

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

KÁTIA NAOMI KUROSHIMA

**ESTUDOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DAS PLANTAS *Virola oleifera* e
Hyeronima alchorneoides.**

FLORIANÓPOLIS

2002

KÁTIA NAOMI KUROSHIMA

**ESTUDOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DAS PLANTAS *Virola oleifera* e
Hyeronima alchorneoides.**

**Tese desenvolvida para Obtenção do Grau
de Doutor. Universidade Federal De Santa
Catarina. Centro De Ciências Físicas e
Matemáticas. Curso De Pós-Graduação Em
Química**

ORIENTADOR: PROF. DR. ROSENDO A. YUNES.

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. VALDIR CECHINEL FILHO

FLORIANÓPOLIS

2002

KÁTIA NAOMI KUROSHIMA

**ESTUDOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DAS PLANTAS *Virola oleifera* e
Hyeronima alchorneoides.**

**Tese aprovada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor.
Curso de Pós-Graduação em Química.
Universidade Federal de Santa Catarina.**

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes – Depto de Química – UFSC

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel-Filho – CCS – UNIVALI

Prof. Dra. Tomoe Nakashima – Depto. Farmácia – UFPR

Prof. Dr. Domingos Tabajara Martins – Faculdade de Medicina – UFMT

Prof. Dr. Ricardo José Nunes – Depto de Química – UFSC

Prof. Dr. José Carlos Gesser – Depto de Química – UFSC

Prof. Dr. Miguel S. Balparda Caro – Depto de Química – UFSC

Florianópolis, 03 de outubro de 2002.

AGRADECIMENTOS

- *Aos professores Dr. Rosendo A. Yunes e Dr. Valdir Cechinel Filho, pela orientação, pelos ensinamentos e incentivos mostrados durante todas as etapas deste trabalho,*
 - *Ao Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí (NIQFAR/UNIVALI), pelo espaço cedido, material e tudo que foi necessário para a realização deste trabalho,*
 - *A colega Fátima Campos, pelo grande auxílio nos testes farmacológicos apresentados neste trabalho e das discussões e ensinamentos repassados até o momento,*
 - *Ao Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar da Universidade do vale do Itajaí (CTTMar/UNIVALI), pelo tempo, espaço, equipamentos e material cedido para a realização deste trabalho e o incentivo da equipe para o desenvolvimento do mesmo,*
 - *Ao corpo docente do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina que tanto me auxiliou e incentivou para a realização deste trabalho,*
 - *À CAPES, pelo suporte financeiro,*
 - *Ao professor Dr. Franco Delle Monache do Centro Chimica Recettori, C.N.R., Roma, Itália, pelos espectros de RMN,*
 - *Ao Prfº. Dr. Luis Proença por ter cedido o laboratório do CTTMar/UNIVALI, para a utilização do HPLC,*
 - *Aos professores membros da banca Dra. Tomoe Nakashima, Dr. Domingos Tabajara Martins, Dr. Ricardo José Nunes, Dr. José Carlos Gesser e Dr. Miguel S. Balparda Caro, pelas valiosas contribuições,*
 - *A Graça e Jadir, pelo constante auxílio no encaminhamento da parte burocrática e no desenrolar desta tese,*
 - *Aos colegas do laboratório que mesmo sem querer me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho,*
 - *À minha família, que mesmo de longe, sempre me incentivou em todas as atividades que venho desenvolvendo,*
 - *Ao Roberto, meu companheiro de todas as horas.*
-

RESUMO

Este trabalho abordou o estudo fitoquímico e farmacológico das folhas de *Virola oleifera* (Myristicaceae) e *Hyeronima alchorneoides* (Euphorbiaceae). Os testes farmacológicos dos extratos brutos e das frações semi-purificadas das folhas das duas plantas indicaram potencial analgésico, causando inibição em torno de 50%, nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sugerindo a presença de compostos bioativos, confirmando o uso destas plantas pela medicina popular. Através de técnicas convencionais de cromatografia de coluna e técnicas espectrométricas (IV, RMN-¹H e RMN-¹³C) foram isoladas e identificadas das folhas de *V. oleifera*, duas neolignananas já identificadas anteriormente, a oleiferina-B e C, além de uma mistura de dois flavonóides ramnosídeos, a quercitrina e a astilbina, identificadas pela primeira vez nesta planta. A outra planta estudada, *H. alchorneoides*, apresenta até o momento poucos trabalhos fitoquímicos realizados, apesar da sua utilização na medicina popular como analgésica. Das suas folhas foram isolados e identificados o β -sitosterol, além do triterpeno simiarenol e o biflavonóide amentoflavona, estes dois, sem registro a partir deste gênero. A mistura de flavonóides isolada das folhas de *V.oleifera* foi hidrolizada nos fornecendo os flavonóides agliconas, quercetina e taxifolina. A quercetina foi submetida às reações de acetilação, levando à quercetina penta-acetilada e a reação de metilação produziu uma mistura de flavonóides metilados em diferentes graus, que não puderam ser purificados devido à complexidade da mistura. Todos os compostos purificados e os resultados das modificações estruturais foram novamente submetidos aos testes farmacológicos de analgesia. A oleiferina-B e C, e a mistura de flavonóides, obtidos das folhas de *V. oleifera*, apresentaram respectivamente as seguintes porcentagens de inibição nas contorções abdominais dos camundongos: 27; 76 e 62%, indicando que a oleiferina C e a quercitrina devem ser os compostos responsáveis pela ação analgésica apresentada pelo extrato bruto desta planta. Os compostos isolados das folhas de *H. alchorneoides*, simiarenol e amentoflavona, apresentaram respectivamente 67 e 74% de inibição no mesmo modelo de dor. A ação da amentoflavona, apesar do seu potencial analgésico já ter sido comprovado anteriormente, somado à atividade do triterpeno, explicariam o elevado percentual de inibição das suas frações semipurificadas, em torno de 90%. A quercetina metilada e acetilada apresentaram um ligeiro aumento em relação à atividade analgésica. Estes resultados, em conjunto, justificam o uso destas plantas pela medicina popular e evidenciam perspectivas para a continuidade de estudos de modificação estrutural de alguns compostos bioativos isolados destas plantas para a otimização dos efeitos farmacológicos detectados.

Palavras-chaves: *Virola oleifera*, *Hyeronima alchorneoides*, oleiferina-B e C, quercitrina, astilbina, amentoflavona, simiarenol, β -sitosterol, metilação, acetilação, atividade antinociceptivo.

ABSTRACT

Virola oleifera (Myristicaceae) and *Hyeronima alchorneoides* (Euphorbiaceae) leaves were investigated with respect to the phytochemical and pharmacological aspects. The analgesic tests realized with its crude extracts and semi-purified fractions showed a good inhibition percentages in abdominal constrictions induced by acetic acid injection (more than 50%), indicating the presence of naturally antinociceptive compounds in these plants. The compounds were isolated and identified by chromatographic and spectrometric methods (IR, NMR-¹H and NMR-¹³C). From *V. oleifera* leaves were isolated and identified two neolignans, the oleiferin-B and C, and two flavonoids, quercitrin and astilbin. From *H. alchorneoides* leaves were isolated a usual steroid, β -sitosterol; the triterpene, simiarenol, and a biflavonóide, amentoflavone, these two compounds not yet isolated from this plant. The flavonoids glycosides isolated from *V. oleifera* were hydrolyzed, given two aglicone flavonoids, quercetin and taxifolin. The quercetin was submitted to structural modifications (methylation and acetylation). The acetylation reaction given a penta-acetylated quercetin, and the methylation reaction given a mixture of five compounds not purified. These mixtures of compounds and penta-acetylated quercetin were tested to verified antinociceptive activities and showed an increased inhibition of abdominal constriction in the range of 10% induced by acetic acid injection in relation to quercetin. The neolignans and flavonoids isolated from *V. oleifera* leaves showed a 27, 76 and 62% of inhibition, respectively for oleiferin-B, C and a mixture of flavonoids glycosides. Theses results indicated that the presence of these two last compounds in its leaves were responsible for analgesic effect observed in its crude extract. The simiarenol and amentoflavone isolated from *H. alchorneoides* showed, respectively 67 and 74% of inhibition, indicating that these compounds could be the responsible for the high analgesic activities showed by its semi purified fractions, which showed about 90% of inhibition in abdominal constriction. These results indicated the presence of compounds with analgesic activities in the leaves of *Virola oleifera* and *Hyeronima alchorneoides*, confirmed its use by traditional medicine.

Keywords: *Virola oleifera*, *Hyeronima alchorneoides*, oleiferin-B e C, quercitrin, astilbin, amentoflavone, simiarenol, β -sitosterol, methylation, acetylation, antinociceptive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura-1: Fotografia da espécie adulta de <i>Virola oleifera</i> (A), evidenciando as suas folhas (B). (Fonte: Lorenzi, 1998).....	9
Figura-2: Fotografia da espécie adulta de <i>Hyeronima alchorneoides</i> (A), e as suas folhas em destaque (B). (Fonte: LORENZI, 1998)	19
Figura-3: Esquema da análise fitoquímica desenvolvida com as folhas das plantas de <i>Virola oleifera</i> e <i>Hyeronima alchorneoides</i>	24
Figura-4: Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos hexânico (A) e diclorometânico (B), das folhas de <i>Virola oleifera</i> . Utilizado como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2), e como revelador uma solução de anisaldeído sulfúrico a 110°C.....	34
Figura-5: Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) de Oleiferina-B (1), isolado da fração hexânica das folhas de <i>Virola oleifera</i> . Expansão da região dos prótons da metila e os aromáticos.....	37
Figura-6: Espectro de RMN- ¹³ C e APT (CDCl ₃ , 75MHz) de oleiferina-B (1), isolado da fração hexânico das folhas de <i>Virola oleifera</i>	39
Figura-7: Espectro de RMN- ¹ H (300MHz, CDCl ₃) de oleiferina-C isolada da fração diclorometano das folhas de <i>Virola oleifera</i> . Expansão da região dos prótons de metila (1,0~0,5ppm) , da região dos prótons alifáticos (4,5~1,2ppm) e da região dos prótons aromáticos (7,0~6,0ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida (300MHz, TMS como padrão interno).....	43
Figura-8: Espectro de RMN (¹ H- ¹ H)-COSY (300MHz, CDCl ₃) da oleiferina-C, isolada da fração diclorometano das folhas de <i>Virola oleifera</i>	44
Figura-9: Espectro de COSY ampliado para a região dos deslocamentos dos prótons aromáticos observados para a oleiferina-C, isolado das folhas de <i>O. virola</i> e as correlações ¹ H- ¹ H observadas representadas na estrutura de Oleiferina-C.....	46
Figura-10: Espectro de RMN- ¹³ C e APT (75MHz, CDCl ₃) de oleiferina-C isolada da fração diclorometano das folhas de <i>Virola oleifera</i>	47
Figura-11: Representação esquemática da biossíntese de lignanas e neo-lignanas, baseado em BARBOSA FILHO (1999).	49
Figura-12: Reações de hidrólise dos flavonóides glicosídeos isolados das folhas de <i>Virola oleifera</i> : quercitrina (4) e astilbina (6), fornecem como produto da reação os flavonóides livres; a quercetina e a taxifolina, respectivamente.	51
Figura-13: Espectrograma de HPLC do fração de acetato de etila, da fração semipurificada das folhas de <i>Virola oleifera</i> e dos padrões de quercitrina (4) e astilbina.(6) Detector de UV, e leitura realizada a 350nm.....	52
Figura-14: Espectro de RMN- ¹ H (300MHz, CDCl ₃) da mistura de quercitrina e astilbina isolados da fração acetato de etila das folhas de <i>Virola oleifera</i> . Expansão da região dos prótons de metila (1,0~0,5ppm) , da região dos prótons alifáticos (4,5~1,2ppm) e da região dos prótons aromáticos (7,0~6,0ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida (300MHz, TMS como padrão interno).	54
Figura-15: Espectro de RMN- ¹³ C e APT (75MHz, CDCl ₃) da mistura de quercitrina e astilbina, isolada da fração acetato de etila das folhas de <i>Virola oleifera</i>	57

Figura-16: Esquema da biossíntese de vários triterpenos, incluindo o simiarenol (6), isolado das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> . Baseado em HEUPEL (1985) e NISHIMOTO et al. (1968).	63
Figura-17: Espectro de RMN- ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do triterpeno Simiarenol (6), isolado da fração hexano das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> . Expansão da região com deslocamento entre δ1,6~0,6ppm.....	67
Figura-18: Espectro de RMN- ¹³ C e APT (75MHz, CDCl ₃) do triterpeno Simiarenol (6), isolado da fração hexano das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i>	69
Figura-19: Espectro de RMN- ¹³ C do <i>b</i> -sitosterol isolado das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> . (75 MHz, CDCl ₃ , TMS como padrão interno).	73
Figura-20; Espectro de RMN- ¹ H do <i>b</i> -sitosterol isolado das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> . (300 MHz, CDCl ₃ ; TMS como padrão interno).....	76
Figura-21: Espectro de RMN- ¹ H da amentoflavona, com expansão da área dos prótons aromáticos. (300MHz, CDCl ₃ , deslocamentos em ppm). TMS utilizado como padrão interno.....	82
Figura-22: Espectro de RMN- ¹³ C APT, de amentoflavona (75MHz, CDCl ₃), deslocamentos em ppm.....	84
Figura-23: Espectro no IV da quercetina (A) e da 3,3',4',5,7-penta-acetil-quercetina (B) (pastilha de KBr). Absorbância em cm ⁻¹	93
Figura-24: Espectro de RMN- ¹ H da quercetina penta-acetilada, produto da reação de acetilação da quercetina (200MHz, CDCl ₃). Deslocamentos em ppm e TMS como padrão interno.....	95
Figura-25: Espectro de RMN- ¹³ C da quercetina penta-acetilada resultado da acetilação da quercetina (50MHz, CDCl ₃). Deslocamentos em ppm e padrão interno TMS.....	96
Figura-26: Efeitos da administração intraperitoneal do extrato metanólico bruto, das frações hexano, diclorometano e acetato de etila (10mg/Kg) das folhas de <i>V. oleifera</i> (A) e <i>H. alchorneoides</i> (B), no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético a 0,6%.	103
Figura-27: Efeito da administração intraperitoneal dos compostos isolados das folhas de <i>V. oleifera</i> (A), <i>H. alchorneoides</i> (B), e dos padrões analgésicos, aplicados intraperitonealmente (10mg/Kg) no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético a 0,6%.	106
Figura-28: Efeito antinociceptivo causado pela oleiferina-C, aspirina e paracetamol sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. A-Diferentes concentrações de oleiferina-C, testados neste modelo. B-Valores de ID ₅₀ (μmol/kg) calculado através das curvas de concentrações crescentes de cada composto.....	107
Figura-29: Efeito antinociceptivo causado pelos produtos da modificação estrutural da quercetina (A), e os padrões analgésicos conhecidos (B), sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos, injetados na dose de 10mg/kg.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela-1: Compostos químicos encontrados em <i>Virola oleifera</i> e respectivas atividades farmacológicas detectadas para alguns destes compostos.....	16
Tabela-2: Distribuição das massas e rendimentos obtidos dos extratos metanólicos, hexânico, diclorometânico e acetato de etila, das folhas de <i>Virola oleifera</i>	33
Tabela-3: Dados do espectro de RMN- ¹ H da oleiferina-B, obtido do fração hexânico das folhas de <i>Virola oleifera</i> , comparados aos dados descritos na literatura.....	38
Tabela-4: Dados do espectro de RMN- ¹³ C da oleiferina-B, obtido do fração hexânico das folhas de <i>Virola oleifera</i> , comparados aos dados apresentados na literatura.	40
Tabela-5: Dados do espectro de RMN- ¹ H da oleiferina-C, obtido do fração diclorometânico das folhas de <i>Virola oleifera</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	42
Tabela-6: Dados do espectro de RMN- ¹³ C da oleiferina-C, obtido do fração diclorometânico das folhas de <i>Virola oleifera</i> , comparados aos dados apresentados na literatura.....	48
Tabela-7 Dados do espectro de RMN- ¹ H da mistura de flavonóides glicosilados, quercitrina e astilbina, obtido do fração de acetato de etila das folhas de <i>Virola oleifera</i> , comparados aos dados apresentados na literatura.	53
Tabela-8: Dados de RMN- ¹³ C da mistura de flavonóides glicosilados, astilbina e quercitrina, obtidos do fração de acetato de etila das folhas de <i>Virola oleifera</i> , comparados aos dados da literatura.	56
Tabela-9: Distribuição das massas e rendimentos obtidos dos extratos metanólico, hexânico, diclorometânico e acetato de etila, das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i>	60
Tabela-10: Dados do espectro de RMN- ¹ H do simiarenol (6), obtido do fração hexânico das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	66
Tabela-11: Dados do espectro de RMN- ¹³ C do simiarenol (9), obtido do fração hexânico das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	70
Tabela-12: Dados do espectro de RMN- ¹³ C do β-sitosterol, obtido do fração hexânico das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	74
Tabela-13: Dados do espectro de RMN- ¹ H do β-sitosterol, obtido do fração hexânico das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	77
Tabela-14: Dados do espectro de RMN- ¹ H da amentoflavona, obtido do fração acetato de etila das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	81
Tabela-15: Dados do espectro de RMN- ¹³ C da amentoflavona, obtido do fração hexânico das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> , comparados aos dados descritos na literatura.	85
Tabela-16: Compostos isolados das folhas de <i>Virola oleifera</i> e <i>Hyeronima alchorneoides</i> e seus respectivos rendimentos.....	87

Tabela-17: Dados do espectro de RMN- ¹ H da 3,3',4',5,7-penta-acetil-quercetina obtido da reação de acetilação da quercetina.	94
Tabela-18: Dados do espectro de RMN- ¹³ C da 3,3',4',5,7-acetil-quercetina obtido da reação de acetilação da quercetina.	97
Tabela-19: Efeito dos extratos metanólicos brutos de <i>V. oleifera</i> e <i>H. alchorneoides</i> , das frações de hexano, diclorometano e acetato de etila semipurificadas (10mg/kg) nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6%. Controle 1, utilizado para o cálculo da % de inibição do extrato metanólico bruto e o controle 2, para as demais frações.....	102
Tabela-20: Efeito dos compostos isolados (10mg/kg) das folhas de <i>V. oleifera</i> e <i>H. alchorneoides</i> , e dos padrões analgésicos, injetadas intraperitonealmente nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6%.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – acetonitrila

AE – acetato de etila

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

DCM – diclorometano

DI₅₀ - dose inibitória de 50 % da atividade biológica

DMSO – dimetilsulfóxido

HEX – hexano

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IV – espectrometria no Infravermelho

RMN-¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13.

RMN-¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fitoquímica e plantas medicinais	1
1.1.1 Principais atividades farmacológicas obtidas das plantas.....	3
1.2 Revisão Bibliográfica	8
1.2.1 <i>Virola oleifera</i> (Schott)	8
1.2.1.1 Características taxonômicas.....	8
1.2.1.2 Propriedades fitoquímicas e farmacológicas de <i>Virola oleifera</i> e outras plantas do gênero.	11
1.2.2 <i>Hyeronima alchorneoides</i> (Allemao).....	17
1.2.2.1 Características taxonômicas.....	17
1.2.2.2 Propriedades fitoquímicas e farmacológicas de <i>Hyeronima alchorneoides</i> e outras plantas da família <i>Euphorbiaceae</i>	19
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Coleta do material	23
3.2 Procedimentos analíticos	23
3.3 Modificações estruturais	26
3.3.1 Reações de hidrólise	26
3.3.2 Reações de acetilação.....	27
3.3.3 Reações de metilação.....	28
3.4 Testes farmacológicos	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Fitoquímica das folhas de <i>Virola oleifera</i>	32
4.1.1 Obtenção dos extratos das folhas de <i>Virola oleifera</i>	32
4.1.2 Isolamento e identificação dos compostos majoritários das folhas de <i>Virola oleifera</i>	34
4.1.2.1 Fração Hexânico.....	34
4.1.2.1.1 Oleiferina-B (1).....	35
4.1.2.2 Fração diclorometânico.....	40
4.1.2.2.1 Oleiferina-C (2).....	41
4.1.2.3 Lignanas e neo-lignanas	48
4.1.2.4 Fração de Acetato de Etila	50
4.1.2.4.1 Mistura de Astilbina e Quercitrina	51
4.2 Fitoquímica das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i>	59
4.2.1 Obtenção dos extratos das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i>	59
4.2.2 Isolamento e identificação dos compostos majoritários das folhas de <i>Hyeronima alchorneoides</i>	61
4.2.2.1 Fração Hexânico.....	61
4.2.2.1.1 Simiarenol.....	64
4.2.2.1.2 b-Sitosterol.....	70
4.2.2.2 Fração Diclorometânico.....	77
4.2.2.3 Fração Acetato de Etila.....	78
4.2.2.3.1 Amentoflavona	79
4.3 Compostos isolados	87
4.4 Modificações estruturais na quercetina	90
4.4.1 Acetilação da quercetina.....	90
4.4.2 Metilação da quercetina	97
4.5 Atividade biológica	100
4.5.1 Atividade antinociceptiva.....	100
4.5.1.1 Atividade antinociceptiva dos extratos e frações semi-purificadas.....	101
4.5.1.2 Atividade antinociceptiva dos compostos isolados das folhas de <i>Virola oleifera</i> e <i>Hyeronima alchorneoides</i>	104
4.5.1.3 Atividade antinociceptiva dos compostos obtidos das modificações estruturais.	111

5 CONCLUSÕES.....	116
5.1 <i>Virola oleifera</i>	116
5.2 <i>Hyeronima alchorneoides</i>.....	118
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fitoquímica e plantas medicinais

A química dos produtos naturais começou a ganhar ênfase e força nas suas pesquisas a partir das últimas décadas do século vinte, quando algumas alterações foram observadas no hábito da população em geral. Em primeiro lugar, as ervas, como eram conhecidas as plantas medicinais, começaram a ser mais utilizadas, visto a insatisfação com a medicina moderna no que se refere à sua efetividade e ao elevado custo dos medicamentos (MILLER, 1998). Além disso, a maioria das indústrias farmacêuticas começou a reconhecer a eficácia do uso das plantas em preparações caseiras com fins medicinais como possíveis fornecedores de constituintes para os novos fármacos ou protótipos para os mesmos (RATES, 2001). Como a obtenção de patentes e exclusividades com as plantas mais tradicionais e clássicas se tornaram mais difíceis, as pesquisas se voltaram para a busca de plantas mais exóticas e raras utilizadas na medicina popular em áreas mais remotas, como as florestas tropicais (PRANCE, 1977). A maioria das indústrias farmacêuticas vem desenvolvendo pesquisas em cooperação com pesquisadores ou institutos de pesquisa de países tropicais como o Brasil, Costa Rica, China, México, Bornéu e até mesmo a Samoa (ROBBERS et al., 1996). Apesar do aumento de estudos nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas

existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996, SIMÕES et al., 1999).

Um outro fator que corrobora com o aumento das pesquisas nesta área, está relacionado com o desenvolvimento tecnológico em várias áreas como a engenharia genética, recombinação de DNA, e mais especificamente a farmacobiotecnologia. Estas tecnologias permitem a transferências do material genético de um organismo para outro, permitindo mais tarde a produção em quantidades suficientes de componentes que podem ser utilizados como um fármaco (SCHENKEL et al.,1999), ou mesmo o sequenciamento de DNA (KATO, 2001).

A primeira aplicação da tecnologia na farmacognosia foi um processo desenvolvido pela Empresa Eli Lilly, que permitiu a produção da insulina humana através da bactéria *Escherichia coli* modificada geneticamente. Foi introduzido um gene humano para a produção de insulina, no código genético desta bactéria, forçando-a a sua produção. Atualmente, outros exemplos podem ser citados utilizando a tecnologia no desenvolvimento de novos fármacos (SCHENKEL et al.,1999). No Brasil, um dos maiores exemplos da aplicação desta tecnologia pode ser representado pelo sequenciamento de DNA da bactéria *Xylella fastidiosa*, possibilitando a descoberta da cura de uma das mais devastadoras doenças no cultivo de frutas cítricas, a clorose variegada dos frutos cítricos, ou seja a perda de clorofila das folhas, tornando-as amarelas, seguidas da maturação precoce das frutas (SIMPSON et al., 2000; BEVAN, 2000).

A utilização destas tecnologias, no entanto, não minimiza a importância dos compostos de origem vegetal ou animal com aplicação terapêutica. Na China, por exemplo, a enciclopédia de fármacos *Pen-ts' ao kang um*, compilado por Li Shih-Chen e publicado em 1596, apresenta uma lista com mais de 2000

fármacos de fonte natural, originados de mais de 5000 plantas, entre outros organismos (ROBBERS et al., 1996).

1.1.1 Principais atividades farmacológicas obtidas das plantas

Vários exemplos de plantas como fonte de produtos naturais podem ser citados, ou ao menos com atividade biológica e em vias de testes para a futura aplicação como medicamento. Das 250.000 plantas com flores conhecidas, cerca de 90 espécies foram fontes para 120 fármacos utilizados comercialmente (FARNSWORTH, 1985). As principais atividades biológicas determinadas em plantas foram: antimicrobiana (FERNANDES et al., 1999; LEE e HECKER, 1999), cardiotônicas (Digitalis), anticolinérgicas (alcalóides semelhantes à belladona), analgésicos (alcalóides do opium), antihipertensivas (reserpina), colinérgicas (fisostigmina, pilorcarpina), antimalária (alcalóides e Cinchona), anestésica (cocaína), relaxante muscular (tubocurarina) e anticancerígenas (PEZZUTO, 1997; PHILLIPSON, 2001).

Os produtos naturais originados de plantas utilizados no tratamento de câncer são diversos. Acredita-se que em torno de 60% dos agentes antitumorais disponíveis comercialmente, apresentam a sua origem nos produtos naturais (SHU, 1998). Além disso, muitos estudos estão sendo direcionados no sentido de procurar fármacos como agentes quimiopreventivos; muitos deles produtos naturais que previnem ou inibem a carcinogênese. Alguns fármacos utilizados atualmente para o tratamento de câncer se originaram de produtos naturais ou resultam de suas modificações. O paclitaxel (Taxol), por exemplo, isolado a partir da *Taxus brevifolia*

L; a vincristina (Oncovin), isolado da *Catharantus roseus*; a podofilotoxina, isolado da *Podophyllum peltatum* e a camptotecina, isolada da planta *Camptotheca acuminata* (PEZZUTO, 1997).

Os compostos originados de fontes naturais apresentam uma série de vantagens para a medicina moderna (ROBBERS et al., 1996; PEZZUTO, 1997 e CECHINEL FILHO e YUNES, 1998):

- Fornecem quantidades razoáveis de fármacos que apresentam dificuldade, ou impossibilidade na sua produção comercial através de síntese, incluindo-se neste grupo a maioria dos antibióticos, os alcalóides originados das papoulas e das solanáceas;
- Fornecem quantidades razoáveis de compostos que podem posteriormente ser modificados estruturalmente para aumentar a sua eficácia ou diminuir a sua toxicidade, tendo como exemplo, as variações da morfina;
- Atuam como protótipos ou modelos na síntese de novos fármacos que apresentam atividade similar ao compostos original; tendo como exemplos a procaína originada da cocaína e a aspirina, originada do ácido salicílico.

As modificações estruturais nos compostos originados de plantas podem, ainda, ser originadas através de processos biológicos. As modificações químicas e biológicas realizadas no estigmasterol, que ocorre abundantemente no óleo de soja, permitiram a produção em larga escala de hidrocortisona e corticoesteróides relacionados, compostos que ocorrem na natureza em pequenas quantidades (ROBBERS et al., 1996).

Visto a grande importância das plantas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos (ROBBERS et al., 1996; SIMÕES et al., 1999), a maior dificuldade se encontra na busca da planta correta no meio de um grupo muito

vasto e variado. Atualmente, existem cerca de 850.000 espécies vegetais conhecidas (FARNSWORTH, 1986 e MATOS, 1997). Considerando-se que cada espécie é formada de um conjunto de milhões de indivíduos cujas variações biológicas naturais atingem, em maior ou menor grau, tanto a sua morfologia quanto a sua composição química, o problema da escolha de um critério de prioridades de estudo se torna uma tarefa de difícil solução (MATOS, 1997). Muitas vezes, a mesma espécie botânica ocorre em diferentes regiões e sua composição química pode também apresentar diferenças (GOTTLIEB e BORIN, 2000). Este tipo de variação deve ser levado em conta no estudo fitoquímico das plantas, desde a escolha do material até a etapa final do registro e divulgação dos resultados. Isso ressalta a importância do uso de um processo de seleção para que se possa escolher quais espécies devem ser estudadas prioritariamente (MATOS, 1997 e CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Dados da literatura mostram que a probabilidade de se encontrar atividade biológica em plantas orientadas pela medicina popular é bem maior em relação à escolha das plantas ao acaso, sendo que cerca de 75% dos compostos naturais puros empregados hoje na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (JÚNIOR et al., 1994 e CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Neste caso, é importante o contato com os nativos, habitantes do local de coleta do material, pois os mesmos em contato com as plantas durante várias gerações, apresentam um vasto conhecimento não só das plantas, mas também da sua utilização medicinal (POSEY e BALEE, 1989), evitando desta forma, a utilização de plantas que mesmo apresentando compostos bioativos, possuem uma elevada toxicidade (MILLER 1998; RATES, 2001).

Outros aspectos de grande importância para a seleção de plantas finalizando o estudo químico, podem resultar dos testes farmacológicos em pequenos animais ou órgãos isolados mantidos vivos durante a experiência; ou através da verificação da ocorrência de determinado tipo de constituinte, ou de um conjunto de constituintes julgados de interesse para o estudo. Podem ainda se basear na posição filogenética da planta, selecionando um grupo de plantas (gênero ou família) em função da ocorrência de um determinado composto ou grupo de compostos (MATOS, 1997). A diversidade dos produtos naturais é atribuída à co-evolução das plantas com os agentes fitófagos e patogênicos (GOTTLIEB, 1987). Pode-se ainda fazer um levantamento da flora da região a ser pesquisada, isto é, o levantamento preliminar da vegetação e de sua composição florística. Assim é possível descobrir quais espécies são predominantes e principalmente sobre elas concentrar os estudos químicos. Os resultados dos estudos, neste caso, podem conduzir a trabalhos complementares, com vista à exploração econômica destas plantas de larga ocorrência, com maior probabilidade de sucesso (MATOS, 1997).

Desta forma, a escolha da planta, além da sua utilização na medicina popular, varia em função do objetivo do trabalho, bem como do interesse econômico e da abundância da planta a ser trabalhada.

As informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal são pouco precisas, mas estima-se que varie entre US\$12,4 bilhões e US\$20 bilhões/ano (SIMÕES et al., 1999). No Brasil, estima-se que 25% do faturamento da indústria farmacêutica seja originado de medicamentos derivados de plantas. No entanto, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Destas plantas, 590

foram registradas pelo Ministério da Saúde para comercialização (SIMÕES et al., 1999). O panorama brasileiro nessa área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais (BERMUDEZ, 1995 e SIMÕES et al., 1999).

As pesquisas na área de produtos naturais como fontes de compostos bioativos são árduas e seus custos são muito elevados. Estimativas mostram que a produção de um novo fármaco requer o investimento de aproximadamente US\$ 100-360 milhões, e um mínimo de 10 anos de investigações, sendo que apenas um em cada 10 mil compostos testados apresenta-se promissor como novo fármaco; e destes, apenas um entre quatro será aprovado como novo fármaco (RATES, 2001).

Estas informações revelam a necessidade de se buscar uma alternativa para superar a dependência externa, principalmente quando se confrontam os altos preços médios praticados no Brasil em comparação com aqueles praticados em países desenvolvidos. Além disso, o grande banco de informações reservado em nosso país, seja armazenado nas plantas já identificadas ou naquelas ainda não identificadas, fornece material para ser investigado e provavelmente deve fornecer muitos produtos com atividade farmacológica ou ainda servir como modelo para a síntese de novos compostos.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 *Virola oleifera* (Schott)

1.2.1.1 Características taxonômicas

A *Virola oleifera* pertence à família Myristicaceae, a qual pertence à ordem Magnoliales, uma das maiores entre as angiospermas (JOLY, 1998). Segundo Willis (1973) e Romoff e Yoshida (1997), a família da Myristicaceae é composta por 18 gêneros e abrange em torno de 300 espécies. Entre as espécies encontradas no continente americano, são conhecidas em torno de 60 espécies de *Virola*, 30 de *Iryanthera*, 11 de *Compsonera*, 9 *Dialyanthera* e 1 espécie de *Osteophloeum* (ROMOFF e YOSHIDA, 1997). São frequentes no Brasil as famílias *Virola* e *Myristica* (JOLY, 1998), apresentando em torno de 45 a 60 espécies (SCHULTES, 1979).

A primeira descrição e ilustração de *Virola* foram feitas por AUBLET em 1775. Baseia-se em *Virola sebífera*, espécie-tipo colhida por ele durante as suas explorações botânicas na Guiana Francesa. Adota para o nome genérico a mesma nomenclatura vulgar utilizada pelos índios Sinemari para a espécie-tipo e situa o seu novo gênero na classe *Dioecia Hexandria* do sistema sexual de Lineu (RODRIGUES, 1980).

As plantas desta família são todas lenhosas, arbóreas, raramente arbustivas, com folhas inteiras, dispostas alternada e dísticamente, sem estípulas, de margem inteira, e de forma oblonga ou elíptica (Fig.1). O seu tamanho é muito

variável, as de maior comprimento (50 cm ou mais), ocorrem muito comumente em *Virola decorticans* e *V. multinervia* (RODRIGUES, 1980). Apresentam flores pequenas, reunidas em densas inflorescências, perfeitamente cíclicas, monoclamídeas, de sexo separado. Tépalas em número de 2 a 5, freqüentemente 3. Estames desde 2 a muito numerosos, concrecidos em uma estrutura central, muitas vezes disciformes. As folhas são dísticas, simples, alternas. Fruto em geral seco ou às vezes maior ou menos carnososo, abrindo-se por duas valvas, semente grande, com arilo fimbriado e caracteristicamente com endosperma ruminado (JOLLY, 1998).



Figura-1: Fotografia da espécie adulta de *Virola oleifera* (A), evidenciando as suas folhas (B). (Fonte: Lorenzi, 1998)

A *Virola oleifera*, conhecida popularmente como bocuva, bicuíba, candeia de caboclo, ucuúba-branca, entre outros, apresenta uma altura que varia de 20 a 30 metros e tronco de 50 a 90 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples de 12 a 24 cm de comprimento. Ocorre na mata pluvial atlântica e distribui-se do sul da Bahia e Minas Gerais até o nordeste do Rio Grande do Sul. Nestas regiões ocorre nas encostas dos morros, e mais raramente na planície litorânea, sem preferência de solo (FERRI, 1993). É uma planta semidecídua, heliófita, característica e exclusiva de floresta pluvial atlântica. Ocorre principalmente no interior da mata primária densa, entretanto apresenta alguma regeneração natural em capoeiras e clareiras abertas na mata, o que faz supor tratar-se de espécie pioneira. Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis. Floresce principalmente durante os meses de janeiro a maio e a maturação das suas sementes inicia-se no final de julho, prolongando-se até o final de novembro (LORENZI, 1998).

Desde o descobrimento do Brasil, já se valorizavam algumas espécies de *Virola* como planta útil da flora brasileira, sendo as mais utilizadas a *V. surinamensis* e *V. sebífera*, pela produção do comercialmente conhecido “sebo de ucuuba”, gordura proveniente das sementes destas espécies, de emprego tecnológico importante, ainda hoje, na produção de velas e sabão. Esta gordura é formada de ácidos graxos saturados (cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico) e insaturados (oléico e linoleico). Dentre os componentes da gordura, se destaca a trimiristina, um triglicerídeo de elevado valor na confecção de cremes e sabões para barba, ou emoliente graxo em inúmeros preparados farmacêuticos. Seu elevado preço demonstra as necessidades industriais e reflete a intensa procura para dar maciez e suavidade nas fórmulas de perfumaria e cosméticos (RODRIGUES, 1980).

A madeira da ucuúba é largamente utilizada na fabricação de compensados, e, como consequência do processo industrial, permite o uso de resíduos na confecção de papéis de boa qualidade (RODRIGUES, 1980).

1.2.1.2 Propriedades fitoquímicas e farmacológicas de *Virola oleifera* e outras plantas do gênero.

As plantas do gênero *Virola* apresentam uma vasta utilização na medicina popular e alguns trabalhos fitoquímicos e farmacológicos já realizados vêm a comprovar as suas diferentes atividades.

Levantamentos etnobotânicos registraram que cinco ou seis espécies de *Virola* são utilizadas no preparo de agentes alucinógenos, tendo o principal composto psicoativo identificado como a triptamina (SCHULTES e HOLMSTEDT, 1971; SCHULTES, 1979). Em 1973, pesquisadores do Centro Médico da Universidade de Illinois (LAI et al., 1973), isolaram e identificaram os mesmos alcalóides em *V. peruviana*, (5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina e N,N-dimetiltriptamina), confirmando o aspecto alucinógeno desta planta. Outros compostos foram identificados nesta planta, como as lignanas (lirioresinol-A, lirioresinol-B), os esteróides β -sitosterol, campesterol e estigmasterol), e uma mistura de n-alcanóis (octacosanol, triacontanol e dotriacontanol) (LAI et al., 1973). Na *V. cuspidata*, foram registrados outros alcalóides, identificados como, 6-metoxitetrahydroharmina, e outros dois em menor proporção, 6-metoxiharmina e 6-metoxiharmalina (CASSADY et al., 1970). Na *V. venosa*, foi identificado o mesmo alcalóide encontrado na *V. peruviana*, além de outros compostos: a 5-deoxiflavonas nas suas flores, pericarpos

e folhas, e outras flavonas e lignanas em abundância ao longo de toda a planta (KATO et al., 1992).

