos da *A. blanchetti* foi calculado os percentuais de rendimento em massa das frações obtidas (Hex, DCM, AE e BuOH), de todos os órgãos vegetais da *A. blanchetti* que são mostrados na tabela 11.

Tabela 11. Frações obtidas a partir do fracionamento de extrato bruto de *A. blanchetti* (fase adulta)

ÓRGÃO	MASSA / EXTRATO (g)	FRAÇÃO	RENDIMENTO (g)	RENDIMENTO (%)
Raiz	15,02	Hexano	1,84	11,52
		DCM	0,31	1,98
		AE	5,25	32,80
		Resíduo EtOH	4,76	29,76
Caulos	22,04	Hexano	1,86	8,46
		DCM	2,25	10,24
		AE	1,73	7,86
		BuOH	*	*
Folhas	46,70	Hexano	5,88	12,61
		DCM	3,75	8,04
		AE	4,46	9,55
		BuOH	11,42	24,45
Flores	23,12	Hexano	1,20	5,19
		DCM	1,91	8,26
		AE	1,10	4,35
		BuOH	*	*

*A fração BuOH dos caules e flores foram descartadas

Os resultados sugerem diferenças significativas quanto ao rendimento em massa de cada fração e órgão correspondente. O rendimento maior da fração Hex foi na folha e o menor nas flores. A fração DCM apresenta índices semelhantes em todas as frações de todos os órgãos, com exceção da raiz onde o índice é expressivamente menor. No entanto, na fração

AE, a raiz apresentou um índice 7 vezes superior aos demais órgãos. Este pode ser considerado um resultado animador, para trabalhos que visem o isolamento de iridóides glicosilados, como é o caso do iridóide plumerídeo (com muitas atividades terapêuticas), que é encontrado em frações mais polares, como a fração.¹⁴¹

5.2.2. Ensaio comparativos do perfil fitoquímico entre espécie jovem e espécie adulta

Antes do início do processo de isolamento, outro ensaio comparativo que consideramos importante realizar, foi rastrear os principais componentes químicos que poderiam estar presentes na planta e planta jovem e adulta da espécie *A. blanchetti*, uma vez que, durante o desenvolvimento do trabalho ocorreu a necessidade de se proceder a novas coletas, muitas vezes não encontramos a mesma espécie com o mesmo tempo de cultivo.

A metodologia consistiu em realizar com os extratos brutos obtidos de todos os órgãos das espécies e jovem adulta da *A. blanchetti*, um ensaio comparativo por CCD, com o adsorvente suporte em variados sistemas de eluentes, padrões autênticos e reveladores específicos, cujos resultados estão descritos na tabela 12.

Baseado na análise fitoquímica realizada, conclui-se que compostos químicos existentes na espécie adulta se assemelham ao da espécie jovem, com algumas diferenças em determinados grupos químicos como: o iridóide glicosilado plumierídeo foi detectado na flor da planta jovem e em todos os órgãos da planta adulta; a plumericina se apresentou na raiz da planta adulta e na folha da planta jovem. Os grupos fenólicos só estão presentes na flores da planta adulta e ausente na planta jovem. Os fitoesteróis estigmasterol e β -sitosterol não aparecem na planta jovem, no entanto, são detectados em todos os órgãos da planta adulta. O ácido ursólico está presente em todos os órgãos da planta adulta e ausente nas flores da espécie jovem e a quercetina está presente só nas folhas da planta jovem e em todos os órgãos

da planta adult .As cumarinas estão ausentes nas flores das 2 espécies. Não foram detectados alcalóides. A marcha sistemática acima realizada se constitui uma ferramenta importante para otimização de sistemas de eluição a serem utilizados na sequência do trabalho, bem como oportuniza o descarte da planta jovem, se o grupo prioritário de busca fosse os fitosteróis e ácido ursólico. ^{88, 116}

Tabela 12 – Ensaio fitoquímico comparativo por CCD entre *A. blanchetti* adulta e jovem (raiz, caule, folha, flor)

GRUPO QUÍMICO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR	PLANTA ADULTA	PLANTA JOVEM
Terpenos	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ todos os órgãos	⊕ folha, raiz
Plumierídeo	DCM: MeOH 90:10	Anisaldeído	⊕ todos os órgãos	⊕ flor
Plumericina	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ raiz	⊕ folha
Estigmasterol / β-sitosterol	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ todos os órgãos	■ todos órgãos
Ácido ursólico	H : AE 80:20	Anisaldeído	⊕ todos os órgãos	■ flores
Grupos fenólicos	AE : Acetona: Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ flor	■ flor
Quercetina	AE : Acetona:Água 25:5:1	FeCl ₃	⊕ todos os órgãos	⊕ folhas
Alcalóides	DCM : MeOH 90:10	Dragendorff	■ todos órgãos	■ todos órgãos
Cumarinas	CCl ₃ : AE 80:20 366 nm	KOH 10% + UV visível	■ flor	■ flor

Legenda

■ = ausente

⊕ = presente

No entanto, se comparar os resultados obtidos da *A. blanchetti* (planta jovem e planta adulta) com o rastreamento realizado no perfil fitoquímico preliminar das 3 espécies – UFSC (página 142) constatamos diferenças significativas quanto a presença de determinados grupos químicos. Como por exemplo, o ácido ursólico está presente em todos os órgãos das 3 espécies coletadas anteriormente e ausente nas flores da planta jovem da UFSC. A plumericina foi detectada em todos os órgãos da espécie da UFSC e na espécie adulta e jovem da *A. blanchetti* foi encontrada somente na raiz da planta adulta e folhas da planta jovem. O plumierídeo foi encontrado em todos os órgãos da espécie da UFSC e planta adulta, enquanto que na espécie jovem foi detectado somente nas flores. A quercitina aparece somente nas folhas da *A. blanchetti* (UFSC) e na planta jovem e também, em todos os órgãos da planta adulta. As cumarinas estão ausentes nas flores da planta jovem e adulta está presente somente nas raízes das espéciescoletadas no campus da UFSC.

Uma vez que, as 3 marchas sistemáticas analíticas foram desenvolvidas com extratos de uma **mesma** estação do ano (verão), todas essas diferenças encontradas nos 3 ensaios, podem ser explicadas pela diferença de habitat de cada planta, fatores climáticos, local da coleta, nutrientes e pH do solo e idades cronológicas diferentes.^{54, 95}

As diferenças encontradas nos levam a reforçar a crença, de que devemos ter o máximo de cuidado, quando ao desenvolver um trabalho de isolamento, tentar na medida do possível, estabelecer parâmetros padronizados afim de que, durante todo o desenvolvimento do trabalho as espécies vegetais sejam coletadas dentro destes padrões pré-estabelecidos como, por exemplo, numa mesma região física e climática, mesma idade cronológica para que possamos oportunizar a reprodutibilidade de trabalhos anteriormente realizados.

5.2.3. FRACIONAMENTO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUENTES QUÍMICOS DA *A. blanchetti*

Depois de rastreado o perfil fitoquímico comparativo entre a planta jovem e a planta adulta, iniciou-se a separação, purificação e identificação dos constituintes químicos das folhas e caules (que forma reunidos por apresentarem semelhanças cromatográficas por CCD), das raízes e flores da *A. blanchetti*. As frações escolhidas para os ensaios (dos órgãos acima citados) foram aquelas que apresentavam um bom perfil cromatográfico e então estas frações foram submetidas aos procedimentos isolamento e identificação estrutural dos compostos puros obtidos através de técnicas cromatográficas anteriormente descritas .^{117, 118, 120, 121, 123, 125}

5.2.4. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DAS FOLHAS E CAULES DA *A. blanchetti*

Com partes aéreas (caules e folhas) da planta em estudo trabalhou-se com as frações Hex e AE (estação verão), devido ao bom perfil cromatográfico apresentado.

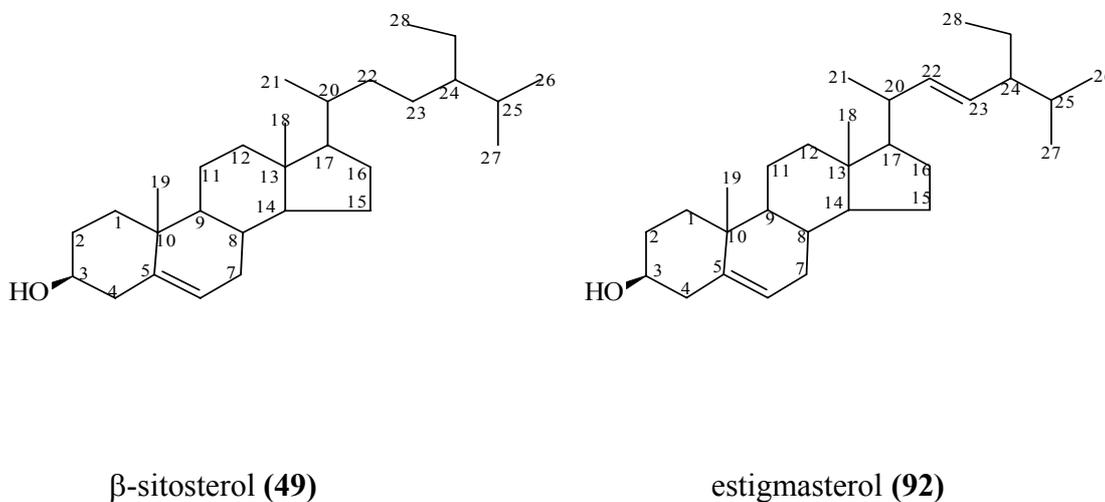
5.2.4.1. Fração hexânica

As investigações químicas com folhas e caules da fração hexânica da *A. blanchetti* levaram ao isolamento de uma mistura de 2 esteróis (β -sitosterol (**49**) estigmasterol (**92**), o qual foi chamado de mistura **53-63H**.

5.2.4.1.1 MISTURA 53-63 H – β -sitosterol + estigmasterol

A mistura **53-63H**, isolado da fração hexânica do extrato etanólico de folhas e caules da *A. blanchetti* (verão), após CC, apresentou-se como um cristal branco transparente, solúvel em acetona que após lavagem com AE: MeOH e MeOH deu origem a um sólido transparente (14 mg). Os dados obtidos sugerem que se trata de uma mistura que possuem esqueleto esteroidal com insaturação^{226, 227}, cuja estrutura foi confirmada através de análises de IV, RMN ¹H e C ¹³ e por comparação com dados existentes na literatura como sendo β -sitosterol (**49**) e estigmasterol (**92**).

Mistura 53-63 H



O espectro de IV (figura 30) em pastilha de KBr apresentou uma banda de absorção em 3441 cm^{-1} , referente às vibrações de deformação axial do grupo OH. Foram observadas também, bandas de absorção de intensidades médias em 2865 cm^{-1} , correspondente a estiramentos do grupo –CH. Nas regiões de 1463 cm^{-1} e 1374 cm^{-1} foram observadas bandas

de absorção correspondentes a estiramentos do grupo-CH₂ e CH₃. Outra banda de absorção de fraca intensidade referente a deformação de olefinas foi observado em 1 638 cm⁻¹. Os dados observados no espectro de IV da mistura 53-63H foram comparados com dados da literatura.

116, 133

Figura 30 - Espectro de IV (KBr) da mistura **53-63H** - β-sitosterol(**49**) + estigmasterol (**92**)

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H (Figura 31) indicam que a mistura 53-63H apresenta os seguintes deslocamentos: todas as metilas, grupos metilênicos e metinos foram registrados na região do espectro entre (δ) 0,72-1,03. Os hidrogênios das metilas C-28 teve seu deslocamento químico em forma de triplete, o C-21, C-26 e C-27 tiveram seus deslocamentos químicos em forma de dublete e as metilas C-18 e C-19 tiveram seus deslocamentos químicos em forma de singlete e observados na região de 1,02 ppm.

Um sinal em 3,77 ppm foi atribuído aos hidrogênios (H-3) das 2 moléculas da mistura. A diferenciação de um esteróide do outro, deve-se a dupla ligação do estigmasterol entre C-22 e C-23 que pode ser observados em forma de multiplete na região de 5,18 ppm. Pode ainda, ser observado outros deslocamentos químicos nesta região de absorção de H olefínicos, como o dublete na região de 5,31 ppm ($J= 4,0$ Hz) atribuído ao H-6 da mistura. Estes valores coincidem com dados da literatura.^{228, 229, 133}

Os valores de deslocamentos químicos em ppm para RMN ^{13}C para a mistura 53-63H são compatíveis aos encontrados na literatura¹³³ e por serem compostos muito conhecidos considerou-se desnecessário mostrá-los.

Os 2 fitoesteróis encontrados na mistura 53-63H constituem-se metabólitos secundários comumente presentes em várias plantas²³⁰ e foi demonstradas suas propriedades analgésicas em vários modelos de dor em camundongos.²³¹ Dados da literatura revelam que o β -sitosterol é um composto que vem se evidenciando pela sua significativa importância na produção de fármacos esteroidais, como hormônios.

Figura 31 - Espectro de RMN ¹ H (200 Mhz/ acetona D6/ TMS) da mistura **53-63H** - β-sitosterol + estigmasterol

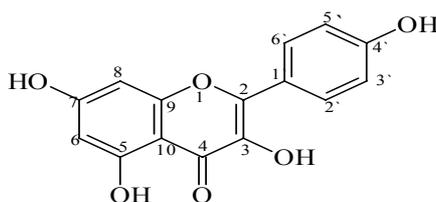
Outras pesquisas demonstraram que estes fitoesteróis, além da atividade antinociceptiva, podem exercer uma potente ação antiedematogênica em ratos, sendo o seu efeito comparável com a hidrocortizona (corticóide) e fenilbutazona (antiinflamatório não esteroide).²³² Cabe ainda, ressaltar que estes compostos e seus derivados apresentam eficácia no tratamento da hiperplasia benigna de próstata (HBP).²³³ Apesar destes esteróis serem encontrados no gênero *Allamanda*, a literatura relata que eles **não** haviam sido isolados dos caules e folhas da *A. blanchetti*.

5.2.4.2. Fração AE

As investigações químicas com as folhas e caules da *A. blanchetti*, fração AE (4,97 g) estação verão, levaram ao isolamento dos compostos **59-73AE (46)**, **37 (9) AE (93)** e **25-33AE (94)**

5.2.4.2.1 COMPOSTO 59-73 AE: canferol – (5,7,3', 4' tetra-hidroxi-flavonol) (46)

O composto **59-73 AE** (64,1 mg) foi isolado da fração AE, a partir de extrato etanólico das folhas e caules da *A. blanchetti* (verão), após CC, apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em acetona e ponto de fusão 270-278 °C. A sua estrutura foi confirmada através de IV, RMN ¹H e ¹³C e comparação com os dados da literatura como:



canferol– (5,7, 3', 4' tetra-hidroxi-flavonol) (46)

O espectro de IV (fig. 32) apresenta bandas de absorção em $3\,392\text{ cm}^{-1}$ referente às vibrações de deformação axial do grupo OH. Em $3\,311\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma banda fina de absorção referente a deformação axial =CH. O grupamento aromático pode ser observado nas bandas de absorção de intensidade média da deformação axial C=C em $1\,612\text{ cm}^{-1}$ e $1\,510\text{ cm}^{-1}$ e deformação angular =CH confirmada na deformação angular em 820 cm^{-1} . Em 1660 cm^{-1} a banda observada indica a presença de carbonila conjugada.

Figura 32 - Espectro de IV (pastilha de KBr) do composto **59-73AE** canferol- (5,7, 3', 4'-tetra-hidroxi-flavonol

Pelo espectro de RMN ^1H (fig. 33) observa-se vários sinais na região de hidrogênios aromáticos sendo: 2 dubletes que foram registrados na região entre (δ) 8,16-7,03 (4H) correspondente aos hidrogênios aromáticos H-2', H-6' e H'-3', H-5' do anel B. Um sinal em forma de 2 dubletes em (δ) 6,27 ($J = 2,0$ Hz) e 6,54 ($J = 2,0$ Hz), atribuídos para os hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente.

Outro deslocamento químico observado foi um singlete em (δ) 12,18 atribuído ao hidrogênio de OH ligado ao carbono C-5. O sinal observado em 2,92 ppm é atribuído à presença de umidade na amostra.

Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz/ $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ / TMS) do composto **59-73 AE** - canferol- (5,7, 3', 4'tetra-hidroxiflavonol)

Para o espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (espectro desacoplado em faixa larga e do tipo DEPT 135 e DEPT 90) todas as absorções observadas (fig. 34) estão de acordo com os descritos na literatura para o canferol.

Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz / $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto **59-73AE** - canferol- (5,7, 3', 4' tetra-hidroxiflavonol)

Na tabela 13 pode-se observar a concordância dos valores obtidos no espectro de RMN ^1H e ^{13}C para o composto **59-73-AE** e dados da literatura para o canferol.²³⁴

Tabela 13 - Valores de deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C para o composto **59-73 AE** e dados da literatura para o canferol ²³⁴

Posição	59-73AE (δ) ^1H	59-73AE (δ) C^{13}	Canferol (δ) ^1H (Chiale et al,1991)	Canferol (δ) ^{13}C (Chiale et al,1991)
2		147,21 (C)	.	156,30
3		135,30 (C)		133,30
4		176,84 (C)		177,60
5		162,54 (C)		161,40
6	6,27 sl (J= 2,0)	99,24 (CH)	6,15 d (J= 2,3)	99,01
7		165,19 (C)		164,30
8	6,54 sl (J= 2,0)	94,54 (CH)	6,37 d (J= 2,3)	93,95
9		158,01(C)		156,70
10		104,27 (C)		104,17
1'		123,43 (C)		121,07
2' - 6'	8,16 (J= 8,6) d	130,61(CH)	8,03 d (J= 8,0)	130,29
3' - 5'	7,03 (J= 8,6) d	116,12(CH)	6,82 d (J= 8,1)	115,35
4'		160,37(C)		159,04
OH (5)	12,18 s		12,19	
Solvente	$\text{C}_3\text{D}_6\text{O}/300\text{ Mhz}$	$\text{C}_3\text{D}_6\text{O}/75,5\text{ MHz}$	$\text{DMSO}/25,2\text{ MHz}$	$\text{DMSO}/25,2\text{ MHz}$

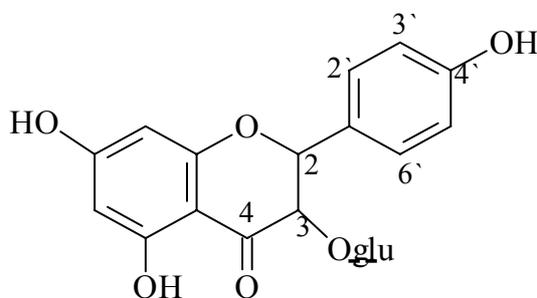
Estudos farmacológicos têm sido realizado com o canferol e dados bibliográficos têm demonstrado atividade anti-inflamatória e antioxidante para o canferol, atividade esta relacionada com a presença de OH nos carbonos C-3, C-5 e C-7 e da dupla ligação entre o C-2 e C-3. ²³⁴ Existem relatos que o canferol também apresenta atividades antihipoglicemiantes, atividade antiviral, antibacteriana e alelopática. ^{236, 237}

Embora o canferol seja conhecido no gênero *Allamanda*, durante a revisão da literatura não foi encontrado nenhuma citação de isolamento do kampeferol em **nenhum** órgão da *A. blanchetti*, sendo, portanto, a **primeira vez**, o isolamento deste flavonóide na espécie estudada.

5.2.4.2.2. COMPOSTO 37(9)AE - isoquercitrina

O composto **37 (9) AE** (26 mg) isolado da fração AE do extrato etanólico das folhas e caules da *A.blanchetti* (verão), após cromatografia em coluna, apresentou-se como sólido de cor amarelo muito forte, solúvel em acetona, e quando visualizado no UV longo (366 nm) foi detectada cor azul fluorescente acentuada.

Através de ensaios por CCD e padrões autênticos de flavonóides, reveladores específicos para grupos fenólicos, e por comparação de Rf conclue-se que o composto constituía-se uma mistura de flavonóides. A sua estrutura foi confirmada por técnicas espectroscópicas e comparação com dados da literatura como sendo uma mistura de **quercitina-3-O-glicosídeo (93) + canferol (46)** ou também chamado de isoquercitrina.



Quercetina -3-O-glicosídeo (**93**) - (isoquercitrina)

Pelo espectro de RMN ^1H os hidrogênios aromáticos para os 2 compostos tiveram seus deslocamentos químicos registrados na região de (δ) 6,2 a 8,2. Tanto para o canferol quanto para a quercetina os sinais encontrados em forma de 2 dubletes em (δ) 6,51 e (δ) 6,2 são atribuídos para os hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Em (δ) 6,96 e 6,97, os 2 dubletes

observados são referentes à H-6` da quercetina e H-3` e H-5` do canferol. Em (δ) 8,1 ppm, o sinal registrado refere-se à H-2` e H-6` do canferol. E por último foi registrado um deslocamento químico em forma de singlete em (δ) 12,32 atribuído ao hidrogênio de OH ligado ao carbono 5. Os hidrogênios referentes à unidade glicosídica para a quercitina pode ser observado através de sinais na região compreendida entre (δ) 4,20 e 3,3 . O hidrogênio anomérico apresenta-se como um dublete em (δ) 5,26. Todas as absorções acima citadas podem ser observadas na figura 35.

Figura 35 - Espectro de RMN¹ H (200 MHz/ acetona D6 /TMS) do composto **37(9)AE-isoquercitrina**

Os valores de deslocamento químico de RMN ^1H apresentados na figura 35 indicam que o composto **37(9)AE** é um flavonóide de **quercetina-3-O glicosídeo** em mistura com o canferol.²³⁸

A quercetina e o canferol são flavonóides relatados frequentemente na literatura, e considerados importantes em virtude de sua efetividade em muitas patologias como: efeito mutagênico em linfócitos de pacientes com Talassemia²³⁹, ação fungicida contra *Aspergillus flavus* e produção de aflotoxinas.²⁴⁰

Com a quercetina aglicona e seus derivados glicosídicos, recentemente foi demonstrado seu potencial antioxidativo, uma vez que, após administração intragástrica deste flavonóide, o plasma dos animais em estudo, apresentaram-se mais resistentes contra a lipoperoxidação causada por íons cobre.^{241, 242}

Alguns estudos comprovam que a quercetina é um efetivo inibidor da oxidação da LDL catalizada pela 15-LOX (enzima 15-lipoxigenase que pode contribuir para a peroxidação lipídica da LDL durante os estágios iniciais da aterosclerose).^{243, 244, 245} A quercetina e outros flavonóides são considerados antioxidantes mais eficientes que o ácido ascórbico e o α -tocoferol, em concentrações equimolares,²⁴⁶ provavelmente por sua adsorção interfacial na superfície da LDL, em contraste com as vitaminas C e E, localizadas nas fases aquosa e lipídica.²⁴⁷

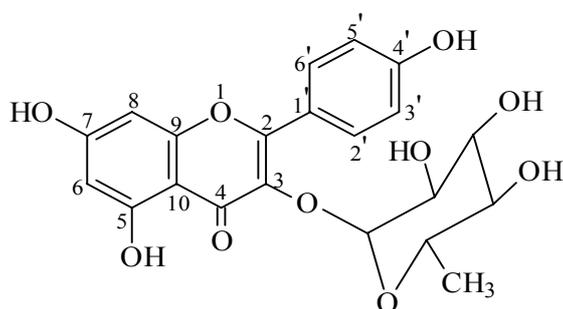
A quercetina ao reagir *in vitro* com peroxinitrito, pode ser considerada como um agente antiinflamatório potencial.^{248, 247} Também em função de sua propriedade sequestradora de radicais livres, a quercetina provoca descréscimo da incidência de doenças cardiovasculares.^{249, 250} A inibição da lipoperoxidação da quercetina é influenciada por certas características estruturais dos flavonóides como: a) a presença de um grupamento hidroxila na posição 3 do anel C; b) dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C; c) grupo carbonila na

posição 4 do anel C; d) padrão e número de grupos hidroxilas nos anéis A, B e C; e) presença de açúcares e f) atividade quelante pela associação do grupo carbonila no C-4 e uma hidroxila no C-3 ou C-5.²⁵¹

Até o presente momento, **não** foi relatado na literatura, o isolamento da quercetina e canferol em caules e folhas da *A. blanchetti*, o que oportuniza ensaios biológicos que na sequência serão relatados neste trabalho, dada a significância farmacológica destes flavonóides.

5.2.4.2.3 COMPOSTO 25-33AE - canferol-3-O- β -ramnosídeo (94).

O composto **25-33AE** (111 mg) isolado da fração AE do extrato etanólico das folhas e caules da *A. blanchetti* (verão), após cromatografado em CC, apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol. A sua estrutura foi confirmado através de análises de RMN ¹H e ¹³C (figuras 35 e 36) como sendo o **canferol-3-O- β -ramnosídeo (94)**.



canferol-3-O- β -ramnosídeo (94)

Os valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C apresentados na tabela - 14 indicam que o composto 25-33AE é um flavonóide-O-glicosilado. Pelo espectro de RMN ^1H (figura 36), o que se observou foi um singlete em (δ) 12,43 referente a OH-5; Os deslocamentos de H-2'' e H-6'' aparecem em (δ) 8,14 (em forma de dublete). O H-1'' ligado ao carbono anomérico aparece como um sinal em (δ) 5,24. Na região de (δ) 4,96-3,32 encontram-se os sinais dos hidrogênios H-2'', H-3'', H-4'' e H-5''. Na região de (δ) 1,40 estão dispostos os H metilênicos da ramnose.

Figura 36 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz / MeOH D₆/ TMS) do composto **25-33AE** - canferol-3-O- β -ramnosídeo

Quanto ao espectro de ^{13}C (figura 37) os deslocamentos químicos são muito semelhantes ao composto **59-73AE**, uma vez que o núcleo estrutural básico do flavonóide é o mesmo. O que diferencia quanto aos deslocamentos (δ), são os sinais referentes ao tipo de açúcar ligado ao carbono 3, que neste caso é ramnose. Foram observados na região de (δ) 95,08 uns sinais correspondente ao C-1''; de 78,3-65,4 ppm foram observados os sinais atribuídos aos carbonos C-2''.....C6''.

Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz/ acetona D6 / TMS) do composto **25-33AE**-canferol-3-O- β -ramnosídeo

Na tabela 14 se observa a concordância dos valores no espectro de RMN ^1H e ^{13}C do composto **25-33 AE** e dados da literatura para o canferol-3-O- β ramnosídeo.²⁵²

Tabela 14 - Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o composto **25-33AE** e dados da literatura para o canferol-3-O- β -ramnosídeo²⁵²

Posição	25-33AE δ ^1H J (Hz)	25-33AE δ ^{13}C	canferol-3-O- β - ramnosídeo δ ^1H J (Hz) ²⁵²	canferol-3-O- β - ramnosídeo δ ^{13}C ²⁵²
2	-	151,11	-	146,8
3	-	-	-	135,6
4	-	179,6	-	175,7
5	-	166,04	-	160,6
6	6,27	105,93	6,18 d (J= 2,0)	98,1
7	-	163,24	-	163,8
8	6,53	104,43	6,40 d (J= 2,0)	93,3
9	-	161,76	-	156,1
10	-	-	-	103,0
1'	-	129,02	-	121,9
2''	8,14 d (J= 8,0)	135,74	7,67 d (J= 8,6)	131,9
3''	6,98 d (J= 8,0)	122,95	7,03 d (J= 8,7)	116,5
4''	-	158,60	-	161,5
5''	6,98 d (J= 8,0)	116,34	6,89 d (J= 8,3)	116,5
6''	8,14 d (J= 8,0)	132,64	7,53 d (J= 8,6)	131,9
1'''	5,24	95,08	5,47	103,0
2'''	4,96	78,3	4,31	77,2
3'''	4,25 d (J= 8)	75,6	3,80	75,3
4'''	3,49	73,93	3,42	82,8
5'''	3,32	65,4	3,40	63,9
6'''	1,15	15,08	1,01	-
OH (5)	12,43		12,42	
Solvente	Acetona D6/ 200 Mhz	MeOH/ Acetona 50 Mhz	CD ₃ OD 600,13 MHz	CD ₃ OD 150,93 MHz

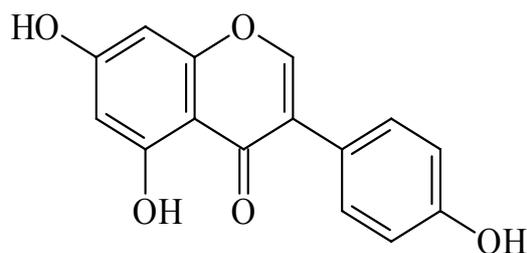
O flavonóide canferol tem sido isolado de várias espécies, inclusive da *A. cathartica* e *A. schottii*^{195, 194}, porém ainda **não** foi relatado na literatura, o isolamento do canferol-3-O- β -ramnosídeo do gênero *Allamanda*

O canferol em estudos anteriores demonstrou diversas atividades farmacológicas, já citadas, quando da identificação do composto **59-73AE**.

5.2.4.2.4. COMPOSTO **41(9)AE** - **5,7,4'** tri-hidroxi-isoflavona (**95**).

O composto **41(9) AE** foi isolado das partes aéreas (follhas) da *A. blanchetti* (estação verão) e apresentou-se como um sólido branco solúvel em acetona. Através de técnicas espectroscópicas de RMN ¹H foi identificado com sendo **5,7,4'** tri-hidroxi-isoflavona (**95**).

41(9) AE



5,7,4' tri-hidroxi-isoflavona (**95**)

Pelo espectro de RMN ¹H (figura 38) foram observados os seguintes deslocamentos químicos: em 5,23 ppm observa-se um singlete referente a H-2, em 6,28 e 6,51 ppm são observados mais 2 singletes responsáveis pelas absorções dos H-6 e H-8, respectivamente. Os 2 dubletes que aparecem em 6,94 e 7,58 ppm são atribuídos aos H-3' e H-2'. Os deslocamentos químicos em forma de 3 singletes que são observados em 8,53, 9,86 e 12,26 ppm correspondem a próton das OH.

No espectro de RMN ¹³C se observa sinais característicos de isoflavonas, sendo que os deslocamentos observados em 154-151 ppm corresponde ao C-2, os deslocamentos em 121-

125 ppm são atribuídos ao C-3 e em 174-179 ppm os deslocamentos observados são responsáveis pelas absorções do C-4.

Figura 38 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz/ MeOH/ D_6 /TMS) do composto **41(9)AE-5,7,4'** tri-hidroxi-isoflavona

Os isoflavonóides são caracterizados como os demais flavonóides por uma cadeia arila-C-3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Muitas outras estruturas podem se formar por

diferenciação de seu nível de oxidação e variação do núcleo fundamental. Biogeneticamente, os isoflavonóides são formados como os flavonóides em geral, via chalconas. Nos vegetais, uma grande parte das isoflavonas comporta-se como fitoalexina que é uma substância produzida pelas plantas em resposta a uma infecção por um agente patogênico. Os substituintes mais comuns são os grupamentos hidroxila, metoxila e metileno dioxila.^{166, 167}

Às isoflavonas são atribuídas várias atividades farmacológicas, entre elas, efeitos antioxidantes, inibição de enzimas envolvidas no metabolismo estrogênico²⁵³, inibição de proteinoquinas envolvendo sinalização celular, efeitos no transporte da glicose, proliferação celular e inibição da angiogênese.²⁵⁴

Alguns estudos sugerem o papel das isoflavonas na prevenção de peroxidação de lipídeos²⁵⁵, atividade antifúngica e antibacteriana.¹⁶⁶ Vicent e Fitzpatrick (2000) constataram que na maioria de dietas ricas em isoflavonas, ocorre uma diminuição significativa do colesterol total, LDL e triglicérides.²⁵⁶ Em estudo com 38 pacientes foi comprovado que a ingestão diária de 100 mg de isoflavonas promoveu a redução de 9,3% no LDL e 10,5% em triglicérides.²⁵⁸ Em macacos jovens sacrificados após 14 meses de dietas com proteína animal e com isoflavonas, foi observado 90% a menos de aterosclerose no grupo tratado com isoflavona.²⁵⁹

Em mulheres na pré-menopausa, maior ingestão de alimentos com isoflavonas, provocou um significativo incremento e manutenção do pico, de massa óssea na coluna lombar, quando avaliado por densitometria óssea.²⁶⁰ São relatados também, trabalhos que provam as propriedades anticancerígenas das isoflavonas²⁶¹ por realizar bloqueio de proliferação celular de células tumorais de mama *in vitro*.²⁶² E ainda, um outro trabalho relata, que foi observado em 474 mulheres pós-menopausa, um percentual de 13,2% a menos de linfocitopenia quando estas ingeriram 200 mg diárias de isoflavonas.²⁶³

Não existe registros na literatura de isolamento de isoflavonas nas espécies *A. blanchetti* e *A. schottii*, o que sugere possíveis e promissores trabalhos em estudos futuros com este grupo químico.

5.2.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DAS RAÍZES

DA *Allamanda blanchetti*

Com as raízes da *A. blanchetti*, trabalhou-se com a fração AE (estação verão) por apresentar bom perfil cromatográfico. A secagem, processo extrativo e obtenção de extrato bruto e frações foram realizados com o mesmo procedimento das folhas e caules (página 86).

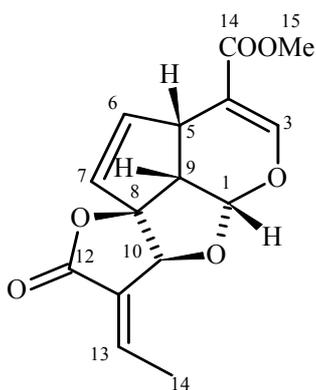
As investigações químicas levaram ao isolamento dos compostos **10B30-76** (21); **10C78-120**; **10D122-164**; **10E165-203** (96) e **FG12AE** .

Os compostos **10D122-164**, **10E165-203** e **FG12AE** quando revelados no UV longo (366 nm) apresentaram manchas azuis fluorescentes muito brilhantes, características de cumarinas¹¹⁶ e quando revelados com KOH/EtOH 5%, a cor azul intensificou-se, o que levou a expectativa da identificação de possível cumarina.

5.2.5.1. Fração AE

5.2.5.1.1 COMPOSTO 10B30-76 - plumericina

O composto **10B30-76** (86 mg) isolado da fração AE obtida das raízes do extrato etanólico da *A.blanchetti* (verão), após CC e recristalização com Hexano: AE + 2 gts de MeOH, apresentou-se como um sólido branco, solúvel em MeOH e ponto de fusão entre 211-217°C, dado confirmado pela literatura.¹⁵⁰ A sua estrutura foi confirmada através de análises de IV, RMN ¹H, RMN ¹³C como o iridóide **plumericina** (figuras 39, 40 e 41).



Plumericina (**21**)

Na análise de IV, (figura 39) observa-se em 1.757 e 1.709 cm^{-1} duas bandas de grande intensidade referente à deformação axial dos grupos carbonilas. Em 2 951 cm^{-1} 2 bandas de absorção média correspondentes a deformação axial de C-H e em 1 438 cm^{-1} uma banda fina e média intensidade cujo valor corresponde a deformação angular de CHO.

Na região de 1 645 cm^{-1} , o sinal registrado corresponde a absorção de C=C e em 1 187 cm^{-1} , a banda registrada é referente à absorção do grupamento C-O.

Figura 39 - Espectro de IV (pastilha de KBr) do composto **10B30-76- plumericina**

Pelo espectro de RMN ^1H , (figura 39), se observa um deslocamento químico em forma de dublete em 2,2 ppm referente a uma metila 14 e uma absorção como um singlete em (δ) 3,77 ppm, singlete característico de metoxila. Também foram registradas na região de campo baixo (acima de 5 ppm), várias absorções referentes a hidrogênios olefinicos. É possível observar o sinal referente à H-5, o qual aparece como um duplo triplete em 4,02 ppm. O H-3 é registrado como um singlete largo na região de (δ) 7,60 e outro sinal na faixa de (δ) 7,18 responsável pela absorção dos H-13 .

Figura 40 - Espectro de RMN ^1H (Acetona D₆/200 MHz TMS) do composto **10B30-76-plumericina**

Para o espectro de RMN ^{13}C (figura 41), verificou-se a presença de 15 carbonos diferentes. Destes deslocamentos químicos, 2 sinais de carbonila podem ser observados em 167,20 e 168 ppm. Os sinais em 104,82, 102,51 e 80,56 ppm são referentes a carbonos oxigenados. Os sinais observados entre 109-156 ppm são deslocamentos característicos atribuídos à olefinas.

Na tabela 15, são mostrados valores que demonstram a concordância entre os valores de deslocamento químicos de RMN ^1H e ^{13}C para o composto **10B 30-76** com dados da literatura para a plumericina.^{149, 198}

Figura 41 - Espectro de RMN ^{13}C (acetona D6 / 50 MHz -TMS) do composto **10B30-76-plumericina**

Tabela 15 - Valores de deslocamentos químicos (δ) para RMN ^1H e ^{13}C para o composto **10B-30-76** e dados da literatura para a plumericina^{149, 198}

Posição	10B 30-76 δ ^1H J (Hz)	10B 30-76 δ ^{13}C	Plumericina ¹⁴⁹ δ ^1H J (Hz)	Plumericina ¹⁹⁸ δ ^{13}C
1	5,57 d (J = 6,0)	102,51	5,59 d (J = 6,0)	102,3
3	7,45 s	152,94	7,47 sl	152,7
4	-	109,62	-	109,4
5	4,02 dt (J = 9,6 e 2,4)	38,66	4,03 dt (J = 9,0 e 2,0)	38,4
6	6,05 dd (J = 5,4 e 2,1)	126,64	6,07 dd (J = 6,0 e 2,0)	141,1
7	5,65 dd (J = 5,4 e 2,1)	141,32	5,66 dd (J = 6,0 e 2,0)	144,7
8	-	104,82	-	104,6
9	3,44 dd (J = 9,6 e 5,7)	53,91	3,44 dd (J = 9,0 e 6,0)	53,7
10	5,11 s	80,56	5,13 s	80,3 d
11	-	127,73	-	127,4
12	-	171,30	-	168,2
13	7,18 qd (J = 7,1 e 1,8)	145,49	7,18 qd (J = 7 e 2)	145,3
14	2,09 d (J = 7,2)	16,29	2,09 d (J = 7,0)	16,1
15	-	167,20	-	166,7
16	3,77 s	51,40	3,79 s	51,7
Solvente	Acetona D6 / 200 MHz	Acetona D6 / 50 MHz	CDCl ₃ / 300 MHz	CDCl ₃ / 300 MHz

A plumericina constitui-se um importante iridóide que já foi isolado de diversas espécies da família Apocyanaceae. A sua significância se deve a diversos estudos farmacológicos realizados, onde se relata a atividade moluscida, antibacteriana e antifúngica da plumericina e isoplumericina.¹⁶² A atividade citotóxica já foi detectada em muitos ensaios com isolamento e testes biológicos com estes 2 iridóides, onde ressalta-se a sua expressiva efetividade inibitória em células tumorais de câncer de seio, cólon, pulmão e melanomas.^{33, 162, 163, 164} A plumericina, em trabalhos anteriores já havia sido relatado o isolamento das raízes da *A. cathartica* e *A. blanchetti*, mas em função de sua grande efetividade terapêutica, durante este trabalho foi desenvolvido diversos ensaios, no intuito de isolamento deste iridóide em outros órgãos e outra espécie, que na seqüência será demonstrado.

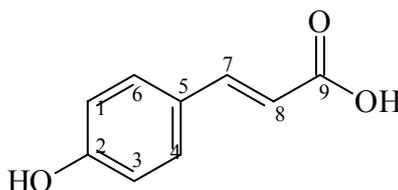
5.2.5.1.2. COMPOSTO 10C 78-120 - plumericina

O composto **10C 78-120**, obtido a partir da fração AE oriundo de extrato EtOH das raízes de *A.blanchetti* (verão), apresentou-se como um sólido branco, solúvel em MeOH. Após comparação IV, RMN ^1H , ^{13}C e CCD, e por apresentar deslocamentos químicos e Rf idênticos ao composto **10B 30-76** chegou-se a conclusão que o composto **10C 78-120** se constituía o mesmo composto **10B30-76**, anteriormente isolado e identificado como plumericina.

5.2.5.1.3. COMPOSTO 10E165-203 - ácido *p*-hidroxi-cinâmico

O composto **10E 165-203** (64 mg) foi obtido a partir da fração AE de extrato EtOH de raízes de *A.blanchetti* (verão) e após CC e recristalização com hexano/AE 90:10, apresentou-se como um sólido branco e solúvel em acetona. A sua estrutura foi confirmada através de análises espectroscópicas de IV, RMN ^1H e ^{13}C (figuras 42, 43 e 44) como sendo **ácido *p*-hidroxi-cinâmico (96)**.

10E 165-203



ácido *p*-hidroxi-cinâmico (96)

O espectro de IV (figura 42) apresentou uma banda de absorção entre 3 480 cm^{-1} , a 3 200 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo OH do fenol. Em 1 690 cm^{-1} é mostrado uma banda intensa, referente a deformação axial do grupo C=O. A banda de absorção registrada em 850 cm^{-1} corresponde a deformação do anel aromático para-substituído. A deformação angular de C-H do anel aromático pode ser observada na região 1 520 a 1450 cm^{-1} .

Figura 42 - Espectro de IV (pastilha de KBr) do composto **10E 165-203-**ácido *p*-hidroxi-cinâmico

Os valores de deslocamentos para RMN ^1H (figura 43) registram um dublete em 6,90 (J= 9,0) ppm referente aos H-6 e H-4. Em 7,50 (J= 9,0) ppm foi observado um dublete referente a H-3 e H-1. Um dublete encontrado em 6,35 ppm (J= 16) corresponde ao H-7 e outro dublete em 7,65 ppm (J= 16) é referente ao CH-8..

Figura 43 - Espectro de RMN ^1H (200 Mhz /acetona D6 /) do composto **10E 165-203** - ácido *p*-hidroxi-cinâmico

No espectro de RMN ^{13}C (figura 44), os sinais de deslocamentos químicos foram observados em (δ) 131,02 referentes à C-4 e C-6 e em (δ) 145,36 referentes aos deslocamentos (CH) de C-7. Em 160,72 ppm foi observado um sinal correspondente a C-2 e a absorção registrada em (116,87 ppm refere-se aos C-1 e C-3. Em 115,90 ppm observa-se o sinal para C-8 e a carboxila do C-9 foi observado em 168,72 ppm.

Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz/ acetona D6/ TMS) do composto **10E 165-203-ácido *p*-hidroxi-cinâmico**

Os valores de deslocamento químico (δ) de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto 10E 165-203 foram comparados e compatíveis com os da literatura.²⁶⁷ No entanto, por se tratar de molécula simples e bastante conhecida, considerou-se desnecessário a inclusão destes dados.

Os ácidos cinâmicos constituem-se uma classe muito importante para ensaios biológicos e químicos na área de produtos naturais. Estes grupos químicos são os precursores da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (ArC_3), compostos aromáticos

com uma cadeia lateral de 3 átomos de carbono ligada ao anel aromático .A significância do ácido cinâmico reside no fato de, originar classes de compostos de grande efetividade terapêutica. A redução da cadeia lateral dos ácidos cinâmicos conduz á formação de moléculas importantes presentes em óleos voláteis, como por exemplo: o eugenol, empregado como anestésico tópico em tratamentos odontológicos e higiene oral e o anetol, que exerce propriedades carminativas, antiespasmódicas e expectorantes. ¹⁶⁰

A cadeia lateral pode também perder átomos de carbono originando ArC₂ e ArC₁, sendo que estes compostos fenólicos desempenham um papel importante na defesa dos vegetais contra insetos herbívoros, fungos e também atividades alelopáticas. Os ácidos cinâmicos podem sofrer acoplamento oxidativo de duas unidades e originar as lignanas que, entre outras propriedades possuem ações: antioxidante de produtos alimentícios, antiinflamatória, antihepatotóxica, antitumoral, cercaricida, relaxante muscular, antineoplásica, antileucêmica, anti-HIV, anticonvulsionante, antiespasmódica, anti-PAF (fator de agregação plaquetária) e antialérgica. ^{268, 269}

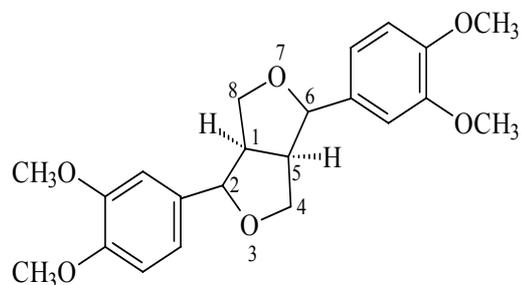
Outro grupo importante que deriva dos ácidos cinâmicos, são as cumarinas cujas atividades farmacológicas estão descritas na página 66.

O isolamento do ácido-*p*-OH-cinâmico **não** foi relatado ainda no gênero *Allamanda*, sendo portanto, esta a **primeira vez** que ele foi isolado e identificado no gênero.

5.2.5.4. COMPOSTO FG-12AE - eudesmina

O composto **FG12AE** foi isolado da fração AE, obtida a partir do extrato EtOH das raízes de *A. blanchetti* (verão), que após cromatografia preparativa, apresentou-se em forma de um sólido branco, solúvel em MeOH. Quando visualizado no UV longo (366 nm) apresentou uma única mancha azul fluorescente, com característica de cumarina. A sua

estrutura foi confirmada através de análises de RMN ^1H e ^{13}C (fig. 45 e 46) e dados da literatura como sendo a eudesmina (**97**).²⁷⁰



Eudesmina (**97**)

O espectro de RMN ^1H (figura 45) apresentou deslocamentos químicos (δ) em forma de multiplete em 3,10 ppm referente ao hidrogênio H-1 e H-5. Entre (δ) 3,84 e 3,95 em forma de multiplete, se observou os deslocamentos químicos do H-4 axial e H-8 axial. Os prótons do anel aromático foram observados entre 6,80 e 6,91 ppm. Na região de 4,24 ppm observam-se os sinais em forma de duplo duplete referente a H-4 equatorial e H-8 equatorial. Em 4,73 ppm, o duplete observado corresponde à H-2 e H-6. Os sinais que aparecem em forma de singlete (δ) em 3,91 e 3,95 ppm são referentes às 4 metoxilas.

Os valores de deslocamentos químicos para ^{13}C para o composto FG 12AE (figura 46) estão registrados em 55,62 e 56,66 ppm como 2 sinais atribuídos a (C-1 e C-5). Em 72,87 ppm, o deslocamento observado é referente aos C-4 e C-8. Os grupamentos $-\text{CH}-\text{O}$ foram registrado em (δ) 87,78. Os CH aromáticos foram absorvidos nas faixas de (δ) 116,34, ppm e 120,33 ppm correspondentes aos CH-2', CH-5' e CH-6'. O deslocamento do CH-1' foi registrado em 134,05 ppm e os sinais na região de 147,58 e 149,39 ppm são atribuídos à CH-4' e CH-3'.

Figura 45 - . Espectro de RMN ^1H (200 MHz/CDCL₃ + D₂O / TMS) do composto **FG12AE-eudesmina**

Figura 46 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz/MeOH / TMS) do composto **FG12AE - eudesmina**

Nas tabelas 16 e 17 pode-se observar a concordância para RMN ^1H e RMN ^{13}C de dados relatados na literatura para a eudesmina (97) e comparação com o composto **FG 12AE**

270

Tabela 16 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H do composto **FG 12AE** e dados da literatura para a eudesmina ²⁷⁰

Posição H	FG 12A δ ^1H J (Hz)	Eudesmina ²⁷⁰ δ ^1H J (Hz)
1	3,10 m	3,12 m
2	4,73 d	4,76 d
3	-	-
4 eq	4,24 dd	4,26 dd
4 ax	3,84-3,95 m	3,86-3,96 m
5	3,10 m	3,04 m
6	4,74 d	4,76 d
7	-	-
8eq	4,24 dd	4,26 dd
8 ax	3,84-3,95 m	3,86-3,96 m
O Me	3,91, 3,90 s	3,86, 3,90 s
Arom	6,80-6,91	6,84-6,92
Solvente	Acetona D6/200 Mhz	$\text{CDCl}_3\text{OD D6/ 600,13 MHz}$

Tabela 17 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C do composto **FG 12AE** e dados da literatura para a eudesmina ²⁷⁰

Posição C	FG 12AE δ ^{13}C	Eudesmina ²⁷⁰ δ ^{13}C
1	56,66 d	54,0 d
2	87,78	85,5 d
4	72,87	71,5 t
5	55,62	54,0 d
6	87,78	85,5 d
8	72,87	71,5 t
1'	134,05	133,3 s
5'	110,9 d	110,9 d
Solvente	MeOH / 50 MHz	CDCl_3 D6/ 25 MHz

5.2.6. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO QUÍMICO ISOLADO DAS FLORES DA

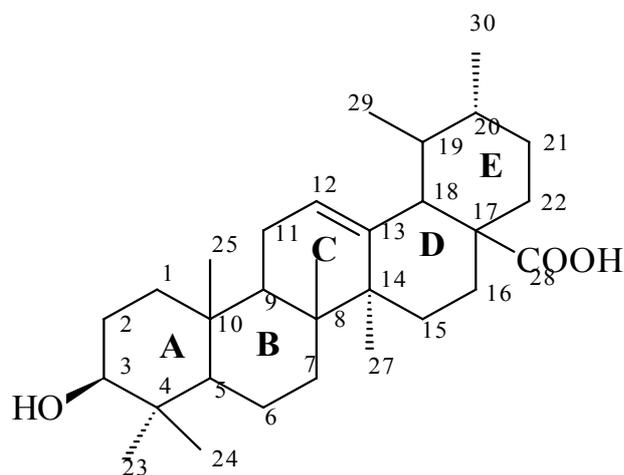
A.blanchetti

5.2.6.1. Fração DCM

5.2.6.1.1. COMPOSTO 15H53-70 – ácido ursólico

Com as flores da *A.blanchetti*, trabalhou-se apenas com a fração DCM, obtida do extrato EtOH (estação outono), que após ser cromatografada resultou num sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio nominado de composto **15H53-70**. A sua estrutura foi confirmada através de análises de IV, RMN C¹³ ¹H como sendo **ácido úrsólico** (53).

15H53-70



ácido ursólico (53)

O espectro de IV (figura 47) apresentou uma banda intensa em 3 439 cm⁻¹ referente ao estiramento grupos OH. Observa-se em 1731 cm⁻¹, uma banda de absorção de média

intensidade característica de deformação axial C=O. Em 1634 cm^{-1} , o espectro apresentou uma banda de absorção de média intensidade, referente a deformação axial ligações C=C.

Figura 47 - Espectro de IV (pastilha de KBr) do composto **15H-53-70- ácido ursólico**

Pelo espectro de RMN ^1H as várias absorções características tornam possível identificar o composto como ácido ursólico, uma vez que, observam-se 5 absorções na região de 0,64-1,07 ppm correspondente aos deslocamentos químicos das metilas em forma de singlete e 2 absorções em forma de dublete. Outros deslocamentos químicos também observados foram: um singlete largo em 5,1 ppm confirma a presença de próton olefínico referente à H-12. Um tripleto observado em 3,21 ppm se refere à absorção do H-3 e um dublete mostrado 2,26 ppm correspondem ao próton H-18. Os deslocamentos químicos para RMN ^1H podem ser observados na figura 48.

