

Universidade de Évora

Estudos sobre a composição química e actividade biológica do

***Laurus azorica* (Seub.) Franco**

Tese de Doutoramento

Maria Teresa de Freitas Ferreira Tinoco

Évora, 2000

Universidade de Évora

Estudos sobre a composição química e actividade biológica do

***Laurus azorica* (Seub.) Franco**



169045-

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do grau de
Doutor em Química

Maria Teresa de Freitas Ferreira Tinoco

Évora, 2000

A meu marido

e

a meu filho

Agradecimientos

Ao Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais desejo manifestar o meu reconhecimento pela sua orientação, incentivo, e inestimável apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Jesus Miguel Lopez Rodilla o meu muito obrigada pelo seu precioso apoio científico na identificação das estruturas dos compostos isolados, sem o qual não teria sido possível levar a cabo este trabalho e ainda pela facilidade concedida na utilização do espectrofotómetro de RMN e espectrómetro de massas do Laboratório de Química da Universidade da Beira Interior.

À Dra. Maria de Fátima Bastos Candeias agradeço a sua amizade e a colaboração imprescindível especialmente durante a fase da realização dos ensaios biológicos.

Ao Prof. Doutor Rui Manuel Alves Ferreira um agradecimento sincero e amigo pela disponibilidade e apoio científico prestado.

À Prof. Doutora Maria Paula Alves Robalo agradeço a execução de algumas análises espectrais.

Ao Professor Doutor António Mário Augusto Proença da Cunha expresso o meu agradecimento pela simpatia com que sempre me acolheu no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e pela autorização concedida na utilização instrumental necessária a este trabalho.

Ao Dr. Carlos Manuel Freire Cavaleiro agradeço a sua cordialidade e colaboração prestada na realização das determinações efectuadas no Laboratório de Farmacognosia.

Ao Prof. Doutor Joaquim Manuel Efe Serrano expresso o meu reconhecimento pelo modo cordial com que me acolheu no Laboratório de Fitotecnia da Universidade de Évora e me facilitou a utilização do equipamento.

Ao Professor Doutor Julio Gonzalez Urones, Director do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Salamanca, o meu agradecimento pela permissão concedida na utilização dos equipamentos do seu laboratório.

À Dra. Maria de Fátima Rosado da Fonseca, Directora do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital do Espírito Santo de Évora, agradeço a autorização para a execução das análises microbiológicas neste laboratório e a amabilidade com que fui acolhida.

À Mestra Isabel Maria Simão Alves Pereira pela amizade e ajuda prestada no tratamento estatístico dos resultados obtidos nos ensaios biológicos, o meu muito obrigada.

À Dra Maria do Rosário Caeiro Martins o meu agradecimento pelo apoio e interesse manifestado ao longo da realização deste trabalho.

À D. Maria Jesuína Vieira Mósca e D. Anabela da Conceição Guerra Charrua Cabeça, do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade de Évora, pelo apoio à realização experimental do trabalho, o meu sincero obrigada.

A todos os colegas e familiares agradeço o apoio e incentivo manifestados ao longo deste trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade de Évora, agradeço o apoio instrumental e em reagentes que contribuíram para a realização do trabalho.

Ao Centro de Estudos de Ecossistemas Mediterrânicos (CEEM) e ao Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM), pela utilização do equipamento, o meu agradecimento.

Ao Eng.º Henrique Miguel da Silva Costa Neves, Director do Parque Natural da Madeira, pela prontidão e solicitude com que sempre respondeu aos pedidos do material vegetal e ainda pela sua já longa amizade, o meu muito obrigada.

Abreviaturas

ALT	alanino aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BSA	albumina sérica bovina
cit b5	citocromo b5
cit P450	citocromo P450
°C	graus Celcius
CCF	cromatografia em camada fina
CCFP	cromatografia de camada fina preparativa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
C.L.E.D.	meio de cultura com extracto de carne
CMI	concentração mínima inibitória
COSY	Correlated Spectroscopy
d	duplete
dd	duplo duplete
δ	desvio químico
DSC	calorimetria de varrimento diferencial
ECOD	7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
END	etilmorfina <i>N</i> -desmetilase
EROD	7-etoxiresorufina <i>O</i> -desetilase
eV	electrões volt
FID	detector de ionização de chama
FT-IR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GC	cromatografia gasosa
GR	glutatio no redutase
GSH	glutatio no (forma reduzida)
GSSG	glutatio no (forma oxidada)
GST	glutatio no <i>S</i> -transferase
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear correlation through Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear correlation through Multiple Quantum Coherence
IE	impacto electrónico

IV	espectroscopia de infravermelho
J	constante de acoplamento
m	multiplete
[M] ⁺	ião molecular
Me	metilo
MHz	megaHertz
MS	espectrometria de massa
m/z	massa/carga
NADH	dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADPH red	NADPH citocromo P450 redutase
pH	-log (actividade de H ⁺)
ppm	partes por milhão
R _f	factor de retardação
RMN	espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão
r.p.m.	rotações por minuto
s	singuleto
sl	sinal alargado
S.N.C.	sistema nervoso central
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
p/v	peso/volume
v/v	volume/volume

Resumo

Apesar de todos os avanços da química, as plantas continuam a ser uma importante fonte de matérias primas para a produção de medicamentos e a constituírem uma das mais promissoras fontes para pesquisa de novos fármacos.

O *Laurus azorica* (Seub.) Franco, LAURACEAE endémica da região macaronésica e muito abundante na laurissilva da Ilha da Madeira, é utilizada amplamente pela população local com fins terapêuticos, em particular o óleo obtido por expressão dos frutos maduros, e na cozinha tradicional, as folhas e os ramos novos, devido às suas propriedades aromáticas.

Neste trabalho, teve-se como objectivos principais identificar os componentes químicos mais abundantes dos órgãos referidos e avaliar até que ponto poderão justificar as finalidades etnomedicinais com que são utilizados pela população, fazendo-se para isso um estudo etnobotânico na região e uma recolha do material na laurissilva aos 850 m de altitude.

Foram preparados e analisados os extractos de hexano e de clorofórmio da folha e do fruto maduro tendo revelado a presença de hidrocarbonetos terpénicos, principalmente lactonas sesquiterpénicas, sendo as maioritárias a costunolida e a dehidrocostus lactona. Além destas lactonas foram identificadas nos extractos da folha a 8-acetoxiguaian-1(10),11(13)-dien-6 α ,12-olida, a 8-acetoxiguaian-9,11(13)-dien-6 α ,12-olida, a 8-acetoxi-1-hidroxigermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olida, a 1,8-dihidroxigermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olida, a 1(5),8(13)-diepoxigermacran-10(14),4(15)-dien-6 α ,12-olida e a 1(5),8(13)-diepoxigermacran-10(14),4(15)-dien-6 β ,12-olida, um hidrocarboneto monoterpénico o 3,5-diacetoxi-1(7),4(8)-p-mentadieno, um composto esteróide o β -sitosterol, misturas de hidrocarbonetos saturados entre C₁₈ e C₂₅ e misturas de alcoóis de cadeia linear.

O óleo do fruto preparado artesanalmente revelou uma composição química semelhante, igualmente com predomínio da costunolida e dehidrocostus lactona.

O estudo da composição química do óleo essencial das folhas colhidas em duas épocas diferentes de maturação, Primavera e Outono, mostrou uma pequena variação na composição ao longo do ciclo vegetativo da planta em termos quantitativos, tendo-se observado que no óleo obtido da folha colhida na Primavera havia uma maior predominância de hidrocarbonetos sesquiterpénicos em relação ao óleo da folha do Outono.

No óleo essencial da folha da Primavera identificaram-se como componentes predominantes o α -pineno (20,88%), 1,8-cineol (15,79%), β -pineno (14,89%), 3-careno (5,64%), acetato de terpenilo (4,45%) e τ -muurolol (2,78%), enquanto que no do Outono estes foram o α -pineno (22,42%), 1,8-cineol (16,95%), β -pineno (15,60%), acetato de terpenilo (4,73%), pinocarvona (3,00%) e 3-careno (2,82%).

Na composição do óleo essencial do fruto maduro os componentes predominantes foram o *trans*- β -ocimeno (21,61%), α -pineno (15,64%), *cis*-ocimeno (8,07%), β -pineno (7,55%), germacreno D (4,88%), 3-careno (4,23%) e β -elemeno (3,00%).

Os óleos essenciais da folha e do fruto revelaram possuir actividade antimicrobiana face a várias estirpes de microrganismos Gram + e Gram -, destacando-se a actividade sobre a *Serratia marcescens*, a qual foi da mesma ordem de grandeza da manifestada pelo antibiótico específico e sobre o *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus epidermitis*, *Streptococcus equisimilis* e *Streptococcus pneumoniae*, para os quais

apresentaram actividade de cerca de 50% da manifestada pelos antibióticos utilizados como referência.

O óleo essencial da folha manifestou actividade biológica em ensaios realizados em murganhos Charles River e em ratos Wistar, destacando-se uma actividade depressora sobre o Sistema Nervoso Central que se traduziu por uma evidente diminuição da actividade motora e do tónus muscular acompanhados por uma clara ataxia e analgesia. Observou-se ainda uma marcada hipotermia.

No estudo toxicológico efectuado com o óleo essencial em ratos Wistar, observou-se que a administração deste óleo pareceu não afectar a integridade do tecido hepático, uma vez que não se verificou variação das actividades enzimáticas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina do soro.

No entanto, no que diz respeito às actividades enzimáticas relacionadas com a biotransformação hepática de drogas e xenobióticos em geral, observou-se a ocorrência de inibição ou de activação de algumas das subfamílias do sistema citocromo P450.

As variações observadas parecem apontar para um possível efeito hepatotóxico associado à administração do óleo essencial da folha.

Em estudos de toxicidade realizados com o óleo artesanal do fruto observou-se um perfil de resposta semelhante ao revelado pelo óleo essencial da folha, apontando também para uma provável hepatotoxicidade mais evidente com a dose mais elevada.

Apesar dos riscos de toxicidade que a utilização do óleo artesanal em ratos Wistar deixou sugerir e da conhecida toxicidade das lactonas sesquiterpénicas em geral, as actividades farmacológicas atribuídas a estas e ao óleo essencial parecem justificar pelo menos em parte a utilização dada ao óleo artesanal do fruto na medicina popular madeirense.

Face à similaridade qualitativa da composição química do fruto e da folha do *L. azorica*, julgamos que seria preferível a utilização desta na medicina tradicional em vez do fruto, dado que, ao contrário da folha, este é relativamente escasso e a sua colheita excessiva poderá contribuir para uma redução desta laurácea na laurissilva madeirense.

Abstract

Despite all the advances in chemistry, plants are still an important source of raw material for the production of medicines, and they form one of the most promising sources in the search for new drugs.

Laurus azorica (Seub.) Franco, an endemic Lauraceae of Macaronesia and abundant in the laurel forest of Madeira Island, is widely used by the local population for therapeutic purposes, particularly the oil obtained by pressing ripe fruits, and in traditional cookery, where the leaves and the stem wood are used for their aromatic properties.

In this work our main objectives were to identify the most abundant chemical components of the leaf and fruit and to assess how far their use in traditional medicine in Madeira could be justified. For this purpose we studied the ethnobotanic of the region and we collected the material from the laurel forest at 850 m of altitude.

Hexane and chloroform extract of the leaf and fruit showed similar chemical composition, with a predominance of terpenic hydrocarbons, mainly sesquiterpenic lactones, where costunolide and dehydrocostus lactone predominate. Beyond these lactones, other lactones were identified in the leaf extract: 8-acetoxylguaian-1(10),11(13)-dien-6 α ,12-olide, 8-acetoxylguaian-9,11(13)-dien-6 α ,12-olide, 8-acetoxyl-1-hydroxygermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olide, 1,8-dihydroxygermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olide, 1(5),8(13)-diepoxygermacran-10(14),4(15)-dien-6 α ,12-olide and 1(5),8(13)-diepoxygermacran-10(14),4(15)-dien-6 β ,12-olide. Also identified were a monoterpenic hydrocarbon, 3,5-diacetoxy-1(7),4(8)-*p*-menthadiene, a steroid compound, β -sitosterol, a mixture of saturated hydrocarbons between C18 and C25 and a mixture of unbranched chain alcohols.

The oil of the fruit, obtained by a manual process, revealed a similar chemical composition, with costunolide and dehydrocostus lactone as the main constituents.

The chemical composition of the essential oil of leaves collected in two different seasonal periods, Spring and Autumn, showed a small variation in the quantitative composition throughout the vegetative cycle. In the oil from Spring, the sesquiterpenic hydrocarbons are higher than in the oil from Autumn.

In Spring, the essential oil of the leaf contained, as principal components, α -pinene (20,88%), 1,8-cineole (15,79%), β -pinene (14,89%), 3-carene (5,64%), terpenyl acetate (4,45%) e τ -muurolol (2,78%), while in the Autumn oil, the main components found were α -pinene (22,42%), 1,8-cineole (16,95%), β -pinene (15,60%), terpenyl acetate (4,73%), pinocarvone (3,00%) and 3-carene (2,82%).

The essential oil of the ripe fruit contained, as principal components, *trans*- β -ocimene (21,61%), α -pinene (15,64%), *cis*-ocimene (8,07%), β -pinene (7,55%), germacrene D (4,88%), 3-carene (4,23%) and β -elemene (3,00%).

The essential oils of leaf and fruit showed antibacterial activity against several strains of bacteria Gram+ and Gram-. The most sensitive bacteria was *Serratia marcescens* whose susceptibility was similar to that displayed in reaction to a specific antibiotic. The strains *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Streptococcus equisimilis* and *Streptococcus pneumoniae* only showed a susceptibility about 50% of that displayed in reaction to antibiotics used as reference.

We observed that the essential leaf oil present biologic activity in rodents, showing a depressant effect on the central nervous system, indicated by an evident

depression of locomotor activity and muscular tonus together with a clear ataxy and analgesia. A clear hypothermia was also observed.

Toxicologic studies in Wistar rats showed that the oil did not affect the integrity of hepatic tissue, since no changes were detected on levels of serum transaminases (AST and ALT) and alkaline phosphatase.

However, the study of enzymatic activities related to the hepatic biotransformation of drugs and xenobiotics revealed inhibition or activation of some subfamilies of the cytochrome P450 system.

These variations suggested a hepatotoxic effect related to the administration of the essential oil of the leaf.

Toxicity studies of the oil of the fruit obtained by manual process, revealed the same response as the response to the essential oil of the leaf, but hepatotoxicity was more evident in fruit oil in the highest dose.

Despite the risks of toxicity suggested by the administration of this oil in rats and the known toxicity of sesquiterpene lactones, the pharmacologic activities related to them, and to the essential oil, may justify the folk use of fruit oil.

Based on the qualitative similarity of the chemical composition of the fruit and the leaf of *L. azorica*, it seems that the use of the leaf in folk medicine would be more advantageous than the use of the fruit, since, in contrast to the leaf, fruit is relatively scarce and its excessive harvest could contribute to a reduction of this lauraceae in the laurel forest of Madeira Island.

Índice

	<u>Página</u>
Índice de quadros	xxxix
Índice de figuras	xxxii
1 - Introdução	1
2 - Caracterização botânica	7
<u>2.1 - Caracterização da espécie</u>	9
<u>2.2 - Distribuição geográfica</u>	10
3 - Pesquisa etnofarmacológica	17
4 - Estudos anteriores sobre a família das LAURACEA, género Laurus	25
5 - Parte experimental	29
<u>5.1 - Colheita e preparação das amostras</u>	31
<u>5.2 - Estudo fitoquímico da folha e fruto</u>	31
5.2.1 - Pesquisa fitoquímica sistemática	33
5.2.1.1 - Pesquisa no extracto de clorofórmio: óleos voláteis, ácidos gordos, esteróis, terpenos, carotenóides, alcalóides, compostos antraquinónicos, flavónicos e cumarinas	33
5.2.1.2 - Pesquisa no extracto de etanol: taninos e polifenóis, glúcidos redutores, alcalóides, bases quaternárias e aminas oxidadas	36
5.2.1.3 - Pesquisa no extracto de etanol hidrolisado: heterósidos antracénicos, flavínicos, cumarínicos, esterólicos, triterpénicos e cardiotónicos	37
5.2.1.4 - Pesquisa no extracto aquoso: glúcidos redutores, oses e poliooses, saponinas e taninos	38
<u>5.3 - Caracterização dos componentes químicos maioritários da folha</u>	39
5.3.1 - Fraccionamento dos compostos por solventes de diferentes polaridades	39
5.3.2 - Análise fitoquímica dos extractos	40
5.3.2.1 - Tratamento dos extractos: de hexano, de clorofórmio e de etanol	40
5.3.3 - Isolamento de componentes maioritários dos extractos	44
5.3.3.1 - Separação por cromatografia sólido-líquido: cromatografia em	

coluna e em camada fina	44
5.3.4 - Identificação dos compostos isolados: ponto de fusão, índice de refração, poder rotatório, densidade, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa	45
<u>5.4 - Caracterização dos componentes químicos maioritários do fruto</u>	47
5.4.1 - Análise cromatográfica dos extractos de hexano e clorofórmio do fruto	47
5.4.2 - Análise cromatográfica do óleo artesanal do fruto obtido por expressão	48
<u>5.5 - Estudo da composição química do óleo essencial</u>	48
5.5.1 - Obtenção do óleo essencial: folha e fruto	48
5.5.2 - Estudo cromatográfico do óleo essencial	49
5.5.2.1 - Estudo por GC/FID	50
5.5.2.2 - Estudo por GC/MS	50
<u>5.6 - Estudos da actividade biológica do <i>Laurus azorica</i> em murganhos Charles River e ratos Wistar</u>	52
5.6.1 - Triagem hipocrática da actividade farmacológica do óleo essencial da folha e do óleo artesanal do fruto	52
5.6.2 – Actividade analgésica do óleo essencial da folha	53
5.6.3 - Efeito do óleo essencial da folha e do óleo artesanal do fruto sobre actividades enzimáticas	54
5.6.3.1 - Efeito sobre actividades enzimáticas do soro em ratos Wistar	55
5.6.3.2 - Efeito sobre actividades enzimáticas do tecido hepático	56
5.6.4 - Estudo comparativo entre a actividade hepática do óleo essencial da folha e a actividade de uma droga hepatoprotectora	67
5.6.5 – Análise estatística	69
<u>5.7 - Estudo da actividade antimicrobiana do <i>L. azorica</i></u>	70
5.7.1 - Estudo da actividade antimicrobiana do óleo essencial da folha e do fruto	70
5.7.2 - Avaliação da concentração mínima inibitória	72
<u>5.8 – Equipamento</u>	74
<u>5.9 - Reagentes</u>	76
6 – Resultados da parte experimental	81
<u>6.1 - Estudos fitoquímicos preliminares da folha e do fruto</u>	83

<u>6.2 - Componentes químicos maioritários da folha</u>	84
6.2.1 – Extracto de hexano	84
6.2.1.1 – Caracterização dos compostos isolados	85
6.2.2 – Extracto de clorofórmio	93
6.2.2.1 - Caracterização dos compostos isolados	94
6.2.3 – Extracto de etanol	95
6.2.3.1 - Caracterização dos compostos isolados	96
<u>6.3 - Composição química dos extractos do fruto</u>	100
<u>6.4 - Composição química do óleo artesanal do fruto</u>	101
<u>6.5 - Composição química dos óleos essenciais da folha e do fruto</u>	102
<u>6.6 – Estudos de actividade biológica em murganhos Charles River e ratos Wistar</u>	104
6.6.1 - Actividade biológica do óleo artesanal do fruto e do óleo essencial da folha	104
6.6.1.1 – Actividade biológica geral	104
6.6.1.2 – Actividade analgésica do óleo essencial da folha	105
6.6.1.3– Efeito sobre actividades enzimáticas do soro	106
6.6.1.4 – Efeito sobre sistemas enzimáticos do tecido hepático	108
6.6.2 – Efeito do óleo essencial da folha sobre o sistema hepático em comparação com uma droga hepatoprotectora típica	114
6.6.2.1 - Efeito sobre actividades enzimáticas das transaminases do soro	114
6.6.2.2 - Efeito sobre sistemas enzimáticos do tecido hepático	116
<u>6.7 - Actividade antimicrobiana</u>	124
6.7.1 - Actividade antimicrobiana do óleo essencial da folha e do óleo essencial do fruto	124
6.7.2 – Concentração mínima inibitória	124
7 – Discussão	127
8 – Conclusões	159
9 – Referências bibliográficas	165

Apêndices	175
Apêndice A – Espectros de infravermelho	177
Apêndice B – Espectros de ressonância magnética nuclear	185
B.1 – ^1H	187
B.2 – ^{13}C	193
B.3 – Correlação HMQB, HMBC e COSY	194
Apêndice C – Espectros de massa	203
Apêndice D – Cromatogramas	209
Apêndice E – Termogramas	213
Apêndice F – Parâmetros avaliados na triagem hipocrática e curva de calibração para a proteína total (método de Lowry)	217
Apêndice G – Resultados da análise de variância (modelo "ANOVA I")	221

Índice de quadros

Capítulo 6

<u>Quadro 6.1</u> – Fraccionamento do extracto de hexano	84
<u>Quadro 6.2</u> – Fraccionamento do extracto de clorofórmio	93
<u>Quadro 6.3</u> – Fraccionamento do extracto de alcalóides totais	95
<u>Quadro 6.4</u> – Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos	103
<u>Quadro 6.5</u> – Actividades antimicrobianas dos óleos essenciais das folhas do <i>Laurus azorica</i> colhidas na Primavera e Outono e do frutos maduros	125
<u>Quadro 6.6</u> – Actividade antimicrobiana (CMI) dos óleos essenciais da folha e do fruto	124

Capítulo 7

<u>Quadro 7.1</u> – Composição dos óleos essenciais por tipo de compostos	144
---	-----

Apêndice F

<u>Quadro I</u> – Parâmetros avaliados na triagem hipocrática	219
---	-----

Apêndice G

<u>Quadro II</u> – Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsossomal e do citosol do fígado de ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 0,02 e 0,1 mL/kg do óleo do fruto do <i>Laurus azorica</i>	223
<u>Quadro III</u> – Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsossomal e do citosol do fígado de ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 0,02 e 0,1 mL/kg do óleo essencial da folha do <i>Laurus azorica</i>	224
<u>Quadro IV</u> – Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsossomal e do citosol do fígado de ratos fêmeas Wistar, controlo e tratados com 0,4 mL de tóxico e com as doses de 0,1; 0,3 e 0,9 mL de óleo essencial da folha de <i>Laurus azorica</i> adicionadas de 0,4 mL de tóxico	225
<u>Quadro V</u> - Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsossomal e do citosol do fígado de ratos fêmeas Wistar, controlo e tratados com uma droga hepatoprotectora adicionada de 0,4 mL de tóxico	226

Índice de figuras

Capítulo 6

<u>Figura 6.1</u> – Efeito da administração do óleo essencial da folha na temperatura de ratos Wistar	104
<u>Figura 6.2</u> - Efeito da administração do óleo artesanal na temperatura de ratos Wistar	105
<u>Figura 6.3</u> – Actividade analgésica do óleo essencial da folha em murganhos Charles River	105
<u>Figura 6.4</u> – Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na actividade enzimática alanino aminotransferase do soro de ratos Wistar	106
<u>Figura 6.5</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na actividade enzimática aspartato aminotransferase do soro de ratos Wistar	107
<u>Figura 6.6</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na actividade enzimática fosfatase alcalina do soro de ratos Wistar	108
<u>Figura 6.7</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na concentração de citocromo P450 da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar	109
<u>Figura 6.8</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na concentração de citocromo b5 da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar	109
<u>Figura 6.9</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na actividade enzimática NADPH (P450) reductase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar	110
<u>Figura 6.10</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo do fruto e do óleo essencial da folha na actividade enzimática 7-etoxioresufina <i>O</i> -desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar	111
<u>Figura 6.11</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo dos frutos e do óleo essencial da folha na actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar	111

<u>Figura 6.12</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo dos frutos e do óleo essencial da folha na actividade enzimática etilmorfina <i>N</i> -desmetilase da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar	112
<u>Figura 6.13</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo dos frutos e do óleo essencial da folha na actividade enzimática glutatióno <i>S</i> -transferase do citosol do fígado de ratos Wistar	113
<u>Figura 6.14</u> - Efeito da administração de diferentes doses do óleo dos frutos e do óleo essencial da folha na actividade enzimática glutatióno redutase do citosol do fígado de ratos Wistar	113
<u>Figura 6.15</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática alanino aminotransferase do soro de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	115
<u>Figura 6.16</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática aspartato aminotransferase do soro de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	115
<u>Figura 6.17</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na concentração de citocromo P450 da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	117
<u>Figura 6.18</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na concentração de citocromo b5 da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	117
<u>Figura 6.19</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	118
<u>Figura 6.20</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática 7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	119

<u>Figura 6.21</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	120
<u>Figura 6.22</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática etilmorfina <i>N</i> -desmetilase da fracção microssomal do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	121
<u>Figura 6.23</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática glutationo <i>S</i> -transferase do citosol do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	122
<u>Figura 6.24</u> - Efeito da administração do tóxico (tetracloreto de carbono) na actividade enzimática glutationo redutase do citosol do fígado de ratos Wistar após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha e após tratamento com uma droga hepatoprotectora (silimarina)	123

Apêndice A

<u>Figura I</u> - Espectro de infravermelho do composto A	179
<u>Figura II</u> – Espectro de infravermelho do composto B	179
<u>Figura III</u> – Espectro de infravermelho do composto C	180
<u>Figura IV</u> – Espectro de infravermelho da mistura D	180
<u>Figura V</u> – Espectro de infravermelho do composto E	181
<u>Figura VI</u> – Espectro de infravermelho do composto F	181
<u>Figura VII</u> – Espectro de infravermelho da mistura G	182
<u>Figura VIII</u> – Espectro de infravermelho do composto H	182
<u>Figura IX</u> – Espectro de infravermelho da mistura I	183
<u>Figura X</u> – Espectro de infravermelho do composto J	183
<u>Figura XI</u> – Espectro de infravermelho do composto L	184

Apêndice B

<u>Figura XII</u> – Espectro de RMN ¹ H do composto A	187
<u>Figura XIII</u> – Espectro de RMN ¹ H do composto B	187

<u>Figura XIV</u> – Espectro de RMN ^1H do composto C	188
<u>Figura XV</u> – Espectro de RMN ^1H da mistura D	188
<u>Figura XVI</u> – Espectro de RMN ^1H do composto E	189
<u>Figura XVII</u> – Espectro de RMN ^1H do composto F	189
<u>Figura XVIII</u> – Espectro de RMN ^1H da mistura G	190
<u>Figura XIX</u> – Espectro de RMN ^1H $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ do composto H	190
<u>Figura XX</u> – Espectro de RMN ^1H do composto J	191
<u>Figura XXI</u> – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto L	191
<u>Figura XXII</u> – Espectro de RMN ^1H $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ do composto L	192
<u>Figura XXIII</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto A	193
<u>Figura XXIV</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto B	193
<u>Figura XXV</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto C	194
<u>Figura XXVI</u> - Espectro de RMN ^{13}C da mistura D	194
<u>Figura XXVII</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto E	195
<u>Figura XXVIII</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto F	195
<u>Figura XXIX</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto H	196
<u>Figura XXX</u> - Espectro de RMN ^{13}C do composto J	196
<u>Figura XXXI</u> - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) do composto L	197
<u>Figura XXXII</u> - Espectro de RMN ^{13}C $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ do composto L	197
<u>Figura XXXIII</u> – Espectro HMQC do composto E	198
<u>Figura XXXIV</u> - Espectro HMBC do composto E	198
<u>Figura XXXV</u> – Espectro COSY do composto E	199
<u>Figura XXXVI</u> – Espectro HMQC do composto J	200
<u>Figura XXXVII</u> – Espectro HMBC do composto J	200
<u>Figura XXXVIII</u> – Espectro HMQC do composto L	201
<u>Figura XXXIX</u> – Espectro HMBC do composto L	201
<u>Figura XL</u> – Espectro COSY do composto L	202
Apêndice C	
<u>Figura XLI</u> – Espectro de massa do composto A	205
<u>Figura XLII</u> – Espectro de massa do composto B	205
<u>Figura XLIII</u> – Espectro de massa do composto C	205
<u>Figura XLIV</u> - Espectro de massa do composto D ₁	206

<u>Figura XLV</u> - Espectro de massa do composto D ₂	206
<u>Figura XLVI</u> - Espectro de massa do composto E	207
<u>Figura XLVII</u> - Espectro de massa do composto F	207
<u>Figura XLVIII</u> – Cromatograma e espectro de massa da mistura I	208
<u>Figura XLIX</u> - Espectro de massa do composto L	208

Apêndice D

<u>Figura L</u> – Cromatograma do óleo essencial da folha colhida no Outono	211
<u>Figura LI</u> – Cromatograma do óleo essencial da folha colhida na Primavera	211
<u>Figura LII</u> – Cromatograma do óleo essencial do fruto maduro	212
<u>Figura LIII</u> – Cromatograma do óleo essencial do fruto verde	212

Apêndice E

<u>Figura LIV</u> – Termograma do composto B	215
<u>Figura LV</u> – Termograma do composto C	215

Apêndice F

<u>Figura LVI</u> – Curva de calibração utilizada na determinação da concentração de proteína total	220
---	-----

1 - Introdução

As plantas foram o principal recurso utilizado pelos homens primitivos para o tratamento de doenças e alívio da dor. Com o correr dos tempos esta utilização foi muitas vezes associada a práticas religiosas e de magia.

Nas civilizações antigas já era grande o conhecimento e a utilização das plantas medicinais. Esse conhecimento foi sendo transmitido oralmente de geração em geração e, depois, de forma escrita em papiros, pergaminhos, dispensatórios e farmacopeias. Na obra escrita por Dioscórides no século I da nossa Era intitulada “Matéria Médica”, estão descritos remédios provenientes dos três reinos da Natureza, a maioria do reino vegetal, encontrando-se a descrição de mais de 600 espécies de plantas.

Nos princípios do século XIX, tem lugar o isolamento dos primeiros princípios activos a partir das drogas vegetais, o que levou a uma modificação no procedimento seguido até aí, passando os constituintes activos das plantas a ser usados directamente ou tomados como ponto de partida para a preparação sintética de novas moléculas activas. Esta mudança permitiu fazer uma dosagem mais correcta das substâncias medicamentosas e obter uma acção farmacológica mais eficaz, com eliminação de possíveis efeitos adversos causados por outros componentes presentes nas plantas.

Contudo, esta maneira de pensar sofreu algumas alterações nas últimas décadas, uma vez que se foi verificando que, por vezes, é necessária a presença conjunta de outros componentes das plantas para se obter os efeitos desejados e, até mesmo, se tomarem menos tóxicos que os componentes isolados. Assim, hoje, a par das drogas preparadas por via química, retomou-se a utilização das plantas medicinais sob as mais variadas formas farmacêuticas: infusos, macerados, extractos, tinturas ou até mesmo formas farmacêuticas sólidas, como é o caso de fracções de plantas reduzidas a pó administradas directamente ou depois de incluídas em cápsulas. Mas este ressurgimento da Fitoterapia é apoiado pelos recentes avanços tecnológicos e novos meios analíticos,

que permitem que o uso das plantas seja agora feito com base no conhecimento científico da sua composição química e bioactividade. No entanto, continua a existir um imenso manancial de espécies vegetais utilizadas pelas populações com fins curativos baseado apenas no seu conhecimento empírico.

As plantas não são só fonte de princípios medicamentosos fornecem também outros produtos que interessam à indústria em geral, nomeadamente óleos essenciais utilizados na indústria cosmética e de saboaria, corantes naturais usados na tinturaria, aromatizantes, e um sem número de outros produtos com as mais diversas aplicações.

A região mediterrânica é uma das regiões do mundo onde há uma maior diversidade de plantas medicinais e aromáticas e a Ilha da Madeira, pela sua situação geográfica, possui uma riquíssima flora não só de origem mediterrânica como subtropical.

O *Laurus azorica* (Seub.) Franco, ali colhido e objecto deste estudo, é uma dessas plantas ainda insuficientemente estudadas e que é usada pela população com fins medicinais diversos.

A parte da planta mais utilizada na medicina tradicional, é o fruto - baga carnuda, da qual é extraído um óleo que é ingerido ou aplicado externamente, conforme a origem dos padecimentos. As folhas e os ramos novos são usados apenas em aplicações culinárias pelas propriedades aromáticas que possuem.

Tendo em conta o uso generalizado que é feito desta planta com fins medicinais pela população madeirense, incluindo a obtenção do seu óleo, preparação de formas farmacêuticas e a sua dispensa em Farmácia e face à escassez de informação científica a seu respeito, decidimo-nos pelo seu estudo na preparação desta tese de doutoramento.

Consultada a literatura existente e as bases de dados disponíveis, encontramos apenas referências ao estudo do óleo essencial presente nas folhas do *L. Azorica* (Carmo e Frazão, 1975, Hokwerda *et al.*, 1982 e Cruz Morais, 1987) e uma abordagem qualitativa da composição química geral das mesmas (Cruz Morais, 1987).

Com este trabalho pretendemos fazer o estudo químico e farmacológico do fruto, dada a importância que lhe é dada pela população, e o estudo mais exaustivo da folha, uma vez que é a parte mais abundante e disponível da planta.

Nesta perspectiva, desenvolvemos um plano de trabalho que incidiu sobre os seguintes temas:

1. Preparação de extractos das folhas e dos frutos em solventes de diferentes polaridades - hexano, clorofórmio e etanol.
2. Estudo fitoquímico desses extractos.
3. Isolamento e caracterização dos componentes maioritários dos extractos de hexano e de clorofórmio.
4. Inquérito junto da população da Ilha da Madeira sobre a utilização e o modo de preparação do óleo dos frutos.
5. Recolha do óleo de preparação artesanal e pesquisa dos principais grupos de componentes presentes.
6. Determinação da actividade biológica desse mesmo óleo em roedores.
7. Obtenção e estudo da composição química do óleo essencial das folhas e dos frutos.
8. Determinação da actividade biológica dos óleos essenciais em roedores.
9. Determinação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos.

2 - Caracterização botânica

2.1 - Caracterização da espécie

O *Laurus azorica* é uma árvore de 8 a 10 metros (raramente até 20 metros) de altura, com tronco erecto, ritidoma liso e cinzento escuro e copa densa. As folhas são persistentes, coriáceas, verde escuras, mais claras na página inferior, pecioladas, com margem plana ou ligeiramente ondulada, nervura principal bem pronunciada e notando-se pouco as secundárias, glabras excepto enquanto novas, lâmina suborbicular a lanceolada, apresentando entre 5 a 17 centímetros de comprimento e 3 a 8 centímetros de largura.

Floresce de Fevereiro até Maio ou Junho e as flores são agrupadas, pedunculadas, em situação subterminal (axilas foliares) de cor creme-esverdeada.

Os frutos são carnudos (bagas drupáceas) oblongo-elípticos, quase negros e lustrosos, podendo chegar aos 2 centímetros de comprimento, quando maduros em Setembro- Outubro.

As características das suas flores obrigam a que esta espécie seja integrada no género *Laurus L.*, pelo que a antiga designação de *Persea azorica* dada por Seubert, em 1844, deixa de ser possível, assim como a designação de *Laurus canarienses* conferida por Webb e Berthelot em 1846, uma vez que este binome não está de acordo com as actuais Regras Internacionais de Nomenclatura Botânica. Estas razões expostas pelo Professor João do Amaral Franco em 1960 e publicadas nos Anais do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa em Agosto desse mesmo ano, levaram a que fosse por ele proposta uma nova designação – *Laurus azorica* (Seub.) Franco, nome pelo qual é agora designada.

Esta nova classificação já vem referida na Flora Europaea, volume I, de T. G. Tutin *et al.*, 1ª edição, publicada em Cambridge em 1964 pela University Press, bem

como na Nova Flora de Portugal, volume I, (Continente e Açores) tradução de João do Amaral Franco dessa mesma Flora Europaea, publicada em Lisboa, em 1971, pela Sociedade Astória, Lda.

Segundo a Flora Europeia, o género *Laurus L.* pertence à família das *LAURACEAE*, ordem das *RANALES*, classe *Dicotyledonae*, divisão *ANGIOSPERMAE*, reino *SPERMATOPHYTA*.

Em 1957, o botânico Kostermans tinha apresentado um sistema de classificação das lauráceas baseado nas afinidades entre a composição química dos diversos ramos desta família (Reinwardtia 4 (2) 193, 1957) e segundo este autor, o género *Laurus L.* incluía-se na ordem das *MAGNOLIACEAE*, família *LAURACEAE*, sub-família *LAURIDEAE*, tribo *Litseae* e sub-tribo *Laurineae*.

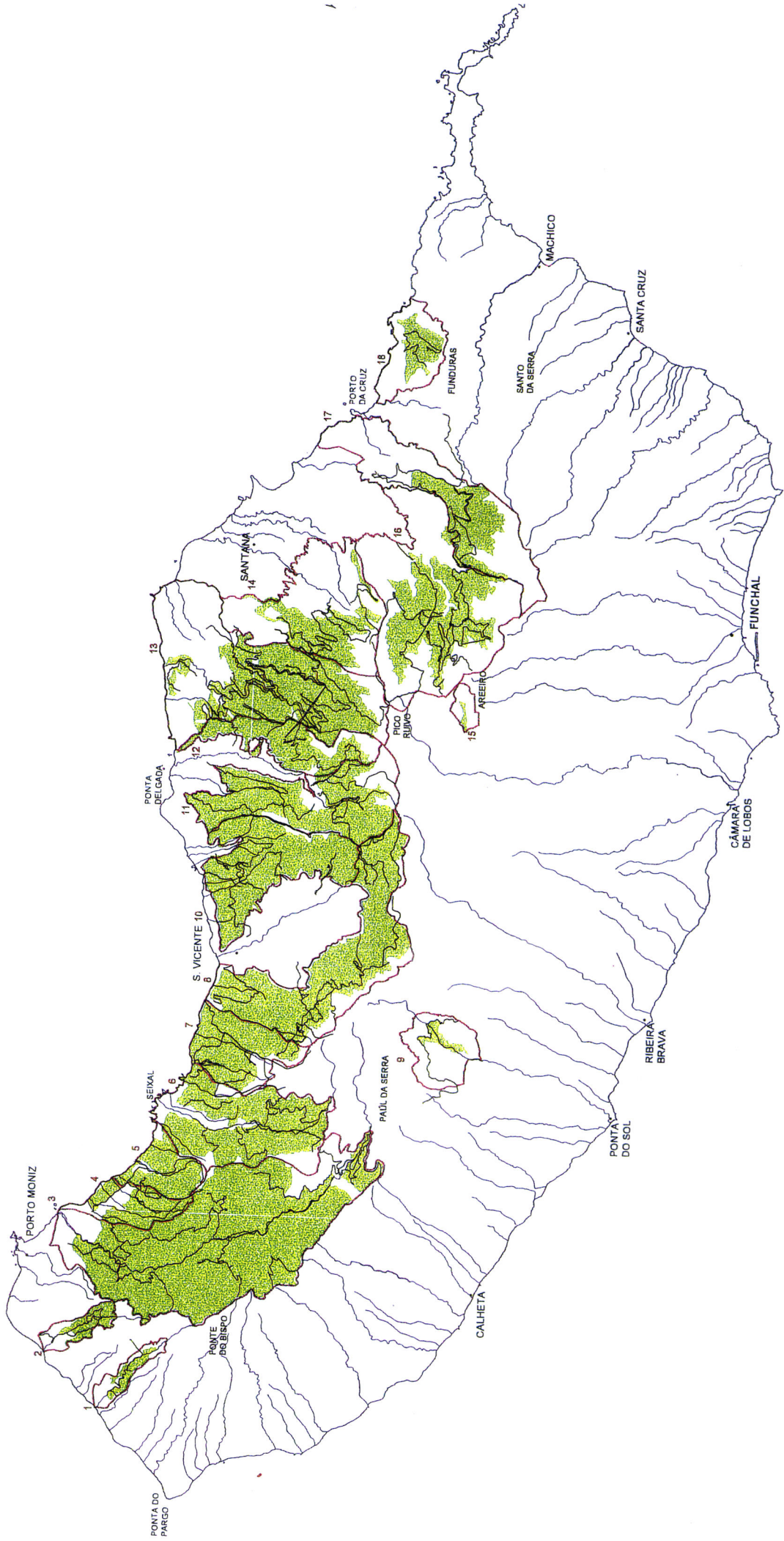
Conforme refere Gottlieb, em 1972, num artigo de revisão sobre a sistemática química das Lauráceas, esta foi apenas uma tentativa de sistematizar as afinidades da evolução entre os membros desta vasta família de plantas.

2.2 - Distribuição geográfica

O *Laurus azorica* é um endemismo da Macaronésia, região que engloba os arquipélagos da Madeira, Açores, Canárias e Cabo Verde e ainda uma parte da costa ocidental de África, abrangendo a região do antigo Sahara espanhol.

A Ilha da Madeira, principal ilha do arquipélago do mesmo nome e região onde foi colhida a espécie em estudo, é uma ilha de origem vulcânica que se encontra localizada no oceano Atlântico a sudoeste do continente europeu entre os paralelos 33° e 32° 25' de latitude norte e os meridianos 16° e 17° de longitude ocidental.

Ilha da Madeira



Área da Laurissilva

O *L. azorica* faz parte da flora primitiva da Ilha, constituída por uma floresta mesófila, a Laurissilva, composta de árvores e arbustos de folha persistente, principalmente da família das lauráceas, cuja origem remonta à Era Terciária, períodos Miocénio e Pliocénio.

A Laurissilva ocupa actualmente uma área estimada em 22000 hectares, estendendo-se entre os 300 e os 1300 metros de altitude em vales e vertentes com grandes declives, onde a humidade relativa é elevada, quase sempre acima dos 85%, com uma precipitação anual de 1700 mm e frequentes nevoeiros. A temperatura média do ar nesta zona situa-se entre os 11,5° e 13° C. No entanto, é possível encontrar loureiros desde quase a beira-mar até acima dos 1600 m de altitude.

Este tipo de floresta, actualmente, está restringida às ilhas da Macaronésia, contudo, antes da última glaciação cobria também as zonas húmidas do sul da Europa.

Referindo-nos um pouco à história da floresta que cobre grande parte da ilha, traçamos uma visão rápida da evolução por ela sofrida desde o descobrimento da Madeira, em 1419, até à época actual.

Na altura do descobrimento, a ilha estava totalmente coberta por uma floresta densa, facto já referido por Camões no Canto V de “Os Lusíadas”:

“ Passamos a grande ilha da Madeira
Que do muito arvoredado assi se chama...”

Esta floresta, a Laurissilva, (designação que provém do latim *laurus* = loureiro, lauráceas e *silva* = floresta, bosque) é composta essencialmente por quatro espécies da família das Lauráceas, todas pertencendo a géneros diferentes, especificando: o Til - *Ocotea foetens* (Ait.) Baill., o Vinhático - *Persa indica* (L.) Spreng., o Barbusano - *Apollonias barbujana* (Cav.) Bomm. e o Loureiro - *Laurus azorica* (Seub.) Franco.

Além destas lauráceas, há a referir outros endemismos cuja presença é significativa como sejam o Folhado, o Cedro da Madeira, o Pau branco, o Aderno e uma grande diversidade de elementos florísticos pertencentes ao extracto herbáceo-inferior.

Mas logo após o seu descobrimento, esta riqueza florestal começou a sofrer graves danos. Gonçalves Zarco e os homens que o acompanhavam para se poderem instalar, iniciaram o seu desbaste por meio de abates de árvores e fogos. Com a chegada de novas gentes em 1425 e a ocupação efectiva do solo, esse espaço foi sendo sucessivamente alargado, principalmente na vertente sul onde o clima era mais ameno e o acesso mais fácil.

As árvores que povoavam tal floresta eram todas de boa madeira o que levou a que se tivesse iniciado a sua exploração. Assim, começaram a cortar-se árvores para marcenaria, construção de barcos e com este fim até se fez a exportação para os estaleiros do continente. Além destas aplicações, as madeiras eram ainda aproveitadas para a produção de lenha e carvão vegetal.

Com a implementação da cultura dos cereais como meio de subsistência das populações, durante o século XV e, mais tarde, nos finais desse século e meados do seguinte, o início da cultura da cana-do-açúcar na zona litoral sul fez deslocar a cultura dos cereais para zonas ocupadas pela floresta na vertente sul e alargar-se a sua cultura na vertente norte. A partir do final do século XVI até hoje, a cultura da vinha substituiu a da cana-do-açúcar ocupando as mesmas zonas de cultivo e, ainda, algumas zonas de cereais.

A aliar-se a esta acção destruidora causada pela mão do homem, veio juntar-se a provocada pelo gado caprino e ovino trazido pelos povoadores e lançado nas serras onde se reproduziu sem controlo e originou a destruição de uma parte significativa do coberto vegetal.

Em época mais recente, a introdução de espécies exóticas veio também ocupar zonas que outrora eram pertença da Laurissilva.

Como resultado de todos estes factos, a floresta primitiva reduziu-se bastante na vertente sul da Ilha. Contudo, na vertente norte, onde os acessos são mais difíceis e o clima mais frio e húmido devido à exposição aos ventos alísios de Nordeste, a fixação humana foi menos intensa e a floresta mais poupada.

Nas últimas décadas, houve um esforço por parte das entidades governamentais e regionais no sentido de repôr, na medida do possível, a primitiva Laurissilva, tendo-se iniciado a reflorestação de muitas das áreas devastadas e feito a aquisição de áreas de floresta particulares, pelo que, actualmente, abrange a área de 22000 hectares atrás referida.

Este valioso património natural levou à criação, em 1982, do Parque Natural da Madeira, recentemente considerado como Reserva Biogenética, incluída na rede europeia de Reserva Biogenética sob a égide do Conselho da Europa. Em Dezembro de 1999, tendo em conta a biodiversidade de espécies vegetais e animais nela existentes, únicas no mundo, a Laurissilva foi considerada Património Mundial Natural pelo Comité do Património Mundial da UNESCO.

3 - Pesquisa etnofarmacológica

A utilização do óleo dos frutos, vulgarmente chamadas “bagas”, do *Laurus azorica* pela população madeirense vem de longa data, não só com fins curativos, mas também na indústria de azeite de iluminação popular, tendo adquirido tal importância que, no século XV, chegou a ser feita a exportação da baga para o fabrico de óleo em diversas partes da Europa. Como curiosidade, refere-se que, ao tempo do rei D. João IV, foi concedido ao Conde de Vimioso, Capitão Donatário da Vila de Machico, na Ilha da Madeira, o monopólio dessa exportação e igual regalia foi concedida ao Capitão Donatário da Ilha do Porto Santo, pois nessa altura o loureiro ainda não se encontrava extinto naquela ilha.

Actualmente o óleo obtido dos frutos do *Laurus azorica* continua a ser usado pela população. Dado que ainda é fornecido por algumas farmácias, foi possível, mediante informação nelas recolhida e também através de particulares interessados na utilização de produtos naturais, saber onde e como ainda hoje se obtém tão apreciado óleo.

