

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**“INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Cordia curassavica*
(JACQ.) ROEM. & SCHULT MONITORADA PELO ENSAIO
DE LETALIDADE PARA LARVAS *DE Artemia salina*”**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam de
Barcellos Falkenberg

GIANA THAÍS KAUFMANN

FLORIANÓPOLIS

2002

Aos meus pais,
pelo apoio, paciência,
compreensão, amor,
vida.

Depois de um tempo você aprende a diferença entre dar a mão e acorrentar a alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprender a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

(...) E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas não se importam. E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa; ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida. E que bons amigos são a família que nos permitem escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam; percebe que seu melhor amigo e você podem fazer alguma coisa, ou nada, e ter bons momentos juntos.

(...) Começa a aprender que não deve se comparar com os outros, mas com o melhor que você pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que se quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo; mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter responsabilidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

(...) Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais de seus pais em você do que você supunha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens; poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame não significa que esse alguém não o ama com tudo que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém; algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido; o mundo não para que você conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida.

Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.

William Shakespeare

Agradecimentos

Praticamente impossível citar todas as pessoas que contribuíram para realização deste trabalho. Tive a sorte de encontrar MUITOS anjos nesta caminhada. Porém, é imprescindível a citação de alguns deles:

Minha orientadora Miriam de Barcellos Falkenberg, pela confiança, paciência, amizade e dedicação;

Meus pais, Ivo e Marisa Kaufmann, minhas irmãs e cunhado, pela paciência, incentivo, apoio e por todo amor.

Minha orientadora de Iniciação Científica Tomoe Nakashima, pelo incentivo, carinho e confiança;

Marcos José Machado pelo incentivo e compreensão

Cristiano Mora, amigo e companheiro, pela paciência, incentivo, dedicação, amor e muito apoio;

Rochelle Piske, grande amiga e irmã de coração, por seu apoio e amizade de todas as horas;

Ana Paula Dores Ramos, Ricardo Andrade, Welington, Rodolfo, grandes amigos, por todo apoio e amizade.

Alessandra Borges, Teca, Patrícia, pela amizade, apoio e filosofias essenciais;

Solange, aliás, super Solange, pelo apoio no laboratório

Professores do programa, pelos conhecimentos compartilhados

Rogério Prioste e Décio Gomes de Oliveira, diretor e coordenador do curso de Farmácia da UNOESTE, pela confiança e apoio.

E todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente na concretização deste trabalho.

A TODOS

:

MUITO OBRIGADA!!!

Giana Thaís Kaufmann

SUMÁRIO

Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de figuras.....	xv
1.Introdução.....	17
1.1. Família BORAGINACEAE - Gênero <i>Cordia</i>	19
1.2. <i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.....	21
1.3. Bioensaio utilizando larvas de <i>Artemia salina</i>	25
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Materiais.....	28
3.1.1. Material vegetal.....	28
3.1.1.1. Escolha do local de coleta e teste de viabilidade de utilização de folhas danificadas.....	28
3.1.1.2. Testes para escolha do sistema extrativo e produção dos extratos para fracionamento.....	28
3.1.2. Bioensaio de letalidade as larvas de <i>Artemia salina</i>	28
3.1.3. Equipamentos utilizados.....	28
3.1.4 Solventes e reagentes.....	29
3.2. Metodologia.....	30
3.2.1. Bioensaio de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i>	30
3.2.1.1. Obtenção das larvas.....	30
3.2.1.2. Preparação das diluições seriadas dos extratos, frações e compostos.....	30
3.2.1.3. Incubação das larvas com o material.....	30
3.2.1.4. Contagem das larvas.....	31
3.2.1.5. Análise estatística dos resultados.....	31

3.2.2. Escolha do local de coleta e teste de viabilidade de utilização de folhas danificadas.....	31
3.2.3. Testes para escolha do sistema extrativo.....	32
3.2.4. Preparação dos Extratos para Análise Fitoquímica.....	33
3.2.5. Fracionamento dos extratos brutos – Colunas A.....	33
3.2.6. Colunas B.....	34
3.2.7. Coluna 1°Sx.....	34
3.2.8 Coluna C.....	35
3.2.9. Testes de impregnação da sílica com nitrato de prata.....	36
3.2.9.1. Placas prontas com base de alumínio.....	36
3.2.9.2. Sílica para placas preparadas no laboratório.....	36
3.2.9.2.1 Método de LAM <i>et al.</i> (1985).....	37
3.2.9.2.2. Método segundo MAREK (1994).....	37
3.2.9.2.3. Método de GUPTA e DEV (1963).....	38
3.2.9.2.4. Método de TOUCHSTONE <i>et al.</i> (1992).....	38
3.2.9.2.5. 1:20 e 1:50 (m/m) de AgNO ₃	38
3.2.9.2.6. 1:20 e 1:10 (m/m) de AgNO ₃	39
3.2.10. Escolha do sistema cromatográfico.....	39
3.2.11. Testes de recuperação do composto utilizando cafeína.....	39
3.2.12. Teste de recuperação e purificação do composto utilizando colesterol.....	39
3.2.13. CCDPAs das frações 1°Sx5 e reunião das frações C5-12: Processo Cromatográfico.....	40
3.2.14. CCDP das frações TPAg I e III.....	41
3.2.15. Extração do óleo essencial de <i>Cordia curassavica</i>	41
4. Resultados e Discussão.....	42
4.1. Escolha do local de coleta e teste de viabilidade de utilização de folhas danificadas.....	42
4.2. Testes para escolha do sistema extrativo.....	43
4.2.1. Avaliação dos extratos por CCD.....	43
4.2.2. Avaliação dos extratos obtidos com o teste de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i>	43
4.3. Obtenção dos Extratos.....	45

4.4. Colunas A.....	46
4.4.1. Resultados da avaliação de letalidade para as larvas de <i>Artemia salina</i> das frações das colunas A.....	46
4.4.2. Avaliação por CCD das frações da coluna A.....	47
4.5. Colunas B.....	47
4.5.1. Resultados das CCD das colunas B.....	47
4.5.2. Avaliação de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> das frações das colunas B.....	48
4.6. Coluna de Sephadex (Sx).....	48
4.6.1. CCD das frações da coluna Sx.....	49
4.6.2. Bioensaio de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> com frações da coluna Sx.....	49
4.7. Coluna C.....	49
4.7.1. CCD das frações da coluna C.....	49
4.7.2. Teste de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> das frações coluna C.....	50
4.8. Testes de impregnação da sílica com nitrato de prata em placas prontas.....	50
4.9. Impregnação de Sílica para produção de placas de CCD Preparativa.....	51
4.10. Escolha do sistema cromatográfico.....	52
4.11. Testes de recuperação da amostra após CCDP utilizando cafeína.....	52
4.12. Teste de recuperação e purificação do composto utilizando colesterol.....	53
4.13. CCDPAGs das frações 1°Sx5 e fração C5-12.....	53
4.14 CCD analítica das frações PAg.....	53
4.15. CCDP das frações TPAg II e III – Obtenção de Cc1 e Cc2.....	54
4.15.1. Fração TPAg II – Obtenção de Cc1.....	54
4.15.2. Fração TPAg III – Obtenção de Cc2.....	55
4.16. Teste de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> com Cc1 e Cc2.....	55
4.17. Extração do óleo essencial de <i>Cordia curassavica</i>	55

4.18. Elucidação estrutural de Cc1.....	56
5. Conclusões.....	90
6. Refrências Bibliográficas.....	91

Resumo

Cordia curassavica (Jacq.) Roem. & Schult (erva-baleeira) é uma espécie característica da restinga litorânea, onde se emprega o extrato alcoólico das partes aéreas desta planta para uso externo contra reumatismo. O objetivo deste trabalho foi isolar substância(s) ativa(s) de *Cordia curassavica*, monitorando-se as frações pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*. Foram testados extratos preparados com vários solventes e plantas de várias procedências, optando-se por investigar o extrato éter de petróleo (EP) de material coletado na Praia do Campeche (Florianópolis – SC). O extrato EP foi fracionado por cromatografia em coluna sobre gel de sílica (CCSi) ou Sephadex LH-20 (CSLH20), além de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) sobre gel de sílica impregnada com AgNO₃. Para esta última foram testadas diversas metodologias. As frações obtidas de cada procedimento cromatográfico foram analisadas por CCD utilizando vanilina sulfúrica como revelador cromatográfico e avaliadas quanto à letalidade para larvas de *Artemia salina*, utilizando-se a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) e análise estatística pelo teste de Qui-quadrado, com a correção de Yates (tabela 2x2). A seqüência do fracionamento e isolamento foi feita com as frações que apresentaram índice de letalidade mais alto. Foi isolada uma substância (1,7 mg) nomeada Cc1, que apresentou 87% de letalidade na concentração de 3 µg/mL ($\chi^2 = 14,94$, $\alpha = 0,01$). A elucidação estrutural foi obtida pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) em CDCl₃ (500 MHz): ¹³C-RMN, DEPT, H-RMN, COSY, HMQC e HMBC, bem como pela comparação com dados de H-RMN da literatura. A estrutura para Cc1 proposta foi do álcool sesquiterpênico 2,3-di-hidrofarnesol, sendo esse o primeiro relato da presença deste composto no gênero *Cordia*.

Palavras-chave: *Cordia curassavica*, *Artemia salina*, nitrato de prata

Abstract

Cordia curassavica (Jacq.) Roem. & Schult (“erva-baleeira”) grows as a shrub in the marine coasts from Santa Catarina (Brazil) until Central America. The alcoholic extract of this plant is employed topically against rheumatic diseases. The object of this project was the fractionation of *Cordia curassavica*'s extract bioguided with the brine shrimp assay in order to isolate potentially active compounds. The preliminary tests were made with extracts of plant material from different origins and in many solvents. The petrol extract of leaves collected at Campeche's Beach (Florianopolis, SC) was elected to the phytochemical investigation. The concentrated extract was chromatographed on columns with silica (CCSi) or Sephadex LH-20 (CSLH20) besides preparative thin layer chromatography; in this way different methods of silica impregnation with silver nitrate were tested. The obtained fractions were analysed by TLC and brine shrimp assay. The isolation process followed with the most active fractions. The active compound (Cc1) isolated (1,7 mg) was identified through NMR spectra in CDCl₃ 500 MHz (¹³C-RMN, DEPT, H-RMN, COSY, HMQC and HMBC) and comparison with literature data as being the sesquiterpenic alcohol 2,3-dihydrofarnesol. This substance showed a lethality index of 87% at the concentration of 3 µg/mL ($\chi^2 = 14,94$, $\alpha = 0,01$) and it was reported by the first time in the genus *Cordia*.

Key words: *Cordia curassavica*, *Artemia salina*, dihydrofarnesol

Lista de Abreviaturas

- AcOEt – acetato de etila
- AgNO₃ – nitrato de prata
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa
- CCDPAg - cromatografia em camada delgada preparativa com sílica impregnada com nitrato de prata
- CCl₄ – tetracloreto de carbono
- CDCl₃ – clorofórmio deuterado
- CHCl₃ – clorofórmio
- COSY – correlation spectroscopy
- DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer
- DHF - dihidrofarnesol
- EP – éter de petróleo
- EtOH – etanol
- FativSx – fração ativa proveniente da coluna de Sephadex
- Fração 1°A 1 – fração 1 da **primeira** coluna A realizada
- Fração 1°B 1 - fração 1 da **primeira** coluna B realizada
- Fração C1 – fração 1 da coluna C
- Fração Pag – fração da CCDPAg
- Fração Sx1 – fração 1 proveniente da coluna com Sephadex
- HF – Horto Florestal
- HMBC – heteronuclear multiple-bond correlation
- HMQC – heteronuclear multiple-quantum correlation
- MeOH – metanol]
- n-Hx – n-hexano
- PC – Praia do Campeche
- PF – Praia da Ferrugem
- RMN – ressonância magnética nuclear

- RMNP - ressonância magnética nuclear protônica
- TPAg II – reunião das frações II provenientes das CCDPAg
- TPAgIII - reunião das frações III proveniente das CCDPAg

Lista de Tabelas

Tabela 1. Especificações dos parâmetros utilizados para as colunas A	33
Tabela 2. Especificação dos parâmetros utilizados para as colunas B.....	35
Tabela 3. Resultados de rendimento e letalidade para <i>Artemia salina</i> com extratos obtidos de folhas sadias e danificadas de diferentes locais de coleta.....	42
Tabela 4. Extratos que apresentaram letalidade significativa para larvas de <i>Artemia salina</i>	44
Tabela 5. Frações obtidas das colunas A com letalidade significativa para larvas de <i>Artemia salina</i>	46
Tabela 6. Síntese dos resultados obtidos com as frações das colunas B.....	48
Tabela 7. Tipo de C atribuído a cada sinal do espectro de ¹³ C-RMN de Cc1 a partir das técnicas de DEPT 135 e DEPT 90.....	57
Tabela 8. Sinais de deslocamentos químicos dos H relacionados aos C que estão diretamente acoplados de acordo com os espectros obtidos da técnica de HMQC.....	69
Tabela 9. Deslocamentos químicos típicos para C e H (Silverstein, 1994).....	70
Tabela 10. Correlações entre os grupos de prótons a partir dos espectros obtidos pela técnica de COSY.....	74
Tabela 11. Acoplamentos entre grupos de H e C a distância a partir dos espectros obtidos da técnica de HMBC.....	78
Tabela 12. Comparação dos dados de RMNP de Cc1 e do di-hidrofarnesol da literatura.....	84

Lista de Figuras

Figura 1. Foto de <i>Cordia curassavica</i> destacando as inflorescências em espiga.....	22
Figura 2. Foto de <i>Cordia curassavica</i> . destacando a superfície folhar.....	23
Figura 3. Cromatograma dos extratos clorofórmio obtidos por maceração em diferentes sistemas extrativos.....	44
Figura 4. Esquema dos procedimentos utilizados no isolamento de Cc1.....	45
Figura 5. CCD das frações obtidas da coluna 3° A.....	47
Figura 6. CCD das frações da coluna 1°B.....	48
Figura 7. CCD das frações obtidas da coluna C.....	50
Figura 8. Detalhe do espectro ¹³ C-RMN de Cc1 (região entre 123,5 e 137,5 ppm)..	58
Figura 9. Detalhe do espectro ¹³ C-RMN de Cc1 (região entre 13 e 41 ppm) com as setas apontando para os sinais descartados pela baixa intensidade.....	58
Figura 10. a) Aspecto geral do espectro de ¹³ C-RMN de Cc1 em CDCl ₃ ; b) Espectro de ¹³ C-RMN obtido pela técnica DEPT 135; c) Espectro de ¹³ C-RMN obtido pela técnica DEPT 90.....	59
Figura 11. a) Espectro de ¹³ C-RMN obtido pela técnica DEPT 135. b) Espectro de ¹³ C-RMN obtido pela técnica DEPT 90.....	60
Figura 12. Espectro de RMNP geral de Cc1 obtido em CDCl ₃ e aparelho de 500 MHz.....	63
Figura 13. Espectro de RMNP de Cc1 obtido em CDCl ₃ e aparelho de 500 Mhz. (região entre 0,6 2,4 ppm).....	64
Figura 14. Detalhe ampliado do espectro de RMNP de Cc1 em CDCl ₃ (500 MHz). (região entre 1,89 e 2,21 ppm).....	65
Figura 15. Detalhe ampliado do espectro de RMNP de Cc1 em CDCl ₃ (500 MHz). (região entre 3,6 e 5,2 ppm).....	66
Figura 16. Espectro bidimensional de RMN de HMQC de Cc1, assinalando as correlações para os carbonos e prótons olefínicos e a função álcool.....	67
Figura 17. Detalhe do espectro bidimensional de RMN de HMQC de Cc1, assinalando as correlações para os carbonos e prótons alquílicos em campo mais alto (região entre 14 e 43 ppm).....	68

Figura 18. Espectro bidimensional de RMN protônica de Cc1, obtido pela técnica de HH-COSY.....	71
Figura 19. Detalhe ampliado do espectro bidimensional de RMN protônica de Cc1, pela técnica de HH-(região entre 0,8 e 2,4 ppm).....	72
Figura 20. Detalhe ampliado do espectro bidimensional de RMN protônica de Cc1, obtido pela técnica de HH-COSY (região entre 5,0 e 5,2 ppm).....	73
Figura 21. Espectro idimensional de ¹³ C-RMN x RMNP de Cc1, obtido pela técnica de HMBC.....	75
Figura 22. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ¹³ C-RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 0,08 a 2,15 ppm x 108 a 138 ppm).....	76
Figura 23. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ¹³ C-RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 0,08 a 2,15 ppm x 16 a 64 ppm).....	76
Figura 24. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ¹³ C-RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 0,825 a 0,960 ppm x 28 a 41,5 ppm).....	77
Figura 25. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ¹³ C-RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 1,54 a 2,14 ppm x 38 a 41 ppm).....	77
Figura 26. Estruturas parciais 1 e 2 propostas para Cc1.....	79
Figura 27. estrutura parcial 3 de Cc1, formada a partir dos fragmentos 1 e 2.....	80
Figura 28. Fragmento 4 proposto como estrutura parcial de Cc1, contendo o grupamento funcional álcool.....	80
Figura 29. Estrutura proposta para Cc1.....	81
Figura 30. Estruturas do di-hidrofarnesol comparando dados de RMNP de Cc1 e da literatura.....	85
Figura 31. Comparação do espectro DEPT 135 do citrionelol (PAVIA et al., 1996) e estrutura proposta para Cc1.....	86
Figura 32. Comparação do espectro HH COSY do citrionelol (PAVIA et al., 1996) e estrutura proposta para Cc1.....	87

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no combate a estados patológicos data de milênios. Desde a existência da vida na Terra houve enfermidades e a tentativa de cura, mesmo que inconscientemente. Se considerarmos que os animais silvestres são capazes de distinguir as plantas em espécies alimentares e espécies tóxicas e que em relação a isto raramente se enganam, a observação do comportamento desses animais e o estudo das espécies consumidas representaram e podem representar uma importante fonte de informação sobre o potencial terapêutico dos vegetais (FOYE *et al.*, 1995).

Uma lenda chinesa muito antiga (aproximadamente 4 séculos a.C.) sobre a descoberta de *Radix notoginseng* pode retratar um pouco disso. Havia um agricultor que há tempos tentava matar uma cobra, a qual se alimentava sempre de um arbusto e, no dia seguinte, parecia estar totalmente recuperada dos golpes sofridos. Um dia, o filho do agricultor chegou gravemente ferido da guerra com os mongóis e o senhor deu-lhe para beber uma xícara com o chá daquela planta que a cobra costumava comer. No dia seguinte, o filho do agricultor estava curado. Pai e filho levaram a erva milagrosa aos soldados do Imperador, que também se recuperaram rapidamente dos ferimentos. Assim, os chineses expulsaram os mongóis e o senhor e seu filho foram recompensados com mil moedas de ouro. Este episódio teria iniciado o uso de *Radix notoginseng* na China como cicatrizante e hemostático (BATSARIS, 1995).

A fitoterapia é amplamente utilizada na China. Em um livro muito conhecido chamado Matéria Médica do Marido Divino (*SHEN NONG BEN CAO JING*) são descritas 364 preparações usadas medicinalmente, destas, 252 do reino vegetal, 67 do reino animal e 45 do reino mineral. Todas são avaliadas quanto as suas propriedades medicinais, dose, efeito, indicações e forma de preparação. É um dos primeiros livros médicos conhecidos no mundo. O material foi compilado por médicos e não há referência à origem do material e nem quem coordenou o trabalho. Sabe-se apenas que ele foi compilado em torno de 100 a.C., sendo depois revisto por *Tao Hong Jin* (452-536 d.C.), médico das dinastias do Sul e do Norte (BATSARIS, 1995).

Assim como na China, o uso das plantas no resto do mundo vem desde a origem do ser humano. Não apenas os índios, ou aborígenes de terras distantes, mas também nós e nossos antecessores utilizamos/utilizam alguma espécie vegetal na tentativa de cura de alguma doença específica. A medicina popular, tanto antiga como moderna, tem sido fonte de muitas das terapias utilizadas atualmente. Alguns dos produtos obtidos a partir de plantas, atualmente utilizados na sua forma natural ou como derivados, foram descobertos a partir destas informações.

Talvez o primeiro uso medicinal descrito de uma planta foi da erva chamada “Ma Huang”, uma espécie de *Ephedra* usada na China há mais de 5000 anos. O principal constituinte desta planta é a efedrina, que tem sido utilizado com sucesso no tratamento de bronquite asmática, febre do feno e outras condições alérgicas. Esta substância foi isolada em 1887 e foi introduzida na medicina ocidental em torno de 1925 por K.K.Chen da Companhia Eli Lilly. Atualmente, a principal aplicação da efedrina, assim como de outros alcalóides da *Ephedra*, é em antitussígenos e descongestionantes orais utilizados em resfriados comuns (FOYE *et al.*, 1995).

Outra substância que ainda tem muita utilização nos dias atuais é a morfina, extraída a partir do ópio (látex seco dos frutos de *Papaver somniferum*, a papoula). Ela é um potente analgésico, utilizado em dor intensas, largamente empregado em pacientes em estágio terminal de câncer. Os antigos egípcios eram grandes conhecedores das propriedades de “produzir sono” do ópio. Sydenham, um notável médico do século XVII e fundador do método clínico, declarou que “Without opium I would not care to practice medicine” (FOYE *et al.*, 1995).

O primeiro antimalárico conhecido, a quinina, foi também advindo do uso popular de plantas. O uso de quinina na Europa começou no século XVII, após os Incas do Peru informarem aos jesuítas espanhóis sobre as propriedades antimaláricas das cascas de uma árvore das montanhas, a qual eles chamavam de quinquina. A casca, quando preparada em solução aquosa, era capaz de curar a maioria das formas de malária. A planta foi listada na *London Pharmacopoeia* de 1677. Um de seus alcalóides, a quinina, foi isolado em 1820, sendo esta uma substância bastante amarga, que tem sido utilizada desde então por milhões de pessoas que sofrem com a malária. Mais recentemente, ela tem sido utilizada no combate a cepas de *P. falciparum* cloroquina-resistentes (FOYE *et al.*, 1995).

Além destas substâncias, pode-se citar inúmeras outras, como o taxol, obtido das cascas de *Taxus brevifolia* e a camptotecina das cascas de *Camptotheca acuminata*, da qual são obtidos derivados semi-sintéticos, utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer (HELDT, 1997).

Estes são apenas alguns exemplos de uma vasta lista de medicamentos empregados atualmente e que foram descobertos a partir de plantas.

1.1. Família BORAGINACEAE - Gênero *Cordia*

A família Boraginaceae é conhecida taxonomicamente pela presença de naftoquinonas e benzoquinonas (FALKENBERG, 2001), possivelmente comandada pela expressão gênica que dá origem às enzimas necessárias ao processo de biossíntese de tais substâncias. Esta família possui cerca de 100 gêneros e 2000 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais, sendo que o gênero *Cordia* L. é o melhor representado no Brasil (AKISUE *et al.*, 1983).

A partir das sementes de *Cordia obliqua* já foram isolados α -amirina, betulina, actacosanol, lupeol-3-ramnosídeo, β -sitosterol, β -sitosterol-3-glucosídeo, hentricontanol, hentriacontano, taxifolina-3, 5-diramnosídeo e hesperetina-7-ramnosídeo (AGNIHOTRI *et al.*, 1997).

Das folhas de *Cordia alliodora*, uma árvore tropical que exala pronunciado cheiro de alho (PIO CORRÊA, 1986), foram isolados, dentre outros compostos, seis triterpenóides repelentes de formigas (CHEN *et al.*, 1983).

Em *Cordia eucalyculata* Vell., foi determinada a presença de alantoína no extrato etanólico e tritriacontano a partir do extrato hexânico (SAITO *et al.*, 1985). Dentre outras substâncias, cinco compostos derivados da geranil-hidroquinona foram isolados da *Cordia elaeagnoides* (MANNERS, 1983).

Cordia spinescens é arbusto nativo de bosques úmidos do Oeste e Sul do México até Venezuela e Peru. Infusões das raízes e folhas desta planta são utilizadas pelos índios do Noroeste da Venezuela no combate à febre e dores de cabeça (MORTON, 1981). As cascas do caule pulverizadas são também utilizadas como cicatrizante. A partir do extrato metanólico de suas folhas, NAKAMURA e

colaboradores (1997) isolaram dois triterpenos do tipo damarano. O extrato aquoso das folhas deste arbusto demonstrou ser um potente inibidor da transcriptase reversa do HIV (LIM *et al.*, 1997).

Extratos de *Cordia salicifolia* foram avaliados em relação ao vírus herpes simplex tipo I. Foi testado o extrato parcialmente purificado a partir do extrato etanólico das folhas e ramos, o qual demonstrou potente atividade anti-herpética *in vitro* (HAYASHI *et al.*, 1990).

Um arbusto largamente distribuído na América Central e do Sul é a *Cordia linnaei*. O decocto das suas folhas é usado na Costa Rica para o tratamento de febres e problemas hepáticos. A partir do extrato diclorometano das raízes do arbusto foram isoladas três naftoquinonas meroterpenóides inéditas e uma naftoquinona meroterpenóide já conhecida (Cordiaquinona B). As atividades das naftoquinonas contra *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans* foram similares às aquelas apresentadas pela nistatina (IOSET *et al.*, 1997).

Quatro naftoquinonas meroterpenóides foram isoladas das raízes de *Cordia corymbosa*, popularmente conhecida como “Maria-Preta”. As cordiaquinonas A e B têm esqueleto atípico para o gênero *Cordia*, pois possuem 21 átomos de carbono e a parte terpenóide de ambas é rearranjada, sendo que as cordiaquinonas C e D têm esqueletos sesquiterpenóides não rearranjados, os quais podem ser considerados os precursores biogenéticos dos análogos A e B (BIEBER *et al.*, 1990). Cordiaquinonas A e B foram testadas para atividade antimicrobiana, citotóxica e inibição tumoral, sendo que apenas fungos fitopatogênicos foram inibidos por tais substâncias. Ambas substâncias exibiram atividade citotóxica contra células KB, e cordiaquinona B foi cerca de 10 vezes mais potente que a A. Entretanto, em testes antitumorais *in vivo*, usando sarcoma 180 e carcinoma sólido de Ehrlich em ratos foi constatado efeito inibitório apenas para A, mas a concentrações muito próximas daquela que provocou toxicidade aguda. Cordiaquinonas A e B provavelmente não são compostos interessantes para posterior *screening* anticancer, mas evidentemente outros análogos naturais ou sintéticos podem apresentar maiores razões de inibição ou menor toxicidade (DA SILVA FILHO *et al.*, 1993).

