

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
CENTRO DE QUÍMICA DA MADEIRA
CENTRO DE COMPETÊNCIAS EM CIÊNCIAS EXACTAS E DA
ENGENHARIA



**CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DE
COMPOSTOS BIOACTIVOS DO FUNGO
LAUROBASIDIUM LAURI (MADRE DE LOURO)**

Maria João Menezes Carvalho

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA APLICADA

Sob a orientação de:

Professora Doutora Paula Castilho

2010

Agradecimentos

Este projecto conclui o 2º Ciclo em Bioquímica Aplicada da Universidade da Madeira, desenvolvido no laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais, sob orientação da Professora Doutora Paula Castilho.

Um agradecimento muito especial

À Professora Doutora Paula Castilho por depositar em mim a confiança no desenvolvimento deste projecto, orientando e incentivando o desenvolvimento de cada etapa.

Aos colegas de laboratório, que ao meu lado desenvolveram os seus projectos, pelas manifestações de companheirismo e de entreaajuda sempre que necessário facilitando bons momentos no laboratório, enaltecendo o apoio incansável cedido pela Doutora Sandra Gouveia.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional na minha formação académica e na minha evolução enquanto pessoa.

À Mariana por ser a minha gémea, a minha melhor amiga e companheira desde sempre.

Ao Rodrigo que com muito carinho apoia e incentiva todas as minhas decisões.

Aos meus amigos, principalmente à Carla, sempre amiga e companheira neste percurso académico.

A todos os que contribuíram para a realização deste projecto o meu profundo agradecimento.

Resumo

Os objectivos deste trabalho consistiram em desenvolver um método de separação eficaz e reprodutível de modo a isolar as lactonas sesquiterpénicas - dehidrocostus e costunolida - de extractos do fungo parasita da espécie *Laurus novocanariensis* - *Laurobasidium lauri*; em testar os compostos relativamente às suas capacidades antioxidantes e bioactivas - citotoxicidade e alelopatia - e em obter uma quantidade considerável destas lactonas de modo a enviar para laboratórios em parceria para realização de testes de actividade anticancerígena *in vitro* (Instituto Canário de Investigação em Cancro), de anti-tuberculose *in vivo* (Instituto politécnico Nacional, México), de actividade anti-inflamatória *in vivo* (UNIVALI, Brasil) e de actividade anti-ulcerativa *in vivo*.

Neste trabalho foi possível isolar 116 mg de lactona costunolida com 97% de pureza através do fraccionamento do extracto de Madre de Louro em hexano pela técnica de cromatografia em coluna aberta com sistema de eluentes Hexano:Acetato de etilo (50:0 – 43:7 mL), procedendo à sua identificação por HPLC-MS e RMN ^{13}C , não tendo sido possível atingir o mesmo objectivo para a lactona dehidrocostus.

O extracto de Madre de Louro em Metanol demonstrou ser a amostra com maior poder antioxidante relativamente aos teste de ABTS, DPPH e FRAP, enquanto o extracto em Diclorometano apresentou maior poder antioxidante no teste do β -caroteno/ácido linoléico.

No que toca aos ensaios biológicos, o extracto de madre de louro em hexano foi o que apresentou um valor de DL_{50} mais baixo (0,1mg/mL) representando assim maior poder de toxicidade perante as larvas de camarão (*Artemia salina*).

Abstract

The aims of this study consisted in developing an efficient and reproducible method of separation and isolation of the sesquiterpene lactones - dehydrocostus and costunolide - from the parasitic fungus of the specie *Laurus novocanariensis* - *Laurobasidium lauri*; to test these compounds relatively to their antioxidant, cytotoxic and allelopathic capacities and to obtain a considerable amount of these compounds to send them to laboratories with partnership to realize assays of anticancer activity *in vitro* (Instituto Canário de Investigação em Cancro), anti-tuberculosis *in vivo* (Instituto politécnico Nacional, México), anti-inflammatory activity *in vivo* (UNIVALI, Brasil) and anti-ulcerative activity *in vivo*.

In this work it was possible to isolate 116 mg of costunolide lactone with 97% purity by fractionation of the hexane extract from the fungus Madre de Louro using an open column chromatography technique with hexane:Ethyl acetate (50:0 - 43:7) and proceeding to the identification by HPLC-MS and RMN ^{13}C . It was not possible to achieve the same goal for dehydrocostus lactone.

The methanolic extract from Madre de Louro demonstrate being the sample with most antioxidant power relatively to ABTS, DPPH and FRAP assays, whereas the dichloromethane extract displayed more activity in the β -carothene/linoleic acid assay.

For the *Artemia salina* bioassay, the hexanic extract showed a lower value of DL_{50} (0,1mg/mL) witch represents more toxicity power towards brine shrimp.

Lista de abreviaturas:

ABTS – Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico)

AChE – Acetilcolinesterase

CC(s) – Coluna(s) cromatográfica(s)

DCM - Diclorometano

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EP – Éter de Petróleo

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

g – Grama

GC – Gas Chromatography

IV - Infravermelho

MeOH - Metanol

ML – Madre-de-louro

mL – Mililitro

min – Minutos

mg – Miligramas

MS – Mass Spectrometry

m/z – Razão massa carga

ppm – Partes por milhão

% – Por cento

TLC – Thin Layer Chromatography

TMS – Tetrametilsilano

Rf – Coeficiente de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

¹³C-RMN – Ressonância magnética nuclear de carbono-13

UV – Ultravioleta

µg/mL – Micrograma por mililitro

µmol/eq. Trolox – Micromole por equivalente de Trolox

µmol/mg – Micromole por miligrama

µL – microlitro

δ – Desvio químico

Índice geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Abreviaturas	v
Índice Geral	vi
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	vii
1 Introdução	1
1.1 Madre-de-louro	1
1.1.1 Aplicações Medicinais	3
1.2 Lactonas sesquiterpénicas	3
1.2.1 Biossíntese	5
1.2.2 Lactonas Costunolida e dehidrocostus	8
1.2.3 Actividades Biológicas	9
1.2.3.1 Inibição da Acetilcolinesterase na prevenção de doenças neurodegenerativas	10
1.2.3.2 Efeitos inibitórios na absorção de álcool	11
1.2.3.3 Efeitos citotóxicos e quimiopreventivos em células tumorais	12
1.2.3.4 Efeitos protectores na resposta dos osteoblastos ao stress oxidativo	14
1.2.3.5 Actividade anti-micobacteriana	15
1.3 Ensaio de bioactividade	16
1.3.1 Toxicidade sobre artemia salina	16
1.3.2 Alelopatia	18
1.4 Isolamento e purificação dos compostos bioactivos	20
2 Procedimento experimental	22
2.1 Extracção	22
2.2 Fraccionamento do extracto hexânico da Madre de Louro	23
2.2.1 Técnicas de Cromatografia	23
2.2.1.1 TLC	24
2.2.1.2 Cromatografia em camada fina Preparativa	26
2.2.1.3 Cromatografia em coluna aberta	27
2.3 Caracterização /Identificação das fracções	29
2.3.1 GC-MS	30
2.3.2 LC-MS	31
2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear	33
2.3.4 Espectroscopia do Infravermelho e do Ultravioleta	34
2.4 Testes de Actividade Antioxidante	35
2.4.1 ABTS	36
2.4.2 DPPH	38
2.4.3 TLC screening (DPPH)	39
2.4.4 FRAP	39
2.4.5 Sistema β -caroteno / ácido linoléico	41
2.5 Determinação de Fenóis totais	42
2.5.1 Teste Folin-Ciocalteu (FC) colorimétrico	42
2.6 Testes de actividade biológica	44
2.6.1 Artemia salina	44
2.6.2 Alelopatia	45

2.6.3	TLC screening (Inibidores da Acetilcolinesterase)	47
3	Resultados e Discussão	48
3.1	Extracção	48
3.1.1	Rendimentos das extracções	48
3.2	Fraccionamento e Caracterização dos compostos bioativos	48
3.2.1	TLC	49
3.2.2	TLC Preparativa	50
3.2.3	Colunas Cromatográficas abertas	52
3.3	Caracterização dos compostos bioativos	53
3.3.1	GC-MS	53
3.3.2	LC-MS	54
3.3.2.1	Identificação e Quantificação da Costunolida	54
3.3.2.2	Identificação e Quantificação da Dehidrocostus	55
3.3.3	RMN	56
3.3.3.1	Identificação da Costunolida	57
3.3.3.2	Identificação da Dehidrocostus	57
3.3.4	Espectroscopia IV	58
3.4	Testes de actividade antioxidante	58
3.4.1	ABTS	58
3.4.2	DPPH	59
3.4.3	Análise qualitativa da actividade antioxidante (DPPH) por TLC	59
3.4.4	FRAP	60
3.4.5	Sistema β -caroteno / ácido linoléico	61
3.5	Quantificação dos Fenóis Totais	62
3.6	Ensaio biológico	63
3.6.1	Teste de citotoxicidade em <i>Artemia salina</i>	63
3.6.2	Teste de alelopatia sobre sementes de <i>Lactuca sativa</i>	65
3.6.3	TLC screening –Inibidores da Acetilcolinesterase	65
4	Conclusão e Perspectivas futuras	67
5	Referências Bibliográficas	69
6	Anexos	76

Índice das Figuras

Figura 1 - <i>Laurobasidium lauri</i> (Madre-de-Louro)	2
Figura 2 - Mapa da Ilha da Madeira	2
Figura 3 - Estruturas do isopreno e isopentano (ChemBioDraw 2008)	4
Figura 4 - Imagem dos três tipos básicos de lactonas sesquiterpénicas	5
Figura 5 - Esquema simplificado de formação de compostos eudesmanolídeos e guaianolídeos	6
Figura 6 - Possível via biosintética para os três tipos comuns de lactonas sesquiterpénicas	6
Figura 7 - Representação esquemática do mecanismo de biossíntese da costunolida	7
Figura 8 - Formação de outras LSTs através da (+)-costunolida	8
Figura 9 - Estrutura química das lactonas Costunolida e Dehidrocostos	9
Figura 10 - <i>Artemia salina</i>	17
Figura 11 - Indução dos aleloquímicos por stress biótico e abiótico	18
Figura 12 - Esquema de uma placa de TLC com as lactonas reveladas.	25
Figura 13 - Esquema de uma placa de cromatografia preparativa.	26
Figura 14 - Representação esquemática (à esquerda) e fotografia (à direita) de uma cromatografia em coluna	27
Figura 15 - TLC desenvolvida em Hexano:Éter dietílico (75:25)	49
Figura 16 - TLC desenvolvida em Acetato de Etilo: Metanol (55:5)	49
Figura 17 - Espectro de massa com as fragmentações da lactona dehidrocostos	53
Figura 18 - Cromatograma geral da Fracção Z contendo a lactona 'verde'	54
Figura 19 - Espectro de Massa com as fragmentações MS ⁺ - MS4 ⁺ da Fracção Z contendo a lactona 'verde'	54
Figura 20 - Cromatograma geral da Fracção 10b da 17 ^o CC contendo a lactona 'rosa' contaminada	55
Figura 21 - Espectro de Massa com as fragmentações MS ⁺ - MS4 ⁺ da Fracção 10b da 17 ^o CC contendo a lactona 'rosa' contaminada	56
Figura 22 - Picos obtidos no espectro de RMN do ¹³ C da Fracção Z contendo a lactona costunolida	57
Figura 23 - Gráfico representativo da actividade antioxidante das amostras testadas em µmol eq trolox/ g de amostra	58
Figura 24 - Gráfico representativo da actividade antioxidante das amostras testadas em mM eq trolox/mg amostra	59
Figura 25 - TLC revelada com solução de DPPH	60
Figura 26 - Gráfico representativo da actividade antioxidante em mg amostra por mmolFeSO ₄ .7H ₂ O	60
Figura 27 - Gráfico representativo da actividade antioxidante em mmolFeSO ₄ .7H ₂ O por mg amostra	61
Figura 28 - Gráfico representativo da percentagem de actividade antioxidante por amostra	61
Figura 29 - Gráfico representativo da quantificação dos fenóis totais pelo método de Folin (mg de ácido gálico por g de amostra)	62
Figura 30 - Gráfico representativo da Dose Letal 50 em mg/mL das amostras testadas	64
Figura 31 - TLCs reveladas com a solução de Liberman-Bouchard (a primeira) e de acetilcolinesterase	66

Índice das Tabelas

Tabela 1 - Sistemas de eluentes testados	24
Tabela 2 - Colunas cromatográficas - amostras e solventes testados	28/29
Tabela 3 - Condições utilizadas na análise das fracções obtidas do extracto de Madre de Louro em Éter de Petróleo no GC-MS	31
Tabela 4 - Rendimento das extracções do fungo com vários solventes	48
Tabela 5 - Sistemas de eluentes escolhidos e Rfs dos compostos principais	49
Tabela 6 - Rendimentos das TLCs preparativas realizadas	50/51
Tabela 7 - Condições mais satisfatórias das CCs para o fraccionamento do extracto ML em Hexano	52
Tabela 8 - Esquema geral da obtenção das lactonas	52/53
Tabela 9 - Identificação dos compostos assinalados na figura seguinte	65

1. Introdução

A Natureza tem sido, por milhares de anos, uma fonte de agentes terapêuticos, e muitos fármacos existentes actualmente derivam de fontes naturais, muitos baseados no uso de plantas ou extractos vegetais. (Sarker *et al.*, 2006)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 75% das pessoas ainda recorrem primeiramente a produtos à base de plantas para tratar problemas de saúde. (Sarker *et al.*, 2006)

Cerca de 259 (21,42%) das 1209 espécies de flora das ilhas Madeira e Porto Santo, têm sido usadas na medicina popular, um valor superior comparado com os 10% estimados da flora usada na Península Ibérica para fins terapêuticos. (Rivera e Obón, 1995)

As folhas do *L. novocanariensis*, por exemplo, têm sido desde sempre usadas na medicina tradicional da Madeira na preparação de remédios com função anti-ulcerativa e depurativa. (Tinoco *et al.* 2009)

Entre a variedade de produtos naturais, encontra-se o fungo parasita *Laurobasidium lauri*, o qual cresce nos troncos de *Laurus azorica*. (Rivera e Obón, 1995)

1.1 Madre de Louro

A espécie *Laurobasidium lauri* é um fungo pertencente à Ordem Exobasidiales e à família Exobasidiaceae, que vive sobre as árvores do género *Laurus*.

Esta espécie era considerada como pertencente ao género *Exobasidium* (*E. lauri* Geyler) até que Jülich (1982) descreve o género *Laurobasidium* para as espécies exclusivas da família Lauraceae que por sua vez é caracterizado por possuir hifas em forma de galhos. (Cerceda *et al.*, 1991)

O *Laurobasidium lauri*, mais conhecido pelo seu nome tradicional, madre-de-louro, é um parasita do *Laurus azorica* (Seub) Franco. É uma espécie que não apresenta grande abundância pois só se desenvolve em árvores com mais de 10 anos. (Cruz Morais, 1987)

1.1.1 Aplicações medicinais

Cruz Morais descreveu na sua tese de Doutoramento de 1987 um estudo etnofarmacológico que consistiu em obter informações sobre as utilidades medicinais da madre-de-louro junto da sabedoria popular. Descreveu como o povo usa a madre-de-louro na preparação de bebidas conforme o tratamento a ser aplicado, por exemplo, para o alívio de problemas de origem circulatória ou erupções cutâneas faziam infusões deste fungo e bebiam um litro por dia. *(Cruz Morais, 1987)*

Quando se tratava de combater problemas de origem nervosa ou eliminar dores de diversas origens – reumáticas, lombares, menstruais e outras – preparavam uma bebida alcoólica, misturando aguardente e o fungo (agitando todos os dias durante um mês, adicionando, por fim um pouco de mel), que seria consumida aos poucos todos os dias, de manhã e à noite, até que os sintomas fossem completamente eliminados. *(Cruz Morais, 1987)*

Segundo Rivera e Obón (1995), o fungo parasita do loureiro é usado como anti-reumático, homeostático, emenagogo (que favorece ou regulariza o fluxo menstrual), insecticida e analéptico (que estimula o SNC ao nível dos centros cardiovasculares e respiratórios). *(Rivera e Obón, 1995)*

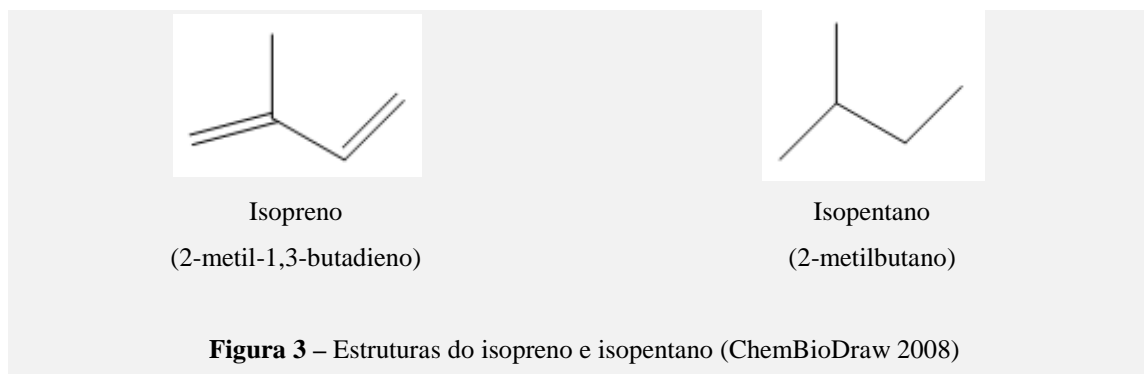
Além do uso medicinal a madre-de-louro tomou importância também em licores e bebidas quotidianas devido ao sabor agradável que proporcionava e porque o povo, no geral, acreditava nas propriedades calmantes que advinham desse consumo. *(Cruz Morais, 1987)*

Cruz Morais (1987) descobriu que as substâncias bioativas da madre de louro são lactonas sesquiterpénicas.

1.2 Lactonas Sesquiterpénicas

As lactonas sesquiterpénicas fazem parte da família dos terpenos, que por sua vez constituem uma vasta família de produtos naturais que apresentam diversas propriedades químicas. *(Campos, 2005; Lobo, 2007; Kaufman, 1999)*

Apesar das várias modificações estruturais possíveis, os terpenos têm uma característica simples e única - são um grupo único de produtos naturais cujas estruturas contêm um esqueleto carbonado composto de várias unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) - dando origem a estruturas que podem ser divididas em unidades de isopentano (2-metilbutano). *(Campos, 2005; Lobo, 2007; Kaufman, 1999)*



Os terpenos são classificados pelo número de unidades de 5-carbonos que contêm:

Hemiterpenos	C ₅
Monoterpenos	C ₁₀
Sesquiterpenos	C₁₅
Diterpenos	C ₂₀
Sesterpenos (muito raros)	C ₂₅
Triterpenos	C ₃₀
Tetraterpenos	C ₄₀

(Kaufman, 1999)

Existe, assim, uma diversidade estrutural enormíssima, que leva a uma grande variedade de compostos de terpenos (ou terpenóides). *(Kaufman, 1999)*

Os terpenos encontram-se apenas nos seres vivos do Reino Vegetal, com raras exceções (como é o caso do esqualeno, em C₃₀, que é o precursor dos esteróides em todos os organismos vivos). *(Campos, 2005; Kaufman, 1999)*

Os monoterpenos e sesquiterpenos são habitualmente constituintes do aroma destas plantas - cânfora, mentol, citrionelal - que são vulgarmente designados por “óleos essenciais”. Estes compostos apresentam uma dupla função nas plantas - ecológica e/ou fisiológica. Por exemplo, muitos deles inibem o crescimento de plantas competitivas (alelopatia); alguns são conhecidos por terem função insecticida; outros têm a capacidade para atrair insectos polinizadores. *(Campos, 2005; Kaufman, 1999)*

Derivados de unidades de isopreno, os sesquiterpenos C₁₅ existem numa grande variedade de formas, incluindo estruturas lineares, bicíclicas e tricíclicas. *(Kaufman, 1999)*

Tal como os monoterpenos, muitos sesquiterpenos fazem parte de óleos essenciais uma vez que pertencem à fracção destilada que muitas vezes contém os componentes odoríferos que caracterizam as plantas.

O farnesol é um componente importante, cujo pirofosfato serve como uma chave intermediária da biosíntese dos terpenóides. (Kaufman, 1999)

As lactonas sesquiterpénicas (LSTs) pertencem a um grupo de metabolitos secundários das plantas que têm recebido uma atenção considerável nas últimas décadas por várias razões. (Schmidt, 1999)

A maioria dos compostos deste tipo possui uma variedade de actividades biológicas e constitui um grande valor ecológico, uma vez que são responsáveis, pelo menos em parte, pelo sucesso evolutivo das plantas. (Schmidt, 1999)

Os tipos básicos de LSTs, isto é, os representantes dos esqueletos de carbono mais frequentes - *germacrolidos*, *eudesmanolidos*, *guaianolidos* e seus derivados - encontram-se em muitas plantas da família Asteracea, em algumas da Apiaceae, Magnoliaceae, Lauraceae e outras. (Schmidt, 1999)

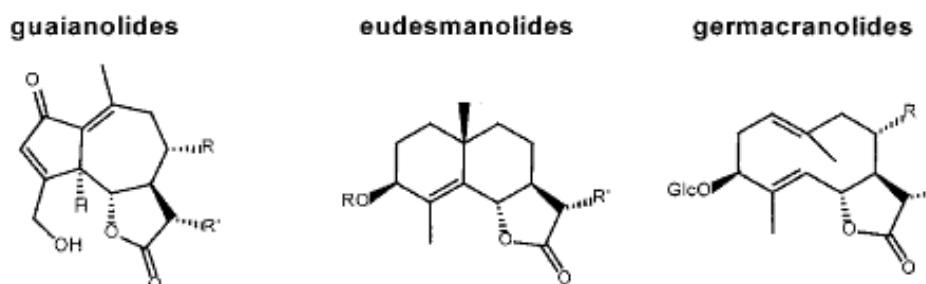


Figura 4 – Imagem dos três tipos básicos de lactonas sesquiterpénicas (Kraker *et al.*, 2002)

As lactonas do tipo germacrolido com funções químicas em C-14 ou C-15, ou em ambos, são os metabolitos secundários típicos de um número considerável de espécies. (Carollo, 2008)

1.2.1 - Biossíntese

Kraker *et al.* (1998) propôs um esquema simplificado (sem os passos oxidativos) para a formação de compostos eudesmanolídeos e guaianolídeos, envolvendo duas enzimas de ciclização – germacreno sintetase e germacreno ciclase – como indicado na figura 5. A literatura sugere que o germacreno tenha como possível intermediário o germacreno A ou B.

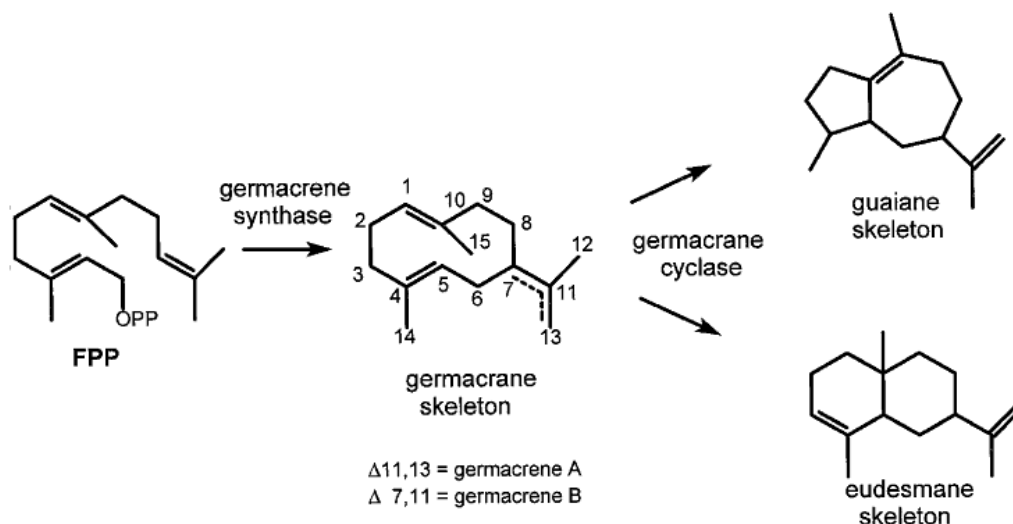


Figura 5 – Esquema simplificado de formação de compostos eudesmanolídeos e guaianolídeos

(Kraker *et al.*, 1998)

Kraker *et al.* (1998) propôs uma via de biosíntese para as lactonas sesquiterpénicas (na planta Chicória) usando a enzima (+)-germacreno sintetase como o ponto de partida (Figura 6). (Não são conhecidas as etapas em que ocorrem os passos oxidativos.)

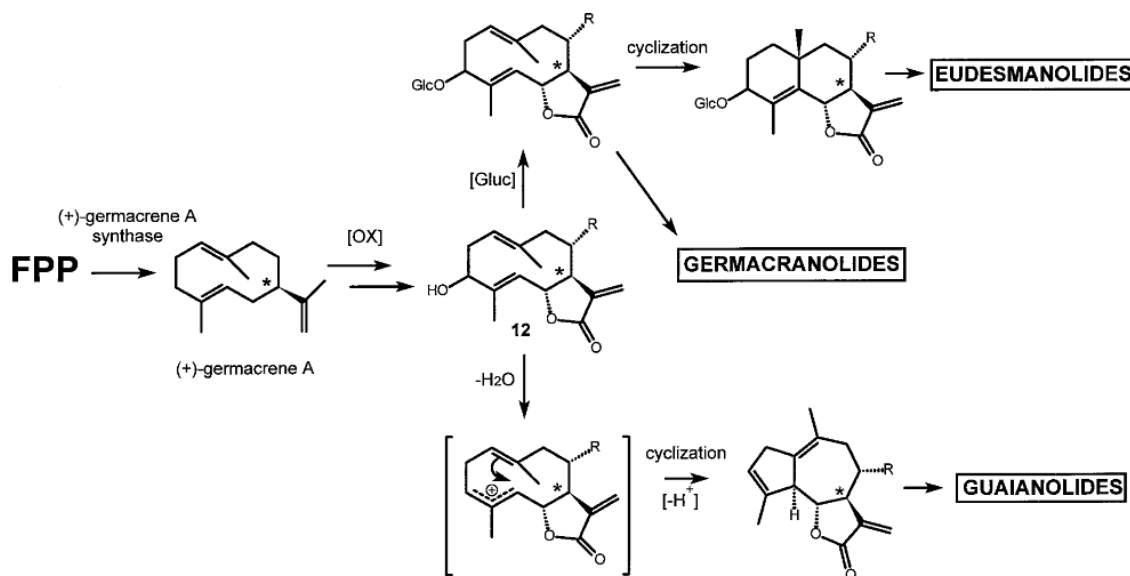


Figura 6 – Possível via biosintética para os três tipos comuns de lactonas sesquiterpénicas

(Kraker *et al.*, 1998)

Os três tipos básicos de lactonas sesquiterpénicas são tidos como originários de um germacrolido comum designado de (+)- costunolida. (Kraker *et al.*, 2002)

Kraker *et al.* (2002) estudou a actividade enzimática dos extractos das raízes da chicória em que o ácido germacranolídeo é convertido em (+)- costunolida. A enzima (+)-costunolida sintetase catalisa o último passo na formação do anel presente nas lactonas sesquiterpénicas e é dependente do NADPH e de oxigénio molecular. Este autor propôs um mecanismo para a biossíntese da (+)- costunolida, a qual é considerada como um importante intermediário na biossíntese das lactonas sesquiterpénicas (Figura 7):

- I. Ciclização do farnesil difosfato (FPP) a (+)- germacranolídeo (A) através de uma reacção enzimática por uma sintetase;
- II. Hidroxilação da cadeia lateral de isopropenil por uma hidroxilase (uma enzima citocromo P450);
- III. Reacções de oxidação catalisadas por desidrogenases dependentes de NAD(P)⁺;
- IV. Hidroxilação na posição C₆ do ácido germacratrien-12-óico (14) e subsequente lactonização irão originar a (+)-costunolida (15).

