



**COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO**

Renata dos Reis

Rio de Janeiro  
2009

**RENATA DOS REIS**

Aluna do Curso em Tecnologia em Produção de Fármacos

Matrícula 0613800005

## **EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO**

Trabalho de Conclusão de Curso, TCC, apresentado ao Curso de Graduação em Tecnologia em Produção de Fármacos, da UEZO como parte dos requisitos para obtenção do grau de Tecnólogo em Produção de Fármacos, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alaíde de Sá Barreto.

Rio de Janeiro

Agosto de 2009

Reis, Renata dos

Extração e identificação do Ácido Ursólico / Renata dos Reis. – Rio de Janeiro, 2009.

63p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Produção de Fármacos) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO, 2009.

Orientador (a): Dr<sup>a</sup> Alaíde de Sá Barreto

1. Ácido Ursólico. 2. *Plumeria rubra* L. 3. CG/EM. I. Título.

# EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO

Elaborado por Renata dos Reis

Aluna do Curso em Tecnologia em Produção de Fármacos da UEZO

Este trabalho de graduação foi analisado e aprovado com

GRAU: .....

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

---

Joelma Fonseca de Oliveira Fernandes, DSc.

---

Paulo Roberto Dias dos Santos, DSc.

---

Alaíde de Sá Barreto, DSc.  
Presidente

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto de 2009

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos.  
E a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram.

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar a vida. A minha família, colegas e professores pela solidariedade e ajuda.

A minha Orientadora, Alaíde de Sá Barreto, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto. A Farmanguinhos e a Gláucia Slana, pelo prazer da pesquisa ser realizada por lá, e particularmente ao profissional, Marcos Jun Nakamura, pelas ajudas durante esta caminhada.

## RESUMO

Neste trabalho foi isolado das folhas secas da *Plumeria rubra* L. forma acutifolia (Ait) Woodson o Ácido Ursólico. O extrato das folhas dessa espécie apresenta uma quantidade significativa deste ácido (19%). Este triterpenóide é de grande importância, pois pode atuar tanto como agente emulsificante na indústria alimentícia, cosmético, medicamento e como agente antineoplásico. A fim de extrair de maneira eficiente este metabólito foram realizados testes de solubilidade com diferentes solventes. Verificou-se que o melhor solvente para extração deste metabólito foi o diclorometano. Foram realizados estudos sazonais e, estes revelaram que o mês de setembro foi o que apresentou maior rendimento para o terpenóide (19%). Todos os extratos obtidos foram derivatizados com diazometano e injetados em CG/EM (Cromatografia com fase Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas). Os resultados obtidos permitiram desenvolver um protocolo de extração e identificação a partir das análises das principais rotas de fragmentação deste metabólito através do uso da técnica de CG/EM.

Palavras Chave: Ácido Ursólico. *Plumeria rubra* L. CG/EM.

## ABSTRACT

This work was isolated from the dried leaves of *Plumeria rubra* L. form *acutifolia* (Ait) Woodson the ursolic acids. The extract of leaves of this species has a significant amount of this acid (%). This triterpenoid is of great importance because it can act both as an emulsifier in food industry, cosmetic, medicine and as an antineoplastic agent. In order to efficiently extract this metabolite, tests were made with different solubility solvents. It was found that the best solvent for extraction of this metabolite was dichloromethane. Seasonal studies were conducted and these revealed that the month of September showed the highest yield for terpenoid (19%). All extracts obtained were derivatized with diazomethane and injected into GC / MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry). The results allowed to develop a protocol for extraction and identification through analysis of the main routes of fragmentation of this metabolite through the use of the technique of GC / MS.

Keywords: Ursolic acid. *Plumeria rubra* L. GC / MS.

Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.

Baltasar Gracián (1601- 1658)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfina (1), Estriquinina (2) e Quinina (3).....	1
Figura 2: Variedades da espécie <i>Plumeria rubra</i> L.....	8
Figura 3: Estrutura química do Ácido Ursólico.....	9
Figura 4: Coleta e preparo do material vegetal.....	14
Figura 5: Extração e teste de solubilidade.....	15
Figura 6: Cromatografia em Coluna – coluna A.....	17
Figura 7: Cromatografia em Coluna – coluna B.....	18
Figura 8: Recristalização.....	19
Figura 9: Fluxograma do isolamento do Ácido Ursólico.....	19
Figura 10: Análise em CG/EM.....	20
Figura 11: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato acetato de etila</u> .....	22
Figura 12: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato diclorometânico</u> .....	23
Figura 13: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato metanólico</u> .....	24
Figura 14: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato clorofôrmico</u> .....	25
Figura 15: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato hexânico</u> .....	26
Figura 16: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato etanólico</u> .....	27
Figura 17: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de janeiro</u> .....	28
Figura 18: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de fevereiro</u> .....	29
Figura 19: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de março</u> .....	30
Figura 20: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de abril</u> .....	31
Figura 21: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de maio</u> .....	32
Figura 22: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de junho</u> .....	33
Figura 23: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de julho</u> .....	34
Figura 24: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de agosto</u> .....	35
Figura 25: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de setembro</u> .....	36
Figura 26: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de outubro</u> .....	37
Figura 27: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de novembro</u> .....	38
Figura 28: Cromatograma de íons totais do <u>Extrato do mês de dezembro</u> .....	39
Figura 29: Cromatograma de íons totais das frações da <u>Coluna A</u> .....	41
Figura 30: Cromatograma de íons totais da <u>amostra recristalizada</u> .....	43
Figura 31: Espectro de Massas do Ácido Ursólico.....	44
Figura 32: Fragmentação do ÁU-1.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias extraídas de certas plantas, com atividade clínica.....	2
Tabela 2: Coletas mensais das folhas de <i>Plumeria rubra</i> L.....	21
Tabela 3: Rendimentos dos extratos brutos mensais das folhas de <i>Plumeria rubra</i> L.....	40

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
QPN	Química dos Produtos Naturais
SQR	Substâncias Químicas de Referências
INCQS	Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
HIV- 1	Vírus da Imunodeficiência humana Tipo 1
AU	Ácido Ursólico
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
COX	Ciclooxigenase
CG/EM	Cromatografia com fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CCF	Cromatografia em Camada Fina
EM	Espectrometria de Massas
CC	Cromatografia em Coluna
CCF	Cromatografia em Camada Fina

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 HISTÓRICO.....	1
1.2 DOENÇAS CANCERÍGENAS.....	3
1.3 A PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS NO BRASIL.....	4
1.4 FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL.....	5
1.5 FAMÍLIA APOCYNACEAE.....	6
<b>1.5.1 A espécie <i>Plumeria rubra</i> L. forma <i>acutifolia</i> (Ait) Woodson</b> .....	7
1.5.1.1 Ácido Ursólico.....	9
1.6 OBJETIVO.....	11
<b>1.6.1 Objetivos específicos</b> .....	12
<b>2 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	13
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.2 MATERIAL VEGETAL.....	14
2.3 EXTRAÇÃO E TESTE DE SOLUBILIDADE.....	15
2.4 METILAÇÃO COM DIAZOMETANO.....	16
<b>2.4.1 Preparação do diazometano</b> .....	16
<b>2.4.2 Metilação da amostra</b> .....	16
2.5 ISOLAMENTO DO ÁCIDO URSÓLICO.....	16
<b>2.5.1 Cromatografia em coluna – <u>Coluna A</u></b> .....	16
<b>2.5.2 Cromatografia em coluna – <u>Coluna B</u></b> .....	17
<b>2.5.3 Recristalização</b> .....	18
2.6 ANÁLISE POR CG/EM.....	20
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	21
3.1 EXTRAÇÃO E TESTE DE SOLUBILIDADE.....	21
3.2 ISOLAMENTO DO ÁCIDO URSÓLICO.....	40
<b>3.2.1 Cromatografia em coluna – <u>Coluna A</u></b> .....	40
<b>3.2.2 Cromatografia em coluna – <u>Coluna B</u></b> .....	42
3.3 IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO.....	44
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	47

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

A história relata o uso das plantas medicinais desde a antiguidade, como o uso da beladona, ópio, ginseng, acônito, quina, alho, sene, cânfora, entre outras. Várias descrições sobre as plantas medicinais feitas pelo homem remontam as sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este documento, encontrado perto da pirâmide de Ramsés II, descreve 700 receitas utilizando-se material de natureza vegetal e animal (ALONSO, 1999).

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a ocorrer no século XVIII. Nos séculos XVIII e XIX, aumentaram os trabalhos de extração, principalmente, de ácidos orgânicos e de alcalóides, sendo esta época o isolamento de Morfina (1806), Quinina (1818) e Estriquinina (1820) (PINTO *et al.*, 2002).

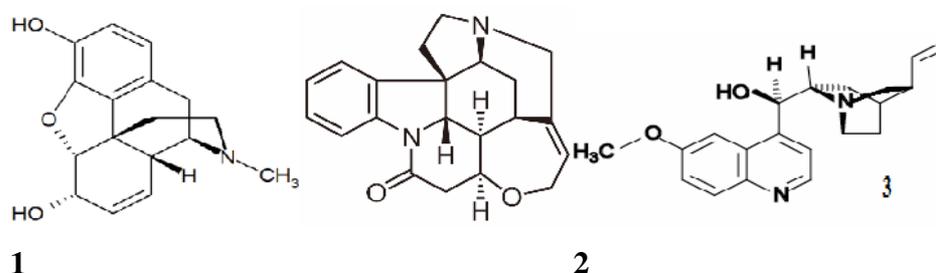


Figura 1: Morfina (1), Estriquinina (2) e Quinina (3) (KATZUNG, 2007)

O grande desafio do último século tem sido desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial clínico. Nesta escalada ascendente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera, por ora, 252 medicamentos essenciais e básicos à saúde humana, sendo que 11% (28 medicamentos) são viabilizados a partir de espécies vegetais, ditas medicinais. Entre 529 medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), 39% (206 medicamentos) são obtidos a partir de produtos naturais (RATES, 2001; RASKIN, 2002; DAVID, 2004). Estima-se ainda, que 80% da população mundial (dados da OMS) façam uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (CRAGG, NEWMAN, SNADER, 1997). Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais (CALIXTO, 2003). No entanto, há poucos estudos que possibilitam uma visão ampla de grande diversidade das espécies de plantas utilizadas com fins terapêuticos. Muitos desses conhecimentos tradicionais sobre as

plantas, especialmente medicinais, estão se perdendo com o passar do tempo, por causa da falta de estudos ou pelo uso inadequado dos recursos vegetais (SILVA, ALBUQUERQUE, 2005). Apesar de ser uma tarefa complexa, desenvolver, a partir de plantas medicinais, fármacos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis, o potencial de tais extratos está longe de ser esgotado. Soluções para novas necessidades, como novos conhecimentos poderão ser encontrados no reino vegetal, através de descobertas de novas moléculas com atividades terapêuticas e/ou novos fitoterápicos com maior eficiência de ação (CRAGG, NEWMAN, SNADER, 1997; GUERRA, 2004).

Ainda que a biologia molecular ofereça alternativas viáveis à produção de novos medicamentos obtidos por modelos computacionais, as espécies vegetais constituem uma estratégia para inovação farmacêutica e competitividade do setor, tendo em vista a singularidade estrutural dessas substâncias, efetividade terapêutica e expectativas de patenteabilidade, devido a parcerias científicas entre a indústria farmacêutica e instituições de ensino e pesquisa (OLIVEIRA, BRAGA, 2003). Estudos exaustivos ao longo dos anos, em áreas multidisciplinares, viabilizaram o isolamento de várias moléculas bioativas, hoje utilizadas em efetividade na clínica convencional. Na Tabela 1 destacamos a presença de algumas das principais moléculas de interesse antineoplásico.

Tabela1: Substâncias extraídas de certas plantas, com atividade clínica

<b>Substância vegetal</b>	<b>Atividade clínica</b>	<b>Planta</b>	<b>Família</b>	<b>Parte vegetal</b>
Ácido betulínico (obtido após síntese com a betulina)	Antineoplásico	<i>Betula alba</i>	Betulaceae	Folhas e casca
Camptotecina	Antineoplásico	<i>Camptotheca acuminata</i>	Nyssaceae	Casca
Cholchicina	Antitumoral	<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicaceae	Flores, bulbo e sementes
Etoposídeo	Antitumoral	<i>Podophyllum peltatum</i>	Berberidaceae	Rizomas e resina
Lapachol	Antitumoral	<i>Tabebuia sp.</i>	Bignoniaceae	Casca
Podofilotoxina	Antineoplásico	<i>Podophyllum peltatum</i>	Berberidaceae	Rizomas e resina
Taxol	Antineoplásico	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxaceae	Casca
Teniposídeo	Antitumoral	<i>Podophyllum peltatum</i>	Berberidaceae	Rizomas e resina
Vinblastina	Antitumoral	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Folhas
Vincristina	Antitumoral	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Folhas

(adaptada KONG, 2003)

## 1.2 DOENÇAS CANCERÍGENAS

O câncer é uma doença caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular. As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados protooncogenes que se transformam em oncogenes, responsáveis pela malignidade de células normais, que ao se diferenciarem nos tecidos onde se encontram originam células patológicas, chamadas cancerígenas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Existem mais de cem tipos de câncer, como por exemplo, podemos citar o de pele, pulmão, mama, fígado, rim, ovário, cérebro, próstata, pâncreas e ossos, sendo responsáveis anualmente pela morte de mais de 4 milhões de óbitos em todo o planeta (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, quimioterapia, radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X e até prótons e mésons pi negativos) ou ainda uma combinação de técnicas (SALMONN, 1998). A quimioterapia é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte (SALMONN, 1998). Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (SALMONN, 1998). Mais recentemente têm-se usado fotorradiação, que permite a destruição com maior seletividade pelo uso de radiação específica com fluorescência (620 - 640nm) que, no entanto, é restrita a tumores superficiais (CHABNER, LONGO, 1996). Um outro tratamento antineoplásico utilizado atualmente é estímulo das próprias defesas do organismo, através da imunoterapia com o interferon , interleucina-2, cuja ação, no entanto, se limita somente às células cancerosas residuais resultantes de cirurgias ou outros tratamentos (ANTONINI *et al.*, 2000).

As causas relacionadas ao câncer são multifatoriais, envolvem desde aspectos genéticos até culturais, passando pela exposição a fatores de risco no ambiente de trabalho, contaminação por vírus, entre tantas outras. O cálculo mais recente da Estimativa do Câncer no Brasil, válido para 2008 e 2009, prevê a ocorrência de 460 mil novos casos de doença no país em cada ano. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o

câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões (INCA, 2008).

### 1.3 A PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS NO BRASIL

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO *et al.*, 2002). A Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO *et al.*, 2002). Em contra partida, no Brasil, a utilização de plantas como meio curativo é uma atividade altamente difundida e popular, às vezes, empregada de maneira equivocada e até mesmo malévola, afinal muitas plantas possuem princípios ativos tóxicos e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas (PINTO *et al.*, 2002). Diversas espécies vegetais já têm seus princípios ativos determinados. Porém, para que possam ser utilizadas como medicamentos, é necessário que uma dosagem padronizada possa ser administrada para o paciente. Dessa forma, as concentrações destes princípios ativos, nas partes vegetais, devem ser conhecidos (PINTO *et al.*, 2002).

Poucas são as empresas brasileiras que investem em pesquisa e desenvolvimento de insumos oriundos da flora, as que utilizam, preferem comprar os insumos provenientes da flora internacional, gerando outra forma de dependência (PINTO *et al.*, 2002). O Brasil começou, em 2002, a trilhar o caminho da produção de substâncias químicas de referência (SQR) certificadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e o Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em parceria com a Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, financiada pela ANVISA (PINTO *et al.*, 2002). A definição de SQR é complexa. Trata-se de material de referência certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos. Em linguagem mais simples é a substância química utilizada como parâmetro para o teste de outras substâncias. Vários procedimentos analíticos de produtos farmacêuticos exigem o uso das SQRs para caracterização e/ou atribuição de valores de propriedades (PINTO *et al.*, 2002). E é essa análise um dos fatores mais importantes para assegurar a qualidade do medicamento e/ou cosmético. Contudo, em relação à produção de padrões derivados de plantas, oriundas ou não da biodiversidade brasileira, os

resultados são irrisórios (PINTO *et al.*, 2002). O único modo do Brasil vencer estas barreiras econômicas é investir na pesquisa e desenvolvimento na área de produtos naturais que impliquem, inicialmente, na obtenção de novas fontes de insumos farmacêuticos de interesse industrial (PINTO *et al.*, 2002).

#### 1.4 FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL

Qualidade é o conjunto de critérios que caracterizam uma matéria-prima para o uso ao qual se destina. A partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para matéria – prima, e considerando-se um planejamento racional com controle do processo de produção, a qualidade do produto final estará em grande parte assegurada (IHRIG, BLUM, ZUR BEURTEIN IUNG, 1992). A Qualidade deve passar por diversas etapas do processo como: coleta, preparação da amostra, preparação do material, eficácia de métodos quantitativos, validação dos resultados, interpretação e registros, para que possa servir de parâmetros para estudos posteriores (DATI, BRAND *et al.*, 2002). A qualidade almejada só se concretiza quando os suportes são alicerçados em bases científicas e técnicas já comprovadas experimentalmente. Estabelecidos esses critérios o emprego dos protocolos de análise, que permitem o acompanhamento de todos os procedimentos assim como a sua documentação, é fundamental para segurança e gerenciamento da qualidade (DATI, BRAND, 2000).

Os fatores críticos para o emprego de espécies medicinais envolvem especialmente o controle de qualidade, segurança e eficácia destes produtos, bem como o monitoramento de sua pureza, identidade e estabilidade (MITSCHER, PILLAI, SHANKEL, 2000). Apesar do desenvolvimento de vários métodos confiáveis de isolamento, elucidação e quantificação para a análise de fitoconstituintes, os referenciais de padronização em plantas medicinais deixam ainda a desejar (MITSCHER, PILLAI, SHANKEL, 2000). Esta insuficiência informativa se deve ao fato da grande variabilidade de composição química em determinada espécie, manejo agrícola, fatores intrínsecos e extrínsecos, durante as diversas fases de seu processamento (MITSCHER, PILLAI, SHANKEL, 2000). Durante os processos produtivos, a variabilidade de constituintes químicos detectados numa planta, seja quantitativo ou qualitativo, depende de muitos fatores (fatores genéticos, ambiente físico, condições de secagem, estocagem entre outros) e estes promovem o acréscimo, diminuição ou até ausência de determinados metabólitos secundários bioativos (RASKIN *et al.*, 2002; CAPASSO *et al.*, 2000). Cada variedade botânica possui uma faixa própria de temperatura mais favorável à germinação, ao crescimento e a produção de seus compostos. Elas também vão responder de forma específica

às modificações na proporção de luz e escuridão dentro de um ciclo de 24 horas. O fotoperíodo é responsável pelo crescimento vegetativo, floração e produção de metabólitos (FILGUEIRA, 1981; SILVA, 1997). O grau de umidade do ar influencia na transpiração e teor de umidade do solo, determina a absorção de água e nutrientes, afetando o desenvolvimento (FILGUEIRA, 1981; SILVA, 1997). Outros fatores, como pH do solo, condições de crescimento, nutrientes do solo, método de coleta (data, hora, etc), a parte da planta utilizada, fase de desenvolvimento no momento da coleta, secagem e transporte, interações entre plantas, presença de microrganismos, podem afetar diretamente a concentração dos componentes químicos de cada espécie (FILGUEIRA, 1981; SILVA, 1997; CAPASSO, 2000). A variação sazonal, ou seja, a coleta de plantas em diversas épocas ou estações do ano, é um fator muito significativo, na percentual e produção de metabólitos secundários (MITSCHER, PILLAI, SHANKEL, 2000; NAVARRO *et al.*, 2002). Daí a necessidade de um estudo de sazonalidade, quando se trabalha com plantas medicinais ((MITSCHER, PILLAI, SHANKEL, 2000; NAVARRO *et al.*, 2002).