1.2. *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult

A *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult é um arbusto, medindo até 2,5 m de altura por 10 cm de diâmetro na base, provido de muitos ramos. Os ramos menores podem ser glabros, pulverulentos ou pubescentes. Possuem coloração pardo-amarronzada e são providos de lenticelas pequenas de 1 mm de comprimento, aproximadamente, possuidoras de forma circular com pequena depressão central. Pequenas cicatrizes salientes, lembrando acúleos, podem ser observadas em caules finos. As folhas são sésseis ou subsésseis de forma lanceolada e oblongolanceolada, providas de ápice agudo e base atenuada. A margem das folhas é denteada e a sua superfície é verde-escura e áspera, ao passo que a inferior é branca e tomentosa. Medem cerca de 5 a 14 cm de comprimento por 1,5 a 4 cm de largura. As flores são reunidas em inflorescências do tipo espiga, longo pedunculadas, densas e às vezes laxas próximo à base, medindo 2 a 8 cm longos. O cálice é sésil pubescente campanulado medindo 2,5 a 3,5 mm de comprimento e provido de lobos triangulares. A corola é branca campanulada, medindo 5 a 7 mm de comprimento, provida de lobos curtos e arredondados. Os estames, em número de cinco são livres, exclusivos e providos de base de filetes pilosos. O gineceu é constituído de ovário bicarpelar súpero, possuidor de estilete terminal encimado por estigma dividido caracteristicamente. O fruto é subgloboso drupáceo de coloração vermelha quando maduro. A planta possui cheiro forte e característico (AKISUE *et al.*, 1983).

Segundo PIO CORRÊA (1986), “o arbusto fornece madeira de pequenas dimensões, resistente e nodosa, aproveitável para construção civil, obras internas ou expostas, marcenaria e carpintaria. As folhas têm aroma forte e desagradável, passando por úteis contra tumores e úlceras de mau caráter”. As partes aéreas deste vegetal, especialmente as folhas, são empregadas popularmente no litoral, principalmente dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, na elaboração de um extrato alcoólico para friccionar as partes do corpo atacadas pelo reumatismo. Utiliza-se ainda o decocto obtido pela fervura das folhas em água, adicionada de pequena quantidade de álcool, em banhos, no tratamento de dores dos membros (AKISUE *et al.*, 1983). O extrato das folhas é também utilizado na medicina popular

como antiinflamatório e cicatrizante, acreditando-se também exercer efeitos benéficos no trato gastrointestinal (SERTIÉ *et al.*, 1990).

Cordia curassavica tem como sinonímia científica: *Cordia verbenacea* DC, *Cordia salicina* DC, *Cordia curassavica* auctt. bras. Ex Fresen, *Cordia cylindristachia* auctt. bras. Ex Fresen, *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* Kuntze e *Lithocardium verbaceum* Kuntze.

É popularmente conhecida por: erva-balieira, erva-baleeira, salicilina, salicina, caraminha, caramoneira-do-brejo, balieira-branca e catinga-preta, balieira-cambará, camaradinha. Os dois últimos nomes citados podem gerar a confusão levando a ser empregadas certas espécies de *Lippia* L. e de *Lantana* L. (AKISUE *et.al.*, 1983). A maioria dos artigos encontrados refere-se à espécie como *C. verbenacea*.



Figura 1: Foto de *Cordia curassavica* destacando as inflorescências em espiga.



Figura 2: Foto de *Cordia curassavica* destacando a superfície folhar.

LINS e colaboradores, em 1980, isolaram do extrato etanólico da erva-balieira β -sitosterol e duas flavonas, 5,6'-di-hidroxi-3,3',4',6,7-pentametóxi-flavona e 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametóxi-flavona (AKISUE *et al.*, 1983). Esta última, conhecida como artemetina, já havia sido isolada a partir de *Artemisia arborescens* e *Artemisia absinthium*, Compositae (VELDE *et al.*, 1982). No ano seguinte, ZELNIK e colaboradores confirmaram a presença destas duas flavonas em *Cordia curassavica* e isolaram um triterpeno do tipo damarano (AKISUE *et al.*, 1983). Em 1982, VALDE e colaboradores, a partir do extrato acetônico das folhas, isolaram e elucidaram a estrutura das duas flavonas citadas anteriormente e de dois novos triterpenos com esqueleto tipo damarano, ambos com um grupo hemiacetal fazendo ponte no anel A, um grupo hidroxila em C-11 e dupla ligação entre C-20 e C-22. Tais compostos foram denominados de cordialina A [24,25-epoxi-11 α -hidroxidamar-20(22)-en-23-ona 3,19-Hemiacetal] e cordialina B [damar-20(22)-en-11 α -24,25-triol-3,19-Hemiacetal].

Em 1983, AKISUE e colaboradores fizeram a caracterização farmacognóstica de *Cordia curassavica* e de sua tintura, com material proveniente do Município de Itanhaém, São Paulo. Em seus experimentos obtiveram um teor de óleo essencial de 1,1% (v/m), enquanto que PANIZZA relata um rendimento de 0,5 a 1%. AKISUE e

colaboradores descreveram também um sistema cromatográfico com multidesenvolvimento que utiliza gel de sílica GF₂₅₄ como adsorvente, benzeno como primeiro eluente seguido por hexano/acetato de etila (1:4), como sendo o melhor testado por eles para caracterização da tintura. Com o auxílio de padrões, pôde-se caracterizar a presença de artemetina, cordialina A e cordialina B.

Alguns testes foram realizados no intuito de avaliar as atividades biológicas dos extratos da erva-balieira e da artemetina, composto previamente isolado da planta. Extratos hidroalcoólicos (70%) brutos liofilizados, feitos com as folhas frescas da planta, foram avaliados em vários modelos animais, sendo testadas tanto a administração tópica quanto oral. No ensaio do granuloma induzido por “pellets” de algodão implantados subcutaneamente, a administração tópica do extrato demonstrou efeito inibitório de 28,1% e 16,6% por via oral (BASILE *et al.*, 1989; SERTIÉ *et al.*, 1988), sendo que as maiores doses administradas (2,79 e 4,18 mg/kg) topicamente foram mais efetivas que o piroxicam (4 mg/kg) na redução do granuloma (BASILE *et al.*, 1989).

No teste de edema induzido pela nistatina, a administração oral do extrato em ratos produziu um efeito inibitório significativo, mas menor que o observado com a administração de indometacina (5 mg/kg) (SERTIÉ *et al.*, 1991). No ensaio de dermatite induzida por óleo de *Croton tiglium* L. em ratos, na dose de 0,09 mg/orelha o extrato foi mais efetivo ao inibir a resposta inflamatória que o naproxeno na dose de 1,0 mg/orelha (SERTIÉ *et al.*, 1991).

O extrato também foi avaliado quanto a sua gastrotoxicidade, considerando que a maioria dos fármacos antiinflamatórios comuns têm o potencial de gerar lesões. A combinação das ações antiinflamatória e antiulcerogênica foi encontrada para o extrato bruto liofilizado de *Cordia curassavica*. Este parece exercer um efeito protetor importante na mucosa gástrica. Em comparação com piroxicam e ácido acetilsalicílico, o extrato apresentou redução significativa no número de lesões gástricas. (SERTIÉ *et al.*, 1991)

SERTIÉ e colaboradores (1990) testaram também a atividade antiinflamatória e a toxicidade sub-aguda da artemetina, que demonstrou significativa atividade antiinflamatória usando vários modelos experimentais em ratos. A flavona inibiu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina, com a administração oral de doses de 30,4 a 153,9 mg/kg. Porém, se comparadas às doses

administradas *per os* e a porcentagem de inibição do granuloma do extrato bruto (1,24 mg/kg, com 16,4% de inibição 4º dia) e da artemetina (67,07 mg/kg, com 13,7% de inibição 6º dia) no ensaio do granuloma induzido por “pellets” de algodão (SERTIÉ *et al.*, 1988; SERTIÉ *et al.*, 1990), pode-se sugerir que o efeito antiinflamatório da *Cordia curassavica* não deve estar associado apenas à artemetina.

Eventuais efeitos tóxicos hematológicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cordia curassavica* foram também avaliados em ratos, após 30 dias de administração *per os*. Sob as condições experimentais utilizadas não houve alterações dos parâmetros séricos e nem da função cardíaca, sugerindo a ausência de efeitos tóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

IOSET e colaboradores (2000) isolaram quatro naftoquinonas dos extratos diclorometânicos das raízes de *Cordia curassavica*, cordiquinonas A e B, já conhecidas, e duas naftoquinonas meroterpenóides inéditas, cordiaquinonas J e K. Todas demonstraram atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum*, *Candida albicans* e toxicidade para larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

1.3. Bioensaio utilizando larvas de *Artemia salina*

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal simples pode ser usado para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos de plantas. Os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER *et al.*, 1982).

As larvas de *Artemia salina* já foram utilizadas em vários sistemas de bioensaios, como para análise de resíduos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas de dinoflagelados, compostos relacionados à morfina, toxicidade de dispersantes de óleos, e de ésteres de forbol carcinogênicos. Para explorar a gama de produtos naturais que poderiam ser detectados por este bioensaio, foram testados extratos etanólicos das sementes de 41 espécies de Euphorbiaceae, família conhecida por conter compostos tóxicos de diversas estruturas e mecanismos de ação. Dezoito destes extratos demonstraram toxicidade no

bioensaio (DL50 < 1000 µg/ml). Das 24 espécies que demonstraram atividade contra 90 S, 14 foram tóxicas para as larvas. O bioensaio não é específico para ação antitumoral ou qualquer ação fisiológica em particular, mas para um número significativo de espécies com atividade citotóxica é possível o monitoramento com este bioensaio, que é mais prático, barato e consome menos tempo que outros ensaios de citotoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

A metodologia admite variações. SOLIS e colaboradores (1993) sugerem que o mesmo bioensaio seja feito em microplacas. Nos testes feitos por eles com as larvas de *A. salina* todos os compostos foram tóxicos para células KB em uma série de 21 agentes farmacologicamente ativos, exceto para dois que requeriam ativação metabólica em humanos. Quatro quassinóides com atividade citotóxica e antiplasmódica também foram tóxicos para as larvas, enquanto a quassina, que não possui tais atividades, também não apresentou toxicidade. Assim, o bioensaio poderia ser uma boa opção na busca de novos fármacos antiplasmódicos, pois os testes de atividade antimalárica usados atualmente são de alto custo. Além disto, a RNA polimerase DNA-dependente da *A. salina* tem demonstrado ser similar à dos mamíferos e o organismo tem uma ATPase ouabáina-sensível Na⁺/K⁺ dependente. Então, espera-se que compostos ou extratos que agem nestes sistemas possam ser detectados por esse bioensaio.

Larvas de *A. salina* vêm sendo usadas também na avaliação de extratos de cultura de cianobactérias (FALCH *et al.*, 1995); no *screening* de plantas medicinais da Argentina (MONGELLI *et al.*, 1996) e para o monitoramento de frações de *Tabebuia barbata*. Neste último foram isoladas substâncias com atividade citotóxica para células HT-29 (carcinoma de cólon humano), A-549 (adenocarcinoma humano de pulmão) e MCF-7 (carcinoma de mama). Estes resultados reforçam a validade do *screening* e fracionamento direcionado pela bioatividade, utilizando o teste de letalidade de *A. salina* para se isolar compostos com potencial atividade antitumoral (COLMAN DE SAIZARBITORIA *et al.*, 1997).

Em um *screening* realizado por MACHADO e colaboradores (1998) com mais de 50 espécies medicinais da Ilha de Santa Catarina, os extratos clorofórmicos de *Cordia curassavica* apresentaram letalidade significativa para larvas de *Artemia salina*. A partir destes resultados surgiu a proposta de se realizar a investigação fitoquímica de extratos dessa espécie monitorada pelo bioensaio com *A. salina*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar extratos de *Cordia curassavica* com vista ao isolamento de substâncias ativas biomonitorado pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Testar a atividade de extratos preparados em diferentes solventes, com material vegetal (folhas de *Cordia curassavica*) procedentes de diferentes locais de coleta.
- ✓ Realizar o fracionamento do extrato preparado nas condições otimizadas nos ensaios preliminares.
- ✓ Proceder o monitoramento das frações obtidas com o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*.
- ✓ Elucidar a estrutura da(s) substância(s) isolada(s) através de métodos espectroscópicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Material vegetal

As amostras foram identificadas pelo Prof. Daniel de Barcellos Falkenberg, Departamento de Botânica, UFSC e as excisatas depositadas no herbário FLOR, daquele Departamento.

3.1.1.1. Escolha do local de coleta e teste de viabilidade de utilização de folhas danificadas

Os materiais vegetais foram coletados no Horto Florestal (HF) do IBAMA localizado no bairro Córrego Grande (Florianópolis, SC), na Praia da Ferrugem (PF), em Garopaba, SC e na Praia do Campeche (PC), em Florianópolis, SC.

3.1.1.2. Testes para escolha do sistema extrativo e produção dos extratos para fracionamento

O material vegetal foi coletado na Praia do Campeche, entre 10 e 500 m da praia.

3.1.2. Bioensaio de letalidade as larvas de *Artemia salina*

A água do mar utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Camarões da UFSC, após sofrer o processo de dupla filtração e tratamento com radiação ultravioleta. Os cistos de *Artemia salina* secos foram obtidos em lojas especializadas.

3.1.3. Equipamentos utilizados

Para concentração dos extratos e das frações foi utilizado evaporador rotatório a vácuo Quimis, com banho-maria em temperatura inferior a 40 °C.

Todos os espectros foram obtidos no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Bonn, em espectrômetro Bruker 500 MHz, pelo Dr. Alexandre Taketa.

3.1.4. Solventes e reagentes

Os solventes utilizados foram de grau analítico, de procedência Nuclear, Vetec ou Synth. Os adsorventes utilizados na cromatografia em coluna foram: gel de sílica 60, com partículas entre 0,05 a 0,2 mm de diâmetro, de marca Carlo Erba e Sephadex[®] LH20, Pharmacia.

Para as análises cromatográficas de cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas prontas, de gel de sílica 60 GF 254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 µm de diâmetro. Para impregnação da sílica foi utilizado o sal AgNO₃, da marca Merck.

Para detecção das substâncias nas placas cromatográficas foi utilizado reagente vanilina sulfúrica, preparada com vanilina da marca Merck (MERCK, 1984).

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*.

Foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) com algumas adaptações, como descrito a seguir.

3.2.1.1. Obtenção das larvas

Inicialmente água do mar foi colocada no aquário em volume tal de modo que o aerador ficasse aproximadamente 5 cm abaixo da superfície. Cistos de *Artemia salina* (cerca de 0,5 g) foram adicionados, deixando-se por 48 h para a eclosão das larvas.

3.2.1.2. Preparação das diluições seriadas dos extratos, frações e compostos

Em função das concentrações desejadas pesou-se de uma alíquota do material seco em balão volumétrico adequado. Completou-se o volume com o mesmo solvente utilizado na extração, resultando em uma solução de concentração definida. Desta solução do extrato foram retirados e colocados nos tubos de ensaio os volumes necessários de forma a conterem a concentração final desejada do material a ser testado, considerando-se o volume final de 5 mL por tubo. O solvente foi então evaporado completamente à temperatura ambiente ou em banho-maria. Juntamente são preparados os tubos-controle onde foi colocado apenas o solvente. Para cada diluição os testes foram realizados em triplicata.

3.2.1.3. Incubação das larvas com o material

A todos os tubos foram adicionados 50 µL de dimetilsulfóxido e na seqüência 1 a 1,5 mL de água do mar. Os tubos foram colocados em sonicador, onde foram deixados por 10 minutos. Com o auxílio de pipeta graduada foram transferidas 10 larvas para cada tubo de ensaio, completando-se a seguir o volume final para 5 mL com água do mar.

3.2.1.4. Contagem das larvas

24 h após a incubação das larvas com o material em análise, registrou-se o número de sobreviventes, sendo consideradas mortas as larvas que se mantiveram sem movimento por mais de 10 segundos.

3.2.1.5. Análise estatística dos resultados

A análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-quadrado, tabela de contingência 2x2, utilizando a correção de Yates, sendo considerados significativos os valores de χ^2 maiores ou iguais a 3,84 (CENTENO,1990).

3.2.2. Escolha do local de coleta e teste de viabilidade de utilização de folhas danificadas

Folhas de *Cordia curassavica*, intactas e também as danificadas (comidas por insetos, rasuradas, etc), foram coletadas em diversos locais. Os extratos foram obtidos separadamente, conforme especificado abaixo, avaliados por CCD e quanto à letalidade para larvas de *Artemia salina*:

a) Extratos HF

Local de coleta: Horto florestal – IBAMA

Data: 06/10/99

m droga utilizada para cada extrato: • 7 g folhas intactas
• 19,5 g folhas danificadas

b) Extratos PC

Local de coleta: Praia do Campeche – Florianópolis, SC.

Data: 17/10/99

m droga utilizada para cada extrato: • 5 g folhas intactas
• 19,5 g folhas danificadas

c) Extratos PF

Local de coleta: Praia da Ferrugem – Garopaba, SC.

Data: 17/10/99

m droga utilizada para cada extrato: • 20 g folhas intactas
• 19,5 g folhas danificadas

As folhas frescas com pecíolo foram cominuidas em moinho de facas e preparados extratos com clorofórmio e n-hexano (n-Hx) na proporção 1:6 (m:V). A droga foi macerada por 24 h, sendo então os macerados filtrados e concentrados em evaporador rotatório. A massa do resíduo seco foi determinada e procedeu-se o bioensaio para as larvas de *A. salina* nas concentrações de 200 e 50 µg/mL (extrato/água do mar).

Os extratos foram avaliados em CCD utilizando placas prontas de gel de sílica e o revelador vanilina sulfúrica. Como fases móveis foram utilizados CH₂Cl₂:n-Hx (1:1) e CH₂Cl₂:MeOH (94:6) para os extratos n-hexânicos e clorofórmicos, respectivamente.

3.2.3. Testes para escolha do sistema extrativo

Foram utilizadas folhas frescas com pecíolo, coletadas na praia do Campeche, em Florianópolis – SC, no dia 21 de fevereiro de 2000. A droga foi triturada em moinho de facas e para cada teste foram utilizados 10 g do material vegetal.

Os solventes utilizados foram etanol, clorofórmio e éter de petróleo. Excetuando-se os extratos não seqüenciais etanólicos, que foram feitos apenas na proporção 1:5, todos os extratos foram feitos nas proporções de 1:4, 1:5 e 1:6.

Para a extração seqüencial 10 g da droga triturada foram colocados em maceração por 24 h com cada solvente, na seqüência: éter de petróleo, clorofórmio e etanol, filtrando-se o extrato e submetendo o material vegetal a nova maceração com outro solvente. O mesmo procedimento também foi realizado com o tempo de maceração de 48 h em cada solvente.

Na extração não seqüencial foram testados os tempos de maceração de 1, 2 e 4 dias.

Todos os extratos obtidos foram avaliados quanto à letalidade para larvas de *Artemia salina* nas concentrações de 200 e 50 (g/mL. Os extratos clorofórmicos foram também avaliados por CCD em gel de sílica, com CH₂Cl₂:MeOH (94:6) e vanilina sulfúrica como revelador.

3.2.4. Preparação dos Extratos para Análise Fitoquímica

Para obtenção do extrato 1 o material vegetal foi coletado na Praia do Campeche, em Florianópolis – SC, no dia 12/05/2000, entre 10 e 500 m da praia. As folhas saudáveis com pecíolo foram separadas e trituradas em moinho de facas. A droga foi colocada em maceração com éter de petróleo na proporção 1:6 (m/V). Após 4 dias o macerado foi filtrado sobre papel de filtro e concentrado do extrato em evaporador rotatório (banho-maria entre 38 e 40 °C).

Para a obtenção de extrato 2 O material vegetal foi coletado na Praia do Campeche, em Florianópolis – SC, no dia 02/11/2000, variando entre 10 e 500 m da praia. O extrato foi obtido nas mesmas condições do extrato 1.

3.2.5. Fracionamento dos extratos brutos – Colunas A

As colunas 1^a A e 2^a A foram feitas com o Extrato 1, as demais foram desenvolvidas com o Extrato 2, todas utilizando gel de sílica 60 e CH₂Cl₂ como fase móvel (FM) e em coluna de vidro de 8 cm de diâmetro e 30 cm de altura. Os parâmetros utilizados para as colunas A são apresentados na Tabela 1. As frações foram avaliadas quanto à letalidade para larvas de *A. salina* na concentração de 50 µg/mL. O fracionamento prosseguiu com as que obtiveram o maior índice de letalidade.

Tabela 1: Especificação dos parâmetros utilizados para as colunas A

Parâmetros	1 ^a A	2 ^a A	3 ^a A	4 ^a A	5 ^a A
m sílica (g)	276	276	375	375	450
Altura da sílica empacotada (cm)	18,5	18,5	22	24,5	27
m aplicada do extrato (g)	9,3316	14,18	15,0322	14,9951	21,25
Solubilização do extrato	20 mL CH ₂ Cl ₂	20 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)	26mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)	26 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)	20 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)
Fluxo da FM	20 mL/min	18 mL/min	20 mL/min	20 mL/min	20 mL/min
Volume das frações (mL)	500	250	500	500	500

Tabela 1: (Continuação)

Parâmetros	1 ^a A	2 ^a A	3 ^a A	4 ^a A	5 ^a A
Número de frações obtido	15	32	23	22	22
Trocas de eluente	Início da fração	Início da fração	Início da fração	Início da fração	Início da fração
CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1).	1 ^a A12	1 ^a A14a	1 ^a A20	1 ^a A19	1 ^a A19
CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1).	Final da fração	Final da fração	Final da fração	Final da fração	Final da fração
	1 ^a A12	1 ^a A14b	1 ^a A20	1 ^a A19	1 ^a A19
MeOH	Final da fração	Final da fração	Final da fração	Final da fração	Final da fração
	1 ^a A13	1 ^a A15b	1 ^a A21	1 ^a A20	1 ^a A20

Observação: Na coluna 2^a A as frações foram nomeadas de 1 a 16, seguidas pela letra a ou b (Ex: frações 1a e 1b, na seqüência).

3.2.6. Colunas B

Também foram feitas várias colunas B, nomeadas de acordo com a seqüência de realização de 1^a B a 4^a B. Para todas foi utilizada uma coluna com 3 cm de diâmetro, gel de sílica e EP:AcOEt:Acetona (93:4:3) como fase móvel. As outras especificações delas estão na Tabela 2.

3.2.7. Coluna 1^oSx

Procedeu-se o desenvolvimento desta coluna com as frações obtidas das colunas B que se mostraram ativas no bioensaio de letalidade para larvas de *A. salina*. Para tal foi utilizada uma coluna de vidro com 2 cm de diâmetro e 13 g de Sephadex, que resultou num percurso de 40 cm. Foram aplicados 587 mg de amostra solubilizados em clorofórmio. A fase móvel utilizada foi CHCl₃:MeOH (7:3) no fluxo de 1,7 mL/ min. Recolheram-se frações de 5 mL, exceto para as frações Sx4 e Sx5,(10 mL e 7 mL respectivamente), devido a variação na coloração do material que estava eluindo. As frações foram avaliadas em CCD sobre gel de sílica com EP:AcOEt:Acetona (93:4:3) e vanilina sulfúrica como revelador. Foram

avaliadas quanto a letalidade para as larvas de *Artemia salina* apenas Sx4, Sx5 e Sx7, na concentração de 20 µg/mL.

Tabela 2: Especificação dos parâmetros utilizados para as colunas B.

Parâmetros	1 ^a B	2 ^a B	3 ^a B	4 ^a B
m sílica (g)	138	130	130	50
Altura da sílica empacotada (cm)	53	52	52,5	40
m aplicada do extrato(g)	1,3415	0,9907	1,19	0,4749
Solubilização do extrato	10 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)	10 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)	10 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)	5 mL CH ₂ Cl ₂ : EP (1:1)
Fluxo da FM	4 mL/min	3,5 mL/min	3,75 mL/min	~4 mL/min
Volume das frações	60 mL até Fç10 30 mL até o fim	60 mL até Fç10 30 mL até o fim	60 mL até Fç10 30 mL até o fim	30 mL até Fç10 15 mL até o fim
Número de frações obtido	52	58	60	57
Trocas de eluente	Início da	Início da	Início da	Início da
EP:AcOEt (85:15)	fração 1 ^a B 40	fração 2 ^a B 47	fração 3 ^a B 50	fração 4 ^a B 54
EP:AcOEt (7:3)	Início da fração 1 ^a B 50	Início da fração 2 ^a B 55	Início da fração 3 ^a B 57	Início da fração 4 ^a B 56

3.2. 8. Coluna C

Esta coluna foi feita com a fração FativSx (94,9 mg), utilizando uma bureta de 25 mL, preenchida com 9 g de Sílica gel de partículas finas(ver as especificações), resultando em um percurso de 28 cm. Como fase móvel foi utilizado CHCl₃:EtOH

(99:1). A amostra foi solubilizada em 1 mL de CHCl_3 e eluída a um fluxo de 0,7 mL/min. Foram recolhidos de 3 mL para cada uma das 39 frações. Estas foram avaliadas por CCD com a fase móvel CHCl_3 :MeOH (99:1) e vanilina sulfúrica como revelador. Com as frações C5, C8 e C12 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, foi realizado o bioensaio com *A. salina*.

3.2.9. Testes de impregnação da sílica com Nitrato de Prata

3.2.9.1. Placas prontas com base de alumínio

Foram testados dois métodos de preparação:

Imersão: As placas foram cortadas no tamanho a serem utilizadas e colocadas com a parte da sílica virada para baixo em um recipiente contendo solução aquosa de nitrato de prata 10% (m/V). Após aproximadamente 5 segundos foram retiradas, deixadas secar à temperatura ambiente no escuro por 1 hora e então em estufa a 105 °C por 1 hora. Deixou-se esfriar ao abrigo da luz. Este processo foi testado com duas soluções de nitrato de Prata a 10%(m/V): uma preparada com MeOH:H₂O (75:25) (COLLINS *et al.*, 1995) e outra apenas com água. Todas foram avaliadas em luz UV 254 e 366 nm para verificar a uniformidade e a intensidade de impregnação alcançadas.

Eluição: As placas foram cortadas no tamanho a serem utilizadas e colocadas em cuba cromatográfica tendo como eluente solução de nitrato de prata. Foram testadas duas soluções diferentes: uma delas a 10% (m/V) em MeOH: H₂O (75:25) (COLLINS *et al.*, 1995) e a outra uma solução aquosa a 40% (m/V) (TONG-SHUANG *et al.*, 1995). A placa foi deixada eluir até que a solução alcançasse o fronte, permanecendo mais 10 minutos. Secou-se à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h, seguido de 1 h na estufa a 105°C. Foram avaliadas em luz UV 254 e 366 nm.

3.2.9.2. Sílica para placas preparadas no laboratório

Foram realizados vários testes de acordo com a literatura consultada, alguns com pequenas adaptações, como descrito mais adiante. Os materiais obtidos pelos métodos 3.2.9.2.1 a 3.2.9.1.3 foram avaliados como pó quanto à aparência, e depois de incorporados às placas, sob luz UV 254 e 366 nm, quanto a homogeneidade e

grau de impregnação do sal. Os demais foram avaliados somente depois de incorporados às placas da mesma forma que os primeiros.

3.2.9.2.1 Método de LAM *et al.* (1985)

Foi seguido o método de preparação dos autores com adaptações para a massa de sílica utilizada (1g). Dissolveu-se 0,111 g de AgNO_3 em 2,2 mL de água destilada. Esta solução foi adicionada lentamente a 1,0 g de sílica com agitação. Esta suspensão foi deixada sob agitação por 0,5 h e secada em estufa por 17 min. a 105-120 °C. A sílica impregnada e dessecada foi guardada em frasco âmbar até o dia seguinte. Foram preparadas placas com lâminas de vidro de 2,5 X 8 cm por espalhamento da suspensão de 1 g da sílica impregnada com 3 mL de água destilada, deixando secar em temperatura ambiente por 24 h e ativando em estufa a 110 °C por 1 hora.