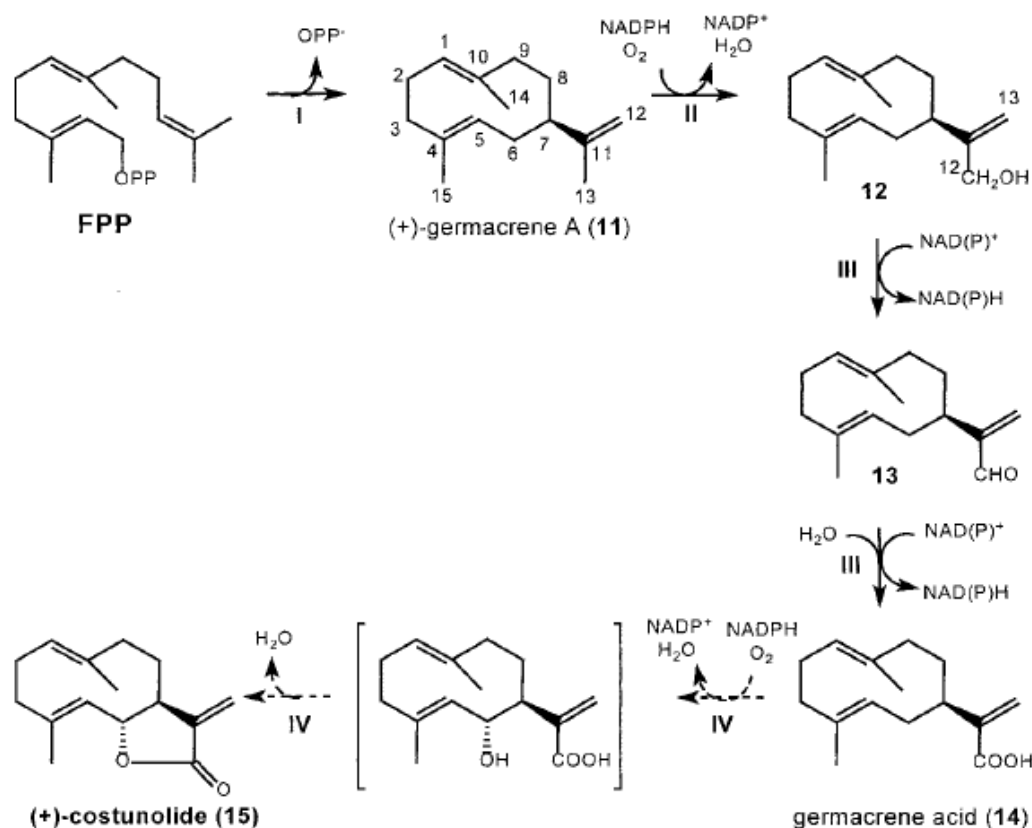


Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de biossíntese da costunolida (Kraker *et al.*, 2002)

Kraker *et al.* (2002) verificou que incubação da lactona dehidrocostonus na presença de NADPH e de um extracto de raízes da chicória produziu um novo composto desconhecido com menor tempo de retenção, com a mesma massa e que exibiu um espectro de massa muito semelhante ao da lactona dehidrocostonus. É provável que seja o resultado de uma isomerização de ligação dupla algures na molécula. (Kraker *et al.*, 2002)

1.2.2 Lactonas Costunolida e Dehidrocostonus

A costunolida pertence à classe dos germacrolidos, possuindo na sua constituição um anel de 10 Carbonos. Esta lactona é, estruturalmente, a forma mais simples de germacrolido, e é geralmente aceite como o composto parental dos três tipos mencionados de lactonas sesquiterpénicas. (Grieco e Nishizawa, 1977, Luna-Herrera *et al.* 2007)

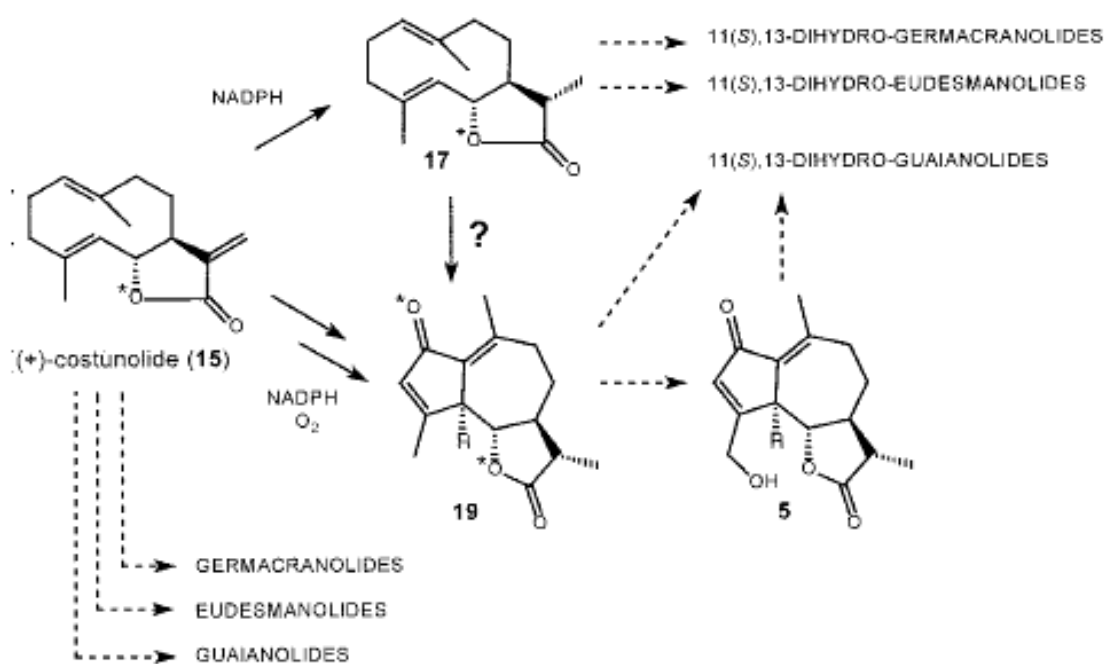


Figura 8 – Formação de outras LSTs através da (+)-costunolida

(Kraker *et al.*, 2002)

Luna-Herrera *et al.* no seu estudo em 2007 demonstrou que as lactonas costunolida e dehidrocostonus são os maiores compostos do extracto metanólico do óleo de louro da Madeira, enaltecendo estes compostos pelas suas várias actividades biológicas.

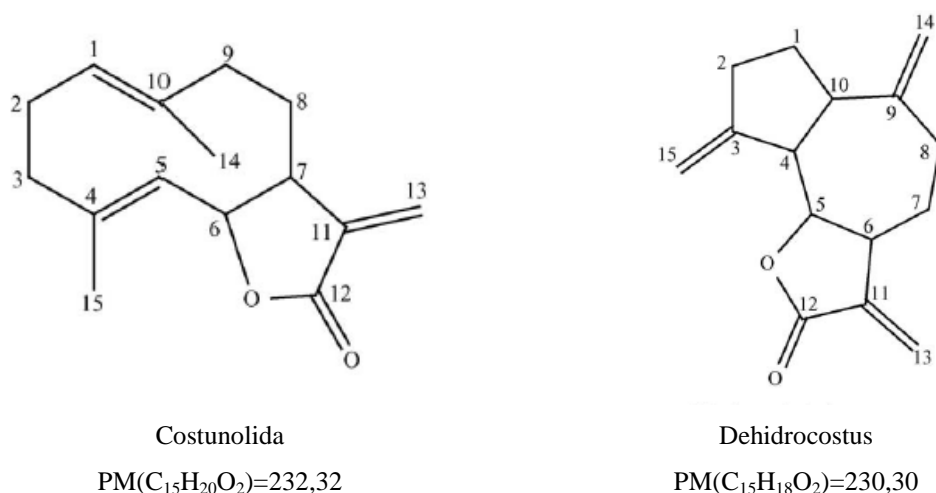


Figura 9 – Estrutura química das lactonas Costunolida e Dehidrocostonus

(Li et al., 2005)

1.2.3 - Actividades biológicas

Estudos recentes têm demonstrado as implicações de reacções de oxidação e radicais livres nos processos de degeneração relacionados com o envelhecimento e com doenças, tais como o cancro, as doenças cardíacas e neurodegenerativas, como por exemplo, Alzheimer. (Pulido et al. 2000)

As defesas antioxidantes que ocorrem no organismo contra espécies de oxigénio reactivas (pró-oxidantes e radicais livres), que são produzidas durante uma respiração celular aeróbica normal, podem ser endógenas (enzimáticas e não enzimáticas) ou de origem alimentar (vitaminas, carotenóides, flavonóides, etc.) (Pulido et al. 2000)

Quando as defesas naturais são surpreendidas com uma produção excessiva de pró-oxidantes, desenvolve-se uma situação de stress oxidativo, podendo ocorrer lesão celular e, deste modo, afectar a função imunitária. O aumento da ingestão de antioxidantes na dieta pode ajudar a manter o equilíbrio antioxidante-oxidante adequado nos organismos vivos. (Pulido et al. 2000)

Estudos epidemiológicos suportam este efeito protector de antioxidantes na dieta: o aumento de ingestão de frutas e vegetais está relacionado com uma redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro. (Pulido et al. 2000)

Os antioxidantes provenientes da dieta alimentar têm mostrado ser um factor maioritariamente responsável pelos efeitos protectores. (Pulido et al. 2000)

Os antioxidantes que ocorrem naturalmente em vegetais folhosos e sementes, tais como o ácido ascórbico, a vitamina *E* e compostos fenólicos possuem a habilidade de reduzir os danos oxidativos associados a muitas doenças, incluindo o cancro, cataratas, aterosclerose, diabetes, artrite, imunodeficiências e envelhecimento. (Siddhuraju and Becker 2003)

Os legumes têm um papel muito importante na dieta alimentar por todo mundo, uma vez que são pobres em gorduras e ricos em proteínas, fibras e numa variedade de micronutrientes e fitoquímicos. Recentemente, foi verificado que os constituintes polifenólicos de variadas sementes de legumes têm potenciais propriedades medicinais, incluindo actividade antioxidante. (Siddhuraju and Becker 2003)

1.2.3.1 Inibição da Acetilcolinesterase na prevenção de doenças neurodegenerativas:

A doença de Alzheimer (AD) é uma desordem crónica neurológica que é caracterizada pela disfunção cognitiva, alteração da memória, distúrbios comportamentais e a dificuldade nas actividades mais básicas do quotidiano. Esta doença tem sido associada a um défice colinérgico no cérebro *post-mortem* caracterizada por um decréscimo significativo de acetilcolina. (Orhan et al., 2004)

A doença de Alzheimer tem se revelado extremamente problemática particularmente em países desenvolvidos, devido ao aumento da esperança média de vida em populações desenvolvidas com qualidade de vida. (Orhan et al., 2004)

A acetilcolina é um neurotransmissor inibido primeiramente pela acetilcolinesterase (AChE) e secundariamente pelo butirilcolinesterase (BChE), e considera-se que tenha um papel importante na patologia de Alzheimer. Ambas as enzimas estão presentes no cérebro e são detectadas entre o emaranhado de neurofibras e placas neuríticas (acumulação de componentes degradados) (Orhan et al., 2004)

Uma das estratégias usadas como tratamento mais eficaz contra a doença de Alzheimer é a elevação da quantidade de acetilcolina pela inibição da enzima AChE. (Orhan et al., 2004)

Os inibidores das enzimas AChE e BChE têm se tornado excelentes alternativas no tratamento desta doença, no entanto os fármacos actuais com actividade inibitória da AChE possuem alguns efeitos secundários e são eficazes apenas numa fase inicial da doença, não havendo também, até ao momento, um fármaco disponível com actividade inibitória da BChE. É por isso vital o desenvolvimento de novos fármacos para o combate da doença de Alzheimer. (Orhan et al., 2004; Mroczek, 2009)

A procura de novas estratégias no desenvolvimento de uma droga para combater a doença de Alzheimer baseia-se em plantas medicinais. (Orhan et al., 2004)

No estudo de I. Orhan (2004), testaram o potencial anti-colinesterase dos extractos de algumas plantas medicinais da Turquia, com o objectivo de descobrir novos compostos anti-colinesterase. (Orhan et al., 2004)

Muitas das plantas testadas revelaram ser eficazes na inibição das enzimas AChE e BChE, numa forma dependente da concentração, em particular, espécies pertencentes às famílias Fumariaceae, Papaveraceae and Ericaceae, que revelaram ser as mais potentes, direccionando os estudos da terapêutica da doença de Alzheimer para estes produtos naturais. (Orhan et al., 2004)

Uma vez que a maioria dos inibidores de AChE são conhecidos por conter azoto, a elevada actividade destes extractos poderá ter a ver com a sua riqueza em alcalóides, no entanto são necessários mais estudos sobre este tema. (Orhan et al., 2004)

1.2.3.2 Efeitos inibitórios na absorção de álcool:

A ingestão momentânea de grandes quantidades de álcool pode induzir a uma toxicidade aguda com acidose, falência cardíaca e depressão respiratória causadas por disfunções cerebrais. (Yoshikawa et al., 2000)

O consumo prolongado de grandes quantidades de álcool induz o aparecimento de várias condições patológicas afectando a integridade de vários órgãos como por exemplo, o fígado, o tracto gastrointestinal, o pâncreas e o sistema cardiovascular, provocando também distúrbios do foro psíquico e social. (Yoshikawa et al., 2000)

Para o tratamento do alcoolismo são usadas várias terapêuticas, umas das quais consiste na toma de benzodiazepinas e inibidores da enzima aldeído-desidrogenase. A primeira pode causar dependência psicológica e levar ao abuso no seu consumo resultando noutras complicações, e a segunda demonstra provocar sérios sintomas de toxicidade. Tudo isto impulsiona uma necessidade na procura de terapêuticas mais seguras na prevenção e tratamento do alcoolismo. (Yoshikawa et al., 2000)

Yoshikawa et al. (2000) verificou que o extracto metanólico e uma fracção solúvel em acetato de etilo das folhas de *L. nobilis* inibiam o aumento dos níveis de etanol no sangue de ratos. As lactonas costunolida e dehidrocostus foram identificadas nessas fracções e foi demonstrado que um anel de α -methylene- β -butyrolactone (α -MGBL), presente em ambas as moléculas, é o responsável pela inibição do aumento de etanol do sangue. (Yoshikawa et al., 2000)

Outros estudos mostraram que a administração oral da costunolida ou de α -MGBL, isolados do extracto metanólico das folhas do *L. nobilis*, atrasavam a sensação de estômago vazio e causavam a estagnação do suco gástrico em ratos carregados de etanol, sendo este processo da responsabilidade do grupo α -MGBL. (Yoshikawa *et al.*, 2000)

Estes resultados sugerem que as lactonas sesquiterpénicas têm um efeito preventivo potente para a toxicidade aguda por álcool, podendo também ser disponibilizados na reabilitação de alcoólicos. (Yoshikawa *et al.*, 2000)

Tinoco *et al.* (2009) vem reforçar os resultados obtidos por Yoshikawa *et al.* (2002), ao observar as propriedades gastro-protectoras do extracto hexânico das folhas de *L. novocanariensis*, em casos de distúrbios causados pela ingestão de álcool, dando grande importância à presença das lactonas costunolida e dehidrocostus.

O estudo foi realizado em ratos Wistar, no qual verificou-se que os animais tratados com o extracto hexânico, antes da administração oral de álcool, apresentaram uma menor concentração de álcool no sangue em relação ao grupo testado apenas com álcool. (Tinoco *et al.*, 2009)

Os resultados sugerem que a inibição observada parece estar relacionada com o atraso no esvaziamento gástrico causado pelas lactonas sesquiterpénicas, aumentando o tempo de exposição da enzima álcool desidrogenase (ADH), acelerando assim o metabolismo gástrico do etanol. Desta forma a quantidade de álcool não metabolizado é reduzida, o qual, é tido como o causador de disfunções celulares. (Tinoco *et al.*, 2009)

1.2.3.3 Efeitos citotóxicos e quimiopreventivos em células tumorais:

A costunolida, um composto sesquiterpénico comum a várias espécies, tem sido conhecida por possuir efeitos citotóxicos e quimiopreventivos em várias células cancerígenas humanas. (Choi *et al.*, 2005)

Sang-Ho Choi *et al.* (2005), estudou a inibição do crescimento de duas linhas celulares do cancro da mama Humano – tipo selvagem p53 MCF-7 e mutante p53 MDA-MB-231 - na presença da costunolida. Neste estudo a costunolida foi isolada do caule da *Magnolia sieboldii* da Coreia. (Choi *et al.*, 2005)

A telomerase é uma ribonucleoproteína específica que tem um papel vital no processo de proliferação celular, como um importante mecanismo de protecção contra os erros de finalização da replicação, adicionando uma sequência repetida – TTAGGG – aos telómeros.

A maioria das células humanas normais não apresentam actividade detectável da telomerase, mas, isto é observado na maioria das células cancerígenas. A actividade da telomerase está, portanto, associada à imortalização celular e à tumorigénese. (Choi *et al.*, 2005)

Neste estudo, verificou-se que a costunolida inibiu o crescimento e a actividade da telomerase das células MCF-7 (tipo selvagem p53) e MDA-MB-231 (mutante p53), numa forma dependente dos parâmetros concentração e tempo. Este efeito foi associado e mediado (pelo menos em parte) por uma diminuição significativa da actividade da telomerase. (Choi *et al.*, 2005)

Com os resultados obtidos é sugerido que esta lactona possa liderar futuras experiências relacionadas com o mecanismo molecular ocorrido na inibição da actividade da telomerase, assim como em estudos *in vivo* e clínicos tendo com alvo esta proteína. (Choi *et al.*, 2005)

Em termos de patologia maligna nos homens, o cancro da próstata permanece, actualmente, a ser um dos maiores problemas. A mortalidade proveniente deste tipo de cancro deriva das metástases que espalham-se para os ossos e linfa, e na progressão do crescimento do cancro, inicialmente dependente de androgénio passando a ser independente desta hormona. (Kim *et al.*, 2008)

Num estágio em que o crescimento do cancro depende do androgénio, o tratamento é eficaz na terapêutica de privação do mesmo, no entanto, na maioria dos pacientes, o cancro progride para uma fase fatal em que o seu crescimento torna-se independente do androgénio, deixando de responder ao tratamento inicial. Daí a necessidade de desenvolver estratégias quimiopreventivas usando agentes anti-cancerígenos. (Choi *et al.*, 2005)

Kim *et al.* no seu estudo em 2005 pretendia determinar se o extracto hexânico de *Saussurea lappa* (HESL) induzia a apoptose em células tumorais da próstata DU145 (insensíveis ao androgénio).

Os resultados demonstraram que o HESL inibe o crescimento celular e induz a apoptose. (Kim *et al.*, 2008)

Isolaram, ainda, o princípio activo do HESL - a lactona dehidrocostus (DHCL) - a qual também demonstrou induzir a apoptose nas células DU145. (Kim *et al.*, 2008)

Este estudo (em culturas de células) providenciou algumas bases moleculares no uso de HESL e DHCL como potenciais agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos, no entanto, e apesar da demonstração de que pequenas quantidades de HESL e DHCL inibem o crescimento celular, são necessários estudos experimentais em modelos animais, de modo a avaliar o seu potencial como agentes anti-carcinogénicos. (Kim *et al.*, 2008)

1.2.3.4 Efeitos protectores na resposta dos osteoblastos ao stress oxidativo:

A formação e manutenção da estrutura óssea são asseguradas pelo equilíbrio entre a actividade de dois tipos de células. Os osteoblastos produzem os componentes assegurando a formação óssea, enquanto os osteoclastos permitem a remoção dos componentes, do osso ‘antigo’, a serem eliminados. Este ciclo é assegurado por diversas hormonas e factores locais. (Choi *et al.*, 2009)

Os osteoblastos podem produzir antioxidantes de modo a proteger a estrutura óssea de espécies de oxigénio reactivas, enquanto os osteoclastos produzem o superóxido, contribuindo para a degeneração óssea. (Choi *et al.*, 2009)

O desequilíbrio deste ciclo, em que a actividade dos osteoclastos é superior à actividade dos osteoblastos, está na origem de diversas doenças ósseas incluindo a osteoporose. O stress oxidativo, resultante de níveis elevados de espécies de oxigénio reactivas, representa a maior causa de danos e de morte celular num largo leque de condições patológicas incluindo a osteoporose, em que é observado um aumento significativo de marcadores de stress no sangue. (Choi *et al.*, 2009)

Os fármacos desenvolvidos para a prevenção e tratamento da osteoporose funcionam pela inibição da degeneração óssea, mas falham no aumento significativo de massa óssea. Torna-se necessário então conseguir desenvolver agentes de formação óssea, que possam simular a formação do osso e corrigir a microarquitECTURA trabecular característica da osteoporose. (Choi *et al.*, 2009)

O desenvolvimento de agentes para o aumento da formação óssea, deverá ser direccionado no sentido em que estes actuem seja no aumento da proliferação da linha celular osteoblástica ou na indução da diferenciação dos osteoblastos. (Choi *et al.*, 2009)

Um modelo usado comumente no estudo do desenvolvimento osteogénico é a linha celular osteoblástica MC3T3-E1, uma vez que em cultura, estas células são caracterizadas por uma proliferação distinta e estádios diferenciados, produzindo, assim um programa temporal consistente com a diferenciação dos osteoblastos ocorrente na formação do osso *in vivo*. (Choi *et al.*, 2009)

Eun Mi Choi *et al.*, (2009) investigou os efeitos da lactona dehidrocostus nas mudanças de função osteoblástica e nas modificações oxidativas após exposição ao peróxido de hidrogénio (H₂O₂) usando células MC3T3-E1. (Choi *et al.*, 2009)

O estudo demonstrou que o H₂O₂ induzido pela disfunção osteoblástica está associado com os danos oxidativos nas proteínas e lípidos nas células MC3T3-E1. Este estudo sugere, ainda, a habilidade protectora da lactona dehidrocostus contra o stress oxidativo (induzido na inibição da diferenciação osteoblástica).

As terapias com antioxidantes, especialmente quando combinadas com tratamentos existentes, podem então representar uma hipótese viável na terapêutica de condições patológicas ósseas associadas com o aumento do stress oxidativo. (Choi et al., 2009)

Os resultados demonstram que a lactona dehidrocostus pode proteger os osteoblastos da disfunção celular induzida pelo H₂O₂, sugerindo o potencial desta lactona como um agente protector dos danos oxidativos nos osteoblastos. (Choi et al., 2009)

1.2.3.5 Actividade anti-micobacteriana:

A ressurgência da tuberculose (TB) é um dos maiores desafios da saúde pública do século 21. Apesar de esforços para o seu controlo, a TB permanece como líder nas causas de doenças e morte pelo mundo todo. O recente aumento de TB está associado com a emergência do vírus humano de imunodeficiência (HIV) e com a rápida difusão de estirpes de TB multi-resistentes a fármacos. (Luna-Herrera et al., 2007)

Existe uma necessidade para o desenvolvimento de compostos da classe dos antibióticos com actividade contra estas estirpes. Os compostos puros que ocorrem na natureza, assim como os extractos de plantas e organismos terrestres e marinhos, têm indicado que a actividade inibitória, contra a *Mycobacterium tuberculosis*, está espalhada na natureza. (Luna-Herrera et al., 2007)

O nosso grupo tem vindo a desenvolver um estudo cujos objectivos se baseiam na determinação do potencial micobacteriano do óleo de louro, das suas fracções e das suas duas lactonas sesquiterpénicas contra várias estirpes micobacterianas, e em estabelecer a possibilidade de ocorrência de alguns efeitos sinérgicos entre as lactonas usando uma modificação do micro-ensaio fluorimétrico Alamar Blue (FMABA). (Luna-Herrera et al., 2007)

Os resultados já realizados confirmaram o facto de que ambas as lactonas – costunolida e dehidrocostus - apresentam uma importante acção inibitória contra ambas as estirpes de *M. tuberculosis* (uma susceptível e outra resistente às drogas), potenciando esta acção com a junção das lactonas, o que leva à conclusão a existência de actividades de sinergia entre as lactonas, aumentando a actividade biológica. (Luna-Herrera et al., 2007)

A demonstração do potencial sinérgico das lactonas existentes no óleo de louro com actividade inibitória micobacteriana potencia a possibilidade de uso deste produto natural como um adjuvante da terapêutica actual usada nos pacientes recentemente diagnosticados com a TB. (Luna-Herrera et al., 2007)

Com a informação recolhida, os trabalhos futuros podem ser direccionados na obtenção de fracções enriquecidas com a mistura das lactonas costunolida e dehidrocostus (com efeito sinérgico), eliminando procedimentos trabalhosos de purificação, melhorando resultados e reduzindo os custos, originando assim uma nova geração de agentes antituberculose do tipo não-antibióticos. (Luna-Herrera et al., 2007)

1.3 Ensaios de bioactividade

Uma forma de complementar os estudos fitoquímicos é associá-los a ensaios biológicos simples no intuito de seleccionar e direccionar a pesquisa de extractos de plantas na procura de substâncias bioactivas. (Nascimento et al. 2008)

Os compostos bioactivos são quase sempre tóxicos em doses elevadas. (Dey e Harnorne, 1991)

1.3.1 Toxicidade sobre *Artemia salina*

Um dos parâmetros principais a ser avaliado cientificamente, em relação à bioactividade dos produtos de uma determinada planta, em terapias clássicas ou alternativas, é o seu potencial tóxico. (M. Leite et al. 2009)

Dentro dos bioensaios, encontra-se o método que avalia a toxicidade sobre *Artemia salina* Leach (Figura 10). Esta espécie designa um microcrustáceo de água salgada comumente usada como alimento para peixes. (Luna et al., 2005; Nascimento, et al. 2008).

Este microcrustáceo pertence à divisão dos Artrópodes, à classe dos Crustáceos, estando inserido na subfamília Branchiopoda e na ordem Anostraca. Tem um comprimento de 8 a 10 mm e a sua coloração pode variar conforme o habitat (vermelho claro, rosa ou acastanhado). (Leite et al. 2009)

A larva reproduz-se rapidamente e os seus ovos desidratados podem ser armazenados aproximadamente por 10 anos, mantendo a capacidade de eclosão quando expostos à água salina. (M. Leite et al. 2009)

O uso de larvas de camarão como bioensaio de citotoxicidade tem como vantagens: a sua disponibilidade comercial, a simplicidade com que pode ser manuseado (não requerendo condições especiais para o mesmo), a rapidez dos ensaios (eclosão em 48h e teste em 24h), o seu baixo custo, e a requisição de pouca quantidade de substância, favorecendo assim, a sua utilização rotineira e reprodutível em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral. (Luna *et al.*, 2005; Nascimento, *et al.* 2008; Harwig e Scott, 1971; Dey e Harnorne, 1991)

Este bioensaio tem sido estabelecido como um método seguro, prático, económico, rápido e eficiente na determinação da bioactividade tanto de compostos sintéticos, como de produtos naturais (de plantas). (Silva *et al.* 2007; Leite *et al.* 2009)

A *Artemia salina* L. tem sido usada em larga escala nas mais variadas áreas, tais como, na quantificação do potencial anestésico, na avaliação da toxicidade de vários produtos sintéticos (*insecticidas, pesticidas, antibióticos e materiais dentários*) e produtos naturais (*sais de metais pesados, algas, produtos de plantas, toxinas de bolores*), tomando grande importância como teste preliminar dos efeitos inibitórios de carcinogéneos. (Harwig e Scott, 1971; Leite *et al.* 2009; Dey e Harnorne, 1991)

A correlação entre o ensaio de larvas de camarão e a inibição *in vitro* do crescimento de linhas de células tumorais humanas tem sido satisfatória, demonstrando propriedades citotóxicas para alguns tumores humanos, validando este bioensaio como uma ferramenta de testes prévios na procura de fármacos anti-tumorais. (Silva *et al.* 2007; Leite *et al.* 2009).



Figura 10 - Artemia salina

(http://www.hlasek.com/artemia_salina_6908.html (visualizado a 01-09-2010))

1.3.2 Alelopatia

A alelopatia pode ser definida como um processo pelo qual produtos – um químico, ou um conjunto de químicos - do metabolismo secundário de um determinado vegetal são libertados e influenciam directamente o desenvolvimento e crescimento de outro. Esta inibição alelopática interfere com vários processos fisiológicos. (Alves *et al.*, 2004; Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003; Einhelling, 1996)

A produção de substâncias alelopáticas está fortemente relacionada com vários tipos de stress - bióticos e abióticos - do ambiente em que se encontra o vegetal, incluindo insectos e doenças, temperaturas extremas, variados nutrientes e misturas, radiação e herbicidas, por isso podemos dizer que são induzidas por stress ambiental.

Os aleloquímicos são induzidos por vários tipos de stress - na figura 11 (em baixo) estão representados alguns exemplos - elevada radiação de UV, lesão dos tecidos e ataque de patogénicos.

O stress leva a planta a desenvolver uma resposta de protecção, que baseia-se na produção de substâncias químicas que são transportadas e expostas ao ambiente em redor resultando em respostas alelopáticas. (Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003)

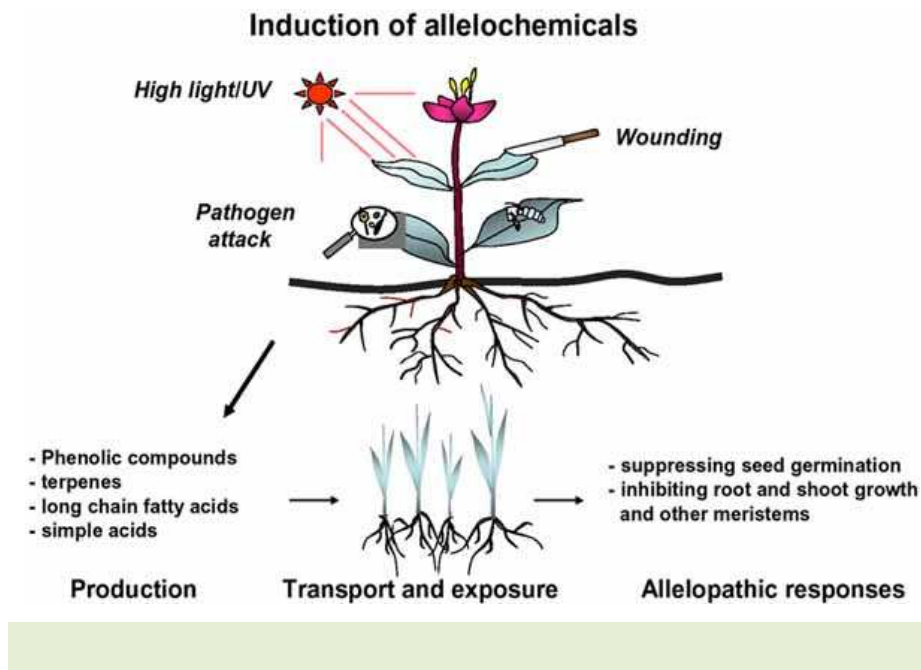


Figura 11 - Indução dos aleloquímicos por stress biótico e abiótico. (Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003)

Resposta alelopática:

Os organismos que são expostos aos aleloquímicos (alomonas) poderão sofrer consequências como: a supressão da germinação das sementes e/ou a inibição do desenvolvimento dos vários tecidos, impedindo o crescimento da planta.

Dependendo de várias condições próprias de cada espécie e de cada indivíduo (genética, metabolismo celular, etc) a resposta destes organismos (expostos aos aleloquímicos) pode variar. Por isso a resistência ou tolerância aos metabolitos secundários é uma característica espécie-específica. (Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003; Einhelling, 1996)

Além dessas condições intrínsecas, as interacções de múltiplos stresses – bióticos e abióticos - nos cultivares também irão determinar o impacto relativo da alelopatia. (Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003)

Como exemplo de espécies mais sensíveis temos a *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* M. (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino). Devido à sua sensibilidade aos aleloquímicos são consideradas plantas indicadoras de actividade alelopática, sendo as mais comumente analisadas em laboratório.

