

**ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS. CONCEITOS SOBRE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL PARA OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE \***

Valdir Cechinel Filho

FAQFAR - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) - CP 360 - 88302-202 - Itajaí - SC

Rosendo A. Yunes

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - 88040-900 - Florianópolis - SC

Recebido em 28/11/96; aceito em 20/2/97

**ESTRATEGIES FOR OBTAINING PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM MEDICINAL PLANTS. CONCEPTS ABOUT STRUCTURAL MODIFICATION FOR IMPROVE THE ACTIVITY.** In the present paper we discuss, based in our experience, some experimental procedures which may be employed for isolation of active compounds from medicinal plants. We have also emphasized some insights about the way to obtain more active and selective compounds from natural products through structural modifications oriented for analysis of structure-activity relationships.

**Keywords:** medicinal plants; active compounds; chromatography; synthesis; structure-activity relationships.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytochemistry*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, etc.

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica, como por exemplo o taxol, a forskolina, a artemisinina, etc. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica<sup>1-4</sup>. Como exemplo, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc. Cabe mencionar que dados da literatura indicaram que, em 1980, os consumidores dos Estados Unidos pagaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos. Em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades<sup>5</sup>.

Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos. Em recente artigo publicado neste periódico<sup>6</sup>, o Prof. R. B. Filho enfatiza alguns aspectos relacionados ao estudo da química de produtos naturais, demonstrando a importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas destas investigações.

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais<sup>7-10</sup>. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais.

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, podemos mencionar a *forskolina*, obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores<sup>11</sup>, a *artemisinina*, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica<sup>12</sup>, e o diterpeno anticancerígeno *taxol*, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões<sup>13-16</sup>. Entretanto, estudos visando a cura de outros tipos de câncer e de outras enfermidades com deficiente profilaxia têm avançado significativamente tanto em termos de produtos sintéticos como naturais. Sob este aspecto, é importante ressaltar que o sucesso das investigações na área de princípios ativos naturais depende, principalmente, do grau de interação entre a Botânica, a Química e a Farmacologia.

O presente artigo visa indicar e/ou sugerir algumas etapas experimentais que podem ser utilizadas para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, especialmente no que tange à modificação estrutural para conseguir moléculas mais ativas e/ou seletivas. Discorre também sobre algumas estratégias que podem ser empregadas nestes estudos além de descrever algumas dificuldades e cuidados inerentes à estas etapas, baseados em nossa experiência adquirida ao longo dos anos na pesquisa com plantas medicinais.

## 2. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica

\* Parte do Curso de Fitoquímica ministrado no XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - Florianópolis - SC - Setembro de 1996.

clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isto a necessidade de um trabalho em colaboração mais ampla entre químicos e farmacólogos para a análise de extratos, onde se obtém extratos semi-puros, frações e finalmente, os compostos puros. Neste sentido, torna-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Esta avaliação permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado. Desta forma, para se obter substâncias puras dotadas de efeitos biológicos, são requeridos, além da dedicação e da determinação dos pesquisadores, uma ampla colaboração multidisciplinar. A figura 1 ilustra algumas etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas<sup>17</sup>. O fundamento básico deste procedimento consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo.

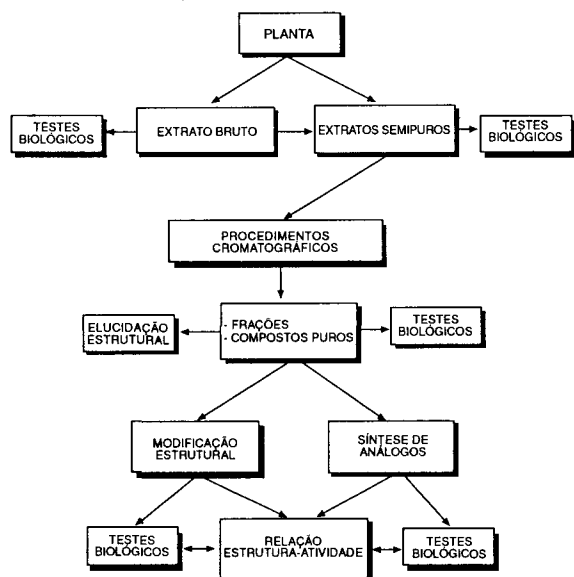


Figura 1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos.

Analisando o esquema indicado na figura 1, podemos especificar com maiores detalhes cada etapa mencionada, como segue:

## 2.1. Planta

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso<sup>18-20</sup>. Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular<sup>21</sup>. Outros aspectos importantes que devem ser levados em consideração são as informações botânico-taxonômicas e químico-taxonômicas<sup>3,22</sup>.

Como a constituição química, na maioria dos casos, difere significativamente em relação às distintas partes da planta<sup>23-26</sup>, parece mais viável estudar inicialmente aquela empregada na medicina popular e posteriormente as outras partes da planta, que também podem conter princípios ativos.