Na *V. surinamensis* não foi observada a presença de alcalóides, apesar da sua utilização em rituais utilizando bebidas alucinógenas (BELOZ, 1992). A avaliação dos óleos voláteis desta planta permitiu a identificação de vários monoterpenos, sesquiterpenos. A concentração nas folhas apresentaram um comportamento sazonal (LOPES et al., 1997). Posteriormente, foi verificado, que alguns flavonóides isolados da sua raiz, apresentavam atividade fungicida (LOPES et al., 1999a). Mais tarde, os mesmos autores estudaram os óleos voláteis desta planta (LOPES et al., 1999b), após verificarem que os índios amazonenses inalavam o vapor obtido das suas folhas para o tratamento da malária. Identificaram 11 monoterpenos, 11 sesquiterpenos, e 3 fenilpropanóides e verificaram que o sesquiterpeno nerolidol apresentava 100% de inibição no crescimento do parasita da Malaria (*Plasmodium falciparum*) a uma concentração de 100 µg/ml.

Outras novas lignanas e fenilpropanóides foram identificadas na *V. pavonis*, a 7,7'-epoxilignana (FERRI e BARATA, 1991); a 8,4'-oxineolignana, a eusiderin-E, e o pavonisol (1-(4-hidroxi-3',5'-dimetoxifenil)-1-metoxi-2-propanol) (FERRI e BARATA, 1992). As lignanas desidroeugenol, dihidrocarinationol e carinatidiol foram identificadas pela primeira vez nas folhas de *V. carinata* (GUARIN S. et al, 2000), além de diversas neolignanas e lignanas já identificadas nas folhas, frutos e casca desta planta (CAVALCANTE et al, 1985; GUARIN S. et al, 2000).

Braz Filho e colaboradores (1977) identificaram novos isoflavonóides (isoflavonas, 2'-hidroxiformononetina e o pterocarpano) nas *V. caducifolia*, *V. flexuosa*, *V. multinervia*, *V. venosa* e *Osteophleum platyspermum*, uma outra espécie da família Myristicaceae. Foram identificados também esteróis, e dois novos

diarilpropanóis na *V. multinervia*, a virolane e a virolanol (GOTTLIEB et al., 1973; BRAZ FILHO et al., 1973). A flavona isolada da *Virola michelli*, identificada como titonina (7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona), assim como os produtos da sua acetilação e metilação apresentaram atividade antiinflamatória e analgésica, segundo Carvalho et al. (1999).

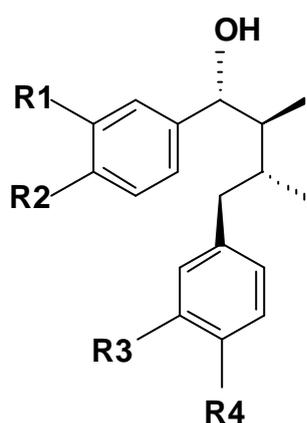
Barata e Baker (1973) verificaram que a fração hexânica das folhas de *V. surinamensis* apresenta quando aplicado topicamente, ação protetora contra infecção por *Schistosomona mansoni*. Sua ação quimioprolática da esquistossomose está relacionada com a presença de uma lignana ainda não identificada. As lignanas tetraidrofurânicas, presentes na fração diclorometânica desta planta, mostraram atividade *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*, podendo esta ser utilizada como um aditivo no sangue na profilaxia da doença de Chagas, já que a transfusão de sangue tem sido considerada uma importante etapa no processo de transmissão desta doença (LOPES et al., 1998). As lignanas 8,4'-oxineolignanas apresentaram atividade antifúngica, provavelmente inibindo a síntese dos polímeros que constituem a parede celular destes organismos (ZACCHINO et al., 1998). Martinez V. et al. (1999) identificaram novas lignanas dibenzilbutanos na *V. sebifera*, ainda sem atividade comprovada.

Com relação à espécie estudada neste trabalho, a *V. oleifera*, é amplamente utilizada na medicina popular. O óleo extraído da semente desta espécie é utilizado contra dores reumáticas, acessos asmáticos, tumores nas articulações, vermes intestinais, mau hálito, hemorróidas e moléstias da pele. A casca do tronco, quando raspada, produz uma resina que é utilizada contra hemorragia dos mamilos, hemorróidas e cólicas, além de possuir ação cicatrizante de úlceras e feridas crônicas, combater diarreias e hemoptises. Em homeopatia é

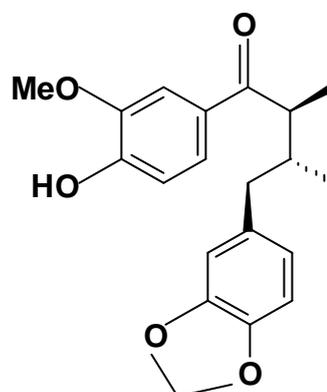
muito útil nas cólicas do estômago e intestinais e como tônico e restaurador de forças, além de ser utilizado como estimulante cerebral da memória e da inteligência (FERNANDES et al., 1993; FERRI, 1993; AZEVEDO, et al., 1997).

Apesar da sua vasta utilização na medicina popular, muito pouco se conhece com relação aos estudos fitoquímicos e muito menos com relação às propriedades terapêuticas dos extratos e compostos desta planta.

Fernandes e colaboradores (1993, 1994), Ferri (1993) e Azevedo e colaboradores (1997) isolaram e identificaram algumas lignanas, especialmente



- 1- **Oleiferina-A:** R1-R2=OCH₂O; R3=R4=OMe
- 2- **Oleiferina-B:** R1=R2=OMe; R3-R4=OCH₂O
- 3- **Oleiferina-C:** R1-R2=R3-R4= OCH₂O
- 4- **Oleiferina-D:** R1= OMe; R2=OH; R3-R4=OCH₂O



Oleiferina-E

neolignanas, nas folhas desta espécie (Tab.1). Algumas destas substâncias já foram identificadas anteriormente e outras são novas, porém não foram avaliadas quanto as suas possíveis atividades biológicas. Os compostos novos identificados foram oleiferina-A-E.

Posteriormente, Sartorelli e colaboradores (1998), trabalhando com esta mesma espécie, encontraram as mesmas lignanas (Tab.1), e outras ainda não identificadas. Denominando-as de oleiferina-F a H, além de uma ciclolignana.

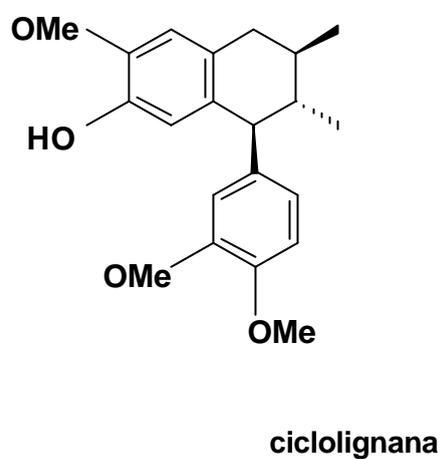
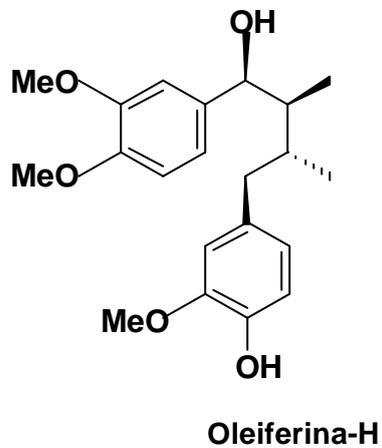
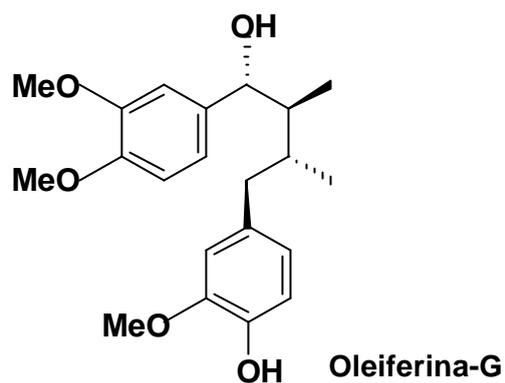
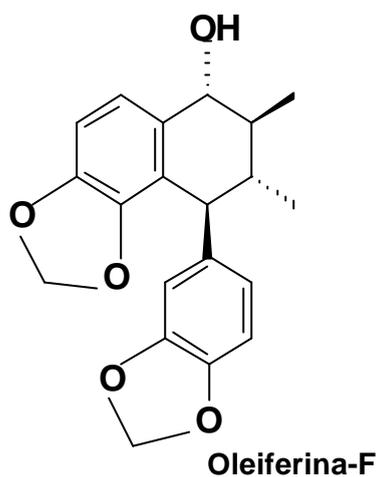


Tabela-1: Compostos químicos encontrados em *Virola oleifera* e respectivas atividades farmacológicas detectadas para alguns destes compostos.

Composto	Atividade detectada	Obs:	Referência
Galbacin		Detectado anteriormente na planta <i>Hymantandra baccata</i> .	FERNANDES et al. (1993)
Eupomatenoide-8		Detectado anteriormente na planta <i>Eupomatia laurina</i> . Encontrado neste trabalho na forma de um cristal e anteriormente como uma resina.	FERNANDES et al. (1993)
(+)-aristolignina		Detectado anteriormente na planta <i>Aristolochia chilensis</i> . Isolado anteriormente como um óleo e desta vez como um cristal.	FERNANDES et al. (1993)
(7R*,8S*,8'R*)-3',4'-dimetoxi-3,4-me-tilenodioxilignana-7-ol (Oleiferina-A)**	Fungicida (<i>Cladospori-um sphaerosper-mum</i> , <i>C. claudosporoides</i>)		FERNANDES et al., 1993 SARTORELLI et al, 1998
(7R*,8S*,8'R*)-3-4:3'4'-bis(metilenodioxil)igna-7-ol (Oleiferina-C)	Fungicida (<i>Cladospori-um sphaerospermum</i> , <i>C. claudosporoides</i>)		FERNANDES et al., 1993 SARTORELLI et al, 1998
(8S*,8'R*)-4-hidroxi-3-metoxi-3',4'-metilenodioxilignana-7-ona. (oleiferina-D)			FERNANDES et al., 1993
(7 α ,7' β ,8 β ,8' α)-3-4:3'-4'-bis(metilenodioxil)-2,7'-cicloliganana-7-ona (oleiferina-E)			FERNANDES et al., 1993
4-hidroxi-5,3',4'-trimetoxi-2,7'-ciclolignana.			SARTORELLI et al, 1998
4'-hidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxiligna-7-ol (oleiferina-F)	Fungicida (<i>Cladospori-um sphaerospermum</i> , <i>C. claudosporoides</i>)		SARTORELLI et al, 1998
4'-hidroxi-3,4,-3'-trimetoxiligna-7-ol (oleiferina-G)	Fungicida (<i>Cladospori-um sphaerospermum</i> , <i>C. claudosporoides</i>)		SARTORELLI et al, 1998
4'-hidroxi-3,4,-3'-trimetoxiligna-7-ol (oleiferina-H)	Fungicida (<i>Cladospori-um sphaerospermum</i> , <i>C. claudosporoides</i>)		SARTORELLI et al, 1998

** Oleiferina B: o isômero de oleiferina-A, com a rotação dextro.

Sartorelli e colaboradores (1998) verificaram que algumas das lignanas presentes nesta espécie apresentavam atividade fungicida contra o fungo saprófago *Cladosporium sphaerospermum* a uma concentração mínima de 0,25 μ g. Demonstraram também que outras lignanas já identificadas em trabalhos anteriores apresentaram atividade fungicida contra o fungo patogênico *C. claudosporoides*, a

uma concentração mínima de 10 µg. Considerando que a concentração mínima apresentada por outros fungicidas conhecidos e utilizada como controle neste trabalho foram inferiores em até 25 vezes, talvez, estes compostos não tenham uma aplicação muito promissora nesta área farmacológica, mas a sua utilização na bioquímica ecológica, favorecendo alguns microorganismos para a sua decomposição após a queda dos seus frutos no chão, é um processo a ser discutido (SARTORELLI et al., 1998).

1.2.2 *Hyeronima alchorneoides* (Allemao)

1.2.2.1 *Características taxonômicas*

A planta *Hyeronima alchorneoides* pertence à família Euphorbiaceae, incluída na ordem Geraniales, e compreende uma das maiores famílias das dicotiledôneas, apresentando cerca de 290 gêneros e 7500 espécies, distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África, sendo muito bem representada na flora brasileira (JOLY, 1998).

São plantas de hábito bastante variado, existindo como ervas, subarbustos, árvores e também trepadeiras, com folhas alternas inteiras ou partidas, em geral com estípulas latescentes ou não. As flores são sempre de sexo separadas, em geral monoclamídeas, podendo ocorrer as diclamídeas em plantas monóicas, reunidas em inflorescências muito variadas, em geral do tipo cacho.

Esta família inclui muitas plantas úteis ao homem, dentre as quais destacam-se o *Ricinus communis* L. (mamona), originária da região norte africana, com sementes ricas em óleo (óleo de rícino); a *Aleurites iordi* (tungue) e a *Aleurites moluccana* (nogueira de Iguape ou a noqueira da Índia), as quais apresentam sementes que produzem óleo industrial. Pertence também a esta família, a seringueira da Amazônia (*Hevea brasiliensis*), a maior produtora de borracha extensamente cultivada na Malásia e Indonésia, destaca-se também a maniçoba do nordeste, produtora de borracha (JOLY, 1998).

A espécie *Hyeronima alchorneoides* é popularmente conhecida como lucurana em Santa Catarina, e por outros nomes em outras regiões: margonçalo, goiabeira-brava, abacateiro, quina-vermelha, entre outros (LORENZI, 1998).

São árvores que apresentam entre 20 a 30m de altura, com troncos de 50-70cm de diâmetro e folhas simples de 9 a 20cm de comprimento (LORENZI, 1998) (Fig.2). Apresenta uma vasta distribuição desde a Amazônia até o nordeste do Rio Grande do Sul, sendo, entretanto, mais freqüente na floresta ombrófila densa da encosta atlântica do Brasil. Apresenta florescência durante os meses de outubro-dezembro podendo estender-se até janeiro e os seus frutos amadurecem nos meses de janeiro a abril (LORENZI, 1998).

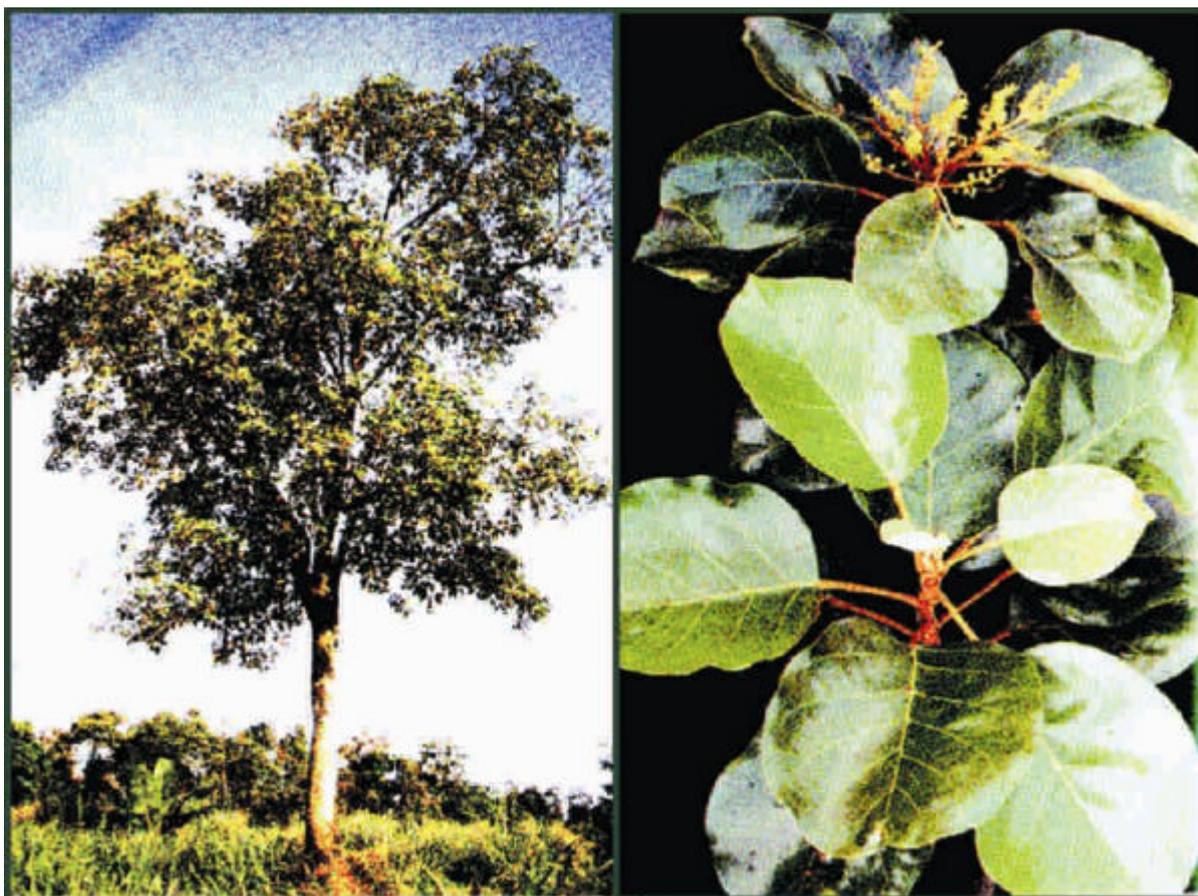


Figura-2: Fotografia da espécie adulta de *Hyeronima alchorneoides* (A), e as suas folhas em destaque (B). (Fonte: LORENZI, 1998)

1.3.2.2 Propriedades fitoquímicas e farmacológicas de *Hyeronima alchorneoides* e outras plantas da família Euphorbiaceae.

Várias euphorbiáceas são utilizadas como plantas medicinais, sendo as mais conhecidas as chamadas quebra-pedras (*Phyllanthus*). Deste mesmo gênero foram comprovadas várias atividades biológicas, como analgésica, antiinflamatória, antialérgica, entre outros (CALIXTO et al., 1998).

Vários trabalhos foram desenvolvidos utilizando exemplares desta família. Como exemplo, podemos citar a atividade analgésica (MEYRE-SILVA et al.,

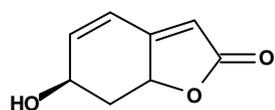
1998); bactericida (LOCHER et al., 1995) e fungicida (LOCHER et al., 1996) no gênero *Aleurites*. Efeitos analgésicos também foram observados nos extratos das folhas e raízes de *Sebastiania schottiana*, relacionados com a presença de triterpenos (GAERTNER et al., 1999).

As plantas do gênero *Croton*, incluída nesta mesma família (Euphorbiaceae), são também bastante utilizadas na medicina popular e da mesma forma tem sido muito estudada por diversos grupos de trabalho abordando aspectos fitoquímicos. Os extratos de *C. cajucara* comprovaram atividade antinociceptiva (CAMPOS et al., 2002) e antígenotóxica (AGNER et al., 2001). Foram também comprovadas atividades antidiarréicas a partir dos extratos de *C. urucurana* (GURGEL et al., 2001); anticancerígenos, dos extratos de *C. oblongifolius* (ROENGSUMRAN et al., 2002); antimicrobiana, dos extratos de *C. stellulifer* (MARTINS et al., 2000) e atividade antiviral dos extratos de *C. lechleri* (WILLIAMS, 2001).

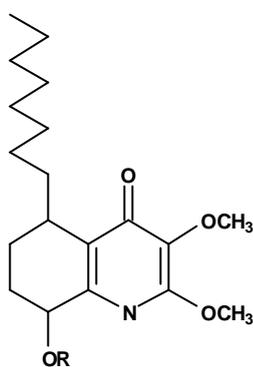
O gênero *Hyeronima*, apesar de pertencer a uma família tradicionalmente bastante utilizada pela medicina popular e algumas com comprovação científica, até o momento apresenta poucos trabalhos fitoquímicos para este gênero.

O primeiro trabalho fitoquímico relacionado com a espécie *H. alchorneoides*, aborda um levantamento fitoquímico das suas folhas e raízes, coletado das florestas da Guiana Francesa, na qual é isolado e identificado a partir das suas folhas um raro butenolideo, o arquilegiolide'ó, além dos triterpenos conhecidos: lupeol, estigmasterol e sitosterol (TINTO et al., 1991).

Das raízes desta espécie foram isolados recentemente, dois novos compostos, denominados de hyeronimona e o seu respectivo acetato. Posteriormente, foi identificado o seu precursor, a antidesmona, identificado em mais de 20 espécies da subtribo Antideminae, que inclui o gênero (BUSKE et al., 2002). Atualmente, a antidesmona está sendo utilizada na quimiotaxonomia das plantas desta subtribo.

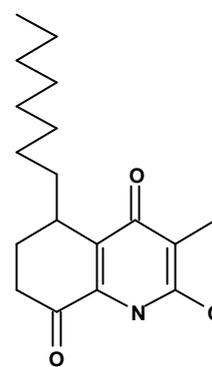


arquilegiolideo



R= H → hyeronimona

R = Ac → acetato de hyeronimona



antidesmona

2 OBJETIVOS

A utilização das folhas e cascas do caule da *Virola oleifera* no combate às cólicas intestinais e dores de estômago (FERNANDES, 1993) e a utilização das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, no combate à enxaqueca, a ausência de trabalhos científicos comprovando estas atividades farmacológicas, além da ausência de levantamento fitoquímico destas plantas, relacionadas a estas atividades, nos motivaram a apresentar como objetivo principal deste trabalho a investigação fitoquímica e farmacológica das folhas das plantas *Virola oleifera* e *Hyeronima alchorneoides*, tendo como objetivos específicos, os seguintes tópicos:

1. Realizar testes farmacológicos com os diferentes extratos das plantas como indicativo dos estudos químicos;
 2. Isolar os compostos majoritários das plantas selecionadas através de métodos cromatográficos; priorizando aqueles extratos com maior atividade farmacológica;
 3. Identificar os compostos isolados através de métodos espectrométricos (IV, UV, EM, RMN ^1H e ^{13}C);
 4. Realizar testes farmacológicos nos compostos puros identificados;
 5. Realizar modificações estruturais em pelo menos um composto ativo isolado;
 6. Realizar testes farmacológicos nos compostos modificados estruturalmente, com o intuito de obter compostos mais potentes e seletivos.
-

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do material

As folhas das plantas *Virola oleifera* e *Hieronima alchorneoides*, utilizadas neste trabalho foram coletadas em setembro de 1999, no Morro do Baú, localizado no município de Ilhota (SC). As plantas foram identificadas pelo Prof. Dr. Ademir Reis, do Departamento de Botânica da UFSC, e as exsicatas estão depositadas no Herbarium Barbosa Rodrigues (Itajaí), com as seguintes identificações: VC Filho 019, para *V.oleifera*, e VC Filho 020, para *H. alchorneoides*.

3.2 Procedimentos analíticos

Os procedimentos analíticos normalmente utilizados para uma abordagem fitoquímica englobam diversas etapas, as quais consistem no preparo dos diferentes extratos, seguidos dos procedimentos cromatográficos para a purificação das frações e uma combinação de diferentes métodos espectrométricos para a elucidação estrutural do composto purificado descritos em Cechinel Filho e Yunes (1998) e Falkenberg et al. (1999). Todas estas etapas são acompanhadas paralelamente pelos testes biológicos, os quais muitas vezes direcionam o andamento do processo analítico.

As técnicas experimentais adotadas neste trabalho para as análises fitoquímicas de *Virola oleifera* e *Hyeronima alchorneoides*, bem como a seqüência analítica adotada, seguem as metodologias descritas anteriormente (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998) e estão esquematizados na Figura-3 e resumidos a seguir:

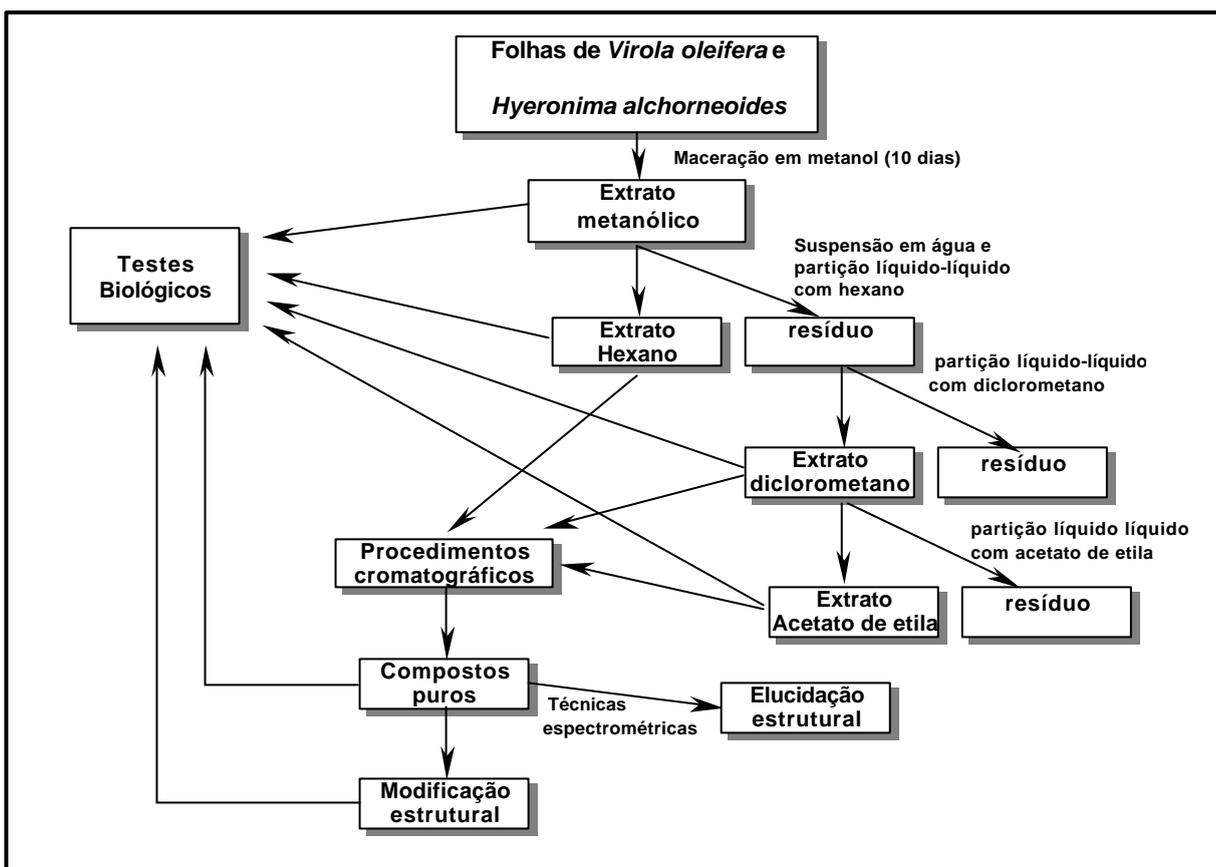


Figura-3: Esquema da análise fitoquímica desenvolvida com as folhas das plantas de *Virola oleifera* e *Hyeronima alchorneoides*.

1. As folhas da *V. oleifera* e *H. alchorneoides* foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas separadamente, durante dez dias em metanol P.A., a temperatura ambiente. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida a 60°C até 100ml, obtendo-se os respectivos extratos metanólicos.

2. Foram realizadas partições líquido-líquido nos extratos metanólicos brutos, com solventes de polaridades crescentes, utilizando-se, hexano, diclorometano e acetato de etila, visando uma semipurificação das substâncias através de suas diferentes polaridades. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, resultando nos respectivos extratos.
 3. Foram realizados testes farmacológicos do extrato metanólico bruto e dos extratos semipurificados, para verificar possível atividade analgésica e indicar o direcionamento das etapas posteriores. O teste farmacológico realizado foi o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (10mg/Kg), segundo recomendações descritas em Collier et al. (1968).
 4. Os extratos semipurificados, que apresentaram atividade positiva nos testes farmacológicos, foram selecionados para serem submetidos aos procedimentos cromatográficos, visando o isolamento e a elucidação estrutural dos princípios ativos, na forma de compostos puros. Para este procedimento, foram adotadas técnicas de cromatografia de coluna, com sílica gel (tamanho entre 0,063 a 0,200mm e diâmetro) como fase estacionária. A fase móvel foi variável em função das polaridades de cada fração, e em cada coluna foi empregada uma mistura de solventes de modo a passar solventes com polaridades crescentes. Para as frações hexano e diclorometano foram utilizadas misturas de hexano e acetato de etila, em proporções crescentes, aumentando a polaridade do solvente. Já para a fração de acetato de etila, foi utilizada como fase móvel, uma solução com diferentes proporções de clorofórmio e metanol, proporcionando eluentes com polaridades crescentes.
 5. As frações obtidas foram todas cromatografadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações que apresentaram purificação na primeira
-

cromatografia foram isoladas para a sua elucidação; e àquelas que demonstraram perfis semelhantes foram combinados e recromatografados, utilizando cromatografia de coluna, porém com eluentes diferentes, determinados pela CCD.

6. Os compostos purificados foram submetidos a diferentes técnicas de espectrometria na tentativa de elucidar a sua estrutura química, utilizando para isso a IV, RMN-¹H, RMN-¹³C, e técnicas mais sofisticadas de RMN, como o COSY e HETCOR.
7. Os compostos purificados e identificados foram submetidos a novos testes farmacológicos para verificar e confirmar a sua atividade analgésica.

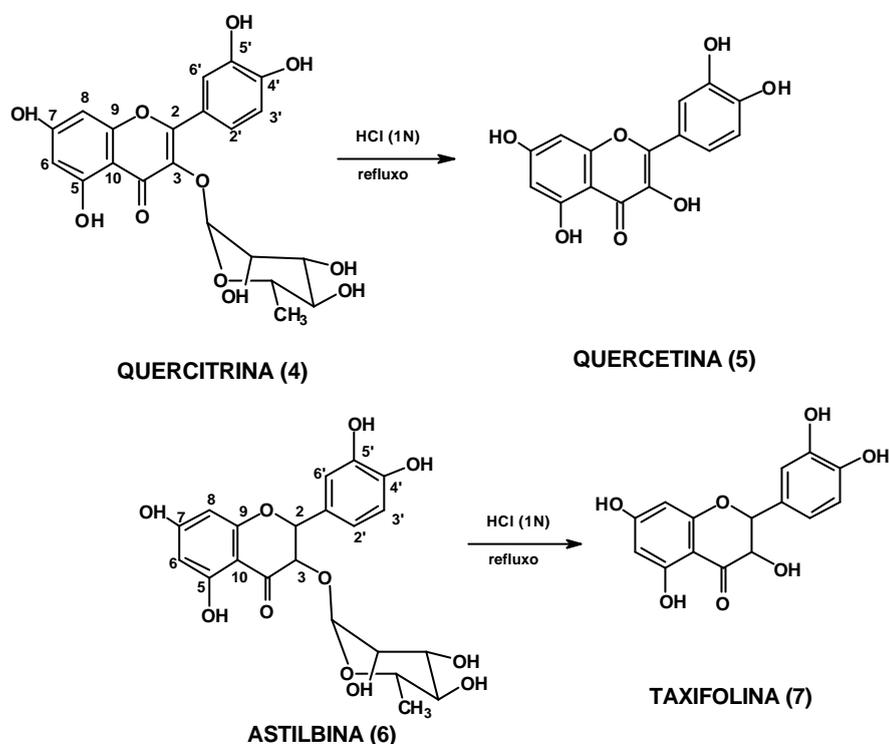
3.3 Modificações estruturais

3.3.1 Reações de hidrólise

A reação de hidrólise foi realizada com a mistura dos dois flavonóides glicosilados: a astilbina e a quercitrina. Estes compostos foram isolados como uma mistura na fração acetato de etila das folhas de *Virola oleifera*, e a reação de hidrólise foi realizada para confirmar a presença destes compostos.

A hidrólise foi realizada utilizando 2mg desta mistura de flavonóides glicosilados, adicionando 1ml de HCl (1N) e deixados em refluxo por 30 minutos. Após o resfriamento foram adicionados 5ml de água destilada e os compostos agliconas foram extraídos com acetato de etila, e o solvente evaporado. As reações foram comprovadas através de CCD, utilizando padrões autênticos de quercetina e

taxifolina, produtos da hidrólise. As reações de hidrólise são demonstradas nos esquemas abaixo.

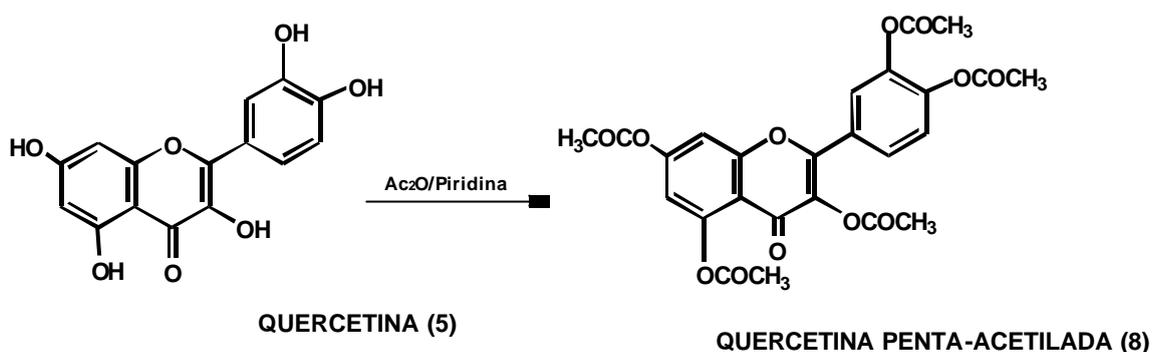


3.3.2 Reações de acetilação

A quercetina resultado da reação de hidrólise, descrita anteriormente, foi submetida à acetilação com anidrido acético e piridina (MATOS, 1997). Para obter os flavonóides acetilados, foi utilizada a quercetina comercial (MARCA Sigma, com 98% de grau de pureza). 400mg de quercetina foram dissolvidos em 4ml de piridina e 2ml de anidrido acético. Esta solução foi colocada em banho-maria a aproximadamente 70°C, durante 3 horas, com agitação ocasional. Após o resfriamento, foi adicionada a esta mistura 50ml de água com gelo, deixado por 30 minutos. O acetato cristalizado foi removido por filtração. O composto foi

recristalizado em metanol:clorofórmio (5:1). A pureza foi verificada através do CCD.

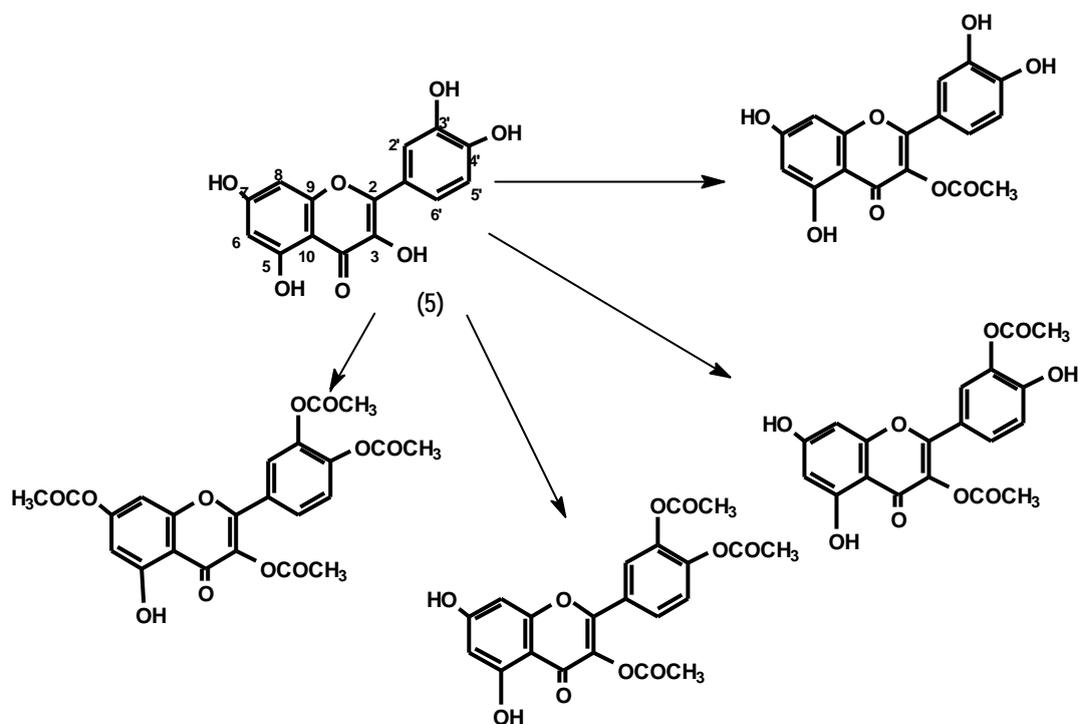
A reação de acetilação da quercetina está representada no esquema a seguir.



