



UNIVALI
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PATRICIA WALTER ROSA

**PERFIL FITOQUÍMICO, VARIAÇÃO SAZONAL E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Epidendrum mosenii***

Itajaí - 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS E BIOATIVAS**

PATRICIA WALTER ROSA

**PERFIL FITOQUÍMICO, VARIAÇÃO SAZONAL E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Epidendrum mosenii***

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Rivaldo Niero

Itajaí, Novembro de 2006.

**PERFIL FITOQUÍMICO, VARIAÇÃO SAZONAL E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Epidendrum mosenii***

Patricia Walter Rosa

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Valdir Cechinel Filho, Doutor
Orientador

Tânia Mari Bellé Bresolin, Doutora
Coordenadora do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Titulação Nome do Presidente da Banca (instituição)
Presidente

Doutor Rivaldo Niero (Univali)
Co-orientador

Itajaí, 13 de novembro de 2006

Dedicatória

Não apenas essa dissertação, mas todas as minhas conquistas profissionais são dedicadas aos meus pais, César e Elsa, que a muito custo sempre investiram e acreditaram em mim e ao Samuel, meu melhor amigo e companheiro. Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Esse momento além de uma vitória profissional, é acima de tudo uma vitória pessoal, por isso agradeço:

A Deus por ter me dado a vida e a consciência, não sei se sou merecedora mas me proponho a fazer jus. Obrigada, por me conceder todos os sentidos me permitindo sentir e apreciar o caminho, mesmo com muitas pedras, oportunidades de aprendizado e crescimento.

Ao meu anjo protetor, por sempre ouvido minhas lamentações (não foram poucas!).

Ao meu pai, Cesar Amilcar Rosa, por ser o meu grande exemplo de pessoa, por ter permitido ser quem sou, mesmo que contrariado em alguns momentos, estando sempre ao meu lado, sendo meu símbolo de força e ternura. Obrigada por me amar e aceitar, você é meu herói!

A minha mãe Elsa Walter Rosa e meus irmãos André e Alexandre Walter Rosa por darem o verdadeiro sentido a palavra família, discutindo nossas vidas em mesas redondas e nem sempre convergindo para o mesmo veredito porém, sempre cheias de preocupação e cuidado (um pouco de discussão também!).

Ao meu namorado, Samuel Melim por estar sempre comigo, nos bons e maus momentos, escrevemos essa dissertação a quatro mãos, às custas de muitos finais de semana e com uma boa dose de conjectura...melhor amigo, companheiro, confidente, sempre sensível e compreensivo. Meu mérito é teu também, te amo!

Ao imprescindível conhecimento técnico da professora Marina, sua ajuda engrandeceu muito o trabalho.

Ao pessoal do meu novo setor, Ana, Gabi, Paty, Fe, por terem paciência e compreensão nos momentos de desespero dos "deadlines"!

À todos os amigos, do curso e fora dele, que torceram por mim nos dias mais difíceis. Espero comemorar a vitória dessa etapa e continuar contando com vocês...

Ao meu orientador, professor Cechinel, e a todas as pessoas que fizeram análises pertinentes ao trabalho, porque com esse tema tão abrangente, vários setores foram necessários, obrigada. Rosélia a você também, que paciência...

Aqueles que em alguma etapa fizeram parte da minha vida e dessa luta, que eu tenha esquecido de citar (desculpem, pois nem acredito que esse dia chegou!).

A Vivi, minha neguinha que sempre me achou o máximo e nunca me reprovou por nada!!! Au au

Em especial à todos aqueles que se dedicaram à tarefa de tornar esses anos de mestrado o mais estressantes e sofríveis possíveis para mim. Sem vocês eu não teria me tornado uma pessoa ainda mais tolerante.

**“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda em vão,
Que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
Que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
Que em conformidade viver.”**

Martin Luther King

PERFIL FITOQUÍMICO, VARIAÇÃO SAZONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Epidendrum mosenii*.

Patricia Walter Rosa

Novembro/2006

Orientador: Valdir Cechinel Filho, Doutor.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Bioativas

Número de Páginas: 106

A *Epidendrum mosenii* Rchb. F. (Orchidaceae), conhecida popularmente como “orquídea da praia”, é uma planta comumente encontrada na costa brasileira, utilizada como ornamental, sendo também empregada na medicina popular para o tratamento de algumas doenças. Este trabalho descreve um estudo comparativo das diferentes partes vegetais (caules, folhas, raízes e flores) de quatro diferentes coletas, representando diferentes estações do ano. Foi realizado um estudo comparativo com a finalidade de verificar qual a melhor parte da planta, em termos de rendimento (em massa), constituição química e atividade biológica, visando obter subsídios para o futuro desenvolvimento de um fitoterápico. Para tanto, foram adequadas metodologias analíticas quali e quantitativas. Dos caules da *E. mosenii* foram obtidos (isolados) dois triterpenos, uma mistura de esteróides e dois estilbenos. O triterpeno 24-metileno-ciclo-artanol teve seu perfil cromatográfico, analisado e quantificado nos extratos através de cromatografia gasosa e o perfil do triterpeno folidotina e demais estilbenos foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os extratos utilizados no estudo foram obtidos a partir da extração com diclorometano. Verificou-se que o caule, apesar de apresentar um baixo rendimento em massa de extrato, demonstrou o melhor rendimento de 24-metileno-ciclo-artanol, tornando-se a parte de escolha para obtenção do mesmo. Verificou-se ainda que a coleta referente ao mês de fevereiro apresentou o melhor rendimento desta substância. Os extratos de caule, assim como os estilbenos, isoladamente, apresentaram significativo efeito analgésico quando testados no modelo de dor induzida pelo ácido acético em camundongos, sendo o extrato obtido da planta coletada em novembro o mais promissor. A planta em questão apresentou também atividade antifúngica, especialmente contra dermatófitos, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), a qual parece estar relacionada com a presença de estilbenos. Os resultados obtidos confirmam estudos anteriores e justificam o uso popular desta planta contra processos infecciosos.

Palavras-chave: *Epidendrum mosenii*, estilbenos, triterpenos, atividade analgésica, atividade antifúngica.

STUDIES ON *Epidendrum mosenii*. SEASONAL EVALUATION AND BIOLOGICAL EFFECTS.

Patricia Walter Rosa

Nov /2006

Advisor: Valdir Cechinel Filho, Doutor.

Area of Concentration: Natural Products and bioactive compounds

Number of Pages: 106

Epidendrum mosenii Rchb. F. (Orchidaceae), known as “orquídea-da-praia”, commonly occurs near to the Brazilian coast as ornamental, being sometimes employed in folk medicine to treat several diseases. This work describes a comparative study of different parts (leaves, stems, roots and flowers) from four harvestings of this plant in different seasons. From the stems were obtained two triterpenes, a steroidal mixture and two stilbenes. A comparative study was realized to verify the best part of the plant which produces the higher mass extract, biological activity and chemical constitution, in order to obtain subsidies for the development of a future new phytomedicine. The development of novel qualitative and quantitative analytical methodologies are needed for these purposes. A study on the content of the triterpene 24-methylene-cyclo-artanol in extracts was made and its concentration was determined by Gas Chromatography (GC), using external standard isolated from the *E.mosenii* stems. The presence of another triterpene (Pholidotin) and stilbenes was carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) also using external standard isolated from the *E.mosenii* stems. The used extracts were obtained from dichloromethane extraction. The quantitative analysis showed that the stems present more 24-methylene-cyclo-artanol than the other parts when collected on February. The stems collected in november exhibited the most pronounced antinociceptive activity against acetic acid pain model as well as the stilbenes. When tested against different pathogenic fungi, this plant demonstrated antifungal activity, especially against dermatophytes, by the determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), which seems to be related to the presence of stilbenes. The results confirm previous studies on this plant and justify its popular use against infectious and dolorous processes.

Keywords: Medicinal plants, *Epidendrum mosenii*, chemical composition, analytical methodologies, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) **3** **Erro! Indicador não definido.**
- FIGURA 2.** Flor de *Epidendrum mosenii* 46
- FIGURA 3.** Planta inteira (*Epidendrum mosenii*) 46
- FIGURA 4.** Curva de calibração do 24-metileno-ciclo-artnol 55
- FIGURA 5.** Curva de calibração da folidotina 58
- FIGURA 6** Curva de calibração do 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno 59
- FIGURA 7** Curva de calibração do 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno 60
- FIGURA 8.** Rendimento do extrato (g %) das diferentes partes da planta nas 4 coletas 64
- FIGURA 9.** Representação esquemática de CCD analítica do extrato diclorometano de caule e dos padrões externos isolados como referência, eluída com sistema hexano : acetona na proporção 70 : 30 e revelada com anisaldeído sulfúrico 65
- FIGURA 10.** Representação esquemática de CCD analítica do extrato diclorometano de caule e dos padrões externos isolados como referência, eluída com sistema hexano : acetona na proporção 60 : 40 e revelada com anisaldeído sulfúrico 67
- FIGURA 11.** Cromatograma (CG) do 24-metileno-ciclo-artanol obtido a partir da curva de calibração 69
- FIGURA 12.** Cromatograma (CG) do extrato DCM do caule 70
- FIGURA 13.** Cromatograma (CG) do extrato DCM da folha 70
- FIGURA 14.** Cromatograma (CG) do extrato DCM da raiz 71
- FIGURA 15.** Cromatograma (CG) do extrato DCM da flor 71
- FIGURA 16.** Gráfico ANOVA obtido a partir das concentrações (mg / mL) do composto (14) nas diferentes partes da planta 73
- FIGURA 17.** Gráfico ANOVA obtido a partir das concentrações (mg / mL) do composto (14) nas diferentes coletas durante as diferentes estações do ano 74
- FIGURA 18.** Gráfico ANOVA obtido a partir das concentrações (mg / mL) do composto (14) nas diferentes partes da planta e diferentes estações do ano 75
- FIGURA 19.** Cromatograma (CLAE) do extrato DCM do caule com sistema acetonitrila / água (70 : 30) 1 mL / min 77
- FIGURA 20.** Cromatograma (CLAE) do extrato DCM do caule com sistema acetonitrila / água (90 : 10) 0,6 mL / min 77
- FIGURA 21.** Cromatograma (CLAE) do extrato DCM do caule com sistema acetonitrila / água (95 : 5) 0,8 mL / min 77
- FIGURA 22.** Cromatograma (CLAE) do extrato DCM do caule com sistema gradiente 79
- FIGURA 23.** Cromatograma (CLAE) do composto folidotina 80
- FIGURA 24.** Perfil cromatográfico do extrato DCM do caule e absorções máximas em UV do composto folidotina no extrato 81

FIGURA 25. Cromatograma (CLAE) do composto 4,5'- diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno 82

FIGURA 26. Perfil cromatográfico do extrato DCM do caule e absorções máximas em UV do composto 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno 83

FIGURA 27. Cromatograma (CLAE) do composto 4,3'5'- triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno 84

FIGURA 28. Perfil cromatográfico do extrato DCM do caule e absorções máximas em UV do composto 4,3'5'- triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno 85

FIGURA 29. Efeito dos extratos DCM de caule de *Epidendrum mosenii* em diferentes coletas, administrados via intraperitoneal no modelo de dor induzida pelo ácido acético 86

FIGURA 30. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em relação ao tratamento com estilbenos isolados de *Epidendrum mosenii* 88

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Condições utilizadas para análise em CG 54
- TABELA 2.** Sistema de gradiente utilizado para análise em CLAE 56
- TABELA 3.** Rendimento bruto de massa do extrato de diclorometano obtido de diferentes partes de *E.mosenii* em diferentes coletas 63
- TABELA 4.** Análise estatística (ANOVA) das concentrações do 24-metileno-ciclo-artanol na *Epidendrum mosenii* para os extratos diclorometano 74
- TABELA 5.** Concentração de 24-metileno-ciclo-artanol nas diferentes partes em diferentes coletas em mg / 100g de planta seca 76
- TABELA 6.** Absorção máxima dos compostos, seu tempo e fator de retenção 80
- TABELA 7.** Concentração de folidotina nas diferentes partes em diferentes coletas em mg / 100g de planta seca 81
- TABELA 8.** Concentração de 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno nas diferentes partes em diferentes coletas em mg / 100g de planta seca 83
- TABELA 9.** Concentração de 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno nas diferentes partes em diferentes coletas em mg/100g de planta seca 85
- TABELA 10.** Avaliação da atividade analgésica dos extratos de caule de *E.mosenii* das diferentes coletas, em distintas doses no modelo de contorções abdominais 87
- TABELA 11.** Atividade antifúngica através do método da Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g} / \text{mL}$) dos estilbenos isolados 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno 89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[]: concentração
24 MCA: 24 metileno-ciclo-artanol
C, H e O: carbono, hidrogênio e oxigênio
CC: cromatografia em coluna
CCD: Cromatografia em camada delgada
CG: cromatografia gasosa
CIM: concentração inibitória mínima
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CV: coeficiente de variação
DCM: diclorometano
DI₅₀: Dose inibitória 50%
DIC: detector de ionização de chama
DiOH: 4,5 diidroxi 3,3-dimetoxidiidroestilbeno **(18)**
DMSO: dimetilsulfóxido
FDA: Food and Drug Administration
HPLC: high performance liquid chromatography
IV: infra vermelho
K': fator de retenção
KBr: brometo de potássio
kg: quilogramas
LD: limite de detecção
mg: miligrama
min: minutos
mL: mililitro
µg: micrograma
n: número de replicatas
OMS: Organização Mundial de Saúde
s: desvio padrão
TriOH: 4,3'5'triidroxi-3- metoxi-diidroestilbeno **(19)**
UV: ultravioleta

LISTA DE COMPOSTOS

- COMPOSTO 1** Quinina
- COMPOSTO 2** Morfina
- COMPOSTO 3** Codeína
- COMPOSTO 4** Cânfora
- COMPOSTO 5** Cocaína
- COMPOSTO 6** Digitoxina
- COMPOSTO 7** Digoxina
- COMPOSTO 8** Taxol
- COMPOSTO 9** 3'4'5,6,7,8-Hexametoxi-flavonóide
- COMPOSTO 10** Resveratrol
- COMPOSTO 11** Hircinol
- COMPOSTO 12** Orchinol
- COMPOSTO 13** Folidotina
- COMPOSTO 14** 2 4 metileno-ciclo-artanol
- COMPOSTO 15** β -sitosterol
- COMPOSTO 16** Stigmasterol
- COMPOSTO 17** Campesterol
- COMPOSTO 18** 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno
- COMPOSTO 19** 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 A importância das plantas medicinais como fonte de medicamentos	20
3.2 Etnobotânica X Fitoterapia	26
3.3 O mercado de fitoterápicos e a indústria farmacêutica	27
3.4 Desenvolvimento de Fitoterápicos	29
3.5 Controle de qualidade de matérias-primas vegetais	34
3.6 Compostos fenólicos	38
3.7 Família Orchidaceae	42
3.7.1 <i>Epidendrum mosenii</i>	46
3.7.1.1 <i>Constituintes químicos isolados da Epidendrum mosenii</i>	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Solventes, reagentes e materiais utilizados	50
4.2 Equipamentos	50
4.3 Obtenção do material vegetal.....	51
4.3.1 <i>Coleta da planta</i>	51
4.3.2 <i>Triagem do material vegetal</i>	51
4.3.3 <i>Secagem do material vegetal</i>	51
4.3.4 <i>Moagem do material vegetal</i>	51
4.4 Preparação e concentração dos extratos	52
4.5 Isolamentos dos compostos	52
4.6 Purificação dos compostos isolados	52
4.7 Caracterização dos compostos isolados	53
4.7.1 <i>Espectrofotometria de absorção no infra-vermelho</i>	53
4.7.2 <i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear</i>	53
4.8 Quantificação dos compostos isolados por cromatografia	53
4.8.1 <i>Quantificação por cromatografia gasosa</i>	53

4.8.1.1	<i>Curva de calibração do triterpeno 24 – metileno-ciclo-artanol</i>	54
4.8.1.2	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	55
4.8.2	<i>Quantificação por cromatografia líquida de alta definição</i>	56
4.8.2.1	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	57
4.8.2.2	<i>Curva de calibração da folidotina</i>	57
4.8.2.3	<i>Curva de calibração do 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno</i>	58
4.8.2.4	<i>Curva de calibração do 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno</i>	59
4.9	<i>Metodologia para avaliação dos efeitos biológicos</i>	60
4.9.1	<i>Ação analgésica</i>	60
4.9.2	<i>Ação antifúngica</i>	61
4.10	<i>Análise estatística dos dados</i>	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	<i>Análise fitoquímica</i>	63
5.1.1	<i>Rendimentos dos extratos obtidos</i>	63
5.1.2	<i>Isolamento e caracterização dos compostos</i>	64
5.2	<i>Quantificação dos compostos isolados através de métodos cromatográficos</i>	68
5.2.1	<i>Otimização das condições de cromatografia gasosa</i>	68
5.2.1.1	<i>Composto 24-metileno-ciclo-artanol</i>	68
5.2.1.1.1	<i>Análise estatística do método cromatográfico</i>	72
5.2.1.1.2	<i>Rendimento do 24-metileno-ciclo-artanol nos extratos</i>	75
5.2.2	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	77
5.2.2.1	<i>Otimização dos parâmetros do método analítico</i>	77
5.2.2.2	<i>Análise quantitativa</i>	80
5.2.2.3	<i>Rendimento da folidotina nos extratos</i>	80
5.2.2.4	<i>Rendimento do 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno nos extratos</i>	82
5.2.2.5	<i>Rendimento do 4,3'5'triidroxi-3- metoxi-diidroestilbeno nos extratos</i>	84
5.3	<i>Avaliação biológica</i>	86
5.3.1	<i>Atividade analgésica</i>	86
5.3.2	<i>Atividade antifúngica</i>	89
6.	CONCLUSÕES	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a etiologia das doenças é ainda bastante limitado e para a maioria destas não existem tratamentos realmente efetivos (TULP; BOHLIN, 2004). Assim, as plantas medicinais que têm sua toxicidade e eficiência terapêutica avaliadas ou determinadas, podem ser utilizadas pela população, atendendo algumas de suas necessidades básicas de saúde e garantindo um tratamento de baixo custo, fácil acesso e com grande compatibilidade cultural (YAMADA, 1998).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana, apesar de ainda geralmente se aproveitar apenas de uma pequena fração das mesmas. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL; PINTO; VEIGA JÚNIOR, 2002), como ocorre, por exemplo, com grande parcela da população brasileira e 2/3 da população mundial (PINTO et al., 2002).

O aumento significativo do uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica, atualmente, pela população mundial, comprova-se pelo fato de que, em 1991, quase metade dos medicamentos mais vendidos no mundo eram produtos de origem natural ou derivados dos mesmos (STEPP, 2004). No Brasil, observa-se que as plantas medicinais encontram-se comercialmente bastante difundidas, fazendo parte do cotidiano das pessoas de diferente poder aquisitivo, desde as regiões com menos recursos e acesso a informação até as grandes cidades (MACIEL; PINTO; VEIGA JÚNIOR, 2002).

O expressivo interesse do mercado econômico por medicamentos provenientes de plantas medicinais tem sido frequentemente observado no cenário mundial, especialmente na Alemanha, responsável por 50 % do mercado de fitoterápicos da Europa, Ásia e Estados Unidos. Dentre as várias razões que propiciaram o crescimento deste mercado e o interesse da população por tais medicamentos podem ser mencionadas: 1) a preferência dos consumidores por terapias naturais; 2) a preocupação em relação aos efeitos colaterais frequentemente observados com os medicamentos sintéticos e a crença errônea de que os medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais; 3) a tendência da população em acreditar que os

medicamentos fitoterápicos podem ser efetivos nos tratamentos de doenças quando os medicamentos sintéticos têm falhado; 4) a tendência para a automedicação; 5) a existência de estudos científicos para alguns produtos comprovando sua eficácia clínica, segurança, bem como a melhoria do controle de qualidade dos mesmos e 6) menores custos para o consumidor de fitoterápicos (CALIXTO, 2001).

Estima-se que apenas uma porcentagem relativamente pequena (5 – 15 %) de aproximadamente 250.000 plantas superiores existentes foram sistematicamente investigadas focando a presença de compostos bioativos (KINGHORN, 2001). O Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria-prima para a produção de fitofármacos e fitoterápicos, detendo cerca de 1/3 da flora mundial, sendo uma significativa fonte alternativa de medicamentos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; NIERO et al., 2003).

É importante ressaltar que muitos exemplares de plantas medicinais da biota brasileira, são provenientes de outros países e sendo assim, as plantas endêmicas ainda são pouco conhecidas e se constituem num fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento. O pesquisador que trabalha com estas plantas deve estar envolvido tanto no isolamento e identificação dos constituintes ativos como na tentativa de validação de métodos analíticos modernos, visando o controle de qualidade (PINTO; KANEKO; OHARA, 2002).

O Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) vem estudando o potencial terapêutico de plantas da flora catarinense há cerca de 10 anos, sendo que vários extratos, frações e compostos puros com diferentes ações biológicas e finalidades terapêuticas, demonstraram relevantes resultados referentes aos diferentes ensaios biológicos (CECHINEL FILHO, 2000).

Entre as plantas estudadas pelo NIQFAR, destaca-se a *Epidendrum mosenii* Rchb (Orchidaceae), a qual é muitas vezes empregada popularmente contra processos infecciosos e dolorosos (OLIVEIRA, 1999).

No Baixo e Médio Vale do Itajaí, a *E. mosenii* caracteriza-se como planta de vegetação litorânea ocorrendo freqüentemente nesta localização (KLEIN, 1978). Os estudos fitoquímicos são escassos sobre esta planta, mas Floriani e colaboradores, (1998) demonstraram que a planta possui ação analgésica de interesse, cujo efeito parece estar relacionado com os triterpenos folidotina e 24-metileno-ciclo-artanol

(FERREIRA et al., 2000), além dos esteróides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol (OLIVEIRA, 1999; CECHINEL FILHO, 2000). Estes autores confirmaram os efeitos analgésicos destes compostos em vários modelos experimentais *in vivo*. Em testes toxicológicos, os extratos das folhas de *Epidendrum mosenii*, quando avaliados em relação à toxicidade aguda e sub-aguda, teste hipocrático, parâmetros anatomopatológicos e ensaios bioquímicos, apresentaram baixa toxicidade (CORDEIRO; ZAMBAM, 1999).

Diante do suposto, a espécie *E.mosenii* representa interessante material vegetal, caracterizada pelo seu potencial biológico, para a continuação de seu estudo através do desenvolvimento de uma proposta de metodologia analítica para avaliação de seu perfil fitoquímico em função da sazonalidade, bem como da sua relação com atividade biológica.

O presente trabalho visa, portanto, fornecer ferramentas para o futuro desenvolvimento de um produto fitoterápico ou fitomedicamento mediante a adequação de métodos analíticos aplicados à matéria-prima vegetal, constituída de caule, folha, raiz e flores, separadamente, considerando o fator sazonal investigando a atividade biológica dos compostos utilizados como marcadores químicos e com maior rendimento de massa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fitoquímico da *Epidendrum mosenii* considerando a variação sazonal, bem como, as propriedades analgésicas e antifúngicas de alguns compostos isolados.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar, purificar e caracterizar constituintes químicos com atividade biológica presentes nos extratos de diclorometano da *E. mosenii* através de procedimentos cromatográficos e espectroscópicos convencionais;
- Comparar a composição química dos diferentes órgãos vegetais (folhas, flores, caules e raízes) de *E. mosenii* considerando as modificações sazonais verificadas nas quatro estações do ano;
- Desenvolver metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) para a análise qualitativa e quantitativa dos compostos isolados de *E. mosenii* nos distintos órgãos vegetais (folhas, flores, caules e raízes) nas diferentes coletas, em quatro estações do ano;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos diclorometano, bem como alguns compostos puros obtidos de *E. mosenii* contra diferentes microrganismos patogênicos aos seres humanos, através da determinação da CIM;
- Avaliar a atividade analgésica *in vitro* dos extratos diclorometano, bem como alguns compostos puros obtidos de *E. mosenii* através do modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A importância das plantas medicinais como fonte de medicamentos

A natureza, de forma geral, tem produzido inúmeras substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos desses de grande valor agregado devido as suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e componentes agrícolas. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (PINTO et al., 2002).

Tradicionalmente, a pesquisa envolvendo fontes naturais sempre foi focada em plantas terrestres e microrganismos e ultimamente, organismos de origem marinha e até outras fontes menos convencionais têm sido relatadas. No entanto, dentre estas, historicamente a fonte mais importante para obtenção de medicamentos tem sido as plantas medicinais e as pesquisas têm progredido em duas linhas majoritárias: etnofarmacologia e toxicologia (TULP; BOHLIN, 2004).

A importância dos produtos naturais na terapêutica é reconhecida desde tempos imemoriais e o conhecimento de plantas alucinógenas pelos ameríndios que as empregavam em seus ritos pagãos, bem como das propriedades afrodisíacas de diversas poções preparadas a partir de distintas espécies vegetais, acompanha o homem há milênios (BARREIRO; FRAGA, 2001).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica e são importantes pela sua devida contribuição como fonte natural de fármacos (NOLDIN et al., 2003). O estudo das plantas medicinais propiciou o isolamento de algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, como a morfina,

quinina, cânfora e cocaína e que até hoje, são muito empregados no tratamento de certas doenças (MONTANARI; BOLZANI, 2001; NIERO et al., 2003).

O Brasil, geograficamente é o quinto maior país do mundo em território e tem aproximadamente 170 milhões de habitantes. É o 12º colocado em riqueza, porém 9,9 % de sua população vive com menos de 1 dólar por dia. O país é marcado por desigualdades sociais, regionais, étnicas, rurais e urbanas, porém com uma longa história de utilização de medicina tradicional pelos indígenas locais e alta incidência de tratamentos em medicina alternativa e complementar (TOVEY et al., 2006).

