



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL
UFAM DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS
DE FITOCONSTITUINTES
ISOLADOS DE *Peltodon radicans*

HABDEL NASSER ROCHA DA COSTA

MANAUS

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HABDEL NASSER ROCHA DA COSTA

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE FITOCONSTITUINTES
ISOLADOS DE *Peltodon radicans*

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Flávio de Carvalho Alcântara

MANAUS

2007

Ficha catalográfica, elaborada pelo Bibliotecário Flaviano Lima de Queiroz

C837e Costa, Habel Nasser Rocha da
Estudos químicos e biológicos de fitoconstituintes
isolados de peltodon radicans / Habel Nasser Rocha da Costa. - -
Manaus : UFAM /
Instituto de Ciências Biológicas, 2007.

180 f. ; 30 cm

Orientador: Antonio Flávio de Carvalho Alcântara

Tese (Doutorado) – UFAM / Instituto de Ciências
Biológicas /
PMPB, 2007.

1. Plantas medicinais 2. Jararaca (cobra) – veneno 3.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 10 de agosto de 2007 às 14h30min na sala de aula do PPGBIOTEC, Bloco "G"- Mini-Campus- UFAM **HABDEL NASSER ROCHA DA COSTA** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada "Estudo químicos e biológicos de fitoconstituintes isolados de *Peltodon radicans*".

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Antônio Flavio Carvalho de Alcântara (UFMG) – Presidente	Aprovado () Reprovado ()	
Dra. Cecília Verônica Nunez (INPA)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dr. Massayoshi Yoshida (CBA)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dra. Sandra Zanotto (UEA)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dra. Maria Meneses Pereira (UFAM)	Aprovado (x) Reprovado ()	

Resultado Final: Aprovado (x)
Reprovado ()

Manaus (AM), 10 de AGOSTO de 2007.

Coordenador do PPGBIOTEC
EM EXERCÍCIO

Dedico este trabalho,

Ao Senhor Deus minha total reverência, amor e dedicação.

*À Gilzônia Veloso, Gabriel Nasser
e Daneil Nasser o meu amor e carinho
pelo incentivo e compreensão
durante as horas de ausência.*

*Aos meus pais, Ivan Bezerra (in memoriam)
e Judeceli Rocha, pelo amor,
educação, formação e estímulo.*

*A todos os meus irmãos, irmãs,
familiares de minha esposa
e suas respectivas famílias.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma participaram na realização deste trabalho!

Ao prof. Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara pela paciência, compreensão, amizade e incansáveis horas de dedicação e orientação durante a realização desta tese.

À profa. Dra. Maria Cristina dos Santos pela valiosa amizade, incentivo, dedicação e fundamental colaboração no desenvolver deste trabalho.

Ao prof. Dr. Spartaco Astolf pela amizade, apoio e colaboração.

Ao prof. Dr. Luiz Rúbens Piedade pelo apoio e colaboração.

À profa. Dra. Dorila Pilo Veloso pelo incentivo, dedicação e colaboração.

Aos colegas e amigos Rebeca, Mauro (*in memorian*), Izandina, Andréia, Ana Frazão, Ana Maria, Julieta, Antonio José, Nívea, Gustavo, Roceli, e Miriam pelo apoio em todos os momentos e compartilhamento nas horas de estudo e alegrias.

À todos professores(as) do Departamento de Química da UFRR, pelo apoio e incentivo.

Aos professores(as) do Departamento de Química da UFAM, em especial o prof. Dr. Genilson Pereira Santana.

Aos colegas e amigos de Minas Gerais, Diego, Larissa, Marilda, Daniel, Tetê, Lara, Keli, Rodrigo, Marilza, Mariana, Filipe e Henrique pelo apoio, acolhimento e incentivo.

Ao casal, Dr. Gaspar (UFMG) e Dra. Mariza (UFV) pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas de turma pelas horas de estudo, troca de idéias, apoio e incentivo.

A todos os professores e funcionários do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM.

Aos colegas do INPA, Dra. Cecília, Dr. Orlando Libório, Dr. Ézio, Dr. Adrian, Zelina, Ananias e Gilson pela valiosa colaboração, apoio e incentivo.

A todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório CPPN-INPA, por abrir as portas de seus laboratórios e pela confiança em mim depositada. Meu muito obrigado pela ajuda e contribuição que todos me deram durante o período que passei nos seus laboratórios.

Aos colegas Gleice, Celina, Heleno, Roberta Andreza, Giselle, Letícia, que contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo suporte financeiro.

*No meio da praça e de uma e outra banda do rio,
estava a árvore da vida, que produz doze frutos,
dando o seu fruto de mês em mês, e as folhas
da árvore são para a saúde das nações.*

Ap. 22.2

SUMÁRIO

Índice de figuras.....	i
Índice de tabelas.....	vii
Índice de esquemas.....	viii
Índice de quadros.....	ix
Abreviaturas, siglas e símbolos.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii

APRESENTAÇÃO**CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO**

1. As Serpentes.....	5
1.2. Serpentes do Gênero <i>Bothrops</i>.....	8
1.3. <i>Bothrops atrox</i>.....	10
1.4. Sinais e Sintomas do Envenenamento Botrópico.....	11
1.5. Papel do Soro Antibotrópico.....	15
1.6. Plantas com Atividades Antiofídicas.....	16
1.7. Família Lamiaceae e Gênero <i>Peltodon</i>.....	18
1.8. <i>Peltodon radicans</i>.....	20

CAPÍTULO II: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Materiais e Métodos.....	25
1.1. Parte Química.....	25
1.2. Coleta e processamento do material vegetal para análise.....	26
2. Procedimento Fitoquímico.....	28
2.1. Preparação dos extratos da primeira coleta.....	28

2.2. Preparação dos extratos da segunda coleta.....	30
3. Procedimentos Biológicos.....	31
3.1. As peçonhas	31
3.2. Os animais.....	31
3.3. Determinação da Dose Mínima Edematogênica.....	31
CAPÍTULO III: ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS	
1. Fracionamento Cromatográfico das Folhas.....	34
1.1. Extrato hexânico (Fo-EH).....	34
1.2. Extrato Etanólico (Fo-EE).....	35
1.2.1. Fracionamento cromatográfico de Fo-EE-G1.....	37
1.2.2. Fracionamento cromatográfico de Fo-EE-G2.....	39
2. Estudo Fitoquímico das Flores.....	40
2.1. Extrato hexânico (Fl-EH).....	40
2.2. Extrato etanólico (Fl-EE).....	42
3. Estudo Fitoquímico do Caule	44
3.1. Extrato hexânico (Ca-EH).....	44
3.2. Extrato Etanólico (Ca-EE).....	44
4. Estudo Fitoquímico da Raiz.....	47
4.1. Extrato hexânico (Ra-EH).....	47
4.2. Extrato Etanólico (Ra-EE).....	47
5. Dados Físico-Químicos das Substâncias e ou Misturas Isoladas.....	49
5.1. Fo-EH-1 (Mistura de Hidrocarbonetos).....	49
5.2. Fo-EE-1 (Mistura de Hidrocarbonetos insaturados).....	49
5.3. Fo-EE-2 (α -Amirina).....	50
5.4. Fo-EE-3 (Mistura de β -sitosterol e estigmasterol). Os compostos Fo-EE-4 a Fo-EE-8, Ca-EE-1, Ca-EE-2 e Ra-EE-1 apresentara dados físico-químicos semelhantes.....	50
5.5. Fl-EH-1 (Mistura de hidrocarbonetos).....	51
5.6. Fl-EH-2 (α -amirina e β -amirina).....	51
5.7. Fl-EE-1 (Ácido ursólico).....	52
5.8. Fl-EE-2 (Ácido $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico, Ácido ursólico)...	52

5.9. Ca-EH-1 (Mistura de hidrocarbonetos).....	53
5.10. Ca-EE-2 (3 β -OH. 28-COOMe, metilursolato).....	54
5.11. Ra-EH-1 (Mistura de hidrocarbonetos).....	54
5.12. Ra-EE-2 (Mistura de 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosíl-Sitosterol e 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosíl- Estigmasterol).....	55
CAPÍTULO IV: ANÁLISE ESTRUTURAL DOS FITOCONSTITUINTES ISOLADOS	
1. Análise de Fo-EH-1.....	57
2. Análise de Fo-EE-1.....	68
3. Análise de Fo-EE-2.....	70
4. Análise de Fo-EE-3.....	75
5. Análise de Fo-EE-4 a Fo-EE-8.....	82
6. Análise de Fl-EH-1.....	84
7. Análise de Fl-EH-2.....	85
8. Análise de Fl-EE-1.....	93
9. Análise de Fl-EE-2.....	112
10. Análise de Ca-EH-1.....	131
11. Análise de Ca-EE-1.....	132
12. Análise de Ca-EE-2.....	133
13. Análise de Ca-EE-3.....	133
14. Análise de Ra-EH-1.....	139
15. Análise de Ra-EE-1.....	140
16. Análise de Ra-EE-2.....	140
CAPÍTULO V: ANÁLISE DOS TESTES BIOLÓGICOS	
1. Determinação da DME com os extratos etanólicos da primeira coleta.....	146
2. Determinação da DME dos extratos macerados (M-F0 e M-FI) da segunda coleta.....	150
CONCLUSÃO	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Fosseta loreal de serpentes.....	6
Figura I.2. Exemplar adulto de espécies do gênero <i>Bothrops</i> : (a) <i>B. erythromelas</i> , (b) <i>B. brazili</i> e (c) <i>B. jararacussu</i>	9
Figura I.3. Exemplar adulto de <i>B. atrox</i>	10
Figura I.4. Paciente acidentado no tornozelo por <i>B. atrox</i>	14
Figura I.5. Inflorescência de <i>Lavandula stoechas</i>	19
Figura I.6. Exsicatas de <i>P. radicans</i>	21
Figura I.7. Folhas e caule de um exemplar adulto de <i>P. radicans</i>	22
Figura I.8. Flores e cimeiras de <i>P. radicans</i>	22
Figura I.9. Estruturas químicas de β -sitosterol 1 , ácido ursólico 2 e <i>mio</i> -inositol 3 , isolados anteriormente de <i>P. radicans</i>	23
Figura II.1. Localização do município de Novo Airão (AM), no estado do Amazonas (latitude -2,62139° e longitude -60,94417°), onde foram realizadas as coletas de <i>Peltodon radicans</i>	27
Figura II.2. Material da primeira coleta com: (a) triagem para separação das diferentes partes da planta; (b) e (c) sendo respectivamente as folhas e flores separadas.....	27
Figura II.3. Excicata da amostra coletada de <i>Peltodon radicans</i>	28
Figura II.4. Procedimento de obtenção dos extratos das folhas para testes biológicos: (a) em maceração; (b) macerado espremido e (c) extrato bruto.....	30
Figura II.5. Experimentos de DME: (a) aplicação da solução salina; (b) extratos vegetais sendo injetados por via intraperitoneal e (c) mensuração das patas.....	32
Figura IV.1. Espectro de RMN de ^1H de Fo-EH-1 (CDCl_3 , 400 MHz).....	57
Figura IV.2. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° de Fo-EH-1 (CDCl_3 , 100 MHz).....	58
Figura IV.3. Espectro de RMN de ^{13}C de Fo-EH-1 , incluindo valores das integrações dos sinais (100 MHz; CDCl_3).....	59
Figura IV.4. Mapa de contorno HMQC de Fo-EH-1 (400 MHz; CDCl_3).....	60
Figura IV.5. Mapa de contorno HMBC de Fo-EH-1 (400 MHz; CDCl_3).....	61

Figura IV.6. Mapa de contorno COSY de Fo-EH-1 (400 MHz; CDCl ₃).....	62
Figura IV.7. Mapa de contorno NOESY de Fo-FH-1 (400 MHz; CDCl ₃).....	63
Figura IV.8. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa de Fo-EH-1	64
Figura IV.9. Espectro de Massas do pico com R.T. = 46,45 min do cromatograma por CG de Fo-EH-1	65
Figura IV.10. Espectro de Massas do pico com R.T. = 48,80 min, do cromatograma por CG de Fo-EH-1	66
Figura IV.11. Espectro de Massas do pico com R.T. = 52,11 min, o cromatograma por CG de Fo-EH-1	67
Figura IV.12. Espectro de RMN de ¹ H e ampliação do espectro de Fo-EE-1 (CDCl ₃ ; 200 MHz) na região entre δ_H 2,3 - 0,7.....	68
Figura IV.13. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT 135° de Fo-EE-1 (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	69
Figura IV.14. Espectro de RMN de ¹ H de Fo-EE-2 (CDCl ₃ ; 200 MHz) e ampliação na região entre δ_H 5,5 - 3,1.....	70
Figura IV.15. Espectro de RMN de ¹³ C de Fo-EE-2 (CDCl ₃ ; 50 MHz) e ampliação na região entre δ_C 59,0 - 15,6.....	71
Figura IV.16. Espectro de DEPT 135° de Fo-EE-2 (CDCl ₃ ; 50 MHz) e ampliação na região entre δ_C 41,5 - 15,1.....	72
Figura IV.17. Espectro de RMN de ¹ H de Fo-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃).....	75
Figura IV.18. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Fo-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃) na região entre δ_H 5,58 – 1,64.....	76
Figura IV.19. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Fo-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃) na região entre δ_H 1,88 – 0,64.....	76
Figura IV.20. Espectro de RMN de ¹³ C de Fo-EE-3 (100 MHz; CDCl ₃).....	77
Figura IV.21. Espectro de RMN de ¹³ C de Fo-EE-3 (100 MHz; CDCl ₃ , TMS).....	78
Figura IV.22. Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de Fo-EE-3 (100 MHz; CDCl ₃) na região entre δ_C 56,8-33,9.....	78
Figura IV.23. Espectro de absorção na região do IV de Fo-EE-3 (KBr, cm ⁻¹).....	79
Figura IV.24. Espectro de RMN de ¹ H de (a) Fo-EE-4 , (b) Fo-EE-5 , (c) Fo-EE-6 , (d)	

Fo-EE-7 e (e) Fo-EE-8 , na região entre δ_H 5,35 e 4,5, de (CDCl ₃ ; 500 MHz).....	83
Figura IV.25. Cromatograma de CG de FI-EH-1 (Coluna: SE54 30 m x 0.32 mm; temperaturas: coluna 150 °C; velocidade de arraste 10 °C/min; injetor 300 °C; detector 300 °C; “split” 1/100; fluxo 2 mL/min).....	84
Figura IV.26. Espectro de RMN de ¹ H de FI-EH-2 e ampliação na região entre δ_H 5,5 - 2,0 (400 MHz; CDCl ₃).....	85
Figura IV.27. Mapa de contornos COSY de FI-EH-2 (400 MHz; CDCl ₃).....	86
Figura IV.28. Espectro de RMN de ¹³ C de FI-EH-2 (100 MHz, CDCl ₃).....	86
Figura IV.29. Ampliações do espectro de RMN de ¹³ C de FI-EH-2 (100 MHz, CDCl ₃) nas regiões δ_C 80,0 – 10,0, 37,0 – 31,0 e 30,0 – 14,0.....	88
Figura IV.30. Subespectro DEPT 135° de FI-EH-2 (100 MHz, CDCl ₃) e ampliações nas regiões δ_C 60,0 – 31,0 e 29,0 – 14,0.....	89
Figura IV.31. Ampliação do mapa de contornos HMQC de FI-EH-2 na região δ_H 5,5 – 2,5 (400 MHz; CDCl ₃).....	90
Figura IV.32. Ampliação do mapa de contornos HMQC de FI-EH-2 na região δ_H 2,0 – 0,5 (400 MHz; CDCl ₃).....	91
Figura IV.33. Espectro de RMN de ¹ H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	91
Figura IV.34. Espectro de RMN de ¹ H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD), ampliação entre δ_H 1,2 – 0,7.....	94
Figura IV.35. Espectro de RMN de ¹ H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD), ampliação entre δ_H 1,7 – 1,2.....	94
Figura IV.36. Espectro de RMN de ¹ H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD), ampliação entre δ_H 3,0 – 1,9.....	95
Figura IV.37. Espectro de RMN de ¹ H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD), ampliação na região δ_C 185,0 – 55,0 e δ_C 45,0 – 15,0.....	96
Figura IV.38. Subespectro DEPT 135° de FI-EE-1 (100 MHz; MeOD) e ampliações nas regiões δ_C 55,0 – 15,0.....	97
Figura IV.39. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FI-EE-1 (KBr; cm ⁻¹). ..	98
Figura IV.40. Mapa de contornos COSY de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	100

Figura IV.41. Mapa de contornos COSY de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	101
Figura IV.42. Mapa de contornos COSY de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	101
Figura IV.43. Mapa de contornos COSY de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	101
Figura IV.44. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	102
Figura IV.45. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	103
Figura IV.46. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).....	103
Figura IV.47. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	104
Figura IV.48. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	105
Figura IV.49. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	105
Figura IV.50. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	106
Figura IV.51. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	106
Figura IV.52. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	107
Figura IV.53. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	107
Figura IV.54. Mapa de contornos NOESY de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	108
Figura IV.55. Mapa de contornos NOESY de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	109
Figura IV.56. Mapa de contornos NOESY de FI-EE-1 (MeOD; 100 MHz).....	109
Figura IV.57. Espectro de RMN de ^1H de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).....	113
Figura IV.58. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de FI-EE-2 (MeOD; 400 MHz), em δ_{H} 1,9 – 0,6.....	113
Figura IV.59. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de FI-EE-2 (MeOD; 400 MHz), em δ_{H} 2,0 – 0,7.....	114
Figura IV.60. Espectro de RMN de ^{13}C de FI-EE-2 (100 MHz; MeOD) e ampliação na região entre δ_{C} 140,2 – 55,2 e δ_{C} 43,2 – 16,7.....	115
Figura IV.61. Subespectro DEPT 135° de FI-EE-2 (100 MHz; MeOD) e ampliação na região entre δ_{C} 49,3 – 16,7 e δ_{C} 42,9 – 16,4.....	116
Figura IV.62. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FI-EE-2 (KBr; cm^{-1}).	117
Figura IV.63. Mapa de contornos COSY de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).....	119
Figura IV.64. Mapa de contornos COSY de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).....	119
Figura IV.65. Mapa de contornos COSY de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).....	120
Figura IV.66. Mapa de contornos COSY de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).....	120
Figura IV.67. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	121

Figura IV.68. Mapa de contornos HMQC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	121
Figura IV.69. Mapa de contornos HMQC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	122
Figura IV.70. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	122
Figura IV.71. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	123
Figura IV.72. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	123
Figura IV.73. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	124
Figura IV.74. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	124
Figura IV.75. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	125
Figura IV.76. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	125
Figura IV.77. Mapa de contornos HMBC de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	126
Figura IV.78. Mapa de contornos NOESY de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	126
Figura IV.79. Mapa de contornos NOESY de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	127
Figura IV.80. Mapa de contornos NOESY de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	127
Figura IV.81. Mapa de contornos NOESY de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	128
Figura IV.82. Mapa de contornos NOESY de Fl-EE-2 (MeOD; 100 MHz).....	128
Figura IV.83. Cromatograma de CG de Ca-EH-1 (Coluna: SE54 30 m x 0.32 mm; temperaturas: coluna 150 °C, aquecimento 10 °C/min, 300 °C; injetor 300 °C; detector 300 °C; “split” 1/100; fluxo 2 mL/min).....	131
Figura IV.84. Espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-1 (400 MHz; CDCl ₃ ; TMS).....	132
Figura IV.85. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-2 (200 MHz; CDCl ₃) na região entre δ_{H} 5,36 – 3,40.....	133
Figura IV.86. Espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃).....	134
Figura IV.87. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃), em δ_{H} 1,4 – 0,7.....	134
Figura IV.88. Espectro de RMN de ¹³ C de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃).....	135
Figura IV.89. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃), em δ_{C} 80,0 – 15,3.....	135
Figura IV.90. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃), em δ_{C} 56,6 – 15,3.....	136
Figura IV.91. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃), em δ_{C} 33,2 – 15,3.....	136

Figura IV.92. Subespectro DEPT 135° de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl ₃) e ampliação na região entre δ 55,3 - 15,3.....	137
Figura IV.93. Cromatograma de CG de Ra-EH-1 (Coluna: SE54 30 m x 0.32 mm; temperaturas: coluna 150 °C, aquecimento 10 °C/min; injetor 300 °C; detector 300 °C; “split” 1/100; fluxo 2 mL/min).....	139
Figura IV.94. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de Ra-EE-1 (CDCl ₃ , TMS).....	140
Figura IV.95. Espectro de RMN de ¹ H de Ra-EE-2 (400 MHz; CDCl ₃).....	141
Figura IV.96. Espectro de RMN de ¹³ C de Ra-EE-2 (100 MHz; CDCl ₃).....	142
Figura IV.97. Subespectro DEPT 135° de Ra-EE-2 (100 MHz; CDCl ₃).....	142
Figura IV.98. Estrutura química de esteróides glicosilados.....	144
Figura 1. Estruturas químicas dos fitoconstituintes isolados de <i>P. radicans</i>	155

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III.1. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Fo-EH.....	34
Tabela III.2. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Fo-EE.....	37
Tabela III.3. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Fl-EH.....	41
Tabela III.4. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Fl-EE.....	42
Tabela III.5. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Ca-EE.....	45
Tabela III.6. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Ra-EE.....	48
Tabela IV.1. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de Fo-EE-2 e de α -amirina.....	73
Tabela IV.2. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de Fo-EE-3, β -sitosterol e estigmasterol.....	80
Tabela IV.3. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de Fl-EH-2 e de β -amirina e α -amirina.....	92
Tabela IV.4. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de Fl-EE-1 e do ácido ursólico.....	99
Tabela IV.5. Dados de RMN de ^{13}C de Fl-EE-2 e do ácido tormêntico descrito na literatura.....	129
Tabela IV.6. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de Ca-EE-3 e de 3β -OH,28-COOMe, metilursolato.....	138
Tabela IV.7. Atribuições dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C (em ppm).....	143
Tabela V.1. Testes de DME após 2 h da aplicação dos extratos Fl-EE, Fo-EE e Ca-EE.....	147
Tabela V.2. Testes de DME após 4 h da aplicação dos extratos Fl-EE, Fo-EE e Ca-EE.....	148
Tabela V.3. Testes de DME após 6 h da aplicação dos extratos Fl-EE, Fo-EE e Ca-EE.....	149
Tabela V.4. Leitura dos testes de neutralização, da atividade Edematogênica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> , após 2 h da aplicação dos extratos M-Fo e M-Fl nas concentrações de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL em solução salina.....	152
Tabela V.5. Leitura dos testes de neutralização, da atividade Edematogênica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> , após 4 h da aplicação dos extratos M-Fo e M-Fl nas concentrações de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL em solução salina.....	153
Tabela 1. Rendimento de obtenção das substâncias isoladas nos diferentes extratos de <i>P. radicans</i>	156

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema I.1. Classificação das principais serpentes encontradas no Brasil entre peçonhentas e não peçonhentas, em função da presença de fosseta loreal.....	5
Esquema II.1. Seqüência da obtenção dos extratos das diferentes partes da planta a partir do material vegetal da primeira coleta.....	29
Esquema II.2. Seqüência de obtenção dos extratos das diferentes partes da planta, a partir do material da segunda coleta.....	30
Esquema III.1. Seqüência do isolamento de Fo-EH-1.....	35
Esquema III.2. Seqüência do fracionamento cromatográfico do extrato Fo-EE.....	36
Esquema III.3. Fracionamento cromatográfico da fração Fo-EE-G1.....	38
Esquema III.4. Seqüência do fracionamento cromatográfico da fração Fo-EE-G2.....	40
Esquema III.5. Seqüência do fracionamento cromatográfico de Fl-EH.....	41
Esquema III.6. Seqüência do fracionamento cromatográfico de Fl-EE.....	43
Esquema III.7. Seqüência do fracionamento cromatográfico do extrato Ca-EE.....	46

ÍNDICE DE QUADRO

Quadro I.1. Acidentes ofídicos registrados no Brasil entre 1990 e 1993.....	8
Quadro I.2. Classificação taxonômica de <i>Peltodon radicans</i> , segundo Cronquist.....	20

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
ν	Deformação axial (estiramento)
λ	Comprimento de onda
1D	Uma Dimensão
2D	Duas Dimensão
Acoet	Acetato de Etila
Ca	Caule
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDS	Cromatografia em Camada Delgada de Sílica
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
COSY	<i>CO</i> related <i>Spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DME	Dose Mínima Edematogênica
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
E%	Edema
EH	Extrato Hexânico
EE	Extrato Etanólico
EM	Espectroscopia de Massa
EtOH	Etanol
eV	Eletronvolts
Fl	Flor
Fo	Folha
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>

<i>i</i>	integração
I%	Inibição
<i>i.p.</i>	itraperitoneal
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
<i>m</i>	Multiplato
M ⁺	Íon Melecular
m/z	Razão entre massa e carga
M-Fl	M acerado das F lores
M-Fo	M acerado das F olhas
MeOD	Metanol Deuterado
MeOH	Metanol
N%	Neutralização
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
pág.	página
P.D.	Pata Direita
P.E.	Pata Esquerda
p.f.	P onto de F usão
<i>q</i>	Quarteto
Ra	R aiz
RMN	R essonância M agnética N uclear
RMN de ¹ H	R essonância M agnética N uclear de H idrogênio
RMN de ¹³ C	R essonância M agnética N uclear de C arbono-13
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplato
TMS	Tetrametilsilano
T.R.	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta

Resumo

A maioria dos acidentes com serpentes na região Amazônica envolve a espécie *Bothrops atrox*, cujo veneno apresenta as atividades edematogênica e necrótica mais potentes no gênero. Este trabalho descreve o estudo do isolamento dos constituintes químicos e da atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae), espécie vegetal que é usada no tratamento de picadas de serpentes e escorpiões na região. O extrato apresentou hidrocarbonetos alifáticos, 3β -OH, β -amirina (**1**), 3β -OH, α -amirina (**2**), β -sitosterol (**3**), estigmasterol (**4**), ácido ursólico (**5**), ácido $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico (ácido tormêntico **6**), 3β -hidroxi,28-metil-ursolato de metila (**7**), $3-O-\beta$ -D-glicopiranosíl-sitosterol (**8**) e $3-O-\beta$ -D-glicopiranosíl-estigmasterol (**9**). Os extratos das flores apresentaram maiores atividades edematogênicas. Este é o primeiro registro do estudo das flores, caules e raízes dessa planta.

Palavras-chaves: Plantas medicinais; Jararaca (cobra); veneno.

Abstract

Most of the snakebite incidents in the Amazon region involve the *Bothrops atrox*, whose venom presents the most potent edematogenic and necrotic activities in the genus. This work describes the studies of isolation of the chemical constituents and antiedematogenic activity of the species *Peltodon radicans* (Lamiaceae), which is used in the treatment of snakebites and scorpion stings in the region. The extracts presented aliphatic hydrocarbons, 3β -OH, β -amirin (**1**), 3β -OH, α -amirin (**2**), β -sitosterol (**3**), stigmasterol (**4**), ursolic acid (**5**), $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (tormentic acid, **6**), methyl 3β -hydroxy,28-methyl-ursolate (**7**), sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**8**), and stigmasterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**9**). The flower extracts presented the largest antiedematogenic activity. This is the first report on the study of the flowers, stem, and roots of this plant.

Keywords: Medicinal plants; Jararaca (snake); poison.

APRESENTAÇÃO

No Brasil, em torno de 20 mil acidentes ofídicos por ano são registrados por espécies pertencentes principalmente ao gênero *Bothrops* (jararacas). Os sinais e sintomas no acidentado envolvem indução geralmente a manifestações locais e sistêmicas, frequentemente dor, edema, hemorragia e alteração da coagulação sangüínea. Várias espécies vegetais são usadas popularmente como antiofídicas e que tiveram eficácia comprovada. Assim, tem-se *Eclipta prostrata*, testada contra veneno de espécies dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (cascavéis), neutralizando a ação hemorrágica e as atividades letais e miotóxicas. *Curcuma longa* foi testada contra o veneno de *Bothrops jararaca*, neutralizando a sua ação letal e hemorrágica. *Peltodon radicans* (paracari) possui vários usos pela medicina popular, principalmente o tratamento de asma, bronquite, coqueluche, inflamações dos rins e do fígado, afeções da pele e como vermífugo. Além disso, essa espécie é muito utilizada também no tratamento de acidentes ofídicos na região Amazônica. O contuso dessa espécie foi testado contra o veneno de *Bothrops atrox*, neutralizando 34,6% da atividade edematogênica e 28,6% da atividade fosfolipásica.

P. radicans distribui-se amplamente no Brasil, sendo encontrada em terrenos arenosos e matas de terra firme na região Amazônica. Em estudos fitoquímicos de suas folhas foram identificados sitosterol e ácido ursólico, além de *mio*-inositol. Entretanto, nenhum outro estudo químico mais sistemático tem sido descrito sobre essa espécie. Desta forma, tendo em vista a necessidade de busca de novas alternativas para o tratamento de acidentes ofídicos, principalmente em regiões que apresentam tanto alta incidência de acidentes quanto fatores geográficos e de infra-estrutura que dificultam o atendimento de acidentados, este trabalho tem por objetivo o estudo químico de *P. radicans*, biomonitorado por testes biológicos, para determinação de extratos, frações e/ou fitoconstituintes de diferentes partes da planta (raiz, flores, caule e folhas) com atividades anti-edematogênica. No caso dos fitoconstituintes isolados, as determinações serão realizadas para relacionar com as atividades biológicas alegadas.

Para o estudo proposto, pretende-se realizar a obtenção de extratos de diferentes partes de *P. radicans*; fracionamento cromatográfico dos extratos, principalmente daqueles que se apresentarem positivos aos testes biológicos; purificação e identificação por métodos espectroscópicos e espectrométricos dos fitoconstituintes isolados; análise conformacional por RMN e realização de testes de atividades biológicas (edematogênica) dos extratos, das frações e/ou fitoconstituintes isolados. Desta forma, através deste trabalho, espera-se que as informações obtidas pelos estudos propostos permitam contribuir para o conhecimento fitoquímico de *P. radicans* e inferir sobre a relação estrutura química e atividades biológicas de seus constituintes.

No Capítulo I são introduzidas informações sobre (i) as serpentes, especialmente *Bothrops atrox*, (ii) os sinais e sintomas do envenenamento e (iii) as plantas com atividades antiofídicas, especialmente *Peltodon radicans*. Os procedimentos experimentais empregados são descritos no Capítulo II, contendo os materiais e métodos, a parte fitoquímica, além da parte dos testes de atividade antiedematogênica.

Os resultados dos estudos fitoquímicos são apresentados no Capítulo III, abordando o fracionamento cromatográfico dos extratos hexânicos e etanólicos das folhas, flores, caules e raízes do material vegetal, descrevendo também os dados físicos e químicos dos fitoconstituintes isolados. No capítulo IV são apresentadas as análises estruturas desses fitoconstituintes.

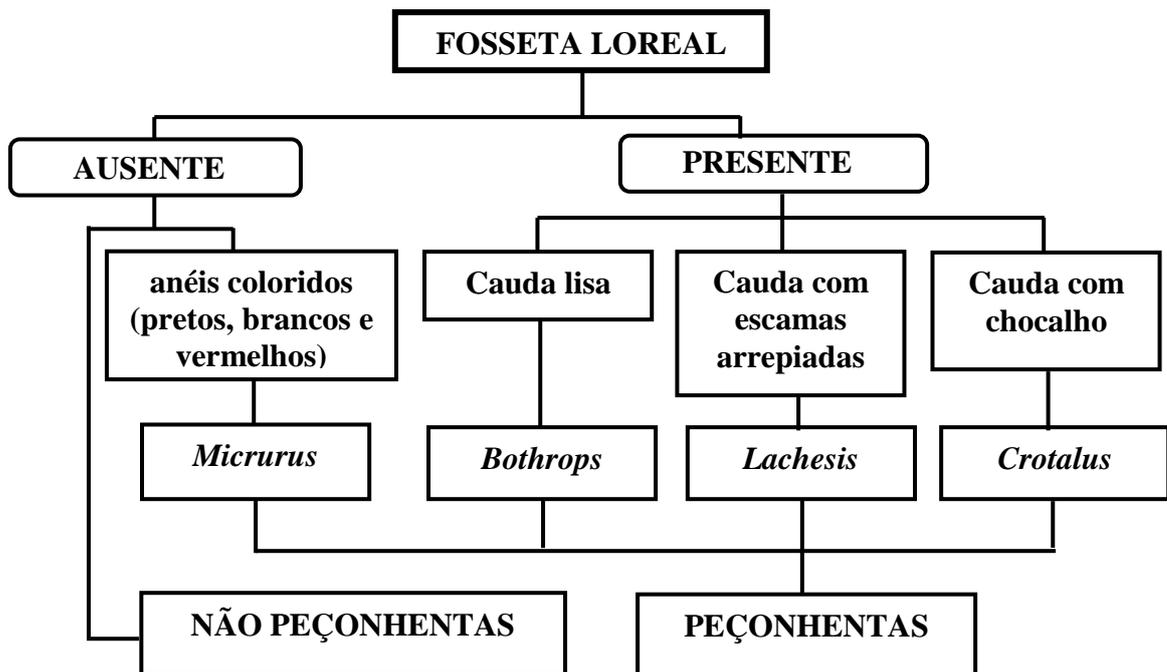
Finalmente, a análise dos testes biológicos é apresentada no Capítulo V. Os testes de atividade edematogênica são analisadas para os extratos etanólicos obtidos por procedimentos fitoquímicos, incluindo também testes com extratos macerados obtidos conforme informações etnofarmacológicas.

CAPÍTULO I:

INTRODUÇÃO

1. As Serpentes

De acordo com a literatura, as serpentes são vertebradas, ectotérmicas e carnívoras, que pertencem ao grupo dos répteis. Podem ser classificadas em dois grupos básicos: as peçonhentas e as não peçonhentas (Esquema I.1)¹. As serpentes não peçonhentas são aquelas que possuem a glândula produtora do veneno, que não é inoculado com facilidade na presa ou não tem atividade tóxica considerável. Seus representantes são geralmente ativos, rápidos e de hábitos noturnos, não possuem presas anteriores e fosseta loreal (órgão termorreceptor situado entre o olho e a narina), mas possuem pupilas circulares. A cabeça não se destacada do corpo e a cauda afina progressivamente².



Esquema I.1. Classificação das principais serpentes encontradas no Brasil entre peçonhentas e não peçonhentas, em função da presença de fosseta loreal.

As serpentes peçonhentas são aquelas que conseguem inocular seu veneno no corpo de uma presa ou vítima, sendo identificadas por três características fundamentais. Uma é a presença de fosseta loreal (Figura I.1). Outra é presença de guizo ou chocalho no final da cauda. A terceira é a presença de anéis de cores variadas, frequentemente vermelhos, pretos, brancos ou amarelos².



<http://www.saude.pr.gov.br/saudeambiental/animais/galeria/images/cobras.jpg>

Figura I.1. Fosseta loreal de serpentes.

As serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Laquesis* possuem dentes inoculadores bem desenvolvidos, pupilas em fenda, cabeças triangulares destacadas do corpo, caudas que se afinam abruptamente, hábitos noturnos e costumam ser vagarosas³. Além disso, são providas de fosseta loreal que indica que a serpente é peçonhenta (Esquema I.1). Apesar de as serpentes do gênero *Micrurus* serem peçonhentas, possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos e não possuem fosseta loreal⁴.

Estima-se a existência de 3 mil espécies de serpentes no mundo, das quais de 10 a 14% são consideradas peçonhentas⁵. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em torno de 2,5 milhões de acidentes envolvendo serpentes peçonhentas ocorrem anualmente no mundo, com

125 mil mortes⁶. Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam um enorme problema de saúde pública, pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam⁷, especialmente em países tropicais.

A mortalidade dos acidentados varia nas regiões do mundo⁸. Na Europa, EUA e Canadá, os acidentes ofídicos são relativamente raros, com hospitalização de 90% dos 8 mil acidentados por ano, sendo de 15 a 30 dos casos fatais. Na África, a prevalência de acidentes ofídicos é subestimada devido ao sistema de notificação ser impreciso, sendo registrados cerca de 500 mil acidentados por ano, com 40% dos casos hospitalizados e 20.000 óbitos⁶. Na Ásia, principalmente Índia, Paquistão e Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25 a 35 mil óbitos por ano, com alta incidência envolvendo a espécie *Vipera russelli*⁹. No Japão, a incidência geral é de aproximadamente de 1/100 mil habitantes e a letalidade é inferior a 1%. Na Austrália, estima-se uma incidência entre 3 e 18 casos por 100 mil habitantes, sendo as serpentes dos gêneros *Pseudonaja* e *Notechis* responsáveis pela maioria dos casos letais⁶.

Segundo dados do Ministério da Saúde ocorrem no Brasil entre 19 e 22 mil acidentes ofídicos por ano, com aproximadamente 0,45% de letalidade¹⁰. A Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP) do Ministério da Saúde levantou 81.611 acidentes no período de 1990 a 1993, com um coeficiente de incidência de 13,5 acidentes/100 mil habitantes (veja Quadro I.1). A região Centro-Oeste apresentou o maior índice por região, sendo 33 acidentes/100 mil habitantes⁸.

A identificação das serpentes entre peçonhentas e não peçonhentas permite o conhecimento das espécies por regiões, o uso de procedimentos terapêuticos específicos e estabelece o antiveneno a ser administrado. No caso do gênero da serpente ter sido informado, *Bothrops* foi responsável por 90,5%, *Crotalus* 7,7%, *Lachesis* 1,4% e *Micrurus* 0,4% dos acidentes, sendo a maior taxa de letalidade envolvendo serpentes das espécies do gênero *Crotalus* (1,87%)^{8,10}.

Quadro I.1. Acidentes ofídicos registrados no Brasil entre 1990 e 1993*

DISTRIDUIÇÃO	CASOS	%	ÓBITOS	%
Bothrops	59.619	73,1	185	0,31
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2	95	1,87
<i>Lachesis</i>	939	1,1	9	0,95
<i>Micrurus</i>	281	0,3	1	0,36
Não informados	13.339	16,3	69	0,52
Não peçonhentos	2.361	3,0	-	-
TOTAL	81.611	100	359	0,45

(*) Adaptado da Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP) do Ministério da Saúde

1.2 Serpentes do Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* é constituído por aproximadamente 30 espécies de serpentes distribuídas em todo o Brasil. As espécies mais conhecidas são: *B. atrox*, encontrada no norte do Brasil; *B. erythromelas*, na região nordeste; *B. neuwiedi*, em todas as regiões, exceto na região Norte; *B. jararaca*, na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste; *B. brazili* na região Amazônica e *B. alternatus* no sul do país^{2,6,11}. A Figura I.2 mostra exemplares adultos de *B. erythromelas*, *B. brazili* e *B. jararacussu*¹².

Seus representantes possuem cauda lisa e não têm chocalho, cores muito variadas que dependem da espécie e da região onde vivem. Habitam zonas rurais e periféricas das grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros e depósitos de lenhas). Tem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares^{3,10,12}.

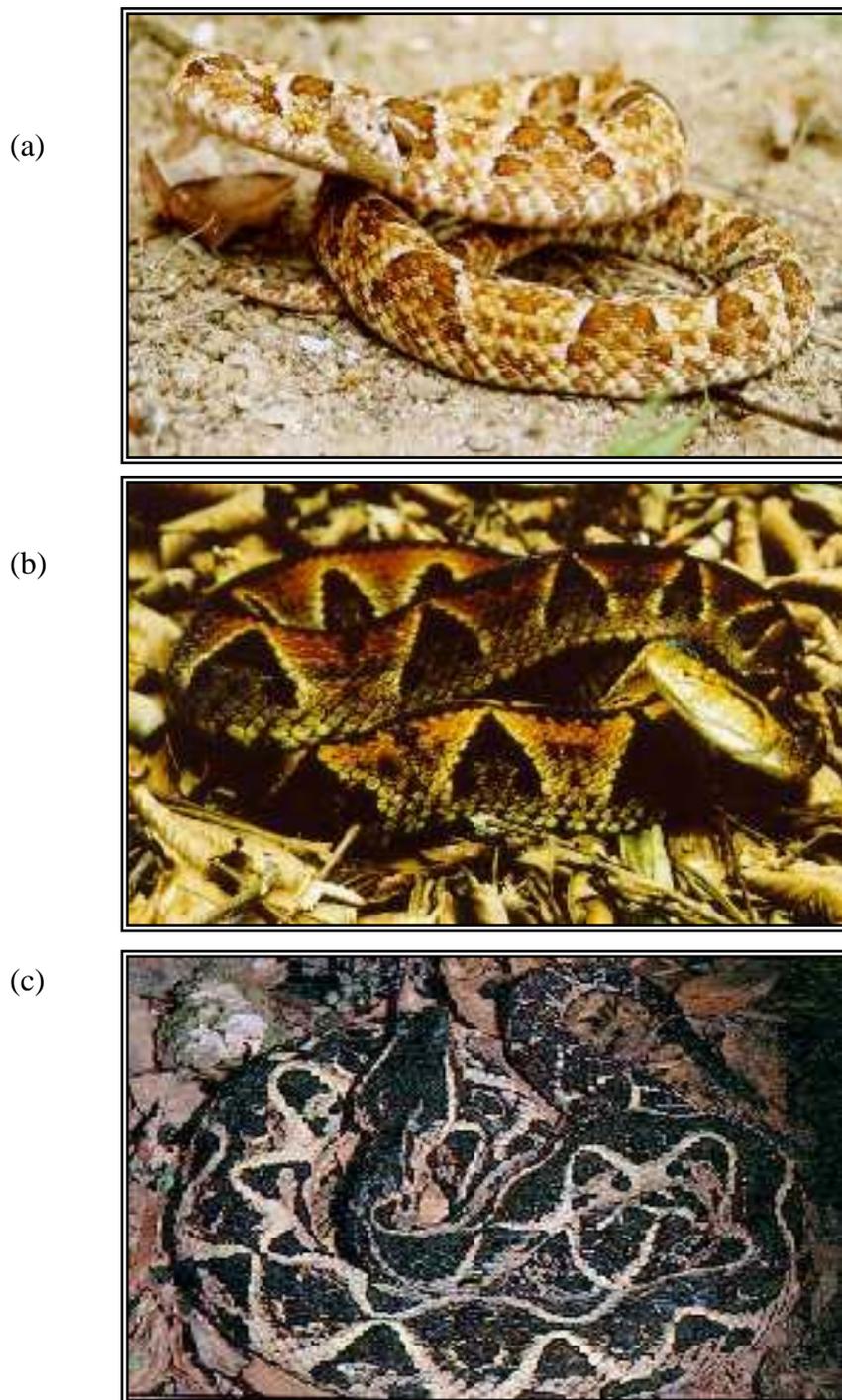


Figura I.2. Exemplar adulto de espécies do gênero *Bothrops*: (a) *B. erythromelas*, (b) *B. brazili* e (c) *B. jararacussu* (Foto: Paulo F. Buhnheim).

1.3. *Bothrops atrox*

A espécie *Bothrops atrox* (Figura I.3) é conhecida popularmente como surucurana, jararaca-do-norte, acuambóia, cuambóia, combóia ou jararaca-do-rabo-branco^{12,13}. Dentre suas principais características, destacam-se por serem agressivas e apresentarem cabeça subtriangular lanceolada com focinho pontudo, olhos moderados com pupila vertical, nasal dividido, fosseta loreal, dentição solenóglifa e escudos pequenos da parte superior da cabeça, carenados, mais ou menos arredondados anteriormente e afilados posteriormente. As escamas são dorsais em 23 a 29 filas, com redução fortemente carenadas, afiladas e imbricadas. A coloração apresenta padrão variável entre os indivíduos, os sexos e nos jovens. Alguns exemplares apresentam marcas em “V” truncado e inverso, orladas por uma faixa amarelada clara no dorso e, na parte terminal, uma mancha amarelada. Por sua vez, outras têm contornos ausentes ou mal definidos dos triângulos truncados em todo o corpo, a coloração é acinzentada com manchas negras e brancas¹⁴. Possuem porte médio a grande, podendo alcançar quase 1,50 m de comprimento e cauda de 11,2% a 16,7% do comprimento total. São vivíparas, podendo ter mais de 40 filhotes de uma só vez¹⁵.



<http://www.wikipedia.org/>

Figura I.3. Exemplar adulto de *B. atrox*.

Representantes dessa espécie são encontradas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e na região Amazônica, tanto nas florestas como em regiões de vegetação secundária, capoeiras, locais inundados e áreas com atividades agropastoris¹⁶. Na Amazônia, *Bothrops atrox* ocorre em altas densidades, em vários habitats (principalmente florestas), é normalmente noturna, embora seja encontrada eventualmente em atividade de dia). Quando ativa ou em repouso, utiliza tanto o chão quanto a vegetação e forrageia usando tática de espreita¹³. A dieta é generalista, consumindo centopéias, anuros, rãs, lagartos, aves e mamíferos. Representantes dessa espécie apresentam mudança ontogenética. Quando jovens alimentam-se principalmente de presas exotérmicas e os adultos ingerem principalmente presas endotérmicas, sendo, por isso, a peçonha das serpentes jovens diferente das adultas^{2,12,17}.

1.4. Sinais e Sintomas do Envenenamento Botrópico

A literatura relata que as peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexo de todos os venenos, podendo desempenhar diversas funções na natureza. As funções defensivas são observadas em alguns lepidópteros (taturanas). As funções alimentares são observadas nas serpentes, escorpiões e aranhas, sendo utilizados na imobilização e no início da digestão da presa. As funções de ataque com intuito de defesa são observadas em formigas, vespas e abelhas, na proteção de suas colônias, e em serpentes¹⁸.

Os venenos de serpentes contém vinte ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco do veneno é constituído por proteínas, correspondendo grande variedades de enzimas, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas². São produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente por polipeptídeos. Várias dessas substâncias

analisadas apresentam efeitos biológicos diversificados¹⁸. As ações biológicas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* mostraram variações interespecíficas¹⁹. Variações intraespecíficas nos constituintes e nas ações biológicas têm sido verificadas também no veneno de *Bothrops atrox*^{20,21}.

Historicamente, os venenos têm sido classificados de acordo com a atividade farmacológica predominante, ou seja, como miotóxicos, neurotóxicos, hemorrágicos ou coagulantes, dentre outros²². Os venenos botrópicos induzem normalmente a um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais imediatas como hemorragia, edema, dor e mionecrose que se desenvolvem rapidamente no local, após a inoculação do veneno²³⁻²⁸

A dor costuma ser imediata e de intensidade variável no local da inoculação do veneno, estendendo-se por tudo o membro nas horas seguintes. A mionecrose é causada diretamente pela ação direta de miotoxinas sobre a membrana plasmática das células musculares e, indiretamente, pelo desenvolvimento de isquemia resultante de drásticas alterações induzidas por esses venenos sobre a microvasculatura e artérias intramusculares. A hemorragia local no envenenamento botrópico resulta da ação de metaloproteinases de relativa alta massa molecular que agem diretamente sobre os capilares, induzindo extravasamento. O edema local é também uma característica da injeção de venenos botrópicos. Esse efeito é devido provavelmente à ação direta de componentes do veneno sobre a microvasculatura, aumentando a permeabilidade de capilares e vênulas. O edema local pode acometer vários segmentos do membro afetado e, dependendo das proporções que adquire, acarreta aumento da pressão sanguínea, em compartimentos que contém músculos, nervos, levando à síndrome comportamental, podendo deixar como seqüelas a perda funcional ou mesmo anatômica do membro acometido^{2,8,9,23}. As ações biológicas destacam-se principalmente como coagulantes, hemorrágicas e proteolíticas²³⁻

A ação coagulante é derivada da fração do veneno do tipo trombina capaz de ativar fatores da coagulação sanguínea. O veneno pode transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina intravascular, podendo tornar o sangue incoagulável. A maioria dos venenos botrópicos ativa a coagulação sanguínea, por atuarem sobre o fibrinogênio, a protrombina (fator II), o fator X (fator Stuart-Prower) da cascata da coagulação sanguínea. A coagulopatia de consumo, conseqüente à ativação da coagulação, determina incoagulabilidade sanguínea, representada, clinicamente, por sangramentos espontâneos, como gengivorragia, hematúria microscópica e púrpuras (principalmente esquimoses em locais distantes à picada)^{2,9}. As principais causas de óbitos no envenenamento botrópico, estão relacionadas à insuficiência renal aguda (IRA), sangramentos em órgão vitais e choques. O choque constitui uma evolução rara, porém de instalação precoce, pode estar relacionada à quantidade de veneno inoculado na vítima^{2,8,29}.

A ação hemorrágica, um outro sintoma característico induzido pelo veneno das serpentes botrópicas, leva a alteração da microvasculatura local e sistêmica em nível de pulmões, cérebro e rins. A ação vasculotóxica é causada por fatores hemorrágicos denominados de hemorraginas, metaloproteinases dependentes de zinco, capazes de romper a membrana basal dos vasos sanguíneos^{26,27}.

As hemorraginas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente sua ruptura. O edema no local da picada, que ocorre geralmente minutos após o acidente, é decorrente de lesão tóxica no endotélio dos vasos sanguíneos^{9,23,26}. A ação das hemorraginas explica muitos casos de hemorragias sistêmicas e algumas vezes fatais no sistema nervoso central^{8,26,27}, conforme mostrado na Figura I.4.



<http://www.lava.med.br/livro>

Figura I.4. Paciente acidentado no tornozelo por *B. atrox*.

Dos três tipos de ações principais do veneno botrópico, a atividade proteolítica é de importância fundamental para a caracterização clínica do acidente. A ação proteolítica, mais bem definida como inflamatório agudo, decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno (proteases, hialuronidasas e fosfolipases), podendo ocorrer liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares. Essa ação tem relação direta com a quantidade inoculada de veneno. As lesões locais (rubor, edema, bolhas e necrose) são devidas a essa ação, mas decorrem também da presença de hemorraginas, ação coagulante destes venenos e liberação de mediadores da resposta inflamatória, podendo ser potencializadas por infecções secundárias^{2,8,21,28}.

1.5. Papel do Soro Antibotrópico

O único tratamento conhecido e eficiente nos casos de acidentes ofídicos é a soroterapia específica que consiste na administração o mais precocemente possível do soro, por via endovenosa³⁰. Os antivenenos produzidos no Brasil são gerados a partir de espécies serpentes e artrópodes provenientes da região sudeste do Brasil, sendo o Instituto Butantan de São Paulo o centro produtor principal, além da Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais³¹.

A literatura relata que os antivenenos produzidos pela administração de veneno em cavalos contêm anticorpos que neutralizam muito dos efeitos sistêmicos e locais induzidos³². O soro antibotrópico é eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos, particularmente das alterações da coagulação sanguínea. Por isso, o soro botrópico tem contribuído para a diminuição, ao longo do tempo, dos casos de letalidade³³. Antes da utilização da soroterapia, o envenenamento por serpentes botrópicas apresentava prognóstico de morte de 2 a 3%, tendo sido reduzido atualmente para 0,5 – 0,6%.²⁸

O soro antibotrópico, diferentemente de sua ação do quadro sistêmico, não neutraliza de modo eficaz as reações locais acarretadas pelo veneno botrópico, mesmo sendo administrado logo após o acidente³³⁻³⁹. As lesões locais, particularmente o edema, progridem nas primeiras 24 horas, mantendo-se por vários dias⁴⁰. A ineficácia do antiveneno em neutralizar os efeitos locais constitui-se em um dos mais sérios problemas no tratamento do envenenamento botrópico. Algumas hipóteses são sugeridas para explicar esta ineficácia. Em primeiro lugar, os efeitos locais instalam-se rapidamente, o que contribui para dificultar a reversão do processo já iniciado desde o período de administração do soro. Em segundo lugar, a existência de variações interespecíficas e intraespecíficas dos venenos, associadas à distribuição geográfica, sexuais, ontogenéticas e sazonais dos animais, faz com que o uso desses antivenenos possa resultar em uma neutralização ineficiente de suas toxinas^{2,28,21,36}.

A dose de soro empregada no tratamento é determinada em função da sintomatologia do envenenamento, sendo classificada em leve, moderada e grave. Existem muitas controvérsias quanto à dosagem terapêutica e acredita-se que a administração de doses excessivas de soro contribui para a alta incidência de reações anafiláticas observadas nos tratamentos²⁸. A utilização de fármacos como terapêutica complementar à soroterapia não foi estabelecida ainda, uma vez que não estão caracterizados totalmente os mecanismos envolvidos nas ações locais induzidas por esses venenos. Com exceção da dor, os efeitos locais têm sido muito estudados atualmente. No entanto, apesar de alguns estudos experimentais indicarem a utilização de heparina como benéfica no tratamento das reações locais por envenenamentos ofídicos⁴¹⁻⁴³.

1.6. Plantas com Atividades Antiofídicas

Geralmente, os princípios ativos extraídos dos vegetais são produtos metabólicos secundários decorrentes da adaptação a diferentes estações do ano, tipo de solo, pH, umidade e temperatura, dentre outros fatores. Esses metabólitos distribuem-se diferentemente nas diversas partes do vegetal, como raízes, caule e folhas. Por isso, torna-se muito importante a padronização por parte dos pesquisadores e usuários quanto à classificação correta da planta, época e local de coleta, parte utilizada e modo de preparo do extrato vegetal.

O uso de plantas medicinais para tratamento de acidentes com serpentes é muito difundido entre a população. Há muitos relatos e poucos são os conhecimentos científicos a respeito das prováveis características apresentadas por essas plantas. Desse modo, deve-se dar importância a estudos que visem a conhecer melhor os efeitos que essas plantas apresentam quando usadas no tratamento de acidentes com animais peçonhentos.

No Brasil, existem várias espécies vegetais usadas popularmente como antiofídicas e que tiveram eficácia comprovada. A literatura relata que o extrato aquoso do látex de *Croton urucurana* Baillon, conhecida popularmente como sangra d'água, é utilizado como anti-reumático, anti-inflamatório e cicatrizante. Além disso, estudos apresentaram especificidade para a inibição da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*⁴⁴.

A espécie *Eclipta prostrata*, conhecida como erva-botão, é muito usada na medicina popular como antiofídica, com redução da letalidade e antagonização da miotoxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. As substâncias wedelolactona, estigmasterol e sitosterol foram isolados dessa espécie e apresentaram também proteção contra doses letais deste veneno⁴⁵. Os efeitos tanto do extrato bruto desta planta quanto da wedelolactona foram testados. Os resultados obtidos mostraram a presença de substâncias antiproteolíticas e anti-hemorrágicas, sugerindo a eficiência desta planta e de seus componentes no tratamento de envenenamentos⁴⁶.

O extrato aquoso de *Curcuma longa*, planta medicinal conhecida por apresentar propriedades anti-inflamatórias, possui substâncias tais como cumarinas e o ar-turmerona que protegem tanto o homem quanto os animais contra o veneno de serpente⁴⁷. Estudos demonstraram que extratos dessa planta mostraram efeito inibitório em hemorragias provocadas pelo veneno de *B. jararaca* e *B. alternatus*, bem como na dose letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

A espécie *Casearia sylvestris*, conhecida popularmente como guaçatonga, é empregada na medicina popular como anti-séptica, cicatrizante, anestésico tópico e antiofídica. Extratos aquosos dessa planta apresentaram efeitos inibitórios nos venenos das serpentes *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *Lachesis muta*⁴⁸. Estudos mostraram que o extrato da espécie *Casearia grandiflora* inibiu a atividade PLA₂ das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*⁴⁹. Os extratos de *Tabernaemontana catharinensis* e *Eclipta prostrata* inibiram as atividades miotóxicas em camundongos provocadas pelas peçonhas de *C. durissus terrificus* e *B. jararacussu*,

respectivamente^{45,46,50}. *Mandevilla velutina*, conhecida popularmente como jalapa, apresentou atividade antiofídica, inibindo a fosfolipase A₂ e fosfolipase C em edemas de camundongos⁵¹. *Musa paradisíaca* neutraliza as atividades da fosfolipase A₂ miotóxica, hemorrágica e letal de peçonha crotálicas⁵².

A literatura registra que o extrato de *Marsypianthes chamaedrys* apresenta atividade analgésica, antiinflamatória e moluscida, bem como demonstrou atividade antiofídica do veneno de *Bothrops jararaca*^{53,54}. Por sua vez, levantamentos etnofarmacológicos indicam que *Peltodon radicans*, pertencente à família Lamiaceae, tem sido usada popularmente no tratamento de acidentes ofídicos⁵⁴.

1.7. Família Lamiaceae e Gênero *Peltodon*

As espécies da família Lamiaceae são consideradas como tônicas e aromáticas devido ao óleo essencial que possuem. Os povos orientais da antigüidade tinham grande interesse em espécies dessa família, usando-as em seus cultos, na terapêutica e na feitiçaria. Salomão estudou o *Yssopo* e seus molhos foram descritos aos israelitas para formarem brochas com que deveriam aspergir o sangue do cordeiro no umbral da porta ao saírem do Egito, na célebre noite da morte dos primogênitos⁵⁵. *Origanum maru* é uma erva de cheiro forte e sabor picante nativa da ilha de Creta e de toda a Palestina que foi incluída na antiga farmacopéia como *Herba Maru Cretici*. Na bibliografia antiga, as mentas eram consideradas como plantas carminativas, aromáticas e tonificantes. Quando os portugueses e espanhóis vieram ocupar o Novo Mundo, muitas espécies da família Lamiaceae foram trazidas da Europa, onde eram usadas na terapêutica e na culinária. As lamiáceas têm aceitação universal por possuírem características como óleo essencial geralmente aromático, substâncias extrativas amargas, resinas e bálsamos⁵⁶.

A família Lamiaceae é constituída por 252 gêneros contendo aproximadamente 6700 espécies. A sistemática de classificação das espécies dessa família está baseada na inflorescência, sendo dividida em oito subfamílias⁵⁷: Ajugoideae, Chloanthoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Pogostemonoideae, Scutellarioideae, Teucroideae e Viticoideae. Espécies dessa família são cosmopolitas, distribuídas amplamente em áreas tropicais e temperadas, principalmente em regiões mediterrâneas e em savanas de planalto tropical⁵⁸. As suas plantas são ervas ou arbustos, raras vezes árvores pequenas chegando a 18 m em *Hiptis arborea*, com vários tipos de pêlos, providos geralmente de glândulas epidérmicas pedunculadas com características essenciais, apresentando terpenóides⁵⁹. Possuem folhas opostas ou, algumas vezes, verticiladas (alternas), simples ou ocasionalmente pinaticompostas e com ausência de estípulas⁵⁹⁻⁶¹.

As inflorescências são de vários tipos. Porém, a maioria delas apresenta-se em pequenas cimeiras na axila de brácteas ou folhas, formando um verticilastro e, quando reunidas, formando um tirso. As cimeiras são axilares, reduzidas a uma flor, e a inflorescência é essencialmente um racimo (exemplificada para *Lavandula stoechas* na Figura I.5). Flores menores são bracteoladas, perfeitas ou algumas unissexuadas. O cálice é geralmente persistente.



<http://www.biloge.uni-hanburg.de/>

Figura I.5. Inflorescência de *Lavandula stoechas*.

Segundo a literatura, vários tipos de iridóides e flavanóides glicosilados, triterpenóides, flavonas, esteróides (principalmente sitosteróis) e semiquinonas têm sido isolados das folhas de espécies da família Lamiaceae. Apesar dos ácidos rosmarínico e clorogênico serem marcadores quimiotaxonômicos dessa família, esses dois ácidos não têm sido isolados de algumas de suas espécies^{57,62}.

Peltodon é um gênero botânico da família subfamília Nepetoideae composto pelas espécies: *Peltodon comaroides*, *Peltodon longipes*, *Peltodon pusillus*, *Peltodon tomentosus*, *Peltodon repens*, *Peltodon rugosus* e *Peltodon radicans*.

1.8. *Peltodon radicans*

A espécie *Peltodon radicans* é conhecida popularmente por boiaaca, paracari, hortelã-do-mato, hortelã-do-campo ou rabugem-de-cachorro^{63,64}. A classificação taxonômica obedece ao sistema proposto por Cronquist⁶⁵, conforme mostrado no Quadro I.2.

Quadro I.2. Classificação taxonômica de *Peltodon radicans*, segundo Cronquist

Classe	Dicotiledonea
Subclasse	Asteridae
Ordem	Lamiales
Família	Lamiaceae
Subfamília	Nepetoideae
Tribo	Ocimeae
Gênero	<i>Peltodon</i>
Espécie	<i>Peltodon radicans</i>

A espécie *Peltodon radicans* (Figura I.6) apresenta uma ampla distribuição geográfica, proporcionando geralmente características morfológicas altamente variadas entre si^{57,66,67}. Representantes dessa espécie distribuem-se largamente no Brasil e no Paraguai, sendo encontradas na região Amazônica, principalmente em terrenos arenosos e matas de terra firme⁵⁹.



http://www.zum.de/stueber/pohl/band1/high/IMG_6608.html



Figura I.6. Exsicatas de *P. radicans*.

As folhas são simples, verticiladas ou opostas 2 a 2, ovais ou agudas, sem estípulas e com margens dentadas ou serrilhadas. Apresentam veias secundárias salientes na face abaxial, porém um pouco desorganizadas^{60,61}. A Figura I.7 mostra as folhas e caule de um exemplar

adulto de *P. radicans*. O caule apresenta ramos com pêlos não orientados na mesma direção. Os caules e ramos são quadrangulares e pubescentes (tricomias pluricelulares).



Figura I.7. Folhas e caule de um exemplar adulto de *P. radicans*.

As flores são arroxeadas, axilares, dispostas em cimeiras, sendo pequenas e a polinização pode ser realizada por insetos e beija-flores⁵⁹⁻⁶¹. A Figura I.8 mostra as flores de um exemplar adulto de *P. radicans*.



Figura I.8. Flores e cimeiras de *P. radicans*.

Vários usos de *P. radicans* têm sido descritos pela medicina popular, destacando-se os tratamentos de asma, bronquite, coqueluche, inflamações dos rins e do fígado, afecções da pele e como vermífugo^{62,67}. Além de apresentar diversas atividades bioquímicas, o extrato dessa planta podem ser usado na composição de medicamentos populares, como anti-sépticos e

antiinflamatórios^{68,69}. Na região Amazônica, as folhas e flores desta espécie tem sido utilizada no tratamento de acidentes ofídicos⁵⁴.

P. radicans é uma planta aromática devido à presença de óleos essenciais nos pêlos glandulares das folhas. Um estudo fitoquímico qualitativo dessa planta indicou uma quantidade considerável de éteres de cadeias longas, resinas, glucosídeos e alcalóides⁷⁰. Do estudo fitoquímico das folhas de *P. radicans* foram identificados anteriormente β -sitosterol **1** e ácido ursólico **2** (Figura I.10)⁶⁰. Posteriormente, outro estudo fitoquímico das folhas dessa espécie identificou o isolamento de *mio*-inositol⁷¹ **3** (Figura I.9). Além desses, nenhum outro estudo mais sistemático foi descrito sobre *P. radicans*.

Esses resultados evidenciam o potencial de classes químicas presentes em *P. radicans* e, conseqüentemente, a importância do estudo fitoquímico das diferentes partes da planta (raiz, flores, caule e folhas), biomonitorado por testes farmacológicos para determinar aqueles extratos que apresentam atividades anti-edematogênica.

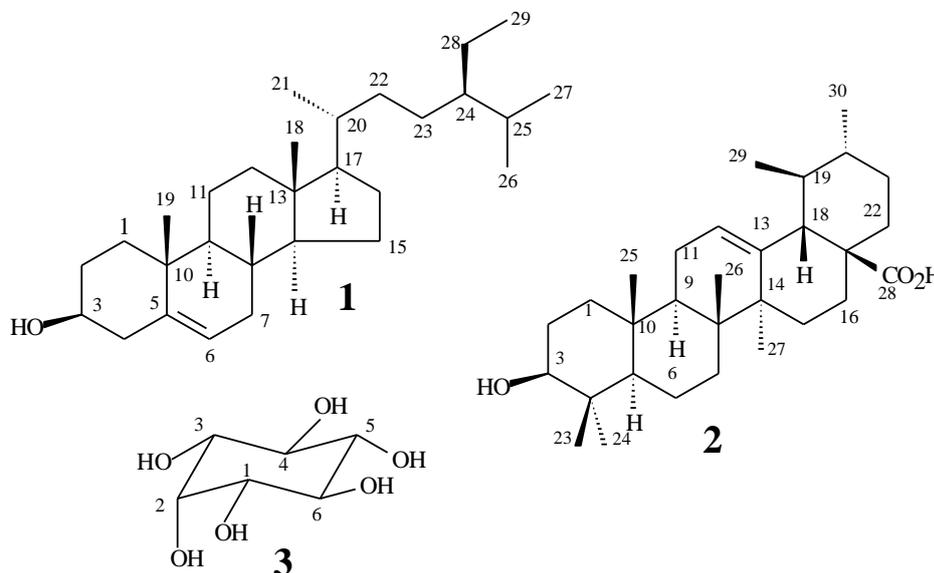


Figura I.9. Estruturas químicas de β -sitosterol **1**, ácido ursólico **2** e *mio*-inositol **3**, isolados anteriormente de *P. radicans*.

CAPÍTULO II:

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Materiais e Métodos

1.1. Parte Química

Os materiais vegetais (folhas, flores, caule e raiz) foram secos em estufa Biomatic e pesados em balança analítica Helmac HM 500. Os fracionamentos por cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD) foram acompanhados por luz Ultravioleta (UV) em aparelho Camag Gabinete II ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 366 nm). Todas as frações foram concentradas a pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório MA 120 Marconi e bomba de vácuo modelo 161/V, 1700 rpm (pressão de 658 mm/Hg). Pontos de fusão (p.f.) foram determinados em um aparelho Mettler, modelo FP80, sem correção. As amostras quando liofilizadas foram obtidas em aparelho liofilizador Edwards acoplada à bomba Edwards modelo E2W3.