### 1.5 FAMÍLIA APOCYNACEAE

A família Apocynaceae encontra-se distribuída de maneira preponderante em regiões tropicais e semitropicais, sendo poucas de zona temperada. Compreende aproximadamente 200 gêneros, com mais de 2000 espécies. A família Apocynaceae é representada por árvores, arbustos, ervas, cipós e trepadeiras. (CRONQUIST, 1981; SCHULTZ, 1984; MALHEIROS, 1995; LORENZI, MOREIRA, 2001).

A corola é representada por uma só peça, dividida em partes iguais, porém torcidas ou cortadas de maneira que, não possui nenhum plano de simetria (JOLY, 1975; BARROSO, 1978; SCHULTZ, 1984; JUDD, 1999).

As flores podem ser pequenas, e também grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas e diclamídeas (possuem corola e cálice). Possuem folhas em geral opostas e fruto seco capsular ou indeiscente (que não se abrem espontaneamente) ou então frutículos secos deiscentes (que se abrem espontaneamente) e sementes aladas (apresentam estruturas que possibilitam o “pouso” ou “vôo” da semente), pilosas, ou não. (JOLY, 1975; BARROSO, 1978; SCHULTZ, 1984; JUDD, 1999).

Algumas espécies da família Apocynaceae, já foram estudadas quimicamente e seus compostos químicos majoritários estão representados por diversos glicosídeos e alcalóides tóxicos localizados em todos os órgãos da planta (LORENZI, MOREIRA, 2001; SCHULTZ,

1984; JOLY, 1975). Muitas espécies produzem também princípios ativos amargos e substâncias resinosas que são encontradas no seu látex leitoso. (LORENZI, MOREIRA, 2001; SCHULTZ, 1984; JOLY, 1975). Caracterizam-se ainda por produzir diversos tipos de iridóides, glicosídeos cardiotônicos e grupos esteroidais (CRONQUIST, 1981). Muitos gêneros desta família são relatados na literatura devido a importantes atividades terapêuticas, como por exemplo, o gênero *Catharanthus*, cujos alcalóides vincristina e vimblastina são utilizados no tratamento de sarcoma de Kaposi, leucemia linfoblástica aguda infantil, câncer de ovário e testículo (BARROSO, 1978). Entre os glicosídeos de relevância farmacológica foram isolados ovabaina, acocantherina, thevetina, oleandrina, neriina nos gêneros *Thevetia* e *Nerium*, bem como os célebres alcalóides da *Rawolfia serpentina*, espécie originária da Índia e reconhecida pela sua ação hipotensora (CRONQUIST, 1981). Desta família, ainda foi isolado do gênero *Strophantus*, um glicosídeo cardiotônico, o estrofanto, consagrado pelo seu uso em tratamentos de distúrbios cardíacos e também úteis, como precursor da cortisona (CRONQUIST, 1981). Ainda nesta família, o gênero *Allamanda*, apesar de possuir poucas espécies, tem contribuído expressivamente para a clínica terapêutica através de moléculas bioativas importantes para o tratamento de diversas enfermidades como imunodeficiência tipo I (HIV – 1) e inibição de processos tumorais (KARDONO, 1990; DOBHAL, 2004).

### **1.5.1 A espécie *Plumeria rubra* L. forma *acutifolia* (Ait) Woodson**

*Plumeria rubra* L. forma *acutifolia* (Ait) Woodson (figura 2) pertence à família Apocynaceae, subfamília Plumerioideae (JOLY, 1975; LORENZI, 2001; BARRETO, 2007). Esta espécie é uma arvoreta da América Tropical, introduzida no Brasil como planta ornamental. Atinge porte de 4 a 8m de altura e, é muito apreciada pelos paisagistas pelos seus caules grossos de casca lisa, cinzenta ou bronzeada, de formato escultórico (JOLY, 1975; LORENZI, 2001; BARRETO, 2007). Os galhos de aspecto suculento secretam um látex quando seccionados. Suas folhas verde-escuras, medindo cerca de 30cm de comprimento, nascem na ponta dos ramos e caem no inverno e na primavera (JOLY, 1975; LORENZI, 2001; BARRETO, 2007).

Segundo R. E. Woodson Jr., o gênero *Plumeria* possui um único representante no Brasil: *Plumeria rubra* L., uma vez que *P. loranthifolia* Muell. - Arg., *Plumeria acutifolia* Poir e outras são consideradas variantes da primeira como o resultado do cultivo e hibridações

naturais (WOODSON JR, 1938). São aceitas quatro variedades (WOODSON JR, 1938; AZAMBUJA, 1947) de *Plumeria*, são elas: *P. rubra* L., *forma typica*, *P. rubra* L., *forma lutea* (R & P) Woodson, *P. rubra* L., *forma acutifolia* e *P. rubra* L., *forma tricolor* (R & P) Woodson (figura 2). A identificação dessas diferentes formas de *P. rubra* L. é baseada, ainda hoje, na cor da corola. Vários estudos foram feitos pelos botânicos na tentativa de descobrirem diferenças morfológicas mais características entre as variedades. Mas, os resultados obtidos foram dúbios. A última tentativa em separá-las foi baseada na forma, tamanho e aparência das folhas. A dificuldade de se encontrar características confiáveis e repetitivas era devido principalmente, a folhagem decídua que tornava as exsiccatas extremamente frágeis. Além disso, como as corolas das flores utilizadas na comparação e identificação descoravam, durante os processos de dessecação, a chance de se encontrar modificações significativas entre as plantas já descritas tornaram-se extremamente difíceis (WOODSON JR, 1938; AZAMBUJA, 1947). Logo, o impasse permanece quanto à identificação das variedades de *P. rubra* L.



*Plumeria rubra* L., *forma tricolor* (R & P) Woodson



*Plumeria rubra* L. *forma acutifolia* (Ait) Woodson



*Plumeria rubra* L., *forma typica*

Figura 2: Variedades da espécie *Plumeria rubra* L (WOODSON, 1938)

Baseados em dados morfológicos, sabe-se que o gênero *Plumeria* é usado na medicina popular brasileira. Infusões e decocções feitas com cascas de *Plumeria rubra* são usadas como emenagogo, purgativo, bactericida, antitumoral e no tratamento de doenças venéreas (JOLY, 1975; LORENZI, 2001; BARRETO, 2007).

A escolha das folhas de *Plumeria rubra* L. *forma acutifolia* (Ait) Woodson para este trabalho foram baseados no conhecimento prévio dos membros do nosso grupo da alta concentração deste triterpenóide ácido em suas folhas e da facilidade de obtenção (campus da

Fundação Oswaldo Cruz) e coleta do material (JOLY, 1975; LORENZI, 2001; BARRETO, 2007).

#### 1.5.1.1 Ácido Ursólico

O Ácido Ursólico (AU; figura 3) é um triterpenóide pentacíclico pertencente ao grupo dos Ursanos, e normalmente surge associado ao seu isômero Ácido Oleanólico. AU é conhecido também pelos nomes correntes de urson, prunol, micromerol e malol, sendo “ácido (3 $\beta$ )-3-hidroxiurs-12-en-28-oico” o seu nome denominado pela IUPAC. Este ácido apresenta uma baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizados como aditivos em bebidas, alimentos e em cosméticos (LEUNG, FOSTER, 1996).

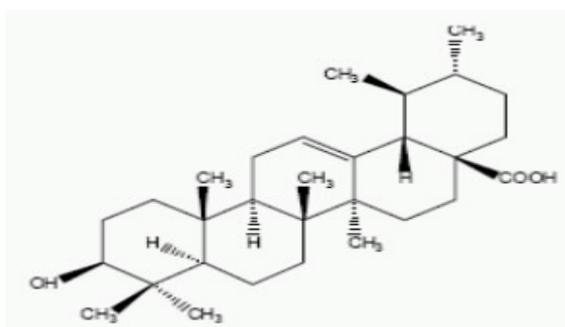


Figura 3: Estrutura química do Ácido Ursólico (LEUNG e FOSTER, 1996)

O AU é encontrado na camada externa de maçãs, pêras, entre outros frutos (MEZZETTI, ORZALESI, BELLAVITA, 1971; TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA, 1987; ISHIDA *et al.*, 1990; NAJID, 1992; KIKUKO, 1993; HUANG *et al.*, 1994; LIU, 1995). Durante muito tempo, foi considerado como farmacologicamente inativo, sendo utilizado exclusivamente como agente emulsificante em preparações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (MEZZETTI, ORZALESI, BELLAVITA, 1971; TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA, 1987; ISHIDA *et al.*, 1990; NAJID, 1992; KIKUKO, 1993; HUANG *et al.*, 1994; LIU, 1995). Entretanto, após estudos, descobriram-se suas propriedades regeneradoras, rejuvenescedora (“anti-ageing”) e antiinflamatórias, que o torna eficiente em aplicações cosméticas (MEZZETTI, ORZALESI, BELLAVITA, 1971; TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA, 1987; ISHIDA *et al.*, 1990; NAJID, 1992; KIKUKO, 1993; HUANG *et al.*, 1994; LIU, 1995). Ele promove a saúde da pele e dos cabelos através da formação de uma barreira oleosa que os protege contra as agressões externas da mesma forma como ocorre nas frutas onde é encontrado (MEZZETTI, ORZALESI, BELLAVITA, 1971; TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA, 1987; ISHIDA *et al.*, 1990; NAJID, 1992; KIKUKO, 1993; HUANG *et*

*al.*, 1994; LIU, 1995). Esta substância tem sido utilizada em produtos para tratar peles envelhecidas pela ação do Sol, pois previne o aparecimento de rugas e manchas senis através da regeneração das fibras de colágeno e sua elasticidade; inibe a ação da enzima elastase prevenindo seu ataque às proteínas estruturais, além de estimular a circulação periférica do couro cabeludo (MEZZETTI, ORZALESI, BELLAVITA, 1971; TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA, 1987; ISHIDA *et al.*, 1990; NAJID, 1992; KIKUKO, 1993; HUANG *et al.*, 1994; LIU, 1995). O Ácido Ursólico é um potente agente antiinflamatório, pois inibe as atividades da 5-lipoxigenase e da ciclooxigenase; portanto, tem sido recomendado em produtos para tratamento de queimadura. (MEZZETTI, ORZALESI, BELLAVITA, 1971; TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA, 1987; ISHIDA *et al.*, 1990; NAJID, 1992; KIKUKO, 1993; HUANG *et al.*, 1994; LIU, 1995).

O AU possui uma função recentemente comprovada por vários pesquisadores que muito provavelmente irá mudar o tratamento de vários tipos de câncer: alta capacidade de produzir apoptose sem lesar as mitocôndrias. Ele provoca apoptose em grande variedade de neoplasias humanas, como nas células HL-60 da leucemia humana. (BACK, 1997; LAUTHIER, 2000; HOLLOSZY, 2001; HARMAND, 2003; ANDERSSON, 2003; LI, 1999). Ele também regula a expressão de genes específicos envolvidos na diferenciação celular formando um complexo com o receptor do glicocorticóide ou seu análogo nuclear e desta forma induz a diferenciação das células malignas em benignas em vários tipos de cânceres (LEE, 1999). Age como um potente inibidor da proliferação das células B-16 do melanoma humano, parando o ciclo celular na fase G1 (ES-SAADY, 1996a). Este ácido também é um potente inibidor da proliferação das células MCF-7 do câncer de mama humano parando o ciclo celular na fase G1 e levando as células malignas à morte (ES-SAADY, 1996b).

Além disso, reduz a expressão da matrix metaloproteinases, que são enzimas proteolíticas que degradam o colágeno e outros componentes da matrix do meio intersticial, estimulando a formação do colágeno em preparações dermatológicas e em culturas de fibroblastos e aumenta a produção de ceramidas na pele humana por estímulos dos queratinócitos, portanto apresentam uma atividade anti-invasiva e anti-metastática. (CHA, 1996; CHA, 1998; YAROSH, 2000; BOTH, 2002). O Ácido Ursólico inibe a indução da COX-2 e a síntese de prostaglandinas E2 no epitélio mamário humano, lembrando que a COX, é uma enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides (incluindo prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano). A inibição farmacológica da COX pode causar alívio aos sintomas da inflamação e da dor. Ele não é

antioxidante, entretanto ele funciona como moderado indutor da quinona redutase, enzima ativa no metabolismo dos xenotóxicos (substâncias químicas estranhas e tóxicas ao organismo) (LEE, 1999). O ácido apresenta ação frente ao *Plasmodium falciparum* no caso da resistência dele a cloroquina (STEELE, 1999) e também apresenta atividade inibitória contra HIV-1 protease (XU *et al.*, 1996). Estudos demonstraram que o Ácido Ursólico é altamente ativo contra *Micrococcus luteus*, atividade moderada frente às outras bactérias gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e fraca atividade frente a *Escherichia coli* (KATO, 2006).

Ele também inibe de forma eficaz a atividade da aromatase *in vitro*. (GNOATTO *et al.*, 2007). A potência inibitória foi comparável ao da apigenina, um dos mais potentes inibidores da aromatase. A comparação da estrutura/atividade em relação a outros compostos, revela que a estrutura do ÁU parece ser mais favorável para reconhecer o sítio ativo da aromatase e bloquear a aromatização (GNOATTO *et al.*, 2007). Ele apresenta capacidade de inibir Elastase leucocitária humana que é uma protease de serina que catalisa a hidrólise de várias proteínas endógenas incluindo a elastina, o principal componente que confere elasticidade aos pulmões, vasos sanguíneos e cartilagens, agindo como inibidor competitivo ou não competitivo (YING *et al.*, 1991).

Nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos, o AU é usado como emulsificante (LORENZI, MATOS, 2002). Além disso, ele é um marcador químico de algumas espécies. Os marcadores químicos são especialmente válidos para autenticar o material vegetal utilizado na produção dos extratos, ponto crucial para garantir a qualidade do produto (BRAGA, 2003). Apesar do AU estar presente em várias espécies tropicais (HAYEK *et al.*, 1989), a fonte tradicional de extrações são européias (HAYEK *et al.*, 1989; LEUNG, FOSTER, 1996).

## 1.6. OBJETIVOS

O nosso trabalho tem como objetivo o uso das folhas da espécie *Plumeria rubra L. forma acutifolia (Ait) Woodson*, para extração do Ácido Ursólico e a proposição de um protocolo eficiente de extração e identificação deste metabólito presente nas folhas desta espécie.

### 1.6.1 Objetivos específicos

- Determinar através do teste de solubilidade o melhor solvente para obtenção do Ácido Ursólico;
- determinar através do teste de sazonalidade anual o melhor mês de coleta para este triterpenóide e,
- desenvolver métodos de análise em CG/EM (Cromatografia com fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas) para determinar a composição percentual qualitativa dos extratos das folhas da espécie *Plumeria rubra L.* forma acutifolia (Ait) Woodson.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados em Farmanguinhos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no laboratório da Plataforma de métodos analíticos, no setor de Produtos Naturais (PN).

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

No fracionamento cromatográfico utilizaram-se colunas de gel de sílica (0,05-0,2 $\mu$ m). Nas análises das frações utilizaram-se placas em camada fina de gel de sílica 60 F254 (MERCK). O revelador químico específico empregado no procedimento de detecção do triterpenóide em cromatografia de camada fina (CCF) foi o *p*-anisaldeído sulfúrico (utilizado na detecção de terpenos e esteróides).

Nas cromatografias em coluna foram utilizadas como fase estacionária gel de sílica 60 (Merck) de granulometria 70-230 mesh ( $\phi$  = 0,063-0,20mm). O diâmetro e altura das colunas foram escolhidos de acordo com a quantidade do material a ser cromatografado. O sistema de eluição foi realizado com os solventes hexano e diclorometano e acetato de etila.

A análise por CG-EM (Cromatografia com fase Gasosa acoplada a Espectrometria de massas) foi realizada em um equipamento HP, Modelo 6890, acoplado a um detector de massas HP, Modelo 5971, dotado de biblioteca de espectros Wiley (software 59943B). Foi utilizada uma coluna capilar MS-HP-1 (30m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m de filme), gás carreador He (fluxo 11,3 mL/min), temperatura do injetor 300 °C, e taxa de split 5:1. As condições de operação foram: temperatura inicial (ti) 290 °C, temperatura final (tf) 350°C, taxa de aquecimento 5°/min, fluxo de He: 1,5ml/min; injeção de 1 $\mu$ L de uma solução de 1,4mg de Ácido Ursólico em 1mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

A secagem das folhas foi realizada em estufa MARCONI, Modelo MA-035/5 e trituradas a mão no interior de sacos plásticos hermeticamente fechados. Todas as extrações e eluições foram realizadas com solvente PA da Vetec®. Os extratos foram evaporados em rotavapor BUCH RE-120 acoplado a banho-maria com controle de temperatura. Os extratos, frações e compostos foram pesados em balança analítica SHIMADZU LIBROR-AEG-220 e SHIMADZU LIBROR EB-33OD.

## 2.2 MATERIAL VEGETAL

Folhas adultas e sadias (200g a 1300g) de *Plumeria rubra* L, foram coletadas sempre na 2ª ou 3ª semana de cada mês (totalizando no término da coleta 12 meses). As coletas não eram realizadas em dias chuvosos para evitar uma possível descaracterização do perfil cromatográfico do extrato. Logo, optou-se por coletar em dias ensolarados ou nublados com dois dias ou mais (anteriores a coleta) sem chuva. As coletas eram realizadas no horário entre 14:00 horas e 15:00 horas, estipulado aleatoriamente, no ano de 2008 (tabela 2, pg. 17). A espécie coletada foi identificada pela professora Alaíde de Sá Barreto.

Após a seleção das folhas, estas foram colocadas em estufa a 50°C (o peso constante foi o critério estabelecido para o tempo de secagem). Em seguida, as folhas secas foram trituradas e armazenadas sob refrigeração (8°C), até o momento do preparo do extrato, como é visto na figura 4.

