

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA
PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA DE PLANTAS
SUPERIORES: *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)

MESTRANDA: Juliana A. Severi
ORIENTADOR: Prof. Dr. Wagner Vilegas

ARARAQUARA – SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA
PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA DE PLANTAS
SUPERIORES: *Guapira noxia* (nyctaginaceae)

Juliana A. Severi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wagner Vilegas

ARARAQUARA – SP

2007

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S498u Severi, Juliana Aparecida
Uso sustentável da biodiversidade brasileira prospecção químico-farmacológico de plantas superiores: *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) / Juliana Aparecida Severi. – Araraquara, 2007.
89 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Wagner Vilegas

1.Guapira noxia. 2.Nyctaginaceae. 3.Flavonóides. I.Vilegas, Wagner , orient. .II. Título.

CDD: 547.7



Dissertação desenvolvida no laboratório de Produtos Naturais
do Instituto de Química/ UNESP, com bolsa concedida pela
Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Geraldo e Elza,
que me ensinaram a levar a vida com amor e dignidade
e que sempre se doaram por inteiro,
renunciando seus sonhos para realizar os meus.
À vocês minha eterna gratidão!*

*... Também aos meus irmãos
Marcio, Luiz Henrique, Fabiana, Juninho e Henrique,
uma força sempre presente e apoio aos meus sonhos,
incondicionalmente...*

*“Eu tenho uma espécie de dever.
Dever de sonhar, de sonhar sempre.
Pois, sendo mais que um espectador de mim mesmo,
tenho que ser o melhor espetáculo que posso.
Assim, me construo a ouro e sedas.
Em salas supostas invento palcos, cenários,
para viver o meu sonho,
entre luzes brandas e músicas invisíveis”.*

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Esse trabalho é fruto de uma longa caminhada que teve início muito antes que ele fosse projetado. Caminhada pela qual muitos passaram; caminhada que muitos fizeram comigo, através do estímulo constante e força sempre presente, nos momentos de alegria e, principalmente, nos momentos de dificuldade.

Agradeço ao meu orientador Wagner Vilegas que, com competência, e simplicidade, se fez amigo, acreditou em mim e em meu potencial. Meu crescimento científico é fruto do seu incentivo, sabedoria e confiança. À você sempre terei a agradecer. Também à profa. Lourdes, pelos ensinamentos e constante disposição em me ajudar.

Aos docentes de graduação e pós-graduação da FCFAR e Iq/UNESP que, em maior ou menor grau, contribuíram para minha formação profissional e que sempre estiveram abertos às minhas indagações. Agradeço em especial ao prof. João Aristeu da Rosa, que me descobriu e a partir de então, instigou-me a traçar meu caminho, seja qual fosse, e assim poder oferecer o melhor de mim. Obrigada pelos sábios conselhos e pela oportunidade de termos trabalhado juntos e compartilhado momentos determinantes para minha formação pessoal.

À profa. Hérica e ao Nivaldo, que participaram do meu exame de qualificação, bem como aos prof. Jairo K. Bastos e Luis Claudio Di Stasi, que participaram do meu exame de defesa, os quais contribuíram com sugestões importantes para a melhoria deste trabalho.

Aos funcionários da FCFAR e IQ/UNESP pelo contínuo carinho, atenção e auxílios prestados para realização desse trabalho.

Aos professores e estudantes que compõem o projeto BIOTA, pela realização dos ensaios biológicos e importantes discussões sobre as potencialidades da espécie em estudo.

Ao Marcos, Fer ou, pessoalmente, Macaco, pelo seu amor, carinho e compreensão nos momentos difíceis. Meu amigo e companheiro, sua presença marcante serve como norte da minha vida.... obrigada!

Aos meus queridos amigos de laboratório, mesmo aos que já se foram, com os quais não dividi somente experimentos, mas tive o privilégio de poder dividir minha vida, minhas alegrias, angústias e ideais!

Aos meus estimados amigos da FCFar, Iq, turma 71, do PET, CACIF, MEF, e de tantas outras comissões e atividades estudantis, através das quais os conheci e que cujos nomes não caberiam nestas poucas linhas. Por isso, não deixarei nomes registrados, porque os tenho sempre comigo na lembrança, com suas marcas pessoais... obrigada por fazerem parte da minha história!

Às moradoras de república e "agregadas", que assumiram integralmente o papel de "família" em Araraquara, a quem eu primeiramente recorria quando precisava de ajuda, conselhos, atenção, colo e carinho...

*A amizade não se força, não se compra, não se vende..
ela acontece, lentamente, em silêncio, devagar. Cada um que passa em nossa
vida, passa sozinho, porque é único para nós, mas não vai sozinho e nem nos deixa só.
Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.
Essa é a mais bela responsabilidade de nossa vida,
a prova de que as almas não se encontram por acaso.*

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida

*(...) Ai daqueles e daquelas, entre nós,
que pararem com sua capacidade de sonhar,
de inventar a sua coragem de denunciar e de anunciar;
Ai daqueles e daquelas que em lugar de visitar de vez em quando o amanhã,
o futuro, pelo profundo engajamento com o hoje, com o aqui e o agora;
Ai daqueles que, em lugar desta viagem constante ao amanhã,
atrelarem-se a um passado de exploração e de rotina;
Ai de nós se deixarmos de sonhar sonhos impossíveis...
Os possíveis realizamos,
Os impossíveis só dependem de nós.*

(Paulo Freire, Pedagogia do oprimido)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1- INTRODUÇÃO

1.1- Biodiversidade e uso de Plantas Medicinais 1

1.2- *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) 5

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais 9

2.2- Objetivos específicos 9

3- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 10

4- DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Estudo químico

4.1.1 - Coleta, secagem e pulverização do material vegetal 12

4.1.2 - Preparação dos extratos 12

4.1.3 - Triagem fitoquímica 13

4.1.4 - Quantificação de fenóis totais nos extratos 15

4.1.5 - Perfil Cromatográfico do EMeOH 16

4.1.6 - Fracionamento do EMeOH 18

4.1.7 - Quantificação dos flavonóides totais 19

4.1.8 - Purificação das frações 20

4.1.9 - Elucidação estrutural 23

4.1.10 - Identificação dos flavonóides no perfil cromatográfico 37

4.2- Estudo Farmacológico

4.2.1 - Avaliação da atividade antioxidante 42

4.2.2 - Avaliação da toxicidade aguda 45

4.2.3 - Avaliação da atividade antiulcerogênica 48

4.2.4 - Avaliação da atividade analgésica 57

4.2.5 - Avaliação da atividade antimicrobiana 63

4.2.6 - Avaliação da atividade sobre o sistema imune 69

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS 76

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

ANEXOS

Resumo

Esse trabalho é parte do projeto temático BIOTA-FAPESP: "Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica de Plantas Superiores" e visa contribuir com a caracterização do Bioma-Cerrado do estado de São Paulo, investigando espécies brasileiras de interesse químico-medicinal. Dentre as espécies com particular interesse estão as do gênero *Guapira* (Nyctaginaceae), com informações etnofarmacológicas de uso para problemas estomacais.

G. noxia é conhecida popularmente como "Maria-mole" ou "Capa-rosa" e tem ocorrência no cerrado brasileiro. Essa espécie é utilizada na medicina popular como antiúlcera. Apesar do uso popular, ainda não há informações sobre a composição química e ensaios farmacológicos desta espécie e que cuja caracterização está sendo descrita pela primeira vez.

O extrato metanólico das folhas de *G. noxia* foi fracionado por técnicas cromatográficas convencionais (Permeação em gel, HPLC) e as substâncias resultantes foram identificadas através de métodos espectroscópicos (RMN, IV, UV e EM). Esse trabalho levou à identificação de oito heterosídeos de flavonóides (com três e duas unidades de açúcares) derivados da quercetina, da isorhamnetina e do kaempferol, além da alantoína e de um ciclitol. Além disso, foi estabelecido o perfil cromatográfico do extrato metanólico, juntamente com a quantificação do teor de compostos fenólicos e de flavonóides totais, com vistas à sua completa caracterização química.

O estudo farmacológico do extrato metanólico evidenciou principalmente as atividades antiúlcera, antimicrobiana e imunomodulatória. A presença dos flavonóides e demais compostos fenólicos pode justificar os efeitos biológicos atribuídos à espécie.

Como conclusão, este estudo contribuiu para aprofundar o conhecimento químico-farmacológico sobre *Guapira noxia*, que ocorre no cerrado brasileiro.

⌘ Palavras-chave: *Guapira noxia*, Nyctaginaceae, flavonóides.

Abstract

This work is part of the BIOTA-FAPESP project "Sustainable use of the Brazilian Biodiversity: Chemical and Pharmacological Prospection on Higher Plants", which intends to contribute to improve the knowledge of the biome Cerrado of the State São Paulo, Brazil. Species from the *Guapira* (Nyctaginaceae) genus have special interest, since they are used in folk medicine as antiulcerogenic agent.

G. noxia is known in folk medicine as "Maria-mole" or "Capa-rosa" and occurs naturally in the Brazilian cerrado, being used due to its antiulcerogenic properties. Although the folk use, there is no data about chemical and pharmacological studies on this species. We describe here the first chemical and pharmacological characterization.

The methanolic extract of *G. noxia* leaves was fractionated by chromatography techniques (GPC, HPLC) and the substances were identified by spectrometric methods (NMR, MS, IR, UV). This approach led to identification of eight heterosides (two and three glycosides) of flavonoids derived from quercetin, isorhamnetin and kaempferol, besides one allantoin and one cyclitol. Moreover, we have established the HPLC/UV/DAD chromatographic profile of this extract, as well as the spectrophotometric quantification of phenolic compounds and flavonoids.

Pharmacological investigations showed antiulcerogenic, antimicrobial and immunomodulatory properties of the methanolic extract. The presence of flavonoids and phenolic compounds may probably explain the pharmacological effects of the polar extract of *G. noxia* and their use in folk medicine.

In conclusion, this study contributed to improve the knowledge of the chemistry and pharmacological activities of *Guapira noxia*, an species that occurs in the Brazilian cerrado.

Ⓜ Keywords: *Guapira noxia*, Nyctaginaceae, flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição geográfica do cerrado brasileiro	2
Figura 1.2	Distribuição geográfica das espécies pertencentes à família Nyctaginaceae	5
Figura 1.3	<i>Guapira noxia</i>	8
Figura 4.1	Fluxograma da preparação dos extratos das folhas de <i>G. noxia</i>	13
Figura 4.2	Perfil Cromatográfico do EMeOH das folhas de <i>G. noxia</i>	17
Figura 4.3	Fluxograma representativo do estudo químico de <i>G. noxia</i>	22
Figura 4.4	Estrutura química proposta para Gn1	24
Figura 4.5	Estrutura química de Gn2 - Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1')- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo	25
Figura 4.6	Estrutura química de Gn3 - 3'-metoxiquercetina-3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1')- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo	28
Figura 4.7	Estrutura química de Gn4 - 3'-metoxiquercetina-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1')- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo	28
Figura 4.8	Estrutura dos flavonóides Gn5 e Gn6 isolados do EMeOH de <i>G. noxia</i>	
Figura 4.9	Estrutura dos flavonóides Gn7 e Gn8 isolados do EMeOH de <i>G. noxia</i>	32
Figura 4.10	Estrutura química de Gn9 - kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1')- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo	35
Figura 4.11	Estrutura química de Gn10 - 3- <i>O</i> -metil- <i>chiro</i> -inositol	36
Figura 4.12	Perfil Cromatográfico do EMeOH das folhas de <i>G. noxia</i>	38
Figura 4.13	Cromatograma dos extratos e frações de <i>G. noxia</i> revelado com β -caroteno 0,05% em DCM	43
Figura 4.14	Cromatograma dos extratos e frações de <i>G. noxia</i> revelado com DPPH em MeOH	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1	Média dos pesos (g) de camundongos machos (M) e fêmeas (F) monitorados durante 14 dias (n=6) após tratamento com o extrato EMeOH	47
Gráfico 4.2	Média do peso (g) de camundongos machos (M) e fêmeas (F) monitorados durante 14 dias (n=6) após tratamento com o extrato ECHCl ₃	47
Gráfico 4.3	Efeito do EMeOH no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto	50
Gráfico 4.4	Efeito do ECHCl ₃ no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto	50
Gráfico 4.5	Efeito do EMeOH no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol acidificado	51
Gráfico 4.6	Efeito do EMeOH no modelo de lesão ulcerativa induzida por fármaco antiinflamatório não-esteroidal	52
Gráfico 4.7	Efeito do EMeOH sobre a motilidade intestinal	53
Gráfico 4.8	Efeito do EMeOH no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, 30 minutos após o tratamento	58
Gráfico 4.9	Efeito do ECHCl ₃ no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, 30 minutos após o tratamento	58
Gráfico 4.10	Efeito do ECHCl ₃ no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, 60 minutos após o tratamento	59
Gráfico 4.11	Efeito do ECHCl ₃ no modelo de placa quente em camundongos, 30 minutos após o tratamento	60
Gráfico 4.12	Efeito do ECHCl ₃ no modelo de placa quente em camundongos, 60 minutos após o tratamento	60
Gráfico 4.13	Determinação da produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença dos extratos de <i>G. noxia</i>	70
Gráfico 4.14	Determinação da liberação de H ₂ O ₂ em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença dos extratos de <i>G. noxia</i>	71
Gráfico 4.15	Determinação da liberação de TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos da <i>G. noxia</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Panorama químico-farmacológico de espécies de Nyctaginaceae	7
Tabela 1.2	Classificação botânica proposta para <i>Guapira noxia</i>	8
Tabela 4.1	Quantidades de extratos obtidos a partir de 1 kg das folhas secas de <i>G. noxia</i>	12
Tabela 4.2	Triagem fitoquímica dos extratos das folhas de <i>G. noxia</i>	14
Tabela 4.3	Teor de substâncias fenólicas presentes nos extratos de <i>G. noxia</i>	15
Tabela 4.4	Tempos de Retenção (TR) e máximos de absorção na região do UV das substâncias eluídas com a mistura MeOH/H ₂ O 1:1	16
Tabela 4.5	Quantidades obtidas nas frações resultantes da ELL do EMeOH de <i>G. noxia</i>	18
Tabela 4.6	Agrupamento resultante do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de <i>G. noxia</i>	18
Tabela 4.7	Valores de RMN ¹ H, ¹³ C e correlações observadas em Gn1 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T)	24
Tabela 4.8	Valores de RMN ¹ H e ¹³ C de Gn2 (DMSO-d ₆ , 11,7 T)	26
Tabela 4.9	Valores de RMN ¹ H e ¹³ C de Gn3 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T)	27
Tabela 4.10	Valores de RMN ¹ H e ¹³ C de Gn4 (DMSO-d ₆ , 11,7 T)	29
Tabela 4.11	Valores de RMN ¹ H e ¹³ C de Gn5 e Gn6 (DMSO-d ₆ , 11,7 T)	31
Tabela 4.12	Valores de RMN ¹ H e ¹³ C de Gn7 e Gn8 (DMSO-d ₆ , 11,7 T)	33
Tabela 4.13	Estrutura química de Gn9 - kaempferol-3- <i>O</i> -β-D-galactopiranosil-(6→1)- <i>O</i> -α-L-rhamnopiranosídeo	35
Tabela 4.14	Valores de RMN ¹ H, RMN ¹³ C e <i>g</i> COSY observados em Gn10 (D ₂ O, 11,7 T)	36
Tabela 4.15	Identificação dos flavonóides isolados no perfil cromatográfico do EMeOH de <i>G. noxia</i>	38
Tabela 4.16	Efeito do tratamento agudo com os extratos EMeOH e ECHCl ₃ (5.000 mg/kg) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos (M) e fêmeas (F)	47
Tabela 4.17	Determinação da produção NO, H ₂ O ₂ e TNF-α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença de extratos da <i>G. noxia</i>	73
Tabela 4.18	Panorama das atividades farmacológicas avaliadas nos extratos das folhas de <i>G. noxia</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico
AcOEt	acetato de etila
ACN	acetonitrila
AINES	antiinflamatórios não esteroidais
api	apiose
BAW	mistura de <i>n</i> -butanol, ácido acético e água
BHI	Brain-Heart Infusion
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CIM	concentração inibitória mínima
CLC	cromatografia líquida em coluna aberta
CMH	caldo Mueller-Hinton
d	dubleto
DCCC	droplet countercurrent chromatography
DCM	diclorometano
dd	duplo dubleto
d.i.	diâmetro interno
DMSO d_6	dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1- difenil-1-picril-hidrazila
ECHCl ₃	extrato clorofórmico
EMeOH	extrato metanólico
EMeOH 70%	extrato hidroalcoólico
ELL	extração líquido-líquido
ERO	espécies reativas de oxigênio
FE	fase estacionária
FM	fase móvel
FrHex	fração hexânica
FrBuOH	fração butanólica
FrAq	fração aquosa
gal	galactose
glic	glicose
GPC	cromatografia de permeação em gel
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
Hex	<i>n</i> -hexano
g COSY	gradient correlation spectroscopy
g HMBC	gradient heteronuclear multiple bond correlation
g HMQC	gradient heteronuclear multiple quantum coherence
IR	índice de refração
J	constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
m	múltiplo
MeOH	metanol
m/z	relação massa/carga

n-BuOH	<i>n</i> -butanol
NP/PEG	natural product/polietilenoglicol
n-PrOH	<i>n</i> -propanol
Rf	fator de retenção
rha	rhamnose
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	singleto
TFA	ácido trifluoracético
TOCSY-1D	total correlation spectroscopy, 1D
TR	tempo de retenção
UFC	unidades formadoras de colônias
UV	ultravioleta
ZIM	zimosan

1. Introdução

1.1- Biodiversidade e uso de Plantas Medicinais

A Biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas. As funções ecológicas desempenhadas pela biodiversidade são ainda pouco compreendidas, muito embora se considere que ela seja responsável pelos processos naturais e produtos fornecidos pelos ecossistemas e espécies que sustentam outras formas de vida e modificam a biosfera, tornando-a apropriada e segura para a vida. Além do seu valor intrínseco, a biodiversidade também é a base das atividades agrícolas, pecuárias, pesqueiras e florestais, além dos valores ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e estético. Com tamanha importância, é preciso evitar a perda da biodiversidade (MMA, 2005).

O Brasil possui uma superfície de 8.511.596,3 km². No âmbito dessa extensão continental, abrange desde regiões equatoriais ao norte até áreas extratropicais ao sul, diferenciadas climática e geomorfologicamente, com uma extraordinária diversidade ecológica. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (Guerra e Nodari, 2003). Foi o primeiro signatário da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) e é considerado megabiodiverso – país que reúne ao menos 70% das espécies vegetais e animais do Planeta – pela Conservation International (CI). Em território brasileiro encontram-se 7 biomas principais: Amazônia, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica, Costeiros, Campos Sulinos e Cerrado (IBAMA, 2005).

O cerrado nativo era o segundo maior bioma do País, superado apenas pela Floresta Amazônica. Ocupava uma área superior a 2 milhões de km², cerca de 23% do território brasileiro, abrangendo os estados Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Distrito Federal, Tocantins e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, São Paulo, Paraná e Rondônia. Ocorria também em pequenas áreas nos estados de Roraima, Pará, Amapá e Amazonas (Figura 1.1) (Durigan *et al.*, 2004).

O cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas, riquíssima flora com mais de 10.000 espécies de plantas, das quais 4.400 endêmicas deste bioma. Apresenta as mais diversas formas de vegetação, desde campos sem árvores, ou arbustos, até o cerrado lenhoso denso com matas ciliares (Oliveira e Marquis, 2002).



Figura 1.1. Distribuição geográfica do cerrado brasileiro (em preto) (Durigan *et al.*, 2004).

Apesar do seu tamanho e importância, o cerrado é um dos ambientes mais ameaçados do mundo. Até a década de 1950, os cerrados mantiveram-se quase inalterados. A partir de então, com a interiorização da capital e a abertura de novas redes rodoviárias, largos ecossistemas deram lugar à pecuária e à agricultura extensiva, como a soja, arroz, cana de açúcar e trigo. Tais mudanças se apoiaram, sobretudo, na implantação de novas infra-estruturas viárias e energéticas, bem como na descoberta de novas vocações desses solos regionais, permitindo novas atividades agrárias rentáveis, em detrimento de uma biodiversidade até então pouco alterada. Durante as décadas de 1970 e 1980 houve um rápido deslocamento da fronteira agrícola, com base em desmatamentos, queimadas, uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que resultou em 67% de áreas de cerrado "altamente modificadas", com voçorocas, assoreamento e envenenamento dos ecossistemas, restando apenas 20% de área em estado conservado (BDT, 2005; Oliveira e Marquis, 2002).

A partir da década de 1990, governos e diversos setores organizados da sociedade debatem como conservar o que restou do cerrado, com a finalidade de buscar tecnologias embasadas no uso adequado dos recursos hídricos, na extração de produtos vegetais nativos, nos criadouros de animais silvestres, no ecoturismo e outras iniciativas que possibilitem um modelo de desenvolvimento sustentável e justo (AmbienteBrasil, 2005).

Atualmente, dos mais de 2 milhões de km² de vegetação nativa de cerrado restam apenas 20% e a expansão da atividade agropecuária pressiona cada vez mais as áreas remanescentes. Essa situação faz com que a região seja considerada um *hotspot* de biodiversidade e desperte especial atenção para a conservação dos seus recursos naturais.

Existem hoje, no estado de São Paulo, 280.000 ha cobertos por vegetação natural de cerrado, dos quais 25.000 ha (menos de 10%) estão protegidos na forma de Unidades de Conservação (UC) estaduais, incluindo as Áreas de Proteção Ambiental (APAs). Além das UCs e APAs, muitos fragmentos estão legalmente amparados por se enquadrarem no conceito de "áreas de preservação permanente" ou nos 20% de reserva legal obrigatória. Os levantamentos feitos no Cerrado paulista constataram que este bioma encontra-se bastante fragmentado - são mais de oito mil pequenos fragmentos espalhados principalmente em áreas privadas - o que traz um grave problema para sua conservação. A diversidade presente nesses pequenos fragmentos, no entanto, é imensa (BDT, 2005).

Pode-se dizer que o interesse pelas plantas capazes de produzirem quaisquer tipos de efeitos no corpo humano (daqueles que não podem ser considerados apenas como alimentos), é tão antigo como a própria humanidade. Iniciou-se certamente em conjunto com o processo de racionalização e memorização dos conhecimentos, o que tornou possível a transmissão desses conhecimentos gradualmente adquiridos. Todo um saber empírico foi assim acumulado, primeiro pela tradição oral e, logo que surgiu a escrita, tornado permanente pela produção de documentos que o perpetuassem. São bem conhecidos os tratados da Mesopotâmia e do Egito. Mais tarde, as compilações de plantas medicinais foram desenvolvidas por diversos autores, entre eles, Dioscórides, Scribônio Largo, Oribásio, embora existam descrições dispersas, por exemplo, na obra de Plínio, essencialmente um naturalista (Rico, 2003).

Esse conhecimento manteve-se no domínio do puro empirismo até o século XIX, quando os progressos na Química começaram a permitir o isolamento dos princípios ativos nas plantas, cumprindo assim o preconizado por Paracelso, já no século XVI, ao afirmar que o importante não era juntar plantas e outros produtos no tratamento dos doentes, mas, antes, isolar os seus princípios ativos (Rico, 2003).

Desde então, as plantas têm sido uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Elas revelam uma gama quase que inesgotável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Entretanto, apesar do grande interesse, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Guerra e Nodari, 2003).

Os progressos da química de síntese e as perturbações introduzidas por sucessivas guerras, levaram a um certo esquecimento dos produtos vegetais em consequência da escassez de matérias-primas e da facilidade de obtenção de novos compostos e mais ativos. Acresce ainda as crescentes exigências postas nos últimos tempos ao estudo de novos

fármacos, a que os produtos de origem vegetal têm, com frequência, dificuldade de responder. Explica-se, em parte, por estas razões, certa diminuição transitória do interesse pelas plantas medicinais e pela sua aplicação. Os problemas ligados à variação nos produtos ativos, ao seu teor em diferentes amostras das plantas, aos ligados à sua estabilidade e condições de conservação, tornam, também mais complexa, a problemática das plantas medicinais, sobretudo quando comparada com substâncias de origem melhor controlada e submetidas a processos de purificação e análises mais rigorosas (Rico, 2003).

Ainda assim, a OMS estima que 80% da população fazem uso de plantas medicinais como fonte medicamentosa. Há um interesse crescente e renovado no uso de terapias complementares e produtos naturais, especialmente vegetais, como recurso terapêutico. O crescimento da procura por drogas vegetais relaciona-se a vários fatores, entre eles: a decepção com os resultados obtidos com tratamentos convencionais, efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo de medicamentos sintéticos, dificuldade de acesso e a crença popular errônea de que o natural é inofensivo (Rates, 2001).

Nesse sentido, a busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam com seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (Hostettmann *et al.*, 2003). A relevância da pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre diferentes mecanismos biológicos torna-se de grande importância para a saúde humana.

Assim, nosso projeto Biota-Fapesp: "Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica de Plantas Superiores" visa contribuir com a caracterização do Bioma-Cerrado do estado de São Paulo, investigando espécies brasileiras de interesse químico-medicinal. Dentre as espécies com particular interesse estão as do gênero *Guapira* (Nyctaginaceae), com informações etnofarmacológicas de uso para problemas estomacais (Hiruma-Lima e Souza Brito, 2004 - comunicação pessoal). Assim, o estudo do gênero *Guapira* iniciou-se com a espécie *G. noxia*.

1.2- *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)

A ordem Caryophyllales também é conhecida pela denominação Centrospermae e inclui grande número de espécies medicinais. Nessa ordem de espécies vegetais estão incluídas quinze distintas famílias, das quais as mais importantes e com grande ocorrência no Brasil são: Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae, Cactaceae e Nyctaginaceae (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

A família Nyctaginaceae descrita por Antonine Laurent de Jussieu em 1803 compreende 390 espécies tropicais, distribuídas em trinta gêneros, incluindo árvores, arbustos e ervas que produzem betalaínas, mas não antocianinas (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; MOBOT, 2005).

A distribuição geográfica da família é essencialmente tropical (Furlan, 1996) (Figura 1.2). No Brasil ocorrem dez gêneros e aproximadamente setenta espécies, com ampla distribuição no território e pertencentes especialmente aos gêneros *Neea*, *Boerhaavia*, *Bougainvillea*, *Mirabilis*, *Pisonia*, *Guapira* e *Andradea* (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; Furlan, 1996).



Figura 1.2. Distribuição geográfica das espécies pertencentes à família Nyctaginaceae (em cinza) (Disponível em: <http://www.arbolesornamentales.com/Nyctaginaceae.htm>)

Especialistas em Nyctaginaceae (Furlan, 1996) comentam que, analisando os trabalhos sobre esta família, chama atenção a quase inexistência de chaves de identificação para as espécies da tribo Pisonieae, e ainda que faltam especialistas em Nyctaginaceae, tanto nacional quanto internacionalmente. O mesmo autor comenta que, ao nível de espécie, a família Nyctaginaceae é uma das mais difíceis famílias neotropicais de classificação.

Levantamento bibliográfico realizado em diversas fontes (SciFinder, Webofscience, Scencedirect, Pubmed, Chemical Abstracts, Medline) evidenciou quão escassos são os estudos referentes à composição química e a ensaios comprobatórios de atividade farmacológica com espécies desta família.

Dentre os poucos trabalhos existentes, Hiruma-Lima (2002) reporta as atividades analgésica, antiinflamatória, hepatoprotetora e diurética em *Boerhaavia diffusa*, sendo reportados como constituintes químicos alcalóides (Aslam, 1996), xantonas (Ahmed e Yu, 1992), rotenóides (Lami *et al.*, 1991a; Borreli *et al.*, 2006) e flavonóides (Pandey *et al.*, 2005) lignanas (Lami *et al.*, 1991b). Em *Bougainvillea spectabilis* foram detectadas atividades inibitórias da xantina oxidase e redução de hepatites e tumores cerebrais, bem como a presença de flavonóides, cumarinas e compostos fenólicos (Chang *et al.*, 1993, 1994). Estudos de Zhang (1997) demonstraram presença de glicolípideos em *Mirabilis himalaica*. Já em *Pisonia umbellifera*, Lavaud (1996) reportaram presença de saponinas.

Além disso, a partir das informações apresentadas na Tabela 1 pode-se verificar a ampla variedade de classes de metabólitos presentes nas poucas espécies investigadas. Há ocorrência de substâncias comumente encontradas em plantas como, ácidos graxos, esteróides, triterpenos, flavonóides, e ainda de outras de ocorrência menos comum como, alcalóides, saponinas, rotenóides, xantonas, lignanas e lactonas. Assim, esses dados salientam a importância de estudos com espécies de Nyctaginaceae.

O gênero *Guapira* foi descrito por Aublet em 1775, mas esteve esquecido por quase 200 anos, tendo sido utilizado apenas recentemente por Woodson Jr. & Kidd para incluir espécies da Flora do Panamá (Furlan, 1996).

No Brasil há ocorrência de mais de 10 espécies de *Guapira* em todas as regiões, porém com baixa frequência na região amazônica; nesta região foram coletados poucos indivíduos de *G. opposita* e *G. hirsuta* bem como um número maior de indivíduos de *G. venosa*. Outras coletas esporádicas foram registradas com exemplares de *G. graciliflora* e *G. opposita* no estado de Rondônia, indicando que estas espécies podem estar começando a colonizar novas áreas, sem, no entanto, ter se estabelecido totalmente. Na região litorânea encontram-se as espécies *G. hirsuta*, *G. nítida*, *G. obtusata*, *G. opposita* e *G. pernambucensis*, enquanto que na caatinga ou restinga encontram-se preferencialmente *G. laxa* e nos campos de altitude e rupestres, *G. tomentosa*. Por fim, nas regiões de cerrado ocorrem principalmente as espécies de *G. areolata*, *G. campestris*, *G. graciliflora* e *G. noxia* (Furlan, 1996).

Tabela 1.1. Panorama químico-farmacológico de espécies de Nyctaginaceae

Espécie	Substâncias presentes	Atividade Biológica	Referências
<i>Boerhaavia difusa</i>	alcalóides, aminoácidos, lignanas, flavonóides, rotenóides, xantonas	analgésica, antiinflamatória, hepatoprotetora, diurética, laxativa, carminativa, espectorante, antifibrinolítica, imunossupressão, antidiabética	Hiruma-Lima <i>et al.</i> , 2000; Aslam, 1996; Ahmed e Yu, 1992; Lami <i>et al.</i> , 1991a, 1991b; Pandey <i>et al.</i> ; Borrelli <i>et al.</i> , 2006; Pari e Satheesh, 2004
<i>B. coccinea</i> <i>B. erecta</i>	rotenóides betalaínas, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos	ND antimalárica	Messana <i>et al.</i> , 1986 Hilou <i>et al.</i> , 2006
<i>B. repens</i>	rotenóides,	ND	Ahmed <i>et al.</i> , 1990
<i>Bougainvillea glabra</i>	betacianinas, flavonóides	ND	Heuer <i>et al.</i> , 1994;
<i>B. spectabilis</i>	ciclitóis	analgésica	Malairajan <i>et al.</i> , 2006
<i>Colignonia scandens</i>	saponinas	depurativo para pele com sarampo	De Feo <i>et al.</i> , 1998
<i>Mirabilis himalaica</i>	glicolipídeos	problemas estomacais gonorréia,	Zhang <i>et al.</i> , 1997
<i>Mirabilis jalapa</i>	betalainas, esteróides, triterpenos, saponinas, xantonas, proteínas	antioxidante, atração de insetos, antiviral	Gandía-Herrero <i>et al.</i> , 2005; Gordana <i>et al.</i> , 1988; Saxena <i>et al.</i> , 1986; Begun <i>et al.</i> , 1994; Shamin <i>et al.</i> , 1984; Piateli <i>et al.</i> , 1965
<i>Mirabilis viscosa</i>	flavonóides	ND	Wollenweber e Dorr, 1996
<i>Pisonia umbellifera</i>	saponinas	inseticida	Lavaud <i>et al.</i> , 1996
<i>Acleisanthes acutifolia</i> , <i>A. crassifolia</i> , <i>A. longiflora</i> , <i>A. obtusa</i> , <i>A. wrightii</i> , <i>Mirabilis alipes</i> , <i>M. bigelovii</i> , <i>M. greenei</i> , <i>M. jalapa</i> , <i>M. longiflora</i> , <i>M. macfarlanei</i> , <i>M. multiflora</i> , <i>M. pudica</i> , <i>M. triflora</i> , <i>Selinocarpus angustifolius</i> , <i>S. chenopodioides</i> , <i>S. lanceolatus</i> , <i>S. parvifolius</i> , <i>S. purpusianus</i> , <i>S. undulatus</i> .	monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos graxos, derivados de aminoácidos, lactonas, benzenóides, fenilpropanóides, compostos nitrogenados	atração de insetos para polinização	Levin <i>et al.</i> , 2001

ND: atividade farmacológica não determinada

Em relação ao gênero *Guapira*, o mesmo levantamento bibliográfico evidenciou também que nenhuma espécie foi estudada, seja sob o ponto de vista químico, seja do farmacológico. Assim, tendo em vista as dificuldades taxonômicas encontradas no processo de identificação das Nyctaginaceae, aliadas a um forte desmatamento registrado em algumas regiões do Brasil, enfatizam a necessidade urgente de maiores estudos do gênero *Guapira*.