Placas de vidro com 0,50 – 0,75 mm de espessura, recoberta por sílica gel 60 G Merck e placas de sílica com suporte em alumina Merck foram empregadas nos procedimentos por CCD. Os procedimentos por CC foram realizados em colunas de vidro de diversos diâmetros e comprimentos, com eluição a pressão atmosférica, tendo como fases estacionárias sílica gel 60 (70 a 230 Mesh – ASTM, Merck). Silica gel 60 (230 – 400 Mesh), alumina 90 neutra (Mesch) e florisil foram empregados como fases estacionárias nas cromatografias “Flash”.

Os reveladores empregados em CCD foram luz UV e iodo ressublimado. O revelador solução de anisaldeído foi preparado misturando uma solução de anisaldeído em ácido acético 2% e uma solução etanólica de ácido sulfúrico 20%. Após borrifação com a solução, as placas cromatográficas foram aquecidas por aproximadamente 10 min, em estufa a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}^{72}$.

As revelações com solução de sulfato de cérico foram realizadas empregando 42,0 g de sulfato de cérico em 500,0 mL de água destilada contendo 28,0 mL de ácido sulfúrico e

completando o volume para 1,0 L. Após borrifação com a solução, as placas cromatográficas foram aquecidas por aproximadamente 5 min, em estufa a 100 °C⁷².

Nos testes de Liebermann-Burchard, as amostras foram dissolvidas em clorofórmio, com adição de 1 mL de anidrido acético e, lentamente, 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O teste positivo para triterpenos pentacíclicos é dado pelo aparecimento da cor violeta ao azul permanente. Quando há aparecimento de cor verde, o teste é positivo para esteróides⁷².

As análises por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard modelo HP5989A (série II), acoplado a espectrômetro de Massas VG Autospect do Departamento de Química – ICEX, UFMG. As amostras foram ionizadas a 70 eV e submetidas a coluna capilar metilsilicone de sílica fundida (30 m X 0,2 mm), tendo hélio como gás de arraste em fluxo de 1,5 mL/min.

Os espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Mattson Instruments – FTIR. As amostras sólidas foram medidas como discos em KBr e as não sólidas como filmes entre placas de NaCl.

Os dados de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-400 *Avance* e DPX-200 do Departamento de Química – ICEX, UFMG. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, subespectros DEPT 135, COSY, NOESY, HMQC e HMBC foram obtidos utilizando CDCl₃ e CD₃OD como solventes e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz.

1.2. Coleta e processamento do material vegetal para análise

Os materiais vegetais de *Peltodon radicans* foram coletados no município de Novo Airão – AM (Figura II.1), sendo a primeira coleta em janeiro de 2004 e a outra em março de

2006, ambas durante o dia e com tempo nublado. No local da coleta, o solo era argiloso, latossolo, em local onde havia bastante capim.

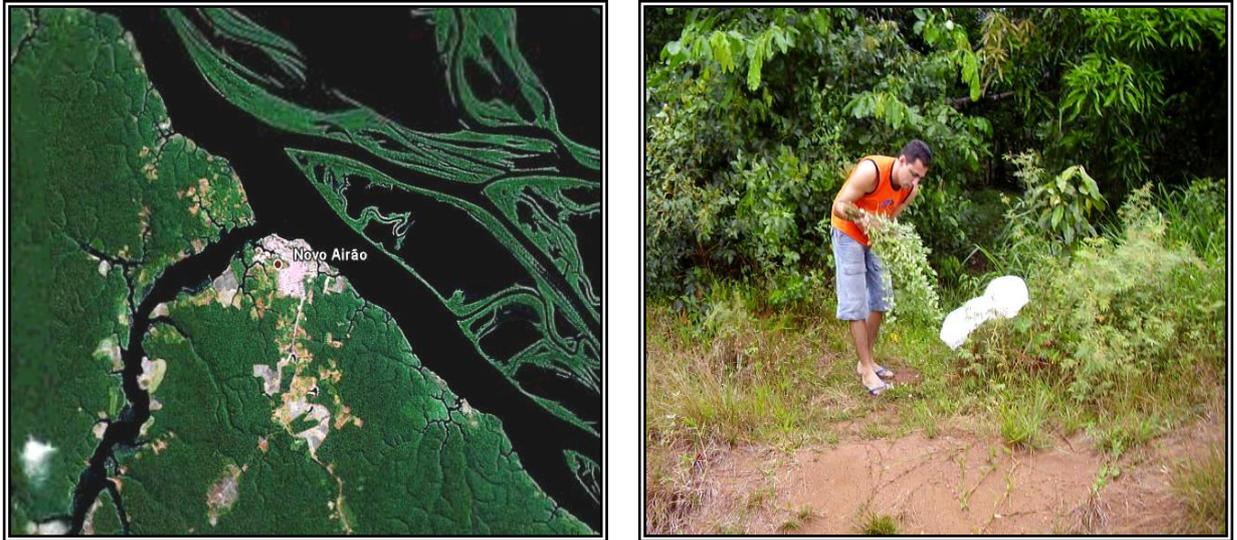


Figura II.1. Localização do município de Novo Airão (AM), no estado do Amazonas (latitude S $-2,62139^\circ$ e longitude W $-60,94417^\circ$), onde foram realizadas as coletas de *Peltodon radicans*.

O material da primeira coleta sofreu uma triagem, com separação das diferentes partes da planta: folhas, flores, caules e raízes (Figura II.2). Após secagem a temperatura ambiente, o material vegetal foi triturado e pulverizado.



Figura II.2. Material da primeira coleta com: (a) triagem para separação das diferentes partes da planta; (b) e (c) sendo respectivamente as folhas e flores separadas.

A identificação botânica de um exemplar da planta coletada foi realizada pelo Dr. José Lima (INPA). A exsicata encontra-se depositada no Herbário do INPA com o número de registro 216.222 (Figura II.3).

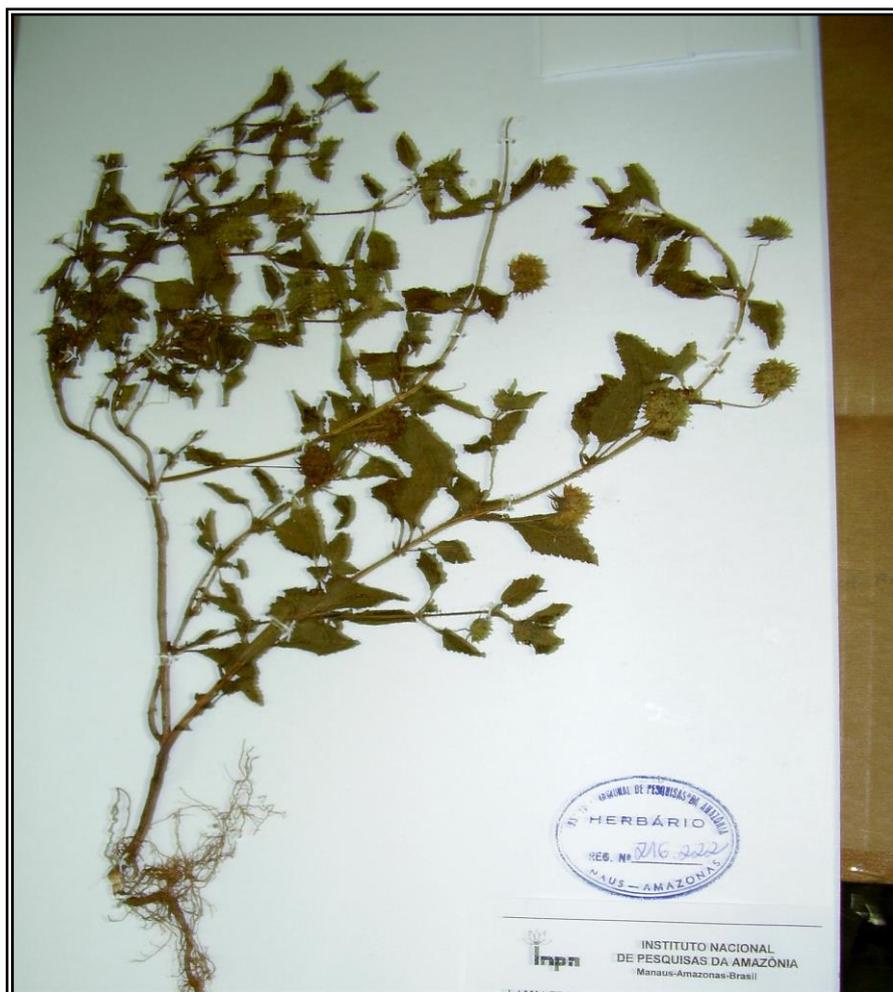


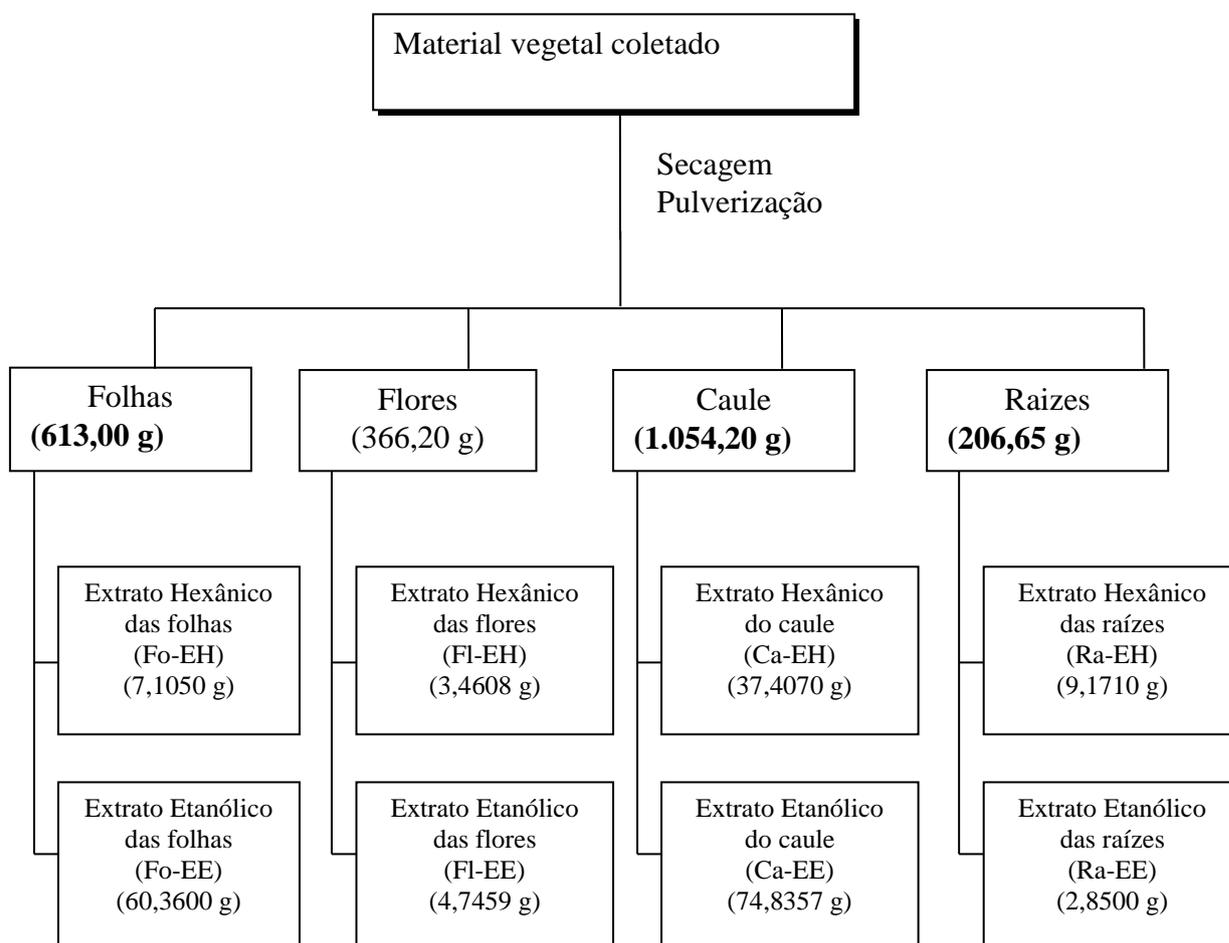
Figura II.3. Exsicata da amostra coletada de *Peltodon radicans*.

2. Procedimento Fitoquímico

2.1. Preparação dos extratos da primeira coleta

Os extratos foram preparados para realização de procedimentos empregados usualmente em estudos fitoquímicos⁷². O material da primeira coleta (5,0 kg) foi separado em diferentes

partes da planta (folhas, flores, caule e raiz), mantido em estufa a 50 °C para secagem, sendo depois triturado e pulverizado. A quantidade de cada um dos materiais pulverizados são apresentados no Esquema II.1. Esses materiais foram acondicionados em mariotes de vidro para extração a frio em *n*-hexano e, depois, etanol, obtendo-se de cada parte da planta os extratos EH e EE, respectivamente. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a pressão reduzida e condições brandas de aquecimento. Os extratos foram acondicionados em frascos apropriados e pesados para estudos fitoquímicos posteriores.



Esquema II.1. Seqüência da obtenção dos extratos das diferentes partes da planta, a partir do material vegetal da primeira coleta.

2.2. Preparação dos extratos da segunda coleta

Os extratos foram preparados para testes de atividade biológica. O material da segunda coleta (1.916,72 g) foi separado em diferentes partes da planta (folhas, flores, caule e raiz). Em seguida, foram maceradas, espremidas e liofilizadas, conforme mostrado na Figura II.4.

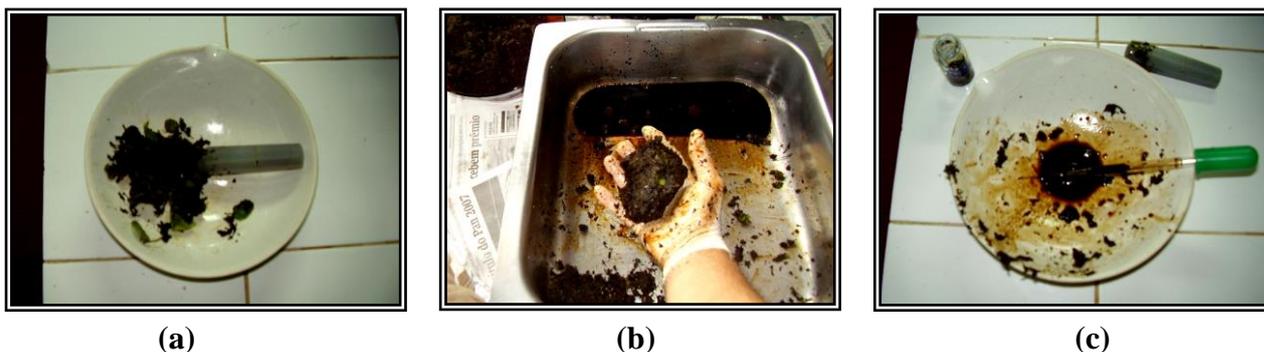
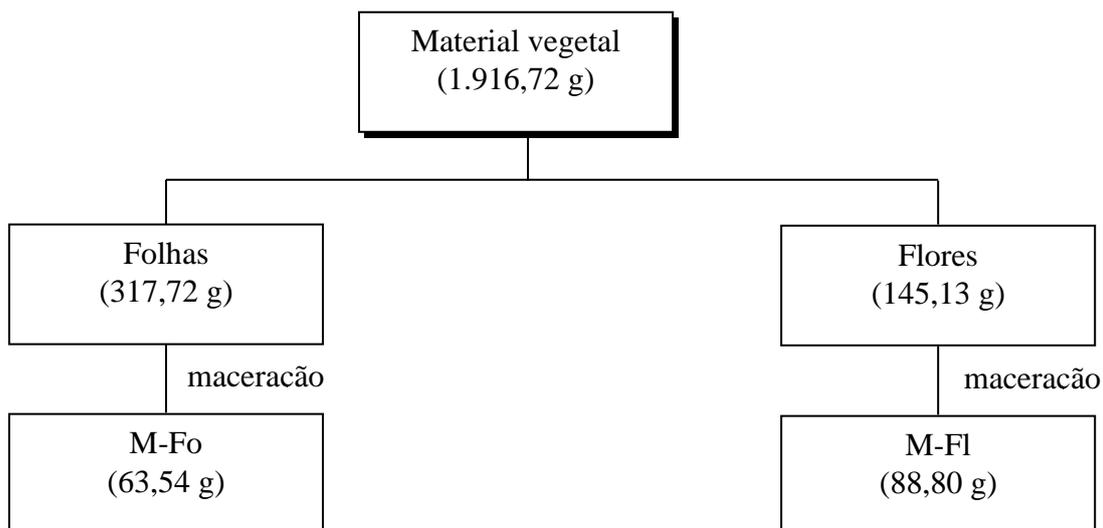


Figura II.4. Procedimento de obtenção dos extratos das folhas para testes biológicos: (a) em maceração; (b) macerado espremido e (c) extrato bruto.

O Esquema II.2 mostra o procedimento de obtenção dos extratos submetidos a testes de atividades biológicas. Após maceração e liofilização, foram obtidos os extratos dos macerados das folhas (M-Fo) e das flores (M-FI).



Esquema II.2. Seqüência de obtenção dos extratos das diferentes partes da planta, a partir do material da segunda coleta.

3. Procediment

os Biológicos

3.1. As peçonhas

O veneno utilizado nos experimentos foi obtido de uma serpente adulta de *Bothrops atrox*, procedente do Município de Presidente Figueiredo (AM, Brasil), que foi mantida no Núcleo de Animais Peçonhentos do Instituto de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus (AM). Para a extração do veneno, a serpente foi anestesiada com vapor de gás carbônico. O veneno foi coletado, esterilizado com filtro 0,45 µm (Millipore), liofilizado e estocado a -20°C.

3.2. Os animais

Para os experimentos foram utilizados camundongos fêmeas adultas não isogênicos, pesando entre 18 e 22 gramas, procedentes do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Estes animais foram mantidos, em gaiolas de plástico, no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Amazonas.

3.3. Determinação da Dose Mínima Edematogênica

A Dose Mínima Edematogênica (DME) é definida como a menor quantidade de peçonha que induz 30% do aumento máximo da espessura da pata experimental (injetada com a peçonha) em relação à pata controle (injetada com salina). A mensuração das patas dos camundongos foi realizada com um paquímetro digital Mitutoyo.

De acordo com o método utilizado para a determinação de DME do veneno de *Bothrops atrox*⁷³, quatro animais foram utilizados, recebendo a dose equivalente a 3 DME veneno (3 x 1,2 µg/animal), no coxim plantar da pata traseira direita (pata experimental), na dose de 1,2 µg em um volume de 50 µL por animal. No coxim plantar da pata contra-lateral (pata controle) 50 µL de solução salina foi aplicado como controle (Figura II.5). Os extratos vegetais foram

injetados por via intraperitoneal no tempo zero, em um volume de 0,1 mL. A mensuração das patas foi realizada nos tempos de 2, 4 e 6 horas após aplicação do veneno.

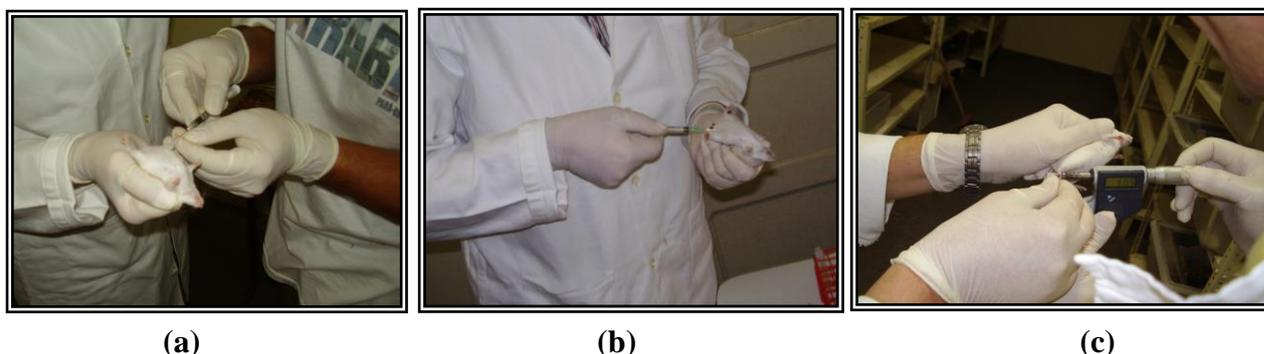


Figura II.5. Experimentos de DME: (a) aplicação da solução salina; (b) extratos vegetais sendo injetados por via intraperitoneal e (c) mensuração das patas.

O edema foi expresso, em percentagem, pela diferença entre as espessuras do coxim da pata experimental e da pata controle, dividida pela espessura do coxim da pata controle, sendo este resultado multiplicado por 100, conforme Equação II.1. Nesta equação, $V_p\%$ é o aumento percentual do volume podal, sendo V_f e V_i os volumes final e inicial das patas medidas, respectivamente.

$$V_p\% = [(V_f - V_i) / V_i] \times 100 \quad (\text{Eq. II.1})$$

Alíquotas dos extratos etanólicos obtidos da primeira coleta foram submetidas aos testes de DME. Nos testes, o extrato etanólico das folhas (100 μL) foi diluído em 900 μL de solução salina. O extrato etanólico das flores (100 μL) foi diluído em 800 μL de solução salina e 100 μL de Twenn 20. O extrato etanólico do caule (100 μL) foi diluído em 900 μL de solução salina.

Nos testes de DME dos extratos dos macerados das folhas e das flores, 70 mg de extrato, tanto folhas quanto das flores, foram diluídos em 1,00 mL de solução salina. Após 24 horas, 0,25 mL da solução de cada extrato (folhas e flores) obtida anteriormente foi diluída novamente em 7,0, 3,5 e 1,75 mL de solução salina.

CAPÍTULO III:

ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS

1. Fracionamento Cromatográfico das Folhas

1.1. Extrato hexânico (Fo-EH)

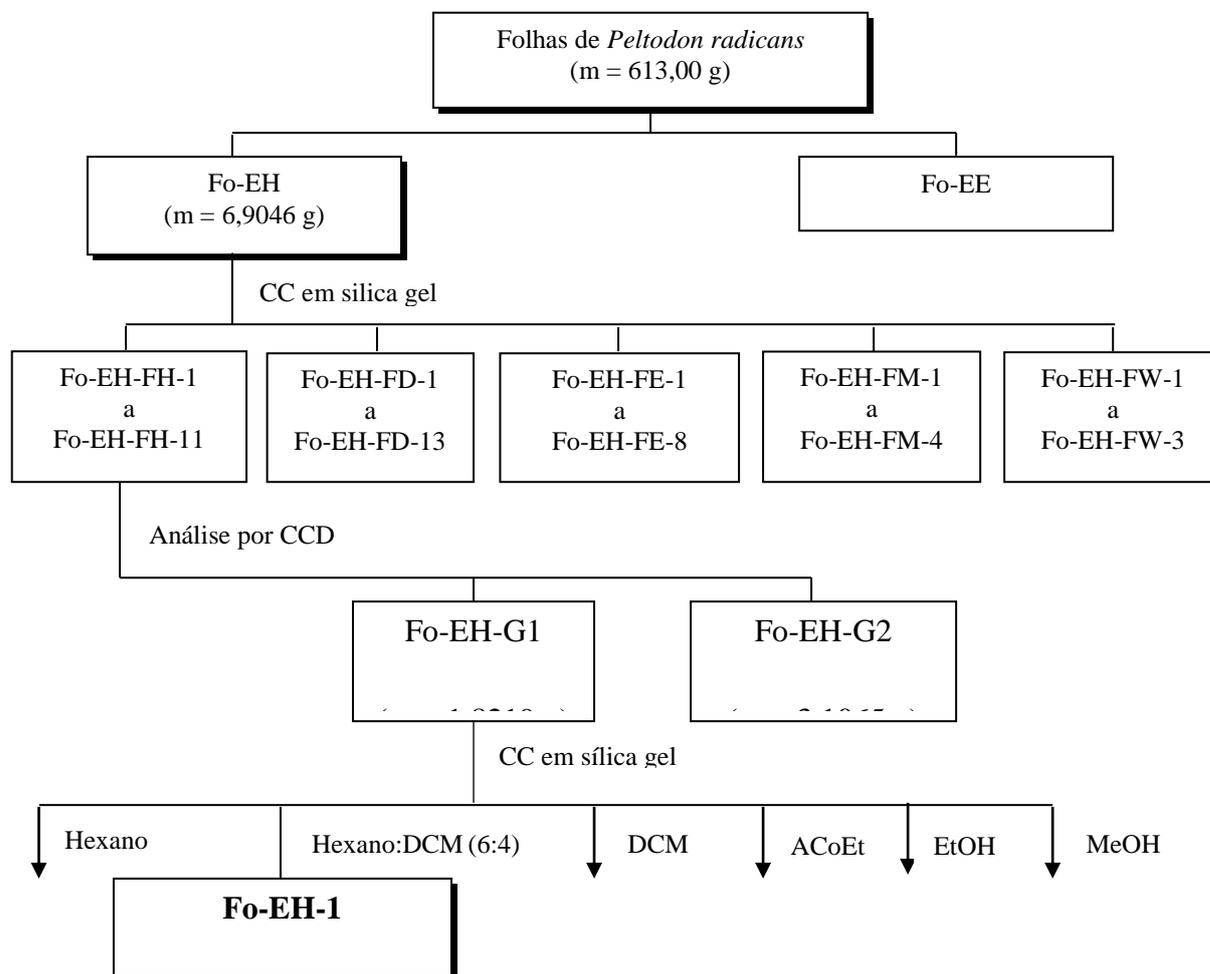
O extrato Fo-EH ($m = 7,1050$ g) foi submetido à CC de sílica gel e eluição com *n*-hexano, diclorometano, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento cromatográfico foi acompanhado por fluorescência em luz UV. As frações foram concentrados em evaporador rotativo a pressão reduzida, obtendo-se 39 frações de 250 mL, conforme Tabela III.1. As análises comparativas por CCDS empregando diferentes sistemas eluentes, com revelação por luz UV, iodo, solução de anisaldeído e sulfato de cérico, permitiu reunir as frações em 9 grupos.

Tabela III.1. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Fo-EH

Solvente	Frações	Grupo	Massa
Hexano	Fo-EH-FH-1 a Fo-EH-FH-11	Fo-EH-G1	1,8219 g
		Fo-EH-G2	3,1065 g
Diclorometano	Fo-EH-FD-1 a Fo-EH-FD-13	Fo-EH-G3	0,7148 g
		Fo-EH-G4	0,0025 g
Etanol	Fo-EH-FE-1 a Fo-EH-FE-8	Fo-EH-G5	0,0838 g
		Fo-EH-G6	0,3255 g
Metanol	Fo-EH-FM-1 a Fo-EH-FM-4	Fo-EH-G7	0,0249 g
		Fo-EH-G8	0,0198 g
Água	Fo-EH-FW-1 a Fo-EH-FW-3	Fo-EH-G9	0,8049 g

A fração Fo-EH-G1 (1,8219 g) foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. Na eluição com hexano:diclorometano (6:4) foi isolado um sólido cristalino ($m = 12,8$ mg), denominado Fo-EH-1. O Esquema III.1 mostra a seqüência de isolamento cromatográfico de Fo-EH-1. Os

espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C 1D e 2D de Fo-EH-1, além de Cromatografia Gasosa indicaram tratar-se de misturas de hidrocarbonetos.



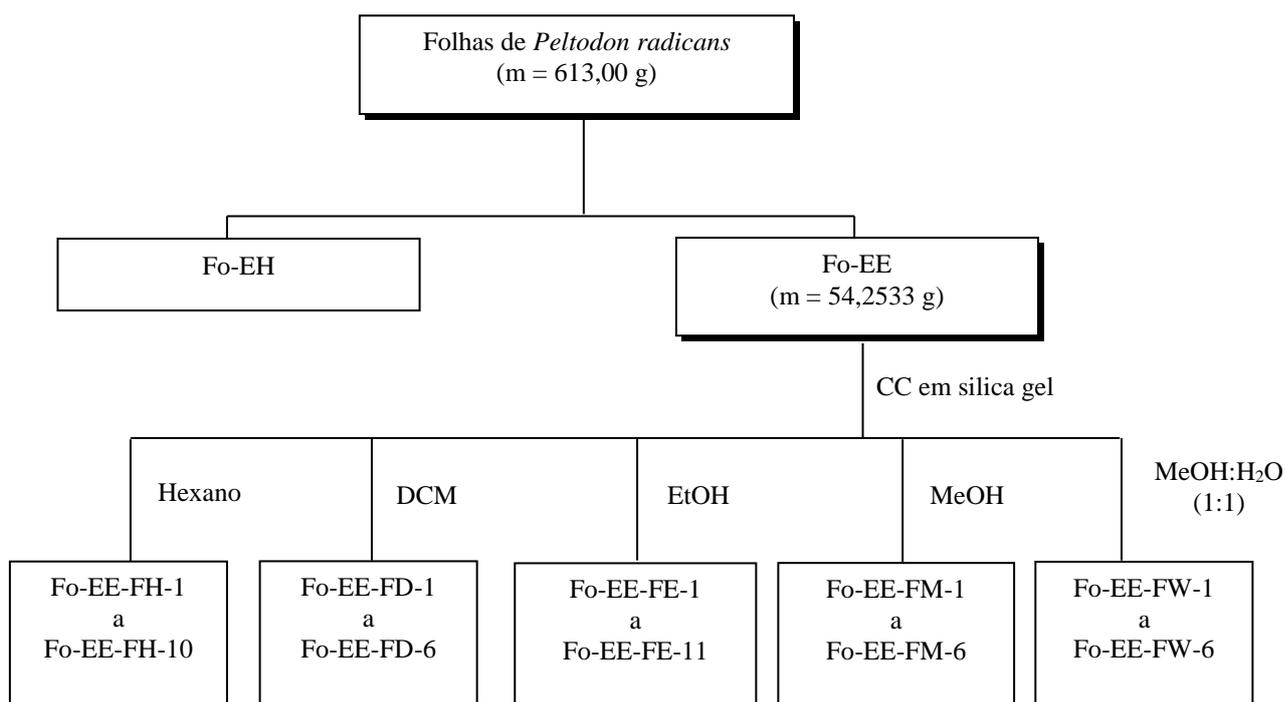
Esquema III.1. Seqüência do isolamento de Fo-EH-1.

As demais frações do extrato Fo-EH apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

1.2. Extrato Etanólico (Fo-EE)

Após destilação do solvente sob pressão reduzida, foram obtidos 60,3600 g do extrato Fo-EE. Uma alíquota de 6,1067g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante do extrato Fo-EE (54,2533 g) foi submetido à CC de sílica gel e eluição com hexano,

diclorometano, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento cromatográfico foi acompanhado por fluorescência de luz UV. As frações foram concentradas em um evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 39 frações de 15 mL, conforme Esquema III.2.



Esquema III.2. Seqüência do fracionamento cromatográfico do extrato Fo-EE.

As frações de Fo-EE foram agrupadas de acordo com análises comparativas por CCD de sílica gel empregando diferentes sistemas eluentes, com revelação por luz UV, iodo, anisaldeído/ácido sulfúrico e sulfato de cérico. A Tabela III.2 apresenta o resultado da reunião das frações do extrato Fo-EE, obtendo-se 11 grupos.

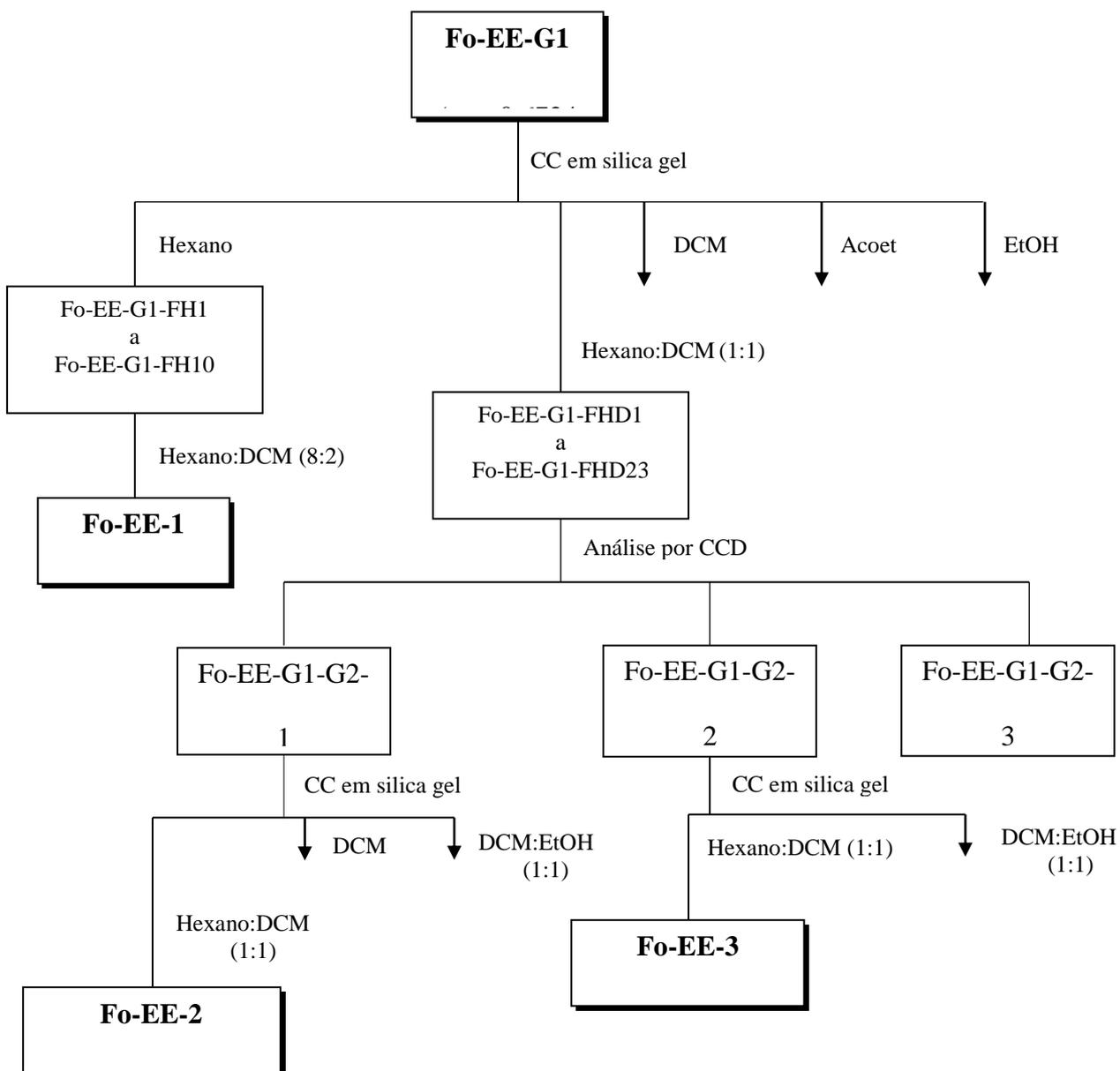
Tabela III.2. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Fo-EE

Solvente	Frações	Grupo	Massa
Hexano	Fo-EE-FH-1 a Fo-EE-FH-10	Fo-EE-G1	0,6724g
		Fo-EE-G2	19,6053g
		Fo-EE-G3	1,1436g
Diclorometano	Fo-EE-FD-1 a Fo-EE-FD-6	Fo-EE-G4	0,1318 g
		Fo-EE-G5	0,1194 g
Etanol	Fo-EE-FE-1 a Fo-EE-FE-11	Fo-EE-G6	12,7566 g
Metanol	Fo-EE-FM-1 a Fo-EE-FM-6	Fo-EE-G7	0,1084 g
		Fo-EE-G8	6,1013 g
Água	Fo-EE-FW-1 a Fo-EE-FW-6	Fo-EE-G9	11,7798 g
		Fo-EE-G10	0,2532 g
		Fo-EE-G11	0,1376 g

1.2.1. Fracionamento cromatográfico de Fo-EE-G1

A fração Fo-EE-G1 (0,6724 g) foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. A eluição com hexano resultou em 10 frações de 10 mL (Fo-EE-G1-FH1 a Fo-EE-G1-FH10). A fração Fo-EE-G1-FH1 foi recristalizada em hexano:diclorometano (8:2), obtendo-se um sólido cristalino nomeado de Fo-EE-1 (52,1 mg) (Esquema III.3). A análise por espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentou semelhança com uma estrutura de hidrocarboneto insaturado com fórmula mínima próxima a $\text{C}_{30}\text{H}_{54}$.

A eluição com hexano:diclorometano (1:1) resultou em 23 frações de 10 mL que foram analisadas comparativamente por CCDS e revelação em luz UV e iodo, empregando diferentes sistemas eluentes. As frações foram reagrupadas em 10 subgrupos, nomeadas de Fo-EE-G2-1 a Fo-EE-G2-10 (Esquema III.3).



Esquema III.3. Fracionamento cromatográfico da fração Fo-EE-G1.

A fração Fo-EE-G1-G2-1 foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano e diclorometano em gradiente crescente de polaridade. A eluição com hexano:diclorometano (1:1) resultou em 25 frações de 10 mL. A fração 3 apresentou-se como um sólido branco

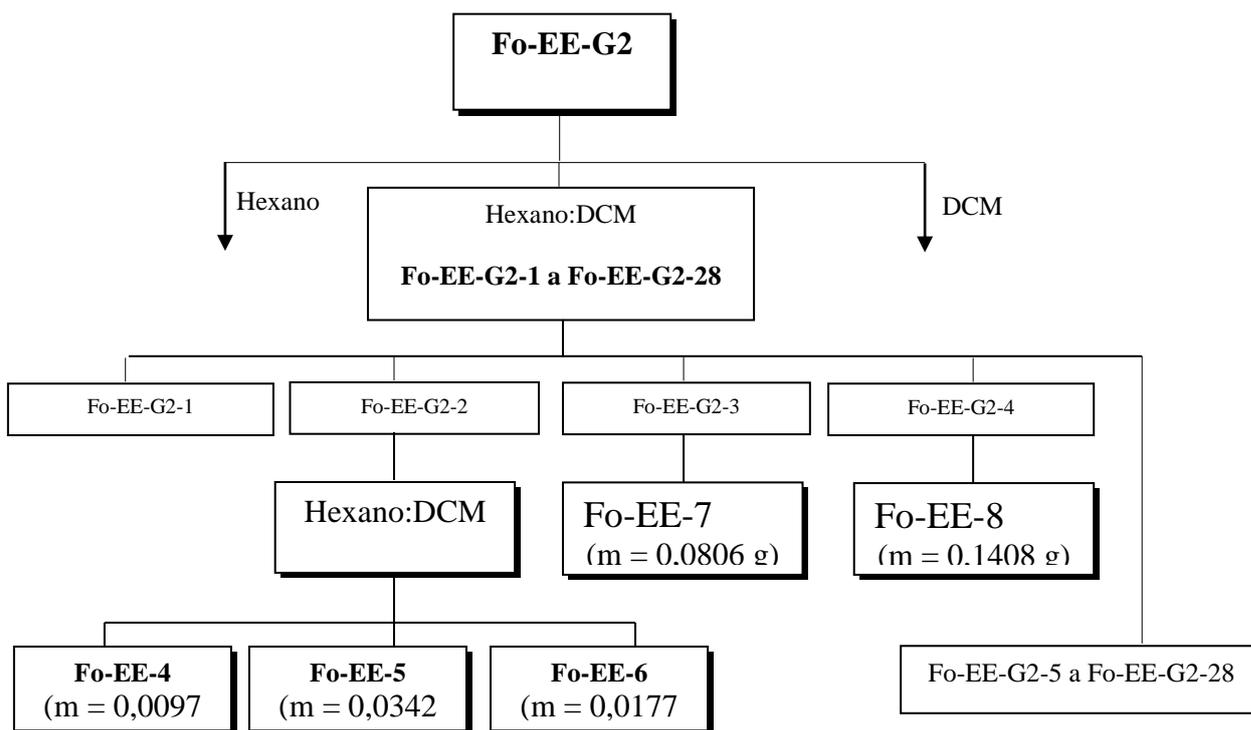
crystalino (8,6 mg), com teste Liebermann-Burchard foi positivo para triterpenos pentacíclicos. Esse sólido foi denominado de Fo-EE-2. Os espectros de RMN de ^1H bem como o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de Fo-EE-2 indicaram tratar-se do triterpenóide α -Amirina.

A fração Fo-EE-G1-G2-2 foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano e etanol, em gradiente crescente de polaridade. A eluição com hexano:diclorometano (1:1) resultou em 39 frações de 10 mL. A fração 18 apresentou-se como um sólido branco cristalino (3,0 mg), com teste Liebermann-Burchard foi positivo para esteróides, denominado de Fo-EE-3. Análises dos espectros no IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e comparação com padrão, permitiram concluir tratar-se de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (ver pág. 50).

1.2.2. Refracionamento cromatográfico de Fo-EE-G2

A fração Fo-EE-G2 (19,6053g) foi submetida à CC em sílica gel e eluída em hexano e diclorometano com gradiente crescente de polaridade, resultando em 125 frações de 10 mL. Pelas análises comparativas por CCDS, com revelação em luz UV, iodo, solução de anisaldeído e sulfato cérico, essas frações foram reunidas em 28 novos grupos, nomeados de Fo-EE-G2-1 a Fo-EE-G2-28, conforme mostrado no Esquema III.4.

A fração Fo-EE-G2-2 apresentou teste com DPPH positivo para antioxidante. Essa fração foi submetida à CC em sílica gel e eluição hexano e diclorometano, com gradiente crescente de polaridade. As frações 45 a 46 eluídas em hexano foram reunidas e submetidas novamente a CC em sílica gel e eluição em hexano:diclorometano (1:1). Três sólidos cristalinos brancos foram obtidos em frações diferentes, nomeados de Fo-EE-4, Fo-EE-5 e Fo-EE-6, com teste Liebermann-Burchard positivo para esteróides. Esses sólidos apresentaram dados físicos e químicos semelhantes aos descritos para Fo-EE-3.



Esquema III.4. Seqüência do fracionamento cromatográfico da fração Fo-EE-G2.

A fração Fo-EE-G2-3 foi recristalizada em etanol, resultando em um sólido cristalino branco nomeado de Fo-EE-7 (0,0806 g). A fração Fo-EE-G2-4 (140,8 mg) apresentou-se como um sólido cristalino branco solúvel em clorofórmio, nomeado de Fo-EE-8. Esses sólidos apresentaram dados físicos e químicos semelhantes à Fo-EE-3. Mistura de β -sitosterol e estigmasterol (ver pág. 39). As demais frações do extrato Fo-EE apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

2. Estudo Fitoquímico das Flores

2.1. Extrato hexânico (Fl-EH)

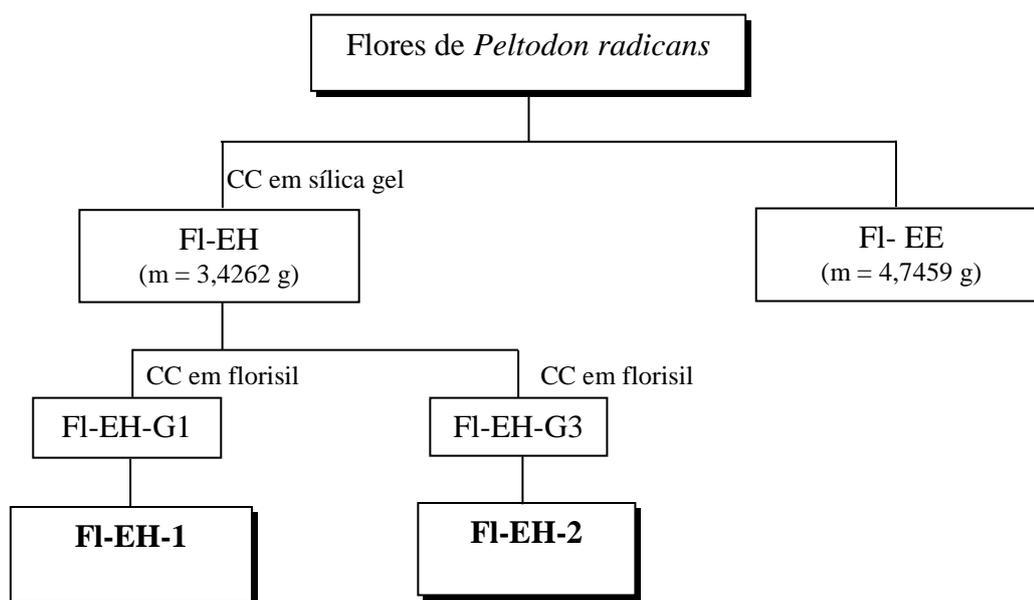
Do extrato Fl-EH (3,4608 g), uma alíquota de 0,0346 g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante de Fl-EH (3,4262 g) foi submetido à CC de alumina neutra e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, metanol e água, em gradiente

crecente de polaridade. O fracionamento cromatográfico resultou em 29 frações de 250 mL e, após análises por CCD, foram reunidas em 6 grupos, conforme mostrado na Tabela III.3.

Tabela III.3. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato FI-EH

Solvente	Frações	Grupo
Hexano	FI-EH-FH-1	FI-EH-G1
Diclorometano	FI-EH-FD-1 a FI-EH-FD-5	FI-EH-G2
Acetato de Etila	FI-EH-FA-1 a FI-EH-FA-5	FI-EH-G3
Etanol	FI-EH-EE-1	FI-EH-G4
Metanol	FI-EH-EM-1 a FI-EH-EM-9	FI-EH-G5
Metanol:água (1:1)	FI-EH-EMW-1 a FI-EH-EMW-8	FI-EH-G6

A fração FI-EH-G1 foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano e etanol, em gradiente crescente de polaridade. As frações eluídas em hexano foram reunidas e recristalizadas em etanol (Esquema III.5). O sólido branco (11,4 mg) foi nomeado de FI-EH-1; p.f.: 43,2 - 62,1 °C. A análise por CG foi comparada com padrões indicou tratar-se de mistura de hidrocarbonetos saturados C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂ e C₃₃.



Esquema III.5. Seqüência do fracionamento cromatográfico de FI-EH.

A fração FI-EH-G3 foi submetida à CC de florissil e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. A eluição com diclorometano forneceu 14 frações de 10 mL. A última fração foi recristalizada em hexano:diclorometano (7:3). O sólido cristalino branco (10,1 mg) foi nomeado de FI-EH-2, apresentando teste Lieberman-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos identificada por análises espectroscópicas como uma mistura de α -amirina e β -amirina;

As demais frações do extrato FI-EH apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

2.2. Extrato etanólico (FI-EE)

Do extrato FI-EE (4,7459 g), uma alíquota de 0,0476 g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante do extrato FI-EH (4,6983 g) foi submetido à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento resultou em 34 frações de 250 mL, sendo reunidas em 6 grupos (Tabela III.4).

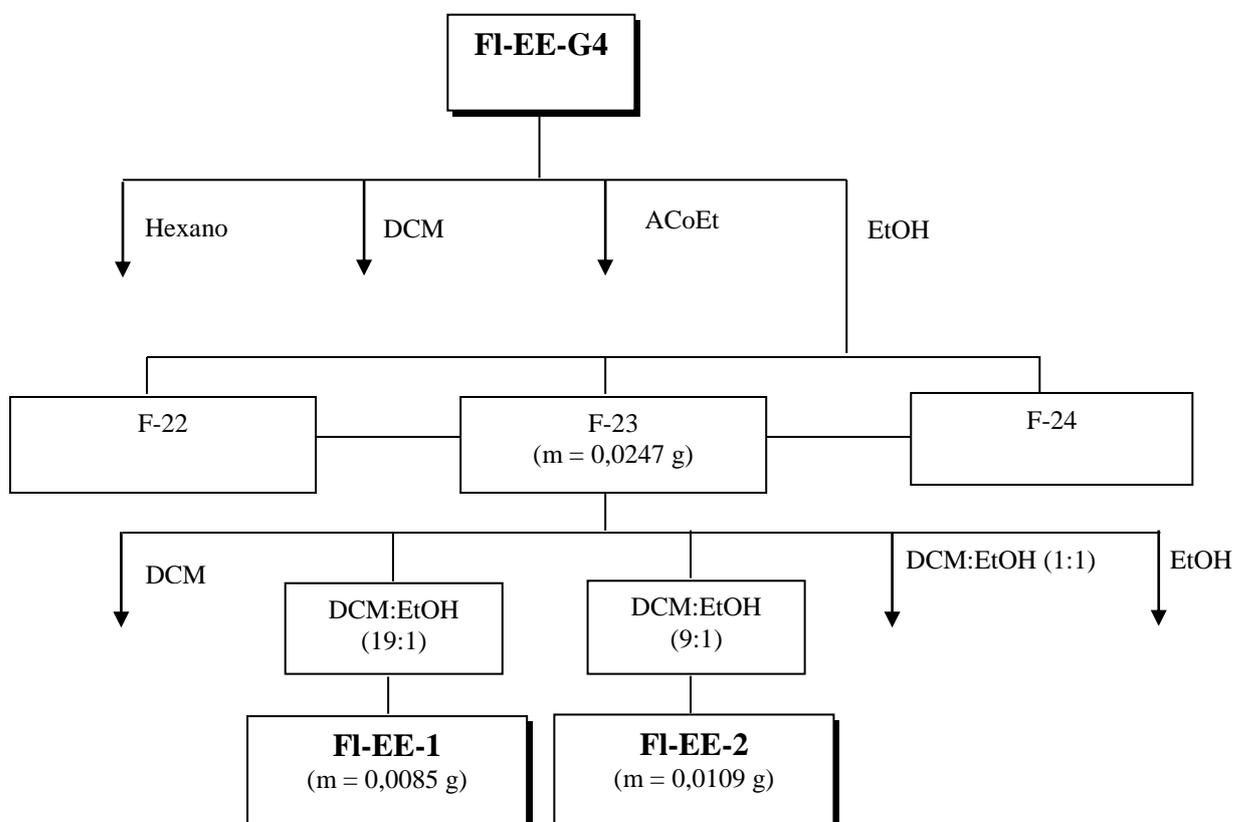
Tabela III.4. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato FI-EE

Solvente	Frações	Grupo
Hexano	FI-EE-FH-1 a FI-EE-FH-5	FI-EE-G1
Diclorometano	FI-EE-FD-1 a FI-EE-FD-11	FI-EE-G2
Acetato de etila	FI-EE-FA-1 a FI-EE-FA-3	FI-EE-G3
Etanol	FI-EE-FE-1 a FI-EE-FE-5	FI-EE-G4
Metanol	FI-EE-FM-1 a FI-EE-FM-6	FI-EE-G5
Metanol:água (1:1)	FI-EE-FW-1 a FI-EE-FW-4	FI-EE-G6

A fração FI-EE-G4 foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. As frações

etanólicas resultaram em 25 frações de 10 mL. As frações F-22, F-23 e F-24 apresentaram-se como sólidos que foram recristalizados em acetona (Esquema III.6) e foram reunidas. O sólido reunido (0,0247 g) foi submetido à CC de sílica gel e eluição com diclorometano e etanol, em gradiente crescente de polaridade. A eluição com diclorometano:etanol (19:1) forneceu um sólido cristalino branco (8,5 mg), apresentando teste de Lieberman-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos. Esse sólido foi nomeado de FI-EE-1. Análises dos espectros no IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C 1D e 2D indicou tratar-se do Ácido ursólico; p.f.: 224,3 – 227,5 °C.

A fração eluída com diclorometano:etanol (9:1) por CC de sílica gel do sólido recristalizado das frações F-22 a F-24 forneceu um sólido cristalino branco (10,9 mg), apresentando teste Lieberman-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos. Esse sólido foi nomeado de FI-EE-2 que por análises dos espectros no IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C 1D e 2D indicou tratar-se do Ácido tormêntico; p.f.: 278,5 – 283,2 °C.



Esquema III.6. Sequência do fracionamento cromatográfico de FI-EE.

As demais frações do extrato Fl-EE apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

3. Estudo Fitoquímico do Caule

3.1. Extrato hexânico (Ca-EH)

Do extrato Ca-EH (37,4070 g), uma alíquota de 0,3741 g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante de Ca-EH (37,0329 g) foi submetido à CC de alumina neutra e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade. As frações hexânicas (0,0655 g) foram reunidas e nomeadas de Ca-EH-1. Por análise de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) bem como a análise por CG comparada com padrões, indicou tratar-se mistura de hidrocarbonetos (p.f.: 49,5 – 63,4 °C) de C_{29} , C_{30} , C_{31} , C_{32} , C_{33} , C_{34} , C_{35} , C_{36} e C_{37} . As demais frações do extrato Ca-EH apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

3.2. Extrato Etanólico (Ca-EE)

Do extrato Ca-EE (74,8357 g), uma alíquota de 0,7484 g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante de Ca-EE (74,0873 g) foi submetido à CC de alumina neutra e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento resultou em 56 frações de 250 mL que foram concentradas em um evaporador rotativo sob pressão reduzida. Após análise por CCD, as frações foram reunidas em 6 grupos, conforme Tabela III.5.

A fração Ca-EE-G3 (2,9284 g) foi submetida à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento resultou em 29 frações de 20 mL. A fração 11 (1,0058 g) eluída com diclorometano foi

submetida novamente à CC de florisil e eluição com hexano e diclorometano, em gradiente crescente de polaridade.

Tabela III.5. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Ca-EE

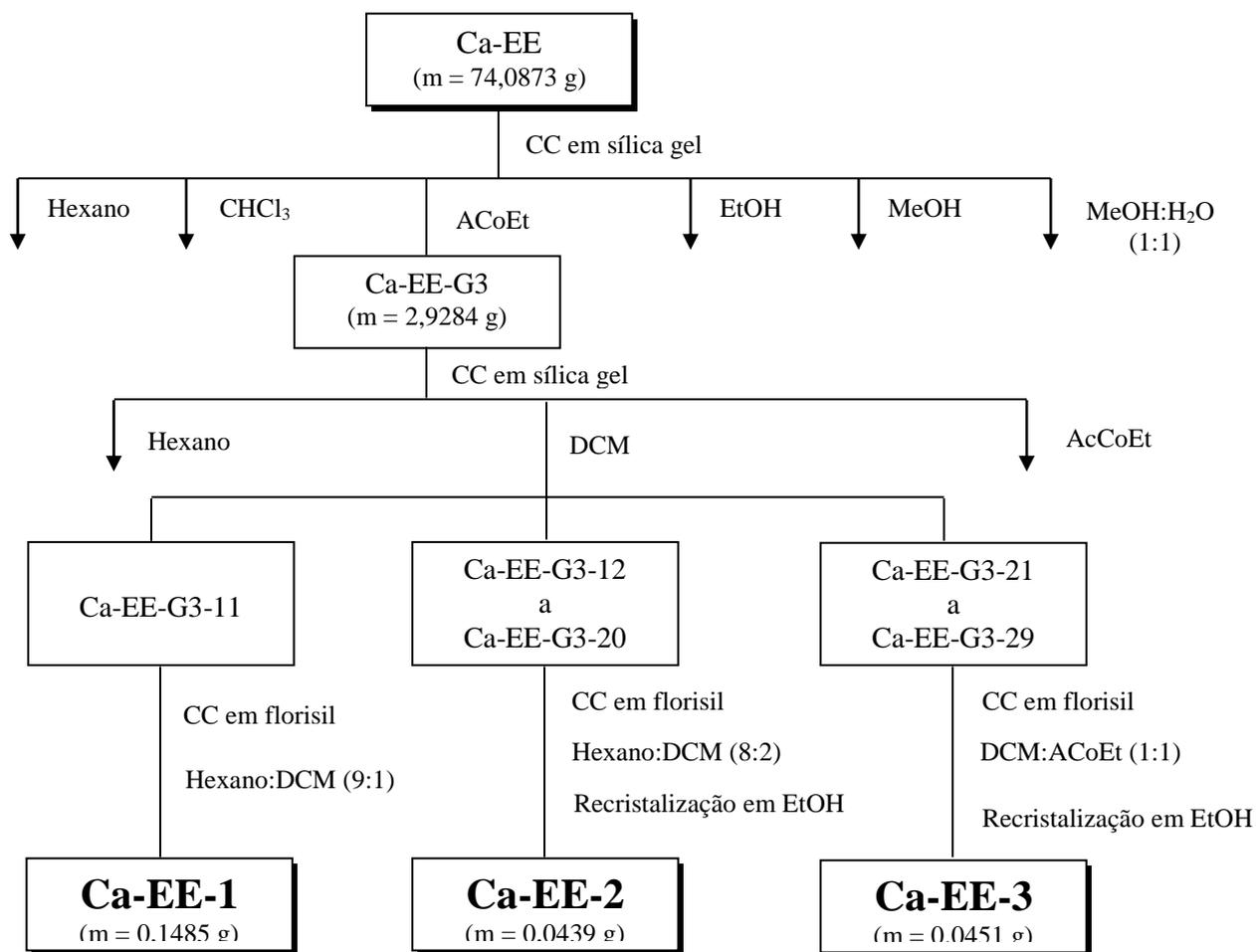
Solvente	Nome das frações	Grupo
Hexano	Ca-EE-FH-1	Ca-EE-G1
Hexano:DCM (1:1)	Ca-EE-FD-1 a Ca-EE-FD-7	Ca-EE-G2
Acetato de Etila	Ca-EE-FA-1 a Ca-EE-FA-23	Ca-EE-G3
Etanol	Ca-EE-FE-1 a Ca-EE-FE-14	Ca-EE-G4
Metanol	Ca-EE-FM-1 a Ca-EE-FM-6	Ca-EE-G5
Metanol:água (1:1)	Ca-EE-FW-1 a Ca-EE-FW-5	Ca-EE-G6

A fração eluída com hexano:diclorometano (9:1) forneceu um sólido cristalino branco (148,5 mg), apresentando teste de Lieberman-Burchard positivo para esteróides (Esquema III.7). Esse sólido foi nomeado de Ca-EE-1. Mistura de β -sitosterol e estigmasterol; p.f.: 133,6 – 137,4 °C; dados físicos e químicos semelhantes aos registrados para Fo-EE-3 (ver pág. 39)

As frações 12 a 20 foram reunidas e submetidas a CC de florisil e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento forneceu 24 frações de 10 mL. A fração eluída com hexano:diclorometano (8:2) apresentou-se como um sólido que foi recristalizado em etanol (0,0439 g), apresentando teste Lieberman-Burchard positivo para esteróides. Esse sólido foi nomeado de Ca-EE-2. Mistura de β -sitosterol e estigmasterol; p.f.: 131,5 – 135,0 °C; dados físicos e químicos semelhantes aos registrados para Fo-EE-3 (ver pág. 39).

As frações 21 a 29 foram reunidas (0,8870 g) e submetidas à CC de florisil e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. O

fracionamento resultou em 65 frações de 10 mL. As frações eluídas com diclorometano:acetato de etila (1:1) foram reunidas e recristalizadas em etanol. O sólido cristalino branco (45,1 mg) apresentou teste Lieberman-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos. Esse sólido foi nomeado de Ca-EE-3 que por análises dos espectros no IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C 1D e 2D indicou tratar-se de 3β -Hidroxi-28-ursolato de metila; (p.f.: 218,9-222,7 °C).



Esquema III.7. Seqüência do fracionamento cromatográfico do extrato Ca-EE.

As demais frações do extrato Ca-EE apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

4. Estudo Fitoquímico da Raiz

4.1. Extrato hexânico (Ra-EH)

Do extrato Ra-EH (9,1710 g), uma alíquota de 0,00917 g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante de Ra-EH (9,0793 g) foi submetido à CC de alumina neutra e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade.

As frações em hexano foram reunidas e submetidas à CC de sílica gel e eluição com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento forneceu 27 frações de 10 mL. As frações eluídas com hexano foram reunidas (5 mg) e nomeadas de Ra-EH-1. Mistura de hidrocarbonetos; p.f.: 52,4 – 63,3 °C. A análise por CG foi comparada com padrões de hidrocarbonetos saturados C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅, C₃₆ e C₃₇.

As demais frações do extrato Ra-EH apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

4.2. Extrato Etanólico (Ra-EE)

Do extrato Ra-EE (2,8500 g), uma alíquota de 0,0290 g foi armazenada para testes de atividade biológica. O restante de Ra-EE (2,8220 g) foi submetido à CC de alumina neutra e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água, em gradiente crescente de polaridade. O fracionamento resultou em 28 frações de 25 mL. Após análise por CCDS, as frações foram reunidas em 6 grupos, conforme Tabela III.6.

Tabela III.6. Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato Ra-EE

Solvente	Frações	Grupo	Massa
Hexano	Ra-EE-FH1 a Ra-EE-FH4	Ra-EE-G1	0,1985 g
Hexano:acetato de etila (9:1)	Ra-EE-FHA1	Ra-EE-G2	0,1254 g
Hexano:acetato de etila (1:1)	Ra-EE-FHA2	Ra-EE-G3	0,6020 g
Acetato de Etila	Ra-EE-FA1 a Ra-EE-FA13	Ra-EE-G4	0,2013 g
Etanol	Ra-EE-FE1 a Ra-EE-FE2	Ra-EE-G5	0,1850 g
Metanol:água	Ra-EE-FMW1 a Ra-EE-FMW7	Ra-EE-G6	0,1320 g

A fração R-EE-G2 (0,1254 g) foi recristalizada em metanol, obtendo-se um sólido branco cristalino solúvel em clorofórmio. Esse sólido foi recristalizado em etanol (9,0 mg) e nomeado de Ra-EE-1, apresentando teste Liebermann-Burchard positivo para esteróides. Mistura de β -sitosterol e estigmasterol; p.f.: 146,9 – 148,1 °C. Os dados de Ra-EE-1 foram semelhantes aos registrados para Fo-EE-3 (ver pág. 39).

A fração Ra-EE-G3 foi recristalizada em etanol, obtendo-se um sólido cristalino branco (2,9 mg) solúvel em clorofórmio, apresentando teste Liebermann-Burchard positivo para esteróides. Esse sólido foi nomeado de Ra-EE-2. Por análise espectroscópica este composto foi identificado como 3-*O*- β -D-glicosíl-Sitosterol e 3-*O*- β -D-glicosíl-Estigmasterol; p.f.: 282,9 – 285,6 °C.

As demais frações do extrato Ra-EE apresentaram-se como misturas complexas, não permitindo o isolamento e caracterização de seus componentes.

5. Dados Físico-Químicos das Substâncias e ou Misturas Isoladas

5.1. Fo-EH-1 (Mistura de Hidrocarbonetos)

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 62,9 – 68,7 °C

Solubilidade: Hexano:diclorometano (6:4)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 2,74 (s, 2H), 1,25 (s, 40H) e 0,88 (m, 6H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 31,95 (CH_2), 29,72 (CH_2), 29,68 (CH_2), 29,38 (CH_2), 22,71 (CH_2) e 14,12 (CH_3).

CG/EM: pico de T.R. 52,14 min (71,15%) com EM (EI; 70 eV) m/z 267 (M^+), 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 111, 99, 85, 71, 57 e 43 (pico base); pico de T.R. 46,45 (10,59%) com EM (EI; 70 eV) m/z 287 (M^+), 211, 195, 127, 113, 97, 85, 71, 57 e 43 (pico base); pico de T.R. 48,79 min (9,47%) com EM (EI; 70 eV) m/z 169 (M^+), 155, 141, 125, 113, 97, 85, 71, 57 e 43 (pico base).

5.2. Fo-EE-1 (Mistura de Hidrocarbonetos insaturados)

Aspecto: Sólido cristalino

Faixa de fusão: 102,4 – 106,5 °C

Solubilidade: Hexano:diclorometano (8:2)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5,14 (m, 2H), 2,02 (m, 8H), 1,68 (m, 4H), 1,60 (m, 8H), 1,26 (m, 28H) e 0,88 (m, 8H).

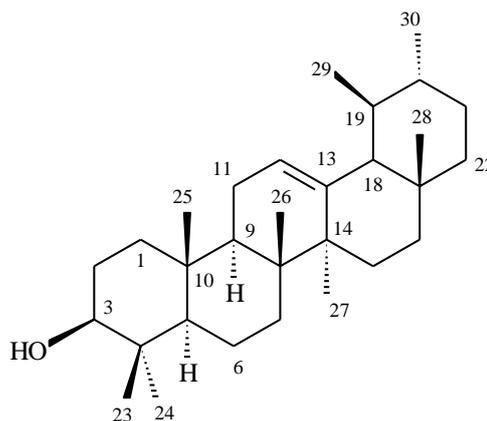
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 135,32 ($\text{C}=\text{C}$), 135,11 ($\text{C}=\text{C}$), 131,45 ($\text{C}=\text{C}$), 124,64 ($\text{CH}=\text{C}$), 124,55 ($\text{CH}=\text{C}$), 39,99 (CH_2), 39,97 (CH_2), 32,17 (CH_2), 29,95 (CH_2), 29,61 (CH_2), 28,51 (CH_2), 27,01 (CH_2), 26,90 (CH_2), 25,92 (CH), 22,93 (CH_2), 17,90 (CH_3), 16,26 (CH_3), 16,22 (CH_3), 14,39 (CH_3) e 14,35 (CH_3).

5.3. Fo-EE-2 (α -Amirina)Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 78,0 – 81,1 °C

Solubilidade: Hexano:diclorometano (1:1)



RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 5,15 (m, 1H), 5,12 (m, 2H), 4,15 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,23 (dd, $J = 4,9$ e 3,4 Hz) e 2,17 – 0,79 (vários sinais sobrepostos).