3.2.9.2.2. Método segundo MAREK (1994)

Foram adicionados aos poucos e com agitação 5 g de sílica a 10 mL de solução aquosa de AgNO_3 a 10%. Esta suspensão foi agitada manualmente em banho-maria com temperatura entre 60 – 80 °C por 30 minutos e o solvente foi eliminado no rotaevaporador. A sílica resultante foi armazenada em frasco âmbar. No dia seguinte foram preparadas placas por espalhamento da suspensão de 5 g desta sílica em 12 mL de água destilada. Foram utilizadas 2 placas de vidro com dimensões 10 X 20 cm e 3 com 2,5 X 8,0 cm. Deixou-se secar em temperatura ambiente por 24 h e ativou-se em estufa a 110 °C por 1 hora.

Deste método também foi testada uma variação, sem evaporar água : Foi dissolvido 1 g de AgNO_3 em 12 mL de água destilada. A esta solução foram adicionados lentamente e sob agitação manual 5 g de sílica. A suspensão foi então aquecida em banho-maria na temperatura entre 60 e 70 °C sob agitação por 30 minutos. Foram adicionados mais 4,5 mL de água e então preparadas as placas cromatográficas, que foram deixadas secar ao abrigo da luz por 24 h e ativadas em estufa a 110 °C por 1 h.

3.2.9.2.3. Método de GUPTA e DEV (1963)

Dissolveu-se 0,75 g de AgNO_3 em 0,75 mL de água destilada e completou-se

o volume para 12,5 mL com etanol. A esta solução foram adicionados lentamente e com agitação 5 g de gel de sílica G. Depois de 15 minutos sob agitação em agitador magnético, o álcool foi eliminado no rotaevaporador e a sílica obtida foi armazenada em frasco âmbar até o dia seguinte. Foram preparadas placas por espalhamento da suspensão dos 5 g desta sílica em 12 mL de água destilada. Utilizaram-se 2 placas de vidro com dimensões 10 X 20 cm e 3 com 2,5 X 8 cm. Estas foram deixadas secar em temperatura ambiente por 24 h e ativadas em estufa a 110 °C por 1 hora.

3.2.9.2.4. Método de TOUCHSTONE *et al.* (1992) -1h ou 2h na estufa

Dissolveram-se 2,5 g de AgNO₃ em 12,5 mL de água destilada e a esta solução foram adicionados sob agitação manual 5 g de sílica. Após agitação em agitador magnético por 20 minutos a suspensão foi espalhada sobre placas de vidro de dimensões 8 x 2 cm e 20 x 5 cm, deixadas secar por 3 h ao abrigo da luz. Após foram ativadas em estufa 110 °C, algumas por 1 h e outras por 2 h. Deste método também foi testada uma variante, na concentração de 10 % de AgNO₃, também ativando-se na estufa por 1h ou 2 h: Procedeu-se como descrito acima, mas utilizando-se apenas 0,5 g de AgNO₃.

3.2.9.2.5. 1:20 e 1:50 (m/m) de AgNO₃ com e sem aquecimento na hora de mexer sílica

Foram preparados 4 frascos de 8 mL de solução de AgNO₃ em água, 2 com 0,15 g e 2 com 0,06 g do sal. A estas foram adicionados 3 g de sílica sob agitação. As suspensões foram submetidas à agitação por 20 minutos, uma de cada concentração de AgNO₃ em BM a 60 °C com agitação manual e outra em agitador magnético sem aquecimento. Foram então espalhadas pelas placas de vidro, deixadas secar por 3 h ao abrigo da luz e temperatura ambiente, após ativadas em estufa a 110 °C por 1 h.

3.2.9.2.6. 1:20 e 1:10 (m/m) de AgNO₃ sem aquecimento

Foram preparadas duas soluções de AgNO₃ com 8mL de água, uma com 0,15 g e outra com 0,3 g do sal. A cada uma foram adicionados 3 g de sílica. As

suspensões foram deixadas sob agitação em agitador magnético por 20 minutos, quando foram espalhadas sobre as placas de vidro. Estas foram deixadas secar a temperatura ambiente por 3 h e depois ativadas em estufa 110 ° C por 1 h.

3.2.10. Escolha do sistema cromatográfico

Inicialmente as placas preparadas pelo método 3.2.9.1.1 foram testadas com as frações C₆ e Sx₅ e os eluentes CHCl₃: AcOEt (8:2) CHCl₃: AcOEt (7:3) e CHCl₃: AcOEt (3:1). As demais placas preparadas pelos outros métodos foram testadas com as mesmas frações e os eluentes CHCl₃: AcOEt (3:1) e CHCl₃: AcOEt (8:2).

As placas preparadas pelo método 3.2.9.2.8 foram avaliados em sistemas diferentes: CHCl₃: AcOEt (3:1) e CHCl₃: AcOEt (8:2), com e sem saturação da cuba por 15 minutos.

3.2.11. Testes de recuperação do composto utilizando cafeína

Foram preparadas duas placas de dimensões 20x10 cm com sílica impregnada com 10% AgNO₃ (m/m) segundo o método 3.2.9.2.8, deixadas secar a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 24 h e ativadas em estufa 110 °C por 1 h. Em cada placa foram aplicados, em barra, 10 mg de cafeína solubilizada em 5 mL de CHCl₃, eluindo-se em cuba saturada com eluente CHCl₃: MeOH (7:3). Após a localização da cafeína em luz UV 254 nm a mancha foi raspada e a sílica extraída com solvente sob agitação em agitador magnético por 2 h; em uma placa a extração foi feita com 40 mL de CHCl₃ e na outra, com 40 mL de MeOH. Filtrou-se a vácuo, evaporou-se o solvente e a massa do resíduo foi medida.

3.2.12. Teste de recuperação e purificação do composto utilizando colesterol

Foram preparadas duas placas como descrito no item 3.2.9.2.6 e em ambas foram aplicados 10 mg de colesterol dissolvidos em 5 mL de CHCl₃. Procedeu-se a cromatografia em cuba saturada com CHCl₃: MeOH (1:1). Após a localização da substância por luz UV 254 nm, fez-se a raspagem da faixa correspondente nas duas placas. Para extrair a substância da sílica, o material obtido de cada placa foi ressuspenso em 40 mL de solução CHCl₃: MeOH (8:2) e deixado por 2 h, um em

sonicador e o outro em agitador magnético. As suspensões foram filtradas e o solvente evaporado. A cada resíduo foram adicionados 4 mL de solução aquosa de KCl 10%. Depois de agitar, estes foram deixados em repouso por 20 minutos e então submetidos a extração 3 x 5 mL de CHCl_3 . O solvente foi então evaporado e medidas as massas dos resíduos (RÖNSCH e SCHREIBER, 1967).

3.2.13. CCDPAgs das frações 1°Sx5 e reunião das frações C5-12

Processo Cromatográfico: foi realizado em placas de dimensões 20x20 cm, preparadas de acordo com o método 3.2.9.2.6, com a sílica contendo 10% de AgNO_3 (m/m). As placas foram deixadas secar por 24 h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz e ativadas em estufa a 110 °C por 1 h antes da utilização. Os 131,2 mg da fração 1°Sx5 foram dissolvidos em 25 mL de CHCl_3 , e aplicados em 9 placas ao total. O resíduo das frações C5 a C12 (59,2 mg) foi solubilizado em 10 mL de CHCl_3 e aplicado em 3 placas, sendo estas eluídas em CHCl_3 : AcOEt (3:1) em cuba saturada.

Localização das manchas: foi utilizado a adaptação do método descrito por Mistryukov (KIRCHNER, 1978). Um papel filtro de dimensões da placa cromatográfica foi umedecido com CHCl_3 e colocado sobre a placa já eluída, fazendo-se leve pressão. A parte que estava em contato com a sílica foi borrifada com vanilina sulfúrica e o papel foi levado a estufa 105 °C por 5 minutos. O local onde apareceram as manchas foi delimitado com lápis e recortado. A placa cromatográfica foi revelada nos 2 cm iniciais da borda lateral. Colocou-se o “papel molde” sobre a placa, e, com base nas manchas reveladas e dimensões relativas, foram delimitadas as margens das manchas.

Extração e purificação das frações: cada parte da sílica previamente delimitada foi raspada, ressuspensa em 30 mL de solução CHCl_3 : MeOH (8:2) e deixada no sonicador por 1h e 40 min. As suspensões foram filtradas e os filtrados levados à secura.

A cada resíduo obtido no procedimento anterior foram adicionados 4 mL de solução aquosa 10% de KCl, deixando-se em repouso por 20 minutos. Foi procedida a extração com 2x 4 mL de CH_2Cl_2 , os volumes obtidos foram filtrados e o solvente deixado evaporar em capela.

CCD analítica das frações PAg : em placas de sílica gel prontas, impregnadas com AgNO₃ por imersão, foram aplicadas as frações obtidas e eluídas em cuba saturada com CHCl₃: AcOEt (3:1), para as três primeiras placas (frações PAg I, II e III), e CHCl₃: AcOEt (8:2), para as outras duas placas (frações PAg IV – V), todas com o percurso de 10 cm e reveladas com vanilina sulfúrica.

3.2.14. CCDP frações TPAg II e III

Foram preparadas 2 placas por espalhamento da suspensão de 24 g de sílica em 37 mL de água destilada. Estas foram deixadas secar por 24 h a temperatura ambiente e ativadas em estufa a 110 ° C por 1 h antes da utilização. As duas frações mais puras, 8,6 mg de TPAg II e 12,2 mg de TPAg III, foram ressuspensas em 3 mL de CHCl₃ e cromatografadas nestas placas cromatográficas preparativas com os eluentes EP:AcOEt(8:2), para fração PAg II e CHCl₃:EtOH(99:1) para fração TPAg III.

Os compostos foram localizados da maneira como descrito no item 3.2.13.2. Feitas as raspagens, os materiais foram extraídos com 30 mL de MeOH em sonificador por 2 h, filtrados e o solvente levado a secar em evaporador rotatório a 40 ° C.

CCD analítica das substâncias obtidas: As substâncias foram cromatografadas em placa de sílica impregnada com AgNO₃ com CHCl₃: AcOEt (3:1) e em gel de sílica comum com EP:AcOEt (8:2). Ambas foram reveladas em luz UV 254 nm e 366 nm e com vanilina sulfúrica.

3.2.15. Extração do óleo essencial de *Cordia curassavica*

Foi realizada com folhas coletadas na Praia do Campeche, dia 09/05/2001. 40 g de folhas foram rasuradas e submetidas a extração por 3 h, seguindo o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4 ed.

4. Resultados e Discussão

4.1. Escolha do local de coleta e teste de viabilidade de utilização de folhas danificadas

O resumo dos dados referentes aos diferentes extratos está descrito na Tabela 3. Os rendimentos obtidos foram maiores nos extratos produzidos com as folhas sadias (S) que com as folhas danificadas (D). Os extratos etéreos (EP) feitos com folhas sadias coletadas no Horto florestal (HF) e na Praia do Campeche (PC) apresentaram índice de letalidade para larvas de *Artemia salina* significativos ($\chi^2 \geq 3,84$) apenas na maior concentração testada.

Tabela 3. Resultados de rendimento e letalidade para *Artemia salina* com extratos obtidos de folhas sadias e danificadas de diferentes locais de coleta.

Extrato		Material vegetal	Rendimento (%)	Teste <i>Artemia salina</i> []:	Teste <i>Artemia salina</i> []:
				200µg/mL χ^2	50µg/mL χ^2
HF	CH ₂ Cl ₂	S	22,8	2,653	0,062
		D	2,4	1,183	0,062
	EP	S	6,1	12,211	0,358
		D	4,9	0,124	0,028
PC	CH ₂ Cl ₂	S	21,5	1,183	0,035
		D	8,3	1,814	0,035
	EP	S	7,4	5,408	0,035
		D	2,4	0,036	0,083
PF	CH ₂ Cl ₂	S	7,3	1,183	0,062
		D	11,1	1,814	0,035
	EP	S	3,3	0,300	0,028
		D	4,4	11,791	0,046

HF: Horto Florestal

PC: Praia do Campeche

PF: Praia da Ferrugem

EP: éter de petróleo

CH₂Cl₂: diclorometano

χ^2 significativo: > 3,84

Com as folhas danificadas coletado na praia da Ferrugem (PF), tanto o índice de letalidade do extrato EP como os rendimentos dos extratos EP e CH₂Cl₂ foram maiores que para os extratos de folhas saudias. Isto poderia ser devido a presença de fitoalexinas apolares, produzidas pela planta para sua defesa. Nenhum extrato apresentou índice de letalidade significativo na menor concentração testada.

Como no Horto florestal havia poucas plantas e a praia da Ferrugem (Garopaba, SC) é relativamente longe, foi escolhida a Praia do Campeche como local de coleta pela abundância de material vegetal e facilidade de acesso.

4.2. Testes para escolha do sistema extrativo

4.2.1. Avaliação dos extratos por CCD

Pode-se observar (Fig.3) que nos extratos CHCl₃ seqüenciais as manchas de R_f entre 0,43 e 0,87 (setas) aparecem com menor intensidade, principalmente nos extratos obtidos por 2 dias de maceração (caixas cinzas). Isto sugere que estes compostos devem ter sido extraídos também pelo éter de petróleo, possuindo polaridade intermediária entre os dois solventes.

4.2.2. Avaliação dos extratos obtidos com o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*

Com o material coletado na Praia do Campeche foram preparados diversos extratos conforme descrito em 3.2.3 (Materiais e Métodos). Nenhum dos extratos apresentou letalidade significativa para larvas de *Artemia salina* na concentração de 50 µg/mL. Mesmo na concentração maior nenhum extrato etanólico apresentou letalidade significativa. Os extratos ativos estão relacionados na tabela 4.

Os extratos n-hexânicos foram os mais ativos em todas as proporções droga:solvente testadas. Os extratos clorofórmicos apresentaram atividade significativa no bioensaio, mas menos intensa, sendo que nenhum dos extratos seqüenciais obtidos com este solvente apresentou. Isto indica que as substâncias potencialmente ativas teriam natureza mais apolar. Em função do custo do n-hexano, optou-se por utilizar éter de petróleo para preparação dos extratos, já que ambos têm características lipofílicas.

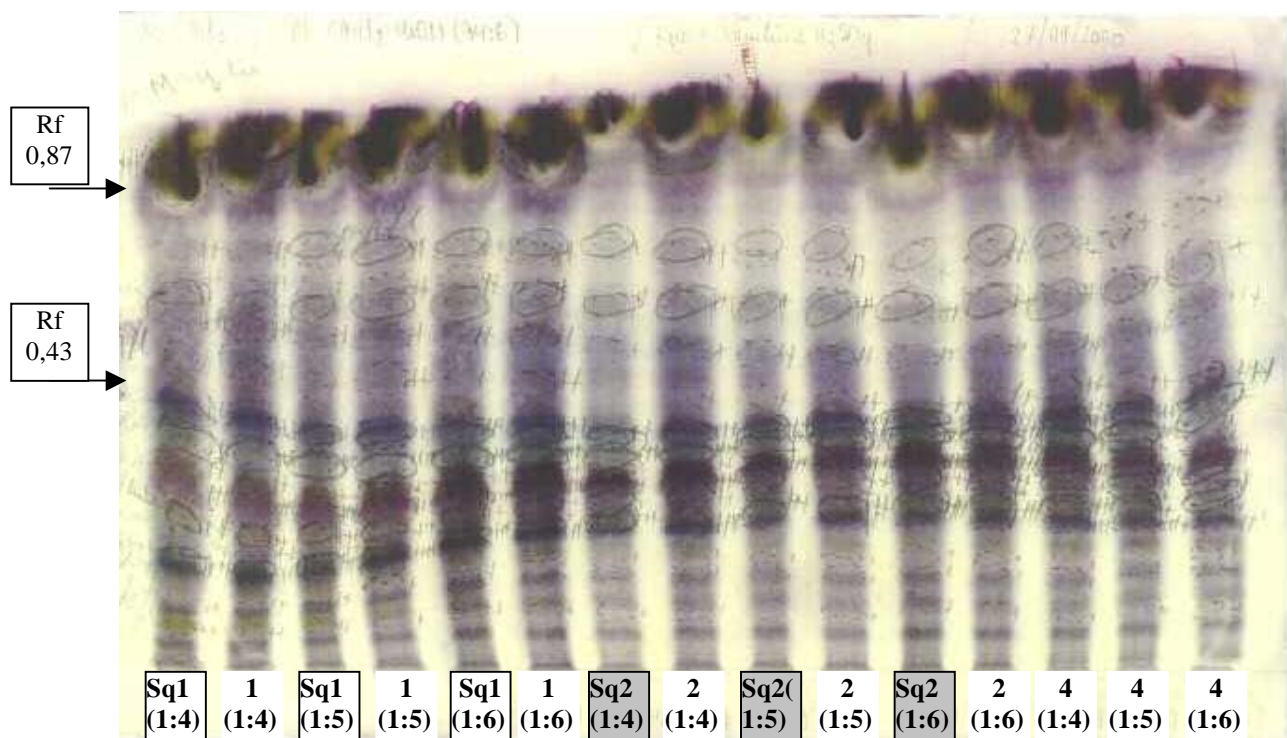


Figura 3. Cromatograma dos extratos clorofômicos obtidos por maceração em diferentes sistemas extrativos: Sq = Extração seqüencial, Sq"n"=tempo de maceração (dias), (... : ...)= Proporção droga: solvente

Tabela 4. Extratos que apresentaram letalidade significativa para larvas de *Artemia salina*.

EXTRATO	χ^2 (200 $\mu\text{g/mL}$)
Sq1 (1:4) n-Hx	28,133
Sq1 (1:5) n-Hx	11,082
CHCl ₃ 1 (1:5)	6,330
Sq1 (1:6) n-Hx	14,951
Sq2 (1:4) n-Hx	11,082
Sq2 (1:5) n-Hx	7,070
Sq2 (1:6) n-Hx	9,548
CHCl ₃ 2 (1:6)	7,848
n-Hx 4 (1:4)	7,070
CHCl ₃ 4 (1:4)	9,082
n-Hx 4 (1:5)	17,410
CHCl ₃ 4 (1:5)	7,848
n-Hx 4 (1:6)	17,410
CHCl ₃ 4 (1:6)	9,082

Sq = Extração seqüencial, Sq"n"= tempo de maceração (dias), **n-Hx** =n- hexano, **CHCl₃**: clorofômio, (... : ...) = Proporção droga: solvente

4.3. Obtenção dos Extratos

Extrato 1: Foi obtido 23,25 g de extrato seco, de aparência pastosa e coloração amarelo-parda. Com este extrato foram procedidas as colunas 1° A e 2° A, seguidas pela coluna 1° B.

Extrato 2: Obteve-se 49,52 g de extrato seco. Com este foram realizadas as colunas 3° A, 4° A e 5° A, seguidas pelas colunas 2° B, 3° B e 4° B, conforme Fig.4.

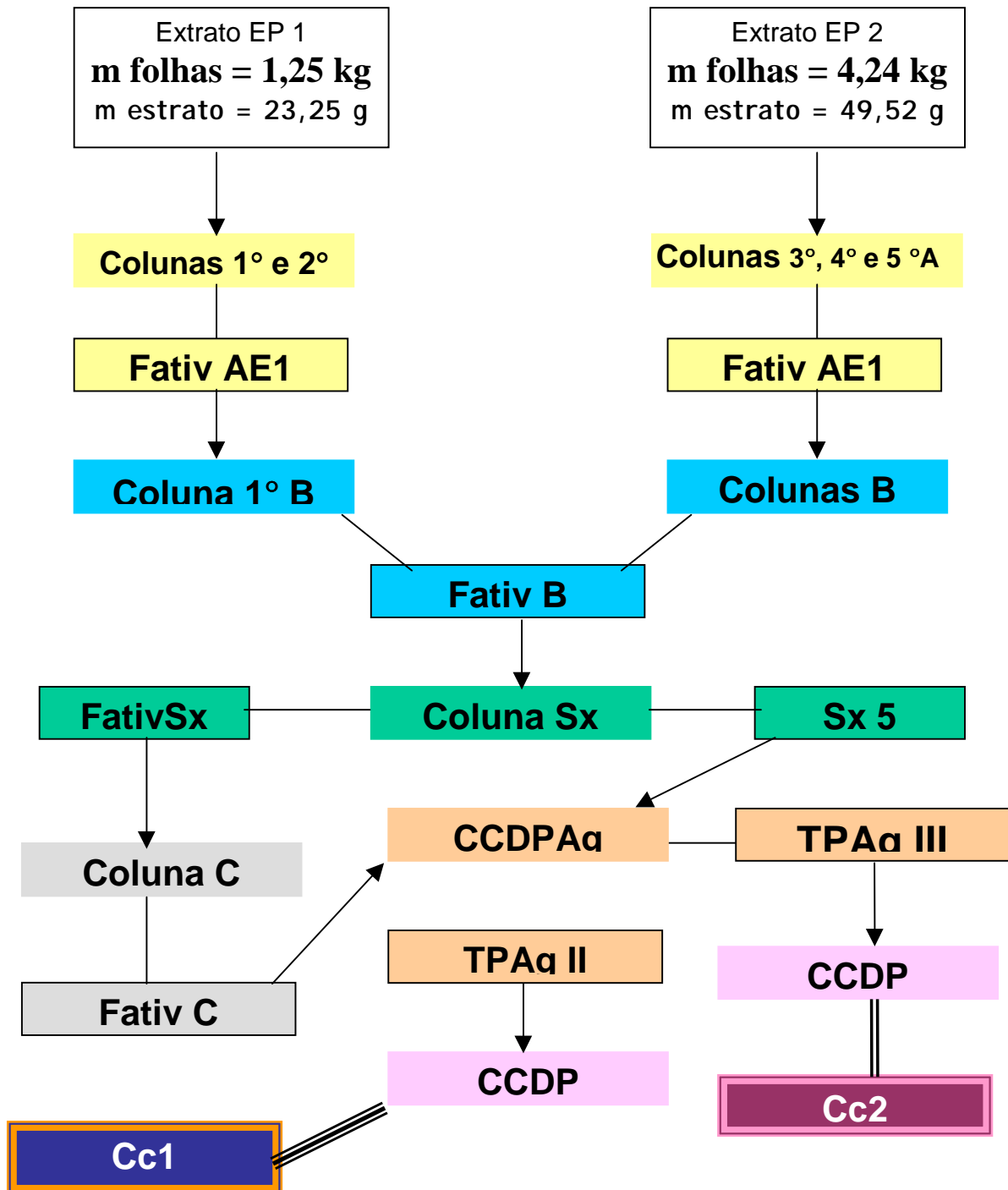


Figura 4. Esquema dos procedimentos utilizados no isolamento de Cc1.

4.4. Colunas A

A maior coluna disponível no laboratório não tinha capacidade suficiente para que fosse realizado o fracionamento inicial de uma só vez. Portanto foi repetido o mesmo sistema cromatográfico com os extratos 1 e 2, cinco vezes no total.

4.4.1. Resultados da avaliação de letalidade para as larvas de *Artemia salina* das frações das colunas A

Todas as frações obtidas da coluna 1° A e as frações de numeração entre 3 e 10 das demais foram testadas quanto à letalidade para larvas de *Artemia salina*. Os testes foram realizados na concentração de 50 µg/ mL. A tabela 5 apresenta os resultados das frações com índices significativos de letalidade para larvas de *Artemia salina*.

Tabela 5. Frações obtidas das colunas A com letalidade significativa para larvas de *Artemia salina*.

Extrato	Coluna	Frações ativas	Massa (mg)	χ^2 (50 µg/ mL)
EXTRATO 1	1° A	1° A6	177,6	5,1905
	2° A	2° A6b*	64,7	4,4240
EXTRATO 2	3° A	3° A4	754,0	9,5490
		3° A5	407,6	28,1333
		3° A7	112,9	5,1905
	4° A	4° A5	340,1	12,4872
		4° A6	143,3	20,9333
		4° A8	45,5	20,9333
		4° A9	25,3	4,5438
	5° A	5° A6	205,7	10,5715
		5° A7	226,1	25,1481
		5° A8	235,2	8,4118
		5° A9	59,8	8,4118

* Na coluna 2° A as frações recolhidas foram de 250 mL e não 500 mL como nas demais. Por tal motivo as frações foram nomeadas com as letras a, para os primeiros 250 mL, e b para os 250 mL seguintes.

O processo de fracionamento foi prosseguido com as frações ativas. Devido ao baixo rendimento das frações ativas das colunas 1°A e 2°A também foram incluídas as frações 1°A5 e 2°A 4a – 6a, 7a, que demonstraram perfis cromatográficos semelhantes.

4.4.2. Avaliação por CCD das frações da coluna A

Na figura 5 é demonstrado o cromatograma das frações obtidas da coluna 3° A, com eluente EP: AcOEt :Acetona (93:4:3), revelação com vanilina sulfúrica; a fração mais ativa no bioensaio de *Artemia salina* foi a 3° A5.

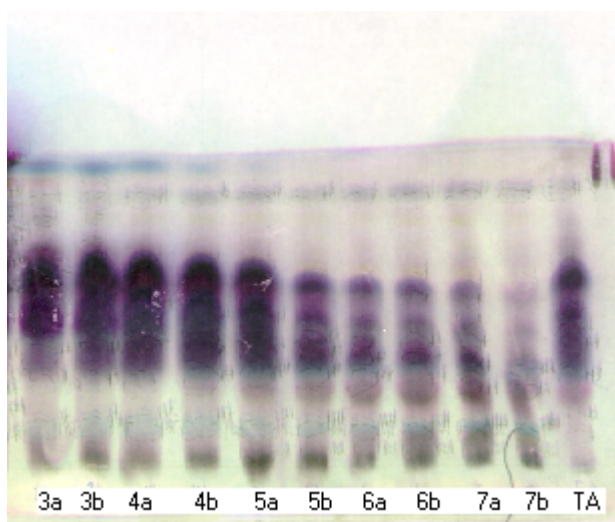


Figura 5. CCD das frações obtidas da coluna 3° A.

4.5. Colunas B

Devido à baixa capacidade da coluna foram realizadas várias repetições do processo cromatográfico B. A Coluna 1° B foi procedida com as frações ativas obtidas das colunas 1° A e 2° A.

4.5.1. Resultados das CCD das colunas B

Na figura 6 pode ser observada a presença de uma mancha azul escura em Rf 0,39 nas frações 29 a 42 que foram reunidas na fração nomeada 1°BVII. Esta apresentou o índice de letalidade para larvas de *Artemia salina* mais significativo das frações da coluna 1°B. A mancha azul citada acima não foi visualizada nas análises cromatográficas das demais colunas B.