G. noxia (Figura 1.3) é uma espécie típica dos cerrados brasileiros, comumente encontrada no estado de São Paulo e tem seu limite sul de distribuição em Angatuba. É uma árvore pequena (2-4 m de altura), dióica, cujas folhas são simples, alternas e com gemas apicais revestidas por pilosidades ferrugíneas (Durigan *et al.*, 2004; Furlan, 1996). A Tabela 1.2 apresenta a classificação botânica e demais características atribuídas a essa espécie.

Tabela 1.2. Classificação botânica proposta para *Guapira noxia* (Furlan, 1996; Durigan *et al.*, 2004)

Ordem: Caryophyllales
Família: Nyctaginaceae
Tribo: Pisoniae
Gênero: <i>Guapira</i>
Nome Científico: <i>Guapira noxia</i> (Netto) Lundell
Sinônimas Científicas: <i>Pisonia obtusata</i> , <i>P. rufensis</i> , <i>Torrubia noxia</i>
Nome popular: Pao-judeo, João-mole, João-mole-do-campo, Maria-mole, Capa-rosa.
Características: árvore, arvoreta ou arbusto, com cerca de 2-4 m de altura, caule com 10-30 cm de diâmetro, em geral tortuosos e nodosos, súber espesso e fendido, folhas com pilosidades ferrugíneas-esverdeadas.
Época de florescimento: agosto – setembro.
Época de frutificação: setembro – novembro.
Habitat: Cerrado.

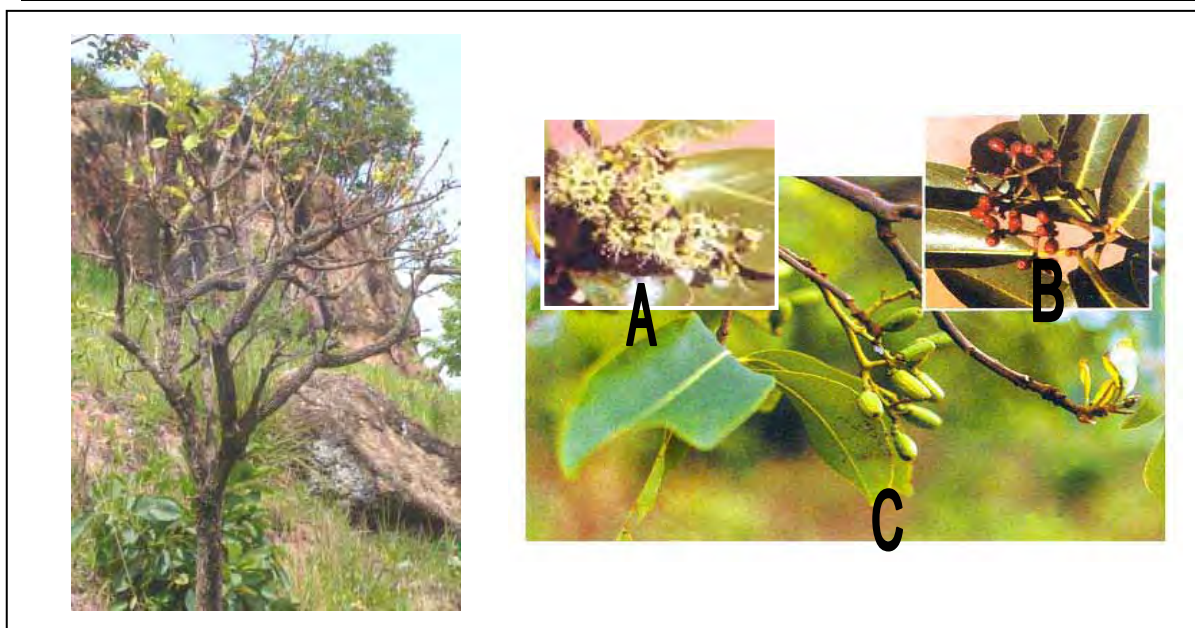


Figura 1.3. *Guapira noxia*: A) Flores, B) Folhas e frutos maduros e C) Folhas e frutos verdes

2. Objetivos

2.1- Objetivos Gerais

- Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a composição química e atividade farmacológica de *Guapira noxia*, e, conseqüentemente, sobre a biodiversidade brasileira. Esse objetivo está engajado no projeto temático BIOTA-FAPESP (02/05503-6).

2.2- Objetivos Específicos

- Realizar triagem química das principais classes de metabólitos secundários presentes
- Realizar quantificação do teor de compostos fenólicos e de flavonóides presentes
- Determinar o perfil cromatográfico da espécie
- Investigar os principais constituintes químicos dos extratos brutos e frações enriquecidas presentes em *G. noxia*, através de técnicas cromatográficas de separação e de elucidação estrutural apropriadas
- Avaliar a atividade antioxidante
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos
- Avaliar as atividades antiúlcera, antiinflamatória, antimicrobiana e imunomodulatória dos extratos
- Tentar estabelecer relação entre os efeitos biológicos e a composição química da espécie.

3. Material e equipamentos

- Pulverização do vegetal foi realizada em moinho de facas Marconi
- O rotaevaporador utilizado para concentração de extratos e frações foi da marca Tecnal, modelo TE-210, acoplado a uma bomba a vácuo modelo TE-058 Tecnal
- Os solventes utilizados para preparação de extratos fracionamentos cromatográficos foram de grau PA, das marcas Synthlab e Merck, os de grau HPLC foram das marcas Mallincrodt, ChromAr e Riedel-deHaën e os deuterados (DMSO-d₆, D₂O) da marca Sigma Aldrich
- Água purificada em sistema Milli Q, Progard 2 da Millipore
- O fracionamento por cromatografia em permeação em gel (GPC) foi realizado em coluna de vidro contendo Sephadex LH-20, acoplado à bomba peristáltica marca Pharmacia, modelo P1 18-1110-91, conectada à coluna de vidro (100 X 3 cm d.i.) e a coletor automático de frações marca Pharmacia, modelo RedFrac, com capacidade para 95 frações
- A purificação por DCCC (Droplet Countercurrent Chromatography) foi realizada em equipamento EYELA DCC-300 equipado com colunas de vidro de 40 cm x 2 mm de d.i., *loop* para injeção da amostra de 16 mL e coletor automático de frações EYELA DC-1200 com capacidade para 120 frações
- Nas análises por CCDC, as placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 G (Merck) em água destilada, na proporção 1:2 (p/v), sobre placas de vidro 5,0 x 10,0 ou 20,0 x 20,0 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente após a preparação das placas. Estas foram deixadas em repouso por cerca de 8 horas à temperatura ambiente e depois em estufa a 120°C por cerca de 1 hora. Foram usadas também placas preparadas comerciais de sílica gel 60 (Aldrich ou Merck) sem indicador de fluorescência, de tamanho 20,0 x 20,0 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente
- Como reveladores para CCDC foram utilizados:

Luz UV: 254-366 nm (Chromatovue)

Vapores de iodo ressublimado

Anisaldeído/H₂SO₄ (Wagner *et al.*, 1984): 0,85 mL de anisaldeído, 85,0 mL de MeOH, 10,0 mL de ácido acético, 5,0 mL de H₂SO₄. Pulveriza-se a placa cromatográfica com o revelador e observam-se manchas roxas para terpenos, lilás para saponinas, amareladas para flavonóides, cinza para ácido gálico e marrom para taninos;

NP/PEG (Wagner *et al.*, 1984): 100,0 mg de difenilaminoborato (NP), 500,0 mg de polietilenoglicol 2000 (PEG), 20,0 mL de MeOH. Borrifa-se sobre a placa cromatográfica e observa-se no visível e sob luz UV. Fornece mancha amarela para flavonóides derivados do kaempferol e alaranjadas para derivados da quercetina

Cloreto férrico: solução a 2% em metanol. Borrifa-se a placa cromatográfica até que o revelador espalhe bem até atingir revelação instantânea. Observa-se se as manchas da cromatoplaça adquirem coloração verde-azulada como positivo para compostos fenólicos;

β -caroteno: solução a 0,02% em DCM. Borrifa-se sobre a placa cromatográfica até que esta fique completamente com a coloração amarelada da solução. Expõe-se a placa à luz ambiente por 2 horas e observa-se a atividade antioxidante através da permanência de coloração amarela das manchas

DPPH: solução a 0,04% em MeOH. Borrifa-se sobre a placa cromatográfica até que esta fique completamente com a coloração violeta da solução. Esperam-se alguns minutos e observa-se a atividade antioxidante através da formação de coloração amarela nas manchas

Draggendorf (Matos, 1997): 5,0 g de carbonato de bismutila em 50,0 cm³ de água, 12,0 cm³ de ácido clorídrico, 25,0 g de iodeto de potássio, completa para 100,0 mL de água. A presença de alcalóides é evidenciada pela presença de precipitados já que eles reagem com metais formando sais duplos na forma de precipitados

- Para quantificação de fenóis totais e flavonóides foi utilizado espectrofotômetro HACH/DR4000 com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico;
- Análises por HPLC no modo analítico foram feitas em aparelho da Varian, modelo Pro Star 210/330, com detector de arranjo de foto diodos (HPLC-UV-PDA) acoplado a uma coluna analítica de fase reversa C18, modelo Luna (2), da Phenomenex de 250 x 4,6 mm, apresentando partículas com tamanho de 5 μ m e poro com d.i. de 100Å e coluna de guarda Phenomenex de 4 x 3 mm. A amostra e extrato foram injetados através de injetor Rheodyne 7125 com loop de 20 μ L
- Análises por HPLC no modo semipreparativo foram realizadas em aparelho constituído por uma bomba de fluxo máximo 10 mL/minuto, injetor com *loop* de 100 μ L e registrador modelo L250E (Knauer), acoplados à coluna semipreparativa de fase reversa C18 (Phenomenex), de 250 x 10 mm e ao detector por Índice de Refração Differential Refractometer, modelo Waters R401, da Millipore
- Os espectros no Infra Vermelho foram gerados em aparelho Shimadzu, FT-IR, modelo 8300 em KBr
- Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro de 500 MHz (Varian® Inova), operando a 11,7 T.
- Os espectros de massa obtidos em espectrômetro Fisons-Plataform II, de quadrupolo simples, via ionização por electrospray, bomba Rheo4000, fluxo 20 μ L/min, ACN/H₂O (1:1) e injetor Rheodyne com *loop* de 1 μ L.

4. Desenvolvimento, resultados e discussões

4.1.1- COLETA, SECAGEM E PULVERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Guapira noxia* foram obtidas de um exemplar adulto desta espécie em abril de 2005, período da manhã, localizado na fazenda Palmeiras da Serra, município de Pratânia/SP. A coleta foi realizada por Clemente J. Campos (IBB-UNESP/Botucatu) e Juliana Severi e seu registro de exsicata encontra-se depositado no Herbário "Irina Delanova Gemtchujnicov" BOTU/ UNESP-Botucatu/SP.

As folhas foram separadas dos galhos para secagem em estufa de ar circulante a 40°C, durante 4 dias, com o material esporadicamente revirado. Em seguida foram finamente trituradas em moinho de facas com malhas de 0,5-1,0 mm a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos, obtendo-se 1,3 kg de pó seco.

4.1.2- PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O pó das folhas (1,0 kg) foi submetido aos processos de extração a frio por maceração, na proporção de 1:3 (p/v) (3 vezes, por 72 h cada) empregando-se CHCl₃ como líquido extrator, seguido por percolação com 3,0 L de MeOH e finalmente com 3,0 L de uma mistura composta por MeOH/H₂O 70:30 (v/v). Após cada extração, o extrato obtido foi filtrado em papel-filtro, concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida (em temperatura inferior a 40°C), transferido para vidro pesado e deixado em capela até completa eliminação dos solventes. Após a evaporação dos solventes foram obtidos ECHCl₃, EMeOH e EMeOH 70%, respectivamente, e estes foram armazenados ao abrigo da luz e umidade. A Figura 4.1 ilustra, esquematicamente, o processo de obtenção dos extratos e a Tabela 4.1 as quantidades fornecidas em cada etapa de extração.

Tabela 4.1. Quantidades de extratos obtidos a partir de 1 kg das folhas secas de *G. noxia*.

	Quantidade obtida (g)	Rendimento (%)
ECHCl ₃	46,8	4,7
EMeOH	96,3	9,6
EMeOH 70%	56,7	5,7
Total	199,8	20,0

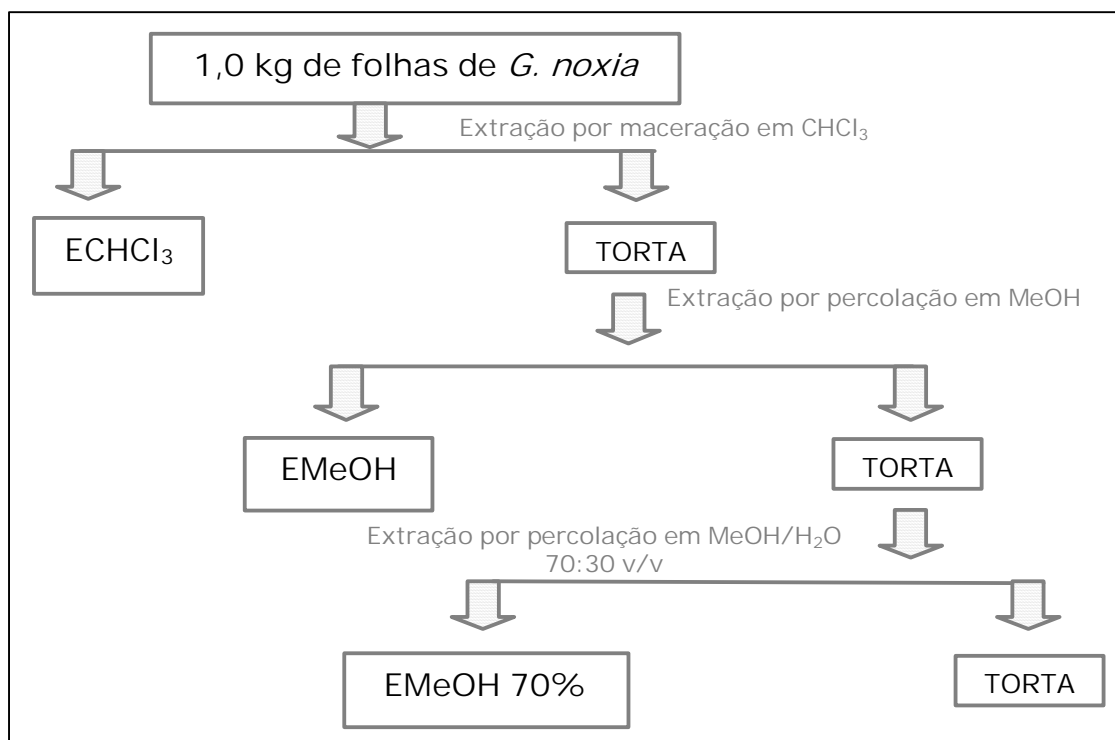


Figura 4.1. Fluxograma da preparação dos extratos das folhas de *G. noxia*.

4.1.3- TRIAGEM FITOQUÍMICA

Cerca de 10,0 mg dos extratos ECHCl_3 , EMeOH e EMeOH 70% foram dissolvidos em 5,0 mL de CHCl_3 , MeOH e MeOH/H₂O 70%, respectivamente, e analisados por cromatografia em camada delgada comparativa - CCDC (sílica gel; diferentes misturas de Hex/AcOEt, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ e BAW), com aplicação simultânea de padrões de produtos naturais de diferentes classes (flavonóides, ácidos fenólicos, terpenos, taninos, etc.), e posterior pulverização das cromatoplasmas com reveladores gerais e específicos: anisaldeído/ H_2SO_4 (flavonóides, saponinas, terpenóides, esteróides e catequinas) (Wagner *et al.*, 1984); cloreto férrico a 2 % (compostos fenólicos); NP/PEG (flavonóides) e Dragendorff (alcalóides) (Matos, 1997). Após revelação as placas também foram visualizadas sob luz UV de 254 nm.

Essas análises indicaram a presença predominante de esteróides e terpenóides no ECHCl_3 (manchas roxas quando reveladas com anisaldeído sulfúrico) e ausência das demais classes investigadas. Em contrapartida, nos extratos polares (EMeOH e EMeOH70%), revelação com anisaldeído sulfúrico evidenciou diversas classes de metabólitos secundários, evidenciadas por manchas roxas, amarelas, alaranjadas, cinzas e marrons. Revelação seletiva com cloreto férrico e NP/PEG mostrou que as principais manchas das cromatoplasmas produziram, respectivamente, cores verde e amarela, indicando ocorrência de flavonóides como constituintes majoritários.

Devido à presença de substâncias de polaridade elevada nos extratos EMeOH e EMeOH70% [evidenciadas pela presença de manchas roxas após eluição das placas com BAW 4/1/5 (fase orgânica) e reveladas com anisaldeído sulfúrico], foi realizada também a pesquisa de saponinas. Tendo em vista que os extratos polares eram apenas parcialmente solúveis em água, foi preparado um chá com o pó das folhas (1,0g /50,0 mL de água), submetendo-se em seguida o extrato aquoso à agitação. A formação de espuma abundante e resistente à adição de HCl diluído (0,5%) indicou a presença desta classe de substâncias na espécie (Simões *et al.*, 2003).

Realizou-se também o teste específico para taninos dissolvendo-se 50,0 mg dos extratos em 2,0 mL de água destilada, seguido da adição de 2 gotas de HCl diluído e algumas gotas de solução de gelatina incolor a 2,5%. Não foi observada a formação de precipitado, o que indicou a ausência de taninos no extrato, uma vez que taninos possuem capacidade de precipitar com proteínas solúveis (Simões *et al.*, 2003).

O teste específico para alcalóides foi realizado com a dissolução de 20,0 mg dos extratos em 5,0 mL de MeOH e 1 gota de ácido acético, seguido da adição por gotejamento de reagente Dragendorff. Não foi observada a presença de precipitado, o que indicou a ausência de alcalóides no extrato. Os resultados encontram-se apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Triagem fitoquímica dos extratos das folhas de *G. noxia*.

Classe de compostos	ECHCl ₃	EMeOH	EMeOH70%
Esteróides	+	+	-
Terpenos	+	+	-
Compostos fenólicos	-	+	+
Flavonóides	-	+	+
Saponinas	-	+	+
Alcalóides	-	-	-
Taninos	-	-	-

Os sinais (+) e (-) indicam presença ou ausência da classe de compostos

4.1.4- QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS

Considerando o relevante papel que os compostos fenólicos apresentam na prevenção de doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos, determinamos o teor destas substâncias nos extratos ECHCl₃, EMeOH e EMeOH 70%, uma vez que a análise por CCDC descrita anteriormente apontou a presença de constituintes fenólicos nos extratos polares da espécie.

A quantificação de fenóis totais presentes nos extratos foi realizada utilizando método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu (Merck). Esse reagente é composto por uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que reage com hidroxilas fenólicas formando um composto de coloração azul de absorvância máxima em 760 nm.

Inicialmente foi construída uma curva de calibração com substância fenólica-padrão (ácido tânico - Vetec). Para tanto, preparou-se solução-estoque de 1.000 µg/mL e a partir desta, preparou-se outras seis diluições nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL em água. Em seguida, adicionou-se a cada 0,25 mL de solução de padrão mais 0,25 mL de Folin-Ciocalteu, (1:1, v/v); 2,0 mL de água e 0,25 mL de solução saturada (200 g/L) de Na₂CO₃. Após 30 min à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância a 760 nm, juntamente com amostra em branco na cela de referência (Zieliski e Kozowska, 2000). Os pontos da curva foram gerados a partir das médias entre as triplicatas das absorvâncias registradas a 760 nm, em função das concentrações de padrão fenólico, o que levou à obtenção da curva de calibração com equação $y = 0,0057x - 0,0448$ e correlação linear superior a 0,999 ($r^2 = 0,9991$) no intervalo de 10 a 60 µg/mL.

A estimativa da concentração de substâncias fenólicas foi realizada a partir da interpolação das absorvâncias registradas das soluções dos extratos (concentrações de 20, 40 e 60 µg/mL) na curva de calibração, as quais foram submetidas ao mesmo procedimento acima descrito.

Como resultado (Tabela 4.3), verificou-se que o EMeOH forneceu o maior teor de substâncias fenólicas, seguido do EMeOH 70%. Em contrapartida, no ECHCl₃ não foi possível quantificar devido à dificuldade de solubilização em água. Assim, devido ao maior rendimento na extração e ao maior teor de compostos fenólicos presentes, optamos por estudar inicialmente o EMeOH das folhas de *G. noxia*.

Tabela 4.3. Teor de substâncias fenólicas presentes nos extratos de *G. noxia*.

Teor de fenóis totais (%)	
ECHCl ₃	*
EMeOH	12,2
EMeOH 70%	10,2

(*) Valor não determinado

4.1.5- PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EMeOH

A fim de determinar com maior precisão os tipos de metabólitos secundários ocorrentes no EMeOH e assim estabelecer uma estratégia para a separação das substâncias presentes, foi registrado o perfil cromatográfico desse extrato por meio de análises por HPLC-UV-PDA.

Uma alíquota de 20,0 mg do EMeOH foi dissolvida em 1,0 mL de MeOH, filtrado em filtro millex de 0,45 μm e em filtro de 0,22 μm . A solução foi submetida ao fracionamento em cartucho Sep-Pak C18 (Supelco, com 100 mg de adsorvente), eluído com 3,0 mL de MeOH/H₂O 8:2 (v/v), 3,0 mL de MeOH/H₂O 1:1 (v/v) e, finalmente, com 6,0 mL de MeOH 100%. As soluções resultantes foram analisadas por HPLC-UV-PDA (Figura 4.1.2).

Com essa análise verificou-se que as frações eluídas com MeOH/H₂O 8:2 e com MeOH 100% não apresentam picos de substâncias com espectros no UV definidos. Ao contrário, percebe-se que a fração eluída com MeOH/H₂O 1:1 forneceu um cromatograma no qual constam pelo menos nove picos de substâncias majoritárias com tempos de retenção que variam entre 21 e 35 min. Análise dos espectros de absorção no UV desses picos revelam que eles apresentam padrão similar de absorção ao redor de 330-370 nm e 240-280 nm (Tabela 4.4). Após comparação com padrões disponíveis em nosso laboratório, juntamente com dados da literatura (Mabry, 1970) é possível inferir que os picos sejam de flavonóides, principalmente, dos derivados da quercetina (flavonol).

Tabela 4.4. Tempos de Retenção (TR) e máximos de absorção na região do UV das substâncias eluídas com a mistura MeOH/H₂O 1:1.

Pico	TR (min)	λ 360 nm	
		Banda II	Banda I
1	21,0	255,0;	352,8
2	23,6	254,9;	351,9
3	24,1	255,0;	352,4
4	28,7	255,4;	353,5
5	29,3	255,8;	353,0
6	29,8	253,8;	352,3
7	32,2	264,5;	342,1
8	33,9	254,5;	352,9
9	34,5	253,9;	353,4

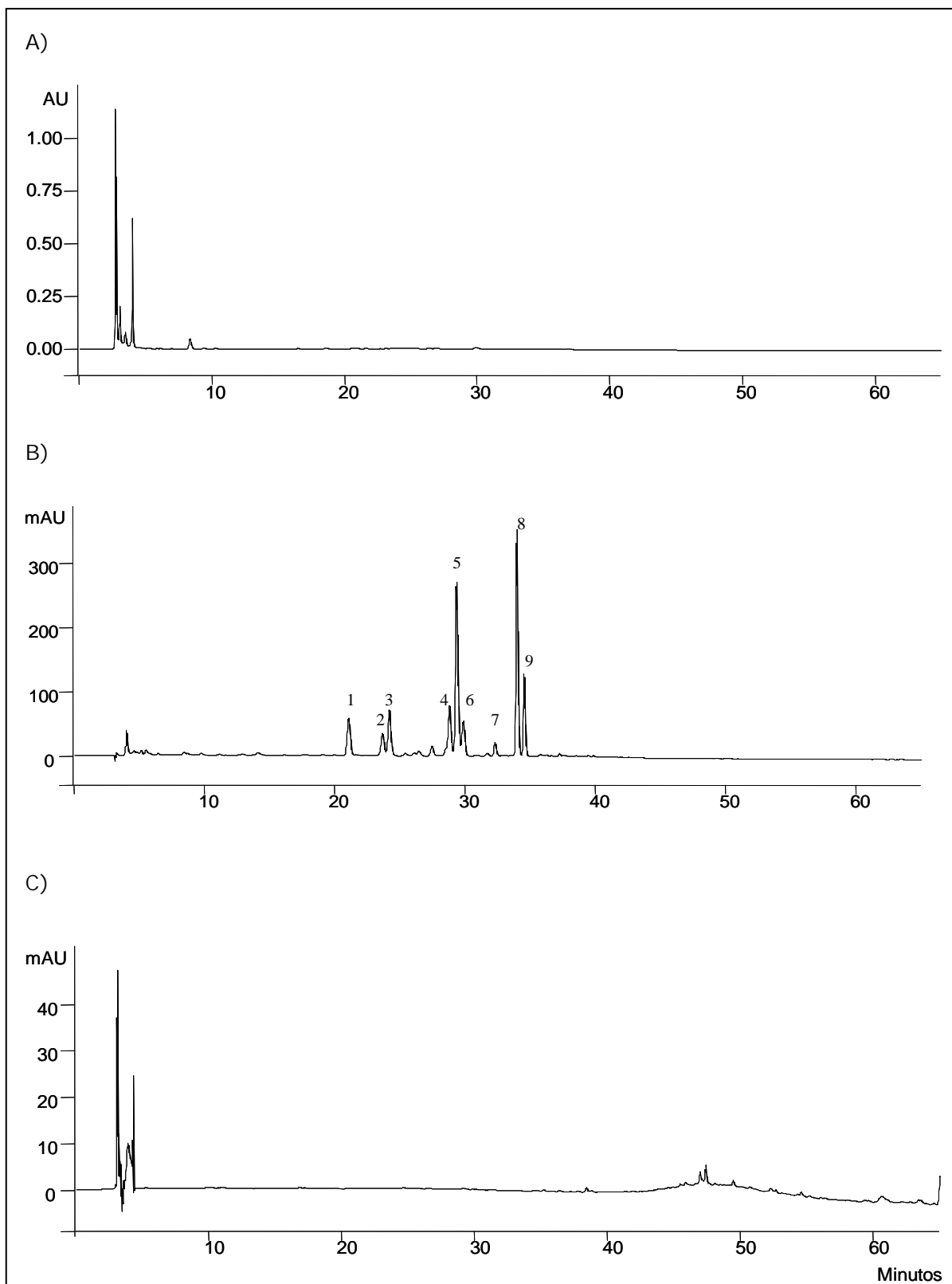


Figura 4.2. Perfil Cromatográfico do EMeOH das folhas de *G. noxia*. (A) fração eluída com MeOH/H₂O 8:2; (B) substâncias eluídas com MeOH/H₂O 1:1 e espectro no UV representativo para os picos 1-9; (C) fração eluída com MeOH 100%. (C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μm; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-37% de B em A em 20 min, de 38-70% de B até 60 min e 71-100% de B até 65 min; vazão de 1,17 ml/min, λ 360nm).

4.1.6- FRACIONAMENTO DO EMeOH

O EMeOH (15,0 g) foi solubilizado em 400,0 mL de água. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas (Extração Líquido-Líquido - ELL) com hexano 1:1 v/v (3x), seguido por *n*-BuOH, 1:1 v/v, (5x), obtendo-se três frações com polaridades distintas: fração hexânica (FrHex), butanólica (FrBuOH) e aquosa (FrAq). Cada uma das frações obtidas da ELL foi seca em rotaevaporador, transferida para recipiente de vidro pesado e colocada em capela sob jato de ar comprimido, obtendo-se as quantidades apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Quantidades obtidas nas frações resultantes da ELL do EMeOH de *G. noxia*.

	Quantidade obtida (g)	Rendimento (%)
FrHex	1,5	10
FrBuOH	5,7	38
FrAq	7,8	52
Total	15,0	100

As frações obtidas da ELL foram cromatografadas em CCDC, o que demonstrou que os flavonóides encontram-se majoritariamente na FrBuOH, enquanto que compostos terpênicos, clorofila e açúcares ficaram concentrados nas demais fases. Uma amostra da FrBuOH, correspondente a 2,5 g, foi solubilizada em 10,0 mL de MeOH e centrifugada por 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de permeação em gel (GPC), aplicando-o numa coluna de vidro de 72,0 x 2,5 cm (d.i.) a qual continha Sephadex LH-20 como fase estacionária (FE). A fase móvel (FM) utilizada foi MeOH e esta bombeada na coluna por meio de bomba peristáltica a um fluxo de 1,0 mL/min. Frações com aproximadamente 8,0 mL foram coletadas em tubos de ensaio por um coletor automático, obtendo-se o total de 260 frações. Estas foram analisadas por CCDC (sílicagel, CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O, 5:6:1:4 v/v- fase inferior) e reunidas conforme similaridade de Rf's e colorações diante dos reveladores empregados (anisaldeído/H₂SO₄, luz UV, NP/PEG). A tabela 4.6 apresenta o agrupamento de novas frações resultantes da GPC.

Tabela 4.6 Agrupamento resultante do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. noxia*.

Frações	quantidade (mg)	Frações	quantidade (mg)
1-40	10	114-123	144
41-57	17	124- 133	220
58-66	21	134-142	203
67-75	85	143-157	166
76-87	450	158-165	33
88-91	248	166-174	28
92-104	509	175-220	62
105-107	93	221-245	34
108-113	160	246-260	29

4.1.7- QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS

Tendo em vista que as análises cromatográficas evidenciaram que os flavonóides permaneceram principalmente na FrBuOH e que ensaios biológicos foram realizados com essa fração, realizamos a quantificação dos flavonóides totais, que foi determinada com base na reação de complexação de metal com o núcleo flavonoídico.

Nas condições de análise, o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Outros compostos fenólicos, que comumente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais, mesmo formando complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda inferiores, minimizando interferências nas medidas de absorvância (Marcucci *et al.*, 1998, Markham, 1982).

Inicialmente foi construída uma curva de calibração com flavonóide-padrão (rutina). Para tanto, pesou-se uma alíquota de 2 mg de rutina a qual foi solubilizada em metanol até obtenção de uma solução-estoque de 100 $\mu g/mL$. A partir desta, preparou-se outras seis diluições até as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu g/mL$. Em seguida, adicionou-se a cada 2,0 mL das diluições de padrão mais 2,0 mL de uma solução de $AlCl_3$ 2% em metanol. Decorridos 15 min a temperatura ambiente, mediu-se a absorvância a 425 nm juntamente com uma amostra em branco (metanol puro) na cela de referência (Djeridane *et al.*, 2006).

Os pontos foram gerados a partir das médias entre as triplicatas das absorvâncias registradas a 425 nm, em função das concentrações de padrão, o que levou à obtenção da curva de calibração com equação $y = 0,0211x + 0,4149$ e correlação linear superior a 0,999 ($r^2 = 0,9995$) no intervalo de 10 a 60 $\mu g/mL$.