RMN de ^{13}C (400 MHz; $CDCl_3$) δ_C : 139,6 (C-13), 124,4 (C-12), 79,1 (C-3), 59,1 (C-18), 55,2 (C-5), 47,7 (C-9), 42,1 (C-14), 41,5 (C-22), 40,0 (C-8), 39,6 (C-19 e C-20), 39,4 (C-1), 38,8 (C-4), 36,9 (C-10), 33,7 (C-17), 32,9 (C-7), 31,9 (C-21), 28,7 (C-15), 28,1 (C-23 e C-28), 27,3 (C-2), 26,6 (C-16), 23,3 (C-11), 22,7 (C-27), 21,3 (C-30), 19,8 (C-6), 17,5 (C-29), 16,9 (C-26) e 15,6 (C-24 e C-25).

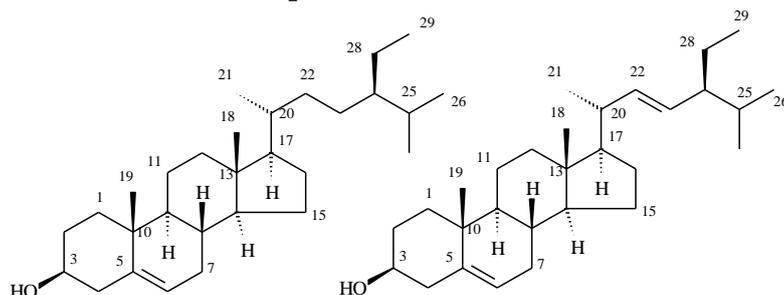
5.4. Fo-EE-3 (Mistura de β -sitosterol e estigmasterol). Os compostos Fo-EE-4 a Fo-EE-8, Ca-EE-1, Ca-EE-2 e Ra-EE-1 apresentara dados físico-químicos semelhantes

Fórmula molecular: $C_{29}H_{50}O$

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 133,6 – 137,4 °C

Solubilidade: Hexano



IV (KBr, cm^{-1}) ν : 3428, 3310, 2950, 2860, 1650, 1630, 1450, 1350, 1065, 1050, 860, 722 e 634.

RMN de 1H (400 MHz; $CDCl_3$) δ_H : 5,35 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, H-6), 5,21 (m), 4,95 (m), 3,50 (m, 1H, H-3), 2,21 (m), 1,80 (m), 1,52 (m) e 1,50 – 0,60 (vários sinais sobrepostos).

RMN de ^{13}C (100 MHz; $CDCl_3$) δ_C : 140,7, 138,0, 129,0, 121,7, 71,8, 56,7, 56,0, 50,1, 45,8, 42,3, 31,9, 31,6, 29,6, 29,1, 28,6, 26,1, 23,3.

5.5. Fl-EH-1 (Mistura de hidrocarbonetos)

Aspecto: Sólido branco

Faixa de fusão: 43,2 - 62,1 °C

Solubilidade: Hexano

A análise por CG apresentou mistura de substâncias com T.R. entre 10 e 15 min, com predominância do pico com T.R. 12,5 min. A comparação com padrões de hidrocarbonetos alifáticos e saturados indicou tratar-se de uma mistura constituída por hidrocarbonetos alifáticos C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂ e C₃₃.

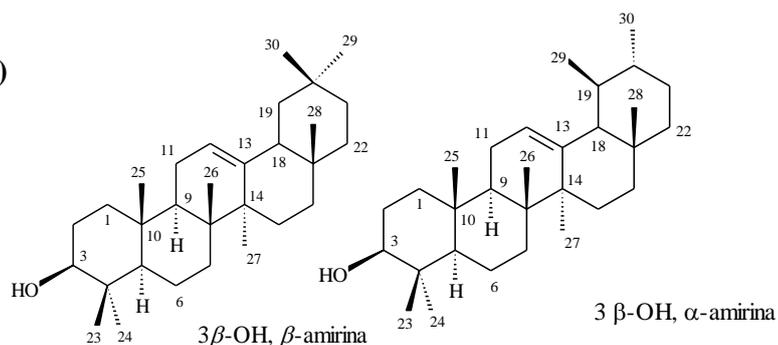
5.6. Fl-EH-2 (α -amirina e β -amirina)

Fórmula molecular: C₃₀H₅₀O

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 77,6 – 78,7 °C

Solubilidade: Hexano:diclorometano (7:3)



RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃) δ_H 5,18 (m), 5,12 (m), 3,22 – 3,21 (m, H-3), 1,90 – 0,75 (vários sinais sobrepostos);

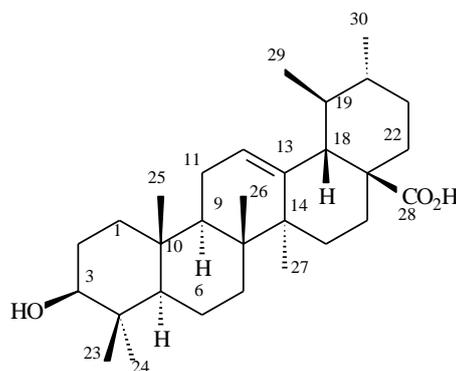
RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ_C : 145,2 (C), 139,6 (C), 124,5 (CH), 121,8 (CH), 79,1 (CH), 78,3 (CH), 59,1 (CH), 55,3 (CH), 55,2 (CH), 47,8 (CH), 47,7 (CH), 47,3 (CH), 46,9 (CH), 42,1 (C), 41,8 (C), 40,1 (C), 39,7 (CH), 39,6 (CH), 38,8 (C), 38,8 (CH₂), 38,6 (CH₂), 37,2 (C), 37,0 (C), 37,2 (CH₂), 34,8 (CH₂), 33,8 (C), 33,0 (CH₂), 32,8 (CH₂), 31,3 (CH₂), 31,1 (CH), 28,8 (CH₂), 28,4 (CH₃), 28,1 (CH₃), 27,9 (CH₃), 27,3 (CH₂), 27,0 (CH₂), 26,7 (CH₂), 26,2 (CH₂), 26,0 (CH₃), 23,7 (CH₃), 23,6 (CH₂), 23,4 (CH₂), 23,3 (CH₃), 21,41 (CH₂), 18,9 (CH₃), 18,4 (CH₂), 17,5 (CH₃), 16,8 (CH₃), 15,7 (CH₃), 15,6 (CH₃) e 15,5 (CH₃).

5.7. Fl-EE-1 (Ácido ursólico)Fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_2$

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 224,3 – 227,5 °C

Solubilidade: diclorometano:etanol (19:1)



ácido ursólico

IV (KBr, cm^{-1}) ν : 3430, 2927, 2871, 1731 (ombro), 1692, 1457, 1387, 1379, 1093, 1030, 807 e 662.

RMN de 1H (400 MHz; MeOD) δ_H : 5,20 (t, 1H, H-12), 3,15 (dd, $J = 11,2$ e $4,9$ Hz, H-3), 2,10 (d, $J = 11,2$ Hz, H-18), 1,84 – 0,68 (vários sinais).

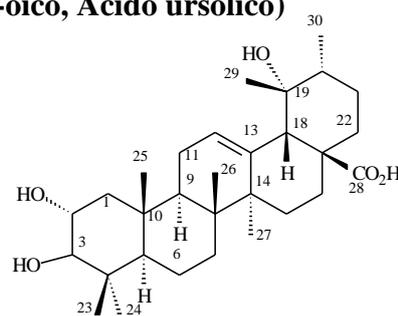
RMN de ^{13}C (100 MHz; MeOD) δ_C : 181,9 (C-28), 139,8 (C-13), 127,0 (C-12), 79,9 (C-3), 56,9 (C-5), 54,6 (C-18), 49,3 (C-17), 49,1 (C-9), 43,4 (C-14), 40,9 (C-8), 40,6 (C-4 e C-19), 40,2 (C-20), 39,9 (C-1), 38,3 (C-10 e C-22), 34,5 (C-7), 31,9 (C-21), 29,4 (C-15), 28,9 (C-23), 28,1 (C-2), 25,5 (C-16), 24,5 (C-27), 24,2 (C-11), 21,7 (C-30), 19,4 (C-6), 17,9 (C-29), 17,7 (C-26), 16,5 (C-25) e 16,2 (C-24).

5.8. Fl-EE-2 (Ácido $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico, Ácido ursólico)Fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_5$

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 278,5 – 283,2 °C

Solubilidade: diclorometano:etanol (9:1)



IV (KBr, cm^{-1}) ν : 3430, 2970, 2850, 1692, 1460, 1379, 1262, 1233, 1156, 1048, 1033, 932, 866 e 802.

RMN de 1H (MeOD, 400 MHz) δ_H : 5,20 (s, H-12), 3,50 (m, H-2), 2,81 (d, $J = 9,6$ Hz, H-3), 2,48 (dd, $J = 13,2$ e $4,0$ Hz, H-16a), 2,41 (s, H-18), 1,91 (m, H-11), 1,84 (dd, $J = 12,1$ e $4,2$ Hz, H-1a), 1,71 (ddd, $J = 14,6$, $13,6$ e $4,2$ Hz, H-15a), 1,65 (m, H-9), 1,63 (m, H-21a), 1,62 (m, H-22a),

1,53 (m, H-22b), 1,45 (m, H-6a), 1,42 (m, H-16b), 1,39 (m, H-6b), 1,27-1,24 (m, H-20), 1,24 (s, H-27), 1,13 (m, H-21b), 1,09 (s, H-29), 0,92 (s, H-25), 0,88 (m, H-15b), 0,84 (d, $J=6,6$ Hz, H-30), 0,82 (s, H-23), 0,78 (m, H-1b), 0,77 (m, H-5), 0,71 (s, H-24) e 0,70 (s, H-26).

RMN de ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ_{C} : 181,1 (C-28), 140,3 (C-13), 129,4 (C-12), 84,3 (C-3), 73,8 (C-19), 69,7 (C-2), 56,9 (C-5), 55,3 (C-18), 48,8 (C-17), 48,7 (C-9), 48,3 (C-1), 43,2 (C-20), 41,3 (C-8), 40,7 (C-4), 39,4 (C-10), 39,2 (C-22), 34,3 (C-7), 29,7 (C-15), 28,8 (C-23), 27,4 (C-21), 27,2 (C-29), 26,8 (C-16), 25,0 (C-27), 24,9 (C-11), 19,8 (C-6), 17,7 (C-24), 17,6 (C-26), 17,1 (C-25) e 16,7 (C-30).

5.9. Ca-EH-1 (Mistura de hidrocarbonetos)

Aspecto: Sólido branco

Faixa de fusão: 49,5 - 63,4 °C

Solubilidade: Hexano

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1,56 (m), 1,25 (m) e 0,88 – 0,84 (vários sinais sobrepostos).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 31,95 (CH_2), 29,73 (CH_2), 29,39 (CH_2), 22,71 (CH_2) e 14,13 (CH_3).

A análise por CG apresentou mistura de substâncias com T.R. entre 9 e 17 min. A comparação com padrões indicou tratar-se de mistura hidrocarbonetos alifáticos e saturados C_{29} , C_{30} , C_{31} , C_{32} , C_{33} , C_{34} , C_{35} , C_{36} e C_{37} .

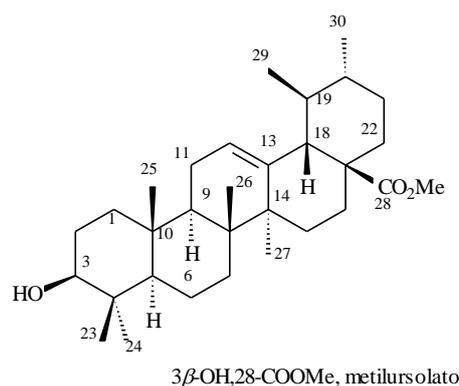
5.10. Ca-EE-2 (3 β -OH, 28-COOMe, metilursolato)

Fórmula molecular: C₃₁H₅₁O₂

Aspecto: Sólido branco cristalino

Faixa de fusão: 218,9-222,7 °C

Solubilidade: diclorometano:acetato de etila (1:1)



RMN de ¹H (400 MHz; MeOD) δ_H : 5,30 (m, H-12), 3,65 (s, O-Me), 3,42 (d, $J = 6,5$ Hz, H-3), 2,05 (H-16), 2,12 (H-18), 1,92 (m, H-11), 1,73 (m, H-2), 1,63 (m, H-9a), 1,47 (m, H-19a), 1,16 (s, H-26), 1,12 (s, H-27), 0,92 (d, $J = 3,2$ Hz, H-30) e 0,88 – 0,84 (vários sinais sobrepostos).

RMN de ¹³C (100 MHz; MeOD) δ_C : 180,4 (C-28), 138,5 (C-13), 125,3 (C-12), 78,8 (C-3), 55,3 (C-5), 53,0 (C-18 e O-Me), 47,8 (C-17), 47,7 (C-9), 42,1 (C-14), 39,6 (C-8), 39,2 (C-19), 39,0 (C-20), 38,8 (C-4), 38,7 (C-1), 37,1 (C-10), 37,0 (C-22), 33,1 (C-7), 30,9 (C-21), 28,2 (C-15 e C-23), 27,3 (C-2), 24,5 (C-16), 23,6 (C-27), 23,3 (C-11), 21,3 (C-30), 18,4 (C-6), 17,1 (C-29), 17,0 (C-26), 15,7 (C-25) e 15,5 (C-24).

5.11. Ra-EH-1 (Mistura de hidrocarbonetos)

Aspecto: Sólido branco

Faixa de fusão: 52,4 - 53,2 °C

Solubilidade: Hexano

A análise por CG apresentou mistura de substâncias com T.R. entre 6 e 17 min. A comparação com padrões de hidrocarbonetos alifáticos e saturados indicou tratar-se de uma mistura constituída por hidrocarbonetos alifáticos C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄ e C₃₅.

5.12. Ra-EE-2 (Mistura de 3-O- β -D-glicopiranosil-Sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosil-Estigmasterol)

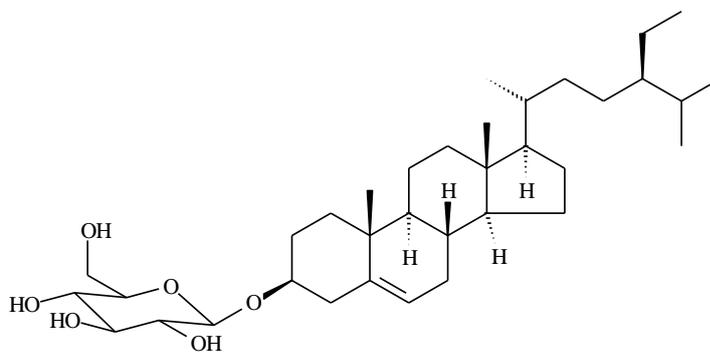
Aspecto: Sólido branco amorfo

Faixa de fusão: 282,9 – 285,6 °C

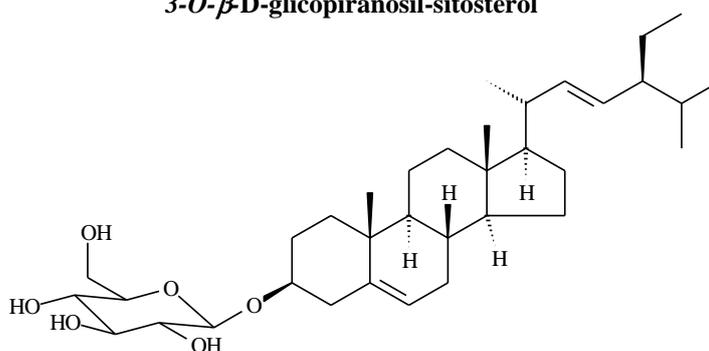
Solubilidade: Hexano

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3) δ_{H} : 5,33 (d, 1H, H-6), 5,16 (d, $J = 8,6$ Hz, H-22), 5,06 (d, $J = 8,6$ Hz, H-23), 4,86 (m, OH), 4,43, 4,22 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H-10), 3,69 (m, H-3'), 3,78-3,47 (m, H-6'b), 3,64 (m, H-6'a) 3,30-2,28 (m, H-2), 3,13-3,01 (m, H-3', H-4', H-5'), 2,90 (m, H-2'), 2,3 (t, 1H, H-1), 1,95- 1,14 (vários sinais), 1,01-0,69 (vários sinais), 066 (s, 3H, H-18).

RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) δ_{C} : 140,5 (C-5), 138,0 (C-22), 128,8 (C-23), 121,2 (C-6), 100,8 (C-1'), 76,9 (C-3'), 76,8 (C-2'), 73,5 (C-5'), 70,1 (C-3 e C-4'), 61,1 (C-6'), 56,2 (C-14), 55,4 (C-17), 50,6 (C-24), 49,6 (C-9), 41,9 (C-4 e C-13), 40,1 (C-20), 39,2 (C-12), 36,8 (C-1), 36,2 (C-10), 31,4 (C-8 e C-25), 31,3 (C-2 e C-7), 29,3 (C-16), 24,9 (C-15 e C-28), 21,1 (C-21), 20,9 (C-26), 20,6 (C-11), 19,1 (C-19), 18,6 (C-27), 12,1 (C-29) e 11,8 (C-18).



3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol



3-O- β -D-glicopiranosil-estigmasterol

CAPÍTULO IV:

ANÁLISE ESTRUTURAL DOS FITOCONSTITUINTES

ISOLADOS

1. Análise de Fo-EH-1

A Figura IV.1 mostra o espectro de RMN de ^1H de **Fo-EH-1**. Esse espectro registra apenas sinais na região entre δ_{H} 2,74 e 0,84, característicos de estruturas alifáticas saturadas. O sinal em δ_{H} 2,74 pode ser atribuído a hidrogênios metínicos ou metilênicos; o sinal em δ_{H} 1,25 pode ser atribuído a hidrogênios metilênicos e o multipeto em δ_{H} 0,84 pode ser atribuído a hidrogênios metílicos. Considerando que a integração (*i*) do sinal em δ_{H} 0,84 (*i* = 72,26) seja atribuído a hidrogênios de dois grupos metilas, e a integração em 2,74 (*i* = 27,71) e 1,25 (*i* = 421,48) sugerem um hidrocarboneto de fórmula mínima $\text{C}_{21}\text{H}_{44}$.

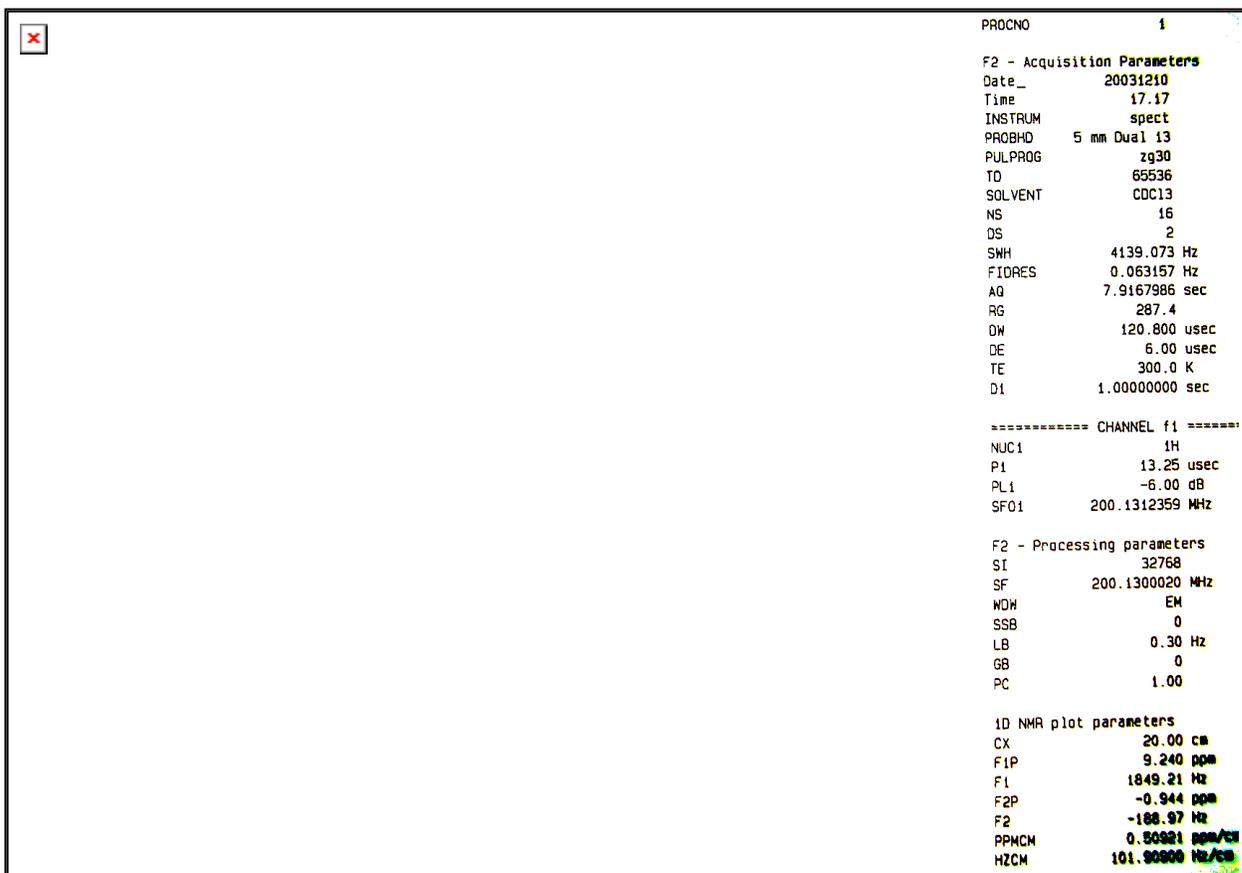


Figura IV.1. Espectro de RMN de ^1H de **Fo-EH-1** (CDCl_3 ; 400 MHz).

A Figura IV.2 mostra o espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135° de **Fo-EH-1**. O espectro registra apenas sinais entre δ_c 32,0 e 14,0, confirmando tratar-se de uma estrutura alifática e saturada. De acordo com o subspectro DEPT 135° , os sinais em δ_c 31,95, 29,72, 29,68, 29,38 e 22,71 correspondem a carbonos metilênicos e o sinal em δ_c 14,12 corresponde a carbono metílico.

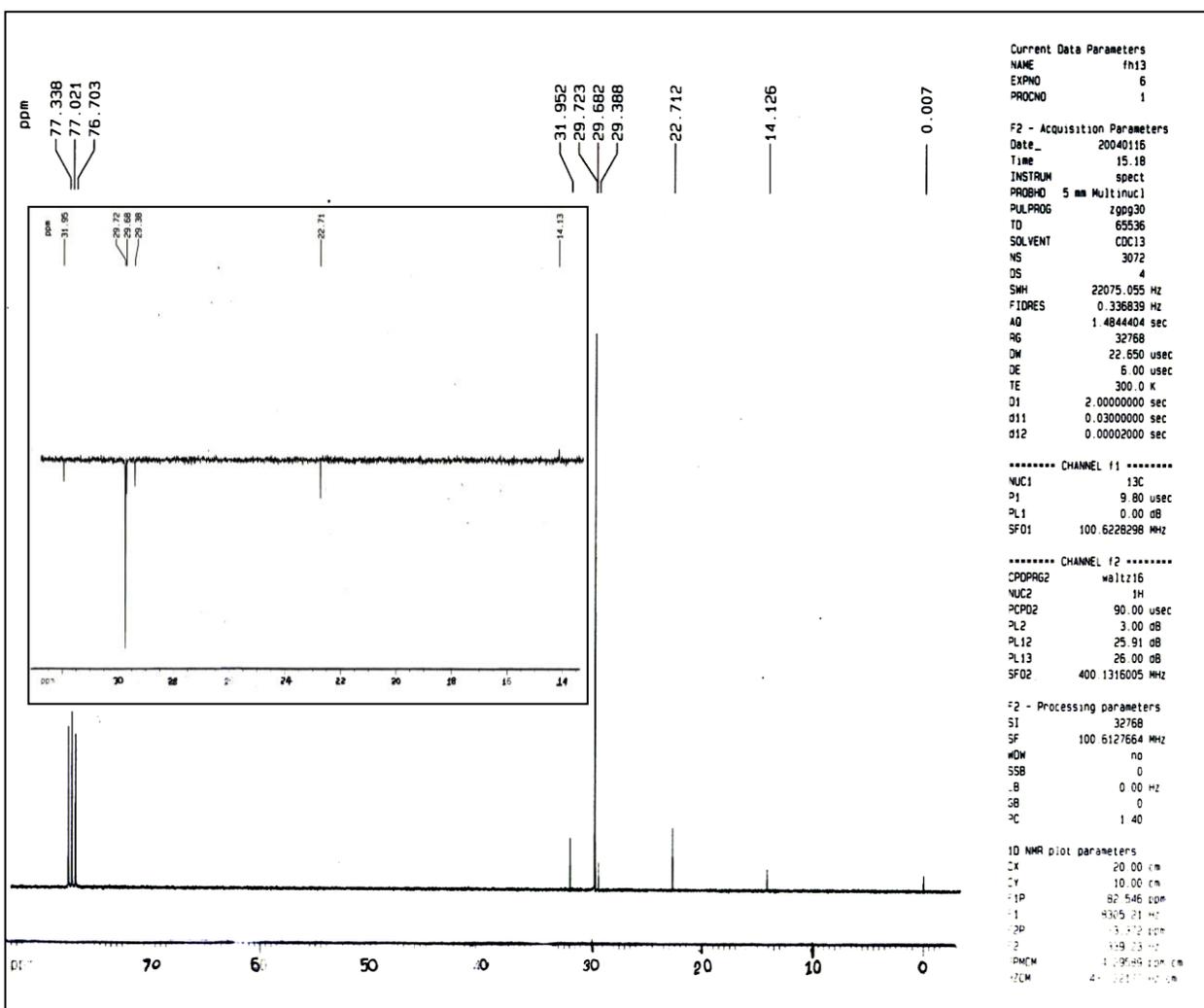


Figura IV.2. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° de **Fo-EH-1** (CDCl_3 , 100 MHz).

A Figura IV.3 mostra o espectro de RMN de ^{13}C de **Fo-EH-1**, indicando as integrações dos sinais. Considerando que a integração do sinal em δ 14,12 seja devida a 2 carbonos metílicos, as integrações dos sinais em δ 31,95, 29,72, 29,68, 29,38 e 22,71 corresponderão a 2, 29, 2, 1 e 3 carbonos, respectivamente. Esses resultados sugerem um hidrocarboneto de fórmula mínima $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$.

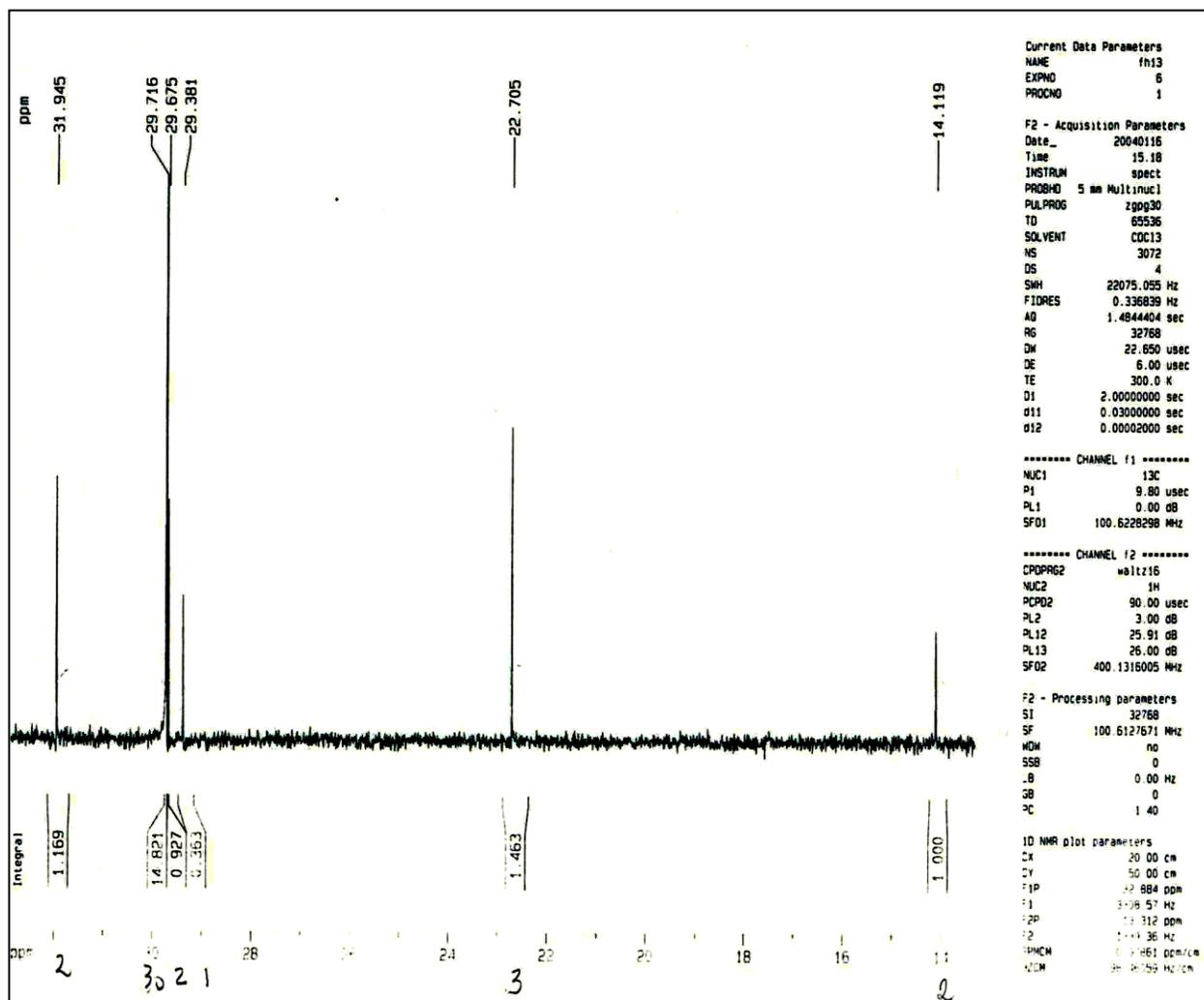
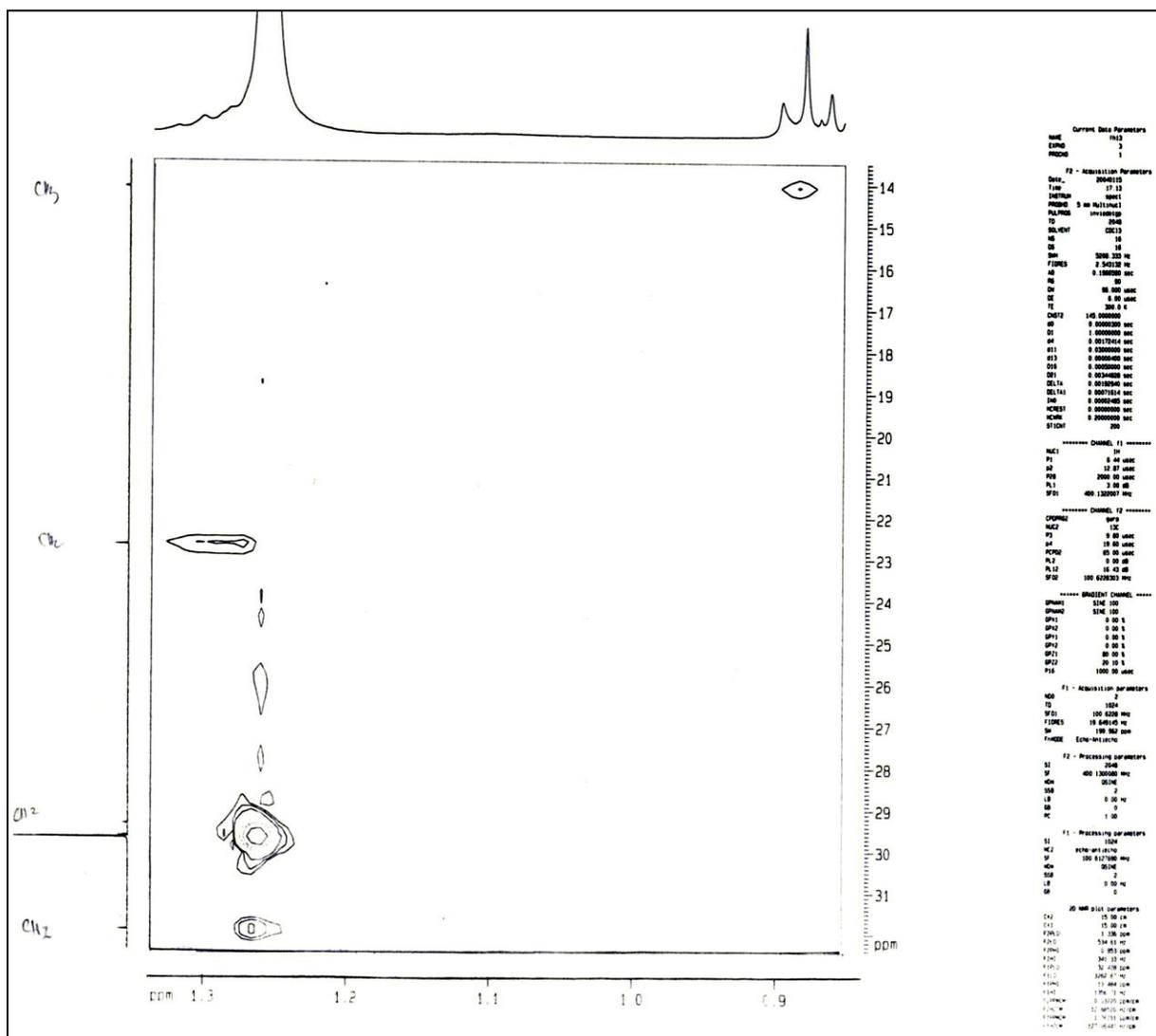


Figura IV.3. Espectro de RMN de ^{13}C de **Fo-EH-1**, incluindo valores das integrações dos sinais (100 MHz; CDCl_3).

A Figura IV.4 mostra o mapa de contornos HMQC de **Fo-EH-1**. Os hidrogênios em δ_H 0,84 correlacionam-se com o carbono em δ_C 14,12; os hidrogênios em δ_H 1,25 correlacionam-se com os carbonos em δ_C 31,95, 29,72, 29,68, 29,38 e 22,71. Os hidrogênios em δ_H 2,74 não se correlacionam com carbonos, indicando tratar-se de hidrogênios não pertencentes à estrutura de **Fo-EH-1**.



A Figura IV.5 mostra o mapa de contornos HMBC de **Fo-EH-1**. Os hidrogênios em δ_H 0,84 correlacionam-se com os carbonos em δ_C 22,71 e 31,95. Os hidrogênios em δ_H 1,25 correlacionam-se com os carbonos em δ_C 31,95, 29,72, 29,68, 29,38 e 22,71. Os hidrogênios em δ_H 2,74 não se correlacionam com carbonos, indicando tratar-se de hidrogênios não pertencentes à estrutura de **Fo-EH-1**.

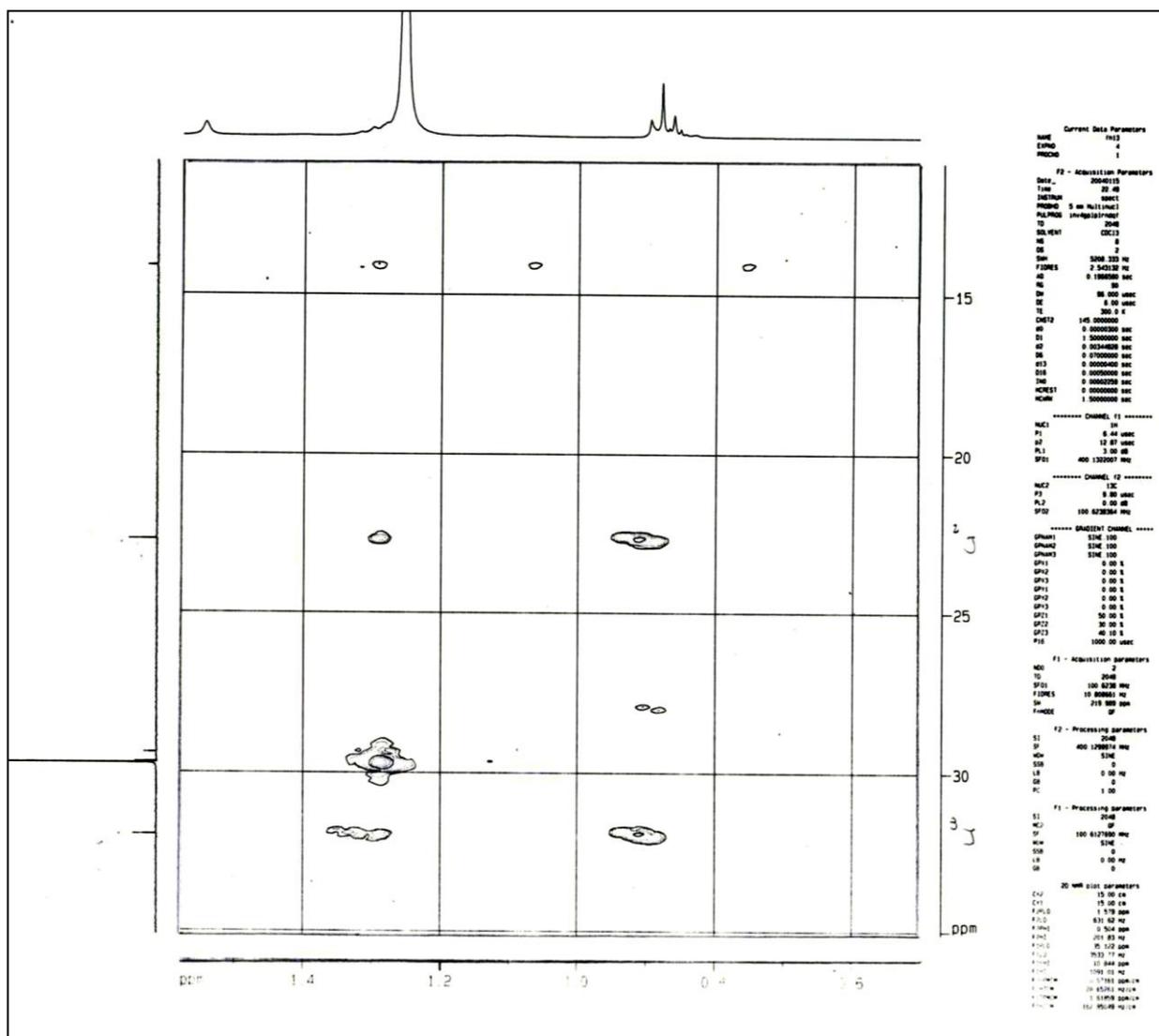


Figura IV.5. Mapa de contornos HMBC de **Fo-EH-1** (400 MHz; CDCl_3).

A Figura IV.6 mostra o mapa de contornos COSY de **Fo-EH-1**. Os hidrogênios em δ_H 0,84 correlacionam-se com os hidrogênios em δ_H 1,25. Esses resultados mostram que este último sinal pode ser atribuído a vários hidrogênios de grupo metilênicos. Os hidrogênios em δ_H 2,74 não se correlacionam com carbonos, indicando tratar-se de hidrogênios não pertencentes à estrutura de **Fo-EH-1**.

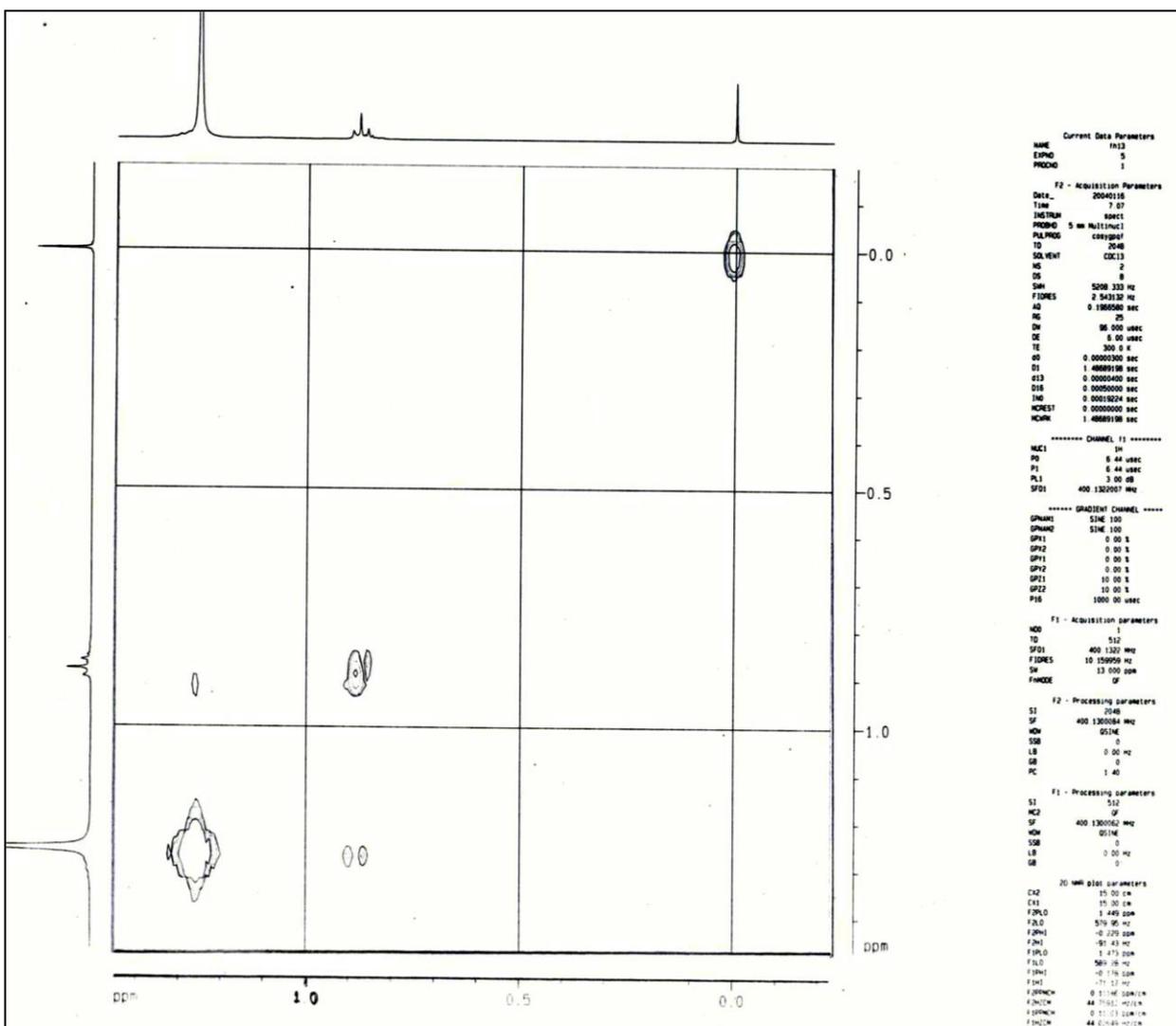


Figura IV.6. Mapa de contornos COSY de **Fo-EH-1** (400 MHz; CDCl₃).

A Figura IV.7 mostra o mapa de contornos NOESY de **Fo-EH-1**. Os hidrogênios em δ_H 0,84 correlacionam-se com os hidrogênios em δ_H 1,25. Os hidrogênios em δ_H 0,84 apresentam dois contornos de correlação, indicando tratarem-se de diferentes grupos metila na estrutura. Os hidrogênios em δ_H 2,74 não se correlacionam com carbonos, indicando tratar-se de hidrogênios não pertencentes à estrutura de **Fo-EH-1**.

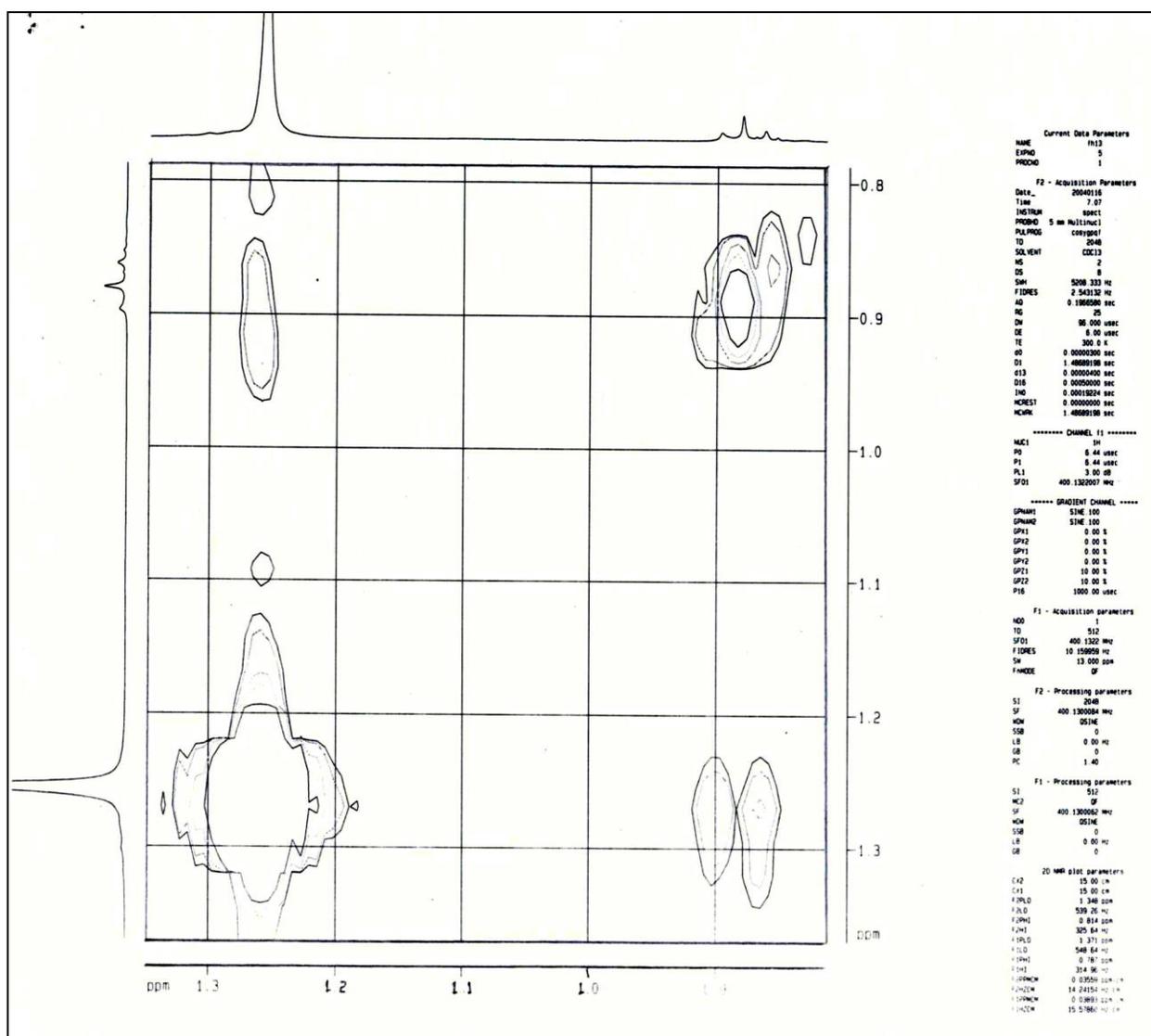


Figura IV.7. Mapa de contornos NOESY de **Fo-FH-1** (400 MHz; $CDCl_3$).

A Figura IV.8 apresenta o cromatograma obtido por cromatografia gasosa do fitoconstituente **Fo-EH-1**. Os picos com tempos de retenção (TR's) em 52,14, 46,45 e 48,60 min são os mais intensos, correspondendo a 71,15%, 10,59% e 9,47% da área total, respectivamente. Esses resultados mostram que **Fo-EH-1** é uma mistura constituída predominantemente pela substância de T.R. = 52.14 min.

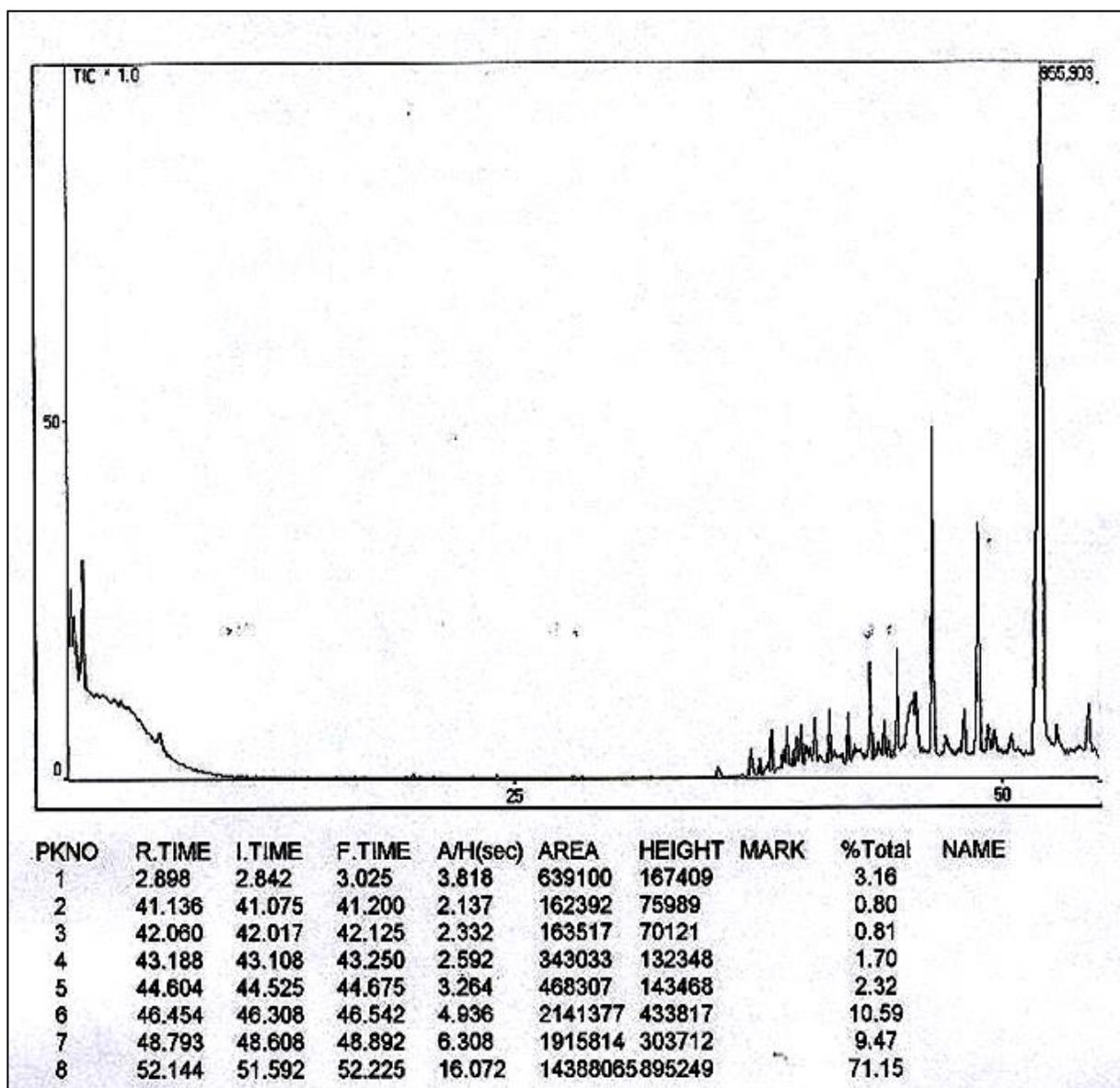


Figura IV.8. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa de **Fo-EH-1**.

A Figura IV.9 mostra o espectro de Massas do pico com TR = 46,45 min do cromatograma por CG de **Fo-EH-1** da Figura IV.8. O pico em m/z 155 pode ser devido a fragmentação do pico em m/z 211, com perda de 56 unidades de massa atômica, correspondente a C_4H_8 . Os picos em m/z 127, 113, 99, 85, 71, 57 e 43 podem ser atribuídos a perdas sucessivas de grupos CH_2 a partir do pico em m/z 155, característico de estruturas alifáticas. O pico de maior relação carga/massa é registrado em m/z 289, correspondendo a uma fórmula mínima próxima a $C_{21}H_{44}$.

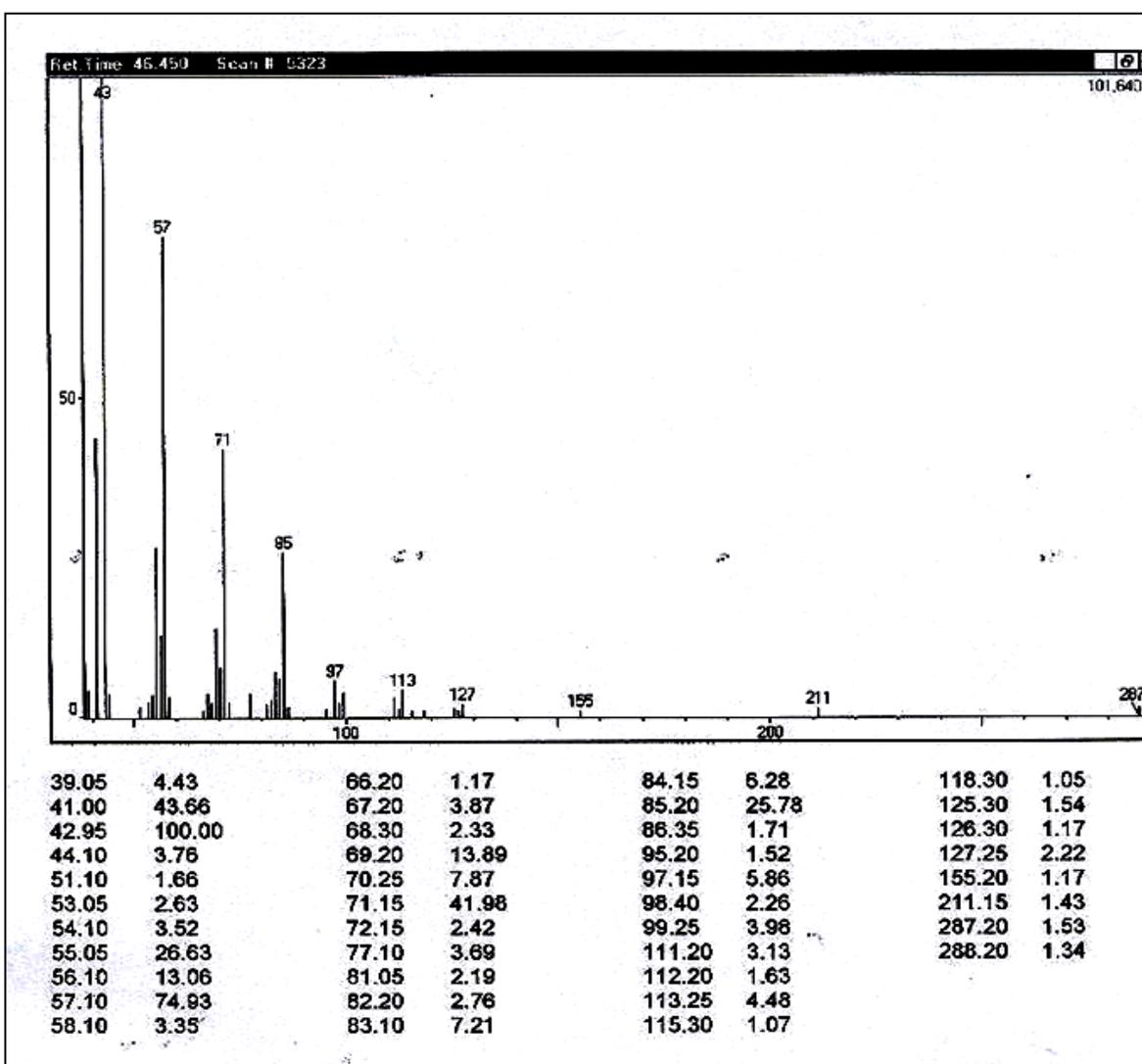


Figura IV.9. Espectro de Massas do pico com T.R. = 46,45 min do cromatograma por CG de **Fo-EH-1**.

A Figura IV.10 mostra o espectro de Massas do pico com T.R. = 48,80 min do cromatograma por CG de **Fo-EH-1** da Figura IV.8. Os picos em m/z 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57 e 43 podem ser atribuídos à perdas sucessivas de grupos CH_2 a partir do pico em m/z 169, fragmentações características de estruturas alifáticas. O pico em m/z 169 pode ser atribuído a perda de hidrogênio radical do íon molecular, correspondendo a uma fórmula mínima próxima a $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$.

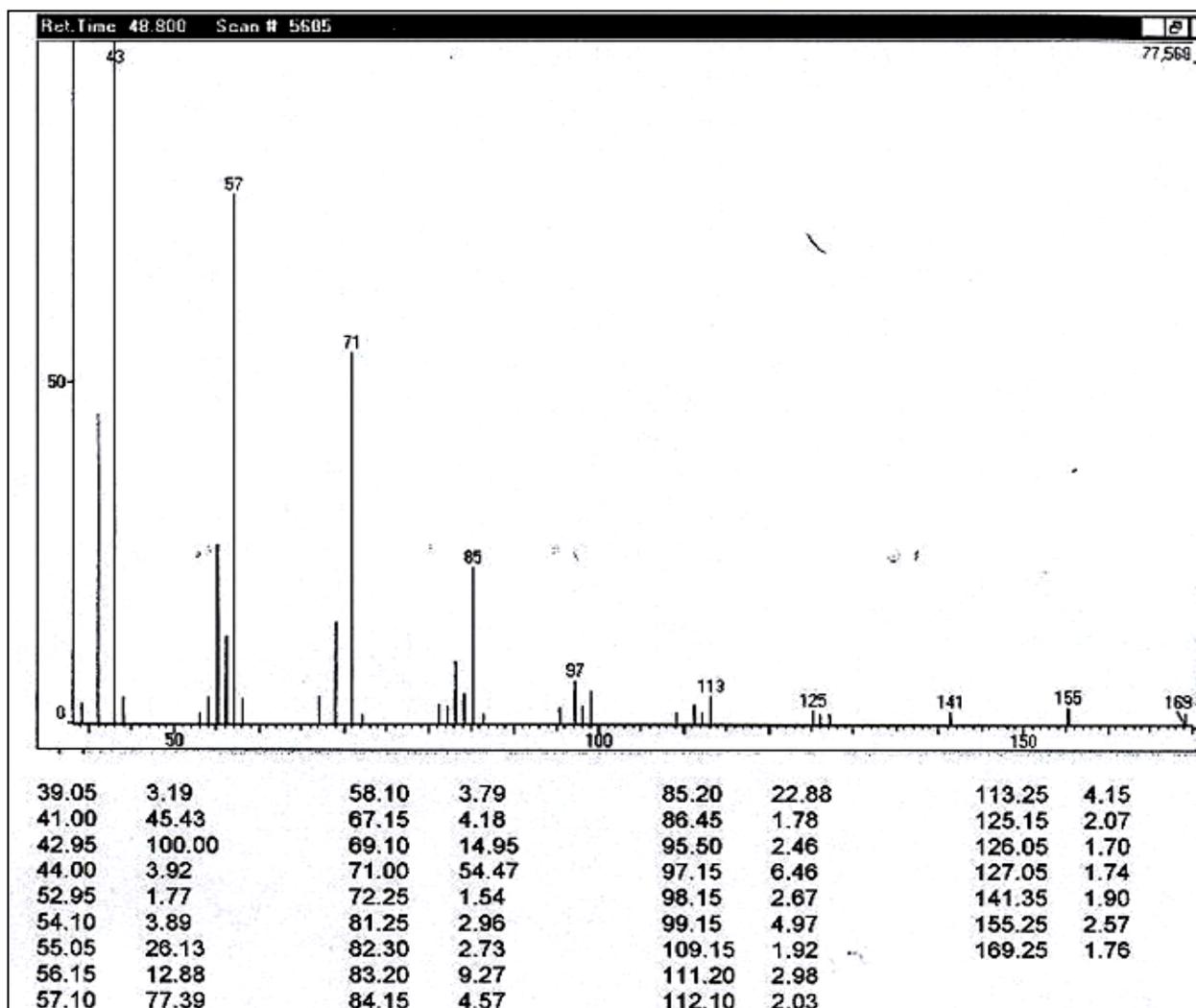


Figura IV.10. Espectro de Massas do pico com T.R. = 48,80 min, do cromatograma por CG de **Fo-EH-1**.

A Figura IV.11 mostra o espectro de Massas do pico com T.R. = 52,12 min do cromatograma por CG de **Fo-EH-1** da Figura IV.8. Os picos em m/z 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57 e 43 podem ser atribuídos à perdas sucessivas de grupos CH_2 a partir do pico em m/z 197, fragmentações características de estruturas alifáticas. O pico em m/z 267 pode ser atribuído à perda de hidrogênio radical do íon molecular, correspondendo a uma fórmula mínima próxima a $\text{C}_{19}\text{H}_{40}$. Portanto, os dados de RMN e os dados de CG/EM indicam que **Fo-EH-1** é constituído principalmente por uma mistura de hidrocarbonetos saturados de cadeias longas e de fórmulas moleculares $\text{C}_{19}\text{H}_{40}$ (71,15%), $\text{C}_{21}\text{H}_{44}$ (10,59%) e $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ (9,47%)⁷⁴.

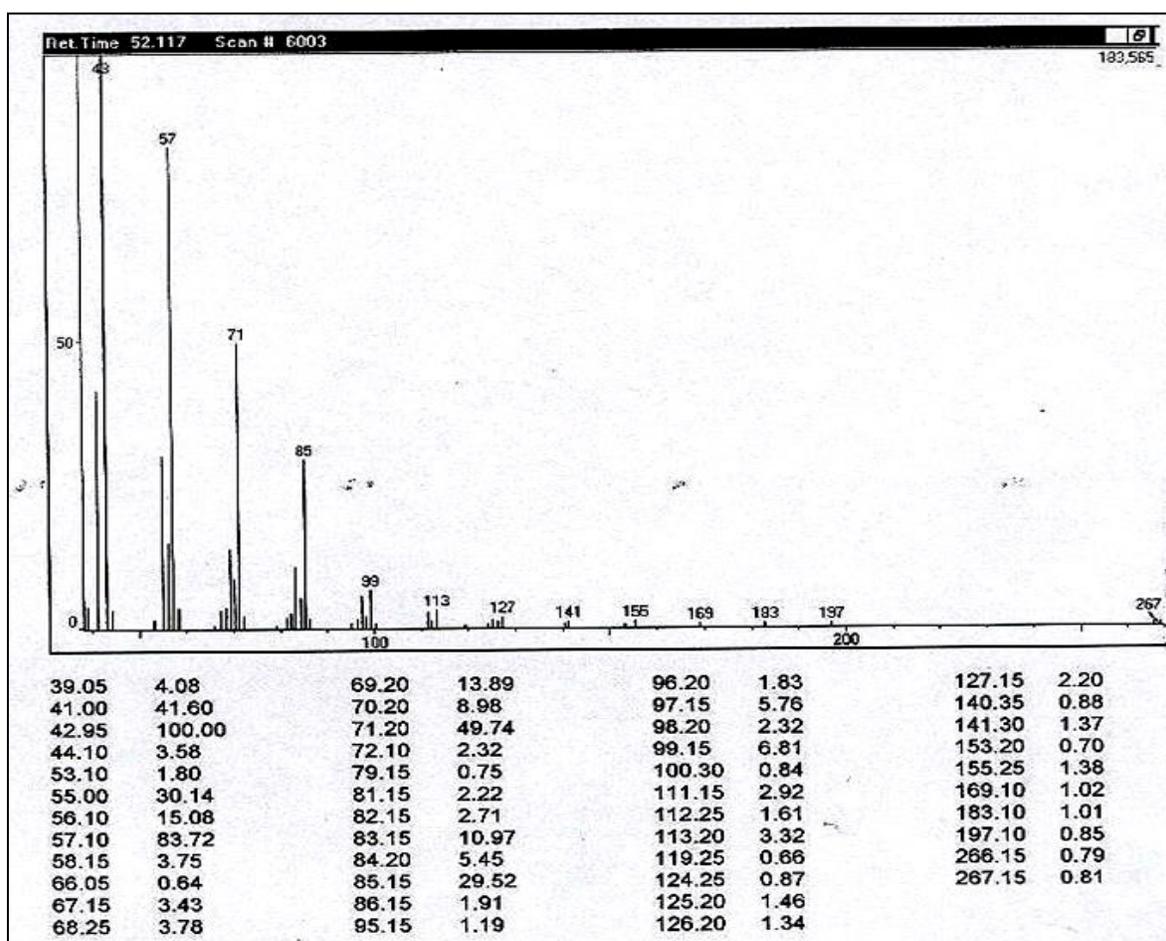


Figura IV.11. Espectro de Massas do pico com T.R. = 52,11 min, do cromatograma por CG de **Fo-EH-1**.

2. Análise de Fo-EE-1

A Figura IV.12 mostra o espectro de RMN de ^1H de **Fo-EE-1**. O sinal largo entre δ_{H} 5,15 e 5,12 pode ser atribuído a hidrogênios alquínlicos. Os demais sinais são registrados entre δ_{H} 2,02 e 0,85, correspondendo a hidrogênios de grupos alifáticos saturados. Considerando que o sinal largo dos hidrogênios alquênlicos corresponde a dois hidrogênios, a relação com as integrações dos demais sinais indica uma fórmula mínima próxima a $\text{C}_{28}\text{H}_{56}$.