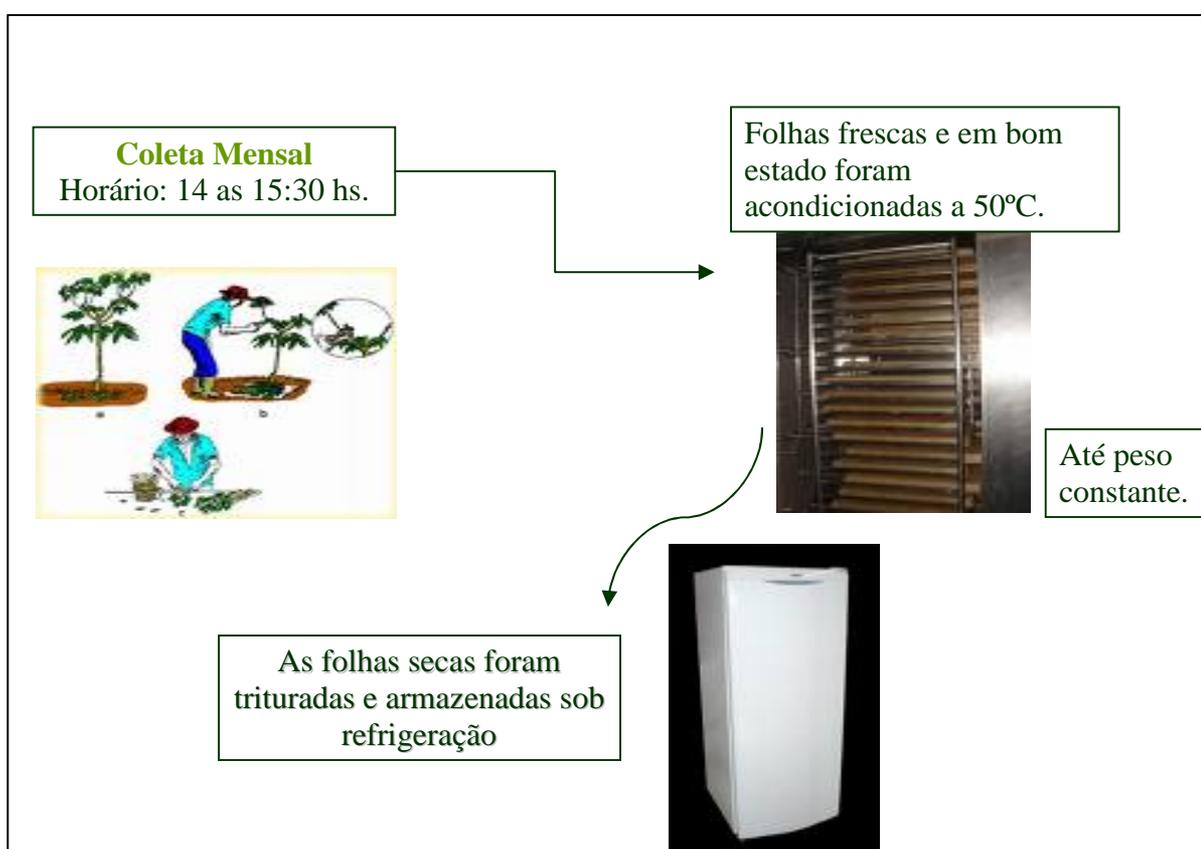


Figura 4: Coleta, secagem (em estufas) e preparo do material vegetal

### 2.3 EXTRAÇÃO E TESTE DE SOLUBILIDADE

A extração consiste em um processo dinâmico, onde se faz o arrastamento do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento do material vegetal. Esta técnica permite obter as soluções extrativas mais concentradas, com gradiente de polaridade, economia do líquido extrator e tempo relativamente curto.

Foram pesadas 5g de folhas secas e moídas. Em seguida, elas foram submetidas à extração em soxhlet, utilizando 150mL de solventes de diferentes polaridades (metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e hexano) para determinação do maior efeito extrator em relação ao terpenóide. A amostra foi extraída por um período de 12h com refluxo constante. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, conforme apresentado na figura 5. Os extratos brutos de cada solvente (metanol, etanol, diclorometano, hexano, acetato de etila e clorofórmio) foram pesados (cerca de 1mg). derivatizados com 1mL de diazometano. As amostras derivatizadas foram diluídas a uma concentração de 500ppm com diclorometano e injetados no CG/EM. Após análises dos cromatogramas dos íons totais dos extratos brutos dos solventes utilizados no teste de solubilidade, observou-se que o extrato diclorometano foi solvente que permitiu a extração de maior quantidade do triterpenóide com menor número das demais substâncias presentes no extrato. Posteriormente, foram realizadas as coletas mensais (totalizando doze meses) e, as extrações foram realizadas com o solvente diclorometânico..

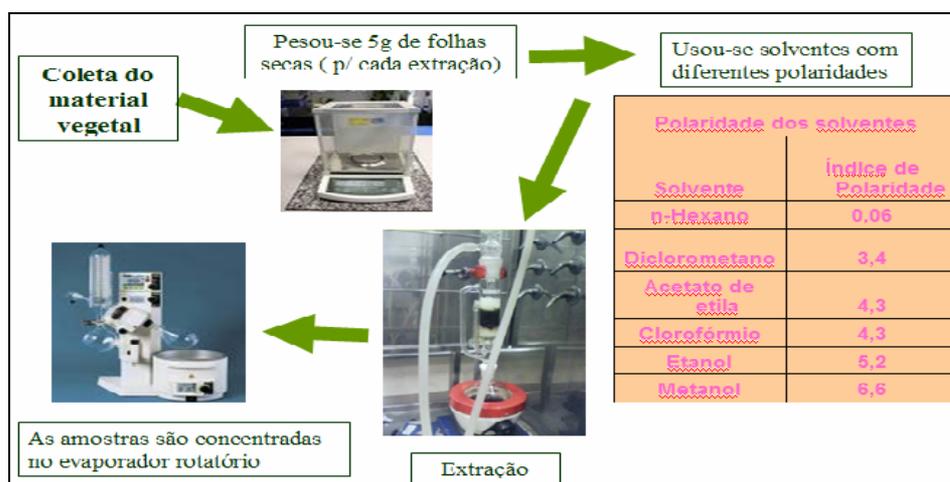


Figura 5: Extração e teste de solubilidade

## 2.4 METILAÇÃO COM DIAZOMETANO

### 2.4.1 Preparação do diazometano

Em um balão de fundo redondo de 125mL, dissolveu-se 1,25g de KOH em 20mL de água destilada e, posteriormente, adicionou-se 6,25mL de etanol. Doravante nos referiremos a esta solução como a **solução A**.

Em ampola de decantação de 100mL dissolveu-se 5,35g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald) em 50mL de éter anidro. Doravante nos referiremos a esta solução como a **solução B**.

A **solução A** foi colocada em balão de fundo redondo em banho de óleo sob agitação. A este balão foram conectados; uma ampola de adição com a **solução B** e um condensador reto contendo a saída direcionada a um balão coletor. Ver-teu-se, através de gotejamento da **solução B** sobre a **solução A**. O diazometano produzido foi recolhido no balão coletor e, analisado por CG/EM para verificação de sua pureza.

### 2.4.2 Metilação da amostra

Um miligrama dos extratos foram solubilizados com éter sulfúrico seco e adicionado 1mL de solução de diazometano recém preparada. A solução resultante foi deixada em repouso por 12 horas e o éter removido por passagem de um fluxo de N<sub>2</sub>.

## 2.5 ISOLAMENTO DO ÁCIDO URSÓLICO

### 2.5.1 Cromatografia em coluna - **Coluna A**

Após a determinação do melhor solvente para extração do Ácido Ursólico (solvente diclorometânico), 10g de folhas secas foram submetidas à extração em soxhlet com 700mL de hexano. A extração inicial das folhas secas com hexano foi utilizada para diminuir a concentração de pigmentos fotossintetizantes e demais substâncias apolares presentes no extrato obtido subsequentemente (extrato diclorometânico). Posteriormente, submeteu-se amostra a extração com 300mL de diclorometano. O extrato diclorometânico obtido (400mg) foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica (4g) empacotada com hexano e, eluída com misturas de hexano e diclorometano em ordem crescente de polaridade. Foram

coletadas 106 frações em alíquotas de 10mL cada. Em seguida, evaporadas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. As frações assim obtidas da coluna A foram submetidas à análise em CCF com 9:1 (volume:volume) de Clorofórmio e Metanol e reveladas em solução de paranisalaldeído em temperatura 150°C, conforme é mostrado na figura 6.

As frações (85 a 92) da coluna A foram reunidas, pois apresentaram como constituinte majoritário o Ácido Ursólico, identificado por análise em CG/EM. Contudo, o cromatograma de íons totais obtido no CG/EM revelaram também uma grande quantidade de substâncias apolares. Estas frações (200mg) foram re-submetidas a uma nova coluna cromatográfica (Coluna B).

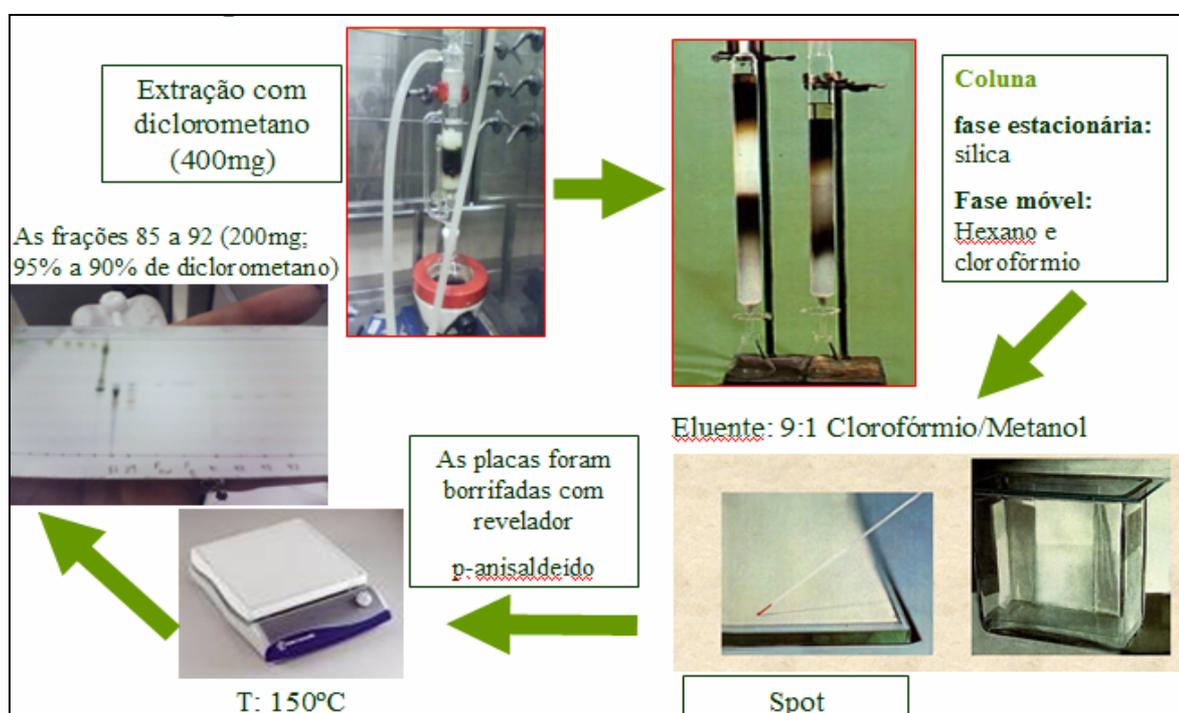


Figura 6: Cromatografia em Coluna – coluna A

### 2.5.2 Cromatografia em coluna - Coluna B

As frações da coluna (85 a 92; 200mg) que apresentavam este triterpenóide como componente majoritário foram re-submetida a uma nova coluna cromatográfica em coluna de gel de sílica empacotada com hexano. Esta coluna utilizou como fase móvel hexano e acetato de etila 86:14 (volume:volume). Foram recolhidas 35 frações de 10mL. Posteriormente, a frações (coluna B) foram evaporadas e submetidas à CCF utilizando a solução de

paranisaldeído, como solução reveladora em temperatura 150°C e como fase móvel Clorofórmio e Metanol 9:1 (volume:volume). Após a análise das cromatoplasas as frações mais puras (frações 28-35) foram reunidas obtendo-se um total de 24mg, conforme é mostrado na figura abaixo.

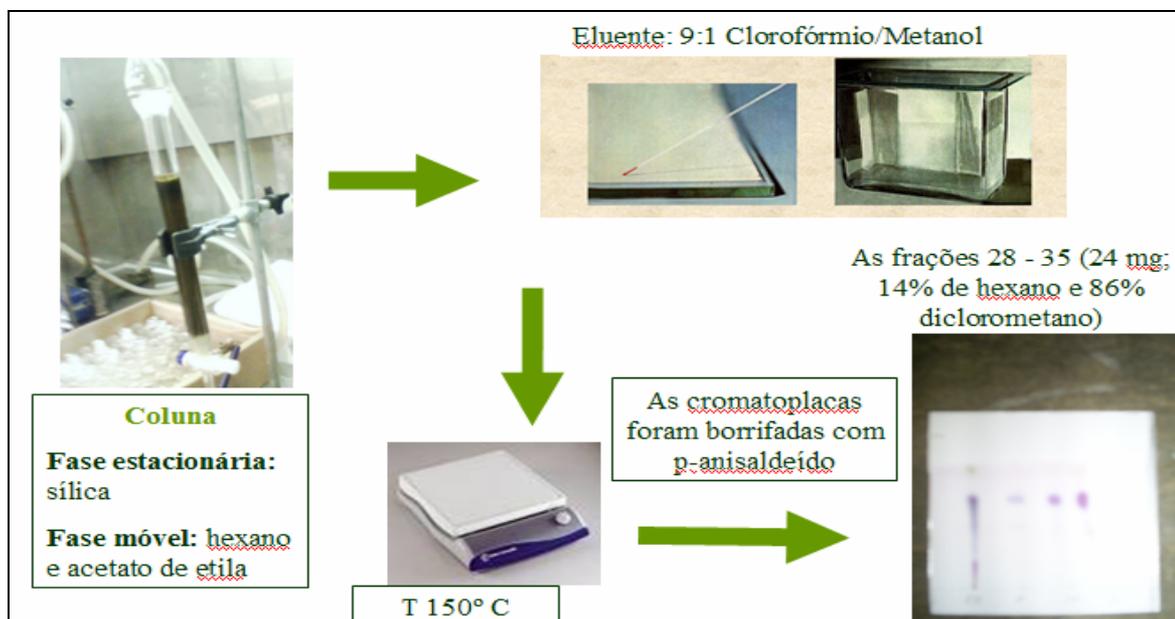


Figura 7: Cromatografia em Coluna - coluna B

### 2.5.3 Recristalização

As amostras reunidas foram pesadas (24mg) em balança analítica SHIMADZU LIBROR-AEG-220 e diluídas com pequenas quantidades de metanol PA a quente, temperatura inferior ao seu ponto de ebulição. Depois que a amostra foi totalmente diluída ainda a quente, o frasco foi lacrado e armazenado no congelador durante um dia. A mudança de temperatura brusca levou a formação de cristais, conforme apresentado na figura 8. O método de recristalização foi repetido por duas vezes para melhorar a eficiência do processo. O Ácido Ursólico é solúvel em metanol a quente e insolúvel a frio. Após a recristalização, a amostra foi pesada (20mg) e uma pequena amostra (1,4mg) foi submetida à análise em CG/EM, conforme apresentado na figura 9.



Figura 8: Recristalização

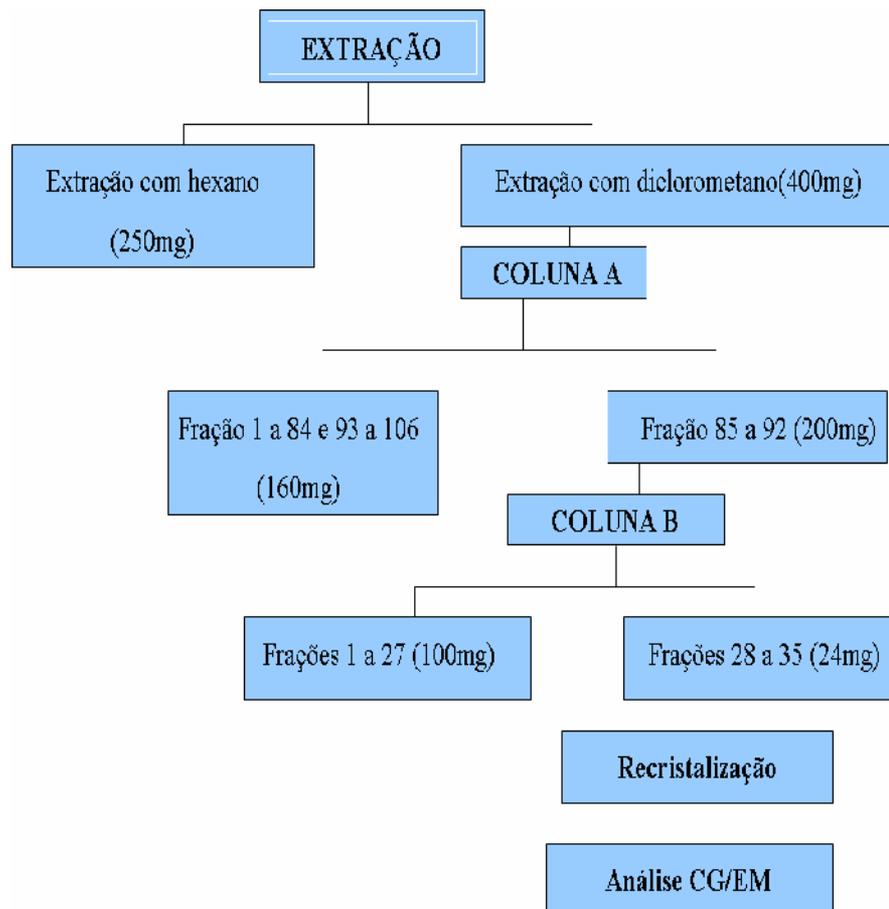


Figura 9: Fluxograma do isolamento do Ácido Ursólico

## 2.6 ANÁLISE POR CG/EM

Uma solução de 1,4mg de amostra recristalizada foi pesada e diluída em 1mL de diclorometano, conforme descrito na figura 10. Posteriormente, esta alíquota foi submetida à CG-EM, [equipamento HP, Mod. 6890, acoplado a um detector de massas, HP Mod. 5971, dotado de biblioteca de espectros Wiley (software 59943B)]. Foi utilizada uma coluna capilar MS-HP-1 (30m x 0,25mm x 0,25µm de filme), gás carreador He (fluxo 11,3 mL/min), Temperatura do injetor 300°C, e taxa de split 5:1. As condições de operação foram:  $t_i$  290°C,  $t_f$  350°C, taxa de aquecimento 5°/min, fluxo de He: 1,5mL/min; injeção de 1µL de uma solução de 1,4 mg de ácido ursólico em 1mL de diclorometano.

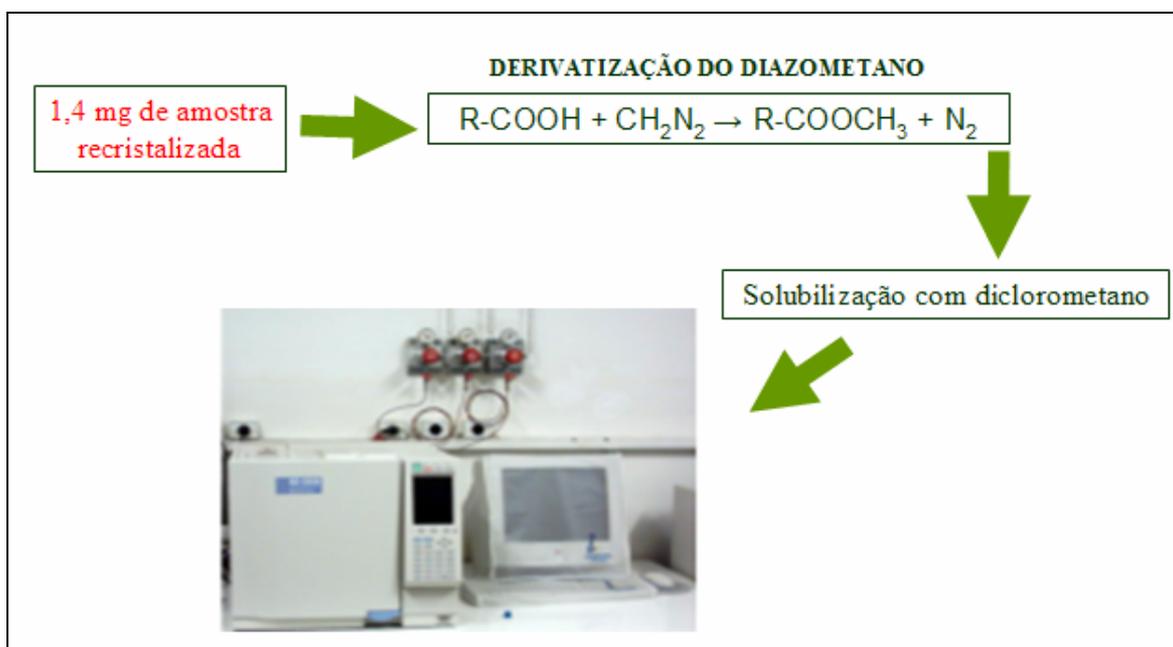


Figura 10: Análise em CG/EM

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 EXTRAÇÃO E TESTE DE SOLUBILIDADE

Como foi relatado na página 12, o material vegetal da *Plumeria rubra L.*, utilizado para o isolamento de seu metabólito secundário, foi procedente da localidade do Mangueiros – RJ, no Campus da FioCruz. As coletas realizadas nas proximidades do laboratório, agilizaram o trabalho, uma vez que havia a necessidade de grandes quantidades da planta todos os meses.