A estimativa do teor de flavonóides foi realizada a partir de uma solução estoque (200 $\mu g/mL$) da FrBuOH. Esta foi sequencialmente diluída até as concentrações de 60, 40 e 20 $\mu g/mL$ em metanol. Em seguida, as soluções resultantes foram submetidas ao mesmo procedimento empregado para construção da curva. As soluções resultantes foram lidas em triplicata e a quantificação determinada a partir da extrapolação da absorvância lida, na curva de calibração.

Essa análise indicou teor estimado de flavonóides na FrBuOH em de cerca de 35%, confirmando a presença destas substâncias no EmeOH.

4.1.8- PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES

A Fr(143-157) (166 mg) forneceu um precipitado branco cristalino, que foi separado por centrifugação, denominado Gn1 (13 mg).

Análise por CCDC da Fr(134-142) (203 mg) indicou que esta possuía apenas duas manchas amarelas de Rf's próximos. Assim, a amostra foi solubilizada em 2,0 mL de MeOH/H₂O 1:1 v/v, filtrada em Millex de 0,45 µm, obtendo-se solução de 100,0 mg/mL que foi submetida à purificação por HPLC-IR (C18, MeOH/H₂O 1:1; 2,0 mL/min). Foram realizadas 10 injeções, de 50,0 µL cada, obtendo-se duas manchas de substâncias com coloração amarela frente à revelação com NP/PEG, que foram denominadas Gn2 (10 mg) e Gn3 (13 mg).

A Fr(124-133) (220 mg) também foi submetida às mesmas condições cromatográficas anteriormente descritas para sua purificação (HPLC-IR, MeOH/H₂O 1:1, 1,8 mL/min). Foram realizadas 12 injeções de 50,0 µL cada. Seguiu-se com a análise por CCDC (sílica gel, CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O, 5:6:1:4 v/v -fase inferior) e revelação sob luz UV e NP/PEG, a qual evidenciou uma substância de coloração amarela quando revelada com NP/PEG, denominada Gn 4 (10 mg).

A Fr(88-91) (248,0 mg) quando analisada por CCDC (sílica gel, CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O, 5:6:1:4, v/v, fase orgânica, revelada sob luz UV e NP/PEG) evidenciou, dentre outras substâncias, presença de flavonóide com polaridade maior que da rutina, além de outras substâncias minoritárias. Assim a purificação foi realizada através de CLC (cromatografia líquida em coluna aberta) utilizando gradiente de H₂O/MeOH como FM e C18 como FE.

A mesma amostra então foi solubilizada em 4,0 mL de MeOH/H₂O (1:9, v/v) e centrifugada. Separou-se o sobrenadante e este foi fracionado por CLC aberta de 10,0 x 1,5 cm de d.i., utilizando como eluente misturas de H₂O/MeOH (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 100% MeOH, v/v) em fluxo de 1,5 mL/min. Foram obtidas 25 frações, de 8,0 mL cada, as quais foram analisadas por CCDC (sílica gel, CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O 5:6:1:4 v/v -fase orgânica, revelada sob luz UV e NP/PEG) e agrupadas conforme similaridade de cor e Rf. Esse procedimento forneceu (com 20% MeOH) uma mancha de coloração amarela com NP/PEG, que foi denominada Gn5 (20 mg).

A Fr(92-104) (509,0 mg) também foi submetida à CLC em coluna aberta contendo C18 como FE. Assim, solubilizou-se a amostra em 6,0 mL de MeOH/H₂O (1:9, v/v), seguido por centrifugação e aplicação do sobrenadante ao topo de uma coluna de 15,0 x 1,5 cm de d.i. Procedeu-se a eluição com misturas de H₂O/MeOH (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 100% MeOH, v/v) em fluxo de 1,0 mL/min, obtendo-se 45 frações, que foram analisadas por CCDC (sílica gel, CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O, 5:6:1:4, v/v, fase orgânica) e agrupadas conforme similaridade diante do revelador (luz UV, NP/PEG). Através desse procedimento foi obtida outra mancha (com 20% MeOH) de R_f~0,3, com a mesma coloração da substância anterior diante do NP/PEG. Essa foi denominada Gn7 (15 mg) e analisada espectroscopicamente.

A Fr(114-123) (144,0 mg) foi solubilizada em cerca de 1,5 mL de MeOH/H₂O 1:1 v/v, filtrada em Millex de 0,45 µm, e submetida à purificação por HPLC-IR no modo semipreparativo (C18, MeOH/H₂O 1:1; 2,0 ml/min). Foram realizadas 10 injeções de 50µL cada. Este procedimento forneceu uma substância que produz mancha amarelo-ouro quando revelada com NP/PEG (sílica gel, CHCl₃/MeOH 8:2 v/v), sendo denominada Gn9 (5 mg) e enviada para análise por RMN.

Análise por CCDC da Fr(76-87) (450 mg) (sílica gel, CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O 5:6:1:4 e BAW 4:1:5, v/v, fase orgânica) evidenciou que a mesma se apresentava como uma mistura complexa, com muitas manchas roxas, alaranjadas e cinzas quando revelada com anisaldeído/H₂SO₄, de R_f baixo (~0,3). Assim, a fim de tentar isolar os componentes da Fr(76-87) (450,0 mg) utilizamos a Cromatografia em Contra-Corrente por Gotejamento (DCCC- "Droplet Countercurrent Chromatography") por ser uma técnica que permite a separação de substâncias mais polares sem haver perdas por adsorção irreversível da amostra.

A separação dos componentes da Fr(76-87) foi realizada no modo descendente, em que a fase móvel (mais densa) era constituída pela fase orgânica do sistema de solventes formado por CHCl₃/MeOH/H₂O - 43:37:20 v/v, enquanto que a fase estacionária era composta pela fase aquosa da mesma mistura. A amostra foi dissolvida em 10,0 mL da fase estacionária, centrifugada por 10 min, aplicando-se o sobrenadante. Procedeu-se o fracionamento coletando-se amostras de 8,0 mL cada. Após análise por CCDC e reagrupamento das frações semelhantes (sílica gel, CHCl₃/MeOH, 80:20, v/v + 3 gotas de ácido acético, reveladores: anisaldeído/H₂SO₄, luz UV) foi uma substância de coloração cinza diante do anisaldeído sulfúrico, denominada Gn10 (12 mg).

A figura 4.3 apresenta o fluxograma representativo dos procedimentos empregados no estudo químico das folhas de *G. noxia*.

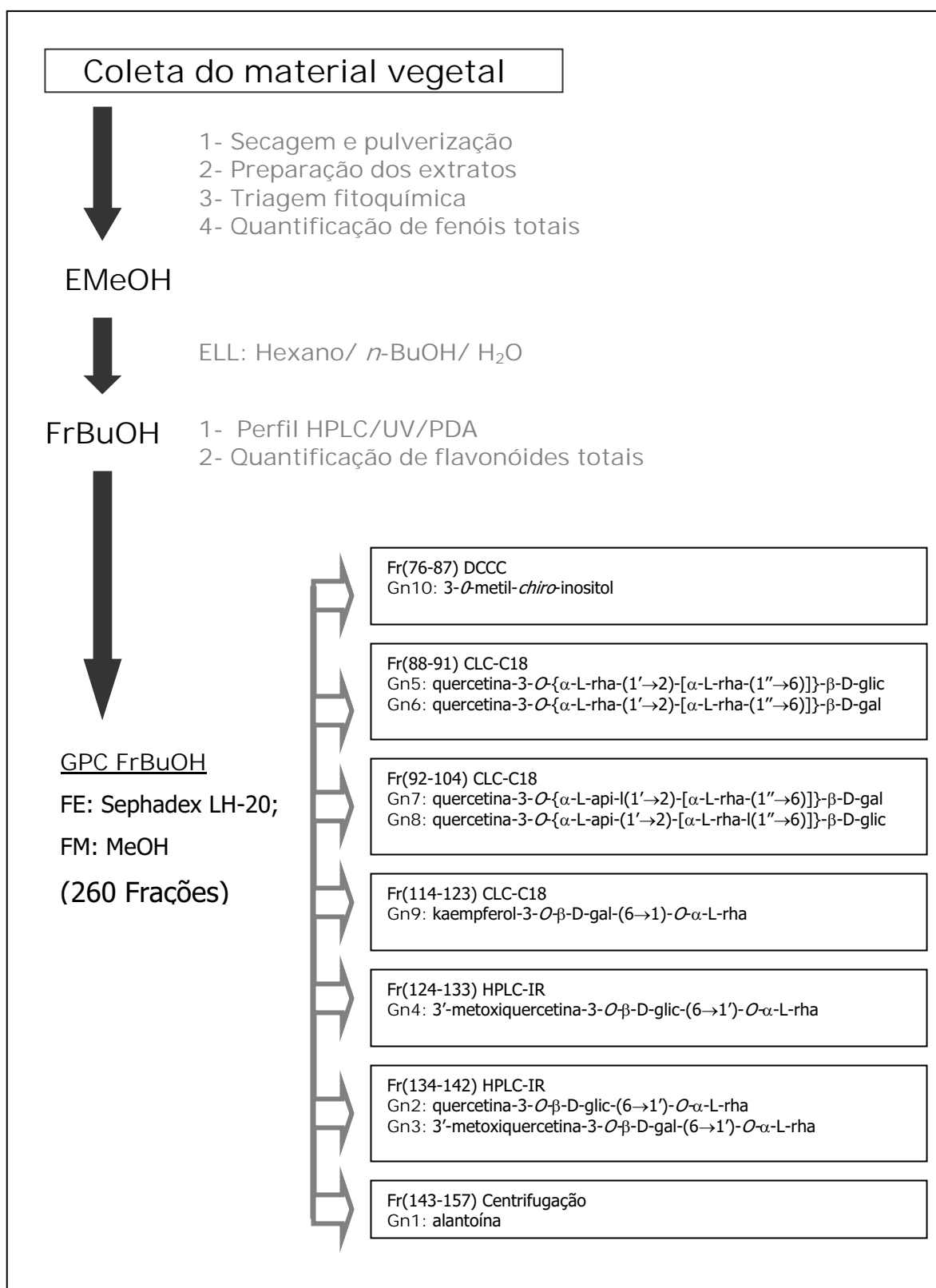


Figura 4.3. Fluxograma representativo do estudo químico de *G. noxia*.

4.9- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Gn1

Gn1 (13 mg) apresentou-se na forma de sólido cristalino branco, solúvel em água e insolúvel em MeOH.

O espectro na região do IV forneceu duas bandas finas na região de 3.300 e 3.400 cm^{-1} referentes a estiramento de ligação N-H de amidas primárias. Em 3.058 cm^{-1} observou-se uma banda referente ao estiramento da ligação C-H de C sp^2 . Em 1.778, 1714 e 1652 cm^{-1} ocorrem 3 bandas de deformação axial da ligação C=O. Em 1.529 cm^{-1} ocorre uma banda de deformação angular da ligação N-H (Pavia *et al.*, 2001; Silverstein e Webster, 2000). A banda em 2.364 cm^{-1} foi atribuída a CO atmosférico.

O espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 apresentou dois dubletos com $J = 8,0$ Hz (1H cada) em δ 6,87 e δ 5,24. O espectro apresenta ainda dois singletos em δ 8,03 (1H), δ 5,76 (2H) e outro singlete em δ 10,5. O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais δ 173,7; δ 157,4; δ 156,8 e δ 62,4.

Análise do experimento $g\text{COSY}$ 1H-1H evidenciou duas correlações entre os sinais δ 6,87/5,24 e 5,24/8,03. O experimento $g\text{HMQC}$, por sua vez, revelou apenas uma correlação em δ 5,24/62,4, indicando que os demais carbonos observados no espectro de RMN ^{13}C eram quaternários e que os outros sinais do espectro de RMN ^1H eram provavelmente de N-H.

Essa informação foi confirmada através da análise do espectro de RMN de ^{15}N (DMSO- d_6), o qual mostrou sinais correspondentes a três picos em δ 103,0; δ 92,0 e δ 78,0. Análise do experimento $g\text{HMBC}$, juntamente com comparação de dados da literatura (Kalinowski *et al.*, 1988) permitiram correlacionar os sinais (Tabela 4.7) e sugerir a estrutura da alantoína (Figura 4.4).

Análise do espectro de massas ESI-EM no modo negativo exibiu pico do íon quase-molecular $[\text{M-H}]^-$ em m/z 157, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$, o que corrobora com a estrutura proposta (Figura 4.4).

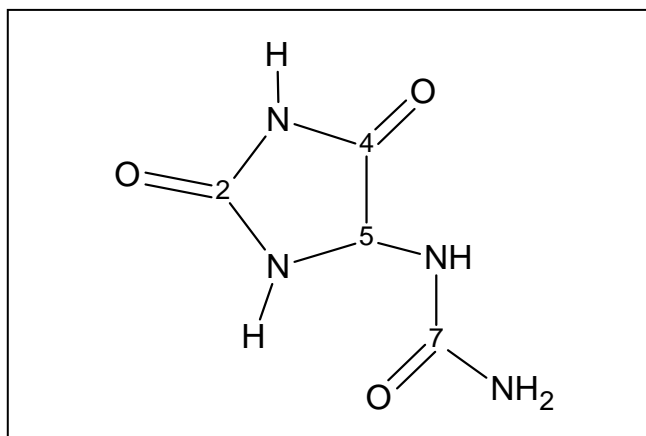


Figura 4.4. Estrutura química proposta para Gn1 (alantoína)

Tabela 4.7. Valores de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas em Gn1 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Gn1				
Posição	δ ^1H	δ $^{13}\text{C}^*$	δ $^{15}\text{N}^*$	COSY
1	10,5 (s, 1 H)	-	**	-
2	-	156,8	-	-
3	8,03 (s, 1 H)	-	103,0	H5
4	-	173,7	-	-
5	5,24 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	62,4	-	H6,H3
6	6,87 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	-	92,0	H5
7	-	157,4	-	-
8	5,76 (s, 2 H)	-	78,0	-

* Correlações obtidas a partir dos experimentos de gHMQC (^1H - ^{13}C e ^1H - ^{15}N); ** sinal não verificado

A alantoína é produto do catabolismo oxidativo dos nucleotídeos da purina, e, como tal, encontra-se amplamente disseminada em organismos animais e vegetais. Pode servir como fonte alternativa de nitrogênio em plantas que não o fixam. Dessa maneira, ureídeos como a alantoína, possuem papel essencial na assimilação, metabolismo, transporte e acúmulo de nitrogênio em plantas (Schubert e Boland, 1990).

Dados da literatura demonstram que a alantoína há muito vem sendo utilizada devido suas propriedades cicatrizantes, queratolíticas, hidratantes, epitelizantes e antiirritantes. As comprovadas propriedades promotoras de penetração da alantoína também melhoram a eficácia de preparações terapêuticas de uso tópico por permitirem a atuação dos outros componentes no sítio de ação na pele. O efeito antiirritante combate o prurido que freqüentemente acompanha a formação de cicatrizes (Reynolds, 1996).

Está presente, por exemplo, nas raízes e folhas de *Symphytum officinale*, conhecida como confrei. Trata-se de uma espécie utilizada para fins medicinais por auxiliar na redução de feridas, cicatrização e que contém alantoína numa concentração de 0,6-0,8%, tida como um dos princípios ativos (Lorenzi e Matos, 2002).

Gn2

Gn2 (10,0 mg) apresentou-se como sólido amarelo. A análise cromatográfica por CCDC e revelação amarela em NP/PEG indicou que poderia se tratar de um flavonóide.

O espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 de Gn2 apresentou sinais característicos de flavonóides (região de 6,0 a 7,5 ppm). Apresentou um duplo-dublete em δ 7,50 ($J = 2,0$ e 8,0 Hz) referente ao H6' e outro dublete em δ 7,53 ($J = 2,0$ Hz) referente ao H2' do anel B do flavonóide; outro dublete em δ 6,82 ($J = 8,0$ Hz) é referente ao H5'. O espectro apresenta ainda dois dubletos acoplados em meta ($J = 2,0$ Hz), referentes aos H6 e H8 do anel A do flavonóide em δ 6,17 e 6,37, respectivamente. Uma parte sacarídica pôde ser detectada a partir da presença do dublete de um hidrogênio anomérico em δ 5,32 ($J = 7,0$ Hz) e de outro dublete de hidrogênio anomérico em δ 4,37 ($J = 1,0$ Hz), bem como pelo conjunto de sinais entre δ 3,7 e 3,0.

O espectro de RMN ^{13}C evidencia a existência de 27 sinais, 15 dos quais atribuídos à aglicona do flavonóide e outros 12 à porção sacarídica. Através do experimento TOCSY-1D com irradiação nos hidrogênios anoméricos (δ 5,32 e δ 4,37), juntamente com a análise das constantes de acoplamento e dos sistemas de spins evidenciados neste experimento, permitiram atribuir à porção sacarídica os açúcares β -D-glicose e α -L-rhamnose, respectivamente. Através do experimento $g\text{HMBC}$ verificou-se a correlação existente entre os hidrogênios com os respectivos carbonos. O experimento $g\text{HMBC}$, por sua vez, indicou eventuais correlações existentes à longa distância, dentre elas, entre o sinal em δ 5,32 (H1-glicose) e o sinal em δ 133,4 (C3-aglicona), e entre o sinal em δ 4,37 (H1-rhamnose) e o sinal em δ 67,1 (C6-glicose), mostrando que a glicose está ligada no C-3 da aglicona do flavonóide e que a rhamnose encontra-se ligada no C-6 da glicose.

Comparação dos dados espectrométricos de Gn2 com os da literatura (Agrawal, 1989; Harborne e Willians, 1986) confirmou que esta substância é a quercetina-3- O - β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1')- O - α -L-rhamnopiranosídeo, comumente chamada de rutina (Figura 4.5).

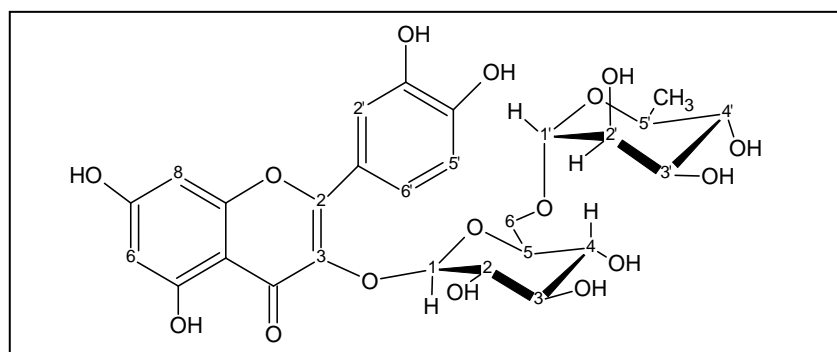


Figura 4.5. Estrutura química de Gn2 - Quercetina-3- O - β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1')- O - α -L-rhamnopiranosídeo (rutina).

Tabela 4.8. Valores de RMN ^1H e ^{13}C de Gn2 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Posição	Gn2		Literatura(*)
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^{13}C
2	-	156,7	156,6
3	-	133,4	133,5
4	-	177,4	177,8
5	-	161,3	161,3
6	6,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,8	99,0
7	-	164,3	164,0
8	6,37 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,7	93,9
9	-	156,5	156,8
10	-	104,0	104,2
1'	-	121,3	121,4
2'	7,53 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	116,3	115,4
3'	-	144,8	144,8
4'	-	148,5	148,5
5'	6,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	115,3	116,5
6'	7,50 (dd, $J = 2,0$ e 8,0 Hz, 1H)	121,7	121,5
3-O-glic			
1	5,32 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H)	101,3	101,4
2	3,22 (m)	74,2	74,3
3	3,27 (m)	76,5	76,6
4	3,04 (m)	70,1	70,3
5	3,26 (m)	75,9	76,1
6	3,68 (m)	67,1	67,3
rha 1→6 glic			
1'	4,37 (sl, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,8	100,9
2'	3,38 (m)	70,4	70,6
3'	3,26 (m)	70,7	70,6
4'	3,04 (m)	71,9	72,1
5'	3,26 (m)	68,3	68,5
6'	0,97 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H)	17,8	18,0

(*) Agrawal, 1989.

Gn3

Gn3 (13,0 mg) apresentou-se como sólido amarelo. Quando submetido à análise cromatográfica por CCDC e revelado com NP-PEG exibiu uma mancha amarela, sugerindo que poderia se tratar de outro flavonóide.

O espectro de RMN ^1H de Gn3 apresentou duplo-dublete em δ 7,50 ($J = 2,0$ e 8,5 Hz) referente ao H6', dublete em δ 7,98 ($J = 2,0$ Hz) referente ao H2' do anel B do flavonóide e dublete em δ 6,90 ($J = 8,5$ Hz) referente ao H5' do flavonóide, indicando que este também é di-oxigenado. À aglicona ainda podem ser atribuídos dois dubletos em δ 6,17 e δ 6,40, acoplados em meta ($J = 2,0$ Hz), referentes aos H6 e H8 do anel A do flavonóide, respectivamente. A presença de um singleto em δ 3,80 (integração de 3H) indica a presença de uma metoxila. Quando comparado com o espectro da rutina (Gn2), observa-se que a principal diferença ocorre no deslocamento químico de H2', que se apresenta blindado em cerca de - 0,45, o que sugere que a metoxila seja posicionada na posição 3' da aglicona, que caracteriza o núcleo da isorhamnetina (Harborne e Willians, 1986; Agrawal, 1989).

O experimento TOCSY-1D com irradiação sobre o hidrogênio anomérico em δ 5,43 mostra correlação com os sinais em δ 3,51; δ 3,43 e δ 3,64, evidenciando tratar-se da galactose. Irradiação em δ 4,42 exhibe o sistema de spin da rhamnose, similar ao observado em Gn2. Análise dos experimentos de g HMQC e g HMBC permitiram completar a atribuição dos sinais e verificar que o H-1 da galactose (δ 5,43) correlaciona com C-3 (δ 133,0) da aglicona do flavonóide, ao passo que o H-1 da rhamnose (δ 4,42) correlaciona com o C-6 da galactose (δ 65,2). Esses dados, juntamente com os da literatura específica (Agrawal, 1989; Harborne, 1986), confirmaram que Gn3 é 3'-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (isorhamnetina-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo) (Figura 4.6, Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Valores de RMN ^1H e ^{13}C de Gn3 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

Posição	Gn3		Literatura (*)
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^{13}C
2	-	156,2	156,5
3	-	133,0	133,2
4	-	177,2	-
5	-	161,1	161,2
6	6,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,9	98,8
7	OH	164,5	164,1
8	6,40 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,9	93,8
9	-	156,5	156,5
10	-	103,6	104,1
1'	-	121,0	121,1
2'	7,98 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	113,4	113,6
3'	-	146,9	149,4
4'	-	149,5	147,0
5'	6,90 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	115,2	115,9
6'	7,50 (dd, $J = 2,0$ e 8,5 Hz, 1H)	121,9	121,1
3- <i>O</i> -gal			
1	5,43 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	101,9	101,9
2	3,59 (m)	71,1	71,2
3	3,43 (m)	72,9	73,4
4	3,64 (m)	67,9	68,0
5	3,60 (m)	73,6	73,7
6	3,60 (m)	65,2	65,6
rha 1 \rightarrow 6 gal			
1'	4,42 (sl, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,0	100,2
2'	3,40 (m)	70,4	70,7
3'	3,30 (m)	70,6	70,7
4'	3,09 (m)	71,8	72,0
5'	3,38 (m)	68,2	68,2
6'	1,05 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H)	17,8	17,8
OCH ₃	3,80 (s, 3H)	55,9	56,2

(*) Agrawal, 1989.

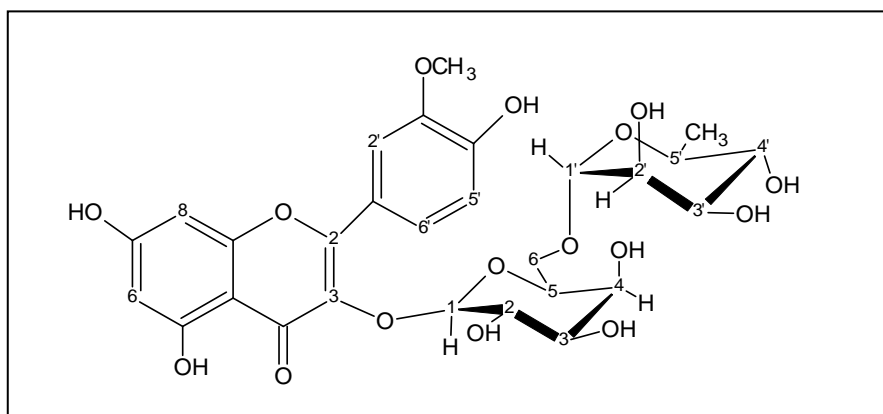


Figura 4.6. Estrutura química de Gn3 – 3'-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

Gn4

A análise do espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 evidencia a mistura de dois flavonóides derivados da quercetina. Na região de δ 6,0 a 8,0 observam-se os mesmos sinais característicos de Gn3. Contudo, verifica-se ainda a existência de uma segunda metoxila com δ 3,82, além de um hidrogênio anomérico em δ 5,41. Experimento TOCSY com irradiação sobre o sinal em δ 5,41 revela sistema de spin compatível com o da glicose. O conjunto dos espectros *g*HMQC, *g*HMBC permitiu verificar que a unidade de glicose está ligada ao C-3 da aglicona do flavonóide e que a rhamnose encontra-se ligada no C-6 da glicose. Comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989, Harborne e Willians, 1986) possibilitou identificar Gn4 como sendo 3'-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (isorhamnetina-3-*O*-rutinosídeo), cuja estrutura é apresentada na Figura 4.7, Tabela 4.10.

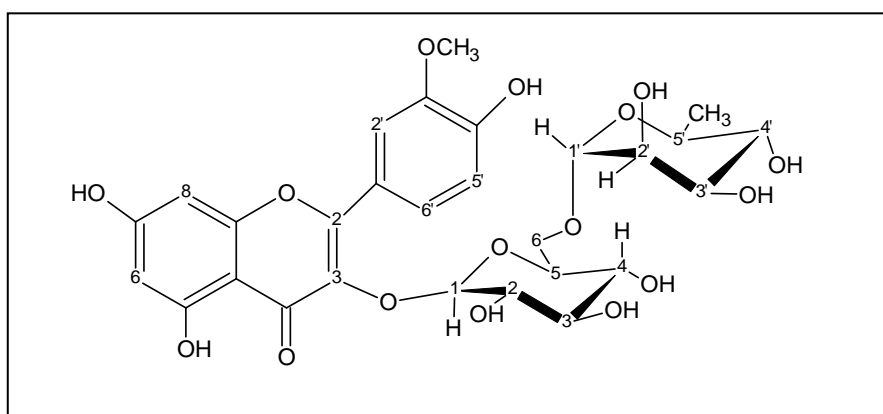


Figura 4.7. Estrutura química de Gn4 - 3'-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

Tabela 4.10. Valores de RMN ^1H e ^{13}C de Gn4 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Posição	Gn4		Literatura (*)
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^{13}C
2	-	156,5	156,2
3	-	133,0	133,3
4	-	177,2	177,3
5	-	161,1	161,2
6	6,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,9	98,7
7	OH	165,0	164,0
8	6,40 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,8	93,7
9	-	156,3	156,4
10	-	103,6	104,1
1'	-	121,0	121,2
2'	7,83 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	113,3	113,9
3'	-	146,9	149,5
4'	-	149,4	147,0
5'	6,90 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	115,2	115,3
6'	7,50 (m, $J = 2,0$ e 8,5 Hz, 1H)	122,2	122,4
3-O-glic			
1	5,41 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H)	101,3	101,5
2	3,22 (m)	74,3	74,4
3	3,27 (m)	76,4	76,7
4	3,03 (m)	70,1	70,2
5	3,20 (m)	75,9	76,1
6	3,70 (m)	67,0	67,0
rha 1→6 glic			
1'	4,40 (sl, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,8	100,8
2'	3,40 (m)	70,3	70,4
3'	3,30 (m)	70,6	70,8
4'	3,08 (m)	71,8	72,1
5'	3,29 (m)	68,2	68,2
6'	0,97 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	17,6	17,6
OCH ₃	3,82 (s, 3H)	55,7	56,0

(*) Agrawal, 1989.

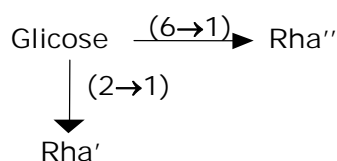
Gn5 e Gn6

Gn5 (18,0 mg) apresentou-se como sólido amarelo. A análise cromatográfica por CCDC e revelação em NP/PEG evidenciou uma mancha amarela, indicando que poderia se tratar de um flavonóide. Análise do espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 permitiu detectar a presença de uma mistura de dois flavonóides, porém em quantidades diferentes, caracterizados pela intensidade dos sinais. Assim, denominamos de Gn5 e Gn6 os flavonóides que apresentaram, respectivamente, conjunto de sinais com maior e menor intensidades.

Análise dos sinais de maior intensidade, referentes à substância Gn5, mostrou a presença de um duplo-dublete em δ 7,53 (H6', $J = 2,5$ e 8,5 Hz), um dublete em δ 7,48 (H2', $J = 2,5$ Hz) e um dublete em δ 6,83 (H5', $J = 8,5$ Hz) do anel B de um flavonóide. Dois dubletos em δ 6,18 e 6,37 com acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz) são referentes aos H6 e H8 do anel A, respectivamente, caracterizando a aglicona como sendo derivada da quercetina.

Observa-se ainda a presença de sinais intensos referentes a três unidades de açúcares, os quais, através de experimentos TOCSY-1D com irradiação nos hidrogênios anoméricos, juntamente com a análise das constantes de acoplamento permitiram identificar sistemas de spin referentes à β -D-glicose δ 5,53 ($J = 8,0$ Hz) e α -L-rhamnose δ 5,07 (d, $J = 3,5$ Hz) e δ 4,34 ($J = 1,0$ Hz). Pode-se observar também a presença de dois dubletos intensos ($J = 6,5$ Hz) em δ 0,81 e δ 0,98 indicativos do grupo CH_3 das unidades de rhamnose.

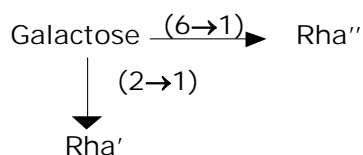
Análise dos espectros de RMN ^{13}C e $g\text{HMQC}$ e comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989) forneceram as correlações entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos e evidenciaram similaridade com as estruturas dos flavonóides Gn5 e Gn6, derivados da quercetina glicosilados em C3. Análise do espectro de $g\text{HMBC}$ (com ampliações) forneceu a ligação dos açúcares entre si e com a aglicona: verificou-se acoplamento entre o H1-Gli (δ 5,53) com o C3 da aglicona (δ 132,7), entre o H1-Rha' (δ 5,07) e o C2-Gli (δ 77,2) e entre o H1-Rha'' (δ 4,34) e o C6-Gli (δ 67,1).



Dessa forma, Gn5 foi identificada como sendo a quercetina-3- O - $\{\alpha$ -L-rhamnopiranosil (1' \rightarrow 2)- $[\alpha$ -L-rhamnopiranosil (1'' \rightarrow 6)] $\}$ - β -D-glicopiranosídeo (Figura 4.8, Tabela 4.11).

No caso da substância com sinais de menor intensidade, Gn6, o espectro de RMN ^1H mostrou a presença de um duplo-dublete em δ 7,65 ($\text{H6}'$, $J = 2,5$ e $8,5$ Hz), um dublete em δ 7,48 ($\text{H2}'$, $J = 2,5$ Hz) e um dublete em δ 6,81 ($\text{H5}'$, $J = 8,5$ Hz) do anel B de um flavonóide. Dois dubletos em δ 6,18 e 6,38 com acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz) são referentes aos H6 e H8 do anel A, respectivamente. Pode-se observar também a presença de dois dubletos de baixa intensidade em δ 0,81 ($J = 6,5$ Hz) e δ 1,06 ($J = 6,5$ Hz) indicativos do CH_3 das unidades de rhamnose.

Observa-se ainda a presença de sinais intensos referentes a 3 unidades de açúcares, os quais, através de experimentos TOCSY-1D com irradiação nos hidrogênios anoméricos, juntamente com a análise das constantes de acoplamento permitiram identificar sistemas de spin referentes à β -D-galactose δ 5,57 ($J = 10,0$ Hz); e α -L-rhamnose δ 5,06 (d, $J = 3,5$ Hz) e δ 4,39 ($J = 1,0$ Hz). Análise do espectro de $g\text{HMBC}$ (com ampliações) forneceu a ligação dos açúcares entre si e com a aglicona: verificou-se acoplamento entre o H1-Gal (δ 5,57) com o C3 da aglicona (δ 132,8), entre o H1-Rha' (δ 5,06) e o C2-Gal (δ 74,9) e entre o H1-Rha'' (δ 4,39) e o C6-Gli (δ 65,0).



