UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N. E. BR.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MELISSA MANCINI CORRÊA

FLORIANÓPOLIS, 2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N. E. Br.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Mareni Rocha Farias

MELISSA MANCINI CORRÊA

FLORIANÓPOLIS
2005

Ata de sessão, da defesa de Dissertação de Mestrado de **Melissa Mancini Corrêa,** elaborada pela **Profa. Dra. Mareni Rocha Farias**. Aos trinta e um dias de março de dois mil e cinco, às 14:00 horas, na sala do Conselho Departamental CCS - UFSC, realizou-se a sessão de apresentação e defesa da Dissertação, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia. A Comissão Examinadora, consoante a Portaria 012/PGFAR/2005, esteve constituída pelos professores doutores **Flávio Reginatto , Diva Sonaglio e Miriam de Barcellos Falkenberg.** O trabalho apresentado teve o seguinte título: **"Estudo Fitoquímico da Fração n-butanólica de Lippia Alba (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils".** Após a exposição do trabalho pela candidata, a mesma foi argüida pelos membros da Comissão Examinadora obedecendo a seqüência: **Prof. Dr. Flávio Reginatto, Profa. Dra. Diva Sonaglio e Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg.** À medida que cada examinador terminava a formulação das perguntas, coube ao candidato respondê-las. A candidata **Melissa Mancini Corrêa,** foi considerada (X) **aprovada**, ( ) **reprovada.** Devem ser realizadas as alterações abaixo discriminadas, exigidas pelos membros da banca examinadora.

Revisão cuidadosa do texto, com ênfase na discussão da elucidação estrutural.

Em relação a dissertação aprovada, cabem os seguintes destaques:

abordagem multidisciplinar, inéditismo dos resultados e perspectivas de continuidade

Às 17:30 horas foi encerrada a presente sessão, cuja ata vai por mim assinada, bem como pelos demais membros da Comissão Examinadora e pelo Candidato. Florianópolis, 31/03/2005.

Membros:

Prof. Dr. Flávio Reginatto .....

Profa. Dra. Diva Sonaglio .....

Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg.....

Orientador Profa. Dra. Mareni Rocha Farias.....

Candidata: Melissa Mancini Corrêa .....

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Giamela, e minha irmã Milena, por me incentivarem em todos os momentos da minha vida; por terem acreditado em mim e contribuído para minhas realizações;

Ao meu noivo Rafael, por estar sempre ao meu lado, me motivando para meu crescimento pessoal e profissional;

À professora Mareni, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com pesquisa durante toda minha formação profissional;

Ao professor Eloir, pelo privilégio de tê-lo como colaborador ativo em diversas e decisivas etapas deste trabalho;

À professora Miriam, por estar sempre disposta à contribuir com meu aprendizado, solucionando minhas dúvidas e me dando sugestões;

Ao professor Palermo, por ter feito parte deste trabalho realizando as análises espectroscópicas de RMN;

À professora Thereza, por ter me dado a oportunidade de participar dos ensaios farmacológicos deste trabalho;

À Solange, pela atenção e cooperação. À Silvana e ao Rodrigo, por tanta coisa... pelo companheirismo, pela colaboração e principalmente pela amizade, que espero ter de ambos por toda minha vida;

Aos colegas de laboratório Patrícia, Francisco, Roberto, Dai, Andressa, Mariana, Mariliz, Karen, Cíntia e Rebeca, que contribuíram, cada um de uma forma, em algum ou muitos momentos.

RESUMO

Lippia alba é uma espécie medicinal que ocorre em todas as regiões do Brasil. Caracteriza-se pela sua ampla utilização na medicina popular, sendo utilizada, sobretudo, como tranquilizante. Trata-se de uma espécie que requer estudos científicos sobre isolamento e identificação de seus constituintes. Em estudos anteriores, a fração n-butanólica, obtida por partição do extrato hidroetanólico apresentou efeitos sedativo e anticonvulsivante. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo desta mesma fração, buscando o isolamento e a identificação de seus constituintes químicos, o acompanhamento sazonal qualitativo destas substâncias e a realização de ensaios farmacológicos (verificação da temperatura corporal e da atividade hipno-sedativa, através da indução com pentobarbital e com éter etílico). Assim, partindo-se de um extrato hidroalcoólico das folhas do material vegetal, seguido de partição com solventes de polaridade crescente, obteve-se a fração n-butanólica. Após purificação das subfrações, foi possível isolar as substâncias LA-1 (verbascosideo), LA-2, LA-3 (ácido 3β, 16α, 23 trihidroxiolean-12-en-28-óico bidesmosídico) e LA-4. Para a substância LA-2 estão sendo aguardados os espectros de RMN para sua elucidação estrutural; para a substância LA-4 deve-se primeiramente purificá-la por CLAE para que seja então igualmente elucidada. Em relação aos testes farmacológicos, não é possível afirmar que a fração n-butanólica apresenta atividade hipno-sedativa, uma vez que prolongou o tempo de sono induzido por barbitúrico (na dose de 300 mg/kg, no tempo de 1 h, v. o.) mas não potencializou o sono induzido por éter, na mesma dose e tempo anteriores; não alterou significativamente a latência do sono, inclusive no grupo diazepam; reduziu a temperatura corporal nas doses de 100 e 300 mg/kg significativamente nos tempos de 1 e 2 h, mas não é possível afirmar que seja devido a um mecanismo de ação central. Dessa forma, constatou-se que *L. alba* é uma espécie promissora para a obtenção de metabólitos secundários. Os constituintes químicos analisados neste trabalho puderam ser encontrados na espécie em todas as coletas realizadas, não havendo variação sazonal qualitativa. Sugere-se que estudos posteriores realizem pesquisas mais aprofundadas em relação às atividades farmacológicas da fração n-butanólica, bem como de seus constituintes químicos isolados e do infuso. Além disso, devem ser elucidadas as estruturas ainda não identificadas.

Unitermos: *Lippia alba*, estudo fitoquímico, fração n-butanólica, atividade hipno-sedativa.

ABSTRACT

Lippia alba is a medicinal plant wich is find in all regions of Brazil. This especie is largely used in the folk medicine, especially as a tranquilizer. It needs cientific studies about isolation and identification of its constituents. In previous studies, the n-butanolic fraction, obtained from a hidroalcoolic extract showed sedative and anticonvulsant effects. The objective of this work was the study of the same fraction, searching the isolation and identification from its chemical constituents, the qualitative seasonal accompaniment of this substances and the achievement from pharmacological experiments (verification of the body temperature and sedative activity, through the induction with pentobarbital and ether). Thus, from a hidroalcoolic extract of the leaves from the vegetable material, followed by partition with solvents of increasing polarity, the n-butanolic fraction was obtained. After purification of subfractions, was possible to isolate the substances LA-1 (verbascoside), LA-2, LA-3 (3β, 16α, 23 trihydroxiolean-12-en-28 oic acid bidesmosidic) and LA-4. To the elucidation of the substance LA-2, is necessary wait for the NMR spectrum; to the substance LA-4, is necessary the purification from CLAE to its elucidation. About the pharmacological trials, it is no possible to assure that the n-butanolic fraction shows sedative activity; it increased the barbiturate sleeping time (300 mg/ Kg body wt., 1 h after the treatment v.o.) but not increased the ether sleeping time, at the same previously dose and time; not modified significative the latency of the sleep, including the control group; decreased the body temperature (100 and 300 mg/ Kg wt., 1 and 2 h after the treatment v.o.) but it is no possible to say that is because a central effect. In that way, *L. alba* is shown as a viable source of potentially active secondary metabolites. The chemical constituents analysed in this work could be find in all assessments, so there is no qualitative seasonal variation. Posterior studies could achieve more researches about the pharmacological activities from the n-butanolic fraction and from its chemical constituents isolated and from the infusion. Furthermore, could elucidate the structures not yet identified.

Uniterms: *Lippia alba*; phytochemical study; n-butanolic fraction; sedative activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – acetato de etila
CCD – cromatografía em camada delgada
CH_2Cl_2 - diclorometano
CLAE – cromatografía líquida de alta eficiencia
EB – extrato bruto
EtOH – etanol
EP – éter de petróleo
Fração n-BuOH – fração n-butanólica
Het. Card. – heterosídeos cardiotônicos
i.p. – intraperitoneal
isoprOH – isopropanol
MeOH – metanol
NaOAc – acetato de sódio
NaOMe – metóxido de sódio
SNC – sistema nervoso central
T. condensados – taninos condensados
T. hidrolisáveis – taninos hidrolisáveis
v.o. – via oral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils……5

FIGURA 2: Cultivo de *L. alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.....18

FIGURA 3: Representação esquemática da partição da solução extrativa com solventes em ordem crescente de polaridade.....22

FIGURA 4: Representação esquemática do processo de isolamento e purificação de substâncias a partir da fração n-BuOH.....23

FIGURA 5: Representação esquemática do perfil cromatográfico das substâncias isoladas (em ordem crescente de polaridade: LA – 1 a LA - 4; eluente: AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O: ác. acético; placas em sílica gel F_{254}).....38

FIGURA 6: Representação esquemática doespectro de UV apresentado para a solução metanólica da substância LA-1 e empregando-se os reativos de deslocamento.....40

FIGURA 7: Estrutura do verbascosídeo 43

FIGURA 8: Espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado da substância LA-1 em DMSO-d_6 a 100 MHz e subespectro DEPT 135° 44

FIGURA 9: Subespectro DEPT 90° de LA-1.....45

FIGURA 10: Espectro de correlação C – H HETCOR (400 – 100 MHz) da substância LA-1.....45

FIGURA 11: Espectro de RMN ^{1}H da substância LA-1 em DMSO-d_6 a 400 MHz.....46

FIGURA 12: Espectro de RMN H – H COSY da substância LA-1 em DMSO-d_6 a 400 MHz.....46

FIGURA 13: Estrutura proposta para a saponina LA-3.....55

FIGURA 14: Espectro de RMN H – H RCT da substância LA-3 em MeOH.....56

FIGURA 15: Espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado da substância LA-3 em MeOH a 100 MHz e subespectro DEPT 90°.....57

FIGURA 16: Subespectro DEPT 135° de LA-3.....58

FIGURA 17: Espectro de correlação C - H HETCOR da substância LA-3.....58

FIGURA 18: Espectro de RMN ^{1}H da substância LA-3 em MeOH.....59

FIGURA 19: Espectro de RMN H – H COSY da substância LA-3 em MeOH..... 59

FIGURA 20: Representação esquemática do perfil cromatográfico das 6 coletas sazonais realizadas (eluente: AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O; placas em sílica gel F_{254}).....62

FIGURA 21: Duração do sono induzido por barbitúrico, 1 hora após o tratamento com a fração n-butanólica de *L. alba*. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle e os valores estão expressos em minutos, como média ± e.p.m., *$p < 0,05$.....65

FIGURA 22: Grupos de correlações observada nos espectros H - H COSY e RCT entre os prótons de cada anel da aglicona.....49

FIGURA 23: Espectros ampliados C - H HETCOR e RMN ^{13}C, do sinal em δ 36,41.....60

FIGURA 24: Sequência de prótons determinados através das correlações observadas nos espectros H - H COSY e RCT.....53

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 1 24

QUADRO 2: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 2 25

QUADRO 3: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 3 26

QUADRO 4: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 4 27

QUADRO 5: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 5 28

QUADRO 6: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 6 29

QUADRO 7: Resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e das frações após partição 37

QUADRO 8: $\lambda_{máx}$ apresentados por LA-1 no espectro de UV, empregando-se os reativos de deslocamento, segundo Mabry, Markhan e Thomas (1970) 39

QUADRO 9: Caracterização dos carbonos de LA-1, de acordo com os dados do espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado 41

QUADRO 10: Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H em DMSO-d_6, para a substância LA – 1 (verbascosídeo) 47

QUADRO 11: Caracterização dos carbonos da substância LA-3 a partir do espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado 50

QUADRO 12: Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H em DMSO-d_6 para a substância LA-3 (saponina do tipo oleano) comparados com dados da literatura 61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Perda por dessecação das folhas secas e moídas de *L. alba* após 5 dias 36

TABELA 2: Perda por dessecação das folhas secas e moídas de *L. alba* após 7 dias 63

TABELA 3: Rendimento dos extratos obtidos a partir das coletas realizadas para análise sazonal 63

TABELA 4: Tempo médio de sono induzido por barbitúrico 1, 2 e 3 horas após o tratamento com a fração butanólica de *L. alba*. Os valores estão expressos em minutos, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05 64

TABELA 5: Latência média para o sono induzido por barbitúrico 1, 2 e 3 horas após o tratamento com a fração butanólica de *L. alba*. Os valores estão expressos em segundos, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05 65

TABELA 6: Tempo médio de latência e duração do sono induzido por éter 1 hora após o tratamento com a fração butanólica de *L. alba*, na dose de 300 mg/kg, v.o. Os valores estão expressos em segundos, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05 ...66

TABELA 7: Temperatura colônica basal (T_0) e 1, 2 e 3 horas após o tratamento com a fração butanólica de *L. alba*. Cada animal serviu como seu próprio controle. Os valores estão expressos em ºC, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05 66

SUMÁRIO

RESUMO v
ABSTRACT vi
LISTA DE ABREVIATURAS vii
AcOEt – acetato de etila vii
LISTA DE FIGURAS viii
LISTA DE QUADROS x
LISTA DE TABELAS xi
SUMÁRIO xii
APRESENTAÇÃO xv
1. INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVOS 18
2.1. Objetivos específicos 18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
3.1. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. 19
3.1.1. Usos Populares 20
3.1.2. Estudos Farmacológicos 21
3.1.3. Estudos Tecnológicos 25
3.1.4. Constituintes Químicos e Estudos Fitoquímicos 26
3.2. Compostos fenólicos 28
3.2.1. Fenilpropanóides – Verbascosídeo 29
3.3. Saponinas – Ácido oleanólico 31
4. MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1. Reagentes, solventes e soluções 33
4.2. Materiais para cromatografia e equipamentos 33
4.3. Coleta e preparação do material vegetal utilizado para isolamento de substâncias 34
4.3.1. Secagem e moagem 35
4.3.1.1. Determinação da perda por dessecação (F.B. IV) 35
4.3.1.2. Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e das frações obtidas por partição 36
4.4. Isolamento dos constituintes da fração n-butanólica 37
4.4.1. Preparação da solução extrativa 38
4.4.2. Fracionamento 38
4.4.2.1. Obtenção dos constituintes majoritários da fração n-butanólica 39
4.4.2.2. Coluna 1: 40

4.4.2.3. Coluna 2: 42
4.4.2.4. Coluna 3: 43
4.4.2.5. Coluna 4: 44
4.4.2.6. Coluna 5: 45
4.4.2.7. Coluna 6: 46
4.4.2.8. Purificação de LA-3 46
4.4.3.1. Espectroscopia no ultra-violeta (UV) 47
4.4.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^{1}H) 48
4.5. Análise sazonal da fração n-butanólica 48
4.5.1.1. Fracionamento 48
4.5.1.2. Secagem e moagem 49
4.5.1.3. Determinação da perda por dessecação 49
4.6. Ensaios farmacológicos 49
4.6.1. Preparação da fração n-BuOH para os ensaios farmacológicos 49
4.6.2. Ensaios farmacológicos 49
4.6.2.1. Animais empregados 49
4.6.2.2. Fármacos empregados 50
4.6.2.3. Avaliação da ação hipno-sedativa 51
4.6.2.4. Hipnose induzida por pentobarbital 51
4.6.2.5. Hipnose induzida por éter 51
4.6.2.6. Temperatura colônica 51
4.6.3. Análise estatística 52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
5.1. Caracterização do material vegetal utilizado 53
5.1.1. Determinação da perda por dessecação 53
5.1.2. Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e das frações obtidas por partição 53
5.2. Determinação do rendimento da extração e do fracionamento da fração n-butanólica 54
5.3. Identificação das substâncias isoladas 54
5.3.1. Elucidação estrutural de LA-1 55
5.3.2. Elucidação estrutural de LA-3 69
5.5. Ensaios farmacológicos 93
5.5.1. Avaliação da ação hipno-sedativa 93
5.5.1.1. Hipnose induzida por pentobarbital 93
Latência para o sono 94
6. CONCLUSÕES 98

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação refere-se à pesquisa desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Fármaco e Medicamentos, Linha de Pesquisa Investigação de Produtos Naturais com Potencial Atividade Biológica.

A espécie *Lippia alba* tem sido estudada já há alguns anos na Universidade Federal de Santa Catarina, em relação a seus aspectos fitoquímicos, tecnológicos e biológicos. Contudo, a cada trabalho desenvolvido, tem-se diferentes abordagens de estudo e novas perspectivas levantadas.

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de isolamento de substâncias de *L. alba*, desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia, sob orientação da Prof[a] Dr[a] Mareni Rocha Farias, bem como a elucidação estrutural de algumas destas substâncias, realizada em colaboração com o Prof. Dr. Jorge Alexandro Palermo, da Universidade de Buenos Aires.

Ainda em relação ao estudo fitoquímico, este trabalho descreve um acompanhamento sazonal realizado com a espécie, entre os anos de 2003 e 2004, verificando a influência da época de coleta sobre o perfil qualitativo dos constituintes químicos.

Paralelamente, o trabalho relata ainda, o estudo farmacológico realizado com a fração utilizada para o isolamento de substâncias, possibilitado pela colaboração com a Prof[a] Dr[a] Thereza C. M. de Lima, do Departamento de Farmacologia da UFSC.

1. INTRODUÇÃO

As plantas se caracterizam por produzir uma diversidade de compostos químicos, responsáveis por suas funções biológicas (GUERRA; NODARI, 2003; GOTTLIEB; BORIN, 2003). Sendo assim, a pesquisa com plantas medicinais – vegetais que têm emprego terapêutico baseado no conhecimento popular ou científico – continua sendo uma via interessante de acesso à descoberta de novos fármacos, por serem uma fonte importante de produtos biologicamente ativos (ELISABETSKY, 1991; WAGNER, 1993; BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO, 2003; GUERRA; NODARI, 2003; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003). Historicamente, estes produtos naturais constituíram a base inicial da terapêutica e foram os responsáveis pelo começo dos avanços da farmacologia (ELISABETSKY; WANNMACHER, 1993).

Além da busca de protótipos, a pesquisa científica com plantas deve buscar ainda, a conservação e preservação da biodiversidade, o desenvolvimento de fitoterápicos, o conhecimento da medicina nativa e a elucidação de bases racionais para o uso medicinal de plantas (ELISABETSKY, 1991; ETKIN, 2001).

A etnofarmacologia permite a integração entre o uso popular da flora medicinal e estudos químicos/ farmacológicos realizados em laboratório, ou seja, somente a base científica integra informações populares com tecnológicas (ELISABETSKY, 1991; ELISABETSKY; DE SOUZA, 2003; GOTTLIEB; BORIN, 2003). Os estudos científicos devem considerar os aspectos relacionados à qualidade da matéria-prima vegetal, eficácia (ação comprovada por testes farmacológicos) e segurança (toxicidade avaliada). A partir da fundamentação científica e do conhecimento dos aspectos de atividade biológica do vegetal é que se pode considerar a transformação de uma planta medicinal em um produto fitoterápico (FARIAS, 2003; LAPA et al., 2003; SONAGLIO et al., 2003).

Neste sentido, a avaliação da eficácia e segurança de plantas tradicionalmente usadas deve preceder sua inclusão em sistemas de saúde que incluam a fitoterapia (WANNMACHER, 1990). Entretanto, muitos produtos são comercializados no Brasil e dispensados em serviços públicos, sem terem passado por testes farmacológicos e toxicológicos adequados e, além disso, terem sido submetidos a um controle de qualidade eficiente (ELISABETSKY; WANNMACHER, 1993).

Em relação à qualidade, métodos analíticos como cromatografia e espectrofotometria permitem a avaliação do fitoterápico, contribuindo para a garantia da constância de sua

composição e, conseqüentemente, da eficácia e segurança de sua utilização, pois são capazes de avaliar o teor de substâncias ativas e o perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal e no produto final, bem como a pureza do material empregado (SONAGLIO et al., 2003).

Dessa forma, a pesquisa fitoquímica é essencial para o estabelecimento de metodologias e parâmetros de qualidade, uma vez que esta tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais (FALKENBERG; DOS SANTOS; SIMÕES, 2003). Contudo, a composição química das plantas está estritamente conectada às flutuações fisiológicas e ambientais, o que torna muito difícil a realização de prognósticos sobre a variabilidade metabólica do vegetal (GOTTLIEB; BORIN, 2003). Plantas medicinais tendem a possuir um conteúdo variável de compostos químicos, incluindo aqueles responsáveis por suas atividades biológicas. Uma mesma espécie crescendo em diferentes áreas ou em anos com padrões climáticos diferentes tende a possuir um perfil quantitativo de um mesmo composto diferente (GYLLENHALL et al., 2000). Para uma terapia racional, a padronização de extratos torna-se possível através do conhecimento das substâncias ativas da planta (WAGNER, 1993). Contudo, em algumas espécies medicinais a identidade da substância ativa é desconhecida; nestes casos um composto deve ser usado como um marcador único da espécie, possibilitando a padronização do extrato vegetal (GYLLENHALL et al., 2000). A escolha da espécie de planta para isolamento de compostos bioativos deve basear-se na etnobotânica, ecologia química e anatomia da planta (WATERMAN, 1990; ROBARDS, 2003).

Para a presente dissertação propusemos o estudo da espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., já que para esta espécie é atribuída uma ampla variedade de propriedades e, em estudos anteriores detectou-se atividade depressora do Sistema Nervoso Central, sem que se tenha a elucidação de seus compostos majoritários.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa é aprofundar o estudo fitoquímico e farmacológico da espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.

2.1. Objetivos específicos

1. Isolar os constituintes químicos majoritários da fração n-butanólica;
2. Identificar os constituintes químicos isolados;
3. Avaliar a ação hipno-sedativa da fração n-butanólica;
4. Fazer um acompanhamento sazonal da espécie, verificando a influência da época de coleta sobre o perfil qualitativo dos constituintes químicos presentes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.

L. alba (Figura 1) é conhecida popularmente como erva cidreira, melissa, sálvia, entre outras sinonímias. Freqüentemente estes nomes também são atribuídos à outras espécies medicinais (PIO CORRÊA, 1969; CORRÊA, 1992; MENTZ; BORDIGNON, 2003).

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae, subfamília Verbenoidae, muito freqüente na natureza e com várias espécies de uso medicinal, sendo que *L. alba* é uma das espécies mais estudadas (RIMPLER; SAUERBIER, 1986; CORRÊA, 1992; SOUZA BRITO; SOUZA BRITO, 1993; PASCUAL et al., 2001).

Este gênero geralmente apresenta um perfil constante de composição química, atividades farmacológicas e usos tradicionais. Geralmente, são utilizadas as folhas ou partes aéreas com flores, comumente preparadas por infusão ou decocção, administradas por via oral (CORRÊA, 1992; PASCUAL et al., 2001).

Para a espécie *L. alba* são utilizadas diversas sinonímias em publicações científicas (SOARES; FARIAS; SONAGLIO, 2000; PASCUAL et al., 2001; SOARES, 2001). Corrêa (1992) considera válido o binômio *L. alba*, apontando *L. germinata* como sinonímia para a espécie; contudo, a correlação destas espécies é discutível, já que alguns autores consideram tratar-se de espécies diferentes (ZAMORA MARTINEZ; NIETO PASCUAL, 1992; PASCUAL et al., 2001).

A espécie *L. alba* é originária da América do Sul; aparece principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, é encontrada em todas as regiões (CÁCERES et al., 1991; CORRÊA, 1992; HEINRICH; RIMPLER; BARRERA, 1992; GOMES et al., 1993). Devido à ampla distribuição geográfica da planta, não apenas sua nomenclatura popular tende a variar, como também as propriedades a ela atribuídas, influenciadas, dentre outros fatores, por culturas locais (SOARES, 2001).

Em decorrência de sua vasta utilização, esta planta foi incluída no Projeto de Fitoterapia do SUS-PR (GOMES et al., 1993). Em um levantamento sobre plantas medicinais usadas na comunidade da Costa da Lagoa, foi a espécie mais citada (CÓRDOVA; DEMÉTRIO, 1994), o mesmo ocorrendo na comunidade do Ribeirão da Ilha (PAGLIARINI, 1995), ambas no

município de Florianópolis, SC. Em diferentes regiões brasileiras, é a planta mais citada como sedativa/ tranqüilizante (KLUEGER et al., 1997). É uma das plantas mais utilizadas como medicinal na região sul do Brasil, por diferentes populações (MARQUESINI, 1995; VENDRUSCOLO, 2004).

FIGURA 1: ***Lippia alba*** **(Mill.) N. E. Br.**

3.1.1. Usos Populares

Espécies do gênero *Lippia* são comumente empregadas no tratamento de doenças respiratórias, segundo alguns autores, devido ao fato de serem ricas em óleo volátil (SOUZA BRITO; SOUZA BRITO, 1993; PASCUAL et al., 2001).

L. alba é utilizada como sucedânea da *Melissa officinalis* L. e da *Salvia officinalis* L., por tratar-se de uma planta com ações antiespasmódica, estomáquica e emenagoga (PIO CORRÊA, 1969; CORRÊA, 1992).

Na América do Sul e Central, África Tropical e em alguns países europeus, a espécie é empregada por infusão e decocção no tratamento de problemas gastrointestinais (AGRA; BARBOSA FILHO, 1990; VALE et al., 1999; PASCUAL et al., 2001), preconizada contra gastrite (ZAMORA MARTINEZ; NIETO DE PASCUAL, 1992) e como carminativa (HEINRICH; RIMPLER; BARRERA, 1992). No Brasil e na Guatemala, é aplicada externamente no tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, ferimentos e úlceras (GIRON et al., 1991). Estudos etnobotânicos citam ainda o uso de *L. alba* no tratamento da sífilis (ZAMORA MARTINEZ; NIETO DE PASCUAL, 1992). É utilizada ainda, sob a forma de chá, como analgésico, antipirético e antiinflamatório (HUTCHINGS; VAN STADEN, 1994; VALE et al., 1999), como chá antiespasmódico (HUTCHINGS; VAN STADEN, 1994; KLUEGER et al., 1997) e, como tranquilizante (VALE et al., 1999) e sedativa (KLUEGER et al., 1997).

Segundo Pascual e colaboradores (2001), os usos populares da espécie devem ser melhor investigados do ponto de vista científico, uma vez que são muitas as propriedades atribuídas, e poucos os estudos sobre isolamento e identificação de constituintes e de suas atividades farmacológicas. Em relação ao uso popular, até o momento, não foram encontradas referências que comprovem sua utilização segura para quaisquer das indicações populares.

3.1.2. Estudos Farmacológicos

Apesar do amplo emprego terapêutico das espécies do gênero *Lippia*, poucos estudos farmacológicos têm sido relatados (PASCUAL et al., 2001).

Para a espécie *L. alba*, foram desenvolvidos alguns estudos farmacológicos no intuito de elucidar suas atividades biológicas, empregando-se diferentes modelos experimentais. Contudo, a grande maioria dos trabalhos foi apresentado em congressos e publicado na forma de resumos, o que algumas vezes, pode comprometer a avaliação da metodologia utilizada.

Alguns autores sugerem que diferentes quimiotipos do óleo volátil da espécie – OE I, com predominância de carvona e limoneno e OE II, constituído sobretudo de neral e geranial - apresentam atividade anticonvulsivante, quando testados em camundongos fêmeas (25 g) por via

oral, ambos aumentando a latência de convulsão dos animais, no modelo de pilocarpina (600 mg/Kg, i.p.) (VALE; VIANA; MATOS, 1996).

A atividade anticonvulsivante foi sugerida ainda para a solução extrativa hidroalcoólica à 80 %, na dose de 400 mg/Kg, bem como para a fração n-butanólica, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, pois reduziram o tempo de duração e o número de convulsões dos animais, no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.) (CARDOSO et al., 2000). Cemin e colaboradores (2001), dando continuidade a este último estudo, testaram em camundongos fêmeas, por via oral, o sobrenadante originado a partir da fração n-butanólica; nas doses de 0,05 e 0,1 mg/ml foi capaz de aumentar a latência das convulsões em 30 e 115 %, respectivamente, ambas no tempo de 1 h após o teste (no mesmo modelo do estudo anterior), sugerindo atividade anticonvulsivante também para esta preparação.

Klueger e colaboradores (1996) sugerem que o infuso apresenta efeitos miorrelaxante e sedativo, quando administrado à camundongos fêmeas (30 g) na dose de 30 mg/Kg, por via intraperitoneal. O infuso teve a capacidade de reduzir a ambulação dos animais e todos os parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado; também teve a capacidade de aumentar o número de quedas e reduzir o tempo de permanência na barra giratória no teste de rota-rod. Além disso, diminuiu a latência para indução e aumentou a duração do sono induzido por pentobarbital sódico.

Silva e Farias (1997), assim como Klueger e colaboradores (1996) utilizando as frações aquosa e n-butanólica da espécie, sugeriram que ambas frações apresentam atividade depressora inespecífica sobre o SNC, pois diminuíram a atividade locomotora, causaram potencialização do sono induzido por barbitúricos e reduziram a temperatura colônica dos animais testados.

Um estudo realizado por Santos e colaboradores (1998) verificou que o extrato hidroalcoólico à 80 % induzia hipotermia, quando testado em camundongos machos, por via oral, na dose de 200 mg/Kg, o que também já havia sido previamente observado por Klueger e colaboradores (1996).

Para a fração n-butanólica, obtida a partir de extratos hidroetanólicos com 80 % de teor alcoólico, foi sugerida ainda, atividade antiviral *in vitro*, uma vez que foi capaz de inibir a replicação do HSV-1 na cepa resistente ao aciclovir (BETTEGA et al., 2000).

Partindo-se para os estudos publicados na forma de artigo, há aqueles que constatam alguns dos efeitos farmacológicos do óleo volátil; outros descrevem diferentes atividades de compostos fixos da espécie.

Vale e colaboradores (1999) descrevem os efeitos ansiolítico e sedativo de três quimiotipos de *L. alba*: OE I, sobretudo constituído de citral, β-mirceno e limoneno; OE II, sobretudo com citral e limoneno; OE III, predominantemente com carvona e limoneno. Os três aumentaram o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos; além disso, reduziram a temperatura retal dos animais testados, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, por via intraperitoneal. No teste de rota-rod, o OE II, administrado pela mesma via, na dose de 200 mg/Kg, reduziu o tempo de permanência dos animais na barra giratória, demonstrando ainda efeito miorrelaxante.