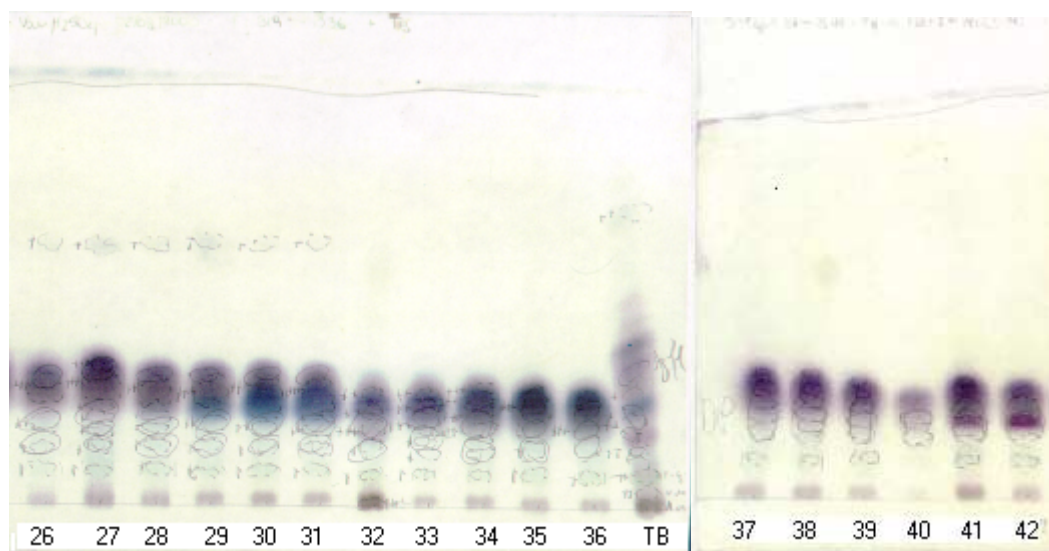


Figura 6. Cromatograma das frações da coluna 1°B.

4.5.2. Avaliação de letalidade para larvas de *Artemia salina* das frações das colunas B

A tabela 6 apresenta dados das frações testadas que tiveram resultados significativos frente ao bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*.

Tabela 6. Síntese dos resultados obtidos com as frações das colunas B.

Frações aplicadas	Coluna	Frações reunidas	Nome da fração	rendimento (mg)	χ^2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
1° A5-6 e 2° A4a-7 ^a	1°B	1° B29-42	1°BVII	186,9	8,2223
3° A4,5,7 4° A5-9 5° A6-9	2°B	2° B15-23	2°BV	139,4	7,0202
		2° B24-35	2°BVI	112,2	28,1333
	3°B	3° B15-17	3°BV	89,5	17,4102
		3° B18-26	3°BVI	213,0	28,1333
		3° B27-30	3°BVII	71,7	14,9524
	4°B	4° B11-17	4°BIII	95,5	28,1333
4° B18-21		4°BIV	38,8	17,4102	

4.6. Coluna de Sephadex (Sx)

Para continuação do fracionamento cromatográfico foram utilizadas as

frações 2°BVI, 3°BVI, 4°BIII e a fração 1°BVII.

No decorrer da eluição destacaram-se duas manchas, uma de cor amarelo-escura e outra amarelo claro, percorrendo a coluna rapidamente. A primeira foi recolhida na fração Sx4(12 mL) e a segunda na fração Sx5 (11mL), quando foi trocado o frasco para recolher a fração Sx6, depois passou-se a recolher 7 mL por fração.

Após evaporação do eluente, nas frações Sx4-7 estava presente um líquido oleoso amarelo, mais escuro em Sx4. Nas três primeiras também estava presente um precipitado de cor branca, em maior quantidade na Sx4 e 5. As massas obtidas foram de 117,5 mg para Sx4, 136,6 mg para Sx5, 33,0 mg para Sx6 e 61,9 mg para Sx7.

4.6.1. CCD das frações da coluna Sx

As frações Sx6 e 7 apresentaram perfis cromatográficos muito semelhantes, com a presença em maior concentração da(s) substância(s) responsável(eis) por uma mancha *deep purple* ao UV 366 nm na primeira.

4.6.2. Bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* com frações da coluna Sx

Devido à pequena quantidade obtida, foram testadas apenas as frações Sx4, 5 e 7 na concentração de 20 µg/mL, sendo que a única fração com resultado significativo no bioensaio foi Sx7, com χ^2 28,1333.

4.7. Coluna C

Esta coluna foi procedida com a reunião das frações Sx6 e 7, já que Sx6 demonstrou um perfil cromatográfico praticamente idêntico a Sx7.

4.7.1. CCD das frações da coluna C

Na Figura 7 pode-se observar que praticamente não houve separação das manchas, estando a mancha em Rf 0,28 de fluorescência *deep purple* (seta) presente da fração C5 a C15.

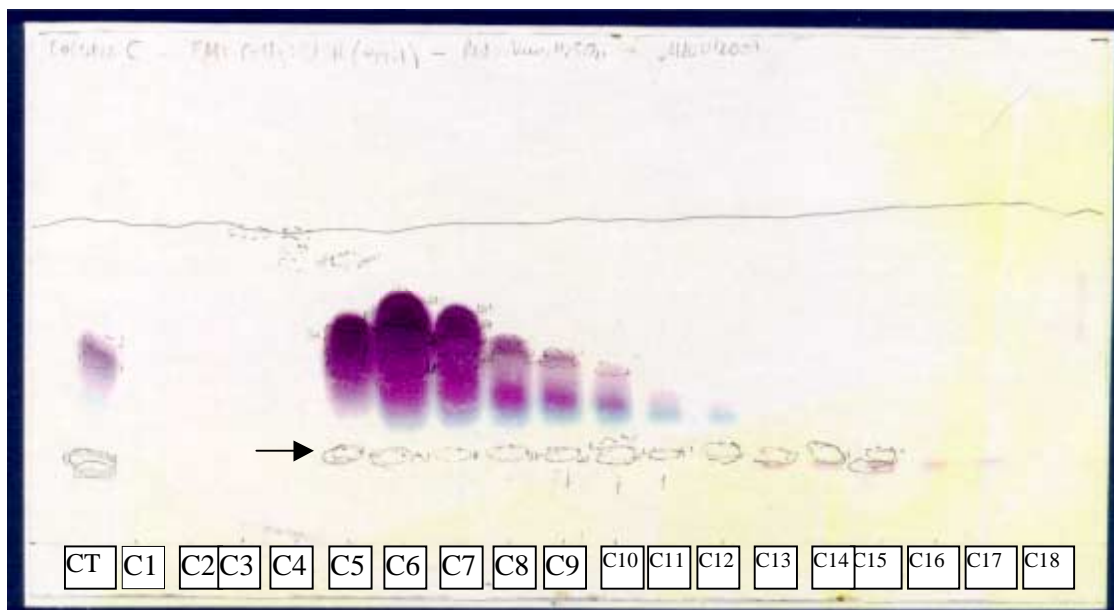


Figura 7. CCD das frações obtidas da coluna C.

4.7.2. Teste de letalidade para larvas de *Artemia salina* das frações coluna C

Foram testadas as frações C5, 8 e 12. Todas apresentaram $\chi^2 = 28,13$ no bioensaio (significativo para $\alpha=0,01$).

4.8. Testes de impregnação da sílica com nitrato de prata em placas prontas

Imersão: Sob luz UV 254 nm observou-se que a distribuição do AgNO_3 foi homogênea. Notou-se que a separação das manchas no processo cromatográfico foi superior àquelas alcançadas com sílica normal e com alumina.

Eluição: Observou-se sob luz UV 254 nm que nos dois testes, com solução do sal a 10% (m/V) em $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (75:25) e solução aquosa do sal a 40% (m/V), a distribuição do sal pela placa não foi totalmente homogênea. No primeiro, como descrito pelo autor, o $\frac{1}{4}$ final da placa apresentou-se mais claro que nos outros $\frac{3}{4}$ da placa. No segundo isto aconteceu apenas com 5% da parte superior, mas o tempo de eluição desta placa foi de 30 minutos, praticamente o dobro da primeira (~16 minutos). A intensidade de impregnação alcançada em ambas as placas foi superior às obtidas por imersão.

4.9. Impregnação de Sílica para produção de placas de CCD

Preparativa

Na comparação quanto à aparência das sílicas impregnadas com AgNO_3 obtidas pelos métodos **3.2.9.2.1**, **3.2.9.2.2** e **3.2.9.2.3**, observou-se que o primeiro método foi superior. A sílica obtida pelo método **3.2.9.2.2** apresentou grumos e a sílica, preparada pelo método **3.2.9.2.3** apresentou coloração mais escura que as outras, indicando a autooxidação do material (WILLIAMS e MANER., 2001), possivelmente pela utilização do etanol na sua preparação. A sílica obtida pelo método **3.2.9.2.2**, mesmo apresentando a maior concentração do sal, 20 % (m/m), apresentou a mesma coloração que a obtida pelo primeiro método, que continha a metade desta concentração.

Quando incorporadas nas placas cromatográficas e analisadas sob luz UV 254, as placas preparadas com a sílica obtida do primeiro método apresentaram melhor homogeneidade quanto à impregnação do sal, seguida pelas do método **3.2.9.2.2**. Analisando-se sob luz UV 254 nm as placas feitas com o material obtido pela variação do método de MAREK (sem evaporar a água), observou-se que os dois centímetros iniciais e os dois finais apresentaram-se mais escuros que o restante da placa. As preparadas com a sílica obtida pelo método de TOUCHTONE e colaboradores (1992) a 50% e 10% (m/m) do sal (método **3.2.9.2.4**) apresentaram boa homogeneidade, porém nos cromatogramas realizados com a sílica obtida com o sal na concentração mais alta (50%) a visualização das manchas foi prejudicada. Tanto sob luz UV 254 nm como depois de reveladas com vanilina sulfúrica, alguns compostos não foram visualizados. Quanto ao tempo de ativação na estufa, a diferença foi pequena. Nas placas ativadas por duas horas os R_f das manchas foram menores. Porém, nas placas preparadas pelo método **3.2.9.2.4** com AgNO_3 a 10% e ativadas por 2 h a resolução das manchas foi inferior. A resolução das manchas pode depender das camadas de hidratação do adsorvente (WILLIAMS E MANER, 2001).

As placas preparadas com a sílica obtida pelo método **3.2.9.2.5** apresentaram distribuição homogênea quando analisadas sob luz UV 254 nm e permitiram a visualização das manchas, tanto no UV 254 nm, como depois de reveladas com vanilina sulfúrica, mas péssima resolução das manchas após o processo cromatográfico, sendo que a placa preparada com o material sem aquecimento no

preparo foi um pouco superior.

Analisando-se sob luz UV 254 nm as placas produzidas com sílica obtida pelo método **3.2.9.2.6**, observou-se que aquelas com 10% de AgNO₃ apresentaram-se mais homogêneas quanto à distribuição do sal que as placas a 5%. No melhor sistema cromatográfico testado, CHCl₃: AcOEt (3:1), com saturação da cuba, na placa a 5% foi visualizada em 254 nm uma mancha em R_f coincidente com uma das manchas reveladas; na placa a 10%, tal mancha apareceu em R_f 0,65 e a mancha revelada em R_f 0,49. De acordo com os motivos acima expostos o método de preparação da sílica para a realização das CCDP escolhido foi o **3.2.9.2.6**, com 10%(m/m) de AgNO₃ em relação à sílica.

4.10. Escolha do sistema cromatográfico

Nas placas prontas preparadas por imersão e nas placas preparadas em laboratório com sílica impregnada com AgNO₃ pelos métodos já citados foram testadas as frações C6 e Sx5 com CHCl₃: AcOEt (85:15) CHCl₃: AcOEt (8:2) e CHCl₃: AcOEt (3:1) e revelador vanilina sulfúrica. Na avaliação foram levados em consideração principalmente os componentes da fração C6, visto que esta apresentou atividade no bioensaio.

Em todas as placas testadas, o eluente CHCl₃: AcOEt (3:1) demonstrou ser o mais efetivo na separação das manchas. Nas placas prontas obteve-se R_f 0,1, 0,2, 0,43 e 0,53, para as manchas de maior concentração, em um percurso de 8 cm. Nas placas preparadas em laboratório obteve-se manchas em R_f 0,05, 0,13, 0,33, 0,5, 0,59, 0,69 e 0,74 (esta última visualizada em luz UV 254 nm) em um percurso de 17 cm e em cuba saturada para.

Portanto o sistema cromatográfico escolhido foi: sílica impregnada com nitrato de prata 1:10 (preparada pelo método 3.2.9.2.6), CHCl₃: AcOEt (3:1) como eluente, com saturação da cuba e revelador luz UV 254 nm e vanilina sulfúrica.

4.11. Testes de recuperação da amostra após CCDP utilizando cafeína

Após extração da cafeína a partir da sílica impregnada com AgNO₃ (ver item 3.2.11) e a evaporação do metanol obteve-se 51,9 mg de um resíduo de coloração escura. Pode-se afirmar que o metanol extraiu não só o composto, como também

solubilizou certa quantidade de sílica, pois a amostra aplicada foi de 10 mg, e o resíduo continha partículas muito semelhantes à sílica. A massa do resíduo obtido da extração com clorofórmio foi de 6,5 mg, de tonalidade escura, mas não tão intensa quanto o anterior. Tais resultados mostram que estes métodos de extração não são adequados.

4.12. Teste de recuperação e purificação do composto utilizando colesterol

Após extração (ver item 3.2.12) e a evaporação do líquido extrator foram obtidos 6,4 mg de resíduo extraído sob agitação em agitador magnético e 8,4 mg do resíduo extraído sob sonicação. Estes apresentavam cor, odor e aparência similares ao colesterol. Os resíduos foram cromatografados juntamente com amostra de colesterol, comprovando-se a autenticidade dos compostos recuperados e ausência de artefatos pela análise sob luz UV 254 nm e 366 nm e após revelação com vanilina sulfúrica.

4.13. CCDPAGs das frações 1°Sx5 e fração C5-12

Após a revelação das placas, como descrito no método 3.2.13.3, naquelas onde foram cromatografadas a fração 1°Sx5 foram detectadas 6 manchas em Rf 0,13, 0,33, 0,51, 0,59, 0,69 e 0,74 (esta última visualizada em luz UV 254 nm). A mancha de menor Rf foi encontrada apenas nas placas 1, 2, 5 e 7. Nas placas onde foram cromatografadas a fração C5-12 observou-se 1 mancha com extinção em Rf 0,72 e, depois de revelada a placa, outras 4 manchas em Rf 0,13, 0,33, 0,49 e 0,62. Todas as frações foram submetidas aos procedimentos 3.2.13. As frações foram nomeadas \underline{x} PAg \underline{y} , " \underline{x} " indicando a placa proveniente e " \underline{y} " o número da mancha por ordem crescente de Rf. Por exemplo: para fração **1PAg III** da CCDPAg da fração C5-12, fração proveniente da placa 1 e mancha de Rf 0,49.

4.14. CCD analítica das frações PAg

As frações foram cromatografadas sobre placas prontas impregnadas com AgNO₃ por imersão e em placas de gel de sílica sem o sal. Em todas as placas foram visualizadas uma mancha no ponto de aplicação e outra no frente. Além destas manchas foram visualizadas nos cromatogramas:

→ **Frações 1,2,5 e 7 PAg I:** mancha em Rf 0,11 e das **frações 10 a 12 PAg I** (proveniente fração C5-12) manchas em Rf 0,11, 0,15 e 0,19.

→ **Frações 1 a 12 PAg II:** manchas em Rf 0,31. Porém quando cromatografadas sobre gel de sílica sem AgNO₃ com EP: AcOEt (8 : 2), apresentaram três manchas em Rf 0,39, 0,47 (representando 80% da fração) e 0,55.

→ **Frações 1 a 9 PAg III:** mancha em Rf 0,48 nas frações 1 a 9 e nas **frações 10 a 12** manchas em Rf 0,4 (menos intensa) e 0,48. Quando cromatografadas sobre gel de sílica sem AgNO₃ com CHCl₃: EtOH (99:1) foram visualizadas manchas com extinção em Rf 0,38 e, depois de reveladas com vanilina sulfúrica, manchas em Rf 0,35, 0,41 e 0,44, com esta última representando 70% da fração.

→ **Frações 1 a 9 PAg IV:** manchas em Rf 0,16, 0,39, 0,46, 0,54, 0,56 e **frações 10 a 12** manchas em Rf 0,48, 0,56 e 0,6. Todas apresentaram intensidades semelhantes, portanto foi descartada a hipótese de posterior purificação

→ **Frações 1 a 9 PAg V :** manchas em Rf 0,48, 0,55, 0,62, 0,66 e 0,7. As intensidades das manchas também foram semelhantes e a purificação dos compostos não foi realizada.

As manchas de baixa intensidade não foram visualizadas em sílica contendo AgNO₃, uma desvantagem do método que demonstra a necessidade do controle da pureza das frações em gel de sílica sem prata. Isto poderia estar relacionado ao complexo formado da prata com os elétrons π da molécula, o que pode dificultar ou impedir as transições eletrônicas necessárias para originar a cor e/ou mesmo impedir a complexação do revelador com a molécula.

O processo de purificação foi procedido com as frações 1 a 12 PAg II (TPAg II) e 1 a 12 PAg III (TPAg III).

4.15. CCDP das frações TPAg II e III – Obtenção de Cc1 e Cc2

4.15.1. Fração TPAg II- Obtenção de Cc1

Após revelação segundo método 3.2.13.3 observaram-se três manchas em Rf 0,25, 0,39 e 0,5. Embaixo desta última já havia sido visualizada em UV 254 nm uma mancha com extinção. A mancha em Rf 0,39 que representava aproximadamente

65% do total foi raspada e submetida ao processo de extração (método 3.2.14), resultando em 1,6 mg de um resíduo oleoso e de cheiro agradável. Quando este foi cromatografado sobre sílica impregnada com AgNO₃ e revelado com vanilina sulfúrica apresentou apenas uma mancha em Rf 0,36. No cromatograma de sílica sem AgNO₃, eluída com EP: AcOEt (8:2), pôde-se observar três manchas, uma em Rf 0,37, outra em Rf 0,32 e a maior em Rf 0,3 de cor azul escuro após revelação com vanilina sulfúrica, que representou aproximadamente 95% do total. Esta substância, nomeada Cc1, foi enviada para análise por RMN na Universidade de Bonn, sendo que os espectros obtidos são discutidos no item 5.

4.15.2. Fração TPAg III – Obtenção de Cc2

Nesta placa foi visualizada uma mancha com extinção em Rf 0,43 que depois de revelada (método 3.2.14), adquiriu cor roxa, uma mancha de coloração roxa em Rf 0,31 e a mais intensa (aproximadamente 60% do total) em Rf 0,56. Esta última, de coloração entre roxa e rosa, foi raspada e extraída (método 3.2.15.1) resultando em 2,2 mg de um resíduo oleoso que, quando cromatografado sobre gel de sílica sem prata com EP:AcOEt (8:2) mostrou ser constituída por três substâncias, as minoritárias em Rf 0,2, 0,37 e a majoritária (90% do total) em Rf 0,29. Esta amostra, nomeada Cc2, foi enviada para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas na Universidade de Bonn, mas até o momento os espectros não foram recebidos.

4.16. Teste de letalidade para larvas de *Artemia salina* com Cc1 e Cc2

Apenas Cc1, na concentração de 3 µg/mL, apresentou índice significativo de letalidade para larvas de *Artemia salina*, com $\chi^2 = 14,94$.

4.17. Extração do óleo essencial de *Cordia curassavica*

Obteve-se o teor de óleo essencial de 0,85% (V/m), sendo que a literatura descreve de 0,5% a 1,1% (AKISUE *et al.*, 1983). O óleo foi enviado para análise por GC/MS.

4.18. Elucidação estrutural de Cc1

Nos espectros de ^{13}C -RMN (Fig. 8, 9 e 10a) foram observados 19 sinais. Os sinais em 14,51, 23,09 e 32,50 ppm, por apresentarem baixa intensidade em relação aos demais foram considerados como sendo impureza presentes na amostra. Na tabela 17 estão os tipos de carbono que correspondem a cada sinal, de acordo com a análise dos espectros obtidos pelas técnicas DEPT (Fig. 10b, 10c, 11a e 11b). Nos espectros obtidos pela técnica DEPT 135 (Fig. 10b e 11a) os sinais com deslocamentos 25,75, 27,12, 30,10, 37,58, 40,13, 40,33 e 61,66 ppm aparecem invertidos, o que indicou tratarem-se de carbonos metilênicos (PAVIA *et al.*, 1996; SANDERS e HUNTER, 1993). O último deles, pelo deslocamento que apresenta, trata-se de um grupo metilênico ligado a um átomo de oxigênio (Tab. 9). Nos espectros obtidos pela técnica DEPT 90 (Fig. 10c e 11b), onde os sinais de metila desaparecem e os sinais de metinos se intensificam, pode-se observar que os sinais em 16,37, 18,09 e 26,09 ppm desapareceram, o que indicou tratarem-se de metilas. (SANDERS e HUNTER, 1993; PAVIA *et al.*, 1996) Os sinais em 124,77, 124,99, 19,97 e 29,59 ppm não apareceram invertidos no espectro de DEPT 135 e apresentaram maior intensidade (exceto o sinal em 19,97) nos espectros da técnica DEPT 90, o que indicou serem sinais de metinos (SANDERS e HUNTER, 1993; PAVIA *et al.*, 1996). A baixa intensidade do sinal em 19,97 ppm nestes espectros apontou a possibilidade de se tratar de dois sinais no mesmo deslocamento químico: uma metila, grupo responsável pelo sinal mais intenso no espectro ^{13}C -RMN normal e que desaparece no espectro de DEPT 90, e um metino. Os sinais entre 124 e 136 ppm correspondem a carbonos olefínicos (Tab. 9). De acordo com o observado nos espectros de DEPT os carbonos em 124,77 e 124,99 ppm são metinos e os sinais em 131,70 e 135,30 ppm, que desaparecem em ambos os espectros obtidos pelas técnicas de DEPT 90 e 135, são carbonos quaternários.

Tabela 7. Tipo de C atribuído a cada sinal do espectro de ^{13}C -RMN de Cc1 a partir das técnicas de DEPT 135 e DEPT 90.

Deslocamento C (ppm)	Tipo de C
16,37	CH ₃
18,09	CH ₃
19,97	CH ₃
25,75	CH ₂
26,09	CH ₃
27,12	CH ₂
29,59	CH
30,10	CH ₂
37,58	CH ₂
40,13	CH ₂
40,33	CH ₂
61,66	CH ₂ OH
124,77	CH=
124,99	CH=
131,70	CR ₄
135,30	CR ₄

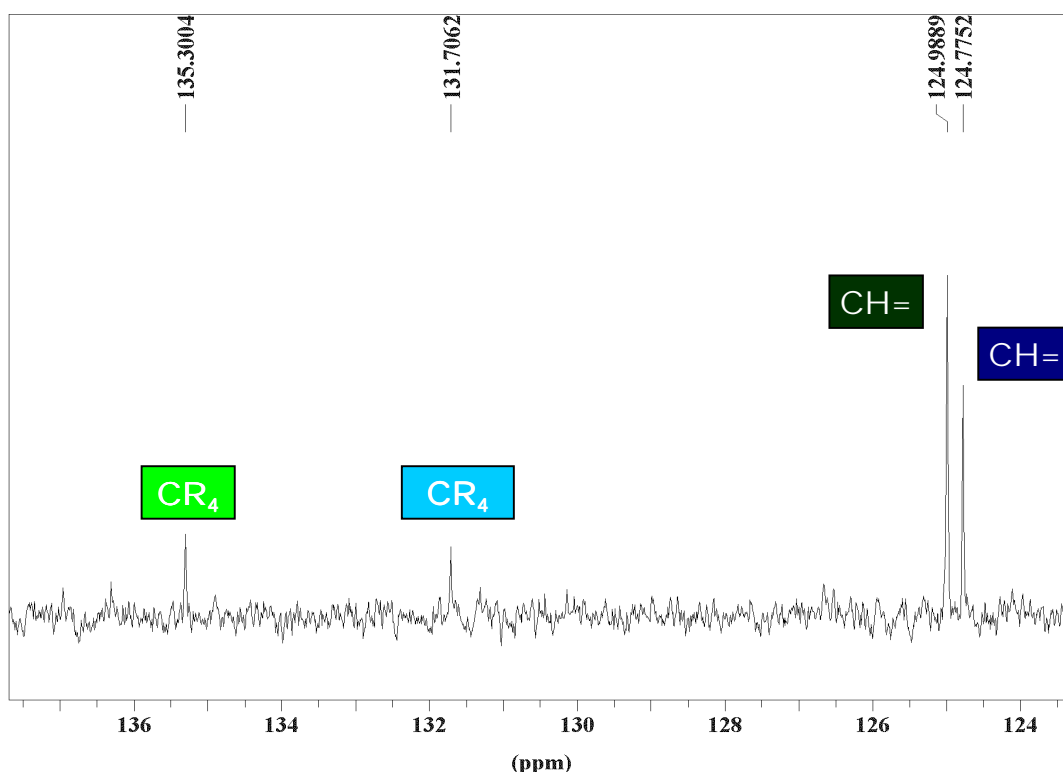


Fig.8. Detalhe do espectro ^{13}C -RMN de Cc1 (região entre 123,5 e 137,5 ppm).