Nos estudos e experiências realizadas para que uma planta seja indicada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas. Este mecanismo de inibição alelopática que ocorre na natureza é um mecanismo muito interessante e muito vantajoso. (Alves et al., 2004)

As interacções por stresses alelopáticos têm implicações nas estratégias como herbicidas e controlo de infestantes, rotações de cultivares, medidas biológicas de controlo, e práticas de cultivo que podem contribuir para uma agricultura mais sustentável.

As substâncias alelopáticas, se presentes em variedades de culturas - plantas ou produtos agrícolas - podem reduzir a necessidade de protecção de ervas invasoras, por produtos herbicidas (sintéticos). (Weston, 1996; Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003)

A alelopatia por si só poderá não ser uma tecnologia perfeita na eliminação das ervas parasitas, mas pode ser uma ferramenta suplementar no seu controlo.

Uma estratégia que vale a pena explorar é a possibilidade de incorporar traços alelopáticos nos diversos cultivares, o que poderá reduzir ou mesmo anular a necessidade para aplicar herbicidas ao cultivo. (Kil-Ung Kim e Dong-Hyun Shin, 2003)

1.4 Isolamento e purificação dos compostos bioativos

Na tentativa de isolar as lactonas costunolida e dehidrocostus com uma elevada percentagem de pureza e identificá-las com um elevado grau de certeza surgiram alguns estudos com resultados interessantes.

O método descrito por Li *et al.* (2005) foi o primeiro a ser bem sucedido na separação das lactonas costunolida e dehidrocostus por high-speed counter-current (HSCCC). Este autor utilizou a técnica de HSCCC para o isolamento e purificação das lactonas costunolida e dehidrocostus a partir da planta chinesa medicinal *Aucklandia lappa Decne* (Muxiang em chinês), usando solventes de duas fases petróleo light-metanol-água (5:6,5:3,5. v/v/v), sendo que a fase superior de petróleo light-metanol-água (5:6,5:3,5. v/v/v) foi usada como fase estacionária. (Li *et al.* 2005)

Foram obtidas 35,7 mg de costunolida e 43,6 mg de dehidrocostus com a pureza de 100% e 99,6%, respectivamente, através dum processo de separação de um passo a partir de 110mg de extracto de raízes da *Aucklandia lappa Decne*. As estruturas das lactonas foram identificadas por ^1H NMR e ^{13}C NMR. (Li *et al.* 2005)

Outros autores, nomeadamente, Ferrari *et al.* (2005) tiveram sucesso na identificação directa e na determinação da quantidade das lactonas costunolida e dehidrocostus, no óleo de *Laurus novocanariensis*, por análise do espectro de ^{13}C -NMR, sem o processo de separação prévia dos constituintes (glicéridos), nem derivatização ou qualquer preparação da amostra. (Ferrari *et al.* 2005)

Muitos métodos têm sido desenvolvidos na quantificação da costunolida e da dehidrocostus em extractos de plantas, baseados em separação por HPLC (high-performance liquid chromatography) com detecção UV (ultravioleta), espectroscopia ^{13}C NMR, TLC (Thin-layer chromatography) e HSCCC (high-speed counter current chromatography), não existindo, no entanto, na literatura disponível a avaliação destas lactonas em matrizes biológicas. (Hu *et al.* 2010)

Os ensaios com amostras biológicas são muito mais complicados que com matrizes não-biológicas. A ausência de estudos detalhados de bio-disponibilidade e de farmacocinética das lactonas costunolida e dehidrocostus deve-se à falta de procedimentos analíticos fiáveis para a análise destes compostos em matrizes biológicas. (Hu *et al.* 2010)

Mais recentemente, no estudo de Hu *et al.* (2010) foi desenvolvido um método cromatográfico UPLC-MS/MS (ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) para a quantificação das lactonas costunolida e dehidrocostus em plasma de ratos. O método baseou-se na precipitação das proteínas com acetonitrilo, seguida pela separação por cromatografia líquida isocrática de alta performance usando uma fase móvel de metanol-ácido fórmico (0,1% em água; 70:30 v/v). (Hu *et al.* 2010)

A detecção ocorreu por espectrometria de massa ESI (electrospray ionization) em modo iónico positivo usando MRM (multiple reactions monitoring).

O espectro de massa da costunolida e da dehidrocostus apresentaram $[M + H]^+$ a m/z 233 como o ião principal e alguns fragmentos a m/z 215 e 187, e $[M + H]^+$ a m/z 231 como o ião principal e alguns fragmentos a m/z 213 e 185, respectivamente. (Hu *et al.* 2010)

Este método demonstrou ser preciso, reprodutível, específico e aplicável a avaliações de perfis farmacocinéticos das lactonas costunolida e dehidrocostus em ratos, podendo ser um método promissor para a avaliação de parâmetros farmacocinéticos em humanos. (Hu *et al.* 2010)

2. Procedimento experimental

Aqui encontram-se descritos todos os procedimentos realizados no trabalho laboratorial. Os reagentes, material de TLC e outro encontram-se descritos nos anexos.

Antes de passar aos passos complexos de separação e purificação, é de vital importância a preparação da amostra, de modo a eliminar parte dos compostos que não são de interesse para o estudo em questão. (*Hostettmann et al.,2001*)

Ao criar protocolos iniciais de purificação, é normal que os primeiros passos combinem alta capacidade com baixo poder de resolução. As técnicas mais clássicas e muito úteis incluem uma extracção selectiva, filtração e cromatografia em coluna aberta, entre outros. (*Hostettmann et al.,2001*)

2.1 Extracção

A escolha do procedimento de extracção depende da natureza do material e dos compostos a serem isolados. Primeiro é necessário estabelecer o objectivo da extracção. (*Sarker et al., 2006*)

A forma inicial mais óbvia para preparar correctamente a amostra é a eleição adequada do(s) solvente(s) de extracção. Com uma extracção inicial com solventes de baixa polaridade obtêm-se os compostos mais lipofílicos enquanto com solventes mais polares obtêm-se um amplo espectro de material polar e apolar. (*Hostettmann et al.,2001*)

O processo de extracção típico, especialmente para as plantas, envolve diversos passos, um dos quais baseia-se em secar e triturar o material, procedendo posteriormente à maceração com solventes de polaridades diferentes. (*Sarker et al., 2006*)

O fungo foi colhido na zona da Portela sob autorização da Direcção Regional de Florestas.

O fungo colhido fresco foi posto a secar num local protegido da luz num ambiente sem humidade, e depois triturado para ficar em pó. Seguiu-se a maceração com solventes de diferentes polaridades - Hexano, Diclorometano, Clorofórmio e Metanol - na proporção (100g fungo: 1L de solvente). Após 24h de extracção, procedeu-se à filtração adicionando carvão activo de modo a retirar clorofilas, levando depois ao rotavapor para evaporação do solvente.

2.2 Fraccionamento do extracto hexânico da Madre de Louro

Para o fraccionamento e caracterização dos compostos de interesse – lactonas dehidrocostus e costunolida - dos extractos, foram usadas várias técnicas de Cromatografia e Espectroscopia.

Uma vez que o extracto de um produto natural contém muitos compostos torna-se difícil aplicar uma única técnica de separação para isolar individualmente os compostos da mistura bruta. De modo a contornar este problema, procede-se ao fraccionamento, ou seja, separa-se inicialmente o extracto bruto em várias fracções contendo compostos com polaridades ou tamanhos moleculares semelhantes. (Sarker *et al.*, 2006)

2.2.1 Técnicas de Cromatografia

A cromatografia, por definição clássica, é um processo de separação em que a resolução é conseguida pela distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases: estacionária e móvel. (Scott, 1997)

Os componentes que fixam-se preferencialmente na fase estacionária são mais retidos no sistema em relação aos que são distribuídos na fase móvel. Como consequência os solutos são eluídos pelo sistema conforme o seu aumento de coeficientes de distribuição, permitindo assim a sua separação. (Scott, 1997)

Em relação à fase estacionária, esta pode ser um gás ou um líquido o qual origina duas formas de cromatografia: Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida (LC). A fase estacionária divide-se em sólida e líquida, originando dois subgrupos de GC e LC, nomeadamente Cromatografia Gás-Sólido (GSC) e Cromatografia Gás-Líquido (GLC), juntos com a Cromatografia Líquido-Sólido (LSC) e Cromatografia Líquido (LLC). (Scott, 1997)

A Cromatografia de Camada Fina - TLC (Thin Layer Chromatography) – foi introduzida para descrever algumas formas de Sistemas Cromatográficos laminares, Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para separações baseadas em tamanhos moleculares, Cromatografia de fase reversa (RPC) para separações cromatográficas que são determinadas por interacções dispersivas com a fase estacionária, e existam ainda muitas outras. (Scott, 1997)

A Cromatografia de camada fina é, basicamente, uma forma de LSC (Liquid Solid Chromatography), mas com duas diferenças distintas.

A separação é conseguida numa folha laminar de fase estacionária, ao contrário da coluna cilíndrica, e a fase móvel não é bombeada através do sistema, mas permitida a percorrer através da camada de fase estacionária por forças de tensão superficiais. (Scott, 1997)

A fase estacionária, usualmente sílica ou sílica salinizada, encontra-se em toda a superfície de uma placa de vidro na qual é colocado um ponto da amostra na parte de baixo e é depois mergulhada numa câmara (recipiente) contendo a fase móvel, onde ocorre a separação. (Scott, 1997)

À medida que o solvente sobe na placa, os solutos são eluídos por diferentes distâncias ao longo da placa, e a separação é conseguida. Esta técnica é limitada no seu poder de resolução e no tamanho da amostra no entanto é uma técnica relativamente económica, tornando-se um procedimento eleito. (Scott, 1997)

2.2.1.1 TLC:

Recorreu-se à técnica de cromatografia em camada fina (TLC) como teste qualitativo em várias fases do trabalho laboratorial: Numa fase inicial dos extractos obtidos para testar e determinar qual o melhor sistema de eluentes para a separação dos compostos; Durante a cromatografia em coluna para verificar as fracções obtidas; Testes qualitativos do DPPH e de inibição da acetilcolinesterase.

Escolha de eluentes e do revelador adequado:

De seguida encontra-se uma tabela com os vários sistemas de eluentes testados;

Tabela 1 – Sistemas de eluentes testados		
Extracto em:	Eluentes	Proporção (mL)
Éter de Petróleo/Hexano, DCM, Clorofórmio	Hexano : Éter dietílico	45 : 5
	Hexano : Éter dietílico	40 : 10
	Hexano : Éter dietílico	40 : 20
	Hexano : Éter dietílico	10 : 40
	Hexano : Éter dietílico	20 : 30
	Hexano : Éter dietílico	25 : 25
	Hexano : Éter dietílico	75 : 25
	Hexano : Éter diet. : Acet. Etilo	75 : 25 : (3gotas)
	Hexano : Acetona	24 : 76
Metanol	Clorofórmio	100 %
	Acetato de etilo : MetOH	38 : 2
	Acetato de etilo : MetOH	55 : 5
	Acetato de Etilo : DCM	25 : 25

Para os extractos em Éter de Petróleo/Hexano, em DCM e em Clorofórmio o sistema de eluentes que foi escolhido como o mais adequado foi o Hexano:Éter dietílico (75:25), enquanto para o extracto metanólico o mais adequado foi o Acetato de etilo : MetOH (55 : 5).

O revelador Lieberman-Bouchard foi testado e demonstrou ser adequado para os compostos analisados.

Preparação da solução Lieberman-Bouchard: Junta-se 5mL de anidrido acético com 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e adiciona-se cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, enquanto se arrefece em banho de gelo. Aquece-se a placa de TLC após ter sido pulverizada a 100°C.

Procedimento: Numa placa coloca-se duas gotas da amostra na linha de aplicação, transferindo a placa para uma câmara de cromatografia saturada com o sistema de eluentes escolhido, tapando e esperando que a eluição fique completa. Após eluição retira-se a placa da câmara e desenha-se a linha do solvente, vaporizando a mesma com o revelador escolhido.

A visualização dos compostos eluidos e separados pode ser feita pelo aparecimento de manchas de cor, ou com a ajuda de uma câmara de luz ultravioleta com o comprimento de onda nos 366 nm.

A figura abaixo representa um esquema de cromatografia em camada fina, com os compostos principais revelados – dehidrocostus (rosa) e costunolida (verde) - e os seus factores de retenção (Rf). O factor de retenção foi calculado através da divisão da distância percorrida pelo soluto pela distância percorrida pelo eluente.

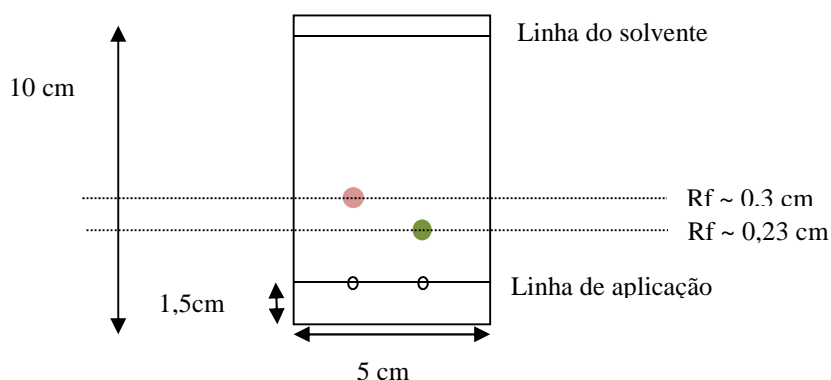


Figura 12 - Esquema de uma placa de TLC com as lactonas reveladas.

2.2.1.2 Cromatografia em camada fina Preparativa:

Testou-se o procedimento em cromatografia preparativa em várias fases do trabalho experimental: Para fraccionar o extracto de Madre de Louro em Éter de Petróleo de modo a obter fracções contendo compostos com composição semelhante; Para tentar separar as lactonas dos restantes compostos obtidas no fraccionamento do extracto por colunas cromatográficas abertas.

Na cromatografia preparativa, a maior grossura da camada contendo a fase estacionária (sílica) permite uma aplicação de maiores quantidades de amostra. Além disso, após o processo de eluição a amostra pode ser raspada e extraída para recuperar os analitos. (Miller 2005)

Este teste decorre basicamente como o anterior embora além de servir para qualificar, serve também para quantificar os compostos separados.

O processo de aplicação da placa decorre ao longo de toda a linha de aplicação, sendo que nas margens (ambas) procede-se como anteriormente – aplicação de duas gotas do composto, que vão servir como indicadores.

Após eluição numa câmara saturada, com o sistema de eluentes escolhidos, os compostos são revelados, com o relevador seleccionado, nas margens da placa, procedendo-se à raspagem da sílica (entre as margens) contendo os compostos de interesse.

A sílica e os compostos eluídos são moídos num almofariz e transferidos para um erlenmeyer com solvente (Hexano) e põe-se em agitação contínua por cerca de 24h para extrair os compostos de interesse. Posteriormente, procedemos à filtração para um balão e vai ao rotavapor para evaporação do solvente, de modo a obtermos os compostos separados.

A figura abaixo representa um esquema de cromatografia preparativa, com os compostos principais revelados – as lactonas dehidrocostus (rosa) e costunolida (verde).

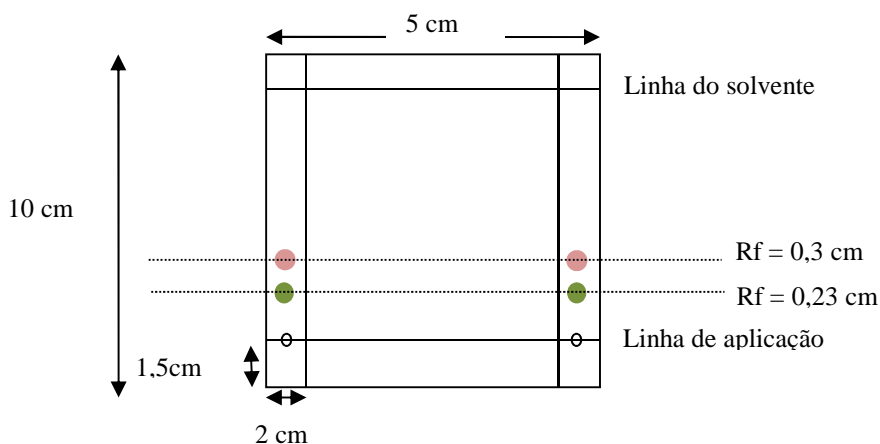


Figura 13 - Esquema de uma placa de cromatografia preparativa.

Nota: Nos Resultados e Discussão são indicadas as condições utilizadas nesta técnica, nomeadamente, a quantidade de amostra testada e o sistema de eluentes escolhido.

2.2.1.3 Cromatografia em coluna aberta:

A técnica de cromatografia em coluna aberta convencional é utilizada universalmente devido à sua simplicidade de preparação. (Hostettmann et al., 2001)

Recorreu-se à técnica de cromatografia em coluna aberta para a separação dos compostos do extracto hexânico da Madre-de-louro, usando sílicagel (0,035-0,070 nm, 60 Å) como preenchimento. Testou-se a separação do extracto hexânico do fungo por cromatografia em coluna alterando alguns parâmetros:

- Sistemas de eluentes:
 - ✓ Hexano: Éter dietílico;
 - ✓ Hexano: Acetato de Etilo;
 - ✓ Hexano: Ciclohexano: Acetato de Etilo;
- Quantidade de solvente adicionada: testou-se com 100mL e com 50mL;
- Coluna: Dimensões (altura e diâmetro);
- Rácio amostra:sílica (mg:mg):
 - ✓ 1 : 30
 - ✓ 1 : 60

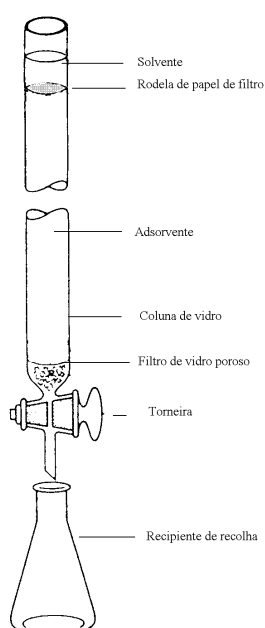


Figura 14 – Representação esquemática (à esquerda) e fotografia (à direita) de uma cromatografia em coluna

Procedimento: Procede-se ao enchimento da coluna com a sílica molhando com o solvente mais apolar – Hexano – mexendo para libertar as bolhas de ar enclausuradas. A adição de sílica e de solvente é alternada de modo a permitir que a sílica assente tornado a fase estacionária o mais homogénea possível, sem quebras.

É deixado um espaço suficiente para deitar a amostra e o solvente, tendo o cuidado de não deixar a coluna secar.

As fracções foram recolhidas em balões de fundo redondo ou em tubos de ensaio.

Na tabela seguinte encontram-se as condições utilizadas nas colunas cromatográficas realizadas.

Colunas		Amostras		Solventes	
Nº	Altura x diâmetro (cm)	ID	(g)	Mistura	Proporção
1 ^a	30x3	ML em EP	1,0104	Hexano:Éter dietílico	100:0 – 38:62
2 ^a	30x3	ML em EP	2,5058	Hexano:Éter dietílico	100:0 – 20:80
3 ^a	30x3	ML em EP	2,5173	Hexano:Éter dietílico	100:0 – 30:70
4 ^a	30x2	ML em EP	0,6377	Hexano:Éter dietílico	50:0 – 22:28
5 ^a	30x3	ML em EP	0,7211	Hexano:Éter dietílico	50:0 – 27:23
6 ^a	30x3	ML em EP	0,7828	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 41:9
7 ^a	30x3	ML em EP	0,5618	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 42,5:7,5
8 ^a	30x3	ML em EP	0,5739	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 43:7
9 ^a	30x3	ML em EP	0,6165	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 43:7
10 ^a	48x3	ML em EP	1,8057	Hexano:Acetato de Etilo	100:0 – 82:18
10a)	30x2	Fracções F10c-F17d da 10 ^a CC	0,5836 g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 43:6
11 ^a	30x2	ML em EP	0,5467g	Hexano:Acetato de Etilo	100:0 – 87:13
12 ^a	30x3	Fracções (A...V)*	1,0322g	Hexano:Ciclohexano:Acetato de Etilo	25:25:0 - 18,5:18,5:13
13 ^a	48x3	ML em Hexano	1,8064g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 38:12
14 ^a	48x3	ML em Hexano	1,5113g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 35:15
15 ^a	48x3	fracções (misturado em	2,0608g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 34,5:15,5

		19/11/09)*			
16 ^a	30x3	Fracção 15a- 16b da 15 ^a CC	1,1880g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 41:9
17 ^a	30x3	ML em Hexano	1,0974g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 – 39:11
18 ^a	30x3	ML em Hexano	1,0974g	Hexano:Acetato de Etilo	50:0 - 38,5:11,5

*Ver nos anexos

A sequência e condições das 18 colunas cromatográficas realizadas encontram-se nos anexos. As fracções obtidas nas colunas realizadas, que demonstraram em TLC conter as lactonas dehidrocostus e costunolida, foram sujeitas a testes de identificação por técnicas de RMN, HPLC e GC acopladas a espectrometria de massa.

2.3 Caracterização /Identificação das fracções

Neste trabalho foram várias as técnicas que auxiliaram na caracterização e identificação dos compostos, muitas delas associadas com a técnica de separação – Sistemas em tandem.

A maioria dos sistemas em tandem envolve a associação de técnicas de separação com alguma forma de espectroscopia, as mais comuns sendo ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa, entre outras. Todas, com excepção da última dependem da absorção de emissão de radiação electromagnética. (Scott, 1997)

As técnicas de cromatografia GC e HPLC acopladas à espectrometria foram essenciais no desenvolvimento do trabalho mais precisamente no auxílio na identificação dos compostos.

O poder da espectrometria de massa reside no facto de que o espectro de massa de muitos compostos é suficientemente específico para permitir a identificação com certo grau de confiança, se não com a certeza absoluta. Se o analito de interesse for encontrado como parte de uma mistura, no entanto, o espectro de massa obtido irá conter iões de todos os compostos presentes e, particularmente se o analito de interesse for um composto minoritário da mistura, será mais difícil a identificação com algum grau de certeza. A combinação da capacidade de separação da cromatografia (na obtenção de compostos ‘puros’) com a capacidade de identificação do espectrómetro de massa é claramente vantajosa, particularmente devido ao facto de muitos compostos terem características de retenção idênticas ou similares, mas uma vez que apresentam diferentes espectros de massa, permite assim a sua diferenciação. (Ardrey, 2003)

2.3.1 GC-MS

Cromatografia Gasosa/ espectrometria de massa (GC/MS) é uma combinação sinérgica de duas técnicas analíticas potentes. A técnica cromatografia gasosa separa os componentes de uma mistura num espaço de tempo, e a espectrometria de massa providencia informação que auxilia na identificação estrutural de cada componente. *(Kitson et al., 1996)*

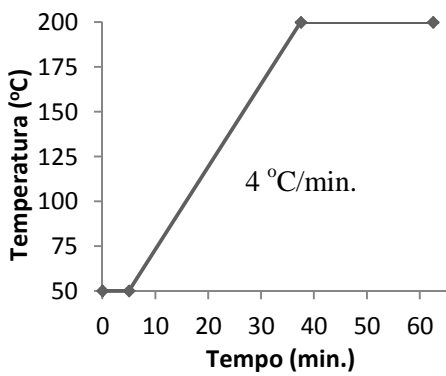
O princípio básico de operação da GC envolve a volatilização da amostra com a ajuda de um injector (a determinada temperatura), a separação dos componentes da mistura numa coluna especialmente preparada, e a detecção de cada componente por um detector. A cromatografia gasosa utiliza um gás de arraste – hidrogénio ou hélio – para transferir a amostra do injector, através da coluna, até o detector. *(Kitson et al., 1996)*

A coluna contém um preenchimento como fase estacionária. A separação dos componentes é determinada pela distribuição de cada componente entre o gás de arraste (fase móvel) e a fase estacionária. Um componente que passe pouco tempo na fase estacionária vai eluir rapidamente. Apenas os materiais que possam ser vaporizados sem sofrer decomposição são adequados para análise em GC. *(Kitson et al., 1996)*

Os componentes chave da cromatografia gasosa são os sistemas que aquecem o injector, o detector, as linhas de transferência e permitir que a temperatura programada, controle a coluna. *(Kitson et al., 1996)*

O espectrómetro de massa é um instrumento que mede o rácio massa-carga (m/z) dos iões da fase gasosa e providencia uma medida de abundância de cada espécie iónica. A medição é calibrada contra iões de rácio m/z conhecido. No GC/MS, a carga é quase sempre 1, pois a escala de calibração é em Dalton ou unidades atómicas de massa. *(Kitson et al., 1996)*

Condições do GC-MS: As análises foram efectuadas num sistema de GC-MS composto por um cromatógrafo gasoso Varian STAR 3400 CX equipado com um auto-injector Varian 8200 e um espectrómetro de massa de “íon trap” (armadilha de iões) Varian Saturn 3. O gás de arraste usado foi o Hélio N60 (AirLiquide) com uma pressão à entrada da coluna de 100kPa (13 Psi), originando um fluxo constante de cerca de 1mL/min. como indicado na tabela seguinte:

Tabela 3 – Condições utilizadas na análise das frações obtidas do extracto de Madre de Louro em Éter de Petróleo no GC-MS		
Injector	Programa de Temperaturas	Detector
Temperatura: <ul style="list-style-type: none"> • 250°C 		Tipo: <ul style="list-style-type: none"> • Espectrómetro de massa, Varian Saturn 3
Modo: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Splitless</i> 		TRAP: <ul style="list-style-type: none"> • 170°C
Gás de arraste: <ul style="list-style-type: none"> • He (N60) • 13Psi (constante) 		Energia de Ionização: <ul style="list-style-type: none"> • 70 eV
Fluxo: <ul style="list-style-type: none"> • 1mL/min (constante) 	Coluna: <ul style="list-style-type: none"> • TR-WaxMS, Polyethylene Glicol (Thermo Electron Corporation) • 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm 	Multiplicador de electrões: <ul style="list-style-type: none"> • 2750 V
Injecção: <ul style="list-style-type: none"> • 1µL 	Linha de Transferência: <ul style="list-style-type: none"> • 220°C 	Modo: <ul style="list-style-type: none"> • Impacto electrónico • Varrimento total

Os compostos foram separados numa coluna capilar TR-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) de polietileno glicol, Thermo Electron Corporation. O injector foi aquecido até 250°C e a temperatura inicial da coluna ajustada a 50°C durante 5 min.. Após os 5 min. a temperatura aumentou 4°C/min até aos 200°C mantendo-se a esta temperatura durante 20min. Todos os cromatogramas foram obtidos no modo scan com ionização por impacto electrónico. A temperatura do detector foi de 220°C e o volume de amostra injectada foi de 1µL.

2.3.2 LC-MS

A combinação de HPLC com espectrometria de massa permite uma melhor identificação e determinação quantitativa dos compostos em relação ao HPLC por si só.

Em HPLC a fase móvel é um líquido que corre a alta pressão (até 400 bar (4×10^7 Pa) de modo a permitir um fluxo constante e assim uma cromatografia reprodutível, enquanto a fase estacionária encontra-se numa coluna capaz de resistir a altas pressões que são necessárias. A separação cromatográfica ocorre se os componentes da mistura interferirem de diferente forma com as fases móvel e/ou estacionária e originando tempos diferentes de detecção. (Ardrey 2003)

A análise em HPLC constituiu uma fonte de identificação e auxílio na quantificação das lactonas de algumas fracções obtidas dos extractos hexânicos e ainda na identificação de compostos presentes no extracto metanólico da Madre de Louro.

Equipamento e acessórios: O equipamento usado nesta análise foi o LC-MSMS- com espectrofotómetro de massa do tipo Ion trap multipolar (Sistema LCMSMS Bruker Esquire 6000) com fontes ESI e APCI, com capacidade MSⁿ. O cromatógrafo líquido acoplado (DIONEX ULTIMATE 3000 Fast Separation LC) com detector de díodos (PDA 3000) e colector de fracções. O Software consiste no COMPASS incluindo SmartSuite para optimização automática de todos os parâmetros experimentais e Chromeleon®.

Condições: O leque dos comprimentos de onda variou de 210 a 520 nm e foi monitorizado a 280 nm. As amostras foram separadas numa coluna C18 Phenomenex Gemini (5 mm, 250_3.0mm i.d.; Phenomenex) com um volume de injeção de 10 mL.

Para as amostras com as lactonas: A fase móvel consistiu em Acetonitrilo (0,1% ác. Fórmico) (A) e água/ácido fórmico (0,1% ác. Fórmico) (B). Foram testados vários programas de gradientes tendo sido escolhido o que reproduziu melhores resultados: 30% B (0-1 min), 30% B (1-4 min), 25% B (4-8 min), 20% B (8-12 min), 18% B (12-16 min), 10% B (16-18 min), 0% B (18-20 min) e 30% B (aos 20 min). O fluxo da fase móvel foi de 0,4 mL/min; o cromatograma foi registado a 280 nm e os dados espectrométricos para todos os picos foram acumulados dos 190 aos 400 nm. A temperatura da coluna foi controlada a 30°C.

Preparação: 5 mg de amostra foram dissolvidas em 1mL de Clorofórmio (visto ser o solvente com melhores resultados de solubilidade) e a solução foi filtrada para um vial adequado ao equipamento de injeção do HPLC.

Para as amostras com o extracto metanólico: A fase móvel consistiu em Acetonitrilo (0,1% ác. Fórmico) (A) e água/ácido fórmico (0,1% ác. Fórmico) (B). Foram testados vários programas de gradientes tendo sido escolhido o que reproduziu melhores resultados: 0% A (0 min), 5% A (15 min), 15% A (20 min), 20% A (30 min), 40% A (40 min), 60% A (42-47 min) e 0% A (59-52 min).