Além disso, o Brasil tem um importante papel como país possuidor de uma mega-diversidade vegetal, com elevada variedade genética no mundo, com aproximadamente 55.000 espécies vegetais catalogadas que, se tiverem comprovação do seu valor medicinal, poderão ser utilizadas pela indústria farmacêutica como matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos e como fonte para fitofármacos (OLIVEIRA, 2006).

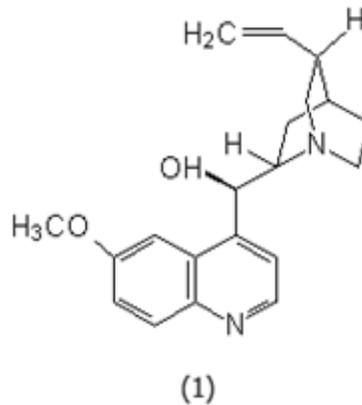
Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

A medicina tradicional chinesa desde muito tempo tem contribuído para a descoberta de novos produtos naturais bioativos. Um exemplo clássico desta importante contribuição pode ser ilustrado pelo isolamento de terpenos polioxigenados do extrato da árvore *Ginkgo biloba*, os quais apresentam uma importante atividade anti-trombótica (BARREIRO; FRAGA, 2001). A cerca dessa utilização, podemos citar ainda os produtos naturais isolados de espécies como *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces*, obtidos e testados durante a Segunda Guerra Mundial com efetiva ação antibacteriana (PHILLIPSON, 2001).

São inúmeros os compostos extraídos de plantas empregados na preparação de agentes terapêuticos que já se encontram disponíveis no mercado farmacêutico. Muitos deles utilizados em associação com substâncias naturais ou sintéticas (NIERO et al., 2003). Além do fator econômico e do avanço tecnológico que as plantas com potencial

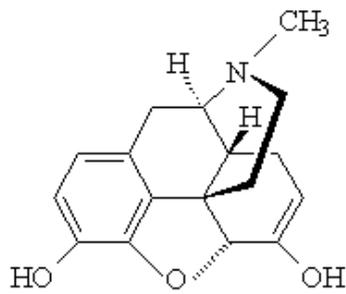
terapêutico possuem, há que se destacar a importância também para a manutenção da biodiversidade através da conservação dessas espécies (MONGE et al., 2000).

Diferentes classes químicas originaram diversos fármacos, de distintas categorias terapêuticas, como ilustram os alcalóides de Cinchona como a quinina **(1)**, a atropina, efedrina, pilocarpina, morfina e muitos outros como a vincristina e a vinblastina, alcalóides isolados da *Vinca rosea* empregados no tratamento de leucemias (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

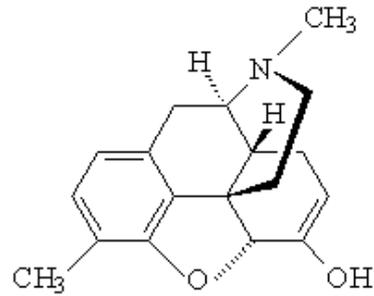


A utilização da espécie botânica *Papaver somniferum* L., conhecida como papoula, e seus alcalóides, de onde é extraído o ópio, remete-se a 5.000 anos aC, onde há relatos descrevendo a morfina **(2)** com sua potente ação hipnoanalgésica e a codeína **(3)** com sua ação antitussígena (PINTO et al., 2002).

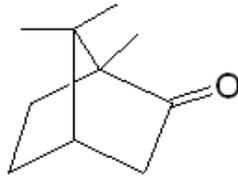
Outras substâncias isoladas de plantas e que se consagraram muito eficazes até hoje em diferentes aplicações clínicas são a cânfora **(4)** e a cocaína **(5)** (MONTANARI; BOLZANI, 2001).



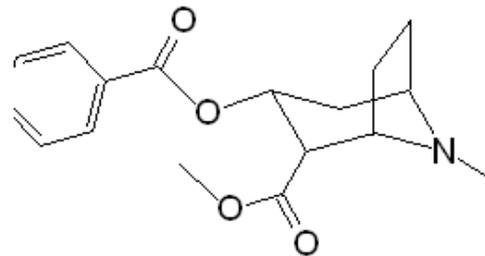
(2)



(3)



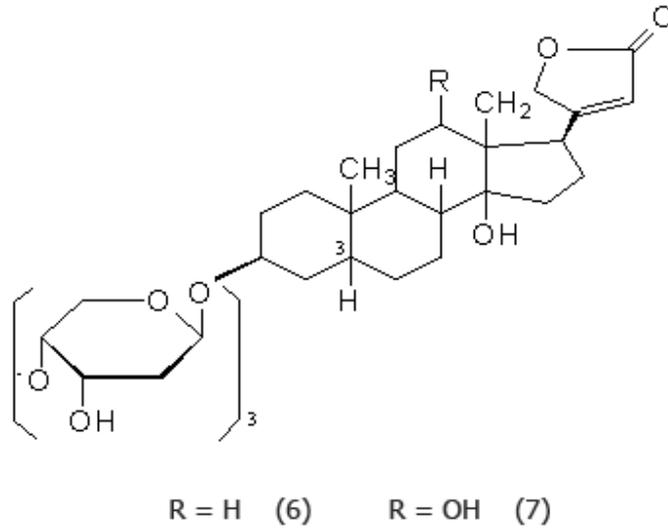
(4)



(5)

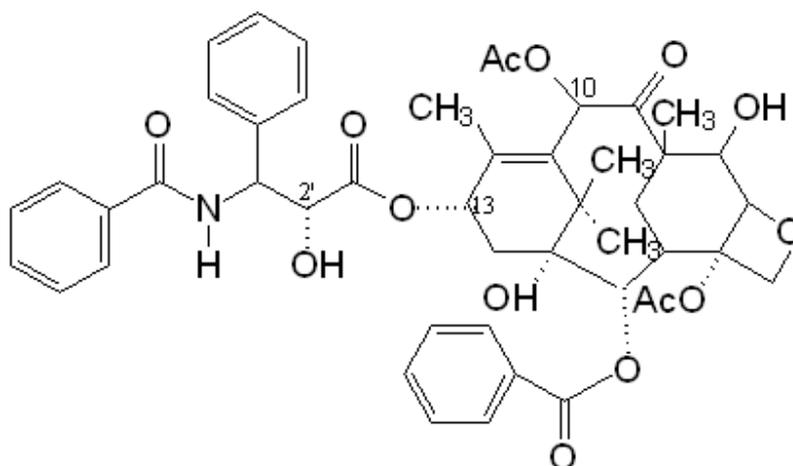
Um exemplo histórico da importância dos produtos naturais na gênese de fármacos foi a descoberta do ácido acetilsalicílico (AAS) a partir da salicina que é um glicosídeo natural proveniente do *Salix sp*, precursor do ácido salicílico e encontrado no salgueiro (*Salicaceae*). Este glicosídeo foi o protótipo natural para a descoberta do ácido acetilsalicílico, um fármaco centenário com importantes propriedades farmacoterapêuticas, empregado até hoje como analgésico, inclusive para uso pediátrico, com estrutura extremamente simples de apenas nove átomos de carbono (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Na pesquisa por novas substâncias com atividades cardiovasculares, destaca-se a forskolina, que exibiu diminuição da pressão sanguínea, além de apresentar efeito antiespasmódico e ser empregada no tratamento do glaucoma. Os efeitos benéficos dos extratos das plantas *Digitalis purpurea* e *lanata* levaram ao uso da digitoxina (6) e digoxina (7) na medicina cardiovascular e hoje são conhecidos como glicosídeos cardíacos (CLARK, 1996).



O uso de plantas medicinais por pacientes em farmacoterapia cardiovascular é largamente disseminado o que atualmente tem se tornando um problema, pois a própria digoxina, descoberta através da *Digitalis*, tem sido relatada como envolvida em diversos casos de interações com plantas medicinais como o caso da erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*) acusada de diminuir as concentrações plasmáticas de digoxina (IZZO et al., 2005).

Outro importante e talvez o mais marcante exemplo da natureza em fornecer compostos ativos consiste no taxol (**8**), um diterpeno isolado de *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae) (MONTANARI; BOLZANI, 2001; STEPP, 2004). A descoberta do taxol data de 1962 quando, 2 anos após coletado, os pesquisadores descobriram que seus extratos apresentavam atividade citotóxica e isolaram uma substância cristalina que somente em 1978 foi considerada capaz de regredir tumores mamários e nos anos 80 mostrou ainda ser efetiva contra o câncer de ovário. Essa substância foi denominada taxol e atualmente é obtida através de uma semi-síntese cuja matéria-prima apresenta esqueleto taxano e o anel oxietano completamente formado (LESNEY, 2004). Desde a sua descoberta até hoje, o taxol é o agente anti-câncer mais vendido de todos os tempos, excedendo o volume de vendas no valor de US\$ 1 bilhão anualmente (TULP; BOHLIN, 2002).



(8)

Uma análise retrospectiva realizada por Kinghorn (2002) demonstrou que mais de 60% dos agentes anti-infecciosos e anti-tumorais comercialmente disponíveis ou em estágios finais de desenvolvimento são fármacos de origem natural.

Entre os produtos naturais de origem vegetal utilizados como protótipos na descoberta de novos fármacos encontra-se ampla e diversa arquitetura molecular, como ilustram os terpenos, bioformados pela mesma rota sintética geral, com diversos centros esterogênicos e possuindo apenas átomos de C, H e O. A espetacular diversidade molecular de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais, como flavonóides, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, alcalóides, entre outras, representa fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura enantiopura, como assinalava Pasteur em 1860 (BARREIRO; FRAGA, 2001).

A química combinatória continua a ser o maior método utilizado no processo de desenvolvimento de fármacos. É notório que há uma tendência em relação à síntese de complexos produtos naturais como compostos referências e a adoção conjunta da diversidade da síntese orientada e a química combinatória (NEWMAN; CRAGG; KENNETH, 2003). Sabe-se que a síntese e caracterização dos complexos compostos naturais obtidos de plantas é um processo de grande dificuldade. Além disso, muitos destes são difíceis de purificar e se obter em quantidade mínima até para se desenvolver um estudo (LESNEY, 2004).

Portanto, a utilização das plantas, seja como fitoterápico ou como fonte de substâncias protótipos, evidencia a importância da investigação científica para o desenvolvimento de um novo medicamento. Tais pesquisas deverão ser direcionadas à valorização e modulação da atividade farmacológica a ser explorada, garantindo a ação terapêutica, a segurança de utilização, bem como a viabilidade de produção. Neste contexto, a pesquisa fitoquímica tem por objetivos, além de conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença, também selecionar as substâncias de interesse biológico e direcionar para seu isolamento e elucidação estrutural (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; SIMÕES et al., 2003; NIERO et al., 2003).

3.2 Etnobotânica X Fitoterapia

As observações populares sobre o uso e a eficácia do tratamento com plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitos ainda não terem seus constituintes químicos conhecidos (PINTO et al., 2002).

A etnobotânica, o estudo da relação entre pessoas e plantas, prevê a utilização das plantas pelos humanos para obtenção de alimento, vestuário, ornamentação, rituais, materiais de construção e fins religiosos. O uso de plantas medicinais por povos indígenas tem sido particularmente interessante como possível rota de desenvolvimento de medicamentos, sendo que a própria etnobotânica tem um importante papel no rápido crescimento da fitoterapia no mundo desenvolvido (COX; HEINRICH, 2001).

As plantas constituem importante elemento no sistema de tratamento medicinal de muitos povos, mas principalmente dos indígenas. Por exemplo, no nordeste da Amazônia, os povos indígenas utilizam pelo menos 1.300 espécies diferentes para criar as chamadas drogas do sertão (KONG et al., 2003).

Muitas das plantas medicinais utilizadas na atualidade na América do Sul e no Brasil têm sua utilização justificada pela etnobotânica, mas nem todas possuem comprovação científica de sua eficácia (COELHO DE SOUZA et al., 2004).

A fitoterapia é uma prática conceituada pela OMS como sendo uma forma de terapia que emprega as plantas medicinais em seus programas de saúde alicerçada por

estudos de comprovação científica. Dentro desta premissa, nos deparamos com um mercado crescente dos produtos fitoterápicos e espera-se que haja também o crescimento da preocupação com o desenvolvimento de todos os controles que visam a segurança, eficácia e a qualidade dos mesmos, bem como, sua utilização racional (WHO, 2002).

Entre as vantagens dos fitoterápicos que atualmente justificam seu uso estão os efeitos sinérgicos de seus componentes, a associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes, os menores riscos de efeitos colaterais e os menores custos em pesquisa (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Estratégias que envolvem a etnofarmacologia em paralelo à toxicologia têm produzido muitos fármacos de grande interesse, com diferentes aplicações e ainda continuam a fornecer compostos protótipos (TULP; BOHLIN, 2004).

3.3 O mercado de fitoterápicos e a indústria farmacêutica

Antigamente a indústria farmacêutica de fitoterápicos baseava-se apenas na extração dos componentes das plantas, tornando-os disponíveis em sua forma mais pura, como por exemplo, o corante obtido do pau-brasil, principal produto de exportação da colônia e talvez o principal motivo para a colonização do Brasil pelos portugueses (PINTO et al., 2002).

A indústria farmacêutica nacional é basicamente uma “indústria de transformação” (KOROLKOVAS, 1989), e o mercado é controlado principalmente por companhias internacionais e/ou multinacionais (RATES, 2001). Em termos de consumo, o Brasil é o quinto país mais importante do mundo, mas a indústria farmacêutica nacional em geral não é desenvolvida e depende das descobertas sintéticas e avanços tecnológicos externos (PINTO et al., 2002).

No campo dos produtos de origem natural, as indústrias de plantas medicinais basicamente consistem em pequenos negócios, os quais encontram bastante dificuldade para continuar atuando e os projetos de pesquisa nesta área têm seu desenvolvimento limitado basicamente aos laboratórios das universidades (RATES, 2001).

Detentores de um mercado extremamente lucrativo, movimentando 400 milhões por ano, os fitoterápicos reacenderam o interesse da indústria farmacêutica pelos produtos de origem vegetal e com base em dados publicados no *Annual Reports of Medicinal Chemistry* do *The United States Food and Drug Administration (FDA)*, os produtos naturais competem por uma parcela significativamente alta no que diz respeito à descoberta de novos fármacos e no seu processo de desenvolvimento (ERENO, 2005; MONTANARI; BOLZANI, 2001). Até o ano de 1994, os medicamentos de origem natural ou acoplados à síntese de seus protótipos, representavam 60 % e 75 %, respectivamente, para o tratamento na área do câncer e das doenças infecciosas (NEWMAN; CRAGG; KENNETH, 2003; SHU, 1998).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde e outras publicações mais recentes baseadas na literatura sobre a pesquisa por novos medicamentos obtidos a partir de plantas, existem 121 fármacos utilizados como medicamento em todo o mundo, que são derivados de plantas (STEPP, 2004).

Nas duas últimas décadas do século XX, intensificaram-se as pesquisas sobre plantas medicinais no Brasil com o objetivo de avaliar sua eficácia terapêutica e a segurança de seu uso. A fitoquímica ampliou-se significativamente com a implantação de inúmeros grupos de pesquisa com pessoal habilitado e, iniciaram-se trabalhos de bioprospecção de substâncias vegetais disponíveis, bem como o isolamento biomonitorado de constituintes de plantas (OLIVEIRA; BRAGA, 2003).

Por ser o Brasil detentor de uma exuberante flora, estimada em 20 a 22 % do total mundial de espécies de plantas superiores, desempenhando papel de destaque, suscita-se o interesse cada vez maior da indústria farmacêutica mundial pelo potencial terapêutico das florestas tropicais brasileiras (OLIVEIRA; BRAGA, 2003).

Apesar de apenas cerca de 8 % das espécies vegetais brasileiras terem sido estudadas em busca de moléculas bioativas (AMORIM et al., 2003), inúmeras são as dificuldades encontradas no percurso que vai da idéia de um medicamento até o mercado, dentre elas: tempo longo, alto custo, necessidade de domínio de tecnologias avançadas e de equipes bem treinadas e multidisciplinares. Isto faz com que apenas empresas grandes, competentes e com grande disponibilidade de recursos para investimento desenvolvam medicamentos (FERREIRA, 1998).

A indústria tem se tornando organizada, formando vários grupos de estudo para aumentar a qualidade de seus produtos de origem vegetal e obtendo cooperação acadêmica para direcioná-los à investigação científica (RATES, 2001). A exemplo disto podemos citar o primeiro anti-inflamatório tópico feito a partir do extrato de uma planta brasileira oriunda da Mata Atlântica denominado Acheflan[®] e desenvolvido pela Aché, lançado recentemente, resultante de um projeto que contou com a colaboração de agrônomos, farmacêuticos e médicos em um projeto iniciado em 1998 (ERENO, 2005).

Na última década, considerável esforço foi destinado, por diversos órgãos internacionais, na tentativa de se obter provas clínicas de eficácia, para a padronização de procedimentos para se obter medicamentos a partir de plantas e para definir a composição química no intuito de se substituir produtos rudimentares por formulações farmacologicamente modernas (RATES, 2001).

Um novo modelo de exploração e conservação da biodiversidade como base do desenvolvimento da economia deve ser o próximo paradigma para o Brasil e este parece ser o caminho para se estabelecer uma economia de sucesso com parceria científica no mundo globalizado (KATO, 2001).

3.4 Desenvolvimento de Fitoterápicos

As dificuldades na utilização de plantas na tentativa de desenvolvimento de novos medicamentos são muitas, envolvendo desde questões técnicas até o desmatamento natural proveniente da seleção inicial de espécies nativas promissoras, além da obtenção de seus complexos metabólitos (LESNEY, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, a floresta tropical tem sido freqüentemente considerada o “habitat” mais promissor para pesquisas que visam obter novas fontes de fitomedicamentos devido sua elevada biodiversidade e endemismo (STEPP, 2004).

Por definição, fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais não podendo apresentar em sua composição substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004). A adição de princípios ativos sintéticos isolados, vitaminas e minerais descaracterizam-no como fitoterápico (ERENO, 2005).

Fitofármaco, por definição, "é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal", diferenciando-se do fitoterápico e exigindo portanto, uma boa dose de critério mediante sua produção e formulação (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A definição de fitoterápico (BRASIL, 2004) pressupõe que a transformação de uma planta em medicamento deve priorizar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico. (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Portanto, a produção de fitoterápicos requer necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agronômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (SONAGLIO et al., 2003).

Ao se estudar uma planta com relação às suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos que são importantes para o seu desenvolvimento: os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, etc. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, relacionados aos processos adaptativos (NIERO et al., 2003). Dados ecológicos podem fornecer dicas importantes na procura por plantas com compostos bioativos (STEPP, 2004).

A análise fitoquímica compreende a extração, separação e purificação dos constituintes químicos, bem como sua elucidação estrutural (UGAZ, 1994), sendo que apenas os compostos de maior concentração da planta são os que conseguem geralmente ser isolados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Os procedimentos utilizados na fitoquímica baseiam-se na afinidade química que os metabólitos secundários, geralmente princípios ativos responsáveis pelos efeitos medicinais, apresentam quando em contato com determinados solventes. Portanto, ao empregar por exemplo, um solvente apolar para obter um extrato, este apresentará na sua composição determinadas classes de compostos, como esteróides, terpenos e acetofenonas, enquanto que um solvente de maior polaridade, pode apresentar

flavonóides, taninos, saponinas e compostos fenólicos em geral (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Atualmente, as três categorias consideradas mais importantes de componentes de plantas no desenvolvimento e venda de medicamentos são os terpenóides, incluindo Taxol e seus derivados, os glicosídeos incluindo digitalis e flavonóides, e os alcalóides incluindo os opiáceos (LESNEY, 2004).

Embora uma única planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas aqueles presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. Além do que, os presentes em menor proporção na planta geralmente são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Cechinel Filho e Yunes (1998) elaboraram um esquema para auxiliar nesse processo (Figura 1).

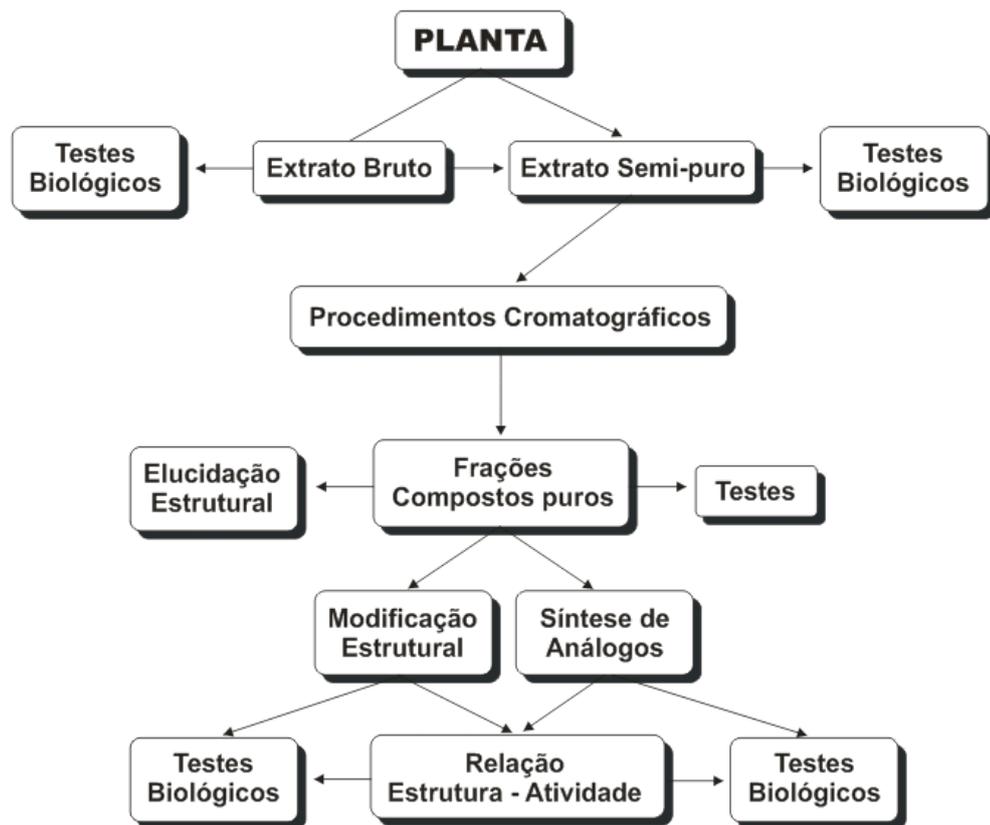


Figura 1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Uma importante etapa no estudo fitoquímico das plantas é a preparação dos extratos e o local da coleta da mesma. Como podem gerar diferenças na composição química, fatores como clima, tipo de solo e época de coleta devem ser cuidadosamente monitorados (NIERO et al., 2003).

Todas as influências ambientais, envolvendo a interação entre os organismos e seus meio ambientes, naturalmente, atuam contínua e conjuntamente sobre a planta. Esta deve ajustar-se a elas para manter-se diante de sua complexidade e âmbitos de variabilidade, em face da competição e da sobrevivência (LARCHER, 1986).

Um problema observado neste sentido para a grande maioria das plantas é a inexistência de especificações adequadas que possam orientar as atividades agronômicas, das quais a composição química depende fortemente (BASSANI; GONZALES; PETROVICK, 2005). No entanto sabe-se que o plantio é capaz de alterar a produção de compostos secundários, mudando o perfil de seus constituintes (SALLAS et al., 1999).

Enquanto as partes aéreas estão mais expostas à variabilidade, no espaço e no tempo, de radiação, temperatura, umidade, precipitação e movimento, as partes subterrâneas também sofrem com diversos fatores, como por exemplo a taxa de absorção de energia radiante, que por sinal é dependente da orientação solar, podendo variar consideravelmente frente sua localização na superfície terrestre, considerando-se a latitude, longitude e estações do ano. Esse conjunto de fatores periodicamente variável afeta diretamente os ciclos vitais dos organismos, influenciando inclusive na produção de metabólitos secundários, chama-se sazonalidade (LARCHER, 1986).

Os mecanismos bioquímicos de sobrevivência das plantas são bastante complexos por exemplo, a vegetação que ocorre nos solos de areia branca apresenta geralmente nas plantas perenes, folhagem sempre verde, mesmo quando a estação seca for muito severa. Além disso, estas plantas são ricas em compostos secundários tóxicos produzidos como defesa química devido à necessidade de superar as perdas nutricionais (JANZEN, 1980).

Nesses sistemas não é surpreendente constatar que exista uma forte competição entre as raízes e os fungos. Não raro, neste sistema radicular as raízes estão envolvidas numa interação mutualística com fungos que aparentam ser especialistas

em absorver nutrientes. Esse é um caso bastante comum entre as orquídeas epífitas nos solos tropicais de areia branca, os quais são praticamente desprovidos de sais minerais de utilidade fisiológica, onde a planta supre o fungo micorrizal com carboidratos que são absorvidos pelas hifas e os sais minerais absorvidos pelas hifas são fornecidos para a raiz (JANZEN, 1980).

Todos os procedimentos envolvendo a planta após sua coleta são de extrema importância visto que podem influenciar diretamente nos resultados analíticos perdendo, portanto seus propósitos essenciais. A secagem em estufa (40°C) ou à sombra, à temperatura ambiente, deve ser procedida logo após a coleta, para evitar a proliferação de fungos. Na preparação dos extratos, a planta deve estar completamente fresca ou totalmente seca para definir com melhor exatidão o rendimento, tanto da massa bruta como dos constituintes químicos (CALIXTO, 2001).