3.3.3 Reações de metilação

A quercetina (5) foi submetida à reação de metilação através da dissolução em acetona seca adicionado o carbonato de sódio e o sulfato de dimetila, este último adicionado estequiometricamente na proporção de um grupo hidroxila para cada metila (KUPCHAN e BAUERSCHMIDT, 1971; MALAN e ROUX, 1979). 600mg de quercetina foram misturados com 6g de K_2CO_3 , 5ml de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ e 40ml de acetona seca, deixado em refluxo por 130 horas. Depois de resfriado, o precipitado foi filtrado, lavado com acetona e o solvente evaporado. Os compostos metilados foram purificados por CC, utilizando sílica-gel como fase estacionária e uma mistura de CHCl_3 : MeOH em proporções crescentes como fase móvel. As frações foram recolhidas em frascos de 10ml, e reunidas de acordo com o seu perfil

cromatográfico, acompanhado através de CCD. (IV, RMN-¹ e RMN-¹³C). As possíveis reações são apresentadas no esquema a seguir.



3.4 Testes farmacológicos

Os testes farmacológicos realizados neste trabalho abordam os testes para a avaliação da atividade analgésica através do *modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, administrado intraperitonealmente em camundongos* (COLLIER et al., 1968).

Os animais utilizados para este teste foram camundongos machos Swiss Webster, com peso entre 25 e 30g, mantidos a temperatura ambiental

controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob um ciclo claro-escuro de luz de 12 horas. Água e alimentação foram fornecidas livremente, exceto durante os testes farmacológicos.

Segundo este modelo, as respostas nociceptivas induzidas pela injeção intraperitoneal do ácido acético (0,6%), consistem nas contrações da musculatura abdominal seguida da extensão de uma das patas posteriores (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1995). Para avaliar a atividade antinociceptiva, os animais foram pré-tratados com injeção intraperitoneal dos extratos semipurificados ou compostos purificados ou os compostos resultados das modificações estruturais, 30 minutos antes da injeção do ácido acético. Os compostos purificados foram injetados na concentração de 1mg/ml e os extratos semipurificados (metanólico, hexano, diclorometano e acetato de etila) a uma concentração de 10mg/ml. Estas soluções foram injetadas no animal de acordo com o seu peso, em volumes que oscilaram entre 0,25 a 0,30ml para cada animal, resultando na dose de 10mg/kg do animal.

Após a injeção dos extratos ou dos compostos, os animais foram separados em campânulas de vidro individuais e quantificados acumulativamente o número de contorções abdominais durante um período de 20 minutos. Estes valores foram comparados ao animal controle, no qual foi injetado em substituição aos extratos e/ou compostos, um volume conhecido de água e DMSO (dimetilsulfóxido), este último utilizado para diluir os extratos e os compostos injetados. A atividade antinociceptiva foi determinada em função do número de inibições das contorções abdominais observados entre o animal controle e os animais injetados com os extratos e/ou compostos, observados durante os primeiros vinte minutos e expressas em porcentagem de inibição. Todos os resultados apresentados expressam um valor médio, resultado de aproximadamente 6 camundongos.

A avaliação da dose-dependência dos compostos que apresentaram atividade analgésica positiva foi realizada com a injeção de doses variadas deste composto no animal, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Para os compostos que apresentaram uma resposta dose-dependente, foi possível calcular a DI_{50} (dose do composto capaz de reduzir em 50% a resposta analgésica, quando comparado ao animal controle). Estes valores foram calculados através da regressão linear obtido do conjunto de dados obtidos para cada composto, considerando os valores médios de cada resposta e os respectivos desvios padrão. Com os valores de DI_{50} foi possível a comparação com outros compostos ou fármacos tradicionalmente utilizados para esta atividade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fitoquímica das folhas de *Virola oleifera*

4.1.1 Obtenção dos extratos das folhas de *Virola oleifera*

As folhas de *Virola oleifera*, coletadas em setembro de 1999, foram secas a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 dias, cortadas em pequenos pedaços e pesados, obtendo 523,6g de peso das folhas secas. Estas folhas foram maceradas em metanol P.A. durante dez dias aproximadamente, a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida a 60°C até reduzir a 100ml, denominado de extrato metanólico. Deste extrato foi retirada uma alíquota de 1ml, separado, seco a temperatura ambiente, e pesado. Este peso foi utilizado para estimar o peso do extrato metanólico total, obtendo-se uma massa de 69,6g para todo o extrato metanólico, correspondendo a um rendimento de 13,3%, em relação ao peso das folhas secas.

O extrato metanólico foi submetido a sucessivas partições líquido-líquido utilizando n-hexano (9 x 200ml), diclorometano (4 x 200ml) e acetato de etila (6x200ml), visando uma semipurificação das substâncias através das suas diferentes polaridades. Os solventes foram então evaporados sob pressão reduzida, secos e pesados. As massas e os respectivos rendimentos obtidos são apresentados na Tabela-2.

Tabela-2: Distribuição das massas e rendimentos obtidos dos extratos metanólicos, hexânico, diclorometânico e acetato de etila, das folhas de *Virola oleifera*.

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)*	
		Sobre o extrato metanólico	Sobre o peso seco das folhas
Metanólico	69,6	100	13,3
Hexânico	27,7	39,8	5,3
diclorometânico	3,8	5,4	0,7
Acetato de etila	16,6	23,8	3,2
<i>total</i>	48,1	69,0	9,2

*Os rendimentos foram calculados em relação ao extrato metanólico e em relação ao peso seco das folhas.

Observa-se que os maiores rendimentos foram obtidos para as fração hexânicos (40%) e acetato de etila (24%) e a menor fração para o extrato diclorometânico (5%), cuja polaridade é intermediária aos dois extratos de maior rendimento. A fração mais polar, aquosa, foi descartada por conter somente açúcares, verificados por CCD (MATOS, 1997). Estes resultados podem estar indicando que nestas folhas, os compostos majoritários devem apresentar características de polaridades extremas, sendo ou muito apolares (esteróides, ácidos graxos, terpenos, hidrocarbonetos) ou muito polares (flavonóides, taninos, xantonas e compostos fenólicos em geral) (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001). Além do rendimento obtido pela fração diclorometano ser muito baixo, o perfil de distribuição dos compostos majoritários, revela uma semelhança entre os extratos hexano e diclorometano (Figura-4), sendo que apenas alguns compostos mais apolares estão presentes no extrato hexânico, sem os mesmos aparecerem no extrato do diclorometano, justificando desta forma, o baixo rendimento obtido no extrato diclorometânico. Estes resultados mostram que, para estudos posteriores nesta mesma planta (folhas), a extração da fase de diclorometano poderia ser eliminada, visando um trabalho mais rápido sem a perda dos compostos majoritários.

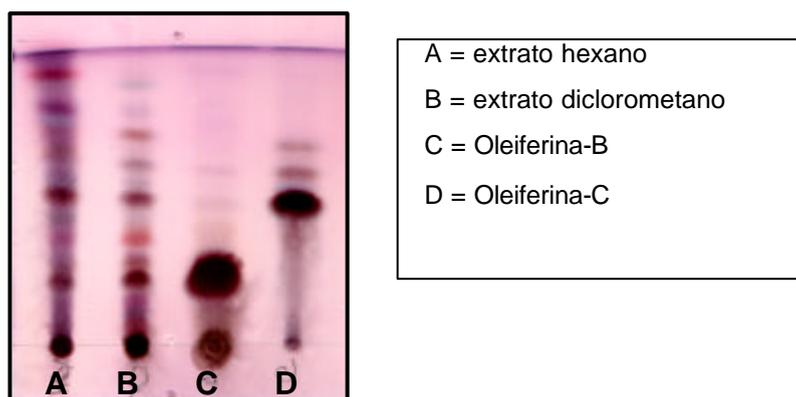


Figura-4: Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos hexânico (A) e diclorometânico (B), das folhas de *Viola oleifera*. Utilizado como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2), e como revelador uma solução de anisaldeído sulfúrico a 110°C.

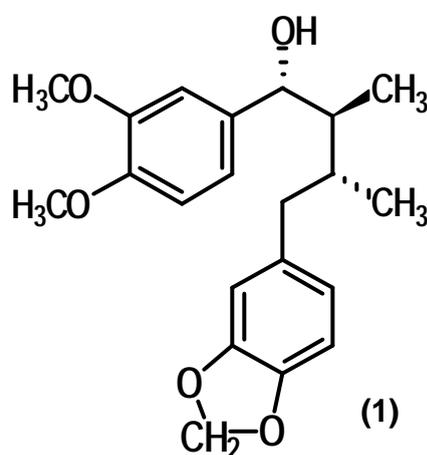
4.1.2 Isolamento e identificação dos compostos majoritários das folhas de *Viola oleifera*.

4.1.2.1 Fração Hexano

Parte do extrato hexano (1,5g) foi separado para a purificação dos diferentes compostos através da cromatografia de coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente, uma mistura de hexano e acetato de etila em diferentes proporções constituindo um sistema de polaridades crescentes até obter um eluente a 100% de acetato de etila. As frações foram coletadas em frascos de 10 ml e a sua pureza verificada através de cromatografia de camada delgada (CCD). As frações que apresentaram perfis semelhantes foram combinadas e recromatografadas utilizando diferentes eluentes, selecionados de acordo com o perfil apresentado pelo CCD. Quando o cromatograma apresentava um único

composto, este foi isolado pesado e identificado através da combinação de diversos métodos espectrométricos de IV, $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ para a sua identificação.

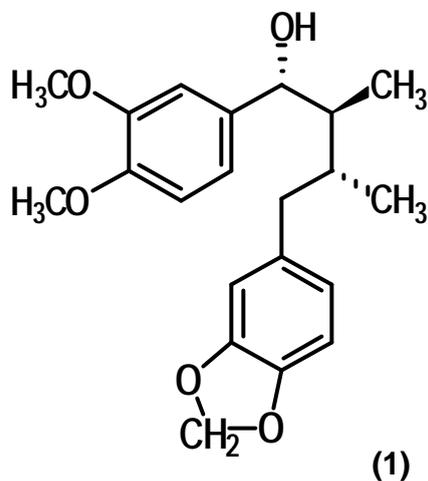
O extrato hexânico nos forneceu apenas um único composto purificado, apesar de sucessivas cromatografias, o qual foi identificado como sendo a neo-lignana Oleiferina-B (**1**), através dos métodos espectrométricos e comparações com os espectros publicados (FERNANDES et al., 1993; FERRI, 1993).



4.1.2.1.1 Oleiferina-B (1)

A neolignana oleiferina-B (**1**) foi obtida da fração hexano das folhas de *Virola oleifera*, na forma de um óleo, em torno de 38,2mg, estimando para toda fração hexano a quantidade presente deste composto será de 705mg, o que corresponde a um rendimento de aproximadamente 2,5% em relação ao extrato hexânico, 1,0% em relação ao extrato metanólico bruto e apenas 0,13% em relação

ao peso seco das folhas. A identificação deste composto foi realizada através da análise dos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (Figuras 5 e 6).



O espectro de RMN- ^1H (Fig-5 e Tabela-3) se caracteriza pela presença de vários prótons aromáticos ($\delta \sim 6\text{ppm}$) e grupo metilas blindados (δ menores que 2ppm). Os deslocamentos observados em δ 0,78 (dubleto $J=6,6\text{Hz}$) e 1,02ppm (dubleto $J = 6,8\text{Hz}$) foram atribuídos respectivamente aos grupos metilas de C-8 e C-8' e os multipletos localizados em δ 1,51 e 1,77ppm, atribuídos aos metinos H8' e H8, respectivamente, corroborando com os diversos acoplamentos sofridos por este próton com os seus vizinhos (grupos metilas de C-9; metileno de C-7 e ainda os próprios acoplamentos entre os prótons de C8).

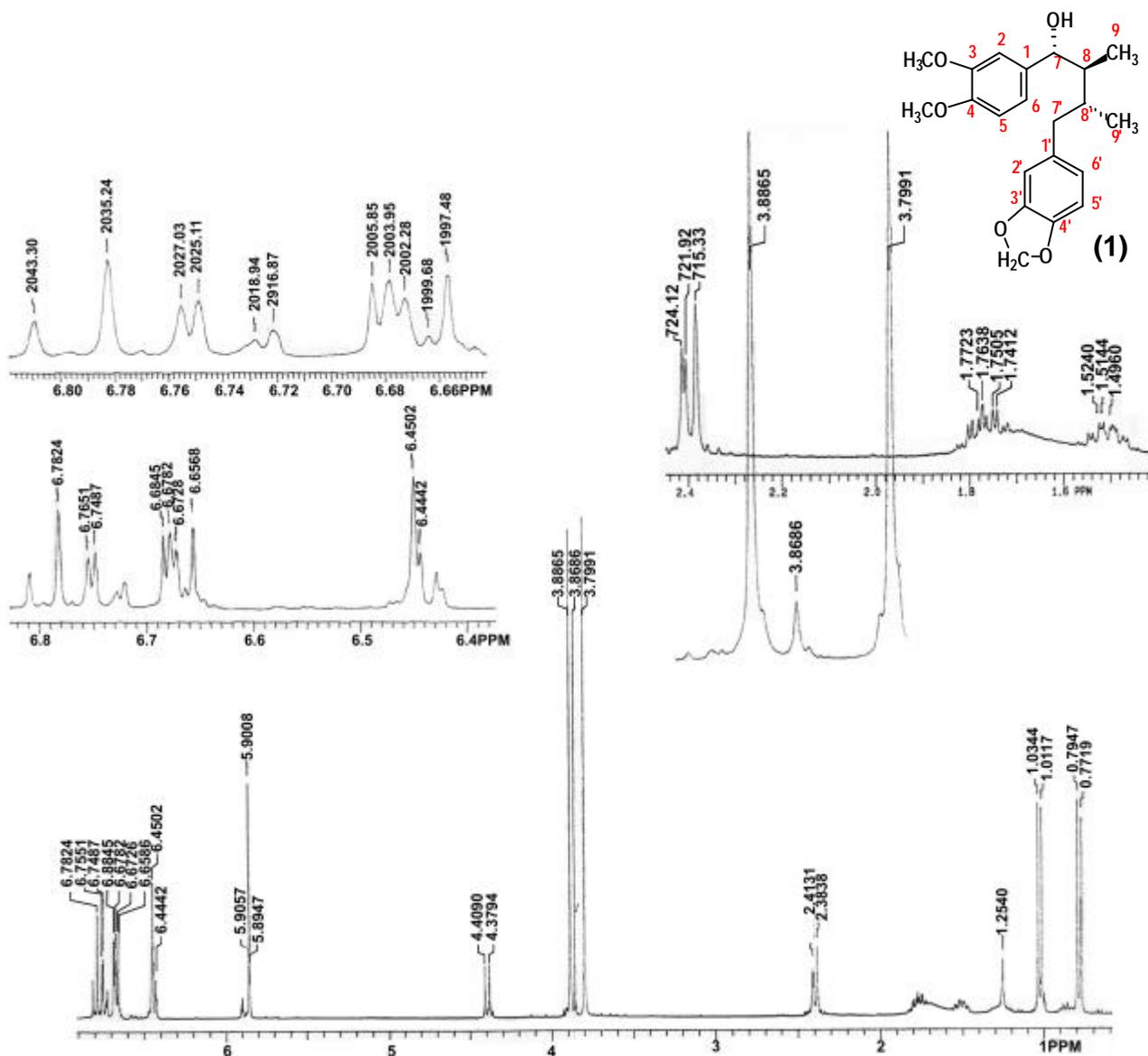


Figura-5: Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃) de Oleiferina-B (1), isolado da fração hexânica das folhas de *Virola oleifera*. Expansão da região dos prótons da metila e os aromáticos.

Tabela-3: Dados do espectro de RMN-¹H da oleiferina-B, obtido do extrato hexânico das folhas de *Virola oleifera*, comparados aos dados descritos na literatura.

Hidrogênio	Referência* (300 MHz, CCl ₄)		Este trabalho (300 MHz, CDCl ₃)	
	d	J (Hz)	d	J (Hz)
Me-8	0,93	6,7	1,02	d 6,8
Me-8'	0,77	6,7	0,78	d 6,6
OH	1,4	s (largo)	1,3	s
H-8'	1,52	m	1,51	m
H-8	1,62	m	1,77	m
H-7'	2,30	dd 6,8; 13,8	2,4	dd 6,5
H-7'	2,38	dd 9,1; 13,8	2,4	dd 6,5
H-7	4,27	d 8,5	4,39	d 8,88
OMe-3	3,79	s	3,88	s
OMe-4	3,70	s	3,79	s
H-5	6,55	d 9,0	6,80	d 8,1
H-5'	6,64	d 8,1	6,77	d 8,2
H-6	6,37	dd 8,0	6,67	m
H-6'	6,55	dd 9,0	6,73	d 8,24
H-2	6,35	s	6,45	s
H-2'	6,59	s	6,78	s

* FERRI, 1993; FERNANDES et al., 1993.

O espectro de RMN-¹³C APT (Tabela-4 e Figura-6) mostra os deslocamentos observados para os carbonos de Oleiferina-B. Observa-se a presença de carbonos aromáticos cujos deslocamentos se apresentam próximos de $\delta=128,5\text{ppm}$ (SILVERSTEIN et al., 1994). Comparando este espectro com os da literatura (FERRI, 1993 e FERNANDES et al., 1993) observa-se apenas pequenas diferenças nos deslocamentos (menores que 0,5ppm) os quais podem ser atribuídas aos diferentes solventes utilizados.

Observa-se a presença de um grupo 3',4'-metilenodioxifenil (δ 147,3 e 145,8ppm) atribuídos aos carbonos C-3' e C-4', respectivamente; além do grupamento 3,4-dimetoxifenil (δ 149,2 e 148,3ppm) atribuídos aos carbonos C-3 e C-4, respectivamente. Os demais deslocamentos conferem perfeitamente aos descritos na literatura, confirmando ser o composto Oleiferina-B, denominado também de (7*R**,8*S**, 8'*R**)-3,4-dimetoxi-3'-4'metilenodioxilignan-7-ol.

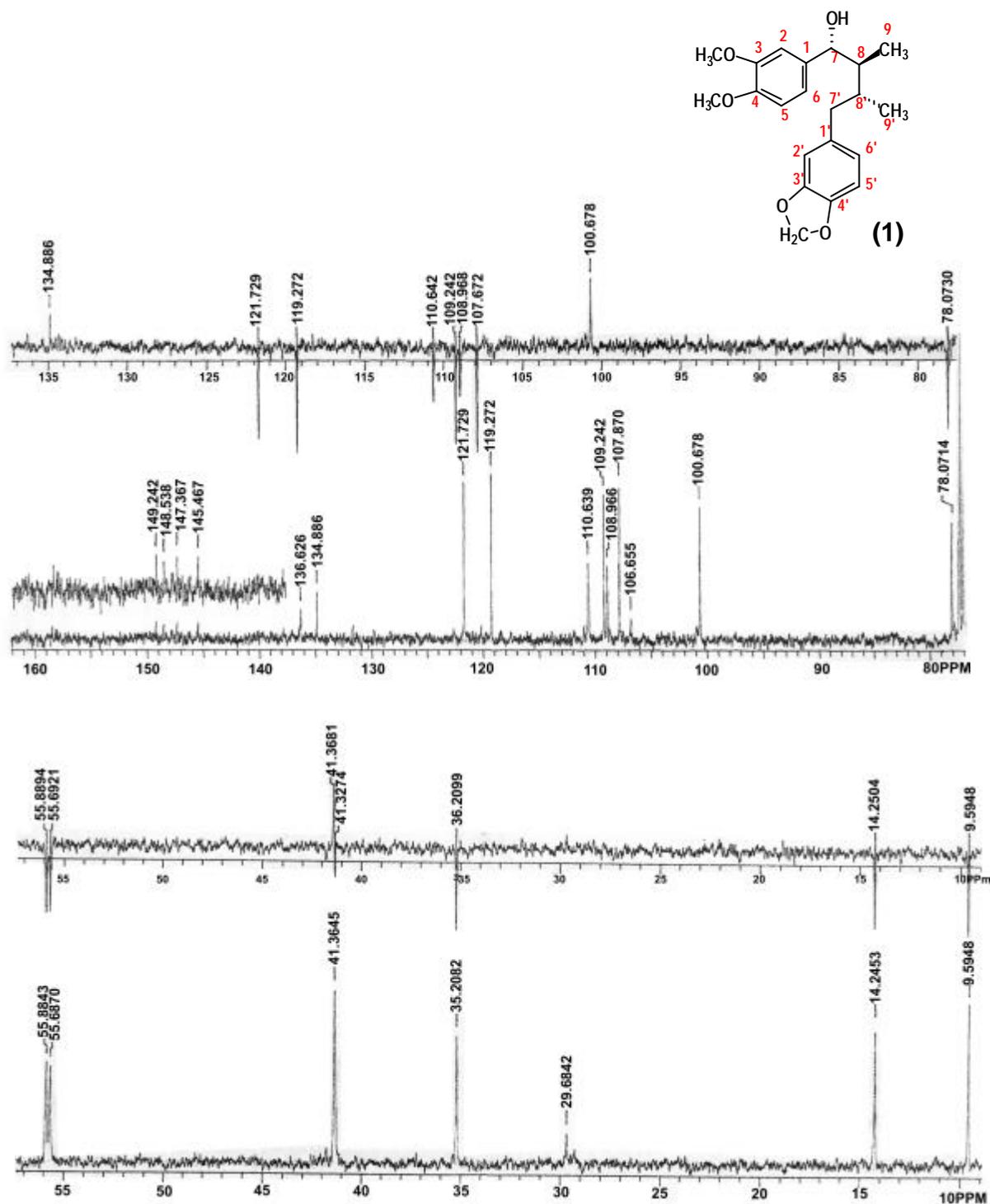
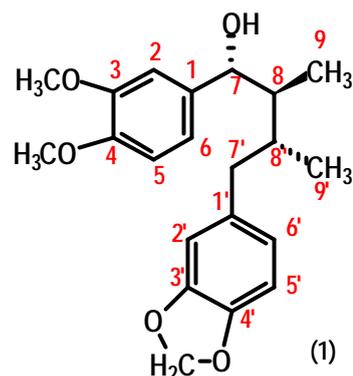


Figura-6: Espectro de RMN- ^{13}C e APT (CDCl_3 , 75MHz) de oleiferina-B (1), isolado da fração hexânico das folhas de *Virola oleifera*.

Tabela-4: Dados do espectro de RMN-¹³C da oleiferina-B, obtido do extrato hexânico das folhas de *Virola oleifera*, comparados aos dados apresentados na literatura.

Carbono	d - Referência* (75 MHz, CCl ₄)	d - Este trabalho (75MHz, CDCl ₃)
1	136,6	136,3
2	109,4	109,2
3	149,5	149,2
4	148,6	148,3
5	111,0	110,6
6	118,6	119,2
7	77,1	78,1
8	41,2	41,3
9	9,3	9,6
1'	134,3	134,9
2'	108,9	108,9
3'	147,1	147,3
4'	145,2	145,8
5'	107,2	107,8
6'	121,3	121,7
7'	41,2	41,4
8'	35,0	35,2
9'	14,6	14,2
OCH ₃ -3	55,2	55,9
OCH ₃ -4	54,9	55,7
OCH ₂ O	100,1	100,6

*FERRI, 1993; FERNANDES et al., 1993.

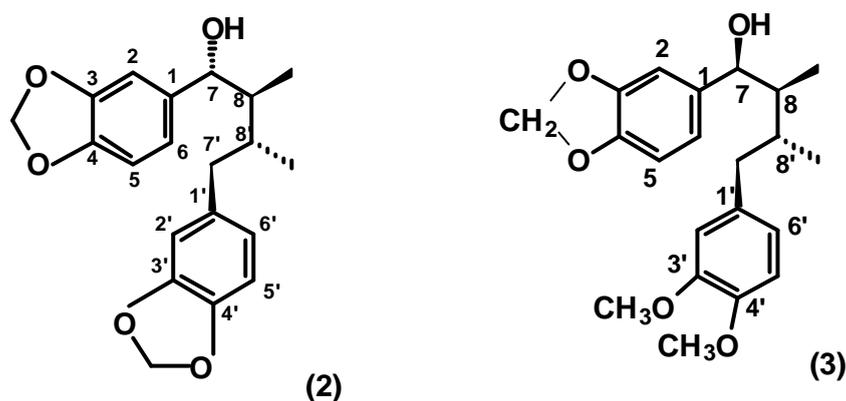


3.1.2.2 Fração diclorometânico

Uma parte do extrato diclorometano (1,5g) foi cromatografada em CC, utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano-acetato de etila como eluente. As proporções destes eluentes foram preparadas a partir de 100% de hexano até obter 100% de acetato de etila, obtendo-se assim, gradientes crescentes de polaridade. A primeira CC forneceu um composto purificado, e o restante foi agrupado para serem recromatografados como descrito anteriormente para o extrato hexânico. No entanto, não se obteve mais nenhum composto purificado a partir deste extrato. O composto isolado foi identificado posteriormente

como **oleiferina-C (2)**, segundo os dados espectrométricos de RMN-¹H (Tabela-5, Figura-7) e RMN-¹³C e DEPT (Tabela-6, Figura-10), comparados aos dados da literatura (FERNANDES et al., 1993).

3.1.2.2.1 Oleiferina-C (2)



A fração de diclorometano nos forneceu 28mg de oleiferina-C (2), extrapolando para toda a fração, isto corresponde a 70,9mg deste composto, representando 1,86% desta fração, e apenas 0,1% da fração metanólica bruta, ou ainda 0,0135% do peso das folhas secas de *Virola oleifera*, 10 vezes menos que a concentração observada para a oleiferina-B. Deve-se, no entanto, salientar que a porcentagem deste composto nas folhas desta planta deve ser maior, considerando que através de CCD, foi observada a presença deste composto também na fração hexânica, o qual não foi contabilizado nestes cálculos, além das pequenas perdas observadas durante a execução da CC.

A oleiferina-C (2), uma neo-lignana com o mesmo precursor da oleiferina-B, foi identificado pela primeira vez como produto natural a partir das folhas desta espécie (FERRI, 1993), tendo sido, porém sintetizado anteriormente a partir da (-)-austrobailignana, também uma neolignana, isolada como produto natural

de *Saururus cernuus* (RAO e RAO, 1990). Além disso, foi verificado que compostos que apresentam diarilpropanóides como precursores são bastante comuns nas espécies do gênero *Virola* (GOTTLIEB et al., 1973; CAVALCANTE et al., 1985; GUARÍN, et al., 2000 e MARTÍNEZ et al., 1999). Recentemente este composto foi identificado também no caule de *Talauma ovata*, uma magnoliaceae, associado à outras neolignanas, (STEFANELLO et al., 2002), sendo esta, a primeira ocorrência destes compostos em espécies não pertencentes à família Myristicaceae.

A identificação deste composto foi realizada através de comparação dos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C em comparação com os publicados na literatura (FERRI, 1993 e FERNANDES et al., 1993).

Tabela-5: Dados do espectro de RMN-¹H da oleiferina-C, obtido do extrato diclorometânico das folhas de *Virola oleifera*, comparados aos dados descritos na literatura.

HIDROGÊNIO	Referência* (300MHz, CCl ₄)		Este trabalho (300 MHz, CDCl ₃)	
	d	J (Hz)	d	J (Hz)
Me-8'	0,76	d 6,9	0,76	d 6,8
Me-8	0,92	d 6,9	1,0	d 6,8
OH	1,29	s	1,25	?
H-8'	1,54	m	1,58	m
H-8	1,62	m	1,75	m
H-7'	2,3	dd 6,9; 13,5	2,36	dd 7,39; 13,7
H-7'	2,45	dd 8,1; 13,5	2,44	dd 8,15; 13,6
H-7	4,33	d 8,1	4,38	d 9,0
OCH ₂ O-3-4			5,94	d 12,3
OCH ₂ O-3'-4'			5,94	d 12,3
H5-H5'			6,71	dd 8,2
H6-H6'			6,45	m
H2-H2'			6,68	m

* FERRI, 1993; FERNANDES et al., 1993.

Os espectros de RMN-¹H (Tabela-5, Figura-7, 8 e 9) e RMN-¹³C (Tabela-6; Figura-10) deste composto foram bastante similares ao apresentado para a oleiferina-B, em função das semelhanças estruturais destes dois compostos, o que já era esperado, facilitando desta forma a sua identificação. Nos procedimentos

analíticos, porém, o primeiro composto isolado foi a oleiferina-C, posteriormente foi isolada a oleiferina-B, assim a dificuldade foi na identificação deste composto, o que nos levou a realização de vários espectros de correlação (2D), discutidos a seguir

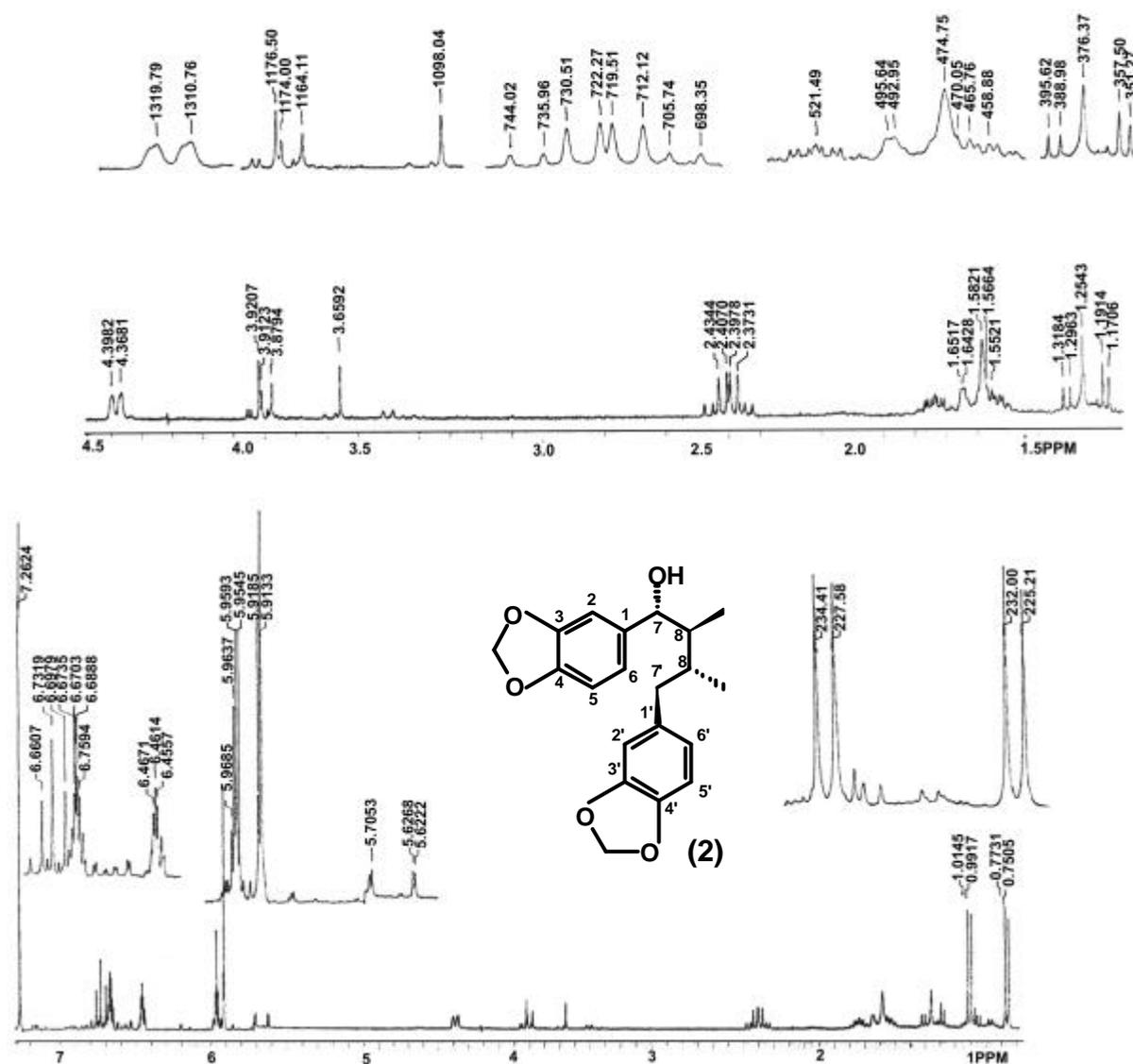


Figura-7: Espectro de RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) de oleiferina-C isolada da fração diclorometano das folhas de *Virola oleifera*. Expansão da região dos prótons de metila (1,0-0,5ppm), da região dos prótons alifáticos (4,5-1,2ppm) e da região dos prótons aromáticos (7,0-6,0ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida (300MHz, TMS como padrão interno).

O espectro de RMN- ^1H revela os mesmos grupos identificados para oleiferina-B: os dubletos observados em campo baixo $\delta 0,76$ ($J=6,8\text{Hz}$) e $1,0\text{ppm}$ ($J=6,8\text{Hz}$) atribuídos aos grupos metilas $\text{Me-}8'$ e $\text{Me}8$, respectivamente. O singlete observado a $\delta 1,25\text{ppm}$, atribuído ao grupo alcoólico OH ligado ao $\text{C-}7$; os multipletos observados em $\delta 1,58$ e $1,75\text{ppm}$, atribuídos aos prótons metínicos $\text{H-}8'$ e $\text{H-}8$, respectivamente.

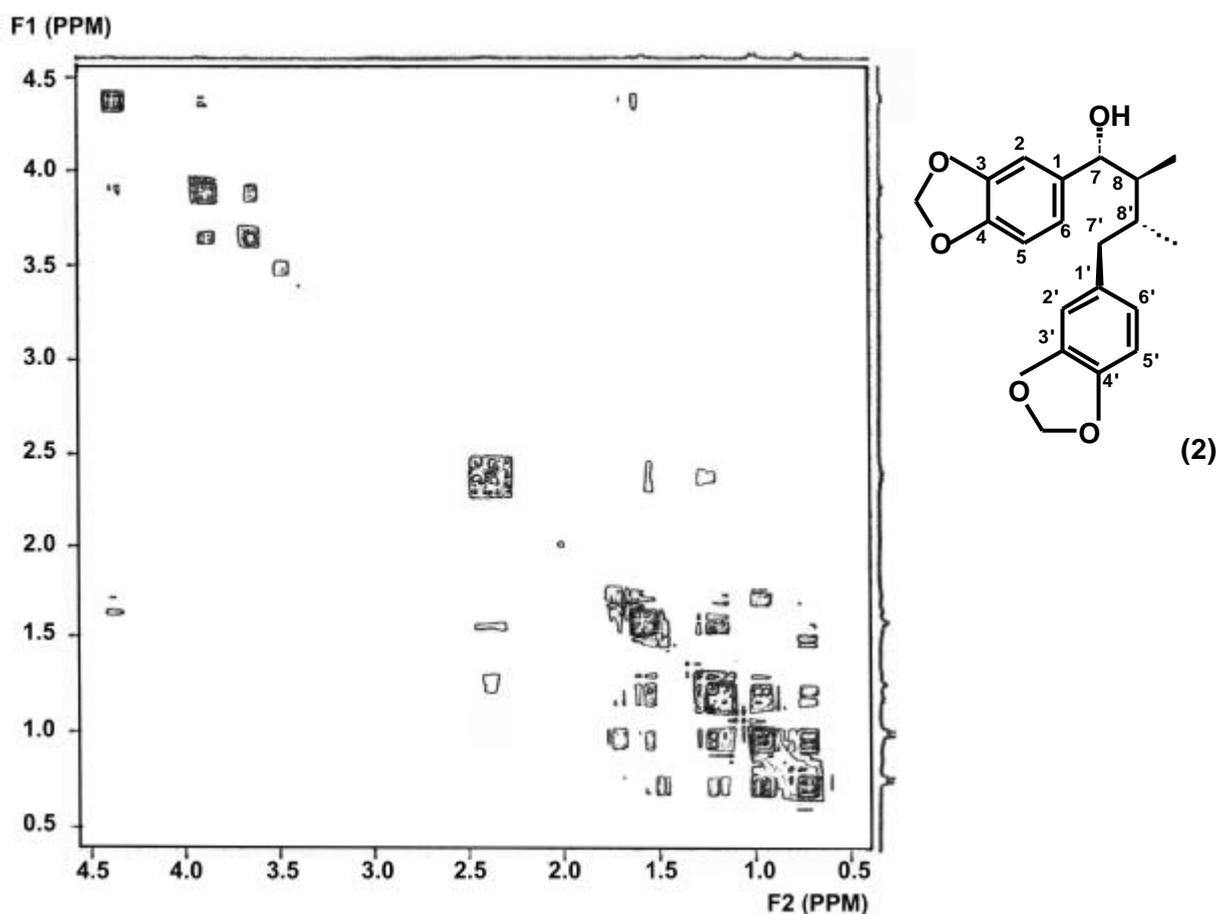


Figura-8: Espectro de RMN $(^1\text{H}-^1\text{H})$ -COSY (300MHz, CDCl_3) da oleiferina-C, isolada da fração diclorometano das folhas de *Virola oleifera*.

O espectro homonuclear $(^1\text{H} - ^1\text{H})$ COSY (Figura-8) mostra as correlações existentes entre estes prótons, permitindo uma identificação mais precisa dos mesmos.

Partindo do deslocamento observado para o OH-alcoólico (δ 1,29ppm), observamos um forte acoplamento deste próton e Me-8 (δ 1,0ppm) e um outro acoplamento mais fraco com Me-8' (δ 0,76ppm). O próton H8 (δ 1,75ppm) mostra um acoplamento com o Me-8, mas não apresenta um acoplamento com a metila-8', identificando o seu deslocamento. O próton H-8' (δ 1,58ppm), por outro lado, apresenta um acoplamento com os dois prótons de H7' (δ 2,36 e 2,44ppm), mas não apresenta um acoplamento com H-7 (δ 4,38ppm). Conferindo os deslocamentos dos prótons alifáticos. Evidencia também a contaminação observada entre os deslocamentos δ 3,5 e 4,0ppm, sem acoplamento com outros prótons.

