

LOUISIANE FACCIO VERANI BRESCIANI

**ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE QUATRO
ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA CATARINENSE**

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel-Filho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Vilma E. F. Heizen

Florianópolis – SC

Junho de 2003

LOUISIANE FACCIO VERANI BRESCIANI

**ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE QUATRO
ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA CATARINENSE**

**Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de
Santa Catarina como parte dos pré-requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Química
Orgânica.**

Florianópolis – SC

Junho de 2003

Agradecimentos

Esta parte da tese, para mim, é a mais importante, pois mostra que uma etapa foi vencida junto com pessoas que fazem parte deste trabalho assim como de minha vida.

Agradeço...

À minha Mãe, Solange, e meus irmãos, Artur Afonso, Alexander e Andersen, que sem os quais nada faria sentido. Agradeço ainda a Rose minha irmã emprestada. Em especial, às pequenas Luísa e Maria Vitória, pelas brincadeiras e horas alegres;

À toda a minha família;

Ao Professor Rosendo Augusto Yunes, por sua orientação e confiança, e por seu exemplo de vida;

Ao Prof. Valdir Cechinel Filho, por sua co-orientação e amizade;

À minha amiga Irma Luiza Christmmam, por estar sempre presente e por sua amizade;

À amiga Valquíria Nantes Barbosa Ferreira, por sua amizade;

Ao Jacir Dal Magro;

Aos amigos e colegas de trabalho Jacks, Grazi e Tiago;

Aos colegas e amigos de laboratório: Dione, Rosi, Ângela, Louise, André, Bruno, Dani, Christiane, Paula, Julieta e Berenice;

À Sra. Marcia Helene, secretária do Prof. Rosendo;

À Prof^a. Sandra R. S. Ferreira, da Engenharia Química e de Alimentos, que com seu entusiasmo muito contribuiu para realização deste trabalho;

Às amigas e companheiras de trabalho, Eliane e Tatiana, também do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos;

Ao Prof. Franco Delle Monache, do Centro Chimica Recettore, CNR, Roma, Itália;

À Prof^a. Maria da Graça Nascimento pelo constante apoio e interesse;

Ao Prof. Fernando M. Lanças por ter cedido gentilmente seu laboratório – CROMA - no Instituto de Química da USP de São Carlos para realização de parte deste trabalho;

À amiga Rosicler P. Machado, por sua paciência, amizade e ajuda;
À Prof^a. Rozangela C. Pedrosa pelos testes bioquímicos aqui apresentados;
Ao Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da UNIVALI – Itajaí representados pela pessoa da Prof^a. Márcia M. de Souza;
À Central de Análises do Depto. De Química da UFSC;
À Graça e Jadir e toda a Pós-Graduação em Química da UFSC;
Ao Departamento de Química;
À Universidade Federal de Santa Catarina;
À CAPES e CNPq.

A Deus que, acima de tudo e todos, nos mostra o caminho a seguir e nos ampara, mesmo que às vezes não O entendamos.

*À uma pessoa muito
importante e que tem me dado o que
não imaginei existir, Marco Aurélio.
Ao meu amorzinho Sofia.*

RESUMO

Nos últimos anos, tem aumentado muito o uso de plantas medicinais na forma de chás, fitoterápicos e fitofármacos. A variedade e a comercialização de chás e fitoterápicos é o que proporcionalmente mais tem aumentado. Estes fatos levam ao aparecimento de vários problemas: i) a validação científica do efeito das plantas usadas na medicina popular; ii) o controle de qualidade do material vegetal e dos fitoterápicos; iii) a determinação de métodos ótimos de extração. O presente trabalho foi desenvolvido com diversos objetivos, centrados nestes três problemas, com respeito às seguintes plantas: *Wedelia paludosa*, *Adiantum cuneatum*, *Calendula officinallis* e *Equisetum arvense*. Da planta *Wedelia paludosa* foi possível isolar sete compostos já descritos na literatura: ácido caurenóico, luteolina, coreopsina, butina, buteína, ácido protocatético e ácido cafêico. O estudo sazonal mostrou uma grande variação na concentração do ácido caurenóico nas diferentes partes da planta, quando coletadas em diferentes épocas do ano. A máxima concentração do composto ocorreu nas raízes da planta coletada durante o outono. Esta planta demonstrou um interessante efeito antinitrosante frente a morfolina, tanto do extrato metanólico, quanto da fração acetato de etila semipurificada em coluna de sílica gel, possivelmente devido à presença de butina e buteína. Na planta *Adiantum cuneatum* foram encontrados: filiceno, filicenal, adiantol e isoadiantona. O filiceno, que é o composto que apresentou melhores resultados nos testes farmacológicos, encontra-se em maior concentração nas folhas coletadas no inverno. O extrato obtido por fluido supercrítico e o composto filiceno apresentaram um bom efeito no modelo de hiperplasia de próstata induzida em ratos. Devemos salientar que o filiceno apresenta uma relação inversa de concentração versus atividade antihiperplásica. Os compostos filiceno e o filicenal mostraram um interessante efeito analgésico no modelo de dor induzido pela formalina. As plantas *Calendula officinallis* e *Equisetum arvense* foram estudadas para comparar extratos obtido por via supercrítica e convencional, com solventes orgânicos. Observou-se que a extração com fluido supercrítico (CO₂) foi mais seletiva, e que a composição química destas plantas coletadas no Brasil apresentam grandes diferenças com relação a amostras das mesmas espécies, coletadas na Europa ou em outras partes do mundo.

ABSTRACT

On the last years has increased very much the use of medicinal plants as teas, phytotherapics and phytofarmics. The variety and comercialization of the phytotherapics and tea was proporcionaly what more have increased. This facts lead to the appearing of some problems: i) the scientific validation of the effects of the plants used in popular medicine; ii) the quality control of vegetable material and of the phytotherapics; iii) the determination of the best methodology of extraction. The present work was development with objectives centralized in this three problems, with respect to the following plants: *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*), *Adiantum cuneatum*, *Calendula officinalis* and *Equisetum arvense*. From *Wedelia paludosa* was possible isolate seven compounds described in the literature: kaurenoic acid, luteolin, coreopsin, butin-butein, prothocatic acid and caffeic acid. The sazonal study showed a large variation on the concentration of the kaurenoic acid on differents parts of plant collected in differents season of the year. The bigger concentration of the compound occur on roots of plant collected on the fall season. The methanolic extract and the ethyl acetate partition extract semipurified with silic gel column demonstrated a interesting antinitrosating effect over morfolin possibily by presence of the compounds butin and butein. On the plant *Adiantum cuneatum* was found: filicene, filicenal, adiantol and isoadiantona. The filicene, that showed important pharmacollogycal results, is present in higher concentration on the leaves collected on the winter. The supercritical fluid extraction and the filicene showed a good effect on prostatic hiperplasia indused on rats. It is Important to note that the filicene exhibits a inverse relation of concentration versus antihiperplasic activity. Supercritical fluid and conventional extraction with organic solvents extracts of *Calendula officinalis* and *Equisetum arvense* were compared. It was observed that the extraction with supercritical fluid (CO₂) was more selective than solvent conventional extraction and that the chemistry composition of this plants collected on Brazil showed great differences with relations of the samples of the same especies, collected on Europe or other countries.

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÃO ..1

1 - Introdução Geral..2

1.1 - Breve História das Plantas Medicinais e de Fármacos..3

1.2 - Importância das Plantas..4

1.3 - Fármacos Oriundos de Plantas..6

1.4 - Novas Perspectivas na Área de Produtos Naturais..11

1.5 - Aspectos Gerais sobre Controle de Qualidade..12

1.6 - Fluido Supercrítico como uma Técnica Seletiva de Extração..13

2 – Objetivos..15

2.1 - Objetivos Gerais..15

2.2 - Objetivos Específicos..16

3 - Justificativa do Trabalho..17

PARTE I..19

I.1 – Introdução..20

I.1.1 - Compostos Fenólicos e sua Função na Natureza..22

I.1.2 - Reações de Nitroação..22

I.1.3 - Reações de Nitroação em Meio Ácido..23

I.1.4 - Inibição da Nitroação por Substâncias Fenólicas e Flavonóides..24

I.1.5 - Considerações Sobre as Plantas em Estudo..25

I.1.5.a - *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE)..26

I.1.5.b - *Adiantum cuneatum*..28

I.2 - Parte Experimental..30

I.2.1 – Materiais..30

I.2.1.a - Reagentes e Solventes..30

I.2.1.b – Equipamentos..30

I.2.2 – Métodos..32

I.2.2.a - Silanização das Amostras..32

I.2.2.b - Metodologia de Extração..32

I.2.2.c – Metodologia para Isolamento, Purificação e Identificação de Compostos ..33

<i>Wedelia paludosa</i>..	33
<i>Adiantum cuneatum</i>..	38
I.2.2.d - Curvas de Calibração..	40
I.2.2.e - Análises no CG para o Controle de Qualidade..	41
I.2.2.f - Análises de HPLC para as Amostras Semipurificadas da Planta <i>Wedelia paludosa</i>..	41
I.2.2.g - Reações de Nitroação..	45
I.2.2.h - Curvas de Calibração para Quantificação do Ácido Gálico e do Nitrito de Sódio..	46
I.2.2.i - Ensaio Farmacológico..	47
I.3 - Resultados e Discussão..	51
I.3.1 – Extração - <i>Wedelia paludosa</i>..	52
I.3.2 – Determinação Estrutural dos Compostos Isolados – <i>Wedelia paludosa</i>..	52
I.3.2.1 – Composto W-1 – Ácido Caurenóico..	53
I.3.2.2 – Composto W-2 – Luteolina..	55
I.3.2.3 – Composto W-3 – Coreopsina..	57
I.3.2.4 – Composto W-4 – Buteína..	58
I.3.2.5 – Composto W-5 – Butina..	59
I.3.2.6 – Composto W-6 – Ácido Protocatético..	60
I.3.2.7 – Composto W-7- Ácido Cafeico..	60
I.3.3 – Extração – <i>Adiantum cuneatum</i>..	62
I.3.4 – Determinação Estrutural dos Compostos Isolados – <i>Adiantum cuneatum</i>..	62
I.3.4.1 – Composto A-1 – Filiceno..	63
I.3.4.2 – Composto A-2 – Filicenal..	65
I.3.4.3 – Composto A-3 – Adiantol..	67
I.3.4.4 – Composto A-4 – Isoadiantona..	69
I.3.5 – Variação Sazonal de Ácido Caurenóico nas Diferentes Partes da Planta <i>Wedelia paludosa</i>..	70
I.3.6 – Variação Sazonal de Filiceno nas Diferentes Partes da Planta <i>Adiantum cuneatum</i>..	73
I.3.7 - Análises de CLAE para as Amostras Semipurificadas da Planta <i>Wedelia paludosa</i>..	76

I.3.8 – Reações de Nitroação..	81
I.3.9 – Resultados dos Ensaio Biológicos..	88
I.3.9.a - Atividade Diurética..	88
I.3.9.b - Avaliação do Potencial Anti-hiperplásico Prostático Prostático..	89
Peso da Próstata..	90
Peso da Vesícula Seminal..	93
Medida da Atividade da Fosfatase Ácida..	95
Nível Sérico de Colesterol Total..	96
Nível de Testosterona Tecidual..	98
Nível de Dihidrotestosterona (DHT) Tecidual..	99
I.3.9.c - Modelo de Contorções Abdominais Causada por Injeção Intraperitoneal de Ácido Acético Diluído..	105
I.3.9.d - Modelo de Dor Induzido pela Formalina..	107
PARTE II..	108
II.1 – Introdução..	109
II.2 – Plantas Medicinais..	110
II.3 – Justificativa..	112
II.4 – Materiais e Métodos..	113
II.4.1 – Material Vegetal..	113
II.4.2 – Metodologia de Extração..	113
II.4.2.a – Extração por Fluido Supercritico..	113
II.4.2.b – Extração por Solventes Orgânicos..	114
II.4.3 – Análise Cromatográfica e Identificação dos Componentes dos Extratos..	115
II.5 – Resultados e Discussão..	116
II.5.1 – <i>Calendula officinalis</i>..	116
II.5.2 – <i>Equisetum arvense</i>..	121
PARTE III – CONCLUSÕES..	130
REFERÊNCIAS..	133

ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1.** Número de espécies vivas conhecidas e que se estimam existirem (Pandey, 1998)..5
- TABELA 2.** Alguns fitofármacos de maior demanda no mercado de produtos medicinais (Lozoya, 1997)..10
- TABELA 3.** Diferentes condições testadas para otimizar o método de análise por HPLC das amostras obtidas a partir da planta *W. paludosa*..42
- TABELA 4.** Dados referentes aos fluxos e tempos de retenção do monitoramento da *N*-Nitrosodietilamina e *N*-Nitrosomorfolina e do nitrito nos cromatogramas de CLAE..46
- TABELA 5.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-1 – Ácido Caurenóico (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CDCl_3)..53
- TABELA 6.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-2 – Luteolina (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CCl_4)..55
- TABELA 7.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-3 – Coreopsina (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CCl_4)..57
- TABELA 8.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-4 – Buteína (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CCl_4)..58
- TABELA 9.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-5 – Butina (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CCl_4)..59
- TABELA 10.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-6 – Ácido Protocatético (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CDCl_3)..60
- TABELA 11.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-7 – Ácido Cafeico (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CDCl_3)..60

- TABELA 12.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-1 – Filiceno (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CD_2Cl_2)..63
- TABELA 13.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-2 – Filicenal (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CD_2Cl_2)..65
- TABELA 14.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-3 – Adiantol (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CD_2Cl_2)..67
- TABELA 15.** Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-4 – Isoadiantona (tendo como padrão interno de referência TMS - solvente utilizado – CD_2Cl_2)..69
- TABELA 16.** Concentração de Ácido Caurenóico nas Diferentes Partes da *W. paludosa* em Diferentes Épocas do Ano..73
- TABELA 17.** Concentrações de filiceno, em $\mu\text{g/g}$ de planta seca..74
- TABELA 18.** Descrição das amostras de *Wedelia paludosa* que foram cromatografadas por CLAE..77
- TABELA 19.** Compostos identificados nas frações semipurificadas obtidas a partir da fração acetato de etila de *Wedelia paludosa*..78
- TABELA 20.** Resultados sobre o volume urinário total após oito horas de experimento com os grupos tratados com o extrato metanólico bruto e a fração acetato de etila de *A. cuneatum* em relação aos grupos controles tratados com hidroclorotiazida e com água..89
- TABELA 21.** Dados dos eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-) determinados na urina dos ratos tratados com os extratos de *A. cuneatum* e com controles padrões..90
- TABELA 22.** Atividade analgésica da fração hexânica, filiceno e filicenal da planta *Adiantum cuneatum*, ácido acetilsalicílico e acetaminofeno no modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos..106

- TABELA 23.** Atividade analgésica do filiceo e filicenal extraídos da *A. cuneatum*, ácido acetilsalicílico e indometacina para o modelo de dor induzida por formalina em camundongos..107
- TABELA 24.** Oleoresina de *Calendula officinalis* extraída por FSC: número dos sinais equivalentes ao cromatograma, compostos identificados, peso molecular e percentagem de área dos sinais para as amostras a diferentes pressões..117
- TABELA 25.** Comparação dos rendimentos dos extratos obtidos por meio de extração convencional e por fluido supercrítico, a partir das flores secas e trituradas de *C. officinalis*..118
- TABELA 26.** Composição integrada dos extratos obtidos por meio de extração convencional (hexano e diclorometano) e extração por fluido supercrítico a partir de *C. officinalis* e dados da literatura..120
- TABELA 27.** Componentes identificados na oleoresina de *E. arvensis*. Os números dos sinais estão de acordo com a FIGURA 35. São apresentados o peso molecular e o tempo de retenção para cada compostos..122
- TABELA 28.** Efeito da densidade de CO₂ na composição da oleoresina de *E. arvensis*. A composição é expressa em fração molar e a percentagem da área dos sinais..123
- TABELA 29.** Efeito do tempo de extração na composição da oleoresina de *E. arvensis*. Composição é expressa em fração molar para a amostra obtida a 40°C e 200 bar..126
- TABELA 30.** Rendimentos obtidos nos diferentes processos de extração..127
- TABELA 31.** Comparação dos resultados da extração por FSC (200bar, 40oC e 120bar, 30oC), hexano, diclorometano e dados da literatura (percentagem da área do sinal)..129

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** *Wedelia paludosa*..27
- FIGURA 3.** *Adiantum cuneatum*..29
- FIGURA 3.** Esquema de Fracionamento e Isolamento dos Compostos Presentes no Extrato das Flores de *Wedelia paludosa*..36
- FIGURA 4.** Esquema de Isolamento dos Compostos da Fração Acetato de Etila das Flores da *Wedelia paludosa*...37
- FIGURA 5.** Esquema de Fracionamento e Isolamento dos Compostos Presentes no Extrato das Folhas da *Adiantum cuneatum*..39
- FIGURA 6.** Curvas de calibração para o ácido caurenóico isolado da *W. paludosa* e filiceno isolado da *A. cuneatum*..40
- FIGURA 7.** Cromatograma em CLAE para a coreopsina (3) semi purificada com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C..43
- FIGURA 8.** Cromatograma em CLAE para a isocoreopsina semipurificada com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C..43
- FIGURA 9.** Cromatograma em CLAE para a butina (2) / buteina (4) semipurificadas com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C..44
- FIGURA 10.** Cromatograma em CLAE para a ácido cafeico semipurificada com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C..44
- FIGURA 11.** Curvas de calibração para o ácido gálico [$3,983 \times 10^6 x - 2,384 \times 10^5$ ($r=0,9999$)] e para o nitrito de sódio [$6,537 \times 10^5 x - 1,353 \times 10^5$ ($r=0,9998$)].46

- FIGURA 12.** Cromatogramas obtidos da fração hexânica das diferentes partes da planta *W. paludosa* colhida em maio de 1998. a-flores, b-folhas, c-caule e d-raízes..72
- FIGURA 13.** Concentração de filiceno em diferentes partes de *Adiantum cuneatum* em função da estação do ano..75
- FIGURA 14.** Cromatogramas referentes aos extratos de acetato de etila em CLAE obtidos das diferentes partes de *W. paludosa*: flores (a), caule (b), folhas (c) e raízes (d). (1) ácido cafeico, (2) butina, (3) coreopsina, (4) buteína..80
- FIGURA 15.** Cromatogramas de *N*-Nitrosodietilamina e Nitrito de Sódio em CLAE (fluxo - 0,7 mL/min) com a variação de tempo (5, 15 e 60 min) da reação de nitrosação..81
- FIGURA 16.** Cromatogramas de *N*-Nitrosomorfolina e Nitrito de Sódio em CLAE (fluxo - 1,0 mL/min) com a variação de tempo (5, 15 e 60 min) da reação de nitrosação..82
- FIGURA 17.** Variação da área no cromatograma de CLAE correspondente a formação de *N*-nitrosodietilamina em função do tempo da reação (5, 15, 30 e 60 min) e da concentração de A – ácido cafeico, B – ácido gálico, C – quercetina, D – rutina..83
- FIGURA 18.** Variação da área no cromatograma de CLAE correspondente a formação de *N*-nitrosomorfolina em função do tempo da reação (5, 15, 30 e 60 min) e da concentração de A – ácido cafeico, B – ácido gálico, C – quercetina, D – rutina..84
- FIGURA 19.** Variação da área do sinal no cromatograma de CLAE correspondente a formação de *N*-nitrosodietilamina e *N*-nitrosomorfolina em função da concentração da amostra M (TABELA 18) e do tempo de reação..85
- FIGURA 20.** Variação na área do sinal no cromatograma de CLAE correspondente a formação de *N*-nitrosomorfolina em função da concentração do extrato aquoso (a) e metanólico (b) da *W. paludosa* e do tempo da reação..86

FIGURA 21. Cromatogramas de formação de *N*-nitrosomorfolina e nitrito de sódio em CLAE (fluxo – 1,0 mL/min), com variação da concentração de ácido gálico, após 30 minutos de reação..87

FIGURA 22. Peso da próstata (mg/100g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4 mg/kg), fração supercrítica (24 mg/kg), extrato bruto metanólico (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (b) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente..91

FIGURA 23. Peso da próstata (mg/100g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com ebm (ebm= extrato bruto metanólico) (300 mg/kg, 30 mg/kg e 3 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a), (b) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente..92

FIGURA 24. Peso da próstata (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com filiceno (0,1 mg/kg; 1 mg/kg e 10 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente..92

FIGURA 25. Peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4 mg/kg), fração supercrítica (24mg/kg), extrato bruto metanólico (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a), (b) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente..93

FIGURA 26. Peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com diferentes doses do extrato bruto metanólico (ebm) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6..94

FIGURA 27. Peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásico e tratados com filiceno (0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6..94

FIGURA 28. Atividade da fosfatase ácida dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4 mg/kg), fração supercrítica (24 mg/kg), extrato bruto metanólico (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a), (b) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$..95

FIGURA 29. Nível sérico de colesterol (mg/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4mg/kg), fração supercrítica (24 mg/kg), extrato bruto metanólico (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente..96

FIGURA 30. Nível sérico de colesterol (mg/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com extrato bruto metanólico (ebm) (300 mg/kg e 3 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,01$..97

FIGURA 31. Nível sérico de colesterol (mg/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com filiceno (0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente..98

FIGURA 32. Nível de testosterona tecidual (ng/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com fração supercrítica (24 mg/kg) e extrato bruto metanólico (300 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) diferença significativa em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001..99$

FIGURA 33. Nível tecidual de DHT ($\mu\text{g/dL}$) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com fração supercrítica (24 mg/kg) e extrato bruto metanólico (300 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) diferença significativa em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001..100$

FIGURA 34. Resultados da análise de CG-EM da oleoresina de *Calendula officinalis* obtida por extração por FSC a 20°C e 188 bar..117

FIGURA 35. Cromatograma da análise de oleoresina de *E. arvensis* por cromatografia a gasosa (amostra obtida a 200 bar e 40°C)..121

FIGURA 36. Efeito da densidade do solvente na composição da oleoresina..124

FIGURA 37. Efeito do tempo de extração na composição da oleoresina de *E. arvensis* onde: (1) ácido dodecanóico; (2) 3-nonoinato de metila; (4) heneicosano; (8) metinolona..125

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

δ , ppm – Deslocamento Químico

A. cuneatum – *Adiantum cuneatum*

AC – Ácido Cafêico

ACN – Acetonitrila

AE – Acetato de Etila

AG – Ácido Gálico

AIDS (SIDA) – Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida

ASA – Ácido Acetilsalicílico

BSTFA – bis-(trimetilsilil)trifluoro-acetamida

BuOH – Butanol

C. officinalis – *Calendula officinalis*

ca. – Cerca

CC – Cromatografia de Coluna

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCl₄ – Tetracloreto de Carbono

CD₂Cl₂ – Diclorometano Deuterado

CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado

CG – Cromatografia a Gás

CG-EM – Cromatografia a Gás Acoplada a um Espectrômetro de Massas

CLAE (HPLC) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a um Espectrômetro de Massas

CO₂ – Dióxido de Carbono

DCM – Diclorometano

DEA – Dietilamina

DHT – Dihidrotestosterona

DI₅₀ – Dose Inibitória 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonuclêico

E. arvense – *Equisetum arvense*

EB – Extrato Bruto

ebm – Extrato Bruto Metanólico

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
FDA – Food and Drug Administration
FID – Detector por Ionização de Chama
FSC – Fluido Super Crítico
H₂O – Água
HBP – Hiperplasia Benigna de Próstata
HCl – Ácido Clorídrico
HEX – Hexano
i. p. - Intraperitoneal
IND – Indometacina
KCl – Cloreto de Potássio
MeOH – Metanol
MOR – Morfolina
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
P.A. – Grau de Pureza Analítica
PBS – Solução Salina com Tampão Fosfato
QUE – Quercetina
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RUT – Rutina
S. repens – *Serenoa repens*
TMS – Tetrametilsiloxano
t_R – Tempo de Retenção
UV-DAD – Detector de Ultra Violeta com Diodo de Varredura
v.o. – Via Oral
W. paludosa – *Wedelia paludosa*

APRESENTAÇÃO

O caminho que este trabalho procurou seguir foi o de dar embasamento científico para o emprego medicinal de plantas, sendo que algumas delas já são bastante utilizadas na medicina popular.

Para uma melhor disposição e compreensão dos dados, ele foi dividido em duas partes.

Parte I – Avaliação das plantas *Adiantum cuneatum* e *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) procurando estabelecer a identidade estrutural de compostos isolados. Procurou-se fazer o controle de qualidade sazonal para verificar em qual época do ano seria mais conveniente sua coleta em relação à concentração dos compostos presentes.

As substâncias fenólicas constituem uma classe de compostos responsáveis por diversos efeitos biológicos, e são amplamente encontradas nas frações polares de muitas plantas, inclusive da *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*), onde foram identificados vários compostos, sendo alguns deles fenólicos. Com base nestes dados, procurou-se também verificar, através de reações acompanhadas via cinética, a atividade antinitrosante de substâncias fenólicas na presença de compostos aminados. Estas reações foram, a princípio, executadas com padrões puros (adquiridos comercialmente) e, em seguida, foram utilizadas as frações das plantas semipurificadas e pré-analisadas via cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, fez-se a análise farmacológica de atividades como: analgesia, efeito diurético, efeito hipocolesterolêmico e efeito na hiperplasia benigna de próstata para os extratos, frações e compostos isolados da planta *Adiantum cuneatum*. Determinar quais compostos são os responsáveis por estas atividades também foi um objetivo deste trabalho.

Parte II – Na segunda parte desta tese, o objetivo foi o de otimizar uma metodologia visando a obtenção de extratos mais purificados e seletivos, onde se consiga obter, variando-se as condições de extração, frações com apenas uma classe de compostos, facilitando a determinação do responsável ou responsáveis pela atividade farmacológica descrita para a planta. As plantas envolvidas neste trabalho foram a *Calendula officinalis* e *Equisetum arvense*.

1 - Introdução Geral

O uso das plantas medicinais (ervas) tem um longo caminho na história das civilizações (CHAN, 1997). Em recentes anos, tem aumentado o interesse por medicamentos naturais ou de ervas, parcialmente porque a medicina moderna não é capaz de solucionar, de curar, todos os males da humanidade. Os medicamentos naturais podem ser compostos de uma única espécie vegetal ativa, com seu extrato, ou conter uma associação de extratos de várias ervas. O interesse se dá porque os compostos naturais contidos nestes coquetéis podem atuar de maneira sinérgica, com uma única propriedade terapêutica, apresentando muito pouco ou nenhum efeito colateral (HUIE, 2002). Hoje, uma quarta parte, senão mais, dos fármacos empregados nos países industrializados se originam ou são modelados a partir de compostos vegetais (LOZOYA, 1997), os quais são produtos do metabolismo secundário das plantas e freqüentemente ativos biologicamente, isto é, possuem ação tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida, etc (PLETSCH, 1998).

Povos inteiros dominavam a manipulação das plantas, associando-as, muitas vezes, à magia e a rituais religiosos, onde a maioria das pessoas definiria planta medicinal como sendo aquela erva colhida no fundo do quintal ou no campo, com a qual pode-se fazer um chá, uma tintura ou pomada. A utilização de plantas é considerada “natural” e faz parte da medicina herborística, com origem nas tradições milenares da China e Índia (YAMADA, 1998).

1.1 - Breve História das Plantas Medicinais e de Fármacos

Desde que existem registros sobre medicina, as plantas medicinais estão presentes. Os dados mais antigos podem ser rastreados até 2500 a.C., com a Medicina Tradicional Chinesa (YAMADA, 1998). Acredita-se que muitos outros documentos antigos tenham se perdido com o incêndio da Biblioteca de Alexandria (391 d.C), mas pode-se afirmar que 2000 anos antes do aparecimento dos médicos gregos já existia uma medicina egípcia organizada. O egiptólogo Georg Ebers, em 1873 descobriu e decifrou um papiro o qual iniciava assim: “Aqui começa o livro destinado à preparação de remédios para todas as partes do corpo”. Em paralelo a isto, sabe-se que a China, a Índia e a Europa Central têm a mais completa documentação conhecida sobre o uso de plantas no tratamento de doenças (GRUENWALD, 1998).

Pode-se iniciar a história dos fármacos com a analogia da chave e fechadura de Emil Fisher (1852 – 1919) e, simultaneamente, o modelo da bala mágica de Paul Ehrlich (1854 – 1915), onde os medicamentos seriam levados aos tecidos doentes. Em seguida, foi proposto o modelo da aspirina, no início do Século XX; nas décadas de 40 e 50, a síntese química e os ensaios farmacológicos; na década seguinte, 60, o desenvolvimento da bioquímica, área de primordial importância para o avanço da química medicinal (TAFT e LEWIS, 1959; HANSCH *et al.*, 1962). Nos anos 70, a físico-química orgânica conseguiu determinar descritores moleculares de fatores polares, eletrônicos e estéricos que afetam a reatividade química dos compostos. Com relação a estes descritores, ainda em 1960, FUJITA e HANSCH propuseram uma equação de correlação entre atividade biológica com fatores polares (polares-eletrônicos) e hidrofobicidade das moléculas (HANSCH *et al.*, 1962).

Com o desenvolvimento dos computadores, nos anos 80, surgiu, então, a Química Computacional, a qual fundamenta-se na química teórica, que desenvolve teorias para descrever propriedades experimentalmente determinadas ou não determináveis. Isto permite prever efeitos causados por estruturas reais ou imaginárias (SILVERMAN, 1992).

Finalmente, na década de 90, surgiu a Biologia Molecular, que está intimamente ligada à Engenharia Genética. A esperança depositada nesta nova ciência é a de que ela possa conduzir a um melhor entendimento de doenças ligadas à etiologia gênica. Já sabemos, por exemplo, que aproximadamente 5000 distúrbios gênicos afetam o homem, provocando várias doenças. O conhecimento destes genes, e de como eles interagem, deve conduzir a novos e mais eficientes fármacos (HOB DEN,1996).

1.2 - Importância das Plantas

A fitoterapia é a forma de tratamento utilizada em várias partes do mundo, particularmente pela população rural e mais carente (MATTHEWS *et al.*, 2000), sendo que o Brasil possui de 40 a 200 mil espécies vegetais (um terço das existentes no planeta), e cerca de 10 mil são medicinais. A título de comparação, a China tem 27 mil espécies vegetais, com 5 mil medicinais (20%), e a Índia, 18 mil, com 2,5 mil medicinais (14%) (BRAZ-FILHO, 1994). Temos, portanto, uma das floras mais ricas do mundo em matérias-primas para fitoterápicos e fitofármacos.

Das inúmeras espécies vegetais do Brasil, muitas são usadas principalmente como fonte de material para construções e carpintarias, para fabricação de carvão e celulose e para extração de componentes químicos com valor comercial para atender a demanda internacional (BRAZ-FILHO, 1994). Assim, permanecemos assistindo a um processo de devastação desordenado e indiscriminado, sem adotar posição compatível com a preservação racional da maior reserva florestal do mundo. O extermínio das espécies vegetais prejudica o equilíbrio ambiental e elimina um poderoso laboratório vivo de produtos químicos, muitos deles úteis para manutenção do sistema ecológico e para curar doenças e salvar vidas.

O desenvolvimento de métodos de produção e isolamento, determinação estrutural, síntese e controle de qualidade de produtos naturais permitiram um grande avanço contra inúmeras doenças (CORDELL, 1995).

Na Tabela 1 são observados os números de espécies conhecidas e que se estimam existirem em cada grupo de seres vivos (PANDEY, 1998).

TABELA 1. Número de espécies vivas conhecidas e que se estimam existirem

Grupo	Espécies Conhecidas	Espécies Estimadas	% de espécies conhecidas
Vírus	5.000	130.000	4
Bactérias	4.760	40.000	12
Fungos	69.000	1.500.000	5
Algas	40.000	60.000	67
Briófitas	17.000	25.000	68
Gimnospermas	750		
Angiospermas	250.000	270.000	93
Protozoa	30.800	100.000	31
Poríferos	5.000		
Cnidários	9.000		
Nemátodos	15.000	500.000	3
Crustáceos	38.000		
Insetos	800.000	~10.000.000	8-13
Outros vertebrados	132.460		
Moluscos	50.000		
Equinodermos	6.100		
Anfíbios	4.184		
Répteis	6.380		
Peixes	19.000	21.000	90
Pássaros	9.198		~100
Mamíferos	4.178		~100

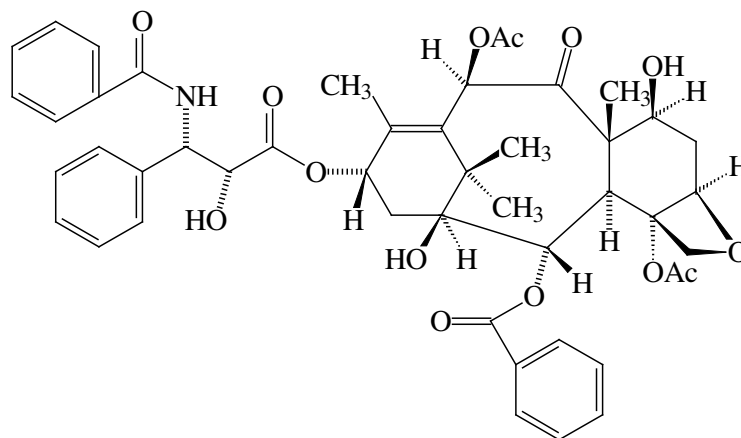
Referência: PANDEY, 1998

Com base na TABELA 1, pode-se perceber que não somente plantas, mas também fungos, bactérias e muitas outras classes de seres vivos são pouco estudados e conhecidos quando comparados ao número de espécies que se estima existirem. Porém, nos últimos anos tem aumentado o número de grupos de pesquisa que se dedicam às plantas medicinais (PANDEY, 1998).

1.3 - Fármacos Oriundos de Plantas

A medicina alopática utiliza universalmente 119 fármacos, com estruturas definidas, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores. Este dado nos permite deduzir que muitas substâncias com atividade farmacológica podem ser isoladas destes organismos vegetais e caracterizadas estruturalmente (PLETSCH, 1998). Muito trabalho tem sido feito nos últimos anos, com respeito à investigação de espécies conhecidas e desconhecidas, com o intuito de se descobrir compostos potencialmente importantes para a indústria farmacêutica. Diversos produtos de origem natural têm sido obtidos a partir de mais de uma espécie e, também, se têm provado efetivos no combate a várias doenças, como por exemplo, um composto com atividade antitumoral pode ser efetivo também contra o vírus do HIV e ainda ser útil no tratamento do diabetes (LOZOYA, 1997).

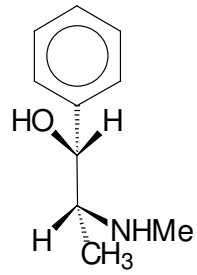
O potencial químico dos organismos vivos na produção de substâncias de interesse estimula a busca das indústrias farmacêuticas por fontes de fármacos. O paclitaxel (**1**), extraído de várias espécies de *Taxus*, comercialmente conhecido como taxol, e que era utilizado na medicina tradicional da Índia como uma planta anticancerígena e sendo atualmente reconhecida como anti-tumora, é um bom exemplo (PANDEY, 1998).



