



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
MOLECULARES

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES ANTI-  
TUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE TRITERPENOS ISOLADOS DE  
*Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE)**

Rosa Silva Lima

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Anápolis- GO  
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
MOLECULARES

Rosa Silva Lima

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES ANTI-  
TUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE TRITERPENOS ISOLADOS DE  
*Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE)**

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Moleculares (Físico-Química - Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Anápolis- GO  
2010

ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES: ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE TRITERPENOS ISOLADOS DE *Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE)

**ROSA SILVA LIMA**

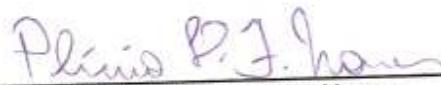
Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



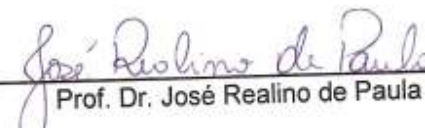
---

Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes



---

Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Nunes



---

Prof. Dr. José Realino de Paula

ANÁPOLIS, GO - BRASIL  
JUNHO 2010

Dedico este trabalho *in memória* do meu pai Pedro Benedito da Silva, que foi e continuará sendo uma das pessoas mais importante na minha vida e formação profissional. E a minha mãe Ana da Silva Lima que lutou bastante para criar seus filhos e educá-los com muito amor, carinho e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pelo dom da vida, do amor e da sabedoria ao longo de mais uma jornada de trabalho e por todas as conquistas em minha vida.
- Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes, pela paciência, dedicação, conselhos, orientação e principalmente por ter me aceito para fazer parte do seu grupo de trabalho mesmo sem me conhecer e especialmente por ter acreditado que eu seria capaz de ir até o fim.
- Ao meu namorado Everson pela paciência, amor e companheirismo nos momentos bons e difíceis deste trabalho.
- A minha família pelo apoio e carinho.
- A memória do meu pai que esteve sempre presente ao longo desses dois anos, me dando forças para continuar nessa jornada.
- A professora Caridad pelo carinho, amizade, contribuição e conselhos.
- Aos meus queridos amigos; Clayton, Adriana, Gracielle, Marcela, Poliana e Bruna pela amizade, contribuição e especialmente pelo carinho e os sorrisos no laboratório.
- Aos colegas que contribuíram de uma forma direta ou indireta na realização deste trabalho.
- Aos técnicos dos laboratórios de Enzimologia e Instrumental, Valter e Paulo, pela contribuição sempre que precisávamos.
- Aos técnicos do almoxarifado, Valéria, Talita, Kátia, Tiago, Paula, Daiane, Dona Valéria e o Senhor Fernando que sempre contribuíram conosco pegando os solventes e reagentes e emprestando material quando precisávamos.

- Ao professor Dr. Elson e sua equipe do laboratório de farmacologia da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos testes anti-inflamatórios.
  
- Ao professor Dr. Manoel Odorico de Moraes e sua equipe do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Estadual do Ceará.
  
- A professora Doutora Mirley Luciene dos Santos pela identificação botânica da planta *Vochysia cinnamomea*.

Eclesiástico 21:16

A ciência do sábio espalha-se como a água que transborda, e o conselho que ele dá permanece como fonte de vida.

## RESUMO

ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE TRITERPENOS DE *Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE). O presente trabalho descreve o estudo dos extratos da planta *Vochysia cinnamomea* pertencente à família Vochysiaceae, com intuito de isolar e identificar as substâncias promissoras que apresenta atividades antitumorais e anti-inflamatórias. Do extrato da casca do caule foram isolados 2 triterpenos: lupeol e o ácido betulínico e 1 esteróide:  $\beta$ -sitosterol. Dos extratos das folhas foram isolados 3 triterpenos:  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e o ácido ursólico. Os testes antitumorais foram realizados frente às linhagens de células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólono-humano) e SF-295 (sistema nervoso central) com as substâncias: Lupeol, ácido betulínico, ácido ursólico e mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina não apresentando atividade relevante. Os triterpenos: lupeol e ácido betulínico foram testados a atividade anti-inflamatória pelo método de contorção abdominal, mas apenas o ácido betulínico teve atividade satisfatória na concentração de 30 mg/kg e o lupeol na concentração de 10 mg/kg não apresentou atividade.

Palavras chaves: *Vochysia cinnamomea*, lupeol, ácido betulínico, ácido ursólico,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina.



## ABSTRACT

ISOLATION, STRUCTURAL DETERMINATION AND ANTITUMOR AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF THE TRITEPENES FROM *Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE). This work describes the study of plant extracts *Vochysia cinnamomea* Vochysiaceae, aiming to isolate and identify promising substances which has antitumor activities and anti-inflammatory properties. Extract of stem bark were isolated two triterpenes: lupeol and betulinic acid and a steroid:  $\beta$ -sitosterol. Extracts of the leaves were isolated three triterpenes:  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin and ursolic acid. The tests were carried forward to the antitumor cell lines MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (human-colon) and SF-295 (central nervous system) with substances: Lupeol, betulinic acid, ursolic acid and mixing  $\alpha$  and  $\beta$  amyrin showing no relevant activity. Triterpenes: lupeol and betulinic acid were tested for anti-inflammatory activity by the acetic acid-induced abdominal writhing method, but only the betulinic acid activity was satisfactory at a concentration of 30 mg / kg and Lupeol the concentration of 10mg/kg was inactive.

Keywords: *Vochysia cinnamomea*, lupeol, betulinic acid, ursolic acid,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 – Cerrado:.....	4
2.2 - Revisão de Produtos Naturais .....	5
2.3 - Produtos Naturais e a descoberta de fármacos importantes.....	8
2.4 – Atividade Anti-inflamatória.....	11
2.4.1 – Alguns metabólitos secundários com ação anti-inflamatória.....	12
2.4.2 – Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	13
2.4.3 - A importância da dor .....	15
2.4.4 – Conceito de nocicepção.....	17
2.5 – Câncer .....	18
2.5.1 - Drogas antitumorais originadas de Plantas .....	20
2.6 - Família Vochysiaceae.....	23
2.6.1 - A espécie <i>Vochysia cinnamomea</i> Pohl .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1. Materiais e reagentes utilizados .....	26
3.2. Equipamentos:.....	27
3.3 - Material Botânico.....	27
3.3.1- <i>Vochysia cinnamomea</i> – Coleta .....	27
3.3.3 - Fracionamento do extrato bruto .....	29
3.3.4 – Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>V. cinnamomea</i> :...30	
3.3.4.1 – Obtenção das substâncias do extrato hexânico de VCCCEH.....	30
3.3.4.2 – Obtenção das substâncias da fração de VCCCED.....	33
3.3.5 – Fracionamento dos extratos de VCFED eVCFEA.....	35
3.4 – Ensaio biológicos.....	37
<b>3.4.1 – Avaliação da Atividade Antinociceptiva .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4.1.1 – Contorções abdominais induzidas por ácido acético .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 – Análise Estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6 – Análise da Atividade Antitumoral .....</b>	<b>38</b>
<b>3.6.1 – Teste do MTT.....</b>	<b>38</b>
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>5- CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>

<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
--	-----------

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Estrutura química da coniina e alguns alcalóides opióides .....	9
Figura 2: Estrutura química da salicina e seus derivados.....	10
Figura 3: Estrutura do ácido masticadienóico e o ácido masticadienólico.....	13
Figura 4: Estrutura do ácido caféico e da glicirrizina anti-inflamatórios naturais.....	13
Figura 5: Estruturas químicas de substâncias alrogênicas.....	18
Figura 6: Estruturas de algumas drogas antitumorais.....	22
Figura 7: Estrutura das duas principais drogas antitumorais.....	23
Figura 8: Estrutura química do ácido elágico e da vochysine.....	24
Figura 9: Estruturas de alguns compostos isolados de espécies do gênero <i>Vochysia</i> ..	25
Figura 10: Foto de <i>V. cinnamomea</i> , UEG, Anápolis-GO, LIMA, R.S., .....	26
Figura 11: Fluxograma de obtenção do extrato bruto de VCCCE.....	28
Figura 12: Fluxograma de obtenção do extrato bruto das folhas de <i>V. cinnamomea</i> ....	28
Figura 13: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato VCCCE.....	29
Figura 14: Fluxograma do fracionamento com celulose do extrato VCFE.....	29
Figura 15: Fluxograma do isolamento da substância 22-29 HAH de VCCCEH.....	31
Figura 16: Fluxograma do isolamento da substância 1-13 HAH3 de VCCCEH.....	32
Figura 17: Fluxograma do fracionamento do extrato de DCM de VCCCED.....	33
Figura 18: Fluxograma do isolamento da substância 61-65 HD5 do extrato de DCM. 34	
Figura 19: Fluxograma do isolamento da substância 09HD7 do extrato de DCM.....	35
Figura 20: Fluxograma do isolamento da substância B (VCFED) do extrato de DCM. 36	
Figura 21: Fluxograma do isolamento da substância (VCFEA) do extrato de AcOEt. 37	
Figura 22: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 22 HAH.....	43
Figura 23: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	43
Figura 24: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 13 HAH3.....	46
Figura 25: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 13 HAH3.....	46
Figura 26: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 61-65 HD5 e 09 HD7. ....	49
Figura 27: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 09HD7.....	49
Figura 28: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 51-55 VCFEA.....	52
Figura 29: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 51-55 VCFEA.....	52
Figura 30: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 101-105VCFED.....	56
Figura 31: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) expandido de 101-105VCFED....	56
Figura 32: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 101-105 VCFED.....	57

Figura 33: Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	59
Figura 34: Foto da Contorção abdominal de um camundongo swiss, LIMA, R. S. ....	61

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 –Classificação química dos principais agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) .....	14
Quadro 2 – Classes de agentes carcinógenos .....	19

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do fracionamento com celulose das folhas e da partição líquido-líquido das cascas do caule de <i>V. cinnamomea</i> .....	30
Tabela 2 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H da substância 22HAH em CDCl <sub>3</sub> .....	41
Tabela 3- Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup> C da substância 22 HAH em CDCl <sub>3</sub> .....	42
Tabela 4 – Dados Espectroscópicos RMN <sup>1</sup> H da substância 1-13HAH3 em CDCl <sub>3</sub> .....	43
Tabela 5- Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup> C da substância 1-13 HAH3 em CDCl <sub>3</sub> .....	45
Tabela 6 – Dados espectroscópicos RMN <sup>1</sup> H da substância 09HD7 em CDCl <sub>3</sub> .....	47
Tabela 7- Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup> C da substância 09 HD7 em CDCl <sub>3</sub> .....	48
Tabela 8 – Dados espectroscópicos RMN <sup>1</sup> H da substância 51-55 VCFEA em CDCl <sub>3</sub> .....	50
Tabela 9- Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup> C da substância 51-55VCFEA em CDCl <sub>3</sub> ..	51
Tabela 10 – Dados espectroscópicos RMN <sup>1</sup> H da substância 101-105VCFED em CDCl <sub>3</sub> .....	54
Tabela 11-Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup> C da substância101-105VCFED em CDCl <sub>3</sub> .....	55
Tabela 12 – Porcentagem de inibição através do ensaio do MTT.....	58

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Aco	Acetato
AcOEt	Acetato de Etila
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CC	Cromatografia em Coluna
Conc.	Concentração
fr.	Frações
h	Altura
Me	Metila
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
Ac	Acetona
Hex	Hexano
$\Phi$	Diâmetro
$\lambda$	Comprimento de onda
UV	Ultra Violeta
VCCCE	<i>Vochysia cinnamomea</i> Casca do Caule Etanol
VCFE	<i>Vochysia cinnamomea</i> Folhas Etanol
Rf	Fator de Retenção
i.p	intraperitoneal
s.c	subcutânea
dd	duplo dubleto
s	singleto
m	multipleto
t	tripleto
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13



# 1 – INTRODUÇÃO

As espécies vegetais têm sido usadas para o tratamento e cura de doenças desde o remoto início da civilização. Essa prática milenar sobreviveu a todos os obstáculos no decorrer da história, chegando até os dias atuais, sendo largamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recursos medicinais (DI STASI, 1996).

Os registros existentes comprovam que há mais de 2500 anos os chineses, os egípcios, os gregos e os romanos já conheciam várias maneiras de preparação de medicamentos e elaboravam seus extratos por meio de extrações de muitas plantas. Com o decorrer dos anos, os produtos naturais adquiriram grande importância no conhecimento popular devido suas propriedades e passaram a ser utilizadas principalmente dentro de um contexto cultural (REIS et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países subdesenvolvidos utilizam algum tipo de planta na atenção primária à saúde (MARTINS, 2000), sendo que destes, 30% são por indicação médica. Pesquisas realizadas nos EUA constataram que em 25% das receitas médicas enviadas às farmácias, um dos princípios ativos era um derivado de plantas (TRENTINI e YAMADA, 2001). Cerca de 20% da população mundial é responsável pelo consumo de 85% dos medicamentos disponíveis no mercado, vale ressaltar que os países desenvolvidos estão em primeiro lugar no ranking internacional de consumo.

Os índios, europeus e africanos deixaram para a cultura brasileira uma grande influência no uso de plantas para o tratamento de doenças e o conhecimento popular está baseado nessas influências. O desenvolvimento do conhecimento popular no uso de plantas medicinais está relacionado com grupos culturais que estão ligados diretamente com a natureza, essas pessoas vivem perto das belezas naturais e exploram suas potencialidades, mantendo esse patrimônio vivo (ELISABETSKY, 1997). Os pesquisadores aproveitam as práticas populares por meio de informações que são obtidas pela etnobotânica e etnofarmacologia. Mesmo assim, as plantas empregadas com propriedades medicinais só passam a ter valor como drogas fitoterápicas após estudos e comprovação científica de sua eficácia e segurança em relação à toxicidade.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o consumo de espécies vegetais medicinais é bastante elevado em alguns países. Na China entre 30-50% dos medicamentos consumidos é de origem vegetal. Nos países da Europa e da América do Nor-

te, 50% da população já fizeram uso de fitoterápico. Na Alemanha, 90% das formulações farmacêuticas contêm componentes de origem vegetal (WHO, 2008).

A Fitoterapia é uma forma de terapia medicinal em notável crescimento, e que esta movimentando mais ou menos 22 bilhões de dólares mundialmente ao ano, sendo que no Brasil a participação é de aproximadamente 20% (YUNES et al., 2001). Os medicamentos fitoterápicos têm oferecido um grande suporte a indústria farmacêutica nacional de pequeno e médio porte, com um crescimento desses mercados de aproximadamente 15% ao ano (REIS, et al., 2003).

Na obtenção de novos fármacos, existem dois aspectos que devemos considerar, para distinguirmos os produtos naturais de origem vegetal dos sintéticos; a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais bioativos é superior à dos produtos sintéticos. E os produtos de organismos vivos têm similaridades com o metabolismo dos mamíferos, sendo que os produtos naturais muitas vezes apresentam propriedades adicionais àquelas a eles associadas (NISBET e MOORE, 1997).

A biodiversidade da flora brasileira abrange quase 30% das plantas encontradas no mundo, o que faz do território brasileiro uma extensa fonte de plantas medicinais e exóticas, criando assim um vasto campo comercial a ser explorado (MALUENDAS e PEITZ, 2004).

O crescimento e a busca por terapias de origem natural vêm sendo observados tanto em países de terceiro mundo como nos países desenvolvidos. Muitas pessoas acreditam na falsa idéia de que os fármacos oriundos de plantas, não são tóxicos e nem tem efeitos colaterais, e são, portanto seguros. Estudos realizados recentemente comprovaram que as plantas possuem enormes quantidades de metabólitos secundários e alguns deles apresentam toxicidade elevada. Dentre vários compostos tóxicos temos muitas drogas antineoplásicas, os digitálicos, a efedrina, os ésteres de forbol, a estricnina, os curares e os heterosídeos cianogênicos. Existem muitos problemas para detectar a toxicidade em humanos, porque o número de relatos e ocorrências e a associação causa e efeito, as vezes não chegam a ser registrados. Isso torna os efeitos tóxicos das plantas aparentemente menores se relacionados com os alopáticos que passaram por todo um processo de testes até chegar ao consumo humano e mesmo assim alguns têm apresentado efeitos colaterais e toxicidade (D'ARCY, 1993; DREW e MYERS, 1997; BAGHERI et al., 1998; CALIXTO, 2000). As plantas não podem ser validadas como, medicamentos eficazes e seguros, baseado somente em conhecimentos populares. Por isso,

a autorização oficial do uso de produtos naturais como drogas medicamentosas deve estar fundamentada em dados experimentais (estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos), que demonstrem que os benefícios oferecidos a partir do uso desses medicamentos são superiores aos riscos que eles oferecem àqueles que os utilizam (BRASIL, 1995).

O grupo de pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Anápolis (UnUCET) desenvolve estudos com o objetivo de isolamento, determinação estrutural de constituintes químicos de plantas do Cerrado tendo como base em informações etnofarmacológicas e etnobotânicas. Nesta linha têm sido estudadas algumas plantas com atividade, antitumoral, inseticida, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana.

No presente trabalho se estudou uma planta que pertence à família Vochysiaceae e esta classificada no gênero *vochysia*, seu nome científico é *Vochysia cinnamomea*(LORENZI, 1998). Esta planta foi escolhida depois de pesquisa bibliográfica, relacionada com o estudo fitoquímico e farmacológico da família Vochysiaceae e do gênero *vochysia*. Ao ser constatado que as plantas pertencentes a esta família apresentavam reputação como medicinais (antibacteriana, antifúngica, antiulcerogênica, gástrica, analgésica e anti-inflamatória), optou-se por fazer o estudo fitoquímico e a avaliação de algumas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória e antitumoral, com os constituintes químicos isolados dessa espécie. Até o presente momento esse tipo de estudo para essa espécie é considerado inédito e foram procuradas informações populares importantes que serviram de ponto de partida para a realização do trabalho. O objetivo desse trabalho é o isolamento, determinação estrutural e atividades antitumoral, e anti-inflamatória de triterpenos isolados de *Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE).

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Cerrado:

Na América do sul cerca de dois milhões de Km<sup>2</sup> constitui o Bioma Cerrado, esta área cobre aproximadamente 25% do território brasileiro e áreas pequenas da Bolívia e Paraguai. A vegetação do cerrado é do tipo savânica e tem uma estrutura praticamente variável caracterizando uma mistura de plantas de estrato lenhoso, isso inclui as árvores e os arbustos, que contém plantas de um estrato rasteiro, composto por subarbustos e herbáceas (OLIVEIRA-FILHO e RATTER, 2002). Os solos do cerrado têm baixa concentração de nutrientes, e as estações secas e as queimadas fazem com que as plantas sofram os fatores de estresse, sendo que existe pouco conhecimento da influência dos fatores bióticos (MARQUIS et al., 2002).

O termo cerrado pode ser designado tanto em relação aos tipos de vegetação quanto o bioma ou áreas geográficas (RIBEIRO e WALTER, 1998). O cerrado *sensu lato* designa as formações savânicas e campestres, enquanto o cerrado *sensu stricto* designa o tipo fisionômico que mais caracteriza o bioma (COUTINHO, 1978; RIBEIRO e WALTER, 1998).

O Bioma cerrado possui o segundo maior conjunto de animais da Terra e sua riqueza biológica está estimada em torno de 160.000 espécies de plantas e animais e tudo isso corresponde a mais ou menos 5% da flora e fauna do mundo (DIAS, 1992). Por possuir uma grande diversidade, criou-se na região do cerrado, uma enorme tradição do uso dos recursos vegetais das mais variadas formas.

O estudo do cerrado está concentrado em apenas algumas localidades específicas, o que acaba gerando muitas incertezas sobre a sua biodiversidade. Por isso, há necessidade de se realizar estudos bem elaborados nas áreas que ainda são pouco conhecidas para que se possa traçar uma política ambiental de aumento dessas áreas protegidas do Cerrado, que atualmente cobrem menos de 2% do total do Bioma cerrado, sendo insuficiente para sua preservação (BUSCHBACHER, 2000).

Existem muitas ameaças à diversidade do cerrado, mais a maior delas é a crescente ocupação das paisagens naturais por atividades antrópicas. O homem está sempre em busca de mais espaço, para uma série de políticas de cunho desenvolvimentista e

isso tem transformado a região do cerrado numa paisagem fragmentada com a predominância da atividade agropecuária (BUSCHBACHER, 2000).

O grande nível de antropização no Cerrado tem descaracterizado os ecossistemas existentes, isso acaba em conseqüências no ambiente como o extermínio de parte da fauna silvestre. As conseqüências para a fauna estão relacionadas com as queimadas, os atropelamentos nas rodovias, caças indiscriminada, o lixo e agrotóxicos jogados nos rios e principalmente pela ocupação do habitat para construir cidades e lavouras (NASCI-MENTO, 2001).

O fogo é uma característica do Cerrado, mas a ocupação do homem está mudando este cenário natural do fogo, em relação às estações e á freqüência de inúmeras queimadas. Tudo isso tem trazido conseqüências para a biodiversidade. No período dos meses de junho a novembro, algumas áreas do país sofrem com as queimadas, que se estendem por quase todas as regiões com maior ou menor intensidade. No Bioma Cerrado este período é acometido pela seca que deixa a umidade relativa do ar muito baixa. Na agropecuária o fogo é empregado para diversos fins, como renovação de áreas de pastagem, remoção de material acumulado, entre outros (IBAMA-PREVFOGO).

As plantas medicinais do cerrado empregam muitas pessoas, desde técnicos, profissionais e empresários, na colheita, no preparo e na distribuição que muitas vezes ocorrem em pontos de vendas de feiras, mercados e ambulantes. Existe também, uma diversificação de nomes das plantas que ocorre de uma região para outra, com maior ênfase na Bahia ( ORTENCIO, 1997).

## **2.2 - Produtos Naturais**

A humanidade utiliza as plantas medicinais para o tratamento de doenças desde os tempos antigos. Hoje sabemos que os povos primitivos sempre buscaram nos produtos naturais medicamentos para aliviar a dor causada por doenças ou acidentes. Por meio de experimentos e da observação do comportamento do reino animal, que buscam nas plantas, alívio para suas dores, as pessoas de todos os continentes sempre buscaram produzir ao longo de toda a história um importantíssimo saber sobre as propriedades dos produtos naturais (SILVA, 2003).

No livro sagrado cristão, a Bíblia, tanto no Antigo como no novo Testamento, existem muitas citações de plantas curativas e seus derivados, por exemplo, o aloe, o benjoim, a mirra, entre outros (TOMAZZONI, 2004).