Assim, ainda existem lagares de óleo ou azeite de louro nas freguesias da Ponta do Pargo, Porto da Cruz, Serra d'Água e Camacha, sendo as duas primeiras na zona norte da Ilha e as duas últimas na vertente sul.

Este óleo é obtido a partir dos frutos maduros. Antigamente, o processo decorria a frio em lagares onde os frutos eram colocados num alguidar de madeira e esmagados, sendo em seguida submetidos à expressão em pequenos lagares também de madeira. Nos lagares que funcionam actualmente, os frutos são fervidos antes da expressão. Este procedimento leva à obtenção de maior quantidade de óleo mas a sua qualidade é inferior, uma vez que é eliminada a maior parte dos componentes do óleo essencial pela temperatura a que são sujeitos.

O óleo obtido é coado através de um passador de rede, aquecido e novamente coado através de um pano. Depois de arrefecido, é guardado em frascos. É fornecido directamente aos consumidores que se deslocam ao lagar, mas também a algumas farmácias que o comercializam. Nestas, pode ser vendido em frascos ou, mais recentemente, acondicionado em cápsulas gelatinosas, forma farmacêutica mais apreciada, uma vez que assim é eliminado o mau sabor característico do óleo.

A dose recomendada é de 1 cápsula ou de 1 colher de chá de óleo por dia e a duração do tratamento de 7 a 9 dias.

Este óleo é utilizado com objectivos variados, nomeadamente em problemas de garganta e digestivos, distúrbios circulatórios, infecções e gangrena, queimaduras e ainda, em casos de tétano. Nas farmácias, quando o fornecem, limitam-se a aconselhar a sua utilização como purificador do sangue.

O óleo é ainda aplicado externamente em fricções, nos casos de reumatismo. Com este mesmo fim o resíduo da expressão (bagaço) é também aplicado sob a forma de emplastos.

O fruto é também usado directamente na preparação de um “chá”, quando é pretendida uma acção anticatarral.

As folhas são usadas unicamente como condimento na culinária, pelas suas propriedades aromáticas.

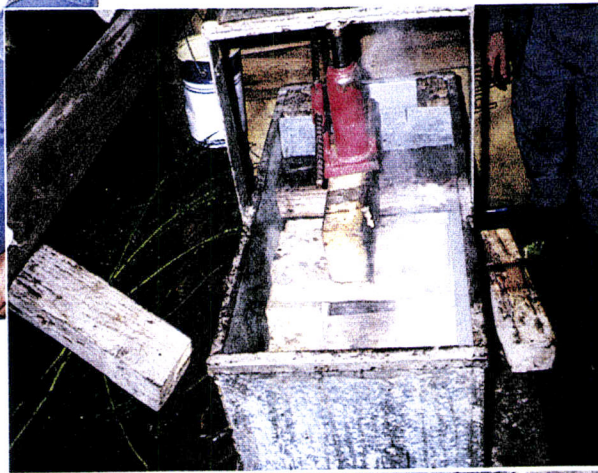
Os ramos mais finos, depois de retiradas as folhas, são utilizados como instrumentos para assar carne, à qual conferem o seu aroma durante a assadura. São bem conhecidas na arte culinária portuguesa as “Espetadas de carne da Ilha da Madeira”.

As “bagas” do *Laurus azorica* e a obtenção do seu óleo

1



2



3



4

1 – Baga madura

2 - Lagar artesanal

3 – Compressão das bagas

4 – Recolha do óleo

O valor afectivo desta laurácea para a população da Ilha da Madeira levou a incluí-la no cancioneiro popular madeirense, do qual transcrevo uma quadra de uma canção de embalar que a ela se refere:

“Vai-te embora passarinho
Deixa a baga do loureiro
Ai deixa o menino a dormir
O seu soninho primeiro.”

Refere-se, no entanto, que a colheita dos frutos é condicionada pelas autoridades regionais, não só quanto ao local como ao número de horas de colheita. Esta medida visa a protecção da floresta e do pombo trocaz, ave endémica da Laurissilva, cuja principal fonte alimentar são os frutos do loureiro.

4 - Estudos anteriores sobre a família das *LAURACEAS*,

género *Laurus*



Da família das *LAURACEAS*, género *Laurus*, existem duas espécies conhecidas: o *L. azorica* existente na Macaronésia e o *L. nobilis*, que predomina na Europa Mediterrânica.

O *L. nobilis* já se encontra largamente estudado, tanto quanto à composição química das folhas (Tada e Takeda, 1976/1971; El-Feraldy e Benigni, 1980; Pech e Bruneton 1982 e Novák, 1985) como à do óleo essencial extraído das folhas, flores, frutos e casca (Carmo e Frazão, 1975; Zola *et al.*, 1977; Hokwerda *et al.*, 1982; Nývák, 1985; Tanriverdi *et al.*, 1991 e Fiorini, 1997). Encontramos também referências às propriedades antimicrobianas e antibacterianas do óleo essencial das folhas (Fiorini, 1997). Do óleo proveniente dos frutos também se conhece a sua composição e sabe-se que já foi usado com fins medicinais, tais como estimulante local e antisséptico, actualmente usa-se apenas em veterinária como parasiticida (Costa, 1994). As folhas são também referenciadas como possuindo algumas propriedades curativas e até se encontram indicações sobre a sua utilização, a saber: a ingestão de uma infusão das folhas favorece a digestão, o seu decocto misturado com a água do banho combate as dores dos membros, o óleo essencial diluído em água pode ser utilizado em entorses e reumatismos articulares, mas se aplicado em excesso pode provocar irritações da pele (Bremness, 1996).

Apesar do *L. nobilis* possuir as propriedades atrás referidas, as principais aplicações que lhe são dadas hoje em dia, são a utilização das folhas na cozinha mediterrânica como aromatizante e do óleo essencial na indústria de perfumaria e cosmética. O óleo dos frutos é também usado em saboaria (Tanriverdi *et al.*, 1991 e Costa, 1994).

Do *L. azorica* existem escassos estudos sobre a composição química do óleo essencial retirado das folhas, apenas por GC/FID (Carmo e Frazão, 1975; Hokwerda *et al.*, 1982; Cruz Morais, 1987), não havendo outros estudos incluindo por GC/MS.

5 - Parte experimental

5.1- Colheita e preparação das amostras

As folhas e frutos do *L. azorica* foram colhidas na zona da Laurissilva da Ilha da Madeira.

A época de colheita foi diferente conforme o fim pretendido. Assim, para o estudo fitoquímico das folhas estas foram colhidas no Outono. Para a extracção do óleo essencial colheram-se também na Primavera. Os frutos foram colhidos verdes em Junho e maduros em Outubro e nos dois lotes fez-se o estudo fitoquímico e extraiu-se o óleo essencial.

Para a pesquisa do óleo essencial, as folhas frescas foram cortadas grosseiramente, os frutos golpeados e num aparelho tipo Clevenger foram submetidos a hidrodestilação.

As folhas restantes e os frutos foram secos, por exposição ao ar em atmosfera arejada desprovida de humidade, e reduzidos a pó num moinho de facas Brabender OHG-Duisburg, equipado com um crivo de 1 mm.

Com uma fracção das folhas e frutos reduzidos a pó, prepararam-se extractos em clorofórmio, etanol e água. Este fraccionamento dos componentes em solventes de polaridade crescente mediante as respectivas afinidades químicas facilitou o estudo fitoquímico subsequente.

5.2- Estudo fitoquímico da folha e fruto

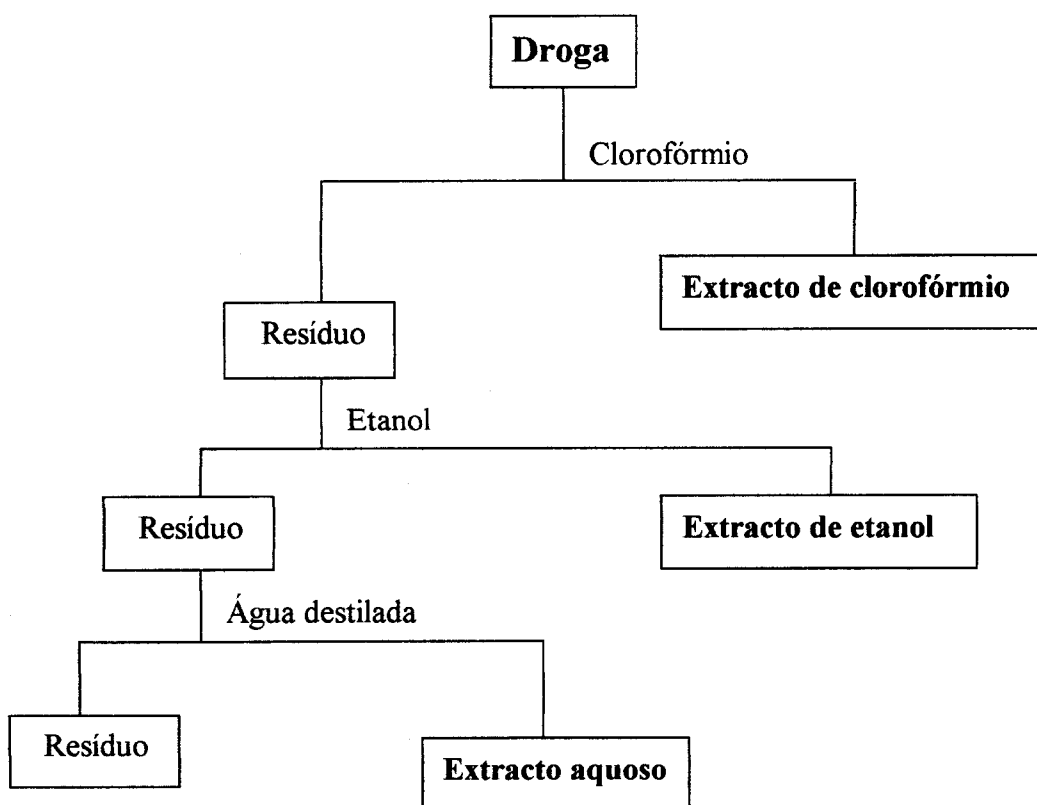
A 10 g das folhas e 100 g de frutos secos reduzidos a pó adicionaram-se várias alíquotas de clorofórmio e submeteram-se a agitação mecânica até ao esgotamento da droga por este solvente. Reunidas as fracções obtidas, estas foram concentradas até 50

mL em evaporador rotativo a pressão reduzida. Os resíduos foram secos e esgotados pelo etanol a 96° seguindo o mesmo processo extractivo utilizado para a preparação dos extractos de clorofórmico. Após a separação dos extractos de etanol e secagem do resíduo final, este foi submetido a extracção pela água em b.m. fervente durante 30 minutos. Depois de frios e separados os resíduos, os extractos aquosos foram concentrados até 50 mL.

O estudo fitoquímico foi feito por meio de reacções químicas características dos vários grupos de compostos presentes, de acordo com os procedimentos indicados por Costa, 1982; Ciulei, 1984 e Abreu Matos, 1988.

No extracto de clorofórmio encontram-se os princípios activos lipófilos, no de etanol e no aquoso os compostos químicos hidrófilos.

Esquema da preparação dos extractos



5.2.1 - Pesquisa fitoquímica sistemática

5.2.1.1 – Pesquisa no extracto de clorofórmio

Pesquisa de óleos voláteis

Num balão de fundo redondo introduziu-se cerca de 20 mL de extracto e evaporou-se à secura. Apresentando um odor agradável e aromático, extraiu-se o óleo volátil com pequenas quantidades de álcool mediante eluições sucessivas, concentrando-se em seguida o extracto obtido. A presença de óleo volátil é indicada pelo odor aromático apresentado pelo resíduo.

Pesquisa de ácidos gordos

Numa ampola de decantação colocou-se uma fracção do extracto e agitou-se com hidróxido de sódio a 4%. Deixou-se repousar e separou-se a fase aquosa da fase de clorofórmio.

A fase aquosa alcalina foi colocada noutra ampola de decantação e tratada com ácido clorídrico a pH 3-4. Após repouso, esgotou-se a fase aquosa ácida com várias porções de clorofórmio que se reuniram e desidrataram com sulfato de sódio anidro.

A presença de ácidos gordos é indicada pelo aspecto untuoso dos resíduos após evaporação do solvente.

Pesquisa de esteróis e triterpenos

Evaporou-se 10 mL do extracto numa cápsula de porcelana em banho de água, juntou-se ao resíduo 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de clorofórmio, transferiu-se a

solução obtida para um tubo de ensaio seco. Com a ajuda de uma pipeta deixou-se correr ao longo das paredes do tubo 1 a 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A presença de esteróis e triterpenos é indicada pelo desenvolvimento de uma cor violeta ao fim de 5 minutos, reacção de Liebermann-Burchard, ao nível da separação das duas fases

Pesquisa de carotenóides

Colocou-se 10 mL de extracto numa cápsula de porcelana e evaporou-se em banho de água. Adicionou-se ao resíduo ácido sulfúrico concentrado.

A presença de carotenóides é indicada pelo aparecimento de uma cor azul intensa ou verde azulada.

Pesquisa de alcalóides

Tomou-se 10 mL de extracto que foram evaporados. O resíduo foi dissolvido em 1,5 mL de ácido clorídrico a 2% em b.a. quente. A solução foi filtrada e dividida por 3 tubos de ensaio. A um deles juntou-se 2 a 3 gotas de reagente de Mayer, a outro 2 a 3 gotas de reagente de Bertrand e ao terceiro 2 a 3 gotas de reagente de Dragendorff.

A presença de alcalóides é indicada pela formação de precipitados branco-amarelados no primeiro e segundo tubos e vermelho-alaranjados no terceiro.

Pesquisa de compostos antraquinónicos

Num tubo de ensaio colocou-se 3 mL de extracto juntou-se 1 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% e agitou-se com vareta de vidro.

A presença de derivados da antraquinona livres é indicada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelha, reacção de Bornträger.

Pesquisa de compostos flavónicos

Após evaporação de 3 mL de extracto, o resíduo foi dissolvido em 1-2 mL de metanol a 50%, em b.a. quente. A solução foi transferida para um tubo de ensaio no qual se juntou 2 a 3 fragmentos de limalha de magnésio metálico e 4 a 5 gotas de ácido clorídrico concentrado.

A presença de flavonas é indicada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelho-alaranjada, uma coloração vermelha indica a presença de flavonóis e violeta a presença de flavononas, reacção de Shibata ou teste da cianidina.

Pesquisa de cumarinas

Evaporou-se 3 mL de extracto e dissolveu-se o resíduo em 2 mL de água destilada fervente. Após o arrefecimento, dividiu-se a solução por 2 tubos: a um juntou-se 5 mL de solução de amoníaco a 10%, o outro é o tubo testemunha. Observou-se à luz ultravioleta.

A presença de cumarinas é indicada por uma fluorescência azul ou esverdeada da solução alcalina.

5.2.1.2 - Pesquisa no extracto de etanol

Pesquisa de taninos e polifenóis

Do extracto de etanol retirou-se 1 mL para um tubo de ensaio, diluiu-se com 2 mL de água destilada e juntou-se 2 a 3 gotas de solução de cloreto férrico a 1%. No caso de estarem presentes estes compostos, desenvolve-se uma cor azul escura na presença de taninos gálhicos e verde na presença de catequinas.

Pesquisa de glúcidos redutores

Num tubo de ensaio introduziu-se 1 mL da solução alcoólica, diluiu-se com 2 mL de água destilada, adicionou-se 1 mL de reagente de Fehling e aqueceu-se à ebulição. A presença de açúcares redutores é indicada pela formação de um precipitado vermelho-acastanhado.

Pesquisa de alcalóides, bases quaternárias e aminas oxidadas

Tomou-se 20 mL de extracto e concentrou-se a pressão reduzida até consistência de xarope. Adicionou-se 8 mL de ácido clorídrico a 10% e misturou-se a quente. Após arrefecimento, juntou-se 0,5 g de cloreto de sódio e misturou-se. A solução foi filtrada e o filtro lavado com 2 a 3 mL de ácido clorídrico a 10%. Retirou-se 1 mL desta solução para 3 tubos de ensaio e efectuou-se a pesquisa com os reagentes de Mayer, Bertrand e Dragendorff conforme atrás referido. A formação de precipitado abundante indica a presença de alcalóides e sais quaternários ou aminas oxidadas.

Para confirmar a presença de alcalóides, adicionou-se amónia concentrada à solução ácida restante até pH 8-9, colocou-se esta solução numa ampola de decantação e

agitou-se com pequena quantidade de éter. Separou-se a solução etérea (a) da aquosa alcalina (b).

A identificação de alcalóides foi feita na solução etérea (a). Para isso, evaporou-se o éter, o resíduo foi dissolvido em ácido clorídrico 2N e na solução obtida fizeram-se as reacções de pesquisa referidas anteriormente. O aparecimento de precipitados confirma a presença de alcalóides.

Para identificação das bases quaternárias e aminas oxidadas, acidulou-se a solução alcalina (b) a pH 3 com ácido clorídrico a 10% e filtrou-se. Tomou-se 1-2 mL desta solução e efectuaram-se as reacções de identificação com os 3 reagentes já referidos.

Os alcalóides, os sais quaternários de amónio e as aminas oxidadas precipitam em meio ácido ou neutro, na presença de alguns poliacidos minerais complexos, como o ácido silicotúngstico do reagente de Bertrand, e com reagentes iodados, como os de Mayer e Dragendorff.

5.2.1.3 - Pesquisa fitoquímica no extracto de etanol hidrolisado

Para efectuar a hidrólise, introduziu-se 25 mL do extracto alcoólico num balão de fundo redondo e adicionou-se 15 mL de ácido clorídrico a 10%, adaptou-se um refrigerante e levou-se à ebulição a refluxo durante 30 minutos. Destilou-se o álcool e transferiu-se a solução aquosa para uma ampola de decantação e agitou-se com éter (3 x 15 mL). Da separação resultaram duas fases, a fase etérea que foi seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada e a fase aquosa ácida.

Pesquisa de heterósidos

Na fase éterea fez-se a pesquisa de antracénósidos, flavonósidos, cumarinas e glucósidos esterólicos e triterpénicos recorrendo às reacções químicas características das geninas obtidas por hidrólise. Estas reacções de pesquisa foram efectuadas segundo o procedimento indicado para a identificação destes mesmos compostos no extracto de clorofórmio.

Pesquisa de geninas cardiotónicas

Evaporou-se 10 mL da fase éterea numa cápsula em b. a., dissolveu-se o resíduo em 1-2 mL de metanol, juntou-se 1-2 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio 1N e 3-4 gotas de solução a 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico. A presença destes heterósidos é indicada quando, por aquecimento, se desenvolve uma coloração vermelho-violácea, Reacção de Kedde.

5.2.1.4 - Pesquisa no extracto aquoso

Pesquisa de oses e polioses

Colocou-se num tubo de ensaio 2 mL do extracto aquoso e adicionou-se 2 gotas do reagente de Molisch (α -naftol a 5% em etanol). Após agitação, adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, com cuidado, deixando correr ao longo das paredes do tubo. O desenvolvimento de uma coloração púrpura indica a presença de oses e/ou polioses.

Pesquisa de glúcidos redutores

A pesquisa foi feita pelo reagente de Fehling seguindo o procedimento referido para o extracto de etanol.

Pesquisa de saponinas

Diluiu-se 1 mL de extracto aquoso com 49 mL de água. Transferiu-se 4 mL deste extracto diluído para um tubo de ensaio com um diâmetro de 1 cm e agitou-se durante 15 segundos. A formação de uma coluna de “mousse”, com altura mínima de 1 cm e persistente durante 15 minutos, indica a possível presença de saponinas.

Pesquisa de taninos

Do extracto aquoso retirou-se 1 mL para tubo de ensaio e efectuou-se a reacção de pesquisa seguindo o procedimento indicado anteriormente para o extracto de etanol não hidrolisado.

5.3 – Caracterização dos componentes químicos maioritários da folha

5.3.1 – Fraccionamento dos compostos por solventes de diferentes polaridades

Para uma melhor separação e estudo dos diferentes componentes procedeu-se ao esgotamento da droga por solventes de polaridade crescente, n-hexano, clorofórmio e etanol a 96°.

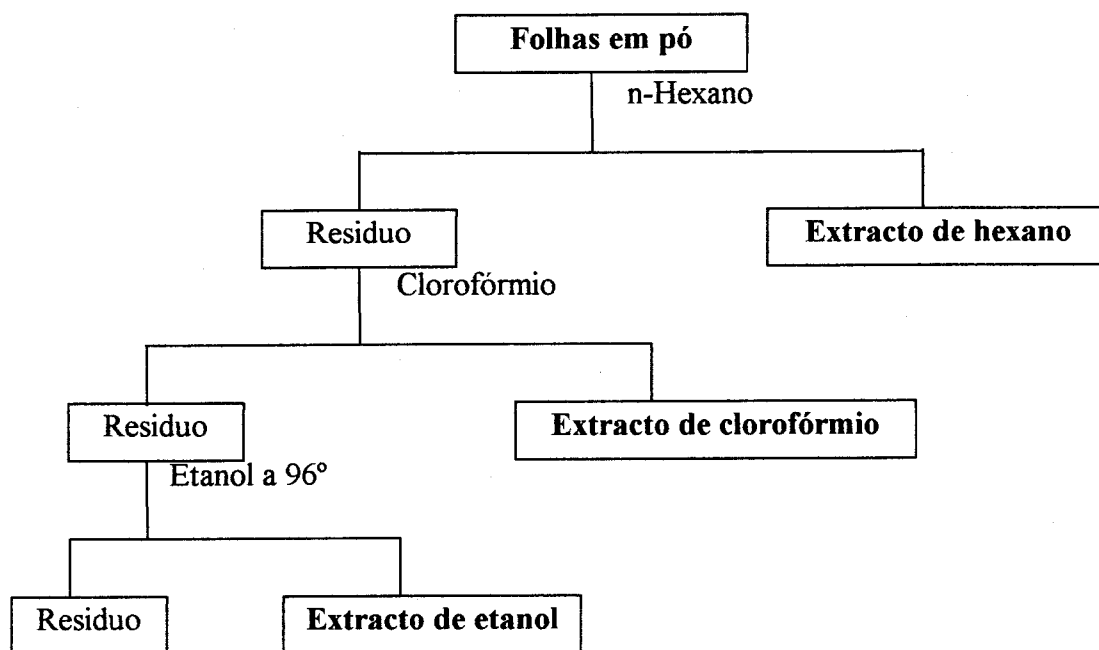
Preparação dos extractos

A droga reduzida a pó foi posta em contacto com n-hexano e submetida a agitação mecânica durante 5 dias à temperatura ambiente.

Findo este tempo, separou-se o extracto por decantação. O decantado foi filtrado e seco em rotavapor a pressão reduzida e a baixa temperatura e por fim pesado.

Utilizando este mesmo procedimento, o resíduo depois de seco, foi em seguida esgotado pelo clorofórmio e, finalmente, pelo etanol a 96°.

Esquema de fraccionamento das folhas do *Laurus azorica*



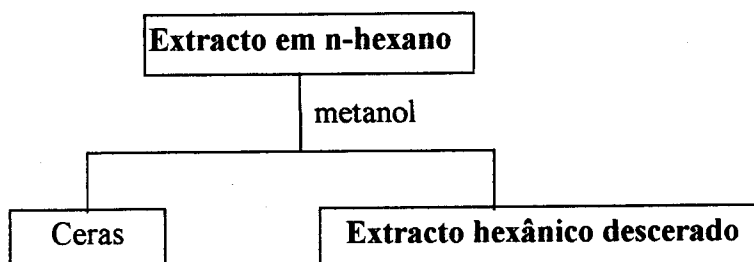
5.3.2 – Análise fitoquímica dos extractos

5.3.2.1 – Tratamento dos extractos

Extracto de hexano

O extracto de hexano foi filtrado, seco em evaporador rotativo a pressão reduzida e a baixa temperatura (40°-60° C) e, por fim, pesado.

O extracto descerado foi obtido segundo o esquema a seguir apresentado.



Dissolveu-se um pouco deste extracto seco em hexano e fez-se uma cromatografia em camada fina bidimensional utilizando sílica como fase estacionária e como eluentes hexano/acetato de etilo 9:1 e clorofórmio/metanol 95:5. Esta cromatografia permitiu-nos ter uma ideia grosseira do número de compostos presentes neste extracto e da sua polaridade relativa depois de revelados.

O extracto seco restante foi redissolvido a quente (40°C) na mínima quantidade de n-hexano, aplicado numa coluna de sílica e eluído com um gradiente de solventes, incluindo o hexano, benzeno, clorofórmio, acetato de etilo e metanol. Por cada grama de substância a cromatografar utilizaram-se entre 60 a 100 g de adsorvente.

Extracto de clorofórmio

O extracto de clorofórmio depois de seco em evaporador rotativo e a pressão reduzida foi pesado.

Com uma fracção deste extracto foi feita uma cromatografia em camada fina bidimensional em moldes idênticos aos utilizados para o extracto de hexano e com as mesmas finalidades.

O extracto foi redissolvido num pouco de clorofórmio e disperso numa pequena quantidade de sílica para cromatografia em coluna. Após evaporação do solvente, esta

sílica com o extracto adsorvido foi colocada numa coluna cromatográfica cuja matriz era também sílica. A proporção sílica/extracto foi idêntica à usada para o extracto hexânico.

Fez-se a eluição com solventes de polaridade crescente permitindo um melhor fraccionamento do extracto, começando pelo benzeno, clorofórmio, e, em seguida, um gradiente de clorofórmio/acetato de etilo, butanol, etanol e, finalmente, metanol.

Extracto de etanol

Em geral, no extracto de etanol encontram-se as substâncias mais polares e entre elas, os alcalóides, a maior parte sob a forma de sais, resultantes das combinações com os ácidos naturais da planta.

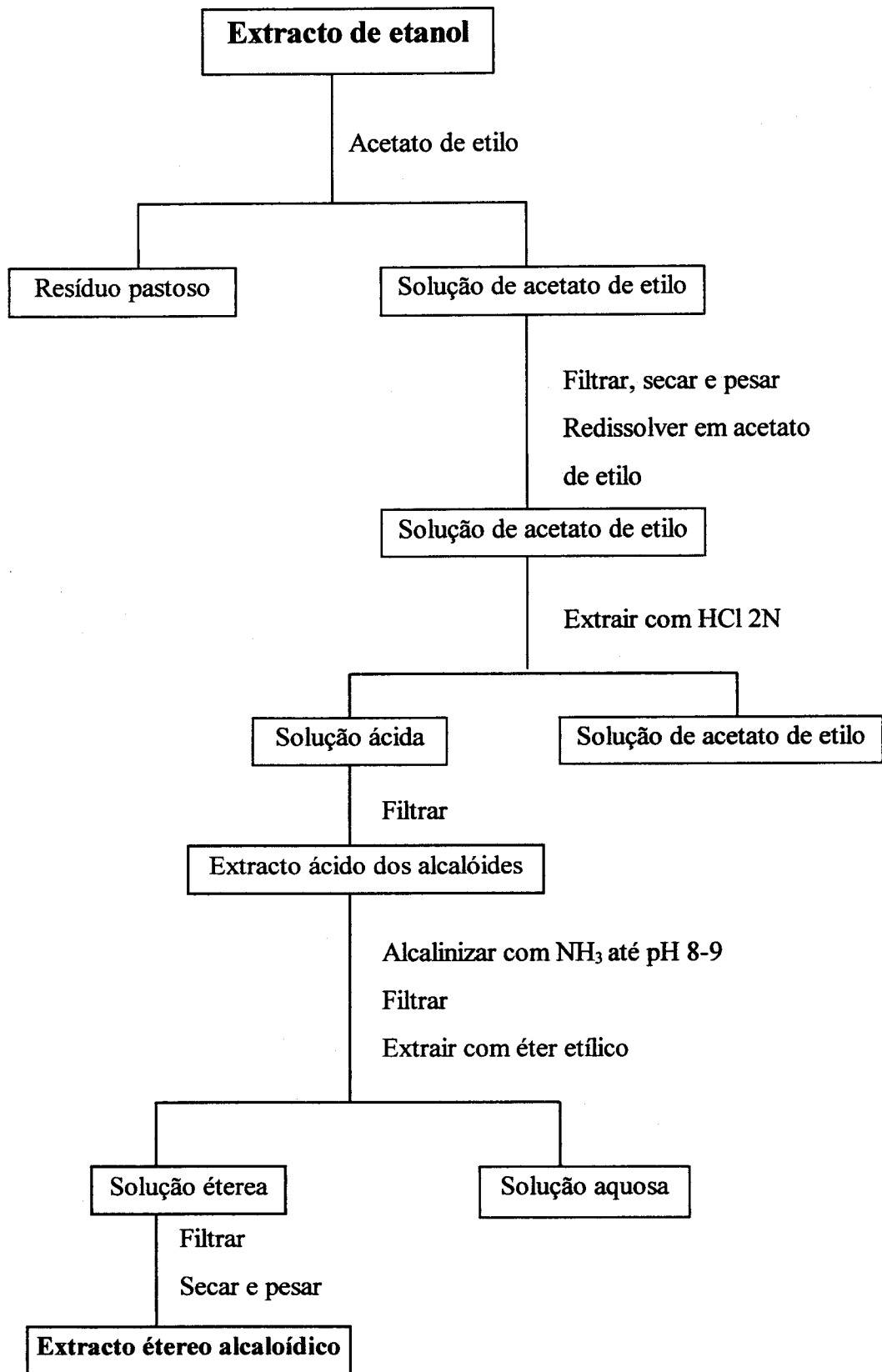
Para separar os alcalóides do extracto da planta em estudo, fez-se a extracção com acetato de etilo, o qual dissolve os sais de alcalóides e também os que se encontram na forma neutra. Evaporado o solvente e pesado o resíduo, foi redissolvido em acetato de etilo e tratado várias vezes com ácido clorídrico 2N, obtendo-se os alcalóides sob a forma de cloridrato. Seguiu-se uma alcalinização com amoníaco concentrado até pH 8-9 que decompôs os sais, libertando os alcalóides sob a forma básica, que foram em seguida extraídos pelo éter etílico obtendo-se uma solução etérea com os alcalóides totais.

Esta solução foi seca em evaporador rotativo a pressão reduzida e pesada.

O resíduo obtido foi aplicado numa coluna de cromatografia, sendo usada como fase estacionária o óxido de alumínio, mantendo-se a relação entre o adsorvente e a droga aplicada idêntica à usada na preparação das colunas dos extractos anteriores. A eluição efectuou-se com solventes de polaridade crescente: benzeno, um gradiente de benzeno/clorofórmio e clorofórmio/metanol e, finalmente, metanol.

Antes da aplicação na coluna fez-se também uma cromatografia em camada fina, mas usando como eluentes a mistura de benzeno/etanol 9:1.

Esquema de obtenção do extracto de alcalóides totais



5.3.3 – Isolamento de componentes maioritários dos extractos

O fraccionamento dos extractos foi feito por cromatografia sólido-líquido preparativa em coluna, o controlo das diferentes fracções obtidas por cromatografia em camada fina, mono e bidimensional, e a separação e isolamento dos componentes por cromatografia preparativa em camada fina

5.3.3.1 - Separação por cromatografia sólido-líquido

Cromatografia em coluna

As colunas foram preparadas utilizando por cada grama de substância a cromatografar 60 a 100 g de adsorvente.

Utilizaram-se diversos suportes adsorventes :

- sílica gel 60 G (Merck), granulometria 0,063 - 0,200 mm.
- mistura de sílica gel 60 G / AgNO₃ a 10% em peso.
- óxido de alumínio 90 (Merck) + 6% de água, granulometria 0,063 - 0,200 mm.

Usaram-se colunas de vidro, onde se colocou na extremidade inferior algodão embebido no 1º eluente a utilizar e encheram-se até cerca de ¼ da altura com o eluente. Com uma vareta calcou-se ligeiramente o algodão para eliminar bolhas de ar. À parte, preparou-se uma papa da matriz sólida no eluente e com ela enchemos lentamente as colunas até 2/3 da altura, mantendo a torneira aberta e o eluente a cair gota a gota, para melhor compactar a mistura.

Cromatografia em camada fina

Realizaram-se em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 (Merck), com 0,20 mm de espessura, activadas durante 1 hora a 120° C.

Usaram-se também placas preparadas no laboratório com uma mistura de sílica gel 60 G (Merck) e AgNO₃ a 10% em peso.

As placas de vidro, depois de desengorduradas com acetona, foram preparadas espalhando sobre elas uma massa de consistência apropriada com a espessura de 0,20 a 0,25 mm, obtida pela suspensão de 30 g de sílica gel 60G em 60 mL de água destilada, secas à temperatura ambiente e activadas, posteriormente, a 105°C durante 30 minutos.

Depois das amostras aplicadas (10 µL) e eluídas com os eluentes escolhidos, os cromatogramas foram secos em estufa de ar quente e observados sob radiação ultravioleta de 254 e 366 nm, após o que foram revelados com os reagentes adequados.

Cromatografia em camada fina preparativa

Utilizaram-se placas de sílica gel 60 (Merck), 20 x 20 cm com 0,063-0,200 mm de espessura e placas de 10 x 10 cm preparadas manualmente, como já foi indicado anteriormente.

Para a recuperação do composto isolado, a sílica foi raspada e extraída pelo eluente usado na eluição cromatográfica, mediante agitação mecânica as vezes necessárias até obter peso constante depois de seco.

5.3.4 - Identificação dos compostos isolados dos extractos

Os compostos isolados em quantidades que permitiram o seu estudo foram caracterizados mediante as suas propriedades físico-químicas e espectroscópicas.

Métodos e procedimentos

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Büchi 512, segundo o método preconizado pela Farmacopeia Portuguesa VI (1997) e por calorimetria de varrimento diferencial (DSC) num aparelho Shimadzu DSC-50. Nesta técnica termo-analítica, a amostra (6mg) foi acondicionada numa cápsula de alumínio e o varrimento efectuado sob atmosfera de azoto com uma velocidade de aquecimento de 20°C/min. no intervalo de temperatura de 20° a 200°C (Apêndice E).

Os índices de refacção foram determinados no refractómetro de Abbé, Bellingham Stanley, Limited.

Os poderes rotatórios foram medidos num polarímetro Bellingham Stanley, Limited, com uma célula de 10 cm, e em solução de clorofórmio.

As densidades foram determinadas pelo processo do picnómetro.

Os espectros de absorção no IV foram efectuados num espectrofotómetro Hitachi 260-10 e FT-IR, Perkin-Elmer, Paragon 1000 PC.

Utilizaram-se as amostras viscosas em filme capilar em janelas de NaCl e as amostras sólidas incluíram-se em pastilhas de KBr. No 1º caso, as amostras aplicaram-se directamente ou dissolvidas em clorofórmio, sendo este evaporado após a aplicação.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram realizados alguns num espectrómetro Varian, modelo Unity 300, utilizando 300 MHz para o RMN do ^1H e 75 MHz para o RMN do ^{13}C e outros num espectrómetro Brüker AC-250 P, utilizando 250MHz para RMN do ^1H e 62,9 MHz para RMN do ^{13}C . Para alguns compostos utilizou-se como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e como referência interna o clorofórmio residual (CHCl_3) a 7,26 ppm para o ^1H e 77,0 ppm para o ^{13}C e, para outros,

utilizou-se a acetona deuterada $(CD_3)_2CO$ e como referência interna a acetona residual a 2,05 ppm para o 1H e 30,8 ppm para o ^{13}C .

Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Os espectros de ressonância magnética nuclear bidimensionais foram obtidos nos "Servicios Generales" de RMN da Universidade de Salamanca pelo Professor Jesus M. Rodilla do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

Os espectros de massa obtiveram-se a partir da técnica de cromatografia gás-espectrometria de massa (GC/MS) num equipamento Fissons Sistem VG Trio 1000, sendo a fragmentação obtida por impacto electrónico, utilizando uma fonte de energia de ionização de 70 eV e um detector de massa do tipo quadrupolo. Utilizou-se uma coluna capilar DB-5 com as seguintes temperaturas de operação: 50°C (18 min.), 5°C/min. até 130°C, 130°C (16 min.), 5°C/min. até 210°C, 210°C (14min.).

5.4 – Caracterização dos componentes químicos maioritários do fruto

Com o objectivo de facilitar o estudo subsequente dos vários grupos de componentes, os frutos reduzidos a pó foram esgotados por solventes com polaridades crescentes seguindo o procedimento utilizado para o estudo das folhas.

5.4.1 – Análise cromatográfica dos extractos do fruto

Com uma pequena fracção do extracto de hexano e de clorofórmio fizeram-se cromatografias em camada fina bidimensionais utilizando placas de folha de alumínio

revestidas com sílica e como eluentes misturas de hexano/acetato de etilo 9:1 e clorofórmio/metanol 95:5.

O extracto de etanol sofreu o tratamento referido no ponto 5.3.2.1 para a obtenção do extracto de alcalóides totais. Com um pouco da solução éterea alcaloídica fizémos uma cromatografia em camada fina também em placas revestidas a sílica, usando como eluente uma mistura de benzeno/etanol 9:1.

5.4.2 – Análise cromatográfica do óleo do fruto obtido por expressão

O óleo do fruto estudado foi adquirido numa farmácia da Ilha da Madeira.

Diluímos uma fracção de óleo do fruto em clorofórmio, aplicámos alguns microlitros em duas placas de cromatografia revestidas com sílica e fizémos cromatografia bidimensional seguindo o procedimento referido no ponto anterior para os extractos de hexano e clorofórmio. Uma das placas foi revelada com solução etanólica de ácido sulfúrico a 4% e a outra com o reagente de Dragendorff. Os cromatogramas foram comparados com os cromatogramas dos extractos referidos em 5.4.1.

5.5 – Estudo da composição química do óleo essencial

5.5.1 - Obtenção do óleo essencial: folha e fruto

Comprovada a presença do óleo essencial nas folhas, procedeu-se à sua extracção a partir de 2 lotes de folhas, um colhido na Primavera e outro no Outono.

A extracção foi feita por hidrodestilação. Para isso, as folhas foram cortadas grosseiramente e submetidas a extracção num aparelho tipo Clevenger. Do destilado, separou-se a fase oleosa constituída pelo óleo essencial.

Paralelamente à extracção do óleo essencial da folha, fez-se também a extracção do óleo essencial do fruto em verde e em maduro. Neste caso, os frutos depois de golpeados sofreram o mesmo processo aplicado às folhas.

5.5.2 – Estudo cromatográfico do óleo essencial

A cromatografia gás-líquido de alta resolução com colunas capilares é um método separativo de elevada resolução, reprodutibilidade e alta sensibilidade, características que fazem com que tenha larga utilização em química orgânica analítica.

A análise dos óleos voláteis foi feita por cromatografia gás-líquido (GC/FID) e por cromatografia gás-líquido/espectrometria de massa (GC/MS). Utilizaram-se colunas capilares de sílica fundida com fases estacionárias de diferente polaridade, sendo na coluna polar de polietilenoglicol e na coluna apolar de polidimetilsiloxano.

A identificação dos componentes fez-se por comparação dos respectivos tempos de retenção com os das substâncias padrão e por enriquecimento de picos. Esta informação foi complementada pela interpolação linear dos respectivos índices de retenção na escala de Índices de Kovats e pela comparação dos respectivos espectros de massa com os referidos na literatura e bases de dados computadorizadas.

A quantificação dos componentes foi feita com base nas áreas dos picos respectivos obtidos nas duas colunas.

5.5.2.1 – Estudo por GC/FID

Os cromatogramas foram obtidos num cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II, equipado com um detector de ionização de chama (FID). Utilizaram-se duas colunas capilares de sílica fundida da Supelco: Supelcowax[™]10 com revestimento polar de polietilenoglicol e SE 30 com revestimento apolar de polidimetilsiloxano, ambas com 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

Condições analíticas

Temperatura da coluna: 70°C (3 min.) /70°C - 220°C/3°C/min. (10 min. a 220°C)

Temperatura no injector: 195°C

Temperatura no detector: 210°C

Volume injectado: 0.18µL

Gás de arrastamento: Hélio

Repartição de fluxo: 1/50.

5.5.2.2 - Estudo por GC/MS

A cromatografia gás-líquido, por si só, não consegue identificar os componentes de uma mistura, limita-se a separá-los. Já a espectrometria de massa permite a identificação da molécula de cada componente duma mistura, pela reconstrução da mesma a partir dos fragmentos iónicos originados, quando essa molécula sofre absorção de energia e se fragmenta para adquirir de novo a estabilidade. A fragmentação pode ser provocada por impacto de electrões ou ionização química.

Cada fragmento iónico possui uma relação m/z (massa/carga) bem definida e cada molécula origina um número de iões com uma determinada intensidade e uma relação de

m/z característica, o que faz com que o espectro de massa de uma molécula permita a sua identificação.

Este facto levou a que a associação da cromatografia gás-líquido, de elevado poder separativo, com a espectrometria de massa, com elevado poder identificativo, se tenha tornado numa das técnicas hífenadas de maior valor analítico.

As análises dos óleos essenciais foram efectuadas num sistema constituído pela associação de um cromatógrafo de gás Hewlett Packard 6890 e um espectrómetro de massa Hewlett Packard 5973.

O cromatógrafo equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida HP-1, fase estacionária de metilsiloxano, 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura de filme.

O espectrómetro de massa equipado com um detector de massas do tipo quadrupolo.

Condições analíticas

Temperatura da coluna: 70°C – 220°C/3°C/min. (15 min. a 220°C)

Temperatura no injector: 250°C

Volume injectado: 0.2µL (óleo diluído a 1/8 em N-pentano)

Gás de arrastamento: Hélio

Repartição de fluxo: 1/40

Energia de ionização: 70 eV

5.6 – Estudos da actividade biológica do *Laurus azorica* em ratos

Wistar

5.6.1 - Triagem hipocrática da actividade farmacológica do óleo essencial da folha e do óleo artesanal do fruto

A triagem hipocrática é um dos modelos de triagem farmacológica aplicada a substâncias desconhecidas e suspeitas de possuírem actividade biológica. Este modelo de triagem foi proposto por Malone, M. em 1973 e tem sido utilizado com resultados satisfatórios na pesquisa de novos fármacos.

Com este estudo preliminar, pretendeu-se estabelecer as possíveis actividades farmacológicas dos óleos em estudo, tendo em vista orientar os estudos farmacológicos e toxicológicos que subsequentemente se viessem a justificar.

Neste estudo utilizaram-se ratos machos Wistar, com cerca de 500 g de peso, do biotério do laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora.

Os animais foram mantidos em jejum 16 horas antes do início dos ensaios e com água “*ad libitum*”, numa sala com a temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humidade a $55 \pm 5\%$ e sob um ciclo diário de 12 horas de luz/12 horas de escuridão.

Foram constituídas duas séries de 4 grupos de 4 animais. Em cada uma das séries um dos grupos foi escolhido como testemunha e os outros três foram sujeitos à administração do óleo essencial da folha ou do óleo artesanal do fruto em diferentes concentrações.

A administração das diferentes fracções fez-se por via intraperitoneal nas doses de 0,3 mL/kg, 0,6 mL/kg e 1 mL/kg. Aos grupos testemunha foi apenas administrado o veículo, óleo de amendoim. O volume administrado foi 0,5 mL.

As leituras foram realizadas a 1ª antes da administração (tempo zero) e as seguintes aos 10, 20, 30, 40 e 60 minutos e às 2, 4, 6 e 24 horas após a administração.

Os animais de cada uma das séries foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação 7 dias após o início dos ensaios para necropsia.

Os parâmetros avaliados nesta triagem correspondem a acções que podem ser observadas facilmente e que se distribuem pelos seguintes grupos:

- Acção sobre o Sistema Nervoso Central
- Acção sobre os olhos
- Acção sobre as orelhas e mucosas
- Acções de carácter geral
- Acções de carácter subjectivo
- Acção sobre a glicémia
- Acção sobre a temperatura corporal

No quadro I do apêndice F encontram-se discriminados estes parâmetros.

5.6.2 – Actividade analgésica do óleo essencial da folha

A determinação da actividade analgésica fez-se segundo o método de Koster e Anderson (1959).

Utilizaram-se murganhos fêmeas Charles River, com cerca de 25 g, do biotério do laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora.

Os animais foram mantidos em jejum 16 horas antes do início dos ensaios e com água “*ad libitum*”, numa sala com a temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humidade a $55 \pm 5\%$ e sob um ciclo diário de 12 horas de luz/12 horas de escuridão.

Formaram-se 4 grupos de 6 animais cada. Um grupo foi utilizado como testemunha, ao qual foi administrado o veículo – óleo de amendoim. Aos outros grupos administrou-se intraperitonealmente o óleo essencial nas doses de 0,3 mL/kg, 0,6mL/kg e 1mL/kg.

Passados 30 minutos após terem recebido a droga, os animais receberam por via intraperitoneal 0,25 mL de uma solução de ácido acético a 3% (v/v) e 15 minutos após a administração, iniciou-se a contagem das contorsões, durante 5 minutos, em cada grupo de animais.

5.6.3 – Efeito do óleo essencial da folha e do óleo artesanal do fruto sobre actividades enzimáticas

Generalidades

Os humanos e os animais em geral são constantemente confrontados com a exposição a produtos estranhos ao organismo. Esses produtos, denominados xenobióticos, quer de origem natural ou sintetizados provenientes do ambiente a que estamos expostos ou da administração deliberada, como é o caso dos medicamentos, são absorvidos através da pele, pulmões ou pelo sistema gastrointestinal.

A sua acumulação no organismo pode traduzir-se em fenómenos de toxicidade, pelo que se torna necessário promover a sua eliminação. Esta é conseguida naturalmente através de processos de biotransformação dos tóxicos em produtos mais facilmente

excretáveis em que entram sistemas diferentes da fase I, em particular o citocromo P450 e da fase II como o glutathione *S*-transferase.

A metabolização de endobióticos e xenobióticos processa-se em vários órgãos, sendo no fígado onde ocorre em maior extensão, pelo que é importante manter a sua integridade nomeadamente no que diz respeito aos componentes enzimáticos. Por esta razão, julgámos pertinente estudar a acção da droga sobre algumas destas actividades enzimáticas.

5.6.3.1 - Efeito sobre actividades enzimáticas do soro em ratos Wistar

Determinou-se o efeito das drogas em estudo nas actividades enzimáticas alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina do soro, uma vez que os valores destas actividades são indicadores da integridade do tecido hepático.

As experiências foram realizadas em ratos Wistar machos, com peso médio de 360 g, provenientes do laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora.

Constituíram-se 5 grupos de 4 animais, sendo um o grupo de controlo ao qual foi administrado o veículo, o óleo de amendoim, os restantes grupos receberam respectivamente 0,02 e 0,1 mL/kg/dia de óleo do fruto e de óleo essencial da folha. O volume administrado foi de 0,5 mL.

O tratamento foi feito diariamente durante 4 dias e no 5º dia, foi recolhido o sangue por punção cardíaca.

O sangue recolhido foi centrifugado a 3000 g durante 20 minutos a 4°C e retirado o soro, no qual foram determinadas as actividades alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina.