Outro ponto que deve ser enfatizado é a influência dos fatores ambientais na biossíntese dos metabólitos secundários,

como clima, tipo de solo, época de coleta, etc<sup>21,27</sup>. Diante do exposto, na etapa inicial das pesquisas com plantas medicinais é importante que sejam determinadas a data e as características do local da coleta.

## 2.2. Preparação dos extratos

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos que consideramos ser o mais adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v). Este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas<sup>28</sup>. Caso o extrato apresente efeitos biológicos de interesse, deve-se proceder a um método sistemático de estudo. Neste caso, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes<sup>29-31</sup>, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. Outros solventes de polaridades similares também podem ser utilizados. No sentido de localizar os princípios ativos, todos os extratos semi-puros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos. Recomenda-se sempre utilizar grandes quantidades de planta, pois este fato possibilita determinar também os constituintes presentes em baixas concentrações. A figura 2 ilustra os procedimentos descritos e indica as prováveis classes de compostos separados.

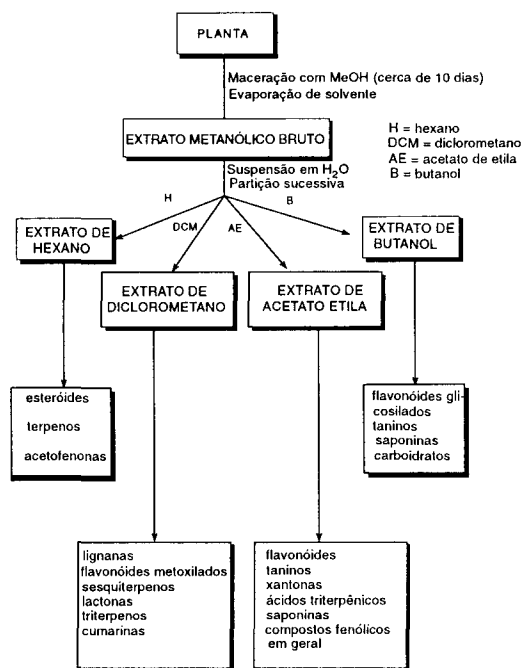


Figura 2. Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.

Outra metodologia de semi-purificação de extratos consiste na filtração de extratos alcoólicos (metanol ou etanol) brutos em sílica gel com solventes de polaridades crescentes, ocorrendo também uma separação das substâncias pela polaridade<sup>32</sup>. Posteriormente, os extratos semi-puros devem ser testados biologicamente e aquele(s) que apresentar(em) atividade

de interesse deverá (ão) ser submetidos aos procedimentos cromatográficos visando o isolamento e a elucidação estrutural dos princípios ativos.

Os métodos acima mencionados podem ser geralmente usados quando não se conhece a natureza dos compostos químicos ativos presentes na planta em estudo; caso contrário, podem ser utilizados outros métodos específicos. Por exemplo, quando já são conhecidos alcalóides bioativos de outras espécies do gênero em estudo, deve-se proceder o isolamento pelo método específico e tradicional<sup>33-35</sup>. O mesmo pode ser aplicado para outras classes de compostos<sup>36,37</sup>.

Além destes, um método alternativo para obtenção de extratos consiste em macerar a planta em estudo durante vários dias diretamente com solventes de polaridade crescente<sup>38</sup>, conforme o exemplo indicado na figura 3.

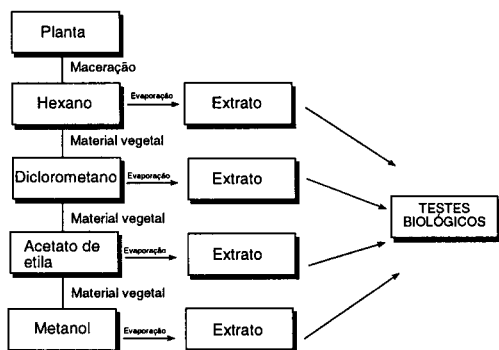


Figura 3. Esquema geral para obtenção de extratos diretamente da planta.

### 2.3. Análise Biológica

Devido ao grande número de amostras a serem analisadas, alguns aspectos devem ser observados quando se procura princípios ativos em plantas. Neste contexto, devem ser levados em consideração a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos<sup>17</sup>. Usualmente, são feitas triagens com modelos experimentais menos complexos e após a seleção das substâncias puras ativas, estas são avaliadas em ensaios mais específicos, e posteriormente submetidas à análise do mecanismo de ação biológica.