Após a coleta e secagem do material da planta adulta e correta identificação botânica iniciou as técnicas extrativas para isolamento e obtenção do metabólito secundário da espécie em estudo. As coletas foram realizadas mensalmente (tabela 2), para possível identificação da variação do metabólito secundário.

Tabela 2: Coletas mensais das folhas de *Plumeria rubra L.*

Coletas mensais das folhas de <i>Plumeria rubra L.</i> (entre os dias 15 a 31)				
Meses	Dia	Temp (°C) / Horário (horas)	Peso das folhas frescas (g)	Peso das folhas secas (g)
Janeiro	23/1/2008	25°C/ 15:30	1309,47	165,485
Fevereiro	27/2/2008	27°C/ 15:20	1306	165,13
Março	31/3/2008	30°C/ 14:30	803,4	101,83
Abril	16/4/2008	26,7°C/ 15:00	453,5	57,49
Maio	28/5/2008	29°C/ 15:30	428,41	57,45
Junho	30/6/2008	26°C/ 15:00	321,3	43,33
Julho	28/7/2008	28°C/ 15:22	199,52	21,3
Agosto	28/8/2008	27°C/ 14:00	377,59	44,54
Setembro	22/9/2008	20°C/ 15:10	578,68	78,19
Outubro	23/10/2008	26°C/ 14:30	487,43	49,27
Novembro	24/11/2008	26°C/ 14:40	335,8	34,81
Dezembro	23/12/2008	28°C/ 14:00	444,36	44,06

A extração para obtenção do ácido ursólico foi baseada no resultado do teste de solubilidade de seis solventes: metanol, etanol, acetato de etila, diclorometano, hexano e clorofórmio. O extrato bruto foi derivatizado com diazometano e analisado em CG/EM, obtendo os cromatogramas de íons totais apresentados nas figuras 11-16 .