Para estas determinações utilizaram-se “kits” comercializados pela Clonital e seguiram-se os protocolos analíticos que os acompanhavam.

5.6.3.2 – Efeito sobre actividades enzimáticas do tecido hepático

Este estudo incidiu sobre o conteúdo de duas fracções subcelulares do fígado, a fracção microsomal e o citosol. Assim, na fracção microsomal determinámos a concentração de proteínas, citocromos P450 e citocromos b5, e as actividades enzimáticas NADPH(P450) redutase, etoxicumarina *O*-desetilase, etoxirresorufina *O*-desetilase e etilmorfina *N*-desmetilase. Na fracção citosólica determinou-se a concentração de proteínas e as actividades enzimáticas glutatióno *S*-transferase e glutatióno redutase.

Estas actividades enzimáticas são responsáveis em grande parte pelos processos de biotransformação de xenobióticos e produtos naturais, incluindo fármacos, e os seus valores fornecem indicações sobre a influência da droga no metabolismo hepático.

Utilizaram-se ratos machos Wistar, do laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora, com o peso médio de 360 g.

A sala onde se encontravam os animais foi mantida nas mesmas condições de temperatura, humidade e ciclo de luz já referidas anteriormente.

Constituíram-se 5 grupos de 4 animais, tendo o grupo de controlo recebido o veículo, o óleo de amendoim, e os restantes grupos receberam respectivamente 0,02 e

0,1 mL/kg/dia de óleo do fruto ou de óleo essencial da folha. O tratamento foi feito diariamente durante 4 dias.

Ao 5º dia após a pesagem dos animais, fez-se a colheita de sangue por punção cardíaca, abriu-se a cavidade abdominal e retirou-se o fígado que foi colocado de imediato em meio de homogeneização, KCl 0,154 M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 a 4°C.

Preparam-se homogeneizados do tecido hepático a partir de amostras de fígado de cada rato com um peso aproximado de 3,0 g.

As amostras, colocadas no copo do homogeneizador mantido a 4°C, foram homogeneizadas com 9,0 ml de meio de homogeneização KCl 0,154 M em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 num homogeneizador tipo Potter, com 10 impulsos a 6000 r.p.m.

Os homogeneizados foram coados para tubos de centrifuga através de um passador de rede de plástico com uma malha de 1 mm e mantidos a 4°C.

Preparação da fracção microssomal e do citosol

A fracção microssomal e o citosol foram preparados de acordo com o procedimento geral de Lake (1987).

Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g durante 20 minutos, a 2-4°C. Os sedimentos obtidos foram desprezados e os sobrenadantes pós-nucleares foram centrifugados a 10000 g, durante 30 minutos, a 2-4°C. Os sobrenadantes pós-mitocondriais obtidos foram transferidos para tubos de ultra-centrifuga, previamente arrefecidos, e centrifugados a 105000 g, durante 60 minutos, a 2-4°C. A fracção citosólica sobrenadante foi recolhida para “eppendorfs” e guardada a -20°C para utilização posterior. O sedimento microssomal foi ressuspenso num volume de meio de homogeneização idêntico ao registado antes da última fase de centrifugação e

novamente centrifugado a 105000 g, durante 60 minutos a 2-4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em igual volume de meio de homogeneização.

Para a determinação da concentração de proteína total, utilizámos o método de Lowry *et al.* (1951), que se baseou na reacção catalisada pelo cobre, em meio alcalino, entre o reagente de Folin Ciocalteu (ácido fosfomolibdicofosfotúngstico) e os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas, levando à formação de um complexo de heteromolibdénio de cor azul intensa.

Preparámos uma curva de calibração para o intervalo de concentrações 50-200 µg/mL, a partir de uma solução-mãe de albumina do soro de bovino, BSA (500 µg/mL).

Tomámos uma alíquota de 0,2 mL da fracção microssomal ou do citosol que foi diluída com NaOH 0,5 M para um volume total de 1,0 mL.

Adicionámos a 1,0 mL de cada solução-padrão ou das amostras diluídas, 5,0 mL de reagente de Lowry, constituído por sulfato de cobre penta-hidratado 0,1% (p/v), tartarato de sódio e potássio 0,2% (p/v) em carbonato de sódio a 2% (p/v). Após agitação no vortex, aguardámos 10 min. e adicionámos 0,5 mL de solução de ácido fosfomolibdicofosfotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu) diluído ½ com água bidestilada e voltámos a agitar. Aguardámos 30 min. e, após nova agitação no vortex, lemos a absorvância a 720 nm contra um branco preparado só com os reagentes.

Construímos a curva de calibração com os valores obtidos (Apêndice F) e calculámos, por interpolação gráfica a concentração de proteínas das amostras.

A concentração do citocromo b5 na fracção microssomal foi calculada a partir do espectro de absorção molecular da forma reduzida contra um branco que continha a forma oxidada, seguindo o procedimento indicado por Lake (1987).

Da fracção microssomal do fígado retirámos 0,5 mL e diluímos com 4,0 mL de solução tampão de fosfatos 0,2 M, pH 7,4. Dividimos a solução obtida por duas células e, num espectrofotómetro de duplo feixe, traçámos um espectro de absorção entre 400 e 500 nm, devendo obter-se uma linha de base paralela ao eixo das abcissas, isto é, sem se registar absorvância apreciável entre 450 e 490 nm, zona de comprimento de onda onde se fará a leitura da redução do citocromo b5 após adição do NADH.

Mantendo as células a 37° C, adicionámos 0,025 mL de NADH a 2% em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 à célula de leitura, agitámos e aguardámos 2 min. Traçámos novamente um espectro de absorção entre 400 e 500 nm e registámos a diferença de absorvância entre o valor máximo a 424 nm e o mínimo a 409 nm, a qual foi utilizada no cálculo da concentração de citocromo b5, considerando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o citocromo b5 na forma reduzida igual a $185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Para determinar o conteúdo do citocromo P450, às células utilizadas na determinação do citocromo b5, adicionámos alguns cristais de ditionito de sódio e traçámos o espectro de absorção entre 400 e 500 nm, obtendo uma linha de base paralela ao eixo das abcissas.

Fizémos borbulhar monóxido de carbono na célula de leitura durante 1 min. e traçámos novo espectro de absorção entre os mesmos valores de comprimento de onda. Registámos a diferença de absorvância entre 450 e 490 nm. A partir deste valor e considerando o valor de $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ como coeficiente de absorvidade molar da forma reduzida do citocromo P450, calculámos a concentração total deste.

A actividade NADPH (P450) reductase foi determinada utilizando o método proposto por Peterson *et al.* (1978) e Lake (1987), que emprega o citocromo c como

aceitador artificial de electrões, uma vez que a sua forma reduzida apresenta um máximo de absorção a 550 nm.

Tomámos alíquotas de 0,1 mL de fracção microsomal com uma concentração aproximada de proteínas de 10 mg/mL e adicionámos ao meio de incubação constituído por citocromo c 0,5 mM e cianeto de potássio 1,2 mM diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6. Incubámos a mistura a 37° C. Após 3 min., iniciámos a reacção com a adição de solução de NADPH 0,4 mM em tampão fosfato.

Registámos a variação de absorvância durante 120 seg. a 550 nm, lida contra um branco de composição semelhante à da célula de leitura, mas onde a solução de NADPH foi substituída por igual volume de tampão fosfato.

Calculados os valores dos coeficientes angulares das rectas obtidas, determinámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar $21\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Lake, 1987) para a forma ferrosa do citocromo c.

Determinação de actividades enzimáticas do sistema Cit P450

A determinação da actividade enzimática da etilmorfina *N*-desmetilase foi feita por espectrofotometria do visível segundo o protocolo de Nash (1953), modificado por Lake (1987). Baseou-se no facto de a *N*-desmetilação da etilmorfina em presença de citocromo P450 originar a formação de formaldeído, que fica retido no meio de incubação pela semicarbazida. Este, ao reagir com o reagente de Nash, forma um cromóforo que absorve a 412 nm.

Tomámos alíquotas de 0,1 mL de fracção microsomal com uma concentração aproximada de proteínas de 10 mg/mL e colocámos num meio de reacção composto por semicarbazida 5mM, NADP^+ 0,5 mM, ácido D,L-isocítrico 3,75 mM, sulfato de magnésio hepta-hidratado 5 mM e isocitrato desidrogenase 1U, diluídos em tampão

Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 . Incubámos a 37° C em banho de água, com agitação a 100 ciclos. min⁻¹, durante 5 min.

Iniciámos a reacção com a adição da solução de hidrocloreto de etilmorfina como substrato e deixámos decorrer a reacção durante 10 min. nas mesmas condições de agitação e temperatura. Ao fim deste tempo, parámos a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo.

Adicionámos 1,0 mL de solução de sulfato de zinco a 5% e 1,0 ml de solução saturada de hidróxido de bário, agitámos no misturador e centrifugámos os tubos a 2000 g, durante 15 min., à temperatura de 2-4° C. Após a sedimentação das proteínas, recolhemos 2,0 mL dos sobrenadantes aos quais adicionámos o reagente de Nash e, após agitação, colocámos os tubos em banho de água a 37° C durante 60 min. Arrefecemos os tubos à temperatura ambiente e lemos a absorvância a 412 nm. Preparámos, em simultâneo, para cada amostra, um branco idêntico ao meio anterior, mas só adicionámos a solução de hidrocloreto de etilmorfina após os 10 min. da reacção. Preparámos também, para cada amostra, um padrão de referência com composição e ordem de adição idênticos às dos brancos, mas em que, após a adição do substrato, também adicionámos 0,3 mL de formaldeído 1,5 mM.

Lemos os valores de absorvância contra os respectivos valores dos brancos.

A actividade enzimática foi determinada por interpolação do valor de absorvância registado para as amostras com o valor de absorvância registado para o respectivo padrão.

O reagente de Nash foi preparado dissolvendo 0,4 mL de acetilacetona bidestilada em 100 mL de solução de acetato de amónio 0,308 g/L em ácido acético a 0,6%.

A calibração do padrão de formaldeído foi efectuada fazendo reagir 0,2 mL da solução padrão de formaldeído diluída para 2,0 ml de água bidestilada com 2,0 mL de reagente de Nash, durante 60 min., a 37° C. O valor do coeficiente de absorvidade molar de 8 mM⁻¹.cm⁻¹ (Lake, 1987) foi o utilizado para o cálculo da concentração do formaldeído dissolvido na solução.

A actividade enzimática 7-etoxicumarina O-desetilase foi determinada por espectrofluorimetria de acordo com o protocolo de Lake (1987), tendo por base que a O-desetilação da 7-etoxicumarina leva à formação da 7-hidroxycumarina, composto capaz de emitir fluorescência a 452 nm quando excitado por radiação electromagnética a 380 nm.

Retirámos alíquotas de 0,05 mL da fracção microssomal com uma concentração aproximada de proteínas de 10 mg/ml e adicionámos ao meio de reacção composto por NADP⁺ 0,75 mM, ácido D,L-isocítrico 7,5 mM, sulfato de magnésio hepta-hidratado 5 mM e isocitrato desidrogenase 1U, diluídos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 . Após mistura no agitador, os tubos foram incubados num banho de água a 37° C e submetidos a uma agitação de 100 ciclos.min⁻¹, durante 5 min.

Iniciámos a reacção com a adição do substrato, a 7-etoxicumarina, e deixámos decorrer a reacção durante 10 min., nas mesmas condições de agitação e temperatura.

Parámos a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo e, em seguida, adicionámos a cada tubo 1,0 mL de sulfato de zinco a 5% e 1,0 mL de solução saturada de hidróxido de bário. Agitámos os tubos no misturador e centrifugámos a 2000 g durante 15 min., à temperatura de 2-4° C. Recolhemos 1,0 mL dos sobrenadantes aos quais adicionámos 2,0 mL de tampão NaOH-glicina 0,5 M, pH10,5.

Agitámos de novo os tubos e lemos a intensidade da fluorescência para o comprimento de onda de emissão de 450 nm e de excitação de 380 nm e com a abertura de fenda de 1 e 3 mm, respectivamente.

Preparámos em simultâneo para cada amostra, ensaios em branco e ensaios com o padrão de referência. Nos ensaios em branco, a solução de 7-etoxicumarina só foi adicionada ao meio de reacção após os 10 min de reacção. Nos ensaios com o padrão de referência, mantivemos a composição e a ordem de adição dos ensaios em branco, mas tendo adicionado a 7-hidroxycumarina após a adição do substrato.

Os respectivos valores de intensidade de fluorescência foram lidos nos mesmos comprimentos de onda das amostras.

A actividade enzimática foi determinada por interpolação do valor da fluorescência registado para as amostras com o valor da fluorescência registado para o respectivo padrão.

A determinação da actividade enzimática da etoxirresorufina *O*-desetilase foi feita seguindo o protocolo desenvolvido por Lake (1987) e baseado no método proposto por Burke e Mayer (1974). Este método fundamentou-se no facto de a *O*-desetilação da 7-etoxirresorufina levar à formação da resorufina, composto capaz de emitir fluorescência a 582 nm quando excitado por radiação electromagnética a 535 nm.

Retirámos alíquotas de 0,05 mL da fracção microssomal com uma concentração aproximada de proteínas de 10 mg/mL e adicionámos a um meio de reacção composto por NADP⁺ 0,5 mM, ácido D,L-isocítrico 7,5 mM, sulfato de magnésio hepta-hidratado 5 mM e isocitrato desidrogenase 1U, diluídos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,4. Após mistura do conteúdo dos tubos no agitador, estes foram incubados num banho de água tapado a 37° C e submetidos a uma agitação de 100 ciclos.min⁻¹ durante 5 min.

Iniciámos a reacção com a adição do substracto, a 7-etoxirresorufina 0,25 μ M, e deixámos decorrer durante 10 min. nas mesmas condições de agitação e temperatura.

Parámos a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo e, em seguida, adicionámos a cada tubo 1,0 mL de sulfato de zinco a 5% e 1,0 mL de solução saturada de hidróxido de bário. Agitámos os tubos no misturador e centrifugámos a 2000 g durante 15 min., à temperatura de 2-4° C. Recolhemos 1,0 mL dos sobrenadantes aos quais adicionámos 2,0 ml de tampão NaOH-glicina 0,5 M, pH 8,5.

Agitámos de novo os tubos e lemos a fluorescência aos comprimentos de onda de excitação 535 nm e de emissão de 582 nm, com uma abertura de fenda de 1 e 3 mm respectivamente.

Preparámos, em simultâneo para cada amostra, ensaios em branco e ensaios com o padrão de referência. Nos ensaios em branco, a solução de 7-etoxirresorufina só foi adicionada ao meio de reacção após os 10 min de reacção. Nos ensaios com o padrão de referência, mantivemos a composição e a ordem de adição dos ensaios em branco, mas tendo adicionado 0,2 mL de resorufina 5 nmol/mL após a adição do substrato.

Os respectivos valores de intensidade de fluorescência foram lidos nos mesmos comprimentos de onda de excitação e de emissão das amostras.

A actividade enzimática foi determinada por interpolação do valor da fluorescência registado para as amostras com o valor da fluorescência registado para o respectivo padrão.

A solução extemporânea de etoxirresorufina foi preparada dissolvendo, aproximadamente, 2 mg de etoxirresorufina em 2,0 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, em banho de ultra-sons, durante 15 min.

Traçámos um espectro de absorção dessa solução entre 400 e 800 nm num espectrofotómetro de feixe duplo e registámos a diferença de absorvância entre o

máximo registado a 482 nm e a linha de base. Calculámos a concentração da solução utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para a 7-etoxirresorufina de $22,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A solução foi diluída para uma concentração de 5,0 nmol/mL com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,4 para ser utilizada no ensaio enzimático. A solução foi protegida da luz envolvendo o frasco com papel de alumínio.

A solução extemporânea de resorufina, utilizada como solução padrão, foi preparada dissolvendo, aproximadamente, 2 mg de resorufina na mínima quantidade de etanol, sendo o volume final de 2,0 mL completado com solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,4. Traçámos um espectro de absorção dessa solução entre 500 e 800 nm num espectrofotómetro de feixe duplo e registámos a diferença de absorvância entre o máximo a 572 nm e a linha de base. Calculámos a concentração da solução utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para a resorufina de $40,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A solução foi diluída para uma concentração de 5,0 nmol/mL com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,4 para ser utilizada no ensaio enzimático. A solução foi protegida da luz envolvendo o frasco com papel de alumínio.

Determinação da actividade da glutathione S-transferase

A actividade catalítica do enzima glutathione S-transferase foi determinada no citosol, sendo a determinação feita por espectrofotometria.

O método (Habig *et al.*, 1974) baseou-se na reacção entre o substrato (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e o glutathione na forma reduzida (GSH) que conduz à formação de um conjugado, o 2,4-dinitrofenil S-glutathione, cromóforo que absorve a 340 nm.

Incubaram-se alíquotas de 0,1 mL de citosol com uma concentração aproximada de proteínas de 0,5 mg/mL em células de absorção do espectrofotómetro que continham um meio de reacção composto por glutathione na forma reduzida (GSH) 1mM e 1-cloro-

2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mM, dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 num volume total de 3,0 mL.

Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional sem a presença do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno no compartimento das células do espectrofotómetro, com a temperatura controlada a 37° C e sob agitação constante, durante 5 min. Iniciou-se a reacção com a adição de 0,1 mL de solução etanólica do substrato e registou-se a variação de absorvância a 340 nm, durante 120 seg., nas mesmas condições de agitação e temperatura.

As leituras foram efectuadas contra um branco previamente preparada em que se substituiu o substrato por igual volume de solução tampão.

Calculámos a actividade enzimática a partir do valor do coeficiente angular das rectas obtidas utilizando como valor do coeficiente de absorvidade molar $9,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o conjugado 2,4-dinitrofenil *S*-glutathione (Weber e Waxman, 1993, Kore *et al.*, 1993).

Determinação da actividade da glutathione redutase

A actividade catalítica da glutathione redutase foi determinada no citosol, de acordo com o método proposto por Goldberg e Sponer (1987).

A determinação da actividade deste enzima baseou-se na acção catalítica desempenhada na redução da forma dissulfureto do glutathione (GSSG), utilizando o NADPH como cofactor. Determinou-se por espectrofotometria, acompanhando-se o decréscimo de absorvância, a 340 nm, devido à oxidação do NADPH.

Incubaram-se alíquotas de 0,1 mL do citosol, com uma concentração aproximada de proteínas de 0,5 mg/mL, em células de absorção do espectrofotómetro que continham um meio de reacção composto por glutathione na forma oxidada (GSSG)

2,2 mM, EDTA 0,5 mM, NADPH 0,17 mM dissolvidos em 3,0 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2.

Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional, sem a presença do NADPH, no compartimento das células do espectrofotómetro, durante 5 min., com a temperatura controlada a 37° C e sob agitação constante. A reacção iniciou-se com a adição de 0,050 mL de NADPH e registou-se a variação de absorvância durante 120 seg., nas mesmas condições de agitação e temperatura. As leituras foram efectuadas contra um branco no qual se substituiu a solução de NADPH por igual volume de solução tampão.

A actividade enzimática determinou-se a partir do valor do coeficiente angular das rectas obtidas e utilizando como valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH $6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.6.4 – Estudo comparativo entre a actividade hepática do óleo essencial da folha e a actividade de uma droga hepatoprotectora

Face aos efeitos do óleo essencial da folha observados nos ensaios referidos nos pontos 5.6.3.1 e 5.6.3.2 sobre as actividades enzimáticas do soro e do tecido hepático, e dado que é possível obter este o óleo em maior quantidade e em qualquer época do ano, o que não acontece com o óleo do fruto, e ainda, porque o óleo do fruto obtido por expressão a frio é rico em óleo essencial cujos componentes são na maioria comuns aos do óleo essencial da folha, decidimos proceder ao estudo comparativo entre a actividade hepática do óleo essencial da folha e a actividade de uma droga hepatoprotectora, tendo por fim avaliar a possibilidade de uma actividade deste tipo por parte deste óleo essencial.

Para este estudo, utilizaram-se ratos fêmeas Wistar com peso médio de 200 g, da mesma origem dos utilizados nos ensaios anteriores.

O ensaio decorreu durante 7 dias e a água foi fornecida *ad libitum*. Organizaram-se 6 grupos de 4 animais, sendo um o grupo de controlo, ao qual foi administrado por via intraperitoneal, durante os dias de ensaio, o óleo de amendoim. Dos outros grupos, nos primeiros quatro dias um grupo recebeu o veículo, outro a droga hepatoprotectora – a silimarina - na dose de 35 mg/kg e os restantes grupos receberam óleo essencial nas doses de 0,1, 0,3 e 0,9 mL/kg respectivamente. Nos 5º e 6º dias foi adicionado aos tratamentos dos 5 grupos, 0,4 mL/kg de tóxico – o tetracloreto de carbono. O volume administrado foi de 0,5 mL e o veículo utilizado o óleo de amendoim.

No 7º dia de ensaio os animais foram sacrificados, tendo sido privados de comida 12 h antes do sacrifício. Antes deste, fez-se a colheita de sangue. Utilizou-se o fígado para a preparação da fracção microssomal e do citosol, de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

As actividades enzimáticas estudadas no soro e no tecido hepático foram as referidas no estudo da actividade biológica do óleo essencial no ponto 5.6.3.1 e 5.6.3.2.

5.6.5 - Análise estatística

Na determinação da actividade biológica do *Laurus azorica* testámos a existência de diferenças com significado estatístico na interacção observada entre os óleos administrados e alguns enzimas dos sistemas metabólicos P450 e glutatióno hepáticos e enzimas marcadores do metabolismo hepático presentes no soro de ratos Wistar.

Para esse efeito constituímos grupos de ratos o mais semelhantes possíveis em termos de peso, idade ou doses administradas, tendo comparado entre si os resultados de variáveis por análise de variância simples (ANOVA I).

Procedemos ao cálculo da variância total (S^2) para todos os grupos em estudo, da variância entre grupos e da variância no interior dos grupos para termos uma noção acerca da variação individual e do erro experimental.

Aceitamos diferenças significativas entre os grupos comparados, negando a hipótese nula $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ nas situações em que o valor do F-estatístico, o quociente da variância entre os grupos pela variância no interior dos grupos, excedeu o valor tabelado de F, para os respectivos graus de liberdade, com o nível de significância de 99 e/ou 95% (Apêndice G).

Procedemos à discriminação dos grupos significativamente diferentes pelo teste de Tukey, pressupondo que as diferenças entre grupos são devidas aos tratamentos fixos.

Os cálculos e as representações gráficas que apresentamos foram efectuados utilizando os programas Excel 98 e SPSS Base 9.0 for Windows licenciados pela Microsoft para a Universidade de Évora.

5.7- Estudo da actividade antimicrobiana do *L. azorica*

A actividade biológica, e especificamente a actividade antimicrobiana manifestada por muitas plantas aromáticas, resulta em grande parte da composição química dos seus óleos essenciais, nomeadamente dos hidrocarbonetos monoterpénicos dos quais os oxigenados são os mais activos.

Uma vez que a composição química dos óleos essenciais é influenciada por diversos factores, entre eles a época de colheita da planta, neste trabalho estudámos a actividade antimicrobiana dos óleos provenientes das folhas colhidas na Primavera e Outono e ainda do óleo essencial obtido dos frutos maduros.

5.7.1 – Estudo da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Para efectuar este estudo recorreremos ao método de difusão em meio sólido que é um dos métodos utilizados para determinar a actividade antimicrobiana de uma dada substância. Este método consiste na aplicação da substância em estudo numa placa de Petri contendo uma estirpe bacteriana semeada num meio de cultura adequado, seguindo-se a incubação a 37°C durante 24 h (Collee, 1993 e Pelczar *et al.*, 1996).

A aplicação da substância em análise pode ser feita por impregnação directa em discos de papel de filtro depositados à superfície do meio de cultura (método dos discos) ou por deposição de uma solução da substância em estudo em cavidades moldadas na superfície do meio de cultura (método dos poços).

Ao fim das 24 h de incubação cada local de aplicação pode estar ou não rodeado de uma zona em que não houve desenvolvimento bacteriano. O diâmetro dessa zona de inibição é indicador da sensibilidade da estirpe bacteriana à substância em estudo.

Determinação da actividade antimicrobiana

As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital do Espírito Santo de Évora. As amostras eram provenientes de diferentes produtos de colheita e foram cultivadas e isoladas em diversos meios de cultura, como se resume no quadro seguinte.

Microrganismos	Origem	Meio de cultura/Isolamento
<i>Escherichia coli</i>	Urina	C.L.E.D. e MacConkey
<i>Serratia marcescens</i>	Pus	Gelose sangue
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreção brônquica	MacConkey
<i>Staphylococcus aureus</i>	Orofaringe	Gelose sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Sangue	Gelose sangue
<i>Streptococcus equisimilis</i>	Líquido intravesicular	Gelose chocolate
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Expectoração	Gelose sangue
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Secreção respiratória	Gelose sangue

Após identificação, foram feitas novas sementeiras nos meios de cultura mais apropriados para cada microrganismo com o fim de se obterem colónias bem isoladas.

A partir das colónias obtidas prepararam-se suspensões em soro fisiológico, segundo o critério da escala de McFarland (Difco, 1994).

Segundo este método, a diluição das colónias de microrganismos Gram positivos, deve levar à obtenção de uma suspensão cuja turvação permita a leitura de 0,5 na escala do respectivo aparelho de medida, turvação correspondente a uma suspensão de 150 milhões de bactérias/mL. Para os Gram negativos, devemos obter uma leitura de 1,0, turvação correspondente a uma suspensão de 300 milhões de bactérias/mL.

As suspensões assim preparadas foram, então, distribuídas por espalhamento pelas caixas de Petri com os meios de cultura adequados para cada estirpe.

Os meios de cultura utilizados foram os meios gelose sangue e Mueller-Hinton, fornecidos comercialmente pela Bio-Merieux.

Para determinação das actividades antimicrobianas, em cada placa de Petri colocaram-se 4 discos de papel de filtro esterilizado, de 6 mm de diâmetro, da Becton Dickinson, sendo três deles impregnados com 4 µL de óleo essencial e o quarto com o antibiótico específico seleccionado por antibiograma para aquele microrganismo. Os discos com os antibióticos foram adquiridos à Bio-Merieux.

Cada ensaio foi realizado em triplicado. Após incubação das placas a 37°C, efectuaram-se as leituras às 24 h e 48h.

O diâmetro das zonas de inibição (halo) foi medido em três direcções usando uma escala em mm, estando o diâmetro do disco de papel de filtro incluído na leitura. Foram feitas as médias dos replicados e os valores dos halos obtidos foram comparados com os halos de inibição dos discos impregnados com antibiótico específico.

5.7.2 – Avaliação da concentração mínima inibitória

Em relação aos microrganismos que foram sensíveis aos óleos essenciais aqui estudados, estimámos a sua capacidade inibitória pela determinação da concentração mínima inibitória, entendendo-se por CMI a mínima concentração de óleo essencial capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano ao fim de 24 h de incubação a 37° C (Collee, 1993 e Dellar *et al.*, 1994), ou 24-48 h a 37° C (Soliman *et al.*, 1994).

Para esta determinação, preparámos várias diluições dos óleos essenciais em etanol absoluto e fizemos o estudo das actividades antibacterianas das diferentes concentrações segundo o método de difusão em discos, tal como no ensaio anterior.

Este método de difusão em disco não permite diferenciar se a acção inibidora é bacteriostática ou bactericida. Para isso seria necessário preparar uma suspensão de germes e semeá-la em tubos de ensaio contendo várias concentrações dos óleos essenciais e, após o período de incubação, seria necessário comparar o número de germes sobreviventes com o número de germes da suspensão inicial. Considerar-se-ia que os óleos em estudo possuiriam acção bactericida intensa se houvesse menos de 0,01 % de sobreviventes. Este método exige maiores volumes de amostra que não nos foi possível obter, pelo que não o executámos.

Determinação da concentração mínima inibitória

Para determinação da concentração mínima inibitória utilizaram-se diluições dos óleos essenciais de 1:1, 1:3, 1:7 e 1:10 (v/v) em etanol absoluto e procedeu-se à aplicação e incubação em condições idênticas às efectuadas para a determinação da actividade antimicrobiana. Neste ensaio, o quarto disco foi impregnado de etanol e tomado como testemunha. Os ensaios foram efectuados em triplicado e as leituras efectuadas às 24 e 48 h de incubação.

5.8 – Equipamento

Para a realização deste trabalho utilizaram-se os seguintes equipamentos principais:

- Aparelho de hidrodestilação do tipo Clevenger
- Aparelho Büchi 512 para determinação do ponto de fusão
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança técnica da marca Mettler, modelo PJ 3000
- Banho de ultra-sons da marca Sonorex, modelo Bandelin RK 100
- Banho termostaticado com agitação da marca Selecta Unitronic, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Calorímetro da marca Shimadzu DSC-50
- Centrífuga da marca Hermle, modelo Z380
- Cromatógrafo de gás Hewlett-Packard 5890, Series II
- Cromatógrafo de gás Hewlett-Packard 6890 associado a um Espectrómetro de massa Hewlett-Packard 5973
- Cromatógrafo de gás associado a um Espectrómetro de massa Fissons Sistem VG Trio 1000
- Espectrofluorímetro de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espectrofotómetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U 2000, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant
- Espectrofotómetro de infravermelho da marca Hitachi, modelo 260-10
- Espectrofotómetro de infravermelho com transformadas de Fourier da marca Perkin-Elmer, modelo Paragon 1000 PC
- Espectrómetro da marca Varian, modelo Unity 300

- Evaporador rotativo da marca Heidolph, modelo W 2000
- Homogeneizador tipo Potter da marca TRI-R Instruments StiR-R, modelo K 41
- Medidor de pH da marca Metrohm, modelo 691
- Misturador da marca Heidolph, modelo Reax 2000
- Misturador oscilante da marca Heidolph, modelo Unimax 2010
- Moinho de facas da marca Brabender, modelo OHG-Duisburg
- Polarímetro da marca Bellingham Standley, Limited
- Refractómetro de Abbé da marca Bellingham Standley, Limited
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z382 K
- Ultracentrífuga da marca Sorvall, modelo Ultra 80 TM & Combi Plus equipada com o rotor Sorvall T-875

5.9 – Reagentes

Durante a realização deste trabalho utilizaram-se os seguintes reagentes:

- Acetato de amónio, pró-análise, 98,0%, MERCK, Darmstadt
- Acetato de etilo, pró-análise, (d=0,90) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Acetilacetona, pró-análise, (d=1,05) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Acetona, pró-análise, (d=0,79) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Acetona-d₆, grau de deuteração 99,95%, MERCK, Darmstadt
- Ácido acético glacial, pró-análise, (d=0,97) 100%, MERCK, Darmstadt
- Ácido azótico, pró-análise, (d=1,40) 65%, MERCK, Darmstadt
- Ácido clorídrico, pró-análise, (d=1,19) 37%, MERCK, Darmstadt
- Ácido DL-isocítrico, pró-análise, 96,0%, Sigma, St. Louis
- Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico), pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Ácido sílico-túngstico, pró-análise, MERCK, Darmstadt
- Ácido sulfúrico, pró-análise, (d=1,84) 95-97%, MERCK, Darmstadt
- Ácido tartárico, pró-análise, 99,8 - 100%, Riedel-de-Haën, Seeize-Germany
- Albumina sérica bovina, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Amoníaco, pró-análise, (d=0,91) 25%, MERCK, Darmstadt
- Ar K reconstituído, Ar Líquido, Lisboa
- Azoto N-46, Ar Líquido, Lisboa
- Azoto R, Ar Líquido, Lisboa
- Benzeno, pró-análise, (d=0,88) 99,7%, MERCK, Darmstadt
- Butanol, pró-análise, (d=0,81) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt

- Citocromo c, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Cloreto férrico, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Cloreto de mercúrio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cloreto de potássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cloreto de sódio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Clorofórmio, pró-análise, (d=1,47) 99,0-99,4%, MERCK, Darmstadt
- Clorofórmio-d, grau de deuteração 99,95%, MERCK, Darmstadt
- Diclorometano, pró-análise, (d=1,32) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Dietilamina, pró-análise, (d=0,71), MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal sódico), pró-análise, 97,0%, Sigma, St. Louis
- Ditionito de sódio, pró-análise, >99,0%, MERCK, Darmstadt
- Discos de papel de filtro esterilizado, Ø 6 mm, Becton Dickinson Europe, Meylan, France
- Etanol, pró-análise, (d=0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Éter dietílico, pró-análise, (d=0,71) 99,5%, Riedel-de-Haën, Seeize-Germany
- 7-Etoxicumarina, pró-análise, 99,5%, Sigma, St. Louis
- 7-Etozirresorufina, pró-análise, >99,0%, Sigma, St. Louis
- Ferricianeto de potássio, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (sal sódico) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis

- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido(sal sódico) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glicina, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo reduzido, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Hélio N-55, Ar Líquido, Lisboa
- Hexano, pró-análise, (d=0,66) 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Hidroclorato de etilmorfina, pró-análise, 99,0-100%, MERCK, Darmstadt
- Hidroclorato de semicarbazida, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Hidrogénio, Ar Líquido, Lisboa
- Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- 7-Hidroxycumarina, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Hidróxido de bário octahidratado, pró-análise, 98,0%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de potássio, pró-análise, 85,0%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Iodeto de potássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Isocitrato desidrogenase (de coração de porco), pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Kits GPT/ALT, GOT/AST e ALP, Clonital, Carvico (BG), Italy
- Magnésio em folha, 0,15-0,25 mm de espessura por 3mm de largura, MERCK, Darmstadt
- Meios de cultura para microrganismos: C:L:E:D:, Gelose sangue, Gelose chocolate, Mac Conkey e Mueller Hinton, Bio-Merieux
- Metanal, pró-análise, (d=1,09) 37%, MERCK, Darmstadt

- Metanol, pró-análise, (d=0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Monóxido de carbono grau CA 15°, RI.93B, Ar Líquido, Lisboa
- Nitrato de prata, pró-análise, 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Óleo de amendoim, (d=0,914), Fluka, Chemie AG, Switzerland
- Ortofosfato de tripotássio, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Óxido de alumínio 90 para cromatografia em coluna, Ø 63 –200 µm, MERCK, Darmstadt
- Padrões de óleos essenciais para GC, Extrasynthèse, Genay, France
- Papel de filtro, Whatman Scientific Limited, England
- Piridina, pró-análise, (d=0,98), MERCK, Darmstadt
- Placas para cromatografia, folha de alumínio 20x20 cm revestida com sílica gel 60 G, 0,20 mm de espessura, MERCK, Darmstadt
- Placas para cromatografia em vidro, 20x20 e 10x10 cm
- Reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Resorufina, pró-análise, >99,0%, Sigma, St. Louis
- Sílica gel 60 para cromatografia em camada fina, Ø 15 µm, MERCK, Darmstadt
- Sílica gel 60 para cromatografia em coluna, Ø 63 –200 µm, MERCK, Darmstadt
- Subnitrato de bismuto, pró-análise, 71,0%, MERCK, Darmstadt
- Sulfato de cobre penta-hidratado, pró-análise, 99-100%, MERCK, Darmstadt
- Sulfato de magnésio hepta-hidratado, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Sulfato de sódio anidro, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Sulfato de zinco, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt

6 - Resultados da parte experimental

6.1 – Estudos fitoquímicos preliminares

Os ensaios de pesquisa fitoquímica realizados nas folhas e frutos do *L. azorica* permitiram evidenciar a presença de óleos voláteis, ácidos gordos, esteróis, terpenos, alcalóides, cumarinas, taninos, glúcidos, bases azotadas livres e saponinas, assinalada com (+) no quadro seguinte:

Tipo de compostos	Folhas	Frutos verdes	Frutos maduros
Óleos voláteis	+	+	+
Ácidos gordos	+	+	+
Esteróis e triterpenos	+	+	+
Carotenóides	-	-	-
Alcalóides	+	-	+
Bases quaternárias e aminas oxidadas	+	-	+
Antraquinonas	-	-	-
Flavonas	-	-	-
Flavonóis	+	-	-
Flavononas	-	-	-
Cumarinas	+	+	+
Taninos e polifenóis	+	+	+
Oses e polioses	+	+	+
Glúcidos redutores	+	+	+
Heterósidos cardiotónicos	-	-	-
Saponinas	-	-	+

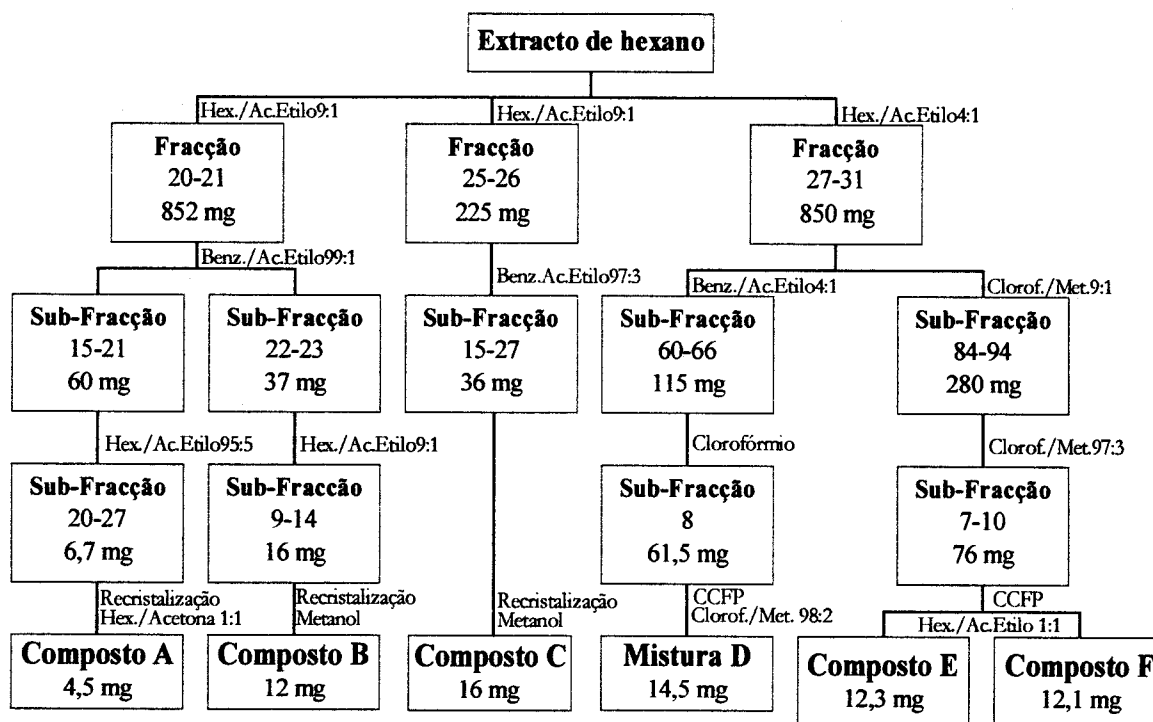
6.2- Componentes químicos maioritários da folha

6.2.1 - Extracto de hexano

2500 g de folhas secas forneceram 27 g de um extracto untuoso e de cor verde escura, com um rendimento de 1,08 %. Depois de descerado reduziu-se a 12,5 g.

Para o isolamento dos componentes, procedeu-se ao fraccionamento, em cromatografias de coluna, deste extracto, conforme indicado no quadro 6.1, obtendo e purificando-se os compostos A, B, C, E, F e uma mistura D constituída por dois compostos isómeros.

Quadro 6.1 – Fraccionamento do extracto de hexano



6.2.1.1 - Caracterização dos compostos isolados

Composto A

O composto A, sólido, foi cristalizado a partir de uma mistura de hexano/acetona 1:1 sob a forma de agulhas incolores, apresentou as seguintes características:

Ponto de fusão: 60-61°C.

Poder rotatório:

$$[\alpha]_D^{25} = -12^\circ (\text{CHCl}_3, c = 1,4).$$

Espectro de IV (Apêndice A)

$$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1}): 3100, 1770, 1640, 1440, 1130, 810.$$

Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

6,22 (1H, *d*, J=3,3 Hz, H_b-13), 5,50 (1H, *d*, J=3,3 Hz, H_a-13),

5,27 (1H, *d*, J=2,1 Hz, H_a-15), 5,07 (1H, *d*, J=2,1 Hz, H_b-15),

4,90 (1H, *s*, H_a-14), 4,82 (1H, *s*, H_b-14), 3,97 (1H, *t*, J=9,0 Hz, H-6).

Espectro de RMN ¹³C (75,429 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

47,8 (C-1), 30,3 (C-2)*, 32,6 (C-3)*, 151,2 (C-4), 52,1 (C-5), 85,1 (C-6),

45,3 (C-7), 31,0 (C-8), 36,2 (C-9), 149,3 (C-10), 139,9 (C-11),

170,1 (C-12), 119,9 (C-13), 112,7 (C-14), 109,7 (C-15).

* sinais intercambiáveis

Espectro de massas (Apêndice C)

(IE, 70eV) m/z (int.rel): 230 [M]⁺ (84), 215 (20), 202 (20), 150 (100), 91 (96), 79 (80).

Composto B

O composto B, sólido incolor cristalizado em metanol, apresentou as características a seguir indicadas:

Ponto de fusão: 106-107°C.

Poder rotatório:

$[\alpha]_D^{25} = +117^\circ$ (CHCl₃, c = 0,3).

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1})$: 3100, 1760, 1660, 1440, 1140, 810.

Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

6,27 (1H, *d*, J=3,6 Hz, H_b-13), 5,53 (1H, *d*, J=3,6 Hz, H_a-13),

4,85 (1H, *dd*, J₁=4,8, J₂=5,1 Hz, H-1), 4,74 (1H, *d*, J=10,2 Hz, H-5),

4,57 (1H, *dd*, J₁=8,4, J₂=8,7 Hz, H-6), 1,70(3H, *d*, J=1,5 Hz, Me-15),

1,42 (3H, *s*, Me-14).

Espectro de RMN ¹³C (75,429 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₂)

127,5 (C-1), 26,2 (C-2), 41,1 (C-3), 136,9 (C-4), 127,1 (C-5), 81,9 (C-6),

50,5 (C-7), 28,2 (C-8), 39,5 (C-9), 140,3 (C-10)*, 141,3 (C-11)*,

170,3 (C-12), 119,4 (C-13), 16,1 (C-14), 17,3 (C-15).

*sinais intercambiáveis

Espectro de massas (Apêndice C)

(IE, 70eV) m/z (int.rel): 232[M]⁺ (56), 217 (24), 204 (6), 149 (65), 109 (68), 91 (40), 81 (100), 53 (52).

Composto C

Este composto apresentou-se como um sólido branco e cristalino. Recristalizado em metanol, apresentou os seguintes dados:

Ponto de fusão: 135-136°C.

Poder rotatório:

$$[\alpha]_D^{25} = -35,6^\circ (\text{CHCl}_3, c = 1,1).$$

Espectro de IV (Apêndice A)

$$\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}} (\text{cm}^{-1}): 3420, 2930, 1650, 1464, 1361, 1050.$$

Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

5,35(1H, *m*, H-6), 3,52(1H, *m*, H-3), 1,00(3H, *s*, Me-18)*, 0,67(3H, *s*, Me-19)*,

0,93(3H, *d*, J=6,5Hz, Me-21)*, 0,84(3H, *d*, J=6,0Hz, Me-26)*,

0,81(3H, *d*, J=6,0, Me-27)*, 0,83(3H, *t*, J=7,2Hz, Me-29).

* e ° sinais intercambiáveis.

Espectro de RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₂)

37,2 (C-1), 31,2 (C-2), 71,8 (C-3), 42,2 (C-4), 140,7 (C-5), 121,7 (C-6),

31,6 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,0 (C-11), 39,7 (C-12),

42,2 (C-13), 56,7 (C-14), 24,4 (C-15), 28,2 (C-16), 56,0 (C-17), 11,8 (C-18),

19,4 (C-19), 36,1 (C-20), 19,0 (C-21), 33,9 (C-22), 26,0 (C-23), 45,8 (C-24),
29,1 (C-25), 18,8 (C-26), 19,8 (C-27), 23,0 (C-28), 12,0 (C-29).

Espectro de massas (Apêndice C)

(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 415 [M+1]⁺ (5), 397 (5,6), 382 (3,8), 320 (7,5), 304 (86), 274 (7,5), 256 (12,5), 213 (22,5), 159 (31,3), 145 (48,8), 105 (71,3), 95 (67,5), 81 (81,3), 55 (100).

Mistura D

Os dados espectroscópicos dos dois compostos constituintes da mistura D, designados por D1 e D2, revelaram os valores a seguir mencionados:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (cm^{-1})$: 2925, 1760, 1735, 1660, 1230, 1140, 1020, 815.

Espectros de RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear do próton e do carbono 13 forneceram dados espectrais, que permitiram atribuir valores a cada um dos isômeros.

Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

Composto D1

6,3(1H, *d*, J=3,5Hz, H_b-13), 5,9(1H, *d*, J=3,5Hz, H_a-13), 5,1(1H, *d*, J=9,8Hz, H-8),
4,01(1H, *d*, J=6,1Hz, H-6), 3,05(1H, *m*, H-7), 2,1(3H, *s*, COO **Me**),
1,9(3H, *s*, Me-14), 1,4(3H, *s*, Me-15).

Composto D2

6,3(1H, *d*, J=3,5Hz, Hb-13), 5,9(1H, *d*, J=3,5Hz, Ha-13), 5,2(1H, *m*, H-9),
5,1(1H, *d*, J=9,8Hz, H-8), 4,01(1H, *d*, J=8,5Hz, H-6), 3,08(1H, *m*, H-1),
3,05(1H, *m*, H-7), 2,1(3H, *s*, COO Me), 1,8(3H, *s*, Me-14), 1,3(3H, *s*, Me-15).

Espectro de RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₂)

Composto D1

139,6 (C-1), 46,6 (C-2), 23,6 (C-3), 44,3 (C-4), 58,0 (C-5), 77,2 (C-6),
47,0 (C-7), 72,0 (C-8), 36,4 (C-9), 134,9 (C-10), 141,1 (C-11),
169,6 (C-12), 126,4 (C-13), 20,9 (C-14), 17,3 (C-15), 20,1(OOCCH₃),
168,7 (OOCCH₃).

Composto D2

51,5 (C-1), 22,3 (C-2), 23,6 (C-3), 44,3 (C-4), 58,0 (C-5), 77,5 (C-6),
47,0 (C-7), 72,6 (C-8), 125,1 (C-9), 134,9 (C-10), 141,1 (C-11),
169,5 (C-12), 126,4 (C-13), 20,9 (C-14), 17,3 (C-15), 20,1 (OOCCH₃),
168,7 (OOCCH₃).

Espectros de massas (Apêndice C))

Os isômeros D1 e D2 mostraram os seguintes espectros:

Composto D1

(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 290 [M]⁺, 247 (13,6), 213 (18,6), 161 (30,9), 121 (54,5), 111
(100), 84 (80,4).

Composto D2

(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 292 [M+2]⁺ (5,4), 246 (12,7), 231 (16,4), 213 (32,7), 167 (25,9), 121 (44,5), 111 (100), 84 (85,5).