Preparação: 10 mg de amostra foram dissolvidas em 1mL de Metanol e a solução foi filtrada para um vial adequado ao equipamento de injeção do HPLC.

2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica que baseia-se nas propriedades magnéticas do núcleo atômico. Quando colocado num campo com elevado magnetismo, alguns núcleos ressonam a determinada frequência no leque de frequências rádio do espectro magnético. É possível obter informação detalhada acerca da estrutura molecular, no qual o átomo está contido, através de ligeiras modificações da frequência ressonante. (Jacobsen, 2007)

Muitos átomos (por exemplo, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) comportam-se como se o núcleo carregado positivamente estivesse a girar sobre um eixo. A carga deste movimento giratório, como uma corrente eléctrica, causa um pequeno campo magnético. Quando colocado num campo externo com forte magnetismo, o núcleo magnético tenta alinhar-se com este como uma agulha compassada no campo magnético da Terra. (Jacobsen, 2007)

A técnica espectroscópica de RMN é a mais poderosa em termos de elucidação estrutural, infelizmente é uma das técnicas menos sensíveis. (Scott, 1997)

Alguns núcleos de spinning têm cargas assimétricas e assim constituem magnetos nucleares tendo associados campos magnéticos. Devido à conservação do momento angular, quando tais núcleos estão situados num campo magnético forte, eles alteram o eixo de rotação conforme o seu ambiente magnético, o qual por sua vez, irá depender dos átomos adjacentes, e dos prótons associados aos átomos adjacentes. (Scott, 1997)

A espectrometria de massa tem muito mais sensibilidade que o RMN, e o espectro de massa permite a confirmação da identificação de uma substância e permite a elucidação dos detalhes das estruturas moleculares desconhecidas. (Scott, 1997)

Condições: As fracções contendo as lactonas sesquiterpénicas (dehidrocostus e costunolida) foram analisadas por RMN num espectrómetro 400 MHz (UltraShield™ 400 Plus ULTRA LONG HOLD), com uma sonda quadrupolar de 5 mm, dissolvidas em aproximadamente 0,7 mL de clorofórmio deuterado (> 99,8%, %H₂O <0,01%, SDS). Os valores de desvio químico (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) relativamente ao desvio do padrão interno de tetrametilsilano (TMS, Merck, NMR Grade) e a frequência de observação foi de 75,477 MHz para o núcleo de ^{13}C . O número (máximo) de scans acumulados para carbono foi de 23185. Como sinal de "lock" foi usado o sinal do deutério da molécula de solvente (CDCl₃).

2.3.4 Espectroscopia do Infravermelho e do Ultravioleta

A espectroscopia do infravermelho é uma técnica que baseia-se na interacção da radiação electromagnética com um sistema molecular, mais precisamente, nas vibrações dos átomos de uma molécula. Na maioria dos casos essa interacção ocorre na forma de absorção de energia dos raios incidentes induzindo transições entre os níveis de energia vibracional. (Stuart, 2004; Wartewig 2003)

A absorção de luz infravermelha ocorre com comprimento de onda mais longo que o espectro visível, isto é, entre 2 e 15 microns. Para uma molécula mostrar absorção no Infravermelho tem que possuir uma característica específica, isto é, um momento dipolar eléctrico da molécula tem que mudar durante a vibração. (Scott, 1997; Stuart, 2004)

A interacção da radiação infravermelha com a matéria pode ser entendida em termos de mudança nos dipolos moleculares associados com vibrações e rotações. (Stuart, 2004)

O espectro de IV demonstra a absorção de luz a diferentes comprimentos de onda resultantes das mudanças de energia rotacional e vibracional da molécula, e é geralmente obtido pela passagem da radiação infravermelha através duma amostra e determinando qual fracção da radiação incidente é absorvida a uma determinada energia. A energia correspondente a um determinado pico num espectro de absorção corresponde à frequência da vibração duma parte de uma molécula da amostra. (Scott, 1997; Stuart, 2004)

Cada modo de vibração está então associado a uma frequência característica e a uma banda de adsorção. (Scott, 1997)

No espectro infravermelho, a intensidade da banda pode ser medida pela absorvância ou pela transmitância, no entanto a transmitância é usada tradicionalmente para interpretação do espectro e a absorvância usada para o trabalho quantitativo. (Stuart, 2004)

Opticalmente, o sistema de Espectroscopia do Infravermelho é muito semelhante ao usado para medir a absorção do Ultravioleta excepto que os materiais de construção têm de ser diferentes, ou seja, os componentes ópticos têm que ser adequados à luz correspondente com comprimento de onda característico. (Scott, 1997)

Enquanto a espectroscopia do IV detecta as mudanças no momento dipolar da molécula à medida que esta vibra e é sensível aos grupos funcionais polares, a espectroscopia do UV providencia informação nas transições dos electrões e é adequada para a identificação de certas classes de compostos, tais como aromáticos e insaturados. (Scott, 1997)

A absorção no ultravioleta ocorre a frequências onde a energia de radiação é igual à da transição electrónica específica nas moléculas da substância, enquanto a adsorção do IV ocorre a frequências onde a energia de radiação é igual à das mudanças de energia vibracional e rotacional da molécula. (Scott, 1997)

Ambas as absorções em UV e IV providenciam espectros que são característicos de cada molécula e ambos podem ser usados para identificação dos compostos. No entanto o espectro de IV, devido ao largo número de possíveis bandas de absorção, mostra diferenças consideráveis entre as diversas moléculas sendo mais fácil a sua análise. Pelo contrário, em relação ao UV, a maioria dos espectros são muito semelhantes, apesar da estrutura das moléculas diferir consideravelmente. (Scott, 1997)

Consequentemente, o espectro de IV pode ser muito mais adequado para confirmar a identidade dos compostos relativamente ao espectro de UV. Uma medição em IV requer mais amostra do que o UV e assim, apesar do IV ser mais informativo, a técnica não é tão sensível. (Scott, 1997)

A técnica do Infravermelho foi utilizada neste trabalho numa fase inicial para identificar a presença das lactonas costunolida e dehidrocostus e para garantir a completa secagem dos extractos, de modo a despistar a presença de solvente enclausurado no extracto bruto.

Condições do IV: Analisou-se cada uma das amostras usando o espectrofotómetro FT-IR (Avatar 360) em janelas de NaCl (para amostras líquidas).

A técnica do Ultravioleta serviu como instrumento de análise na determinação de compostos com actividade antioxidante e na quantificação de compostos fenólicos.

2.4 Testes de Actividade Antioxidante

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficiência de antioxidantes provenientes da dieta alimentar, seja como compostos puros ou como extractos de alimentos, como também para determinar a actividade antioxidante do plasma como um índice do status antioxidante *in vivo*. Estes métodos focam os diferentes mecanismos de sistemas de defesa por antioxidantes, isto é, eliminação do oxigénio e de radicais hidroxilo, redução de radicais peróxilos lipídicos, inibição da peroxidação dos lípidos ou quelação de metais iónicos. (Pulido et al. 2000)

Assim, alguns métodos determinam a habilidade dos antioxidantes de eliminar radicais livres gerados no meio da reacção tais como os ensaios: TEAC (capacidade antioxidante equivalente Trolox), ORAC (capacidade de absorvância dos radicais de oxigénio) ou TRAP (habilidade do plasma de redução total). Outros métodos tais como o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ou DMPD medem a captura de espécies de radicais estáveis por antioxidantes. (Pulido *et al.* 2000)

Na maioria dos casos ocorre um mecanismo comum envolvendo uma reacção redox. (Pulido *et al.* 2000)

São muitos os métodos disponíveis para avaliar o poder antioxidante de compostos naturais em comidas ou em sistemas biológicos. Dois métodos comumente usados nesta avaliação são os procedimentos que usam o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ou o ABTS (2,2-azinobis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) como geradores de radicais livres, respectivamente. (Teow *et al.*, 2007)

O mecanismo para ambos os métodos é similar, no sentido em que o espectro de absorvância do radical livre estável muda quando a molécula é reduzida por um antioxidante ou por espécies de radicais livres. (Teow *et al.*, 2007)

O ABTS é solúvel seja em solventes aquosos ou orgânicos, e reage relativamente rápido quando comparado com o DPPH, o qual normalmente leva algumas horas para completar a reacção. (Teow *et al.*, 2007)

A interferência da coloração do ensaio de DPPH com amostras que contenham antocianinos leva a uma estimacção mais baixa da actividade antioxidante. No entanto, este problema não ocorre com o ensaio de ABTS, especialmente quando a absorvância é medida a 734 nm. (Teow *et al.*, 2007)

Para os ensaios de actividade antioxidante – ABTS, DPPH e FRAP - utilizou-se o espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis (espectrómetro Lambda 2).

De seguida encontram-se as condições de cada teste:

2.4.1 ABTS

Um método para a verificacção de actividade antioxidante é o ensaio de descoloracção que se aplica tanto a antioxidantes lipofílicos como a hidrofílicos, incluindo flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides, e antioxidantes do plasma. (Re *et al.* 1999)

O radical monocatião pré-formado de Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) é originado pela oxidacção do ABTS com persulfato de sódio e é reduzido na presenca de antioxidantes doadores de hidrogénio. (Re *et al.* 1999)

A determinação da actividade antioxidante é influenciada pela concentração do antioxidante e pela duração da reacção de inibição da absorção do catião radical. Este ensaio é um melhoramento do ensaio TEAC (the ferryl myoglobin/ABTS) na determinação da actividade de antioxidantes em muitas formas. (Re *et al.* 1999)

Primeiro, a química envolve a formação directa do monocatião radical ABTS sem envolvimento de um radical intermediário. Segundo, é um ensaio de descoloração, assim o catião radical é pré-formado antes da adição dos sistemas de testes antioxidantes, em vez da formação do radical tomar lugar continuamente na presença do antioxidante. Daí que os resultados obtidos com o sistema melhorado não possam sempre ser directamente comparados com os obtidos usando o ensaio original TEAC. Terceiro, é aplicável a ambos sistemas aquosos e lipofílicos. (Re *et al.* 1999)

O procedimento para este ensaio foi baseado no método de Re *et al.* (1999), com algumas modificações:

Preparou-se duas soluções iniciais – solução aquosa de ABTS (2 mM), e solução aquosa de Persulfato de Potássio ($K_2S_2O_8$) com concentração de 70 mM.

A solução do radical ABTS foi preparada pela junção de 50 mL de solução aquosa ABTS com 200 μ L de solução aquosa de Persulfato de Potássio. Esta solução foi colocada num local escuro a temperatura ambiente por 12h-16h, permitindo assim a estabilidade do radical $ABTS^+$.

Preparou-se ainda uma solução tampão PBS (pH 7,4) dissolvendo-se 8,18 g NaCl, 0,27 g de KH_2PO_4 , 3,94 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ e 0,15 g de KCl para um litro de água destilada.

Para a determinação da actividade antioxidante, de cada uma das amostras, preparou-se, no dia de cada análise, a diluição da solução de $ABTS^+$ com solução tampão PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,4, até se obter uma absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

As amostras foram preparadas, separadamente, pela dissolução em etanol, de modo a obter uma concentração de 1 mg/mL.

Para cada análise adicionou-se 100 μ L de cada amostra a 1,8 mL de solução $ABTS^+$ e registou-se a diminuição da absorvância a um comprimento de onda de 734 nm, durante 6 minutos.

A capacidade antiradicalar é expressa em μ mol eq. Trolox/ g amostra com base na recta de calibração obtida com soluções referência de Trolox (7,98 – 268 μ M).

Para cada amostra as análises foram feitas em triplicado.

De seguida encontram-se as equações da curva de calibração obtidas:

Abs vs umol Trolox: $y = -12,521x + 0,6733$, com $r^2 = 0,9988$

Abs vs mM Trolox: $y = -2,5023x + 0,6733$, com $r^2 = 0,9988$.

2.4.2 DPPH

Este método é semelhante ao anterior, sendo que neste caso o gerador de radicais é o 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

O método é baseado no descrito no artigo de Teow *et al.* (2007), com algumas modificações:

Preparou-se seis soluções, em metanol, dos extractos, com seis concentrações diferentes (mg/mL).

Adicionou-se 100 μ L de cada solução a 3,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mM) e mediu-se o decréscimo da absorvância a 516 nm, em intervalos de 60 segundos, durante 30 minutos. Em todas as determinações usou-se como branco uma solução de metanol puro. O espectrómetro usado nas medições de absorvância foi um Perkin Elmer UV-Vis Spectrometer Lambda 2 com células de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

A capacidade antiradicalar é expressa em μ mol eq. Trolox/100 g de extracto com base na recta de calibração obtida com soluções referência de Trolox ($\geq 99,8\%$, HPLC, Fluka).

A concentração de DPPH restante no meio reaccional foi determinada a partir da curva de calibração da seguinte forma:

Onde $[DPPH]_t$ é a concentração de DPPH no tempo final e $[DPPH]_{t=0}$ é a concentração de DPPH no tempo inicial.

Representaram-se os valores da % $DPPH_{rest.}$ em função da razão entre a massa de extracto (mg) e massa de DPPH (mg). Assim determinou-se a actividade antiradicalar (EC_{50}) que é definida como sendo a quantidade mínima de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH de 50%.

Equação da curva de calibração obtida:

A vs μ mol Trolox

A vs mM Trolox

2.4.3 Análise qualitativa da actividade antioxidante (DPPH) por TLC

A detecção de compostos com actividade antioxidante em placas de TLC ocorre pelo aparecimento de manchas de cor amarelo esbranquiçado contrastando um fundo roxo de DPPH. (Rodriguez *et al.* 2008)

Este teste qualitativo é feito pela técnica de TLC (explicada anteriormente) com a alteração do revelador, que é a solução de DPPH.

Preparação da solução: Procede-se à diluição de 0,1 g de DPPH em 50 mL de Metanol.

Após eluição a placa é vaporizada com a solução de DPPH e as manchas brancas correspondem aos compostos que reagem à solução de DPPH, ou seja, que apresentam actividade antioxidante.

2.4.4 FRAP

Pulido *et al.* (2000) descreve o método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) baseando-se na metodologia de Benzie e Strain (1996). Estes autores desenvolveram uma metodologia para determinar a habilidade redutora do plasma como uma medida do seu poder antioxidante.

Inicialmente, desenhado para determinar a actividade antioxidante do plasma, também foi aplicado a outros substratos tais como chás e vinhos, e foi renomeado como ensaio de redução do ferro/ poder antioxidante. (Pulido *et al.* 2000)

O ensaio de FRAP é um método simples de determinação da habilidade de redução do ferro. O método, usando ferro como um sensor redox, determina a redução de um complexo incolor *ferric-tripyridyltriazine* (TPTZ-Fe²⁺) na presença de antioxidantes. (Miwa *et al.* 2008)

É um método espectrofotométrico simples que ocorre a um pH de 3,6 a 37°C.

A reacção origina a forma ferrosa (Fe²⁺) que apresenta uma cor azul intensa com um máximo de absorção a 593 nm. (Pulido *et al.* 2000)

O Trolox, um análogo da vitamina E, solúvel em água, é usado para a calibração. Este método mede o poder redutor da amostra. (Miwa *et al.* 2008)

A ausência de medição da contribuição dos grupos tióis e o pH ácido representam a principal limitação do método. (Miwa *et al.* 2008)

O método para este procedimento está descrito no trabalho de Raquel Pulido *et al.* (2000) com algumas alterações:

Preparação de soluções: O reagente FRAP é preparado adicionando 2,5 mL da solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) e 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM, em HCl 40 mM) a 25 mL de solução tampão de acetato (0,3 M) com pH 3,6. Para preparar a solução tampão adicionou-se 3,1 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 16 mL de ácido acético glacial e perpez-se com água destilada até um litro.

Teste: Juntou-se 1800 μL de solução FRAP (preparada recentemente e aquecida a 37°C) a 180 μL de água destilada e 30 μL de amostra, ou metanol (para o branco). A diluição final da amostra é de 1:15.

Registou-se o decréscimo da absorvância a um comprimento de onda máximo de 593 nm, em intervalos de 15 segundos, durante 30 minutos, mantendo a temperatura a 37°C .

O espectrofotómetro utilizado foi um Perkin Elmer UV-VIS Spectrometer Lambda 2 (com células de vidro com um percurso óptico de 1 cm) equipado com um porta-células termostatizado. Durante o tempo de reacção a temperatura foi mantida a $37^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Recta de calibração: Para a elaboração da curva de calibração preparou-se soluções metanólicas de Fe (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) com concentrações no intervalo de 500 - 2000 μM .

O parâmetro *Equivalent Concentration 1* (EC_1) é definido como a concentração de antioxidante que tem ferric-TPTZ reducing ability equivalente a 1 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O EC_1 é calculado como a concentração de antioxidante que origina um aumento na absorvância no método FRAP equivalente ao valor teórico da absorvância de 1mmol/L de solução de Fe (II) usando a equação de regressão linear.

De seguida encontram-se as equações da curva de calibração obtidas:

$$\text{Abs vs mM FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}: y=0,1843x+0,0712 \text{ (com } r^2 = 0,9952)$$

$$\text{Abs vs mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}: y=1,620E-04x-1,136E-0,5 \text{ (com } r^2=0,9952).$$

A equação da curva de calibração obtida para o método de FRAP usando soluções de trolox, para *Abs vs mM Trolox* foi - (com).

2.4.5 Sistema β -caroteno / ácido linoléico

Os carotenóides são compostos naturais com propriedades lipofílicas com mais de 500 compostos diferentes identificados, sendo o β -caroteno o mais proeminente. A maioria dos carotenóides contém um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, o qual é responsável pela actividade antioxidante. Estudos epidemiológicos em humanos têm sugerido que o β -caroteno ajuda na prevenção do cancro. (Sies e Stahl, 1995)

Os carotenóides protegem os sistemas biológicos de danos derivados de radicais de oxigénio e parecem inibir reacções de radicais livres. (Sies e Stahl, 1995)

Karamac e Amarowicz (1997) abordam o teste de Miller (1971), em que ocorre a combinação da oxidação do β -caroteno e do ácido linoléico, para determinação da actividade antioxidante, uma vez que este teste tem sido largamente aplicado em estudos de actividade antioxidante de compostos naturais isolados das plantas. Estes autores compararam as propriedades antioxidativas de *buthylated hydroxyanisole* (BHA), *buthylated toluene* (BHT) and *buthylated hydroquinone* (TBHQ) num teste com β -caroteno e ácido linoléico, para propor o uso destes antioxidantes como padrões em ensaios com produtos naturais. (Karamac e Amarowicz, 1997)

No sistema β -caroteno/ácido linoléico, os radicais livres originados pela oxidação do ácido linoléico, atacam as moléculas insaturadas do β -caroteno, causando um decréscimo na absorvância a 470nm. A presença de antioxidantes pode bloquear a extensão do descoloramento do β -caroteno pela neutralização do radical livre do linoleato e de outros radicais livres formados no sistema. Na ausência de antioxidantes a absorvância a 470 nm descrece rapidamente enquanto na sua presença, a cor, e assim, a absorvância é retida por mais tempo. (Oliveira et al., 2008)

O procedimento foi baseado nos métodos usados por Barros *et al.* (2007) e Siddhuraju e Becker (2003), mas com algumas modificações:

Adicionou-se 1mL de solução β -caroteno em clorofórmio (1mg por 5mL) a 25 μ L de ácido linoleico e 200mg de Tween 40.

O clorofórmio foi evaporado num sistema de vácuo (rotavapor) a 45°C por 4 min. Depois adicionaram-se 50 mL de água ultrapura oxigenada ao resíduo semi-sólido, com agitação vigorosa, de modo a obter uma emulsão.

Adicionaram-se 250 μ L da emulsão em cada poço da placa a 30 μ L de cada amostra e a absorvância foi medida de imediato, a 492 nm, tendo como composto de referência o BHT. Os tubos foram colocados em banho-maria a 55°C com intervalos de 15 min num tempo total de 180 min.

Todos os ensaios ocorreram em triplicata.

A actividade antioxidante (AA) das amostras foi avaliada pela coloração do β -caroteno usando a seguinte fórmula: $AA = \frac{A_0 - A_t}{A'_0 - A'_t}$, em que A_0 e A'_0 são os valores da absorvância medidos a tempo zero de incubação para a amostra teste e para o controlo, respectivamente, e o A_t e A'_t são os valores de absorvância medidos após incubação por 180 minutos.

2.5 Quantificação de Fenóis totais

Existem muitas substâncias fenólicas nas plantas, e conseqüentemente, nos alimentos, incluindo frutos, chás, café, cacau e alimentos processados derivados destas matérias-primas. Quando em grande quantidade, em particular, quando os níveis de açúcar são baixos, os fenóis caracterizam-se pela sua adstringência, amargura e cor nos alimentos, influenciando grandemente o gosto dos vinhos tintos, chás e produtos de chocolate. Torna-se, então, importante a avaliação do conteúdo fenólico nos alimentos. (Waterhouse, 2002)

No geral, a resposta dos testes de fenóis totais é comparável à dos testes de actividade antioxidantes, com melhor correlação nos testes de actividade antioxidante baseados em sistemas aquosos em relação aos de meios lipídicos. (Waterhouse, 2002)

2.5.1 Teste Folin-Ciocalteu (FC) colorimétrico

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas. (Sousa et al., 2007)

O reagente Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstíco, no qual os óxidos de tungsténio e molibdénio são reduzidos na presença de certos agentes redutores, como por exemplo, compostos fenólicos. A redução destes compostos exibe uma coloração azulada correspondendo a uma faixa de absorvância de luz com um máximo nos 765nm.

O teste usando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC) é um teste colorimétrico uma vez que a coloração adquirida devido à redução dos óxidos permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, sendo que a intensidade da absorção da luz a um determinado comprimento de onda é proporcional à concentração dos fenóis. (Waterhouse, 2002; Sousa et al., 2007)

Este método foi, originalmente desenvolvido para análises em amostras de vinho, no entanto pode ser adaptado a outras matrizes, tendo em atenção os possíveis interferentes.

(Waterhouse, 2002)

O método FC tem sido adoptado como um procedimento oficial para determinação dos níveis de fenóis. O desenvolvimento da cor é lento mas pode ser acelerado pelo aquecimento da amostra. Com o aumento excessivo do aquecimento, no entanto, a perda de cor subsequente é muito rápida, tornando-se difícil a reprodutibilidade do registo da variação colorimétrica.

(Waterhouse, 2002)

Análise espectral: As substâncias fenólicas podem ser também quantificadas pela medição da absorvância a 280 nm. A aplicabilidade deste método é muito mais limitada, no entanto, devido às propriedades de absorvância dos diferentes fenólicos variam e não podem ser relacionados com um padrão específico. Devido a isto, e devido à facilidade do método, a análise espectrofotométrica está bem adequada ao processo de monitorização do conteúdo de fenóis totais. (Waterhouse, 2002)

O teor total de compostos fenólicos nas amostras (extractos e fracções) de *Laurobasidium lauri* (Madre de Louro) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu.

Adicionou-se 50 µL de solução da amostra (10 mg/mL) em Metanol a 1,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:10) com 1 mL de carbonato de sódio (75 g/L). A absorvância é medida a 765 nm durante 30 minutos, em células de vidro de 1 cm de percurso óptico.

Para a elaboração da curva de calibração preparou-se soluções de ácido gálico em metanol com concentrações diferentes, nomeadamente, 0,024, 0,075, 0,105, 0,3 e 0,4 mg/mL, usando o mesmo procedimento.

Os resultados foram expressos em mg ácido gálico (GAE) por grama de extracto. Todas as determinações foram efectuadas em triplicata.

2.6 Testes de actividade biológica

Os ensaios biológicos aqui realizados vêm complementar o estudo fitoquímico do extracto ML em vários solventes.

2.6.1 Artemia salina

A *Artemia salina* tem sido usada desde cedo, nos anos 50 para avaliar os efeitos de várias toxinas em animais. Nos anos 80, McLaughlin e seus colegas enaltecem a capacidade dos ensaios com este organismo propondo outras utilidades para o mesmo, como testes toxicológicos. Um dos exemplos práticos seria testar os extractos de plantas, de modo a avaliar a sua capacidade biológica, permitindo assim a evolução do conhecimento das actividades biológicas dos extractos das plantas. (Hayden, 2003)

Gerou-se a ideia de usar sistemas biológicos para estudar os compostos bioactivos das plantas. De acordo com McLaughlin os testes biológicos deverão poder ser generalizados e económicos, sendo que as larvas de camarão enquadram-se perfeitamente como ensaio biológico. (Hayden, 2003)

O ensaio de brine shrimp tornou-se então rotineiro na avaliação de compostos biológicos das plantas facilitando o caminho da produção de agentes farmacológicos a partir de fontes naturais. (Hayden, 2003)

As larvas de camarão servem de guias do potencial das plantas e ajudam a ilustrar a fronteira entre efeitos tóxicos e efeitos terapêuticos, uma vez que é a sua morte por intoxicação que serve como um indicador directo de potenciais compostos de plantas que podem se tornar novas formas de agentes terapêuticos. Mantêm a relação próxima entre a farmacologia e a toxicologia. (Hayden, 2003)

A FDA (Food and Drug Administration) considera mau que haja toxicidade em testes clínicos de III fase, no entanto, numa primeira fase a alta toxicidade em larvas de camarão podem indicar potenciais compostos farmacológicos. (Hayden, 2003)

Após estudos fitoquímicos e toxicológicos, os estudos farmacológicos irão determinar a dosagem adequada na introdução de agentes terapêuticos de modo a permitir efeitos benéficos. (Hayden, 2003)

Segundo Dey e Harnorne (1991) o teste de letalidade *in vivo* num organismo zoológico simples (*Artemia salina*) pode ser usado na monitorização das fracções obtidas de extractos de plantas. É também um teste simples, económico e rápido, daí que optamos por efectuar este teste de modo a complementar o estudo químico feito à Madre de Louro.

O procedimento ocorreu como descrito por Dey e Harnorne (1991) baseado no método de Meyer *et al.*, (1998), com algumas modificações.

Os ovos de camarão foram colocados num erlenmeyer com água do mar (previamente filtrada) por 48 horas para atingirem a maturação adequada.

Na preparação das soluções começou-se pelas soluções-mãe para cada uma das amostras, diluindo em DMSO, para a concentração de 20mg/mL. A partir desta solução-mãe prepararam-se diluições em DMSO (1 mL) com as seguintes concentrações de 5; 1; 0,5; 0,1 mg/mL.

Conforme a % de mortalidade verificada, sendo que elevada nalguns casos, houve a necessidade de testar concentrações intermédias ou mais baixas que as definidas anteriormente.

Colocou-se 5 mL da água do mar filtrada em cada tubo de ensaio e adicionou-se 50 µL de cada solução diluída. Colocaram-se 10 larvas em cada um dos tubos e para cada concentração realizaram-se três ensaios.

O número de sobreviventes foi contabilizado após 24 horas.

Calculou-se a média e o desvio padrão e o LD₅₀ foi calculado através por interpolação linear.

2.6.2 Alelopatia

Para o ensaio de alelopatia foram testados vários parâmetros com base em alguns artigos.

Foram usadas sementes de alface – *Lactuca sativa* (Batavia) - para verificar a actividade inibitória dos extractos de Madre-de-louro e de fracções do extracto hexânico, contendo as lactonas de interesse, sobre a germinação das sementes.

Consideram-se germinadas as sementes que apresentam protrusão da radícula. (Alves *et al.*, 2004)

A escolha da espécie teste *Lactuca sativa* deveu-se ao facto de as suas sementes estarem comercialmente disponíveis e facilmente acessíveis e devido ao facto de exibir uma elevada sensibilidade perante outros químicos como é referido na literatura.

Baseado no procedimento descrito por Abdelgaleil *et al.* (2007), com algumas modificações:

As soluções mãe foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente inicial seguido de diluição com água destilada para uma concentração final de 500 µg/mL.

A concentração de DMSO nas soluções mãe foi de 0,5% v/v. Foram preparadas outras soluções teste (10, 50, 100 e 250 µg/mL) pela diluição das soluções mãe com água destilada. O tratamento controlo foi uma solução aquosa em DMSO (1,5% v/v).

Foram preparadas três réplicas, cada uma com 50 sementes para cada teste usando caixas de Petri (9 cm) semeadas em papel de filtro. Foram adicionados directamente 6 mL de solução teste a cada caixa de Petri. A percentagem de germinação foi verificada e calculada após 3 dias.

Devido aos resultados obtidos, repetiu-se este procedimento variando alguns parâmetros. Preparou-se soluções mãe de 2000 µg/mL. As soluções teste foram de 1500, 1000, 500 µg/mL. Foram preparadas três réplicas, cada uma com 30 sementes para cada teste usando caixas de Petri (9 cm) semeadas em papel de filtro. Foram adicionados directamente 3 mL de solução teste a cada caixa de Petri. A percentagem de germinação foi verificada e calculada após 3 dias.

Baseado no procedimento descrito por Alves *et al.* (2004), com algumas modificações:

Cada extracto foi emulsionado com Tween®40 (Acros Organics), na proporção 1:1, e dissolvido em água destilada para a obtenção de soluções com concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 2; 5; e 100% (v/v), (20, 1, 0,4, 0,2, 0,02, 0,002 mg/mL, respectivamente). Essas concentrações constituíram os tratamentos e, para a concentração de 0,0 utilizou-se a solução de Tween®40 a 1,0% v/v.

A verificação do potencial alelopático dos extratos voláteis de cada amostra, nas diversas concentrações, foi realizada pela avaliação da % de germinação. Três repetições de 50 sementes (pré-lavadas com lixívia diluída em água destilada – 1:10 (v/v) por 10min) foram semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), tendo como substrato três folhas de papel-filtro, humedecidas com quantidade de água destilada equivalente a três vezes a massa do papel seco.