Alguns dos principais efeitos biológicos procurados em plantas e alguns dos modelos experimentais utilizados são indicados abaixo:

- Atividade antifúngica e antibacteriana:
  - \* Método de difusão em agar<sup>39,40</sup>
  - \* Método da concentração inibitória mínima<sup>41,42</sup>
- Atividade analgésica:
  - \* Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos<sup>43,44</sup>
  - \* Modelo de dor induzida pela formalina em camundongos<sup>45,46</sup>
  - \* Modelo da placa quente<sup>47</sup>
- Atividade antiinflamatória:
  - \* Modelo do edema de pata de rato<sup>48,49</sup>
  - \* Modelo da pleurisia induzida por neurotransmissores<sup>50</sup>
- Atividade antiespasmódica:
  - \* Contração de órgão isolado induzida por neurotransmissores<sup>51,52</sup>
- Atividade antialérgica:
  - \* Modelo do edema alérgico em camundongos ativamente sensibilizados por ovoalbumina<sup>53</sup>
- Atividade antitumoral:
  - \* Modelo da leucemia "in vivo"<sup>54</sup>

### 2.4. Separação, purificação e identificação dos constituintes químicos

O extrato selecionado no item 2.2 deverá ser submetido à diferentes técnicas cromatográficas. A princípio, é geralmente empregada a cromatografia em coluna aberta (CC)<sup>55</sup>, com sílica gel como fase estacionária, onde, dependendo do extrato, a mesma é eluída com uma mistura de solventes que deve ser previamente determinada por cromatografia em camada delgada (CCD)<sup>56,57</sup>. Outros suportes cromatográficos podem ser usados, como alumina, celulose, poliamida e sephadex<sup>58,59</sup>.

As frações obtidas devem ser reunidas segundo seu perfil cromatográfico, verificado por CCD. Em muitos casos, se obtém compostos puros numa única CC, ou utilizando a cromatografia "flash"<sup>60</sup> ou ainda após uma simples recristalização da substância isolada. As frações reunidas, após serem analisadas farmacologicamente e se apresentarem atividade, devem ser novamente submetidas à CC ou, dependendo da complexidade da mistura, à técnicas cromatográficas especiais, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>61</sup>, cromatografia de dupla contra-corrente (CDCC)<sup>62</sup>, etc. Uma vez isolados os compostos ativos, deve-se proceder a elucidação estrutural dos mesmos. Uma ferramenta que seria importante para a identificação rápida e eficiente de misturas, consiste no uso de cromatografia gasosa ou cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa, onde grande parte dos componentes de uma mistura pode ser identificada e quantificada<sup>63,64</sup>.

O uso em conjunto de técnicas espectrais, como UV, IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e MS<sup>65-68</sup> aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN (NOE, COSY, HETCOR, INADEQUATE, etc.)<sup>3, 69-71</sup> tem permitido propôr com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais. Além disso, o uso de difração de raios-X, quando possível, possibilita avaliar a estereoquímica real destas substâncias<sup>72</sup>.

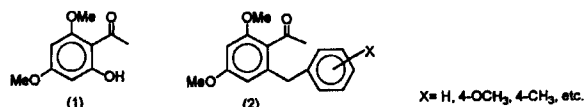
### 2.5. Modificação estrutural e correlação entre estrutura química e atividade biológica

Uma vez obtido um composto biologicamente ativo, pode-se lançar mão de estudos envolvendo modificação molecular, também chamada de variação molecular ou manipulação molecular, que constitui-se, certamente, no método mais usado e recompensador para otimizar essa atividade<sup>73,74</sup>. Muitas mudanças podem ser introduzidas numa molécula, dependendo de seus grupos reativos. Inicialmente, realizam-se modificações procurando introduzir grupos que conferem ao composto em estudo uma maior ou menor hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, permitindo posteriormente a aplicação de algum método de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica, que pode ser qualitativa como quantitativa (SAR e QSAR).

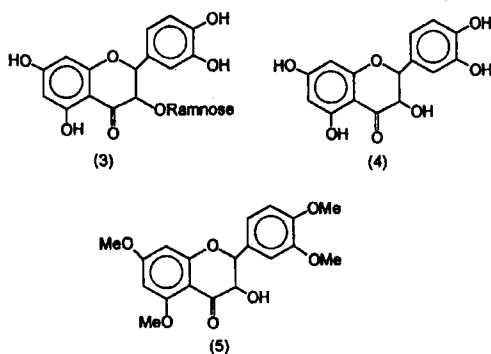
Neste contexto, foram desenvolvidos vários métodos de correlação estrutura-atividade, objetivando promover um planejamento racional de novas moléculas ativas. A aplicação destes métodos auxilia na predição de qual novo grupo ou átomo pode ser introduzido em determinada molécula para torná-la mais ativa, proporcionando assim muitas vantagens aos químicos e farmacólogos. O método mais usado, principalmente por indústrias farmacêuticas, foi desenvolvido por Hansch e colaboradores<sup>75</sup>, que procura relacionar a atividade biológica com as propriedades físico-químicas das moléculas em estudo: a hidrofobicidade ( $\pi$ ), fatores eletrônicos ( $\sigma$ ) e estéricos (Es), valores estes tabelados, obtidos experimentalmente. Detalhes sobre estes e outros métodos de QSAR podem ser obtidos em vários livros e artigos relatados na literatura<sup>76-81</sup>.