Figura 48 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz/ CDCl_3 / TMS) do composto **15H53-70** – **ácido ursólico**

Comparando-se com outros trabalhos, onde se isolou e identificou-se o ácido ursólico, os valores obtidos do composto **15H53-70** confirmam ser pertinentes aos valores registrados quando da identificação do ácido ursólico. Os deslocamentos químicos (δ) RMN ^{13}C para o composto **15H 53-70** podem ser observados na figura 49.

Tabela 18 - Valores de deslocamentos (δ) ppm de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **15H 53-70** e dados da literatura para o ácido ursólico.^{133, 271}

Posição	Composto 15H 53-70	Composto 15H 53-70	Ácido ursólico ^{133,27,}	Ácido ursólico ^{133, 271}
	δ ppm (J= Mhz)	δ ^{13}C	δ ppm (J= Mhz)	δ ^{13}C
1	-	37,3	-	38,8
2	-	27,9	-	27,3
3	3,21 m	78,3	3,40 m	78,8
4	-	37,3	-	38,8
5	-	55,9	-	55,4
6	-	18,9	-	18,4
7	-	33,7	-	33,0
8	-	39,6	-	39,6
9	-	48,8	-	47,5
10	-	-	-	37,0
11	-	23,9	-	23,3
12	5,1 sl	126,3	5,45 sl	125,5
13	-	138,7	-	138,8
14	-	42,7	-	42,0
15	-	28,7	-	28,2
16	-	24,9	-	23,3
17	-	48,2	-	48,1
18	2,26 d (J= 10 Mhz)	53,5	2,80 d (J= 11 Mhz)	52,8
19	-	39,3	-	39,1
20	-	37,3	-	38,8
21	-	30,3	-	30,7
22	-	-	-	36,7
23	1,30 s	28,7	1,23 s	28,2
24	0,64 s	16,1	0,87 s	15,5
25	1,07 s	16,3	1,04 s	15,7
26	1,02 s	17,7	1,01 s	16,7
27	1,25 s	-	1,21 s	-
28	-	23,5	-	23,6
29	0,94 d (J= 5,4 Mhz)	17,6	0,93 d (J= 5,4 Mhz)	16,9
30	0,98 d (J= 6,3 Mhz)	21,8	0,98 d (J= 6,3 Mhz)	21,1

Solvente CDCl_3D_6 / 200 Mhz CDCl_3D_6 / 50 Mhz Não informado solvente $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ / 75,5 Mhz

Na tabela 18 se observa os valores de deslocamentos em ppm de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **15H 53-70** e a concordância com dados dados da literatura obridos para o ácido ursólico.^{271, 133}

Figura 49 - Deslocamentos químicos (δ) RMN¹³C para o composto **15H 53-70 – ácido ursólico**

Ao ácido ursólico são atribuídas atividades importantes como inibidor da lipooxigenase, impedindo dessa forma a produção de mediadores químicos como os leucotrienos (desencadeantes da agregação plaquetária).²⁷²

Dentre as ações terapêuticas, as mais significativas têm sido, o seu grande potencial citotóxico em leucemia linfocítica de células P-388 e L-1210 (carcinomas de pulmão), câncer de cólon (HCT-8) e células tumorais de mama (MCF-7). Estudos comprovam que, esterificações deste composto induziram o aumento de atividade citotóxica contra câncer pulmonar (L-1210) e linhagens de células leucêmicas P-388.^{273, 274} O ácido ursólico, até então,

havia sido isolado de raízes, caules e folhas de *Allamanda cathartica*^{142, 144, 147, 194}, porém no gênero *Allamanda* é a **primeira vez** que foi isolado das flores.

Em virtude da ação antineoplásica do ácido ursólico nos estudos acima relatados, a presença deste composto na composição química da *A. blanchetti* induz a provável responsabilidade pelo efeito antileucêmico demonstrado por esta planta nos resultados farmacológicos.

5.2.6.2.COMPOSTOS ISOLADOS DA *A. blanchetti* em fase de identificação

Durante o trabalho, 4 compostos foram isolados e estão em fase de identificação:

* COMPOSTO GU 12

* COMPOSTO FRAN 7

* COMPOSTO 38-48

* COMPOSTO JU 18

5.2.7. COMPARAÇÃO DAS DIVERSAS TÉCNICAS EXTRATIVAS EM FOLHAS DE *A. blanchetti* PARA OBTENÇÃO DE PARÂMETROS FITOQUÍMICOS

Como foi descrita na página 96, uma alíquota 100 g de folhas *in natura* da *A.blanchetti* foi submetida a processos extrativos de maceração⁹⁸, percolação⁹⁹, turboextração e ultrasons¹⁰¹, a fim de se averiguar o potencial de rendimento e detecção de grupos químicos existentes nesta espécie.

Quanto aos rendimentos em massa de cada processo, os resultados demonstram que o método de extração mais eficiente em folhas de *A.blanchetti* é o da turboextração⁹⁹, seguido pela maceração e percolação.^{98, 99} O que proporcionou menor rendimento foi o ultrassom e os índices de todos eles encontram-se na tabela 19.

Tabela 19 - Rendimentos obtidos em diversas técnicas extrativas a partir de folhas *in natura* de *A. blanchetti*

Espécie vegetal	Método de extração	Rendimento
<i>A. blanchetti</i>	Ultrasom	0,36 g
	Turboextração	1,78 g
Folhas (100 g)	Percolação	0,52 g
	Maceração 3 dias	0,54 g

Quanto à detecção dos grupos químicos por CCD quando comparados com os padrões autênticos utilizados, os resultados revelaram a presença de terpenos, estigmasterol, β - sitosterol, campesterol, ácido ursólico e compostos fenólicos, sendo que estes foram melhor revelados pelo processo da percolação e turboextração.

Tais resultados nos levam a inúmeros questionamentos de: como devemos proceder em futuras investigações fitoquímicas e também, a mudanças de posturas na rotina laboratorial, uma vez que na maioria das vezes estivemos atrelados a parâmetros pré-estabelecidos, e na verdade existem outras formas alternativas de otimizarmos os estudos realizados com plantas medicinais.

5.3. MATERIAL VEGETAL : *Allamanda schottii*

5.3.1. Obtenção dos extratos

A técnica de extração utilizada para obtenção dos metabólitos secundários da *A. schottii* foi baseado na mesma metodologia utilizada para o isolamento dos fitoconstituintes da *A. blanchetti*, descrita por Niero et al (2003)²³⁰ (figura 8, página 40).

Para a preparação dos extratos brutos foram realizadas 3 coletas: verão, outono e primavera dos diversos órgãos da planta em estudo. Os extratos brutos foram obtidos a partir de material vegetal seco, pulverizado e posteriormente macerados separadamente todos os órgãos: sementes (MeOH), caule, folhas, flores e raízes (EtOH) por 10 dias. Após a remoção do solvente, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida e sucessivamente particionados com Hexano, DCM, AE e BuOH. Os rendimentos dos extratos e frações obtidos das 3 coletas, encontram-se nas tabelas 20 e 21.

Como não se partiu da mesma massa (matéria vegetal) de cada órgão nas diversas estações do ano, não se pode afirmar matematicamente que os resultados estejam completamente corretos em virtude da falta de padronização. Porque a intenção não foi um estudo especificamente quantitativo e sim uma proposta preliminar de se rastrear as possíveis diferenças de massa em diversas épocas do ano.

Tabela 20 - Rendimento dos extratos brutos obtidos a partir de órgãos secos de *A. schottii*

Estação do ano	Órgão	Peso	Solvente	Rendimento extrato bruto	%
VERÃO	Raiz	540,33g	EtOH	20,02g	3,7
	Caule/folha	931,22g	EtOH	153,94g	1,6
OUTONO	Raiz	302g	EtOH	11,22g	3,7
	Caule/folha	909,46g	EtOH	144,85g	15,9
	Sementes	700g	MeOH	118,37g	16
PRIMAVERA	Caules/folhas	2 Kg	EtOH	316,64g	15,8
	Flores	732,106g	EtOH	13,87g	1,8
	Sementes	1,049 Kg	MeOH	84,78g	8,4

Pelos resultados obtidos, pode-se observar um percentual de rendimento semelhante quanto aos extratos das raízes nas estações verão e outono, sendo que na primavera o

rendimento chega a ser quase 5 vezes maior. Quanto às sementes, o percentual de rendimento chega ao dobro na estação do outono, comparado com a primavera.

Dos extratos brutos acima obtidos, decidiu-se por trabalhar primeiramente com caules e folhas do verão de *A. schottii*, os quais foram reunidos por apresentarem similaridade de composição química, quando monitorados por CCD. O extrato bruto EtOH foi, na sequência particionado através de uma coluna de filtração, e não pelo método usual de partição líquido-líquido.

Durante o processo de particionamento (filtração), já descrito na parte experimental, assim que se obteve a fração hexânica, ocorreu uma separação distinta desta fração, em 2 fases, o que resultou uma dupla extração com hexano: uma fração normal (semi líquida) e outra sólida (precipitação de um sólido escuro) a qual foi chamada de fração hexano ppt. A seguir deu-se continuidade ao processo de filtração utilizando-se solventes de polaridade crescente originando as frações DCM, AE e BuOH.

Com as frações obtidas também se calculou o rendimento, os quais são mostrados na tabela 21.

Tabela 21 - Rendimento das frações obtidas a partir de extrato bruto dos caules e folhas da *A. schottii* (verão)

Órgão	Volume/extrato bruto	Fração obtida	Rendimento (g)	%
CAULES E FOLHAS	77,61g	Hexano ppt	15,42	18,5
		Hexano	10,83	12,8
		DCM	4,92	6,3
		AE	5,10	6,6
		BuOH	0,61	0,8

5.3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS (FOLHAS E CAULES) DA *A. schottii*

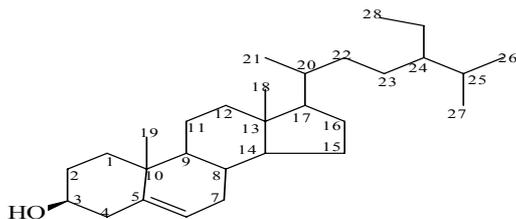
As investigações químicas, com a intenção de isolamento e identificação de compostos químicos foram realizadas com a fração DCM: AE (50:50) das folhas e caules do verão, que levaram os isolamento da mistura **58-75** (49+92), dos compostos **Col 6-80-106** (21), **Col 1-18**, **Col 8- 24-37** (98), **Col 9-A** (53), **Col 9-B**, **Col 9-C**, **AE 89** (23).

5.3.2.1. Fração DCM: AE

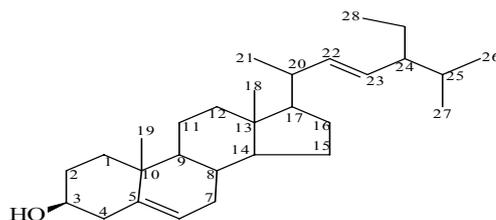
5.3.2.1.1. MISTURA 58-75 - β - sitosterol e estigmasterol,

O composto **58-75** (20 mg), isolado da fração DCM:AE (50:50) e obtido a partir de extrato EtOH de caules e folhas de *A.schottii* após CC, mostrou-se como um sólido branco, solúvel em acetona (49+92). No perfil fitoquímico preliminar realizado através de CCD e padrões autênticos detectou-se tratar de uma mistura de esteróides. A sua estrutura foi confirmada através de RMN ^1H e RMN ^{13}C como mistura de 2 fitoesteróis: β -sitosterol e estigmasterol, cujos valores espectroscópicos encontrados estão em concordância com dados encontrados na literatura^{133, 228, 229} e relatados nas páginas 150-154.

Mistura 58-75



β -sitosterol (49)



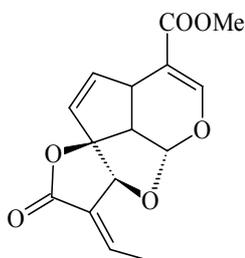
estigmasterol (92)

Estudos anteriores relatam que apenas o β -sitosterol, havia sido isolado das flores da *A. schottii*, e **nenhum** relato foi encontrado sobre o isolamento destes 2 esteróides em folhas e caules da *A. schottii*.^{142, 144, 194}

Comparativamente, com os dados espectroscópicos observados nos compostos **53-63H** (isolados da fração hexânica de folhas e caules de *A. blanchetti*) e **58-75**, pode-se concluir que os esteróides β -sitosterol e estigmasterol, são compostos comuns à partes aéreas das espécies *A. blanchetti* e *A. schottii*.

5.3.2.1. 2. COMPOSTO COL-80-106 - plumericina

O composto **Col-80-106** (56,5 mg) isolado da fração DCM: AE das partes aéreas (folhas e caules), solúveis em acetona, apresentou-se como um cristal branco e dotado de cor azul fluorescente quando observado no UV longo.



Plumericina (**21**)

O composto **Col 80-106**, após análises espectroscópicas de IV, RMN ¹H e ¹³C foi identificado com sendo o iridóide **plumericina (21)**.

Quando comparados com dados da literatura, os deslocamentos químicos de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C do composto **Col 80-106** são compatíveis com os relatados

bibliograficamente³³ e já foram discutidos nas páginas 170-175, quando se isolou a plumericina das raízes da *A. blanchetti* (**composto 10B 30-76**)

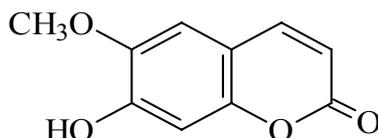
A plumericina constitui-se um iridóide de expressiva significância em muitos ensaios farmacológicos já descritos anteriormente, porém até o presente momento **não** tinha sido isolada espécie *A. schottii* sendo, portanto através deste trabalho, a **primeira vez** que este iridóide foi encontrado na espécie em estudo.

Através de estudo comparativo, os dados espectroscópicos comprovaram que o composto **COL 80-106** (caules e folhas de *A. schottii*) e **10B 30-76** (raízes de *A. blanchetti*) constituem-se o mesmo composto, concluindo-se que a plumericina é um iridóide que pode aparecer tanto em partes aéreas como em raízes de espécies diferentes de *Allamanda*, oportunizando desta forma, a sua múltipla extração e aplicabilidade mais diversificada.

5.3.2.1.3. COMPOSTO 24-37 - escopoletina

O composto **24-37** (14,5 mg) obtido a partir da fração DCM/AE de folhas e caules (verão) da *A. schottii* apresentou-se como um sólido branco solúvel em acetona. Através de técnicas espectroscópicas como IV, RMN ¹H e ¹³C e dados pertinentes a literatura ^{275, 276} foi identificado como sendo **escopoletina (98)**

24-37



escopoletina (98)

Na figura 50, onde se observam dados do espectro de IV, para o composto **24-37** foram encontradas as seguintes absorções: uma banda larga e de grande intensidade em $3\ 342\ \text{cm}^{-1}$, referente a deformação axial do OH, em ligação de Hidrogênio intermolecular; 2 bandas de grande intensidade em $2\ 916\ \text{cm}^{-1}$ e $2\ 850\ \text{cm}^{-1}$ referente a deformação axial de C-H. Observa-se ainda, banda de grande intensidade em $1\ 711\ \text{cm}^{-1}$ referente a deformação axial de C=O.

Figura 50 - Espectro de IV (KBr) do composto **24-37**- escopoletina

O espectro de RMN ^1H traz diversos deslocamentos químicos (figura 51), apresentando dubletes à hidrogênios olefinicos para H-3 e H-4 na a região de 6,20 e 7,87 ppm. Foram registrados 2 singletes em 7,20 e 6,80 ppm referentes a H-5 e H-8 e pode-se observar o deslocamento referente a metoxila em 3,90 ppm, os quais estão em concordância com dados da literatura para a escopoletina.**(98)**²⁷⁵

Ainda, podemos encontrar para RMN ^{13}C , dados do composto **24-37** compatíveis com dados espectrais da escopoletina, como pode ser observados na tabela 22.²⁷⁶

Figura 51 - Espectro de RMN para ^1H (200 Mhz/ Acetona/TMS) do composto **24-37-escopoletina**

Figura 52 - Espectro de RMN ^{13}C (55 Mhz/ Acetona/TMS) do composto **24-37- escopoletina**

Tabela 22 – Dados de para RMN ^1H e ^{13}C para o composto **24-37** e dados da literatura para a escopoletina ^{275, 276}

Posição	Composto 24-37	Composto 24-37	Escopoletina ²⁷⁵	Escopoletina ²⁷⁶
	δ ppm (J= Mhz)	δ ^{13}C	δ ppm (J= Mhz)	δ ^{13}C
2	-	160,07	-	160,39
3	6,20 d	112,8	6,28 d	114,4
4	7,87 d	145,4	7,67 d	143,4
5	7,20 s	113,8	6,85 s	113,9
6	-	142,9	3,96 s	143,4
7 OH	6,12 sl	152,6	6.12 sl	149,8
8	6,80 s	102,7	6,92 s	104,2
9	-	143,8	-	147,2
10	-	112,6	-	114,4
6-OMe	3,10s	57,03	3,96 s	56,3
Solvente	CDCl_3D_6 / 200 Mhz	CDCl_3D_6 /50 Mhz	CDCl_3D_6 / 300 Mhz	CDCl_3D_6 /50 Mhz

Diversos estudos de citotoxicidade são encontrados na literatura para a escopoletina.

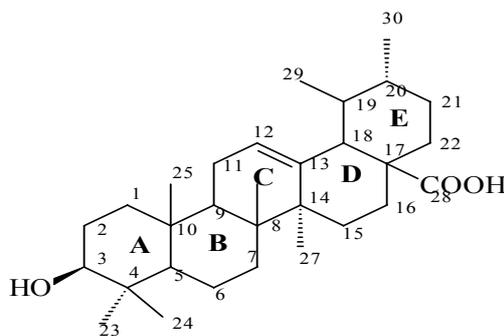
Entre os resultados mais expressivos, foi observado, a apoptose em células promielócitas HL-60 com segmentação proteolítica e aumento das enzimas protease e caspase-3, que promovem o processo de fragmentação do DNA.²⁷⁷ A atividade de segmentação do DNA foi também observado pela escopoletina isolada de raízes de *Mallotus resinous*.²⁷⁸ Citotoxicidade em células cancerígenas humanas e linhagem de células tumorais U251 e MCF7 foi encontrada, as quais promoveram redução em tumores cerebrais e câncer de mama.^{279, 280}

Em outros estudos, foram detectados pela ação da escopoletina, atividade antifúngica em ensaios de MIC na concentração de 50 mg/mL²⁸ e aumento da acetilcolina cerebral extracelular de 170 pra 300% quando comparado a estudos anteriores.²⁸² Outros trabalhos evidenciaram atividade antiespasmódica para a escopoletina²⁸³ e importantes efeitos diuréticos e anti-asmáticos também foram registrados.²⁸⁴

Em virtude da expressiva ação citotóxica da escopoletina, estudos futuros utilizando-se esta cumarina serão importantes para se avaliar se é ela uma das responsáveis pela atividade antileucêmica verificada neste trabalho

5.3.2.1.3. COMPOSTO COL 9-A – ácido ursólico

COL 9 -A



Ácido ursólico (53)

O composto **COL 9-A** isolado da fração DCM: AE (50:50) das folhas e caules (verão), da *A. schottii* apresentou-se como um sólido amorfo. Em virtude de sua semelhança física com o ácido ursólico, já isolado de outras frações, procedeu-se um rastreamento por CCD e padrão anteriormente isolado, chegando-se a conclusão de se tratar deste triterpeno.

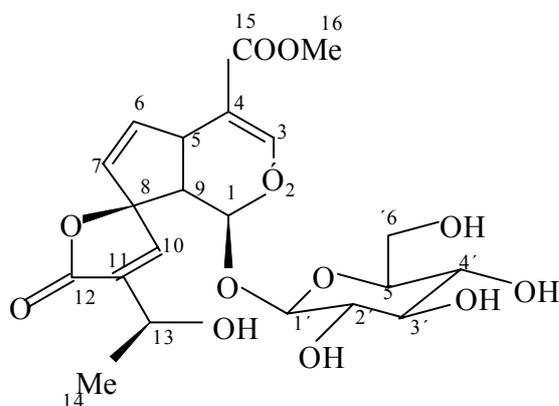
Com a intenção de confirmar-se espectroscopicamente esta molécula, foram realizadas análises de IV, RMN de ^1H e C^{13} cujas absorções e deslocamentos químicos foram compatíveis com as encontradas na literatura ¹³³

O ácido ursólico é detentor de expressivas ações terapêuticas já descritas, porém nesta espécie foi a **primeira** vez que ele foi isolado.

5.3.2.1.4. COMPOSTO AE 89 - plumierídeo

O composto **AE 89** (12 mg) isolado da fração DCM: AE (50:50) das folhas e caules (verão), da *A. schottii* apresentou-se como um sólido amorfo de cor escura e ponto de fusão 223-224°C e foi identificado como um iridóide glicosilado, chamado de **plumierídeo (23)**.

AE 89



plumierídeo (23)

No espectro de IV do composto **AE 89** (figura 53) as bandas de absorção detectadas foram: uma banda em $1\ 649\ \text{cm}^{-1}$ resultante da deformação de olefinas, 2 bandas de absorção intensas em $1\ 776\ \text{cm}^{-1}$ e $1\ 713\ \text{cm}^{-1}$ referentes a lactona α - β insaturada e carbonila de éster. A outra banda de absorção intensa em $3\ 338\ \text{cm}^{-1}$ deve-se ao estiramento de grupos OH.

Figura 53 - Espectro de IV (KBr) do composto **AE 89- plumierídeo**

Os deslocamentos químicos de RMN ^1H em campo baixo do composto **AE 89 (23)** são correspondentes a hidrogênios olefínicos H-3, H-6, H-7 e H-10. Em campo alto pode-se observar uma absorção em forma de dublete em 1,30 ppm ($J= 6,6\ \text{Hz}$) correspondente á metila H-14 (integração para 3 Hidrogênios). A metila H-16 aparece em 3,64 ppm em forma de singlete (integração para 3 hidrogênios). O H-9 é detectado em forma de duplo dublete na

região de (δ) 2,82 (J=7,8 e 4,7 Hz). O próton anomérico H-1 é observado em forma de dublete (J= 8,0 Hz) e as absorções referentes à unidade glicosídica podem ser vistas em forma de dublete e registradas na região de (δ) 3,0 a 4,56 (J= 8,0 Hz).

Figura 54- Espectro de RMN ^1H (300 Mhz / CD_3OD) do composto **AE 89 - plumierídeo**

Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C (75,5 Mhz / CD_3OD) do composto **AE 89 - plumierídeo**

Pelo espectro de RMN ^{13}C , as absorções na região de 60 a 102 ppm são atribuídas aos carbonos da unidade glicosídica. Em 22,34 e 51,93 ppm são observadas 2 metilas correspondentes ao C-14 e C-16, observadas na figura 55.

Os dados de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de RMN ^{13}C estão em concordância com os dados pesquisados na literatura para o iridóide plumierídeo, cujos valores podem ser confirmados na tabela 23.

O plumierídeo é um iridóide que vem despertando interesse na comunidade científica desde a década de 70. O primeiro ensaio farmacológico com esta molécula foi realizada por Jewers e seus colaboradores (1971), comprovando a sua citotoxicidade.

Outros testes biológicos já comprovaram a sua ação antifúngica e algicida,¹⁴⁸ e pesquisadores chineses ao utilizar sementes de arroz verificaram que o plumierídeo era

detentor de atividade inibitória de crescimento de plantas,¹⁹¹ despertando a atenção de grupos que trabalham com Alelopatia. Tal atividade foi confirmada atualmente através de testes alelopáticos realizados por Adam e seus colaboradores (2000).¹⁹⁶

Tabela 23 - Valores de deslocamentos químicos (δ) RMN ^1H e ^{13}C para o composto **AE 89** e dados da literatura para o plumierídeo^{149,150}

Posição	AE 89 (δ) (J Hz)	AE 89 (δ) ^{13}C	Plumierídeo ¹⁴⁹ (δ) (J Hz)	Plumierídeo ¹⁵⁰ (δ) ^{13}C
1	5,17 d (J= 4,7)	94,22	5,17 d (J= 4,0)	94,4
2	-	-	-	-
3	7,39 d (J= 1,9)	152,63	7,48 (J= 1,5)	152,5
4	-	111,12	-	111,1
5	3,82 m	40,31	3,90	40,4
6	6,36 dd(J=5,5 e 2,4)	141,53	6,39 dd(J=5,0 e 2,5)	141,5
7	5,40 dd(J=5,5 e 2,1)	130,09	5,55 dd(J=5,0 e 2,0)	150,2
8	-	97,93	-	97,9
9	2,82 dd (J= 7,8 e 4,7)	50,52	2,82 dd (J= 8 e 4)	50,7
10	7,25 d (J= 1,5)	150,40	7,25 d (J= 1,0)	130,0
11	-	138,73	-	139,0
12	-	172,96	-	175,9
13	4,44 qd (J=6,6 e 1,2)	62,51	4,36 qd (J=6,0 e 1,0)	63,6
14	1,30 d (J= 6,6)	22,34	1,28 d (J= 6,0)	22,5
15	-	168,62	-	169,8
16	3,64 s	51,93	3,70 s	51,9
1'	4,56 d (J= 8,0)	100,10	4,52 d (J= 7,0)	100,3
2'	3,08 dd(J= 8,0 e 9,0)	74,65	3,25	74,8
3'	3,27	74,45	3,25	78,0
4'	3,25	71,28	3,25	71,5
5'	3,21	77,81	3,25	78,8
6'	3,58	63,47	3,90	62,7

Solvente / MHz	CD ₃ OD / 300 Mhz	CD ₃ OD / 75,5 Mhz	CD ₃ OD / 90 Mhz	CD ₃ OD / 67,5 Mhz
----------------	------------------------------	-------------------------------	-----------------------------	-------------------------------

Trabalhos recentes demonstraram ação do plumierídeo contra dermatófitos causadores de dermatomicoses em animais e seres humanos¹⁵⁵ e também foi detectado expressivos efeitos na espermatogênese de ratos albinos.¹⁵³

Em virtude da sua promissora perspectiva como fitofármaco, Dobhal e colaboradores realizaram modificações estruturais na molécula do plumierídeo e constataram *in vitro* a

expressiva efetividade citotóxica em células tumorais de fibrosarcomas (2004) plumierídeo.¹⁴¹

O plumierídeo até o presente momento, segundo a literatura, **não** tinha sido isolado das folhas e caules da *A. schottii*

5.3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS OBTIDOS DAS RAÍZES *A.*

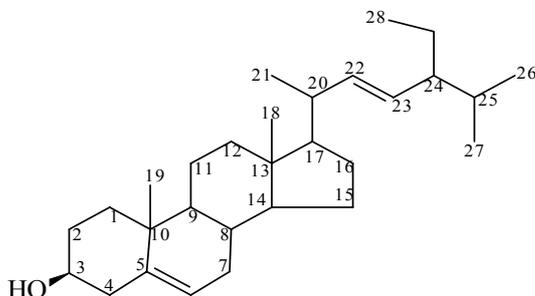
schottii

As investigações químicas, com a intenção de isolamento e identificação de compostos químicos das raízes de *A. schottii*, foram realizadas com a fração Hex e DCM da estação outono.