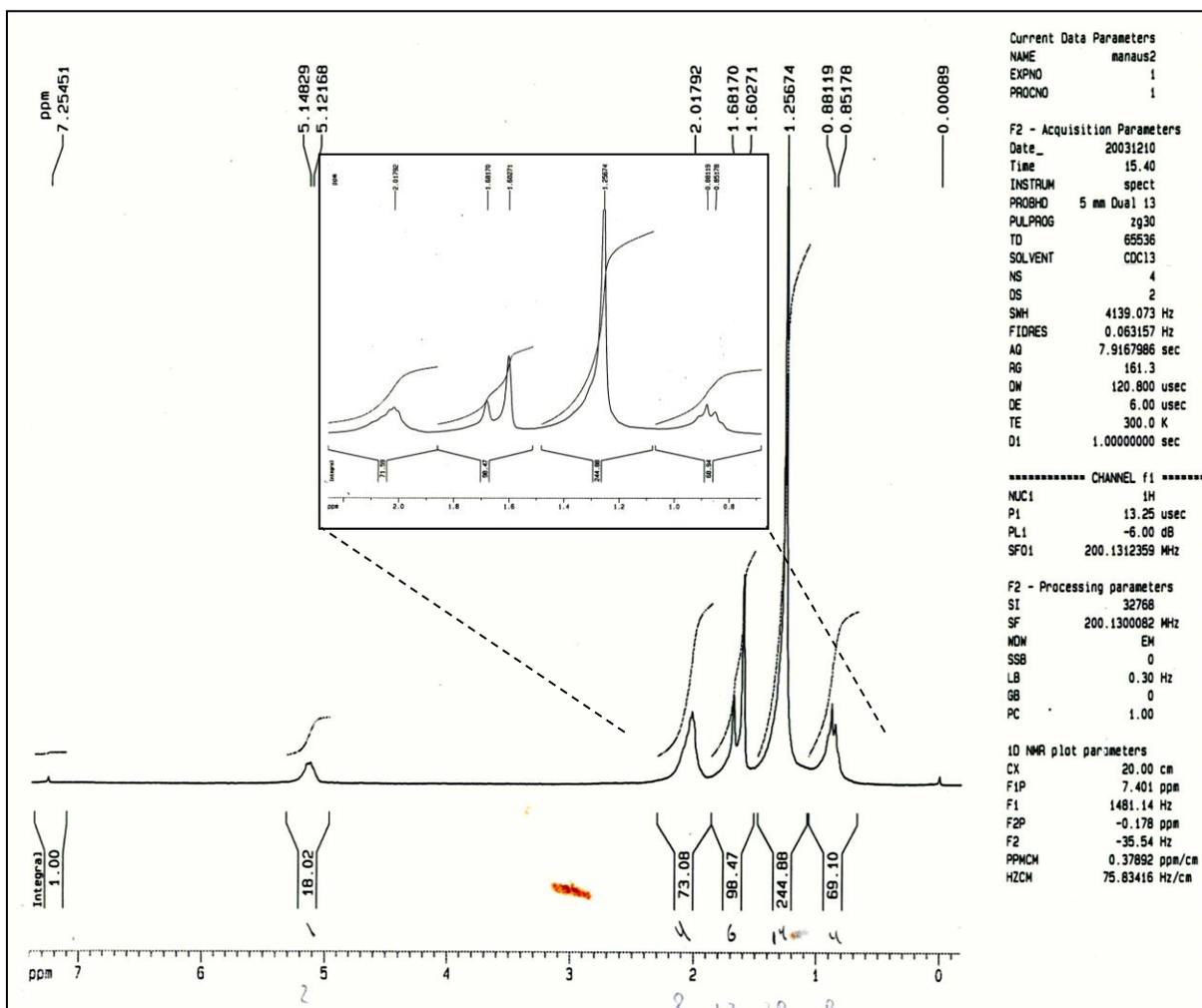


Figura IV.12. Espectro de RMN de ^1H e ampliação do espectro de **Fo-EE-1** (CDCl_3 ; 200 MHz) na região entre δ_{H} 2,3 – 0,7.

A Figura IV.13 mostra o espectro de RMN de ^{13}C e o espectro DEPT 135° de **Fo-EE-1**. Os sinais em δ_c 135,32, 135,11 e 131,45 são devidos à carbonos olefínicos não hidrogenados. Os sinais em δ_c 124,64 e 124,55 são devidos à carbonos olefínicos e metínicos. Os sinais em δ_c 39,99, 32,17, 29,95, 28,51, 27,01, 26,90 e 22,93 são devidos a carbonos metilênicos. Os sinais em δ_c 25,92, 17,90, 16,26 e 14,35 correspondem a carbonos metílicos. Esses dados estão de acordo com uma estrutura de hidrocarboneto insaturado com fórmula mínima próxima a $\text{C}_{30}\text{H}_{54}$. Porém, a complexidade do espectro não permitiu a sua elucidação estrutural.

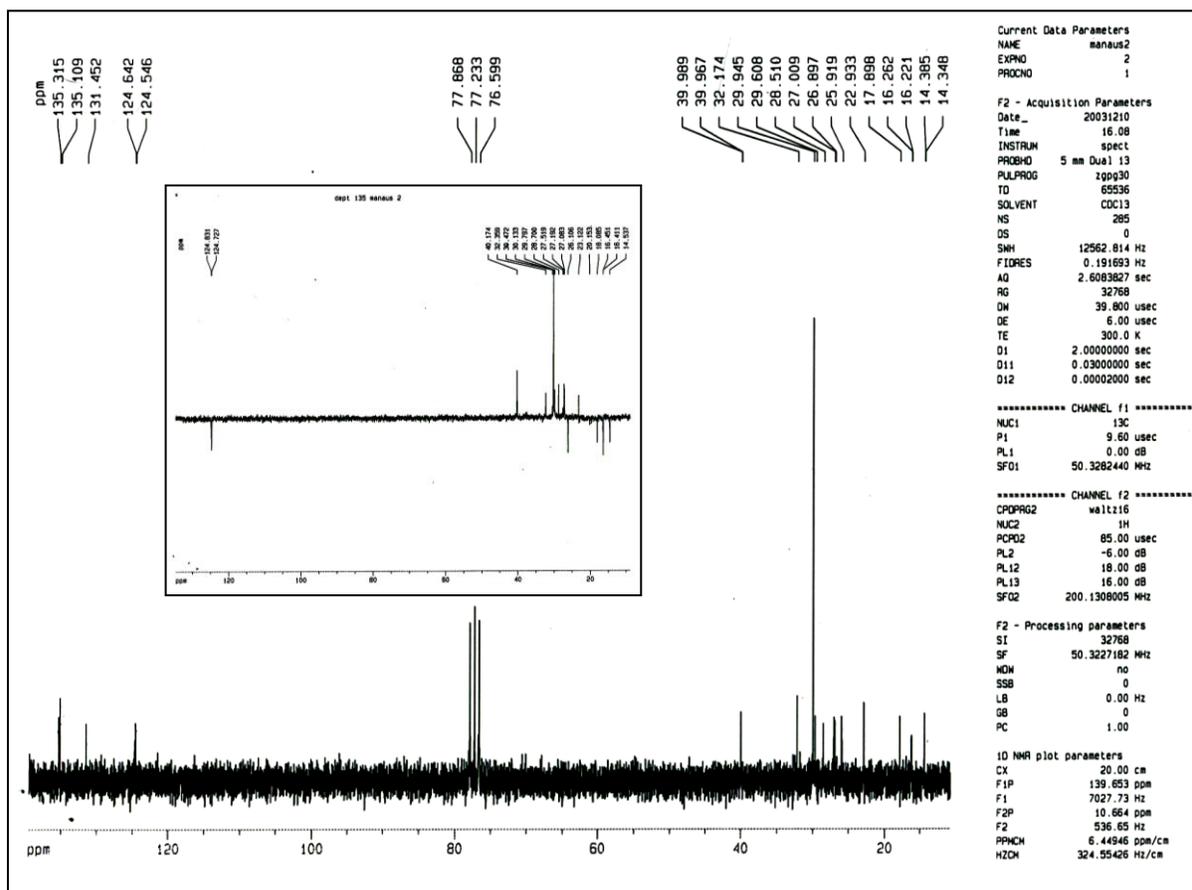


Figura IV.13. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135°

de **Fo-EE-1** (CDCl_3 ; 50 MHz).

3. Análise de Fo-EE-2

O teste Liebermann-Burchard foi positivo para triterpeno pentacíclico. A Figura IV.14 mostra o espectro de RMN de ^1H de **Fo-EE-2**. O sinal largo entre δ_{H} 5,15 e 5,12 pode ser atribuído ao hidrogênio alquênico H-12 da α -amirina. O sinal duplete em δ_{H} 4,15 ($J= 6,9$ Hz) pode ser atribuído ao hidrogênio hidroxílico em C-3. O sinal multiplete entre δ_{H} 3,27 e 3,15 pode ser atribuído ao hidrogênio do carbono hidroxilado C-3. Os demais sinais são registrados na região entre δ_{H} 2,17 e 0,79, podendo ser atribuídos a hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos da α -amirina.

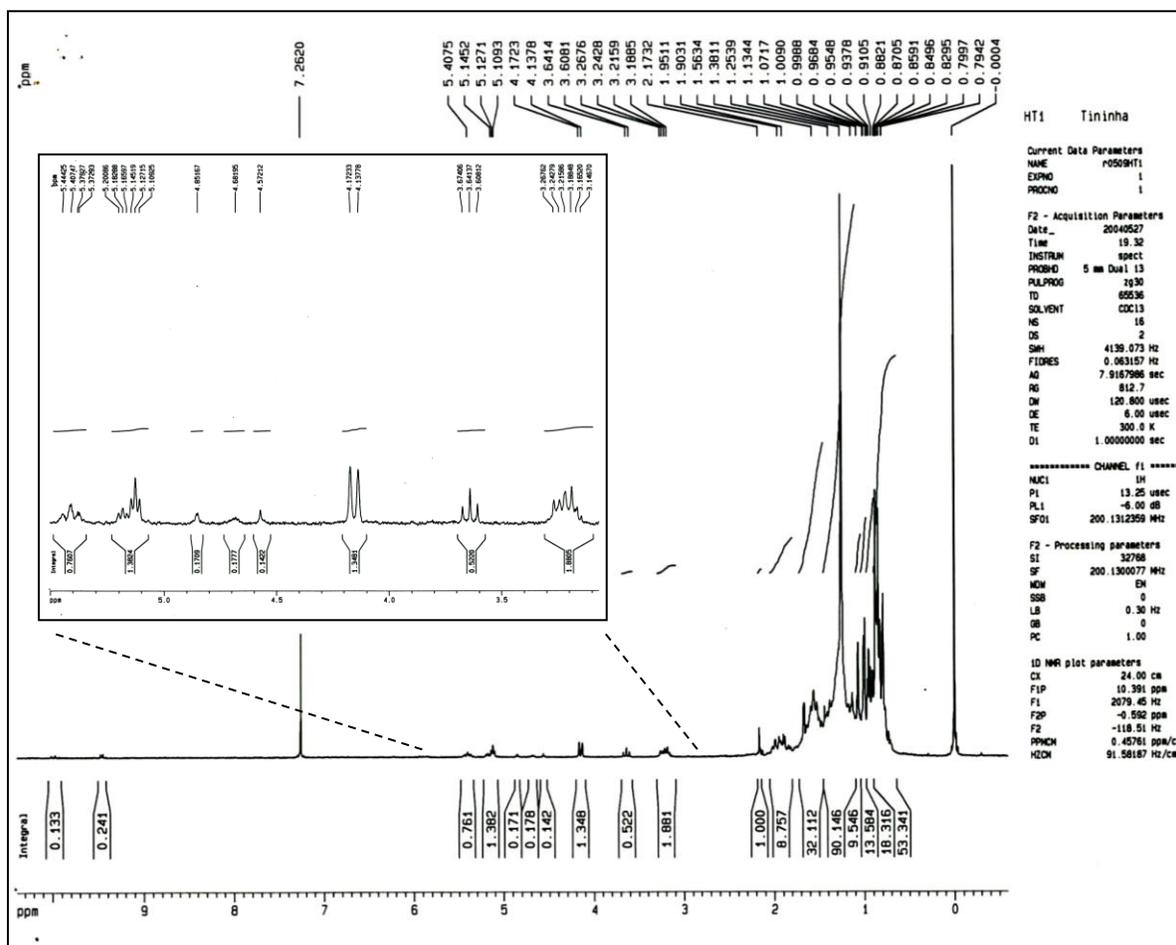


Figura IV.14. Espectro de RMN de ^1H de **Fo-EE-2** (CDCl_3 ; 200 MHz) e ampliação na região entre δ_{H} 5,5 – 3,1.

A Figura IV.15 mostra o espectro de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-2**. O sinal em δ 139,6 pode ser atribuído ao carbono não hidrogenado C-13 da α -amirina. O sinal em δ 124,4 pode ser atribuído ao carbono metínico C-12. O sinal em δ 79,1 pode ser atribuído ao carbono metínico e hidroxilado C-3. O sinal em δ 59,1 pode ser atribuído ao carbono metínico C-18. O sinal em δ 55,2 pode ser atribuído ao carbono metínico C-5. O sinal em δ 47,7 pode ser atribuído ao carbono metínico C-9. Os demais sinais são registrados na região entre δ 42,1 e 15,6, podendo ser atribuídos a carbonos metínicos, metilênicos e metílicos da α -amirina.

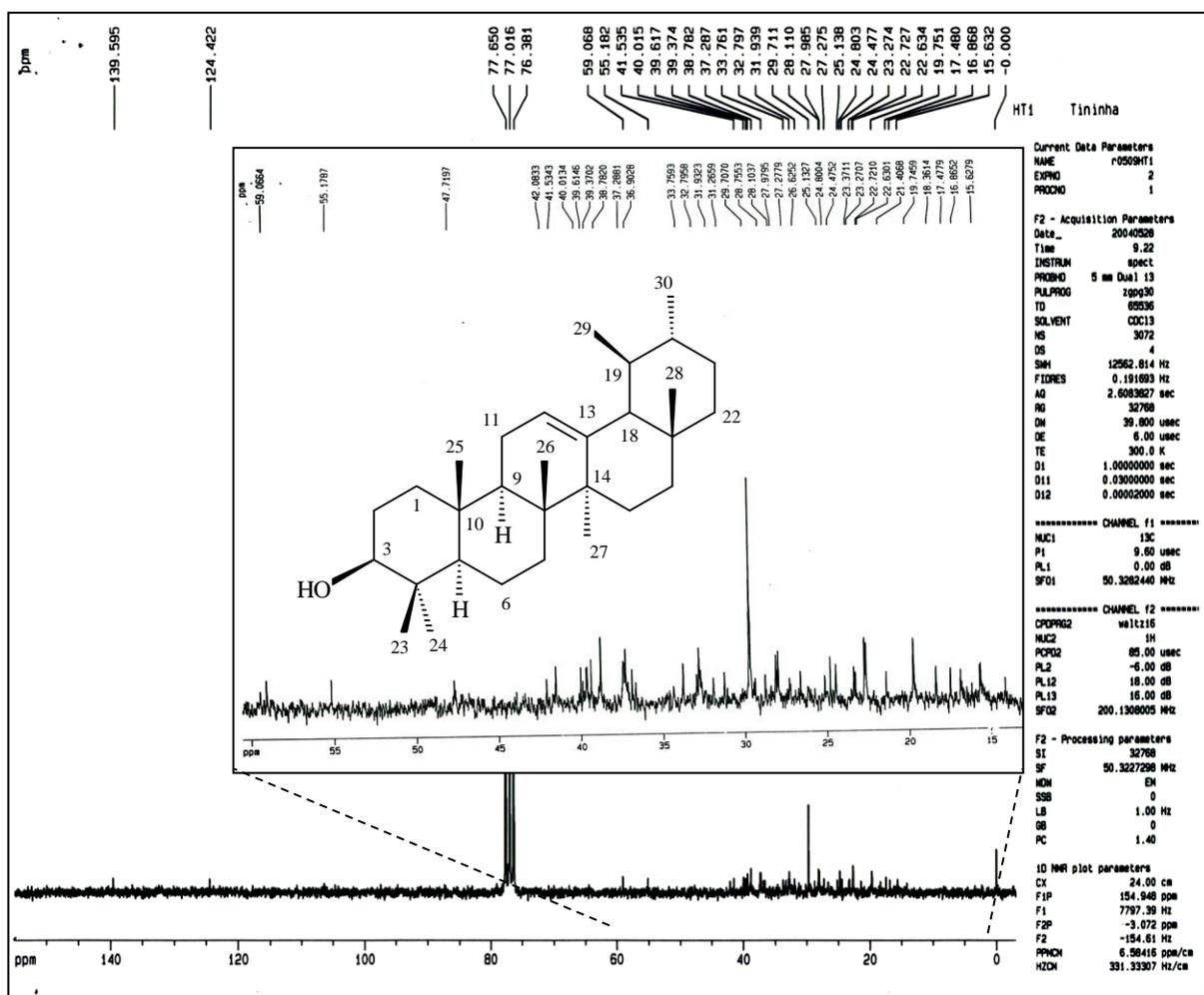


Figura IV.15. Espectro de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-2** (CDCl_3 ; 50 MHz) e ampliação na região entre δ 59,0 – 15,6.

A Figura IV.16 mostra o espectro DEPT 135° de **Fo-EE-2**. Os sinais em δ 28,1, 22,7, 21,3, 17,5, 16,9 e 15,6 correspondem a carbonos metílicos. Os sinais em δ 41,5, 39,4, 32,9, 31,9, 28,7, 27,3, 26,6, 23,3 e 19,8 correspondem à carbonos metilênicos. Os sinais em δ 124,4, 79,1, 55,2, 47,7 e 39,6 correspondem a carbonos metínicos. Os demais sinais que são observados no espectro de RMN de ^{13}C , porém não observados no subspectro DEPT 135, são carbonos quaternários.

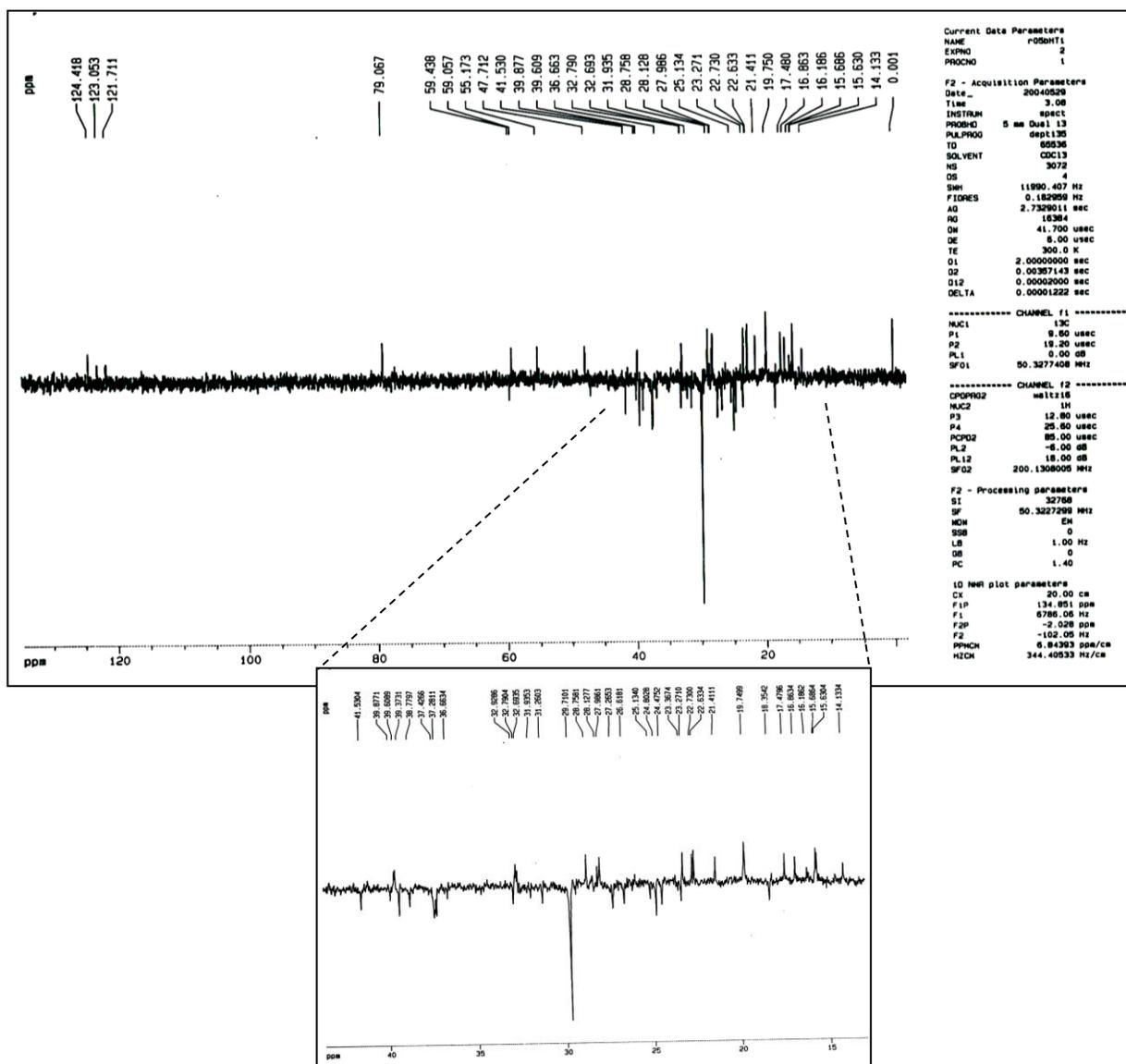
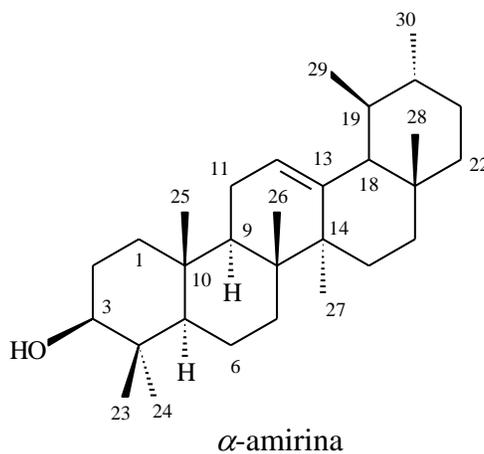


Figura IV.16. Espectro de DEPT 135° de **Fo-EE-2** (CDCl_3 ; 50 MHz) e ampliação na região entre δ 41,5 – 15,1.

As atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-2** apresentados na Tabela IV.1, que inclui também dados de δ_{C} descritos na literatura para α -amirina^{75,76}, ambos em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos dos carbonos de **Fo-EE-2** apresentam-se muito próximos aos sinais correspondentes registrados na literatura para α -amirina, indicando que ambas são a mesma substância.

Tabela IV.1. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-2** e de α -amirina

Átomo	Fo-EE-2 δ_{C}	α -amirina δ_{C}
C-1	39,4	38,7
C-2	27,3	27,2
C-3	79,1	78,3
C-4	38,8	38,7
C-5	55,2	55,2
C-6	19,8	18,3
C-7	32,9	32,9
C-8	40,0	40,0
C-9	47,7	47,7
C-10	36,9	36,9
C-11	23,3	23,3
C-12	124,4	124,3
C-13	139,6	139,3
C-14	42,1	42,0
C-15	28,7	28,7
C-16	26,6	26,6
C-17	33,7	33,7
C-18	59,1	58,9
C-19	39,6	39,6
C-20	39,6	39,6
C-21	31,9	31,2
C-22	41,5	41,5
C-23	28,1	28,1
C-24	15,6	15,6
C-25	15,6	15,6
C-26	16,9	16,8
C-27	22,7	23,3
C-28	28,1	28,1
C-29	17,5	17,4
C-30	21,3	21,3



A α -amirina, como os demais triterpenos pentacíclicos, são produtos naturais e componentes minoritários em organismos vivos, sendo definidos como metabólitos secundários. Nas plantas, os triterpenóides desempenham um papel fundamental na defesa contra agentes externos, tais como: microorganismos (bactérias e fungos)⁷⁷. A variedade estrutural dessa classe de triterpenos tem sido de grande interesse nos estudos de suas propriedades biológicas, apresentando-se como antiinflamatórios, anti-bacterianos, fungicida, antivirais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais e tuberculostáticos⁷⁸. α -Amirina e β -amirina isolados de *E. precatória* (Arecaceae) apresentaram testes de toxicidade sobre *A. salina*, tanto nos extratos quanto isoladas, com $DL_{50} = 200 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{50} = 23 \mu\text{g/mL}$ ⁷⁹, respectivamente. Da resina da espécie *Protium kleinii* foram isoladas misturas de α -amirina e β -amirina que demonstraram efeitos antinociceptivo em diversos modelos de nocicepção química e mecânica. Os efeitos anti-hiperalgésico da α -amirina têm sido observados nas dores inflamatórias persistentes induzidas pela injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund^{80,81}.

α -Amirina e β -amirina podem ser encontradas na forma livre ou ligadas a um grupo glicosila, ácido graxo ou estruturas fenólicas. Dentre suas propriedades biológicas, α -amirina apresenta atividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*^{82,83}. Alguns estudos mostram que α -amirina e outros triterpenóides apresentam atividades similares aos corticóides, com inibição do mRNA e dos inibidores de síntese protéica da actinomicina e cicloheximida^{84,85}. A atividade antiinflamatória dos triterpenóides apresenta uma contribuição do grupo no carbono C-28, podendo ser importante para os receptores glucocorticóides⁸⁶. A atividade antiinflamatória dos triterpenóides tem sido atribuída também a presença de grupos carboxílicos e hidroxílicos em posições específicas. No caso da α -amirina, essa atividade tem sido atribuída a posição do grupo hidroxila em C-3⁸⁶.

A α -amirina apresenta potencial de inibição dos sinais reguladores das enzimas protéicas de eucariontes cAK e do ciclo do PKA⁸⁷, sendo também inibidora competitiva da tripsina da serine protease e da quimotripsina bovina⁸⁵. As proteases segregadas podem contribuir para as inflamações pela síntese da citocina. Essas inibições indicam efeitos antiinflamatórios localizados⁸⁸.

4. Análise de Fo-EE-3

O sólido branco **Fo-EE-3** (3,0 mg) apresentou fusão entre 133,6 e 137,4 °C e teste Liebermann-Burchard positivo para esteróides. As Figuras IV.17 a IV.19 apresentam o espectro de RMN de ¹H de **Fo-EE-3**. O sinal duplete centrado em δ_H 5,35 ($J= 4,4$ Hz) pode ser atribuído aos hidrogênios H-6 de β -sitosterol e estigmasterol. Os sinais multipletos em δ_H 5,21 e 4,95 podem ser atribuídos respectivamente aos hidrogênios alquenílicos de H-22 e H-23 do estigmasterol. O sinal entre δ_H 3,70 e 3,45 pode ser atribuído aos hidrogênios H-3 de ambos os compostos. Os demais sinais são característicos de estruturas predominantemente alifáticas ($\delta_H < 2$ ppm).

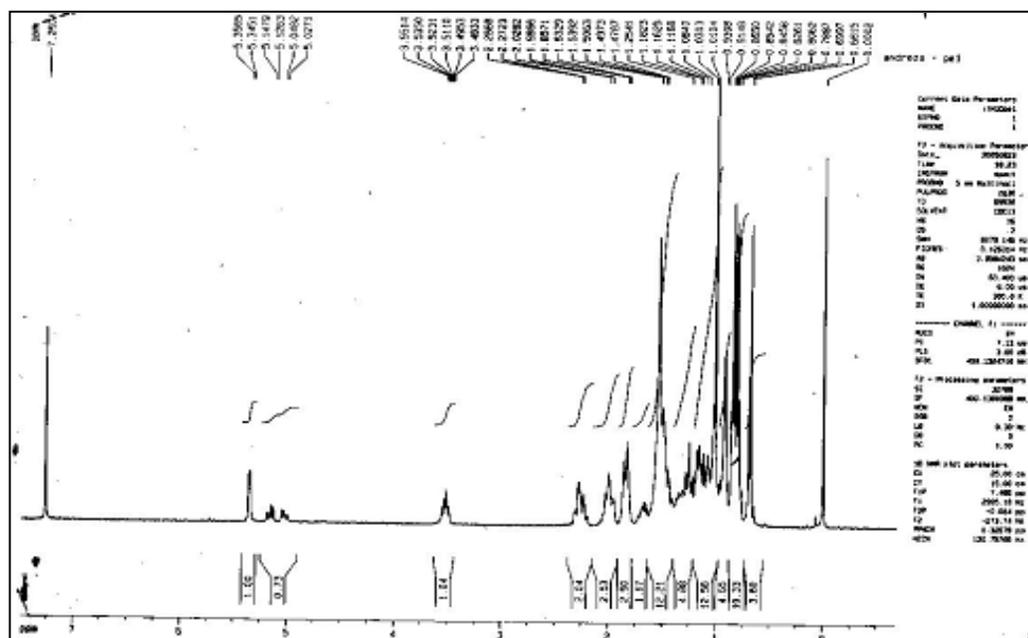


Figura IV.17. Espectro de RMN de ¹H de **Fo-EE-3** (400 MHz; CDCl₃).

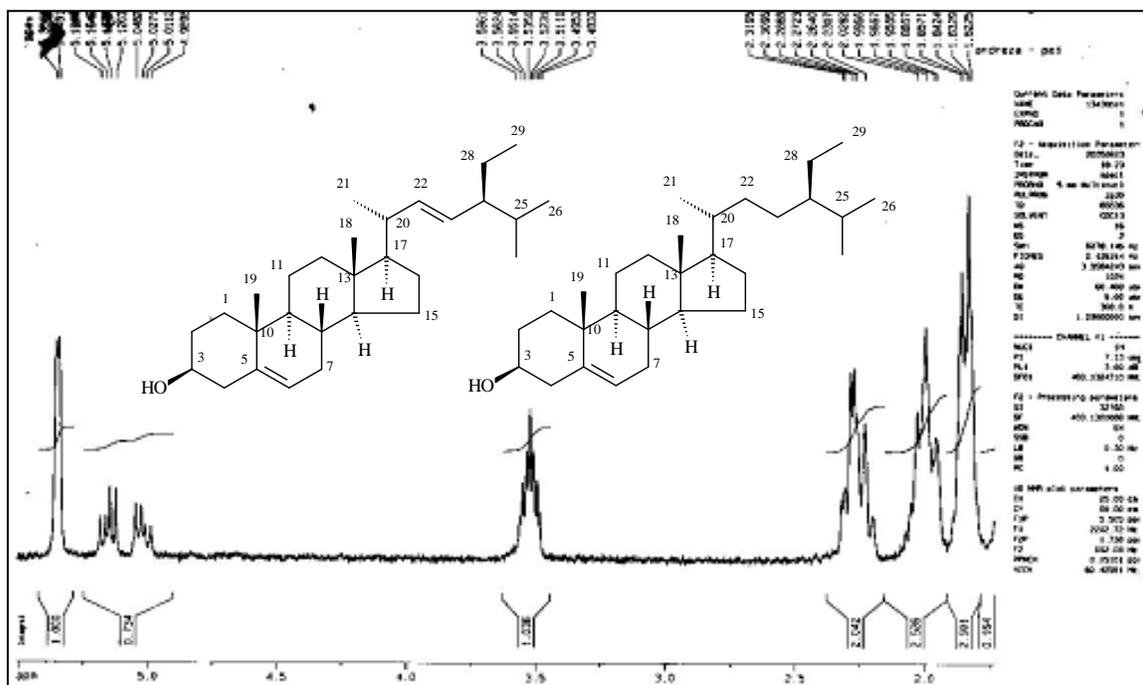


Figura IV.18. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **Fo-EE-3** (400 MHz; CDCl_3) na região entre δ_{H} 5,58 – 1,64.

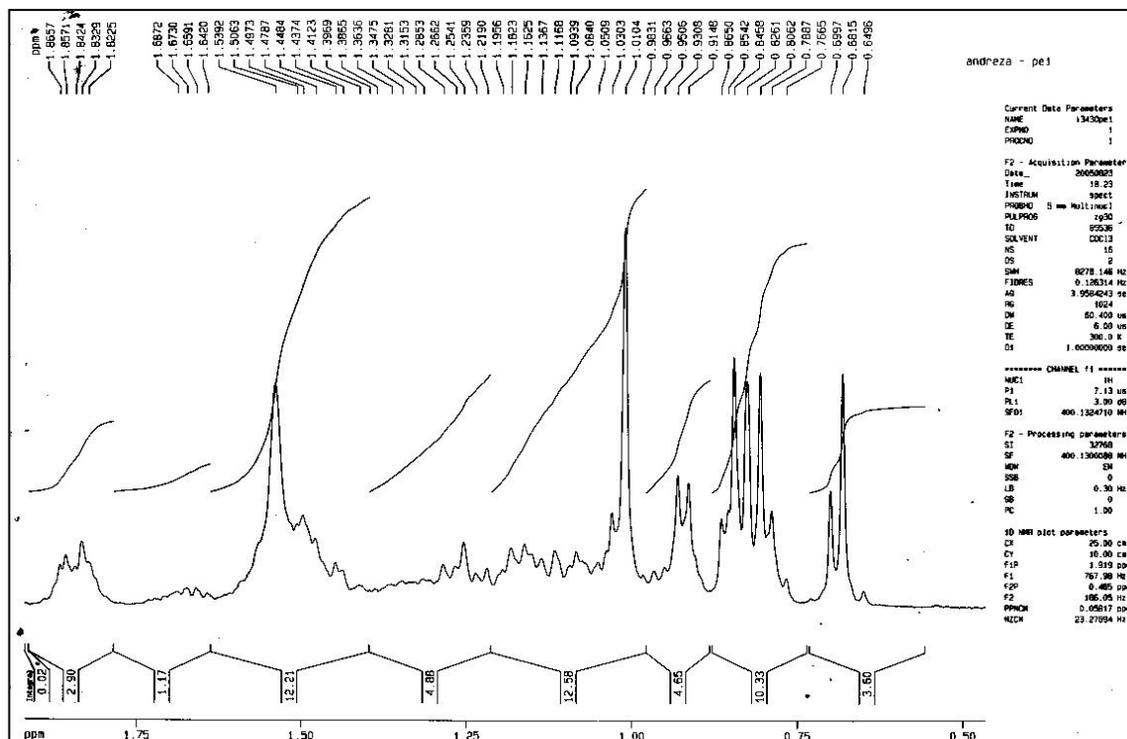


Figura IV.19. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **Fo-EE-3** (400 MHz; CDCl_3) na região entre δ_{H} 1,88 – 0,64.

As Figuras IV.20 a IV.22 mostram o espectro de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-3**. Os sinais em δ_c 140,7 e 121,7 podem ser atribuídos aos carbonos C-5 e C-6, respectivamente, tanto do β -sitosterol quanto do estigmasterol bem como são observados os sinais em δ_c 138,4 e 129,3, respectivamente dos carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol. Isso indica uma proporção significativamente menor do estigmasterol na mistura esteroidal. Outros sinais são registrados e confirmam a mistura entre β -sitosterol e estigmasterol: como o sinal em δ_c 71,7 atribuído à C-3 de ambos os esteróides; os sinais em δ_c 56,7 e 56,0 atribuídos aos carbonos C-14 de β -sitosterol e estigmasterol, respectivamente; os sinais em δ_c 39,7 e 39,6 atribuídos a C-12 de β -sitosterol e estigmasterol, respectivamente; os sinais em δ_c 31,9 e 31,6 atribuídos aos carbonos C-8 de estigmasterol e β -sitosterol, respectivamente.

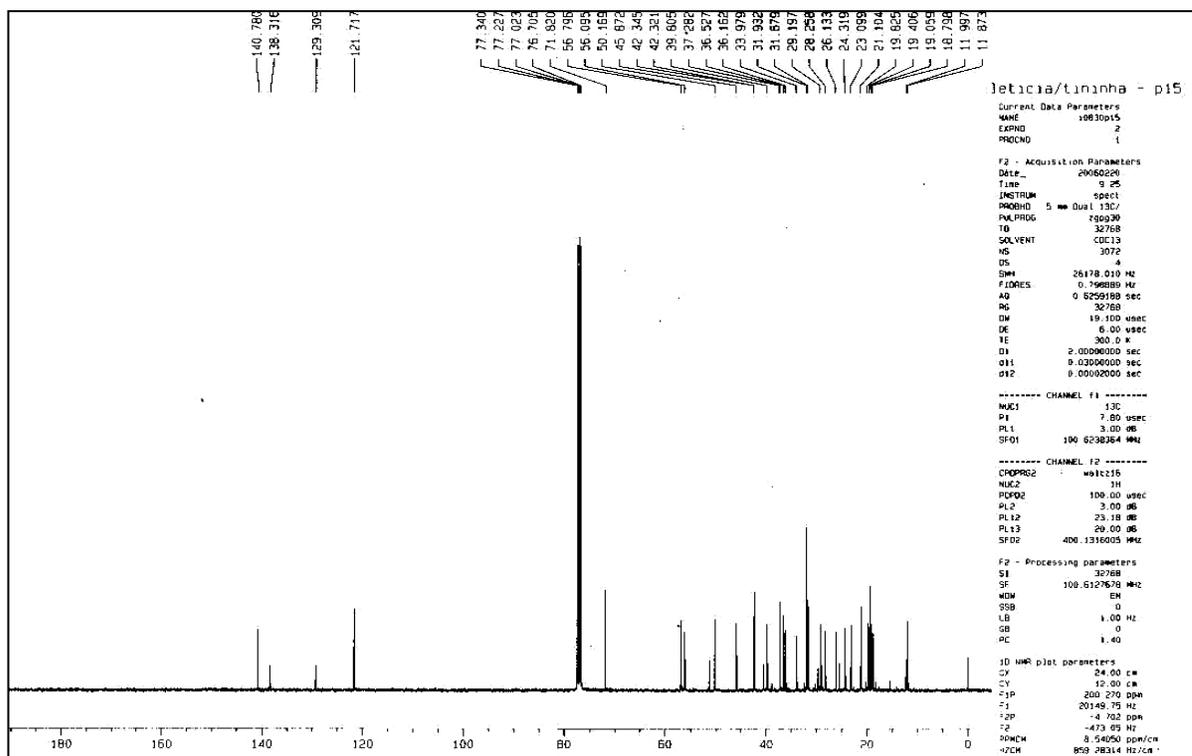


Figura IV.20. Espectro de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-3** (100 MHz; CDCl_3).

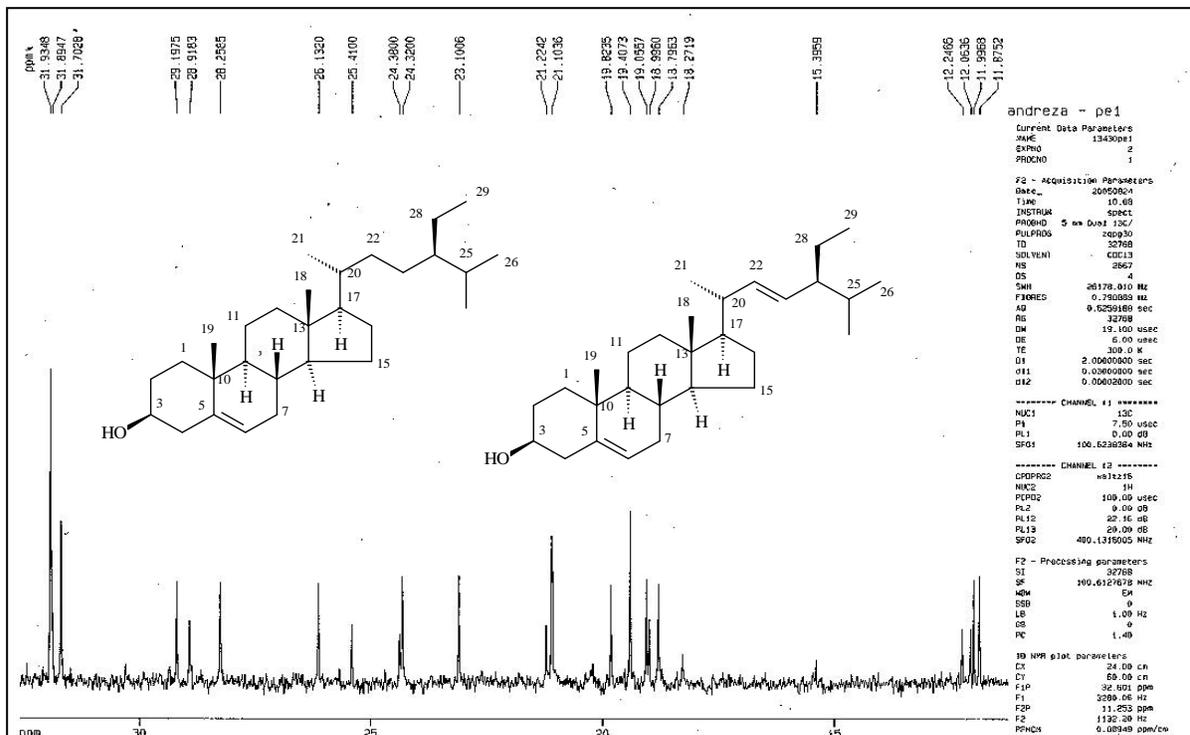


Figura IV.21. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de Fo-EE-3 (100 MHz; CDCl_3) na região entre δ_c 31,9-11,8.

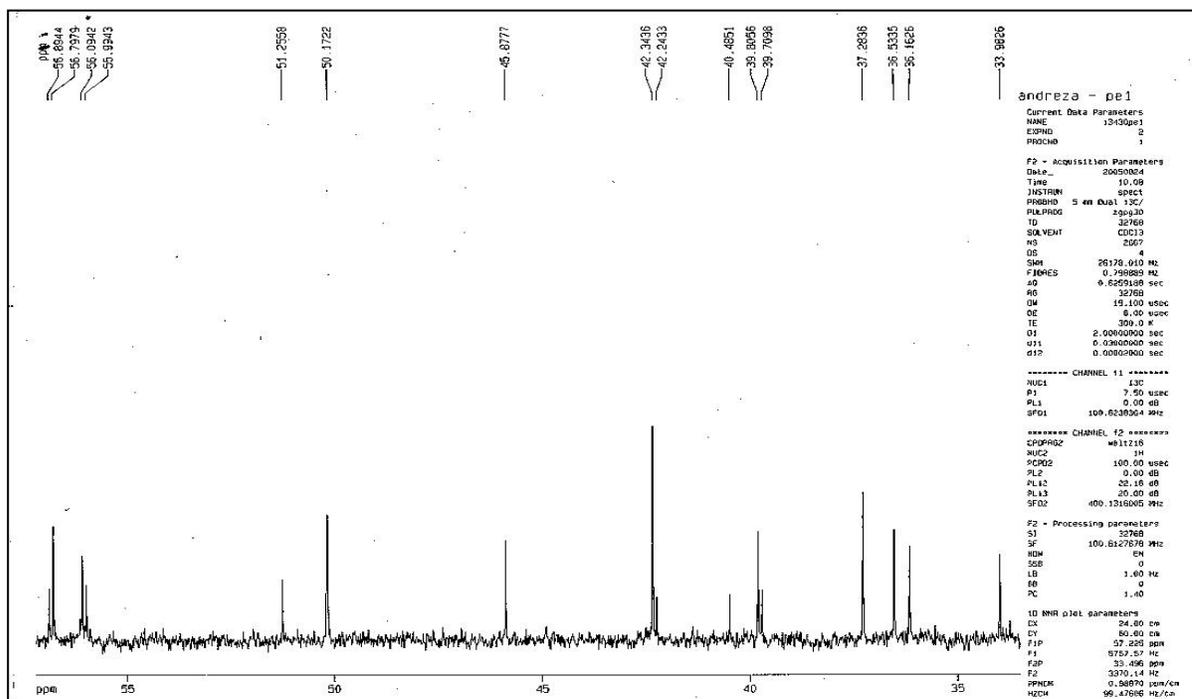


Figura IV.22. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de Fo-EE-3 (100 MHz; CDCl_3) na região entre δ_c 56,8-33,9.

A Figura IV.23 apresenta o espectro de absorção na região do Infravermelho (IV). As absorções em ν 3428 e 3310 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos de O-H. As absorções entre ν 2950 e 2860 cm^{-1} correspondem a estiramentos de C-H de grupos alifáticos. As absorções pouco intensas na região entre ν 1650 e 1630 cm^{-1} correspondem a estiramentos de C-H de carbonos alquênílicos. As absorções intensas em ν 1450 e 1380 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformações angulares de grupos metílicos e metilênicos. As absorções em ν 1065 e 1050 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramento C-O⁷⁴

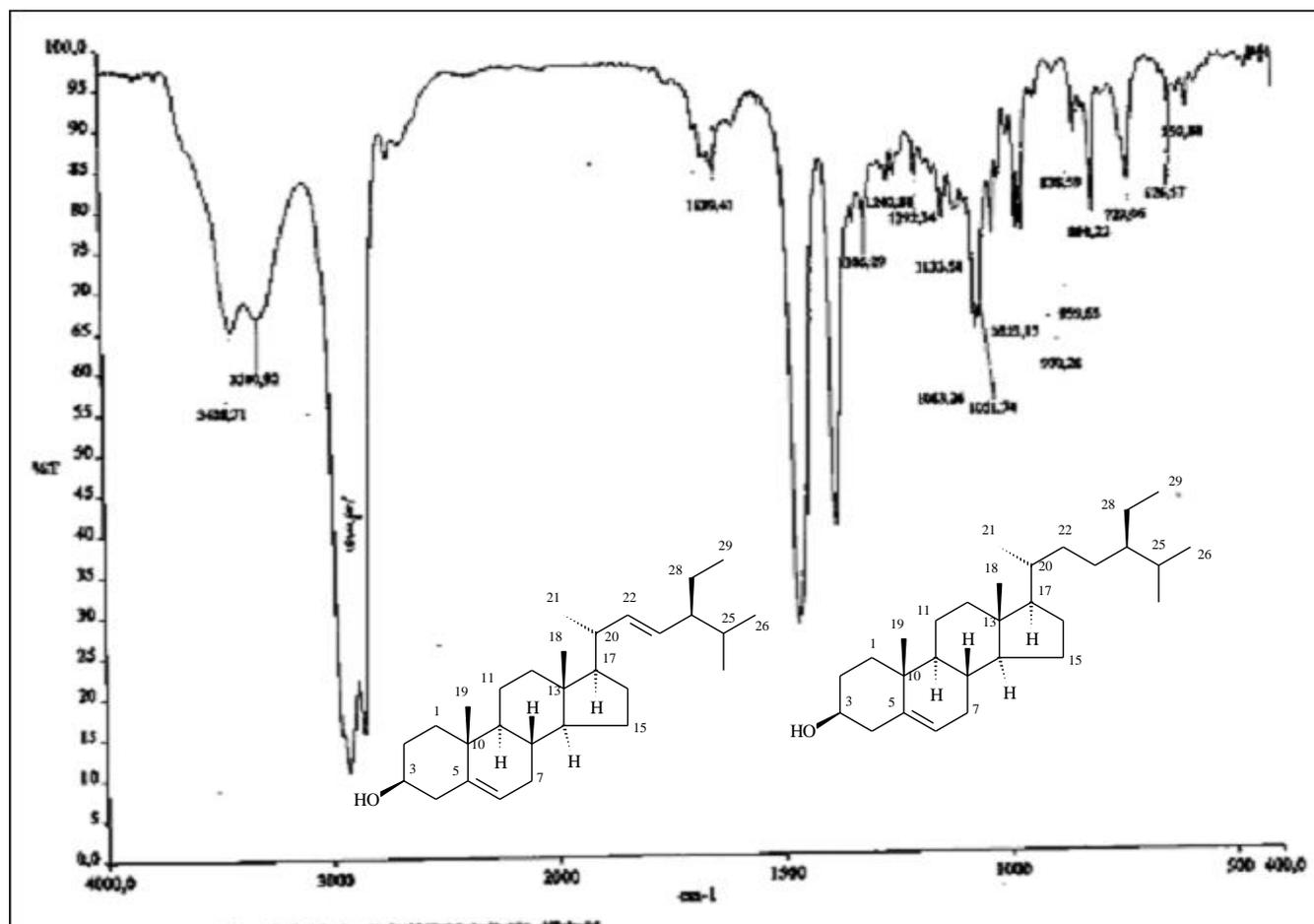


Figura IV.23. Espectro de absorção na região do IV de **Fo-EE-3** (KBr, cm^{-1}).

A Tabela IV.2 apresenta as atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **Fo-EE-3** e dados do β -sitosterol e estigmasterol^{76,77, 89,90} (em CDCl_3). Os deslocamentos químicos dos carbonos de **Fo-EE-3** apresentam-se muito próximos aos sinais dos carbonos correspondentes que são registrados na literatura para esses esteróides.

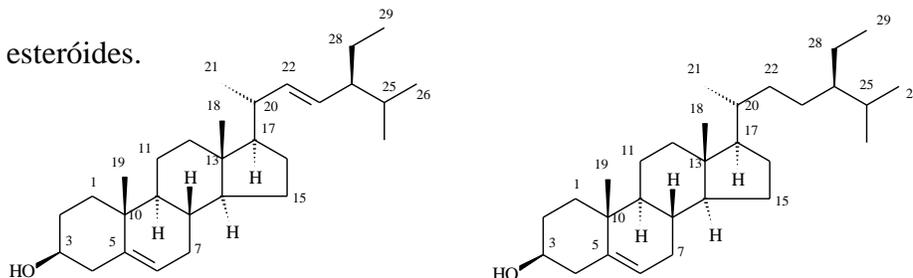


Tabela IV.2. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de Fo-EE-3, β -sitosterol e estigmasterol

Átomo	Fo-EE-3	estigmasterol	Fo-EE-3	β -sitosterol
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
C-1	37,2	37,3	37,2	37,3
C-2	31,8	31,7	31,8	31,7
C-3	71,7	71,8	71,7	71,8
C-4	42,2	42,4	42,2	42,2
C-5	140,7	140,8	140,7	140,7
C-6	121,7	121,7	121,7	121,7
C-7	31,9	31,9	31,9	31,9
C-8	31,6	31,9	31,8	31,8
C-9	50,1	50,2	50,1	50,1
C-10	36,4	36,6	36,4	36,5
C-11	21,0	21,1	21,0	21,2
C-12	39,7	39,7	39,7	39,7
C-13	42,3	42,4	42,3	42,2
C-14	56,7	56,9	56,7	56,8
C-15	24,2	24,4	24,2	24,3
C-16	29,1	29,0	28,2	28,4
C-17	56,0	56,1	56,0	56,0
C-18	11,9	12,1	11,8	11,9
C-19	19,3	19,4	19,3	19,4
C-20	40,5	40,5	36,1	36,3
C-21	21,0	21,1	18,7	18,9
C-22	138,0	138,4	33,9	33,9
C-23	129,0	129,3	26,0	26,1
C-24	51,3	51,3	45,8	45,9
C-25	31,8	31,9	29,1	29,1
C-26	21,0	21,3	19,8	19,8
C-27	19,0	19,0	19,0	19,0
C-28	26,0	25,4	23,0	23,1
C-29	11,9	12,3	11,9	12,3

Pelo espectro de RMN de ^1H de **Fo-EE-3** (Figura IV.19, pág. 73), a relação entre as integrações dos sinais em δ_{H} 5,21 (H-6 do β -sitosterol e estigmasterol) e 4,95 (H-22 e H-23 do estigmasterol) indicam uma mistura β -sitosterol:estigmasterol (2,26:1,00). Ambos os esteróides apresentam esqueleto básico do tipo peridroclíclopentanofenantreno e encontram-se largamente distribuídos nos meios biológicos⁹⁰.

Os esteróides são matérias-primas em processos industriais para produção de hormônios esteroidais^{91,92}. Na indústria alimentícia, β -sitosterol é muito utilizado para aumentar a solubilidade de gorduras líquidas em meio aquosos, melhorando também a consistência de margarinas e maioneses. Na indústria de cosméticos, β -sitosterol tem sido incluído em fórmulas para aumentar as propriedades emulsionantes dos produtos⁹³. Devido a grande abundância natural e semelhança estrutural com os esteróides, os esteróis têm sido apontados como potenciais precursores para a síntese de esteróides hormonais⁹⁴. Na medicina, os esteróides são muito empregados terapeuticamente como antiinflamatórios, anticoncepcionais, antitumorais, antifúngicos e moduladores da atividade imunológica.

Dentre as várias propriedades do β -sitosterol, podem ser destacadas suas atividades como anticancerígena, antiinflamatória, hipotensiva, antipirético, antibacterial e anti-hemolítica^{92,95-99}. β -Sitosterol, estigmasterol e o ácido caurenóico isolados do extrato hexânico de *Croton floribundus* foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e fortemente ativos contra *Bacillus subtilis*¹⁰⁰. β -Sitosterol isolado de *Dorstenia multiformis* mostrou atividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*¹⁰¹. As atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *A. nitidum* têm sido atribuídas ao lupeol, β -sitosterol e estigmasterol presentes no extrato e capazes de reduzir o edema de pata causado pela carragenina¹⁰².

Estigmasterol e β -sitosterol mostraram potente efeito analgésico em vários modelos de dor¹⁰³; inibiram significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos; apresentaram efeitos analgésico, antiinflamatório e anticancerígeno¹⁰⁴; atividades antitumorais *in vitro*¹⁰⁵; atividades neumática¹⁰⁶; atividade de redução do colesterol existente no plasma dos seres humanos^{107,108}; aumento da proliferação de linfócitos no corpo e a atividade das células NK (“natural killers”) que agem matando microorganismos invasores^{109,111}; redução da dilatação da próstata (hiperplasia prostática), auxiliando no tratamento do câncer de próstata.

Recentemente várias substâncias naturais de diferentes classes foram submetidas a testes de neutralização dos efeitos dos venenos da *Bothrops*, sendo que o β -sitosterol, estigmasterol e 3 β -glicopiranosídeo de sitosterila apresentaram proteção contra o efeito antiletal deste veneno. Os esteróides isolados dos extratos da espécie *E. precatória* apresentaram ação antiofídica^{46,79}.

5. Análise de Fo-EE-4 a Fo-EE-8

Os testes Liebermann-Burchard de **Fo-EE-4**, **Fo-EE-5**, **Fo-EE-6**, **Fo-EE-7** e **Fo-EE-8** foram positivos para esteróides e os dados físicos e químicos são semelhantes aos registrados para Fo-EE-3 (pág. 73). O sinal multipletto em δ_H 5,35 corresponde aos hidrogênios H-6 de β -sitosterol e estigmasterol e o sinal multipletto em δ_H 5,05 corresponde aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol. As Figura IV.24 mostra os espectros de RMN de 1H (na região entre δ_C 5,35 e 4,5) de **Fo-EE-4**, **Fo-EE-5**, **Fo-EE-6**, **Fo-EE-7** e **Fo-EE-8**. A relação entre as integrações desses sinais indicam uma mistura β -sitosterol:estigmasterol em **Fo-EE-4** (1,95:1,00), **Fo-EE-5** (1,65:1,00), **Fo-EE-6** (1,29:1,00), **Fo-EE-7** (1,87:1,00) e **Fo-EE-8** (0,86:1,00).

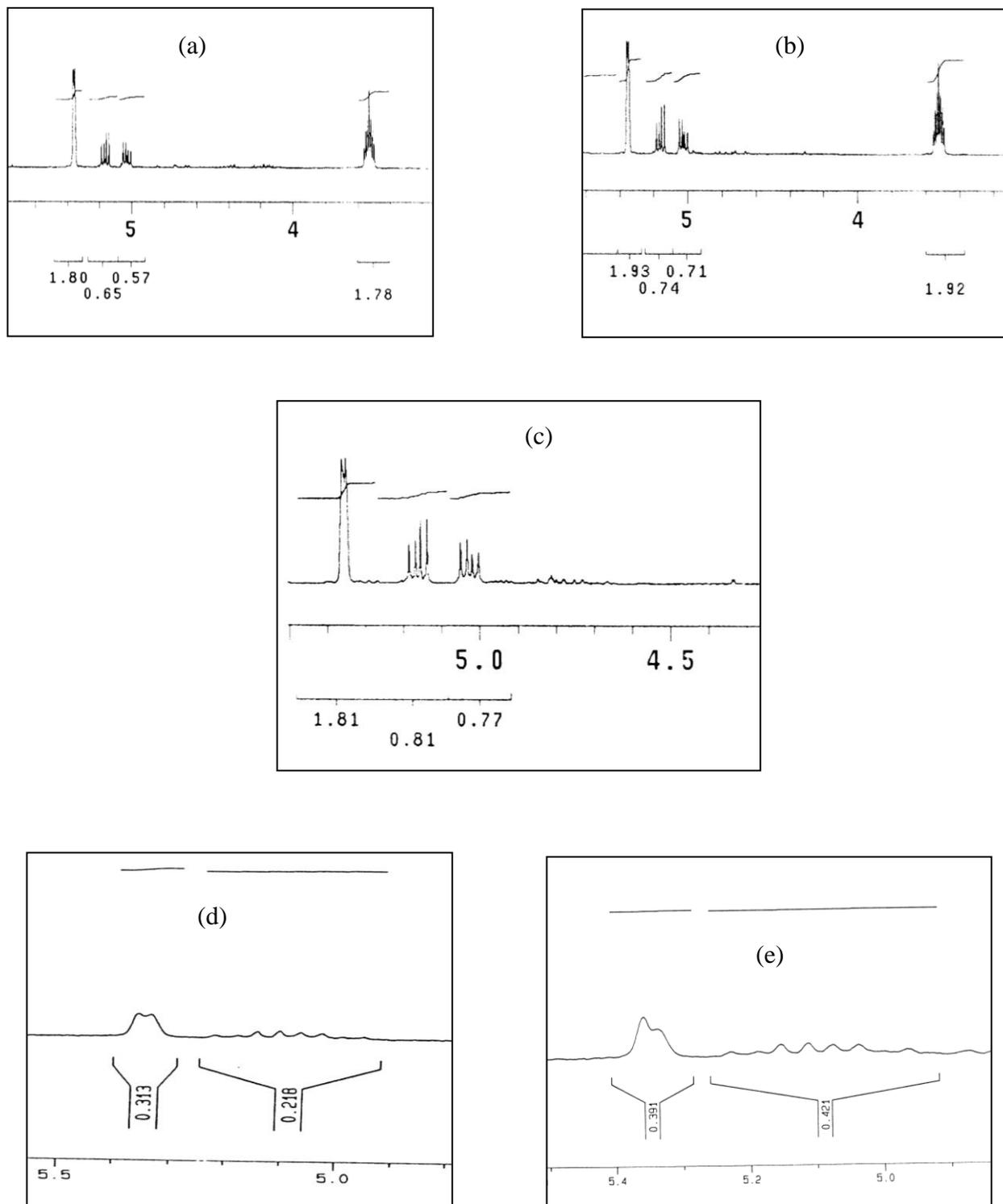


Figura IV.24. Espectro de RMN de ¹H de (a) **Fo-EE-4**, (b) **Fo-EE-5**, (c) **Fo-EE-6**, (d) **Fo-EE-7** e (e) **Fo-EE-8**, na região entre δ_H 5,35 e 4,5, (CDCl₃; 500 MHz).

6. Análise de FI-EH-1

O isolamento de **FI-EH-1** por CC nas primeiras frações hexânicas do extrato hexânico e seu baixo ponto de fusão (43,2 – 62,1 °C) indicam tratar-se de uma estrutura de baixa polaridade. O cromatograma de CG de **FI-EH-1** é apresentado na Figura IV.25. O cromatograma mostra uma mistura de substâncias com T.R. entre 10 e 15 min, com predominância do pico com T.R. 12,5 min. A comparação com padrões de hidrocarbonetos alifáticos e saturados indicou tratar-se de uma mistura constituída por hidrocarbonetos alifáticos C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂ e C₃₃.

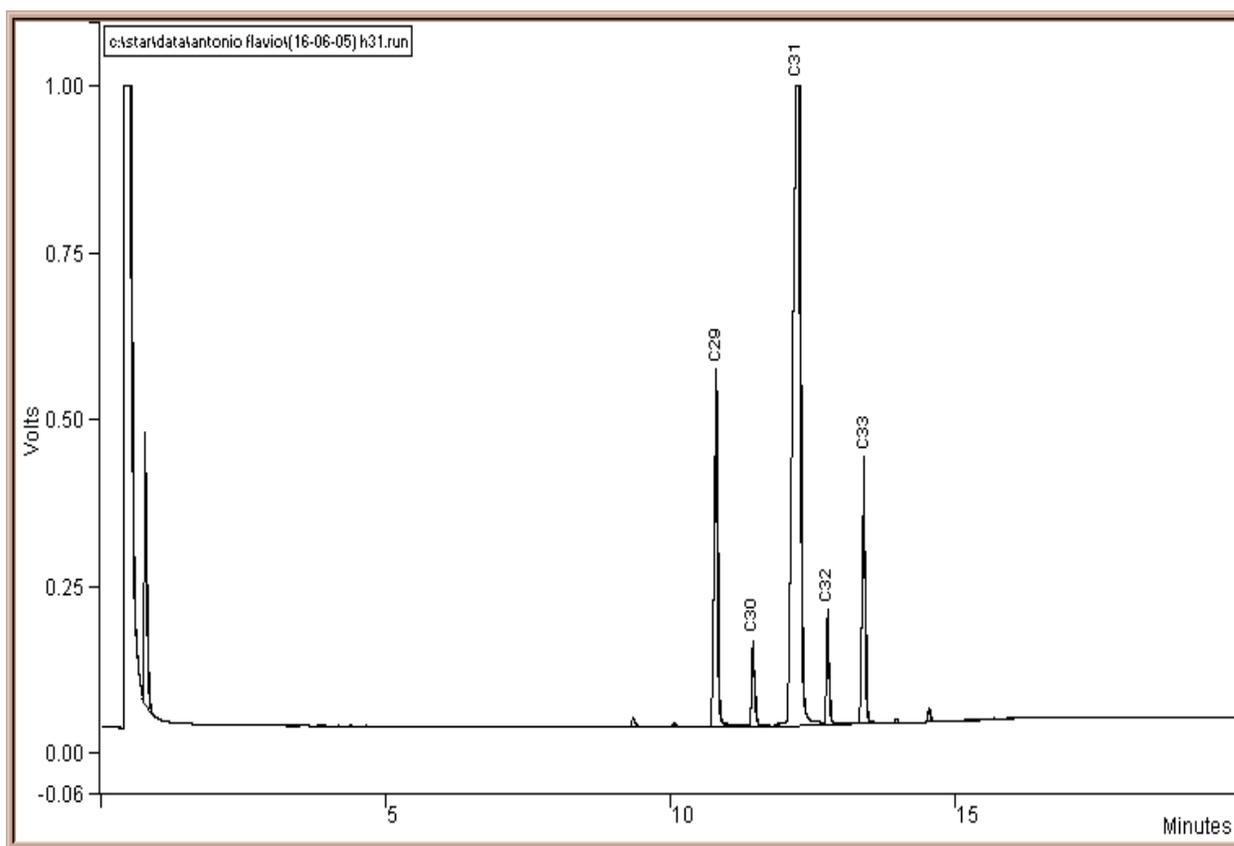


Figura IV.25. Cromatograma de CG de **FI-EH-1** (Coluna: SE54 30 m x 0.32 mm; temperaturas: coluna 150 °C; velocidade de arraste 10 °C/min; injetor 300 °C; detector 300 °C; “split” 1/100; fluxo 2 mL/min).

7. Análise de FI-EH-2

O teste Liebermann-Burchard de **FI-EH-2** foi positivo para triterpenos pentacíclicos. A Figura IV.26 mostra o espectro de RMN de ^1H de **FI-EH-2**. Na região de hidrogênios alquênílicos há dois sinais tripletos em δ_{H} 5,18 e 5,13, podendo ser atribuídos a dois triterpenos pentacíclicos diferentes. A integração desses sinais indica uma proporção 1,33:1,00. A análise do espectro torna-se difícil pela sobreposição dos demais sinais de hidrogênio.