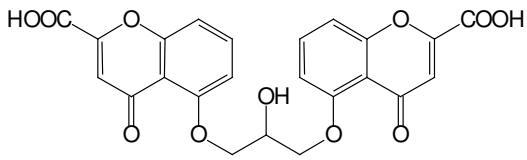
(1)

A efedrina (2), muito utilizada como broncodilatador, descongestionante nasal, agente antiarrítmico, agente hipotensivo e contra choque é extraído da *Ephedra vulgaris* e é conhecida desde 2.800 a.C. na medicina chinesa (BRAZ-FILHO, 1994). Muitos outros exemplos são encontrados na área de saúde como, por exemplo, o cromolin (3), que foi introduzido em terapêutica em 1970, é obtido a partir de *Ammi visnaga*, uma planta utilizada no sudoeste do mediterrâneo, para o tratamento de congestão bronquial (PANDEY, 1998). Os índios peruanos utilizavam as cascas de quina no tratamento da malária e somente por volta de 1677 esta planta foi incluída na London Pharmacopoeia sob o nome de *Cortex peruanus* e, em 1820, foi isolada a quinina (4). A artemisinina (5) presente na *Artemisia annua* também é utilizada como agente antimalárico (AGTMAEL *et al.*, 1999). A digitoxina, a digoxina e a digitoxigenina são três exemplos de compostos que são importantes fármacos com poderoso efeito cardiotônico, extraídos das folhas da *Digitalis purpurea* (MILLER, 1998). Há ainda, dois compostos extraídos da *Hypericum perforatum*, a hipericina e a pseudohipericina, que seriam responsáveis pelo efeito antidepressivo desta planta (VITIELLO, 1999).

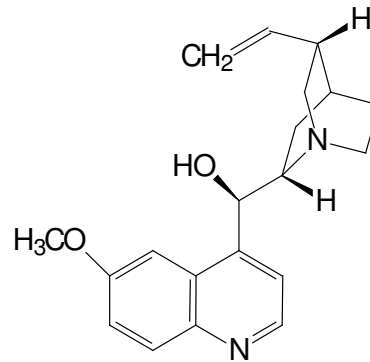
Outros exemplos podem ser encontrados nas indústrias agroquímicas pelo fornecimento de inseticidas e fungicidas naturais como a rotenona (6), alimentícias para a obtenção de substâncias naturais flavorizantes, como o mentol (7), o ácido benzóico (8) e corante dos alimentos e cosméticos pela indústria de perfumes como cânfora (9), cumarina (10) e linalol (11).



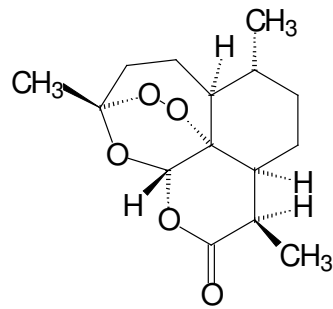
(2)



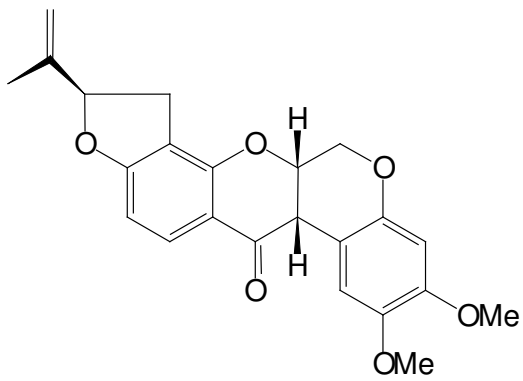
(3)



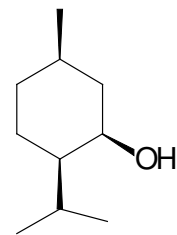
(4)



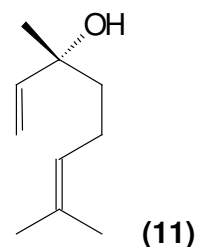
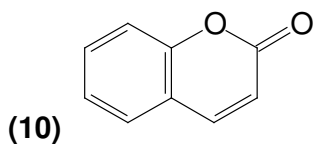
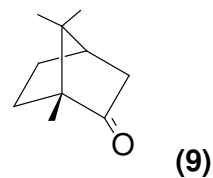
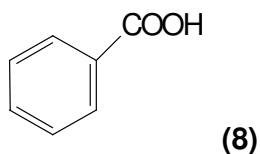
(5)



(6)



(7)



Até alguns anos, a química medicinal preocupava-se basicamente em sintetizar determinadas moléculas que tivessem um efeito específico sobre algum alvo molecular. Nos últimos anos, tem-se adotado uma nova abordagem na produção de medicamentos, com a introdução dos fitoterápicos, que são elaborados a partir do extrato bruto ou de frações do mesmo, cuja ação farmacológica depende da combinação dos princípios ativos obtidos do vegetal (LOZOYA, 1997). Na TABELA 2, estão apresentadas algumas plantas cujos efeitos farmacológicos já estão cientificamente comprovados.

Dentro desta nova abordagem na pesquisa de medicamentos, a dos fitoterápicos, tem-se um recente e importante exemplo de grande venda e repercussão na Europa e Estados Unidos, que é o extrato lipoesterólico da *Serenoa repens*. Este fitoterápico tem mostrado resultados altamente promissores no tratamento da Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP), uma doença degenerativa que afeta 50% dos homens a partir dos 50 anos de idade e 80% dos homens na faixa dos 80 anos (BRINKER, 1994)

TABELA 2. Alguns fitofármacos de maior demanda no mercado de produtos medicinais.

Planta	Efeito Comprovado	Usos
<i>Allium sativum</i>	Reduz a agregação plaquetária	Arterioscleroses e disfunção plaquetária
<i>Arnica montana</i>	Antiinflamatório	Contusões e lesões
<i>Artemisia annua</i>	Antiparasitário	Malária
<i>Angelica sinensis</i>	Hepatoprotetor	Hepatite e cirrose hepática
<i>Astragalus radix</i>	Imunoestimulante	Gripe
<i>Centella asiatica</i>	Ativa a produção de colágeno	Feridas e queimaduras
<i>Crataegus oxyacantha</i>	Melhora a permeabilidade vascular	Enfermidades cardiovasculares
<i>Echinaceae purpurea</i>	Imunoestimulante	Infecções respiratórias
<i>Ginkgo biloba</i>	Antioxidante	Insuficiência cerebrovascular
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ativa prostaglandinas	Úlcera gástrica e duodenal
<i>Matricaria chamomilla</i>	Inibe prostaglandinas e leucotrienos	Inflamação visceral
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Hipoglicemiante	Diabetes mellitus
<i>Panax ginseng</i>	Adaptógeno e tônico	Debilidade e estresse
<i>Plantago psyllium</i>	Hipocolesterolemiantes	Prevenção do infarto
<i>Psidium guajava</i>	Antagonista de cálcio	Antidiarreico
<i>Tanacetum parthenium</i>	Antiserotoninérgico	Enxaquecas
<i>Thymus vulgaris</i>	Antimicrobiano	Faringites e amigdalite
<i>Zingiber officinale</i>	Antiserotoninérgico	Enxaqueca e tonturas

Referência: LOZOYA, 1997.

1.4 - Novas Perspectivas na Área de Produtos Naturais

A química assume em muitos aspectos as características de ciência transdisciplinar, ou seja, uma ciência que fornece os meios essenciais e a linguagem fundamental para o correto entendimento de outras disciplinas científicas (CORDELL,1995).

O conhecimento da estrutura do universo, a caracterização da matéria e da natureza e a preservação da vida dependem de atividades de pesquisa desenvolvidas pelos químicos, já que todos os processos da vida – nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento e morte – representam manifestações de transformações químicas.

A compreensão dos processos da vida dependem de conhecimentos bioquímicos (química dos processos da vida: enzimologia, endocrinologia, neuroquímica, química de membranas e química vetorial, estudos químicos de sistemas biológicos). Neste contexto entra a biotecnologia, que é uma área de pesquisa extremamente ativa, especialmente na busca de produtos para fins terapêuticos (indústrias farmacêuticas) e para melhoramento na agricultura e pecuária.

Efetivamente, o domínio científico dos processos orgânicos vitais (animais e vegetais) necessita de conhecimentos biológicos, bioquímicos, biofísicos, fisiológicos, genéticos, farmacológicos e de química de produtos naturais do metabolismo secundário, alcançados através de programas interdisciplinares, contando com outras disciplinas correlatas e essenciais para o desenvolvimento destas áreas do conhecimento (CORDELL, 1995).

As células são laboratórios vivos e dispõem de todas as condições essenciais para a biossíntese de diversas substâncias necessárias para a preservação e sobrevivência da sociedade humana, inclusive, para a bioprodução, em quantidade e qualidade de produtos necessários para a erradicação de doenças que continuam fazendo vítimas fatais (câncer, AIDS, malária, etc.) (BRAZ-FILHO, 1994). Os organismos vivos terrestres e marinhos possuem mecanismos químicos para a comunicação, adaptação, evolução e construção do ambiente ecológico para manter o equilíbrio da sobrevivência. Portanto, as próximas etapas da química de produtos naturais do metabolismo secundário não deverão envolver somente a descoberta de novas estruturas e

catalogação dos constituintes das espécies estudadas. Além disto, as pesquisas deverão ser ampliadas, para que sejam investigadas exaustivamente as propriedades farmacológicas e ecológicas de metabólitos secundários isolados, explorar-se a capacidade bioprodutiva de culturas de células e tecidos, e para que sejam investigados microrganismos em meios de culturas preparados artificialmente (PANDEY, 1998). A biopreparação de produtos com estereoquímicas definidas e a introdução e modificação biosseletivas de grupos funcionais em substratos naturais ou sintéticos dependem de rotas biogenéticas que precisam ser conhecidas cientificamente (BRAZ-FILHO, 1994).

1.5 - Aspectos Gerais sobre Controle de Qualidade

Recentemente, tem-se observado a necessidade de um maior controle quanto ao uso de plantas medicinais por se tratar de um sério problema de saúde pública (VILEGAS *et al.*, 1994 e 1995). O conhecimento sobre os constituintes químicos das plantas medicinais e seus efeitos farmacológicos e tóxicos em humanos são extremamente limitados. Por exemplo, cerca de 5000 espécies de plantas são utilizadas na China como plantas medicinais, mas somente as 230 mais comuns foram submetidas a estudos clínicos, químicos e farmacológicos em profundidade (CHAN, 1997).

Freqüentemente, estes estudos não conseguem todas as informações necessárias com segurança, por várias razões. Estudos toxicológicos em animais não necessariamente revelam todos os riscos em humanos (CHAN, 1997). Triagens clínicas em voluntários humanos são freqüentemente poucas e as reações adversas são mal descritas. Efeitos adversos que tenham um longo período de latência como carcinogenicidade e teratogenicidade são problemas que surgirão futuramente (GRUENWALD, 1998). Devido a todos estes problemas, a única maneira de diminuir estes riscos é ter uma linha de controle que assegure a qualidade das plantas medicinais através do monitoramento dos seus constituintes químicos. A identificação dos compostos responsáveis pela atividade faz-se necessária, para que se viabilize a determinação de sua concentração. Também é importante monitorar a maneira como a planta é estocada e manipulada em todas as fases de preparação do fitoterápico para que nenhum

processo utilizado seja desconhecido e assim ser descartada a hipótese da formação de subprodutos ou contaminantes. Ainda deve-se fazer um controle sazonal de coleta da planta versus concentração dos princípios ativos nas diferentes partes da planta. Cabe salientar que, embora as plantas produzam inúmeros compostos com importantes propriedades terapêuticas, muitos já usados na preparação de fármacos, a determinação de sua estrutura pode levar à síntese de análogos ou derivados mais potentes e/ou seletivos (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998). Ou seja, o controle de qualidade deve envolver a real identificação da planta em questão, e o monitoramento dos princípios ativos, já que a sua produção, por se tratarem, na maioria deles, de metabólitos secundários, está sujeita a variações devido a fatores como época de coleta, pH do solo, fase de desenvolvimento da planta em que foi coletada, armazenamento e outros (BAUER e TITTEL, 1996).

Em síntese, o controle de qualidade tem como objetivo garantir que o produto fitoterápico tenha uma composição química definida, bem como um efeito farmacológico cientificamente comprovado, com baixos riscos de toxicidade, assim como devem ser os fármacos sintéticos.

A demanda pelo desenvolvimento de novas técnicas para separar, purificar e determinar a estrutura de produtos naturais tem aumentado na mesma velocidade em que aumentam a quantidade e a complexidade dos compostos. Dentre estas técnicas, as mais utilizadas são a Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia de Coluna (CC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia e Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) (CORDELL, 1995).

1.6 - Fluido Supercrítico como uma Técnica Seletiva de Extração

A extração por Fluido Supercrítico (FSC) é uma técnica que utiliza as propriedades de solventes no estado supercrítico, o que combina a capacidade dos solventes líquidos com a mobilidade dos gases (BERNA *et al.*, 2000). Esta dualidade da densidade e viscosidade destes fluidos é o que permite o meio termo entre o comportamento de um gás e de um líquido. Contudo, a difusão

destes fluidos tende a ser muito maior do que a dos líquidos, o que leva a um aumento na razão de extração. Estas propriedades variam grandemente com as condições de operação (pressão e temperatura).

A preparação de extratos de plantas para análise é mais freqüentemente feita com solventes orgânicos convencionais, porém existem algumas vantagens na utilização da técnica de extração por FSC. Por exemplo, a extração por solventes orgânicos freqüentemente requer vários dias de extração, obtêm-se extratos diluídos (que devem ser concentrados para análise), além de gerar resíduos que para o tratamento, demandam algum custo e algumas vezes danos ao meio ambiente. Levando em conta estes fatores, é que o interesse na extração por FSC tem aumentado (SEWRAM, *et al.*, 2000), principalmente utilizando-se como solvente o dióxido de carbono, por ser não tóxico, não corrosivo, de baixo custo e não inflamável (MOLDÃO-MARTINS *et al.*, 2000).

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos Gerais

1) Analisar qualitativamente e quantitativamente os componentes químicos presentes nas plantas *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) e *Adiantum cuneatum*, já utilizadas na medicina popular, empregando-se técnicas cromatográficas como: cromatografia de coluna (CC), de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

2) Acompanhar reações de nitrosação de compostos aminados, utilizando-se a CLAE, assim como o efeito antinitrosante de compostos fenólicos e frações obtidas da planta *Wedelia paludosa*;

3) Estudar as atividades biológicas, tais como efeito antinociceptivo, diurético e anti-hiperplásico, de extratos brutos, semipurificados e dos compostos puros obtidos a partir de *Adiantum cuneatum* e de *Wedelia paludosa*, com o objetivo de confirmar ou não os dados da medicina popular;

4) Propor uma metodologia rápida e segura visando o monitoramento dos princípios ativos das plantas *A. cuneatum* e *W. paludosa* e, também, de *Calendula officinalis* e *Equisetum arvense*, comparando-se a extração convencional com a extração por fluido supercrítico.

2.2 - Objetivos Específicos

1) Estudar as atividades farmacológicas como analgesia, hiperplasia benigna de próstata (HBP), nível de colesterol e atividade diurética dos extratos brutos e semipurificados das plantas selecionadas;

2) Isolar e determinar a estrutura dos compostos responsáveis pelas atividades antes mencionadas;

3) Realizar estudos orientados ao controle de qualidade sazonal de alguns extratos de interesse e comparar diferentes métodos de extração, com a finalidade de tornar possível a obtenção de extratos mais purificados e seletivos, no que diz respeito a uma classe de compostos. Analisar os extratos obtidos por técnicas como CG, CLAE e CG-EM.

4) Verificar, através de reações acompanhadas via cinética, a atividade antinitrosante de compostos aminados na presença de substâncias fenólicas (padrões) e de frações semipurificadas da planta *Wedelia paludosa*.

3 - Justificativa do Trabalho

As plantas são laboratórios naturais para a síntese de compostos com propriedades medicinais. A extração e caracterização de compostos ativos de plantas medicinais têm resultado no descobrimento de novos compostos com alto valor terapêutico (HUIE, 2002), além de que, testes com estruturas já conhecidas podem revelar novas atividades farmacológicas e, utilizando-se os produtos puros como modelo ou protótipo, obtém-se novas substâncias ativas através da síntese orgânica (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998; STROHL, 2000).

Desde que os primeiros médicos portugueses vieram para o Brasil, muito cedo foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas. Também não se pode deixar de citar o corante extraído do pau-brasil. Em seguida, houve a corrida às especiarias do sertão – canela, baunilha, cravo, anil, raízes aromáticas, urucum, pixurí, salsa, madeira, etc.. A partir de 1808, D. João VI abriu os portos brasileiros para as nações amigas e então começaram a chegar ao país as primeiras expedições científicas, que tinham como objetivo conhecer nossa exuberante fauna e flora (PINTO *et al.*, 2002). Com este contexto, historicamente o Brasil sempre foi um país que fez uso de seus produtos vegetais, seja como especiarias na alimentação, como corantes e, principalmente, na utilização de plantas e ervas para cura de doenças.

Desde a época da colonização até hoje, a história da utilização de produtos vegetais brasileiros vem demonstrando a riqueza da cultura dos índios e a importância do desenvolvimento de estudos científicos nesta área, permitindo novas perspectivas de sobrevivência aos indivíduos portadores de doenças graves. Com base nisso, podemos citar os exemplos da artemisinina, que apresenta potente ação contra malária (PEDROSA *et al.*, 2000) e o taxol, agente antitumoral empregado especialmente contra o câncer de pulmão e ovários (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998). Ambos os compostos, e muitos outros de origem natural, foram descobertos através de informações etnomedicinais, permitindo um direcionamento para o desenvolvimento das pesquisas científicas que revelaram tais compostos.

É notório que as plantas representam poderosa ferramenta para se obter novos fitoterápicos ou fármacos. No entanto, embora o Brasil detenha cerca de um terço da flora mundial (BRAZ-FILHO, 1994), pouco ou quase nada tem

evoluído nesta área, sendo a maioria dos medicamentos meras cópias de produtos desenvolvidos em outros países. Assim, torna-se relevante que sejam obtidos subsídios científicos que estimulem a indústria farmacêutica nacional a investir na produção de medicamentos (fitoterápicos, fitofármacos e fármacos) a partir de plantas essencialmente brasileiras.

Logo, este trabalho visa a avaliação de algumas propriedades terapêuticas de duas plantas abundantes na flora catarinense (*Wedelia paludosa* e *Adiantum cuneatum*) e a determinação de seus princípios ativos.

E ainda, investigar técnicas analíticas que permitam realizar um efetivo controle de qualidade químico dos extratos, levando em consideração a sazonalidade da composição das plantas em questão. Também é avaliadas a composição química de extratos das plantas *Calendula officinallis* e *Equisetum arvense* obtidos por diferentes técnicas de extração como, por exemplo, extração convencional e por fluido supercrítico de CO₂.

PARTE I – Análise dos Componentes Químicos de *Adiantum cuneatum* e *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*), Testes Biológicos e Controle de Qualidade com Acompanhamento Sazonal

I.1 - Introdução

A utilização de produtos naturais para fins terapêuticos é tão antiga quanto a própria civilização. A Revolução Industrial e o desenvolvimento da Química Orgânica resultaram (de maneira temporária) na preferência por produtos sintéticos para o tratamento dos distúrbios de saúde. Por algum tempo, o uso de produtos naturais esteve ligado a conceitos de magia e religião, onde os produtos de origem natural eram considerados apenas como uma opção para comunidades carentes e sem nenhum valor científico (RATES, 2001).

Nos últimos dez anos, a venda de produtos naturais em países industrializados aumentou consideravelmente (CAPASSO *et al.*, 2000). Este crescimento nas vendas ocorreu devido ao incremento do uso de plantas medicinais para o tratamento de uma grande gama de problemas de saúde (desde insônia, ansiedade, obesidade, asma, constipação, gengivite, eczemas e, até mesmo, a síndrome de imunodeficiência adquirida – AIDS). O acréscimo no consumo de produtos naturais, principalmente de plantas, é devido a diversos fatores, entre eles: (i) o desenvolvimento de novas doenças, com complicações graves, para as quais não havia tratamento apropriado; (ii) a crença de que medicamentos naturais são inócuos, em contraste com os medicamentos convencionais; (iii) a idéia de que o que é natural só pode ser bom; (iv) os movimentos ecológicos, que dão especial atenção à utilização de plantas medicinais; e (v) a crença de que produtos naturais são naturalmente superiores aos compostos sintéticos (CAPASSO *et al.*, 2000).

Em paralelo ao aumento do consumo de plantas medicinais, aumentou na mesma proporção o seu cultivo e o desenvolvimento de modernos métodos de processamento e preservação do material das plantas medicinais, procurando manter-se sua qualidade por um longo espaço de tempo. Contudo, um grande número de plantas não tem sido submetido a estudos científicos que realmente comprovem seu grau de eficiência e toxicidade. Em muitos países, como por exemplo da África e Ásia, onde as plantas são muito utilizadas pela população, é reconhecido que algumas delas devem ser usadas com cuidado devido à presença, em sua composição, de compostos com efeitos tóxicos sobre órgãos como fígado (alcalóides pirrolizidínicos, opióides, safrol, lignanas, etc.), rins (terpenos e saponinas), pele (lactonas sesquiterpênicas, furanocumarinas, etc.) e

outros tecidos (CAPASSO *et al.*, 2000). Por outro lado, compostos tóxicos encontrados em plantas podem ainda ser utilizados de maneira benéfica. É descrito na literatura, que aproximadamente 60% dos agentes antitumorais que estão disponíveis no mercado ou em fase de testes clínicos hoje são de origem natural (SHU,1998).

Recentemente, dados mostraram que as florestas tropicais contêm mais da metade das espécies de plantas estimadas no planeta e que menos de 1% destas têm sido estudadas. As plantas tropicais possuem de três a quatro vezes o número de constituintes químicos ativos, se comparados com as plantas de regiões temperadas (DI STASI *et al.*; 2002).

O Brasil, com seu território de proporções continentais tem uma flora privilegiada, sendo detentor da maior floresta equatorial e tropical do planeta. Isto, por si só, leva-nos a compreender porque a Química de Produtos Naturais dentro da Química Brasileira, foi a que primeiro se desenvolveu (PINTO *et al.*, 2002).

Todos estes fatos nos levam a crer que o desenvolvimento de técnicas e metodologias para análise e controle de qualidade, tanto quantitativo como qualitativo dos constituintes das plantas utilizadas como medicinais, seja primordial (CALIXTO, 2000), principalmente, quando nos defrontamos com uma verdadeira explosão de fitoterápicos e fitofármacos no mercado, inclusive, com o apoio de governos de vários países (OSOSKI *et al.*, 2002).

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a análise de constituintes de plantas e fitoterápicos. As Cromatografias de Camada Delgada (CCD) e de Coluna (CC) são as mais utilizadas para o isolamento e purificação de compostos, e estas técnicas estão sempre aliadas a análises por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e ^{13}C). Em análises quantitativas e qualitativas são empregadas técnicas de Cromatografia Gasosa (CG) (CARDOSO *et al.*, 1998) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE / HPLC). Para a identificação dos compostos presentes em misturas também pode-se utilizar técnicas cromatográficas como CG e CLAE, acopladas a um Espectrômetro de Massas (EM) (CG-EM e CLAE-EM).

I.1.1 - Compostos Fenólicos e sua Função na Natureza

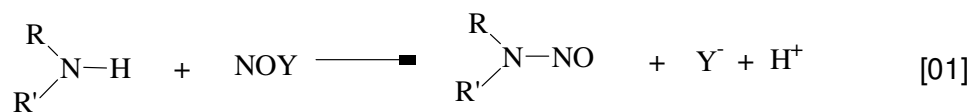
É conhecido que uma grande variedade de compostos fenólicos, entre os quais flavonóides, estão presentes na maioria das espécies vegetais conhecidas. Flavonóides e compostos fenólicos atuam em plantas como antioxidantes, agentes antimicrobiais, fotorreceptores, como atrativos visuais e repelentes. Muitos estudos sugerem que estes compostos exibem várias atividades biológicas. A capacidade de compostos polifenólicos de atuar como antioxidantes *in vitro* tem sido objeto de vários estudos nos últimos anos (PIETA, 2000).

I.1.2 - Reações de Nitrosação

O mecanismo da nitrosação é conhecido e este ocorre facilmente nas condições ácidas, tais como, no estômago humano. A primeira etapa consiste na formação dos intermediários reativos a partir do ácido nitroso e posterior reação destes com centros nucleofílicos, tais como aminas e fenóis. A reatividade com estes compostos pode variar, e propiciar reações competitivas nas quais um dos compostos reage mais facilmente com intermediários oxigenados do ácido nitroso, assim protegendo o outro composto frente a reação (TANAKA *et al.*, 1998).

A nitrosação pode ser definida como o processo de trocar um átomo de hidrogênio em uma molécula pelo grupo nitroso. As reações de nitrosação que são conhecidas ocorrem com os átomos de carbono, oxigênio, enxofre e nitrogênio, denominando-se respectivamente, C-, S-, O- e N-nitrosação, sendo as duas últimas as que mais interessam neste trabalho.

De forma esquemática, as reações de nitrosação de aminas secundárias podem ser representadas pela Equação 1;



onde o primeiro reagente é uma amina secundária (que recebe o nome de substrato nitrosável) e NOY é o agente nitrosante. Os agentes nitrosantes devem ser substâncias capazes de transferir a espécie NO⁺, e podem ser classificados em dois grupos principais: inorgânicos e orgânicos (NEURATH *et al.*; 1979).

Os principais agentes nitrosantes orgânicos são N-nitrosaminas e N-nitrosamidas que participam de reações que podem transferir o grupo nitroso a outros substratos. Estas reações são conhecidas como trans-nitrosação (BUMGARDNER *et al.*, 1961; SINGER *et al.*, 1977; CHALLIS e CHALLIS, 1982; DAL MAGRO *et al.*, 2001). Outros agentes nitrosantes são nitritos e tionitritos de alquila, RONO e RSNO, em solventes orgânicos e em água (CHALLIS e CHALLIS, 1982); e nitrocompostos, RNO₂ (SCHIMIDT e SCHUMACHER, 1921).

I.1.3 - Reações de Nitrosação em Meio Ácido

Em solução aquosa de ácidos minerais, os sais do íon nitrito formam ácido nitroso segundo o equilíbrio ácido-base apresentado na Equação 2:



[2]

Sendo a constante de equilíbrio expressa pela Equação 3:

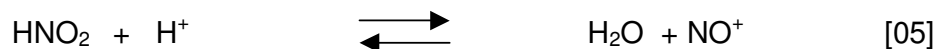
$$K = [\text{H}^+][\text{NO}_2^-] / [\text{HNO}_2] \quad [3]$$

O pKa para este ácido fraco é de 3,4 (MARTI, 1988). Em solução aquosa, o ácido nitroso se encontra em equilíbrio com outras espécies, tais como o trióxido de dinitrogênio, N₂O₃, íon NO⁺ e espécies na forma NOX, onde o X pode ser um haleto, um alcóxido RO⁻ ou uma molécula neutra como um tiocomposto, resultando, neste caso, em um derivado catiônico.

A protonação do ácido nitroso pode gerar duas espécies (Equações 4 e 5);



ou



denominadas, respectivamente, de íon nitrosônio, sendo que o ataque nucleofílico se dá sobre estas espécies, pelas substâncias nitrosáveis, que incluem compostos fenólicos e flavonóides.

I.1.4 - Inibição da Nitrosação por Substâncias Fenólicas e Flavonóides

Alguns trabalhos recentes têm relatado a utilidade de constituintes presentes em plantas como inibidores de nitrosação, mesmo nas condições mais ácidas, tal como, no estômago (OLDREIRE *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 1998; HIGASHIMOTO *et al.*, 2000; SOTTOFATTORI *et al.*, 2001). Compostos N-nitrosos são formados em condições ácidas, como a do estômago, e podem provocar câncer. Descobertas recentes têm demonstrado que existem vários caminhos para a formação endógena de compostos N-nitrosos. Substratos nitrosáveis ingeridos ou endógenos podem reagir com o ácido nitroso no estômago, ou serem nitrosados por agentes nitrosantes vindos de formação endógena de NO, ou por redução bacteriana do nitrato (BARTSCH *et al.*, 1992; LOHSONTHORN e DANCICTA, 1995).

Desde que a “Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos” (EPA) declarou na publicação “Câncer Principles” (1970), que a “maioria dos cânceres humanos são causados pela evitável exposição à carcinogênicos”, a química dos compostos N-nitrosos tem atraído considerável atenção devido aos efeitos tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos destas substâncias sobre muitas espécies animais, incluindo primatas (PIGNATELLI *et al.*, 1985; LIJINSKI, 1992).

A exposição de humanos a nitritos presentes na dieta, ou originados a partir da produção endógena de óxido nítrico, pode desempenhar importante papel na etiologia de cânceres do trato gastrointestinal, tal como nos cânceres estomacais (BARTSCH *et al.*, 1992; LOHSONTHORN e DANCICTA, 1995). A produção de espécies reativas nitrogenadas derivadas do nitrito, como HNO₂ e N₂O₃, pode causar danos de várias maneiras. Por exemplo, eles podem levar a N-nitrosação de aminas, nitração de compostos aromáticos e deaminação de bases de DNA (CHALLIS e CHALLIS, 1982; LEAF *et al.*, 1989; VAN DER VLIET, 1997;

WINK *et al.*, 1996). Muitos estudos têm demonstrado que constituintes fenólicos na dieta são eficientes seqüestradores de espécies reativas oxigenadas (SALAH *et al.*, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996) e espécies reativas cloradas (PAYA *et al.*, 1992), e existe considerável expectativa na possibilidade de que tais compostos possam atuar na proteção contra cânceres, através dos mecanismos descritos, sendo estes igualmente viáveis como seqüestradores de espécies reativas nitrogenadas. Alguns estudos têm sido realizados, particularmente na área de ciência de alimentos, com o intuito de bloquear ou inibir a formação destas espécies reativas oxigenadas e nitrogenadas, que apresentam propriedades patogênicas (BAO e LOEPPKY, 1991; WILCOX *et al.*, 1991; LOEPPKY *et al.*, 1994).

Segundo HIGASHIMOTO e col. (2000), os chás verde, preto e “oolong” obtidos de infusões de *Camellia sinensis* inibem a N-nitrosação e revelam possuir atividade antimutagênica e antitumoral. O ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina-carboxílico, presente nos molhos de soja, é um mutagênico potente quando na presença de nitrito e, quando foram adicionadas a este as infusões dos chás verde, preto e “oolong”, sua mutagenicidade decresceu de maneira dose-dependente.

I.1. 5 - Considerações Sobre as Plantas em Estudo

Conforme já mencionado, o interesse do presente trabalho foi focado em plantas encontradas no Estado de Santa Catarina e que são utilizadas na medicina popular. Considerando estes dois parâmetros, o trabalho foi concentrado no estudo de *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) e de *Adiantum cuneatum*.

I.1.5.a - *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (COMPOSITAE)

A Família Compositae compreende cerca de 920 gêneros com aproximadamente 19000 espécies, sendo, portanto a maior família das angiospermas. São plantas de hábito muito variado, ervas, arbustos e trepadeiras. As flores são sempre reunidas em inflorescência característica, o capítulo. As flores são de simetria radial. A espécie *Wedelia paludosa*, uma planta rasteira com capítulos amarelos é muito freqüente nos jardins, formando tapetes. Sua posição taxonômica é dada abaixo:

Classe: Angiospermae (Anthophyta)

Classe 1: Dicotyleddoneae

Sub classe: Archichlamydeae

Ordem: Campanulales (=Synandreae)

Família: Compositae (ASTERACEAE)

Gênero: *Wedelia*

Espécie: *paludosa*

Várias espécies do gênero *Wedelia* (Compositae) são empregadas na medicina popular em muitos países para o tratamento de diversos distúrbios como: dores de cabeça, febre, infecções e patologias do trato respiratório (ROQUE *et al.*, 1987; MILES *et al.*, 1990).

A *Wedelia paludosa* é conhecida no Brasil como “pseudo-arnica”, “pingo-de-ouro” ou “margaridão”. É muito utilizada como planta ornamental, sendo freqüentemente empregada na medicina popular para o tratamento de vários problemas de saúde, incluindo processos infecciosos e condições dolorosas. (ROQUE *et al.*, 1987; MICHALAK, 1997). O ácido caurenóico, o principal constituinte desta planta, exibe diferentes tipos de atividades, tais como: bactericida, larvicida (SLIMESTAD *et al.*, 1995), tripanossomicida (ALVES *et al.*, 1995) e antinociceptivo (BLOCK *et al.*, 1998a.), além de potente estimulador das contrações uterinas (PAGE *et al.*, 1992) (FIGURA 1).



FIGURA 1. *Wedelia paludosa*

Os estudos fitoquímicos prévios têm indicado que esta planta contém, além do ácido caurenóico (ROQUE *et al.*, 1987), monoterpenos (CRAVEIRO *et al.*, 1993) e lactonas da classe eudesmolide (FERREIRA *et al.*, 1994). Investigações recentes em nossos laboratórios revelaram que extratos, frações, e alguns compostos puros obtidos de *W. paludosa*, como o ácido caurenóico e a luteolina, têm forte efeito antinociceptivo sobre camundongos. Sua ação farmacológica é mais pronunciada com extratos obtidos a partir das raízes (BLOCK *et al.*, 1998b). A atividade antinociceptiva de alguns esteróis encontrados na *W. paludosa*, incluindo o β -sitosterol e o estigmasterol, também foi demonstrada em trabalho prévio (SANTOS *et al.*, 1995).

I.1.5.b - *Adiantum cuneatum* (POLYPODIACEAE)

A espécie *Adiantum cuneatum* pertence a Família Polypodiaceae, da qual reconhecem-se mais de 200 gêneros com cerca de 5000 espécies, distribuídas em todo o mundo, predominando nas regiões tropicais e subtropicais sendo, assim, o grupo mais importante dentre as pteridófitas vivas. Embora existam fósseis desde o Jurássico no Mesozóico, a maioria é do Cenozóico, o que faz com que o grupo seja considerado como o mais moderno das filicíneas. A posição taxonômica da *Adiantum* é descrito abaixo:

Classe: Pteridophyta

Classe 1: Filices (= Pteropsida)

Sub classe: Leptosporangiatæ

Ordem: Filicales

Família: Polypodiaceae

Gênero: *Adiantum*

Espécie: *cuneatum*

O gênero *Adiantum* já é bastante conhecido, porém da espécie *Adiantum cuneatum*, muito pouco está relatado na literatura. A *A. cuneatum* é uma planta amplamente distribuída pela América do Sul. É conhecida nos países sul-americanos de língua espanhola como “culantrillo de Montpellier” ou apenas “culantrillo” (DE FEO, 1992). É popularmente utilizada nestes países como diurético, sudorífica, expectorante e emoliente. Também é usada para tosse, desordem urinária, resfriados, reumatismos, queda de cabelo e problemas estomacais (DE FEO, 1992).

No Brasil, é conhecida como “avenca” e é utilizada popularmente para o tratamento da bronquite e tosse (SHIOJIMA *et al.*, 1997a) (FIGURA 2).



FIGURA 2. *Adiantum cuneatum*

A *A. cuneatum* é muito utilizada na Europa e Japão como planta ornamental. Na literatura, os únicos trabalhos científicos sobre sua composição química descrevem a identificação de alguns triterpenos (SHIOJIMA *et al.*, 1997 a, b, c). Não foi encontrado relatos sobre seus possíveis efeitos farmacológicos.

I.2 - Parte Experimental

I.2.1 - Materiais

I.2.1.a - Reagentes e Solventes

Os reagentes orgânicos e inorgânicos utilizados foram adquiridos comercialmente (marcas: MERCK, ALDRICH, VETEC E SIGMA) com grau de pureza P.A. e grau HPLC de acordo com a ACS, tendo sido purificados antes do uso, sempre que necessário.

I.2.1.b - Equipamentos

As análises de CG foram feitas em uma coluna capilar (30m) de fase ligada do tipo LM-1 (polimetilsiloxano) e CBP5 – M25 – 025 – Shimadzu (coluna apolar de sílica fundida) com 25 m de comprimento, hidrogênio como gás carreador (vazão ca. de 1-2 mL/min, taxa de divisão de fluxo 40mL/min). A temperatura do injetor utilizada foi de 280°C e a do detector (por ionização de chama) de 320°C. O período sem divisão de fluxo, quando utilizado, foi de 1,0 minuto. As condições de análise foram, em geral: temperatura inicial de 40°C, temperatura final de 305°C, a programação de aquecimento dependendo do perfil da amostra injetada. Tempo de isoterma final de 10 minutos. Esta programação é tida como ideal, ou que se adequa à maioria das análises, porém, ocorrem adaptações sempre que necessário. O cromatógrafo a gás utilizado foi da marca SHIMADZU (modelo CG-14B). Os cromatogramas foram armazenados e em seguida processados com auxílio de um “software” da Microquímica.