Após a secagem do material coletado, segue-se a fundamental etapa de extração pela escolha de métodos como a maceração ou percolação, utilizando diferentes tipos de solventes orgânicos, resultando em preparações líquidas, secas ou viscosas. A natureza do solvente, do processo de extração, concentração e secagem, afetam criticamente a composição química do produto final (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2001).

A partir dos extratos é possível realizar o isolamento dos constituintes da planta podendo envolver diferentes técnicas cromatográficas, com destaque para cromatografia em coluna, através da qual, os compostos se distribuem entre as fases, estacionária e móvel, mediante a sua afinidade química (NIERO et al., 2003). Sendo acompanhado por cromatografia em camada delgada onde através do registro dos valores de R_f adequadamente organizados, permite determinar a presença de substâncias conhecidas cuja ocorrência seja esperada, utilizando para isso, padrões analisadas comparativamente, sob as mesmas condições (MATOS, 1994).

Evidentemente, não se pode isolar todos os constituintes de uma planta dessa maneira, pois são muito numerosos, sendo necessário dispor de testes biológicos ou farmacológicos para localizar a atividade procurada no extrato da planta e nas frações obtidas nas diferentes etapas de purificação e separação, chamados de estudos biomonitorados (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

O processo de determinação estrutural dos compostos isolados envolve o acúmulo de dados de numerosas fontes, sendo que cada qual fornece muitas informações e a assimilação destes dados fornece a estrutura química (NIERO et al., 2003). Através da espectrofotometria no infravermelho (IV), técnica que abrange a região de 4000 a 400 cm^{-1} , é possível se obter informações preliminares das características da molécula como um todo, de seus grupamentos funcionais, que dão origem a bandas com uma mesma frequência, independente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

Por sua vez, os dados obtidos através da ressonância magnética nuclear (RMN) são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente todas as classes de produtos naturais, permitindo caracterizar o número e tipo de átomos de hidrogênio e carbono, dos compostos isolados, em função da sua localização e do desdobramento de sinais, correspondentes à absorção de energia eletromagnética (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

Após estas etapas, a avaliação do perfil fitoquímico dos extratos obtidos pode ser feita através de métodos cromatográficos e a determinação dos mesmos depende, inicialmente, da escolha dos marcadores, substâncias ou grupo de substâncias responsáveis preferencialmente pela ação farmacológica em estudo, que estejam presentes na matéria-prima vegetal (BASSANI; GONZALES; PETROVICK, 2005). As técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) são freqüentemente requeridas para tanto (LESNEY, 2004).

3.5 Controle de qualidade de matérias-primas vegetais

Segundo Holetz e colaboradores, (2002) a utilização de plantas medicinais no mundo, principalmente na América do Sul, contribui significativamente com os cuidados da saúde. No entanto, sabe-se que, muitas das plantas utilizadas e comercializadas para fins terapêuticos atualmente não possuem dados científicos que comprovem a sua eficácia e espectro toxicológico, sendo que no Brasil muitas plantas são utilizadas sem qualquer evidência científica no tratamento de infecções comuns, na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos.

É importante, ressaltar o quão imprescindível se torna a padronização de métodos de controle para a produção e garantia da qualidade dos medicamentos desenvolvidos a partir destas plantas (FERREIRA, 1998).

Devido à grande divulgação de que o uso de plantas proporciona benefícios em diversas enfermidades, os usuários, de um modo geral, apresentam o hábito de empregá-las como remédio, porém, muitas vezes de forma inadequada e sem o conhecimento exato dos efeitos terapêuticos e de sua potencial toxicidade (MARQUES et al., 2002).

Ao contrário do que se observa com os medicamentos de origem sintética, o controle de qualidade, a padronização e a estabilização dos medicamentos fitoterápicos, constituem uma tarefa bastante complexa, embora possível atualmente, em função dos avanços crescentes nos métodos analíticos de alta resolução, que permitem o isolamento e a identificação de constituintes químicos presentes em baixas concentrações nas plantas (CALIXTO, 2001).

O suporte para a confiabilidade nos medicamentos de origem vegetal, no que tange à segurança, eficácia e qualidade, também foi dado por organismos internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), que elaborou diretrizes para o registro, preparação de monografias, boas práticas de fabricação e controle bem como, incentivou o acesso deste tipo de medicamento (MORETTO, 2000).

Os parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos são estabelecidos nas Farmacopéias e Códigos Oficiais sendo que, para algumas matérias-primas vegetais oriundas de plantas clássicas que tenham estudos químicos e farmacológicos bem estabelecidos, existem monografias definindo critérios de identidade, pureza e de teor de constituintes químicos. Porém, no caso de drogas vegetais que não apresentam monografias em farmacopéias, torna-se necessário estabelecer padrões de qualidade para as mesmas (FARIAS, 2001).

Desde sua última edição, publicada em 2004, a Farmacopéia Brasileira ampliou significativamente o número de monografias de plantas publicadas. Ao longo de seus 4 fascículos e revisões, atualmente há 43 monografias publicadas na versão digital sendo apenas 10 presentes no primeiro fascículo impresso (BRASIL, 2006).

Para que possam ser preparadas monografias oficiais sobre plantas medicinais é indispensável estabelecer conhecimentos botânicos, agronômicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos e, apenas após esses estudos, é possível por questões éticas e lógicas, pensar em ensaios clínicos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 da ANVISA, a qual estabelece as exigências para o controle de qualidade de fitoterápicos, prevê desde a identificação botânica da droga vegetal, testes de autenticidade (caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica), testes físico-químicos e microbiológicos para garantir a pureza e integridade, até análises quali e quantitativas dos princípios ativos ou marcadores, dentre outras análises (BRASIL, 2004).

Os problemas no controle de qualidade de fitoterápicos são muitos, para isso, a fitoterapia moderna busca especialmente a padronização dos extratos obtidos a partir de plantas medicinais, os quais geralmente se apresentam efetivos devido à uma ação conjunta de várias substâncias, diferente dos medicamentos sintéticos, por exemplo (COX; HEINRICH, 2001).

Os perfis fitoquímicos entre plantas cultivadas e as de crescimento espontâneo, variam muito, ainda mais quando coletadas em diferentes estações, períodos do ciclo de vida e locais. Tais fatores devem ser estudados previamente para que sejam ampliados os conhecimentos sobre essas plantas medicinais a fim de se produzir um medicamento a partir da mesma, diminuindo os riscos de utilizações inefetivas e / ou inadequadas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Além do controle nas condições de cultivo das plantas e da utilização de métodos padronizados de produção, a análise química é necessária para garantir uma composição homogênea dos extratos de plantas. Ao contrário das substâncias quimicamente definidas dos constituintes de medicamentos sintéticos, os quais podem ser quantitativamente mensurados, o conhecimento dos constituintes de fitoterápicos apóia-se em métodos cromatográficos de separação e análise qualitativos e semi-quantitativos (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2001).

A padronização química de plantas medicinais pode envolver técnicas cromatográficas como a CLAE e a CG que permitem análises quali e quantitativas de misturas complexas com alta resolução e sensibilidade (PAIVA; MAZZEI; KAPLAN,

2002). Tais técnicas vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentícias segundo Ribani e colaboradores, (2004), e pesquisas realizadas até o presente momento demonstram que os equipamentos necessários para um controle de qualidade satisfatório envolvem técnicas cromatográficas como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), CLAE e CG, além de dados espectroscópicos dos constituintes presentes no material vegetal (NIERO et al., 2003).

Os primeiros artigos envolvendo a cromatografia como uma ciência foram publicados em 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, o qual separou algumas substâncias de extratos de plantas. Desde então, esta técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com elevada sofisticação, inicialmente com a CG, posteriormente a cromatografia líquida e finalmente a cromatografia com fluido supercrítico, concebida nos anos 60, mas empregada muito depois de seu desenvolvimento (MUHLEN; LANÇAS, 2004).

A cromatografia gasosa é um método utilizado para separar componentes de uma solução e medir sua quantidade relativa ao seu padrão. É um instrumento analítico utilizado para identificação de compostos mais apolares como sesquiterpenos, triterpenos, esteróis além de muitos outros (LANÇAS, 1993). A CG demonstrou, desde seu aparecimento, uma potencialidade enorme devido à sua eficiência, facilidade e possibilidade de analisar misturas voláteis, correspondendo à 20 % dos compostos existentes, portanto os demais compostos que não tem volatilidade podem ser analisados por CLAE, desde que haja compatibilidade e solubilidade das amostras com a fase móvel e estacionária (CIOLA, 2003)

A cromatografia líquida é um método também utilizado para separar componentes de uma solução e medir sua quantidade relativa, no entanto é utilizada como método analítico para identificação de compostos pouco voláteis, permitindo a análise dentre outros de: proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, corantes, polissacarídeos, pigmentos e metabólitos de plantas, compostos iônicos, polímeros surfactantes e produtos farmacêuticos (CIOLA, 2003). Segundo Ferreres e colaboradores, (2003), a análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida em

fase reversa, não é somente difícil e sim extremamente dificultada pela falta de material vegetal que geralmente é uma constante, atrapalhando a validação do método.

Dependendo da tecnologia e do solvente utilizado, a técnica de CLAE pode gerar espectros que caracterizam os multicomponentes ativos principais de forma única, como uma impressão digital. Determinando um grande número de constituintes, o cromatograma de impressão digital, *fingerprint*, não pode apenas estabelecer a identidade dos constituintes ativos da planta, mas pode também testar sua composição interna constante pela checagem do *fingerprint* de uma determinada amostra contra um cromatograma armazenado eletronicamente de uma amostra considerada como padrão de referência (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2001).

A utilização da cromatografia líquida conjugada à técnica de detecção por varredura de espectro no ultravioleta é uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo caracterizar simultaneamente as substâncias constituintes ou seus principais grupos estruturais (PAIVA; MAZZEI; KAPLAN, 2002).

Alguns procedimentos são extremamente importantes para se assegurar a confiabilidade dos resultados experimentais. Devendo-se apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade adequados à análise. Dentro destes, o limite de detecção (menor nível determinável) e quantificação (menor nível de amostra determinável com precisão e exatidão aceitáveis), apresentam-se imprescindíveis (BRASIL, 2003).

Independente da técnica a ser utilizada ou da metodologia a ser seguida, é essencial que se trabalhe com réplicas de forma a compensar os desvios inerentes aos ensaios ou acidentais sendo que, a potência das amostras desconhecidas pode ser determinada pelo dimensionamento da resposta de uma diluição apropriada, seguido de leitura em curva de calibração a partir do composto padrão (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

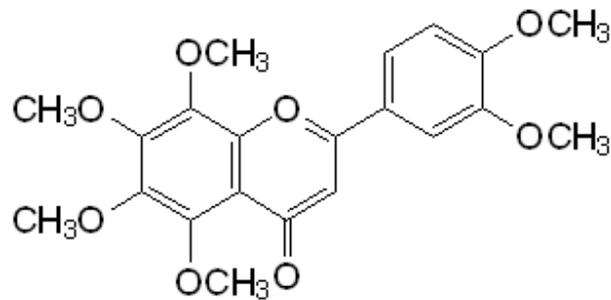
3.6 Compostos fenólicos

O maior grupo de componentes fitoquímicos é representado pelos compostos fenólicos. Polifenólicos originados de plantas são metabólitos secundários amplamente

encontrados em plantas superiores e historicamente têm sido considerados pelos nutricionistas como anti-nutrientes por diminuir a atividade de algumas enzimas digestivas. No entanto, atualmente, a atividade antioxidante de muitos compostos polifenólicos têm provido muitos benefícios à saúde de seus usuários (DILLARD; GERMANN, 2000).

Atualmente houve um aumento significativo no interesse e importância dos compostos polifenólicos em áreas diversas como a agricultura, ecologia, nutrição, medicina natural, pigmentação floral, colas e vernizes naturais (DILLARD; GERMANN, 2000). Nas plantas, dentro do grupo de compostos fenólicos estão os esteróides, que exercem um papel importante como constituintes das membranas celulares, detectores de insetos e hormônios de crescimento presentes em muitas plantas (SCHIMADA; MITAMURA; HIGASHI, 2001).

A alguns extratos de cascas de laranja foram atribuídos atividade anti-tumoral devido à presença de compostos fenólicos, especificamente 3',4',5,6,7,8-hexametoxi flavonóide (9) (TULP; BOHLIN, 2004).



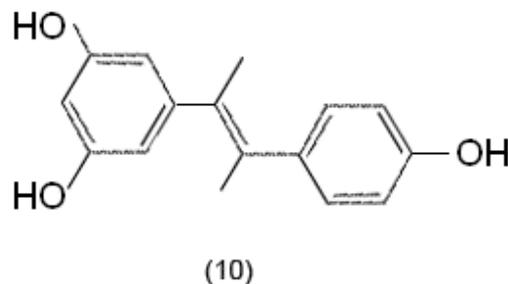
(9)

Os terpenos, em geral, são compostos que apresentam uma capacidade anti-oxidante quando em contato com radicais livres particionando-os em ácidos graxos devido à suas longas cadeias de carbono laterais sendo que, os terpenos com capacidade anti-oxidante mais estudados até o momento, possivelmente, sejam os tocoferóis. Já os fitosteróis, são uma subclasse importante dos terpenos e duas moléculas de esteróide bastante importante que são sintetizadas por plantas são o β -sitosterol e seus glicosídeos, os quais apresentam atividade anti-inflamatória, anti-

neoplásica, anti-pirética e imunomoduladora quando testados em animais e em humanos (DILLARD; GERMANN, 2000).

Aos esteróides estigmasterol, β -sitosterol e campesterol em estudos anteriores realizados nesta universidade, relatou-se atividade em diversos modelos de dor, inflamação e hiperplasia benigna de próstata (CECHINEL FILHO, 2000).

Estilbenos hidroxilados são fitoalexinas produzidas pelas plantas em resposta à infecções por fungos. Um dos estilbenos mais conhecidos é o resveratrol **(10)** havendo sobre ele um enorme interesse nos últimos anos devido à sua forte atividade antioxidante, relacionada à sua capacidade de redução da mortalidade por doença coronariana e também por inibir a agregação plaquetária, além de suas propriedades estrogênicas que parecem contribuir à cardioproteção reportada pelo consumo de vinho (BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2000).



Estudos recentes afirmam a elevada capacidade de recuperação quanto ao dano isquêmico no miocárdio para ratos tratados de forma crônica com resveratrol, quando comparados aos grupos que não receberam tratamento com o mesmo, segundo Dernek e colaboradores, (2004) e ainda, que o resveratrol promove a defesa contra a injúria pós-isquemia e reperfusão, vasodilatação, proteção e manutenção do endotélio, além de ter propriedades antiateroscleróticas, inibir a oxidação do colesterol LDL e suprimir a agregação plaquetária (OLSON et al., 2004).

O resveratrol é um triidroxiestilbeno considerado ativo na inibição na proliferação da carcinogênese segundo um estudo realizado em Nova Jersey, EUA, o qual Utilizou o resveratrol como protótipo, sintetizando vários polihidroxi e polimetoxiestilbenos, sendo testados seus efeitos anti-proliferativos em células humanas normais e transformadas. O estudo mostrou que o estilbeno tetrahidroxilado apresentou inibição do crescimento celular e apoptose das células transformadas (LU et al., 2001).

Os estilbenos são encontrados em diversas espécies que são utilizadas para diferentes finalidades, de acordo com sua indicação popular. Pacher e colaboradores, (2002) isolaram 15 novos estilbenos das raízes de *Stemona collinsae*, dentre eles, 4 dihidroestilbenos denominados de estilbosteminas, aos quais foram atribuídas atividade antifúngica frente à 5 espécies: *Alternaria citri*, *Fusarium avenaceum*, *Pyricularia grisea*, *Botrytis cinerea* e *Cladosporium herbarum*. Esta planta encontra-se largamente distribuída no sudoeste da Ásia, muito utilizada na China para o tratamento de bronquite, pneumonia, disfunções respiratórias e pulmonares em geral além de sua aplicação como antimicrobiana.

A classe dos diidroestilbenos seus derivados foram identificados na *Cannabis sativa* por Crombie e Crombie (1982) e sua importância consiste no potencial anticancerígeno, mais especificamente como antimitóticos e agentes antileucêmicos (CUSHMAN et al., 1991).

A *Glycyrrhiza glabra* é uma planta com rica tradição etnobotânica na China, onde pode ser encontrada na Farmacopéia oficial, sendo que suas raízes, apresentam principalmente saponinas triterpênicas das quais a glicirrizina parece ser responsável por sua capacidade anti-úlceras, anti-inflamatória e anti-alérgica. As raízes de *G. glabra* apresentam ainda atividade antimicrobiana e antioxidante devido à presença de uma variedade de compostos polifenólicos, dentre eles alguns dihidroestilbenos recentemente isolados (BIONDI; ROCCO; RUBERTO, 2003).

Plantas do gênero *Artocarpus* são amplamente distribuídas na Tailândia sendo a espécie *A. chaplasha* empregada na medicina popular no tratamento da infecção provocada por *Taeniasis saginata*. Um estudo realizado por Boonlaksiri e colaboradores (2000), identificou estilbenos ativos no tratamento da malária, contra o *Plasmodium falciparum in vitro*, à partir do extrato bruto das partes aéreas de *Artocarpus integer*.

Li e colaboradores, (2004) obtiveram novos estilbenos derivados do oxiresveratrol denominados de gnetumontaninas e ainda, uma investigação química da orquídea *Arundina graminifolia* levou ao isolamento de um novo estilbenóide denominado arundina, sendo que sua estrutura foi denominada como sendo 2-(p-hidroxibenzil)-3-hidroxi-5-metoxibenzilestilbeno (LIU et al., 2004).

Hajdú e colaboradores, (1998) isolaram estilbenos das raízes de *Leuzea carthamoides*, Cornelius e Majinda (2001) isolaram estilbenos também das raízes de *Elephantorrhiza goetzei*, Shimizu, Kondo e Sakai (1997) isolaram um derivado dos caules de *Artocarpus incisus* e têm sido atribuídos a esses compostos diferentes atividades, e ainda, Cheong e colaboradores, (1999) atribuíram também atividade anti-alérgica à alguns hidroxiestilbenos.

A “resina cubana” é um extrato das raízes de *Lonchocarpus utilis* e *L.urucu* utilizado como inseticida e pesticida, sendo seus principais componentes a rotenona, deguelina, flavonóides e estilbenóides confirmando novamente a atividade dos compostos polifenólicos no controle do crescimento microbiano (FANG; CASIDA, 1999).

Os estilbenóides por serem considerados fitoalexinas e conhecidos como metabólitos induzidos acumulados após infecção microbiana são também muito encontrados nas orquídeas (PACHER et al., 2002).

3.7 Família Orchidaceae

As orquídeas constituem uma das maiores famílias de plantas florais conhecidas pelo homem abrangendo mais de 30.000 espécies silvestres, além de muitos milhares de híbridos registrados (KRAMER, 1989). Divididas em aproximadamente 750 gêneros é a maior de todas as famílias de plantas espalhadas pelo mundo, apresentando formas terrestres, aquáticas, epífitas e aéreas (KONG et al., 2003).

As principais famílias pertencentes a classe das epífitas são as Gesneriaceae, Melastomataceae, Cactaceae, Rubiaceae, Asclepiadaceae, Solanaceae, Bromeliaceae e Orchidaceae, sendo as duas últimas quase inteiramente epífitas. Ecologicamente, uma epífita é uma planta perene que não tem necessidade de produzir e manter maciços caules e ramos lenhosos; porém ela tem de conviver com um substrato extremamente pobre de nutrientes. As raízes estão na dependência da água de chuva e do acúmulo de materiais orgânicos trazidos por outros animais. A maioria das epífitas produz grande quantidade de pequenas sementes que são dispersadas pelo vento e a estrutura de sua comunidade é pouco influenciada pela ação de herbívoros (JANZEN, 1980).

Em virtude da pobreza de nutrientes no ambiente das epífitas, parece ser vantajoso para elas fazerem investirem muito em defesas químicas, produzindo-as em certa quantidade para proteger suas poucas folhas, podendo desta maneira justificar seu uso na medicina popular (JANZEN, 1980).

A maioria das orquídeas origina-se das florestas tropicais, subtropicais e chuvosas, mas algumas também crescem em zonas de clima temperado, do nível do mar até 5000 m de altitude e têm diferentes formas de crescimento, podendo se adaptar de acordo com o ambiente. São extremamente sensíveis a mudanças, chamadas de flores das quatro estações porque algumas podem florescer na primavera e verão enquanto outras florescem no outono e inverno mas, em geral florescem uma vez ao ano (KRAMER, 1989).

No Brasil existem várias espécies de orquídeas (cerca de mais ou menos 3000 espécies) (SCHULTZ, 1968) sendo possível encontrar diferentes espécies em função da altitude e do clima, localizadas desde as florestas tropicais até o calor úmido da bacia Amazônica.

Cada espécie tem se adaptado a um nicho específico no ambiente sendo sempre associado às condições de habitat que envolvem: disponibilidade de nutriente, luz e água. Além disso, durante todo seu ciclo de vida, as orquídeas têm mantido uma relação de simbiose com alguns fungos, sendo estes, os responsáveis pelo suprimento de nutriente e energia às mesmas permitindo sua sobrevivência durante seu período de latência embaixo da terra, para em seguida emergir produzindo flores. Esta fase sob a terra pode explicar porque muitas espécies de orquídeas não são encontradas no mesmo local, de um ano para outro, havendo com isso, pouca informação sobre a estação de germinação bem como sua taxa (RASMUSSEN; WHIGHAM, 1993).

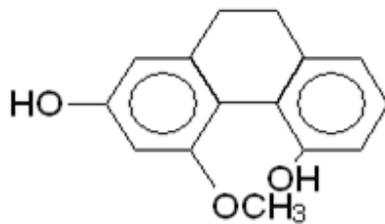
A utilidade comercial das orquídeas é de considerável importância econômica, particularmente na horticultura e florística, mas também tem aumentado na indústria farmacêutica e de essências (KONG et al., 2003).

A aplicação das orquídeas na medicina natural é histórica, de modo que, um total de 365 espécies estão publicadas na milenarmente conhecida Matéria Médica Chinesa (Shen Nung Pen-tsoo Ching) (KONG et al., 2003).

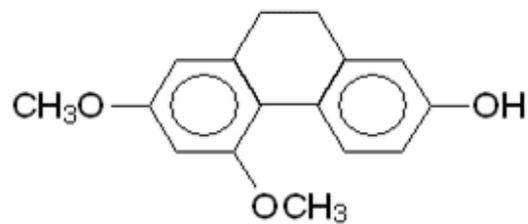
Sabe-se que estas apresentam várias atividades biológicas (FLORIANI et al., 1998) entre as quais podemos citar as das espécies *Cypripedium* sp., que devido ao seu efeito sedativo é comumente utilizada para histerias, dor de cabeça, insônia e depressão nervosa acompanhada de desordens estomacais. O efeito rápido do alívio da dor e tranqüilidade, sugere a presença de substâncias narcóticas (DUKE, 1991).

Na família Orchidaceae, o gênero *Phalaenopsis* é muito conhecido e atualmente representa 75 % do total de orquídeas comercializadas no mercado, sendo reproduzido em grande escala em suas diversas espécies com fins florísticos (GRIESBACH, 2002).

Outra espécie da família Orchidaceae é a *Vanilla planifolia*, uma planta valiosa comercialmente, pois suas sementes aromáticas fornecem a baunilha, utilizada como flavorizante principalmente pela indústria de alimentos e essências em geral (SCHULTZ, 1968). Além de muito utilizada para fins comerciais é relatada como afrodisíaco, carminativo, estimulante e inibidora da cárie, dentre outros (DUKE, 1991).



(11)



(12)

Segundo Fritzemeier e Kindi (1983), os compostos hircinol **(11)** e orchinol **(12)** (derivados do 9,10-dihidrofenantreno), que são considerados responsáveis pelo acúmulo de fitoalexinas, foram isolados dos bulbos de plantas da família Orchidaceae, incluindo *Barlia longibracteata*, *Orchis anatolica*, *O.militares*, *O.italica*, *O.longicornu*, *O.máscula*, *O.morio*, *O.papilionaceae* e *O.palustris*.

Nas orquídeas da Índia, cerca de 18 novos compostos de diversas classes químicas foram isolados. Estruturalmente, estes compostos foram agrupados dentro de alguns tipos, como: 9,10-dihidrofenantreno, 9,10-dihidrofentropirano, pirano, fenantreno, bibenzil, triterpenóides e esteróides (MAJUMDER; PAL; LAHIRI, 1987). Os estilbenóides calosumina, calosuminina e calosumidina foram isolados da orquídea *Agrostophyllum callosum*, além de outros 10 estilbenóides já conhecidos (MAJUMDER; BANERJEE; SEN, 1996). Re-investigando a orquídea *Dendrobium amoenum*,

Majumder, Guha e Sen, (1999) isolaram dois novos derivados bibenzílicos e denominaram amoenilina e isoamoenilina.

Estudos realizados com *Pholidota rubra* e *Cirrhopetalum elatum* permitiram a identificação de um novo triterpenóide designado folidotina (24-metileno-ciclo-artanil-*p*-hidroxi-cis-cinamato) (**13**). Na *Pholidota*, também isolaram os conhecidos coelonina, imbricatina e 2,4-metileno-ciclo-artanil-*p*-hidroxi-trans-cinamato, todos derivados do 9,10-dihidrofenantreno. Já na *Cirrhopetalum elatum* também isolaram a folidotina, em quantidades menores, e o composto majoritário determinado foi o 24-metileno-ciclo-artanil-*p*-hidroxi-trans-cinamato. A diferença entre a folidotina e o 24-metileno-ciclo-artanil-*p*-hidroxi-trans-cinamato consiste na estereoquímica, onde a folidotina apresenta configuração *cis* e o outro com configuração *trans* (MAJUMDER; GUHA; SEN, 1999).