Logo após a semeadura da alfaca, 3 mL da solução de cada concentração de cada amostra foram distribuídos em dois papéis-filtro, colados na tampa da placa, evitando o contacto directo. As placas ficaram a germinar a temperatura ambiente (24°C±3°C) por dois dias. Após 48 horas fez-se a contagem das sementes germinadas (consideram-se germinadas as sementes que apresentam protrusão da radícula) e calculou-se a % de germinação.

A percentagem de germinação foi calculada pela equação:

$$G (\%) = (N/A) \times 100,$$

onde G é a percentagem de germinação, N é o número de sementes germinadas e A é o número total de sementes postas a germinar. (Gatti, 2003)

2.6.3 TLC screening (Inibidores da Acetilcolinesterase)

A enzima Acetilcolinesterase (AChE) tem um papel importante na hidrólise da acetilcolina dos neurotransmissores (ACh). Disfunções neste equilíbrio AChE – Ach originam condições neurodegenerativas, daí que os inibidores de AChE são os agentes mais eficazes no tratamento de doenças deste fórum. (Niño et al., 2006)

Actualmente os fármacos disponíveis para a terapêutica de doenças neurodegenerativas têm várias limitações, incluindo os efeitos secundários desfavoráveis. Surge, então, a necessidade de pesquisar potenciais agentes para tratar estes distúrbios. (Niño et al., 2006)

Os extractos das plantas têm revelado possuir capacidades de inibição da AChE, daí a opção de realizar um teste qualitativo por TLC para verificar se existem compostos com essa capacidade nos extractos de ML.

Preparação de soluções: A solução da acetilcolinesterase foi preparada previamente por Emanuel Camacho. Para a detecção da enzima foi preparada a solução de acetato de naftil ($\geq 99\%$ GC, Fulka) em etanol (250 mg/mL) e a solução de Fast Blue B – (Fluka) em água destilada (400mg/160mL). Estas soluções foram preparadas imediatamente antes de usar para evitar a sua degradação.

Teste: Aplicou-se 20 μ L de solução metanólica a cada uma das amostras (1,5 – 6 mg/mL) e de dois compostos de referência – eserina e o ácido clorogénico (99%, Acros organics) – numa placa de sílica gel.

O processo de eluição ocorre colocando a placa numa câmara saturada com a mistura de solventes (seleccionados anteriormente). Após eluição a placa foi colocada sobre um suporte num tanque fechado contendo uma pequena quantidade de água, para que esta não entre em contacto directo com a água, mas que a atmosfera do sistema seja mantida com humidade. Este tanque foi colocado na estufa a 37°C durante 20 minutos no escuro. Após este processo a placa foi vaporizada com a solução da enzima, colorindo-a de roxo passados 5 minutos. Os compostos inibidores da acetilcolinesterase dão origem a manchas brancas.

3. Resultados e Discussão

Aqui encontram-se os resultados e os tratamentos respectivos do trabalho experimental.

3.1 Extracção

3.1.1 Rendimentos das extracções

Os rendimentos das extracções foram calculados através da equação:

Tabela 4 – Rendimento das extracções do fungo com vários solventes

Extracção	Solvente	Tempo de extracção (horas)	Peso do extracto (gramas)	η (%)
1ª extracção	Éter de Petróleo	24	11,76	1,89
		48	4,74	0,76
	Diclorometano	24	11,58	1,86
	Clorofórmio	24	2,86	0,46
	Metanol	24	76,86	10,96
2ª extracção	Éter de Petróleo	24	0,4567	0,0527
		72	0,0821	0,0095
3ª extracção	Éter de Petróleo	72	0,5467	0,1799
4ª	Hexano	72	0,9299	0,0391
5ª Extracção	Hexano	72	6,2554	0,4891
6ª Extracção	Hexano	48	3,7474	0,5517
7ª Extracção	Hexano	67	8,5185	0,6143

3.2 Fraccionamento e Caracterização dos compostos bioactivos

Nesta fase do trabalho utilizaram-se diversas técnicas de separação e identificação dos compostos de interesse (lactonas dehidrocostus e costunolida).

3.2.1 TLC

Testaram-se alguns sistemas de eluentes adequados, em TLC, para os extractos de Madre de Louro em Hexano, DCM e Clorofórmio, e para as fracções contendo maioritariamente as lactonas ‘rosa’, ‘verde’ e a mistura de ambas. Verificou-se que o mais adequado é o Hexano:Éter dietílico na proporção de 75:25 v/v.

Para a amostra de extracto ML em MeOH o sistema de eluentes mais adequado verificado foi o de Acetato de Etilo e Metanol (55:5 v/v).

Tabela 5 – Sistemas de eluentes escolhidos e Rfs dos compostos principais				
Amostra	Concentração (mg/mL)	Sistema de eluentes	Revelador	Rfs
ML em Hexano	5,3	Hexano : Éter Dietílico 72:25	Lieberman Bouchard	Lact.rosa ~ 0,29 Lact. Verde ~ 0,23
ML em DCM	5,7			
ML em Clorofórmio	5,0			
ML em MeOH	1,6	Acetato de Etilo : Metanol 55:5		-
Lactona ‘rosa’	5,0	Hexano : Éter Dietílico 72:25		~ 0,29
Mistura das lactonas	5,0			Lact.rosa ~ 0,29 Lact. Verde ~ 0,23
Lactona ‘verde’	5,0			~ 0,23

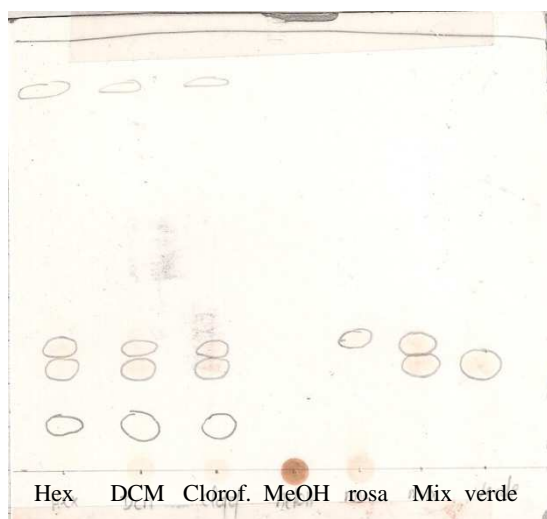


Figura 15- TLC desenvolvida em Hexano:Éter dietílico (75:25)



Figura 16- TLC desenvolvida em Acetato de Etilo: Metanol (55:5)

3.2.2 TLC Preparativa

Uma das técnicas testadas para o fraccionamento e separação dos compostos de interesse – lactonas dehidrocostus e costunolida – foi a TLC preparativa.

Na TLC preparativa, verificou-se um rendimento muito baixo (<50%), como verifica-se em baixo na tabela seguinte:

Tabela 6 – Rendimentos das TLCs preparativas realizadas					
Amostra (mg)		Sist. Eluentes (Hex: Éter diet.)	Fracções obtidas (mg)		η (%)
Extracto ML em EP 24h	54,3		A	19,8	36,464
			B	6,4	11,786
			C	8,1	14,917
F4 da 1ª CC	41,8		–	–	–
	21,5		6F (FA - FF)	–	–
F5 da 1ª CC	41,8	4,5:0,5	A	1	2,392
			B	12,4	29,665
			C	2,4	5,742
F11 da 2ª CC	61,6	70,0:30,0	A	2,6	4,221
			B	8,1	13,149
			C	14,4	23,377
			A (contaminado)	3	4,870
			B (contaminado)	5	8,117
			C (contaminado)	12,3	19,968
	57,5	70,0:30,0	A	3,9	6,783
			B	9,5	16,522
			C	11,5	20,000
	53	70,0:30,0	A	2,4	4,528
			B	5,9	11,132
			C	4,1	7,736
			D	4,9	9,245
			A (contaminada)	2,6	4,906
			B (contaminada)	4,6	8,679
C (contaminada)			6,6	12,453	
D (contaminada)	12,453				
57,3	70,0:30,0	A	0,4	0,698	
		B	10,3	17,976	
		C	9,9	17,277	
F12 da 2ª CC	57	70,0:30,0	A	18,3	32,105
			B	8,6	15,088
	52	70,0:30,0	A	13,9	26,731
			B	14,9	28,654
	53	70,0:30,0	A	4,6	8,679

			B	0,9	1,698
	56,1	70,0:30,0	A	–	–
			B	–	–
	51,6	70,0:30,0	A	–	–
			B	–	–
F8 da 3ª CC	50,3	70,0:30,0	FA+ FB + FC (junção de todas as fracções correspondentes)	28	8,833
	53,3			96,6	36,220
	54,7			73,6	34,489
	51,2				
	50,9				
	56,6				

Alguns valores relativos à massa, das fracções obtidas por cromatografia preparativa, não se encontram descritos na tabela, pois a sua determinação não foi possível por diversos factores, entre eles: a perda do produto devido a falha humana ou no processo de raspagem, extracção com solvente e a filtração da sílica.

Este procedimento não reproduziu resultados favoráveis. Houve um baixo rendimento, reflectindo uma grande perda do produto inicial (fracções obtidas nas colunas cromatográficas).

A cromatografia preparativa apesar de ser um dos métodos de separação mais económico e de requerer o mais básico dos equipamentos tem vários inconvenientes, tais como: (*Hostettmann et al.,2001*)

Adsorventes: no geral o formato das placas cromatográficas são de 20x20 cm ou de 20x40 cm, limitando a espessura e o tamanho da placa, reduzindo assim a quantidade de material que se pode separar, uma vez que a carga máxima de amostra para uma placa de sílica com 1mm de espessura é aproximadamente de 5mg/cm².

A aplicação da amostra: é um dos aspectos mais críticos da TLC preparativa. As placas devem ser pré-lavadas de forma a minimizar as impurezas que se podem recuperar quando se extrai o composto de interesse do adsorvente. O solvente para diluir a amostra para aplicação na placa deve ser volátil para não haver problemas de alargamento da banda de aplicação. A banda de aplicação deve ser mais estreita possível para um melhor poder de resolução. (*Hostettmann et al.,2001*)

Eleição da fase móvel e desenvolvimento da placa cromatográfica: A eleição do solvente necessita de testes preliminares por TLC. Não é recomendado o uso de metanol para eluir os componentes uma vez que pode solubilizar o gel de sílica e algumas das suas impurezas. (*Hostettmann et al.,2001*)

3.2.3 Colunas Cromatográficas abertas

As colunas cromatográficas (CCs) abertas foram úteis no fraccionamento do extracto ML em hexano e na separação das lactonas.


Na realização das colunas cromatográficas foram testados parâmetros diferentes (como descrito no Procedimento Experimental), tendo-se verificado que as colunas que reproduziram melhores resultados reuniam as seguintes condições:


Coluna			Sistema de eluentes		Rendimento das colunas com estas condições
Tipo	Dimensão da coluna (altura x diâmetro)	Rácio Amostra:Sílica	Total	Fracções com lactonas	
Molhada	30cm x 3 cm	1mg:60mg	Hexano:Acetato de Etilo 50:0 – 38:12	Entre 36,5:13,5 e 44:6	Média=69,596 Desvpad=13,11 CV(%)=18,84

A técnica de cromatografia por coluna aberta, não permitiu 100% de reprodutibilidade na separação dos compostos do extracto ML em Hexano, daí a necessidade de realizar um elevado número de colunas cromatográficas, de modo a adquirir alguma quantidade de fracções contendo as lactonas puras ou, pelo menos, minimamente contaminadas para proceder a outros passos de separação.

Existem algumas limitações inerentes à técnica de cromatografia em coluna aberta, tais como, a separação ser lenta, a ocorrência de adsorção irreversível dos solutos e a incompatibilidade com partículas de granulometria pequena. (Hostettmann *et al.*,2001)

Em baixo encontra-se uma tabela indicando, de uma forma geral, a obtenção da lactona 'verde'.

Colunas	Fracções	M obtida (mg)	Lactona	TLC
7 ^a	12a-12c	~36,5	Lactona costunolida (~116 mg) Caracterização: RMN + HPLC-MS (Fracção Z – junção)	 Mancha cor verde Rf=0,23
8 ^a	12b-12c	~40,9		
9 ^a	12b-12c	~40,9		

17 ^a	10b	~131,1	Lactona dehidrocostus (contaminada) (~131,1 mg) Caracterização: HPLC-MS		Mancha cor rosa Rf=0,29
-----------------	-----	--------	--	---	----------------------------

Verificou-se através de testes de identificação (referidos mais à frente) que as lactonas designadas neste trabalho de ‘verde’ e ‘rosa’ devido à sua coloração em TLC representam a costunolida e a dehidrocostus, respectivamente. A junção das fracções 12a-12c (da 7^a e 8^aCC) e 12b-12c (da 9^a CC) ficou denominada como **Fracção Z**, de modo a facilitar o seguimento do trabalho.

3.3 Caracterização dos compostos bioativos

3.3.1 GC-MS

A fracção C obtida por TLC preparativa feita à fracção 5 obtida na 1^a CC foi analisada em GC-MS, e apresentou os seguintes picos:

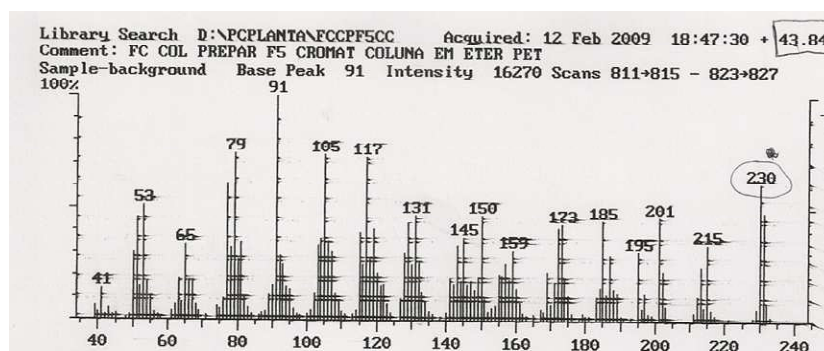


Figura 17– Espectro de massa com as fragmentações da lactona dehidrocostus

Com destaque: m/z de 230 (M^+), 215, 150, 91 e 79. A biblioteca de massa identificou este composto como sendo a lactona dehidrocostus com uma certeza de 96% o que foi confirmado pela comparação com os dados obtidos por Cruz Morais na sua tese de Doutoramento (1987).

Uma vez que o equipamento de GC-MS apresentou uma falha técnica, não foi possível continuar a análise de fracções por este método, no entanto, em relação ao aspecto qualitativo ficou provado com algum grau de confiança a presença da lactona dehidrocostus nalgumas fracções obtidas do extracto hexânico de Madre de Louro.

3.3.2 LC-MS

Analisaram-se algumas fracções obtidas no fraccionamento do extracto de Madre de Louro em Hexano por LC-MSMS com o objectivo de identificar e auxiliar na quantificação dos compostos de interesse presentes no extracto hexânico - lactonas dehidrocostus e costunolida.

Experimentou-se a análise em modo ESI positivo MS^+ e em modo ESI negativo MS^- , tendo-se verificado que o analito responde melhor em modo positivo.

3.3.2.1 Identificação e Quantificação da Costunolida:

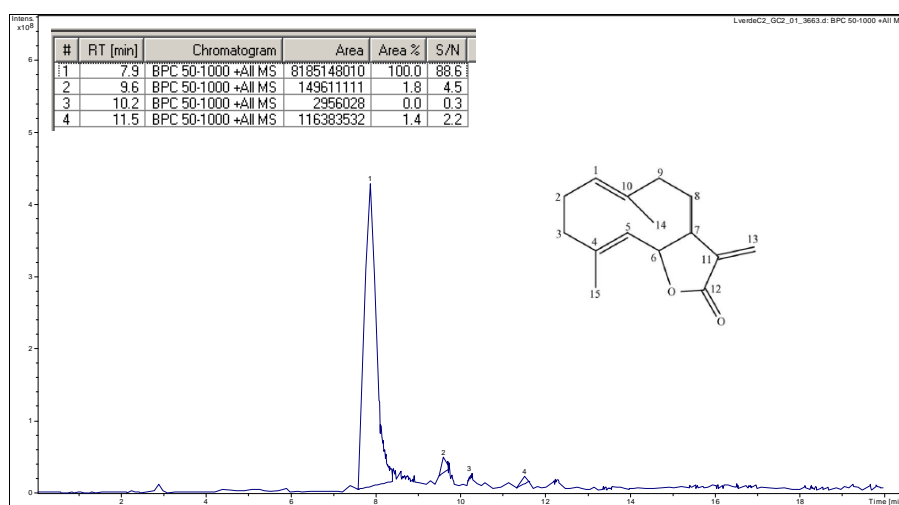


Figura 18 - Cromatograma geral da Fracção Z contendo a lactona ‘verde’

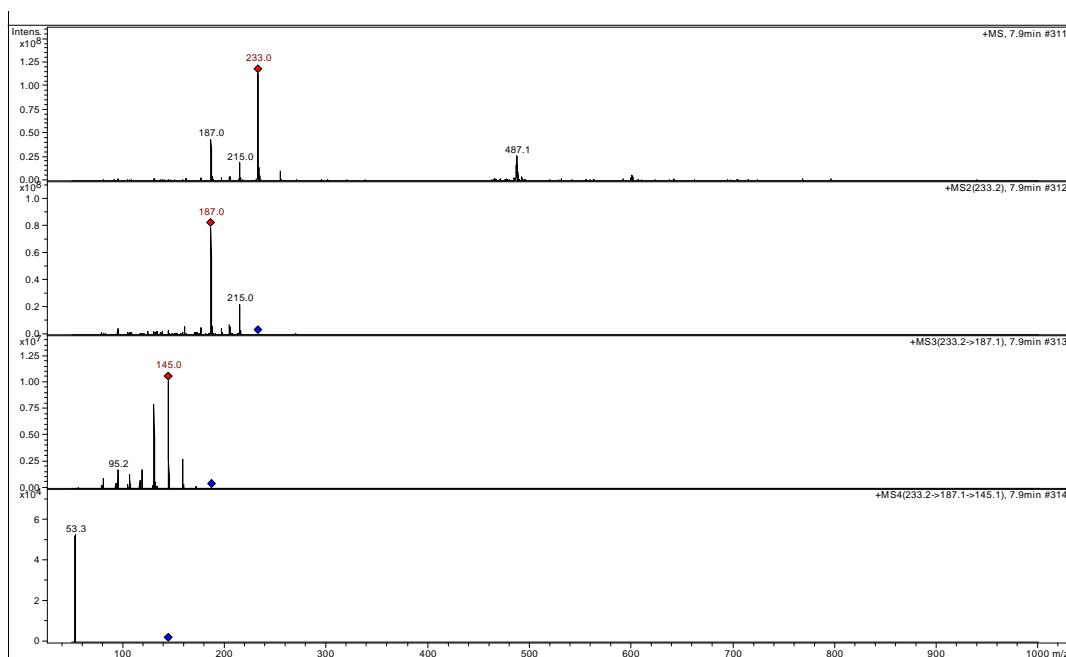


Figura 19 - Espectro de Massa com as fragmentações MS^+ - MS_4^+ da Fracção Z contendo a lactona ‘verde’

O espectro de massa da fracção Z apresentou $[M+H]^+$ com rácio m/z de 233 (100% de I_T) como o ião maioritário com fragmentação: MS_2^+ [233,2]: 187 (100%); MS_3^+ [233,2 \rightarrow 187,1]: 145(100%); MS_4^+ [233,2 \rightarrow 187,1 \rightarrow 145,1]: 53,3 (100%). Estes resultados indicam a presença da lactona costunolida, de acordo com os resultados verificados no artigo de Hu *et al.* (2010).

Para a quantificação da percentagem da lactona costunolida na fracção Z baseamo-nos no seguinte cálculo:

Tendo-se verificado que a costunolida apresentou aproximadamente 97% (96,899%) de pureza nesta fracção analisada.

Num cálculo generalizado (excluindo perdas de pequenas quantidades de amostra ao longo de todo o processo), isto indica-nos que, na extracção de 721,1g de fungo seco em 6500mL de Éter de petróleo obteve-se 16,5116g de extracto contendo 1,06g de lactona costunolida.

3.3.2.2 Identificação e Quantificação da *Dehidrocostus*:

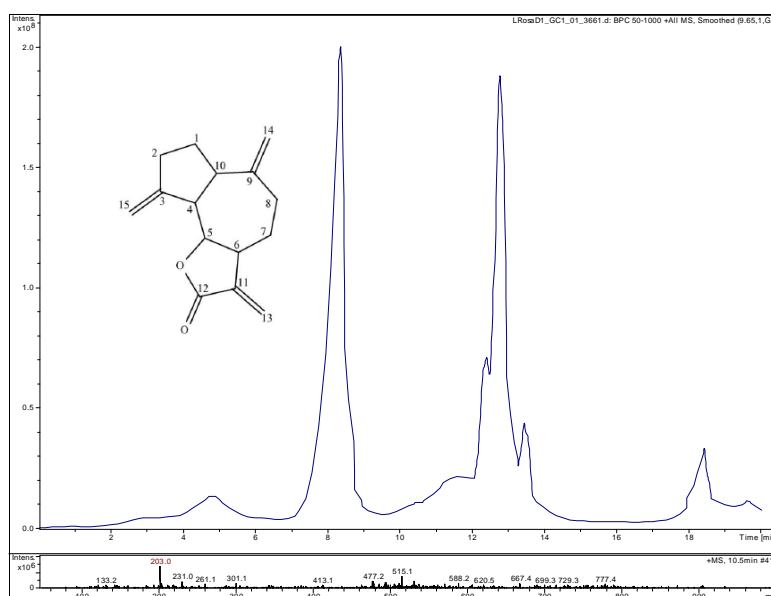


Figura 20 - Cromatograma geral da Fracção 10b da 17^aCC contendo a lactona 'rosa' contaminada

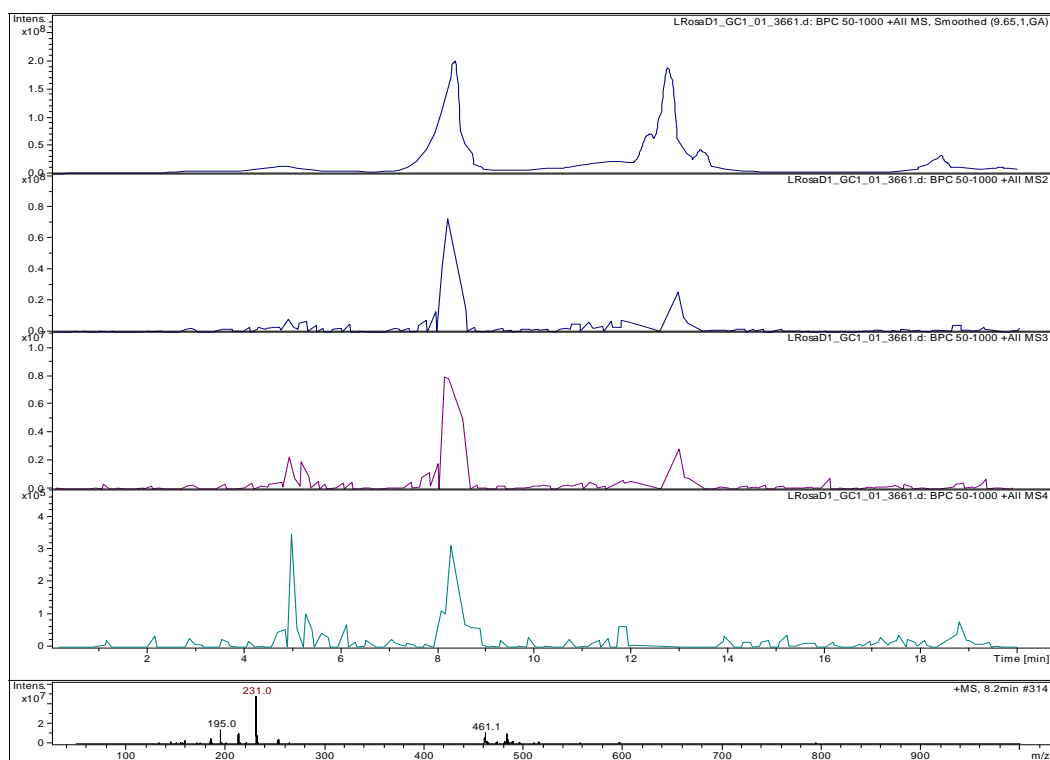


Figura 21 - Espectro de Massa com as fragmentações MS^+ - $MS4^+$ da Fração 10b da 17^aCC contendo a lactona 'rosa'

O espectro de massa da fracção 10b da 17^aCC apresentou $[M+H]^+$ com rácio m/z de 231 (100% de I_r) como o ião maioritário com fragmentação: $MS2^+$ [231,2]: 185 (100%); $MS3^+$ [232,2→185,3]: 143(100%); $MS4^+$ [231,2→185,3→143,3]: 128 (100%).

Estes resultados indicam a presença da lactona dehidrocistus, de acordo com os resultados verificados no artigo de Hu *et al.* (2010), no entanto esta fracção com a lactona contém outros compostos, não tendo sido possível então a obtenção de uma fracção com elevado grau de pureza para a lactona dehidrocistus.

Os fragmentos obtidos do extracto ML em MeOH não puderam ser alvo de estudo e de identificação devido à falta de tempo, no entanto será o passo imediato no seguimento deste tema.

3.3.3 RMN

Como auxílio na identificação das lactonas nas fracções obtidas do extracto hexânico de Madre de Louro, analisou-se o espectro de RMN de ^{13}C .

3.3.3.1 Identificação da *Costunolida*:

Procedeu-se à análise da fracção Z contendo a lactona costunolida em RMN de ^{13}C .

Peak	$\nu(\text{Fl})$ [ppm]	Intensity [abs]	Intensity [rel]
1	170.4233	1202016.75	0.14
2	141.4213	2039448.75	0.25
3	140.1327	2286109.25	0.27
4	136.9194	2375437.25	0.27
5	127.3185	4563442.50	0.51
6	127.0809	4156925.75	0.51
7	119.5744	3825300.50	0.43
8	81.8934	5904699.00	0.67
9	77.3110	58085318.75	6.95
10	77.1966	2843673.00	0.32
11	76.9939	62628240.00	7.04
12	76.6761	57271157.25	6.99
13	65.2853	521476.25	0.06
14	50.4423	4823291.75	0.62
15	41.0115	4769020.75	0.54
16	39.4691	4868360.25	0.61
17	28.0731	4530377.00	0.55
18	26.1955	4944499.00	0.56
19	17.3208	5295076.25	0.61
20	16.3330	383867.50	0.06
21	16.0886	3800269.00	0.43

Figura 22 – Picos obtidos no espectro de RMN do ^{13}C da Fracção Z contendo a lactona costunolida

Fracção Z (*Costunolida*): ^{13}C NMR (400 MHz, C_2HCl_3), δ (ppm): 170.42 (C-12), 141.42 (C-11), 140.13 (C-4), 136.91 (C-10), 127.31 (C-5), 127.08 (C-1), 119.57 (C-13), 81.89 (C-6), 50.44 (C-7), 41.01 (C-3), 39.46 (C-9), 28.07 (C-2), 26.19 (C-8), 17.32 (C-15), 16.08 (C-14).

Os dados foram comparados com a literatura e a identificação da costunolida foi auxiliada pelos estudos feitos por Li *et al.* (2005) e Ferrari *et al.* (2005).

3.3.3.2 Identificação da *Dehidrocostus*:

Uma vez que não foi possível obter uma fracção com um mínimo de grau de pureza da lactona dehidrocostus, refiro aqui a fracção com melhor espectro de RMN ^{13}C , de modo a identificar a presença desta lactona no extracto hexânico da Madre de louro.

Fracção 11 da 2^a CC (*dehidrocostus*): ^{13}C NMR (400 MHz, C_2HCl_3), δ (ppm): 170.22 (C-12), 151.22 (C-11), 149.25 (C-3), 139.66 (C-9), 120.18 (C-13), 112.63 (C-15), 109.63 (C-14), 85.22 (C-5), 52.06 (C-4), 47.65 (C-6), 45.16 (C-10), 36.25 (C-2), 32.61 (C-8), 30.95 (C-7), 30.32 (C-1).

Os dados foram comparados com a literatura e a identificação da dehidrocostus foi auxiliada pelos estudos feitos por Li *et al.* (2005) e Ferrari *et al.* (2005).

3.3.4 Espectroscopia IV

Analisaram-se algumas amostras dos extractos hexânicos em espectroscopia IV e verificaram-se bandas a 1762.16 e 1767.64 cm^{-1} correspondendo ao stretching de carbonilo (C=O) típico das lactonas costunolida e dehidrocostus. Esta observação é feita por comparação com a literatura, nomeadamente com os estudos feitos por Castilho *et al.* (2005) e Díaz *et al.* (2003).

3.4 Testes de actividade antioxidante

Aqui encontram-se representados os gráficos com os resultados dos testes de actividade antioxidante.

Para os testes de actividade antioxidante as amostras testadas foram as seguintes: extractos de madre de louro em Hexano, DCM, Clorofórmio e MeOH, e as fracções contendo a lactona rosa (12a da 18^aCC), a lactona verde (fracção Z) e a mistura de ambas (12b-14a da 18aCC).

Nota: os ensaios espectroscópicos de actividade antioxidante ABTS, DPPH e FRAP para as amostras contendo as lactonas foram feitos em duplicata devido à pouca quantidade obtida destes compostos.