Dessa forma, Gn6 foi identificada como sendo a quercetina-3-*O*-{ α -L-rhamnopiranosil (1'→2)-[α -L-rhamnopiranosil (1''→6)]}- β -D-galactopiranosídeo (Figura 4.8, Tabela 4.11).

Tabela 4.11. Valores de RMN ^1H e ^{13}C de Gn5 e Gn6 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

P	Gn5			Gn6		
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ $^{13}\text{C}^*$	δ ^1H	δ ^{13}C	δ $^{13}\text{C}^{**}$
2	-	156,7	156,3	-	156,7	156,3
3	-	132,7	132,7	-	132,9	132,7
4	-	177,2	176,1	-	177,2	177,0
5	-	161,2	161,3	-	161,2	161,1
6	6,18 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,6	98,9	6,18 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,6	98,9
7	-	164,0	165,1	-	164,0	165,1
8	6,37 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H)	93,6	93,6	6,37 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,6	93,6
9	-	156,4	155,9	-	156,3	155,9
10	-	103,9	103,5	-	103,9	103,5
1'	-	121,2	121,9	-	121,2	121,9
2'	7,48 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H)	116,1	115,9	7,48 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H)	116,1	115,1
3'	-	144,8	144,9	-	144,8	144,9
4'	-	148,3	148,5	-	148,3	148,5
5'	6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	115,1	115,6	6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	115,7	115,6
6'	7,53 (dd, $J = 8,5; 2,5$ Hz, 1H)	121,6	121,0	7,65 (dd, $J = 8,5$ e $2,5$ Hz, 1H)	122,5	121,0
3- <i>O</i> -glic				3- <i>O</i> -gal		
1	5,53 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	98,6	98,7	5,57 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H)	99,2	99,2
2	3,49 (m)	77,2	77,3	3,81 (m)	74,9	75,7
3	3,39 (m)	77,1	77,0	3,60 (m)	73,6	73,9
4	3,08 (m)	71,8	71,8	3,60 (m)	68,6	68,8
5	3,26 (m)	75,7	75,5	3,61 (m)	73,6	73,8
6	3,70 (m)	67,1	66,8	3,55 (m)	65,0	65,8
rha' 1→2 glic				rha' 1→2 gal		
1'	5,07 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,5	100,5	5,07 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,5	100,6
2'	3,74 (m)	70,4	70,3	3,74 (m)	70,4	70,9
3'	3,48 (m)	70,6	70,5	3,48 (m)	70,6	70,5
4'	3,14 (m)	71,9	71,8	3,14 (m)	71,9	72,2
5'	3,76 (m)	68,2	68,2	3,76 (m)	68,2	68,9
6'	0,81 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	17,2	17,2	0,81 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	17,2	17,2
rha'' 1→6 glic				rha'' 1→6 gal		
1''	4,34 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,7	100,5	4,39 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H)	100,0	100,3
2''	3,35 (m)	70,4	70,5	3,37 (m)	70,4	70,9
3''	3,24 (m)	70,6	70,5	3,29 (m)	70,6	70,5
4''	3,05 (m)	71,8	71,8	3,09 (m)	71,8	72,2
5''	3,35 (m)	70,4	68,2	3,33 (m)	70,4	68,3
6''	0,98 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	17,2	17,6	1,06 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	17,6	17,7

P: posição; (*) Otsuka *et al.*, 1989; (**) Yasukawa *et al.*, 1989

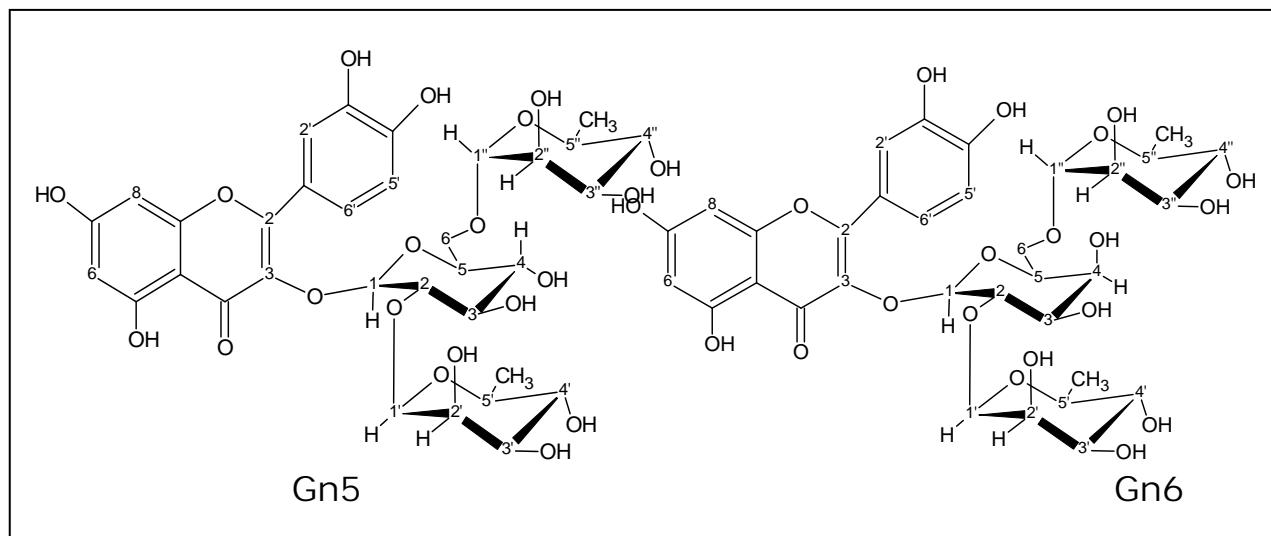


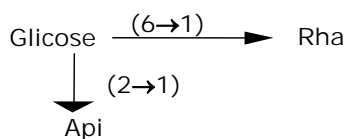
Figura 4.8. Estrutura dos flavonóides Gn5 e Gn6 isolados do EMeOH de *G. noxia*.

Gn7 e Gn8:

Análise do espectro de RMN ^1H de Gn7 evidenciou outra mistura de dois flavonóides em proporções diferentes, denominados de Gn7 (substância majoritária) e Gn8 (substância minoritária).

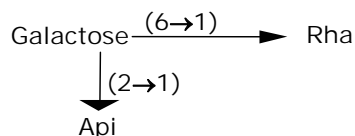
O espectro de RMN ^1H é semelhante ao da mistura Gn5 e Gn6. A única diferença reside no dupletos ($J = 1,0$ Hz) em δ 5,32 e δ 5,34. No caso da substância majoritária, experimentos TOCSY-1D com irradiação no sinal anomérico em δ 5,32 levou somente a um duplete em δ 3,80, indicativo de uma unidade de α -L-apiose. Confirmação adicional para essa unidade sacarídica proveio dos experimentos de RMN mono e bidimensionais, especialmente da correlação δ 5,34/108,8 (H1/C1-api), típica deste açúcar (Agrawal, 1989). No caso da substância minoritária, irradiação no sinal anomérico em δ 5,34 também levou somente a um duplete em δ 3,80, característico de uma outra unidade de β -D-apiose e no espectro HMQC foi observada a mesma correlação δ 5,34/108,8 (H1/C1-api).

Análise do espectro $g\text{HMBC}$ (ampliado) da substância majoritária Gn7, evidenciou acoplamento entre o H1-Gal (δ 5,53) com o C3 da aglicona (δ 132,0), entre o H1-Api (δ 5,32) e o C2-Gal (δ 76,1) e entre o H1-Rha'' (δ 4,38) e o C6-Gal (δ 66,6).



Assim, Gn7 foi identificada como sendo a quercetina-3- O - $\{\beta$ -D-apiofuranosil(1' \rightarrow 2)- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosil(1'' \rightarrow 6)] $\}$ - β -D-galacopiranosídeo (Figura 4.9, Tabela 4.12).

No caso da substância minoritária Gn8, o espectro de g HMBC forneceu a ligação dos açúcares entre si e com a aglicona: verificou-se acoplamento entre o H1-Glic (δ 5,49) com o C3 da aglicona (δ 132,0), entre o H1-Api (δ 5,34) e o C2-Glic (δ 76,9) e entre o H1-Rha'' (δ 4,34) e o C6-Glic (δ 66,6).



Assim, Gn8 foi identificada como sendo a quercetina-3-*O*-{ β -D-apiofuranosil(1'→2)-[α -L-rhamnopiranosil(1''→6)]}- β -D-glicopiranosídeo (Figura 4.9, Tabela 4.12).

Tabela 4.12. Valores de RMN ^1H e ^{13}C de Gn7 e Gn8 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Posição	Gn7		Gn8	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	156,6	-	156,6
3	-	132,0	-	132,0
4	-	177,2	-	177,2
5	-	161,2	-	161,2
6	6,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,6	6,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,6
7	-	164,0	-	164,0
8	6,37 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H)	93,5	6,36 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,5
9	-	156,2	-	156,2
10	-	104,5	-	104,5
1'	-	121,0	-	121,0
2'	7,49 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	115,8	7,49 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	115,8
3'	-	144,8	-	144,8
4'	-	148,5	-	148,5
5'	6,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	115,0	6,82 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	114,8
6'	7,73 (dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz, 1H)	121,9	7,58 (dd, $J = 8,5$ e $2,5$ Hz, 1H)	121,5
3- <i>O</i> -gal			3- <i>O</i> -glic	
1	5,53 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H)	99,2	5,49 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	98,5
2	3,79 (m)	76,1	3,49 (m)	76,9
3	3,60 (m)	73,5	3,40 (m)	76,7
4	3,58 (m)	68,2	3,07 (m)	71,7
5	3,60 (m)	73,6	3,22 (m)	75,8
6	3,52 (m)	66,6	3,68 (m)	66,6
api 1'→2 gal			api 1'→2 glic	
1'	5,32 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H)	108,8	5,34 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H)	108,8
2'	3,80 (d, $J = 2,5$ Hz, 1 H)	76,1	3,80 (d, $J = 2,5$ Hz, 1 H)	76,1
3'	-	79,1	-	79,1
4'	3,84 (m)	73,9	3,84 (m)	73,9
5'	3,38 (m)	64,3	3,38 (m)	64,3
rha 1''→6 gal			rha 1'' →6 glic	
1''	4,38 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H)	99,9	4,34 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H)	100,7
2''	3,37 (m)	70,4	3,35 (m)	70,4
3''	3,30 (m)	70,6	3,24 (m)	70,4
4''	3,10 (m)	71,8	3,06 (m)	71,7
5''	3,35 (m)	70,2	3,24 (m)	70,4
6''	1,06 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H)	17,8	0,98 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H)	17,6

(-) sinal não verificado.

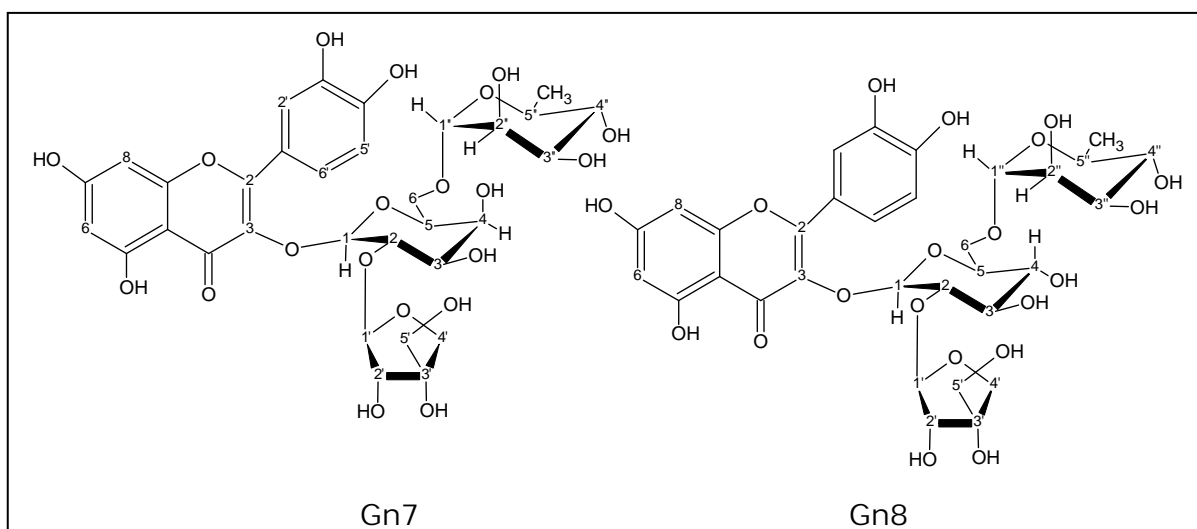


Figura 4.9. Estrutura dos flavonóides Gn7 e Gn8 isolados do EMeOH de *G. noxia*.

Gn9:

Gn9 (5 mg) apresentou-se como sólido amarelo. A análise cromatográfica por CCDC e revelação em NP/PEG evidenciou uma mancha amarela ouro, indicando que poderia se tratar de um flavonóide.

O espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 forneceu o perfil de uma molécula aromática com dois dubletos acoplados na posição *orto* ($J = 8,5$ Hz), integrando para 2H cada em δ 6,84 e δ 8,02, atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H3'/H5' e H2'/H6' do anel B de um flavonóide. Foram verificados também dois singletos em δ 6,0 e δ 6,18, referentes aos H6 e H8, respectivamente, do anel A de um flavonóide hidroxilado nas posições 5 e 7, sugerindo então que este flavonóide seja derivado do kaempferol.

A presença de duas unidades de açúcares foi verificada a partir dos sinais referentes aos hidrogênios anoméricos em δ 5,22 e δ 4,41. Pode-se observar também a presença de um dubleto ($J = 6,5$ Hz) em δ 1,06 indicativo do grupo CH_3 de uma unidade de rhamnose. Experimentos TOCSY-1D, com irradiação nos hidrogênios anoméricos em δ 5,22 e δ 4,41 levaram ao reconhecimento de unidades de galactose e rhamnose, respectivamente.

O conjunto dos espectros mono e bidimensionais permitiu atribuir todos os sinais de GN9 (Tabela 4.12). Apesar de o experimento $g\text{HMBC}$ não ter mostrado correlações entre a aglicona/açúcar e correlações entre as duas unidades sacarídicas, os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos C2 e C3 da aglicona deixam claro a substituição em C3. Além disso, o valor de δ 64,8 de Gal-6 é típico de substituição por uma segunda unidade sacarídica (Agrawal, 1989).

Esse conjunto de dados e comparação com a literatura (Agrawal, 1989; Harborne e Willians, 1986), permitiram identificar Gn9 como sendo o kaempferol-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (Figura 4.10).

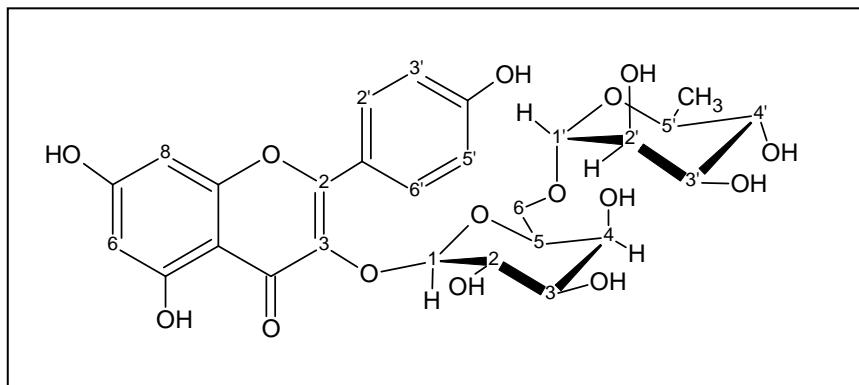


Figura 4.10. Estrutura química de Gn9 - kaempferol-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(6 \rightarrow 1)-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

Tabela 4.13. Valores de RMN ^1H e RMN ^{13}C de Gn9 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Posição	Gn9		
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ $^{13}\text{C}^*$
2	-	155,2	156,3
3	-	-	133,1
4	-	-	177,5
5	-	-	161,3
6	6,0 (<i>s</i> , 1 H)	99,0	99,0
7	-	-	164,3
8	6,18 (<i>s</i> , 1 H)	94,5	93,6
9	-	-	156,3
10	-	-	103,8
1'	-	121,8	121,2
2'/6'	8,02 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 2 H)	130,7	130,8
3'/5'	6,84 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 2 H)	114,9	115,0
4'	-	160,0	159,9
3- <i>O</i> -gal			
1	5,22 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz, 1 H)	103,0	102,2
2	3,54 (<i>m</i>)	73,0	71,5
3	3,40 (<i>m</i>)	72,5	73,0
4	3,59 (<i>m</i>)	67,7	68,1
5	3,40 (<i>m</i>)	72,5	73,6
6	3,60 (<i>m</i>)	64,8	65,4
rha 1 \rightarrow 6 gal			
1'	4,41 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz, 1 H)	100,5	100,4
2'	3,42 (<i>m</i>)	70,2	70,7
3'	3,30 (<i>m</i>)	70,4	70,4
4'	3,10 (<i>m</i>)	71,6	72,0
5'	3,36 (<i>m</i>)	68,2	68,3
6'	1,06 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3 H)	17,6	17,9

(-) Sinal não verificado; (*) Agrawal, 1989

Gn10:

Gn10 apresentou-se como sólido cristalino branco, solúvel apenas em água. Análise do espectro de absorção na região do IV (em KBr) dessa substância evidenciou bandas de absorção características de ν_{O-H} (3.402, 3.319 e 1.450 cm^{-1}), de ν_{C-H} (2.900 cm^{-1}) e de ν_{C-O} (1.072 cm^{-1}) (Pavia *et al.*, 2001; Silverstein e Webster, 2000).

O espectro de RMN ^1H em D_2O apresentou sinais referentes a 6 hidrogênios carbinólicos entre δ 3,2 a 3,9, sendo: um multipletto em δ 3,94 (2H); dois duplo-dubletos em δ 3,75 (1H, $J = 10,0$; 3,0 Hz) e δ 3,70 (1H, $J = 9,5$; 3,0 Hz); dois tripletos (feição) em δ 3,59 (1H, $J = 9,5$ Hz) e 3,28 (1H, $J = 9,5$ Hz). O mesmo espectro evidencia ainda a presença de um singletto em δ 3,52 (3 H), indicativo de uma metila.

O espectro de RMN ^{13}C mostra a presença de 6 sinais característicos de carbonos carbinólicos e um típico de metoxila em δ 59,9 (Pavia *et al.*, 2001; Silverstein e Webster, 2000). Análise dos espectros uni- e bidimensionais $g\text{COSY}$, e $g\text{HMQC}$ permitiu atribuir todos os hidrogênios e carbonos e deduzir que se trata de um ciclitol.

Análise dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos (Tabela 4.14), levaram à identificação de Gn10 como sendo 3-*O*-metil-*chiro*-inositol (pinitol) (Figura 4.11), cuja nomenclatura segue as recomendações IUPAC (2006).

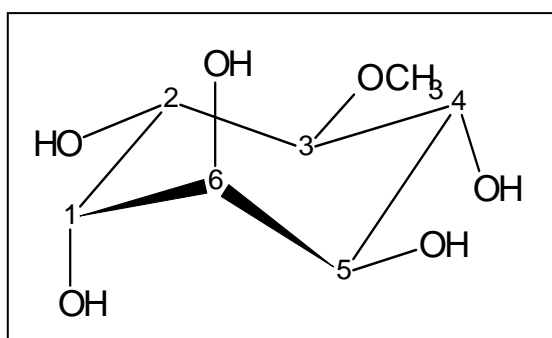


Figura 4.11: Estrutura química de Gn10 - 3-*O*-metil-*chiro*-inositol.

Tabela 4.14. Valores de RMN ^1H , RMN ^{13}C e $g\text{COSY}$ observados em Gn10 (D_2O , 11,7 T).

Gn10				
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	δ $^{13}\text{C}^*$	$g\text{COSY}$
1	3,94 (m, 2 H)	71,7	71,5	H5/H1
2	3,75 (dd, $J = 10,0$; 3,0 Hz, 1 H)	70,0	69,8	H4/H6
3	3,28 (t, $J = 9,5$ Hz, 1 H)	82,9	82,7	H3/H5
4	3,59 (t, $J = 9,5$ Hz, 1 H)	72,3	72,1	H2/H4
5	3,70 (dd, $J = 9,5$; 3,0 Hz, 1 H)	70,8	70,5	H1/H3
6	3,94 (m, 2H)	71,9	71,1	H2/H6
OCH_3	3,51 (s, 3 H)	59,8	59,7	

(*) deslocamentos químicos referentes ao 3-*O*-metil-*chiro*-inositol

Ciclitóis são derivados cicloexânicos que contém pelo menos três hidroxilas no anel. Quando a estrutura básica for derivada do 1,2,3,4,5,6-hexaidróxicicloexano, geralmente é utilizado o termo inositol (IUPAC, 2006). De acordo com o levantamento bibliográfico (Suresham *et al.*, 2004; Podeschwa *et al.*, 2003), seis isômeros de ciclitóis obtidos de produtos naturais encontram-se descritos na literatura: *myo*, *scyllo*, *neo*, *D-chiro*, *L-chiro* e *muco*-inositol, os quais se diferenciam apenas pela orientação dos grupos hidroxilas no anel.

Inositóis e seus derivados são de ocorrência natural e a eles têm sido atribuídas importantes atividades biológicas, como por exemplo, os fosfatidilinositóis, que estão envolvidos no sistema intracelular de segundo mensageiro, promovendo aumento da concentração de cálcio intracelular (Berridge, 1993; Irvine e Schell, 2001).

Dentre os isômeros de inositóis conhecidos, seis, acima citados, são de ocorrência natural. Porém, para o entendimento das relações de estrutura-atividade desta classe, trabalhos apresentam a síntese dos isômeros naturais e ainda de outros isômeros, tais como *allo*-, *epi*- e *cis*-inositol (Podeschwa *et al.*, 2003).

Nos animais, os inositóis ocorrem preferencialmente na forma fosforilada, enquanto que na plantas eles aparecem fosforilados, metilados (por ligação éter) ou na forma livre (Podeschwa *et al.*, 2003).

Os derivados do *chiro*-inositol também são mediadores de alguns mecanismos biológicos importantes. Por exemplo, estudos com o D-pinitol (3-*O*-metil-D-*chiro*-inositol), isolado de *Bougainvillea spectabilis* (Nyctaginaceae), mostram que ele apresenta a mesma ação da insulina, sendo considerado uma das substâncias responsáveis pelo efeito antidiabético atribuído a esta espécie (Bates *et al.*, 2000).

Dessa forma, o isolamento e identificação dessa substância no extrato de *G. noxia* é mais um resultado importante para auxiliar na compreensão das atividades biológicas atribuídas à espécie.

4.1.10- IDENTIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES NO PERFIL CROMATOGRÁFICO

A identificação dos picos foi realizada a partir da co-injeção de uma mistura da solução do perfil acima ilustrado com outra da solução (1 mg/mL) de cada flavonóide isolado, na proporção de 4:1, respectivamente, com monitoramento em 360 nm. Assim, verificou-se que os flavonóides isolados até o momento referem-se aos seguintes picos (Tabela 4.15, Figura 4.12).

Tabela 4.15. Identificação dos flavonóides isolados no perfil cromatográfico do EMeOH de *G. noxia*

Pico	TR (min)	Substância identificada
1	21,0	Gn7: quercetina-3- <i>O</i> -{ β -D-api-l(1'→2)-[α -L-rha-(1''→6)]}- β -D-gal Gn8: quercetina-3- <i>O</i> -{ β -D-api-(1'→2)-[α -L-rha-l(1''→6)]}- β -D-glic
2	23,6	Gn6: quercetina-3- <i>O</i> -{ α -L-rha-(1'→2)-[α -L-rha-(1''→6)]}- β -D-gal
3	24,1	Gn5: quercetina-3- <i>O</i> -{ α -L-rha-(1'→2)-[α -L-rha-(1''→6)]}- β -D-glic
5	29,3	Gn2: quercetina-3- <i>O</i> - β -D- glic-(6→1')- <i>O</i> - α -L-rha
7	32,2	Gn9: kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-gal-(6→1)- <i>O</i> - α -L-rha
8	33,9	Gn3: 3'-metoxiquercetina-3- <i>O</i> - β -D-gal-(6→1')- <i>O</i> - α -L-rha
9	34,5	Gn4: 3'-metoxiquercetina-3- <i>O</i> - β -D-glic-(6→1')- <i>O</i> - α -L-rha

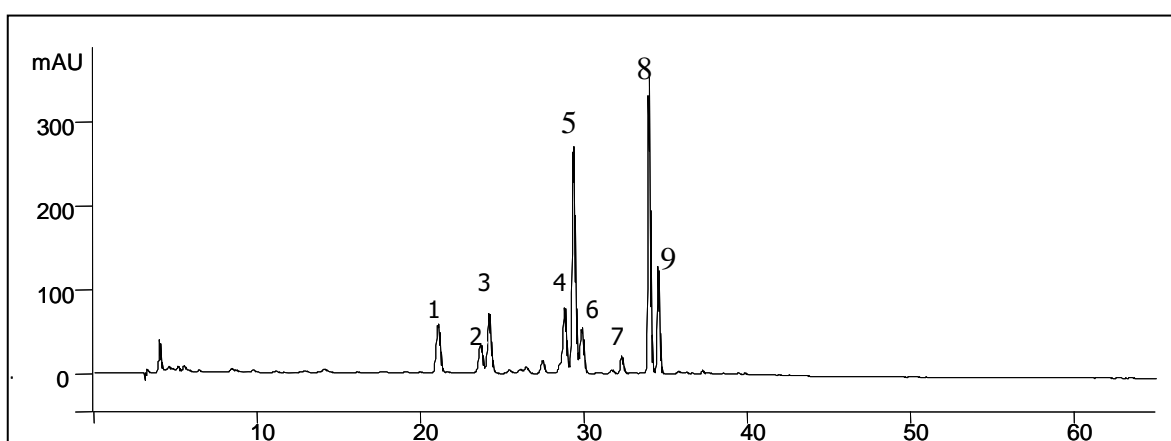


Figura 4.12. Perfil Cromatográfico do EMeOH das folhas de *G. noxia* (C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-37% de B em A em 20 min, de 38-70% de B até 60 min e 71-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 ml min⁻¹, λ 360nm).

Os flavonóides estão presentes em grande parte das plantas, incluindo folhas, raízes, cascas, pólen e sementes (Harborne e Willians, 1986) e por isso representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal, desempenhando importantes funções nas plantas, tais como: proteção contra radiação UV, contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de agentes polinizadores, antioxidantes, agentes alelopáticos, dentre outras (Harborne e Willians, 2000).

Do ponto de vista estrutural, os flavonóides englobam um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresentam uma estrutura química comum entre eles, que se caracteriza pela presença de dois anéis aromáticos A e B e um heterociclo oxigenado. As modificações estruturais mais freqüentes nas agliconas flavonoídicas são em grande parte devido a hidroxilações, metilações e em especial, a glucosilações (Markham, 1982).

A glicosilação pode ocorrer nos grupos hidroxila, originando flavonóides *O*-glicosilados, ou diretamente no núcleo flavonoídico, dando origem aos flavonóides *C*-glicosilados, sendo que as unidades de açúcares mais abundantes na natureza são D-glicose e L-rhamnose (Harborne e Willians, 2000).

Dados da literatura revelam que são conhecidos mais de 6.000 flavonóides, sendo que novas estruturas ainda estão sendo descobertas. Eles podem ser utilizados como marcadores taxonômicos, pois, apresentam abundância em todo o reino vegetal, especificidade de classes em algumas espécies, relativa facilidade de isolamento e identificação, estabilidade química, dentre outras características. A grande abundância e diversidade dos flavonóides sugerem que eles sejam importantes para as plantas superiores (Zuanazzi e Montanha, 2003; Harborne e Willians, 2000).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto. Muitas atividades biológicas são atribuídas a eles, como: antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, vasodilatadora, anti-hiperproliferativa, antidiarréica, antiúlcera, antiestrogênica, anticâncer, antidiabética, anti-hepatotóxica (Ross e Kasum, 2002; Harborne e Willians, 2000). Também inibem, *in vitro*, a lipoperoxidação de membranas celulares, a agregação plaquetária, a permeabilidade e a fragilidade capilar, e a atividade de enzimas, como fosfolipase A₂, ciclooxigenase, lipoxigenase, glutathione redutase e xantina oxidase (Chang *et al.*, 1993).

A maioria dos efeitos benéficos dos flavonóides é atribuída à sua atividade antioxidante, por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido (O²⁻), o radical hidroxila ou radical peróxido, atuando em sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Alguns flavonóides ainda são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Assim, os flavonóides podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres, protegendo os sistemas biológicos de seus efeitos deletérios (Katsube *et al.*, 2006).

Além disso, estudos moleculares demonstram também que compostos fenólicos, como os flavonóides, podem exercer os efeitos biológicos em decorrência de modulação da expressão genética, bem como através da interação com proteínas chaves e alvos específicos de sinalização celular, tais como, na cascata de AMPc, além de proteger contra dano na membrana mitocondrial (Soobratee *et al.*, 2005).

Dentre os flavonóides identificados em *G. noxia*, aparentemente a rutina é o majoritário. Trata-se de um derivado diglicosilado da quercetina, comumente encontrado em outras plantas. Desde que foi obtida pela primeira vez de *Ruta graveolens*, a ela é dada reconhecida importância terapêutica, principalmente em virtude de sua capacidade de inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios.

Além disso, segundo *Christel* (2000) também apresenta efeitos na normalização da permeabilidade e fragilidade dos vasos sanguíneos, proteção contra edema (devido à inibição da enzima hialuronidase), além da já citada atividade antioxidante. Outros trabalhos da literatura ainda reportam as atividades antiinflamatória e hepatoprotetora à rutina, o que reforça sua importância para a saúde humana (*Raghav et al.*, 2006; *Gilani et al.*, 1995).

Embora a presença de flavonóides na dieta humana seja evidente, ainda existem poucos estudos (e controversos) sobre a capacidade dos mesmos de serem absorvidos e alcançarem os sítios de ação.

De forma geral, supõe-se que os heterosídeos são dificilmente absorvidos pelo intestino delgado, porque a unidade sacarídica eleva significativamente sua hidrofília. Por isso, acredita-se que a forma heterosídica dos flavonóides atravesse o intestino delgado e entre no ceco, cólon e ali sejam hidrolizados até a forma aglicona, por enzimas de enterobactérias (*E. coli*, por exemplo). Na forma aglicona então, os flavonóides podem ser absorvidos mais facilmente pelas células epiteliais do intestino grosso, porque a lipofília facilita a passagem pela camada fosfolipídica da membrana celular. Em seguida, eles atingem a circulação sanguínea e são submetidos à *o*-metilação, glucoronidação, e/ou sulfatação no fígado. Uma parte substancial pode então ser excretada na bile e retornar para o lúmen intestinal. Novamente, ele será hidrolisado, reabsorvido pelas células intestinais e excretado nas fezes (*Murota e Terao*, 2003; *Erlund* 2004). Todavia, alguns pesquisadores também verificaram absorção intestinal de flavonóides glicosilados, como a rutina (*Andlauer et al.*, 2001).

Os flavonóides, normalmente, não são considerados substâncias tóxicas e várias especialidades farmacêuticas os descrevem como isentos de toxicidade. Porém, não há atualmente respaldo científico suficiente para isentá-los. Ainda assim, devido às suas atividades biológicas, o uso dos flavonóides nas formulações farmacêuticas e de alimentos tem sido objeto de muito interesse (*Katsoura et al.*, 2006) e, por isso, o seu estudo continua sendo de grande importância para a saúde humana.

Nosso grupo de pesquisa em química de produtos naturais do IQ-UNESP/ Araraquara, juntamente com os pesquisadores da área de farmacologia de produtos naturais do IB-UNICAMP, IB-Botucatu-UNESP e de Ciência Biológicas da FCF- UNESP/Araraquara iniciaram colaboração há cerca de dois anos (Projeto-Biota/Fapesp, Coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas) para desenvolvimento de pesquisas em biodiversidade e prospecção de produtos naturais farmacologicamente ativos, ao qual este trabalho está inserido.