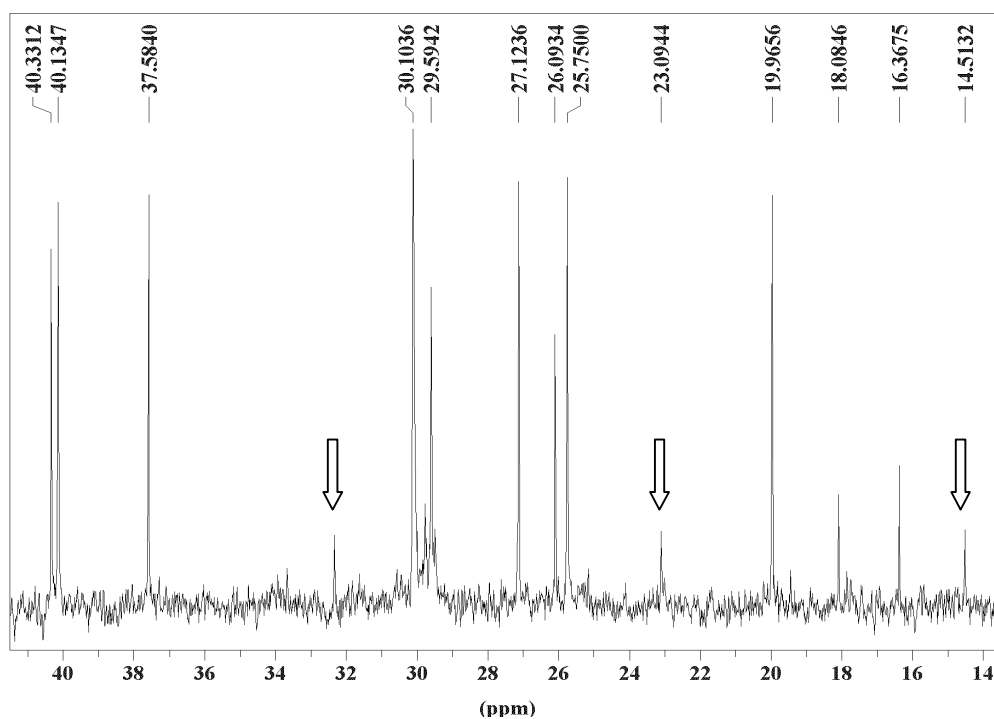
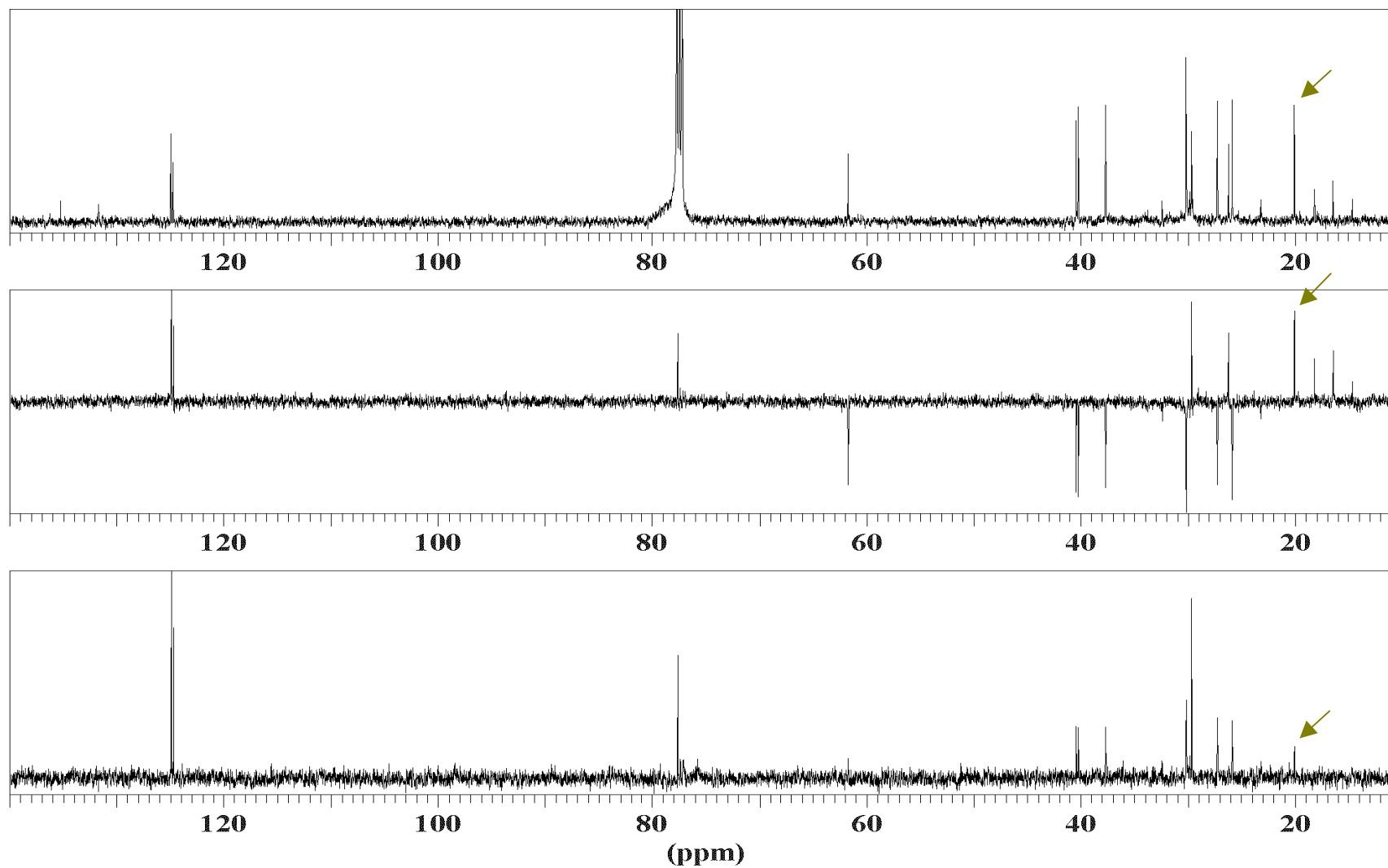


Figura 9. Detalhe do espectro ^{13}C -RMN de Cc1 (região entre 13 e 41 ppm) com as setas apontando para os sinais descartados pela baixa intensidade.



b) Espectro de ^{13}C -RMN obtido pela técnica DEPT 135.

Figura10. a) Aspecto geral do espectro de ^{13}C -RMN de Cc1 em CDCl_3 .

b) Espectro de ^{13}C -RMN obtido pela técnica DEPT 135.

c) Espectro de ^{13}C -RMN obtido pela técnica DEPT 90.

As setas apontam para o sinal em 19,96 ppm que foi interpretado como superposição de uma metila e um metino

A

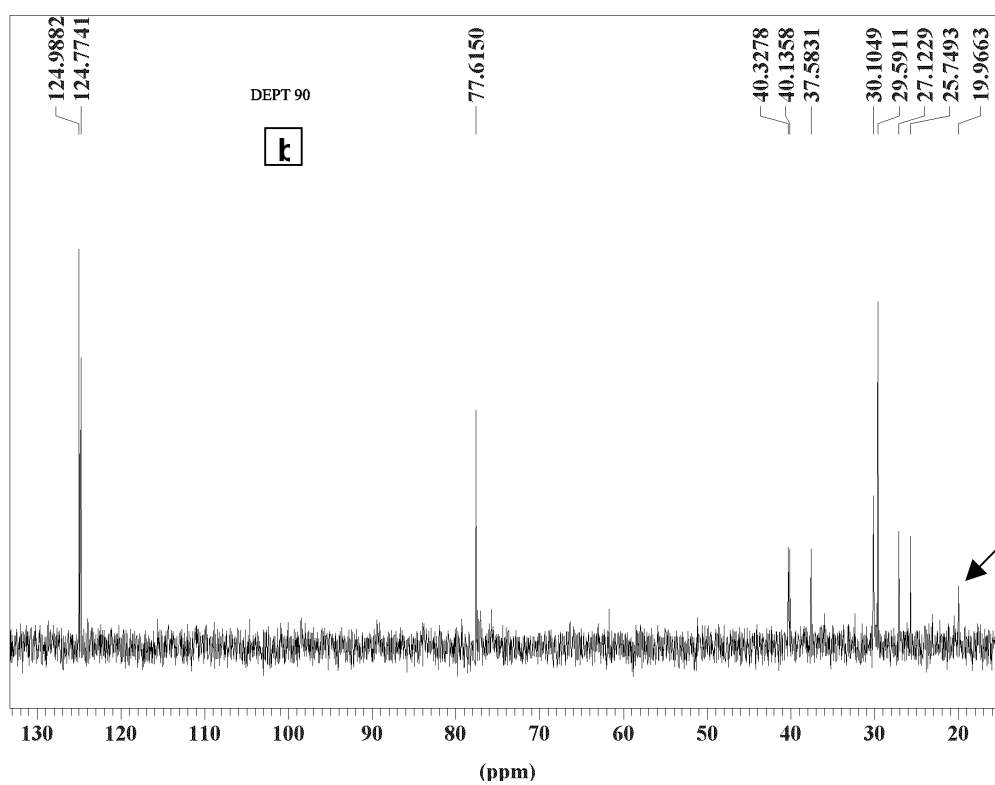
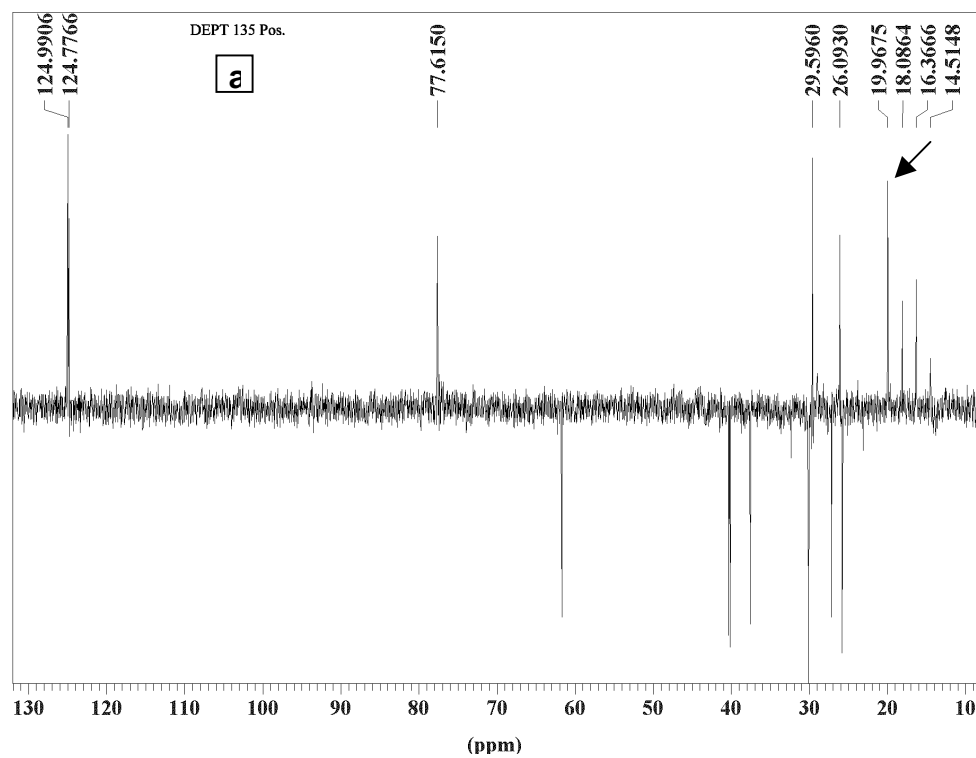


Figura 11. a) Espectro de ^{13}C -RMN obtido pela técnica DEPT 135.

b) Espectro de ^{13}C -RMN obtido pela técnica DEPT 90.

As setas apontam para o sinal em 19,96 ppm, proposto como sinais de metino e metila sobrepostos, ressaltando a diferença de intensidade.

O número de prótons correspondentes a cada sinal no espectro de RMNP total (Fig. 12) foi calculado de acordo com a calibração pela integral do sinal do grupo CH₂OH em 3,7 ppm (δ obtido da análise da Fig. 15) que corresponde a 2 prótons. Assim o sinal em 0,94 ppm (δ obtido da análise da Fig. 15) corresponde a cerca de 4 prótons; o sinal em 1,3 ppm a 10 H; em 1,6 ppm a 14 H; em 1,7 ppm a 4 H; entre 2,0 e 2,1 ppm a 6 H e o sinal em 5,1 ppm a 2 H. Isto indicaria um total de aproximadamente 43 H. Este número não condiz com o número esperado para o composto Cc1 partindo-se dos espectros de ¹³C-RMN normal e da técnica DEPT (Figs. 8 a 11). No espectro obtido pela técnica bidimensional de RMN de HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation) (Fig.17) pode-se observar que o próton do grupo metino (que estava sobreposto ao sinal de metila em 19,96 ppm) encontra-se na mesma região dos prótons desta, em 0,94 ppm, o que estaria de acordo com a presença de 4 H nesta região sugerida pela integral. Os prótons da metila aparecem no espectro de RMNP como um dubleto com constante de acoplamento de 6,56 Hz (Fig. 13). Analogamente pode ser observado no de HMQC (fig.17) que os prótons correspondentes ao metileno em 23,09 ppm (sinal desconsiderado baixa intensidade), o metileno em 32,5 ppm e o metileno de sinal intenso em 37,58 encontram-se no singuleto em 1,3 ppm.

A presença de impurezas na amostra dificultou a interpretação dos sinais nos espectros de RMNP (Figs. 12 a 15). Aparentemente observa-se um dubleto em 0,94 ppm, singuletos em 1,3, 1,6 e 1,7 ppm e multipletos nas regiões entre 2,0 e 2,1 (Fig 13) e 3,66 e 3,76 ppm (Fig. 15). De acordo com o espectro obtido pela técnica bidimensional de RMN de HMQC (fig.17) os sinais localizados entre 2,0 e 2,1 ppm correspondem a três grupos metilênicos CH₂, CH₂ e CH₂. Pode-se afirmar que os sinais correspondentes aos prótons de CH₂ e CH₂ estão localizados no multiplete entre 1,97 e 2,05 ppm e os sinais dos prótons de CH₂ no multiplete entre 2,05 e 2,12 ppm. Os deslocamentos atribuídos a estes prótons foram 2,00, 2,02 e 2,09 ppm.

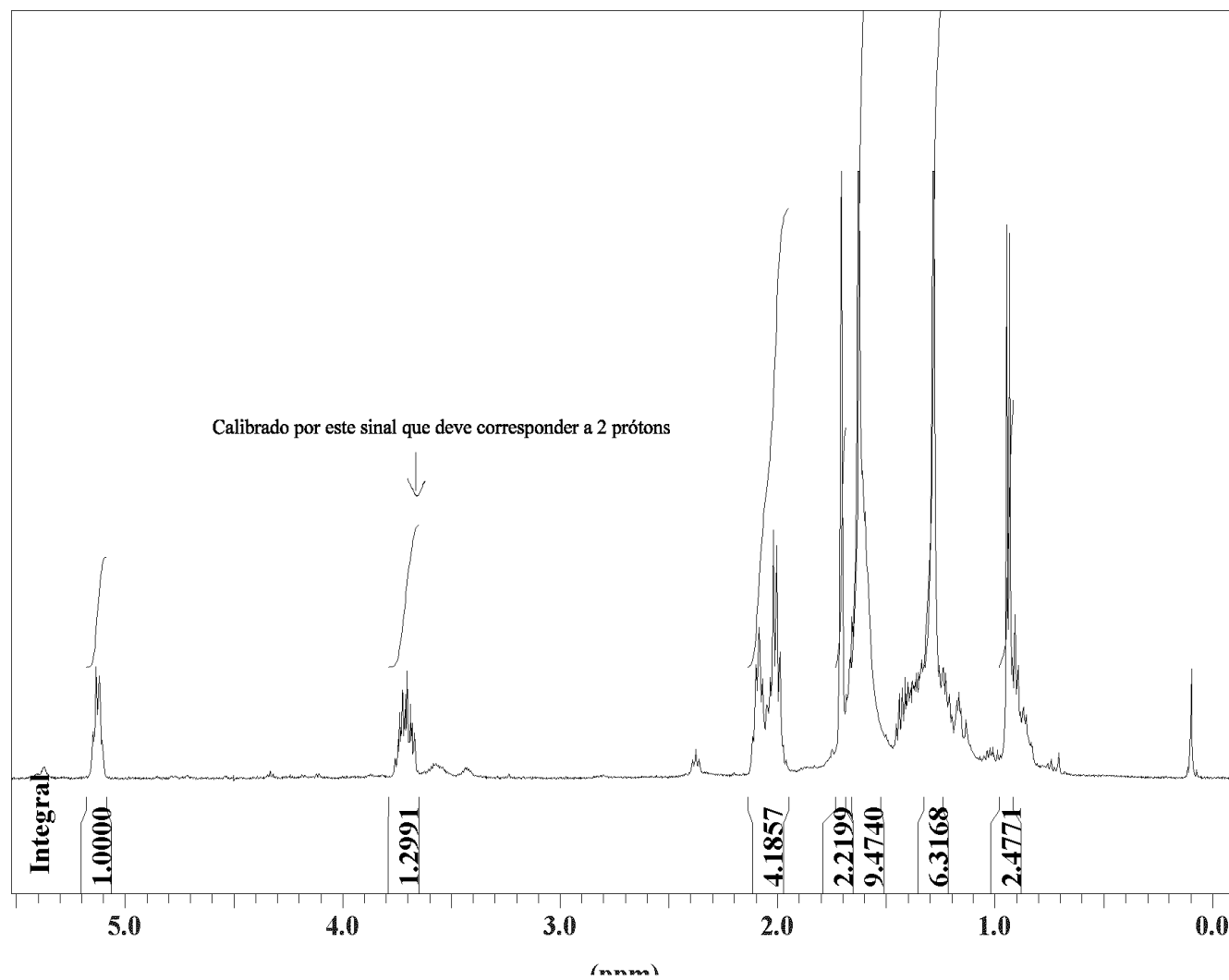


Figura 12. Espectro de RMNP geral de Cc1 obtido em CDCl_3 e aparelho de 500 MHz.

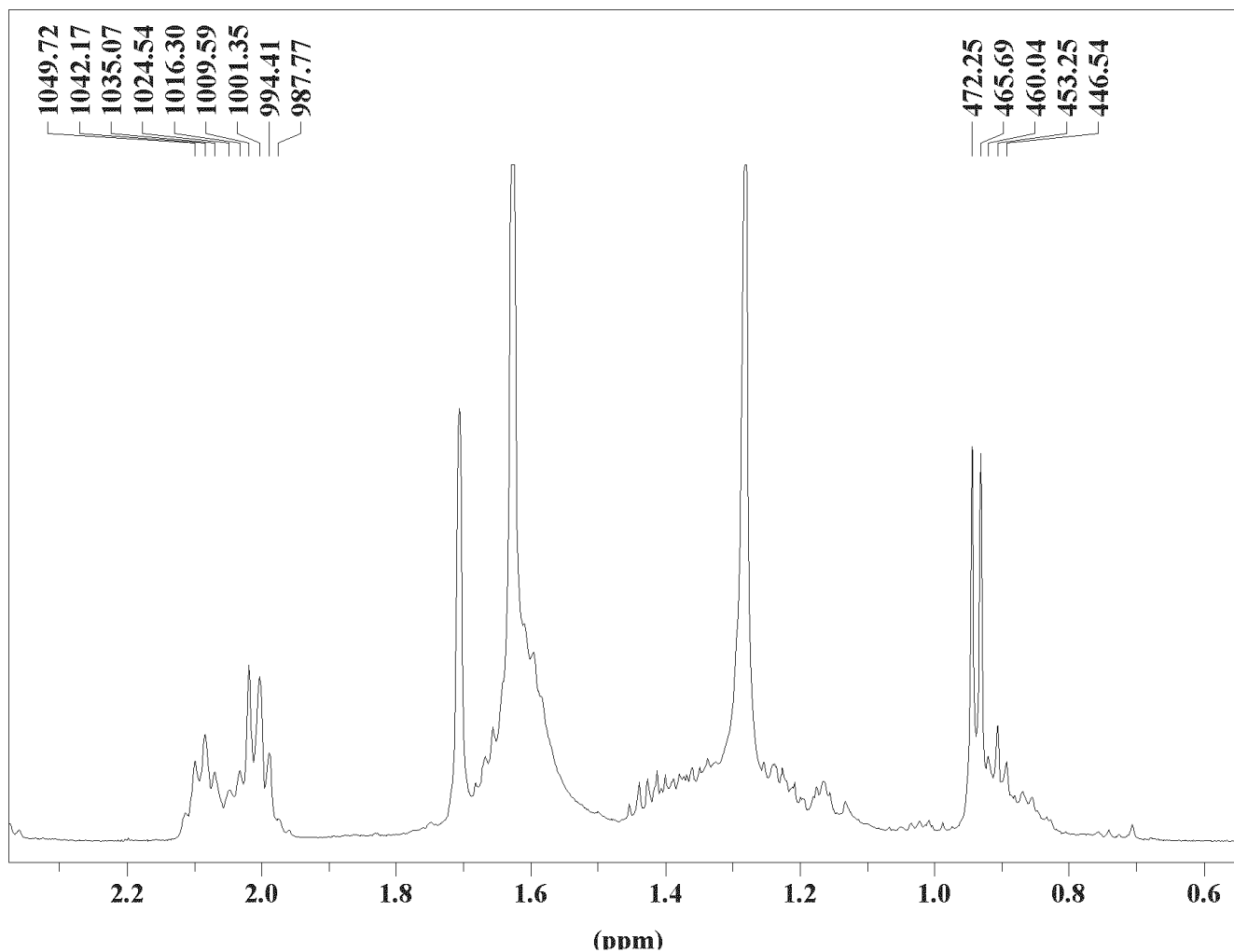


Figura 13. Espectro de RMNP de Cc1 obtido em CDCl_3 e aparelho de 500 MHz. (região entre 0,6 2,4 ppm).

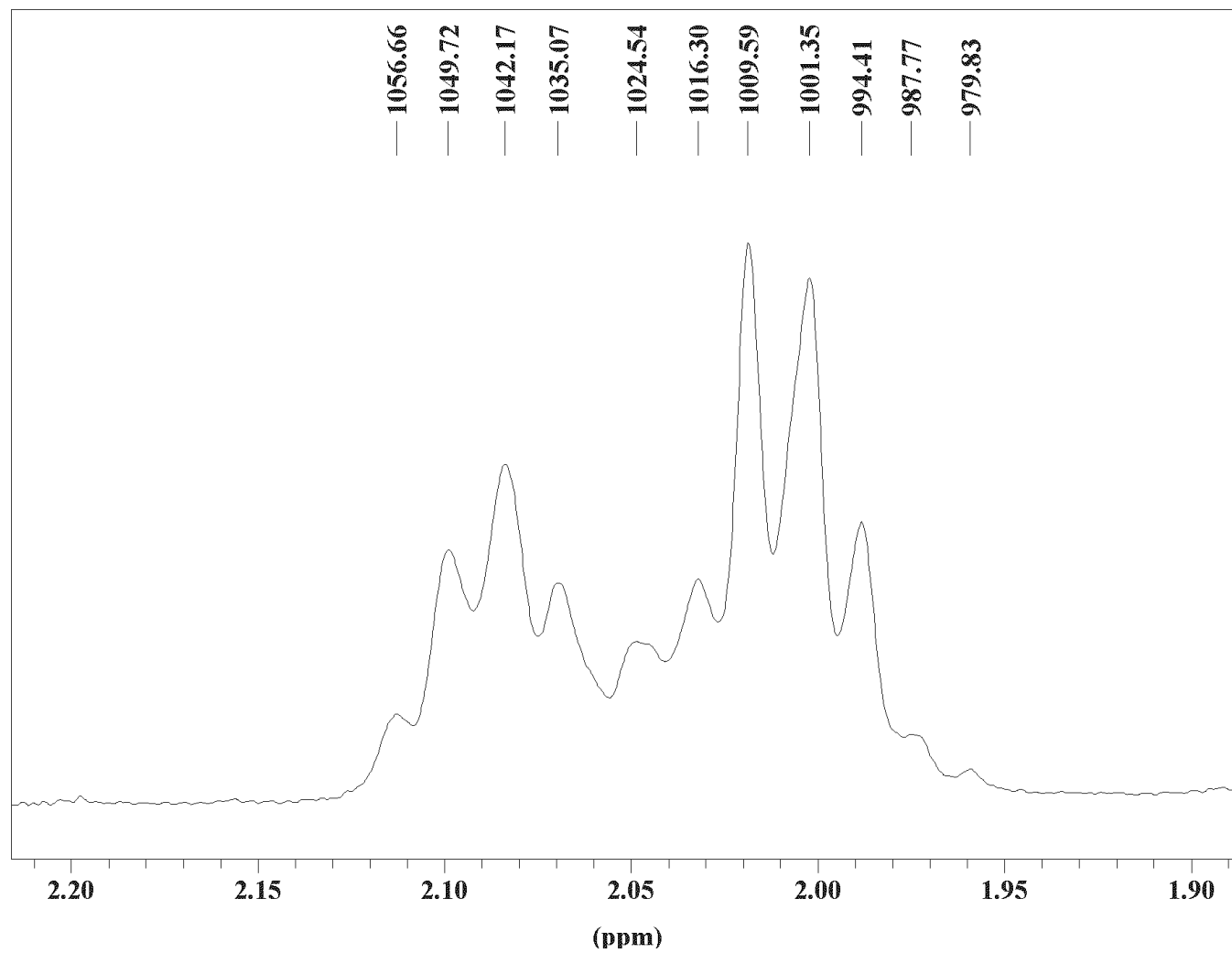


Figura 14. Detalhe ampliado do espectro de RMNP de Cc1em CDCl_3 (500 MHz). (região entre 1,89 e 2,21 ppm).

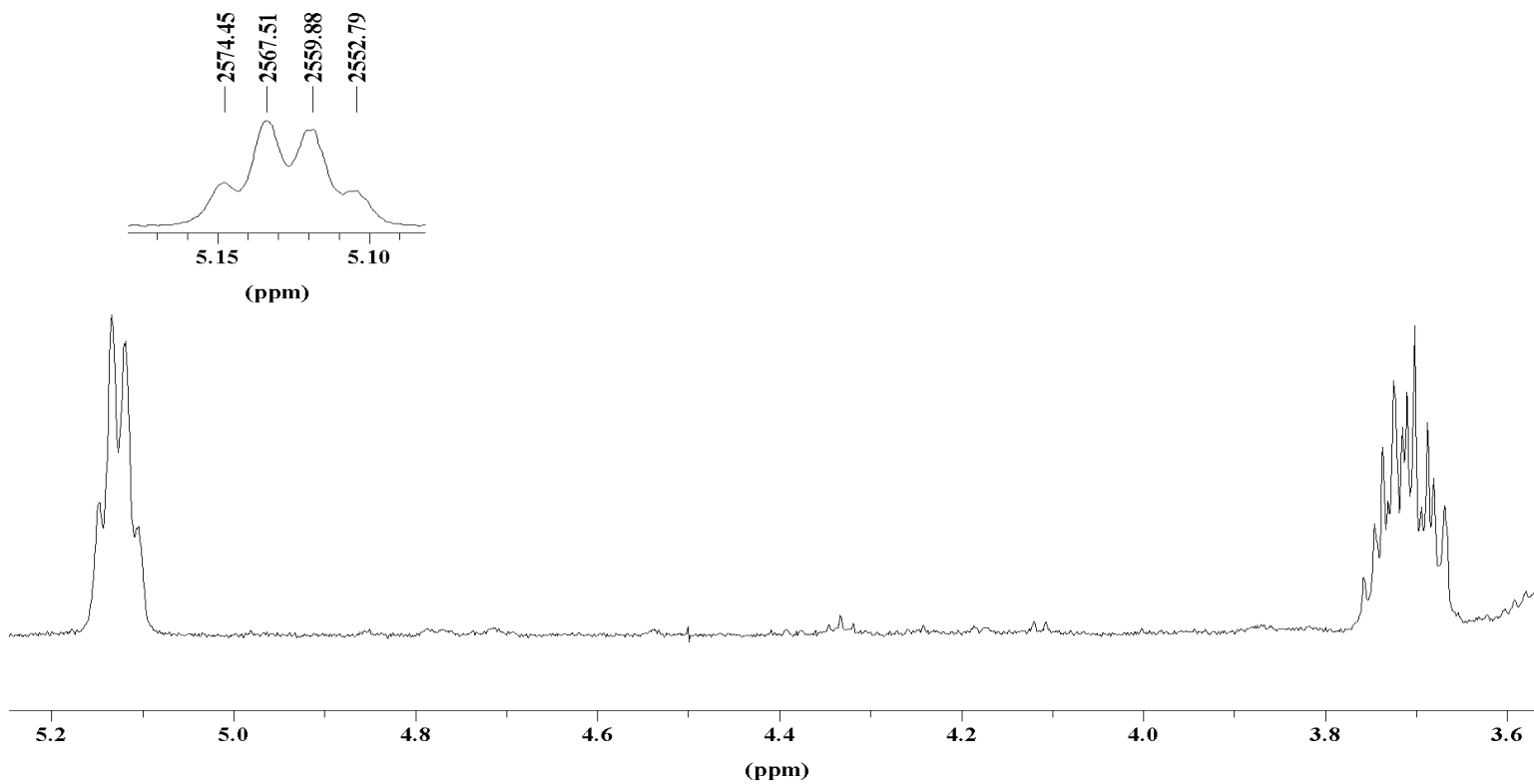


Figura 15. Detalhe ampliado do espectro de RMNP de Cc1 em CDCl_3 (500 MHz). (região entre 3,6 e 5,2 ppm).