Oriente e Ocidente são ricos em exemplos do uso de produtos naturais; na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, podemos citar como exemplo de destaque as civilizações Egípcia, Greco-Romana e Chinesa (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006). Em 1873 o egiptólogo alemão Georg Ebers, decifrou o Papiro de Ebers, um tratado médico muito famoso, conhecido desde o século XVI antes de Cristo. Esse tratado tem uma importância muito grande para a fitoterapia, pois nele estão descritas centenas de plantas medicinais e receitas para preparar medicamentos utilizando produtos naturais (SILVA, 2003).

Na civilização da antiga Grécia, os gregos já tinham conhecimentos de plantas que curavam enfermidades, e as consideravam sagradas e mitológicas em relação aos deuses. O grego Hipócrates teve uma grande importância na medicina do século V antes da era cristã, ele foi o autor de uma completa obra sobre medicina, *Corpus Hipocratium*, esta obra rendeu-lhe o título de pai da medicina. No ano 100 a.C os chineses escreveram o Sheng Nung Bem Cao Chien (Herbal clássico do divino lavrador), o primeiro livro chinês sobre as plantas e o seu poder de cura. Naquela época os chineses já conheciam 250 plantas e a cura de 150 doenças com elas. No século I d.C início da era cristã foi fundado o primeiro tratado Europeu, escrito pelo médico e cirurgião romano, Pedanios Dioscórides denominado “De Matéria Médica” esse tratado contém 600 plantas descritas de origem asiática, grega, egípcia e italiana, que foram à base da medicina por 18 séculos (SILVA, 2003).

Os países em desenvolvimento têm muitos problemas relacionados ao uso de medicamentos industrializados, pois, as populações são na maioria pobres que não têm condições de obter esses medicamentos e acabam buscando no conhecimento tradicional um meio para curar seus males. Mas sabe-se que a cura oriunda de remédios tradicionais não é muito confiável, pois, os mesmos não acompanham os avanços tecnológicos, e os métodos de preparos são tidos como secretos. Muitas vezes o uso destes medicamentos esta associado à crenças, rituais, misticismo, forças intangíveis como à feitiçaria, e em muitos aspectos baseado em princípios morais e espirituais que dificultam a racionalização (TAYLOR et al., 2001).

Os remédios de origem vegetal estão ganhando destaque nos países Ocidentais, devido a necessidade urgente de desenvolver novas drogas e as plantas medici-

nais tem ganhado atenção especial tanto das indústrias farmacêuticas como da comunidade científica (TAYLOR et al., 2001).

O desenvolvimento de trabalhos com plantas medicinais origina medicamentos em menor tempo, com custos às vezes mais baratos e acessíveis à população carente sem condições financeiras de adquirir os remédios necessários para a manutenção da saúde. Por esse motivo ou pelo descaso dos órgãos responsáveis pela assistência primária de saúde, 80% dessas pessoas não tem acesso a um atendimento médico básico de saúde (TOLEDO et al., 2003).

Devido às limitações financeiras das pessoas de baixa renda dos países em desenvolvimento, destaca-se uma demanda muito grande pelos produtos fitoterápicos, que tem um potencial muito amplo de geração de empregos e renda, principalmente em regime de economia solidária. Para que tudo isso aconteça de forma organizada é preciso mais esforços nas áreas de pesquisas de fitoterápicos que comprovem as propriedades medicinais das plantas e a estruturação dos sistemas de saúde, mediante capacitação dos profissionais que trabalham nesta área (NUNES et al., 2003)

O Brasil precisa resgatar a valorização da fitoterapia cuidadosamente para que as plantas de alto valor medicinal não sejam exterminadas, das matas, da caatinga e do cerrado, dificultando assim o trabalho dos cientistas na descoberta de suas propriedades medicinais, para que elas sejam transformadas em remédios. Deve-se ter a preocupação do desenvolvimento de técnicas de cultivo e colheita para não comprometer a reprodução dessas espécies. Conscientizar a população quanto ao crescimento urbano desordenado que causa o extermínio das áreas verdes ricas em produtos naturais de fonte medicinal (ADEODATO et al., 1996).

Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal, tais como: a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer, estudos sobre a biodiversidade, a preservação das espécies e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas. Por outro lado, a falta de informação e mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de efeitos colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença na sua eficácia (CARVALHO, 2001).

Na luta pelo nosso próprio progresso, deve-se ter sempre o cuidado de não destruir aquilo que nos ajuda a progredir. As plantas foram fiéis servidoras do homem desde os primórdios dos tempos, e é difícil imaginar a farmácia ou a medicina sem os glicosídeos do gênero *Digitalis*, os alcalóides do ópio, os antibióticos da tetraciclina ou, a

propósito, as antraquinonas da *Cassia angustifolia*. No entanto, sem as plantas, nem estes, nem muitos medicamentos usados jamais teriam existido. Já é hora de retribuir, ajudando às plantas a continuar ocupando seu lugar de direito no mundo, em que elas já existiam muito antes do *Homo sapiens* (ROBBERS et al., 1997).

A Portaria N° 2.982/GM/MS(1), publicada em 2009, no seu anexo II, inclui no Elenco de Referência Nacional de Medicamentos e Insumos Complementares para a Assistência Farmacêutica na Atenção Básica:

Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) – cápsula, comprimido, emulsão, solução e tintura;

Guaco (*Mikania glomerata*) – cápsula, solução oral, tintura e xarope;

Alcachofra (*Cynara scolymus*) – cápsula, comprimido, drágea, solução oral e tintura;

Aroeira (*Schinus terebenthifolius*) – gel e óvulo;

Cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana*) – cápsula e tintura;

Garra-do-diabo (*Harpagophytum procumbens*) – cápsula;

Isoflavona-de-soja (*Glycine max*) – cápsula e comprimido;

Unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) – cápsula, comprimido e gel.

Medicamentos homeopáticos conforme Farmacopeia Homeopática Brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009)

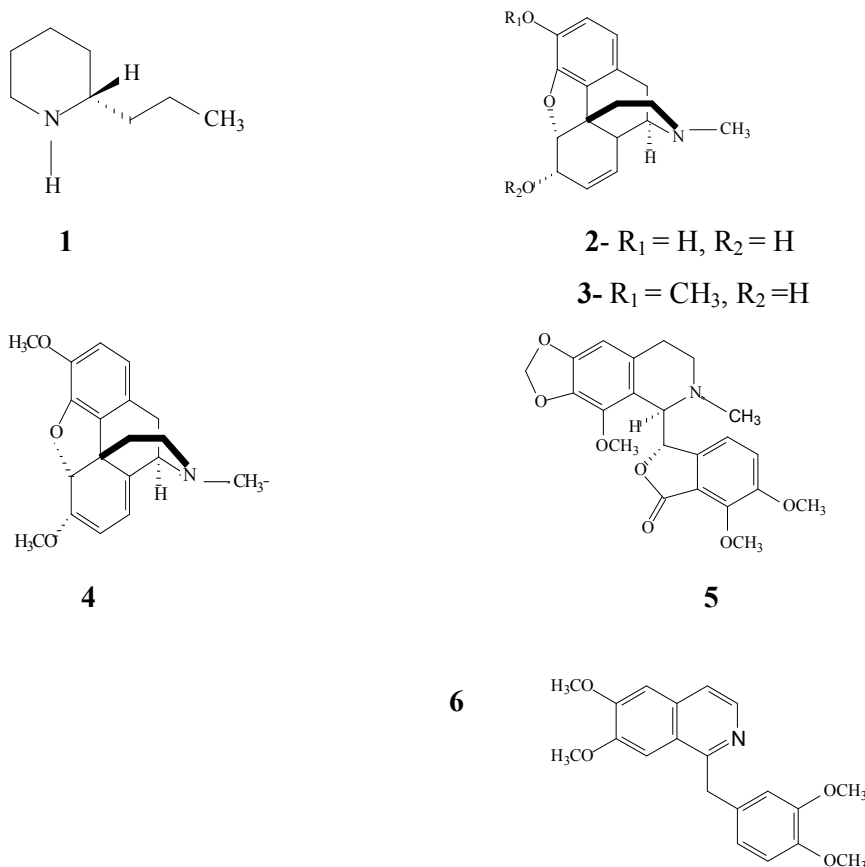
Atualmente, um dos principais alvos relacionados à pesquisa com plantas medicinais são os problemas gastrintestinais, principalmente os males associados ao sistema gástrico. A relação entre os produtos obtidos de fontes naturais e a gastroproteção é antiga e, constantemente, tem sido objeto de estudos incessantes em busca da substância com efeito terapêutico ideal.

### **2.3 - Produtos Naturais e a descoberta de fármacos importantes**

A descoberta de substâncias alucinógenas derivadas de produtos naturais causou um grande impacto na humanidade, levando uma modificação no comportamento do homem moderno. Os povos antigos utilizavam largamente rapés e bebidas alucinógenas em suas práticas religiosas e mágicas. Na Grécia antiga, extratos vegetais eram utilizados em execuções, como no caso de Sócrates, que morreu após a ingestão de uma bebida a base de cicuta, que continha a coniina (1, Figura 01) (PINTO, 1995).



Outra substância importante derivada de plantas é o ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*. Conhecido por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Esta planta era utilizada desde a época dos Sumérios (4000 A.C), havendo relatos na mitologia grega atribuindo ao ópio da papoula o simbolismo de Morfeu, o deus do sono (HOSTETTMANN et al., 2003). Em 1803, Derosne descreveu o “sal de ópio”, iniciando os primeiros estudos sobre a constituição química do ópio; em 1804, na França, Armand Séquin isolou o seu constituinte majoritário, a morfina (**2**), ele e Sertüner publicaram seus trabalhos sobre *o principium somniferum*, tendo sido os pioneiros na busca pela utilização de substâncias naturais na forma pura (HENRIQUES et al., 1999). O ópio contém outros alcalóides com propriedades interessantes como a codeína (**3**, antitussígeno), a tebaína (**4**, antagonista da morfina), a narcotina (**5**, antitussígeno e espasmolítico) e a papaverina (**6**, espasmolítico) (HOSTETTMANN et al., 2003) (Figura 01). A grande eficácia da morfina como analgésico foi reconhecida após a invenção da seringa hipodérmica (1853), e foi largamente utilizada pelas tropas dos EUA durante a Guerra de Secessão (1861-1865) (HOSTETTMANN et al., 2003).

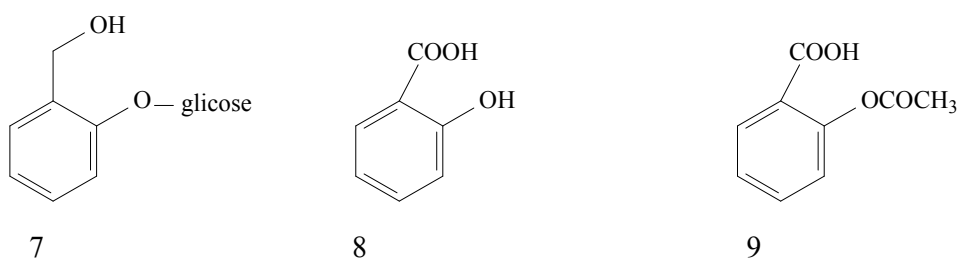


**Figura 1:** Estrutura química da coniina e alguns alcalóides opióides

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix Alba* (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001; WEISSMANN, 1991) em 1757, quando o reverendo Edward Stone provou o sabor amargo das cascas do salgueiro de *Salix alba* e associou-o ao sabor dos extratos de *Cinchona*. O reverendo levou seus estudos adiante e alguns anos mais tarde obteve resultados incríveis e muito importantes para a medicina, com a descoberta das propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato dessa planta (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001; WEISSMANN, 1991).

Em 1807, França e Alemanha brigavam na busca pelo princípio ativo de *S. Alba* que era na época uma importante descoberta a ser patenteada. Mas foi só em 1828, no Instituto de Farmacologia de Munique, que o pesquisador Johan A. Buchner isolou a substância salicina (7) (Figura 02). O rendimento da salicina a partir do extrato da planta foi muito baixo, sendo assim houve interesse de outros cientistas em melhorar a qualidade da substância obtida. Em 1860, Herman Kolbe e alguns alunos sintetizaram o ácido salicílico (8), e também o sal sódico a partir do fenol, por volta de 1874, Friedrich Von Heyden, montou uma grande fábrica para a produção de salicilatos (WEISSMANN, 1991).

No início do século XX, Felix Hofmann pesquisando a cura para artrite, doença que acometia seu pai, que era muito sensível aos efeitos colaterais do salicilato de sódio. Fez uma importante descoberta marcando a época, o ácido acetil-salicílico (9, Figura 02), menos ácido que o ácido salicílico, mas que continha as mesmas propriedades analgésicas desejadas.



**Figura 2:** Estrutura química da salicina e seus derivados

Devido às propriedades terapêuticas do ácido acetil-salicílico (AAS), em seus laboratórios de pesquisas, a Bayer lançou o AAS como um produto novo no mercado, para competir com os salicilatos naturais, e foi no início do século XX que esse medicamento passou a ser chamado de Aspirina. Depois de mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de muitas pesquisas sobre sua ação terapêutica como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001; WEISSMANN, 1991).

#### **2.4 – Atividade Anti-inflamatória**

A inflamação é uma resposta do tecido vivo e vascularizado a estímulo irritante, sendo freqüentemente associada à dor e envolvendo eventos como retração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local, aumento da migração de granulócitos e células mononucleares, assim como proliferação de tecido granulomatoso (ANDRADE et al., 2007).

O rubor e a hipertermia da inflamação aguda são resultado da dilatação dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo na região inflamada, e o edema inflamatório é provocado pelo acúmulo de líquido e células inflamatórias nos espaços intersticiais, particularmente dos componentes fluidos. A dor resulta de uma combinação de fatores incluindo a pressão nas terminações nervosas, pelo edema, e de um efeito direto de determinados fatores químicos liberados durante a resposta inflamatória. A perda da função, total ou parcial, na área inflamada, pode ser uma consequência direta da injúria ou secundária ao edema e dor marcantes provocados pelo próprio dano (STEVENS e LOWE, 2002; HANSEL e DINTZIS, 2007).

Dentre as diversas metodologias empregadas para pesquisas de novas drogas com potencial anti-inflamatório os agentes flogísticos, indutores do processo inflamatório, como a carragenina, dextrana e histamina são bastante usados em triagem farmacológica para avaliação de substâncias com potencial anti-inflamatório (WINTER et al., 1962).

Anti-inflamatórios são fármacos que podem agir em vários passos do processo fisiopatológico, podendo inibir a biossíntese de mediadores pela interação direta com enzimas-chaves (como inibidores da enzima ciclooxigenase), ou reduzindo níveis de

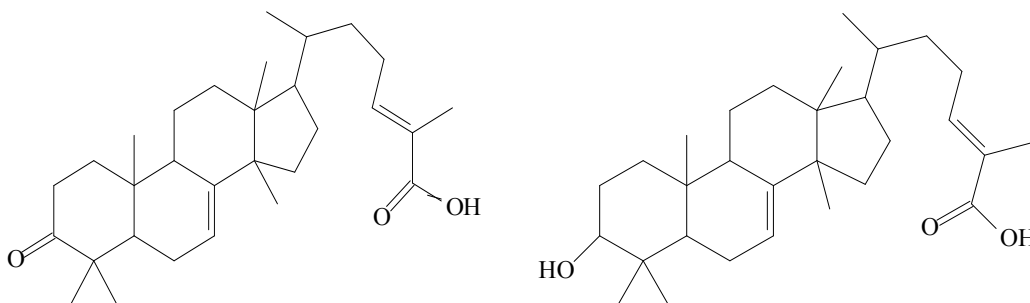
substrato (redução da liberação de ácido araquidônico). Adicionalmente podem agir inibindo a liberação de mediadores estocados (por exemplo, histamina) ou através da imunoestimulação, removendo a substância irritante e diminuindo a agressão tecidual (SAFAIHY E SAILER, 1997).

#### 2.4.1 – Alguns metabólitos secundários com ação anti-inflamatória

Muitas plantas medicinais usadas popularmente para tratar condições inflamatórias apresentam triterpenóides exibindo ação anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*, incluindo supressão da síntese de prostanóides e citosinas, bem como inibição da atividade enzimática e peroxidação lipídica. Em geral sesquiterpenos e triterpenos pentacíclicos tem sido reportados por exibir ação anti-inflamatória, antiulcerogênica e antinociceptiva (NAVARRETE et al., 2002; FERNANDES et al., 2003; MALHEIROS et al., 2001; SCHEIDT et al., 2002).

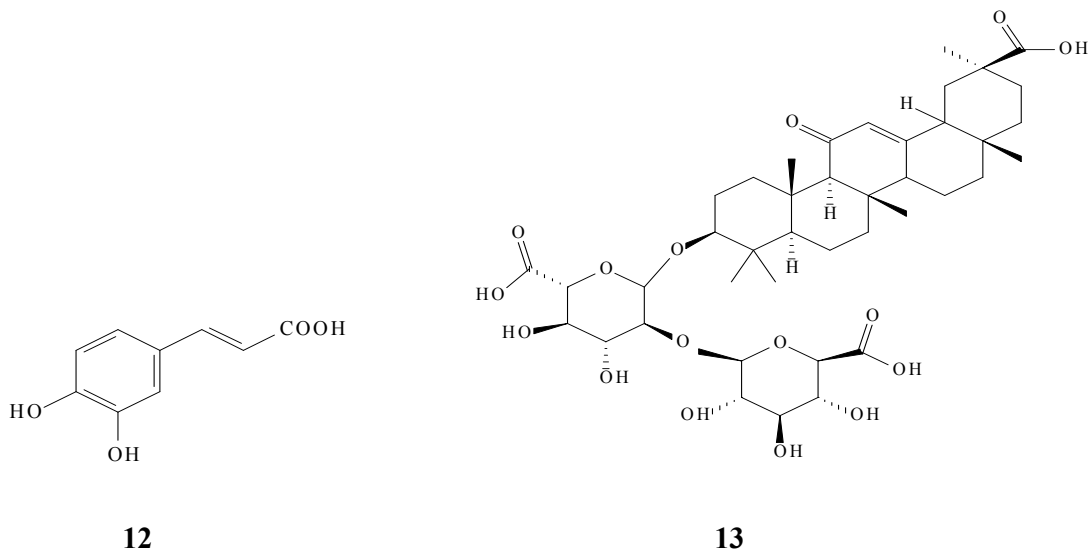
Em trabalhos desenvolvidos por Jain e colaboradores (1995) foi verificado que os triterpenos, como o ácido masticadienóico (**10**) e o ácido masticadienólico (schinol) (**11**) (Figura 03), apresentam atividade anti-inflamatória por serem inibidores competitivos e específicos da fosfolipase  $A_2$ .

Flavonóides e alguns compostos triterpênicos têm sido relatados por apresentar efeito inibitório da enzima lipoxigenase ou ciclooxigenase (NARAYANA et al., 2001; KIM et al., 2004; ORHAN et al., 2006; KUPELI et al., 2006; GUTIERREZ-LUGO et al., 2004).



**Figura 3:** Estrutura do ácido masticadienóico e o ácido masticadienólico.

Alguns glicosídeos do ácido caféico (**12**) (Figura 04) apresentam inibição seletiva da 5-lipoxigenase, a qual está relacionada com a biogênese dos leucotrienos, estando estes envolvidos com a imunorregulação (KIMURA et al., 1987). Plantas ricas em taninos são empregadas tradicionalmente em doenças como diarreias, hipertensão, reumatismo, hemorragias, problemas estomacais (azia, gastrite e úlcera gástrica); problemas renais e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996). Saponinas como glicirrizina (**13**) (Figura 04), (isolada da *Glycyrrhiza glabra* L.) têm demonstrado importante atividade anti-inflamatória (SCHENKEL et al., 2000). Diversas atividades foram atribuídas as xantonas tais como inibição da agregação plaquetária e ação anti-inflamatória (LIN et al., 1996). Lignanas (como glicosídeo do álcool di-hidrodicofenil isolada da espécie *Plagiorhegma dubium* Maxim.) e Neolignanas (como por exemplo, a magnoshinina, isolada da *Magnolia salicifolia* Maxim.) demonstraram também atividade anti-inflamatória (MACRAE e TOWER, 1984)



**Figura 4:** Estrutura do ácido caféico e da glicirrizina anti-inflamatórios naturais.

#### 2.4.2 – Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

O desenvolvimento de inúmeros anti-inflamatórios não esteroidais, inibidores seletivos de COX-2 numa tentativa de aumentar a aceitação dessas medicações pelos pacientes,

<b>Substâncias</b>	<b>Derivados</b>
Ácido salicílico e derivados	Ácido acetilsalicílico, salicilato de sódio, diflunisal.
Ácidos indol e indol acéticos	Indometacina, sulindaco, etodolac.
Ácidos hetero aril-acéticos	Tolmetina, diclofenaco, aceclofenaco, ceterolaco.
Ácidos arilpropionícos	Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, loxoprofeno, oxaprozina.
Ácidos antranílicos (fenamatos)	Ácidos, mefanâmico, ácido meclofenâmico.
Ácidos enólicos	Piroxicam, tenoxicam, meloxicam.
Alcanones (não acídicos)	Nabumetona
Furanona diaril-substituído	Refecoxib
Pirazol diaril-substituído	Celecoxib
Sulfonanilida	Nimesulida

reduzir a toxicidade (principalmente gastrointestinal), e aumentar o efeito anti-inflamatório. O Quadro 1 mostra a classificação dos AINEs, baseadas nas estruturas químicas de fármacos convencionais ainda de uso corrente ao lado daqueles considerados com maior seletividade anti-COX-2 (SOLOMON, 2007; BRENOL et al., 2000).

**Quadro 1** – Classificação química dos principais agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs compõem um grupo heterogêneo de compostos, que consiste de um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional. São ácidos orgânicos fracos que atuam principalmente nos tecidos inflamados e se ligam, significativamente, à albumina plasmática (JÚNIOR et al., 2007).

Essencialmente, todos os AINEs são convertidos em metabólitos inativos pelo fígado e são, predominantemente, excretados pela urina; embora o sulindac também

possa ser metabolizado no rim. Alguns AINEs e seus metabólitos têm excreção biliar (KIPPER et al., 2001).

O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição específica da COX e conseqüente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) a prostaglandinas. Reações mediadas pelas COXs, a partir do AA produzem PGG<sub>2</sub>, que sob ação da peroxidase forma PGH<sub>2</sub>, sendo então convertidas às prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanos (TXs) (JÚNIOR et al, 2007; BRENOL et al., 2000).