Viana e colaboradores (2000) demonstram que os mesmos quimiotipos (OE I, OE II e OE III) apresentam ainda atividade anticonvulsivante, quando administrados em camundongos fêmeas (25 g) por via intraperitoneal. Todos os quimiotipos testados produziram um aumento na latência de convulsão, em relação aos animais controle, no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (OE II nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg; OE I nas duas últimas doses e OE III apenas na maior dose testada). Neste mesmo estudo, tratando-se os animais com os principais constituintes químicos isolados dos quimiotipos – citral, β-mirceno e limoneno – foi mantido o aumento na latência de convulsão dos animais, quando testados por via intraperitoneal, nas doses de 100 e 200 mg/Kg. Contudo, testando-se os mesmos compostos por via oral, o efeito foi observado apenas aplicando-se a dose de 400 mg/Kg.

Em outro estudo, realizado por Do Vale e colaboradores (2002), foi demonstrado que os mesmos constituintes predominantes nos quimiotipos, apresentam ainda, efeito sedativo. Citral e β-mirceno, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, além do limoneno, na dose de 200 mg/Kg, potencializaram o tempo de sono barbitúrico dos animais, quando administrados por via intraperitoneal.

Para o óleo volátil já foi demonstrada também, *in vitro*, atividade antioxidante similar ao α-tocoferol (STASHENKO; JARAMILLO; MARTÍNEZ, 2004).

Existem estudos que visam comprovar se os efeitos de *L. alba* sobre o SNC são mesmo relacionados a seus compostos voláteis. Soares (2001) salienta que, para o estabelecimento de propriedades mais consistentes à espécie, são necessárias publicações sobre outras classes de constituintes.

Um estudo realizado por Klueger e colaboradores (1997) demonstrou que o infuso e a fração n-butanólica, administrados por via intraperitoneal em camundongos machos (30 g) na dose de 300 mg/Kg, apresentam efeito depressor. Ambas preparações reduziram a atividade locomotora dos animais, avaliada em caixas de movimentação com células fotoelétricas, 1 h após o tratamento; contudo, o mesmo não ocorreu quando as mesmas preparações foram administradas por via oral, nas mesmas doses e tempo anteriores. No mesmo estudo, sendo avaliada a potencialização do sono induzido por pentobarbital, o infuso (na dose de 300 mg/Kg, por via oral), apresentou ainda efeito sedativo, uma vez que aumentou a duração do sono dos animais; o mesmo tratamento por via intraperitoneal não apenas aumentou a duração do sono induzido, como ainda reduziu a latência.

Soares (2001) constatou que o extrato hidroalcoólico à 80 % de teor alcoólico, sua fração n-butanólica e subfrações originadas desta (precipitado e sobrenadante), apresentam atividade anticonvulsivante, quando administradas por via oral, no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol. Utilizando camundongos fêmeas (30 g), o extrato hidroalcoólico à 80 % aumentou significativamente o tempo de latência no teste da convulsão, na dose de 400 mg/Kg; a fração n-butanólica reduziu tanto o tempo quanto o número de convulsões dos animais, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, o mesmo ocorrendo com as subfrações precipitado e sobrenadante, nas doses de 10 e 20 mg/Kg, respectivamente.

Além disso, o mesmo estudo realizado por Soares (2001), avaliando a atividade antimicrobiana do mesmo extrato hidroalcoólico e de suas diferentes frações, constatou que os constituintes mais polares, presentes nas frações n-butanólica, acetato de etila e no extrato hidroalcoólico inibem o crescimento bacteriano mais eficientemente do que as demais frações. Isso foi demonstrado utilizando-se cepas de *S. aureus*, em solução fisiológica; as três preparações apresentaram os maiores halos de inibição de crescimento do microorganismo, em comparação com as demais frações.

De acordo com Zétola e colaboradores (2002), o extrato hidroalcoólico à 80 % de teor alcoólico apresenta ainda, atividades sedativa e miorrelaxante. Tais ações foram constatadas em camundongos machos (35 g) tratados por via oral com uma dose de 200 mg/Kg do extrato. Esta preparação reduziu a latência e aumentou a duração do sono induzido por pentobarbital sódico; além disso, aumentou o número de quedas e reduziu o tempo dos animais na barra giratória, no teste de rota-rod, quando comparada ao grupo controle. O mesmo estudo constatou ainda que esta preparação apresenta viabilidade tecnológica quando nebulizado e acrescido do excipiente

dióxido de silício coloidal, pois mantém a propriedade sedativa. A atividade anticonvulsivante, bem como a alteração da temperatura corporal dos animais não foram confirmadas para a mesma preparação, neste mesmo estudo.

Dessa forma, os trabalhos desenvolvidos até o momento não elucidam completamente os efeitos de *L. alba* sobre o SNC, pois embora existam evidências de algumas atividades, como sedativa e anticonvulsivante, faltam trabalhos que identifiquem as frações biologicamente ativas e que elucidem quais frações e constituintes ativos da planta são responsáveis pelos efeitos centrais e quais são os sistemas envolvidos com seu mecanismo de ação.

Ainda em relação às atividades biológicas de extratos e/ou frações polares da espécie, a literatura demonstra, *in vitro*: sua atividade antioxidante, protegendo o DNA contra stress oxidativo (RAMOS et al., 2003); sua atividade antimicrobiana, demonstrada contra bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*), responsáveis por infecções respiratórias (CÁCERES et al., 1991; SOARES, 2001). Um estudo mais recente sobre atividade antimicrobiana, testando-se extratos hidroalcoólicos à 90 % de teor alcoólico não confirmam a atividade antimicrobiana, mas demonstra que o mesmo extrato apresenta atividade antifúngica moderada contra *C. Krusei* (HOLETZ et al., 2002).

Testes *in vivo* demonstram que no aparelho digestivo, a infusão da planta previne ulceração gástrica induzida por indometacina, apresentando potente atividade antiulcerogênica (PASCUAL et al., 2001b), além de redução do tônus intestinal (KLUEGER et al., 1997).

3.1.3. Estudos Tecnológicos

Conforme Soares (2001), trabalhos à respeito de desenvolvimento tecnológico sobre a espécie *L. alba* são basicamente sobre a influência de certos fatores no processo de extração.

Estudos demonstram que o teor alcoólico da solução extrativa é um dos fatores que maior influência exerce sobre respostas avaliadas. Verificando o teor de flavonóides totais em diferentes níveis de teor alcoólico, estudos constatam que o teor alcoólico e o teor de flavonóides totais são diretamente proporcionais (BETTEGA et al., 1998; SANTOS et al., 1998; SOARES et al., 1998; ZÉTOLA et al., 2002). Estudos avaliando ações farmacológicas no SNC de extratos hidroalcoólicos de *L. alba* verificaram que a atividade depressora central destes extratos é proporcional ao teor alcoólico da solução extrativa, levando os autores a apontar os flavonóides

presentes em extratos hidroalcoólicos como prováveis responsáveis pela atividade (ZÉTOLA et al., 2002), também sugerido em estudos preliminares (SANTOS et al., 1998; CARDOSO et al., 2000).

Campestrini, Soares e Sonaglio (2000) sugerem que soluções extrativas de *L. alba* de elevado teor alcoólico são, portanto, as mais eficientes do ponto de vista tecnológico. Ainda em relação aos estudos tecnológicos realizados com a espécie, Zétola e colaboradores (2002) constatam a viabilidade tecnológica de extratos nebulizados de *L. alba*, obtidos de extratos hidroetanólicos de teor alcoólico 80 %, demonstrando sua atividade sedativa.

3.1.4. Constituintes Químicos e Estudos Fitoquímicos

Há poucos estudos publicados em relação à composição química das espécies do gênero *Lippia.* A composição do óleo volátil deste gênero é o que tem sido melhor investigado; os compostos fenólicos têm sido menos estudados (PASCUAL et al., 2001).

Rimpler e Sauerbier (1986) propuseram o uso de iridóides glicosilados do tipo geniposídeo como marcadores taxonômicos do gênero *Lippia*, posteriormente verificados na espécie *L. alba* por Heinrich, Rimpler e Barrera (1992).

Estudos sobre o gênero mostram uma predominância de constituintes do óleo volátil e compostos flavonoídicos (MACAMBIRA et al., 1986; TOMÁS BARBERÁN; HARBORNE; SELF, 1987). O gênero *Lippia* apresenta ainda uma variedade de derivados do ácido cafeico; segundo a revisão bibliográfica realizada no presente estudo, um destes derivados, o verbascosídeo (ou acteosideo), já foi identificado em *L. dulcis* Trevir., *L. multiflora* Moldenke e em *L. triphylla* L. Her. (PASCUAL et al., 2001).

L. alba possui óleo volátil em teor variável (GOMES et al., 1993; VALE et al., 1999; PASCUAL et al., 2001; SIANI et al., 2002), sendo que os componentes observados neste óleo em maior frequência são os monoterpenos (GOMES et al., 1993; VALE et al., 1999; PASCUAL et al., 2001). Dentre estes constituintes, alguns autores destacam a predominância de limoneno, carvona e/ ou citral (CORRÊA, 1992; VALE et al., 1999; STASHENKO; JARAMILLO; MARTÍNEZ, 2004); outros autores consideram como predominantes no óleo volátil, δ-terpineno (GOMES et al., 1993). Também existem estudos que classificam os constituintes do óleo volátil em quimiotipos, dentre eles: citral, β-mirceno e limoneno (OE I); citral e limoneno (OE II);

carvona e limoneno (OE III) (MATOS et al., 1996; VALE et al., 1999; PASCUAL et al., 2001; DO VALE et al., 2002; SIANI et al., 2002).

Serafini e colaboradores (2002) e Siani e colaboradores (2002) consideram que o componente majoritário do óleo volátil da espécie é o linalol (apesar dos primeiros autores salientarem que a composição química do óleo da espécie varia, dependendo da origem do material vegetal, do estágio de desenvolvimento da planta e da parte utilizada para destilação do óleo). Castro, Ming e Marques (2002), considerando a variação sazonal sobre diferentes regiões do ramo, consideraram como principais constituintes do óleo essencial o citral, mirceno e β-cariofileno, uma vez que mostraram-se dominantes, independentemente da época e região do ramo colhido, o que não ocorreu com os outros constituintes.

É importante salientar que algumas das modificações fitoquímicas da espécie podem ser decorrentes de variações no local de coleta, na latitude e nas condições do solo; além disso, *L. alba* é sujeita a modificações morfológicas e anatômicas, em função do meio onde vive (CORRÊA, 1992; GOMES et al., 1993). Sendo assim, a diversidade observada pode ser devido à variabilidade da espécie ou devido à influência do ambiente sobre as plantas analisadas (MATOS et al., 1996).

Em relação aos estudos de triagem fitoquímica com a espécie *L. alba*, foi detectada a presença de derivados triterpênicos e esteróides, usualmente detectados como saponinas (AGRA; BARBOSA FILHO, 1990; CORRÊA, 1992; GOMES et al., 1993; HUTCHINGS; VAN STADEN, 1994); gomas, mucilagens e taninos (CORRÊA, 1992), além de flavonóides (KLUEGER et al., 1997; FERREIRA et al., 2002).

Ferreira e colaboradores (2002) sugeriram que heterosídeos flavonoídicos e derivados fenilpropanóides parecem ser as principais substâncias encontradas em extratos aquoso e hidroetanólico da espécie, já que constataram a presença destes constituintes em várias coletas sazonais realizadas.

Em relação ao ciclo reprodutivo, alguns autores sugerem que a melhor época de coleta de material para produção de extratos vegetais é de junho a julho e de outubro a novembro, quando ocorre, respectivamente, o melhor período de floração e frutificação da espécie (REIS et al., 2002). Já para obtenção de óleo essencial, o melhor período de colheita da planta é de dezembro a março, quando a espécie apresenta maior teor de linalol (constituinte majoritário, segundo os autores) e maior rendimento do óleo volátil (SERAFINI et al., 2002).

3.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são estruturas com pelo menos um anel aromático e que têm pelo menos um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila. Podem ser formados por duas rotas metabólicas: pela via do ácido chiquímico – a partir de carboidratos, onde obtém-se compostos com grupos hidroxila em posição orto, que se formam a partir do ácido cinâmico – ou pela via do acetato polimalato – a partir de acetil coenzima A e malonil coenzima A, que formam compostos com hidroxilas em posição meta (ROBARDS, 2003; SIMÕES et al., 2003). As plantas apresentam uma grande diversidade em relação ao número, tipo e concentração de fenóis (GORINSTEIN et al., 2001).

Os polifenóis formam um grupo complexo de moléculas presentes em plantas, com muitas funções: inibição do desenvolvimento de patógenos, proteção contra radiação UV e stress oxidativo (SCALBERT et al., 2002; SIMÕES et al., 2003).

Tratam-se de compostos altamente bioativos, sendo que sua bioatividade mais estudada é a antioxidante (ROBARDS, 2003). Todos os polifenóis são agentes redutores; seqüestram radicais livres, regeneram outros antioxidantes (como a vitamina E) e protegem constituintes celulares contra danos oxidativos (SCALBERT et al., 2002). Sistemas aromáticos condensados que contêm grupos fenólicos, fenóis simples e estruturas com sistemas aromáticos combinados com cadeias laterais insaturadas (além de análogos estruturais do ácido araquidônico) são compostos que, isolados ou presentes em extratos ou frações de plantas, demonstram ser os mais eficazes como antiinflamatórios (WAGNER, 1993).

Em estudos fitoquímicos, para identificação de compostos fenólicos, utiliza-se, sobretudo, métodos cromatográficos. Além disso, para sua completa caracterização e elucidação estrutural, é necessário, muitas vezes, hidrólise da molécula com cromatografia subseqüente, sobretudo tratando-se de glicosídeos fenólicos (ROBARDS, 2003).

Todos fenóis possuem um forte sistema cromóforo; sendo assim, seus espectros de ultra-violeta fornecem informações estruturais que podem distinguir o tipo de fenol e seu padrão de oxidação (WOLFENDER; HOSTETTMANN, 1993). Para análise estrutural de compostos fenólicos, alia-se técnicas cromatográficas com espectroscópicas (HOSTETTMANN et al., 1995; GARO et al., 1998).

3.2.1. Fenilpropanóides – Verbascosídeo

Compostos fenilpropanóides são derivados do ácido cinâmico que, através de diferentes ações enzimáticas, podem originar diferentes derivados hidroxicinâmicos: ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico e ácido cafeico. Esta subdivisão em grupos ocorre de acordo com a ligação alcoólica, já que estes ácidos fenólicos ocorrem mais comumente na forma de éster. Todos estes ácidos servem como intermediários biossintéticos em dicotiledôneas; dentre eles, o ácido cafeico é o intermediário mais comum (MOLGAARD; RAVN, 1988; DOUGLAS, 1996; SIMÕES et al., 2003). O ácido cafeico origina uma variedade de compostos já identificados no gênero *Lippia*, como o verbascosídeo ou acteosídeo (DOUGLAS, 1996; PASCUAL et al., 2001).

Atualmente, o verbascosídeo é conhecido em algumas famílias de angiospermas, dentre elas a família Verbenaceae. Foi originalmente isolado da espécie *Verbascum sinuatum*; dentre as espécies do gênero *Lippia*, já foi isolado de *L. dulcis* Trevir., *L. multiflora* Moldenke e *L. triphylla* (L. Her.) Kuntze. Trata-se do mais comum dos ésteres de dissacarídeo e, por ser um derivado do ácido cafeico, serve como marcador taxonômico de dicotiledôneas (embora glicosídeos fenilpropanóides ocorram comumente entre dicotiledôneas, os que ocorrem como di e trissacarídeos estão restritos às ordens sem pétalas) (MOLGAARD; RAVN, 1988; JIMENEZ; RIGUERA, 1994; PASCUAL et al., 2001).

Em plantas, derivados do ácido cafeico caracterizam-se por sua atividade protetora contra herbívoros e patógenos; sua biossíntese é induzida por agentes agressores. Além disso, o verbascosídeo pode originar uma variedade de derivados, através de alterações no tipo ou posição de açúcares (MOLGAARD; RAVN, 1988; SCOGIN, 1992; JIMENEZ; RIGUERA, 1994; PASCUAL et al., 2001).

Diversas atividades biológicas e farmacológicas são atribuídas ao verbascosídeo. Por se tratar de um composto fenólico, é eficaz no seqüestro de ânion superóxido ou radical hidroxila (ZHOU; ZHENG, 1991; OZGOVÁ; HERMÁNEK; GUT, 2003; LEE et al., 2004). Além disso, por tratar-se de um glicosídeo fenilpropanóide com dois grupos orto-dihidroxila em anel fenólico, tem atividade antioxidante bastante significativa, sendo capaz de reagir rapidamente contra radicais livres. Dentre estes radicais, o óxido nítrico (ZHENG et al., 1993; RICE EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; WANG et al., 1996; XIONG et al., 2000).

Devido (dentre outros fatores) à sua capacidade antioxidante apresenta, *in vivo*, efeito hepatoprotetor dose-dependente; tem a capacidade de bloquear tanto a bioativação de sistemas

envolvidos com hepatotoxicidade quanto a indução de apoptose hepática mediada por TNF-α (XIONG et al., 1999; XIONG et al., 2000; LEE et al., 2004). Apresenta efeito antiproliferativo *in vitro*, devido (também dentre outros fatores), à inibição da proteína quinase C (HERBERT et al., 1991; MAHATO et al., 1994; OHNO et al., 2002).

O verbascosídeo demonstra atividade antiinflamatória *in vivo*, através da inibição de histamina e bradicinina, ou ainda, através do seqüestro de óxido nítrico (SCHAPOVAL et al., 1998; XIONG et al., 2000). É capaz de inibir enzimas da cascata do ácido araquidônico, interferindo na atividade da tromboxano sintase; reduz a geração de óxido nítrico e de TNF- α, e apresenta seletividade para inibição de COX-2 (DIAZ et al., 2004).

Testes em coração isolado de rato demonstram que o verbascosídeo é um agente cardiotônico, capaz de estimular a formação intracelular de AMPc, aumentando níveis de prostaciclina e ocasionando aumento significativo de cronotropismo, inotropismo e ritmo de perfusão coronária (PENNACCHIO et al., 1995; PENNACCHIO et al., 1996a; PENNACCHIO et al., 1996b; PENNACCHIO et al., 1999). Outros autores afirmam, com base em um *screening* farmacológico, que há indicações de efeito anti-hipertensivo (ANDARY et al., 1982).

No SNC, através do mesmo *screening* realizado por Andary e colaboradores (1982), foi demonstrado que o verbascosídeo atua como agonista na atividade anti-tremor de L-DOPA e apresenta atividade antinociceptiva.

A literatura relata ainda, que o mesmo composto apresenta atividade antimicrobiana *in vitro*, destacando-se atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, agindo como bacteriostático ou como bactericida, dependendo da dose e do tempo; o mecanismo de ação envolvido é a inibição da síntese protéica, via obstrução de absorção de leucina (PARDO et al., 1993; ÁVILA et al., 1999).

3.3. Saponinas – Ácido oleanólico

Saponinas são glicosídeos de terpenóides e álcoois esteróides. Podem ser quimicamente categorizadas como uma aglicona ligada a uma ou mais cadeias de açúcar (MAHATO; SARKAR; PODDAR, 1988; SIMÕES et al., 2003). As mais comumente encontradas na natureza possuem 30 átomos de carbonos e núcleo triterpênico. Existem em torno de 200 esqueletos de triterpenos diferentes, derivados de fontes naturais (SIMÕES et al., 2003; XU; FAZIO; MATSUDA, 2004). Podem originar-se da ciclização do esqualeno, oxidosqualeno e bis-oxidosqualeno, sendo que as plantas angiospermas caracterizam-se pela presença de diversos triterpenóides formados pela ciclização do oxidosqualeno. Este, após ciclizado, gera produtos de distribuição filogenética diferente; cicliza para intermediários-chave na biossíntese de componentes de membrana celular (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004).

Triterpenos e derivados esteroídicos, usualmente identificados como saponinas, têm sido relatados na espécie *Lippia alba* (PASCUAL et al., 2001).

O ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxiolea-12-en-28-óico) trata-se de um triterpenóide que ocorre comumente em plantas, na forma de ácido livre ou aglicona de saponina triterpênica (MAHATO; SARKAR; PODDAR, 1988).

Este composto já foi isolado de mais de 120 espécies de plantas e muitas propriedades farmacológicas têm sido a ele atribuídas (WANG; JIANG, 1992; LIU, 1995). Mostra-se um eficiente composto hepatoprotetor, desde pesquisas realizadas em 1975; de acordo com Liu (1995), é um composto que tem a capacidade de proteger o fígado contra danos quimicamente induzidos em ratos. Há diversos mecanismos envolvidos no seu efeito hepatoprotetor; em culturas de hepatócitos de camundongos, o composto foi capaz de reduzir a citotoxicidade produzida por CCl_4 e D- galactosamina, relacionada à inibição da peroxidação lipídica (HIKINO et al., 1984). Contudo, o mecanismo de hepatoproteção do ácido oleanólico ainda não está completamente elucidado (LIU, 1995).

Ainda no fígado, inibe competitivamente a atividade de enzimas do citocromo P_{450}, relacionadas à metabolização de fármacos. Sendo assim, a administração concomitante de ácido oleanólico com fármacos metabolizados por isoformas deste sistema, é capaz de resultar em interações medicamentosas (KIM et al., 2004).

O efeito antiinflamatório é uma propriedade comum a maioria dos triterpenóides; contudo, tanto o ácido oleanólico, quanto o seu isômero, o ácido ursólico, são os mais notáveis dentre

estes compostos, em relação a esta atividade (MAHATO; SARKAR; PODDAR, 1988; LIU, 1995). Desde 1960 seus efeitos antiinflamatórios são conhecidos. Ele inibe edema de pata produzido em ratos por 12-o-tetradecanoilforbol acetato (TPA), demonstrando atividade antiinflamatória por via tópica (LIU, 1995; NADINIC et al., 1999). Os mecanismos envolvidos nesse efeito são atribuídos, dentre outros mecanismos, à inibição da histamina liberada de mastócitos (TSURUGA; EBIZUKA; SANKAWA, 1991), ou ainda, à inibição da atividade da lipoxigenase e ciclooxigenase (SIMON et al., 1992), que reduz alguns fatores inflamatórios da cascata do ácido araquidônico.

Tanto a iniciação quanto a promoção tumoral são inibidas pelo ácido oleanólico em diversos estágios (LIU, 1995). Os mecanismos desta supressão são desconhecidos; contudo, já foi demonstrado que este triterpenóide é capaz de inibir promotores tumorais, como o 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em pele de ratos (OGURO et al., 1998). O uso de ácido oleanólico tem sido recomendado na terapia do câncer de pele no Japão (MUTO; NINOMIYA; FUJIKI, 1990).

Preparações cosméticas contendo ácido oleanólico são patenteadas no Japão na prevenção de câncer de pele, para uso tópico (ISHIDA et al., 1990). Entretanto, segundo Liu (1995), são necessárias pesquisas mais aprofundadas para desenvolver-se uma quimioterapia anticâncer utilizando ácido oleanólico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes, solventes e soluções

Acetato de etila P. A. (Nuclear)

Acetato de sódio (Reagen)

Acetonitrila H. P. L. C. (Nuclear)

Ácido acético glacial P. A. (Sinth)

Ácido clorídrico concentrado P. A. (Prolab)

Ácido fórmico P. A. (Reagen)

Ácido fosfórico concentrado P. A. (Biotec)

Ácido sulfúrico concentrado P. A. (Cinética Química®)

Ácido 3,5-dinitrobenzóico (Sigma)

Água destilada

Álcool etílico 92,8° INPM (Coperalcool®)

Álcool etílico P. A. (Nuclear)

Álcool isopropílico P. A. (Nuclear)

Álcool metílico P. A. (Nuclear)

Álcool n-butílico P. A. (Nuclear)

Anidrido acético (Cinética Química®)

Anisaldeído (Merck®)

Diclorometano P. A. (Nuclear)

Éter de petróleo P. A. (Nuclear)

Hidróxido de amônio P. A. (Merck®)

Solução de cloreto férrico 2,5 %

Solução de gelatina a 2,5 %

Tolueno P. A. (Reagen)

Vanilina (Nuclear)

4.2. Materiais para cromatografia e equipamentos

Adsorventes em gel de sílica para colunas cromatográficas (θ = 0,05 - 0,20 mm; 0,04 – 0,063 mm; 0,063 – 0,20 mm)(MERCK®)

Aparelho de CLAE (CLASS-VP 5.02 Shimadzu®) com microcomputador Megaware acoplado

Balança analítica (Sartorius)

Balões de fundo redondo e cônico

Banho de água (Quimis®)

Banho de ultra-som (Metasom-14)

Cápsulas de porcelana

Colunas cromatográficas de vidro (θ = 2,0 cm x 20 cm; 2,0 cm x 40 cm; 3,5 cm x 48 cm)

Coluna prep-ODS (Shimadzu®)

Cubas cromatográficas de vidro

Dessecador de vidro 160 mm (Vidrolabor)

Espectrofotômetro UV/VIS Lambda 10 (Perkin-Elmer®)

Estufa Termostatizada (De Leo)

Evaporador rotatório (Quimis®)

Fragmentos de magnésio

Frascos de vidro

Lâmpada UV 254/365 nm (Camag)

Pedras de porcelana

Pêra de separação

Pesa-filtros

Pistola de aquecimento (Hotstrip™)

Placas cromatográficas de gel de sílica 60 F_{254} sobre folha de alumínio 20 x 20 cm (Merck®)

Tubos de ensaio

4.3. Coleta e preparação do material vegetal utilizado para isolamento de substâncias

Como matéria-prima vegetal foram utilizadas folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. proveniente de cultivo (Figura 2), coletada em Cacupé, em Florianópolis, Santa Catarina, em 05 de abril de 2003. Foram coletados ramos com folhas e flores. A amostra para exsicata foi

depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina e encontra-se sob o código alfanumérico FLOR 31267.

FIGURA 2: Cultivo de *L. alba* (Mill.) N. E. Br.

4.3.1. Secagem e moagem

O material fresco foi seco em estufa de ar circulante, a temperatura inferior a 50 °C, ao abrigo da luz, por 5 dias. Concluído o processo de secagem, as folhas foram separadas dos ramos e flores. As folhas foram selecionadas, retirando-se as danificadas; depois foram moídas em moinho de facas e então pesadas.

Obteve-se 840 g de droga moída e esta quantidade foi utilizada na preparação da solução extrativa.

4.3.2. Caracterização do material vegetal

4.3.1.1. Determinação da perda por dessecação (F.B. IV)

Em pesa-filtros previamente tarados, pesou-se exatamente cerca de 1 g da droga, colocou-se em estufa à 100-105 °C por 2 horas, deixou-se esfriar em dessecador e pesou-se a

seguir. Os pesa-filtros foram recolocados em estufa por mais 30 min, e este procedimento foi repetido até peso constante, ou seja, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não excedesse 0,5 mg. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.1.2. Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e das frações obtidas por partição

Os ensaios de caracterização dos grupos de constituintes vegetais foram realizados segundo Dominguez (1973), Marini-Bettolo (1980), Costa (1986) e Farmacopéia Brasileira (1988):

Reação com cloreto férrico – caracterização de compostos polifenólicos: 1 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram transferidos para tubos de ensaio, sendo adicionadas 2 gotas de solução de cloreto férrico 2,5 %, verificando-se o desenvolvimento de coloração;

Reação de cianidina ou de Shinoda – caracterização de flavonóides: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram transferidos para cápsulas de porcelana e aquecidos até a secura, sem que houvesse carbonização dos resíduos. Estes resíduos foram retomados em 1,5 ml de metanol e vertidos para diferentes tubos de ensaio. Adicionou-se 2 – 3 fragmentos de magnésio e 0,5 ml de HCl concentrado, observando-se a coloração;

Reação de gelatina – caracterização de taninos: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram dissolvidos (ou suspensos) em água e adicionado de uma solução de gelatina a 2,5 % gota a gota, observando-se a formação de precipitado;

Reação de Stiasny – diferenciação de taninos condensados e hidrolisáveis: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram submetidos a refluxo por 30 min com 40 ml de água e 5 ml do reativo de Stiasny (5 ml de HCl concentrado + 10 ml de formol, preparado no momento do uso). Os taninos condensados originam um precipitado vermelho (flobafeno). Fez-se a filtração do precipitado e ao filtrado adicionou-se acetato de sódio em excesso e 2 gotas de solução de cloreto férrico a 2,5 % observando-se o desenvolvimento de coloração;

Reação de Borntranger – detecção de antraquinonas: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram colocados em balão de fundo redondo de 100 ml, com 30 ml de HCl 2N e 2 ml de solução de cloreto férrico 2,5 %. Montados os balões no sistema de refluxo, adicionou-se pedras de porcelana e manteve-se cada um sob ebulição por 15 min. Após esfriar, as soluções foram filtradas, desprezou-se os resíduos sólidos e a fase aquosa de cada solução foi extraída

com 10 ml de tolueno. Estes extratos foram concentrados em evaporador rotatório e então vertidos para tubo de ensaio, sendo adicionados de 2 ml de solução de NH_4OH a 50 %;

Reação de Liebermann-Burchard – caracterização de núcleos triterpênicos e esteroidais: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram acrescidos, pelas paredes dos tubos de ensaio, o reativo de Liebermann-Burchard (1 ml de anidrido acético e gotas de ácido sulfúrico concentrado), observando-se o aparecimento de coloração após 15 min de repouso;

Reação de Salkowsky – detecção de esteróides: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram acrescidos, pelas paredes dos tubos de ensaio, 1 ml do reativo de Salkowsky (ácido sulfúrico concentrado), observando-se o aparecimento de coloração;

Reação de Keller-Killiani – detecção de desoxioses em extremidades livres de heterosídeos cardiotônicos: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram acrescidos de 0,5 ml do reativo de Keller-Killiani (1,5 ml de ácido acético glacial e 1 gota de solução de cloreto férrico ácida), sendo então vertidos para tubos de ensaio que já continham 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, sem mistura dos dois líquidos. Observou-se então a formação de coloração;

Reação de Kedde – caracterização do anel lactônico pentagonal insaturado dos cardenolídeos: 2 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações foram acrescidos de 1 ml de etanol a 50 % e de 1 ml do reativo de Kedde (8 gotas de solução metanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2 % e 2 gotas de solução metanólica de KOH 1N), observando-se o aparecimento de coloração;

Teste de formação de espuma – detecção de saponinas: 3 ml do extrato bruto e de cada uma das 5 frações (após eliminação do solvente em banho-maria), foram acrescidos de água e colocados em tubos de ensaio, agitando-se vertical e fortemente os 6 tubos durante 1 min, observando-se o aparecimento de coloração.