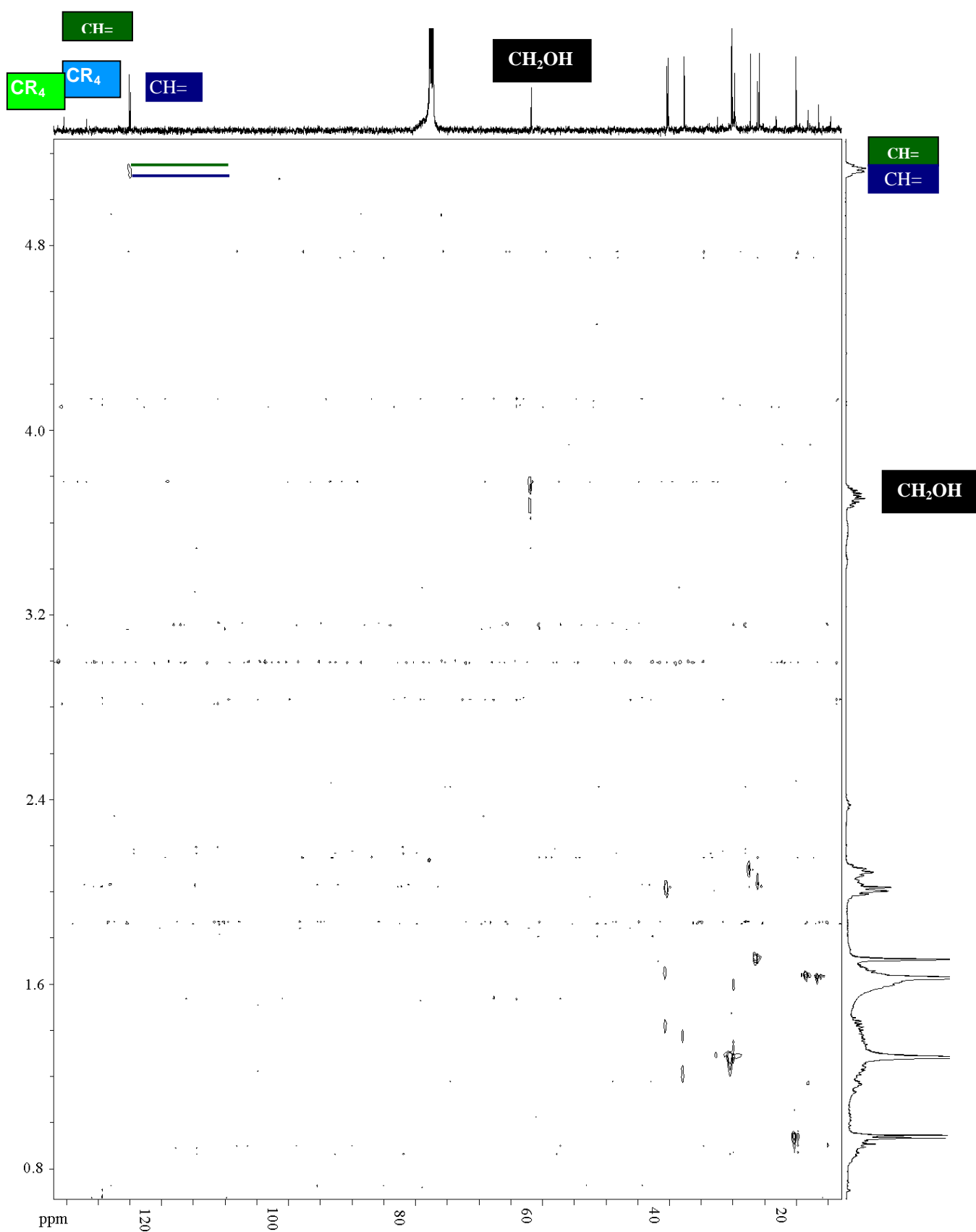


Figura 16. Espectro bidimensional de RMN de HMQC de Cc1, assinalando as correlações para os carbonos e prótons olefínicos e a função álcool.

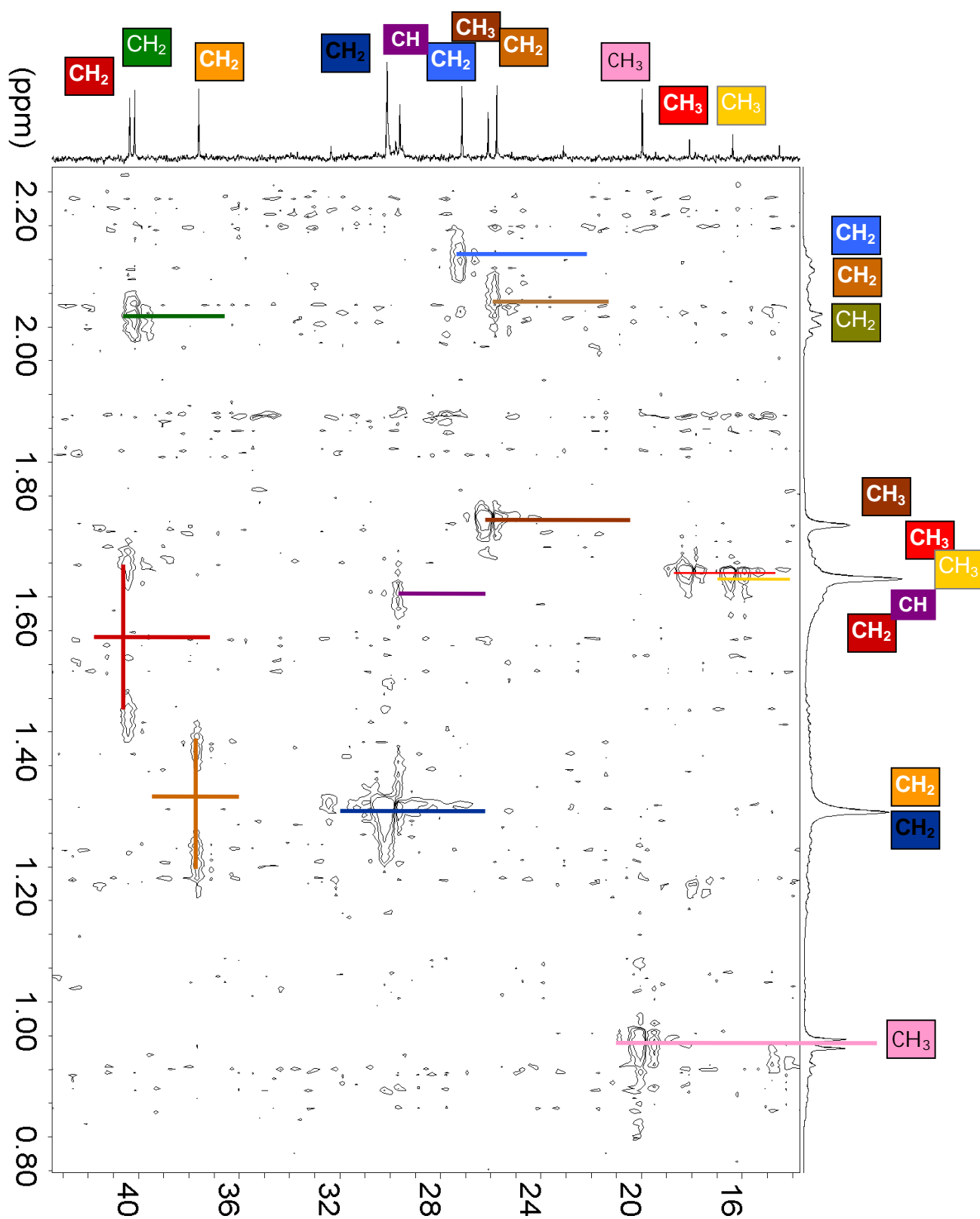


Figura 17. Detalhe do espectro bidimensional de RMN de HMQC de Cc1, assinalando as correlações para os carbonos e prótons alquílicos em campo mais alto (região entre 14 e 43 ppm).

Através dos espectros obtidos pela técnica HMQC (Fig.16 e 17) que relaciona os carbonos com os prótons diretamente acoplados (PIHLAJA e KLEINPETER, 1994; CROASMUN e CALSON, 1994) pôde-se observar os dados da tabela 8 abaixo.

Tabela 8. Sinais de deslocamentos químicos dos H relacionados aos C que estão diretamente acoplados de acordo com os espectros obtidos da técnica de HMQC.

Deslocamento C (ppm)	Tipo de C	H diret. Ligado HMQC (ppm)
14,51	CH ₃ (sinal descartado pela baixa intensidade)	0,90
16,37	CH ₃	1,6
18,09	CH ₃	1,6
19,97	CH ₃	0,94
23,09	CH ₂	Sem correlação
25,75	CH ₂	2,02
26,09	CH ₃	1,73
27,12	CH ₂	2,09
29,59	CH	1,59
30,10	CH ₂	1,3
32,3	CH ₂	1,3
37,58	CH ₂	1,3
40,14	CH ₂	2,00
40,33	CH ₂	1,53
61,66	CH ₂ OH	3,7
124,77	CH=	5,12
124,99	CH=	5,15

O sinal no espectro de RMNP em 3,67 ppm foi atribuído aos prótons do grupo metileno ligado à hidroxila. Este deslocamento químico é característico para este tipo de grupamento, pois a eletronegatividade do oxigênio acarreta na desblindagem destes prótons, fazendo com que apareçam em campo mais baixo (PAVIA *et al.*, 1996).

Na análise por CCD ao final do processo de purificação da amostra haviam sido percebidos sinais de impurezas. O carbono metilênico em 23,09 ppm no espectro de ^{13}C -RMN, de intensidade relativamente baixa do sinal, não apresentou correlação com hidrogênios nos espectros obtidos pela técnica de HMQC (Tab. 8 e Fig. 17), confirmando que este deve corresponder a impurezas presentes na amostra. Os outros sinais que também foram considerados de impureza da amostra pela baixa intensidade relativa nos espectros de ^{13}C -RMN, o carbono de metila em 14,5 ppm e o do grupo metilênico em 32,3 ppm apresentaram correlações nos espectros de HMQC com sinais de H em 0,9 e 1,3 ppm, respectivamente.

Nos espectros obtidos pela técnica de HMQC, COSY (Correlated Spectroscopy) (Fig. 18) e HMBC (Figs. 21 a 25) pode-se observar que os sinais dos prótons de CH_2 e CH_2 com deslocamentos em 1,53 e 1,3 ppm respectivamente, aparecem duplos. Isto indica que tais grupos estão ligados a um carbono quiral (PAVIA *et al.*, 1996).

Os sinais foram interpretados conforme os valores característicos de deslocamento químico (Tab. 9), de acordo com a literatura :

Tabela 9. Deslocamentos químicos típicos para C e H (Silverstein, 1994).

Deslocamento C ppm	Tipo de C	Deslocamento H ppm	Tipo de H
0 – 30	CH_3	0,5 - 1,5	CH_3CR_3
0 – 45	Alcanos	1 - 1,7	CH_3
25 – 45	CH_2 acíclico	1,5 - 2	$\text{CH}_3\text{-CR=CH}$
30 – 60	CH acíclico	1 - 2	R_3CH
110 – 150	Alqueno	4,5 - 7	RCH=C R_2
30 – 60	$\text{CH}_2\text{-O-}$	1 – 5,5	$\text{R}_3\text{C-OH}$

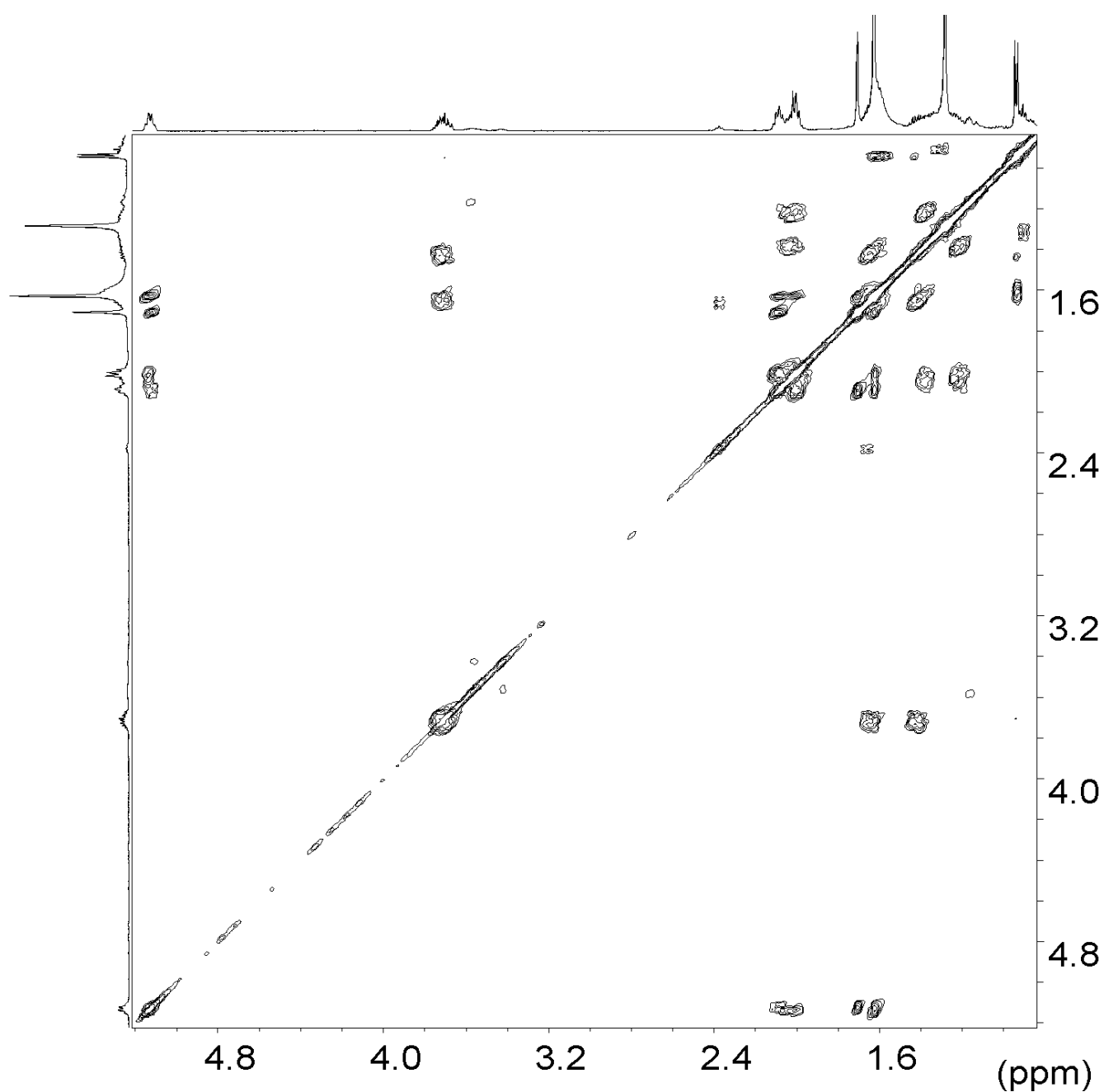


Figura 18. Espectro bidimensional de RMN protônica de Cc1, obtido pela técnica de HH-COSY.

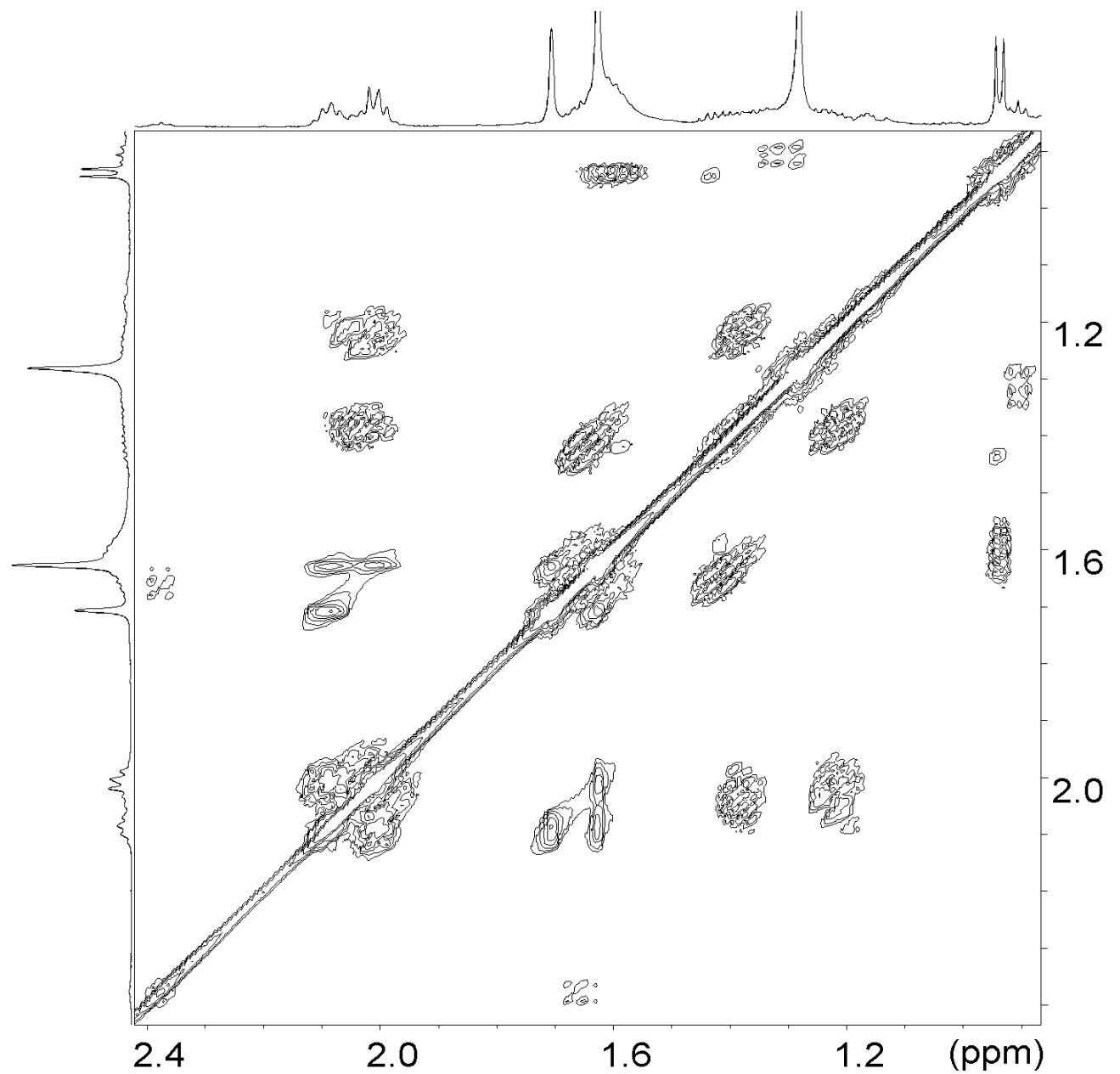


Figura 19. Detalhe ampliado do espectro bidimensional de RMN protônica de Cc1, pela técnica de HH-(região entre 0,8 e 2,4 ppm).

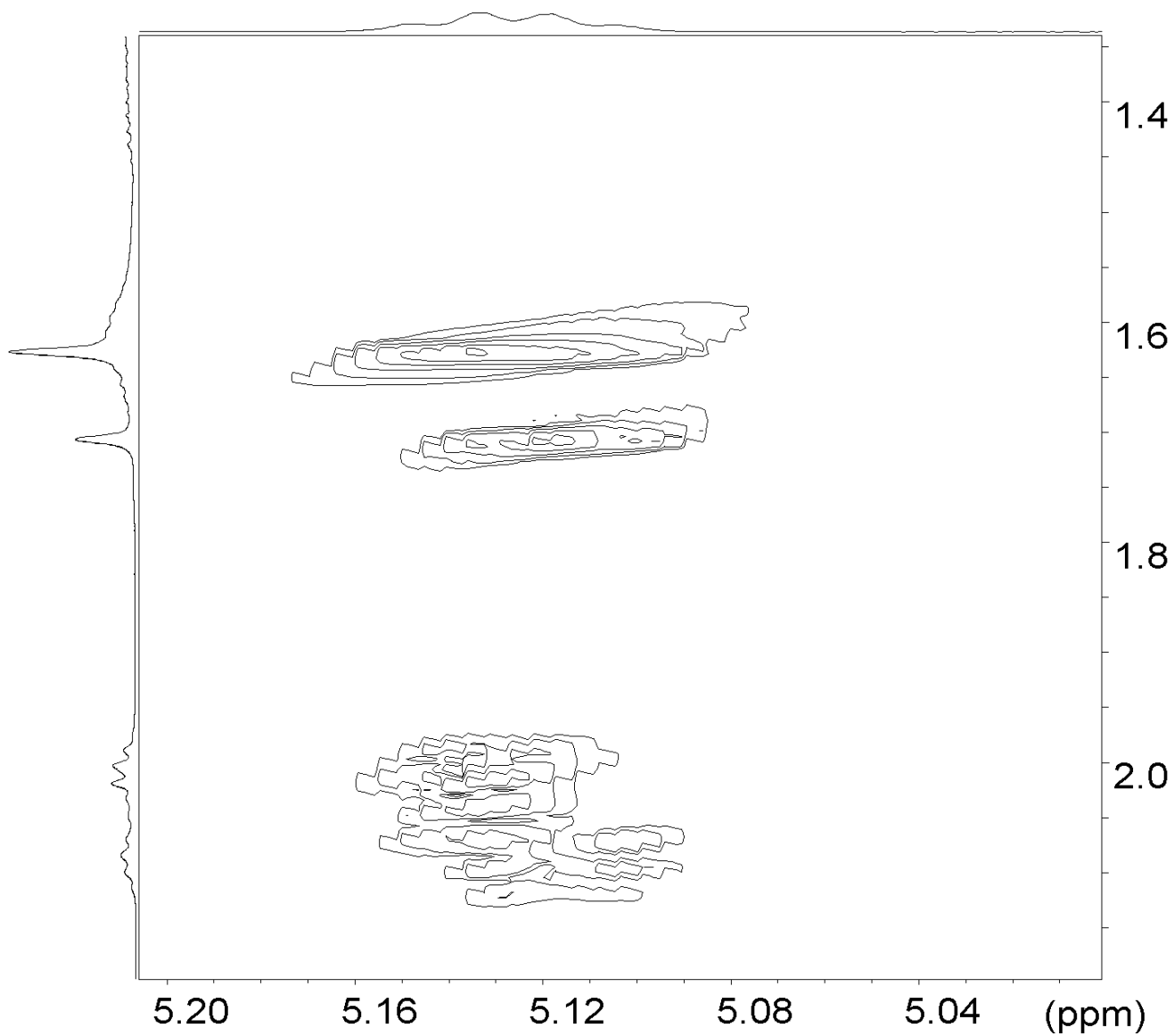


Figura 20. Detalhe ampliado do espectro bidimensional de RMN protônica de Cc1, obtido pela técnica de HH-COSY (região entre 5,0 e 5,2 ppm).

Tabela 10. Correlações entre os grupos de prótons a partir dos espectros obtidos pela técnica de COSY.

Deslocamento C (ppm)	Tipo de C	H diret. ligado HMQC (ppm)	deslocamento de H relacionado
16,37	CH ₃	1,6	2,00
18,09	CH ₃	1,6	1,70 2,09
19,97	CH ₃	0,94	1,59
25,75	CH ₂	2,02	1,6 ou 1,6 1,3
26,09	CH ₃	1,70	2,09 1,6 ou 1,6
27,12	CH ₂	2,09	1,70 1,6 ou 1,6
29,59	CH	1,59	0,94
30,10	CH ₂	1,3	0,9
37,58	CH ₂	1,3	2,02
40,13	CH ₂	2,00	1,6 ou 1,6
40,33	CH ₂	1,53	0,94
61,66	CH ₂ OH	3,7	1,53
124,77	CH=	5,12	1,6 +++ou 1,6 +++ 2,09 +++ 1,70+++ 2,00++ 2,02 +
124,99	CH=	5,15	1,6 +++ou 1,6 +++ 1,70+ 2,09 + 2,00+++ 2,02 +++

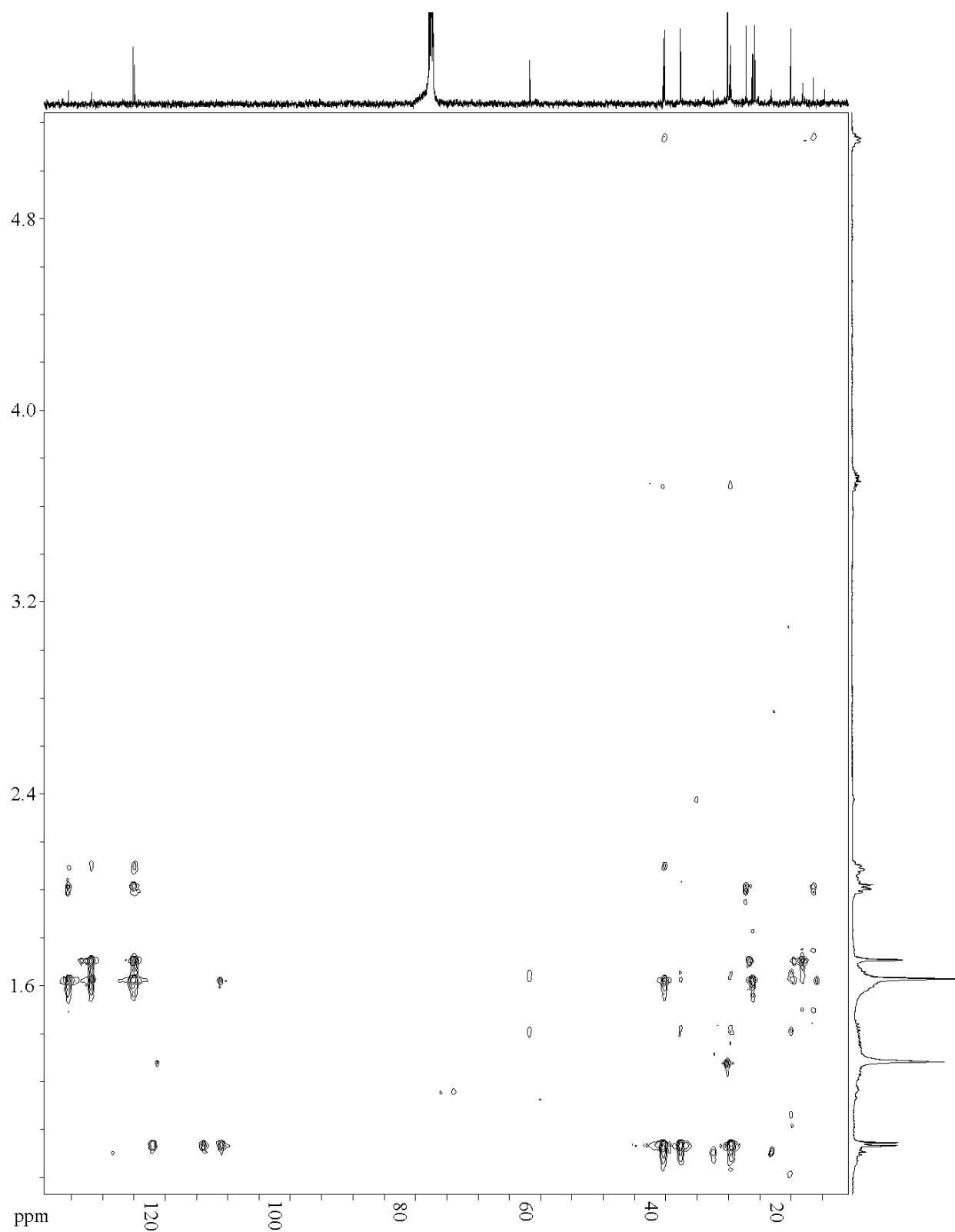


Figura 21. Espectro bidimensional de ^{13}C -RMN x RMNP de Cc1, obtido pela técnica de HMBC.