Composto E

Os dados espectroscópicos fornecidos pelos espectros de IV, RMN ¹H, RMN ¹³C e espectro de massas foram os seguintes:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (cm^{-1})$: 3450, 2930, 1765, 1735, 1670, 1235, 1140, 1020, 810.

Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

6,28(1H, *d*, J=2,1Hz, Ha-13), 5,74(1H, *d*, J=2,1Hz, Hb-13), 5,39(1H, *t*, J=6,5Hz, H-6),
5,32(1H, *d*, J=6,4Hz, H-9), 4,86(1H, *d*, J=6,7Hz, H-5), 4,62(1H, *t*, J=6,0Hz, H-8),
4,40(1H, *dd*, J₁=3,3, J₂=6,9Hz, H-1), 3,03(1H, *m*, H-7), 2,31(2H, *m*, H-3),
2,08(3H, *s*, C8-OOCCH₃), 1,91(3H, *s*, Me-15), 1,83(3H, *s*, Me-14).

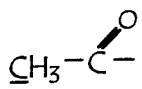
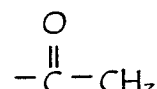
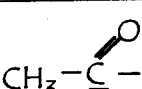
Espectro de RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₂)

66,7 (C-1), 27,1 (C-2), 35,2 (C-3), 137,9 (C-4), 125,9 (C-5), 73,1 (C-6),
49,1 (C-7), 74,1 (C-8), 126,2 (C-9), 142,9 (C-10), 136,8 (C-11), 169,3 (C-12),
123,0 (C-13), 16,8 (C-14), 15,5 (C-15), 21,1 (OOCCH₃), 170,0 (OOCCH₃).

Espectro de massas (Apêndice C)

(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 306 [M]⁺, 281 (0,3), 246 (1,4), 231 (1,5), 191 (11,8), 161 (26,4), 121 (25,5), 105 (20,9), 95 (56,4), 77 (34,5), 43 (100).

Espectros de correlação de RMN bidimensional: (Apêndice B₃)

Posição	C (δ)	HMQB (δ)	HMBC	COSY
1	66,7	4,40	C-14	H-1 → H-14
2	27,1	≈ 2,06	C-10, C-1	—
3	35,2	2,31	C-5, C-4, C-1	H-3 → H-15
4	137,9	—	—	—
5	125,9	4,86	C-15, C-3	H-5 → H-15, H-6
6	73,1	5,39	C-4	H-6 → H-7, H-5
7	49,1	3,03	C-11, C-8	H-7 → H-8, H-13
8	74,1	4,62	C-7, C-6	H-8 → H-7, H-9
9	126,2	5,32	C-14, C-1	H-9 → H-14, H-8
10	142,9	—	—	—
11	136,8	—	—	—
12	169,3	—	—	—
13	123,0	5,74, 6,27	C-12, C-11, C-7	H-13 → H-7
14	16,8	1,83	C-10, C-9, C-1	Me-14 → H-1, H-9
15	15,5	1,91	C-5, C-4, C-3	Me-15 → H-3, H-5
	21,1	2,08		—
	170,0	—	—	—

Composto F

Este composto apresentou os seguintes dados espectroscópicos de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e de espectro de massas:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1})$: 3090, 2930, 2850, 1760, 1730, 1650, 1230, 1020, 815.

Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3), δ (ppm): (Apêndice B₁)

6,34(1H, *d*, $J=2,9\text{Hz}$, H_b-7), 5,86(1H, *d*, $J=2,9\text{Hz}$, H_a-7),
3,84(2H, *dd*, $J_1=4,6$, $J_2=3,8\text{Hz}$, H-3 e 5), 2,07(2x3H, *s*, C3-OOCCH₃ e C5-OOCCH₃),
1,79(2x3H, *s*, Me-9 e Me-10).

Espectro de RMN ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3), δ (ppm): (Apêndice B₂)

146,2 (C-1), 30,6 (C-2), 72,5 (C-3), 169,3 (C-4), 72,5 (C-5),
30,6 (C-6), 125,5 (C-7), 135,6 (C-8), 21,0 (C-9), 21,0 (C-10),
21,0 (OOCCH₃), 169,7 (OOCCH₃).

Espectro de massas (Apêndice C)

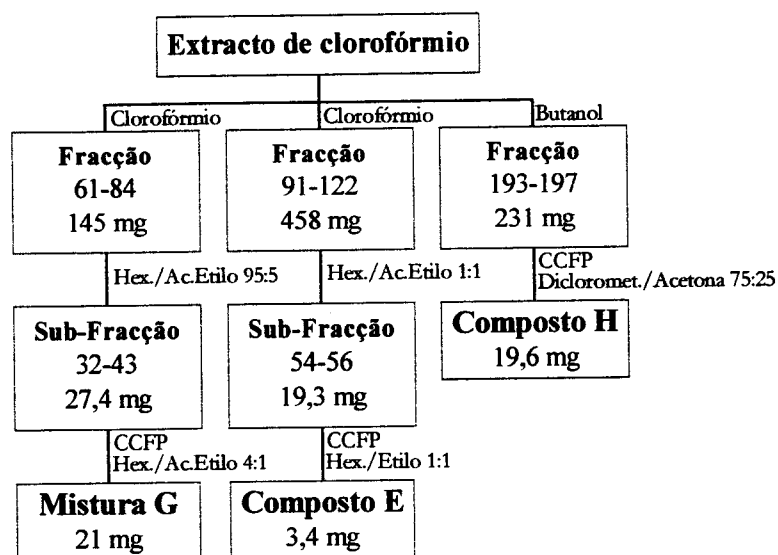
(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 252 $[\text{M}]^+$, 199(12,7), 185 (14,5), 161 (17,7), 145 (24,5), 135 (30,9), 117 (32,7), 105 (61,8), 91 (100), 79 (71,8), 55 (92,7).

6.2.2 - Extracto de clorofórmio

O extracto de clorofórmio obtido apresentou um rendimento de 3,7 %. Mostrava aspecto pastoso e cor verde escura.

Para o isolamento dos componentes partimos de 3 g deste extracto e procedeu-se ao seu fraccionamento conforme indicado no quadro 6.2. A mistura G e os compostos E e H foram isolados e purificados por cromatografia de coluna.

Quadro 6.2 – Fraccionamento do extracto de clorofórmio



6.2.2.1– Caracterização dos compostos isolados

Mistura G

Dados espectroscópicos apresentados pela mistura:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1})$: 3306, 2917, 2849, 1462, 1215, 757.

Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3), δ (ppm): (Apêndice B₁)

3,64(1H, t, $J=6,2\text{Hz}$, $-\underline{\text{CH}}_2\text{-OH}$), 1,58(2H, m, $-\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_3$), 1,25(2n H, m, $-(\underline{\text{CH}}_2)_n$),
0,88(3H, t, $J=7,0\text{Hz}$, $(-\text{CH}_2)_n\text{-Me}$).

Composto H

Este composto apresentou os seguintes dados espectroscópicos:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} \text{cm}^{-1}$: 3418, 2928, 2856, 1755, 1672, 1444, 1273, 1148, 1026, 818.

Espectro de RMN ^1H (250 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): (Apêndice B₁)

6,16(1H, sl, H-5), 6,07(1H, sl, H-9), 5,27(1H, d, $J=10,0\text{Hz}$, Hb.13),
4,95(1H, d, $J=10,0\text{Hz}$, Ha-13), 4,64(1H, t, $J=9,6\text{Hz}$, H-1), 4,44(1H, m, H-8),
2,80(1H, m, H-7), 1,80(3H, s, Me-14), 1,78(3H, s, Me-15).

Espectro de RMN ^{13}C (62,9 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): (Apêndice B₂)

66,0 (C-1), 27,9 (C-2), 35,5 (C-3), 133,2 (C-4), 126,5 (C-5), 74,6 (C-6) 52,6 (C-7), 70,6
(C-8), 131,4 (C-9), 143,0 (C-10), 139,8 (C-11), 169,9 (C-12), 121,1 (C-13), 16,5 (C-14),
15,0 (C-15).

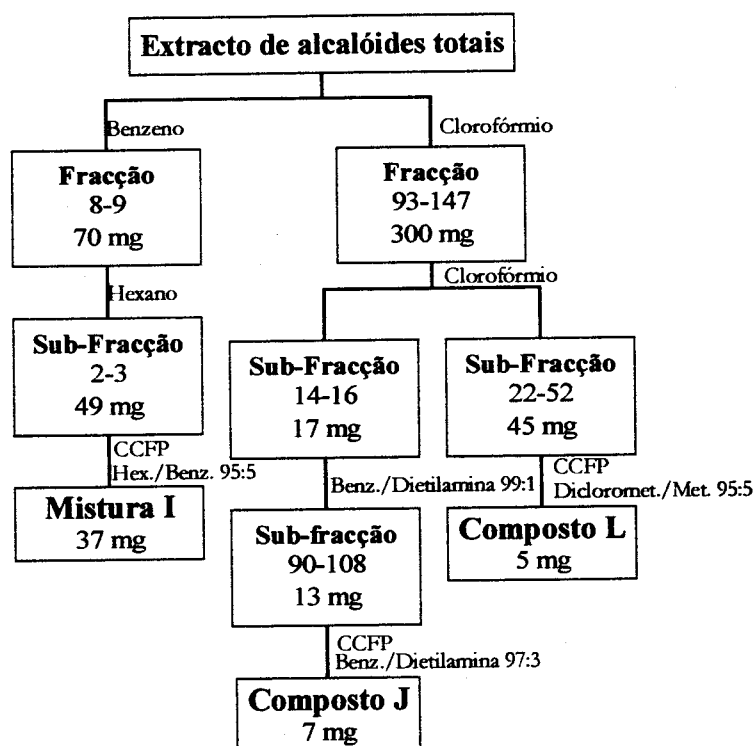
6.2.3 – Extracto de etanol

O extracto de etanol, obtido com um rendimento de 9,92 %, apresentava um aspecto pastoso e uma cor castanha escura.

Extracto de alcalóides totais

248 g do extracto de etanol levaram à obtenção de 3 g de extracto de alcalóides totais segundo o método referido no ponto 5.3.2.1, e do seu fraccionamento obtivemos a mistura I e os compostos Je L conforme se encontra indicado no quadro 6.3.

Quadro 6.3 – Fraccionamento do extracto de alcalóides totais



6.2.3.1 – Caracterização dos compostos isolados

Mistura I

Dados espectroscópicos apresentados pela mistura:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1})$: 2925, 2850, 1460, 1380, 760.

Da análise da mistura por GC/MS obteve-se os seguintes compostos:

Compostos	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8
<u>T.de retenção</u>	28,89	31,07	33,14	35,10	36,97	38,77	40,50	42,45
<u>[M⁺]</u>	254	268	282	296	310	324	338	352

Cromatograma e espectro de massa (Apêndice C)

Composto J

Os dados espectroscópicos fornecidos por este composto foram os seguintes:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} \text{cm}^{-1}$: 3081, 2937, 1770, 1658, 1175, 1085, 939, 909.

Espectro de RMN ¹H (250MHz, CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₁)

5,34(1H, *d*, J=1,8Hz, H_b-14), 5,11(1H, *d*, J=1,8Hz, H_a-14),

5,05(1H, *s,l*, H_b-15), 4,92(1H, *s,l*, H_a-15),

4,45(1H, *m*, H-1), 4,15(1H, *m*, H-8), 3,96(1H, *dd*, J₁=1,6, J₂=1,6Hz, H-6),

3,45(1H, *sl*, H-5), 2,75(1H, *m*, H-11), 2,60(1H, *m*, H-7).

Espectro de RMN ¹³C (62,9 MHz, (CDCl₃), δ (ppm): (Apêndice B₂)

75,4 (C-1), 27,0 (C-2), 28,4 (C-3), 144,1 (C-4), 73,0 (C-5), 71,8 (C-6), 57,9 (C-7),
82,3 (C-8), 42,7 (C-9), 149,9 (C-10), 45,9 (C-11), 175,6 (C-12), 54,4 (C-13),
117,1 (C-14), 107,1 (C-15).

Espectros de correlação de RMN bidimensional: (Apêndice B₃)

Posição	C (δ)	HMQB (δ)	HMBC
1	75,4	4,45	C-12, C-9, C-5
2	27,0	≈1,80, ≈2,30	—
3	28,4	2,34, 2,49	C-15, C-2
4	144,1	—	—
5	73,0	3,45	C-15
6	71,8	3,95	C-7
7	57,9	2,59	C-13, C-9
8	82,3	4,15	C-9
9	42,7	2,59, 2,91	C-14
10	149,9	—	—
11	45,9	2,75	C-13
12	175,6	—	—
13	54,4	2,59, 3,01	C-11
14	117,1	5,11, 5,34	C-9
15	107,1	4,92, 5,05	C-5

Espectro de massa (Apêndice C)

(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 262 [M]⁺ (0,2), 233 (1,5), 221 (0,8), 193 (9,1), 147 (10,9), 125 (30,0), 109 (29,1), 97 (100), 91 (54,5), 79 (42,7), 69 (78,2).

Composto L

Os dados espectroscópicos apresentados por este composto foram os seguintes:

Espectro de IV (Apêndice A)

$\nu_{\text{máx.}}^{\text{filme}} \text{ cm}^{-1}$: 3081, 2937, 1761, 1657, 1190, 1082, 994, 908.

RMN ^1H (250MHz, CDCl_3), δ (ppm): (Apêndice B₁)

5,35(1H, *d*, $J=1,3\text{Hz}$, Hb-14), 5,11(1H, *d*, $J=1,3\text{Hz}$, Ha-14), 4,96(1H, *sl*, Hb-15), 4,92(1H, *sl*, Ha-15), 4,41(1H, *m*, H-1), 4,13(1H, *m*, $J=9,7\text{Hz}$, H-8), 4,05(1H, *dd*, $J_1=2,3\text{Hz}$, $J_2=7,5\text{Hz}$, H-6), 3,47(1H, *sl*, H-5).

RMN ^1H (250MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): (Apêndice B₁)

5,38 (1H, *d*, $J=1,1\text{Hz}$, Hb-14), 5,14(1H, *d*, $J=1,1\text{Hz}$, Ha-14), 5,04(1H, *d*, $J=2,2\text{Hz}$, Hb-15), 4,81(1H, *d*, $J=2,2\text{Hz}$, Ha-15), 4,38(1H, *m*, H-1), 4,25(1H, *m*, H-8), 4,11(1H, *dd*, $J_1=1,6\text{Hz}$, $J_2=4,9\text{Hz}$, H-6), 3,45(1H, *sl*, H-5), 2,62 (1H, *m*, H-7).

RMN ^{13}C (62,9MHz, CDCl_3), δ (ppm): (Apêndice B₂)

75,4 (C-1), 26,9 (C-2), 28,3 (C-3), 144,1 (C-4), 73,0 (C-5), 72,2 (C-6), 55,8 (C-7), 82,1 (C-8), 42,7 (C-9), 149,6 (C-10), 47,2 (C-11), 175,5(C-12), 49,0 (C-13), 117,4 (C-14), 107,0 (C-15).

RMN ^{13}C (62,9MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): (Apêndice B₂)

75,4 (C-1), 27,8 (C-2), 29,6 (C-3), 145,5 (C-4), 74,1 (C-5), 72,8 (C-6), 56,4 (C-7), 82,6 (C-8), 43,4 (C-9), 151,3 (C-10), 48,0 (C-11), 176,2(C-12), 49,5 (C-13), 116,9 (C-14), 107,0 (C-15).

Espectros de correlação de RMN bidimensional em (CD₃)₂CO: (Apêndice B₃)

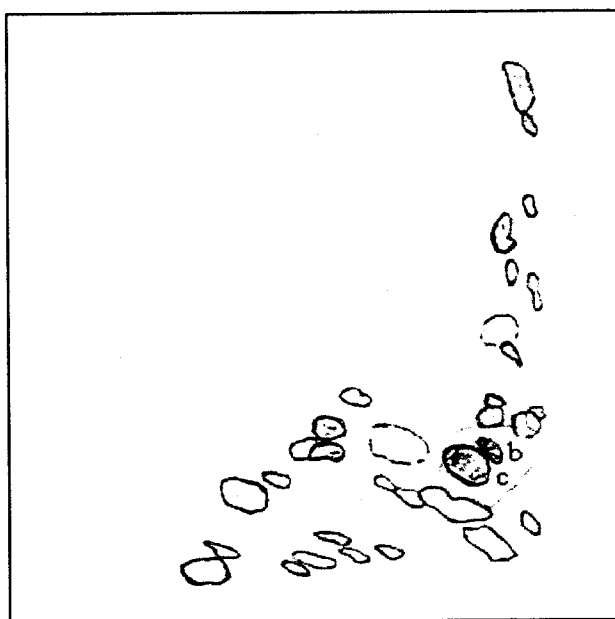
Posição	C (δ)	HMQB (δ)	HMBC	COSY
1	76,1	4,38	—	H-1 → H-14, H-2
2	27,8	2,20	C-4	H-2 → H-1, H-3
3	29,6	2,30	C-15, C-5, C-4, C-1	H-3 → H-15, H-5
4	145,5	—	—	—
5	74,1	3,45	C-15, C-4	H-5 → H-15, H-6
6	72,8	4,11	C-11, C-7	—
7	56,4	2,62	C-13, C-12, C-8, C-6	H-7 → H-13, H-8, H-6
8	82,6	4,25	C-6	H-8 → H-9, H-7
9	43,4	2,51, 2,86	C-14, C-10, C-8, C-7, C-1	H-9 → H-8
10	151,3	—	—	—
11	48,0	2,86	—	—
12	176,2	—	—	—
13	49,5	2,86, 3,22	C-12, C-7	H-13 → H-7
14	116,9	5,14, 5,38	C-10, C-9, C-1	H-14 → H-9, H-1
15	107,0	4,81, 5,04	C-5, C-3	H-15 → H-5, H-3

Espectro de massa (Apêndice C)

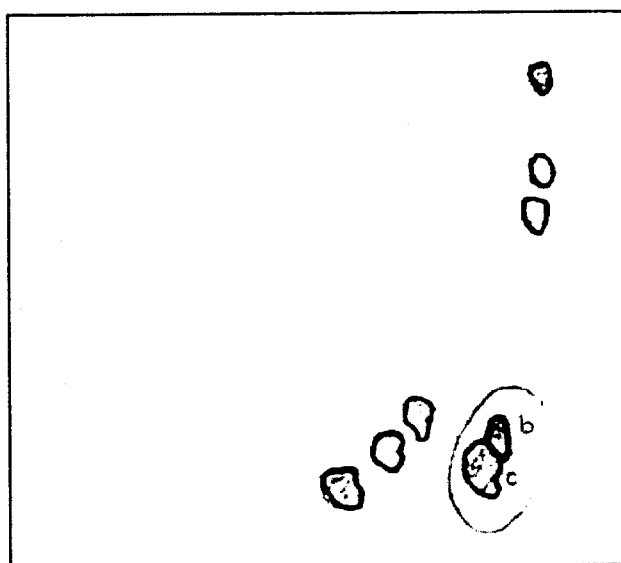
(IE, 70eV) m/z (int.rel.): 263 [M+1]⁺ (0,3), 233 (1,6), 221 (0,8), 193 (9,1), 147 (10,9), 125 (30,0), 109 (29,1), 97 (100), 91 (54,5), 79 (42,3), 69 (78,2).

6.3 – Composição química dos extractos do fruto

Os cromatogramas obtidos por cromatografia em camada fina, mono e bidimensional, com os extractos de hexano e de clorofórmio dos frutos maduros mostraram uma composição semelhante à dos extractos correspondentes da folha com destaque para os componentes **b** e **c** assinalados nas figuras seguintes.



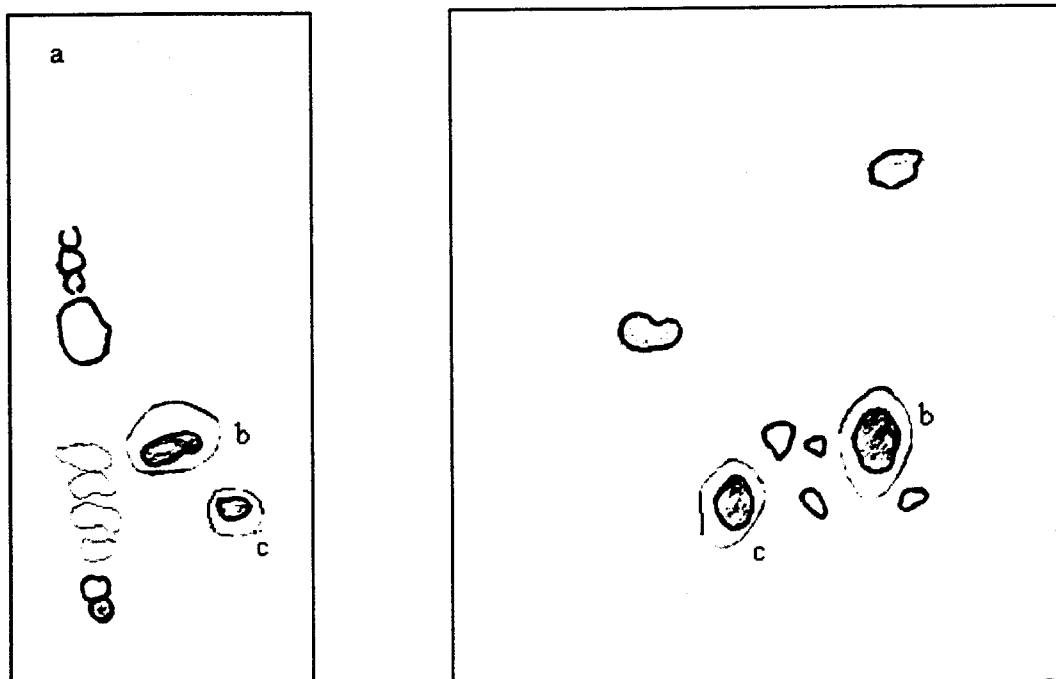
Extracto de hexano da folha



Extracto de hexano do fruto

6.4 – Composição química do óleo artesanal do fruto

As cromatografias realizadas em camada fina mono e bidimensional do óleo obtido por expressão dos frutos revelaram uma composição idêntica à dos extractos de hexano e de clorofórmio do fruto, encontrando-se em evidência manchas semelhantes, particularmente a mancha b da dehidrocostus lactona e a c da costunolida.



a – Óleo do fruto

b – Dehidrocostus lactona

c - Costunolida

6.5 – Estudo do óleo essencial

Os óleos essenciais obtidos dos frutos verdes, dos frutos maduros e das folhas colhidas na Primavera e no Outono apresentaram-se como líquidos lípidos, levemente amarelados e com odor semelhante característico.

Os rendimentos obtidos foram os seguintes:

Folhas colhidas na Primavera – 0,3% v/p

Folhas colhidas no Outono – 0,4% v/p

Frutos verdes – 0,2% v/p.

Frutos maduros – 0,75% v/p

Os valores das constantes físico-químicas dos óleos essenciais das folhas foram os seguintes:

Óleo essencial	Densidade d_{20}	Índ. de refração 20° C	Poder rotatório 20°C
Folhas/Primavera	0,985	1,4828	+ 1,5°
Folhas/Outono	0,681	1,4813	0°

No quadro 6.4 que a seguir se apresenta estão indicados os componentes dos óleos essenciais analisados e os respectivos índices de retenção em cada uma das colunas cromatográficas utilizadas.

Os cromatogramas encontram-se no apêndice D.

Quadro 6.4 - Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos

Componentes	Folha Outono	Folha Primavera	Fruto maduro	Fruto verde	I.R. Col. Polar	IR. Col. Apolar
Tricicleno	v	0,16	-	-	1018	921
a-Tujeno	-	-	0,56	-	-	922
a-Pineno	22,42	20,88	15,64	8,82	1030	930
a-Fencheno	-	0,79	-	-	1067	941
Canfeno	0,70	0,57	0,72	0,37	1076	941
b-Pineno	15,60	14,89	7,55	6,40	1118	970
Sabineno	2,16	1,90	0,53	0,23	1128	964
β-Careno	2,82	5,64	4,23	1,10	1154	1005
Mirceno	0,18	0,33	1,49	1,25	1165	980
a-Felandreno	-	-	2,66	-	1171	997
a-Terpineno	v	0,11	-	-	1187	1010
Limoneno	0,89	1,09	0,80	0,47	1206	1020
1,8-Cineol	16,95	15,79	2,46	1,17	1214	1019
<i>cis</i> -Ocimeno	-	-	8,07	6,52	1235	1025
<i>trans</i> -b-Ocimeno	-	-	21,61	14,14	1253	1035
g-Terpineno	0,21	0,37	-	-	1249	1047
m-Cimeno	1,50	0,94	0,28	0,46	1272	1006
p-Cimeno	1,74	1,90	1,56	0,80	1275	1019
a-Terpinoleno	v	0,13	0,20	-	1288	1077
a-Cubebeno	v	v	0,17	0,11	1447	1343
Germacreno D	-	-	4,88	6,07	1467	-
Etanona	0,17	0,54	-	-	1490	1104
a-Canfolenal	-	-	0,30	0,36	1491	1105
Cânfora	0,14	0,15	-	-	1515	1119
Linalol	1,30	1,36	2,29	1,24	1547	1083
Acetato de linalilo	0,25	0,59	-	-	1548	1244
a-Copaeno	-	-	13,00	-	1556	1369
b-Bourboneno	v	v	0,20	-	-	1376
Pinocarvona	3,00	1,85	0,21	-	1565	1135
Acetato de bornilo	0,89	0,70	0,59	0,58	1579	1267
b-Elemeno	v	0,12	3,00	2,71	1588	1382
b-Cariofileno	10,00	0,13	1,23	1,39	1593	1408
Mirtenal	0,98	0,90	-	-	-	1165
Terpineno-4-ol	0,79	0,83	-	0,06	1598	1158
Mirtenol	0,16	0,70	0,41	-	1623	1176
<i>allo</i> -Aromadendreno	0,98	0,78	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarveol	1,76	1,23	-	-	-	1121
a-Humuleno	0,20	0,29	0,40	0,52	1663	1442
<i>trans</i> -b-Farneseno	-	-	0,18	0,56	-	1447
a-Guaieno	-	-	0,51	0,94	1684	1427
a-Terpineol	-	-	0,52	0,12	1692	1168
Acetato de terpenilo	4,73	4,45	0,21	0,40	1695	1331
b-Selineno	0,75	1,03	0,99	1,76	1711	1472
Valenceno	0,13	0,35	0,87	0,99	1723	1479
d-Guaieno	-	-	0,68	-	-	1502
g-Cadineno	-	0,13	-	-	1751	1498
d-Cadineno	0,20	0,38	0,92	1,38	1754	1508
a-Bisaboleno	-	-	-	14,41	1772	1531
<i>cis</i> -Calameneno	0,27	0,55	-	-	1825	1502
Óxido de cariofileno	1,04	1,56	0,56	0,62	1968	1557
Metileugenol	0,22	0,82	-	0,36	2009	1368
Nerolidol	0,44	0,38	1,05	1,22	2037	1545
Elemicina	0,14	0,32	0,47	-	2071	1529
Acetato de cinamilo	0,38	0,92	-	-	-	1396
Eugenol	0,15	0,37	-	-	-	-
Spatulenol	-	0,17	0,98	0,63	2159	1552
b-Eudesmol	-	-	0,58	-	-	1620
Carvacrol	0,15	0,32	-	-	2206	-
t-muurolol	1,01	2,78	0,72	1,64	2218	1627

v: vestígios < 0,1%

6.6 - Estudos de actividade biológica

6.6.1 – Actividade biológica do óleo artesanal do fruto e do óleo essencial da folha

6.6.1.1 – Actividade biológica geral

Os resultados obtidos na triagem hipocrática geral do óleo essencial da folha mostraram que este óleo produziu acção sobre o Sistema Nervoso Central dos animais, a qual se traduziu numa diminuição da actividade motora e do tonús muscular, mais evidente com as doses de 0,6 mL/kg e 1mL/kg entre os 30 min. e a 1 hora de ensaio, acompanhadas por uma clara ataxia e analgesia. Com as mesmas doses observou-se, ainda, uma hipotermia acentuada às duas horas de ensaio, conforme se pode observar na figura 6.1.

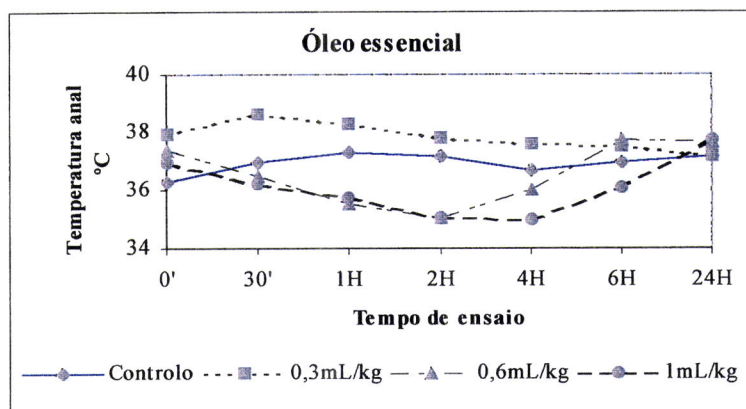


Figura 6.1 – Efeito da administração do óleo essencial da folha na temperatura de ratos Wistar.

Os resultados obtidos na triagem hipocrática efectuada com o óleo artesanal não evidenciaram qualquer efeito deste óleo sobre o Sistema Nervoso Central ou sobre a temperatura dos ratos Wistar, como se observa na figura 6.2.

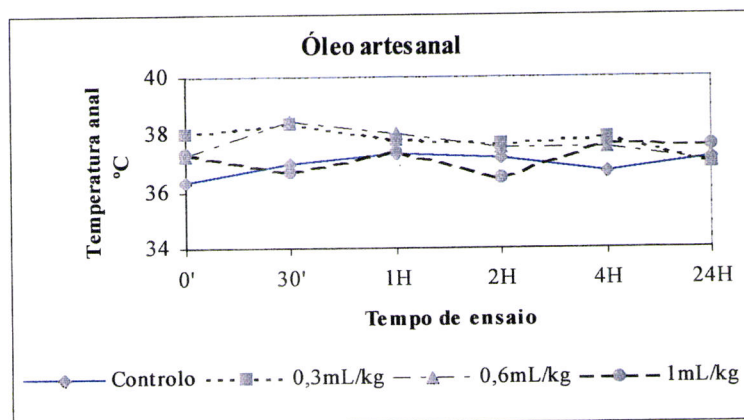


Figura 6.2 – Efeito da administração do óleo artesanal na temperatura de ratos Wistar.

6.6.1.2 – Actividade analgésica do óleo essencial da folha

A actividade analgésica foi avaliada a partir do número médio do total das contorsões observadas em cada grupo.

O efeito analgésico manifestou-se nos grupos de animais que receberam as doses de 0,6 mL/kg e 1 mL/kg, sendo mais acentuado com a dose mais elevada, conforme se pode observar na figura 6.3.

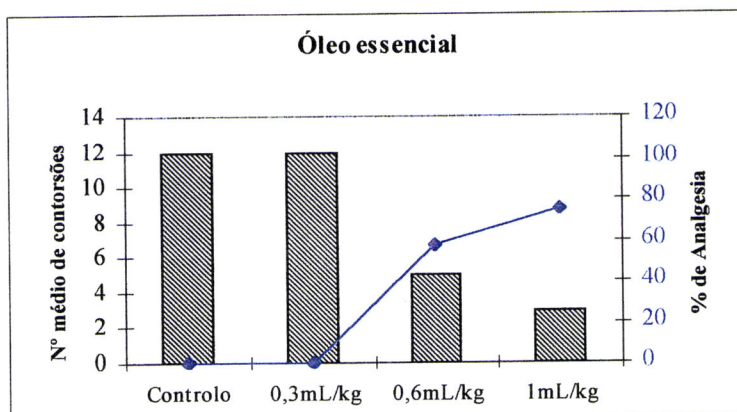


Figura 6.3 – Actividade analgésica do óleo essencial da folha em murganhos Charles River

6.6.1.3 – Efeito sobre actividades enzimáticas do soro

Neste subcapítulo apresentamos os resultados relativos aos efeitos provocados pela administração do óleo do fruto e óleo essencial da folha nas actividades enzimáticas alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina.

Actividade enzimática alanino aminotransferase

Pela figura 6.4 observamos que a actividade enzimática alanino aminotransferase do soro sofreu uma diminuição com a dose de 0,02 mL/kg de cada um dos óleos relativamente ao controlo, embora as variações observadas com qualquer das doses não tenham significado estatístico ($P < 0,05$).

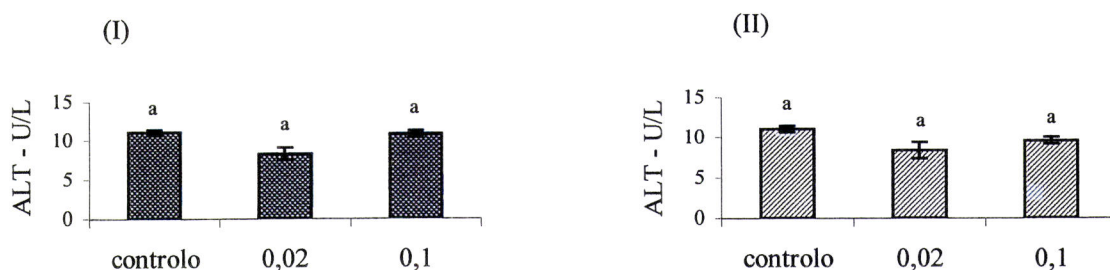


Figura 6.4 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática alanino aminotransferase do soro de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Actividade enzimática aspartato aminotransferase

A administração do óleo do fruto na dose de 0,02 mL/kg provocou um decréscimo da actividade enzimática aspartato aminotransferase mais evidente que o

observado com a dose de 0,1mL/kg, embora em qualquer das doses não tenha ocorrido variação significativa ($P < 0,05$) relativamente ao controlo, conforme mostra a figura 6.5(I). O tratamento com o óleo essencial da folha não provocou variação com significado estatístico ($P < 0,05$) para ambas as doses, como podemos ver na figura 6.5(II).

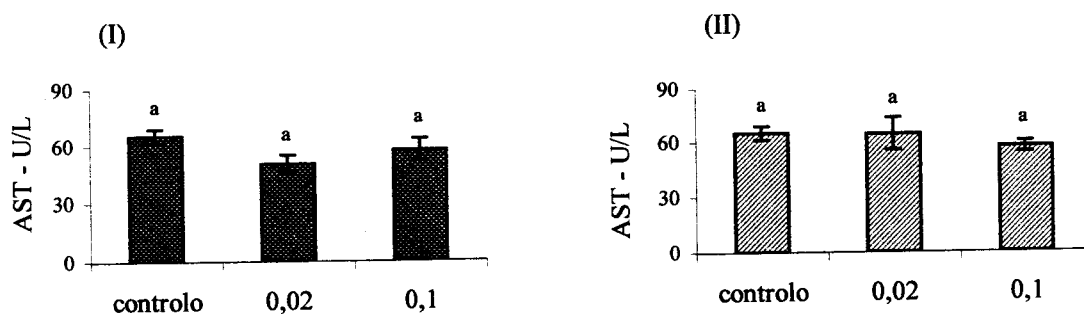


Figura 6.5 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática alanino aminotransferase do soro de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Actividade enzimática fosfatase alcalina

A figura 6.6 mostra-nos que não ocorreu variação significativa em relação ao controlo ($P < 0,05$) com o tratamento efectuado com qualquer dos óleos, embora entre as duas doses do óleo do fruto tenhamos observado uma resposta significativamente diferente ($P < 0,05$).

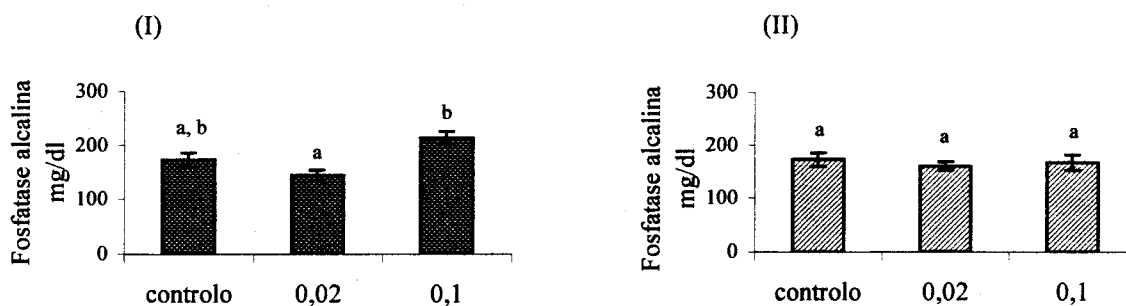


Figura 6.6 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática fosfatase alcalina do soro de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

6.6.1.4— Efeito sobre sistemas enzimáticos do tecido hepático

Procurámos avaliar o efeito da administração do óleo do fruto e do óleo essencial da folha sobre concentrações e algumas actividades catalíticas hepáticas, nomeadamente a concentração de citocromo P450 e citocromo b5 e as actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, 7-etoxirresorufina *O*-desetilase, 7-etoxicumarina *O*-desetilase, etilmorfina *N*-desmetilase, glutatióno *S*-transferase e glutatióno redutase, cujos resultados a seguir se apresentam.

Concentração de citocromo P450

O tratamento efectuado com o óleo do fruto na dose de 0,02 mL/kg provocou um acréscimo da concentração de citocromo P450 microsossomal comparativamente ao controlo, já com a dose de 0,1 mL/kg não ocorreu variação. Porém, estas observações não são estatisticamente significativas ($P < 0,05$), conforme mostra a figura 6.7(I). Pela

figura 6.7(II) podemos constatar que a administração do óleo essencial da folha não provocou alteração da concentração de citocromo P450 ($P < 0,05$) em ambas as doses.

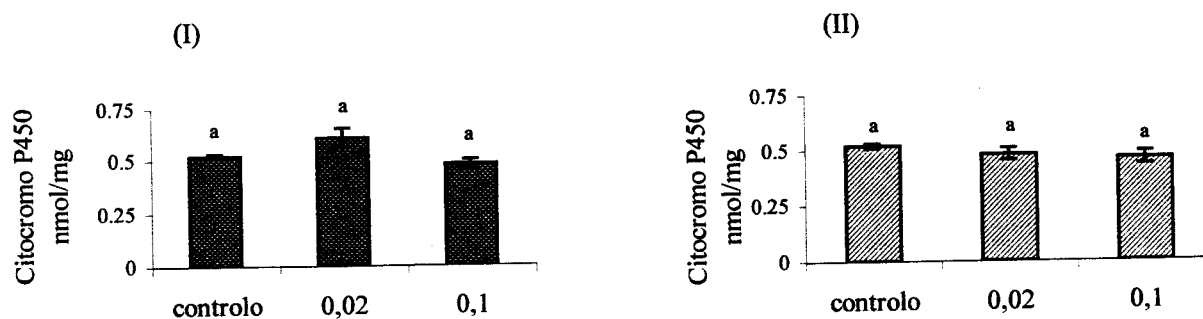


Figura 6.7 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na concentração de citocromo P450 da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Concentração de citocromo b5

A concentração de citocromo b5 microsomal não apresentou variação

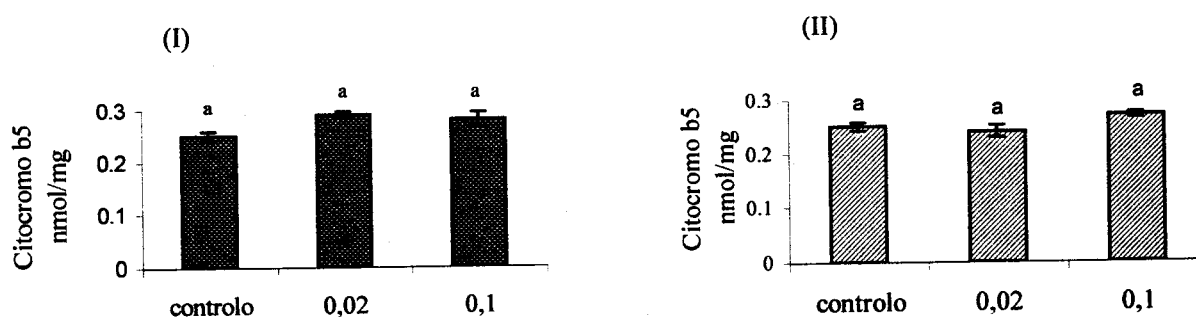


Figura 6.8 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na concentração de citocromo b5 da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controlo com ambas as doses de qualquer dos óleos, como se pode observar na figura 6.8.

Actividade enzimática NADPH (P450) redutase

A figura 6.9 mostra-nos que a actividade enzimática NADPH (P450) redutase microsomal sofreu um decréscimo com a dose de 0,02 mL/kg, mais evidente com o óleo do fruto embora sem significado estatístico, mas aumentou significativamente ($P < 0,05$) com a dose de 0,1 mL/kg de qualquer dos óleos.

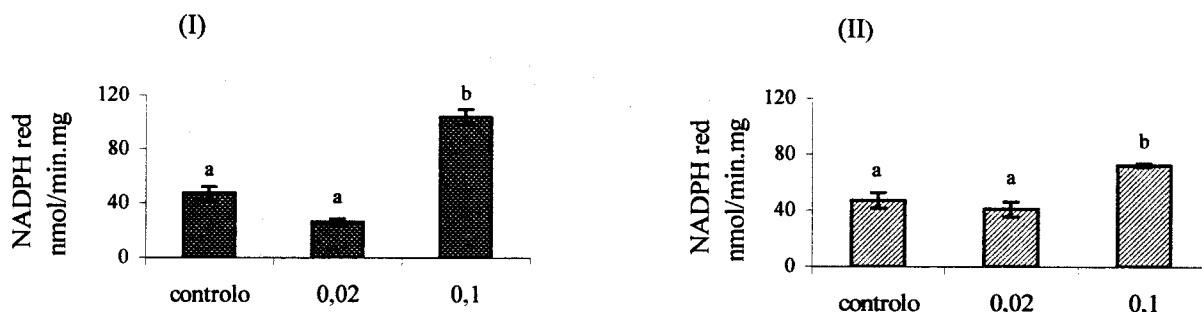


Figura 6.9 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Actividade enzimática 7-etoxiresorufina O-desetilase

Pela figura 6.10(I) podemos observar que a actividade enzimática 7-etoxiresorufina O-desetilase microsomal não sofreu variação significativa ($P < 0,05$) com a administração da dose de 0,02 mL/kg do óleo do fruto, contudo a dose de 0,1 mL/kg provocou um decréscimo acentuado ($P < 0,01$) desta actividade relativamente ao controlo. O óleo essencial da folha na dose de 0,02 mL/kg provocou uma variação significativa ($P < 0,01$) desta actividade enzimática, ao contrário da dose de 0,1 mL/kg

que não ocasionou variação com significado estatístico ($P < 0,05$), como podemos observar na figura 6.10(II).

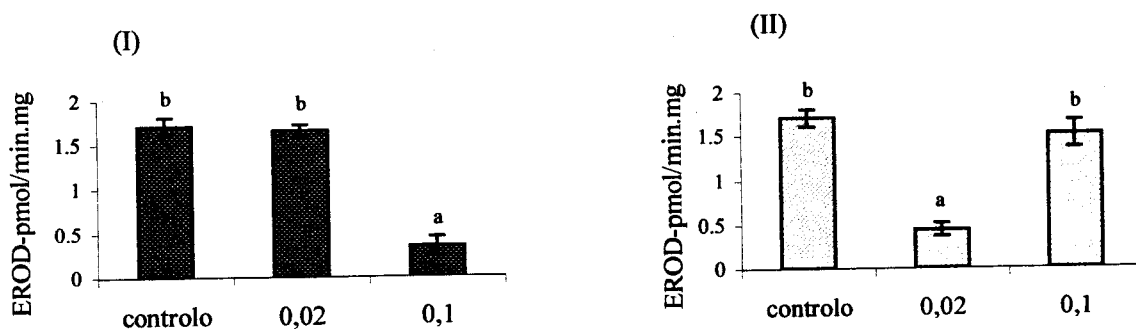


Figura 6.10 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo do fruto (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática 7-etoxiresorufina *O*-desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase

A actividade catalítica 7-etoxicumarina *O*-desetilase microsomal não sofreu

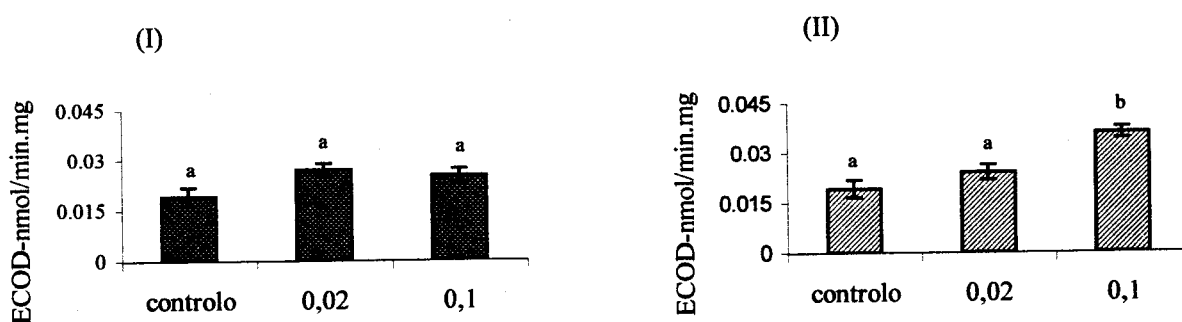


Figura 6.11 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo dos frutos (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

variação significativa ($P < 0,05$) com qualquer das doses do óleo do fruto administradas durante o tratamento, como mostra a figura 6.11(I). Mas com o óleo essencial da folha

na dose mais elevada observamos um acréscimo de actividade significativo ($P < 0,05$), figura 6.11(II).

Actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase

A figura 6.12 mostra-nos que a actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase microsomal sofreu um decréscimo significativo ($P < 0,01$) com a dose de 0,02 mL/kg de cada um dos óleos e com a dose de 0,1 mL/kg do óleo essencial da folha relativamente ao controlo, enquanto que a administração de 0,1 mL/kg de óleo do fruto provocou uma diminuição, mas sem significado estatístico ($P < 0,05$). A resposta obtida com as duas doses de tratamento do óleo do fruto apresentou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre si, figura 6.12(I).