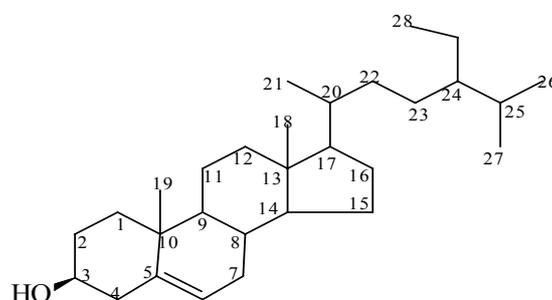
5.3.4.1 Fração Hexano

5.3.4.1.1. COMPOSTO 29-31- estigmasterol + β -sitosterol

Das subfrações 29-31 da fração hexano de raízes de *A. schottii*, isolou-se um composto (23 mg) que se apresentou como um sólido amorfo branco solúvel em hexano, acetona e clorofórmio. Após comparação por CCD com um padrão autêntico e dados espectrais de RMN, foi identificado por comparação com a literatura, como uma provável mistura de estigmasterol e β -sitosterol e denominado de **ASR 29-31**. Estes esteróis são muito comuns em



estigmasterol (92)



β -sitosterol (49)

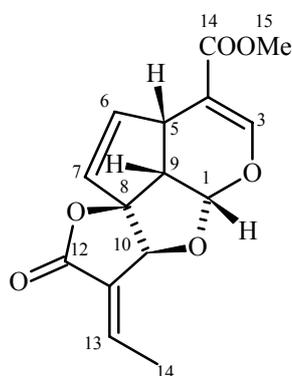
espécies vegetais, isolados anteriormente no gênero *Allamanda*¹³³ e já foram discutidos neste trabalho na páginas 150-154.

5.3.4.2.2. Fração DCM

5.3.4.2.2.1. COMPOSTO ASR 16-31 - plumericina

Na fração DCM, isolou-se das subfrações 16-31 um sólido amorfo branco (22 mg), solúvel em clorofórmio e acetona nominado de **ASR 16-31**.

Pela análise do espectro de RMN ¹H e RMN ¹³C observou-se sinais característicos de iridóides e os deslocamentos químicos investigados estão de acordo com os dados referenciados na literatura para a plumericina¹⁴⁹ e também equivalentes à dados encontrados para a plumericina isolada anteriormente neste trabalho (compostos **10B 30-76**- raízes da *A.blanchetti* e **Col 80-106** de folhas e caules da *A.schottii*).



Plumericina (**21**)

Como pudemos observar, durante o processo de isolamento e identificação dos compostos, a plumericina é um iridóide presente com muita freqüência no gênero *Allamanda*. Consideramos este, um fator de expectativa promissora para investigações futuras com compostos puros, visto que este iridóide é comum a partes aéreas e raízes das espécies em estudo. Outro estímulo a novos ensaios reside no fato de que, a plumericina em trabalhos anteriores já promoveu resultados inibitórios significativos em diversos processos neoplásicos^{33, 140, 198}. Como será visto na continuidade do trabalho, frações de *A. schottii* e *A. blanchetti* promoveram expressiva ação antileucêmica, o que nos leva ao questionamento

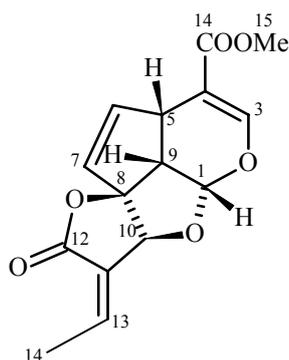
sobre qual ou quais substâncias isoladas e testadas poderão ser as responsáveis por resultado tão marcante.

5.3.4.2.2. COMPOSTO 44 – 48 - isoplumericina

O composto 44-48 foi isolado da fração DCM das raízes de *A. schotti* (outono) e apresentou-se como um sólido amorfo branco (41 mg), solúvel em clorofórmio e acetona e que recebeu o nome de **ASR 44-48**

Pela análise do espectro de RMN ^1H (figura 56) observou-se similaridade nos deslocamentos químicos de RMN ^1H com a plumericina. Todos os sinais estão em concordância, exceto dois sinais: o dublete, que na plumericina encontra-se em 2,09 ppm, e que no espectro do composto acima aparece em 2,80 ppm. O outro sinal passa de 7,18 ppm a 7,00 ppm. Os valores de RMN ^1H observados estão de acordo com a estrutura da **isoplumericina**, onde a única diferença entre os dois compostos refere-se à estereoquímica do carbono 13.¹⁴⁹

Em relação à atividade biológica, a isoplumericina apresenta a mesma atividade inibitória em células tumorais de câncer de seio, cólon, pulmão e melanomas que a plumericina.^{33, 140, 198}



Isoplumericina (22)

Figura 56 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, acetona D_6) do composto **44-48-isoplumericina**

5.3.4.2.3.COMPOSTO ASR 21-22 – 1-(3,4-dimetoxi-fenil) etano-1,2-(diol)

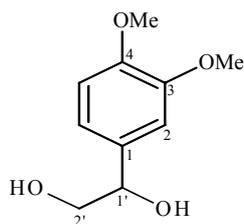
O composto **ASR 21-22** foi isolado da fração DCM nas frações 21-22 (48 mg) oriundas da subfração 50-87, e se apresentou como um sólido amorfo branco e identificado como **1-(3,4-dimetoxi-fenil) etano-1,2-(diol) (99)**

Pela análise de RMN ^1H (Figura 57), observa-se na região de 3,0 a 5,0 ppm sinais referentes a hidrogênios próximos a oxigênio. Na região de 7,00 ppm são observados hidrogênios de anel aromático.

Figura 57 - Espectro de RMN ^1H do composto **ASR 21-22** (300 MHz, acetona D_6) -**1-(3,4-dimetoxi-fenil) etano-1,2-(diol)**

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 58) são observados quatro sinais em δ 54,19, 55,9, 71,64 e 85,89 referente a carbonos oxigenados. Na região de δ 108 a 145 observam-se seis sinais referentes a carbono de anel aromático.

Através da análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , e por comparação com dados da literatura,²⁸⁵

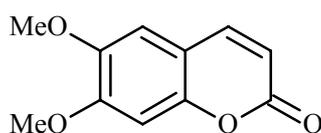


1-(3,4 dimetóxi-fenil)-etano-1,2-(diol) (**99**)

O mesmo já havia sido isolado dos bulbos da espécie *Crinum bulbispermum* Milne.²⁸⁵

Este composto **não** havia sido relatado anteriormente no gênero *Allamanda*, sendo a primeira vez isolado neste gênero. Pelo levantamento de dados, este composto está relacionado com a biodegradação das ligninas, que são substâncias de estruturas complexas, macromoléculas tridimensionais de origem fenilpropanóidica, ocupando cerca de 30% dos As ligninas são subprodutos nos processos de polpação utilizados na produção de celulose. Para produzir compostos químicos úteis a partir das ligninas é necessária a sua despolimerização controlada, o que pode ser feito através de processos oxidativos.²⁸⁷

5.3.4.2.4. COMPOSTO ASR 28-30 - escoparona



Escoparona (**100**)

A partir da fração DCM das raízes (outono) da *A. schottii* foi isolada da subfração 28-30, oriunda da 44-48 um sólido incolor e solúvel em clorofórmio (15 mg), chamado de **ASR 28-30** e identificada como escoparona (**100**).

Pelo espectro de RMN ¹H (figura 58) foram observados dois sinais em δ 3,86 e 3,94 característicos de grupos metoxila. Nos deslocamentos químicos entre 6,0 a 8,0 ppm estão registrados quatro sinais, dois como singletes e dois dubletes característicos de hidrogênios aromáticos.

Figura 58 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **ASR 28-30 - escoparona**

Pelo levantamento bibliográfico realizado observou-se concordância com os dados da escoparona. Esta cumarina já havia sido isolada anteriormente dos caules da *Allamanda schottii*.¹⁶⁴ Bastante estudada, as atividades antioxidantes e antitumorais da escoparona já foram comprovadas em diversos trabalhos.^{288, 289} No tratamento de hepatites e infecções biliares observaram-se a redução do óxido nítrico (NO) e prostaglandina E_2 (PGE_2) bem como supressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e COX-1 (mediadores químicos responsáveis pela evolução do processo inflamatório).²⁹⁰ Expressiva atividade antifúngica foi detectada contra cepas de *Candida albicans* e *Penicillium expansum*, bem como ação antiinflamatória *in vitro*.²⁹¹ Pesquisas rastrearam o efeito vasodilatador e interações da escoparona com propanolol e KCl e mostraram que o efeito vasodilatador da escoparona não foi afetado e provocou

relaxamento dos músculos da aorta.²⁹ Atividade vaso-ralaxante com efeitos imunossupressivos,²⁹³ atividade hipolipédêmica e hipotensora,²⁹⁴ acentuada ação broncodilatadora do processo asmático também foram observados com a escoparona quando se utilizou fenilefrina com controle.²⁹⁵ O isolamento da escoparona da espécie em estudo é de suma importância, para o entendimento futuro de certas atividades biológicas apresentadas.

5.3.5. COMPOSTOS ISOLADOS DA *A. schottii* em fase de identificação

Além dos compostos relacionados, 5 outros metabólitos da *A. schottii* estão em fase de identificação:

- **COMPOSTO ASR 20-25**
- **COMPOSTO ASR 37-39**
- **COMPOSTO ASR31-37**
- **COMPOSTO ASR13-15**
- **COMPOSTO ASR 25-27**

5.3.6. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO RENDIMENTO DE DIVERSAS TÉCNICAS EXTRATIVAS EM FOLHAS DE *A. schottii*

De acordo com o que foi descrito na página 108, 100 g de folhas *in natura* e 100 g de folhas desidratadas da *A. schottii* foram submetidas a processos extrativos de maceração (3 dias), maceração (10 dias), percolação, turboextração e ultrasons a fim de se averiguar o potencial de rendimento e detecção de grupos químicos existentes nesta espécie.

Quanto aos rendimentos em volume de cada processo, os resultados demonstraram que o método de extração mais efetivo em folhas de *A.schottii* da espécie *in natura* é o da turboextração, seguido pela maceração por 10 dias, percolação e maceração por 3 dias .

Embora as correntes de alta frequência do ultrassom promovam com mais efetividade o rompimento das membranas celulares, ¹¹este foi o método que proporcionou rendimento menos significativo em peso. Mas como não foi avaliado o percentual de concentração dos constituintes químicos, não podemos afirmar o seu grau de significância. Os índices de todos os processos extrativos da espécie *in natura* encontram-se tabela 24. Também são mostrados os índices das folhas da *A.schotti* da planta desidratada na tabela 25.

Tabela 24 - Rendimentos obtidos em diversas técnicas extativas a partir de folhas *in natura* de *A. schottii*

Espécie vegetal	Método de extração	Rendimento
<i>A.schottii</i> Folha <i>in natura</i> (100 g)	Ultrassom	0,38 g
	Turboextração	1,67 g
	Percolação	0,55 g
	Maceração por 3 dias	0,43 g
	Maceração por 10 dias	0,58 g

Tabela 25 - Rendimentos obtidos em diversas técnicas extativas a partir de de folhas desidratadas de *A. schottii*

Espécie vegetal	Método de extração	Rendimento
<i>A.schottii</i> Folhas secas (100 g)	Ultrassom	0,54 g
	Turboextração	0,83 g
	Percolação	0,66 g
	Maceração por 3 dias	0,35 g
	Maceração por 10 dias	0,47 g

Comparando-se os valores de rendimento obtidos (massa) com planta seca e planta frescas, os resultados sugerem que o melhor método de extração ainda é a turbo extração, embora o peso seja reduzido à metade da planta seca (0,83 g), quando comparado a planta fresca (1,67 g - provavelmente em função da água evaporada).⁹⁵

No entanto, o método de ultrasons, que na espécie *in natura* ficava em último lugar, com a planta seca pode ser colocado na faixa média de otimização do processo extrativo.

Outras variáveis, que vem corroborar algumas literaturas, são o uso prolongado da maceração, onde os autores afirmam que “quanto maior o tempo de extração, maior também seria o índice extrativo”.¹⁰¹ Este é um índice bem notório no presente estudo, pela pequena diferença em volume, da maceração realizada com 3 dias (0,35 g) contra a maceração realizada por tempo maior de 10 dias (0,47 g). Embora seja um resultado matematicamente calculado, não oferece parâmetros de índices, que nos digam o rendimento real da concentração de cada fitoconstituente. Por mais que a massa encontrada seja percentualmente animadora, o grande questionamento é o seguinte: será que se extraiu metabólitos secundários biologicamente ativos ou o peso encontrado é pertinente a compostos inertes, sem interesse farmacológico?

A segurança desta resposta só poderá ser fornecida através de análises quanti e qualitativas por meio de CG e HPLC, que é uma das propostas de continuidade deste trabalho, otimizar a melhor e mais rentável forma de extração de fitoconstituintes.

No entanto, neste estudo, o resultado mais importante desta variável (maceração), reside na detecção dos grupos químicos por monitorados por CCD, quando comparados com os padrões autênticos utilizados. Os resultados revelaram em todos os processos, a presença de terpenos, mistura de estigmasterol e sitosterol, ácido ursólico e grupos fenólicos, sendo que a maceração por 10 dias extraiu 2 compostos fenólicos a mais que os demais processos. Este resultado foi bem visível, já que na revelação da CCD com cloreto férrico, a maceração por

10 dias, apresentou 2 manchas verdes escuro-amarronzado, característica de grupos fenólicos. Isto mostra a efetividade de contato por tempo maior entre soluto/solvente.

Os demais resultados acima sugeridos nos levam a refletir sobre os direcionamentos que devemos adotar ao escolher a forma extrativa que consideramos ideal às nossas investigações fitoquímicas. A grande maioria dos pesquisadores usa a maceração a frio por poucos dias,⁹⁹ mas outros estudos com parâmetros pré-estabelecidos devem ser realizados na busca de uma confiável confirmação.

Neste ensaio, tratando-se especificamente da *A. schottii* as conclusões que chegamos são : **a)** se desejarmos um rendimento bruto (em peso) maior, vamos ter que mudar nossa postura tradicional e descartamos a utilização da maceração mais comum realizada nos laboratórios, que é a maceração por poucos dias (3 dias). O seu índice de rendimento é bem inexpressivo quando comparado a outras técnicas. **b)** Mas em contrapartida, a maceração por um tempo maior (10 dias), embora com rendimento pequeno, é capaz de extrair um número maior de grupos fenólicos quando se trabalha com a planta seca. **c)** E se a nossa opção for a utilização da planta *in natura*, o melhor método extrativo para grupos fenólicos, não é maceração, e sim, a turbo extração. **d)** Ainda, se preferirmos a turboextração devido ao seu poder de otimização mostrado nas 2 tabelas, sem conhecermos a composição química da planta em estudo, podemos correr o risco de volatilizar compostos pelo calor gerado pelo cisalhamento ou interferir em processos metabólicos importantes.⁹⁹

Todos esses questionamentos, a respeito da melhor escolha, acreditamos, só poderiam ser elucidados com maior índice de confiabilidade, ao se proceder um rastreamento mais quantitativo através de outras cromatografias como a CG e HPLC utilizando-se padrões internos de referência.^{101, 103}

5.4. RESULTADOS DOS TESTES BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

5.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA *Allamanda blanchetti* CONTRA MICROORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

Microrganismos normalmente encontrados na cavidade oral causando processos infecciosos foram cultivados e testados (tabela 26) contra extrato bruto das flores da *A. blanchetti* coletadas no mês de outubro. Os microrganismos criopreservados a -80°C foram mantidos, cultivados e submetidos aos testes contra a amostra da planta medicinal. Os resultados de sensibilidade foram expressos em concentração mínima inibitória (CMI), isto é, a mínima concentração da planta medicinal que completamente inibiu o crescimento bacteriano.

Todos os experimentos foram conduzidos em duplicatas e se as concentrações testadas não inibiram o crescimento bacteriano os microrganismos foram classificados como não-sensíveis ao extrato da planta medicinal nas concentrações testadas. Das 30 bactérias avaliadas apenas duas apresentaram sensibilidade ao extrato bruto da flor colhida no outono da *A. blanchetti*: *Selenomas noxia* e *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum*, cujo índice de inibição pode ser observado na figura 60.

Tabela 26 - Identificação (ATCC) e sensibilidade dos microrganismos ao extrato de *A. blanchetti* (flores-outono) nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL

Bactéria	ATCC	Sensibilidade
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (serotypes a)</i>	43718 (y4)	n.s.
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (serotypes b)</i>	29523	n.s.
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860	n.s.
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	n.s.
<i>Actinomyces odontolyticus (serotype I)</i>	17929	n.s.
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 (1084)	n.s.
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 (371)	n.s.
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 (25)	n.s.
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 (27)	n.s.
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 (4)	n.s.
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	n.s.
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	n.s.
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586	≥1 µg/mL
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	10953	n.s.
<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	49256	n.s.
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	n.s.
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	n.s.
<i>Neisseria mucosa</i>	19696	n.s.
<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270	n.s.
<i>Prevotella melanogenica</i>	25845	n.s.
<i>Propionibacterium acnes (serotypes I)</i>	11827	n.s.
<i>Propionibacterium acnes (serotypes II)</i>	11828	n.s.
<i>Selenomonas noxia</i>	43541	≥32 µg/mL
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	n.s.
<i>Streptococcus intermedius</i>	27355	n.s.
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	n.s.
<i>Streptococcus oralis</i>	35037	n.s.
<i>Streptococcus salivarius</i>	27945	n.s.
<i>Streptococcus sanguis</i>	10556	n.s.
<i>Streptococcus vestibularis</i>	49124	n.s.

n.s. = não sensível

Como podemos observar pelos resultados obtidos, o número de bactérias testado foi bastante expressivo (30), porém a efetividade só foi detectada somente contra o crescimento do *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum* (figura 59) e *Selenomas noxia*, comprovando que a espécie vegetal em estudo é pouco ativa contra microrganismos da cavidade oral.

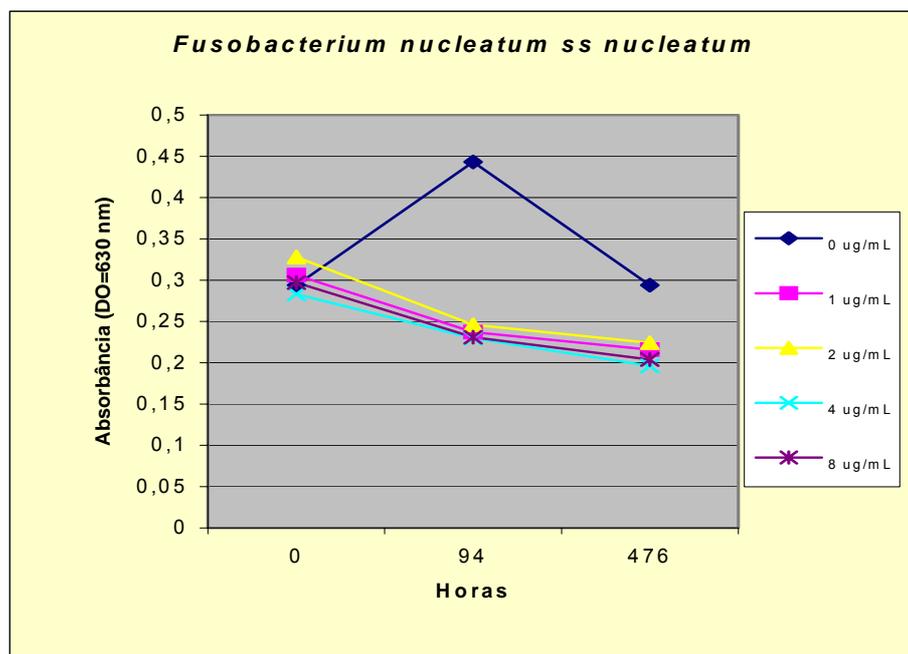


Figura 59 - Curvas de crescimento do *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum* monitorados em densidade ótica = 630 nm e expostos a diferentes concentrações do extrato bruto de flores da *Allamanda blanchetti*.

5.4.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA – CIM

Os resultados obtidos dos ensaios da atividade antimicrobiana dos extratos e frações da *A. blanchetti* e *A. schottii* pelo Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM), estão registrados nas tabelas 27 e 28. Nos ensaios microbiológico, apenas os extratos totais da raiz e caule da *A. schottii*, na concentração de 5000 µg/mL, inibiram o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *T. rubrum* (LM- 105), *T. mentagrophytes* e *M. canis*. Os halos de inibição produzidos pelos extratos foram entre 16-20 mm de diâmetro. A fração DCM do caule de *A. blanchetti*, inibiu somente uma cepa fúngica, *M. canis*, com halo de inibição de 10 mm de diâmetro (Tabela 28).

Na tabela 27, estão demonstrados os resultados da CIM dos extratos totais da raiz e caule da *A. schottii*. Ambos produziram inibição sobre o crescimento das espécies bacterianas e fúngicas até a concentração de 1 250 µg/mL.

Tabela 27 – Média de inibição (mm) do ensaio de extratos e frações *A.blanchetti* e *A. schottii*, em meio sólido

<i>A.blanchetti</i>	Conc. (µg/ mL)	As- Sep-Pa-MI-Ca1	Ca2 – Cg -Cs- Cp	C t- Ti- Cn-Tr1-	Tr2-Tm-Mc- P-	F- Afl- Ap
Ext. raiz	5 000	-	-	-	-	-
Ext. caule	5000	-	-	-	-	-
Ext. folha	5000	-	-	-	-	-
Fr H caule	3000	-	-	-	-	-
Fr AE caule	3000	-	-	-	-	-
Fr DCM caule	3000	-	-	-	-	10

<i>A.schottii</i>	Conc. (µg/ mL)	As- Sep-Pa-MI-Ca1	Ca2 – Cg -Cs- Cp	C t- Ti- Cn-Tr1-	Tr2-Tm-Mc- P-	F- Afl- Ap
Ext. raiz	5 000	-	-	-	17	- 16 - 18
Ext. caule	5000	16-18	-	-	-	20 - 17
Ext. folha	5000	-	-	-	-	-
Ext. flor	5000	-	-	-	-	-
Ext. semente	5000	-	-	-	-	-
Fr H caule	3000	-	-	-	-	-
Fr DCM caule	3000	-	-	-	-	-

Como se pode observar, apenas a fração DCM do caule da *A. blanchetti* produziu halo significativo de inibição (10 mm) contra cepas de *Microsporium cannis*.

Quanto à espécie *A. schottii*, esta foi um pouco mais efetiva, uma vez que, o extrato da raiz promoveu inibição de 17 mm em cepas de *Trychophyton rubrum* (LM- 108), 16 mm no *T. mentagrophytes* (LM- 103) e 18 mm no *Microsporium cannis*

O extrato do caule da *A. schottii* promoveu índice de inibição um pouco maior que o extrato da raiz, produzindo um halo de inibição de 20 mm em cepas de *T. mentagrophytes*

(LM- 103) 17 mm em cepas de *Microsporium cannis*. Outra sensibilização foi detectada no extrato bruto do caule onde o *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) apresentou 16 mm de halo inibitório e *S. epidermidis* (ATCC- 12228) com 18 mm.

A tabela 28 mostra os resultados obtidos pela CIM dos extratos brutos da raiz e caules de *A. schottii* em meio sólido, onde a inibição ocorre em concentração superior a 1 250 µg/mL quando testados com cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*.

Tabela 28 - Média dos halos de inibição (mm) da CIM dos extratos brutos da raiz e do caule de *A. schottii*, em meio sólido

<i>A. schottii</i>	Concentração (µg/ mL)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>T. rubrum</i> (LM- 105)	<i>T. mentagrophyt</i> (LM-103)	<i>M. canis</i> (LM-828)
Extrato bruto raiz	5 000	-	-	-	-	-
	2 500	-	-	-	-	-
	1250	-	-	-	-	-
	625	-	-	+	+	+
	313	-	-	+	+	+
	156	-	-	+	+	+
	78	-	-	+	+	+
Extrato bruto caule	5 000			-	-	-
	2 500			-	-	-
	1 250			-	-	-
	625	+	+	+	+	+
	313	+	+	+	+	+
	156	+	+	+	+	+
	78	+	+	+	+	+
Controle do microorganismo	+	+	+	+	+	+
Controle do antimicrobiano	-	-	-	-	-	-

Legenda : + crescimento do microorganismo _ inibição do microorganismo

5.4.3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA – MÉTODO DA DILUIÇÃO - CIM (µg/mL)

Os testes realizados com extratos brutos de raiz e caule de *A. schottii* em meio sólido mostraram efetividade apenas contra as cepas de *Microsporium canis* (C-112), *Trichophyton*

rubrum (C-137-2000) e *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC-9972) , cujos resultados são mostrados na tabela 29.