Os prótons aromáticos foram identificados através do espectro de (^1H - ^1H)-COSY, da região aromática expandida (Figura-9) e dos deslocamentos observados para a oleiferina-A (**3**) (página 42), descrita por Ferri (1993). No espectro de correlação, observa-se que existem três grupos de prótons, além do grupamento metilenodióxido, provavelmente os prótons estejam sobrepostos em função das semelhanças na sua vizinhança. Observou-se um acoplamento entre os prótons com deslocamento em δ 5,94ppm (d $J=12,3\text{Hz}$) com o multiplete δ 6,45ppm e com os prótons com deslocamento em δ 6,68ppm, mas não foram observados acoplamentos com o grupamento de prótons em δ 6,71ppm. Desta forma atribuiu-se aos prótons metildióxido o δ 5,94ppm; δ 6,45ppm aos prótons H-2 e H-2'; δ 6,68ppm aos prótons H-5 e H-5' e δ 6,71ppm aos prótons H-6 e H-6'. Assim observa-se forte acoplamento entre H-5' e H-6, o qual acopla-se também com H-2, bem como H-5' com H-6' e este com o H-2' (Figura-9). Segundo Ferri (1993), não foram observadas correlações entre os prótons do grupamento metildióxido e os demais prótons aromáticos, como observado neste espectro. Porém, observa-se que estes acoplamentos são mais

fracos que os acoplamentos observados entre os prótons aromáticos, justificando estas diferenças.

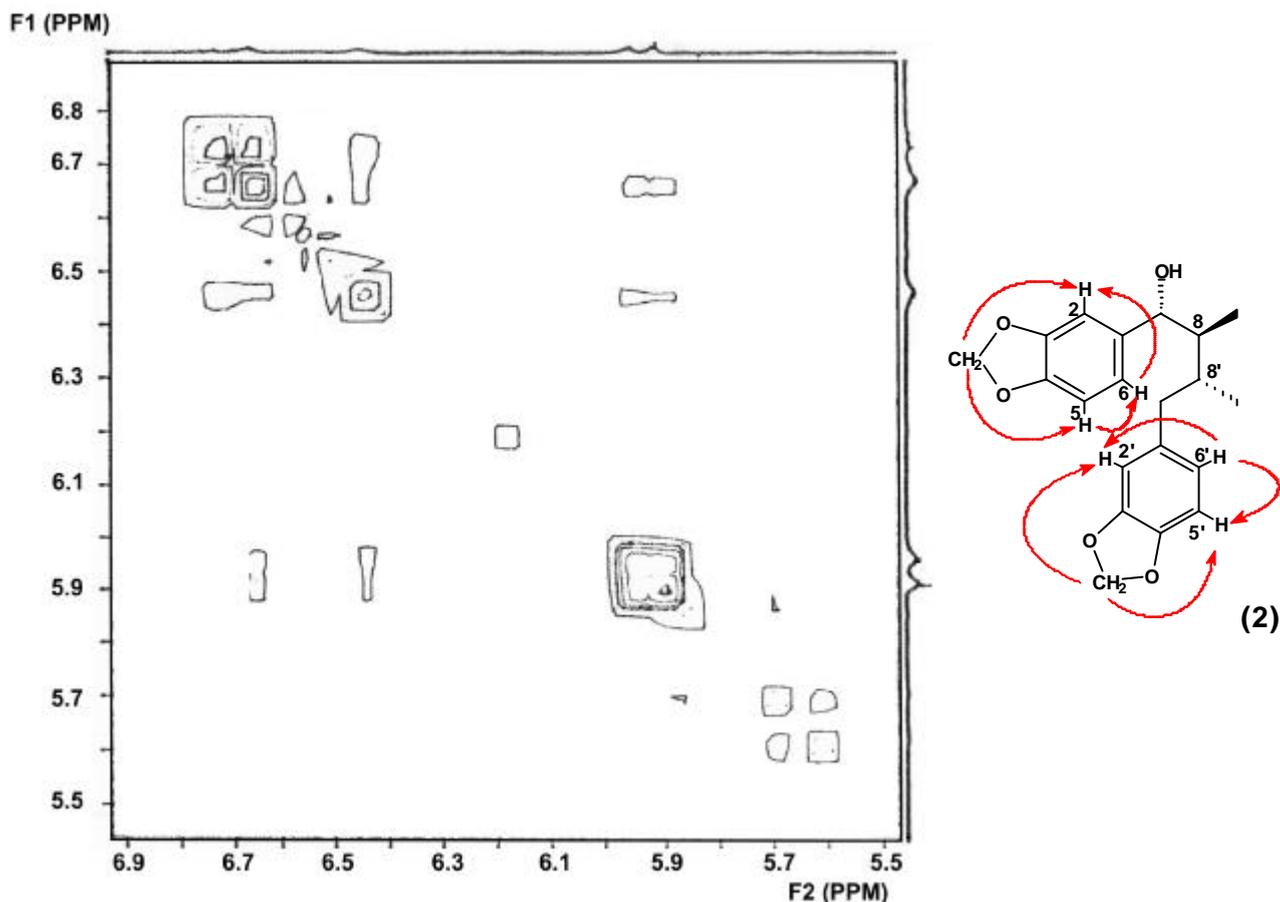


Figura-9: Espectro de COSY ampliado para a região dos deslocamentos dos prótons aromáticos observados para a oleiferina-C, isolado das folhas de *O. virolae* e as correlações ^1H - ^1H observadas representadas na estrutura de Oleiferina-C.

O espectro de RMN- ^{13}C (Tabela-6, Figura-10) identifica os carbonos característicos, já determinados para oleiferina-B, considerando que ambos apresentam o mesmo esqueleto básico. As pequenas diferenças observadas nos deslocamentos químicos entre os espectros apresentados na literatura e os espectros deste trabalho, podem ser resultados dos diferentes solventes utilizados para o desenvolvimento dos mesmos (AKITT, 1983). As interferências do solvente

podem ser significativas dependendo do composto e do solvente utilizado, em função das diferentes interações que os mesmos podem desempenhar.

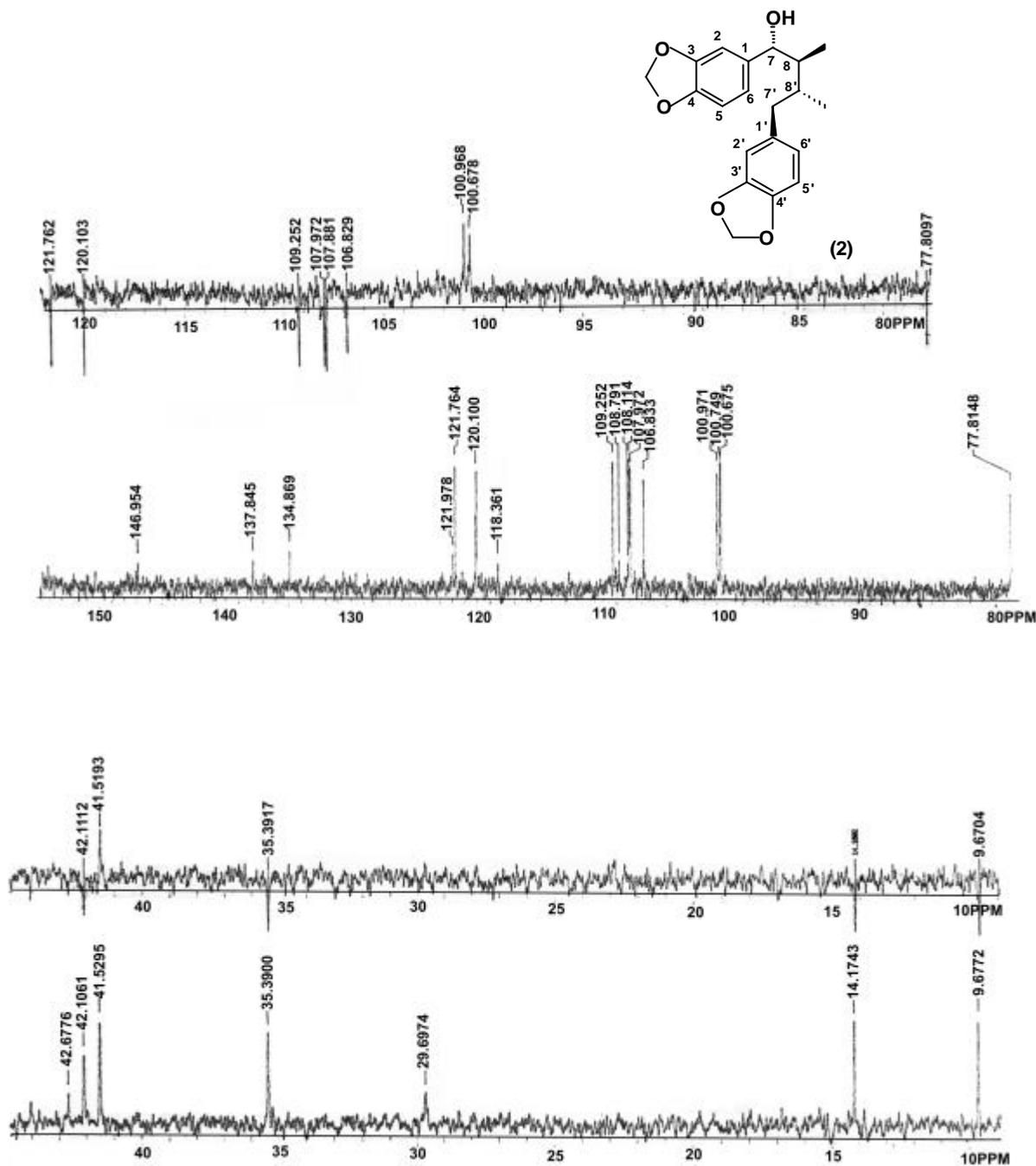
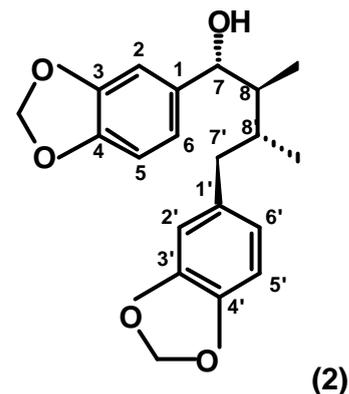


Figura-10: Espectro de RMN- ^{13}C e APT (75MHz, CDCl_3) de oleiferina-C isolada da fração diclorometano das folhas de *Virola oleifera*.

Tabela-6: Dados do espectro de RMN-¹³C da oleiferina-C, obtido do extrato diclorometânico das folhas de *Virola oleifera*, comparados aos dados apresentados na literatura.

CARBONO	d (ppm) -Referência* (75MHz, CCl ₄)	d (ppm) -espectro (75MHz, CDCl ₃)
1	138,1	137,8
2	107,6	108,0
3	147,5	
4	146,5	
5	106,5	106,8
6	119,4	120,1
7	76,8	77,8
8	42,1	42,1
9	9,4	9,7
1'	134,2	134,9
2'	108,9	109,2
3'	147,2	147,7
4'	145,3	146,9
5'	107,5	107,9
6'	121,3	121,8
7'	41,4	41,5
8'	35,3	35,4
9'	14,5	14,2
OCH ₂ O	100,0	100,7
OCH ₂ O	100,3	101,0



* FERRI, 1993; FERNANDES et al., 1993.

4.1.2.3 Lignanas e neo-lignanas

As lignanas são substâncias que se depositam nas paredes das células vegetais e lhes conferem a estrutura rígida, representam em torno de 1/3 da biomassa vegetal terrestre (DONALDSON, 2001) e são desta forma, os compostos mais abundantes entre os organismos vegetais, perdendo apenas para os carboidratos (BARBOSA FILHO, 1999). Em função desta vasta distribuição, são considerados dentre os metabólitos secundários, os mais estudados. Existem atualmente mais de 500 lignóides conhecidos, dos quais em torno de 90% se distribuem entre os grupos das lignanas e neo-lignanas.

A biossíntese destes compostos (Figura-11) mostra que as lignanas e as neo-lignanas foram originados a partir dos metabólitos primários finais da via metabólica do ácido chiquímato. Os precursores das neolignanas são os radicais arilpropanóides, com as suas estruturas C₆-C₃, cuja combinação formando o seu dímero, determina o esqueleto básico destas neolignanas.

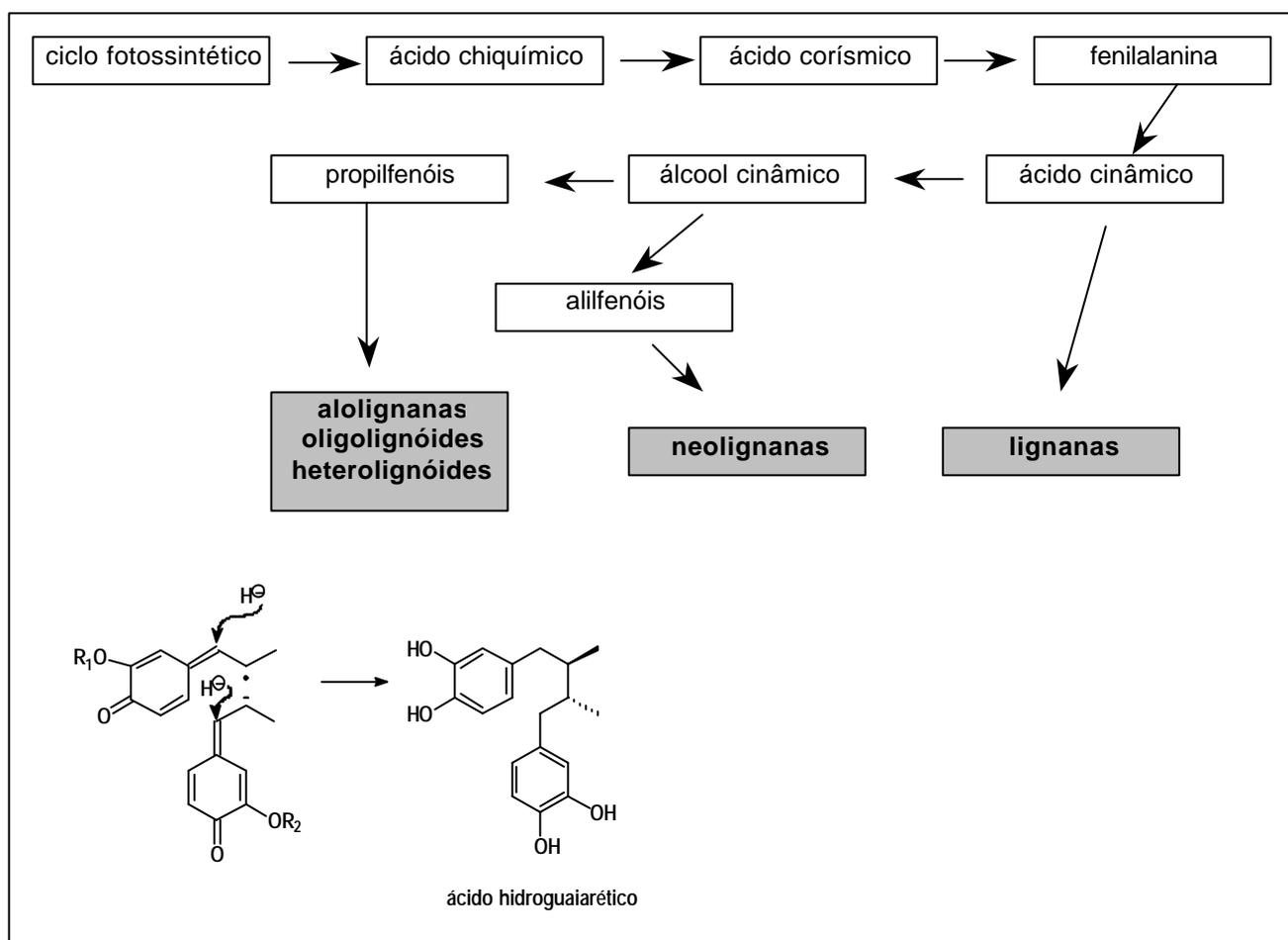


Figura-11: Representação esquemática da biossíntese de lignanas e neo-lignanas, baseado em BARBOSA FILHO (1999).

4.1.2.4 Fração de Acetato de Etila

Uma parte do extrato de acetato de etila (3,0g) foi utilizada para as investigações dos compostos majoritários, buscando o seu isolamento e sua elucidação estrutural. Esta fração foi diluída em acetona e metanol (1:1) e cromatografada em CC, utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de clorofórmio e metanol em diferentes proporções (95:5 até 0:100), como fase móvel, obtendo eluentes com polaridades crescentes. As frações foram recolhidas em frascos de 10ml e verificadas a sua composição através de CCD. As frações parecidas foram combinadas e no caso de mistura de compostos, estes foram recromatografados até obter compostos puros. Este extrato nos forneceu, na segunda cromatografia, um composto que através da CCD nos pareceu um único composto purificado, a mancha esverdeada na revelação com FeCl_3 nos indicou a presença de grupos fenólicos. No entanto o seu R_f foi diferente dos observados para os padrões de flavonóides glicosídeos conhecidos (quercitrina, rutina, isoquercitina e quercitina). Os espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , nos revelaram ser na verdade uma mistura de dois flavonóides glicosídeos já conhecidos: a quercitrina **(4)** e a astilbina **(5)**. Apesar dos flavonóides serem bastante conhecidos e identificados em diversas outras plantas, esta foi a primeira vez que estes flavonóides são descritos nas folhas desta planta.

4.1.2.4.1 Mistura de Astilbina e Quercitrina

Os dois flavonóides apresentam uma estrutura química bastante similar, sendo a única diferença na ligação dupla do anel C, entre o C2 e C3. Quando estes compostos estão glicosilados, as interações das hidroxilas com a sílica da coluna se tornam mais fortes, justificando a formação de uma única mancha no CCD. Após a hidrólise, a perda da ramnose, e conseqüentemente a diminuição das hidroxilas, faz com que as diferenças se tornem perceptíveis no CCD, apesar da diferença estrutural entre os dois compostos serem muito pequenas.

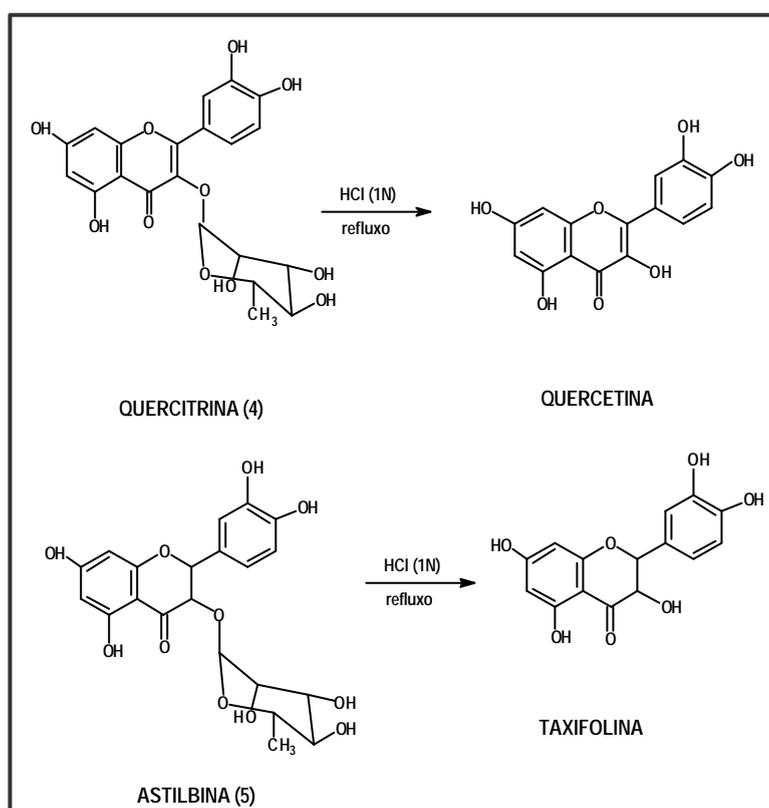


Figura-12: Reações de hidrólise dos flavonóides glicosídeos isolados das folhas de *Virola oleifera*: quercitrina (4) e astilbina (6), fornecem como produto da reação os flavonóides livres; a quercetina e a taxifolina, respectivamente.

Para confirmar a presença destes dois compostos na mesma fração foram realizados espectrogramas de HPLC, com os padrões dos flavonóides

glicosídeos (astilbina e quercitrina), a fração com os dois compostos misturados, e o extrato de acetato de etila (Figura. 13).

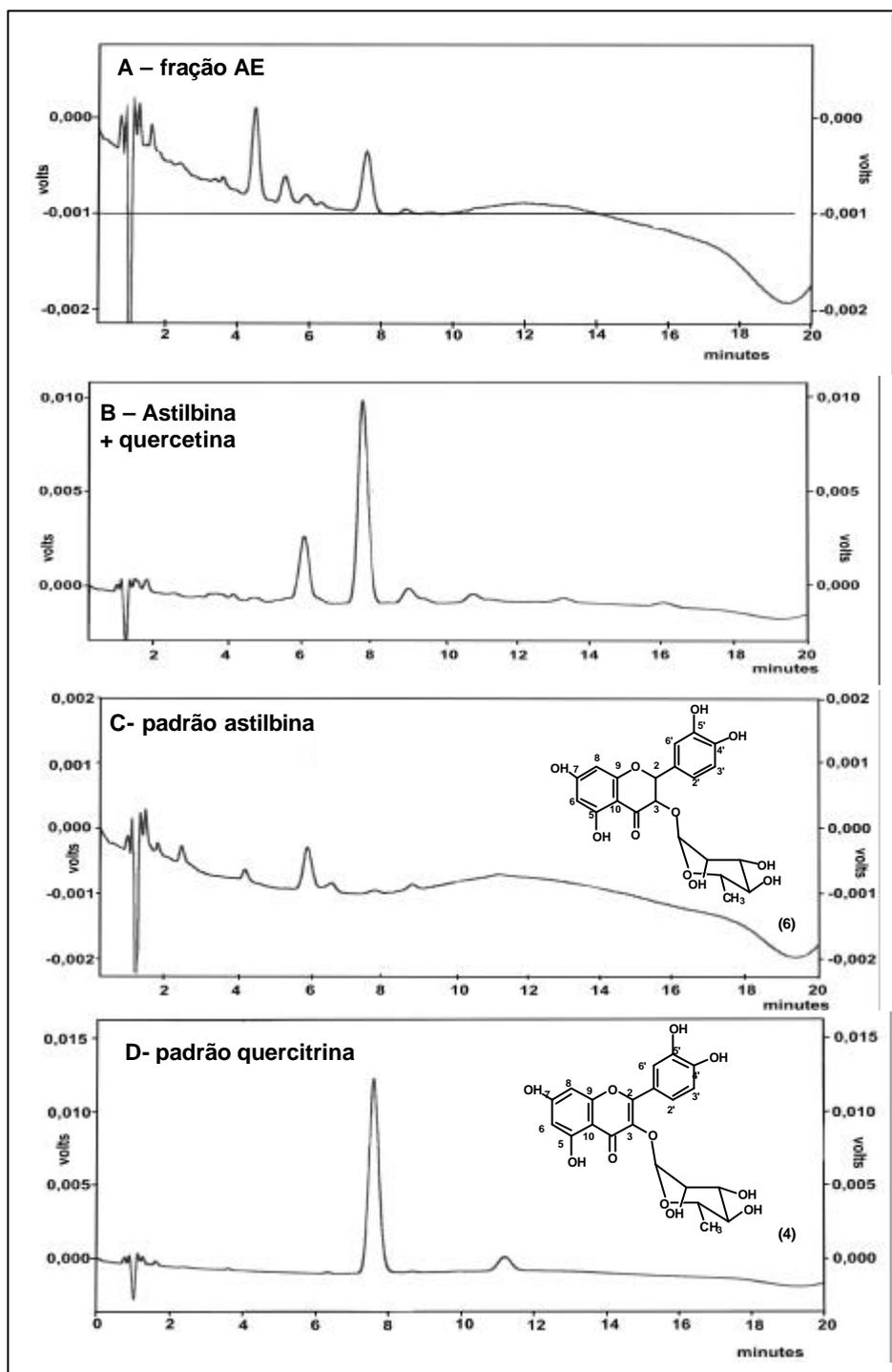


Figura-13: Espectrograma de HPLC do extrato de acetato de etila, da fração semipurificada das folhas de *Virola oleifera* e dos padrões de quercitrina (4) e astilbina.(6)

Os espectros de HPLC confirmaram a mistura de astilbina e quercitrina na fração semipurificada obtida da partição com acetato de etila. Através destes espectros pôde-se verificar também que a proporção encontrada entre astilbina e quercitrina é em torno de 1:3 (observado também pelos espectros de RMN-¹H).

A presença destes dois flavonóides foi confirmada através dos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C (Tabelas-7 e 8; figuras-14 e 15).

Tabela-7 Dados do espectro de RMN-¹H da mistura de flavonóides glicosilados, quercitrina e astilbina, obtido do extrato de acetato de etila das folhas de *Virola oleifera*, comparados aos dados apresentados na literatura.

	QUERCITRINA				ASTILBINA			
	Referência*		Este trabalho		Referência**		Este trabalho	
	(200MHz; DMSO- <i>d</i> 6)		(300MHz; MeOH- <i>d</i> 4)		(500MHz; acetona- <i>d</i> 6)		(300 MHz; MeOH- <i>d</i> 4)	
	δ ppm	J (Hz)	δ ppm	J (Hz)	δ ppm	J (Hz)	δ ppm	J (Hz)
H2	----		----		5,16	d 9,85	5,15	d 10,6
H3	----		----		4,55	d 9,85	5,44	d 10,7
H6	6,2	d 2,0	6,71	d 2,09	5,76	s	6,45	d 2,09
H8	6,38	d 2,0	6,66	d 2,02	5,78	s	6,33	d 2,05
H2'	7,29	d 1,9	8,03	d 2,20	6,88	s	7,63	d 1,60
H5'	6,86	d 8,3	7,70	d 8,32	6,72	s	7,20	d 8,73
H6'	7,52	dd 8,4; 2,2	7,32	dd 8,41; 2,14	6,72	s	7,17	d 1,79
H1''	5,24	d 1,1	5,0	d 0,93	4,04	s	5,0	
H2''	3,96	s	4,45	m	3,41	m	4,45	m
H3''	3,5	dd 8,6; 3,1	4,62	m	3,35	m	4,62	m
H4''	3,21~3,29		4,31	m	3,12	m	4,31	m
H5''	3,08~3,21		5,10	m	3,91	m	5,10	m
H6''	0,81	d 5,5	1,48	d 6,0	1,07	d 5,85	1,70	d 6,09

* BECK et al., 1998

** SOUQUET et al., 2000

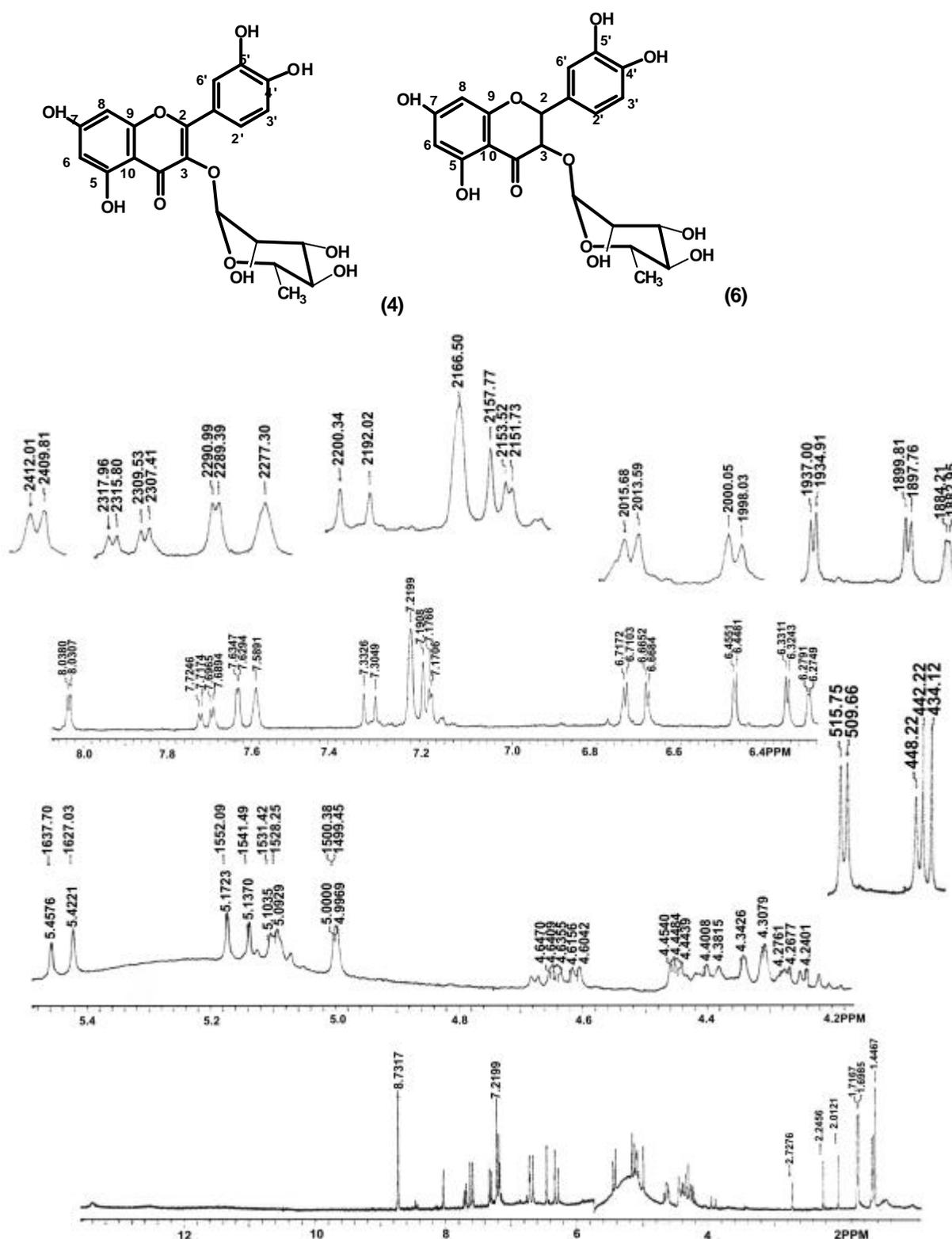


Figura-14: Espectro de RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) da mistura de quercitrina e astilbina isolados da fração acetato de etila das folhas de *Viola oleifera*. Expansão da região dos prótons de metila (1,0~0,5ppm) , da região dos prótons alifáticos (4,5~1,2ppm) e da região dos prótons aromáticos (7,0~6,0ppm). Deslocamentos expressos em ppm e Hz na área expandida (300MHz, TMS como padrão interno).

O espectro de RMN-¹H evidenciou a mistura de flavonóides glicosídeos. Os açúcares ligados aos flavonóides foram identificados como ramnose pela presença dos prótons do grupo metila em 1,48 (6,0Hz) e 1,70ppm (*d* 6,09Hz), respectivamente para quercitrina e astilbina, típico de ramnose (LU e FOO, 1999) e a presença do singlete largo observado em δ 5ppm atribuído ao próton do C1 (LU e FOO, 1997; SOUQUET et al., 2000).

Além dos deslocamentos dos prótons, o espectro de RMN-¹³C (Tabela-8; Figura-15) apresenta 8 deslocamentos próximos de δ 70ppm, atribuídos aos carbonos da hexose, além dos carbonos anoméricos de quercitrina e astilbina, respectivamente em δ 101,8 e 102,1ppm e os carbonos das metilas, com deslocamentos em δ 18,2 e 18,5ppm, para quercitrina e astilbina, respectivamente (BARAKAT et al., 1991). Os outros prótons da ramnose apareceram sobrepostos, como multipletos, com deslocamentos entre δ 4,2 e 5,1ppm, em função da presença de dois grupos ramnosídeos. As diferenças nos deslocamentos observados e os apresentados pela literatura podem ser resultado da diferença no solvente utilizado. Gohar et al. (2000) observaram diferenças de até 0,75ppm nos deslocamentos dos prótons de açúcares ligados a flavonóides e até 5ppm para os carbonos destas estruturas.

Tabela-8: Dados de RMN-¹³C da mistura de flavonóides glicosilados, astilbina e quercitrina, obtidos do extrato de acetato de etila das folhas de *Virola oleifera*, comparados aos dados da literatura.

CARBONO	QUERCITRINA		ASTILBINA	
	Referência*	Este trabalho	Referência**	Este trabalho
	δ (50 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (75 MHz; MeOH- <i>d</i> ₆)	δ (125,7MHz; acetona- <i>d</i> ₆)	δ (75 MHz; MeOH- <i>d</i> ₆)
C2	156,4	157,5	81,08	83,1
C3	134,2	136,0	75,42	76,9
C4	177,7	178,9	194,20	195,4
C5	161,2	163,2	163,20	164,97
C6	98,6	99,5	95,86	97,2
C7	164,1	165,6	170,14	168,6
C8	93,6	94,3	96,7	96,0
C9	157,2	158,0	162,14	162,8
C10	104,0	105,3	100,28	102,0
C1'	120,7	121,97	126,9	128,2
C2'	115,4	115,7	114,67	116,2
C3'	145,1	147,1	145,5	148,0
C4'	148,4	150,3	144,84	147,2
C5'	115,8	116,9	115,3	116,2
C6'	121,0	122,0	118,62	119,6
C1-ram	101,8	103,8	99,7	102,1
C2-ram	70,3	71,8	69,63	71,9
C3-ram	70,5	73,1	70,27	73,7
C4-ram	71,1	70,4	71,48	71,6
C5-ram	70,0	72,4	68,68	72,4
CH3-ram	17,4	18,2	17,5	18,5

* BECK et al., 1998.

** SOUQUET et al., 2000

Tendo identificado o grupo glicosídeo, os flavonóides foram identificados basicamente pelos deslocamentos observados no espectro de carbono para os carbonos C2 e C3 do anel C. Para quercitrina estes deslocamentos foram observados em 157,5 e 136,0ppm respectivamente a C2 e C3 e para astilbina estes mesmos carbonos foram observados em 83,1 e 76,9ppm. Os deslocamentos para campo mais alto observado para os carbonos de quercitrina indicaram a presença de um grupo olefínico, indicando ser resultado da estrutura de um flavonol.

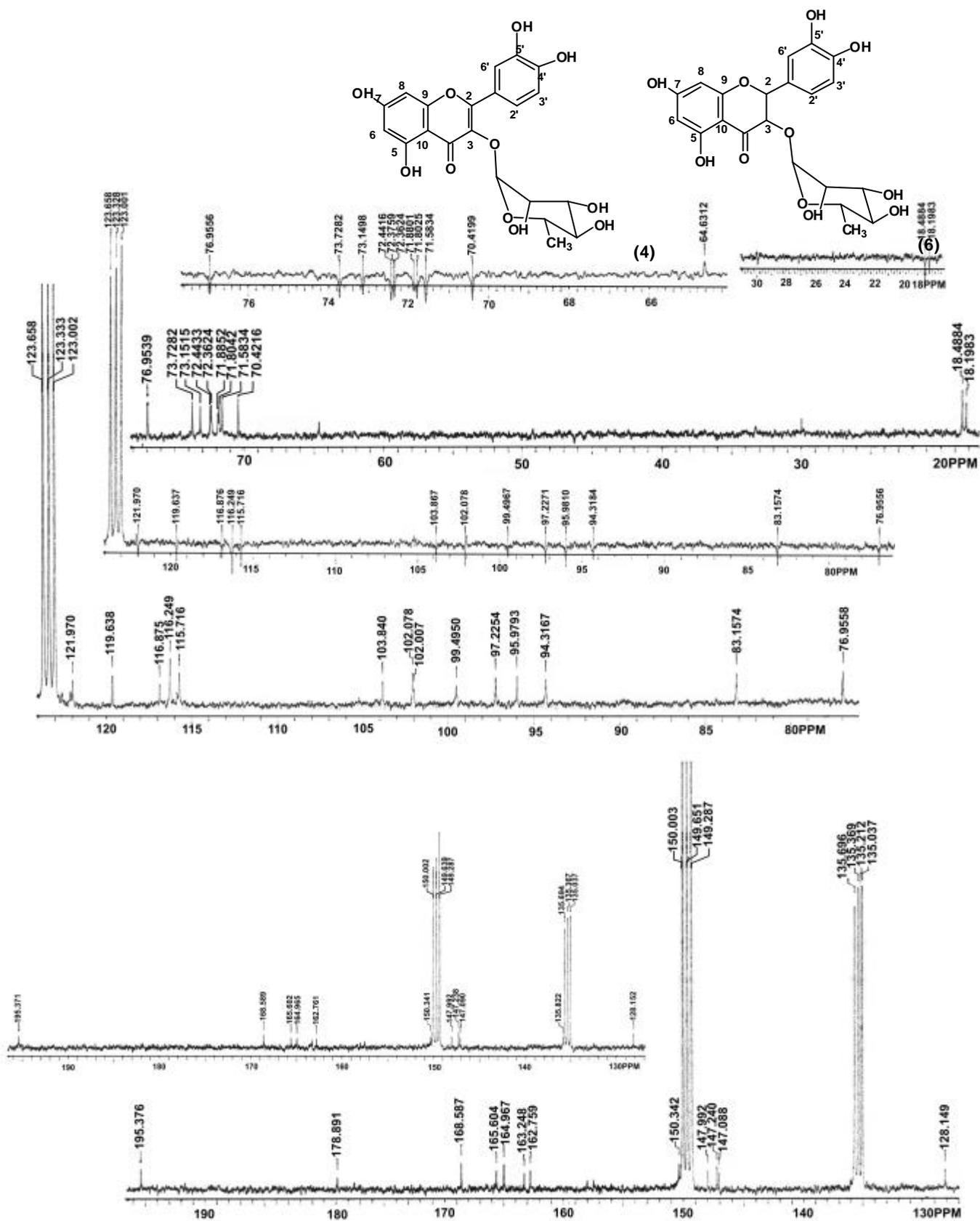


Figura-15: Espectro de RMN- ^{13}C e APT (75MHz, CDCl_3) da mistura de quercitrina e astilbina, isolada da fração acetato de etila das folhas de *Virola oleifera*.