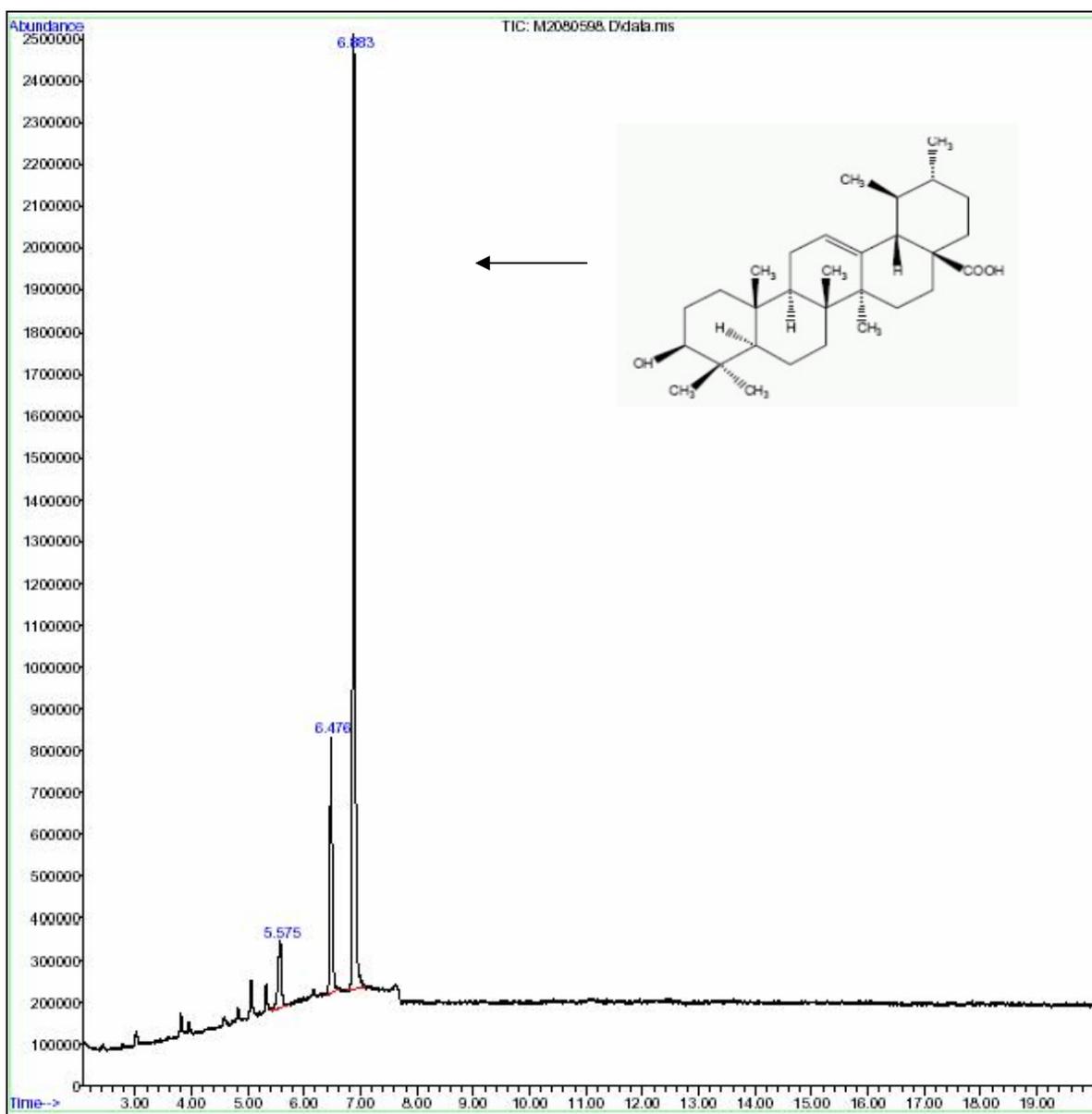


Figura 11: Cromatograma de íons totais do Extrato acetato de etila

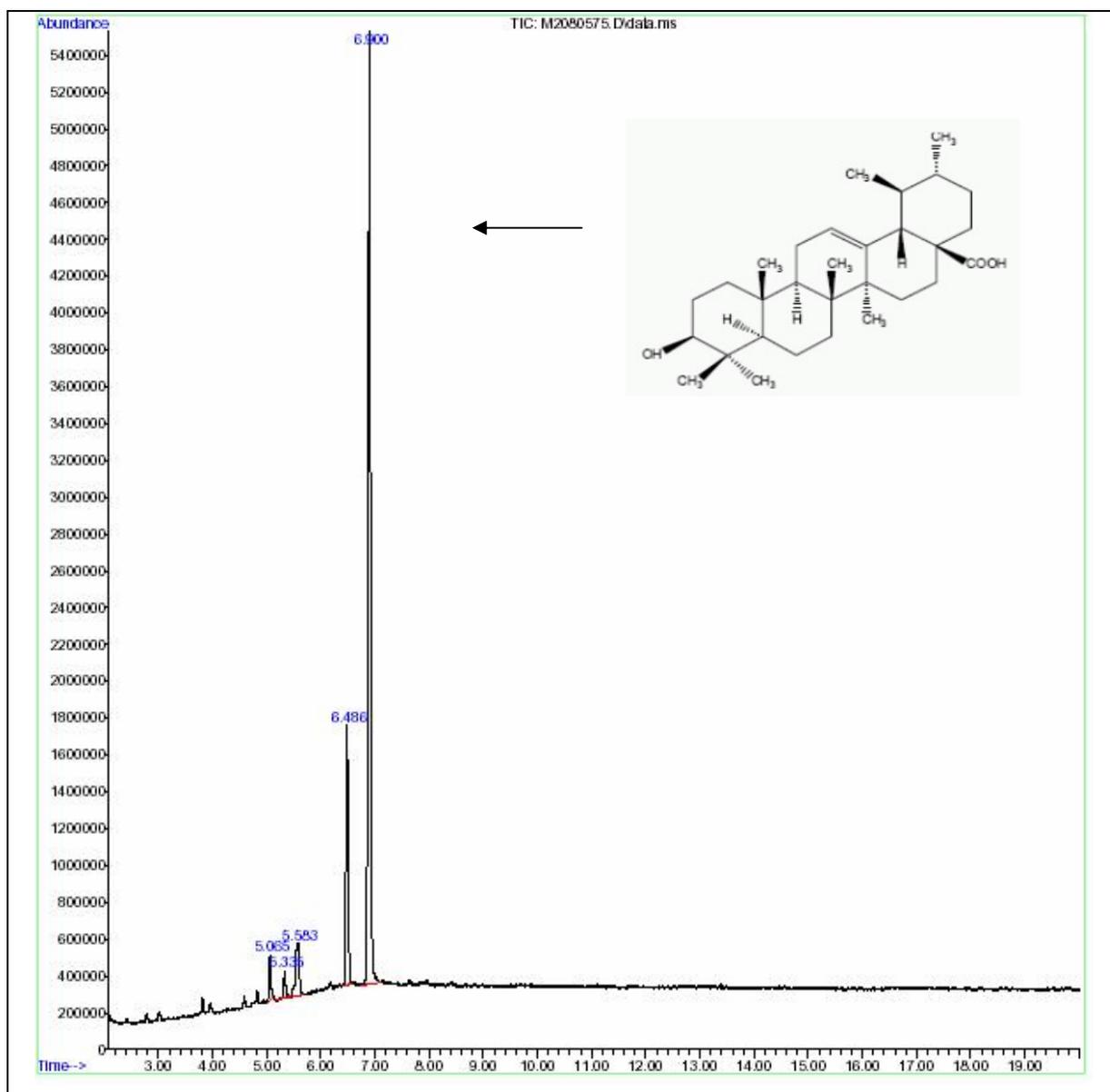


Figura 12: Cromatograma de íons totais do Extrato diclorometânico

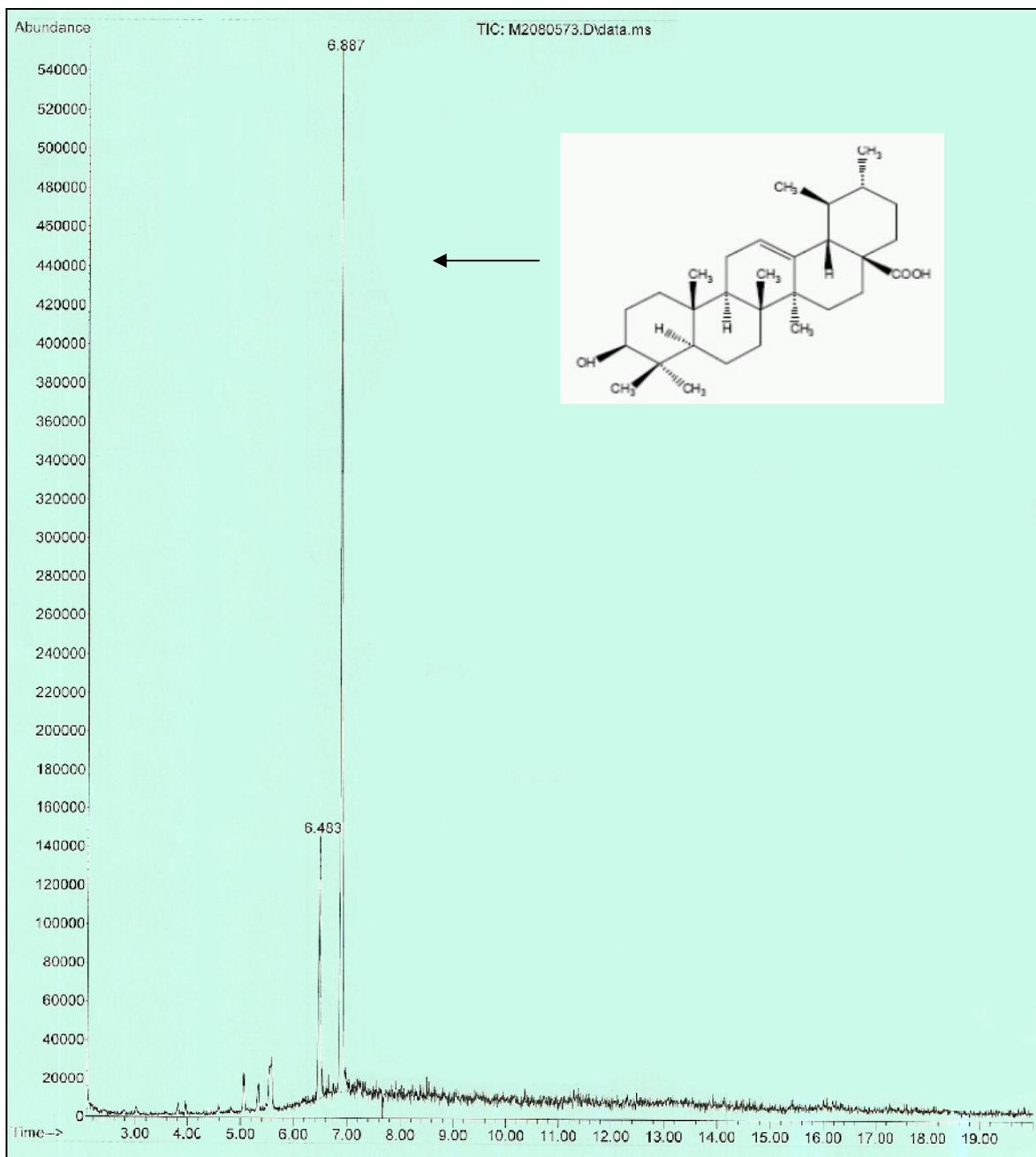


Figura 13: Cromatograma de íons totais do Extrato metanólico

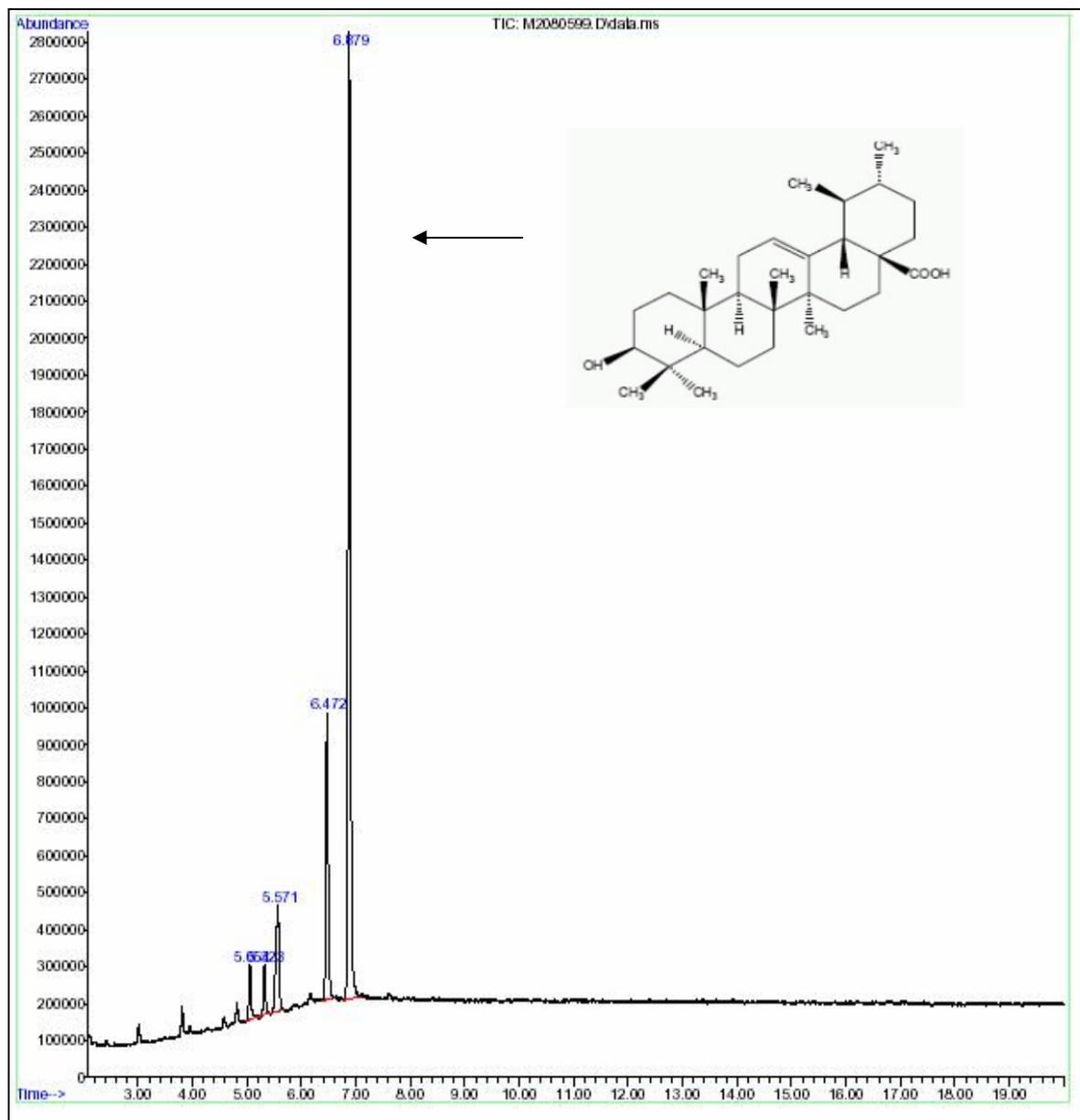


Figura 14: Cromatograma de íons totais do Extrato clorofôrmico

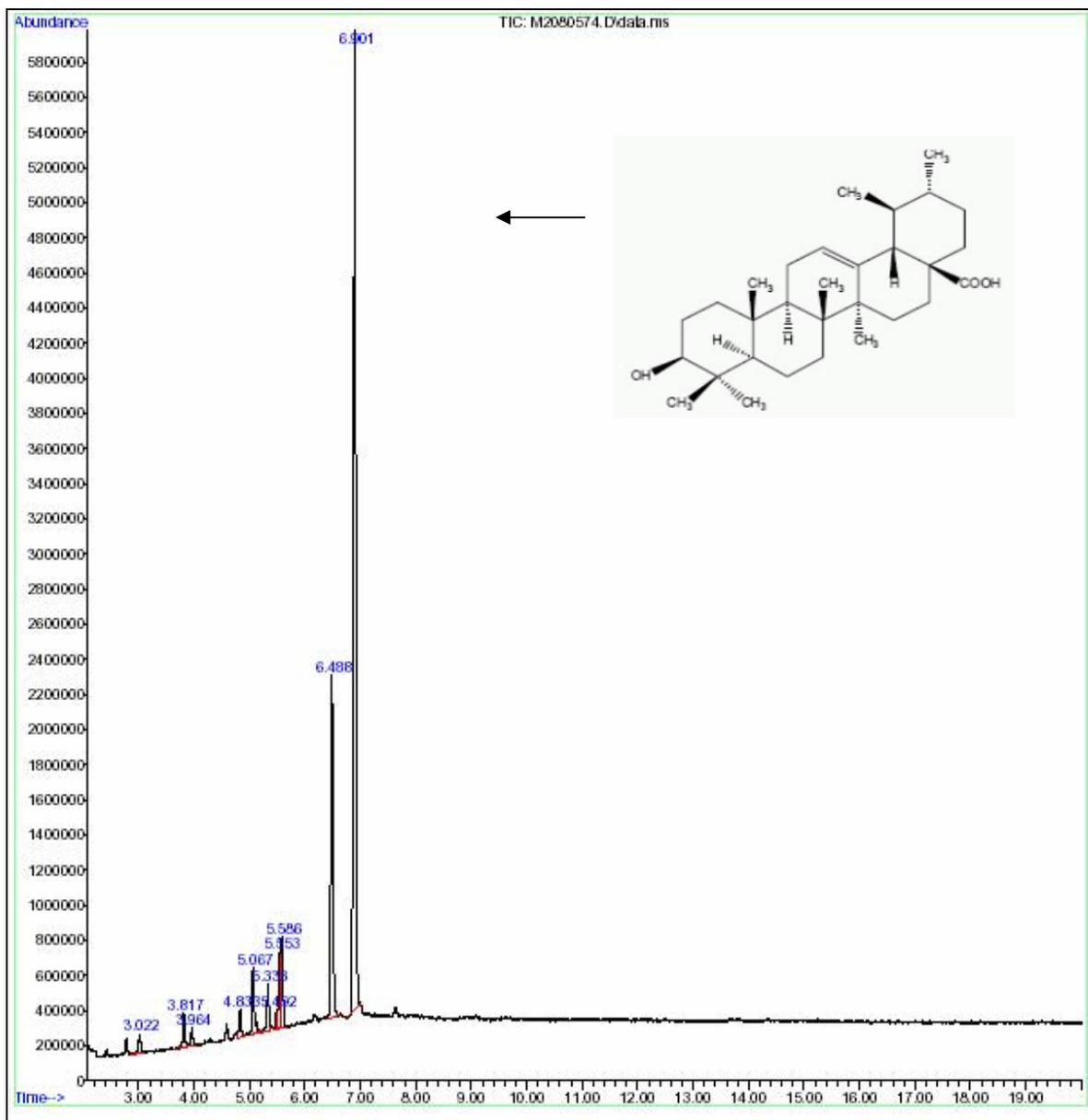


Figura 15: Cromatograma de íons totais do Extrato hexânico

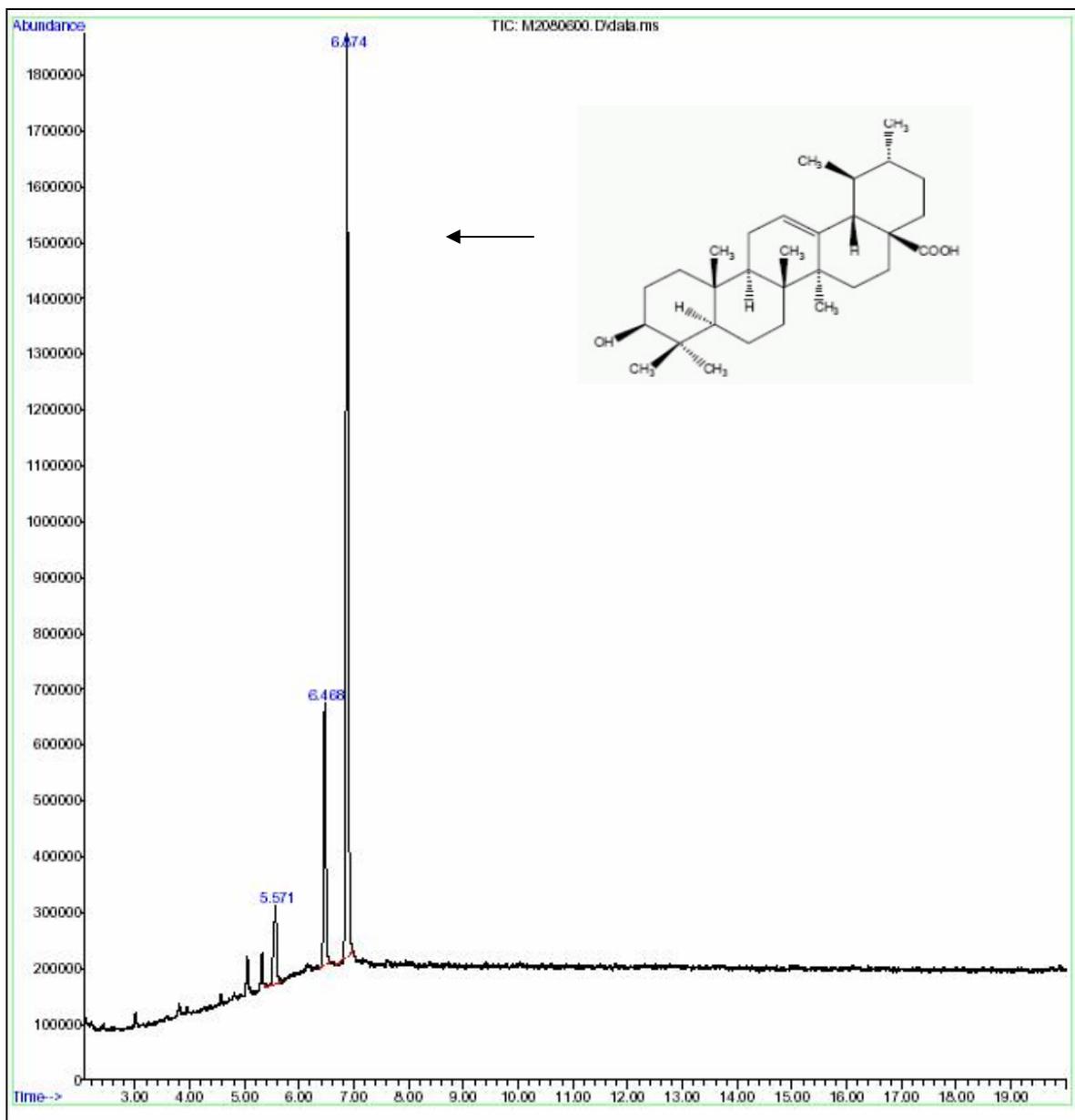


Figura 16: Cromatograma de íons totais do Extrato etanólico

Após a análise dos cromatogramas de íons totais (figuras 11-16), observou-se que o poder extrator destes foram similares. Contudo, o extrato diclorometano apresentava menor quantidade de substâncias apolares interferentes. Vale a pena ressaltar que os trabalhos descritos na literatura não realizam teste de solubilidade para determinar o melhor solvente para extração do Ácido Ursólico. O solvente mais utilizado para a obtenção do triterpenóide é o etanol (KATO, 2006; FRIGHETTO, 2008; RAUTER, 2007). Baseados nos resultados obtidos neste trabalho as extrações mensais das folhas de *P. rubra* forma acutifolia foram realizadas com diclorometano. Após a remoção dos solventes, os extratos foram

concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida e analisados em CG/EM. Os cromatogramas de íons totais dos 12 meses do ano de 2008 são apresentados nas figuras 17 - 28.