Tabela 29 - Média dos halos de inibição (mm) da CIM dos extratos brutos da raiz e do caule de *A. schottii*, em meio sólido

Espécie	Ca	Ct	Cn	Sc	Afu	Afl	An	Mc	Mg	Ef	Tr	Tm
<i>A. schottii</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	≥ 250	> 1000	1000	250	≥ 125

Como pode ser observados ao se comparar os 2 últimos ensaios, os testes apesar de, serem realizados em instituições diferentes e com cepas com algumas variantes sugerem a mesma efetividade, na atividade antifúngica, contra determinados microorganismos que são freqüentes em diversas patologias comuns na clínica dermatológica. Dados da literatura relatam que muitas lesões no couro cabeludo e alopecia em crianças são causadas pelo *Microsporum canis*.^{296, 297} O *Trichophyton rubrum*, clinicamente é o agente responsável por quase todos os tipos de micoses de pele. Apesar de se usar a griseofulvina em muitos quadros de micoses epiteliais, o microorganismo burla as defesas inatas do hospedeiro, não havendo remissão total do quadro.²⁹⁸ E por último, o *Trichophyton metagrophytes* é o agente responsável pela segunda causa de dermatofitoses causando micoses de unha, lesões interdigitais e interdigitoplantares (pé de atleta), alguns tipos de herpes e lesões fúngicas corporais.^{297, 298}

Se a *A. schottii* provocou considerável inibição frente ao crescimento deste fungos patogênicos relacionados, a perspectiva de novos medicamentos antifúngicos mais efetivos que possam estagnar quadros lesionais dentro da Clínica Médica, pode vir a ser uma estratégia importante.

Quanto aos resultados obtidos com cepas bacterianas, o extrato bruto do caule foi efetivo contra 2 microorganismos que ao infectarem o homem, desenvolve patologias de acentuada gravidade, como é o caso do *Staphylococcus aureus* que pode provocar endocardite, síndrome do choque tóxico, osteomielite, furúnculos, infecção de ferida pós-operatório e pneumonia. O outro fungo sensível ao extrato bruto da *A. schottii* foi o *Staphylococcus epidermidis*, que se constituiu patógeno oportunista podendo causar infecção de articulações artificiais, infecções de drenos, infecções de trato urinário, osteomielite decorrente de ferida no esterno e endocardite pós-prótese de válvulas.²⁹⁹

5.4.4. RESULTADO OBTIDO COM O MÉTODO DA *Neurospora crassa*

Nos últimos anos, a parede celular tem sido considerada como um alvo sumamente útil para detectar agentes antifúngicos seletivos e portanto, não tóxicos para o hospedeiro. A diferença mais marcante entre células fúngicas e humana é que somente as primeiras possuem parede.²¹² A parede celular serve como proteção, evita a sua ruptura osmótica e confere forma. As células humanas carecem de parede e fazem que antifúngicos que atuam por este mecanismo sejam drogas específicas e portanto, seguras. A parede celular fúngica está formada por muitos componentes macromoleculares, entre eles, os betaglucanos, quitina e outros.²¹⁵ Três atividades enzimáticas têm mostrado ser essencial para a formação da parede antifúngica: 1,3 - β - glucano, 1,6 - β -glucano sintase e quitina sintase que catalizam a formação de 1,3 e 1,6 - β - glucanos e quitina respectivamente e, portanto, são alvos atrativos para o descobrimento de novos medicamentos antifúngicos.²¹² A inibição da parede celular antifúngica pode ser feita por ensaios celulares e enzimáticos como: bioensaios pela má formação de hifas, bioensaios da *Neurospora crassa* e com sorbitol.²¹⁶ O bioensaio com da

N. crassa é bastante utilizado em produtos naturais, quando se quer descobrir qual é o mecanismo de ação do fungo em estudo.²¹⁵

Nestes nossos estudos *in vitro*, concluiu-se que os extratos da *A. schotti* não impedem a invasão do microorganismo, pelo mecanismo da parede celular, sendo portanto outro mecanismo invasivo, o que leva a propor novos estudos esclarecedores.

5.4.5. ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA CONTRA O *Menopon gallianae*

A Clínica Veterinária dispõe de poucos medicamentos fitoterápicos. Em trabalhos de campo com animais, a medicina popular utiliza empiricamente muitas espécies vegetais, porém poucos resultados são registrados ou validados cientificamente.³⁰⁰

No entanto, nos últimos 20 anos, a Fitoterapia tem sido resgatada através de pesquisas pela Etnoveterinária, na busca de controle de várias enfermidades que acometem animais de produção, como é o caso da utilização do *Allium sativum* em nematóides gastrointestinais de caprinos³⁰¹ e redução de 47,3% na infestação por parasitas em bovinos. Expressiva efetividade antihelmíntica foi observada com a bananeira (*Musa sp*) em bezerros,³⁰³ *Spigelia anthelmia* (lombrigueira) e *Mormodica charandia* (melão de São Caetano) para o controle de helmintos gastrintestinais em bovinos.³⁰⁴

Algumas abordagens etnofarmacológicas da *A. cathartica* como piolhícida e a grande carência de fitoterápicos na Veterinária, foram os motivos que nos levaram a esta experimentação, onde, uma alíquota de 228 aves contaminadas com o ectoparasita *Menopon gallinae* foi tratada com solução aquosa a 0,5 % (a partir de extrato bruto) de raízes de *A. blanchetti* e *A. schottii* em forma de banho e pulverização e decocto a 20% de caules e folhas de *A. blanchetti* e *A. schottii* em forma de pulverização. O tratamento consistiu em banho e pulverização, por 2 dias consecutivos.

A escolha pelo piolho *Menopon gallinae*, deve-se ao fato, de ser um ectoparasita infestante de um número significativo de aves, especialmente galinhas e frangos, que dependendo do tratamento, o seu consumo interfere diretamente na dieta alimentar humana.

O *M. gallinae* foi identificado por Linnaeus em 1758, pertence segundo Forte (1987) à Classe Insecta, ordem Mallophaga, família Menoponidae e gênero *Menopon*. Os piolhos dessa ordem são conhecidos popularmente por piolho mastigador e falso piolho.³⁰⁵

Este mesmo autor relata que este piolho se localiza em maior concentração na região do tronco, nos cálamos (base) das penas. A presença de grande quantidade de piolhos pode provocar prurido, levar a queda das penas e conseqüentemente a infecções na pele (pitiríase).³⁰⁶ A infestação ocorre com maior freqüência em aves adultas e ao se alimentarem de penas, células e sangue, provocam irritação local, perda de peso e como conseqüência atrapalha a sua conversão alimentar. Este piolho pode ser fatal ao infestar animais jovens, uma vez que ataca o SNC.^{306, 307}

Os resultados obtidos com a *Allamanda*, sugerem um índice de redução em torno de 50% dos piolhos em todas as formas farmacêuticas utilizadas, sendo que a mortalidade foi mais expressiva em ectoparasitas mais jovens. Os resultados quantitativos da ação antiparasitária observada nas 2 espécies estudadas encontram-se no gráfico 2 e 3.

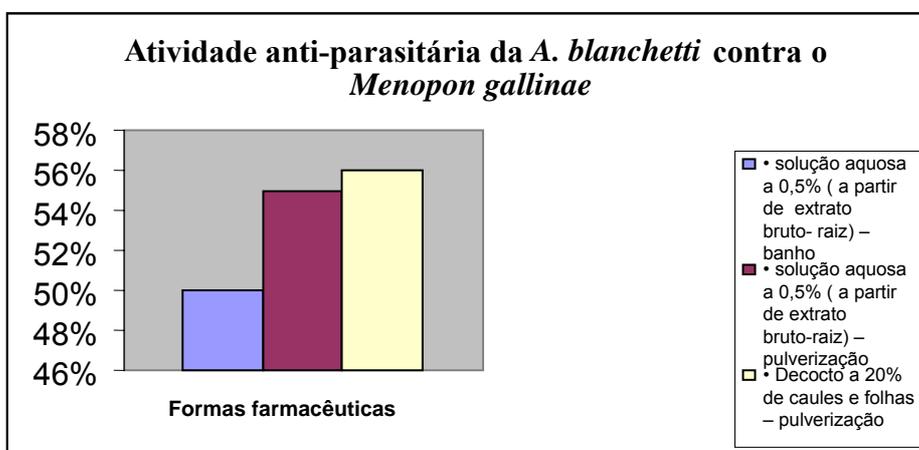


Gráfico 2 – Atividade antiparasitária da *A. blanchetti* contra o *Menopon gallinae*

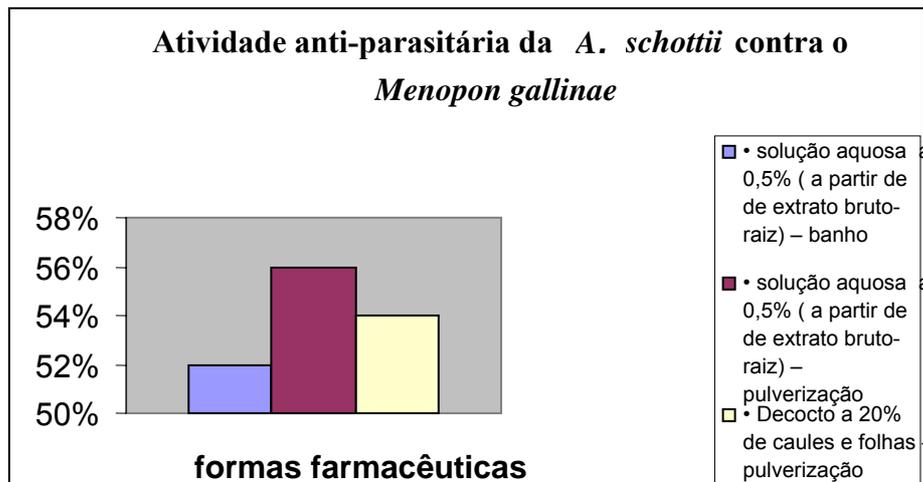


Gráfico 3 – Atividade antiparasitária da *A. schottii* contra o *Menopon gallinae*

Um questionamento a ser levantado com os índices obtidos, seria se esperar que os extratos brutos, que “teoricamente” se constituem a forma mais concentrada e mais potencialmente ativa, “poderiam” proporcionar um resultado antiparasitário mais expressivo. No entanto, os resultados sugerem o **mesmo** grau de efetividade que o decocto, que é maneira como a medicina popular costuma usar nos seus experimentos caseiros.

Levando-se em conta a similaridade dos resultados quanto às formas farmacêuticas utilizadas, podemos afirmar que, mais uma vez, um estudo científico valida uma experiência popular. Comprova-se através de estudos como este, que os dados etnofarmacológicos se constituem uma ferramenta importantíssima para a ciência, uma vez que, ao interagir as informações adquiridas nas comunidades locais que fazem uso da flora medicinal (através da experimentação) oportuniza um grande atalho para a comprovação científica de plantas potencialmente ativas .^{93,94,91}

5.4.6. ATIVIDADE ANTI-VIRAL

No rastreamento de possível atividade antiviral contra o Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) e vírus da raiva foram testados inúmeros extratos brutos etanólicos de *A.blanchetti* e *A. schottii* já relacionados na parte experimental.

a. *Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1)*

O *herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1)* foi primeiramente testado nos extratos brutos das 2 espécies em estudo.

Como o extrato bruto da *A.blanchetti* não inibiu o efeito citopático viral do HSV-1, das cepas KOS e 29R, não foram testadas as suas frações, concluindo-se que esta espécie vegetal não é ativa contra este microrganismo.

No entanto, os extratos brutos de *A. schottii*, promoveram um índice de seletividade de IS= 2,64 para o extrato bruto das folhas e IS= 2,44 para o extrato bruto das flores apontando efeito citopático viral do HSV-1, com as cepas KOS e 29R

Uma vez, que os resultados dos 2 extratos acima foram significativos quanto ao índice de seletividade contra cepas KOS e 29R do vírus HSV-1, testou-se então as frações H, DCM, BuOH e EtOH das folhas e das flores da *A. schottii*. No entanto, nenhuma das frações testadas dos 2 órgãos, promoveu índice de seletividade significativa contra o Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1), o que pode nos levar a nos questionar “se existe” um sinergismo no extrato total da planta, o qual, perde a sua vitalidade terapêutica quando é particionado.

Como conclusão, observando os índices referenciados, podemos considerar um resultado promissor dos extratos brutos das folhas e flores da *A.schottii* contra o HSV-1, uma vez que para este experimento, se utilizou como grupo controle o Aciclovir, que é um fármaco

considerado de grande efetividade contra este tipo de patologia herpética. Os resultados encontram-se na figura 60.

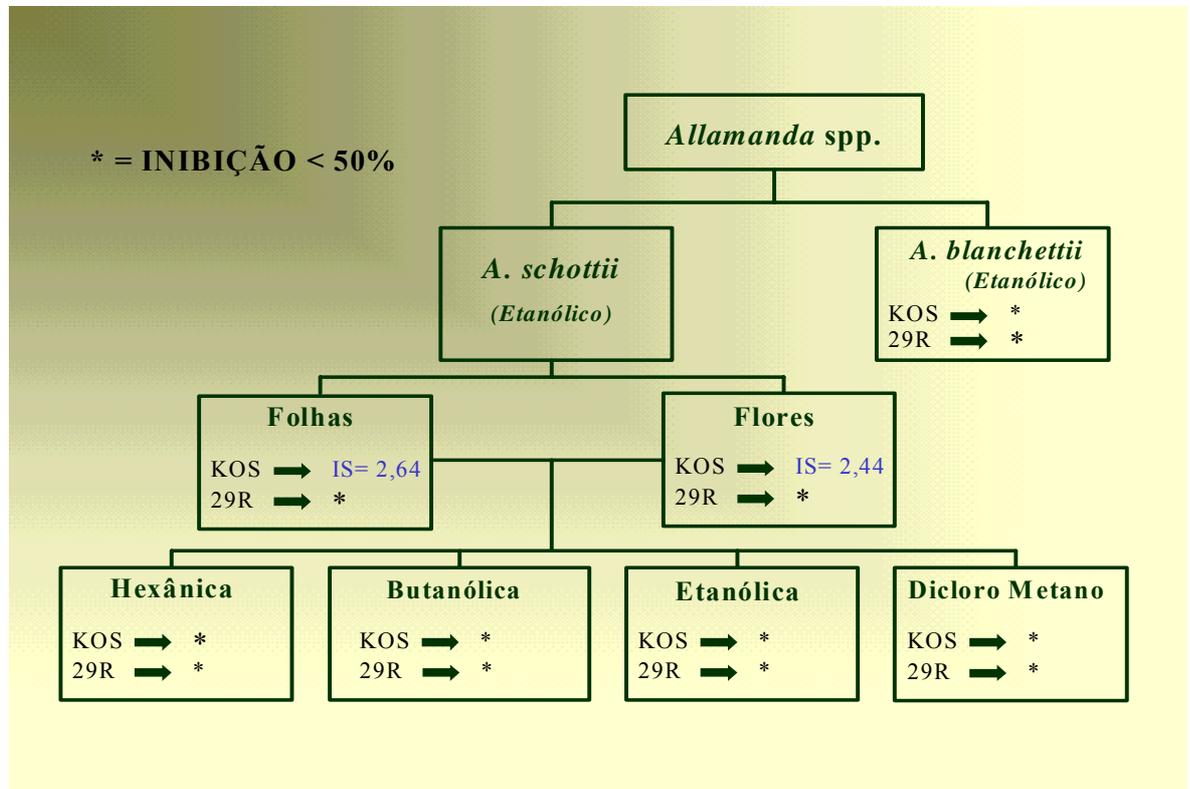


Figura 60 - Atividade antiviral dos extratos e frações da *A.blanchetti* e *A.schottii* contra o *Herpes vírus simplex tipo 1* (HSV-1)

b. Vírus da raiva (cepa PV) em células McCoy

Outro ensaio de conotação antiviral para este trabalho, foi o experimento contra o vírus da raiva (cepa PV) em células McCoy, onde foram testados os extratos brutos etanólicos das raízes e caules da *A. blanchetti* e folhas e flores da *A. schottii*. Os resultados sugerem maior expressividade da ação antiviral no extrato bruto das folhas da *A. schottii* e significante atividade nas demais extratos como pode ser observado na tabela 30.

Tabela 30 - Resultados dos índices de seletividade dos extratos testados para raiva (cepa PV) em células McCoy.

Extrato	CC ₅₀ mg/mL*	CE ₅₀ mg/mL*	IS(CC ₅₀ /CE ₅₀)
<i>A. blanchetti</i> (raízes)	<2,0	0,99 ± 0,08	2,0
<i>A. blanchetti</i> (caule)	1,43 ± 0,37	0,42 ± 0,08	3,4
<i>A. schottii</i> (folhas)	1,29 ± 0,36	0,23 ± 0,06	5,6
<i>A. schottii</i> (flores)	1,54 ± 0,27	0,50 ± 0,11	3,1

*Valores representados pela média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média.

5.4.7. ATIVIDADE LEISHMANICIDA FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

Dentre as várias doenças que acometem os homens, as parasitoses e notadamente as protozooses, são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Neste contexto as leishmanioses e Doença de Chagas representam um grande impacto social e econômico nos países da América Latina, onde milhões de indivíduos encontram-se infectados pelos parasitas.³⁰⁸ No presente trabalho a atividade leishmanicida de extratos brutos e frações semipurificadas diversos órgãos da espécie *A. schottii* foram testadas em 2 grupos de pesquisa diferentes e em formas infestantes também diferentes, com a finalidade de avaliação de atividade leishmanicida. Os resultados da triagem das frações de *A. schottii* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (realizada pelo primeiro grupo de pesquisa) encontram-se nos gráficos abaixo, demonstrando uma expressiva ação leishmanicida. A atividade leishmanicida foi realizada segundo a metodologia de Napolitano et al, 2004 onde cada tubo recebeu um inóculo de 1×10^6 promastigotas/ml.²³⁵ Os resultados obtidos são mostrados na tabela 31 e 32.

Tabela 31 – Diminuição das formas promastigotas de *L. amazonensis* frente à fração DCM

--	--	--	--	--

			Fração Diclorometano		Fração Diclorometano { 25 g/ ml }		Fração Diclorometano { 50 g/ml }		Fração Diclorometano		
Controle									tubo		
Cultivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
3°	N° de células	1,0375x 10 ⁷	1,2925x 10 ⁷	9,525 x 10 ⁶	6,75 x 10 ⁶	1,3625x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	6,25 x 10 ⁶	3,25 x 10 ⁵	2,75 x 10 ⁵	2,75 x 10 ⁵
	Média	1,65 x 10 ⁷		8,1375 x 10 ⁶		2,48125 x 10 ⁶		4,75 x 10 ⁵		2,75 x 10 ⁵	
	Viabilidade (%)	100%		69,85%		21,30%		4,08%		2,36%	
	Inviabilidade (%)	0%		30,15%		78,70%		95,92%		97,64%	
5°	N° de células	2,365 x 10 ⁷	3,195 x 10 ⁶	2,08 x 10 ⁷	1,865 x 10 ⁷	1,025 x 10 ⁶	1,0075x10 ⁷	1,675 x 10 ⁶	8,5 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	6,75 x 10 ⁵
	Média	2,78 x 10 ⁷		1,9725 x 10 ⁷		5,55 x 10 ⁶		1,2625 x 10 ⁶		5,875 x 10 ⁵	
	Viabilidade (%)	100%		70,95%		19,78%		4,54%		2,11%	
	Inviabilidade (%)	0%		29,05%		80,12%		95,46%		97,89%	

Tabela 32 – Diminuição das formas promastigotas de *L. amazonensis* da fração DCM

			Fração Diclorometano {10 g/ml}		Fração Diclorometano {25 g/ ml}		Fração Diclorometano { 50 g/ml}		Fração Diclorometano 75 g/ml		
Dias de Cultivo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	
3°	N° de células	9,775 x10 ⁶	8,125 x10 ⁶	6,175 x10 ⁶	5,25 x10 ⁶	2,325 x10 ⁶	2,225 x10 ⁶	7,25 x10 ⁶	4,0 x10 ⁵	5,0 x10 ⁵	4,75 x10 ⁵
	Média	8,95 x 10 ⁶		5,7125 x 10 ⁶		2,275 x 10 ⁶		5,625 x 10 ⁵		4,875 x 10 ⁵	
	Viabilidade (%)	100%		63,83%		25,42%		6,29%		5,45%	
	Inviabilidade (%)	0%		36,17%		74,58%		93,71%		94,55%	
5°	N° de células	1,852 x10 ⁷	1,725 x10 ⁷	1,1575 x10 ⁷	1,05 x 10 ⁷	4,325 x10 ⁶	4,1 x10 ⁷				
	Média	1,725 x 10 ⁷		1,10375 x 10 ⁷		4,2125 x 10 ⁶					
	Viabilidade (%)	100%		62,18%		23,73%					
	Inviabilidade (%)	0%		37,82%		76,27%		100,00%		100,00%	

Atividade leishmanicida das frações testadas pode ser observada pelos índices obtidos, onde a presença da fração DCM nas culturas promoveu crescente diminuição no crescimento das formas promastigotas de *L.amazonensis*. Na concentração de 10mg/ml, o crescimento de tais células foi reduzido 33,16%, após 72h de incubação (o que se repetiu após 120h), a

25mg/ml, a redução foi de 76,64%, a 50mg/ml, de 94,82%, e a 75mg/ml não mais se observou a presença de células vivas. A concentração desta fração que inibiu 50% do crescimento (DL50) de *L. amazonensis* foi estimada em 15,6mg/ml. A fração hexânica mostrou atividade leishmanicida a concentrações maiores, não tendo sido observadas células vivas à concentração de 250mg/ml. Como conclusão, podemos afirmar que ambas as frações provenientes da *A. schotti* mostraram atividade contra as formas promastigotas da cepa IFA/BR/67/PH8 de *L. amazonensis*.

5.4.8. ATIVIDADE LEISHMANICIDA FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmani chagasi*

Neste segundo ensaio buscando verificar a atividade leishmanicida de extratos brutos e frações semipurificadas foram testados diversos órgãos da espécie *A. schotti*. Neste ensaio foram utilizadas formas promastigotas de *L. chagasi*. Os resultados da triagem das frações de *A. schottii* frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi* encontram-se na tabela 33, demonstrando uma expressiva ação leishmanicida.

Uma vez que os 2 testes tiveram abrangência à parasitas diferentes, conclui-se que os extratos e frações semipurificadas de *A. schottii* promovem um efeito citotóxico bastante significativo, o que oportuniza estudos futuros mais detalhados. A possibilidade de se testar futuramente os compostos isolados da *A. schottii* pode ser considerada uma via de acesso bastante promissora para elucidação dos possíveis mecanismos que a composição química desta espécie pode provocar nestes parasitas.

Tabela 33 – Frações de *A. schottii* frente às formas promastigotas de *L. chagasi*

<i>A. schottii</i> - Frações	Percentagem de 1000 µg/mL	Inibição 1000 µg/mL
Raiz AE	100	100
Raiz DCM	100	100
Caule Hex	100	100
Caule DCM	100	22
Caule AE	100	10
Folha Hex	100	100
Folha DCM	100	30
Flor Hex	100	44
Flor DCM	100	100
Semente Hex	48	19
Semente DCM	100	65
Semente AE	100	74
Raiz BuOH	100	100

5.4.9. ATIVIDADE TRIPANOMICIDA

A atividade tripanocida em extratos brutos e compostos obtidos de plantas têm sido pesquisada por diferentes autores. Mafezoli e colaboradores (2000) estudando a atividade de extratos brutos de 9 espécies de plantas da família Rutaceae contra tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, verificaram que 8 dos 32 extratos, ocasionaram a mortalidade de 75% dos parasitas na concentração de 4 mg/mL. De 25 frações obtidas a partir dos extratos ativos, 6 ocasionaram uma redução de 80% no número de parasitas, na concentração de 2 mg/ mL.

309

Berger e colaboradores (1998) avaliando a atividade tripanocida de 5 espécies de plantas da Guatemala, utilizadas em medicina popular mostraram que as frações etanólicas,

hexânica e aquosa de *Neurolaen alobata* (Asteraceae) apresentaram IC₉₀ de 290,6; 152,4 e 551,8 ug/mL para epimastigotas de *T. cruzi*.³¹⁰ Na Medicina Tradicional Chinesa foram testadas 18 plantas e foi verificado que 50% dos extratos inibiram o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* na concentração de 250 ug/ mL.³¹⁰

Neste estudo, frações AE e DCM (raízes), Hex, DCM e AE (caules), Hex e DCM (folhas), Hex e DCM (flores) e Hex, DCM e AE (sementes) da *A. schottii* foram testadas com a finalidade de avaliar a inibição de formas infestantes causadoras do mal de Chagas. Os resultados da triagem das frações de *A. schottii* frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y e a determinação das IC₅₀ das frações de *A. schottii* contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y, quando comparados com o benznidazol encontram-se na figura 61. Os resultados das frações raiz AE e DCM, caule – fração Hex, folha – fração Hex e flor – fração DCM podem ser consideradas frações bastante promissoras em virtude dos índices apresentados quando comparados com o benznidazol.