4.4. Isolamento dos constituintes da fração n-butanólica

Dando continuidade aos estudos anteriores que demonstraram que a fração n-butanólica, obtida a partir de soluções extrativas de elevado teor alcoólico (80 %), apresentou atividade anticonvulsivante (no modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol) (SOARES, 2001) e alterações na atividade locomotora (no modelo de campo aberto) (KLUEGER et al., 1997), partiu-se desta fração para isolamento e identificação de substâncias químicas.

4.4.1. Preparação da solução extrativa

A solução extrativa foi preparada pelo método de maceração, obedecendo a proporção 1:20 (farmacógeno: líquido extrator). A mistura foi deixada em maceração por 4 dias, ao abrigo da luz, sob agitação periódica. Então foi filtrada, o marco prensado e novamente filtrado, obtendo-se então parte de solução extrativa. Submetendo o marco à remaceração nas mesmas condições, as soluções extrativas obtidas foram então reunidas.

O líquido extrator utilizado no processo de maceração/ remaceração foi álcool etílico comercial (92,8° INPM).

4.4.2. Fracionamento

A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotatório até a completa eliminação do líquido extrator. Obteve-se 89,21 g de extrato concentrado (extrato bruto), que foi ressuspenso em 2800 ml de água (com auxílio de ultrassom, por 25 min) e então submetido à partição com solventes de polaridade crescente: éter de petróleo (EP), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH). Foram utilizados 900 ml de cada solvente, sendo realizadas 6 extrações sucessivas com 150 ml cada, conforme o esquema mostrado na Figura 3.

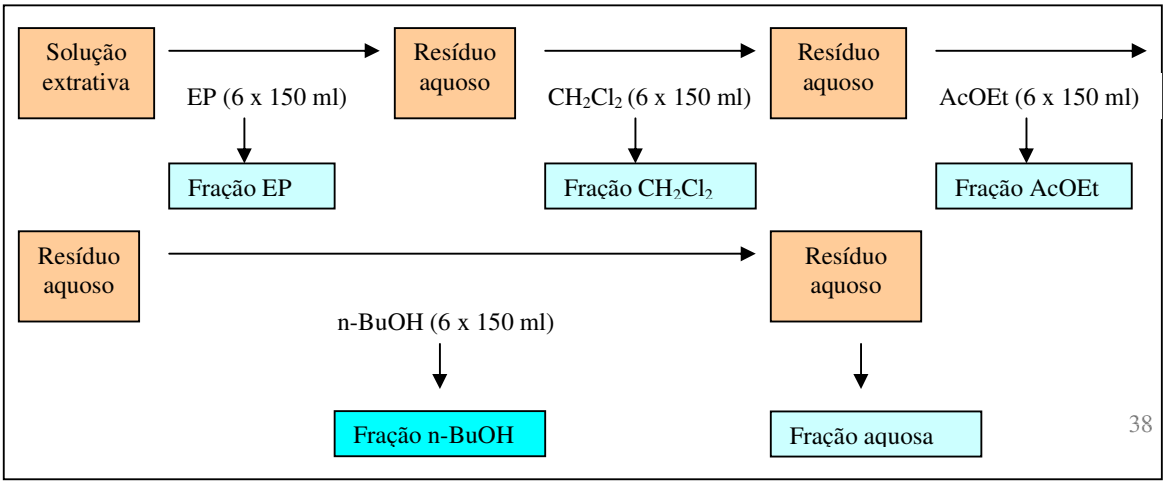


FIGURA 3: Representação esquemática da partição da solução extrativa com solventes em ordem crescente de polaridade

Terminado o processo de partição da solução extrativa, foram obtidas as 5 frações diferentes (EP, CH_2Cl_2, AcOEt, n-BuOH e aquosa), sendo que as 3 primeiras foram armazenadas em geladeira e a última em freezer.

A fração n-BuOH foi concentrada parte em evaporador rotatório e parte em cápsulas em banho-maria (ambos a 43 °C), até completa eliminação do solvente. Procedeu-se então a sua análise e purificação através de procedimentos cromatográficos.

4.4.2.1. Obtenção dos constituintes majoritários da fração n-butanólica

Primeiramente, foram realizados sucessivos testes com diversos sistemas cromatográficos em cromatografias em camada delgada (CCD) para identificar e separar os constituintes da fração n-BuOH. A cromatografia em camada delgada foi também utilizada no monitoramento de subfrações resultantes da purificação da fração n-BuOH.

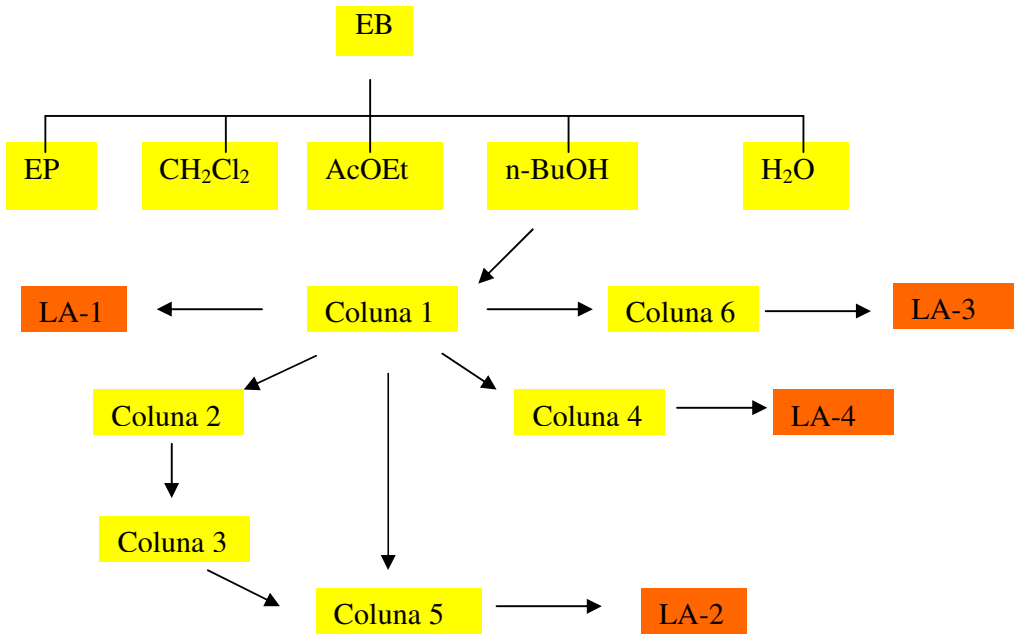
Para isso, foram utilizadas placas cromatográficas de gel de sílica F_{254} e detecção destas sob luz UV 254 e 365 nm (sendo que a melhor visualização de manchas foi obtida utilizando-se o maior comprimento de onda) e ainda com reveladores como vanilina H_3PO_4, NP/PEG e vapores de NH_3.

Dessa forma, o sistema selecionado como padrão para as cromatografias em camada delgada foi acetato de etila: metanol: isopropanol: água: ácido acético (AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O: ác. acético), na proporção 7: 1: 2: 5: 0,2, com separação de fases em pêra de separação. Desprezava-se a fase aquosa e utilizava-se sempre como eluente, nas cromatografias em camada delgada, a fase orgânica deste sistema.

Para a realização da purificação das substâncias da fração n-BuOH, utilizou-se sucessivas colunas cromatográficas no processo de fracionamento. Através desta metodologia, foi possível o isolamento de 4 substâncias. Estas foram denominadas LA-1 a LA- 4, de acordo com a ordem crescente de polaridade na CCD, no sistema utilizado.

A Figura 4 apresenta de forma resumida o processo de isolamento e purificação das 4 substâncias isoladas a partir da fração n-BuOH. Nas colunas 1, 2, 3 e 5 utilizou-se o sistema AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H_2O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2); nas colunas 4 e 6 o sistema empregado foi etanol: acetato de etila: água (EtOH: AcOEt: H_2O), na proporção 120: 60: 5.

Todas as colunas realizadas para o fracionamento encontram-se descritas do item 4.4.2.2. ao item 4.4.2.8.



EB = extrato bruto; EP = fração éter de petróleo; CH_2Cl_2 = fração diclorometano; AcOEt = fração acetato de etila; n-BuOH = fração n-butanol

FIGURA 4: Representação esquemática do processo de isolamento e purificação de substâncias a partir da fração n-BuOH

4.4.2.2. Coluna 1:

Utilizando-se 2,83 g da fração n-BuOH pulverizada, procedeu-se a separação de substâncias da seguinte maneira:

- Utilizou-se como fase fixa 250 g de sílica (0,05 – 0,20 mm) em coluna de vidro (3,5 cm x 48 cm), resultando em uma coluna de 42 cm de altura de sílica;

- Foi utilizado como fase móvel um sistema isocrático, constituído de AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H_2O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2), após separação de fases em funil de separação e utilização da fase orgânica;
- Manteve-se um fluxo de 2 ml/ min e coletou-se 162 subfrações de cerca de 6,5 ml cada uma, após 12 h de separação em coluna;
- As subfrações foram então monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 5 subfrações, conforme o Quadro 1:

QUADRO 1: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 1

subfrações reunidas	Quantidade (mg)
C1-01 - 11	208,0
C1-12 - 22	304,9
C1-23 - 43	244,7
C1-44 - 107	105,1
C1-108 - 162	265,1
C1-Lavagem MeOH	407,3

As subfrações C1-01-11 e C1-44-107 mostraram-se muito impuras.

A subfração C1-12–22, além de ter um bom rendimento, apresentou uma única mancha em Rf ~ 0,7; foi então denominada LA - 1. Esta substância foi submetida à análise estrutural através de espectros de ressonância magnética nuclear, conforme o item 4.4.3.2. A elucidação estrutural deste constituinte encontra-se descrita no item 5.3.1.

A subfração C1-23–43, por ter um rendimento significativo e um bom grau de pureza, mostrou-se promissora para purificação em coluna cromatográfica. O mesmo ocorreu com a subfração C1-108–162, que apresentou uma mancha predominante em Rf ~ 0,3 e apenas uma impureza em Rf ~ 0,15.

A subfração C1-lavagem MeOH refere-se à lavagem da coluna feita com metanol após o término de coleta de subfrações da coluna; contém apenas as substâncias mais polares da fração n-BuOH. Por tratar-se de uma fração bem mais pura que a original e por ter um bom rendimento, mostrou-se igualmente promissora para purificação em coluna.

4.4.2.3. Coluna 2:

Utilizando-se as 344,7 mg da subfração C1-23-43 procedeu-se a separação de substâncias da seguinte maneira:

- Utilizou-se como fase fixa 25 g de sílica (0,05 – 0,20 mm) em coluna de vidro (2 cm x 40 cm), resultando em uma coluna de 26 cm de altura de sílica;
- Foi utilizado como fase móvel um sistema isocrático, constituído de AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H_2O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2), após separação de fases em funil de separação e utilização da fase orgânica;
- Manteve-se um fluxo de 1,6 ml/ min e coletou-se 156 subfrações de cerca de 2,5 ml cada uma, após 5 h de separação em coluna;
- As subfrações foram então monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 5 subfrações, conforme o Quadro 2.

QUADRO 2: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 2

subfrações reunidas	Quantidade (mg)
C2-01 - 07	04,0
C2-08 - 34	160,6
C2-35 - 51	10,5
C2-52 - 90	08,8
C2-91 - 156	16,6

A subfração C2-01–07, através de comparação em CCD com LA - 1, mostrou tratar-se da mesma substância.

A subfração C2-08–34 mostrou-se viável para purificação através de coluna cromatográfica, além de ter bom rendimento.

A subfração C2-52–90 tinha uma mancha predominante em Rf ~ 0,36 e apenas uma impureza em Rf ~ 0,16. Contudo, seu baixo rendimento impossibilitou sua purificação. As subfrações C2-35–51 e C2-91–156 mostraram-se muito impuras.

4.4.2.4. Coluna 3:

Utilizando-se as 160,6 mg da subfração C2-08-34 procedeu-se a separação de substâncias da seguinte maneira:

- Utilizou-se como fase fixa 15 g de sílica (0,04 – 0,063 mm) em coluna de vidro (2 cm x 20 cm), resultando em uma coluna de 13 cm de altura de sílica;
- Foi utilizado como fase móvel um sistema isocrático, constituído de AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H_2O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2), após separação de fases em funil de separação e utilização da fase orgânica;
- Manteve-se um fluxo de 1 ml/ min e coletou-se 145 subfrações de cerca de 1,7 ml cada uma, após 4,5 h de separação em coluna;
- As subfrações foram então monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 3 subfrações, conforme o Quadro 3.

QUADRO 3: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 3

Subfrações reunidas	Quantidade (mg)
C3-01 - 50	33,3
C3-51 - 115	109,3
C3-116 - 145	02,8

A subfração C3-01–50 era de baixo rendimento e igualmente baixo grau de pureza.

A subfração C3-51–115 tinha um grau de pureza considerável e rendimento razoável; comparando-se através de CCD com a subfração C1-44–107 (coluna 1), constatou-se que ambas apresentavam as mesmas manchas. Sendo assim, foram reunidas buscando-se maior rendimento para purificação em coluna.

A subfração C3-116–145 apresentou uma mancha predominante em Rf ~ 0,4; contudo, seu baixo rendimento impossibilitou sua purificação.

4.4.2.5. Coluna 4:

Utilizando-se as 407,3 mg da subfração C1-lavagem MeOH (subfração da coluna 1) pulverizada, procedeu-se a separação de substâncias da seguinte maneira:

- Utilizou-se como fase fixa 40 g de sílica (0,063 – 0,20 mm) em coluna de vidro (2 cm x 40 cm), resultando em uma coluna de 38 cm de altura de sílica;
- Foi utilizado como fase móvel um sistema isocrático, constituído de EtOH/ AcOEt/ H_2O (120: 60: 5);
- Manteve-se um fluxo de 1,4 ml/ min e coletou-se 259 subfrações de cerca de 1,6 ml cada uma, após 7,5 h de separação em coluna;
- As subfrações foram então monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 3 subfrações, conforme o Quadro 4.

QUADRO 4: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 4

Subfrações reunidas	Quantidade (mg)
C4-01 - 55	72,0
C4-56 - 96	45,4
C4-97 - 259	31,8

A subfração C4-01–55 apresentou uma mancha predominante em Rf ~ 0,25; foi então denominada LA-4. Contudo, conforme descrito no item 5.3., deve-se ainda realizar sua purificação e elucidação estrutural.

As subfrações C4-56–96 e C4-97–259 não mostraram-se promissoras para purificação em coluna, devido seus baixos rendimentos e grau de pureza.

4.4.2.6. Coluna 5:

Utilizando-se 214,4 mg das subfrações C1-44–107 (105,1 mg; coluna 1) e C3-51–115 (109,3 mg; coluna 3) pulverizadas, procedeu-se a separação de substâncias da seguinte maneira:

- Utilizou-se como fase fixa 23 g de sílica (0,04 – 0,063 mm) em coluna de vidro (2 cm x 40 cm), resultando em uma coluna de 19 cm de altura de sílica;
- Foi utilizado como fase móvel um sistema isocrático, constituído de AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H_2O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2), após separação de fases em funil de separação e utilização da fase orgânica;
- Manteve-se um fluxo de 1 ml/ min e coletou-se 154 subfrações de cerca de 1,8 ml cada uma, após 6,5 h de separação em coluna;
- As subfrações foram então monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 5 subfrações, conforme o Quadro 5.

QUADRO 5: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 5

Subfrações reunidas	Quantidade (mg)
C5-01 - 21	03,1
C5-22 - 55	24,6
C5-56 - 62	11,5
C5-63 - 82	13,9
C5-83 - 154	13,4

As 4 primeiras subfrações apresentaram grau de pureza razoável mas um rendimento que impossibilitou a realização de purificação através de cromatografia em coluna.

A subfração C5-83–154 apresentou uma única mancha em Rf ~ 0,16; foi então denominada LA-2. Contudo, conforme descrito no item 5.3., estão sendo aguardados seus espectros de ressonância magnética nuclear para que se realize sua elucidação estrutural.

4.4.2.7. Coluna 6:

Utilizando-se as 265,1 mg da subfração C1-108–162 (subfração da coluna 1) pulverizada, procedeu-se a separação de substâncias da seguinte maneira:

- Utilizou-se como fase fixa 26 g de sílica (0,04 – 0,063 mm) em coluna de vidro (2 cm x 40 cm), resultando em uma coluna de 25 cm de altura de sílica;
- Foi utilizado como fase móvel um sistema isocrático, constituído de EtOH/ AcOEt/ H_2O (120: 60: 5);
- Manteve-se um fluxo de 1 ml/ min e coletou-se 143 subfrações de cerca de 1,4 ml cada uma, após 4,5 h de separação em coluna;
- As subfrações foram então monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 2 subfrações, conforme o Quadro 6.

QUADRO 6: Subfrações resultantes da coluna cromatográfica n° 6

Subfrações reunidas	Quantidade (mg)
C6-01 - 113	218,5
C6-114 - 143	01,4

A subfração C6-01–113 apresentou duas manchas praticamente sobrepostas, em Rf ~ 0,3; foi então denominada LA- 3. A separação destas substâncias foi realizada conforme item 4.4.2.8. A substância predominante foi submetida à análise através de espectros de ressonância magnética nuclear, conforme o item 4.4.3.2. A elucidação estrutural deste constituinte encontra-se descrita no item 5.3.2.

A subfração C6-114–143 mostrou-se de baixo rendimento e igualmente baixo grau de pureza.

4.4.2.8. Purificação de LA-3

A subfração designada por LA-3 foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se: como fase fixa uma coluna preparativa ODS (Shimadzu®); como fase móvel um sistema gradiente, constituído primeiramente de acetonitrila: água (7 : 3) e

então, acetonitrila: água (5 : 5); fluxo de 0,2 ml/min; tempo total de eluição de 180 min; detecção UV $\lambda_{máx}$= 254 nm.

4.4.3. Elucidação estrutural das substâncias isoladas

4.4.3.1. Espectroscopia no ultra-violeta (UV)

As análises de espectroscopia no ultra-violeta foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer Lamba 10.

A substância LA-1 foi submetida à análise espectroscópica no UV segundo Mabry, Markhan e Thomas (1970), uma vez que apresentava comportamento típico de flavonóide em cromatografia em camada delgada, conforme item 5.3.1.

Preparou-se a solução original da amostra com cerca de 1 mg/10 ml de metanol (MeOH), obtendo-se o espectro original utilizando-se 2 ml da solução em MeOH para determinação dos comprimentos de onda ($\lambda_{máx.}$). Esta solução foi dividida em três alíquotas de 2 ml cada uma, adicionando-se reativos de deslocamento, conforme descrito a seguir:

Numa alíquota de 2 ml da solução original foram adicionadas 3 gotas da solução de metóxido de sódio (NaOMe) - 2,5 g de sódio metálico em 100 ml de MeOH - obtendo-se os espectros imediatamente e repetindo-se após 5 min, para observação da ocorrência ou ausência de decomposição do mesmo;

Em outra alíquota de 2 ml da solução original foram adicionadas 6 gotas de $AlCl_3$ (5 g de $AlCl_3$ em 100 ml de MeOH), obtendo-se vários espectros até que os $\lambda_{máx}$. estivessem estáveis. Ao estabilizarem, foram então adicionadas 3 gotas de solução de HCl (HCl: H_2O, na proporção 1:2), obtendo-se novo espectro;

Finalmente, na última alíquota de 2 ml da solução original foi adicionado acetato de sódio (NaOAc) sólido, formando uma camada no fundo da cubeta. Obteve-se espectros imediatamente e após 5 min. Não havendo deslocamento, adicionou-se a esta solução H_3BO_3 sólido, fazendo-se novamente a leitura.

4.4.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^{1}H)

As análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas pelo Prof. Dr. Jorge Alexandro Palermo, da Universidade de Buenos Aires. Para este experimento foi utilizado um espectrofotômetro BRUCKER AM 500.

4.5. Análise sazonal da fração n-butanólica

Além da coleta de material vegetal para o isolamento de substâncias (item 4.3.), a espécie *L. alba* foi coletada ainda em seis meses diferentes, para análise sazonal: em junho, agosto, outubro e dezembro de 2003 e em fevereiro e abril de 2004.

Dessa forma, obteve-se seis diferentes frações n-BuOH, conforme o item 4.5.1.; estas frações foram comparadas em relação ao perfil qualitativo dos constituintes químicos presentes (Figura 20, item 5.4.).

Verificou-se também, o rendimento obtido a partir das diferentes coletas, tanto do extrato bruto quanto da fração n-BuOH, ambos em relação à quantidade de droga moída (Tabela 3, item 5.4.).

4.5.1. Preparação da solução extrativa para a análise sazonal

A preparação das seis soluções extrativas utilizadas para a análise sazonal foi feita conforme descrito no item 4.4.1.

4.5.1.1. Fracionamento

O fracionamento destas soluções, bem como a obtenção das diferentes frações n-BuOH foram de acordo com a Figura 3 (item 4.4.2).

4.5.1.2. Secagem e moagem

Uma vez que a estufa encontrava-se em manutenção durante os meses de junho e agosto de 2003, a metodologia empregada na secagem e moagem do material vegetal utilizado na análise sazonal não ocorreu conforme descrito no item 4.3.1. O material fresco foi seco sobre jornal à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 7 dias, nas seis coletas realizadas.

Concluído o processo de secagem, as folhas foram separadas dos ramos e flores. As folhas secas foram selecionadas, retirando-se as danificadas; depois foram moídas em moinho de facas e então pesadas. Obteve-se exatamente cerca de 80 g de droga moída em cada uma das 6 coletas, e esta quantidade foi utilizada na preparação da solução extrativa.

4.5.1.3. Determinação da perda por dessecação

Este ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.3.2.1. As 6 coletas sazonais foram submetidas ao ensaio e realizadas em triplicata.

4.6. Ensaios farmacológicos

A atividade no SNC da fração n-butanólica foi analisada, buscando-se verificar algumas das atividades sugeridas em estudos preliminares (item 3.1.2.).

4.6.1. Preparação da fração n-BuOH para os ensaios farmacológicos

A fração n-BuOH foi preparada de acordo com o item 4.4.1. e a Figura 3 (item 4.4.2.).

4.6.2. Ensaios farmacológicos

4.6.2.1. Animais empregados

Foram usados camundongos suíços machos, provenientes do Biotério Central da UFSC, pesando entre 35-45 g. Os animais foram alojados em grupos de 10 por caixa e mantidos com

água e ração *ad libitum*, exceto durante a vigência dos experimentos, e mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (luzes acesas às 7:00 h) num ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 ºC). Todos os animais foram habituados nas condições do laboratório por pelo menos, uma semana antes do início dos testes comportamentais. Nenhum animal havia sido previamente utilizado, sendo testados apenas uma vez, exceto quando explicitamente indicado em testes não invasivos. Os experimentos comportamentais foram conduzidos de acordo com normas internacionais de experimentação em animais, conforme recomendado pela Society for Neuroscience e a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (1992) e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (# 23080.027554/2004-49/UFSC). O número mínimo de animais e a duração mínima de observação que permitiram obter dados consistentes foram usados em todos os experimentos.

4.6.2.2. Fármacos empregados

- Diazepam (Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP): sedativo/ansiolítico padrão (controle positivo);
- Pentobarbital sódico (Laboratórios Abbott, São Paulo, SP): hipno-sedativo (ALPERN; MCINTYRE, 1986);
- Éter etílico P.A. (Laboratórios Dinâmica): anestésico volátil (KATZUNG, 1997).

O diazepam e o pentobarbital foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9 %) e (quando necessário) acrescidos de 10 % de propilenoglicol (PEG), no dia dos experimentos. O volume de administração foi de 1 ml/kg, por via intraperitoneal.

A fração n-butanólica também foi suspensa em solução salina (NaCl 0,9 %), com volume de administração de 1 ml/kg, mas por via oral.

4.6.2.3. Avaliação da ação hipno-sedativa

Houveram três grupos diferentes de animais: os pré-tratados com diazepam, na dose de 1 mg/kg, por via intraperitoneal (20 minutos antes da indução do sono, constituindo o grupo controle positivo); os tratados com solução salina 0,9 %, por via oral (1, 2 ou 3 horas antes da indução do sono); ou aqueles tratados com fração n-butanólica, nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg, por via oral (também 1, 2 ou 3 horas antes da indução do sono).

Foi utilizado um n = 6-8/grupo.

4.6.2.4. Hipnose induzida por pentobarbital

Para avaliar a potencialização da hipnose, o pentobarbital sódico foi injetado por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 50 mg/kg. A latência para a perda do reflexo postural e a duração do sono induzido (tempo de sono / *sleeping time*) foram registrados com um cronômetro por até 3 h após a indução do sono. O tempo de sono foi medido pelo período entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento postural dos animais (CARLINI et al., 1986; CHWEH; SWINYARD; WOLF, 1987).

4.6.2.5. Hipnose induzida por éter

Também para avaliar a potencialização da hipnose, utilizou-se outro agente indutor de hipnose que, diferentemente do pentobarbital, não tem metabolização hepática: o éter etílico (5 ml em câmara saturada por 10 min) (VIEIRA, 2001).

Os parâmetros registrados foram os mesmos descritos para o sono barbitúrico.

4.6.2.6. Temperatura colônica

A temperatura corporal foi medida colocando-se um sensor de 2 cm no reto do camundongo. O registro digital da temperatura foi feito com uma aproximação de 0,1 ºC por um termômetro digital Cole-Parmer Instrument Company, modelo 8402-00. O sensor de mesma marca, n° 08432-00, embebido de silicone foi mantido no reto até que a temperatura ficasse

estável (cerca de 30 s). Os registros da temperatura retal foram feitos antes da indução do sono barbitúrico (CARLINI et al., 1986). Foi utilizado um n = 6-8/grupo.

4.6.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. (n válido). Os testes estatísticos usados foram a ANOVA, o teste "*t*" de Student "pareado" ou "não-pareado". A ANOVA foi utilizada no protocolo de dose-resposta do sono barbitúrico, onde várias doses estavam sendo testadas; pelo fato dos resultados não terem sido significativos, foi realizado ainda neste protocolo, o teste "*t*" não pareado. No sono induzido por éter etílico, utilizou-se apenas o teste "*t*" não pareado. Para a temperatura retal, utilizou-se o teste "*t*" pareado, uma vez que o animal é seu próprio controle.

Os valores que não apresentaram distribuição normal foram convertidos para log (x) ou log (x+1), a fim de possibilitar as análises. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas estatisticamente significativas quando "p" foi menor que 0,05. Os dados foram analisados pelo software Statistica® versão 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do material vegetal utilizado

5.1.1. Determinação da perda por dessecação

Este ensaio permite uma correlação com o teor de umidade do material vegetal, que pode interferir tanto na conservação do material quanto na sua extração. Isso porque um alto teor de umidade em matérias-primas vegetais acelera o processo de deterioração da mesma, degradando seus constituintes químicos e possibilitando a proliferação microbiana (FARIAS, 2003). As Farmacopéias preconizam teores de umidade na faixa de 8 a 14 % para as diferentes espécies de drogas vegetais.

O material vegetal utilizado apresentou 11,01 ± 0,007 % de perda por dessecação, conforme a Tabela 1.

TABELA 1: Perda por dessecação das folhas secas e moídas de *L. alba* após 5 dias

Verificação	Perda por dessecação (%)
1	11,01
2	11,02
3	11,01
média	11,01 ± 0,007 %

5.1.2. Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e das frações obtidas por partição

Esta análise foi realizada para a verificação de classes de constituintes químicos presentes no extrato bruto e em cada uma das 5 frações obtidas após a partição.

Este ensaio indicou a presença de polifenóis, taninos, triterpenos e/ou esteróides em todas as frações. Para saponinas o resultado foi duvidoso, bem como para flavonóides (em algumas frações). Estes resultados encontram-se resumidos no Quadro 7.

QUADRO 7: Resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e das frações após partição

Reação	EB	EP	CH_2Cl_2	AcOEt	n-BuOH	H_2O
Polifenóis	+	+	+	+	+	+
Flavonóides	+	-	+	?	?	+
Taninos	+	+	+	+	+	+
T. condensados	-	-	-	-	-	-
T. hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Triterpenos/esteróides	+	+	+	+	+	+
Esteróides	+	-	+	+	+	+
Desoxioses (Het. Card.)	+	-	-	+	+	-
Cardenolídeos	+	-	-	+	+	-
Saponinas	?	?	?	?	?	?

T. condensados = taninos condensados; T. hidrolisáveis = taninos hidrolisáveis; Het. Card. = heterosídeos cardiotônicos; EB = extrato bruto; + = resultado positivo; - = resultado negativo; ? = resultado duvidoso

5.2. Determinação do rendimento da extração e do fracionamento da fração n-butanólica

Partindo-se de uma quantidade conhecida de droga vegetal (840 g), utilizada no processo de maceração/ remaceração, foi possível calcular o rendimento do extrato bruto concentrado. Obteve-se 89,21 g deste extrato, ou seja, 10,62 % de rendimento em relação à quantidade de droga moída. Em seguida, o extrato bruto foi ressuspenso em 2800 ml de água e submetido à partição, conforme a Figura 3 (item 4.4.2.). Concentrando-se a fração n-BuOH até a secura, obteve-se 11,42 g desta fração, representando 1,36 % de rendimento em relação a droga moída.

5.3. Identificação das substâncias isoladas

Para a realização da purificação das substâncias da fração n-BuOH, utilizou-se sucessivas colunas cromatográficas no processo de fracionamento. Através desta metodologia, foi possível

o isolamento de 4 substâncias. Estas foram denominadas LA-1 a LA- 4, de acordo com a ordem crescente de polaridade. O perfil cromatográfico das 4 substâncias isoladas estão na Figura 5. O isolamento de cada uma das 4 substâncias está descrito no item 4.4.

