

DEISE PREHS MONTRUCCHIO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Ptychopetalum olacoides BENTHAM**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilis Dallarmi Miguel

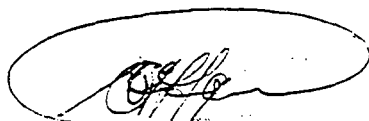
CURITIBA
2001

**"ESTUDO FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PTYCHOPETALUM OLACOIDES BENTHAM".**


por

DEISE PREHS MONTRUCCHIO

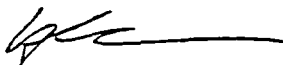
Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre no Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão
Examinadora



Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel (Orientador/Presidente)



Prof. Dra. Angela Malheiros (FURB)



Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber (UFPR)

Curitiba, 12 de dezembro de 2001

AOS MEUS PAIS
Por todo o carinho, dedicação e apoio,
que me permitiram chegar até aqui.

**Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel,
meus sinceros agradecimentos pela
orientação e constante apoio.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel, pela co-orientação, amizade e pelo constante acompanhamento e revisão do trabalho;

À Yerbalatina Import Export e ao Efren W. B. Maluendas, pelo material vegetal, pela amizade, pelo apoio e pelo financiamento do projeto;

Ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber e à Profª Drª Tomoe Nakashima, pela amizade, colaboração e convívio;

À Profª Wanda Moscalewski e Geni Peruzzo, do laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR, pela ajuda nos ensaios microbiológicos;

À Drª Marta Regina Tazoniero do Amaral e Drª Carmem Etsuko Kataoka, do Tecpar, pela colaboração no fornecimento das cepas de bactérias;

Ao Dr. Roberto Tomaz, do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pelo fornecimento dos fungos utilizados nos ensaios microbiológicos;

Ao Dr. Franco Delle Monache, pela grande ajuda na obtenção e interpretação dos espectros de RMN;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos funcionários do laboratório de Fitoquímica da UFPR, pela companhia;

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Ao amigo João Luiz S. Carvalho, pela amizade e pelo grande auxílio nas análises cromatográficas;

Às amigas Miriam M. Cúnico e Virgínia C. Silva, que compartilharam todos os bons e maus momentos durante esta caminhada, pelo companheirismo, apoio, carinho e incentivo;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a elaboração deste trabalho;

À minha família, por estar sempre ao meu lado;

E a Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO.....	6
2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA.....	6
2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO/ESPÉCIE.....	7
2.4 DADOS DE USO POPULAR.....	8
2.5 DADOS DE CONSTITUIÇÃO QUÍMICA.....	10
2.6 DADOS FARMACOLÓGICOS.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	17
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	17
3.2.1 Extrato Hidroalcoólico a 20%.....	17
3.2.1.1 Pesquisa de alcalóides.....	18

3.2.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas.....	18
3.2.1.3	Pesquisa de flavonóides.....	18
3.2.1.4	Pesquisa de cumarinas.....	19
3.2.1.5	Pesquisa de antraquinonas.....	19
3.2.1.6	Pesquisa de esteróides e triterpenos.....	20
3.2.2	Extrato Aquoso a 20%.....	21
3.2.2.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	21
3.2.2.2	Pesquisa de saponinas.....	22
3.2.2.3	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	22
3.2.2.4	Pesquisa de taninos.....	22
3.2.2.5	Pesquisa de aminogrupos.....	24
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	25
3.4	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO.....	25
3.4.1	Partição Líquido/Líquido.....	26
3.4.2	Partição Sólido/Líquido.....	27
3.5	ISOLAMENTO DE COMPOSTOS.....	30
3.5.1	Separação dos Constituintes da Fração Hexânica.....	30
3.5.2	Separação dos Constituintes da Fração Clorofórmica.....	31
3.5.3	Separação dos Constituintes da Fração Acetato de Etila.....	34
3.6	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
3.6.1	Atividade Antibacteriana.....	36
3.6.1.1	Preparo das amostras.....	36

3.6.1.2	Preparo dos discos de papel.....	37
3.6.1.3	Preparo do meio de cultura.....	37
3.6.1.4	Preparo do inóculo.....	38
3.6.1.5	Preparo do teste.....	39
3.6.2	Atividade Antifúngica.....	39
3.6.2.1	Obtenção dos extratos.....	40
3.6.2.2	Preparo do teste.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	44
4.1.1	Fração Hexânica.....	44
4.1.1.1	Substância H01.....	45
4.1.1.2	Substância H02.....	52
4.1.1.3	Substâncias H03 e H04.....	54
4.1.2	Fração Clorofórmica.....	58
4.1.2.1	Substância C02.....	58
4.1.2.2	Substância C04.....	63
4.1.2.3	Demais xantinas.....	65
4.1.3	Fração Acetato de Etila.....	71
4.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	75
4.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	75
5	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ALGUNS PRODUTOS ALEMÃES FORMULADOS À BASE DE MUIRAPUAMA.....	10
FIGURA 2 – ESTRUTURA DO α - ESTEROL PROPOSTO POR AUTERHOFF et. al. (1968).....	12
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO β -SITOSTEROL PRESENTE EM <i>Ptychopetalum olacoides</i>	12
FIGURA 4 – ESTRUTURA DO LUPEOL PRESENTE EM <i>Ptychopetalum olacoides</i>	12
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO.....	27
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DE PARTIÇÃO SÓLIDO/LÍQUIDO.....	29
FIGURA 7 – GRÁFICO DA CROMATOGRÁFIA GASOSA PARA A SUBSTÂNCIA H01.....	45
FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA A SUBSTÂNCIA H01.....	47
FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA H01.....	48
FIGURA 10 – ESTRUTURA DO ÁCIDO PALMÍTICO.....	49
FIGURA 11 – ESTRUTURA DO ÁCIDO ESTEÁRICO.....	49
FIGURA 12 – ESPECTRO DE MASSA PARA O ÉSTER METÍLICO DA SUBSTÂNCIA H01.....	51
FIGURA 13 – GRÁFICO DA CROMATOGRÁFIA GASOSA PARA A SUBSTÂNCIA H02.....	52
FIGURA 14 – ESTRUTURA DOS ESTERÓIDES PRESENTES NA MISTURA H02.....	53
FIGURA 15 – GRÁFICO DA CROMATOGRÁFIA GASOSA PARA A MISTURA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES.....	53

FIGURA 16 – GRÁFICO DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A SUBSTÂNCIA H03.....	54
FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA A SUBSTÂNCIA H03.....	56
FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C PARA A SUBSTÂNCIA H03.....	57
FIGURA 19 – ESTRUTURA DA CAFEÍNA.....	58
FIGURA 20 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO PARA A SUBSTÂNCIA C02.....	60
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA A SUBSTÂNCIA C02.....	61
FIGURA 22 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C PARA A SUBSTÂNCIA C02.....	62
FIGURA 23 – ESPECTRO DE MASSA DE UM PADRÃO DE CAFEÍNA.....	63
FIGURA 24 – GRÁFICO DE CLAE DA CAFEÍNA NO MATERIAL VEGETAL..	64
FIGURA 25 – GRÁFICO DE CLAE DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA EXTRAÍDA EM SOXHLET.....	66
FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS XANTINAS.....	67
FIGURA 27 – GRÁFICO DE CLAE DOS PADRÕES DE XANTINAS.....	69
FIGURA 28 – GRÁFICO DE CLAE DO RESÍDUO ALCALOÍDICO BRUTO E CO-INJEÇÃO COM OS PADRÕES DE XANTINAS.....	70
FIGURA 29 – ESTRUTURA DO β-SITOSTEROL GLICOSILADO.....	71
FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA A SUBSTÂNCIA AE01.....	73
FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C PARA A SUBSTÂNCIA AE01.....	74
FIGURA 32 – RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE.....	6
TABELA 2 – RENDIMENTOS OBTIDOS NAS PARTIÇÕES LÍQUIDO/LÍQUIDO E SÓLIDO/LÍQUIDO.....	30
TABELA 3 – FRAÇÕES OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO HEXANO.....	31
TABELA 4 – FRAÇÕES RESULTANTES DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO CLOROFÓRMIO.....	33
TABELA 5 – FRAÇÕES RESULTANTES DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO 54-75.....	33
TABELA 6 – FRAÇÕES RESULTANTES DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	35
TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS UTILIZADAS NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..	38
TABELA 8 – RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	42
TABELA 9 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN ¹³ C PARA A SUBSTÂNCIA H01.....	46
TABELA 10 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN DE ¹³ C PARA A SUBSTÂNCIA H03.....	55
TABELA 11 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN DE ¹³ C PARA A SUBSTÂNCIA C02.....	59
TABELA 12 – FRAÇÕES OBTIDAS DA EXTRAÇÃO DE 80g DE MATERIAL..	65
TABELA 13 – GRADIENTE UTILIZADO NA ANÁLISE DAS XANTINAS POR CLAE.....	67
TABELA 14 – RENDIMENTOS OBTIDOS NA CCD PREPARATIVA DO RESÍDUO ALCALOÍDICO BRUTO.....	68

TABELA 15 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA AE01.....	72
TABELA 16 – RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	76
TABELA 17 – RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

^{13}C RMN...	Ressonância magnética nuclear de ^{13}C
^1H RMN.....	Ressonância magnética nuclear de próton
ACN.....	Acetonitrila
AE01.....	Substância nº 1 isolada da fração acetato de etila
ATCC.....	American Type Culture Collection
BDA.....	Ágar dextrose-batata
C02.....	Substância nº 2 isolada da fração clorofórmica
C04.....	Substância nº 4 isolada da fração clorofórmica
CCD.....	Cromatografia em camada delgada
CG.....	Cromatografia gasosa
CG-EM.....	Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa
CLAE.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
COOH.....	Grupo carboxila
EM.....	Espectro de massa
H.....	Hidrogênio
H01.....	Substância nº 1 isolada da fração hexânica
H02.....	Substância nº 2 isolada da fração hexânica
H03.....	Substância nº 3 isolada da fração hexânica
H04.....	Substância nº 4 isolada da fração hexânica
IV.....	Infravermelho
l/l.....	Líquido/líquido

MeOH.....	Metanol
N.....	Nitrogênio
OH.....	Grupo hidroxila
pH.....	Potencial hidrogeniônico
Rf.....	Tempo de retenção
RMN.....	Ressonância magnética nuclear
s/l.....	Sólido/líquido
UFC.....	Unidade formadora de colônia
UV.....	Ultravioleta

RESUMO

A espécie *Ptychopetalum olacoides* Bentham, popularmente conhecida como “marapuama” ou “muirapuama”, é uma Olacaceae nativa da região norte do Brasil, há muito conhecida e utilizada por suas propriedades estimulantes e afrodisíacas, sendo inclusive exportada para diversos países. O estudo fitoquímico do lenho desta árvore, neste trabalho representado pelos galhos da planta, revelou a presença majoritária de vários ácidos graxos, esteróides e xantinas, sendo eles: ácido palmítico, ácido esteárico, β -sitosterol, estigmasterol, lupeol, glutinol, α -amirina, cafeína, teobromina e adenina, sendo que as três últimas não haviam ainda sido reportadas na espécie. O estudo das atividades antimicrobianas revelou que os extratos da planta não apresentam atividade inibitória sobre o desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*. Porém, o resíduo do extrato alcoólico apresenta uma significativa ação inibitória do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*, e ação menos pronunciada sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

Ptychopetalum olacoides Benthham, popularly known as “marapuama” or “muirapuama”, is an Olacaceae native from north Brazil, known and used for its stimulating and aphrodisiac properties for a long time, being also exported to several countries all over the world. The phytochemical study of the wood of this tree, represented by its stems, revealed the presence of several fatty acids, sterols and xanthenes, including palmitic acid, stearic acid, β -sitosterol, stigmasterol, lupeol, glutinol, α -amirin, caffeine, theobromine and adenine, and the latest three substances have not been reported in this specie yet. The study of antimicrobial properties revealed that the plant extracts don't have any inhibitory activity against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus epidermidis*. However, the alcoholic extract residue does have a remarkable inhibitory action on the mycelial growth of *Colletotrichum acutatum* and *Fusarium oxysporum*.

1 INTRODUÇÃO

O emprego de vegetais como alimento, medicamento ou cosmético se perde na própria história do homem na face da terra. E, de certa forma, a farmácia é inseparável da história da humanidade, pois satisfaz uma necessidade básica desta (GENARO, 1987). O uso de fármacos, nas formas vegetal e mineral, ainda que na forma bruta, indubitavelmente data de antes dos primeiros registros históricos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR, 2000).

Nas civilizações mais antigas as doenças eram consideradas “castigos dos deuses”, ou ainda, os pacientes eram vítimas das forças do mal, de modo que as pessoas capazes de curar estes pacientes eram os xamãs e feiticeiros da época. Estes se valiam de diversas ervas medicinais para suas práticas curativas, e as observações eram empíricas, com idealizações mágicas e exigências rituais (CHARAM, 1987). E desta forma foram sendo descobertos, pouco a pouco, os poderes curativos e tóxicos das plantas.

No antigo Egito já haviam inúmeros registros farmacêuticos, reconhecidos como os mais antigos da história, onde figuravam diversos produtos naturais. O Papiro de Ebers, datado do século XVI a.C., é dominado por fórmulas de fármacos, descrevendo-os com mais de 800 fórmulas ou prescrições e mencionando mais de 700 produtos diferentes, a grande maioria de origem botânica (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR, 2000).

Dioscórides, médico e botânico grego, no início do século I d.C., inventariou mais de 500 drogas de origem vegetal, mineral e animal, em seu trabalho *Materia Medica*, considerado uma pedra fundamental no desenvolvimento da botânica farmacêutica e no estudo das substâncias medicinais encontradas na natureza. Cláudio Galeno, no século II, foi autor de cerca de 500 tratados sobre medicina, incluindo descrições de numerosos fármacos de origem natural (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR, 2000).

O uso dos recursos naturais no tratamento das diversas enfermidades se estendeu através dos tempos, e a partir do século XIX, a humanidade se depara

perplexa diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais. A busca e intensificação do uso de plantas *in natura* para fins medicinais ocorre até mesmo nas sociedades mais industrializadas (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

As plantas medicinais fazem parte da terapêutica em praticamente todos os países. Nas nações desenvolvidas, as plantas constituem matérias-primas para a produção industrial de derivados químicos puros, enquanto nos países em desenvolvimento fazem parte de extratos ou compostos fitoterápicos utilizados no tratamento das mais diversas enfermidades.

A muirapuama, nome pelo qual é conhecida popularmente a espécie *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae), é uma planta que cresce na região norte do Brasil, em especial nas regiões da Amazônia e Pará. Esta planta é também encontrada na Reserva Duke, que compreende aproximadamente 300 hectares ao longo da Rodovia Manaus-Itacatiara, em floresta tropical úmida em terra firme (RIBEIRO, 1976).

A muirapuama tem seus primeiros relatos de uso datando do início dos anos 1900, especificamente entre os nativos da sua região de origem. Seu histórico de uso na medicina popular tem sido como afrodisíaco, tônico do sistema nervoso e no alívio de distúrbios gastrintestinais (SIQUEIRA et. al., 1998; PAIVA et. al., 1998).

A palavra *muirapuama* vem de *maira* (ou *myra*), que significa *lenho* ou *árvore* e *puama*, que significa *forte*, *potente*. Segundo outros autores, a origem da palavra viria de *myra* (ou melhor, *puyra*), que significa *colar*, e *apuam* ou *puam*, significando *arredondado* ou *esférico*, nome originado da forma dos frutos da planta, os quais serviam de adorno para as índias brasileiras (SILVA, 1925).

O primeiro trabalho de pesquisa publicado acerca da muirapuama data de 1907, por G. WEIGEL (1907), e já falava de suas propriedades afrodisíacas. Desde então, poucos trabalhos foram publicados até os dias atuais, sendo alguns deles a respeito dos constituintes químicos da espécie (AUTERHOFF; PANKOW, 1968; PANKOW; AUTERHOFF, 1969; AUTERHOFF; MOMBERGER, 1971; STEINMETZ, 1971; TOYOTA et. al., 1979; FORGACS, 1983; BUCEK; FOURNIER; DADOUN, 1987).

Parte destes trabalhos citam a presença de um alcalóide, o qual foi denominado “muirapuamina”, embora sua real estrutura química não seja citada.

Porém, todos os trabalhos referentes à composição química da muirapuama traz o estudo de suas raízes. SILVA (1925) já propunha a utilização das cascas dos caules e ramos das árvores adultas, evitando assim o sacrifício destas árvores para retirada das raízes. O autor também supõe que o alcalóide “muirapuamina” seria encontrado quase que exclusivamente nas cascas, e apenas em traços nas raízes, e salienta a necessidade de um estudo químico comparativo entre cascas e raízes.

Ainda nos dias de hoje a muirapuama é conhecida e utilizada em diversos países, e constitui-se num item importante da exportação de plantas medicinais brasileiras. Estima-se que sejam exportadas cerca de 50 toneladas/ano do lenho na forma inteira, pulverizada e na forma de extrato seco, principalmente para os Estados Unidos. Em conjunto com outras plantas dotadas de atividades tônicas e estimulantes, a muirapuama faz parte de um grande número de formulações utilizadas como complementos alimentares, estimulantes gerais e afrodisíacos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Com base nos dados de utilização popular da planta e seus relatos bibliográficos de ação e componentes químicos, pretende-se realizar o estudo fitoquímico e de atividade antimicrobiana de *Ptychopetalum olacoides*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Separar e identificar os compostos presentes majoritariamente nos galhos de *Ptychopetalum olacoides*;
- Identificar o alcalóide denominado “muirapuamina”;
- Avaliar uma possível atividade antibacteriana dos extratos;
- Avaliar uma possível atividade antifúngica dos extratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Desde o primeiro trabalho publicado a respeito da muirapuama, em 1907, a primeira confusão encontrada é em relação à sua nomenclatura científica. Neste primeiro trabalho, WEIGEL (1907) se refere à muirapuama como a droga obtida de duas espécies botânicas: *Liriosma ovata* Miers e *Acanthea virilis* Kebourgeon.

Desde então a muirapuama é tratada, em diferentes publicações, por seis “sinônimos” diferentes. GRIEBEL (1912) se refere à muirapuama como *Liriosma ovata* Miers, e já descreve em seu artigo uma metodologia para a detecção de um ativo, que o autor chama de “princípio afrodisíaco”. Os outros nomes atribuídos à muirapuama, na época, são *Acanthus virilis*, *Symplocos ovata* e *Dulacia ovata* (Miers) Lyons.

Em 1925, Rodolpho Albino Dias da SILVA escreve um artigo com um estudo botânico e farmacognóstico da muirapuama, descrevendo inclusive esta dificuldade quanto à identidade botânica. Cita o autor:

Os primeiros trabalhos botânicos que encontramos sobre a muirapuama atribuem-lhe o nome científico de *Acanthes virilis* (outros escrevem *Acanthae*), nome esse que parece indicar pertencer a planta em questão à família Acanthaceae. Não existe, porém, nesta família natural um gênero *Acanthes* ou *Acanthae*, mas sim *Acanthus*, convindo acrescentar, entretanto, que não figura no *Index Kewensis* nenhum *Acanthus virilis* (ou *viridis*, segundo outros). Em publicações mais recentes, figura a muirapuama com a classificação ora de *Symplocos ovata* (Symplocaceae), ora de *Liriosma ovata* Miers (Olacaceae), corrigido, de acordo com estudos mais acurados, para *Dulacia ovata* (Miers) Lyons.

Devido à dificuldade de classificação, o autor elaborou um material para identificação da espécie, concluindo que a verdadeira muirapuama trata-se realmente de uma Olacaceae, não a *Dulacia ovata* (Miers) Lyons, mas sim a espécie brasileira *Ptychopetalum olacoides* Benth.

O trabalho de SILVA (1925) foi confirmado, em 1933, por um estudo morfo-anatômico das espécies acima citadas elaborado por ANSELMINO (1933). Neste estudo, concluiu-se novamente que a verdadeira muirapuama é proveniente de uma espécie do gênero *Ptychopetalum*.

2.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE

	Segundo Engler (JOLY, 1998)	Segundo CRONQUIST (1998)
Divisão	Angiospermae (Anthophyta)	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archichlamydeae	Rosidae
Ordem	Santalales	Santalales
Família	Olacaceae	Olacaceae
Gênero	<i>Ptychopetalum</i>	<i>Ptychopetalum</i>
Espécie	<i>P. olacoides</i>	<i>P. olacoides</i>

2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA

A família Olacaceae compreende cerca de 27 gêneros, distribuídos nos trópicos de todo o mundo, e seus representantes são plantas lenhosas, árvores ou arbustos com folhas inteiras, dispostas em espiral. As flores são pequenas, em geral reunidas em inflorescências axilares. Certos representantes são hemiparasitas (como por exemplo, espécies de *Ximenia*), crescendo sobre raízes de outras plantas. As flores são diclamídeas, radiais e hermafroditas, com cálice pequeno, com 3 a 6 dentes, e em certos casos ampliado no fruto (por exemplo, espécies de *Aptandra* e *Heisteria*). A corola apresenta pétalas soldadas com grande extensão. Os estames apresentam-se em número igual às pétalas (por exemplo, *Liriosma*) ou em menor número, às vezes com filetes monadelfos (por exemplo, *Aptandra*). O ovário é geralmente súpero, raramente ínfero, com 2 a 5 carpelos e um só estilete. Lóculos em geral só reconhecíveis na base do ovário, em número de 2 a 5, e apenas um óvulo em cada lóculo. O fruto é indeiscente com uma só semente, em geral drupáceo. Nas matas brasileiras encontram-se representantes de 10 gêneros, sendo os de maior número de espécies, *Heisteria*, *Ximenia*, *Liriosma* e *Schoepfia*. Ao gênero *Minquartia* pertence a madeira designada

“acariquara” na Amazônia; nesta região, espécies do gênero *Curupira* produzem a “castanha-curupira” (JOLY, 1998).

Do gênero *Ptychopetalum*, apenas duas das dez espécies conhecidas são encontradas no Brasil: *P. olacoides* e *P. uncinatum*, ambas na região amazônica.

2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO/ESPÉCIE

O gênero *Ptychopetalum* compreende dez espécies, sendo apenas duas sul-americanas, e as outras oito nativas da África (INDEX KEWENSIS, 1997).

<i>P. acuminatissimum</i> Engl.	nativa de Camarões
<i>P. acutissimum</i> Engl.	nativa da África tropical
<i>P. alliaceum</i> Wildem.	nativa da África tropical
<i>P. anceps</i> Oliver	nativa da África tropical
<i>P. cuspidatum</i> R.E. Fries	nativa da Rhodesia
<i>P. laurentii</i> DeWild.	nativa da África tropical
<i>P. nigricans</i> Wildem.	nativa da África tropical
<i>P. olacoides</i> Benth.	nativa da Guiana e Amazônia brasileira
<i>P. petiolatum</i> Oliver	nativa da África tropical
<i>P. uncinatum</i> Anselmino	nativa da Amazônia brasileira

De acordo com SILVA (1925), a *Ptychopetalum olacoides* é uma árvore de ramos alternos, delgados, cilíndricos e glabros, com os ramos mais novos subangulosos, levemente sulcados longitudinalmente e em geral um tanto flexuosos.

As folhas são alternas, oblongo-elípticas, longa e estreitamente acuminadas, um tanto obtusas, de base aguda, verde-escuras na parte superior e mais claras na porção inferior, de 9 a 11 cm de comprimento por 2,5 a 3 cm de largura, subcoriáceas quando adultas e glabras. A nervura mediana é levemente sulcada na face superior e bastante saliente na inferior; as nervuras secundárias partem quase horizontalmente da mediana,

arqueando-se próximo à margem, onde se anastomosam em uma fina trama, pouco saliente; o pecíolo é muito curto, de 2 a 3 mm de comprimento, subcilíndrico e canaliculado.