3.4.1 ABTS

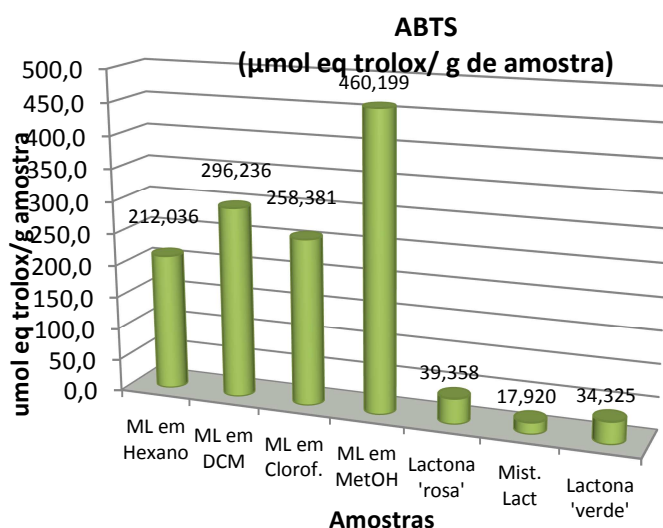


Figura 23 – Gráfico representativo da actividade antioxidante das amostras testadas em $\mu\text{mol eq trolox/g}$ de amostra

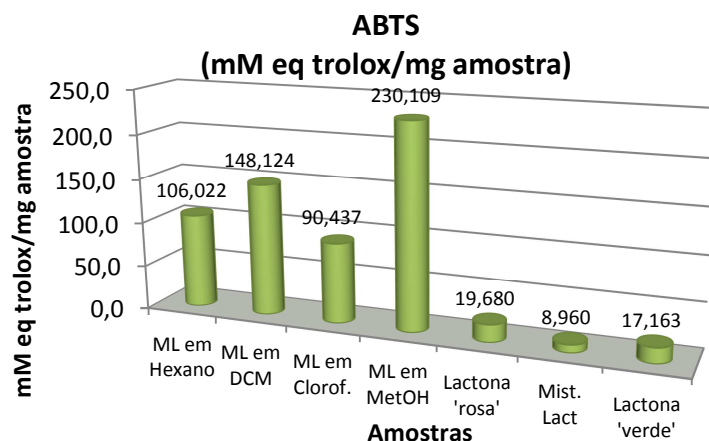


Figura 24 – Gráfico representativo da actividade antioxidante das amostras testadas em mM eq trolox/mg amostra

As amostras com os extractos revelaram maior actividade perante o ensaio de FRAP em relação às amostras com as lactonas, sendo que o extracto de ML em MeOH foi o que se mostrou mais activo seguindo-se o extracto ML em DCM, em Hexano e em Clorofórmio. As fracções testadas com as lactonas revelaram maior actividade em relação à fracção com a mistura das lactonas.

3.4.2 DPPH

Os resultados do teste DPPH não revelaram actividade dos compostos testados com excepção do extracto metanólico, sendo que este apresentou um valor de $1,09E^{-4}$ $\mu\text{mol eq trolox}/100\text{g extracto}$.

2.4.3 Análise qualitativa da actividade antioxidante (DPPH) por TLC

A detecção de compostos com actividade antioxidante em placas de TLC ocorre pelo aparecimento de manchas de cor amarelo esbranquiçado contrastando um fundo roxo de DPPH. (Rodriguez et al. 2008)

Este teste qualitativo é feito pela técnica de TLC (explicada anteriormente) com a alteração do revelador, que é a solução de DPPH. As amostras testadas foram os extractos de ML em Éter de Petróleo em 24h/48h, DCM e Clorofórmio, respectivamente, como verificado de seguida:

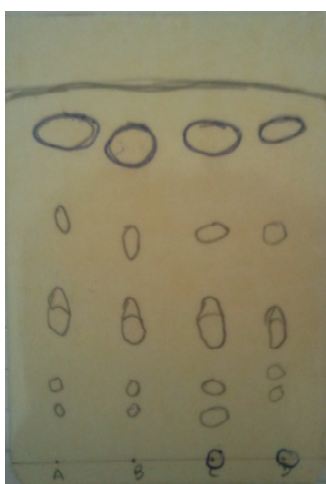


Figura 25 – TLC revelada com solução de DPPH

Os compostos mais apolares foram os que exibiram maior nitidez na descoloração ao aplicar o revelador, sendo que os compostos com Rfs idênticos aos das lactonas não demonstram uma mancha significativa.

Este teste qualitativo contrasta com os valores obtidos pelo ensaio espectroscópico quantitativo de actividade antioxidante de DPPH, no sentido em que o teste espectroscópico revela actividade apenas no extracto ML em MeOH.

3.4.4 FRAP

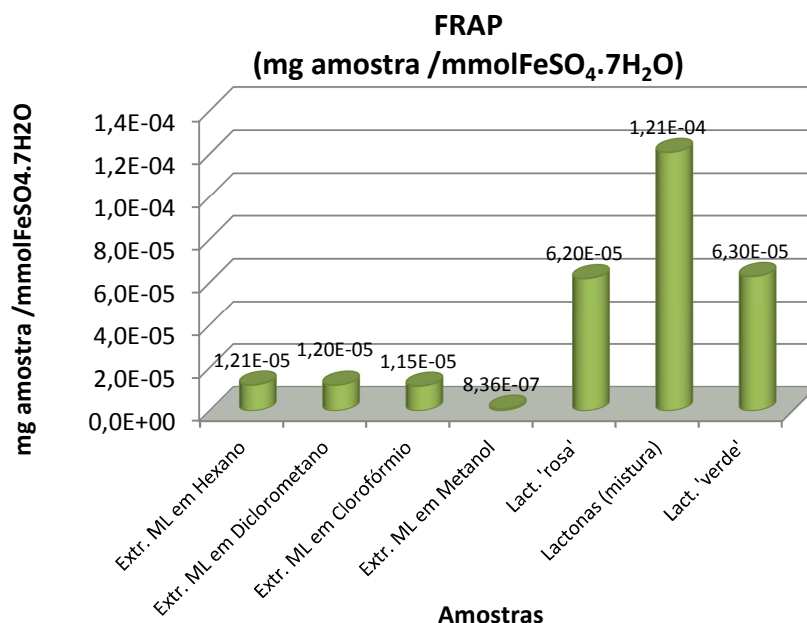


Figura 26 – Gráfico representativo da actividade antioxidante em mg amostra por mmolFeSO₄.7H₂O

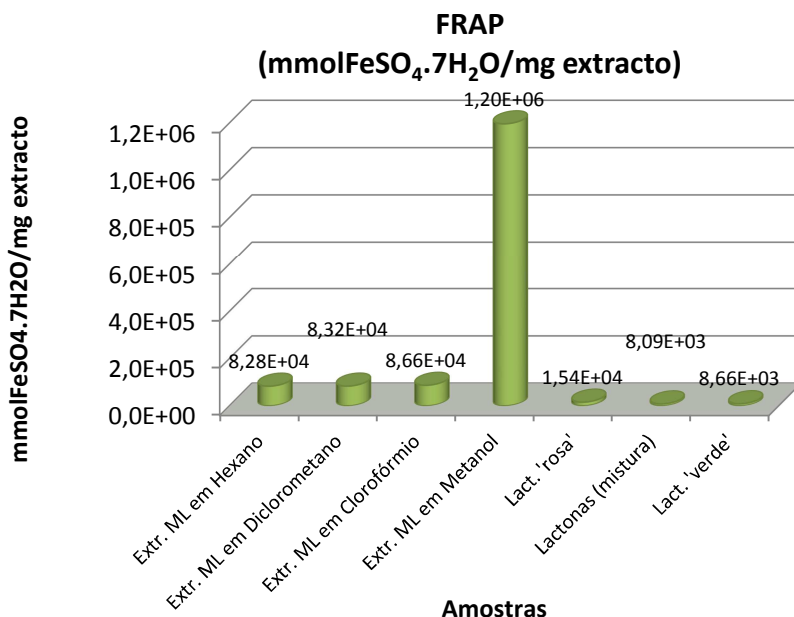


Figura 27 – Gráfico representativo da actividade antioxidante em mmolFeSO₄.7H₂O por mg amostra

Verificou-se que o extracto ML em MeOH é a amostra mais activa uma vez que necessita de apenas 8,36E⁻⁷ mg de amostra para reagir com 1 mmolFeSO₄.7H₂O, enquanto a mistura das lactonas (dehidrocostono e costunolida) necessita de 1,21E⁻⁴ mg de amostra para reagir com 1 mmolFeSO₄.7H₂O.

Pelos resultados obtidos, os extractos de ML apresentam mais actividade antioxidante em relação às lactonas.

3.4.5 Sistema β-caroteno / ácido linoléico

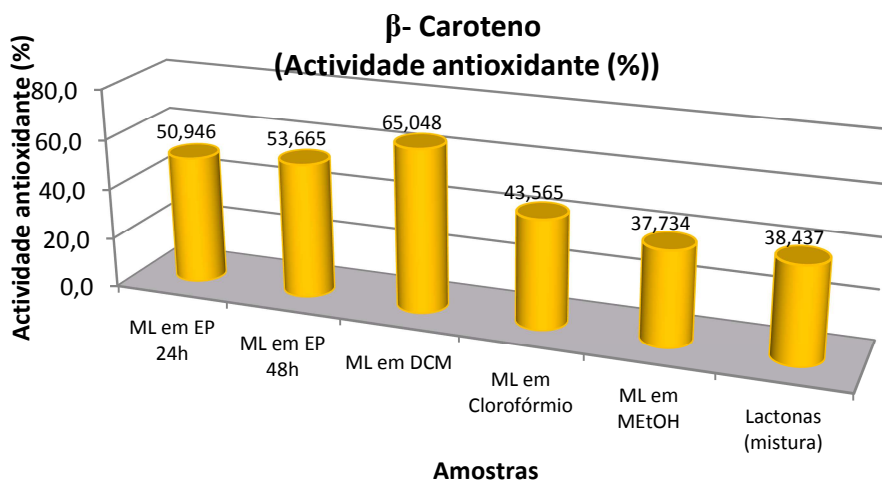


Figura 28 – Gráfico representativo da percentagem de actividade antioxidante por amostra

Não foi possível realizar o teste do β -caroteno nas amostras de lactonas devido à pouca quantidade obtida, no entanto foi testada uma amostra contendo a mistura das lactonas.

Todas as amostras testadas revelaram actividade antioxidante, no entanto o extracto ML em DCM foi o que revelou maior percentagem de actividade antioxidante com 65%, seguindo-se o extracto ML em Éter de Petróleo com ~50% e as restantes amostras com valores inferiores a 50%.

O extracto metanólico foi o que revelou melhores resultados para os testes de ABTS, DPPH e FRAP, destacando-se em relação às restantes amostras, virando as atenções para o potencial antioxidante existente neste extracto, enquanto no teste do β -caroteno os extractos de ML em Diclorometano e em EP são os que revelam maior percentagem de actividade antioxidante.

3.5 Quantificação dos fenóis totais

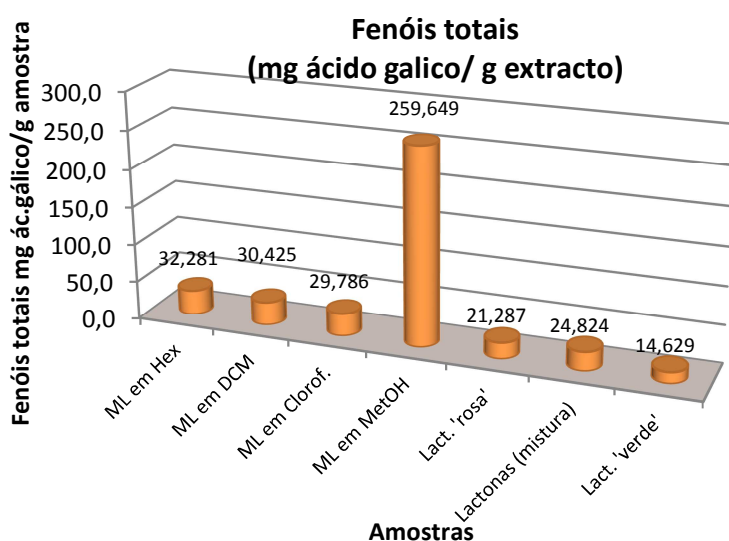


Figura 29 – Gráfico representativo da quantificação dos fenóis totais pelo método de Folin (mg de ácido gálico por g de amostra)

Verificou-se que o extracto metanólico contém, concerteza, compostos fenólicos.

As fracções testadas com as lactonas acusaram positivo neste teste, e uma vez que estes compostos não são fenólicos representa uma falha neste método, ou seja, demonstra a ausência de precisão.

Uma vez que as amostras contendo as lactonas deram um falso positivo e cujos valores aproximam-se dos valores obtidos para os extractos de ML em hexano, DCM e Clorofórmio, não é possível determinar se estes extractos possuem na sua constituição compostos fenólicos.

Esta falha indica a falta de sensibilidade deste teste, tendo sido apenas possível quantificar os compostos fenólicos no extracto ML em MeOH.

Os métodos baseados em transferência de electrões medem a capacidade de um antioxidante na redução do oxidante, o qual muda de cor quando reduzido. O grau de variação da cor é correlacionado com as concentrações dos antioxidantes na amostra. Aqui os valores de pH têm um efeito importante na capacidade de redução dos antioxidantes. (Huang *et al.*, 2005)

Estes ensaios incluem o teste de ABTS, FRAP, DPPH e o de Folin-Ciocalteu. (Huang *et al.*, 2005)

Apesar das desvantagens o teste quantitativo de fenóis usando o reagente de Folin-Ciocalteu, é conveniente, simples e reprodutível, e tem se tornado num ensaio de rotina no estudo de antioxidantes fenólicos. (Huang *et al.*, 2005)

O teste de DPPH é tecnicamente simples mas algumas desvantagens inerentes limitam a sua aplicação. (Huang *et al.*, 2005)

O ideal será sempre realizar vários testes baseados em transferência de electrões, o que muitas vezes permite a obtenção de excelentes correlações lineares, valorizando assim os resultados obtidos. (Huang *et al.*, 2005)

3.6 Ensaio biológicos

Aqui encontram-se representados os resultados dos ensaios biológicos.

Para os testes de actividade biológica, as amostras testadas foram as seguintes: extractos de madre de louro em Hexano, DCM, Clorofórmio e MeOH, e as fracções contendo a lactona rosa (12a da 18^aCC), a lactona verde (fracção Z) e a mistura de ambas (12b-14a da 18aCC).

3.6.1 Teste de citotoxicidade em *Artemia salina*

A % de mortalidade foi calculada pela regra de:

10 (larvas mortas)-----100% (mortalidade)

Nº larvas mortas (teste)----- X

sendo que X representa a % de mortalidade de uma dada concentração.

A determinação do DL_{50} foi feita por interpolação linear, como exemplificado em baixo com a amostra de extracto ML em Éter de Petróleo:

Concentração (mg/mL)	% Mortalidade
5	100
2,5	97,5
2	97,5
1	57,5
0,5	0
0,1	0

x	y
0,5	0
x	50
1	57,5

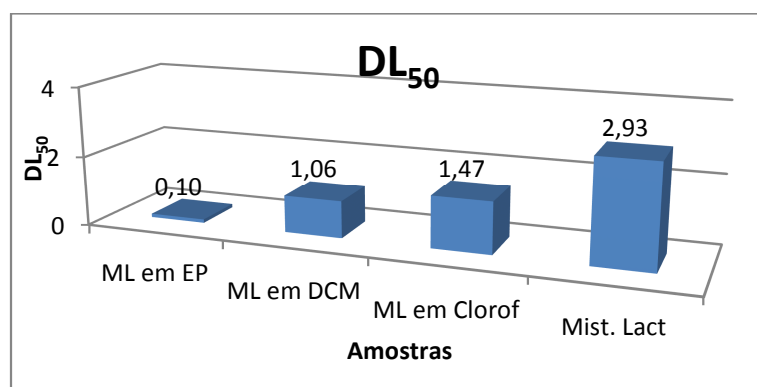


Figura 30 – Gráfico representativo da Dose Letal 50 em mg/mL das amostras testadas.

As amostras de ML em MeOH e das lactonas ‘rosa’ e ‘verde’ apresentaram valores de % de mortalidade inferiores a 50%, tendo sido, portanto, excluídas deste gráfico.

O extracto em Éter de Petróleo foi a amostra que apresentou um valor de DL_{50} mais baixo seguindo-se o extracto em diclorometano, o extracto em clorofórmio e por fim a Fracção (12b-14^a da 18^aCC) com a mistura de lactonas com os valores de 0,10; 1,06; 1,47 e 2,93 mg/mL, respectivamente.

Estes resultados indicam que o extracto ML em Éter de Petróleo foi o que apresentou maior citotoxicidade nas larvas de camarão uma vez que apresentou o valor de DL₅₀ mais baixo, ou seja, requer menos quantidade de amostra para eliminar 50% da população.

3.6.2 Teste de alelopatia sobre sementes de *Lactuca sativa*

Devido à indisponibilidade de alguns equipamentos e reagentes no laboratório, foram testados vários parâmetros (individualmente) de forma a verificar qual o procedimento mais adequado a este teste com as condições disponíveis. Apesar de terem sido testados vários parâmetros incluindo várias concentrações das amostras, os resultados obtidos não permitem avaliar precisamente a inibição das amostras sobre a germinação das sementes de Alface.

Seria requerido mais tempo e maior quantidade de amostra (extractos e lactonas) para chegar ao procedimento adequado de modo a avaliar correctamente a actividade alelopática sobre as sementes de alface e possivelmente testar noutras espécies também.

Existem muitas condições a serem monitorizadas ao usar sementes em bioensaios. A maioria dos estudos usa uma ou pouco mais espécies teste diferentes limitando assim a resposta aos químicos testados. (Macías *et al.*, 2000)

No entanto, estudos já realizados provam a actividade alelopática das lactonas sesquiterpénicas costunolida e dehidrocostus, como verificado, por exemplo, no estudo de Abdelgaleil *et al.* (2007) que refere a lactona costunolida como potencial aleloquímico.

3.6.3 TLC screening – Inibidores da acetilcolinesterase

O sistema de eluentes para todas as amostras foi de Hexano e éter Dietílico (75:25), com excepção do extracto ML em metanol, que foi de Acetato de Etilo e Metanol (55:5).

Tabela 9 – Identificação dos compostos assinalados nas figura seguinte

ID	Amostra	Concentração (mg/mL)	Rf (revelador Liberman-Bouchard)	Rf (revelador enzima AChE)
A	Eserina		-	
B	Ácido clorogénico		-	
Hex (C)	ML em Hexano	5,3	Lact.rosa ~ 0,29 Lact. Verde ~ 0,23	~0,30
DCM (D)	ML em DCM	5,7		
Clorof. (E)	ML em Clorofórmio	5,0		
MeOH (F)	ML em MeOH	1,6	-	
Rosa (G)	Lactona 'rosa'	5,0	~ 0,29	
Mix (H)	Mistura das lactonas	5,0	Lact.rosa ~ 0,29 Lact. Verde ~ 0,23	~0,25
Verde (I)	Lactona 'verde'	5,0	~ 0,23	

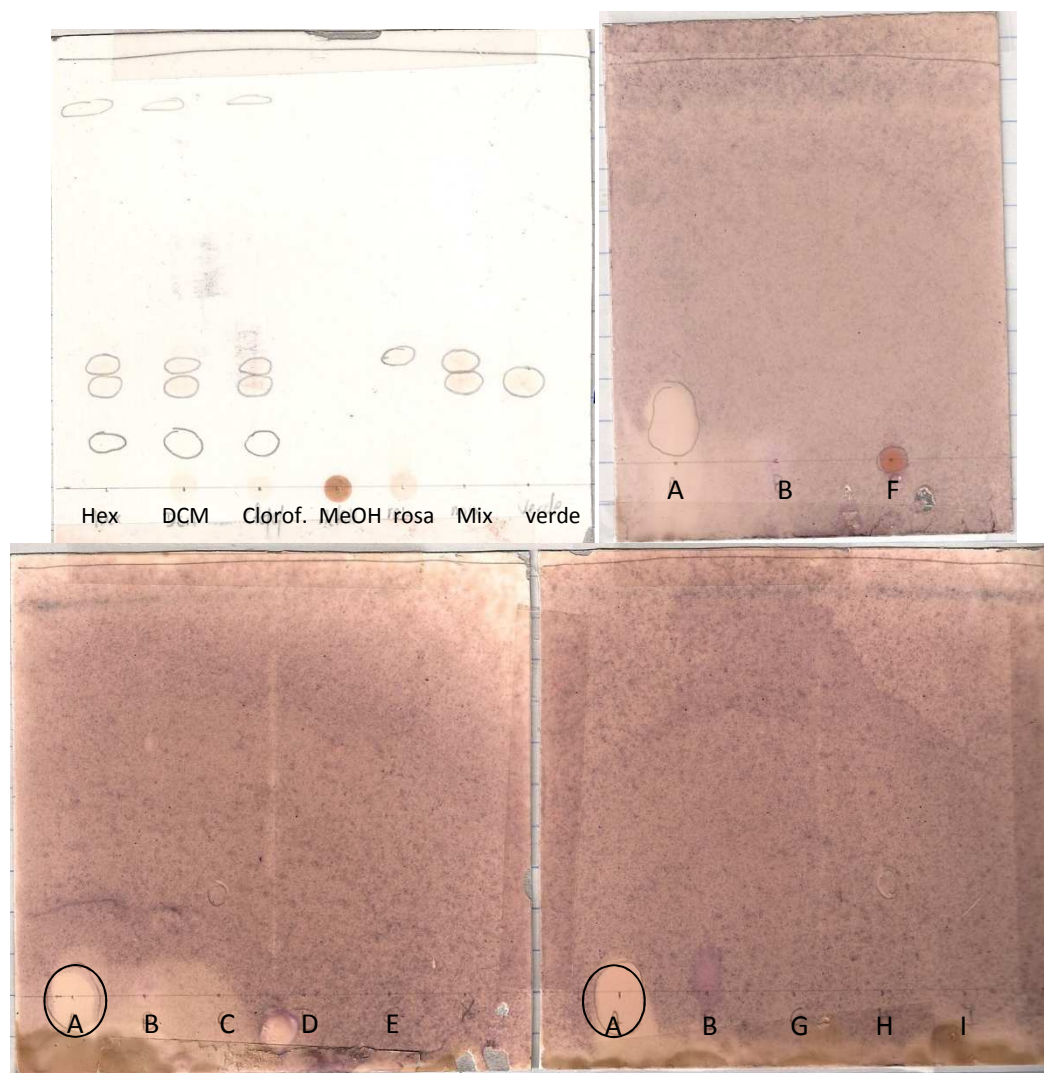


Figura 31 – TLCs reveladas com a solução de Lieberman-Bouchard (a primeira) e de acetilcolinesterase

A 1ª TLC foi revelada com o Lieberman-Bouchard para podermos comparar os factores de retenção com possíveis manchas brancas das TLCs reveladas com a solução da enzima acetilcolinesterase.

O extracto de ML em Hexano e a mistura das lactonas revelaram manchas brancas muito ténues com Rfs de aproximadamente $\sim 0,30$ e $\sim 0,25$, o que poderia representar ambas as lactonas. Não é portanto, possível dizer com toda a certeza quais as amostras que reagem perante a acção da enzima acetilcolinesterase.

Será necessário a realização de um teste mais preciso para definir quais as amostras que inibem a actividade da acetilcolinesterase.

4. Conclusão e Perspectivas Futuras

A Madre de Louro possui na sua constituição compostos de grande interesse científico, nomeadamente as lactonas sesquiterpénicas costunolida e dehidrocostus. Pensa-se que estes compostos advêm do hospedeiro – *Laurus novocanariensis* – tal como é descrito no trabalho de doutoramento de Cruz Morais (1987), em que este autor faz um estudo comparativo entre ambas as espécies.

Estas lactonas têm sido alvo de muitos estudos científicos nos últimos tempos devido ao seu potencial nas mais diversas actividades biológicas. O problema consiste em desenvolver métodos eficazes na obtenção de fracções com um elevado grau de pureza (> 97%).

Pela técnica de TLC, usando como revelador a solução de Lieberman-Bouchard, verificou-se a presença de duas manchas que se destacam dos restantes compostos pela coloração que adquirem, nomeadamente rosa e verde, que mais tarde vieram a ser identificadas como as lactonas dehidrocostus e costunolida, respectivamente.

Neste trabalho experimental foram testadas algumas técnicas de fraccionamento e de separação destas lactonas de interesse a partir de extractos do fungo Madre de Louro.

Foi possível obter 116 mg de lactona costunolida com uma percentagem relativa de pureza de 97%, através do fraccionamento pela técnica de cromatografia em coluna aberta com sistema de eluentes Hexano:Acetato de etilo (50:0 – 43:7 mL), tendo procedido à sua identificação por HPLC-MS e RMN ¹³C.

Infelizmente, a purificação da lactona dehidrocostus não foi conseguida, permanecendo em fracções com alguns contaminantes.

Relativamente ao estudo de actividade antioxidante, para os estudos de ABTS, DPPH e FRAP o extracto metanólico obteve melhores resultados, demonstrando ter maior poder antioxidante, daí que seja necessário proceder a uma identificação dos compostos que este apresenta. Esta tarefa requer tempo, daí que não tenha sido possível realizar neste trabalho.

No estudo de actividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico todas as amostras testadas revelaram actividade, tendo sido o extracto em diclorometano o mais activo.

O teste de quantificação dos fenóis utilizando o reagente Folin-Ciocalteu demonstrou a sua falibilidade ao revelar um falso positivo nas amostras contendo as lactonas, no entanto veio enaltecer a presença destes compostos no extracto metanólico. A dúvida sobre a presença de compostos fenólicos nos extractos de hexano, diclorometano e clorofórmio mantém-se uma vez que os resultados quantitativos assemelham-se aos obtidos nas amostras com as lactonas.

Em relação aos ensaios biológicos, o teste de toxicidade sobre artemia salina demonstrou ser o extracto hexânico o mais activo em relação às restantes amostras, incluindo a fracção com a mistura das lactonas, uma vez que apresentou um valor de DL₅₀ mais baixo (0,1mg/mL), ou seja, requer menos quantidade de amostra para eliminar 50% da população.

Testaram-se alguns procedimentos para o estudo de inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa*, no entanto não foram obtidos resultados concretos. Seria necessário mais tempo e maior quantidade de amostra para testar os parâmetros mínimos de modo a chegar às condições ideais para a sua realização. O teste qualitativo sobre a presença de inibidores da enzima acetilcolinesterase pela técnica de TLC não desenvolveu resultados concretos, não sendo possível a sua determinação.

A sinergia das lactonas em questão não pôde ser realçada neste trabalho devido aos resultados obtidos, no entanto outros estudos feitos pelo nosso grupo (Luna-Herrera *et al.*, 2007) demonstram e enaltecem esta situação.

Perspectivas futuras:

Este trabalho traz mais informação de caracterização das lactonas costunolida e dehidrocostus obtidas a partir do fungo *Laurobasidium lauri*, e de algumas possíveis técnicas e procedimentos de isolamento e purificação. Será, no entanto, necessário isolar mais quantidade destes compostos puros de modo a enviar para outros laboratórios com os quais temos parceria, de modo a proceder a testes:

- de actividade anticancerígena *in vitro* (Instituto Canário de Investigação em Cancro);
- de anti-tuberculose *in vivo* (Instituto politécnico Nacional, México);
- de actividade anti-inflamatória *in vivo* (UNIVALI, Brasil);
- de actividade anti-ulcerativa *in vivo*.

Os testes *in vivo* com estas lactonas serão de vital importância no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para terapias de patologias diversas.

5. Referências Bibliográficas

- Abdelgaleil SAM, Hashinaga F. *Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from Magnolia grandiflora L.* Biochemical Systematics and Ecology 2007; 35: 737-742.
- Alves MCS, Filho SM, Inneco R *et al.* *Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz alface*, Pesq. Agropec. Bras. 2004; 39(11): 1083-1086.
- Ardrey RE. *Liquid chromatography – Mass spectrometry: an introduction*. England, John Wiley & Sons Ltd. 2003, 276 pgs.
- Barros L, Ferreira MJ, Queirós B *et al.* *Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities*. Food Chemistry 2007; 103: 413–419.
- Benzie IFF & Strain JJ. *Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. Methods Enzymol 1999; 299: 15–27.
- Campos LS. *Entender a Bioquímica*. Lisboa, Escolar Editora. 2005, 683 pgs.
- Carollo CA. *Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubaçãoda radiação solar e do stress hídrico, acumulo de metabólitos secundários em espécies do género Mikania*. Tese de doutoramento 2008, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.
- Castilho PC, Costa MC, Rodrigues A *et al.* *Characterization of Laurel Fruit Oil from Madeira Island, Portugal*. JAOCS 2005; 82 (12): 863-868.
- Cerceda CML, Freire L. *Laurobasidium lauri (Geyler) Jülich. Especie mediterránea en Galicia (N.O. de la Península Ibérica)*. MUNIBE (Ciencias Naturales-Natur Zientziak) 1991; 4:99-101.

Choi EM, Kim GH, Lee YS. *Protective effects of dehydrocostus lactone against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells.* Toxicology in Vitro 2009; 23: 862–867.

Choi SH, Im E, Kang HK. *Inhibitory effects of costunolide on the telomerase activity in human breast carcinoma cells.* Cancer Letters 2005; 227: 153–162.

Díaz E, Barrios H, Fuentes A *et al.* *Evidencias espectroscópicas de RMN 1H y 13C en la formación inusual de un “carbonilo inorgánico”, derivado de la lactona costunólida.* Journal of Mexican Society 2002; 46(3): 242-246.

Dey PM, Harborne JB. *Methods in plant biochemistry: Assays for bioactivity.* Vol.6. London, Academic Press Limited 1991, 341 pgs.

Einhellig FA. *Interactions involving allelopathy in cropping systems.* Agronomy Journal 1996; 88:886–893.

Ferrari B, Castilho P, Tomi F *et al.* *Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostuslactone in the fixed oil of Laurus novocanariensis by 13C-NMR Spectroscopy.* Phytochemical Analysis 2005; 16:104-107.

Gatti A.B. *Atividade alelopática de extratos aquosos de Aristolochia esperanzae O. KTZE e Ocotea odorífera (VELL) ROHWER na germinação e crescimento de Lactuca sativa L. e Raphanus sativus L.* Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais 2003, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Grieco PA e Nishizawa M. *Total Synthesis of (+)-Costunolide.* J. Org. Chem. 1977; 42(10): 1717-1720.

Hayden C. *When nature goes public: the making and unmaking of bioprospecting in Mexico.* New Jersey, Princeton University Press. 2003; 284 pgs.