Em 1763 Carolus Linnaeus desenvolveu um tratado de classificação botânica sistemática nomeando uma centena de espécies diferentes, mas foram todas classificadas sob o mesmo gênero, *Epidendrum*. Atualmente, este gênero é muito encontrado na América Central, principalmente no México (KRAMER, 1989).

Compreendendo mais de mil espécies, esse gênero é encontrado da Carolina do Norte até a Argentina. A maioria é epífita, embora algumas cresçam no solo, outras em rochas. A forma da planta e as flores variam muito. Há dois grupos principais de espécies: as que apresentam pseudo bulbos e as que apresentam pseudo bulbos em cana. Alguns botânicos reclassificaram muitas espécies de *Epidendrum* em outros gêneros: *Encyclia*, *Barkeria* e *Nanodes* (KRAMER, 1989).

A baixa taxa de frutificação é freqüentemente citada como uma característica da família das orquídeas, principalmente de espécies sem néctar floral. Para tanto, a *Epidendrum denticulatum* produz néctar nos pecíolos e não em suas flores e desta forma, engana seus polinizadores. Neste experimento, formigas encontradas forrageando seus nectários extraflorais têm a capacidade de limitar a herbivoria dos órgãos reprodutivos sem interferir no comportamento dos polinizadores (ALMEIDA; FIGUEIREDO, 2003).

A *Epidendrum tuberosum*, muito empregada na medicina chinesa, é de aplicação bastante difundida e diversificada sendo empregada desde para o tratamento do câncer de mama até feridas na pele (KONG et al., 2003).

3.8.1 *Epidendrum mosenii*.

3.8.1.1 Constituintes químicos isolados da *Epidendrum mosenii*.

Epidendrum mosenii (Figuras 2 e 3), recentemente re-classificada como *Epidendrum fulgens* é empregada na medicina popular contra processos infecciosos e dolorosos, por apresentar propriedades analgésicas, antiinflamatórias e cicatrizantes. No Baixo e Médio Vale do Itajaí esta se caracteriza como planta de vegetação litorânea, ocorrendo freqüentemente nesta localização. Floresce durante o verão e apresenta flores amarelas e vermelhas na mesma inflorescência (OLIVEIRA, 1999).

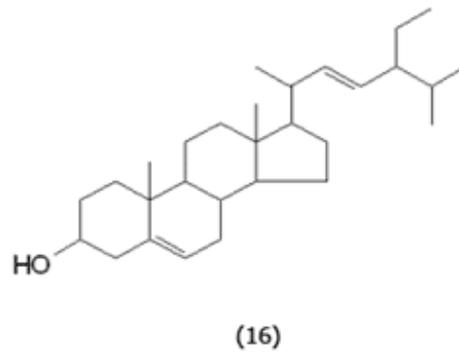
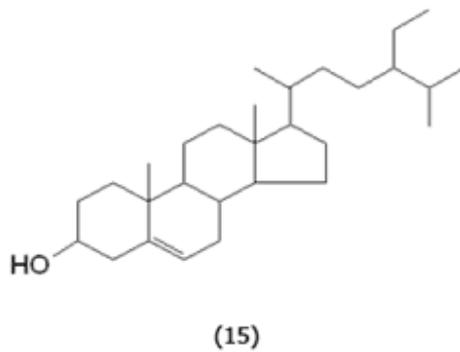
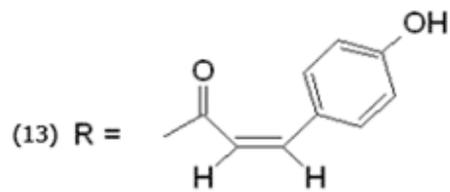
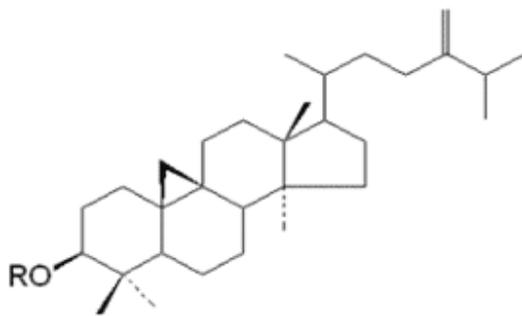


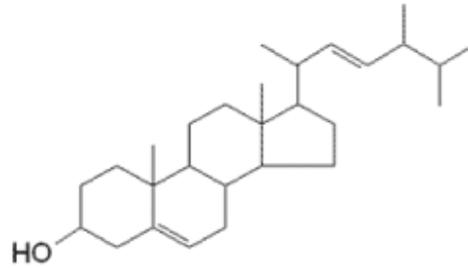
Figura 2. Flor de *Epidendrum mosenii*.



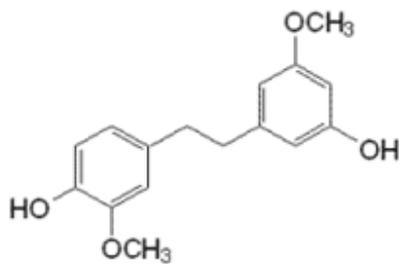
Figura 3. Planta inteira (*Epidendrum mosenii*)

Os estudos fitoquímicos são escassos sobre esta planta, porém Floriani e colaboradores, (1998) em sua investigação a partir de extratos diclorometano dos caules, isolaram os esteróides β -sitosterol (**15**), stigmasterol (**16**) e campesterol (**17**), os triterpenóides folidotina (24-metileno-ciclo-artanil-*p*-hidroxi-cis-cinamato) (**13**) e 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) e os estilbenóides 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno (**18**) e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**), sendo este último inédito na literatura.

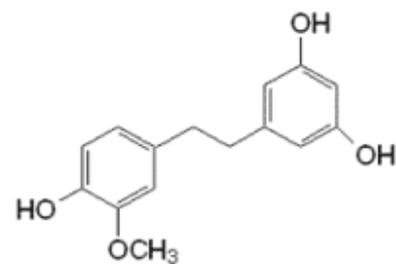




(17)



(18)



(19)

Os estilbenos são encontrados em diferentes espécies e a estes são atribuídas diversas atividades conforme demonstrado no item 3.6.

Ferreira e colaboradores, (2000) demonstraram que a planta possui ação analgésica de interesse, cujo efeito parece estar relacionado com os triterpenos folidotina **(13)** e 24-metileno-ciclo-artanol **(14)**. Estes autores confirmaram os efeitos analgésicos destes compostos isoladamente em vários modelos experimentais *in vivo*, com atividade superior ao diclofenaco, fármaco utilizado na clínica com finalidade analgésica e antiinflamatória.

Recentemente, demonstrou-se que o extrato bruto metanólico dos caules de *E.mosenii*, frente aos efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em íleo isolado de cobaias, não apresenta efetividade antagonista da mesma (EMENDORFER; BELLATO, 2003).

Os resultados obtidos através do estudo de Novaes e colaboradores (2001) sugerem que o extrato metanólico de *E.mosenii* poderia ser utilizado como agente

adjuvante no tratamento de *diabetes mellitus*, pois apresentou interessante atividade hipoglicemiante frente ao teste de diabetes induzido, utilizando aloxano em ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes, reagentes e materiais utilizados

Os solventes empregados para a realização deste trabalho foram:

- Acetona (Nuclear);
- Acetonitrila (Tedia – grau HPLC);
- Água purificada (Tipo I, obtido por filtração em aparato Milli Q);
- Diclorometano (Merck, Vetec, EM – grau HPLC);
- Hexano (Merck, Vetec, EM – grau HPLC);
- Metanol (Tedia – grau HPLC).

Os reagentes e materiais mais utilizados:

- Anisaldeído sulfúrico;
- Coluna capilar cromatografia gasosa DB1 (J e W Scientific) 30 m;
- Coluna cromatográfica com suporte universal;
- Coluna analítica fase reversa Luna (Phenomenex) 25 cm;
- Filtro de membrana 0,45 µm (Millex LCR);
- Membrana de filtração celulose regenerada 0,2 µm (Schleicher e Schuell);
- Micropipetador com ponteiros descartáveis de volume 10-100 e 100-1000 µL;
- Microseringa com agulha com bisel capacidade 10 µL (Hamilton);
- Microseringa com agulha sem bisel capacidade 25 µL (Hamilton);
- Placas de sílica gel 60 F 254 (Merck);
- Seringa de vidro capacidade 50 mL;
- Sílica gel 60 (60 – 70 Mesh);
- Tamis Bertel abertura 1,70 mm, 10 Mesh.

4.2 Equipamentos

- Banho de ultra-som Unique, modelo USC 1400;
- Balança semi-analítica Metler Toledo modelo AE 200;
- Cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC-14B;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters modelo 600, gerenciado por software Empower versão Pro e detector por arranjo de fotodiodo em UV-Vis (PDA 2996);

- Espectrofotômetro de absorção infra-vermelho Bomem MB-series, Hartmann e Braun;
- Espectrômetro de ressonância nuclear magnética Varian XL 300 MHz (RMN-1H) e 75 MHz (RMN-13C);
- Estufa de secagem Brasimet modelo Professional 50;
- Moinho de facas Philips modelo Walita Pique.

4.3 Obtenção do material vegetal

4.3.1 Coleta da planta

As coletas de *Epidendrum mosenii* foram realizadas nos dias 15 de maio de 2002, 15 de agosto de 2002, 15 de novembro de 2002 e 15 de fevereiro de 2003, sempre às 10:00 h no Canto do Morcego, Praia Brava, município de Itajaí (SC), respectivamente correspondentes às estações do outono, inverno, primavera e verão.

4.3.2 Triagem do material vegetal

O material vegetal coletado foi separado em 4 partes: caules, folhas, raízes e flores, descartando-se as partes consideradas não conforme e eliminando as sujidades. Após essa seleção prévia, o material foi manualmente rasurado.

4.3.3 Secagem do material vegetal

Após a triagem inicial, o material foi posteriormente levado à estufa de circulação de ar mantido à 40 °C com ciclo liga/desliga, a cada intervalo de 12 horas, por um período de 7 dias.

4.3.4 Moagem do material vegetal

Após o processo de secagem, o material foi triturado em moinho de facas, sendo que, os volumes referentes às diferentes partes da planta foram armazenados separadamente, em frascos de vidro, em local seco e arejado, ao abrigo da luz.

4.4 Preparação e concentração dos extratos

Amostras de 10 g de cada parte da planta seca, moída e tamisada (tamis com abertura de malha de 1,70 mm) foram então submetidas à maceração em repouso em erlenmeyer de vidro, empregando como solvente extrator 200 mL de diclorometano por um período de 48 horas. Depois da maceração, seguiu-se com as etapas de filtração sobre papel e eliminação do solvente à temperatura ambiente em capela com exaustão. Tal procedimento foi repetido por mais 2 vezes, totalizando 3 repetições, sendo os filtrados coletados reunidos em um único frasco. Os extratos obtidos foram novamente submetidos a eliminação do solvente à temperatura ambiente em capela com exaustão. Posteriormente foram mantidos em dessecador (vácuo e sílica), em vidraria previamente tarada para cálculo de rendimento. O mesmo procedimento foi repetido para cada coleta.

4.5 Isolamentos dos compostos

Os compostos foram isolados a partir do extrato de diclorometano do caule, através de Cromatografia de Coluna (CC) preparada com sílica gel 60 (60 – 70 Mesh) e acompanhada por Cromatografia em camada delgada (CCD) analítica utilizando sílica gel 60 e F 254 (fluorescência 254 nm) (OLIVEIRA, 1999). As placas de sílica gel espotadas com 1 µL de amostra, (WAGNER; BLADT, 1996) com auxílio de microseringa E 1 cm de distância entre elas, foram submetidas as relações de eluentes hexano / acetona (70 : 30 e 60 : 40) e reveladas com anisaldeído sulfúrico, revelador específico para açúcares, terpenos e esteróides (UGAZ, 1994). A partir destes procedimentos, vários compostos foram isolados, incluindo 2 triterpenos, 3 esteróides e 4 estilbenos.

4.6 Purificação dos compostos isolados

A purificação dos compostos isolados foi obtida através da realização de sucessivas colunas cromatográficas, conforme item 4.5, acompanhadas pelo seu perfil em CCD usando-se amostras puras dos compostos obtidos em trabalhos anteriores (OLIVEIRA, 1999), como referência.

4.7 Caracterização dos compostos isolados

4.7.1 - Espectrofotômetro de absorção infra-vermelho

Cerca de 1 mg de cada amostra foi prensada sob a forma de pastilha prensadas juntamente com brometo de potássio como suporte. Os espectros obtidos foram comparados aos espectros dos mesmos compostos isolados anteriormente (OLIVEIRA, 1999) para serem utilizados como padrões de análise quali-quantitativa.

4.7.2 Espectrômetro de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-1H) e de carbono 13 (RMN-13C) foram realizados no *Centro de Chimica Recettori, da Universita Cattolica del Sacro Cuore* (Roma/Itália), pelo professor Franco Delle Monache, utilizando-se o aparato Varian XL 300 MHz (RMN-1H) e 75 MHz (RMN-13C).

4.8 Quantificação dos compostos isolados - Avaliação cromatográfica

Após a avaliação da estrutura química dos compostos através dos resultados obtidos, a partir da análise espectroscópica descrita no item 4.7.1 e 4.7.2, optou-se pela avaliação cromatográfica dos extratos através das técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tanto na CG quanto na CLAE utilizou-se o método de calibração externa, que compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão de referência do analito (RIBANI et al., 2004).

4.8.1 Quantificação por cromatografia gasosa

Foi utilizado o cromatógrafo gasoso, modelo GC-14B da marca Shimadzu, provido de um detector de ionização de chama. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio com um fluxo constante de 1 mL / min e a coluna cromatográfica empregada foi uma coluna capilar de 30 m (DB1 - J e W) com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de

filme de diâmetro de 0,25 μm . Para otimização do método cromatográfico foi utilizada metodologia conforme Bresciani, Cechinel Filho e Yunes (2000), operando-se em modo “split” na razão de 1 : 30.

As condições de análise utilizadas estão discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições utilizadas para análise em CG

Condição	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)	Velocidade ($^{\circ}\text{C} / \text{min}$)
Inicial da coluna	200		
Inicial em isoterma		2	
Final da coluna	290		
Taxa de aquecimento			10
Final em isoterma		20	
Injetor	290		
Detector	300		

Para a quantificação dos extratos foram preparadas soluções dos mesmos injetadas com concentração de 10 mg / 0,6 mL. Após filtração, alíquotas de 1 μL foram manualmente injetadas com auxílio de uma microseringa.

O processamento de conversão de dados analógicos para digital foi realizado pelo software MQI96-A da Microquímica.

4.8.1.1 Curva de calibração do 24 – metileno-ciclo-artanol

A curva de calibração foi obtida pela análise de cinco soluções de 24 – metileno-ciclo-artanol cujas diluições foram injetadas em triplicata. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas à partir de uma solução mãe de concentração inicial de 4,10 mg / mL até 0,13 mg / mL de 24-metileno-ciclo-artanol correspondendo às concentrações de 4,10, 2,05, 1,025, 0,513 e 0,13 mg / mL. A curva foi construída com a média dos valores encontrados em cada concentração e com o auxílio do software Origin 5.0, foi realizada a regressão linear (Fig. 4).

A equação da reta foi calculada através de regressão linear conforme mostrado na figura 4.

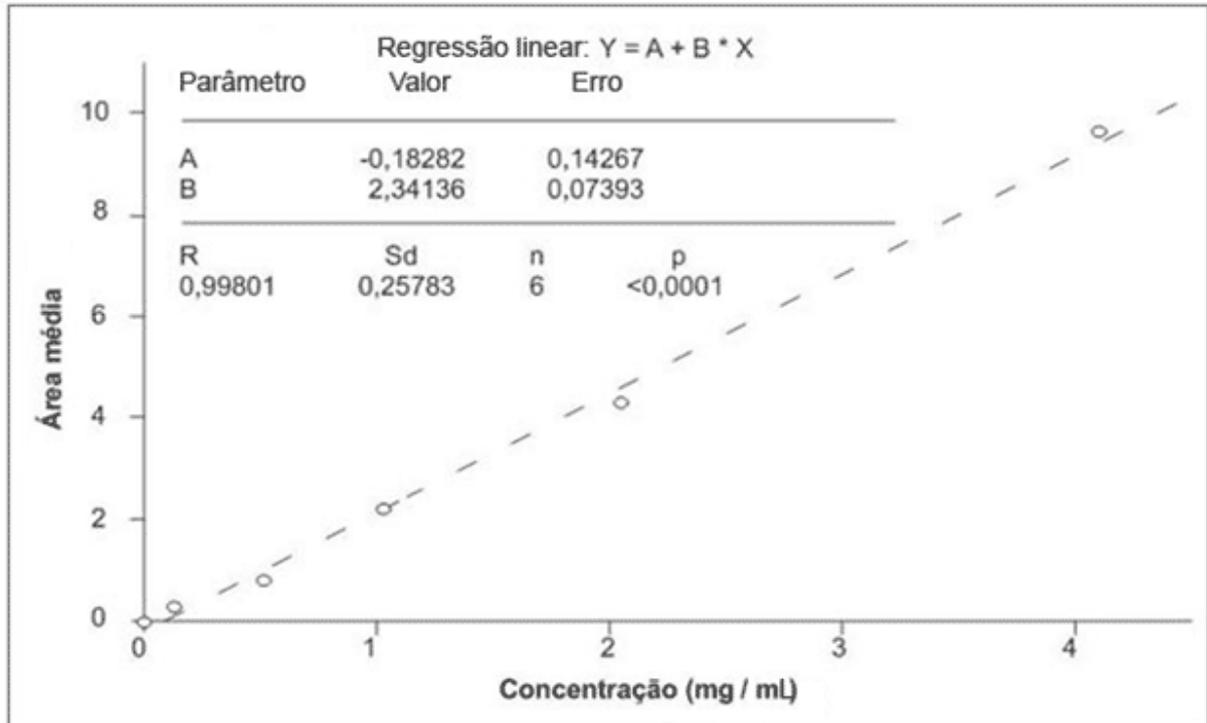


Figura 4. Curva de calibração do 24-metileno-ciclo-artanol

A linearidade foi determinada através de regressão linear determinando-se o coeficiente de correlação ($r^2 = 0,996$) que deve estar o mais próximo de 1,0, preferencialmente (RIBANI et al., 2004).

4.8.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do composto 24-metileno-ciclo-artanol foi determinado pelo método de diluições sucessivas a partir da concentração inicial de 0,5 mg / mL obtendo-se soluções padrões de baixa concentração que foram posteriormente injetadas no cromatógrafo até que a relação sinal/ruído fosse de 3:1 (BRASIL, 2003). Essa concentração foi de 0,09 mg / mL.

O limite de quantificação obtido no cromatógrafo até que a relação sinal/ruído fosse de 10:1 (BRASIL, 2003) para o 24-metileno-ciclo-artanol foi de 0,10 mg / mL.

4.8.2 Quantificação por cromatografia líquida

Para cromatografia líquida foi utilizado o sistema de cromatografia líquida a partir do equipamento Waters, gerenciado por software Empower versão Pro e detector por arranjo de fotodiodo em UV-Vis (PDA 2996). A coluna cromatográfica empregada foi C18 (Phenomenex) modelo Luna de dimensões 25 cm x 4,6 mm x 5 μ m (tamanho de partícula) e diâmetro interno do poro de 100 Å. O “loop” de injeção utilizado foi de 20 μ L acoplado ao sistema injetor manual (Rheodyne 7725i) seguido do degaseificador (in line Degasser AF) e por fim, da bomba propulsora modelo 600 F. A temperatura de trabalho para o forno da coluna foi programada para 25 °C com fluxo de fase móvel constante e modo gradiente de acordo com a tabela 2. A fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila / água acidificada com ácido o-fosfórico 0,05 % (pH 3,5). Foram preparadas soluções de 10 mg / mL dos extratos utilizando metanol : água (20 : 80) como solvente, sendo injetadas alíquotas de 20 μ L.

A metodologia utilizada como parâmetro para otimização do método cromatográfico foi adaptada a partir do trabalho de Vastano et al., (2000). No estudo de otimização foram testadas várias condições de análise que estão discriminados na Tabela 2.

Tabela 2. Sistema gradiente utilizado para análise em CLAE.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
0,00	0,70	2,0	98,0
5,00	0,70	2,0	98,0
10,00	0,70	5,0	95,0
15,00	0,70	10,0	90,0
20,00	0,70	15,0	85,0
60,00	0,70	15,0	85,0

Solvente A: Acetonitrila

Solvente B: Água com ácido fosfórico 0,05%

Após otimizada a metodologia de análise, as soluções das diferentes partes da planta em diferentes coletas foram preparadas a partir de 10 mg de extrato em 0,2 mL de metanol com 0,8 mL de água purificada (conc. 10 mg / mL). As soluções foram então homogeneizadas em banho de ultra som por cinco minutos e filtradas em filtro de membrana 0,45 μ m e uma alíquota de 20 μ L injetada em triplicata.

Os compostos isolados 24-metileno-ciclo-artanil-*p*-hidroxi-cis-cinamato (folidotina) e os estilbenóides: 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno e o 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno foram quantificados a partir da curva de calibração dos seus padrões de referência purificados.

4.8.2.1 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção, foi determinado pelo método de diluições sucessivas a partir de 0,5 mg / mL obtendo-se soluções padrões de baixa concentração que foram posteriormente injetadas no cromatógrafo até que a relação sinal/ruído fosse de 3 : 1 (BRASIL, 2003). Essa concentração foi de 0,5 µg / mL para os compostos 4,5-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno.

O limite de quantificação obtido no cromatógrafo até que a relação sinal / ruído fosse de 10:1 (BRASIL, 2003) foi de 0,1 µg / mL para os compostos 4,5-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno.

4.8.2.2 Curva de calibração da folidotina

A curva de calibração foi obtida pela análise de cinco soluções de folidotina, cujas diluições foram injetadas em triplicata. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas a partir de uma solução-mãe de concentração inicial de 5 mg / mL até 0,88 mg / mL de folidotina correspondendo às concentrações de 5, 2,5, 1,7, 1,1 e 0,88 mg / mL. A curva foi construída com a média dos valores encontrados em cada concentração e plotadas pelo software Empower Pro (Figura 5).

A equação da reta foi calculada através de regressão linear conforme figura 5.

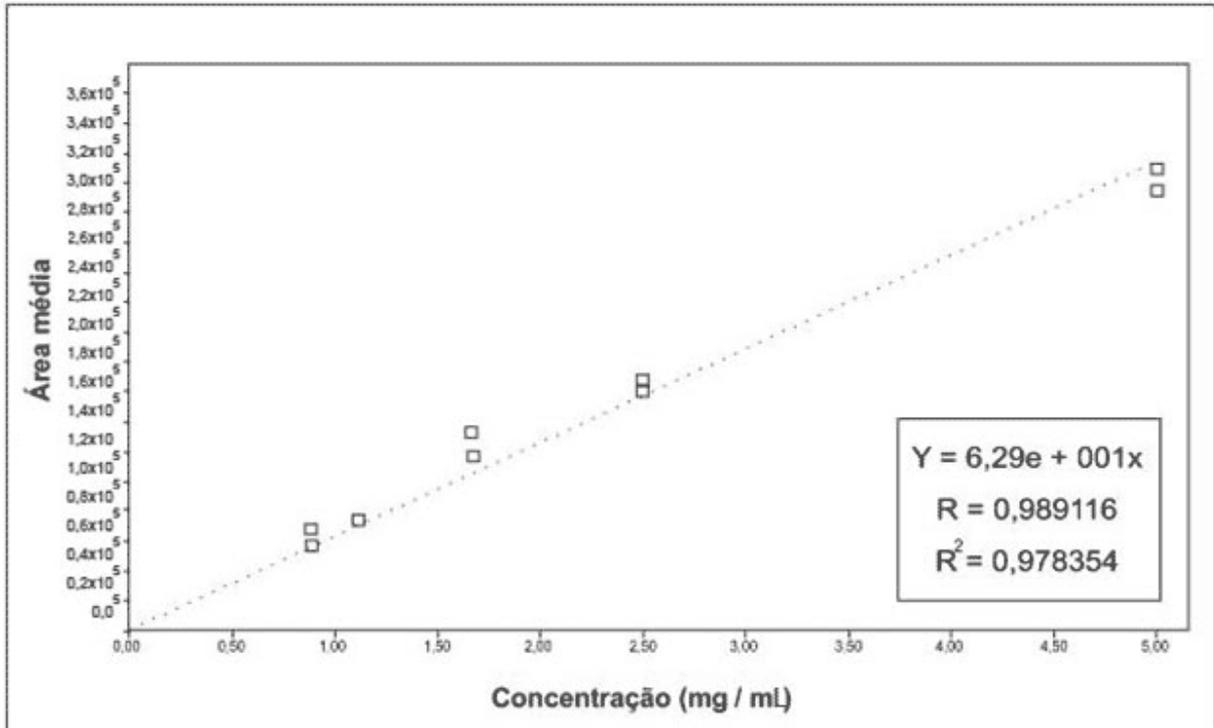


Figura 5. Curva de calibração da folidotina

4.8.2.3 Curva de calibração do 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno

A curva de calibração foi obtida pela análise de seis soluções de 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno, cujas diluições foram injetadas em triplicata. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas a partir de uma solução-mãe de concentração inicial de 4 mg / mL até 0,050 mg / mL de 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno correspondendo às concentrações de 4, 2, 1,33, 0,08, 0,06 e 0,05 mg / mL. A curva foi construída com a média dos valores encontrados em cada concentração e plotada pelo software Empower Pro (Figura 6).

A equação da reta foi calculada através de regressão linear conforme figura 6.