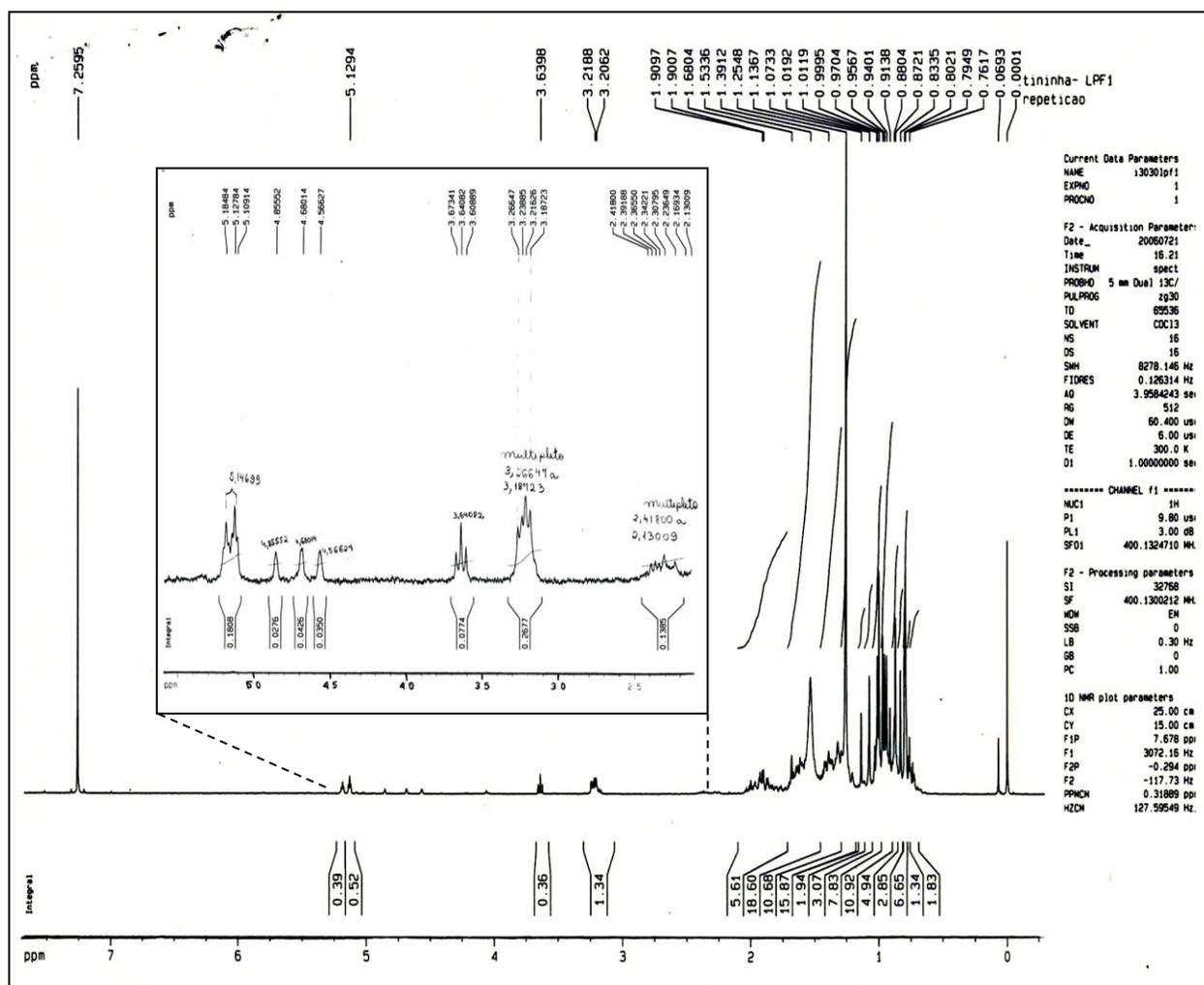


Figura IV.26. Espectro de RMN de ^1H de **FI-EH-2**

e ampliação na região entre δ_{H} 5,5 – 2,0 (400 MHz; CDCl_3)

A Figura IV.27. apresenta o mapa de contornos COSY de **FI-EH-2**. Os hidrogênios em δ_H 5,18 e 5,13 apresentam correlações com os hidrogênios em δ_H 1,91 e 1,35, indicando esqueletos similares próximos ao sítio alquênico desses triterpenos pentacíclicos. Isto é observado também nas correlações COSY do hidrogênio em δ_H 3,21 (atribuído ao hidrogênio do carbono hidroxilado de ambos os triterpenos) com o hidrogênio em δ_H 1,75. No entanto, as diferenças estruturais entre os seus esqueletos podem ser observados nas correlações do hidrogênio em δ_H 3,64, que, por serem pouco intensas, podem ser atribuídas a apenas um dos triterpenos.

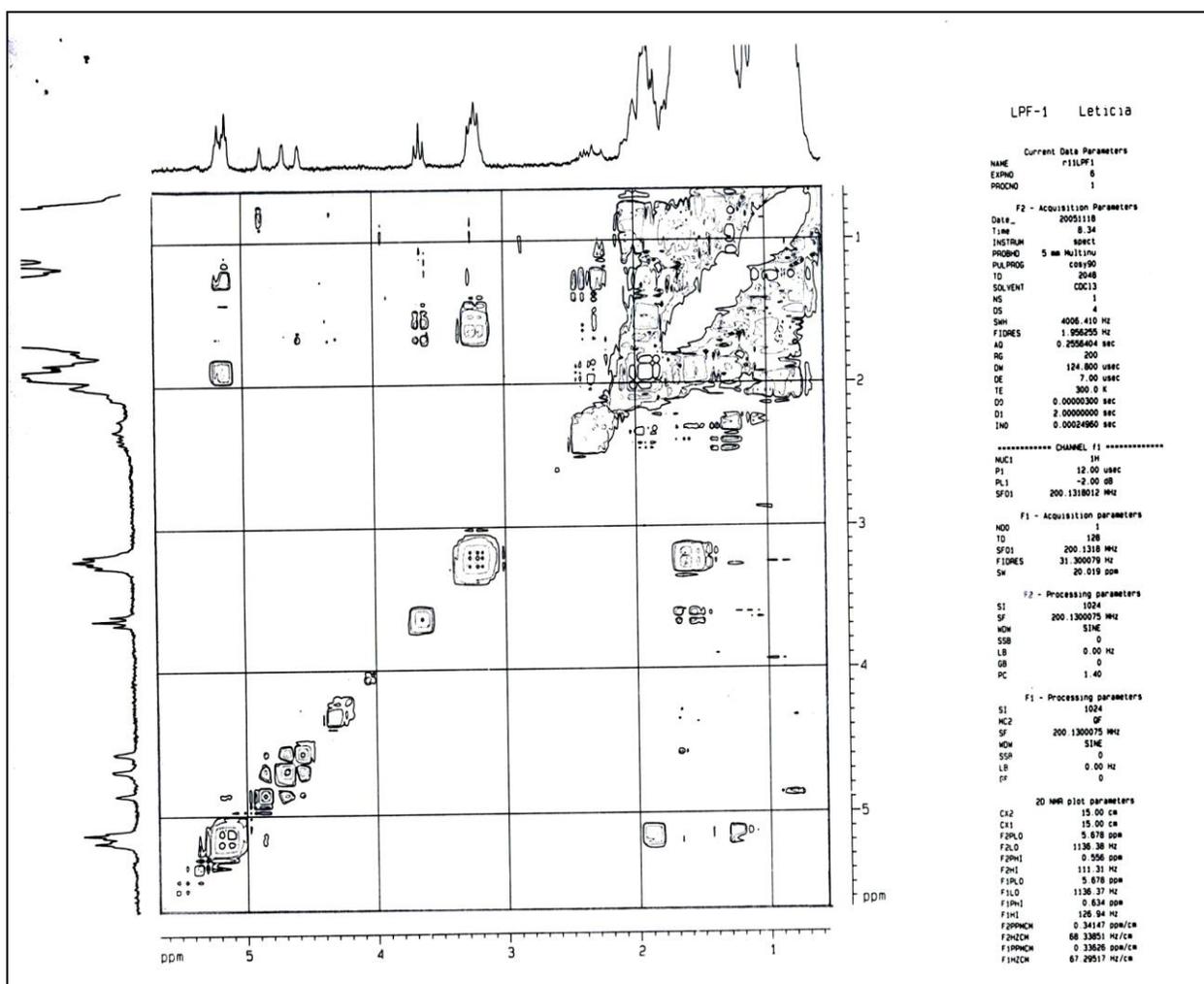


Figura IV.27. Mapa de contornos COSY de **FI-EH-2** (400 MHz; $CDCl_3$).

As Figuras IV.28 a IV.30 mostram o espectro de RMN de ^{13}C de **FI-EH-2**, ampliações desse espectro e subspectro DEPT 135° com ampliações, respectivamente. Na região de carbonos alquênlicos, dois sinais são devidos a carbonos não hydrogenados registrados em δ 145,2 e 139,6 e outros dois sinais são devidos a carbonos metínicos registrados em δ 124,5 e 121,8. Os sinais sobrepostos em δ 79,1 podem ser atribuídos a carbonos metínicos e hidroxilados, característicos de hidroxila em C-3 de dois triterpenos pentacíclicos. A duplicação dos demais sinais de carbono de **FI-EH-2** corresponde a uma mistura de triterpenos pentacíclicos.

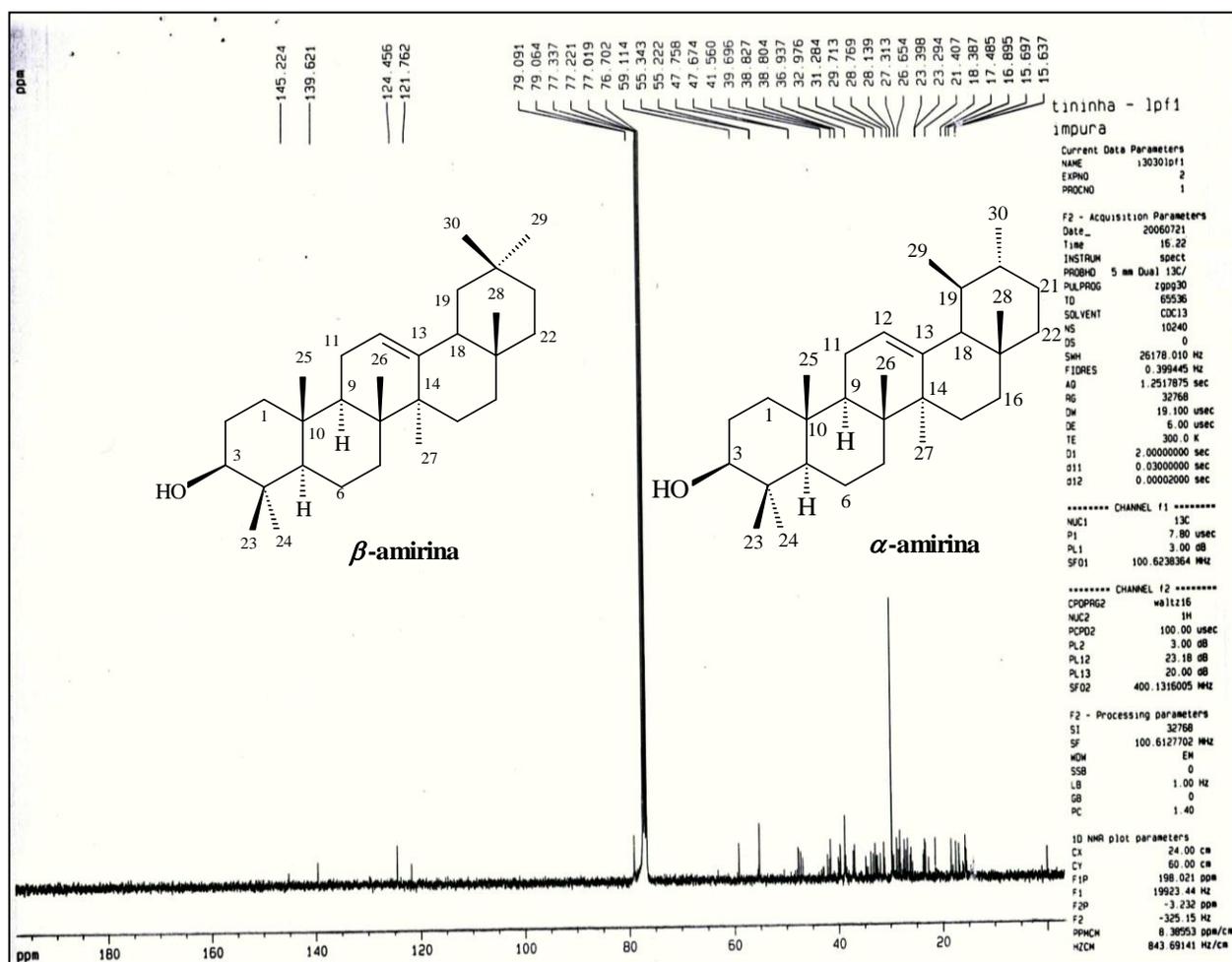


Figura IV.28. Espectro de RMN de ^{13}C de **FI-EH-2** (100 MHz, CDCl_3).

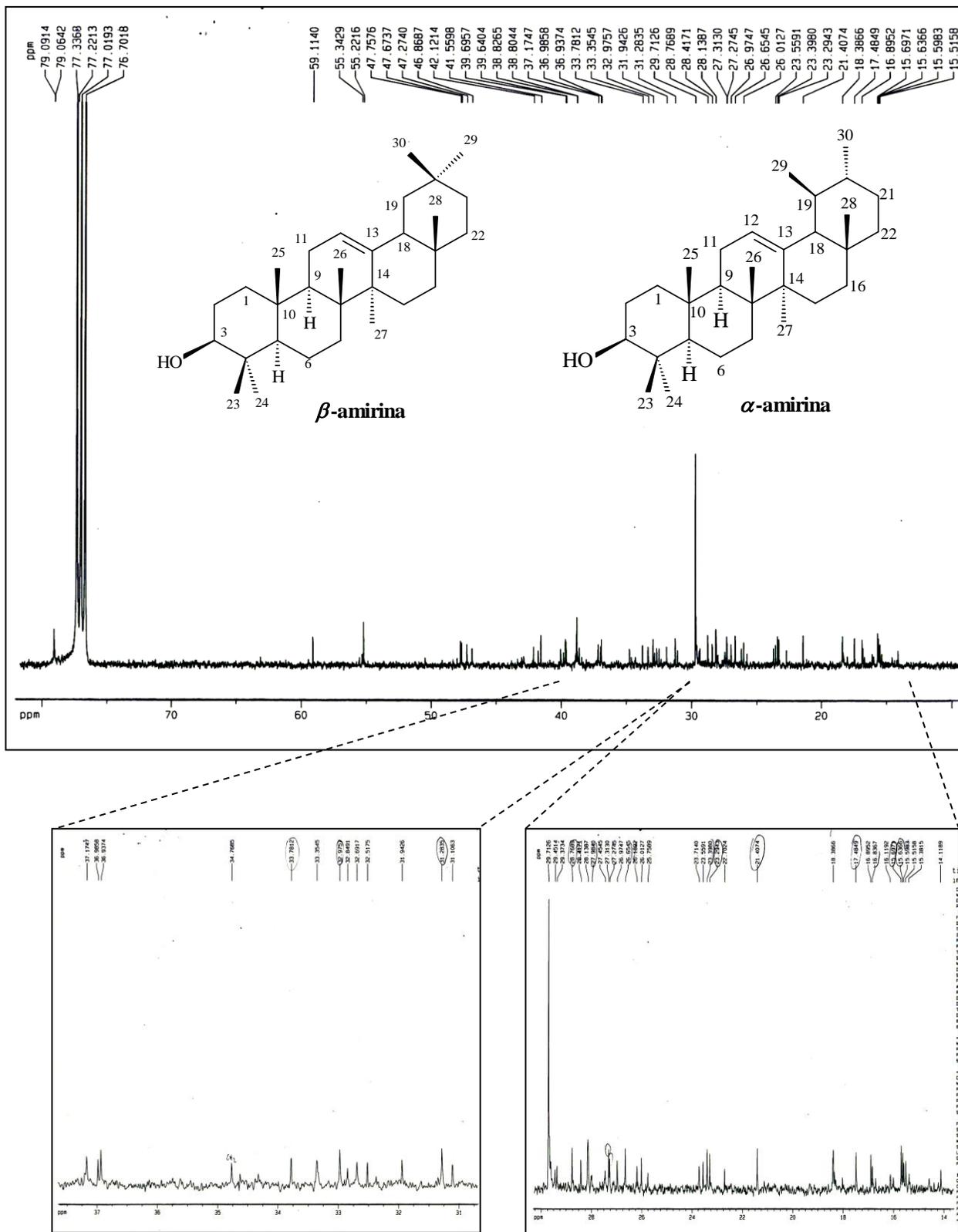


Figura IV.29. Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de FI-EH-2 (100 MHz, CDCl_3) nas regiões δ_{C} 80,0 – 10,0, 37,0 – 31,0 e 30,0 – 14,0.

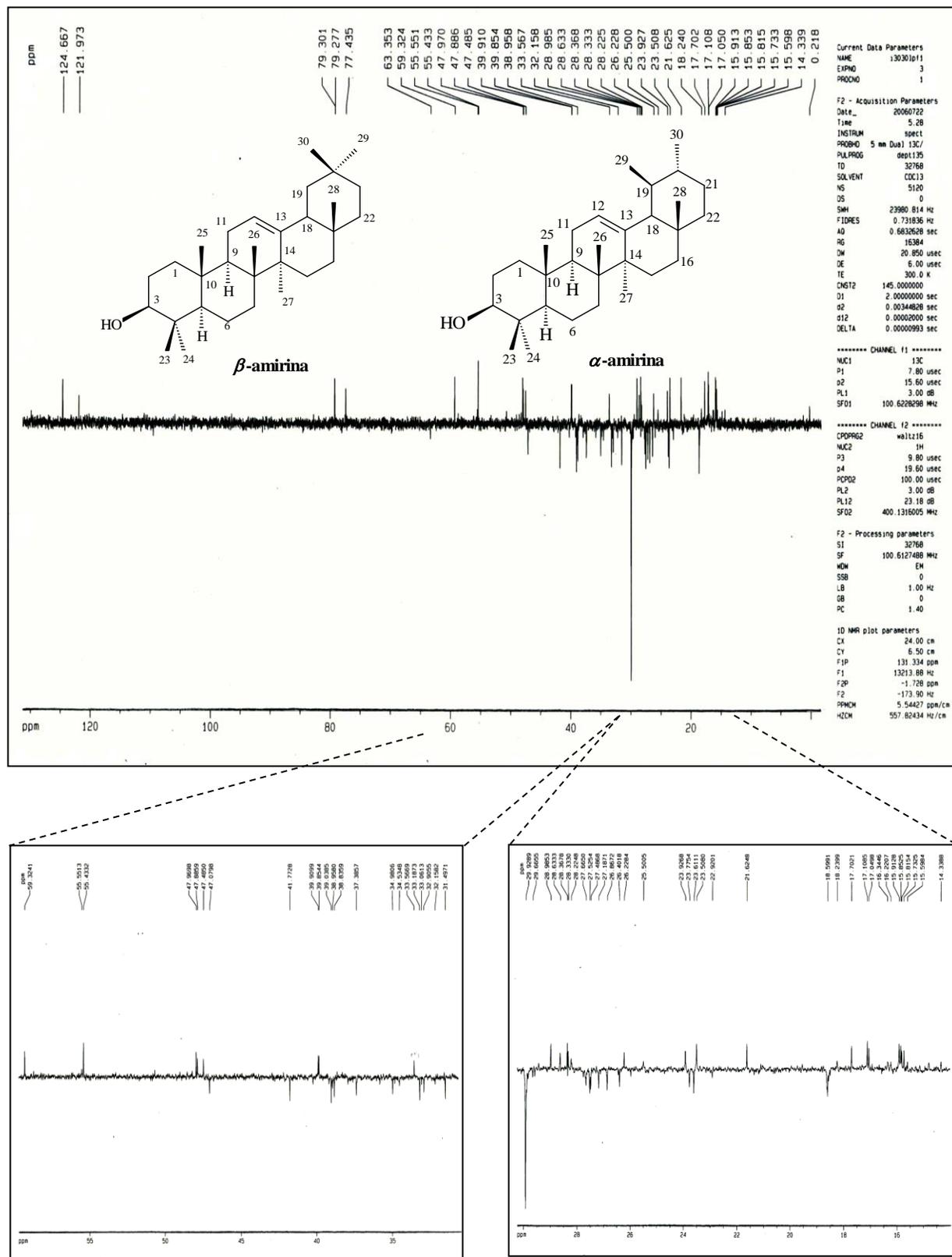


Figura IV.30. Subespectro DEPT 135° de FI-EH-2 (100 MHz, CDCl₃) e ampliações nas regiões δ_c 60,0 – 31,0 e 29,0 – 14,0.

As Figuras IV.31 e IV.32 mostram ampliações do mapa de contornos HMQC de **FI-EH-2** nas regiões δ_H 5,5 – 2,5 e 2,0–0,5. Na região devida a grupos alquênlicos, o hidrogênio em δ_H 5,18 correlaciona-se com o carbono em δ_C 121,8 atribuído a C-12 de 3β -OH, β -amirina. Por sua vez, o hidrogênio em δ_H 5,12 correlaciona-se com o carbono em δ_C 124,5 atribuído a C-12 de 3β -OH, α -amirina. Desta forma, pode-se estabelecer que a proporção entre essas substâncias calculada pela integração dos sinais de RMN de 1H na região dos hidrogênios alquênlicos. Assim, a proporção de β -amirina e α -amirina na mistura é 1,33:1,00.

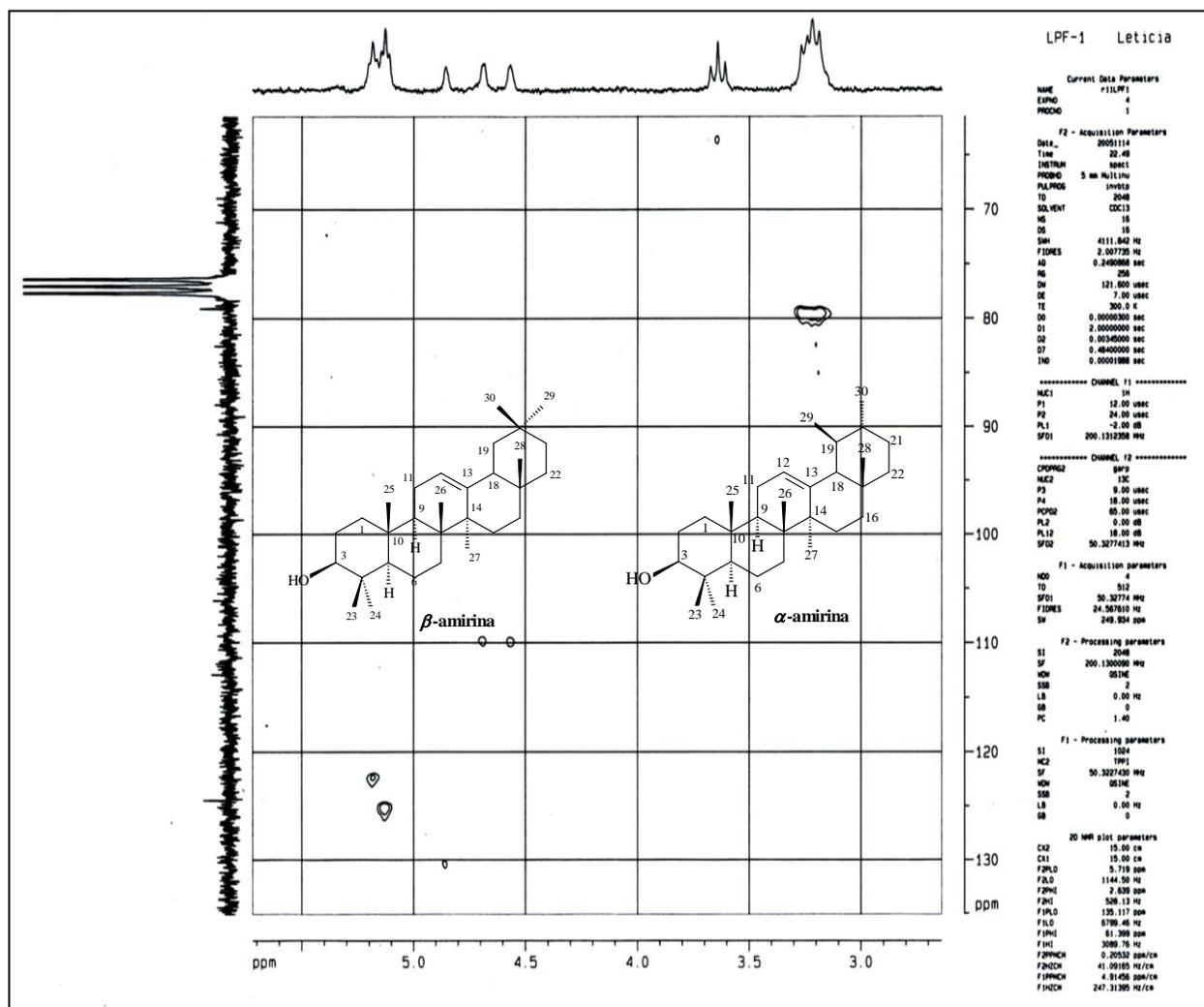


Figura IV.31. Ampliação do mapa de contornos HMQC de **FI-EH-2**

na região δ_H 5,5 – 2,5 (400 MHz; $CDCl_3$).

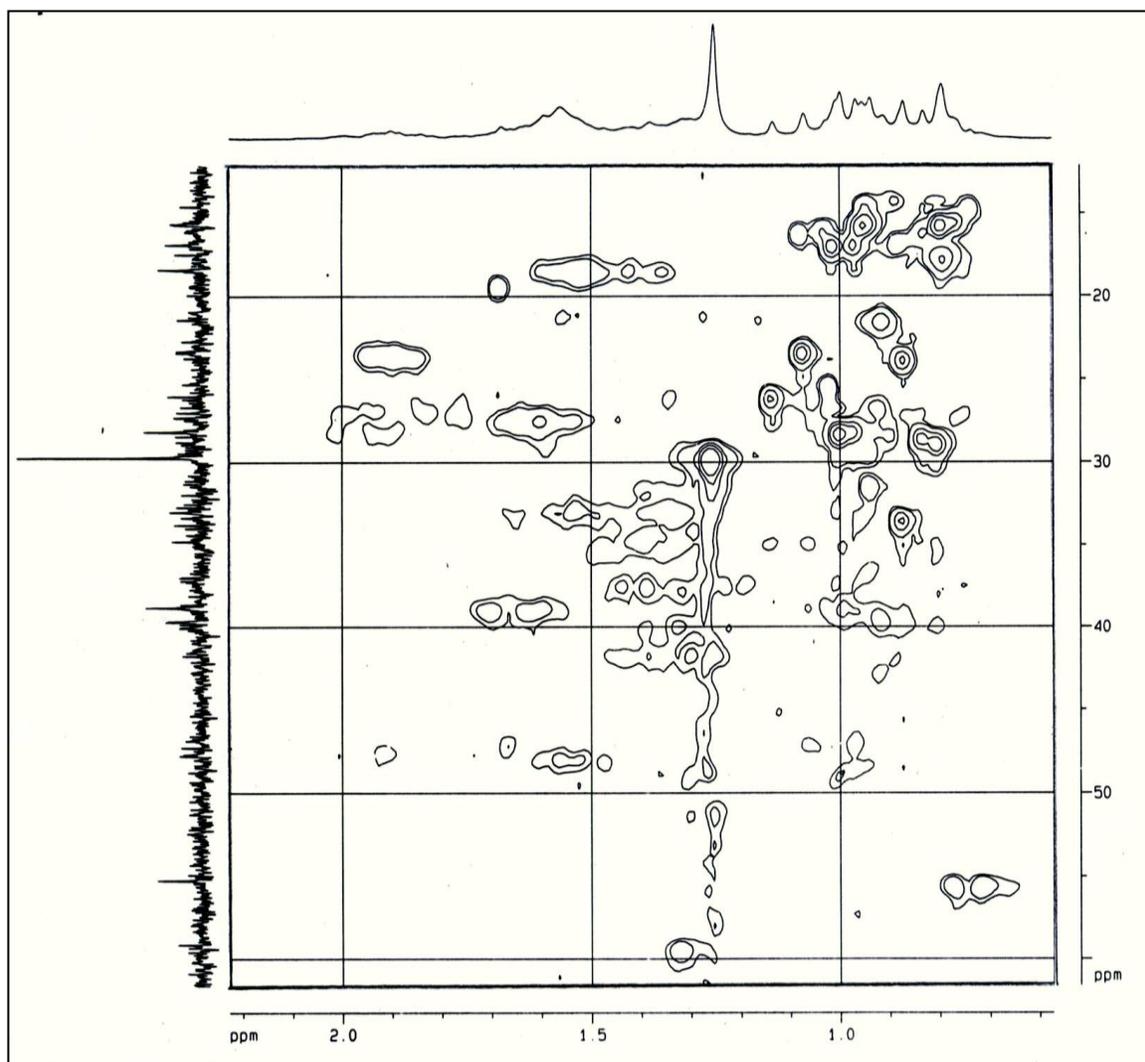
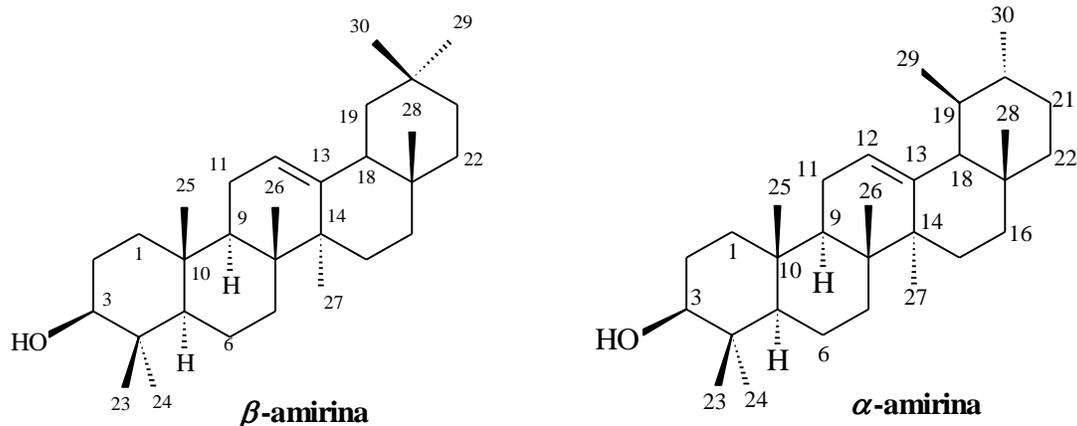


Figura IV.32. Ampliação do mapa de contornos HMQC de **FI-EH-2**

na região δ_{H} 2,0 – 0,5 (400 MHz; CDCl_3).

A Tabela IV.3 apresenta as atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **FI-EH-2**, incluindo também os dados de deslocamento químico descritos na literatura para β -amirina^{76,81} e α -amirina⁷⁶, ambos em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos dos carbonos de **FI-EH-2** apresentam-se muito próximos aos sinais correspondentes registrados na literatura para esses dois triterpenos pentacíclicos, confirmando que **FI-EH-2** seja constituído por essas duas substâncias.

Tabela IV.3. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **Fl-EH-2** e de β -amirina e α -amirina

Átomo	Fl-EH-2	β -amirina	Fl-EH-2	α -amirina
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
C-1	38,8	38,7	38,6	38,7
C-2	27,3	27,3	27,3	27,2
C-3	79,1	79,0	79,0	78,3
C-4	38,8	38,8	38,8	38,7
C-5	55,2	55,3	55,3	55,2
C-6	18,4	18,5	18,4	18,3
C-7	32,8	32,8	33,0	32,9
C-8	38,8	38,8	40,1	40,0
C-9	47,8	47,7	47,7	47,7
C-10	37,2	37,6	37,0	36,9
C-11	23,6	23,6	23,4	23,3
C-12	121,8	121,8	124,5	124,3
C-13	145,2	145,1	139,6	139,3
C-14	41,8	41,8	42,1	42,0
C-15	26,2	26,2	28,8	28,7
C-16	27,0	27,0	26,7	26,6
C-17	32,5	32,5	33,8	33,7
C-18	47,3	47,4	59,1	58,9
C-19	46,9	46,9	39,7	39,6
C-20	31,1	31,1	39,6	39,6
C-21	34,8	34,8	31,3	31,2
C-22	37,2	37,2	41,6	41,5
C-23	28,1	28,2	28,0	28,1
C-24	15,5	15,5	15,6	15,6
C-25	15,6	15,6	15,7	15,6
C-26	18,9	16,9	16,8	16,8
C-27	26,0	26,0	23,3	23,3
C-28	28,4	28,4	27,9	28,1
C-29	33,4	33,3	17,5	17,4
C-30	23,7	23,7	21,4	21,3

8. Análise de FI-EE-1

O sólido **FI-EE-1** (8,2 mg) apresentou ponto de fusão de 224,3-227,5 °C e teste Liebermann-Bouchard positivo para triterpenos pentacíclicos. A Figura IV.33 mostra espectro de RMN de ^1H de **FI-EE-1** e as Figuras IV.34 a IV.36 mostram ampliações desse espectro em diferentes regiões. O sinal triplo em δ_{H} 5,20 (t) pode ser atribuído ao hidrogênio alquenílico H-12 do ácido ursólico. O sinal em δ_{H} 3,15 (dd, $J= 11,2$ e 4,9 Hz) pode ser atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, cujos acoplamentos indicam a presença de β -configuração. O sinal duplete em δ_{H} 2,10 ($J= 11,2$ Hz) pode ser atribuído a H-18. O sinal em δ_{H} 1,92 (dd, $J= 8,6$ e 3,6 Hz) pode ser atribuído aos hidrogênios H-11. Os demais sinais de RMN de ^1H apresentam-se sobrepostos na região entre δ_{H} 1,8 e 0,7, sendo portanto de difícil atribuição. Porém, esses sinais são compatíveis com os registrados para o ácido ursólico.

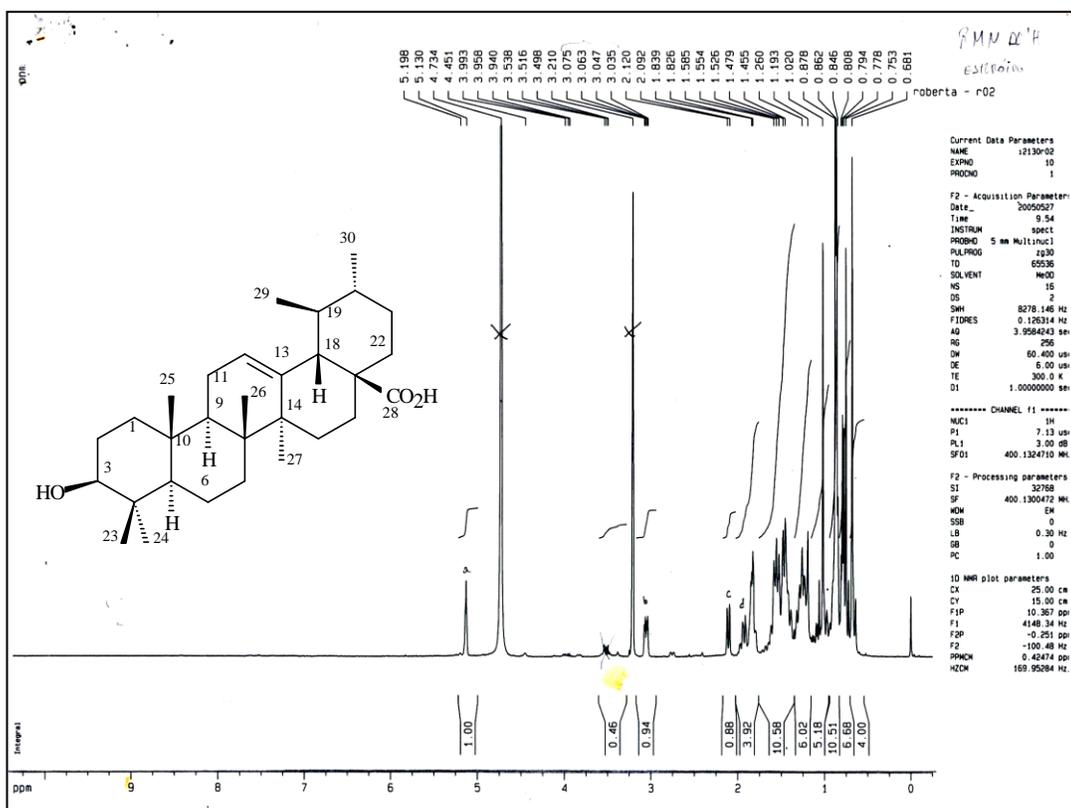


Figura IV.33. Espectro de RMN de ^1H de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD).

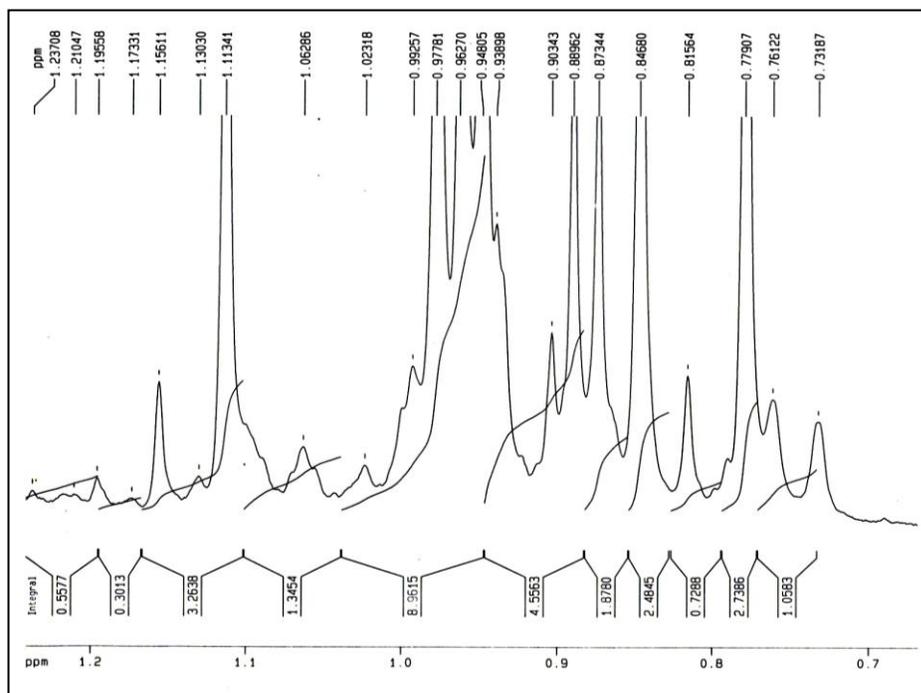


Figura IV.34. Espectro de RMN de ^1H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD), ampliação entre δ_{H} 1,2 – 0,7.

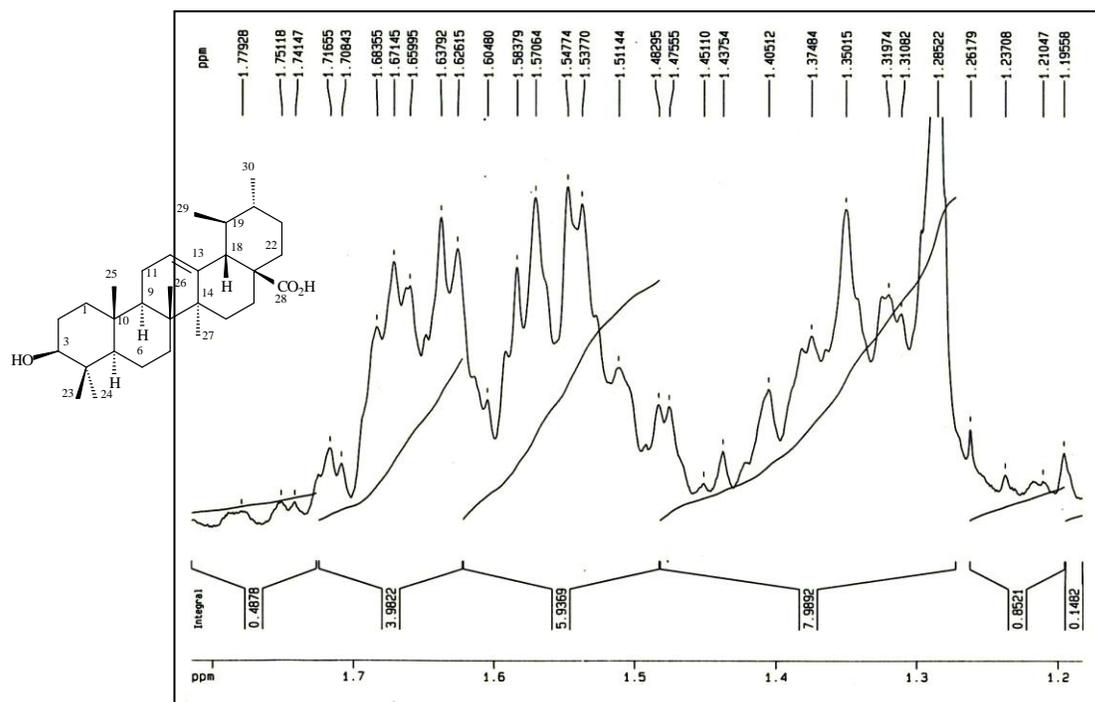


Figura IV.35. Espectro de RMN de ^1H de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD), ampliação entre δ_{H} 1,7 – 1,2.

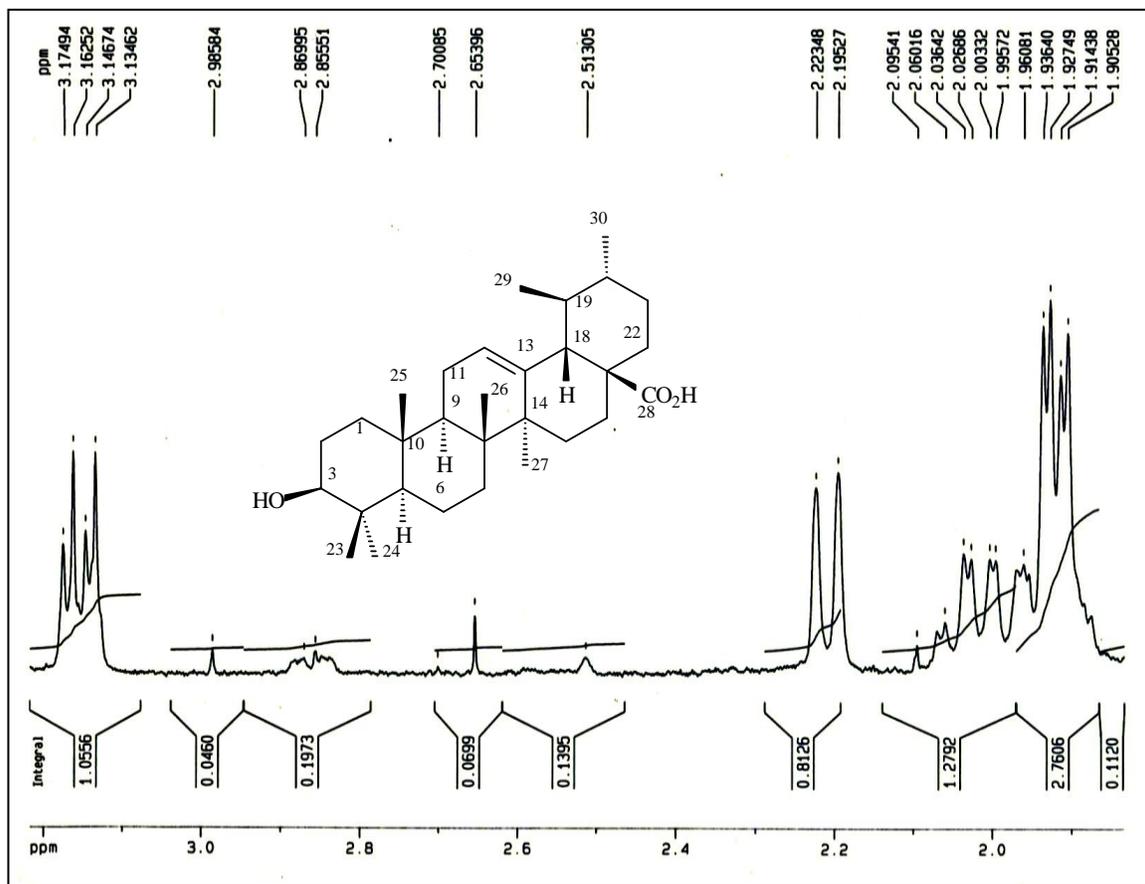


Figura IV.36. Espectro de RMN de ^1H de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD),
ampliação na região δ_{H} 3,0 – 1,9.

A Figura IV.37 mostra o espectro de RMN de ^{13}C de **FI-EE-1** com ampliações nas regiões entre δ_{H} 182,0 – 54,0 e 44,0 – 16,0 e a Figura IV.38 mostra o subespectro DEPT 135 e ampliações correspondentes. O sinal em δ_{C} 181,9 corresponde ao carbono quaternário C-28 do grupo carboxila. O sinal em δ_{C} 139,62 corresponde ao carbono quaternário C-13 do grupo alquenílico. O sinal em δ_{C} 127,0 corresponde ao carbono metínico C-12 do grupo alquenílico. O sinal em δ_{C} 79,9 corresponde ao carbono metínico C-3. O sinal em δ_{C} 56,9 corresponde ao carbono metínico C-5. O sinal em δ_{C} 54,6 corresponde ao carbono metínico C-18. As demais atribuições dos sinais de carbono de **FI-EE-1** são apresentadas na Tabela IV.4 (pág. 95)⁷⁶.

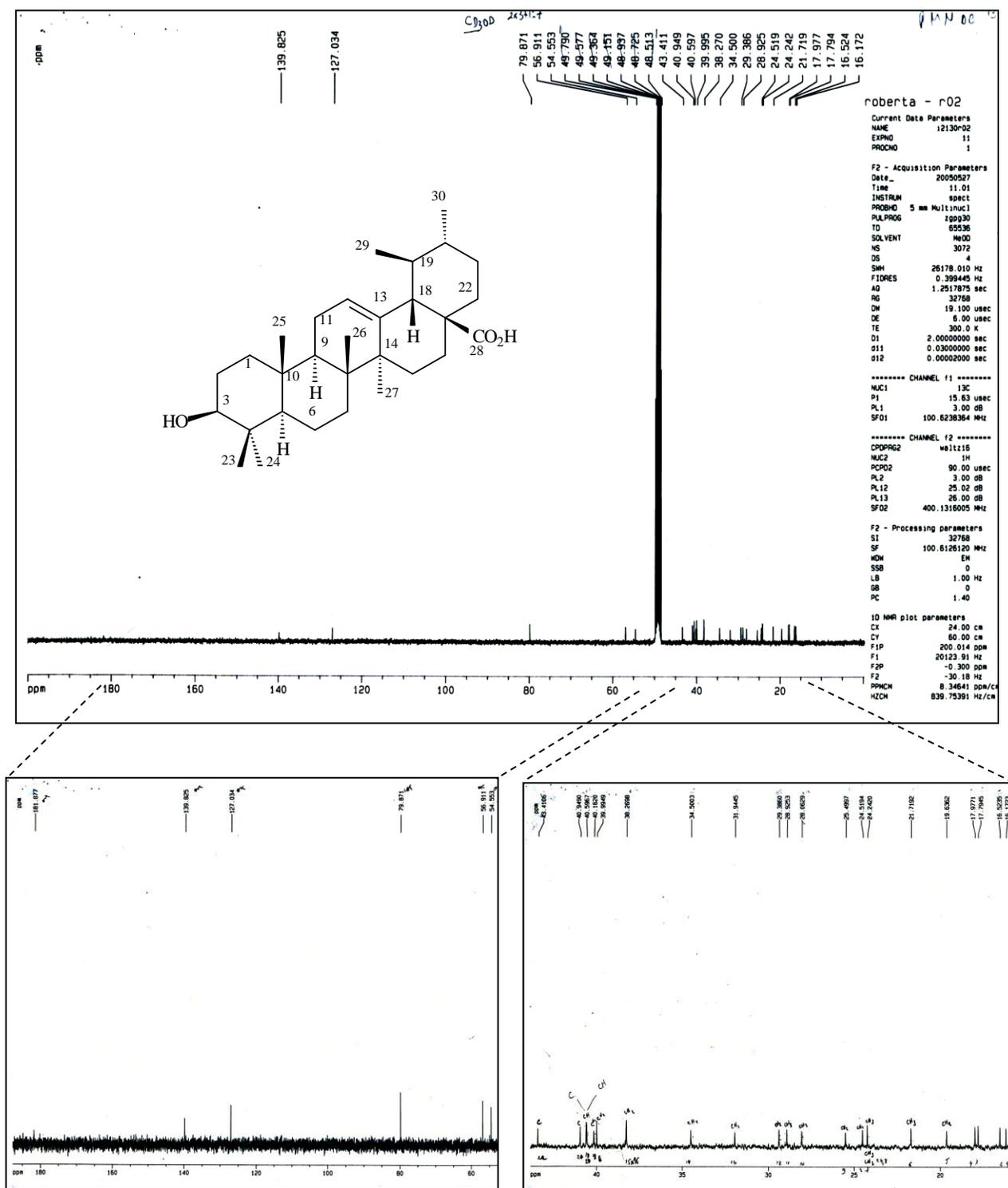


Figura IV.37. Espectro de RMN de ^{13}C de FI-EE-1 (100 MHz; MeOD) e ampliações nas regiões

δ_{C} 185,0 – 55,0 e δ_{C} 45,0 – 15,0.

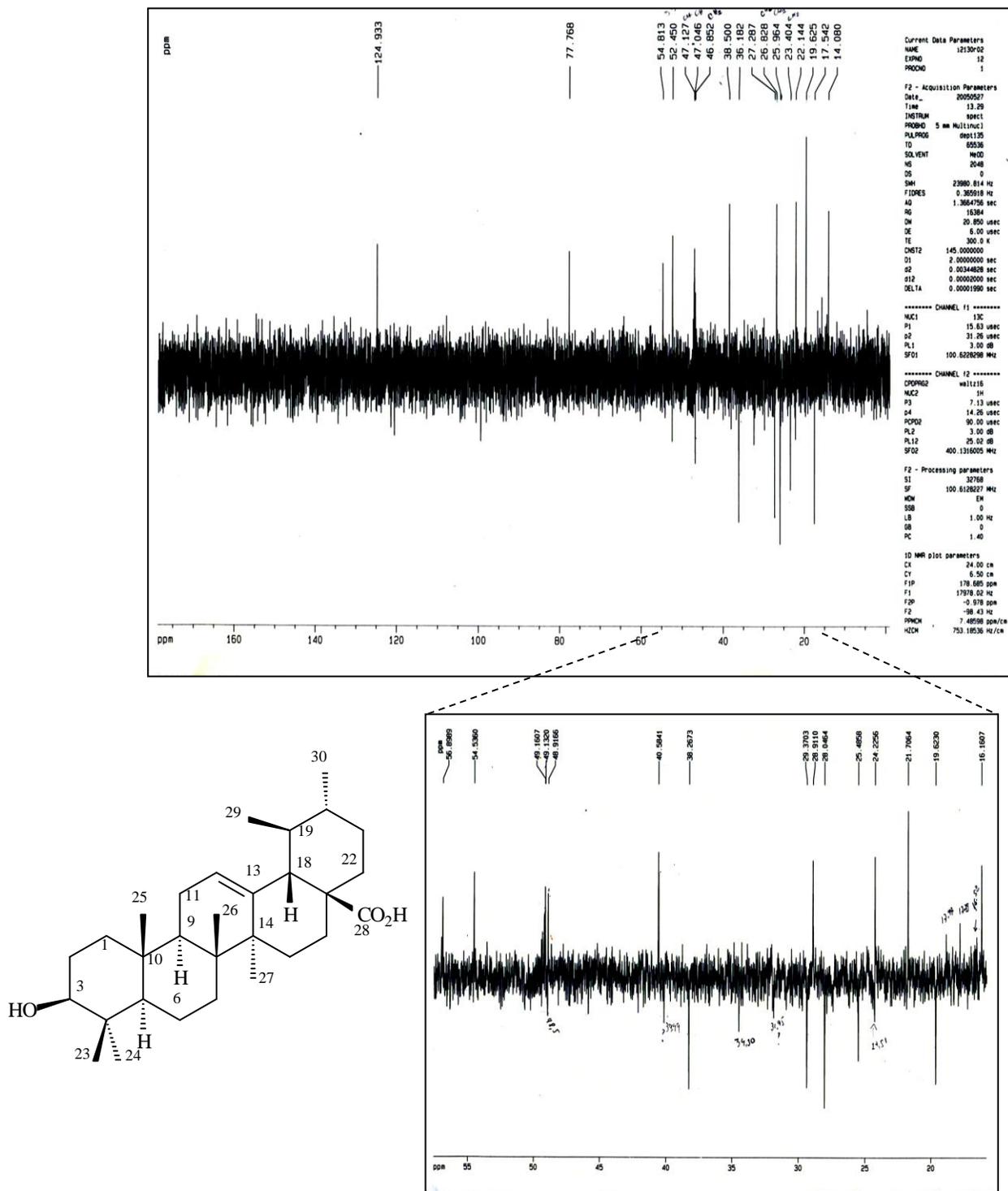


Figura IV.38. Subespectro DEPT 135° de **FI-EE-1** (100 MHz; MeOD) e ampliação na região δ_c 55,0 – 15,0.

A Figura IV.39 apresenta o espectro de absorção no Infravermelho de **FI-EE-1**. A absorção em ν 3430 cm^{-1} pode ser atribuído a vibrações de grupos hidroxila de álcoois e ácidos carboxílicos. As absorções na região entre ν 2970 e 2850 cm^{-1} pode ser atribuído a vibrações de grupos alquilas. O ombro em ν 1731 cm^{-1} e a absorção intensa em ν 1692 cm^{-1} podem ser atribuídos respectivamente a vibrações C=C de grupos alquênlicos e C=O de ácidos carboxílicos. As absorções largas em ν 1090 e 1030 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramento de C – O em álcoois e ácidos carboxílicos⁷⁴. Estes dados estão de acordo com a estrutura do ácido ursólico⁷⁶.

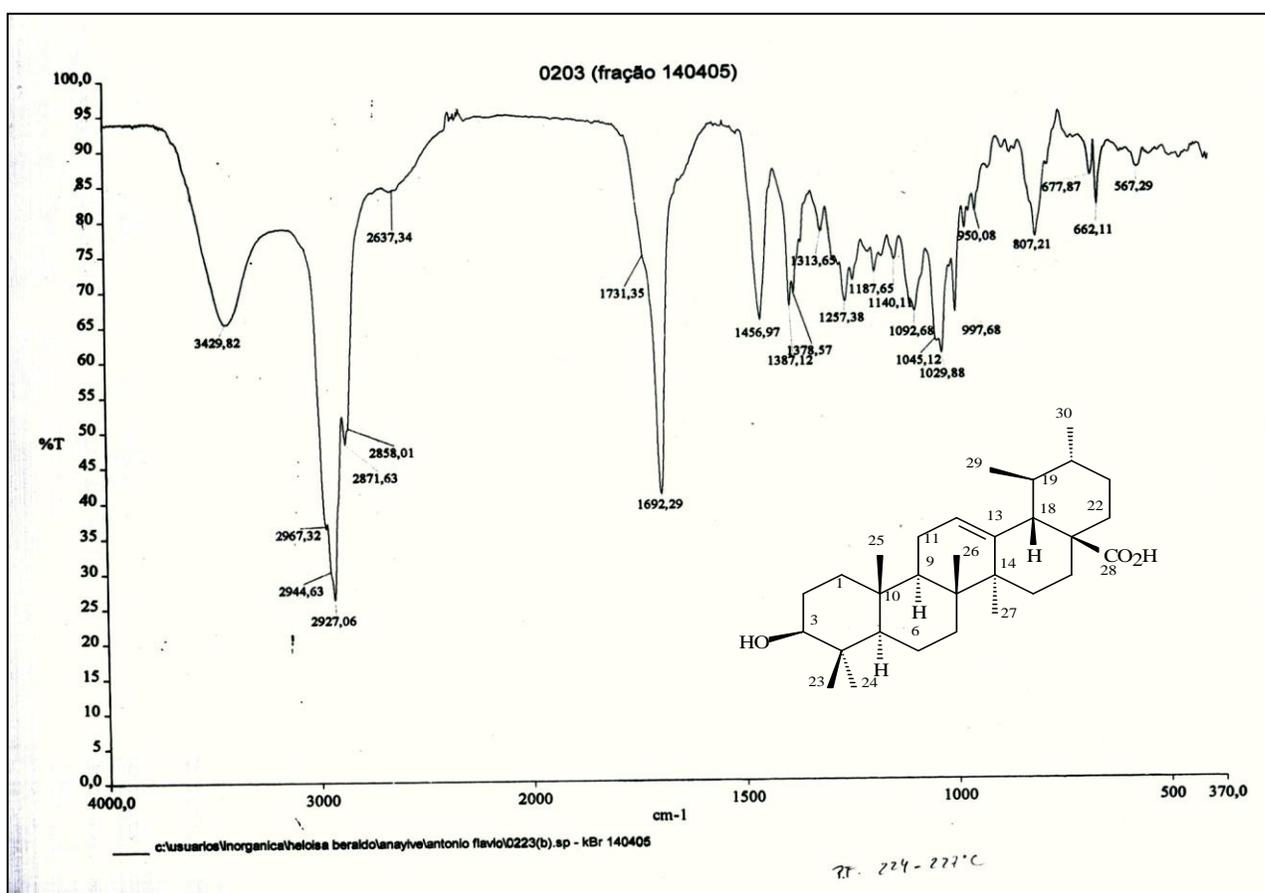
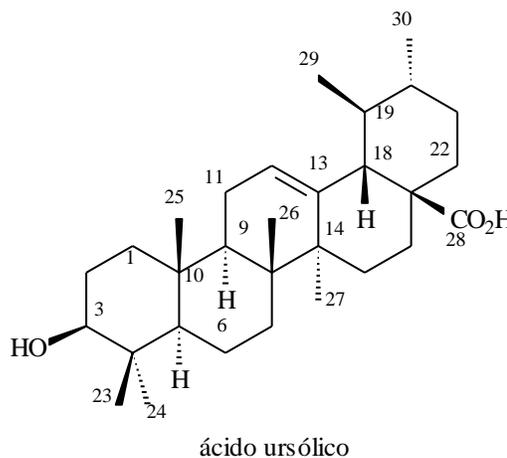


Figura IV.39. Espectro de absorção na região do Infravermelho de **FI-EE-1** (KBr; cm^{-1}).

Tabela IV.4. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **FI-EE-1** e do ácido ursólico

Átomo	FI-EE-1 δ_c	ácido ursólico δ_c
C-1	39,9	38,8
C-2	28,1	27,3
C-3	79,9	78,8
C-4	40,6	38,8
C-5	56,9	55,4
C-6	19,4	18,4
C-7	34,4	33,0
C-8	40,9	39,6
C-9	49,1	47,5
C-10	38,3	37,0
C-11	24,2	23,3
C-12	124,9	125,5
C-13	139,9	139,0
C-14	43,4	42,0
C-15	29,4	28,2
C-16	25,5	24,3
C-17	49,3	48,1
C-18	54,6	52,8
C-19	40,6	39,1
C-20	40,2	38,8
C-21	31,9	30,7
C-22	38,3	36,7
C-23	28,9	28,2
C-24	16,2	15,5
C-25	16,5	15,7
C-26	17,7	16,9
C-27	24,5	23,6
C-28	181,9	180,8
C-29	17,9	16,9
C-30	21,7	21,2



As Figuras IV.40 a IV.43 mostram os mapas de contornos COSY de **FI-EE-1** em diferentes níveis de corte. O hidrogênio em δ_H 5,20 (H-12) correlaciona-se com os hidrogênios em δ_H 1,92 (H-11). O hidrogênio em δ_H 1,92 (H-11) correlaciona-se também com o hidrogênio em δ_H 1,55 (H-9). O hidrogênio em δ_H 3,15 (H-3) correlaciona-se com o hidrogênio em δ_H 1,54 (H-2). O hidrogênio em δ_H 1,54 (H-2) correlaciona-se também com o hidrogênio em hidrogênio em δ_H 1,88 (H-1a). O hidrogênio em δ_H 2,10 (H-18) correlaciona-se com o hidrogênio em δ_H 1,48 (H-19). Essas correlações verificadas no mapa de contornos COSY estão de acordo com a estrutura do ácido ursólico.

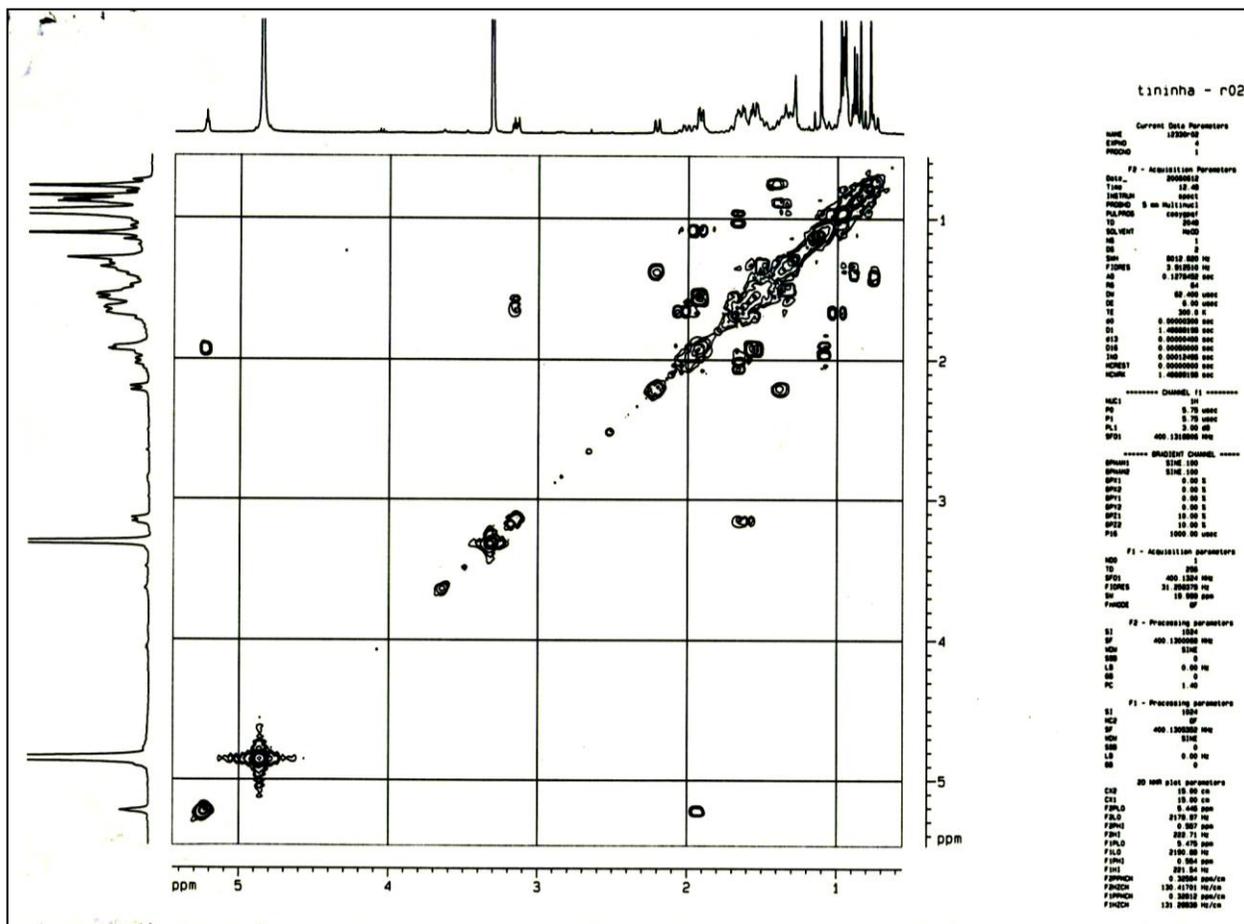


Figura IV.40. Mapa de contornos COSY de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD).

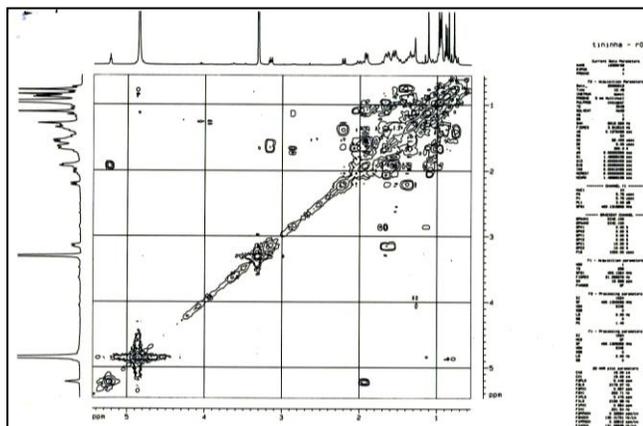


Figura IV.41. Mapa de contornos COSY de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD).

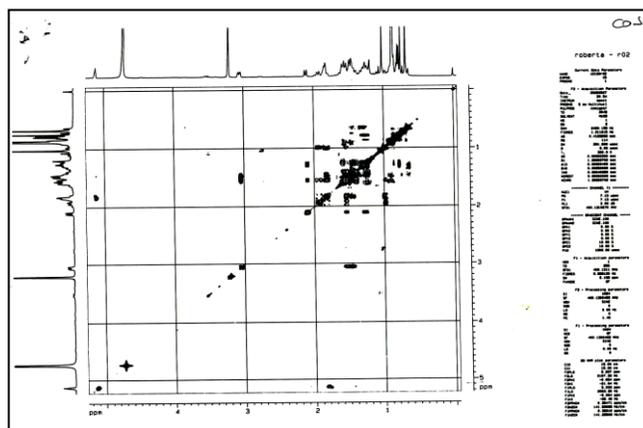


Figura IV.42. Mapa de contornos COSY de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD).

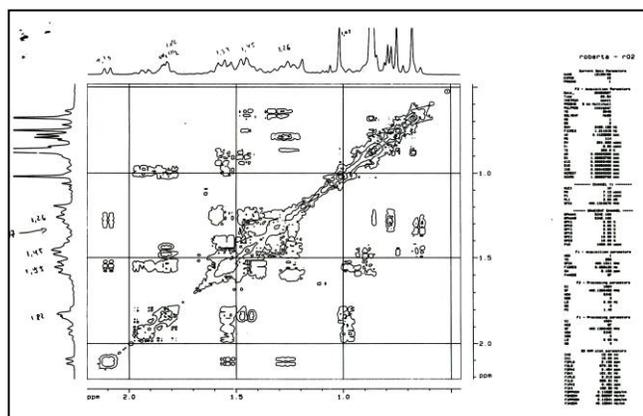


Figura IV.43. Mapa de contornos COSY de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD).