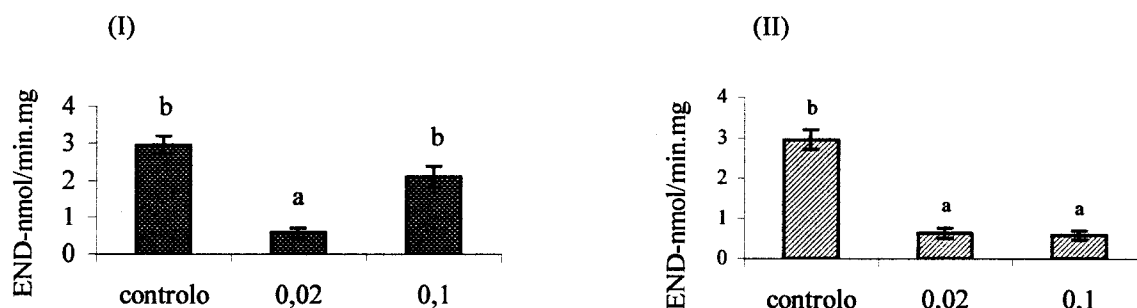


Figura 6.12 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo dos frutos (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Actividade enzimática glutatióno *S*-transferase

Os valores da actividade enzimática glutatióno *S*-transferase do citosol não variaram significativamente ($P < 0,05$) comparativamente ao grupo controlo com qualquer das doses dos dois óleos administradas, como observamos na figura 6.13.

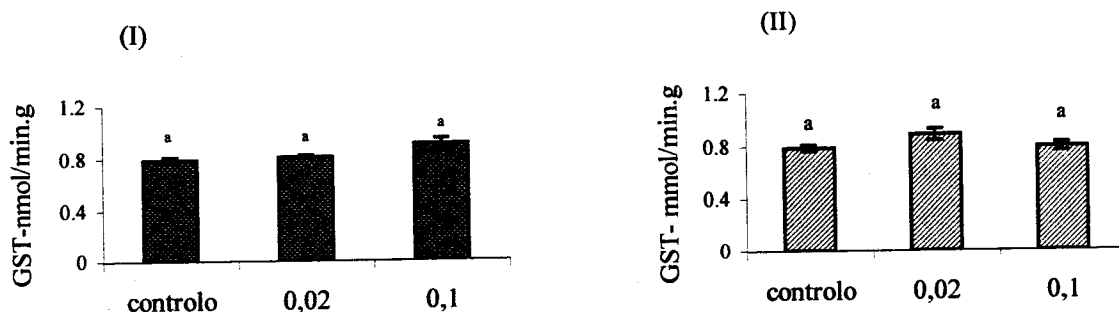


Figura 6.13 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo dos frutos (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática glutatióno *S*-transferase do citosol do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

Actividade enzimática glutatióno redutase

A figura 6.14 mostra que o tratamento com qualquer dos óleos não afectou significativamente ($P < 0,05$) a actividade enzimática glutatióno redutase citosólica relativamente aos valores desta actividade, obtidos para o grupo controlo.

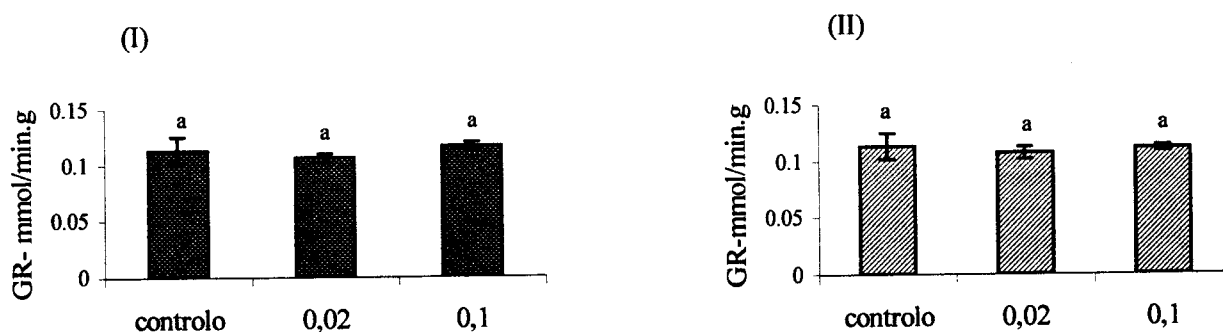


Figura 6.14 - Efeito da administração de diferentes doses, expressas em mL/kg de peso de animal, do óleo dos frutos (I) e do óleo essencial da folha (II) na actividade enzimática glutatióno redutase do citosol do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,01$ ou $P < 0,05$.

6.6.2 – Efeito do óleo essencial da folha sobre o sistema hepático em comparação com uma droga típica hepatoprotectora

6.6.2.1 – Efeito sobre actividades enzimáticas das transaminases do soro

Apresentamos neste subcapítulo os resultados dos efeitos do tratamento com o óleo essencial da folha e com uma droga hepatoprotectora padrão – a silimarina, sobre as actividades enzimáticas alanino aminotransferase e aspartato aminotransferase do soro de ratos Wistar, aos quais foi administrado um tóxico típico - o tetracloreto de carbono.

Actividade enzimática alanina aminotransferase

A figura 6.15(I) mostra-nos que as actividades enzimáticas alanino aminotransferase dos grupos de animais tratados com o óleo essencial da folha e administração posterior do tóxico apresentaram um acréscimo significativo ($P < 0,05$) mais acentuado com a dose de 0,3 mL/kg relativamente ao grupo tratado apenas com o tóxico, o qual apresentou um aumento desta actividade enzimática em relação ao controlo, mas sem significado estatístico ($P < 0,05$).

No ensaio em que o tratamento prévio foi efectuado com uma droga padrão hepatoprotectora, figura 6.15(II), a actividade enzimática em estudo apresentou um decréscimo significativo ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com o tóxico. No entanto, a actividade enzimática deste último grupo apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) em relação ao grupo controlo.

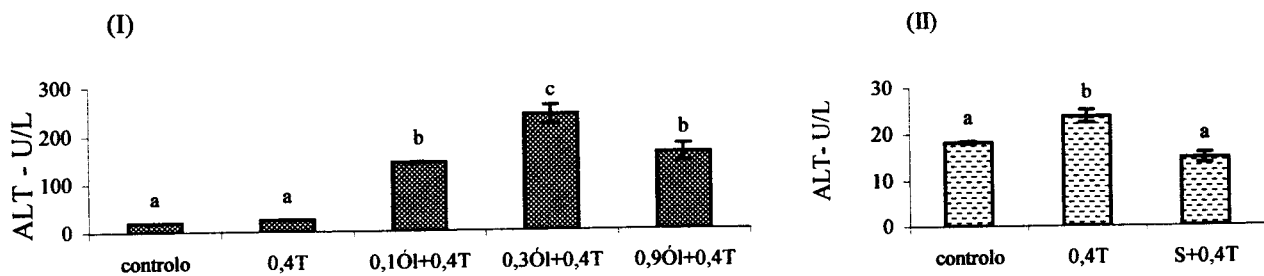


Figura 6.15 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática alanino aminotransferase do soro de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Actividade enzimática aspartato aminotransferase

As actividades enzimáticas aspartato aminotransferase dos grupos tratados com o óleo essencial apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) com as doses administradas comparativamente ao grupo tratado com o tóxico como se observa na

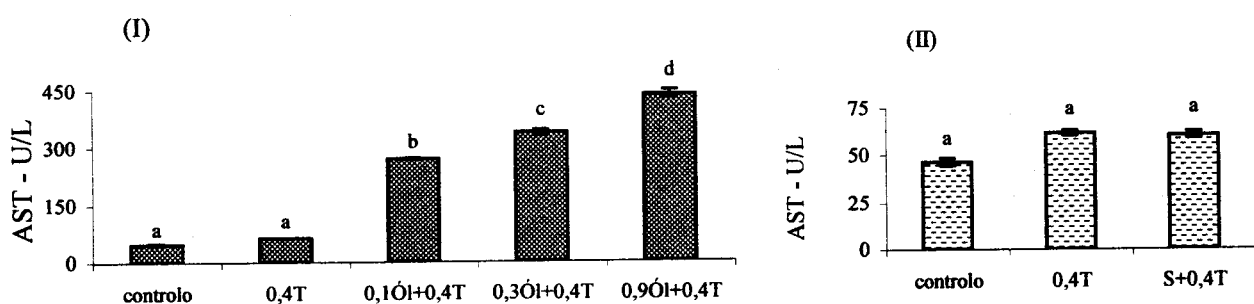


Figura 6.16 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática aspartato aminotransferase do soro de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

figura 6.16(I). Esta figura ainda nos mostra que o tratamento com o tóxico levou a um aumento desta actividade enzimática relativamente ao controlo, mas sem significado estatístico ($P < 0,05$). A figura 6.16(II) mostra-nos que nos grupos tratados com silimarina não houve variação significativa ($P < 0,05$) desta actividade enzimática comparativamente ao grupo tratado pelo tóxico e ao grupo de controlo.

6.6.2.2 – Efeito sobre sistemas enzimáticos do tecido hepático

Neste subcapítulo apresentamos o efeito da administração do tóxico após o tratamento dos animais com o óleo essencial da folha e com uma droga hepatoprotectora, sobre a concentração e algumas actividades catalíticas hepáticas nomeadamente a concentração de citocromo P450 e citocromo b5 e as actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, 7-etoxirresorufina *O*-desetilase, 7-etoxicumarina *O*-desetilase, etilmorfina *N*-desmetilase, glutationo *S*-transferase e glutationo redutase.

Concentração de citocromo P450

A figura 6.17(I) mostra-nos que o tratamento prévio com o óleo essencial na dose de 0,1 e 0,3 mL/kg não provocou alteração significativa ($P < 0,05$) da concentração de citocromo P450 relativamente ao grupo tratado com o tóxico e ao controlo, mas no grupo ao qual foi administrado 0,9 mL/kg de óleo essencial ocorreu um decréscimo de concentração com significado estatístico ($P < 0,05$) comparativamente ao grupo que recebeu apenas tóxico. Contudo, esta variação de concentração não é significativa ($P < 0,05$) relativamente ao grupo controlo.

No grupo de animais tratados pela silimarina, a administração do tóxico não provocou variação significativa ($P < 0,05$) na concentração de citocromo P450 em relação ao grupo que recebeu o tóxico e ao controlo, conforme observamos na figura 6.17(II).

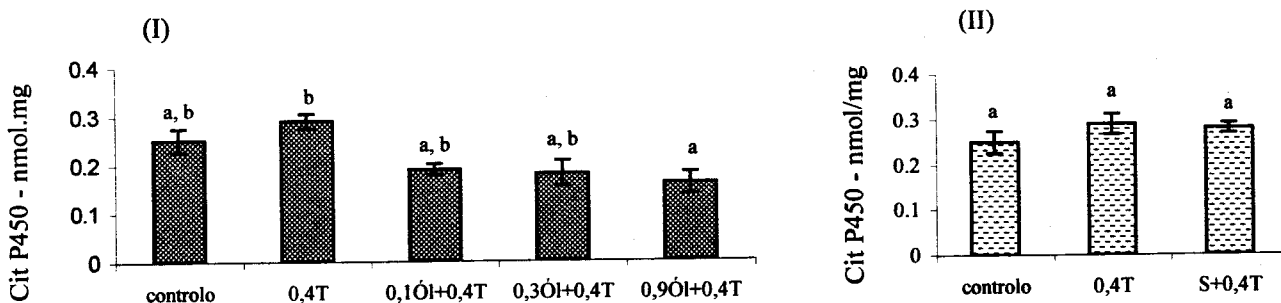


Figura 6.17 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na concentração de citocromo P450 da fracção microsossomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Concentração de citocromo b5

A concentração de citocromo b5 não apresentou variação com significado

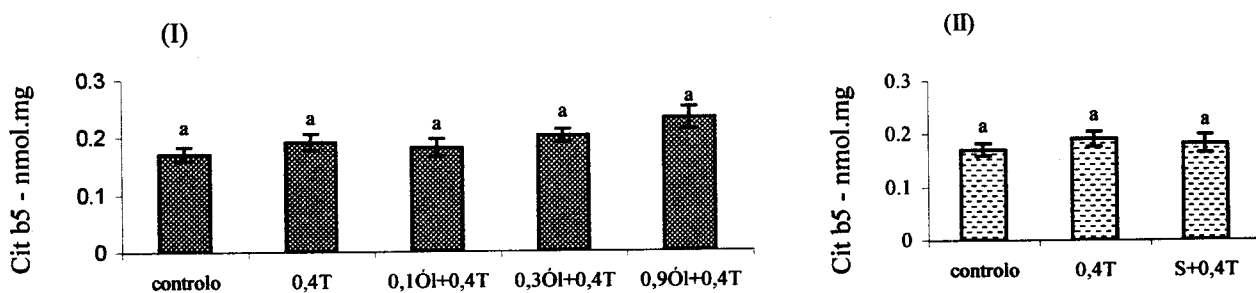


Figura 6.18 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na concentração de citocromo b5 da fracção microsossomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

estatístico ($P < 0,05$) com os tratamentos efectuados tanto com o óleo essencial como com a droga hepatoprotectora relativamente ao tratamento com o tóxico e ao controlo, como observamos na figura 6.18.

Actividade enzimática NADPH (P450) redutase

A figura 6.19(I) mostra-nos que o tratamento prévio efectuado com a dose de 0,3 mL/kg de óleo essencial e administração posterior do tóxico provocou acréscimo da actividade enzimática NADPH (P450) redutase com significado estatístico ($P < 0,05$) em relação ao tratamento apenas com o tóxico e ao controlo. Podemos também observar que as administrações de 0,1 e 0,3 mL/kg de óleo essencial produziram, entre si, variação significativa ($P < 0,05$) desta actividade enzimática, mas relativamente ao grupo tratado com o tóxico não ocorreu variação significativa ($P < 0,05$). Analisando as variações provocadas pelos tratamentos relativamente ao controlo, constatamos que apenas o tratamento com a dose de 0,3mL/kg de óleo essencial provocou variação com significado estatístico ($P < 0,05$).

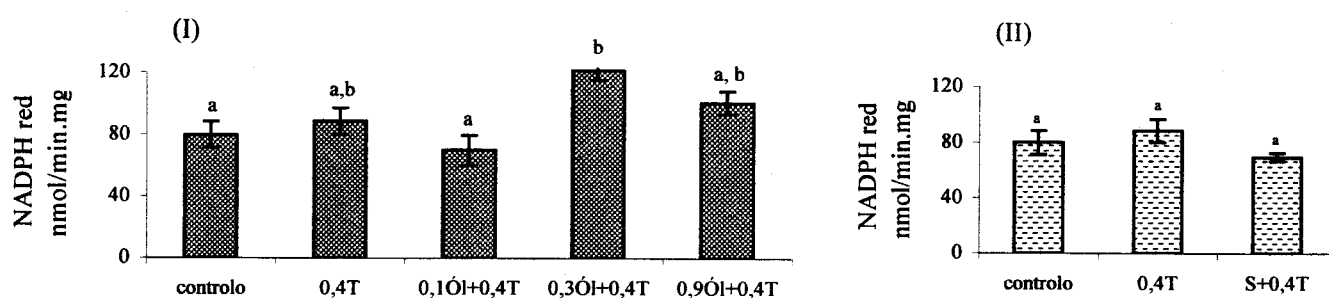


Figura 6.19 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microsossomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Como pode ser observado na figura 6.19(II) o tratamento pela silimarina não provocou variação significativa ($P < 0,05$) da actividade enzimática NADPH (P450) redutase relativamente ao grupo que recebeu o tóxico e ao controlo.

Actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase

A administração de 0,1 mL/kg de óleo essencial seguida do administração do tóxico não provocou alteração significativa ($P < 0,05$) da actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase em relação ao grupo tratado pelo tóxico e ao grupo controlo. No entanto, o tratamento prévio com as doses de 0,3 e 0,9 mL/kg de óleo essencial ocasionou um decréscimo significativo ($P < 0,05$) desta actividade enzimática relativamente ao grupo que recebeu apenas o tóxico e ao controlo, como mostra a figura 6.20(I).

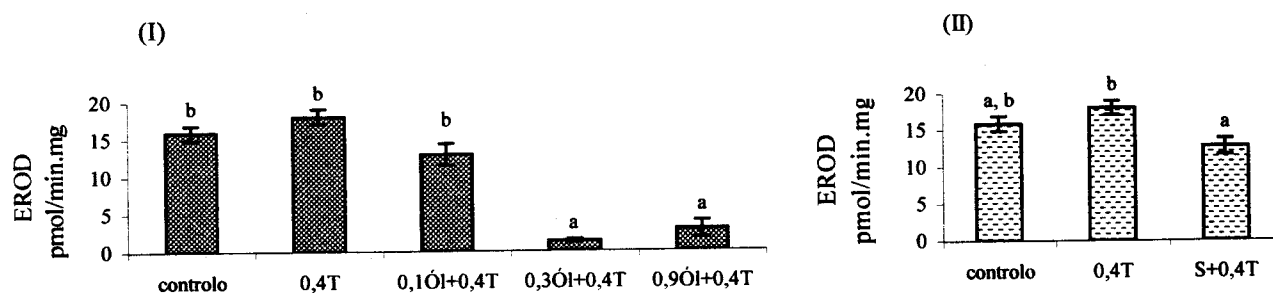


Figura 6.20 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha ÓL, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase da fracção microsossoma do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Pela observação do gráfico da figura 6.20(II) constatamos que a actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase, após o tratamento com a silimarina, sofreu

variação significativa ($P < 0,05$) relativamente ao grupo tratado com o tóxico, mas não em relação ao controlo. Entre o grupo que recebeu o tóxico e o de controlo também não observamos alteração com significado estatístico ($P < 0,05$).

Actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase

A análise do gráfico da figura 6.21(I) mostra-nos que a actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase referente aos grupos tratados com o óleo essencial apresentou um decréscimo significativo ($P < 0,05$) relativamente ao grupo tratado apenas com o tóxico, mas não variou significativamente em relação ao controlo. Por outro lado, entre o grupo que recebeu o tóxico e o de controlo, a variação apresentada tem significado estatístico ($P < 0,05$).

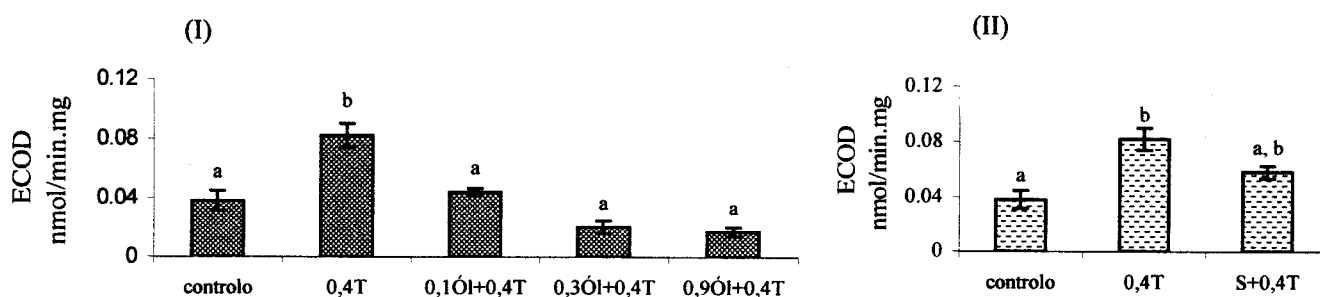


Figura 6.21 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

O tratamento com a silimarina não provocou alteração significativa ($P < 0,05$) desta actividade enzimática comparativamente à apresentada pelo grupo tratado pelo tóxico e pelo controlo. Contudo, entre o grupo ao qual foi administrado o tóxico e o de

controlo observamos uma variação de actividade com significado estatístico, figura 6.21(II).

Actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase

Pela figura 6.22(I) observamos que o tratamento com o óleo essencial nas doses de 0,1 e 0,3 mL/kg e administração posterior de tóxico provocou um decréscimo significativo ($P < 0,05$) da actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase em relação ao grupo tratado pelo tóxico, mas, comparativamente ao grupo controlo, a variação não tem significado estatístico ($P < 0,05$). O tratamento com a dose de 0,9 mL/kg ocasionou um aumento significativo ($P < 0,05$) desta actividade enzimática, tanto em relação ao grupo que recebeu o tóxico como em relação ao controlo.

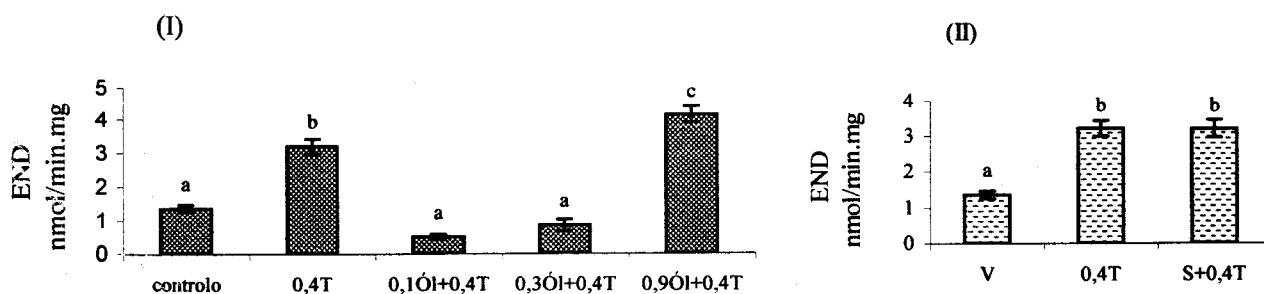


Figura 6.22 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha ÓI, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase da fracção microsomal do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

A figura 6.22(II) mostra-nos que o tratamento com a silimarina não provocou variação significativa ($P < 0,05$) da actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase relativamente ao grupo tratado pelo tóxico. Contudo, estes dois tratamentos provocaram um acréscimo significativo ($P < 0,05$) em relação ao controlo.

Actividade enzimática glutathione S-transferase

A representação gráfica da figura 6.23(I) mostra-nos que apenas o tratamento com óleo essencial na dose de 0,9 mL/kg provocou alteração significativa ($P < 0,05$) da actividade enzimática glutathione S-transferase relativamente ao tratamento pelo tóxico e ao controlo.

Pela figura 6.23(II) observamos que a administração da silimarina ocasionou uma variação significativa ($P < 0,05$) desta actividade enzimática relativamente ao grupo que recebeu o tóxico e ao controlo, mas estes grupos entre si não apresentam variação com significado estatístico ($P < 0,05$).

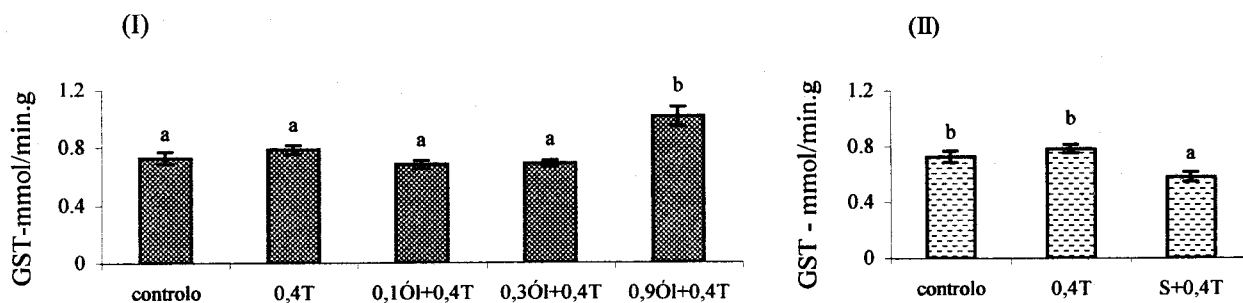


Figura 6.23 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática glutathione S-transferase do citosol do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Actividade enzimática glutathione redutase

A figura 6.24(I) mostra-nos que com os tratamentos efectuados com o óleo essencial, apenas a dose de 0,9 mL/kg ocasionou alteração significativa ($P < 0,05$) da actividade enzimática glutathione redutase comparativamente aos valores apresentados

pelo grupo que recebeu o tóxico e pelo controlo, cujos valores desta actividade enzimática não apresentam variação significativa ($P < 0,05$) entre si.

Pela observação da figura 6.24(II) podemos constatar que não ocorreu variação significativa ($P < 0,05$) da actividade enzimática glutathione redutase do grupo tratado com a droga hepatoprotectora relativamente ao grupo tratado com o tóxico e ao grupo controlo, nem estes entre si apresentam variação significativa ($P < 0,05$) desta actividade enzimática

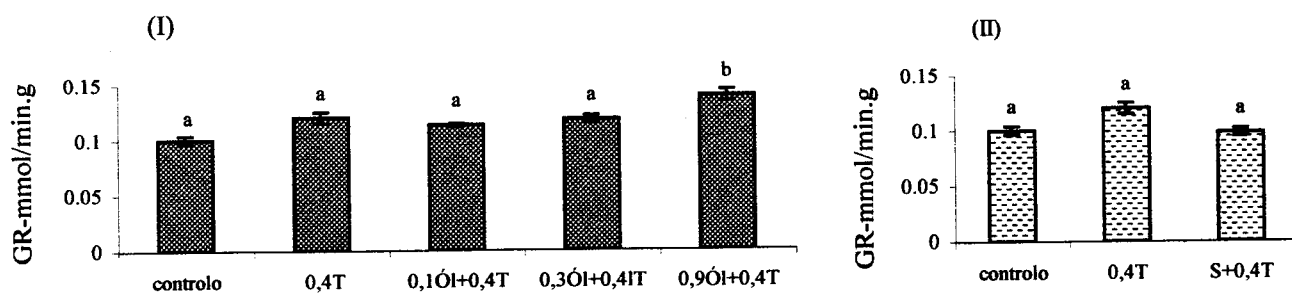


Figura 6.24 – Efeito da administração do tóxico T (tetracloreto de carbono) após tratamento com diferentes doses do óleo essencial da folha Ól, expressas em mL/kg de peso de animal (I) e após tratamento com uma droga hepatoprotectora S (silimarina) (II) na actividade enzimática glutathione redutase do citosol do fígado de ratos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 4 animais \pm desvio-padrão. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para $P < 0,05$.

6.7 – Actividade antimicrobiana

6.7.1 – Actividade antimicrobiana dos óleos essenciais da folha e do fruto

Os óleos essenciais da folha e do fruto apresentaram actividade inibitória contra *Serratia marcescens*, *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus epidermitis*, *Streptococcus equisimilis* e *Streptococcus pneumoniae*. Deve realçar-se que no caso da *Serratia marcescens* o diâmetro da zona de inibição aumentou durante as 48 h de ensaio.

No Quadro 6.5 da folha seguinte apresentam-se os resultados obtidos para as actividades antimicrobianas dos óleos essenciais, bem como as actividades inibitórias dos antibióticos específicos para cada microrganismo.

6.7.2 – Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória de cada um dos óleos ensaiados para os microrganismos que se lhes revelaram sensíveis apresentaram os valores que constam no quadro 6.6.

Quadro 6.6 – Actividade antimicrobiana (CMI em $\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais da folha e do fruto maduro

Óleos essenciais	Microrganismos Gram -	Microrganismos Gram +		
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphilococcus aureus</i>	<i>Staphilococcus epidermitis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Folha Primavera	141	140	985	95
Folha Outono	97	65	227	65
Fruto maduro	295	295	295	127

Quadro 6.5 - Atividades antimicrobianas dos óleos essenciais das folhas do *Laurus azorica* colhidas na Primavera e Outono e dos frutos maduros

Actividade antimicrobiana (4µl de óleo essencial)											
		Gram -						Gram +			
Microorganismos	Escherichia coli	Serratia marcescens	Pseudomonas aeruginosa	Staphilococcus aureus	Staphilococcus epidermitis	Streptococcus equisimilis	Streptococcus equisimilis	Enterobacter aerogenes	Sireptococcus pneumoniae		
Meio de Cultura / Isolamento	MacConkey	Gelose sangue	MacConkey	Gelose sangue	Gelose sangue	Gelose Chocolate	Gelose Chocolate	Gelose sangue	Gelose sangue		
Meio de Cultura / Antibiograma	Gelose sangue	Gelose sangue	Gelose sangue	Gelose sangue	Mueller-Hinton	Gelose sangue	Gelose sangue	Mueller-Hinton	Gelose sangue		
Tempos de leitura (halos em mm)	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	48h
Folha Prim.	x	10	x	9	8	8	8	x	x	10	11
Folha Out.	x	9	x	9	8	8	8	x	x	12	11
Fruto maduro	x	8	x	8	9	9	9	x	x	8	9
Antibiótico	Cefalotina 30 µg 18 18	Aztreonam 30 µg 10 10	Trimethoprim 5µg x x	Gentamicina 10µg 18 18	Gentamicina 10µg 23 23	Eritromicina 15µg 23 23	Eritromicina 15µg 23 23	Tobramicina 10µg 11 11	Oxacicina 5µg 20 20		

7 - Discussão

Este estudo sobre a folha e fruto do *Laurus azorica* permitiu um melhor conhecimento dos seus componentes químicos, bem como de algumas actividades biológicas, tornando possível estabelecer uma relação entre as características químicas e actividades farmacológicas atribuídas a alguns desses componentes e os efeitos curativos que a população madeirense julga obter quando utiliza esta planta na sua medicina tradicional.

Os extractos da folha e do fruto mostraram ter uma composição química semelhante com predominância de lactonas sesquiterpénicas. Os respectivos cromatogramas dos extractos de hexano e clorofórmio apresentaram diversas manchas, das quais duas maioritárias que revelaram características semelhantes à costunolida e dehidrocostus lactona que foram utilizadas como referência. Assim, sob a acção da radiação ultravioleta a 254 e 366 nm emitiram a mesma fluorescência e após revelação pela solução de H₂SO₄ a 5% uma das manchas adquiriu a mesma coloração verde e apresentou o mesmo R_f que a costunolida e a outra exibiu a coloração vermelha e R_f idênticos à dehidrocostus lactona tomada como referência.

Paralelamente observámos nos cromatogramas obtidos com o óleo do fruto preparado pelo processo artesanal que as manchas mais em evidência apresentaram o mesmo tipo de comportamento e idênticos valores de R_f que a costunolida e dehidrocostus lactona após a revelação com a solução de H₂SO₄ a 5%. Pelo que, parece podermos concluir que neste óleo estariam presentes os mesmos grupos de compostos encontrados nos extractos menos polares da folha e do fruto que preparámos.

Dos extractos preparados a partir da folha isolaram-se e caracterizaram-se os compostos maioritários. O isolamento foi feito por processos cromatográficos e a caracterização feita mediante a determinação das respectivas constantes físico-químicas e características espectroscópicas.

Do extracto de hexano separaram-se lactonas cujas estruturas apresentaram características das guaianolidas e das germacranolidas, um fitosterol vulgarmente presente nas plantas superiores e ainda um composto que revelou ser um hidrocarboneto monoterpénico.

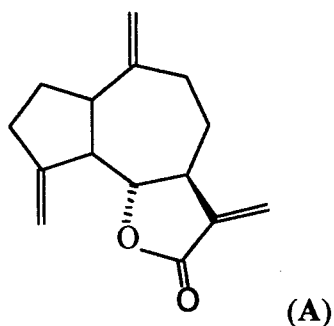
O composto designado por composto A, apresentou-se como uma substância cristalina, levógira, com ponto de fusão de 60-61°C.

O espectro de IV apresentou bandas a 3100, 1770, 1640 e 1130 cm^{-1} correspondendo respectivamente aos C-H vinílicos, à γ -lactona do grupo α -metileno- γ -lactona, às duplas ligações C=C e à ligação C-O.

O espectro de RMN ^1H mostrou a presença de três grupos metileno, um deles em H-13 apresenta sinais de dois dupletos a $\delta = 6,22$ (1H, *d*, $J=3,3$ Hz, Hb-13) e 5,50 ppm (1H, *d*, $J=3,3$ Hz, Ha-13), o segundo na posição H-14 de dois singuletos com $\delta = 4,90$ (1H, *s*, Ha-14) e 4,82 ppm (1H, *s*, Hb-14) e o terceiro em H-15 de dois dupletos com $\delta = 5,27$ (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, Ha-15) e 5,07 ppm (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, Hb-15). Assinalou ainda um tripleto atribuído ao protão do grupo CH-O na posição H-6 a $\delta = 3,97$ ppm (1H, *t*, $J=9,0$ Hz, H-6).

O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de 15 átomos de carbono, 7 sp^2 e 8 sp^3 que junto com o espectro de massas de ião molecular a m/z 230 está de acordo com a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$ para o composto.

Com base nas constantes físicas, propriedades espectroscópicas e fragmentação molecular identificou-se este composto como sendo a **dehidrocistus lactona**.



Os dados obtidos são concordantes com os referenciados na literatura (El-Feraly *et al.*, 1979; Silva *et al.*, 1981; Luengo *et al.*, 1986; Shoji *et al.*, 1986; Cruz Morais, 1987 e Dey e Harborne, 1991).

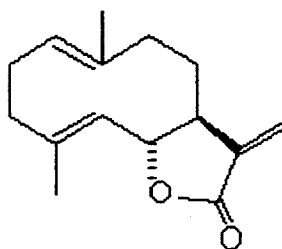
O composto B é uma substância incolor e cristalina, dextrógira, com ponto de fusão de 105-106°C.

O espectro de IV apresentou bandas a 3100, 1760, 1660 e 1140 cm^{-1} consistentes com a presença de C-H vinílicos, da γ -lactona, das duplas ligações C=C e da ligação C-O.

O espectro de RMN ^1H revelou a existência de um grupo metileno na posição H-13 sinalizado por dois dupletos, um a $\delta = 6,27$ (1H, *d*, $J=3,6$ Hz, Hb-13) e outro a $\delta = 5,53$ ppm (1H, *d*, $J=3,6$ Hz, Ha-13), dois grupos metilo das posições H-14 e H-15, cujos sinais dois singuletos aparecem a $\delta = 1,42$ e $\delta = 1,70$ ppm, cada um deles integra com 3H, dois grupos CH=C das posições H-1 e H-5 sendo o sinal do próton em H-1 um duplo duplete com $\delta = 4,85$ ppm (1H, *dd*, $J_1 = 4,8$ e $J_2 = 5,1$ Hz) e do próton em H-5 um duplete com $\delta = 4,74$ ppm (1H, *d*, $J=10,2$ Hz) e um grupo CH-O da posição H-6 sinalizado por um duplo duplete com $\delta = 4,57$ ppm (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $8,7$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de 15 átomos de carbono, dos quais 7 sp^2 (C-1, C-4, C-5, C-10, C-11, C-12 e C-13) e os restantes 8 sp^3 .

A fórmula molecular deste composto $C_{15}H_{20}O_2$ foi estabelecida a partir do espectro de massas que apresentou a formação do ião molecular a m/z 232. O tipo de fragmentação obtida bem como os restantes dados são coincidentes com os descritos na literatura (Kalsi et al., 1979; Shoji *et al.*, 1986; Cruz Morais, 1987 e Dey e Harborne, 1991) e permitem identificar este composto como sendo a **costunolida**.



(B)

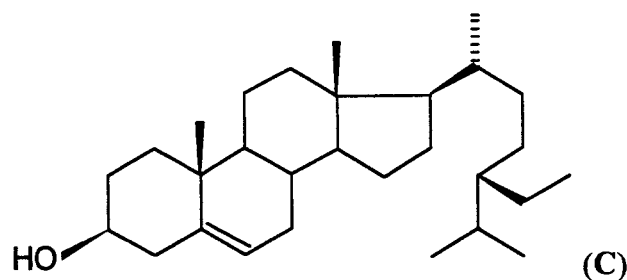
O composto C é um sólido branco cristalino, levógiro, com o ponto de fusão de 135-136°C.

O seu espectro de IV apresentou bandas intensas a 3420, 1650 e 1464 cm^{-1} correspondentes à presença do grupo OH, da dupla ligação C=C e das ligações C-H.

O espectro de RMN 1H revelou a presença de seis grupos metilo cujos prótons apresentam sinais a $\delta = 1,00$ ppm (3H, *s*, Me-18), $\delta = 0,67$ ppm (3H, *s*, Me-19), $\delta = 0,93$ ppm (3H, *d*, $J=6,5$ Hz, Me-21), $\delta = 0,84$ ppm (3H, *d*, $J=6,0$ Hz, Me-26), $\delta = 0,81$ ppm (3H, *d*, $J=6,0$ Hz, Me-27) e $\delta = 0,83$ ppm (3H, *t*, $J=7,2$ Hz, Me-29). Assinalou ainda um grupo CH=C na posição H-6 com $\delta = 5,35$ ppm (1H, *m*) e um sinal do próton em H-3 ligado ao hidroxilo a $\delta = 3,52$ ppm (1H, *m*).

O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de 29 átomos de carbono, em que o carbono ao qual está ligado o hidroxilo apresenta o sinal a $\delta = 71,8$ ppm (C-3) e os carbonos envolvidos na dupla ligação (C-5 e C-6) estão localizados a $\delta = 140,7$ e $\delta = 121,7$ ppm.

O espectro de massas apresentou o íão $[M+1]^+$ a m/z 415 de acordo com a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. O tipo de fragmentação, os dados espectroscópicos e as constantes físicas obtidas são concordantes com os valores referidos na literatura para o β -sitosterol (Rodilla, 1988; Greca *et al.*, 1990 e Dey e Harborne, 1991), pelo que identificámos este composto como tal.



Da mistura D faziam parte dois compostos isómeros conforme indicaram as respectivas análises por GC/MS.

O espectro de IV apresentou bandas intensas a 1760 cm^{-1} referente ao grupo γ -lactona, a 1735 cm^{-1} correspondendo ao $C=O$ de um éster (acetato), a 1660 cm^{-1} às duplas ligações $C=C$ e a $1230, 1140$ e 1020 cm^{-1} aos $C-O$.

Os espectros de RMN 1H e ^{13}C forneceram sinais correspondentes a cada um dos isómeros.

Assim, para o composto D1 o RMN 1H mostrou a presença de um grupo metileno exocíclico conjugado com a γ -lactona sinalizado por um duplete a $\delta = 6,3$ (1H, *d*, $J=3,5\text{Hz}$, H-13b) e $5,9$ ppm (1H, *d*, $J=3,5\text{Hz}$, H-13a), três grupos metilo, um a $\delta = 1,9$ ppm (3H, *s*, Me-14), outro a $\delta = 1,4$ ppm (3H, *s*, Me-15) e o terceiro de um grupo COOMe sinalizado a $\delta = 2,1$ ppm (3H, *s*, COOMe). Mostrou ainda os seguintes agrupamentos: CH-OAc a $\delta = 5,1$ ppm (1H, *d*, $J=9,8\text{Hz}$, H-8) e CH-O a $\delta = 4,01$ ppm (1H, *d*, $J=6,1\text{Hz}$, H-6) e um protão a $\delta = 3,05$ ppm (1H, *m*, H-7).

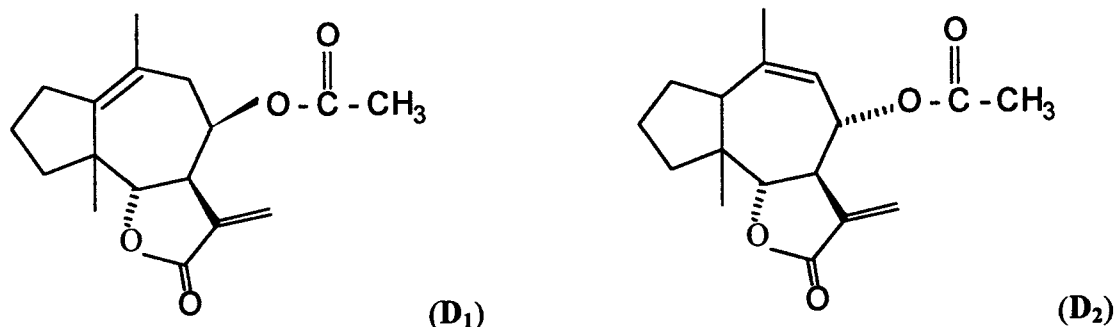
O espectro de RMN ^{13}C do composto D1 revelou a presença de 17 átomos de carbono, sendo dois pertencentes ao grupo acetato a $\delta = 20,1$ ppm para o carbono $\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ e a $\delta = 168,7$ ppm para o carbono $\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$, três carbonos com ligação C-O, um da posição C-6 a $\delta = 77,2$ ppm, outro em C-8 com $\delta = 72,0$ ppm e outro em C-12 com $\delta = 169,6$ ppm. Os carbonos das duplas ligações apresentaram valores de desvio químico a 139,6 ppm (C-1), a 134,9 ppm (C-10), a 141,1 ppm (C-11), a 126,4 ppm (C-13) e a 169,6 ppm (C-12).

Relativamente ao composto D2 os sinais obtidos no espectro de RMN ^1H revelaram algumas diferenças comparativamente aos obtidos para o composto D1, nomeadamente nos sinais dos prótons dos dois grupos metilo em H-14 e H-15 dois singletos a $\delta = 1,8$ ppm (3H, *s*, Me-14) e a $\delta = 1,3$ ppm (3H, *s*, Me-15), um grupo =CH em C-9 com $\delta = 5,2$ ppm (1H, *m*, H-9) e um grupo CH a $\delta = 3,08$ ppm (1H, *m*, H-1).

Os sinais obtidos no espectro de RMN ^{13}C deste composto D2 diferiram dos obtidos para o D1 nos sinais do C-1 cujo desvio químico apareceu a 51,5 ppm por este não ter sofrido desblindagem como aconteceu no respectivo carbono do composto D1 devido à dupla ligação e no sinal do C-9 em que o sinal aparece a campo mais baixo $\delta = 125,1$ ppm por este carbono estar envolvido na dupla ligação.

Os espectros de massas revelaram o ião $[\text{M}+2]^+$ a $m/z = 292$ para o composto D2 e para o composto D1 não se pode detectar o ião molecular, de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$.

Os dados espectroscópicos conjuntamente com o tipo de fragmentação obtidos para estes compostos permitiram identificá-los como sendo a **8 β -acetoxi-pseudoguaian-1(10),11(13)-dien-6 α ,12-olida** (D1) e a **8 α -acetoxi-pseudoguaian-9,11(13)-dien-6 α , 12-olida** (D2) e propor as seguintes estruturas para os mesmos:



O composto E foi identificado com base nos dados espectroscópicos obtidos através dos espectros de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMQC, HMBC e COSY identificou-se este composto como sendo a **8-acetoxi-1-hidroxigermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olida** com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$.

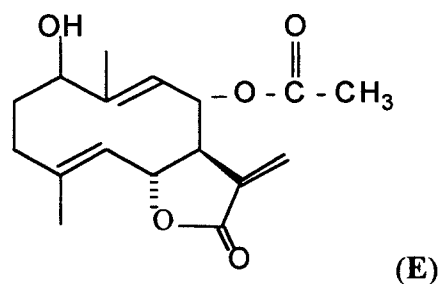
O espectro de IV deste composto mostrou a 3450 cm^{-1} uma banda larga relativa à presença do grupo OH, a 1765 cm^{-1} da γ -lactona, a 1735 cm^{-1} do éster (acetato), a 1670 cm^{-1} das duplas ligações C=C e a $1235, 1140$ e 1020 cm^{-1} das ligações C-O.

O espectro de RMN ^1H assinalou a presença de um par de dupletos relativos aos prótons de um grupo metileno exocíclico de uma γ -lactona insaturada a $\delta = 6,28\text{ ppm}$ (1H, *d*, $J=2,1\text{ Hz}$, Ha-13) e $\delta = 5,74\text{ ppm}$ (1H, *d*, $J=2,1\text{ Hz}$, Hb-13), três grupos metilo, um deles Me-14, outro Me-15 e outro -COOMe com desvios químicos respectivamente a $1,83\text{ ppm}$ (3H, *s*, Me-14), a $1,91\text{ ppm}$ (3H, *s*, Me-15) e a $2,08\text{ ppm}$ (3H, *s*, -COOMe), um grupo OH na posição 1 em que o sinal do próton aparece como um duplo duplete a $\delta = 4,40\text{ ppm}$ (1H, *dd*, H-1), um grupo CH-O a $\delta = 5,39\text{ ppm}$ (1H, *t*, $J=6,5\text{ Hz}$, H-6), dois grupos =CH um a $\delta = 5,32\text{ ppm}$ (1H, *d*, $J=6,4\text{ Hz}$, H-9) e outro a $\delta = 4,86\text{ ppm}$ (1H, *d*, $J=6,7\text{ Hz}$, H-5), um grupo CH ligado ao acetato em que o sinal do próton, um tripleto, aparece a $\delta = 4,62\text{ ppm}$ (1H, *t*, $J=6,0\text{ Hz}$, H-8) e outro grupo CH a $\delta = 3,03$ (1H, *m*, H-7).

O espectro de RMN ^{13}C revelou a presença de 17 átomos de carbono, dois correspondem aos carbonos do grupo acetato com $\delta = 21,1$ ppm ($\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) e $\delta = 170,0$ ppm ($\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), três carbonos com oxigénios apresentam desvios químicos a 66,7 ppm (C-1), a 73,1 ppm (C-6), a 74,1 ppm (C-8) e um carbonilo de lactona a 169,3 ppm (C-12), sete estão envolvidos nas duplas ligações com desvios químicos a 137,9 ppm (C-4), a 125,9 ppm (C-5), a 126,2 ppm (C-9), a 142,9 ppm (C-10), 136,8 ppm (C-11), 123,0 ppm (C-13).

A atribuição dos carbonos e protões da molécula deste composto e a sua interligação foi completada com o recurso às técnicas bidimensionais Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) e Correlated Spectroscopy (COSY).

O espectro de massas não indicou o ião molecular, sendo a fragmentação correspondente a $m/z = 306$ consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$. O tipo de fragmentação observada e os dados espectroscópicos obtidos permitiram propor para este composto a seguinte estrutura:



O composto F comprovou ser um hidrocarboneto monoterpénico identificado através dos seus dados espectroscópicos.

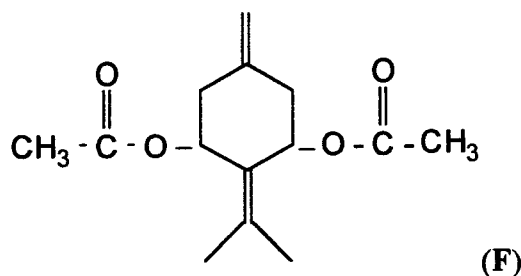
O espectro de IV deste composto revelou bandas intensas a 3090 cm^{-1} pela presença do grupo C-H vinílico, a 2930 e 2850 cm^{-1} dos CH_3 do grupo isopropílico, a 1760 e 1730 cm^{-1} correspondentes ao éster dos grupos acetato, a 1650 cm^{-1} das ligações duplas C=C e a 1230 e 1020 cm^{-1} das ligações C-O dos ésteres.

O espectro de RMN¹H indicou a presença de um grupo metileno na posição 7 com os protões assinalados por um duplete a $\delta = 6,34$ ppm (1H, *d*, $J=2,9$ Hz, Hb-7) e a $\delta = 5,86$ ppm (1H, *d*, $J=2,9$ Hz, Ha-7), dois grupos CH-OAc nas posições 3 e 5, sinalizados por um duplo duplete a $\delta = 3,84$ ppm (2H, *dd*, $J_1=4,6$ e $J_2=3,8$ Hz, H-3 e 5), um grupo isopropilo com os protões integrados num singuleto a $\delta = 1,79$ ppm (2x3H, *s*, Me-9 e Me-10) e dois grupos metilo dos acetatos a $\delta = 2,07$ ppm (2x3H, *s*, -COOMe).