As análises em HPLC foram feitas em dois locais diferentes.

As frações semipurificadas da *W. paludosa* foram analisadas no laboratório CROMA, do Prof. Fernando Lanças, no Instituto de Química – USP – São Carlos, SP. O aparelho utilizado foi um CLAE SHIMADZU, equipado com forno, duas bombas e detector do tipo UV-DAD (Diodo Array Detector). A coluna utilizada foi do tipo CLAE “Reversed Phase Column”, “Bio-Sil-ODS-5S” de 250mm x 4mm com uma coluna guarda do tipo LCPAH – C18.

Para as reações de nitroação na presença de compostos fenólicos puros e frações da planta *W. paludosa* previamente analisadas, foi utilizado o CLAE do laboratório do Departamento de Química - UFSC da marca SHIMADZU equipado com uma bomba modelo LC – 6AD, detector UV-VIS (SPD – 10AV VP) e uma unidade controladora SCL – 10A VP. A coluna utilizada foi uma Shim-pack CLC – ODS (M) de 15 cm com o grupo octadecil como fase estacionária – fase reversa com uma coluna guarda – “LC Column, Shim-pack CLC G-ODS (4)”. O CLAE está acoplado a um microcomputador, contendo um sistema de aquisição de dados Class-VP Shimadzu

Os espectrômetros de ressonância magnética nuclear (RMN) utilizados foram dois. Um RMN da marca VARIAN GEMINI 300 (^1H 300 MHz; ^{13}C 50 MHz) operado pelo Prof. Dr. Franco Delle Monache do Centro Chimica Recettori, CNR, Roma, Itália. O outro, um espectrômetro de RMN da marca BRUKER AC – 200F (^1H 200 MHz; ^{13}C 50 MHz) (Universidade Federal de Santa Catarina), tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Todos os solventes utilizados foram solventes deuterados. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais (δ , ppm).

Foi utilizado um aparelho Cromatotron de modelo “Harrison Research Chromatotron Centrifugal Thin-Layer Chromatography” equipado com uma bomba tipo “Lab Pump Jr. Model RHSY” – modelo Fluid Metering Inc.

Também, foram utilizados aparelhos de Ultrassom UNIQUE T-1440, pHmetro HANNA HI-8417 equipado com um eletrodo duplo de vidro e um banho termostático MICROQUÍMICA MOBTC 99-20, calibrado para $37,0 \pm 0,1$ °C.

Para as cromatografias de coluna (CC), utilizou-se a sílica gel (0,063-0,200 mesh) da marca MERCK como suporte. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. Na cromatografia de camada delgada (CCD), usou-se sílica gel 60 GF 254 da MERCK. A visualização dos compostos foi feita com luz ultravioleta em comprimentos de onda 254 e 366 nm e pulverização com anisaldeído sulfúrico, seguida por aquecimento em placa ou por pulverização de cloreto férrico a 6% em etanol.

Os eluentes utilizados para cromatografia em coluna e em camada delgada possuíam grau de pureza P.A., ou foram tratados e destilados de maneira usual.

As frações foram pesadas em balança de precisão marca SHIMADZU LIBROR AEG-220.

I.2.2 - Métodos

I.2.2.a - Silanização das Amostras

A silanização dos compostos de interesse é uma técnica utilizada visando a preservação da fase estacionária da coluna, o aumento da volatilidade dos compostos e a melhor resolução do cromatograma, e foi realizado seguindo a metodologia de JAFFÉ e colab.(1995). Após a evaporação do solvente até a secura, foram adicionados ~30 μ L de BSTFA (bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamida), marca SIGMA, a cada amostra , passando-se, em seguida, um fluxo de nitrogênio. As amostras então foram deixadas na estufa por 1h a temperatura de 50-60°C. Logo após, foi evaporado o restante do reagente com fluxo de nitrogênio, procedendo-se a adição do solvente de análise. Em seguida as amostras foram mantidas no freezer, no máximo três dias, para serem analisadas por CG e CG –EM.

Para as análises por CG-EM foi utilizado um aparelho SHIMADZU (modelo CGMS – QP – 2000 – A). A coluna capilar empregada foi de igual fase estacionária utilizada nas análises por CG, sendo o hélio o gás carreador (vazão entre 1-2mL/min) e a fonte de ionização, por impacto de elétrons (70 eV).

Os extratos das plantas, após um pré-fracionamento em cromatografia de coluna, foram separadas em um cromatotrom.

I.2.2.b - Metodologia de Extração

Foram adotadas duas metodologias de extração: uma direcionada para análises de controle de qualidade e outra para a separação, identificação e testes farmacológicos dos componentes químicos das plantas em questão.

Para o controle de qualidade, a metodologia utilizada foi: após a coleta e secagem das diferentes partes da planta em temperatura ambiente, estas foram trituradas (1g de planta) e então maceradas em hexano (10mL) a temperatura ambiente e sem a presença de luz (7 dias). Em seguida, foi filtrado e evaporado o solvente e o concentrado resultante analisado. Depois de efetuada a filtração, foi recolocado solvente de maior polaridade e o mesmo processo repetido (solventes

que foram utilizados, em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol).

Para a separação, identificação e testes farmacológicos dos princípios ativos a metodologia aplicada foi: o material da planta foi seco a temperatura ambiente (1-1,5Kg de planta seca) e macerados com metanol por um período de 5 dias, trocando-se o solvente a cada 24 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado em rota evaporador à baixa pressão e, então, procedeu-se ao fracionamento do concentrado em distintas frações com solventes de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Esta etapa foi efetuada por meio de separação líquido-líquido ou por filtração do extrato bruto em sílica gel, separando-se as distintas frações com diferentes polaridades, como descrito acima. A metodologia de fracionamento depende das características da planta em estudo.

Após esta etapa, cada fração foi novamente concentrada em rota evaporador à baixa pressão e mantida em dessecador para novos fracionamentos por cromatografia em coluna e separação por cromatotrom, com o objetivo de obter-se e quantificar-se os componentes presentes por CG, CCD e métodos espectroscópicos e, ainda, testar as atividades farmacológicas das frações e dos compostos isolados.

I.2.2.c – Metodologia para Isolamento, Purificação e Identificação de Compostos

Wedelia paludosa

As flores da planta *Wedelia paludosa* foram coletadas em 28/11/1998 na Estrada Geral da Lagoa da Conceição, e identificadas pelo Dr. Ademir Reis (Herbário Barbosa Rodrigues [HBR, Itajaí (SC)]), onde uma exsicata foi depositada (V. C. Filho 002). A planta foi seca a temperatura ambiente por 10 dias. As flores secas e trituradas (628,93 g) foram maceradas por 7 dias em metanol (5,5 L). Após a maceração, o extrato foi concentrado em roatevaporador sob pressão reduzida até obter-se uma pasta verde-escura (extrato bruto - EB) de concentração 77,1 g/mL. O EB foi então dissolvido em uma mistura de água/metanol (3:7) e fracionado por separação líquido-líquido com solventes de

polaridade crescente: hexano (HEX) (900 mL), dicloro metano (DCM) (900 mL), acetato de etila (AE) (1200 mL) e butanol (BuOH) (400 mL). As quatro frações foram também concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida obtendo-se os seguintes rendimentos em relação ao peso da planta seca: 1,07% para a HEX, 1,68% para a DCM, 1,34% para a AE e 0,87% para o BuOH. As frações foram guardadas em dessecador para posterior análise.

Para o isolamento e purificação dos compostos, as frações foram submetidas a cromatografia em coluna, empregando sílica gel como fase estacionária e eluídas com solventes de polaridades crescentes.

A fração hexânica (HEX) (1,081 g), foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 3,0 cm) de sílica gel (90 g), empacotada com hexano e enriquecida com acetato de etila gradualmente até Hex/AE (1:1). Foram coletadas 130, frascos de 15 mL cada e com base na análise por cromatografia em camada delgada, as frações foram reunidas por semelhança. Na fração obtida pela reunião das frações 35 a 45, foi obtida uma mistura amarelada e, por lavagem com acetona gelada, foi possível o isolamento de um composto de cor branca denominado W – 1 (0,108 g).

A fração diclorometano (DCM) (487,1 mg), foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ 3,0 cm) de sílica gel (80 g), empacotada com hexano e enriquecida com acetato de etila gradualmente até Hex/AE (1:1). Foram coletadas 210 frascos, de 15 mL cada e após com a cromatografia em camada delgada (CCD), as frações foram reunidas por semelhança. Na fração obtida pela reunião das frações 151 a 200, foi isolado um composto amarelado chamado de W -2 (0,102 g).

A fração acetato de etila (AE) (5,137 g) foi também submetida a cromatografia em coluna (ϕ 3,0 cm da coluna) sobre sílica gel (36,04 g) empacotada e eluída com diclorometano (DCM) e gradualmente enriquecida com metanol (MeOH). Foram coletados 140 frascos, de 15 mL cada. Com análise em CCD, do conteúdo de todos os frascos, as amostras foram reunidas, por semelhança em doze (12) sub-frações. Na sub-fração 1 foram reunidos os frascos 1-25 (0,050 g); na sub-fração 2 os frascos 26-27 (0,010 g); na sub-fração 3, de 28-33 (0,070 g); na sub-fração 4, de 34-39 (0,070 g); na sub-fração 5, de 40-55 (0,150 g); na sub-fração 6, de 56-60 (0,070 g); na sub-fração 7, de 61-70 (0,700

g); na sub-fração 8, de 71-100 (3,230 g); na sub-fração 9, de 101-105 (0,140 g); na sub-fração 10, de 106-110 (0,030 g); na sub-fração 11, de 110-115 (0,070 g); e na sub-fração 12, de 116-140 (0,160 g).

A sub-fração 8 foi recromatografada em coluna (ϕ 2,5 cm) de sílica gel (33,72 g) empacotada com acetato de etila e eluída com uma mistura de acetato de etila/acetona/água (25:5:1). Foram coletados 48 frascos, de 15 mL cada, e com base nas CCDs, as frações foram reunidos por similaridade. Foi possível, com esta coluna, isolar um composto, na forma de um pó amarelado (23 mg), presente nos frascos 19-30, que foi denominado W-3.

A sub-fração 4, foi recromatografada em coluna (ϕ 2,0 cm) de sílica gel (22,4 g) empacotada com diclorometano (DCM) e eluída com DCM/MeOH (95:5), sendo enriquecida gradualmente com MeOH até MeOH 100%. Foram coletados 20 frascos de 15 mL cada, e com base nas CCDs, as frações foram reunidos por similaridade. Foi possível, com esta coluna, isolar uma mistura de dois compostos presentes nos frascos 4-6. Esta mistura foi, então, cromatografada no cromatotron com eluente DCM/MeOH (70:30), sendo então possível isolar os compostos W-4 (9,4 mg) e W-5 (10 mg).

As sub-frações 5 e 6 foram reunidas e recromatografadas em coluna (ϕ 2,5 cm) de sílica gel (31,24 g) empacotada com diclorometano (DCM) e eluída com DCM/MeOH (95:5), sendo gradualmente enriquecida com MeOH até 100%. Foram coletados 45 frascos, de 15 mL cada, e com base nas análises das CCDs, as frações foram reunidas por similaridade. Foi possível, com esta coluna, isolar dois compostos, o W-6 (7,4 mg) dos frascos 17-19 e W-7 (9,2g) dos frascos 26-30. As FIGURAS 3 e 4 apresentam de maneira esquemática a seqüência do fracionamento e purificação dos compostos presentes na planta *Wedelia paludosa*.

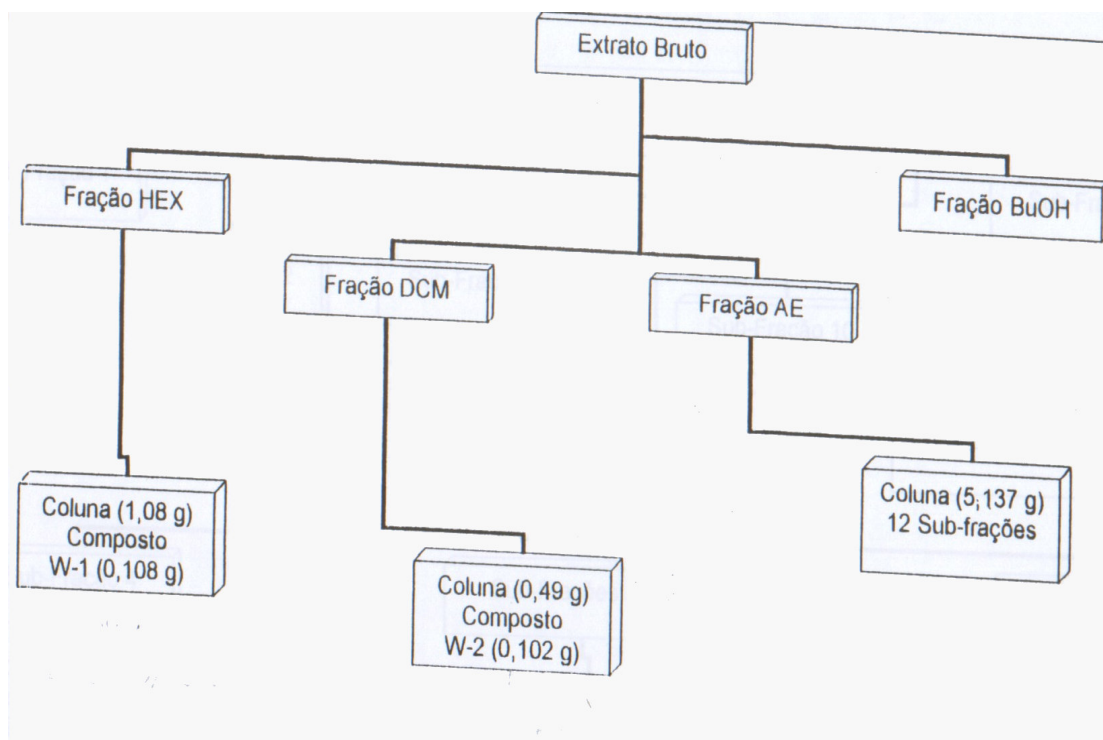


FIGURA 3. Esquema de Fracionamento e Isolamento dos Compostos Presentes no Extrato das Flores de *Wedelia paludosa*.

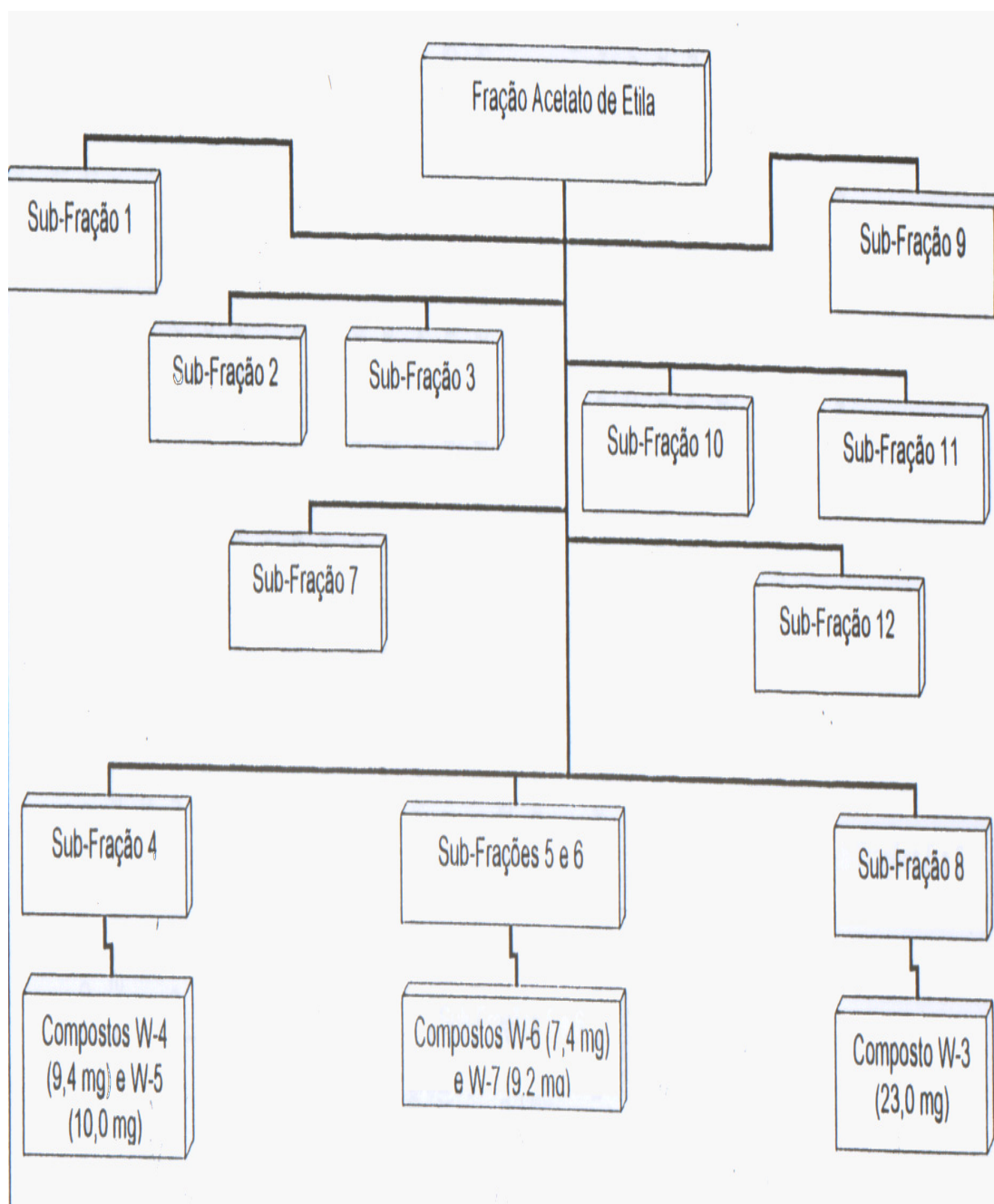


FIGURA 4. Esquema de Isolamento dos Compostos da Fração Acetato de Etila das Flores da *Wedelia paludosa*.

Adiantum cuneatum

A. cuneatum foi coletada em março de 2000 em Caxambu do Sul, cidade próxima a Chapecó, oeste de Santa Catarina e identificada pelo Prof. Ademir Reis (Departamento de Botânica, UFSC). Uma exsicata foi depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí) com número VC Filho 025.

As folhas foram secas e trituradas (595 g), e extraídas com metanol por duas vezes (3L cada vez) por cinco dias à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado em rotaevaporador, sob pressão reduzida até obter-se uma pasta verde (extrato bruto – EB) pesando 115,72 g.

O EB foi fracionado por filtração em uma coluna (ϕ 10 cm) de sílica gel com solventes de polaridades crescentes: hexano (12,87 g), hexano/diclorometano (1:1) (18,66 g), diclorometano (6,89 g), diclorometano/acetato de etila (1:1) (2,54 g), acetato de etila (6,04 g), acetato de etila/butanol (1:1) (22,23 g) e butanol (15,12 g).

A fração hexânica (HEX) (2,219 g) foi cromatografada em cromatografia em coluna (ϕ 3,0 cm) de sílica gel (30,54 g), empacotada e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila. Foram coletados 195 frascos, de 15 mL cada. Em seguida foi feita a CCD do conteúdo de todos os frascos e, por semelhança, as amostras foram reunidas. Foi possível, com esta coluna, isolar quatro compostos, sendo o primeiro denominado A1 (1,102 g) e isolado como um cristal branco. O segundo, denominado A2 (0,453 g) e isolado como um composto amorfo amarelo que, após lavagem com acetato de etila gelado forneceu um cristal branco. Os dois outros compostos foram isolados como substâncias amareladas, ambos tendo sido lavados com metanol gelado, obtendo-se cristais brancos denominados A3 (0,047 g) e A4 (0,025 g).

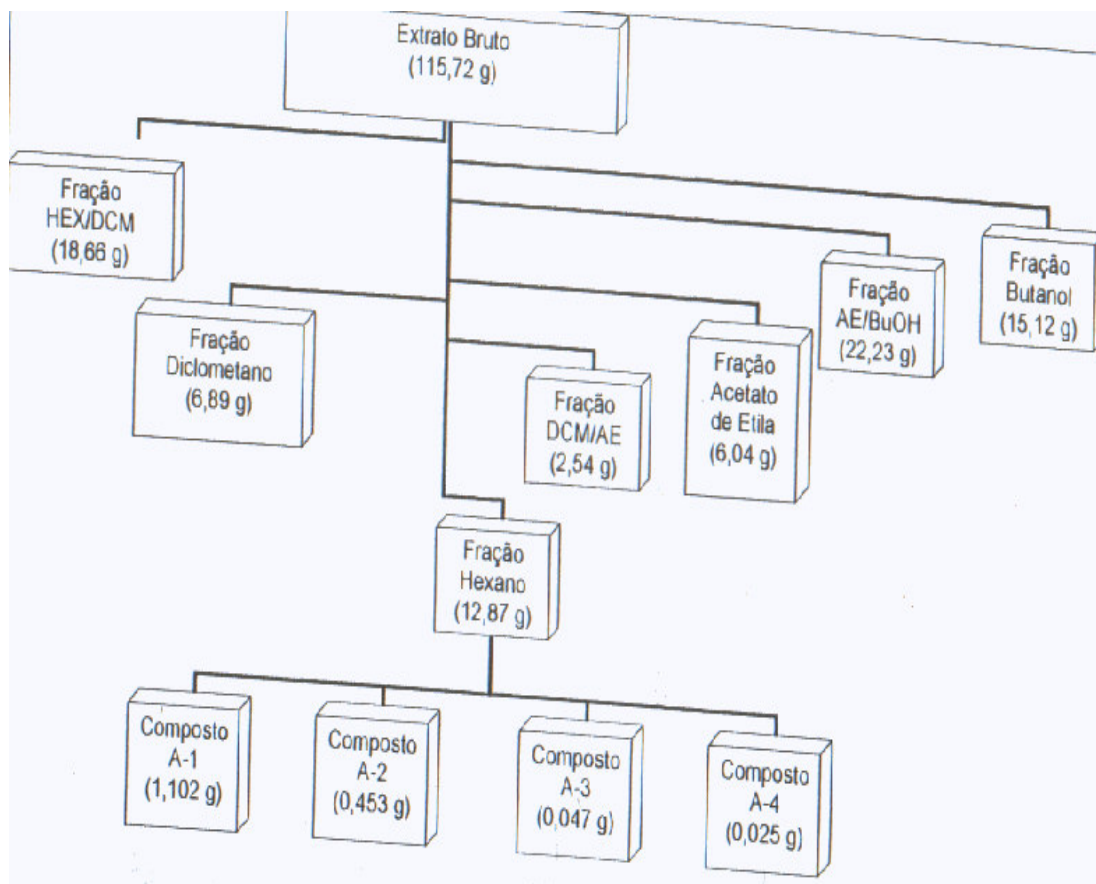


FIGURA 5. Esquema de Fracionamento e Isolamento dos Compostos Presentes no Extrato das Folhas da *Adiantum cuneatum*.

I.2.2.d - Curvas de Calibração

Foram feitas duas curvas de calibração, utilizando-se cromatografia a gás, para quantificação, em diferentes épocas do ano e de diferentes partes da planta, do ácido caurenóico e do filiceno, previamente isolados da planta *Wedelia paludosa* e da planta *Adiantum cuneatum*, respectivamente.

O ácido caurenóico, com alto grau de pureza (P.A.) foi utilizado para preparar uma solução estoque, após ter sido silanizado. Foi empregado diclorometano, grau analítico, para a preparação das soluções. Quatro soluções foram preparadas a partir da solução estoque. As concentrações das soluções de ácido caurenóico utilizadas foram 110,0; 220,0; 440,0 e 880,0 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 1,0 μL das quatro diluições foram silanizadas e analisadas por CG e as áreas dos picos cromatográficos calculadas. Cada injeção foi feita em triplicata e nas mesmas condições das análises das amostras.

A curva de calibração construída para o filiceno obedeceu ao mesmo procedimento, sendo distinto apenas no fato de não ter sido silanizado. As concentrações utilizadas foram 4,00; 2,00; 1,00; 0,50 e 0,25mg/mL.

As curvas de calibração, para o ácido caurenóico e para o filiceno estão apresentados na FIGURA 6 a e b, respectivamente.

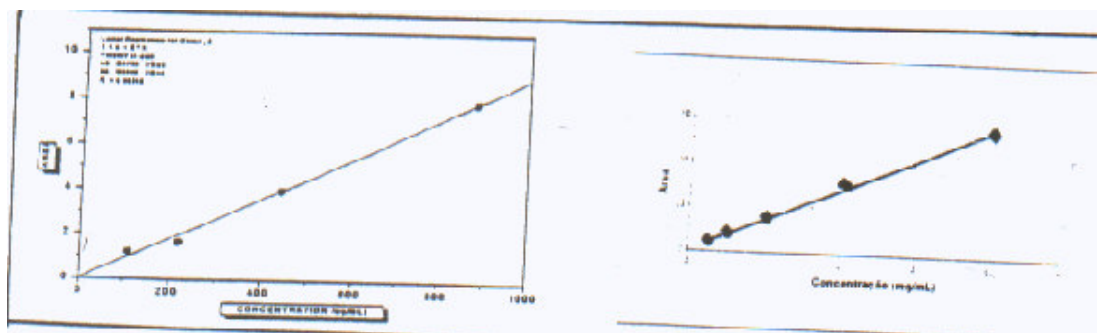


FIGURA 6. Curvas de calibração para o ácido caurenóico isolado da *W. paludosa* e filiceno isolado da *A. cuneatum*.

I.2.2.e - Análises no CG para o Controle de Qualidade

As análises foram feitas no cromatógrafo a gás descrito anteriormente. As amostras foram injetadas usando-se o modo sem divisão de fluxo por 1,0 minuto, onde foi injetado 1,0µL de cada amostra e utilizando-se a seguinte programação:

- *Wedelia paludosa*: 40°C de temperatura inicial até 310°C (taxa de aquecimento de 8°C/min) ficando em isoterma final por 10 minutos. A coluna utilizada foi a LM-1, descrita anteriormente.

- *Adiantum cuneatum*: 40°C de temperatura inicial até 305°C (taxa de aquecimento de 8°C/min) ficando em isoterma final de 10 minutos. A coluna utilizada foi a CBP5, descrita anteriormente.

Os dados foram armazenados e posteriormente processados usando o programa Cromatografia (MICROQUÍMICA) em um PC 486.

I.2.2.f - Análises por CLAE para as Amostras Semipurificadas de *Wedelia paludosa*

As amostras semipurificadas da fração acetato de etila das flores da *Wedelia paludosa* foram analisadas por CLAE. Para otimizar as condições de análise, foi utilizada a seguinte metodologia conforme descrito a seguir. Com as soluções dos compostos não puros, (já que este é um dos objetivos desta tese), sendo estes ácido cafeico, coreopsina, isocoreopsina e butina/buteina, foram feitos testes para diferentes soluções carreadoras, gradientes, diferentes vazões de fluxo e temperaturas de forno. Todas estas condições estão descritas na TABELA 3.

TABELA 3. Diferentes condições testadas para otimizar o método de análise por CLAE das amostras obtidas a partir de *W. paludosa*.

Soluções Carreadoras	Gradiente (MeOH/A.Fórmico 1%)	Vazão (mL/min)	Temperatura do Forno (°C)
MeOH/H ₂ O	1min – B – 45%	0,8	30
	15min – B – 70%		
	20min – B – 45%		
ACN/A.Fosfórico 2%	1min – B – 45%	1,0	33
	15min – B – 80%		
	20min – B – 45%		
ACN/MeOH (10:15)	1min – B – 45%	1,1	40
	15min – B – 90%		
	20min – B – 45%		
MeOH/A.Fórmico 2%	1min – B – 45%	1,2	50
	15min – B – 100%		
	20min – B – 45%		
MeOH/A.Fórmico 1%	-	-	-

Sendo: B- Parte orgânica da solução carreadora;

MeOH- Metanol;

ACN- Acetonitrila

A determinação da melhor condição de análise foi estabelecida levando-se em consideração tempo de análise, definição dos picos cromatográficos e separação dos mesmos. A melhor condição foi:

-Solução Carreadora: MeOH/A.Fórmico 1%

-Gradiente: 1min – B – 45%

15min – B – 100%

20min – B – 45%

-Vazão: 1,0mL/min

-Temperatura do forno: 40°C.

A seguir são apresentados os cromatogramas dos compostos considerados como padrões (isolados a partir da planta *Wedelia paludosa*) injetados nas condições escolhidas como ideais (descritas acima), para a análise das amostras semipurificadas da fração acetato de etila obtidas das flores da *W. paludosa* (FIGURAS 7 a 10).

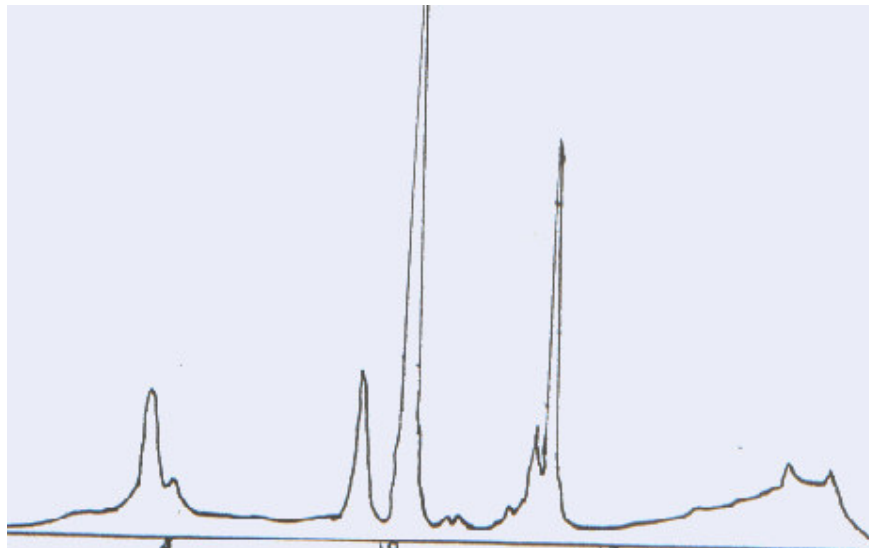


FIGURA 7. Cromatograma em CLAE para a coreopsina (3) semi purificada com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C.

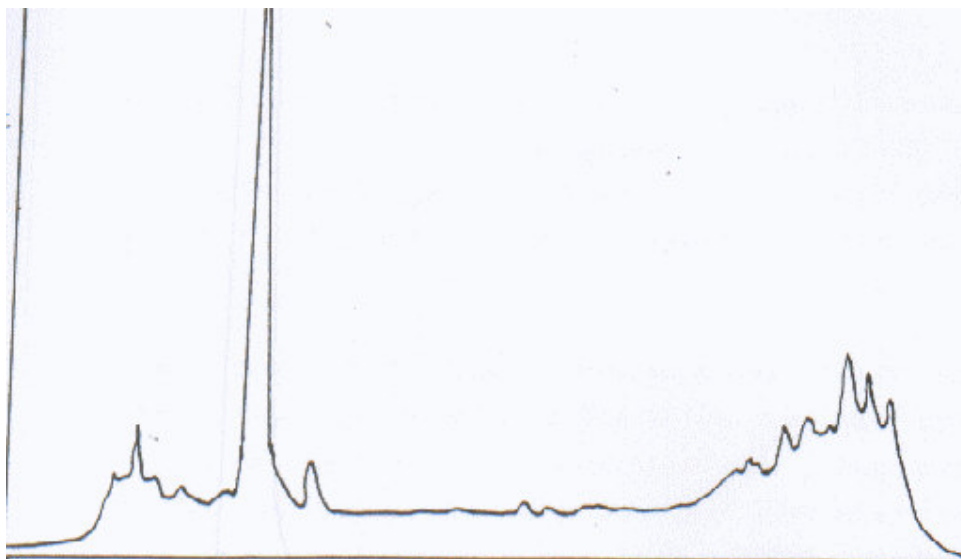


FIGURA 8. Cromatograma em CLAE para a isocoreopsina semipurificada com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C.

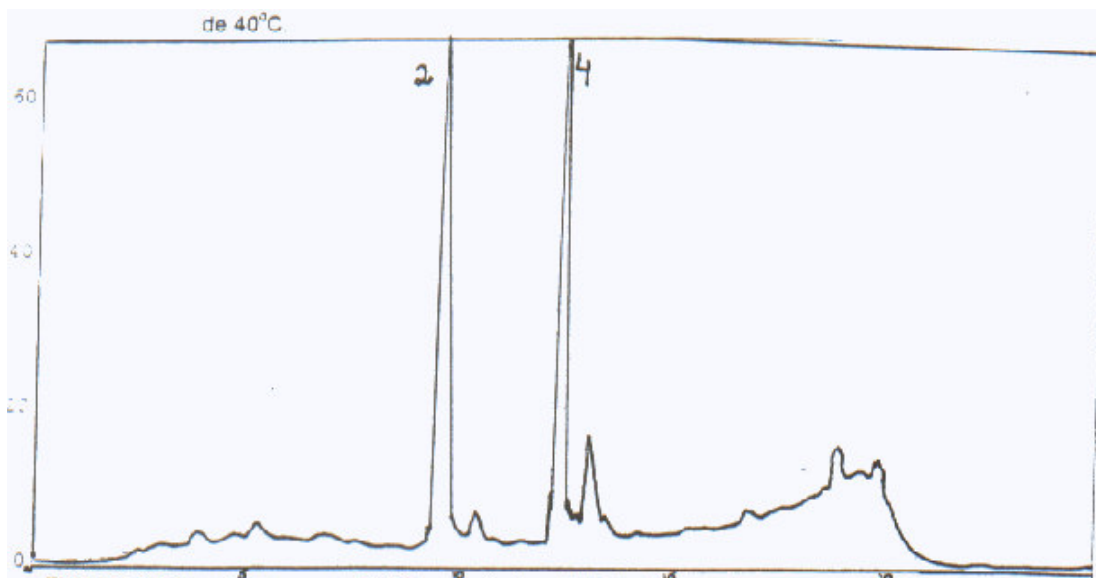


FIGURA 9. Cromatograma em CLAE para a butina (2) / buteina (4) semipurificadas com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C.

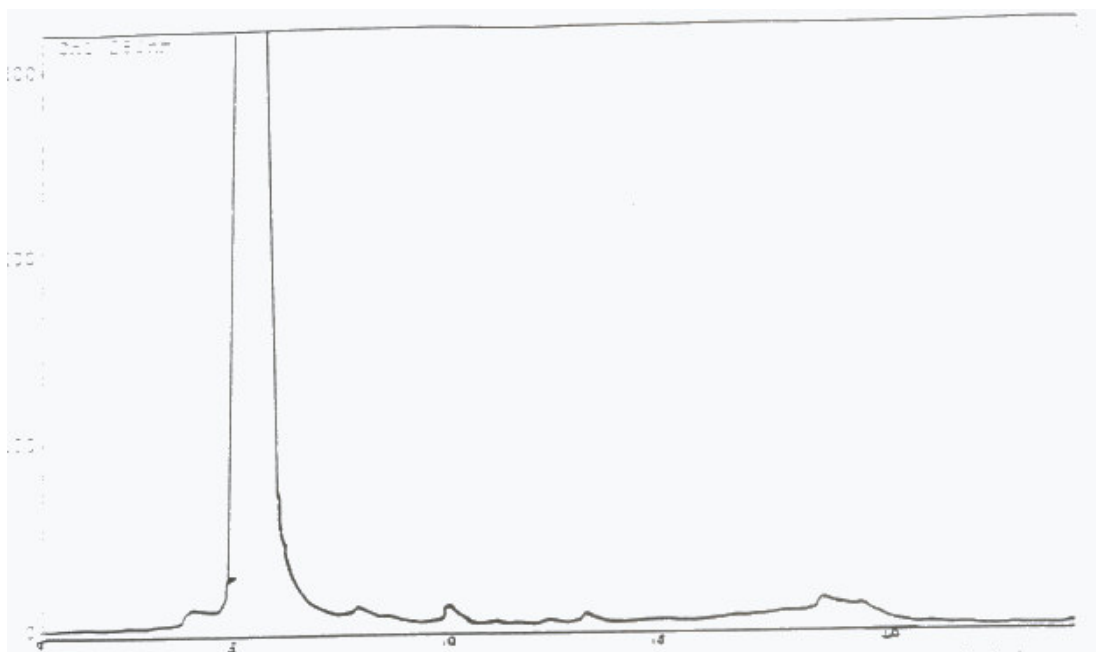


FIGURA 10. Cromatograma em CLAE para a ácido cafeico semipurificada com fase móvel de MeOH/Ac. Fórmico 1% e gradiente de: 0 min, 45% de B (MeOH); 15 min, 100% de B; 20 min, 45% de B e a 25 min final da análise. Vazão de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 40°C.