As prostaglandinas têm ação vasodilatadora. A PGD<sub>2</sub> é liberada de mastócitos ativados por estímulos alérgicos ou outros. A PGE<sub>2</sub> inibe a ação de linfócitos e outras células que participam das respostas alérgicas ou inflamatórias. Além de promoverem vasodilatação, sensibilizam os nociceptores (hiperalgesia) e estimulam os centros hipotalâmicos de temoregulação (JÚNIOR et al., 2007; BRENOL et al., 2000).

A prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) predomina no endotélio vascular e atua causando vasodilatação e inibição da adesividade plaquetária. O TX, predominante nas plaquetas, causa efeitos contrários como vasoconstrição e agregação plaquetária (JÚNIOR et al., 2007; KLIPPER et al., 2001).

Os leucotrienos aumentam a permeabilidade vascular e atraem os leucócitos para o sítio da lesão. A histamina e a bradicinina aumentam a permeabilidade capilar e ativam os receptores nocigênicos (JÚNIOR et al., 2007; KLIPPER et al., 2001).

Existem pelo menos duas isoformas de COX que apresentam diferenças na sua regulação e expressão. A atividade de ambas as isoformas são inibidas por todos os AINEs em graus variáveis. A COX-1 e COX-2 possuem 60% de homologia na sua seqüência de aminoácidos expressa em muitos tecidos. As COX-1, ditas como constitutivas, auxiliam na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo plasmático renal (KLIPPER et al., 2001).

### **2.4.3 - A importância da dor**

A dor é uma condição complexa, muitas vezes de etiologia indefinida, com valor biológico fundamental. Sem dor seria impossível a vida normal; ela funciona como um mecanismo de defesa, sendo uma resposta adaptativa e protetora ao estresse ambiental. Porém é um sintoma desagradável e individual, causando limitações, incapacidade e sofrimento, afetando tanto o físico quanto o psíquico (SILVA e MORAIS, 2000).

Os estímulos e as condições que causam a dor podem variar e dependem em parte do tecido específico, da natureza, intensidade e duração do estímulo. Em geral, os estímulos que são percebidos como dolorosos têm potencial de causar dano aos tecidos (SMITH, 1992).

Associada à lesão tecidual prolongada ou processo degenerativo de origem central ou periférica, a dor resulta de múltiplas e complexas modificações em vias nociceptivas, incluindo desde alterações de excitabilidade de fibras nervosas aferentes até mudanças de fenótipo celular, estrutura neural, sinapses e expressão de novas moléculas, incluindo enzimas, neurotransmissores e receptores. Alterações estruturais, particularmente após lesões de nervos periféricos, também podem ser vistas, incluindo perda de interneurônios medulares, rearranjo inadequado de processos nervosos aferentes na medula espinhal e proliferação de fibras simpáticas em gânglios sensitivos. A ocorrência dessa multiplicidade de processos não é uniforme, dependendo de tecido lesado, envolvimento de tipos específicos de fibras aferentes e participação do sistema imune (PLEUVRY e LAURETTI, 1996).

A dor aguda ou fisiológica resulta da estimulação nociva intensa ou potencialmente injuriante, é bem localizada, e tem curta duração quando não ocorre dano tecidual, freqüentemente esvaecendo-se sem que medidas especiais sejam adotadas. Geralmente é causada por processos identificáveis, sejam inflamatórios, espásticos ou isquêmicos. O papel dessa dor é simples, mas importante como sinal de alerta, indicando perigo, risco, já que informa ao corpo sobre o perigo potencial e, via de regra inicia respostas reflexas de retirada do segmento corporal da fonte do estímulo nocivo (BROWN e BOTTOMLEY, 1990; TURK e MELZACK, 1992; PRADO, 2001).

A dor crônica, ou patológica, ocorre em resposta à lesão tecidual e é caracterizada pela sensação de dor em resposta a estímulos normalmente inócuos ou mesmo pela ocorrência de dor espontânea, persistindo por mais tempo do que o esperado para a cura da lesão. Muitas vezes apresenta etiologia incerta, não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais e é a causa de incapacidade e inabilidades prolongadas. Representa um fenômeno de sensibilização nociceptiva, com redução do limiar à dor (alodinia), amplificação da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) e sensação de dor prolongada após estimulação (hiperpatia). Mesmo a dor crônica possui uma fase aguda, geralmente associada a dano tecidual e inflamação. Na fase crônica, a dor geralmente associada às alterações ou danos ao tecido nervoso, caracterizando-se a dor neuropática, comum especialmente em idosos, nesta condição, a dor aparentemente

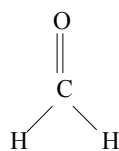


perde qualquer função adaptativa e torna-se de fato patológica (BROWN e BOTTO-MLEY, 1990; FEUERSTEIN e HICKEY, 1992; PLEUVRY e LAURETTI, 1996; MACFARLANE et al., 1997; WOOLF e MARNION, 1999; FERREIRA, 2001; PERRISSINOTTI, 2001; PRADO, 2001; TURK e OKIFUJI, 2001; MCQUAY, 2002).

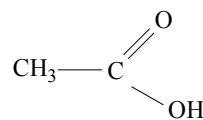
#### 2.4.4 – Conceito de nocicepção

A nocicepção é um processo de detecção e sinalização da presença de um agente nocivo ao organismo. Diante de um estímulo doloroso mecânico ou térmico, ativam-se os nociceptores na região atingida, os quais enviam a informação ao cérebro através das fibras C aferentes. Denomina-se essa dor de fisiológica e que tem como objetivo informar ao corpo acerca de um perigo, ela desencadeia um conjunto de fenômenos, entre os quais se encontra o reflexo de retirada (DUBUISSON e DENNIS, 1977).

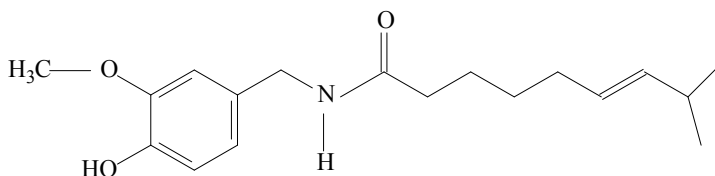
O tratamento intraperitoneal de substâncias algogênicas em animais de experimentação (camundongos Swiss) é um modelo de nocicepção amplamente utilizado na pesquisa de drogas analgésicas (EMIM, 1996). Injeção subcutânea de substâncias que induzem a dor, como a formalina (**14**), ácido acético (**15**) ou capsaicina (**16**) em animais de experimentação determina o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (DUBUISSON e DENNIS, 1977).



**14**



**15**



**Figura 5:** Estruturas químicas de substâncias algogênicas.

A administração intraperitoneal de ácido acético em animais de experimentação, como camundongos, promove a liberação de substâncias endógenas como aminas biogênicas, cininas e prostanóides, que estimulam as terminações nociceptivas (WHITTLE, 1964).

## 2.5 – Câncer

O câncer é a doença que mais causa temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer de origem latina significando “caranguejo” deve ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1971).

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadirem tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, que representa 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão (1,3 milhão); estômago (cerca de 1 milhão); fígado (662 mil); cólon (655 mil) e mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005 mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006). Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. Também é conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que

ocorrem por ano no mundo poderia ser prevenido (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

A maioria dos cânceres humanos resulta da exposição a agentes carcinógenos ambientais. Estes incluem produtos químicos, radiação e vírus (DOLL e PETO, 1981). Os carcinógenos podem ser divididos em várias classes, como mostrado no Quadro 2.

<b>Classe</b>	<b>Exemplos de Agentes Carcinógenos</b>
<b>1 - Carcinógenos Genotóxicos</b> Primários, agentes alquilantes diretos.	Dimetilsulfato, $\beta$ -propiolactone, etileno imina, safrol
<b>2 - Pró-carcinógenos</b> Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos Nitrosaminas Hidrazina Inorgânico	Benzo [ $\alpha$ ]pireno Dimetilnitrosamina 1,2-Dimetilhidrazina Cádmio, plutônio
<b>3 – Carcinógenos Epigenéticos</b> Promotores Hormônios Imonossupressores Cocarcinógenos	Ésteres de forbol, sacarina, ácidos biliares Estrógenos Análogos da purina Catecol
<b>4 – Não-classificados</b> Proliferadores de Peroxissoma	Ésteres de ftalato

**Quadro 2** – Classes de agentes carcinógenos

O tratamento do câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Os tumores podem ser tratados com cirurgias, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas. A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é

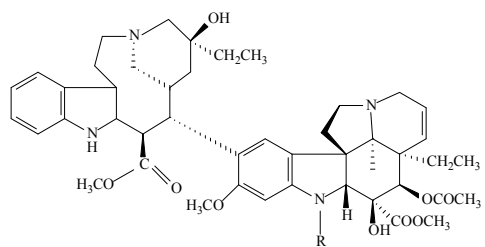
utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, á base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente ou combinados, sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO et al., 2003).

O controle do câncer, que lidera a segunda maior causa de morte no mundo, poderia ser beneficiado pelas terapias alternativas (REDDY et al., 2003). O uso de produtos naturais já é uma solução, pois, a maioria dos antineoplásicos é de origem natural.

### **2.5.1 - Drogas antitumorais originadas de Plantas**

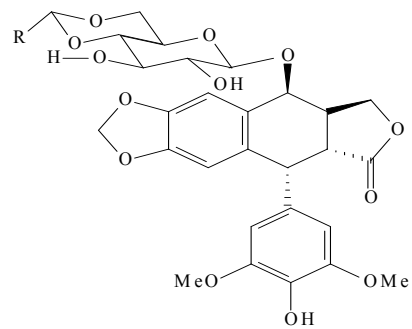
No processo de descoberta de drogas antitumoral, o screening pré-clínico no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) em linhagens tumorais humanas *in vitro* e seleção de testes *in vivo* ajuda a identificar a maioria das drogas ativas contra células alvos. No próximo estágio de desenvolvimento de drogas, ensaios toxicológicos, de produção e de formulação são realizados antes da droga iniciar uma triagem clínica (LEE, 1999).

Um grande número de drogas usadas no tratamento do câncer atualmente vem sendo sintetizada a partir dos produtos naturais. Desde 1961 sete compostos derivados de plantas têm sido usados como drogas anticancerígena nos EUA, como: vimblastina (23), vincristina (24), etoposídeo (25), tenoposídeo (26), paclitaxel (27), vinorelbina (28) e mais recentemente em 1996, docetaxel (29), topotecan (30) e irinotecan (31) (Figura 6). Outros onze agentes estão sendo usados na medicina chinesa, sendo todos considerados fármacos importantes introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos e fundamentais para o renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica (WANG e LEE, 1997).

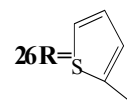


**23** R= -CH<sub>3</sub> e

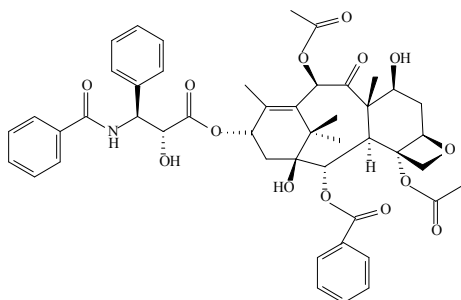
**24** R= - CHO



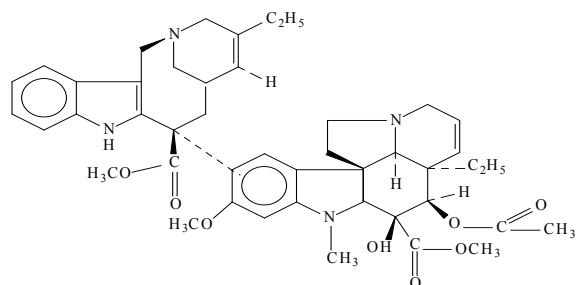
**25** R=Me



**26** R=

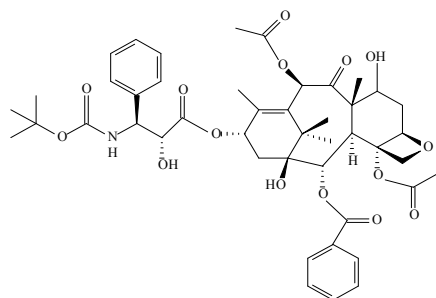


**27**

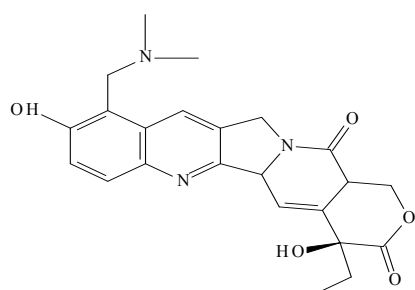


**28**

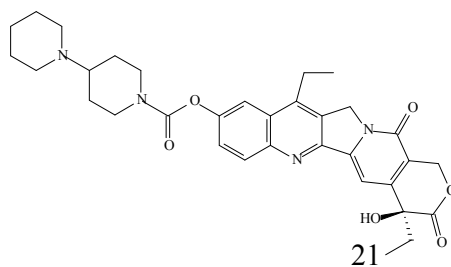
**28**



**29**



**21**



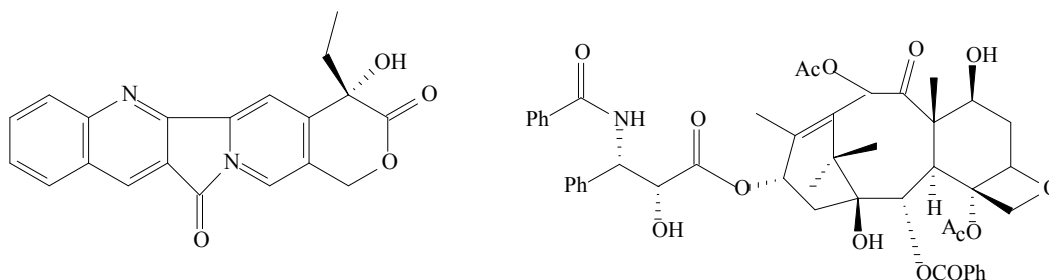
**Figura 6:** Estruturas de algumas drogas antitumorais.

A camptotecina (**32**) e do taxol (**33**) (Figura 7) têm muito mais em comum do que apenas seu uso terapêutico, pois ambos os fármacos foram descobertos no mesmo grupo de pesquisa. Em 1966, Wall e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (WALL et al., 1966; OBERLIES e KROLL, 2004).

Na década de 60, época da descoberta da camptotecina, o grupo do pesquisador Wall estudava a atividade citotóxica de *C. acuminata* e o National Cancer Institute (NCI) dos EUA, selecionou o extrato das cascas de *Taxus brevifolia* para avaliação de sua eventual atividade antitumoral. Entretanto, nos modelos *in vivo* utilizados pelo NCI, este extrato não foi muito ativo. Entre 1986 e 1995, a forte pressão de ambientalistas motivou intensos esforços no sentido de se encontrar fontes naturais alternativas para o taxol. O insucesso nestas iniciativas culminou quando, em 1994, a Bristol-Myers Squibb decidiu interromper o uso das cascas de *T. brevifolia* (WALL e WANI, 1998).

Wall prosseguiu o estudo do fracionamento e isolou o taxol em 1966 e observou uma forte correlação entre a atividade citotóxica *in vitro* em células 9KB e a atividade antitumoral *in vivo* (OBERLIES E KROLL, 2004). Estas duas substâncias, a camptotecina e o taxol foram aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, em 1966, e atualmente são comercializadas pela Pfizer, para tratamento de câncer de cólon e de ovário (VIEGAS JÚNIOR, et al., 2006).

Estes fatos, certamente têm estimulado a busca por novos agentes com potencial antitumoral a partir de fontes naturais, com a finalidade de obter novos protótipos, com mecanismos de ação mais seletivos, eficazes contra tumores resistentes e menor toxicidade, buscando uma melhor terapêutica.

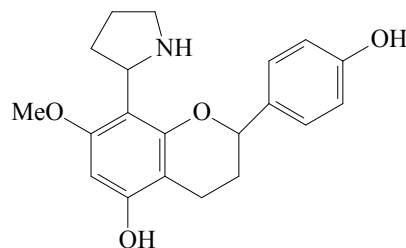
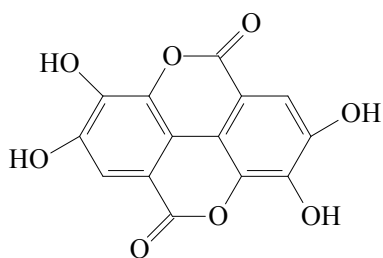


**Figura 7:** Estrutura das duas principais drogas antitumorais.

## 2.6 - Família Vochysiaceae

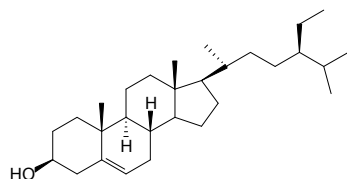
A família Vochysiaceae esta composta por árvores e arbustos tropicais compreendendo oito gêneros e 200 espécies, sendo que o gênero *Vochysia* é encontrado em mais da metade deles. No Brasil ocorrem sete gêneros e 150 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). Os gêneros mais importantes são *Callisthene* (10 espécies), *Qualea* (60 espécies), *Salvertia* (uma espécie) e *Vochysia* (105 espécies), (HEYWOOD, 1993).

Vários estudos fitoquímicos de Vochysiaceae têm sido voltados, especialmente para o gênero *Vochysia*. Derivados do ácido elágico (**34**) foram reportados em *Vochysia acuminata* e *V. thyrsoidea* (CORREA et al, 1975). O 5-deoxy-flavones foi isolado das folhas de *Vochysia*, *Qualea* e *Salvertia* (LOPES et. al., 1979). A vochysine (**35**) (Figura 8), uma pirrolidoflavona, foi isolada das hastes de *Vochysia guianensis* (BAUDOUIN, et al., 1983). Além disso, o gênero *Vochysia* é uma fonte rica de terpenóides. O ácido bartogenico e o vismiaefólico foram encontrados nas hastes de *Vochysia vismiaefolia* (ARAÚJO et. al., 1990). Enquanto *V. divergens* contém  $\beta$ -sitosterol (**36**) e ácido betulinico (**37**) e ácido sérico (**38**) (HESS et al.; 1995), ácido divergióico (**39**), ácido 24-hidroxi-tormentico(**40**) e o éster glucopiranosil(**41**) (HESS e DELLE MONACHE,1999), ácido tormentico (BORTALANZA et al.; 2002). Em *Vochysia ferruginea* foi reportado uvaol(**42**), eritrodíol (**43**), ácido ursólico (**44**), ácido oleanólico (**45**), ácido 6 $\beta$ -hidroximaslinico (**46**),  $\beta$ -sitosterol-glicosilado (**47**) (Figura 9), ácido 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -dihidroxi-12-en-28-óico, ácido 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -dihidroxi-oleano-12-en-28-óico, belericagenina A e o éster (28-1)  $\beta$ -D-glucopiranosil (belericasideo A) (ZUCARO et al.; 2000).

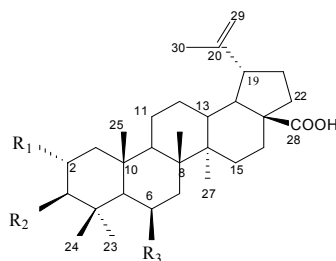


**35**

**Figura 8:** Estrutura química do ácido elágico e da vochysine.

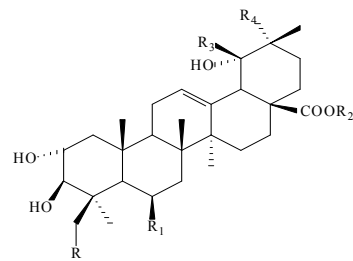


**36**



**37**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

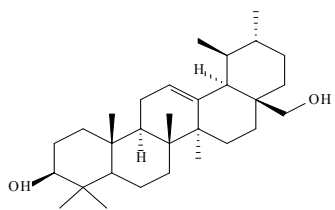
**39**  $R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$



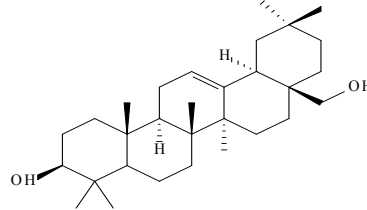
**38**  $R = \text{OH}; R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}; R_4 = \text{Me}$

**40**  $R = \text{OH}; R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}; R_3 = \text{Me}$

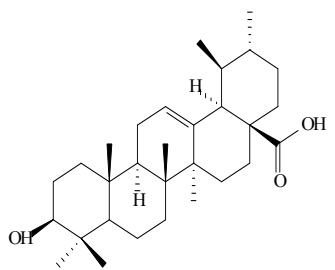
**41**  $R = \text{OH}; R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{Gluc}; R_3 = \text{Me}$



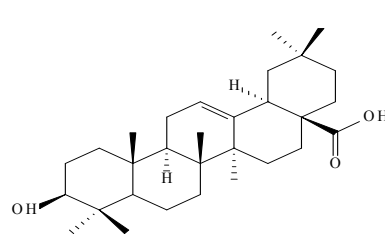
**42**



**43**

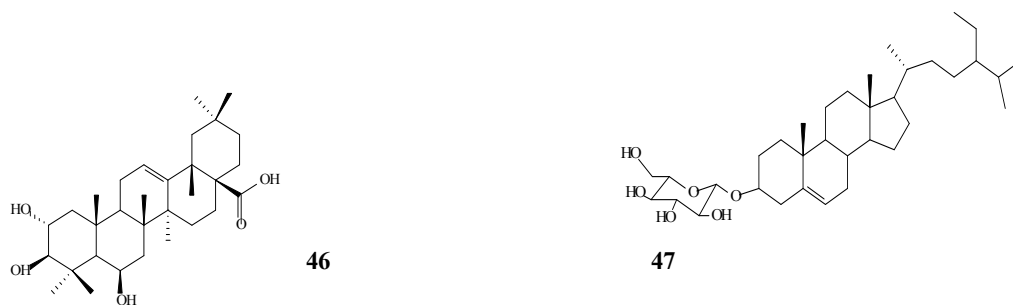


**44**



**45**





**Figura 9:** Estruturas de alguns compostos isolados de espécies do gênero *Vochysia*.

Várias espécies de *Vochysia* têm sido estudadas na medicina popular da América Latina, e um grande número de relatos descreve a atividade biológica destas plantas. *V. divergens* é usada contra infecções e asma (POTT e POTT, 1994). Compostos isolados de origem destas espécies têm evidenciado poder antifúngico (HESS et al., 1995), analgésica (BORTALANZA et al., 2002), antibacteriana (HESS et al., 1997). A atividade antiinflamatória e analgésica foi reportada nos extratos alcoólico de *V. ferruginea* (CALDERON et al., 2001).