O espectro de RMN¹³C mostrou a existência de 14 átomos de carbono, quatro pertencentes aos grupos acetato com sinais a $\delta = 21,0$ ppm (OOCCH₃) e a $\delta = 169,7$ ppm (OOCCH₃), dois carbonos oxigenados em C-3 e C-5 com $\delta = 72,5$ ppm e sinais dos carbonos quaternários a $\delta = 146,2$ ppm (C-1) e a $\delta = 169,3$ ppm (C-4).

O espectro de massas revelou o ião molecular a $m/z = 252$ de acordo com a fórmula molecular C₁₄H₂₀O₄.

Com base nos dados espectroscópicos obtidos propomos para este composto a seguinte fórmula de estrutura que corresponde ao **3,5-diacetoxi-1(7),4(8)-*p*-mentadieno. (F)**



Além das lactonas identificadas no extracto de hexano da folha do *L. azorica*, foram identificadas outras e ainda misturas de alcóois e hidrocarbonetos nos extractos de clorofórmio e de etanol respectivos.

Assim, a partir do extracto de clorofórmio separaram-se 3 compostos, um mostrou ser uma mistura de alcóois e os outros dois 2 lactonas.

O espectro de IV da mistura G apresentou as bandas características dos alcóois, a 3306 cm^{-1} uma banda larga dos grupos OH, a 1215 cm^{-1} das ligações C-O e as restantes bandas correspondem às vibrações de alongação e deformação dos grupos CH_3 e CH_2 .

O RMN ^1H sinalizou os protões do grupo $-\text{CH}_2\text{-OH}$ um triplete a $\delta = 3,64$ ppm, do grupo $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ multiplete a $\delta = 1,58$ ppm, dos grupos $-(\text{CH}_2)_n$ multiplete a $\delta = 1,25$ ppm e dos grupos metilo $-(\text{CH}_2)_n\text{-Me}$ triplete a $\delta = 0,88$ ppm.

Dado que estas são as características referenciadas na literatura (Silverstein, 1991 e Lambert *et al.*, 1998) para os alcóois de cadeia linear, assim identificámos a mistura G como sendo uma **mistura de alcóois de cadeia linear**.

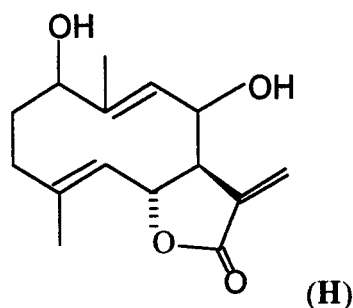
$\text{CH}_3\text{-}(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{OH} \Rightarrow$ Mistura G

O composto H apresentou no seu espectro de IV bandas intensas, das quais salientamos a banda a 3418 cm^{-1} indicadora da presença dos grupos OH, a 1755 cm^{-1} da γ -lactona, a 1672 cm^{-1} das duplas ligações C=C, a $1273,1148$ e 1026 cm^{-1} das ligações C-O.

O espectro de RMN ^1H apresentou sinais correspondentes aos protões dos grupos metilo na forma de dois singletos a $\delta = 1,80$ ppm (3H, *s*, Me-14) e $\delta = 1,78$ ppm (3H, *s*, Me-15), dois dupletos dos protões do grupo metileno localizado na posição 13 a $\delta = 5,27$ ppm (1H, *d*, $J=10,0$ Hz, Hb-13) e $4,95$ ppm (1H, *d*, $J=10,0$ Hz, Ha-13), dois singletos largos indicadores dos protões vinílicos a $\delta = 6,16$ ppm (1H, *sl*, H-5) e $\delta = 6,07$ ppm (1H, *sl*, H-7) e sinais dos protões dos grupos CH-OH das posições 1 e 8 a $\delta = 4,64$ ppm (1H, *t*, $J=9,6$ Hz, H-1) e $\delta = 4,44$ ppm (1H, *m*, H-8).

O espectro de RMN ^{13}C assinalou 15 átomos de carbono concordante com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$. Os carbonos das duplas ligações apresentam sinais a $\delta = 133,2$ ppm (C-4), 126,5 ppm (C-5), 131,4 ppm (C-9), 143,0 ppm (C-10), 139,8 ppm (C-11), 169,9 ppm (C-12) e 121,1 ppm (C-13).

Não foi possível efectuar o espectro de massa, porque quando foi isolado este composto o espectrómetro de massas não estava disponível. Contudo, com base nos dados obtidos no espectro de IV e RMN ^1H e ^{13}C foi possível identificar o composto como o **1,8-dihidroxigermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olida** com a estrutura a seguir indicada.



A outra lactona isolada deste extracto e designada por composto E, já tinha também sido separada do extracto de hexano.

A partir do extracto de etanol separaram-se 3 compostos, sendo um deles uma mistura de hidrocarbonetos e os outros dois apresentaram estruturas lactónicas isómeras.

Em relação à mistura I o espectro de IV obtido permitiu concluir que se tratava de uma **mistura de hidrocarbonetos saturados** pela apresentação de bandas típicas destes compostos (Silverstein, 1991). Assim, a 2925 e 2850 cm^{-1} mostrou as bandas correspondentes às vibrações de alongação dos grupos CH_3 e CH_2 , e a 1460, 1380 e 760 cm^{-1} as bandas das vibrações de deformação dos mesmos grupos.

O espectro de massas forneceu valores dos iões moleculares dos diferentes hidrocarbonetos separados por GC, conforme indicado no ponto 6.2.3.1, que permitiram propor tratar-se de **hidrocarbonetos com cadeias carbonadas entre C18 e C25**.



As estruturas lactónicas para os compostos J e L foram obtidas a partir de técnicas espectroscópicas.

O espectro de IV do composto J apresentou bandas características dos grupos C-H vinílicos a 3081 cm^{-1} , da γ -lactona, das duplas ligações C=C a 1658 cm^{-1} e das ligações C-O a 1175 e 1085 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H apresentou sinais de dois grupos metileno nas posições 14 e 15 a $\delta = 5,34\text{ ppm}$ (1H, *d*, $J=1,8\text{ Hz}$, H_b-14) e $5,11\text{ ppm}$ (1H, *d*, $J=1,8\text{ Hz}$, H_a-14) e a $\delta = 5,04\text{ ppm}$ (1H, *sl*, H_b-15) e $4,92\text{ ppm}$ (1H, *sl*, H_a-15). Os protões das posições 1 e 5 do grupo epóxido estão sinalizados por um multipeto e um singuleto largo a $\delta = 4,45\text{ ppm}$ (1H, *m*, H-1) e a $\delta = 3,45\text{ ppm}$ (1H, *sl*, H-5) respectivamente. Os protões das posições 8 e 13 fazem parte de outro grupo epóxido e estão sinalizados por um multipeto a $\delta = 4,15\text{ ppm}$ (1H, *m*, H-8) e a $\delta = \sim 2,6\text{ ppm}$ misturado com outros sinais da molécula.

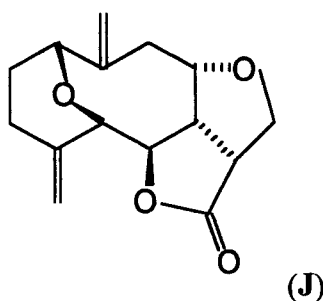
O espectro de RMN ^{13}C assinalou a presença de 15 átomos de carbono, dos quais: 6 grupos metileno, 6 grupos metino e 3 carbonos quaternários. Os carbonos envolvidos nas duplas ligações foram sinalizados a $\delta = 144,1\text{ ppm}$ (C-4), a $107,1\text{ ppm}$ (C-15), a $146,9\text{ ppm}$ (C-10), a $117,1\text{ ppm}$ (C-14) e a $175,6\text{ ppm}$ um carbonilo (C-12).

A atribuição dos carbonos e protões da molécula deste composto e a sua interligação foi completada com o recurso às técnicas bidimensionais Heteronuclear

Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) e Correlated Spectroscopy (COSY).

O espectro de massa apresentou o íon molecular a $m/z = 262$ consistente com a fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_4$.

A estrutura proposta para este composto foi estabelecida com base nos dados espectroscópicos obtidos e identificado o composto como o **1(5),8(13)-diepoxigermacran-10(14),4(15)-dien-6 β ,12-olida**.



O espectro de IV do composto L apresentou a 3081 cm^{-1} a banda correspondente aos C-H vinílicos, a 1761 cm^{-1} a banda da γ -lactona, a 1657 cm^{-1} assinalou as duplas ligações C=C e a 1190 e 1082 cm^{-1} a presença das ligações C-O.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram realizados dissolvendo o composto em dois solventes, o clorofórmio deuterado e a acetona deuterada.

Qualquer dos espectros de RMN ^1H assinalou a existência de grupos metileno nas posições 14 e 15 com desvios químicos compreendidos entre 5,38 e 5,11 ppm para os prótons em H-14 e entre 5,04 e 4,81 ppm para os prótons em H-15.

Os prótons do grupo epóxido nas posições 1 e 5 foram assinalados por um multipeto em H-1 com δ variando entre 4,41 e 4,38 ppm e em H-5 como um singuleto largo com δ entre 3,47 e 3,45 ppm. Os prótons das posições 8 e 13 do outro grupo

epóxido foram sinalizados por um multipeto com valores de δ entre 4,25 e 4,13 ppm e a $\delta = \sim 2,6$ ppm misturado com outros sinais da molécula.

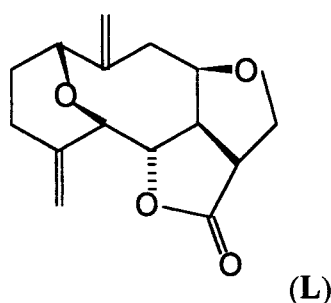
Os espectros de RMN ^{13}C obtidos com o composto dissolvido em qualquer dos solventes revelaram a existência de 6 grupos metileno, 6 metinos e 3 carbonos quaternários.

Os carbonos das duplas ligações apresentaram desvios químicos para a ligação entre C-10 e C-14 a $\delta = 151,3$ ppm $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ e $\delta = 149,6$ ppm $[(\text{CDCl}_3)]$ em C-10 e $\delta = 116,9$ ppm $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ e $\delta = 117,4$ ppm $[(\text{CDCl}_3)]$ em C-14, para a ligação entre C-4 e C-15 a $\delta = 145,5$ ppm $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ e $\delta = 144,1$ ppm $[(\text{CDCl}_3)]$ em C-4 e $\delta = 107,0$ ppm tanto em $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ como em $[(\text{CDCl}_3)]$ para o C-15 e o carbono em C-12 do grupo carbonilo a $\delta = 176,2$ ppm $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ e $\delta = 175,5$ ppm $[(\text{CDCl}_3)]$.

A completa atribuição das posições dos prótons e carbonos e a sua interligação fez-se com o auxílio das técnicas bidimensionais Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) e Correlated Spectroscopy (COSY).

O espectro de massas revelou a presença do ião $[\text{M}+1]^+$ a $m/z = 263$ concordante com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$.

Com base nos dados espectroscópicos estabelecemos a estrutura e identificámos o composto como o **1(5),8(13)-diepoxigermacreno-10(14),4(15)-dien-6 α ,12-olida**.



As estruturas dos compostos J e L poderão ter sido resultado de modificações sofridas pelos compostos originais durante o tratamento a que foi submetido este extracto com vista à obtenção do extracto alcaloídico e no qual apenas se detectaram alcalóides em quantidades vestigiais. A acidificação pelo ácido clorídrico poderá eventualmente ter conduzido à formação de carbaniões e a extracção pelo éter ter provocado oxidação da molécula por acção dos peróxidos que normalmente se encontram presentes neste solvente.

Uma outra fracção importante da folha e também do fruto do *L. azorica* é o óleo essencial extraído de cada um destes órgãos da planta, dos quais fizemos um estudo da composição química e actividade biológica.

Nos cromatogramas obtidos a partir do óleo essencial das folhas foi possível identificar e quantificar 46 componentes. Sendo de destacar 14 componentes maioritários com quantidades superiores a 1%. No óleo essencial da folha da Primavera identificaram-se como componentes predominantes o α -pineno (20,88%), 1,8-cineol (15,79%), β -pineno (14,89%), 3-careno (5,64%), acetato de terpenilo (4,45%) e τ -muurolol (2,78%), enquanto que no do Outono estes foram o α -pineno (22,42%), 1,8-cineol (16,95%), β -pineno (15,60%), acetato de terpenilo (4,73%), pinocarvona (3,00%) e 3-careno (2,82%),

Nos cromatogramas dos óleos essenciais dos frutos identificaram-se 41 componentes, dos quais 16 com quantidades superiores a 1%. Os componentes predominantes foram o *trans*- β -ocimeno (21,61%), α -pineno (15,64%), *cis*-ocimeno (8,07%), β -pineno (7,55%), germacreno D (4,88%), 3-careno (4,23%) e β -elemeno (3,00%).

A identificação dos componentes fez-se por comparação dos respectivos tempos de retenção com os das substâncias padrão e por enriquecimento de picos. Esta informação foi complementada pela interpolação linear dos respectivos índices de retenção na escala de Índices de Kovats e pela comparação dos respectivos espectros de massa com os referidos na literatura e base de dados computadorizada Wiley. A quantificação foi feita com base nas áreas dos picos respectivos.

Pela análise do quadro 7.1 que a seguir se apresenta, constatamos que na composição química do óleo essencial das folhas a quantidade total de monoterpenos é semelhante nas duas épocas de colheita. No caso dos hidrocarbonetos sesquiterpénicos o óleo essencial das folhas colhidas na Primavera apresenta maior predominância deste tipo de compostos relativamente ao óleo essencial das folhas da época outonal.

No óleo essencial obtido dos frutos maduros observou-se maior abundância de monoterpenos e menor de sesquiterpenos contrariamente ao que se observou na análise do óleo essencial dos frutos verdes.

Quadro 7.1 – Composição dos óleos essenciais por tipo de compostos

Compostos (%)	Folhas Outono	Folhas Primavera	Frutos maduros	Frutos verdes
Monoterpenos hidrocarbonados	48,2	49,6	65,9	40,6
Monoterpenos oxigenados	25,7	24,6	6,7	3,8
Sesquiterpenos hidrocarbonados	2,6	3,8	14,1	30,8
Sesquiterpenos oxigenados	2,5	4,9	3,9	4,1
Ésteres derivados	6,3	6,7	0,8	1,0

Estabelecendo uma comparação entre o presente estudo e outros anteriores sobre o óleo essencial da folha do *L. azorica* (Carmo e Frazão, 1975; Hokwerda *et al.*, 1982 e

Cruz Morais 1987), verificámos que os componentes maioritários como o α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno e acetato de terpenilo por nós encontrados, também são referidos nesses trabalhos como tal.

Comparando com a outra espécie do género *Laurus*, o *Laurus nobilis*, nos vários trabalhos publicados sobre a sua composição química (Zola *et al.*, 1977; Hokwerda *et al.*, 1982; Tanriverdi *et al.*, 1991 e Fiorini *et al.*, 1997) constatamos que o componente maioritário referido para esta espécie é o 1,8-cineol, enquanto que o predominante para o *L. azorica* é o α -pineno. Dos restantes componentes maioritários são comuns às duas espécies o α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno e acetato de terpenilo.

Quanto ao óleo essencial do fruto não encontramos referências bibliográficas sobre a composição química do óleo do fruto do *L. azorica*, mas em relação à composição química do óleo do fruto do *L. nobilis* Tanriverdi *et al.* (1991) referem como componente maioritário o 1,8-cineol, enquanto que no óleo essencial do *L. azorica* por nós estudado o componente maioritário foi o *trans*- β -ocimeno.

Analisando a composição química do óleo essencial da folha e do fruto verificámos que o óleo essencial deste último, principalmente do fruto verde é mais rico em sesquiterpenos que o da folha. No entanto, a totalidade dos monoterpenos é muito semelhante entre o óleo essencial da folha e o do fruto maduro.

Dado que não existem estudos descritos sobre a actividade farmacológica do óleo essencial do *L. azorica* e como grande parte dos óleos essenciais estudados apresentam acção antimicrobiana e farmacológica interessantes, face à razoável quantidade de óleo obtido desta planta realizámos estudos nesse âmbito com os óleos essenciais da folha e do fruto do *L. azorica*.

Os resultados obtidos mostraram que estes óleos essenciais à semelhança de outros, como os óleos do *Laurus nobilis*, de várias espécies de *Origanum*, de *Helichrysum*, de *Mentha* e muitos mais referidos na literatura por Deans e Ritchie (1987), Sivropoulou *et al.* (1995, 1996) e Roussis *et al.* (1998), também manifestaram actividade antimicrobiana face a alguns dos microrganismos utilizados neste trabalho, sendo de salientar a actividade sobre a *Serratia marcescens* onde a inibição do desenvolvimento bacteriano levou à formação de um halo de 10 mm, valor este também obtido com o antibiótico específico.

Em relação aos outros microrganismos utilizados, os óleos essenciais da folha e fruto só apresentaram actividade face a alguns dos microrganismos Gram +, nomeadamente o *Staphylococcus aureus*, o *Staphylococcus epidermitis*, o *Streptococcus equisimilis* e o *Streptococcus pneumoniae*, correspondendo os respectivos halos de inibição, com um diâmetro médio de 9 mm, a cerca de 50% da apresentada pelos antibióticos utilizados como referência.

Estes resultados mostraram que os óleos essenciais das folhas possuem uma actividade inibitória mais intensa que o óleo do fruto, uma vez que a inibição do desenvolvimento bacteriano ocorreu em maior extensão, exceptuando a acção sobre o *Staphylococcus epidermitis* em que se verificou o inverso.

As actividades antimicrobianas observadas vêm de encontro ao referido na literatura, onde a actividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais é relacionada com alguns componentes também presentes nos óleos essenciais do *L. azorica*, como o 1,8-cineol, linalol, acetato de linalilo, α -terpineol, terpineno-4-ol, carvacrol (Sivropoulou *et al.*, 1995, 1996) e terpenos oxigenados em geral (Vokou *et al.*, 1993).

Para além da actividade do óleo essencial interessaria estudar a acção dos compostos isolados dos extractos preparados. No entanto, as quantidades obtidas foram muito pequenas o que tornou impossível realizar estudos farmacológicos para além dos estudos de identificação e caracterização química efectuados, tanto mais que a quantidade da planta à nossa disposição era relativamente pequena.

Quanto ao óleo essencial não se encontra descrito a actividade biológica e face à actividade antimicrobiana manifestada o nosso estudo prosseguiu com a pesquisa da actividade biológica geral do óleo essencial da folha em murganhos Charles River e em ratos Wistar.

Sendo que o óleo artesanal do fruto continua a ser usado pela população madeirense com diversos fins curativos e ainda porque quando este é obtido por expressão contém vestígios do óleo essencial em que muitos dos componentes são comuns aos do óleo essencial da folha, efectuámos também idêntico estudo com um óleo adquirido numa Farmácia local.

Na triagem hipocrática geral do óleo essencial da folha os resultados obtidos salientaram uma actividade depressora sobre o S.N.C., mais ou menos intensa consoante a dose de óleo essencial utilizada. Observou-se que com as doses de 0,6 e 1 mL/kg de óleo essencial, os animais manifestaram uma diminuição da actividade motora e do tónus muscular e sinais claros de ataxia e analgesia. Paralelamente a esta acção observou-se uma acentuada hipotermia. Este efeito já foi observado em estudos efectuados com o óleo essencial do *Laurobasidium lauri* cuja composição estudada por Cruz Morais em 1987 é semelhante à do óleo essencial do *L. azorica*.

A actividade analgésica foi posteriormente confirmada por ensaios realizados em murganhos onde a indução da dor foi conseguida pela administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético. Observou-se que o número de contorsões dos animais

causadas pelo agente agressor diminuiu com o aumento da dose de óleo essencial administrado.

Diversas acções depressoras do S.N.C. têm sido manifestadas por outras plantas contendo óleos essenciais. Citando algumas dessas plantas referimos a *Valeriana officinalis* cuja acção sedativa é atribuída quer aos componentes dos seus extractos quer aos ésteres do borneol presentes no seu óleo essencial. A *Passiflora incarnata* e as espécies de *Lavandula* são outras plantas às quais são atribuídas acções idênticas. Relativamente à noção exacta de quais os componentes responsáveis por este tipo de acções destas e outras plantas ainda não existem estudos concludentes, pensa-se contudo, resultarem de acções de sinergismo (Paris e Hurabielle, 1986; Costa, 1994 e Bruneton, 1999).

Existem já estudos em relação a componentes dos óleos essenciais que apresentaram tais actividades depressoras, como é o caso do 1,8-cineol, um dos principais componentes de muitos óleos essenciais, que num trabalho efectuado por Santos e Rao (2000) manifestou acção antiinflamatória e antinociceptiva em ratos e murganhos. Também Ahmed *et al.* (2000) observaram a actividade analgésica do eugenol em estudos realizados em murganhos, o mesmo se pode dizer em relação ao mirceno com base nos trabalhos efectuados em roedores por Paumgartten *et al.* (1990) e Da Silva *et al.* (1991). Pelo que a actividade analgésica do óleo essencial do *L. azorica* deverá estar ligada à presença destes componentes, principalmente do 1,8-cineol que é um dos seus componentes maioritários.

Nos ensaios efectuados com o óleo artesanal do *L. azorica* não se observaram quaisquer das acções manifestadas pelo óleo essencial da folha, tal como se previa, uma vez que a quantidade de óleo essencial presente no óleo artesanal era vestigial.

No intuito de aprofundar o conhecimento sobre as actividades destes óleos, prosseguimos com estudos toxicológicos. Assim, procurámos avaliar o efeito da administração destes óleos sobre a actividade de alguns enzimas marcadores de lesão hepática no soro de ratos Wistar e também, num estudo a nível molecular, sobre o efeito na actividade de alguns enzimas do sistema citocromo P450 do fígado dos mesmos animais dada a importância deste sistema enzimático no metabolismo de endo e xenobióticos.

Sabemos através de diversos estudos (Hiroi *et al.*, 1995 e De-Oliveira *et al.*, 1997, 1999) que os óleos essenciais interferem nas actividades enzimáticas de algumas das subfamílias do citocromo P450, podendo conduzir ao aparecimento de fenómenos de toxicidade. Alguns dos componentes dos óleos essenciais mencionados nestes trabalhos como sendo os mais responsáveis pelas alterações verificadas, também se encontram presentes no óleo essencial da folha do *L. azorica*, sendo de referir o α -pineno, o 1,8-cineol, o mirceno e o cadineno.

Esta metodologia constitui o procedimento normalmente seguido em estudos farmacológicos de novas drogas quando se pretende avaliar a existência de uma possível actividade hepática (Mehendale, 1987 e Le Dinh e Christoforov, 1994).

Os enzimas do soro escolhidos para este estudo foram a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina. Escolhemos estes enzimas pelo facto de os respectivos valores serem indicadores da integridade do tecido hepático, sendo que os valores da ALT, AST e fosfatase alcalina do soro aumentam no decurso de afecções, nomeadamente a necrose hepatocelular causada por hepatites originadas por medicamentos ou tóxicos (Tietz, 1976; Leporrier, 1993 e Muller, 1998).

Se o tratamento efectuado com uma droga não provocar alteração dos valores normais destas actividades enzimáticas, provavelmente esse tratamento não causou lesões no tecido hepático, no entanto, há que esclarecer se não haverá acção tóxica ao nível molecular, pelo que um dos passos seguintes desse estudo será a avaliação do funcionamento do fígado estudando as actividades enzimáticas envolvidas nos processos de metabolização e desintoxicação, principalmente as actividades do citocromo P450, glutathione *S*-transferase e glutathione reductase, uma vez que é neste órgão que ocorrem maioritariamente os processos de biotransformação de drogas e xenobióticos em geral (Haley, 1987; Popp e Catley, 1991 e Sipes e Gandolfi, 1991).

Com os tratamentos que efectuámos com o óleo essencial da folha e com o óleo artesanal do fruto nas doses de 0,02 e 0,1 mL/kg de peso do animal, os valores das actividades enzimáticas ALT, AST e fosfatase alcalina determinadas no soro de ratos Wistar foram da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para o grupo de animais de controlo ou até apresentaram um decréscimo com algumas das doses de cada um dos óleos utilizadas, mas sem significado estatístico, pelo que admitimos não terem ocorrido danos hepáticos celulares.

A biotransformação dos xenobióticos envolve um processo bifásico de metabolização dos substratos caracterizado por uma primeira fase (Fase I) em que por meio de várias reacções, fundamentalmente de hidrólise, oxidação e redução, se disponibilizam grupos funcionais já existentes nas moléculas desses compostos ou são introduzidos novos grupos funcionais como sejam -OH, -NH₂ ou -SH. Estas reacções são catalisadas principalmente pelas oxidases de função mista onde se incluem os enzimas do sistema citocromo P450 e citocromo b5. Numa segunda fase (Fase II) ocorrem reacções de conjugação dos produtos resultantes das reacções de

funcionalização com biomoléculas como por exemplo o glutatióno, glucuronato, aminoácidos e outras substâncias, originando produtos mais hidrófilos e facilmente excretáveis. As transferases são os enzimas que catalisam estas reacções.

A biotransformação de uma droga ou xenobiótico nem sempre corresponderá a um efeito benéfico para o organismo. Será benéfico, quando os produtos resultantes da biotransformação ao interagirem com o organismo em locais específicos manifestam uma acção farmacológica. Mas, pelo contrário, será prejudicial quando os produtos resultantes dessa interacção forem tóxicos produzindo efeitos deletérios para o organismo. Esta acção resulta da ligação entre os metabolitos formados com macromoléculas dando origem à formação de aductos de elevada toxicidade (Mckee e Mckee, 1996 e Okita e Masters, 1997).

Prosseguindo o nosso estudo com vista à avaliação do funcionamento hepático em roedores a que administrámos o óleo essencial e em testemunhos a que injectámos apenas o veículo, determinámos a concentração do citocromo P450 e do citocromo b5, a actividade da NADPH (P450) redutase enzima fornecedor de potencial redutor para que estas reacções enzimáticas possam ocorrer e as actividades de algumas oxidases mais vulgarmente envolvidas nestes processos de biotransformação, nomeadamente nas reacções de desalquilação de substratos como a 7-etoxiresorufina *O*-desetilase, a 7-etoxicumarina *O*-desetilase e a etilmorfina *N*-desmetilase. Dos enzimas participantes na segunda fase (Fase II) de metabolização determinámos as actividades glutatióno *S*-transferase e glutatióno redutase. O glutatióno *S*-transferase é um dos enzimas que participam na reacção de conjugação dos xenobióticos com o glutatióno ou ainda na conjugação de derivados metabólicos produzidos pelo sistema citocromo P450, levando em qualquer dos casos à formação de produtos facilmente elimináveis. Este processo é

muitas vezes assistido pelos enzimas glutatono redutase que mantêm o nível intracelular da glutatono *S*-transferase necessário para as reacções de conjugação (Sipes e Gandolfi, 1991), pelo que também determinámos a respectiva actividade.

Os enzimas podem ser de expressão constitutiva ou induzida. No rato, os isoenzimas constitutivos do sistema citocromo P450 hepático podem ser associados a actividades enzimáticas características. Assim, as reacções de *O*-desetilação da 7-etoxicumarina e da 7-etoxiresorufina envolvem a participação maioritária dos isoenzimas constitutivos codificados pelo CYP1A2, CYP2B1 e CYP2B2. Na reacção de *N*-desmetilação da etilmorfina participam maioritariamente os enzimas codificados pela subfamília CYP3A1 (Guengerich, 1986; Wazier *et al.*, 1990 e Nelson *et al.*, 1996).

As actividades destes isoenzimas do sistema citocromo P450 de expressão constitutiva podem ser activadas ou inibidas de acordo com a actividade indutora ou inibidora da droga ou fármaco utilizados no tratamento ou pode acontecer que sejam induzidas outras actividades não expressas.

A indução destes enzimas pode constituir um factor negativo do ponto de vista farmacológico quando a biotransformação diminui a sua biodisponibilidade ou torna a sua eliminação tão rápida impedindo que este exerça qualquer efeito terapêutico. Pode, no entanto, dar-se o contrário e a indução conduzir à biotransformação de um composto num metabolito dotado de actividade farmacológica. É o que acontece com as substâncias denominadas pró-fármacos (Le Dinh e Christoforov, 1994).

Do ponto de vista de toxicidade a indução enzimática pode levar à formação de produtos intermediários reactivos que são capazes de desencadear agressões moleculares que levam à morte celular, produzir carcinogénese, teratogénese ou outros processos de toxicidade (Sipes e Gandolfi, 1991 e Guengerich *et al.*, 1994).

A inibição ou inactivação de um ou mais isoenzimas também poderá ser causadora de fenómenos de toxicidade devido à diminuição da taxa de biotransformação e consequente acumulação de produtos tóxicos (Jeffrey, 1991).

Na avaliação dos efeitos sobre o sistema enzimático P450 nos animais aos quais foram administrados os óleos obtidos do *L. azorica* constatámos que a concentração do citocromo P450 e citocromo b5 microssomais não sofreram alteração comparativamente aos valores observados para os animais testemunha, o que poderá indicar que este sistema enzimático globalmente não foi afectado. Contudo na avaliação das actividades da NADPH (P450) redutase e das monoxigenases estudadas observámos variações.

No tratamento efectuado com o óleo essencial da folha, obtivemos resultados que face ao grupo de controlo mostraram que o tratamento com a dose de 0,02 mL/kg não provocou variação significativa ($P < 0,05$) da concentração de citocromo P450 e de citocromo b5 assim como da actividade enzimática NADPH redutase, ECOD, GST e GR. No entanto, observámos um decréscimo das actividades enzimáticas EROD (CYP1A2 e/ou CYP2B1 e CYP2B2) e END (CYP3A1), pelo que numa primeira aproximação podemos admitir que ocorreu inibição destas actividades enzimáticas, as quais são responsáveis pela desalquilação dos substratos e, no caso da END, também pela hidroxilação de esteróides.

Com a administração da dose de 0,1mL/kg a concentração do citocromo P450 e do citocromo b5 também não sofreram variação significativa ($P < 0,05$), mas a actividade enzimática NADPH redutase mostrou um aumento com significado estatístico ($P < 0,01$), o que nos leva a admitir que com esta dose de óleo alguns isoenzimas do citocromo P450 hepático aumentaram a sua capacidade de biotransformação. Um indício deste facto talvez seja o acréscimo da actividade enzimática EROD e ECOD verificada após a administração desta dose de tratamento. Contudo, a actividade enzimática END (CYP 3

A1) sofreu um decréscimo significativo ($P < 0,01$), pelo que admitimos que também com esta dose de óleo continua a haver inibição desta via enzimática.

As actividades dos enzimas GST e GR que participam na segunda fase de biotransformação também não foram afectadas significativamente ($P < 0,05$) pelo tratamento com qualquer das doses

Por um lado, o facto de a dose de 0,1 mL/kg ter provocado um acréscimo das actividades enzimáticas NADPH redutase, EROD e ECOD, e estes aumentos de actividade não terem sido acompanhados pela indução dos enzimas GST e GR da fase II de biotransformação, poderá originar um efeito hepatotóxico, uma vez que a grande parte dos produtos resultantes das reacções de desalquilação, mais tóxicos para as células, têm melhores condições para ficarem retidos no organismo.

Por outro lado, a inibição da subfamília CYP3A1 poderá afectar o metabolismo de hidroxilação dos esteróides constituindo também um factor de toxicidade, uma vez que o metabolismo de excreção de esteróides via 6β -hidroxilação será afectado.

Face aos resultados obtidos com o óleo essencial nas doses referidas, repetiram-se os ensaios com doses mais elevadas (0,1, 0,3 e 0,9 mL/kg de peso de animal) administrando-se simultaneamente uma dose fixa de um tóxico típico, o tetracloreto de carbono, com o objectivo de clarificar um pouco mais o efeito da droga sobre o tecido hepático.

Paralelamente realizou-se um outro ensaio no qual se substituiu o óleo essencial por uma droga padrão hepatoprotectora para comparação dos efeitos, caso o óleo essencial revelasse acção farmacológica deste tipo.

Os resultados obtidos nos grupos de animais tratados com estas doses de óleo essencial mais elevadas revelaram um acréscimo significativo ($P < 0,05$) das actividades enzimáticas ALT e AST, comparativamente aos respectivos valores evidenciados pelo

grupo de animais que receberam apenas o tóxico, o que para além dos eventuais sinergismos que tenham ocorrido entre o tóxico e o óleo essencial parecem apontar para uma toxicidade intrínseca ao óleo nas doses estudadas.

Analisando os resultados das actividades enzimáticas que reflectem o que se passa a nível molecular, verificámos diferentes respostas nos grupos de animais que receberam o óleo essencial relativamente ao grupo tratado apenas pelo tóxico, nomeadamente os valores das actividades enzimáticas das monoxigenases, que apresentaram um decréscimo significativo ($P < 0,05$) com as doses de 0,3 e 0,9 mL/kg, no caso da EROD e ECOD, e com as doses de 0,1 e 0,3 mL/kg no caso da END, o que nos leva a admitir que a administração do óleo essencial nas doses referidas terá inibido estas actividades enzimáticas e muito provavelmente afectado os processos metabólicos e de desintoxicação.

Observando os resultados após o tratamento efectuado pelo óleo artesanal do fruto verificámos que comparativamente ao grupo de controlo os valores das actividades enzimáticas obtidos com a dose de 0,02mL/kg não mostraram variações significativas ($P < 0,05$), excepto a actividade enzimática END na qual se observou um decréscimo, levando a supor ter ocorrido uma inibição.

No tratamento com a dose de 0,1mL/kg, observámos um aumento significativo ($P < 0,05$) da actividade enzimática NADPH redutase não acompanhada por qualquer variação significativa das outras actividades enzimáticas estudadas. Este aumento de actividade da NADPH redutase leva a supor ter havido indução dos isoenzimas do citocromo P450 não acompanhados por um aumento das actividades dos enzimas conjugantes, pelo que será de admitir um efeito hepatotóxico.

No entanto, no óleo artesanal há que ter em conta que além das actividades biológicas anteriormente descritas, estão presentes como componentes mais abundantes a costunolida e a dehidrocostus lactona, as quais poderão imprimir propriedades farmacológicas a este óleo que poderão justificar algumas das utilizações desta planta na medicina tradicional madeirense.

As lactonas costunolida e dehidrocostus lactona foram identificadas em muitas outras plantas e também no *Laurus nobilis* e no fungo *Laurobasidium lauri* (Cruz Morais, 1987) que se desenvolve nos troncos das árvores mais velhas do *Laurus azorica*. Destas lactonas sabe-se que possuem actividade antimicrobiana como referem Cantrell *et al.* (1998) e antiparasitária segundo Rodriguez *et al.* (1976) e Harborne e Dey (1991). Relativamente à costunolida em particular, em estudos efectuados com plantas em cuja composição figura esta lactona e também com a costunolida delas isolada, ficou demonstrado que esta possui propriedades colagogas e inibidoras da formação de úlcera gástrica em ratos Wistar segundo Yamahara *et al.* (1985), esta mesma actividade antiulcerogénica foi referida para as sementes do *Laurus nobilis* por Afifi *et al.* em 1997. Outra importante propriedade destas lactonas diz respeito à acção reguladora que desempenham no crescimento das plantas conforme referido por Kalsi *et al.* (1984, 1985).

A reactividade apresentada pelas lactonas sesquiterpénicas, julga-se ser devida à presença nas suas moléculas do grupo α -metileno- γ -lactona e ainda de outros grupos funcionais reactivos como epóxidos, ésteres ou cetonas α , β -insaturadas. O mecanismo de actuação passa pela alquilação dos centros nucleófilos das moléculas biológicas.

As propriedades farmacológicas atrás referenciadas para a costunolida e dehidrocostus lactona e ainda outras, são atribuídas às lactonas sesquiterpénicas em

geral, nomeadamente propriedades antiinflamatórias, antiulcerosas, carminativas, citotóxicas e antitumorais, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (Rodriguez *et al.*, 1976; Coutinho, 1980; Fischer, 1991; Heinrich *et al.*, 1998; Cantrell *et al.*, 1998 e Bruneton, 1999).

Contudo estas lactonas não são inócuas, são susceptíveis de provocarem dermatites alérgicas de contacto, quando os produtos que as contêm são usados em excesso como é o caso de certos óleos de plantas usados em perfumaria. Presumivelmente estes fenómenos alérgicos são devidos a reacções de adição de Michael entre as proteínas da pele e a dupla ligação exocíclica presente na maioria das lactonas sesquiterpénicas.

Relativamente ao óleo do fruto do *L. azorica*, embora a maioria das utilizações seja feita por via oral, casos há em que é aplicado na pele. No entanto, na recolha etnofarmacológica efectuada, não foram referenciadas quaisquer queixas nesse sentido.

Face às propriedades destas lactonas e à presença nesta planta de outras lactonas com estruturas muito semelhantes a estas seria de muito interesse proceder futuramente ao estudo das suas actividades farmacológicas pois, neste trabalho, não foi possível fazê-lo por não dispormos de matéria prima em quantidade suficiente.

8 - Conclusões

Neste trabalho prepararam-se extractos da folha e do fruto do *Laurus azorica* em solventes de polaridade crescente, a partir dos quais se isolaram e caracterizaram vários compostos.

Os compostos isolados dos extractos de hexano e de clorofórmio da folha e do fruto apresentaram composição química semelhante com predomínio de lactonas sesquiterpénicas, sendo as maioritárias a costunolida e a dehidrocostus lactona. Além destas lactonas foram identificadas nos extractos da folha a 8-acetoxiguaian-1(10),11(13)-dien-6 α ,12-olida, a 8-acetoxiguaian-9,11(13)-dien-6 α ,12-olida, a 8-acetoxi-1-hidroxigermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olida, a 1,8-dihidroxigermacran-4,9,11(13)-trien-6 α ,12-olida, a 1(5),8(13)-diepoxigermacran-10(14),4(15)-dien-6 α ,12-olida e a 1(5),8(13)-diepoxigermacran-10(14),4(15)-dien-6 β ,12-olida, um hidrocarboneto monoterpénico o 3,5-diacetoxi-1(7),4(8)-p-mentadieno, um composto esteróide o β -sitosterol, misturas de hidrocarbonetos saturados entre C₁₈ e C₂₅, e misturas de alcoóis de cadeia linear.

Das folhas e frutos colhidos em diferentes épocas do ano extraíram-se os respectivos óleos essenciais que revelaram uma composição química rica em hidrocarbonetos monoterpénicos, mas apresentando diferenças quantitativas relacionadas com a época de colheita. No óleo obtido da folha colhida na Primavera verificámos haver uma maior percentagem de hidrocarbonetos sesquiterpénicos relativamente ao óleo da folha do Outono. No óleo essencial dos frutos maduros os hidrocarbonetos monoterpénicos predominaram sobre os do óleo dos frutos verdes, enquanto que com os hidrocarbonetos sesquiterpénicos verificou-se o contrário.

No óleo essencial da folha da Primavera identificaram-se como componentes predominantes o α -pineno (20,88%), 1,8-cineol (15,79%), β -pineno (14,89%), 3-careno

(5,64%), acetato de terpenilo (4,45%) e τ -muurolol (2,78%), enquanto que no do Outono estes foram o α -pineno (22,42%), 1,8-cineol (16,95%), β -pineno (15,60%), acetato de terpenilo (4,73%), pinocarvona (3,00%), 3-careno (2,82%) e sabineno (2,16%).

Na composição do óleo essencial do fruto maduro os componentes predominantes foram o *trans*- β -ocimeno (21,61%), α -pineno (15,64%), *cis*-ocimeno (8,07%), β -pineno (7,55%), germacreno D (4,88%), 3-careno (4,23%) e β -elemeno (3,00%). No óleo dos frutos verdes estes foram o α -bisaboleno (14,41%), *trans*- β -ocimeno (14,14%), α -pineno (8,82%), *cis*-ocimeno (6,52%), β -pineno (6,40%), germacreno D (6,07%) e β -elemeno (2,71%).

Estes óleos essenciais mostraram possuir propriedades antimicrobianas face a alguns microrganismos Gram+ e Gram- ensaiados "in vitro", sendo de salientar a actividade face à *Serratia marcescens* que foi semelhante à manifestada pelo antibiótico específico utilizado. Face ao *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus epidermitis*, *Streptococcus equisimilis* e *Streptococcus pneumoniae*, apresentaram uma actividade de cerca de 50% da manifestada pelos antibióticos utilizados como referência e perante a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes* a actividade foi nula.

A administração intraperitoneal do óleo essencial da folha a ratos Wistar provocou redução da actividade motora e do tónus muscular, analgesia, ataxia e acentuada hipotermia. A actividade analgésica foi confirmada em murganhos Charles River com a execução do teste do ácido acético.

O óleo essencial da folha e o óleo artesanal, quando administrados por via intraperitoneal nas doses de 0,02 e 0,1 ml/kg, não afectou as actividades enzimáticas

ALT, AST e fosfatase alcalina do soro de ratos Wistar, mas a dose de 0,1mL/kg provocou um aumento das actividades enzimáticas EROD, ECOD e ainda da NADPH redutase e um decréscimo da actividade END.

A administração conjunta do óleo essencial e tetracloreto de carbono teve como resultado um aumento das actividades enzimáticas ALT e AST do soro e um decréscimo ou aumento das actividades EROD, ECOD, END, GST e GR do fígado consoante a dose de óleo essencial administrado.

Os resultados obtidos no soro e no fígado parecem apontar para uma certa hepatotoxicidade do óleo essencial da folha dependente da dose utilizada.

Apesar da toxicidade evidenciada pelo óleo artesanal do fruto, face às propriedades da costunolida e dehidrocostus lactona, julgamos que a sua presença maioritária neste óleo artesanal poderá justificar a utilização deste na medicina tradicional da Madeira.

9 - Referências bibliográficas

- AFIFI, F. U., KHALIL, E., TAMIMI, S. O. e. DISI, A. (1997) – Evaluation of the gastroprotective effect of *Laurus nobilis* seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats, *J. Ethnopharmacol.*, 58 (1), 9-14.
- AHMED, M., AMIN, S., ISLAM, M., TAKAHASHI, M., OKUYAMA, E. e HOSSAIN, C. F. (2000) – Analgesic principle from *Abutilon indicum*, *Pharmazie*, 55 (4), 314-316.
- ALMAGBOUL, A. Z., BASHIR, A. K., FAROUK, A. e SALIH, A. K. M. (1984) – Antimicrobial Activity of Certain Sudanese Plants Used in Folkloric Medicine. Screening for Antibacterial Activity (IV), *Fitoterapia*, LVI, 331-337.
- AOAC, (1990) – *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- BREMNESS, L. (1996) – *Les Plantes Aromatiques et Médicinales*, Edition Française, Bordas, Paris.
- BRUNETON, J. (1991) – *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, 1^{re} éd., Éditions. Tec & Doc, Paris.
- BRUNETON, J. (1999) - *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3^e éd., Éditions. Tec & Doc, Paris.
- BURKE, M. D. e MAYER, R. T. (1974) – Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene, *Drug Metab. Disp.*, 2, 6, 583-588.
- CAMPOS ANDRADA, E. (1990) – *Repovoamento Florestal no Arquipélago da Madeira (1952-1975)*, edição do Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Secretaria de Estado da Agricultura, Direcção-Geral das Florestas, Lisboa.
- CARMO, M e FRAZÃO, S. (1975) – Possibilidade de industrialização de algumas plantas aromáticas da Ilha da Madeira, LNETI., Queluz, Lisboa.
- CHANEGRIHA, N., BAALIOUAMER, A. e ROLANDO, C. (1998) – Polarity changes during Gas chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric analysis using serially coupled columns of different natures and temperature programming. Application to the identification of constituents of essential oils, *J. Chrom. A*, 819, 61-65.
- CANTRELL C. L., NUÑES I. S., CASTAÑEDA-ACOSTA J., FOROOZESH M., FROONCZEK F. R., FISCHER N. H. e FRANZBLAU S. G. (1988) – Antimycobacterial Activities of Dehydrocostus Lactone and Its Oxidation Products, *J. Nat. Prod.*, 61, 1181-1186.
- CHAVES das NEVES, H. J. e COSTA FREITAS, A. M. (1996) – *Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução*, edição de Dias de Sousa, Lda., Portugal.
- CIULEI, I. (1984) – *Methodologie d'analyse des produits vegetaux*, Organisation des Nations Unies pour le Developpement Industriel.
- COLLEE, J. G., DUGUID, I. P., FRASER, A. G. e MARMION, B. P. (1993) – *Microbiologia Médica*, 6^a ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- COSTA NEVES, H. , VALENTE, V., FARIA, B., SILVA, I., MARQUES, J., GOUVEIA, N., SILVA, P. e OLIVEIRA, P. (1996) – *Laurisilva da Madeira, caracterização quantitativa e qualitativa*, S.R.A.F.P. - Parque Natural da Madeira.
- COSTA NEVES, H. e VALENTE, V. (1992) – *Conheça o Parque Natural da Madeira*, Funchal, Região Autónoma da Madeira.
- COSTA, A. F. (1994) – *Farmacognosia*, 5^aed., Vol.I, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- COSTA, A. F (1994) – *Farmacognosia*, 4^a ed., Vol.II, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

- COSTA, A. F (1982) – *Farmacognosia*, 2ª ed., Vol.III, Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa.
- COSTA, A. F.(1975) – *Elementos da Flora Aromática. O Laboratório de Farmacognosia no Estudo dos Óleos Essenciais de Portugal e Angola*, edição da Junta de Investigações Científicas do Ultramar.
- COUTINHO, A. C. (1980) – *Dicionário Enciclopédico de Medicina*, 3ª ed., Argo Editora, Lisboa.
- COX, P. A e BALICK, M.J. (1994) – The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery, *Scientific American*, 6, 60-65.
- CRUZ MORAIS, J. M. (1987) – *Identificação e Acção Farmacológica de Alguns Constituintes do Fungo Parasita *Laurobasidium Lauri* (Geyler) Julich e sua Detecção na Planta Hospedeira *Laurus Azorica* (Seub) Franco*, Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, Lisboa.
- CUNHA, A. P. (1989) – A Fitoterapia e o Farmacêutico, *Revista Portuguesa de Farmácia*, 39 (3), 24-26.
- DA-SILVA, V. A., DE-FREITAS, J. C., MATTOS, A., P., PAIVA-GOUVEA, W., PRESGRAVE, O. A., FINGOLA, F. F., MENEZES, M. A. e PAUMGARTEN, F. J. (1991) – Neurobehavioral study of the effect of beta-myrcene on rodents, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24 (8), 827-831.
- DAVIES, R. e FREARSON (1994) – *Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, London.
- DAVIES, N.W. (1989) – Gas Chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on Methyl silicone and Carbowax 20 M phases, *Journal of Chromatography*, 503, 1-24.
- DE-OLIVEIRA, A. C. A. X., FIDALGO-NETO, A. A. e PAUMGARTEN, F. J.R. (1999) – In vitro inhibition of liver monooxygenases by 2-ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol, *Toxicology*, 135 (1), 33-41.
- DE-OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO-PINTO, L. F., OTTO, S. S., GONÇALVES, A. e PAUMGARTEN, F. J. (1997) – Induction of liver monooxygenases by beta-myrcene, *Toxicology*, 124 (2), 135-140.
- DEANS, S. G. e RITCHIE, G. (1987) – Antibacterial properties of plant essential oils, *Int. J. Food Microbiol.*, 5, 165-180.
- DELLAR, J. E., COLE, M. D., GRAY, A. I., GIBBONS, S. e WATERMAN, P.G. (1994) – Antimicrobial Sesquiterpenes from *Prostanthera aff. melissifolia* and *P. rotundifolia*, *Phytochemistry*, 36 (4), 957-960.
- DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. (1991) – *Methods in Plant Biochemistry*, Vol.7, *Terpenoids*, Academic Press, London.
- DIFCO MANUAL (1994) - *Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*, 10th ed., Difco Laboratories, USA.
- DOSKOTCH, R. W. e EL-FERALY, F. S. (1970) – The structure of Tulipinolide and Epitulipinolide. Cytotoxic Sesquiterpenes from *Liriodendron tulipifera* L., *J. Org. Chem.*, 35, 1928-1936.
- EL-FERALY, F. S. e BENIGNI, A D. (1980) – Sesquiterpene Lactones of *Laurus Nobilis* Leaves, *J. Nat. Prod.*, 43, 527-531.
- EL-FERALY, F. S. e CHAN, Y.-M. (1978) – Isolation and Characterization of the Sesquiterpene Lactones Costunolide, Parthenolide, Costunolide Diepoxide, Santamarine, and Reynosin from *Magnolia grandiflora* L., *J. Pharm. Sci.*, 67, 347-350.