I.2.2.g - Reações de Nitrosação

As reações de nitrosação da morfolina (MOR) e dietilamina (DEA), bem como também as suas inibições por polifenóis, foram acompanhadas em pH 2,0 (HClO₄), contendo no máximo 6% de DMSO (dimetilsulfóxido). As concentrações de nitrito de sódio, morfolina e dietilamina utilizadas, foram de 10 mM, enquanto a dos agentes antinitrosantes variando entre 5,0 mM e 0,0625 mM.

Os polifenóis utilizados para verificar a capacidade antinitrosante foram os ácidos cafeico e gálico e os flavonóides rutina e quercetina. Foram realizados testes com dois extratos de *Wedelia paludosa*, o extrato metanólico das flores e o extrato aquoso, também, das flores obtidos por infusão. Foi feito um teste com uma das sub-frações semipurificadas, no caso uma amostra proveniente da reunião dos frascos 19-30, da Sub-fração 8, da fração de AE, que foi denominada amostra M, conforme está descrito na TABELA 17. Todos os testes foram feitos diante da nitrosação da MOR.

As concentrações do extrato metanólico das flores testados foram de 0,015; 0,030; 0,061 e 0,121 mg/mL. Para a extração em água, as concentrações foram de 0,016; 0,031; 0,063 e 0,126 mg/mL. Para a amostra M foram utilizadas apenas duas concentrações: 0,134 e 0,268 mg/mL

As reações foram realizadas em recipientes fechados a 37 °C, sendo retiradas alíquotas de 200µL, nos tempos 0, 5, 15, 30 e 60 minutos de reação, nas quais foram adicionadas 200µL de NaOH 0,035M para neutralizar o pH, de modo a inibir a reação de nitrosação. As análises foram realizadas em CLAE (descrito anteriormente) com uma coluna C18, comprimento de onda de 210nm e 250nm, respectivamente, para DEA e MOR. Utilizou-se um fluxo de 1,0mL/min para análise na presença de ácido gálico (AG) e MOR, e 0,7mL/min para os demais agentes antinitrosantes, na presença de DEA e MOR. As análises foram realizadas em sistema isocrático, e a solução carreadora utilizada foi de 98% da solução (50mM de KCl e 7,8mM de HCl em 20% de MeOH) e 2% de acetonitrila. Foram injetados 20µL de amostra de cada reação.

As reações entre nitrito de sódio com DEA e MOR foram acompanhadas pelo monitoramento do aparecimento da *N*-Nitrosodietilamina e *N*-Nitrosomorfolina, respectivamente, e desaparecimento do nitrito de sódio. A

TABELA 4 apresenta os tempos de retenção (t_R) e fluxo da solução carreadora utilizada nos experimentos descritos acima:

TABELA 4. Dados referentes aos fluxos e tempos de retenção do monitoramento da *N*-Nitrosodietilamina e *N*-Nitrosomorfolina e do nitrito de sódio nos cromatogramas de CLAE

Fluxo (mL/min)	t_R <i>N</i> -Nitrosodietilamina (min)	t_R <i>N</i> -Nitrosomorfolina (min)	t_R Nitrito (min)
1,0	-	3,20	6,19
0,7	2,63	4,53	8,40

I.2.2.h - Curvas de Calibração para Quantificação do Ácido Gálico e do Nitrito de Sódio

Foram feitas duas curvas de calibração, uma com o ácido gálico e outra com nitrito de sódio para quantificar a proporção de nitrito de sódio consumido na reação. As concentrações de nitrito utilizadas foram: 0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM. As concentrações de ácido gálico testadas foram: 0,08; 0,16; 0,24 e 0,32 mM. Todas as injeções foram feitas em triplicata e nas mesmas condições de análise das reações. As curvas resultantes são apresentadas na FIGURA 11.

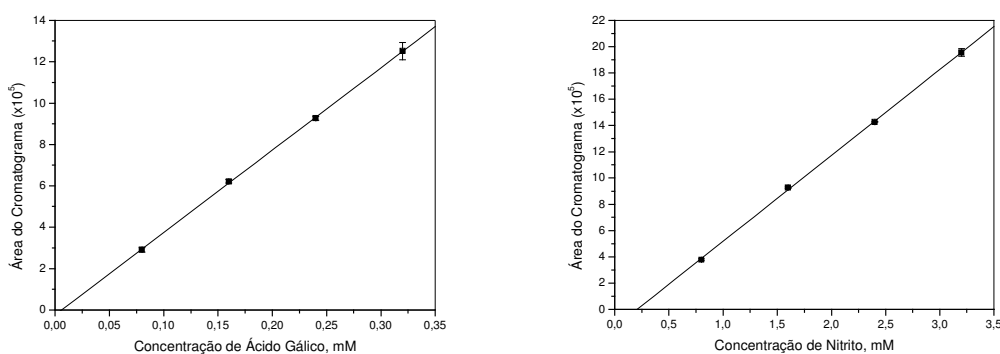


FIGURA 11. Curvas de calibração para o ácido gálico [$3,983 \times 10^6 x - 2,384 \times 10^5$ ($r=0,9999$)] e para o nitrito de sódio [$6,537 \times 10^5 x - 1,353 \times 10^5$ ($r=0,9998$)].

I.2.2.i - Ensaio Farmacológico

Modelo Experimental para Atividade Diurética (HNATYSZYN *et al.*, 1999): Ratos machos com peso entre 180-200g, foram divididos em 3 grupos de 10 animais. O efeito de diferentes extratos, na excreção urinária, foram estudados de acordo com o procedimento descrito por KAU e colaboradores (1984). Os ratos foram mantidos uma noite com livre acesso à água e, uma hora antes de iniciar o experimento, foi-lhes administrada uma solução salina fisiológica (0,4% do peso corporal).

Em seguida, em um dos grupos de ratos foi administrado o extrato da planta a uma dose de 400mg/kg do peso corporal (8mL/kg). Ao grupo seguinte foi administrado 25mg/kg de peso corporal p.o. de hidroclorotiazida (CÁCERES *et al.*, 1992; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1994). O grupo de ratos controle recebeu somente uma quantidade equivalente de solução salina. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais. A urina foi coletada em cilindros graduados e seu volume anotado em intervalos de 2 horas por um período de 8 horas. Os eletrólitos foram estimados para cada amostra de urina no final do experimento. Sódio, potássio e cloretos foram medidos e expressos em mEq/8h. A determinação dos eletrólitos sódio e potássio foram feitos por fotometria de chama (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985; ENGLERT e HARNISCHFEGER, 1991; NAVARRO *et al.*, 1994). O cloreto foi determinado pelo método colorimétrico em aparelho da marca MICROLAB, 2000.

Modelo Experimental para Atividade Antihipercolesterolêmica em Ratos:

a) Dieta Indutora de Hipercolesterolemia em Ratos: após um período de adaptação, os ratos foram divididos em 3 grupos de 6 animais, os quais foram distribuídos de forma que o peso corporal, concentração de triglicerídeos e plasma fossem próximas. O grupo I, foi mantido em uma dieta hipercalórica – Dieta de Cafeteria - (colesterol 1%, colato de sódio 2%, mistura de vitaminas 2%, oligoelemento 0,2%, mistura de sais 5,8%, óleo de milho 20%, celulose 4%, sacarose 44%, caseína 5% e proteína 15%) (ROTHERWELL *et al.*, 1982). O grupo II foi mantido por 30 dias somente com a dieta hipercalórica, mas o Grupo III, foi tratado com uma dieta altamente gordurosa e com o extrato da planta *A. cuneatum* em estudo (300mg/kg) pelo mesmo período de tempo. Amostras de sangue para ensaios foram coletadas aos quinze e aos trinta dias de tratamento.

b) Hipercolesterolemia em Ratos Induzido por Triton: para investigar em pouco tempo os efeitos em ratos hipercolesterolêmicos induzidos por Triton, ratos pesando entre 290±25g foram utilizados. O teste de GARATTINI e colaboradores (1961), modificado foi aplicado para a primeira e segunda fases, sendo que onde a primeira fase do teste hipercolesterolêmico induzido por Triton é designado para elucidar a ação de fármacos sobre a síntese do colesterol. Para a primeira fase do

teste, óleo de milho ou extrato da planta (300mg/Kg) foram administrados junto com Triton (200mg/kg dissolvido em solução de 0,9% de NaCl, i.p.), e os níveis totais de colesterol, HDL-colesterol e triglicérides foram medidos 8 horas após. Para a segunda fase do teste, o extrato vegetal foi administrado 20 horas após a administração do Triton. Amostras de sangue foram coletadas 8 horas após e foram feitas análises para a avaliação das taxas de lipídios resultantes.

Modelo Experimental para Atividade Antihiperplásica: o modelo experimental que foi utilizado constitui-se de ensaios *in vivo*, utilizando-se ratos castrados e tratados com: testosterona para mimetizar um quadro de HBP, e então tratados com extratos brutos e frações da *A. cuneatum*. O sangue foi coletado no sétimo dia e ao final do tratamento (30 dias) e o tecido prostático foi retirado, para a realização dos seguintes ensaios bioquímicos: medida da concentração de testosterona, dihidrotestosterona, colesterol e fosfatase ácida. O peso da próstata e vesícula seminal foram determinados.

Modelo de Contrações Abdominais Causada por Injeção Intraperitoneal de Ácido Acético Diluído: As contrações abdominais foram induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), de acordo com procedimentos descritos previamente (COLLIER *et al.*, 1968; SOUZA *et al.*, 1998), com pequenas modificações. Os animais foram pré-tratados com a fração ou os compostos, intraperitonealmente, 30min antes da injeção de ácido acético. Animais controle receberam um volume similar de NaCl 0,9% (10 mL/kg, i.p.). Cada camundongo foi colocado em um funil de vidro e o número de contrações abdominais foi cumulativamente contado em um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi expressa como a redução do número de contrações abdominais entre os animais controle e os animais pré-tratados com a fração ou os compostos.

Modelo de Dor Induzido pela Formalina: O procedimento utilizado foi basicamente, o mesmo descrito pela literatura (HUNSKAAR *et al.*, 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; SOUZA *et al.*, 1998). Os animais de mesma linhagem foram suavemente anestesiados com éter, exceto quando foi analisada a primeira fase de dor induzida por formalina, e 20µL de 2,5% (0,92% formaldeído) em PBS (solução salina com tampão fosfato contendo: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM e

tampão fosfato 10mM) foi injetado sobre a superfície da pata traseira esquerda. Os animais foram aclimatizados no laboratório por no mínimo 24hs antes dos experimentos. Dois camundongos (controle e tratados) foram observados simultaneamente de 0 a 30 min seguintes à aplicação de formalina. O efeito nociceptivo inicial é obtido normalmente após 5 min (primeira fase, representando a dor neurogênica), e após 15-30 min após a injeção de formalina (segunda fase, representando a dor por inflamação) (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Os animais foram tratados com uma solução salina 0,9% (10mL/kg, i.p.), ou com os compostos, 60 min antes da injeção de formalina. Após a injeção irritante intraplantar, os animais foram imediatamente colocados em um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro). O tempo que os animais permanecem mordendo ou lambendo a pata foi medido com um cronômetro e foi considerado como indicativo de dor. Todos os resultados foram analisados estatisticamente.

I.3 - Resultados e Discussão

O uso de *Wedelia paludosa* e *Adiantum cuneatum* na medicina popular, seus efeitos biológicos e farmacológicos, apresentados por seus extratos brutos e semipurificados e, também, por alguns de seus compostos isolados, serviram de estímulo para a pesquisa, visando o estabelecimento de uma metodologia de controle de qualidade.

Nesta parte do trabalho, são apresentados os dados referentes à extração e purificação de princípios ativos das espécies citadas, a quantificação sazonal dos dois principais compostos, ácido caurenóico extraído de *W. paludosa* e filiceno extraído de *A. cuneatum*. Também, são apresentados os resultados dos testes farmacológicos realizados, não somente com os extratos, mas também, com os compostos puros. Foram avaliadas, ainda, as reações de nitrosação de compostos aminados na ausência e presença de compostos fenólicos extraídos das flores da *Wedelia paludosa*.

As análises realizadas permitiram a avaliação das reais atividades farmacológicas e, também, quais dos compostos são os responsáveis. Foi possível, ainda, ter idéia de qual é o período ideal do ano para coletar *W. paludosa* e *A. cuneatum*, e quais as partes das plantas (flores, caule, folhas, raízes) possuem maior concentração dos compostos de interesse.

I.3.1 – Extração - *Wedelia paludosa*

Para extração dos metabólitos secundários das flores da *W. paludosa*, após a coleta, a planta foi seca a temperatura ambiente e extraída por maceração com metanol por sete dias. Após esta etapa, o solvente foi evaporado e o extrato bruto foi então particionado por separação líquido-líquido obtendo-se quatro frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol.

Foram feitas colunas com sílica gel como descrito anteriormente com as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila. Estas frações foram previamente analisadas por cromatografia de camada delgada. A partir da fração hexânica foi possível isolar o composto W-1; da fração diclorometano foi isolado o composto W-2; e da fração acetato de etila foram isolados os compostos W-3, W-4, W-5, W-6 e W-7.

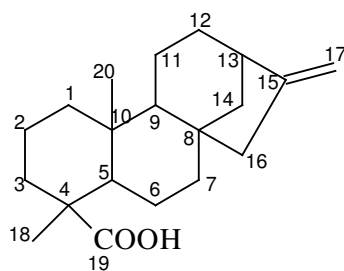
I.3.2 – Determinação Estrutural dos Compostos Isolados – *Wedelia paludosa*

Os compostos W-1 a W-7 foram identificados através de seus dados espectrais de ^1H - e ^{13}C -RMN, e por comparação com dados da literatura, sendo que todas as substâncias isoladas foram previamente descritas. A seguir, são apresentados tabelas, contendo os valores dos deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C . Todos os valores foram comparados e estão de acordo com dados da literatura, sendo que W-1 foi identificado como sendo o ácido caurenóico, W-2 a luteolina, W-3 a coreopsina, W-4 a buteína, W-5 a butina, W-6 o ácido protocatético e W-7 o ácido cafeico.

I.3.2.1 – Composto W-1 – Ácido Caurenóico

TABELA 5. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) obtidos para W-1 – Ácido Caurenóico (solvente utilizado – CDCl_3 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1	1,60; 0,64	39,04 / CH_2
2	1,83; 1,73	19,58 / CH_2
3	1,65; 1,55	39,69 / CH_2
4		45,85 / C
5	1,45	53,57 / CH
6	2,04; 1,94	24,43 / CH_2
7	1,72; 1,12	39,35 / CH_2
8		41,54 / C
9	1,08	59,43 / CH
10		40,75 / C
11	1,51; 1,43	18,04 / CH_2
12	1,44; 1,46	31,34 / CH_2
13	2,29	40,24 / CH
14	1,34; 1,24	37,41 / CH_2
15		153,16 / C
16	2,48; 2,24	42,02 / CH_2
17	4,56; 4,88	105,58 / CH_2
18	1,24	24,16 / CH_3
19	10,05	181,64 / C
20	0,89	12,12 / CH_3



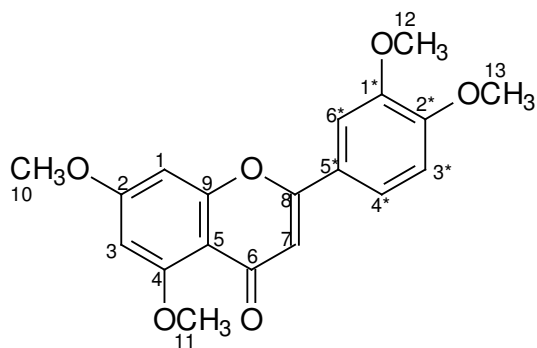
Os dados de deslocamento químico mostrados na TABELA 5 para o ácido caurenóico foram comparados com dados publicados em SILVA *et al.*, (1999).

I.3.2.2 – Composto W-2 - Luteolina

TABELA 6. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) obtidos para W-2 - Luteolina (solvente utilizado – CCl_4 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
8	6,49	112,01 / CH
7		160,72 / C
6	6,34	94,22 / CH
5		158,19 / C
10		113,03 / C
4		176,4 / C
3	6,61	112,82 / CH
2		161,51 / C
9		163,27 / C
11	3,88	55,79 / CH_3
12	3,92	56,13 / CH_3
13	3,88	61,40 / CH_3
14	3,90	55,98 / CH_3
4'		147,77 / C
3'		150,23 / C
6'	6,88	119,73 / CH
5'	7,28	116,71 / CH
2'	7,39	118,56 / CH
1'		117,05 / C

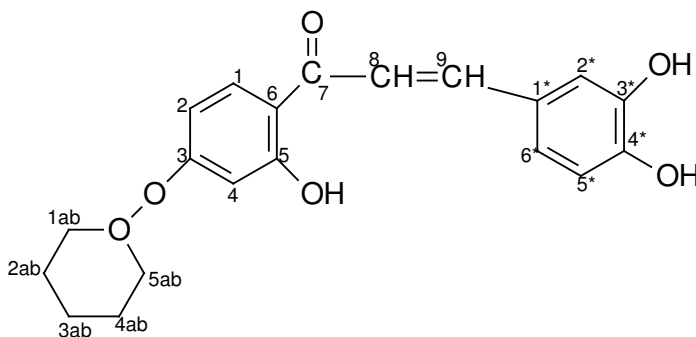
Os dados de deslocamento químico mostrados na TABELA 6 para a luteolina foram comparados com dados publicados em DIAS *et al.*, (1998).



I.3.2.3 – Composto W-3 - Coreopsina

TABELA 7. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-3 – Coreopsina (solvente utilizado – CCl_4 - tendo como padrão interno de referência TMS).

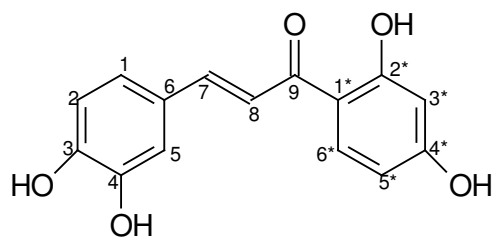
Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
2'	7,79	122,81 / CH
3'	8,08	118,97 / CH
4'		175,69 / C
5'	6,99	113,89 / CH
6'	9,22	156,71 / C
1'		100,99 / C
9		191,91 / C
8	7,38	118,52 / CH
7	7,29	145,42 / CH
1		126,77 / C
2	7,16	113,01 / CH
3	9,22	144,19 / C
4	9,22	147,35 / C
5	6,98	115,87 / CH
6	7,10	119,51 / CH
1''	4,16; 4,24	82,49 / CH_2
2''	2,13; 2,46	23,48 / CH_2
3''	0,96; 1,15	15,76 / CH_2
4''	2,13; 2,46	23,48 / CH_2
5''	4,16; 4,24	82,49 / CH_2



I.3.2.4– Composto W-4 - Buteína

TABELA 8. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-4 – Buteína (solvente utilizado – CCl_4 - tendo como padrão interno de referência TMS).

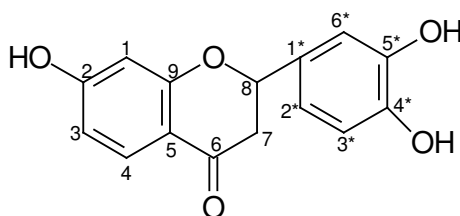
Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
2'	7,10	119,51 / CH
3'	6,98	115,87 / CH
4'	10,24	147,35 / C
5'	10,24	144,19 C
6'	7,16	113,01 / CH
1'		126,77 / C
9	7,29	145,42 / CH
8	7,38	118,52 / CH
7		191,90 / C
1		113,50 / C
2	10,24	165,70 / C
3	6,38	103,20 / CH
4	10,24	166,30 / C
5	6,48	108,80 / CH
6	7,61	133,30 / CH



I.3.2.5 – Composto W-5 – Butina

TABELA 9. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-5 – Butina (solvente utilizado – CCl_4 - tendo como padrão interno de referência TMS).

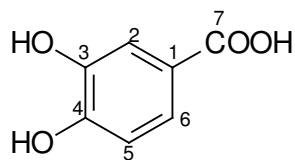
Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
8	6,44	100,53 / CH
7	6,01	161,93 / C
6	6,43	114,1 / CH
5	7,78	129,82 / CH
10		116,42 / C
4		190,06 / C
3	3,03 d; 2,93	44,17 / CH_2
2	5,51	78,10 / CH
9		162,58 / C
1'		129,60 / C
6'	6,99	115,68 / CH
5'	6,01	145,03 / C
4'	6,01	145,92 / C
3'	6,92	115,23 / CH
2'	6,22	119,90 / CH



I.3.2.6 – Composto W-6 – Ácido Protocatético

TABELA 10. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-6 – Ácido Protocatético (solvente utilizado – CDCl_3 - tendo como padrão interno de referência TMS).

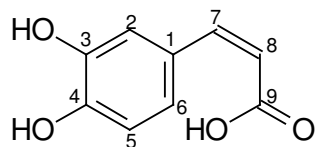
Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1		127,70 / C
2	7,58	118,30 / CH
3	7,09	145,00 / C
4	7,09	144,10 / C
5	6,94	117,30 / CH
6	7,52	122,90 / CH
7	7,09	175,12 / C



I.3.2.7 – Composto W-7- Ácido Cafeico

TABELA 11. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para W-7 – Ácido Cafeico (solvente utilizado – CDCl_3 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1		129,13 / C
2	7,14	112,31 / CH
3	8,46	145,10 / C
4	8,46	146,90 / C
5	6,87	116,77 / CH
6	7,14	118,81 / CH
7	6,84	148,08 / CH
8	5,77	117,50 / CH
9	8,46	172,90 / C



Os dados de deslocamento químico mostrados na TABELA 11 para o ácido cafeico foram comparados com dados publicados em LU *et al.*, (1999).

I.3.3 – Extração – *Adiantum cuneatum*

A extração das partes aéreas (folhas e caule) da planta *A. cuneatum* foi efetuada por maceração da planta seca e triturada em metanol, por cinco dias. Após esta etapa, o solvente foi evaporado e o extrato bruto foi particionado por filtração em sílica gel, para evitar formação de emulsão, resultando em sete frações: hexano, hexano/diclorometano, diclorometano, diclorometano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/butanol e butanol.

A fração com a qual optou-se trabalhar foi a hexânica, devido os bons resultados obtidos nos testes farmacológicos realizados com esta fração.

Submetendo-se a fração hexânica à cromatografia de coluna com sílica gel foi possível isolar quatro compostos denominados A-1, A-2, A-3 e A-4.

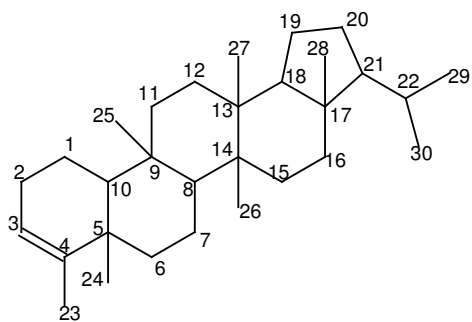
I.3.4 – Determinação Estrutural dos Compostos Isolados – *Adiantum cuneatum*

Os compostos A-1 a A-4 foram identificados através de seus dados espectrais de ^1H - e ^{13}C - RMN, e por comparação com dados da literatura, sendo que todas as substâncias isoladas foram previamente descritas. A seguir, são apresentadas as tabelas contendo os valores dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C para A-1 a A-4. Todos os valores foram comparados e estão de acordo com os dados da literatura, sendo que A-1 foi identificado como sendo o filiceno, A-2 o filicenal, A-3 o adiantol e o A-4 a isoadiantona.

I.3.4.1 – Composto A-1 – Filiceno

TABELA 12. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-1 – Filiceno (solvente utilizado – CD_2Cl_2 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1	1,91; 1,81	17,88
2	2,07; 1,97	26,40
3	5,14	120,50
4		144,50
5		41,96
6	1,40; 1,68	38,52
7	1,48; 1,39	18,20
8	1,05	55,03
9		36,92
10	1,37	45,95
11	1,47; 1,57	34,44
12	1,16; 1,76	31,04
13		41,68
14		38,14
15	1,26; 1,87	31,08
16	1,58; 1,68	36,10
17		42,95
18	1,67	50,27
19	1,44; 1,54	20,15
20	1,30; 1,64	28,25
21	1,08	59,70
22	1,50	30,80
23	1,52	19,80
24	0,95	17,80
25	0,68	19,79
26	0,91	20,41
27	0,91	19,42
28	0,82	14,00
29	0,86	22,58
30	0,96	22,58

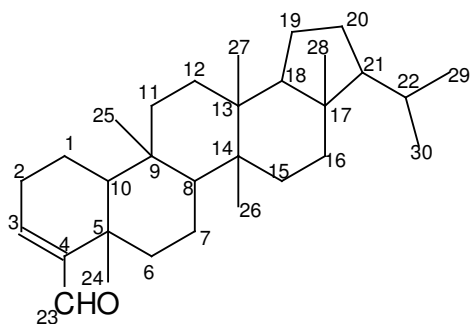


Os dados de deslocamento químico mostrados na TABELA 12, para o filiceno foram comparados com dados publicados por AGETA e IWATA (1966) e SHIOJIMA et al., (1993). A temperatura de fusão experimental para o filiceno foi de 234-236 °C. O ponto de fusão encontrado na literatura foi de 232-234 °C (SHIOJIMA et al., 1997a).

I.3.4.2 – Composto A-2 - Filicenal

TABELA 13. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-2 – Filicenal (solvente utilizado – CD_2Cl_2 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1	1,92; 2,02	17,61
2	1,95; 2,01	24,10
3	6,67	150,94
4		139,75
5		36,74
6	1,42; 1,64	37,49
7	1,49; 1,59	17,94
8	1,05	55,03
9		37,81
10	1,35	46,22
11	1,47; 1,57	34,44
12	1,16; 1,76	31,04
13		41,68
14		38,14
15	1,26; 1,87	31,08
16	1,58; 1,68	36,10
17		42,95
18	1,67	50,27
19	1,44; 1,54	20,15
20	1,30; 1,64	28,25
21	1,08	59,70
22	1,50	30,80
23	9,25	193,68
24	0,13	29,19
25	0,17	19,79
26	0,91	19,42
27	0,91	20,41
28	0,82	14,00
29	0,86	22,58
30	0,96	22,58

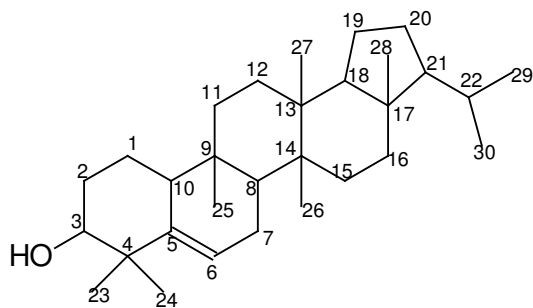


Os dados de deslocamento químico apresentados na TABELA 13, para o filicenal, foram comparados com dados publicados por AGETA e IWATA, (1966) e SHIOJIMA *et al.*, (1993). A temperatura de fusão experimental para o filiceno foi de 234-236°C. O ponto de fusão encontrado na literatura foi de 232-234°C (SHIOJIMA *et al.*, 1997a).

I.3.4.3 – Composto A-3 – Adiantol

TABELA 14. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-3 – Adiantol (solvente utilizado – CD_2Cl_2 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1	1,49; 1,57	22,12 / CH_2
2	1,54; 1,91	28,84 / CH_2
3	2,72; 3,40	80,09 / CH
4		39,57 / C
5		147,05 / C
6	5,47	116,79 / CH
7	2,29; 2,49	25,20 / CH_2
8	1,92	47,41 / CH
9		35,05 / C
10	1,86	40,95 / CH
11	1,11; 1,71	36,07 / CH_2
12	1,16; 1,76	31,04 / CH_2
13		41,68 / C
14		37,8 / C
15	1,27; 1,87	31,08 / CH_2
16	1,58; 1,68	31,10 / CH_2
17		42,95 / C
18	1,67	50,27 / CH
19	1,44; 1,54	20,15 / CH_2
20	1,30; 1,64	28,25 / CH_2
21	1,08	59,70 / CH
22	1,50	30,80 / CH
23	1,06	26,83 / CH_3
24	0,96	26,83 / CH_3
25	0,91	15,95 / CH_3
26	0,91	19,52 / CH_3
27	0,91	20,41 / CH_3
28	0,82	14,00 / CH_3
29	0,86	22,58 / CH_3
30	0,96	22,58 / CH_3

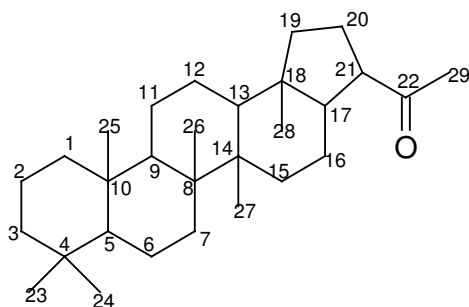


Os dados de deslocamento químico apresentados na TABELA 14, para o adiantol foram comparados com dados publicados por NAKANE e colaboradores (1999). A temperatura de fusão experimental para o adiantol foi de 195-197°C. O ponto de fusão encontrado na literatura foi de 196-197 °C (NAKANE *et al.*,1999).

I.3.4.4– Composto A-4 – Isoadiantona

TABELA 15. Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para A-4 – Isoadiantona (solvente utilizado – CD_2Cl_2 - tendo como padrão interno de referência TMS).

Posição	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1	0,58; 1,54	40,25
2	1,39; 1,59	18,65
3	1,13; 1,36	42,05
4		33,1
5	0,81	56,00
6	1,37; 1,54	18,65
7	1,06; 1,44	33,15
8		41,75
9	1,04	50,35
10		37,30
11	1,50; 1,84	20,85
12	1,50; 1,84	23,95
13	1,09	47,23
14		41,80
15	1,08; 1,45	33,42
16	1,28; 1,40	21,55
17	2,04	55,52
18		43,69
19	1,00; 1,56	41,88
20	1,65; 2,06	27,20
21	2,10	51,88
22		212,87
23	0,86	27,35
24	0,76	27,35
25	0,78	15,70
26	1,00	16,10
27	1,00	16,75
28	0,65	17,88
29	2,15	29,00



Os dados de deslocamento químicos apresentados na TABELA 15, para a isoadiantona foram comparados com dados publicados por SHIOJIMA e AGETA (1994). A temperatura de fusão experimental para a isoadiantona foi de 237-239°C. O ponto de fusão encontrado na literatura foi de 236-238°C (SHIOJIMA *et al.*, 1997a).

I.3.5 – Variação Sazonal do Teor de Ácido Caurenóico nas Diferentes Partes da Planta *Wedelia paludosa*

Parte dos dados deste trabalho, referentes às concentrações do ácido caurenóico nas diferentes partes da planta durante o outono, foi publicado na revista *Natural Product Letters*, 14(4), 247-254, 2000 (Anexo 1). O ácido caurenóico é o principal componente de *Wedelia paludosa* e exibe diferentes atividades farmacológicas, entre as principais estão a ação bactericida, larvicida (SLIMESTAD *et al.*, 1995), tripanossomicida (ALVES *et al.*, 1995) e antinociceptiva (BLOCK *et al.*, 1998a,b), além de uma potente ação estimuladora de contrações uterinas (PAGE *et al.*, 1992).

A cromatografia gasosa é um método bastante utilizado e muito apropriado para a caracterização e padronização de extratos vegetais (BAUER e TITTEL, 1996; VILEGAS *et al.*, 1997). Como as análises foram feitas por cromatografia gasosa, que é uma técnica limitada para compostos voláteis e, apesar da extração ter sido feita com hexano, compostos hidroxilados podem ser extraídos. Por isso, tanto os extratos quanto o padrão, ácido caurenóico, foram silanizados

com BSTFA (Bis-Trimetilsilil-trifluoroacetamida) (GOOSSENS *et al.*, 1989; WAKEHAM e CANUEL, 1990). Este método de derivatização foi escolhido por ser de baixo custo, de fácil e rápida manipulação, e promover ainda, uma melhora na definição cromatográfica (VILEGAS *et al.*, 1997).

A FIGURA 12, mostra os cromatogramas obtidos com as frações hexânicas das diferentes partes da planta *W. paludosa* colhida em maio de 1998. Fazendo-se uma análise comparativa dos cromatogramas das flores, folhas, caule e raízes, é possível perceber a presença de vários constituintes não polares. O composto 1 (ácido caurenóico) é o principal componente destas frações, e está presente em todas as amostras, em altas concentrações.

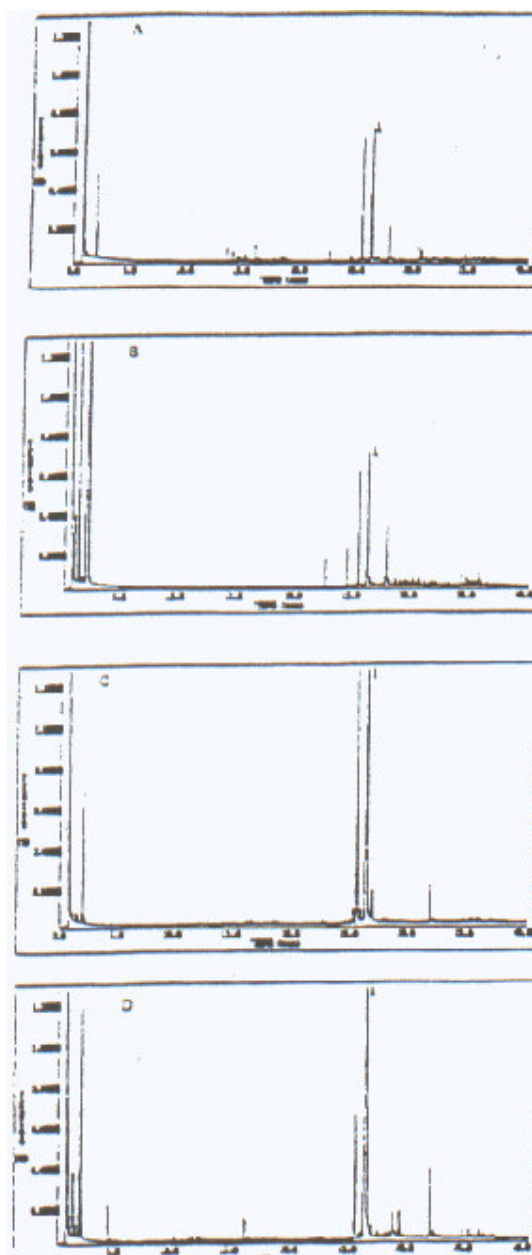


FIGURA 12. Cromatogramas obtidos da fração hexânica das diferentes partes de *W. paludosa* colhida em maio de 1998. (a)-flores, (b)-folhas, (c)-caule e (d)-raízes.