### 2.6.1 - A espécie *Vochysia cinnamomea* Pohl

A planta *Vochysia Cinnamomea* Pohl, também conhecida popularmente como quina-doce, casca-doce e pau-doce, (Figura 10) é uma árvore que pode medir de 4-7 metros de altura, dotada de copa globosa pequena, com ramos e folhas cobertos por tomento marrom-esbranquiçado (cor de canela). Ocorre nos estados do Brasil Central, nos cerrados e campos cerrados. Esta planta é freqüente nos cerrados de altitudes superiores a 800 m e também encontra-se no Paraguai. A madeira é empregada localmente, para confecção de cangas para bois, construções rústicas, bem como para lenha e carvão. A casca é reputada como medicinal e ela floresce exuberantemente durante os meses de março-abril. Os frutos amadurecem em agosto-setembro (LORENZI, 1998).



**Figura 10:** Foto de *V. cinnamomea*, UEG, Anápolis-GO, LIMA, R.S., setembro de 2008.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais e reagentes utilizados

##### -Cromatografias:

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada, utilizando-se sílica gel tipo 60 Merck, 70-230 e 60-200 mesh, como adsorventes.

A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi efetuada sob placas de cromatofolhas de alumínio como suporte e sílica gel 60 F<sub>254</sub> como adsorvente.

Os cromatogramas foram revelados usando a lâmpada ultravioleta ( $\lambda = 254$  e 365 nm) e solução de vanilina ácida seguido de aquecimento com o secador serigráfico Skil 1800 W.

##### - Solventes:

Os solventes e reagentes utilizados foram produtos analiticamente puros QHEMIS, NEON e DINÂMICA: etanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, éter etílico, éter de petróleo e acetona.

Para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados analiticamente puros (clorofórmio e dimetilsulfóxido) da marca MERCK e ALDRICH e como referência interna tetrametilsilano (TMS).

##### - Células:

As linhagens utilizadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano), SF-295 (sistema nervoso central), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (U-

SA), tendo sido cultivadas em RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, incubadas em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2. Equipamentos:**

- Evaporador: rotativo TECNAL (TE120) e Quimis
- Moinho de facas tipo cróton Modelo MA-580
- Espectrômetro de RMN:
- Bruker Advanced 3 – 500 MHz– 11, 75 Tesla - DQ-UFG

### **3.3 - Material Botânico**

#### **3.3.1- *Vochysia cinnamomea* – Coleta**

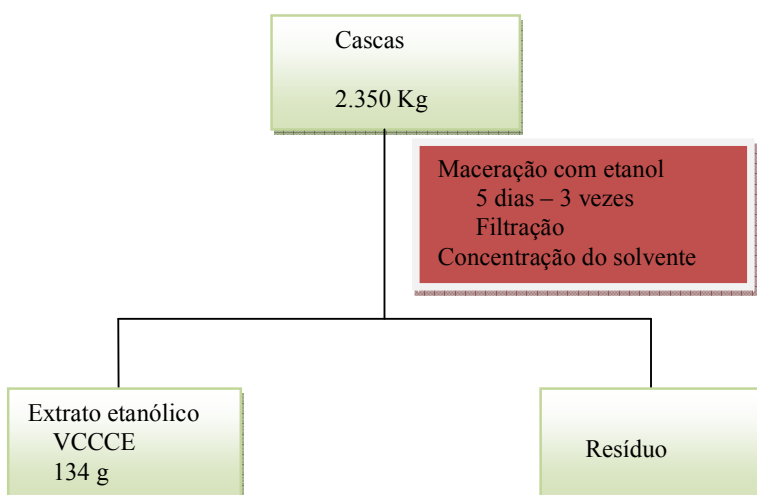
As cascas do caule (2,35 Kg) e as folhas (974 g) de *Vochysia cinnamomea* foram coletadas durante o mês de setembro de 2008, no Campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG) na cidade de Anápolis – GO, Brasil.

A identificação do material botânico foi feita pela Professora Dra. Mirley Luciene dos Santos da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG, tendo sido duas exsicatas da mesma incorporada ao acervo do Herbário desta instituição, cujos números de registros são 6988 e 6989.

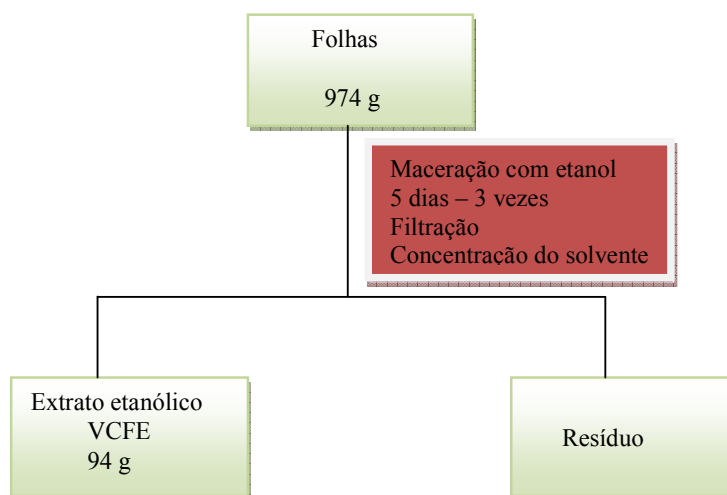
#### **3.3.2 - Obtenção dos extratos brutos**

As cascas do caule e as folhas de *V. cinnamomea* foram secas em estufa com circulação de ar a 50 °C durante 72h, e depois pulverizadas em moinhos de facas tipo cróton modelo MA-580. Em seguida transferiu-se os materiais vegetais para erlenmeyers de 2 L em contato com etanol P.A durante 5 dias. Filtrou-se o material concentrado, a seguir o solvente foi evaporado em um rotaevaporador TECNAL modelo TE

120 sob pressão reduzida, numa temperatura que variou entre 40 °C a 46 °C, fornecendo os extratos brutos das cascas do caule e das folhas de acordo com as figuras 11 e 12.



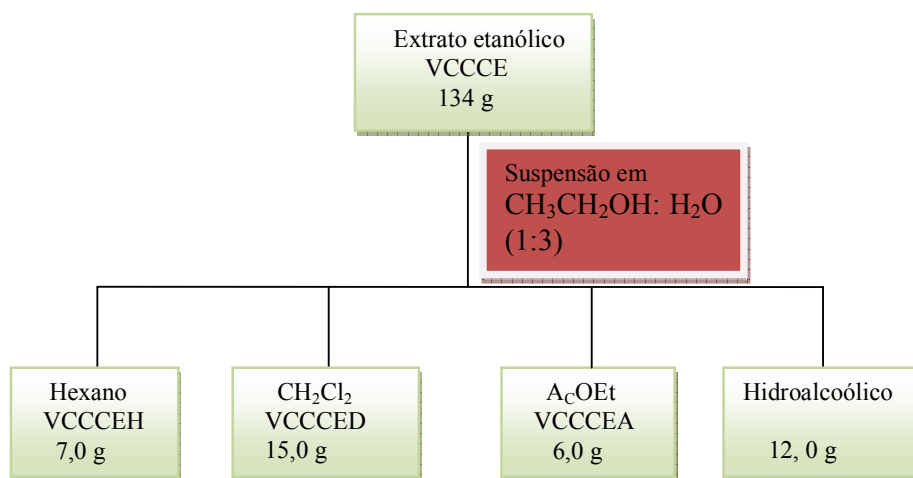
**Figura 11:** Fluxograma de obtenção do extrato bruto das cascas de *V. cinnamomea*.



**Figura 12:** Fluxograma de obtenção do extrato bruto das folhas de *V. cinnamomea*

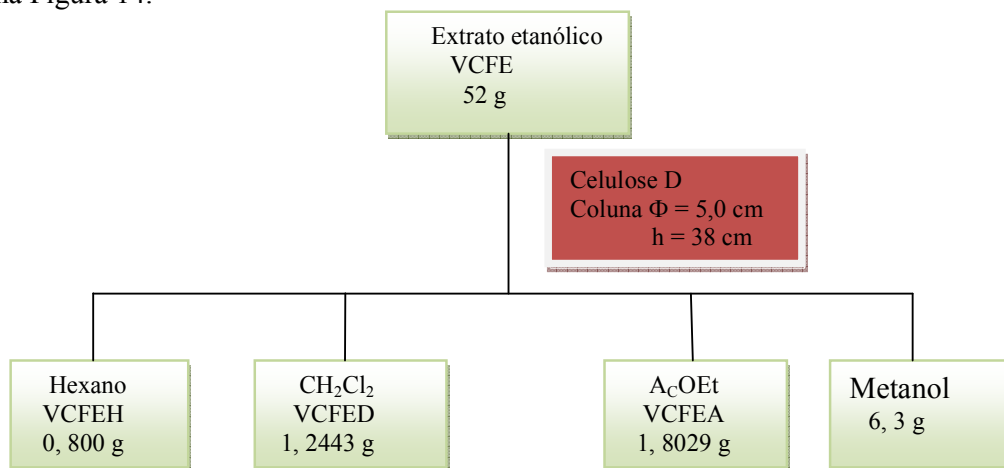
### 3.3.3 - Fracionamento do extrato bruto

O extrato etanólico das cascas do caule foi ressuspensionado em etanol e água 1:3 (750 mL de etanol para 250 mL de água), e em seguida particionou-se pelo processo líquido-líquido. A partição foi feita por ordem crescente de polaridade dos solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila. O procedimento utilizado para o fracionamento do extrato etanólico da planta (VCCCE) está representado na Figura 13.



**Figura 13:** Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato VCCCE.

O extrato etanólico das folhas de *V. cinnamomea* foi fracionado em uma coluna cromatográfica de vidro com celulose D microcristalina em solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, conforme descrito na Figura 14.



**Figura 14:** Fluxograma do fracionamento com celulose do extrato VCFE.

O resumo do fracionamento dos estudos dos extratos etanólico das cascas do caule e das folhas se apresenta na tabela 2.

**Tabela 1** - Resultados do fracionamento com celulose do extrato das folhas e da partição líquido-líquido das cascas do caule de *V. cinnamomea*.

<b>EXTRATO</b>	<b>ETA-NÓLICO</b>	<b>Fração</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>Quantidade</b>
		Hexano	VCFEH	0,8 mg
<b>Folhas</b>		Diclorometano	VCFED	1, 24 g
<b>52 g</b>		AcOEt	VCFEA	1, 80 g
		MeOH	VCFEM	6,3 g
		Hexano	VCCCEH	7,0 g
<b>Cascas do caule</b>		Diclorometano	VCCCED	15,0 g
<b>134 g</b>		AcOEt	VCCCEA	6,0 g
		Hidroalcoólico	VCCCE-W	12,0 g

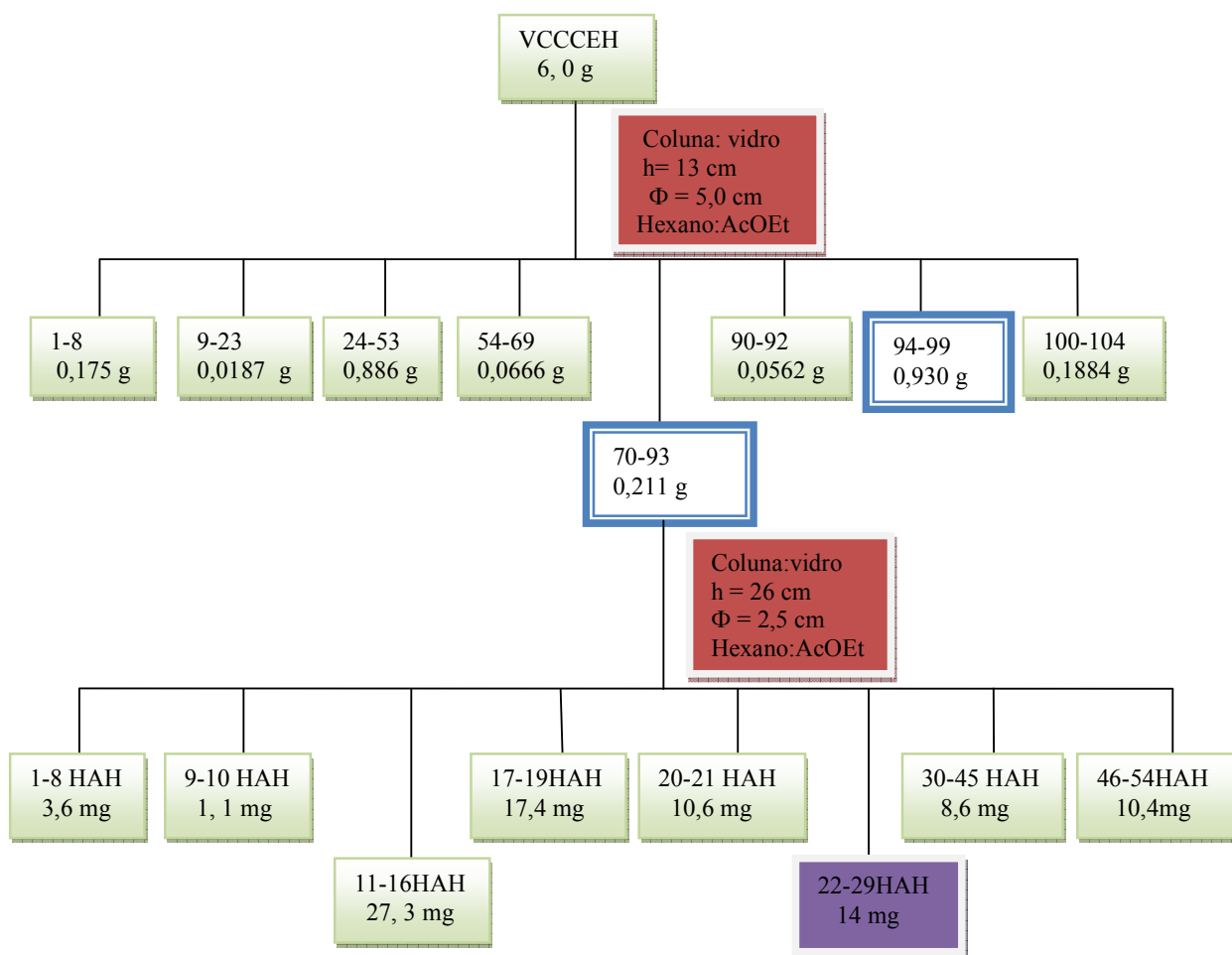
### 3.3.4 – Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *V. cinnamomea*:

#### 3.3.4.1 – Obtenção das substâncias do extrato hexânico de VCCCEH.

O fracionamento do extrato hexânico das cascas do caule de *V. cinnamomea* foi realizado pelo processo de cromatografia em coluna de vidro de diâmetro 5,0 cm, usando como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 Mesh), com mistura de solventes hexano:AcOEt com o gradiente de polaridade crescente. Iniciou-se o empacotamento da

coluna com uma solução a hexano:AcOEt 2%, terminando o processo de fracionamento com AcOEt analiticamente puro. Foram coletadas 104 subfrações. Após a evaporação do solvente, foi realizada a cromatografia em camada delgada analítica das alíquotas em ordem de três em três. As subfrações que tinham o mesmo R<sub>f</sub>s foram reunidas como mostra o fluxograma da Figura 17.

A fração que continha as alíquotas 70-93 após evaporação do solvente foi pesada e a massa obtida era suficiente para um novo fracionamento, seguiu-se então com o novo fracionamento em coluna de vidro de diâmetro 2,5 cm com mistura de solventes hexano:AcOEt 15%. Após realizar a CCDA constatou que as alíquotas 22-29 estavam teoricamente puras e apresentavam o mesmo R<sub>f</sub>s, então foram reunidas e a substância isolada foi denominada de 22-29 HAH, Figura 15.

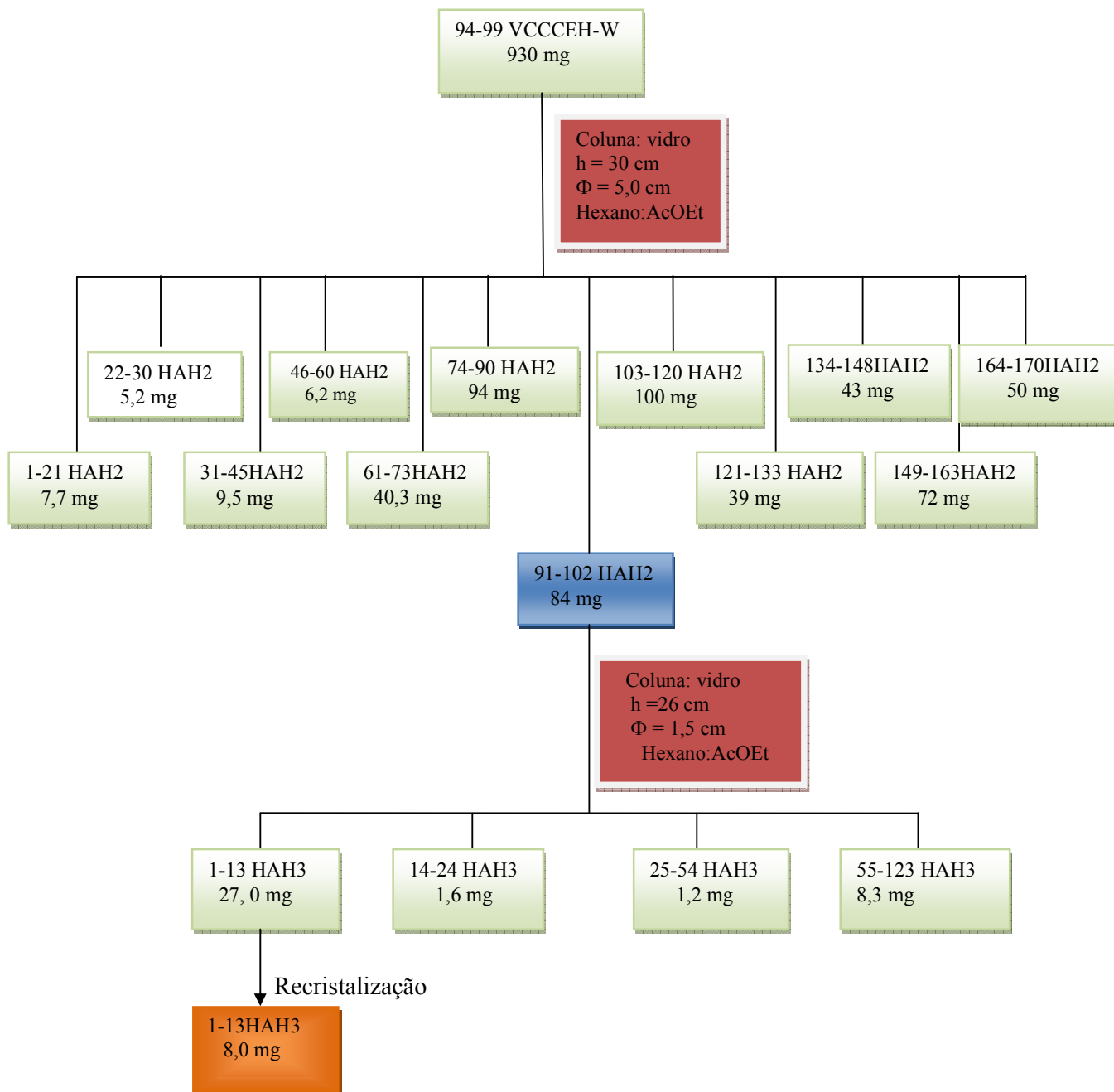


**Figura 15:** Fluxograma do isolamento da substância 22-29 HAH do extrato VCCCEH.

As alíquotas 94-99 após serem reunidas, passaram por um processo de recristalização com hexano P.A, na tentativa de obter o sólido puro, mas como amostra não fi-

cou totalmente pura, foi submetida a um novo fracionamento em coluna de vidro de 5,0 cm de diâmetro em hexano:AcOEt 20%, com o aumento do gradiente de polaridade.

Após a realização da CCDA, as amostras não apresentaram puras, então realizou-se um novo fracionamento, isolando a substância 1-13 HAH3 como mostra a figura 16.



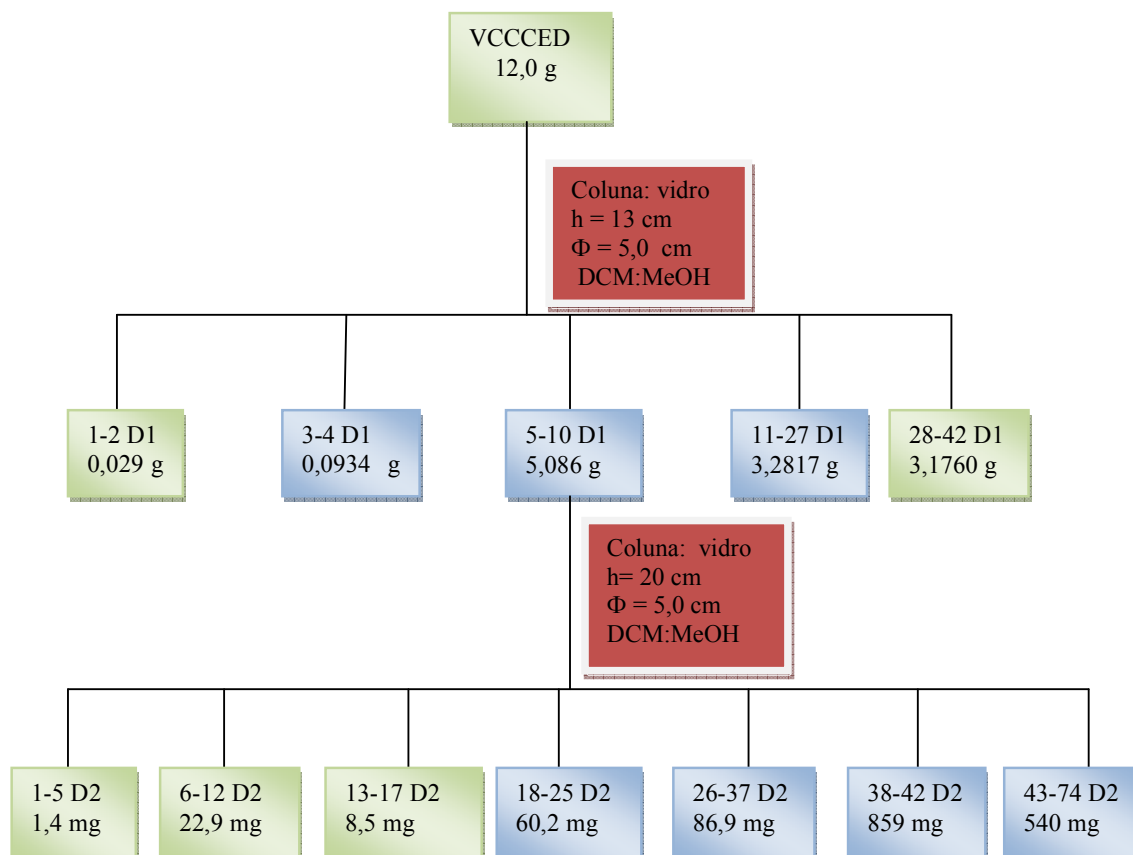
**Figura 16:** Fluxograma do isolamento da substância 1-13 HAH3 do extrato VCCCEH.