A inflorescência aparece em racemos flexuosos axilares, alternados, com cinco a oito flores, isolados ou agrupados em número de dois ou três. Os pedúnculos florais têm de 4 a 6 mm de comprimento. As flores são hermafroditas, heteroclamídias, actinomorfas, brancas e muito aromáticas. O cálice é muito pequeno, hipógino, de cerca de 1 mm de altura, cupuliforme, indistintamente quinque-denteado, subcoriáceo.

As pétalas aparecem em número de cinco, raramente seis, iguais, de 1 a 1,3 cm de comprimento, alternas com os lobos calicinos, um tanto carnosas, lineares-linguiformes, mais ou menos agudas, côncavas, externamente glabras e internamente densamente cobertas, até dois terços de sua altura, de pêlos brancos, tendo na parte superior as margens membranáceas, crenuladas e inflexas. Os estames normalmente aparecem em número de dez, sendo cinco mais longos interpostos às pétalas e cinco menores, opostos às mesmas; freqüentemente, porém, faltam de dois a três dos mais longos; os filetes são sub-livres e as anteras amarelas, versáteis, oblongas, eretas e dorsifixas.

Apresenta o ovário súpero, livre, oblongo, unilocular, com dois óvulos minúsculos, anátropos. O estilete é tão longo quanto o ovário, terminando num estigma nitidamente trilobado. O fruto é drupáceo, ovóide, de 2 a 3 cm de comprimento por 1 a 1,8 cm de largura, a princípio avermelhado e roxo-negro após a maturação, com o endocarpo crustáceo. A semente é única, com o embrião pequeno alojado no vértice do albúmem carnosos, enrugado-sublobado.

2.4 DADOS DE USO POPULAR

Como citado anteriormente, os relatos de uso da muirapuama datam do início do século XX. As primeiras observações do seu uso foram feitas entre os índios da

região amazônica, os quais utilizavam primariamente as raízes das plantas novas, como afrodisíaco, tônico e estimulante geral (SANGIRARDI JR, 1980).

Nunes Pereira, etnógrafo e indianista que se deteve com especial atenção no estudo da sexologia entre as tribos da Amazônia, relata que, entre os *Parintintin*, os homens recorriam às forças mágicas, “mas também a infusões de um afrodisíaco efficientíssimo: o *Canindé-poã-munhum*, bastante conhecido e utilizado pelos caboclos da Amazônia sob o nome de muirapuama ou marapuama” (SANGIRARDI JR, 1980).

SILVA (1925) relata em seu artigo a eficácia da muirapuama no tratamento das doenças do sistema nervoso central, e também cita resultados positivos em casos de astenia gastrointestinal e circulatória, atonia da ovulação, ataxia locomotriz, nevralgias, reumatismo crônico e paralisias parciais.

Além das raízes, os ramos são também utilizados como tônico para tratamento de problemas neuromusculares. Em decocção, a planta é utilizada externamente, em banhos e massagens, para tratamento de paralisia e beribéri. Internamente, na forma de infuso, é considerada eficaz no tratamento de debilidade sexual, reumatismo, gripe e astenia cardíaca e gastrointestinal (CHARAM, 1987; STEINMETZ, 1971). GAEBLER (1970) cita também seu uso em casos de distúrbios menstruais, enquanto TOYOTA et. al. (1979) citam ainda seu uso em casos de poliomielite aguda, como antidisentérico e estimulante do apetite.

Apesar de ser considerada útil no tratamento de toda esta diversidade de sintomas, o objetivo principal do uso da muirapuama é o tratamento das disfunções de origem sexual – como afrodisíaco e para os casos de impotência sexual (CHARAM, 1987; GAEBLER, 1970; PAIVA; RAO; SILVEIRA, 1998; SANGIRARDI JR, 1980; SIQUEIRA et. al., 1998; STEINMETZ, 1971; TOYOTA et. al., 1979; WEIGEL, 1907).

Com todas estas atribuições, não é de se admirar que muitas são as formulações atualmente disponibilizadas no mercado que apresentam em sua composição extratos de muirapuama. Não apenas no Brasil, mas em muitos outros países este número é bastante elevado. Um exemplo são os produtos alemães, como *Zumba* e *Liebes-tropfen*

(figura 1), vendidos livremente em farmácias e *sex shops* na Alemanha (SANGIRARDI JR, 1980).

FIGURA 1 - ALGUNS PRODUTOS ALEMÃES FORMULADOS À BASE DE MUIRAPUAMA



“planta das florestas brasileiras” (*brasilianischen Urwaldpflanze*). Zumba é vendido em farmácias, e os outros dois em sexshops: são “gotas de amor” (*Liebestropfen*), de “ação imediata” (*Sofortwirkend*). Misturadas com uma bebida alcoólica qualquer, resultam essas gotas na “receita indicada para o coquetel do êxtase vodu” (*Rezeptvorschlag für den Voodoo-Extase-Cocktail*).

No Brasil, os galhos da muirapuama são utilizados, na forma de pó ou extratos, nas mais diversas formas farmacêuticas tais como cápsulas, comprimidos, soluções orais, e mesmo na forma de tinturas ou extratos fluidos, às vezes isoladamente, mas na maioria das formulações associada com outras plantas conhecidas como estimulantes, como por exemplo, o guaraná e a catuaba.

2.5 DADOS DE CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

Dentre todos os trabalhos publicados, desde 1907 até os dias atuais, referentes à composição química da muirapuama, a maioria se reporta às raízes da planta.

WEIGEL (1907) escreve que os principais constituintes são um óleo etéreo, e um princípio cristalino amargo, solúvel em água quente mas que recristaliza em água fria, o qual o autor não nomeia.

GRIEBEL (1912) descreve em seu artigo um método para detectar o “princípio afrodisíaco” da muirapuama, ainda tratada como *Liriosma ovata*, por uma reação de fluorescência. Embora o autor não cite o tipo químico desta substância, o sistema de extração, por diferenciação em meio ácido e básico, nos leva a acreditar ser esta substância de algum grupo alcaloídico.

SILVA (1925) cita em seu artigo dois outros autores, que teriam encontrado nas raízes:

- Segundo C. Rebourgeon: essência; uma substância cristalizada (a qual o autor supõe ser um glicosídeo); taninos; flobafeno e substâncias indiferentes.
- Segundo Peckolt: essência; 0,055% de muirapuamina; dois ácidos resinosos (0,6 e 0,72%, respectivamente); 0,38% de substância gordurosa e matéria amarga amorfa.

SILVA (1925) ainda nos dá as características da muirapuamina, como sendo insolúvel na água fria e solúvel na água fervente, donde se separa pelo resfriamento; dissolve-se facilmente no álcool, no éter e na água acidulada; forma um precipitado branco com o reativo de Mayer (cloreto mercúrico e iodeto de potássio), precipitado amarelo com o trinitrofenol e precipitado pardo-avermelhado com o soluto iodo-iodetado.

AUTERHOFF et. al., numa série de três artigos publicados em 1968, 1969 e 1971, trazem uma descrição dos principais compostos da porção lipofílica das raízes da planta. No primeiro artigo (1968), os autores relatam a presença de 0,4 a 0,5% de uma mistura de ésteres, consistindo de aproximadamente 66% de um éster do ácido behênico e um α -esterol, com a estrutura proposta mostrada na figura 2. Os outros 33% seriam compostos homólogos do ácido behênico. Os autores citam ainda a presença de uma pequena quantidade de β -sitosterol (figura 3), 0,05% de

muirapuamina, 0,5% de uma substância amarga, 0,4% de matéria gordurosa e uma quantidade de ácidos resinosos.

FIGURA 2 – α -ESTEROL PROPOSTO
POR AUTERHOFF et. al. (1968)

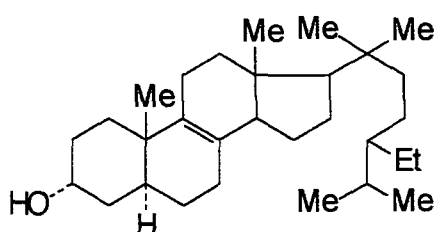
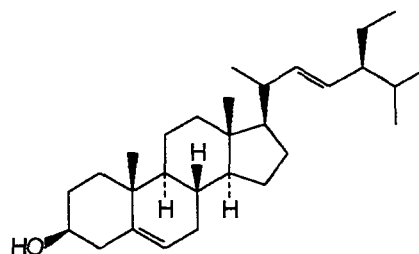
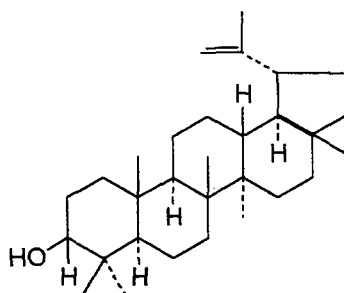


FIGURA 3 – β -SITOSTEROL



No segundo artigo da série (1969), PANKOW e AUTERHOFF relatam a presença dos ácidos araquídico, behênico, lignocérico, uncósanico, tricósanico e pentacosanico. Já no terceiro artigo (1971), os autores relatam a presença do lupeol (figura 4) como principal componente da fração lipofílica da muirapuama.

FIGURA 4 – LUPEOL



TOYOTA et. al. (1979) descrevem a presença de sete ácidos graxos livres de cadeia longa, sendo eles o ácido cerótico (C_{26}), ácido heptacosanico (C_{27}), ácido montânico (C_{28}), ácido nonacosanico (C_{29}), ácido melísico (C_{30}), ácido hentriacosanico (C_{31}), e ácido dotriacosanico (C_{32}), além da presença de cumarinas.

FORGACS et. al. (1983) publicam um estudo fitoquímico de 18 plantas da Guiana Francesa, incluindo a *P. olacoides*. Neste estudo os autores relatam a presença de alcalóides, saponinas, taninos e leucoantocianidinas.

BUCEK et. al. (1987) relatam um estudo do óleo essencial das raízes de *P. olacoides*, onde, por cromatografia gás-líquido combinada com espectrometria de massa, concluem que os principais componentes do óleo essencial da muirapuama (o qual foi encontrado na concentração de 1,5%) são o α -pineno (25,9%), α -humuleno (9,2%), β -pineno (7,8%), β -cariofileno (7,7%), canfeno (6,6%) e canfor (6,2%), além de Δ^3 -careno, mirceno, *p*-cimeno, limoneno, α -terpineno, linalol, borneol, cubebeno, χ -muuroleno, α -copaeno, elixeno, aloaromadendreno, *trans*- β -farneseno, α -guaieno, α -muuroleno, β -bisaboleno, δ -cadineno, α -elemeno e óxido cariofileno, presentes em menor quantidade. Os autores encontraram ainda, na casca das raízes, além do óleo essencial, lipídios, taninos e alcalóides.

2.6 DADOS FARMACOLÓGICOS

Acerca de suas propriedades farmacológicas, o primeiro trabalho data de 1927, mas ainda se refere à muirapuama como *Liriosma ovata*, de modo que não podemos garantir que o trabalho se refira à real espécie de muirapuama. Neste, OLOFSSON (1927) avaliou o efeito, em coelhos, da injeção de um extrato a 10% de cascas de *Liriosma ovata*. Neste experimento foi observado que a injeção do extrato causava uma diminuição da pressão sanguínea, efeito este dependente da dose administrada, e seria devido à dilatação dos vasos sanguíneos. Foi observado ainda que a administração de uma dose equivalente a 21 ml/kg de um extrato a 10% causava morte dos animais por parada cardíaca. Apesar deste efeito vasodilatador periférico, o extrato mostrou-se capaz de reforçar a atividade inibitória e motora da adrenalina no útero, intestino e vasos coronarianos, sensibilizando os terminais nervosos simpáticos, mas diminuindo levemente a excitabilidade dos terminais nervosos parassimpáticos, sem modificar a excitabilidade ou contratilidade muscular.

HAMET (1932) se refere ao extrato de muirapuama como tendo uma ação semelhante à nicotina, não sendo portanto um afrodisíaco.

Em 1997, dois trabalhos relatam a atividade farmacológica de uma preparação farmacêutica contendo extrato de muirapuama em conjunto com guaraná (*Paullinia cupana*), catuaba (*Trichilia catigua*) e gengibre (*Zingiber officinalis*). No primeiro trabalho, CALIXTO et. al. (1997) demonstram que a formulação testada apresentava ação relaxante dos vasos isolados de ratos, coelhos e cobaias, pré-contraídos por noradrenalina ou fenilefrina. No entanto, esta ação parece estar relacionada às três outras plantas presentes na formulação, não à muirapuama. Enquanto os extratos das outras três plantas, isolados, mostraram efeito vasorelaxante, o extrato isolado de muirapuama causou uma pequena contração dos vasos dos animais.

No segundo trabalho, VAZ et. al. (1997) investigaram a toxicidade aguda e subcrônica, bem como o efeito antinociceptivo da formulação, em modelos térmicos e químicos, em camundongos. Foram testados também os extratos alcoólicos isolados, de cada uma das plantas, contra a dor induzida por ácido acético e formalina em camundongos. Os resultados demonstraram que a *P. olacoides*, assim como as três outras plantas envolvidas na formulação, apresenta atividade de inibição da dor induzida por ácido acético e por formalina, sem revelar nenhum sinal de toxicidade, quando comparado com um grupo controle.

PAIVA et. al. (1998), salientando a falta de dados científicos sobre as propriedades farmacológicas da muirapuama, promovem um estudo dos efeitos de um extrato hidroalcoólico das cascas dos galhos da planta sobre o comportamento de camundongos em dois modelos de teste: imobilidade induzida por nado forçado e teste em campo aberto. Os resultados obtidos mostraram que o extrato hidroalcoólico, em administração oral, apresenta tanto atividade depressora quanto estimulante motora, dependendo do modelo de teste utilizado. Ao mesmo tempo em que o extrato diminuiu a atividade locomotora no teste de campo aberto, reduziu o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Estes efeitos também se mostraram semelhantes aos produzidos pela clonidina, um agonista α_2 adrenérgico, e foram abolidos pela ioimbina, um antagonista α_2 adrenérgico. Com estes dados, os autores sugerem que o extrato das cascas de *P. olacoides* apresenta um efeito semelhante ao da clonidina, ou seja, como agonista de receptores α_2 .

Também em 1998, SIQUEIRA et. al., baseados em dados etnofarmacológicos, discutem a hipótese de que a *P. olacoides* possa ter efeitos psicofarmacológicos por interação com diferentes sistemas neurotransmissores: (1) sistema dopaminérgico, considerando seu uso como modulador do apetite, para alívio de tremores e por sua propriedade de despertar o desejo sexual; (2) sistema noradrenérgico, novamente por seu uso contra tremores e/ou depressão; e (3) sistema serotoninérgico, também relacionado a depressão e desejo sexual. Os dados coletados pelos autores indicam que a *P. olacoides* tem efeitos no sistema nervoso central e suportam a hipótese de sua interação com os sistemas dopaminérgicos e/ou noradrenérgicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para que o trabalho alcance os objetivos inicialmente propostos, fazem-se necessárias diversas etapas seqüenciais, as quais incluem, além da revisão de literatura citada no item 2, as seguintes:

- 3.1. Coleta e identificação do material a ser analisado;
- 3.2. Análise fitoquímica preliminar;
- 3.3. Obtenção de um extrato bruto em etanol;
- 3.4. Fracionamento do extrato bruto em solventes de diferentes polaridades;
- 3.5. Separação, isolamento e purificação dos componentes de cada fração;
- 3.6. Identificação dos componentes isolados, por meio de dados físico-químicos e de técnicas espectroscópicas;
- 3.7. Ensaios microbiológicos das diferentes frações, para investigação de atividade antibacteriana e antifúngica.

Os gráficos de cromatografia gasosa (CG) foram obtidos num cromatógrafo Shimadzu 14B equipado com injetor SPL-14, detector FID Cell, interface CBM-101, workstation CLASS-CR10, conectado a um sistema operacional windows 93, utilizando-se uma coluna megabore J&W Scientific DB-1, de 0,53mm de diâmetro interno por 30m de comprimento, com filme de 1,5 μ m.

Os gráficos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram obtidos num cromatógrafo Merck-Hitachi composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne 7725i, detector DAD L7450 e interface L7000, conectado a um sistema operacional windows NT, utilizando-se uma coluna RP18 (250x4mm).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos na Universidade Católica de Roma. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em CDCl_3 a 300 MHz, enquanto os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos a 75,5 MHz, também em solvente CDCl_3 .

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado constitui-se dos galhos de *Ptychopetalum olacoides*, coletados em junho de 1999 no Pará, região norte do Brasil. A espécie foi identificada no Instituto de Pesquisa da Amazônia – INPA – e uma amostra encontra-se depositada no herbário daquela instituição.

O material foi seco e estabilizado ao sol, e reduzido a um pó moderadamente grosso, gentilmente cedido pela empresa Yerbalatina Import Export, situada em Colombo-Pr.

3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

No intuito de orientar o início do trabalho, procedeu-se inicialmente ao estudo fitoquímico do material analisado, visando identificar os principais grupos químicos presentes. Para tanto, as metodologias utilizadas foram a marcha sistemática descrita por MOREIRA (1979), e o estudo fitoquímico descrito por MATOS & MATOS (1989), com algumas adaptações descritas a seguir.

3.2.1 Extrato Hidroalcoólico a 20%

Este extrato foi preparado a partir de 40 g do material (galhos secos, estabilizados e pulverizados de *Ptychopetalum olacoides*), pelo método de maceração a quente (70°C, 1 hora), utilizando como líquido extrator etanol a 70%. Este extrato foi então submetido aos testes fitoquímicos para alcalóides, leucoantocianidinas, flavonóides, cumarinas, antraquinonas, esteróides e triterpenos.

3.2.1.1 Pesquisa de alcalóides

A pesquisa de alcalóides foi feita utilizando-se os reativos gerais de alcalóides – Mayer, Dragendorff, Bouchardt e Bertrand. Iniciou-se com a prévia secura de 50 ml do extrato, em banho maria a 70°C, seguido de dissolução do resíduo em 1 ml de etanol e 20 ml de HCl 1%.

Parte extrato clorídrico (10 ml) foi separado em tubos, e então procedeu-se as reações, adicionando-se 3 gotas de cada reativo sobre o extrato clorídrico. A formação de precipitados sugeriu a presença de alcalóides. O restante do extrato clorídrico foi alcalinizado até pH 10, convertendo os alcalóides para sua forma livre, os quais foram em seguida extraídos com uma solução de clorofórmio e éter (na proporção de 3:1). Este extrato foi submetido às mesmas reações anteriores.

3.2.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Inicialmente foi realizado um processo de extração das leucoantocianidinas, caso presentes. 10 ml do extrato alcoólico foram agitados duas vezes com 15 ml de acetato de etila; a fração acetato de etila foi então concentrada até 5 ml. A reação foi feita pela adição de HCl concentrado e aquecimento à ebulição, sendo que o desenvolvimento de coloração vermelha indicou reação positiva.

3.2.1.3 Pesquisa de flavonóides

A pesquisa de flavonóides foi realizada pela reação de Schinoda ou reação da cianidina, inicialmente com o extrato alcoólico total, e após extração seletiva.

20 ml do extrato alcoólico total foram submetidos a uma extração com hexano, para retirar os compostos apolares, resinas e pigmentos, e em seguida a uma extração

com acetato de etila, em duas vezes de 15 ml. Esta última fração foi concentrada a 5 ml e submetida à reação.

Para a reação, foram adicionados 200 mg de limalha de magnésio e 2 ml de HCl fumegante a 5 ml do extrato, em tubos de ensaio.

3.2.1.4 Pesquisa de cumarinas

Este teste foi feito após acidificação de 30 ml do extrato hidroalcoólico até pH 1, concentração e extração com éter etílico, em dois volumes de 10 ml. Este extrato etéreo foi concentrado até aproximadamente 5 ml, e metade deste volume foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual adicionou-se 2 ml de NaOH N. Este foi deixado em exposição ao ultravioleta por 15 minutos.

O restante do extrato etéreo foi depositado em 3 pontos de um papel de filtro, e a dois deles foi adicionada 1 gota de NaOH N. Uma destas duas manchas foi coberta por papel alumínio, e o papel de filtro deixado em exposição ao ultravioleta por 15 minutos.

O aparecimento de fluorescência azul no tubo e na mancha alcalinizada e descoberta do papel de filtro indicou reação positiva.

3.2.1.5 Pesquisa de antraquinonas

A pesquisa de antraquinonas foi realizada pela reação de Borntraeger, com NH_4OH . Inicialmente, 30 ml do extrato hidroalcoólico foram aquecidos em refluxo durante 30 minutos com 5 ml de H_2SO_4 a 10%, seguido de filtração ainda quente. Depois de frio, este filtrado foi extraído duas vezes por agitação com éter etílico.

O extrato etéreo foi concentrado a 5 ml, transferido para um tubo de ensaio e submetido à reação com 5 ml de NH_4OH , onde o aparecimento de coloração rósea indicaria prova positiva.

3.2.1.6 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Existem diversas reações de caracterização de esteróides e triterpenos, sendo que uma delas é a reação de Liberman Bouchardt.

Inicialmente 50 ml do extrato hidroalcoólico foram evaporados à secura, sendo o resíduo dissolvido em 5 ml de clorofórmio e filtrado. Fez-se então uma bateria de diluições crescentes deste extrato clorofórmico, as quais foram submetidas à reação de Liberman Bouchardt, adicionando 1 ml de anidrido acético e 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de coloração verde indicou prova positiva.

As outras reações para esteróides e triterpenos envolveram 2 fases anteriores: precipitação com acetato básico de chumbo, seguida de centrifugação; extração do líquido sobrenadante por agitação com clorofórmio, seguido de concentração deste extrato.

Depois desta etapa, o extrato clorofórmico foi submetido a várias reações, tais como: Keller Kelliani, Baljet, Legal, Tollens, Kedde e Xantidrol.

Reação de Keller Kelliani

Nesta reação, 2 ml do extrato clorofórmico foram evaporados à secura, e o resíduo dissolvido em 2 ml de ácido acético glacial e 0,2 ml de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. Esta mistura foi transferida para um tubo contendo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, e o desenvolvimento de coloração na zona de contato dos dois líquidos indicou reação positiva para desoxiaçúcares.

Reação de Baljet

A 2 ml do extrato clorofórmico foram adicionados volumes iguais de solução de ácido pícrico a 5% em etanol e solução de hidróxido de sódio a 10% (1 ml de cada solução). O desenvolvimento de coloração indicaria prova positiva.

Reação de Tollens

Inicialmente, 4 ml do extrato clorofórmico foram evaporados à secura. O resíduo foi tratado com 1 ml de piridina, 0,5 ml de solução aquosa de nitrato de prata a 10% e 0,5 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5%, seguida de dissolução do precipitado com hidróxido de amônio e fervura em chama. Esta reação resultaria positiva se ocorresse a formação de espelho de prata nas paredes do tubo de ensaio.

Reação de Kedde

A 1 ml do extrato clorofórmico foi adicionado 1 ml da mistura de ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2% em etanol e hidróxido de potássio a 6% em água. O desenvolvimento de coloração violácea indicaria reação positiva para heterosídeos e geninas com anel lactônico insaturado.

Reação de Xantidrol

A 1 ml do extrato clorofórmico foi adicionado 0,5 ml de uma solução de 0,125% de xantidrol em ácido acético glacial mais 1% de HCl concentrado. O desenvolvimento de coloração avermelhada indicaria reação positiva.