Os deslocamentos observados no espectro de RMN-¹H para os prótons aromáticos foram bem diferentes, indicando que esta mistura de flavonóides era constituída por um flavonol (quercitrina) e uma flavanona (astilbina). Os deslocamentos observados em δ 6,45 e 6,33ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 da astilbina, respectivamente; os deslocamentos observados em δ 6,71 e 6,66ppm, aos mesmos hidrogênios, da quercitrina. Os deslocamentos observados em δ 7,63; 7,20 e 7,17ppm, atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente, do anel B da astilbina. Estes mesmos prótons foram observados na quercitrina em δ 8,03; 7,7 e 7,32ppm.

O espectro de RMN-¹³C evidenciou as diferenças estruturais dos dois flavonóides, além da diferença observada entre os carbonos C-2 e C-3 saturados da astilbina e os carbonos olefínicos da quercitrina; já discutidos anteriormente. Foram observados os seguintes deslocamentos que os diferenciam: δ 195,4 e 128,2ppm atribuídos respectivamente aos carbonos C-4 e C-1' da astilbina, os quais foram observados em δ 178,9 e 121,97ppm para os mesmos carbonos em quercitrina. Os demais deslocamentos são apresentados na tabela-8.

4.2 Fitoquímica das folhas de *Hyeronima alchorneoides*

4.2.1 Obtenção dos extratos das folhas de *Hyeronima alchorneoides*

As folhas de *Hyeronima alchorneoides*, coletadas em setembro de 1999, foram secas a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 dias, cortadas em pequenos pedaços e pesados, nos fornecendo 685,7g de peso das folhas secas. Estas folhas foram maceradas durante 10 dias em metanol P.A. a temperatura ambiente, e então o solvente foi evaporado sob pressão reduzida a 60°C, até obter aproximadamente 100ml, o qual foi denominado de extrato metanólico total de *H. alchorneoides*. Foi estimado o seu peso, utilizando a mesma técnica adotada para as folhas de *V. oleifera*, obtendo 59,5g para este extrato, correspondendo a um rendimento de 8,7% em relação ao peso das folhas secas.

O extrato metanólico bruto foi então particionado utilizando solventes de polaridades crescentes: n-hexano (10x 200ml), diclorometano (5 x 200ml) e acetato de etila (5 x 200ml), obtendo assim uma primeira separação a partir da diferença na polaridade dos compostos presentes nestas folhas. Todos os solventes foram evaporados sob pressão reduzida a temperatura de aproximadamente 60°C, secos e pesados. Os respectivos pesos e rendimentos em relação ao peso seco das folhas e em relação ao extrato metanólico são apresentados na Tabela-9.

Tabela-9: Distribuição das massas e rendimentos obtidos dos extratos metanólico, hexânico, diclorometânico e acetato de etila, das folhas de *Hyeronima alchorneoides*.

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)	
		Sobre o extrato metanólico	Sobre o peso seco das folhas
Metanólico	59,5	100	8,7
Hexânico	15,1	25,4	2,2
diclorometânico	0,7	1,2	0,10
Acetato de etila	6,6	11,1	1,0
total	22,4	37,6	3,3

Os rendimentos foram calculados em relação ao extrato metanólico e em relação ao peso seco das folhas (685,7g).

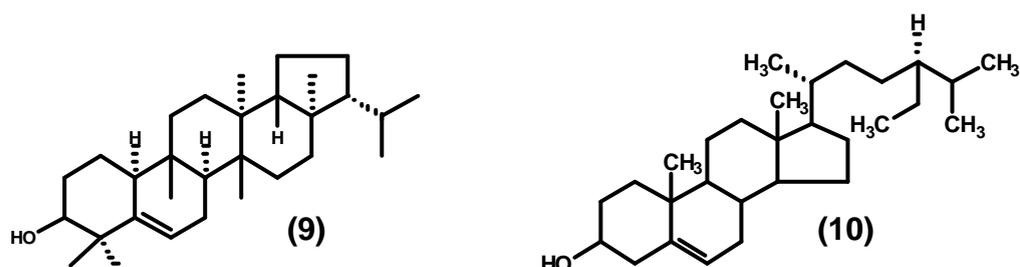
Os rendimentos dos extratos obtidos para as folhas de *H. alchorneoides* apresentaram uma distribuição semelhante ao observado para as folhas de *V. oleifera*. O extrato que apresentou o menor rendimento foi o de diclorometano, do qual foi obtido uma massa de 0,7g, o que corresponde a um rendimento de 1,2% em relação ao extrato metanólico bruto e apenas 0,1% em relação ao peso da folhas secas. A fração aquosa, mais polar, foi descartada, da mesma forma que a realizada com a fração mais polar de *V. oleifera*, por apresentar na sua constituição apenas açúcares, como comprovado por CCD (MATOS, 1997).

Da mesma forma que observado para as folhas de *V. oleifera*, o menor rendimento foi obtido para a fração diclorometânico, cuja polaridade é intermediária entre os outros dois solventes utilizados. Pode-se concluir também neste caso, que as folhas desta planta, apresentam compostos que são ou muito apolares, extraídos pelo n-hexano, ou muito polares, extraídos com acetato de etila.

4.2.2 Isolamento e identificação dos compostos majoritários das folhas de *Hyeronima alchorneoides*.

4.2.2.1 Fração Hexânico

Uma parte da fração *n*-hexano (5g) foi separada e utilizada para as determinações cromatográficas, com o intuito de isolar os compostos majoritários. A cromatografia de coluna foi desenvolvida, utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de solventes como eluente. Estas misturas foram preparadas a partir de 100% de *n*-hexano e proporções crescentes de acetato de etila, até atingir 100% deste último, obtendo assim gradientes crescentes de polaridade. As frações foram recolhidas em frascos de 10ml e as suas composições foram verificadas através de CCD. As técnicas adotadas para o isolamento dos compostos foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente para as folhas *V. oleifera*.



Esta fração nos forneceu dois triterpenos, o simiarenol **(9)** que apresenta o esqueleto hopano, muito mais raro que o outro compostos isolado, o esteróide β -sitosterol **(10)**. Ambos os compostos foram identificados através dos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C e MS, comparados aos espectros referenciados e foram isolados pela primeira vez nesta planta.

Os triterpenos são amplamente difundidos entre os produtos naturais, sendo produzidos pelos microorganismos e fungos, passando pelo reino vegetal e animal, podendo ser originado a partir dos organismos terrestres, ou aquáticos, de água doce ou marinha (ROBBERS et al., 1996). Atualmente existem cerca de quatro mil triterpenos identificados como produtos naturais, distribuídos em mais de 40 tipos diferentes de esqueletos pentacíclicos ou tetracíclicos.

A biossíntese dos triterpenos (Fig.16) envolve três unidades de acetil-CoA nos primeiros estágios de sua formação, os quais são transformados em uma seqüência de etapas no ácido mevalônico. Na etapa seguinte, este ácido é fosforilado duas vezes fornecendo o 5-pirofosfatomevalonato, o qual é então descarboxilado formando o isopentenil-pirofosfato, conhecido como o isopreno ativo, formado por 5 carbonos, sendo a unidade básica para a formação de terpenos e esteróides. As ligações cabeça-cauda destes compostos formam os conhecidos terpenóides, sesqui (C15) e diterpenos (C20), porém as ligações cabeça-cabeça entre as duas moléculas de farnesil-pirofosfato (C15) darão origem ao esqualeno, o precursor dos triterpenos (C30). Durante as últimas etapas desta biossíntese, pode ocorrer a perda de pequenos fragmentos de carbonos, formando então, moléculas com menos de 30 carbonos, como por exemplo, os esteróides, que apresentam 27 carbonos na sua composição (ROBBERS et al., 1996; TORSSELL, 1997 e dos SANTOS et al., 1999), incluindo o β -sitosterol, isolado das folhas de *Hyeronima alchorneoides*.

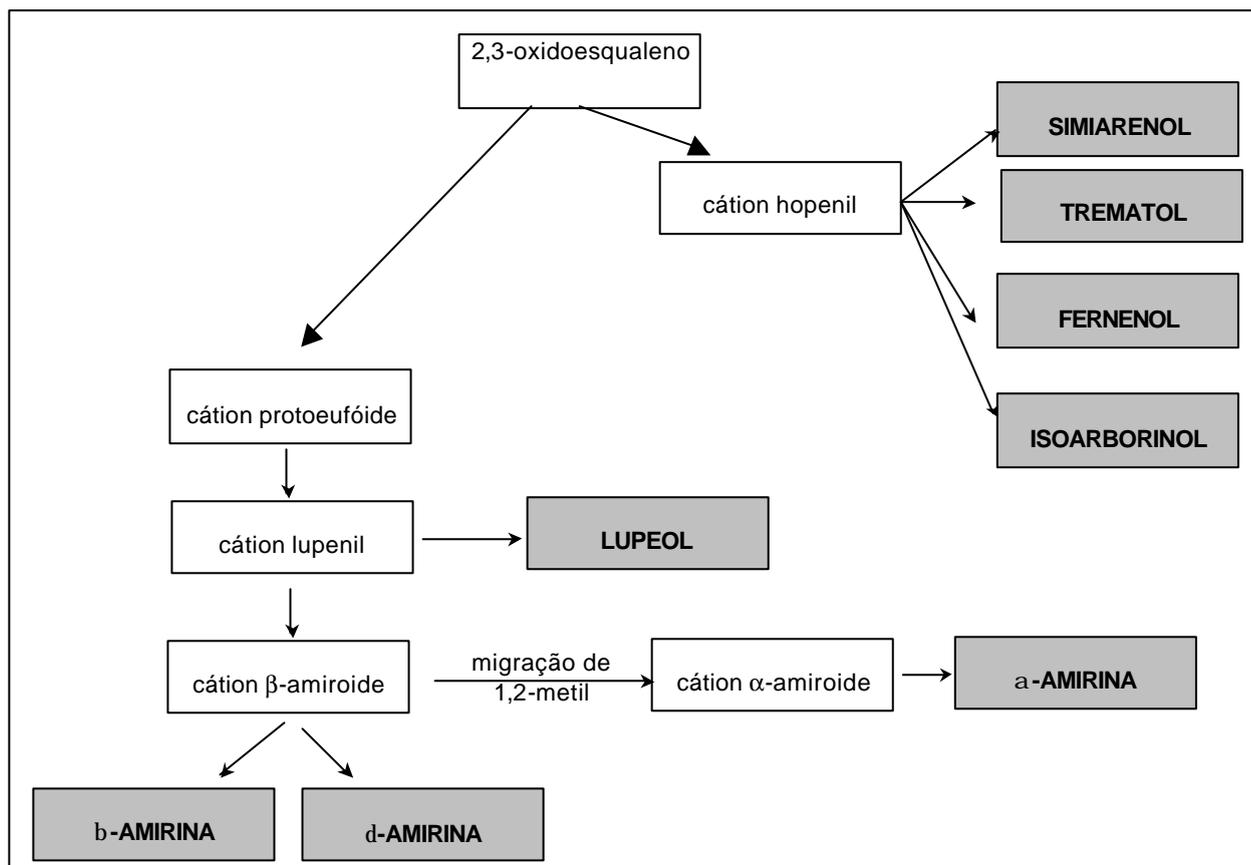


Figura-16: Esquema da biossíntese de vários triterpenos, incluindo o simiarenol (6), isolado das folhas de *Hyeronima alchorneoides*. Baseado em HEUPEL (1985) e NISHIMOTO et al. (1968).

A ocorrência do triterpeno simiarenol (9) sempre foi acompanhada de outros triterpenos, como a fiedelina (GUNASEKERA e SULTANBAWA, 1977; 1983), fernenol (NISHIMOTO et al., 1968; LAO et al., 1984), isoarborinol (NISHIMOTO et al., 1968; HEUPEL, 1985), α,β,δ -amirina (LAO et al, 1984; HEUPEL, 1985) assim como do esteróide β -sitosterol (OGUNKOYA et al., 1972; DAHANAYAKE et al., 1974; SOMNATHAN et al., 1974, GUNASEKERA e SULTANBAWA, 1977; HEUPEL, 1985 entre outros), observado também neste trabalho.

Todos os triterpenos citados, assim como o esteróide, apresentam o mesmo precursor na rota biossintética, o 2,3-oxidoesqualeno (Figura-16) (HEUPEL,

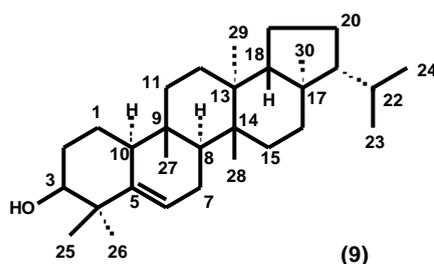
1985; BIAVATTI, 2001), podendo desta forma, justificar a presença sempre conjunta destes compostos. Trabalho anterior realizado com as folhas de *Hyeronima alchorneoides* confirma também a presença de β -sitosterol, além de outros dois compostos que apresentam o mesmo precursor: estigmasterol e o triterpeno lupeol (TINTO et al., 1991).

4.2.2.1.1 Simiarenol

O triterpeno simiarenol, derivado do seu precursor esqualeno segundo esquema representado na figura-16, foi isolado pela primeira vez das folhas de *Rhododendron simiarum* (Ericaceae) em 1960, identificado como β -hidroxi-E:B-friedo-hop-5-eno. A identificação deste novo composto foi realizada através da comparação de espectros de RMN-¹H entre triterpenos similares obtidos anteriormente, como o glutinol, juntamente com as variações observadas nos espectros de RMN-¹H deste composto após as reações de acetilação, oxidação e redução (ARTHUR et al., 1965 e APLIN et al., 1966). Apesar deste composto ter sido isolado há mais de 40 anos, a estereoquímica confirmada através dos espectros de RMN-¹H e ¹³C, foi realizada apenas recentemente (CHAKRAVARTY et al., 1994).

Apesar de ser um triterpeno mais raro que o sitosterol, o simiarenol (**9**), já foi identificado em algumas espécies além do primeiro registro (*R. simiarum*), sendo, no entanto observada com mais frequência na casca do caule da planta do que nas folhas. A sua presença já foi registrada nas cascas de *Trema orientalis* (Ulmaceae) (OGUNKOYA et al., 1972) e *Caraipa densifolia* (Clusiaceae)

(GUNASEKERA et al., 1983); nas cascas de caules de três espécies do gênero *Calophyllum* (Guttiferae) *C. walkeri* (DAHANAYAKE et al., 1974); *C. trapezifolium* (SOMANATHAN et al., 1974) e *C. cuneifolium* (GUNASEKERA et al., 1977); do rizoma de *Imperata cylindrica* (Gramineae) (NISHIMITO et al., 1968), das folhas de *Sorghum bicolor* (Graminae) (HEUPEL, 1985) e *Artemisia argyi* (Compositae) (LAO et al., 1984). Apesar desta distribuição, até o momento não foi observado nenhum registro em espécies da família Euphorbiaceae, sendo este o primeiro registro da tal ocorrência.



O simiarenol **(9)**, um triterpeno pentacíclico alcoólico, foi isolado da fração hexano, fornecendo 171,5mg do mesmo, o que corresponde a um rendimento de 0,29% do extrato metanólico bruto e 0,025% do peso das folhas secas. Este composto foi obtido na forma de um sólido branco (PF=200-207°C); $[\alpha]_D +57,5$ (c 0,2 em CHCl_3) (PF=210°C; $[\alpha]_D +50,8$ (c 1,21), segundo Aplin e colaboradores (1966)) e a identificação deste composto foi realizada através da análise de espectros de RMN- ^1H (Tabela-10, Figura-17) e de RMN- ^{13}C APT (Tabela-11, Figura-18) comparada às apresentadas na literatura (HEUPEL, 1985 e CHAKRAVARTY et al., 1994).

O espectro de RMN-¹H (Figura-17) mostra uma série de deslocamentos entre o d 1,0 e 2,0ppm, e dois picos distintos, um singlete a d 3,47ppm, atribuído ao H3 e um multipletto a d 5,62ppm, atribuído ao H6 olefínico. Este padrão de deslocamento caracteriza os espectros de RMN-¹H de triterpenos (CHAKRAVARTY et al., 1994), dificultando a identificação de todos os prótons dos grupos metilas, metilenos e metínico. Desta forma, por comparação com os espectros da literatura pudemos identificar apenas alguns grupos metilas e metínicos, apresentados na Tabela-10. A utilização do espectro de RMN-¹³C foi neste caso fundamental para identificação deste composto.

Tabela-10: Dados do espectro de RMN-¹H do simiarenol (6), obtido do extrato hexânico das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, comparados aos dados descritos na literatura.

HIDROGÊNIO	Referência* [§] (200MHz, CDCl ₃)		Este trabalho (300 MHz, CDCl ₃)	
	d	J (Hz)	d	J
H-2 (2H)	1,70; 1,86	s	1,85	s
H-3 (1H)	3,469	m	3,47	s
H-6 (1H)	5,616	t 4	5,62	m
H-19 (2H)	1,26; 1,36	s	1,25	s
H-20 (2H)	1,19; 1,82	s		s
H-23 (3H)	1,045	s	1,05	s
H-24 (3H)	1,141	s	1,14	s
H-25 (3H)	0,895	s	0,89	s
H-26 (3H)	1,005	s	1,0	s
H-27 (3H)	0,925	s	0,92	s
H-28 (3H)	0,780	s	0,78	s
H-29 (3H)	0,888	d 6,5	0,88	d 5,35
H-30 (3H)	0,829	d 6,5	0,82	d 6,5

* HEUPEL, 1985; [§] (500MHz, CDCl₃) CHAKRAVARTY et al., 1994.

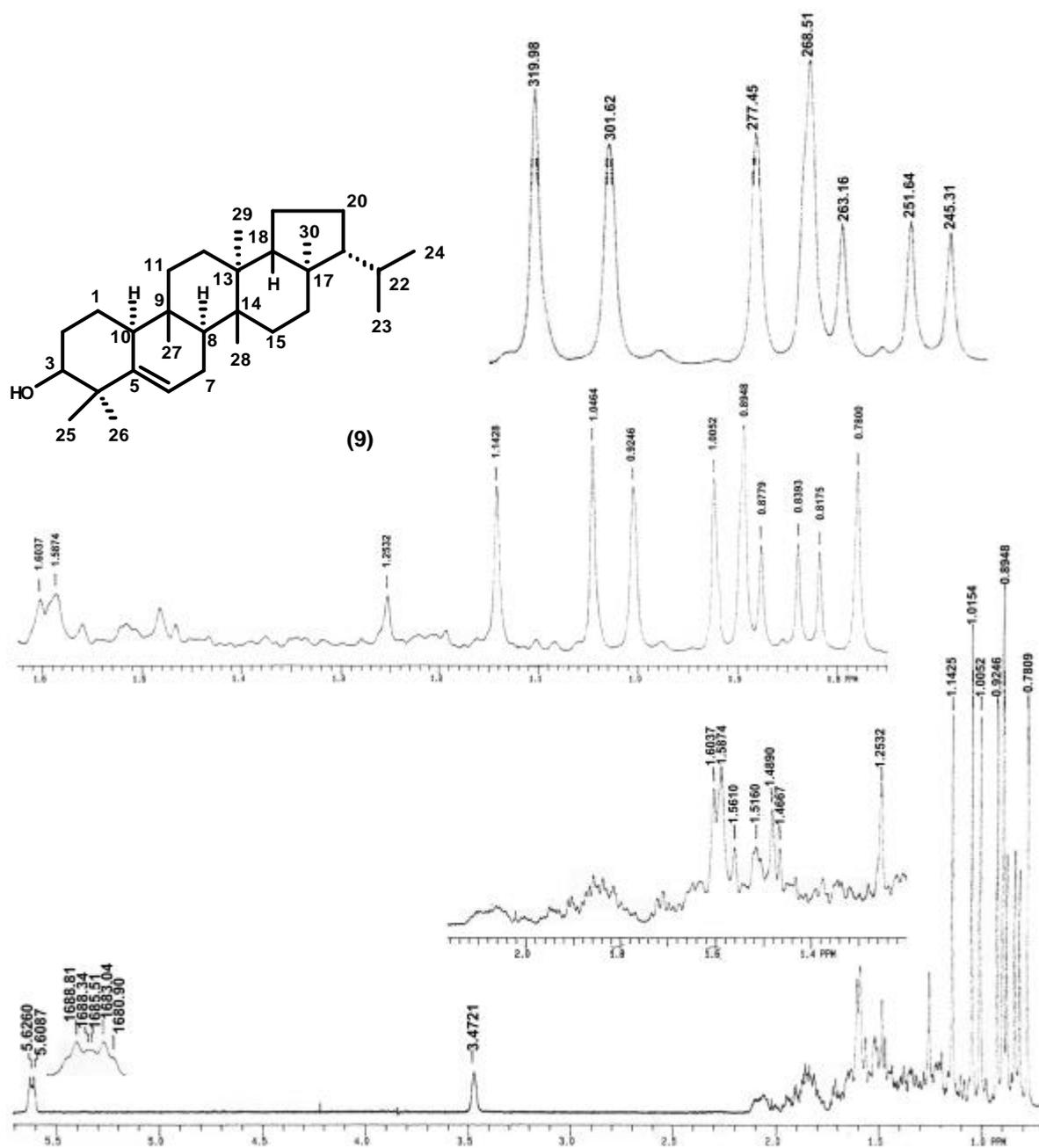


Figura-17: Espectro de RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) do triterpeno Simiarenol (6), isolado da fração hexano das folhas de *Hyeronima alchorneoides*. Expansão da região com deslocamento entre d1,6~0,6ppm.

O espectro de RMN-¹³C (Tabela-11 e fig-18) mostra que a maioria dos carbonos deste composto estão blindados (apresenta-se em campo alto); não

apresentam núcleos aromáticos, mas possivelmente estão na forma de ciclos pentanos ou hexanos saturados já que apresentam deslocamentos entre δ 25 e 30ppm, e ainda vários grupos metilas (δ próximo de 15ppm) anexados. Podendo apresentar um grupo olefínico e uma substituição alcoólica. Os únicos carbonos com deslocamentos em campo baixo foram observados para δ 141,99 e 121,98ppm, os quais demonstram a presença de uma ligação dupla, sendo portanto atribuídos aos C-5 e C-6, respectivamente. Além disso, o deslocamento observado em δ 76,35ppm, indica a presença de um grupo alcoólico, sendo atribuído ao C-3. Os agrupamentos metilas foram determinados por comparação aos publicados por Chakravarty e colaboradores (1994), os quais identificaram os mesmos, através de experimentos em 2D, como o HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), definindo a estrutura básica deste triterpeno.

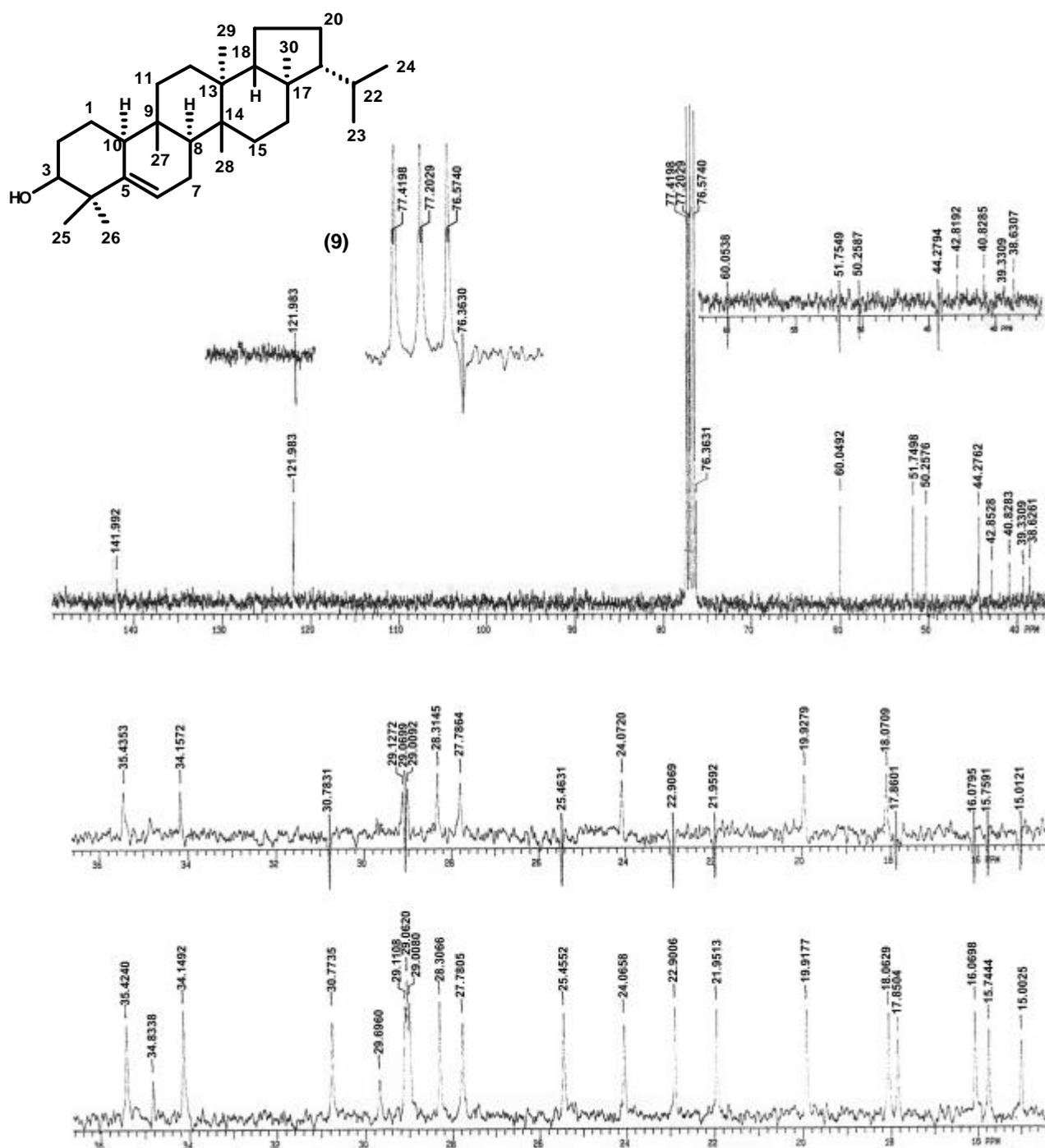
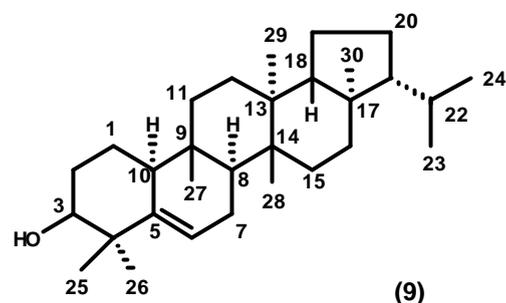


Figura-18: Espectro de RMN-¹³C e APT (75MHz, CDCl₃) do triterpene Simiarenol (6), isolado da fração hexano das folhas de *Hyeronima alchorneoides*.

Tabela-11: Dados do espectro de RMN-¹³C do simiarenol (9), obtido do extrato hexânico das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, comparados aos dados descritos na literatura.

CARBONO	d (ppm) -Referência* (125MHz, CDCl ₃)	d (ppm) -espectro (75MHz, CDCl ₃)
1	18,06	18,06
2	27,78	27,78
3	76,36	76,35
4	40,82	40,82
5	141,97	141,99
6	121,99	121,98
7	24,05	24,06
8	44,25	44,27
9	34,82	34,83
10	50,23	50,26
11	34,14	34,15
12	29,00	29,00
13	38,61	38,64
14	39,31	39,33
15	29,10	29,11
16	35,41	35,42
17	42,79	42,81
18	51,74	51,75
19	19,91	19,93
20	28,32	28,31
21	60,03	60,04
22	30,79	30,78
23	29,07	29,06
24	25,48	25,46
25	17,87	17,85
26	15,75	15,74
27	15,00	15,00
28	16,07	16,07
29	21,96	21,95
30	22,93	22,90



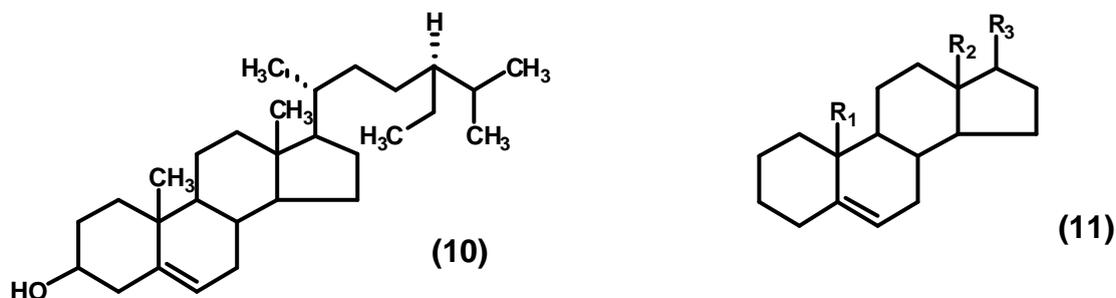
* CHAKRAVARTY, 1994.

4.2.2.1.2 *b*-Sitosterol

Os esteróides compreendem uma grande variedade de compostos, os quais são classificados de acordo com a sua função biológica, podendo ser classificados como ácidos biliares, heterosídeos cardiotônicos, sapogeninas, hormônios sexuais, óleos vegetais, entre outros; todos de fundamental importância para os processos biológicos, vegetais ou animais. Como os insetos não são capazes de sintetizar o esqueleto básico dos esteróides, e estes são importantes,

por exemplo, no processo de muda, esta carência metabólica fortifica a dependência entre os insetos e as plantas, tornando estes últimos como fornecedores do material primário para a síntese dos outros esteróides (ecdisona), sendo o sitosterol, o esteróide mais comum utilizado para este fim (HARBORNE, 1993).

Todos os esteróides apresentam um esqueleto básico (11), formado por 4 anéis, o que os faz apresentar esta grande variabilidade consiste nas variações das cadeias laterais R_1 , R_2 e R_3 , e em segundo lugar nas diferenças entre as substituições nucleares e o grau de insaturações observadas nos anéis (GROS et al., 1985). R_1 e R_2 são normalmente formados por grupos metilas, oxigenados ou não, e a cadeia lateral, R_3 , é formada por uma cadeia alifática, formada por 2, 4, 5, 8, 9 ou 10 carbonos. Quando esta cadeia estiver ausente, esta posição se encontra oxigenada.



O esterol mais comum encontrado nos animais é o colesterol, tendo como seu precursor a lanolina, o qual é também encontrado nos tecidos vegetais. O ergosterol é o esterol mais comum encontrado entre os fungos, formado por uma cadeia de 28 carbonos, também conhecido como provitamina D, pois sob radiação ultravioleta ocorre uma série de isomerizações e subsequente abertura do anel B, formando a vitamina D. No reino vegetal, o esterol mais comum é o *b*-sitosterol,

formado por 29 carbonos, é também conhecido como stigmast-5-en-3**b**-ol, e apresenta a mesma rota biossintética apresentada para o triterpeno simiarenol, tendo como seu precursor, o (3s)-2,3-epóxido-esqualeno (GROS et al., 1985 e ROBBERS et al., 1996). A sua biossíntese ocorre nas últimas etapas da biossíntese dos triterpenos, com a perda de alguns carbonos, se caracterizando, por compostos tetracíclicos no seu esqueleto principal.

O **b**-sitosterol (**10**) foi isolado da fração hexano das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, nos fornecendo 33mg, o que corresponde a um rendimento de aproximadamente 0,17% do extrato metanólico bruto e 0,0145% do peso seco das folhas. Obtido na forma de um sólido branco, apresentou um P.F. de 128-131,4°C (P.F. 135°C; SOMANATHAN e SULTANBAWA, 1974).

A sua identificação foi realizada através de comparação do R_f com um padrão de **b**-sitosterol, isolado anteriormente no laboratório a partir de outras plantas, além da análise dos espectros de IV e RMN-¹H e ¹³C.

O espectro de RMN-¹³C APT (Figura-19, Tabela-12) nos forneceu o esqueleto básico deste esteróide, indicando a presença de 29 carbonos, dos quais 13 na forma de carbonos secundários (-CH₂) e/ou quaternários e 16 distribuídos entre carbonos primários (-CH₃) e/ou terciários (-CH).

Os deslocamentos dos carbonos foram em geral observados em campo alto (δ menores que 70 ppm), indicando a ausência de grupos olefínicos, aromáticos, carboxílicos, éteres ou outros grupos provocando o desblindamento dos mesmos (DELLE MONACHE, 2001). As únicas exceções foram observadas para os carbonos com deslocamentos em δ 121,7 e 140,7ppm atribuídos aos carbonos da insaturação do anel B.

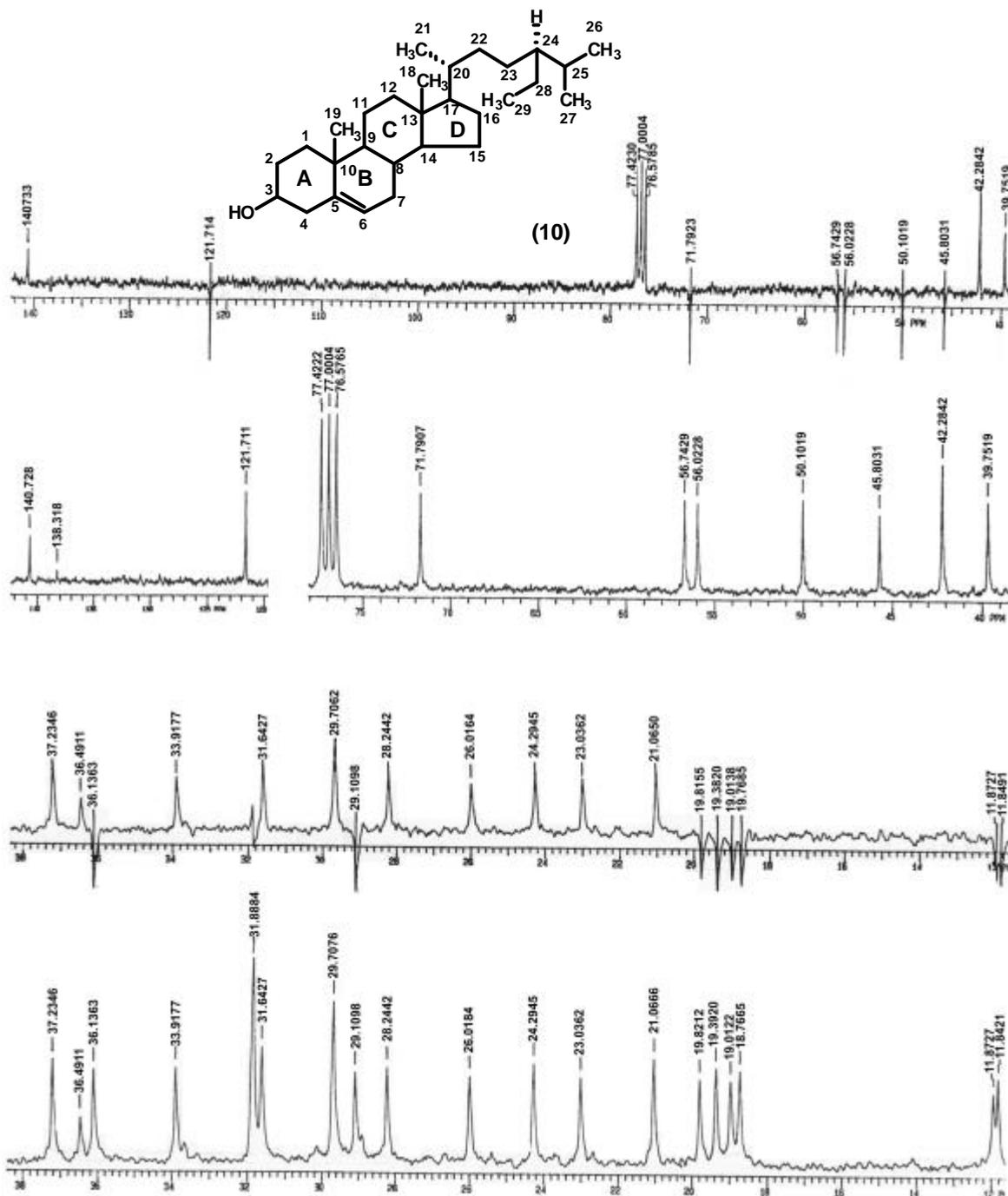


Figura-19: Espectro de RMN-¹³C do *b*-sitosterol isolado das folhas de *Hyeronima alchorneoides*. (75 MHz, CDCl₃, TMS como padrão interno).