### 3.3.4.2 – Obtenção das substâncias da fração de VCCCED

O extrato diclorometano das cascas do caule de *V. cinnamomea* de originado do processo de partição líquido-líquido (VCCCED) como apresentado no fluxograma da Figura 13 foi submetido á cromatografia em coluna de vidro de diâmetro 5,0 cm, com sílica gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária. Após a análise de CCDA escolheu a mistura de solventes DCM:MeOH 5% como fase móvel e foi aumentando o gradiente de polaridade durante o processo até MeOH analiticamente puro. Foram coletadas 42 subfrações. As amostras que apresentaram Rfs similares em CCDA foram organizadas de acordo com o fluxograma da Figura 17.

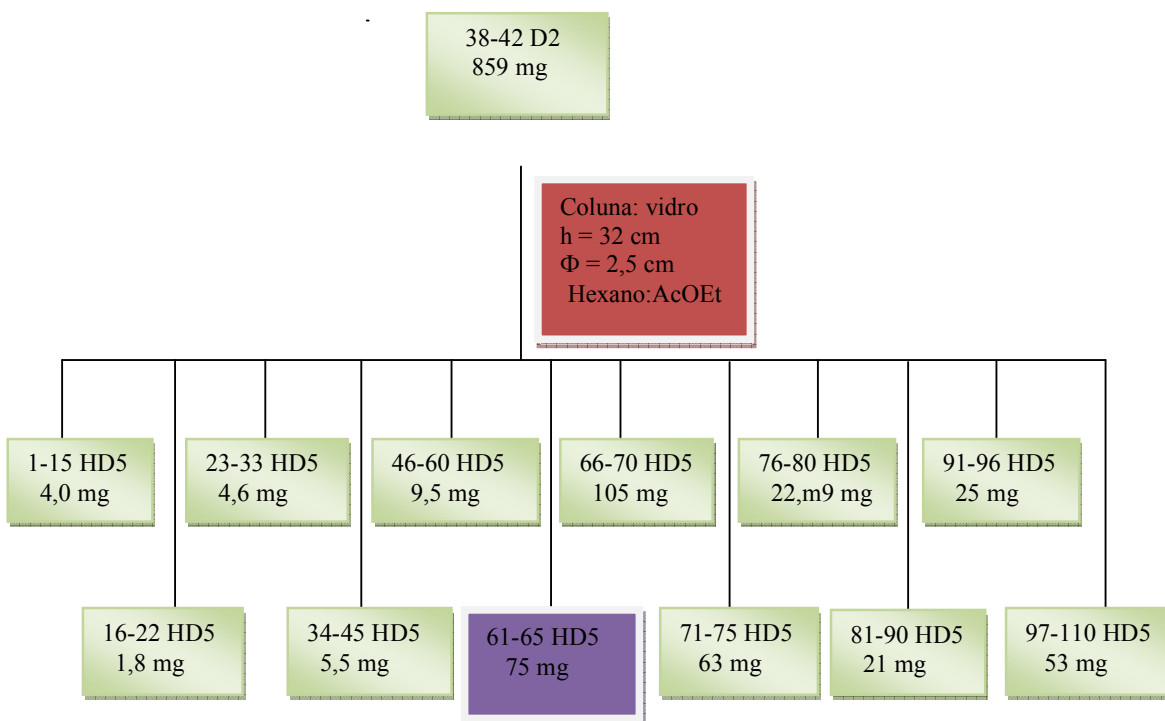
A subfração 5-10 D1 foi submetida a um novo fracionamento com uma solução de DCM:MeOH 2% com o aumento do gradiente de polaridade.



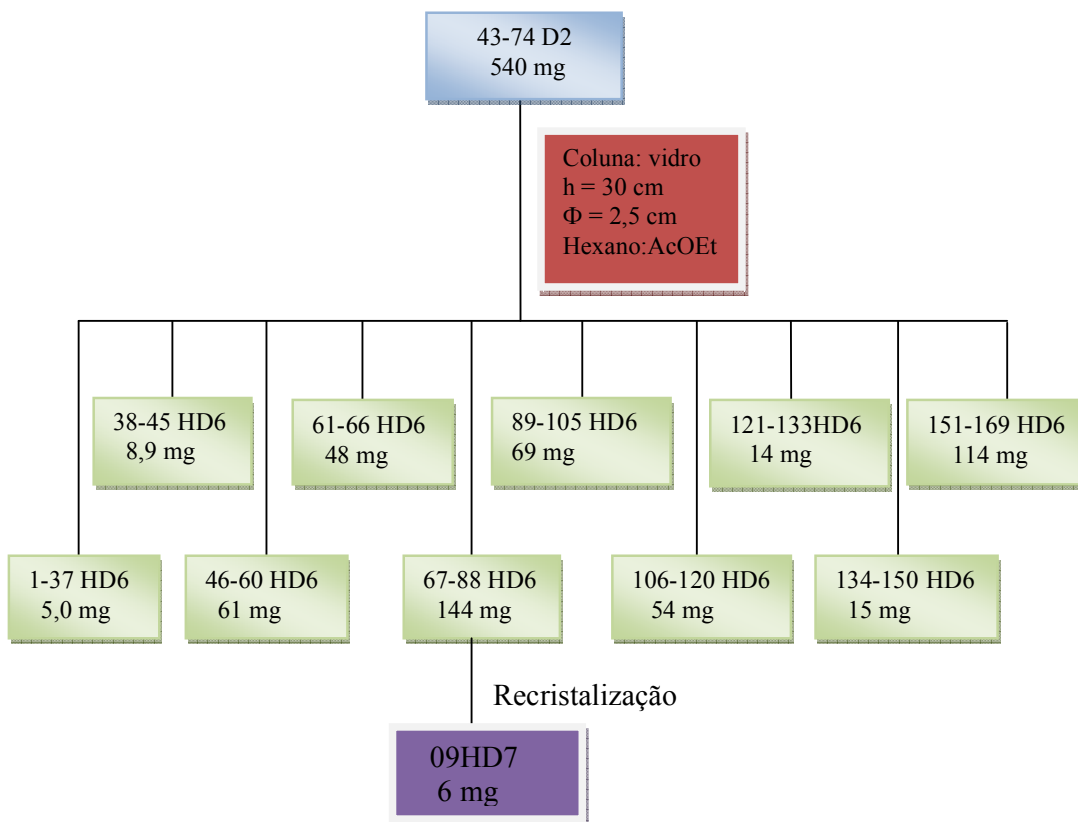
**Figura 17:** Fluxograma do fracionamento do extrato de DCM de VCCCED.

### 3.3.4.3 – Fracionamento das subfrações 38-42 D2 e 43-74 D2

As subfrações 38-42 D2 e 43-74 D2 foram submetidas ao fracionamento em coluna de vidro usando sílica gel 60 (60-200 Mesh) como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de hexano:AcOEt. Dessas frações foram isoladas as substâncias 61-65 HD5 e 09HD7 conforme representado nos fluxogramas das figuras 18 e 19.



**Figura 18:** Fluxograma do isolamento da substância 61-65 HD5 do extrato de DCM.

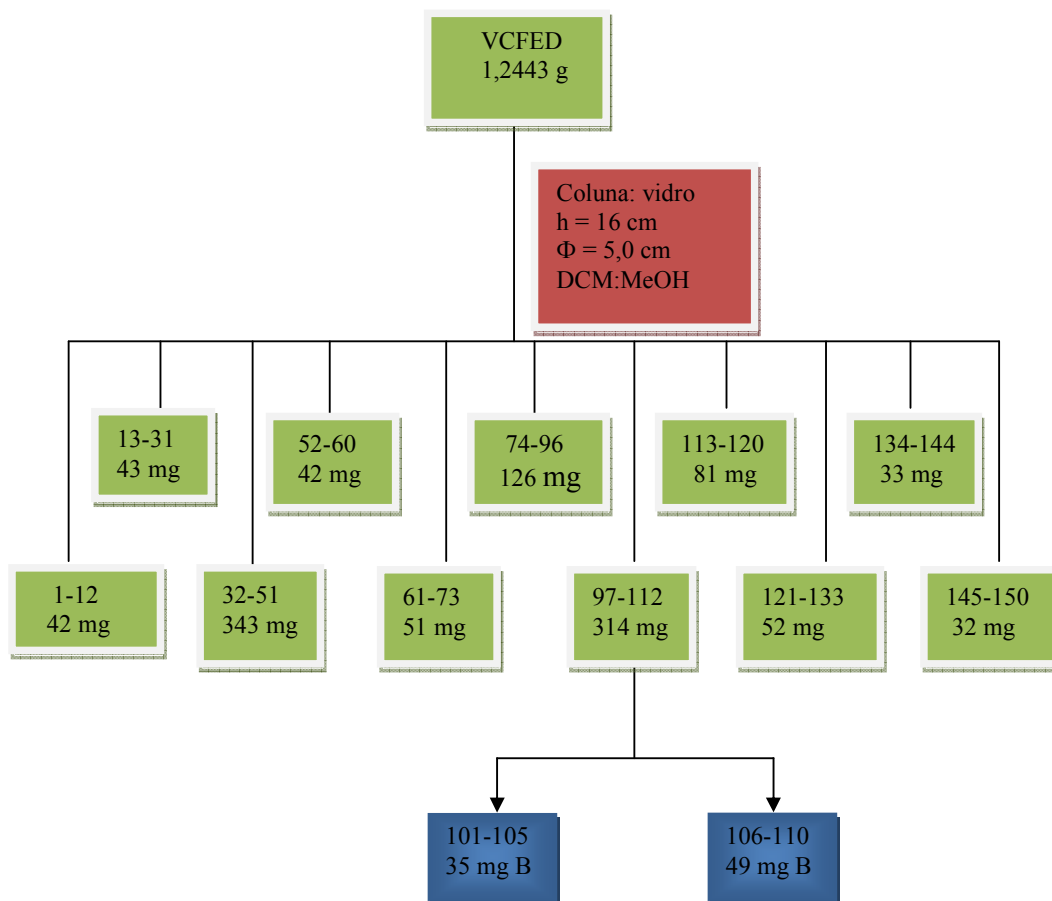


**Figura 19:** Fluxograma do isolamento da substância 09HD7 do extrato de DCM.

### 3.3.5 – Fracionamento dos extratos de VCFED e VCFEA.

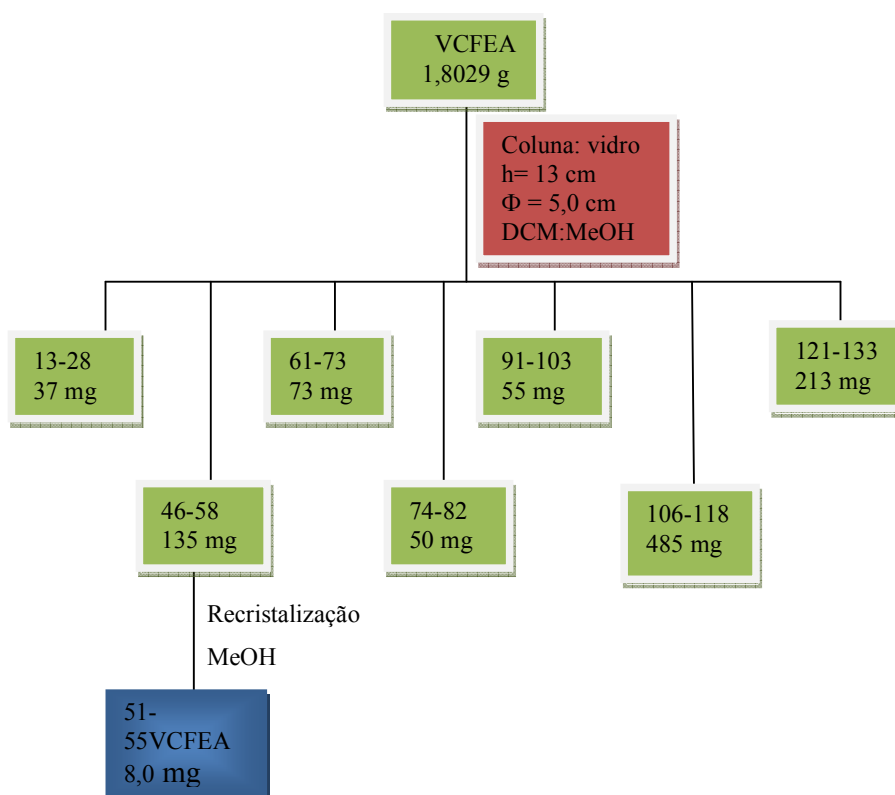
Os extratos de diclorometano e de acetato de etila das folhas de *Vochysia cinnamomea* oriundos da partição com celulose microcristalina D foram submetidos ao fracionamento com sílica gel 60 (60-230 Mesh) como fase estacionária e uma mistura de hexano:AcOEt como fase móvel.

A substância B foi obtida da fração do fracionamento do extrato de diclorometano, após coletar as frações e evaporar o solvente, observou-se a formação de um sólido branco que foram transferidos com uma espátula para outros frasquinhos, em seguida fez-se a CCDA e constatou que estavam puras e que os Rfs eram parecidos, então foram reunidas e denominadas de substância B, (Figura 20).



**Figura 20:** Fluxograma do isolamento da substância B (VCFED) do extrato de DCM.

A fração de acetato de etila, após o fracionamento e evaporação do solvente observou-se que nas alíquotas 51-55 a formação de um sólido amarelado que foi transferido para frasquinhos limpos e efetuado a CCDA. Verificando que as frações encontravam-se ainda impuras, mas os Rfs eram similares então foram reunidas e lavadas com acetona e depois deixadas em processo de recristalização com metanol P.A. Após a evaporação do solvente foi novamente transferida para outro frasquinho e pesada. Repetiu a CCDA, conferindo que estava pura a denominamos de B1 como esta representada na figura 21.



**Figura 21:** Fluxograma do isolamento da substância (VCFEA) do extrato de AcOEt.

### 3.4 – Ensaio biológicos

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas pesando entre 20 a 40g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas. A ração só foi retirada após a injeção subcutânea das substâncias utilizadas, mantendo-se a água durante todo o tempo. O experimento foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFG. O experimento foi realizado em triplicata. Como controle positivo foi usado a indometacina um anti-inflamatório não esteroide.

### **3.4.1 – Avaliação da Atividade Antinociceptiva**

#### **3.4.1.1 – Contorções abdominais induzidas por ácido acético**

A metodologia utilizada é a descrita por (KOSTER, 1959). Foram utilizados grupos experimentais de camundongos swiss que foram tratados com veículo (DM-SO:H<sub>2</sub>O 3% n =9, subcutâneo) lupeol 10 mg/kg (n= 10, subcutâneo), ácido betulínico (n = 10, 30 mg/kg subcutâneo) e indometacina (n = 10, subcutâneo). Todos os grupos receberam ácido acético 1,2% ( v/v intraperitoneal 45 minutos após os tratamentos). O número de contorções abdominais, que a contração da parede abdominal seguida pela extensão de ao menos uma das patas posteriores (TORNOS et al., 1999), foram contadas acumulativamente em 30 minutos de avaliação. Os resultados foram expressos como as médias ± erro padrão (EPM) dos números de contorções abdominais acumuladas em 30 minutos de avaliação experimental.

### **3.5 – Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Turkey. Consideram-se como valores significantes aqueles cujo  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ . Para análise dos dados foi utilizado o software Graph Pad Prism 3.0.

### **3.6 – Análise da Atividade Antitumoral**

#### **3.6.1 – Teste do MTT**

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening do National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano ( SKEHAN, et al.; 1990). É um método rápido, sensível e barato.

Foi descrita primeiramente por Mosmann em 1983 e modificado por Alley em 1996, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) e azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

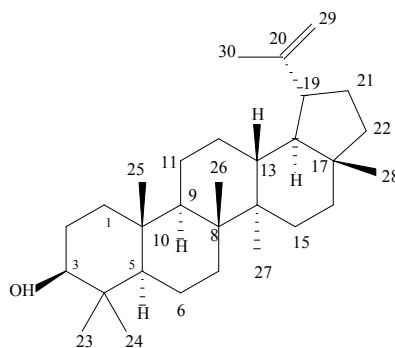
As células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  céls./100 $\mu$ L, para células aderidas. Os diversos compostos foram acrescidos em concentração de 5 $\mu$ g/mL (substâncias puras) em dose única. Foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Antes do término do período de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 200 $\mu$ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a 550nm.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico de *Vochysia cinnamomea* resultou no isolamento de 6 substâncias da casca do caule e das folhas. Cinco pertencem à classe dos terpenóides e foram classificadas como triterpenos (22HAH, 61-65 HD5, 09HD7, 101-105 VCFED e 51-55 VCFEA) e um esteróide (1-13 HAH3). As substâncias 61-65 HD5 e 09HD7 foram comparadas os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  e verificou que se tratava da mesma substância.

#### 4.1.2 - Identificação do lupeol **H 1** (22HAH)



(22 HAH)

A substância **22 HAH** foi isolada da fração hexânica (VCCCEH) através da coluna de cromatografia de adsorção em sílica, conforme descrito no item 3.3.4.1 (Figura 15, p. 31) obtendo após a evaporação do solvente, um sólido branco solúvel em diclorometano. A identificação foi realizada através da espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 22), foi observada a presença de seis singletos referentes a hidrogênios metílicos, estes sinais aparecem em:  $\delta_{\text{H}}$  0,75;  $\delta_{\text{H}}$  0,84;  $\delta_{\text{H}}$  0,96;  $\delta_{\text{H}}$  1,02;  $\delta_{\text{H}}$  1,17 e  $\delta_{\text{H}}$  1,28 e ainda um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1,7 característico de hidrogênios de metila ligada a um carbono insaturado H-30. Foi observado também, um dupletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,71 (dl;  $J = 2,4\text{Hz}$ ) e um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,56 (m;  $J = 2,4\text{Hz}$  e  $1,5\text{Hz}$ )



referentes aos hidrogênios vinílicos H-29 da ligação dupla terminal. A presença desses sinais sugeriu que a substância 22 HAH tratava-se de um triterpeno com esqueleto lupano. A presença de um duplo dubleto em  $\delta_H$  3,23 (dd;  $J = 11,6$  Hz e  $J = 5,4$  Hz) é relativo ao hidrogênio carbinólico H-3. A constante de acoplamento para este sinal sugeriu a posição  $\beta$  para a hidroxila. Os dados de RMN  $^1H$  de 22HAH (TABELA 2) foram comparados com os dados da literatura para o lupeol (SILVA, 2004).

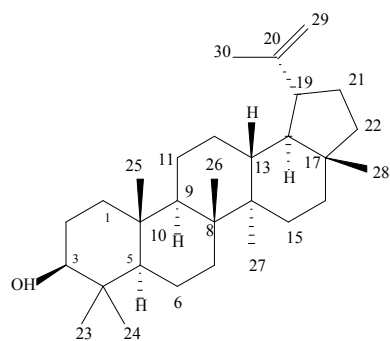
**Tabela 2** – Dados espectroscópicos de RMN  $^1H$  da substância 22HAH em  $CDCl_3$ .

Hidrogênios	$\delta_H$ 22HAH, 500MHz	$\delta_H$ (SILVA,2004) 400MHz
H-3	3,23, dd (1H, $J = 5,4$ e $11,6$ Hz)	3,18,dd(1H, $J=5,4$ e $10,8$ Hz)
H-19	2,37, m (1H)	2,37, m (1H)
H-21	1,37, m (1H), 1,93, m (1H)	1,35, m (1H), 1,91m (1H)
H-23	1,17, s (3H)	0,97, s (3H)
H-24	0,75, s (3H)	0,76, s (3H)
H-25	0,96, s (3H)	0,83, s (3H)
H-26	1,28, s (3H)	1,03, s (3H)
H-27	1,02, s (3H)	0,94, s (3H)
H-28	0,84, s (3H)	0,79, s (3H)
H-29	4,71,dl (1H, $J = 2,4$ Hz)	4,69, d (1H, $J=2,4$ Hz)
	4,56, m (1H)	4,50, m (1H)
H-30	1,7, m (3H)	1,68, s (3H)

O espectro de RMN  $^{13}C$  (Fig. 23, p.43) e os dados (Tabela 3, p.42) indicou a presença de 30 átomos de carbonos, sendo o sinal  $\delta_c$  80,4 referente a um carbono carbinólico e dois sinais em  $\delta_c$  152,6 e  $\delta_c$  110,9 referentes a carbonos olefinicos. Após análise destes dados pode-se identificar a substância 22 HAH como sendo o lupeol. Os dados encontrados na literatura (SANTOS 2005) confirmam a determinação estrutural.