3.2.2 Extrato Aquoso a 20%

Este extrato foi preparado a partir de 40 g do material pulverizado, pelo método de maceração a quente (70°C, 1 hora), utilizando como líquido extrator a água. Este extrato foi então submetido aos testes fitoquímicos para heterosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogénicos, taninos e aminogrupos.

3.2.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

As colorações dos compostos antociânicos variam de acordo com o pH, e estas reações servem como base para a sua identificação. Para esta reação, 15 ml do extrato

aquoso foram distribuídos em três tubos de ensaio; um deles foi alcalinizado com NaOH 10% até pH 10, outro foi acidificado com HCl 10% até pH 4, enquanto o terceiro foi neutralizado (pH 7,0).

O desenvolvimento de colorações indicaria reação positiva.

3.2.2.2 Pesquisa de saponinas

Os tubos de ensaio utilizados na pesquisa de heterosídeos antociânicos foram agitados energicamente durante 5 minutos, deixando-se repousar em seguida por 30 minutos. O resultado seria considerado positivo se persistisse, após o repouso, uma espuma com altura superior a 1cm.

3.2.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogénicos

Transferiu-se para um tubo de ensaio 5 ml do extrato aquoso, ao qual foi adicionado 1 ml de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 1N. Suspendeu-se uma tira de papel micro-sódico no tubo, o qual foi então levado a aquecimento a 60° C, em banho-maria, durante 30 minutos. O resultado seria positivo se ocorresse a formação de uma coloração avermelhada no papel.

3.2.2.4 Pesquisa de taninos

A pesquisa de taninos pode ser feita por reação direta com diversos compostos. As reações testadas com o extrato aquoso foram:

Cloreto Férnico

A 1 ml do extrato aquoso foram adicionadas 3 gotas de cloreto férrico. A formação de coloração azul indicou reação positiva para a presença de taninos.

Solução de Gelatina

A 2 ml do extrato aquoso foram adicionados 2 ml de solução de gelatina a 2,5%. A formação de precipitado sugeriu a presença de taninos.

Sulfato de Ferro Amoniacal

A 5 ml do extrato aquoso foram adicionadas 2 gotas de sulfato férrico amoniacal. A formação de coloração azul indicou reação positiva para a presença de taninos.

Cloridrato de Emetina

A 1 ml do extrato aquoso foram adicionados 4 ml de água destilada e 2 gotas de solução aquosa de cloridrato de emetina a 1%. A formação de precipitado indicaria reação positiva para a presença de taninos.

Água de Bromo

A 5 ml do extrato aquoso foram adicionadas 3 gotas de ácido acético a 10% e solução de água de bromo, gota a gota. A formação de precipitado indicaria reação positiva para a presença de taninos pirocatéquicos.

Cianeto de Potássio

A 5 ml do extrato aquoso foram adicionados 1 gota de ácido acético diluído e 1 ml de solução aquosa de cianeto de potássio a 10%. O desenvolvimento de coloração rósea indicaria reação positiva para a presença de taninos contendo ácido gálico.

Ácido Nitroso

A 5 ml do extrato aquoso foram adicionados 3 cristais de nitrito de potássio e 5 gotas de ácido sulfúrico a 0,5%. O desenvolvimento de coloração rósea, púrpura ou índigo indicaria a presença de taninos contendo ácido elágico.

Dicromato de Potássio

A 5 ml do extrato aquoso foram adicionadas 3 gotas de solução de dicromato de potássio a 1%. A formação de precipitado indicaria reação positiva para a presença de taninos.

Reação com Formol Clorídrico

30 ml do extrato aquoso foram refluxados, em um balão de 250 ml, com 6 ml de formaldeído a 40% e 4 ml de ácido clorídrico, durante uma hora. Depois de frio foi filtrado sobre papel de filtro.

Na porção filtrada fez-se a pesquisa de taninos hidrolisáveis, adicionando acetato de sódio em excesso e algumas gotas de cloreto férrico a 1%. O desenvolvimento de coloração azul indicaria a presença desses taninos.

O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução alcoólica a 50%, e sobre ele foi gotejado KOH a 5%. O desenvolvimento de coloração verde indicaria a presença de taninos condensados.

3.2.2.5 Pesquisa de aminogrupos

Em uma tira de papel de filtro foram adicionadas 5 gotas do extrato aquoso, em pontos previamente demarcados. Depois de seco, nebulizou-se o papel com solução de ninhidrina, levando-o à estufa (95-100°C) durante 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azul-violácea indicou a presença de aminogrupos.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Para o preparo do extrato bruto, 2.000g do material vegetal (galhos secos, estabilizados e pulverizados de muirapuama) foram extraídos com etanol, por maceração seguida de percolação.

Os dois quilos da droga foram previamente umedecidos com 2.100 ml de etanol e acomodados em um percolador de aço inox, onde o material foi deixado em maceração por 6 horas. Decorrido este tempo, foi completado o volume do percolador com 8.000 ml de etanol, e após uma hora iniciou-se o processo de percolação. Este foi carregado a uma velocidade de cerca de 10 gotas por minuto, num processo contínuo; à medida que o extrato era recolhido, era concentrado sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, e o etanol recuperado era retornado ao percolador. Este processo de extração estendeu-se por 20 dias, até esgotamento total da droga. Ao final do processo o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se um total de 500 ml do extrato alcoólico.

Este extrato foi deixado em repouso em freezer durante 24 horas, de modo a precipitar sua porção lipofílica. Decorrido este tempo, foi filtrado sob vácuo, obtendo-se então o extrato bruto com as seguintes características:

- volume: 435 ml
- cor: marrom escuro
- pH: 5,0
- resíduo seco: 10,50% (45,67g - 2,28% em relação ao material vegetal de partida)

3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

Dando seqüência ao trabalho, o extrato etanólico bruto foi particionado, em duas etapas, utilizando-se solventes em polaridade crescente. O objetivo deste

fracionamento foi separar os compostos químicos extraídos da planta em frações bem definidas, de acordo com características de polaridade e afinidade química, de modo a possibilitar seu isolamento.

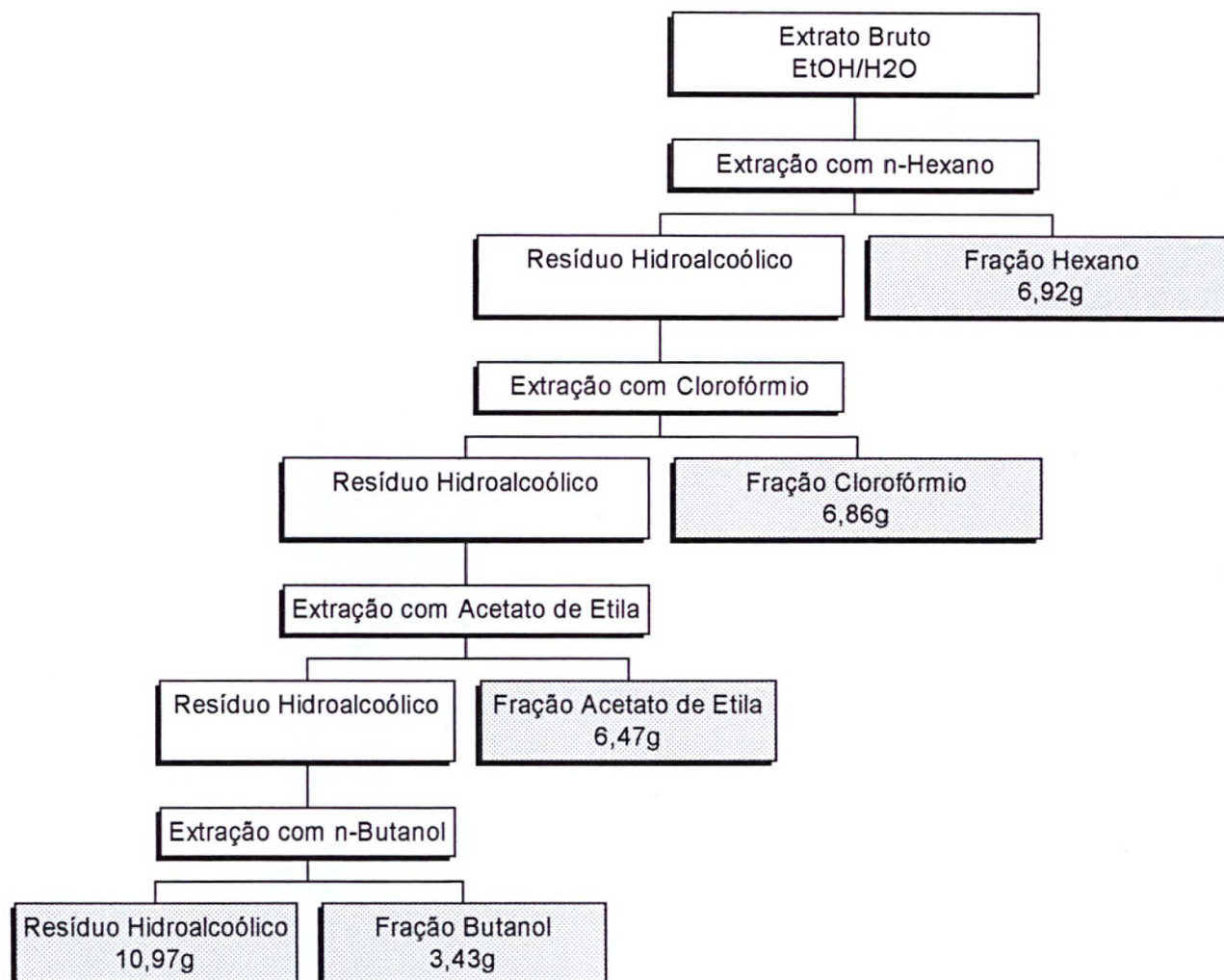
Inicialmente foi feita uma partição líquido/líquido (l/l), utilizando como solventes o n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. Na segunda etapa foi feita a partição pelo sistema sólido/líquido (s/l) descrito por MIGUEL (1996), onde cada uma das frações obtidas na primeira etapa foi submetida a eluição em sílica com os mesmos solventes.

3.4.1 Partição Líquido/Líquido

Para este fracionamento, o extrato etanólico bruto foi novamente concentrado, tendo seu volume reduzido a 200 ml. Este foi transferido para um funil de separação com capacidade para 500 ml e extraído, por agitação manual, inicialmente com n-hexano, em três volumes sucessivos de 100 ml.

O extrato hexânico foi reservado e o resíduo alcoólico foi novamente extraído por agitação manual, com três volumes sucessivos de 100 ml de clorofórmio; o extrato clorofórmico foi reservado, e o resíduo alcoólico foi novamente extraído, em três volumes sucessivos de 100 ml de acetato de etila; a fração acetato de etila foi reservada e o resíduo alcoólico foi extraído, pela última vez, com três volumes sucessivos de 100 ml de n-butanol. O fluxograma desta primeira etapa de fracionamento encontra-se ilustrado na figura 5. Ao final deste processo foram obtidas cinco frações orgânicas, as quais foram então submetidas ao processo de partição sólido/líquido.

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO



3.4.2 Partição Sólido/Líquido

Esta segunda etapa do fracionamento teve por finalidade concentrar ainda mais os componentes químicos afins numa única fração orgânica. Por este processo pode-se obter quase a totalidade de uma dada substância numa única fração, facilitando seu processo de separação e obtendo melhores rendimentos.

Neste processo, cada fração obtida na partição l/l, isoladamente e em polaridade decrescente, foi submetida a uma eluição em sílica, com solventes em polaridade

crescente. As frações de mesmo solvente foram reunidas e concentradas a um volume único, obtendo-se ao final cinco frações bem definidas – n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, n-butanol e metanol.

Iniciou-se o processo com a fração alcoólica total. Esta foi misturada com 20 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck e seca sob constante homogeneização e leve aquecimento, obtendo-se assim uma pastilha de sílica.

Em um filtro de vidro sinterizado de 15 cm de diâmetro por 10 cm de altura, forrado com um disco de papel de filtro, acomodou-se 100 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck. Sobre esta camada colocou-se novo disco de papel de filtro, e este foi coberto com a pastilha de sílica obtida com a fração alcoólica. Cobriu-se novamente com papel de filtro, e este sistema foi eluído inicialmente com 400 ml de n-butanol, seguido de 400 ml de metanol, obtendo-se frações únicas de cada solvente. Por último lavou-se o filtro com água deionizada.

A fração butanol foi reunida à sua respectiva fração obtida no primeiro fracionamento (partição 1/1), e a fração metanol foi reservada.

Seqüencialmente, as frações obtidas no primeiro fracionamento foram submetidas ao mesmo processo acima descrito, na seguinte ordem:

- fração butanol total, em 10 g de sílica gel 60, foi eluída com 400 ml de acetato de etila, n-butanol, metanol e água;
- fração acetato de etila total, em 15 g de sílica gel 60, foi eluída com 400 ml de clorofórmio, acetato de etila, n-butanol, metanol e água;
- fração clorofórmio total, em 15 g de sílica gel 60, foi eluída com 400 ml de n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, n-butanol, metanol e água;
- fração hexano total, em 15 g de sílica gel 60, foi eluída com n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, n-butanol, metanol e água.

Terminado este processo, foram obtidas cinco frações bem definidas, e o fluxograma geral deste processo é ilustrado na figura 6. A tabela 2 mostra uma comparação entre os rendimentos obtidos nas duas partições.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DE PARTIÇÃO SÓLIDO/LÍQUIDO

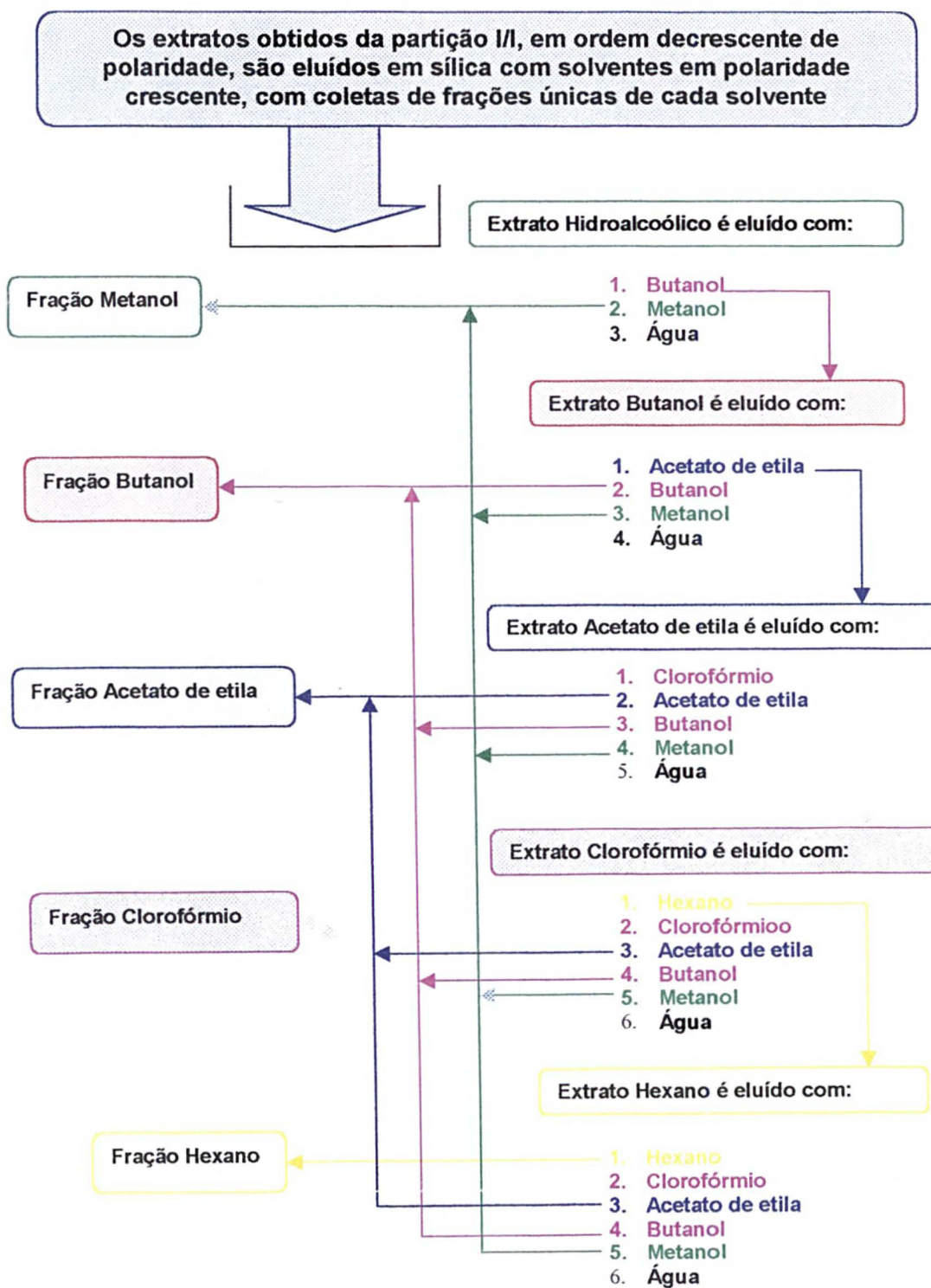


TABELA 2 – RENDIMENTOS OBTIDOS NAS PARTIÇÕES LÍQUIDO/LÍQUIDO E SÓLIDO/LÍQUIDO

Fração obtida	Partição líquido/líquido		Partição sólido/líquido	
	Resíduo seco (g)	% em relação ao material de partida	Resíduo seco (g)	% em relação ao material de partida
Hexano	6,92	0,35	12,06	0,61
Clorofórmio	6,86	0,34	11,92	0,60
Acetato de etila	6,47	0,32	1,87	0,09
Butanol	3,43	0,17	7,15	0,36
Metanol	-	-	1,25	0,06
Res. alcoólico	10,97	0,55	-	-

3.5 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

3.5.1 Separação dos Constituintes da Fração Hexânica

A fração hexânica, evaporada à secura, resultou na obtenção de um óleo esverdeado, de odor bastante característico. Este resíduo (12,06 g) foi dissolvido em quantidade suficiente de acetato de etila e levado ao freezer, durante 24 horas, para precipitar. O precipitado foi então filtrado e lavado com acetato de etila gelado, resultando em 200,4 mg de um pó branco amorfo, denominado como *substância H01*.

O líquido resultante da filtração foi evaporado sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, e então submetido a uma cromatografia em coluna com sílica gel 60. A pastilha foi preparada como descrito no item 3.4.2, utilizando 5 g de sílica gel 60 (Merck). A coluna, de 30x3 cm, foi montada em benzina de petróleo, utilizando 80 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, o que resultou num preenchimento de 10 cm.

A eluição foi feita inicialmente com benzina de petróleo, em duas vezes de 100 ml, passando em seguida para benzina de petróleo:hexano (95:05) e benzina de petróleo:hexano (90:10). Como não houve mudança no padrão de eluição, passou-se

para benzina de petróleo:acetato de etila (95:05), aumentando-se a polaridade com acetato de etila na ordem de 5%, até chegar em 30%. Deste processo foram obtidas 71 frações de aproximadamente 10 ml.

Na fração 29 ocorreu a precipitação de um pó branco, insolúvel em metanol, o qual foi filtrado e lavado com metanol gelado, resultando em 5 mg de um produto que foi denominado como *substância H02*.

Na fração 24 também ocorreu a precipitação de um pó branco, o qual foi filtrado e lavado com metanol gelado, resultando em 17 mg do produto denominado como *substância H03*.

Na fração 25 foi obtido um precipitado branco, o qual foi também filtrado, resultando em 7,6 mg do produto denominado como *substância H04*.

Um resumo das frações obtidas é mostrado na tabela 3.

TABELA 3 – FRAÇÕES OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO HEXANO.

Frações	Eluente / Concentração (polaridade crescente em 5%)	Substância isolada	Quantidade (mg)
Fr. Total	acetato de etila (100%)	H01	200,4
1-23	benzina de petróleo (100%) benzina de petróleo/n-hexano (95:05 a 90:10)	-	-
24	benzina de petróleo/acetato de etila (95:5)	H03	17,0
25	benzina de petróleo/acetato de etila (95:5)	H04	7,6
26-28	benzina de petróleo/acetato de etila (95:5)	-	-
29	benzina de petróleo/acetato de etila (90:10)	H02	5,0
30-71	benzina petróleo/acetato de etila (90:10 a 70:30)	-	-

3.5.2 Separação dos Constituintes da Fração Clorofórmica

A fração clorofórmica total (11,92 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica. A pastilha foi preparada como descrito no item 3.4.2, utilizando 30 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, e a coluna, de 30x3 cm, foi montada em

uma solução de hexano:acetato de etila (80:20), utilizando 100 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, formando um preenchimento de 10 cm.

Iniciou-se a eluição com hexano:acetato de etila (80:20), aumentando-se a polaridade com acetato de etila na ordem de 5%, até acetato de etila puro. A partir daí, fez-se a eluição com acetato de etila e metanol, em concentração crescente de metanol, na ordem de 5%, até metanol puro. Foram coletadas 210 frações de aproximadamente 10 ml.

As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (70:30) e como revelador a vanilina sulfúrica preparada segundo STAHL (1969) e as frações iguais foram reunidas.

Das frações 1 a 8 foi precipitado um pó branco, amorfo, separado de uma resina esverdeada bastante aromática. Esta resina foi dissolvida em éter de petróleo, e o precipitado foi filtrado e lavado com éter de petróleo gelado, resultando em 283 mg de um pó branco, denominado como *substância C01*.

Das frações 54 a 75 ocorreu a precipitação de uma substância branca, no formato de agulhas. Esta foi separada por filtração e lavada com metanol gelado, resultando em 34 mg da *substância C02*.

Das frações 76 a 87 foi precipitado um pó branco, o qual foi separado na quantidade de 5,4 mg, e denominado como *substância C03*.

Um resumo das frações obtidas é mostrado na tabela 4.

O sobrenadante obtido da filtração da fração 54-75 foi submetido a uma cromatografia preparativa a vácuo, num funil de vidro sinterizado de 6x15 cm, preenchido com sílica gel 60 G (Merck), utilizando como eluente uma solução de tolueno:acetato de etila:metanol (60:30:10). Foram obtidas 27 frações (tabela 5), as quais foram monitoradas por CCD utilizando como fase móvel a mesma solução eluente, e como reveladores solução de dragendorff acético preparada segundo WAGNER (1983) e vanilina sulfúrica segundo STAHL (1969).

As frações 3 a 8 foram reunidas, e desta foi obtido um precipitado branco, insolúvel em metanol, o qual foi filtrado obtendo-se 18 mg de um produto branco, em

forma de agulhas, o qual foi denominado como *substância C04*. O sobrenadante desta filtração foi submetido a uma cromatografia em coluna (20x4 cm) preenchida com sephadex LH 20, a qual foi eluída com metanol a 70%, obtendo-se 44 frações, as quais foram monitoradas por CCD (placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) utilizando tolueno:acetato de etila:metanol (4:4:2) como fase móvel e solução de dragendorff clorídrico segundo WAGNER (1983) como revelador.