- EL-FERALY, F. S., CHAN, Y.-M. e CAPITON, G. A. (1979) – Isolation and Characterization of Peroxycostunolide (Verlotorin) and Peroxyparthenolide from *Magnolia grandiflora*. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Costunolide and Related Compounds, *J. Org. Chem.*, 44, 3952-3955.
- EL-FERALY, F. S., CHAN, Y.-M., FAIRCHILD, E. H e DOSKOTCH (1977) – Peroxycostunolide and Peroxyparthenolide: Two Cytotoxic Germacranolide Hydroperoxides from *Magnolia grandiflora*. Structural Revision of Verlotorin and Artemorin, *Tetrahedron Letters*, 1973-1976.
- FERREIRA, R. M. A. (1999) – *Influência da idade e do tratamento com isoproturão no sistema citocromo P450 e nas actividades enzimáticas glutathione S-transferase e glutathione redutase do fígado, rins, testículos e timo de ratos machos Wistar*, Tese de Doutoramento, Universidade de Évora.
- FIORINI, C., FOURASTÉ, I., DAVID, B. e BESSIÈRE (1997) – Composition of the flower, leaf and stem essential oils from *Laurus nobilis L.*, *Flavour Fragr. J.*, 12, 91-93.
- FISCHER, N. H. (1991) – Sesquiterpenoid Lactones, in *Methods in Plant Biochemistry*, Vol.7, *Terpenoids*, Academic Press, London.
- FONT-QUER (1993) – *Plantas Medicinales, El Dioscórides renovado*, editorial Labor, S.A., Barcelona.
- FRANCO, J. A. (1960) – Lauráceas Macaronésicas, *Anais do Instituto Superior de Agronomia (Lisboa)*, Vol.XXIII, 89-104.
- FRANCO, J. A (1971) – *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*, Vol.I, Sociedade Astória, Lisboa.
- FRUTUOSO, G.(1873) – *As Saudades da Terra (Livro II) - História das Ilhas do Porto-Sancto, Madeira, Desertas e Selvagens*, manuscrito do século XVI anotado por Álvaro Rodrigues de Azevedo, Typ. Funchalense, Funchal.
- GIORDANO, O. S., GUERREIRO, E., PESTCHANKER, M. J., GUZMAN, J., PASTOR, D. E GUARDIA, T. (1990) – The Gastric Cytoprotective Effect of Several Sesquiterpene Lactones, *J. Nat. Prod.*, 53, 803-809.
- GOLDBERG, D. M. e SPOONER, R. J. (1987) – Glutathione reductase, in *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., 258-265, Bergmeyer, VCH, New York.
- GÖREN, N. (1993) – Two Farnesol Derivatives from *Tanacetum densum* subsp.*sivasicum*, *Phytochemistry*, 34, 743-745.
- GOTTLIEB, O. R. (1972) – Chemosystematics of the *Lauraceae*, *Phytochemistry*, 11, 1537-1570.
- GRECA, M. D., MENACO, P. e PREVITERA, L. (1990) – Stigmasterols from *Typha latifolia*, *J. Nat. Prod.*, 53, 1430-1435.
- GUENGERICH, F. P. (1993) – Cytochrome P450 enzymes. They defend the body against environmental pollutants, detoxify drugs and synthesize several important signaling molecules, *Am. Scientist*, 81, 440-447.
- GUENGERICH, F. P. (1986) – Enzymology of rat liver cytochrome P450, in *Mammalian cytochromes P450*, 1, 1-54, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- HABIG, W. H., PABST, M.J. e JAKOBY, W. B. (1974) – Glutathione S-transferase: The first enzyme step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.
- HALEY, T. J. (1987) – Absorption, distribution, conjugation and excretion of xenobiotics, in *Handbook of toxicology*, 20-43, 1st ed., Hemisphere Publishing Corporation, London.
- HELANDER, I. M., ALAKOMI, H.-L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM,T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M. e VON WRIGHT, A. (1998) – Characterization of the

- Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3590-3595.
- HEINRICH, M., ROBLES, M., WEST, J. E., DE MONTELLANO, B. R. O. e RODRIGUEZ, E. (1998) Ethnopharmacology of Mexican *Asteraceae* (*Compositae*), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 539-565.
- HIROI, T., MIYAZAKI, Y., KOBAYASHI, Y., IMAOKA, S. e FUNAE, Y. (1995) – Induction of hepatic P450s in rat by essential wood and leaf oils, *Xenobiotica*, 25 (5), 457-467.
- HOKWERDA, H., BOS, R., TATTJE, D.H.E. e MALINGRE, TH. M. (1982) – Composition of Essential Oils of *Laurus nobilis*, *L. nobilis* Var. *angustifolia* and *Laurus azorica*, *Planta Med.* 44, 116-119.
- ISIDOROV, V. A., ZENKEVICH, I. G., DUBIS, E. N., SLOWIKOWSKI, A. e WOJCIUK (1998) – Group identification of essential oils components using partition coefficients in a hexane-acetonitrile system, *J. Chrom. A*, 814, 253-260.
- JAKUPOVIC, J., KLEMEYER, H., BOHLMANN, F. e WHITTEMORE, A. (1988) – Unusual Norhomoditerpenes and Other Constituents from *Kyrsteniopsis dibollii*, *Planta Med.*, 533-537.
- JANSSEN, A. M., SCHEFFER, J. J. C. e SVENDSEN, A. B. (1987) – Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods, *Planta Med.*, 395-398.
- JEFFERY, E. H. (1991) Biochemical bases of toxicity, in *Handbook of Toxicologic Pathology*, 49-70, Academic Press, London.
- JOYEUX, M., MORTIER, F. e FLEURENTIN, J. (1995) – Screening of Antiradical, Antilipoperoxidant and Hepatoprotective Effects of Nine Plant Extracts Used in Caribbean Folk Medicine, *Phytotherapy Research*, 9, 228-230.
- KALSI, P., KHURANA, S. e TALWAR, K. (1985) – Chemistry of costunolide and biological activity of the derived lactones, *Phytochemistry*, 24 (1), 103-109.
- KALSI, P., KAUR, G., SHARMA, S. e TALWAR, K. (1984) – Dehydrocostus lactone and plant growth activity of derived guaianolides, *Phytochemistry*, 23 (12), 2855-2861.
- KALSI, P. S., CHHABRA, B. R., CHHABRA, A. e WADIA, M. S. (1979) – Chemistry of costunolide, *Tetrahedron*, 35, 1993-1996.
- KORE, A. M., JEFFERY, E. H. e WALLIG, M. A. (1993) – Effects of 1-isothiocyanato-3-methylsulfinyl-propane on xenobiotic metabolizing enzymes in rats, *Fd. Chem. Toxicol.* 37, 723-729.
- KOSTER, R., ANDERSON, M. e DE BEER, E. J. (1959) – Acetic acid for analgesic screening, *Fed.Proc.*, 18, 412-417.
- LAKE, B. G. (1987) – Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism, in *Biochemical Toxicology – A practical approach*, 1st ed., IRL Press, Oxford.
- LAM, L. K. T. e ZHENG, B. (1991) – Effects of Essential Oils on Glutathione S-Transferase Activity in Mice, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 660-662.
- LAMBERT, J. B., SHURVELL, H. F., LIGHTNER, A. e COOKS, R. G. (1998) – *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- LE DINH e CHRISTOFOROV, B. (1994) – Etude du métabolisme hépatique des médicaments. Pour une rationalisation du développement des nouvelles molécules, *Thérapie*, 49, 133-40.
- LEPORRIER, M. (1993) – *La Petite Encyclopédie Médicale Hamburger-Guide de Pratique Médicale*, 18^e éd., Médecine-Sciences, Flammarion.

- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. (1951) – Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUENGO, D. H., MISKI, M., GAGE, D. A. e MABRY, T. J. (1986) - 7 α -hydroxy-sesquiterpene lactones from *Decachaeta ovatifolia*, *Phytochemistry*, 25 (8), 1917-1922.
- MALDONADO, E., MANCERA, C., FIALLEGA, G. e ORTEGA, A. (1995) – Germacranolides from *Perymenium Berlandieri*, *Phytochemistry*, 38, 1265-1267.
- MALONE, M. e ROCHICHAUD, R. C. (1962) – A hippocratic screen for pure or crude drug materials, *Lloydia*, 25, 320-332.
- MALONE, M. (1973) – Observational (hippocratic) screening, *Bethesda, Biol. Sci. Sect. Am. Ass. Colleges Phar.*, 120-123.
- MANN, C. M. e MARKHAM, J. L. (1998) – A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils, *J. Appl. Microbiology*, 84, 538- 544.
- MATHUR, S.B., HIREMATH, S.V., KULKARNI, G. H., KELKAR, G. R. e BHATTACHARYYA, S. C. (1965) – Structure of Dehydrocostus Lactone, *Tetrahedron*, 21, 3575-3590.
- MATOS, F. J. A. (1988) – *Introdução à Fitoquímica Experimental*, ed. UFC, Fortaleza-Ceará. Brasil.
- MCKEE, T. e MCKEE, J. R. (1996) – *Biochemistry – an introduction*, 1st ed., WCB Publishers, London.
- MENEZES, C.A. (1914) – *Flora do Arquipélago da Madeira (Phanerogamicas e Cryptogamicas vasculares)*, edição da Junta Agrícola da Madeira, Funchal.
- MIYAZAWA, M., WATANABE, H., UMEMOTO, K. e KAMEOKA, H. (1998) – Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential oils of *Mentha* Species, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3431-3434.
- MULLER, C. (1998) – *Les examens de laboratoire*, 10^e éd., Maloine, Paris.
- NASH, T. (1953) – The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem., J.*, 55, 416-421.
- NELSON, D. R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., SYEGMAN, J. J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D. J., WATERMAN, M. R., GOTOH, O., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., GUNSALUS, I. C. e NEBERT, D. W. (1996) – P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.
- NOVÁK, M. (1985) – A Monoterpene Alcohol from *Laurus nobilis*, *Phytochemistry*, 24, 858.
- NÚÑEZ, A.J., GONZÁLEZ, L.F. e JANÁK, J. (1984) – Pre-Concentration of Headspace Volatiles for Trace Organic Analysis by Gas Chromatography, *J. Chrom.*, 300, 127-162.
- OKITA, R. T. e MASTERS, B. S. S., (1997) – Biotransformations: The cytochromes P450, in *Testbook of Biochemistry with clinical correlations*, 981-998, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc, New York.
- PARANHOS, A. H. S. (1990) – Biotecnologia Vegetal: um Novo Capítulo da Farmacognosia, *Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra*, 14 (2), 7-17.
- PARIS, M. e HURABIELLE, M. (1986) – *Abrégé de Matière médicale, Pharmacognosie*, Tome 2, Masson, Paris.
- PAUMGARTEN, F. J., DELGADO, I. F., ALVES, E. N., NOGUEIRA, A. C, DE-FARIAS, R. C. e NEUBERT, D. (1990) – Single dose toxicity study of beta-myrcene, a natural analgesic substance, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 23 (9), 873-877.
- PELCZAR JR., M. J., CHAN, E. C. S. e KRIEG, N. R. (1996) – *Microbiologia, Conceitos e Aplicações*, Vol.I, 2^a ed., Makron Book, Brasil.
- PEREIRA, E. C. N. (1989) – *Ilhas de Zargo. V. I*, 4^a edição, C.M.F, Funchal.

- PETERSON, J. A., EBEL, R. E. e O'KEEFFE, D. H. (1978) – *Methods in Enzymology*, 52, Academic Press, New York.
- PITA, J. R. (1993) - *Farmácia e Medicamento, Noções Gerais*, ed. Minerva, Coimbra.
- POPP, J. A e CATLEY, R. C. (1991) – Hepatobiliary system, in *Handbook of Toxicologic Pathology*, 279-314, 1st ed., Academic Press, London.
- QUINTAL, R. e VIEIRA, M. J. (1985) – *Esboço de Geografia Física*, edição da Secretaria Regional do Turismo e Cultura, Região Autónoma da Madeira.
- QUINTAL, R. (1989) – *Laurissilva, A Floresta da Madeira*, Edição do Clube de Ecologia Barbusano, Funchal.
- QUINTAL, R. e CAIRES, C. (1989) – *Madeira, Da Floresta Primitiva ao Jardim Botânico Actual*, ed. do Clube de Ecologia Barbusano, Funchal.
- REMMAL, A., BOUCHIKHI, T., RHAYOUR, K. e ETTAYEBI, M. (1993) – Improved methods for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5, 179-184.
- RODILLA, J. M. L. (1988) – *Componentes Diterpénicos do Halimium Verticillatum (Brot.) Sennen*, Tese de Doutoramento, Universidade de Évora.
- RODRIGUEZ, E., TOWERS, G.H. e MITCHELL, J. C. (1976) – Biological Activities of Sesquiterpene Lactones, *Phytochemistry*, 15, 1573-1580.
- ROUSSIS, V., TSOUKATOU, M., CHINO, I. B. e ORTIZ, A. (1998) – Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Helichrysum rupestre* and *H. ambiguum* Growing in the Balearic Islands (Part III), *Planta Med.*, 64, 675-676.
- SABIR, A. W., BHATTY, M. K., KHAN, M. T. J., ASHRAF, M. e CHAUDHRY I. H. (1986) – Chemotherapeutic Evaluation of The Species of The *Myrsinaceae* Family of Pakistan, Part II. Phytochemical and Antibacterial Studies on *Ardisia solanacea*, *Fitoterapia*, LVIII, 357-360.
- SÁENZ, M. T., FERNÁNDEZ, M. A. e GARCIA, M. D. (1997) – Antiinflammatory and Analgesic Properties from Leaves of *Erygium foetidum* L. (*Apiaceae*), *Phytotherapy Research*, 11, 380-383.
- SANTOS, F. A. e RAO, V. S. (2000) – Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils, *Phytother. Res.*, 14 (4), 240-244.
- SHOJI, N., UMEYAMA, A., SAITO, N. e TAKEMOTO, T. (1986) – Vasoactive substances from *Saussurea lappa*, *J.Nat. Prod.*, 49 (6), 1112-1113.
- SILVA, A. J. R., GARCIA, M., BAKER, P. M. e RABI, J. A. (1981) – ¹³C NMR Spectra of Natural Products - 1-Guaianolides, *Org. Magnetic Resonance*, 16 (3), 1981.
- SILVA, F. A. (1946) – *O Revestimento Florestal do Arquipélago da Madeira*, Tipografia do “Comércio do Funchal”, Funchal.
- SILVA, F. A. e MENEZES, C. A. (1978) – *Elucidário Madeirense*, 4^a ed., Tipografia Minerva, Funchal.
- SILVERSTEIN, R. M., CLAYTON BASSLER, G. e MORRILL, T. C. (1991) – *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., John Wiley & Sons, Inc. USA.
- SIPES, G. e GANDOLFI, A. J. (1991) – Biotransformation of toxicants, in *Toxicology*, 4th ed., Pergamon Press, Oxford.
- SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S., LANARAS, T. e ARSENAKIS, M. (1995) – Antimicrobial Activity of Mint Essential Oils, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2384-2388.
- SIVROPOULOU, A., PAPANIKOLAOU, E., NIKOLAOU, C., KOKKINI, S., LANARAS, T. e ARSENAKIS, M. (1996) – Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1202-1205.

- SOLIMAN, F. M., EL-KASHOURY, FATHY, M. M. e GONAIID, M. H. (1994) – Analysis and Biological Activity of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt, *Flavour Fragr. J.*, 9, 29-33.
- SUN, Y.; ZHANG, R. e WANG. Q. (1993) – Programmed-temperature gas chromatographic retention index, *J. Chrom. A*, 657, 1-15.
- TADA, H. e TAKEDA, K. (1971) – Structure of the Sesquiterpene Lactone Laurenbiolide, *Chem. Comm.*, 1391-1392.
- TADA, H. e TAKEDA, K. (1976) – Sesquiterpene of *Lauraceae* Plants. IV. Germacranolides from *Laurus nobilis* L., *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 667-671.
- TANRIVERDI, H., ÖZEK, T., BEIS, S. H. e BASER, K. H. C. (1991) – Composition of the Essential Oils of Turkish Laurel Leaves and Berries, [Felicitation Volume in honour of Prof. Atta-ur-Rahman], *Essays on Science*, Hamdard Foundation Pakistan.
- TIETZ, N. W. (1976) – *Fundamentals of Clinical Chemistry*, W. B. Saunders Company, USA.
- TOMESI, C. N., VIALE, A. A., BUSCHI, ROFI, R. D., SCHEINGART, C. D., IÑIGO, R. P. A., ZALLOCCI, F. M. e POMILIO, A. B. (1984) – Antimicrobial Screening of Some Argentine Higher Plants, Part II, *Fitoterapia LVII*, 46-50.
- TORI, K., HORIBE, I., KURIYAMA, K., TADA, H. e TAKEDA, K. (1971) – Conformational Isomers of Laurenbiolide, a New Ten-membered-ring Sesquiterpene Lactone, *Chem. Comm.*, 1393-1394.
- TORI, K., HORIBE, I., TAMURA, Y., KURIYAMA, K., TADA, H. e TAKEDA, K. (1976) – Re-Investigation of the Conformation of Laurenbiolide, a Ten-membered-ring Sesquiterpene Lactone by Variable-Temperature Carbon-13 NMR Spectroscopy. Evidence for the Presence of Four Conformational Isomers in solution, *Tetrahedron Letters*, 387-390.
- TUTIN, T. G., HEYWOOD, V. H., BURGESS, N. A., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M. e WEBB, D. A. (1964) – *Flora Europaea*, Vol. I, Cambridge, Cambridge University Press
- TWAIJ, H. A. A., SALIH, F. M., NADIR, M. T. e AZIZ, N, K. (1986) – Antimicrobial and Some Pharmacological Activity of *Centaurea Phyllocephala* and *Behen*, *Fitoterapia LVII*, 41-45.
- ULTEE, A., GORRIS, L. G. M. e SMID, E. J (1998) – Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *J. Appl. Microbiology*, 85, 211-218.
- URONES, J. G., MARTIN, D. D. e CRUZ MORAIS, J. M. (1989) – Sesquiterpene Lactones from *Laurobasidium Lauri*, *Fitoterapia, LX*, 178-179.
- VERNET, J-L. (1997) – *L'homme et la forêt méditerranéenne de la Préhistoire à nos jours*, éditions Errance, Paris.
- VOKOU, D., VARELTZIDOU, S. e KATINAKIS, P. (1993) – Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity, *Agric., Ecosystems and Environment*, 47, 223-235.
- VUORELA, H., POHJOLA, J., KRAUSE, C. e HILTUNEN, R. (1989) – Application of Headspace Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Part IX. Selective Loss of Terpene Compounds During Hydrodistillation, *Flavour and Fragrance J.*, 4, 117-120.

- WAZIER, I., CUGNENC, P. H., YANG, C. S., LEROUX, J. P. e BEANNE, P. H. (1990) – Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues, *J. Pharmacol.*, 253, 387-394.
- WEBER, G. F. e WAXMAN, D. J. (1993) – Denitrosation of the anti-cancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea catalyzed by microsomal glutathione S-transferase and cytochrome P450 monooxygenases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 307, 369-378.
- WILLIAMSON, E. M., OKPAKO, D.T. e EVANS, F. J. (1996) – *Pharmacological Methods in Phytoterapy Research*, Vol. I, John Wiley & Sons, England.
- YAMAHARA, J., KOBAYASHI, M., MIKI, K., KOZUKA, M., SAWADA, T. e FUJINUMA, H. (1985) – Cholagogic and antiulcer effect of *Saussureae radix* and its active components, *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (3), 1285-1288.
- ZOLA, A., LE VANDA, J. P. e GUTHBROD, F. (1977) – L'Huile Essentielle de Laurier Noble, *Riv. Ital. Essenze. Profumi. Piante Officinali*, 59, 374-378.