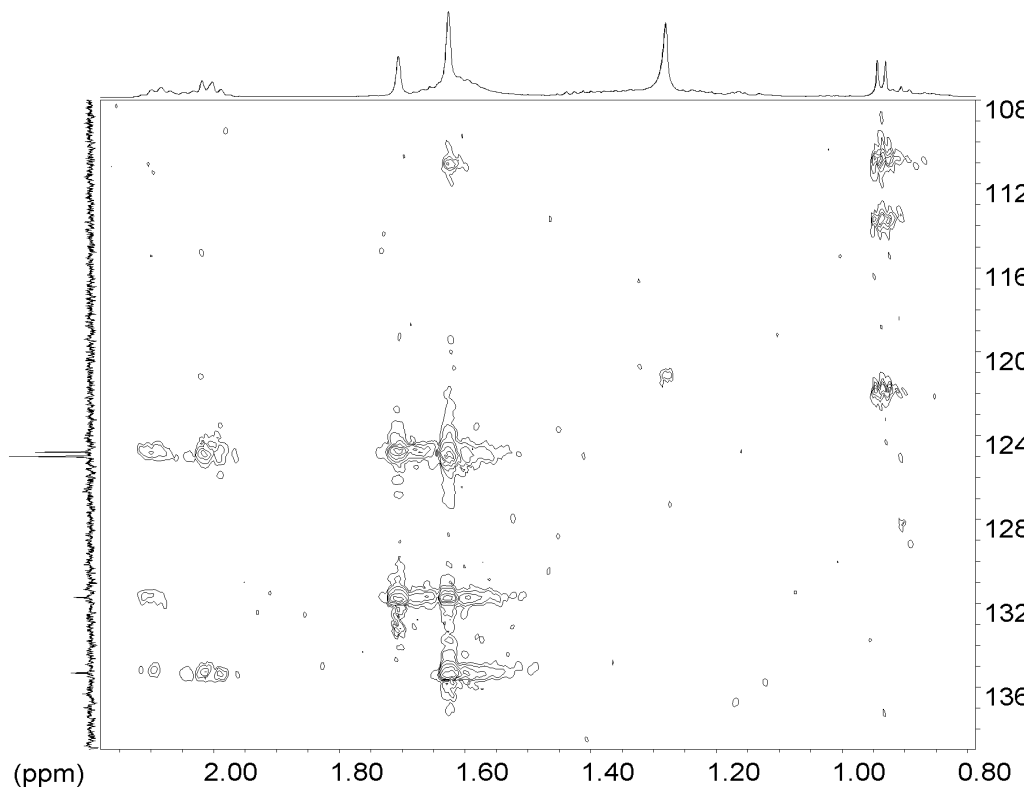


Figura 22. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ^{13}C -RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 0,08 a 2,15 ppm x 108 a 138 ppm).

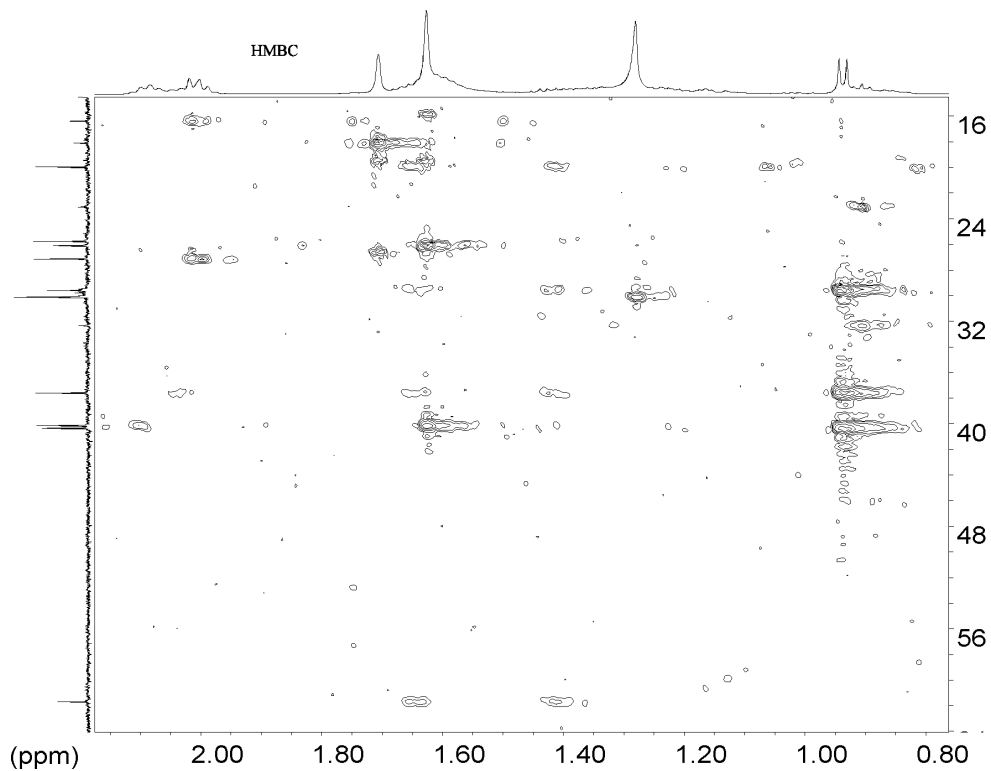


Figura 23. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ^{13}C -RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 0,08 a 2,15 ppm x 16 a 64 ppm).

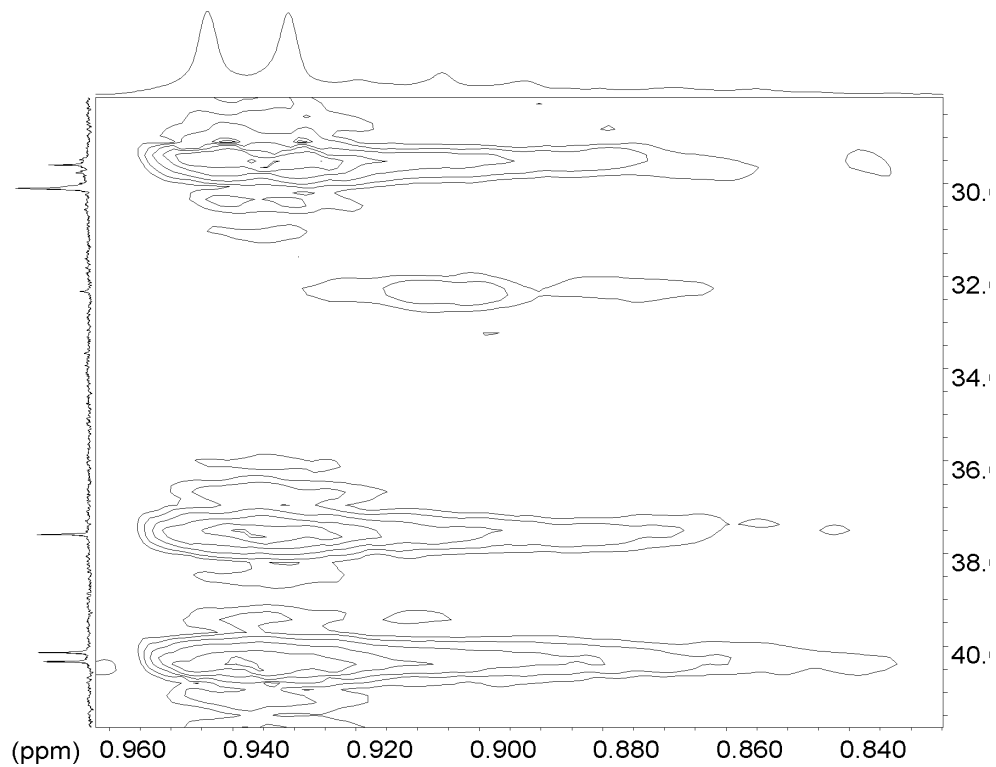


Figura 24. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ^{13}C -RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 0,825 a 0,960 ppm x 28 a 41,5 ppm).

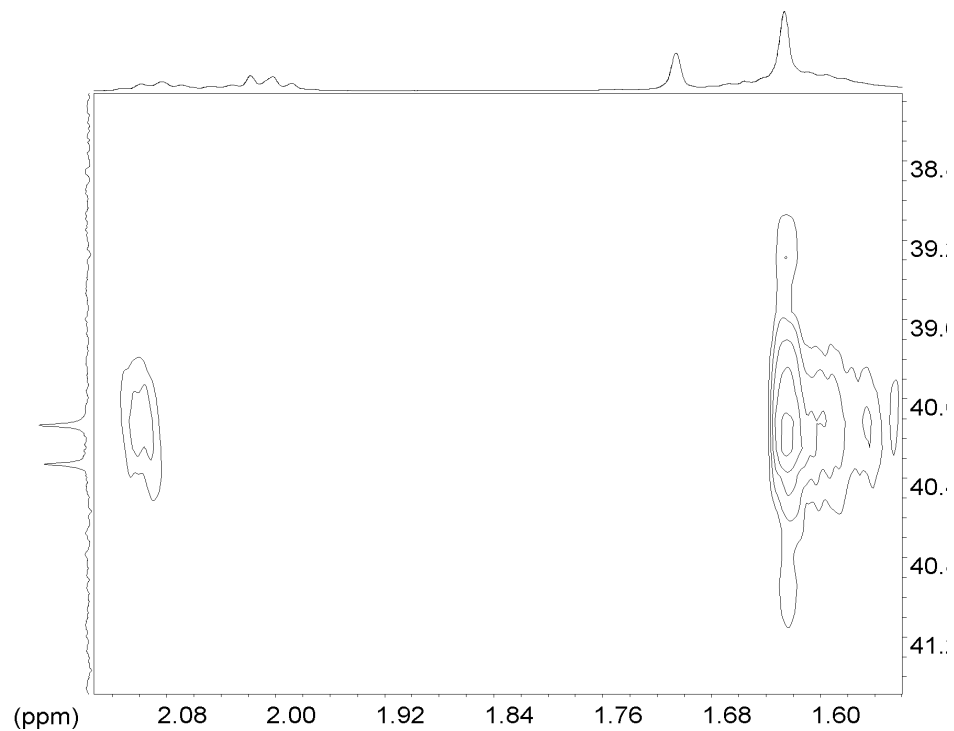


Figura 25. Detalhe do espectro bidimensional de RMNP x ^{13}C -RMN de Cc1, obtido pela técnica HMBC (região 1,54 a 2,14 ppm x 38 a 41 ppm).

Tabela 11. Acoplamentos entre grupos de H e C a distância a partir dos espectros obtidos da técnica de HMBC.

Deslocamento C (ppm)	Tipo de C	H diret. ligado HMQC (ppm)	deslocamento de H acoplados
16,37	CH ₃	1,6	2,00
18,09	CH ₃	1,6	1,70
19,97	CH ₃	0,94	1,53 1,3
25,75	CH ₂	2,02	1,59 1,6 ou 1,6
26,09	CH	1,70	1,6 ou 1,6
27,12	CH	2,1	1,70 2,00 2,02
29,59	CH	1,59	3,67 0,94 1,3 1,53
30,10	CH ₂	1,3	sem correlação
37,58	CH ₂	1,3	1,53 2,02 0,94
40,13	CH ₂	2,01	2,09 1,6 ou 1,6
40,33	CH ₂	1,53	0,94 1,59
61,66	CH ₂ OH	3,7	1,53
124,77	CH=	5,12	1,6+++ ou 1,6+++ 1,70+++ 2,00++ 2,09+++

Tabela 11 – (Continuação)

124,99	CH=	5,15	1,6+++ ou 1,6+++ 2,02 +++ 2,09 + 2,00+++
131,71	CR₄	-	1,6+++ ou 1,6+++ 2,09 +++ 1,70+++
135,30	CR₄	-	1,6+++ ou 1,6+++ 1,70++ 2,00+++ 2,09 + 2,02 +++

Observando-se os sinais e correlações dos carbonos **CH=** e **CR₄** nos espectros obtidos pelas técnicas de COSY e HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) pode-se afirmar que estes átomos estão ligados. O mesmo pode ser observado para os carbonos **CH=** (H em **5,15** ppm) e **CR₄**. Assim pode-se propor as seguintes estruturas parciais para Cc1 (fig.26).

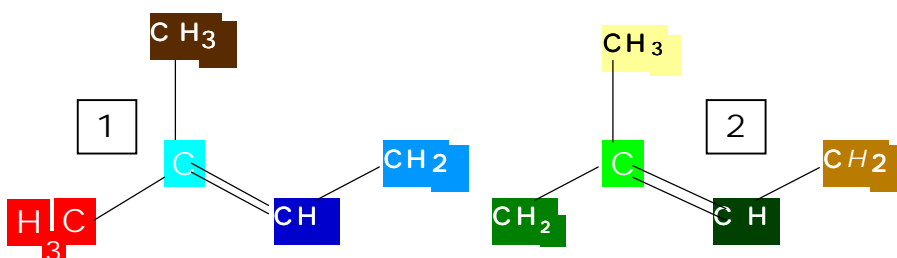


Figura 26 – Estruturas parciais 1 e 2 propostas para Cc1

O acoplamento do grupamento **CH₂** (com deslocamento de prótons em **2,09** ppm) com o grupamento **CH₂** (**2,00** ppm) pode ser observado tanto nos espectros de COSY como nos de HMBC. O grupamento **CH=** nestes espectros acopla com os Hidrogênios do grupamento **CH₂** (**2,01** ppm), assim como o grupamento **CH=** e o átomo de carbono **CR₄** acoplam com os hidrogênios do grupamento **CH₂**. Isto sugeriu que estas duas estruturas estejam ligadas conforme a figura 27.

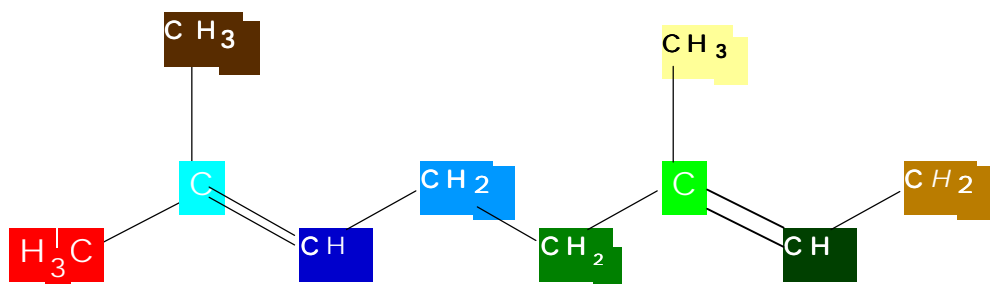


Figura 27 - estrutura parcial 3 de Cc1, formada a partir dos fragmentos 1 e 2

O quarto fragmento (Fig. 28) foi formulado partindo-se da observação que os grupamentos CH_2 (C em deslocamento 37,58 ppm) e CH_2 (40,33 ppm), estão ligados a um centro quiral, o carbono com deslocamento 29,59 ppm do grupamento CH . Este grupamento acopla fortemente com a metila CH_3 com deslocamentos de carbono e hidrogênio em 19,97 e 0,94, respectivamente, nos espectros de COSY e HMBC (Figs. 21 a 25). Nos espectros de HMBC também pode ser observado o acoplamento daquele metino com o metileno CH_2 , com a metila em 19,97 e o metileno ligado à hidroxila, além do acoplamento da metila CH_3 com os metilenos CH_2 e CH_2 e o próprio metino CH . O metileno acoplado à hidroxila CH_2OH demonstra estar ligado ao metileno CH_2 pelo forte acoplamento observado nos espectros de COSY e HMBC (figs. 21 a 25). Isto forneceu a quarta estrutura parcial (Fig. 28).

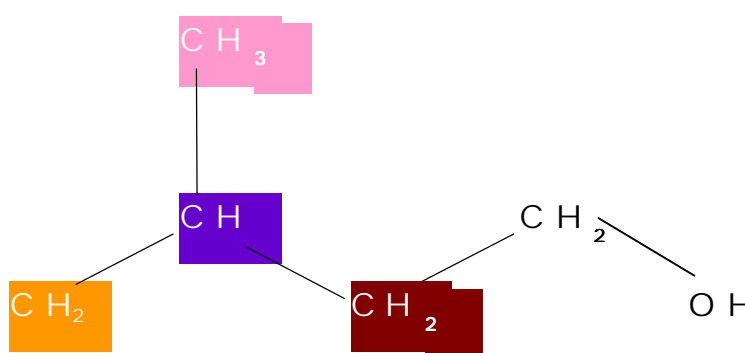


Figura 28. Fragmento 4 proposto como estrutura parcial de Cc1, contendo o grupamento funcional álcool.

Nos espectros de COSY pode-se observar que os prótons do metileno CH_2 com deslocamento em 2,02 ppm acoplam fortemente com os prótons do metileno

CH_2 com deslocamento em 1,3 ppm. Nos espectros de HMBC (Figs. 18 e 19) os prótons do grupamento metilênico CH_2 (2,02 ppm) também acoplam com o carbono do metileno CH_2 , o que sugere que o fragmento 4 esteja ligado por este carbono ao fragmento 3, resultando na estrutura abaixo representada, que de acordo com a literatura corresponde ao 2,3-di-hidrofarnesol (DHF) (Fig 29).

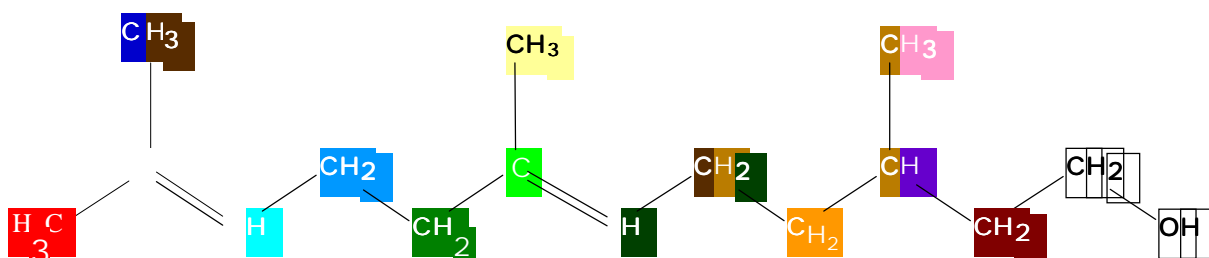


Figura 29. Estrutura proposta para Cc1.

Na tabela 12 estão dispostos os dados de RMNP de Cc1 em comparação com os dados encontrados na literatura para o DHF. VIG e colaboradores (1979) descrevem o espectro de RMNP em CDCl_4 medido em 60 MHz do isômero E(+)-di-hidrofarnesol obtido por síntese. O trabalho apresenta a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}$ para a substância, mas descreve apenas os sinais correspondentes a 26 prótons. O sinal do metino saturado (registrado no espectro de RMNP de Cc1 em 1,59 ppm) não é mencionado. Mas os outros sinais são bastante semelhantes aos sinais de Cc1.

THOMAS e OZAINNE (1978) descrevem para o isômero (-)-Z-di-hidrofarnesol (isolado da resina de *Galbanum*) e para o isômero (±)-E-di-hidrofarnesol, preparado a partir do nerolidol, os espectros de RMNP medidos em CDCl_3 , 90 MHz. Os sinais também são bastante semelhantes aos obtidos para Cc1, com a ressalva de que também não mencionam os sinais de prótons correspondentes ao metino saturado (1,59 ppm para Cc1) e aos dois metilenos saturados ligados a ele. Todos aparecem no espectro de Cc1 entre 1,3 e 1,6 ppm.

SAPLAY e colaboradores (1980) apresentam dados de RMNP dos dois isômeros do di-hidrofarnesol em CDCl_4 (90 MHz), sendo os sinais dos prótons olefínicos descritos como “triplete com má resolução”; os sinais correspondentes ao metino saturado, aos metilenos saturados (entre 1,3 e 1,6 ppm) e aos metilenos alílicos (entre 2,0 e 2,1 ppm) não são descritos.

O sinal do metino quiral do di-hidrofarnesol não é mencionado em nenhum dos trabalhos citados, enquanto os sinais dos metilenos saturados são descritos apenas por Vig e colaboradores (1979). Os autores mencionados chegaram à proposição da estrutura do DHF com base também em dados de espectros de massas e infravermelho. Em função da pequena quantidade de amostra, a obtenção de outros espectros para Cc1 ficou prejudicada. Não foram encontrados na literatura dados espectrais para o DHF obtidos nas mesmas condições que Cc1 (500 MHz, CDCl_3), mas os espectros de Cc1 obtidos, sobretudo os espectros bidimensionais, parecem coerentes com a estrutura proposta.

A análise dos dados de RMNP em CDCl_3 (500 MHz) de Cc1 (Fig. 12 a 15) e sua comparação com os dados da literatura para o di-hidrofarnesol permite propor que o composto isolado seja este álcool sesquiterpênico. Sugere-se que o composto isolado corresponde ao 2,3-dihidro-6(E)-farnesol devido ao deslocamento apresentado pelos prótons da metila em 1,6 ppm. Estes, de acordo com SPLAY e colaboradores (1980), na estrutura trans, deslocam-se para campo mais alto, em 1,67 ppm (Tab. 12). O caráter e a intensidade do sabor e do aroma deste composto, bem como seus efeitos como ferormônios estão relacionados à sua estereoquímica (BARTSCHAT *et al.*, 1997).

O citronelol é um álcool monoterpênico muito semelhante à parte da estrutura do di-hidrofarnesol. Nos espectros de ^{13}C RMN obtidos pela técnica DEPT (Fig. 31) e no espectro bidimensional de RMN protônica obtido pela técnica de HH-COSY (Fig. 31) deste composto (PAVIA *et al.*, 1996), o deslocamento químico do C8 (metila) do citronelol é diferente de Cc1, pois no di-hidrofarnesol trata-se de um grupo metilênico que conecta esta parte da molécula a outra unidade isoprênica deste sesquiterpeno. No espectro bidimensional de RMN protônica obtido pela técnica de HH-COSY (Fig. 32) do citronelol pode-se observar, além da semelhança com os espectros de Cc1 obtidos pela mesma técnica (Figs. 18 e 19), os sinais dobrados dos grupos metilênicos 2 e 4, devido à presença do centro quiral em C3.

Na literatura disponível consultada (FÄCKE e BERGER, 1995) foi encontrado um espectro de ^{13}C -RMN do farnesol em CDCl_3 , 500 MHz. A figura porém é pequena e não relaciona os sinais aos carbonos correspondentes. Pode-se entretanto fazer uma comparação geral dos espectros:

- Região entre 15 e 20 ppm: três sinais de C para o farnesol x três sinais para Cc1;
- Região entre 23 e 30 ppm: quatro sinais de C para o farnesol x quatro para Cc1;
- Região de aproximadamente 40 ppm: um sinal de C para farnesol x três sinais para Cc1;
- Região de aproximadamente 60 ppm: um sinal de C para farnesol x um sinal para Cc1;
- Região entre 120 e 125 ppm: três sinais de C para o farnesol x dois para Cc1;
- Região entre 130 e 140 ppm: três sinais de C para o farnesol x dois para Cc1;

As diferenças de deslocamento químico apresentadas podem ser explicadas pela presença de mais uma insaturação no farnesol, onde os carbonos 2 e três aparecem em campo mais baixo (entre 120 e 140 ppm) e os carbonos ligados diretamente a eles em deslocamentos diferentes de Cc1.

O di-hidrofarnesol foi descrito originalmente em 1924, somente em 1972 foi considerado ser um produto natural, formado pela redução enzimática do farnesol nas pétalas de rosa (THOMAS e OZAINNE, 1978). Atualmente sabe-se que ele faz parte da composição do óleo essencial de algumas espécies *Leptospermum* (BROPHY, 1999), no pericarpo de *Fagara macrophylla* e *Zanthoxylum rigidifolium* (REISCH *et al.*, 1985), e na alga *Sargassum nigrifolium* (SAKAGAMI *et al.*, 1990)

O di-hidrofarnesol também foi encontrado nas secreções marcadoras voláteis de algumas abelhas dos gêneros *Bombus* e *Alpinobombus*, na secreção de glândulas paracloacais de crocodilos (WHEELER *et al.*, 1998), em cepas de mutantes do fungo *Ceratocystis coerulescens* (SPRECHER *et al.*, 1975), na secreção de vespas fêmeas de *Eucera* (KULLENBERG *et al.*, 1973) e na secreção de glândulas temporais de elefantes africanos (GOODWIN *et al.*, 1999).

HARADA e colaboradores (1996) descrevem a produção de um perfume contendo (6E)-2,3-di-hidrofarnesol na forma trans-trans. Segundo os autores, este perfume apresentou excelente qualidade de fragrância, nenhuma sensibilização e também apresentou atividade antibacteriana.

Tabela 12. Comparação dos dados de RMNP de Cc1 e do di-hidrofarnesol da literatura.