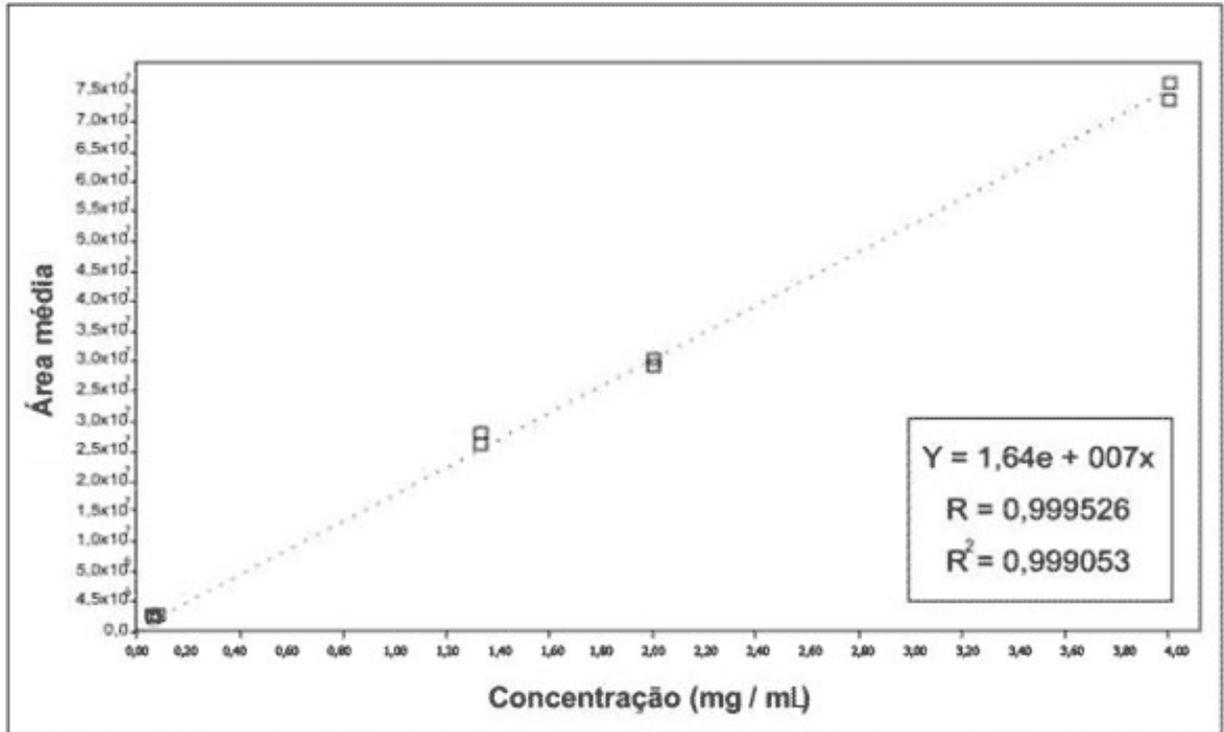


Figura 6. Curva de calibração do 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno

4.8.2.4 Curva de calibração do 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno

A curva de calibração foi obtida pela análise de cinco soluções de 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno, cujas diluições foram injetadas em triplicata. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas a partir de uma solução-mãe de concentração inicial de 6,6 mg / mL até 0,122 mg / mL de 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno correspondendo às concentrações de 4,0, 2,2, 0,733, 0,366, 0,244 e 0,122 mg / mL. A curva foi construída com a média dos valores encontrados em cada concentração e plotadas pelo software Empower Pro (Figura 7).

A equação da reta foi calculada através de regressão linear conforme figura 7.

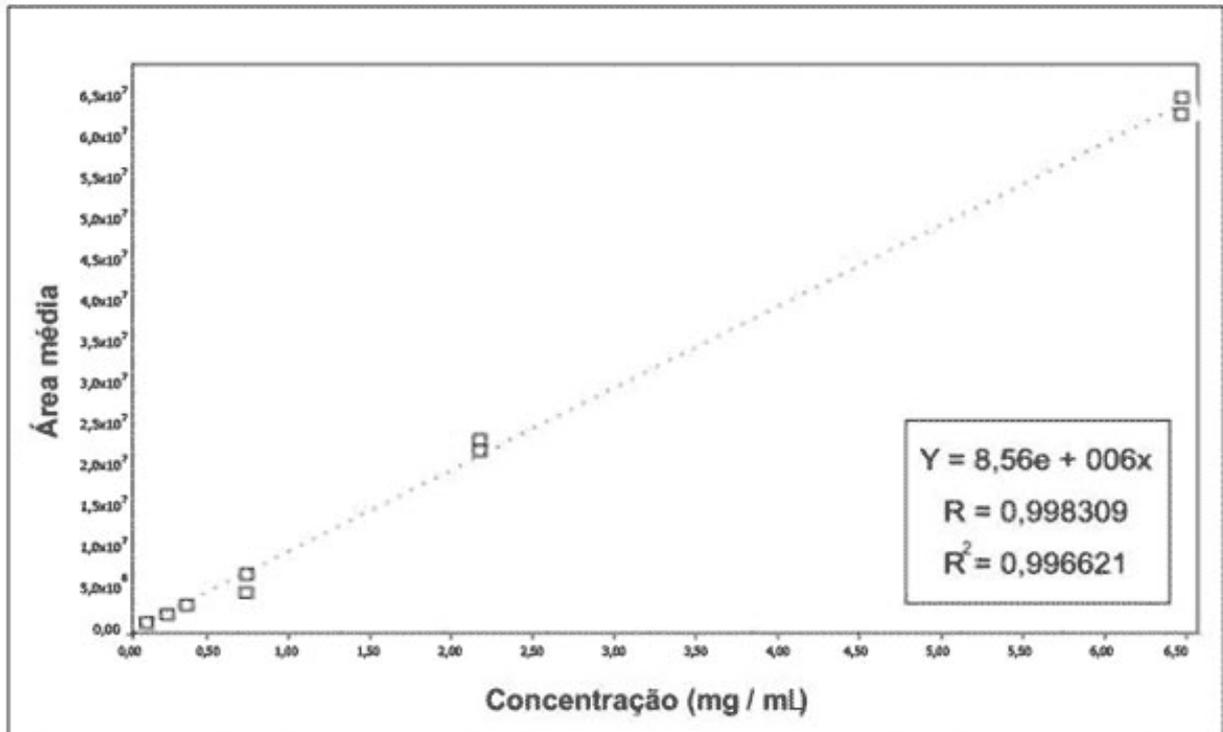


Figura 7. Curva de calibração do 4,3'5'triidroxi-3- metoxi-diidroestilbeno

4.9 Metodologia para avaliação dos efeitos biológicos

4.9.1 Ação analgésica: Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6 % em camundongos.

Para avaliação da atividade analgésica do extrato, realizada pela professora Fátima do Curso de Farmácia Univali, foram utilizados camundongos "Swiss" machos ou fêmeas de 25 a 35 g, mantidos a temperatura controlada (22 ± 2 °C) e iluminação em ciclo claro-escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatados ao laboratório por 1 hora antes de começar os testes. A resposta nociceptiva foi induzida através do ácido acético (0,6 % em solução salina 0,9 %) administrado via intraperitoneal, o qual promove contorções abdominais seguido de extensão de uma das patas posteriores. Os animais foram pré-tratados com os extratos de caule diclorometano e compostos puros obtidos dos caules de *E.mosenii* sob a dose de 1, 3, 5 e 10 mg / kg de peso do animal, sendo administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes da injeção do ácido acético. Comparativamente foi feito um grupo

controle para o experimento, no qual os camundongos receberam apenas solução salina nas mesmas condições de ensaio com mesmo volume final.

Após a injeção do ácido acético, os animais foram colocados em funis de vidro individuais. O número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi então determinada tomando-se como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados, comparando-os com o número de contorções abdominais dos animais controle (SOUZA, 2003). A partir desses resultados, foi calculada para algumas frações e compostos, a dose que inibe 50 % das contorções abdominais (DI_{50}).

4.9.2 Ação antifúngica

A análise antifúngica foi avaliada pelo método quantitativo utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM foi considerada como sendo a menor concentração do extrato de *E.mosenii* que inibiu o crescimento visível dos microrganismos ensaiados após incubação. Para realização do ensaio foram utilizados alguns representantes da classe dos fungos sendo que, para cada qual, foram preparados: um tubo contendo somente o meio de cultura específico adicionado do solvente como controle positivo e um tubo contendo 30 μg / mL de cetoconazol como controle negativo. Após solidificação do meio de cultura, os fungos foram inoculados sobre a superfície do ágar. Os tubos foram incubados a 28 °C por 24, 48 e 72 horas e após este período foi feita a leitura baseada na observação visual do crescimento ou não dos fungos inoculados.

As amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações de 2 % e homogeneizadas em concentrações conhecidas com o meio de cultura, no qual se inocularam os microrganismos (SARTORI et al., 2003).

Os ensaios antifúngicos foram realizados pela equipe da professora Suzana Zacchino (Universidade Nacional de Rosário, Rosário/Argentina).

4.10 Análise estatística dos dados

Para verificar a reprodutibilidade dos dados foi empregado à análise de média, de desvio padrão e de coeficiente de variação (CV). As análises foram consideradas reprodutíveis para $CV < 5\%$ (BRASIL, 2003). Os dados foram analisados pela análise da variância (ANOVA), seguido por teste de comparação múltipla das médias (Tukey). Foi utilizado um software estatístico, o Statistic 6.0[®], onde valores que corresponderam a $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para execução desta análise contou-se com a colaboração da professora Marina da Silva Machado (Curso de Farmácia Univali).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise fitoquímica

Por se tratar de uma espécie endêmica da flora catarinense e considerando a densidade vegetal diversificada na área de Mata Atlântica, a análise sazonal de seus constituintes de diferentes partes está sendo demonstrada pela primeira vez, no intuito de se identificar a melhor época de coleta bem como a parte da planta com maior concentração de compostos de interesse farmacológico, visto terem sido reportadas em trabalhos anteriores (OLIVEIRA, 1999; FERREIRA et al., 2000), promissoras atividades biológicas. Desta forma, serão demonstrados e discutidos a seguir os principais aspectos fitoquímicos referentes à planta em questão.

5.1.1 Rendimentos dos extratos obtidos

A massa de planta seca utilizada nas 4 coletas e o rendimento obtido de seus extratos de diclorometano das diferentes partes encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento bruto de massa do extrato de diclorometano obtido de diferentes partes de *E.mosenii* em diferentes coletas.

Parte da planta	outono	inverno	primavera	verão	Total das partes
Massa de extrato em g/100g de parte de planta seca					
Caule	1,372	3,518	3,493	2,702	11,085
Folha	3,234	5,978	5,530	6,513	21,255
Raiz	1,999	4,371	2,962	2,857	12,189
Flor	-	-	4,093	-	4,093
Total das coletas	6,605	13,867	16,078	12,072	48,622

O rendimento em massa de extrato obtido nas diferentes partes da planta está ilustrado na Figura 8.

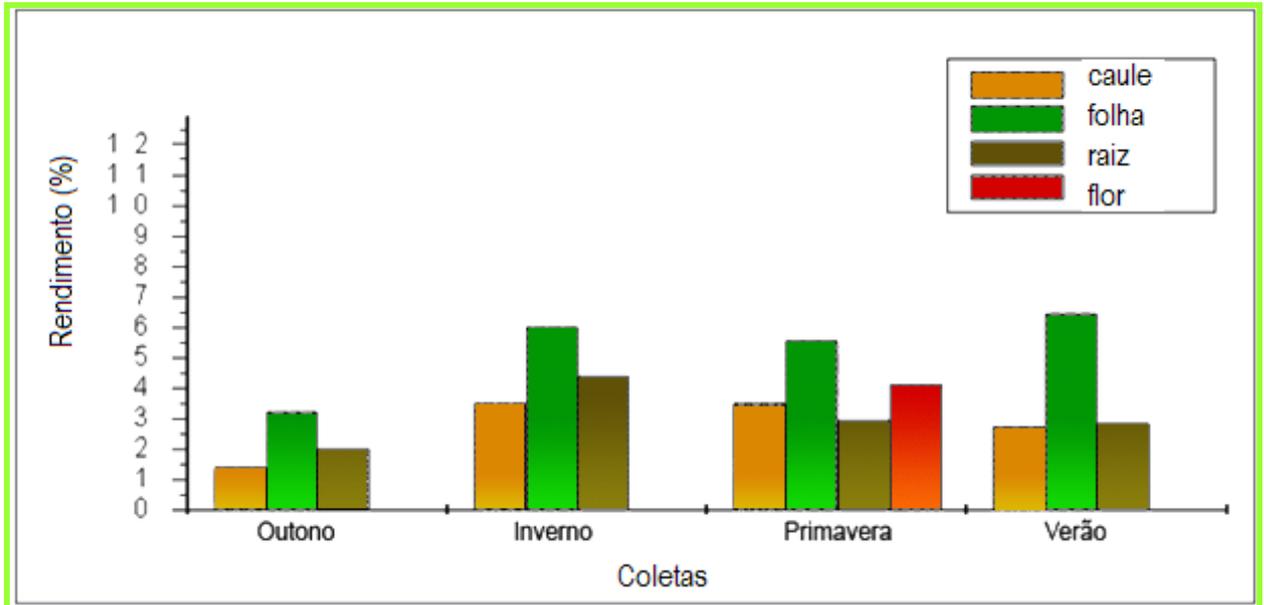


Figura 8. Rendimento do extrato (g %) das diferentes partes da planta nas 4 coletas, conforme descrito na Tabela 3.

De acordo com os resultados (Tabela 3 e Figura 8), verifica-se maior heterogeneidade apenas na coleta ocorrida no verão em relação ao rendimento, considerando-se as diferentes partes da planta. Observa-se ainda que o maior rendimento de massa foi obtido a partir das folhas, independente da estação do ano.

O rendimento nas flores das coletas realizadas no outono, no inverno e no verão foi escasso, por estar fora do período de floração que ocorre na primavera.

5.1.2 Isolamento e caracterização dos compostos

Considerando que estudos anteriores (OLIVEIRA, 1999) demonstraram que o extrato de diclorometano obtido dos caules apresentava um perfil fitoquímico completo por apresentar todos os compostos de interesse em quantidades razoáveis, este foi selecionado para obtenção dos padrões e ainda, para a possível obtenção de outro composto inédito com alguma atividade biológica de interesse e/ou que pudesse ser utilizado como marcador químico, em uma nova proposta para uma metodologia de controle de qualidade.

Após realizada a cromatografia em coluna (CC) e o conseqüente isolamento dos compostos, foi seguida a análise por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica (Figura 9). A CCD analítica com placas de sílica gel foi produzida através de 5 pontos,

As cores utilizadas para a confecção da placa de cromatografia (Figura 9) não representam originalmente a coloração emitida pelos compostos ao serem revelados com anisaldeído sulfúrico, pois estes, apresentam todos tons muito próximos, derivados do roxo, ficando portanto, difícil a diferenciação ilustrativa proposta. A placa foi produzida com relação eluente 70 : 30 para facilitar a visualização porém, os dados anteriores da literatura (OLIVEIRA, 1999) para cálculo de Rf foram feitos utilizando sistema eluente 60 : 40.

Observou-se uma mancha (amarela, coluna 2) com Rf de 0,71; valor este encontrado por Floriani e colaboradores, (1998), referente ao composto folidotina (**13**) puro, sendo a pureza do mesmo observada por CCD e cromatografia líquida e uma mancha (vermelha, coluna 3) na parte superior com Rf de 0,77 (OLIVEIRA, 1999) para o composto 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) referente ao mesmo composto puro. Para os compostos 4,5'-diidroxí-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno (**18**) e 4,3'5'triidroxí-3'-metoxi-diidroestilbeno (**19**), considerados como mistura nesta placa obtiveram Rf de 0,35 (mancha roxa, coluna 5), estando todos estes, de acordo com dados da literatura.

Os esteróides estigmasterol (**16**), β -sitosterol (**15**) e campesterol (**17**) foram obtidos de forma isolada e em mistura, porém, não foram quantificados por não ser objetivo do trabalho. A mistura destes, apresentou valor de Rf 0,73 (mancha laranja, coluna 4), estando também de acordo com a literatura (OLIVEIRA, 1999)

A partir da CC foram ainda isolados mais dois estilbenos que não puderam ser identificados devido à pequena quantidade, sendo denominados de roxo e vermelho, em função de suas cores quando revelados com anisaldeído sulfúrico.

Para melhor visualização dos estilbenos, a CCD analítica com placas de sílica gel foi produzida através de 5 pontos, contendo o extrato diclorometano do caule e os compostos isolados sendo eluída com o sistema hexano : acetona na proporção 60 : 40 e revelada com anisaldeído sulfúrico a placa demonstrou o seguinte perfil (Figura 10).

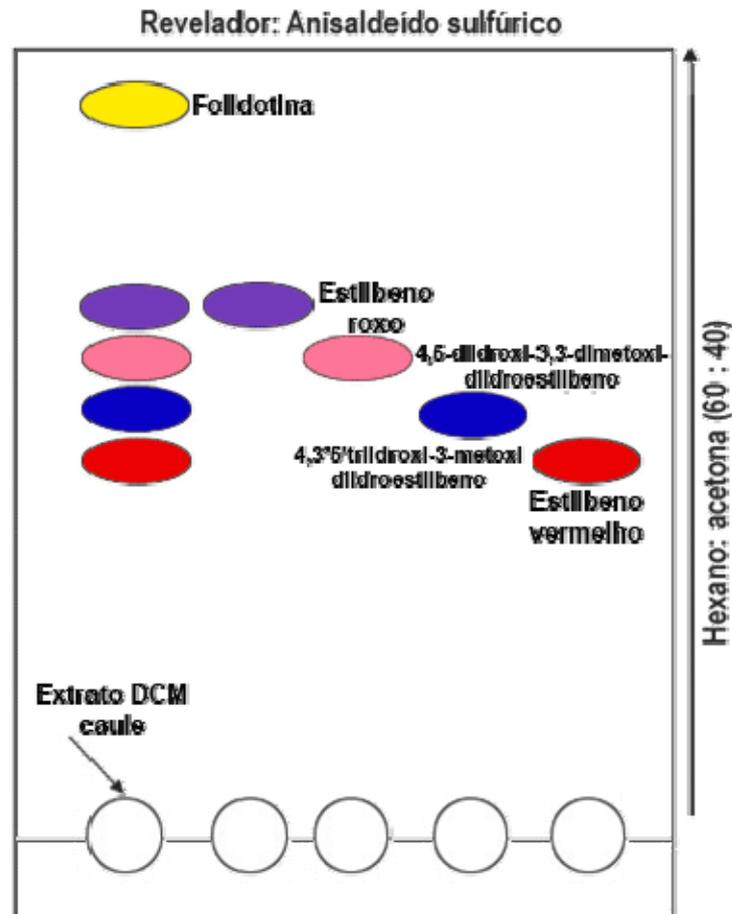


Figura 10. Representação esquemática de CCD analítica do extrato diclorometano de caule e dos padrões externos isolados como referência, eluída com sistema hexano : acetona na proporção 60 : 40 e revelada com anisaldeído sulfúrico. A placa possui 5 cm de altura e 3 cm de largura, tendo 0,5 cm de distância entre os pontos.

De acordo com a placa obtida foram observadas na mesma, manchas em sua parte mediana com Rf bastante próximos, portanto os compostos não tiveram seus Rf determinados, por haver na literatura apenas Rf da mistura. Os compostos mais apolares foram deslocados para parte superior da placa aparecendo apenas o composto folidotina (coluna 1) seguido dos estilbenos que foram identificados com base nos dados espectrais e comparados com resultados anteriores (I.V, CCD, ponto de fusão) (FLORIANI et al., 1998).

Foi observado que no extrato diclorometano do caule, de onde se partiu o isolamento, havia o composto folidotina (24-metilenocicloartanil-*p*-hidroxi-cis-cinamato)

(13), (mancha amarela), os estilbenos: roxo, (mancha roxa, coluna 2), 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno (18) (mancha rosa, coluna 3), 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (19), (mancha azul, coluna 4) e vermelho (mancha vermelha, coluna 5). Justificando desta forma a escolha do caule diclorometano para execução do isolamento, por conter todos os componentes de interesse.

5.2 Quantificação dos compostos isolados através de métodos cromatográficos

Dentre os métodos utilizados para quantificar substâncias em uma amostra (COLLINS; BRAGA, 1998) foi utilizado neste trabalho o método da calibração externa de acordo com Ribani et al. (2004).

5.2.1 Otimização das condições de cromatografia gasosa

5.2.1.1 Composto 24-metileno-ciclo-artanol (14)

A cromatografia dos extratos diclorometano das amostras foi realizada conforme item 4.8.1. descrito anteriormente e para determinação da concentração do composto nos extratos foi construída uma curva de calibração conforme descrito no item 4.8.1.1 e demonstrados na Figura 4.

O cromatograma do composto padrão utilizado na produção da curva de calibração está ilustrado na Figura 11.

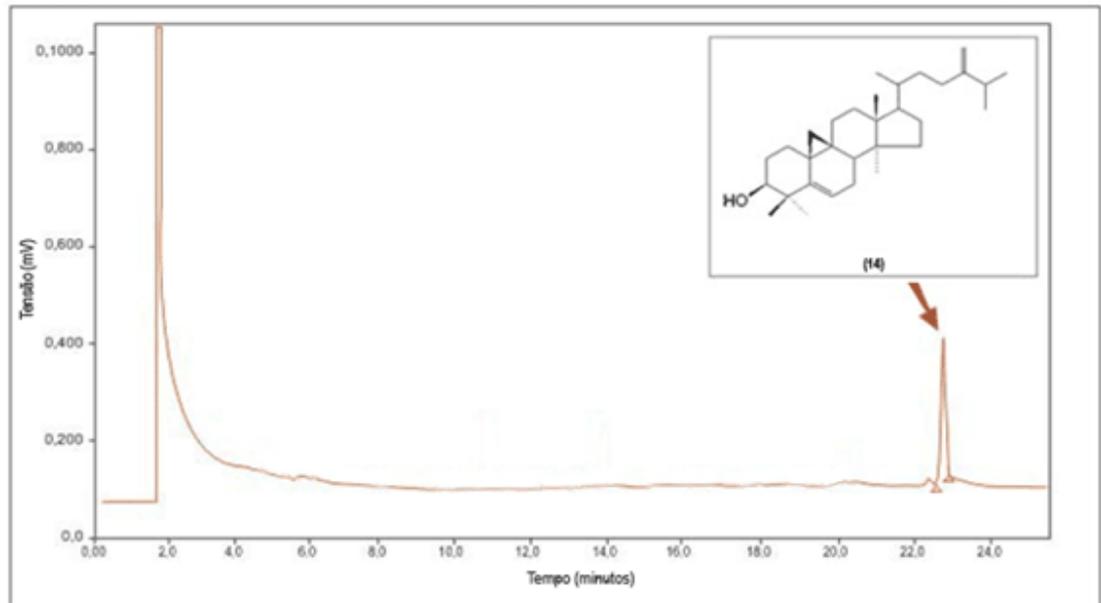


Figura 11. Cromatograma (CG) do 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) obtido a partir da curva de calibração na concentração de 4,10 mg / mL.

Através do cromatograma obtido na Figura 11, observa-se um pico com tempo de retenção em $21,3 \pm 2$ minutos, que foi utilizado como referência para caracterizar sua presença nas diferentes partes planta, segundo o caracterizado nas Figuras 12, 13, 14 e 15, onde constam os cromatogramas dos caules, folhas, raízes e flores da terceira coleta. Todas as amostras foram injetadas na concentração de 10 mg / 0,6 mL de solvente. Todas as injeções foram feitas em triplicata.

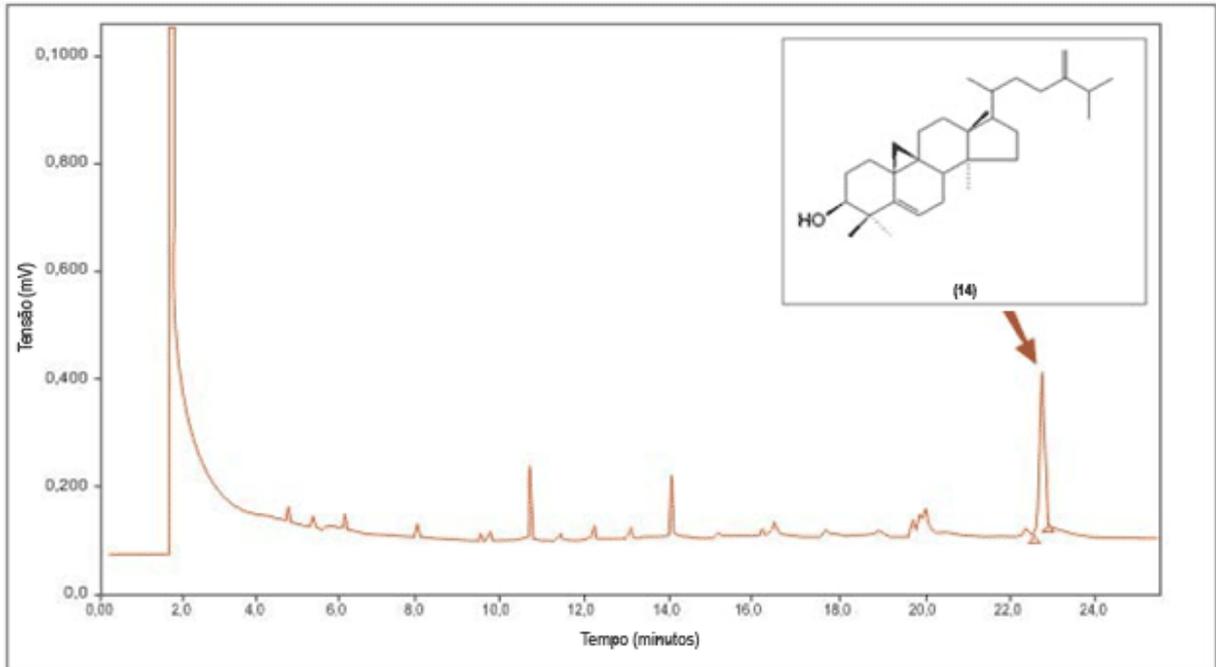


Figura 12. Cromatograma (CG) do extrato DCM do caule, coleta realizada em novembro na concentração de 10 mg / 0,6 mL.