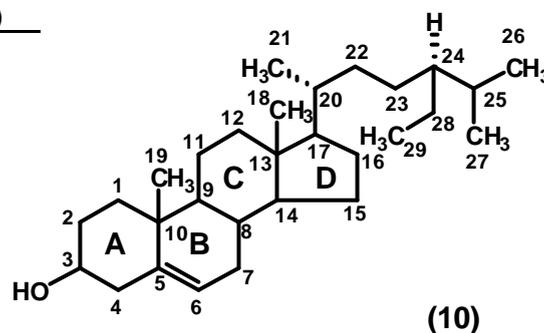
Através do espectro de APT verificou-se que o carbono com deslocamento em δ 121,7ppm apresentou um sinal negativo, indicando ser neste caso, um carbono terciário e, portanto foi atribuído ao carbono C5 da insaturação. O

carbono com deslocamento em δ 140,7ppm, da mesma forma, foi identificado neste caso, como sendo um carbono quaternário, sendo atribuído ao carbono C6 do composto.

O espectro de RMN- ^{13}C APT (Figura-19) mostra a presença de 16 sinais negativos, podendo ser atribuídos aos CH ou CH₃ do composto. Os deslocamentos em campo alto (δ menor que 20ppm) foram atribuídos aos 6 grupos metilas, a saber: C18, C29, C21, C27, C19 e C26, correspondendo respectivamente aos deslocamentos δ 11,8; 12,0; 18,8; 19,01; 19,4 e 19,8ppm. Os outros sinais negativos foram atribuídos aos 10 carbonos terciários do composto.

Tabela-12: Dados do espectro de RMN- ^{13}C do β -sitosterol, obtido do extrato hexânico das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, comparados aos dados descritos na literatura.

CARBONO	d (ppm) -Referência* (50MHz, CDCl ₃)	d (ppm) -espectro (75MHz, CDCl ₃)
1	37,3	37,23
2	31,7	31,6
3	71,8	71,8
4	42,3	42,3
5	140,8	140,7
6	121,7	121,7
7	31,9	31,9
8	31,9	31,9
9	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,1	21,1
12	39,8	39,7
13	42,3	42,3
14	56,7	56,7
15	24,3	24,3
16	28,2	28,2
17	56,1	56,0
18	11,9	11,8
19	19,4	19,4
20	36,2	36,1
21	18,8	18,8
22	33,9	33,9
23	26,1	26,0
24	46,0	45,8
25	28,9	29,1
26	19,8	19,8
27	19,0	19,01
28	23,1	23,03
29	12,3	12,0



* HESS, 1995.

Os sinais positivos observados no espectro de APT indicam carbonos quaternários ou secundários. O Composto **b**-sitosterol apresenta apenas 3 carbonos quaternários os C5, C10 e C13, identificados como sendo os carbonos com deslocamentos em δ 140,7ppm; 36,5 e 42,3ppm, respectivamente. Os demais carbonos com sinais positivos foram então atribuídos aos 10 carbonos secundários do composto.

O espectro de RMN-¹H (Figura-20), mostra uma sobreposição de sinais no campo alto, em função do grande número de metilas e etilas presentes neste composto. Apenas alguns prótons puderam ser identificados e comparados aos dados da literatura, sendo estes tabelados (Tabela-13).

O multiplete com deslocamento em δ 5,3ppm foi atribuído ao próton olefínico e o próton com deslocamento em δ 3,5ppm, ao próton H-3, desblindado em função da presença do grupo OH acoplado neste carbono.

A expansão do espectro da região dos grupos metilas nos permitiu identificá-los, calculando o seu acoplamento (J). Assim, as metilas dos carbonos C-18 e C-19 foram identificados como singletos, com deslocamento em δ 0,68ppm e 1,00ppm, respectivamente. Não apresentam acoplamentos com os prótons vizinhos, em função destes estarem vinculados aos carbonos quaternários do composto. Diferindo dos outros grupos metilas (Me-21, Me-26, Me-27 e Me-29) que se apresentam como dubletos, apresentando um acoplamento com o próton do carbono vizinho.

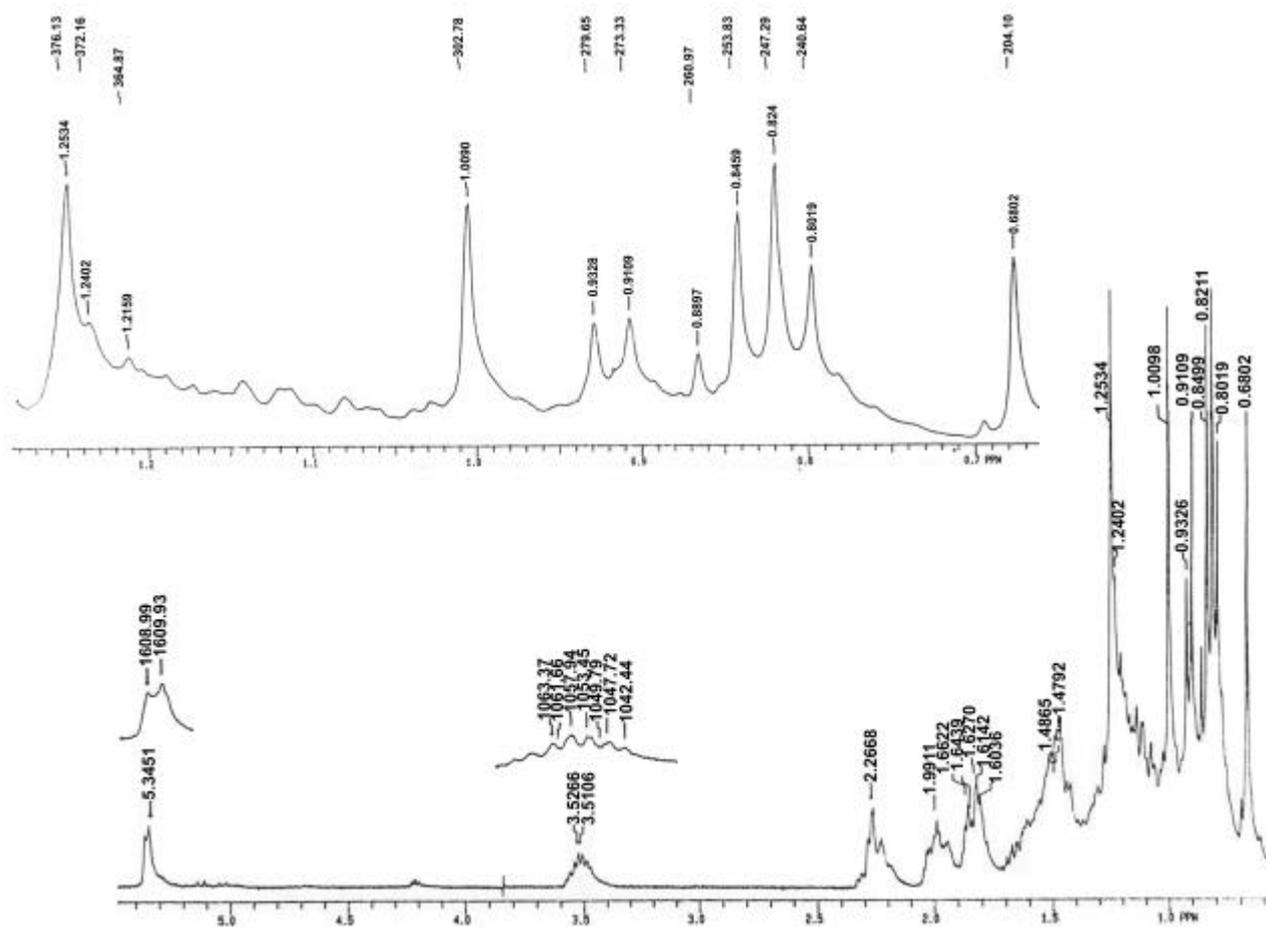
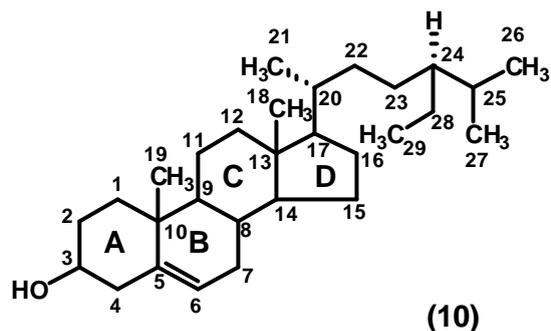


Figura-20; Espectro de RMN-¹H do *b*-sitosterol isolado das folhas de *Hyeronima alchorneoides*. (300 MHz, CDCl₃; TMS como padrão interno).

Desta forma, as metilas com deslocamentos em δ 0,813 (d, $J=6,75\text{Hz}$); 0,835 (d, $J=6,54\text{Hz}$); 0,856 (d $J=7,14\text{Hz}$) e 0,92 (d, $J=6,52\text{Hz}$), foram atribuídos respectivamente aos prótons do grupo metila Me-27; Me-26; Me-29 e Me-21.

Tabela-13: Dados do espectro de RMN¹H do β-sitosterol, obtido do extrato hexânico das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, comparados aos dados descritos na literatura.

HIDROGÊNIO	Referência* (200MHz, CDCl ₃)		Este trabalho (300 MHz, CDCl ₃)	
	d	J (Hz)	d	J (Hz)
H1				
H2				
H3	3,5	m	3,5	m
H4				
H6	5,3	m	5,3	m
H7				
H8				
H9				
H11				
H12				
H14				
H15				
H16				
H17				
Me-18	0,68	s		
Me-19	1,00	s		
H20				
Me-21	0,92	d 6,5	0,92	d 6,52
H22				
H23				
H24				
H25				
Me-26	0,83	d 6,8	0,835	d 6,54
Me-27	0,81	d 6,8	0,813	d 6,75
H28				
Me-29	0,84	t 7,2	0,856	d 7,14

* HESS,1995.

4.2.2.2 Fração Diclorometânico

O extrato do diclorometano apresentou baixo rendimento na sua extração, sendo de apenas 0,7g, correspondendo a 1,2% do extrato metanólico bruto, em relação à fração hexânico (25%). Como o perfil cromatográfico apresentado pelo CCD mostrou que a sua composição foi bastante semelhante ao perfil apresentado pelo extrato hexânico, não foram realizadas as separações neste extrato.

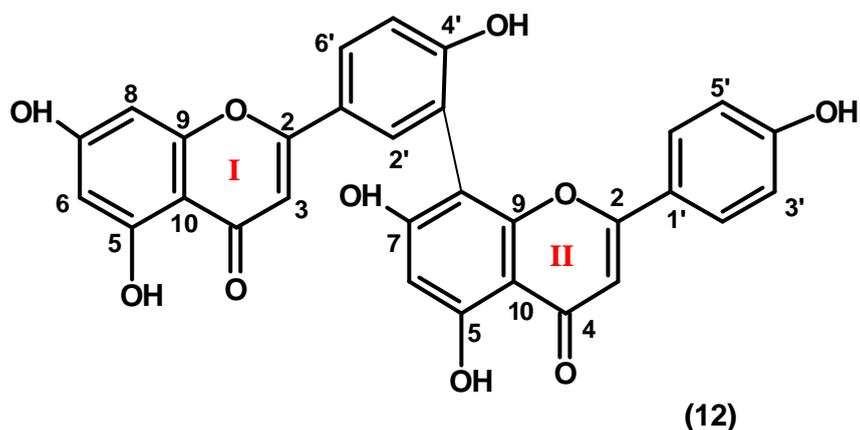
4.2.2.3 Fração Acetato de Etila

Parte do extrato acetato de etila foi utilizado para as determinações fitoquímicas. 3,0g deste extrato foram retirados para a purificação dos compostos através de cromatografia de coluna, utilizando sílica-gel como fase estacionária e uma mistura de clorofórmio e metanol como fase móvel. O eluente foi preparado partindo de 100% de CHCl_3 até 100% de MeOH, obtendo misturas de diferentes proporções, com polaridades crescentes. As separações foram acompanhadas através das CCDs, e as frações que obtinham perfis semelhantes foram unidas e recromatografadas, no caso de frações semipurificadas.

Este extrato não nos forneceu nenhum composto purificado, assim uma outra fração deste mesmo extrato foi utilizada para a separação, neste caso utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conhecida como HPLC (High Performance Liquid Chromatography), acoplada ao detector de varredura de UV. Para esta técnica, foi utilizada uma coluna de fase reversa, LiChrospher® 100 RP-18, de 250x10 de dimensões e partículas de 10 μm de diâmetros. A fase móvel foi composta por uma mistura de Acetonitrila e água em diferentes proporções obtendo neste caso, polaridades decrescentes. Foram testados várias técnicas de separação e a que apresentou melhor separação dos compostos foi o método isocrático, com 70% ACN, coluna aclimatado a 30°C, e o fluxo de passagem de 4ml/min, com tempo total de 15min.

Utilizando esta técnica foi possível isolar um composto purificado. O solvente foi evaporado e separado por partição líquido-líquido utilizando acetato de

etila. Após a evaporação deste solvente, o composto purificado foi identificado através de métodos espectrométricos como sendo um biflavonóide conhecido como amentoflavona (**12**).



4.2.2.3.1 Amentoflavona

Os biflavonóides são dímeros de flavonóides, na qual a ligação entre os flavonóides pode ser através das ligações C-C ou através de uma ligação éter (menos comuns), podendo apresentar uma grande variedade entre os locais de ligação (MARKHAM, 1987). Além disso, os flavonóides interligados podem ser idênticos ou não, sendo os mais comuns aqueles compostos que apresentam as ligações entre as flavonas (ligação dupla entre C2 e C3) e as flavanonas (ligação simples entre C2 e C3), ou uma combinação entre ambos, com um padrão de oxigenação simples, e normalmente agliconas (LIN et al., 2001). No caso da amentoflavona (**12**) a ligação ocorre entre C3' e II-C8 de duas flavonas, e são

também conhecidos como 3'8'' biapigenina, por ser dímeros das flavonas apigeninas (MARKHAM, 1987).

O primeiro biflavonóide isolado de plantas foi a ginkgetin (amentoflavona 7,4'-dimetil-eter), isolado de *Ginkgo biloba* (MARKHAM, 1982; STICHER, 1993), atualmente existem mais de 100 biflavonóides isoladas das plantas (LIN et al., 2001), utilizados para diversos fins, com testes farmacológicos testados e comprovados.

A amentoflavona foi isolada pela primeira vez nesta espécie, apesar de ter sido observada em outras plantas, como nas folhas de *Lanaria lanata*, na qual foi utilizada para a classificação da mesma, incluindo-a na família Haemodoraceae (DORA e EDWARDS, 1991). Este composto é também observado em várias espécies do gênero *Hypericum* e *Ginkgo*, no primeiro caso, principalmente nas suas flores, sempre acompanhado, em diferentes proporções, da hipericina, indicando a sua contribuição de forma sinérgica na ação antidepressiva, característica das espécies deste gênero (BAUREITHEL et al., 1997). A ação antidepressiva deste composto já havia sido comprovada durante a análise química da tintura alcoólica Karmelitter Geist® obtida a partir de uma mistura de dez plantas, utilizada na Dinamarca para tratamento de epilepsia, ou como sedativo hipnótico (NIELSEN, et al., 1988). Este estudo mostrou a amentoflavona como sendo o primeiro composto com alta afinidade ao receptor benzodiazepine, não alcalóide, induzindo a verificação de vários flavonóides para esta atividade farmacológica (MARDER et al., 2001).

A amentoflavona foi isolada das folhas de *H. alchorneoides*, nos fornecendo 5mg da fração acetato de etila, correspondendo a 0,29% da fração metanólica bruta e 0,0256% do peso das folhas secas.

As tabelas-14 e 15 apresentam respectivamente os deslocamentos observados nos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C, comparados ao observado na literatura. A princípio o espectro deste composto apresenta-se como uma mistura de dois flavonóides, no entanto a avaliação mais minuciosa destes espectros revela deslocamentos que o caracterizam como biflavonóide. Este composto pôde ser identificado como um biflavonóide através dos 2 singletos observados em campo baixo (δ 13,0 e δ 13,2) no espectro de RMN-¹H, caracterizando as interações do tipo pontes de hidrogênio formado entre os H do C-5 e o Oxigênio de C-4, e os 12 prótons aromáticos observados entre os deslocamentos δ 6 e 8,5.

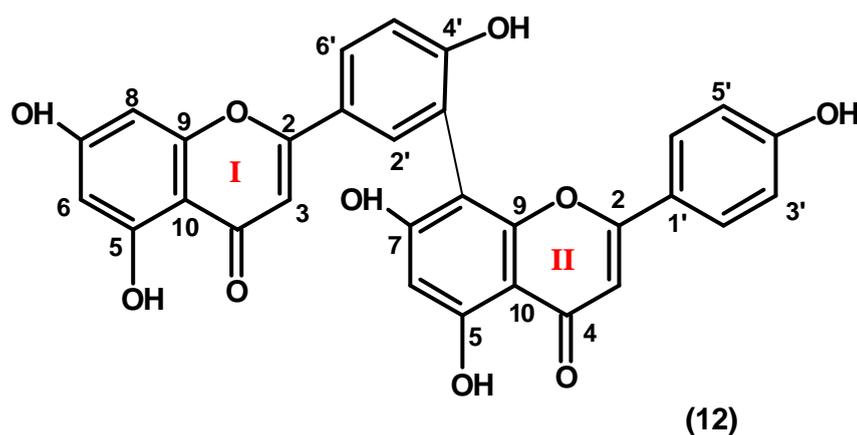


Tabela-14: Dados do espectro de RMN-¹H da amentoflavona, obtido do extrato acetato de etila das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, comparados aos dados descritos na literatura.

HIDROGÊNIO	Referência*		Este trabalho	
	(200MHz, CD ₃ COCD ₃)		(300 MHz, CD ₃ COCD ₃)	
	d (ppm)	J (Hz)	d (ppm)	J (Hz)
H-3	6,73	s	6,74	s
H-6	6,24	d 1,4	6,25	d 2,1
H-8	6,53	d 1,4	6,53	d 2,1
H-2'	8,12	d 2,1	8,14	d 2,4
H-5'	7,25	d 8,6	7,26	d 8,6
H-6'	8,05	dd 2,1; 8,6	8,05	dd 2,4; 8,6
II-H-3	6,66	s	6,68	s
II-H-6	6,46	s	6,46	s
II-H-2'	7,64	d 8,7	7,67	d 8,9
II-H-3'	6,83	d 8,7	6,84	d 8,9
II-H-5'	6,83	d 8,7	6,84	d 8,9
II-H-6'	7,64	d 8,7	7,67	d 8,9

* DORA e EDWARDS, 1991.

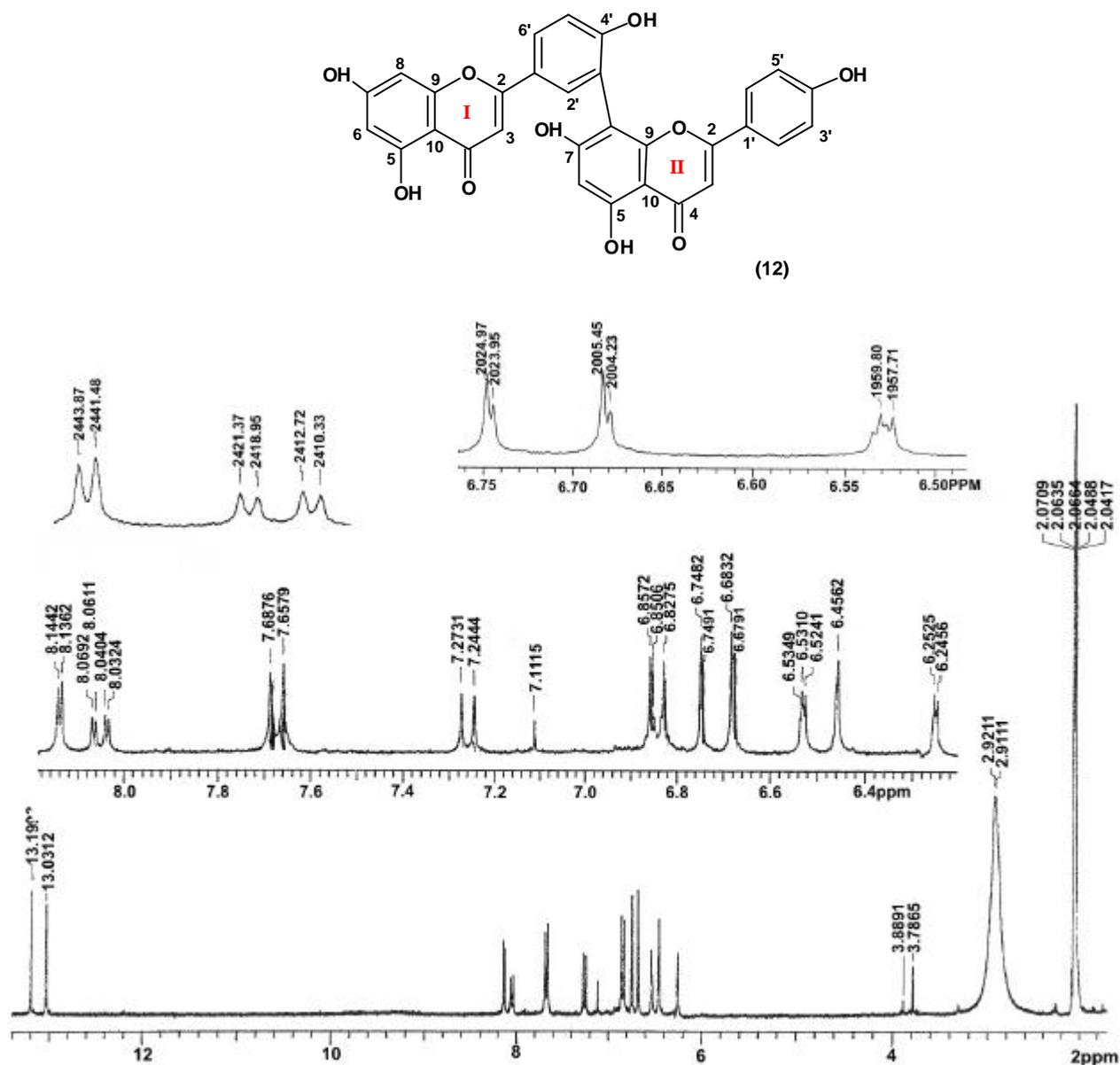


Figura-21: Espectro de RMN-¹H da amentoflavona, com expansão da área dos prótons aromáticos. (300MHz, CDCl₃, deslocamentos em ppm). TMS utilizado como padrão interno.

Os deslocamentos observados no espectro de RMN-¹H (Figura.21) que apresentaram os maiores acoplamentos ($J=8,6$ Hz e $J=8,9$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do anel B dos dois flavonóides, por apresentarem acoplamentos fortes com os respectivos hidrogênios vizinhos. Assim os dubletos apresentados em

δ 6,84 (2H, $J=8,91\text{Hz}$) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios II-H-3' e II-H-5' e os hidrogênios apresentados em δ 7,67 (2H, $J=8,92\text{ Hz}$) aos hidrogênios II-H-2' e II-H-6'. O flavonóide I que apresenta a ligação no C-3 com o outro flavonóide permite a aparecimento de acoplamento entre hidrogênios à longa distância, com conformação W, entre H2' e H6', assim o duplo-dublete em $\delta =8,05$ (dd $J=2,4$ e $J=8,6\text{ Hz}$) foi atribuído a H6', e o dublete em δ 8,14 ($J=2,4\text{Hz}$) ao H2'. Da mesma forma, o dublete observado em δ 7,26 ($J=8,6\text{ Hz}$) foi atribuído ao H5', cujo forte acoplamento com o hidrogênio vizinho, comprova a sua característica. Outro acoplamento observado neste composto, a longa distância e com "conformação W", foi entre os hidrogênios H6 e H8 do flavonóide I, δ 6,25 ($J=2,1\text{ Hz}$) e 6,53 ($J=2,1\text{ Hz}$), respectivamente. Os singletos observados em δ 6,74; 6,68 e 6,46 foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-3, II-H-3 e II-H-6.

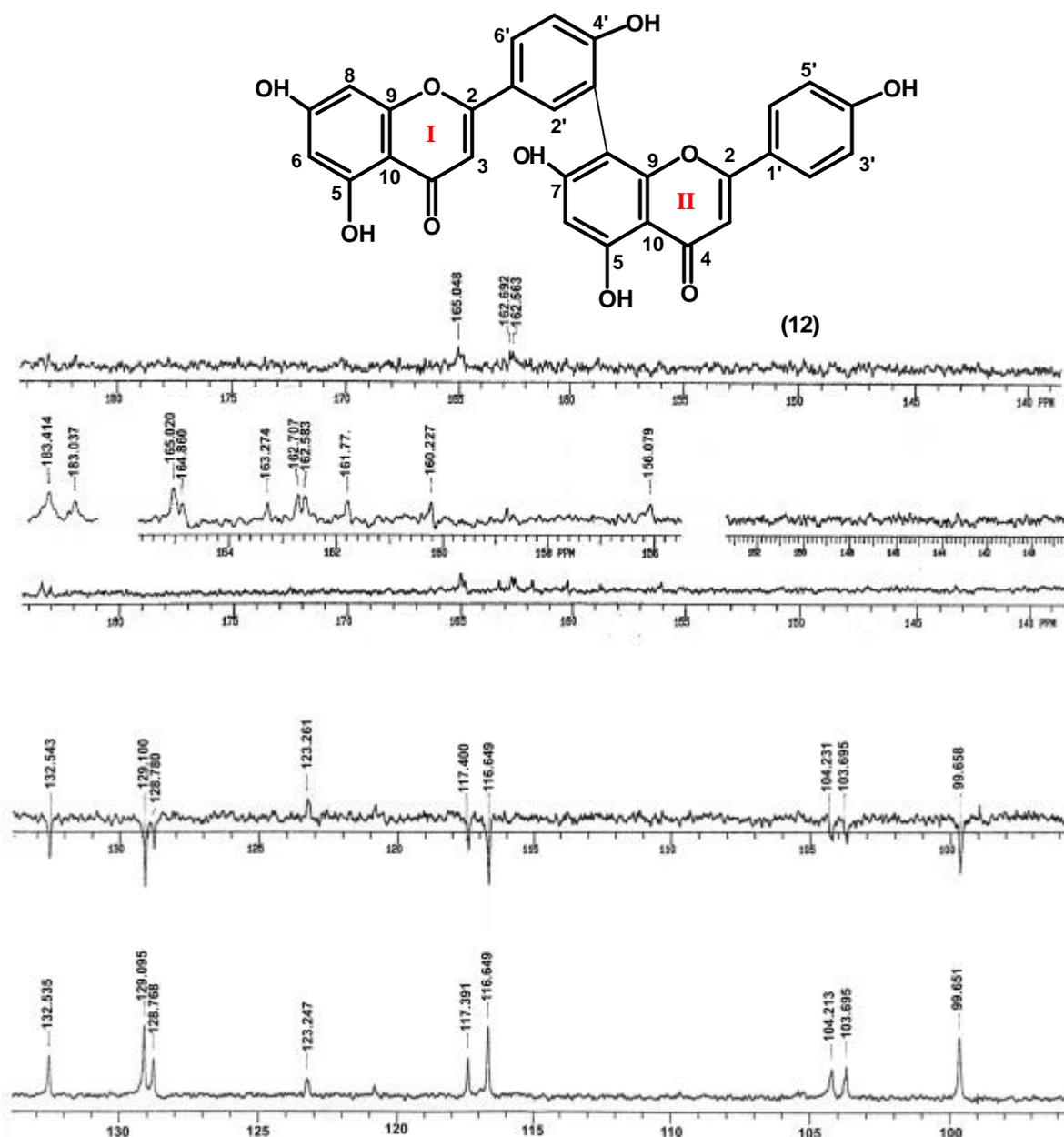


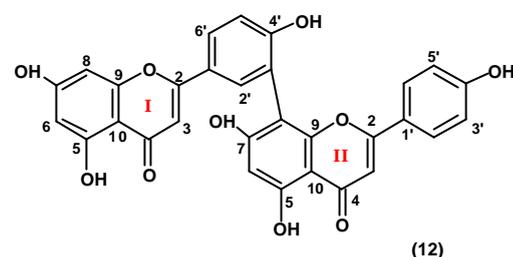
Figura-22: Espectro de RMN- ^{13}C APT, de amentoflavona (75MHz, CDCl_3), deslocamentos em ppm.

Os espectros de RMN- ^{13}C APT (Figura-22) nos permitiu confirmar a presença de 18 carbonos quaternários e 12 carbonos terciários. Além disso, como todos os carbonos quaternários presentes neste biflavonóide apresentam-se ligados diretamente ao oxigênio na estrutura química, estas posições provocam um desblindamento na nuvem eletrônica destes carbonos, sendo deslocados para campo baixo no espectro de RMN- ^{13}C , assim estes foram observados em δ maiores

que 150ppm. As exceções foram observadas apenas para os carbonos 1',3',10 da apigenina I e os carbonos 8, 10 e 1' da apigenina II.

Tabela-15: Dados do espectro de RMN-¹³C da amentoflavona, obtido do extrato hexânico das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, comparados aos dados descritos na literatura.

CARBONO	δ (ppm) -Referência* (50MHz, Me ₂ CO-d ₆)	δ (ppm) - espectro (75MHz, Me ₂ CO-d ₆)
C-2	164,1	165,0
C-3	103,2	103,7
C-4	181,9	183,0
C-5	161,6	162,7
C-6	98,8	99,6
C-7	163,9	164,9
C-8	94,2	94,7
C-9	157,6	158,4
C-10	104,0	105,2
C-1'	120,3	120,8
C-2'	127,9	128,8
C-3'	121,7	
C-4'	159,6	160,2
C-5'	116,4	117,4
C-6'	131,6	132,5
II-C-2	164,3	165,0
II-C-3	102,8	104,2
II-C-4	182,2	183,4
II-C-5	160,8	161,8
II-C-6	99,1	99,6
II-C-7	161,9	162,7
II-C-8	104,1	105,4
II-C-9	154,7	156,1
II-C-10	104,0	105,4
II-C-1'	121,4	123,3
II-C-2'	128,3	129,1
II-C-3'	116,0	116,6
II-C-4'	161,1	162,6
II-C-5'	116,0	116,6
II-C-6'	128,3	129,1



* MARKHAM, SHEPPARD e GEIGER, 1987.

Os deslocamentos para os carbonos aromáticos sem substituição são observados próximos de δ 128,5ppm (SILVERSTEIN et al., 1994), a influência de substituintes neste anel provocam uma menor variação na posição *meta*. Assim os deslocamentos observados em δ 128,8; 129,1 e 129,1ppm foram atribuídos aos respectivos carbonos: C-2'; II-C-2' e II-C-6'. O deslocamento observado no C-6' (δ =132,5ppm) reflete o desblindamento provocado pela formação do dímero entre C-3' e II-C-8.

Os deslocamentos observados no campo alto foram δ 94,7; 99,6 (2 carbonos), atribuídos respectivamente aos carbonos C-8 e C-6 a primeira apigenina e C-6 da segunda apigenina, neste caso sem sofrer nenhuma variação em relação à primeira flavona.

Uma comparação deste espectro com relação ao espectro de RMN-¹³C da flavona apigenina (MARKHAM et al., 1987), mostra que a formação do dímero provoca um deslocamento de +5,7ppm ao C-3' e +3,2ppm ao C-6', além da influência no C-8 de +10,1ppm. Os outros deslocamentos são bastante semelhantes com variações menores que 0,5ppm entre os carbonos.

4.3 Compostos isolados

Os compostos isolados e identificados das folhas de *Virola oleifera* e *Hyeronima alchorneoides* estão resumidos abaixo (Tabela-16), juntamente com os seus rendimentos.

Tabela-16: Compostos isolados das folhas de *Virola oleifera* e *Hyeronima alchorneoides* e seus respectivos rendimentos.

composto	massa (mg)	rendimento Extrato metanólico bruta (%)	rendimento Folhas secas (%)	planta
oleiferina-B	38,2	1,00	0,1350	<i>V. oleifera</i>
oleiferina-C	28,0	0,10	0,0135	<i>V. oleifera</i>
astilbina+quercetrina	48,2	0,38	0,0509	<i>V. oleifera</i>
simiarenol	56,8	0,29	0,0250	<i>H. alchorneoides</i>
sitosterol	33,0	0,17	0,0145	<i>H. alchorneoides</i>
amentoflavona	40,0	0,29	0,0256	<i>H. alchorneoides</i>

Observa-se que o rendimento obtido para a oleiferina-B foi aproximadamente 10 vezes maior que o observado para oleiferina-C. Ferri (1993) nas suas investigações fitoquímicas com as folhas desta mesma espécie não encontrou diferenças nos rendimentos entre estes dois compostos, além disso, o rendimento obtido para os mesmos foi dez vezes mais baixo que o observado neste trabalho. Estas variações podem estar relacionadas com as diferenças espaciais e temporais dos locais de coleta. As folhas de *V. oleifera*, estudadas neste trabalho foram coletadas em setembro de 1999, em Santa Catarina, e o material avaliado por Ferri (1993) foi coletado em maio de 1990, em São Paulo.

Os processos de lignificação em uma planta podem apresentar variações ao longo de um ano, principalmente em função da temperatura e incidência luminosa (DONALDSON, 2001). Esta alta sensibilidade às condições

ambientais está relacionado com a biossíntese das ligninas (Figura-11, p.51), onde a etapa da assimilação do guaiacil a partir da fenilalanina para a formação do ácido cinâmico, precursor das lignanas e neo-lignanas são dependentes da luz (GRAND et al., 1979). Desta forma, o aumento nas concentrações das neo-lignanas, oleiferinas B e C, observado neste trabalho, pode ser resultado desta variação sazonal, considerando que o material coletado para este trabalho, foi realizado em período de maior produção destes compostos (DONALDSON, 2001).

As variações sazonais nas concentrações de compostos biologicamente ativos são detectadas também em outras espécies. Estudos realizados com hipericina, composto ativo biologicamente extraído das folhas de *Hypericum perforatum*, mostraram um aumento em torno de 56 vezes durante um ciclo anual (SOUTHWELL e BOURKE, 2001). Estas variações foram atribuídas principalmente às diferenças climáticas (pluviosidade, temperatura média, fotoperíodo entre outros) observadas durante a época de coleta do material, sendo observados também variações interanuais. Além das condições climáticas, os processos fisiológicos da planta (floração, senescência, formação e maturação de sementes) foram responsáveis por estas variações.

Para a espécie estudada, *V. oleifera*, o período de floração ocorre entre janeiro e maio, e a maturação das sementes se inicia no final de julho prolongando-se até novembro (LORENZI, 1998). Desta forma, as diferenças nas concentrações das oleiferinas B e C, observadas neste trabalho e os relatados por Ferri (1993) podem estar relacionados também com estes processos fisiológicos, já que o material coletado para este trabalho foi realizado durante o período de maturação de sementes e o anterior, durante o período da floração. Para verificar os processos responsáveis pela variação sazonal na produção destes compostos é

necessário um estudo mais minucioso, avaliando a influência destas variabilidades ambientais e fisiológicas na produção biológica dos mesmos.

Os estudos de Ferri (1993) avaliaram que estas duas neolignananas foram os compostos de maior concentração entre as outras oleiferinas observadas (oleiferina D e E). As diferentes técnicas de isolamento e purificação dos compostos utilizados nestes trabalhos podem justificar o fato de não obtermos a identificação das outras neolignananas.

Os flavonóides quercetrina e astilbina foram anteriormente isolados das folhas e inflorescências de *Iryanthera sagotiana* (SILVA et al., 1997) espécie da mesma família das *Virolas* (Myristicaceae), no entanto esta foi a primeira vez que estes compostos são identificados nas espécies de *Virola*, não nos permitindo uma comparação com as concentrações observadas em espécies coletadas em outras regiões ou outras épocas.

Os compostos simiarenol e amentoflavona, isolados das folhas de *Hyeronima alchorneoides*, foram registrados pela primeira vez nesta espécie neste trabalho. *b*-sitosterol, um esteróide bastante difundido entre as plantas, e identificado anteriormente nas folhas desta espécie (TINTO et al., 1991), não foi possível fazer uma comparação entre concentrações já que não foi determinada a concentração no trabalho anterior.

4.4 Modificações estruturais na quercetina

A partir das folhas de *Virola oleifera*, foi isolada uma mistura de dois flavonóides glicosilados, a quercitrina e a astilbina. Trabalhos anteriores realizados por pesquisadores do nosso laboratório, verificaram que a metilação realizada na taxifolina, obtida a partir da hidrólise da astilbina (isolada de *Hymenaea martiniana*), apresentou um aumento em torno de 8 vezes no efeito analgésico, quando aplicado intraperitonealmente, no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (CECHINEL-FILHO et al., 2000). Além disso, testes biológicos realizados com a mistura destes dois flavonóides apresentaram uma inibição relativamente elevada, quando utilizado este mesmo modelo de dor (KUROSHIMA et al., 2001), indicando que a quercitrina deve ser a responsável por esta atividade biológica.

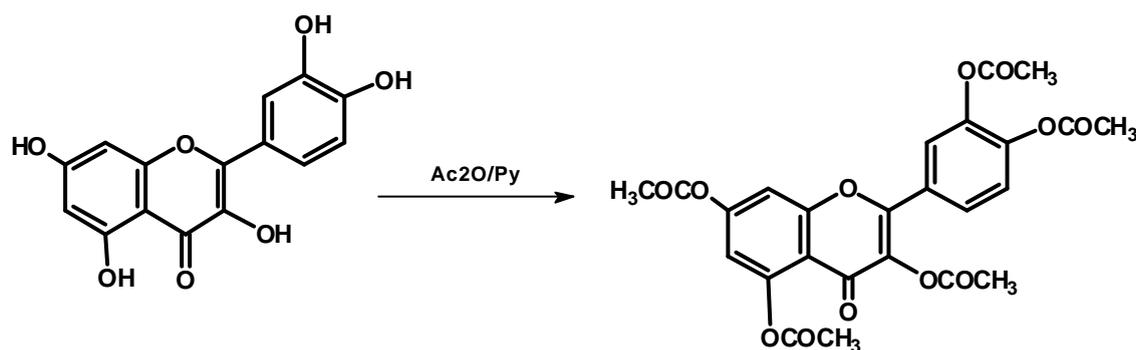
Desta forma, estes resultados, nos motivaram a realizar modificações estruturais na quercitrina e posteriormente na quercetina, e avaliar as possíveis relações estrutura-atividade.