Os resultados originam-se de uma estratégia de pesquisa que parte de informações etnobotânicas e etnofarmacológicas, segue com a realização de ensaios farmacológicos preliminares com extratos, realiza triagem fitoquímica em busca das classes de compostos presentes nos mesmos, prossegue com o isolamento e identificação estrutural dos componentes presentes e utiliza as substâncias ou frações enriquecidas para a determinação dos prováveis mecanismos de ação farmacológica envolvida com a atividade detectada.

Assim, nesse trabalho os dados obtidos dos ensaios biológicos serão apresentados a fim de se obter um panorama geral sobre as atividades biológicas presentes e a composição química da espécie, tentando estabelecer as correlações existentes.

A avaliação da atividade antioxidante do item 4.2.1 foi feita no laboratório de química orgânica, Instituto de Química, juntamente com o estudo químico.

Os experimentos 4.2.2, 4.2.3 e 4.2.4 foram realizados no laboratório de Fisiologia do Instituto de Biociências-UNESP/Botucatu pela pós-graduanda Lucilene P. Mazzolin sob a supervisão da profa. Dra. Clélia A. Hiruma-Lima como parte integrante do projeto BIOTA-FAPESP.

As determinações das atividades antimicrobianas e das CIM do item 4.2.5 foram realizadas nos laboratórios de Microbiologia da FCF/UNESP-Araraquara, pelas profa. Dra. Taís Maria Bauab e Clarice Q. F. Leite, integradas ao projeto BIOTA-FAPESP, enquanto que a avaliação da CIM do item 4 foi realizada no laboratório de Biotecnologia da FCF/UNESP-Araraquara pela pós-graduanda Tatiana M. de Souza.

Os experimentos do item 4.2.6 foram realizados pela pós-graduanda Fernanda P. Benzatti, no laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP/Araraquara, sob a supervisão da profa. Dra. Iracilda Z. Carlos.

4.2.1- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A grande diversidade química existente entre as substâncias naturais torna a análise da atividade antioxidante difícil, bem como sua quantificação. Isso levou ao aparecimento de vários ensaios em diferentes tipos de amostras biológicas *in vitro*, particularmente em matrizes complexas como vegetais.

Um desses testes, disponíveis em nosso grupo para se verificar a propriedade antioxidante de produtos naturais e extratos consiste em avaliar a capacidade destas em seqüestrar radicais livres frente ao DPPH (1,1-difenil-2-picril idrazina). O DPPH apresenta coloração púrpura na forma oxidada (instável) e quando reduzido, torna-se amarelo. Esta redução é devido à ação de algumas substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando assim radicais estáveis, ao qual é atribuída à propriedade antioxidante. Dessa maneira, o teste mede a capacidade de uma substância potencialmente antioxidante de seqüestrar radicais livres (David *et al.*, 2003).

Enquanto o teste de sequestro de radicais livres mede uma ação direta das substâncias candidatas a antioxidantes, pode-se utilizar também testes de inibição de oxidação, os quais permitem avaliar uma ação indireta das substâncias potencialmente antioxidantes. Um tipo de teste dessa natureza é o de verificação de atividade antioxidante quanto à inibição de auto-oxidação do β -caroteno (Carvalho, 2004). No organismo humano o β -caroteno proporciona efeito antilipoperoxidante das membranas celulares, protegendo-as dos radicais livres. Quando no estado reduzido, ele apresenta coloração amarelada. Entretanto, se oxidado pelo oxigênio atmosférico, numa reação fotoquímica, o mesmo torna-se incolor. A evidência de efeito antioxidante se dá através da manutenção da coloração amarela nas manchas da cromatoplaça.

Assim, submeteram-se todos os extratos e frações obtidas da GPC de *G. noxia* à avaliação da atividade antioxidante em CCDC (sílica gel, CHCl_3 / MeOH/ *n*-PrOH/ H_2O 5:6:1:4; v/v, fase orgânica). Após eluição, uma cromatoplaça foi nebulizada com β -caroteno 0,05% em DCM e outra em solução de DPPH 0,04% em metanol.

Os resultados (Figuras 4.13 e 4.14) demonstraram que os resultados foram similares nos dois testes usados. Os extratos polares (EMeOH e EMeOH 70%) apresentaram atividade antioxidante pronunciada, enquanto que o extrato apolar (ECHCl_3) apresentou pouca atividade. Quanto às frações resultantes da ELL, percebeu-se que a atividade antioxidante foi mais acentuada na FrBuOH, seguida da FrAq e pouco evidente na FrHex. As frações obtidas da GPC4, das quais foram obtidos os flavonóides Gn2-Gn9 também apresentaram atividade antioxidante.

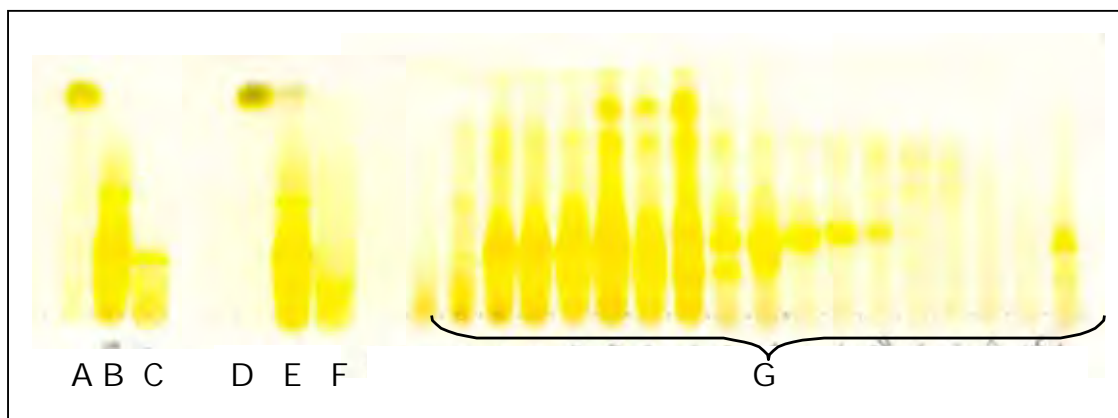


Figura 4.13. Cromatograma dos extratos e frações de *G. noxia* revelado com β -caroteno 0,05% em DCM (sílica gel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ 5/6/1/4; v/v, fase inferior)

A) ECHCl_3 , B) EMeOH , C) EMeOH 70%, D) FrHex, E) FrBuOH, F) FrAq, G) GPC

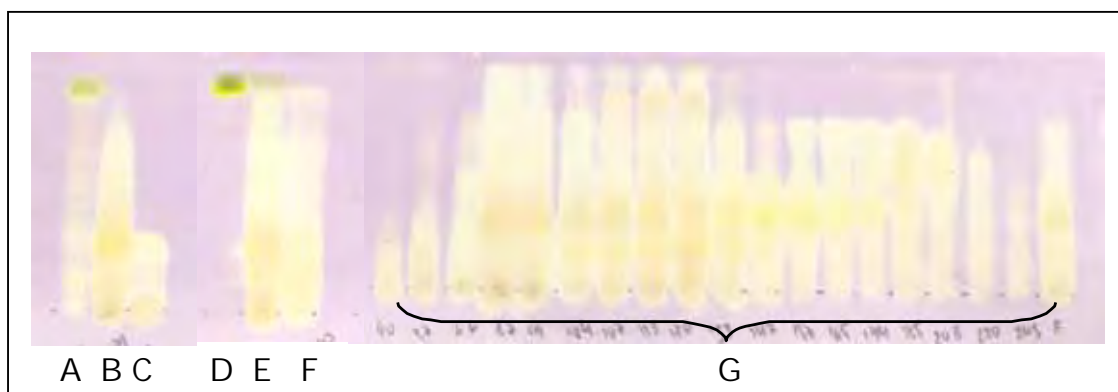


Figura 4.14. Cromatograma dos extratos e frações de *G. noxia* revelado com DPPH em MeOH (sílica gel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ 5/6/1/4; v/v, fase inferior)

A) ECHCl_3 , B) EMeOH , C) EMeOH 70%, D) FrHex, E) FrBuOH, F) FrAq, G) GPC

Em nível celular, constantemente são formadas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) como subprodutos do metabolismo celular. As EROs podem acarretar em lesão e/ou morte celular, pois participam de reações com substâncias orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos, particularmente com moléculas importantes das membranas biológicas e dos ácidos nucléicos. Além disso, as ERO iniciam reações autocatalíticas, em que as moléculas com as quais reagem são elas mesmas convertidas em outras EROs, propagando ainda mais a cadeia de danos celulares (Cotran *et al.*, 2000).

As defesas antioxidantes dos organismos aeróbios são do tipo enzimática e não enzimática. A primeira é intracelular, constituída pelas enzimas superóxido desmutase, catalase e glutathion peroxidase. Já as defesas antioxidantes não enzimáticas são extracelulares e estão presentes no soro. São nutrientes naturais obtidos da dieta os quais apresentam baixo peso molecular como vitamina C, E, além de outras substâncias presentes em menor concentração como β -caroteno, bilirrubina e glutathion.

Todas essas substâncias são capazes de capturar as EROs, interrompendo o processo de oxidação (Leighton *et al.*, 1997). Entretanto, na medida em que a geração de EROs ultrapassa as barreiras de defesa antioxidantes do organismo, há possibilidade de ocorrer dano por lesão química das estruturas biológicas e a este processo denomina-se estresse oxidativo o qual pode levar à morte celular.

Entre as numerosas patologias associadas ao estresse oxidativo estão muitas das causas de morte em países desenvolvidos: arterosclerose, câncer, cataratas, artrite reumatóide, diabetes e Alzheimer. Em geral, o processo biológico de envelhecimento progride em função da magnitude do estresse oxidativo a que estão submetidos os organismos de diferentes espécies (Sohal e Weindruch, 1996). As plantas, por consequência, assim como também os organismos animais, foram dotadas de distintas defesas antioxidantes, para compensar os efeitos deletérios associados à constante formação de EROs e oriundas da presença e utilização do oxigênio nos seus tecidos.

Especialmente nas duas últimas décadas observou-se um enorme crescimento da investigação científica do efeito antioxidante de extratos brutos, frações ou de componentes isolados e/ou modificados de plantas (Filho *et al.*, 2001). Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada e os grupos que mais são chamam a atenção são os flavonóides, carotenóides, cumarinas, ácido fenólicos, além de saponinas e terpenóides, entre outros, já foram relatados como antioxidantes naturais (Filho *et al.*, 2001). Esses compostos são na maioria, potentes antioxidantes necessários para o funcionamento das células vegetais e se encontram em frutas, verduras, ou até mesmo em bebidas, como no vinho (Kinsella *et al.*, 1993).

Essa propriedade advém, na maioria dos casos, devido à presença de sistemas insaturados e de anéis aromáticos que muitos deles apresentam. A estrutura química dos polifenóis é especialmente adequada para exercer ação antioxidante. Estudos revelam que muitos polifenóis naturais são melhores antioxidantes que as vitaminas E e C. Além disso, sua capacidade de quelar metais, especialmente cobre e ferro, os fazem atuar indiretamente como antioxidantes já que inibem a ação dos metais como catalisadores da formação de radicais livres (Cai *et al.*, 2006).

Sabe-se que os flavonóides têm ação antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres. Foi demonstrado que indivíduos que ingerem maiores quantidades de flavonóides, os quais são encontrados em alimentos de origem vegetal (verduras, frutas, chá, mel, etc.) apresentam uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares (infarto do miocárdio, trombose, derrame etc) (Kinsella *et al.*,

1993), o que sugere que o seu consumo diário possa oferecer efeito profilático contra essas doenças.

Assim como ocorre com os demais compostos fenólicos, a atividade antioxidante de flavonóides está intimamente relacionada à sua estrutura química. É controlada pelo número e localização das hidroxilas fenólicas, pela glicosilação e configuração de outros substituintes eventualmente presentes. A literatura específica relata em inúmeros trabalhos a atividade antioxidante de flavonóides, dentre eles da rutina, kaempferol e isorhamnetina (La Casa *et al.*, 2000; David *et al.*; 2001).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos e os flavonóides exercem praticamente todos eles. Esses mecanismos incluem: a) supressão da formação de espécies reativas de oxigênio pela inibição do sistema enzimático reponsável pela geração de radicais livres (como ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase), ou por quelar íons de metais (os quais podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela reação de Fenton ou Harber-Weis); b) seqüestrando radicais; c) regulando positivamente ou protegendo as defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como a glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas, ou pela indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína (uma proteína queladora de metais) (Pietta, 2000).

Assim, esse conjunto de informações, juntamente com a verificação preliminar da atividade antioxidante das frações e extratos de *G. noxia* bem como da presença dos flavonóides identificados na espécie podem justificar muitas das atividades biológicas apresentadas neste trabalho.

4.2.2- AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (Souza Brito, 1994)

Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que o uso popular, e mesmo tradicional de uma planta medicinal, não são suficientes para validar cientificamente seu emprego como medicamento seguro e eficaz. Nesse sentido, as plantas não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização ou autorização oficial de utilização como medicamento, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de ação terapêutica e segurança toxicológica a que se expõem aqueles que a utilizam.

No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o produto teste ou, eventualmente, com doses parceladas em período não superior a 24h. A avaliação dos resultados imediatamente após esse período permite conhecer a espécie mais sensível e o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvos, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte; as

alterações hematológicas, da bioquímica plasmática e urinária; e ainda a verificação histopatológica de eventuais lesões nos órgãos afetados (Lapa *et al.*, 2003).

Esse teste é obrigatório para todos os tipos de materiais em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidencia o risco de intoxicações agudas. Além disso, os resultados obtidos dão suporte à escolha das doses para os demais testes de toxicidade (Lapa *et al.*, 2003).

Por isso, antes de iniciar os demais estudos de avaliação das atividades avaliamos a ocorrência de possíveis efeitos tóxicos que por ventura as preparações (extrato polar – EMeOH e extrato apolar – ECHCl₃) pudessem apresentar. Portanto, como estudo inicial, os extratos EMeOH e ECHCl₃ foram avaliados em uma dose máxima de 5.000 mg/kg, de acordo com a metodologia proposta por Souza Brito (1994). A dose escolhida certamente evidenciaria qualquer efeito tóxico agudo existente nos extratos testados

Nesse ensaio foram utilizados camundongos Swiss albinos, machos e fêmeas (25-40 g) e ratos Wistar machos (150 a 200 g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5–10.

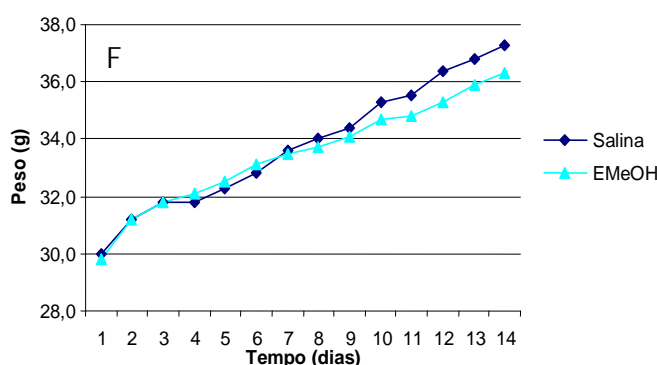
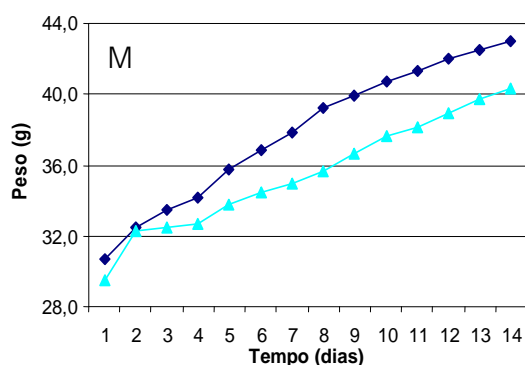
Os animais foram tratados com o veículo (solução salina 0,9% para EMeOH ou Tween 80 a 8% para ECHCl₃) e com os extratos na dose de 5.000 mg/kg. Os tratamentos foram realizados oralmente (uma única dose) e os parâmetros comportamentais foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a realização dos tratamentos, bem como o número de mortes. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quarto dia, os animais foram sacrificados e os seguintes órgãos retirados: coração, pulmão, fígado, baço e rins. Eles foram pesados para se realizar a determinação analítica e comparativa dos órgãos em relação aos respectivos grupos controles, indicando ou não, efeito tóxico agudo dos extratos vegetais.

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (EPM) dos parâmetros obtidos. O teste t de Student foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre dois grupos de tratamento. Foi considerado como nível de significância mínima $p < 0,05$.

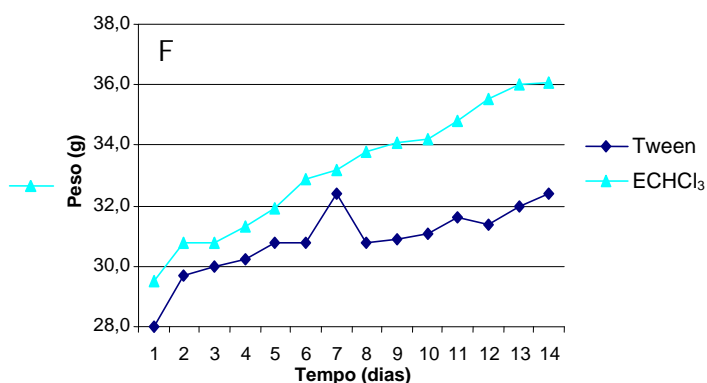
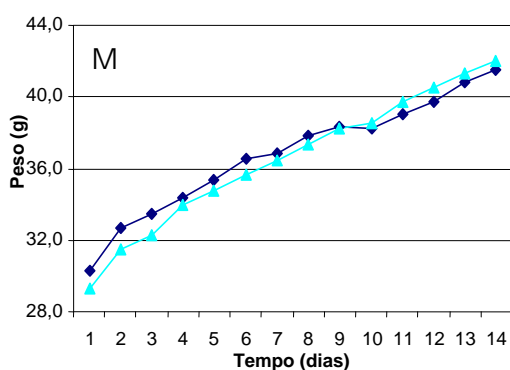
Os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos 4.1, 4.2 e Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Efeito do tratamento agudo com os extratos EMeOH e ECHCl₃ (5.000 mg/kg) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos (M) e fêmeas (F). Os dados representam a razão do peso do órgão e peso corpóreo expressos em média \pm erro padrão da média. Teste t de Student.

Tratamento (v.o.)	N	Fígado	Coração	Pulmão	Baço	Rins	Morte
M Salina	6	13,41 \pm 0,20	3,65 \pm 0,06	4,55 \pm 0,07	3,86 \pm 0,13	6,27 \pm 0,19	0
EMeOH	6	12,78 \pm 0,50	3,77 \pm 0,12	4,96 \pm 0,52	4,25 \pm 0,18	6,23 \pm 0,18	0
F Salina	6	12,08 \pm 0,21	3,79 \pm 0,08	4,53 \pm 0,23	3,85 \pm 0,12	5,75 \pm 0,11	0
EMeOH	6	11,96 \pm 0,27	3,66 \pm 0,12	4,72 \pm 0,07	3,67 \pm 0,16	5,89 \pm 0,18	0
M Tween	6	13,28 \pm 0,22	3,73 \pm 0,07	4,32 \pm 0,08	3,84 \pm 0,13	6,37 \pm 0,15	0
ECHCl ₃	6	13,14 \pm 0,30	3,69 \pm 0,10	4,30 \pm 0,03	3,70 \pm 0,17	6,38 \pm 0,09	0
F Tween	6	11,75 \pm 0,14	3,81 \pm 0,08	4,69 \pm 0,17	3,85 \pm 0,10	5,63 \pm 0,38	0
ECHCl ₃	6	11,96 \pm 0,16	3,80 \pm 0,10	4,47 \pm 0,10	3,77 \pm 0,15	5,35 \pm 0,09	0



Gráficos 4.1. Média dos pesos (g) de camundongos machos (M) e fêmeas (F) monitorados durante 14 dias (n=6) após tratamento com o extrato EMeOH. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t de Student.



Gráficos 4.2. Média do peso (g) de camundongos machos (M) e fêmeas (F) monitorados durante 14 dias (n=6) após tratamento com o extrato ECHCl₃. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t de Student.

A partir dos resultados apresentados nos gráficos 4.1, 4.2 e Tabela 4.16 verifica-se que os extratos analisados (EMeOH e ECHCl₃) não apresentaram efeito tóxico agudo aparente quando analisados os parâmetros: ganho de peso, dano tecidual e mortalidade; quando comparados aos obtidos com os grupos controles (solução salina 0,9% para EMeOH ou Tween 80 a 8% para ECHCl₃). Esses resultados foram corroborados ainda com a triagem hipocrática, na qual eventos comportamentais indicativos de toxicidade não foram observados, além da verificação da ausência de morte entre os animais. Também não houve diferenças estatísticas significativas no peso relativo dos órgãos, quando comparados os tratamentos em machos e fêmeas. O conjunto desses resultados aponta para ausência de toxicidade dos extratos testados, sendo necessários outros estudos complementares para assegurar completamente a ausência de toxicidade.

4.2.3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

A atividade antiúlcera de uma substância desconhecida pode ser determinada em animais de experimentação frente a três modelos agudos: indução de lesões gástricas por medicamentos ou indução por uso de álcool. Tais modelos são utilizados porque representam os agentes etiológicos comuns envolvidos na patologia da úlcera gástrica humana.

Nesses ensaios (1, 2 e 3) foram utilizados camundongos Swiss albinos, machos e fêmeas (25-40 g) e ratos Wistar machos (150 a 200 g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5-10.

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (EPM) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, seguido pelo teste à posteriori de Dunnett em experimentos com mais de dois grupos de tratamento. O teste t de Student foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre dois grupos de tratamento. Foi considerado como nível de significância mínima $p < 0,05$.

Nos testes para avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos (EMeOH e ECHCl₃), foram usados modelos agudos de indução de lesão gástrica nos quais fármacos de referência (carbenoxolona) foram usados como controles positivos e indicados em cada modelo de lesão gástrica, sempre administradas por via oral, em dose-volume de 10 mL/kg. Foi utilizado ainda um grupo controle (negativo) que recebeu um volume equivalente (10 mL/kg) do veículo utilizado para dissolução das amostras vegetais (solução salina 0,9% para EMeOH ou Tween 80 a 8% para ECHCl₃).

Ratos ou camundongos foram mantidos em gaiola especial sem maravalha e submetidos a jejum de no mínimo 6 horas, dependendo do modelo. Nos três tipos de indução, as lesões ulcerativas tiveram suas áreas medidas com o auxílio do programa AVSoft BioView – Spectra versão 4, e os resultados foram expressos na forma de área de lesão e de porcentagem de inibição das lesões.

1) Etanol absoluto (Morimoto *et al.*, 1991)

Este modelo consiste na destruição da barreira mucoprotetora e redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Foram utilizados ratos submetidos a jejum prévio de 24 horas. Os animais foram tratados oralmente por gavagem com carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo), solução salina 0,9% ou Tween 80 a 8% no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e com os extratos EMeOH e ECHCl₃ em diversas doses (125, 250 e 500 mg/kg). Decorridos 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam, também por via oral, 1 mL de etanol absoluto (agente indutor das lesões). Após 60 minutos do agente indutor de lesão gástrica, os animais foram mortos e seus estômagos retirados para mensuração das lesões.

No gráfico 4.3 estão apresentados a área de lesão ulcerativa e a % de inibição destas lesões nos animais tratados com EMeOH nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg frente as lesões induzidas pelo etanol absoluto. Pode-se observar uma proteção efetiva de 51% destas lesões quando nos animais tratados com este extrato dose de 500 mg/kg. Esse resultado serviu como triagem para o delineamento de outros modelos (itens 2 e 3) de avaliação de atividade antiulcerogênica para o mesmo extrato.

No gráfico 4.4 estão apresentados os mesmos parâmetros (área de lesão e % de inibição das mesmas) com o extrato ECHCl₃ nas mesmas doses (125, 250 e 500 mg/kg), porém não se observou proteção efetiva das lesões frente ao agente indutor.

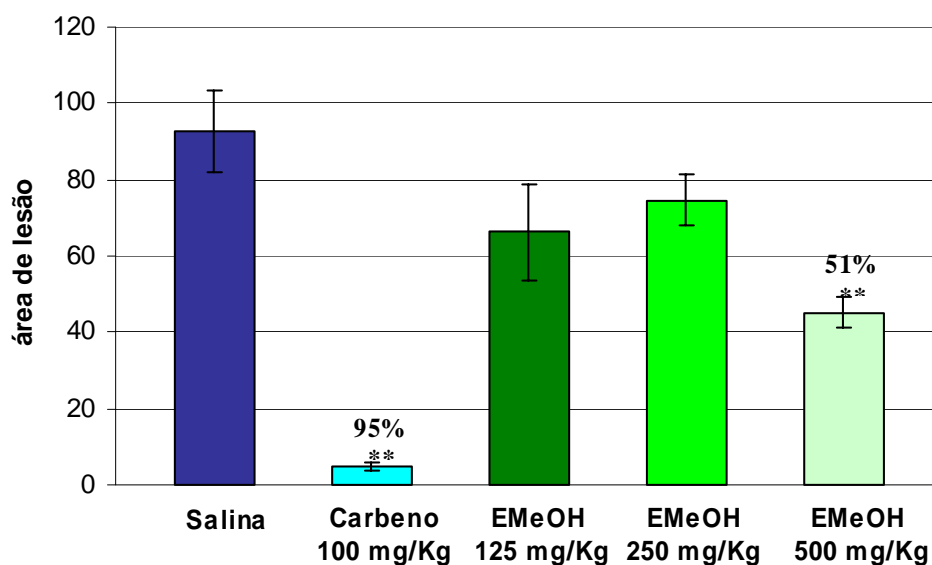


Gráfico 4.3. Efeito do EMeOH no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto. Resultados expressos na forma de média \pm E.P.M. (n: 5) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. Anova – Dunnett ** $p < 0,01$.

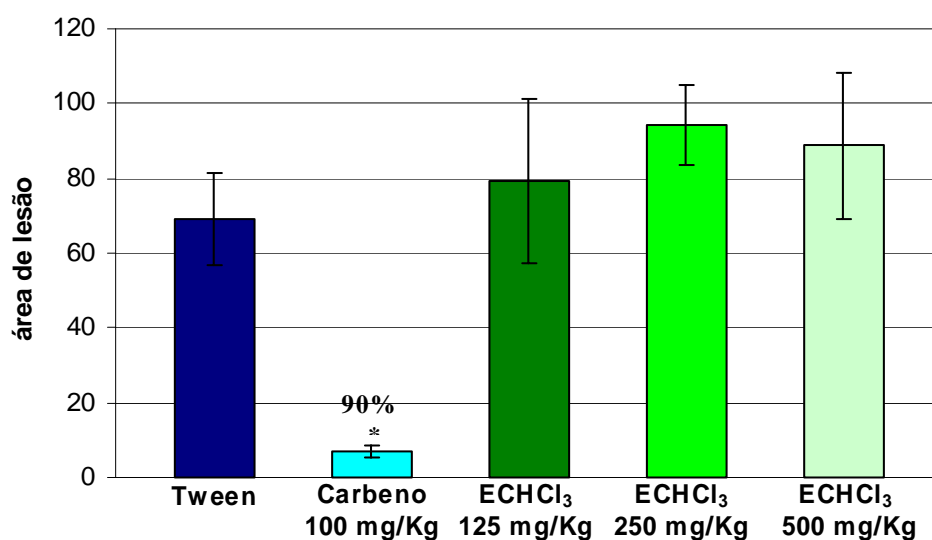


Gráfico 4.4. Efeito do ECHCl₃ no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto. Resultados expressos na forma de média \pm E.P.M. (n: 5) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. Anova – Dunnett * $p < 0,05$.

2) HCl/etanol (Mizui e Douteuchi, 1983)

O mecanismo de lesão é praticamente o mesmo do etanol absoluto, sendo que a presença do HCl 0,3 M acelera o processo lesivo de enfraquecimento da barreira mucosa gástrica. Foram utilizados camundongos submetidos a jejum prévio de 24 h, tratados oralmente com 100 mg/kg de carbenoxolona (controle positivo), solução salina 0,9% no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e EMeOH em doses variáveis (125, 250 e 500 mg/kg). Em seguida (50 min.) foram induzidas às lesões gástricas via oral com 0,2 mL de solução irritante de HCl 0,3 M /etanol 60%. Os animais foram mortos 60 minutos após a administração do agente indutor de lesão e os estômagos retirados para posterior mensuração das lesões, como descrito anteriormente.

No gráfico 5.5 estão apresentados a área de lesão ulcerativa e a % de inibição destas lesões dos animais tratados com EMeOH nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg frente as lesões induzidas pelo etanol acidificado. Verifica-se que neste modelo também houve proteção ao redor de 57 e 53% nos tratamentos realizados com o EMeOH nas concentrações de 250 e 500 mg/kg, respectivamente.

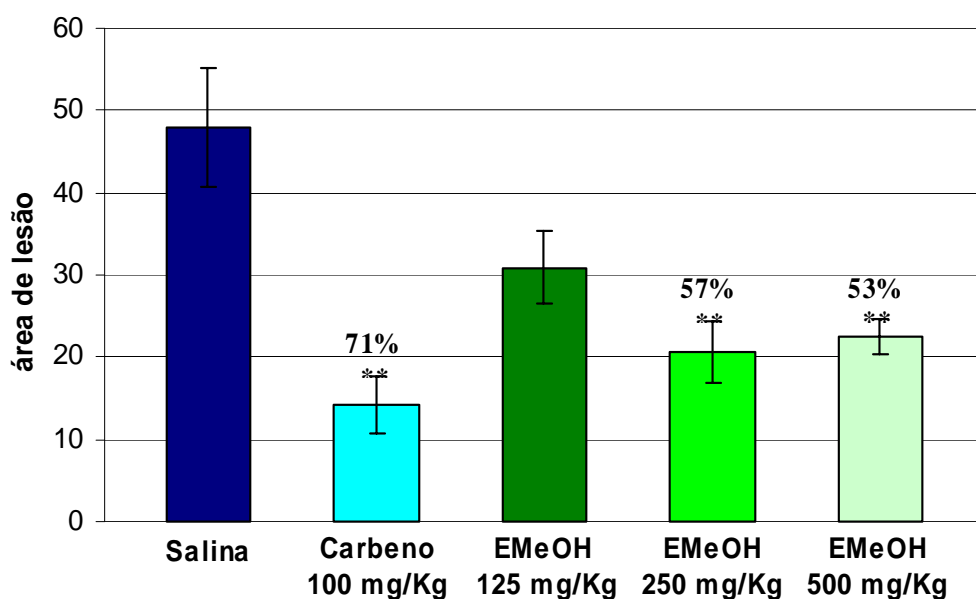


Gráfico 4.5. Efeito do EMeOH no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol acidificado. Resultados expressos na forma de média \pm E.P.M. (n: 6-7) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. Anova – Dunnett ** $p < 0,01$.

3) piroxicam (Puscas *et al.*, 1997)

Nesse modelo foram utilizados camundongos submetidos a jejum prévio de 36 h, tratados oralmente com 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo), solução salina 0,9% no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e EMeOH nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg. Trinta minutos após o tratamento, a lesão gástrica foi induzida por administração subcutânea de 30 mg/kg de fármaco antiinflamatório não-esteroidal (AINES) (piroxicam). Os animais foram mortos 4 h após a administração do agente lesivo e os estômagos foram retirados para mensuração das lesões, como descrito anteriormente.

No gráfico 5.6 estão apresentadas a área de lesão ulcerativa e a porcentagem de inibição destas lesões dos animais tratados com EMeOH frente as lesões induzidas pelo piroxicam. Verifica-se que neste modelo também houve proteção de mais de 50% contra o aparecimento de lesões ulcerativas, em todas as concentrações ensaiadas, inclusive na de menor concentração, que não havia sido verificado nos ensaios anteriores.