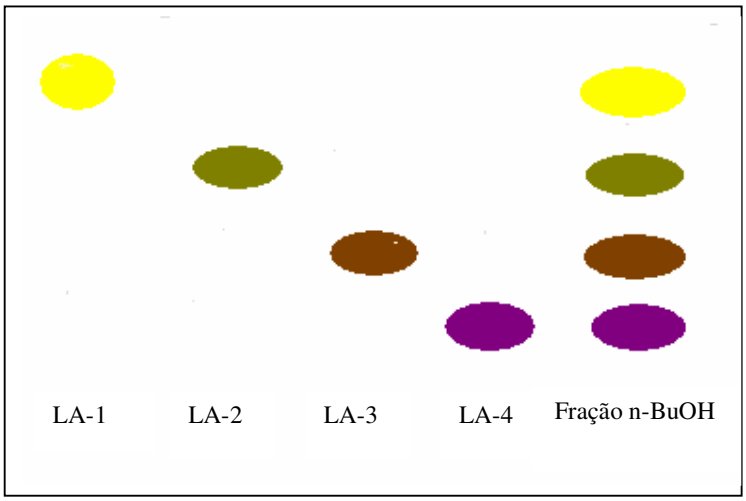


FIGURA 5: Representação esquemática do perfil cromatográfico das substâncias isoladas (em ordem crescente de polaridade: LA – 1 a LA - 4; eluente AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O: ác. acético 7: 1: 2: 5: 0,2; placas em sílica gel F_{254})

As substâncias LA-2 e LA-4 foram isoladas, porém não identificadas. Ambas foram submetidas à análises espectroscópicas de RMN, assim como LA-1 e LA-3, conforme o item 4.4.3.2. Contudo, em relação a substância LA-2, estão sendo aguardados os espectros de ressonância magnética nuclear para sua elucidação estrutural. Para a substância LA-4, através destas mesmas análises espectroscópicas, verificou-se que não se trata de uma substância purificada; dessa forma, deve-se primeiramente purificá-la através de CLAE para que então seja novamente submetida à espectroscopia.

5.3.1. Elucidação estrutural de LA-1

A substância LA-1 apresenta-se como uma mancha azul brilhante (Rf ~ 0,7) em CCD (AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O: ác. acético 7: 1: 2: 5: 0,2 – fase orgânica) quando visualizada sob luz UV em 365 nm, sendo que após a detecção com NP/ PEG, não sofre alteração de cor. Considerando a quimiotaxonomia do gênero, poderia tratar-se de um fenilpropanóide, ou um flavonóide (WAGNER; BLADT, 1996).

Devido a hipótese de tratar-se de um flavonóide, realizou-se experimentos de espectroscopia UV; neste experimento, apresentou absorções em λ_{max}= 332; 291; 245 e 220 nm (metanol). De forma similar aos flavonóides, aplicando-se reativos de deslocamento, apresentou um comportamento típico de substância que tem hidroxilas em posição orto em anel aromático (CORNARD; BOUDET; MERLIN, 2001). Além disso, a solução metanólica apresenta bandas de absorção entre 230 – 330 nm (Quadro 8), indicando a presença de composto fenólico com ligação insaturada fora do anel fenólico (OWEN et al., 2003).

Os dados obtidos com reativos de deslocamento estão apresentados no Quadro 8 e na Figura 6. A metodologia aplicada nos espectros de UV encontra-se descrita no item 4.4.3.1.

QUADRO 8: $\lambda_{máx}$ apresentados por LA-1 no espectro de UV, empregando-se os reativos de deslocamento, segundo Mabry, Markhan e Thomas (1970)

Sol. MeOH + reativos	Banda II (nm)	∇	Banda IIa (nm)	∇	Banda I (nm)	∇	Banda Ia (nm)	∇
MeOH	~ 220		~245		291		332	
NaOMe	240		~265	+ 20	300	+ 9	382	+ 50
$AlCl_3$	~ 230	+ 10	~270	+ 25	300	+ 9	362	+ 30
$AlCl_3$ + HCl	220		240	- 5	290		330	
NaOAc	220		245		291		332	
NaOAc + H_3BO_3	220		260	+ 15	296	+ 5	353	+ 21

De acordo com o Quadro 8 e a Figura 6, observa-se que após a adição de metóxido de sódio (NaOMe) à solução metanólica, ocorreu um desvio bactocrômico de 50 nm para a banda Ia, sem diminuição da intensidade, indicando a presença de grupo 4' – OH em anel aromático.

A adição de $AlCl_3$ produziu um desvio bactocrômico de 30 nm para a mesma banda; sendo acrescida de $AlCl_3$/ HCl reproduziu os espectros originais. Ambos comportamentos são indicativos ainda, da presença de 3' – OH.

A modificação ocorrida, ainda para a banda Ia, após adição de acetato de sódio/ ácido bórico (NaOAc/ H_3BO_3) confirma a presença de grupos orto - diOH na estrutura (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970).

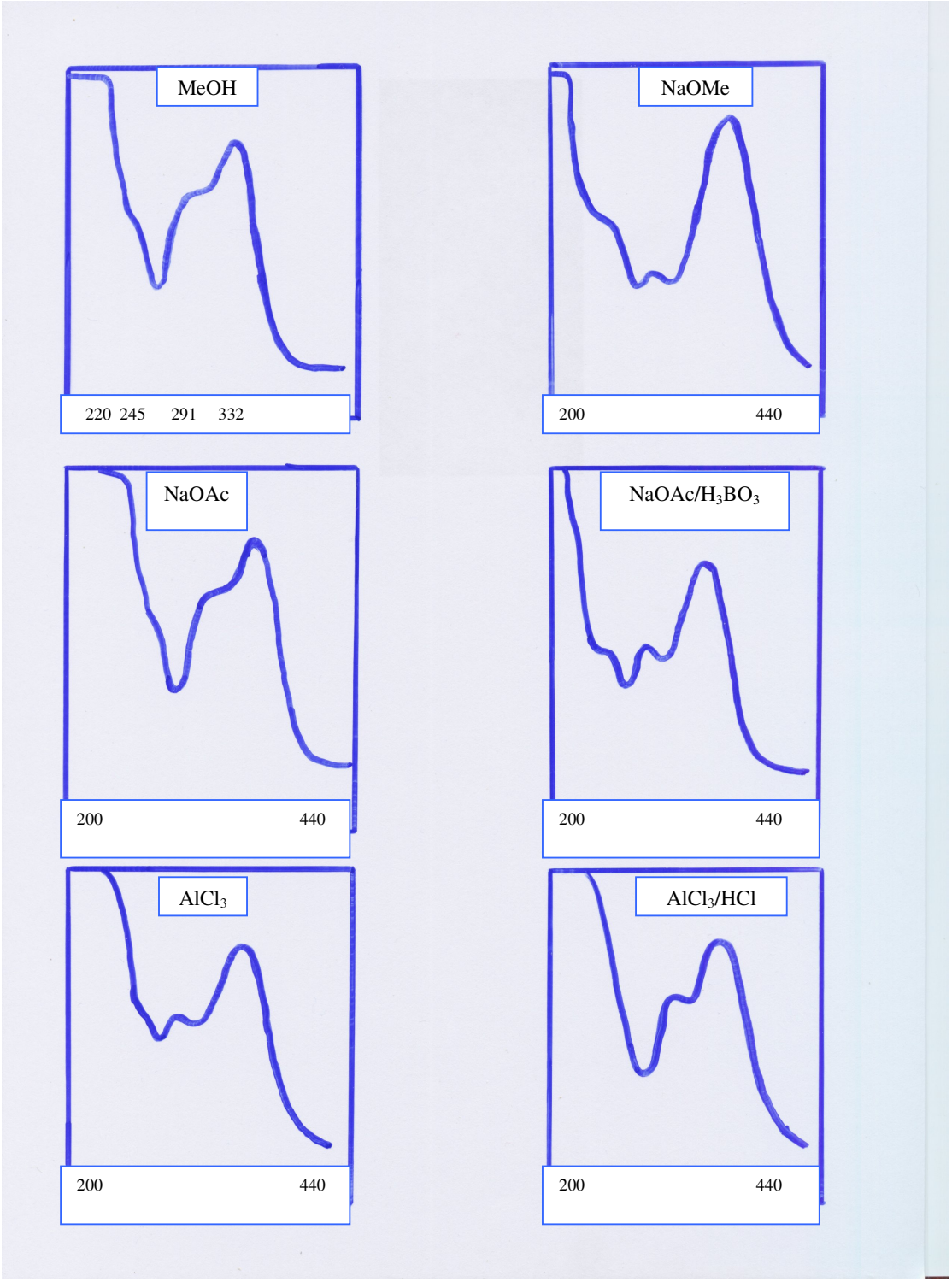


FIGURA 6: Representação esquemática do espectro de UV apresentado para a solução metanólica da substância LA-1 e empregando-se os reativos de deslocamento

Através dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C e de H – H COSY e C – H HETCOR, foi possível caracterizar os átomos de carbono e hidrogênio que compõem a estrutura da substância LA-1 e atribuir os deslocamentos químicos de cada carbono e dos prótons correspondentes aos carbonos primários, secundários e terciários. Pelos espectros de correlação foram observadas as conectividades entre prótons vizinhos (H – H COSY) e as conectividades entre carbonos e seus respectivos prótons (C – H HETCOR), conforme as Figuras 11 e 12, respectivamente. Dessa forma, foi possível verificar que a estrutura era incompatível com a estrutura de um flavonóide; sobretudo a observação da presença de dois carbonos alifáticos foi decisivo para a elucidação de uma estrutura não flavonoídica (Quadro 9 e Figura 7).

Na Figura 8 pode ser observado o espectro totalmente desacoplado de RMN ^{13}C da substância LA-1, onde a caracterização de cada átomo de carbono da molécula foi possível com a análise dos espectros DEPT 135 (Figura 9) e DEPT 90 (Figura 10).

Na Figura 8a pode-se observar os sete sinais de carbonos quaternários presentes na molécula, sendo que seis destes (em δ 125,60; δ 129,28; δ 143,74; δ 145,19; δ 145,83; δ 148,83) encontram-se na região de átomos de carbono em anel aromático e o último (em δ 165,86) na região de carbono carbonílico. Todos os sinais correspondentes à carbonos quaternários foram confirmados pelo espectro C –H HETCOR (Figura 12), que não apresentou hidrogênios correlacionados à estes carbonos.

Na Figura 8b estão destacadas as regiões onde encontram-se todos os carbonos da molécula. Em campo alto, observa-se um sinal correspondente à uma metila (em δ 18,30) e um sinal de carbono secundário (em δ 35,17). Deslocados para campo baixo, encontram-se primeiramente nove sinais na região de carbonos ligados à átomos eletronegativos: dois de carbonos secundários (em δ 60,90 e δ 70,40) e sete de carbonos terciários (entre δ 68,87 e δ 79,22); deslocados para campo mais baixo, encontram-se mais dois sinais de carbonos terciários (em δ 101,35 e δ 102,46), típicos de carbonos anoméricos de moléculas de açúcar. Considerando-se os sinais na região de carbonos ligados à átomos eletronegativos e os dois sinais de carbonos anoméricos, percebe-se que a substância LA-1 apresenta duas moléculas diferentes de açúcar. Finalmente, em campo ainda mais baixo, está destacada a região de carbonos em anel aromático ou pertencentes à ligação insaturada (entre δ 113,66 e δ 145,73), bem como o sinal em δ 165,86, referente à um carbono carbonílico.

No espectro DEPT 135 (Figura 9) observa-se em campo alto: o sinal correspondente à metila, voltado para cima (em δ 18,30) e um sinal de carbono secundário, voltado para baixo (em δ 35,17); em campo baixo, na Figura 9a, observa-se ainda os outros dois sinais de carbonos secundários, também voltados para baixo (em δ 60,78 e δ 70,37). Na Figura 9b, estão destacados ainda os dezoito sinais de carbonos terciários, divididos de acordo com a região em que aparecem: entre δ 68,87 e δ 79,22, pertencentes à moléculas de açúcar; em δ 101,35 e δ 102,46, ambos referentes à carbonos anoméricos; entre δ 113,66 e δ 121,54, pertencentes à anéis aromáticos; em δ 145,73, referente à um carbono em ligação insaturada.

No espectro DEPT 90 (Figura 10), confirma-se os sinais referentes aos carbonos terciários.

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado mostra a existência de 31 carbonos, sendo que 2 destes são referentes à acetila presente no solvente utilizado para isolamento da substância; aparecem em δ 21,53 (CH_3) e δ 172,45 (CO). Sendo assim, a substância apresenta 29 átomos de carbono, os quais puderam ser caracterizados conforme o Quadro 9.

QUADRO 9: Caracterização dos carbonos de LA-1, de acordo com os dados do espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado

Carbono	$-CH_3$	$-CH_2-$	-CH<	-C-
∑= 29	01	03	18	07

A partir do espectro de correlação C – H HETCOR (Figura 12), foi possível identificar os prótons ligados aos carbonos da molécula, caracterizar os sinais referentes a cada próton e verificar possíveis sobreposições de sinais no espectro de RMN ^{1}H (Figura 13). Além disso, este espectro possibilitou a identificação dos prótons referentes aos carbonos secundários, que apresentam deslocamentos químicos diferenciados, podendo-se ainda atribuir os valores de seus deslocamentos. Portanto, este espectro de correlação foi determinante para a elucidação da estrutura, já que permitiu localizar as posições corretas dos prótons no espectro de RMN ^{1}H (Figura 13), que constitui a base para a análise da conectividade molecular, confirmada pela análise do espectro H – H COSY (Figura 11).

Na Figura 12a estão caracterizados todos os sinais de carbonos conectados à hidrogênios. Na Figura 12b estão destacadas as regiões onde encontram-se os carbonos conectados à

hidrogênios: em campo alto, entre δ 18,30 e δ 35,17; em campo baixo, entre δ 60,90 e δ 102,46 (na região de moléculas de açúcar, destacando-se ainda os sinais referentes aos carbonos anoméricos, deslocados para campo mais baixo em relação aos demais sinais da mesma região); em campo mais baixo, entre δ 113,66 e δ 121,54 (na região de carbonos pertencentes à ligação insaturada ou à anéis aromáticos); em campo ainda mais baixo, em δ 145,73 (um sinal referente à ligação insaturada).

O espectro de H – H COSY (Figura 11) forneceu informações importantes sobre a conectividade entre prótons vizinhos, permitindo a construção de porções da estrutura da molécula. Na Figura 11 está destacada a região de prótons pertencentes à moléculas de açúcar (entre δ 3,10 e δ 5,03, além do sinal correspondente à metila, deslocado para campo alto, em δ 18,30) e, em campo mais baixo, a região de prótons pertencentes à carbonos insaturados ou em anéis aromáticos (entre δ 6,17 e δ 7,43).

Em relação ao espectro de RMN ^{1}H (Figura 13), na Figura 13a estão caracterizados todos os sinais de prótons da molécula; na Figura 13b destaca-se os sinais em campo alto (em δ 0,95, correspondente aos prótons da metila e em δ 2,70, típico de carbono secundário ligado à anel aromático), e os sinais em campo baixo, na região de prótons pertencentes à moléculas de açúcar (entre δ 3,10 e δ 5,03), bem como aqueles na região de prótons em anéis aromáticos ou pertencentes à carbonos insaturados (entre δ 6,17 e δ 7,43).

Através dos espectros de correlação pôde-se construir uma molécula que pode ser dividida em quatro porções: 1) porção cafeica – 9 átomos de carbono entre δ 113,66 e δ 165,86, sendo que: 4 deles (δ 125,60; δ 145,83; δ 148,83; δ 165,86) não apresentam hidrogênios correlacionados, tratando-se portanto de carbonos quaternários que, de acordo com seus valores de deslocamento químico são, respectivamente: carbono em anel aromático, carbonos ligados à hidroxilas e em anel aromático e carbono carbonílico; 5 átomos (entre δ 113,66 e δ 145,73) correlacionados com hidrogênios que aparecem como dupletes, entre δ 6,17 e δ 7,43, ou seja, em campo bem baixo, na região de aromáticos, insaturados e carbonílicos; 2) glicose – 6 átomos de carbono entre δ 60,90 e δ 102,46, correlacionados a átomos de hidrogênio que aparecem entre δ 3,19 e δ 4,71 (correlações e multiplicidades: Quadro 10), ou seja, na região de carbonos ligados a átomos eletronegativos; 3) ramnose – 6 átomos de carbono entre δ 18,30 e δ 101,35, correlacionados a átomos de hidrogênio que aparecem entre δ 0,95 e δ 5,03 (correlações e multiplicidades: Quadro 10), ou seja, também em campo baixo, também na região de carbonos

ligados a átomos eletronegativos (com exceção da metila, que aparece em campo alto, em δ 18,30, correlacionada com átomos de hidrogênio que aparecem em δ 0,95 como um duplete); 4) aglicona – 8 átomos de carbono entre δ 35,17 e δ 145,19, sendo que: 3 deles (δ 129,28; δ 143,74; δ 145,19) não apresentam hidrogênios correlacionados, tratando-se portanto de carbonos quaternários que, de acordo com seus valores de deslocamento químico são, respectivamente: carbono em anel aromático e carbonos ligados à hidroxilas e em anel aromático; 5 átomos (entre δ 35,17 e δ 119,67) correlacionados com hidrogênios que aparecem entre δ 2,70 e δ 6,62 (correlações e multiplicidades: Quadro 10).

Sendo assim, através dos espectros analisados, foi atribuída para a substância LA-1 a estrutura do fenilpropanóide denominado verbascosídeo (Figura 7). Esta estrutura foi confirmada comparando-se os valores de deslocamento químico dos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^{1}H com dados da literatura (ANDARY et al., 1982).

Na Figura 7 estão destacadas as porções da molécula que foram confirmadas pelo espectro de ultra-violeta: a presença de anéis aromáticos; hidroxilas em posições orto nestes mesmos anéis (posições 3' e 4'); ligação insaturada fora de anel fenólico. Além disso, destaca-se o carbono carbonílico da molécula. O espectro de UV apresentado pela substância está de acordo com as bandas apresentadas pelo derivado do ácido cafeico denominado verbascosídeo, conforme a literatura (OWEN et al., 2003).

Este fenilpropanóide apresenta diversas atividades farmacológicas. Por tratar-se de um composto fenólico com grupamento orto-dihidroxi, apresenta atividade antioxidante bastante significativa, além de atividade antiinflamatória (itens 3.2. e 3.2.1.). Dentre outras atribuições, é ainda um agente hepatoprotetor, cardiotônico e antibacteriano (item 3.2.1.).

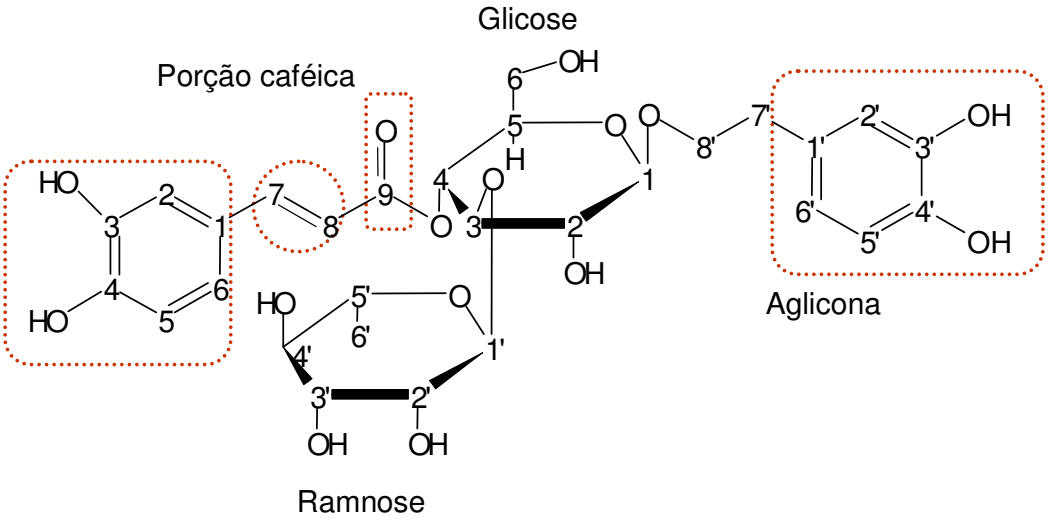


FIGURA 7: Estrutura do verbascosídeo

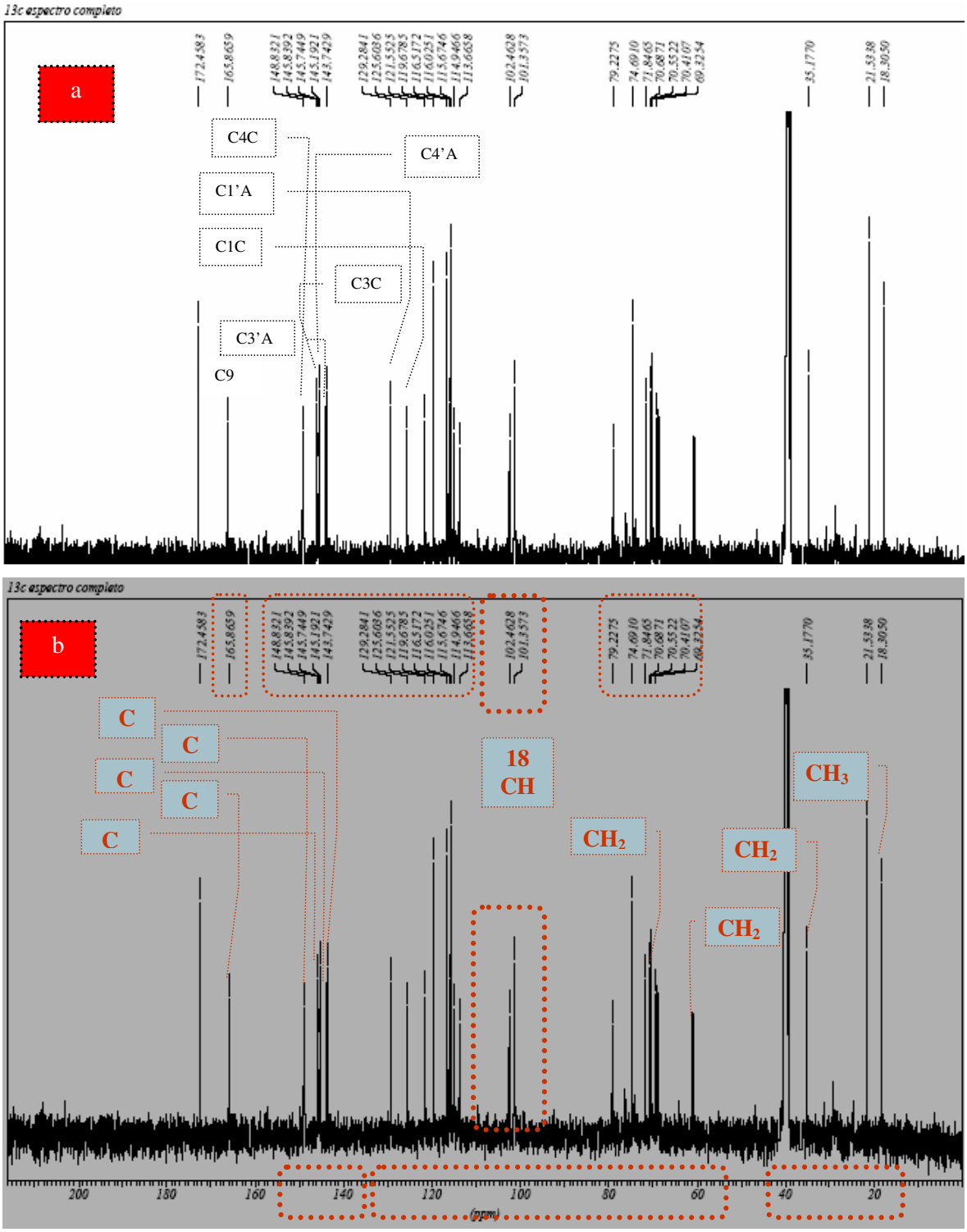


Figura 8: Espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado da substância LA-1 em DMSO-d_6