Abaixo são citados dois exemplos recentemente obtidos por nosso grupo de pesquisa, sobre a aplicação de modificações estruturais em compostos naturais abundantes, que proporcionaram a obtenção de resultados farmacológicos relevantes:

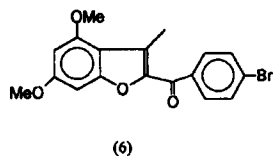
- a) a xantoxilina (1), um produto natural antiespasmódico isolado da *Sebastiania schottiana* (sarandi negro) com rendimento de 0,25 %<sup>82</sup> teve seu efeito farmacológico notavelmente aumentado quando grupos benzilas contendo substituintes hidrofóbicos e doadores de elétrons foram introduzidos (2)<sup>83,84</sup>, segundo indicações obtidas com o uso do método manual de Topliss<sup>76,77</sup>.



- b) a astilbina (3), flavonóide glicosilado isolado de *Hymenaea martiana* (jatobá) com alto rendimento<sup>85,86</sup>, após hidrólise ácida foi transformada na taxifolina (4), molécula muito mais efetiva como analgésica do que a própria astilbina. A metilação de (4) forneceu a taxifolina tetrametilada (5), que apresentou efeito analgésico muito mais potente do que várias drogas tradicionalmente usadas na clínica<sup>10, 87,88</sup>.



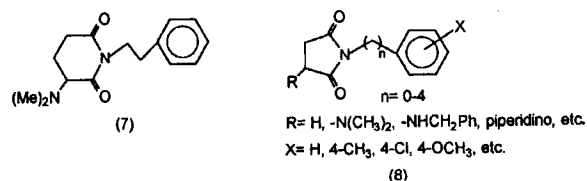
Outro aspecto importante que vale ressaltar é que a partir de compostos inativos em determinado modelo farmacológico, com pequenas modificações estruturais, empregando o critério da similaridade com compostos de reconhecida ação biológica, pode-se sintetizar compostos de relevantes efeitos biológicos<sup>89</sup>. Como exemplo deste caso, podemos citar a síntese do derivado benzofurânico (6), a partir de (1), baseada na reconhecida atividade farmacológica de compostos do tipo benzofurano<sup>90</sup>. Este composto apresentou efeito analgésico extremamente potente quando testado em diferentes modelos de dor em camundongos, sendo cerca de 130 vezes mais ativo do que a aspirina e o acetaminofeno no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, e parece atuar por um novo mecanismo de ação analgésica, diferente dos conhecidos mecanismos da aspirina e da morfina<sup>91,92</sup>.



## 2.6. Síntese de compostos análogos a princípios ativos

Um dos aspectos de interesse no que tange ao estudo de plantas medicinais envolve a utilização dos compostos naturais ativos como modelo para a síntese de substâncias análogas mais potentes e seletivas, que podem ser obtidas mais facilmente e talvez a custos menores. Muitos fármacos disponíveis atualmente no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente

baseados em estruturas naturais ativas<sup>80,93,94</sup>. Podemos citar como exemplo da importância químico-medicinal da síntese de análogos de princípios ativos os estudos obtidos em nossos laboratórios com a molécula da filantimida (7). Este composto, um alcalóide inédito isolado de *Phyllanthus sellowianus* com efeito antiespasmódico moderado<sup>34,95</sup> foi usado como modelo para a obtenção de vários análogos, particularmente succinimidas e maleimidas (8), os quais apresentaram potentes ações antiespasmódicas<sup>96</sup>, analgésicas<sup>97</sup>, antibacterianas<sup>98,99</sup> e antifúngicas<sup>100</sup>. Estas imidas cíclicas, além de demonstrarem efeitos muito mais potentes do que a própria filantimida e drogas padrões utilizadas na terapêutica atual, possibilitaram a elucidação de vários fatores estruturais relacionados com os efeitos biológicos indicados<sup>10</sup>.