**Tabela 3-** Dados espectroscópicos RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 22 HAH em  $\text{CDCl}_3$ 

C	$\delta_c$ 125 MHz	$\delta_c$ ( SANTOS 2005) 50 MHz
1	39,8	38,6
2	29,4	27,3
3	80,4	78,9
4	38,8	38,8
5	56,8	55,2
6	20,5	18,3
7	35,8	34,2
8	41,3	40,8
9	52,3	50,4
10	37,0	37,1
11	20,9	20,9
12	26,6	25,1
13	38,5	38,0
14	42,6	42,8
15	27,4	27,4
16	35,5	35,5
17	44,4	42,9
18	50,0	48,2
19	47,9	47,9
20	152,6	150,9
21	30,9	29,8
22	39,9	39,9
23	27,9	27,9
24	14,7	15,3
25	16,5	16,0
26	15,9	15,9
27	13,4	14,5
28	18,0	17,9
29	110,9	109,3
30	22,6	19,2



Lupeol

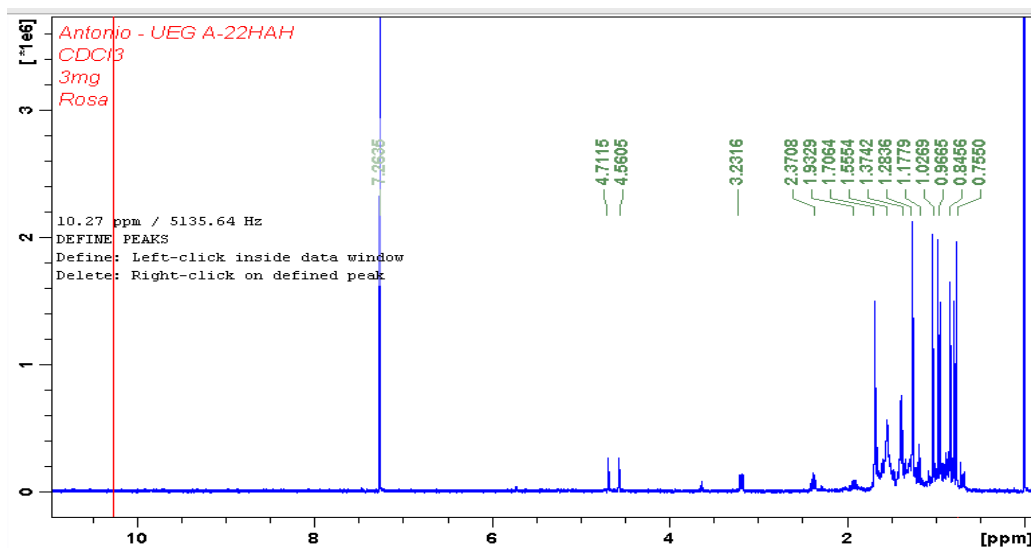


Figura 22: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 22 HAH.

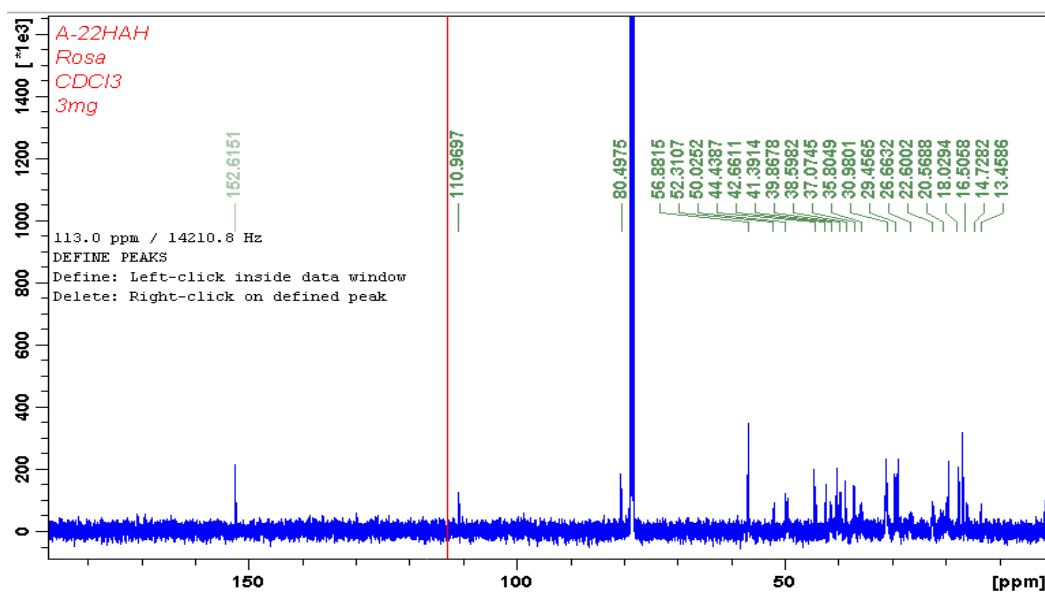
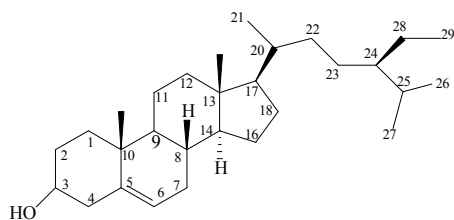


Figura 23: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.3 - Identificação do $\beta$ - Sitosterol (**1-13HAH3**)



**1-13HAH3**

A substância H3 (1-13HAH3) foi isolada da fração de hexano (91-102 HAH2), conforme descrito na figura 16 (p.32). O esteróide foi identificado através de dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 24, p.46) observou-se a presença de um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 referente ao H-6 da insaturação e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,5 multipletto, referente ao H-3 carbinólico. Foi observado também vários sinais referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos na região que compreende entre  $\delta_{\text{H}}$  0,65 – 2,33 característicos do esqueleto esteroidal, como mostra a tabela 4.

**Tabela 4** – Dados espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$  da substância 1-13HAH3 em  $\text{CDCl}_3$

Hidrogênios	$\delta_{\text{H}}$ 1-13HAH3, 500MHz	$\delta_{\text{H}}$ (KROGH, 2001) 200MHz
H-3	3,5, m, (1H)	3,5, m, (1H)
H-6	5,38, m, (1H)	5,3, m, (1H)
H-18	0,65, s, (3H)	0,68, s, (3H)
H-19	1,00, s, (3H)	1,00, s, (3H)
H-21	0,92, d, (J= 6,5 Hz, 3H)	0,92, d, (J= 6,5 Hz, 3H)
H-26	0,83, d, (J= 6,8 Hz, 3H)	0,83, d, (J= 6,8 Hz, 3H)
H-27	0,81, d, (J= 6,8 Hz, 3H)	0,81, d, (J= 6,8 Hz, 3H)
H-29	0,84, t, (J= 7,2 Hz, 3H)	0,84, t, (J= 7,2 Hz, 3H)

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 25, p.46 ) e os dados (TABELA 5) indicou a presença de 29 átomos de carbonos, sendo o sinal  $\delta_{\text{C}}$  73,7 referente a um carbono carbinólico C-3 e dois sinais em  $\delta_{\text{C}}$  142,6 e  $\delta_{\text{C}}$  123,6 referentes a C-5 e C-6 da insaturação do esqueleto esteroidal. Após análise destes dados pode-se identificar a substância

1-13 HAH3 como sendo o  $\beta$ -sitosterol. Os dados encontrados na literatura (KROGH, 2001) confirmam a determinação estrutural.

**Tabela 5-** Dados espectroscópicos RMN<sup>13</sup>C da substância 1-13 HAH3 em CDCl<sub>3</sub>

Carbonos	$\delta_c$ 125 MHz	$\delta_c$ (KROGH, 2001) 50 MHz
C-1	37,6	37,3
C-2	31,8	31,7
C-3	73,7	71,8
C-4	42,3	42,3
C-5	142,6	140,8
C-6	123,6	121,7
C-7	31,8	31,9
C-8	31,8	31,9
C-9	52,1	50,1
C-10	36,5	36,5
C-11	21,1	21,1
C-12	40,8	39,8
C-13	44,4	42,3
C-14	47,3	46,7
C-15	24,7	24,3
C-16	28,2	28,2
C-17	58,6	56,1
C-18	11,9	11,9
C-19	19,4	19,4
C-20	36,0	36,2
C-21	18,8	18,8
C-22	33,4	33,9
C-23	27,3	26,1
C-24	46,0	46,0
C-25	30,6	28,9
C-26	19,8	19,8
C-27	20,6	19,0
C-28	23,1	23,1
C-29	14,1	12,3

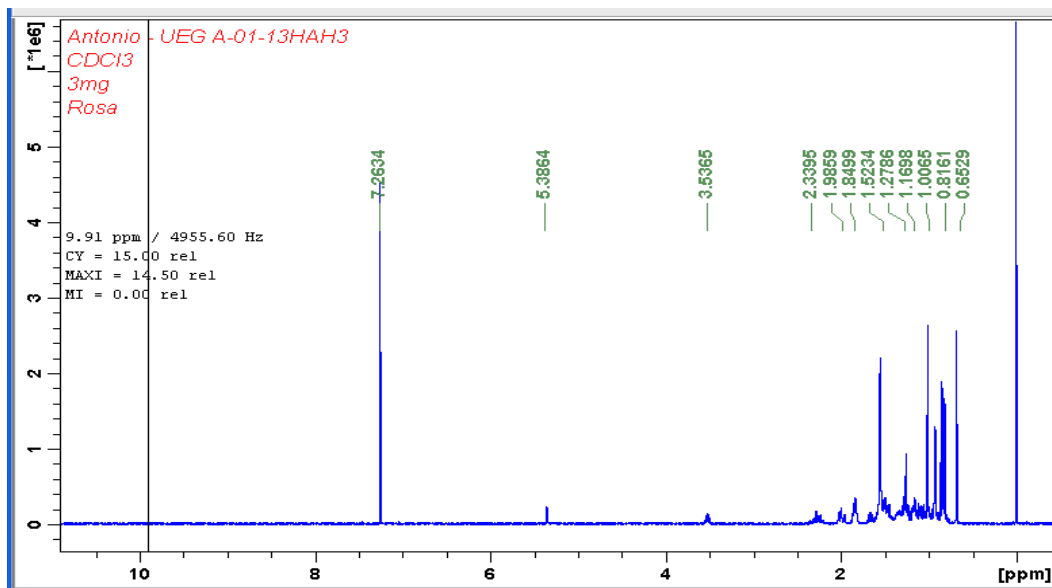
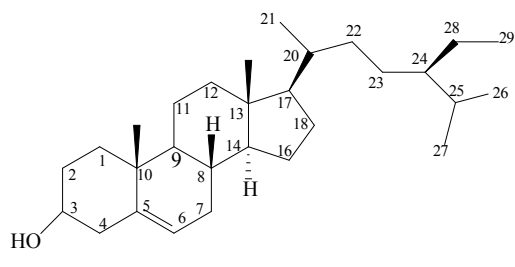


Figura 24: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 13 HAH3.

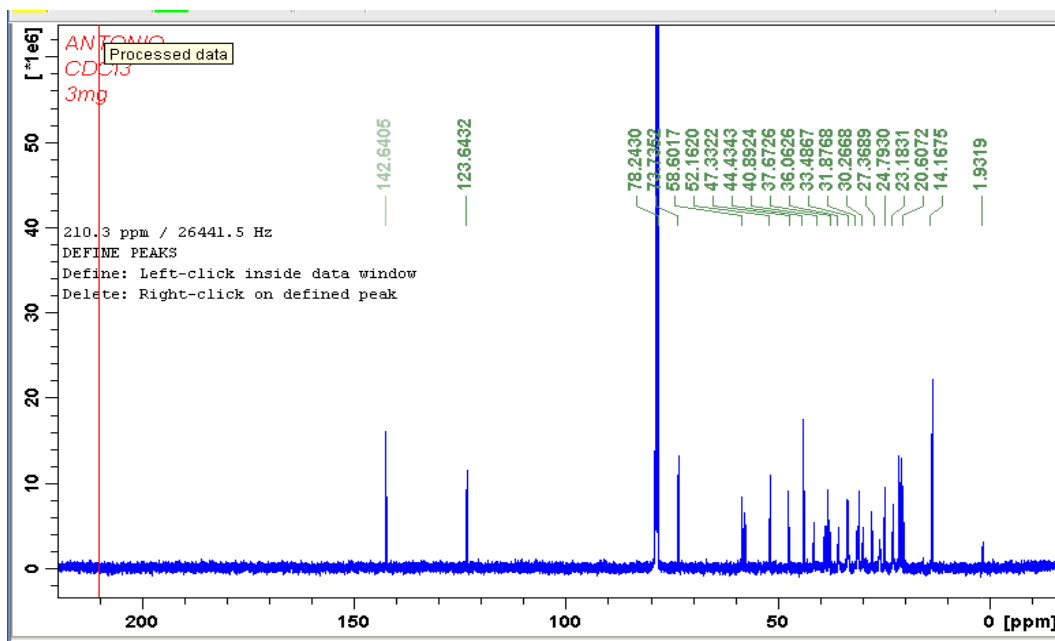
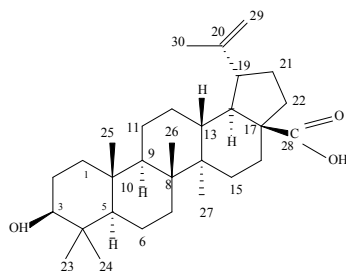


Figura 25: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 13 HAH3.

#### 4.1.4 - Identificação do ácido betulínico (09HD7)



A substância 61-65 HD5 e (09HD7) foi isolada da fração de diclorometano (38-42 D2 e 67-88HD6), conforme descrito na figuras 18 e 19 (p.34 e 35). O triterpeno foi identificado através de dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  e ao comparar os espectros observou-se que tratava da mesma substância.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 26, p.49) apresentou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,76 (singlete) e  $\delta_{\text{H}}$  4,62 (singlete, H-29), um sinal de hidrogênio carbinólico em  $\delta_{\text{H}}$  3,2 (dd,  $J= 5,4$  Hz e 11,5 Hz, H-3), um sinal de hidrogênio metínico em  $\delta_{\text{H}}$  3,02 (ddd,  $J= 4,5, 10,9$  e 12,5 Hz, H-18) e sinais de seis hidrogênios metílicos na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,83 a 1,70, como mostra os dados da tabela 6.

**Tabela 6** – Dados espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$  da substância 09HD7 em  $\text{CDCl}_3$

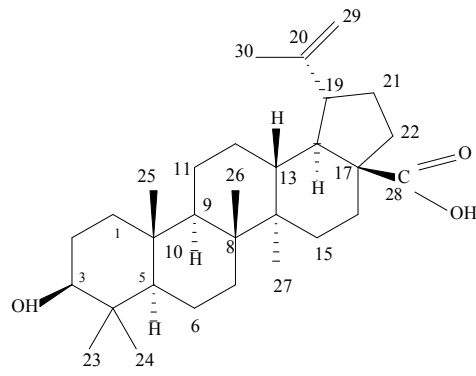
Hidrogênios	$\delta_{\text{H}}$ 09HD7, 500MHz	$\delta_{\text{H}}$ (VANDRESEN, 2005) 300 MHz
H-3	3,20, dd ( $J= 5,4$ e 11,5 Hz, 1H)	3,18, dd ( $J=5,4$ e 10,8Hz , 1H)
H-23	0,98, s (3H)	0,96, s (3H)
H-24	0,74, s (3H)	0,76, s (3H)
H-25	0,83, s (3H)	0,82, s (3H)
H-26	0,92, s (3H)	0,94, s (3H)
H-27	1,20, s (3H)	0,98, s (3H)
H-29	4,76, d ( $J= 2,0$ Hz, 1H) 4,62, d ( $J=2,0$ Hz, 1H)	4,74, d ( $J= 1,5$ Hz, 1H); 4,61, d ( $J=1,5$ Hz,1H)
H-30	1,70, s (3H)	1,68, s (3H)

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 27, p.49) e os dados (TABELA 7) apresentou os sinais em  $\delta\text{c}$  181,5 do carbono carboxílico do ácido (C-28), em  $\delta\text{c}$  81,2 do carbono carbonílico (C-3), em  $\delta\text{c}$  111,2 do carbono metilênico (C-29) e em  $\delta\text{c}$  152,1, do carbono vinílico (C-20). Os dados de RMN foram comparados com os da literatura (VANDRESEN, 2005) e mostraram-se concordantes para o triterpeno ácido betulínico (ácido 3 $\beta$ -hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico).

**Tabela 7-** Dados espectroscópicos RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 09 HD7 em  $\text{CDCl}_3$

C	$\delta\text{c}$ 125 MHz	$\delta\text{c}$ (VANDRESEN, 2005) 75,45 MHz
1	40,0	39,0
2	28,6	27,6
3	81,2	79,2
4	38,4	38,9
5	56,5	55,5
6	18,5	18,5
7	33,4	34,5
8	40,9	40,9
9	50,7	50,7
10	37,4	37,4
11	22,8	21,0
12	26,5	25,7
13	38,5	38,5
14	42,7	42,6
15	31,3	30,7
16	32,3	32,6
17	57,8	56,4
18	46,9	47,0
19	49,1	49,4
20	152,1	150,6
21	29,9	29,9
22	36,1	37,2
23	28,2	28,2
24	15,5	15,5
25	16,2	16,2
26	16,7	16,3
27	15,3	14,9
28	181,5	178,6
29	111,2	109,9
30	19,9	19,5





Ácido betulínico

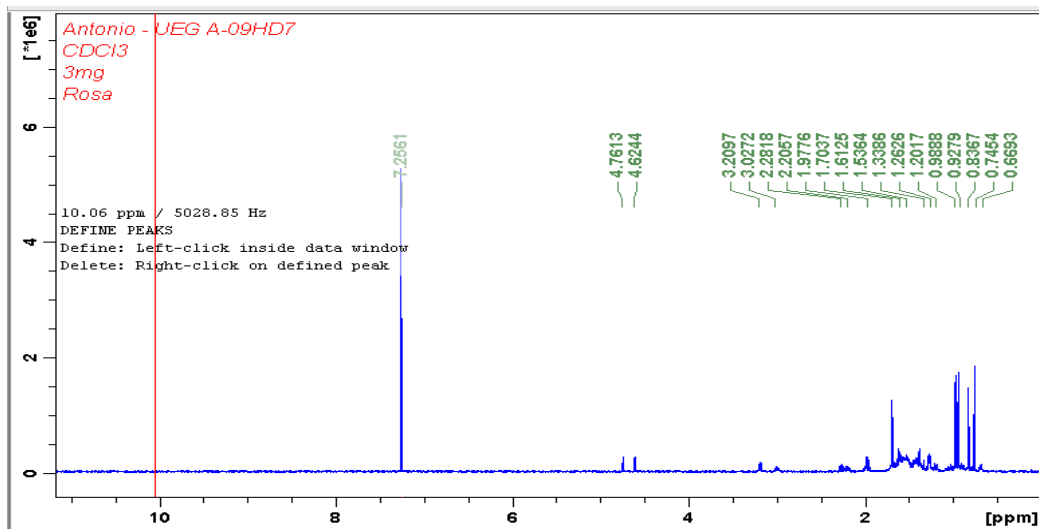


Figura 26: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 61-65 HD5 e 09 HD7.

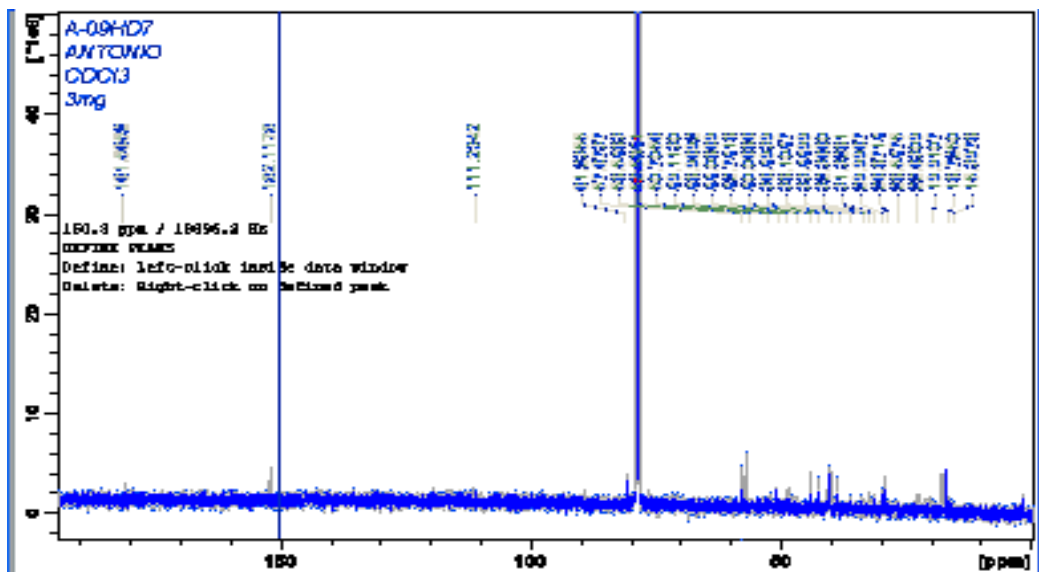
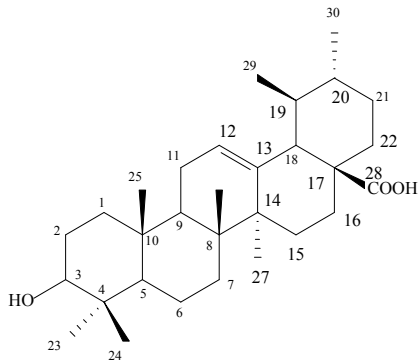


Figura 27: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 09HD7.

#### 4.1.5 - Identificação do ácido ursólico (51-55 VCFEA)



#### 51-55 VCFEA

A substância (51-55 VCFEA) foi isolada da fração de acetato de etila, conforme descrito na figura 21 (p.37). O triterpeno foi identificado através de dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28, p.52) e (Tabela 8) apresentou tripleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,27, referente ao H-12 olefínico (t,  $J=6,7$  Hz), e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,24 referente ao H-3 carbinólico (dd,  $J=10,9$  e  $5,3$  Hz) e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,19 atribuído ao H-18, (d,  $J=11,6$  Hz). Observaram-se também os singletos relacionados a cinco sinais referentes aos hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,14; 1,07; 1,00; 0,78 e 0,71 (H-27, H-23, H-24, H-26, H-25).