O mecanismo de ação do benznidazol é através do bloqueio da síntese de ácido nucléico e de proteínas. Este medicamento usado na clínica reduz a duração e a severidade da doença de Chagas na fase aguda congênita, mas resulta no “clearance” total do parasita somente em 50% dos pacientes tratados.³¹² Além disso, a variação de sua eficácia de acordo com as cepas do parasita e a região geográfica têm sido reportadas.³¹³

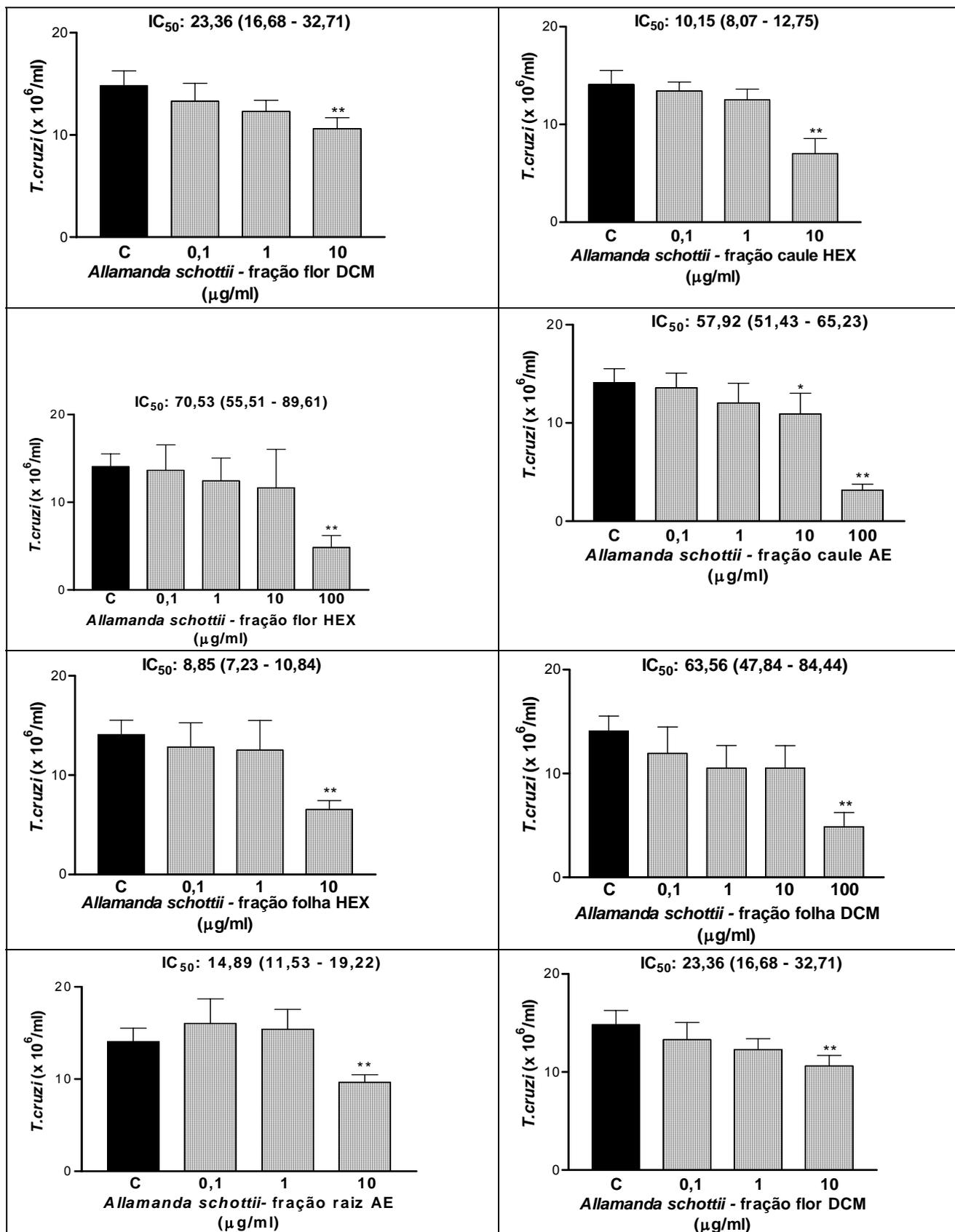


Figura 61 – Efeito tripanocida de diferentes frações de *A. schottii* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y

Os resultados obtidos na determinação das IC₅₀ das frações de *A.schottii* contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* sugerem que 4 frações da *A. schottii* desenvolveram atividade igual ou superior ao benznidazol, o que nos anima e nos leva a propor uma estratégia de continuidade deste trabalho em estudos futuros.

5.4.10. ATIVIDADE ANTI-LEUCÊMICA

A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como a vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, camptotecina e taxol, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional.^{24, 126}

Em virtude dos resultados expressivos relatados pelo gênero *Allamanda* em processos neoplásicos, procurou-se avaliar extratos brutos etanólicos de caules, folhas e raízes das espécies *A.blanchetti* e *A.schotti*.

A atividade dos extratos etanólicos da *A.blanchetti* e *A.schotti*, foram avaliadas em estudos da proliferação células endoteliais do cordão umbilical (HUVEC) e da medula óssea (BMEC) e sobrevivência de células de linhagem leucêmica K562, utilizando o ensaio colorimétrico MTS da Promega (Figuras 62 e 63).

Uma vez que, as atividades farmacológicas de determinadas espécies vegetais são mais significativas nos compostos puros isolados, realizou-se ensaios com o plumierídeo, canferol, isoquercitrina e ácido-*p*-OH-cinâmico obtidos de raízes, na intenção de se rastrear seu perfil antileucêmico frente à células de linhagem leucêmica K562.

Os resultados obtidos encontram-se na figura 64.

Células Endoteliais da Medula Óssea

Células Endoteliais do Cordão Umbilical

Células Leucêmicas Linhagem K562

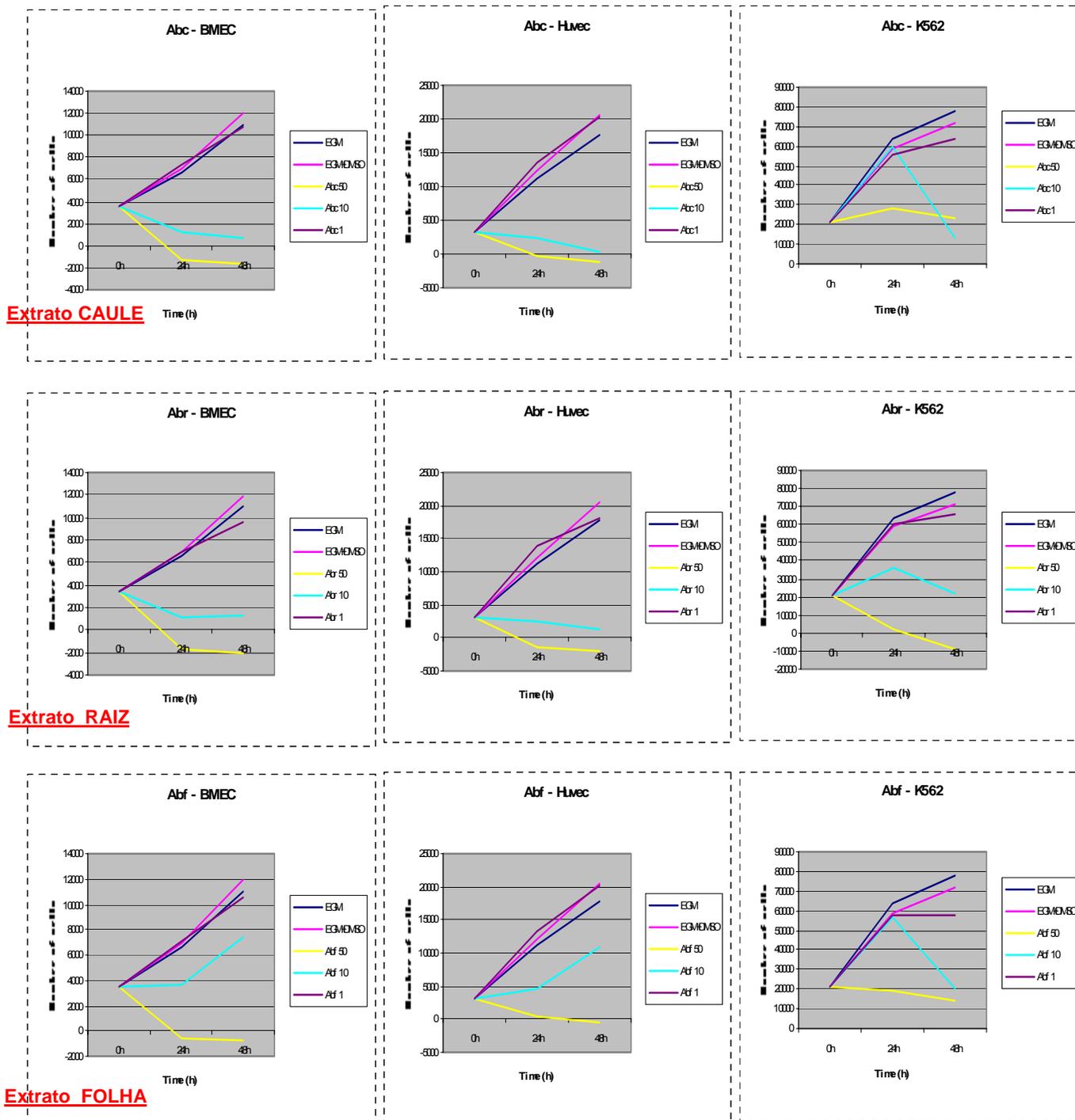


Figura 62 - Efeitos dos extratos etanólicos de raízes, folhas e caules da *A. blanchetti* em células endoteliais do cordão umbilical (HUVEC) e medula óssea (BMEC) e na linhagem de células leucêmicas K562 em cultura avaliado com uso do reagente MTS

Células Endoteliais

Células Endoteliais do Cordão Umbilical

Células Leucêmicas

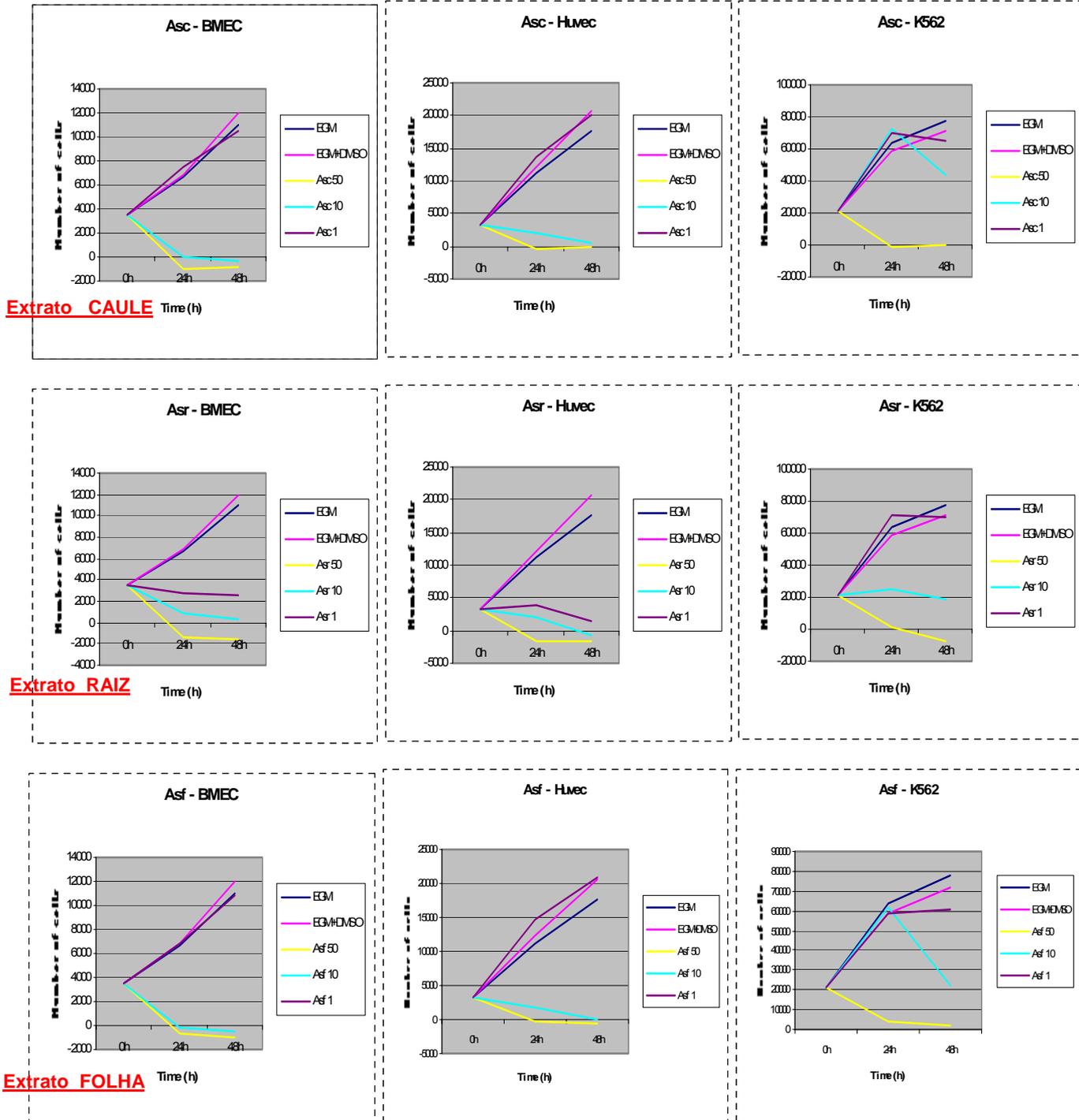


Figura 63 - Efeitos dos extratos etanólicos de raízes, folhas e caules da *A. schottii* em células endoteliais do cordão umbilical (HUVEC) e medula óssea (BMEC) e na linhagem de células leucêmicas K562 em cultura avaliado com uso do reagente MTS

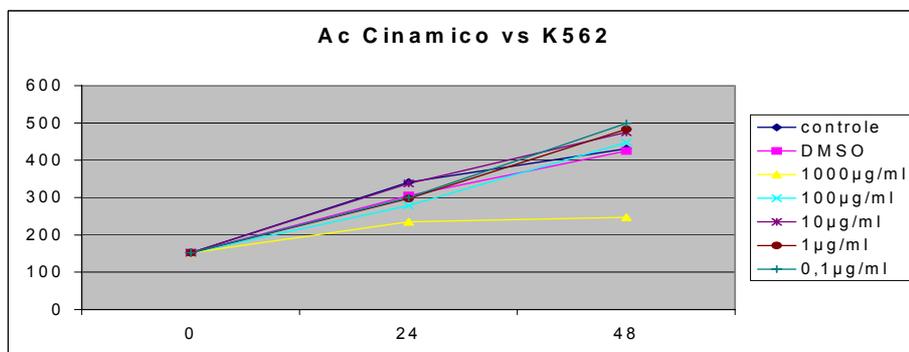
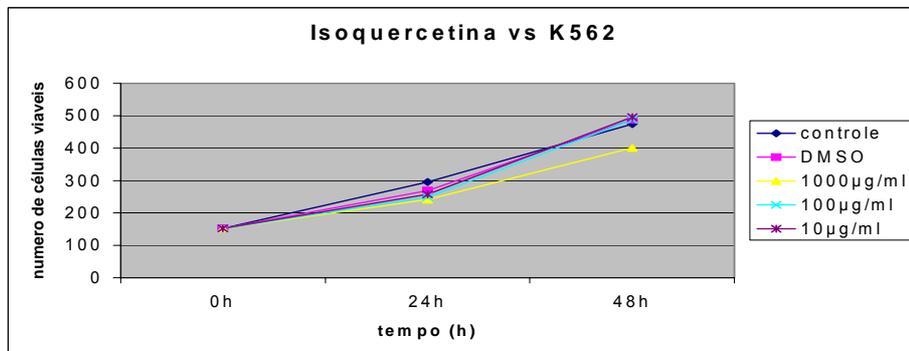
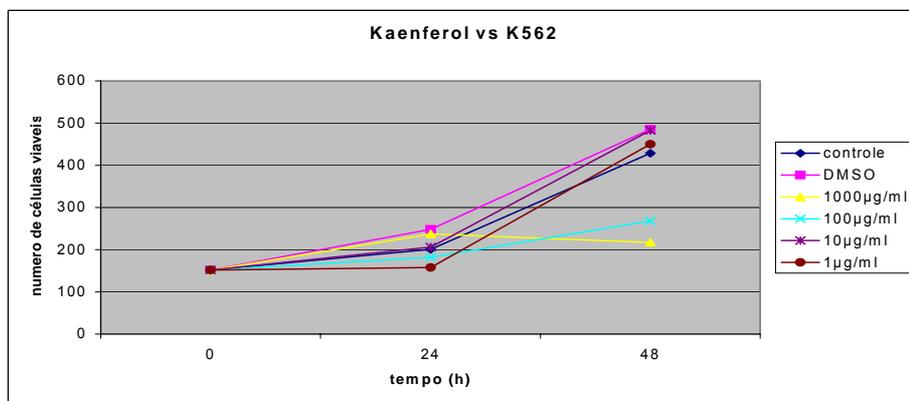
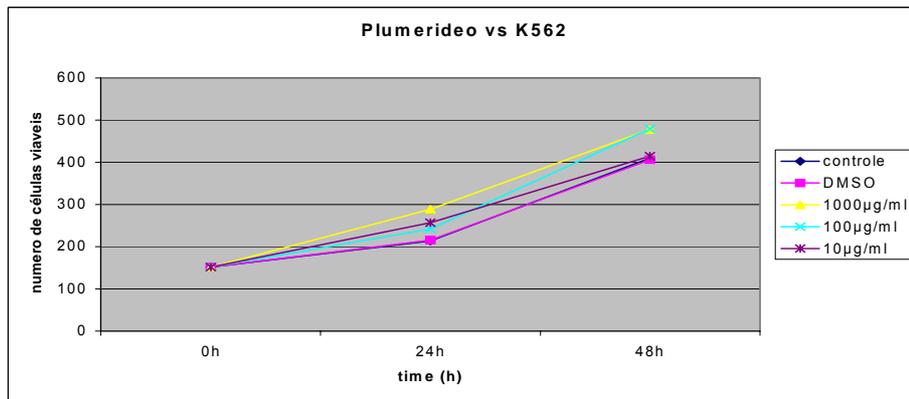


Figura 64 - Efeitos dos compostos isolados (plumierídeo, canferol, isoquercitrina, ácido-*p*-OH cinâmico) da *A. schottii* na linhagem de células leucêmicas K562 em cultura avaliado com uso do reagente MTS

Os resultados preliminares obtidos (figura 62, 63 e 64) demonstram uma elevada atividade citotóxica em todas as células testadas. Na comparação entre os extratos dos diversos órgãos, o extrato da raiz mostrou ser o mais potente de todos.

Quanto à espécie, os extratos de *A. schottii* são pouco mais potentes que os da *A. blanchetti*. O extrato da raiz mostrou efeito citostático sobre as células endoteliais a concentrações de 1µg /125 mL, enquanto que o mesmo efeito é observado nas células K562 a concentrações de 101µg /125 mL. Concentrações 10 vezes mais elevadas determinam forte efeito citotóxico. Efeitos citostáticos e citotóxicos foram também verificados nas células endoteliais, entretanto, em concentrações 5 a 10 vezes inferiores às necessárias para células da linhagem leucêmica, 8 e 80 µg/mL, respectivamente

Para teste pelo método da incorporação de [³H]-thymidine fez-se uso do extrato etanólico de folhas e diferentes linhas celulares de leucemia. Os resultados obtidos mostram significativa inibição da proliferação celular nas concentrações de 10, 100 e 10001µg/mL. O efeito mais acentuado foi observado nas linhas celulares JUKART, RAJI e NALM6.

Quanto aos compostos puros, pode-se afirmar que se constituem um potencial a ser explorado, uma vez que os resultados obtidos foram expressivos quando avaliados em 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL.

Estes resultados são promissores, tornando as raízes da *Allamanda schottii* bons alvos para próximas análises objetivando elucidar o composto ou classe de compostos responsáveis pela atividade antileucêmica.

5.5. CONTROLE DE QUALIDADE SAZONAL

Como constatamos pela revisão bibliográfica, a composição química de uma espécie vegetal é mutante e instável dependendo dos inúmeros agentes a que está exposta. As transformações qualitativas e quantitativas de seus fitoconstituintes se refletem de forma determinante nas atividades terapêuticas esperadas desta planta. Portanto, o controle de qualidade sazonal tem sido uma estratégia importantíssima dentro da área de produtos naturais, uma vez que direciona a melhor época do ano para a coleta e seu beneficiamento. Inúmeros trabalhos são relatados na literatura, mostrando que, através deste tipo de análise é possível traçar um perfil químico dos metabólitos secundários da planta, como se fosse sua impressão digital e dessa forma, otimizar e oportunizar melhor o aproveitamento do seu potencial terapêutico.²²⁵

Motivados pelos resultados farmacológicos obtidos e compostos isolados ao estudar a *A. schottii*, nos sentimos encorajados a desenvolver um controle de qualidade sazonal, o qual teve como parâmetro coletar raízes, caules, folhas, flores e sementes nas diversas estações do ano (verão, outono, inverno e primavera) dos anos de 2003 e 2004. Após a obtenção dos extratos brutos foi realizado o particionamento de cada extrato com solventes de polaridade crescente. Os índices obtidos das frações Hex, DCM, AE e BuOH estão demonstrados nas tabelas 34 e 35. Como se pode notar pelos percentuais obtidos, existem diferenças significantes de uma estação do ano para outra, de órgão para órgão e também de ano para ano. Neste trabalho, no ano de 2004, a fração AE foi a que resultou em maior rendimento em massa de todos os órgãos e sempre na estação inverno. No ano de 2003, já houve diferenças quanto aos rendimentos das frações e também à época do ano. A fração DCM das folhas e

caules do outono foi a mais rentável de todas. As frações hexano e BuOH das raízes foram as que resultaram em maior e mesmo rendimento em massa porém em outra estação, no inverno.

Tabela 34 - Percentual de rendimento de cada fração da *A. schottii*, nas diversas estações do ano de 2004

RAIZ		ESTAÇÃO DO ANO							
Fração	Verão	%	Outono	%	Inverno	%	Primavera	%	
Hexano	50 mg	0,5	70 mg	0,7	60 mg	0,6	40 mg	0,4	
DCM	70 mg	0,7	180 mg	0,18	240 mg	0,24	130 mg	0,13	
AE	220 mg	2,2	140 mg	1,4	440 m	<u>4,4</u>			
FOLHAS		ESTAÇÃO DO ANO							
Fração	Verão	%	Outono	%	Inverno	%	Primavera	%	
Hexano	110mg	0,11	120 mg	0,12	120 mg	0,12	120 mg	0,12	
DCM	240 mg	0,24	200 mg	0,20	190 mg	0,19	280 mg	0,28	
AE	160 mg	1,6	150 mg	1,5	300 mg	<u>3,0</u>			
CAULE		ESTAÇÃO DO ANO							
Fração	Verão	%	Outono	%	Inverno	%	Primavera	%	
Hexano	180 mg	1,8	90 mg	0,9	70 mg	0,7	30 mg	0,3	
DCM	150 mg	1,5	100 mg	1,0	140 mg	1,4	100 mg	1,0	
AE	190 mg	1,9	100 mg	1,0	240 mg	<u>2,4</u>			
SEMENTE		ESTAÇÃO DO ANO							
Fração	Verão	%	Outono	%	Unverno	%	Primavera	%	
Hexano	650 mg	0,65	640 mg	0,64	810 mg	0,81	1,2 g	12	
DCM	300 mg	0,30	770 mg	0,77	680 mg	0,68	240 mg	0,24	
AE	250 mg	2,5	280	2,8	320 mg	<u>3,2</u>			

Tabela 35 - Percentual de rendimento de cada fração da *A. schottii*, nas diversas estações do ano de 2003

RAIZ		ESTAÇÃO DO ANO							
Fração	Verão	%	Outono	%	Inverno	%	Primavera	%	
Hexano	47 mg	0,47	21 mg	0,21	22 mg	<u>2,2</u>	24 mg	0,24	
DCM	71 mg	0,71	109 mg	1,0	109 mg	1,0			
AE	68 mg	0,68	73 mg	0,73	65 mg	0,65			
BuOH	69 mg	0,69	74 mg	0,74	229 mg	<u>2,2</u>			
FOLHAS E CAULES		ESTAÇÃO DO ANO							
Fração	Verão	%	Outono	%	Inverno	%	Primavera	%	
Hexano	104 mg	1,0	111 mg	1,1	162 mg	1,6			
DCM	232 mg	2,3	569 mg	<u>5,6</u>	308 mg	3,0			
AE	104 mg	1,0	106 mg	1,0	78 mg	0,78			
BuOH	147 mg	1,4	155 mg	1,5	831 mg	0,83			

Tais resultados instigam a nossa curiosidade e nos levam a propor inúmeras hipóteses sobre as à presença de quais metabólitos secundários que podem estar presentes nas diversas frações estudadas e em “quais” concentrações.

Impulsionados pelo espírito investigativo, na sequência, como continuidade deste trabalho, pretendemos utilizar o iridóide plumierídeo, os flavonóides quercitina e kaempferol e o terpeno ácido ursólico, como fitofarmacadores e proceder a um rastreamento qualitativo e quantitativo nas frações hexano, DCM e AE de todos os órgãos e estações dos anos coletados. Pretende-se avaliar qualitativamente e quantitativamente estes metabólitos

secundários por HPLC. Este trabalho de rastreamento cromatográfico está em fase inicial, em função de uma parceria existente entre a UFSC e o NIQFAR (Núcleo de Investigação Químico-Farmacêutico) – Universidade do Vale do Itajaí- Itajaí- SC.