TABELA 4 – FRAÇÕES RESULTANTES DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO CLOROFÓRMIO

Frações	Eluente / Concentração (polaridade crescente em 5%)	Substância isolada	Quantidade (mg)
1-8	n-hexano/acetato de etila (80:20)	C01	283,0
9-53	n-hexano/acetato de etila (75:25 a 40:60)	-	-
54-75	n-hexano/acetato de etila (35:65 a 30:70)	C02	34,0
76-87	n-hexano/acetato de etila (25:75)	C03	5,4
88-100	n-hexano/acetato de etila (20:80 a 100%)	-	-
101-153	acetato de etila/metanol (95:05 a 60:40)	-	-
154-210	acetato de etila/metanol (55:45 a 100%)	-	-

TABELA 5 – FRAÇÕES RESULTANTES DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO 54-75

Frações	Eluente	Substância isolada	Quantidade (mg)
1-2	tolueno/acetato etila/metanol (60:30:10)	-	-
3-8	tolueno/acetato etila/metanol (60:30:10)	C04	18,0
9-27	tolueno/acetato etila/metanol (60:30:10)	-	-

3.5.3 Separação dos Constituintes da Fração Acetato de Etila

Inicialmente a fração total de acetato de etila foi evaporada à secura e dissolvida em 4 ml de metanol, resultando na precipitação de um sólido levemente esverdeado. A fração foi deixada em freezer durante 24 horas e então filtrada sob vácuo e lavada com metanol gelado. Obteve-se 23,5 mg de um sólido levemente esverdeado, o qual foi denominado *substância AE01*.

O restante da fração acetato de etila foi submetido a uma cromatografia em coluna com sílica gel 60. A pastilha foi preparada como descrito no item 3.4.2, utilizando 5 g de sílica gel 60 (Merck) e uma coluna de 30x3 cm, a qual foi montada em uma solução de hexano:acetato de etila (80:20), utilizando 80 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, de modo a formar um preenchimento de 10 cm.

Iniciou-se a eluição com hexano:acetato de etila (80:20), aumentando-se a polaridade com acetato de etila na ordem de 5%, até acetato de etila puro. A partir daí, fez-se a eluição com acetato de etila e metanol, em concentração de metanol crescente na ordem de 5%, até a proporção 50:50, obtendo-se um total de 155 frações de aproximadamente 10 ml. Em seguida a coluna foi eluída com metanol puro, recolhendo-se duas frações, e por último com água deionizada, recolhendo-se também duas frações.

As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), utilizando como fase móvel diclorometano:metanol:água (80:20:2) e como revelador a vanilina sulfúrica segundo STAHL (1969), e as frações iguais foram reunidas (tabela 6).

Nas frações 76 a 82 ocorreu a precipitação de pequena quantidade de um pó branco. A fração foi dissolvida em acetona e filtrada, lavando-se o precipitado com acetona gelada. Este processo resultou em 2 mg de um precipitado branco, denominado *substância AE02*.

As frações metanólicas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C, resultando em dois resíduos de coloração castanha, numa quantidade de 21 mg e 57,8 mg, os quais foram chamados de *resíduo AE03* e *resíduo AE04*, respectivamente.

As frações aquosas também foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C, resultando em dois resíduos na quantidade de 39,4 mg e 6 mg, os quais foram denominados *resíduo AE05* e *resíduo AE06*, respectivamente.

TABELA 6 – FRAÇÕES RESULTANTES DA CROMATOGRAFIA DA SUBFRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Frações	Eluente / Concentração (polaridade crescente em 5%)	Substância isolada	Quantidade (mg)
Fr. Total	Metanol (100%)	AE01	23,5
1-44	n-hexano/acetato de etila (80:20 a 45:55)	-	-
45-68	n-hexano/acetato de etila (40:50 a 25:75)	-	-
69-75	n-hexano/acetato de etila (20:80 a 15:85)	-	-
76-82	n-hexano/acetato de etila (10:90)	AE02	2,0
83-86	n-hexano/acetato de etila (05:95)	-	-
87-100	acetato de etila 100% acetato de etila/metanol (95:05 a 90:10)	-	-
101-151	acetato de etila/metanol (85:15 a 50:50)	-	-
152	Metanol (100%)	AE03	21,0
153	Metanol (100%)	AE04	57,8
154	Água (100%)	AE05	39,4
155	Água (100%)	AE06	6,0

3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Como parte do estudo desenvolvido, foi feita uma investigação a respeito de uma possível atividade antibacteriana e antifúngica por parte das substâncias presentes na muirapuama. Para tanto, cada uma das frações obtidas nas etapas anteriores, bem como o extrato alcoólico bruto, foram testadas à procura de alguma atividade inibidora do desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, conhecidos causadores de doenças em seres humanos, e

de cepas de *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum*, fungos causadores de doenças em determinadas plantas. O *C. acutatum* comumente ataca as plantações de morango, enquanto o *F. oxysporum* é um dos grandes causadores de fitopatologias em lavouras de café.

3.6.1 Atividade Antibacteriana

O método utilizado para este teste foi baseado na técnica de difusão em ágar (método de Kirby Bauer), descrito por KONEMAN et. al. (1993), com algumas modificações propostas por JORGE et. al. (1999) e ULUBELEN et. al. (2000).

Resumidamente o estudo baseia-se na inoculação, num meio de cultura específico, de uma solução padronizada de um microorganismo específico. Sobre este meio de cultura adicionam-se discos de papel previamente impregnados com soluções padronizadas das amostras que se deseja investigar a atividade antimicrobiana, e as placas são então incubadas a uma temperatura específica para favorecer o desenvolvimento dos microorganismos. As substâncias presentes na amostra, as quais encontram-se impregnadas nos discos de papel, se difundem através do meio de cultura, e se a amostra em questão apresentar alguma atividade inibitória sobre o microorganismo, forma-se um halo de não-crescimento ao redor do disco impregnado, ao contrário do restante do meio de cultura, onde ocorre o crescimento das colônias.

3.6.1.1 Preparo das amostras

Foram utilizadas para este estudo as seguintes frações, obtidas nas etapas anteriores:

- * fração hexânica (H)
- * fração metanólica (M)
- * fração clorofórmica (C)
- * extrato etanólico total (T)
- * fração butanólica (B)

Da fração hexânica, foi transferido 1 ml para um tubo de ensaio estéril, e adicionado 1 ml de n-hexano, obtendo-se assim uma diluição a 50% (1:2). Desta, 1 ml foi transferido para outro tubo de ensaio e adicionado 1 ml de n-hexano, obtendo-se uma diluição a 25% (1:4). Desta, novamente 1 ml foi transferido para outro tubo de ensaio, e foi adicionado 1 ml de n-hexano, obtendo uma diluição a 12,5% (1:8).

As frações seguintes foram tratadas da mesma forma, utilizando como diluente o próprio solvente da fração testada.

Desta forma foram obtidas as diluições para serem impregnadas nos discos de papel. Cada fração foi testada, portanto, na sua forma total (extrato 100%) e nas diluições a 50%, 25% e 12,5% (1:2, 1:4 e 1:8, respectivamente)

3.6.1.2 Preparo dos discos de papel

Os discos de papel, de 6 mm de diâmetro (Newprov), foram espalhados numa placa de petri, devidamente identificados, e cada disco foi impregnado com 20 µl de uma das diluições previamente preparadas. Foram impregnados seis discos de cada diluição, num total de 120 discos. Estes foram deixados em repouso até a total secura antes de serem utilizados.

Foram também impregnados discos apenas com os solventes utilizados, de modo a servirem como controle.

3.6.1.3 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura escolhido para o teste foi o ágar Mueller-Hinton (Merck), por ser um meio não enriquecido com nenhum nutriente especial, mas ao mesmo tempo suficientemente nutritivo para permitir o perfeito desenvolvimento das colônias. Após o preparo, o meio foi autoclavado (120°C por 15 minutos) e deixado esfriar até uma temperatura em torno de 50°C. Nesta temperatura, 60 ml do meio de cultura foram

adicionados em placas de petri de 15 cm de diâmetro previamente esterilizadas, as quais, após o meio solidificado, foram fechadas e reservadas para a inoculação das cepas.

3.6.1.4 Preparo do inóculo

As cepas utilizadas para o teste foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Estas cepas foram repicadas em ágar Mueller-Hinton, em tubos, 24 horas antes do teste.

Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 ml de salina estéril. Desta suspensão, transferiu-se 1 ml para um tubo estéril e diluiu-se com salina estéril, obtendo-se suspensões bacterianas com as características mostradas na tabela 9.

A leitura das absorbâncias foi feita a 580 nm, utilizando como branco a solução salina. A contagem total de bactérias presentes na suspensão foi feita após diluições sucessivas de uma alíquota de cada suspensão. As diluições foram inoculadas em ágar Mueller-Hinton pelo método de semeadura por profundidade (USP 23, 1995), e as placas incubadas a 35°C durante 24 horas. A contagem das colônias foi feita em um contador de colônias Phoenix CP600, apresentando os resultados mostrados na tabela 7.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Microorganismo testado	Absorbância da suspensão (580 nm)	Total de bactérias na suspensão (UFC/ml)
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0,30	$3,7 \cdot 10^{12}$
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,30	$1,0 \cdot 10^9$
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	0,40	$1,0 \cdot 10^{12}$

No momento da inoculação das placas, 1 ml desta suspensão padronizada foi adicionado a 100 ml de ágar Mueller-Hinton fundido, na temperatura de 45°C. Rapidamente, antes da solidificação, 10 ml deste meio foram transferidos para a superfície das placas de meio de cultura previamente preparadas, sob rápida homogeneização, de modo a obter uma fina camada homogênea do inóculo bacteriano.

Desta forma foram preparadas 12 placas inoculadas com cada microorganismo, de modo que 10 delas foram utilizadas para o teste, enquanto duas foram utilizadas como controle positivo de crescimento.

3.6.1.5 Preparo do teste

Para cada uma das cinco frações testadas procedeu-se da seguinte maneira:

Em uma placa inoculada com *S. aureus* foram distribuídos seis discos de papel, referentes à fração concentrada (100%) e às diluições a 50, 25 e 12,5%, além de um disco impregnado apenas com o solvente (controle) e um disco de cloranfenicol (Newprov) como controle positivo. Em outras duas placas, inoculadas com *S. epidermidis* e *E. coli*, procedeu-se da mesma maneira.

O teste foi feito em duplicata, e as placas prontas foram incubadas em estufa a 35°C durante 24 horas. Passado este período, as placas foram retiradas da estufa e foram medidos os halos de inibição, quando presentes.

3.6.2 Atividade Antifúngica

Como complemento do estudo antimicrobiano, foi avaliada a atividade antifúngica dos extratos aquoso e alcoólico de muirapuama sobre o crescimento de cepas de *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum*, segundo o método adaptado de AUER e BETTIOL (1986) e de STANGARLIN et. al. (1998). O estudo baseia-se na observação do comportamento de crescimento micelial dos esporos dos fungos em

duas condições: (a) quando inoculados em meio de cultura adicionado dos extratos (teste); e (b) quando inoculados em meio de cultura comum (controle).

3.6.2.1 Obtenção dos extratos

Extrato alcoólico

Para a obtenção do extrato alcoólico, 50 g do material vegetal (galhos secos e pulverizados) foram extraídos com etanol, em aparelho de soxhlet, durante 4 horas. Decorrido este tempo o extrato foi filtrado e levado à secura, resultando em 1,85 g de resíduo sólido.

Extrato aquoso

Para a obtenção do extrato aquoso, 50 g do material vegetal (galhos secos e pulverizados) foram extraídos por maceração a quente (70°C em banho maria) com 200 ml de água deionizada, durante 2 horas. Decorrido este tempo o extrato foi filtrado e o resíduo foi novamente extraído, sob mesmas condições, com mais 200 ml de água deionizada, durante 2 horas. O extrato obtido foi filtrado e reunido ao anterior. O resíduo de extração foi lavado com água quente e reunido ao extrato obtido anteriormente, resultando num total de 410 ml de extrato aquoso (total de 2,0254 g de resíduo sólido).

3.6.2.2 Preparo do teste

Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o teste foi o meio BDA (batata-dextrose agar), o qual foi preparado em três baterias de 1000 ml:

- (a) 1000 ml foram preparados incorporando-se o resíduo do extrato alcoólico (1,85g);
- (b) 1000 ml foram preparados substituindo-se 400 ml de água pelo extrato aquoso recém-preparado (2,02 g de sólidos);
- (c) 1000 ml foram preparados normalmente, servindo como controle.

Depois de preparados, os meios foram autoclavados (120°C por 15 minutos) e então vertidos em placas de petri de 15cm de diâmetro, as quais foram deixadas em repouso até total solidificação.

Inoculação das cepas e leitura dos resultados

Foram preparadas, no total, nove placas de cada meio de cultura. Cada conjunto de quatro placas de cada meio foi inoculado com esporos de um fungo específico. Os esporos de *C. acutatum* e *F. oxysporum* foram depositados no centro das placas, as quais foram fechadas e incubadas a 25°C durante cinco dias. Decorrido este tempo procedeu-se à leitura dos resultados, a qual foi feita pela medição do diâmetro das colônias, sendo considerada uma média de duas medidas perpendiculares.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica preliminar apontou a presença de alcalóides, leucoantocianidinas, cumarinas, taninos, aminogrupos, esteróides e triterpenos, conforme ilustrado na tabela 8.

TABELA 8 - RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Grupo fitoquímico pesquisado	Resultado em <i>P. olacoides</i>
Alcalóides	Positivo
Leucoantocianidinas	Positivo
Flavonóides	Negativo
Cumarinas	Positivo
Esteróides e triterpenos	Positivo
Lieberman-Bouchardt	Positivo
Keller-Kiliani	Positivo
Baljet	Negativo
Tollens	Negativo
Kedde	Negativo
Xantidrol	Negativo
Heterosídeos antociânicos	Negativo
Saponinas	Negativo
Heterosídeos cianogenéticos	Negativo
Taninos	Positivo
Cloreto férrico	Positivo
Gelatina	Positivo
Sulfato férrico amoniacal	Positivo
Cloridrato de emetina	Negativo
Água de bromo	Negativo
Cianeto de potássio	Negativo
Ácido nitroso	Negativo
Dicromato de potássio	Negativo
Formol clorídrico	Negativo
Aminogrupos	Positivo

A presença de alcalóides, que já havia sido reportada por SILVA (1925), AUTERHOFF (1968), FORGACS (1983) e BUCEK (1987), foi demonstrada por meio de reações gerais de caracterização de alcalóides. Estas baseiam-se em sua capacidade de complexação com metais pesados, tais como bismuto, mercúrio, tungstênio e iodo. A solubilidade dos alcalóides também é modificada segundo sua forma química: na forma livre, são solúveis em solventes orgânicos, enquanto que quando na forma de sais são solúveis em solventes aquosos.

Esta caracterização foi feita com os reativos gerais de Mayer, Dragendorff, Bouchardt e Bertrand.

A presença de leucoantocianidinas também já havia sido reportada por FORGACS (1983).

A reação positiva para cumarinas havia sido reportada em 1979 por TOYOTA et. al. O teste utilizado baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido o-hidroxi cinâmico, e deve-se ao fato das cumarinas se dissolverem em álcali cáustica com clivagem do anel pirrólico e formação do ácido o-hidroxicinâmico ou sais de seu ânion. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida para soluções recém-preparadas ou soluções estocadas no escuro por meses. No entanto, quando estas soluções são irradiadas com luz ultravioleta, exibem fluorescência com coloração azul ou verde amarelada dentro de poucos minutos, aumentando até um máximo.

Apenas a forma trans do H do grupo fenólico está localizado para possibilitar sua quelação, pois a insaturação não é bloqueada pelo grupo COOH, sendo possível que a ligação quelato esteja relacionada à fluorescência. O fotoefeito aparece também em soluções alcalinas dos derivados cumarínicos que não tenham hidroxila livre ligada ao grupo benzênico, demonstrando que os substituintes parecem ter uma influência no grau de fluorescência.

A presença de compostos esteroidais e triterpênicos já havia sido descrita por AUTERHOFF (1968 e 1971). O teste de caracterização utilizado, a reação de Lieberman-Bouchardt, é uma reação colorimétrica dependente da estrutura química dos compostos. Quando em presença de anidrido acético e ácido sulfúrico, a formação

de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função cetona na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Já a coloração verde indica função OH na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Quando ocorrer desenvolvimento de coloração amarela, possivelmente indica presença de metila em C₁₄.

Reações mais específicas também indicam características particulares dos compostos presentes. Como exemplo, a reação de Keller-Kelliani indica presença de desoxiaçúcares; a reação de Baljet indica presença de geninas com anel lactônico pentagonal insaturado; a reação de Tollens caracteriza insaturação no anel A ou B; e a reação de Kedde indica a presença de anel pentagonal insaturado.

A presença de taninos, previamente reportada por SILVA (1925), FORGACS (1983) e BUCEK (1987), é caracterizada por sua capacidade de precipitação e formação de coloração frente a determinadas substâncias. Como exemplo, os taninos desenvolvem coloração azul quando em presença de cloreto férrico ou sulfato férrico amoniacal; por sua capacidade de precipitar proteínas, promove a precipitação de soluções de gelatina.

Já os aminogrupos, quando presentes, tendem a reagir com a ninhidrina, resultando em complexos de coloração azul escura. A ninhidrina é um agente oxidante forte, que oxida e transforma o grupo amino de alfa-aminoácido em grupo imino e hidrindantina. O iminoácido formado, sendo instável, decompõe-se em NH₃ e em alfa ceto-ácido, liberando CO₂ no processo.

A hidrindantina e outra molécula de ninhidrina reagem com NH₃ formando um complexo de cor púrpura (a púrpura de Ruhemann), o qual reage com outro NH₃, formando um complexo final de cor azul escuro.

4.1 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS

4.1.1 Fração Hexânica

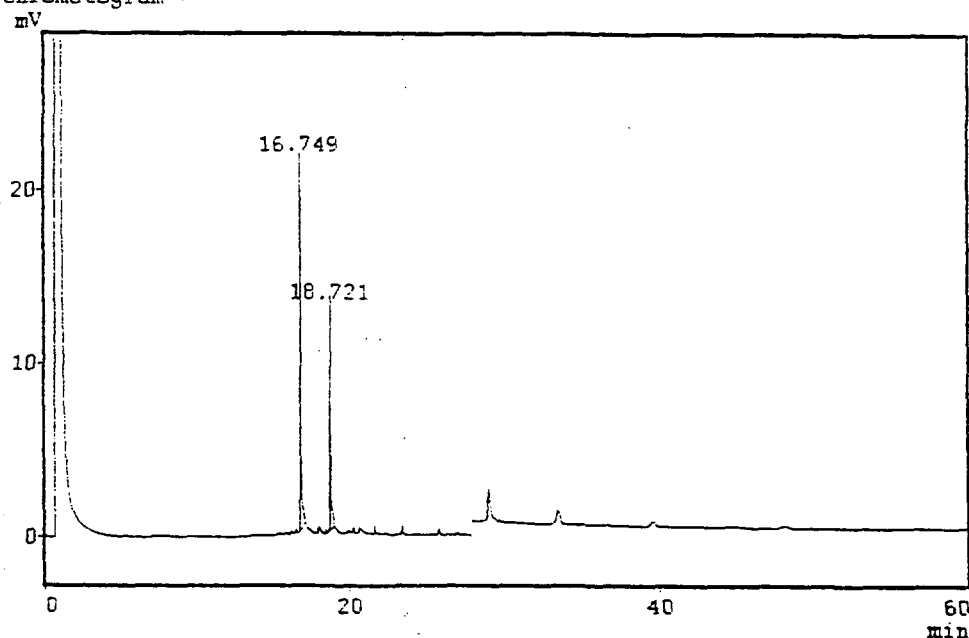
4.1.1.1 Substância H01

A substância H01 teve seu ponto de fusão determinado, resultando numa faixa de 52 a 54°C. A amostra foi então submetida a cromatografia gasosa (CG), obtendo-se um gráfico (figura 7) que mostra a presença de dois picos com tempos de retenção próximos (16,749 e 18,721 minutos) indicando a presença de uma mistura de dois compostos diferentes.

FIGURA 7 – GRÁFICO DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A SUBSTÂNCIA H01

CA.: Shimadzu GC-14B
Amostra: amostra 14; 2 compostos
File 2: Tc=85°C-2'; TP1=270°C-10°C/-45'; TV=270°C TD=280°C;
col. DB 1-0.53 mm x 30 m; vazão=12 ml/';
O2=10 kPa; purga=3 ml/'; split = 12 ml/'; VI: 2 ul
conc: 1.6mg/0.4ml

*** Chromatogram ***



A amostra foi então submetida a uma análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), concluindo-se ser uma mistura de dois ácidos graxos saturados.

RMN de ^1H

O espectro de RMN de ^1H foi obtido em CDCl_3 a 300 MHz (figura 8). Este registrou deslocamentos apenas na região compreendida entre 0,8 a 2,4 ppm. A presença de um triplete em 0,87 ppm indica a absorção de um próton metílico, enquanto um sinal de alta intensidade em 1,26 ppm indica a absorção dos prótons de n grupamentos CH_2 , formando uma cadeia saturada.

A presença de um multiplete em 1,63 ppm indica a absorção de um próton situado no carbono β em relação a um grupo COOH , enquanto um triplete em 2,34 ppm indica a absorção de um próton situado no carbono α em relação ao grupo COOH .

RMN de ^{13}C

No espectro de RMN de ^{13}C , obtido em CDCl_3 a 75,5 MHz (figura 9), foram observadas as absorções relacionadas na tabela 9, as quais estão de acordo com os dados citados na literatura (SDBS DATABASE).