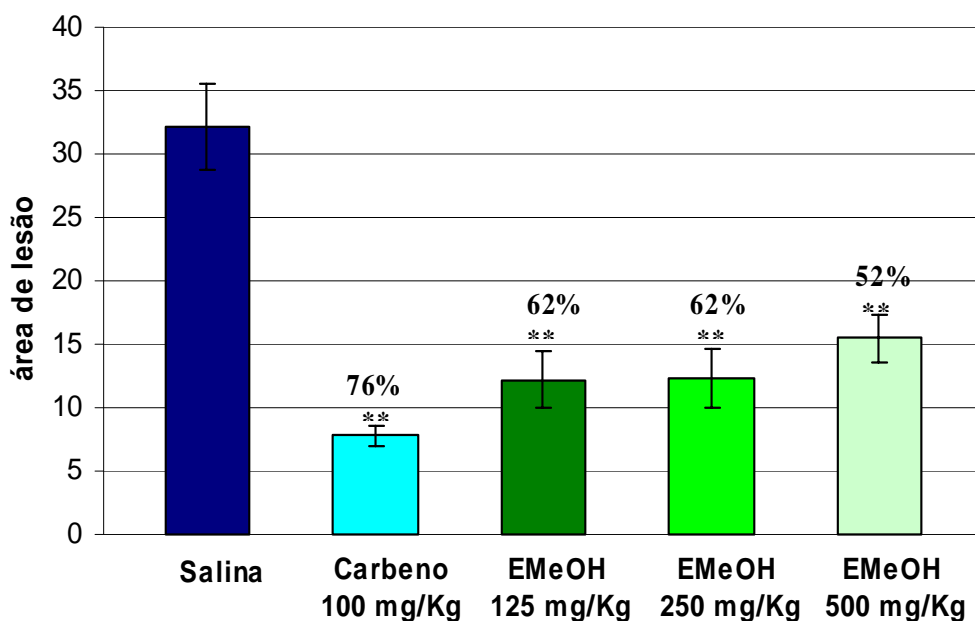


Gráfico 4.6. Efeito do EMeOH no modelo de lesão ulcerativa induzida por fármaco antiinflamatório não-esteroidal (piroxicam). Resultados expressos na forma de média \pm E.P.M. (n: 6) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. Anova – Dunnett $**p < 0,01$.

4) Avaliação sobre a motilidade intestinal (Baggio *et al.*, 2003)

A avaliação do efeito dos extratos sobre o trânsito intestinal foi realizada no modelo descrito por Baggio et al., 2003. Camundongos foram mantidos em jejum de 6h, depois do qual receberam seus respectivos tratamentos orais: salina 0,9%, atropina 5 mg/kg e diferentes doses do extrato EMeOH (125, 250 e 500 mg/kg). Após 30 minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% v.o. num volume de 10 mL/kg. Depois de 30 minutos os animais foram mortos e os intestinos delgados retirados, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, ambos em cm. No gráfico 4.7 estão apresentados os resultados de trânsito intestinal dos animais previamente tratados com o extrato.

Verifica-se que os animais que receberam EMeOH não apresentaram nenhuma interferência na motilidade intestinal quando comparados aos animais que receberam salina. Somente os animais tratados com atropina reduziram de modo significativo o trânsito intestinal.

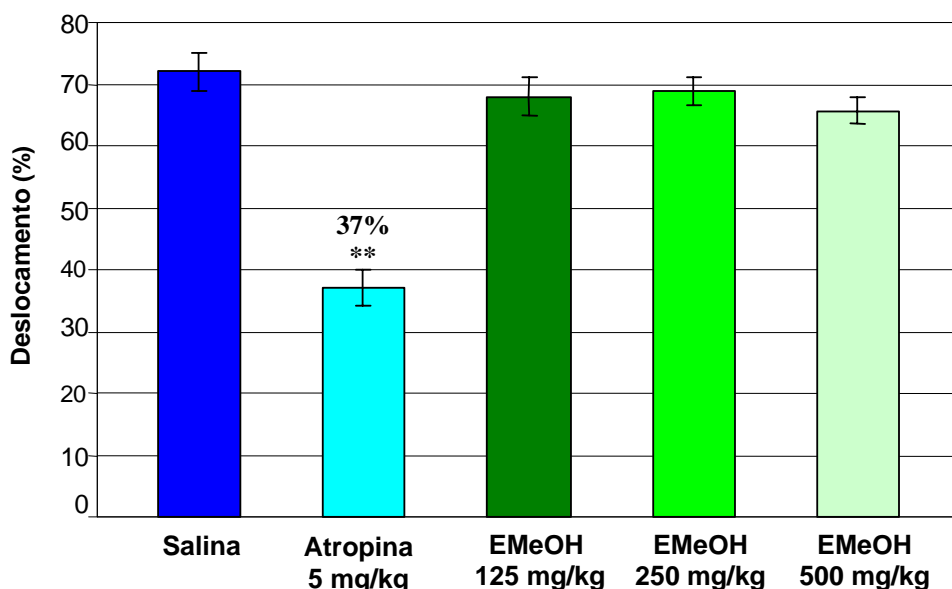


Gráfico 4.7. Efeito do EMeOH sobre a motilidade intestinal. Resultados expressos na forma de média \pm E.P.M. (n: 7) da relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e comprimento total do intestino delgado. Anova – Dunnett ** $p < 0,01$.

A humanidade tem convivido com as úlceras pépticas desde tempos remotos. Talvez a primeira descrição dessa doença tenha sido inscrita nos pilares do templo de Esculápio em Epiduras por volta do século IV antes de Cristo: "um homem com úlcera no estômago". Muitas pessoas ilustres sofreram de indigestão e úlceras, inclusive o imperador romano Marco Aurélio, cuja morte foi atribuída por alguns a uma úlcera perfurada e cujo médico era o próprio Galeno (Hoogerwerf e Pasricha, 2003).

Distúrbios gastrintestinais como as úlceras pépticas ocorrem em número expressivo tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (Dayal e Delellis, 1991). Elas são tão comuns que cerca de 10% da população carregam ao longo de suas vidas esta patologia, ou seqüelas deixadas por ela (Lewis e Hanson, 1991). Traz custos tremendos à sociedade e torna a vida do paciente extremamente difícil, além de ser letal em muitos casos (McIntosh *et al.*, 1991).

A fisiopatologia da doença ulcerosa péptica é mais bem compreendida em termos de um desequilíbrio entre os fatores de defesa da mucosa estomacal (bicarbonato, mucina, prostaglandina, óxido nítrico, outros peptídeos e fatores de crescimento) e fatores agressivos (ácido clorídrico e pepsina) (Hoogerwerf e Pasricha, 2003). Este desequilíbrio resulta em lesões das mucosas duodenal e gástrica e pode ser agravado pelo estresse, consumo de álcool, tabagismo, uso de fármacos antiinflamatórios do tipo não-esteroidais, a presença da *Helicobacter pylori* no trato gastrintestinal, além de patologias como carcinomas que propiciam aumento da secreção ácida (Chan e Leung, 2002). Sabe-se ainda que as lesões ulcerativas encontram-se associadas à presença excessiva de ácido na mucosa e a fatores predisponentes relacionados à redução das defesas naturais desta mucosa (Hirschowitz *et al.*, 1995).

Os ensaios de atividade antiulcerogênica foram realizados no intuito de evidenciar os efeitos gastroprotetores com uma única administração (agudo) dos extratos. Os modelos experimentais utilizados foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos. A formação de lesões em modelos experimentais, assim como as que ocorrem em humanos, envolve um desequilíbrio entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica (Maity *et al.*, 2003), sendo que este desbalanço pode ser induzido de diversas maneiras, como citado anteriormente.

Os modelos de indução de lesão por etanol absoluto e etanol acidificado promovem lesões necróticas de maneira multifatorial. A formação das lesões por estes agentes envolve mecanismos que reduzem o fluxo sanguíneo gástrico, contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia e de necrose ao dissolverem constituintes do muco estomacal (Batista *et al.*, 2004), passando também a estimular a secreção de pepsina, íons H⁺ e histamina, além de diminuir os níveis de proteína, DNA e RNA, ocasionando um comprometimento do tecido (Szabo, 1987).

O etanol é capaz de chegar ao epitélio através do rompimento da barreira mucosa e suas ações celulares refletem em estase e ruptura da parede dos vasos sanguíneos, sendo a causa das lesões hemorrágicas observadas neste modelo (Mincis *et al.*, 1995). Esses efeitos provavelmente se devem à formação de radicais livres, causando estresse oxidativo

intracelular e conseqüente peroxidação de lipídios, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial que precedem a morte celular (Gonzalvez *et al.*, 2001; Repetto e Llesuy, 2002).

Os resultados do experimento de indução de úlcera por etanol absoluto e HCl/etanol, indicam que extrato EMeOH apresentou efeito gastroprotetor em ambos os modelos na dose de 500 e 250 mg/kg, sendo esta proteção de aproximadamente 51 e 57%, respectivamente. O extrato apolar (E_{CHCl₃}) não apresentou a mesma atividade do extrato polar quando avaliado no modelo de etanol absoluto, sendo então este extrato direcionado para os estudos de analgesia e inflamação. Pode-se dizer então, que os constituintes químicos responsáveis pela gastroproteção encontram-se concentrados no extrato EMeOH e quase que inexistentes no extrato E_{CHCl₃}.

Úlceras causadas por antiinflamatórios não-esteroidais, como piroxicam, envolvem mecanismos de inibição das cicloxigenases I e II, de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas (PG E₂), levando à produção de leucotrienos e de outros produtos da via 5-lipoxigenase (Levine, 1971), causando também hipermotilidade gástrica, peroxidação lipídica e desintegração vascular (Takeuchi *et al.*, 1988). As PGs são os mediadores responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato e pela manutenção do fluxo sanguíneo na mucosa (Crawford, 1994), sendo que a redução de seus níveis compromete a barreira mucosa e facilita a formação de lesões causadas pelas secreções gástricas (ácida e enzimática). Neste modelo também foi evidenciado efeito gastroprotetor significativo (p<0,01) do EMeOH, cuja proteção foi de 62% com a menor dose testada (125 mg/kg).

Borelli e Izzo (2000) apresentaram uma variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam experimentalmente atividade antiulcerogênica indicando, portanto, o importante potencial dos princípios ativos vegetais na descoberta de novas opções terapêuticas para o tratamento das úlceras pépticas. Sabe-se, por exemplo, que componentes fenólicos em pequenas quantidades estimulam a produção de prostaglandinas e inibem a liberação de radicais livres (Repetto e Llesuy, 2002), o que sugere que através deste mecanismo, esta seja uma das classes responsáveis pela proteção gástrica dos extratos vegetais (Rastogi *et al.*, 1998).

É conhecido também que antioxidantes naturais previnem lesões na mucosa induzidas por etanol e outros agentes necrozantes e aceleram o tempo de cicatrização das feridas (Repetto e Llesuy, 2002). Radicais livres estão diretamente relacionados às lesões, sugerindo que substâncias antioxidantes contidas nos extratos vegetais sejam capazes de inibir a peroxidação lipídica e proteger a membrana frente a agentes indutores (Arts *et al.*, 2001). Essa propriedade na maioria dos casos é devido à presença da estrutura do anel

conjugado e grupos hidroxilas que muitos dos compostos fenólicos apresentam. Com esses elementos, a função antioxidante é exercida "seqüestrando" as espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou estabilizando-as através de complexações ou hidrogenações com estes elementos (Anila e Vijayalakshmi, 2003).

Dentre os compostos fenólicos dotados de propriedades biológicas importantes, destacam-se as que os flavonóides exercem. Existem inúmeros trabalhos na literatura que relatam a intrínseca relação existente entre a atividade antioxidante/antiúlceras dos flavonóides como rutina (La Casa *et al.*, 2000), kaempferol e quercetina (Izzo *et al.*, 1994), bem como de frações flavonoídicas (Reyes, 1996). Aliado a isso, outros trabalhos reportam a atividade antibacteriana frente *H. pylori* de flavonóides derivados da isohrhamnetina (Ustun *et al.*, 2006), um dos agentes causadores de úlceras.

Aparentemente essas substâncias estão presentes em quantidade suficiente no EMeOH para combater radicais livres e/ou inibir a síntese de prostaglandinas, resultando no efeito gastroprotetor observado. Adicionalmente, o conjunto de resultados químicos obtidos, tais como, a verificação do teor de compostos fenólicos presentes nos extratos, presença de atividade antioxidante, juntamente com a caracterização dos flavonóides encontrados no EMeOH, podem justificar os efeitos antiúlceras observados.

Além disso, trabalhos como o de Redfern e Feldman (1989) mostram que alguns terpenóides, como os de *Glycyrrhiza glabra* inibem lesões gástricas. Gupta (1981) verificou que a saponina triterpenoidal isolada de *Gynostema pentaphyllum*, o acetato de lupeol de *Spilanthes ocyimifolia*, o ácido ursólico de *Psychotria adenophylla* e o taraxerol isolado de *Taraxacum officinale* também atuam como inibidores de lesões gástricas. Esses dados indicam que compostos terpênicos ainda não identificados também podem contribuir com a atividade antiúlceras observada na espécie.

Por fim, a ausência de interferência na motilidade intestinal é mais um resultado que corrobora para explicar os efeitos antiulcerogênicos do EMeOH, uma vez que a hiperomotilidade gástrica influencia no processo inicial de formação de lesões, no modelo de úlceras induzidas por AINES (Suzuki *et al.*, 2000). Além disso, a velocidade do trânsito intestinal é um dos fatores que determina a intensidade de absorção do conteúdo luminal e regula a biodisponibilidade de fármacos por via oral. Por essa razão, a medida da velocidade do trânsito intestinal é etapa obrigatória no estudo de novos medicamentos. Serve também para a pesquisa de novos compostos eventualmente inibitórios ou estimulatórios da atividade peristáltica.

4.2.4- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA

Devido à indicação popular de espécies da família Nyctaginaceae, como por exemplo, *Boerhaavia diffusa* como analgésico, antiinflamatório e diurético (Hiruma-Lima *et al.*, 2002) foi realizada uma triagem para avaliação da atividade analgésica nos extratos.

Para realização dos testes 1 e 2 foram utilizados camundongos Swiss albinos, provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, adequadamente aclimatados às condições do biotério, conforme apresentado no item 4.2.3. Foi utilizado ainda um grupo controle (negativo) do veículo utilizado para dissolução das amostras vegetais (solução salina 0,9% para EMeOH ou Tween 80 a 8% para ECHCl₃).

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (EPM) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, seguido pelo teste à posteriori de Dunnett em experimentos com mais de dois grupos de tratamento. O teste t de Student foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre dois grupos de tratamento. Foi considerado como nível de significância mínima $p < 0,05$.

1) Teste de contorções abdominais (Koster *et al.*, 1959)

Esse ensaio baseia-se na produção de dor através de estímulo químico (ácido acético a 0,8%, ip). Após jejum de 4 horas, os animais foram tratados oralmente por gavagem com ácido acetilsalicílico 300mg/kg (controle positivo), solução salina a 0,9% ou tween 80 a 8% no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e com os extratos EMeOH e ECHCl₃ em diversas doses (125, 250 e 500 mg/kg). Decorridos 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam intraperitonealmente solução de ácido acético 0,8% (agente irritante).

Foram mantidos em caixas individuais, sem contato visual entre eles e observados continuamente por 15 minutos e o número de contorções abdominais foi registrado. Decorrido o tempo de observação, verificou-se que o EMeOH não apresentou redução significativa no número de contorções abdominais nas doses utilizadas (125, 250 e 500 mg/kg) 30 minutos após os tratamentos (Gráfico 4.8), indicando assim, a ausência da atividade analgésica deste extrato, neste modelo.

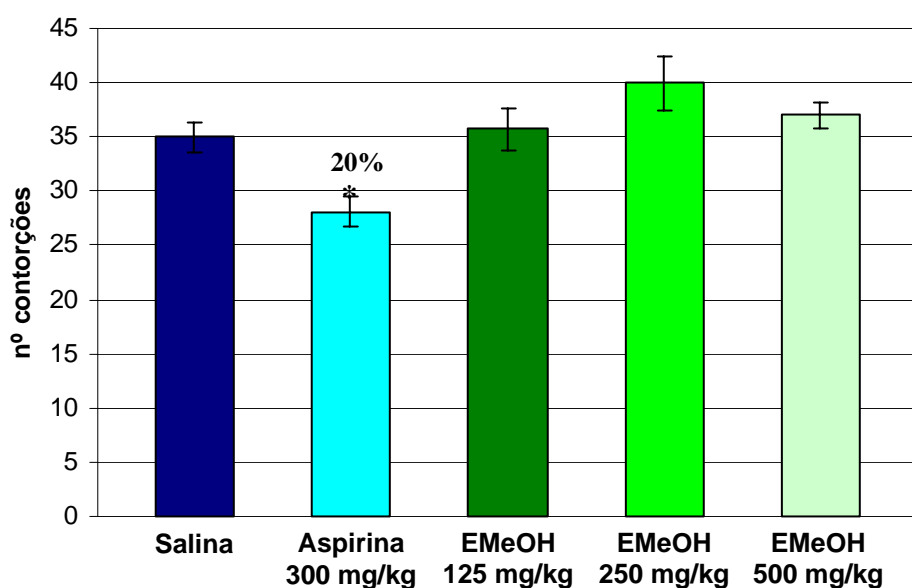


Gráfico 4.8. Efeito do EMeOH no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, 30 minutos após o tratamento. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 9-11) do número de contorções. Anova – Dunnett * $p < 0,05$.

Em contrapartida, o extrato ECHCl₃ apresentou redução significativa no número de contorções abdominais nas doses utilizadas (125, 250 e 500 mg/kg) 30 minutos após o tratamento (Gráfico 4.9) e, quando testado 60 minutos após o tratamento (Gráfico 4.10), quando a mesma atividade analgésica foi ausente.

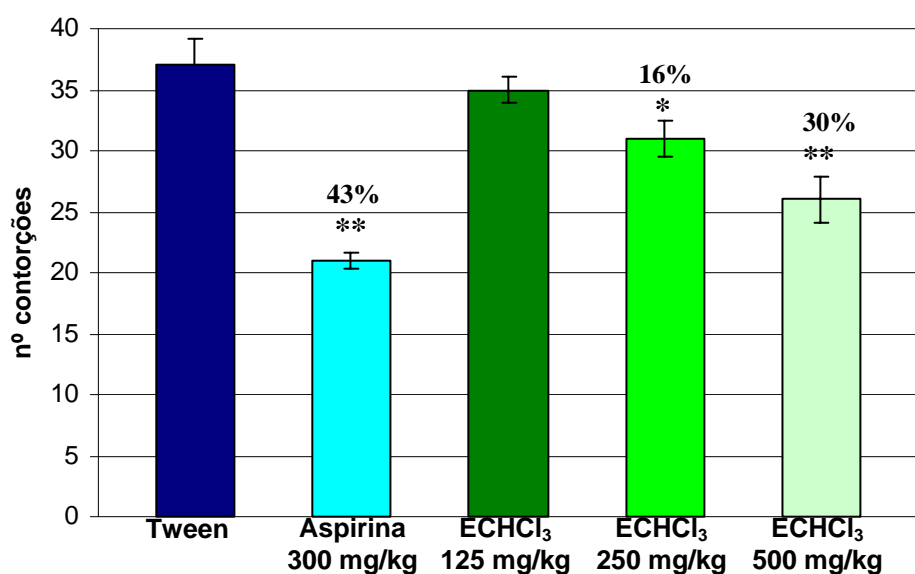


Gráfico 4.9. Efeito do ECHCl₃ no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, 30 minutos após o tratamento. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 7-10) do número de contorções. Anova – Dunnett ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

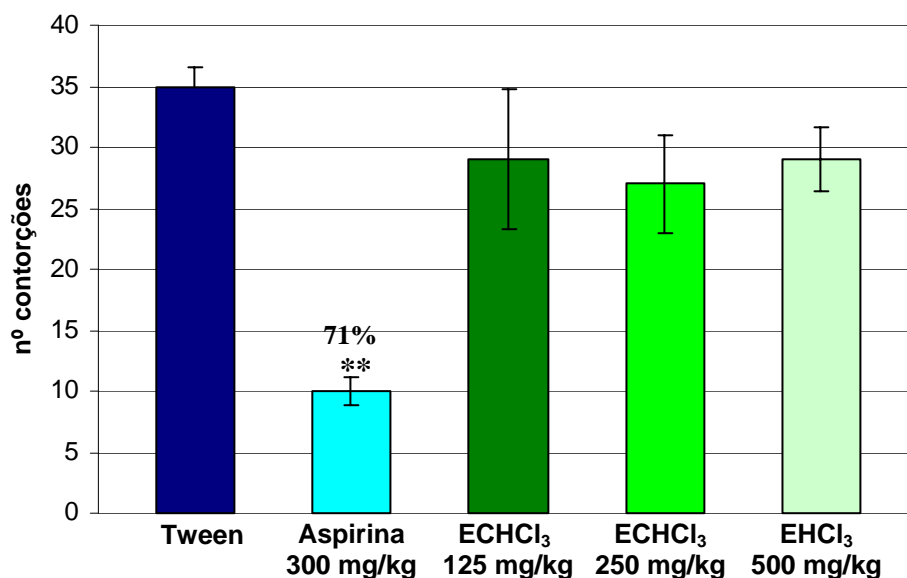


Gráfico 4.10. Efeito do ECHCl₃ no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, 60 minutos após o tratamento. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 5-8) do número de contorções e na forma de porcentagem de inibição das contorções. Anova – Dunnett ** p < 0,01.

2) Teste da placa quente (Woolfe e MacDonald, 1944; Eddy e Leimbach, 1953)

Diante dos resultados obtidos com o ECHCl₃, que apresentou redução significativa no número de contorções abdominais, demos continuidade ao estudo da atividade analgésica em outro modelo somente com esse extrato.

Esse teste consiste na mensuração da resposta de latência de instalação da dor. Para tanto, camundongos foram submetidos a jejum de 4 horas e posteriormente, tratados oralmente por gavagem com tween 80 a 8% (controle negativo), com o extrato ECHCl₃ em diversas doses (125, 250 e 500 mg/kg) e subcutâneamente com morfina na dose de 10 mg/kg (controle positivo).

Foi utilizado o aparelho Insight HP-2002, que consiste de um espaço aberto, porém delimitado por um cilindro acrílico, com superfície metálica mantida a uma temperatura constante de 56 ± 1 °C. Os animais foram colocados em contato com a placa quente 30 e 60 minutos após os tratamentos (não voltando o mesmo animal para a placa).

A latência foi considerada como o tempo decorrente entre o primeiro contato até o momento em que o mesmo lambe suas patas dianteiras ou então efetua um salto repentino. Foram feitas análises preliminares para avaliação comparativa de latência dos animais 24h antes, selecionando os animais que respondam ao estímulo entre 5 e 15 segundos com a finalidade de uniformizar as respostas obtidas, evitando assim animais subsensibilizados (resposta acima de 15 s) ou hipersensibilizados (resposta abaixo de 5 s). O período de latência de 30 s foi estabelecido como analgesia completa.

Neste modelo experimental não foi possível observar aumento na latência para instalação da dor dos animais tratados com o ECHCl₃ nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg em nenhum dos modelos testados, sendo eles, 30 (Gráfico 4.11) e 60 (Gráfico 4.12) minutos após os tratamentos.

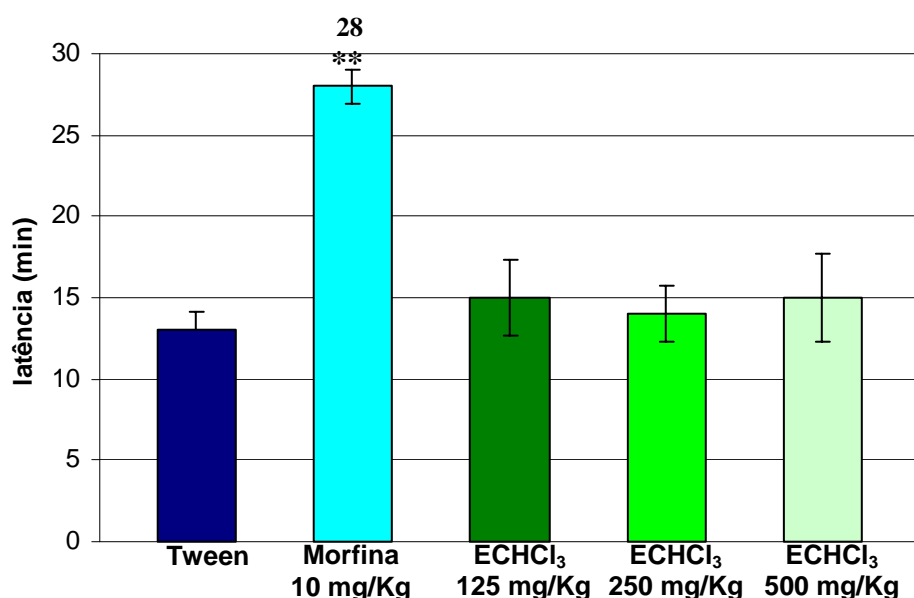


Gráfico 4.11. Efeito do ECHCl₃ no modelo de placa quente em camundongos, 30 minutos após o tratamento. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 6) da latência da instalação da dor. Anova – Dunnett ** p<0,01.

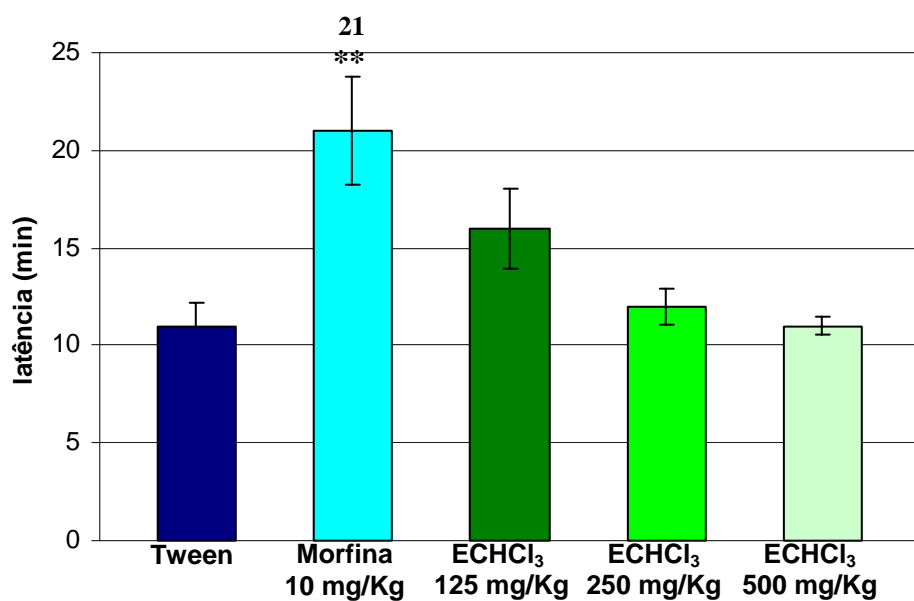


Gráfico 4.12. Efeito do ECHCl₃ no modelo de placa quente em camundongos, 60 minutos após o tratamento. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 6) da latência da instalação da dor. Anova – Dunnett ** p<0,01.

A dor é um problema que continua sendo uma das grandes preocupações da humanidade, uma vez que é causa de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves conseqüências psicosociais e econômicas. Desde os primórdios do ser humano, conforme sugerem alguns registros gráficos da pré-história e os vários documentos escritos posteriormente, o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados ao seu controle (SBED, 2006).

Atualmente, a Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) define esta patologia como uma experiência desagradável e sensorial, associada a uma destruição tecidual (Siddall e Cousins, 1995). Markenson (1996) reporta que um em cada três cidadãos tem experiências de dor crônica, necessitando atenção médica por todo período de vida; mais de 50 milhões de pessoas estão parcial ou totalmente incapacitadas pela dor crônica no mundo.

Dados na literatura demonstram a grande variedade de substâncias químicas, isoladas de plantas, que apresentaram experimentalmente atividade analgésica (Almeida *et al.* 2001), o que favorece a opção de se trabalhar com esta classe terapêutica. A colchicina, isolada de *Colchicum autumnale*, foi provavelmente umas das primeiras substâncias utilizadas para alívio da dor, pois, preparações com base nesta planta são usadas desde o séc. VI. Infusões da casca de salgueiro (*Salix alba*) também foram usadas por milênios para reduzir dor e febre (Korolkovas e Burckhalter, 1988). Dessa planta, foi isolada a salicina em 1827 e a partir desta, sintetizou-se o ácido salicílico. Tais descobertas foram seguidas ainda pela purificação do ópio, isolado da papoula em 1925, cuja estrutura serve até os dias atuais como protótipo em busca de novos derivados que sejam incluídos no arsenal terapêutico de combate à dor.

Mesmo em doses terapêuticas, os analgésicos opióides e derivados do ácido salicílico podem causar efeitos indesejáveis como, depressão respiratória, distúrbios cardiovasculares, náuseas e vômitos. O uso crônico ainda pode causar dependência e tolerância no caso dos derivados opióides e distúrbios gastrintestinas com os AINES, o que incita a pesquisa de novas substâncias e/ou extratos de plantas potencialmente analgésicas.

O modelo de contorção abdominal consiste na indução da algesia por estímulo químico. As contorções caracterizam-se por contração do abdômem, seguida por torções do corpo e estiramento de uma ou ambas as patas traseiras. Essa resposta decorre da aplicação do estímulo nociceptivo por via intraperitoneal. A contagem do número de contorções ocorridas em um intervalo de tempo pré-determinado é utilizada como índice da resposta nociceptiva (Lapa *et al.*, 2003).

O ácido acético é um estímulo conveniente para testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários dos eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção. Estudos postularam que o ácido acético atua indiretamente induzindo a liberação dos mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos sensíveis aos AINEs e opióides (Collier *et al.*, 1968). Assim, este modelo apresenta sensibilidade à substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica dotadas dos mais variados mecanismos de ação.

O EMeOH não apresentou redução significativa nas contorções abdominais, demonstrando que os constituintes presentes neste extrato são aqueles com propriedades antiulcerogênicas. Em contrapartida, o ECHCl₃ reduziu significativamente as contorções abdominais quando induzidas 30 minutos após o tratamento, sugerindo a presença de substâncias com propriedades analgésicas concentradas neste extrato. Esta atividade não pode ser evidenciada nas contorções abdominais induzidas 60 minutos após o tratamento com ECHCl₃, sugerindo a metabolização ou até mesmo excreção dos princípios ativos responsáveis por esta atividade. Embora este extrato tenha inibido significativamente as contorções abdominais, serão necessários outros estudos utilizando modelos de nocicepção mais específicos para esclarecer os mecanismos pelo qual o extrato atua.

A inespecificidade do teste de contorções abdominais torna necessário associar outros testes mais seletivos, como o teste de placa quente, que demonstra efeito analgésico por mecanismos de ação central (opióide).

O teste de placa quente consiste na mensuração da resposta de latência de instalação da dor quando o animal é colocado sobre uma superfície aquecida a mais de 50°C. É bastante indicado para avaliar a ação analgésica central, na qual o animal troca rapidamente o apoio dos pés, levanta ou lambe uma das patas (Woolfe e MacDonald, 1944; Eddy e Leimbach, 1993).

Os resultados mostraram que a suposta atividade analgésica observada no modelo de contorção abdominal não pode ser observada neste modelo mais específico, sugerindo a ausência de um envolvimento do sistema nervoso central nesta analgesia, ou ainda, uma ausência de atividade analgésica do tipo opióide neste extrato. De posse destas informações, modelos mais específicos também deverão ser utilizados para confirmar esta atividade e assim desvendar os possíveis mecanismos envolvidos nesta resposta analgésica.

Esses dados evidenciam a importância de uma futura caracterização das substâncias detectadas por CCDC no ECHCl₃, como, terpenos, esteróides e hidrocarbonetos, os quais podem ser os constituintes ativos responsáveis pela propriedade analgésica verificada.

4.2.5- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada a importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem.

1) *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* (Sanches, 2004; Devienne, 2000; Ellof, 1998a)

A avaliação da atividade antibacteriana e da CIM foi realizada pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica.

Uma colônia de cada cepa de *S. aureus*, *E. coli* e *Y. enterocolitica* foi inoculada em caldo de infusão de cérebro e coração (Brain-Heart Infusion – BHI) e incubada a 37°C, durante 24 horas. A partir deste inóculo, foi realizada a diluição até a turvação 0,5 da escala de McFarland em solução salina estéril e posteriormente nova diluição até 1:10 v/v a fim de obter a concentração final de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Utilizou-se ampicilina, tetraciclina e gentamicina como fármacos antimicrobianos controles para *S. aureus*, *E. coli* e *Y. enterocolitica*, respectivamente, os quais foram ensaiados na concentração de 5, 5 e 25 µg/mL.