## 3. INTERAÇÃO ENTRE A QUÍMICA E A FARMACOLOGIA

Um dos fatores de extrema importância para a descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia. Quanto mais estreita for esta colaboração, mais rápida e consistentemente serão alcançados os objetivos almejados. Podemos citar como exemplo da necessidade desta integração os resultados obtidos em nossos laboratórios com as plantas do gênero *Phyllanthus*, conhecidas como "quebra pedra" e amplamente usadas na medicina popular de vários países, incluindo o Brasil, contra várias patologias<sup>101,102</sup>. Em nossos estudos, demonstramos que os extratos brutos de diferentes espécies de *Phyllanthus* exercem potentes efeitos analgésicos quando analisados em diferentes modelos experimentais de dor em camundongos<sup>103-105</sup> com potência muito maior do que algumas drogas utilizadas na clínica, como a aspirina e o acetaminofeno. Considerando como exemplo o *P. sellowianus*, foi inicialmente verificado que seu extrato hidroalcoólico, quando testado no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, apresentou inibição dose-dependente, com uma DI<sub>50</sub> (dose capaz de inibir em 50% as contorções em relação ao controle) de 53,0 (45,0-61,0) mg/kg<sup>103</sup>. Após sucessivas partições a partir deste extrato, realizadas no laboratório de química, constatou-se, no laboratório de farmacologia, que as frações de hexano (DI<sub>50</sub> < 30 mg/kg) e de acetato de etila (DI<sub>50</sub> < 20 mg/kg) apresentavam uma maior potência do que o extrato de partida. Estas frações semi-purificadas foram novamente analisadas no laboratório de química, onde obteve-se dois fitoesteróides muito comuns em plantas, estigmasterol e β-sitoosterol, que nunca foram avaliados quanto aos seus efeitos analgésicos, mas cujos resultados farmacológicos indicaram uma ação equipotente à aspirina. Os valores de DI<sub>50</sub> foram 16,0 (13,6-20,3) e 9,0 (3,5-23,2) mg/kg para estigmasterol e β-sitoosterol, respectivamente<sup>106</sup>, sendo portanto mais ativos do que os extratos de origem. Por outro lado, o extrato de acetato de etila, quando avaliado fitoquimicamente, forneceu vários compostos ativos como os taninos furosina e geranina, cujos resultados farmacológicos obtidos no modelo de contorções induzidas pelo AcOH foram bastante promissores, com valores de DI<sub>50</sub> de 12,9 (7,1-23,4) e 19,0 (10,9-33,1) mg/kg, respectivamente<sup>107</sup>. Além disso, foi possível isolar também deste extrato os flavonóides quercetina e rutina, que apresentaram relevante ação analgésica com DI<sub>50</sub> de 4,3 (3,3-5,7) e 1,3 (0,8-2,1) mg/kg, respectivamente, além

do galato de etila, composto fenólico que também exerceu efeitos analgésicos com  $DI_{50}$  de 34,7 (27,5-43,7) mg/kg<sup>108-109</sup>.

A presença de todos os compostos analgésicos isolados de *P. sellowianus* demonstra a complexidade do estudo de plantas medicinais e a necessidade de uma clara orientação na interpretação dos resultados. No entanto, a ocorrência ou não de sinergismo entre os compostos indicados está sendo atualmente investigada em novos experimentos, já que estes estudos são importantes para uma melhor compreensão dos efeitos biológicos de produtos naturais. É importante ressaltar que, embora algumas teorias médicas modernas contestem a ocorrência de sinergismo em plantas, são muitos os exemplos práticos relatados na literatura. Como exemplo, podemos citar um trabalho desenvolvido por pesquisadores japoneses, que demonstraram recentemente esta hipótese no estudo do fitoterápico Sho-Saikoto, uma mistura de 7 ervas que atua na prevenção de câncer de fígado<sup>110</sup>.

Conforme mencionado, pode-se afirmar que tanto a química quanto a farmacologia são áreas imprescindíveis para a obtenção de princípios naturais ativos, e devem sempre estar em íntima colaboração no desenvolvimento destas investigações.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL: PRINCIPAIS CUIDADOS E DIFICULDADES

Um dos fatores importantes no estudo de plantas consiste na experiência dos pesquisadores envolvidos. Muitas vezes, a falta de experiência leva a erros que podem tanto comprometer os resultados experimentais como dispendir maior tempo e recursos e não atingir os objetivos almejados. Assim, pode-se enumerar alguns cuidados que devem ser tomados em laboratório quando se busca obter compostos bioativos:

1) **Seleção do material vegetal:** Um dos cuidados que deve ser levado em consideração envolve informações sobre possíveis efeitos tóxicos da planta a ser selecionada. Plantas que tenham o nome popular de mata-boi, mata-cavalo, etc, devem ser vistas com restrições, já que a presença de constituintes tóxicos pode comprometer todo o estudo realizado. A planta a ser investigada deve ser classificada com segurança e a coleta deve ser feita com muito cuidado para não serem agregadas outras espécies diferentes. Também deve ser levada em consideração a quantidade de planta que viceja no local de coleta, para que os estudos não fiquem prejudicados. A secagem, em estufa (40°C) ou à sombra à temperatura ambiente deve ser procedida logo após a coleta para evitar a proliferação de fungos. Caso se deseje armazenar o material vegetal, o mesmo pode ser acondicionado em freezer. Na preparação dos extratos, a planta deve estar completamente fresca ou totalmente seca para definir com melhor exatidão o rendimento tanto da massa bruta como dos constituintes químicos.

2) **Solvente:** A escolha do solvente é de fundamental importância tanto para a obtenção de extratos como para utilizá-lo como eluente em cromatografia em coluna. Impurezas, como ftalatos, usados como estabilizantes de plásticos, podem ser transferidas para o extrato e também dificultar o isolamento dos constituintes naturais. Outro aspecto que deve ser verificado é a presença de água, que influencia significativamente nas separações cromatográficas.

A formação de artefatos na preparação de extratos é muito comum. Isto ocorre, geralmente, quando se aquece demais determinado extrato ou se usa um solvente inadequado para extração. Por exemplo, o clorofórmio, que geralmente contém HCl, quando usado para extração, pode fornecer produtos não naturais formados pela ação do ácido. A acetona também deve ser usada com restrição, já que pode reagir com alguns compostos que contém o grupo amina.