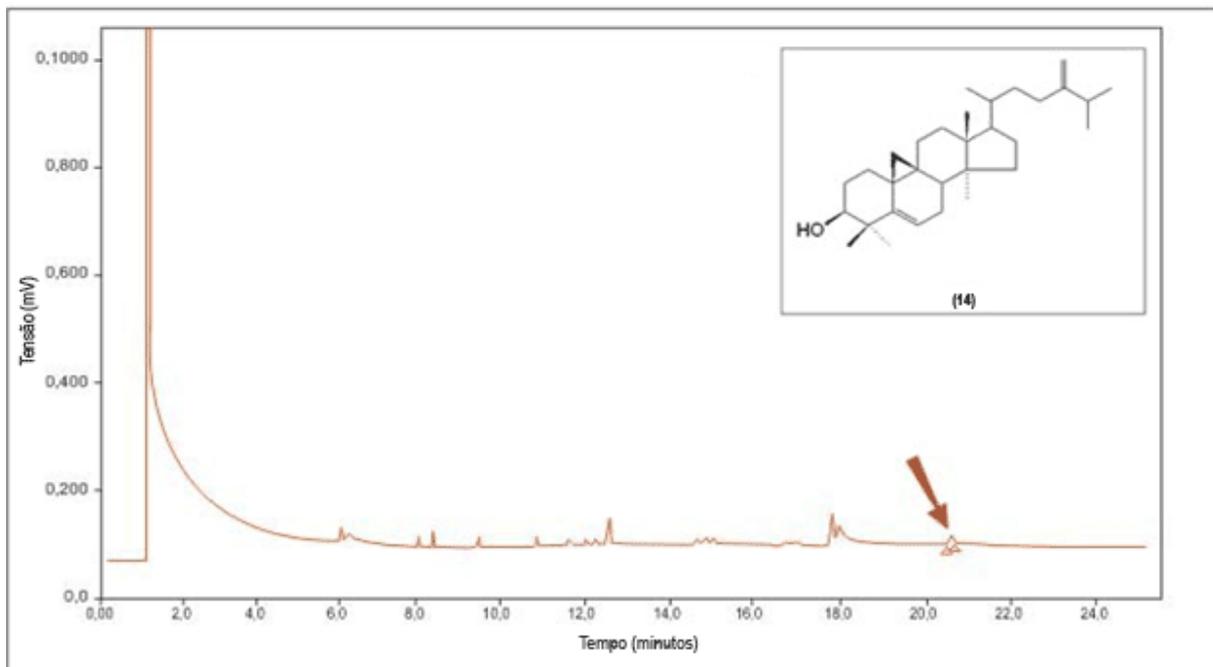


Figura 13. Cromatograma (CG) do extrato DCM da folha, coleta realizada em novembro na concentração de 10 mg / 0,6 mL.

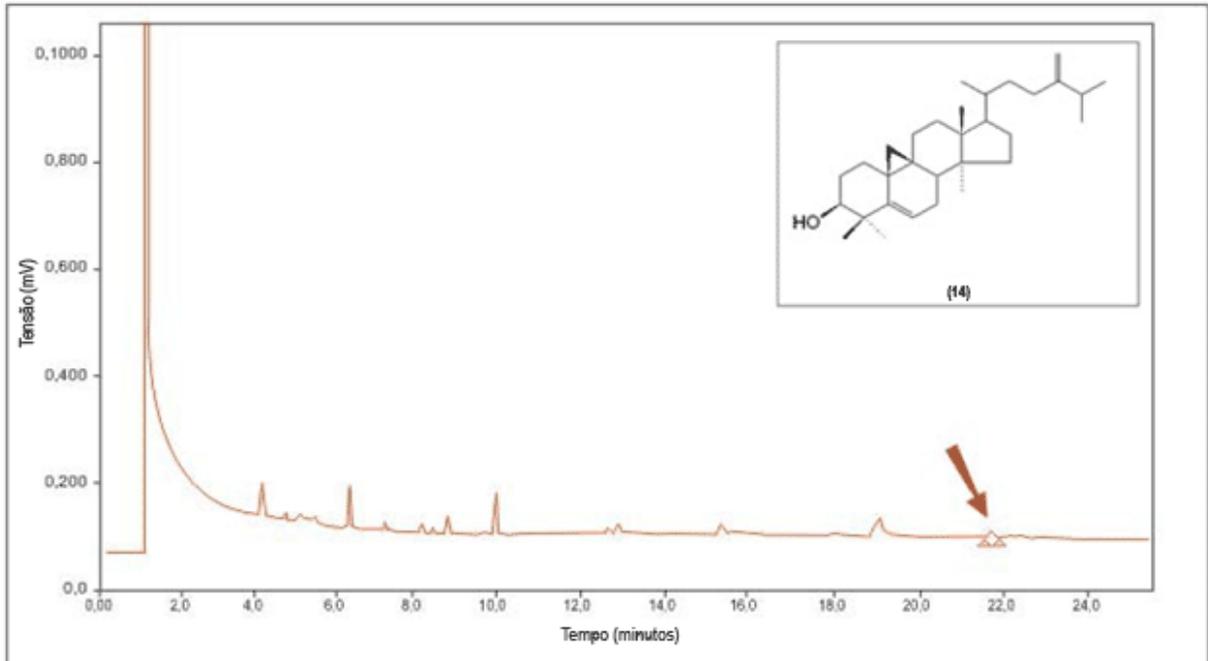


Figura 14. Cromatograma (CG) do extrato DCM da raiz, coleta realizada em novembro na concentração de 10 mg / 0,6 mL.

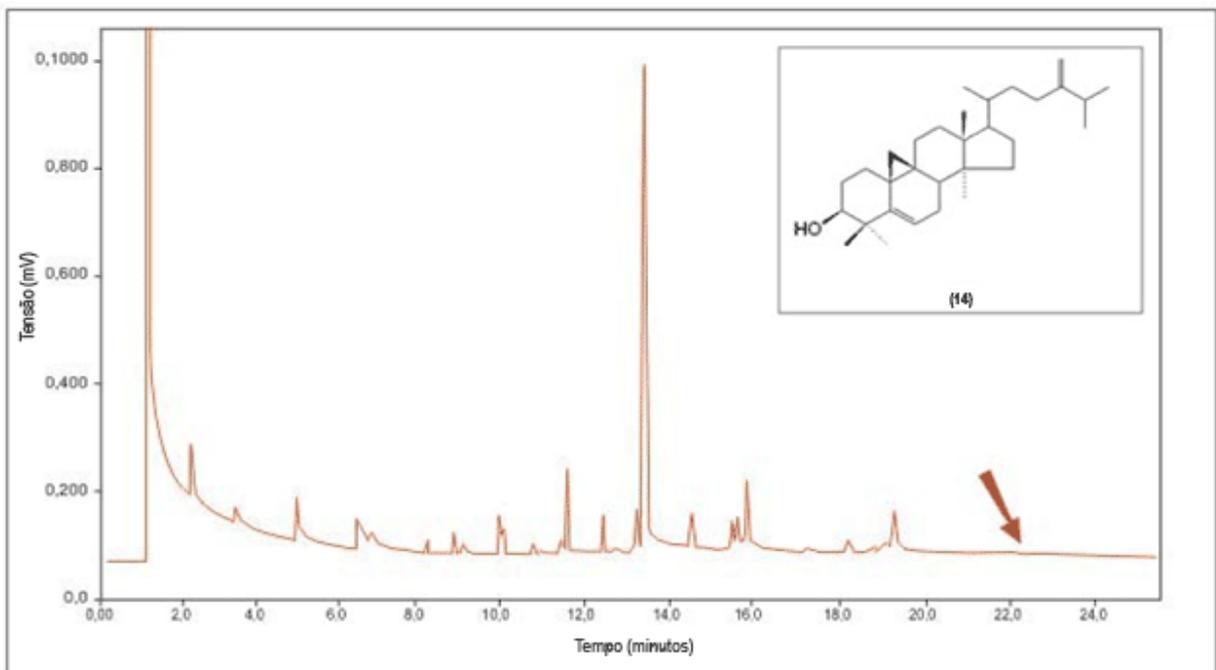


Figura 15. Cromatograma (CG) do extrato DCM da flor, coleta realizada em novembro na concentração de 10 mg / 0,6 mL.

Na Figura 12 observa-se também que, de acordo com a intensidade dos sinais apresentados nas diferentes partes da planta, no caule está o sinal de maior intensidade e como a relação área do pico x concentração é diretamente proporcional, conclui-se que, de maneira geral, o caule contém uma maior concentração de 24-metileno-ciclo-artanol (**14**), como será abordado mais à frente.

5.2.1.1.1 Análise estatística da quantificação do método cromatográfico

A análise estatística foi obtida através do programa Statistic[®] 6.0 pelo método ANOVA e apresentada na forma de tabelas e gráficos.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de média e desvio padrão (s) das triplicatas das concentrações do 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) nos extratos de diclorometano registrados do cromatógrafo e obtidos por curva de calibração, para as diferentes partes da *E.mosenii* (caule, folha, raiz) nas diferentes coletas. Estão apresentados também, os intervalos de confiança para as concentrações médias.

Tabela 4. Análise estatística (ANOVA) das concentrações do 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) na *E.mosenii*, para os extratos diclorometano, média de 3 replicatas.

Parte	Coletas	Conc. (mg / mL)	EPM	s (desvio padrão)	CV %
Caule	Outono	1,574791	0,024807	0,042965164	0,027283
Caule	Inverno	0,951934	0,003556	0,006159575	0,006471
Caule	Primavera	1,299823	0,012266	0,021245096	0,016345
Caule	Verão	2,437965	0,010393	0,018000364	0,007383
Folha	Outono	0,332351	0,001486	0,002574374	0,007746
Folha	Inverno	0,169483	0,000652	0,001129973	0,006667
Folha	Primavera	0,163646	0,002097	0,003632355	0,022196
Folha	Verão	0,162791	0,001851	0,003205544	0,019691
Raiz	Outono	0,111966	0,001265	0,002191654	0,019574
Raiz	Inverno	0,106129	0,001112	0,001925854	0,018146
Raiz	Primavera	0,131755	0,000866	0,00149989	0,011384
Raiz	Verão	0,135599	0,000866	0,00149989	0,011061

Conc. = Concentração; EPM = Erro padrão de média; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

De acordo com os dados da Tabela 4 observa-se que o erro padrão de média, obtido através da divisão do desvio padrão (s) pela raiz do número de replicatas (n) (1,732), é maior onde os valores de concentração são mais altos, porém mesmo assim, podem ser considerados pequenos devido a seu coeficiente de variação (CV) ser inferior a 5 %. Observamos ainda que, o resultado de desvio padrão das triplicatas, da mesma amostra injetada 3 vezes, foi baixo, indicando que as análises são consideradas reprodutíveis para intervalo de confiança de 95% (IC).

Na Figura 16, está representado graficamente as concentrações de 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) em função das diferentes partes planta conforme dados obtidos pela Tabela 4.

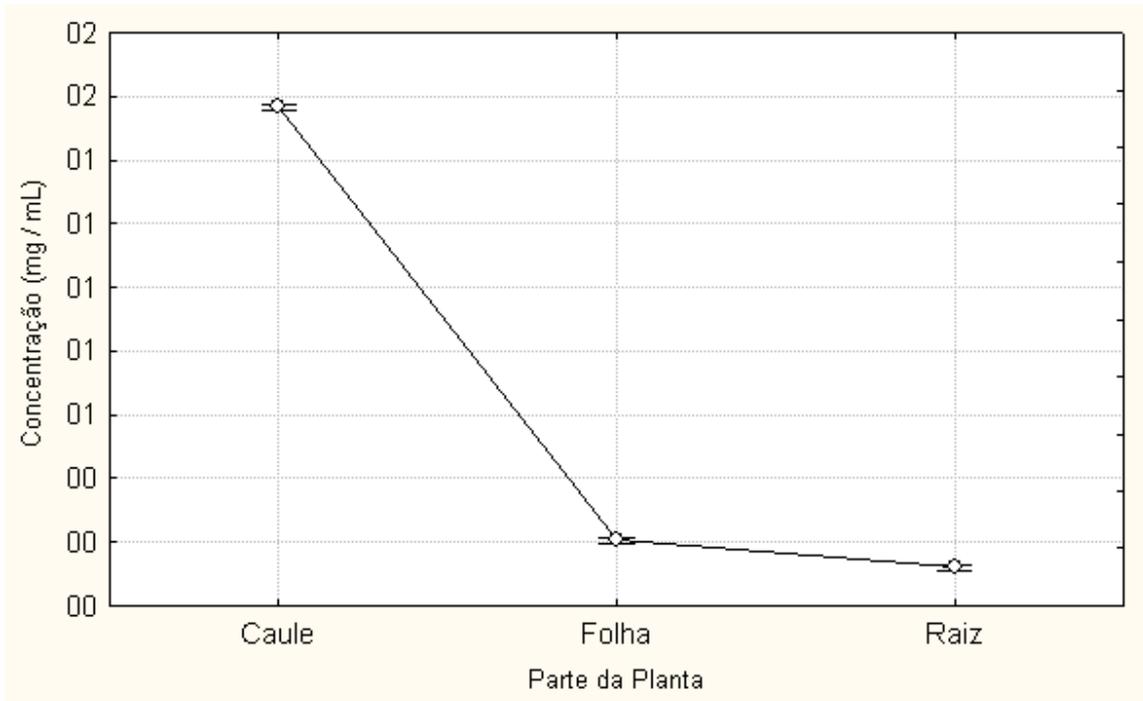


Figura 16. Gráfico ANOVA obtido a partir das concentrações (mg / mL) do composto (**14**) nas diferentes partes da planta.

Através do gráfico apresentado na Figura 16, observa-se que o caule é a parte da planta que apresenta maior concentração do 24-metileno-ciclo-artanol (**14**), independente da coleta, seguido das folhas e das raízes.

A quantificação do 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) nas amostras de extrato foi realizada com os valores das áreas médias apresentadas na Tabela 4 e com equação da reta obtida pela curva de calibração para o 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) (Figura 4).

Foram também comparadas as concentrações do composto (**14**) considerando as coletas independentes das partes a planta (Figura 17).

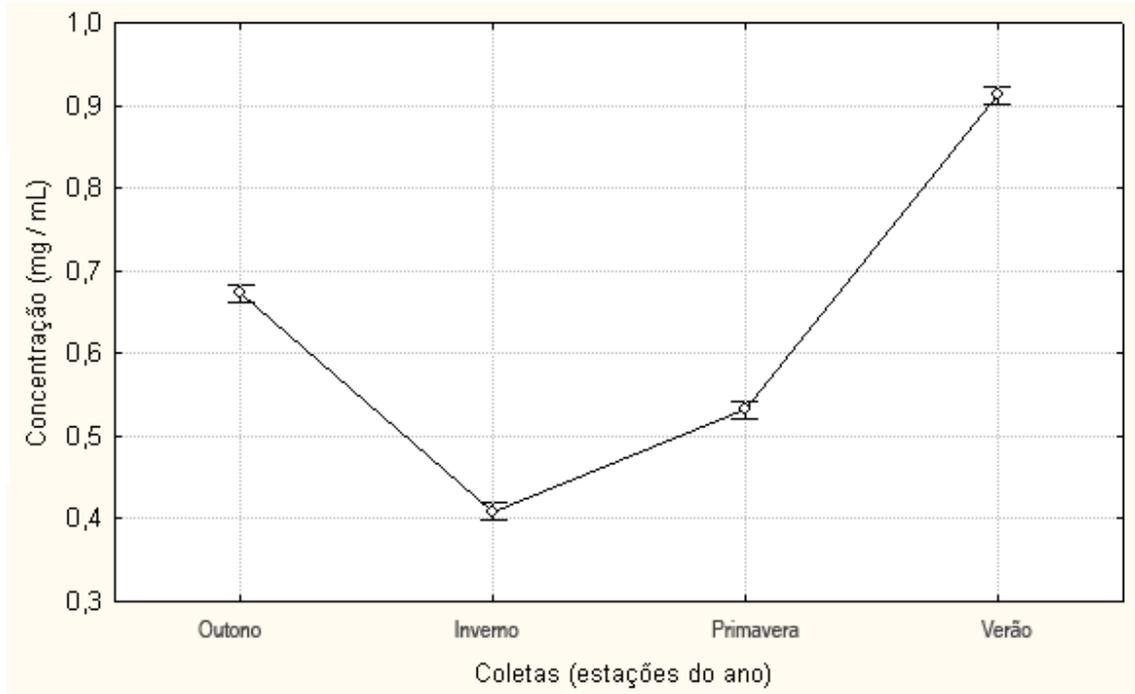


Figura 17. Gráfico ANOVA obtido a partir das concentrações (mg / mL) do composto (**14**) nas diferentes coletas durante as diferentes estações do ano.

Ao comparar-se as diferentes coletas, observa-se que a maior quantidade do composto (**14**) é encontrado na coleta realizada no verão, seguido do outono e primavera mostrando coerência na seqüência da produção de metabólitos pela planta tendo seu menor índice no inverno e gradativamente aumentando na primavera e verão, diminuindo no outono e depois no inverno, iniciando novamente a produção deste metabólito, fechando o ciclo conforme mostra a Figura 17.

Ao cruzar os resultados entre as concentrações do composto (**14**) nas diferentes partes da planta em função das diferentes estações do ano (Figura 18), observa-se que o caule é a parte da planta que apresenta maior concentração do mesmo independente

da coleta, seguido da folha e raiz, sendo mais encontrado no verão, seguido do outono e primavera, com menor produção no inverno.

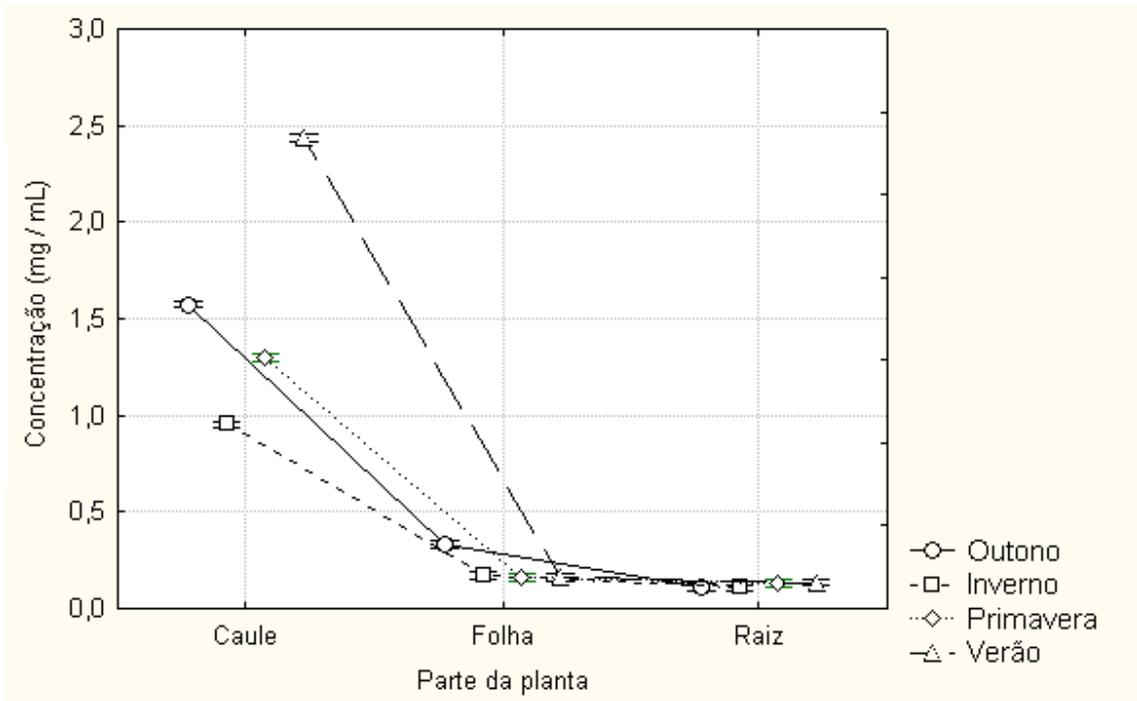


Figura 18. Gráfico ANOVA obtido a partir das concentrações (mg / mL) do composto (14) nas diferentes partes da planta e diferentes estações do ano.

A Figura 18 mostra que, as concentrações totais do composto (14) obtidas pelo somatório das folhas e raízes em diferentes coletas não atingem nem mesmo a menor concentração do mesmo obtida em qualquer coleta de caule, no extrato diclorometano. Portanto, o caule é a parte da planta que apresenta melhores rendimentos do composto (14) responsável pelo comportamento observado na Figura 17.

5.2.1.1.2 Rendimento dos extratos frente o 24-metileno-ciclo-artanol (14)

Ao se correlacionar a o rendimento bruto de massa de extrato (Tabela 3) e as concentrações do 24-metileno-ciclo-artanol (14), para os extratos diclorometano (Tabela 4), observa-se que as folhas apresentam maior rendimento de extrato no entanto as maiores concentrações de composto encontram-se no caule.

Considerando o rendimento em miligramas do triterpeno isolado e sua relação de rendimento com a massa da planta seca (Tabela 5) observa-se o seguinte comportamento:

Tabela 5 - Concentração de 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) nas diferentes partes em diferentes coletas em mg /100g de planta seca

Parte da planta	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Total das partes
Caule	129,6	200,9	272,0	398,2	1000,7
Folha	64,60	57,00	54,30	62,60	238,5
Raiz	14,30	24,80	23,40	23,00	85,50
Flor	-	-	37,20	-	37,20
Total das coletas	208,5	282,7	386,9	483,8	1361,9

O somatório das partes nos mostra que os caules apresentam cerca de quatro vezes mais 24-metileno-ciclo-artanol (**14**) do que as folhas, tornando-se a parte da planta mais interessante para obtenção deste, embora o maior rendimento de extrato seja encontrado nas folhas, seguido pelas raízes.

A coleta do caule não necessariamente virá a interferir no ciclo de vida da planta, visto que suas raízes e flores podem ser preservadas através da otimização do processo de coleta. Observa-se que a coleta de caule que apresenta maior rendimento do 24-metileno-ciclo-artanol (**14**), é a coleta realizada no verão seguida pela coleta realizada na primavera, desta forma poderiam ser evitados os caules com presença de flores, no momento da coleta, conservando desta forma seu aparelho reprodutor.

A partir dos dados da Tabela 5 verifica-se que a ocorrência de 24-metileno-ciclo-artanol (**14**), nas diferentes partes da planta é variável considerando as coletas e seu rendimento em extrato.

Pode-se observar que a melhor época de coleta para o caule é mesmo o verão, pois mesmo que seu rendimento em massa de extrato seja pequeno nesta coleta (Figura 8) o alto rendimento do composto (**14**) nesta época compensa uma pequena produção de extrato.

As folhas apresentam um comportamento bastante homogêneo para produção do composto **(14)** independente da coleta ficando em segunda escolha para obtenção do mesmo.

As raízes apresentam a menor parcela do composto e também apresentam um comportamento bastante homogêneo nas quatro coletas.

5.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.2.1.2.1 Otimização dos parâmetros do método analítico

O desenvolvimento do método analítico foi realizado a partir de um levantamento dos trabalhos citados na literatura sobre a utilização de CLAE para análise de compostos com estruturas semelhantes aos estilbenos em questão.

Primeiramente foram testados sistemas utilizando como solvente a mistura acetonitrila / água (70 : 30), com fluxos de 0,6 mL / min, 0,8 mL / min e 1mL / min (Figura 19) em sistema isocrático, mas não se obteve sucesso já que em todas as tentativas os picos encontravam-se sobrepostos em menos de quinze minutos de análise.

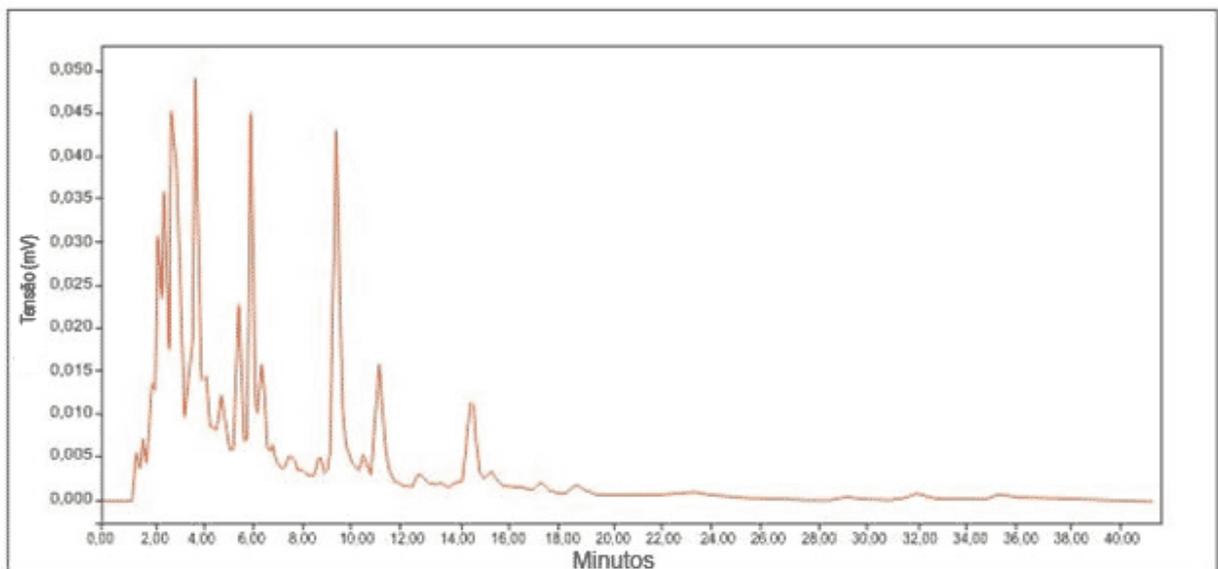


Figura 19. Cromatograma (CLAE) do extrato diclorometano de caule com sistema acetonitrila / água (70 : 30) 1mL / min.