Consideramos esta parte do nosso trabalho, como um fecho gratificante, porque acreditamos que dessa forma, estaremos estabelecendo parâmetros importantes para o controle de qualidade da *A. schottii*. Ao proporcionar uma faceta referencial a mais desta espécie vegetal, investigações futuras poderão aproveitar de forma mais consistente o potencial terapêutico comprovado neste trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, n. 22, p. 162-95, 2005.
2. TULP M. e BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-58, 2004.
3. PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry.**, n.56, p. 237-243, 2001.
4. DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, p. 9-10, 2004.
5. ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina – Bases Clínicas e Farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS. Cidade: Buenos Aires – AR. Ediciones SRL.1999, p.38-92.
6. PINTO, A.C; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova.**, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.
7. FOYE, O. W.; LENKE, T. L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of Medicinal Chemistry**. 4 ed. Baltimore: Williams & Wilkins.1995, p. 1-11.
8. RASKIN, I. et al. **Plants and human health in the twenty-first century**. Trends in Biotechnology, v. 20, n.12, 2002, p. 522-531.
9. RATES, S.M. K. Plants of source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
10. OLIVEIRA, A.B e BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina científica**. v 1, p. 49-58, 2003.
11. HOUGHTON, P. J. & RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**. London: Chapman & Hall, 1998, p.49-86.
12. ALMEIDA, 2004 – Setor de fitomedicamentos deve faturar R\$ 400 milhões. Disponível em:<http://www.traffic.org/publications/trafficc.htm> Acesso em: 6.out. 2004
13. SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.** v. 16, p. 1053-71, 1996.

14. KINGHORN, A.D. e SEO, E. K. **Plantas sources of drugs**. In: FULLER, G.; MCREON, T. A.; BILLS, D. D. Agricultural materials renewable resources: Nonfood and industrial applications. Washington: American Chemical Society. p. 170-93, 1996.
15. S.A. Analgésicos feitos da papoula, as sem viciar. **Pharmacia Brasileira**. 2004, setembro/outubro p. 32.
16. ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e não específicos que interagem com o DNA: uma introdução 2005. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.
- 17- TAN, G. T.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A.D. Evaluation of natural products as inhibitors of human imunodeficiency virus type 1 (HIV-1) revers transcriptase. **J. Nat. Prod**, v. 54, n. 1, p. 143-54, 1999.
18. OLIVEIRA, R. B. e ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores. **Quim. Nova**, v. 25, n.6, p. 976-984, 2002.
19. SALMONN, S. E. **Em Farmacologia Básica e Clínica**, Katzung, B. G., ed.; Guanabara Koogan S. A.. Rio de Janeiro, 1998, p. 629-55.
20. SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em Oncology; JONHSTON, P. G.; ed; Oxford University Press: Oxford, 2001; CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Em Cancer chemotherapy and biotherapy**..2 ed. Lippincott-Raven: Philadelphia, p. 121-32, 1996.
21. ANTONINI, I.; POLUCCI, P. KELLAND, L. R.; SPINELLI, S.; MARTELLI, S. J. Cancer Treatment. **J. Med. Chem.**, n. 43, p. 4801, 2000.
22. MOLINOFF. P.B. e RUDDON, R. W., eds.; Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1996, p. 909-949.
23. NEWMAN, D. J.; CRAAG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Nat. Prod. Rep**. v. 17, p. 1022-37, 2003.
24. CHABNER, B. A. e CALABRESI, P. Em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; GOODMAN, L. S; GILMAN, A., eds; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-49,1995.
25. KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, T. F. Recents advances in traditional plantas drugs and or chids. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24, n.1, p. 7-21, 2003.
26. HARVEY, A. L. & WATERMAN, P. G. The continiung contribution of biodiversity to drug discovery. **Drug Discovery and Development**, v. 1, n.1, p. 71-72, 1998.
27. CECHINEL FILHO; YUNES, R. A. Breve Análise Histórica de Plantas Mediciniais. In: **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. YUNES, R.; A CALIXTO J. B.(orgs). Chapecó: Argos, 2001, p. 18-34.
28. MESSMER, W. M., TIN-WA ,M., FONG, H. H. S. C., BEVELLE, C., FARNSWORTH, N. R., ABRAHAM, D. J., TROJANEK, J. **J. Pharm. Sci.**, n. 61, p. 1858, 1972.

29. CHARLLIER, B.; PERARNAU, J. M., VIEL, J. F. Garlic, onion and cereal fibre as protective for breast cancer: a French case-control study. **Eur J. Epidemiol**, n. 14, p. 78-80, 1998.
30. MANTLE, D., LENNARD, T. W. J., PICKERING, A. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* v.19, n.3, p. 223-240, 2000.
31. RAO, M. M. e KINGSTON, D. G. Plant anticancer agents XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. **J. Nat. Prod**, v. 45, p. 600-04, 1982.
32. SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; PETROVICK, P.R. Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: SIMÕES, C.O. et al. **FARMACOGNOSIA, da Planta ao Medicamento**, Ed. EFRGS/ UFSC. 1999, p. 31-32.
33. KUPCHAN, S. M.; DESSERTINE, A. L.; BLAYLOCK, B. T.; BRUAN, R.F. Isolation and structural elucidation of allamandin, and antileukemic iridoid lactone from *Allamanda cathartica*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 39, n.17, p. 2477-84, 1974.
34. PARKES, E. B.; PATTENDEN, G. Synthesis of Allamancin an Approach to Antileukaemic Iridoid Lactones and Formal Synthesis of Plumericin and Allamandin. **Chem. Soc. Perkin Trans**, n.1, p. 119-34, 1988.
35. WORLD HEATH ORGANIZATION – The leishamianases and Leishmania/HIV co-infections. Disponível em <<http://who.int/inf-fs/em/fact116.html>>, acesso em: 02 de março de 2004.
36. HABTERMARIAM, S. Cytotoxicity of diterpenes from *Prema schimperi* and *Prema oligotriha*. **Planta Medica**, v. 61, p.368-69, 1995.
-
37. NEVES, D. P; MELLO, A.L; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, São Paulo, 9 ed. 1999, p. 61-65.
38. BOGDAN, C.; GESSENER, A.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Curr. Opin. Immunol**, v. 8, p. 517-25, 1996
- 38 – FRAYA, G.J.; SMYTH, J. D.; GOBERT, J.G.; SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and antihelminthic drugs in man. *General phaemacology*, v. 28, n.2, p. 273-99, 1997.
- 39 – GILBERT, I. H. Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes (Review). **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1587, p. 249-257, 2002.
- 40 – CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEL, C.I; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n.6, p.421-64, 1998.
-

41. MARZOCHI, M. C. A. e MARZOCHI, K. B. F. Tegumentar and visceral leishmanioses in Brasil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Publ.** 1994, v. 19, supl. 2, p. 359-57.
42. SUNDAR, S.; AGRAWAL, G.; RAI, M.; MAKHARIA, M. K.; MURRAY, H. W. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposoma amphotericin B: randomized trial. **BMJ**, v. 323, p. 419-22, 2001.
43. FAPEMIG, Minas Faz Ciências. Belo Horizonte: FAPEMIG, n. 9, p.12-13, dez 2001 a fev. 2002.
- 44 – WILLCOX, M. L; COSENTINO, M. J.; PINK, K. Natural products of the treatment of tropical diseases. **Trends in Parasitolog**, v. 17, n.2, p. 58-60, 2001.
45. MENDONÇA-FILHO R. R; RODRIGUES, I. A; ALVIANO, D. S.; SANTOS A. L.; SOARES, R. M.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H.; ROSA, M. D. O. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) **Res. Microbiol**, n. 155, p. 136-43, 2004.
-
46. SARDESAI, V. M. Herbal medicines: Poisons or potions? **J. Lab. Clin. Med.** v 139, n.6, p. 343-46, 2002.
47. BOCHERS, A.T.; SAKAI, S.; HENDERSON, G.L.; HARLEY, M. R.; KEEN, C. L.; STERN, J. S.; TERASAWA, K.; GERSHWIN, M. J. **J. Ethnopharmacol**, n.73, p.17, 2000.
48. ROBBERS, J. E; SPEEDIE, M. K; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo, editorial Premier, 1997, p.365-89.
49. BLUMENTHAL, M. **The complete German Comission E Monographs: therapeutic guide to herbal medicines**. Austin: American Botanical Council, 1998.
50. CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytot. Research**, v. 14, p. 401-18, 2000.
51. GRUWALD, J. O. O Crescente papel da plantas medicinais nos cuidados de Saúde na Europa. **Drug Information Journal**, n. 32, p. 151-53, 1998.
52. FERREIRA S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**. 1998, p. 22-78.
53. SILVA, S; BUITRON, X; OLIVEIRA, L .H; MARTINS, M. V. M. Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos Gerais Sobre Legislação e Comércio. In: <<http://www.traffic.org/publications/>> Acesso em: 23.nov. 2001.
54. MACIEL, M. A. ; PINTO, A .C; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. R. S.; VANDERLINDE, F. A., LAPA, A. J. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacology**, n. 70, p. 41-55, 2000.

55. AGNER, A. R.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; COLUS, M. Antigenotoxicity of trans-dihidrocrotanina clerodano diterpeno of *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 67, p. 815-19, 2001.
56. MOURA, K. C. G DE, EMERY, F. S.; NEVES PINTO, A. P.; PINTO, M. C. F. R., DANTAS, A. P., SALOMÃO, K. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivates: a review from na interdisciplinary study. **J. Bras. Chem. Soc.**, v. 12, p. 325-38, 2001.
57. HUSSAR, D. A. New drug of 1992. **AM. Pharm.** 1993, v. 533, p. 20-47.
58. YUNES, R. A; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 147-52, 2001.
59. BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO, J. X. O uso de matérias primas vegetais para a síntese de fármacos. In: SIMÕES, C.A.O. et al. **FARMACOGNOSIA, da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC. 1999, p. 123-27.
60. AVERY, M. A.; JENNINGS-WHITE, C.; CHING, W. H. M. Total syntesis of (+)-Artemisinin and (+)-9 demethylartemisinin. **Tetrahedron Lett.** v. 28, p. 4629, 1987.
61. AVERY, M. A.; CHONG, W. K. M.; JENNINGS-WHITE, C. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua*. **L. J. Am Chem. Soc.**, v.114, p.974, 1992.
62. CRABEE, P. Some aspect of steroid research basead on natural produets from plant origin. **Bull. Soc. Chim.** , n. 88, p. 345, 1979.
63. BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANTANA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. Eicosanóides (Parte I) **Caderno de Farmácia.**, v 3, p. 67-84, 1987.
64. FARIAS, F. M. .; BARREIRO, E. J.; COELHO, F. A. S.; COSTA, P. R. R. Análogos de prostaglandinas, síntese de novos prostanóides a partir do safrol. **Quim. Nova**, v. 7, p.111, 1984.
65. COELHO, F. S. A; COSTA, P. R. R; DE FARIAS, F. M. C.; BARREIRO, E. J. Análogos de prostanglandinas, síntese de novos derivados de tromboxanas a partir do safrol. **Quim. Nova**, v. 7, p. 113-14, 1984.
66. GHISALBERTI, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, p. 303-23, 1997.
67. IHRIG, M.; BLUM, E.; ZUR BEURTEIN IUNG von Phytopharmaka ausphar zeustischer Sicht. **Pharm.** v. 137, n. 36, p .2715-25, 1992.

68. MITSCHER, L. A.; PILLAI, S.; SHANKEL, D. M. Some transpacific thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. **J. Food and Drug Anal**, v.8, n. 4, p. 229-34, 2000.
69. DIXON, R. A. Phytochemistry in the genomics and post genomics eras. **Phytochemistry**, v. 57, p. 145-48, 2001.
70. RENGER, B. System performance and variability of chromatography techniques used in pharmaceutical quality control. **J. Chromatog**, v. 746, p. 167-76, 2000.
71. DATI, F.; BRAND, B. Standardization actives for harmonization of test results. **Clinica Chimica Acta**, v. 297, p. 239-49, 2000.
72. BAUER, R.; TITTEL, G. B. Quality assesment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 193-99, 1996.
73. GU, Z., M.; ZHOU, D.; LEWIS, G. et al. Quantitative evaluation of appopaceous acetogenesis in montly samples of paw paw (*Asimia triloba*) twings by liquid chromatography/eletres pray ionization tandem mass spectrometry. **Phytochemistry Analysis**, v. 10, p 32-38, 1999.
74. 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**, v. 22, n. 2, p. 175-77, 1999.
75. CAPASSO, R; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytoteraphy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. 58-65, 2000.
76. FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de Oleiricultura**. Editora Agronômica "CERES", Ltda, 2 ed.. SP. 1981, p. 25-31.
77. SILVA JR, A. A. **Plantas Medicinais e Aromáticas**. Secretaria da Agricultura e do Desenvolvimento Rural. Itajaí, SC. 1997, p. 37- 40.
78. CORREA JR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, codimentares e aromáticas** . 2 ed. Jaboticabal. FUNEP. 1995, p. 35-43.
79. KARLSEN, J. In: **The Medicinal Plant Industry**. Quality control and instrumental analysis of plant extracts. Boca Raton, USA: CRC Press. 1991, p. 99-105.
80. NAVARRO, F. N.; SOUZA, M. M; NETO, R. A.; GOLIN, V.; NIERO, R.; YUNES, R. A. DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brasil. **Phytomedicine**, n. 9, p. 427-32, 2002.
81. TYLER, V. E. Phytomedicines: Back to the future. **J. Nat. Prod**, v. 62, p. 1589-92, 1999.
82. **WHO**. General Information-Guidelines for the regulatory assesment of medicinal products for use in self -medication. Wordl Health Organization, 2000.

83. **WHO**. Regional office for the Westewrn Pacific Guidelines for evaluating the sofety and efficacy of herbal medicines. Marila, Wordl Health Organization 1993b.
84. PETROVICK, P. R.;MARQUES, L. C. Normatização de produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN. G. et al Org. **FARMACONOSIA: da planta ao medicamento**, 3 ed.. Porto Alegre, UFRGS/EDUSC. 2001, cap. 14, p.261-99.
85. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n 116 de 08/08/1996. Publica proposta de normas para estudos de toxicidade e da eficácia de fitoterápicos. **Diário Oficial**, 12/08/1996.
86. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24/02/2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 2000.
87. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 24.10.04. Aprova o Regulamento Técnico, visando normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária Diário Oficial da União, 26.10.04.
- 88.NIERO, R. In: **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos** BRESOLIN e CECHINEL FILHO (org).. 1 ed. Editora do Vale do Itajá: UNIVALI. 2003, p.25-30.
89. CORREA JR, C. e SCHEFFER, M.C. Experiência de integracion de industrias y productores en la producion y comercializacion de plantas medicinales. **Acta Horticulturae Wageningen**. 1999, n. 503, p. 173-76.
90. BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Quim. Nov.**, n.17, p. 405-45, 1994.
- 91.ELISABESTKY, E.; MORAES, J. A. R. Em **The First International Congress of Ethnobiology**; Poesy. D.A, Overal, W.L., Belém: Brasil. 1988, v.2, p.11.
92. CORDEL G. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n.6, p. 1585- 1612, 1995.
93. ELIZABESTKY, E. e SETZER, R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and theapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. In: PARKER, E. P. (ed) **The Amazon Caboclo: historical and copntemporany perspectives**. Willianburgh: Studies on the Third World Societies Publications Seres, v. 32, p. 243-78, 1985.
94. ELIZABESTKY, E. e GELY, A. Plantas Medicinales utilizadas em Amazonia comme fond potentiel de nouveaux agents therapeutics dans les cas d'allergie, thrombose et inflammation. **J. Agri. Trop. Botan. App.** v. 36, p. 143-51, 1987,.

95. CORREA JR., C.; SCHEFFER, M. Cultivo de Plantas Mediciniais, Condimentares e Aromáticas. Curitiba, Emater. 1997, p.162-65.
96. ORTEGA, G. G. **Tecnologia de Produção Aplicada de Fitoterápicos** (curso ministrado). Farnapolis: Florianópolis, SC, 2000.
97. MARTIN A. e BUSTTAMANTE, P. **Physical Pharmacy**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993.
98. LIEBERMAN, N. H. A.; LACHMAN, L.; SCHWAZTZ, J. B. (eds.). **Pharmaceutical dosage forms**. 2 ed. New York: Macel de Kiker 1990, v. 2, p.30-57.
99. VOIGT, R. **Pharmazeustische Technologie**. Ausgabe, Berlin: Ullstein Mosby, 1993.
100. LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden, 1989, 200 p.
101. SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al Org. **FARMACONOSIA: da planta ao medicamento**, 3 ed.. Porto Alegre, UFRGS/EDUSC. 2001, cap. 13, p. 228-54.
102. HUIE, C. V. A review of modern sample preapration techniques for the extraction and analysis of medicinal plantas. **Anal Bional. Chem**, v. 373, p. 23-30, 2002.
103. SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookmann. 2002, p.621-47.
104. MOLDÃO-MARTINS, M.; PALAVRA, A.; COSTA, M. L. B. et al. Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *silvestris aroma*. **J. of Superc. Fluids**. v. 18, p. 25-34, 2000.
105. SMITH, R. M. **Supercritical Fluid Chromatography**. RSC, Chromatography Monographs. The Royal Society of Chemistry, London. 1988 cap.2
106. VALENTE, L. P.; AUGUSTO. Microextração em Fase Sólida . **Quim. Nova**, v. 23 n. 4, 523-29, 2000.
107. BICCHI, C.; DRIGO, S.; RUBIOLO, P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. **J. Chromatogr**, v. 892 (1-2) p. 469, 2000.
108. PAWLISZYN, J. **Solid Phase Mcroextraction: Theory and Practice**; WILEY-V. H . C. New York 1997, NY. p.3.
109. HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. HOSTETTMANN, M. **Preparative chromatography techniques**. New York: Verlag Berlin Heidelberg, 1997.
110. BONATO, P. S. In: **Introdução a Métodos Cromatográficos**. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. 3 ed., Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo. 1988, p. 143.

111. BARTON, D.; OLLIS, W. D. **Advances in medicinal phytochemistry**. Ed. John Libbey, 1986.
112. KAUFMANN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. 1999. USA: CRC.
113. LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Camada Gasosa**. São Carlos. ACTA, 1993.
114. CIMPAN, G. & GOCAN, S. Analysis of medicinal plants by HPLC. Recent approaches. **J. of Liquid Chromatography & Related Technology**, v. 25, n. 13-15, p. 2225-29, 2002.
115. WOLFENDER, J. L.; MAILLARD, M.; HOSTETTAN, K. Liquid chromatographic-Thermospray mass spectrometric analysis of crude plant extracts containing phenolic and terpenes glycosides. **J. Chromat.**, v. 647, p. 183-90, 1993.
116. UGAZ, O. L. **Investigacion Fitoquímica. Métodos em el estudio de productos naturales**. 2. Ed. Lima: Pontificia Universidade Católica del Peru – Fondo Editorial, 1994, 299 p.
117. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5 ed.. Ed. Guanabara Koogan, S. A. Rio de Janeiro. 1994, 387 p.
118. BROWN, W. H. **Organic Chemistry**. Saunders College Publishing, USA. 1995 p. 1120.
119. WONG, R. Y. e GAFFIELD, W. In: **Bioactive Natural Products** (eds. COLEGATE, S. M; MOLYNEUX. R. J.) CRC Press, USA, 1993.
120. ROBERTS, J. K. M. e JARDETZKY, O. Monitoring of cellular metabolism by NMR. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 639, p. 53-76, 1981.
121. FREITAS, J. C. C. e BONAGAMBA, T. J. **Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear**. Rio de Janeiro, Ed. AUREMN, 1999.
122. GONZALES-SIERR, M.; KHALID, S. A.; DUDDECK, H. Interpretation of two dimensional NMR spectra: a pedagogical approach. **Fitoterapia.**, v. 1, n.2, p.99-102, 1989
123. DEMORE, A. E. The use of NMR spectroscopy in the structure determination of natural products: two dimensional methods. **Natural Prod Reports.**, p. 111-40, 1989
124. BYRNE, L. T. In: **Bioactive Natural Products. Detection, isolation and structure determination**. COLEGATE, M. S.; MOLYNEVE, R. J. (eds.). CRC Press, Boca raton 1993, p.75
125. SADLER, I. H. The use of NMR spectroscopy in the structure determination of natural products: One dimensional methods. **Natural Prod Reports**, p. 101-127, 1988.

126. AMARAL, A. T. e MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de Planejamento Racional de Fármacos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 39-44, 2002.
127. RAM, P. **Drug Disc Today**. 1999, n. 4, p. 401.
128. KATO, M. J. **Phytochemistry**. 2001, n. 14, p. 419.
129. WATERBEEN, H. V. In: **The practice of Medicinal Chemistry** (Ed. WERMUTH C.G.). Acad Press, Grã Bretanha, 1996.
130. MONTANARI, C. A. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva no Desenvolvimento da Farmacoterapia. **Quim. Nova**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.
- 131 -BARREIRO, E. Desenho de fármacos apartir de produtos naturais. In: **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. YUNES, R.; A CALIXTO J. B.. (orgs). Chapecó: Argos, , p. 182-94, 2001.
- 132 – CREZENSKI, T. B, P; PEDROSA, R. C. Alvos moleculares na pesquisa de fitofármacos e fitoterápico. In: **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. YUNES, R ; A CALIXTO J. B.. (orgs). Chapecó: Argos, 2001.
133. MALHEIROS, A. Estudo químico e avaliação de atividade antibacteriana da *Allamanda cathartica* L. (APOCIANACEAE). Dissertação (Mestrado) do Departamento de de Química, Universidade Estadual de Maringá, 1995.
134. LORENZI, H. e MOREIRA, H. **Plantas ornamentais do Brasil**. 3 ed. Instiuto Plantarum Nova Odessa, 2001.
135. SCHULTZ, A. **Introdução a Botânica Sistemática**. Ed. Universidade UFRGS.1984, 4. ed. v. 2, p. 261.
136. CRONQUIST, A. An Integrated system of classification of flowering plants Columbia University Press 1981, p. 876-79.
137. JUDD, W. S. **Plant Systematics: A Philogenetic Approach**. Sinauer Associaties, Inc. 1999, p.366-69.
138. JOLY, A. B. **Botânica, introdução a taxonomia vegetal**. 2 ed. São Paulo, Editora Nacional, 1975, p. 106-110.
139. BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma no Brasil**. São Paulo: EDUSP, v. 1, 1978.
140. KARDONO, L. B. S; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonseisa. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1447-55, 1990.
141. DOBHAL, M. P.; LI, G.; GRYSHUK, A.; GRAHAM, A.; BHATANAGER, A .K.; KHAJA, S. D.; JOSHI, Y. C.; PANDEY, R. K. Structural modifications of plumieride

isolated from *Plumeria bicolor* and the effect of modifications in vitro anticancer activity. **J. Org. Chem.**, v. 69, p. 6165-72, 2004.

142. AGRAWAL, R.; MUSTAFA, J. GUPTA, A.; OSMAN, S. M. Oil rich euphorbiaceae seeds with high contents of linoleic acid. *Fett. Wissensch. Technologie-Fat Science Technol*, v. 97, p. 526-27, 1995.

143 – AKHATAR, N.; LALIK, A. Oleanane type triterpenes from *Plumeria rubra*. **Phytochemistry**, n. 32, p. 1523-25, 1993.

144. GUPTA, N. C.; BHAGIRATH, S.; BHAKUNI, D. S. Steroids and triterpenes from *Alangium lamarckii*, *Allamanda cathartica*, *Abrus precatorius* and *Haloptelea integrifolia*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 791-92, 1969.

145. PAI, B. R.; SUBRAMANIAN, P. S.; RAO, U. R. Isolation of plumericin and isoplumericin from *Allamanda cathartica* Linn. **Indian J. Chem.** 1970, v. 9.

146. JEWERS, K.; MANCHANDA, A. H., CATILLO, A. V. The constituents of *Allamanda cathartica* L. **Asian Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 1971.

147. JEWERS, K.; COPPEN, J. J.; MANCHANDA, A. H.; PAISLEY, H. M.; CASTILLO, A. Biologically active lactones of *Allamanda cathartica*. **Phalavi Med. Journal**, v. 6, n. 1, p. 52-62, 1975.

148. DIXIT, S. N.; TRIPATHI, S. C.; OJHA, T. N. Allamandaside – A new fungitoxic substance from *Allamanda cathartica* L. **J. Antibact. Antifung. Agents**, v. 10, n.5, p. 197-99, 1982.

149. COPEN J. J. W; COBB, A. The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda* **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p. 125-28, 1983.

150. YAMAUCHI, T.; ABE, F.; TAKI, M. Protoplumericin, an iridoid bis-glycoside in *Allamanda neriifolia*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 10, p. 3051-55, 1981.

151. ABE, F.; MORI, T.; YAMAUCHI, T. Iridoids of Apocyanaceae III. Minor iridoids from *Allamanda neriifolia*. **Chem Pharm. Bull**, v.32, n.8, p. 2947-56, 1984.

152. MAIA, J.G. S.; ZOGHBI, M. D. B.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M. Volatiles from flowers of *Thevetia peruviana* (Pers)K. Schum. and *Allamanda cathartica* Linn (Apocyanaceae). **Journal of essential oil Research**, v. 12 (3), p. 322-24, 2000.

153. GUPTA, R. S.; BHATNAGER, A. K.; JOSHI, Y. C.; SHARMA, R.; SHARMA A. Effects of plumericin and iridoid spermatogenesis in male albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, p. 169-74, 2004.

154. ALEN, Y.; NAKAJIMA, S.; NITODA, T.; BABA, N.; KANZAKI, H.; KAWAZU, K. Antinematodal activity of some tropical rainforest plants against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Zeitschrift fur naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 55, n 3-4, 295-99, 2000.