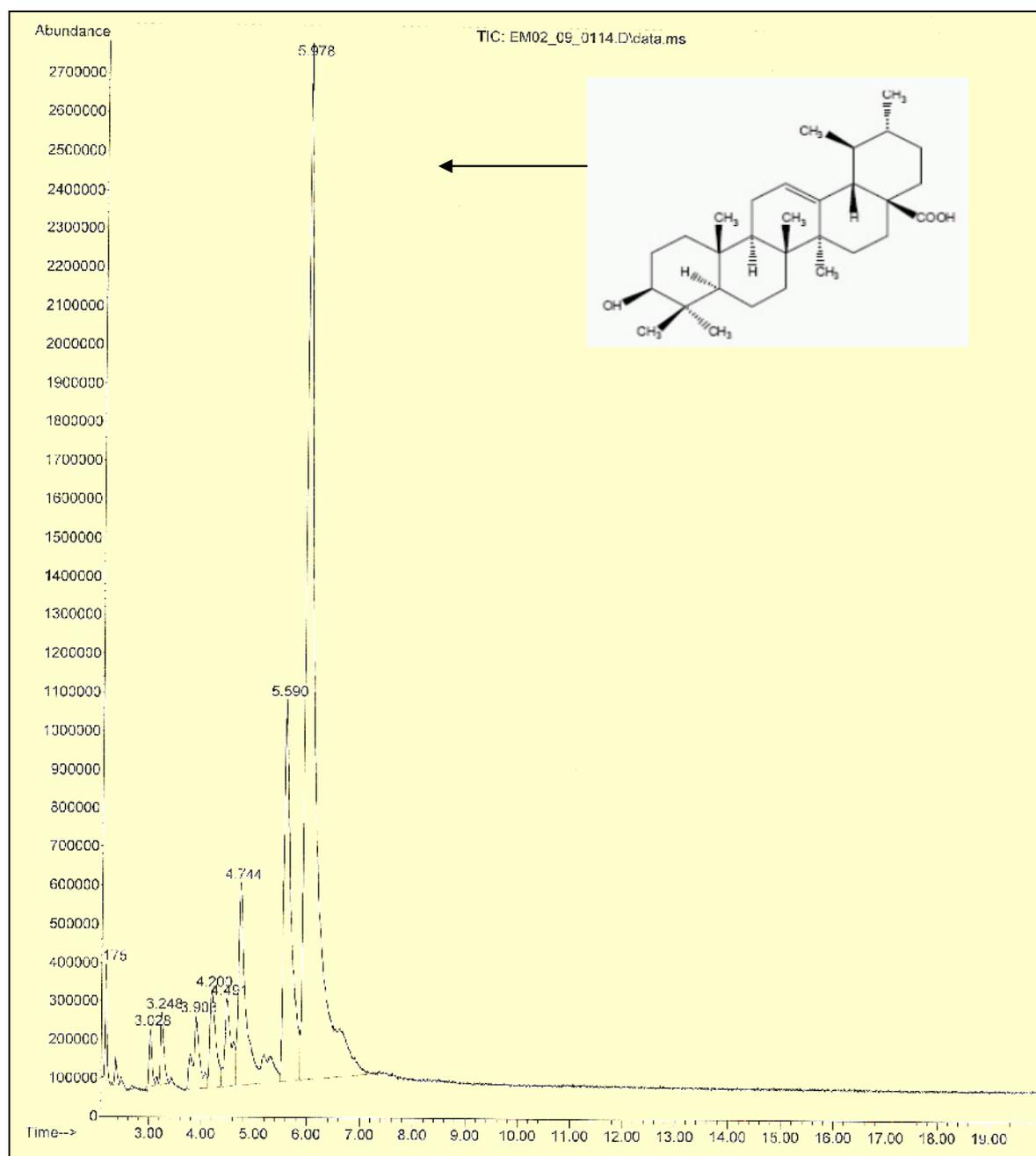


Figura 17: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de janeiro

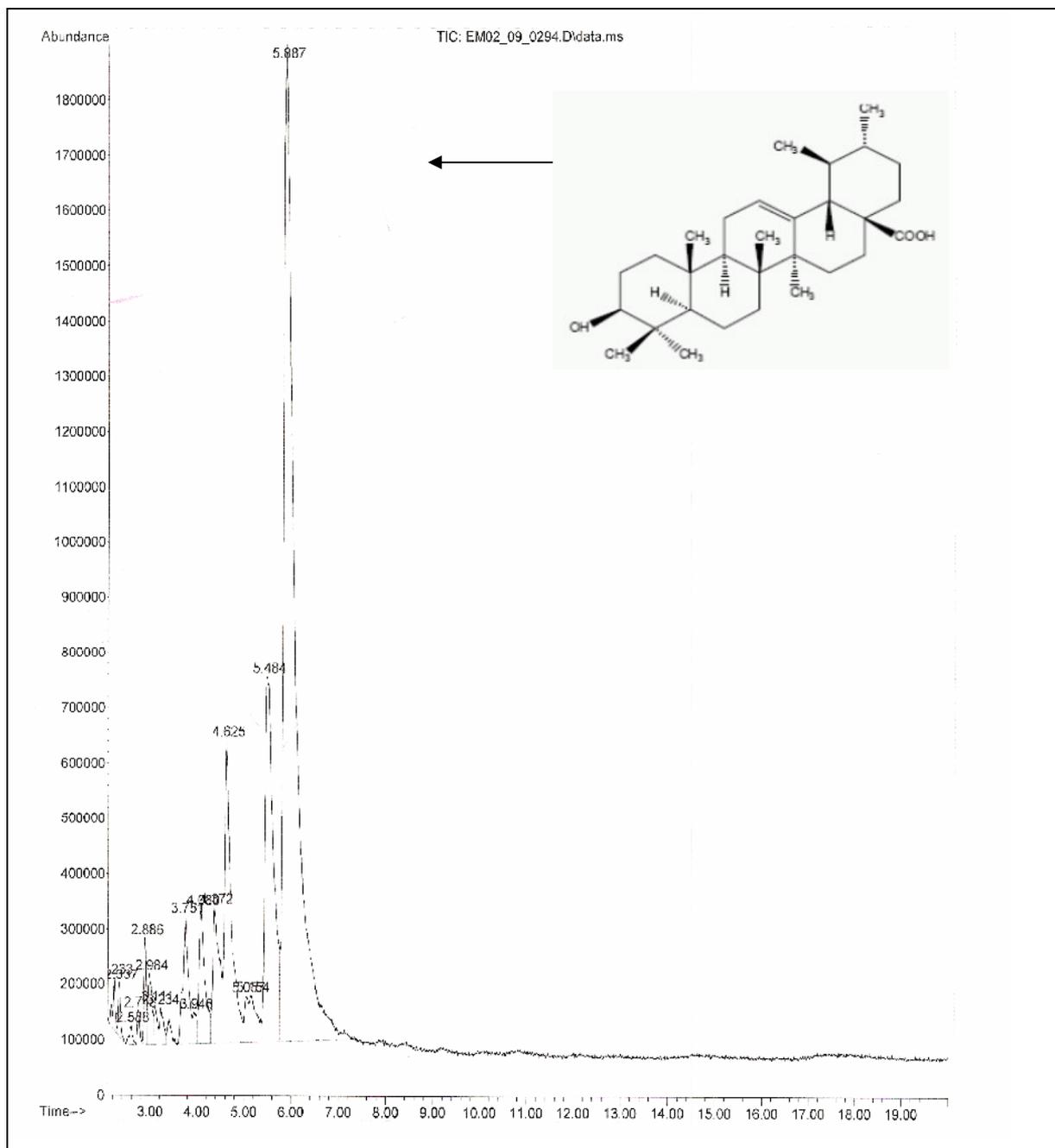


Figura 18: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de fevereiro

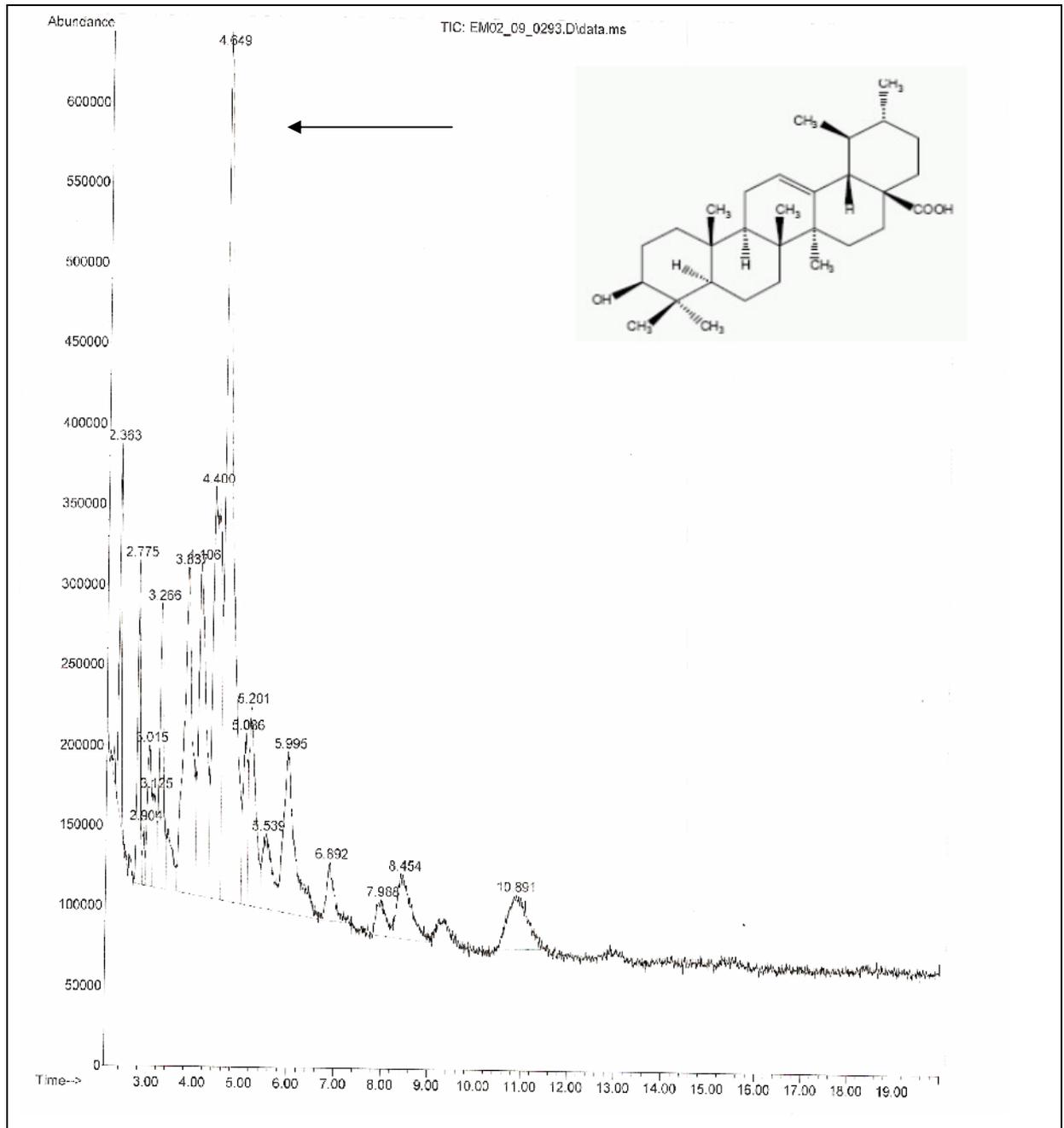


Figura 19: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de março

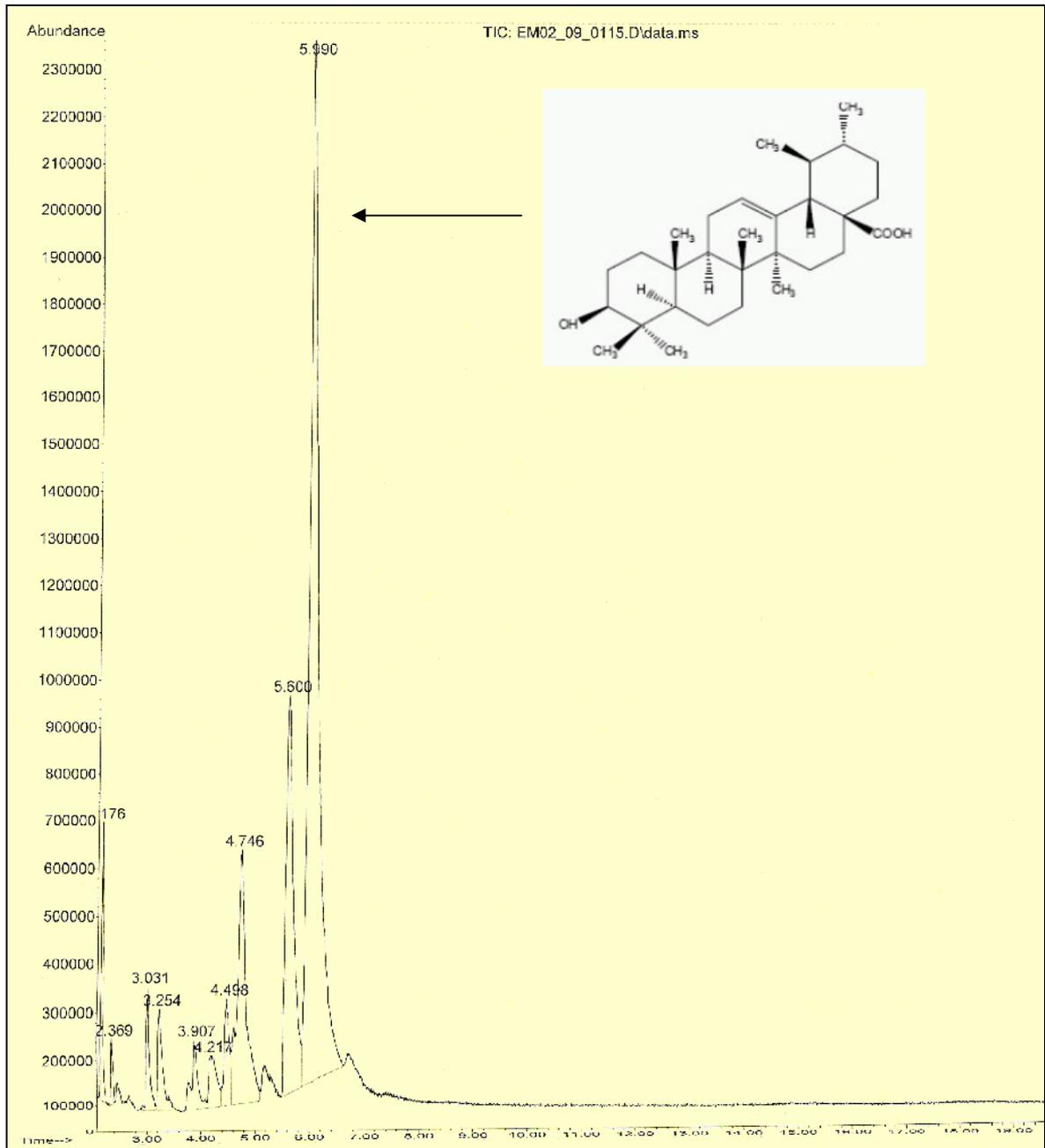


Figura 20: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de abril

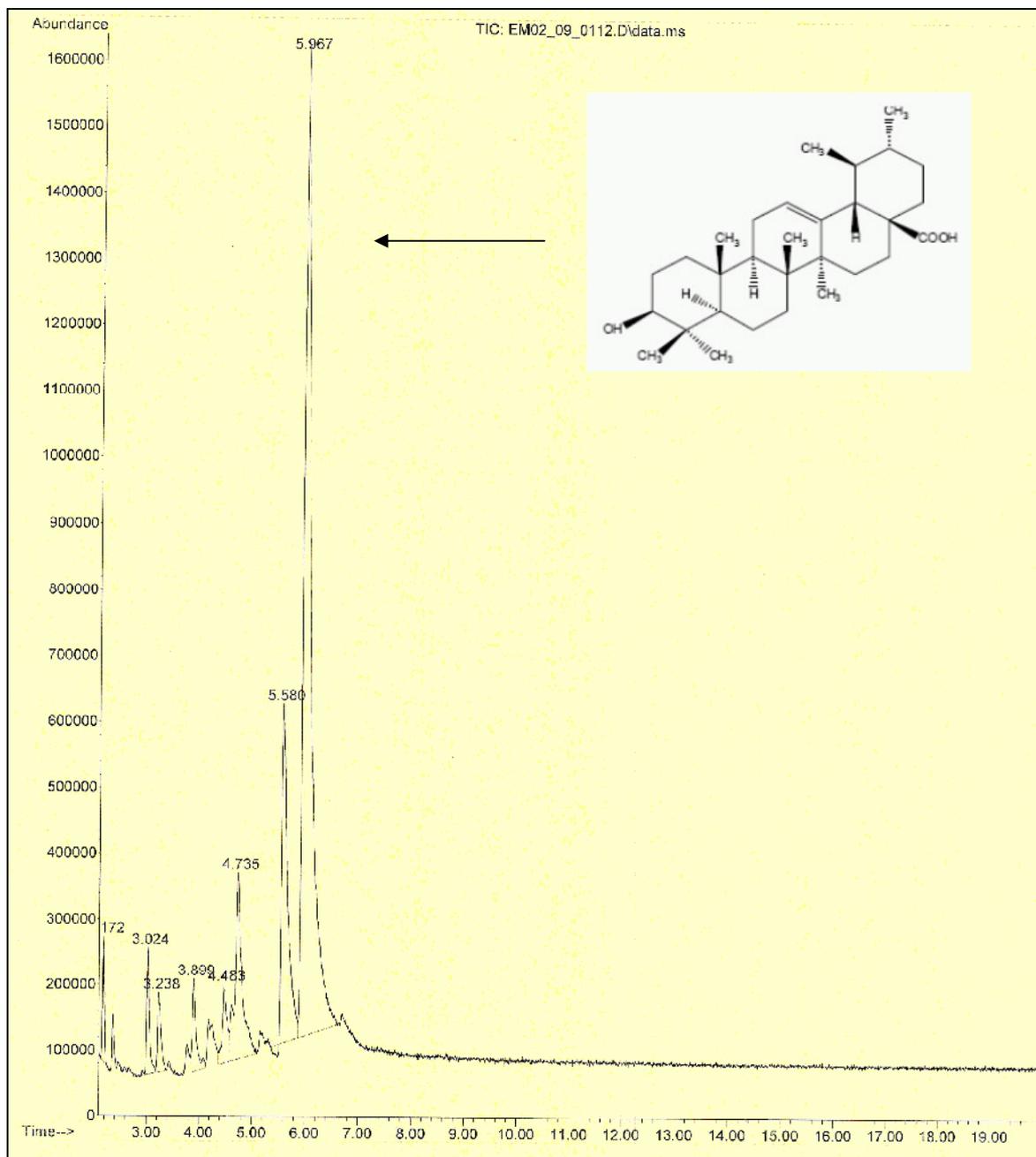


Figura 21: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de maio



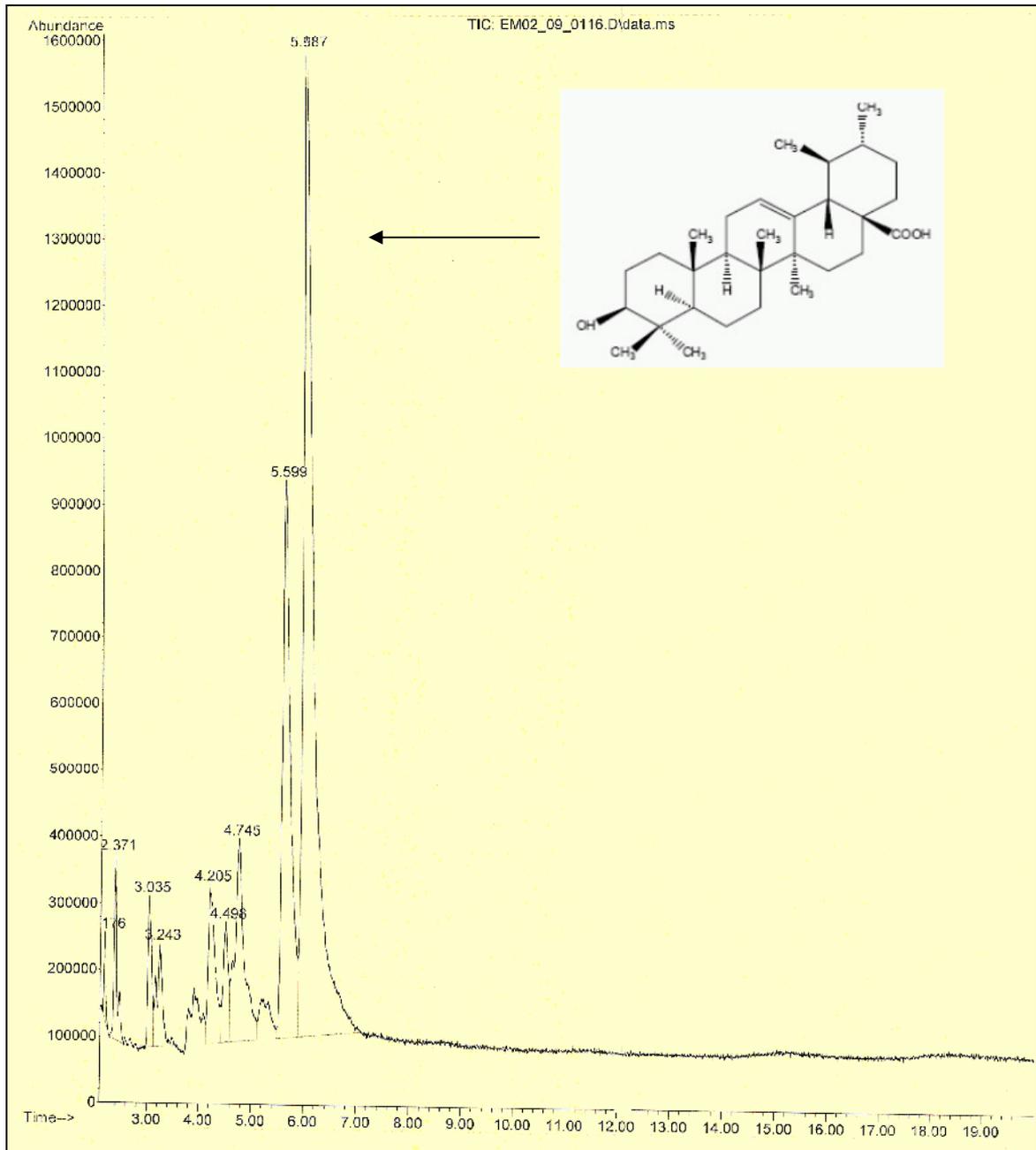


Figura 23: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de Julho

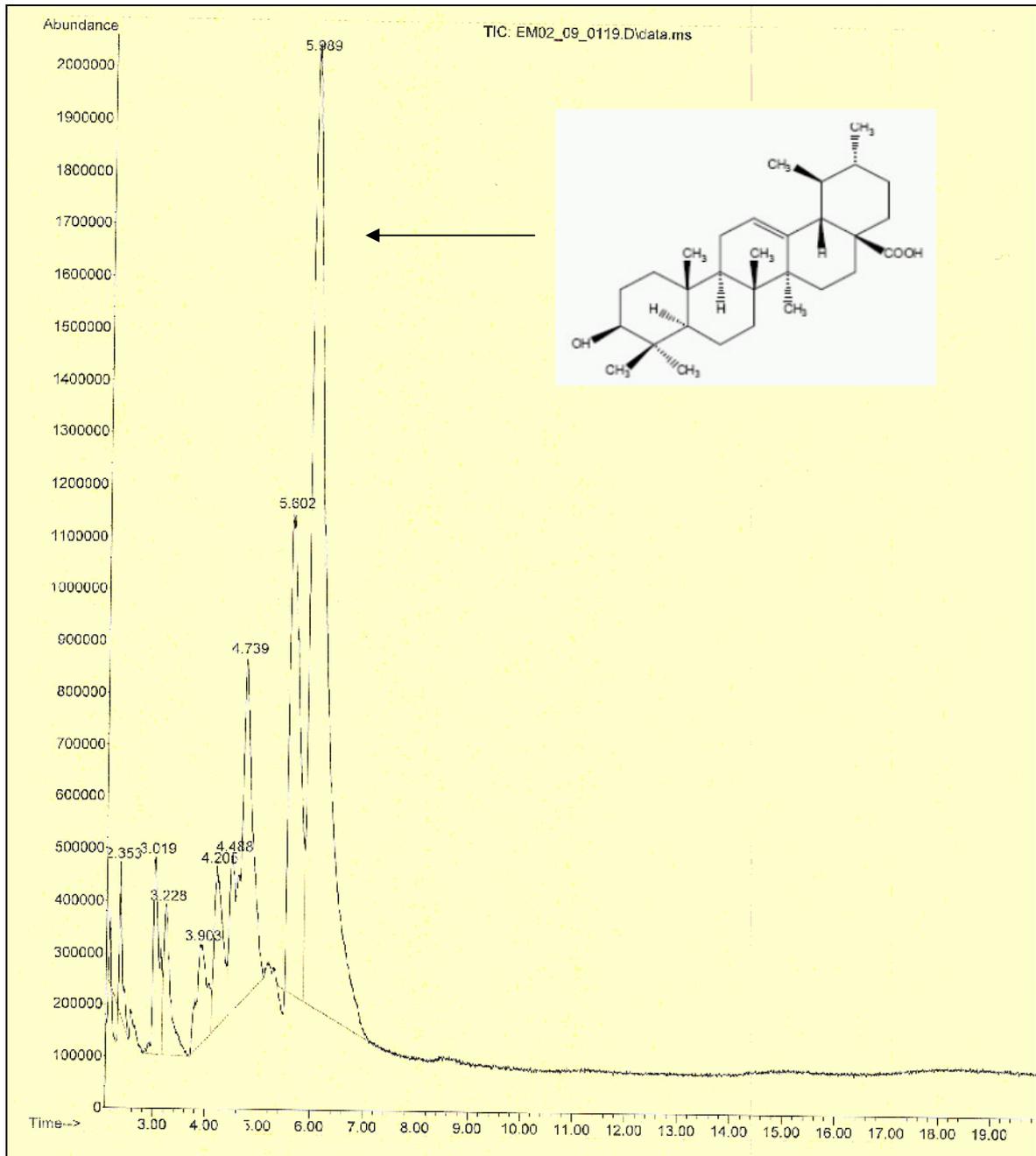


Figura 24: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de agosto



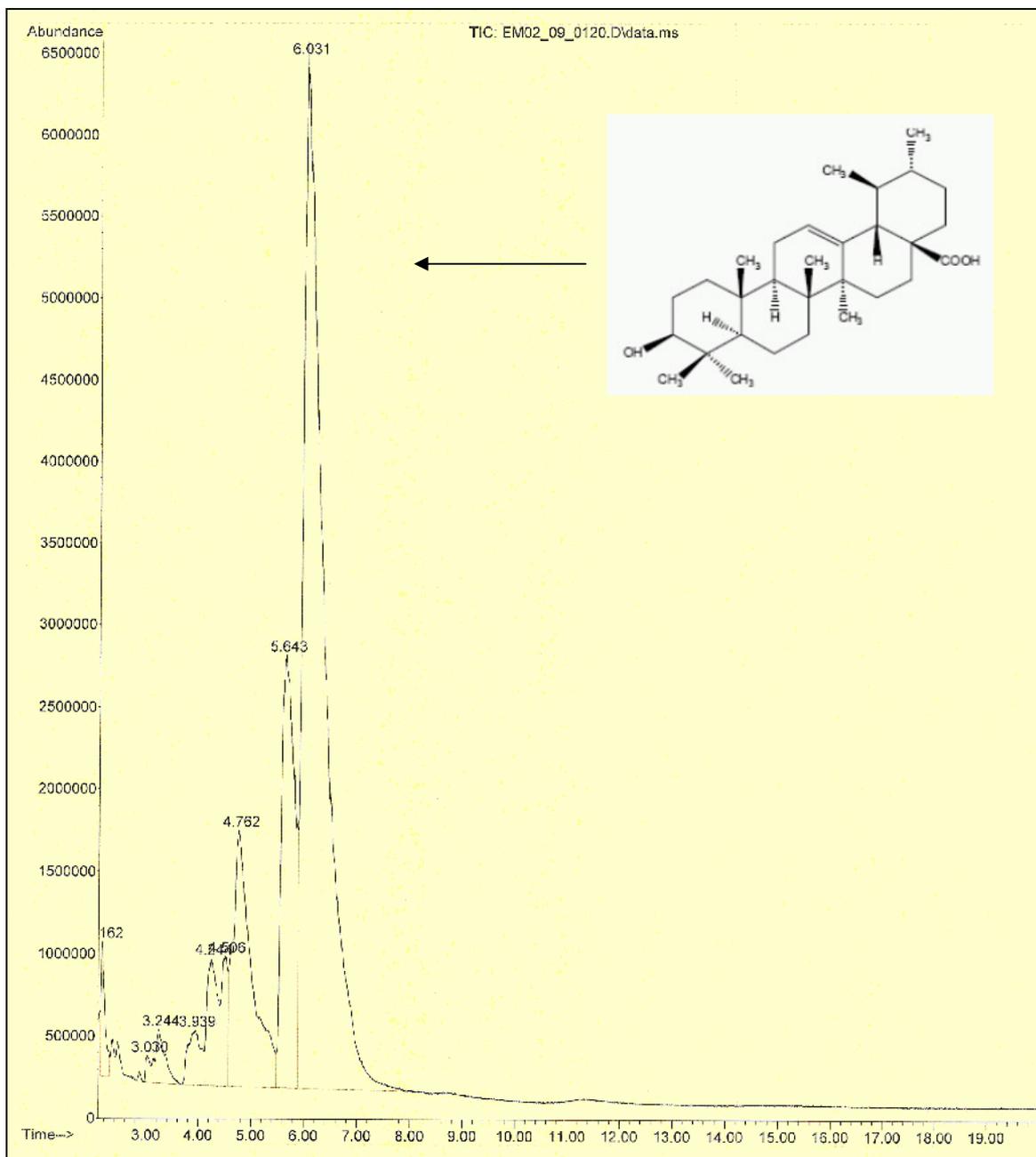


Figura 26: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de outubro

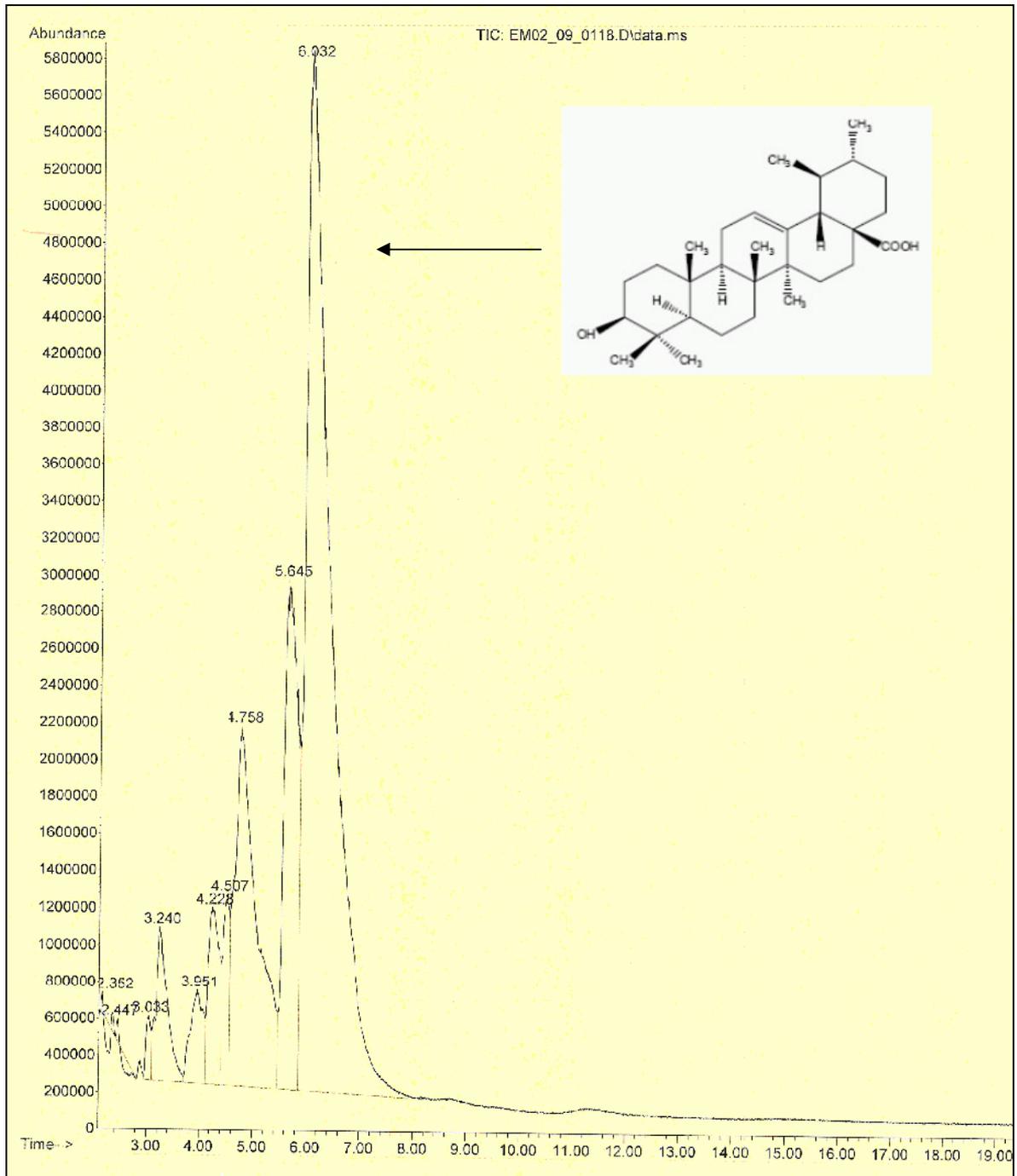


Figura 27: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de novembro

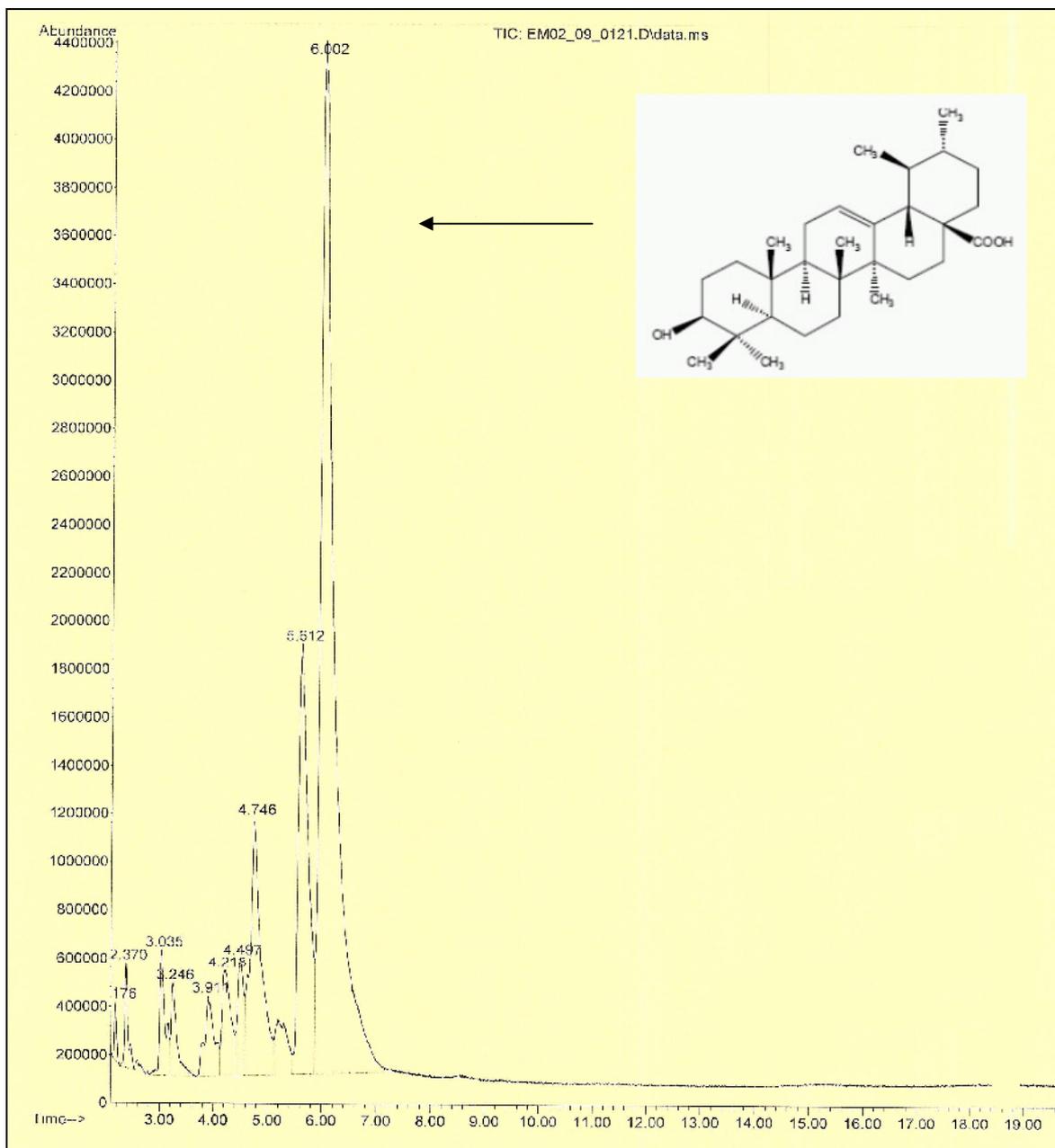


Figura 28: Cromatograma de íons totais do Extrato do mês de dezembro

Na análise por CG/EM, o equipamento oferece área do pico do Ácido Ursólico. Essa área representa a percentagem do Ácido Ursólico presente na amostra em comparação com as outras substâncias. Com base nesta informação, é possível ter uma visão preliminar do rendimento do metabólito durante os meses coletados. Na tabela 3 são apresentados os rendimentos dos extratos brutos, em relação à planta seca e, a área dos picos fornecidos nos cromatogramas.

Tabela 3: Rendimentos dos extratos brutos mensais das folhas de *Plumeria rubra L.* em diclorometano

Meses	Planta seca (g)	Extrato Bruto (g)	Rendimento (%)	Área (%)
Janeiro	10	1,69	16,90%	59.26
Fevereiro	10	1,57	15,70%	54.69
Março	10	0,75	7,50%	25.86
Abril	10	1,5	15%	52.46
Mai	10	1,75	17,50%	59.95
Junho	10	0,616	6,16%	21.72
Julho	10	1,5	15%	51.60
Agosto	10	1,4	14%	50.62
Setembro	10	1,9	19%	69.61
Outubro	10	1,7	17%	59.67
Novembro	10	1,6	16%	55.86
Dezembro	10	0,616	6,16%	21.72

Assim como diversos fatores, a sazonalidade é responsável pela variação dos metabólitos secundários presentes na planta, por isso existem pesquisas que visam análise do mês ideal, ou seja, o mês em que o metabólito secundário se apresenta em maior quantidade. Portanto, setembro é o mês ideal para a extração deste triterpenóide, o que condiz com a literatura, já que é a época de floração da espécie. De modo geral, os triterpenóides são usados como hormônios vegetais e restauradores da membrana plasmática pela planta (GUERRA; NODARI, 2004).

## 3.2 ISOLAMENTO DO ÁCIDO URSÓLICO

### 3.2.1 Cromatografia em coluna - Coluna A

Antes da obtenção do extrato diclorometano das folhas de *P. rubra L.*, estas foram submetidas à extração a quente com hexano em soxhlet. Esta etapa teve como principal objetivo diminuir a quantidade de substâncias lipofílicas, clorofila entre outras, no extrato diclorometano. Após o esgotamento da extração em hexano submetemos o material à extração com diclorometano. Os extratos brutos hexânicos (250mg) e diclorometano (400mg) foram