TABELA 9 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA H01

Carbono		Tipo	Absorção (ppm)
A	B		
1	1	CH_3	14,13
2	2	CH_2 – posição α em relação ao CH_3	22,70
3	3	CH_2 – posição β em relação ao CH_3	31,92
4-13	4-15	CH_2	29,05 a 29,68
14	16	CH_2 – posição β em relação ao COOH	24,66
15	17	CH_2 – posição α em relação ao COOH	34,05
16	18	$\text{C} = \text{O}$	180,17

A e B referem-se às duas substâncias presentes na mistura (A = 16 carbonos; B = 18 carbonos)

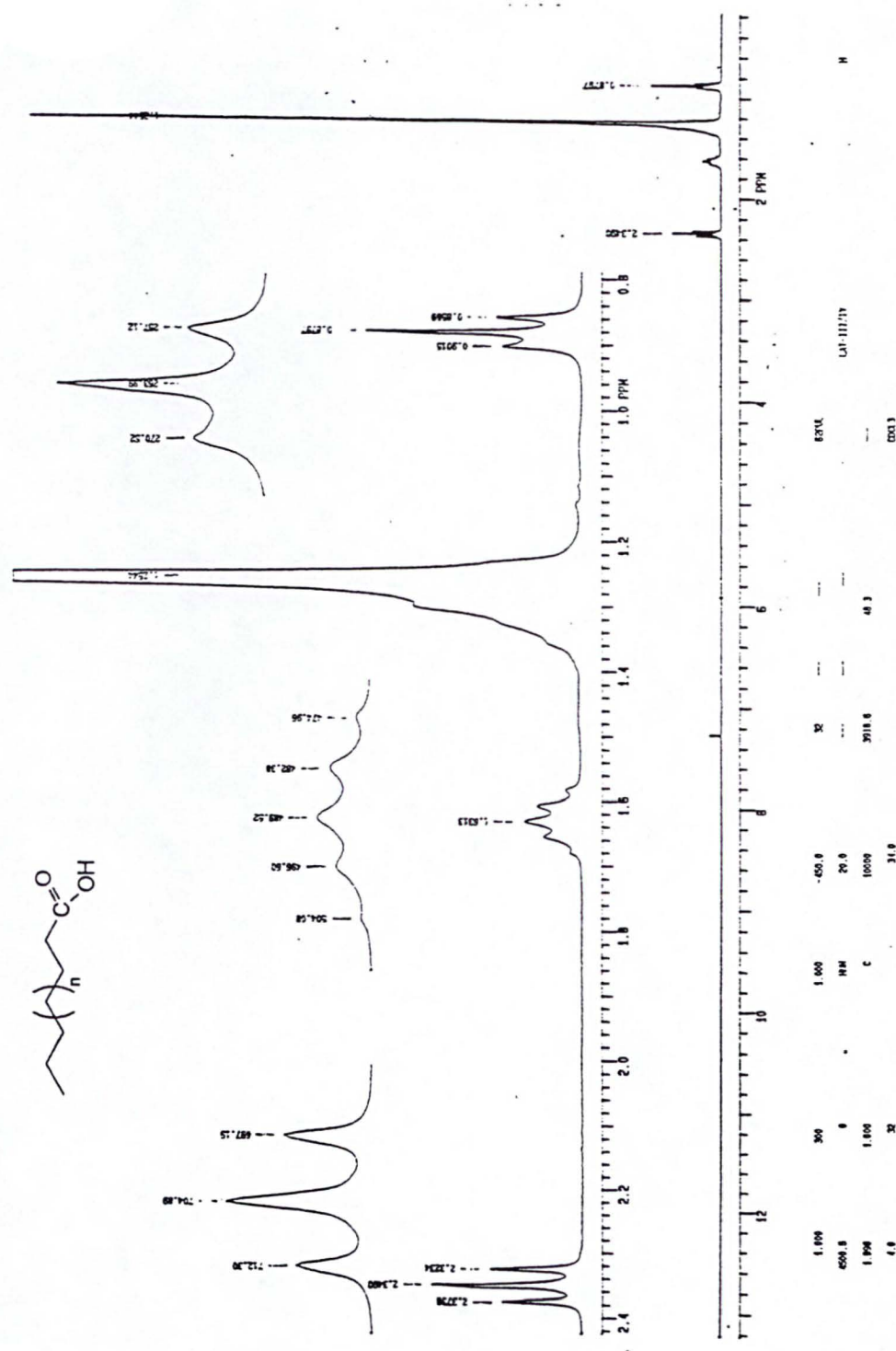
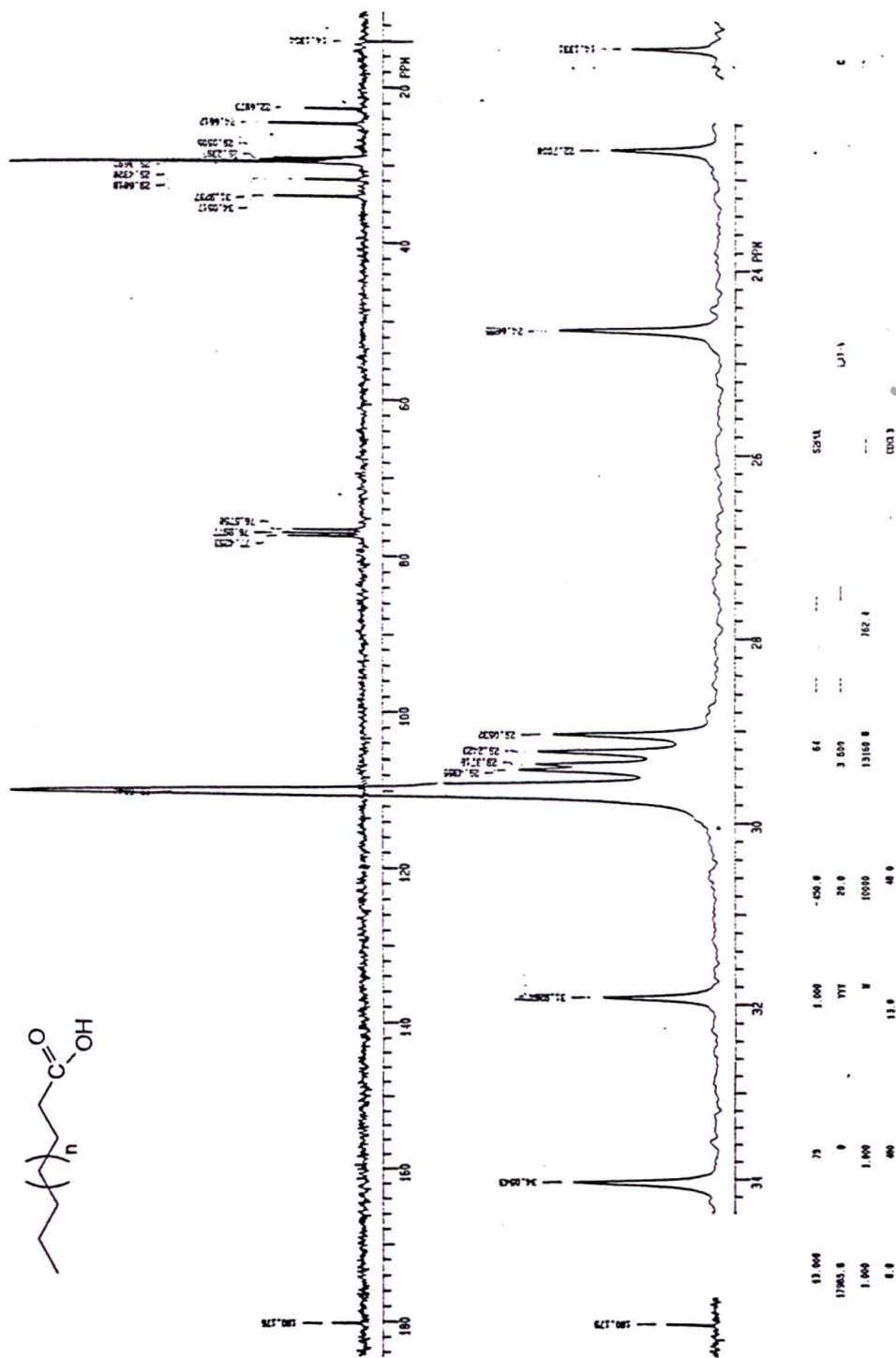
FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA A SUBSTÂNCIA H01 (300 MHz, CDCl_3)

FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA H01 (75,5 MHz, CDCl_3)

CG – EM

A análise por CG-EM resultou numa mistura de compostos, da qual foram obtidos dois espectros bem definidos. Os dados espectrais revelam que os dois ácidos graxos em questão tratam-se do ácido palmítico (C16) e ácido esteárico (C18), com suas estruturas mostradas nas figuras 10 e 11.

FIGURA 10 – ÁC. PALMÍTICO

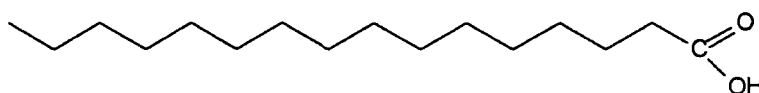
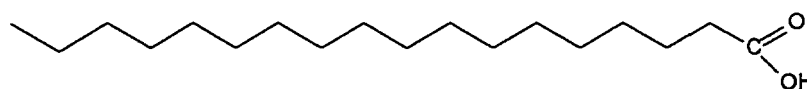


FIGURA 11 – ÁC. ESTEÁRICO



Para esta análise a amostra foi inicialmente metilada, formando os ésteres metílicos dos ácidos em questão. O pico mais característico em ésteres alifáticos é devido ao rearranjo de McLafferty e à quebra de uma ligação afastada do grupo C = O. Assim, no éster metílico de um ácido alifático não ramificado no carbono α , aparece um pico intenso em m/e 74, que é de fato o pico base nos ésteres metílicos lineares de C6 a C26 (SILVERSTEIN, 1994).

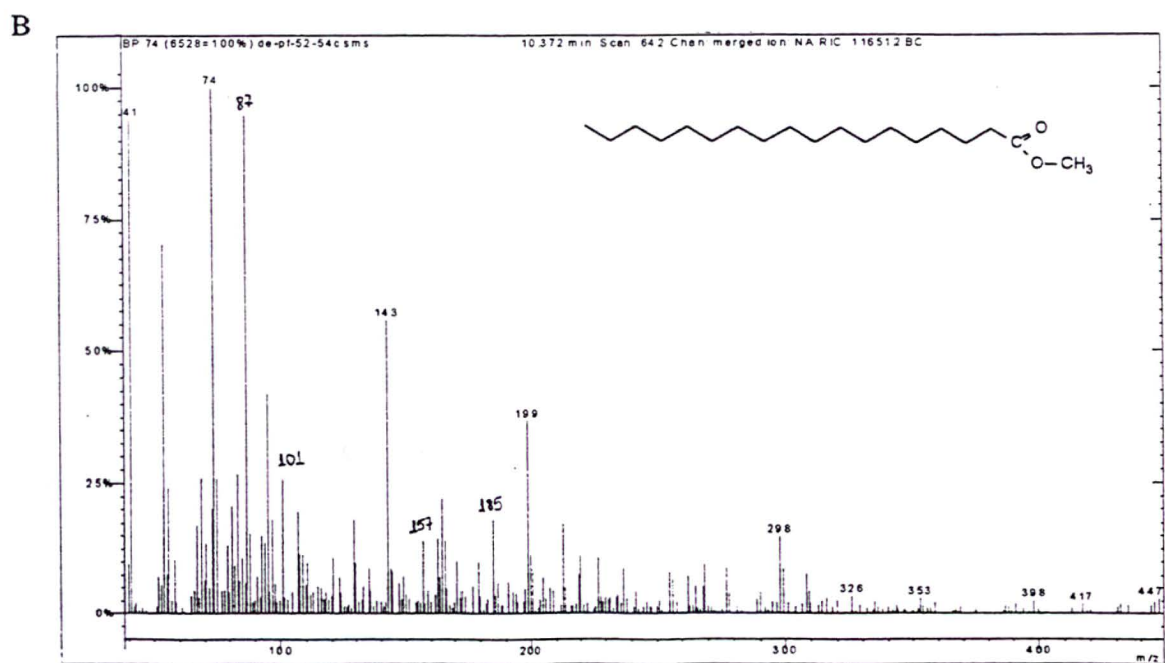
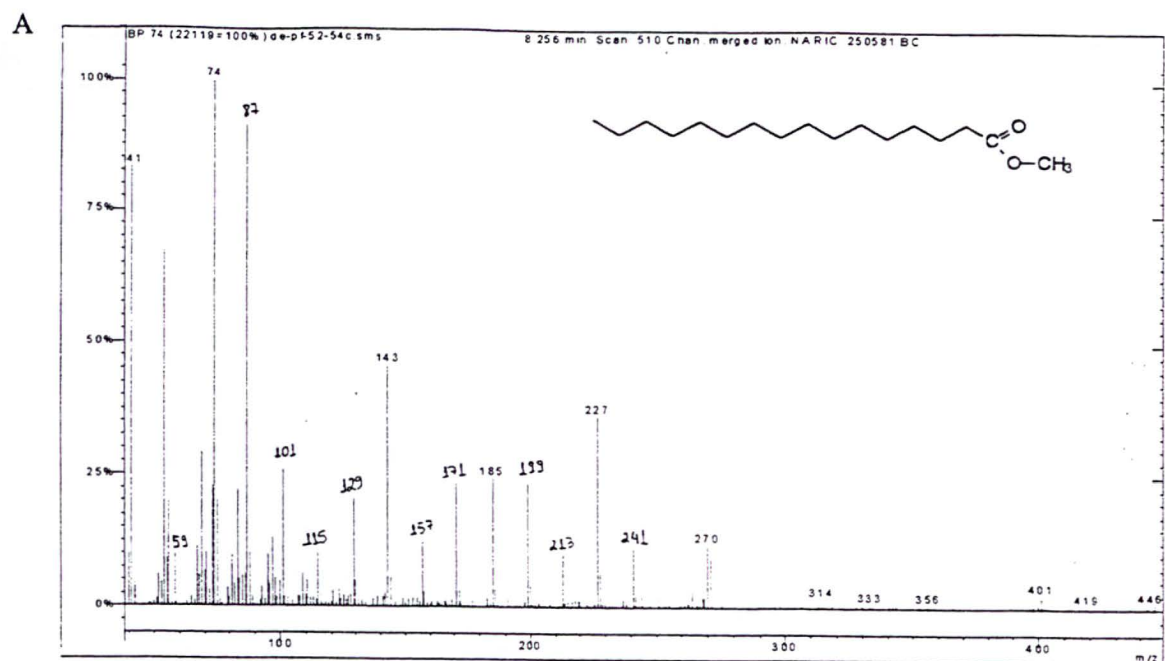
Na seqüência de fragmentação para os ésteres metílicos de ácidos lineares, a quebra das ligações C – C dá origem a íons alquila (m/z 29, 43, 57, e assim por diante) e a íons contendo oxigênio $C_nH_{2n-1}O_2^+$ (m/e 59, 73, 87, e assim por diante). Existem, assim, aglomerados hidrocarbônicos a intervalos de 14 unidades de massa (SILVERSTEIN, 1994).

De fato, no espectro do éster metílico do ácido palmítico (figura 12, A), o pico referente ao íon molecular aparece em m/e 270, enquanto o pico base aparece em

m/e 74 (referente ao fragmento $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$). Os demais fragmentos aparecem em m/e 59 – fragmento COOCH_3 ; 87 – fragmento $(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_3$; 101 – fragmento $(\text{CH}_2)_3\text{COOCH}_3$; 115 – fragmento $(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_3$; 129 – fragmento $(\text{CH}_2)_5\text{COOCH}_3$; 143 – fragmento $(\text{CH}_2)_6\text{COOCH}_3$; 157 – fragmento $(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$; 171 – fragmento $(\text{CH}_2)_8\text{COOCH}_3$; 185 – fragmento $(\text{CH}_2)_9\text{COOCH}_3$; 199 – fragmento $(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}_3$; 213 – fragmento $(\text{CH}_2)_{11}\text{COOCH}_3$; 227 – fragmento $(\text{CH}_2)_{12}\text{COOCH}_3$ e 241 – fragmento $(\text{CH}_2)_{13}\text{COOCH}_3$.

No espectro do éster metílico do ácido esteárico (figura 12, B), o pico referente ao íon molecular aparece em m/e 298, e o pico base também aparece em m/e 74 (fragmento $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$). Os demais fragmentos, como no espectro do ácido palmítico metil éster, aparecem em m/e 87; 101; 143; 157; 185 e 199, além dos fragmentos em 255 e 269, referentes aos dois átomos de carbono adicionais nesta estrutura.

FIGURA 12 – ESPECTRO DE MASSA PARA O ÉSTER METÍLICO DA SUBSTÂNCIA H01



A: Éster metílico do ácido palmítico; B: Éster metílico do ácido esteárico.

4.1.1.2 Substância H02

A substância H02, quando analisada por CG (figura 13), mostrou a presença de sete picos com tempos de retenção entre 35 e 44 minutos, sendo portanto uma mistura de substâncias. Estas foram comparadas por CG com padrões de esteróides, sendo compatíveis com estigmasterol (38,155 minutos - 3), β -sitosterol (40,286 minutos - 4), α -amirina (41,134 minutos - 5), lupeol (43,085 minutos - 6) e glutinol (43,526 minutos - 7), com suas estruturas mostradas na figura 14. Os outros dois picos (35,747 e 37,143 minutos) não foram identificados.

O gráfico da mistura de padrões é mostrado na figura 15.

FIGURA 13 - GRÁFICO DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A SUBSTÂNCIA H02.

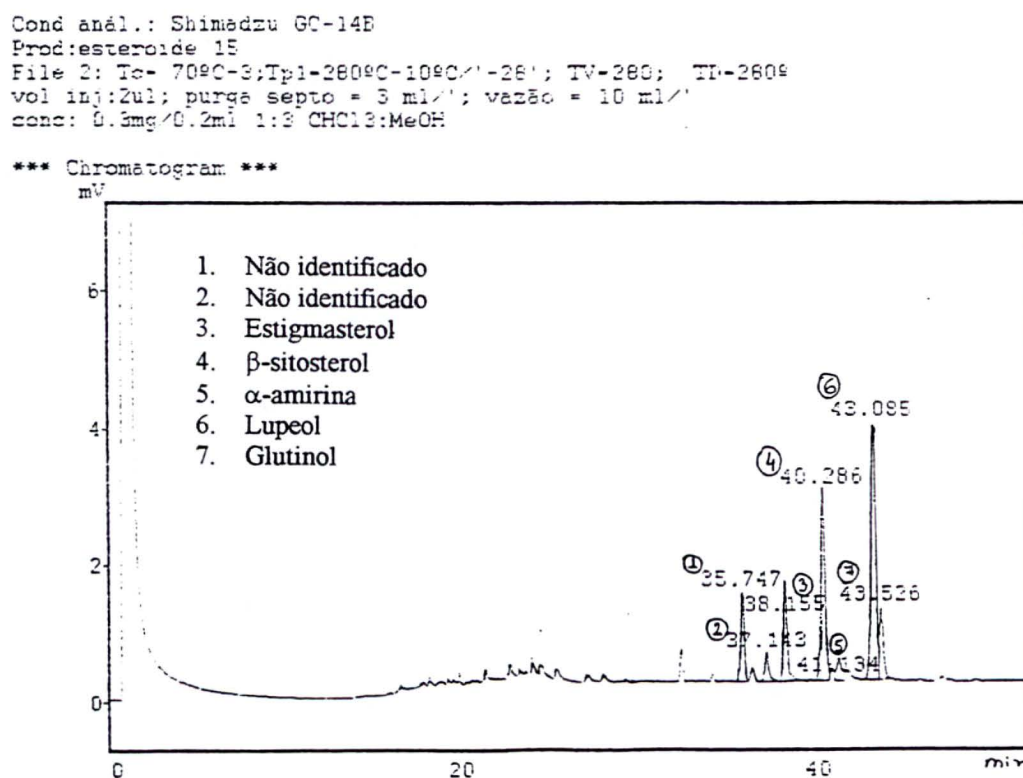


FIGURA 14 - ESTRUTURAS DOS ESTERÓIDES PRESENTES NA MISTURA H02.

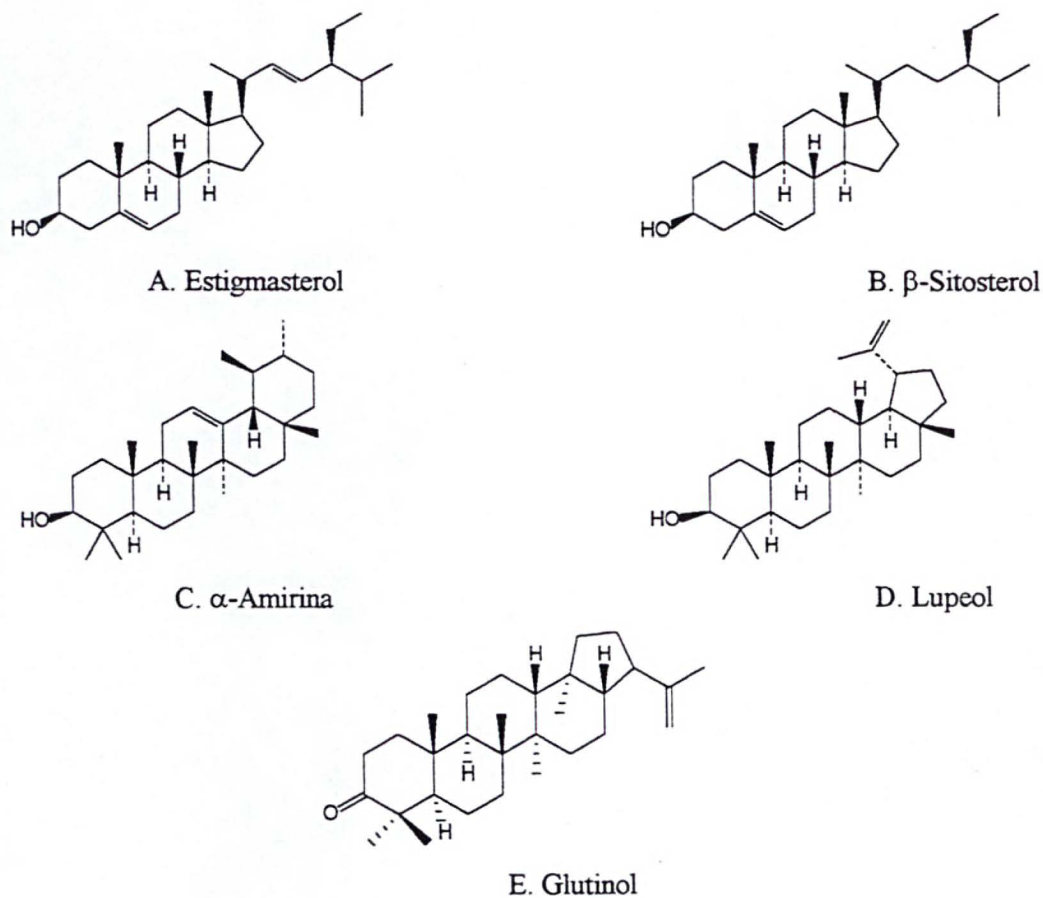
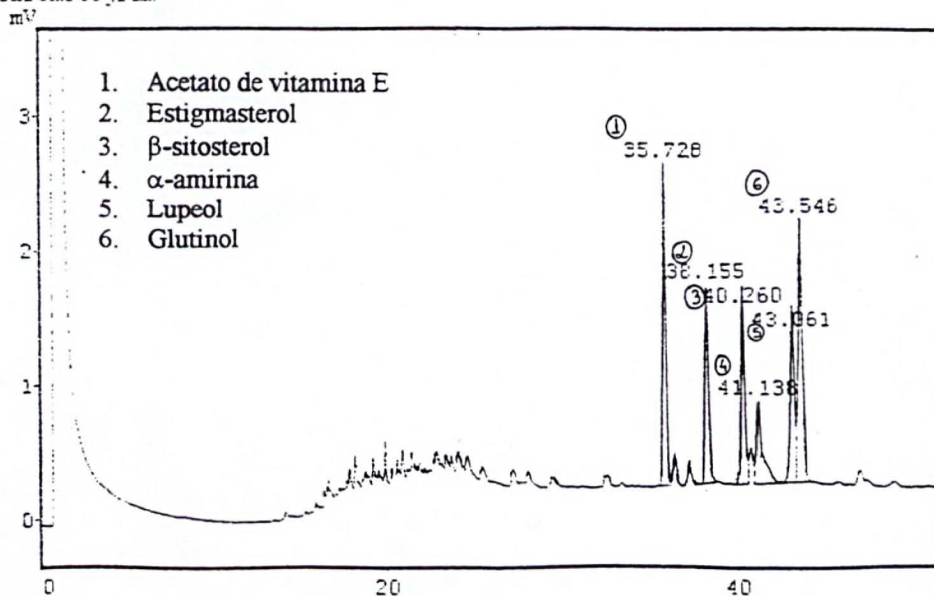


FIGURA 15 - GRÁFICO DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A MISTURA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES.