3) **Testes biológicos:** A avaliação dos efeitos biológicos tanto

“in vitro” como “in vivo” depende de vários fatores, tanto estruturais quanto experimentais. É essencial que a Instituição de pesquisa possua um bom biotério e um laboratório exclusivo para a realização dos experimentos, e a escolha dos modelos deve ser de maneira que possam ser reproduzidos corretamente e evitados os resultados falso-positivos. Os experimentos devem ser repetidos várias vezes para se obter dados estatísticos que comprovem a eficácia do material testado.

#### 5. CONCLUSÕES

A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos onde atualmente o mercado mundial de fitofármacos gira em torno de 15 bilhões de dólares. Talvez o principal fator a contribuir consideravelmente para o crescimento em questão consista na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam, cada vez mais, a eficácia das plantas medicinais, principalmente aquelas empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas.

Entretanto, a necessidade de se chegar aos compostos puros responsáveis pelos efeitos biológicos apresentados pelos extratos, leva a uma obrigatória integração entre a química e a farmacologia molecular, cujo elo pode levar à obtenção de substâncias naturais ou sintéticas de grande interesse químico-medicinal.

Em nosso país, os estudos científicos envolvendo produtos naturais ativos, suas indicações e contra-indicações, podem proporcionar aos fitofármacos um maior nível de aceitação médica, respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica em experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos. Este fato é de extrema importância, considerando-se que o Brasil se encontra atualmente nas primeiras posições no mercado mundial de fármacos, necessitando urgentemente que as indústrias de fitofármacos existentes se desenvolvam para competir inclusive a nível internacional. A instalação de indústrias envolvendo a síntese de fármacos a partir de produtos naturais poderia, assim, ser um considerável polo de crescimento para a química e a farmacologia.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos professores Rogério Corrêa e Susana M. Mello Schlemper/NIQFAR/UNIVALI, pelo inestimável auxílio na correção do manuscrito. Somos gratos também aos órgãos financiadores dos trabalhos citados no texto e desenvolvidos em nossos laboratórios: CNPq, CAPES, FINEP, FAP/ProPPEX/UNIVALI.

#### REFERÊNCIAS

1. Farnsworth, N. R.; *J. Ethnopharmacol.* **1980**, *2*, 173.
2. Matos, F. J. A.; *Rev Extensão-Desafio (UFC)* **1990**, *3*, 5-13.
3. Cordell, G. A.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1585.
4. Teske, M.; Trentini, A. M. M.; *Compêndio de Fitoterapia*, 2a. ed., Herbarium Lab. Botânico, Curitiba, Paraná, 1995.
5. Akerele, O.; *Fitoterapia* **1992**, *63*, 99.
6. Braz-Filho, R.; *Quím. Nova* **1994**, *17*, 405.
7. Havsteen, B.; *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 1141.
8. Calixto, J. B.; Yunes, R.A.; Rae, G. A.; Medeiros, Y.S. In *Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research*; R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, **1990**, p. 88.
9. Samuelsson, G.; *Acta Pharm. Fenn.* **1992**, *101*, 33.
10. Cechinel Filho, V.; *Tese de Doutorado em Química*, UFSC, Florianópolis, SC, 1995.
11. De Souza, N. J.; *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *38*, 177.
12. Kamchonwongpaisan, S.; Meshnick, S. R.; *Gen. Pharmac.* **1996**, *27*, 587.