Na TABELA 16 são apresentadas as concentrações de ácido caurenóico para as diferentes partes da planta colhidas nas quatro estações do ano (verão, outono, inverno e primavera). As concentrações foram calculadas com base na curva de calibração apresentada na Parte Experimental (FIGURA 6). Pode-se perceber uma variação nos valores de concentração do ácido caurenóico muito acentuada, para os materiais vegetais coletados em diferentes estações do ano. Este fato, nos levou a considerar que o ácido caurenóico pode estar atuando como um precursor, para outro composto ou grupo de compostos biologicamente ativos como, por exemplo, na formação das giberilinas, que regulam o crescimento do vegetal (GUISALBERTI, 1997; RADEMACHER, 2000; HELLIWELL *et al.*, 2001) e também, no mecanismo de defesa da planta.

TABELA 16. Concentração de Ácido Caurenóico em Diferentes Partes de *W. paludosa* em Diferentes Épocas do Ano

Partes da Planta	Concentração de Ácido Caurenóico (mg/g)			
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Raízes	6,65	0,0049	1,35	0,101
Caule	4,96	0,0735	0,037	0,0142
Folhas	1,06	0,052	0,114	0,288
Flores	1,04	0,856	0,301	0,0255

I.3.6 – Variação Sazonal de Filiceno nas Diferentes Partes da Planta *Adiantum cuneatum*

O composto utilizado como fitomarcador no extrato de *A. cuneatum* foi o filiceno, um triterpeno esteroidal. Este composto foi escolhido porque, além de se encontrar em grande quantidade na fração hexânica também apresentou relevantes atividades antinociceptiva e anti-hiperplásica. Devido a tais características, julgou-se ser, o filiceno, um excelente fitomarcador para as análises de controle de qualidade desta planta.

Como descrito anteriormente, para a análise sazonal no item anterior, a concentração de filiceno nas frações de *Adiantum cuneatum* nas diferentes épocas do ano foi calculado com base na curva de calibração apresentada na FIGURA 6 (Parte Experimental).

Na TABELA 17, são apresentadas as concentrações de filiceno para as diferentes partes da planta, nas diferentes épocas do ano.

TABELA 17. Concentrações de filiceno, em diferentes partes de *A. cuneatum* em diferentes épocas do ano, em $\mu\text{g/g}$ de planta seca.

Parte da planta	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Caule	4,694	-	-	25,324
Raiz	73,948	96,283	35,758	14,666
Folhas	92,706	231,466	172,271	83,674

A partir da Tabela 17 foi possível relacionar a concentração do filiceno, nas diferentes partes da planta, com as estações do ano, conforme FIGURA 13:

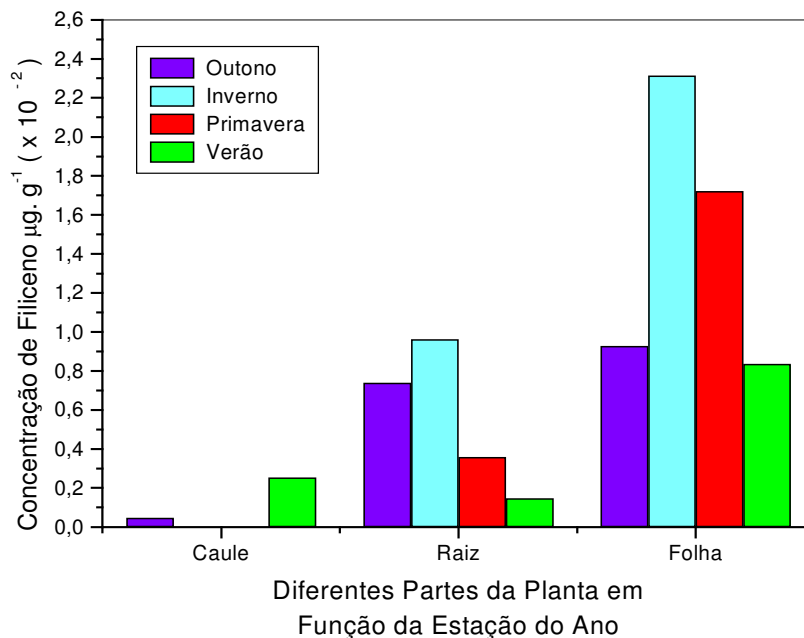


FIGURA 13 – Concentração de filiceno em diferentes partes de *Adiantum cuneatum* em função da estação do ano.

Os dados apresentados na FIGURA 13 indicam que nas folhas é que está concentrada a maior parte do filiceno produzido pela planta. Nas raízes este metabólito também é encontrado, mas em concentração muito menor, enquanto que, no caule, o filiceno quase não está presente.

A concentração do filiceno varia não só entre as diferentes partes da planta, como também em relação à época do ano em que foi realizada a coleta do material vegetal. No inverno, por exemplo, ocorreu a maior concentração de filiceno, principalmente, nas folhas ($231,466 \mu\text{g/g}$ de planta) e nas raízes ($96,283 \mu\text{g/g}$ de planta), embora, não tenha sido detectada a sua presença no caule nesta mesma estação. Na primavera, a concentração do filiceno nas folhas ($172,271 \mu\text{g/g}$ de planta) e nas raízes ($35,758 \mu\text{g/g}$ de planta) diminuiu. Somente, no verão e no outono é que o filiceno começa a aparecer, em mínimas quantidades, no caule ($25,324$ e $4,694 \mu\text{g/g}$ de planta, respectivamente).

A variação na concentração de filiceno pode ser atribuída ao metabolismo da planta, que pode estar produzindo o composto para defesa, ou como precursor de outra substância. A grande variação da concentração de filiceno nas diferentes épocas do ano sugere que este metabólito secundário seja produzido em uma estação do ano, devido a várias condições externas, como temperatura e umidade, e consumido em outra, para seu crescimento, reprodução ou defesa.

I.3.7 – Análise de Amostras Semipurificadas de *Wedelia paludosa* por CLAE

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório do Prof. Mauro F. Lanças, no Instituto de Química da USP – São Carlos – SP.

Na tentativa de desenvolver um método de análise, para controle de qualidade de extratos de plantas, que seja eficiente e rápido, e tendo anteriormente, empregado a técnica de cromatografia a gás para analisar as frações não polares da *W. paludosa*, procurou-se realizar análises semelhantes, com uma das frações mais polares, a fração acetato de etila. Tanto o extrato bruto e pré-purificado, obtidos por cromatografia em coluna, foram submetidos a análise por CLAE. Foram também, analisados os extratos das flores, caule, folhas e raízes, extraídos com acetato de etila, separadamente. Utilizou-se como padrões, compostos não totalmente puros, previamente obtidos. Como foi descrito anteriormente, o objetivo era tentar, com uma metodologia relativamente simples, rápida e eficiente, determinar a presença de fitomarcadores, de maneira que fosse possível reconhecer se um determinado extrato ou fitoterápico é ou não da planta descrita e ainda, se contém ou não os princípios ativos.

As análises foram feitas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector do tipo DAD. Os compostos puderam ser identificados através dos tempos de retenção, comparados com padrões e com os espectros de ultravioleta descritos na literatura.

A análise dos cromatogramas, revelou que em todas as sub-frações estava presente, pelo menos um dos quatro padrões, isolados previamente. Na TABELA 18, são apresentadas as amostras que foram cromatografadas, com a sua descrição. Por exemplo, na amostra A estão contidas amostras de onde foi

previamente isolada a coreopsina. Por análise de CCD, verificou-se que na amostra A havia ainda coreopsina, mas com impurezas. A análise por CLAE, revelou que havia na amostra, além de coreopsina, o ácido cafeico e a butina.

TABELA 18. Descrição das amostras de *Wedelia paludosa* que foram cromatografadas por CLAE.

Amostras	Descrição com base na análise feita por CCD
A	Flores – Fração MeOH (coreopsina + impurezas)
B	Flores – Extrato MeOH – Fração DCM
C	Flores – Fração MeOH (butina + impurezas)
D	Flores – Fração MeOH (Butina/buteína + impurezas)
E	Flores – Fração MeOH (Ácido Cafeico + impurezas)
F	Coluna das Sub-Frações 5-6 – Frascos 5-7
G	Coluna das Sub-Frações 5-6 – Frascos 8-12
H	Coluna das Sub-Frações 5-6 – Frascos 13-16
I	Coluna das Sub-Frações 5-6 – Frascos 26-30
J	Coluna da Sub-Fração 4 – Frascos 17-20
L	Coluna da Sub-Fração 8 – Frascos 1-8
M	Coluna da Sub-Fração 8 – Frascos 19-30
N	Coluna da Sub-Fração 8 – Frascos 31-37
O	Coluna da Sub-Fração 8 – Frascos 60-130

Na TABELA 19, são apresentados os compostos que foram identificados nas diferentes amostras.

TABELA 19. Compostos identificados nas frações semipurificadas obtidas a partir da fração acetato de etila de *Wedelia paludosa*.

Amostra	Ácido Cafeico	Butina	Buteína	Coreopsina
A	X	X		X
B	X	X		X
C	X	X		
D	X	X	X	X
E	X	X		
F	X	X	X	X
G	X	X	X	X
H	X	X	X	
I	X			
J			X	
L	X	X		
M	X	X		
N	X	X		
O	X	X		X
<i>Wedelia</i> Fração AE – Caule			X	X
<i>Wedelia</i> Fração AE – Folha	X	X	X	X
<i>Wedelia</i> Fração AE – Flor	X	X	X	X
<i>Wedelia</i> Fração AE – Raiz	X		X	X

Os dados apresentados na TABELA 19, indicam que o ácido cafeico é o principal metabólito secundário identificado em diferentes partes de *Wedelia paludosa*.

As análises feitas com os extratos AE (acetato de etila), das diferentes partes da planta (caule, folha, flor e raiz), indicam que, apenas nas folhas e flores são encontrados os quatro compostos tomados como padrões (ácido cafeico, butina, buteína e coreopsina). Considerando que os quatro são compostos

fenólicos, a literatura descreve várias atividades relevantes para este tipo de compostos, como: antioxidante, antiinflamatório e antimutagênico, o ideal seria coletar apenas as folhas e flores. Em uma análise simplista, este tipo de análise serviria para monitorar qual parte da planta é mais interessante, do ponto de vista químico. Por outro lado, a análise de todas as partes da planta possibilita a obtenção de um perfil químico dos metabólitos secundários como um todo, servindo como uma espécie de impressão digital química para sua identificação em uma possível mistura. Os quatro cromatogramas, referentes aos extratos de acetato de etila (AE) obtidos a partir das flores, folhas, caule e raízes são apresentados na FIGURA 14.

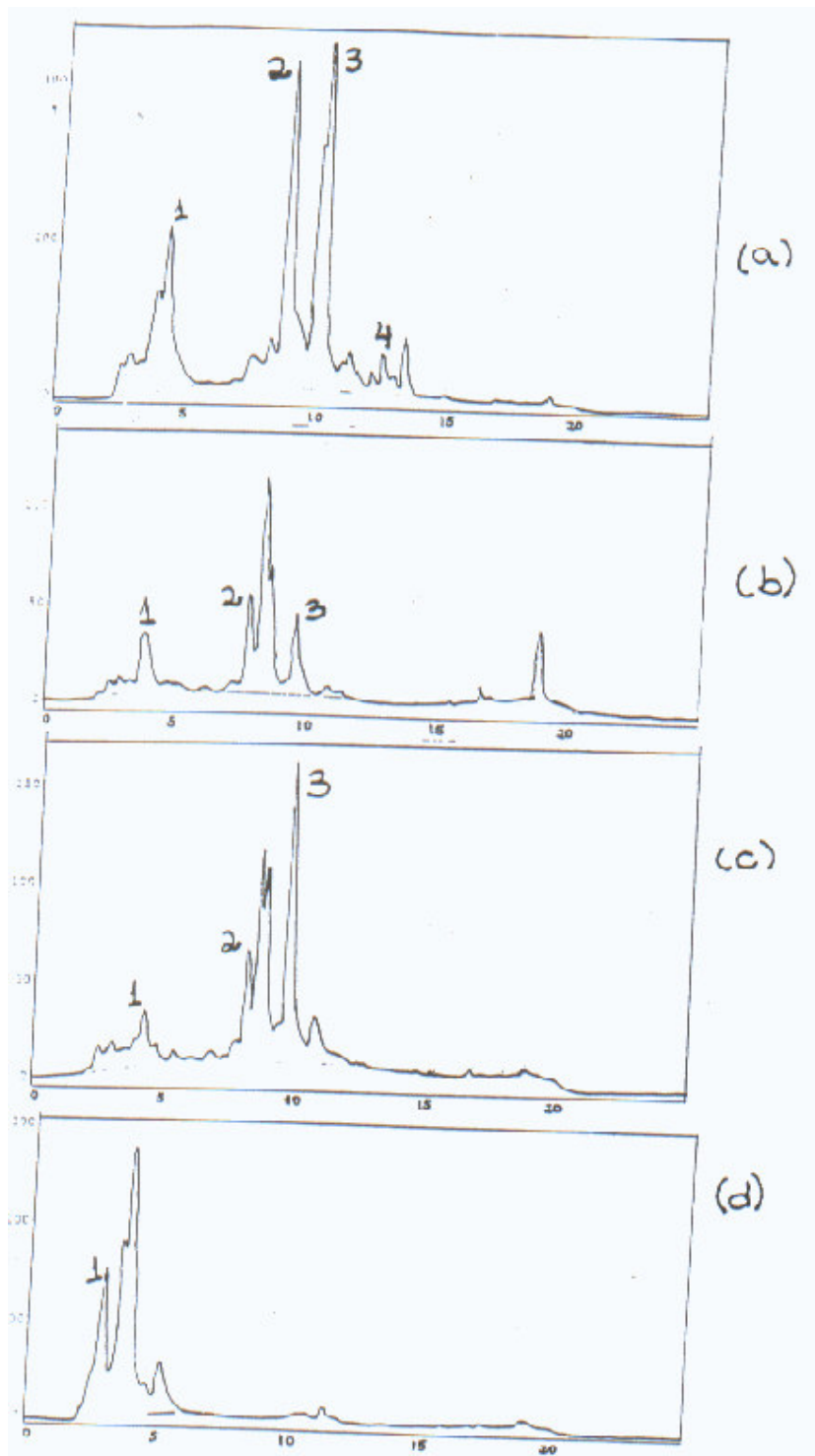


FIGURA 14. Cromatogramas referentes aos extratos de acetato de etila (AE) obtidos das diferentes partes de *W. paludosa*: flores (a), caule (b), folhas (c) e raízes (d). (1) ácido cafeico, (2) butina, (3) coreopsina, (4) buteína.

Devemos levar em conta que todos os padrões aqui citados, foram previamente isolados da própria planta e não se encontravam totalmente puros para as análises. Este fato foi proposital, para testar o método, já que o principal objetivo deste é obter uma metodologia que permita controlar a qualidade de um extrato, sem a necessidade de um grande consumo de tempo e reagentes. O que ocorre na maioria das análises feitas com extratos de plantas, é que os compostos são ainda pouco conhecidos ou não existem na forma de padrão analítico.

I.3.8 – Reações de Nitrosação

As FIGURAS 15 e 16 apresentam os cromatogramas em diferentes tempos para a reação de nitrosação da dietilamina (DEA) e morfolina (MOR), respectivamente, onde observa-se os picos que demonstram o desaparecimento do nitrito e o aparecimento da *N*-nitrosodietilamina e *N*-nitrosomorfolina.

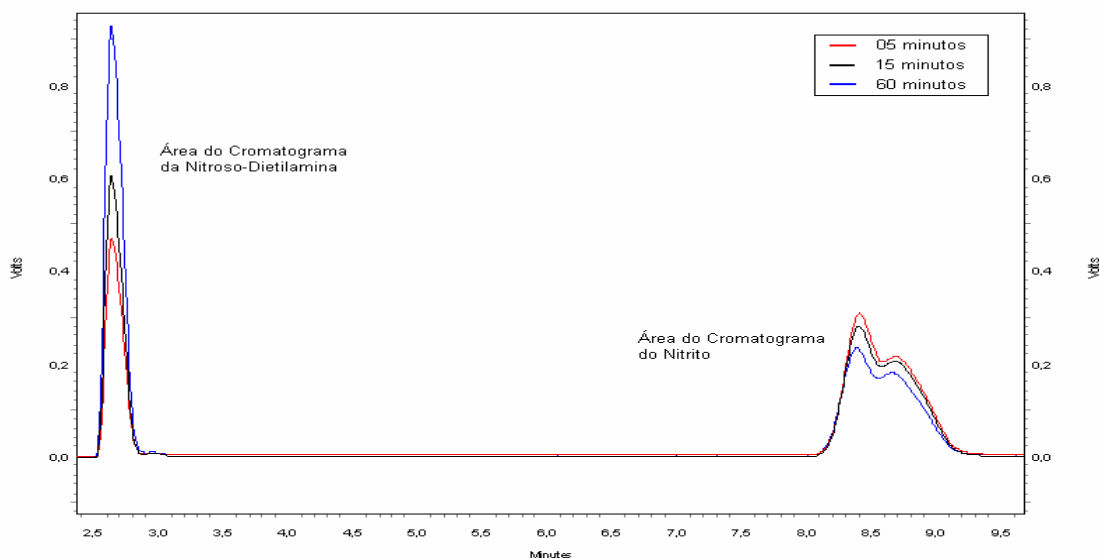


FIGURA 15. Cromatogramas de *N*-Nitrosodietilamina e Nitrito de Sódio em CLAE (fluxo - 0,7 mL/min) com a variação de tempo (5, 15 e 60 min) da reação de nitrosação.

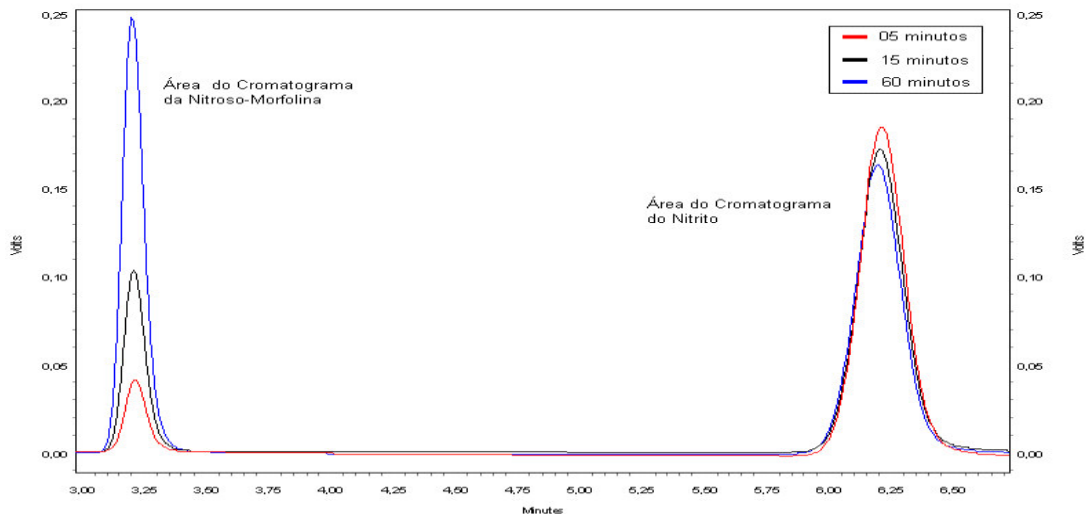


FIGURA 16. Cromatogramas de *N*-Nitrosomorfolina e Nitrito de Sódio em CLAE (fluxo - 1,0 mL/min) com a variação de tempo (5, 15 e 60 min) da reação de nitrosação.

Os dados apresentados nos gráficos das FIGURAS 17 e 18, descrevem a área no cromatograma correspondente ao composto *N*-nitrosodietilamina e *N*-nitrosomorfolina, respectivamente, em função da concentração dos antinitrosantes : A – ácido cafeico (AC), B – ácido gálico (AG), C – quercetina (QUE), D – rutina (RUT) e do tempo de reação.

A nitrosação da DEA, FIGURA 17, não apresenta um comportamento uniforme, o que pode ser observado nos gráficos A e D, onde percebe-se uma tendência na diminuição da área do sinal do cromatograma correspondente à nitrosamina, e nos gráficos B e C apresentaram um efeito contrário, ou seja, percebe-se tendência no aumento da área do sinal cromatográfico correspondente à nitrosamina. As nitrosações foram inibidas em 27 e 37% na presença de 2,5 mM de AC e 0,5 mM de RUT, respectivamente.

Os dados referentes à reação na presença e ausência dos compostos antinitrosantes indicam que, após 60 min de reação, as nitrosações de MOR na presença de 2,5 mM de AC, AG e QUE foram inibidas em 65, 80 e 99%, respectivamente. A RUT, por sua vez, não apresentou qualquer efeito sobre a nitrosação de MOR. É possível dizer que o efeito de “proteção” contra a nitrosação da morfolina, FIGURA 18, pelos polifenóis utilizados, é muito efetivo

para a quercetina e ácido gálico (gráficos C e B), menos efetivo para o ácido cafeico (gráfico A) e praticamente sem atividade para a rutina (gráfico D).

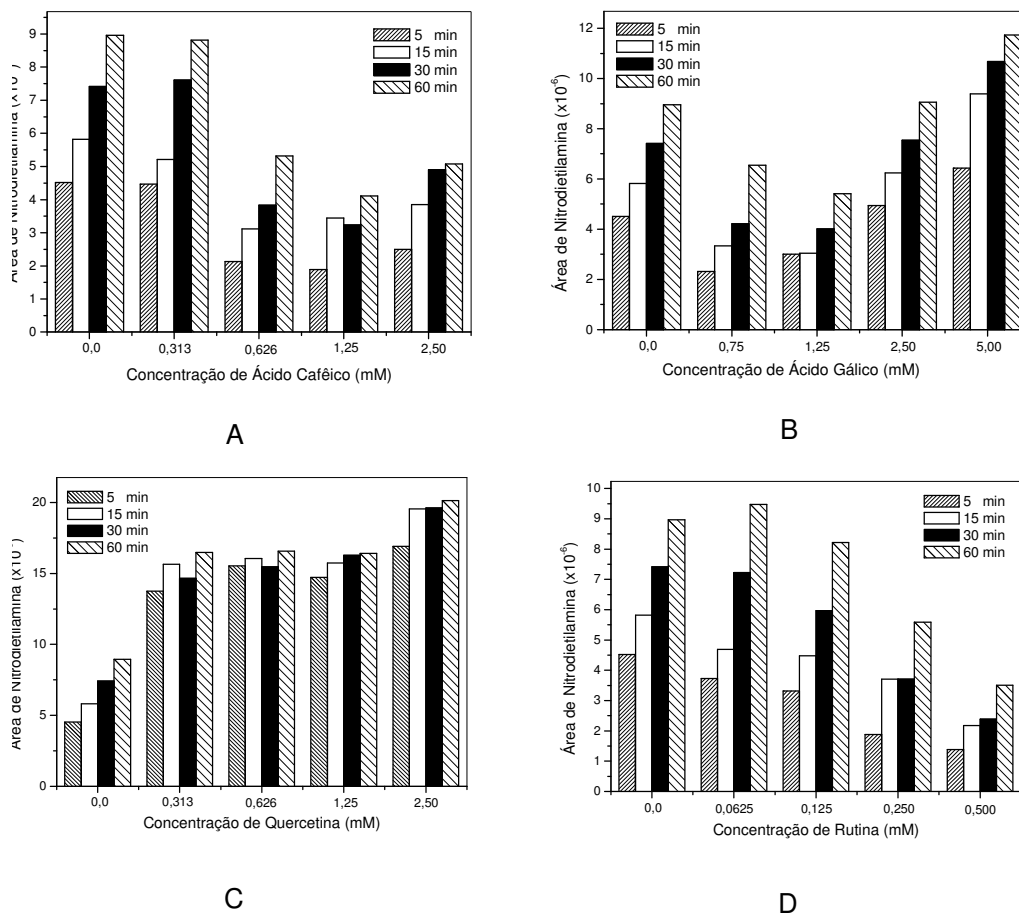


FIGURA 17. Variação da área do cromatograma correspondente a formação de *N*-nitrosodietilamina em função do tempo de reação (5, 15, 30 e 60 min) e em função da concentração de: (A) – ácido cafeico, (B) – ácido gálico, (C) – quercetina, (D) – rutina.

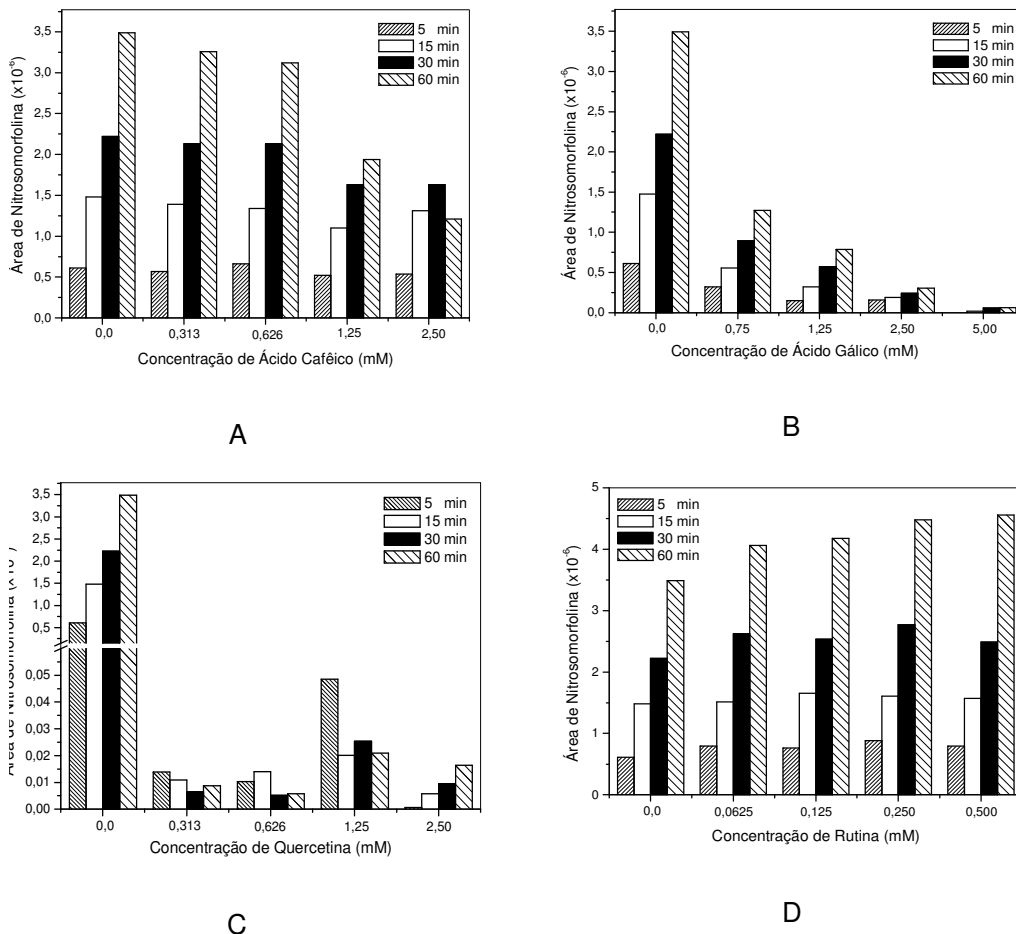


FIGURA 18. Variação da área do cromatograma correspondente a formação de *N*-nitrosomorfolina em função do tempo de reação (5, 15, 30 e 60 min) e em função da concentração de: (A) – ácido cafeico, (B) – ácido gálico, (C) – quercetina, (D) – rutina.

Os dados apresentados nos gráficos da Figura 19 descrevem a área do sinal cromatográfico dos compostos *N*-nitrosodietilamina e *N*-nitrosomorfolina, respectivamente, em função da concentração da amostra M (descrita na TABELA 18) e do tempo da reação. Para os gráficos A e B, ocorre um decréscimo acentuado na área do composto *N*-nitroso com a adição do extrato da planta, e uma pequena mudança com a variação na concentração da mesma. Analisando os dois gráficos de barras, pode-se prever que o efeito antinitrosante do extrato é mais efetivo na reação de nitrosação da dietilamina do que na nitrosação da morfolina.

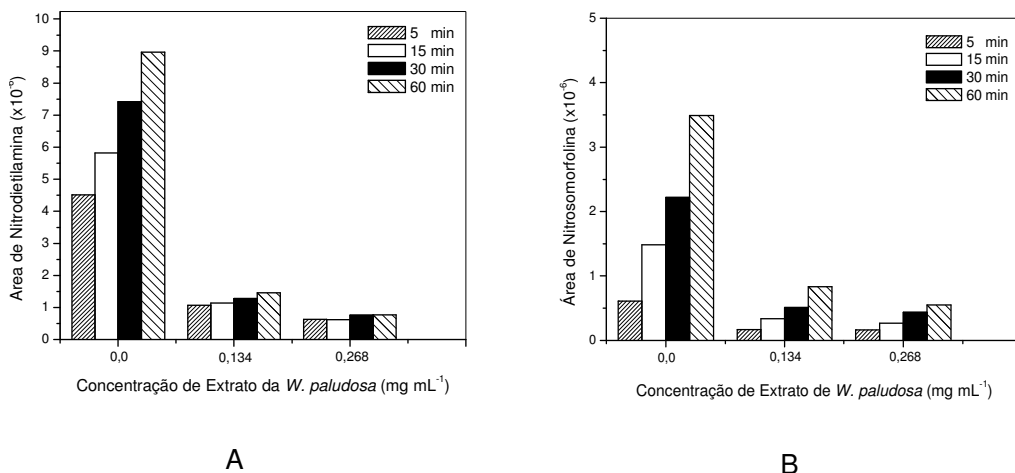


FIGURA 19. Variação da área do sinal no cromatograma de CLAE correspondente a formação de *N*-nitrosodietilamina e *N*-nitrosomorfolina em função da concentração da amostra M (TABELA 18) e do tempo de reação.

Na reação de nitrosação das aminas, o extrato da *W. paludosa* demonstrou ser efetivo em 84 e 91 % na inibição da nitrosação da MOR e da DEA, respectivamente. Isto possivelmente ocorre porque o extrato contém substâncias fenólicas como o ácido cafeico, butina e coreopsina.

Os dados apresentados nos gráficos da FIGURA 20 descrevem a área do sinal composto *N*-nitrosomorfolina no cromatograma de CLAE, em função das concentrações dos extratos aquoso e metanólico da *W. paludosa*, respectivamente, e do tempo da reação. Em ambos os experimentos houve um decréscimo na área do composto *N*-nitroso com a adição dos extratos da planta. Observando os gráficos, pode-se notar que este decréscimo para a reação feita na presença do extrato aquoso da planta é muito pequeno, além de variar com o aumento da concentração de extrato. O extrato aquoso demonstrou ser efetivo em apenas 9% na inibição da nitrosação da morfolina enquanto que o extrato metanólico foi efetivo em 51%. Este resultado talvez possa ser explicado pelas características do solvente utilizado para extração de cada um dos extratos. O metanol, por ser um solvente orgânico, apresenta uma maior afinidade com os compostos fenólicos e, conseqüentemente, os extrai de maneira mais efetiva.

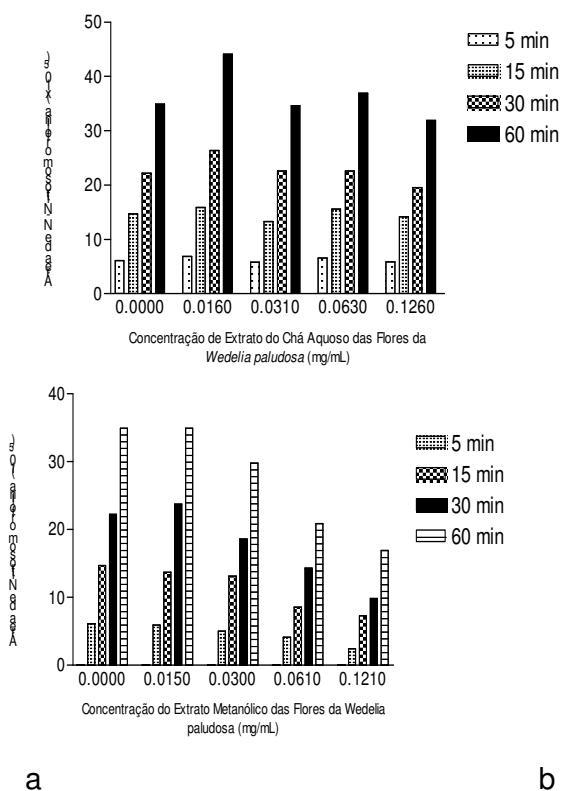
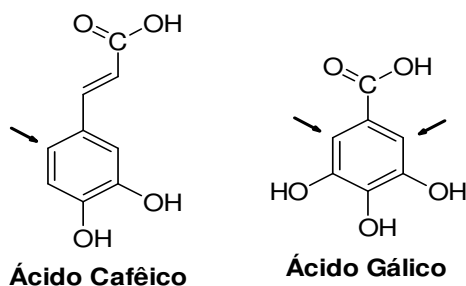


FIGURA 20. Variação na área do sinal no cromatograma de CLAE correspondente a formação de *N*-nitrosomorfolina em função da concentração do extrato aquoso (a) e metanólico (b) da *W. paludosa* e do tempo da reação.

O efeito inibitório mais efetivo para o ácido gálico e a quercetina na reação de nitroação da MOR pode ser explicado pelo mecanismo de nitroação de compostos fenólicos proposto por SOTTOFATTORI e col. (2001), em que a nitroação ocorre no carbono *para* em relação a um substituinte fenólico. Por outro lado, a nitroação pode ocorrer com o ataque nucleofílico dos grupos fenólicos e carboxílicos, que assim podem contribuir para a ação antinitrosante (ESQUEMA 1). Assim, o ácido gálico e a quercetina apresentam mais pontos susceptíveis a nitroação do que o ácido cafeico e a rutina.



ESQUEMA 1

Na FIGURA 21, são apresentados os cromatogramas para a reação de nitrosação de morfolina na presença de ácido gálico, em que aparecem os sinais do ácido nitrosogálico ($t_R=1,70$ a $2,90$ min), nitrosomorfolina ($t_R=3,20$ min) e nitrito ($t_R=6,19$ min), respectivamente. A FIGURA 21 indica, claramente, que ocorre a formação de diversos compostos nitroso-gálicos, produtos das diversas reações de nitrosação de ácido gálico, como também, a diminuição da área do sinal referente à *N*-nitrosomorfolina, com o aumento da concentração do ácido gálico (ESQUEMA 2).

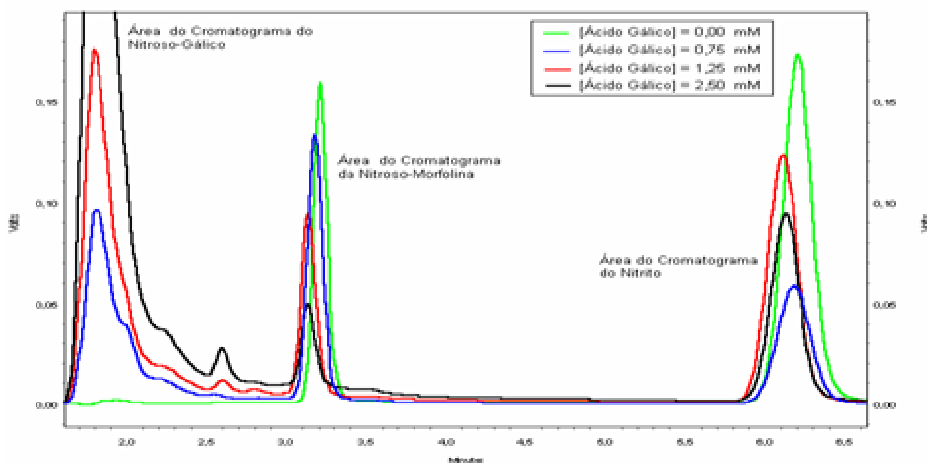
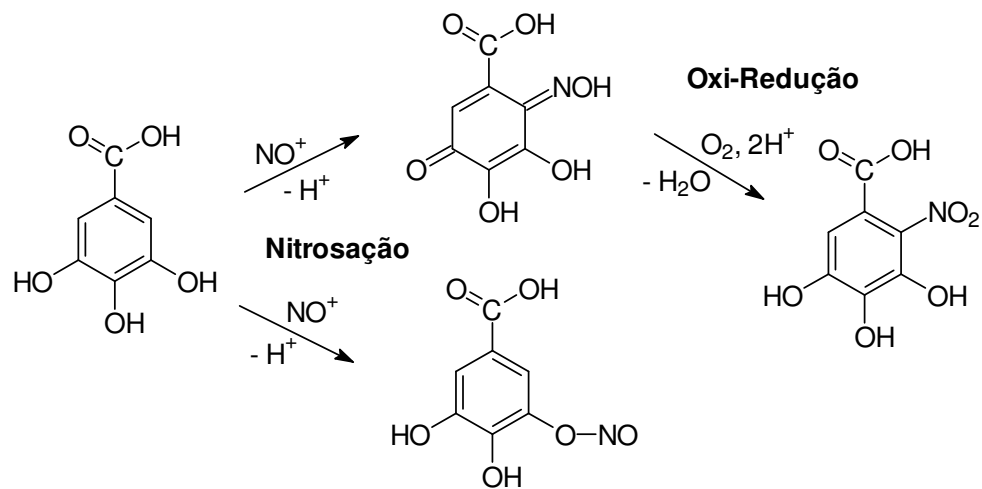


FIGURA 21. Cromatogramas de formação *N*-nitrosomorfolina e nitrito de sódio em CLAE (fluxo – 1,0 mL/min), com variação da concentração de ácido gálico, após 30 minutos de reação.