secos em rotaevaporador e, uma alíquota deste último foi submetido à cromatografia em coluna (CC; 400mg). Os solventes utilizados na CC foram misturas de hexano e diclorometano com aumento crescente na polaridade. Foram obtidas 106 frações. Essas frações foram acompanhadas com análise de CCF, utilizando a solução de paranisalaldeído como solução reveladora. As placas cromatográficas foram eluídas com clorofórmio e metanol (9:1). As frações 85 a 92 (200mg; 95% a 90% de diclorometano) apresentavam o AU como componente majoritário. Essas amostras foram reunidas e 1mg foi submetida à análise em CG/EM, para análise da sua pureza, como é vista no cromatograma de íons totais da coluna A, na figura abaixo.

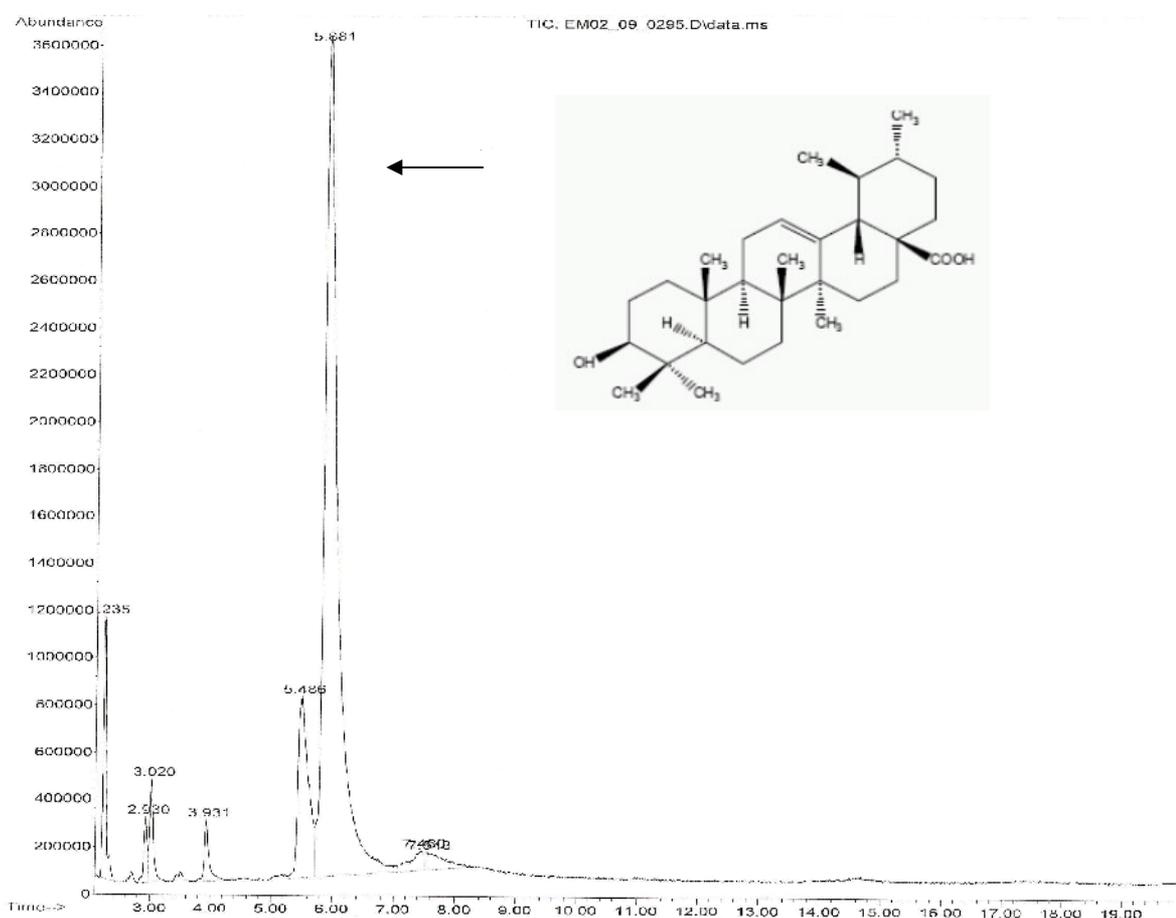


Figura 29: Cromatograma de íons totais das frações (frações 85 a 92) da Coluna A

Analisando o cromatograma de íons totais e espectrometria de massas da Coluna A (frações 85 a 92) pode se observar à presença de outras substâncias na amostra. De acordo com a biblioteca Wiley do software do cromatógrafo e da análise da fragmentação massas, o pico 5.881 é o Ácido Ursólico. Os picos com tempo de retenção inferior ao Ácido Ursólico são representados por substâncias apolares e acima mais polares e/ ou maior massa. O que condiz, com as cromatoplasas que mostraram interferentes acima e abaixo do *r<sub>f</sub>* do Ácido Ursólico. Estas frações foram submetidas a uma nova CC para eliminação destes contaminantes.

### **3.2.2 Cromatografia em coluna - Coluna B**

As frações da coluna A (85 a 92; 200mg) foi submetida a uma nova coluna cromatográfica (eluída com misturas de hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade). Foram obtidas 35.frações, com alíquotas de 10mL. Essas frações foram acompanhadas por CCF, com mesmo sistema eluente 9:1 de clorofórmio e metanol, reveladas com *p*-anisaldeído. As frações 28 - 35 (24 mg; 14% de hexano e 86% acetato de etila) apresentaram o AU como constituinte majoritário. A fim de eliminar possíveis interferentes, as frações submetidas à recristalização, obtendo-se 20mg de ácido ursólico. Cerca de 1mg da amostra foi derivatizada com diazometano e submetida à análise CG/EM, obtendo o cromatograma de íons totais abaixo.

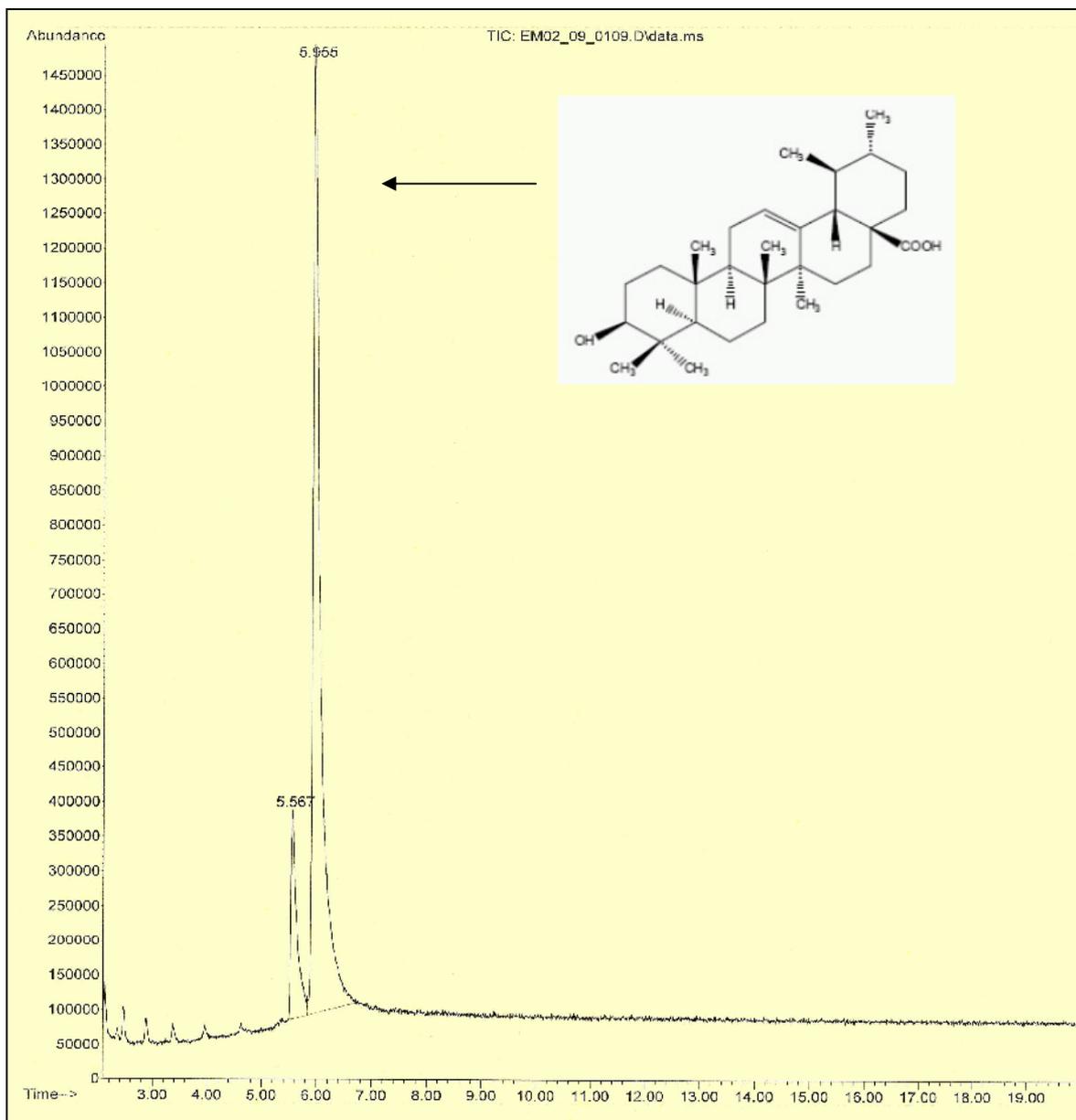


Figura 30: Cromatograma de íons totais da amostra recristalizada.

Segundo a biblioteca Wiley do software do cromatógrafo, o pico 5.955 representa o Ácido Ursólico e, próximo a ele o pico 5.567 é representado pelo seu isômero Ácido Oleanólico, que de acordo com a literatura esses isômeros são encontrados na maioria das vezes juntos e apresentam dificuldade de separação. (WÓJCIAK-KOSIOR, 2007). De acordo com a literatura, a presença do Ácido Oleanólico na amostra não interfere na atividade farmacológica do constituinte majoritário, pois sua atividade é bastante similar (SPORN; SUH, 2000). Porém, o Ácido Oleanólico apresenta uma atividade inferior ao do Ácido Ursólico (SPORN; SUH, 2000).