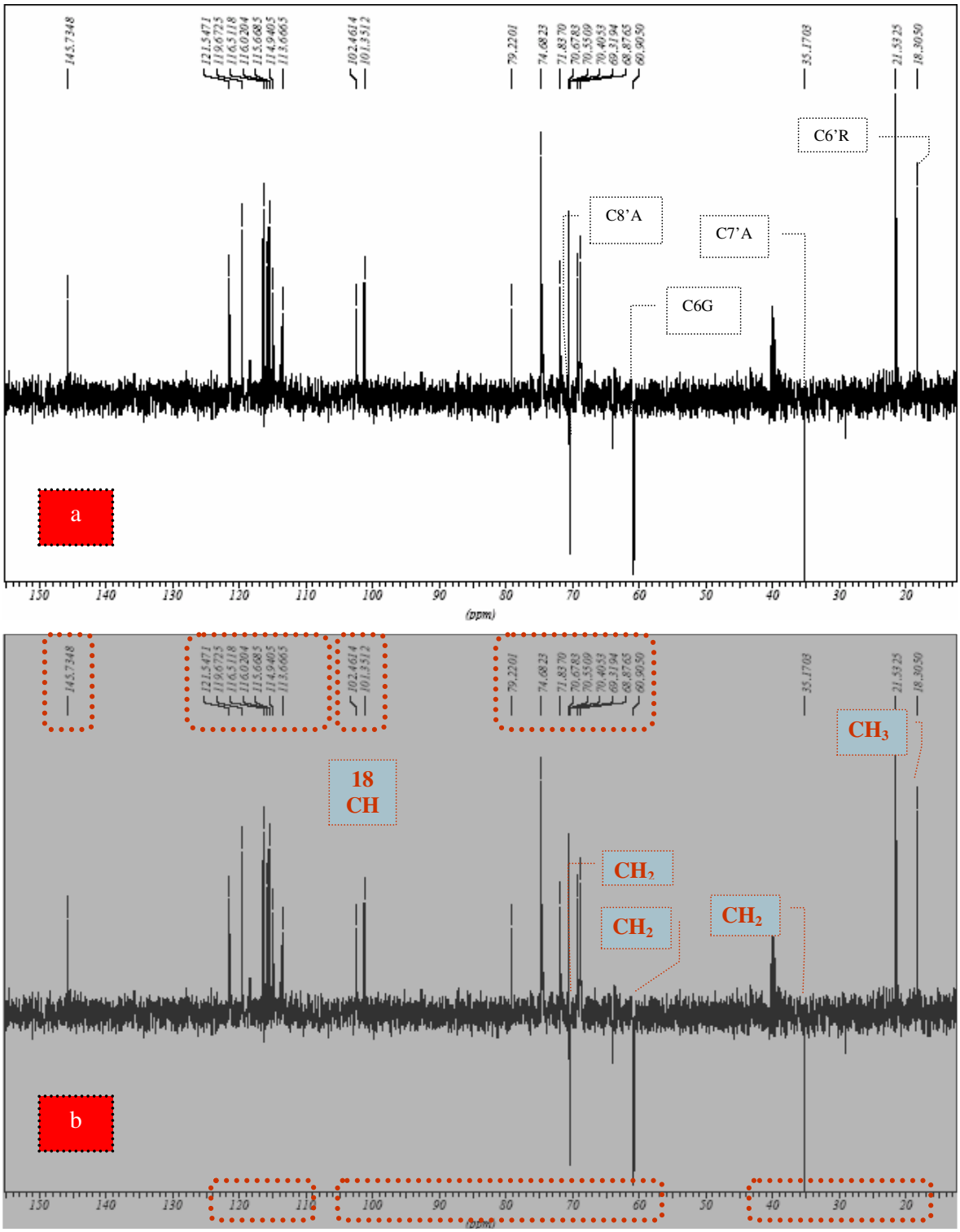


Figura 9: Subespectro DEPT 135° da substância LA-1 em DMSO-d_6

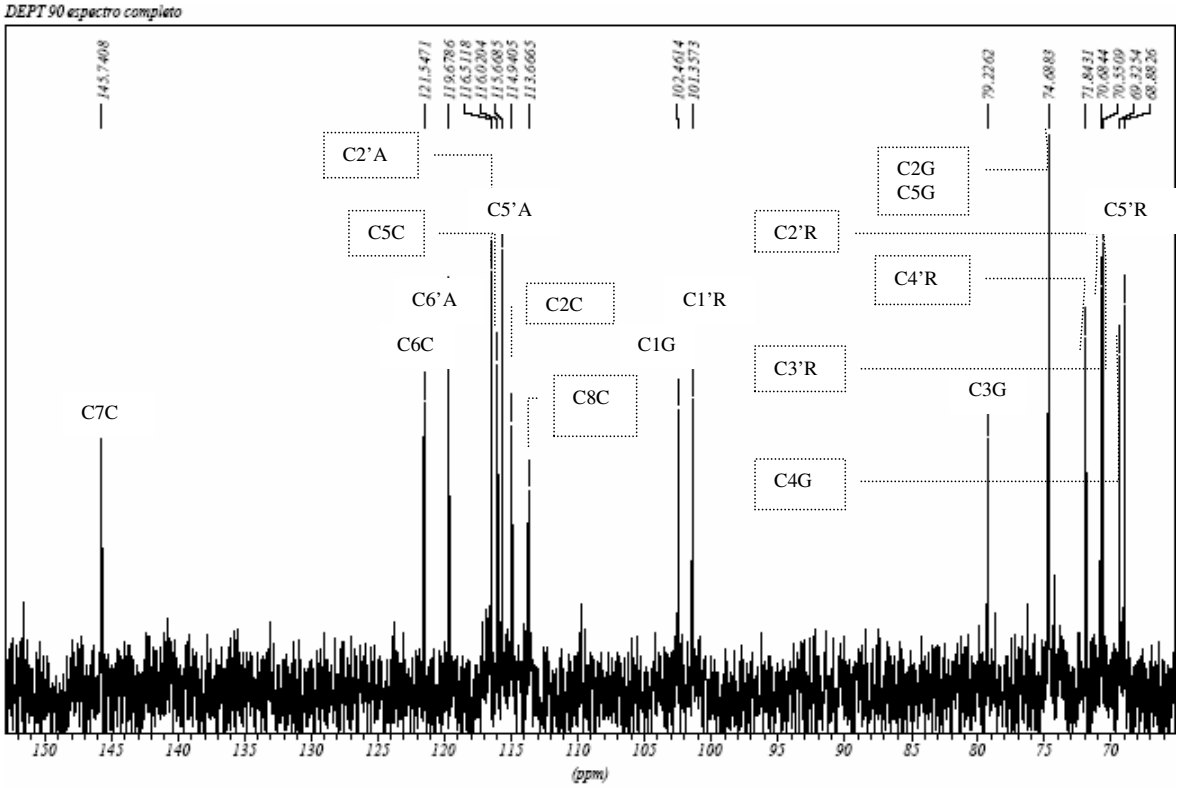


FIGURA 10: Subespectro DEPT 90° de LA-1

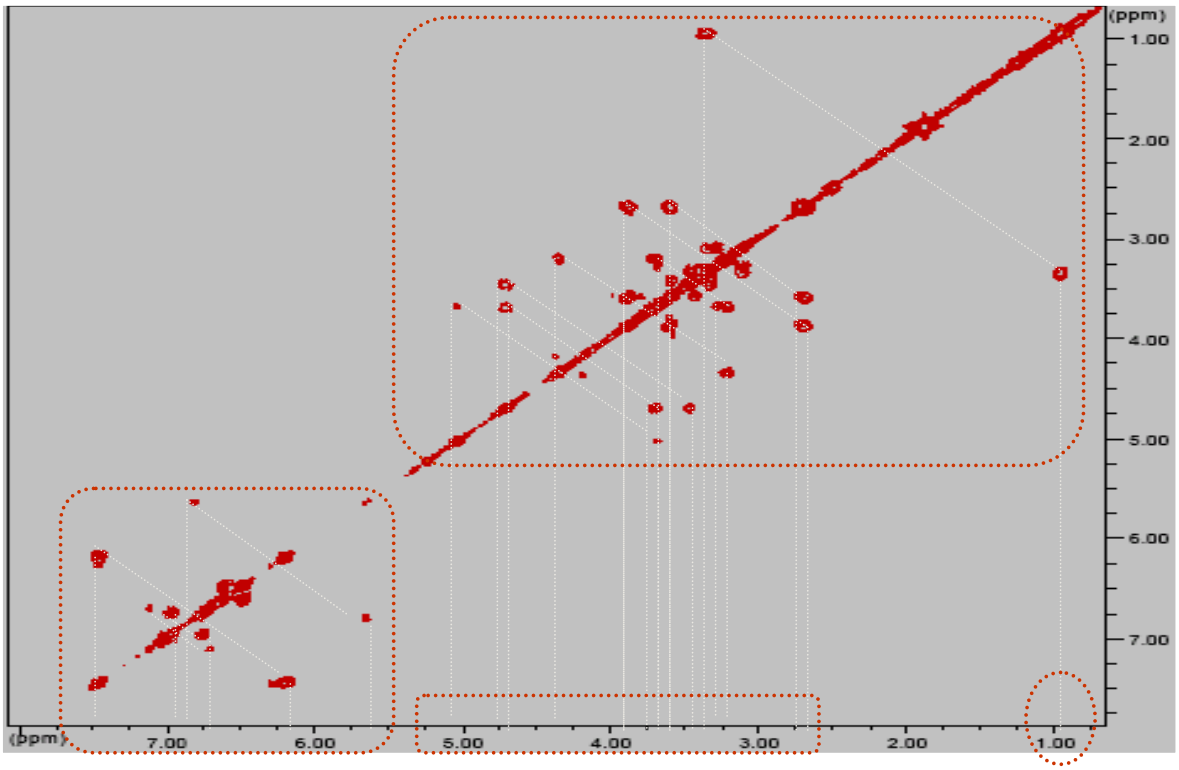


Figura 11: Espectro de RMN H-H COSY da substância LA-1 em DMSO-d_6

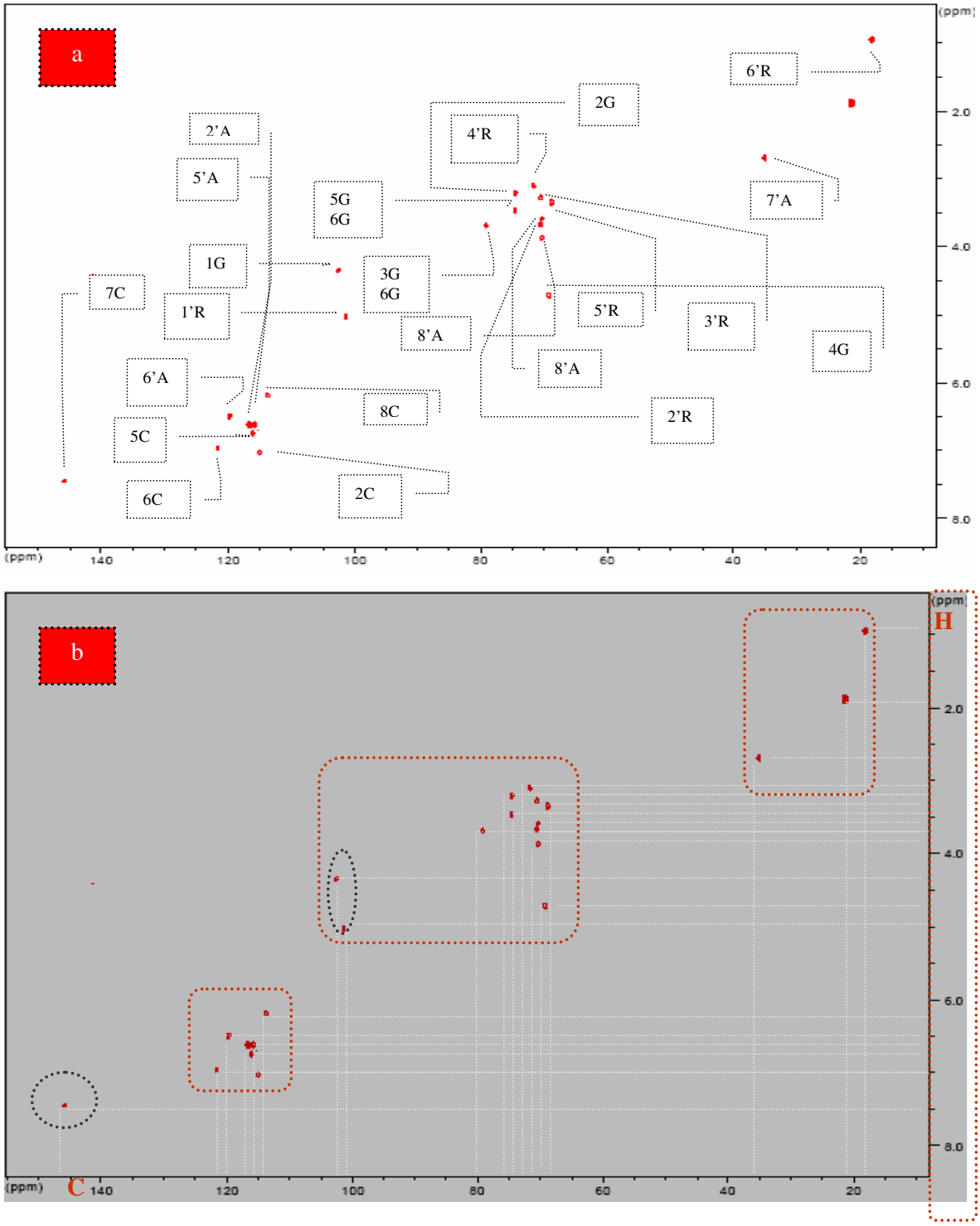


FIGURA 12: Espectro de correlação C – H HETCOR (400 – 100 MHz) da substância LA-1

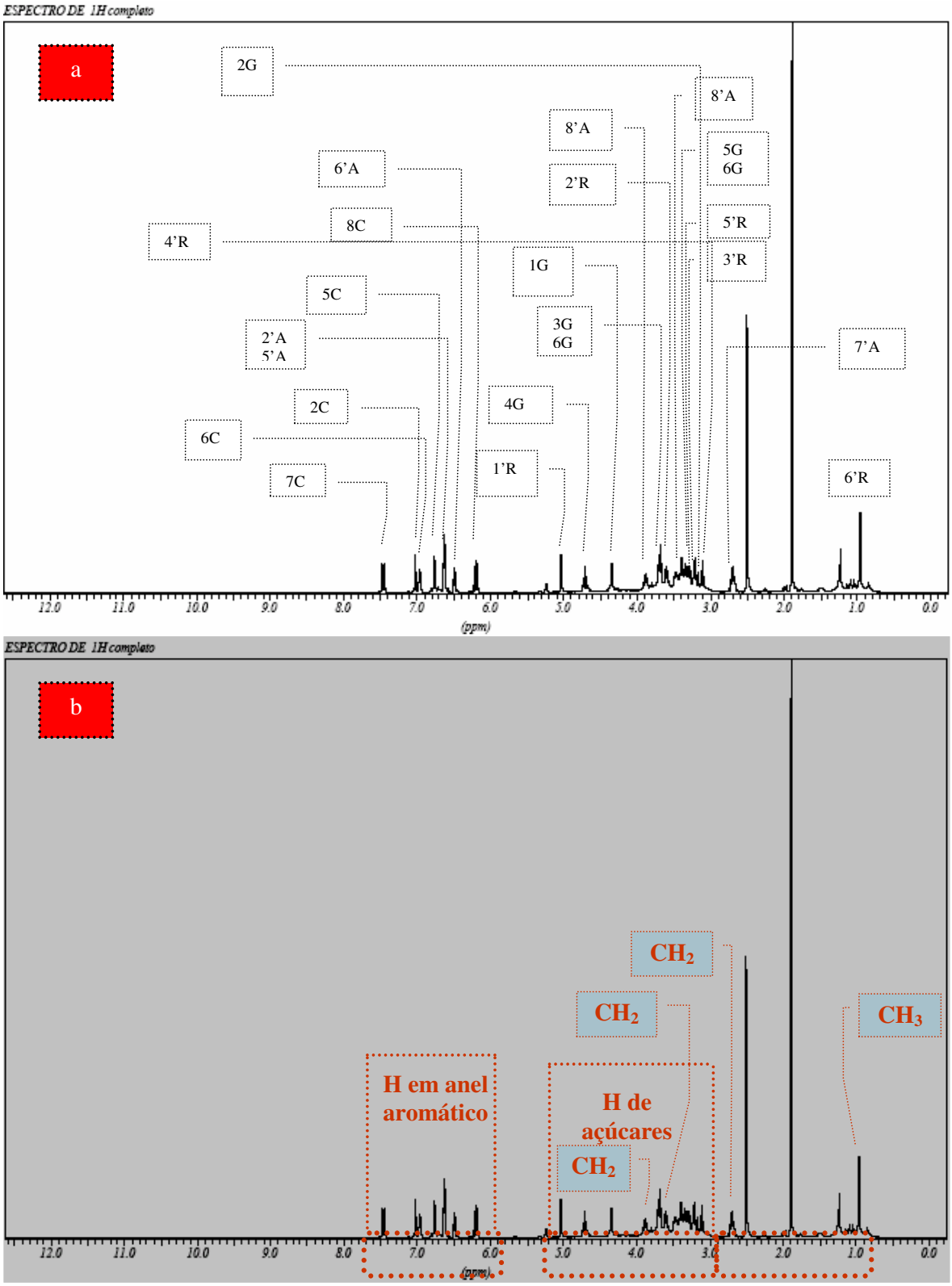


FIGURA 13: Espectro de RMN ^{1}H da substância LA-1 em DMSO-d_6 a 400 MHz

QUADRO 10: Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H em DMSO-d_6, para a substância LA – 1 (verbascosídeo)

C	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C	DEPT	RMN ^{1}H	RMN ^{1}H
Aglicona	LA -1	VERBASCOSÍDEO[1]		VERBASCOSÍDEO[1]	LA-1
1'A	129,28	129,31	C	-	-
2'A	116,51	116,39	CH	6,62	6,62
3'A	145,19	145,04	C	-	-
4'A	143,74	143,58	C	-	-
5'A	115,66	115,52	CH	6,48 d	6,62 d
6'A	119,67	119,65	CH	6,62 d	6,49 d
7'A	35,17	35,07	CH_2	2,72 m	2,70 dd
8'A	70,40	70,37	CH_2	3,60 m; 3,88 m	3,57 m; 3,87 dd

C	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C	DEPT	RMN ^{1}H	RMN ^{1}H
Porção cafeica	LA-1	VERBASCOSÍDEO[1]		VERBASCOSÍDEO[1]	LA-1
1C	125,60	125,62	C	-	-
2C	114,94	114,70	CH	7,00	7,01
3C	145,83	145,64	C	-	-
4C	148,83	148,53	C	-	-
5C	116,02	113,68	CH	6,74 d	6,74 d
6C	121,54	121,54	CH	6,93 d	6,97 d
7C	145,73	145,64	CH	7,43 d	7,43 d
8C	113,66	115,86	CH	6,18 d	6,17 d
9C	165,86	165,81	C	-	-

C	RMN ^{13}C LA-1	RMN ^{13}C VERBASCOSÍDEO[1]	DEPT	RMN ^{1}H VERBASCOSÍDEO[1]	RMN ^{1}H LA-1
Glicose-1G	102,46	102,44	CH	4,33 d	4,34 d
2G	74,68	74,61	CH	3,22 dd	3,19 dd
3G	79,22	79,18	CH	3,70 t	3,72 t
4G	69,31	69,18	CH	4,72 t	4,71 t
5G	74,68	74,61	CH	3,45 m	3,45 m
6G	60,90	60,78	CH_2	3,45 m 3,70 m	3,45 m 3,72 t
Ramnose-1'R	101,35	101,25	CH	5,03 d	5,03 d
2'R	70,67	70,61	CH	3,70 dd	3,68 dd
3'R	70,55	70,52	CH	3,30 dd	3,27 dd
4'R	71,83	71,80	CH	3,12 t	3,10 t
5'R	68,87	68,82	CH	3,36 m	3,35 m
6'R	18,30	18,18	CH_3	1,01 d	0,95 d

[1] ANDARY et al., 1982.

5.3.2. Elucidação estrutural de LA-3

A substância LA-3 apresenta-se como uma mancha azul (Rf ~ 0,3) em CCD (AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O: ác. acético 7: 1: 2: 5: 0,2 – fase orgânica) quando visualizada sob luz UV em 254 nm após revelação com vanilina sulfúrica. Contudo, não ocorre fluorescência quando observada sob luz UV em 365 nm.

Através dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 15), RMN ^{1}H (Figura 19), C – H HETCOR (Figura 18), H – H COSY (Figura 22) e H – H RCT (Figura 23), foi possível caracterizar os átomos de carbono e hidrogênio que compõem a estrutura da substância LA-3 e atribuir os deslocamentos químicos de cada carbono e dos prótons correspondentes aos carbonos primários, secundários e terciários. Pelos espectros de correlação foram observadas as conectividades entre carbonos e seus respectivos prótons (C – H HETCOR; Figura 18) e entre prótons vizinhos (H – H COSY; Figura 22 e H – H RCT; Figura 23).

Na Figura 15 pode ser observado o espectro totalmente desacoplado de RMN ^{13}C da substância LA-1, onde a caracterização de cada átomo de carbono da molécula foi possível com a análise dos espectros DEPT 90 (Figura 16) e DEPT 135 (Figura 17).

Na Figura 15a pode-se observar os oito sinais de carbonos quaternários presentes na molécula, sendo que seis destes (em δ 32,00; δ 37,60; δ 40,70; δ 42,30; δ 43,50; δ 50,00) encontram-se na região de carbonos saturados, sem átomos eletronegativos; um deles (em δ 145,00) encontra-se na região de carbono pertencente à ligação insaturada e o último (em δ 175,50) na região de carbono carbonílico. Todos os sinais correspondentes à carbonos quaternários foram confirmados pelo espectro C –H HETCOR (Figura 18), que não apresentou hidrogênios correlacionados à estes carbonos.

Na Figura 15b estão destacadas as regiões onde encontram-se todos os carbonos da molécula. Em campo alto, observa-se sete sinais correspondentes à metilas (em δ 13,51; δ 16,65; δ 17,97; δ 18,12; δ 25,11; δ 27,29; δ 33,32); nove sinais de carbonos secundários (em δ 19,01; δ 24,49; δ 26,33; δ 31,86; δ 33,68; δ 36,41; δ 36,41; δ 39,59; δ 47,65); três sinais de carbonos terciários (em δ 42,10; δ 48,13; δ 48,41), além dos seis sinais de carbonos quaternários (em δ 32,00; δ 37,60; δ 40,70; δ 42,30; δ 43,50; δ 50,00). Deslocados para campo baixo, encontram-se primeiramente vinte e nove sinais na região de carbonos ligados à átomos eletronegativos: um de carbono terciário (em δ 67,13); quatro de carbonos secundários (em δ 62,72; δ 63,76; δ 65,18; δ

67,13) e vinte de carbonos terciários (entre δ 67,02 e δ 83,64); deslocados para campo mais baixo, encontram-se mais cinco sinais de carbonos terciários (em δ 94,00; δ 101,35; δ 102,50; δ 105,66; δ 106,54), típicos de carbonos anoméricos de moléculas de açúcar. Considerando-se os sinais na região de carbonos ligados à átomos eletronegativos e os dois sinais de carbonos anoméricos, percebe-se que a substância LA-3 apresenta cinco moléculas diferentes de açúcar. Finalmente, em campo ainda mais baixo, está destacada a região de carbonos pertencentes à ligação insaturada (em δ 123,69 e δ 145,00), bem como o sinal em δ 175,50, referente à um carbono carbonílico.

No espectro DEPT 90 (Figura 16), observa-se primeiramente, sinais de carbonos terciários em campo alto (em δ 42,10; δ 48,13; δ 48,41) e sinais em campo baixo (em δ 74,57 e δ 83,64), todos pertencentes à um esqueleto básico, bem como os sinais referentes aos carbonos anoméricos de açúcares (em δ 94,00; δ 101,35; δ 102,50; δ 105,66; δ 106,54), deslocados para campo mais baixo (Figura 16a). Na Figura 16b confirma-se todos os sinais referentes aos carbonos terciários.

No espectro DEPT 135 (Figura 17) observa-se os sinais referentes à carbonos secundários que encontram-se em campo alto, voltados para baixo (em δ 19,01; δ 24,49; δ 26,33; δ 31,86; δ 33,68; δ 36,41; δ 36,41; δ 47,65) na Figura 17a. Na Figura 17b, estão destacados os sete sinais de carbonos terciários que encontram-se em campo alto, voltados para cima, bem como os oito sinais de carbonos secundários que encontram-se na mesma região, mas voltados para baixo.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 15) totalmente desacoplado mostra a existência de 58 átomos de carbono, os quais puderam ser caracterizados conforme o Quadro 11.

QUADRO 11: Caracterização dos carbonos da substância LA-3 a partir do espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado

Carbono	$-CH_3$	$-CH_2-$	-CH<	-C-
∑= 58	08	13	29	08

O sinal em δ 36,41 no espectro ampliado de RMN ^{13}C (Figura 21) foi atribuído à dois sinais de carbonos diferentes, uma vez que nesta região do espectro há um sinal alargado para este valor. Além disso, ainda na Figura 21, observa-se que o mesmo sinal apresenta correlação com quatro prótons, o que caracteriza a ocorrência de dois sinais referentes à carbonos secundários.

A partir do espectro de correlação C – H HETCOR (Figura 18), foi possível identificar os prótons ligados aos carbonos da molécula, caracterizar os sinais referentes a cada próton e verificar possíveis sobreposições de sinais no espectro de RMN ^{1}H (Figura 19). Além disso, este espectro possibilitou a identificação dos prótons referentes aos carbonos secundários, que apresentam deslocamentos químicos diferenciados, podendo-se ainda atribuir os valores de seus deslocamentos. Portanto, este espectro de correlação foi determinante para a elucidação da estrutura, já que permitiu localizar as posições corretas dos prótons no espectro de RMN ^{1}H (Figura 19), que constitui a base para a análise da conectividade molecular, confirmada pela análise dos espectros H – H COSY (Figura 22) e H – H RCT (Figura 23).

Na Figura 18a estão caracterizados a maioria dos sinais de carbonos conectados à hidrogênios: os pertencentes à um esqueleto básico e os sinais de carbonos anoméricos de açúcares. Na Figura 18b estão destacadas as regiões onde encontram-se os carbonos conectados à hidrogênios: em campo alto, entre δ 13,51 e δ 50,00, destacando-se ainda o sinal em δ 36,41; em campo baixo, entre δ 62,72 e δ 106,54 (na região de carbonos ligados à átomos eletronegativos e de moléculas de açúcar, destacando-se ainda os sinais referentes aos carbonos anoméricos, deslocados para campo mais baixo em relação aos demais sinais da mesma região); em campo mais baixo, em δ 123,69 (na região de carbono pertencente à ligação insaturada).

Analisando-se os espectros de RMN ^{13}C (Figura 15), RMN ^{1}H (Figura 19) e os espectros de correlação, percebeu-se que a estrutura tratava-se de uma saponina triterpênica. No espectro de RMN ^{13}C, um sinal característico da ocorrência de carbonila (em δ 175,50), além dos valores atribuídos aos carbonos dos anéis D e E, de acordo com Mahato e Kundu (1994), sugere a ocorrência de ácido carboxílico glicosilado em C28. Para a estrutura básica de uma saponina triterpênica é possível observar correlações características em cada anel da molécula, que são interrompidas pela presença de carbonos quaternários (Cq). Em todos os anéis da substância LA-3 os grupos de correlações foram determinados a partir dos espectros H – H COSY (Figura 22) e H – H RCT (Figura 23). Dessa forma, através deste espectro de correlação, foi possível determinar a localização da maioria dos prótons da aglicona, que pelo espectro C – H HETCOR

(Figura 18) permitiu inferir sobre os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos ligados à estes prótons (Figura 24).

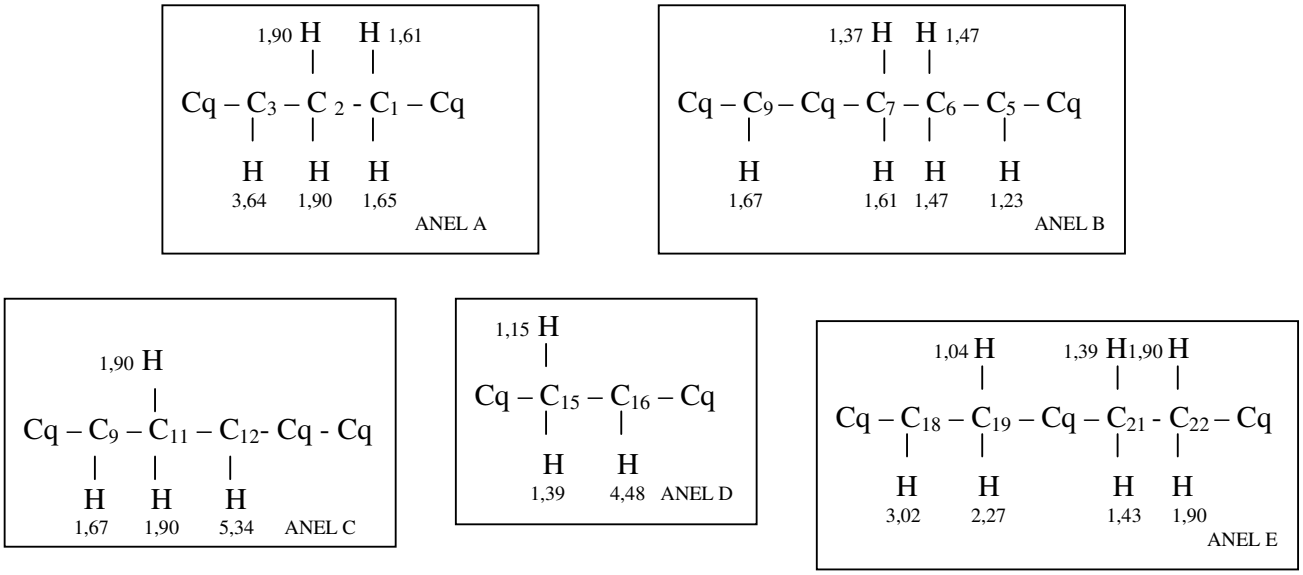


Figura 24: Grupos de correlações observadas nos espectros H – H COSY e H – H RCT entre os prótons de cada anel da aglicona

As agliconas de saponinas apresentam várias unidades $–CH_2-$ que se repetem, o que torna difícil a determinação destas unidades. Graças ao espectro C – H HETCOR (Figura 18) foi possível determinar o número de prótons que aparecem no espectro de RMN ^1H (Figura 19), mesmo nos casos onde encontram-se sobrepostos; esta determinação é fundamental, já que o espectro de RMN ^1H constitui a base para a análise da conectividade molecular observada no espectro H – H COSY (Figura 22). Através dos espectros H – H COSY (Figura 22) e H – H RCT (Figura 23) foi possível observar as correlações pertinentes aos prótons que ressonam em campo mais baixo, que geralmente correspondem aos prótons de moléculas de açúcares, e aos prótons próximos a grupos eletronegativos como hidroxilas e ligações insaturadas; em campo mais alto estão os prótons referentes à metilas e aos carbonos secundários. Apesar da sobreposição da maioria dos sinais dos prótons de carbonos secundários, todos os prótons da molécula foram determinados, já que o espectro C – H HETCOR permitiu localizar as suas posições corretas no espectro RMN ^1H, que foram confirmadas pela análise de correlação no espectro H – H COSY.

Estes espectros indicam tratar-se de uma saponina triterpênica pentacíclica, com uma ligação dupla, um grupamento carboxílico e três carbonos ligados à oxigênio (Figura 13; Quadro

12). Neste grupo de triterpenos, os de ocorrência mais freqüente em plantas são os derivados oleanan-12-eno e ursan-12-eno (ATHAYDE, 1993).

O espectro de RMN ^{1}H (Figura 19a) mostra a existência de oito sinais correspondentes às metilas (δ 0,72; δ 0,77; δ 0,87; δ 0,96; δ 0,99; δ 1,23; δ 1,29 δ 1,37), sendo que seis deles eram pertencentes à aglicona, que aparecem como singletes (com exceção dos sinais em δ 1,23 e δ 1,29, que aparecem como dupletos, pertencentes respectivamente, à ramnose 2 e à ramnose). Ainda na Figura 19a, observa-se todos os sinais de prótons pertencentes ao esqueleto básico, bem como aqueles referentes aos prótons de carbonos anoméricos.

A ocorrência de vários sinais sobrepostos, observados neste mesmo espectro de RMN ^{1}H, é característico de um heterosídeo triterpênico do tipo oleano (MAHATO; KUNDU, 1994).

Na Figura 19b observa-se em campo alto os oito sinais de prótons pertencentes à metilas, bem como nove sinais de prótons de carbonos secundários e três de carbonos terciários; deslocados para campo baixo, encontram-se os sinais de prótons pertencentes à moléculas de açúcar ou ainda três sinais de prótons pertencentes à carbonos ligados à átomos eletronegativos, que constituem o esqueleto básico (em δ 3,36; δ 3,62; δ 3,64).

As Figuras 20a, 20b e 20c são ampliações da região de prótons em campo baixo, do espectro de RMN ^{1}H. Observa-se nestas Figuras os sinais referentes aos prótons de moléculas de açúcares, bem como alguns sinais referentes à prótons do esqueleto básico, que encontram-se em campo baixo por estarem ligados à átomos eletronegativos. Os sinais que correspondem à prótons do esqueleto básico estão destacados nestas Figuras.

A Figura 20d também é uma ampliação da região de prótons em campo baixo, do mesmo espectro. Pode-se observar os cinco prótons de carbonos anoméricos, o último sinal de próton pertencente ao esqueleto básico em δ 4,48 e um sinal em δ 5,34, característico de próton na posição 12 de esqueleto oleano (confirmado pelos sinais em δ 123,69 - correspondente ao C12 - e em δ 145,00 - correspondente ao C13 - ambos no espectro de RMN ^{13}C).

Estes valores de deslocamento no espectro de RMN ^{13}C (em δ 123,69 e δ 145,00) neste tipo de estrutura confirmam a presença de um esqueleto do tipo oleanan-12-eno, pois o carbono 12 é blindado (cerca de 2 ppm), enquanto o carbono 13 é desblindado (cerca de 5 ppm) nas séries oleanan-12-eno em relação às séries ursan-12-eno (ATHAYDE, 1993).

Uma análise detalhada dos valores de deslocamento dos carbonos 3, 4 e 5, bem como dos valores dos cabonos 23 e 24 é de grande valor diagnóstico na definição da conformação da

hidroxila ligada ao C3, bem como do carbono portador do grupamento CH_2-OH. As posições dos carbonos 4 e 5 são afetadas pela configuração da hidroxila em C3 e pela presença do grupamento hidroxila em C23 ou C24.

No caso da configuração 3-β-OH (equatorial), a mais comum em triterpenos, devido ao grupamento β-hidroximetila em C4-axial, ou seja, devido ao C24, os valores dos carbonos 4 e 5 são deslocados para campo mais baixo em relação aos sinais observados para estes mesmos carbonos quando o grupamento hidroximetila está em α-equatorial, ou seja, no C23 (SIDDIQUI et al., 1990).

A presença de um grupo CH_2-OH é evidenciada no espectro de RMN ^{13}C pelo sinal característico em δ 65,18 de um carbono secundário ligado à um grupamento hidroxila. Esta substituição foi localizada no C4 da aglicona, que apresentou sinal em δ 43,50, pois nas saponinas derivadas do ácido oleanólico (ou ursólico), quando este carbono encontra-se substituído por um grupo CH_2-OH (no lugar de um grupo $–CH_3$), o seu sinal no espectro de RMN ^{13}C desloca cerca de 5 ppm para campo mais baixo, conforme a literatura (TAKETA, 1997; COREA et al., 2004).

Esta substituição ocorre no C23 (e não no C24) porque o sinal do C5 aparece em δ 48,4. Se a substituição estivesse no C24, o sinal do C5 estaria deslocado também para campo mais baixo (apareceria em torno de δ 55) (ATHAYDE, 1993; TAKETA, 1997).

Além disso, o posicionamento do substituinte em C23 (posição α em relação ao C4) é evidenciado ainda pela correlação do H23a (δ 3,36) com o H5 (δ 1,23), observada nos espectros H – H COSY (Figura 22) e H – H RCT (Figura 23).

A informação sobre a posição da hidroxila foi obtida ainda, analisando-se uma metila em campo mais alto (δ 13,51) do que o usualmente encontrado para derivados dos ácidos oleanólico e ursólico (cerca de δ 15,7 e δ 16,7). Esta metila em campo mais alto pode ser atribuída ao C24 (posição β ao C4), já que o deslocamento esperado para uma metila em C23 (α ao C4), seria de cerca de 10 ppm para campo mais baixo.