Cond anél.: Shimadzu GC-14E
 Prod:mistura de terpenos + acetato de vitamina E
 File 2: Tc= 70°C-3;Tp1=260°C-10°C/'-26'; TV=260; TD=260°
 vol inj:2ul; purga septo = 3 ml/' ; vazão = 10 ml/'
 conc: 0.8mg/ml 2:8 CHCl₃:MeOH + 1 mg/ml vit.E PI

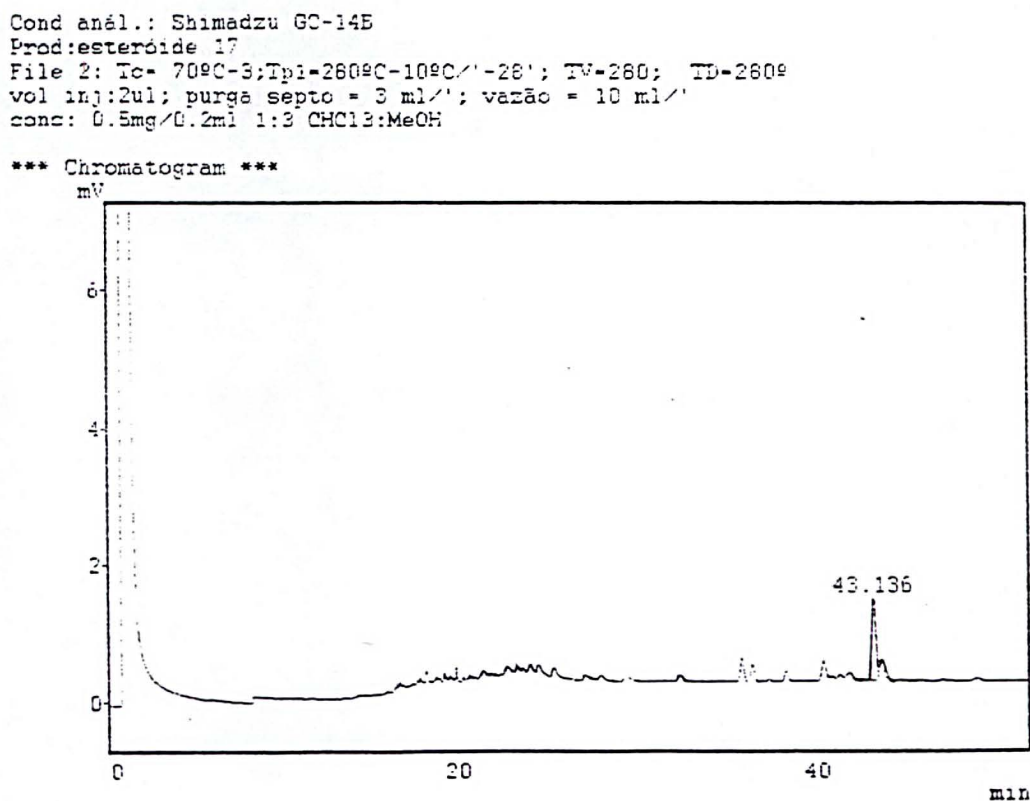
*** Chromatogram ***



4.1.1.3 Substâncias H03 e H04

As substâncias H03 e H04 foram também analisadas por CG, e apresentaram a mesma característica, tratando-se portanto do mesmo composto. O gráfico (figura 16) mostra a presença de uma substância praticamente pura, com tempo de retenção de 43,136 minutos, compatível com o padrão de lupeol (figura 14, D).

FIGURA 16 - GRÁFICO DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A SUBSTÂNCIA H03.



Também por CCD, utilizando como fase móvel tolueno:acetato de etila (93:7) e revelador vanilina sulfúrica segundo STAHL (1969), as duas substâncias apresentaram o mesmo Rf do padrão lupeol.

A identidade da substância foi revelada por RMN de ¹H e RMN de ¹³C. Os espectros foram obtidos na Universidade Católica de Roma, e os dados revelaram a identidade da substância como sendo o lupeol.

RMN de ^1H

O espectro de RMN de ^1H (figura 17) revelou um acúmulo de sinais na região compreendida entre 1,05 a 1,65 ppm. Seis singletes em 0,75 ppm, 0,76 ppm, 0,82 ppm, 0,94 ppm, 0,96 ppm e 1,02 ppm indicam a absorção de prótons das metilas representadas pelos carbonos 24, 28, 25, 27, 23 e 26, respectivamente. Um dublete em 1,67 ppm indica a absorção de um próton da metila representada pelo carbono 30.

Um multiplete centrado em 2,36 ppm indica a absorção do próton do carbono 19, enquanto um multiplete centrado em 3,18 ppm indica a absorção do próton no carbono 3. Pode-se observar ainda dois singletes em 4,56 e 4,68 ppm, referentes à absorção dos prótons do grupo CH_2 representado pelo carbono 29. Estes dados encontram-se de acordo com os citados por MAHATO & KUNDU (1994).

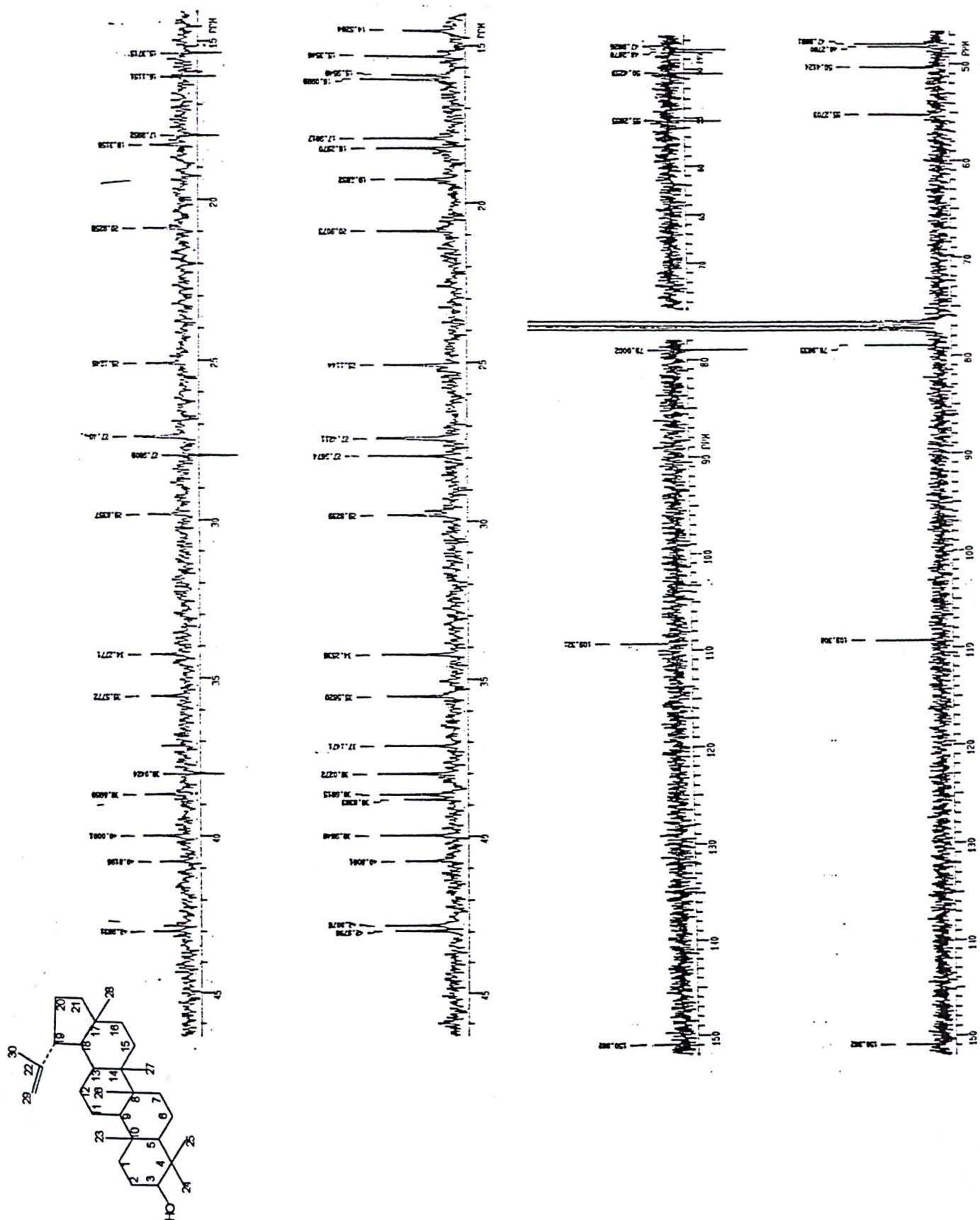
RMN de ^{13}C

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 18) foram observadas as absorções relacionadas na tabela 10 a seguir. Tais dados encontram-se compatíveis com os citados por MAHATO & KUNDU (1994).

TABELA 10 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA H03.

Carbono	Tipo	Absorção (ppm)	Carbono	Tipo	Absorção (ppm)
1	CH_2	38,69	16	CH_2	35,57
2	CH_2	27,40	17	C	42,99
3	C	78,90	18	CH	48,28
4	C	38,83	19	CH	47,98
5	CH	55,28	20	CH_2	150,96
6	CH_2	18,31	21	CH_2	29,83
7	CH_2	34,27	22	C	40,00
8	C	40,81	23	CH_3	27,98
9	CH	50,42	24	CH_3	15,37
10	C	37,20	25	CH_3	16,20
11	CH_2	20,92	26	CH_3	16,11
12	CH_2	25,12	27	CH_3	14,52
13	CH	38,04	28	CH_3	17,99
14	C	42,80	29	CH_2	109,32
15	CH_2	27,41	30	CH_3	19,30

FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA H03 (75,5 MHz, CDCl_3).

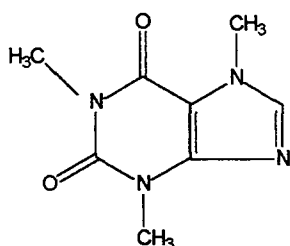


4.1.2 Fração Clorofórmica

4.1.2.1 Substância C02

Das frações 54 a 75 foram isolados 34 mg de cristais brancos, em formato de agulhas (substância C02). Tal substância foi submetida à análise por espectrometria de absorção no infravermelho (IV) e RMN de ^1H e ^{13}C , mostrando espectros compatíveis com aqueles obtidos para um padrão de cafeína (figura 19) (SDBS DATABASE).

FIGURA 19 – ESTRUTURA DA CAFEÍNA



O espectro de absorção no IV (figura 20) foi obtido em pastilha de KBr, e os principais pontos de absorção ocorrem em 1701 cm^{-1} (referente às duas carbonilas), em 1658 cm^{-1} (referentes à ligação $\text{C}=\text{C}$) e em 1485 , 1458 e 1431 cm^{-1} (referentes às três ligações $\text{N}-\text{CH}_3$).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , mostrados nas figuras 21 e 22, respectivamente, foram obtidos na Universidade Católica de Roma, e revelaram as características descritas a seguir. O espectro de massa (EM) de um padrão de cafeína é também ilustrado na figura 23 (SDBS DATABASE).

RMN de ^1H

No espectro de RMN de ^1H (figura 21) foi observada a presença de três singletes em $3,41\text{ ppm}$, $3,58\text{ ppm}$ e $4,00\text{ ppm}$, os quais indicam a absorção de prótons das metilas ligadas aos átomos de nitrogênio. Outro singlete em $7,52\text{ ppm}$ se refere à

absorção do próton do grupo CH. Estes valores são compatíveis com os descritos em literatura para um padrão de cafeína (SDBS DATABASE).

RMN de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 22) revelou as absorções mostradas na tabela 11 a seguir, os quais estão de acordo com os descritos em literatura para um padrão de cafeína (SDBS DATABASE).

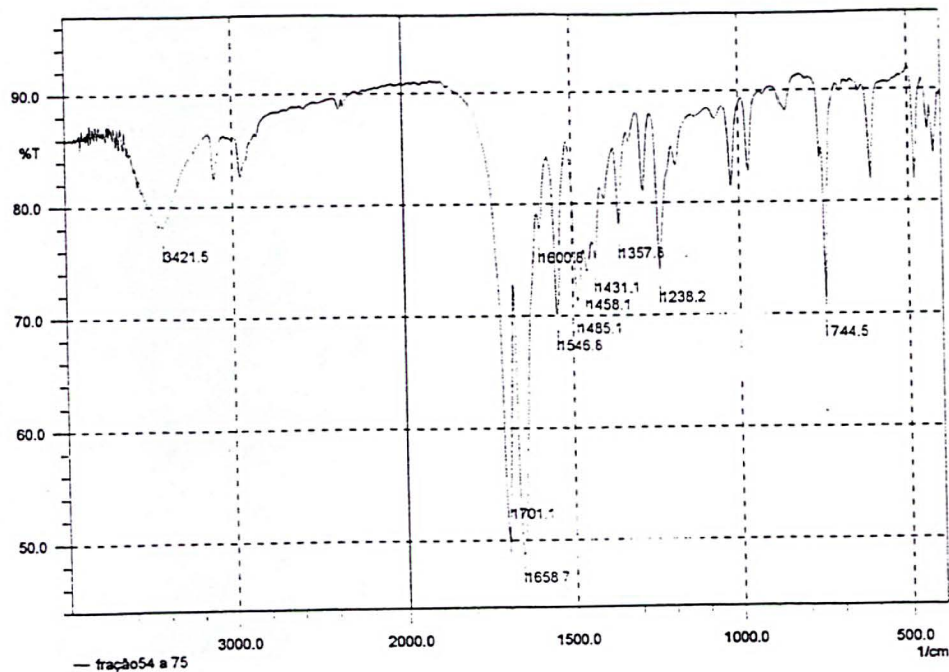
TABELA 11 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA C02

Carbono / Tipo	Absorção (ppm)
$\text{H}_3\text{C} - \text{N}$	27,86
$\text{H}_3\text{C} - \text{N}$	29,68
$\text{H}_3\text{C} - \text{N}$	33,53
$\text{C} = \text{C}$	107,53
$\text{HC} = \text{N}$	141,33
$\text{C} = \text{C}$	148,64
$\text{C} = \text{O}$	151,65
$\text{C} = \text{O}$	155,36

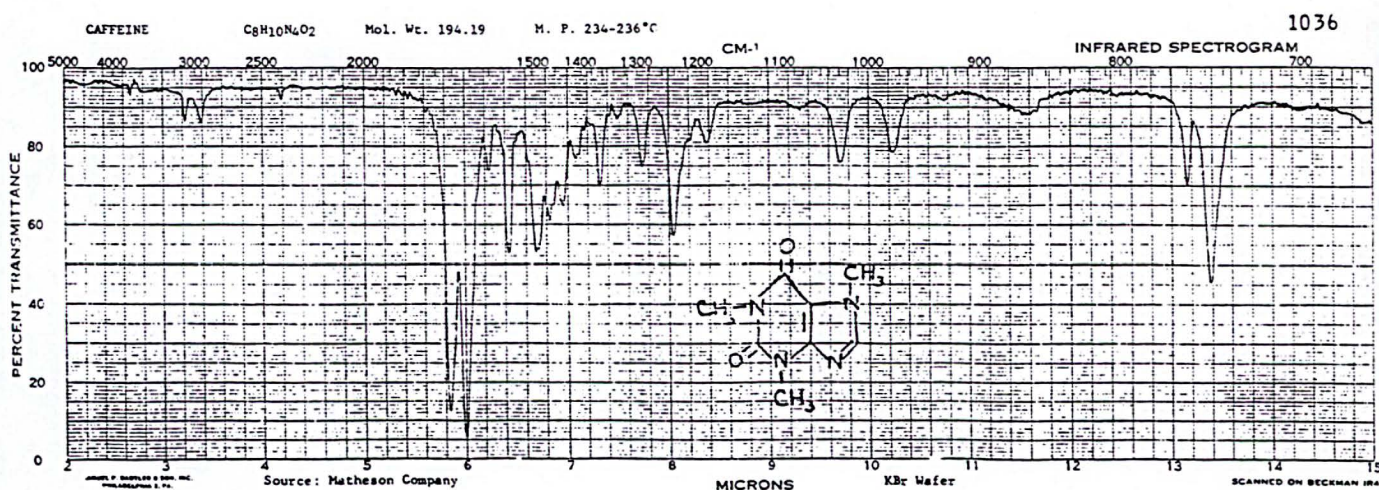
EM

No espectro de massa de um padrão de cafeína (figura 23), o pico base corresponde ao próprio pico do íon molecular, em m/e 194. Os outros principais fragmentos aparecem em m/e 67, 82, 109, 137 e 165.

FIGURA 20 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO PARA A SUBSTÂNCIA C02.



A. espectro no IV (pastilha de KBr) obtido para a substância 2 isolada. A banda com absorção em $3421,5 \text{ cm}^{-1}$ refere-se ao grupo hidroxila da água, uma vez que o espectro foi obtido com a substância não totalmente dessecada.



B. espectro no IV de um padrão cafeína, obtido do banco de dados *Sadtler Research Laboratories Inc.*, 1966.

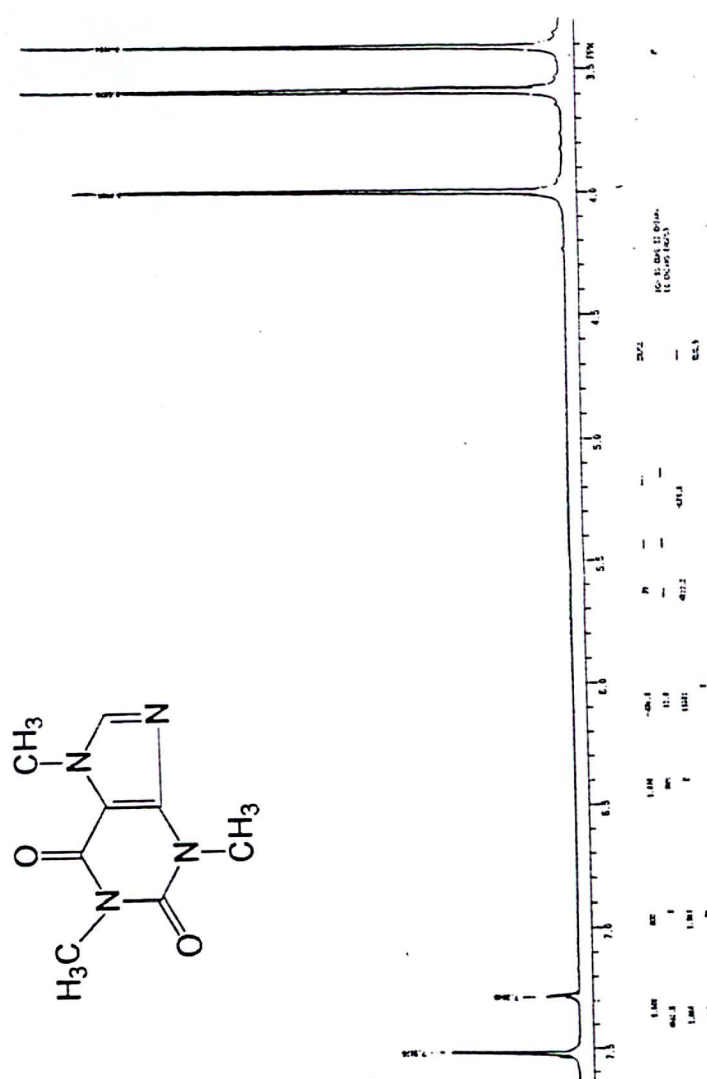
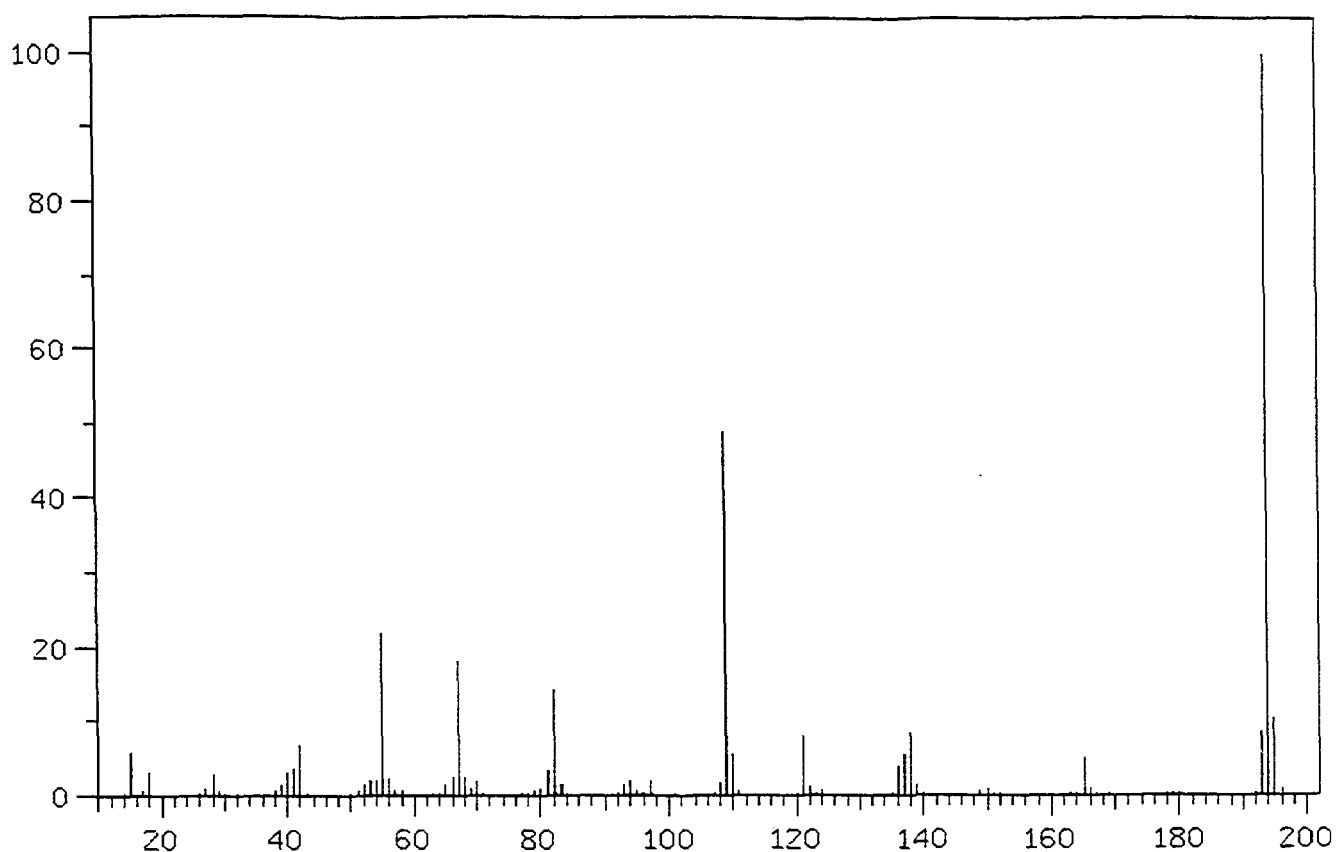
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA A SUBSTÂNCIA C02 (300 MHz, CDCl_3)

FIGURA 23 – ESPECTRO DE MASSA DE UM PADRÃO DE CAFEÍNA (SDBS DATABASE)



4.1.2.2 Substância C04

A substância C04, obtida a partir da cromatografia do resíduo da fração 54 a 75, quando comparada por CCD com a substância C02 e um padrão de cafeína, apresentou o mesmo Rf, tratando-se do mesmo composto.