As soluções das amostras testadas foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 1.000 µg/mL em Mueller-Hinton (CMH) e 5% de DMSO. Aos orifícios da microplaca foram adicionados 100 µL CMH, seguido da adição 100 µL das soluções de extratos e estes diluídos em série, atingindo concentrações variadas (1.000, 750, 500, 450, 250, 150, 125, 75, 50 e 37,5 µg/mL).

Seguiu-se com a adição de 10 µL da suspensão bacteriana em cada orifício e posterior incubação da microplaca a 37°C por 24h. Foram preparados grupos controle da bactéria, do antibiótico e do meio de cultura nas mesmas condições acima descritas. Decorrido o período de incubação, realizou-se a análise do teste através da leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro multicanal a 595 nm. Os testes foram feitos em triplicata na mesma microplaca, e em duas microplacas diferentes.

A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, evidenciado pela presença ou não de turvação nos orifícios. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do extrato vegetal/fração capaz de inibir 90% do crescimento microbiano.

2) *Helicobacter pylori* (Sanches, 2004; Ellof, 1998a)

H. pylori foi mantido em ágar-sangue de base rica. Após incubação em atmosfera de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) por período de 72 hs, colônias foram replicadas para tubos contendo meio CMH, suplementado com 5% de soro de cavalo e incubadas *overnight*. Uma alíquota dessa cultura foi semeada no mesmo meio e incubada a 37°C até turvação equivalente a Escala 0,5 de McFarland para obtenção de crescimento em fase exponencial. Os orifícios da microplaca foram então preenchidos com 100 µL de concentrações variadas (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL) dos extratos e/ou frações a serem avaliadas e em seguida de 10 µL da suspensão bacteriana de 10⁷ UFC/mL.

Como fármaco de referência foi utilizada tetraciclina na concentração de 5 µg/mL. Foram preparados concomitantemente, grupos controle da bactéria, do antibiótico e do meio de cultura nas mesmas condições. Seguiu-se com a incubação das placas e leitura da absorbância em espectrofotômetro multicanal em comprimento de onda de 620nm e posterior incubação por 48-72 horas após, a 37°C em microaerofilia. Decorrido o período de incubação as microplacas foram submetidas novamente à leitura a 620 nm. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência de crescimento do meio, caracterizado pela turvação do meio (observação visual) e pelo aumento na absorbância (leitura espectrofotométrica). A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento microbiano.

3) *Mycobacterium tuberculosis* (Sato, 1998)

A determinação do perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* frente os extratos/frações de *G. noxia* foi realizada pela técnica do MABA (Microplate Alamar blue Assay). Em uma microplaca estéril de 96 orifícios adicionou-se 200 µL de água destilada estéril em todos os orifícios da periferia a fim de evitar evaporação durante a incubação na estufa. Utilizou-se como fármaco de referência isoniazida. Posteriormente, diluiu-se o fármaco e as amostras testadas em DMSO para obtenção de soluções-estoque de 4.000 µg/mL e de 16.000 µg/mL, respectivamente. Em seguida foram realizadas diluições destas soluções no caldo 7H9, obtendo-se nos orifícios concentrações variáveis de isoniazida (de 0,5 a 0,015 µg/mL) e dos extratos vegetais (4.000 a 62,5 µg/mL).

A cepa de *M. tuberculosis* utilizada foi cultivada no caldo Middlebrook 7H9 a 37°C até atingir a turvação igual à Escala 1 de McFarland. Procedeu-se a diluição da cultura até 25 vezes e então 100 µL da diluição inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida e de drogas vegetais.

Selou-se as microplacas com parafilme seguido da incubação a 37°C por 6 dias. Decorrido esse período, adicionou-se Alamar Blue aos orifícios em estudo contendo a cepa micobacteriana.

As placas foram reincubadas por 24 horas após o que, realizou-se a leitura visual. O Alamar blue é capaz de indicar indiretamente a presença de crescimento microbiano através de uma reação de óxido-redução. Assim, manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano, enquanto que o desenvolvimento de cor rósea, como de multiplicação bacteriana. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor azul para róseo.

4) *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (NCCLS, 2002)

Uma cepa amostra de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* levedura foi inoculada em caldo de Sabouraud e incubada sob agitação a 25° C, durante 48 horas. A partir desse inóculo foi realizada a turvação até Escala 0,5 de Mac Farland (cerca $5 \cdot 10^6$ leveduras/mL) em salina. A determinação da CIM foi realizada pela técnica de diluição em microplaca, com modificações, segundo a Norma M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2002 (NCCLS, 2002).

Foram colocados 100 µL de meio RPMI-1640 (adicionado de glutamina, vermelho de fenol e suplementado com MOPS (ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico), na concentração de 0,165 mol/L, pH 7,0 nos poços da microplaca, adicionando-se em seguida 100 µL das soluções de extrato/frações diluídas 1:5 em RPMI a partir de uma solução estoque de 200 mg/mL em DMSO.

Foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL do poço anterior para o poço subsequente. Posteriormente foi realizada a diluição necessária para obter uma suspensão de $5 \cdot 10^3$ UFC/mL, da qual aplicou-se 100 µL nos respectivos poços das microplacas (concentração final de $2,5 \cdot 10^3$ UFC/mL) após a diluição seriada das amostras e dos controles. As microplacas foram incubadas por 48 h a 25° C sob agitação constante. A inibição do crescimento fúngico foi evidenciada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de TTC (2 % de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) após incubação a 30° C por cerca de 3 h, determinando-se a CIM a menor concentração que inibiu o crescimento fúngico, evidenciado pela presença de coloração rósea no fundo do poço. Paralelamente foram realizados testes com os grupos controles do meio, do DMSO e do fármaco de referência. Os testes foram realizados em triplicata.

Os resultados dos ensaios 1, 2, 3 e 4 estão apresentados na tabela 4.16

Tabela 4.16. Atividade antimicrobiana e CIM dos extratos e frações de *G.noxia*

Microrganismo	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Referência
	ECHCl ₃	EMeOH	FrFlav	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	125	75	25	penicilina 5
<i>E. coli</i> ATCC 10536	500	250	50	tetraciclina 5
<i>Y. enterocolitica</i> O8-Ye2707	≥ 750	250	125	gentamicina 25
<i>H. pylori</i> ATCC 43504	≥ 500	150	75	tetraciclina e ampicilina 5
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv-ATCC 27294	≥ 500	31	≥ 500	isoniazida 5
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	*	≥ 5.000	2.500	anfotericina 16
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	*	≥ 5.000	2.500	anfotericina 16
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	*	≥ 5.000	2.500	anfotericina 16

(*) não avaliado

Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. No decorrer dos últimos 60 anos, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes e seguros para lidar com infecções bacterianas e fúngicas revolucionou o tratamento médico, com redução drástica na morbidade e mortalidade causadas pelas doenças microbianas.

Lamentavelmente, acompanhando o desenvolvimento das defesas quimioterápicas do homem contra os microrganismos, estes também desenvolveram defesas contra os agentes quimioterápicos, com conseqüente aparecimento de resistência. Este fato não é surpreendente, porquanto reflete o princípio evolutivo de que os organismos se adaptam geneticamente a mudanças no seu meio ambiente (Rang *et al.*, 2001).

Aliado a isso, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos contribui para o desenvolvimento de resistência em populações de microrganismos, principalmente através da eliminação dos microrganismos sensíveis a partir de ambientes saturados de antibióticos com subseqüente substituição por microrganismos resistentes (Brooks *et al.*, 2001).

A presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores, bem como o seu uso para tratar infecções não são fatos recentes (Buhner, 1999; Cowan, 1999; Yunes e Calixto, 2001). Durante a sua vida, as plantas reagem a várias injúrias advindas do ambiente e são capazes de produzir compostos antimicrobianos para protegê-las contra infecções

causadas por patógenos como bactérias, fungos e vírus (Esquenazi *et al.*, 2002; Yunes e Calixto, 2001). Frente a essas propriedades, a utilização de extratos vegetais com a finalidade antimicrobiana pode ser viável tanto no sentido de evitar e combater infecções como também no de auxiliar na redução do número de bactérias resistentes.

Os microrganismos avaliados nesse trabalho são conhecidos por habitarem a pele ou mucosas da maioria dos homens, pois fazem parte da microbiota normal. Todavia, apesar de estarem comumente associados à rotina do ser humano, quando em condições favoráveis, são os responsáveis por quadros de infecções em pacientes debilitados.

Sabe-se, por exemplo, que a *E. coli* é mais comum e uma das mais antigas bactérias parasitas do homem, sendo o seu habitat natural o intestino. Porém, quando em condições desfavoráveis, é a causadora de infecções urinárias, septicemias e meningites, dentre outras enfermidades. Por sua vez, *S. aureus* é uma outra espécie encontrada em várias partes do corpo, mas que produz enterotoxinas que contribuem para patogenicidade da espécie, aumentando sua capacidade de invadir o corpo e danificar tecidos. Cerca de 15% dos indivíduos são portadores de *S. aureus*, na pele ou nasofaringe. Geralmente é causadora de infecções humanas, tanto de origem comunitária, quanto hospitalar. Além disso, é o agente mais comum em infecções piogênicas localizadas na pele (foliculite, terçol) ou em regiões mais profundas (bacteremia, endocardite, dentre outras), além de intoxicações alimentares (Tortora *et al.*, 2000; Trabulsi *et al.*, 2005).

Yersinia enterocolítica é uma das três principais espécies do gênero *Yersinia* que causam infecções no homem. O gênero *Yersinia* é habitante normalmente do intestino de muitos animais domésticos, mas é um patógeno emergente, que está se disseminando ultimamente em todo o mundo pois frequentemente têm sido transmitidos na carne e leite contaminados. As manifestações clínicas apresentadas pela infecção por *Y. enterocolítica* são na maioria das vezes entéricas, com dores abdominais e diarreias, que podem variar em sua severidade, desde poucas evacuações até uma enterocolite com lesões ulcerativas envolvendo o trato gastrointestinal (Tortora *et al.*, 2000; Trabulsi *et al.*, 2005).

Helicobacter pylori é uma bactéria que infecta o revestimento mucoso do estômago humano. Muitas úlceras pépticas, alguns tipos de gastrite e de câncer do estômago são causados pela infecção pelo *H. pylori*, apesar da maioria dos humanos infectados nunca chegar a manifestar qualquer tipo de complicação relacionada à bactéria. Essa bactéria vive exclusivamente no estômago humano e é o único organismo conhecido capaz de colonizar esse ambiente altamente ácido, em parte pela sua capacidade de excretar uma "nuvem" de amônia que a protege do ácido estomacal (Hazell, 1990).

Sabe-se que o *Mycobacterium tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose. Essa doença é uma das mais importantes doenças infecciosas atuais, que até hoje afeta milhões de seres humanos. Depois do surgimento da SIDA/AIDS sua disseminação continua a crescer. A tuberculose é mais comum nas áreas do mundo em que há muita pobreza, promiscuidade, desnutrição, más condições de higiene. Os países com maior incidência da doença são a Índia, China, Indonésia, Bangladesh, Nigéria, Paquistão, Filipinas, Congo, Rússia e Brasil. Apesar de apenas 10% dos pacientes com tuberculose infecciosa evoluírem para o quadro da doença, a resistência apresentada aos fármacos tuberculostáticos e, em particular, a multirresistência (MR, definida como a resistência à isoniazida e à rifampicina, com ou sem resistência a outros fármacos) constitui ameaça ao controle da doença e representa um grave problema de saúde pública.

De acordo com Holetz (2002) em extratos vegetais considerados com fortes antimicrobianos a CIM deve ser menor ou igual a 100 µg/mL; para os moderados o valor passa a ser de 100 a 500 µg/mL, fracos para CIM entre 500 e 1000 µg/mL e acima de 1000 µg/mL, o extrato é considerado inativo.

Os valores das CIMs estão apresentados na tabela 5.2 e revelam os perfis de susceptibilidade (efeito bacteriostático ou fungistático) ou de resistência aos extratos/frações testadas frente às cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *H. pylori*, *M. tuberculosis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Na avaliação da atividade antibacteriana, verifica-se que o ECHCl₃ gerou os maiores valores de CIM, o que sugere atividade fraca deste extrato, com exceção do efeito moderado obtido com *S. aureus*, que demonstraram serem as cepas mais susceptíveis em todos os testes. Em contrapartida, o EMeOH forneceu valores de CIM menores, indicando que as substâncias ali presentes possuem atividade moderada contra *E. coli*, *Y. enterocolitica* e *H. pylori*, além da potente atividade demonstrada frente o *S. aureus* e *M. tuberculosis*.

Diante dos melhores valores de CIM obtidos com o EMeOH pode-se questionar se os flavonóides presentes neste extrato seriam os constituintes responsáveis por tal atividade. Por isso, foram avaliados também os valores de CIM quando utilizada uma fração denominada flavonoídica, que era composta principalmente por uma mistura de flavonóides provenientes da FrBuOH do EMeOH (dentre eles Gn2 a Gn9). Após o ensaio, verificou-se que CIM foi reduzida diante *E. coli*, *Y. enterocolitica* e *H. pylori*, confirmando nossa hipótese sobre a influência dos flavonóides sobre essa atividade. Todavia, a mesma correlação não pode ser estabelecida na avaliação da atividade do EMeOH frente *M. tuberculosis*, uma vez que houve perda de atividade. Isso nos leva a programar para uma etapa futura, novas avaliações com outras classes de substâncias isoladas de *G. noxia*.

Em relação ao resultado obtido contra *H. pylori*, será de maior importância para auxiliar a compreender a atividade antiulcerogênica de *G. noxia*, pois a infecção por *H. pylori* representa a maior causa de úlcera péptica (Tortora *et al.*, 2000). No Brasil, por exemplo, 70% da população possuem a bactéria e ela está ligada a mais de 95% dos casos de úlcera péptica. Já os outros 5% devem-se ao uso de analgésicos e antiinflamatórios (Boaventura, 2005).

Durante séculos, preparações que contêm flavonóides como principais constituintes ativos têm sido utilizadas no tratamento das doenças microbianas humanas. Isso devido às crescentes verificações da atividade antimicrobiana que os flavonóides apresentam (Havsteen, 1983; Tereschuk, *et al.*, 1997). Dessa forma, muitos grupos de pesquisas têm desenvolvido trabalhos cujo enfoque é a avaliação dessa propriedade, de quantificação dos ativos antimicrobianos e atribuição das relações de estrutura-atividade exercidas pelos flavonóides (Cushnie e Lamb, 2005).

Há muito, dados da literatura confirmam a atividade antimicrobiana de alguns flavonóides, como kaempferol, quercetina e rutina frente diferentes cepas de *S. aureus* e *E. coli*, dentre outros microrganismos (Rauha, 2000; Puyvelde, 1989). A atividade antimicrobiana da isorhamnetina também foi verificada por Puyvelde (1989) frente microrganismos Gram positivos e negativos. Além do potencial de atividade intrínseco a cada flavonóide, Arima (2002) verificaram que melhores atividades antimicrobianas podem ser obtidas utilizando misturas de flavonóides, pois assim ocorre sinergismo dos efeitos atribuídos a cada um separadamente.

Outros compostos identificados em *G. noxia*, como a alantoína, também poderão eventualmente contribuir com a atividade antimicrobiana

4.2.6- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA IMUNE

A fim de aumentar o entendimento sobre as atividades biológicas de *G. noxia*, foram realizados também ensaios de atividade sobre o sistema imunológico.

1) Determinação da produção óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos (Green *et al.*, 1982)

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura foi medido espectrofotometricamente usando reagente de Griess com NaNO_2 como padrão. Foram utilizados macrófagos peritoneais na concentração de 5×10^6 células/mL e estes incubados por 48 h em presença de 100 μL das soluções dos extratos e de lipopolisacarídeo (LPS) de *E. coli* (DIFCO) (potente estimulador de NO), na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ou de somente meio de cultura RPMI-1640.

Após incubação, alíquotas de 100 μL do sobrenadante da cultura foram misturados com 100 μL do reagente de Griess (sulfanilamida 0,1%; naftiletlenodiamina 0,1% e ácido fosfórico a 3%). Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 540 nm em leitor de ELISA. Os dados foram expressos como micromols de nitrito através da curva padrão com concentrações molares conhecidas de NaNO_2 .

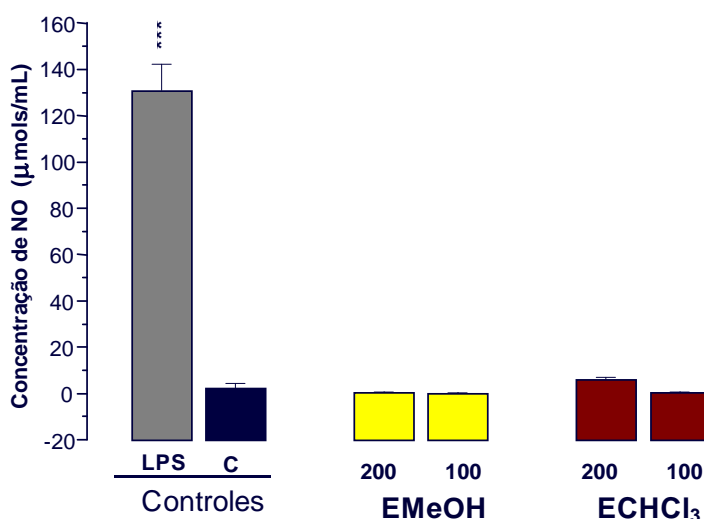


Gráfico 4.13. Determinação da produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença dos extratos de *G. noxia*.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

2) Determinação da liberação de água oxigenada (H_2O_2) por macrófagos peritoneais de camundongos (Pick e Mizel, 1981)

Foram preparadas suspensões de células peritoneais, ajustadas na concentração de 2×10^6 células/mL. Após aderência, as células foram incubadas em solução de vermelho de fenol, contendo: 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol (0,01 mg/mL). Transferiram-se alíquotas de 0,1 mL para placas de cultura de tecidos, de fundo chato contendo 96 escavações, seguido do acréscimo de 50 μL da solução de zimosam (ZIM), na concentração de 2,5 mg/ml e em outros orifícios somente o meio utilizado na reação, representando a liberação espontânea dos macrófagos. A placa foi incubada por uma hora a 37°C em atmosfera úmida. Decorrido este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 10 μL de NaOH 4 N.

Todas as amostras foram, testadas em triplicata e a absorvância determinada em leitor de ELISA automático, com filtro de 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 4N. Os resultados obtidos foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células peritoneais, a partir de uma curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho de fenol.

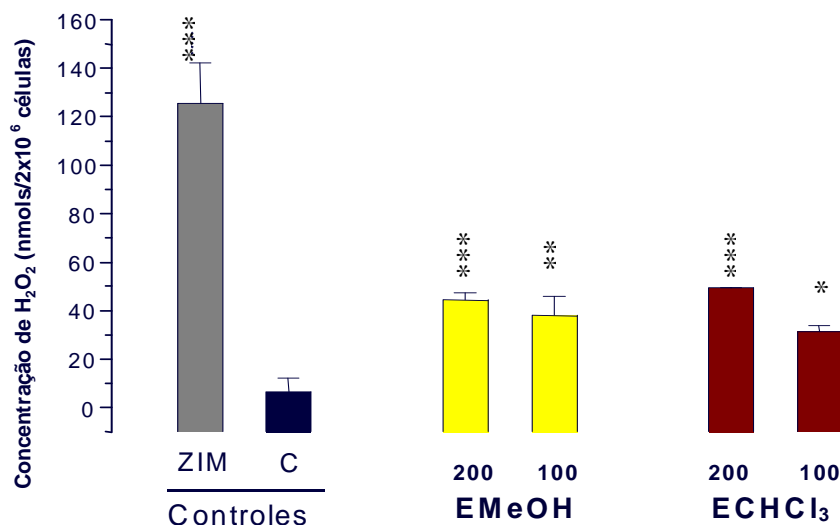


Gráfico 4.14. Determinação da liberação de H_2O_2 em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença dos extratos de *G. noxia*.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3) Determinação da liberação da citocina TNF- α (Fator de Necrose Tumoral) por macrófagos peritoneais de camundongos

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos Swiss inoculados previamente com 3,0 ml de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%, 3 a 4 dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram sacrificados com éter etílico e os macrófagos coletados da cavidade peritoneal com 3,0 mL de solução de Hanks. As células são centrifugadas a 225 g por 10 minutos e suspensas em solução de Hanks. O número de células é contado em câmara hemocitométrica e ajustada à concentração de 5×10^6 células. A seguir essas células foram testadas frente diferentes compostos e avaliada sua indução em liberar a citocina TNF- α . Adicionou-se LPS (controle positivo) e somente meio de cultura (RPMI).

A medida de TNF- α liberado no sobrenadante de cultura de células aderentes *in vitro* é baseada na propriedade que tem o TNF de lisar certas linhagens de células tumorais (Carswel, 1975). As células tumorais da linhagem L929, sensíveis ao TNF- α , foram suspensas

em meio RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino inativado e adicionados a uma placa de microtitulação de 96 orifícios numa concentração de 3×10^4 células/orifício, incubadas por 18 horas à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

No dia seguinte, substituiu-se o meio de cultura por outro contendo actinomicina D (SIGMA) na concentração de 1 µg/mL, e realizadas diluições seriadas das amostras a serem analisadas quanto à presença de TNF- α , ou seja, dos sobrenadantes obtidos de culturas de células aderentes (estimuladas com os extratos e com LPS). As diluições foram feitas com meio RPMI-1640 contendo soro fetal bovino inativado. Adicionou-se 100 µL de cada diluição das amostras por orifício, em triplicata. Após 24 horas de incubação nas condições anteriores, as células foram fixadas e coradas com violeta cristal (0,2% em metanol a 20%) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se o excesso de corante por lavagem em água corrente e adição de 0,1 mL de lauril sulfato a 1% a cada orifício para solubilizar as células coradas. A absorbância de cada orifício foi lida a 490 nm em leitor de ELISA. O cálculo das unidades de TNF- α foi feito utilizando-se uma reta padrão realizada previamente com TNF- α recombinante. Para comprovar a presença de TNF- α nos sobrenadantes das culturas e nos soros dos animais, estas preparações foram previamente incubadas com soro imune de coelho anti-rTNF- α e em seguida realizado o teste de citotoxicidade em células L929.

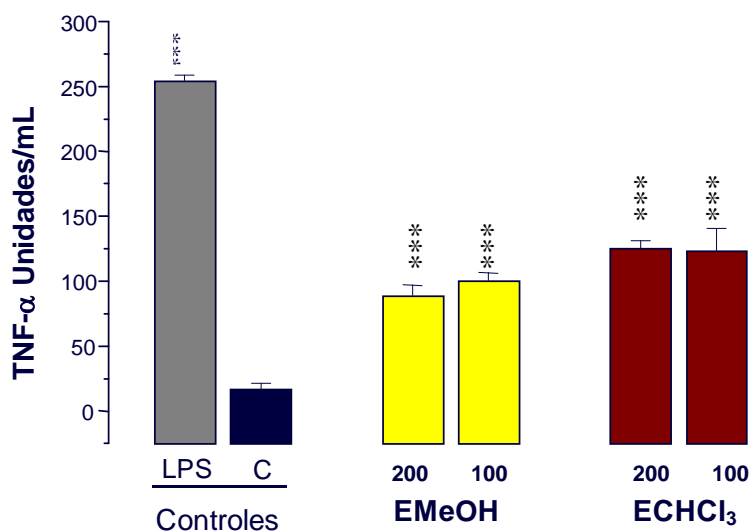


Gráfico 4.15. Determinação da liberação de TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos da *G. noxia*.

*p<0,05, **p<0,01, ***p< 0,001

Tabela 4.17. Determinação da produção NO, H₂O₂ e TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença de extratos da *G. noxia*.

Amostra	Concentração	H ₂ O ₂ (nmols/2.10 ⁵ cels.)	NO (μ mols/mL)	TNF- α (unidades/mL)
EMeOH	200 (μ g/mL)	44,31 \pm 3,15	0,63 \pm 0,11	89,22 \pm 7,68
	100 (μ g/mL)	38,06 \pm 8,00	0,19 \pm 0,05	100,74 \pm 5,81
EChCl ₃	200 (μ g/mL)	49,31 \pm 0,07	6,04 \pm 0,93	125,11 \pm 5,87
	100 (μ g/mL)	31,39 \pm 2,51	0,54 \pm 0,13	123,56 \pm 17,48
Controle (+)				
LPS	1 μ g/orifício	--	130,84 \pm 11,41	254,62 \pm 4,36
ZIM	2,5 mg/mL	125,58 \pm 16,62	--	--
Controle (-)		6,44 \pm 5,73	2,43 \pm 1,87	17,33 \pm 4,17

O sistema imunológico é um mecanismo complexo de defesa do organismo. Ele é capaz de gerar inúmeras células e moléculas que podem especificamente reconhecer e eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores. Estas células e moléculas agem conjuntamente em uma rede dinâmica primorosamente adaptável, cuja complexidade somente se assemelha à do sistema nervoso central (Goldsby *et al.*, 2000).

Os macrófagos são células que possuem um papel central no sistema imunológico. Elas participam de diferentes processos no organismo, como por exemplo, remodelagem tecidual durante a embriogênese, reparação de ferimentos, remoção de células velhas e danificadas, hematopoiese e homeostase (Klimp *et al.*, 2002). Além disso, os macrófagos estão envolvidos em todas as fases da resposta imune (Roitt *et al.*, 1999).

Todas as vezes que se deparam com certos estímulos, os macrófagos sofrem processo de ativação, caracterizado por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Os macrófagos ativados, porém, não funcionam apenas como fagócitos. Essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio, citocinas, etc (Parslow *et al.*, 2000). Parte de sua efetividade se deve à produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e outros reativos intermediários do nitrogênio (RNI), bem como à fagocitose de partículas estranhas (Keil, 1999).

A busca de substâncias naturais com propriedades imunomoduladoras é relativamente recente e pode ser feita através de ensaios de estimulação da imunidade inespecífica. A imunomodulação, por sua vez, pode ser entendida como uma modificação da resposta imunológica ou da função do sistema imune, através da ação de agentes estimulantes ou supressores (Immunomodulation, 2004).

Apesar de os mecanismos de ação dos imunomoduladores serem supostamente muito complexos, parte de sua atividade pode ser devida a um efeito direto sobre as células imunológicas, como em macrófagos. Essa é uma possibilidade para avaliação da potência desses agentes através de medidas da resposta celular *in vitro*.

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser, por exemplo, flavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas e taninos, dentre outras (Willians, 2001).

Dessa forma, os ensaios de avaliação dos efeitos dos extratos ECHCl₃ e EMeOH foram conduzidos na tentativa de avaliar o efeito que os extratos *de G. noxia* pudessem apresentar sobre o sistema imune, pois o entendimento desses efeitos certamente pode auxiliar a explicar as demais atividades biológicas apresentadas.

Nos gráficos 4.13, 4.14, 4.15 e tabela 4.17 podem ser observados os efeitos dos extratos ECHCl₃ e EMeOH frente a produção de H₂O₂, NO e TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos. Como controles positivos foram utilizados LPS e ZIM (potentes estimuladores de macrófagos), enquanto que os controles negativos foram considerados como a produção desses mediadores em condições basais.

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que a aplicação dos extratos nas culturas de macrófagos induziu à produção de H₂O₂ e de TNF- α em cerca de 20 a 40%, se comparado ao controle positivo e que de maneira geral foram dose-dependentes. Esses resultados apontam para um efeito imunoestimulante sobre estes dois mediadores. Em contrapartida, com uso dos mesmos extratos não foi verificada produção de significativa de NO, aparentemente por efeito de imunossupressão.

Diante destes resultados, é necessário avaliar se os efeitos observados são efetivamente decorrentes de imunoestimulação (para H₂O₂ e TNF- α) através de novos testes com os mesmos extratos, porém utilizando macrófagos previamente imunossuprimidos. De maneira similar, também deverão ser conduzidas avaliações da produção de NO (com macrófagos imunoestimulados) para confirmar se o efeito observado é decorrente de imunossupressão ou se significa simplesmente qualquer ausência de atividade.

Levantamento bibliográfico evidenciou a investigação dos efeitos de extratos e de alguns dos compostos de plantas que apresentam propriedades imunomoduladoras, tais como, sesqui e triterpenos que inibiram a produção de NO (Matsuda, 1999) e ainda de flavonóides que alteraram a produção TNF- α e H₂O₂ (Manthey *et al.*, 1999).

A presença de atividade imunomoduladora em Nyctaginaceae não é fato surpreendente. Em um trabalho de Pandey (2005) verificou-se a atividade imunossupressora dos extratos de *Boerhaavia diffusa*. Neste mesmo estudo a diminuição das produções de NO e TNF- α foi atribuída principalmente aos flavonóides encontrados na espécie. Todavia, a avaliação da atividade dos flavonóides sobre o sistema imune tem sido complexa e nem sempre completamente compreendida. Resultados *in vitro* nem sempre estão de acordo com as observações *in vivo*, pois, algumas vezes são imunossupressores e outras imunoestimulantes. Por essa razão é importante uma melhor avaliação de suas propriedades (Ielpo *et al.*, 2000).

A tabela 4.18 apresenta um panorama geral das atividades biológicas realizadas e os resultados alcançados até o momento.

Tabela 4.18. Panorama das atividades farmacológicas avaliadas nos extratos das folhas de *G. noxia*

ENSAIO FARMACOLÓGICO	ECHCl₃	EMeOH	CONTROLE
Toxicidade	ausente	ausente	-
Trânsito intestinal	-	não altera	atropina
Proteção ulcerogênica			
- EtOH	ausente	51% (500 mg/kg)	carbeno - 95% (100 mg/kg)
- HCl/EtOH		57% (250 mg/kg)	
- Piroxicam		62% (125 mg/kg)	
Ação analgésica/antiinflamatória			
- Contorções abdominais	30% (500 mg/kg)	ausente	aspirina - 43% (300 mg/kg)
Sistema Imune			
- TNF- α	125,1 \pm 5,8	100,7 \pm 5,8	254,6 \pm 4,4
- NO	0,54 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	2,43 \pm 1,9
- H ₂ O ₂	31,4 \pm 2,5	38,0 \pm 8,0	125,58 \pm 16,6
Antimicrobiana	CIM (μ g/mL)	CIM (μ g/mL)	CIM (μ g/mL)
- <i>E. coli</i>	500	250	tetraciclina - 5
- <i>S. aureus</i>	125	75	penicilina - 5
- <i>Y. enterocolitica</i>	750	250	gentamicina - 5
- <i>H. pylori</i>	500	150	tetraciclina - 5
- <i>M. tuberculosis</i>	500	31,2	isoniazida - 5
- <i>C. albicans</i>	-	5.000	anfotericina - 16
- <i>C. tropicalis</i>	-	5.000	anfotericina - 16
- <i>C. parapsilosis</i>	-	5.000	anfotericina - 16

5. Considerações finais

A identificação de metabólitos secundários de origem vegetal de interesse terapêutico continua sendo área de relevada importância para a saúde humana. Dessa forma, iniciou-se o estudo químico-farmacológico de espécies do gênero *Guapira* (Nyctaginaceae), que está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho, primeiramente com *G. noxia*.

O local de coleta foi assim escolhido por ser um dos poucos fragmentos nativos restantes do cerrado paulista. Observou-se com cuidado o horário de coleta, a fim de não prejudicar a qualidade do material vegetal e evitar perdas por calor excessivo. O processo de secagem ao qual os órgãos vegetais foram posteriormente submetidos poderia influenciar na qualidade da droga, e, em função da parte utilizada, esta influência poderia ser ainda mais acentuada. Por isso, a secagem foi realizada em temperatura inferior a 40°C. Após a secagem as folhas tornaram-se enegrecidas, conforme referido por Furlan (1996) como uma das características da família.

De acordo com a técnica de extração escolhida, o diâmetro da partícula da droga seca poderia comprometer a extração das substâncias ativas. Assim, foi escolhido moinho cuja peneira apresentava 0,5 mm de d.i., o que permitiu a extração dos constituintes até completa exaustão do vegetal. Através das sucessivas extrações três tipos de extratos com polaridades distintas foram obtidos: ECHCl₃, EMeOH e EMeOH70%.