Visualizado a 04/07/2010 em Google Books:

<http://books.google.pt/books?id=Nm9DXolY1PEC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

Harwig J e Scott PM. *Brine Shrimp (Artemia salina L.) Larvae as a Screening System for Fungal Toxins*. Applied Microbiology 1971; 21(6): 1011-1016.

Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. *Técnicas de cromatografia preparativa: Aplicaciones en el aislamiento de productos naturales*, Tradução de Professor M. V. Dabrio. Barcelona: Springer Verlag Ibérica. 2001, 220pgs. Tradução de: *Preparative Chromatography Techniques*.

Hu F, Feng S, Wu Y. *Quantitative analysis of costunolide and dehydrocostuslactone in rat plasma by ultraperformance liquid chromatography-electrospray ionization-mass-spectrometry*. Biomedical Chromatography. Publicado online a 23 de Agosto de 2010.

Huang D, Ou B, Prior RL. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 1841-1856.

Jacobsen NE. *NMR Spectroscopy explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. New Jersey, John Wiley and Sons Inc. 2007, 668 pgs.

Karamac M. e Amarowicz R. *Antioxidant activity of BHA, BHT and TBHQ examined with Miller's test*. Grasas y Aceites, 1997; 48(2): 83-86.

Kil-Ung Kim and Dong-Hyun Shin, *The importance of allelopathy in breeding new cultivars, Weed management for developing countries (Addendum 1)*, FAO Plant Production and Protection Papers - 120 Add.1, 2003 - 290 pg

Visualizado a 04/07/2010 em: <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y5031E/y5031e0f.htm>

Kim EJ, Lim SS, Park SY *et al*. *Apoptosis of DU145 human prostate cancer cells induced by dehydrocostus lactone isolated from the root of Saussurea lappa*. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 3651–3658.

Kitson FG, Larsen BS, McEwen CS, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a Pratical guide*, California, Academic Press. 1996, 381 pgs.

- Kraker JW, Franssen MCR, Joerink M, *et al.* *Biosynthesis of Costunolide, Dihydrocostunolide, and Leucodin. Demonstration of Cytochrome P450-Catalyzed Formation of the Lactone Ring Present in Sesquiterpene Lactones of Chicory.* *Plant Physiology* 2002; 129: 257–268.
- Kraker JW, Franssen MCR, Groot A, *et al.* *(+)-Germacrene A Biosynthesis: The Committed Step in the Biosynthesis of Bitter Sesquiterpene Lactones in Chicory.* *Plant Physiol.* 1998; 117: 1381–1392.
- Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S *et al.* *Natural Products from plants.* Florida, CRC Press LLC. 1999, 343 pgs.
- Leite AM, Lima EO, Souza EL *et al.* *Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants, Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2009; 19(4): 842-846.
- Li A, Sun A, Liu R. *Preparative isolation and purification of costunolide and dehydrocostuslactone from Aucklandia lappa Decne by high-speed counter-current chromatography.* *Journal of Chromatography A* 2005; 1076: 193–197.
- Lobo AM, Lourenço AM. *Biossíntese de Produtos Naturais.* Lisboa, IST Press. 2007, 272pgs.
- Luna-Herrera J, Costa MC, González HG *et al.* *Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from Laurus spp.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 548–552.
- Luna JS, Santos AF, Lima MRF *et al.* *A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil.* *J Ethnopharmacol* 2005; 97(2):199-206.
- Macías FA, Castellano D, Molinillo JMG *et al.* *Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals Selection of Standard Target Species.* *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 2512-2521.

Miller JM, ***Chromatography: Concepts and contrasts***. New Jersey, John Wiley and Sons, Inc. 2005, 490 pgs.

Visualizado a 04/07/2010 em Google Books:
http://books.google.pt/books?id=22CUljAmScC&printsec=frontcover&dq=chromatography&hl=pt-PT&ei=DtWXTIaRFJ6HOLvMyIgj&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=thin%20layer&f=false

Miwa S, Beckman KB, Muller FL. ***Oxidative Stress in aging: From Model systems to human diseases***. USA, Humana Press. 2008. 320 pags.

Visualizado a 29/09/2010 em Google Books:
http://books.google.pt/books?id=qyBsWMYgorgC&pg=PA276&dq=FRAP+assay&hl=pt-PT&ei=Oue6TOv0ApOG4QaY5NX3DQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=FRAP%20assay&f=false

Morais, JMC. Identificação e acção farmacológica de alguns constituintes do fungo parasita *Laurobasidium lauri* (Geyler) Julich e a sua detecção na planta hospedeira *Laurus azorica* (Seub) Franco. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia 1987.

Mroczek T. *Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography*. Journal of Chromatography A 2009; 1216: 2519–2528.

Nascimento JE, Melo AFM, Lima e Silva TC *et al*. *Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de Artemia salina Leach. de três espécies medicinais do género Phyllanthus (Phyllanthaceae)*. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2008; 29(2): 143-148.

Niño J, Hernández JA, Correa YM *et al*. *In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(7): 783-785.

Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR *et al*. *Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks*. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 2326–2331.

- Orhan I, Sener B, Choudhary MI *et al.* *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants.* Journal of Ethnopharmacology 2004; 91: 57–60.
- Pulido R, Bravo L, Suara-Calixto F. *Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay.* J. Agric. Food Chem. 2000, 48: 3396-3402.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A *et al.* *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical, cation decolorization assay.* Free Radical Biology & Medicine 1999, 26 (9/10): 1231–1237.
- Rivera D, Obón C. *The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review.* Journal of Ethnopharmacology 1995; 46: 73-93.
- Rodríguez M, Hasegawa M, González-Mújica F *et al.* *Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon.* Brazilian Journal of Pharmacognosy 2008; 18(3): 331-338.
- Sarker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural Products Isolation: Methods in Biotechnology.* New Jersey, Humana Press, 2006. 215 pgs.
- Schmidt T.J., *Toxic Activities of Sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects.* Current Organic Chemistry 1999; 3 (6): 577-608.
- Scott RPW. *Tandem Techniques: Separation Science Series.* Inglaterra, John Wiley & Sons Ltd. 1997, 526 pgs.
- Sies H. e Stahl W. *Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants.* Am J Clin Nutr, 1995; 62:1315S-21S.
- Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM *et al.* *Brine shrimp bioassay of some species of Solanum from Northeastern Brazil.* Brazilian Journal of Pharmacognosy 2007; 17(1): 35-38.

Siddhuraju P. e Becker K., *Studies on antioxidant activities of mucuna seed (Mucuna pruriens var utilis) extract and various non-protein amino/imino acids through in vitro models*, J Sci Food Agric 2003; 83:1517–1524.

Stuart B., *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. Inglaterra, John Wiley & Sons Ltd. 2004, 224pgs.

Teow CC, Truong VD, McFeeters RF *et al.* *Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours*. Food Chemistry 2007; 103: 829–838.

Tinoco MT, Ramos P, Candeias MF. *Effects of a hexane extract from Laurus novocanariensis leaves on the ethanol metabolism of Wistar rats*. Fitoterapia 2009; 80: 130-133.

Yoshikawa M, Shimoda H, Uemura T *et al.* *Alcohol Absorption Inhibitors from Bay Leaf (Laurus nobilis): Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the Activity*, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2000; 8: 2071-2077.

Waterhouse AL, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 2002, I1.1.1-I1.1.8.

Visualizado a 04/07/2010 em:

<http://www.nshtvn.org/ebook/molbio/Current%20Protocols/CPFAC/fai0101.pdf>.

Wartewig S. *IR and Raman Spectroscopy Fundamental Processing*. Alemanha, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2003, 175 pgs.

Weston L.A., *Utilization of Allelopathy for Weed Management in Agroecosystems*. Agronomy Journal 1996; 88:860-866.

6. Anexos

Exemplo dos cálculos feitos sobre os resultados obtidos no teste de citotoxicidade em *Artemia salina*, neste caso com extracto ML em EP.

Tabela I- Dados e respectivos cálculos da citotoxicidade de ML em EP em <i>Artemia salina</i>							
Concentração (mg/mL)	Diluição (mg/ml)	Repetições	n° larvas mortas	Média	Desvio padrão	CV (%)	% Mortalidade
Branco		1	0	0	0	0	0
		2	0				
		3	0				
20	5	2	10	10	0	0	100
		1	10				
		2	10				
		3	10				
20,3	2,5375	1	10	9,75	0,5	5,128205	97,5
		2	10				
		3	9				
20	2,5	1	10				
20	2	2	9	9,75	0,5	5,128205	97,5
		3	10				
20,3	2,03	1	10				
		3	10				
		2	6	5,75	0,5	8,695652	57,5
		3	6				
20	1	1	6				
			3	5			
			3	0	0	0	
20	0,5	1	0				
		2	0				
		3	0				
20	0,1	1	0	0	0		0
		2	0				
		3	0				
20	0,1	1	0				
		2	0				
		3	0				

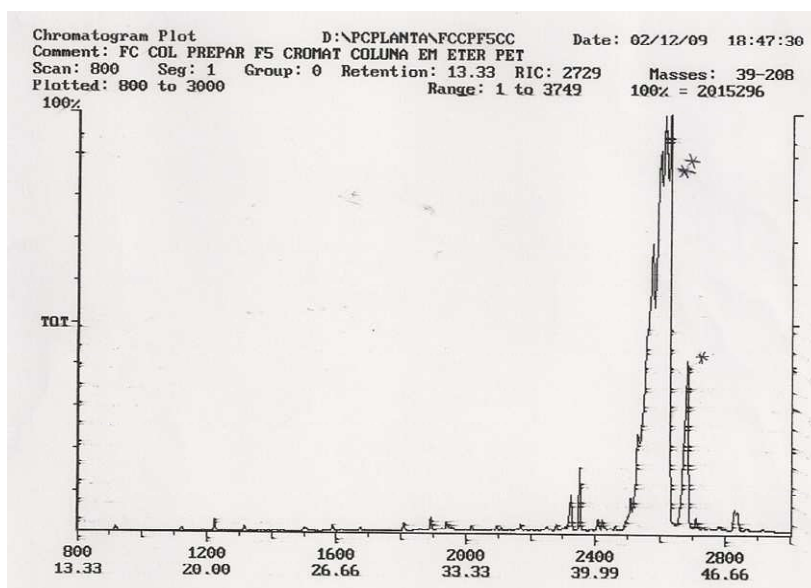


Figura I - Cromatograma geral da Fracção C obtida na TLC preparativa feita à Fracção 5 da 1ª CC

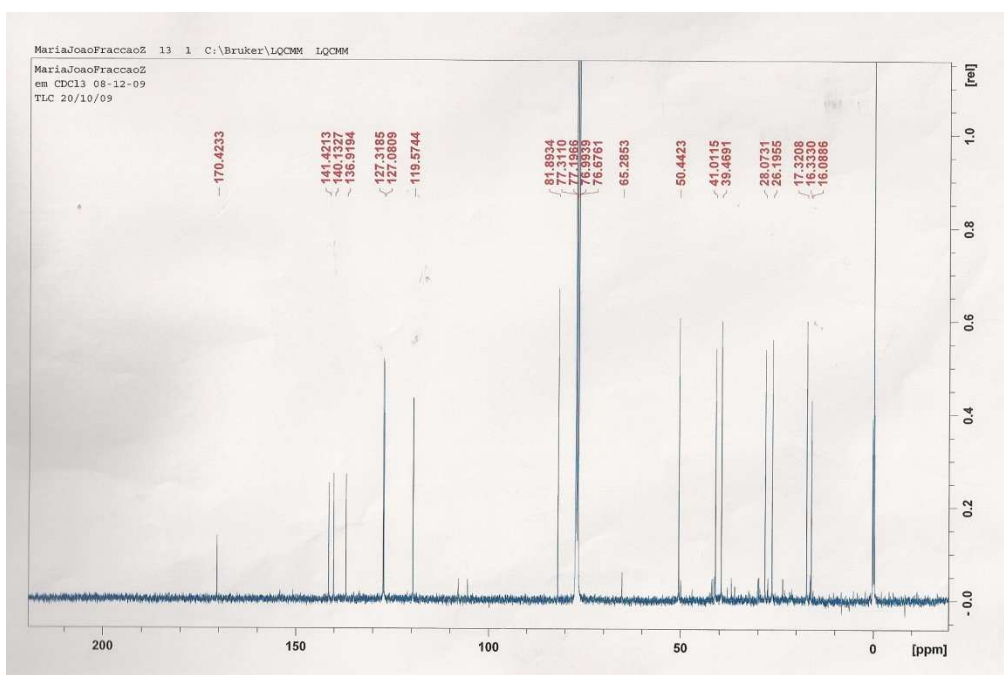


Figura II - Espectro de RMN do conjunto da fracção Z contendo a lactona costunolida

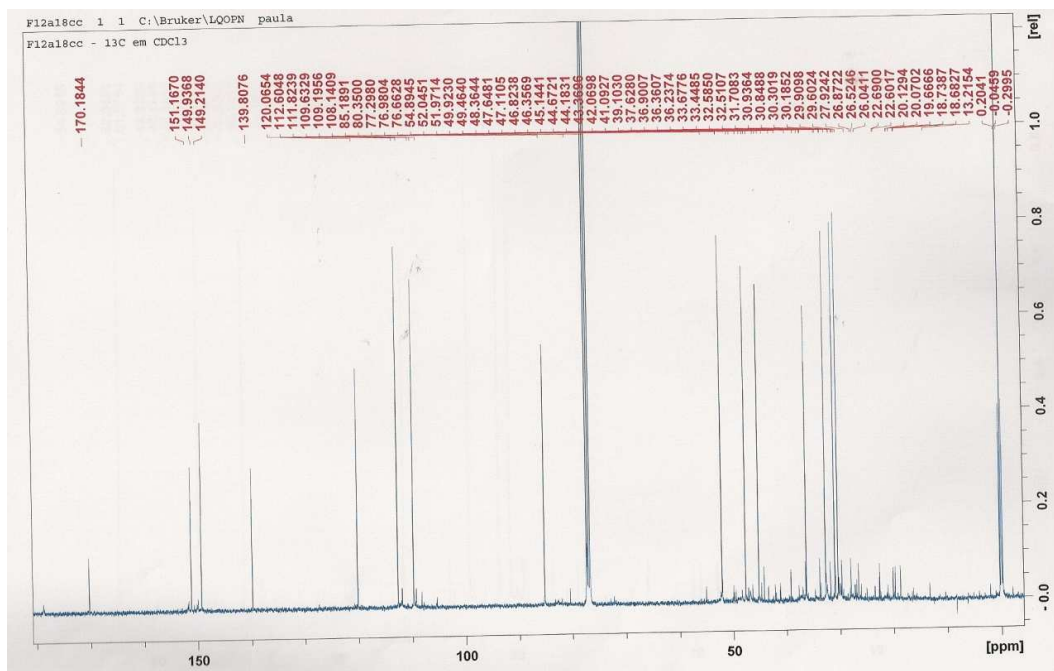


Figura III - Espectro de RMN da fração 12^a obtida na 18^aCC contendo a lactona dehidrocostus

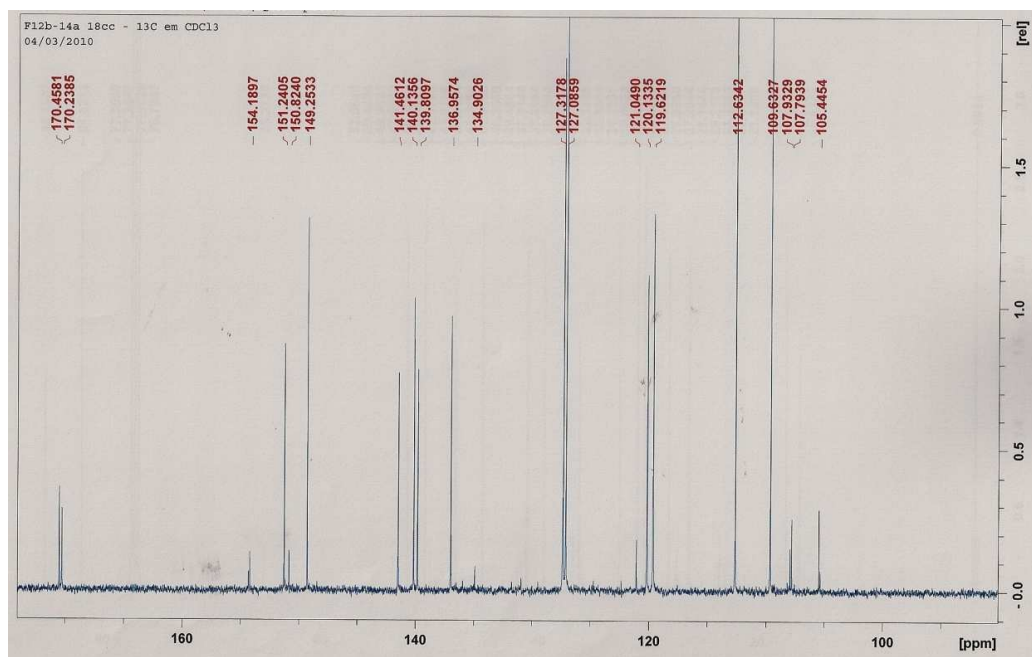


Figura IV - Espectro de RMN do conjunto de frações F12b-14a da 18^a CC

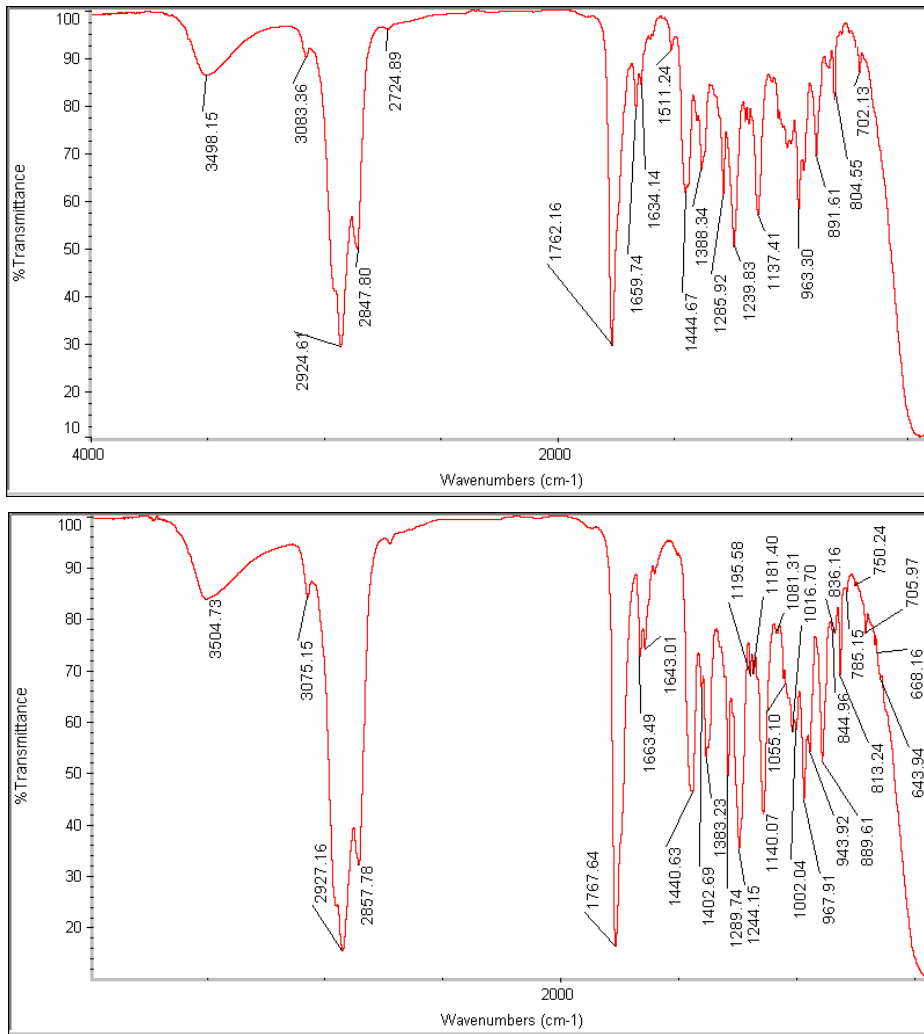
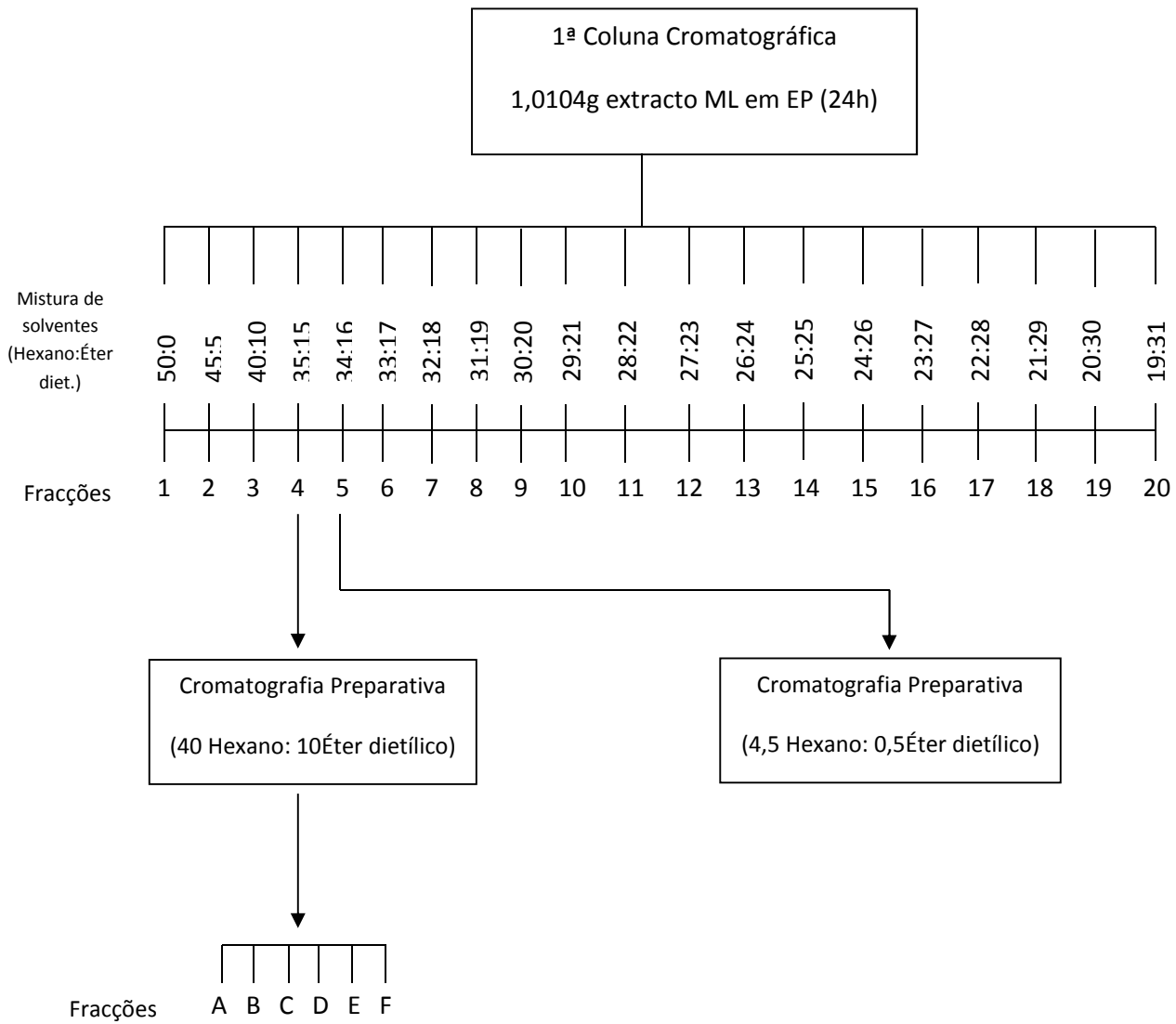


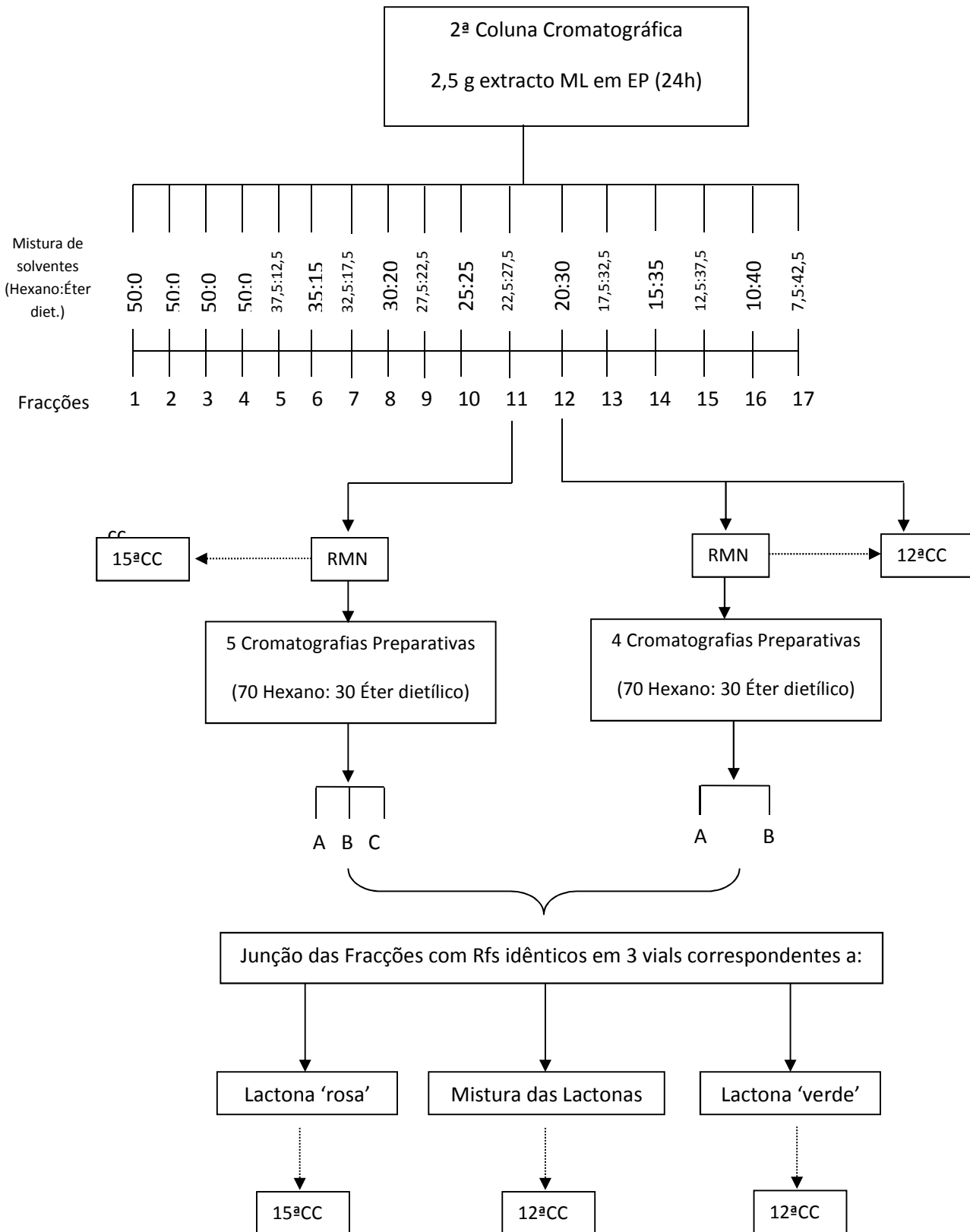
Figura v - Espectro de IV dos extractos de Madre de Louro em Éter de Petróleo