As modificações estruturais realizadas foram a acetilação e metilação da quercetina. Os procedimentos laboratoriais, resultados e identificação do produto das reações são descritos a seguir e os testes biológicos, no próximo capítulo.

4.4.1 Acetilação da quercetina

A acetilação da quercetina (**5**) (400mg) foi realizada através da adição de piridina (4ml) em anidrido acético (2ml), deixado em banho-maria por 3

horas com agitação ocasional. Após o resfriamento, foi adicionado água com gelo, filtrado e recristalizado com MeOH:CHCl₃ na proporção de 5:1, e filtrado. Esta reação nos forneceu 488mg de um composto cristalino branco na forma de agulhas (P.F. 168,5°C; 169-170°C (GOMM e NIERESTEIN, 1931)), com um rendimento de 72%. A pureza do composto foi verificada através de CCD, a confirmação da reação foi verificada através dos espectros e IV (Figura-23) e a identificação do produto da reação foi confirmada através dos espectros de RMN-¹H (Tabela-17, Figura-24) e RMN-¹³C (Tabela-18, Figura-25).



O espectro de IV da quercetina (**10**) e da quercetina penta-acetilada (**13**) (Figura-23) evidencia a ocorrência desta reação. O espectro de quercetina apresenta banda larga de absorção na região entre δ 3200-3000cm⁻¹, característico das vibrações de deformações axial de O-H resultado das ligações intermoleculares; vibrações das deformações angulares de O-H, em 1456 cm⁻¹, caracterizando desta forma a presença dos grupamentos OH. No espectro do produto desta reação, observam-se bandas de absorção que o diferem do primeiro espectro: banda forte em 1773 cm⁻¹, atribuída às vibrações da deformação axial de C=O, bandas de

absorção em 1181 cm^{-1} , referentes às vibrações das duas deformações axiais de C-O, que caracterizam o grupo éster, a deformação axial de C-C(=O)-O e a deformação assimétrica de O-C=C. Além disso observa-se uma absorção forte em 1373 cm^{-1} , referente às deformações angulares assimétricas de C-H das metilas. A ausência de absorções das vibrações moleculares das deformações que caracterizam os grupos OH indica que todos os cinco grupo OH foram substituídos pelo grupo acetato. Outras absorções observadas nos dois espectros caracterizam a presença do anel aromático: absorção em 824 cm^{-1} e 897 cm^{-1} , referentes às deformações angulares fora do plano das ligações C-H do anel e quatro absorções entre $1650\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, referentes às deformações axiais das ligações C-C do anel aromático.

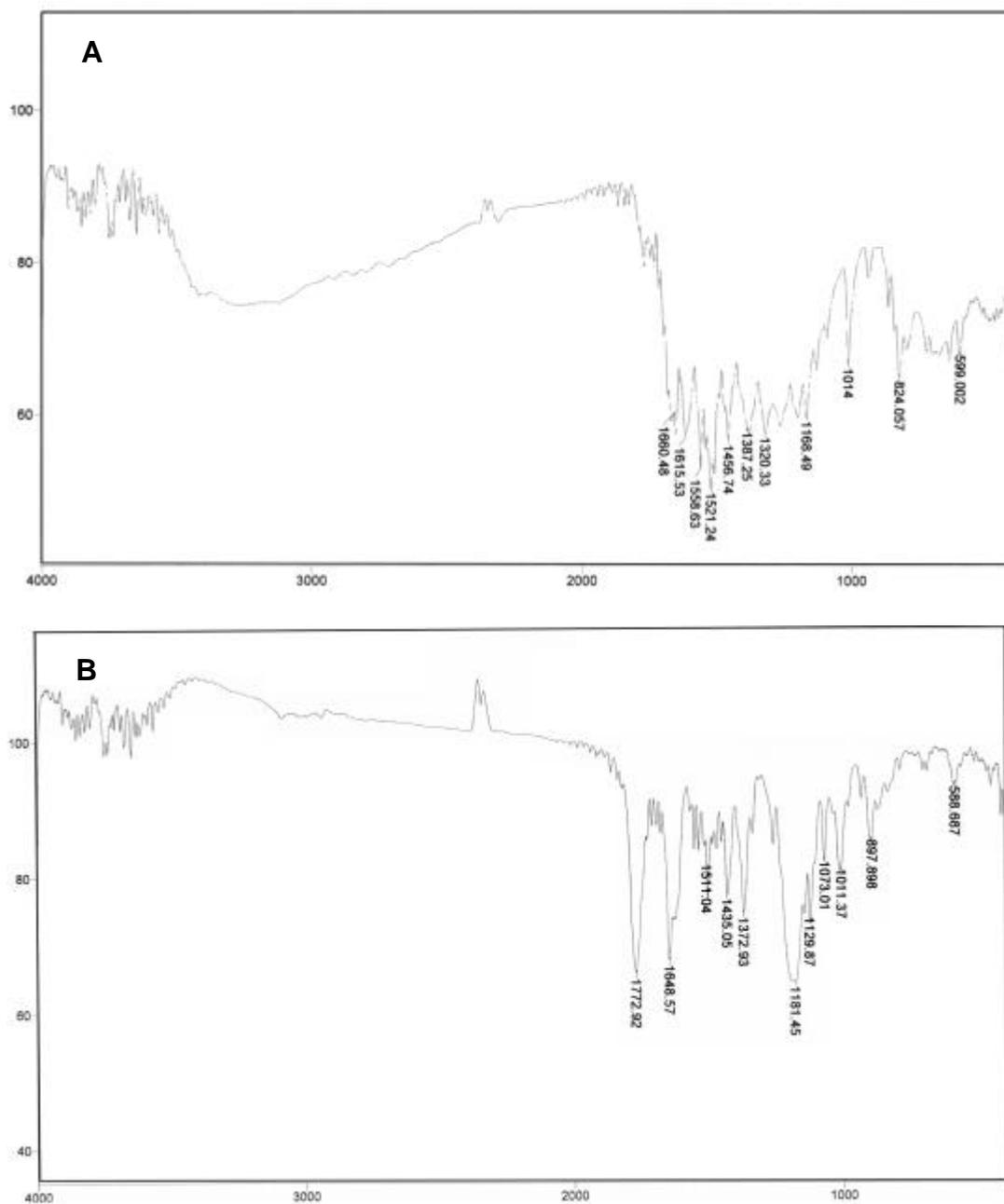


Figura-23: Espectro no IV da quercetina (A) e da 3,3',4',5,7-penta-acetil-quercetina (B) (pastilha de KBr). Absorbância em cm^{-1} .

O espectro de RMN¹ (Figura-24, Tabela-17), confirma as cinco substituições dos grupos OH da quercetina formando os respectivos acetatos, indicado pelo singleto observado no deslocamento em δ 2,3ppm, atribuído aos 15 prótons dos 5 grupos metilas. Confirmado também pela ausência de deslocamentos referentes aos prótons hidroxílicos, inclusive o grupo hidroxílico presente no C-5, cujo deslocamento é normalmente observado em δ acima de 12ppm (MALAN e ROUX, 1979). Este grupo hidroxílico apresenta-se fortemente quelado com o grupo carbonil do vizinho C-4, caracterizando-se desta forma como a mais difícil substituição neste flavonóide (HERGERT et al., 1956).

Tabela-17: Dados do espectro de RMN¹H da 3,3',4',5,7-penta-acetil-quercetina obtido da reação de acetilação da quercetina.

HIDROGÊNIO	Referência*		Este trabalho	
	(60MHz, CDCl ₃)		(200 MHz, CDCl ₃)	
	d (ppm)	J (Hz)	d (ppm)	J (Hz)
H-6	6,36	d 2,0	6,87	d
H-8	6,53	d 2,0	7,30	t
H-2'	7,75	d 2,0	7,70	d
H-5'	7,00	d 9,0	7,30	t
H-6'	7,73	q 9,0	7,70	d
CH ₃			2,3	

* MALAN e ROUX, 1979.

As distribuições dos deslocamentos de espectro de RMN-13C foram comparadas e discutidas em relação a quercetina metilada considerando que não foram observados na literatura os deslocamentos para a quercetina penta-acetilada. Portanto as pequenas diferenças se devem a esta diferença estrutural.

O espectro de RMN-¹³C (Figura-25 e Tabela-18) não apresenta muitas variações em relação aos deslocamentos observados para a quercetina. A efetividade da reação foi confirmada pela presença dos grupos metilas referentes

aos deslocamentos observados em δ 21,2~21,86ppm e através da presença de cinco grupos C=O da carbonila do grupo acetato formado, cujos deslocamentos observados em δ 168,55 ~170,75ppm, foram atribuídos a estes carbonos.

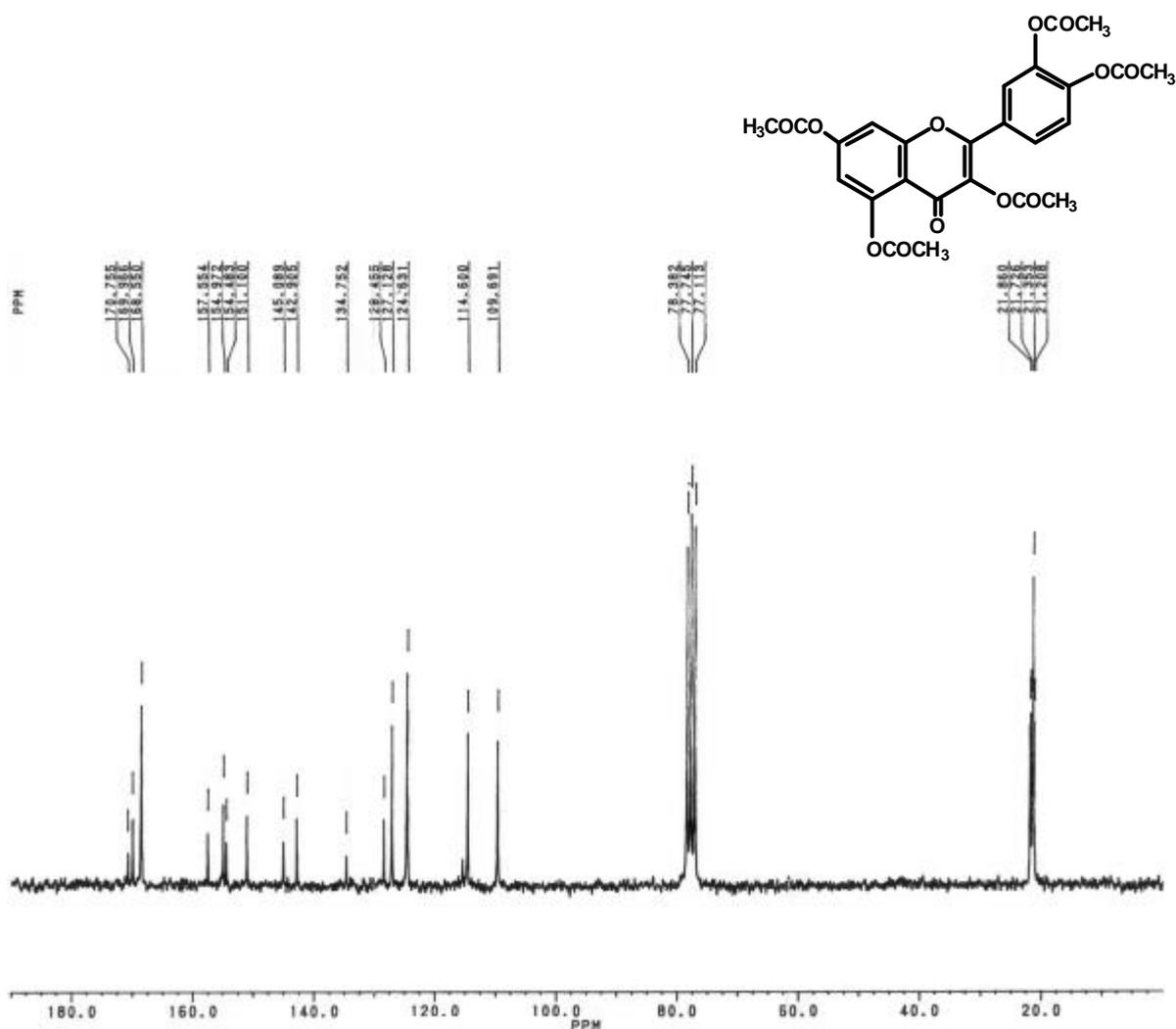


Figura-24: Espectro de RMN- ^1H da quercetina penta-acetilada, produto da reação de acetilação da quercetina (200MHz, CDCl_3). Deslocamentos em ppm e TMS como padrão interno.

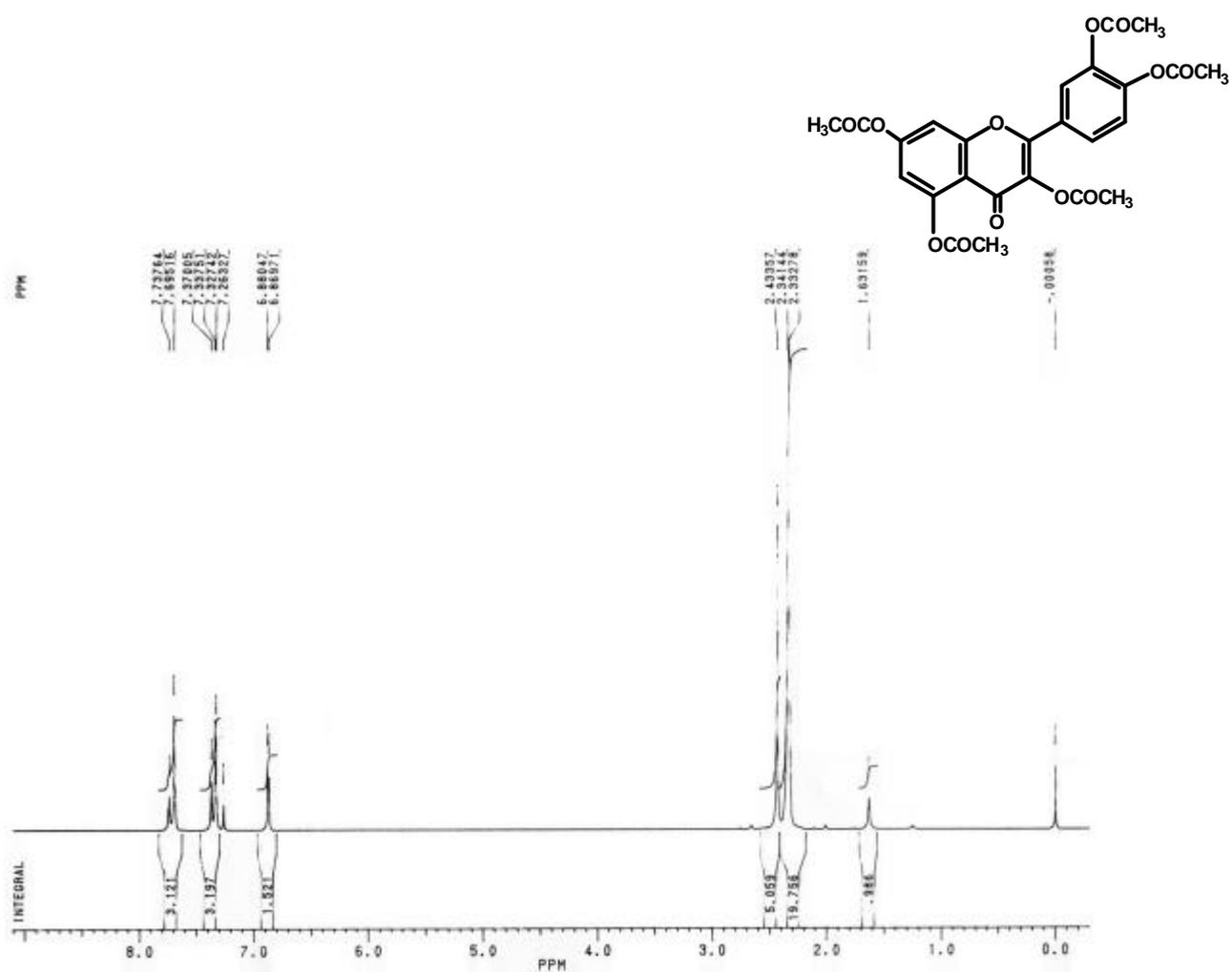
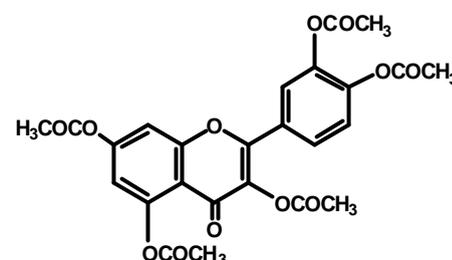


Figura-25: Espectro de RMN- ^{13}C da quercetina penta-acetilada resultado da acetilação da quercetina (50MHz, CDCl_3). Deslocamentos em ppm e padrão interno TMS.

Tabela-18: Dados do espectro de RMN-¹³C da 3,3',4',5,7-acetil-quercetina obtido da reação de acetilação da quercetina.

CARBONO	Referência*	este trabalho
	d ppm	(50 MHz) d ppm
C2	158,7	142,90
C3	135,7	127,13
C4	179,7	157,55
C5	163,3	151,1
C6	100,2	109,70
C7	166,4	154,97
C8	95,1	
C9	159,6	145,09
C10	105,9	109,70
C1'	122,5	124,63
C2'	110,6	114,6
C3'	146,7	134,75
C4'	136,2	128,45
C5'	117,4	
C6'	110,6	114,6
CH ₃		21,3
O-C=O		168,55~170,75



* SLIMESTAD et al., 1995

4.4.2 Metilação da quercetina

A primeira reação de metilação, deixada em refluxo por 16 horas apresentou um rendimento muito baixo, sendo este controlado por CCD. Foi verificada nesta primeira reação que o produto, com R_f maior, provavelmente a quercetina metilada apresentou um rendimento muito baixo.

Foram realizadas posteriormente várias reações de metilação com procedimentos diferentes, alterando a proporção entre a quercetina e o sulfato de metila, o tempo de reação e a quantidade de carbonato de potássio anidro adicionado. Foi verificado nestes experimentos que o aumento da proporção de sulfato de metila em relação a quercetina não apresenta um melhor rendimento, e o

único fator que parece ter melhorado o rendimento foi o tempo de reação. Deixado nesta reação durante 130 horas.

O produto final foi purificado através de cromatografia de coluna utilizando a sílica gel como fase fixa e CHCl_3 como fase móvel, apenas as últimas frações foram remobilizadas através da utilização de uma fase móvel com polaridade crescente, utilizando-se para isso adição de MeOH em diferentes proporções. Esta separação nos forneceu uma mistura de cinco compostos de difícil purificação. A determinação do ponto de fusão desta mistura ($135\sim 138^\circ\text{C}$), nos indicou que a mesma é formada pela mistura das diferentes metilações da quercetina, os quais devem apresentar pontos de fusão bastante elevados, todos acima de 160°C , e quanto menor a metilação, maior o seu ponto de fusão (MALAN e ROUX, 1979; HERGERT et al., 1956), apresentando este gradiente crescente até atingir o ponto de fusão da quercetina, 315°C (HERGERT et al., 1956).

Testes realizados anteriormente (HERGERT et al., 1956) mostraram que a metilação da quercetina segundo o método utilizado neste trabalho ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ e K_2CO_3) apresenta um rendimento maior em relação os outros métodos conhecidos, utilizando CH_3I (KUPCHAN e BAUERSCHMIDT, 1971) ou diazometano (GOMM e NIERENSTEIN, 1931), possibilitando desta forma a formação de diversos produtos de metilação em substituição aos grupos hidroxilas. Além disso, eles estabeleceram os padrões de substituição no decorrer desta reação, sendo as hidroxilas ligadas aos carbonos C-3; C-3' e C-4' os primeiros a serem substituídos, seguidos da substituição da hidroxila ligada ao C-7 e por último a hidroxila do C-5, o qual forma uma quelação com o grupo carbonila, dificultando a sua substituição.

Desta forma, esta mistura de compostos pode estar constituída pelos 5 produtos de metilação da quercetina, com gradientes decrescentes de concentração conforme o aumento no grau de substituição, verificado pelos CCD. Concentrações menores foram observados para produtos mais apolares.

Esta mistura de compostos foi recromatografada diversas vezes através de CC, porém como a sua purificação foi difícil, esta mistura foi testada farmacologicamente e comparada com a quercetina acetilada.

4.5 Atividade biológica

Trabalhos anteriores indicam a utilização das folhas destas plantas, no combate às cólicas intestinais, dor estomacal (FERNANDES et al., 1993), enxaquecas, sem, no entanto uma comprovação científica para estas atividades. Desta forma, um dos objetivos deste trabalho foi verificar a presença destas atividades farmacológicas nestas plantas, identificando os principais grupos ou os compostos responsáveis pelo mesmo.

Assim, os extratos metanólicos brutos das folhas destas plantas foram primeiramente testados farmacologicamente para verificar a presença da atividade antinociceptiva. Posteriormente, os extratos hexânico, diclorometânico e do acetato de etila foram também testados, direcionando os estudos fitoquímicos, nas frações que apresentassem as maiores atividades, segundo o paradigma oriental da busca de novos fármacos (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

4.5.1 Atividade antinociceptiva

A dor é definida como uma sensação desagradável localizada em uma região específica do corpo, sendo um sinal de alerta resultante de um estímulo produzido por ameaça a algum tipo de tecido do organismo (ISSELBACHER et al., 1998). Apesar desta definição clássica da linha médica, a dor é uma experiência

peçoal e altamente subjetiva, onde se consideram os diferentes fatores culturais, sociais emocionais, tornando a sua avaliação de extrema complexidade.

A transmissão da dor é um mecanismo que envolve uma série complexa de interações das estruturas periféricas e centrais do tecido superficial ao córtex cerebral. Podem ser classificadas em nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica, associadas respectivamente aos estímulos nociceptores, dano ao tecido neural, disfunção neural ou fatores psicológicos (FÜRST, 1999 e MILLAN, 1999 *in* CALIXTO et al., 2000).

Os nociceptores são neurônios sensíveis à dor, localizados na pele, vasos, músculos, vísceras e são ativados por algum estímulo mecânico, térmico, ou químico, os quais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC). Esta transmissão passa por uma complexa cadeia de nervos envolvendo os sistemas nervosos central e periférico.

Os ensaios biológicos realizados neste trabalho para avaliar a ação nociceptiva dos extratos, frações semi-purificada ou dos compostos purificados das plantas, consistiram na injeção de ácido acético intraperitonealmente nos camundongos como um estímulo químico, causador da dor. A injeção deste ácido provoca uma contração abdominal seguido de um estiramento dos músculos abdominais. A presença de um composto ou extrato com ação antinociceptiva, alivia a ação do ácido acético

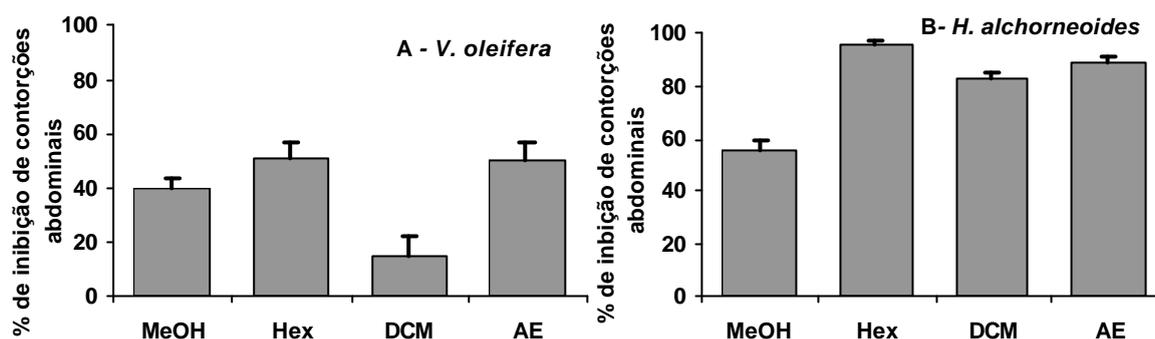
4.5.1.1 Atividade antinociceptiva dos extratos e frações semi-purificadas

Os resultados obtidos a partir dos testes farmacológicos dos extratos brutos destas duas plantas, comprovaram a atividade antinociceptiva das mesmas, demonstrada pelo uso popular (Tabela-19). As folhas de *V. oleifera* apresentaram neste modelo, uma inibição em torno de 40% nas contorções abdominais provocadas pela injeção intraperitoneal de ácido acético, quando comparado com o controle, enquanto as folhas de *H. alchorneoides*, apresentaram uma atividade mais potente, em torno de 66%, quando aplicados nas doses de 10mg/kg.

Tabela-19: Efeito dos extratos metanólicos brutos de *V. oleifera* e *H. alchorneoides*, das frações de hexano, diclorometano e acetato de etila semipurificadas (10mg/kg) nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6%. Controle 1, utilizado para o cálculo da % de inibição do extrato metanólico bruto e o controle 2, para as demais frações.

		nº médio de contorções	% inibição	Erro padrão
<i>V. oleifera</i>	Extrato Metanol	26,2 ± 8,0	39,8	3,9
	Fração hexano	34,8 ± 14,4	51,3	5,9
	Fr. Diclorometano	61,0 ± 18,1	14,8	8,1
	Fr. Acetato de etila	35,4 ± 16,8	50,5	6,3
<i>H. alchorneoides</i>	Extrato Metanol	19,2 ± 9,1	55,9	3,7
	Fração hexano	2,6 ± 2,3	96,4	1
	Fr. Diclorometano	12,4 ± 6,6	82,7	2,9
	Fr. Acetato de etila	7,8 ± 6,2	89,2	2,2
	controle 1	43,5 ± 8,3	-----	2,2
	controle 2	71,6 ± 11,6	-----	5,1

As análises fitoquímicas realizadas nas folhas destas plantas foram direcionadas a partir dos testes fitoquímicos, assim, os extratos semi-purificados foram testados neste mesmo modelo (Tabela-19), com esta finalidade.



OBS: Cada coluna representa uma média de 6 a 8 camundongos, os erros padrões são apresentados nas barras verticais.

Figura-26: Efeitos da administração intraperitoneal do extrato metanólico bruto, das frações hexano, diclorometano e acetato de etila (10mg/Kg) das folhas de *V. oleifera* (A) e *H. alchorneoides* (B), no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético a 0,6%.

As frações semipurificadas, hexânica e acetato de etila, das folhas de *V.oleifera*, apresentaram um pequeno aumento em relação ao extrato metanólico bruto (Figura-26), passando de 40% para aproximadamente 50%. A fração diclorometano, no entanto, apresentou uma inibição menor, em torno de 14% apenas, em relação ao controle. Para as frações semipurificadas das folhas de *H. alchorneoides*, houve um aumento significativo na inibição das contorções abdominais, quando comparado ao extrato metanólico bruto. Passando de 55% para aproximadamente 90% de inibição. Normalmente os extratos brutos de uma planta tendem a apresentar uma atividade biológica menor em relação às frações semipurificadas em função dos compostos estarem menos concentrados nos extratos metanólicos (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; RATES, 2001). No entanto, devem ser considerados outros problemas quando se avalia os resultados dos testes farmacológicos de um extrato bruto de uma planta ou as suas frações semi-purificadas. Um dos problemas está relacionado com os falsos positivos, por

exemplo, pela presença de taninos e/ou saponinas, ou os falsos negativos, como a baixa solubilidade dos compostos ou dos extratos para aos ensaios biológicos (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; PHILLIPSON, 2001). Desta forma, baseado nestes resultados, foram realizadas as investigações fitoquímicas, na tentativa de isolar os compostos majoritários, e posteriormente identificar as suas atividades.

4.5.1.2 Atividade antinociceptiva dos compostos isolados das folhas de *Virola oleifera* e *Hyeronima alchorneoides*

Os compostos isolados das folhas destas plantas foram testados farmacologicamente neste modelo de dor, e são apresentados a seguir.

Tabela-20: Efeito dos compostos isolados (10mg/kg) das folhas de *V. oleifera* e *H. alchorneoides*, e dos padrões analgésicos, injetadas intraperitonealmente nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6%.

		% inibição	Erro padrão
<i>V. oleifera</i>	oleiferina-B	27,0	6,9
	oleiferina-C	76,0	4,68
	quercitrina + astilbina	62,0	5,21
<i>H. alchorneoides</i>	<i>b</i> - sitosterol*	54,0	2,0
	amentoflavona**	67,0	4,0
	simiarenol	74,0	7,7
compostos comerciais	ácido acetilsalicílico***	38	2
	paracetamol***	35	1
	dipirona**	33	8

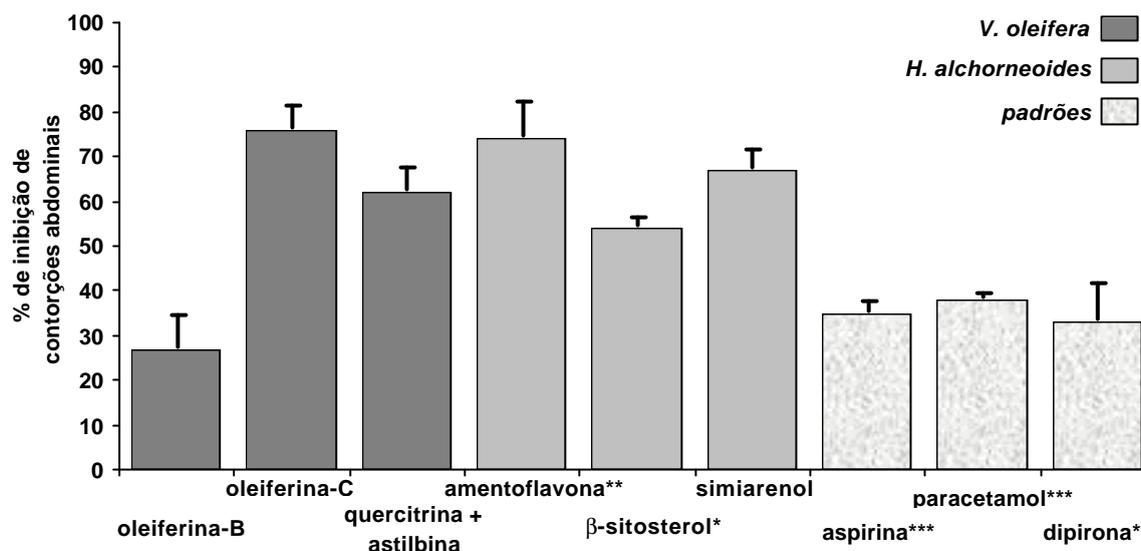
OBS: resultados expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle, representando a média de 6 a 8 camundongos.

* SANTOS et al., 1995.

** da SILVA, et al., 2001.

*** MEYRE-SILVA, 2000.

Os compostos isolados das folhas de *Virola oleifera*, a oleiferina-B e C e a mistura de flavonóides (quercitrina e astilbina) apresentaram respectivamente as seguintes porcentagens de inibição do número de contorções abdominais: 27, 76 e 62%, no ensaio farmacológico testado (Figura-27). Observa-se que estes resultados quando comparados aos apresentados pelas frações semi-purificadas dos quais estes compostos foram isolados, foram menores para a fração hexano, passando de 50% para apenas 27% (oleiferina-B) e a fração diclorometano apresentou um aumento significativo, passando de 15% para 76% (oleiferina-c). O perfil cromatográfico apresentado para estas duas frações, mostra que as mesmas são formadas basicamente pelos mesmos compostos e nas mesmas proporções, a única diferença foi observada para a presença de compostos muito apolares na fração hexano, provavelmente óleos essenciais, os quais não foram observados na fração diclorometano. Lopes e colaboradores (1997, 1999b) determinaram uma série de óleos essenciais nas folhas de *Virola surinamensis*, sendo alguns inclusive formado por fenil-propanóides, tendo o mesmo precursor das oleiferinas na rota biossintética, aumentando a possibilidade da presença destes compostos nesta espécie. Alguns destes óleos essenciais exibem uma forte atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor (CALIXTO et al., 2000), além disso, a toxicidade dos óleos voláteis é bastante conhecida em função da sua ação alelopática nas plantas (HARBORNE, 1993; SIMÕES e SPITZER, 1999; MALHEIROS e PERES, 2001), o que pode ter ocasionado o falso positivo, discutido anteriormente. De uma maneira ou de outra, a presença destes compostos nesta fração pode justificar a alta inibição apresentada por esta fração, sem a mesma ter sido registrada no composto majoritário isolado da mesma.



OBS: Cada coluna representa uma média de 6 a 8 camundongos, os erros padrões são apresentados nas barras verticais.

*Santos et al., 1995.

**da Silva et al., 2001.

***Meyre-Silva, 2000.

Figura-27: Efeito da administração intraperitoneal dos compostos isolados das folhas de *V. oleifera* (A), *H. alchorneoides* (B), e dos padrões analgésicos, aplicados intraperitonealmente (10mg/Kg) no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético a 0,6%.

Além destas semelhanças, foi observado que os compostos majoritários presentes nas duas frações correspondem as oleiferinas-B e C, verificado também em trabalhos anteriores (FERRI, 1993). Como a porcentagem de inibição de oleiferina-B foi muito pequena em relação a oleiferina-C, a elevada porcentagem de inibição observada para a fração semi-purificada de hexano, pode ter sido ocasionada pela presença deste composto nesta fração.

Quanto a pequena atividade apresentada pela fração diclorometano, pode ser resultado dos falsos negativos, como a baixa solubilidade do extrato durante o ensaio farmacológico (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; PHILLIPSON, 2001), ou então a ação inibitória da atividade biológica pode ter sido resultado da ação antagônica apresentado nesta fração, em função da ação

conjunta com os outros compostos presentes na mesma (CALIXTO et al., 2000; WILLIAMSON, 2001).

A oleiferina-C foi testada em diferentes concentrações para verificar a existência da relação dose-dependência deste composto neste modelo (Figura-28). A relação dose-dependência nos permite calcular o DI_{50} , ou seja, a concentração necessária do composto para inibir 50% da atividade. Normalmente os valores de DI_{50} são expressos em molaridade, facilitando a comparação com outros compostos padronizados para este modelo.

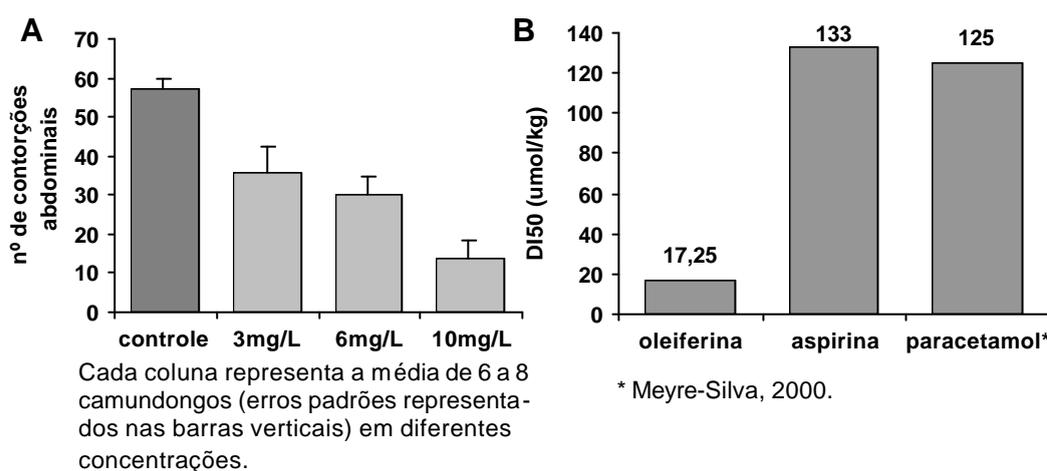


Figura-28: Efeito antinociceptivo causado pela oleiferina-C, aspirina e paracetamol sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. A Diferentes concentrações de oleiferina-C, testados neste modelo. **B** Valores de DI_{50} (mmol/kg) calculado através das curvas de concentrações crescentes de cada composto.

As neolignanans estão amplamente distribuídas no reino vegetal, tornando-as essenciais para a manutenção das plantas, desempenhando principalmente importantes papéis nas adaptações ecológicas, sendo inclusive considerados indicadores no processo evolutivo em angiospermas (GOTTLIEB, 1984, 1987). São atribuída a estes compostos uma variedade de atividades

biológicas: antitumoral (MacRAE e TOWERS, 1984), antifúngica (LOPES et al., 1999a; ZACCHINO et al., 1998), anti-leishmaniose (COSTA et al., 2001), antihepatotóxica e antiinflamatória (BARBOSA FILHO, 1999).

Apesar desta vasta gama de aplicações, ainda não havia sido registrada a atividade antinociceptiva para as oleiferinas, como a oleiferina-C e B registradas neste trabalho. Apesar de ter sido testado em um único modelo, estes resultados dão um indicativo destes compostos serem promissores como analgésicos, principalmente a oleiferina-C, cujo valor de DI_{50} foi aproximadamente 7 vezes menor em relação aos modelos utilizados.