Dessa forma, confirma-se que o grupamento 4-hidroximetila, cujo deslocamento é de δ 65,18 está na posição α em relação ao C4, correspondendo ao C23. A colocação da hidroximetila nesta posição, por compressão estérica afeta a posição do C5, causando um deslocamento do mesmo para campo mais alto (SIDDIQUI et al., 1990).

O sinal que ocorre em δ 48,41 é característico de aglicona do ácido oleanólico (ou ursólico) com substituinte hidroxila em C4; agliconas de saponinas triterpênicas sem substituintes hidroxila em C4 aparecem em torno de δ 55 (SIDDIQUI et al., 1990).

Os espectros de H – H COSY (Figura 22) e H – H RCT (Figura 23) foram decisivos para a definição das seqüências dos prótons referentes aos açúcares. Normalmente, a porção açúcar encontra-se ligada na aglicona de saponinas formando uma ligação tipo éter na hidroxila do C3, ou esterificada no grupo carboxílico do C28. Independentemente do tipo de açúcar, quando está ligado ao C28, ocorre um deslocamento químico característico deste carbono de aproximadamente 4 ppm para campo mais alto (δ 176), que quando livre apresenta deslocamento químico em torno de δ 180. A substância LA-3 apresenta um sinal no RMN ^{13}C em δ 175,50 característico portanto, da presença de açúcar no C28.

De maneira contrária, quando o açúcar encontra-se substituído no C3 ocorre deslocamento químico de 10-15 ppm para campo mais baixo em relação à hidroxila livre (por exemplo, de δ 78 para δ 88) (TAKETA, 1997). A substância LA-3 apresenta um sinal no RMN^{13}C em δ 83,64.

Dessa forma, verifica-se que a substância LA-3 trata-se, portanto, de uma saponina bidesmosídica.

Através do espectro de C – H HETCOR (Figura 18) pode-se observar que o sinal do C3 (em δ 83,64) encontra-se conectado com o sinal em δ 3,64 (que aparece como um triplete no espectro de RMN ^{1}H). A partir do espectro de H – H COSY (Figura 22), é que foi possível identificar que este sinal encontrava-se na região de açúcares no espectro de RMN ^{1}H porque tratava-se de um carbono terciário diretamente ligado à um átomo eletronegativo.

O espectro de H – H COSY (Figura 22), mostra que o sinal em δ 3,64 conectava-se com sinais deslocados para campo alto (em δ 1,65 e δ 1,90), ou seja, deveria fazer parte do esqueleto básico da saponina.

Através deste espectro de correlação foi possível identificar todos os sinais que apareciam em campo baixo por estarem conectados à hidroxilas (em δ 3,36; δ 3,62; δ 3,64; δ 4,48), uma vez que estão todos conectados à átomos que aparecem em campo alto, bem como o sinal em δ 5,34, deslocado para campo ainda mais baixo, por pertencer à ligação insaturada.

No espectro H – H COSY (Figura 22) pode-se observar ainda os prótons pertencentes às moléculas de açúcares, uma vez que todos os sinais correlacionam-se entre si, em campo baixo; os sinais referentes aos prótons de carbonos anoméricos encontram-se na mesma região, mas sempre deslocados para campo ainda mais baixo (Figura 22).

O espectro H- H RCT (Figura 23) uniu finalmente toda a estrutura. Na Figura 23a observa-se que a partir de sinais característicos pode-se construir pequenas porções da estrutura: a partir, por exemplo, dos sinais em H12 (em δ 123,69), H16 (em δ 74,57) e prótons anoméricos. Na Figura 23b confirma-se as correlações visualizadas na Figura 22, bem como é possível visualizar um maior número de conexões para um mesmo sinal.

Em relação à moléculas de açúcares, portanto, através dos espectros H – H COSY e H – H RCT foi possível caracterizar, a partir dos prótons anoméricos, as seqüências dos prótons referentes aos açúcares (Figura 25).

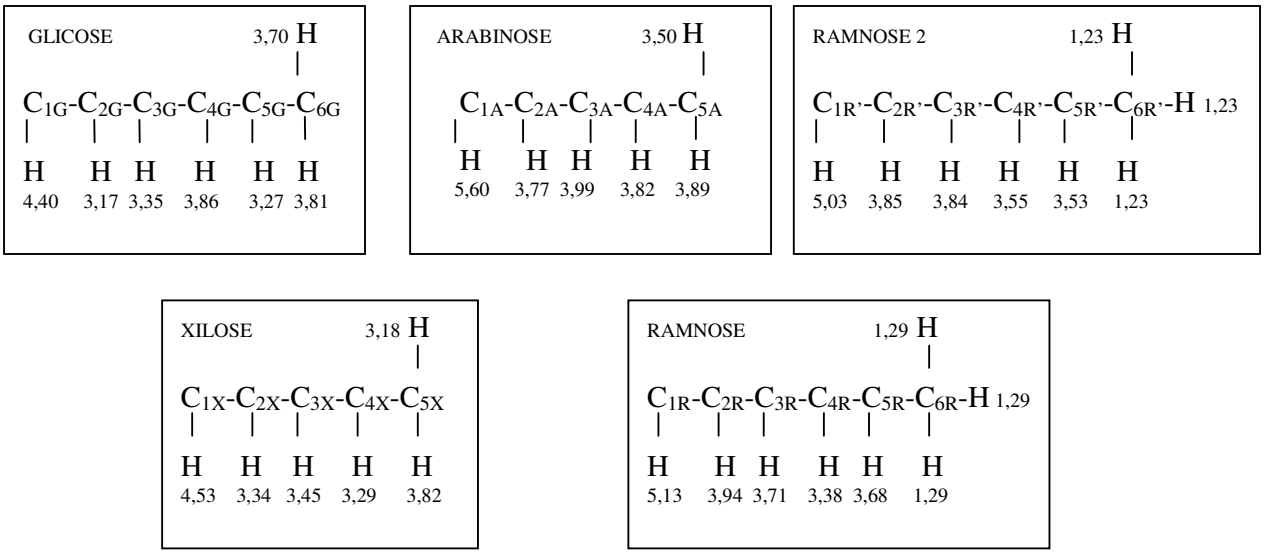


FIGURA 25: Seqüência de prótons determinados através das correlações observadas nos espectros H – H COSY e RCT

A conexão dos açúcares entre si foi estabelecida através de comparação com dados da literatura (TOYOTA; MSONTHI; HOSTETTMANN, 1990; COREA et al., 2004).

Dessa forma, verificou-se que a conexão mais coerente seria aquela proposta por Toyota e colaboradores (1990): C1 da glicose com C3 da aglicona (CH-O); C1 da arabinose com C28 da

aglicona (COO-); C2 da arabinose com o C1 da ramnose 2; C4 da ramnose 2 com o C1 da xilose e finalmente, o C3 da xilose com o C1 da ramnose (Figura 13).

Sendo assim, através dos espectros de correlação, pôde-se construir uma molécula que pode ser dividida em três porções: 1) aglicona – 30 átomos de carbono entre δ 13,51 e δ 175,50, sendo que: 8 deles (δ 32,00, δ 38,60, δ 40,70, δ 42,30, δ 43,50, δ 50,00, δ 145,00 e δ 175,50) não apresentam hidrogênios correlacionados, tratando-se portanto, de carbonos quaternários. Os sinais em campo bem baixo, ou seja, em δ 145,00 e δ 175,50, são respectivamente, de carbono insaturado e de carbono carbonílico; 6 sinais (δ 13,51, δ 16,65, δ 17,97, δ 25,11, δ 27,29 e δ 33,32) são referentes à carbonos primários, que correlacionam-se com hidrogênios que aparecem como singletes, respectivamente, em δ 0,72, δ 0,99, δ 0,77, δ 0,96, δ 1,37 e δ 0,87; 10 sinais (δ 19,01, δ 24,49, δ 26,33, δ 31,86, δ 33,68, δ 36,41, δ 36,41, δ 39,59, δ 47,65, δ 65,18) são referentes à carbonos secundários, sendo que os 5 primeiros, além do sinal em δ 39,59 correlacionam-se com hidrogênios que aparecem como multipletes (ver valores no Quadro 12). Os sinais sobrepostos, em δ 36,51 correlacionam-se com hidrogênios que aparecem em: δ 1,15 (como duplete); δ 1,39 e δ 1,43, como dupletes de dupletes e o sinal em δ 65,18 correlaciona-se com sinais em δ 3,36 e δ 3,62, que aparecem como dupletes; 6 sinais (δ 42,10, δ 48,13, δ 48,41, δ 74,57, δ 83,64 e δ 123,69) são referentes à carbonos terciários, sendo que dois deles (δ 74,57 e δ 83,64) aparecem em campo baixo por tratarem-se de carbonos ligados à átomos eletronegativos e o sinal no campo mais baixo (δ 123,69) trata-se de um carbono carbonílico (ver correlações com hidrogênios no Quadro 12); 2) açúcares do C3 (na região de carbonos ligados a átomos eletronegativos) – glicose: 6 átomos de carbono em campo baixo, entre δ 62,72 e δ 105,66, correlacionados a átomos de hidrogênio que aparecem entre δ 3,17 e δ 4,40 (ver correlações e multiplicidades no Quadro 12); 3) açúcares do C28 (também na região de carbonos ligados a átomos eletronegativos; também em campo baixo, com exceção das metilas das ramnoses) – arabinose: 5 átomos de carbono, entre δ 63,76 e δ 94,00, correlacionados a átomos de hidrogênio que aparecem entre δ 3,50 e δ 5,60 (ver correlações e multiplicidades no Quadro 12); ramnose 2: 6 átomos de carbono, entre δ 17,87 e δ 101,35, correlacionados a átomos de hidrogênio que aparecem entre δ 1,23 e δ 5,03 (ver correlações e multiplicidades no Quadro 12); xilose: 5 átomos de carbono, que aparecem entre δ 67,13 e δ 106,54, correlacionados a átomos de hidrogênio que aparecem entre δ 3,18 e δ 4,53 (ver correlações e multiplicidades no Quadro 12); ramnose: 6 átomos de carbono, entre δ 18,12 e δ 102,50, correlacionados a átomos de

hidrogênio que aparecem entre δ 1,29 e δ 5,13 (ver correlações e multiplicidades no Quadro 12), ou seja, também em campo baixo (com exceção da metila, que aparece em campo alto, em δ 18,12, correlacionada com átomos de hidrogênio que aparecem em δ 1,29 como um duplete).

Sendo assim, para a substância LA-3 foi atribuída a estrutura de uma saponina com aglicona do tipo olean-12-en: ácido 3β, 16α, 23 trihidroxiolean-12-en-28-óico, conhecido como 16α-hidroxihederagenina (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995), conforme a Figura 13, através dos espectros analisados, confirmada através da comparação com dados da literatura (TOYOTA; MSONTHI; HOSTETTMANN, 1990; COREA et al., 2004).

Na Figura 13 estão destacadas porções da molécula que tinham valores caractéristicos: os carbonos 3 e 28, ambos substituídos por moléculas de açúcares, destacando-se que a substância trata-se de uma estrutura bidesmosídica; a ligação dupla entre os carbonos 12 e 13, típica de esqueleto oleano; a presença de grupamento CH_2-OH no carbono 23.

Este triterpenóide apresenta diversas atividades farmacológicas. Apesar da atividade antiinflamatória ser comum aos triterpenos, é ainda mais significativa no ácido oleanólico. Dentre outras atribuições, é ainda um agente hepatoprotetor e antitumoral (item 3.3.).

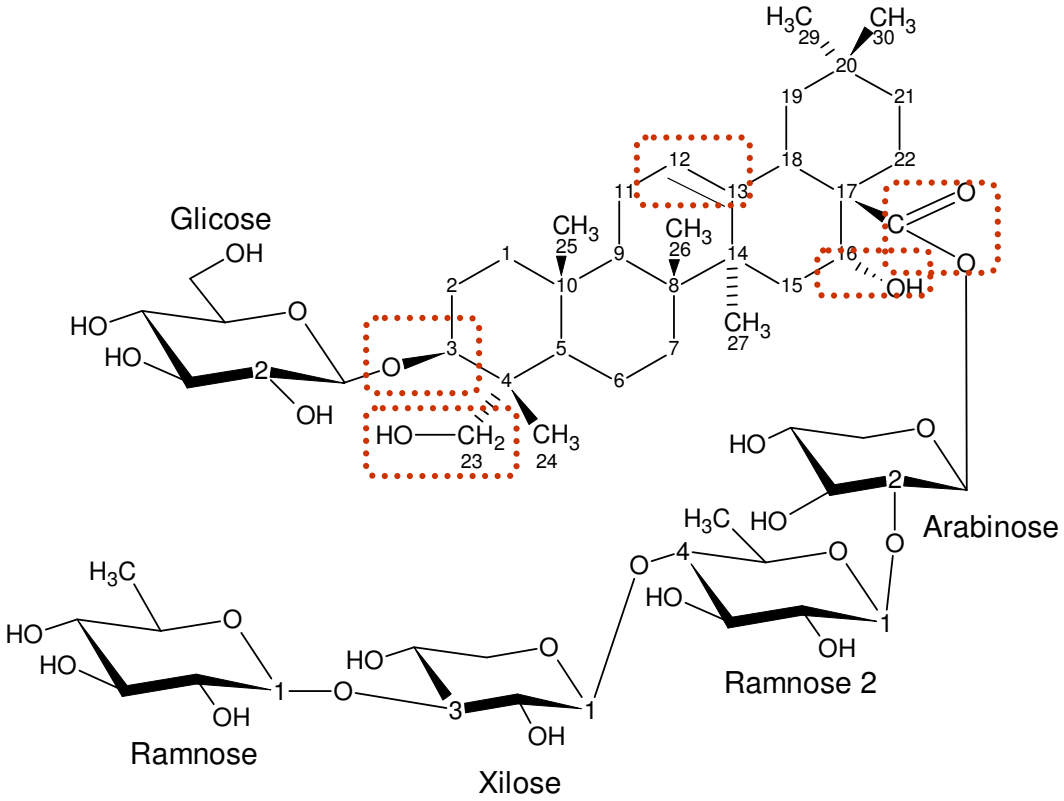


FIGURA 13: Estrutura proposta para a saponina LA-3

Aglicona do tipo olean-12-en: ácido 3β , 16α, 23 trihidroxiolean-12-en-28-óico

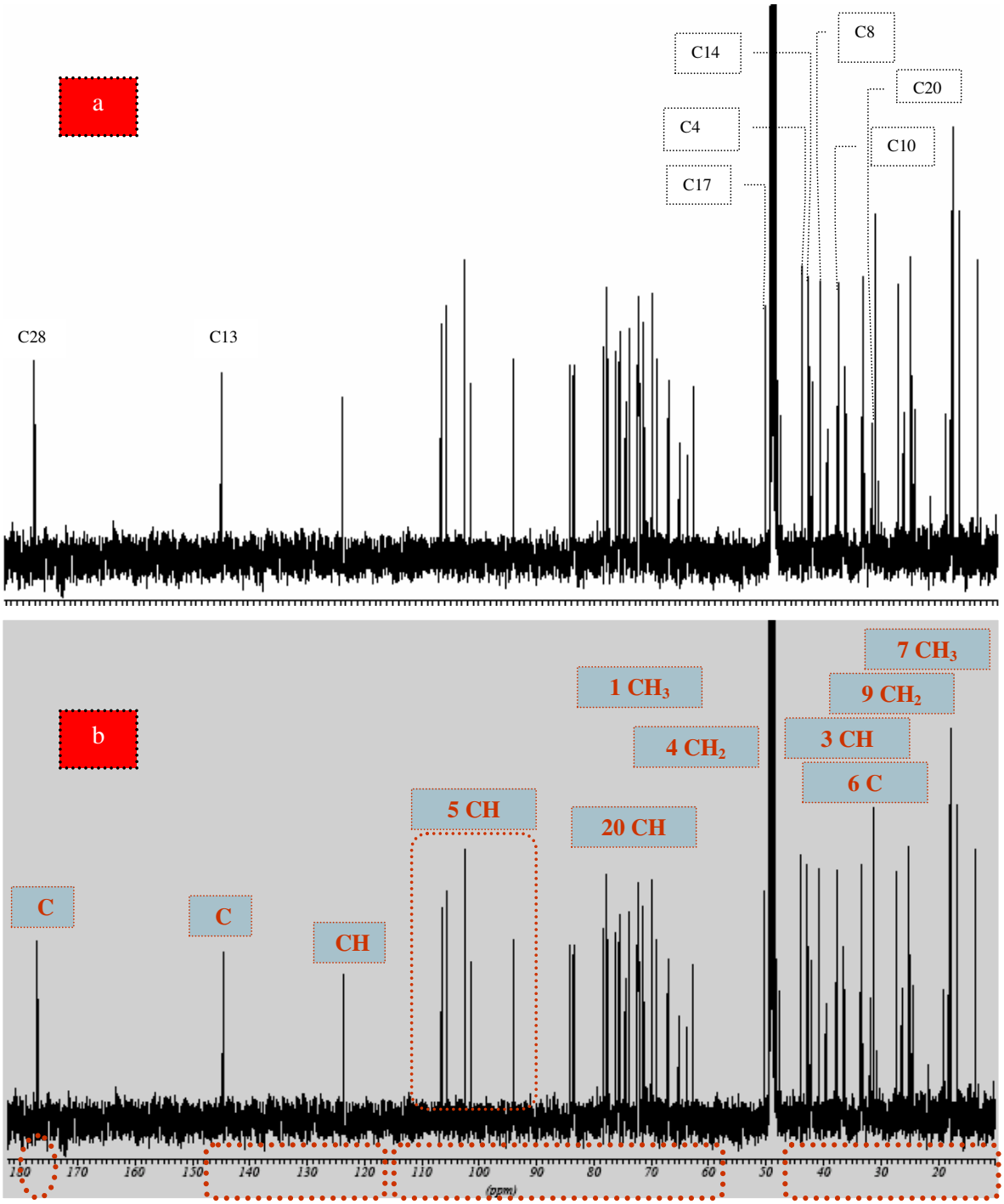


FIGURA 15: Espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado da substância LA-3 em MeOH a 100 MHz