No ESQUEMA 2, estão apresentados os mecanismos mais importantes de nitrosação do ácido gálico.



ESQUEMA 2

I.3.9 – Resultados dos Ensaios Farmacológicos

I.3.9.a - Atividade Diurética:

Conforme descrito na literatura, plantas do gênero *Adiantum* apresentam atividade diurética (DE FEO, 1992; DUKE e VASQUEZ, 1994). No presente trabalho, procurou-se determinar a atividade diurética do extrato metanólico bruto e da fração acetato de etila do caule da planta *Adiantum cuneatum*.

Animais tratados com hidroclorotiazida mostraram, como esperado, um rápido e significativo aumento no volume urinário excretado (HNATYSZYN *et al.*, 1999). Conforme a TABELA 20, os resultados demonstraram uma diferença significativa ($p < 0,001$) no volume urinário total (8 hs) dos ratos tratados com o extrato metanólico bruto e a fração acetato de etila de *A. cuneatum* quando comparados com o grupo controle, tratado com hidroclorotiazida.

Na TABELA 21, são apresentados os dados dos eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-) determinados na urina dos ratos tratados com os extratos e com controles padrões.

Quanto ao íon sódio, foi encontrada uma diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados os efeitos no grupo controle tratado com água e o tratado com extrato metanólico bruto de *A. cuneatum*, não havendo diferença significativa em relação aos tratados com a fração acetato de etila. Já, o grupo tratado com hidroclorotiazida apresentou uma diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado com o tratamento com a fração acetato de etila, o mesmo não ocorrendo com o grupo tratado com o extrato metanólico bruto. Verificou-se diferenças significativas entre os grupos tratados a água e o extrato metanólico bruto ($p < 0,01$), e entre os grupos tratados com a fração acetato de etila ($p < 0,001$) e hidroclorotiazida ($p < 0,05$).

Quanto aos íons cloro, ocorreu diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos tratados com os extratos em relação ao grupo controle tratado com hidroclorotiazida, não havendo, entretanto, diferença significativa em relação ao grupo tratado com a água.

TABELA 20. Resultados sobre o volume urinário total após oito horas de experimento com os grupos tratados com o extrato metanólico bruto e a fração acetato de etila de *A. cuneatum* em relação aos grupos controles tratados com hidroclorotiazida e com água.

Tratamento	Volume Urinário Total (mL) (8hs)
Água	4,260 ($\pm 0,412$)
Hidroclorotiazida	10,689 ($\pm 0,716$)
Extrato MeOH ^a	5,000 ($\pm 0,346$) ^{***}
Fr. Acet. Etila ^b	5,043 ($\pm 0,592$) ^{***}

. ^aExtrato metanólico de *Adiantum cuneatum*. ^bFração acetato de etila de *A. cuneatum*. *Diferença significativa. *** $p < 0,001$.

TABELA 21. Dados dos eletrólitos (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) determinados na urina dos ratos tratados com os extratos de *A. cuneatum* e com controles padrões.

Tratamento	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Água	0,567 (±0,0476)	0,461 (±0,0390)	0,365 (±0,0432)
Hidroclorotiazida	1,079 (±0,0641)***	0,329 (±0,0208)	1,278 (±0,231)***
Extrato MeOH ^a	0,914 (±0,0661)**	0,324 (±0,0252)**	0,521 (±0,0483)***
Fr. Acet. Etila ^b	0,655 (±0,0748)***	0,228 (±0,0233)***	0,328 (±0,0342)***

^aExtrato metanólico de *Adiantum cuneatum*. ^bFração acetato de etila de *A. cuneatum*. *Diferença significativa. ***p<0,001; **p<0,01.

I.3.9.b - Avaliação do Potencial Anti-Hiperplásico Prostático:

Foi avaliada a atividade anti-hiperplásica do extrato metanólico bruto e da fração supercrítica da *Adiantum cuneatum*, bem como, dos compostos isolados desta, filiceno e filicenal. Também, foram estudadas diferentes doses do extrato metanólico bruto e de filiceno. Juntamente com estes produtos naturais, a finasterida e o extrato lipoesterólico da *Serenoa repens* foram utilizados como controles positivos. A finasterida foi o primeiro fármaco a ser aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration – USA) para este fim. (MARANDOLA *et al.*, 1997), e o extrato lipoesterólico da *Serenoa repens* é o agente fitoterápico mais utilizado atualmente para o tratamento da Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP) na Europa (LOWE e KU, 1996).

No presente estudo, após o tratamento dos ratos, os seguintes aspectos foram analisados: peso da próstata e da vesícula seminal, atividade da fosfatase ácida, nível sérico de colesterol e nível tecidual de testosterona e dihidrotestosterona (DHT).

Peso da Próstata

A FIGURA 22, apresenta os resultados referentes ao peso da próstata (mg/100g de peso corpóreo) dos grupos controle, hiperplásico e tratados durante 30 dias com extrato metanólico bruto e fração supercrítica de *Adiantum cuneatum*, filiceno, filicenal, finasterida e extrato lipoesterólico da *S. repens*. Conforme os

resultados demonstram, todos os tratamentos estudados promoveram uma redução estatisticamente significativa do peso da próstata em relação ao grupo hiperplásico.

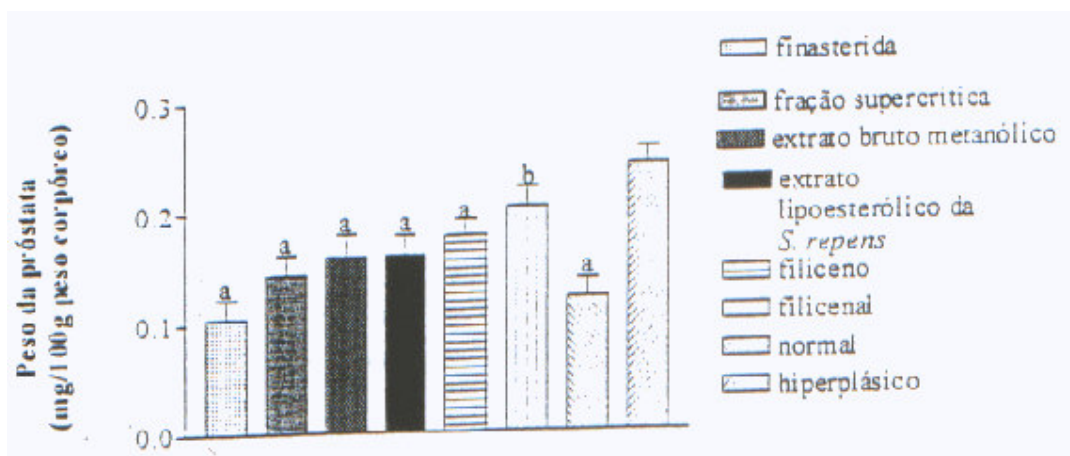


FIGURA 22. Peso da próstata (mg/100g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4 mg/kg), fração supercrítica (24 mg/kg), extrato bruto metanólico de *A. cuneatum* (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (b) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente.

As FIGURAS 23 e 24, apresentam os resultados referentes ao peso da próstata (mg/100g de peso corpóreo) dos grupos controle, hiperplásico e tratados durante 30 dias com diferentes doses de extrato metanólico bruto e filiceno, respectivamente. Deve-se observar que todos os grupos tratados, com exceção do filiceno (10 mg/kg) reduziram o peso da próstata de maneira significativa quando comparado ao controle hiperplásico.

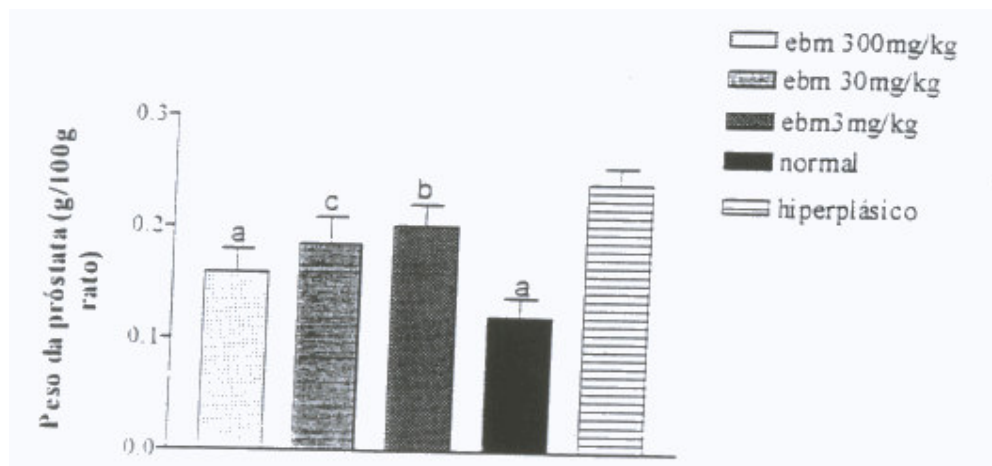


FIGURA 23. Peso da próstata (mg/100g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com ebm (ebm= extrato bruto metanólico) de *A. cuneatum* (300 mg/kg, 30 mg/kg e 3 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a), (b) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

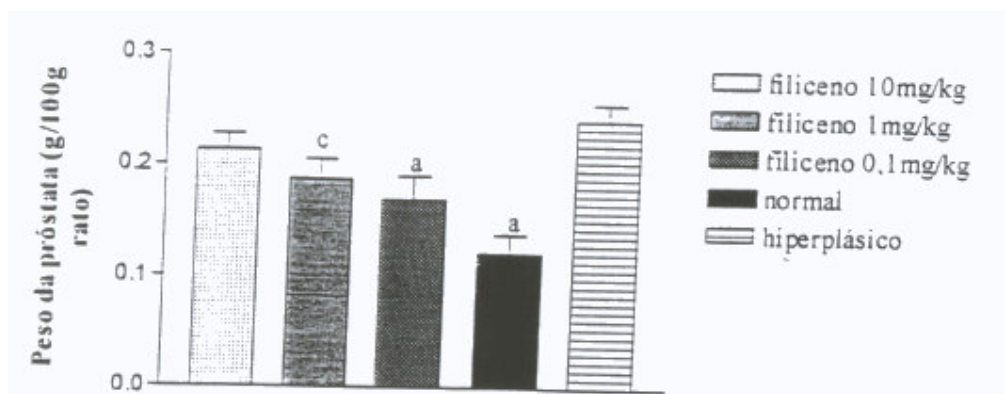


Figura 24. Peso da próstata (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com filiceno (0,1 mg/kg; 1 mg/kg e 10 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente.

Peso da Vesícula Seminal

A FIGURA 25, apresenta os resultados referente ao peso da vesícula seminal (mg/100 g de peso corpóreo) dos grupos controle, hiperplásico e tratados durante 30 dias com extrato bruto, da fração supercrítica de *A. cuneatum*, o filiceno, o filicenal, com a finasterida e extrato lipoesterólico da *S. repens*. Conforme demonstram os resultados, todos os tratamentos, com exceção do extrato metanólico bruto, promoveram uma redução estatisticamente significativa do peso da vesícula seminal em relação ao grupo hiperplásico.

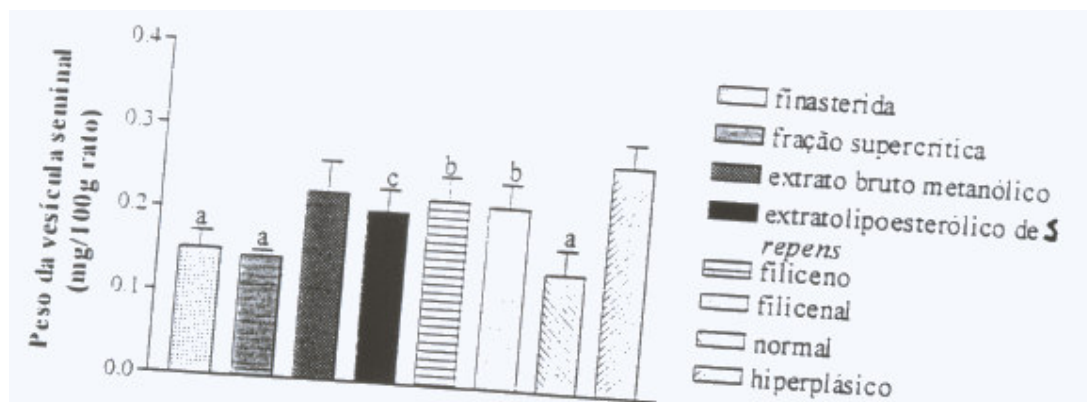


FIGURA 25. Peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4 mg/kg), fração supercrítica (24mg/kg), extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a), (b) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

As FIGURAS 26 e 27, apresentam os resultados referentes ao peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos grupos controle, hiperplásico e tratados com diferentes doses de extrato metanólico bruto e filiceno durante 30 dias. Conforme os resultados mostram, nenhum tratamento promoveu redução estatisticamente significativa do peso da vesícula seminal em relação ao grupo hiperplásico.

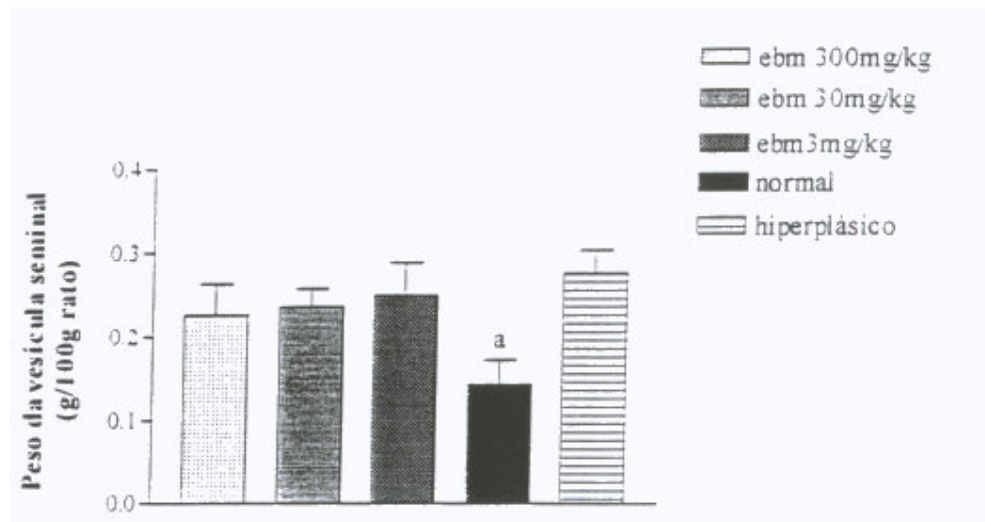


FIGURA 26. Peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com diferentes doses do extrato metanólico bruto (ebm) de *A. cuneatum* durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6.

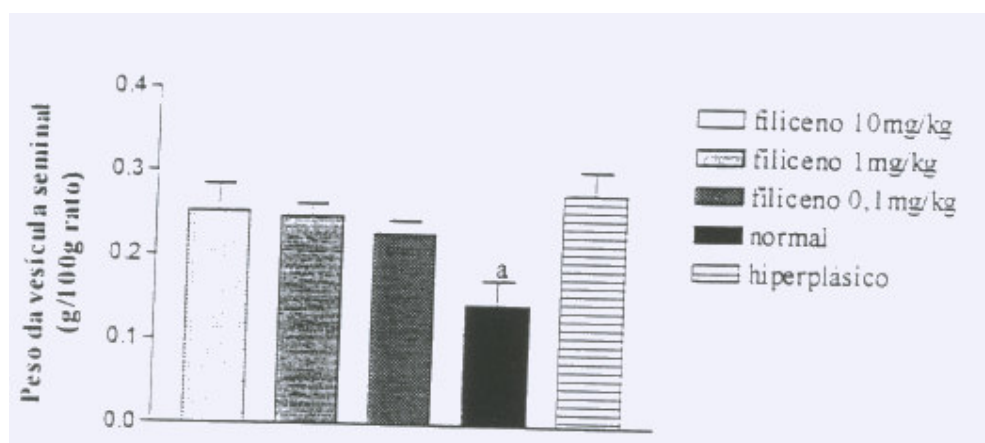


FIGURA 27. Peso da vesícula seminal (mg/100 g do peso corpóreo) dos ratos normais, ratos hiperplásico e tratados com filiceno (0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6.

Determinação da Atividade da Fosfatase Ácida

Na FIGURA 28, estão indicados os resultados referentes à atividade da fosfatase ácida dos grupos controle, hiperplásico e tratados durante 30 dias com os diferentes extratos, frações e compostos estudados. Conforme indicam os resultados, somente o extrato metanólico bruto mostrou um significativo decréscimo da atividade desta enzima quando comparado ao grupo controle.

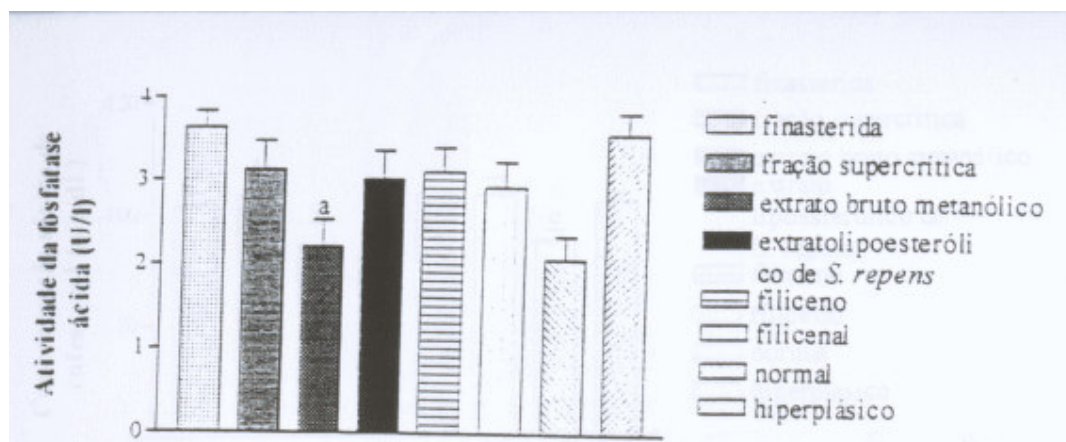


FIGURA 28. Atividade da fosfatase ácida dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4 mg/kg), fração supercrítica (24 mg/kg), extrato bruto metanólico de *A. cuneatum* (300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenal (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a), (b) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$.

Nível Sérico de Colesterol Total

A FIGURA 29, indica os níveis de colesterol sérico dos ratos controle e tratados durante 30 dias com extratos, frações e compostos estudados. É importante observar que os grupos tratados com extrato metanólico bruto e extrato lipoesterólico da *S. repens* mostraram um decréscimo estatisticamente significativo da concentração de colesterol, quando comparado ao grupo hiperplásico.

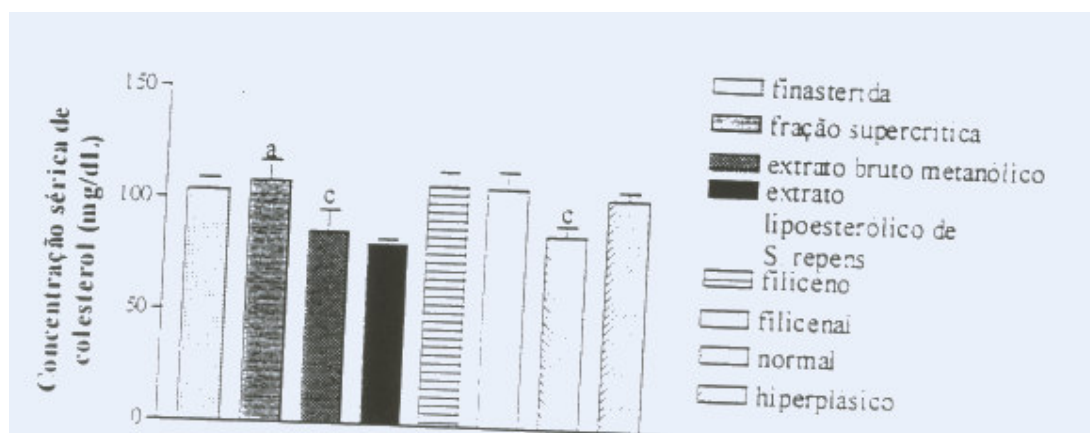


FIGURA 29. Nível sérico de colesterol (mg/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com finasterida (4mg/kg), fração supercrítica (24 mg/kg), extrato metanólico bruto de *A. cuneatum*(300 mg/kg), extrato lipoesterólico da *S. repens* (24 mg/kg), filiceno (4 mg/kg) e filicenai (4 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente.

As FIGURAS 30 e 31, indicam os níveis de colesterol sérico dos ratos controle e tratados durante 30 dias com as diferentes doses do extrato metanólico bruto e filiceno, respectivamente. É importante comparar a redução dos níveis de colesterol sérico do grupo tratado com o filiceno quando comparado ao grupo hiperplásico.

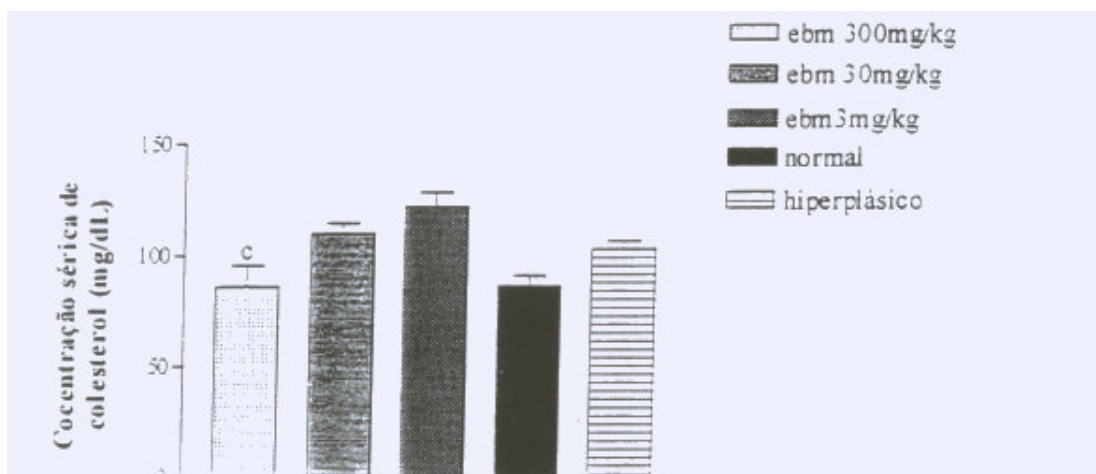


FIGURA 30. Nível sérico de colesterol (mg/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com extrato bruto metanólico (ebm) de *A. cuneatum* (300 mg/kg e 3 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,01$.

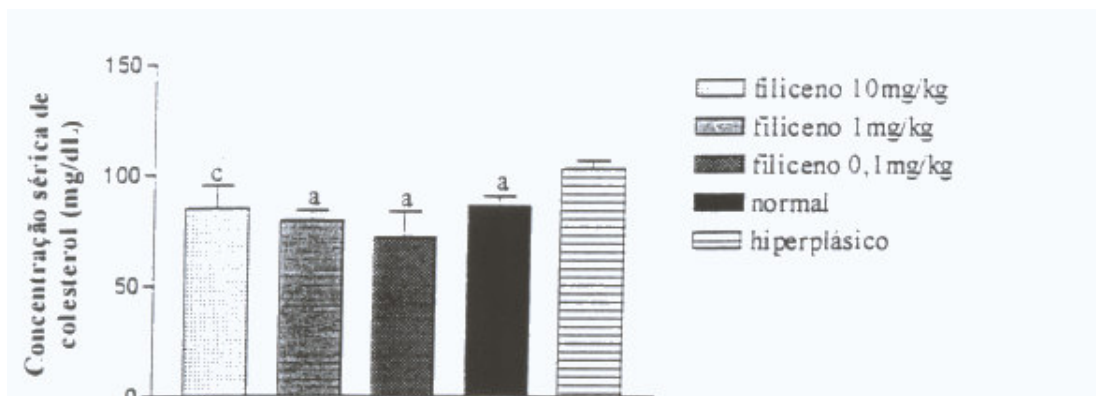


FIGURA 31. Nível sérico de colesterol (mg/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com filiceno (0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) e (c) diferenças significativas em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente.

Nível de Testosterona Tecidual

Na FIGURA 32, estão indicados os resultados referentes ao nível de testosterona tecidual dos ratos normais, hiperplásicos e tratados com o extrato bruto metanólico e a fração supercrítica de *A. cuneatum*, durante 30 dias. É importante observar que houve redução estatisticamente significativa na concentração de testosterona dos animais tratados, quando comparados ao grupo controle hiperplásico.

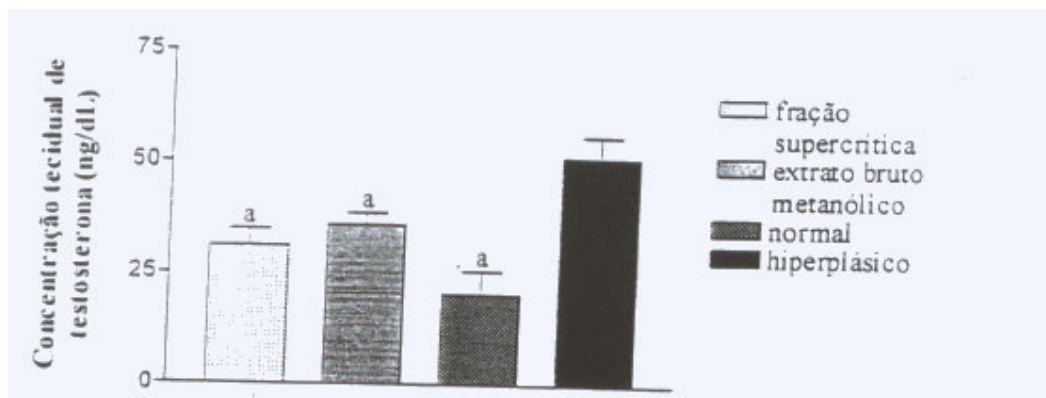


FIGURA 32. Nível de testosterona tecidual (ng/dL) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com fração supercrítica (24 mg/kg) e extrato bruto metanólico de *A. cuneatum* (300 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) diferença significativa em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$.

Nível de Dihidrotestosterona (DHT) Tecidual

A FIGURA 33, apresenta os resultados referentes aos níveis de DHT tecidual dos ratos normais, hiperplásicos e tratados com o extrato bruto metanólico e a fração supercrítica de *A. cuneatum*, durante 30 dias. É possível observar que os grupos tratados apresentam um decréscimo estatisticamente significativo na concentração de diidrotestosterona (DHT) quando comparado ao controle hiperplásico.

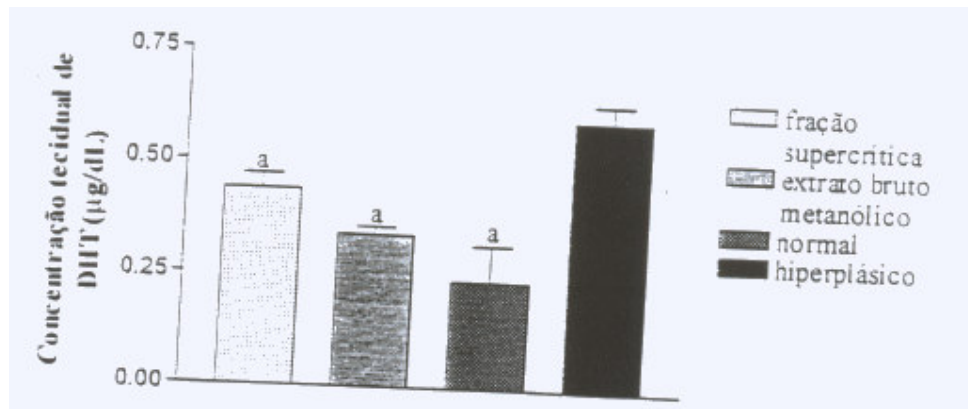


FIGURA 33. Nível tecidual de DHT ($\mu\text{g/dL}$) dos ratos normais, ratos hiperplásicos e tratados com fração supercrítica (24 mg/kg) e extrato bruto metanólico de *A. cuneatum* (300 mg/kg) durante 30 dias (v.o.). Resultados expressos em termos de média \pm desvio padrão, n=6. (a) diferença significativa em relação ao grupo hiperplásico $p < 0,001$.

A próstata apresenta distintas regiões incluindo as zonas central, periférica, de transição e a periuretral. Ela é composta por elementos estromais e epiteliais, e o desenvolvimento do epitélio glandular, na zona periuretral, promove o desenvolvimento da HBP, contribuindo assim, para a obstrução da uretra (MCNEAL *et al.*, 1988).

Conforme apresentado na FIGURA 22, todos os compostos testados, reduziram estatisticamente o peso da próstata em relação à hiperplasia, na razão de 57%, 41%, 34%, 26% e 16% nos tratamentos com a finasterida, a fração supercrítica, e o extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* e o extrato liposterólico da *S. repens*, o filiceno e o filicenal, respectivamente.

Como é mostrado nas FIGURAS 23 e 24, a próstata apresentou redução significativa de 23% e 16% nos grupos tratados com extrato bruto metanólico a 30 mg/kg e 3 mg/kg, e de 30% e 22% nos grupos tratados com o filiceno 1,0 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente.

A finasterida inibe competitivamente a isoforma tipo 2 da 5α -redutase, que está presente nos testículos e faz a conversão da testosterona em

dihidrotestosterona (DHT). Foi demonstrado que, a partir dos 50 anos, o homem apresenta um aumento de DHT na próstata, o qual pode estar envolvido com o desenvolvimento da HBP (GELLER, 1989). Ensaios clínicos mostraram que a finasterida reduz o tamanho da próstata e promove a melhora dos sintomas obstrutivos (STONER, 1994). Neste trabalho, a finasterida promoveu uma redução de 57% do peso da próstata, comparado ao grupo hiperplásico e a fração supercrítica da *Adiantum cuneatum* apresentou um efeito próximo àquele ocasionado por este fármaco.

A vesícula seminal é uma glândula secretora e local de armazenamento de espermatozoides. Sua formação é dependente de testosterona e, portanto, seu crescimento e manutenção é dependente deste andrógeno (GUYTON e HALL, 1997). Conforme a FIGURA 25, todos os tratamentos, com exceção do extrato metanólico bruto de *A. cuneatum*, reduziram de forma estatisticamente significativa o peso da vesícula seminal em relação ao grupo hiperplásico, na razão de 47%, 45%, 25%, 21% e 19% nos tratamentos com a fração supercrítica de *A. cuneatum*, a finasterida, o extrato lipoesterólico de *S. repens*, o filiceno e o filicenal, respectivamente. No estudo dose-dependente, nenhum grupo tratado com o extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* ou com o filiceno apresentou redução significativa do peso da vesícula seminal, quando em comparação ao grupo controle hiperplásico (FIGURAS 26 e 27).

Curiosamente, em relação à atividade da fosfatase ácida, os resultados mostram que somente o extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* causou redução significativa na atividade desta enzima, quando comparado ao grupo hiperplásico. A redução promovida em relação ao grupo hiperplásico foi de 38%. Deve-se destacar, também, que o valor atingido aproxima-se da normalidade. Para os grupos tratados com diferentes doses de extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* e filiceno, ficaram inviabilizada a determinação da atividade devido a problemas no aparelho espectrofotométrico. As amostras destas análises foram descartadas, tendo em vista que as leituras são tempo/dependentes (FIGURA 28).

A fosfatase ácida é uma enzima usada como marcador bioquímico usado para detectar a proliferação do epitélio prostático. A HBP é um processo

hiperplásico verdadeiro porque estudos histológicos demonstraram que ocorre um aumento do número de células, e o estudo de incorporação de timidina, realizado em animais, mostrou claramente um aumento na síntese de DNA (MCNEAL *et al.*, 1988). Sendo assim, a diminuição na atividade da fosfatase ácida ocasionada pelo extrato metanólico bruto de *A. cuneatum*, pode indicar uma diminuição na proliferação celular.

Em relação aos níveis de colesterol sérico, convém observar que no estudo geral dos extratos, frações e compostos da *Adiantum cuneatum*, somente os grupos tratados com extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* e extrato lipoesterólico de *S. repens* tiveram redução de forma significativa, na razão de 17% e 22%, respectivamente, com relação ao controle hiperplásico. No estudo dose-dependente do filiceno quanto aos níveis de colesterol sérico, houve redução significativa, (FIGURA 31), na razão de 30%, 22% e 17% para as respectivas doses de 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg, quando comparados ao controle hiperplásico. Deve-se observar que os valores descritos encontram-se próximos da normalidade, sugerindo assim, um possível efeito hipocolesterolêmico deste composto. Outra possível explicação para estes valores encontrarem-se reduzidos é de que os respectivos tratamentos e experimentos foram realizados no período do inverno, o que poderia ter acarretado uma maior mobilização de lipídios para manutenção da temperatura corpórea.

O colesterol é o principal esterol presente nos tecidos humanos e realiza uma série de funções essenciais, dentre as quais, pode-se destacar seu papel como precursor de hormônios esteroides (BRENDDEL *et al.*, 1999). O colesterol e os seus metabólitos citotóxicos 5-epoxicolesterol e 6-epoxicolesterol parecem ter uma relação com o desenvolvimento da HBP. Tanto a deposição de colesterol, como sua concentração tende a aumentar em tecidos da próstata hiperplásica (DREIKON *et al.*, 1990). Essa tendência de aumento dos níveis de colesterol, ficou bastante clara nos estudos aqui descritos (FIGURA 25), comparando-se o grupo normal com o grupo hiperplásico.

A testosterona é o principal hormônio androgênico circulante. No homem, é secretada principalmente pelos testículos e, com uma menor contribuição, pelas

glândulas adrenais. Para ter atividade máxima na próstata, a testosterona deve ser convertida em DHT pela 5 α -redutase. Pesquisas realizadas com ratos mostraram que, em concentrações equivalentes, o DHT é duas vezes mais potente que a testosterona e possui maior afinidade pelos receptores androgênicos. Isso explica porque existe um acúmulo de DHT nos tecidos da próstata de homens mais idosos, mesmo sabendo que o nível de testosterona circulante tende a diminuir com o avanço da idade (WRIGHT *et al.*, 1996)

Os resultados obtidos para o nível tecidual de testosterona (FIGURA 32), revelam que o tratamento com fração supercrítica e extrato metanólico bruto de *A. cuneatum* ocasionaram uma redução estatisticamente significativa do nível de testosterona de 39% e 30%, respectivamente, quando comparado com o grupo hiperplásico. Quanto a esta significativa queda dos níveis de testosterona em ratos tratados com estes compostos, pode-se sugerir que, pelo menos parcialmente, a testosterona pode ser responsável pelo aumento da próstata. Esta hipótese fica bem mais evidente quando são avaliados os pesos das próstatas e se constata que foram estes tratamentos que apresentaram os menores valores de peso para a glândula.