A mistura de flavonóides glicosilados, quercitrina e astilbina, apresentou uma inibição de $62,0 \pm 5,2\%$ nas contorções abdominais (Tabela-20). Trabalhos anteriores mostraram que a astilbina apresentou uma atividade pequena neste modelo de dor, com DI_{50} maior que $133 \mu\text{mol/kg}$ (CECHINEL FILHO et al., 2000), efeito inferior à apresentada pelos fármacos padrões como a aspirina e paracetamol (Figura-27). Desta forma, o efeito antinociceptivo observado para esta mistura deve ser resultado da ação da quercitrina, não descartando a possibilidade do efeito sinérgico nesta mistura.

CECHINEL FILHO e colaboradores (2000) verificaram que a astilbina apresentou um aumento nas atividades analgésica e antiinflamatórias quando foi hidrolizado e metilado, indicando que a hidrofobicidade destes compostos parece ser um dos fatores que determinam a ação analgésica. Baseado nos resultados anteriores, somado à alta inibição apresentada pela mistura destes flavonóides, esta mistura foi hidrolizada, os flavonóides agliconas foram isolados e a quercetina foi modificada estruturalmente e verificada a ação analgésica dos mesmos. Estes resultados são mostrados no próximo sub-ítem.

Os compostos isolados das folhas de *H. alchorneoides*, *b*-sitosterol, simiarenol e amentoflavona apresentaram uma porcentagem de inibição bastante significativa, acima de 70%, sendo a mais baixa observada para o β -sitosterol ($54 \pm 2\%$). *b*-sitosterol, um dos esteróis mais conhecidos no reino vegetal, está juntamente com o simiarenol, um triterpeno pentacíclico, entre os grupos de compostos que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, entre as quais se destacam as atividades antiinflamatórias e antinociceptivas (CALIXTO et al., 2000).

O esteróide *b*-sitosterol registrado anteriormente nas folhas desta planta (TINTO et al., 1991), já havia sido testado em diversos outros modelos de dor, indicando a sua atividade antinociceptiva e antiinflamatória (SANTOS et al., 1995).

O triterpeno simiarenol, identificado pela primeira vez nas folhas desta planta, apresentou $74,0 \pm 8\%$ de inibição nas contorções abdominais dos camundongos no modelo do ácido acético. Esta elevada atividade biológica registrada para este composto, em adição à inibição apresentada também pelo *b*-sitosterol justifica o elevado potencial de inibição apresentado pela fração hexano ($96,4 \pm 1\%$), da qual estes dois compostos foram isolados.

Tinto e colaboradores (1991) isolaram das folhas desta planta além do sitosterol, dois outros terpenos conhecidos na fitoquímica, o lupeol e o estigmasterol, este último com atividade antinociceptiva conhecida (SANTOS et al., 1995), os quais podem também estar presentes nesta espécie. Deve-se, no entanto levar em consideração as diferentes localidades de coleta do material de estudo, enquanto Tinto e colaboradores (1991), trabalharam com material coletado na Guiana Francesa, o material para este trabalho foi coletado no sul do Brasil, e as diferenças regionais podem influenciar na composição fitoquímica das plantas (GOTTLIEB e BORIN, 2000).

A elevada atividade antinociceptiva observada para a fração hexano e a mesma não ter sido observada isoladamente nos compostos purificados, pode estar indicando que estes compostos devem estar atuando de forma sinérgica, tendo ainda a colaboração de outros compostos minoritários, não identificados atuando positivamente para a mesma atividade (WILLIAMSON, 2001).

A amentoflavona, um biflavonóide isolado da fração acetato de etila, das folhas de *H. alchorneoides*, registrado pela primeira vez também nesta planta, já havia sido verificada a sua ação antinociceptiva, cuja inibição foi de $67 \pm 4\%$, quando aplicado a uma dose de 10mg/kg (da SILVA et al., 2001). Da mesma forma que a fração anterior, o composto majoritário isolado apresentou uma atividade biológica menor que a apresentada pela fração semi-purificada ($89,2 \pm 2,2\%$).

O perfil cromatográfico desta fração acompanhado através de HPLC acoplado ao detector de varredura de diodo, indicou a presença de poucos compostos, nesta fração, porém com polaridades muito parecidas, de difícil separação. Os picos mostraram perfis de UV típicos de flavonóides, com máximas absorbâncias em 270 e 330nm (amentoflavona); 268 e 355nm (flavonol), 290 e 330nm (flavanone) (BROLIS et al., 1998), indicando a presença dos mesmos nesta fração. Estes compostos foram confirmados através dos espectros de RMN-¹H e RMN¹³C como sendo flavonóides glicosilados com substituições no anel A e B, porém não puderam ser identificados em função da contaminação com fragmentos de outros flavonóides. Estes resultados nos dão indicativos da presença de outros flavonóides nesta fração, os quais são conhecidos por apresentar uma elevada atividade antinociceptiva (Di CARLO et al., 1999; CALIXTO et al., 2000).

Desta forma, a elevada atividade observada para esta fração pode estar indicando a ação conjunta destes compostos, a amentoflavona, com atividade

antinociceptiva conhecida e os outros flavonóides, não identificados, mas com reconhecida atividade antinociceptiva.

A amentoflavona já foi testada em diversos ensaios biológicos, sendo verificadas as atividades antiviral (WANG et al., 1998; LIN et al., 1999; MA et al., 2001); eficaz contra os agentes causadores da tuberculose (LIN et al., 2001); antitumoral (WANG et al., 1998); antidepressivo (NIELSEN et al., 1988; BAUREITHEL et al., 1997), estimulante (SUZUKI et al., 1999) e antiinflamatória (TROVATO et al., 2001). Está presente em duas espécies tradicionalmente utilizadas na medicina popular a *Ginkgo biloba* (STICHER, 1993) e *Hypericum perforatum*, nesta última espécie, sendo atribuída à amentoflavona a atividade antidepressiva, característica do extrato desta planta, em função da correlação observada entre a concentração deste composto e a inibição das ligações com o flumazenil (BAUREITHEL et al., 1997). O flumazenil é o primeiro antagonista específico dos benzodiazepínicos (sedativo) a ser utilizado em testes clínicos (RALL, 1991), conferindo-lhe a importância biológica deste composto e sobretudo quando a sua presença se observa como um dos compostos majoritários de uma planta.

4.5.1.3 Atividade antinociceptiva dos compostos obtidos das modificações estruturais.

A quercitrina foi isolada das folhas de *Virola oleifera* como uma mistura junto com a astilbina. Esta mistura foi hidrolisada, e os respectivos flavonóis agliconas, a quercetina e a taxifolina, foram isolados. A quercetina foi submetida a reações de modificações estruturais a acetilação e a metilação e os produtos destas reações foram submetidos aos ensaios biológicos.

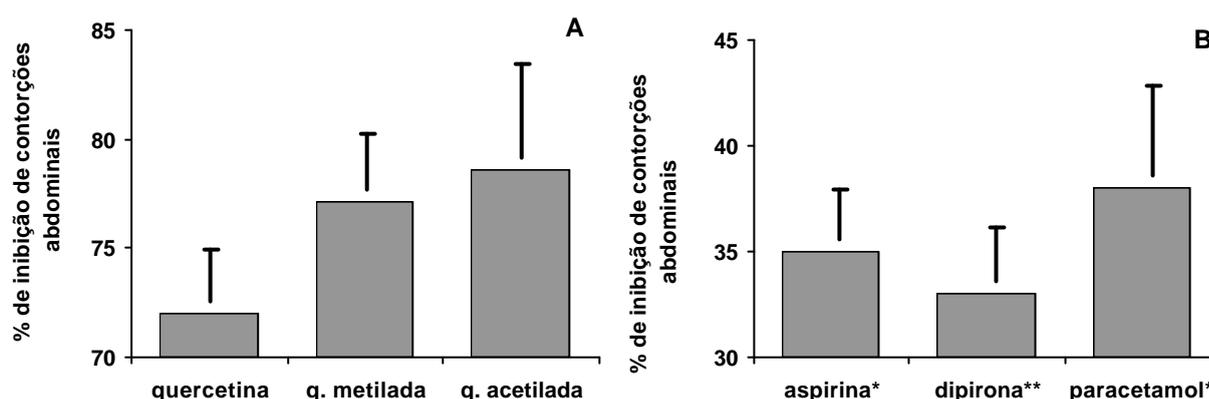
A quercetina penta-acetilada apresentou $78,6 \pm 4\%$ de inibição nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Figura 29), o que representa um aumento em torno de 10% em relação ao efeito nociceptivo apresentado pela quercetina. Neste caso, apesar do aumento observado neste efeito, a presença de grupos acetatos no composto não parece ser de fundamental importância no seu mecanismo de ação.

A acetilação da hidroxila de C-3' de 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona, isolada de outra espécie da *Virola* (*V. michelli*) apresentou um aumento na ação antiinflamatória em torno de 70% (CARVALHO et al., 1999). Deve-se salientar que as diferenças estruturais observadas entre estes compostos, e as diferentes posições das substituições, podem estar sendo responsáveis por estes diferentes resultados biológicos. Estes resultados indicam que estes fatores são de fundamental importância na avaliação biológica destes flavonóides, tornando-os de uma complexidade ainda maior, principalmente quando se objetiva a compreensão e elucidação dos mecanismos de ação deste fármaco e das interações estrutural-atividade do mesmo.

A reação de metilação da quercetina realizada com adição de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ e K_2CO_3 nos forneceu uma série de subprodutos com polaridades menores que o seu precursor, verificadas através de CCD, porém de difícil separação, os quais não puderam ser isolados e purificados pelos métodos convencionais. Assim a mistura destas quercetinas de diferentes padrões de metilação foi testada farmacologicamente e discutida em função do quercetina e da quercetina acetilada.

A mistura das quercetinas metiladas apresentou $77,1 \pm 2,5\%$ de inibição nas contorções abdominais no modelo de dor induzidas pelo ácido acético

(0,6%) (Figura-27). Este resultado foi muito parecido com a porcentagem de inibição apresentada pela quercetina acetilada ($78,6 \pm 4,3$), não apresentando diferenças significativas estatisticamente. Porém, os mesmos apresentaram um aumento em torno de 10% em relação à quercetina. A mistura de compostos obtida da reação de metilação pode ter ocasionado esta pequena diferença entre os resultados dos ensaios biológicos. Não apenas a diminuição da polaridade (substituição das hidroxilas), mas principalmente os padrões de substituição estão fortemente ligados às atividades biológicas.



Cada coluna representa a média de 6 a 8 camundongos (erros padrões representados nas barras verticais).

*Meyre-Silva, 2000

**da Silva et al., 2001.

Figura-29: Efeito antinociceptivo causado pelos produtos da modificação estrutural da quercetina (A), e os padrões analgésicos conhecidos (B), sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos, injetados na dose de 10mg/kg.

Foi observado anteriormente que quaisquer substituições de hidroxilas por grupos metilas realizadas nos anéis A ou C da quercetina, provocam um aumento na ação relaxante dos músculos da traquéia em torno de 10 vezes, e as substituições no anel B deste composto, mesmo provocando uma diminuição da

sua polaridade, apresentou uma diminuição na atividade biológica, em relação à quercetina de aproximadamente 6 vezes. Mesmo não se tratando da mesma atividade biológica, observa-se neste caso que não apenas a polaridade do composto, como vinha sendo discutido anteriormente, mas os padrões de substituição são mais importantes para definir a estrutura-atividade, auxiliando desta forma, nas etapas de síntese de fármacos mais potentes (KO et al., 1999).

As reações de metilação e acetilação da quercetina provocam uma diminuição na polaridade do composto em função das substituições dos grupos hidroxilas. Vários trabalhos têm relatado o aumento da atividade antinociceptiva com a diminuição da polaridade dos compostos testados (CARVALHO et al., 1999; CECHINEL et al., 2000; da SILVA, et al., 2001). Apesar de não existir uma explicação satisfatória com relação à ação dos fármacos como agentes anestésicos, a maioria das teorias é baseada nas propriedades físico-químicas destes compostos. A relação inversa entre polaridade e atividade antinociceptiva observada por este trabalho e diversos autores, parece estar indicando que a ação destes compostos ocorra principalmente na matriz lipídica da membrana celular ou regiões hidrofóbicas das proteínas específicas ligadas às membranas (KENNEDY e LONGNECKER, 1991).

Apesar das pequenas diferenças observadas na atividade entre a quercetina penta-acetilada e as diversas substituições da quercetina metilada, estes compostos apresentaram porcentagens de inibição maiores que os padrões tradicionalmente conhecidos como analgésicos, a aspirina, a dipirona e o paracetamol. A eficiência na inibição das contorções abdominais foi praticamente o dobro ao observado para estes padrões, mostrando a eficácia destes compostos.

Estes resultados mostram a importância da continuidade deste trabalho, na tentativa de isolar os flavonóides metilados, definir os padrões de substituição e testá-los farmacologicamente, para verificar a influência destes padrões de substituição no modelo antinociceptivo realizado.

5 CONCLUSÕES

5.1 *Virola oleifera*

A avaliação fitoquímica e farmacológica das folhas de *Virola oleifera* nos permitiram concluir que:

- ✚ As frações hexano e diclorometano apresentaram praticamente a mesma composição fitoquímica, diferenciando-se apenas pela presença de possíveis óleos voláteis na fração hexano, comprovados pelos perfis cromatográficos.
 - ✚ Estas frações forneceram as neolignanais denominadas oleiferinas-B e C, isoladas como produtos naturais anteriormente a partir das folhas desta mesma espécie. A oleiferina-B apresentou um rendimento de 0,135% em relação às folhas secas e a oleiferina-C, 10 vezes menos concentrada. Estes compostos apresentaram-se como majoritários nestas duas frações, como visto em trabalhos anteriores. No entanto, diferenças temporais e/ou espaciais podem ter ocasionado a diferença no rendimento observado entre este trabalho e o anterior.
 - ✚ A fração acetato de etila forneceu uma mistura de flavonóides glicosilados, a quercitrina e a astilbina, na proporção de aproximadamente 3:1. Trabalhos anteriores, apesar de relatarem a presença de flavonóides em outras espécies desta família, este foi o primeiro registro destes compostos nesta espécie.
 - ✚ As modificações estruturais realizadas com a quercetina foram metilação e acetilação. A acetilação forneceu a quercetina penta-acetilada, com um rendimento em torno de 72%. A metilação forneceu uma mistura de compostos
-

mais apolares que a quercetina, indicando ser provavelmente uma mistura de vários graus de metilação da quercetina.

- ✚ O ensaio biológico realizado com os compostos isolados das folhas desta planta e com os produtos das modificações estruturais da quercetina foi o teste de analgesia, medida pela porcentagem de inibição das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,6%) em camundongos. Estes ensaios mostraram que os compostos isolados das folhas de *V. oleifera* que apresentaram as maiores atividades, foram a oleiferina-C e a mistura de flavonóides glicosilados, cujas porcentagens de inibição foram respectivamente iguais a 76 e 62%. Estes resultados representam praticamente o dobro da atividade que os compostos tradicionalmente utilizados como analgésicos, o AAS, paracetamol e a dipirona.
 - ✚ A quercetina penta-acetilada e a mistura de flavonóides metilados apresentaram um aumento em torno de 10% na atividade analgésica, indicando que neste caso a modificação estrutural não parece ser o fator essencial para a realização da atividade analgésica.
 - ✚ Diante dos resultados promissores obtidos em relação às modificações estruturais da quercetina, sugere-se a continuidade deste estudo, obtendo-se derivados obtidos das reações de benzilação, benzoilação e entre outros e verificar os testes farmacológicos dos mesmos.
 - ✚ As diferenças observadas nas proporções entre as duas neolignananas obtidas neste trabalho e o anterior, sugerem a continuidade deste trabalho com um controle de qualidade destes compostos, levando em consideração a variação sazonal, regional e as diferentes partes desta planta.
-

5.2 *Hyeronima alchorneoides*

A avaliação fitoquímica e farmacológica das folhas de *Hyeronima alchorneoides* permitiram concluir que:

- ✚ Os perfis cromatográficos e os rendimentos das frações obtidas desta planta, sugerem que a mesma apresenta-se basicamente constituída por compostos ou fortemente polares, extraídos pelo acetato de etila, ou fortemente apolares, extraídos pelo *n*-hexano.
 - ✚ As folhas de *Hyeronima alchorneoides* forneceram três compostos, o esteróide β -sitosterol, o triterpeno simiarenol e o biflavonóide amentoflavona, destes, apenas o primeiro composto havia sido registrado nesta planta anteriormente.
 - ✚ Os testes farmacológicos realizados com os compostos isolados desta planta mostram que o triterpeno simiarenol e o biflavonóide amentoflavona apresentaram as maiores atividades, 67 e 74%, respectivamente na inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Estes resultados representam, da mesma forma que os compostos isolados das folhas da outra planta, o dobro da atividade que os compostos utilizados comercialmente e comprovando o uso desta planta pela medicina popular para este fim.
 - ✚ Estas elevadas atividades biológicas obtidas destes compostos sugerem a continuidade deste trabalho realizando outros testes analgésicos, utilizando outros modelos analgésicos.
-

REFERÊNCIAS

- AGNER, A.R. et al. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, vol. 67 (9), pp. 815-819, 2001.
- AKITT, J.W. **NMR and Chemistry-A Introduction to the Fourier transform-multinuclear era**. 2nd ed. New York: Chapman and Hall, 1983. 263p.
- APLIN, R.T.; ARTHUR, H.R.; HUI, W.H. The structure of the triterpene simiarenol (a E:B-friedo-Hop-5-ene) from the Hong Kong species of *Rhododendron simiarum*. **Journal of the Chemical Society (C)**, vol.1, pp. 1251-1255, 1966.
- ARTHUR, H.R.; HUI, W.H. ; APLIN, R.T. The structure of simiarenol from the hong Kong species of *Rhododendron simiarum*. **Tetrahedron Letters**, vol. 6 (14), pp. 937-943, 1965.
- AZEVEDO, N.R., SANTOS, S.C., DE MIRANDA, E.G.;FERRI, P.H. A 2-acylcyclohexane-1,3-dione from *Viola oleifera*. **Phytochemistry**, vol.46 (8), pp.1375-1377, 1997.
- BARAKAT, H.H. et al. Flavonoids of *Ochradenus baccatus*. **Phytochemistry**, vol. 30 (11), pp.3777-3779, 1991.
- BARATA, L.E.S.; BAKER, P.M. Quimioprofilaxia da esquistossomose: a atividade de *Viola surinamensis* (Rol.) Warburg. **Ciência e Cultura**, v.25 (6), p.169, 1973.
- BARBOSA FILHO, J.M. **Lignanas, neo-lignanas e seus análogos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. cap.22, p.471-488.
- BAUREITHEL, K.H. et al. Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, vol.72, pp.153-157, 1997.
- BECK, P.O. et al. Quercetin 3'-sulphate from leaves of *Leea guinensis*. **Phytochemistry**, vol. 47 (6), pp.1171-1173, 1998.
- BELOZ, A. Brine shrimp bioassay screening of two medicinal plants used by the Warao: *Solanum straminifolium* and *Viola surinamensis*.. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.37, pp.225-227, 1992.
- BERMUDEZ, J.A.Z. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade**. São Paulo:Hucintec, 1995. 204p.
-

BEVAN, M. Plant pathology: the bugs from Brazil. **Nature**, vol. 406, pp.140-141, 2000.

BLAVATTI, M.W. **Química e bioatividade de *Raulinoa echinata*, espécie endêmica do Vale do Itajaí-SC**. 2001. 246p. Tese (Doutor em Ciências - Química Orgânica), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

BRAZ FILHO, R., et al. The chemistry of Brazilian Myristicaceae. IX. isoflavonoids from amazonian species. **Lloydia**, vol.40(3), pp.236-238, 1977.

BRAZ FILHO, R., LEITE, M.F.F.; GOTTLIEB, O.R. Constitutions of diarylpropanoids from *Virola multinervis*.. **Phytochemistry**, vol.12, pp.417-419, 1973.

BROLIS, M. et al. Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*.. **Journal of Chromatography A**, vol.825, pp.9-1, 1998.

BUSKE, A.; SCHMIDT, J.; HOFFMANN, P. Chemotaxonomy of the tribe Antidesmeae (Euphorbiaceae): antidesmone and related compounds. **Phytochemistry**, vol 60, pp. 489-496, 2002.

CALIXTO, J.B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapie Resource**, vol.14, pp.401-418, 2000.

CALIXTO, J.B. et al. A review of the plants of the genus Phyllanthus: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Reviews**, vol.18, pp.225-258, 1998.

CAMPOS, A.R. et al. Investigations on the antinociceptive activity of grude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, vol. 73 (2), pp.116-120, 2002.

CARVALHO, J.C.T. et al. Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.64, pp.173-7, 1999.

CASSADY, J.M. et al. The isolation of 6-methoxyharmalan and 6-methoxyharman from *Virola cuspidata*. **Lloydia**, vol.34(1), pp.161-162, 1970.

CAVALCANTE, S.H., YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Neolignans from *Virola carinata* fruit. **Phytochemistry**, vol.24 (5), pp.1051-1055, 1985.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, vol.21(1), pp.99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação de compostos bioativos. In: YUNES, R.A. e CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.cap.1, p47-75.

CECHINEL FILHO, V., et al. Antinociceptive and Anti-oedematogenic Properties of astilbin, Taxifolin and Some related Compunds. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, vol.50(1), pp.281-285, 2000.

CHAKRAVARTY, A.K. et al. Unambiguous assingment of ^{13}C chemical shifts of some hopane and migrated hopane derivatives by 2D NMR. **Tetrahedron**, vol. 50 (9), pp. 2865-2876, 1994.

COLLIER,H.O.J. et al. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v.32, p.295-310, 1968.

COSTA, M.C.A. et al. Structure activity relationship between calculated molecular properties and biological activities against *Leishmania donovani* of the natural neolignan analogues studied with pattern recognition techniques: a possible explanation for the activity/inactivity of some lignans. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, vol.543, pp.147-156, 2001.

SILVA, K.L da. et al. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Thérapie**, vol. 56, pp. 431-434. 2001.

DAHANAYAKE, M. et al. Chemical investigations of Ceylonese plants. Part. VII. Extractives of *Calophyllum thwaitesii* planch and triana and *Calophyllum walkeri* wight (Guttiferae). **Journal of Chemical Society Perkin Translations**, vol. 1, pp.2510-2514, 1974.

DELLE MONACHE, F. Determinação estrutural de produtos naturais através da técnica de ressonância magnética nuclear. In: YUNES, R.A. e CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.cap.3, p101-146.

DI CARLO, G., et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutics drugs. **Life Science**, vol.65(4), pp.337-53, 1999.

DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, vol.27, pp.859-873, 2001.

DORA, G.; EDWARDS, J.M. Taxonomic status of *Lanaria lanata* and isolation of a novel biflavone. **Journal of Natural Products**, vol.54(3), pp.796-801, 1991.

SANTOS, R.I dos. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ed. Porto

Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. cap.10, p.323-354.

FALKENBERG, M. de B.; dos SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. cap.10, p.163-180.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.55 (3), p.225-275, 1986.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v.63, p.965-981, 1985.

FERNANDES, A. M. A. P., BARATA, L. E. S.; FERRI, P. H. Absolute configuration of the lignan oleiferins from *Virola oleifera*. **Phytochemistry**, vol.36(2), pp.533-534, 1994.

FERNANDES, A. M. A. P., BARATA, L. E. S.; FERRI, P. H. Lignans and neolignans from *Virola oleifera* leaves. **Phytochemistry**, vol.32(6), pp.1567-1572, 1993.

FERNANDES, P. B. et al. Microbial resistance: novel screens for a contemporary problem. **Medicinal Research Reviews**, vol. 19 (6), pp.559-568, 1999.

FERRI, P. H.; BARATA, L. E. S. (-)-di-de-o-methylgrandisin, a lignan from *Virola pavonis* leaves. **Phytochemistry**, vol.30 (12), pp.4204-4205, 1991.

FERRI, P. H.; BARATA, L. E. S. Neolignans and phenylpropanoid from *Virola pavonis* leaves. **Phytochemistry**, vol.31 (4), pp.1375-1377, 1992.

FERRI, P. H. **Fitoquímica das folhas de *Virola oleifera* e síntese de compostos [1,4]-benzodioxanos e análogos nitrogenados**. 1993. 177p (vol1). Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade de Campinas-UNICAMP, Campinas.

GAERTNER, M. et al. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, vol.6 (1), pp.41-44, 1999.

GOHAR, A. A., MAATOOQ, G. T.; NIWA, M. Two flavonoids glycosides from *Chenopodium murale*. **Phytochemistry**, vol.53, pp.299-303, 2000.

GOMM, A. S.; NIERENSTEIN, M. The exhaustive o-methylation of quercetin. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 53, pp.4408-4411, 1931.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversity: modelling angiosperms as networks. **Phytochemistry**, vol.55, pp.559-565, 2000.

GOTTLIEB, O.R. Evolução química vegetal. **Ciência e Cultura**. vol. 39(4), pp.357-360, 1987.

GOTTLIEB, O.R. et al. Distribution of diarylpropanoids in amazonian *Virola species*. **Phytochemistry**, vol.12, p.1830, 1973.

GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química das neolignananas. **Química Nova**, pp.250-273. 1984.

GRAND, C. et al. Photoregulation of the incorporation of guaiacyl units into lignins. **Planta**, vol. 146, pp. 281-286, 1979.

GROS, E.G. et al. **Introducción al estudio de los productos naturales**. 1°ed. Washington: The General Secretariat of the Organization of American States. 1985. 146p.

GUARIN S., C.A., CURA S., L.E.; MARTINEZ V, J.C. Lignoids of *Virola carinata* leaves. **Spectroscopy International Journal**, vol.6, pp.107-112, 2000.

GUNASEKERA, A.P.; SULTANBAWA, M.U.S. Chemical investigations of Ceylonese plants. Part. 20. Extractives of *Mesua myrtifolia*. Isolation and structure of a new triterpene hydroxy-acid, myrtifolic acid. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, vol. 1, pp. 6-10, 1977.

GUNASEKERA, A.P.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH. 3*b*-hydroxy-28-*P*-coumaroyloxy-lup-20(29)-en-27-oic acid from *Caraipa densifolia*. **Journal of Natural Products**, vol. 46 (1), pp. 118-122, 1983.

GUNASEKERA, S.P. et al. Chemical investigations of Ceylonese plants. Part 27. Extractive of *Callophyllum cuneifolium* Thw. and *Callophyllum soulattri* Burm. f. (Guttiferae). **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, vol. 1, pp. 1505-1511, 1977.

GURGEL, L.A. et al. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytoterapie Research**, vol. 15 (4), pp. 319-322, 2001.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, vol.30(12), pp.3864-3874, 1991.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4th ed. London: Academic Press Inc., 1993. 318p.

HERGERT, H.L.; COAD, P.; LOGAN, A.V. The methylation of dihydroquercetin. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 21, pp. 304-310, 1956.

HESS, S.C. **Estudos químicos, biológicos e farmacológicos com *Vochysia divergens* pohl (Vochysiaceae) e com *Ocotea suaveolens* (Meissn.) Hassler (Lauraceae).** 1995. 163f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis.

HEUPEL, R.C. Varietal similarities and differences in the polycyclic isopentenoid composition of sorghum. **Phytochemistry**, vol. 24 (12), pp. 2929-2937, 1985.

ISSELBACHER, K.J. et al. **Harrison, medicina interna.** 13ed. México: McGraw-Hill, 1998. 2967p.

JOLY, A.B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal.** 12.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JÚNIOR, C.C.; MING, L.C.; SCHEFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas.** 2ªed. São Paulo: FUNEP, 1994.

KATO, M.J. Global Phytochemistry: the Brazil approach. **Phytochemistry**, vol. 57, pp.621-623, 2001.

KATO, M.J., YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Flavones and lignans in flowers, fruits and seedling of *Virola venosa*. **Phytochemistry**, vol.31(1), pp.283-287, 1992.

KENNEDY, S.K.; LONGNECKER, D.E. História e princípios da anestesiologia. In: GILMAN, A.G. et al. **As bases farmacológicas de terapêutica.** Tradução de ALBUQUERQUE, A.M.D. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. 1991. 8ªed. Cap. 13. p. 178-188.

KO, W.-C., Relaxant effects of quercetin methyl ether derivatives in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationships. **Planta Medica**, vol.65, pp.273-275, 1999.

KUPCHAN, S.M.; BAUERSCHMIDT, E. Cytotoxic flavonols from *Baccharis sarothroides*. **Phytochemical Reports**, vol. 10, pp.664-666, 1971.

KUROSHIMA, K.N. et al. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. **Zeitschrift für Naturforschung C**, vol. 56c, pp. 703-706, 2001.

LAI, A. et al. Phytochemical investigation of *Virola peruviana*, a new hallucinogenic plant. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.62(9), pp.1561-1563, 1973.

LAO, A.; FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. Studies on the constituents of *Artemisia argyi* Lévl et Vant. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, vol. 33 (2), pp. 723-727, 1984.

- LEE, V.J.; HECKER, S.J. Antibiotic resistance versus small molecules, the chemical evolution. **Medicinal Research Reviews**, vol. 19 (6), pp. 521-542, 1999.
- LIN, Y.-M. et al. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, vol.11, pp.2101-2104, 2001.
- LIN, Y.-M. et al. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, vol.65, pp.120-125, 1999.
- LOCHER, C.P. et al. A.J. Anti-microbial activity of extract obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49 (1), pp. 23-32, 1995.
- LOCHER, C.P. et al. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, v.2 (3), pp. 259-264, 1996.
- LOPES, N.P. et al. M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, vol.64, pp.667-669, 1998.
- LOPES, N.P., KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, vol. 51 (1), pp.29-33, 1999a.
- LOPES, N.P. et al. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, vol.46(4), pp.689-93, 1997.
- LOPES, N.P. et al. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiñpi amazon indians. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.67, pp.313-319, 1999b.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas de do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, 1998.
- LU, Y.; FOO, L.Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, vol. 59 (2); pp. 187-194, 1997.
- LU, Y.; FOO, L.Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, vol. 65, p.1-8, 1999.
- MA, S.-C. et al. Antiviral amentoflavona from *Selaginella sinensis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, vol. 24 (3), pp. 311-312. 2001.
-

- MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. An ethnopharmacological examination of *Virola elongata* bark: a South America arrow poison. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.12, pp.75-92, 1984.
- MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v.23 (6), p.1207-1220. 1984.
- MALAN, E.; ROUX, D.G. Flavonoids from *Distemonanthus benthamianus* Baillo. Methoxylated flavones and inter-relationships of benthamianin, a [2]-bezopyrano-[4,3,b][1] benzopyran. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, vol.1, pp.2696-2703, 1979.
- MALHEIROS, A. et al. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, vol.57, pp.103-107, 2001.
- MALHEIROS, A.; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A. e CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.503-523.
- MARDER, M. et al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor complex. **Biorganic e Medicinal Chemistry**, vol.9, pp.323-35, 2001.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification. – (Biological techniques series)**. 1st ed. New York: Academic Press, 1982. 113p.
- MARKHAM, K.R., SHEPPARD, C.; GEIGER, H. ¹³C NMR Studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. **Phytochemistry**, vol.26(12), pp.3335-3337, 1987.
- MARTINEZ V, J.C., ALDANA J., M.I.; CUCA S., L.E. Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves. **Phytochemistry**, vol.50, pp.883-886, 1999.
- MARTINS, A.P. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Cróton stellulifer*, an endemic species from _Tome e Príncipe. **Planta Medica**, vol. 66 (7), pp. 647-650, 2000.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2^a ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.
- MEYRE-SILVA, C. **Determinação de princípios ativos presentes na *Aleurites moluccana* L. (Willd.) Euphorbiaceae**. 2000. 117p. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis.
-

- MEYRE-SILVA, C. et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L.] Willd. **Phytomedicine**, vol.5(2), pp.109-113, 1998.
- MILLER, L.C. Herbal medicinals- Selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Archives of Internal Medicine**, vol. 158, pp. 2200-2211, 1998.
- NIELSEN, M., FROKJAER, S.; BRAESTRUP, C. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amenthoflavon, to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. **Biochemical Pharmacology**, vol.37(17), pp.3285-3287, 1988.
- NISHIMOTO, K.; ITO, M.; NATORI, S. The structure of arundoin, cylindrin and fernenol. Triterpenoids of fernane and arborane groups of *Imperata cylindrical* var. *koenigii*. **Tetrahedron**, vol. 24 (2), pp. 735-752, 1968.
- OGUNKOYA, L.; OLUBAJO, O.O.; SONDHA, D.S. Triterpenoid alcohols from *Trema orientalis*. **Phytochemistry**, vol. 11, pp.3093-3094, 1972.
- PEZZUTO, J.M. Plant-derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, vol.53, pp.121-33, 1997.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, vol.56, pp.237-243, 2001.
- POSEY, D.A.; BALEE, W. Resource management in Amazonian: indigenous and folk strategies. **Advances in Economic Botany**, v.7, p.4-7, 1989.
- PRANCE, G.T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.64, p. 659-684, 1977.
- RALL, T.W. Hipnóticos e sedativos; etanol. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **As bases farmacológicas de terapêutica**. Tradução de ALBUQUERQUE, A.M.D. Rio de Janeiro:Ed. Guanabara Koogan S.A. 1991. cap. 17. p. 228-252.
- RAO, K.V.; RAO, N.S.P. Chemistry of *Saururus cernuus*, VI: Three new neolignans. **Journal of Natural Products**, vol.53(1), pp.212-215, 1990.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol.39, pp.603-613, 2001.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. 9th ed. Pennsylvania: Williams and Wilkins, 1996. 337p.
- RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazônica**, v.10 (1), suplemento. 1980.
-

ROENGSUMRAN, S. et al. Croblongifolin, a new anticancer clerodane from *Croton oblongifolius*. **Planta Medica**, vol. 68(3), pp. 274-277, 2002.

ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. Chemical constituents from Myristicaceae. **Natural Products Research in Brazil**, vol.49(5/6), pp.345-53, 1997.

SANTOS, A.R.S. et al. The involvement of K⁺ channels and G_{i/o} protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **European Journal of Pharmacology**, vol.379, pp.7-17, 1999.

SANTOS, A.R.S. et al. Antinociceptive properties of steroids from *Phyllanthus corcovadensis* im mice. **Planta Medica**, v.61, pp.329-332, 1995.

SARTORELLI, P., YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Antifungal lignans from the arils of *Virola oleifera*. **Phytochemistry**, vol.47(6), pp.1003-1006, 1998.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos** In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. *Farmacognosia- da planta ao medicamento*. 1.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed Universidade/UFRS/Ed. da UFSC, 1999.

SCHULTES, R.E.; HOLMSTEDT, B. De Plantis toxicarii e mundo novo tropicale commentationes. VIII. Miscellaneous notes on Myristicaceous plants of south America. **Lloydia**, vol.34(1), pp.61-78, 1971.

SCHULTES, R.E. Evolution of the identification of the Myristicaceous hallucinogens of South America. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.1, pp.211-239, 1979.

SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, vol. 61 (8), pp. 1053-1071, 1998.

SILVA, D.H.S., YOSHIDA, M.; KATO, M.J. Flavonoids from *Iryanthera sagotiana*. **Phytochemistry**, vol.46(3), pp.579-82, 1997.

SILVERTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de ALENCASTRO, R.B. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1994.387p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. cap.18, p.387-416.

SIMPSON, A.J.G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastigiosa*. **Nature**, v.406, pp.151 – 157, 2000.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefits sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p. 1-15, 1996

SOMANATHAN, R.; SULTANBAWA, M.U.S. Chemical investigations of Ceylonese plants. Part VIII. Trapezifolixanthone, a new di-isoprenylated xanthone from bark of *Calophyllum trapezifolium* Thw. (Guttiferae). **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, vol. 1, pp. 2515-2517, 1974.

SOUQUET, J.-M. et al. Phenolic compositions of grape stems. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, vol. 48, pp.1076-1080, 2000.

SOUTHWELL, I.A.; BOURKE, C.A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, vol 56, pp. 437-441, 2001.

STEFANELLO, M.E.A.; ALVARENGA, M.A.; TOMA, I.N. New neolignans from *Talauma ovata*. **Fitoterapia**, v.73, 135-139, 2002.

STICHER, O. Quality of *Ginkgo* preparations. **Planta Medica**, vol.59, pp.2-11, 1993.

SUZUKI, A. et al. Properties of amentoflavone, a potent caffeine-like Ca^{+2} releaser in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **European Journal of Pharmacology**, vol.372, pp.97-102, 1999.

TINTO, W.F. et al. Constituents of *Hyeronima alchorneoides*. **Journal of Natural Products**, vol. 54(5), pp.1309-1313, 1991.

TORSSELL, K. B.G. **Natural product chemistry - A mechanistic, biosynthetic and ecological approach**. 2nd ed. Estocolmo:Apotekarsocieteten – Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press. 1997. 480p.

TROVATO, A. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae).. **Il Farmaco**, vol.56, pp.455-457, 2001.

WANG, H. et al. Recent Advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol.439, pp.191-225, 1998.

WILLIAMS, J.E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative Medicine Review**, vol. 6 (6), pp. 567-579, 2001.

WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, vol. 8 (5), pp. 401-409, 2001.

WILLIS, J.C. **A dictionary of the flowering plants and ferns.** P.771. Cambridge University Press. Cambridge. 1973.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos, 2001. pp.17-44.

ZACCHINO, S. et al. In vitro studies on mode of action of antifungal 8.O.4'-neolignans occurring in certain species of *Virola* and related genera of *Mirysticaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.62, pp.35-41, 1998.

ANEXO

Segue em anexo, trabalho científico resultado de uma parte deste trabalho de pesquisa intitulado: “Phytochemical and pharmacological investigations of *virola oleifera* leaves”.