Após testar a mistura 70 : 30 partiu-se então para a relação 90 : 10 ainda com acetonitrila / água, com fluxos de 0,8 mL / min e 0,6 mL / min em sistema isocrático, obteve-se, a partir desta, uma melhora pouco significativa no entanto, indicando a direção do próximo sistema a ser testado (Figura 20).

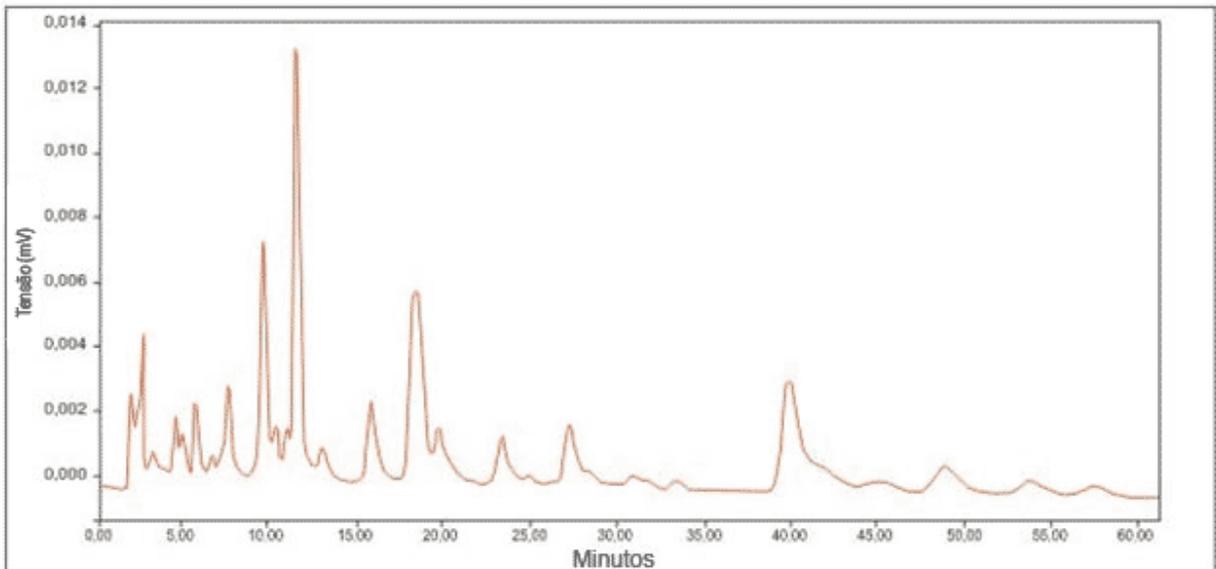


Figura 20. Cromatograma CLAE do extrato diclorometano de caule com sistema acetonitrila / água (90 : 10) 0,6 mL / min.

Através do cromatograma obtido observa-se que houve uma pequena melhora no método de separação, com os picos mais definidos e não tanto sobrepostos. (Figura 21).

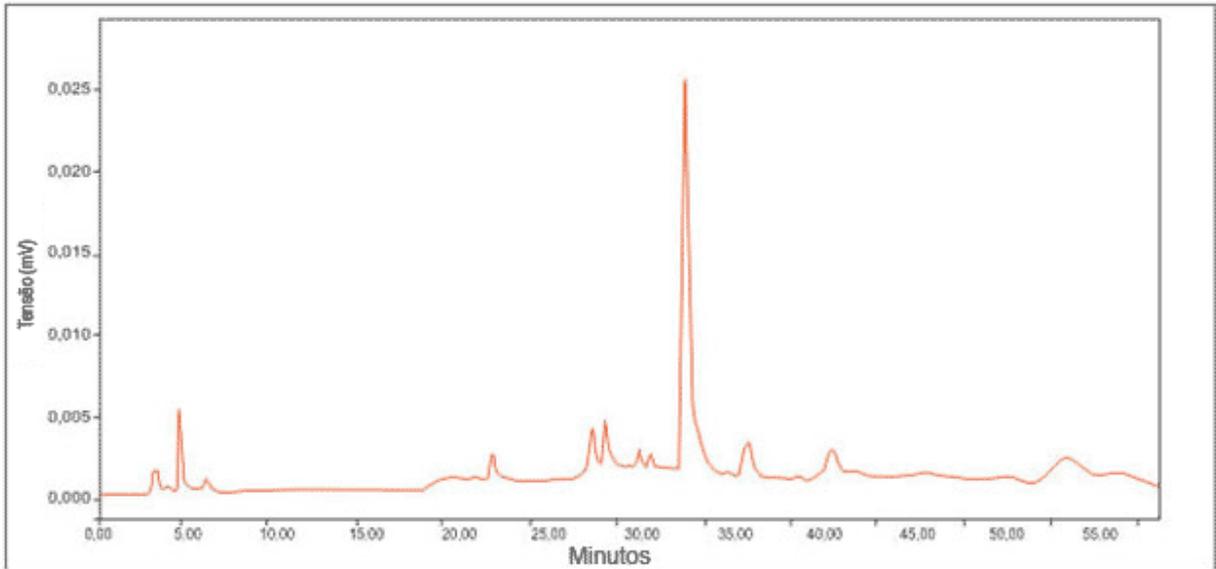


Figura 21. Cromatograma CLAE do extrato diclorometano de caule com sistema acetonitrila / água (95 : 5) 0,8 mL / min.

A partir dos testes preliminares em sistema isocrático, foi testado sistema gradiente segundo a programação demonstrada na Tabela 2, foi possível obter-se a separação da figura 22.

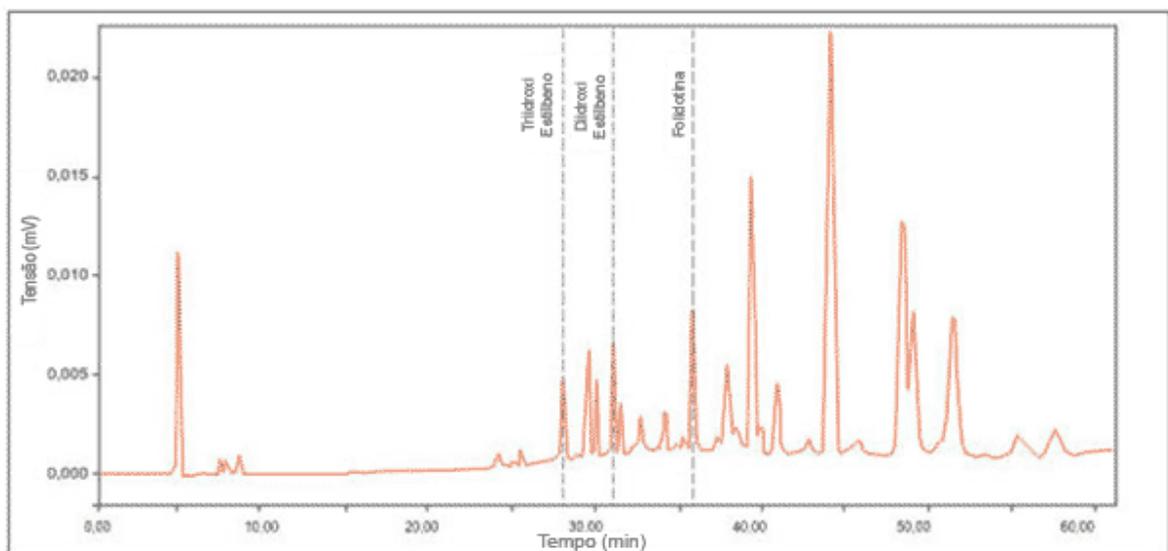


Figura 22. Cromatograma (CLAE) do extrato DCM de caule com sistema gradiente.

A partir do estabelecimento do *fingerprint* do caule foi então obtido o perfil cromatográfico das substâncias previamente isoladas, e determinados os parâmetros importantes para sua subsequente quantificação, dentre eles, sua absorção máxima no UV, seu tempo de retenção e seu fator de retenção (Tabela 6).

Tabela 6 – Absorção máxima dos compostos, seu tempo e fator de retenção.

Compostos	Absorções máximas em UV (nm)	Tempo de Retenção (min) ± 2 minutos	Fator de Retenção (K')
4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno	(223,2 – 376)	26	7,754
4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno	(227,9 - 278,6 – 376)	31	9,437
Folidotina	(255 – 373,6)	34	10,448

5.2.1.2.2 Análise quantitativa

5.2.1.2.3. Rendimento da folidotina (13) nos extratos

Através do cromatograma obtido a partir do composto padrão isolado (Figura 23) observa-se (Figura 24) aos 36 minutos aproximadamente, um pico com absorbâncias 255 e 373,6, utilizado como referência para caracterizar sua presença nas diferentes partes planta, como representado para o extrato do caule (Figura 24).

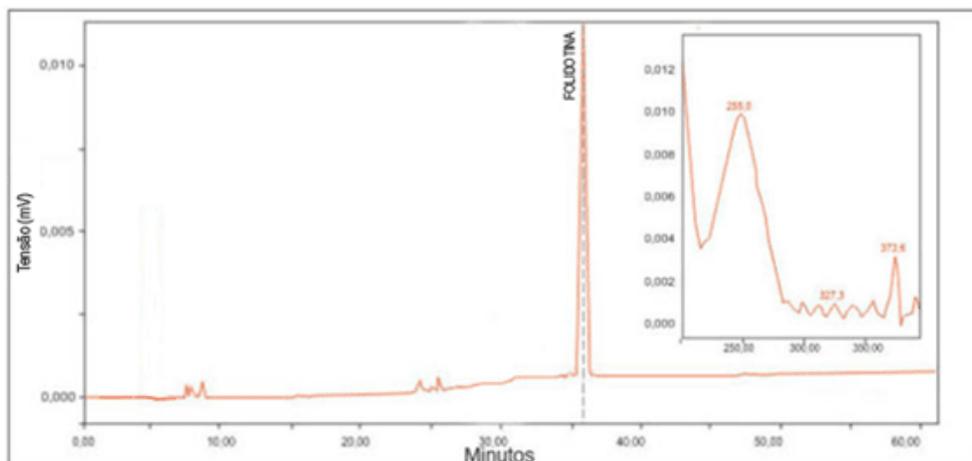


Figura 23. Cromatograma CLAE do composto folidotina.

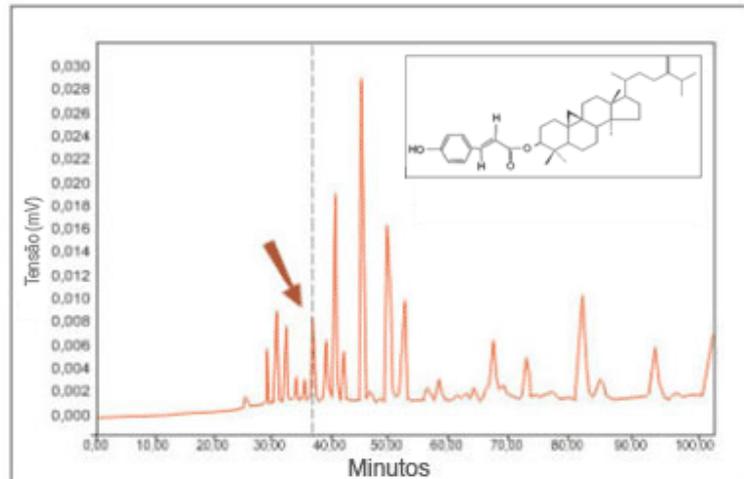


Figura 24. Perfil cromatográfico do extrato DCM do caule e absorções máximas em UV do composto folidotina destacado no extrato.

Na figura 23 o composto foi injetado em uma concentração aleatória apenas para demonstração de seu perfil.

A quantificação do composto folidotina (**13**) nas amostras de extrato foi realizada pelo método de calibração externa a partir dos valores das áreas obtidas do cromatógrafo relacionadas a equação da reta obtida pela curva de calibração para o composto (**13**) automaticamente pelo software Empower versão Pro.

O rendimento em miligramas do triterpeno isolado e sua relação de rendimento com a massa da parte da planta seca que o deu origem encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de folidotina (**13**) nas diferentes partes em diferentes coletas em mg / 100g de planta seca.

Parte da planta	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Total das partes
Concentração em mg / 100g de parte da planta seca					
Caule	*	571,32	607,08	358,82	1.537,22
Folha	102,67	920,60	361,38	2.330,74	3.715,39
Raiz	1.397,60	2.306,14	1.803,86	1.727,91	7.235,51
Total das coletas	1.500,27	3.769,56	2.772,32	4.381,68	12.423,83

* Amostra não testada por insuficiência de volume necessário.

De acordo com os valores apresentados pela tabela 7, observa-se que independente da coleta, a parte que apresenta maior concentração de folidotina é a raiz ainda que os rendimentos dos extratos obtidos pelas raízes sejam relativamente menores que as demais partes da planta, conforme Tabela 3. No entanto, ao se observar suas concentrações nas estações, verificamos que o verão é a coleta onde este composto pode ser encontrado em uma quantidade muito superior as demais coletas.

5.2.1.2.4 Rendimento dos extratos frente o 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno (18)

Através do cromatograma obtido a partir do composto padrão isolado (Figura 25), e do extrato (Figura 26) observa-se aos 31 minutos, um pico com absorbâncias em 226,7, 278,6 e 373,8 nm que foi utilizado como ferramenta para caracterizar sua presença em comparação com o padrão, nas diferentes partes da planta, como representado para o extrato do caule (Figura 26).

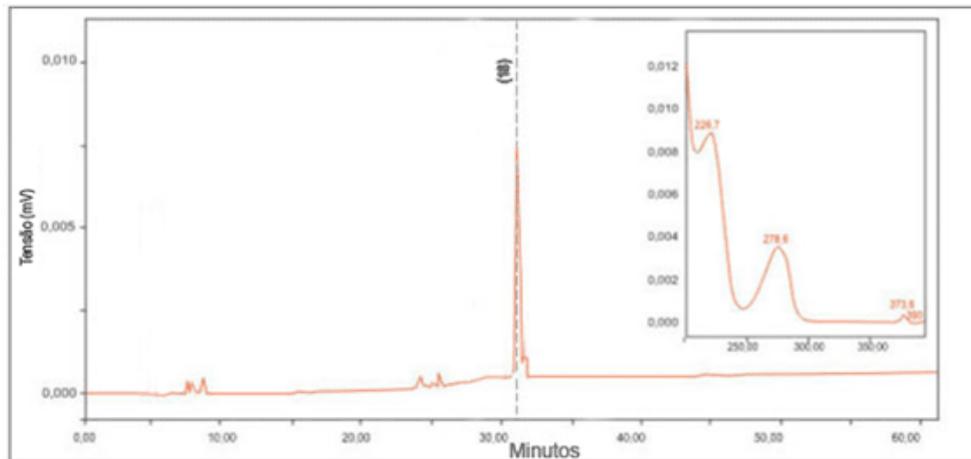


Figura 25. Cromatograma (CLAE) do composto 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno (18).

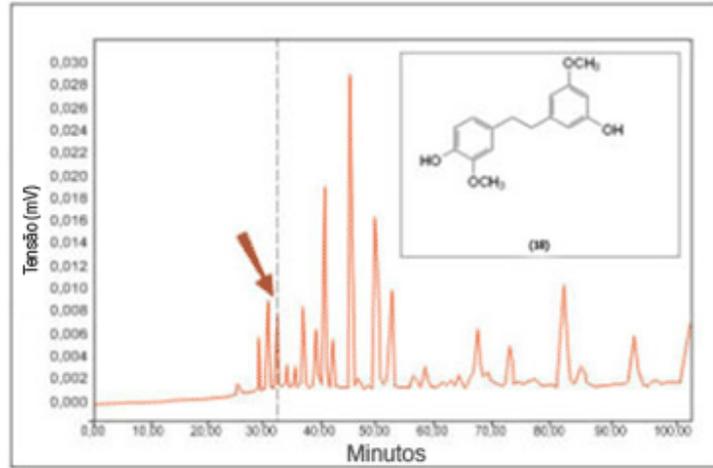


Figura 26. Perfil cromatográfico do extrato DCM do caule e absorções máximas em UV do composto 4,5'-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno (**18**).

Na figura 25 o composto foi injetado numa concentração aleatória apenas para demonstração de seu perfil.

A quantificação do composto 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno (**18**) nas amostras de extrato foi realizada pelo método de calibração externa a partir dos valores das áreas obtidas do cromatógrafo relacionadas a equação da reta obtida pela curva de calibração para o composto (**18**) automaticamente pelo software Empower versão Pro.

O rendimento em miligramas do composto (**18**) isolado e sua relação de rendimento com a massa da parte da planta seca que o deu origem encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração de 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno nas diferentes partes em diferentes coletas em mg / 100 g de planta seca

Parte da planta	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Total das partes
Concentração em mg/100g de parte da planta seca					
Caule	*	4,78	0,34	0,27	5,39
Folha	1,61	0,89	<LD	<LD	2,50
Raiz	4,79	0,43	0,59	0,85	6,66
Total das coletas	6,40	6,10	0,93	1,12	14,55

* Amostra não testada por insuficiência de volume necessário.

< LD = Menor do que o limite de detecção do composto para este método.

De acordo com os valores apresentados pela tabela 8, observa-se que independente da coleta, a parte que apresenta maior concentração de 4,5'-diidroxil-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno (**18**), é a raiz mesmo considerando que os rendimentos dos extratos obtidos pelas raízes são relativamente menores que as demais partes da planta, conforme Tabela 3. Já a melhor coleta apresenta-se como sendo a primeira.

5.2.1.2.5 Rendimento dos extratos frente ao 4,3'5'-triidroxil-3- metoxi-diidroestilbeno (19)

Através do cromatograma obtido a partir do composto padrão isolado (Figura 27), observa-se no extrato (Figura 28) aos 26 minutos aproximadamente, um pico com absorvâncias em 223,2 e 373,6 que foi utilizado como referência para caracterizar sua presença nas diferentes partes da planta, como representado para o extrato do caule (Figura 28).

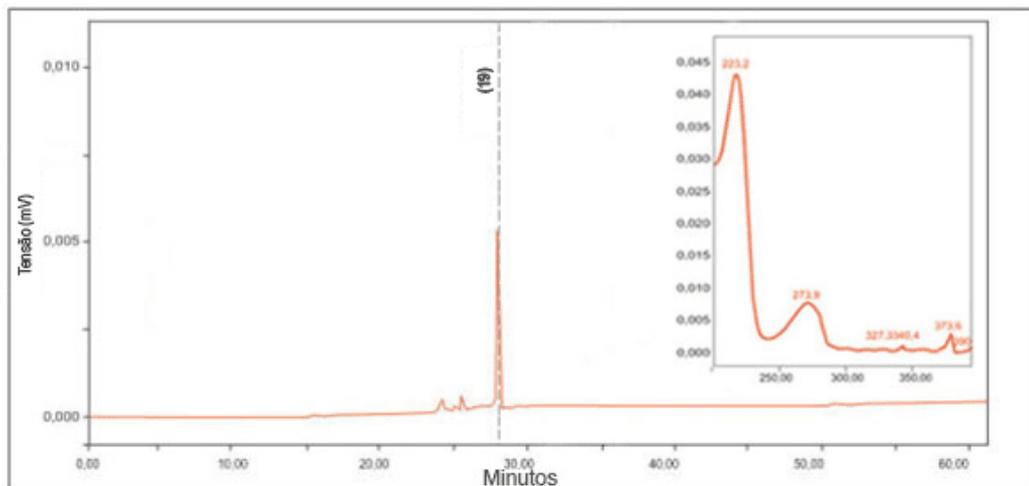


Figura 27. Cromatograma CLAE do composto 4,3'5'-triidroxil-3- metoxi-diidroestilbeno (**19**).

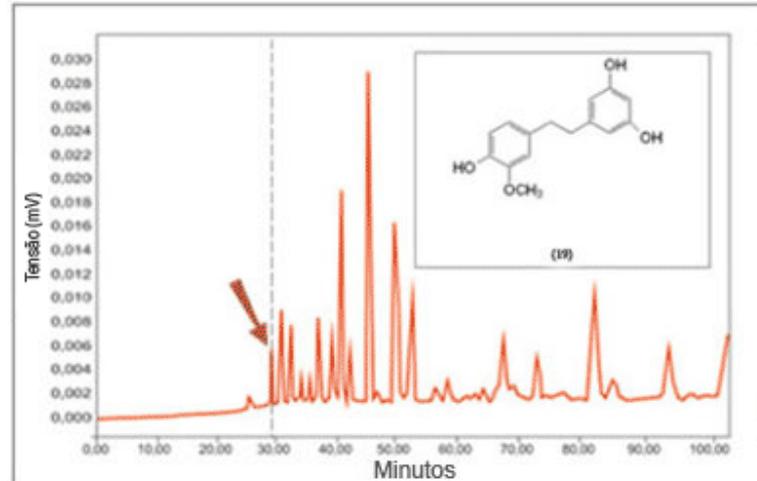


Figura 28. Perfil cromatográfico do caule e absorções máximas em UV do composto 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**)

O composto apresenta-se em concentração aleatória apenas para demonstração de seu perfil sendo que, suas concentrações e áreas obtidas estão na Figura 7.

A quantificação do composto 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**) nas amostras de extrato foi realizada pelo método de calibração externa a partir dos valores das áreas obtidas do cromatógrafo relacionadas a equação da reta obtida pela curva de calibração para o composto (**19**) automaticamente pelo software Empower versão Pro.

O rendimento em miligramas do composto (**19**) isolado e sua relação de rendimento com a massa da parte da planta seca que o deu origem encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**) nas diferentes partes em diferentes coletas em mg / 100g de planta seca

Parte da planta	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Total das partes
Concentração em mg/100g de parte da planta seca					
Caule	*	1,16	19,73	7,83	28,72
Folha	10,51	0,89	1,99	2,60	15,99
Raiz	113,74	11,36	40,43	36,99	202,53
Total das coletas	124,25	13,41	62,15	47,39	247,20

* Amostra não testada por insuficiência de volume necessário.

De acordo com os valores apresentados pela tabela 9, observa-se que independente da coleta, a parte que apresenta maior concentração do composto **(19)** é a raiz, mesmo considerando que os rendimentos dos extratos obtidos pelas raízes são relativamente menores que as demais partes da planta, conforme Tabela 3. No entanto, com relação à esse composto, deve-se considerar que os valores do caule da primeira coleta, que não foram adquiridos podem fazer uma diferença significativa com relação aos rendimentos totais.

5.3 Análises biológicas

5.3.1 Atividade analgésica

A atividade analgésica utilizada para prever a atividade farmacológica foi o modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos tendo como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com ácido acético, comparando-os com o número de contorções abdominais dos animais controle administrados com solução salina 0,9 % e com os extratos e compostos puros obtidos dos caules de *E.mosenii* (Figura 29).

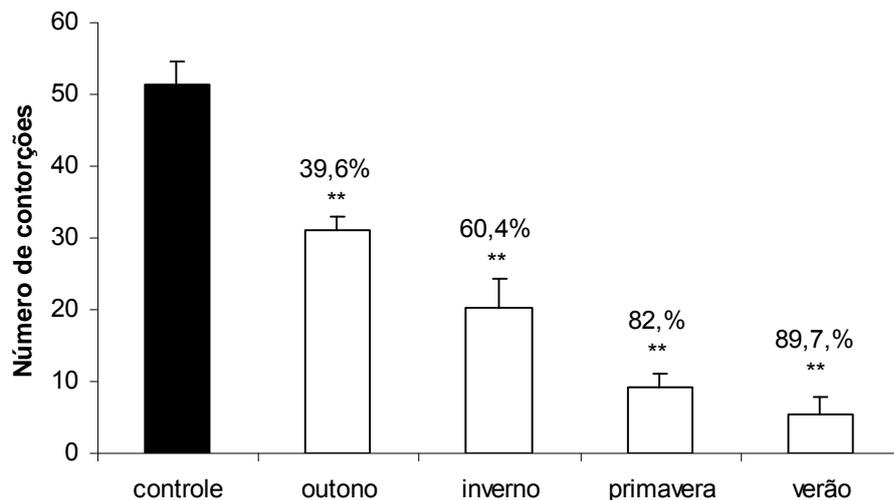


Figura 29. Efeito dos extratos DCM de caule de *Epidendrum mosenii* em diferentes coletas, administrados na concentração de 10 mg / kg, via intraperitoneal no modelo de dor induzida pelo ácido acético. Cada coluna representa uma média de 06 experimentos e as barras verticais indicam o EPM. Asteriscos indicam diferenças significativas (**p < 0,01) quando comparadas com o grupo controle, utilizando-se ANOVA seguida do teste de Dunnet.

De acordo com o esquema gráfico da Figura 29, pode-se observar que os caules coletados no inverno, primavera e verão diminuíram significativamente as contorções abdominais produzidas pelo ácido acético, apresentando uma considerável atividade analgésica. A partir desses dados preliminares, com base nos resultados obtidos nesse ensaio, as coletas foram ainda testadas em diferentes concentrações conforme Tabela 10.

Tabela 10 - Avaliação da atividade analgésica dos extratos de caule de *E.mosenii* das diferentes coletas, em distintas doses no modelo de contorções abdominais.