Com relação aos resultados dos níveis teciduais de DHT, apresentado na FIGURA 33, ficou evidenciado que o tratamento com extrato metanólico bruto e com a fração supercrítica de *A. cuneatum* foram capazes de diminuir esse nível em relação ao controle hiperplásico, de 43% e 26%, respectivamente. Embora, o valor tenha diminuído em relação ao grupo hiperplásico, estes níveis ficaram um pouco acima do controle normal em 41% e 83%, respectivamente.

Os resultados obtidos para os níveis teciduais de testosterona e DHT nos permitem sugerir que o extrato metanólico bruto e a fração supercrítica de *A. cuneatum* possivelmente causam inibição da conversão da testosterona em DHT, uma vez que ocorreu uma redução simultânea dos dois andrógenos.

Em relação ao extrato metanólico bruto de *A. cuneatum*, podemos supor que sua ação é devido ao sinergismo dos componentes ou a compostos ainda não determinados, já que filiceno e filicenal, os quais são extraídos deste extrato, não demonstraram tanta atividade quando isolados. Ainda com relação ao extrato

metanólico bruto de *A. cuneatum*, ficou evidente que a sua atividade na próstata é dose-dependente, já que os melhores resultados foram obtidos para as maiores doses.

Por outro lado, os resultados obtidos no estudo da atividade anti-hiperplásica prostática do filiceno, indicaram que a menor dose foi a que produziu a melhor atividade, isto talvez porque as concentrações testadas estavam acima do limite para produzirem uma resposta satisfatória. Outra consideração importante a ser feita é de que se esperava que o grupo tratado com filiceno (4 mg/kg) apresentasse uma atividade anti-hiperplásica intermediária entre os grupos tratados com 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg, o que não ocorreu, talvez por se tratar de lotes de animais diferentes, ou até mesmo porque os tratamentos foram realizados em condições de temperatura diferentes.

Os resultados obtidos demonstram que o extrato metanólico bruto e a fração supercrítica de *A. cuneatum* possuem um bom potencial anti-hiperplásico prostático, uma vez que foram capazes de reduzir em 34% e 41% o peso da próstata, diminuir cerca de 43% e 26% o nível tecidual de DHT, e diminuir cerca de 30% e 39% o nível tecidual de testosterona, respectivamente. A fração supercrítica de *A. cuneatum* ainda ocasionou redução significativa de 47% no peso da vesícula seminal, e o extrato metanólico bruto da mesma planta causou redução de 38% na atividade da fosfatase ácida e cerca de 17% no nível sérico de colesterol.

Os resultados obtidos no estudo dose-dependente do filiceno demonstraram que o grupo tratado com filiceno (0,1 mg/kg) apresentou uma maior atividade anti-hiperplásica, visto que reduziu em 30% o peso da próstata e o nível de colesterol sérico.

Os resultados evidenciaram que o uso dos extratos seria mais conveniente por apresentar um efeito dose dependente, o qual é fundamental.

I.3.9.c - Modelo de Contorções Abdominais Causadas por Injeção Intraperitoneal de Ácido Acético Diluído:

Foram testados a fração hexânica da planta *Adiantum cuneatum*, e os compostos filiceno e filicenal, extraídos desta mesma fração, com o objetivo de avaliar seu potencial analgésico. Estes resultados estão publicados no artigo “Pharmacological and Phytochemical Evaluation of *Adiantum cuneatum* Growing in Brazil” publicado em Z. Naturforsch. 58c, 2003 (Anexo 2).

Os resultados apresentados na TABELA 22, indicam que a fração hexânica exibe considerável efeito analgésico em camundongos, inibindo as contorções abdominais induzidas por ácido acético de maneira dose-dependente. Estão apresentados também os valores de DI_{50} (Dose Inibitória 50%) (com limite de confiabilidade de 95%) de 19,7 (14,6 – 25,8) mg/kg, administrado intraperitonealmente (i.p.), com inibição máxima de 73%. A fração hexânica foi equipotente aos compostos de referência, ácido acetilsalicílico e acetaminofeno, incluídos neste estudo com intuito comparativo (TABELA 22).

Apenas foram testados para analgesia os compostos filiceno e filicenal, dos quatro compostos isolados desta fração, devido à pequena quantidade obtida dos compostos isoadiantona e adiantol. O filiceno foi cerca de 2,5 vezes mais ativo do que a fração hexânica, com DI_{50} (com 95% de limite de confiabilidade) de 8,0 (7,1 – 9,0) mg/kg (i.p. e inibição máxima de 76%. Na concentração de $\mu\text{mol/kg}$, o filiceno foi cerca de 7 vezes mais potente do que os compostos padrões.

O filicenal foi menos ativo, apresentando inibição de $58 \pm 6\%$ a 10mg/kg.

TABELA 22. Atividade analgésica da fração hexânica, filiceno e filicenal obtidos da planta *Adiantum cuneatum*, ácido acetilsalicílico e acetaminofeno no modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos.

Compostos	ID 50		Inibição Máxima
	(mg/kg)	(μ mol/kg)	(%)*
Fração Hexânica	19,7(14,6 -25,8)	-	73 \pm 4
Filiceno	8,0 (7,1 – 9,0)	19,5 (17,3 – 22,0)	76 \pm 6
Filicenal	~ 10,0	~ 25,0	58 \pm 6
ASA	24,0 (13,0 – 44,0)	133 (73,0 – 247,0)	35 \pm 2
ACE	19,0 (16,0 – 24,0)	125 (140 – 250)	38 \pm 1

Cada grupo representa a média \pm s.e.m. de 6 – 8 experimentos. A fração e os compostos foram administrados intraperitonealmente. AAS = ácido acetilsalicílico; ACE = acetaminofeno. * Inibição máxima a 10,0 mg/kg.

I.3.9.d - Modelo de Dor Induzido pela Formalina:

Para confirmar o efeito analgésico do filiceno e do filicenal, foram realizados experimentos segundo o modelo de dor induzida pela formalina (10 mg/kg, i.p.), um teste no qual ocorrem dois períodos distintos de resposta, a primeira fase (neurogênica) e a segunda fase (inflamatória). O filiceno inibiu ambas as fases, apresentando 51 e 60% de inibição na primeira e segunda fase, respectivamente. Já o filicenal inibiu significativamente somente a fase inflamatória, com 79% de inibição (TABELA 23). Ambos os compostos apresentaram atividades superiores aos compostos padrão (ácido acetilsalicílico e indometacina) em relação à segunda fase do teste da formalina.

TABELA 23. Atividade analgésica do filiceno e filicenal extraídos da *A. cuneatum*, ácido acetilsalicílico e indometacina para o modelo de dor induzida por formalina em camundongos.

Compostos	Inibição (%)	
	Primeira Fase ¹ Fase ²	Segunda
Filiceno	51,0 ± 9	60,0 ± 8
Flicenal	26,1 ± 11,5	79,0 ± 10,4
ASA	Inativo	39,0 ± 4
IND	Inativo	33,0 ± 5

Cada grupo representa a média ± s.e.m. de 6 – 8 experimentos. ¹ 0 – 5 min lambendo; ² 15 – 30min lambendo. Compostos foram administrados via intraperitoneal em doses 10 mg/kg. AAS = ácido acetilsalicílico; IND = indometacina.

PARTE II – Avaliação da Composição Química de Extratos e o Perfil Cromatográfico de Duas Plantas da Medicina Popular

II.1 – Introdução

Com o aumento mundial do interesse em produtos naturais, aumentou na mesma proporção o interesse no estudo de produtos naturais ativos como medicamentos (SEWRAM *et al.*, 2000), aditivos em alimentos (KIM *et al.*, 1999; BERNA, 2000) ou como pesticidas naturais (LANG e WAI, 2001). Neste contexto, o estudo químico de produtos naturais com interesse farmacológico é uma das áreas de pesquisa que mais tem se desenvolvido.

Metabólitos farmacologicamente ativos se apresentam, freqüentemente, em concentrações muito baixas na planta. Uma das linhas de pesquisa que houve maior desenvolvimento foi a procura por técnicas e metodologias mais efetivas e seletivas para a extração de compostos orgânicos, assim como sua análise qualitativa e quantitativa de maneira rápida e eficiente (LANG e WAI, 2001), como por exemplo, a análise da presença de resíduos de pesticidas em alimentos (STEFANI *et al.*, 1997) e plantas medicinais (LINO e SILVEIRA, 1997).

Os métodos de extração convencional, como arraste a vapor e extração por solvente, possuem poucos parâmetros ajustáveis à seletividade, sendo que, basicamente podem ser variadas a temperatura e a polaridade. O desenvolvimento de técnicas analíticas mais seletivas e eficientes se fazem necessárias (HAWTHORNE *et al.*, 1993; VALLE *et al.*, 2000), ppor exemplo a extração por fluido supercrítico (FSC) é uma técnica ambientalmente correta e eficiente na extração de metabólitos secundários, também podendo ser empregada para direcionar a extração, com o objetivo de extrair preferencialmente uma classe de compostos em relação à outras.

Como a técnica de extração por fluido supercrítico apresenta diversas vantagens com relação a outros procedimentos, é uma promissora alternativa às técnicas convencionais de extração com solventes (LEHOTAY e GARCÍA, 1997). O fluido supercrítico possui baixa viscosidade e alto poder de difusão. Isto faz com que o FSC possa penetrar nos poros dos materiais em extração com maior eficiência do que os solventes líquidos. Com isto, o tempo de extração pode diminuir de alguns dias de extração, como no caso dos solventes convencionais, para algumas horas (WHEELER e MCNALLY, 1989; MARSILI e CALLAHAN, 1993).

O poder de solvatação do FSC pode ser manipulado por trocas na pressão e temperatura, fazendo com que a extração se torne altamente seletiva (MOLDÃO-MARTINS, 2000; YAMINI *et al.*, 2002).

A extração por FSC parece ser mais efetiva quando se trata de extrações com quantidades muito pequenas de material vegetal ($\pm 1,0g$). Amostras de plantas, da ordem de 1,5g possivelmente contém até cem compostos voláteis ou semi-voláteis que podem ser extraídos e analisados por técnicas como cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massas (EM) (SMITH e BURFORD, 1992).

II.2 – Plantas Medicinais

O consumo de medicamentos fitoterápicos tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas, tanto nos países industrializados, como naqueles em desenvolvimento. Paralelamente, observa-se um interesse crescente das grandes indústrias farmacêuticas internacionais pelo mercado de medicamentos fitoterápicos, o que poderá ser importante para o surgimento de estudos científicos que comprovem sua eficácia, segurança e biodisponibilidade (CALIXTO, 2000).

As novas estratégias utilizadas para a obtenção de fármacos incluem estudos envolvendo produtos naturais usados na medicina popular, a maioria dos quais, derivados de plantas (HUIE, 2002). Considerando este fato, e ainda que o Brasil é detentor de praticamente um terço das espécies vegetais do mundo, é imprescindível o desenvolvimento de pesquisas nesta área.

A *Calendula officinalis* (ASTERACEAE), conhecida popularmente como calêndula, é uma planta herbácea, nativa de países do Mediterrâneo e, é utilizada historicamente para adicionar cor e aroma a alguns alimentos. Além disso, a calêndula é muito utilizada na medicina popular na forma de infusões, de extratos e pomadas preparadas com suas pétalas, possui atividade farmacológica como: agente anti-inflamatório, antitumoral e cicatrizante (RAMOS *et al.*, 1998; JOCHMANN *et al.*, 2000; BLUMENTHAL, 2000). Efeitos antiviral e imunoestimulante, também, foram citados. Atividade contra o vírus HIV foi observada, sendo que os extratos de *C. officinalis* inibiram

significativamente a replicação do vírus HIV-1 e reduziram a transcriptase reversa de forma dose dependente (KALVATCHEV *et al.*, 1997).

Vários estudos foram realizados com os extratos de calêndula, com o objetivo de identificar os compostos presentes. Os resultados indicaram que as características terapêuticas dos extratos são ocasionadas, basicamente, pela presença de compostos como triterpenos, flavonóides, óleos essenciais e sesquiterpenos (WILKOMIRSKI, 1986; NEWALL *et al.*, 1996; ZITTER-EGLESEER *et al.*, 1997). É, portanto, importante determinar a composição química da calêndula cultivada no Brasil e compará-la com a calêndula cultivada em outros países, considerando os possíveis efeitos do meio ambiente sobre a mesma.

Outra planta que pode ser considerada uma das mais utilizadas como erva medicinal é a *Equisetum arvense*, conhecida como cavalinha. A população a utiliza como diurético, adstringente e redutor de hemorragias. É também, usada para alguns casos de inflamação e para hiperplasia benigna de próstata (DANIELSSKI *et al.*, 2001).

Estudos publicados sobre a cavalinha descrevem alguns compostos isolados, principalmente do extrato metanólico da planta, como o ácido di-*E*-cafeoil-meso-tartárico (VEIT *et al.*, 1991) e o ácido 5-cafeoil-shikimico (VEIT *et al.*, 1992). Ácidos graxos dicarboxílicos ramificados (C₁₀ – C₃₅) foram extraídos dos esporos da cavalinha (REZANKA, 1998), e, ainda, constituintes fenólicos como ácido cafêico, flavonóides e estirilpironas (HAUTEVILLE e CHOPIN, 1981; VEIT *et al.*, 1995a; VEIT *et al.*, 1995b; VEIT *et al.*, 1995c; BECKERT *et al.*, 1997).

II.3 – Justificativa

A iniciativa deste trabalho foi de comparar as técnicas de extração convencional com solventes orgânicos (n-hexano e diclorometano) e a extração com fluido supercrítico (CO₂) de duas espécies, calendula e cavalinha, utilizadas como medicinais. A necessidade de determinar qual o melhor método para obter a relação quantidade/variedade, de metabólitos secundários, possam ser os responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas justificaria a motivação deste trabalho.

A comparação entre os extratos foi feita com base no perfil cromatográfico (cromatografia gasosa) e a identificação dos compostos foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, que é uma técnica bastante confiável e muito eficiente.

II.4 – Material e Métodos

II.4.1 – Material Vegetal

O material vegetal foi adquirido da Chamel Indústria e Comércio (Campo Largo, PR), que forneceu a amostra seca. As amostras, de *Equisetum arvense* e *Calendula officinalis* foram armazenadas em freezer doméstico a temperatura de 10°C negativos, onde foram mantidas até sua utilização.

Para obtenção de maior eficiência na extração, as amostras foram moídas em moedor portátil (Mellita), expondo-se ao solvente o material vegetal finamente moído, facilitando e aumentando as taxas de extração.

II.4.2 – Metodologia de Extração

II.4.2.a – Extração por Fluido Supercrítico (FSC)

O procedimento experimental para as extrações das oleoresinas da calêndula e cavalinha foram baseados na metodologia descrita por JOCHMANN (2000).

Cerca de 40g da planta foram empacotadas no extrator com o auxílio de um “socador” de aço inox. Este procedimento foi padronizado, colocando-se a matéria-prima e alternando-se o “socador”, a fim de evitar-se caminhos preferenciais no leito, promovendo assim uma extração mais uniforme.

Os detalhes da operação da unidade de extração podem ser assim descritos: o cilindro de CO₂ é aberto e, com o auxílio da válvula reguladora, o pulmão é pressurizado. O banho termostático é então acionado para o resfriamento do tanque pulmão e do cabeçote da bomba. Com o leito de partículas já formado e a válvula micrométrica fechada, conecta-se o extrator ao equipamento e ao banho termostático, que controla a sua temperatura de operação.

Após alcançada a temperatura desejada, em torno de 5°C no banho termostático (frio), a válvula globo na saída do tanque pulmão é aberta para a verificação de possíveis vazamentos na linha (a não existência destes permite que a bomba seja acionada). Quando a pressão de operação é alcançada,

inicia-se a extração. Assim, depois de estabelecidas as condições de trabalho, o sistema permanece em repouso por um tempo pré-determinado, denominado tempo estático. Este tempo de contato entre a matriz sólida e o solvente, promove uma maior solubilização do extrato aumentando, assim, as taxas de extração.

A fita de aquecimento é acionada e, após transcorrido o tempo estático, inicia-se a extração propriamente dita, com a abertura da válvula micrométrica. A coleta do extrato foi realizada em frascos de vidro cor âmbar conectados à linha de extração, após a válvula micrométrica, em intervalos de tempo pré-determinados. Foram coletadas 5 amostras em intervalos de 10 minutos cada e, após este período, o intervalo foi aumentado para 30 minutos, até o final das extrações.

Na saída do extrator, após a válvula micrométrica, o CO₂ foi separado do extrato nos frascos coletores por simples despressurização e, por meio de um bolhometro, a vazão de solvente empregado no processo de extração.

II.4.2.b – Extração por Solventes Orgânicos

Na extração pelo método convencional, a planta foi macerada a frio, para evitar degradação térmica.

A maceração foi feita com 103,5 g de flores trituradas de calêndula e, para a cavalinha, foram utilizadas 330,0 g da planta inteira, também triturada. O solvente utilizado para a maceração de ambas as plantas foi o metanol (3,5 L para cada maceração) e o tempo de extração foi de cinco e dez dias, para a cavalinha e calêndula, respectivamente. O extrato resultante foi evaporado a pressão reduzida até 10 a 20% do volume inicial, para obter-se o extrato bruto. O extrato bruto foi, então, fracionado por extração líquido-líquido, com quatro solventes de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, utilizando-se, um funil de separação.

II.4.3 – Análise Cromatográfica e Identificação dos Componentes dos Extratos

As análises de cromatografia gasosa foram feitas em um cromatógrafo (SHIMADZU, Modelo CGS – 14A, Kioto, Japão) equipado com uma coluna 25 m x 0,25 mm d.i. (0,3 µm de espessura do filme interno), com fase estacionária de polimetilsiloxano (coluna LM-1, de L&M, São Paulo, Brasil). As amostras foram injetadas com divisão de fluxo de 1/20 (1,0 µL foi o volume injetado), com detector por ionização de chama (FID) à temperatura de 320°C, e a programação do forno da coluna foi de 40°C a 8°C/min até 310°C (isoterma final de 10 min) para as análises das amostras de calêndula. Para as análises de amostras de cavalinha, foi utilizada a seguinte programação: 40°C com taxa de aquecimento de 6°C/min até 170°C, seguindo uma taxa de aquecimento de 8°C/min até 305°C com isoterma final de 5 min. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à 2 mL/min de fluxo. Os dados foram analisados empregando-se o programa Cromatografia (MICROQUÍMICA). Os principais componentes das oleoresinas foram identificados por cromatografia gasosa espectrometria de massas (SHIMADZU, Modelo GCMS-QP2000A, Kioto, Japão). A programação utilizada foi a mesma descrita para as análises de CG. A identificação dos componentes das oleoresinas foi feita por comparação com a base de dados para produtos naturais (NIST Mass-Spectral Library with windows search program – V2) e informações da literatura (DELLA LOGGIA *et al.*, 1994; BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1997; RONYAI *et al.*, 1998).

II.5 – Resultados e Discussão

II.5.1 – *Calendula officinalis*

Este trabalho foi desenvolvido em conjunto com o Laboratório de Extrações por Fluido Supercrítico no Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC.

A oleoresina de calendula é uma mistura complexa de vários componentes, que tem sido muito utilizada na fitoterapia. O extrato obtido com CO₂ apresenta alta viscosidade e coloração marrom esverdeado.

Como a maioria dos compostos presentes nos extratos de calendula, descritos na literatura são compostos complexos e de alto peso molecular (~300 kg/kgmol), com uma grande viscosidade, a utilização de solventes com alta densidade (acima do ponto crítico) é justificada (DELLA LOGGIA *et al.*, 1994; BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1997; RONYAI *et al.*, 1998; VOLPATO *et al.*, 1999).

A FIGURA 34, mostra o cromatograma por CG para a extração por fluido supercrítico de *Calendula officinalis* à temperatura de 20°C e pressão de 188 bar. Para avaliar o efeito da pressão na composição do extrato, as amostras de calêndula foram também, extraídas com CO₂ a 20°C e 120 bar, e foram também, analisadas por CG. Os resultados para os componentes identificados estão apresentados na TABELA 24 (número dos sinais indicados de acordo com a FIGURA 34) e seus respectivos pesos moleculares. O efeito da pressão na composição do extrato supercrítico é mostrado na TABELA 24, com a área dos sinais para os extratos a 120, 150 e 188 bar. Os resultados apresentaram sensíveis diferenças na composição para estas três pressões. É possível observar um enriquecimento do extrato com o aumento da pressão, principalmente para os componentes identificados entre 30 e 35 min, em relação ao tempo de retenção, especialmente para os sinais 8, 10 e 13. Isto indica um aumento na concentração de componentes de alto peso molecular com o aumento da pressão, o que pode ser explicado pelo efeito da densidade do solvente. Extrações com altos níveis de densidade indicaram baixa seletividade e alto poder de solvatação.

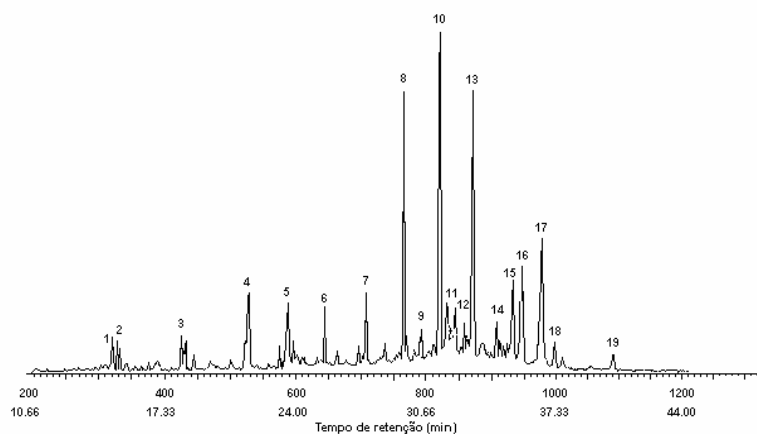


Figure 34. Resultados da análise de CG-EM da oleoresina de *C. officinalis* obtida por extração por FSC a 20°C e 188 bar.

TABELA 24. Oleoresina da *C. officinalis* extraída por FSC: números dos sinais equivalentes ao cromatograma, compostos identificados, peso molecular e percentagem de área dos sinais para as amostras a diferentes pressões.

Sinal	Composto	Peso Molecular (kg/kgMol)	Área do Sinal (%)		
			120 bar	150 bar	188 bar
4	Ac Caprílico	144	1,5290	3,0690	3,3010
8	2,21-Dimetil-Docosano	138	5,8430	5,4990	8,5520
9	11-Butil-Docosano	366	1,1010	--	1,4250
10	11-Pentil-Heneicosano	366	6,0870	8,1840	12,1530
13	1-Heptacosanol	396	2,2940	9,2490	10,3520
14	Estigmasterol	412	1,7130	1,8760	2,4010
15	Eritrodiol	442	3,4260	4,7310	3,4510
16	Taraxasterol	426	2,8750	2,8980	3,8260

Os resultados obtidos com FSC foram também comparados com as análises dos extratos obtidos por extração convencional, o qual foi feito em MeOH e fracionado com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Os rendimentos das frações são expressas em relação ao peso das flores secas e trituradas utilizadas para preparação do extrato bruto. Para cada fração obtive-

se o rendimento de 7,195 g, 23,29 g, 0,957 g e 22,72 g respectivamente. Os rendimentos da extração convencional são apresentados na TABELA 25, onde são comparados com as extrações por FSC.

TABELA 25. Comparação dos rendimentos dos extratos obtidos por meio de extração convencional e por fluido supercrítico, a partir de flores secas e trituradas de *C. officinalis*.

Extração Convencional		Extração por FSC	
Solvente	Rendimento w/w (%)	Condições (bar/°C)	Rendimento (%)
Hexano	6,94	120 / 20	2,63
Diclorometano	22,4	150 / 40	2,85
Acetato de Etila	0,923	188 / 20	3,31
Butanol	21,9		

O alto rendimento apresentado pela fração diclorometano (22,4%) é provavelmente devido à presença das ceras (graxas), presentes nas flores, bem como clorofila e outros pigmentos. Para as condições avaliadas neste trabalho, o resultado obtido para o rendimento por FSC, de 3,5%, foi comparável com o rendimento da fração hexânica, o que é muito satisfatório.

A composição da oleoresina de calêndula varia de acordo com o processo de extração. As amostras obtidas pelos solventes orgânicos hexano e diclorometano foram também, analisados por CG e mostraram que somente os componentes 1 (14,769% em área de pico), 3 (20,429% a. p.), 4 (8,790% a. p.) e 10 (18,604% a. p.) para a fração hexânica e, 1 (6,017% a. p.), 3 (3,203% a. p.), 4 (21,795% a. p.), 5 (31,587% a. p.), 6 (3,593% a. p.) e 10 (4,534% a. p.) para a fração diclorometano (numeração dos sinais de acordo com a FIGURA 34), foram detectados, mostrando uma variedade muito menor de componentes do que aqueles obtidos com a extração por FSC. O perfil cromatográfico para a amostra extraída por FSC apresenta uma maior similaridade com o extrato obtido com diclorometano do que com o obtido com hexano.

A composição da oleoresina de calêndula avaliada (processos convencional e FSC) é significativamente diferente quando comparada com os dados da literatura. A TABELA 26, compara a composição dos componentes identificados nos extratos deste ensaio (FSC a 188 bar e 20°C, hexano e diclorometano) com os dados da literatura. Os resultados obtidos para as flores cultivadas no Brasil, apresentam principalmente hidrocarbonetos alifáticos como

o dimetil-2,21-docosano, e três triterpenos, o estigmasterol, eritrodiol e taraxasterol, (substâncias de alto peso molecular), enquanto que os componentes apresentados pela literatura para flores cultivadas na Europa, ocorreu basicamente triterpenos (do longispinogenina até o taraxasterol). De acordo com ZITTER-EGLEER e colaboradores (1997), os principais compostos do extrato de calêndula são triterpenóides, diferente dos dados encontrados neste trabalho, como mostra a TABELA 26. Contudo, isto pode ser explicado por diferenças no material coletado (flores), como a época do ano, clima, adubação, etc. E principalmente, pelo local de coleta, solo e, possivelmente, pelo uso de diferentes variedades da planta.

TABELA 26. Composição integrada dos extratos obtidos por meio de extração convencional (hexano e diclorometano) e extração por fluido supercrítico a partir de *C. officinalis* e dados de literatura.

Sinais	Compostos	FSC (%a.p.)	Hexano (%a.p.)	Diclorometano (%a.p.)	Literatura (%a.p.)
4	Ac Caprílico	3.3010	8.790	21.795	-
8	2,21-Dimetil-Docosano	8.5520	-	-	-
9	11-Butil-Docosano	1.4250	-	-	-
10	11-Pentil-Heneicosano	12.1530	18.604	4.534	-
13	1-Heptacosanol	10.3520	-	-	-
14	Estigmasterol	2.4010	-	-	-
15	Eritrodiol	3.4510	-	-	-
	Longispinogenina	-	-	-	16.59 ^a
	Lupenetriol	-	-	-	20.86 ^a
	Heliantriol F	-	-	-	15.19 ^a
	Heliantriol C	-	-	-	30.13 ^a
	Ursatriol	-	-	-	17.24 ^a
	Helianol	-	-	-	58.5 ^b
	Damaradienol	-	-	-	5.0 ^b
	β -Amirina	-	-	-	23.4 ^b
	Cicloartenol	-	-	-	0.3 ^b
	Tirucala-7,24-dienol	-	-	-	0.5 ^b
	α -Amirina	-	-	-	14.7 ^b
	Lupeol	-	-	-	15.6 ^b
	24-Metilenecicloartanol	-	-	-	0.2 ^b
	ψ -Taraxasterol	-	-	-	75.5 ^b
	Taraxasterol	3.8260	-	-	5.9 ^b
	Outros	31.3590			0.4 ^b

a. WILKOMIRSKY, 1986 - % w/w para os componentes identificados.

b. AKIHISA *et al.*, 1996.

II.5.2 – *Equisetum arvense*

Este trabalho foi desenvolvido em conjunto com o Laboratório de Extrações por Fluido Supercrítico no Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC.

A oleoresina da cavalinha tem um aspecto viscoso e coloração esverdeada. O resultado da análise de CG do extrato feito por fluido supercrítico é apresentado na FIGURA 35. A amostra obtida a temperatura de 40°C e 200 bar de pressão, foi coletada nos primeiros 100 min de extração. A TABELA 27, apresenta os compostos identificados na oleoresina, os respectivos tempos de retenção e seus pesos moleculares. Os compostos listados na TABELA 27, indicam a presença de uma série de componentes com características não polares, principalmente, porque a extração foi feita com CO₂ no estado supercrítico.

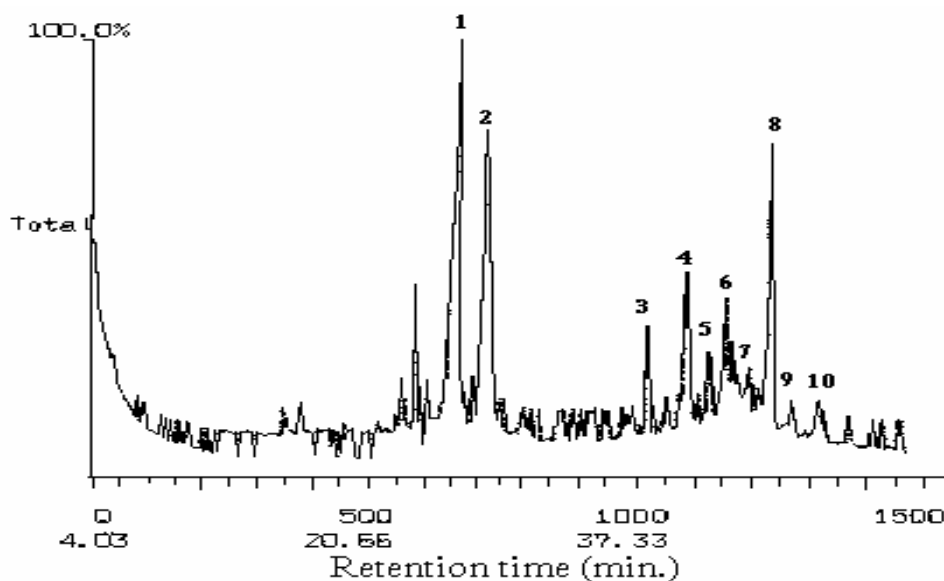


FIGURA 35. Cromatograma da análise de oleoresina de *E. arvensis* por cromatografia gasosa (amostra obtida a 200 bar e 40 °C).

Entre os compostos identificados, são encontrados alcanos como o n-heicosano, ácidos graxos como o ácido dodecanóico, metil ésteres tal como, o 3-noninoato de metila, triterpenos esteroidais, como o ergosta-4,7,22-trien-3-ona e esteróides anabolizantes, como a metenolona.

TABELA 27. Componentes identificados na oleoresina de *E. arvensis*. Os números dos sinais estão de acordo com a FIGURA 35. São apresentados o peso molecular e o tempo de retenção para cada composto.

Pico	Composto	T _R ¹ (min)	Peso Molecular (kg/kgmol)
1	Ácido dodecanóico	26.36	212
2	3-Noninoato de metila	28.73	168
3	3,6-Dimetil decano	38.06	170
4	Heneicosano	40.26	296
5	26-Hidroxicolesterol	41.56	402
6	Ergosta-4,7,22-trien-3-ona	42.60	394
7	8,12-Dimetil-4Z,8E,12E-octadecatrieno	43.93	276
8	Metenolona	45.26	302
9	26,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol-3,7,11,15-tetrametil-acetato(E,E,E)	46.36	332
10	Z-13-Octadecenal	47.90	266

¹T_R – tempo de Retenção.

Resultados preliminares da extração por FSC, indicaram a presença de heneicosano-11-decila, eicosano-10-heptil-10-octil e 17,21-dimetilheptatriacontano. Estes componentes identificados não foram mais detectados nas análises seguintes, provavelmente, devido a diferenças na composição do material vegetal.

A influência da densidade do solvente na composição do extrato está apresentada na TABELA 28. Os resultados estão apresentados em fração molar e em percentagem de área do sinal cromatográfico para os componentes. A FIGURA 36 apresenta a relação entre os componentes identificados com o aumento da densidade do solvente. O ácido dodecanóico (composto 1) foi

detectado somente sob a pressão de 200 bar e sua concentração aumenta com a temperatura. Para os esteróides ergosta-4,7,22-trien-3-ona (composto 6) e a metanolona (composto 8) é observado o efeito da pressão de vapor do soluto. A concentração do composto 6 decresce com a densidade do solvente e aumenta com o aumento da temperatura. Para a metanolona, ocorreu um aumento na concentração com o aumento da temperatura, a pressão de 120 bar, e o decréscimo a pressão de 200 bar. A relação dos componentes identificados é complexa porque o jogo de efeitos da densidade do solvente e a pressão de vapor do soluto atuam em direção oposta à extração do soluto. Isto pode indicar que existe uma região de intersecção entre as temperaturas e pressões estudadas neste trabalho.

TABELA 28. Efeito da densidade de CO₂ na composição da oleoresina de *E. arvensis*. A composição é expressa em fração molar e por percentagem da área dos sinais.

Picos	Fração Molar T(°C)/P(bar)				% Área Pico T(°C)/P(bar)			
	40/120	30/120	40/200	30/200	40/120	30/120	40/200	30/200
1	-	-	0.1430	0.0349	--	--	0.1731	0.0474
2	-	-	0.1403	0.0436	--	--	0.2145	0.0746
3	0.0302	0.0165	0.0161	5.9941e ⁻³	0.0532	0.0295	0.0244	0.0102
4	0.0750	0.0285	0.0419	0.0452	0.0759	0.0290	0.0364	0.0439
5	0.0179	--	9.4101e ⁻³	5.7909e ⁻³	0.0134	--	5.9844e ⁻³	4.1606e ⁻³
6	0.0618	0.0489	0.0334	0.0106	0.0470	0.0374	0.0218	7.7327e ⁻³
7	0.0258	--	0.0178	8.4324e ⁻³	0.0281	--	0.0166	8.7880e ⁻³
8	0.2198	0.1343	0.0877	0.1794	0.2179	0.1340	0.0746	0.1707
9	0.0124	9.7835e ⁻³	0.0123	0.0174	0.0112	8.8823e ⁻³	9.5141e ⁻³	0.0150
10	0.0108	5.8285e ⁻³	0.0145	7.8228e ⁻³	0.0122	6.6406e ⁻³	0.0123	8.4735e ⁻³
NI	0.5463	0.7561	0.4836	0.6409	0.5411	0.7545	0.4108	0.6091

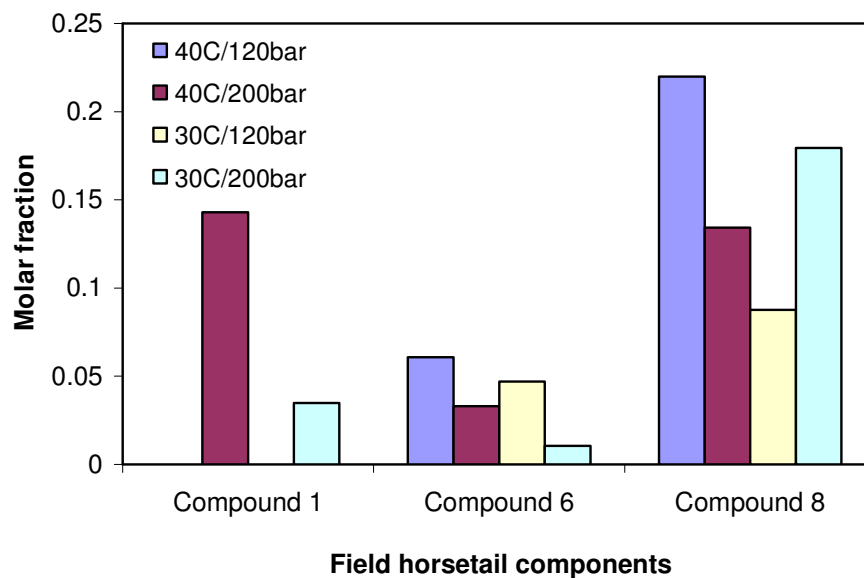


FIGURA 36. Efeito da densidade do solvente na composição da oleoresina de *E. arvensi*.