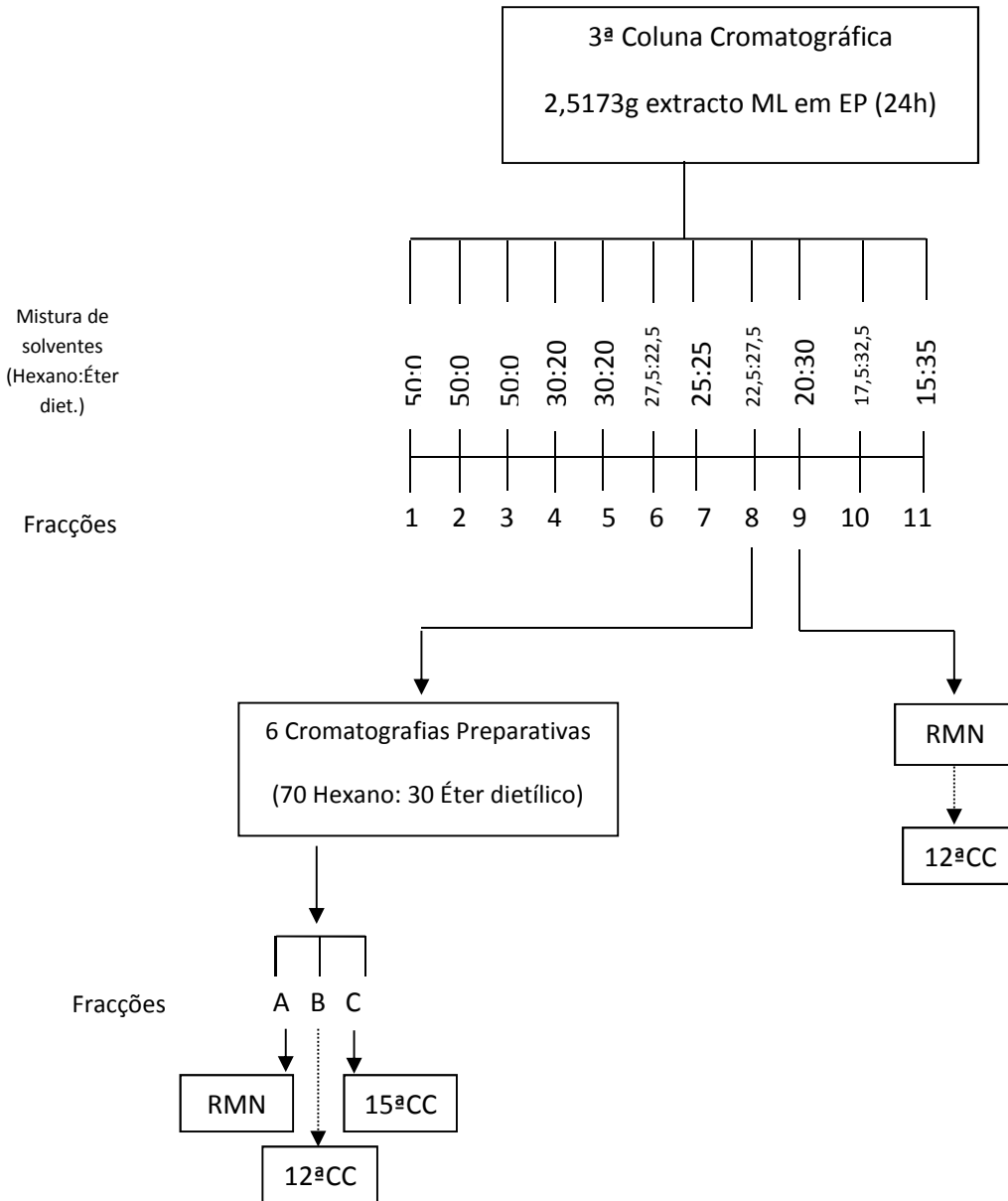
Tabela II - Reagentes		
Reagente	Marca	% pureza
Acetato de Etilo	Fischer Scientific	99,99% por
Acetonitrilo LC-MS	Lab-Scan	99,9% LC-MaScan
Ácido Gálico	Panreac	99%
Carbonato de Sódio Anidro	Merck	99,9%
Carvão Activo	Panreac	-
Cloreto de Potássio	Panreac	99,5%
Cloreto de Sódio	Panreac	99,5%
Clorofórmio	Fischer Scientific	99,99%
Clorofórmio-d	SDS Carlo Erba	99,8 Atom % D
Diclorometano	Merck	99,5%
Dihidrogenofosfato de Potássio	Riedel-de Haën	99,5%
DMSO	Fischer Scientific	-
DPPH	Fluka	≥ 85%
Éter Dietílico	Lab-Scan A.R.	99,5%
Folin-Ciocalteu	Fluka	2N(with respect to acid)
Fosfato de di-sódio dodecahidratado	Riedel-de Haën	99%
Metanol	Fischer Scientific A.R.	-
Persulfato de Potássio	Merck P.A.	-
TMS	Merck	99,7%
TPTZ	Fluka	≥ 99%
Tween®40	Acros Organics	-

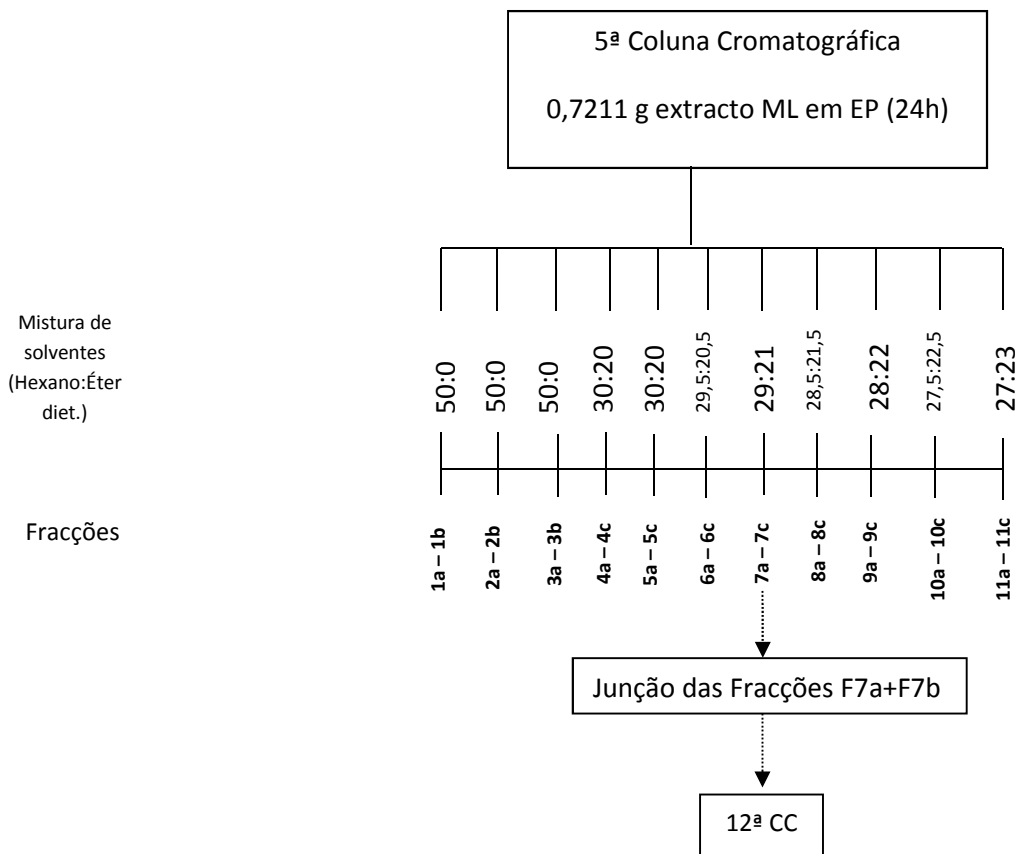
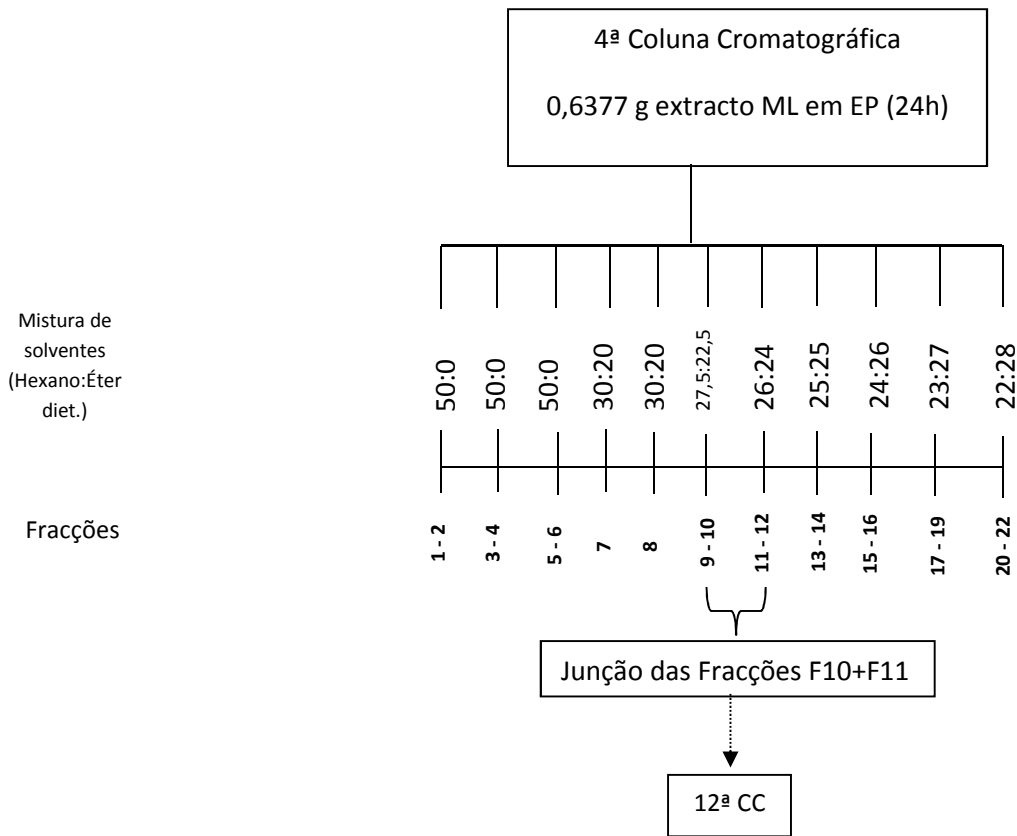
Tabela III – Placas de TLC e Papel de filtro	
Placas TLC	De alumínio revestidas com 0,20 mm de sílica gel 60Å
Placas TLC Preparativas	De sílica gel 60Å 20x20cm 250µm com indicador fluorescentes
Papel de Filtro	150 Whatman 1

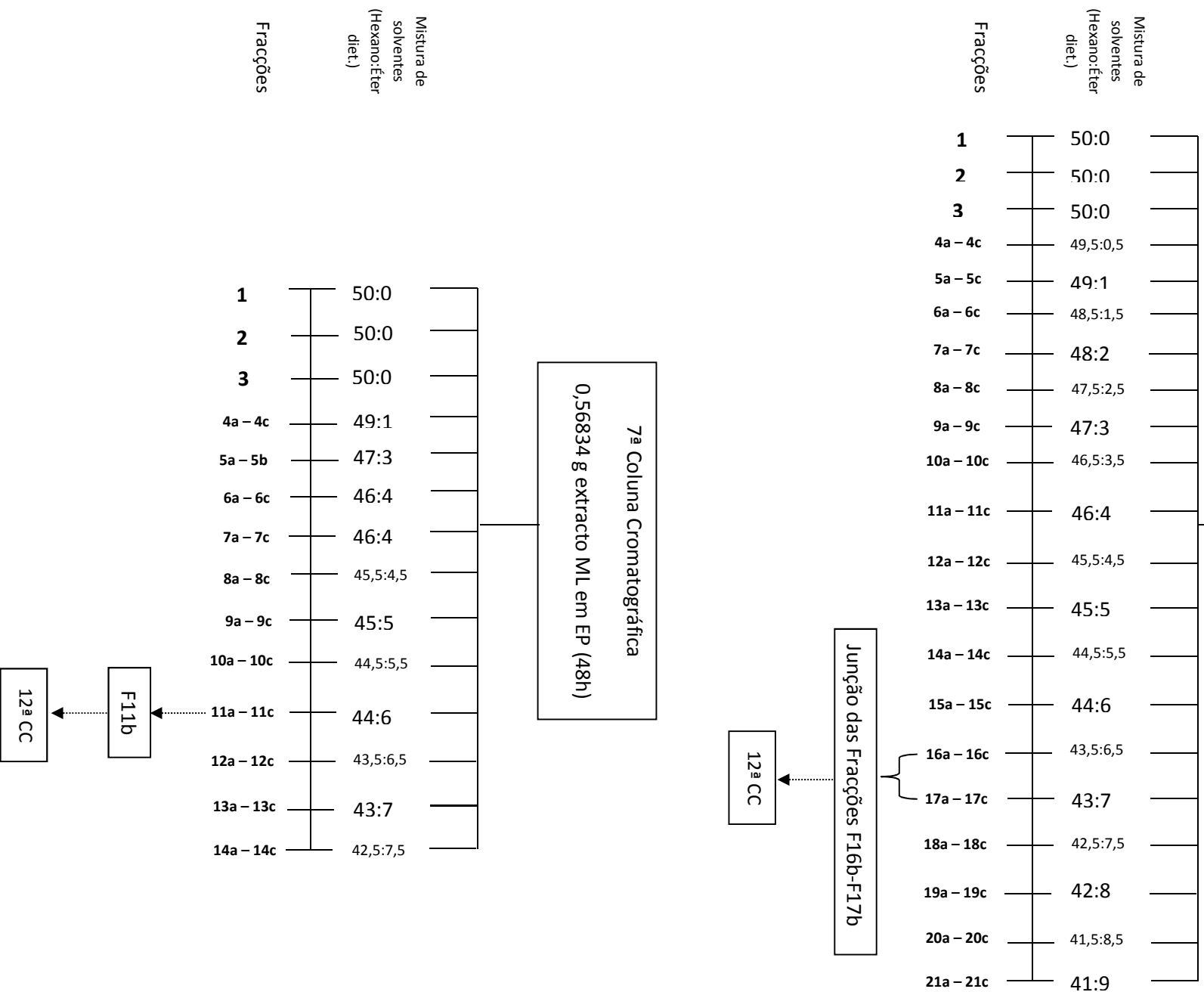
Sequência das Colunas Cromatográficas realizadas:











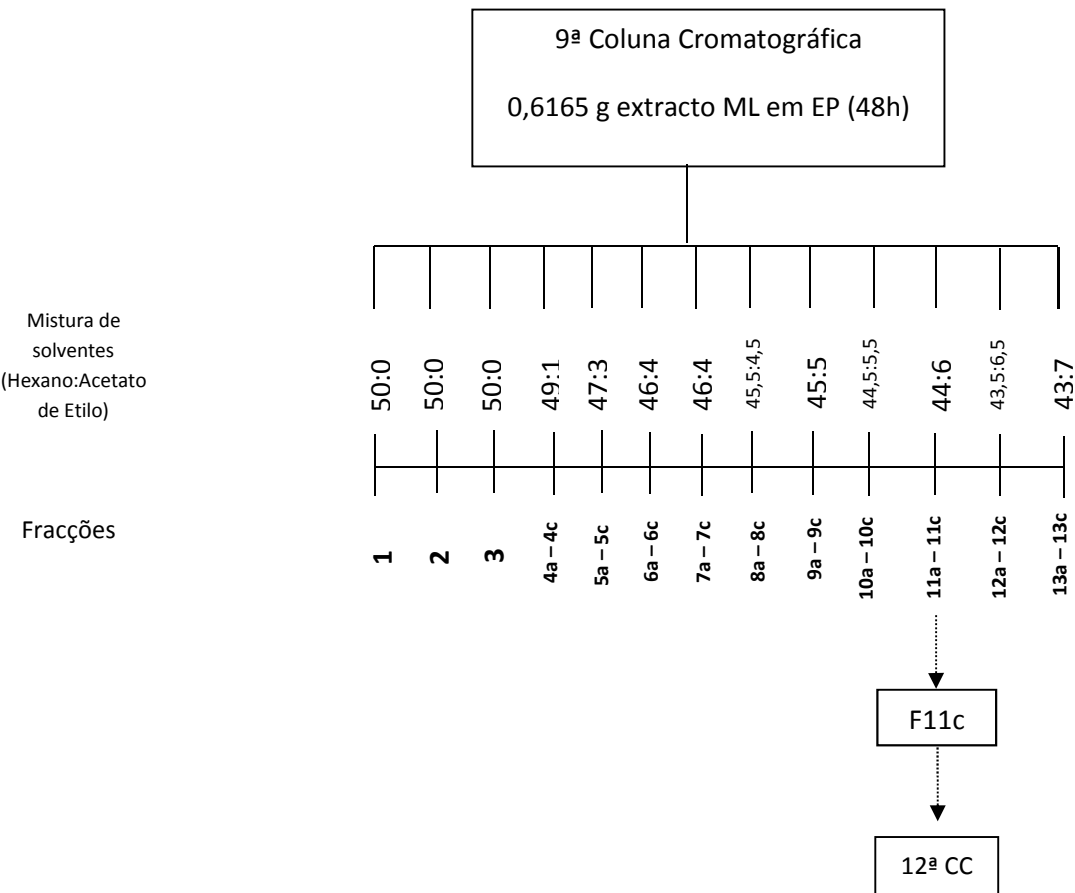
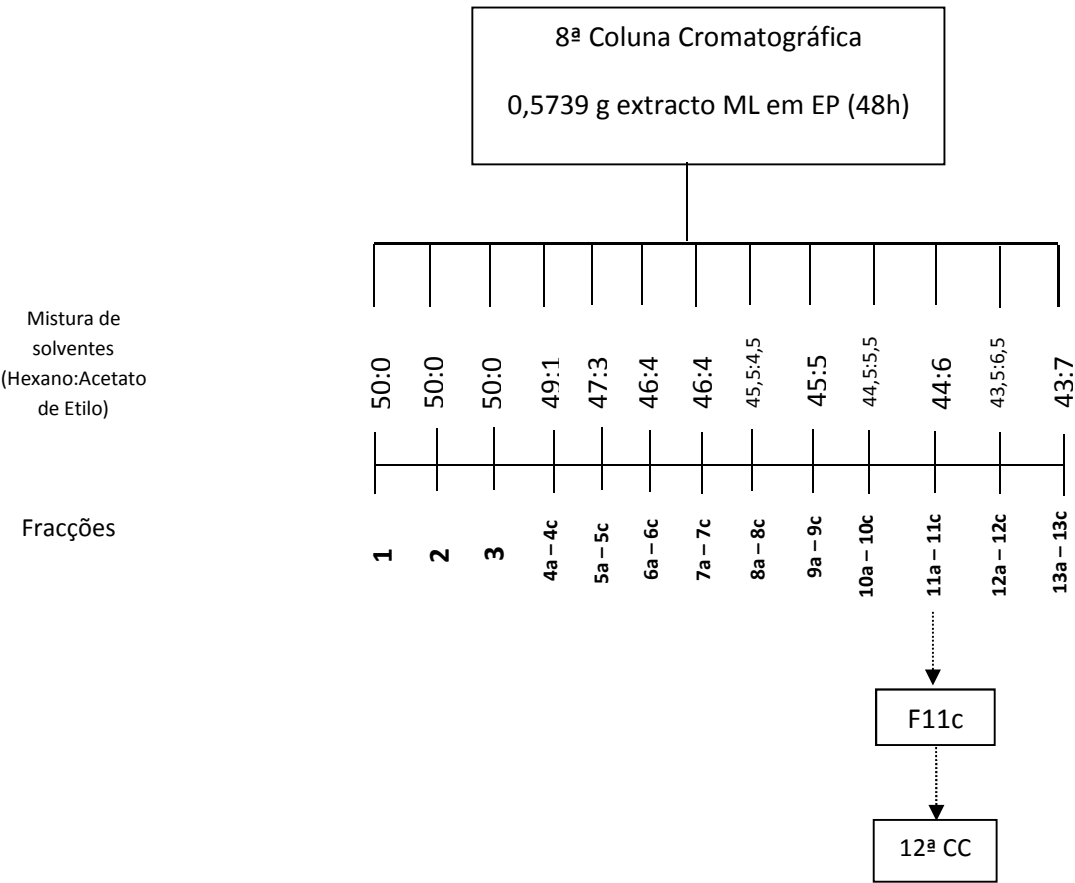
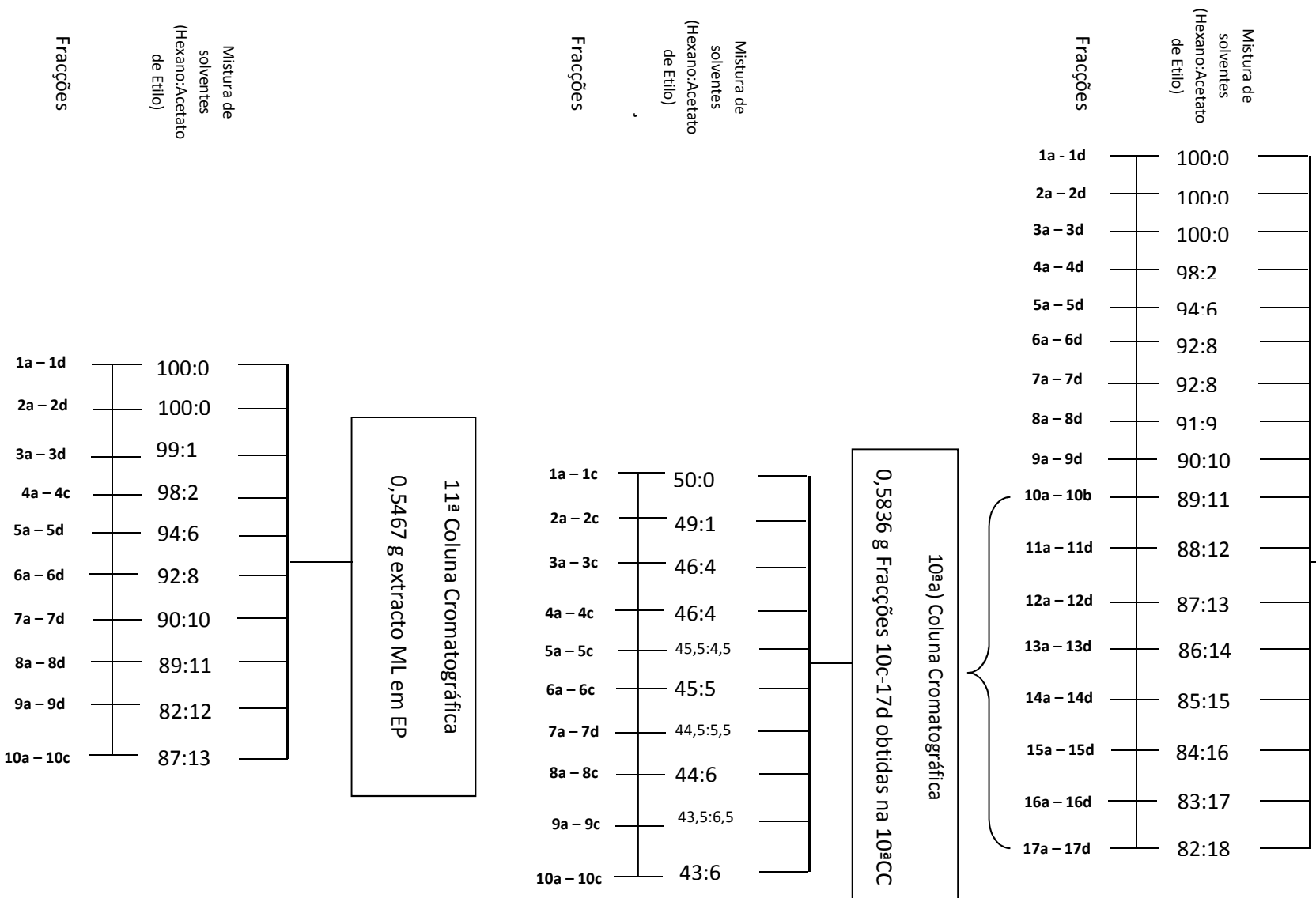


Tabela com a junção das fracções das Colunas Cromatográficas 7^a+8^a+9^a		
ID	Fracções	Colunas
1	1 - 7a	7 ^a + 8 ^a + 9 ^a
2	7b / 7b + 7c	7 ^a + 8 ^a / 9 ^a
3	7c + 8a	7 ^a + 8 ^a
4	8b+8c / 8 ^a +8b	7 ^a + 8 ^a / 9 ^a
5	9a - 10a / 8c - 10b	7 ^a + 8 ^a / 9 ^a
6	10b+10c / 10c + 11a / 11a+11b	7 ^a / 8 ^a / 9 ^a
7	10b / 10c	8 ^a / 9 ^a
8	11a / 11b	7 ^a / 8 ^a
9	11b / 11c	7 ^a / 8 ^a + 9 ^a
10	11c / 12a	7 ^a / 8 ^a +9 ^a
11	12a - 12c / 12b+12c	7 ^a / 8 ^a + 9 ^a
12	13a - 14c / 13a - 13c	7 ^a / 8 ^a +9 ^a

Tabela B Junção de algumas fracções para testar na 12^a CC	
A	F12 da 2 ^a CC
C	Mistura das Lactonas (junção das preparativas das F11+12 da 2 ^a CC)
E	F8B obtida na TLC preparativa da 3 ^a CC
G	Lactona 'Verde' (junção das preparativas das F11+F12 da 2 ^a CC)
H	F9 da 3 ^a CC
L	F10+11 da 4 ^a CC
N	F7a+7b da 5 ^a CC
R	F16b-17b da 6 ^a CC
V	ID9 (F11b da 7 ^a CC e F11c da 8 ^a e 9 ^a CC) (tabela anterior)



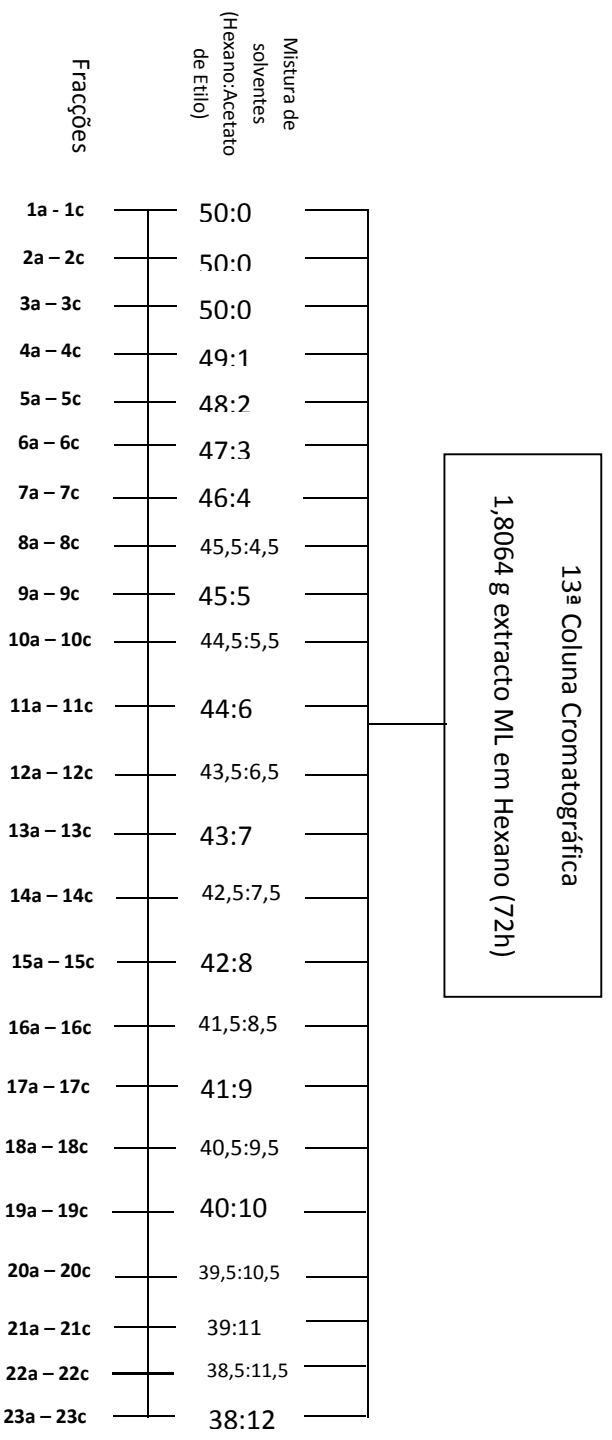
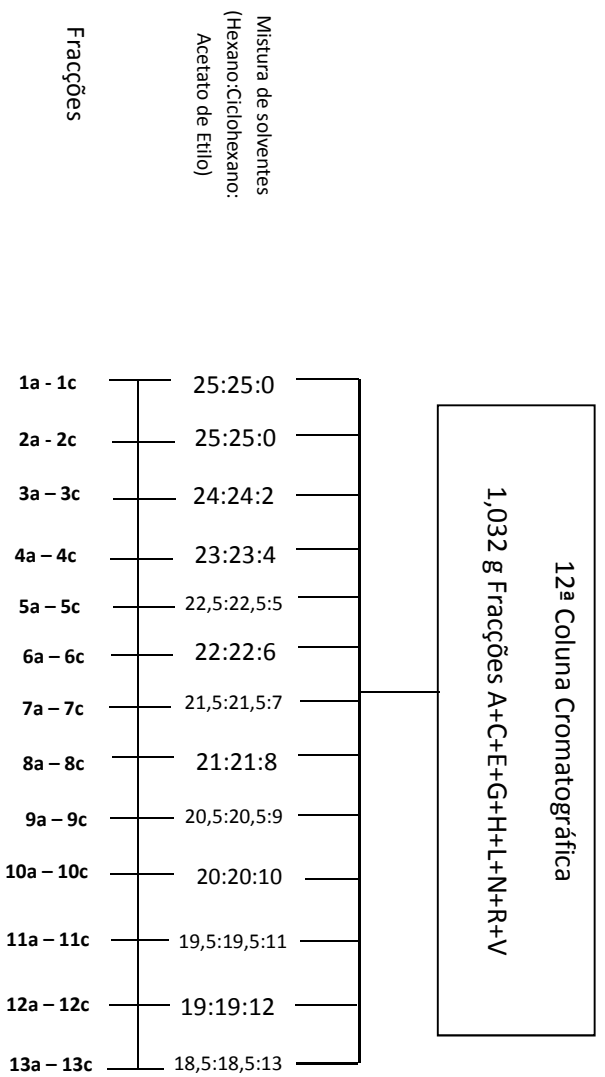


Tabela com a Junção de algumas fracções para testar na 15ª CC	
	F11 da 2ª CC
	Lactona 'rosa' (junção das preparativas das F11+12 da 2ªCC)
	F8C obtida na TLC preparativa da 3ª CC
	F8 da 3ª CC
	F9 da 4ª CC
	F6b+F6c+F7c da 5ª CC
	F15b-16a + F17c-18c da 6ª CC
	ID6 + ID8 + ID10 (tabela A)
	F6a-9c da 10ªa) CC
	F7b-8d da 11ªCC
	F9c + 11c da 12ªCC
	F18a-18b + F19b-20b da 13ªCC

14ª Coluna Cromatográfica
1,5113 g extracto ML em Hexano (72h)

Mistura de solventes (Hexano:Acetato de Etilo)	Fracções
50:0	1a - 1c
50:0	2a - 2c
48:2	3a - 3c
47:3	4a - 4c
46:4	5a - 5c
45:5	6a - 6c
44:6	7a - 7c
43:7	8a - 8c
42:8	9a - 9c
41:9	10a - 10c
40:10	11a - 11c
39:11	12a - 12c
38,5:11,5	13a - 13c
38:12	14a - 14c
37,5:12,5	15a - 15c
37:13	16a - 16c
36,5:13,5	17a - 17c
36:14	18a - 18c
35,5:14,5	19a - 19c
35:15	20a - 20c