As Figuras IV.44 a IV.47 mostram os mapas de contornos HMQC de **FI-EE-1**. O hidrogênio em δ_H 5,20 correlaciona-se com o carbono em δ_C 127,0 (C-12). O hidrogênio em δ_H 3,15 correlaciona-se com o carbono em δ_C 79,9 (C-3). O hidrogênio em δ_H 2,10 correlaciona-se com o carbono em δ_C 54,6 (C-18). O hidrogênio em δ_H 1,92 correlaciona-se com o carbono em δ_C 24,2 (C-11). O hidrogênio em δ_H 2,05 correlaciona-se com o carbono em δ_C 25,5 (C-16). O hidrogênio em δ_H 1,98 correlaciona-se com o carbono em δ_C 39,9 (C-1). O hidrogênio em δ_H 1,65 correlaciona-se com o carbono em δ_C 38,3 (C-22). O hidrogênio em δ_H 1,12 correlaciona-se com o carbono em δ_C 24,5 (C-27). O hidrogênio em δ_H 0,98 correlaciona-se com o carbono em δ_C 21,7 (C-30). O hidrogênio em δ_H 0,96 correlaciona-se com o carbono em δ_C 19,4 (C-6). O hidrogênio em δ_H 0,93 correlaciona-se com o carbono em δ_C 16,2 (C-24). O hidrogênio em δ_H 0,75 correlaciona-se com o carbono em δ_C 56,9 (C-5). As outras correlações HMQC dos hidrogênios com os carbonos de **FI-EE-1** apresentam-se de difícil observação devido a sobreposição dos sinais.

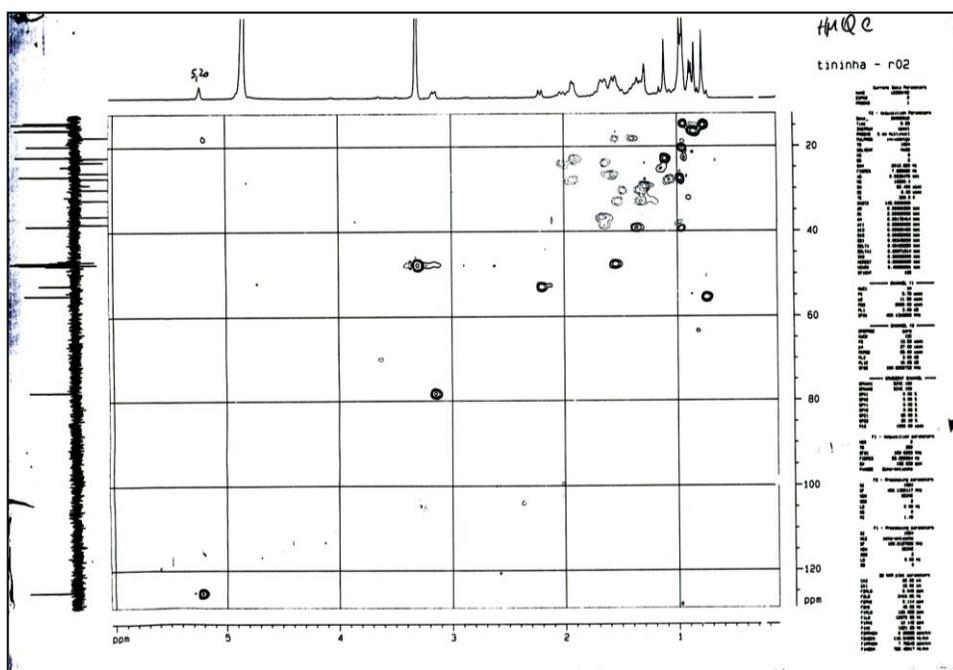


Figura IV.44. Mapa de contornos HMQC de **FI-EE-1** (400 MHz; MeOD).

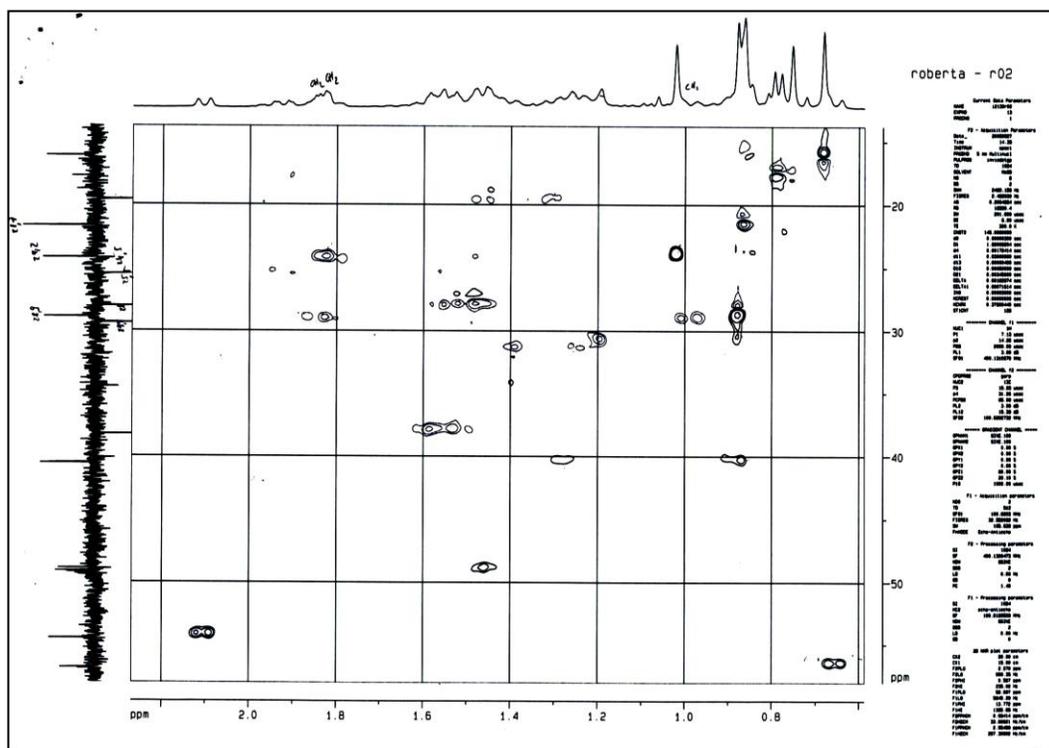


Figura IV.45. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).

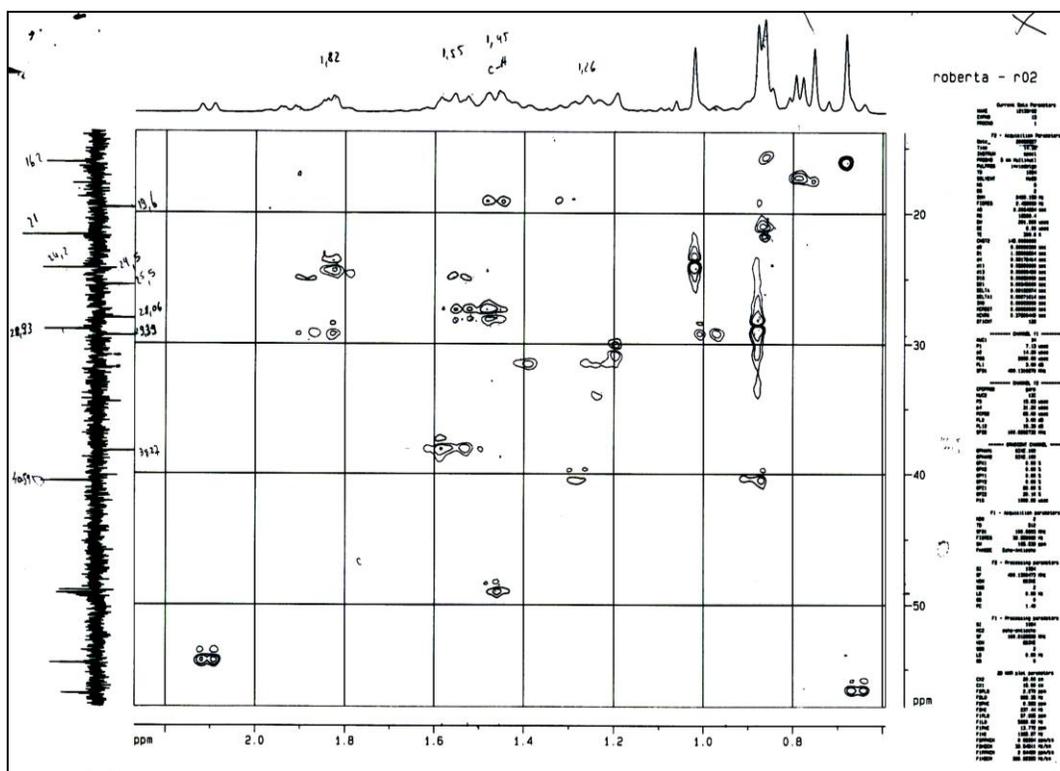


Figura IV.46. Mapa de contornos HMQC de FI-EE-1 (400 MHz; MeOD).

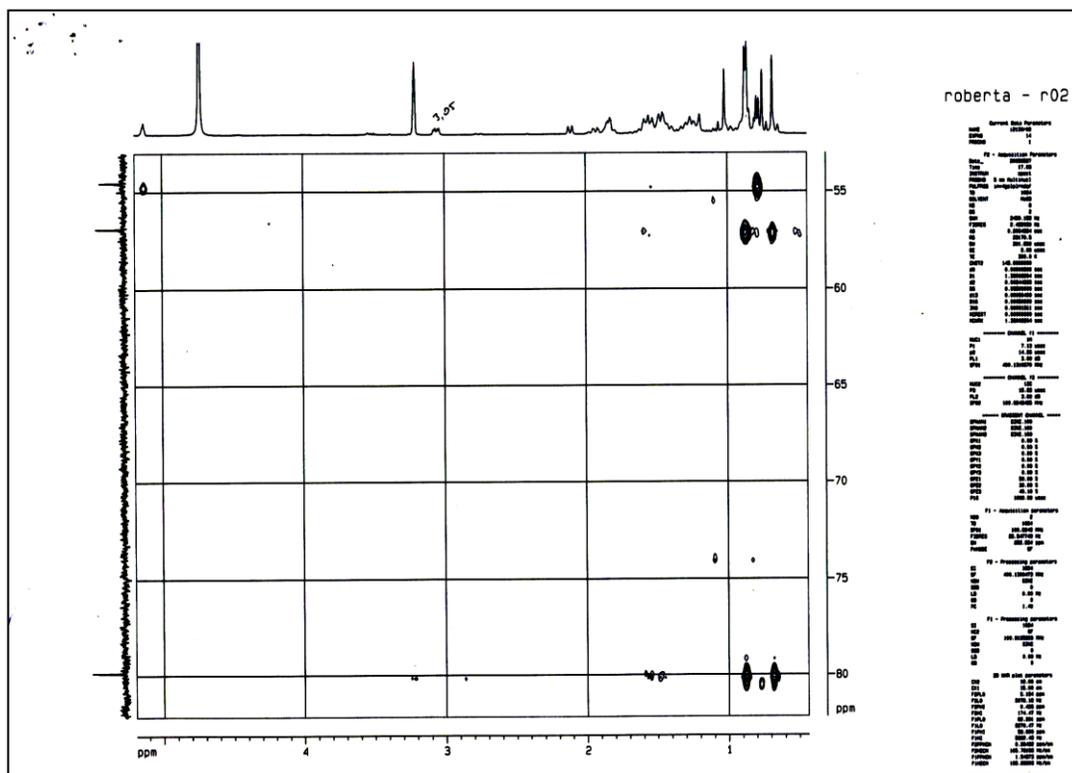


Figura IV.50. Mapa de contornos HMBC de **FI-EE-1** (MeOD; 100 MHz).

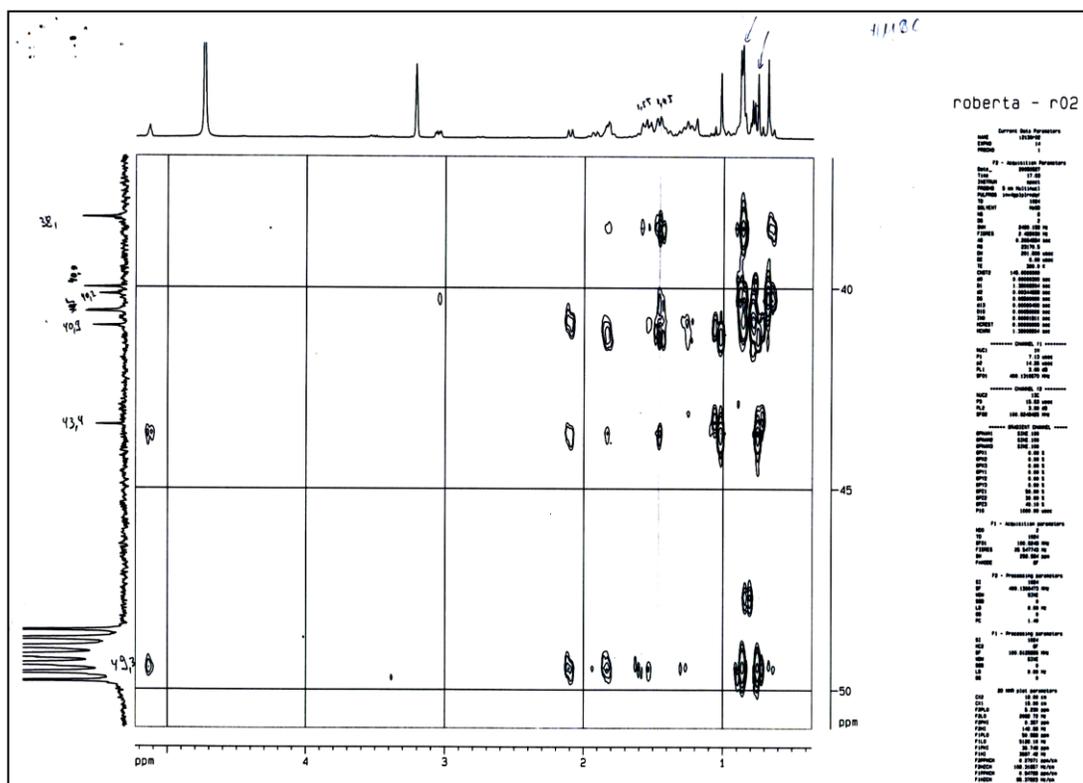


Figura IV.51. Mapa de contornos HMBC de **FI-EE-1** (MeOD; 100 MHz).

O ácido ursólico ou ácido (3 β)-3-hidroxiurs-12-en-28-óico é um composto triterpenóide pentacíclico, membro da família cicloesqualeno, pertencente ao grupo dos ursanos. Normalmente surge associado ao seu isômero ácido oleanólico e pode ser encontrado em diversos tipos de plantas e ervas, tais como *Lavandula augustifolia*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris*¹¹². É amplamente distribuído no reino vegetal em várias formas, como ácido ursólico livre ou na forma de 3-*O*-acetato de ácido ursólico, acetato de lactona, ou como uma saponina¹¹³. Por muito tempo tem sido usado em cosméticos e como agente emulsionante na indústria alimentar. A sua toxicidade (aguda ou crônica) pode ser considerada praticamente nula, sendo considerado dermatologicamente inócuo¹¹⁴.

O ácido ursólico apresenta atividades antiinflamatória^{115,116}, antimicrobiana¹¹⁷, hepatoprotetora¹¹⁸, anti-alérgica^{119,120} e anti-úlceras¹¹⁵. Além disso, apresenta atividades antiparasitárias contra espécies de *Leishmania*¹²¹ e *Trypanosoma* sp^{122,123}, efeitos sob patógenos periodontais¹²⁴, potencial antitubercular contra *Mycobacterium tuberculosis*¹²⁵ e antiviral contra HIV¹¹⁵. A literatura relata que o ácido ursólico foi usado no tratamento de hipertensão^{126,127} e de doenças renais¹²⁸, além de apresentar atividades imunomodulatórias¹¹⁵, antifertilidade¹²⁹ e hipoglicêmica¹¹⁵. Possui propriedades quimiopreventivas¹³⁰, citotóxica¹³¹, anti-invasiva¹¹³ e, mais recentemente, foi incluído na quimioterapias anticancer¹³².

A literatura relata que o ácido ursólico pode atuar em vários estágios no desenvolvimento do tumor, como na inibição da tumorigênese, inibição na promoção do tumor e indução da diferenciação da célula tumoral¹¹⁵. Inibe efetivamente a angiogênese, a invasão de células tumorais e a metástase. É capaz de induzir a apoptose de células tumorais e de prevenir a transformação maligna de células normais¹¹³, podendo ser usado como adjuvante na terapia do câncer¹³³.

De acordo com a literatura, os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do ácido ursólico podem estar relacionados com sua capacidade de inibir a replicação do DNA, a atividade da tirosina quinase¹¹³, síntase induzível do óxido nítrico¹³⁴, matriz metaloproteinase-9¹³⁵, a expressão da lipoxigenase¹³⁶ e ciclooxigenase-2¹³⁵.

Da espécie vegetal *Miconia fallax* foi possível isolar o ácido ursólico que apresentou atividade antimutagênica, bem como o seu efeito anticlastogênico foi observado, sugerindo que este triterpenóide apresenta atividade antioxidante sobre os danos cromossômicos induzidos pelos radicais gerados pela quimioterápico doxorrubicina (DXR Pharmacia Brasil Ltda.)¹³⁶.

A *Curatella americana* L. (Dilleniaceae), uma planta popularmente conhecida como “cajueiro-bravo” e “sambaíba”, é usada na medicina popular para o tratamento da inflamação e úlcera. O estudo desta espécie resultou no isolamento do ácido ursólico, acetato de ácido ursólico e ácido betulínico, que apresentaram efeito antiinflamatório e analgésico¹³⁸.

O ácido ursólico é o constituinte majoritário do extrato etanólico das folhas de *Salzmania nitida* (Rubiaceae). Esse constituintes responsável provavelmente pela atividade espasmolítica dessa planta, pois inibe as contorções induzidas por vários agonistas (carbacol, histamina, ocotocina e noradrenalina), em diferentes tipos de músculos lisos como íleo e traquéia de cobaia, útero de rata e aorta de rato¹³⁹.

A literatura relata que espécie *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae) apresenta iridóides e ácido ursólico, que apresentam respectivamente atividades na inibição da expressão de NO (inibindo a iNO) e inibição da ciclooxigenase¹⁴⁰. O extrato bruto dessa planta apresenta atividade antiedematogênica nos modelos de edema de pata e orelha, inibindo aparentemente a síntese dos prostanóides e permeabilidade vascular¹⁴¹.

Da espécie *Nepeta sibthorpii*, foi possível isolar o ácido ursólico que apresentou-se como um dos principais componentes antioxidantes¹¹⁶. A literatura relata que o ácido ursólico apresenta

atividade antioxidante, diminuindo a geração de radicais³¹ além de diminuir os níveis de peroxidação lipídica marcada no plasma, o ácido ursólico aumenta os níveis de antioxidantes circulantes, tais como ácido ascórbico, glutathione reduzida e alfa-tocoferol, demonstrando dessa maneira, que esse efeito protetor provavelmente seja devido sua capacidade antioxidante¹⁴².

A literatura relata ainda que o teste com *Salmonella typhimurium* utilizando linhagens TA100 e TA98, demonstraram a inibição pelo ácido ursólico da mutagenicidade induzida por aflatoxina B1¹⁴³. Estudos indicaram que o ácido ursólico reduziu o número de PCEMNs induzidos pelo mutagênico mitomicina C, em medula óssea de camundongos Swiss, indicando dessa maneira a ação antimutagênica do ácido ursólico¹⁴⁴. Além disso, foi observada pelo teste de Ames, com a linhagem TA98 e o uso da enzima S9 a atividade antimutagênica do ácido ursólico contra as mutações induzidas pelo benzopireno¹⁴⁵.

9. Análise de FI-EE-2

O sólido **FI-EE-2** (10,9 mg) apresentou ponto de fusão de 278,5-283,2 °C e teste Liebermann-Bouchard positivo para triterpenos pentacíclicos. A Figura IV.57 mostra espectro de RMN de ¹H de **FI-EE-2** e as Figuras IV.58 e IV.59 mostram ampliações desse espectro em diferentes regiões. O sinal triplete em δ_H 5,20 (s) pode ser atribuído ao hidrogênio alquenílico H-12 do ácido tormentico. O sinal em δ_H 3,50 (m) pode ser atribuído ao hidrogênio H-2. O sinal em δ_H 2,81 (d, $J= 9,6$ Hz, 1H) pode ser atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3. O sinal em δ_H 2,48 (dd, $J= 13,2$ e $4,0$ Hz) pode ser atribuído a H-16a. O sinal em δ_H 2,41 atribuído ao H-18; o sinal em δ_H 1,84 (dd, $J= 12,1$ e $4,2$ Hz) pode ser atribuído aos hidrogênios H-1a. O sinal em δ_H em 1,71 (ddd, $J= 14,6$, $13,6$ e $4,2$ Hz) pode ser atribuído ao hidrogênio H-5a; o sinal em δ_H 1,91 (m) ao H-11; o sinal em δ_H 1,65 (m) ao H-9; o sinal em δ_H 1,45 (m) ao H-6a. Os demais sinais de

RMN de ^1H apresentam-se sobrepostos na região entre δ_{H} 1,3 e 0,7, sendo portanto de difícil atribuição. Porém, esses sinais são compatíveis com os registrados para o ácido tormentico.

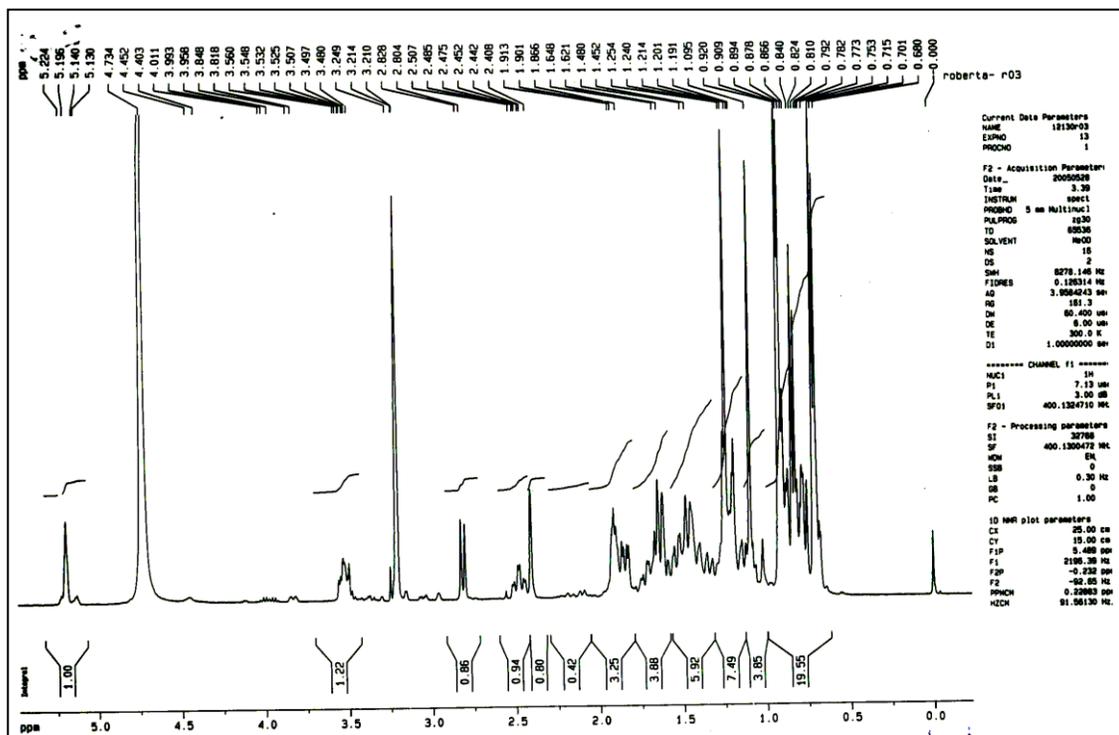


Figura IV.57. Espectro de RMN de ^1H de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).

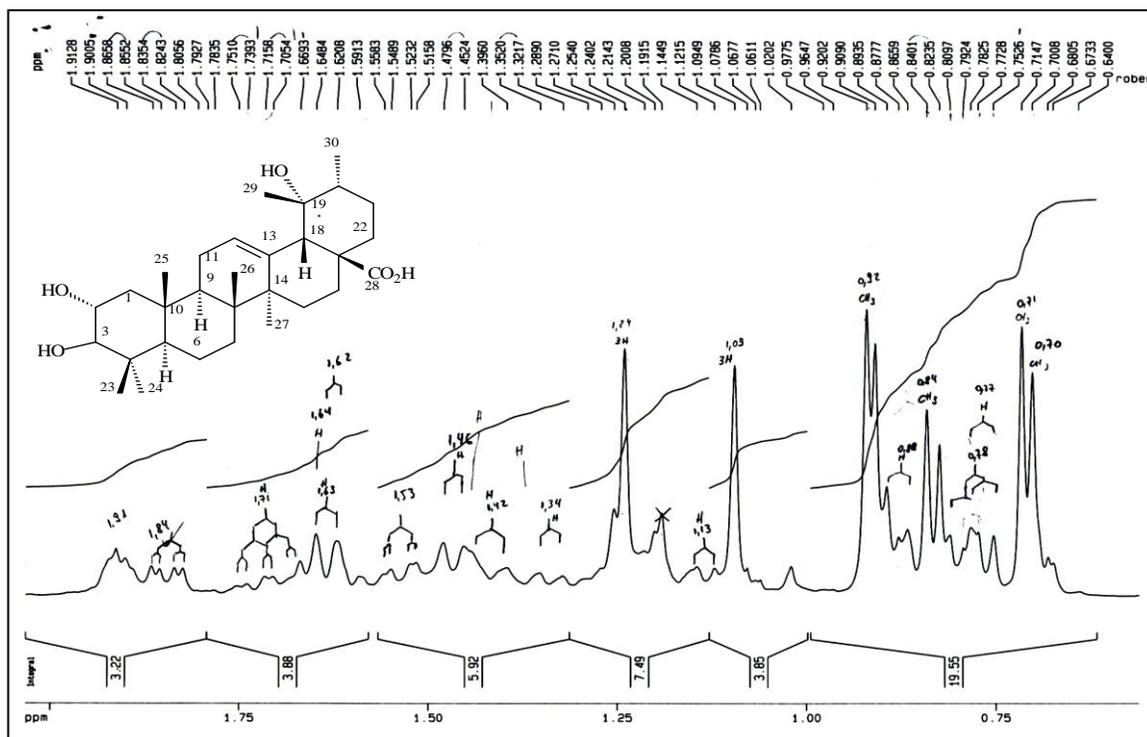


Figura IV.58. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de FI-EE-2 (MeOD; 400 MHz), em δ_{H} 1,9 – 0,6.

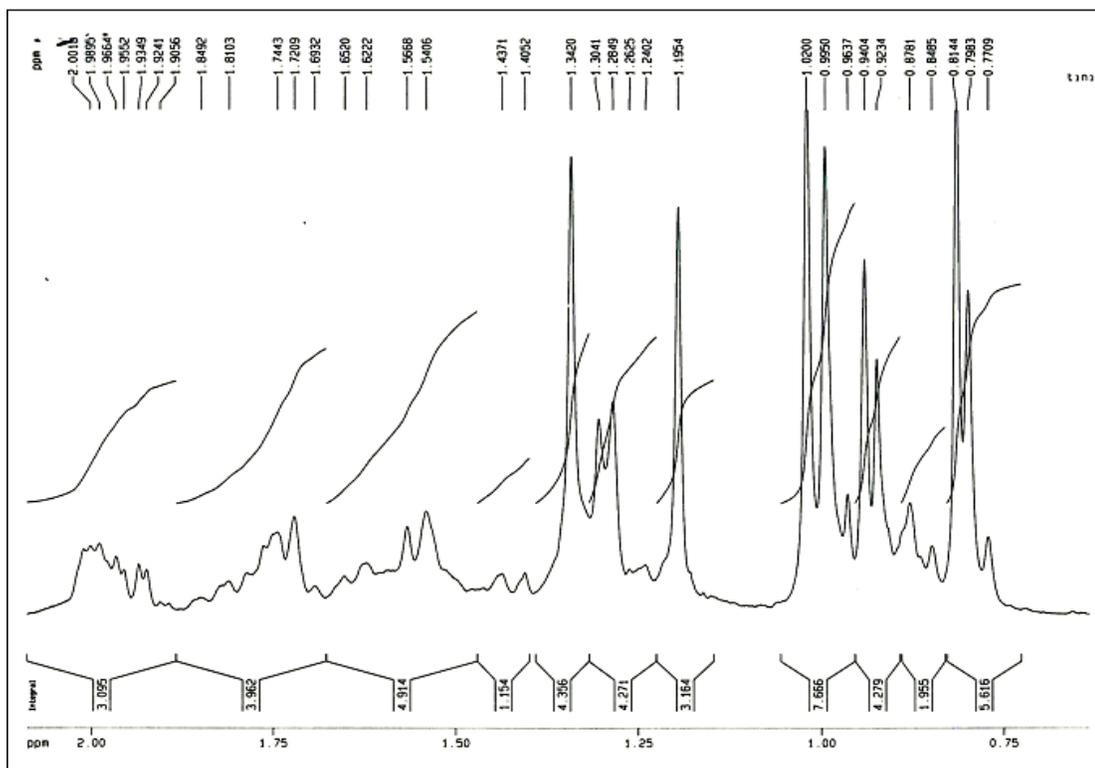


Figura IV.59. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **FI-EE-2** (400 MHz; MeOD), na região entre δ_{H} 2,0 – 0,7.

A Figura IV.60 mostra o espectro de RMN de ^{13}C de **FI-EE-2** com ampliações nas regiões entre δ_{H} 140,2 – 55,2 e 43,2 – 16,7 e a Figura IV.61 mostra o subspectro DEPT 135 e ampliações correspondentes. O sinal em δ_{C} 181,1 corresponde ao carbono quaternário C-28 do grupo carboxila. O sinal em δ_{C} 140,3 corresponde ao carbono quaternário C-13 do grupo alquenílico. O sinal em δ_{C} 129,4 corresponde ao carbono metínico C-12 do grupo alquenílico. O sinal em δ_{C} 84,3 corresponde ao carbono metínico C-3. O sinal em δ_{C} 73,8 e δ_{C} 69,7 correspondem aos carbonos carbinólicos C-19 e C-2, respectivamente. O sinal em δ_{C} 56,9 corresponde ao carbono metínico C-5. O sinal em δ_{C} 55,3 corresponde ao carbono metínico C-18. As demais atribuições dos sinais de carbono de **FI-EE-1** são apresentadas na Tabela IV.5 (pág. 130)⁷⁶

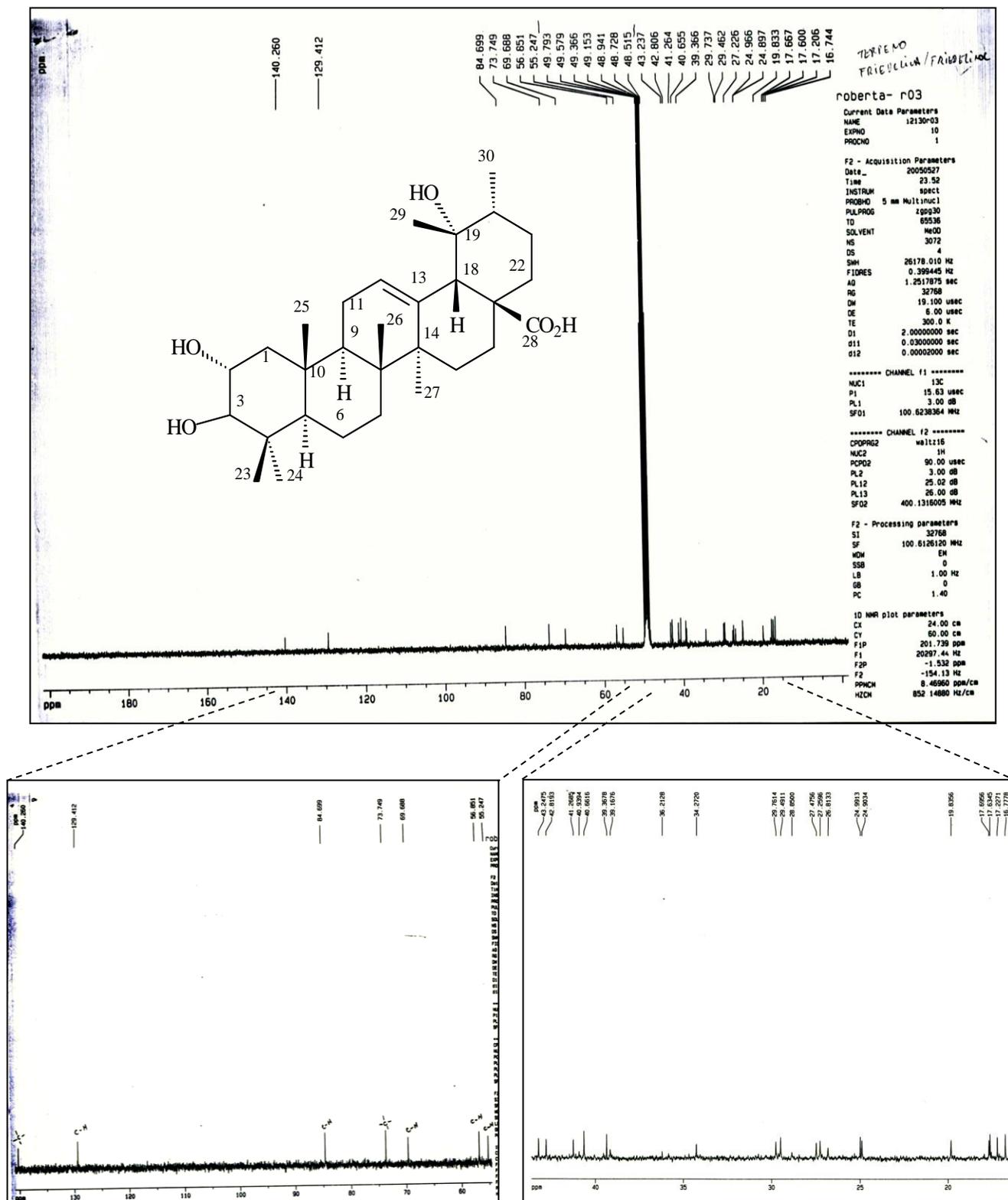


Figura IV.60. Espectro de RMN de ^{13}C de FI-EE-2 (100 MHz; MeOD) e ampliação na região entre δ_{C} 140,2 – 55,2 e δ_{C} 43,2 – 16,7.

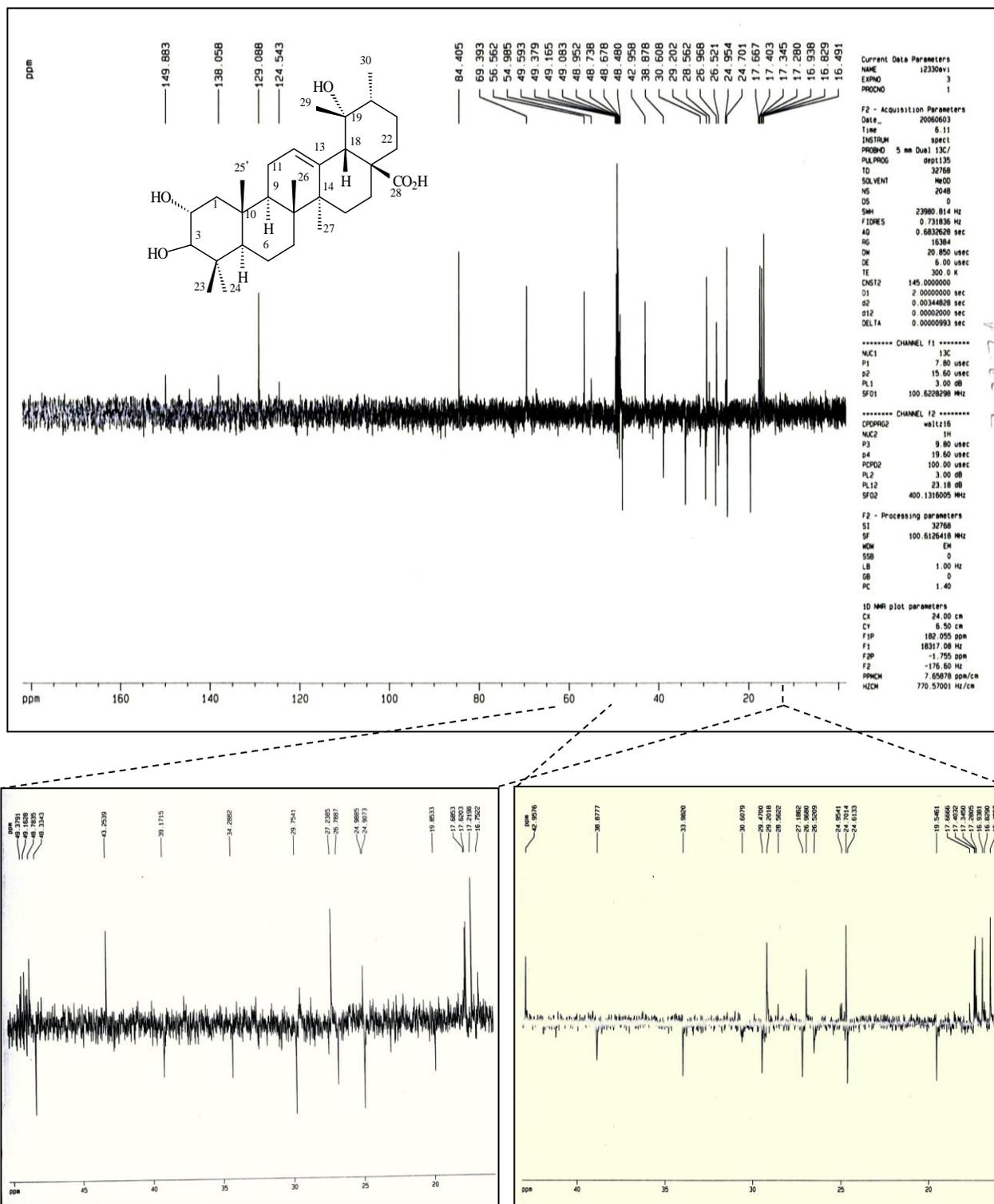


Figura IV.61. Subespectro DEPT 135° de FI-EE-2 (100 MHz; MeOD) e ampliação na região

entre δ_c 49,3 – 16,7 e δ_c 42,9 – 16,4.

A Figura IV.62 apresenta o espectro de absorção na região do Infravermelho de **FI-EE-2**. A absorção em ν 3435 cm^{-1} pode ser atribuído a vibrações de grupos hidroxila de álcoois e ácidos carboxílicos. As absorções na região entre ν 2970 e 2850 cm^{-1} pode ser atribuído a vibrações de grupos alquilas. A absorção intensa em ν 1690 cm^{-1} pode ser atribuído à vibrações C=O de ácidos carboxílicos. As absorções largas em ν 1090 e 1030 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramento de C – O em álcoois e ácidos carboxílicos.⁷⁶ Estes dados estão de acordo com a estrutura do ácido tormêntico.

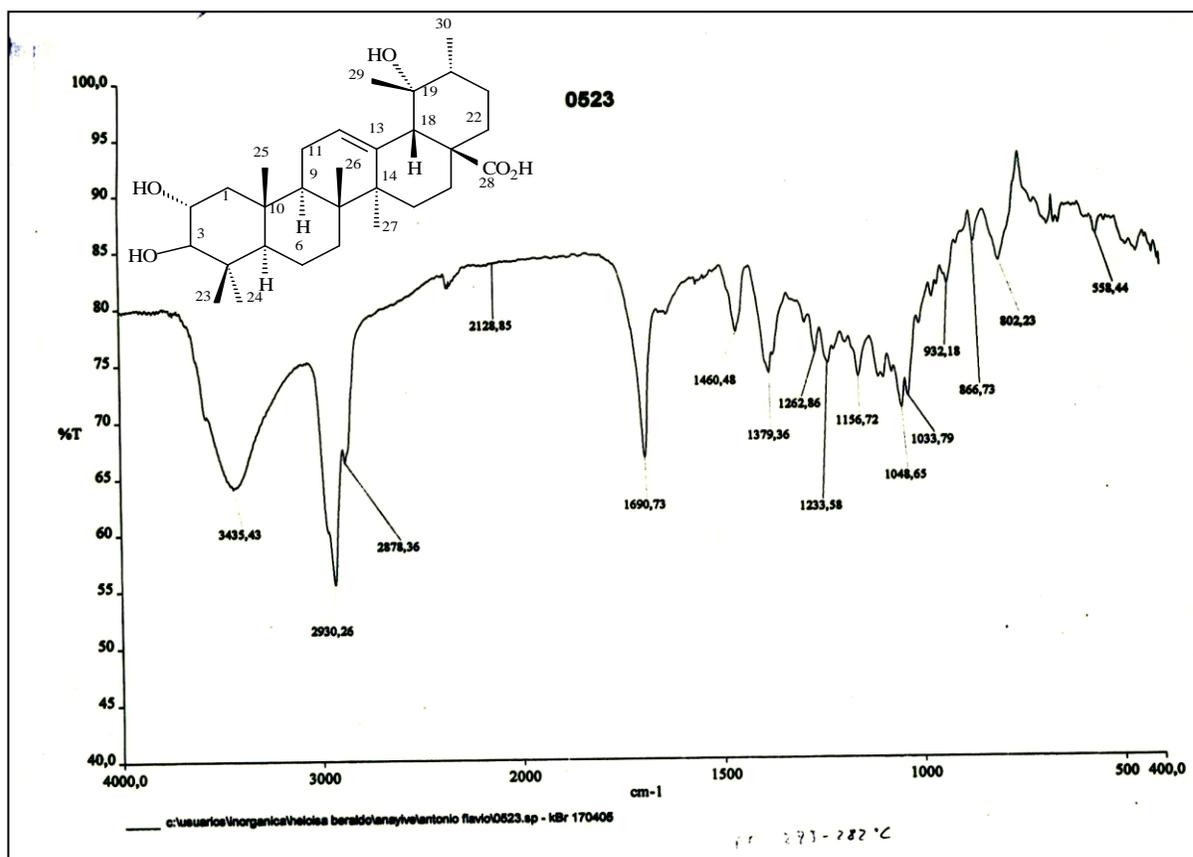


Figura IV.62. Espectro de absorção na região do Infravermelho de **FI-EE-2** (KBr; cm^{-1}).

As Figuras IV.63 a IV.82 mostram os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C em 2D de **FI-EE-2**. Pelo mapa de contornos HMBC verificou-se que H-12 (δ_{H} 5,20) apresentou correlações com os carbonos de δ_{C} 140,3 (C-13), 55,3 (C-18), 48,7 (C-9), 43,0 (C-14) e 24,9 (C-11) e pelo mapa de contornos COSY com os hidrogênios de δ_{H} 2,41 (s, H-18) e 1,91 (m, H-11). O hidrogênio H-18 (δ_{H} 2,41) correlaciona-se por HMBC com os carbonos de δ_{C} 181,9 (C-28), 140,3 (C-13), 129,4 (C-12), 73,8 (C-19), 43,2 (C-20), 43,0 (C-14), 39,2 (C-22), 27,2 (C-29) e 26,8 (C-16), enquanto por NOESY apresenta correlações com os hidrogênios de δ_{H} 0,70 (s, H-26) e 1,09 (s, H-29). Esse último hidrogênio correlaciona-se por HMBC com os carbonos de δ_{C} 73,8 (C-19), 55,3 (C-18) e 43,2 (C-20) e ainda por NOESY apresenta correlações com o hidrogênio de δ_{H} 1,27-1,24 (m, H-20).

O hidrogênio H-2 (δ_{H} 3,50) correlaciona-se por HMBC com os carbonos de δ_{C} 84,3 (C-3), 48,3 (C-1), 40,7 (C-4) e 39,4 (C-10), apresentando por COSY correlações com os hidrogênios de δ_{H} 2,81 (d, $J=9,6$ Hz, H-3), 1,84 (dd, $J=12,1$ e 4,2 Hz, H-1a) e 0,78 (m, H-1b) e por NOESY correlações com os hidrogênios de δ_{H} 0,82 (s, H-23), 0,92 (s, H-25) e 0,78 (m, H-1b).

O hidrogênio H-3 (δ_{H} 2,81) correlaciona-se por HMBC com os carbonos de δ_{C} 69,7 (C-2), 56,9 (C-5), 48,3 (C-1), 40,7 (C-4), 28,8 (C-23) e 17,7 (C-24), apresentando por NOESY correlações com os hidrogênios de δ_{H} 0,77 (m, H-5) e 1,84 (dd, $J=12,1$ e 4,2 Hz, H-1a). O hidrogênio H-25 (δ_{H} 0,92) apresenta por HMBC correlações com os carbonos de δ_{C} 56,9 (C-5), 48,3 (C-1), 39,4 (C-10) e 48,7 (C-9), apresentando por NOESY correlação com o hidrogênio de δ_{H} 0,70 (s, H-26). Esse último hidrogênio apresenta por HMBC correlações com os carbonos de δ_{C} 48,7 (C-9), 43,0 (C-14), 41,3 (C-8) e 34,3 (C-7). As demais atribuições dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C do ácido tormêntico foram realizados por comparação com dados da literatura^{76,146,147}, conforme mostrado na Tabela IV.5 (pág. 130).

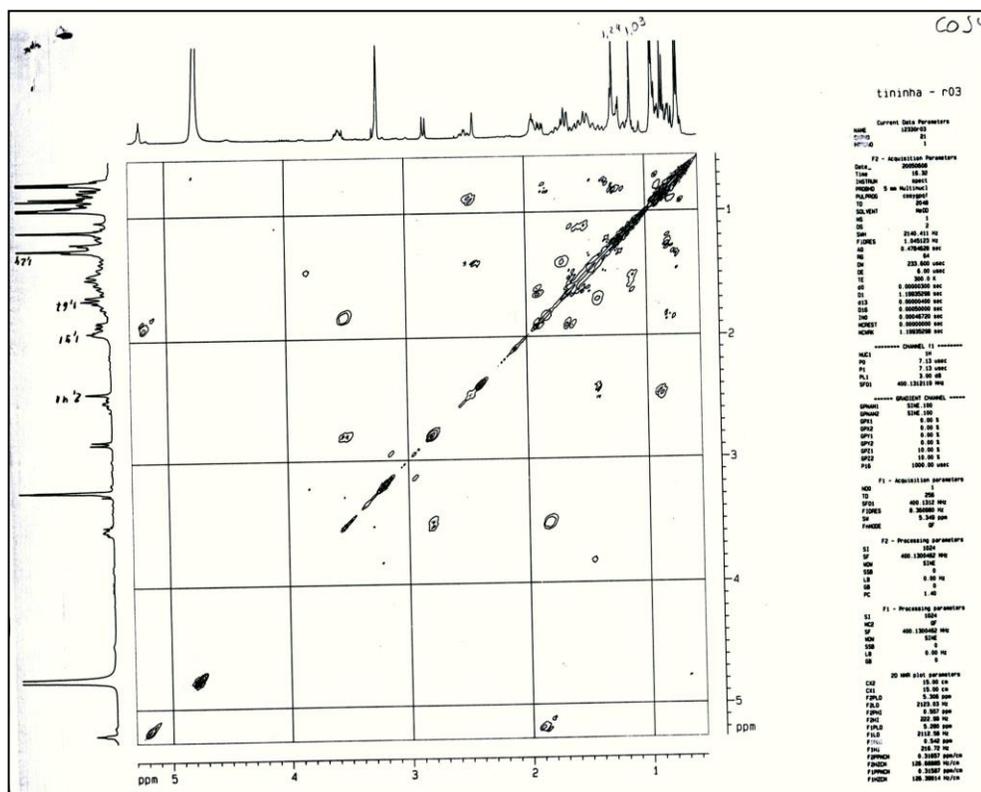


Figura IV.65. Mapa de contornos COSY de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).

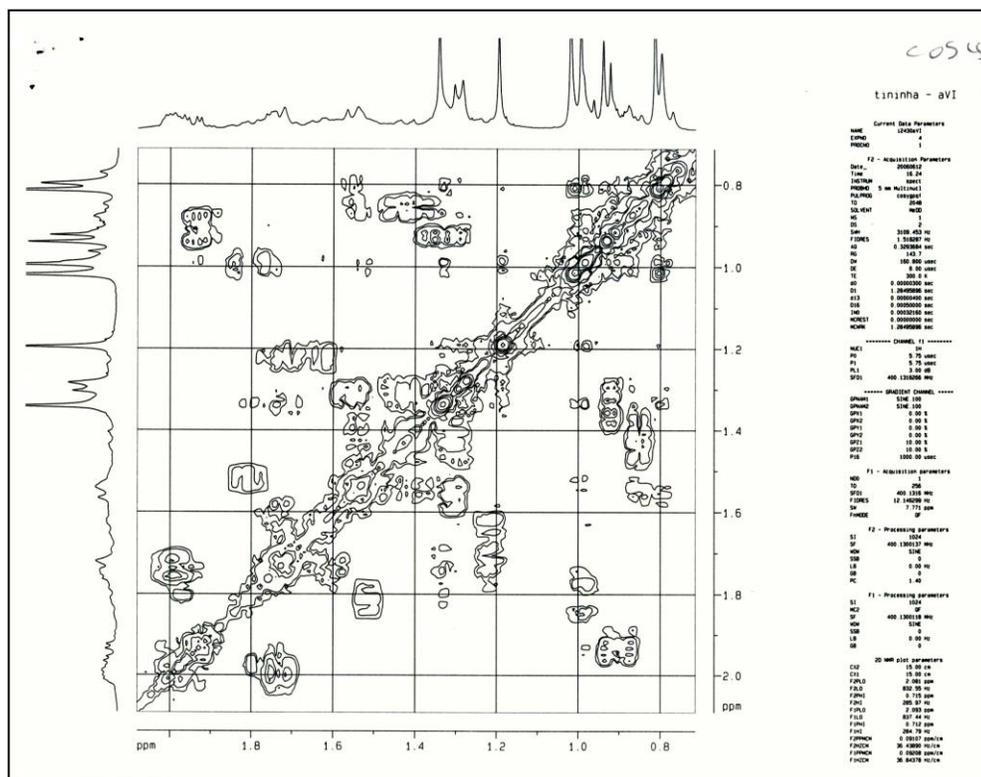


Figura IV.66. Mapa de contornos COSY de FI-EE-2 (400 MHz; MeOD).

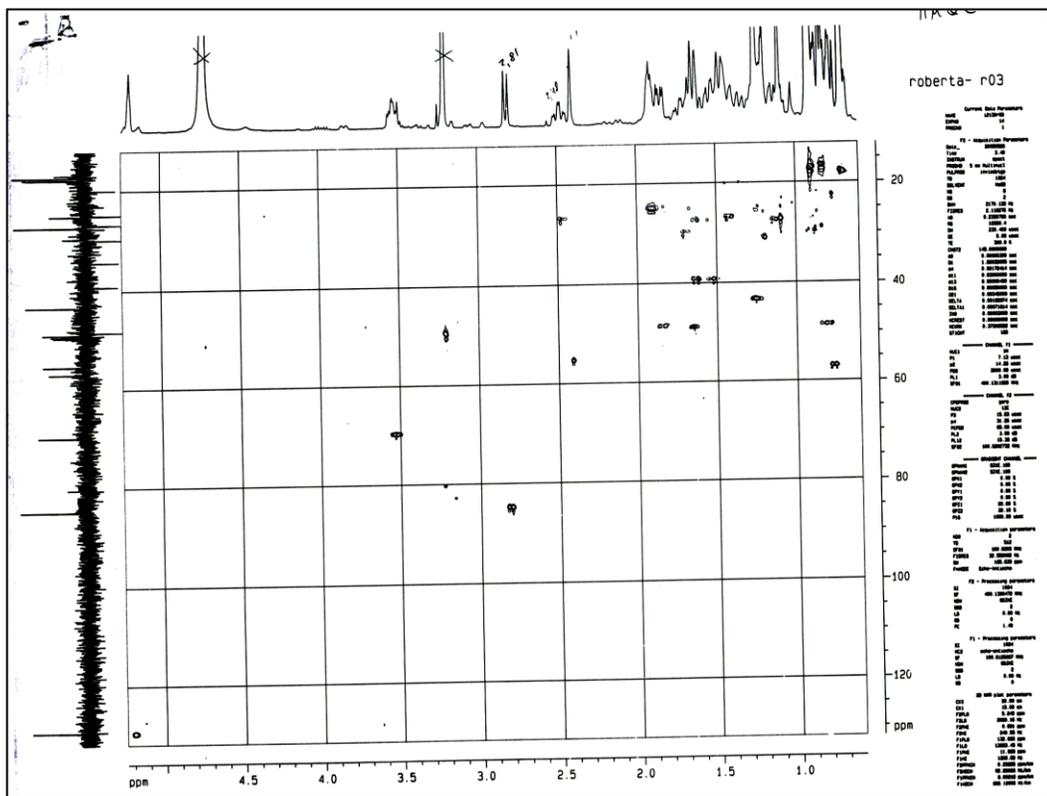


Figura IV.67. Mapa de contornos HMBC de **FI-EE-2** (MeOD; 100 MHz).

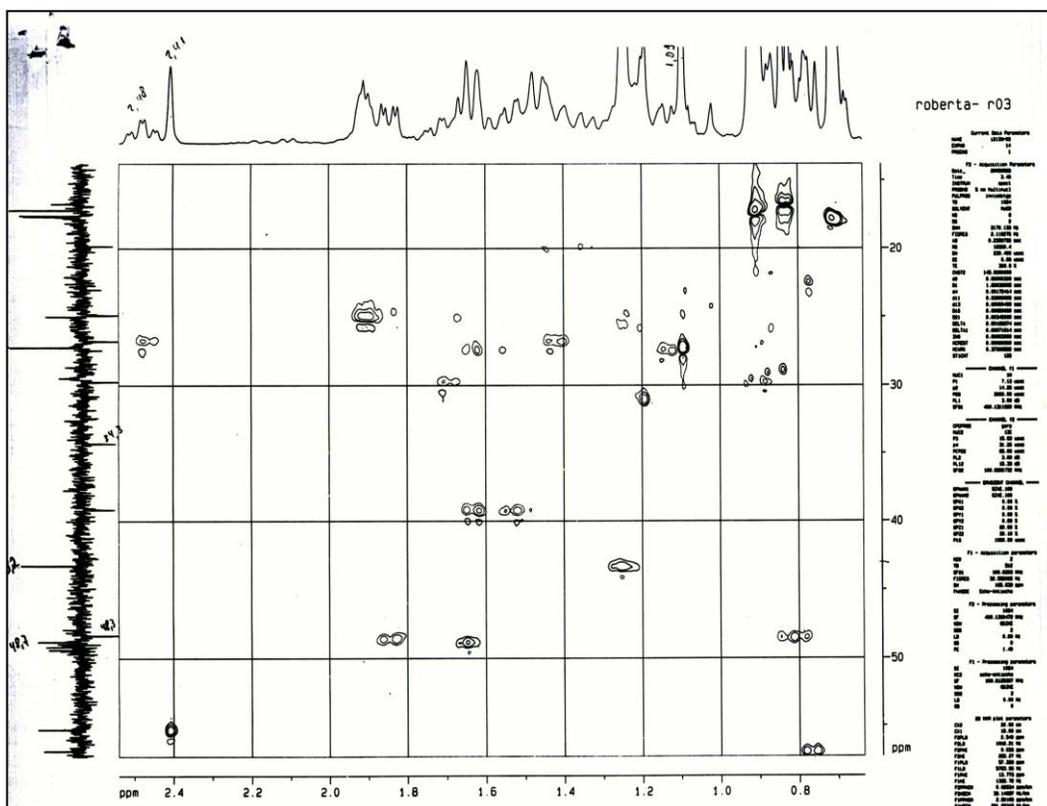


Figura IV.68. Mapa de contornos HMBC de **FI-EE-2** (MeOD; 100 MHz).

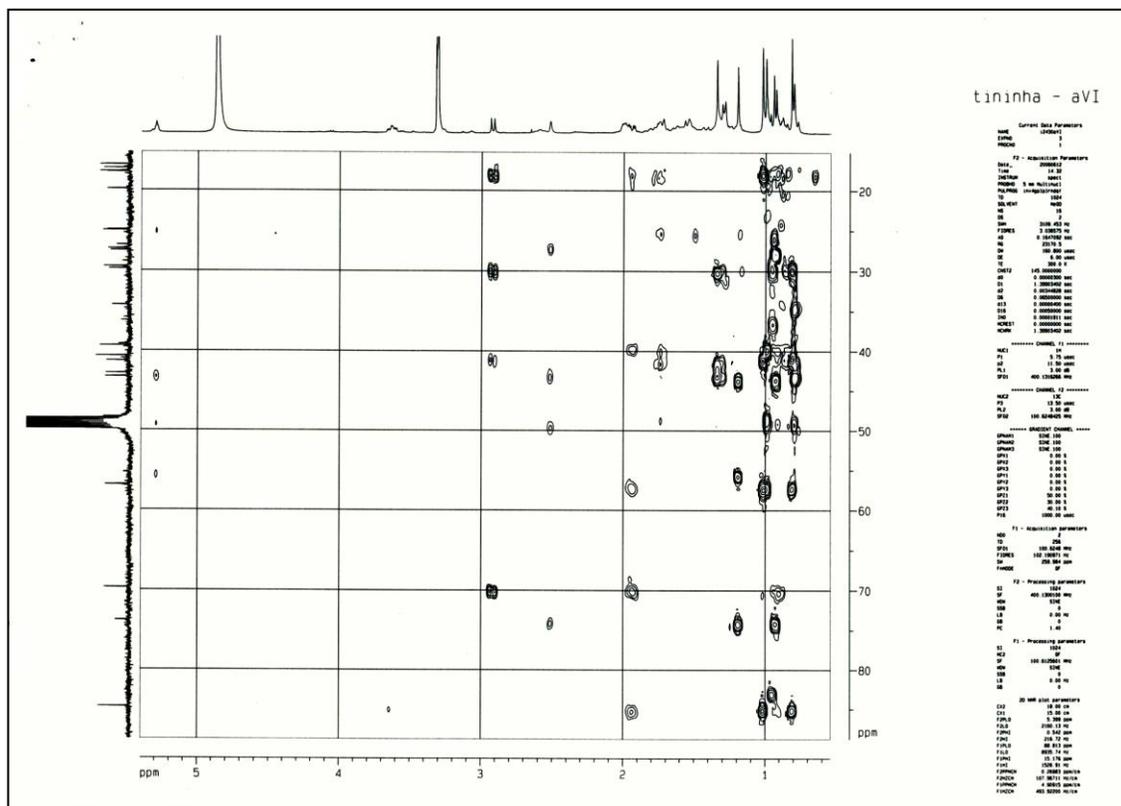


Figura IV.71. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

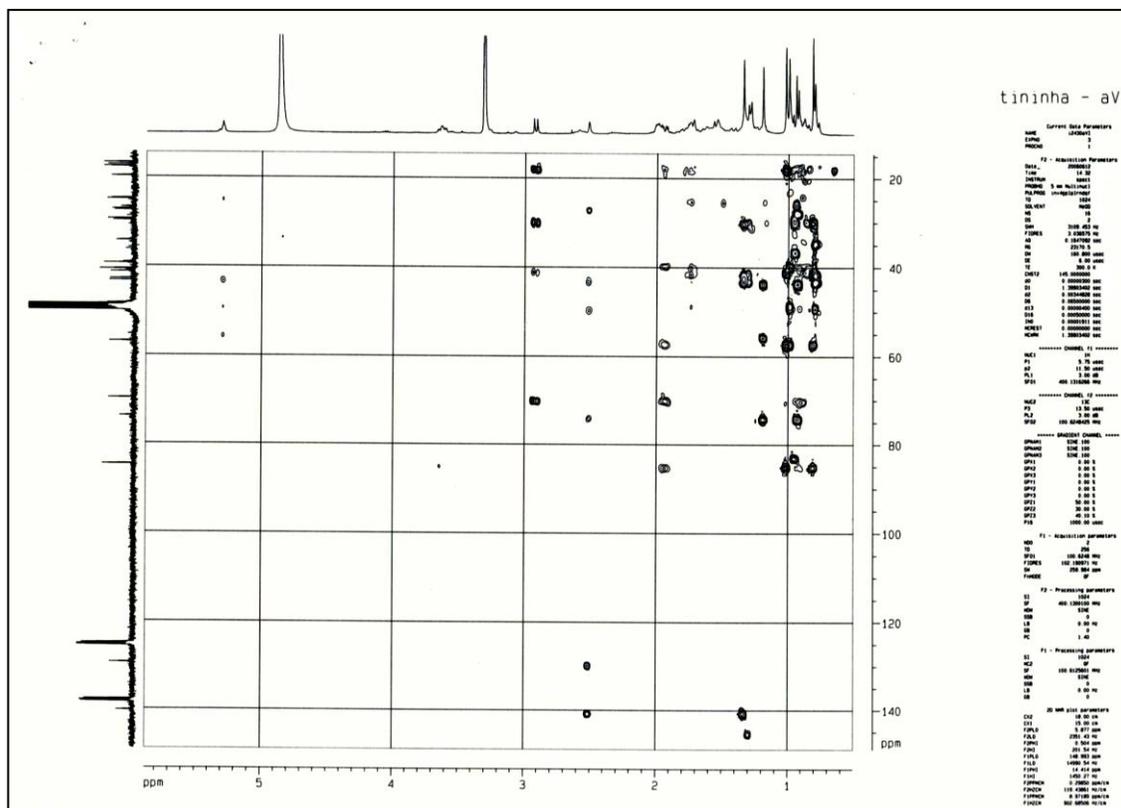


Figura IV.72. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

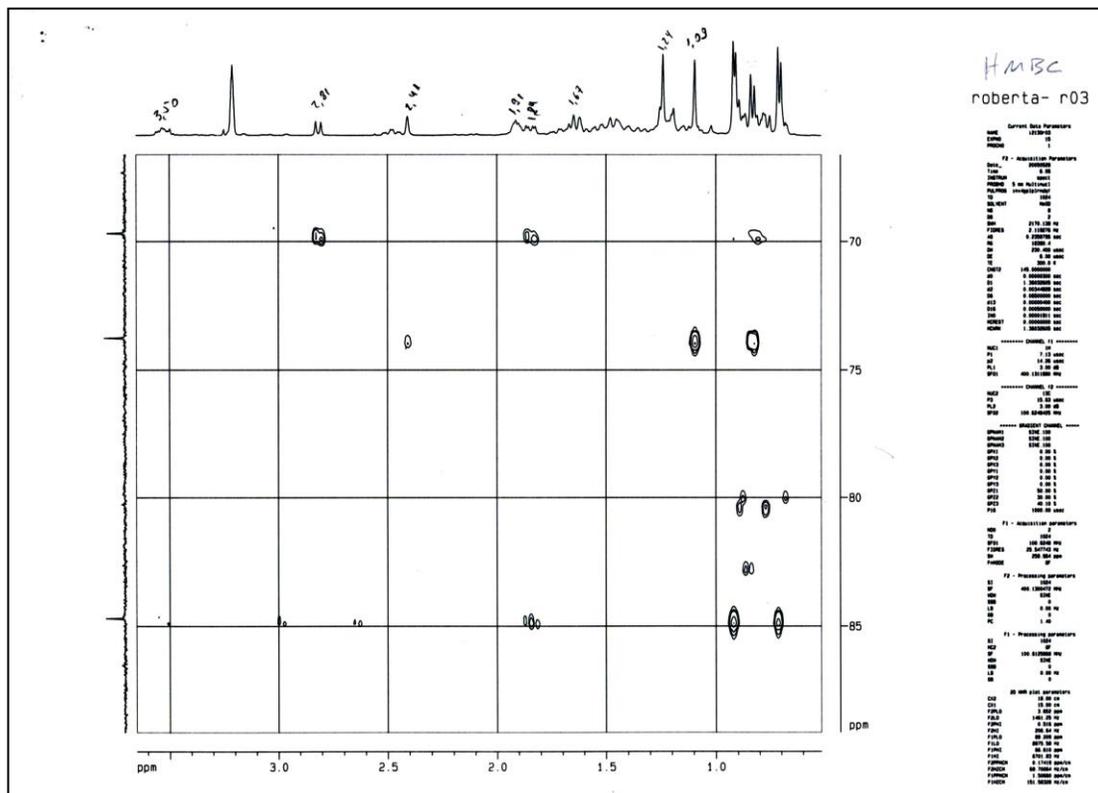


Figura IV.73. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

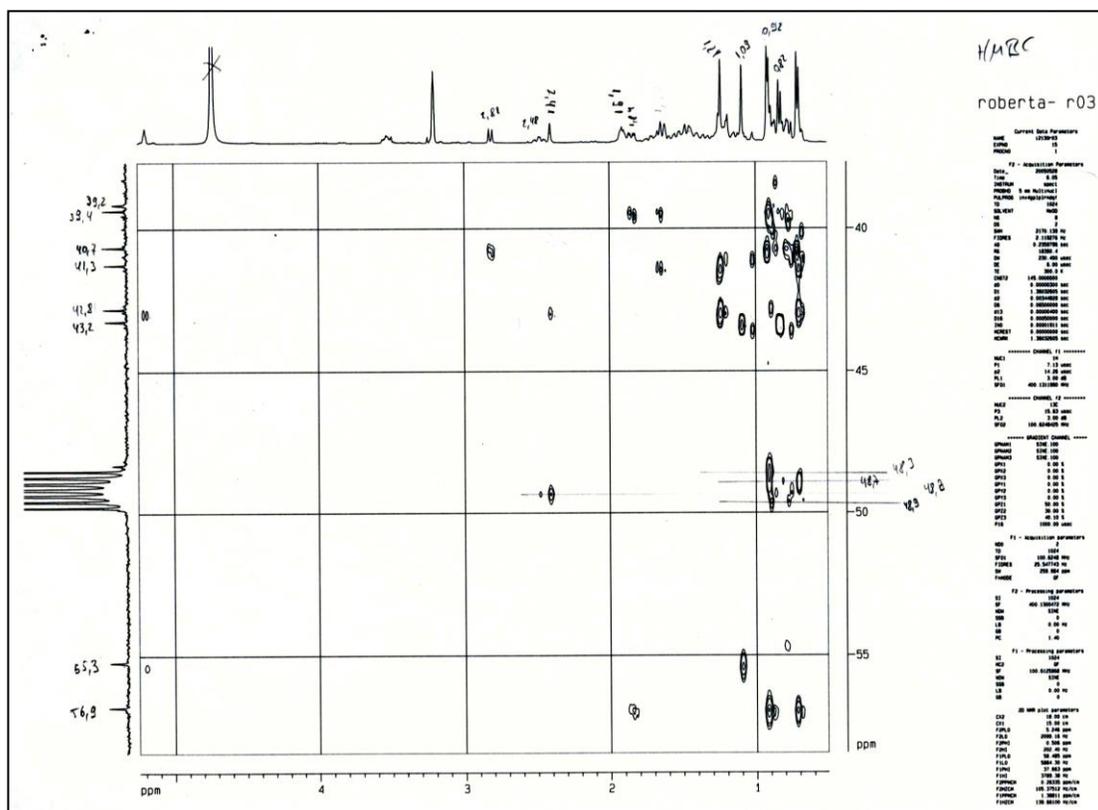


Figura IV.74. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

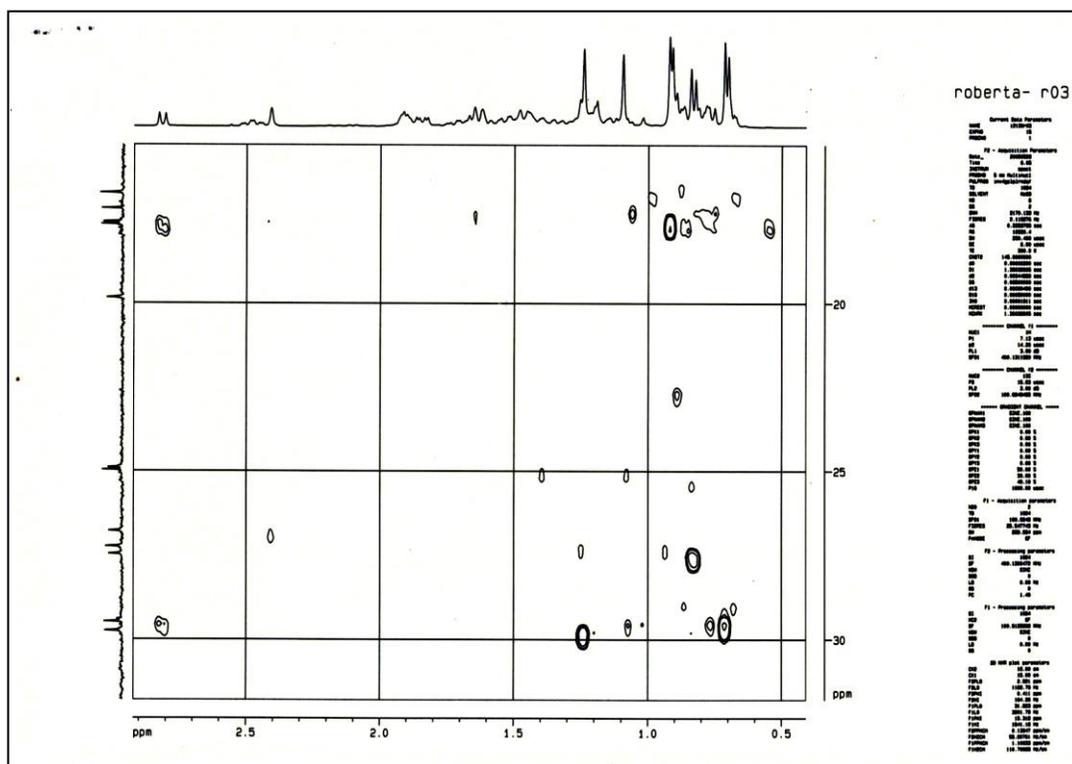


Figura IV.75. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

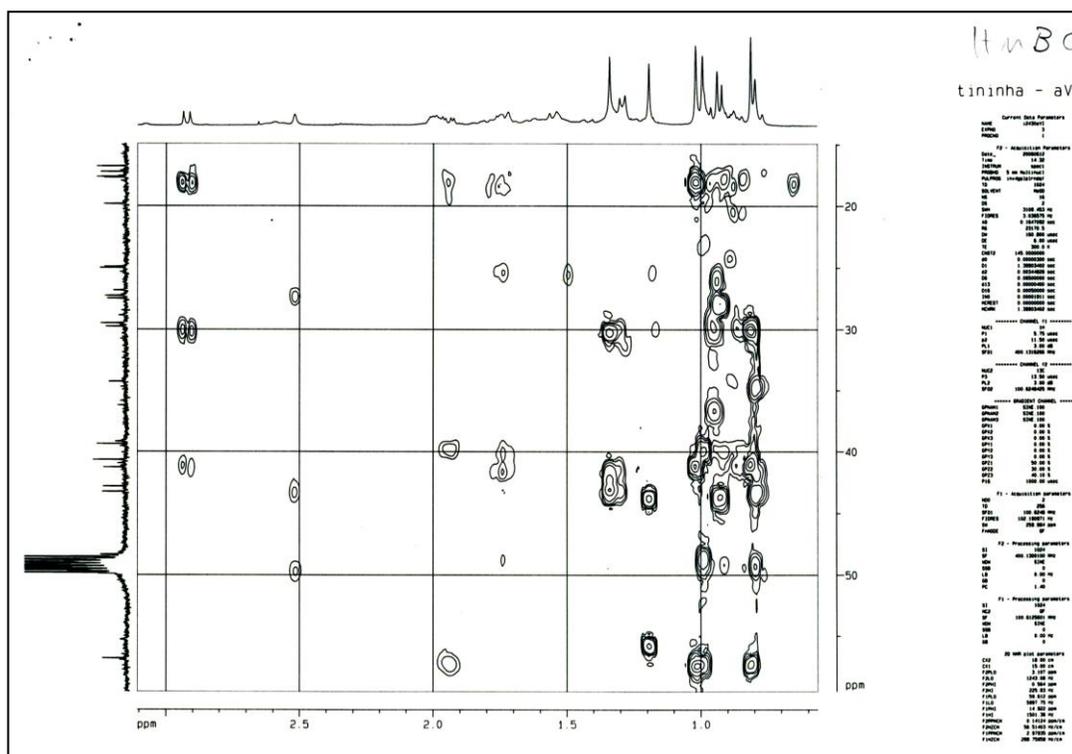


Figura IV.76. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

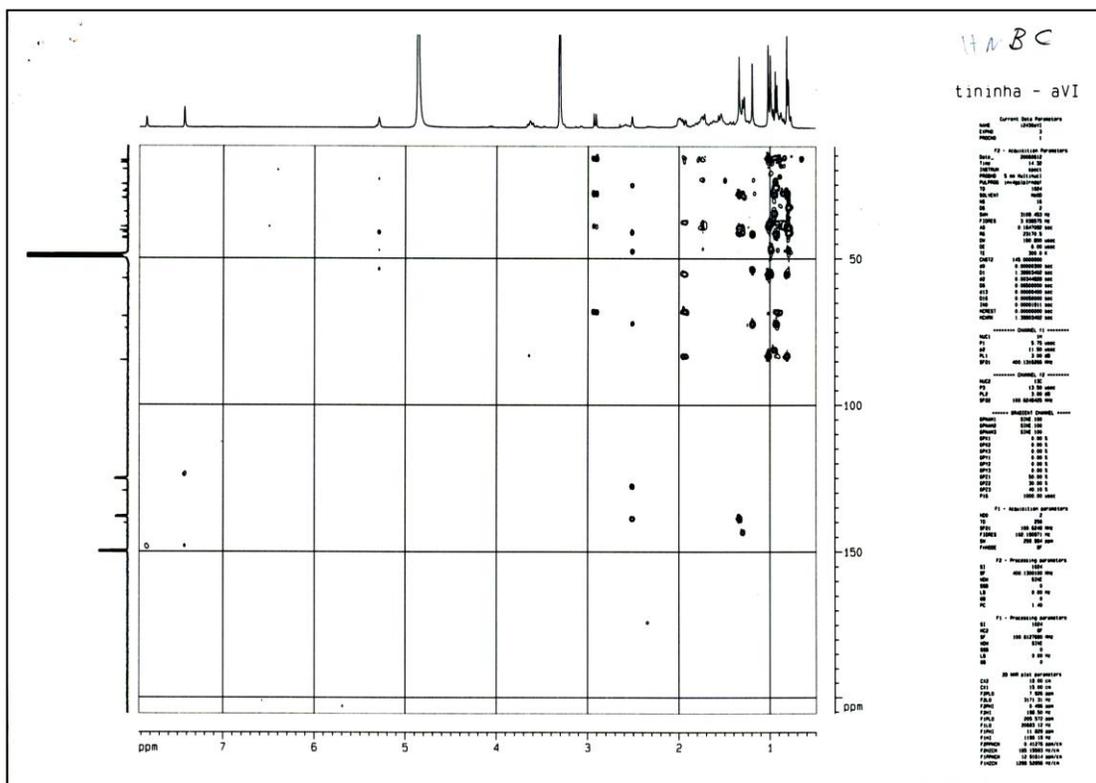


Figura IV.77. Mapa de contornos HMBC de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