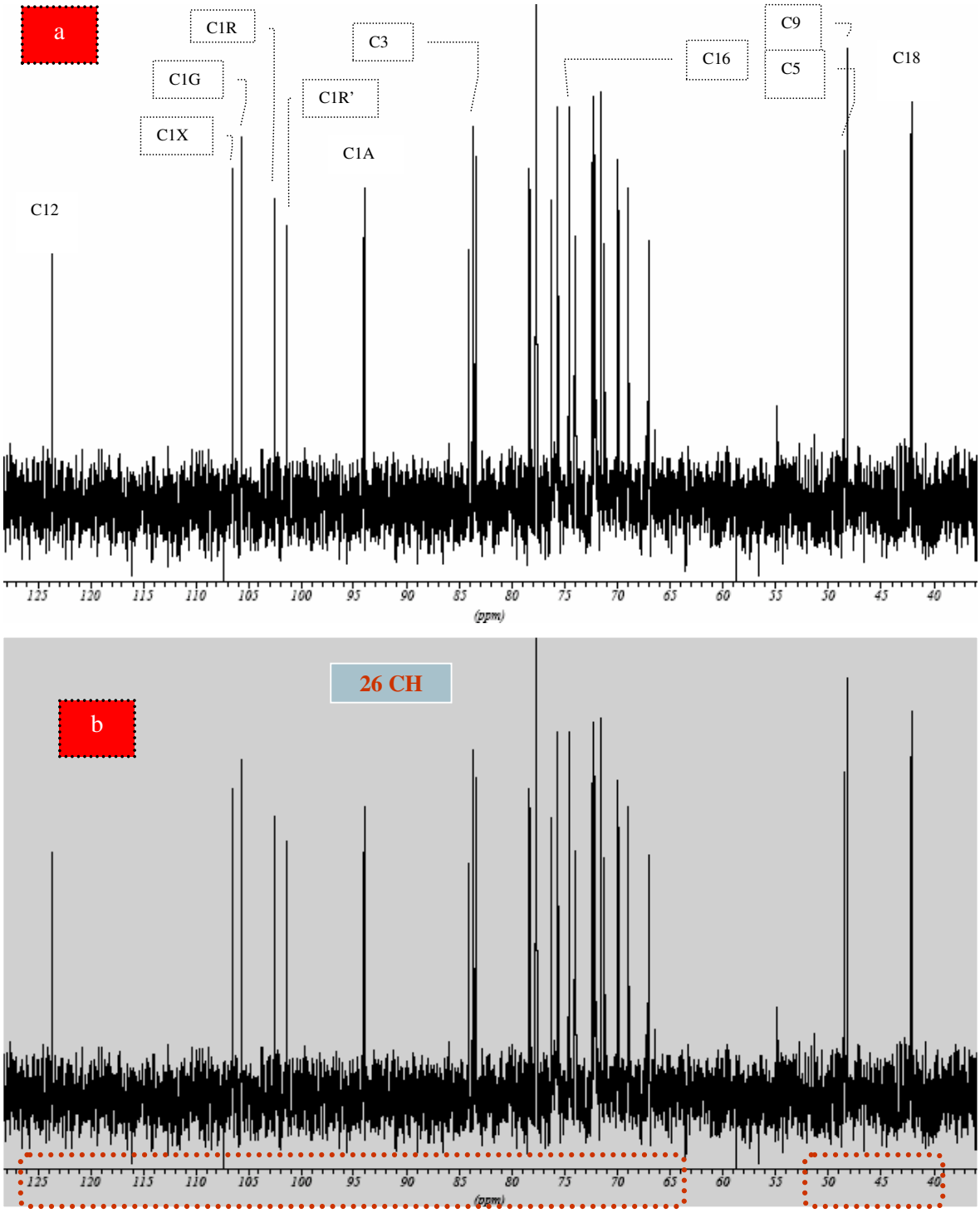


Figura 16: Subespectro DEPT 90° LA-3 em MeOH

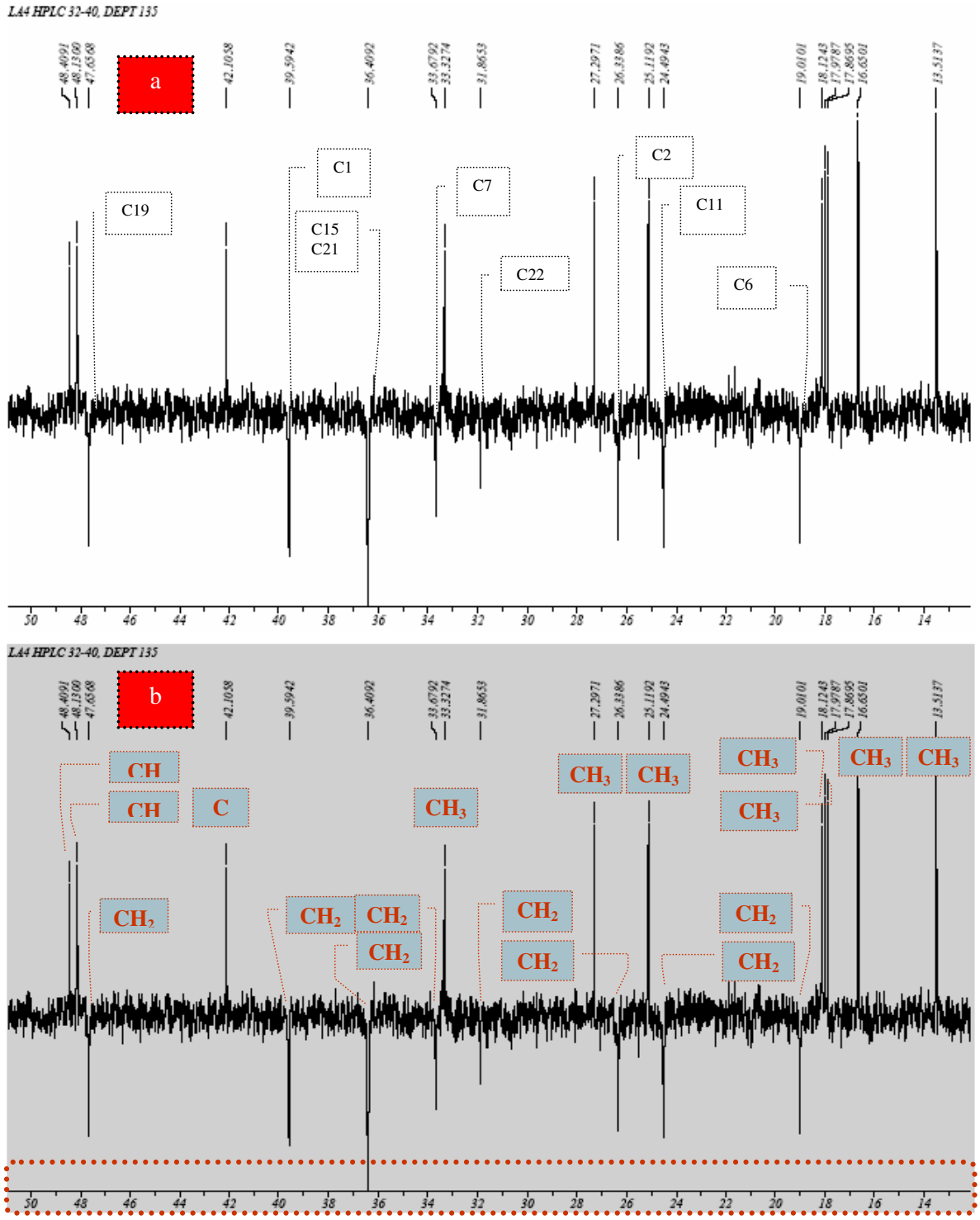


FIGURA 17: Subespectro DEPT 135° de LA-3 em MeOH

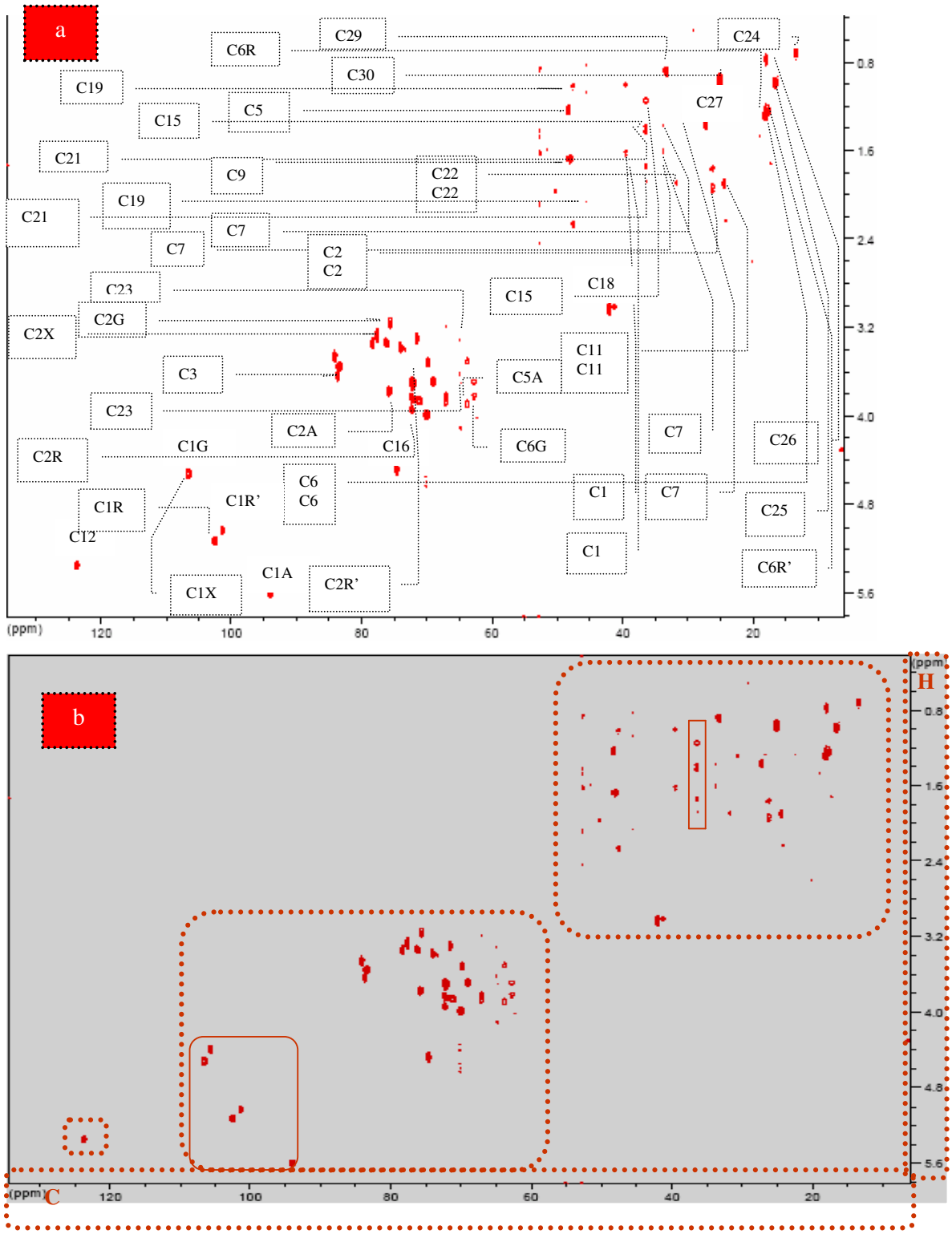


FIGURA 18: Espectro de correlação C - H HETCOR da substância LA-3 em MeOH

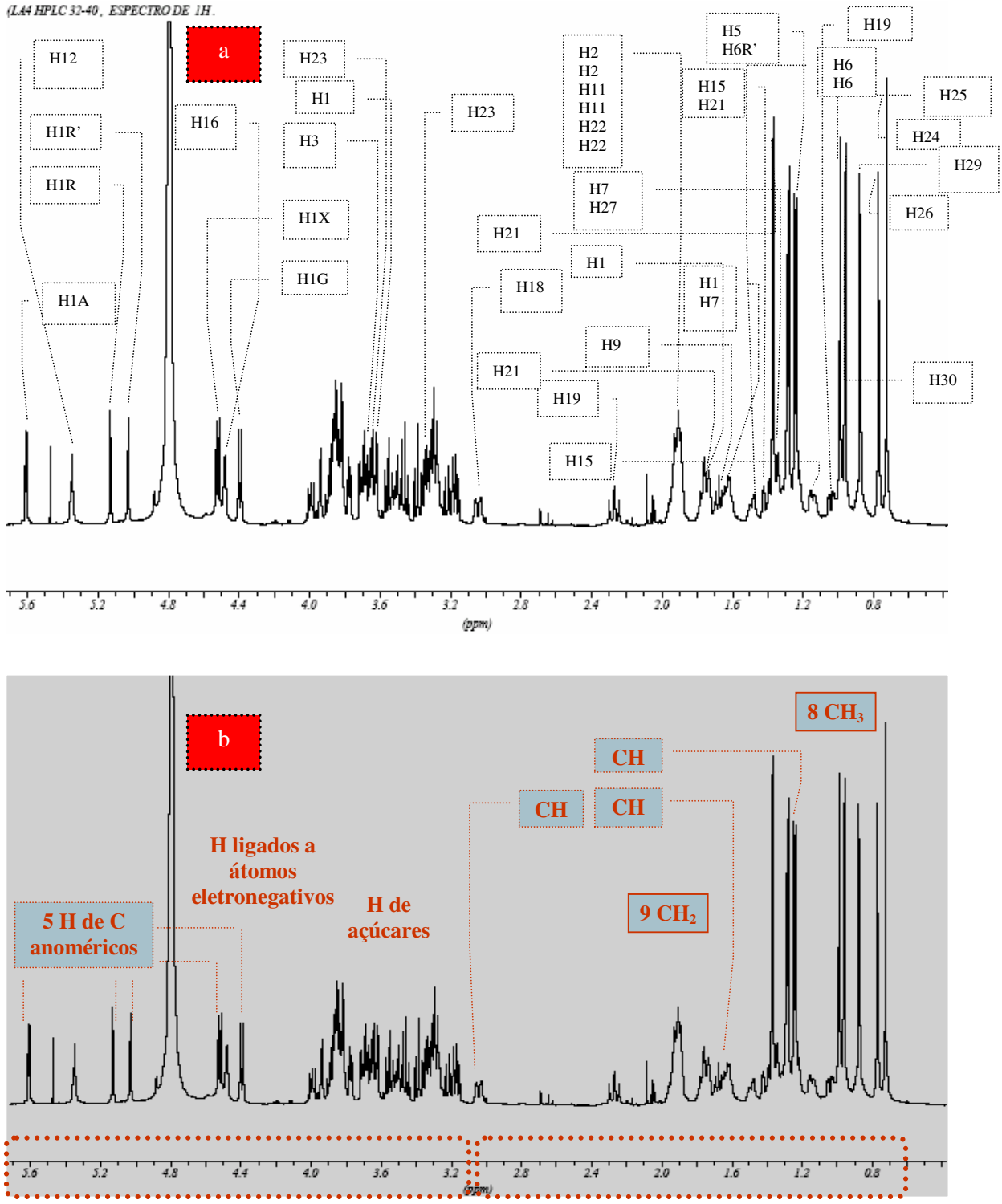


FIGURA 19: Espectro de RMN ^{1}H da substância LA-3 em MeOH

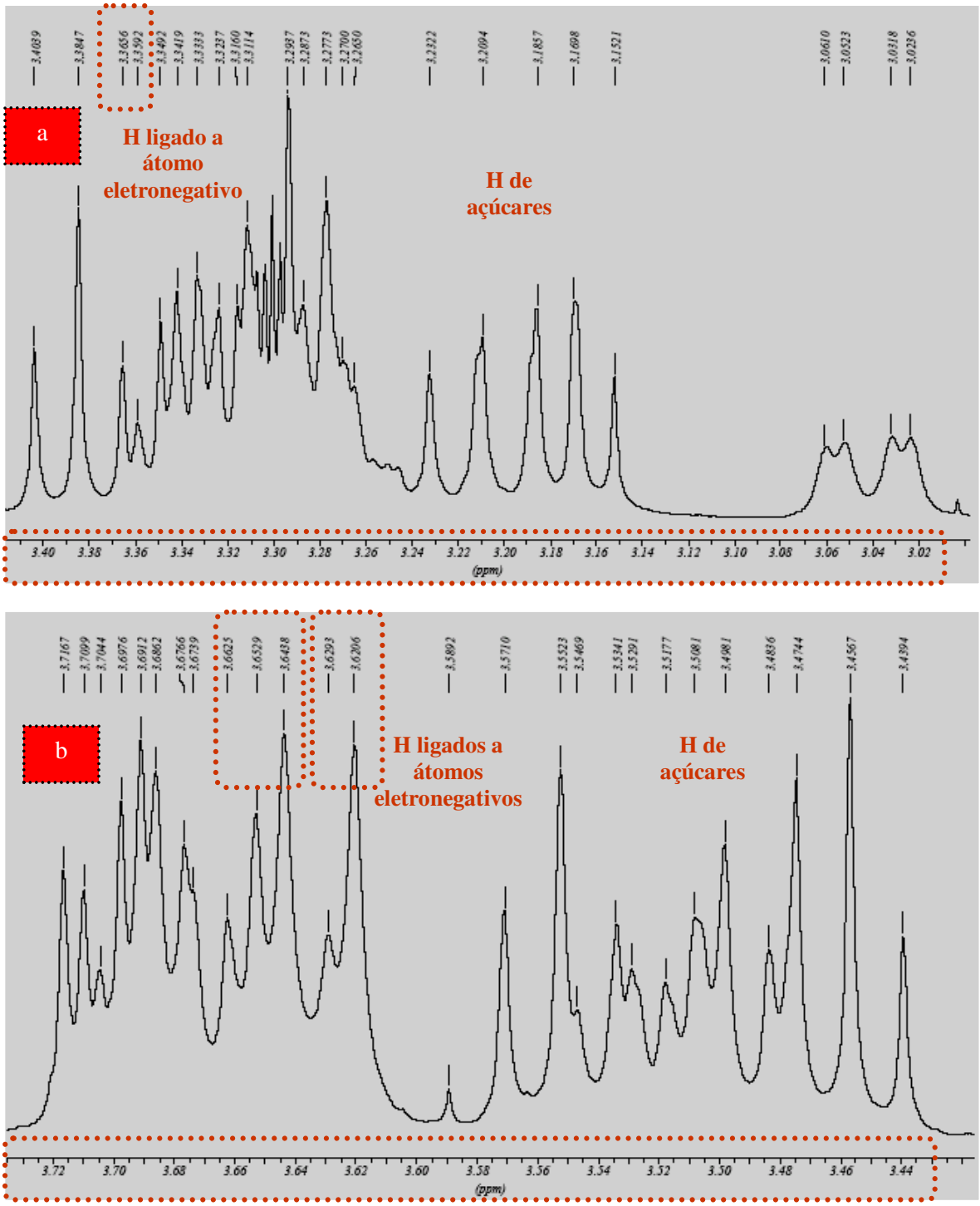


Figura 20: Espectro de RMN ^{1}H da substância LA-3 em MeOH ampliado

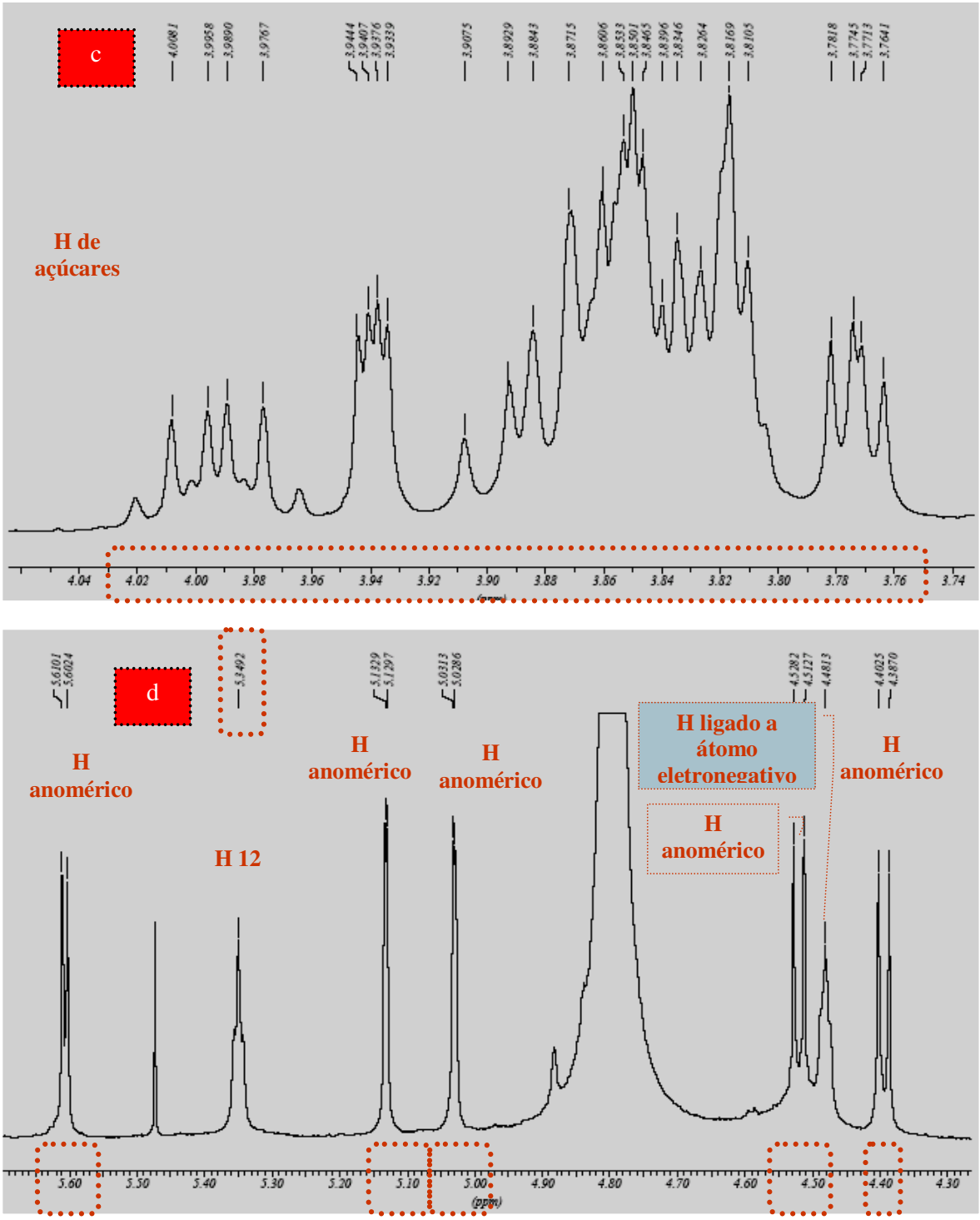


Figura 20: Espectro de RMN ^{1}H da substância LA-3 em MeOH ampliado

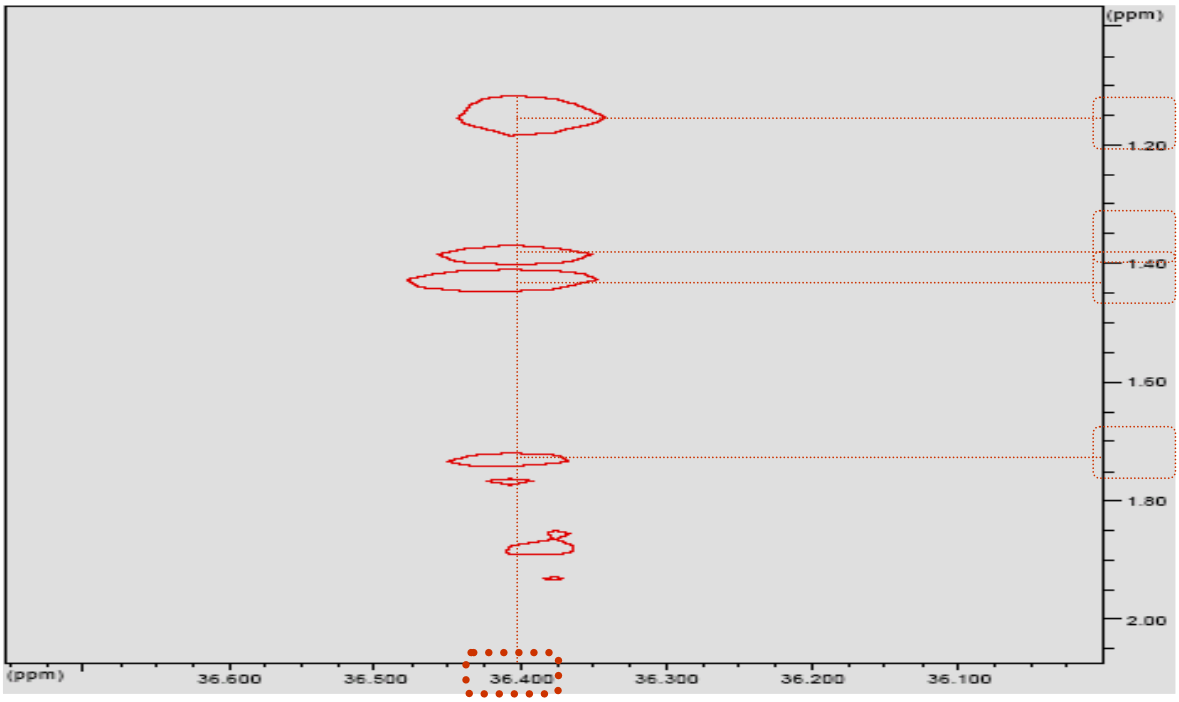


Figura 21: Espectro ampliado do sinal em δ 36,41 da substância LA-3 em MeOH

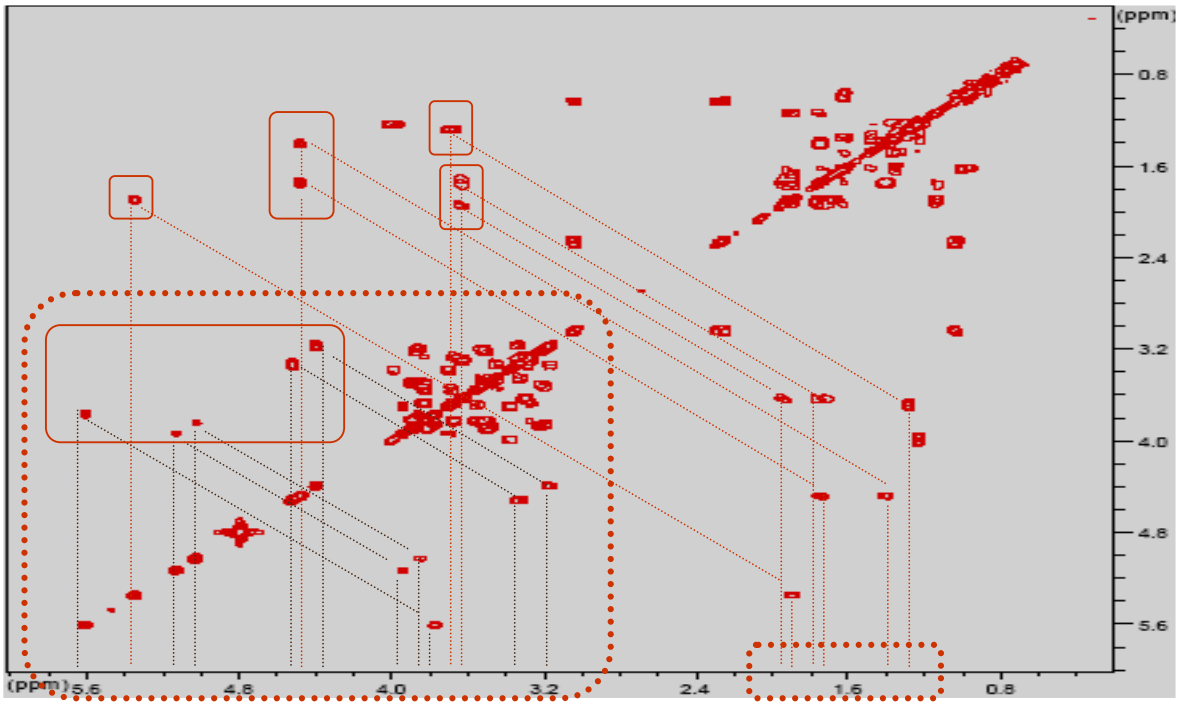


Figura 22: Espectro de RMN H – H COSY da substância LA-3 em MeOH

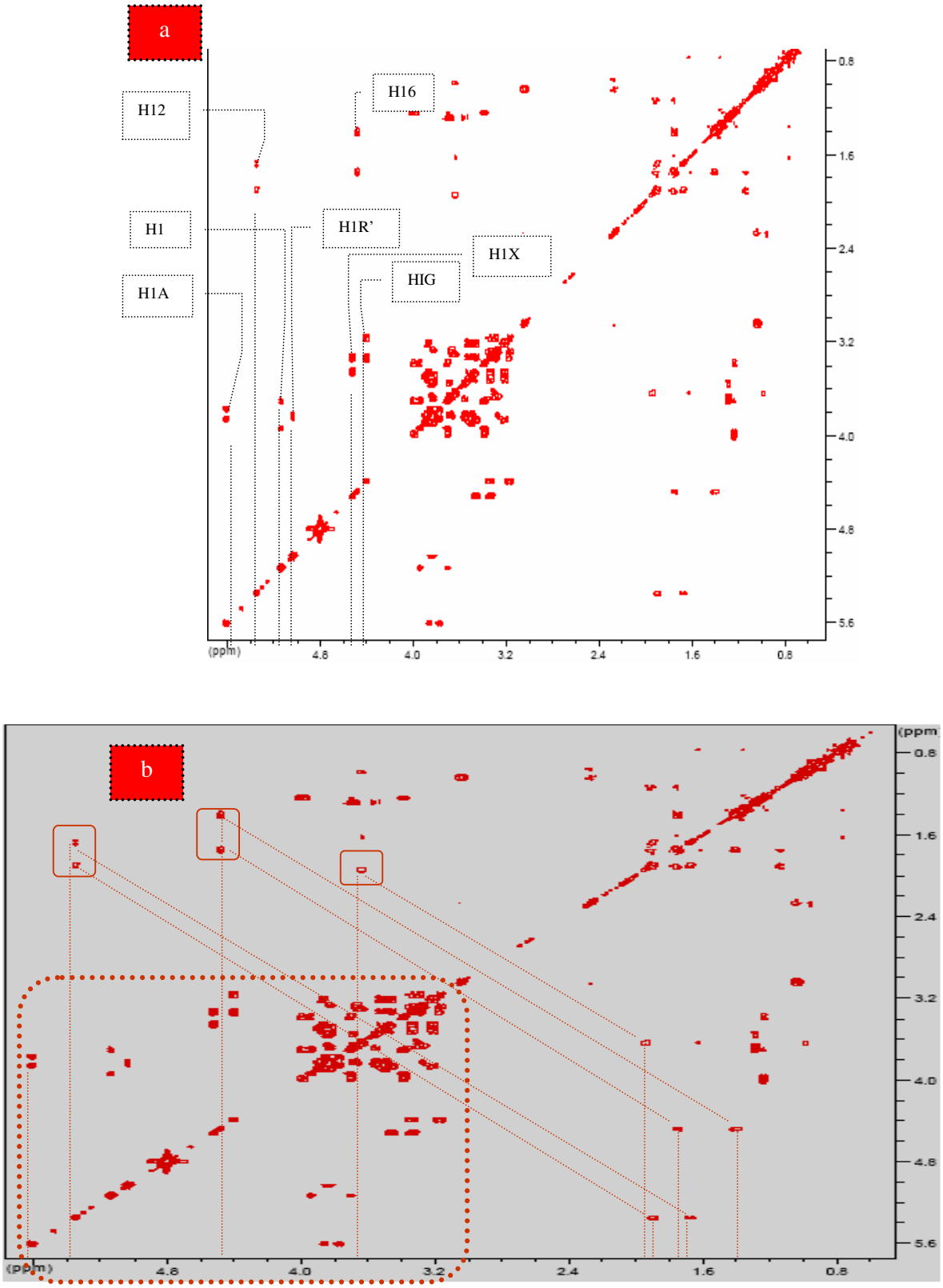


Figura 23: Espectro de RMN H – H RCT da substância LA-3 em MeOH

QUADRO 12: Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H em MeOH para a substância LA-3 (saponina do tipo oleano) comparados com dados da literatura

C	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT
1	39,59	39,70[1]	1,61 m; 1,65 m	CH_2
2	26,33	27,00[1]	1,90 m; 1,90 m	CH_2
3	83,64	83,00[2]	3,64 t	CH
4	43,50	43,50[2]	-	C
5	48,41	49,00[2]	1,23 d	CH
6	19,01	18,70[1]	1,47 m; 1,47 m	CH_2
7	33,68	33,60[1]	1,37m; 1,61 m	CH_2
8	40,70	40,50[1]	-	C
9	48,13	47,80[1]	1,67 m	CH
10	37,60	37,20[1]	-	C
11	24,49	24,80[1]	1,90 m; 1,90 m	CH_2
12	123,69	123,50[1]	5,34 t	CH
13	145,00	145,00[1]	-	C
14	42,30	42,70[1]	-	C
15	36,41	36,00[1]	1,15 d; 1,39 dd	CH_2

C	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT
16	74,57	74,00[1]	4,48 t	CH
17	50,00	48,80[1]	-	C
18	42,10	41,80[2]	3,02 dd	CH
19	47,65	47,10[1]	1,04 d; 2,27 t	CH_2
20	32,00	31,20[1]	-	C
21	36,41	36,30[1]	1,43 dd; 1,75 m	CH_2
22	31,86	32,70[2]	1,90 m; 1,90 m	CH_2
23	65,18	65,40[2]	3,36 d; 3,62 d	CH_2
24	13,51	12,99[3]	0,72 s	CH_3
25	16,65	16,60[1]	0,99 s	CH_3
26	17,97	17,90[1]	0,77 s	CH_3
27	27,29	27,30[1]	1,37 s	CH_3
28	175,50	176,30[2]	-	C
29	33,32	33,30[1]	0,87 s	CH_3
30	25,11	24,60[1]	0,96 s	CH_3

[1]COREA et al., 2004; [2] TOYOTA; MSONTHI; HOSTETTMANN, 1990; [3] ATHAYDE, 1993

Glicose	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT	Arabinose	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT
C1G	105,66	105,50[2]	4,40 d	CH	C1A	94,00	93,20[2]	5,60 d	CH
C2G	75,62	75,50[2]	3,17 t	CH	C2A	75,75	76,10[2]	3,77 dd	CH
C3G	78,29	78,50[2]	3,35 dd	CH	C3A	69,99	70,20[2]	3,99 dd	CH
C4G	71,20	71,50[2]	3,86 m	CH	C4A	67,02	66,10[2]	3,82 m	CH
C5G	77,69	78,10[2]	3,27 m	CH	C5A	63,76	63,00[2]	3,50 d; 3,89 m	CH_2
C6G	62,72	62,20[2]	3,70 m; 3,81 d	CH_2					

[2] TOYOTA; MSONTHI; HOSTETTMANN, 1990

Ramnose	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT	Ramnose 2	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT
C1R	102,50	102,50[2]	5,13 d	CH	C1R'	101,35	101,10[2]	5,03 d	CH
C2R	72,28	72,60[2]	3,94 dd	CH	C2R'	72,11	72,40[2]	3,85 m	CH
C3R	72,22	72,00[2]	3,71 m	CH	C3R'	72,37	72,60[2]	3,84 m	CH
C4R	74,00	74,00[2]	3,38 m	CH	C4R'	83,43	83,50[2]	3,55 m	CH
C5R	68,98	69,80[2]	3,68 m	CH	C5R'	69,87	68,60[2]	3,53 m	CH
C6R	18,12	18,60[2]	1,29 d	CH_3	C6R'	17,87	18,60[2]	1,23 d	CH_3

[2] TOYOTA; MSONTHI; HOSTETTMANN, 1990

Xilose	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C de acordo com a literatura	RMN ^{1}H	DEPT
C1X	106,54	106,60[2]	4,53 d	CH
C2X	76,24	75,30[2]	3,34 dd	CH
C3X	84,12	83,10[2]	3,45 m	CH
C4X	71,55	69,20[2]	3,29 m	CH
C5X	67,13	67,30[2]	3,18 d; 3,82 m	CH_2

[2] TOYOTA; MSONTHI; HOSTETTMANN, 1990

5.4. Análise sazonal

A Figura 20 mostra que as substâncias isoladas encontram-se em todas as coletas realizadas, não tendo sido detectada diferença significativa no perfil cromatográfico qualitativo.

Como todas as amostras são provenientes dos mesmos exemplares, verifica-se que as variações sazonais não interferiram no perfil qualitativo dos constituintes presentes na fração n-butanólica.

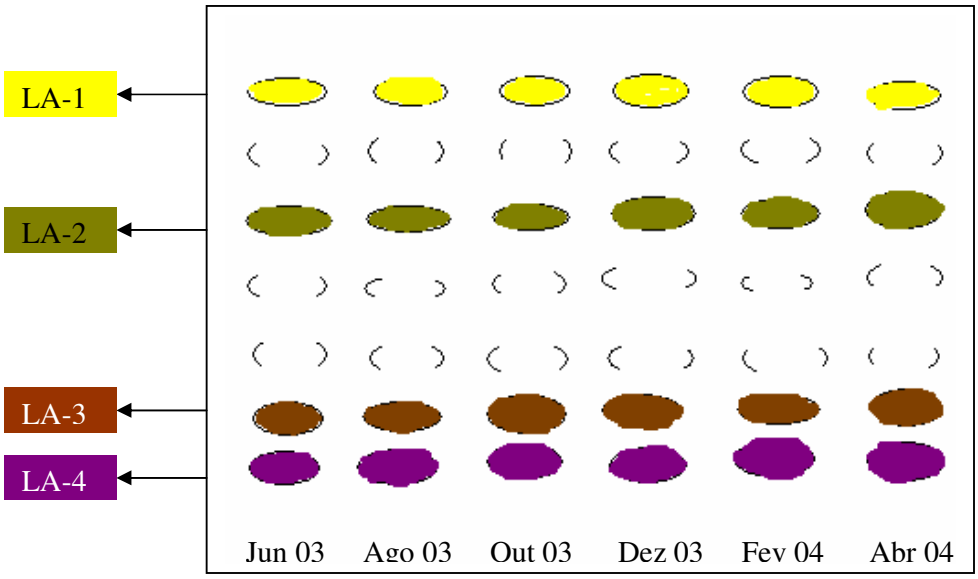


FIGURA 20: Representação esquemática do perfil cromatográfico das 6 coletas sazonais realizadas (eluente AcOEt: MeOH: isoprOH: H_2O: ác. acético 7: 1: 2: 5: 0,2; placas em sílica gel F_{254})

Assim como no estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2002), neste estudo o verbascosídeo foi encontrado em todas as coletas sazonais realizadas. Além disso, este estudo verificou que este composto não apenas ocorre durante todo o ano, como ainda é a substância mais abundante em todas as coletas sazonais realizadas.

Dessa forma, pelo fato da espécie *L. alba* ainda ter a identidade de suas substâncias ativas desconhecidas, propõe-se que o fenilpropanóide mencionado sirva de marcador químico da espécie.

Em relação ao teor de umidade, o material vegetal apresentou um teor constante em todas as coletas, com uma média de 11,02 ± 0,014 % de perda por dessecação, conforme a Tabela 2.

Comparando-se a Tabela 2 com a Tabela 1 (item 5.1.1.), percebe-se que a alteração na metodologia de secagem do material vegetal utilizado na análise sazonal (item 4.5.1.2.) em relação àquela empregada para o material utilizado no isolamento de substâncias (item 4.3.1.) não alterou a perda por dessecação das folhas secas e moídas da espécie. Sendo assim, percebe-se que ambas metodologias de secagem (itens 4.3.1. e 4.5.1.2.) garantem a mesma perda por dessecação ao material vegetal.

TABELA 2: Perda por dessecação das folhas secas e moídas de *L. alba* após 7 dias

Verificação	Perda por dessecação (%)*
Junho 2003	11,03
Agosto 2003	11,04
Outubro 2003	11,02
Dezembro 2003	11,01
Fevereiro 2003	11,02
Abril 2003	11,02
média	11,02 ± 0,014

* Valor médio de 3 determinações

Também foi calculado o rendimento, para as 6 coletas, do extrato bruto concentrado. Obteve-se um rendimento sempre em torno de 10 % de extrato bruto em relação à quantidade de droga moída. Em seguida, o extrato bruto foi ressuspenso em água e submetido à partição, conforme a Figura 3 (item 4.4.2.). Concentrando-se a fração n-BuOH até a secura, obteve-se, em todas as coletas sazonais realizadas, um rendimento em torno de 1 % em relação a droga moída. Os valores exatos estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3: Rendimento dos extratos obtidos a partir das coletas realizadas para análise sazonal

Fração n-BuOH	Quantidade de droga moída (g)	Extrato bruto (g)	Extrato bruto (%)	Fração n-BuOH (g)	Fração n-BuOH (%)
Junho 2003	85	8,62	10,14	1,00	1,18
Agosto 2003	81	8,44	10,42	1,15	1,42
Outubro 2003	84	8,51	10,13	0,89	1,06
Dezembro 2003	80	8,06	10,07	1,03	1,29
Fevereiro 2004	85	8,87	10,44	1,29	1,52
Abril 2004	84	8,61	10,25	1,17	1,39

5.5. Ensaios farmacológicos

5.5.1. Avaliação da ação hipno-sedativa

5.5.1.1. Hipnose induzida por pentobarbital

Vários trabalhos demonstram que o pentobarbital aumenta o influxo de Cl^- decorrente da ligação do GABA em seu receptor $GABA_A$, potencializando a inibição mediada pelo GABA, tanto pré quanto pós-sináptica no SNC de mamíferos. Assim, está demonstrado experimentalmente que a ação hipnótica do pentobarbital, determinada pela perda do reflexo postural e tempo de sono em camundongos, está relacionada à função do receptor $GABA_A$ (CHWEH; SWINYARD; WOLF, 1987), sendo que fármacos com atividade hipno-sedativa devem potencializar a ação hipnótica do pentobarbital.