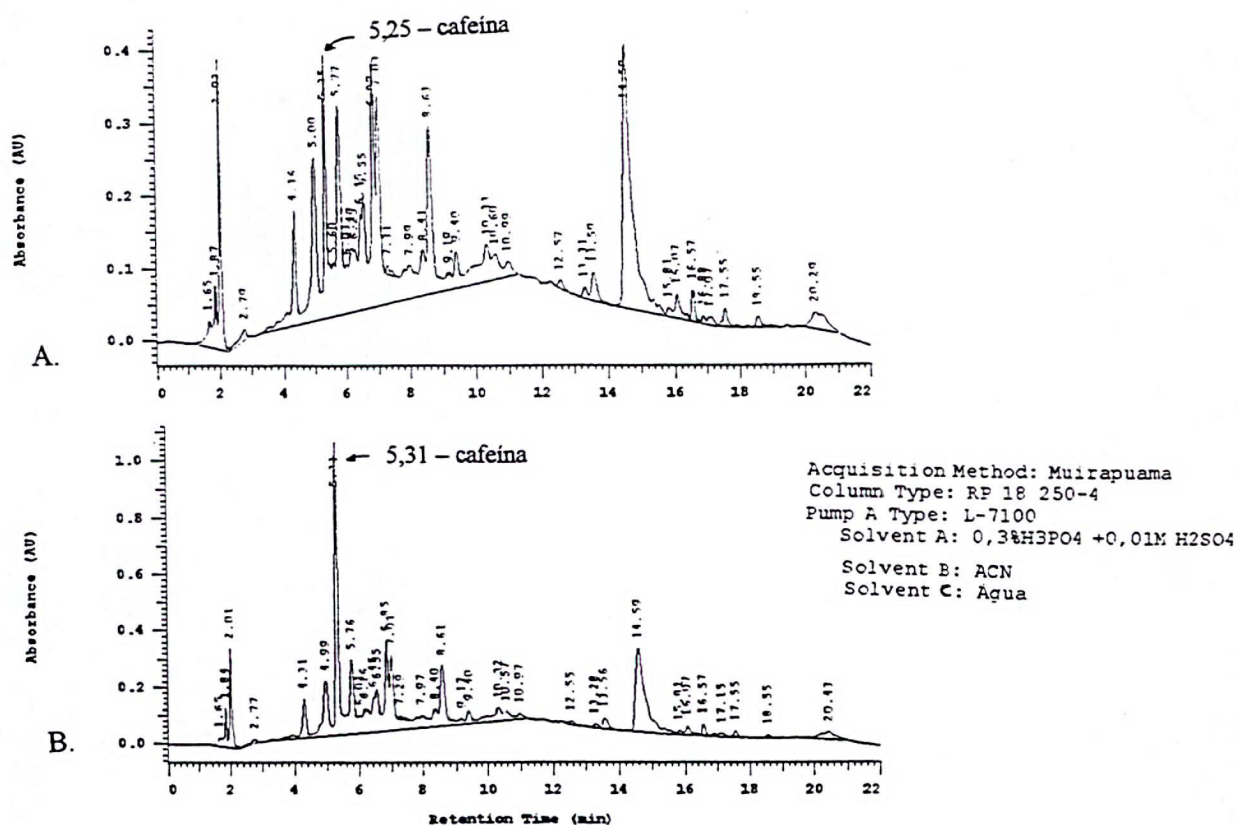
Ainda para comprovar a presença da cafeína na planta, procedeu-se uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto dos galhos secos de muirapuama. 10g do material pulverizado foram extraídos em soxhlet, com 60 ml de etanol 85%, e o extrato obtido foi submetido a CLAE de duas maneiras:

(a) injeção de 20 μ l do extrato etanólico puro

(b) injeção de 20 μ l do extrato adicionado de uma solução a 0,3 mg/ml de cafeína

Utilizou-se um sistema eluente composto por ácido fosfórico, ácido sulfúrico, acetonitrila e água. O pico referente à cafeína apresentou-se com tempo de retenção de 5,35 minutos e uma absorbância de 0,39 no extrato puro, enquanto no gráfico do extrato adicionado o pico da cafeína (tempo de retenção 5,31 minutos) apresentou um aumento na absorbância para 1,30 (figura 24). Este dado comprova portanto a presença da cafeína no material vegetal bruto.

FIGURA 24 – GRÁFICO DE CLAE DA CAFEÍNA NO MATERIAL VEGETAL.



4.1.2.3 Demais xantinas

Foi realizada ainda uma análise paralela para determinar especificamente a presença de outras xantinas. Para esta análise, 80g do material (galhos secos e pulverizados de muirapuama) foram extraídos em soxhlet, inicialmente com 250 ml de hexano, em seguida com 250 ml de clorofórmio, 250 ml de acetato de etila, e finalmente 250 ml de metanol. Cada extração durou cerca de 4 horas, e foram obtidas quatro frações, de acordo com a tabela 12.

TABELA 12 – FRAÇÕES OBTIDAS DA EXTRAÇÃO DE 80g DE MATERIAL

Fração obtida	Quantidade (g)	% em relação ao material de partida
n- hexano	1,2000	1,50
Clorofórmio	0,9535	1,19
Acetato de etila	0,4372	0,55
metanol	3,3871	4,23

A fração clorofórmica foi utilizada para a pesquisa de xantinas. Inicialmente, uma alíquota desta amostra foi submetida a análise por CLAE, utilizando uma coluna Purospher RP18 e um sistema composto por acetonitrila, metanol e água tamponada (pH 7,5-8,0). O gráfico obtido (figura 25) mostrou a presença de sete picos bem definidos, referentes a seis substâncias diferentes, sendo o último pico (12,39 minutos) um efeito do solvente utilizado (clorofórmio).

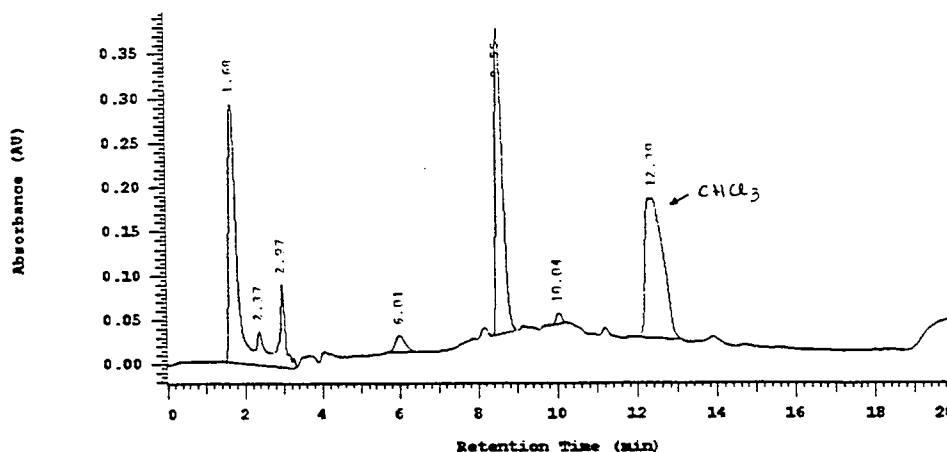
O restante da fração clorofórmica foi submetido a um processo de extração ácido/base, no intuito de purificar a fração e obter uma fração alcaloídica (xantinas) bruta. A fração clorofórmica total (810 mg) foi extraída com HCl 1%, por agitação, em três vezes de 20 ml. Reuniu-se a fração clorídrica, e esta foi alcalinizada com NH_4OH , até pH 12, sendo em seguida extraída com acetato de etila, por agitação, em três vezes de 20 ml. A fração acetato de etila foi levada à secura sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, resultando em 35 mg de um resíduo alcaloídico (xantinas) bruto.

A análise por CCD deste resíduo alcaloídico, utilizando como fase móvel acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10), mostrou a presença de oito substâncias diferentes sob luz ultravioleta, sendo apenas três delas reveladas pelo reativo de dragendorff clorídrico segundo WAGNER (1983).

Parte deste resíduo (9 mg) foi submetido a análise cromatográfica por CLAE, paralelamente a padrões de xantinas – cafeína, teobromina, teofilina e adenina, cujas estruturas são mostradas na figura 26. A análise foi realizada utilizando as mesmas condições citadas para a fração clorofórmica total, e um gradiente mostrado na tabela 13.

FIGURA 25 – GRÁFICO DE CLAE DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA EXTRAÍDA EM SOXHLET.

Processing Method: alcalóides basica RP18 038120
 System(acquisition): Sys 1
 Application: métodos analíticos
 Sample Name: 21mg CHCl₃/2ml
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description:
 Series:4493
 Vial Number: 5
 Vial Type: UNK
 Volume: 20.0 ul



Acquisition Method: alcalóides basica RP18 038120
 Column Type: Purospher RP
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: MeOH
 Solvent C: ACN
 Developed by:
 Solvent B: MeOH
 Solvent D: Agua tamponada PH 7.5-8.0

FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS XANTINAS

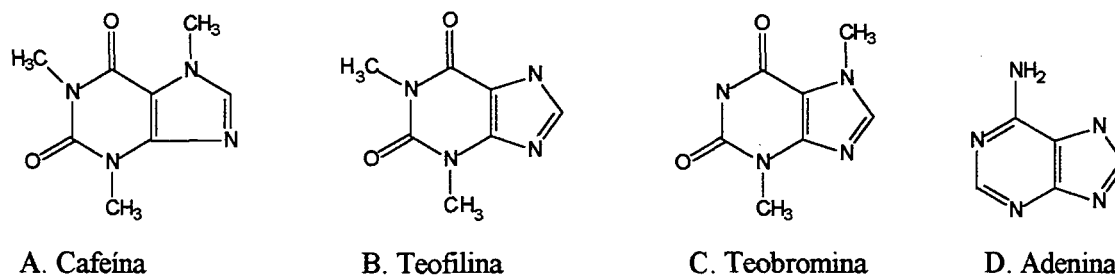


TABELA 13 – GRADIENTE UTILIZADO NA ANÁLISE DAS XANTINAS POR CLAE

Tempo (min)	% metanol	% ACN	% água tamponada	Fluxo (ml/min)
0,0	7,0	3,0	90,0	0,750
2,0	19,0	3,0	78,0	0,750
4,0	32,0	14,0	54,0	0,750
6,0	44,0	19,0	37,0	0,750
16,0	50,0	40,0	10,0	0,800
22,0	7,0	3,0	90,0	0,750
26,0	7,0	3,0	90,0	0,750

A figura 27 mostra os gráficos obtidos para os quatro padrões de xantinas – cafeína - A (8,76 minutos), teofilina - B (7,37 minutos), teobromina - C (6,27 minutos) e adenina - D (4,69 minutos).

A figura 28 mostra uma comparação entre o gráfico do resíduo alcaloídico puro e o gráfico da co-injeção do resíduo alcaloídico e os padrões de cafeína, teobromina e adenina. No primeiro gráfico, referente ao resíduo puro, são mostrados cinco picos, sendo quatro substâncias diferentes e o último pico (12,01 minutos) referente ao solvente clorofórmio. Ao adicionar a este resíduo uma pequena quantidade de cafeína e adenina, observou-se um aumento na intensidade dos picos a 4,85 minutos (adenina) e 8,19 minutos (cafeína); ao adicionar ao resíduo clorofórmico uma solução contendo teofilina e teobromina, observou-se um aumento na intensidade do pico a 6,13 minutos (teobromina) e o aparecimento de um pico a 7,48 minutos (teofilina).

Os dados obtidos desta co-injeção sugerem a presença de cafeína, teobromina e adenina no material vegetal. A quarta substância presente, com tempo de retenção entre 9,90 e 10,10 minutos, embora reaja positivamente à revelação com dragendorff clorídrico segundo WAGNER (1983), ainda não foi identificada.

O restante do resíduo alcaloídico bruto (26 mg) foi submetido a uma CCD preparativa, na tentativa de isolar as diferentes substâncias. Utilizou-se uma placa de vidro de 20x20 cm, preparada com sílica gel G, com espessura de 300µm, ativada a 100°C durante uma hora, a qual foi corrida em fase móvel acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10) em cuba saturada. Observou-se o aparecimento de oito manchas, as quais foram cuidadosamente raspadas e extraídas com metanol. Após filtração, obteve-se o rendimento mostrado na tabela 14.

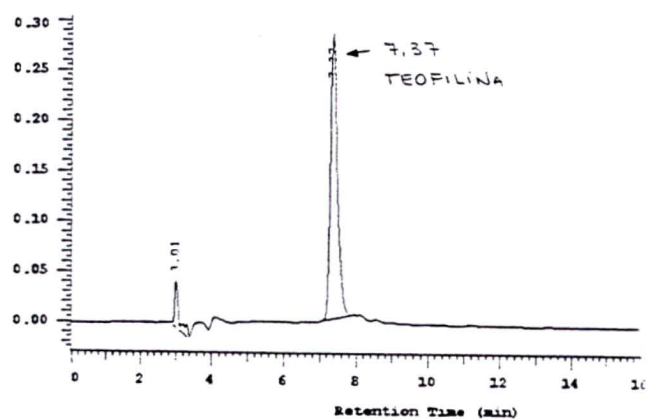
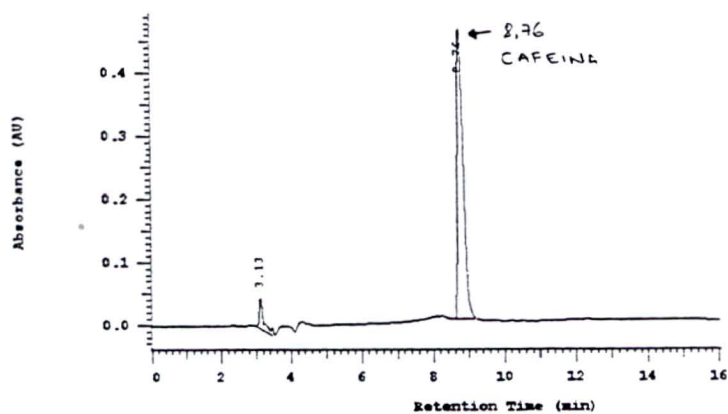
TABELA 14 - RENDIMENTOS OBTIDOS NA CCD PREPARATIVA DO RESÍDUO ALCALOÍDICO BRUTO

Mancha n°	Quantidade (mg)	Substância
1	1,0	Fluorescência azul, ainda não identificada
2	0,3	-
3	0,3	-
4	0,4	teobromina
5	1,3	cafeína
6	0,2	-
7	0,2	-
8	0,2	-

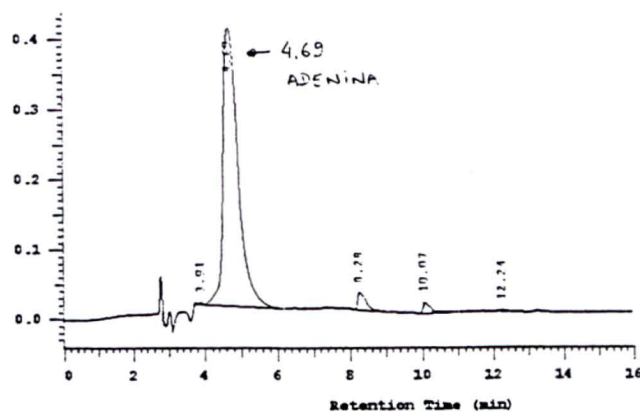
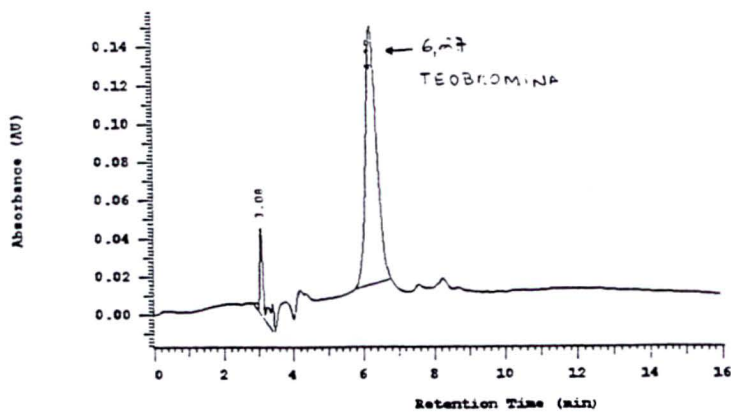
FIGURA 27 – GRÁFICO DE CLAE DOS PADRÕES DE XANTINAS.

Processing Method: alcalóides basica RP18 038120
 System(acquisition): Sys 1
 Application: métodos analíticos
 Sample Name:
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description:

Series:4493
 Vial Number: 1
 Vial Type: UNK
 Volume: 20.0 ul



Chrom Type: Integrated Chromatogram, 209 to 419 nm



Acquisition Method: alcalóides basica RP18 038120
 Column Type: Purospher RP
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: MeOH

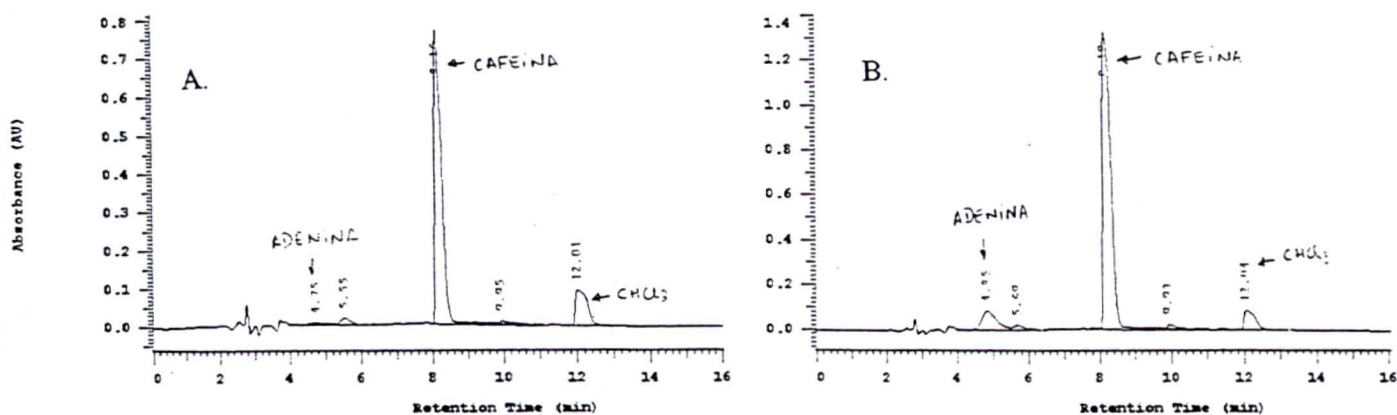
Developed by:

Solvent B: MeOH
 Solvent D: Agua tamponada PH 7.5-8.0

FIGURA 28 - GRÁFICO DE CLAE DO RESÍDUO ALCALOÍDICO BRUTO E CO-INJEÇÃO COM OS PADRÕES DE XANTINAS.

Acquisition Method: alcalóides básica RP18 038120
 Column Type: Purospher RP Developed by:
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: MeOH Solvent B: MeOH
 Solvent C: ACN Solvent D: Água tamponada PH 7.5-8.0

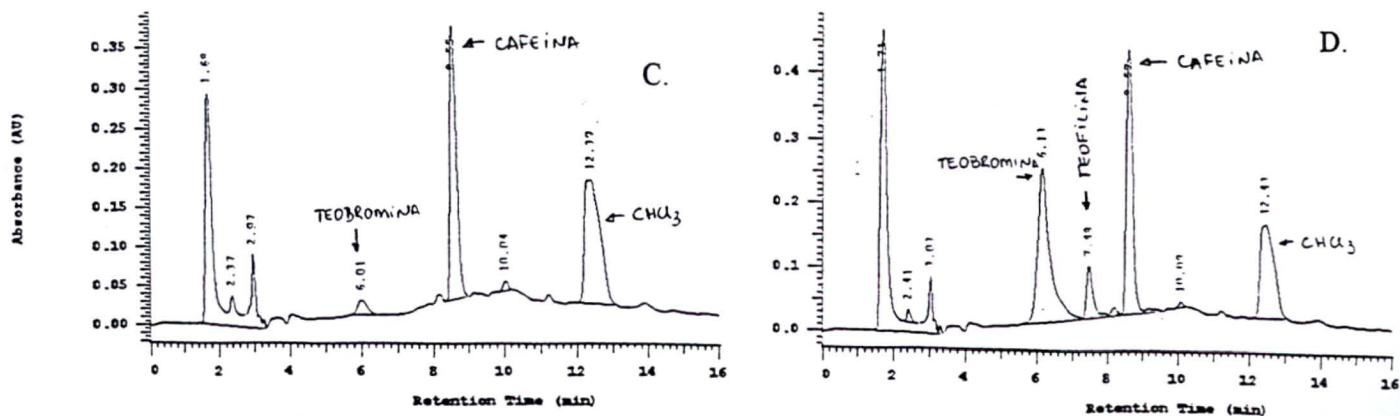
Chrom Type: Integrated Chromatogram, 209 to 419 nm



A. Fração xantinas pura; B. Fração xantinas + cafeína + adenina

Processing Method: alcalóides básica RP18 038120
 System(acquisition): Sys 1 Series:4493
 Application: métodos analíticos Vial Number: 5
 Sample Name: Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20.0 ul
 Sample Description:

Chrom Type: Integrated Chromatogram, 209 to 419 nm



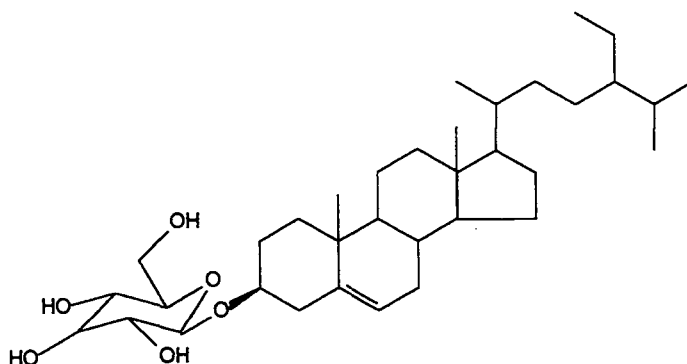
C. Fração clorofórmica pura; D. Fração clorofórmica + teofilina + teobromina

4.1.3 Fração Acetato de Etila

Da fração acetato de etila total obteve-se 23,5 mg de um composto impuro, de coloração esverdeada (substância AE01), do qual foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

A identificação foi feita com base nos dados espectrais e comparação direta com um padrão, sendo determinado como β -sitosterol glicosilado (figura 29). Os espectros foram obtidos na Universidade Católica de Roma, e os resultados obtidos são mostrados a seguir.

FIGURA 29 – ESTRUTURA DO β -SITOSTEROL GLICOSILADO.



RMN de ^1H

O espectro de RMN de ^1H , obtido a 300 MHz em piridina d, ilustrado na figura 30, revelou uma área de intensa absorção entre 0,5 e 1,4 ppm, característica de um esqueleto esteroidal. Nesta região observa-se dois singletes, em 0,67 ppm e 0,94 ppm, relativos aos prótons dos grupos metila representados pelos carbonos 18 e 19, respectivamente. Os dubletes em 0,88 ppm, 0,90 ppm e 1,01 ppm são atribuídos aos prótons dos grupos metila representados pelos carbonos 26, 27 e 21, respectivamente, e um tripleto em 0,88 ppm ainda se refere aos prótons da metila representada pelo carbono 29.

O sinal caracterizado como um multipletto centrado em 2,48 ppm refere-se ao próton no carbono 3, caracterizando a função éter, enquanto vários sinais entre 3,90

ppm e 4,60 ppm são atribuídos aos prótons do fragmento gluco-piranosídeo. Estes dados estão de acordo com os citados em literatura para o β -sitosterol glicosilado (FANG, WANG & CHENG, 1991)

RMN de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C , obtido a 75,5 MHz em piridina d, ilustrado na figura 31, revelou as absorções mostradas na tabela 15 a seguir, os quais são compatíveis com os valores citados na literatura (FANG, WANG & CHENG, 1991).