O efeito do tempo de extração na composição da oleoresina foi também, investigada e os resultados estão apresentados na TABELA 29. As amostras, obtidas a pressão de 200 bar e 40°C de temperatura, foram divididas em três partes, a inicial (de 0 a 100 min do tempo de extração), a intermediária (de 100 a 270 min) e a porção final (de 270 a 380 min). A relação dos componentes (1), (2), (4) e (8) com o tempo de extração é apresentado na FIGURA 37.

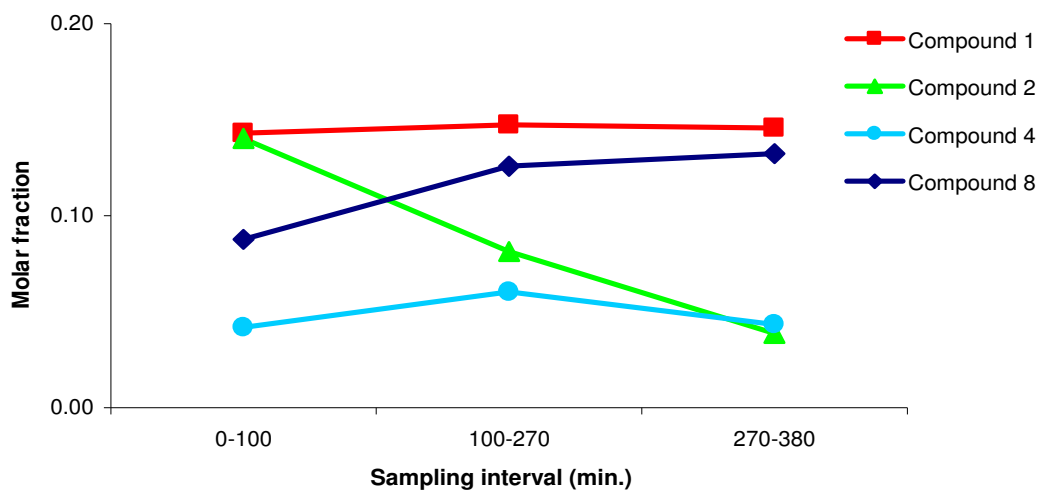


FIGURA 37. Efeito do tempo de extração na composição da oleoresina de *E. arvensis*, onde: (1) ácido dodecanóico; (2) 3-noninoato de metila; (4) heneicosano; (8) metinolona.

As diferentes relações são observadas na FIGURA 37 são: a fração molar do composto (1) não muda com o tempo de extração, enquanto que, o composto (2) decresce e aumenta o composto (8). Para o heneicosano (4), a fração molar aumenta acima dos 270 min e então decresce, possivelmente, por ter sido totalmente extraído ou então, por interação dos componentes restantes na matriz vegetal.

TABELA 29. Efeito do tempo de extração na composição da oleoresina de *E. arvensi*.
Composição é expressa em fração molar para a amostra obtida a 40°C e 200 bar.

Pico	Composto	Fração Molar		
		0-100 min	100-270 min	270-380 min
1	Ácido dodecanóico	0.1430	0.1473	0.1457
2	3-Noninoato de metila	0.1403	0.0814	0.0387
3	3,6-Dimetil decano	0.0161	0.0208	0.0191
4	Heneicosano	0.0419	0.0603	0.0434
5	26-Hidroxicolesterol	9.4101e ⁻³	0.0126	0.0144
6	Ergosta-4,7,22-trien-3-ona	0.0334	0.0457	0.0503
7	8,12-Dimetil-4Z,8E,12E- octadecatrieno	0.0178	0.0251	0.0312
8	Metenolona	0.0877	0.1258	0.1324
9	26,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol- 3,7,11,15-tetrametil-acetato(E,E,E)	0.0123	--	--
10	Z-13-Octadecenal	0.0145	0.0116	--
NI	Não identificados	0.4836	0.4692	0.5249

A extração por fluido supercrítico foi comparada com a extração convencional, empregando-se metanol para obter o extrato bruto e, em seguida, o extrato foi fracionado com hexano e diclorometano. Os resultados dos rendimentos para os diferentes processos de extração estão apresentados na TABELA 30. O maior rendimento foi obtido com a extração por FSC à 40°C e 200 bar (1,10% w/w). O rendimento obtido com a fração hexânica foi comparável ao da extração por FSC. Assim como, o rendimento obtido com diclorometano, um solvente de polaridade intermediária, foi comparável ao obtido com CO₂ supercrítico a 200 bar e 30°C.

TABELA 30. Rendimentos obtidos nos diferentes processos de extração.

Extração com Solvente Orgânico		Extração por FSC	
Solvente	Rendimento w/w (%) ¹	Condições (bar/°C)	Rendimento (%) ¹
Hexano	0,31	120/30	0,35
Diclorometano	0,78	120/40	0,34
		150/30	0,37
		150/40	0,39
		200/30	0,76
		200/40	1,10

¹- Percentagem, em base seca.

A influência nos processos de extração na composição da oleoresina de *E. arvensis* e os resultados da composição são comparados com dados da literatura (VEIT *et al.*, 1995 a,b,c; BECKERT *et al.*, 1997).

Na TABELA 31, é apresentada uma comparação entre as composições da oleoresina extraída com FSC (40°C / 200 bar), com hexano e com diclorometano, a partir do material vegetal cultivado no Brasil, e com dados da literatura que utilizaram material vegetal da Ásia e Europa.

Alcanos, ácidos graxos, metil ésteres e triterpenos esteroidais, componentes apolares detectados no extrato por FSC, não foram encontrados nas frações hexânica e de diclorometano. Os resultados da literatura indicam a presença de ésteres do ácido cafeico, mono e di-cafeoil do ácido chiquímico e estilpironas (BECKERT *et al.*; 1997) e ácido chicórico, di-E-cafeoil do ácido tartárico (VEIT *et al.*; 1995). Estes resultados foram obtidos de amostras analisadas por CLAE. O procedimento de extração foi distinto daquele por nós utilizado.

A comparação da oleoresina extraída neste ensaio, com os dados da literatura indicaram uma grande diferença na composição. As características dos

componentes identificados neste trabalho são apolares, basicamente devido as metodologias de extração e as técnicas de análise.

Por outro lado, algumas amostras de cavalinha cultivadas na Europa foram extraídas com metodologia semelhante a utilizada neste trabalho e analisada por CG-EM. Os resultados mostraram a presença de ácidos dicarboxílicos com longas cadeias carbonílicas (acima de C₁₀) e ésteres metílicos (dos ácidos 14-metilnonacosanedioico e 14,15-dimetiltriacontanedioico) que apresentam polaridades semelhantes aos componentes identificados neste trabalho.

Estes resultados mostram a importância da escolha da metodologia a ser utilizada. Contudo, ainda assim, existe uma clara diferença entre os componentes relatados pela literatura e os por nós identificados, sugerindo que, os fatores climáticos e a estocagem da planta, entre outros fatores, influenciaram muito na composição química da planta que está sendo estudada.

TABELA 31. Comparação dos resultados da extração por FSC (200bar, 40°C e 120bar, 30°C), hexano, diclorometano e dados da literatura (percentagem da área do sinal).

Composto	T _R (min)*	Extração por FSC		Hexano	Diclorometano	Literatura
		200/40 ¹	120/30 ¹			
Ácido dodecanóico	26.36	17.070	-	64.992	67.468	
3-Noninoato de metila	28.73	21.150	-	-	-	
3,6-Dimetil decano	38.06	2.405	2.792	-	-	
Heneicosano	40.26	3.585	2.745	-	-	
26-Hidroxicolesterol	41.56	0.590	-	-	-	
Ergosta-4,7,22-trien-3-ona	42.60	2.149	3.541	-	-	
8,12-Dimetil-4Z,8E,12E-octadecatrieno	43.93	1.635	-	-	-	
Metenolona	45.26	7.354	12.673	-	-	
26,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol-3,7,11,15-tetrametil-acetato(E,E,E)	46.36	0.938	0.840	-	-	
Z-13-Octadecenal	47.9	1.215	0.628	-	-	
Éster do ácido cafeico						0.3-1.4mg g ⁻¹ ^b
Mono e di-cafeoil-meso-ácido tartárico						1.5-3.4mg g ⁻¹ ^b
Ácido 5-O-cafeoilshiquímico						1.5-3.4mg g ⁻¹ ^b
Estilpironas						2-6mg g ⁻¹ ^b
Não identificados		40.499	71.351	31.315	26.916	

*T_R (Tempo de Retenção) ^b – BECKERT et al., 1977: HPLC

¹ – bar/°C

PARTE III – CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados, referentes tanto aos estudos químicos como aos farmacológicos, é possível propor as seguintes conclusões:

a) *Wedelia paludosa*:

Foi possível isolar e identificar sete compostos: ácido caurenóico, luteolina, ácido cafêico, ácido protocatético, coreopsina, butina e buteína. Estes permitiram obter um perfil químico da planta. O controle de qualidade foi feito com as diferentes partes da planta nas quatro estações do ano, estabelecendo-se o ácido caurenóico como fitomarcador padrão para as frações apolares, tendo este apresentado uma grande variação na sua concentração. A máxima concentração de ácido caurenóico foi observada nas raízes, durante o outono. Isto pode ser atribuído a que este composto, no inverno, participa como precursor das giberilinas (fitohormônios), que atuam no crescimento das plantas, principalmente no seu florescimento. Deixando claro a importância deste tipo de estudo para plantas que são utilizadas como medicinais.

Tanto o extrato metanólico bruto quanto uma fração semipurificada de *Wedelia paludosa*, onde estão presentes, os compostos butina e buteína, demonstraram interessante efeito antinitrosante frente à morfolina.

b) *Adiantum cuneatum*:

Foram isolados quatro compostos, todos triterpenos esteroidais: filiceno, filicenal, adiantona e isoadiantol, já descritos na literatura. O filiceno, que foi o composto que apresentou os melhores resultados nos testes farmacológicos, estava presente em maior concentração nas folhas, durante o inverno. Dentre os extratos, frações e compostos da *A. cuneatum* testados no modelo de hiperplasia benigna de próstata (HBP) induzida em ratos, o extrato metanólico bruto e a fração supercrítica foram os que apresentaram o melhor efeito anti-hiperplásico. Este efeito ficou evidente na redução de parâmetros como: nível tecidual de testosterona, de dihidrotestosterona e peso da próstata. Os resultados obtidos indicaram que o efeito do extrato metanólico bruto sobre a HBP demonstrou que é proporcional à dose administrada. Por outro lado, é preciso salientar que o filiceno apresentou relação inversa de concentração versus atividade antihiperplásica. O

efeito do extrato metanólico bruto e da fração supercrítica permitem sugerir que o mecanismo de ação dos mesmos poderá estar relacionado com a inibição da 5 α -redutase. Possivelmente, segundo estes resultados, os extratos devem apresentar uma melhor atividade devido ao sinergismo dos compostos que neles estão presentes. O extrato metanólico bruto e a fração acetato de etila apresentaram atividade diurética quando comparados com os controles padrões (água e hidroclotiazida), sendo que a fração acetato de etila foi a que resultou na atividade diurética mais significativa. A fração hexânica da *A. cuneatum* apresentou intenso efeito analgésico, tanto no modelo de dor induzido por ácido acético quanto no modelo da formalina, sendo que para o primeiro modelo o efeito foi dose-dependente. Os compostos filiceno e filicenal também, demonstraram um efeito analgésico interessante quando comparados aos padrões ácido acetilsalicílico e acetaminofeno.

c) *Calendula officinalis* e *Equisetum arvense*:

Com uma metodologia simples e relativamente rápida, foi possível obter o perfil dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas *E. arvense* e *C. officinalis*. A comparação da composição química da calêndula coletada no Brasil com a coletada na Europa demonstrou ser esta dependente do meio ambiente onde a planta foi cultivada. Comparando-se duas metodologias de extração, a convencional com solventes orgânicos e a por fluído supercrítico, foi possível verificar que a extração por FSC, além de ser mais rápida, é mais seletiva.

Referências

AGETA, H.; IWATA, K. Fern constituents: adipedatol, filicenal and other triterpenoids isolated from *Adiantum pedatum*. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 6069-6074, 1966.

AGTMAEL, M. A. van, EGGELTE, T. A.; BOXTEL, C. J. van. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **TIPS**, v. 20, p. 199-205, 1999.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of *Compositae* and their anti-inflammatory effect. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1255-1260, 1996.

ALVES, M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J. S.; MURTA, M. T.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 61, p. 85-87, 1995.

BAO, Y. T.; LOEPPKY, R. N. Blocking nitrosamine formation with polymers. **Chemical Research Toxicology**, v. 4, p. 382, 1991.

BARTSCH, H.; OHSHIMA, H.; PIGNATELLI, B.; CARMELS, S. Endogenously formed N-nitroso compounds and nitrosating agents in human cancer aetiology. **Pharmacogenetics**, v. 2, p. 227, 1992.

BAUER, R.; TITTEL, G. Quality Assessment of Herbal Preparations as a precondition of Pharmacological and Clinical Studies. **Phytomedicine**, v. 2 n.3, 193-198, 1996.

BECKERT, C.; HORN, C.; SCHNITZLER, J. P.; LEHNING, A.; HELLER, W.; VEIT, M. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p.275-283, 1997.

BERNA, A.; TÁRREGA, A.; BLASCO, M.; SUBIRATS, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 18, p. 227-237, 2000.

BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUSA, M. M. De; SHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85-89, 1998.

BLOCK, L. C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N. L. M.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC. (Compositae). **Pharmazie**, v. 53, p. 716-718, 1998.

BLUMENTHAL, M. Herbal Medicine. Expanded Commission E Monographs. Integrative Medicine Communication. USA, 2000.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Serenoa repens* (Bartram) J. K. Small. **Fitoterapia**, v. 68, p. 99-113, 1997.

BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A Peregrinação de um Pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

BRENDEL, C.; FRUCHART, J. C.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. Transcriptional regulation of cholesterol metabolism. **Medical Science**, v. 15, n. 1, p. 56-62, 1999.

BRINKER, F. An Overview of Conventional, Experimental, and Botanical Treatments of Non-malignant Prostate Conditions. **British Journal Phytotherapy**, v. 3, n. 4, 154-176, 1994.

BUMGARDNER, C. L.; MCCALLUM, K. S.; FREEMEN, J. P. Small ring heterocyclic nitrosamines. **Journal American Chemistry Society**, v. 83, p. 4417, 1961.

CÁCERES, A.; SARAIVA, A.; RIZZO, S.; ZABALA, L.; DE LEON, E.; NAVE, F. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*.2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 36, p. 233-237, 1992.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Qualitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 264-268, 1998.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHALLIS, B. C.; CHALLIS, J. A. **The chemistry of amino, nitroso and nitro compounds and their derivatives**. V. 2. Chichester –New York: John Wiley & Sons, p. 1151, 1982.

CHAN, T. Y. K. Monitoring the Safety of Herbal Medicines. **Drug Safety**, v. 17, n. 4, p. 209-215, 1997.

COLLIER, H. D. J.; DINNIN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in mouse. **Journal Pharmacology**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CORDELL, G. A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L.; KRUSH, A. M.; SILVA, G. V. Volatile constituents of two *Wedelia* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, p. 439-441, 1993.

DAL MAGRO, J.; MEIJIDE, F.; PROVOST, S.; TATO, J. V.; YUNES, R. A. Nitrosation of 2-hydroxyethylpiperidine. **Journal Chemistry Society Perkin translation 2**, v. 2, p. 1192-94, 2001.

DANIELSSKI, L.; SILVA, L. M. A. AND FERREIRA, S. R. S. Group contribution methods applied to determination of phytoterapeutic component properties. *In: Proceedings of the 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering*. Hamburg, Germany, 2001.

DE FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**, v. 63, p. 417-440, 1992.

DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S. T.; ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JÚNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DIAS, A. C. P.; TOMÁZ-BARBERÁN, F. A.; FERNANDES-FERREIRA, M.; FERRERES, F. Unusual Flavonoids Produced by Callus of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1165-1168, 1998.

DREIKON, K.; RICHTER, R.; SCHONHOFER, P. S. Konservative, nicht hormonelle behandlung der benignen prostatahyperplasie. **Urologe**, v. 28, p. 8-16, 1990.

DUKE, J.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**, CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, 1994.

ENGLERT, J. Harnischfeger, G.; Diuretic action of aqueous *Orthosiphon* extract in rats. **Planta Medica**, v. 58, p. 237-238, 1991.

FERREIRA, D. T.; LEVORATO, A. R.; FARIA, T. DE J.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. **Natural Product Letters**, v. 4, p. 1-7, 1994.

GARATTINI S.; PAOLETTI R.; BIZZI L.; GROSSI E.; VERTUA R. In: **Drugs Affecting Lipid Metabolism**, ed. by Garattini S. and Paoletti R., p.144, Elsevier, Amsterdam, 1961.

GELLER, J. Pathogenesis and medical treatment of benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, v. 2, p. 95-104, 1989.

GOOSSENS, H.; DUREN, R. R.; LEEUW, J. W. DE; SCHENCK, P. A. Lipids and their mode of occurrence in bacteria and sediments – II. Lipids in the sediment of a stratified, freshwater lake. **Organic Geochemistry**, v. 14, n. 1, p. 27-41, 1989.

GRUENWALD, J. O Crescente Papel das Plantas Mediciniais nos Cuidados de Saúde na Europa. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 151-153, 1998.

GUISALBERTI, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; LAGUNA, G. Y.; WALKOWSKI, A. Diuretic Activity of Mexican *Equisetum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, p. 269-272, 1985.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiología Médica**; 9 ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 918, 1997.

HANSCH, C., MALONEY, P. P., FUJITA, T. **Nature**, v. 194, p.178, 1962.

HAUTEVILLE, M.; CHOPIN, J. Protogenkwanin, a new flavonoid from *Equisetum arvense* L.; **Pergamon Press**, v. 17, p. 377-381, 1981.

HAWTHORNE, S. B.; RIEKKOLA, M. L.; SERENIUS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R.; HATONEN, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 297-308, 1993.

HELLIWELL, C. A. CHANDLER, P. M.; POOLE, A.; DENNIS, E. S. ; PEACOCK, W. J. The CYP88A cytochrome P450, ent-kauranoic acid oxidase, catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 2065-2070, 2001.

HIGASHIMOTO, M.; AKADA, Y.; SATO, M.; KINOUCI, T.; KUWAHARA, T.; OHNISHI, Y. Inhibitory effects of tea extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid on treatment with nitrite in the presence of ethanol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 7, 2000.

HNATYSZYN, O.; MIÑO, J.; GORZALCZANY, S.; OPEZZO, J.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.; ACEVEDO, C. Diuretic activity of an aqueous extract of *Phyllanthus sellowianus*. **Phytomedicine**, v. 6, n.3, p. 177-179, 1999.

HOBDEN, A. N. The Contribution of Molecular Biology to Drug Discovery, *In The Practice of Medicinal Chemistry*, Ed. Wermuth C. G.; Academic Press; Grã-Bretanha, 1996.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical Bioanalysis Chemistry**, v. 373, p. 23-30, 2002.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

HVEDING-BERGSETH, N.; BRUUN, T.; KJOSEN, H. Isolation of 30-nor-21 α -hopan-22-one (isoadiantone) from the lichen *Platismatia glauca*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 8, p. 1826, 1983.

JAFFÉ, R.; WOLFF, G. A.; CABRERA, A. C.; CHITTY, H. C. The biogeochemistry of lipids in rivers of the Orinoco Basin. **Geochemistry et Cosmochimica Acta**, v. 59, n. 21, p. 4507- 4522, 1995.

JOCHMANN, A., HENSE, H. AND FERREIRA, S. R. S. XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA'2000. Fortaleza, Brazil, 2000.

KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 176-180, 1997.

KAU, S. T., KEDDIE, J. R., ANDREWS, D. A method for screening diuretic agents in the rat.. **Journal Pharmacology Methods**, v. 11, p. 67- 75, 1984.

KIM, H. J.; LEE, S. B.; PARK, K. A.; HONG, I. K. Characterization of extraction and separation of rice bran oil rich in EFA using SFE process. **Separation And Purification Technology**, v. 15, p. 1-8, 1999.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a partial review. **Talanta**, v. 53, p. 771-782, 2001.

LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Tanneenbabaum, S. R.; Mechanism of endogenous nitrosation. **Cancer Survive**, v. 8, p. 323, 1989.

LEHOTAY, S. J.; GARCÍA, A. V. Evaluation of different solid-phase traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 69-84, 1997.

LIJINSKI, W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. *In: Cambridge Monographs on Cancer Research*. Cambridge: Cambridge University Press, Chap. 6, 1992.

LINO, C. M.; SILVEIRA, M. I. N. DA. Extraction and clean-up methods for the determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v. 769, p. 275-283, 1997.

LOEPPKY, R. N.; BAO, Y. T.; BAE, J.; YU, L.; SHEVLIN, G. Blocking nitrosamine formation. *In: Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds, Chemistry and Biochemistry*. ACS Symposium Series 553. Washington: ACS, p. 52, 1994.

LOHSOONTHORN, P.; DANCICTA, D. Colorectal cancer risks: a case control study in Bangkok. **Asia Journal Publication Health**, v. 8, p. 118, 1995.

LOWE, F. C.; KU, J. C. Phytotherapy in treatment of BHP: a critical review. **Urology**, v. 48, n. 1, p. 12-20, 1996.

LOZOYA, X. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy – Más que un regreso a La herbolaria tradicional, lo que presenciamos es la revaloración de las mismas plantas medicinales, aunque bajo una interpretación científica rigurosa. **Investigación y Ciencia**, noviembre, 1997.

LU, Y.; FOO, Y.; WONG, H. Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1149-1152, 1999.

MARANDOLA, P.; BOMBARDELLI, E.; MARAZZONI, P. Main phytoderivatives in the management of benign prostatic hyperplasia. **Fitoterapia**, v. 68, p. 195-202, 1997.

MARSILI, R.; CALLAHAN, D. Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of α - and β - carotene in vegetables. **Journal of Chromatography Science**, v. 31, p. 422-428, 1993.

MARTI, F. B. **Química Analítica Qualitativa**; 10 ed., Madri: Canuto, 1988.

MATTHEWS, H. B., LUCIER, G. W. AND FISHER, K. D. Medicinal Herbs in United States: Research Needs. **Environmental Health Perspective**, v. 107, n. 10, p. 1-6, 1999.

McNEAL, J. E.; LEAV, I.; ALROY, J. Differential lectin staining of central and peripheral zones of the prostate and alterations in dysplasia. **American Journal Clinical Pathological**, v. 89, p. 41-48, 1988.

MICHALAK, E. ; **Apontamentos Fitoterápicos da Irmã Eva Michalak**. Ed. EPAGRI, p.60, Florianópolis, Brazil, 1997.

MILES, D. H.; CHITTAWONG, V.; PAYNE, A. M.; HEDIN, P. A.; KOKPOL, U. Cotton Boll Weevil Antifeedant Activity and Antifungal Activity (*Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*) of Extracts of the Stems of *Wedelia biflora*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 38, p. 1591-1594, 1990.

MILLER, L. G. Herbal Medicinals – Selected Clinical Considerations Focusing on Known or Potential Drug-Herb Interactions. **Archive International Medicine**, v. 158, n.9, p. 2200-2211, 1998.

MOLDÃO-MARTINS, M.; PALAVRA, A.; COSTA M. L. B. DA; BERNARDO-GIL, M. G. Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *Sylvestris* aroma. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 18, p. 25-34, 2000.

NAKANE, T.; ARAI, Y.; MASUDA, K.; ISHIZAKI, Y.; AGETA, H.; SHIOJIMA, K. Fern Constituents: Six New Triterpenoid Alcohols from *Adiantum capillus-veneris*. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 4, p. 543-547, 1999.

NAVARRO, E.; ALONSO, J.; RODRIGUEZ, R.; TRUJILLO, J.; BOADA, J. Diuretic action of an aqueous extract of *Lepidium latifolium* L.. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 65-69, 1994.

NEURATH, G. B.; DUNGER, M.; PEIN, F. G. Environmental N-Nitroso compounds: analysis and formation . *In: IARC Scientific Publications N014.*, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 227, 1979.

NEWALL, C. A., ANDERSON, L. A. AND PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicines: a guide for health-care professionals**. London, The Pharmaceutical Press, 1996.

OLDREIRE, C.; ZHAO, K.; PAGANGA, G.; HALLIWELL, B.; RICE-EVANS, C. Inhibition of nitrous acid-dependent tyrosine nitration and DNA base deamination by flavonoids and other phenolic compounds. **Chemistry Research Toxicology**, v. 11, p. 1574, 1998.

OSOSKI, A. L.; LOHR, P.; REIFF, M.; BALICK, M. J.; KRONENBERG, F.; FUGHERMAN, A.; O'CONNOR, B. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 285-298, 2002.

PAGE, J. E., BALZA ,F., NISHIDA ,T., NEIL TOWERS ,G. H. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3437-3439, 1992.

PANDEY, R. C. **Prospecting for Potentially New Pharmaceuticals from Natural Sources**; Xechem, Inc., Research Laboratories, John Wiley & Sons, Inc., 1998.

PAYA, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J. R. S. Interaction of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemistry Pharmacology**, v. 44, p. 205,1992.

PEDROSA, R. C., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R. A. Fármacos x Fitoterápicos: A Necessidade de Desenvolvimento da Indústria de Fitofármacos e Fitoterápicos no Brasil. **Química Nova**, in press.

PIETA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Products**, v. 3, p. 1035, 2000.

PIGNATELLI, B.; DESCORTES, G.; BARTSCH, H. **Actual Chimica**, v.10, p. 33, 1985.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PLETSCH, M. Compostos Naturais Biologicamente Ativos. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**; a. I, n. 4, p. 12-15, jan.-fev. 1998.

RADEMACHER, W. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 501-531, 2000.

RAMOS, A., EDREIRA, A., VIZOSO, A., BETANCOURT, J., LÓPEZ, M. AND DÉCALO, M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 49-55, 1998.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REZANKA, T. Branched and very long-chain dicarboxylic acids from *Equisetum* species. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p.1539-1543, 1998.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biological Medicine**, v. 20, p. 933, 1996.

RONYAI, E., SIMANDI, B., DEAK, A., KERY, A., LEMBERKOVICS, E., KEVE, T. AND LACK, E. Production of marigold extracts with carbon dioxide supercritical fluid extraction. *In: 5th International Symposium on Supercritical Fluids*, v. 2, p. 607, Nice, France, 1998.

ROQUE, N. F., GIANNELLA, T. L., GIESBRECHT, A. M., BARBOSA, R. DE C. S. B. C. **Revista Latinoamericana Quimica**, v. 18, p. 110-111, 1987.

ROTHERWELL, N. J.; SVILLE, M. E.; STOCK, M. J. Effects of feeding a "cafeteria" diet or energy balance and diet induced thermogenesis in four strains y rats. **Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1515-1524, 1982.

SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G. P.; RICE-EVANS, C. A. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archive Biochemistry Biophysical**, v. 322, p. 933, 1995.

SANTOS , A. R. A. , CECHINEL FILHO , V., NIERO , R., PIZZOLATTI , M. G., DELLE MONACHE, F., YUNES , R. A., . CALIXTO ,J. B. **Planta Medica** , v. 61, p.329, 1995.

SCHIMIDT, E.; SCHUMACHER, R. **Chem. Ber.**, v. 54, p. 1414, 1921.

SEWRAM, V.; RAYNOR, M. W.; MULHOLLAND, D. A.; RAIDOO, D. M. The uterotonic activity of compounds isolated from the supercritical fluid extract of *Ekebergia capensis*. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 24, p. 133-145, 2000.

SHIOJIMA, K., ARAI, Y., NAKANE, T., AGETA, H., CAI, S. Q. Fern Constituents: *Adiantum cuneatum*. III. Four New Triterpenoids, 4,23-Bisnor-3,4-secofilic-5(24)-en-3-al, 4,23-Bisnor-3,3-dimethoxy-3,4-secofilic-5(24)-ene, 7 β ,25-Epoxyfern-9(11)-en-8 α -ol and 7 α ,8 α -Epoxyfernan-25-ol. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n.10, p. 1608-1610, 1997c.

SHIOJIMA, K., ARAI, Y., NAKANE, T., AGETA, H. Fern Constituents: *Adiantum cuneatum*. I. Three New Triterpenoids, Glaucanol B Acetate, 7 β ,25-Epoxyfern-8-ene and 25-Norfern-7-en-10 β -yl Formate. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n. 4, p. 636-638, 1997a.

SHIOJIMA, K., ARAI, Y., NAKANE, T., AGETA, H. Fern Constituents: *Adiantum cuneatum*. II. Six New Triterpenoids, Neohop-18-en-12 α -ol, 13-Epineohop-18-en-12 α -ol, Neohop-13(18)-en-19 α -ol, Fern-7-en-25-ol, Fern-9(11)-en-25-ol, and Adian-5-en-25-ol. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n. 4, p. 639-642, 1997b.

SHIOJIMA, K.; AGETA, H. Fern Constituents: Triterpenoids isolated from the leaves of *Adiantum edgeworthii*. Structures of 19 α -Hydroxyadiantone and Fern-9(11)-en-25-oic acid. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 1, p. 45-47, 1994.

SHIOJIMA, K.; SASAKI, Y.; AGETA, H. Fern constituents: Triterpenoids Isolated from the Leaves of *Adiantum pedatum*. 23-Hydroxyfernene, Glaucanol A and Filicenoic Acid. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 2, p. 268-271, 1993.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. The biotransformation of ent-kaur-16-em-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 397-400, 1999.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. Academic Press Inc.; USA, 1992.

SINGER, S. S.; LIJINSKY, W.; SINGER, G. M. Trans-Nitrozoation by aliphatic nitrosamines. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1613, 1977.

SLIMESTAD, R., MARSTON, A., MAVI, S., HOSTETTMANN, K. **Planta Medica**, v. 61, p. 562-563, 1995.

SMITH, R. M.; BURFORD, M. D. Optimization of supercritical fluid extraction of volatile constituents from a model plant matrix. **Journal of Chromatography**, v. 600, p. 175-181, 1992.

SOTTOFATTORI, E.; MARTELLI, A.; BRAMBILLA, G. Effects of mono-, di and tri-hydroxybenzoic acids on the nitrosation of propranolol: structure-activity relationship. **Mutation Research**, v.490, p. 81, 2001.

SOUZA, M. M.; DE JESUS R. A. P.; CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, v. 5, p. 103-107, 1998.

STEFANI, R.; BUZZI, M.; GRAZZI, R. Supercritical fluid extraction of pesticides residues in fortified apple matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 123-132, 1997.

STONER, E. The clinical development of a 5 α -reductase inhibitor, finasteride. **Steroid Biochemical Molecular Biological**, v. 37, p. 375-378, 1994.

STROHL, W. R. The Role of Natural Products in a Modern Drug Discovery Program. **Drugs Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

TAFT, R. W., LEWIS, I. C. **Journal American Chemistry Society**, v. 81, p. 5343, 1959.

TANAKA, K.; HAYATSU, T.; NEGISHI, T.; HAYATSU, H. Inhibition of N-Nitrosation of secondary amines in vitro by tea extracts and catechins. **Mutation Research**, v. 412, p. 91, 1998.

VALLE, J. M. DEL; BELLO, S.; THIEL, J.; ALLEN, A.; CHORDIA, L. Comparison of conventional and supercritical CO₂ – extracted rosehip oil. **Brazilian Journal of Chemistry Engineering**, v. 17, n. 3, p. 335-348, 2000.

VEIT, M.; BAUER, K.; BECKERT, C; KAST, B.; GEIGER, H.; CZYGAN, FRANZ-C. Phenolic Characters of British Hybrid Taxa in *Equisetum* Subgenus *Equisetum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 1, p.79-87, 1995b.

VEIT, M.; BECKERT, C.; HÖHNE, C.; BAUER, K.; GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* sbgenus *Equisetum*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p.881-891, 1995a.

VEIT, M.; GEIGER, H.; KAST, B.; BECKERT, C; HORN, C.; MARKHAM, K. R.; WONG, H.; CZYGAN, F. Styrylpyrone glucosides from *Equisetum*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p.915-917, 1995c.

VEIT, M.; STRACK, D.; CZYGAN. FRANZ-C.; WRAY, V.; WITTE. L. Di-e-caffeoyl-meso-tartaric acid in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p.527-529, 1991.

VEIT, M.; WEIDNER, C.; STRACK, D.; WRAY, V.; WITTE. L.; CZYGAN. FRANZ-C. The distribution of caffeic acid conjugates in the Equisetaceae and some ferns. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p.3483-3485, 1992.

VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R. High Temperature Capillary GC Analysis of Phytopreparations of “Espinheira Santa” (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M. - Celastraceae), a Brazilian Antiulcer Plant. **Chromatographia**, v. 40, n. 5/6, 1995.

VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C. High Resolution Gas Chromatography Analysis of “espinheira santa” (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): Analysis of Crude Drug Adulterations. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 241-244, 1994.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E. DE; LANÇAS, F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ('Guaco') leaves by capillary gas chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 8, p. 74-77, 1997.

VITIELLO, B. *Hypericum perforatum* Extracts as Potential Antidepressants. **Journal Pharmaceutics Pharmacology**, v. 51, p. 513-517, 1999.

VOLPATO, I., BIZZINI, B., LACHGAR, A., COHEN, P. AND GRINGERI, A. IFN α kinoid vaccine in conjunction with tritherapy, a weapon to combat immunopathogenesis in AIDS. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 87-89, 1999.

WAKEHAM, S. G.; CANUEL, E. Fatty acids and sterols of particulate matter in a brackish and seasonally anoxic coastal salt pond. **Advances in Organic Geochemistry**, v. 16, n. 4-6, p. 703-713, 1990.

WHEELER, J. R.; MCNALLY, M. E. Supercritical fluid extraction and chromatography of representative agricultural products with capillary and microbore columns. **Journal of Chromatography Scienci**, v. 27, p. 534-539, 1989.

WILCOX, A. L.; BAO, Y. T.; LOEPPKY, R. N. Pyrroles as effective agents for blocking amine nitrosation. **Chemical Research Toxicology**, v. 4, p. 373, 1991.

WILKOMIRSKI, B. Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers. **Phytochemistry**, v. 24, p. 3066-3067, 1985.

WILKOMIRSKI, B. Subcellular distribution of free and ester-bound triterpene triols in *Calendula officinalis* flowers. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2667-2668, 1986.

WINK, D. A.; GRISHAM, M. B.; MITCHELL, J. B.; FORD, P. C. Direct and indirect effect of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Methods Enzymology**, v. 268, p. 12, 1996.

WRIGHT, A. S.; THOMAS, L. N.; DOUGLAS, R. C.; LAIZIER, C. B.; RITTMASER, R. S. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventive atrophy and apoptosis in the prostate of castrated rat. **Journal Clinical Investigation**, v. 98, p. 2558-2563, 1996.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia – Sua História e Importância. **A. Artigos**, Mar/Abr. 1998.

YAMINI, Y.; ASGHARI-KHIAVI, M.; BAHRAMIFAR, N. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroids drugs, from spiked matrices and tablets. **Talanta**, v. 58, p. 1003-1010, 2002.

ZITTER-EGLSEER, K., SOSA, S., JURENITSCH, J., SCHUBERT-ZSILAVECZ, M., DELLA LOGGIA, R., TUBARO, A., BERTOLDI, M. AND FRANZ, C. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 139-144, 1997.