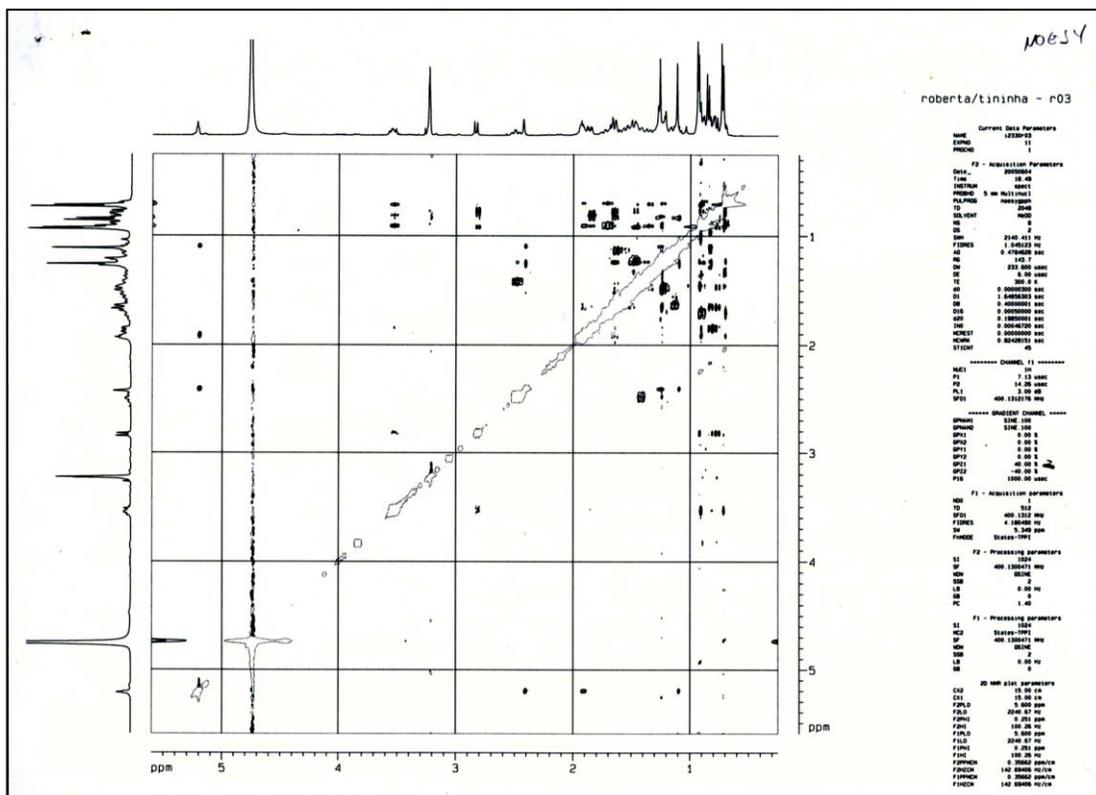
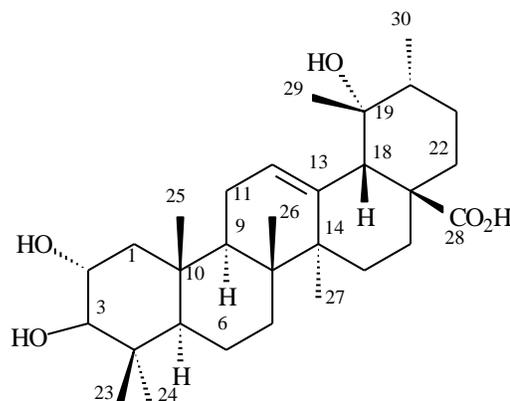


Figura IV.78. Mapa de contornos NOESY de FI-EE-2 (MeOD; 100 MHz).

Tabela IV.5. Dados de RMN de ^{13}C de **FI-EE-2** e do ácido tormêntico descrito na literatura

Átomo	FI-EE-1 δ_c	ácido tormêntico δ_c
C-1	48,3	40,8
C-2	69,7	68,6
C-3	84,3	83,9
C-4	40,7	39,9
C-5	56,9	56,0
C-6	19,8	19,0
C-7	34,3	33,5
C-8	41,3	40,5
C-9	48,7	47,9
C-10	39,4	38,5
C-11	24,9	24,1
C-12	129,4	128,0
C-13	140,3	140,0
C-14	43,0	42,2
C-15	29,7	29,3
C-16	26,8	26,4
C-17	48,8	48,3
C-18	55,3	54,6
C-19	73,8	72,7
C-20	43,2	42,4
C-21	27,4	27,1
C-22	39,2	38,5
C-23	28,8	29,2
C-24	17,7	17,7
C-25	17,1	16,9
C-26	17,6	17,2
C-27	25,0	24,7
C-28	181,1	180,6
C-29	27,2	27,1
C-30	16,7	16,9

 $2\alpha,3\beta, 19\alpha$ -tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico

Ácido de tormêntico ou ácido $2\alpha,3\beta, 19\alpha$ -tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico é um triterpeno pentacíclico oriundo do metabolismo secundário de planta, sendo encontrado em uma variedade de plantas, tais como *Ocotea suaveolens*, *Desfontainia spinosa*, *Vochysia divergens Pohl* e *Hyptis capitata*¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Os triterpenos pentacíclicos isolados desta última espécie apresentaram citotoxicidade *in vitro* significativa em tumores de células de cólon humanas HCT-8¹⁵². O ácido tormêntico isolado do caule de *O. suaveolens* apresenta atividade antinociceptiva contra dose aguda visceral, neurogênica e inflamatória causadas por ácido acético e formalina em ratos¹⁴⁸. A ação do ácido tormêntico é comparada com a ação de drogas anticonvulsantes no alívio de dores neuropáticas em roedores¹⁵³⁻¹⁵⁶. O ácido tormêntico isolado do caule de *Vochysia divergens* não inibe a formação do edema de pata pela injeção de Adjuvante Completo de Freund. No entanto, o ácido de tormêntico administrado duas vezes por dia, inibiu a alodinia neuropática induzida por ligação parcial notadamente do nervo ciático, com 71% a 91% de inibição¹⁵⁷.

O ácido tormêntico isolado de *Eriobotrya japonica* apresenta resultados satisfatórios quando testados com ação de antidiabética¹⁴⁶. O ácido tormêntico isolado de *Chaenomeles sinensis* Koehne apresenta potente atividade antitumor¹⁴⁷. Portanto, muitos estudos descritos na literatura mostram uma ação farmacológica que inclui resposta antiinflamatória do ácido tormêntico¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

10. Análise de Ca-EH-1

O isolamento de **Ca-EH-1** por CC nas primeiras frações hexânicas do extrato hexânico e seu baixo ponto de fusão (49,5 – 63,4 °C) indicam tratar-se de uma estrutura de baixa polaridade. O cromatograma de CG de **Ca-EH-1** é apresentado na Figura IV.83. O cromatograma mostra uma mistura de várias substâncias com TR entre 9 e 17 min. A comparação com padrões indicou tratar-se de uma mistura constituída principalmente por hidrocarbonetos alifáticos C₂₉ a C₃₇.

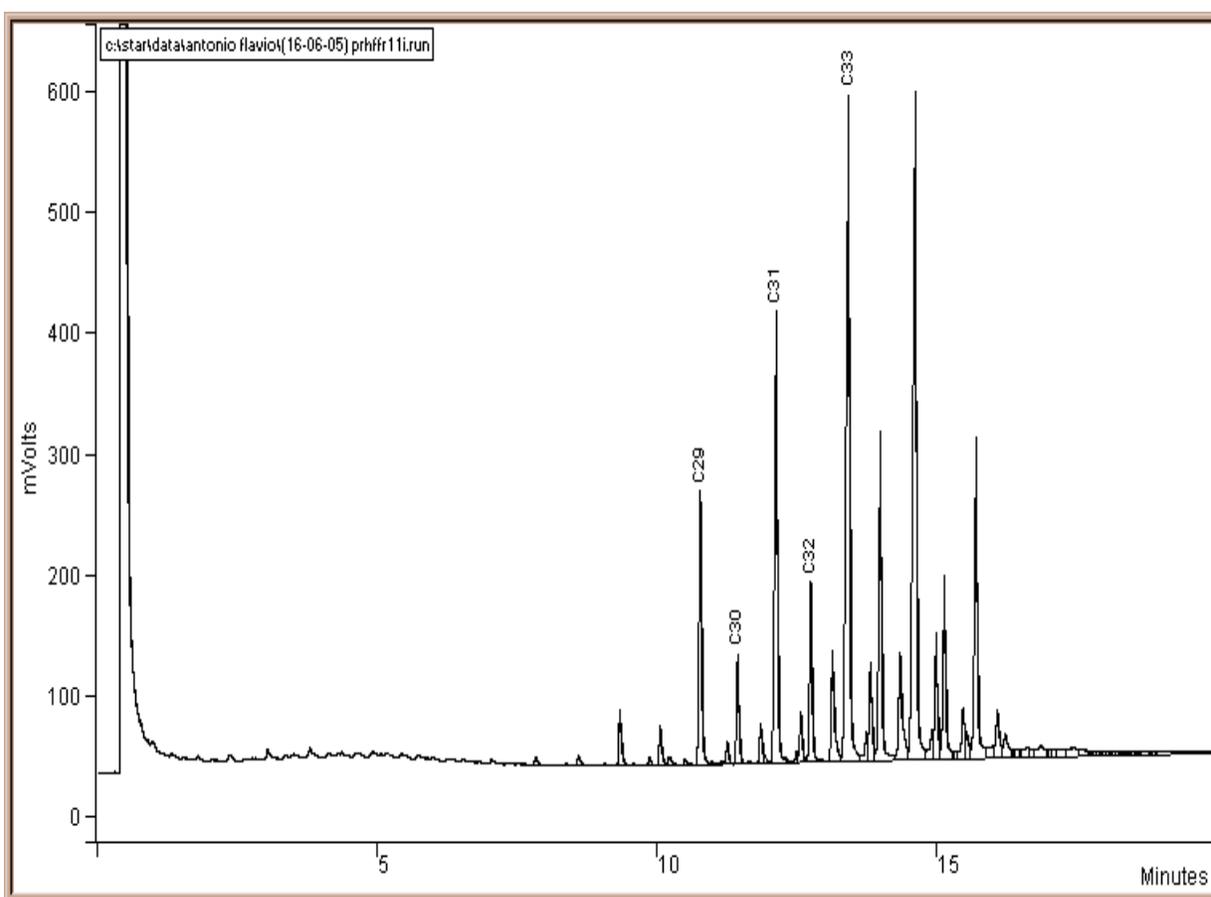


Figura IV.83. Cromatograma de CG de **Ca-EH-1** (Coluna: SE54 30 m x 0.32 mm; temperaturas: coluna 150 °C, aquecimento 10 °C/min, 300 °C; injetor 300 °C; detector 300 °C; “split” 1/100; fluxo 2 mL/min).

11. Análise de Ca-EE-1

O sólido branco obtido **Ca-EE-1** ($m = 0,1485$ g) apresentou fusão entre 133,6 e 137,4 °C. Os dados físicos e químicos de **Ca-EE-1** apresentaram-se semelhantes a **Fo-EE-3**, indicando tratar-se de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol. A Figura IV.84 apresenta o espectro de RMN de ^1H de **Ca-EE-1**. A relação entre as integrações dos sinais em δ_{H} 5,35 (H-6 do β -sitosterol e estigmasterol) e 4,95 (H-22 e H-23 do estigmasterol) indicam uma proporção de estigmasterol: β -sitosterol igual a 1,00:1,74.

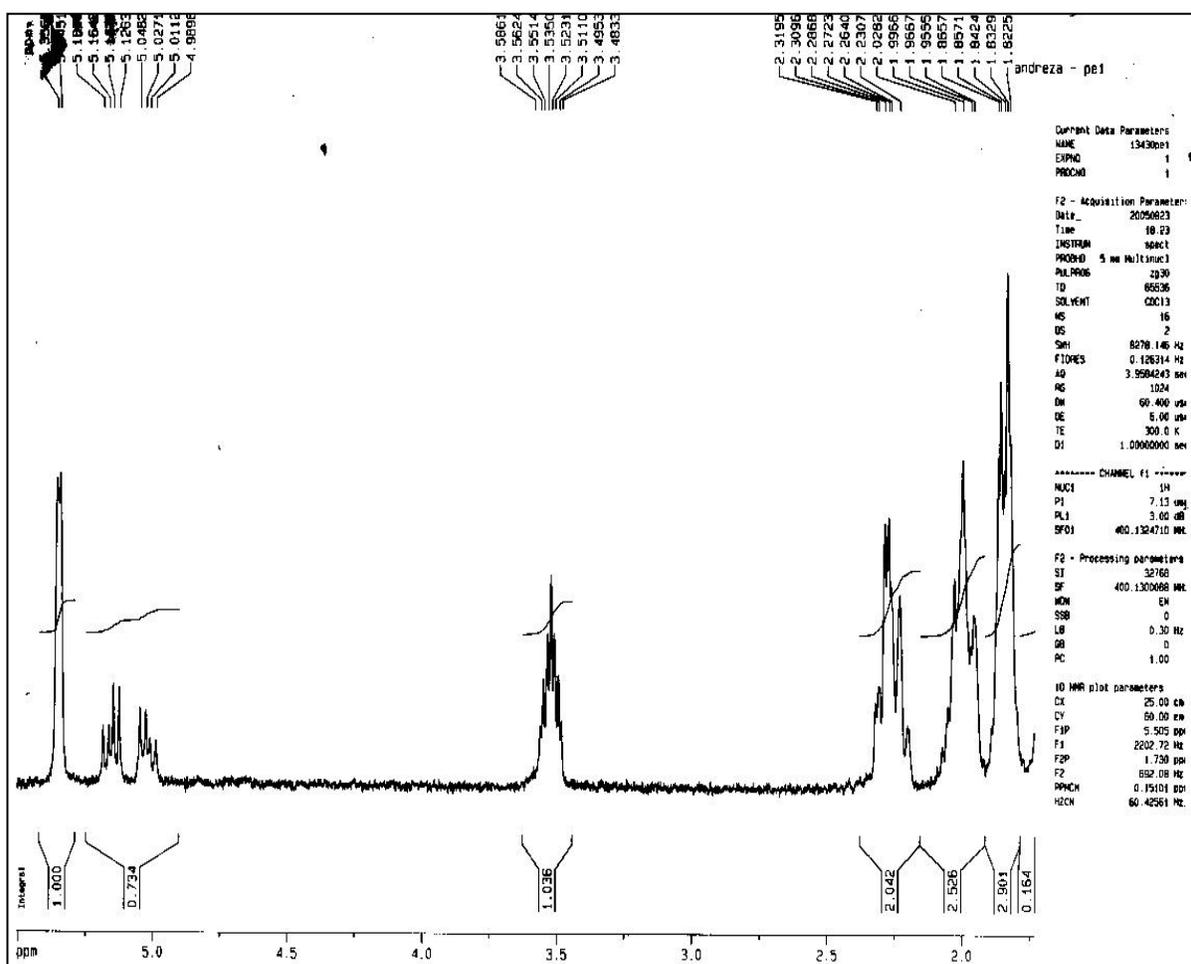


Figura IV.84. Espectro de RMN de ^1H de **Ca-EE-1** (400 MHz; CDCl_3 ; TMS).

12. Análise de Ca-EE-2

O sólido branco **Ca-EE-2** (4,39 mg) apresentou fusão entre 131,5 e 135,0 °C. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C são idênticos aos registrados nos espectros de **Ca-EE-1**. A Figura IV.85 mostra o espectro de RMN de ^1H , indicando uma mistura de β -sitosterol:estigmasterol (0,98:1,00).

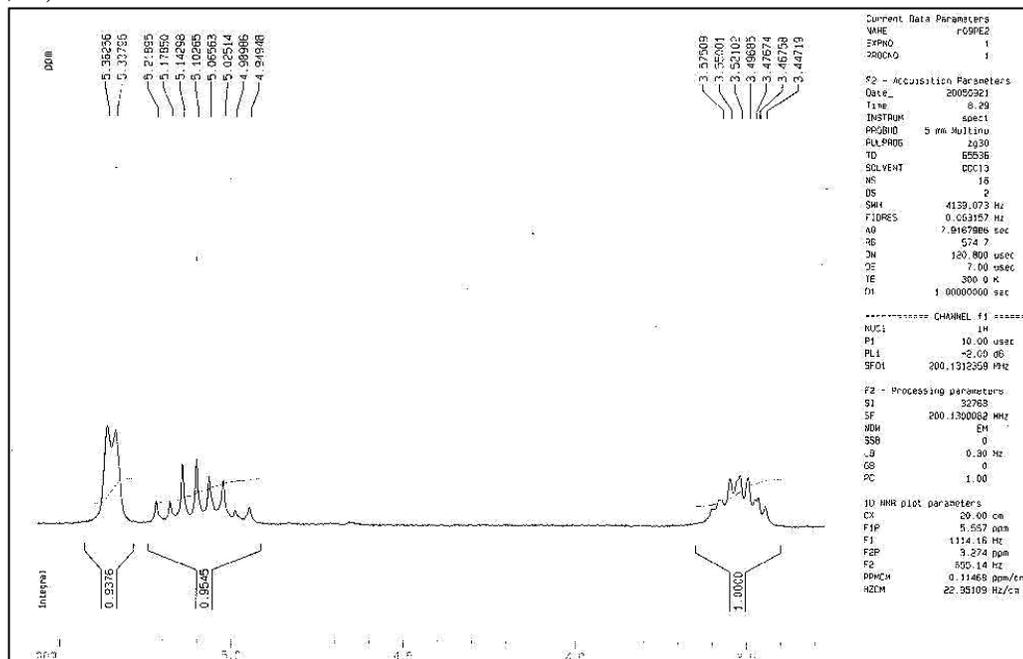


Figura IV.85. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **Ca-EE-2** (200 MHz; CDCl_3) na região entre δ_{H} 5,36 – 3,40.

13. Análise de Ca-EE-3

O sólido **Ca-EE-3** (45,1 mg) apresentou ponto de fusão na faixa entre 218,9 e 222,7 °C e teste de Líberman-Buchard positivo para triterpenos pentacíclicos. As Figuras IV.86 a IV.92 apresenta os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C 1D e 2D de **Ca-EE-3**, mostrando muita semelhança com os dados correspondentes de **FI-EE-1** (ácido ursólico) apresentado na seção 8 (pág. 89). No caso, **Ca-EE-3** apresenta-se de acordo com os dados de $3\beta\text{-OH}$, 28-COOMe, metilursolato⁷⁶, conforme Tabela IV.6 (pág. 134).

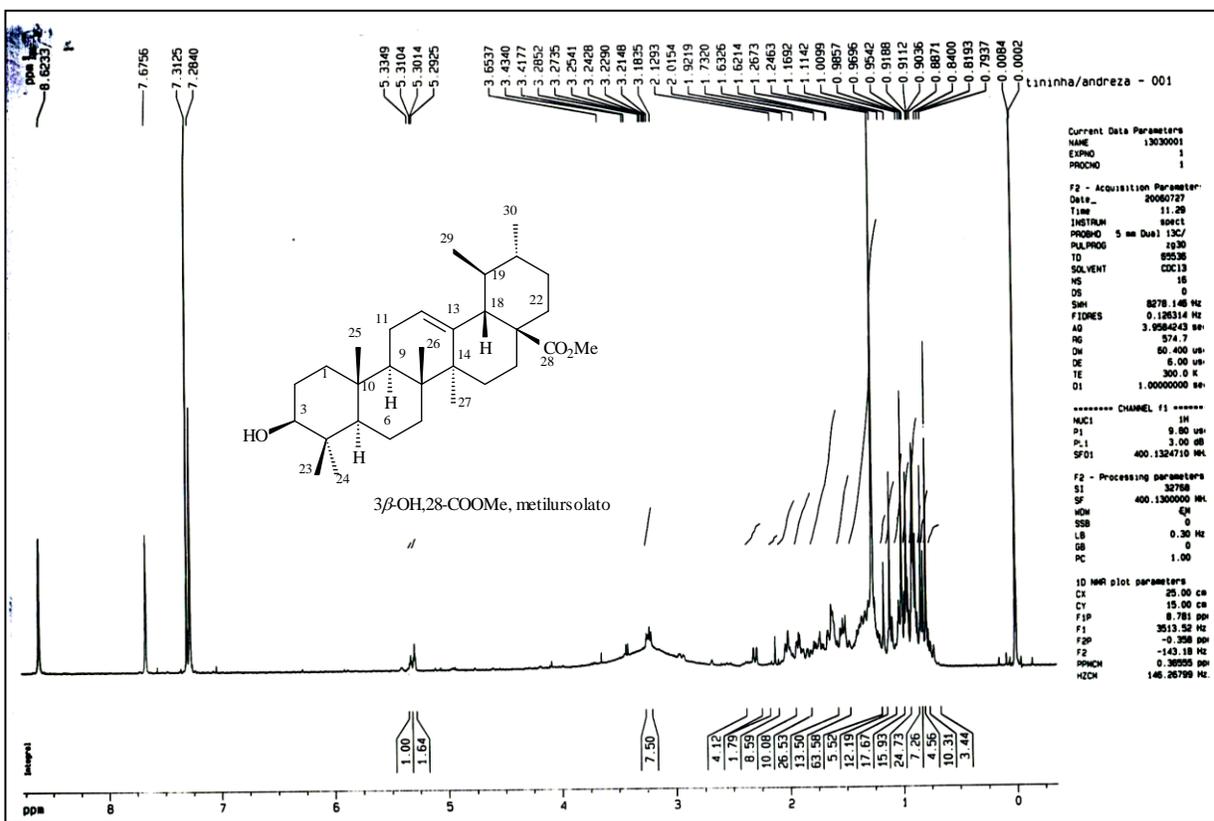


Figura IV.86. Espectro de RMN de ¹H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl₃).

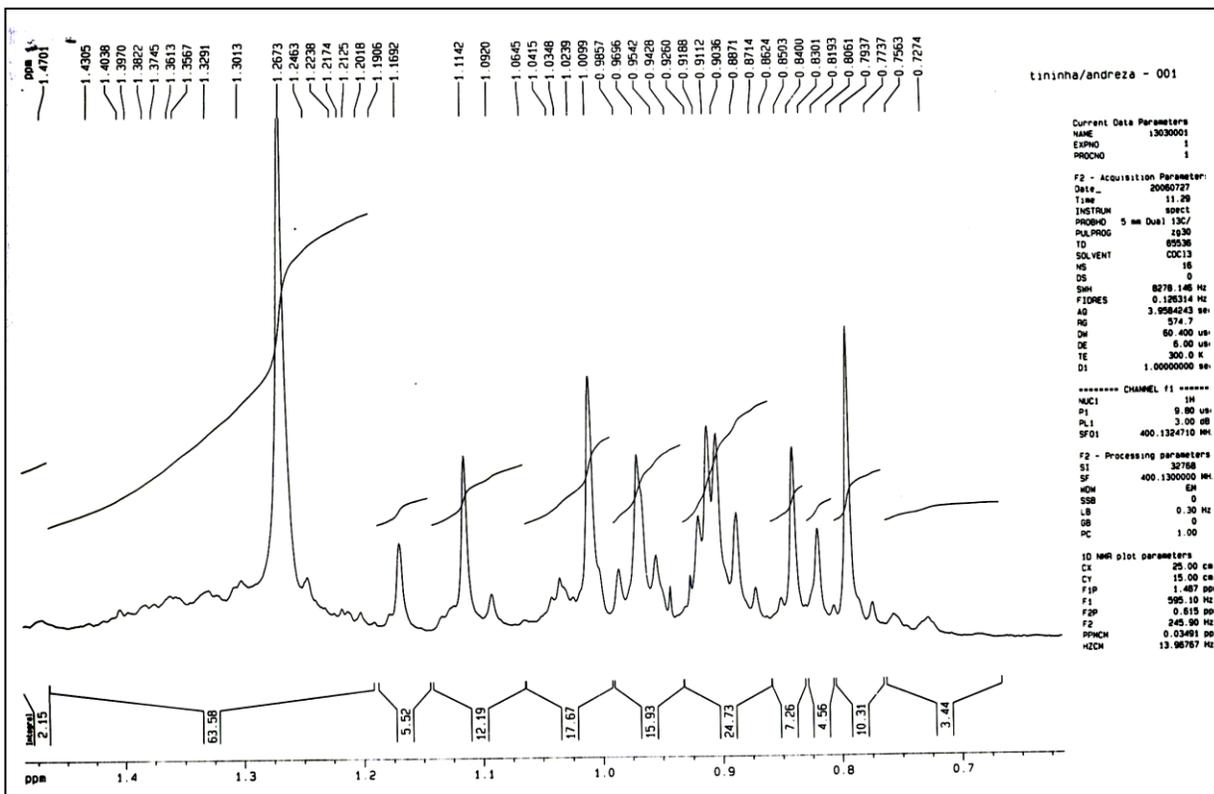


Figura IV.87. Ampliação do espectro de RMN de ¹H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl₃), em δ_H 1,4 – 0,7.

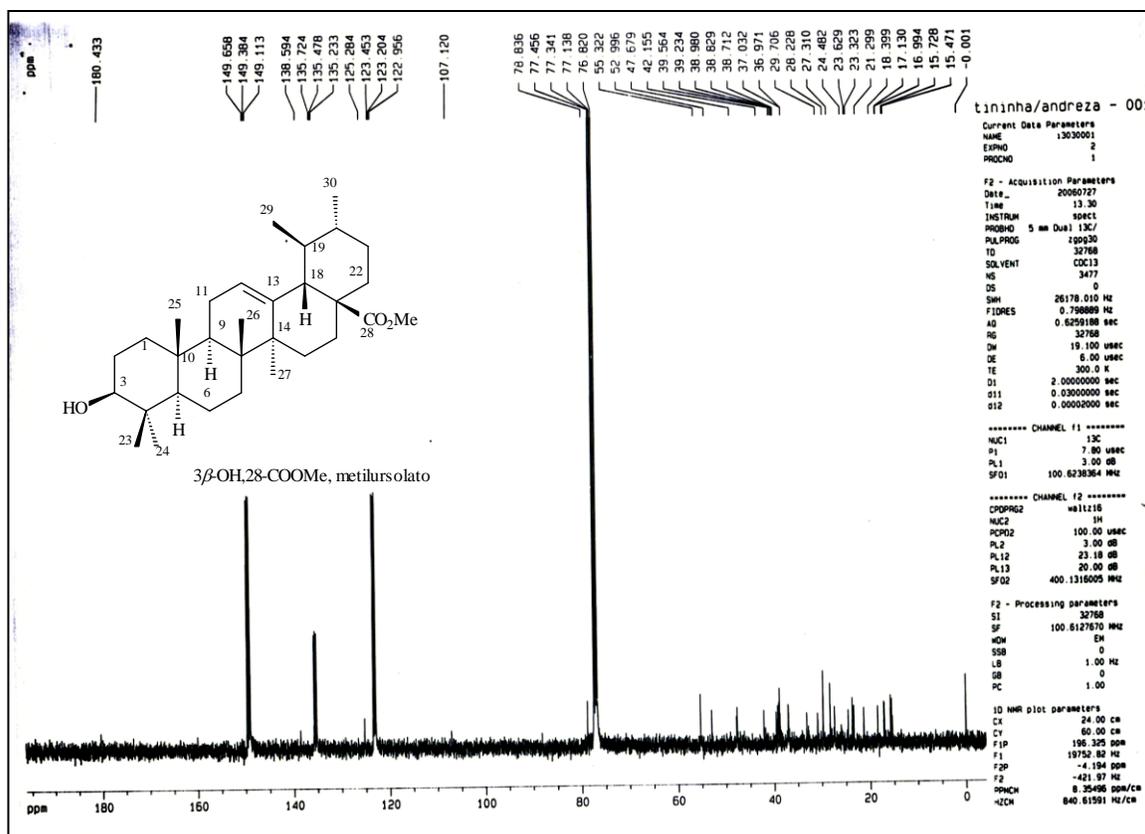


Figura IV.88. Espectro de RMN de ^{13}C de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl_3).

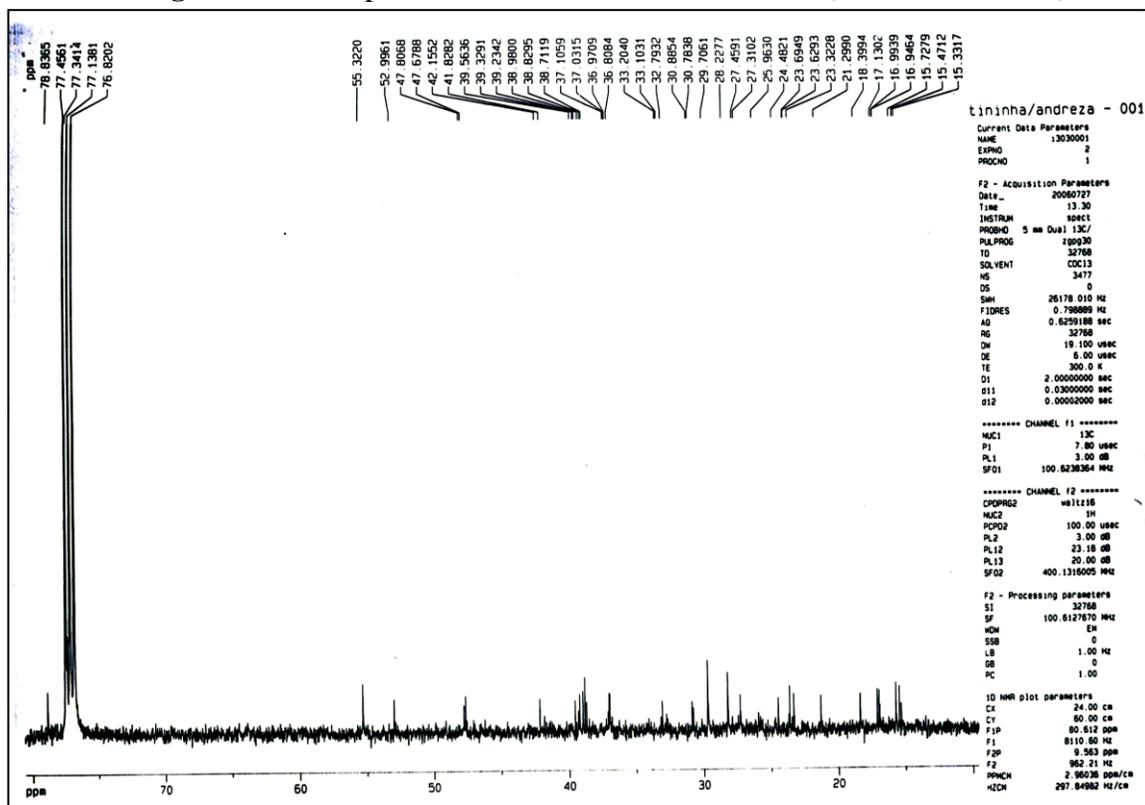


Figura IV.89. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl_3), em δ 80,0 – 15,3.

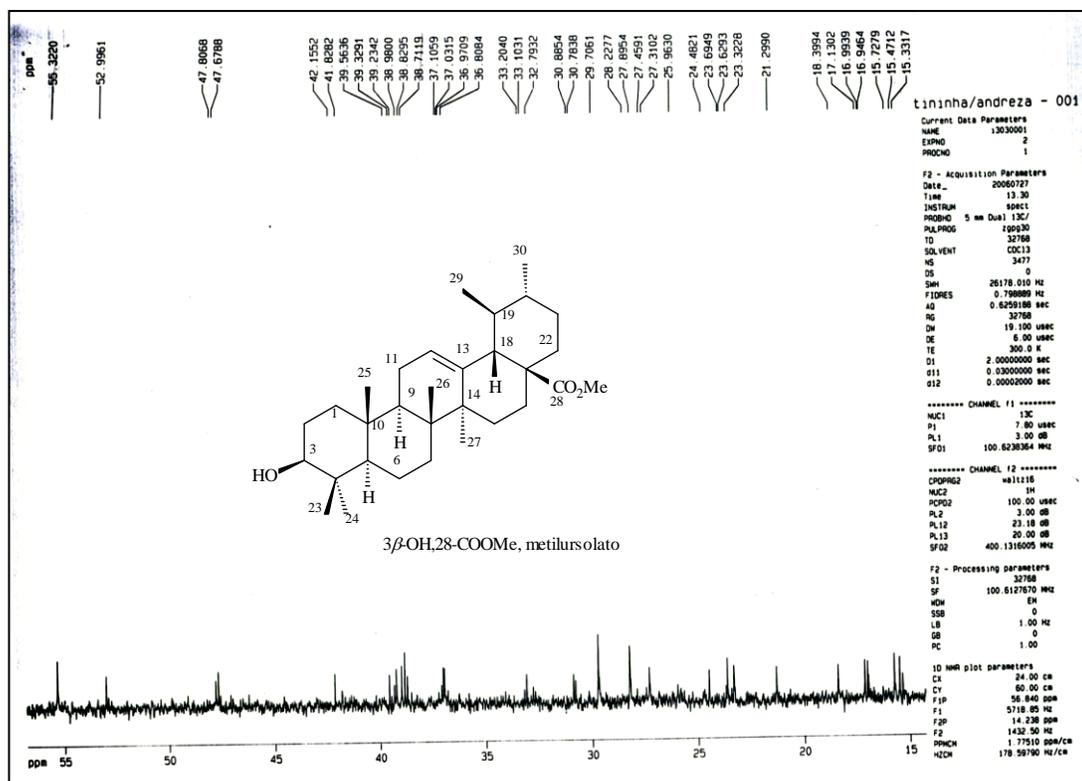


Figura IV.90. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **Ca-EE-3** (400 MHz; CDCl_3), em δ_c 56,6 – 15,3.

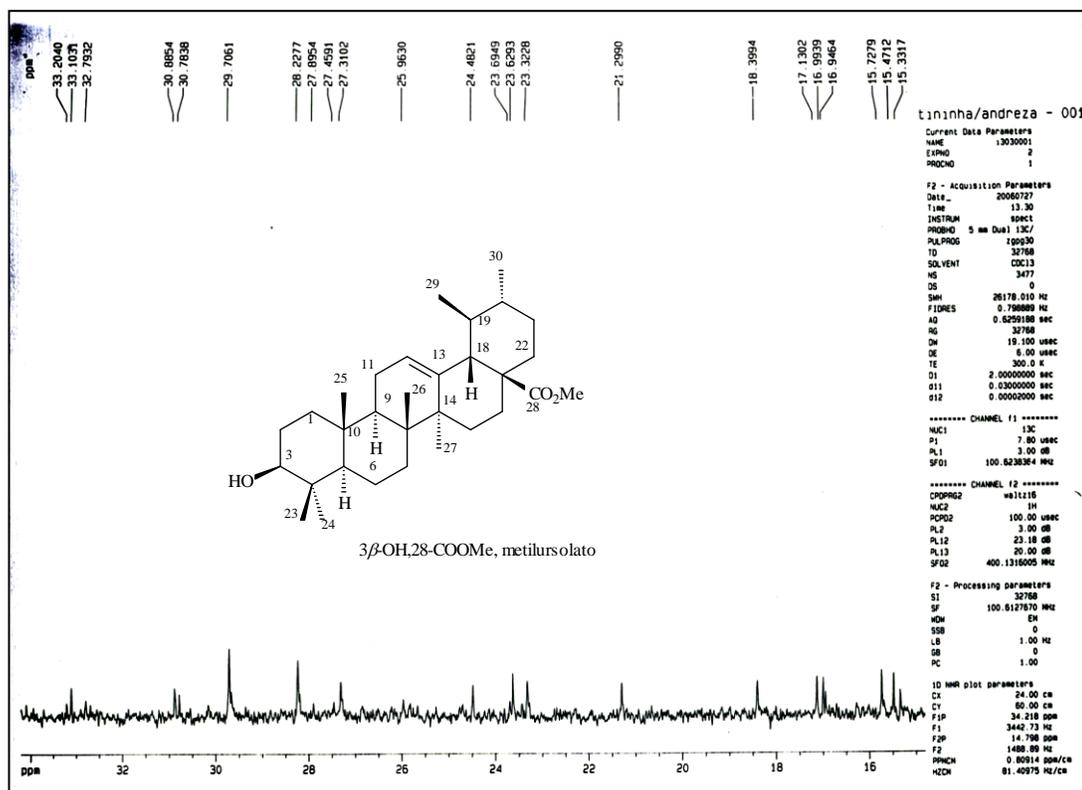


Figura IV.91. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **Ca-EE-3** (400 MHz; CDCl_3), em δ_c 33,2 – 15,3.

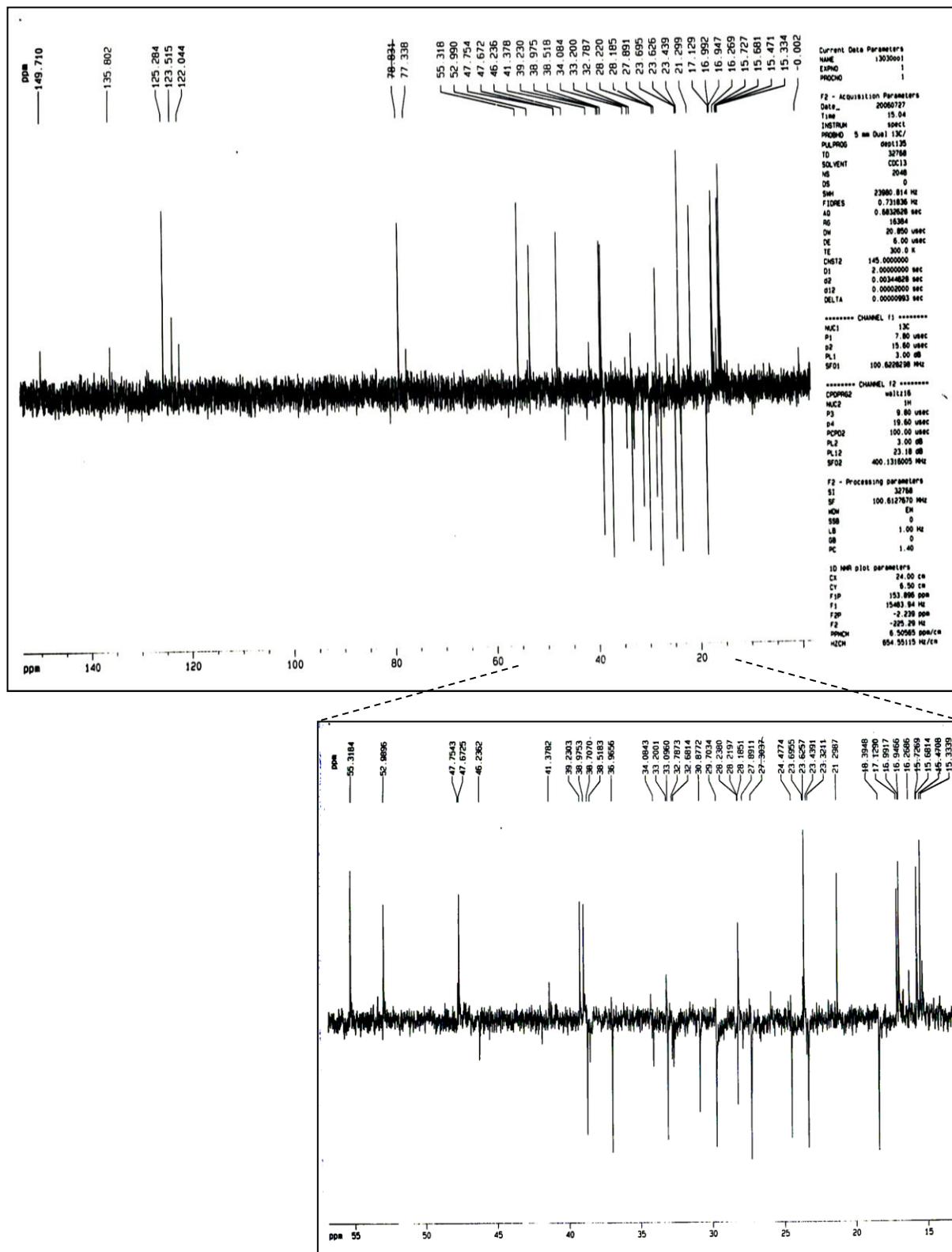
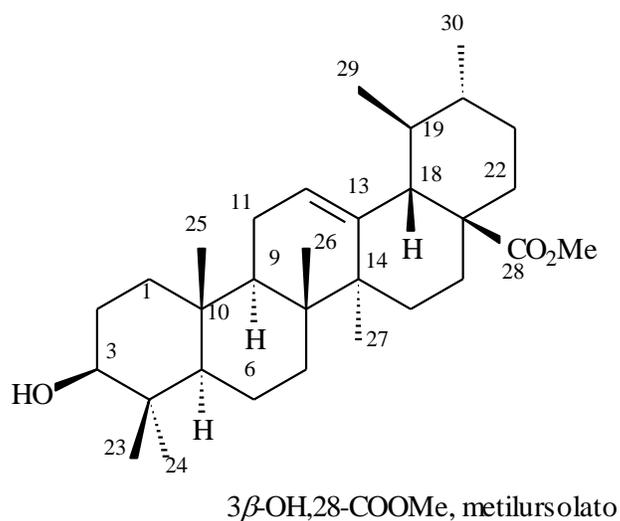


Figura IV.92. Subespectro DEPT 135° de Ca-EE-3 (400 MHz; CDCl₃) e ampliação na região entre δ_c 55,3 – 15,3.

Tabela IV.6. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de **Ca-EE-3** e de $3\beta\text{-OH. 28-COOME}$, metilursolato

Átomo	Ca-EE-3 δ_c	$3\beta\text{-OH. 28-COOME}$, metilursolato δ_c
C-1	38,7	38,8
C-2	27,3	27,3
C-3	78,8	78,8
C-4	38,8	38,8
C-5	55,3	55,4
C-6	18,4	18,4
C-7	33,1	33,0
C-8	39,6	39,6
C-9	47,7	47,5
C-10	37,1	37,0
C-11	23,3	23,3
C-12	125,3	125,5
C-13	138,5	138,0
C-14	42,1	42,0
C-15	28,2	28,2
C-16	24,5	24,3
C-17	47,8	48,1
C-18	53,0	52,8
C-19	39,2	39,1
C-20	39,0	38,8
C-21	30,9	30,7
C-22	37,0	36,7
C-23	28,2	28,2
C-24	15,5	15,5
C-25	15,7	15,7
C-26	17,0	16,9
C-27	23,6	23,6
C-28	180,4	177,8
C-29	17,1	16,9
C-30	21,3	21,2
O- <u>CH</u> ₃	52,8	53,0



14. Análise de Ra-EH-1

O isolamento de **Ra-EH-1** (5,0 mg) por CC nas primeiras frações hexânicas do extrato hexânico e o seu baixo ponto de fusão (52,4 – 53,3 °C) indicam tratar-se de uma estrutura de baixa polaridade. O cromatograma de CG de **Ca-EH-1** é apresentado na Figura IV.93. O cromatograma mostra uma mistura de várias substâncias com TR entre 6 e 17 min. A comparação com padrões indicou tratar-se de uma mistura constituída principalmente por hidrocarbonetos alifáticos C₂₅ a C₃₅.

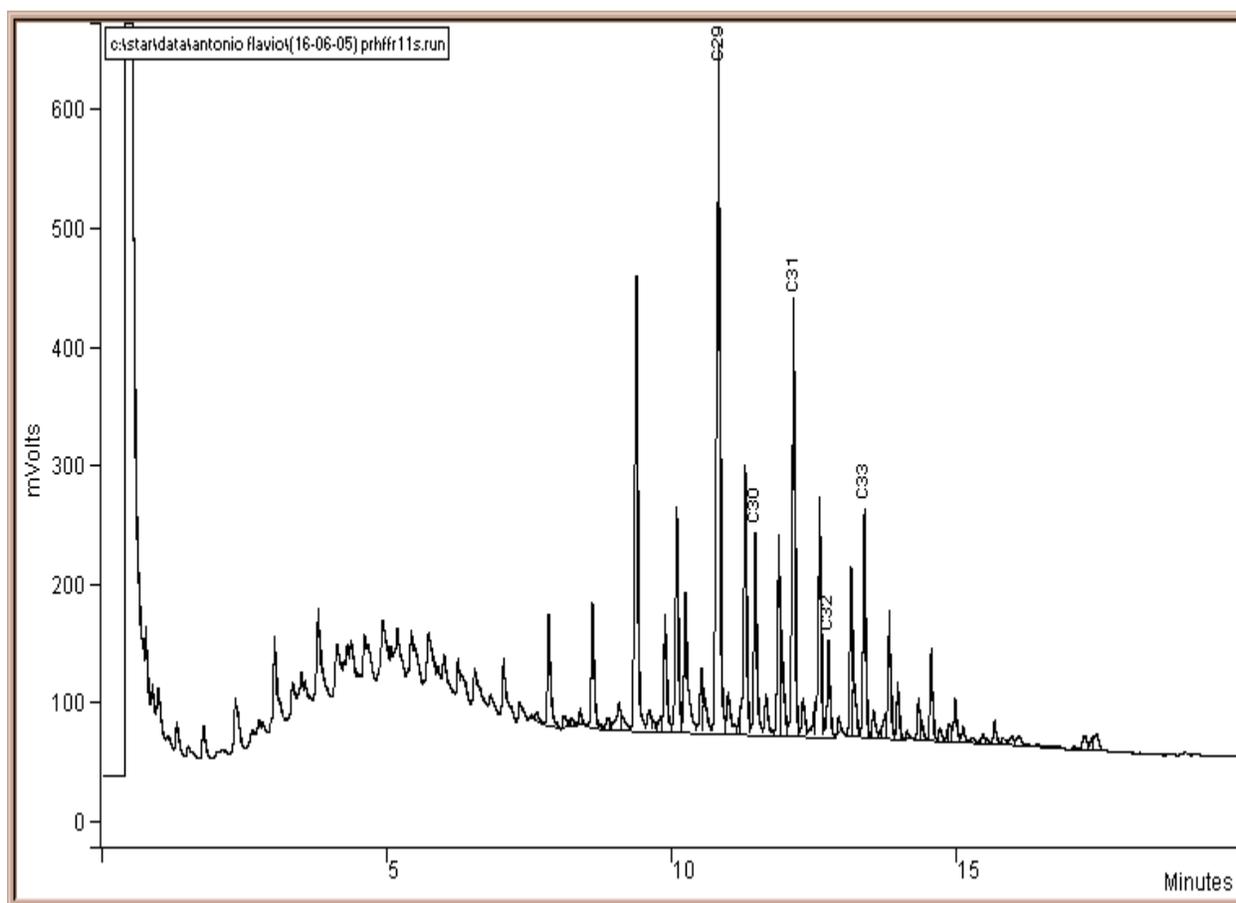


Figura IV.93. Cromatograma de CG de **Ra-EH-1** (Coluna: SE54 30 m x 0.32 mm; temperaturas: coluna 150 °C, aquecimento 10 °C/min; injetor 300 °C; detector 300 °C; “split” 1/100; fluxo 2 mL/min).

15. Análise de Ra-EE-1

O sólido branco **Ra-EE-1** (9,0 mg) apresentou fusão entre 146,9 e 148,1 °C. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C são idênticos aos registrados nos espectros de **Fo-EE-3**. A Figura IV.94 mostra o espectro de RMN de ^1H , indicando tratar-se de uma mistura de β -sitosterol:estigmasterol (1,41:1,00).

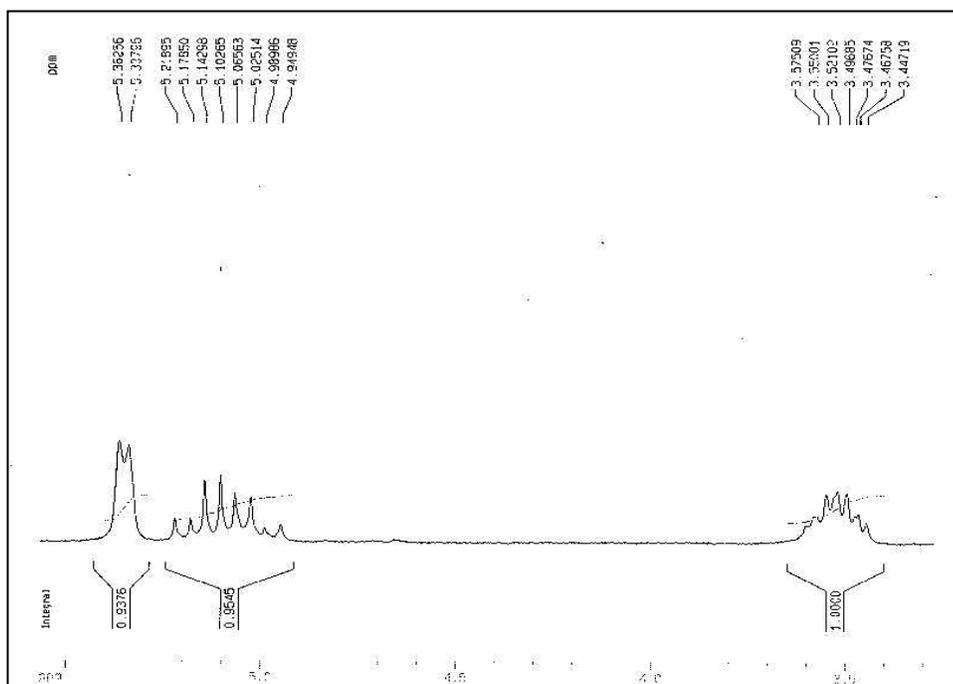


Figura IV.94. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **Ra-EE-1** (CDCl_3) na região entre δ_{H} 5,36 – 3,40.

16. Análise de Ra-EE-2

O sólido branco **Ra-EE-2** (2,9 mg) apresentou teste Liebermann Bourchard positivo para esteróides. A Figura IV.95 apresenta o espectro de RMN de ^1H de **Ra-EE-2**. Os sinais em δ_{H} 5,25 e 5,05 indicam uma mistura de esteróides constituída por β -sitosterol:estigmasterol (0,45:1,00). O ponto de fusão na faixa entre 282,9 – 285,6 °C indica que esses esteróides

apresentam-se substituídos. Os sinais em δ_H 4,43 (triplete), 4,23 (duplete), 3,65 (multiplete) podem ser atribuídos a hidrogênios hidroxílicos. Os sinais na região entre δ_H 3,30 e 2,80 podem ser atribuídos a hidrogênio de carbonos hidroxilados. Portanto, pode-se propor que estes esteróides apresentam-se glicosilados.

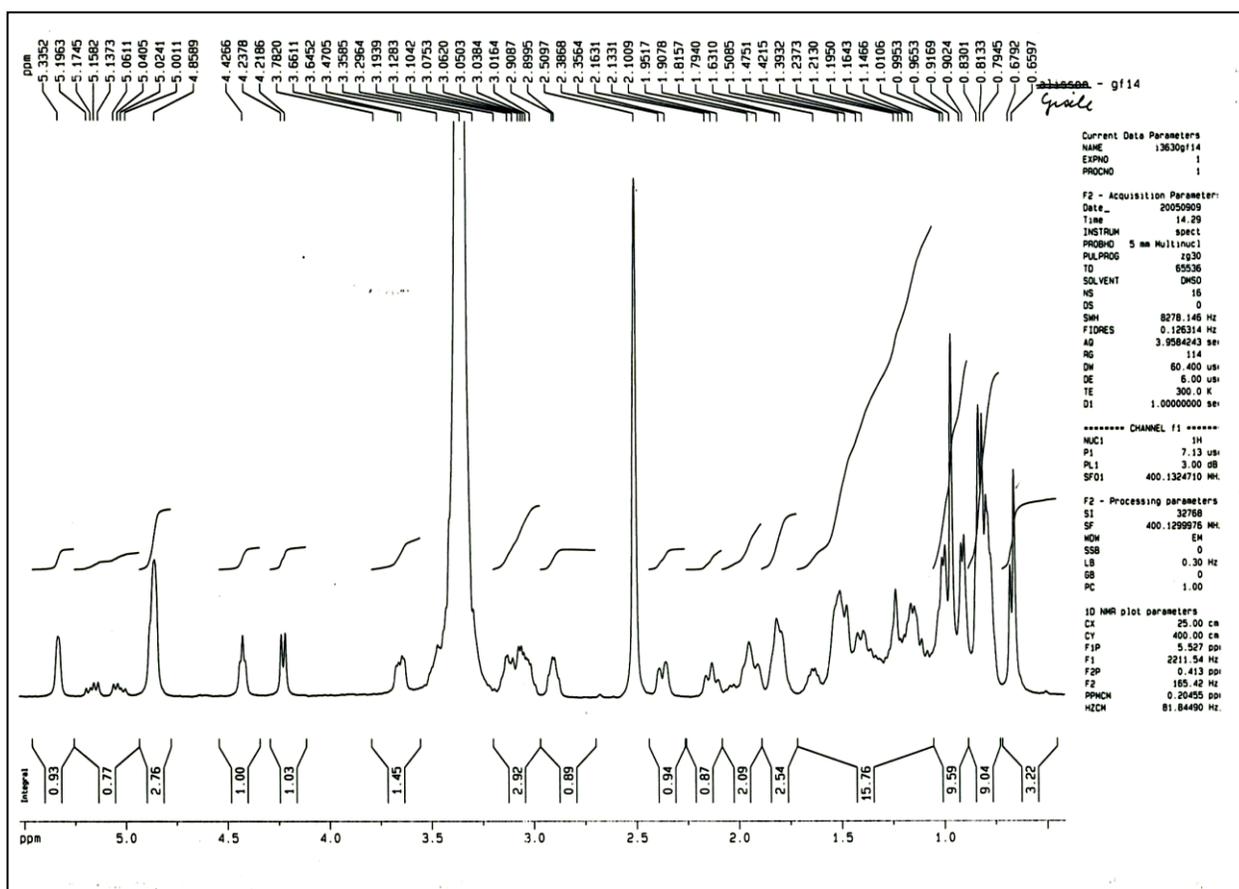


Figura IV.95. Espectro de RMN de ^1H de **Ra-EE-2** (400 MHz; CDCl_3).

As Figuras IV.96 e IV.97 apresentam o espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° de **Ra-EE-2**, respectivamente. O espectro mostra sinais de carbono característicos de β -sitosterol e estigmasterol. Além disso, os sinais de carbonos metínicos em δ_C 100,8, 76,9, 73,5 e 70,1 e o sinal de carbono metilênico em δ_C 61,1 podem ser atribuídos a carbonos da parte glicona.

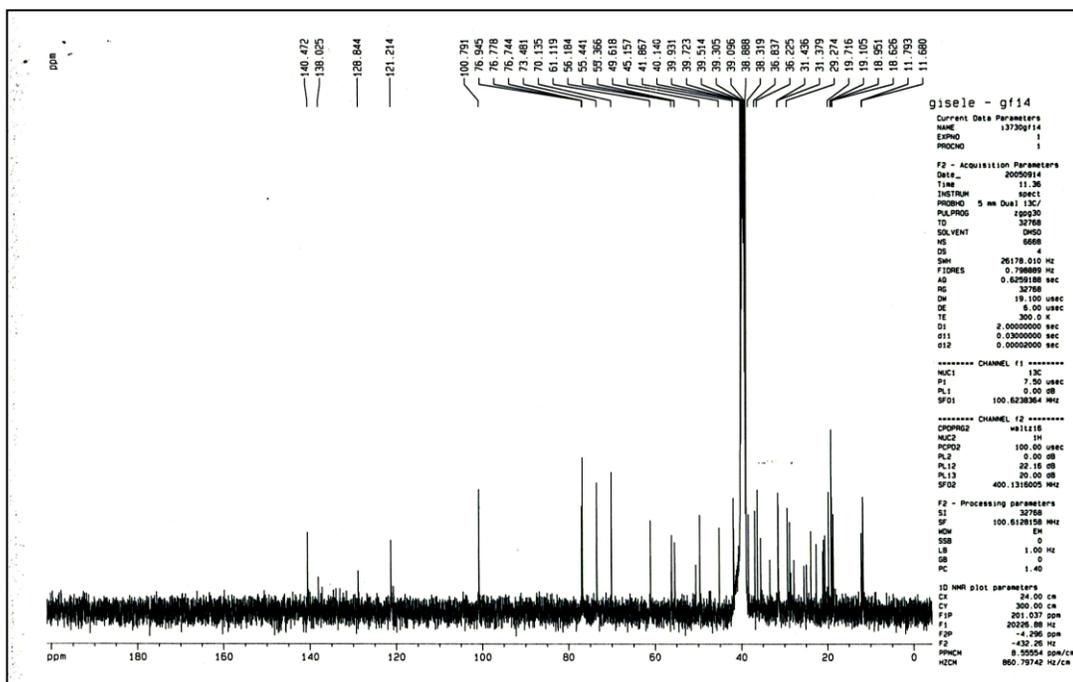


Figura IV.96. Espectro de RMN de ^{13}C de **Ra-EE-2** (100 MHz; CDCl_3).