TABELA 15 – ABSORÇÕES REGISTRADAS EM RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA AE01

Carbono	Tipo	Absorção (ppm)	Carbono	Tipo	Absorção (ppm)
1	CH ₂	37,30	19	CH ₃	19,77
2	CH ₂	29,79	20	CH	36,20
3	CH	75,11	21	CH ₃	19,23
4	CH ₂	21,09	22	CH ₂	34,06
5	C	140,76	23	CH ₂	30,07
6	CH	121,69	24	CH	45,90
7	CH ₂	26,27	25	CH	29,29
8	CH	31,90	26	CH ₃	19,04
9	CH	50,20	27	CH ₃	18,83
10	C	36,74	28	CH	23,23
11	CH ₂	22,70	29	CH ₃	11,97
12	CH ₂	39,79	1'	CH	102,40
13	C	42,30	2'	CH	78,38
14	CH	56,66	3'	CH	78,22
15	CH ₂	24,32	4'	CH	77,94
16	CH ₂	28,34	5'	CH	74,99
17	CH	56,10	6'	CH ₂	62,67
18	CH ₃	11,79			

FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA A SUBSTÂNCIA AE01 (300 MHz, PIRIDINA d).

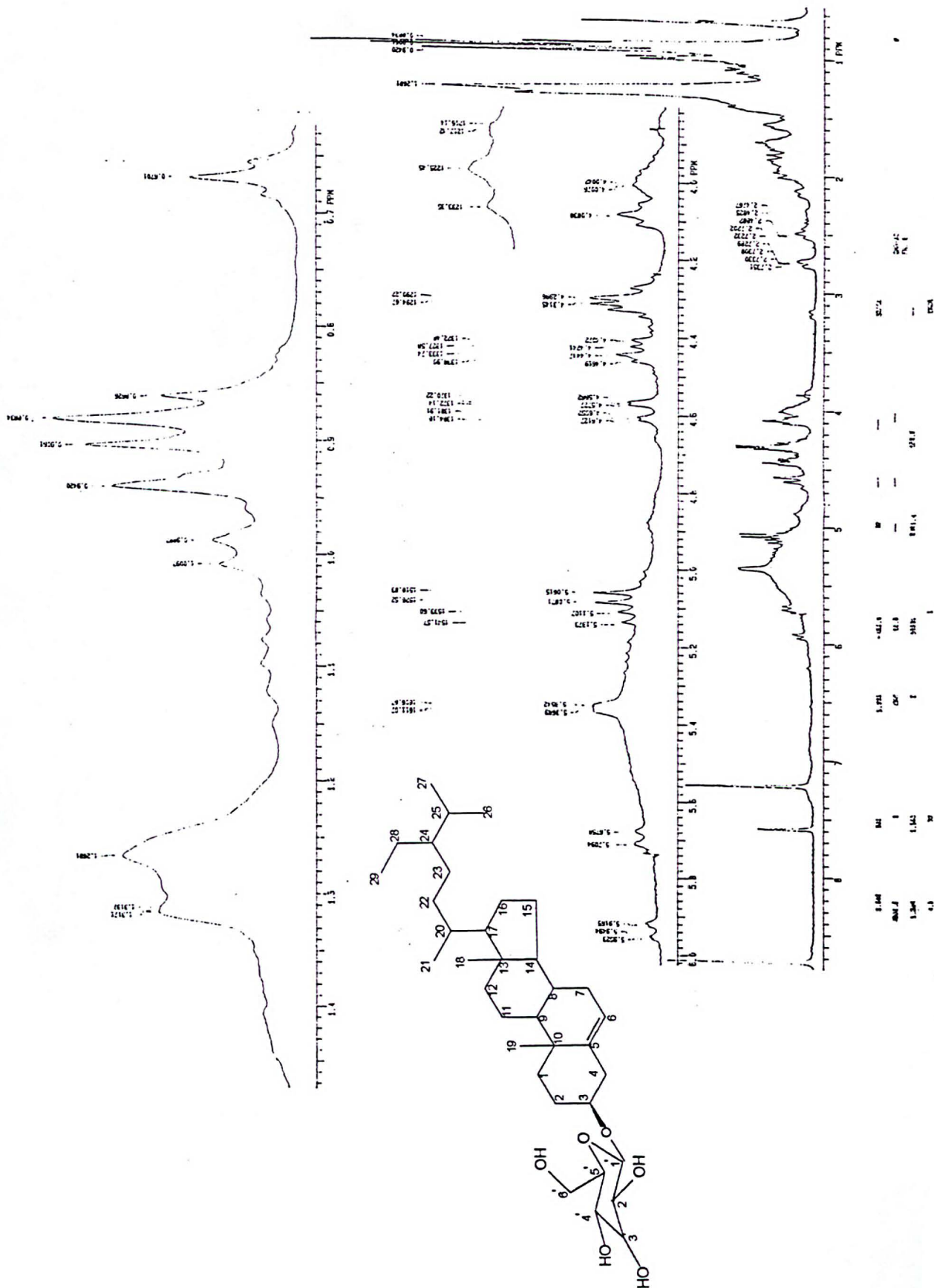
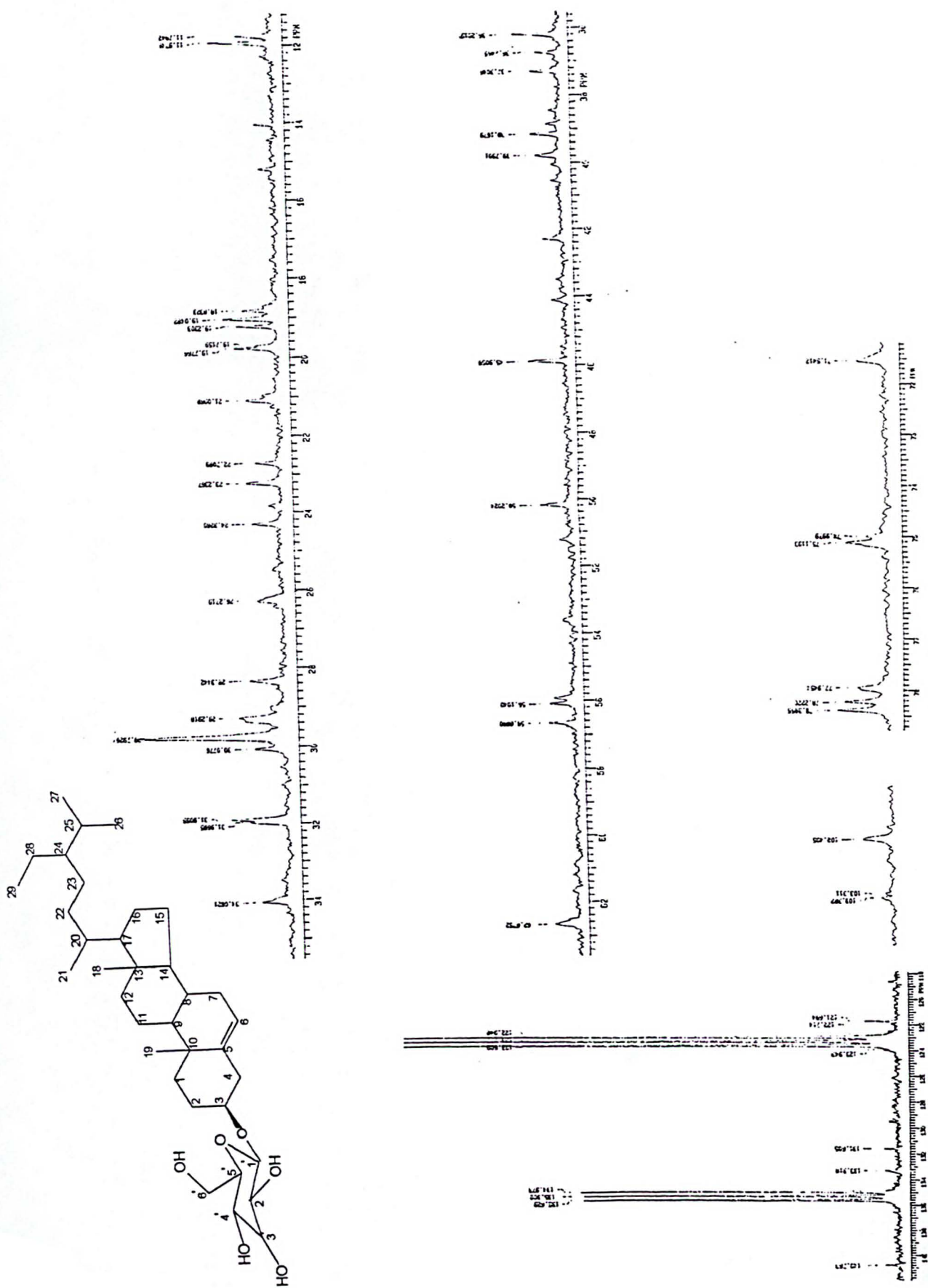


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C PARA A SUBSTÂNCIA AE01 (75,5 MHz, PIRIDINA d).



4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A leitura das placas foi feita após 24 horas de incubação a 35°C. Havendo um resultado positivo, espera-se a formação de um halo de inibição de crescimento ao redor dos discos impregnados.

Os resultados observados, mostrados na tabela 16, revelam um pequeno halo de inibição das frações hexânica e clorofórmica contra as três cepas, e das frações butanólica, metanólica e etanólica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Porém, comparando em termos de concentração em massa, este resultado torna-se não significativo; enquanto o controle cloranfenicol, na concentração de 30µg promoveu um halo de inibição entre 25 a 28 mm, é necessária uma concentração de 30 a 80 vezes maior do extrato ou das frações orgânicas para provocar um efeito inibitório quatro vezes menor que o do cloranfenicol.

Entretanto, houve uma modificação no meio e um certo efeito sobre o crescimento das cepas, embora muito pequeno. Como não foram testadas as substâncias puras isoladas, pode-se considerar a possibilidade deste teste, na tentativa de avaliar sua atividade antibacteriana.

4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

No quinto dia após a inoculação das placas foi feita a leitura do diâmetro das colônias crescidas nos meios teste e controle. Os resultados são mostrados na tabela 17, indicando que os fungos testados, em especial o *C. acutatum* apresentam certa sensibilidade aos extratos de muirapuama, sendo este resultado evidenciado no extrato alcoólico da planta.

O teste foi realizado em quadriplicata, e os resultados apresentados na tabela 17 são mostrados como a média das medidas das quatro placas. Tais resultados são ilustrados na figura 32.

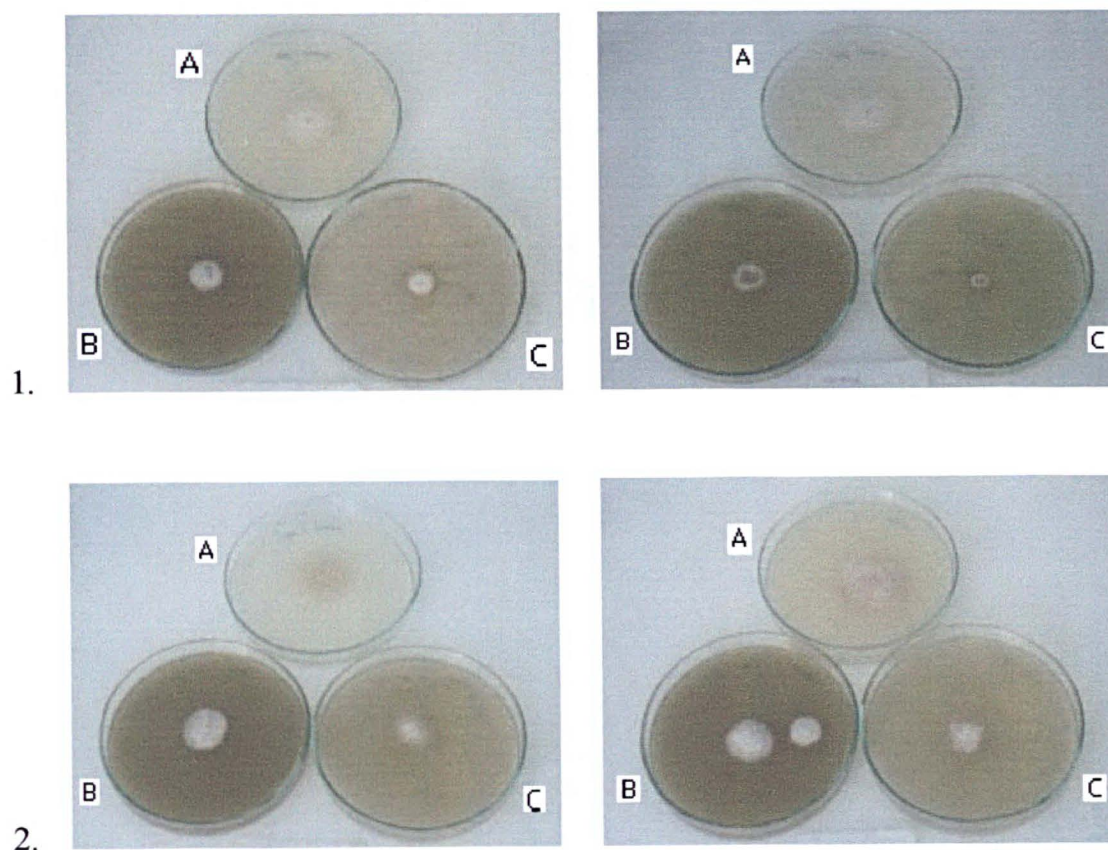
TABELA 16 - RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO O DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) – DIÂMETRO DO DISCO 6 mm.

Amostra	Amostra testada		Cepa utilizada		
	diluição	Concentração µg	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>E. coli</i> ATCC 8739
Extrato etanólico bruto	Total	710,0	7,0	0	7,0
	1:2	355,0	0	0	0
	1:4	177,5	0	0	0
	1:8	88,7	0	0	0
	controle	0,0	0	0	0
Fração hexânica	Total	1600,0	7,0	7,0	7,0
	1:2	800,0	0	0	0
	1:4	400,0	0	0	0
	1:8	200,0	0	0	0
	controle	0,0	0	0	0
Fração clorofórmica	Total	2530,0	7,2	6,8	6,8
	1:2	1265,0	0	0	0
	1:4	632,5	0	0	0
	1:8	316,2	0	0	0
	controle	0,0	0	0	0
Fração butanólica	Total	920,0	6,9	0	6,8
	1:2	460,0	0	0	0
	1:4	230,0	0	0	0
	1:8	115,0	0	0	0
	controle	0,0	0	0	0
Fração metanólica	Total	930,0	6,8	0	7,0
	1:2	465,0	0	0	0
	1:4	232,5	0	0	0
	1:8	116,2	0	0	0
	controle	0,0	0	0	0
Controle Cloranfenicol		30 µg	27,0	28,0	25,0
Controle de crescimento			+	+	+

TABELA 17: RESULTADOS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE MUIRAPUAMA

Extrato testado	Concentração (g/1000ml de meio)	<i>C. acutatum</i>		<i>F. oxysporum</i>	
		Diâmetro das colônias (cm)	% de inibição	Diâmetro das colônias (cm)	% de inibição
Aquoso	2,02	2,21	47	3,06	35
Alcoólico	1,85	1,67	60	2,90	38
Controle	-	4,16	-	4,71	-

FIGURA 32 – RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA



- 1 – *Colletotrichum acutatum* - A: meio controle; B: meio com extrato aquoso;
C: meio com extrato alcoólico
- 2 – *Fusarium oxysporum* - A: meio controle; B: meio com extrato aquoso;
C: meio com extrato alcoólico

5 CONCLUSÃO

Referenciando os objetivos inicialmente propostos, os quais consistiam no estudo fitoquímico e de atividade antimicrobiana de *Ptychopetalum olacoides*, torna-se possível fazer algumas considerações.

A análise fitoquímica preliminar apontou a presença de alcalóides, leucoantocianidinas, cumarinas, taninos, aminogrupos, esteróides e triterpenos, todos previamente reportados. Foram isoladas, no total, 14 substâncias, sendo nove delas identificadas: uma mistura de ácidos graxos (ácido palmítico e ácido esteárico), cafeína e os esteróides estigmasterol, β -sitosterol, β -sitosterol glicosilado, α -amirina, glutinol e lupeol. Foram detectadas ainda duas outras xantinas: adenina (possivelmente como um intermediário da rota metabólica) e teobromina, totalizando 11 substâncias identificadas. À exceção das três xantinas, todos os outros compostos já haviam sido previamente reportados.

Embora vários artigos se refiram a um alcalóide denominado *muirapuamina*, sua estrutura ainda não foi proposta ou revelada, deixando uma lacuna com relação a esta identificação. Várias plantas conhecidas por suas propriedades estimulantes apresentam cafeína em sua composição química, embora esta seja apresentada por nomes diferenciados. Por exemplo, reporta-se a presença de guaranina no guaraná (*Paullinia cupana*) e mateína na erva mate (*Ilex paraguariensis*), embora estas duas substâncias já tenham sido comprovadas como quimicamente idênticas à cafeína, isolada primariamente do café (*Coffea arabica*).

Seguindo esta mesma linha, é possível afirmar que a substância citada diversas vezes como *muirapuamina* trata-se, na realidade, da tão conhecida cafeína.

Quanto à atividade antimicrobiana, foi evidenciado que os extratos obtidos da *muirapuama* não apresentam efeito inibitório significativo sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ou *Escherichia coli*. Entretanto, os dados obtidos sugerem uma avaliação dos compostos puros isoladamente.

Por outro lado, o extrato alcoólico da planta apresenta uma significativa ação inibidora do crescimento de *Colletotrichum acutatum*, e uma ação menos pronunciada sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum*. Tais dados podem vir a ser úteis num estudo de controle de doenças em plantas pela utilização de métodos e produtos naturais, uma vez que não existem produtos sanitários liberados para aplicação no cultivo de plantas medicinais.

Deve-se ter em vista a aplicabilidade farmacológica da espécie e a relação entre a composição química, determinada pela pesquisa científica, e as inúmeras formas farmacêuticas desenvolvidas, em paralelo às características botânicas da espécie e a parte usada. Nesta perspectiva, tem-se que resgatar grupos científicos com interesse em investir esforços na pesquisa agrônômica, tendo como objetivo subsidiar a indústria no fornecimento de matéria-prima, de acordo com o desenvolvimento sustentável da espécie.

Tais medidas remetem a priorizar esforços ecologicamente benignos na obtenção da matéria-prima em prol da produção do medicamento, sob a perspectiva da qualidade do produto final, e desse modo compor uma cadeia de produção de *Ptychopetalum olacoides* que viabilize a obtenção da planta com marcadores químicos definidos, de acordo com a aplicabilidade da mesma.

REFERÊNCIAS

1. ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6 ed. São Paulo: Premier, 2000.
2. ANSELMINO, E. Ancestral sources of muira-puama. **Arch. Pharm.**, n. 271, p. 296-314. 1933.
3. AUER, C. G.; BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF**, n. 32, p. 49-51. 1986.
4. AUTERHOFF, H.; PANKOW, E. Components of muira puama. **Arch. Pharm.**, v. 301, n. 7, p. 481-489. 1968.
5. AUTERHOFF, H; MOMBERGER, B. Lipophilic constituent of muira puama. **Arch. Pharm.**, v. 304, n. 3, p. 223-228. 1971.
6. BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia.** Zaragoza: Acribia, 1991.
7. BUCEK, E. U.; FOURNIER, G.; DADOUN, H. Volatile constituents of *Ptychopetalum olacoides* root oil. **Planta Medica**, v. 53, n. 2, p. 231-233. 1987.
8. CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine Catuama induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 1, p. 32-38. 1997.
9. CHARAM, I. Há ações afrodisíacas nas plantas medicinais do Brasil? **Folha Médica**, v. 94, n. 5, p. 303-309. 1987.
10. CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** New York: New York Botanical Garden, 1998.
11. DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 1995.
12. FANG, J.M.; WANG, K.C.; CHENG, Y.S. Steroids and triterpenoids from *Rosa laevigata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3383-3387. 1991.

13. FORGACS, H. et. al. Études phytochimiques et activités biologiques de 18 plantes de la Guyane Française. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v. 17, n. 1, p. 22-32. 1983.
14. GAEBLER, H. Revival of the drug muira-puama. **Deut. Apoth.**, v. 22, n. 3, p. 94-96. 1970.
15. GENARO, A.R. **Remington farmácia**. 17. ed. v. 1. Buenos Aires: Panamericana, 1987. p. 25-39.
16. GRIEBEL, C. Detection of muira-puama extract. **Z. Nahr. Genussm**, n. 24, p. 687. 1912.
17. HAMET, R. Physiological action of the extract of muira puama. **Compt. Rend. Soc. Biol.**, v. 109, p. 1064-1067. 1932.
18. INDEX kewensis on compact disc. Oxford: Oxford University Press, 1997. 1 CD-ROM.
19. JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.
20. JORGE, L.I.F. et. al. Anatomia e avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 20, n. 2, p. 449-458. 1999.
21. KONEMAN, E.W. et. al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 2 ed. São Paulo: Panamericana, 1993. p. 459-475.
22. MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575. 1994.
23. MATOS, J. F. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 1988.
24. MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico e prático**. Fortaleza: UFC, 1989.
25. MIGUEL, O. G. **Estudo químico e farmacológico das espécies *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus fraternus* e *Siphocampylus verticillatus***. Florianópolis, 1996. 219 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciência Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

26. MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.
27. MOREIRA, E.A. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb. e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 13-39. 1979.
28. OLOFSSON, E. Action of extract of *Liriosma ovata* on the blood pressure, vessels and respiration of the rabbit. **Compt. Rend. Soc. Biol.**, v. 97, p. 1639-1640. 1927.
29. PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Effects of *Ptychopetalum olacoides* extract on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 4, p. 294-296. 1998.
30. PANKOW, E.; AUTERHOFF, H. Components of muira puama II. **Arch. Pharm.**, v. 302, n. 3, p. 209-212. 1969.
31. PDR for herbal medicines. 2. ed. Montvale: Medical Economics Company, 2000.
32. RIBEIRO, M.N.G. Aspectos climatológicos de Manaus. **Acta Amazônica**, v. 6, n. 2, p. 229-233. 1976.
33. SANGIRARDI JUNIOR. **Plantas eróticas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Nórdica, 1980.
34. SDBS Compound Information. Disponível em:
www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_disp?sdbno=908
Acesso em: 30 out. 2001.
35. SDBS Compound Information. Disponível em:
www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_disp?sdbno=1493
Acesso em: 30 out. 2001.
36. SILVA, R. A. D. Plantas medicinaes brasileiras. Estudo botânico e farmacognóstico – muirapuama. **Rev. Bras. Med. Pharm.**, v. 1, n. 1, p. 37-41. 1925.
37. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
38. SIQUEIRA, I. R. et. al. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, p. 327-334, dec. 1998.

39. STAHL, E. **Thin-layer chromatography – a laboratory handbook**. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1969. p. 873-874; 904.
40. STANGARLIN, J. R. et. al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, n. 11, p. 16-21. 1999.
41. STEINMETZ, E. F. Muira-puama. **Quart. J. Crude Drug Res.**, v. 11, n. 3, p. 1787-1789. 1971.
42. TOYOTA, A. et. al. Studies of brazilian crude drugs 1 – muira puama. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 33, n. 2, p. 57-64. 1979.
43. ULUBELEN, A. et. al. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. **Planta Medica**, v. 66, n. 5, p. 458-462. 2000.
44. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 23 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 1681-1686.
45. VAZ, Z. R.; MATA, L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 101-106. 1997.
46. WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAÏNSKI, E.M. **Drogen analyse**. Berlim: Springer Verlag, 1983. p. 300-301.
47. WEIGEL, G. The wood and root of muira-puama. **Pharm. Centralh**, n. 49, p. 139-141. 1907.