13. Kingston, D. G. I.; *Pharmac. Ther.* **1991**, *52*, 1.
14. Horwitz, S. B.; *Nature* **1994**, *367*, 593.
15. Fitoterapia, **1995**, 62- Suplemento dedicado inteiramente à química e farmacologia do taxol e derivados.
16. Corrêa, A. G.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 460.
17. Hamburger, M.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3864.
18. Montellano, O. B.; *Science* **1975**, *188*, 215.
19. Farnsworth, N.R.; Kaas, C. J.; *J. Ethnopharmacol.* **1981**, *3*, 85.
20. Unander, D. W.; Webster, G. L.; Blumberg, B. S.; *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *45*, 1.
21. Júnior, A. A. S.; Vizzotto, V.; *Agrop. Catarinense* **1996**, *9*, 5.
22. Júnior, C. C.; Ming, L. C.; Scheffer, M. C.; *Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas*; 2a. ed., FUNEP, Jaboticabal, São Paulo 1994.
23. Tortoriello, J.; Meckes-Fischer, M.; Vilarreal, M. L.; Berlin, B.; Berlin, E.; *Phytomedicine* **1995**, *2*, 57.
24. Klinar, S.; Castillo, R.; Chang, C.; Schmeda-Hirschmann, G.; Reyes, S.; Theoduloz, C.; Razmilic, I.; *Fitoterapia* **1995**, *66*, 341.
25. Bashir, A. K.; Hassan, S. S.; Amiri, M. H.; Abdalla, A. A.; Wasfi, I. A.; *Fitoterapia* **1992**, *63*, 371.
26. Cechinel Filho, V.; Breviglieri, E.; Willain Filho, A.; Santos, A. R. S.; *Rev. Bras. Farm.* **1995**, *76*, 115.
27. Vanhaelen, M.; Lejoly, J.; Hanocq, M.; Molle, L.; In *The Medicinal Plant Industry*; Wijesekera, R. O. B.; CRC Press, Inc., Boca Raton, USA 1991, p. 59.
28. Cirilo, V. K.; *Manual de Plantas Medicinais*; Ed. Assessor, Francisco Beltrão, Paraná 1993, p. 12.
29. Miguel, O. G.; *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC 1987.
30. Cechinel Filho, V.; *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC 1991.
31. Delle Monache, F.; Comunicação pessoal.
32. Matos, F. J. A.; *Introdução à Fitoquímica Experimental*; Ed. da UFC, Fortaleza, Ceará 1988.
33. Ugaz, O. L.; *Investigación Fitoquímica*; 2a. ed., Pontificia Universidad Católica del Peru, Fondo Editorial, Lima, Peru 1994.
34. Tempesta, M. S.; Corley, D. G.; Beutler, J. A.; Metral, C. J.; Yunes, R. A.; Giacomozzi, C. A.; Calixto, J. B.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *3*, 617.
35. Ikan, R.; *Natural Products: a Laboratory Guide*; Academic Press, Inc., London, UK 1991.
36. Delle Monache, F.; Comunicação pessoal.
37. Karlsen, J.; In *The Medicinal Plant Industry*; Wijesekera, R. O. B.; CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1991, p. 99.
38. Niero, R. *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC 1993.
39. Bauer, A.W.; Kirby, W. M. M.; Serris, J. C.; Turck, M.; *Amer. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493.
40. Lima, E. O.; Morais, V. M. F.; Gomes, S. T. A.; Cechinel Filho, V.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; *Acta Farm. Bon.* **1995**, *14*, 213.
41. Mitscher, L. A.; Leu, R. P.; Bathala, M. S.; Wu, W. N.; Beal, J. L.; White, R.; *Lloydia* **1972**, *35*, 157.
42. Cechinel Filho, V.; Lima, E. O.; Morais, V. M. F.; Gomes, S. T. A.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *53*, 171.
43. Collier, H. O. J.; Dinnen, L. C.; Jhonson, L. A.; Schneider, C.; *Br. J. Pharmacol.*, **1968**, *32*, 295.
44. Corrêa, R.; Rosa, P. W.; Schlemper, V.; Cechinel Filho, V.; Nunes, R. J.; *Pharm. Sci.* **1996**, submetido para publicação.
45. Hunskaar, S.; Fasmar, O. B.; Hole, K.; *J. Neurosci. Methods* **1985**, *14*, 69.
46. Gorski, F.; Corrêa, C. R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, *45*, 1046.
47. Eddy, N. B.; Leimback, D.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *107*, 385.
48. Winder, L. V.; Max, G.; Been, M. A.; *Arch. Int. Pharmacodyn.* **1957**, *112*, 176.
49. Campos, M. M.; Calixto, J. B.; *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 1005.
50. Henriques, M. G. M. O.; Rae, G. A.; Cordeiro, R. S. B.; Willians, T. J.; *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *06*, 579.
51. Schlemper, V.; Ribas, A.; Nicolau, M.; Cechinel Filho, V.; *Phytomedicine* **1996**, *3*, 211.
52. Livingstone, C.; *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations*, 2a. ed., University of Endinburgh, London, 1970, p. 58.
53. Amarin, C. Z.; Cordeiro, R. S.; Vargaftig, B. B.; *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *235*, 17.
54. Mukherjee, B.; Chatterjee, M.; *Planta Med.* **1993**, *59*, 513.
55. Vogel, A. I.; *Química Orgânica*, vol 1, 3a. ed., Ao Livro Técnico S. A., Rio de Janeiro, RJ, 1988, p. 172.
56. Marini-Bettólo, G. B.; Nicoletti, M.; Patamia, M.; Galeffi, C.; Messana, I.; *J. Chromatogr.* **1981**, *213*, 113.
57. Rios, J. L.; Simeón, S.; Jiménez, F. J.; Zafra-Polo, M.C.; Villar, A.; *Fitoterapia* **1986**, *57*, 153.
58. Wichenewski, W.; In *Introdução a Métodos Cromatográficos*; Collins, C. H.; Braga, G. L., 3a ed., Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo, 1988, p. 71.
59. Shriner, R.L.; Fuson, R.C.; Curtin, D.Y.; Morril, T.C. *Identificação Sistemática de Compostos Orgânicos*, Ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1983, p. 318-363.
60. Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.; *J. Org. Chem.* **1978**, *13*, 3926.
61. Gómez-Serranillos, M. P.; Carretero, M. P.; Villar, A.; *Fitoterapia* **1995**, *66*, 156.
62. Marston, A.; Hostettmann, K.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *658*, 315.
63. Bonato, P. S.; In *Introdução a Métodos Cromatográficos*; Collins, C. H.; Braga, G. L., 3a. ed., Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo 1988, p. 143.
64. Ciccio, J. F.; *Ing. Cien. Quím.* **1995**, *15*, 15.
65. Kemp, W.; *Organic Spectroscopy*, 2a. ed., Macmillan Education Ltda., Hong Kong 1987.
66. Silverstain, R.M.; Bassler, G. C.; Morril, T. C.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5a. ed., Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro 1994.
67. Brown, W. H.; *Organic Chemistry*, Saunders College Publishing, USA 1995.
68. Markham, K. R.; *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London 1982.
69. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachman, P.; Ernst, R. R.; *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
70. Bax, A.; Freeman, R.; *J. Mag. Reson.* **1981**, *44*, 542.
71. Byrne, L. T.; In *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structure Determination*, Colegate, M. S.; Molyneux, R. J. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL 1993.
72. Whiston, C.; *X-Ray Methods*, Prichard, F. E. Ed., John Wiley & Sons, London 1987.
73. Korolkovas, A.; Ferreira, E. I.; *Quím. Nova* **1988**, *11*, 320.
74. Korolkovas, A.; *Ciência e Cultura*, **1989**, *41*, 528.
75. Hansch, C. *Drug Design I*, Ariens, E. J. Ed., Academic Press, New York and London 1971, p. 271.
76. Topliss, J. G.; *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1006.
77. Topliss, J. G.; *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 463.
78. Gupta, S. P.; Singh, P.; Bindal, M. C.; *Chem. Rev.* **1983**, *83*, 633.
79. Testa, B.; Kier, L. B.; *Med. Res. Rev.* **1991**, *11*, 35.
80. Montanari, C. A.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 56.
81. Gaudio, A. C.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 278.
82. Calixto, J. B.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; Rae, G. A. *Planta Med.* **1990**, *56*, 31.