Tipo de C	Dados Cc1	*Vig et. al., 1969	**Thomas e Ozainne, 1978		***Saplay et. al., 1980	
	CDCl ₃ , 500 MHz	CCl ₄ , 60 MHz	CDCl ₃ , 90 MHz		CCl ₄ , 90 MHz	
	H diret. Ligado (ppm)	(+)-2,3-dihidro-6(E)-farnesol	2,3-dihidro-6(Z)-farnesol	(±)-2,3-dihidro-6(E)-farnesol	(+)-2,3-dihidro-6(Z)-farnesol	(+)-2,3-dihidro-6(E)-farnesol
CH ₃	0,94 ^d 4H J= 6,56 Hz	0,98, d J= 7Hz 3H metil saturado	0,91, d 3H J=6 Hz	0,91, d 3H J=6 Hz	0,89 d J=6 Hz	0,89 d J=6 Hz
CH ₂	1,3 ^s 10H	1,28 4H metilenos saturados	-	-	-	-
CH ₂	1,6 14 H s	-	-	-	-	-
CH		-	-	-	-	-
CH ₃		1,62 s 9 H metil alílico	1,62 3 H	1,62 6 H s	1,6, s 3H	1,6 s 6H
CH ₃	1,7 6 H		1,67 s 6H	1,67 s 3H		
CH ₂	2,0 – 2,1 "m" 6 H	2,01 6 H metilenos alílicos	2,0 – 2,1 d 6 H	1,95 – 2,1 s 6 H	-	-
CH ₂		-	-	-	-	
CH ₂		-	-	-	-	
CH ₂ OH	3,7 ^{"m"}	3,68, t 2H	3,68, t J= 6 Hz	3,68, t J= 6 Hz	3,6, t J= 7 Hz	3,6, t J= 7 Hz
CH=	5,12 ^d	5,01 2 H m prótons olefínicos	5,12 t J=6	5,12 t J=6	5,05 t 2H	5,05 t 2H
CH=	5,15 ^d					

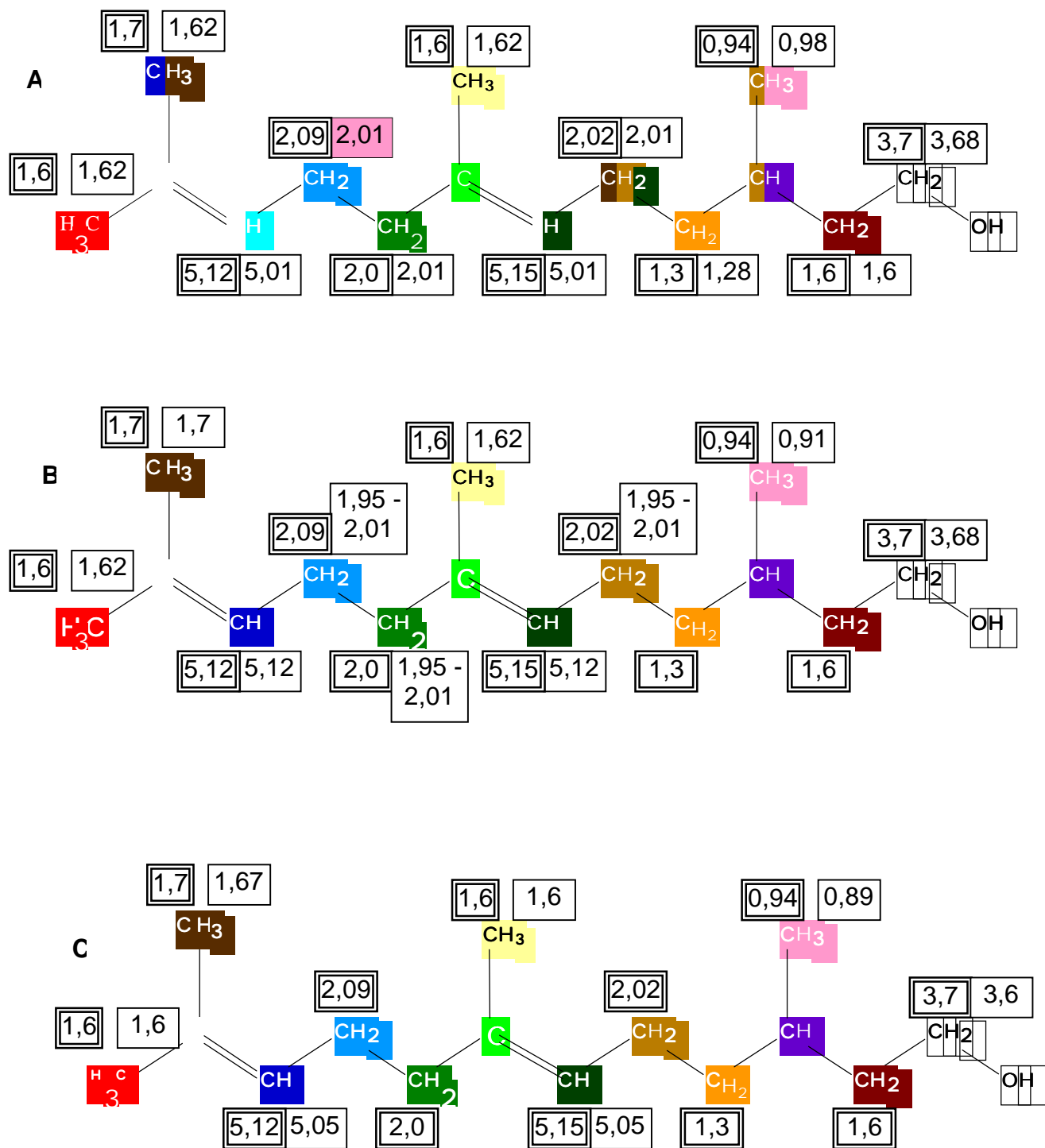


Figura 30. Estruturas do di-hidrofarnesol comparando dados de RMNP de Cc1 () e da literatura ().

A: (+)-2,3-di-hidro-6(E)-farnesol, CCl_4 e 60 MHz (VIG *et al.*, 1979).

B: (\pm)-2,3-di-hidro-6(E)-farnesol, CDCl_3 e 90 MHz (THOMAS e OZAINNE, 1978).

C: (+)-2,3-di-hidro-6(E)-farnesol, CCl_4 e 90 MHz (SAPLAY *et al.*, 1980).

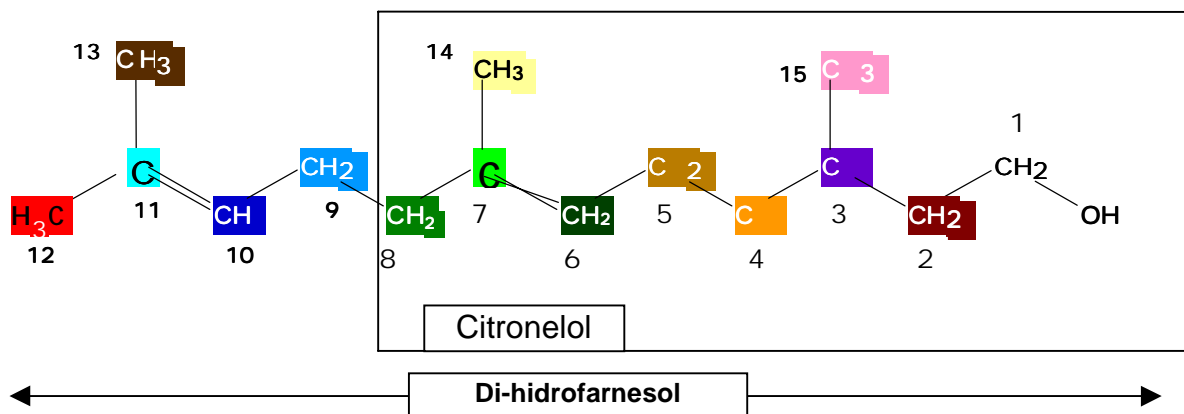


Figura 31. Comparação do espectro DEPT 135 do citronelol (PAVIA et al., 1996) e estrutura proposta para Cc1.

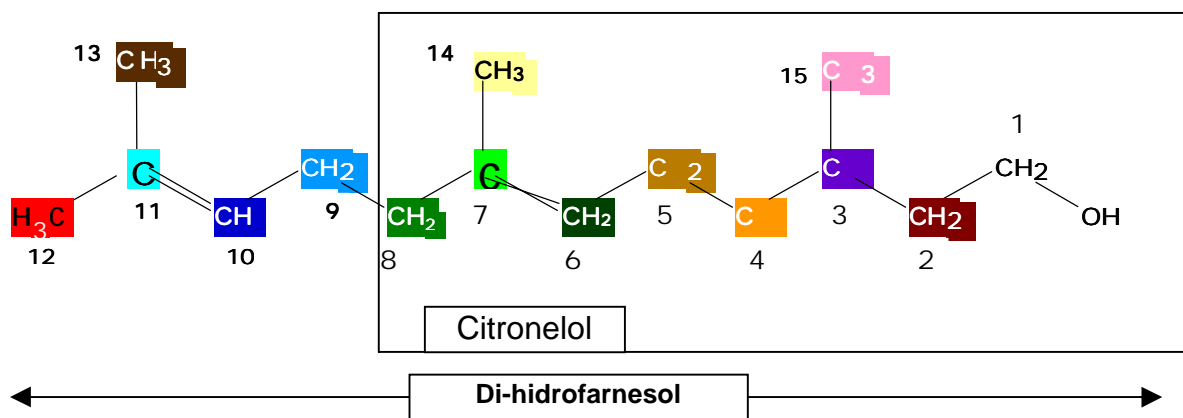


Figura 32. Comparação do espectro HH COSY do citronelol (PAVIA et al., 1996) e estrutura proposta para Cc1.

A síntese do DHF já foi descrita por vários autores (VIG *et al.*, 1979; MOISEENKOV *et al.*, 1989; SAPLAY *et al.*, 1980), assim como a separação de esteroisômeros através de cromatografia gasosa enantioselectiva multidimensional capilar (BARTSCHAT *et al.*, 1997).

Não foi encontrada na literatura nenhuma referência a testes farmacológicos realizados com o di-hidrofarnesol. Para o farnesol já foram descritas várias atividades. HAUG e colaboradores (1994) demonstraram a diminuição da viabilidade das células de linhagem CEM – C1 de leucemia humana aguda quando incubadas com o farnesol, sendo sugerida mais tarde a existência de sítios de ligação ao farnesol nestas células (YAZLOVSKAYA *et al.*, 1997). Em 1995 YAZLOVSKAYA e MELNYKOVYCH, pela toxicidade consideravelmente maior do farnesol observada para células neoplásicas que para células normais, sugerem o envolvimento de proteína quinase C na toxicidade deste composto. Burke *et al.* (1997) comprovaram a inibição do crescimento de células tumorais pancreáticas (MIA PaCa2) em cultura e em ratos. Para este sesquiterpeno, também foram descritas atividades como: diminuição da pressão sangüínea através do bloqueio de canais de cálcio (LUFT *et al.*, 1999; ROULLET *et al.*, 1999); modulação da permeabilidade de membrana de células gliais da retina humana (BRINGMANN *et al.*, 2000); estimulação da diferenciação em queratinócitos epidérmicos (HANLEY *et al.*, 2000).

No bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* o composto Cc1 apresentou χ^2 de 14,94 (significativa para $\alpha=0,01$) na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (13,39 nM de di-hidrofarnesol), o que correspondeu a 86,67 % de letalidade. O lapachol, naftoquinona de comprovada atividade antitumoral, demonstrou uma CL_{50} de 16,7 $\mu\text{g/mL}$ neste bioensaio (DUARTE *et al.*, 2000). A cacospongionolida E, isolada da esponja *Fasciospongia cavernosa*, demonstrou ser um potente antiinflamatório como inibidor da fosfolipase A2 sinovial e também apresentou significativa atividade no bioensaio de *A. salina* (De ROSA *et al.*, 1998). Quando comparadas as doses administradas *per os* e a porcentagem de inibição do granuloma induzido por “pellets” de algodão pelo extrato bruto de *Cordia curassavica* (dose de 1,24 mg/kg, no 4º dia com % inibição 16,4%) e da artemetina (dose de 67,07 mg/kg, no 6º dia com % inibição 13,7%) pode-se sugerir que o efeito antiinflamatório do extrato não deve estar associado apenas à artemetina, mas também a outras substâncias que provavelmente agem em sinergismo com a

flavona. O efeito sobre o granuloma foi mais pronunciado na administração tópica do extrato que com a mesma dose administrada *per os* (SERTIÉ *et al.*, 1988; SERTIÉ *et al.*, 1990). Isto pode indicar a presença de outra(s) substância(s) ativa(s) com capacidade de atravessar a barreira cutânea, eventualmente o próprio di-hidrofarnesol poderia estar envolvido nesta atividade antiinflamatória do extrato bruto. Entretanto há a necessidade de testes específicos com este sesquiterpeno para confirmação desta hipótese.

Como foram necessários aproximadamente 7 kg de planta para o isolamento de 1,6 mg do composto e sua síntese já foi descrita (MOISEENKOV *et al.*, 1989; VIG *et al.*, 1979; SAPLAY *et al.*, 1980) o mais prático seria produzir uma quantidade maior de di-hidrofarnesol e a partir daí serem realizados vários testes farmacológicos, dentre eles a atividade antitumoral, já que Cc1 apresentou atividade interessante, comparável a do lapachol no teste de letalidade para larvas de *Artemia salina* e este bioensaio possui boa correlação com atividade citotóxica.

5. Conclusões

- Os extratos obtidos pela maceração das folhas de *Cordia curassavica* em éter de petróleo foram os mais ativos no ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*;
- O bioensaio com larvas de *A. salina* foi útil no fracionamento dos extratos de *C. curassavica*;
- A utilização de gel de sílica impregnado com AgNO_3 mostrou-se um método eficaz na separação de compostos com mínimas diferenças estruturais e polaridade, tendo possibilitado o isolamento de Cc1 das frações ativas;
- A partir dos dados de RMN uni e bidimensional foi possível elucidar a estrutura de Cc1 como sendo o 2,3-dihidrofarnesol;
- Cc1 apresentou um índice de letalidade para larvas de *Artemia salina* de 86,67% ($\chi^2=14,94$, $\alpha= 0,01$) na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$;
- A obtenção de quantidades suficientes para realização de testes farmacológicos, biológicos e toxicológicos do 2,3-dihidrofarnesol a partir de *Cordia curassavica* com os métodos descritos no trabalho não é economicamente viável, nem seria ecologicamente correta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, V.K.; SRIVASTAVA, S.D.; SRIVASTAV, S.K.; PITRE, S.; RUSIA, K. Constituents from the seeds of *Cordia obliqua* as potencial anti-inflammatory agents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.49, n.2, p.66-69, 1987.

AITZETMÜLLER, K.; LIRENY, A. G. G.. Dynamic impregnation of silica stationary phases for the argentation chromatography of lipids. *Journal of Chromatography*, v.519, p.349-358, 1990.

ANGELY, J. *Flora analítica e fitogeográfica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Phytton, 1970. v.4, p.822.

AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F.; MORAES, M.S.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* A. DC.-BORAGINACEAE. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.5, p.69-82, 1983.

BARTSCHAT, D.; KUNTZSCH, C.; HEIL, M.; SCHITTRIGKEIT, K. S.; MANG, M.; MOSANDL, A.; KAISER, R. Chiral compounds of essencial oils XXI: (E, Z)-2,3-dihidrofarnesals-Chirospecific analysis and structure elucidation of the stereoisomers. *Phytochemical Analysis*, v. 8, p. 159-166, 1997.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; OSHIRO, T.; CALY, K.D.V.; PANIZZA, S. Topical anti-inflammatory activity and toxicity of *Cordia verbenacea*. *Fitoterapia*, v.60, n.3, p.260-263, 1989.

BATSARIS, A. S. *Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras*. São Paulo: Ícone, 1995. p.19-20.

BIEBER, L.W.; MESSANA, I.; LINS, S.C.N.; DA SILVA FILHO, A.A.; CHIAPPETA, A.A.; DE MELO, J.F. Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. *Phytochemistry* 1990, v.29, n.6, p.1955-1959.

BROPHY, J. .; GOLDSACK, R.J.; BEAN, A.R.; FORSTER, P.I.; LEPSCHI, B.J. Leaf essential oils of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in eastern Australia. Part 5. *Leptospermum continentale* and allies. *Flavour Fragrance Journal* 1999, v. 14, p. 98-104.

BURKE, Y.D.; STARK, M.J.; ROACH, S. L.; SEN, S. E., CROWELL, P. L.. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* 1997, v.32, p.151-156.

CENTENO, A. J. *Curso de estatística aplicada à biologia*. Goiânia: Cegraf-UFG, 1990.

CHEN, T.K.; ALES, D.C.; BAEZINGER, N.C.; WIEMER, D.F. Ant-repellent triterpenoids from *Cordia alliodora*. *Journal of Organic Chemistry* 1983, v.48, n.20, p.3525-3531.

COLMAN DE SAIZARBITORIA, T.; ANDERSON, J.E.; ALFONSO, D.; McLAUGHLIN, J.L. Bioactive furanonaphtoquinones from *Tabebuia barbata* (Bignoniaceae). *Acta Cient. Venez.* 1997, v.48, n.1, p.42-46.

COLLINS, C.H; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 6. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.

CROASMUN, W.R.; CARLSON, R. M. K. *Two-dimensional NMR spectroscopy : applications for chemists and biochemists*. 2nd ed. New York: VCH, 1994.

DA SILVA FILHO, A.A.; LIMA, R.M.O.C.; DO NASCIMENTO, S.C.; SILVA, E.C.; ANDRADE, M.S.A.S; LINS, S.C.N.; BIEBER, L.W. Biological activity of cordiaquinones A and B isolated from *Cordia corymbosa*. *Fitoterapia*, v.LXIV, n.1, p.78-80, 1993.

DE ROSA, S.; CRISPINO, A.; DE GIULIO, A.; IODICE, C.; BENREZZOUK, R.; TERCENIO, M.C.; FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M.J.; PAYA, M. A new

cacospongionolide inhibitor of human secretory phospholipase A2 from Tyrrhenian sponge *Fasciospongia cavernosa* and absolute configuration of cacospongionolides. *Journal of Natural Products*, v. 61, n.7, p. 931-935, 1998.

DUARTE, D. S.; DOLABELA, M. F.; SALAS, C. E.; RASLAN, D.S.; OLIVEIRAS, A. B.; NENNINGER, A.; WIEDEMANN, B.; WAGNER, H.; LOMBARD, J.; LOPES, M. T. P. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, n. 3, p. 347-352, 2000.

FÄCKE, T.; BERGER, S. Application of a gradient enhanced measurement for carbon-carbon coupling constants (GRECCO) to a conformation study of geraniol and (E,E)-farnesol. *Journal of the American Chemical Society*, v.117, p. 9547-9550, 1995.

FALCH, B.S.; KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D.; STICHER, O.; ANGERHOFER, C.K.; PEZZUTO, J.M.; BACHMANN, H. Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica*, v.61, p.321-328, 1995.

FALKENBERG, M. Quinonas. IN: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.) *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade./UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. Cap. 25, p.555-580.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. *Principles of Medicinal Chemistry*. 4 ed. London: Williams & Wilkins, 1995. p.7-8, 732.

GOODWIN, T.E.; RASMUSSEN, E.L.; GUINN, A.C.; McKELVEY, S.S.; GUNAWARDENA, R.; RIDDLE, S.W.; RIDDLE, H.S. African Elephant Sesquiterpenes. *Journal of Natural Products*, v.62, p.1570-1572, 1999.

GOEL, R.K.; PATHAK, N.K.; BISWAS, M.; PANDEY, V.B.; SANYAL, A.K. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.39, n.2, p.138-140, 1987.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; TAKAKI, G.M.C.; MURANDI, F.S.; BUOCHBERG, M.S. Comparison of Antibacterial and Antifungal Activities of Lapachol and β -Lapachone. *Planta Medica*, v.60, n.4, p.373-374, 1994.

GUPTA, A. S.; DEV, S.. Chromatography of organic compounds: I. Thin-layer chromatography of olefins. *Journal of Chromatography*, v.12, p.189-195, 1963.

HANLEY, K.; KÖMÜVES, L. G.; NG, D. C.; SCHOONJANS, K.; HE, S.S.; LAU, P.; BIKLE, D.D.; WILLIAMS, M. L.; ELIAS, P.M.; AUWERX, J.; FEINGOLD, K. R.. Farnesol stimulates differentiation in epidermal keratinocytes via PPARalpha. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p.11484-11491, 2000.

HARADA, M.; MATSUDA, H.; YAMAMOTO, T. Perfume containing (6E)-2,3-dihydrofarnesol (Takasago International Corporation, Japan). Eur. Pat. Appl. (1996).

HAUG, J. S.; GOLDNER, C.M.; YAZLOVITSKAYA, E.M.; VOZIYAN, P.A.; MELNYKOVYCH, G.. Directed cell killing (apoptosis) in human lymphoblastoid cells incubated in the presence of farnesol: effect of phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica acta*, v. 1223, p.133-140, 1994.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; NIWAYAMA, S. Antiviral activity of an extract of *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. *Planta Medica* 1990, v.56, n.5, p.439-443.

HELDT, H.W. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Oxford, 1997. p.354-356.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. *Phytochemistry*, v.47, n.5, p.729-734, 1997.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry*, , v.

53,p.613-617,2000.

KIRCHNER, J. G. *Thin-Layer chromatography*. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1978.

KULLENBERG, B.. Field experiments with chemical sexual attractants on aculeate Hymenoptera males. II. *Swed. Zoon, Suppl. 1*, p. 31-42, 1973,.

LAM, L. K. T.; YEE, C.; CHUNG, A.; WATTENBERG, L. W.. Use of silver nitrate impregnated silica cartridges in the separation of kahweol and cafestol esters by preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.328, p. 422-424, 1985.

LEE, R.H.; SLATE, D.L.; MORETTI, R.; ALVI, K.A.; CREWS, P. Marine sponge polyketide inhibitors of protein tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Commun.*, v.184, n.2, p.765-772, 1992.

LIM, Y.A.; KOJIMA, S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; FUSHIMI, H.; KOMATSU, K.; HATTORI, M.; SHIMOTOHNO, K.; GUPTA, M.P.; CORREA, M. Inhibitory effects of *Cordia spinescens* extracts and their constituents on reverse transcriptase and protease from human immunodeficiency virus. *Phytotherapy Research*, v.11, n.7, p.490-495, 1997.

LUFT, U.C.; BYCHKOV, R.; GOLLASCH, M.; GROSS, V.; ROULLET, J.B.; McCARRON, D.A.; RIED, C.; HOFMANN, F.; YAGIL, Y.; YAGIL, C.; HALLER, H.; LUFT, F.C. Farnesol blocks the L-type Ca²⁺ channel by targeting the alpha 1 C subunit. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 19, p.959-966, 1999.

MACHADO, D.L.; FALKENBERG,M.; DEL-REI SOUZA, M.L.; FALKENBERG, D.B. Triagem de espécies vegetais da Iha de Santa Catarina: Pesquisa de quinonas e avaliação da letalidade para larvas de *Artemia salina* . IX Seminário de Iniciação Científica da UFSC. Florianópolis: DAP/PRPG/UFSC, 1999. p.127.

MANNERS, G.D. The hydroquinone terpenoids of *Cordia elaeagnoides*. *Journal of the Chemical Society Perkin Transaction I*, v.1, p.30-44, 1983.

MAREK, A. Peroxide und andere Inhaltstoffe aus Heterothalamus. Arten Universität Bonn, 1994. Tese de doutorado em Ciências Naturais.

MERCK, E. *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie Nr. 21*. Darmstadt: Merck, 1984.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v.45, p.31-34, 1982.

MOISEENKOV, A. M.; KOPTENKOVA, V. A.; VESELOVSKII, V. V. A simple synthesis of (S)-(-)-terrestrol. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, v 3, 699-700, 1989.

MONGELLI, E.; MARTINO, V.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. *International Journal of Pharmacognosy*, v.34, n.4, p.249-254, 1996.

MORTON, J.F.. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield: Charles C. Thomas, 1981, p.719.

NAKAMURA, N.; KOJIMA, S.; LIM, Y.A.; MESELHY, M.R.; HATTORI, M.; GUPTA, M.P.; CORREA, M. Dammarane-type Triterpenes from *Cordia spinescens*. *Phytochemistry*, v.46, n.6, p.1139-1141, 1997.

OLIVEIRA, A.A.M.; ABDALLA, D.S.P.; SERTIÉ, J.A.A. Hematological evaluation of the ethanol extracts of *Cordia verbenacea* leaves. *Fitoterapia*, v.69, n.5, p.387-389, 1998.

PAVIA, D. L.; LAMOMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry*. 2 ed. Orlando: Saunders Golden Sunburst Series, 1996.

PIHLAJA, K.; KLEINPETER, E. *Carbon-13 NMR chemical shifts in structural and stereochemical analysis*. New York: VCH, 1994.

PIO CORRÊA, M. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.4, p.694. v.2, p.142, 1986.

REISCH, J.; BERGENTHAL, D.; ADESINA, S.K.; AKINWUSI, D.D. ; OLATUNJI, A.O. Natural product chemistry, part 106: constituents of *Fagara macrophylla* and *Zanthoxylum rigidifolium* pericarps. *Journal of Natural Products*, v.49, p. 1169-1171, 1986.

RÖNSCH, H.; SCHREIBER, K.. LXXXIII. Analytische und präparative dünnschichtchromatographische trennung von 5 α -gesättigten bzw. ungesättigten Steroidalkaloiden und –Sapogenin an Silbernitrat-haltigen Adsorptionsschichten. *Journal of Chromatography*,v.30, p.149-154, 1967.

ROULLET, J. B.; SPAETGENS, R.L.; BURLINGAME, T.; FENG, Z.P.; ZAMPONI, G. W.. Modulation of neuronal voltage-gated calcium channels by farnesol. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p.25439-25446, 1999.

SAITO, M.L.; OLIVEIRA, F.D.; ALVARENGA, M.A. Allantoin and other chemical constituents of *Cordia eucalyculata*. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.21, n.1, p.14-19, 1985.

SAKAGAMI, H.; ISEDA, J.; FUJIMORI, T.; HARA, Y.; CHIHARA, M. Volatile constituents in marine brown and red algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990, v. 56, p.973-83.

SANDERS, J.K.M; HUNTER, B.K. *Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1993.

SAPLAY, K.M.; SAHNI, R.; DAMODARAM, N.P.; DEV, S. Photochemical transformation – II. *Tetrahedron*, v. 36, p.1455-1461, 1980.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S., OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.P.; PENNA, S.C. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topic antiinflammatory and gastrotoxicity of a crude leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.31, p.239-247, 1991.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R.. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Medica*, v.56, p.36-40, 1990.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extracts of the leaves. *Planta Medica*, v.54, n.1, p.7-10, 1988.

SILVERSTEIN, R. M. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SMITH, L.B. Boragináceas. In: REITZ, P.R. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí. p.85

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica*, v.59, p.250-252, 1993.

SPRECHER, E.; KUBECZKA, K.H.; RATSCHKO, M. Volatile terpenes in fungi. *Archiv der Pharmazie*, v. 308, p. 843-51, 1975.

THOMAS, A. F.; OZAINNE, M. New sesquiterpenes alcohols from *galbanum* resin; the occurrence of C(10)-epi-Sesquiterpenoids. *Helvetica Chimica Acta*, v. 61, p. 2874-2880, 1978.

TONG-SHUANG, L.; JI-TAI, L.; HUI-ZHANG, L. Modified and convenient preparation of silica impregnated with silver nitrate and its application to the separation of steroids and triterpenes. *Journal of Chromatography A*, v. 715, p. 372-375

TOUCHSTONE, J.C. *Practice of thin layer chromatography*. 3rd.ed. New York: John Willey & Sons, 1992.

VELDE, V.V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; MATIDA, A.K.; PANIZZA, S.. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. *Journal of Chemical Society of Perkin Trans. I*, v.11, p.2697-270, 1982.

VIG, O. P.; SHARMA, S. D.; VIG, R.; KUMAR, S. D.. Stereospecific synthesis of (+)-2,3-dihydro-6(E)-farnesol. *Indian Journal of Chemistry*, v. 18B, p.31-32, 1979.

WHEELER, J.W.; IBRAHIM, S A.; WELDON, P.I.J. 2,3-Dihydrofarnesyl and citronellyl esters in the paracloacal gland secretions of the brown caiman (*Caiman crocodilus fuscus*) from Costa Rica. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 27, 27-32, 1998.

WILLIAMS, C. M.; MANDER, L.N. Chromatography with silver nitrate. *Tetrahedron*, v. 57, p. 425-427, 2001.

YAZLOVITSKAYA, E.M.; MELNYKOVICH, G. Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLa-S3K and non-neoplastic CF-3cells. *Cancer Letters*, v.88, p.179-183, 1995.

YAZLOVITSKAYA, E.M.; VOSIAN, P.A.; KURSKII, M.D.; MELNYKOVICH, G. Human leukemia CEM C-1 cells possess a high affinity binding site for farnesol. *Ukraiinskii Biokhimicheskii Zhurnal*, v. 69, p. 126-130, 1997.