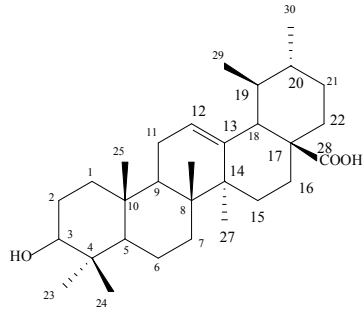
**Tabela 8** – Dados espectroscópicos RMN  $^1\text{H}$  da substância 51-55 VCFEA em  $\text{CDCl}_3$

Hidrogênios	$\delta_{\text{H}}$ 51-55VCFEA, 500MHz	$\delta_{\text{H}}$ (JORGE, 2005) 300,06 MHz
H-2	1,55, dd	1,55, dd ( $J=9,1$ e $3,3$ Hz)
H-3	3,24, dd ( $J=10,9$ Hz e $5,3$ Hz)	3,14, dd ( $J=11,5$ e $5,1$ Hz)
H-9	1,61 m	1,61 m
H-11	1,92 m	1,92 m
H-12	5,27, t	5,22 t
H-18	2,19 d ( $J=11,6$ Hz)	2,19 -1,37 m
H-20	1,62 m	d ( $J=12$ Hz)
H-19	1,36 m	1,321,62 m
$\text{CH}_3$ - 29	0,87 d ( $J=6,3$ Hz)	0,87 d ( $J=6,3$ Hz)
$\text{CH}_3$ - 30	0,95 d ( $J=4,8$ Hz)	0,95 d ( $J=4,8$ Hz)

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 29, p.52 ) e os dados (Tabela 9) apresentou os sinais em  $\delta\text{c}$  182,8 do carbono carboxílico do ácido (C-28), em  $\delta\text{c}$  80,4 do carbono carbinólico (C-3) , em  $\delta\text{c}$  139,4 e  $\delta\text{c}$  127,5 (C-12 e C-13) sinais relacionados aos carbonos olefinicos. Os dados de RMN foram comparados com os da literatura (JORGE, 2005) e mostraram-se concordantes para o triterpeno ácido ursólico.

**Tabela 9-** Dados espectroscópicos RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 51-55VCFEA em  $\text{CDCl}_3$

C	$\delta\text{c}$ 125 MHz	$\delta\text{c}$ (JORGE, 2005) 75,5 MHz
1	38,9	38,1
2	26,0	27,8
3	80,4	79,1
4	39,8	39,8
5	56,0	56,7
6	19,3	19,4
7	34,7	34,3
8	39,9	39,9
9	49,5	48,0
10	38,1	38,1
11	24,3	24,3
12	127,5	127,0
13	139,4	139,8
14	43,7	43,2
15	30,2	29,1
16	25,2	25,2
17	48,0	48,0
18	54,0	54,4
19	40,7	40,7
20	40,4	40,4
21	32,5	31,7
22	41,2	40,4
23	28,6	28,7
24	13,8	15,9
25	16,3	16,3
26	17,5	17,5
27	24,0	24,0
28	182,8	181,9
29	18,0	17,7
30	22,8	21,5



Ácido ursólico (51-55VCFEA)

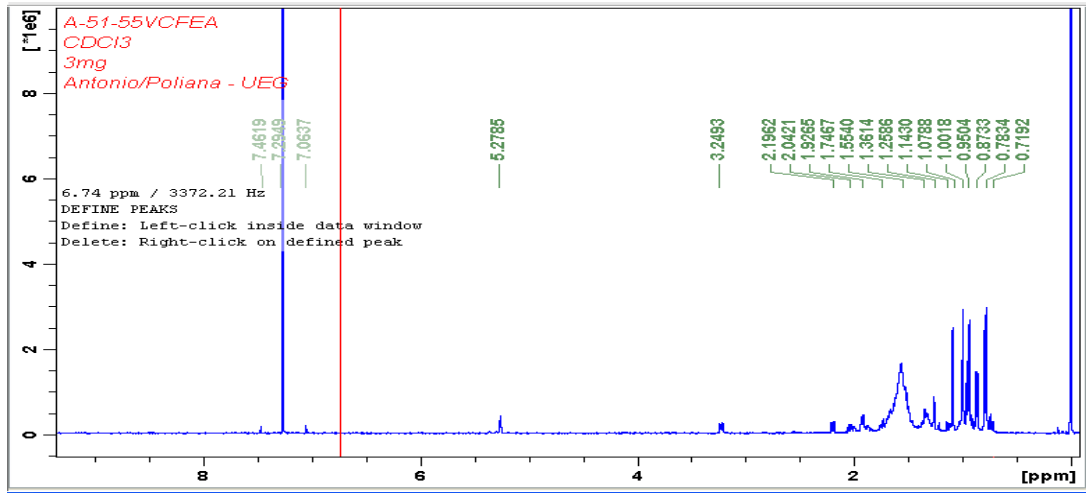


Figura 28: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 51-55 VCFEA.

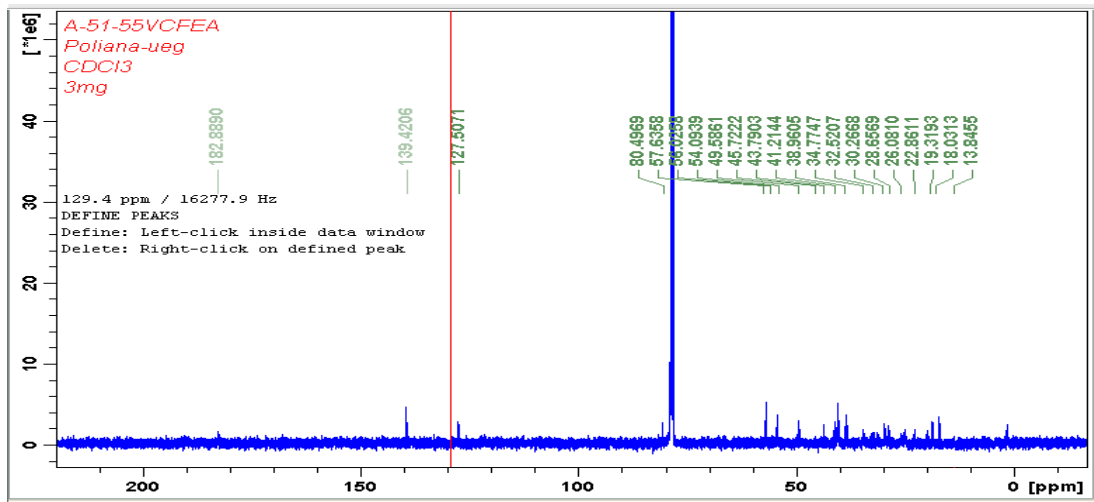
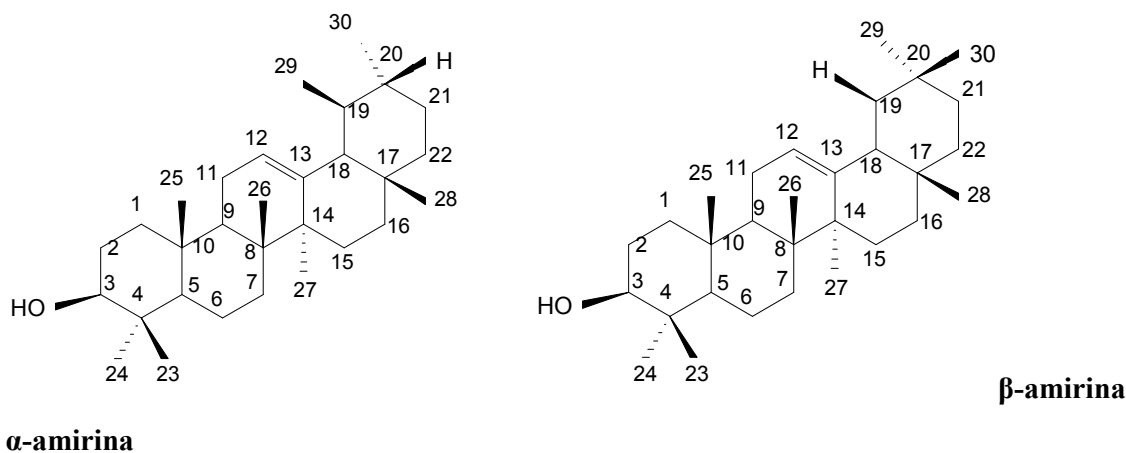


Figura 29: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 51-55 VCFEA.

#### 4.1.6 - Identificação da $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina (101-105 VCFED)



A substância (101-105 VCFED) foi isolada da fração de diclorometano, conforme descrito na figura 20 ( p.36). Os triterpenos foram identificados através de dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30, p.56) traz informações importantes para a classificação dos triterpenos presentes na mistura. Hidrogênios olefinicos possuem um deslocamento químico específico na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  4,5-7,5 devido ao efeito de desblindagem exercido pela nuvem eletrônica da dupla ligação. Nesta região do espectro verificam-se dois tripletes em  $\delta_{\text{H}}$  5,27 (t, J= 3,6 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5,25  $\delta$  (t, J= 3,6 Hz) (Figuras 30 e 31, p.56). Pelo fato de um dos carbonos envolvidos na dupla ligação ser quartenário (C-13) e, portanto não possuir hidrogênios, conclui-se que os sinais verificados são pertencentes ao hidrogênio de C-12. Este próton acopla com os dois hidrogênios H-11, resultado em um triplete para  $\alpha$ -amirina e um para  $\beta$ -amirina.

Esta diferença é explicada pela presença do grupamento 19- $\alpha$ -CH<sub>3</sub> (equatorial), que exerce efeito sobre H-12 nas séries ursan-12-eno, afetando estericamente o valor de deslocamento deste próton. Como em olean-12-eno esta metila encontra-se no C-20, H-12 não sofre este efeito. Os dados de literatura de RMN  $^1\text{H}$  também contribuem para a determinação da conformação de H-3, e consequentemente de OH-3. Quando H-3 está na posição  $\beta$ , seu deslocamento ocorre em  $\delta_{\text{H}}$  3,40 (m) e em  $\alpha$  é  $\delta_{\text{H}}$  3,18 (dd). Os deslocamentos observados no espectro de 101-105VCFED foram em  $\delta_{\text{H}}$  3,22 (dd),  $\delta_{\text{H}}$  2,8 (dd) e  $\delta_{\text{H}}$  3,5  $\delta$  (m) que são sinais característicos de H-3 em  $\alpha$  e  $\beta$  (MESSIAS, 2005).

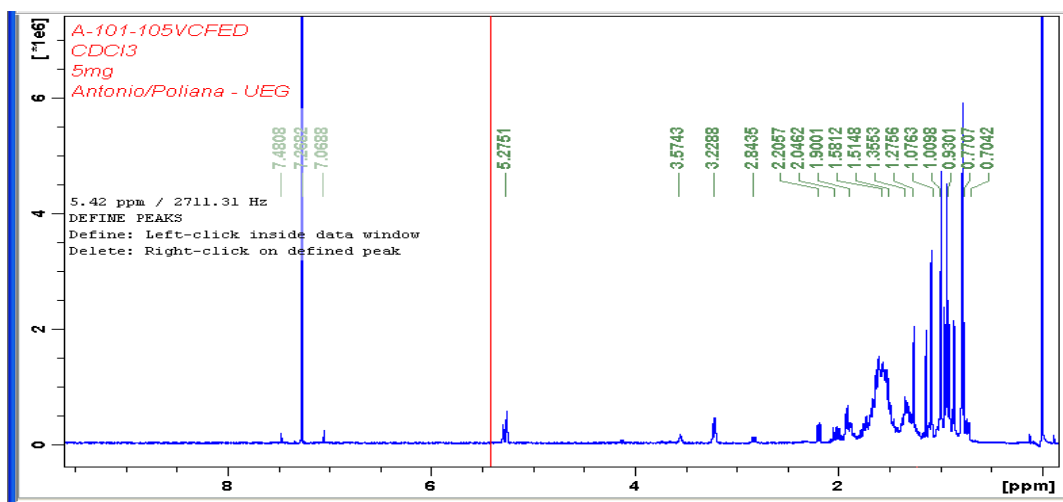
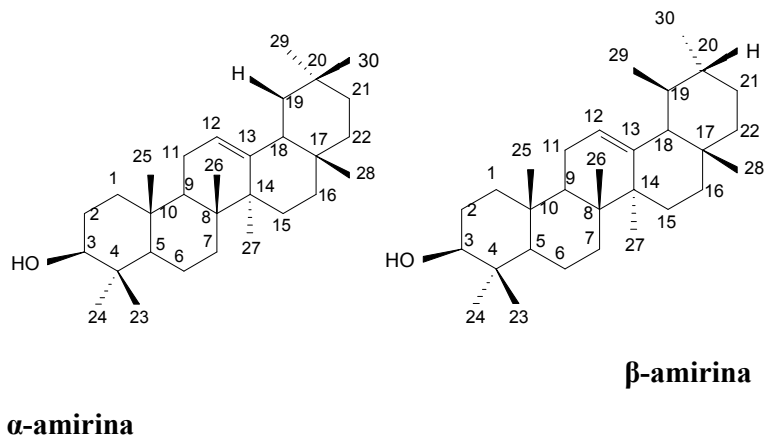
**Tabela 10** – Dados espectroscópicos RMN <sup>1</sup>H da substância 101-105VCFED em CDCl<sub>3</sub>.

Hidrogênios	$\delta_H$ 101-105 VCFED, 500MHz	$\delta_H$ (MESSIAS, 2005) 300 MHz
H-3	3,22 (dd) e 2,8 (dd)	3,25 (dd)
H-11 e H-12	5,27 (t, J= 3,6Hz) 5,25 (t, J=3,6 Hz)	5,15 (t) e 5,20 (t)

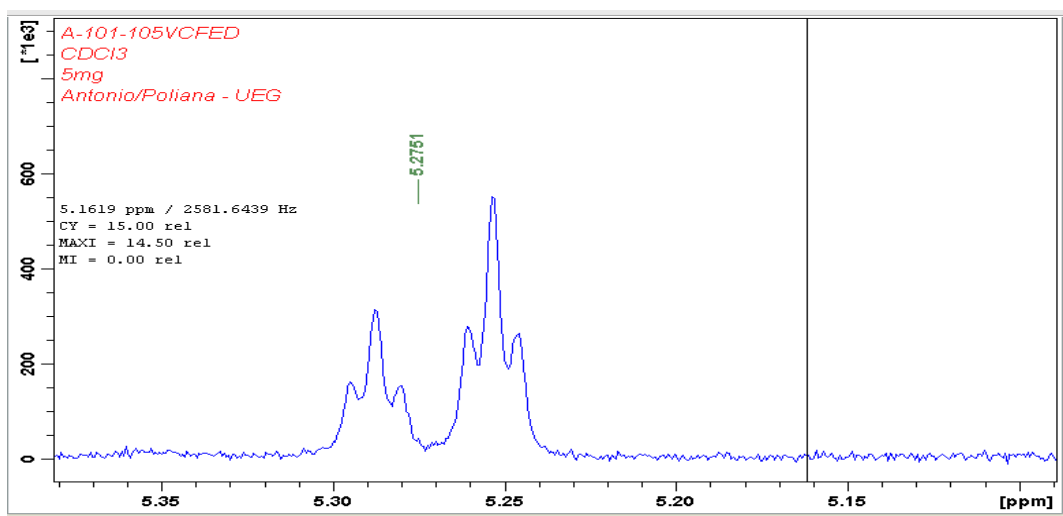
No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 32, p. 57 ) e os dados (Tabela 11) apresentou os sinais em  $\delta_c$  80,4 do carbono carbinólico (C-3), em  $\delta_c$  139,4 e  $\delta_c$  127,5 (C-12 e C-13) sinais relacionados aos carbonos olefínicos. Os dados de RMN <sup>13</sup>C foram comparados com os da literatura (MAHATO, 1998) e mostraram-se concordantes para a mistura dos triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina.

**Tabela 11-**Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup>C da substância 101-105VCFED em CDCl<sub>3</sub>

C	δc 125 MHz (101-105VCFED)	δc (MAHATO, 1988) 50MHz α e β-amirina	
1	38,3	37,8	38,7
2	27,3	27,2	27,3
3	80,4	78,8	79,0
4	38,7	38,7	38,8
5	55,0	55,2	55,3
6	18,3	18,3	18,5
7	33,1	32,9	32,8
8	40,0	40,0	38,8
9	47,7	47,7	47,7
10	36,9	36,9	37,6
11	23,3	23,3	23,6
12	127,1	124,3	127,8
13	139,7	139,3	145,1
14	43,1	42,0	41,8
15	29,9	28,7	26,2
16	26,6	26,6	27,0
17	33,7	33,7	32,5
18	57,3	58,9	47,4
19	40,8	39,6	46,9
20	40,8	39,6	31,1
21	31,5	31,2	34,8
22	41,5	41,5	37,2
23	28,1	28,1	28,2
24	13,5	15,6	15,5
25	13,5	15,6	15,6
26	16,8	16,8	16,9
27	23,3	23,3	26,0
28	28,1	28,1	28,4
29	17,3	17,4	33,3
30	19,9	21,3	23,7

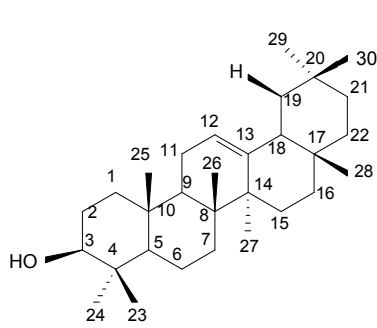


**Figura 30:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 101-105VCFED.

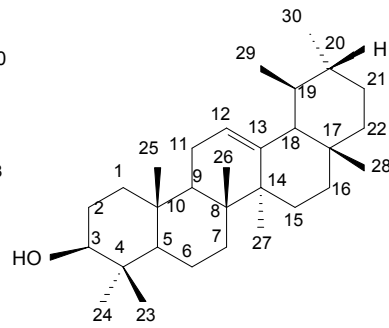


**Figura 31:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) expandido de 101-105VCFED.





$\alpha$ -amirina



$\beta$ -amirina

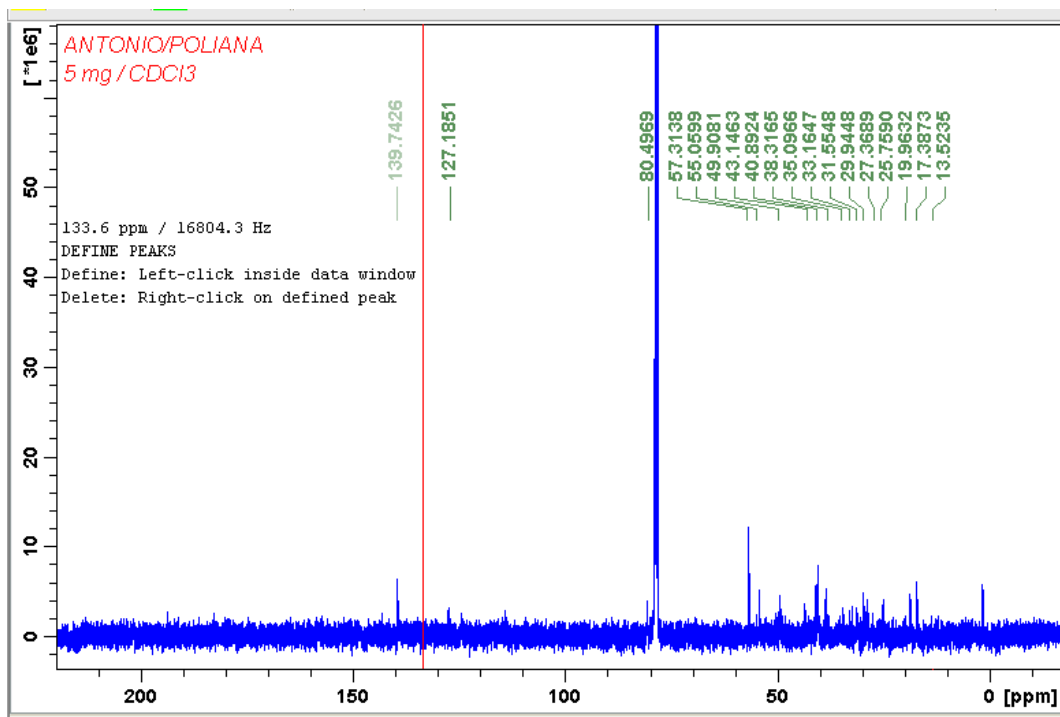


Figura 32: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 101-105 VCFED.

#### 4.1 – Citotoxicidade *in vitro*

As frações obtidas da casca do caule e das folhas de *V. cinnamomea* tiveram suas citotoxicidades testadas frente às linhagens MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano) e SF-295 (sistema nervoso central) em concentração única de 5µg/mL.

As atividades citotóxicas das frações 51-55 VCFEA (ácido ursólico), 101-105 VCFED ( $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina), 61-65 HD5 (ácido betulínico), 22-29 HAH( lupeol), 09 HD7 (ácido betulínico) e HAHW (lupeol) frente às linhagens de células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano) e SF-295 (sistema nervoso central), estão ilustradas na tabela 12 com suas respectivas porcentagens de inibição celular e desvio padrão.

**Tabela 12** – Porcentagem de inibição através do ensaio do MTT

Amostras	HCT-8	DP	MDAMB-		SF-295	DP
			435	DP		
N <sup>o</sup> Identificação	GI%		GI%		GI%	
	(média)		(média)		(média)	
30 VCFEA	31,17%	4,86%	31,37%	2,13%	37,49%	4,74%
32 VCFED	34,44%	3,59%	6,05%	4,81%	10,60%	3,43%
33 HD5	77,24%	4,08%	11,68%	3,15%	32,02%	4,63%
35 HAH	77,56%	5,31%	27,05%	13,97%	47,96%	2,67%
36 HAHW	53,17%	3,05%	19,14%	6,85%	25,55%	3,21%
37 09HD7	40,59%	0,49%	15,08%	6,66%	32,98%	8,82%

SD desvio padrão, GI% percentual de inibição do crescimento celular tumoral

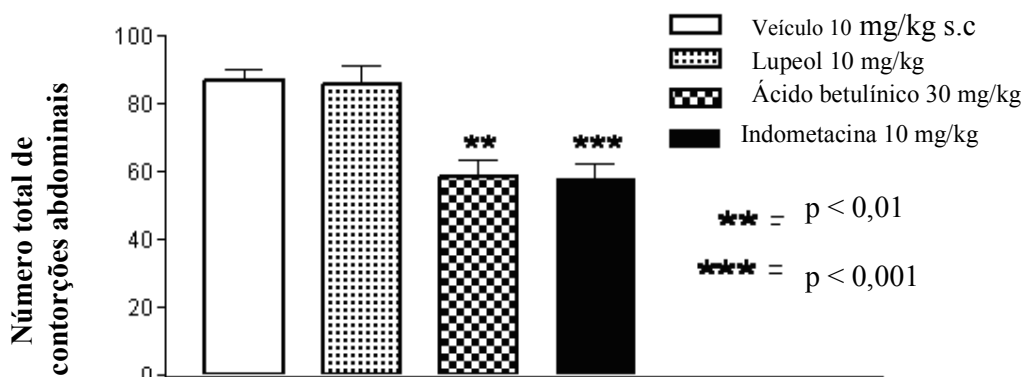
As atividades citotóxicas das frações obtidas da casca do caule e das folhas de *V. cinnamomea*, não apresentaram potencial relevante de inibição do crescimento celular tumoral, pois, apresentaram um percentual de inibição do crescimento tumoral menor que 90% nas linhagens de celulares utilizadas (GI% < 80%) em MTT.