A curva tempo-resposta demonstrou atividade hipno-sedativa apenas quando o sono foi induzido 1 h após o tratamento com a fração n-BuOH; neste tempo, a administração oral da fração n-BuOH de *L. alba*, foi capaz de prolongar o tempo de sono induzido por barbitúrico somente na dose de 300 mg/kg, de 35,08 ± 7,56 min (média obtida no grupo controle) para 72,53 ± 12,63 min (Tabela 4; Figura 21).

Não houve alteração significativa da latência do sono induzido, inclusive no grupo diazepam, exceto para o tempo de 3 h (Tabela 5).

TABELA 4: Tempo médio de sono induzido por barbitúrico 1, 2 e 3 horas após o tratamento com a fração n-butanólica de *L. alba*. Os valores estão expressos em minutos, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05

	Duração do sono		
Tratamento	1 hora	2 horas	3 horas
Controle	35,08 ± 7,56 (7)	33,77 ± 8,51 (7)	33,43 ± 7,81 (6)
30 mg/kg	34,84 ± 6,08 (7)	61,74 ± 25,01 (7)	37,47 ± 8,44 (7)
100 mg/kg	72,18 ± 20,85 (8)	63,36 ± 18,11 (8)	49,79 ± 22,81 (7)
300 mg/kg	72,53 ± 12,63 (8)*	70,33 ± 19,44 (8)	83,41 ± 26,48 (7)
Diazepam	111,25 ± 26,56 (6)*	94,50 ± 22,05 (6)*	103,72 ± 22,06 (7)*

TABELA 5: Latência média para o sono induzido por barbitúrico 1, 2 e 3 horas após o tratamento com a fração n-butanólica de *L. alba*. Os valores estão expressos em segundos, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05

	LATÊNCIA PARA O SONO		
Tratamento	1 hora	2 horas	3 horas
Controle	242 ± 13,58 (7)	254,57 ± 16,95 (7)	445 ± 91,22 (6)
30 mg/kg	264,14 ± 17,41 (7)	223,43 ± 19,11 (7)	437,28 ± 125,28 (7)
100 mg/kg	225,62 ± 19,37 (8)	229,62 ± 15,50 (8)	338,43 ± 41,95 (7)
300 mg/kg	230,5 ± 10,49 (8)	269 ± 48,78 (8)	256,57 ± 24,59 (7)
Diazepam	201 ± 26,76 (6)	231,5 ± 22,06 (6)	235,71 ± 12,80 (7)*

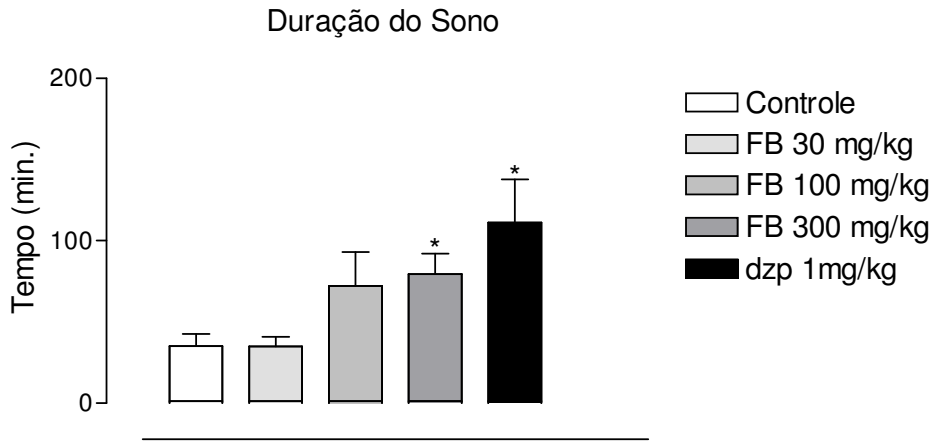


FIGURA 21: Duração do sono induzido por barbitúrico, 1 hora após o tratamento com a fração n-butanólica de *L. alba*. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle e os valores estão expressos em minutos, como média ± e.p.m., *p < 0,05

5.4.1.2. Hipnose induzida por éter

O pentobarbital é uma substância que depende de metabolismo hepático; portanto, para comprovar a atividade hipno-sedativa, utilizou-se uma substância hipnótica com metabolização pulmonar: o éter etílico.

Embora a fração n-butanólica tenha potencializado o sono induzido por pentobarbital, não foi capaz de potencializar o sono induzido por éter, mesmo quando testado na mesma dose e tempo que produziu efeito significativo no primeiro modelo (Tabela 6).

TABELA 6: Tempo médio de latência e duração do sono induzido por éter 1 hora após o tratamento com a fração n-butanólica de *L. alba*, na dose de 300 mg/kg, v.o. Os valores estão expressos em segundos, como média ± e.p.m. (N), *p < 0,05

Sono Etéreo		
Tratamento	Latência	Duração
Controle	42,96 ± 5,737 (5)	137 ± 14,98 (5)
300 mg/kg	46,76 ± 3,924 (7)	141,57 ± 11,78 (7)
Diazepam	50,174 ± 6,172 (5)	190,8 ± 16,61(5)*

5.5.1.3. Temperatura colônica

A temperatura corpórea pode ser empregada como índice de alterações de vários neurotransmissores centrais, como agonistas dopaminérgicos ou serotonérgicos (LIN; CHUANG, 2002), embora sirva também para distinguir entre agonistas totais ou parciais de receptores benzodiazepínicos (JACKSON; NUTT, 1990).

O tratamento com a fração n-BuOH foi capaz de reduzir a temperatura corporal, nas doses de 100 e 300 mg/kg, de forma significativa nos tempos de 1 (36,47 ± 0,21 e 36,1 ± 0,27 °C) e 2 h (35,74 ± 0,14 e 35,57 ± 0,14 °C) após o tratamento (Tabela 7). No entanto, 3 h após o tratamento com a fração n-BuOH observamos uma redução significativa ($p < 0,05$) da temperatura retal para as três doses (34,64 ± 0,32; 34,54 ± 0,41 e 33,93 ± 0,27 °C, para 30, 100 e 300 mg/kg respectivamente), inclusive nos animais controle (34,02 ± 0,45 °C), sugerindo que esta redução não se deve ao tratamento, mas talvez a mecanismos reguladores endógenos, como a ativação de eixo HPA por estresse, como a manipulação dos animais para gavagem (VEENING et al., 2004).

TABELA 7: Temperatura colônica basal (T_0) e 1, 2 e 3 horas após o tratamento com a fração n-butanólica de *L. alba*. Cada animal serviu como seu próprio controle. Os valores estão expressos em ºC, como média ± e.p.m. (n), *p < 0,05

	Temperatura colônica					
Tratamento	1 hora		2 horas		3 horas	
	T_0	T_1	T_0	T_1	T_0	T_1
Controle	36,83 ± 0,26	36,9 ± 0,17 (7)	36,65 ± 0,43	36,17 ± 0,22 (6)	36,72 ± 0,25	34,02 ± 0,45 (6)*
30 mg/kg	37,13 ± 0,23	36,55 ± 0,24 (6)	36,81 ± 0,32	36,38 ± 0,1 (7)	36,58 ± 0,28	34,64 ± 0,32 (7)*
100 mg/kg	37,56 ± 0,12	36,47 ± 0,21 (8)*	36,56 ± 0,26	35,74 ± 0,14 (8)*	36,7 ± 0,29	34,54 ± 0,41 (7)*
300 mg/kg	37,6 ± 0,29	36,1 ± 0,27 (8)*	37 ± 0,17	35,57 ± 0,14 (8)*	37,07 ± 0,15	33,92 ± 0,27 (7)*
Diazepam	36,85 ± 0,27	36,05 ± 0,26 (6)*	37,13 ± 0,22	36,0 ± 0,2 (6)*	36,14 ± 0,59	34,54 ± 0,36 (7)*

5.5.2. Análise dos resultados

Os resultados obtidos para a fração n-butanólica sugerem um efeito sedativo, uma vez que observou-se uma potencialização do sono induzido pelo pentobarbital (na dose de 300 mg/kg, 1 h após o tratamento oral com a fração n-BuOH). Estudos relatam que a atividade hipnótica do pentobarbital deve-se à ligação do barbitúrico com sítios de ação localizados nos receptores GABAérgicos do tipo A (CHWEH; SWINYARD; WOLF, 1987; LANCEL, 1999). Fármacos com ação depressora do SNC, em geral reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono induzido. Os benzodiazepínicos demonstram esse efeito, principalmente prolongando a duração do sono induzido; nestes experimentos, o diazepam promoveu aumento do tempo de sono, tanto barbitúrico quanto etéreo.

Entretanto, o efeito sedativo da fração n-butanólica não foi confirmado no modelo do sono induzido por éter, o que indica que provavelmente, a potencialização do sono barbitúrico deva-se a uma interferência de ordem farmacocinética.

Uma possibilidade para explicar a potencialização do sono barbitúrico seria um efeito sobre o sistema hepático microssomal, que metaboliza o pentobarbital sódico. Compostos ativos de plantas podem competir com sistemas hepáticos de metabolização de barbitúricos (ROBY; KANTOR; GIAMBIANCO, 1999; ROBY; ANDERSON; KANTOR, 2000). Contudo, não há dados experimentais para sustentar esta hipótese.

Em relação à temperatura colônica, a fração n-BuOH foi capaz de induzir hipotermia nos tempos de 1 e 2 h, nas doses de 100 e 300 mg/Kg; os resultados demonstram que a fração n-butanólica reduziu a temperatura corporal de forma significativa em até 1,43 °C (37 ± 0,17 para 35,57 ± 0,14 °C), na dose de 300 mg/kg, no tempo de 2 h após o tratamento oral.

Contudo, não é possível afirmar que a hipotermia tenha sido induzida pelo tratamento com a fração n-butanólica. Além disso, não é possível afirmar que a alteração da temperatura corporal dos animais deva-se à um mecanismo de ação central, uma vez que no tempo de 3 h a temperatura colônica foi reduzida em todos os grupos de animais, inclusive no grupo controle.

6. CONCLUSÕES

- A partir da fração n-butanólica, obtida por partição do macerado hidroalcoólico de folhas de *Lippia alba,* foram isolados e identificados o fenilpropanóide verbascosídeo LA-1) e uma saponina bidesmosídica derivada do ácido oleanólico (LA-3);
- Desta mesma fração n-BuOH foram isoladas outras duas substâncias (LA-2 e LA-4), ainda não identificadas;
- As quatro substâncias isoladas (LA-1, LA-2, LA-3 e LA-4) foram encontradas nas seis coletas realizadas durante os meses de junho, agosto, outubro e dezembro de 2003, e em fevereiro e abril de 2004, não tendo sido detectada diferença significativa no perfil cromatográfico qualitativo, no período analisado;
- O rendimento da extração e do fracionamento da espécie foi sempre em torno de 10 % de rendimento para o extrato bruto e em torno de 1 % de rendimento para a fração n-butanólica, ambos em relação à quantidade de droga moída;
- A fração n-butanólica potencializou a ação do pentobarbital sódico em camundongos, quando comparado ao grupo controle, na dose de 300 mg/kg, por via oral, 1 h após o tratamento, o que seria indicativo de atividade hipno-sedativa. Contudo, não é possível afirmar que tenha demonstrado tal atividade, uma vez que não potencializou o sono induzido por éter, quando testado na mesma dose e tempo que produziu efeito no primeiro modelo;
- A fração n-butanólica reduziu a temperatura corporal dos animais de forma significativa nos tempos de 1 e 2 h após o tratamento, nas doses de 100 e 300 mg/Kg, mas não é possível afirmar que deva-se à um mecanismo de ação central, uma vez que 3 h após o tratamento com a mesma fração houve redução significativa da temperatura retal para as 3 doses (30, 100 e 300 mg/Kg), e para os animais controle.

7. PERSPECTIVAS

- Em relação ao estudo fitoquímico, é necessário elucidar a estrutura da substância LA-2, bem como da substância que foi purificada por CLAE juntamente com LA-3. Além disso, é igualmente necessária a purificação da substância LA-4 por CLAE, para que então seja realizada sua elucidação estrutural;
- Considerando que a análise sazonal realizada foi qualitativa, propõe-se a realização de um estudo quantitativo;
- Também propõe-se um estudo comparativo com material vegetal proveniente de outros locais, com o objetivo de verificar a influência do local de coleta na composição química;
- Em relação aos testes farmacológicos realizados, é interessante avaliar a atividade hipno-sedativa de outras preparações, principalmente do infuso, que é a forma de preparo mais utilizada pela população. Também considera-se importante o estudo farmacológico dos constituintes químicos isolados;
- A interferência farmacocinética da fração n-butanólica com enzimas hepáticas deve ser melhor investigada, sobretudo em relação ao seu uso concomitante com outros fármacos;
- A alteração da temperatura corporal produzida pela fração n-butanólica também deve ser melhor investigada, uma vez que pode tratar-se de uma atividade não terapêutica;
- Ainda em relação ao estudo famacológico, é necessário avaliar também, outras atividades da fração n-BuOH, tais como miorrelaxante e anticonvulsivante, buscando verificar se há reprodutibilidade de resultados, em relação a trabalhos anteriores. O mesmo deve ser feito tanto com o infuso quanto com os constituintes químicos isolados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Levantamento da flora medicinal da Paraíba e triagem fitoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 71, n. 3, p. 72-76, 1990.

ALPERN, H. P.; MCINTYRE, T. D. Sedative-hypnotic anormalies related to dose of pentobarbital in long-sleep and short-sleep selectively-breed mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 25, n. 2, p. 333-336, 1986.

ANDARY, C.; WYLDE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G.; WINTERNITZ, F. Structures of verbascosídeo and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. **Phytochemistry,** n. 21, p. 1123-1127, 1982.

ATHAYDE, M. L. **Saponinas e triterpenos em algumas espécies do gênero Ilex**. Porto Alegre, 1993. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AVILA, J. G.; DE LIVERANT, J. G.; MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, G.; MUÑOZ, J. L.; ARCINIEGAS, A.; DE VIVAR, A. R. Mode of action of *Buddeja cordata* verbascosideo against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 75-78, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JR., J. X. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 8, p.147-210.

BETTEGA, J. M. R.; DE FREITAS, A. M.; SONAGLIO, D.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação da atividade antiviral de extratos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. ex Britt; Wills. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XVI, 2000, Recife. **Resumos...** Recife: Comissão organizadora do XVI SPMB, 2000, p. 265.

BETTEGA, J. R.; ZÉTOLA, M.; FARIAS, M. R.; SONAGLIO, D. Padronização tecnológica preliminar de extratos hidroalcoólicos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt.; Wills. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Comissão organizadora do XV SPMB, 1998, p. 189.

CÁCERES, A.; ÁLVAREZ, A. V.; OVANDO, A. E.; SAMOYOA, B. E. Plants used in Guatemala for treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 193-208, 1991.

CAMPESTRINI, L. H.; SOARES, L.; SONAGLIO, D. Otimização tecnológica preliminar de soluções extrativas de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. In: FARMAPÓLIS, 2000, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, SINDFAR-SC, 2000, p. 60.

CARDOSO, V.; SOARES, L.; CEMIN, L.; FARIAS, M. R.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D. Investigação da atividade farmacológica sobre o SNC de frações de solução extrativa hidroalcoólica de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown (falsa-melissa) Verbenaceae. In: FARMAPÓLIS, 2000, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, SINDFAR-SC, 2000, p. 28.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVIERA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals. **Jounal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 37 – 64, 1986.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.

CEMIN, L.; SOARES, L.; SONAGLIO, D.; DE LIMA, T. C. M.; FARIAS, M. R. Avaliação da atividade anticonvulsivante de diferentes subfrações de *Lippia alba* Miller. In: FARMAPÓLIS, 2001, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, SINDFAR-SC, 2001, p. 26.

CHWEH, A. Y.; SWINYARD, E. A.; WOLF, H. H. Hypnotic action of pentobarbital in mice: a possible mechanism. **Experimental Neurology**, v. 97, p. 70-76, 1987.

CÓRDOVA, C. M. M.; DEMÉTRIO, S. **Uso de ervas medicinais e fitoterápicos na comunidade da Costa da Lagoa, Florianópolis**. Monografia de Conclusão de estágio (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

COREA, G.; IORIZZI, M.; LANZOTTI, V.; CAMMARERI, M.; CONICELLA, C.; LAEZZA, C.; BIFULCO, M. Astersedifolioside A-C, three new oleane-type saponins with antiproliferative activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4909-4915, 2004.

CORNARD, J. P.; BOUDET, A. C.; MERLIN, J. C. Complexes of Al (III) with 3'4'-dihydroxy-flavone: characterization, theoretical and spectroscopic study. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 57, p. 591-602, 2001.

CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt.; Wilson erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia,** Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 57-64, 1992.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1986.

DÍAZ, A. M.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, L.; SILVÁN, A. M.; DE SANTOS, J.; BERMEJO, P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflamatory activity. **Life sciences**, v. 74, p. 2515-2526, 2004.

DOMÍNGUEZ, X. A. **Métodos de Investigación Fitoquímica.** México: Limusa, 1973.

DOUGLAS, C. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosyntesis: from weeds to trees. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 6, p. 171-178, 1996.

DO VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS, J. G. JR.; VIANA, G. S. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Abstracts: **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709-714, 2002.

ELISABETSKY, E.; DE SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 6, p. 107-122.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 235-239, 1991.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 137-143, 1993.

ETKIN, N. Perspectives in ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowleage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 177-182, 2001.

FALKENBERG, M. B.; DOS SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 10, p. 229-246.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 12, p. 263-288.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, J. L. P.; VELASCO, E.; DE ARAÚJO, R. B.; KUSTER, R. M.; AMARAL, A. C. F. Variação sazonal de flavonóides e fenilpropanóides em *Lippia alba*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XVII, 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá, 2002.

GARO, E.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; HILLER, W.; ANTUS, S.; MAVI, S., 1998 Apud ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. Review. **Journal of Chromatograpy A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

GIRÓN, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 173-187, 1991.

GOMES, E. C.; MING, L. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; CONTI, A.; WEISS FILHO, A. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 29-32, 1993.

GORINSTEIN, S.; ZACHWIEJA, Z.; FOLTA, M.; BARTON, H.; PIOTROWICZ, J.; ZEMSER, M.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S.; BELLOSO, M. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 952-957, 2001.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quimiossistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 5, p. 91-106.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 1, p. 13-28.

GYLLENHALL, C.; MERRITT, S.; PETERSON, S. D.; BLOCK, K. I.; GOCHENOUR, T. Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders. Review Article. **Sleep Medicine Reviews**, v. 4, n. 3, p. 229-251, 2000.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N. A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 63-80, 1992.

HERBERT, J. M.; MAFFRAND, J. P.; TAOUBI, K.; AUGERAU, J. M.; FOURASTE, I.; GLEYE, J. Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1595-1600, 1991.

HIKINO, H.; KISO, Y.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Antihepatotoxic actions of papyriogenins and papyriosides, triterpenoids of Tetrapanax papyriferum leaves. Abstracts: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 231-235, 1984.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products**. Londres, 1995.

HOSTETTMANN, K.; RODRIGUEZ, S.; WOLFENDER, J. L.; ODONTUYA, G.; PUREV, O., 1995 Apud ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. Review. **Journal of Chromatograpy A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Plants used for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 89-124, 1994.

ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DALTO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N., 1990 Apud LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

JACKSON, H. C.; NUTT, D. J. Body temperature discriminates between full and partial benzodiazepine receptor agonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 185, n. 2-3, p. 243-246, 1990.

JIMÉNEZ, C.; RIGUERA, R. Phenylethanoid glycosides on plants: structure and biological activity. **Natural Products Reports**, v. 11, p. 591-606, 1994.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6° ed. Sup. de Tradução: Penildon Silva. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

KIM, K.; LEE, J.; PARK, H.; KIM, J.; KIM, C.; SHIM, I.; KIM, N.; HAN, S.; LIM, S. Inhibition of cytocrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. **Life Sciences**, v. 74, p. 2769-2779, 2004.

KLUEGER, P. A.; DAROS, M. R.; SILVA, R. M.; FARIAS, M. R.; DE LIMA, T. C. M. Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae). In: INTERNATINAL JOINT SYMPOSIUM – IOCD/CYTED, 1997, Panamá. **Chemistry, biological, and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas.** Panamá, 1997.

KLUEGER, P. A.; TEUBER, C. A.; DAROS, M. R.; FARIAS, M. R.; DE LIMA, T. C. M. Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de *Lippia alba* Miller

(Verbenaceae). SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XIV, Florianópolis, 1996. **Resumos...** Florianópolis, 1996, p. 118.

LANCEL, M. Role of $GABA_A$ receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonist. **Sleep**, v. 22, n. 1, p. 33-42, 1999.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; DE LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 11, p. 247-262.

LEE, K. J.; WOO, E. R.; CHOI, C. Y.; SHIN, D. W.; LEE, D. G.; YOU, H. J.; JEONG, H. G. Proliferative effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Life sciences**, v. 74, p. 1051-1064, 2004.

LIN, M.T.; CHUANG, J. I. Melatonin potentiates $5\text{-}HT_{1A}$ receptor activation in rat hypothalamus and result in hypothermia. **Journal of Pineal Research**, v. 33, p. 14-19, 2002.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids.** New York: Springer, 1970.

MACAMBIRA, L. M. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A. Naphthoquinoids from Lippia sidoides. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, mar./apr., p. 310-312, 1986.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. Abstracts: **Phytochemistry**, v. 37, p. 1517-1575, 1994.

MAHATO, S. B.; SAHU, N. P.; ROY, S. K.; SHARMA, O. P. Potential antitumor agents from *Lantana camara*: structures of flavonoid - , and phenylpropanoid glycosides. **Tetrahedron,** v. 50, n. 31, p. 9439-9446, 1994.

MAHATO, S., B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. Review article number 38. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3037-3067, 1988.

MARINI-BETTOLO, G. B. Preliminary Chemical Screening of Medicinal Plants in Field Conditions. In: **World Health Organization.** WHO, DPM/80.5, 1980.

MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil.** Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná.

MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) – Parte II – Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 77, n. 4, p. 137-141, 1996.

MENTZ, L. A; BORDIGNON, S. A L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed.da UFSC, 2003, cap. 9, p. 211-228.

MOLGAARD, P.; RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. Review article number 36. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2411-2421, 1988.

MUTO, Y.; NINOMIYA, M.; FUJIKI, H., 1990 Apud LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

NADINIC, E.; GORZALCZANY, S.; ROJO, A.; VAN BAREN, C.; DEBENEDETTI, S.; ACEVEDO, C. Topical anti-inflammatory activity of *Gentianella achalensis*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 166-171, 1999.

OGURO, T.; LIU, J.; KLAASSEN, C. D.; YOSHIDA, T. Inhibitory effect of oleanolic acid on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced gene expression in mouse skin. **Toxicological Sciences**, v. 45, p. 88-93, 1998.

OHNO, T.; INOVE, M.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylpropanoid glycoside. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 666-668, 2002.

OWEN, R. W.; HAUBNER, R.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Isolation structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 703-717, 2003.

OZGOVÁ, S.; HERMÁNEK, J.; GUT, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH- , Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1127-1137, 2003.

PAGLIARINI, W. S. M. **Levantamento das plantas de uso medicinal do distrito de Ribeirão da Ilha.** Florianópolis, 1995. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

PARDO, F.; PERICH, F.; VILLARROEL, L.; TORRES, R. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituint of *Buddeja globosa* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 221-222, 1993.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology,** v. 56, p. 501-504, 2001b.

PENNACCHIO, M.; ALEXANDER, E.; SYAH, Y. M.; GHISALBERTI, E. L.; RICHMOND, G. S. Cardioactive effects of *Eremophila alternifolia* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 91-95, 1995.

PENNACCHIO, M.; ALEXANDER, E.; SYAH, Y. M.; GHISALBERTI, E. L. The effect of verbascosídeo on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels in isolated rat heart. **European Journal of Pharmacology**, v. 305, p. 169-171, 1996b.

PENNACCHIO, M.; SYAH, Y. M.; ALEXANDER, E.; GHISALBERTI, E. L. Mechanism of action of verbascosídeo on the isolated rat heart: increases in level of prostacyclin. Abstracts: **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 3, may, p. 254-255, 1999.

PENNACCHIO, M.; SYAH, Y. M.; GHISALBERTI, E. L.; ALEXANDER, E. Cardioactive compounds from *Eremophila* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 21-27, 1996a.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 4, 1969.

RAMOS, A.; PILOTO, V. J.; GARCIA, A.; RODRÍGUEZ, R. R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 241-246, 2003.

REIS, L. R.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. P.; ROSAL, L. F.; RODRIGUES, M. A. C. M. Fenologia e indicações fitoterápicas da erva baleeira, erva cidreira de arbusto, capim santo e artemísia. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XVII, 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá, 2002.

RICE EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIMPLER, H.; SAUERBIER, H. Iridoid glucosides as taxonomic markers in the genera *Lantana, Lippia, Aloysia* and *Phyla.* **Biochemical Systematics and Ecology,** v. 14, p. 307-310, 1986.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. Review. **Journal of Chromatograpy A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

ROBY, C. A.; KANTOR, E.; GIAMBANCO, V. **St. John's wort impact on CYP3A4 activity, 39th Annual Meeting of New Clinical Drug Evaluation Unit Program**, Boca Raton, 1999.

ROBY, C. A.; ANDERSON, G. D.; KANTOR, G. A. St. John's wort: Effect on CYP3A4 activity. **Clinical Pharmacology Therapy**, v. 67, p. 451-457, 2000.

SANTOS, P. D.; CARDOSO, V.; SONAGLIO, D.; DE LIMA, T. C. M. Efeito farmacológico de diferentes extratos de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae) no comportamento de camundongos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Comissão organizadora do XV SPMB, 1998, p. 83.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 276-282, 2002.

SCHAPOVAL, E. E. S.; DE VARGAS, W.; CHAVES, C. G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Antiinflamatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 53-59, 1998.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed.da UFSC, 2003, cap. 15, p.371-400.

SCOGIN, R. The distribution of acteoside among angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 5, p. 477-480, 1992.

SERAFINI, A. L.; PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Grown in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** Botucatu, v. 4, n. 2, p. 72-74, 2002.

SIANI, A. C.; TAPPIN, M. R. R.; RAMOS, M. F. S.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. C. K. V.; DE AQUINO NETO, F. R.; FRIGHETTO, N. Linalol from *Lippia alba*: Study of the Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3518-3521, 2002.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; BEGUM, S.; NAEED, A., 1990 Apud ATHAYDE, M. L. **Saponinas e triterpenos em algumas espécies do gênero Ilex**. Porto Alegre, 1993. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVA, R. M.; FARIAS, M. R. Investigação químico-farmacológica de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br-Verbenaceae. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VII, 1997, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 1997, p. 330.

SIMÕES, C. M O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.

SIMON, A.; NAJID, A.; CHULIA, A. J.; DELAGE, C.; RIGAUD, M., 1992 Apud LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (Falsa-melissa) Verbenaceae**. Florianópolis, 2001. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina.

SOARES, L.; FARIAS, M. R.; SONAGLIO, D. Revisão da literatura dos constituintes químicos de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae). In: FARMAPÓLIS, 2000, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, SINDFAR-SC, 2000, p. 49.

SOARES, L.; SONAGLIO, D.; PEZZINI, B. R.; ZÉTOLA, M.; BETTEGA, J. R. Aplicação de delineamento fatorial em soluções extrativas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. ex Britt.; Wils. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSC, VIII, 1998, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 1998, p. 505.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M O. et al. (org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 13, p.289-326.

SOUZA BRITO, A. R. M.; SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparision of different extraction methods for the analisis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.

TAKETA, A. T. C. **Saponinas de *Ilex brevicuspis* Reissek**. Porto Alegre, 1997. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HARBORNE, J. B.; SELF, R. Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *Lippia canescens*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 2281-2284, 1987.

TOYOTA, M.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. A molluscicidal and antifungal triterpenoid saponin from roots of *Clerodendrum wildii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2849-2851, 1990.

TSURUGA, T.; EBIZUKA, Y. T.; SANKAWA, U., 1991 Apud LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; DE LIMA, T. C. M.; VIANA, G. S. B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 127-133, 1999.

VALE, T. G.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A Efeito anticonvulsivante do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: um estudo comparativo das variedades carvonífera e citralífera.

In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XIV, 1996, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 1996, p. 120.

VEENING, J. G.; BOUWKNECHT, J. A; JOOSTEN, H. J. J.; DEDEREN, P. J.; ZETHOF, T. J. J.; GROENINK, L.; VAN DER GUETEN, J.; OLIVER, B. Stress-induced induced hyperthermia in the mouse: c-fos expression, corticosterone and temperature changes. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, p. 699– 707, 2004.

VENDRUSCOLO, G. S. **Estudo Etnobotânico das Plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, 2004. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

VIANA, G. S.; DO VALE, T. G.; SILVA, C. M.; MATOS, F. J. Anticonvulsivant activity of essencial oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1314-1317, 2000.

VIEIRA, R. A. **Avaliação dos efeitos centrais do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* Vahl**. Florianópolis, 2001. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2 ed. Springer, 1996.

WANG, B.; JIANG, Z. H., 1992 Apud LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

WANG, P.; KANG, J.; ZHENG, R.; YANG, Z.; LU, J.; GAO, J.; JIA, Z. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method (95) 02255-4. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 687-691, 1996.

WANNMACHER, L., 1990 Apud ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 137-143, 1993.

WATERMAN, P. G. Searching for bioactive compounds: various strategies. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 1, jan/feb, p. 13-22, 1990.

WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K., 1993 Apud ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. Review. **Journal of Chromatograpy A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

XIONG, Q.; HASE, K.; TEZUKA, Y.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Acteoside inhibts apoptosis in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 421-430, 1999.

XIONG, Q.; TEZUKA, Y.; KANEKO, T.; LI, H.; TRAN, L. Q.; HASE, K.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrofages. **European Journal of Pharmacology**, v. 400, p. 137-144, 2000.

XU, R.; FAZIO, C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 261-291, 2004.

ZAMORA-MARTINEZ, M. C.; NIETO DE PASCUAL, C. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 229-257, 1992.

ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS Activities of liquid and spray-

dried extracts from *Lippia alba*- Verbenaceae (Brazilian *false melissa*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207-215, 2002.

ZHENG, R. L.; WANG, P. F.; LI, J.; LIU, Z. M.; JIA, Z. J. Innibition of the autoxidation of linoleic acid by phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* in micelles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 65, p. 151-154, 1993.

ZHOU, Y. C.; ZHENG, R. L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 1177-1179, 1991.

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