De acordo com a legislação atual sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (RDC48/04), dentre as exigências técnicas e legais para a concessão do registro de medicamentos fitoterápicos está a necessidade do controle de qualidade tanto dos derivados de droga vegetal e excipientes quanto do produto acabado. Por isso, determinamos o perfil cromatográfico dessa espécie, que poderá ser de grande importância no controle de qualidade e escolha de marcadores para essa espécie.

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por HPLC. Todavia, quando se pensa em controle de qualidade, também é conveniente a introdução de alternativas mais simples e baratas, pois nesses casos requerem-se procedimentos que permitem a análise rápida de numerosas amostras, em laboratórios geralmente modestos no que se refere ao instrumental instalado e utilizado por analistas na maioria das vezes sem formação superior. Nesse sentido, foram empregadas metodologias baseadas em cromatografia em camada delgada analítica, HPLC-UV-DAD e também realizada a quantificação de flavonóides totais por métodos espectrofotométricos.

A triagem cromatográfica dos extratos evidenciou a presença das principais classes de metabólitos secundários presentes: triterpenos, esteróides, compostos fenólicos, flavonóides e saponinas; e ainda ausência de taninos e alcalóides.

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos revelou que no EMeOH encontra-se a maior quantidade (12%) de substâncias fenólicas, sobre as quais este estudo foi centrado.

O emprego da HPLC-UV-DAD permitiu a realização de análises qualitativas do EMeOH de modo eficaz. Tendo definidas as condições de análise, foi obtido o perfil cromatográfico ou "fingerprint" do EMeOH de *G. noxia*. Através desse perfil cromatográfico, verificou-se a ocorrência de picos de substâncias com espectros no UV típicos de flavonóides derivados da quercetina, mostrando que esta classe é uma das mais proeminentes na espécie.

O fracionamento inicial de um extrato vegetal bruto é muitas vezes realizado através de partição entre solventes orgânicos e água. Esse procedimento implica numa dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis, a fim de promover a separação preliminar dos componentes de uma mistura. Por isso, o fracionamento inicial do EMeOH foi conduzido por ELL entre *n*-BuOH e água. Esse procedimento foi adequado para a extração dos flavonóides, que permaneceram na fase *n*-BuOH, separando-os de moléculas mais polares, como açúcares livres, que permaneceram na fase aquosa. Em seguida, o fracionamento da FrBuOH por GPC levou à obtenção de frações contendo flavonóides com diferentes unidades sacarídicas sem, no entanto, que houvesse perdas por adsorção.

A purificação dos flavonóides de *G. noxia* foi alcançada com uso de cromatografia de fase reversa (C18), devido à polaridade das substâncias bem como pelas pequenas diferenças estruturais existentes entre eles, tais como, presença/ausência de metoxilas na posição 3' do núcleo flavonoídico e identidade dos açúcares ligados à aglicona.

Através dessas técnicas foram isolados flavonóides com duas e três unidades de açúcares, derivados da quercetina, da isorhamnetina e do kaempferol, além de um ciclitol e da alantoína. Os derivados diglicosilados são de ocorrência relativamente comum e de reconhecida importância biológica, como foi discutido anteriormente nesse trabalho. Em contrapartida, os derivados triglicosilados são menos comuns e os seus dados de RMN escassos na literatura. Isso talvez seja devido à dificuldade em se isolar Gn5/Gn6 e Gn7/Gn8 separadamente, haja vista a semelhança estrutural existente entre eles. Além disso, até o momento Gn7 é inédito.

Uma das propriedades dos flavonóides intrinsecamente ligadas às atividades biológicas é a atividade antioxidante. Essa atividade é decorrente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Os flavonóides isolados *G. noxia* são moléculas que apresentam características estruturais adequadas para presença dessa atividade, tais como a existência dos grupos 4-oxo e 5-

hidroxi existentes no anel heterocíclico C e no anel A; grupos catecol no anel B (hidroxilas em C3' e C4') e dupla ligação entre C2 e C3.

Os ensaios realizados evidenciaram que os flavonóides de *G. noxia* apresentam efeito antioxidante, conforme avaliado nos testes com soluções de DPPH e β -caroteno.

Os ensaios iniciais com os extratos de *G. noxia* apontam que essa planta aparentemente é segura para uso, pois não foram observados sinais de toxicidade aguda. Todavia são necessários testes complementares para confirmar a ausência de toxicidade, como por exemplo, ensaios de toxicidade crônica, genotoxicidade e outros.

A avaliação da atividade antiúlcera gástricas mostraram que o EMeOH preveniu a formação de lesões em todos os modelos ensaiados. No ensaio de indução de úlceras por AINES, foi obtida a maior gastroproteção: 62% com a dose de 125 mg/kg de extrato. Uma vez que radicais livres estão diretamente relacionados à formação das lesões, é possível que os flavonóides presentes no EMeOH sejam capazes de inibir a ação deletéria desses radicais e, assim, proteger a membrana frente a agentes indutores de úlceras.

O ECHCl₃ foi inativo nos modelos de estudo de atividade antiúlcera gástricas. Em contrapartida, apresentou resultados promissores de atividade analgésica, com redução de 30% no número de contorções abdominais no modelo de contorções induzidas por ácido acético. Isso indica que esse extrato pode ser fonte promissora de produtos naturais ativos farmacologicamente. Sua composição química será investigada no futuro.

Sabe-se que é possível isolar das plantas uma variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Este fato vem despertando enorme interesse nos cientistas em conseguir produzir novas drogas antimicrobianas mais seguras, potentes e eficazes contra patógenos resistentes (Ahmad e Beg, 2001).

O ensaio de atividade antimicrobiana evidenciou efeito potente a moderado do EMeOH contra microrganismos gram positivos e negativos, mas não contra fungos. A fração flavonoídica deste mesmo extrato exibiu CIM ainda menores. Isso sugere que os flavonóides Gn2-Gn9 podem ser os responsáveis por tal atividade, confirmando a potencialidade das substâncias isoladas de *G. noxia*.

As evidências de que os flavonóides dietéticos são benéficos à saúde são muitas. Entretanto, cabe ainda mencionar que alguns compostos fenólicos podem atuar como pró-oxidantes. Esse efeito é responsável pela citotoxicidade e efeitos pró-apoptóticos de alguns flavonóides isolados de várias plantas medicinais (Ueda *et al.*, 2002). Essas informações sugerem que o mesmo atributo estrutural que melhora a capacidade antioxidante pode exacerbar o estresse oxidativo e o dano funcional e estrutural das moléculas celulares.

Sabe-se que as vias metabólicas que conduzem à formação das micromoléculas (os produtos naturais) são muitas vezes características de algumas famílias, gêneros e espécies possibilitando, portanto, estudos quimiosistemáticos.

Dessa forma, o conhecimento da composição química *Guapira noxia*, conforme apresentado neste trabalho, também poderá contribuir no processo de identificação das demais espécies do gênero, o qual tem apresentado taxonomia conflitante. Esse conjunto de informações justifica a importância do trabalho realizado bem como a necessidade de continuar futuramente o estudo químico-farmacológico com espécies do gênero *Guapira*, das quais poderão ser obtidos novos produtos naturais farmacologicamente ativos.

6. Referências bibliográficas

- AGRAWAL, P. K. Carbon 13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- AHMED, B.; YU, C. P. Borhavine, a dihydroisofuranoxanthone from *Boerhaavia diffusa*. *Phytochemistry*, v.31, n.12, p.4382-4384, 1992.
- AHMED, M.; DATTA, B. K.; ROUF, A. S. S. Rotenoids from *Boerhaavia repens*. *Phytochemistry*, v.29, p.1709-1710, 1990.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, v.8, p.310-322, 2001.
- AMBIENTE Brasil. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br>>. Acesso em: 20 dez. 2005.
- ANDLAUER, W.; STUMPF, C.; FURST, P. Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochem. Pharmacol.*, v.62, p.369-374, 2001.
- ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Emblia officinalis* in hypercholesterolemic rats. *Food Chem.*, v.38, p. 569-574, 2003.
- ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. I. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, v.66, p.1009-1014, 2002.
- ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. N.; VOSS, H. P.; BAST, A. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food Chem. Toxicol.*, v.39, p.787-791, 2001.
- ASLAM, M. Asian and its practice in Britain. In: Evans, W. C. *Pharmacognosy*. London: Saunders Company, 1996.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. *Pharmacol. Res.*, v.47, p.93-98, 2003.
- BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; COBIANCHI, R. C.; VUOTTO, M. L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, v.71, p.110-116, 2000.
- BATES, S.; JONES, R.; BAYLEI, C. Insulin-like effect of pinitol. *Brit. J. Pharmacol.*, v.130, p.1944-1948, 2000.
- BATISTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. B.; DE PIETRO MAGRI, L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.27, p.328-332, 2004.
- BASE DE DADOS TROPICAL. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br>>. Acesso em: 20 jan. 2005.
- BEGUM, S.; ADIL, Q.; SIDDIQUI, B. S.; SIDDIQUI, S. Triterpenes from *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*, v.65, p.177, 1994.
- BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, v.361, p.315-325, 1993.
- BOAVENTURA, L. O nobel também é nosso. *Boletim informativo -UFMG*, n.1512, 2005.
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti ulcer remedies. *Phytother. Res.*, v.14, p.581-591, 2000.
- BORRELLI, F.; ASCIONE, V.; CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; FATTORUSSO, E.; SCAFATI, O. T. Spasmolytic effects of nonprenylated rotenoid constituents of *Boerhaavia diffusa* roots. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 903-906, 2006.

- BRITO, A. R. M. S. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: UNICAMP, 1994. p.122.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Medical microbiology. 22.ed. USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001. p.144-179.
- BUHNER, S. H. Herbal antibiotics: natural alternatives for treating drug – resistant bacteria (a medicinal herb guide). Pownal, Vermont: Storey Books, 1999. p.18-20.
- CAI, Y. Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.*, v.78, p.2872-2888, 2006.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações farmacêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.
- LA CASA, C. I.; VILLEGAS, C.; ALARCÓN, D. L.; MOTILVA, M. J.; MARTÍN, C. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.*, v. 71, p. 45-53, 2000.
- CHAN, F. K. L.; LEUNG, W. K. Peptic ulcer disease. *The Lancet*, v.360, p.933-939, 2002.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms. *Physiol. Rev.*, v.59, p.527-605, 1979.
- CHANG, W. S.; LEE, Y. J.; LU, F. J.; CHIANG, H. C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research*, v.13, p.2165-2170, 1993.
- CHANG, W. S.; CHANG, Y. H.; LU, F. J.; CHIANG, H. C. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, v.14, p.501-506, 1994.
- CHRISTEL, D. Q.; BERNARD, G.; JACQUES, V.; THIERRY, D.; CLAUDE, B.; MICHEL, L.; MICHELINE, C.; JEAN, C. C.; FRANÇOIS, B.; FRANCIS, T. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.*, v.72, p.35-42, 2000.
- COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.*, v.32, p.295-310, 1968.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 9-11.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*, v.12, p.564-582, 1999.
- CRAWFORD, J. M. Trato gastrointestinal. In: Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. L., Patologia estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.672-742.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.26, p.343-356, 2005.
- DAVID, A. L.; GRAHAM, P. S. A natural flavonoids and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin induced erosions. *J. Nutr. Biochem.*, v.12, p.95-100, 2001.
- DAYAL, Y.; DELLELIS, R. A. Trato gastrintestinal: úlceras pépticas. In: Cotrans, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L. (Eds) Patologia estrutural e funcional. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.698-701.

DE FEO, V.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SORIA, R. U. Saponins from *Colignonia scandens* Benth. (Nyctaginaceae). *Biochem. Systematics Ecology*, v.26, p.251-253, 1998.

DEVIENNE, K. F. Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora Unesp, 2002. p. 145-173.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, v.97, p.654-660, 2006.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; DE SIQUEIRA, M. F. Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica, 2004.

EDDY, N. B. E.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutilamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.107, p.385-393, 1953.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. *Planta Medica*, v.64, p.711-713, 1998a.

ELLOF, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol.*, v.60, p.1-8, 1998.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr. Res.*, v.24, p.851-874, 2004.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res. in Microbiol.*, v.153, p.647-652, 2002.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (Orgs) Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna, Chapecó: Argos, 2001. p.318-334.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V.; RODRIGUES, H. M.; MOURAO, R. H.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.72, p.273-278, 2002.

FURLAN, A. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. São Paulo: IBB/ USP. 1996. 359f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 1996.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications *Food Res. Inter.*, v.38, p.879-884, 2005.

GILANI, A. H.; JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A. Studies on the hepatoprotective effects of rutin *Pharmacol. Res.*, v.31, p.91, 1995.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. W. H. *Kuby immunology*. 4.ed New York: W. H. Freeman and company, 2000. 670p.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J. Ethnopharmacol.*, v.77, p.41-47, 2001.

- GORDANA, S., JORAN, P., ANTE, T. AND NIKOLA, B., *Pharmacol. Jugoslavia*, v.38, p.255, 1988.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v.126, p.131-138, 1982.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
- GUPTA, M. B.; NATH, R.; GUPTA, G. B.; BHARGAVA, K. P. Antiulcer activity of some plants terpenoids. *Indian J. Med. Res.*, v.73, p.649-652, 1981.
- HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, C. A. *The Flavonoids: advances in flavonoids research since 1986*. London: Chapman and Hall, 1986. 676p.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p.481-504, 2000.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, v.32, p.1141-1148, 1983.
- HAZELL, S. L. Urease and catalase as virulence factors of *H. pylori*. In: Menge, H. et al. (Eds). *Helicobacter pylori*. Berlin: Springer, 1990.
- HEUER, S.; RICHTER, S.; METZGER, J. W.; WRAY, V.; NIMTZT, M. STRACK, D. Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry*, v.37, p.761-767, 1994.
- HILOU, A.; NACOULMA, O. G.; GUIGUEMDE, T. R. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v.103, p.236-240, 2006.
- HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING D.; LEWIN, M.; OKABE S.; PARSONS M.; SEWING K.; WALLMARCK B.; SACHS G. Pharmacological aspects of acid secretion. *Dig. Dis. Sci.*, v.40, 3s-23s, 1995.
- HIRUMA-LIMA C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B.; GERMONSÉN ROBINEOU, L.; SOUZA BRITO, A. R. M. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.267-274, 2000.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S., BIGHETTI, E. J.; GERMONSEN ROBINEOU, L.; SOUZA BRITO, A. R. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v.71, p.267-274, 2002.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, p.1027-1031, 2002.
- HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Agentes utilizados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastresofágico. In: Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Goodman & Gilman's: as bases farmacológicas da terapêutica, 10.ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2003, p.757-768.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas. São Carlos: EDUFSCAR, 2003

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, Ecossistemas Brasileiros, Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/>>. Acesso em: 10 jan. 2005.

IELPO, M. T. L.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARD, M. M.; RICCIARD, L.; VOUTTO, M. L. Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v.71, p.101-109.

IMUNOMODULATION, Disponível em: <<http://www.wefre.org/cancer/imunomodulation.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2004.

IRVINE, R. F.; SCHELL, M. J. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat. Rev.*, v.2, p.327-338, 2001.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Nomenclature of cyclitols. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/cyclitol/>>. Acesso em: 20 abr. 2006.

IZZO, A. A.; DICARLO, G.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Antiulcer effects of flavonoids-role endogenous PAF. *Phytoter. Res.*, v.3, p.179-181, 1994.

KATSOURA, M. K.; POLYDERA, A. C.; TSIRONIS, L.; TSELEPIS, A.D.; STAMATIS, H. Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency J. *Biotechnol.*, In Press, 2006.

KATSUBE, T.; IMAWAKA, N.; KAWANO, Y.; YAMAZAKI, Y. ; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.*, v.97, p.25-31, 2006.

KEIL, D. E.; LUEBKE, R. W.; PRUETT, B. S. Differences In the effects of dexamethasone on macrophage nitrite production: Dependence on exposure regimen (*in vivo* or *in vitro*) and activation stimuli. *Int. J. Immunopharmacol.*, v.17, p.157-166, 1999.

KINSELLA, J.E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.*, p.85-89, 1993.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Criti. Rev. Oncol. Hematol.*, v.44, p.143-161, 2002.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 783p., 1988.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, v.18, p.412-416, 1959.

LAMI, N.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. Isolation and structure determination of Boeravinone-D, Boeravinone-E, and Boeravinone-F. *Chem. Pharm. Bull.*, v.39, p.1863-1865, 1991a.

LAMI, N.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T.; MOMOSE, Y. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. Identification of Ca-2+ channel antagonistic compound from the methanol extract. *Chem. Pharm. Bull.*, v.39, p.1551-1555, 1991b.

- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Porto Alegre: Gráfica Metrópole, 2003.
- LAVAUD, C.; BEAUVIERE, S.; MASSIOT, G.; MEN-OLIVER, L. L.; BOURDY, G. Saponins from *Pisonia umbellifera*. *Phytochemistry*, v.43, p.189-194, 1996.
- LEIGHTON, F.; CASTRO, C.; BARRIGA, C.; URQUIAGA, I. Vino y Salud. Estudios epidemiológicos y posibles mecanismos de los efectos protectores. *Rev. Med. Chile*, v.125, p.483-491, 1997.
- LEVIN, R. A.; RAGUSO, R. A.; MCDADE, L. A.; Fragrance chemistry and pollinator affinities in Nyctaginaceae. *Phytochemistry*, v.58, p.429-440, 2001.
- LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C. J. Pfeifer. Peptic Ulcer. Munksgaard, Copenhagen, p.92-97, 1971.
- LEWIS, D. A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Progr. Med. Chem.*, v.28, p.201-231, 1991.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2002, p. 103-104.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer-Verlag, 1970
- MCINTOSH, J. H.; BYTH, K.; PIPER, D. W. Causes Of Death Amongst A Population Of Gastric Ulcer Patients In New South Wales, Australia. *Scan. J. Gastroenterol.*, v.26, p.806-811, 1991.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update. *Mol. Cellular Biochemistry: An International Journal for Chem. Biol. Health Disease*, v.253, p.329-338, 2003.
- MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K. J. K. Analgesic activity of some Indian medicinal plants *J. Ethnopharmacol.*, v.106, p.425-428, 2006.
- MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; MONTANARI, A.; ASH, K.; MANTHEY, C. L. Polymethoxilated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytes. *J. Nat. Prod.*, v.62, p.441-444, 1999.
- MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. *Mensagem doce*, n.46, 1998.
- MARKENSON, J. A. Mechanisms of chronic pain. *Am. J. Med.*, v.101, p.1A-7S, 1996.
- MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press; 1982, 113p.
- MATOS, J. F. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: EUFC, 1997.
- MATSUDA, H.; KAGEURA, T.; TOGUCHIDA, I.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; YOSHIKAWA, M. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-b 23-acetate and -c 23-acetate. *Bioorg. Med. Lett.*, v.9, p.3081-3086, 1999.
- MESSANA, I.; FERRAR, F.; SANT'ANA, A. E. G. Two 12a-hydroxyrotenoids from *Boerhaavia coccinea* *Phytochemistry*, v.25, p.2688-2689, 1986.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de fitoterápicos São Paulo: Robe Editorial, 2000. 116p.

MINCIS, M.; CHEBLI, J. M. F.; KHOURI, S. T.; MINCIS, R. Etanol e o trato gastrointestinal. Arch. Gastroenterol., v.32, p.131-139, 1995.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>, Acesso em: 20 jan. 2006.

MIZUI, I.; DOUTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. Jpn J. Pharmacol., v.33, p.934-945, 1983.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: <<http://www.mobot.org/plantscience/default.asp>>. Acesso em: 15 jan. 2005.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S. AND SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. Jpn J. Pharmacol, v.57, p.495-505, 1991.

MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidant flavonoid quercetina: implications of this intestinal absorption and metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.417, p.12-17, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; 2.ed. 19087-1898, 2002.

OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. The cerrados of Brazil – ecology and natural history of a neotropical savana. New York: Columbia University Press, 2002.

OTSUKA, H.; YAMAZAKI, K.; YAMAUCHI, T. Alangifolioside, a diphenylmethylene derivate, and other phenolics from the leaves of *Alangium platanifolium* Var. *tribolum*. Phytochemistry, v.28, p.3197-3200, 1989.

PANDEY, R.; MAURYA, R.; SINGH, G.; SATHIAMOORTHY, B.; NAIK, S. Immunosuppressive properties of flavonóides isolated from *Boerhaavia diffusa* Linn. Inter. Immunopharmacol., v.5, p. 541-553, 2005.

PARI, L.; SATHEESH, M. A. Antidiabetic activity of *Boerhaavia diffusa* L.: effect on hepatic key enzymes in experimental diabetes J. Ethnopharmacol., v91, p.109-113, 2004.

PARSLOW, T. G.; BAINTON, D. F. Imunidade inata. In: Atites, D. P.; Terr, A. I.; Parslow, T. G. Imunologia médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p.19-32.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIS, G. S. Introduction to spectroscopy - a guide for students of organic chemistry. 3.ed. Washington: Brooks/Cole, 2001.

PIATELLI, M.; MINALE, L.; NICOLAUS, R. A. Pigments of centrospermae-V: betaxanthins from *Mirabilis jalapa*. Phytochemistry, v.4, p.817, 1965.

PICK, E.; MIZEL, D. J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J. Immunol. Meth., v.46, p.211-226, 1981.

PIETTA, P. G. J. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, v.46, p.1035-1042, 2000.

PODESCHWA, M.; PLETTENBURG, O.; BROCKE, J. V.; BLOCK, O.; ADULT, S.; ALTENBACH, H. J. Stereoseletive synthesis of *myo*-, *neo*-, *L-chiro*-, *D-chiro*-, *allo*-, *scyllo*-, and *epi*-Inositol systems via conduritols prepared from *p*-benziquinone. Eur. J. Organ. Chem., v.10, p.1958-1972, 2003

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASCA, R.; TORRES, J.; MARQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastro duodenal lesions. *Arzneimittelforschung*, v.47, p.568-572, 1997.

PUYVELDE, L. V.; KIMPE, N. D.; COSTA, J.; MUNYJABO, V.; NYIRANKULIZA, S.; HAKIZAMUNGU, E.; SCHAMP, N. Isolation of flavonoids and a chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichrysetin. *J. Nat. Prod.*, v.52, p.629-633, 1989.

RAGHAV, S. K.; GUPTA, B.; AGRAWAL, C.; GOSWAMI, K., DAS, H. R. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.*, v.104, p.234-239, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.552.

RASTOGI, .L.; PATNAIK, G. K.; DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol. Res.*, v.38, p.125-132, 1998.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma bordagem no ensino de Farmacognosia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.11, p.57-69, 2001.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, v.56, p.3-12, 2000.

REDFERN, J. S.; FELDMAN, M. Role of endogenous prostaglandins in preventing gastrointestinal ulceration induction of ulcers by antibodies to prostaglandins. *Gastroenterology*, v.96, p.596-605, 1989.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 5.ed. São Paulo: Manole. 1999, 423p.

SIDDAL, P. J.; COUSINS, M. J. Pain mechanisms and management: an update. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.22, p.679-688, 1995.

REISINE, T.; PASTERMARK, G. Analgésicos e antagonistas opióides. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* 9.ed. (Ed.) Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B; Ruddon, R. W.; Gilman, A. G. Goodman & Gilman', 1996, p.379-404.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers natural antiulcerogenic antioxidant compounds. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.35, p.523-534, 2002.

REYES, M.; MARTIN, C.; DELACASTRA, C. A.; TRUJILLO, J.; TORO, M. V.; AYUSO, M. J. Antiulcerogenic of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. *Z. Naturforschung*, v.51, p.536-569, 1996.

REYNOLDS J. E. F. (Ed.) *Martindale - The extra pharmacopoeia*. 31.ed. London: Royal pharmaceutical society. 1996.

RICO, J. M. T. Prefácio In: Cunha, A. P.; Silva, A. P.; Roque, O. R. *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. p. 9-11.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 5.ed. São Paulo: Malone, 1999. 423p.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann. Rev. Nutr.*, v.22, p.19-34, 2002.

- SAXENA, R.; ZHANG, J.; KOVAC, P. Immunogens from a synthetic hexasaccharide fragment of the O-SP of *Vibrio cholerae* O:1, serotype Ogawa. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.16, p.187-197, 1986.
- SANCHES, A. C. C. Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphodendron obovatum* Benth. Atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos. Araraquara: UNESP. 2004. 214f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, 2004.
- SCHUBERT, K. R.; BOLAND, M. J., 1990. The ureides. In: Miflin, B. J.; Lea, P. J. *The biochemistry of Plants*, San Diego: Academic Press, p.197-282.
- SHAMIN, A. M.; ABDUL, R.; JAMAL, M.; MOHAMMAD, O. An 8-hydroxyoctadeca-cis-11,14-dienoic acid from *Mirabilis jalapa* seed oil. *Phytochemistry*, v.23, p.2247, 1984.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6.ed., Rio de Janeiro: LTC, 2000.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
- SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR, Disponível em <<http://www.dor.org.br>> Acesso em: 10 ag. 2006.
- SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolic as potencial antioxidant therapeutics: Mechanism and actions. *Mutat. Res.*, v.579, p.200-213, 2005.
- SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* v.273, p.59-63, 1996.
- SURESHAN, K. M.; MIYASOU, T.; WATANABE, Y. Total synthesis of the proposed structure of "brahol" and the structural revision. *Tetrahedron Lett.*, v.45, p.3197-3201, 2004.
- SUZUKI, K.; ARAKI, H.; KOMOIKE, Y.; TAKEUCHI, K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Med. Sci. Monit.*, v.6, p.908-914, 2000.
- SZABO, S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand. J. Gastroenterol.*, v.22, p. 21-28, 1987.
- TAKAHASHI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.20, p. 607-610, 1987.
- TAKEUCHI, K.; MEGUMU, O.; HIROMICHI, M.; OKABE, S. Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility a cytoprotection. *Journal of Pharmacol. Exp. Ther.*, v.48, p.836-839, 1988.
- TERESCHUK, M. L.; RIERA, M. V. Q.; CASTRO, G. R.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.*, v.56, p.227-232, 1997.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*, 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p.670-671.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999.
- USTUN, O.; OZCELIK, B.; AKYON, ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves *Journal of Ethnopharmacology*, v.X, p.X 2006.

- WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKY, E. Plant drug analysis. Berlin: Springer, 1984.
- WEI, E. T.; KIANG, J. G.; BUCHAN, P.; SMITH, T. W. Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.238, p.783-787, 1986.
- WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Altern. Med. Rev.*, v.6, p.567-579, 2001.
- WOLLENWEBER, E.; DORR, M. Exudate Flavonoids from aerial parts of *Mirabilis viscosa* (Nyctaginaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, v.24, p.799, 1996.
- WOOLFE, G. E MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.80, p.300, 1944.
- YASUKAWA, K.; SEKINE, H.; TAKIDO, M. Two flavonol glycosides from *Lysimachia fortunei*. *Phytochemistry*, v.28, p.2215-2216, 1989.
- YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleminamine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.235, p.683-689, 1985.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. p.481-501.
- ZHANG; G. L.; XING, K. Y.; ZHANG, M. Z. Glycolipids from *Mirabilis himalaica*. *Phytochemistry*, v.45, p.1213-1215, 1997.
- ZIELISKI, H., KOZOWSKA, H., Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal rains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.2008-2016, 2000.
- ZUANANZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides In: Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5.ed. Florianópolis: UFRGS, 2003. 1102p.

Anexo I
Atividades Complementares

1- Disciplinas Cursadas

Disciplina	Créditos	Carga horária	Freq. (%)	Conceito
Espectroscopia aplicada à análise de Fármacos e Medicamentos	6	90	100	A
Ensaio Biológicos de Fármacos e Medicamentos	3	45	100	A
Seminários Gerais	2	30	90	A
Espectroscopia de Massas de Produtos Naturais	3	45	100	A
Ensaio de atividade antimicrobiana	3	45	100	A
Teoria e Método de Isolamento e Purificação de Produtos Naturais	6	90	100	A
Estágio Docência na disciplina de Botânica	2	30	100	A

1 crédito corresponde a 15 horas de atividades programadas

2- Trabalhos apresentados e participação em simpósios e congressos durante o mestrado

- Simpósio: Plantas Medicinais do Brasil: O pesquisador brasileiro consegue estudá-las?

- 5th Internacional Congress of Farmaceutical Sciences (CIFARP)

Severi, J. A.; Calvo, T. M.; Salgado, H. R. N.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Evaluation of the gastrointestinal activity of *Indigofera suffruticosa* Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 41, n.1, p.333, 2005.

Severi, J. A.; Silva, M. A.; Sumitani, J. S. A.; Salgado, H. R. N.; Pepato, M. T.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Evaluation of the gastrointestinal activity of *Bauhinia forficata* Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 41, n.1, p.343, 2005.

Silva, M. A.; Severi, J. A.; Salgado, H. R. N.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Evaluation of the gastrointestinal activity of *Strychnos pseudoquina* Braziliam Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 41, n.1, p.324, 2005.

Silva, M. A.; Nasser, A. L. M.; Severi, J. A.; Salgado, H. R. N.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Evaluation of the gastrointestinal activity of *Qualea species* Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 41, n.1, p.333, 2005.

- V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia

Severi, J. A.; Rinaldo, D.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Perfil cromatográfico e atividade antioxidante de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)

Calvo, T. R.; Rodrigues, C. M.; Severi, J. A.; Tamashiro, J.; Brito, A. R.M. S.; Vilegas, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae).

- V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP
- 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química:
Severi, J. A.; Calvo, T. R.; Santos, L. C.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Flavonóides isolados de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)
- II Encontro Nacional da Tuberculose
Pavan, F. R.; Higuchi, C. T.; Sato, D.N.; Severi, J. A.; Vilegas, W.; Coelho, R. Leite, C. Q. F. Estudo de produtos naturais frente ao *Mycobacterium tuberculosis*
- XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental
Mazzolin, L.P.; Severi, J.A.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A. "Avaliação da atividade antiulcerogênica, analgésica e tóxica aguda dos extratos das folhas de *Guapira noxia* (Netto) Lundell (Nyctaginaceae)"
- XV Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina "Ivano Morelli", Perugia
Severi, J. A.; Mazzolin, L. P.; Hiruma-Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Triglycoside flavonoids from *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)
- XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil
Severi, J. A.; Bauab, T. M.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)
Calvo, T. R.; Severi, J. A.; Rinaldo, D.; Brito, A, R. M. S.; Vilegas, W. Constituintes químicos do extrato metanólico das folhas de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae)
Martins, A. R.; Sacramento, L. V. S.; Severi J. A.; Vilegas, W.; Glória, B. A. Análise microscópica do pó e triagem fitoquímica dos extratos de: *Smilax polyantha* Grisebach (Smilacaceae)
Figueiredo, M. E.; Sannomiya; Michelin, D. C.; Severi, J. A.; Santos, L. C.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Vilegas, W. Estudo do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermédia* usando análise por injeção em fluxo com ionização por electrospray-espectroscopia de massas
Michelin, D.; Kumagai, D.; Severi, J. A.; Vilegas, W.; Salgado, H. R. N. Avaliação da atividade laxante do chá de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Convolvulaceae)
- 53º Jornada Farmacêutica
Benzatti, F. P.; Rocha, M. C.; Lopes, F. C. M.; Carli, C. B. A.; Severi, J. A.; Vilegas, W.; Placeres, M. C. P.; Carlos, I. Z. Ativação de macrófagos expostos ao extrato clorofórmico da plantas *Guapira noxia*.

Rocha, M. C.; Benzatti, F. P.; Lopes, F. C. M.; Carli, C. B. A.; Sassá, M. F.; Placeres, M. C. P.; Severi, J. A.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Estudo da influência dos extratos metanólico e clorofórmico da planta *Guapira noxia* sobre a liberação de peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos peritoneais

3- Artigo Publicado

Lima, Z. P.; Severi, J. A.; Pellizzon C. H.; Brito, A. R. M. S.; Solis, P. N.; Cáceres, A.; Girón, L. M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, p.29-37, 2006.

4- Treinamento Ministrado

- Tema: Plantas Medicinais
- Período: 14 de julho de 2005 (8 horas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Araraquara/SP. Referente ao Programa de Capacitação dos Agentes Comunitários de Saúde oferecido pelo Programa de Educação Tutorial - PET Farmácia/UNESP.

5- Organização de evento

- Membro da comissão organizadora do V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP
Realizado de 15 a 20 novembro de 2005, Águas de Lindóia/SP

Anexo II
Espectros das substâncias isoladas