## 4.2 – Atividade Antinociceptiva

### 5.2.1 – Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Comparando com o grupo controle, o ácido betulínico foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O grupo controle que foi previamente tratado com veículo (3% H<sub>2</sub>O:DMSO), 45 minutos antes da injeção de ácido acético (1,2% i.p.) apresentou (86,66 ± 3,42) contorções em 30 minutos. Já o grupo que foi tratado previamente com o ácido betulínico (30 mg/kg s.c) o número de contorções abdominais diminuiu (58,33 ± 4,84). A indometacina (10 mg/kg s.c.) também diminuiu o número de contorções (57,9 ± 4,64). O grupo de animais que foram tratados previamente pela via s.c. com o lupeol (10 mg/kg) não reduziu o número de contorções de forma significativa (85,90 ± 5,28) em relação ao veículo (86,66 ± 3,24) (Figura 33).

#### Avaliação da atividade anti-inflamatória pelo método das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético



**Figura 33:** Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% v/v) durante 30 minutos em camundongos previamente tratados (45 minutos) pela via subcutânea com veículo (V; grupo controle, n= 9), pela via s.c. com lupeol; 10 mg/kg, n = 11), pela via s.c com ácido betulínico; 30 mg/kg, n = 9) ou com indometacina (Indo; 10 mg/kg, n = 10) s.c. As colunas e barras verticais representam as médias ± EPM de cada grupo experimental.

\*\* Estatisticamente diferente do grupo controle (p < 0,01) – ANOVA, teste de Tukey

\*\*\*Estatisticamente diferente do grupo controle (p < 0,001) – ANOVA, teste de Tukey

Os triterpenos pentacíclicos em geral representam uma classe muito grande de metabólitos secundários, e tem demonstrado exibir uma grande variedade de atividades biológicas. Já foram relatados efeitos biológicos dos triterpenos incluindo citotoxicidade, efeitos antitumoral e atividades antivirais, bactericida, fungicida, espermicida, cardiovasculares, analgésicas entre outras, como a atividade anti-inflamatória destas substâncias que esta relacionada com as diversas proteínas celulares e extracelulares (PATOČKA, 2003; ZDZISIŇSKA et al., 2003).

A literatura descreve alguns trabalhos que demonstram significativa atividade anti-inflamatória do composto lupeol (GEETHA e VARALAKSHMI, 2001). Um desses estudos foi realizado com as raízes de *Strobilanthus callosus* e *Strobilanthus ixiocephala*. O lupeol foi identificado como principal agente na supressão de PGE<sub>2</sub>, sem qualquer efeito na liberação de leucotrienos, demonstrando que sua atividade anti-inflamatória possivelmente ocorre devido á sua capacidade de prevenir a produção de alguns mediadores pró-inflamatórios (FERNANDES et al, 2001). Outro estudo mostra também que quando o lupeol é administrado oralmente ou via intra-peritonal na dose de 25-200 mg/kg apresenta ação anti-inflamatória em inflamações agudas e crônicas em ratos e camundongos ( PATOČKA, 2003).

O ácido betulínico detém um amplo histórico de atividades farmacológicas, dentre elas destacam-se as ações anti-inflamatória, antitumoral, anti-HIV, antimalárica e citotóxica ( PATOČKA, 2003).

Este modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético é considerado adequado para avaliar compostos da classe dos triterpenos e de outras classes de compostos que tem atividade anti-inflamatória. O ácido acético por ser uma substância da classe dos algogênicos, ao ser administrado nos camundongos causa dor, e ao mesmo tempo ele estimula a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da nocicepção, por exemplo, a PGE<sub>2</sub>, uma das prostaglandinas associadas a processos fisiológicos de dor e inflamação (SHU et al., 2006). O modelo de contorção abdominal é sensível e a resposta antinociceptiva é pouco específica sendo que vários compostos essencialmente não analgésicos como os anti-histamínicos, estimulantes do sistema nervoso central, antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos, também são capazes de inibir as contorções abdominais (RATES e BARROS, 1994). Apesar de possuir baixa especificidade o modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético é comumente

utilizado na triagem inicial de drogas com possível ação analgésica, pois é um modelo de fácil execução, com boa reprodutibilidade, de baixo custo.

Os resultados deste trabalho demonstram que, no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, a substância ácido betulínico pela via s.c. na dose de 30 mg/kg apresentou atividade antinociceptiva, pois foi capaz de diminuir o número de contorções abdominais acumuladas durante 30 minutos após a injeção intraperitoneal de ácido acético 1,2% (v/v) (Figura 34 ilustrativa). A indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal, disponível no mercado farmacêutico, inibidor da COX-1 e da COX-2 (CRAIG e STITZEL, 2005), foi usada como controle positivo no teste, também foi capaz de diminuir o número de contorções abdominais. Já a substância lupeol não foi capaz de diminuir as contorções abdominais em relação ao veículo (3% H<sub>2</sub>O:DMSO), de acordo com os dados da literatura (PATOČKA, 2003) as doses de lupeol tem que estar entre 25-200 mg/kg, e a dose aplicada no referido teste foi de 10 mg/kg.



**Figura 34:** Foto da Contorção abdominal de um camundongo swiss, LIMA, R. S.

## 5 - CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das folhas e das cascas do caule de *Vochysia cinnamomea* levou ao isolamento de 6 substâncias: 1 esteróide, 5 triterpenos pertencentes às séries dos lupanos, oleanos e ursanos os quais foram identificados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  por comparação com dados da literatura.

Os triterpenos lupeol, ácido betulínico, ácido ursólico e a mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  não apresentou atividade citotóxica sobre às linhagens de células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano) e SF-295 (sistema nervoso central) em concentração única de 5  $\mu\text{g/mL}$ , mas não apresentaram atividade relevante.

Ácido betulínico na concentração de 30 mg/Kg apresentou atividade anti-inflamatória no método de contorção abdominal induzida por ácido acético. Já o lupeol na concentração de 10 mg/kg não apresentou atividade

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEODATO, S., OLIVEIRA, L., OLIVEIRA, V. Uma farmácia no fundo do quintal. **Globo ciências** 6(64): 44-49, 1996.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 464-471, 2007.

ARAÚJO, F.W.L., SOUZA, M.P., BRAZ, R. Vismiaefolic acid, a new triterpene from *Vochysia vismiaefolia*. **Journal of Natural Products** 53 (6), 1436-1440, 1990.

BAGHERI, H.; BROUE, P.; LACROIX, I.; LARREY, D.; OLIVES, J. P.; VAYSSE, P.; GHISOLFI, J.; MONTASTRUC, J. L. Fulminant hepatic failure after herbal medicine ingestion in children. **Thérapie**, v. 53, n. 1, p. 82-83, 1998.

BAUDOIN, G., TILLEQUIN, F., KOCH, M., VUILHORGNE, M., LALLEMAND, J.Y., JACQUEMIN, H. Isolation, structure and synthesis of vochysine, a pyrrolydinoflavane from *Vochysia guianensis*. **Journal of Natural Products** 46 (5), 681-687, 1983.

BORTALANZA, L.B.; FERREIRA, J.; HESS, S.C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A e CALIXTO, J.B. Anti-allodinic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 453 (2): 203-208, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria n. 19/92 de 30-01-92. **Diário Oficial da União**, 197 (seção I), 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.982/GM, de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01dez. 2009. Seção 1, p. 120.

BRENOL, J. C. T.; XAVIER R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. Ver **Bras Med.** 57, 2000.

BROWN, R. S.; BOTTOMLEY, W. K. The utilization and mechanism of action of tricyclic antidepressant in the treatment of chronic facial pain: a review of the literature. **Anesthesia Progress**, v. 37, p. 223-229, 1990.

BUSCHBACHER, R. *Expansão agrícola e perda da biodiversidade no cerrado: origens históricas e o papel do comércio internacional*. Brasília: WWF Brasil, 2000.

CALDERON, A.I., M. ESPOSITO-AVELLA, R.E.B. TELLO, J.M. PEZZUTO, C. SANCHEZ & M.P. **Pharm. Biol.** 39: 35-9, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. And Biol. Res.** 33: (2) 179-189, 2000.

CARVALHO, J.E. **Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento?** In: MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; PEREIRA, J.L.; PASTORE, G.M. ed Ciências de Alimento: avanços e perspectivas, vol. II. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, 2001, p. 196-200.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J.S.; PELLLMAN, D. Surfing on microtubule ends. *Trends Cell. Biol.*, 5, 229-237, 2003.

CORREA, D.B., BIRCHAL, E., AGUIAR, J.E.V e GOTTLIEB, O.R. Ellagic acids from Vochysiaceae. **Phytochemistry** 14 (4), 1138-1139, 1975.

COUTINHO, L.M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**: 1978, p. 17-23.

CRAIG, A.; STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 815 p.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 2-drug interactions. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v. 12, n. 3, p. 147-162, 1993.

DIAS, B. F. de S. Cerrado: uma caracterização. In: DIAS, B.F. de S.(Coord.). **Alternativa de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Brasília: IBAMA, 1992, p.11-2

DOLL, R.; PETO, R. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, 66: 1192–1308, 1981.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: ed. UNESP, 1996, p. 9-21.

DREW, A. K.; MYERS, S. P. Safety issues in herbal medicine: implications the health professions. **The Medical Journal of Australia**, v. 166, n. 10, p. 538-541, 1997.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras**. In: RIBEIRO, Darcy (Ed.) *Suma Etnológica Brasileira*. Petrópolis, RJ: Vozes, Etnobiologia, v. 1, 1997.

EMIM, J. A. S. Atividades farmacológicas de um inibidor seletivo da calcitreína tecidual em processos nociceptivos e antiinflamatórios de camundongos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.



FERNANDES, J.; CASTILHO, R. O.; COSTA, M. R.; WAGNER-SOUZA, K.; KAPLAN, M. A. C.; GATTASS, C. R. Pentacyclic triterpenes from *Crysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, p. 165-169, 2003.

FERNANDES, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M.T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the antiinflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **53**: 1533-1539, 2001.

FERREIRA, P. E. M. S. Dor crônica: avaliação e tratamento psicológico. In: AN-DRADE FILHO, A. C. C.(editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2001, p. 43-52.

FEUERSTEIN, M.; HICKEY, P. F. Ergonomic approaches in the clinical assessment of occupational musculoskeletal disorder. In: TURK, D. C.; MELZACK, R. (editors). **Handbook of pain assessment**. New York: The Guilford Press, 1992, p. 71-99.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology** **76 (1)**: 77-80, 2001.

Goodman e Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10ª ed. 2001.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerials parts of *Anadenanthera colubrine*. **Planta Medica**, v. 70, p. 263-265, 2004.

HANSEL, D. E.; DINTZIS, R. Z. **Fundamentos da Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 937 p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HENRIQUES, A.T., KERBER, V.A., MORENO, P.R.H. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**; SIMÕES, C.M.O.E., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., eds.; 1ª Ed., Ed. UFRGS e UFSC: Porto Alegre/ Florianópolis, 1999, cap.29.

HESS, S.C.; BRUM, R.L.; HONDA, N.K.; MORAIS, V.F.M.; GOMES, S.T.A.; LIMA, E.O.; CECHINEL FILHO, V e YUNES, R.A. **Fitoterapia** **66**: 549-550, 1995.

HESS, S.C., BRUM, R.L., HONDA, N.K., CRUZ, A.B., MORETTO E., CRUZ, R.B., MESSANA, I., FERRARI, F., CECHINEL FILHO, V e YUNES, R.A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **J. Ethnopharm.** **47**: 97-100, 1997.

HESS, S.C e DELLE MONACHE, F. Divergoic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. **J. Braz. Chem. Soc.** **10**: 104-106, 1999.

HEYWOOD, V. **Flowering Plants of the World**. Oxford University Press, New York, 1993, p.335.

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

IBAMA-PREVFOGO. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Disponível em: <>. Acesso em: 16-09-09.

JAIN, M. K.; YU, B. Z.; ROGERS, J. M.; SMITH, A. E.; BOGER, E. T. A.; OSTRANDER, R. L.; RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A<sub>2</sub> from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537-547, 1995.

JORGE, T. C. M. **ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE DUAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA RUBIACEAE: *Cephalanthus glabratus* e *Palicourea crocea***. 2005, 247p. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2005.

JÚNIOR, J. O. L.; SERRANO, S. C.; TEODORO, A. L.; DANA, B. A. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática hospitalar**, v. 51, 173-178, 2007.

KIM, S. H.; SONG, Y. S.; KIM, S.K.; KIM, B. C.; LIM, C. J.; PARK, E. H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 141-146, 2004.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; NISHIBE, S.; ARICHI, S. Effects of caffeoylglycosides on arachidonate metabolism in leukocytes. **Planta Medica**, p. 148-153, 1987.

KLIPPER, JH.; WEYAND, CM.; WORTAMANN, RL. **Primer in the rheumatic diseases**. Ed Arthritis Foundation, Georgia, 2001 p. 583-591.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E.J. Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p. 418-420, 1959.

KROGH, R. **Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pé-caprae* (Convolvulaceae). Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico**. 2001, 173p. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2001.

KUPELI, E. ORHAN, I.; TOKER, G.; YESILADA, E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandene and auricularin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 169-174, 2006.

LEE, K. H. Novel Antitumor Agents from Higher Plants. **Medicinal Research Reviews**, v. 19, p. 569-596, 1999.

LIN, C. N.; HSIEH, H. K.; LIOU, S. J.; K. O.; H. H.; LIN, H. C.; CHUNG, M. I.; K. O.; F. N.; LIU, H. W.; TENG, C. M. Synthesis and antithrombotic effects of xanthone derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 887-890, 1996.

LOPES, J.L.C., LOPES, J.N.C., LEITÃO FILHO, H.F. 5- Deoxy-flavones from the Vochysiaceae. **Phytochemistry** 18 (2), 362, 1979.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Editora plantarum, 1998. p 347.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology e Therapeutic**, v. 75, p. 1-19, 1997.

MACQUAY, H. J. Neuropathic pain: evidence matters. **European Journal of Pain**, (6), p. 11-18, 2002

MACRAE, W. D.; TOWERS. G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1207-1220, 1984.

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

MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHIMITT, C. B.; SANTOS, A. R. S.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J. B.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, v. 57, p. 103-107, 2001.

MALUENDAS, E. W. B.; PEITZ, C. Yerbalatina Phytoatives, a menor distância entre você e a natureza. In: JÚNIOR, C. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnósticos e Perspectivas**. Santa Catarina: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais, 2004, p. 208-211.

MARQUIS, R. J.; MORAIS, H. C. e DINIS, I. R. Interactions Among Cerrado Plants and Their Herbivores: Unique or Typical? In: OLIVEIRA, P. S. e MARQUIS, R. J. (eds.) **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002, p. 306-328.

MARTINS, E. R.; et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, p.13-30, 2000.

MESSIAS, K. L. S. **ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS E CAULES DA *Marlierea tomentosa* Camb. – Itajaí 2005**. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos, Secretaria de Assistência Médica Nacional de Câncer, Brasília, 1971, p. 7-47.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65, 55-63, 1983.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Phadrmacology**, v. 22, p. 2-16, 2001.

NASCIMENTO, I. V. **Cerrado: o fogo como agente ecológico**. Contribuição, Goiânia, 2001.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYS-TREJO, L. Principles of root bark of Hippocratea excels (Hippocrateaceae) with gastriprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 383-388, 2002.

NISBET, L. J.; MOORE, M. **Will natural products remain an important source of drug research for the future?** Current Opinion in Biotechnology, v. 8, n. 6, p. 708-712, 1997.

NUNES, G. P., SILVA, M. F. da., RESENDE, U.M., SIQUEIRA, J.M de. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13 (2), 2003.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 129-135, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A.T e RATTER, J.T. Vegetables physiognomies and Wood flora The cerrado bioma. In: OLIVEIRA, P.S. e MARQUIS, R.J. (eds), **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical Savana**. New York: Columbia University Press, 2002, p. 91-120.

ORHAN, D. D.; KUPELI, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Antiinflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album ssp. Album*. **Zitschrift fur Naturforschung**, v. 61, p. 26-30, 2006.

ORTENCIO, B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2. Ed. Brasília: Thesaurus, 1997.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **J. App. Biomed.** v. 1, p. 7-12, 2003.

PERISSINOTTI, D. M. N. Dor psicogênica. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001, p. 82-85.

PINTO, A.C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**. Vol. 18, p. 608-615, 1995.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 71, p. 313-324, 1996.

POTT, A. e POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. EMBRAPA Editora, Corumbá, Brasil, 1994, p.320.

PRADO, W. A. Neurofisiologia e neuroquímica da dor aguda e crônica. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnostico e tratamento**. 1ª Ed. São Paulo: Roca, 2001, p. 1-5.

RATES, S. M. K.; BARROS, H. M. T. Modelos animais para a avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. *Rev. Bras. Farm.*, v. 75, n. 2, p. 31-34, 1994.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, 99: 1-13, 2003.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia- da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 45-74, 2003.

RIBEIRO, J.F. e WALTER, B.M.T. **Fitofisionomias do bioma cerrado**. Pp. 89-166. In: SANO, S.M e ALMEIDA, S.P. de (eds) **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa cerrados, 1998.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacologia – Biotecnologia*. Ed. Premier, 1997.

SAFAIHY, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpene. **Planta Medica**,v. 63, 487-493, 1997.

SANTOS, D. A. P. “**Busca de metabólitos bioativos em plantas, da família Bignoniaceae contra parasitas causadores de doenças tropicas.**” São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado, 2005.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. Evidence for involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 340-347, 2002.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (Eds.), *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Ed. da Universidade /UFRGS, Porto Alegre, Florianópolis, p. 292-298, 2000.

SHU, X. S.; GAO, Z. H.; YANG, X. L. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. **J Ethnopharmacol**, v. 103, p. 327-332, 2006.

SILVA, D. A. **Estudo Químico e Avaliação de Atividade Antifúngica e Antiproliferativa da Espécie *Luehea candicans* MART et ZUCC, (Tiliaceae)**. 2004. 137 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

SILVA, E. D.; MORAES, T.M. Controle da dor. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES, J. R.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000, p. 145-149.

SILVA, M. I. G. **Utilização de Fitoterápicos nas Unidades Básicas de Atenção a Saúde da Família, no Município de Maracanaú – Ceará** 2003. 160p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., McMAHON, J., VISTICCA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer- drug screening. *J. Natl. Cancer Institute.*, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMITH, C. M. Opioid analgesics – agonists and antagonists. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Sanders Company, 1992, p. 226-250.

SOLOMON, D.H. NSAIDs: **Mecanism of action**. Up To Date, June 2007.

SOUZA, V.C. e LORENZI H. **Botânica Sistemática**. Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005, p.639.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2 ed. Barueri: Manole, 2002, 655 p.

TAYLOR, J. L. S.; RABE, T.; MCGRAW, L. J.; JAGER, A. K.; STADEN, J. Towards the scientific validation of tradicional medicinal plants. **Plant Growth Regulation**, 34: 23-27, 2001

TOLEDO, A. C. O., HIRATA, L. L., DA CRUZ, M., BUFFON, M., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, 21 (1/2): 7-13, 2003.

TOMAZZONI, M. I. **Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/ PR**. 2004.113f. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-Graduação em Enfermagem - Setor de Ciências da Saúde Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

TORNOS, M.P.; SAENZ, M.T.; GARCIA, M.D.; FERNANDEZ, M.A. Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. **J Ethnopharmacol**, v.68, n. 1-3, p.229-234, 1999.

TRENTINI, A. M.; YAMADA, C. B. Indústria de Fitoterápicos-Case Herbarium, 2001. In: JÚNIOR, C. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas**. Santa Catarina; Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais, 2004, p. 2002-207.

TURK, D. C.; MELZACK, R. The measurement of pain and the assesment of people experiencing pain. Handbook of pain assessment. New York London: The Guilford Press, 1992, p. 3-12.

TURK, D. C.; OKIFUJI, A. Pain terms and taxonomies of pain. In: LOESER, J. D.; BUTLER, S. H.; CHAPMAN, C. R.; TURK, D. C. (editors). **Bonica's management of pain**. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001, p. 17-25.

VANDRESEN, F. **CONSTITUIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIEDEMATOGÊNICA E TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* DA ESPÉCIE VEGETAL *Aloysia gratissima* (GILLIES e HOOK.) TRONCOSO (VERBENACEAE)** 2005. 182 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V, S.; BARREIRO, E.J. The natural products and the modem medicinal chemistry. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n.2, p.326-337, Mar./Apr. 2006.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plants antitumor agents I. The isolation and structure of camptotecin, a setel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 3880-38890, 1966.

WALL, M. E.; WANI, M. C. **The alkaloids**. Academic Press: New York, 1998.

WANG, H. K.; LEE, K. H. Plant-derived anticancer agents and their analogs currently in clinical use or in clinical trials. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.38, p. 225, 1997.

WEISSMANN, G. Aspirin. **Scientific American**, 264: 58-65, 1991.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 246-253, 1964.

WHO Media Centre 2008. **Traditional Medicine**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>, acessado em: 18-11-2009.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSSE, G. W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drugs. In: **Proceeding of Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 3, p. 544- 547, 1992

WOOLF, C. J.; MARNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

[WWW.inca.gov.br/estimativa/2008](http://WWW.inca.gov.br/estimativa/2008), Acessado em 07.11.08.

[www.who.int/whr/2006/en/](http://www.who.int/whr/2006/en/). Acessado em 07.11.08.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., eds.; 1<sup>a</sup> ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. **Química Nova**, v. 24, p. 147, 2001.

ZDZISIŃSKA, B.; RZESKI, W.; PADUCH, R.; SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KACZOR, J.; WEJKSZA, K.; KANDEFER-SZERSZEN, M. Differential effect of betulin and betulínico acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Polish J. Pharmacol.* n . 55, p. 235-238, 2003.

ZUCARO, Y.L.; COMPAGNONE, R.S.; HESS, S. C e DELLE MONACHE, F. 6 $\beta$ -Hidroxyimaslinic Acid, a Triterpene from *Vochysia ferruginea*. **J. Braz. Chem. Soc.** 11 (3): 241-244, 2000.