83. Cechinel Filho, V.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; *Quím Nova* **1993**, *16*, 189.
84. Cechinel Filho, V.; Miguel, O. G.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 475.
85. Carneiro, E. *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC 1989.
86. Carneiro, E.; Calixto, J. B.; Delle Monache, F.; Yunes, R. A.; *Int. J. Pharmacog.* **1993**, *31*, 38.
87. Vaz, Z. R.; Cechinel Filho, V.; Medeiros, Y. S.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; *XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Curitiba, Paraná 1992.
88. Vaz, Z. R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; Resultados não publicados.
89. Cechinel Filho, V.; Dal Magro, J.; Yunes, R.A.; Grifos (Unoesc) **1996**- in press.
90. Proksch, P.; Rodrigues, E.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2335.
91. Vaz, Z.R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 304.
92. Cechinel Filho, V.; Vaz, Z. R.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 833.
93. Barreiro, E.; *Ciência e Cultura* **1982**, *35*, 314.
94. Barreiro, E.; *Quím. Nova* **1991**, *14*, 179.
95. Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Neto, A. O. S.; Valle, R. M. R.; Rae, G. A.; *Braz. J. Med. Res.* **1984**, *17*, 313.
96. Cechinel Filho, V.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Pharm. Sci.* **1995**, *1*, 399.
97. Cechinel Filho, V.; Vaz, Z. R.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Pharm. Sci.* **1996**, *2*, 199.
98. Cechinel Filho, V.; Bella Cruz, A.; Nunes, R. J.; Corrêa, R.; Gonzaga, L.; Moretto, E.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Rev. Latinoamer. Quím.* **1994**, *23*, 116.
99. Cechinel Filho, V.; Pinheiro, T. R.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Bella Cruz, A.; Moretto, E.; *Il Farmaco* **1994**, *49*, 675.
100. Cechinel Filho, V.; Queiroz, E. F.; Lima, E. O.; Pinheiro, T. R.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 590.
101. Morton, J. F.; *Atlas of Medicinal Plants in Middle America*, Charles C. Thomas, Springfield 1981, p. 458-462.
102. Miguel, O. G.; *Tese de Doutorado*, UFSC, Florianópolis, SC 1996.
103. Santos, A. R. S.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47*, 66.
104. Santos A. R. S.; *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC 1994.
105. Cechinel Filho, V.; Santos, A.R.S.; Campos, R. O. P.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; Ferrari, F.; Messana, I.; Calixto, J. B.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 1231.
106. Santos, A. R. S.; Niero, R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; Pizzolatti, M. G.; Delle Monache, F.; Calixto, J. B.; *Planta Med.* **1995**, *61*, 329.
107. Miguel, O. G.; Calixto, J. B.; Santos, A. R. S.; Messana, I.; Ferrari, F.; Cechinel Filho, V.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; *Planta Med.* **1996**, *62*, 146.
108. Miguel, O. G.; Cechinel Filho, V.; Niero, R.; Silva, G. O.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B.; *Fitoterapia*, **1995**, *66*, 275.
109. Miguel, O. G.; Cechinel Filho, V.; Pizzolatti, M. G.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B.; Ferrari, F.; Messana, I.; Yunes, R. A.; *Planta Med.* **1995**, *61*, 391.
110. Xue, T.; *The Scientist* **1996**, *Feb 19*, p. 9.