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO

A identificação do Ácido ursólico foi possível, pois uma alíquota (1mg) de AU foi metilado (AU-1) foi submetida à EM por impacto de elétrons (70eV). A metilação com diazometano promove a remoção do hidrogênio da carboxila do ácido ursólico e incorporação de um grupo metila proveniente do diazometano, levando a formação de um éster, o Ursolato de metila, de peso molecular 470. O processo de derivatização e a formação do éster são ideais para diminuir possíveis interações moleculares entre a amostra e a coluna cromatográfica e, portanto diminuir o tempo de retenção. O impacto de elétrons que a substância é exposta, provocando uma fragmentação, gerando íons que são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). O espectro do Ácido Ursólico pode ser visto na figura abaixo.

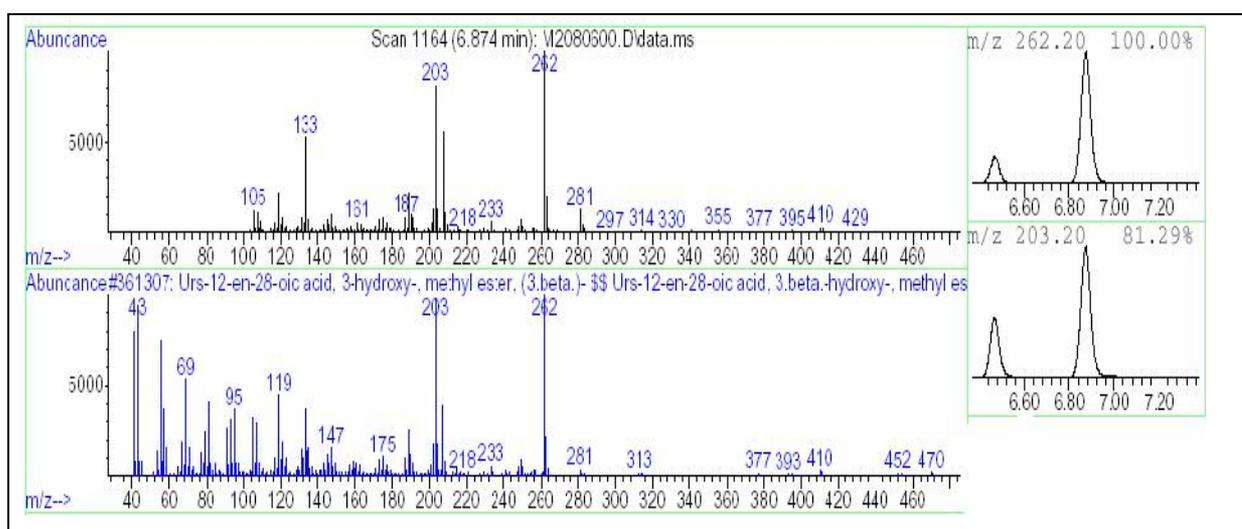


Figura 31: Espectro de Massas do AU

Mesmo não aparecendo íon molecular m/z 470 no espectro de massas do Ácido Ursólico, que confirmaria logo de imediato a sua presença, a soma dos picos m/z 208 e m/z 262, presentes no espectro, confirmaria o íon molecular m/z 470, portanto, o Ácido Ursólico. E o fato do pico m/z 203 apresentar-se com abundância elevada (81,29%), também é característico da família do ursano, diferenciando de outros triterpenos.

O íon molecular por apresentar energia suficiente, gerou a quebra da ligação dupla no anel C e pelo rearranjo de retro Diels-Alder, teve a quebra da molecular em dois fragmentos íon m/z 208 (50%) e o íon m/z 262 (100%), característico da família do lupano e

ursano e a confirmação da presença do grupo éster metilado em C-28, pois a sua perda levou a formação do íon  $m/z$  203. Os dados espectrométricos obtidos do AU-1 metilado (EM) foram similares aos dados da literatura observados para o Ácido Úrsólico (JUNGES *et al.*, 1999, 2000).

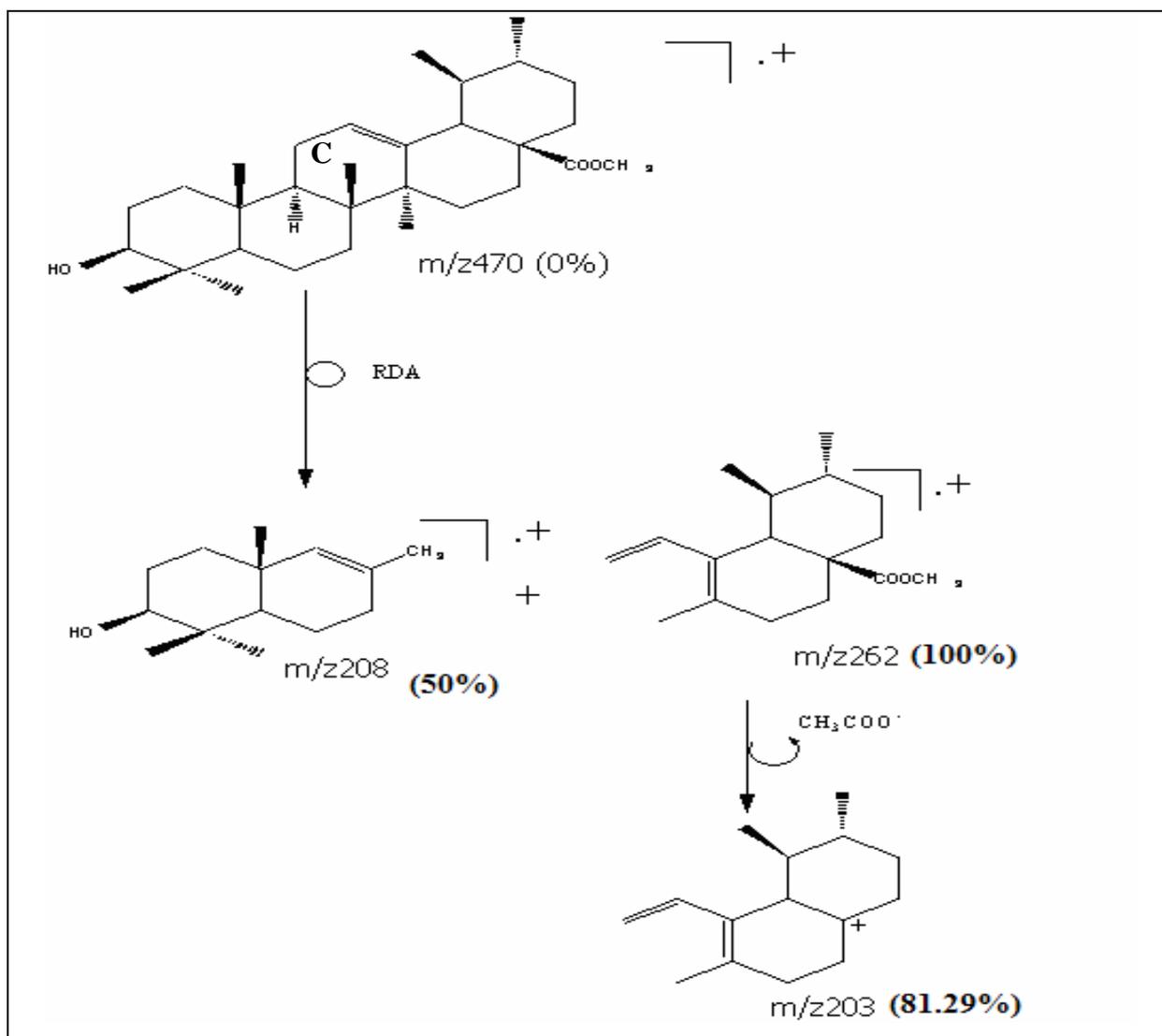


Figura 32: Fragmentação do AU-1

#### 4 CONCLUSÃO

As folhas da *Plumeria rubra L* apresentam uma quantidade significativa do Ácido Ursólico ( $\pm 14\%$ ) em comparação com as demais substâncias presentes no extrato.

Através do teste de solubilidade, verificou-se que o solvente diclorometano é o mais apropriado para se obter o extrato com menos substâncias apolares, sem reduzir a concentração deste metabólito.

A identificação do Ácido Ursólico foi possível graças às análises dos resultados obtidos na fragmentação de massas, similar ao encontrado na literatura.

Através das análises qualitativas do perfil cromatográfico dos extratos mensais, verificou-se que o mês de setembro foi o que apresentou maior rendimento, o que condiz com a literatura, já que é a época de floração da espécie. Grande parte dos vegetais utiliza os triterpenóides como hormônios e restauradores da membrana plasmática.

## 5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específicos e não específicos que interagem com o DNA: uma introdução 2005. **Quim. Nova**, 2005. v.28, n.1, p.118-29.
- ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina - Bases Clínicas e Farmacológicas**. Buenos Aires:ISIS. Cidade: Buenos Aires- AR. Ediciones SRL.1999. p.38-92.
- ANDERSSON D.; LIU J. J.; NILSSON A.; DUAN RD. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. **Anticancer Res**, 2003. n.23. p.3317-22.
- ANTONINI, I.; POLUCCI, P.; KELLAND, L. R.; SPINELLI, S.; MARTELLI, S. J. Cancer Treatment. **J. Med. Chem.**, 2000. n.43, p.4801.
- AZAMBUJA, D.;. Relatório da excursão ao Nordeste brasileiro. **Arquivo do Serviço Florestal**, 1947. n. 3, p.13.
- BACK J.H., LEE Y.S.; KANG C. M.; KIM J. A.; KWON K.C., SON H. C.; KIM KW. Intracellular Ca<sup>2+</sup> release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **Int J Câncer**, 1997. n.73, p. 725-8.
- BARRETO, A. S.; AMARAL, A. C. F; SILVA, J. R. A.; SCRIPSEMA, J. ; REZENDE, C. M. ; PINTO, A. C. Ácido 15-desmetilisoplumierídeo um novo iridóide isolado das cascas de Plumeria rubra e do latex de Himathanthus sucuuba. **Química Nova**, v. 30, p. 1133-1135, 2007
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma no Brasil**. São Paulo: EDUSP, 1978. v.1.
- BOTH, D. M.; GOODTZOVA, K.; YAROSH, D. B.; BROWN, D. A. Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. **Arch Dermatol Res**, 2002. n. 293, p. 569-75.
- BRAGA, F. C.; VALADARES, Y. M.; COSTA, M. A.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. de. Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranga caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico lerobina. **Rev. Bras. Farmacogn**, 2003. v. 14, supl, p. 28-31.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**. 2003. v. 55, n. 3, p. 37-39.
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C; MASCOLO, N. Phytoterapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. 2000. v.17, p.58-65.

CHA, H. J.; BAE, S. K.; LEE, H. Y.; LEE, O. H.; SATO, H.; SEIKI, M.; PARK, B. C.; KIM, K. W. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. **Cancer Res.** 1996. n.56, p. 2281-2284.

CHA, H. Y.; PARK, M. T.; CHUNG, H. Y.; KIM, N. D.; SATO, H.; SEIKI, M.; KIM, K. W. Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells. **Oncogene**, 1998. n.16, p.771-778.

CHABNER, B. A., LONGO, D. I. **Em Cancer chemotherapy and biotherapy**. 2 ed. Philadelphia: Lippincott- Raven, 1996. p. 121-32.

CRAGG, G. C.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, 1997. vol.60, p.52-60.

CRONQUIST, A. **An Integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, 1981. p.876-79.

DATI, F.; BRAND, B. Standardization actives for harmonization of test results. **Clínica Chimica Acta**, 2000. v.297, p.239-49.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos **Infarma**, 2004. v.16, p. 9-10.

DOBHAL, M. P.; LI, G.; GRYSHUK, A.; GRAHAM, A.; BHATANAGER, A. K.; KHAJA, S. D.; JOSHI, Y. C.; PANDEY, R. K. Structural modifications of plumieride isolated from *Plumeria bicolor* and the effect of modifications in vitro anticancer activity. **J. Org. Chem.**, 2004. v.69, p.6165-72.

ES-SAADY, D.; SIMON, A.; JAYAT-VIGNOLES, C.; CHULIA, A. J.; DELAGE, C. MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. **Anticancer Res**, 1996. n.16, p.481-486.

ES-SAADY, D.; SIMON, A.; OLLIER, M.; MAURIZIS, J. C.; CHULIA, A. J.; DELAGE, C. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. **Cancer Lett**, 1996. n.106. p.193-197.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de Oleiricultura**. Editora Agronômica "Ceres", Ltda, 2 ed. São Paulo, 1981. p. 25-31.

GNOATTO, S. C. B.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; NASCIMENTO, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI S. Evaluation of ursolic acid

isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2007. p. 1-13

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 14-20.

HARMAND PO, DUVAL R, LIAGRE B, JAYAT-VIGNOLES C, BENEYTOU JL, DELAGE C, SIMON A. Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells. **Int J Oncol**, 2003. v. 23. p.105-12.

HAYEK EWH, JORDIS U, MOCHE W, SAUTER F. **A bicentennial of betulin**. *Phytochemistry*, 1989. n.28. 2229-2242.

HOLLOSY F.; IDEI M.; CSORBA G.; SZABO E.; BOKONYI G.; SEPRODI A.; MESZAROS G.; SZENDE B.; KERI G. Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. **Anticancer Res**, 2001. v.21, p.3485-91.

HUANG, M., HO, C., WANG, Z., FERRARO, T., LOU, Y., STAUBER, K., MA, W., GEORGIADIS, C., LASKIN, J., AND CONNEY, A. (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Res**, 1994. v.54, p.701-708.

IHRIG, M.; BLUM, E.; ZUR BEURTEIN IUNG. *Phytopharmaka ausphar zeustischer Sicht*. **Pharm**, 1992. v.137, n.36, p.2715-25.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estimativas da incidência e Mortalidade por Câncer. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=2](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2)>. Acesso em: 9 de junho de 2009 as 10:30 hs.

ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N. Topical preparations containing ursolic acid and/ or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract** , 1990. n. 113, p. 12173y.

JOLY, A. B. **Botânica, introdução a taxonomia vegetal**. 2 ed. São Paulo: Nacional, 1975. p.106-110.

JUDD, W. S. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Inc, 1999. p.366-69.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES FILHO, E. The use of C-13 and H-1-NMR in the structural elucidation of a new nor-lupane triterpene. **J Braz. Chem. Soc**, 1999. n.10. p.317-320.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, M. F. G. S.; RODRIGUES FILHO, E.; FRÜHAUF, M.; BARAÑANO, A. G. Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do *Eugenia florida*. **Revista de Pesquisa e pós-graduação da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões**, 2000. n. 1. p.13-29.

KARDONO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonseisa. **Journal of Natural Products**, 1990. v.53, n.6, p.1447-55.

KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A. DE; NASCIMENTO, C. A DO; LIÃO, L. M. Atividade Antimicrobiana de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. In: 29ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 2006. 19-22 maio. 2006, Águas de Lindóia. Anais...Águas de Lindóia-SP, 2006.

KATZUNG, BERTRAM G. **Farmacologia básica e clínica**. 10 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, T. F. Recents advances in traditional plants drugs and or chids. **Acta Pharmacol. Sin.**,2003. v.24, n.1, p.1-21.

KIKUKO,T.; SHIGEMI, S.; MASAHIRO, S.; TATSU, M. **Hair-raising cosmetic**. JapanesePatent,no.05286835,1993.

LAUTHIER F.; TAILLET L.; TROUILLAS P.; DELAGE C.; SIMON A. Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. **Anticancer Drugs**, 2000. n.11, p. 737-45.

LEE, S.K.; SONG, L.; MATA-GREENWOOD, E.; KELLOFF, G.J.; STEELE, V.E.; PEZZUTO, J.M.; Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. **Anticancer Res**, 1999. n.19, p. 35-44.

LEUNG AY; FOSTER S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996.

LI, J.; XU, L. Z.; ZHU, W.P.; ZHANG, T. M.; LI, X.M.; JIN, A. P.; HUANG, K. M.; LI, D. L.; YANG, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on jurkat lymphoma cell line in vitro. **Zhongguo Aizheng Zazhi**, 1999. n.9. p. 395-397.

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

LORENZI, H; MOREIRA, H. **Plantas ornamentais do Brasil**. 3ed. Instituto Plantarum Nova Odessa, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MALHEIROS, A. **Estudo químico e avaliação de atividade antibacteriana da *Allamanda cathartica* L.** 1995. Dissertação (mestrado em Química)- Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Paraná 1995. Orientador: Gentil José Vidotti.

MEZZETTI, T.; ORZALESI, G.; BELLAVITA, V. Chemistry of ursolic acid. **Planta Medica**, 1971. p. 244-252.

MITSCHER, L. A.; PILLAI, S.; SHANKEL, D. M. Some transpacific thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. **J. Food and Drug Anal**, 2000. v.8, n. 4, p. 229-34.

NAJID, A.; SIMON, A.; COOK, J.; CHABLE-RABINOVITCH, H.; DELAGE, C.; CHULIA, A.; RIGUAD, M. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. **FEBS Letters**, 1992. v. 299, n. 3, p. 213-217.

NAVARRO, F. N.; SOUZA, M. M.; NETO, R. A.; GOLIN, V.; NIERO, R.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma Zedoaria* grown in Brasil. **Phytomedicine**, 2002. n.9, p. 427-32.

OLIVEIRA, A. B; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina científica**, 2003. v.1, p. 49-58.

PINTO, A.C; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, 2002. v. 25, n. 1, p. 45-61.

RASKIN, I. et al. **Plants and human health in the twenty-first century**. Trends in Biotechnology, 2002. v.20, n. 12, p. 522-531.

RATES, S. M. K. Plants of source of drugs. **Toxicon**, 2001. v. 39, p.603-613.

SALMONN, S. E. **Em Farmacologia Básica e Clínica**, Katzung, B. G., ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1998, p. 629-55.

SCHULTZ, A. **Introdução a Botânica Sistemática**. Ed. Universidade UFRGS, 1984. 4 ed. v.2, p. 261.

SILVA JR, A. A. **Plantas Medicinais e Aromáticas**. Secretaria da Agricultura e do Desenvolvimento Rural. Itajaí, SC, 1997. p. 37-40.

SILVA, A.C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, 2005. n.19, p. 2738.

SPORN, M. B.; SUH, NANJOO. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**. 2000. v.21. n.3. p.525-530.

STEELE, J.C. WARHURST, D.C. KIRBY, G.C. SIMMONDS, M.S. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytother. Res**, 1999. v.13, n.2, p.115-119.

SUBBARAMAIAH, K.; MICHALUART, P.; SPORN, M. B.; DANNENBERG, A. J. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. **Cancer Res**, 2000. n.60. p. 2399-2404.

TOKUDA, H.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K.; ITO, Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Letters**, 1986. p. 279-285.

XU, R.; ZENG, F.Q.; WAN, M.; SIM. K.Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. **Journal Nat. Prod**, 1996. v.59, n. 7, p. 643-45.

ZALETOVA, N.; SHCHAVLINSKII, A.; TOLKACHEV, O.; VICHKANOVA, S.; FATEEVA, T.; KRUTIKOVA, N.; YARTSEVA, I.; KLYUEV, N. Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. **Chemical Abstracts**, 1987. n. 106, p. 18867.

WÓJCIAK-KOSIOR, M. Separation and determination of closely related triterpenic acids by high performance thin-layer chromatography after iodine derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2007. n. 45. p. 337-340.

WOODSON JR, R. E. Apocynaceae. **Ann. Mo. Bot. Gard**, 1938. n.25, p.189.

YAROSH, D. B.; BOTH, D.; BROWN, D. Liposomal ursolic acid (merotaine) increases ceramides and collagen in human skin. **Horm Res**, 2000. n. 54, p.318-21.

YING, Qi-Long; RINEHART, A. R.; SIMON, S. R.; CHERONIS, J. C. Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. **J. Biochem**, 1991. n. 277, p. 521-526.