155. TIWARI, T. N.; PANDEY, V. B.; DUBEY, N. K. Plumieride from *Allamanda cathartica* as na antidermatophytic agent. **Phytotherapy Research.**, v. 16, n.4, p. 393-94, 2002.
156. SIMÕES, C. M. O. e SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O et al. 1999, p. 387-415.
157. BREITMAER, E. **Terpene**. Stuttgart: Teubner. 1999, 227 p.
158. STEINEEGER, E e HANSEL, R. **Pharmakognosie**. 5 ed. Berlin: Springer, 1992.
159. WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie 2**. 5 ed. Berlin: Springer, 1992.
160. TISSERAND, R. e BALACS, T. **Essential oil safety**. A guide for health care professionals. 1995. New York: Churchill Livingstone.
161. SCHILCHER, H. Effects and side-effects of essential oils. In: SVENDEN, A B; SCHEFFER, J. J. C. (ed.). **Essential oils aromatic plants**. 1985 Dordrech: W. J. Publishers.
162. HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Traditional medicinal-plants of Thailand. 17 Biologically-active constituents of *Plumeria rubra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, n. 3: p. 289-92, 1991.
- 163 – ABE, F.; YAMAUCHI, T. 9 α -hidroxymedioresinol and 9 α -hidroxypinoresinol related lignans from *Allamanda nerifolia*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 354, 1986.
164. ANDERSON, J. E.; CHANG, C. J.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive components of *Allamanda schottii*. **J. Nat. Prod**, v. 51, n. 2, p.307-8, 1988.
166. ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, SIMÕES, C. M. O et al. 1999, p. 489-516.
167. PIETTA, P. G. Flavonoids e Antioxidants. **J. Nat. Prod**. v. 63, n.17, p. 1035-42, 2000.
168. HARBONE, J. B. e WILLIAMS, C. A. Review: Advances in flavonoids research since 1992. **Pyhochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
169. KUKLINSKI, C. **Farmacognosia: Estudio de las drogas y substancias medicamentosas de origen natural**. Barcelona, Ediciones Omega S.A., p. 515, 2000.
170. KUSTER, R. M. e ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, SIMÕES, C. M. O et al, 1999, p. 651-65.
171. EVANS, W. C. Trease and Evan's Pharmacognosy. 14 ed. London: WB Saunders, 1996.
172. HARDAM, J. G; LIMBIRD, L.E. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. New York: McGraw Hill, 1996.

173. HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen. Pharmacol.** v. 27, p. 713-22, 1996.
174. ROBBERS, J. E.; TYLER, V. E.; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosy & Pharmacobiotechnology.** New York: William & Wilkin, 1996.
175. VLIENTINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L. A. Plant derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Medic.**, v. 64, p. 97-109, 1998.
176. BHATTACHARYYA, J.; MORAIS, M. S. Q. 5,6-dimethoxy-7-hydroxycoumarin (unkalin) from *Allamanda blanchetti*, isolation and ¹³C-NMR characteristics. **J. Nat. Prod.**, v. 49, n.2, p. 354, 1986.
177. ABE, F. e YAMAUCHI, T. 9-hydroxymedioresinol and related lignans from *Allamanda neriifolia*. **Phytochemistry.** v. 27, n.2, p. 575-77, 1988.
178. BARBOSA FILHO, J. M. Lignanas, Neolignanas e seus análogos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** SIMÕES, C. M. O et al, 1999, p. 471- 88.
179. MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry.**, v. 23, n.6, p.1207-20, 1984.
180. AYRES, D. C.; LOIKE, J. D. **Lignans. Chemical, biological and clinical properties.** Cambridge: University of Cambridge. 1990, 402 p.
181. BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie. Plantes Médicinales.** 2 ed. Paris: Tec & Doc, 1993.
182. MANN, J. **Secondary metabolism.** 2 ed. Oxford: Clarendon, 1987.
183. SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin.** A textbook of pharmacognosy. Stockholm: Swedish Pharmaceutical, 1992.
184. III JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS / I ENCONTRO RACINE DE FITOTERAPIA E FITOCOSMÉTICO. Out. 1997, Campinas. Taninos e Lignanas: Características Químicas, Farmacológicas e de Manipulação. **RACINE** Qualificação e Assesoria S/C Ltda, p. 29.
185. RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Mol. Biol.**, v. 24, n.1, p. 1-20, 1994.
186. WINK, M. **Secondary products from plant tissue culture.** Oxford: Clarendon, 1990.
187. REITZ, R. P. **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí, SC, 1968, p. 36-39.
188. FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el Dioscórides renovado.** Barcelona, Labor. 1987, 1244 p.

189. CORREA JR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal, FUNEP. 1984, p. 35-43.
190. MORS, W. B., RIZZINI, C. T., PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brasil**. Michigan: Reference Publications, Inc. Agonac, 2000.
191. SHEN, Y. e CHEN, C. Allaneroside and bioactive iridoid glycosides from *Allamanda neriifolia*. **Journal of the Taiwan Pharamceutical Association.**, v. 38, p. 203-13, 1986.
192. GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopées Traditionnelles em Guyane: Créotes, Palikur, Wauãp, Paris**. Editorial 1 ORSTOM, Coll Men, 1987.
193. ARTHUR, H e HUI, W. H. Products from same plants of Hongkong. **Journal Chem. Soc.**, p. 2782, 1954.
194. GANAPATY, S.; RAO, D. V.; AKIHISA, T.; MATSUMOTO, T. Constituents of flowers of *Allamanda blanchetti*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 51, n.6, p. 256-58, 1989.
195. SUBRAMANIAN, S. S. e SWAMY, M. M. Flavonoids of the floewrs of *Guazuma tomentosa* and *Delonix data*. **Cur Sci**. v. 7, n.32, p. 308-10, 1963.
196. ADAM, G; KHOR, N. H.; BERGNER, C.; LIEN, N. T. Plant growth inhibiting propertie of plumieride from *Plumeria obtusifolia*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1399-400, 2000.
197. TROST, B.M.; BALKOWEC, J. M.; MAO, M.K.T. A total synthesis of plumericin, allamacin and allamandin. Biomimetic strategy. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 108, n. 16, p. 4974-83, 1986.
198. KADER-ABDEL, M.; WISSE, J.; EVANS, R.; WERFF, H; KINGSTON, D. G. I. Bioactive iridoids and new lignan from *Allamanda cathartica* and Himatanthus fallax from the Suriname Rainforest. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 1294-97, 1997.
199. ALEN, Y.; NAKAJIMA, S.; NITODA, T.; BABA, N.; KANZAKI, K. Antinematodal activity of some tropical rainforest plants against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Journal of Bioscience**, v. 55, n. 4. p. 295-99, 2000.
200. OTERO, R; NUNEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMENEZ, S.L; OSORIO, R.G., SALDARRIAGA, M.; DIAZ, A. Snakebites and ethobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagie effect of *Bothrppops atrox* Venon. **J. of Ethopharm**, v. 73, n.2, p. 233-41, 2000.
201. MORAES-SOUZA, M. A; CAVALCANTI, M. S. B.; MACIEL, G. M.; ARAÚJO, M.C.M.; MELLO, F. F. Isolamento e caracterização dos constituintes ativos de *Allamanda blanchetti*. **Rev. Inst. Antibiótico**, n. 20, p. 29-34, 1981.
202. RIZZINI, C. T. e MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: EPU (editora Pedagógica Universitária) /EDUSP-Editora da Universidade de São Paulo, 1976.

203. MEDINA, J. C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Instituto Agronômico de Campinas, 1959.
204. THOMSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: review and update on the role of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reviews of Infectious Diseases**, n. 12 (Suppl.), p. 218-22, 1990.
205. GOODSON, J. M. e TANNER, A. Antibiotic resistance of the subgingival microbiota following local tetracycline therapy. **Oral Microb. Immunol.**, n. 7, p. 113-17, 1992.
206. ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica.**, n. 64, p. 711-13, 1998.
207. HORÁKOVÁ, K. A comparison of the traditional method of counting viable cells and quick microplate method for monitoring the growth characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, n. 38, p. 181-84, 2004.
208. BAWER, A. D.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, S. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **AM. J. V. Pathol.** v. 45, p.493, 1966.
209. CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and animal experimental animal infection. In: **Lorian, V. Antibiotics in laboratory Medicine**. 3 ed., Baltimore: Williams and Wilkins. 1991, p. 739-89.
210. HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 137-44, 2000.
211. NCCLS. Performance Standards for aerobic antimicrobial susceptibility testing. NCCLS Document. M2-A7, M7-A5 and Supplemental Tables M-100-S10. January, 2000.
212. ZACCHINO, S. Estratégias para descobrir novos agentes antifúngicos. IN: **Plantas Medicinais sob a ótica da Moderna Química Medicinal**. Calixto, J. B; Yunes, R. A. (orgs)., 2003, p. 1-13.
213. MISTCHER, L.; LEU, R.; BATHALA, M.; WU, W. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**. n. 35, p. 155-62, 1972.
214. Li, E.; CLARK, A.; HUFFORD, C. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, major constituent of *Pseudolarix kampfieri*. **J. Nat. Prod.** 1995, n. 58, p. 57-67.
215. SELITRENNIKOF, C.P. Use of temperature sensitive, protoplast forming *Neurospora crassa strain* for detection of antifungal antibiotics. **Antimicrobial. Agentes Chemotherap.**, n. 26, p. 757-65, 1983.
216. FUKUDA, D.; NAKATSUKASA, W.; YAO, R. HUNT, A. **A complex of fungal cell wall inhibitors produced by a mold.** 1991, p. 211.
217. REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg**, n.27, p. 493-97, 1938.

218. STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Advanced Cell Culture**, v.1, p.67-90, 219, 1981.
219. TAKEUCHI, H.; BABAM.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**1991, v.33, p. 61-71.
220. SIDWELL, R. W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharm. Sci.** 1986, n. 27, p. 433-480.
221. FIELD H. Herpes simplex virus antiviral drug resistance: current trends and future prospects. **J. Clin. Virol**, n. 21, p. 261-69, 2001.
222. WHITLEY, Richard J; ROIZMAN, Bernard. Herpes simplex viruses infections. **The lancet**. v. 357, maio p.1513-18, 2001.
223. NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M., EKKENA, J.; RODRIGUES, B. D. G., OLIVEIRA, G. Aurapten, a coumarin whit growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, 37: 1847-52, 2004.
224. TOMA, H. K. Interação in vitro de cepas de *Trypanosoma cruzi* de parasitemia alta e subpatente in vivo com diferentes linhagens celulares. (**Dissertação de Mestrado**) 1994. Belo horizonte, UFMG, 75 p.
225. BRESCIANI, L. F., CECHINEL, FILHO, V.; YUNES, R. A. Comparation study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. **Natural Products Letters.**, v. 14, n. 4, p. 247-54, 1999
226. RUBISTEIN, I.; GOAD, L. J.; CLAGUE, A. D. H.; MULHEIRN, L. J. The 220 NMR spectra of phytosterols. **Phytochemistry**, v. 15, p.195-200, 1976.
227. PALERMO, J. A.; SELDES, A. M.; GROS, E. G. Free sterol of the re alga gigartina skottsbergii. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2688-89, 1984.
228. OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F. C. Produtos Naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.
229. SANTOS, R. S. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. IN: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C. et al (orgs) Porto Alegre-Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS ed. Da UFSC, p. 323-350, 1999.
230. NIERO, R. Isolamento e identificação de compostos do *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico: Correlação estrutura atividade. **Dissertação de Mestrado**. 1993, Florianópolis, UFSC, 99 p.
231. SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos metabólitos secundários.In: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. SIMÕES, C. et al.1999, p. 323-54.

232. RECIO, M. C. Structural requirements for the antiinflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta Med**, n. 61, 182-85, 1995.
233. LOWE, F. C.; KU, J. C. Phitotherapy in treatment of Benign Prostatic Hyperplasia : a critical review. **UROLOGY**, v. 48, n.1, p.12-20, 1996.
234. CHIALE, C. A.; CABRERA, J. L.; JULIANI, H. R. Kaempferol 3-(6`'-*cis*-cinnamoylglucoside) from *Solanum elaeagnifolium*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p.1042-43, 1991.
235. MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAZ, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer, 1970.
236. HARBONE, J. B.; MABRY, T. J. (eds.). **The flavonoids: advances in research**. New York: Chapman and Hall, 1982.
237. HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (eds.). **The flavonoids**. New York: Academic, 1975, v. 1 e 2.
238. CHIEN-CHANG, S.; YUAN-SHIUN CHANG; LI-KANG H. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7,-dihydroxyflavonoids. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 843-45, 1993.
239. ANDERSON, D.; DHAWAN, A.; YARDLEY-JONESA, A., FOANNIDES, C. WEEB, J. **Teratogenesis carcinogenesis and mutagenesis.**, n.21, p. 165-74, 2001.
240. MALLOZZI, M. A. B., CORREA, B.; HARAGUCHI, M.; NETTO, F.B. Effect of flavonoids on *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Revista de Microbiologia**, n.27, p. 61-65, 1996.
241. DA SILVA E. L.; PISKULA, M. K.; TERAJO J. **Free Radic. Biol. Med.**1998b, 24, p.1209.
242. DA SILVA E. L; PISKULA, M. K.; YAMAMOTO, N.; MOON, J. K. Terao J.**FEBS Lett.**, 1998c, 430. p. 405.
243. KUHN, H; BELKNER, J.; SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. J. **Lipid Res.**, 1994b, 35, p.1749.
244. KUHN, H; BELKNER, J.; WIESNER, R.; SCHEWE, T.; LANKIN, V. Z.; TIKHAZE, A. K. **Eicosanoids**, 1992, 5, p.17.
/
245. EZAKI, M.; WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. J. **Lipid Res.**, 1995, 36, p.1996.
246. DA SILVA, E. L; ABDALLA D.S.; TERAJO, J. **IUBMB Life**, 2000, 49, p.1.
247. BOVERIS, A. **Medicina** (B. Aires), 1998, 58, p.350.
248. ARTEEL, G. E.; SIES, H. **FEBS Letters**, 462, p.167.

249. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: **Farmacognosia: da planta ao Medicamento**. SIMÕES, C. et al (orgs) Porto Alegre - Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS ed. Da UFSC, p. 597-619, 1999.

250 – CARVALHO, J.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: **Farmacognosia: da planta ao Medicamento**. SIMÕES, C. et al (orgs) Porto Alegre- Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS ed. Da UFSC, p. 433-49, 1999.

251. FORMICA, J. V; REGELSON, W. **Fed. Chem. Toxic.** 33, p. 1061, 1995.

252. CHIALE, C. A; CABRERA, J. L; HULIANI, H. R. Kaempferol 3-(6`-cis-cinnamoylglucoside) from *Solanum elaeagnifolium*. **Phytochemistry**, v.30, n.3, p. 1042-43, 1991.

253. IZUMI, T., PISKULA, M. K., OSAWA, S., OBATA, A., TOBE, K., SAITO, M. Soy isoflavone aglicones are absorbed faster and higher amounts than their glucosides in humans. **J. Nutr.**, n. 13, p. 1695-99, 2000.

254. NAFTOLIN, F., GUADALUPE, S. M. Phytoestrogens : are they really estrogen mimics **Fertil Steril.**, n. 77, p. 15-17, 2002.

255. PATEL, R. P., BOERSMA, B.J., CRAWFORD, J.H., HOGG, N., KIRK, M., KALYANAMARAN, B. Antioxidant mechanism of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxil radical scavenging. **Free Radic Biol Med.** 31, p. 1570-81, 2002.

256. VICENT, A, FITZPATRICK, L.A. Soy isoflavones: are they useful in menopause? **Mayo Clinic Proc.**, 75: 1174-84, 2000.

257. LICHTENSTEIN, A. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. **J. Nutr**, v. 128, p. 1589-92, 1998.

258. ANDERSON, J. W., JOHNSTONE, B. M, COOK-NEWELL, 1995, n. 333, p.276-82.

259. ANTONY, M. S., CLAKSON, T. B., BULLOCK, B. C., WAGNER, J. D. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, n. 17, p.2524-31, 1997.

260. HO, S.C., CHAN, S.G., YI, Q., WONG, E., LEUNG, P. C. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese woman. **J. Bone Miner. Res**, n. 16, p.1363-60, 2001.

261. McMICHAEL-PHILLIPS, D. F., HARDING, C., MORTON, M. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 68, p. 1431-351, 1998.

262. HARGREAVES, D, F., POTTEN, C. S., HARDING, C, SHAW, L. E, MORTON, M., S., Two weeks dietary soy suplementatio has na estrogenic effect on normal pre-menopausal breast. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, n. 84, p. 4017-24, 1999.

263. ALEXANDERSEN, P, TOUSSAINT, A., CHRISTIANSEN, C., DEVOGELAER, J. P., ROUX, C. FECHTENBAUM, J. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **JAMA**, n. 285, p. 1482-88, 2001.
264. MOSKOWITZ, O. The emergence e efficacy of natural hormones in the tratement of menopause. **JAMA**, n. 3, p. 36-44, 2000.
265. MESSINA, M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am. J. Clin. Nut**, V. 70, p. 439S-450S, 1999.
266. KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstet Gynecol.**, n. 87, p. 897-904, 1996.
267. CRAVEIRO, A. A; MACHADO, M. I. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, v. 4, n. 23, p. 54-63, 1986.
268. BRUNETON, J. Huiles essentielles. Plantes Medicinales., 2 ed. Paris- TecDoc Lavoisier, 1995
269. EVANS, W. C. Volatile oils and resines. In Trease ande evans pharmacology. 14 .London WB Saunders, 1996 .
270. IIDA, T.; NAKANO, M.; ITO, K. Hydroperoxysesquiterpene and lignan constituents of *Magnolia kobus*. **Phytochemistry**. v. 21, n. 3, p. 673-75, 1982.
271. MIRANDA, R. P. New triterpenoids from *Salvia niscoolsoniana*. **J. of Nat Prod.**, v. 49, n. 2, p. 225-230, 1986.
272. SIMON, A; NAJID, A; CHULIA, A. J; DELAGE, C.; RIGAUD, M. Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). **Biochimica et Biophysica Acta- Lipids and Lipid Metabolism.**, v. 1125, p. 68-72, 1992.
273. LEE, K.H.; LIN, Y. M.; WU, T. S.; SHANG, D. C.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I.H.; CHANG, J. J.; WU, R. Y.; YANG, T. H., **Planta Med**, v, 54, p. 308, 1997.
274. REDDY, K. S.; AMONKAR, A.J.; McCLOUD, T.G.; CHANG, C.J.; CASSADY, J. M. **Phytochemistry**, v. 27, p. 378, 1998.
275. VASCONCELLOS, J. M; SILVA, A. M.; CAVALEIRO, J. A. S. "Chromones and flavonones from *Artemisia campestris* subsp. *Marítima*". **Phytochemistry**. v. 49, n. 5, p. 1471-73, 1998.
276. RADZAN, T. K; QUADRI, B.; HARKAR, S; WAIGHT, E. S. Chromones and coumarins from *Skimmia lauroleola*. **Phytochemistry**. v. 26, n.7, p. 2063-69, 1987.
277. KIM, E; JWON, K; BYUNG, C; SEO, E; LEE, Y; KIM, J.; PARK, J. Scopoletin induces apoptosis in human promyelo leukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor KB and caspase-3. **Life Sciences**, n. 77 (7), p. 824-836, 2005.

278. MA, J; SHANNON, H; JOUES, S; HECHT, M. A coumarin from *Mallotus resinous* that mediates DNA cleavage. **J. Nat. Prod.** v. 67, n. 9, p.1614-16, 2004.
279. RIVIERO CRUZ, J. F.; LEZUTEKANG, R.; LOBO, T.; ITO, A.; MI, O. Citotoxic constituents of the twigs of *Simarouba glaca* collected from a plot in South Florida. **Phytotherapy Research**, v.19, n. 2, p. 136-40, 2005.
280. AWAAD, A.S; SOLIMAN, G. A. Essential oil, coumarins, and flavonoids of *Casimira edulis* leaves growing in Egypt and their biological activities. **Biomedical Sciences**, n.15, p. 42-58, 2005.
281. CAMPINELLA, M.C; FERRAYOLLI, G; PALACIOS, S. M. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hidroxicoumarin isolated of *Melia azedarach*, L. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, n.8, p. 2922-27, 2005.
282. ROLLINGER, T. M; HORNICK, A; LANGER, T; STUPPER, H; PRAST, H. J. Acetylcholinesterase inhibitory activity scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. **Med. Chem**, v. 47, n. 25, p. 6248-54, 2004.
283. ROBBERS, J. E; TYLER, V. E; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosy and Pharamacobiotechnology**. New Yok: Willian & Wilkim, 1996.
284. SUN, J.; XU, B.; ZHANG, W.; SHOU, D. Study on antiasthmatic and diuretic components of *Morus alba*. **Zongguo Zhongyao Zazhi.**, n.27, v. 5, 366-67, 2002
285. KHALIFA, A. .A. Non alkaloidal constituents from *Crinum bulbispermum* bulbs. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n.1, p.41-45, 2001
286. ABREU, H.S; OERTEL, A.C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Revista Cern.**, v.5, n.1, p.52-60, 1999.
287. DEMANT DEMANT, R.A.; PARDINI, V.L. VIERTLER, H. Oxidação eletroquímica de 2-arilóxi-1-(3,4,5- trimetoxifenil)- etanonas e álcoois correspondentes. **Resumos**. 2002, n.23, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
288. DENDOBRIUM, S.W; LIN, P. B.; Xu, H.; WANG, Z.; XU, L. Advances in studies on pharmacology of plants. **Zhongcaoyao**, v. 34, n.11, 19-22, 2003.
289. MOHAMED, T. K. Chemical constituents and antioxidant activity of Citrus paradise (star-ruby red grapefruit) and Citrus sinensis (blood sweet orange). **Asian journal of Chemistry** v.16, n.3-4, 1753-64, 2004.
290. JANG, S. I; KIM, Y-J; LEE, W.Y; KWAK, K.C; BAEK, S. H; KWAK, G. B; YUN, Y. G. Effects of scoparone on the Cox 1 and Cox 2. **Archives of Pharamacol Research**. v. 28, n. 2, 203-08, 2005.
291. SIMONSEN, H. T; ADSERSEN, A , BREMNER, P; HEINRICH. M. Antifungal constituents of *Melicape borbonica*. **Phytotherapy Research**, v. 18, v.7, p. 542-45, v. 31, n. 4, p. 244-46, 2004.

- 292 – MARTIN-ARAGÓN, S; BENEDÍ, J; VILLAR, A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. *Phytother. Res*, v. 10, p. 75-78, 1996.
293. RAKOARISON, O; ROBENAU, I. Vaso relaxants from chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. **European Journal of Pharmacology**. 1991, v. 198, n. 2-3, p. 211-13, 2002.
294. HOULT, J. R., S., PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen. Pharmacol**, n. 27, p.713-22, 1996.
295. LI, Z; LU, G; TENG, Z; YU, P. Effects of scoparone on the content of IL-4 and IFN- γ in asthmatic guinea pigs. **Zhongguo Yalixue Tongbao**, v.19, n.6, p. 653-55, 2003.
296. WEITZMAN, I ; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clon. Microbiol Ver**, v. 8, n. 2, p. 240-53, 1999.
297. SIDRIM, J. J. C ; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**, Editora Guanabara Koogan , RJ. 1999, p. 118-131.
298. SCHOLZ, R ; MEINHOLF, W. Susceptibility of *Trichophyton rubrum* to gliseofulvin. **Mycoses**, v. 34, p.411-14,1991.
299. MIMS, C. A; PLAYFAIR, J. H.; ROITT, I. M; WAKELIN, D; WILLIAMS, R. *Microbiologia Médica*, 1 ed., Editora Manole, Ltda, SP., p. A.11-12, 1995.
300. HAMMOND, J. A; FIELDING, D; BISHOP, S. C. Prospects for plant antihelmintics in tropical veterinary medicine, 21: (3), abril 1997. **Preventive Veterinary Medicine**. 21: (3), abril 1997, p. 213-28. Disponível em Home page <: www.sciencedirect.com/science.> Acesso em: 22 de fevereiro de 2002.
- 301 – BURGER, R. A; WARREN, R; LAWSON, L. D. Enhancement of *in vitro* human immune function by *Allium sativum* fractions. **J. Pharmacogn**, v. 31, n. 3, p. 169-74, 1993.
302. BIANCHINI, I; GOMES, A; FEIJÓ, G. L.D. Eficiência do pó de alho (*Allium sativum* L.) no controle dos parasitos de bovinos. Campo grande. EMBRAPA-CNPGC, : **Comunicado técnico**, 45, 1999, p. 31.
303. OLIVEIRA, D. B. DE; BRAGA, M.M; GARCIA, M.A. L. Avaliação da atividade anti-helmíntica da bananeira (*Musa* sp) em bovinos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AGROPECUÁRIA ECOLÓGICA E SAÚDE HUMANA, 2000, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro-UFF, 2000. disponível em disquete
304. BATISTA, L. M. Atividade anti-helmíntica de *Sogelia anthelmia* e *Momordica charantia*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 11. Salvador. 1999. **Anais...**1999. Salvador: UFBA, 1999, p. 155-56.
305. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**, Editora Sulina, Porto Alegre. 1987, p 332 – 334.

306. SURUMAY Q. **Parasitismo en Especies Avícolas**, FONAIAP-CENIAP, Venezuela. 1993, n.42, enero-junio.
307. ESQUIVEL-HERRERA. Estudio preliminar de la dinámica de poblaciones del piojo de aves *Menopon gallinae*(Mallophaga: Menoponidae) en una granja avícola del Valle Central de Costa Rica, Organización for Tropical Studies, Biblioteca OET:A, disponible no site: www.ots.ac.cr acesso em 20/04/2005.
308. BRENER, Z. GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chaga's disease. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v, 114, p. 103-110, 1997.
309. MAZELOFI, J. VIEIRA, P. C; FRENANDEZ, J. B; DA SILVA, M. F. G. F; ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacology**, n. 73, p. 335- 40, 2000.
310. BERGER, I; BARRIENTOS, A. C; CÁCERES, A; HERNANDEZ, M; RASTRELLI, L; PASSREITER, C. M; KUBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacology**, n. 62, p. 107-115, 1998.
311. SCHINELLA, G. R; TOURNER, H. A; PRIETO, J. M; RIOS, J. L; BUSCHIAZZO, H; ZAINDERBERG, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extract. **Fitoterapia.**, n. 73, p. 569-75, 2002.
312. KIRCHOLF, L. V. Chagas disease: American trypanosomiasis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** n. 7, p. 487-502, 1993.
313. ANDRADE, A. L. S; ZICKER, F. Should benznidazole be used in chronic Chagas disease? **Lancet**, n. 349, p. 653, 1997.