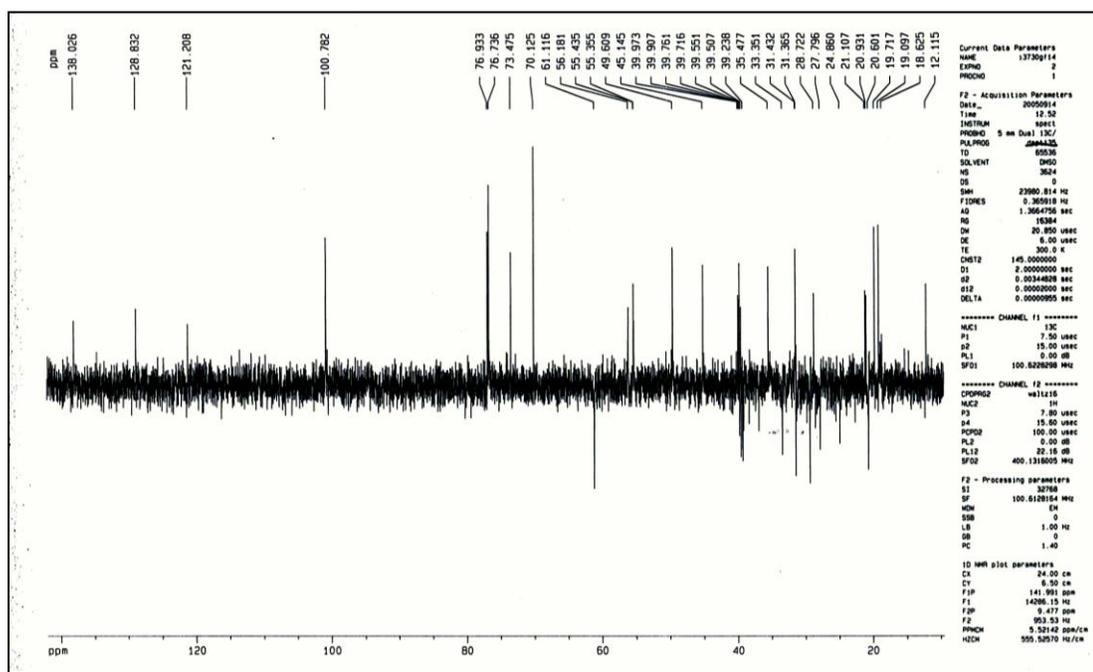


Figura IV.97. Subespectro DEPT 135° de **Ra-EE-2** (100 MHz; CDCl_3).

As estruturas desses esteróides (Figura IV. 98) foram determinadas pelas análises por RMN e comparação com dados descritos na literatura (Tabela IV. 7) para 3-*O*- β -D-glicopiranosíl-sitosterol^{160,161} e 3-*O*- β -D-glicopiranosíl-estigmasterol^{162,163}

Tabela IV.7. Atribuições dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C (em ppm)

Átomo	LC-4 ¹⁶³ $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	Ra-EE-2 $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	Ra-EE-2 $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	DEPT $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HIDROGÊNIO $\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ [mult. <i>J</i> (Hz), n. H]
C1	37,3	36,8	36,8	CH ₂	2,3 (t, 1H)
C2	30,0	29,2	29,2	CH ₂	3,30 - 2,80 (m)
C3	78,4	76,9	76,9	CH	4,43
C4	39,1	39,0	39,0	CH ₂	2,37 (d, 12,2)
C5	140,9	140,5	138,0	C	-
C6	121,8	121,2	128,8	CH	5,33 (d, 1H)
C7	31,9	31,4	31,4	CH ₂	1,95 - 1,14
C8	31,8	31,4	31,4	CH	1,95 - 1,14
C9	50,1	49,6	49,6	CH	1,95 - 1,14
C10	36,7	36,2	36,2	C	-
C11	21,0	20,9	20,9	CH ₂	1,95 - 1,14
C12	39,7	39,7	39,7	CH ₂	1,95 - 1,14
C13	42,3	41,8	41,8	C	-
C14	56,6	56,2	56,2	CH	1,95 - 1,14
C15	24,3	24,8	24,8	CH ₂	1,95 - 1,14
C16	28,6	28,7	28,7	CH ₂	1,95 - 1,14
C17	56,0	55,4	55,4	CH	1,95 - 1,14
C18	11,7	12,1	12,1	CH ₃	0,66 (s, 3H)
C19	19,2	19,1	19,1	CH ₃	1,01 - 0,69
C20	36,2	35,4	35,4	CH	1,95 - 1,14
C21	18,9	18,9	18,9	CH ₃	1,01 - 0,69
C22	34,0	33,5	138,0	-	1,65; 5,16 (dd,8,6; 15)
C23	26,1	27,7	128,8	-	1,50; 5,05 (dd,8,6; 15)
C24	45,8	45,1	45,1	CH	1,95 - 1,14
C25	29,2	31,3	31,3	CH	1,95 - 1,14
C26	18,7	18,6	18,6	CH ₃	1,01 - 0,69
C27	19,7	19,7	19,7	CH ₃	1,01 - 0,69
C28	23,1	21,7	21,7	CH ₂	1,95 - 1,14
C29	11,9	11,8	11,8	CH ₃	1,01 - 0,69
C1'	102,5	100,8	100,8	CH	4,22 (d, 7,7, 1H)
C2'	75,0	73,5	73,5	CH	2,90 (m); 4,85(OH)
C3'	77,0	76,7	76,7	CH	3,69 (m); 3,13-3,01 (m) /a
C4'	71,5	70,1	70,1	CH	3,13 - 3,01 (m)
C5'	78,1	76,9	76,9	CH	3,13 - 3,01 (m)
C6'	62,6	61,1	61,1	CH ₂	3,78-3,47 (m)/b;

LC-4 = Glicopiranosídeosilsistosterol (a) CDCl_3 , 75 MHz; (b) 100 MHz; MeOD; (c) 400 MHz; CDCl_3

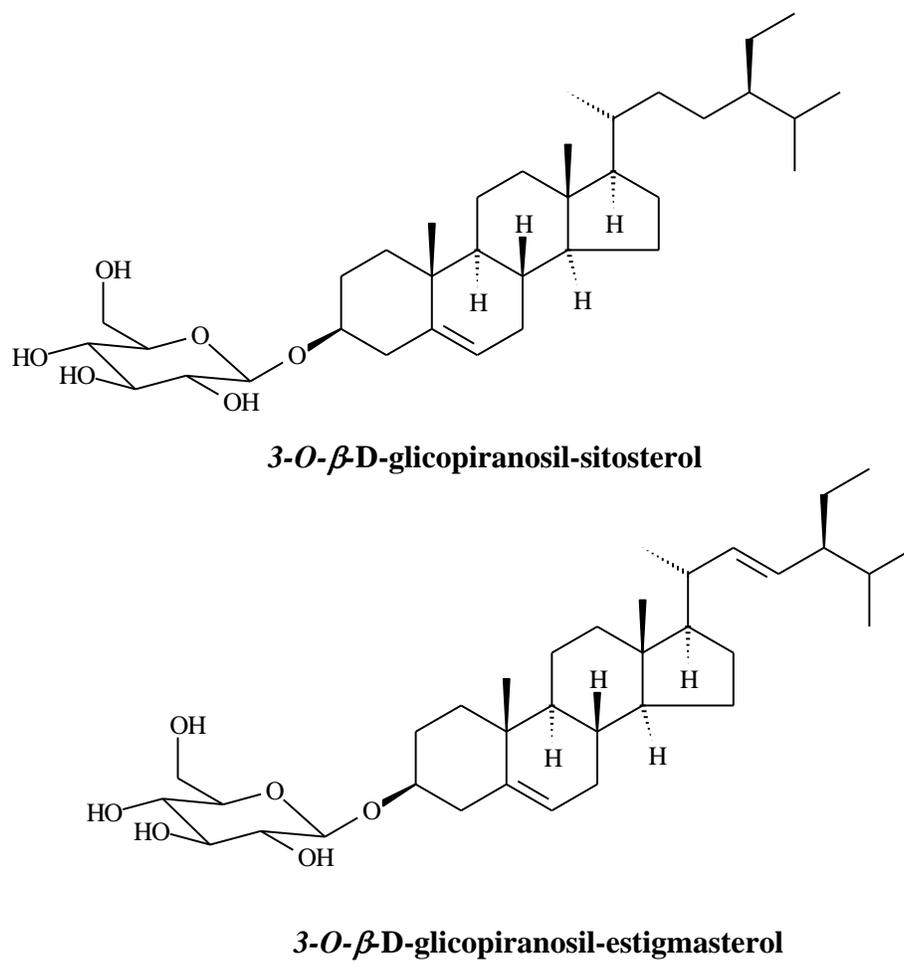


Figura IV.98. Estrutura química de esteróides glicosilados.

CAPÍTULO V:

ANÁLISE DOS TESTES BIOLÓGICOS

1. Determinação da DME com os extratos etanólicos da primeira coleta

O material vegetal da primeira coleta foi submetido à extração em hexano e, posteriormente, em etanol. Os testes para a verificação da neutralização da atividade Edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* foram realizados com parte dos extratos em etanol das folhas (Fo-EE), flores (Fl-EE) e caule (Ca-EE). Cada extrato (100 μL) foi diluído em 900 μL de solução salina. Apenas o extrato Fl-EE (100 μL) foi diluído em 800 μL de solução salina e 100 μL de Twenn 20 para auxiliar na homogeneização. A dose de veneno utilizada nos experimentos de neutralização correspondeu a três Doses Mínimas Edematogênicas ($3 \times 1,2 \mu\text{g}/\text{animal} = 3,6 \mu\text{g}/\text{animal}$) em um volume de 50 μL .

Para avaliação da neutralização dos extratos vegetais obtidos de *Peltodon radicans* foram formados quatro grupos com três camundongos cada. Três grupos foram utilizados para avaliar a neutralização da atividade de edematogênica do veneno de *B. atrox* pelos extratos das folhas (Fo-EE), flores (Fl-EE) e caule (Ca-EE) e um grupo foi utilizado como controle, o qual recebeu veneno, no coxim plantar da pata direita; salina no coxim plantar da pata esquerda; e o veículo, solução salina, por via intraperitoneal (i.p.). No coxim plantar da pata direita (**P.D.**) foi injetado o veneno e no coxim plantar da pata esquerda (**P.E.**) foi injetada a solução salina. Os extratos foram injetados simultaneamente intraperitonealmente em volume de 0,1 mL. O edema (**E%**) foi avaliado pela diferença entre as espessuras do coxim da pata experimental e da pata controle, dividida pela espessura do coxim da pata controle e o resultado obtido foi multiplicado por 100. Assim, % de Edema = $(V_f - V_i) / V_i \times 100$. A inibição (**I%**) foi calculada pelo valor médio da % de Edema do extrato dividido % de Edema do controle, dado em percentagem. A neutralização (**N%**) foi calculada subtraindo de 100% o valor obtido de **I%**. As mensurações das patas foram realizadas nos tempos de 2, 4 e 6 horas após aplicação.

A Tabela V.1 expressa os dados da leitura dos testes de neutralização da atividade Edematogênica após 2 horas da aplicação dos extratos FI-EE, Fo-EE e Ca-EE. O extrato FI-EE apresentou um valor positivo de neutralização do veneno ($N\% = 23,39$) e os demais extratos apresentaram valores negativos, sendo a neutralização empregando o extrato FI-EE ($N\% = -49,65$) menor em relação ao extrato Ca-EE ($N\% = -17,33$). Esses resultados mostram um efeito de neutralização efetivo apenas do extrato FI-EE.

Tabela V.1. Testes de DME após 2 h da aplicação dos extratos FI-EE, Fo-EE e Ca-EE

Extrato	P.D. ^a (mm)	P.E. ^b (mm)	E% ^c	Média	I% ^d	N% ^e
FI-EE	3,74	2,95	26,78	34,77	76,61	23,39
	4,65	3,32	40,06			
	4,11	2,99	37,46			
Fo-EE	5,06	2,87	76,31	67,91	149,65	-49,65
	4,49	2,42	85,54			
	4,20	2,96	41,89			
Ca-EE	4,51	2,59	74,13	53,25	117,33	-17,33
	4,36	2,94	48,30			
	4,49	3,27	37,31			
Controle	4,61	2,96	55,74	45,38		
	4,16	2,95	41,02			
	4,53	3,25	39,38			

(a) **P.D.** = espessura da pata direita, onde foi aplicado o veneno; (b) **P.E.** = espessura da pata esquerda, onde foi aplicada a salina; (c) **E%** = porcentagem de edema; (d) **I%** = porcentagem de inibição em relação ao grupo controle; (e) **N%** = porcentagem de neutralização.

A Tabela V.2 apresenta os dados da leitura dos testes de neutralização após 4 horas da aplicação dos extratos FI-EE, Fo-EE e Ca-EE. Os extratos FI-EE e Ca-EE apresentaram

valores positivos de neutralização do veneno ($N\% = 34,67$ e $7,44$, respectivamente) e extrato Fo-EE apresentou valor negativo ($N\% = -51,45$). Para os extratos FI-EE e Ca-EE, os resultados mostram um efeito de neutralização mais acentuado após 4 h de aplicação (Tabela V.2) em relação a 2 h de aplicação (Tabela V.1). O efeito de neutralização do extrato Fo-EE após 4 horas de aplicação manteve-se similar ao verificado após 2 h de aplicação, indicando não ser efetivo na neutralização.

Tabela V.2. Testes de DME após 4 h da aplicação dos extratos FI-EE, Fo-EE e Ca-EE

Extrato	P.D. ^a (mm)	P.E. ^b (mm)	E% ^c	Média	I% ^d	N% ^e
FI-EE	3,51	2,95	18,98	21,23	65,33	34,67
	3,72	3,04	22,37			
	3,78	3,09	22,33			
Fo-EE	4,33	2,75	57,45	49,21	151,45	-51,45
	4,86	3,00	62,00			
	4,05	3,16	28,16			
Ca-EE	4,23	3,21	31,78	30,07	92,56	7,44
	4,13	3,06	34,97			
	4,05	3,28	23,48			
Controle	4,12	3,08	33,77	32,49		
	4,03	2,98	35,23			
	4,06	3,16	28,48			

(a) P.D. = espessura da pata direita, onde foi aplicado o veneno; (b) P.E. = espessura da pata esquerda, onde foi aplicada a salina; (c) E% = percentagem de edema; (d) I% = percentagem de inibição em relação ao grupo controle; (e) N% = percentagem de neutralização.

A Tabela V.3 mostra os dados da leitura dos testes, de neutralização da ação Edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, após 6 horas da aplicação dos extratos FI-EE,

Fo-EE e Ca-EE. Os extratos FI-EE e Ca-EE apresentaram valores positivos de neutralização do veneno ($N\% = 57,38$ e $20,89$, respectivamente) e extrato Fo-EE apresentou valor negativo ($N\% = -24,62$). Para os extratos FI-EE e Ca-EE, os resultados mostram um efeito de neutralização mais acentuado após 6 h de aplicação (Tabela V.3) em relação a 4 h (Tabela V.2) e 2 h (Tabela V.1) de aplicação. O efeito de neutralização do extrato Fo-EE após 4 horas de aplicação torna-se menos negativo em relação a 2 h e 4 h, indicando não ser efetivo na neutralização.

Tabela V.3. Testes de DME após 6 h da aplicação dos extratos FI-EE, Fo-EE e Ca-EE

Extrato	P.D. ^a (mm)	P.E. ^b (mm)	E% ^c	Média	I% ^d	N% ^e
FI-EE	3,80	3,68	3,26	14,42	42,62	57,38
	3,63	3,02	20,20			
	3,51	2,93	19,80			
Fo-EE	4,12	2,82	46,10	42,16	124,62	-24,62
	3,90	2,84	37,32			
	4,12	2,88	43,06			
Ca-EE	3,69	3,20	15,31	26,76	79,11	20,89
	3,67	2,99	22,74			
	4,21	2,96	42,23			
Controle	3,99	2,95	35,25	33,83		
	3,90	2,99	30,43			
	3,68	2,71	35,79			

(a) **P.D.** = espessura da pata direita, onde foi aplicado o veneno; (b) **P.E.** = espessura da pata esquerda, onde foi aplicada a salina; (c) **E%** = percentagem de edema; (d) **I%** = percentagem de inibição em relação ao grupo controle; (e) **N%** = percentagem de neutralização.

2. Determinação da DME dos extratos macerados (M-Fo e M-Fl) da segunda coleta

As folhas e flores do material da segunda coleta foram maceradas, obtendo-se os extratos liofilizados das folhas (M-Fo; m = 63,54 g) e flores (M-Fl; m = 88,80 g). Uma alíquota de cada extrato (70 mg) foi diluída em 1,00 mL de solução salina e, depois, 0,25 mL de cada solução foi diluída em diferentes proporções de solução salina para preparar soluções de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL. A concentração de 70 mg foi feita com base nas doses utilizadas, popularmente, no tratamento de acidentes por serpentes peçonhentas.

A Tabela V.4 mostra os resultados dos testes de neutralização da atividade edematogênica após 2 h da aplicação dos extratos M-Fo e M-Fl nas concentrações de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL em solução salina. O extrato M-Fo não apresentou atividade efetiva nas diferentes concentrações consideradas. Esses resultados indicam que as folhas apresentaram pouca eficácia na neutralização da atividade edematogênica após 2 h da aplicação do extrato. Por outro lado, o extrato M-Fl apresentou eficácia na neutralização da ação edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* nas diferentes concentrações testadas, sendo que na concentração de 1,75 mg/mL a neutralização foi menor em relação às concentrações 3,5 e 7,0 mg/mL.

A Tabela V.5 mostra os resultados dos testes de neutralização da ação Edematogênica após 4 h da aplicação dos extratos M-Fo e M-Fl nas concentrações de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL em solução salina. Diferentemente dos resultados obtidos após 2 h da aplicação, o extrato M-Fo apresentou atividade neutralizante da atividade Edematogênica, com valores de N% variando de 14,57 a 26,97, para as concentrações de 1,75 e 7,0 mg/mL do extrato. Por sua vez, o extrato M-Fl apresentou valores de N% maiores em relação aos valores obtidos após 2 h da aplicação, atingindo um valor de N% igual a 82,73 na concentração de 7,0 mg/mL do extrato.

Portanto, os testes de DME indicaram que o extrato das flores de *Peltodon radicans* apresentou maior eficácia na neutralização da atividade edematogênica em relação aos extratos das outras partes da planta (folhas e caule). Além disso, a ação bloqueadora da atividade edematogênica do extrato das flores aumentou com o aumento tanto do tempo de aplicação quanto da concentração do extrato (dose-resposta).

Tabela V.4. Leitura dos testes de neutralização, da atividade Edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, após 2 h da aplicação dos extratos M-Fo e M-Fl nas concentrações de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL em solução salina

Extrato/[concentração]	P.D. ^a	P.E. ^b	E% ^c	Média	I% ^d	N% ^e
M-Fo/[1,75mg/mL]	3,93	3,03	29,66	33,37	98,95	1,05
	4,34	3,17	36,99			
	4,17	3,01	38,61			
	3,96	3,09	28,20			
M-Fo/[3,5 mg/mL]	4,52	3,07	47,25	35,68	105,82	(-5,82)
	4,14	3,04	36,26			
	3,95	3,19	23,86			
	4,15	3,07	35,37			
M-Fo/[7,0 mg/mL]	4,07	2,97	37,14	33,16	98,34	1,66
	3,87	2,85	35,69			
	3,78	2,84	33,26			
	3,83	3,03	26,54			
M-Fl/[1,75 mg/mL]	3,95	3,15	25,29	16,95	50,26	49,74
	4,06	3,03	18,21			
	3,83	3,56	7,35			
M-Fl/[3,5 mg/mL]	3,66	3,31	10,44	11,74	34,81	65,19
	4,13	3,64	13,40			
	3,94	3,54	11,37			
M-Fl/[7,0 mg/mL]	3,94	2,98	32,28	13,37	39,64	60,36
	3,63	3,32	9,46			
	3,54	3,32	6,69			
	3,97	3,78	5,03			
CONTROLE	5,04	3,42	47,35	33,72		
	5,00	3,77	32,41			
	4,50	3,40	32,32			
	4,51	3,67	22,78			

(a) **P.D.** = espessura da pata direita, onde foi aplicado o veneno; (b) **P.E.** = pata esquerda, onde foi aplicada a salina; (c) **E%** = percentagem de edema; (d) **I%** = percentagem de inibição em relação ao grupo controle; (e) **N%** = percentagem de neutralização.

Tabela V.5. Leitura dos testes de neutralização, da atividade Edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, após 4 h da aplicação dos extratos M-Fo e M-FI nas concentrações de 7,0, 3,5 e 1,75 mg/mL em solução salina

Extrato/[concentração]	P.D. ^a	P.E. ^b	E% ^c	Média	I% ^d	N% ^e
M-Fo/[1,75mg/mL]	4,16	2,80	48,41	36,65	84,84	15,16
	3,93	3,03	29,79			
	4,16	3,23	28,70			
	4,33	3,10	39,70			
M-Fo/[3,5 mg/mL]	4,15	3,12	33,10	31,55	73,03	26,97
	4,17	3,23	28,83			
	4,21	3,41	23,26			
	4,20	2,98	41,01			
M-Fo/[7,0 mg/mL]	4,34	3,03	42,93	36,90	85,43	14,57
	3,86	2,88	34,06			
	4,08	3,09	32,10			
	4,15	2,99	38,52			
M-FI/[1,75 mg/mL]	4,03	3,35	20,35	18,46	42,74	57,26
	3,88	3,13	24,14			
	4,12	3,31	24,57			
	4,20	4,01	4,79			
M-FI/[3,5 mg/mL]	3,38	3,15	7,27	16,46	38,10	61,90
	3,55	3,30	7,55			
	3,93	3,07	28,19			
	3,90	3,17	22,81			
M-FI/[7,0 mg/mL]	3,85	3,43	12,20	7,46	17,27	82,73
	3,42	3,26	5,03			
	3,33	3,18	4,65			
	3,83	3,55	7,95			
CONTROLE	4,73	3,36	40,71	43,20		
	4,77	3,40	40,26			
	4,67	3,21	45,49			
	4,76	3,25	46,34			

(a) **P.D.** = espessura da pata direita, onde foi aplicado o veneno; (b) **P.E.** = pata esquerda, onde foi aplicada a salina; (c) **E%** = percentagem de edema; (d) **I%** = percentagem de inibição em relação ao grupo controle; (e) **N%** = percentagem de neutralização.

CONCLUSÃO

A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos fitoconstituintes isolados de *Peltodon radicans*, enquanto na Tabela 1 são especificadas as suas quantidades relativas e a parte do vegetal do qual foram isolados.

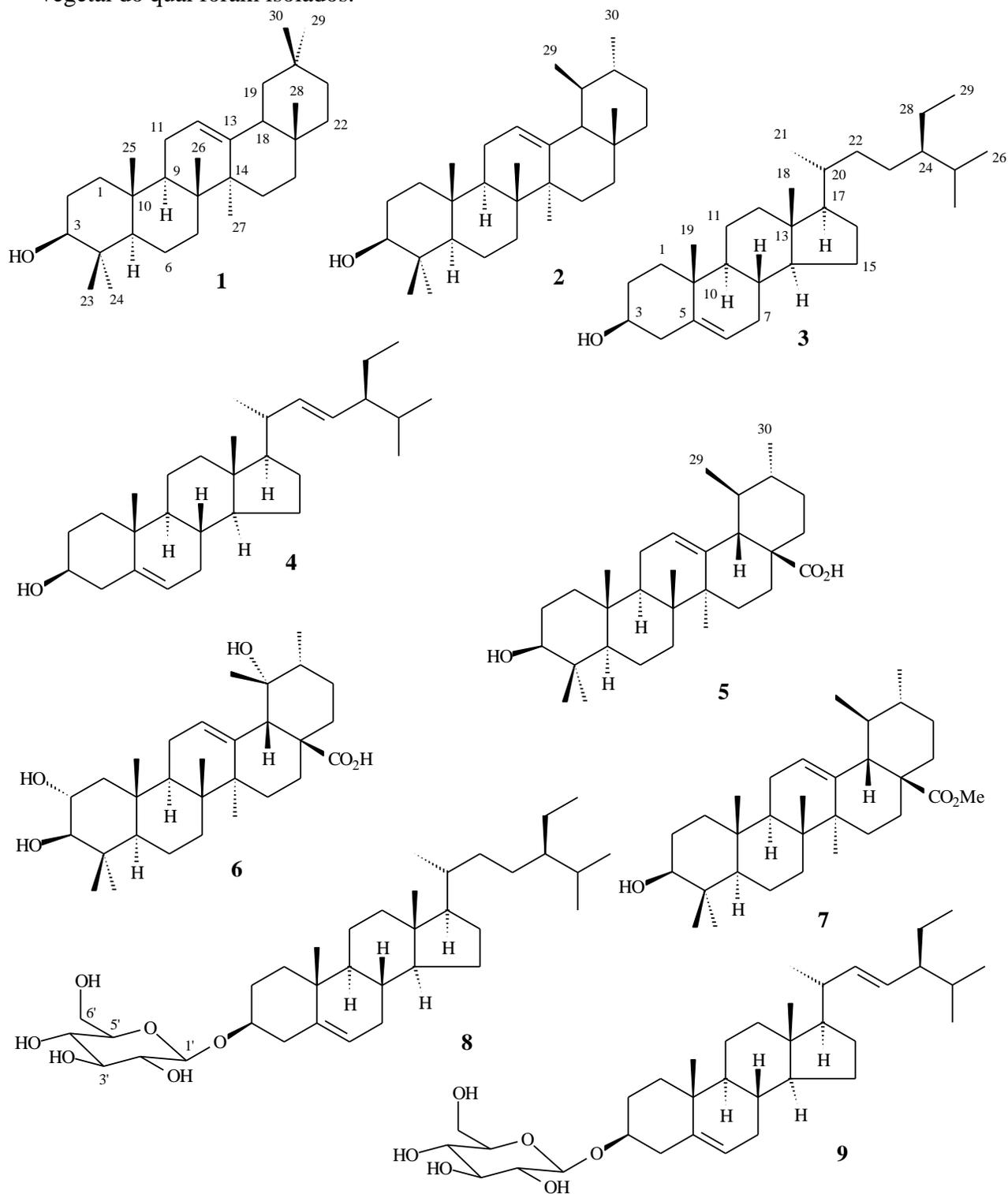


Figura 1. Estruturas químicas dos fitoconstituintes isolados de *P. radicans*.

Tabela 1. Rendimento de obtenção das substâncias isoladas nos diferentes extratos de *P. radicans*

Extrato (massa)	Substância	Massa (mg)	Rendimento
Fo-EH (7,1050 g)	Hidrocarbonetos	12,8	0,18%
Fo-EE (54,2533 g)	α -Amirina (2)	8,6	0,02%
	β -Sitosterol (3)	157,4	0,29%
	Estigmasterol (4)	128,6	0,24%
Fl-EH (3,4608 g)	Hidrocarbonetos	11,4	0,33%
	β -Amirina (1)	4,3	0,12%
	α -Amirina (2)	5,8	0,17%
Fl-EE (4,7459 g)	Ácido ursólico (5)	8,5	0,18%
	Ácido tormêntico (6)	10,9	0,23%
Ca-EH (37,4070 g)	Hidrocarbonetos	65,5	0,18%
Ca-EE (74,8357 g)	β -Sitosterol (3)	75,9	0,10%
	Estigmasterol (4)	116,5	0,16%
	3 β -Hidroxi-28-ursolato de metila (7)	45,1	0,06%
Ra-EH (9,1710 g)	Hidrocarbonetos	5,0	0,05%
Ra-EE (2,8500 g)	β -Sitosterol (3)	5,3	0,19%
	Estigmasterol (4)	3,7	0,13%
	3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosíl-sitosterol (8)	0,9	0,03%
	3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosíl-estigmasterol (9)	2,0	0,07%

Fo= folha; Fl= flor; Ca= caule; Ra= raiz; EH= extrato hexânico; EE= extrato etanólico

A Tabela 1 mostra o rendimento de obtenção das substâncias isoladas nos diferentes extratos da planta. Misturas dos esteróides **3** e **4** foram isoladas de Fo-EE, Ca-EE e Ra-EE, sendo também isolados os esteróides glicosilados **8** e **9** neste último extrato. Porém, esses esteróides não foram encontrados nas flores. Triterpenos pentacíclicos foram isolados em maiores proporções nas flores, sendo **1** e **2** de FI-EH e **5** e **6** de FI-EE. Proporções relativamente pequenas dos triterpenos pentacíclicos **2** e **7** foram isolados respectivamente de Fo-EE e Ca-EE.

Nos testes de bloqueio da ação edematogênica com os extratos Fo-EE, FI-EE e Ca-EE, apenas FI-EE apresentou ação bloqueadora após 2 horas da aplicação, reduzindo em 23,39% a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, em relação aos animais controle. Essa ação bloqueadora foi mais eficaz na quarta e sexta hora (34,67% e 57,38%, respectivamente). Já, o extrato Ca-EE apresentou fraca ação bloqueadora na dose testada (2^a horas = -17,33%; 4^a horas = 7,44% e na 6^a hora = 20,89%) e o extrato Fo-EE não foi eficaz em bloquear a ação edematogênica induzida pelo veneno de *B. atrox*.

Nos testes de bloqueio da ação edematogênica duas e quatro horas após a aplicação dos extratos obtidos de acordo com o uso popular de M-Fo e M-FI, o primeiro (M-Fo) apresentou atividade bloqueadora apenas na quarta hora. Esses resultados indicam efeito pouco eficaz de M-Fo na neutralização da atividade edematogênica do veneno. Por outro lado, M-FI apresentou atividade antiedematogênica efetiva, dose-dependente, nos diferentes tempos observados. Portanto, os testes indicam que as flores apresentam maior concentração de composto(s) eficaz(es) em bloquear a ação edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* do que os extratos obtidos das outras partes da espécie vegetal (folhas e caule).

Estudos mostram que esteróides apresentam atividades antiinflamatórias, podendo ser relacionadas com a neutralização do efeito letal dos venenos brotópicos. No entanto, os extratos das flores não forneceram os esteróides **3**, **4**, **8** e **9** (Tabela 1) ou outros esteróides, mas

apresentaram maiores efeitos de DME. Assim sendo, não é possível relacionar essas substâncias com a atividade DME estudada das flores.

Os efeitos hiperalgésico de **2** têm sido observados nas dores inflamatórias persistentes. Alguns estudos mostram que **1** e **2** apresentam atividades similares aos corticóides. A atividade antiinflamatória dos triterpenos tem sido atribuída à presença de grupos carboxílicos e hidroxílicos em posições específicas nas interações de receptores glucocorticóides. Nos casos de **1** e **2**, a atividade antiinflamatória tem sido atribuída à posição do grupo hidroxila em C-3, com efeitos antiinflamatórios localizados. Nos extratos das flores foram encontrados esses dois triterpenos (Tabela 1), o que poderia ser relacionado com a atividade antiedematogênica de FI-EE e M-Fl.

O ácido ursólico **5** é encontrado amplamente no reino vegetal, apresentando diversas propriedades farmacológicas, como antiedematogênica e antiinflamatória. Por sua vez, o ácido de tormêntico **6** é menos freqüente em espécies vegetais, apresentando também atividades antiinflamatória. Esses dois triterpenos foram encontrados apenas nas flores a 0,18% e 0,23%, respectivamente. Ambas as proporções são relativamente altas, permitindo relacionar **5** e **6** com a atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* verificada popularmente e confirmada pelos testes biológicos realizados neste trabalho.

Assim, nos extratos das folhas, caules e raízes de *Peltodon radicans* foram identificados os esteróides **3**, **4**, **8** e **9**, além de proporções relativamente pequenas dos triterpenos pentacíclicos **2** e **7**. Esses extratos apresentaram menores atividades antiedematogênicas do que o extrato das flores. Os testes de DME indicaram que o extrato das flores de *Peltodon radicans* apresentou eficácia significativa na neutralização da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*. Além disso, a ação bloqueadora da atividade edematogênica desse extrato aumentou tanto com o tempo de aplicação quanto com a concentração do extrato (dose-resposta). Portanto, os resultados estão de acordo com algumas das informações etnofarmacológicas dessa espécie vegetal. Os triterpenos pentacíclicos **1**, **2**, **5** e **6**, identificados nos extratos das flores, podem estar relacionados com o bloqueio da atividade edematogênica pela *P. radicans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral, C. F .S.; Bucarechi, F.; Araújo, F. A. A.; Cardoso, J. L. C.; Campos, J. A.; Marques, M. M. A.; Santalucia, M.; Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde, 1998, 131p.
2. Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S.; Sant'ana, C. M.; Haddad, Jr. V.; Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier: São Paulo, 2003, 468p.
3. Cardoso, J. C. L.; Brando, R. B. Acidentes por animais peçonhentos. Editora Santos, São Paulo, 1982.
4. Chippaux, J.P.; Snake-bites: Appraisal of the Global Situation. Bull World Health Org, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.
5. Pinho, F. M. O.; Pereira, I. D.; Ofidismo. Rev. Ass. Brás., v.47, n. 1, p. 24-29, 2001.
6. Amaral, C. F .S.; Bucarechi, F.; Araújo, F. A. A.; Cardoso, J. L. C.; Campos, J. A.; Marques, M. M. A.; Santalucia, M.; Ministério da Saúde do Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento do acidente ofídico. 1ª reimpressão. Brasília: Ministério da Saúde, 1991.
7. Ribeiro, L. A.; Albuquerque, M. U.; Campos, V. A. P.; Epidemiologia dos Acidentes por Serpentes Peçonhentas: Estudos de Casos Atendidos em 1988. Rev. Saúde Pública, v. 5, p. 380-388, 1995.
8. Amaral, C. F .S.; Bucarechi, F.; Araújo, F. A. A.; Cardoso, J. L. C.; Campos, J. A.; Marques, M. M. A.; Santalucia, M.; Ministério da Saúde do Brasil; Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde: Brasília, 2001, 120p.
9. Barraviera, B.; Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. Arq. Bras Med, v. 65, n. 4, p. 345-355, 1991.
10. Museu do Instituto Butantan, Instituto Butantan, São Paulo. Disponível em: <www.butantan.gov.br>. Acessada em abril de 2004.

11. Jorge, M. T.; Ribeiro, L. A.; Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul-Americana (*C. durissus*). Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo, v. 34, p. 347-54, 1992.
12. Martins, M.; Oliveira, M. E.; Projeto jararaca – História natural e evolução de Viperídeos Sulamericanos. Disponível em:<http://eco.ib.usp.br/labvert/Jararaca/projjar_atrox_manau.htm>. Acessada em março de 2004.
13. Hoge, A. R.; Romano Hoge, S. A. R. W.; Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2ª edição. Memórias do Instituto Butantan, v. 42/43, p. 373-497, 1978/79.
14. Cunha, R.; Ofídios da Amazônia. 1. ed. Belém: Museu Goeldi, 1978, 172p.
15. Dos-Santos, M. C.; Martins, M.; Boechat, A. L.; Sá-Neto, R. P.; Oliveira, M. E.; Serpentes de interesse médico da Amazônia, UA/SESU: Manaus, 1995.
16. Campbell, J. A.; Lamar, W. W.; The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University: New York., 1989. 425p.
17. Dos-Santos, M. C.; Borges, C. C.; Sadahiro, M.; Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do estado do Amazonas. Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, n. 6, p. 637-646, 1999.
18. Bolaños, R.; Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro América. Ed. Universitária de Costa Rica: San José. 1984, 210p.
19. Furtado, M. F. D.; Colleto, G. M. D. D.; Dias da Silva, W.; Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. Memórias do Instituto Butantan, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.
20. Meier, J.; Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. Toxicon, v. 34, n. 7, p. 787-806, 1996.

21. Otero, R.; Osorio, R. G.; Valderrama, R.; Giraldo, O. A.; Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia e Chocó (Colombia). *Toxicon*, v. 30, n. 5/6, p. 611-620, 1992.
22. Russel, F. E.; Calson, R. W.; Wainschel, J.; Osborne, A. H.; Snake venoms poisoning in the United States. Experiences with 550. *J. A. M. A.*, v. 233, p. 341-344, 1975.
23. Rosenfeld, G.; Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In *Venomous Animals and their Venoms*. Ed. W. B. E. E. Buckley, Academic Press: New York, v. 2, p. 345-403, 1971.
24. Trebien, H. A.; Calixto, J. B.; Pharmacological evolution of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions*, v. 26, p. 292-300, 1989.
25. Cury, Y.; Teixeira, C. F. P.; Sudo, L.; Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. *Toxicon*, v. 32, p. 1425-1431, 1994.
26. Picolo, G.; Chacur, M.; Gutiérrez, J. M.; Teixeira, C. F. P.; Cury, Y.; Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 1221-1228, 2002.
27. Gutierréz, J. M.; Lomonte, B.; Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A Review. *Memorias do Instituto Butantan*, v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.
28. Chacur, M.; Medição química da hiperalgesia induzida pelos venenos de serpentes *B. jararaca* e *B. asper* e por uma miotoxina com atividade de fosfolipase A₂ isolada do veneno de *B. asper*. 2000. 106f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Inst. Cien. Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

29. Amaral, C. F. S.; Rezende, N. A.; Da Silva, O. A.; Ribeiro, M. M. F.; Magalhães, R. A.; Dos Reis, R. J.; Carneiro, J. G.; Castro, J. R. S.; Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. Ver. Inst. Méd. Trop.; v. 28, p. 220-227, 1986.
30. Warrell, D. A.; The global problem of snake bite: its prevention and treatment. National University of Singapore, 1992.
31. Tambourgit, D. V.; Campos, A. C. M. R.; Freitas, M. C. W.; Magnoli, F. C.; Silva, W. D.; Eickstedt, V. R. D. V.; Santos, M. C.; Furtado, M. F. D.; Kipnis, T. L.; Manipulation of the Complement System by Animal Venoms. Memórias do Instituto Butantan, v. 54, n. 2, p. 9-10, 1992.
32. Coetzer, P. W.; Tilbury, C. R.; The epidemiology of snakebite in norther Natal. S. Afr. Med., v. 62, n. 7, p. 206-212, 1982.
33. Cardoso, J. L. C.; Fan, H. W.; Franca, F. O. S.; Jorge, M. T.; Leite, R. P.; Nishioka, S. A.; Avila, A.; Sano-Martins, I. S.; Tomy, S. C.; Santoro, M. L.; Chudzinski, A. M.; Castro, S. B.; Kamiguti, A. S.; Kelen, E. M. A.; Hirata, M. H.; Mirandola, R. M. S.; Theakston, R. D. G.; Warrell, D. A.; Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brasil. Q. J. Med., v.86, p. 315-325, 1993.
34. Eichbaum, F. W.; Ação dermatotóxica de veneno ofídicos e sua neutralização pelos antivenenos. Mem. Inst. Butantan, v. 20, p. 79-94, 1947.
35. Gutiérrez, J. M.; Chaves, F.; Bolaños, R.; Cerdas, L.; Rojas, E.; Arroyo, O.; Portilla, E.; Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por um antiveno polivalente. Toxicon, v. 19, p. 493-500, 1981.

36. Gutiérrez, J. M.; Gené, J. A.; Cerdas, L.; Rojas, G.; Neutralization de of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.
37. Gutiérrez, J. M.; Gené, J. A.; Lemonte, B.; Cerdas, L.; Rojas, E.; Comparative study of the edema-formation active of Rican Costa snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 85C, p. 171-175, 1986.
38. Jorge, M. T.; Ribeiro, L. A.; Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 43, n. 1, p. 74-76, 1997.
39. Aguiar, G. F.; Fan, H. V.; Cardoso, D. F.; Cury, Y.; Farsky, S. H. P.; Efficacy of bothropic antivenom in events induced by *Bothrops jararaca* venom on microcirculation. Intravital microscopic study. In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1989.
40. Domingos, M. O.; Resposta imune humoral em pacientes acidentados por *Bothrops spp* e biodistribuição e neutralização do veneno de *B. jararaca* em camundongos. In: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
41. Tu, A. T.; Chemistry of Rattlesnake Venoms. In *Rattlesnake Venoms, their Actions and Treatment*, Marcel Dekker, New York, p. 247, 1982.
42. Boechat, A. L. R.; Paiva, C. S.; Franca, F. O.; Dos-Santos, M. C.; Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.43, no.1, p. 7-14, 2001.
43. Melo, P. A.; Suarez-Kurtz, G.; Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon*, v. 26, n. 1, p. 87-95, 1988.

44. Esmeraldino, L. E.; Avaliação da ação do extrato de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) sobre a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*. 2003. 157f. Tese (Doutorado em Química) Curso de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal. Ribeirão Preto.
45. Melo, P. A.; Nascimento, M. C.; Mors, W. B.; Suarez-Kurtz, G.; Inibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalic venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extract and constituents. *Toxicon*, v. 32, n. 5, p. 595-603, 1994.
46. Mors, W. B.; Nascimento, M. C.; Pereira, B. M. R.; Pereira, M. A.; Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, v. 55, p. 627-642, 2000.
47. Santos, M. M. B.; Melo, M. M.; Jácome, D. O.; Ferreira, K. M.; Veado, J. C. C.; Figueiredo, L. C. B.; Mota, R. O. C.; Avaliação clinica de cães tratados com flunixinina meglumina, *Curcuma longa* e soro antibotrópico. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, n. 1, p. 31-38, 2003.
48. Borges, M. H.; Jamal, C. M.; Santos, D. M.; Raslan, D. S.; Lima, M. E.; Purificação parcial do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* e sua ação anti-PLA₂. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/Html/Bau/Bau-4-45.Html>>. Acessada em: janeiro de 2004
49. Freitas, F. G., Silva, T. A.; Oliveira, F.; Santos, B. R.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Hamaguchi, A.; Toxicidade aguda e propriedades antiofídicas do extrato aquoso de *Casearia grandiflora* (flacourtiaceae): Atividades fosfolipásica A₂, miotóxica de peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. *Biosci. J.*, v. 21, n. 2, p. 95-103, 2005.
50. Veronese, E. L.; Esmeraldino, L. E.; Trombone, A. P.; Santana, A. E.; Bechara, G. H.; Kettlehut, I.; Cintra, A. C.; Giglio, J. R.; Sampaio, S. V.; Inibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by

- the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. (Apocynaceae). *Phytomedicine*, v. 12, n. 1-2, p. 123-130, 2005.
51. Neves, P. C. A.; Maria Neves, M. C.; Cruz, A. B.; Sant'ana, A. E. G.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; Differential effects of *Mendevilla velutina* compounds oedema induced by phospholipase A₂ and phospholipase C. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 243, n. 3, p. 213-219, 1993.
52. Borges, M. H.; Alves, D. L.; Raslan, D. S.; Piló-Veloso, D.; Rodrigues, V. M.; Homs-Brandenburgo, M. I.; Lima, M. E.; Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of *crotalidae* venoms. *J. Ethnopharmacol.*, v. 98, p. 21, 2005.
53. Castro, K. N. C.; Carvalho, A. L. O.; Almeida, A. P.; Oliveira, D. B.; Borba, H. R.; Costa, S. S.; Zingali, R.B.; Preliminary in vitro studies on the *Marsypianthes chamaedrys* (boia-cao) extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. *Toxicon*, v. 41, n. 7, p. 929-32, 2003.
54. Borges, C. C.; Cavalcanti-Neto, A. J.; Boechat, A. L.; Franciscon, C. H.; Arruda, L. F. M. R.; Dos-Santos, M. C.; Eficácia da espécie vegetal *Peltodon radicans* (paracari) na neutralização da atividade edematogênica e a ineficácia do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. *Revista da Universidade do Amazonas. Série: Ciências Biológicas* v. 1, p.97-113, 1996.
55. Êxodo. Português. In: Bíblia de estudo Pentecostal. Tradução de João Ferreira de Almeida. Rio de Janeiro: Casa Publicadora das Assembléias de Deus, 1995. p. 131-135. Edição CPAD. A.T.
56. Hoehne, F.C. *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais*. 1. ed. São Paulo: coletâneas de aulas, 1978. 355p.

57. Pedesen, J. A.; Distribution and taxonomic implication of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 28, p. 229-253, 2000.
58. Font, P. Q.; *Plantas Medicinais*. 1. ed. Rio de Janeiro: Labor, 1968. 1033p
59. Lecciones Hipertextuales de Botânica.; Família Lamiaceae. Disponível em: <<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/lamiacea.htm>>. Acessada em dezembro de 2003.
60. Zelnik, R.; Matilda, K. A.; Paniza, S.; Chemistry of the brazillian Labiatae. The occurrence of ursolic acid in *Peltodon radicans* Pohl,. *Mem. Inst. Butantan*, v. 42/43, p.357-361,1978/79
61. Phol, J. B. E.; *Plantarum Brasiliae icones et descriptiones hactenus ineditae* (1827). Disponível em: <http://www.zum.de/stueber/pohl/band1/high/IMG_6485.html>. Acessada em março 2004
62. Barberán, F. A. T.; Grayer-Barkmeijer, R. J.; Gil, M. I.; Harbonrne, J. B.;Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy and 8-hodroxyflavone glycosides in the Labiateae the Scrophulariaceae and related families *Phytochemistry*, v. 27, p. 2631, 1988.
63. Balbach, A.; *A Flora nacional na medicina doméstica*. 23 ed. Edificação do Lar Iaquaquecetuba: São Paulo, 1969. 1016p.
64. Fanner, R.; Betti, A. H.; Mentz, L. A.; Rates, S. M. K.; Plantas usadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúgica. *Braz. J. Pharm. Scien.*, v. 42, n. 3, 2006 (*Apud*): Lorenzi, H.; Matos F. J. A.; *Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, Rio de Janeiro, 2002, 512p.
65. Cronquist, A.; *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

66. Riberiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C.; Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra Firme na Amazônica Central. INPA, Manaus, 1999, 799p.
67. Paiva, E. A. S.; Machado, S. R.; Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. Braz. Arch. Biol. Techn., v. 48, n. 1, p. 147-153, 2005.
68. Medeiros, K. C. P.; Monteiro, J. C.; Diniz, M. F. F. M.; Medeiros, I. A.; Silva, B. A.; Piuvezani, M. R.; effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globules* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. Braz. Journal Pharm., v. 17, n. 1, p. 23-28, 2007.
69. Rodrigues, V. E.; Carvalho, A. D.; Ethnobotanical Survey of the medicinal plants in the dominion of meadows in the Region of the Alto Rio Grande – Minas Gerais. Ciênc. Agrotéc. Lavras, v. 25, p. 102-123, 2001.
70. Peckolt, T.; Medical and useful plants of Brazil. Ber. Dent. Pharm. Ges. 14: 372-388 From: J. Chem. Soc. Abstr. v. 88, n.11, p. 113, 1905.
71. Moniz, A. M. H.; Estudo teórico do mio-inositol, um fitoconstituínte isolado de *Peltodon radicans*, e seus derivados metilados, acetilados e fosfatados 2004, 180f. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
72. Matos, F. J. A.; Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed. – Fortaleza: Edições UPC, 1997, 141p.

73. Yamakawa, M.; Nozaky, M.; Hokama, Z.; Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka, A.; Hayashi, K.; Sawai, Y. (Editors); *Toxins: Animal, Plant and Microbial*. Plenum Press, New York, v.1, p. 97-109, 1976.
74. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 5ª ed., Editora Guanabara Koogan, 1991, 387p.
75. Otuki, M. F.; Ferreira, J.; Lima, F. V.; Santos, A. R. S.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: Evidence for participation of protein kinase C and protein Kinase A pathways. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, v. 313 p. 310-318, 2005.
76. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; ^{13}C RMN spectra of pentacyclic triterpenoid – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v.37, n. 6, p. 1517- 1575, 1994.
77. Giese, S, OM K.; Estudo Da Composição Química dos Óleos Florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae). 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná Curitiba.
78. Patočka, J.; Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 1, p. 7–12, 2003.
79. Galotta, A, L. Q. A.; Boaventura, M. A. D.; Constituintes Químicos da raiz e do talo da folha do Açai (*Euterpe precatoria* MART., Arecaceae). *Quim. Nova*, v.28, n. 4, p. 610-613, 2005.
80. Luciano, F. B.; Vieira Lima, F.; Otuki, M. F.; Malheiros, A.; Yunes, R. A ; Calixto, J. B.; Ação anti-hiperalgésica do triterpeno alfa, beta-amirina na dor persistente induzida pela injeção intraplantar de CFA (Adjuvante Completo de Freund) em camundongos. In:

- XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental., Águas de Lindoia, 2002.
81. Lima, F. V.; Malheiros, A.; Otuki, M. F.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Filho, V. C.; Monache, F. D.; Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.16, p. 578, 2005.
82. Singh B, Singh S.; Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytother Res* , v. 17, p. 814-816, 2003.
83. Jain S. C.; Jain, R.; Singh, B.; Antimicrobial principles from *Arnebia hispidissima*. *Intern J Pharmacogn.*, v. 41, p. 231-233, 2003.
84. Alax . Mendes, C. L. A.; Triterpenóides e a sua atividade Anti-Inflamatória. Dep. Química, Fac. Ciências e Tec. da Univ. Nova de Lisboa, Portugal. Disponível em <<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Carlos%20Leonard%20TRABALHO.pdf>>. Acessada em março de 2007.
85. Hasmeda, M.; Kweifio-Okai, G.; Macrides, T.; Polya, G., Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med.*, v. 65, p.14-18, 1999.
86. Recio-Iglesias, M. C.; Giner, R. m.; Máñez, S.; Gueho, J.; Julien, H. R.; Hostettmann, K.; Rios, J. L.; Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.*, v. 61, p. 9-12, 1995.
87. Recio-Iglesias, M. C.; Giner, R. M.; Máñez, S.; Talens, A.; Cubells, L.; Gueho, J.; Julien, H. R.; Hostettmann, K.; Rios, J. L.; Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeated local TPA administration. *Planta Med.*, v.61, p. 502-504, 1995.

88. Rajic, A.; Kweifio-Okai, G.; Macrides, G.; Sandeman, T.; Chandler, D. S.; Polya, G.M.; Inhibition of Serine Proteases by Anti-inflammatory Triterpenoids, *Planta Medica*, v. 66, n. 3, p. 206-210, 2000.
89. Junges M. J.; Estudo dos constituintes químicos das folhas de *Eugenia florida* DC (Myrtaceae). 1994. 213f. Tese (Doutorado em Química). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
90. Oliveira, B. H.; Biotransformação de esteróis. *Química Nova*, v. 19, n. 3, p. 233-236, 1996.
91. Kirk, R. E.; Othmer, D. F.; *Encyclopedia of Chemical Technology*, Interscience, New York, v. 7, p. 513-536, 1951.
92. Blunden, G.; Culing, M. C.; Jewers, K.; *Trop. Sci.*, v.17, p.139, 1975.
93. Souza, M. R. Estudo fitoquímico de *Brosimum potabile* Ducke e *Brosimum acutifolium* Huber, visando investigar, por métodos teóricos, o mecanismo de biotransformação de β -sitosterol em estigmasterol. 2000.135f. Dissertação (Mestrado em Química). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade do Amazonas, Manaus.
94. Martin, C. K. A.; Sterols. In: *Biotechnology*, Ed. Rehm. H.-J.; Reed, G., Verlag Chemie, Weinheim, v. 6a, p.79-95, 1984.
95. Mbaze, L. M.; Poumale, H. M. P.; Wansi, J. D.; Lado, J. A.; Khan, S. N.; Iqbal, M. C.; Ngadjui, B. T.; Laatsch, H.; α -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae). *Phytochemistry* v. 68, p. 591–595, 2007.
96. Mohanan, P. V.; Devi, K. S. Toxicological evation of Sobatum, *Cancer Latters*, v. 127 n. 1, p. 135- 140, 1998.

97. Delpont, C. L.; Backhouse, C. N.; Erazo, S.; Negrete, R. E.; Silva, C.; Hess, A.; Nunoz, O.; Garcia, G. M. D.; San Feliciano, A. Biological activities and metabolites from *Trevoa trinervis* Miers. *Phytherapy Research*, v. 11, n. 7, p. 504-507, 1998..
98. Faizi, S.; Siddiqui, B. S.; Saleem, R.; Aftad, K. S. F.; Gilani, A. H.; Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. *Planta-Med.*, v. 64, n. 3, p. 225-8, 1998.
99. Osawa, K.; Yasuda, H.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Antibacterial and antihemolytic activity of triterpenes and β -sitosterol isolated from *Chinese quince*. *Chemistry Abstract* 128: 70376, 1998.
100. Peixoto, J. L. B.; Grzesiuk, V. L.; Vidotti, G. J.; Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) In.: XI Encontro de Química da Região Sul, Pelotas – RS, 11:1, 2003.
101. Balestrin, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* MIQUEL, Moraceae. 2006. 177f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêutica). Universidade Federal do Paraná, Belém.
102. Pereira, M. M.; Souza Júnior, S. N.; Alcântara, A. F. C.; Piló-Veloso, D.; Alves, R. B.; Machado, P. O.; Azevedo, A. O.; Moreira, F. H.; Castro, M. S. A.; Raslan, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum*, Ver. Brás. Pl. Méd., v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006.
103. Filho, V. C.; Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI, *Quím. Nova*, v. 23, n. 5, p.680-685, 2000.
104. Randau, K. P.; Xavier, H. S.; Dimech, G. S.; Wanderley, A. G.; Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae),

- Revista Lecta, Bragança Paulista, v. 20, n. 1, p. 61-68, 2002 Apud: Peres, M. T. L. P. et al. Analgesic compounds of *Croton urucurama* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. *Phytotherapy Research.*, v. 12, p. 209-211, 1998.
105. Sanches, N. R.; Galletto, R.; Oliveira, C. E.; Bazotte, R. B.; Cortez, A. G.; Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) *Pedersen* (Amaranthaceae) *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 613-617, 2001.
106. Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Santos, M. A.; Estudo químico e pesquisa de novos compostos com potencial atividade nematicida de *mucuna sp* Disponível em <http://www.fapemig.br/files/resumo_cex_2002_2003.doc> Acessada em abril 2007.
107. Careri, M.; Elviri, L.; Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of β -sitosterol and stigmasterol in soybean oil. *Journal of Chromat. A.*, v.935, p. 249-257, 2001.
108. Lorenz, R. L.; Johannes, C. Preparation and mass spectrometry of fourteen pure and $^{18}\text{O}_2$ - labeled oxidation products from the phytosterols β -sitosterol and stigmasterol. *Analytical Biochemistry*, v. 325, p. 107-116, 2004.
109. László, F.; O óleo de abacate: potencial fonte de beta-sitosterol para o tratamento de próstata, cardíacos e imunológicos. Disponível em: <<http://www.aromalandia.org/abacate.htm>>. Acessada em janeiro de 2007.
110. Tango, J. S.; Carvalho, C. R. L.; Soares, N. B.; Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo *Rev. Bras. Frutic.*, v. 26, n. 1, p.17-23, 2004.

111. Senatore, F.; Mscize, A.; Mrugasiewicz, K.; Gorecki, P.; Steroidal constituents and inflammatory activity of the horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) bark. *Bolletins Societa Italian di Biologia Sperimentale* v. 65, n 2, p. 137-41, 1989.
112. Cárdenas, C.; Quesada, A. R.; Medina, M. A. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.320, p. 402-408, 2004.
113. Novotny, L.; Vachalkaova, A.; Biggs, D.; Ursolic acid: An anti-tumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasma*, v. 48, n. 4, p. 241-246, 2001
114. Lopes, J.; Triterpenóides com actividade anti-cancerígena. nº12088 - Química Aplicada. Disponível em: <<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Joao%20Filipe%20Triterpen%F3ides.PDF>>. Acessada em março de 2007.
115. Ovesna, Z.; Vachalkova, A.; Horvathova, K.; Tothova, D.; Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Minreview. *Neoplasma*, v. 51, n. 5, p. 327-333, 2004.
116. Miceli, N.; Taviano, M. F.; Giuffrida, D.; Trovato, A.; Tzakou, O.; Galati, E. M. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. *Journal Ethnopharmacology*, v. 97, n. 2, p. 261-266, 2005.
117. Ngouela, S.; Ndjakou, B. L.; Tchamo, D. N.; Zelefack, F.; Tsamo, E.; Connolly, J. D. A prenylated xanthone with antimicrobial activity from the seeds of *Symphonia globulifera*. *Natural Product Research*, v. 19, n. 1, p. 23-27, 2005.
118. Jeong, H. G.; Kim, H. G.; Hwang, Y. P. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. *Toxicology Letters*, v. 155, n. 3, p. 369-76, 2005.

119. Ryu, S. Y.; Oak, M. H.; Yoon, S. K.; Cho, D. I.; Yoo, G. S.; Kim, K. M.; Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Medica*, v. 66, n. 4, p. 358-360, 2000.
120. Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Higashihara, H.; Ukiya, M.; Watanabe, K.; Kimura, Y.; Hasegawa, J.; Nishino, H.; Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumorpromoting effects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 85-90, 2004.
121. Torres-Santos, E. C.; Lopes, D.; Oliveira, R. R.; Carauta, J. P.; Falcão, C. A.; Kaplan, M. A.; Rossi-Bergmann, B.; Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytom.: Intern. J. Phytotherapy and Phytopharm.*, v. 11, n. 2-3, p. 114-120, 2004.
122. Cunha, W. R.; Martins, C.; Da Silva Ferreira, D.; Crotti, A. E.; Lopes, N. P.; Albuquerque, S. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from miconia species. *Planta Medica.*, v. 69, n. 5, p. 470-472, 2003.
123. Taketa, A. T.; Gnoatto, S. C.; Gosmann, G.; Pires, V. S.; Schenkel, E. P.; Guillaume, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 10, p. 1697-1700, 2004.
124. Wang, Q.; Fan, M.; Bian, Z.; Nie, M.; Chen, Z. Extract and identify ingredient from *Ligustrum lucidum* Ait and study its effect to periodontal pathogen. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.*, v. 37, n. 5, p. 388-390, 2002.
125. Gu, J. Q.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Montenegro, G.; Timmermann, B. N.; Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences*, v. 59, n. 11-12, p. 797-802, 2004.

126. Somova, L. I.; Shode, F. O.; Mipando, M.; Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, v. 11, n. 2-3, p. 121-129, 2004.
127. Pozo, M.; Castilla, V.; Gutierrez, C.; Nicolas, R. D.; Egado, J.; Gonzalezcabrero, J.; Ursolic acid inhibits neointima formation in the rat carotid artery injury model. *Atherosclerosis*. 2005 May 24; [Epub ahead of print].
128. Yoshimura, H.; Sugawara, K.; Saito, M.; Murakami, S.; Miyata, N.; Kawashima, A.; Morimoto, S.; Gao, N.; Zhang, X.; Yang, J.; In vitro TGF-beta1 antagonistic activity of ursolic and oleanolic acids isolated from *Clerodendranthus spicatus*. *Planta Medica*, v. 69, n. 7, p. 673-675, 2003.
129. Chattopadhyay, D.; Dungdung, S. R.; Mandal, A. B.; Majumder, G. C.; A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract. *Contraception.*, v. 71, n. 5, p. 372-378, 2005.
130. Dorai, T.; Aggarwal, B. B.; Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer letters*, v. 215, p. 129-140, 2004.
131. Chiang, Y. M.; Chang, J. Y.; Kuo, C. C.; Chang, C. Y.; Kuo, Y. H.; Cytotoxic triterenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, v. 66, n. 4, p. 495-501, 2005.
132. Liu, J.; Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 92-94, 2005.
133. Liu, J.; Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, p.57-68, 1995.
134. Jiwajinda, S.; Santisopasri, V.; Murakami, A.; Kim, O. K.; Kim, H. W.; Ohigashi, H.; Suppressive effects of edible thai plants on superoxide and nitric oxide generation. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, v. 3, n. 3, p. 215-223, 2002.

135. Aggarwal, B. B.; Takada, Y.; Oommen, O. V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opinion on Investigational Drugs.*, v. 13, n. 10, p. 1327-1338, 2004.
136. Diaz, A. M.; Abad, M. J.; Fernandez, L.; Recuero, C.; Villaescusa, L.; Silvan, A. M.; Bermejo, P. In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 23, n.11, p. 1307-1313, 2000.
137. Resende, F. A.; Ácido ursólico reduz a frequência de eritrócitos micronucleados induzidos por Doxorubicina. Relatório de pesquisa. Universidade de Franca –SP. 2005. Disponível em <<http://www.unifran.br/2007/processoSeletivo/indexConteudo.php?cod=70>>. Acessada em abril de 2007.
138. Alexandre, M. S.; Análise Fitoquímica e Avaliação da Atividade Antiinflamatória de *Curatella americana* L. Disponível em: <http://www.biblioteca.ufpb.br/catalogo_96_2000/campus1/prod97.htm>. Acessada em abril de 2007.
139. Alves, J. S.; Terpenóides de *Salzmania nitida* (Rubiaceae) e ação espasmolítica do ácido ursólico, um triterpenóide de caráter antifílico. Disponível em: <http://www.biblioteca.ufpb.br/catalogo_96_2000/campus1/prod97.htm>. Acessada em abril de 2007.
140. Picerno, P.; Autore, G.; Marzocco, S.; Meloni, M.; Sanogo, R.; Aquino, R. P.; Anti-inflammatory activity of verminoside from *Kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis. *J Journal of Natural Products.*, v. 68, n. 11, p.1610-1614, 2005.

141. Silva, R. F. R.; Avaliação da atividade antiinflamatória de frações etanólicas e diclorometano da espécie *Leonurus sibiricus*. Disponível em <<http://www2.unimep.br/mostracademica4/trab/trabpdf/384.pdf>> Acessada em abril de 2007.
142. Martin-Aragón, S.; de las Heras, B.; Sanchez-Reus, M. I.; Benedi, J.; Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 53, p. 199-206, 2001.
143. Young, H. S.; Chung, H. Y.; Lee, C. K.; Park, K. Y.; Yokozawa, T.; Oura, H.; Ursolic acid inhibits aflatoxin B-1-induced mutagenicity in a *Salmonella assay* system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 17, n. 7, p. 990-992, 1994.
144. Guevara, A. P.; Amor, E.; Russell, G.; Antimutagens from *Plumeria acuminata* ait *Mutation Research*, v. 361, p. 67-72, 1996.
145. Niikawa, M.; Hayashi, H.; Sato, T.; Nagase, H.; Kito, H. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait.) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria. *Mutation Research*, v. 319, p. 1-9, 1993.
146. Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T.; Sakagami, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Sugita, D.; Shimura, S.; Yoshida, T.; Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*, v. 59, p. 315-323, 2002.
147. Tanaka, J. C. A.; Vidotti, G. J.; Silva, C. C.; A new tormentic acid derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v.14, p. 475-478, 2003.
148. Beirith, A.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B.; Hess, S. C.; Messana, I.; Ferrari, F.; Yunes, R. A.; Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-

- hydroxytormentic acid isolated from *Ocotea suaveolens* (Meissn) Hassler. *Planta Med.*, v. 65, p. 50–55, 1999.
149. Hess, S. C.; Monache, F. D.; Divergioic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 10, p. 104–106, 1999.
150. Houghton, P. J.; Lian, L. M.; Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*. *Phytochemistry*, v. 25, p. 1939–1944, 1986.
151. Lee, K. H.; Lin, Y. M.; Wu, T. S.; Zhang, D.C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J. J.; Wu, R. Y.; Yang, T. H.; The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Med.*, v. 54, p. 308-311, 1988.
152. Yamagishi, T.; Zhang, C.; Chang, J-J.; McPhail, D. R.; McPhai, A. T.; Lee, K-H.; The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and -B. *Phytochemistry*, v. 27, n. 10, p. 3213-16, 1988.
153. Rosner, H.; Rubin, L.; Kestenbaum, A.; Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. *Clin. J. Pain.* v. 12, p. 56–58. 1996.
154. Hunter, J. C.; Gogas, K. R.; Hedley, L. R.; Jacobson, L. O.; Kassotakis, L.; Thompson, J.; Fontana, D. J.; The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 324, p. 153– 160, 1997.
155. Patel, S., Naeem, S., Kesingland, A., Froestl, W., Capogna, M., Urban, L., Fox, A.; The effects of GABA_B agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Pain.*, v. 90, n. 3, p. 217-226, 2001.
156. Bortalanza, L. B.; Ferreira, J.; Hess, C. S.; Monache, D. F.; Yunes, A. R.; Calixto, J. B.; Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against

- neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharm.*, v. 453, p. 203-208, 2002.
157. Recio-Iglesias, M. C.; Giner, R. M.; Máñez, S.; Rios, J. L.; Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.*, v. 61, p. 182–185, 1995.
158. Matsuyama, F.; Indigestible dextrin corosolic acid, maslinic acid, tormentic acid and their salts as hyperglycemia inhibitors. *Jpn. Kakai Tokkyo Kho*, p.10, 2006.
159. Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H.; Sterol glucosides from *Prunella vulgaris* *Phytochemistry*, v. 29, p. 2351, 1990.
160. Silva, D. A.; Silva, T. M. S.; Lins, A. C. S.; Costa, D. A.; Cavalcante, J. M. S.; Matias, W. N.; Souza, M. F. V.; Braz-Filho, R.; Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (Malvaceae). *Quím. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.
161. Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Piló-Veloso, D.; Howarth, O. W.; Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus swartz* (Bombacaceae). *Eclética Química*, v. 23, p. 45-57, 1998.
162. Agrawal, P. K.; NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides *Phytochemistry*, v. 31, p. 3307, 1982.
163. Silva, D. A.; Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* MART et ZUCC. (Tiliaceae).2004. 137f. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.