	Relação da concentração de extrato em mg / kg de peso do animal		
	10 mg / Kg	3 mg / Kg	1 mg / Kg
Coleta			
Outono	49,0%	39,6%	Nt*
Inverno	60,4%	34,1%	Nt*
Primavera	82,0%	56,4%	31,4%
Verão	89,7%	45,2%	11,8%

* Concentração não testada

A partir desses resultados, foi calculada a DI_{50} para algumas frações e compostos, a qual refere-se a dose capaz de inibir 50 % das contorções abdominais provocadas pelo padrão álgico.

De acordo com os resultados apresentados pela Tabela 10, pode-se observar que os caules coletados na primavera e verão diminuíram significativamente as contorções abdominais produzidas pelo ácido acético, apresentando uma interessante atividade analgésica para este modelo de análise.

Fazendo um paralelo com fármacos tradicionalmente aplicados na clínica com finalidade analgésica, observamos que as amostras coletadas na Primavera e Verão DI_{50} 2,87 (2,21 – 3,73) mg / kg e 4,52 (3,41 – 5,99) mg / kg respectivamente, podem ser considerados cerca de 6 vezes mais potentes do que a aspirina® DI_{50} 24,00 (13,0 – 44,0) mg / Kg e o paracetamol DI_{50} 19 (16,0 – 24,0) mg / Kg.

Observamos que no caule coletado na primavera e verão, encontramos, a maior quantidade o composto 24-metileno-ciclo-artanol, que pode estar sendo o responsável pelo efeito analgésico das amostras coletadas neste mesmo período, o que estaria justificando o uso popular do caule para preparações com finalidade analgésica, sem descartar ainda nesse caso, o efeito sinérgico de todos os componentes da planta.

Para a mesma finalidade foram testados também 2 compostos puros isolados da *E.mosenii*: os estilbenos 4,5-dihidroxi-3,3-dimetoxi-diidroestilbeno (**18**) e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**) e de acordo com a Figura 30, observamos que os mesmos, também apresentam alguma atividade analgésica frente ao modelo, principalmente o 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**), o qual reduz em até 55 % as contorções abdominais na dose de 5 mg, e que apresenta DI_{50} de 4,5 mg / Kg. Ao se considerar a atividade em termos de $\mu\text{mol} / \text{Kg}$ evidencia-se que o composto (**19**) (DI_{50} de 17,3 $\mu\text{mol} / \text{Kg}$) é 7 vezes mais potente do que aspirina e paracetamol, que apresentam de cerca de DI_{50} de 125 $\mu\text{mol} / \text{Kg}$ (FERREIRA et al., 2000).

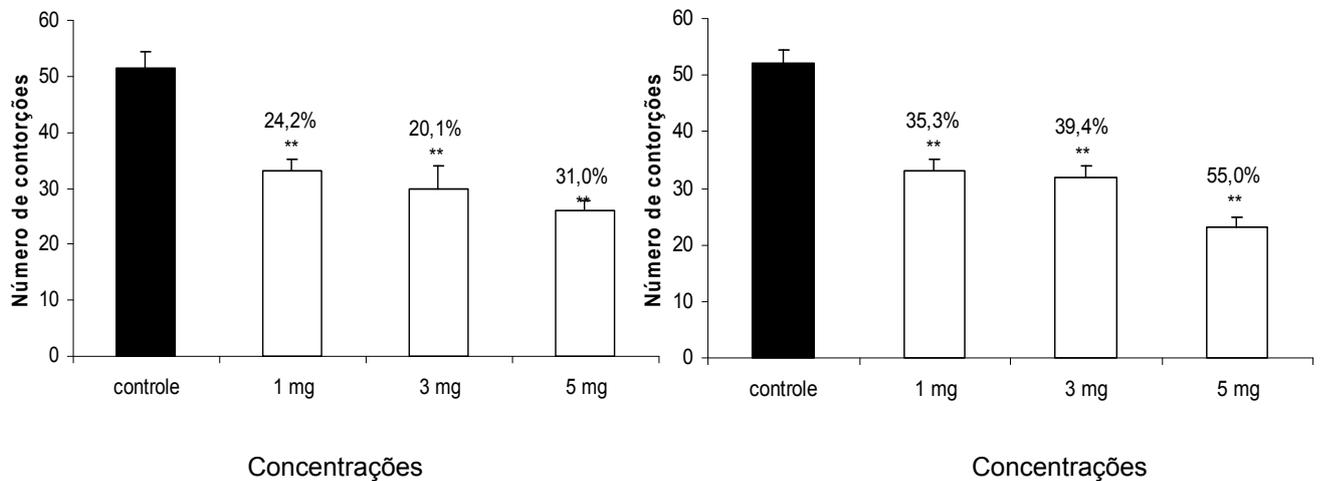


Figura 30. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em relação ao tratamento com estilbenos isolados de *Epidendrum mosenii*.

5.3.2 Atividade antifúngica

No intuito de se detectar alguma substância com potencial biológico, os extratos e compostos puros isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir o desenvolvimento microbiano “*in vitro*”. Foi utilizada para isso a metodologia de diluição em ágar para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) conforme descrito no item 4.8.2.

Para classificar a atividade antimicrobiana dos compostos puros isolados da planta, utilizou-se os seguintes parâmetros:

Os compostos puros que apresentaram CIM menor que 100 µg / mL foram considerados com boa atividade antimicrobiana, os que apresentaram CIM entre 100 a 500 µg / mL foram considerados moderadamente ativos, quando apresentaram atividade entre 500 e 1000 µg / mL foram considerados fracos e quando a CIM for maior que 1000 µg / mL então o produto foi considerado inativo (HOLETZ et al., 2002). Para determinação da mesma, apenas dois compostos foram testados conforme Tabela 11.

Tabela 11 - Atividade antifúngica através do método da Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) dos estilbenos isolados 4,5 diidroxi 3,3-dimetoxidiidroestilbeno (**18**), e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**)

Estilbenos	Microrganismos testados									
	<i>Ca</i>	<i>Ct</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>	<i>Af</i>	<i>Afl</i>	<i>An</i>	<i>Mg</i>	<i>Tr</i>	<i>Tm</i>
DiOH*	>250	>250	>250	125	>250	>250	>250	125	125	125
TriOH**	>250	>250	>250	125	>250	>250	>250	125	62.5	125

*DiOH = 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxidiidroestilbeno (**18**)

TriOH = 4,3'5'triidroxi-3- metoxi-diidroestilbeno (19**)

Ca = *Candida albicans*; *Ct* = *Candida tropicalis*, *Sc* = *Saccharomyces cerevisiae*, *Cn* = *Cryptococcus neoformans*, *Af* = *Aspergillus fumigatus*, *Afl* = *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mg* = *Microsporium gypseum*, *Tr* = *Trychophyton rubrum*, *Tm* = *Trychophyton metagrophytes*

De acordo com os dados obtidos e indicados na Tabela 11, pode-se observar que os compostos 4,5-diidroxi-3,3-dimetoxidiidroestilbeno (**18**) e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno (**19**) apresentam atividade inibitória frente aos seguintes microrganismos testados: *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Trychophyton rubrum*,

Trychophyton metagrophytes. Observa-se ainda que, no caso do dermatófito *T.rubrum*, o estilbeno **(19)** apresenta uma interessante atividade inibidora de seu crescimento, sendo duas vezes mais potente do que o composto **(18)**, neste ensaio.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

1. De acordo com os extratos produzidos a partir dos caules, folhas, raízes e flores provenientes das coletas nos meses de maio, agosto, novembro e fevereiro, respectivamente representadas pelas estações do outono, inverno, primavera e verão, foram obtidos melhores rendimentos de massa nas coletas realizadas no inverno, primavera e verão sendo que o extrato da folha resultou no maior rendimento em massa independente da estação.
2. Foram isolados, a partir do extrato diclorometano do caule, os esteróides β -sitosterol, stigmasterol e campesterol, além dos triterpenóides folidotina (24-metilenocicloartanil-*p*-hidroxi-cis-cinamato) e 24-metileno-ciclo-artanol e dos estilbenóides: 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno confirmando o trabalho anterior de Oliveira e colaboradores, (1999). Além destes últimos, foram isolados mais dois estilbenos inéditos denominados de roxo e vermelho, em fase de elucidação estrutural.
3. As análises por cromatografia gasosa sugerem que o verão, seguido da primavera são as estações que resultam em maior rendimento do 24-metileno-ciclo-artanol, predominantemente nos caules.
4. A análise quantitativa demonstra que para o composto folidotina, a melhor época de coleta é a primavera e a parte da planta com maior rendimento do mesmo é a raiz.
5. Para os compostos 4,5'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno e 4,3'5'triidroxi-3-metoxi-diidroestilbeno a parte da planta com maior rendimento do mesmo é a raiz e a melhor época de coleta é o outono.
6. Os extratos diclorometano do caule em todas as coletas (principalmente na primavera e verão) apresentam interessante atividade analgésica demonstrada pelo ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo 6 vezes mais potentes do que fármacos normalmente utilizados na clínica como aspirina e paracetamol.

7. Os estilbenos 4,5'-diidroxí-3,3'-dimetoxi-diidroestilbeno e 4,3'5'triidroxí-3-metoxi-diidroestilbeno possuem atividade analgésica quando testados no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo este último, considerado 7 vezes mais potente do que os fármacos corriqueiramente utilizados na clínica, como aspirina e paracetamol.
8. Os compostos 4,5'-diidroxí-3,3'-dimetoxidiidroestilbeno, e 4,3'5'triidroxí-3-metoxi-diidroestilbeno apresentam atividade antifúngica frente aos microrganismos: *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Trychophyton rubrum*, *Trychophyton metagrophytes* quando testados no modelo de Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo esta, ainda mais pronunciada frente ao dermatófito *T.rubrum* no caso do composto 4,3'5'triidroxí-3-metoxi-diidroestilbeno.
9. Os caules têm como majoritário o composto 24-metileno-ciclo-artanol, que apresenta maior potencial analgésico, já as raízes apresentam maior rendimento de estilbenos, responsáveis pela atividade anti-fúngica da planta. Portanto, quando o interesse está na busca por analgesia, a parte mais indicada para obtê-la é através dos caules, por outro lado, quando se busca atividade contra fungos, a melhor parte para tanto é obtê-la a partir das raízes. Sendo ainda que as raízes apresentam atividade analgésica pela presença dos estilbenos.
10. Sugere-se sempre que as flores e raízes sejam evitadas durante a coleta a fim de se preservar a espécie, portanto damos preferência aos caules sem flores e raízes aéreas.
11. De maneira geral, pode-se concluir que existe uma grande variação sazonal dos constituintes isolados da *Epidendrum mosenii* e que os mesmos, apresentam propriedades analgésicas e antifúngicas contribuindo para explicar e justificar o uso medicinal desta planta e sugerindo a continuidade dos estudos a fim de se produzir futuramente um fitoterápico com uma planta endêmica do Estado de Santa Catarina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M.; FIGUEIREDO, R. A. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. **Brazilian Journal of Biology**, [S.1.], v. 63, 4 ed., p. 551 - 558, 2003.

AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A; HIGINO, J. S; SILVA, L. R. S.; ALBUQUERQUE, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**. São Paulo, v. 15, n. 1 - 3, p. 66 - 69, 2003.

BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel stilbene derivative from riesling wine. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, [S.1.], v. 48, p. 2681 - 2686, 2000.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. B. M. **Química Medicinal**: As bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001, p. 53 - 81.

BASSANI, V. L.; GONZALES, G. O.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos**, Porto Alegre, v. 1, 1 ed., p. 14 - 29, 2005.

BIONDI, D. M.; ROCCO, C.; RUBERTO, G. New dihydroestilbene derivatives from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity. **Journal of Natural Products**, [S.1.], v. 66, p. 477 - 480, 2003.

BOONLAKSIRI, C.; OONANANT, W.; KONGSAEREE, P.; KITTAKOOP, P.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*. **Phytochemistry**, [S.1.], v. 54, p. 415 - 417, 2000.

BRESCIANI, L. F. V., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. **Natural Product Letters**, [S.1.], v. 14, 4 ed., p. 247 - 254, 2000.

BRASIL. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Lex**: Coletânea de Legislação e Jurisprudência, São Paulo, 1. Trim. de 2003. Legislação Federal e Marginalia.

BRASIL. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Lex**: Coletânea de Legislação e Jurisprudência, São Paulo, 1. Trim. de 2004. Legislação Federal e Marginalia.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (editores). **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, p. 297 – 315, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, [S.1.], v. 55, n. 3, p. 1 - 6 , 2003.

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

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no Niqfar / Univali. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 680 - 685, 2000.

CHEONG, H.; RYU, S. Y.; KIM, K. M. Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbenes. **Planta Médica**, Alemanha, v. 65, n. 3, p. 266 - 268, 1999.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1 ed. São Paulo: Edgarda Blücher, 2003.

CLARK, A. M. Natural products as a source for new drugs. **Pharmaceutical Research**, [S.1.], v. 13, 8 ed., p.1133 - 1141, 1996.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.1.], v. 90, p. 135 - 143, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3 ed. São Paulo: Unicamp, 1988.

CORDEIRO, F. M.; ZAMBAM, C. **Avaliação toxicológica preliminar dos extratos brutos metanólicos de folhas das plantas *Aleurites moluccana*, *Epidendrum mosenii* e *Rubus imperialis* in vivo**. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1999.

CORNELIUS, C. W. W.; MAJINDA, R. R. T. A new stilbene glycoside from *Elephantorrhiza goetzei*. **Fitoterapia**, [S.1.], v. 72, 6 ed. p. 649 - 655, 2001.

COX, P. A.; HEINRICH, M. Ethnobotanical drug discovery: uncertainty or promise? **Pharmaceutical news**, [S.1.], v. 8, n. 3, 2001.

CROMBIE L.; CROMBIE, W.M. Natural products of thailand hight Δ^1 -THC-strain *Cannabis*. The bibenzyl-spiran-dihydrophenanthrene group: relations with cannabinoides and canniflavones. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, [S.1.], supl. 1, p. 1455 - 1466, 1982.

CUSHMAN, M.; NAGARATHNAM, D.; GOPAL, D.; CHAKRABORTI, A.K.; LIN, C.M.; HAMEL, E. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potencial anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. **Journal of Medical Chemistry**, [S.1.], v. 34, n. 8, p. 2579 - 2588, 1991.

DERNEK, S.; IKIZLER, M.; ERKASAP, N.; ERGUN, B.; KOKEN, T.; YILMAZ, K.; SEVIN, B.; KAYGISIZ, Z.; KURAL, T. Cardioprotection with resveratrol pretreatment: improved beneficial effects over standard treatment in rat hearts after global ischemia. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, [S.1.], v. 38, n. 4, p. 245 - 254, 2004.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. Society of Chemical Industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.1.], v. 80, p. 1744 -1756, 2000.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. 8 ed., Florida: CRC, p. 154 - 505, 1991.

EMENDORFER, F.; BELLATO, F. **Efeito de diferentes extratos vegetais sobre musculatura lisa “in vitro”**. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2003.

ERENO, D. Da natureza para a farmácia. Antiinflamatório feito com extrato de planta da Mata Atlântica está pronto para entrar no mercado. Tecnologia de medicamentos. In: **Pesquisa Fapesp**. São Paulo, abr., 2005, p. 78 – 81.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis / Porto Alegre, UFSC / UFRGS, 2003. p. 229 - 245.

FANG, N.; CASIDA, J. E. New bioactive flavonoids and stilbenes in Cubé resin inseticide. **Journal of Natural Products**, [S.1.], v. 62, n. 2, p. 205 - 210, 1999.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001, p. 199 - 222.

FERREIRA, S. H. (Organizador). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998, 132p.

FERREIRA, J.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL, V.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orchidaceae). **Life Sciences**, [S.1.], v. 66, p. 791 - 802, 2000.

FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Approach to the study of C-glycosyl flavones ion trap HPLC – PAD – ESI / MS / MS: application to seeds of Quince (*Cudonia oblonga*). **Phytochemical Analysis**, [S.1.], v. 14, p. 352 - 359, 2003.

FLORIANI, A. E. O.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic compounds from *Epidendrum mosenii* stems. **Pharmazie**, Malburg, v. 53, p. 426 - 427, 1998.

FRITZEMEIER, K. M.; KINDL, H. 9,10-Dihydrophenanthrenes as phytoalexins of Orchidaceae. Biosynthetic studies *in vitro* and *in vivo* proving the route from L-phenylalanine to dihydro-m-coumaric acid, dihydrostilbene and dihydrophenanthrenes. **European Journal of Biochemistry**. [S.1.], v. 133, 3 ed., p. 545 - 550, 1983.

GRIESBACH, R. J. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. Trends in new crops and new uses, **Oramentals**, Alexandria, p. 458 – 465, 2002.

HAJDÚ, Z.; VARGA, E.; HOHMANN, J.; KALMAN, A.; ARGAY, G.; GUNTER, G. A stilbene from the roots of *Leuzea carthamoides*. **Journal of Natural Products**, [S.1], v. 61, p. 1298 - 1299, 1998.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 97, n. 7, p. 1027 - 1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003, 152p.

IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; BORRELLI, F.; ERNST, E. Cardiovascular pharmacotherapy and herbal medicines: the risk of drug interaction. **International Journal of Cardiology**, [S.1.], v. 98, p. 1 - 14, 2005.

JANZEN, D.L. **Ecologia vegetal nos trópicos**. v.7. São Paulo: EDUSP, 1980, 79 p.

KATO, M.J.; Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, [S.1.], v. 57, p. 621 - 623, 2001.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S.1.], v. 53, n. 2, p. 135 - 148, 2001.

KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opinion**, [S.1.], v. 3, n. 2, p. 77 - 79, 2002.

KLEIN, R. M. **Contribuição ao conhecimento da flora e vegetação do Vale do Itajaí – SC**. 1978. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacologica Sinica**, China, v. 24, n. 1, p. 7 - 21, 2003.

KOROLKOVAS, A. **Planejamento de Fármacos / Drug Design**. 6 ed. São Paulo: Ciência e Cultura, 1989. p. 528 – 537.

KRAMER, J. **Orquídeas**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1989, 276 p.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: ACTA, 1993.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986, 319 p.

LESNEY, M. S. Nature's pharmaceuticals: natural products from plants remain at the core of modern medicinal chemistry. **Today's Chemist at work**, American Chemical Society, ed. July, p. 27 - 32, 2004.

LI, X. M.; LIN, M.; WANG, Y. M.; LIU, X. Four new stilbenoids from the lianas of *Gnetum montanum* F. **Planta Médica**, [S.1.], v. 70, n. 2, p. 160 - 165, 2004.

LIU, M. F.; HAN, Y.; XING, D. M.; SHI, Y.; XU, L. Z.; DU, L. J.; DING, Y. A new stilbenoid from *Arundina graminifolia*. **Journal of Asian Natural Products Research**, [S.1], v. 6, n. 3, p. 229 - 232, 2004.

LU, J.; HO, C.T.; GHAI, G.; CHEN, K.Y. Resveratrol analog, 3,4,5,4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53 / Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. **Carcinogenesis**, [S.1], v. 22, 2 ed., p. 321 - 328, 2001.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, N. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.3, p. 429 - 438, 2002.

MAJUMDER, P. L.; PAL, A.; LAHIRI, S. Structure of pholidotin, a new triterpene from Orchids *Pholidota rubra* e *Cirrhopetalum elatum*. **Indian Journal of Chemistry**, India, v. 26b, p. 297 - 300, 1987.

MAJUMDER, P. L.; BANERJEE, S.; SEN, S. Three stilbenoids from the orchid *Agrostophyllum callosum*. **Phytochemistry**, [S.1], v. 42, 3 ed. p. 847 - 852, 1996.

MAJUMDER, P. L.; GUHA, S.; SEN, S. Bibenzyl derivatives from the orchid *Dendrobium amoenum*. **Phytochemistry**, [S.1], v. 52, p. 1365 - 1369, 1999.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S.; OLIVEIRA, K. P.; REIS, S.; NARITA, E.; MONTEIRO, L. Plantas em destaque: Avaliação da utilização da planta confrei (*Symphytum officinale* L.). **Racine**, São Paulo, p. 48 - 54, maio / junho, 2002.

MATOS, F. J. A., Proposta de Validação Farmacognóstica de drogas Vegetais, Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Infarma**, São Paulo, v. 3, n. 9, 1994.

MONGE, A.; CHORGHAE, M.; ERHARDT, P. W.; GANELLIN, C. R.; KOGA, N.; LINDBERG, T. J.; TOPLISS, J. G.; TRIVERDI, B. K.; WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry in the development of societies: biodiversity and natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.1], v. 35, p. 1121 - 1125, 2000.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105 - 111, 2001.

MORETTO, L. D. Fitoterápicos: o Brasil se alinha com a legislação internacional. **Pharmaceutical Technology**, [S.1], p. 46 - 47, 2000.

MUHLEN, C. V.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 747 - 753, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KENNETH, M. S. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, [S.1.], v. 66, p. 1022 - 1037, 2003.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (org). **Ciências farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí, 2003. p. 11 – 56.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividade biológica das folhas de *Cynara scolymus L.* (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331 - 334, 2003.

NOVAES, A. P.; ROSSI, C.; POFFO, C.; PRETTI JÚNIOR, E.; OLIVEIRA, A. E.; SCHLEMPER, V.; NIERO, V.; CECHINEL FILHO, V.; BURGER, C. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some brazilian medicinal plants. **Therapie**, [S.1.], v. 56, n. 4, p. 427 - 430, 2001.

OLIVEIRA, A. E. **Análise fitoquímica e biológica das diferentes partes de *Epidendrum mosenii* (Orchidaceae)**. 1999. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1999.

OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos brasileiros de fitomedicina científica**. São Paulo, v. 1, p. 49 – 53, 2003.

OLIVEIRA, D. G. **Características sócio-demográficas e epidemiológicas da tuberculose: avaliação etnobotânica e da atividade antimicobacteriana das**

plantas utilizadas por uma comunidade indígena. 2006. 74 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

OLSON, E. R.; NAUGLE, J. E.; ZHANG, X.; BOMSER, J. A.; MESZAROS, J. G. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. **American Journal of Physiologic Heart Circulation and Physiology**, [S.1], v. 21, n.3, p. 590 - 599, 2004.

PACHER, T.; SEGER, C.; ENGELMEIER, D.; VAJRODAYA, S.; HOFER, O.; GREGER, H. Antifungal stilbenoids from *Stemona collinsae*. **Journal of Natural Products**, [S.1], v. 65, p. 820 - 827, 2002.

PAIVA, S. R.; MAZZEI, J. L.; KAPLAN, M. A. C. Perfil cromatográfico de duas espécies de plumbaginaceae: *Plumbago sacandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 717 - 721, 2002.

PHILLIPSON, J. D., Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, [S.1], v. 56, p. 237 - 243, 2001.

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

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** São Paulo: Atheneu, 2000, 309 p.

RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. **American Journal of Botany**, [S.1], v. 80, n. 12, p. 1374 - 1378, 1993.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.1.], v. 11, 2 ed. p. 57 - 69, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 0, p. 1 - 10, 2004.

SALLAS, L.; VOURINEN, M.; KAINULAINEN, P.; HOLOPAINEN, J. K. Effects of planting on concentrations of terpenes, resin acids and total phenolic in *Pinus sylvestris* Seedlings. **Scandinavian Journal of Forest Research**, [S.1.], v. 14, p. 218 - 226, 1999.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; BELLA CRUZ, A.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*)(*Asteraceae*). **Pharmazie**, Marburg, v. 58, p. 567 - 569, 2003.

SCHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **Journal of Chromatography**, USA, v. 953, p. 141 - 172, 2001.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Rational phytoterapy – a physicians guide to herbal medicine**. 4 ed. Berlim: Springer, 2001, 382 p.

SCHULTZ, A.R. **Introdução ao estudo da botânica sistemática**. 3 ed. Porto Alegre: Globo, p. 385, 1968.

SHIMIZU, K.; KONDO, R.; SAKAI, K. A stilbene derivative from *Artocarpus incisus*. **Phytochemistry**, [S.1.], v. 45, n. 6, p. 1297 - 1298, 1997.

SHU, Y. Z. Recent natural products based on drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, [S.1.], v. 61, p. 1053 - 1071, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. E. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.1.], v. 12, n. 1, p. 35 – 40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis, 2003, p. 221 - 251.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis, 2003, p. 221 - 251.

SOUZA, M. M. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org.) **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, p. 109 - 157, 2003.

STEPP, J. R. The role of weeds as source of pharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, [S.1.], v. 92, p. 163 - 166, 2004.

TOVEY, P.; BARROS, N. F.; HOEHNE, E. L.; CARVALHEIRA, J. B. C. Use of traditional medicine and globalized complementary and alternative medicine among low-income cancer service users in Brazil, (CAM and Cancer Service Users in Brazil). **Integrative Cancer Therapies**, [S.1.], v. 53, n. 4, p. 232 - 236, 2006.

TULP, M.; BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, [S.1.], v. 23, n. 5, p. 225 - 231, 2002.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S.1.], v. 9, n.10, p.450 - 458, 2004.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales**. 2 ed. Peru: Pontificia Universidad Católica del Peru, 1994, 299 p.

VASTANO, B. C.; CHEN, Y.; ZHU, N.; ZHOU, Z.; ROSEN, R. T. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.1.], v. 48, n. 2, p. 253 - 256, 2000.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519 - 523, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thyn layer chromatography atlas**. 2 ed., Berlin: Springer, 1996.

WHO, World Health Organization. Traditional medicine – Growing needs and potencial. **Policy Perspectives on Medicine**. Geneva, Switzerland, n. 2, p. 1 - 6, 2002.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Racine**, São Paulo, p. 50 - 51, mar / abr, 1998.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147 - 152, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)