Apêndices

Apêndice A

Espectros de infravermelho

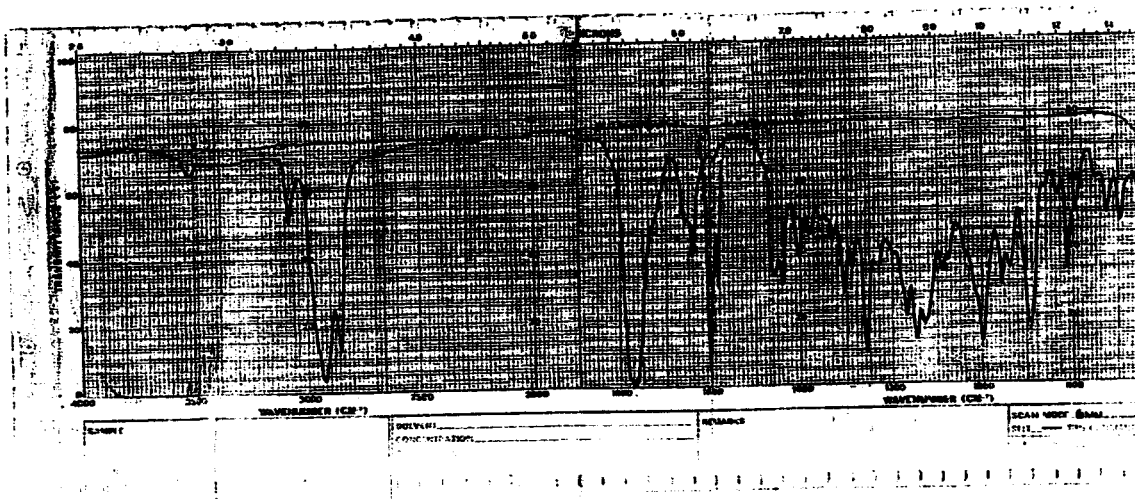


Figura I – Espectro de infravermelho do composto A

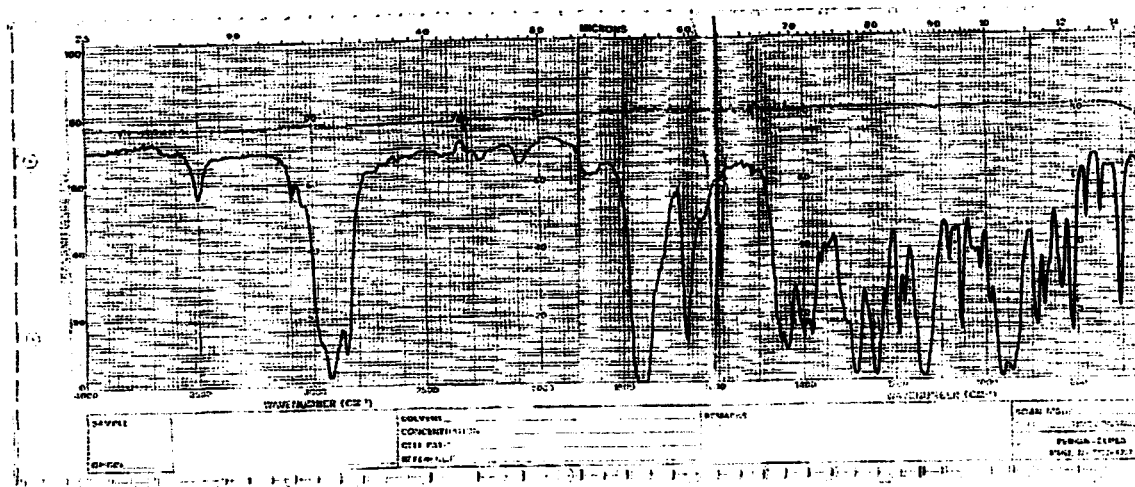


Figura II – Espectro de infravermelho do composto B

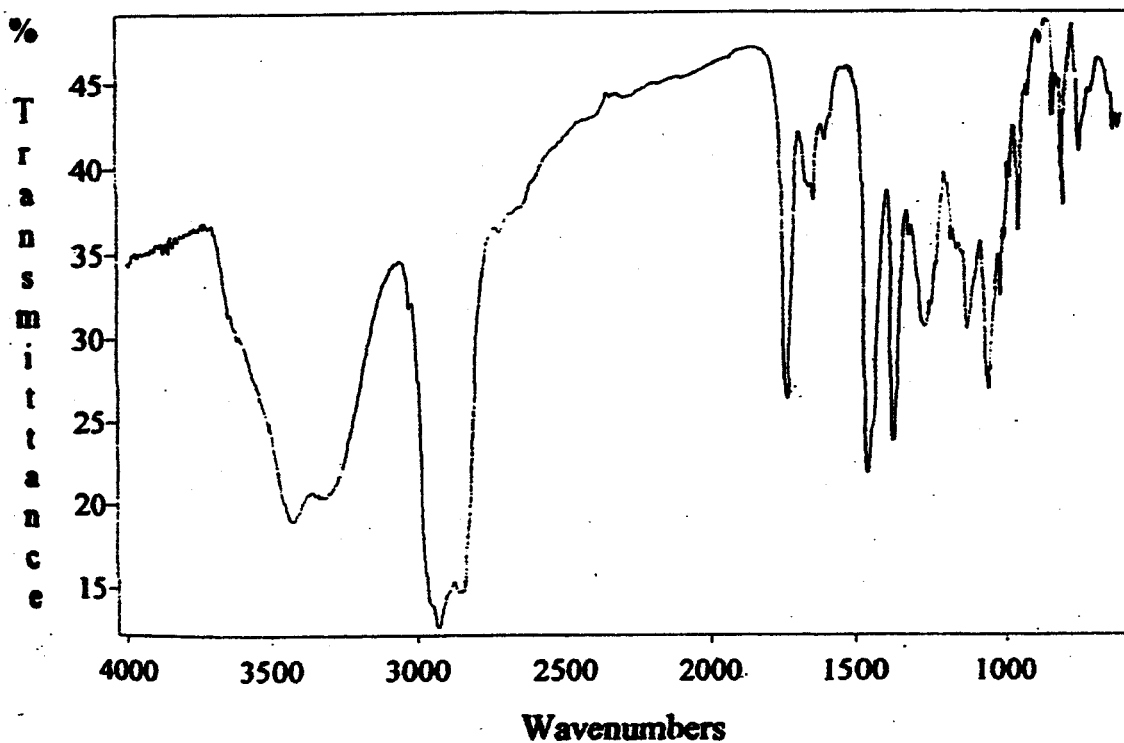


Figura III – Espectro de infravermelho do composto C

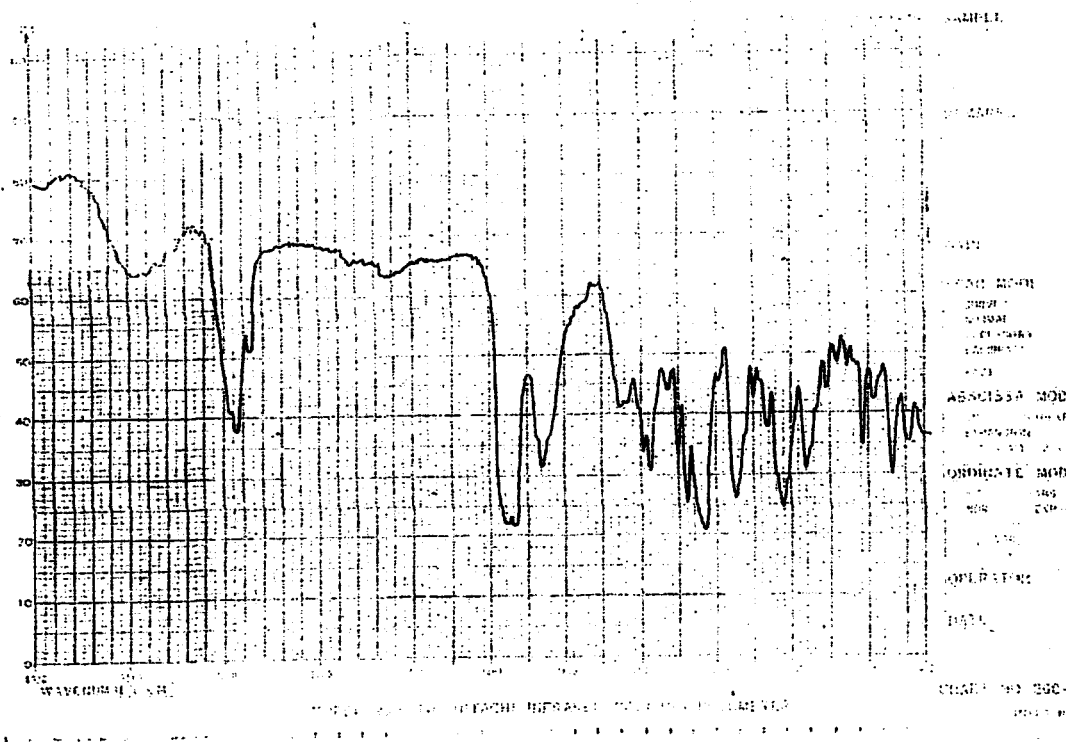


Figura IV – Espectro de infravermelho da mistura D

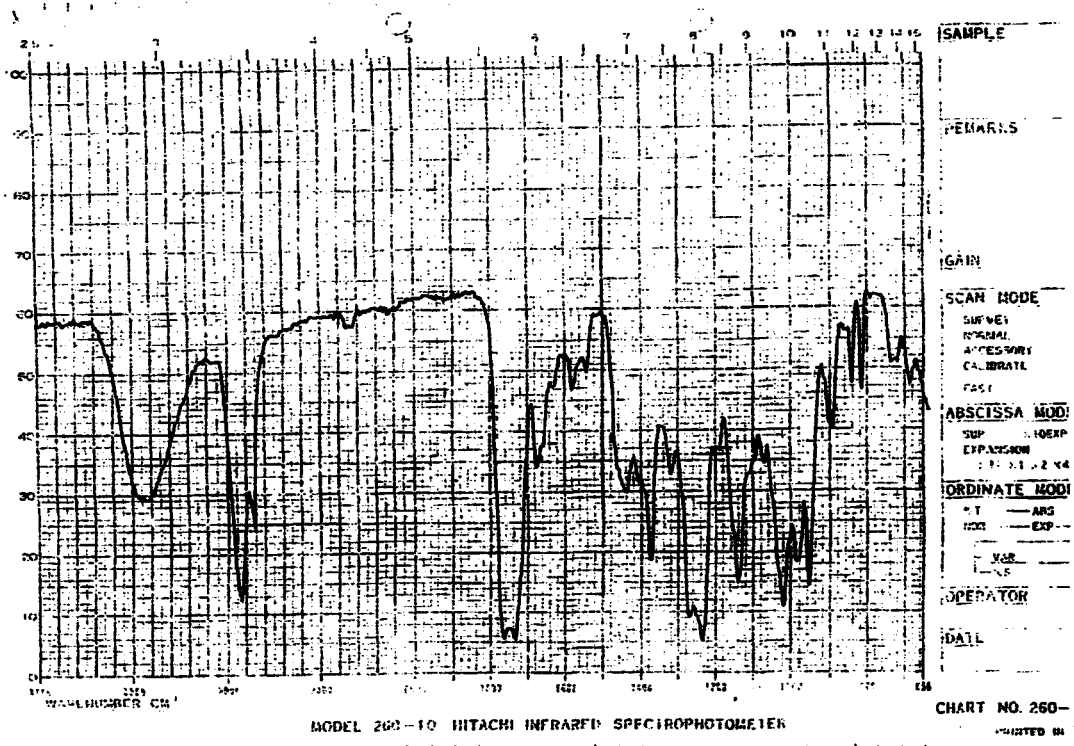


Figura V – Espectro de infravermelho do composto E

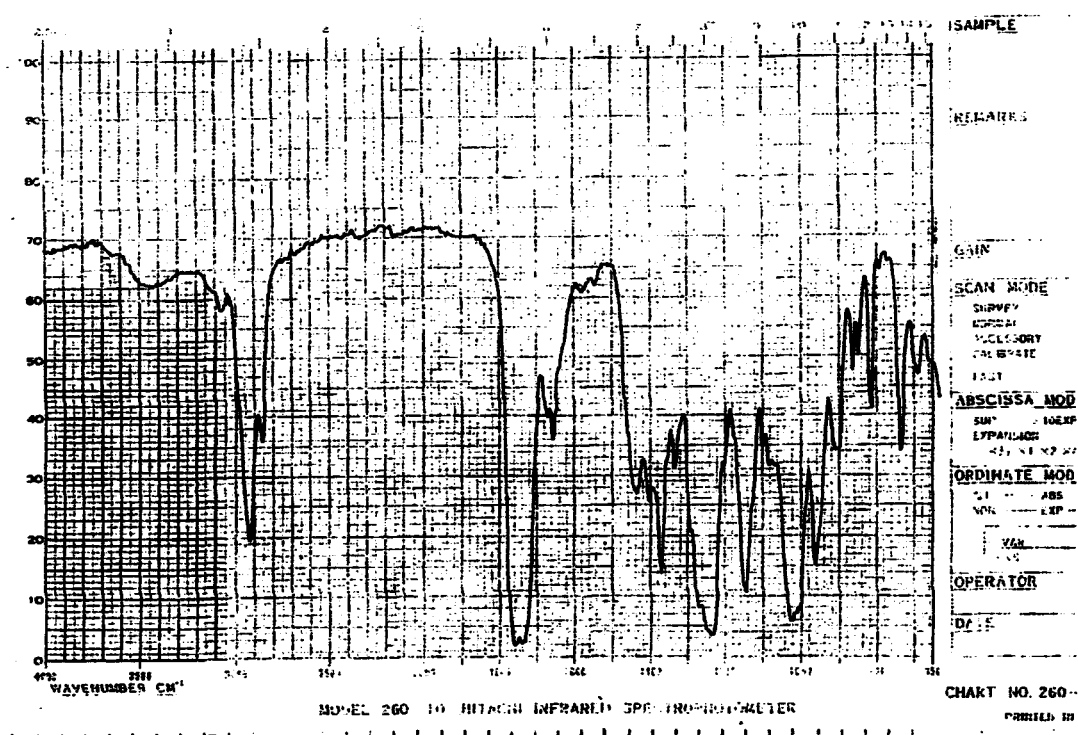


Figura VI – Espectro de infravermelho do composto F

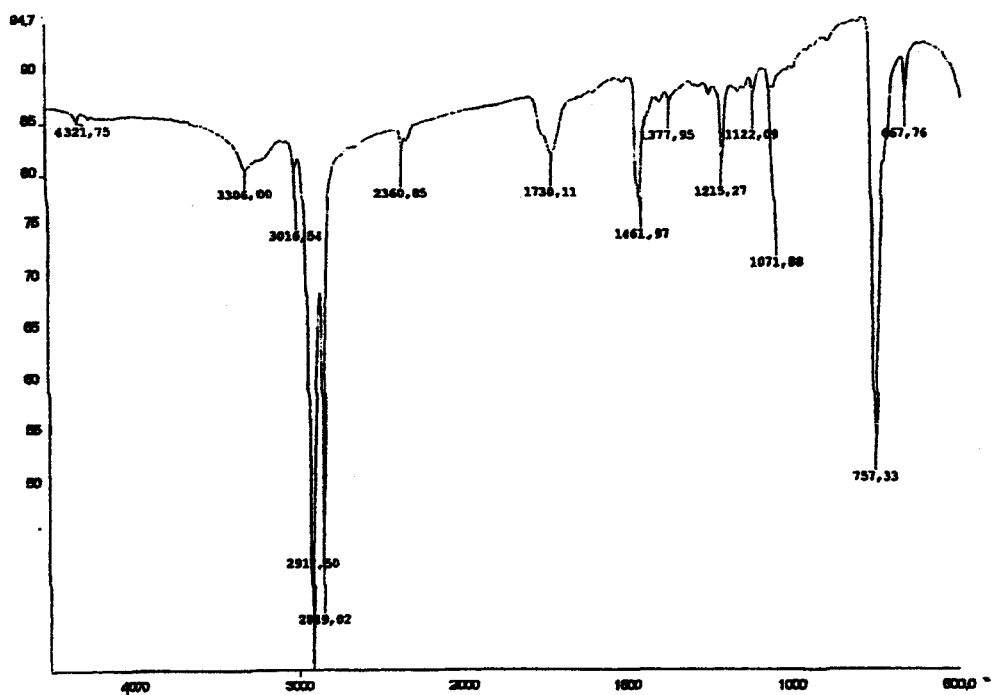


Figura VII – Espectro de infravermelho da mistura G

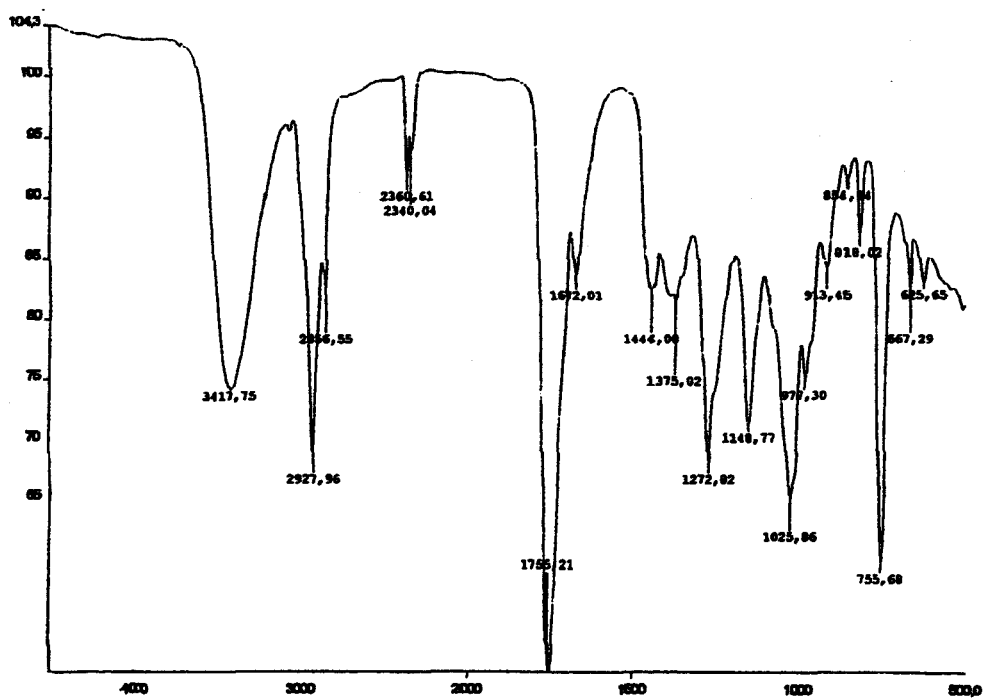


Figura VIII – Espectro de infravermelho do composto H

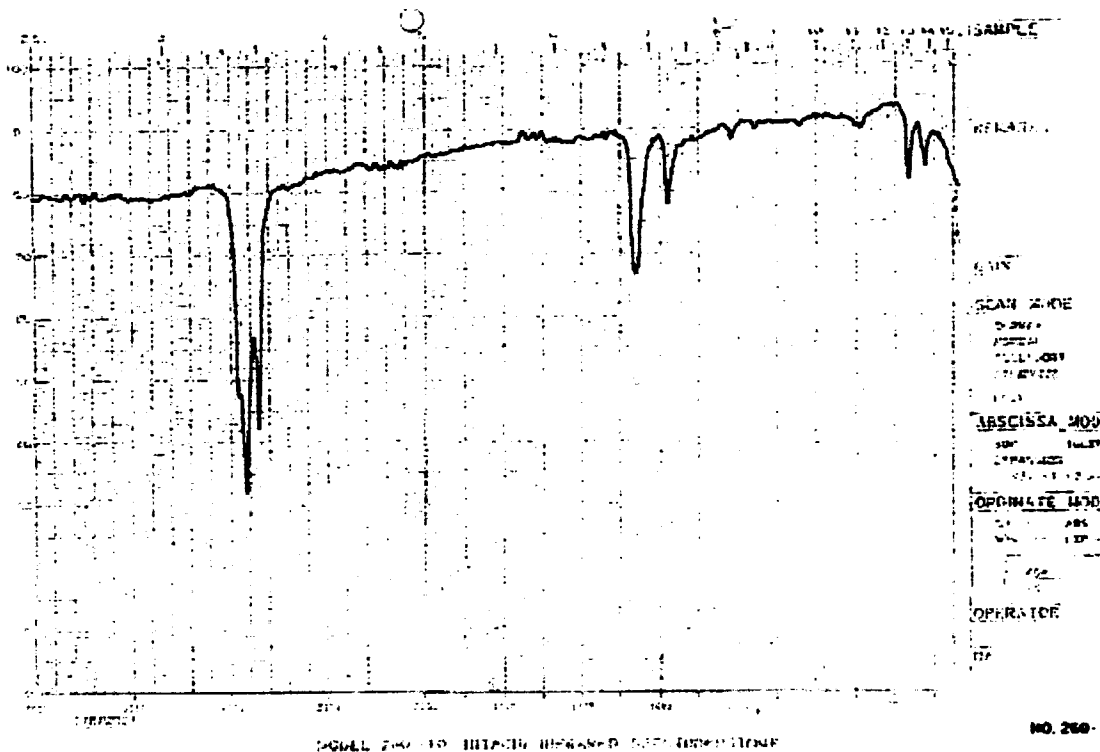


Figura IX – Espectro de infravermelho da mistura I

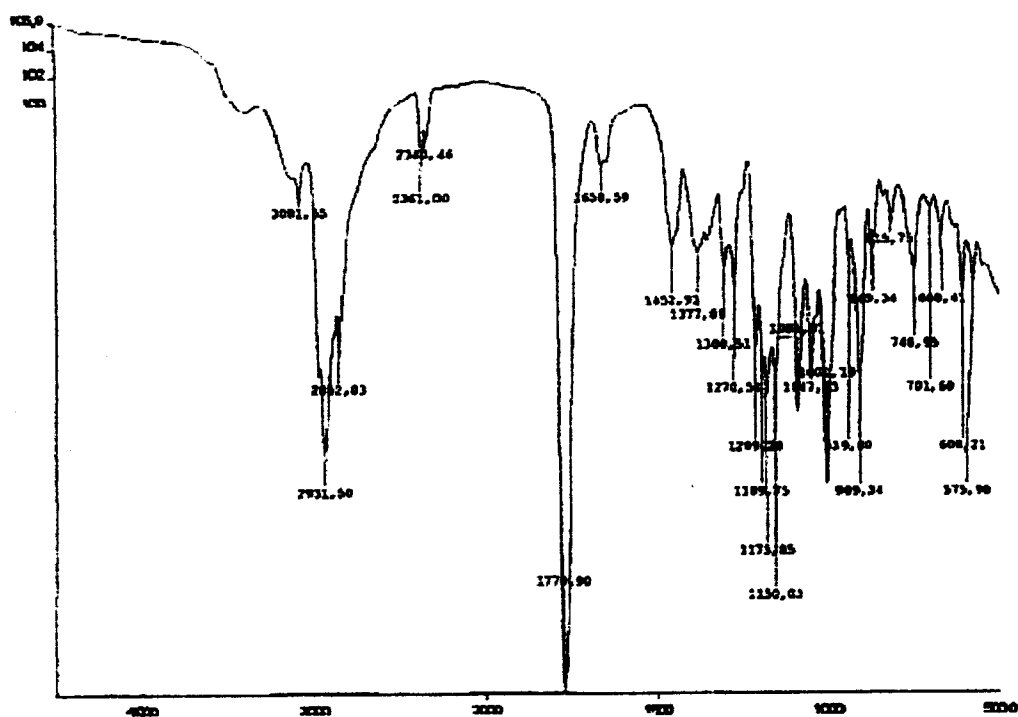


Figura X – Espectro de infravermelho do composto J

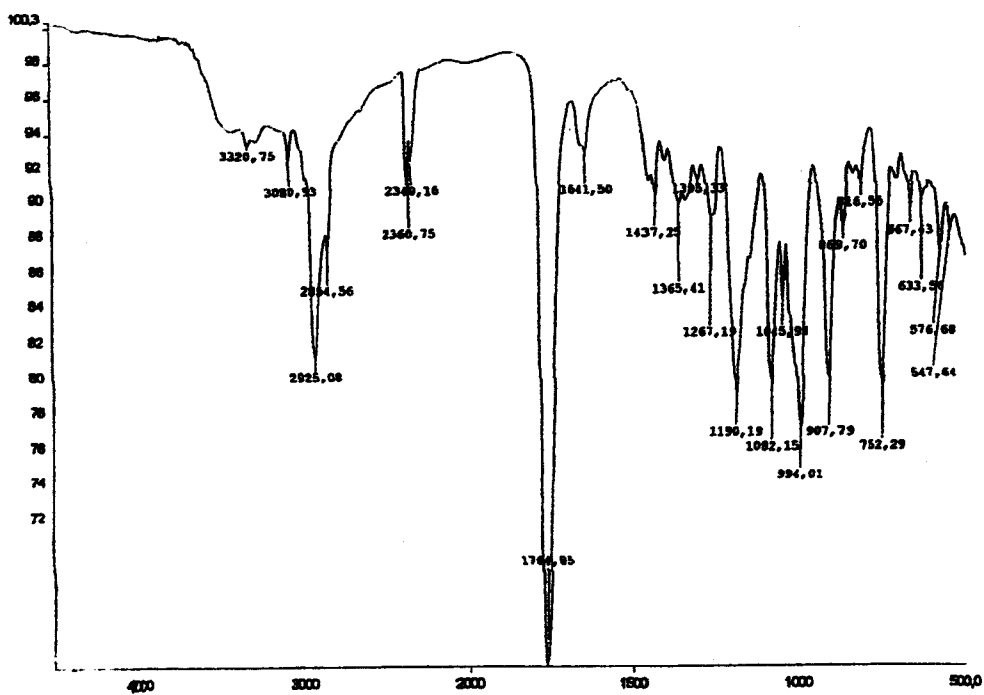


Figura XI – Espectro de infravermelho do composto L

Apêndice B

Espectros de ressonância magnética nuclear

B.1 – Espectros de RMN ^1H

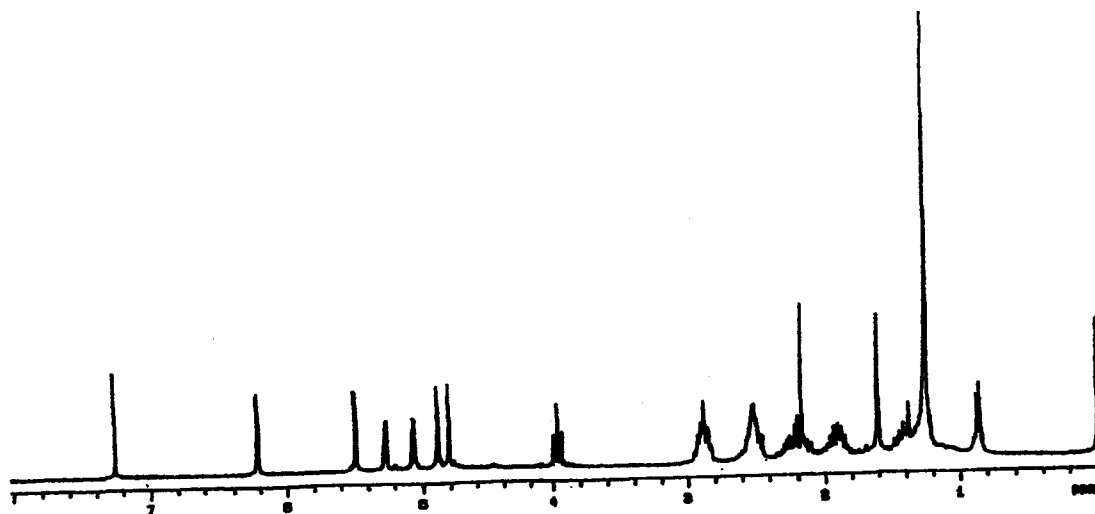


Figura XII – Espectro de RMN ^1H do composto A

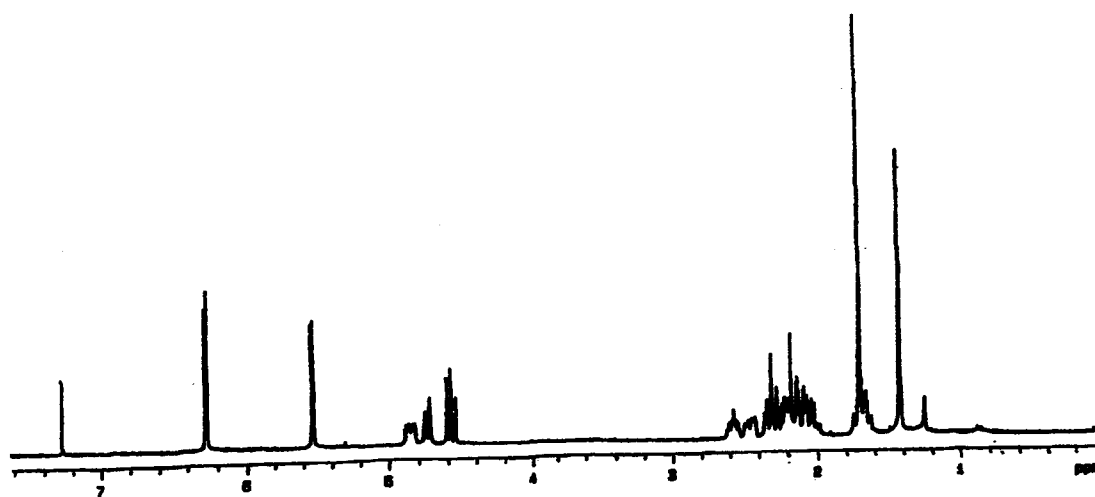


Figura XIII – Espectro de RMN ^1H do composto B

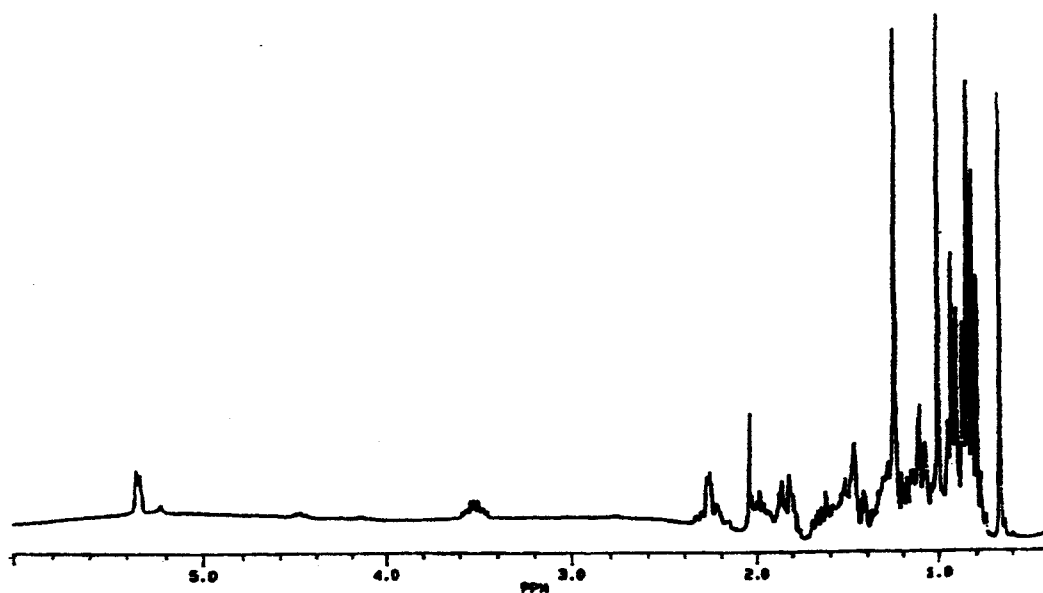


Figura XIV – Espectro de RMN ¹H do composto C

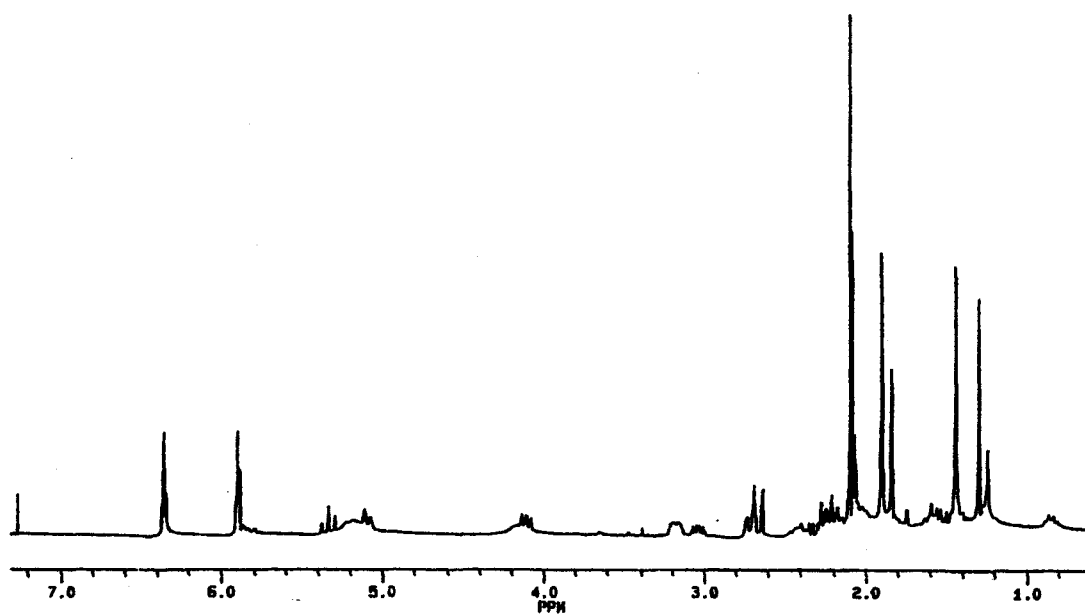


Figura XV – Espectro de RMN ¹H da mistura D

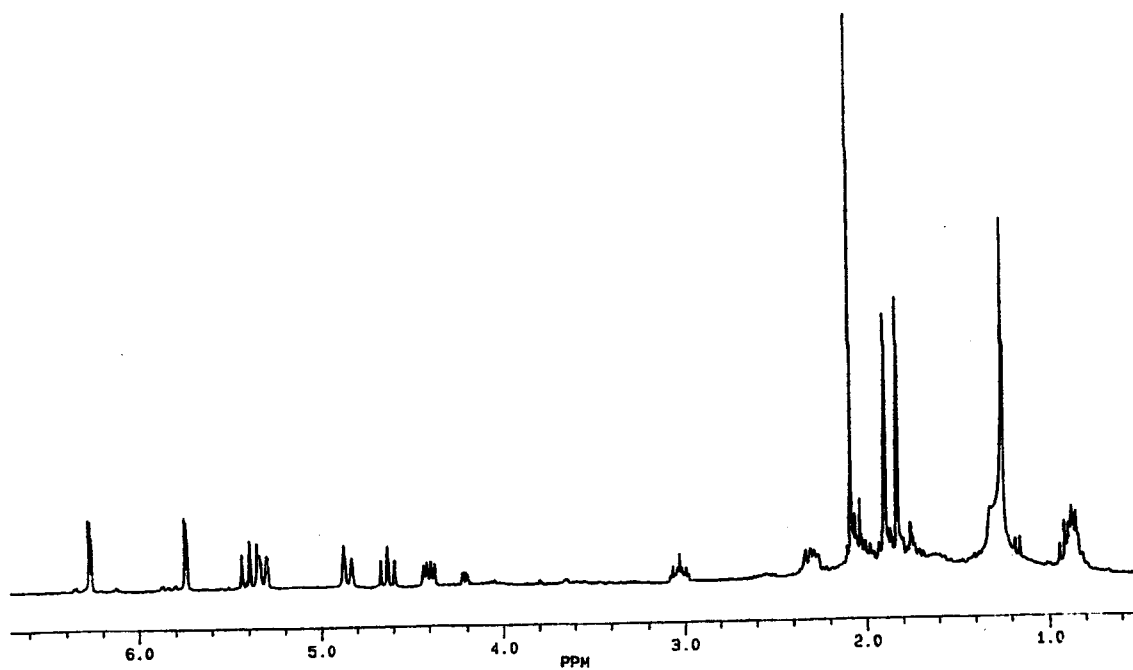


Figura XVI – Espectro de RMN ^1H do composto E

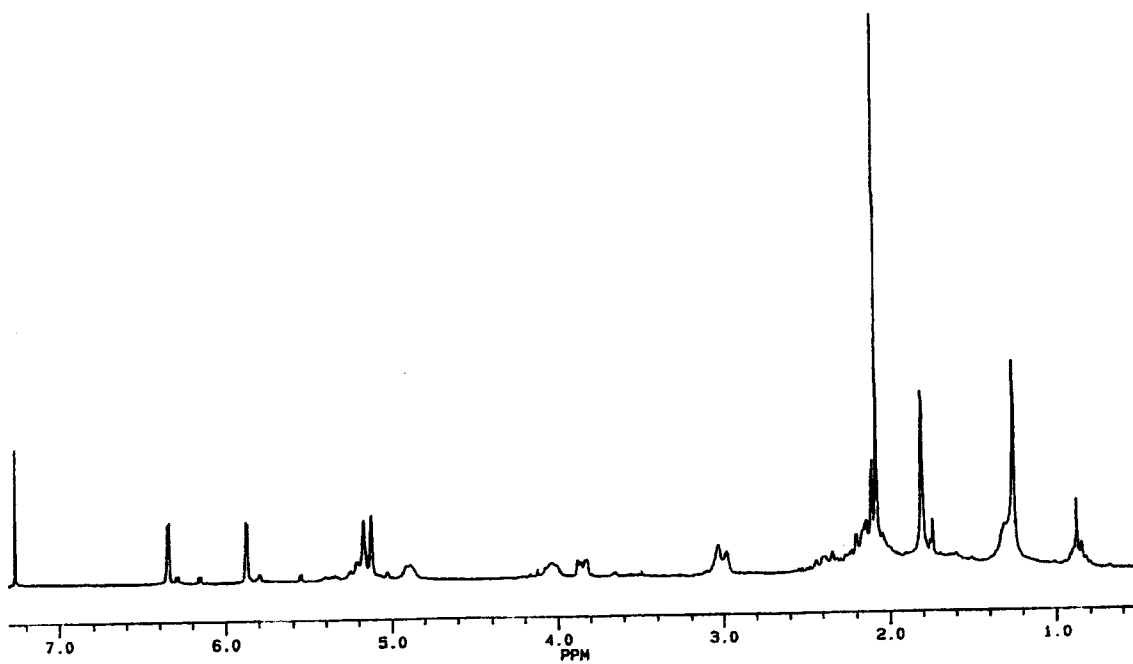


Figura XVII – Espectro de RMN ^1H do composto F

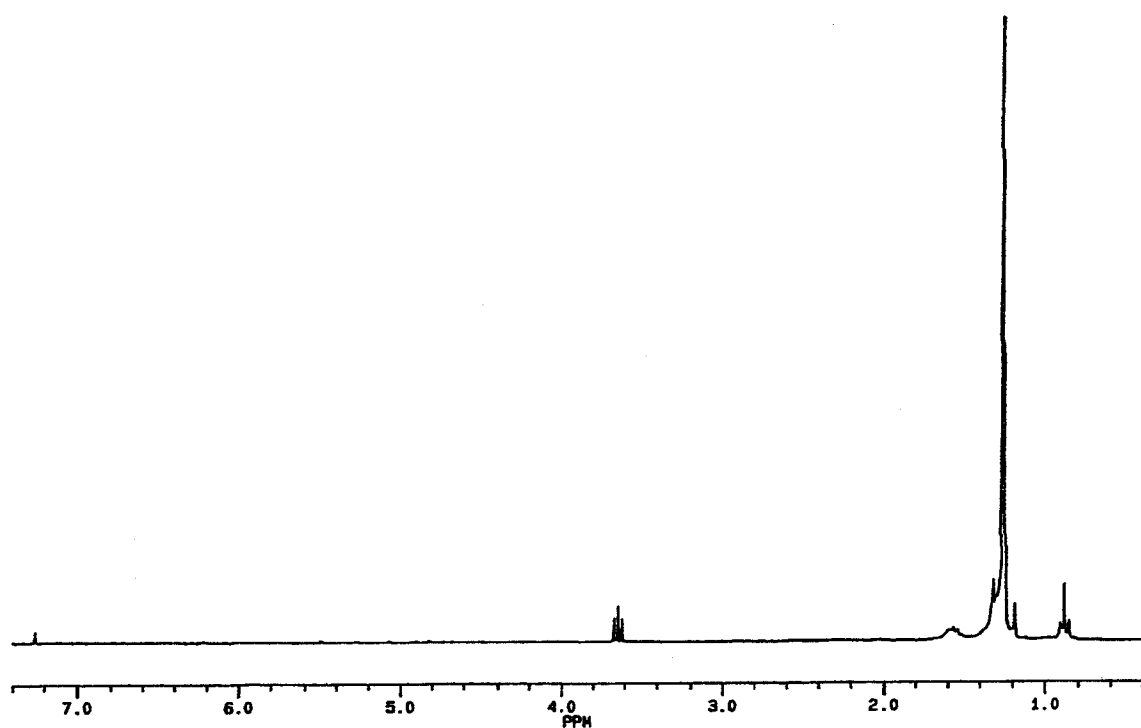


Figura XVIII – Espectro de RMN ^1H da mistura G

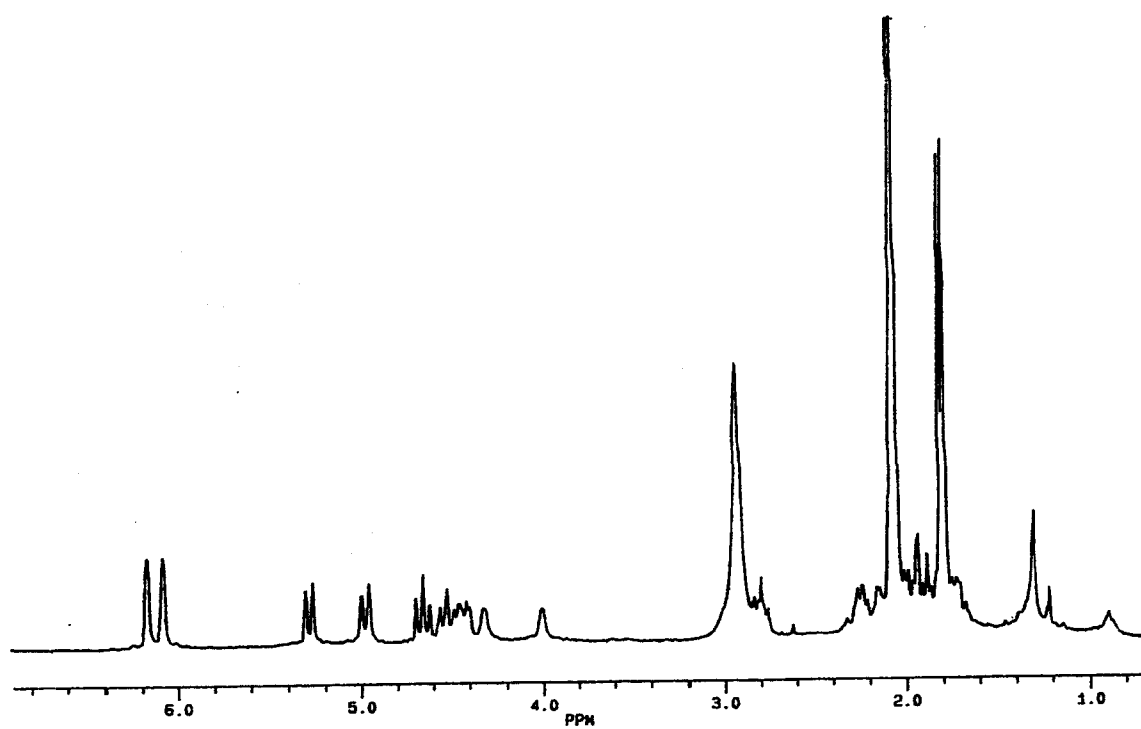


Figura XIX – Espectro de RMN ^1H $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ do composto H

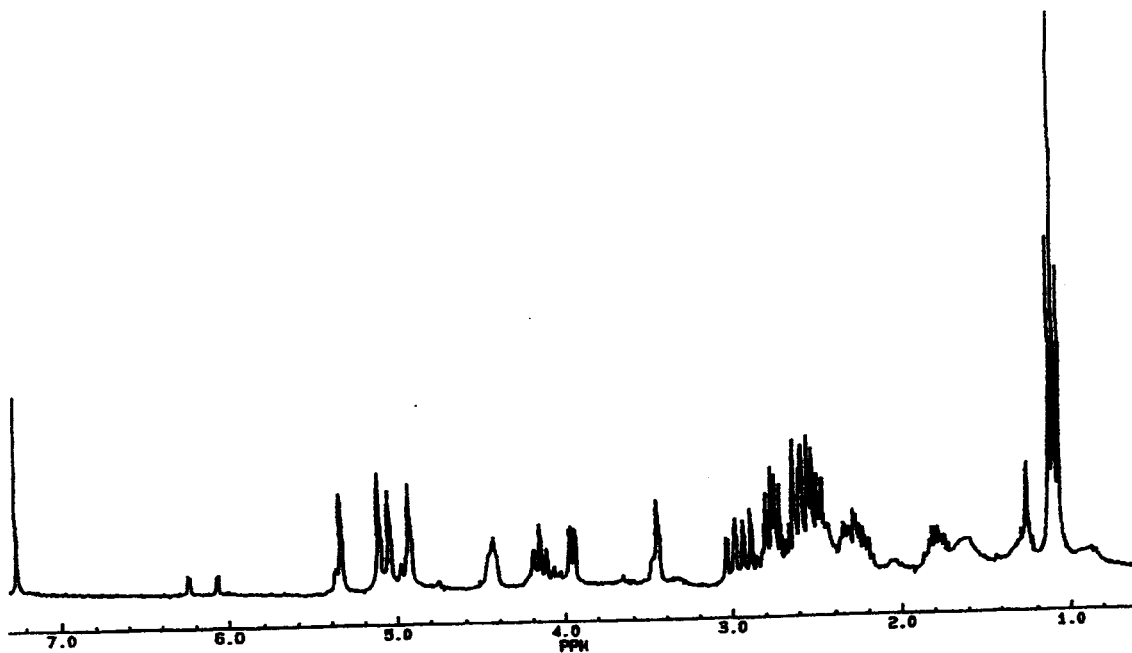


Figura XX – Espectro de RMN ¹H do composto J

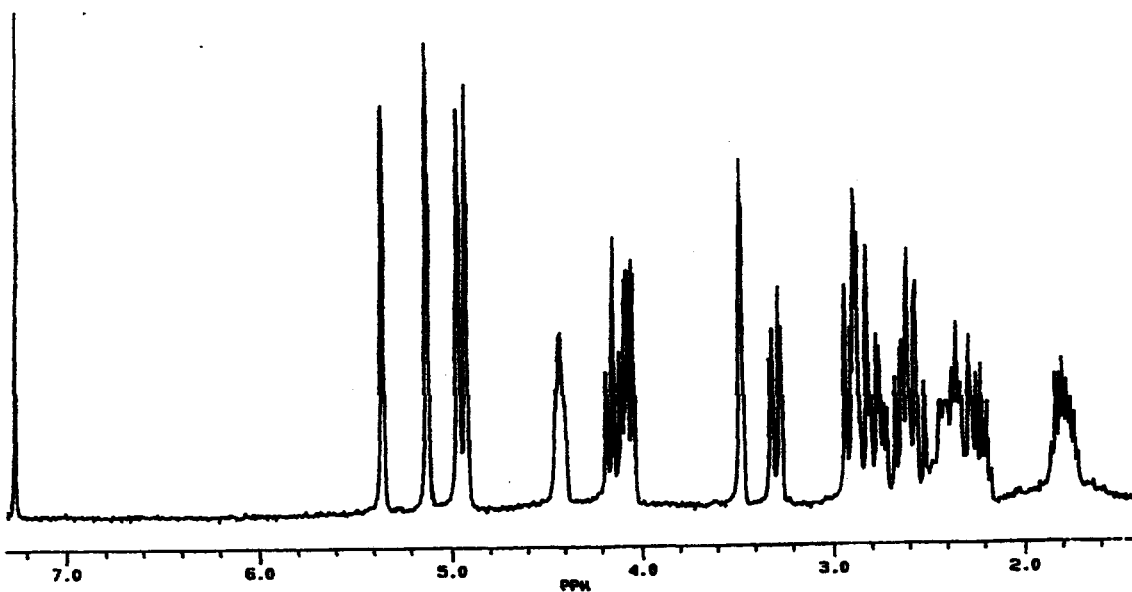


Figura XXI – Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do composto L

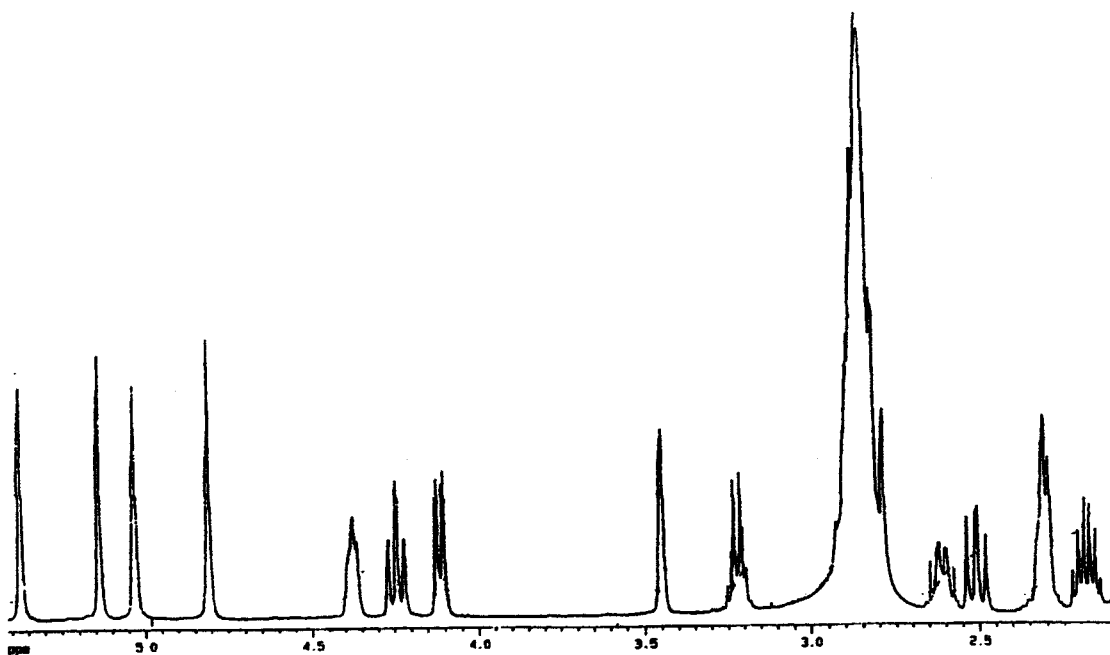


Figura XXII – Espectro de RMN ^1H $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ do composto L

B.2 – Espectros de RMN ^{13}C

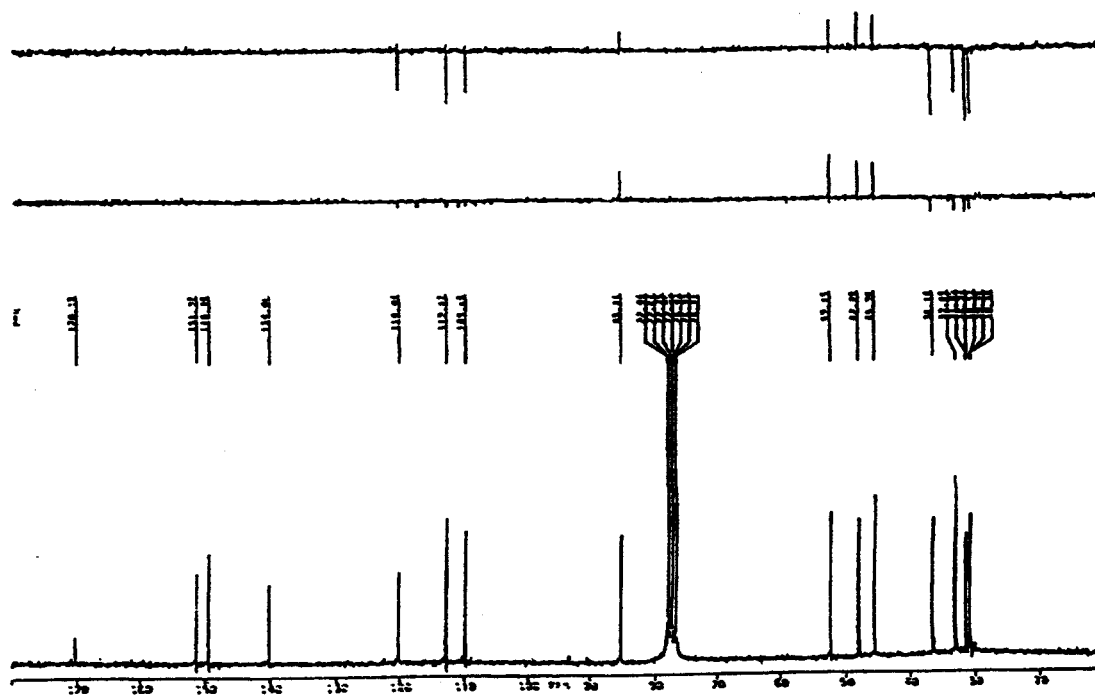


Figura XXIII - Espectro de RMN ^{13}C do composto A

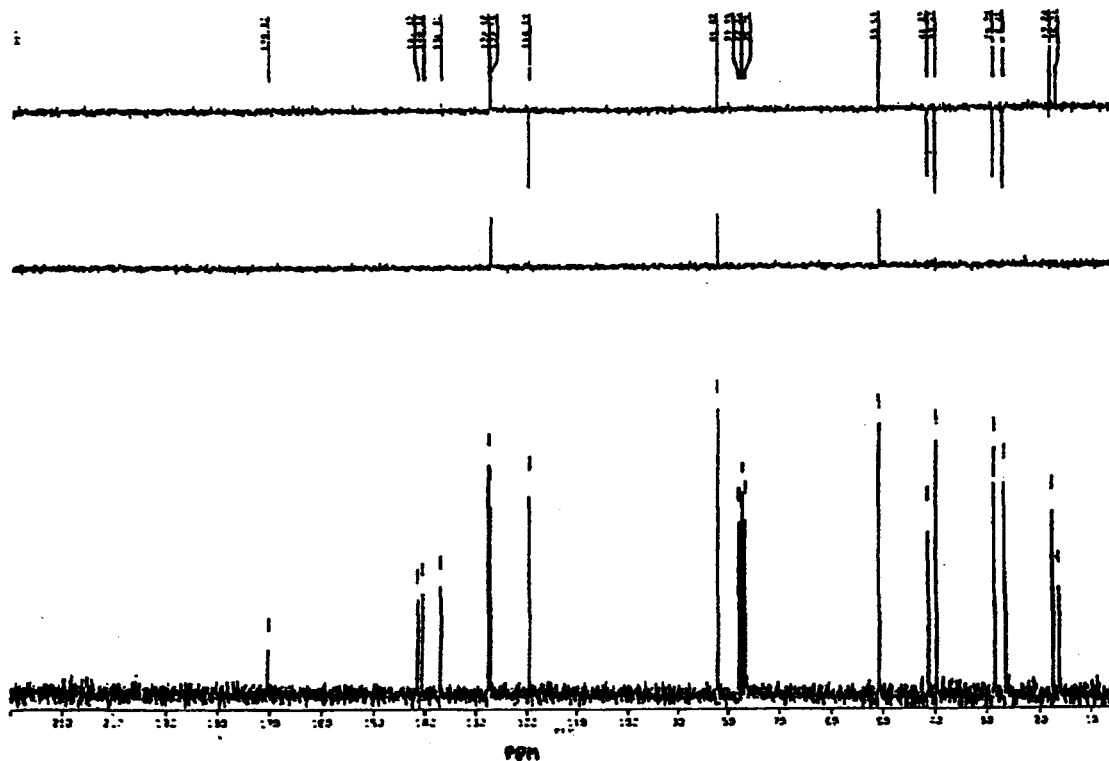


Figura XXIV - Espectro de RMN ^{13}C do composto B

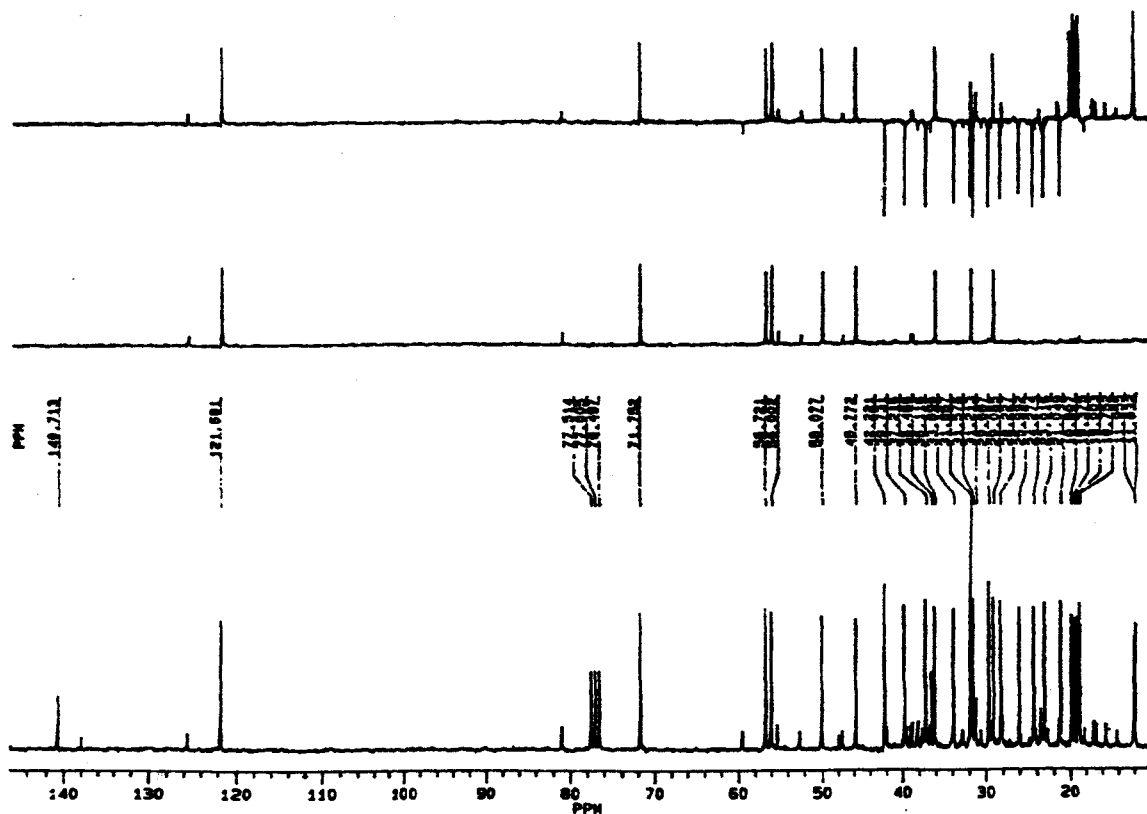


Figura XXV - Espectro de RMN ^{13}C do composto C

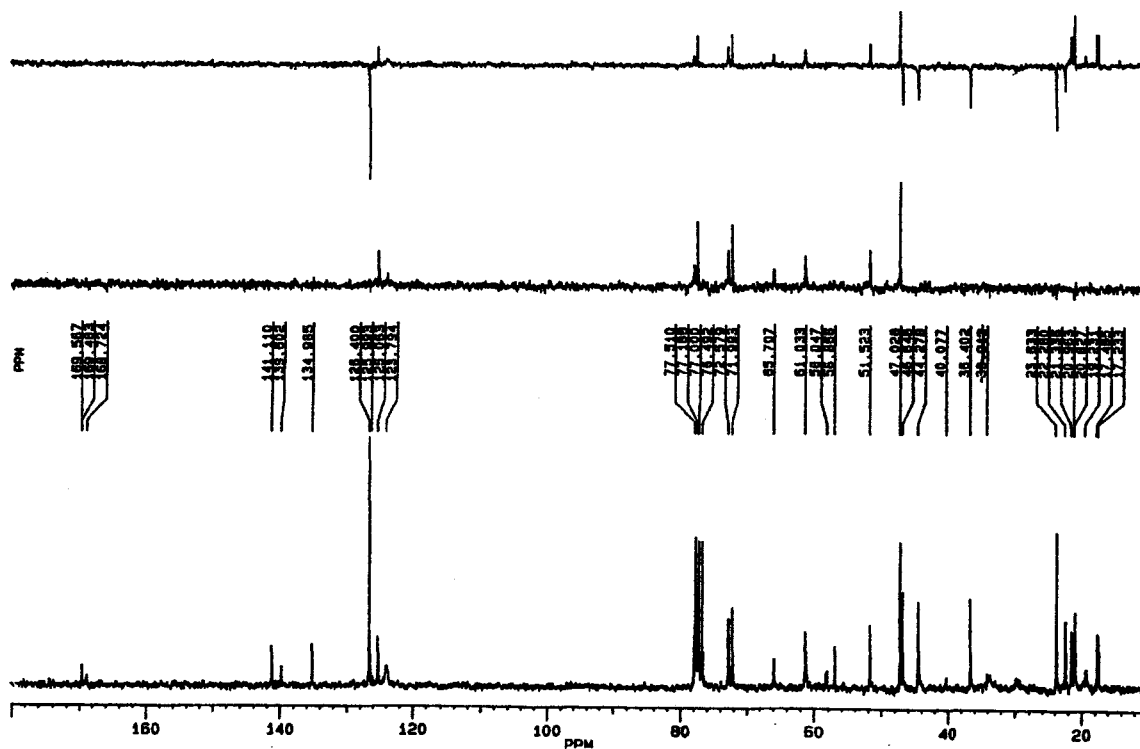


Figura XXVI - Espectro de RMN ^{13}C da mistura D

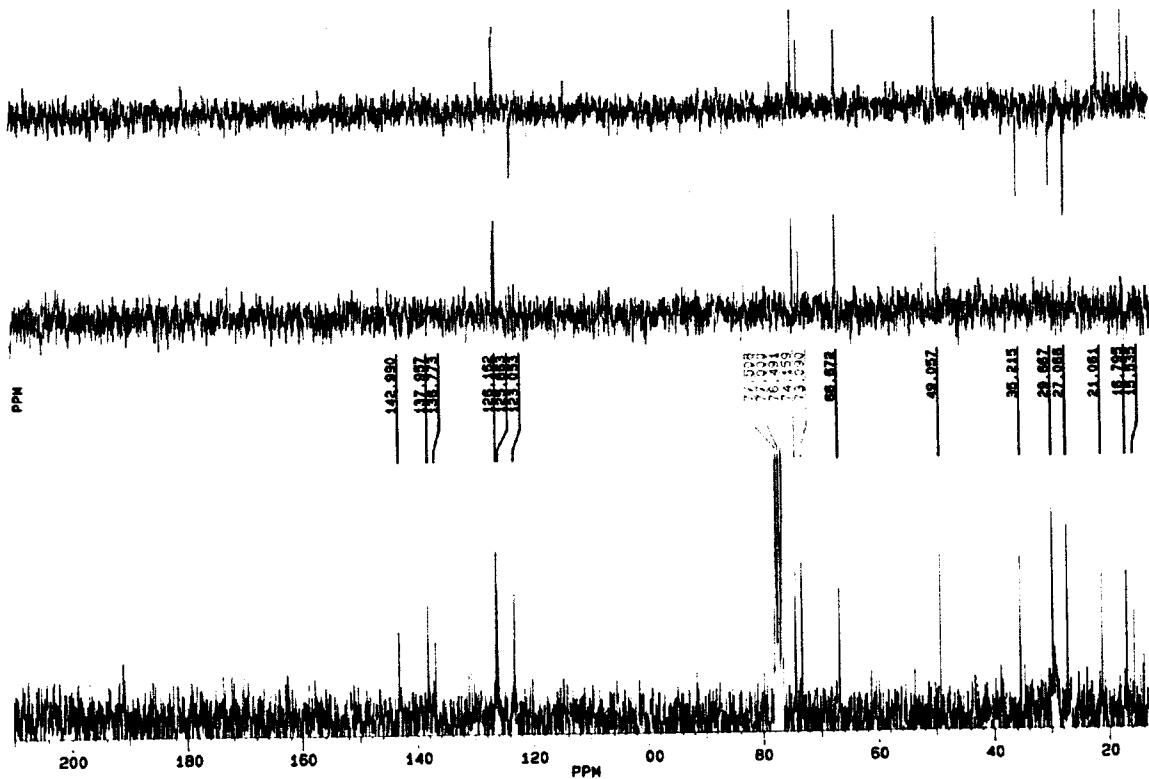


Figura XXVII - Espectro de RMN ¹³C do composto E

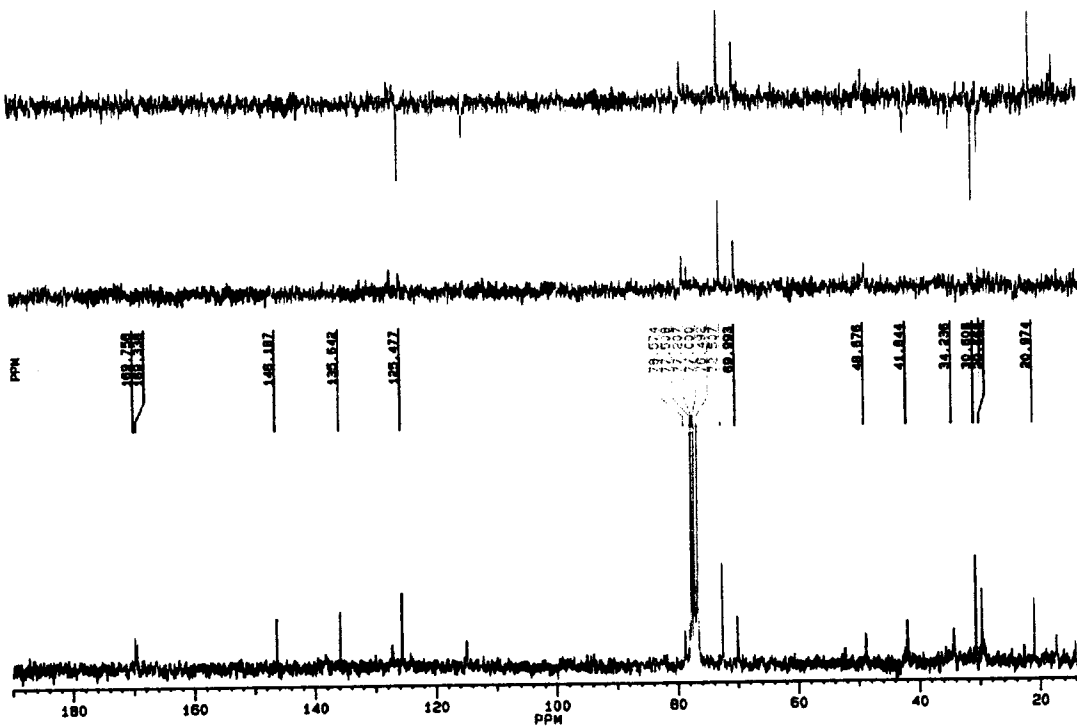


Figura XXVIII - Espectro de RMN ¹³C do composto F

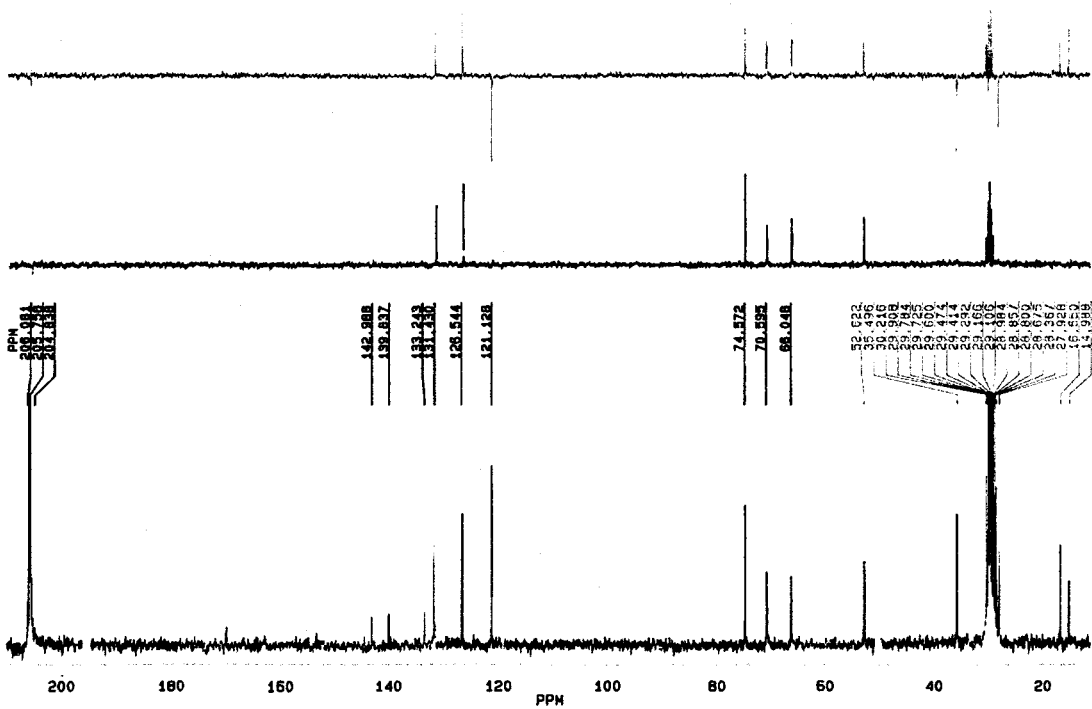


Figura XXIX - Espectro de RMN ¹³C do composto H

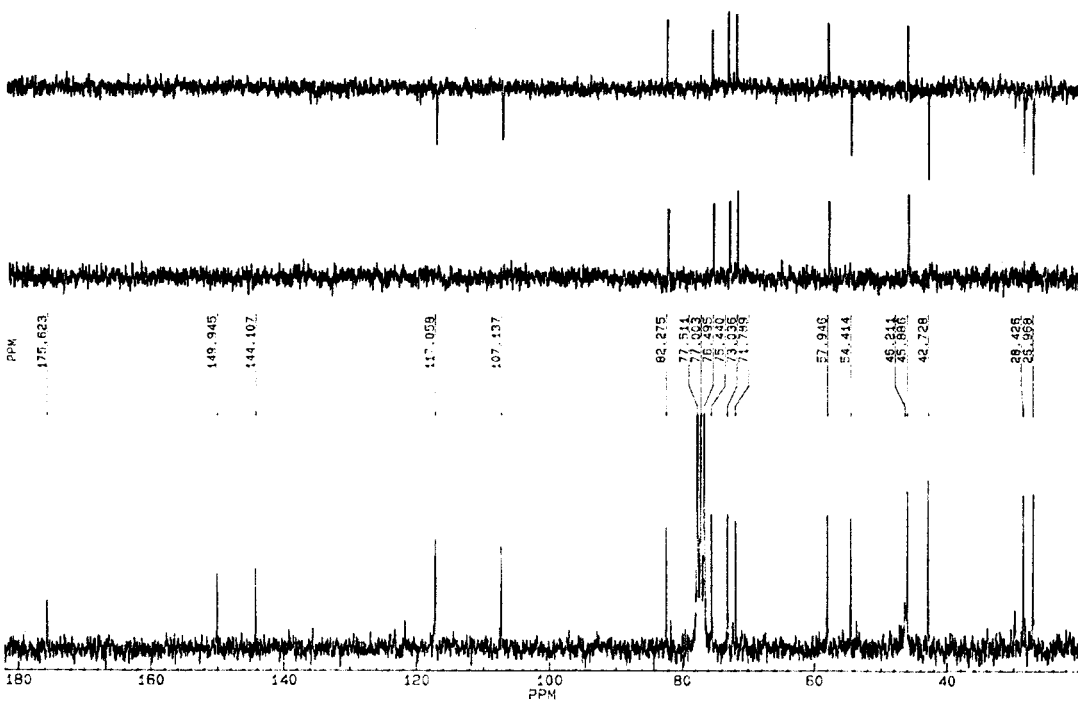


Figura XXX - Espectro de RMN ¹³C do composto J

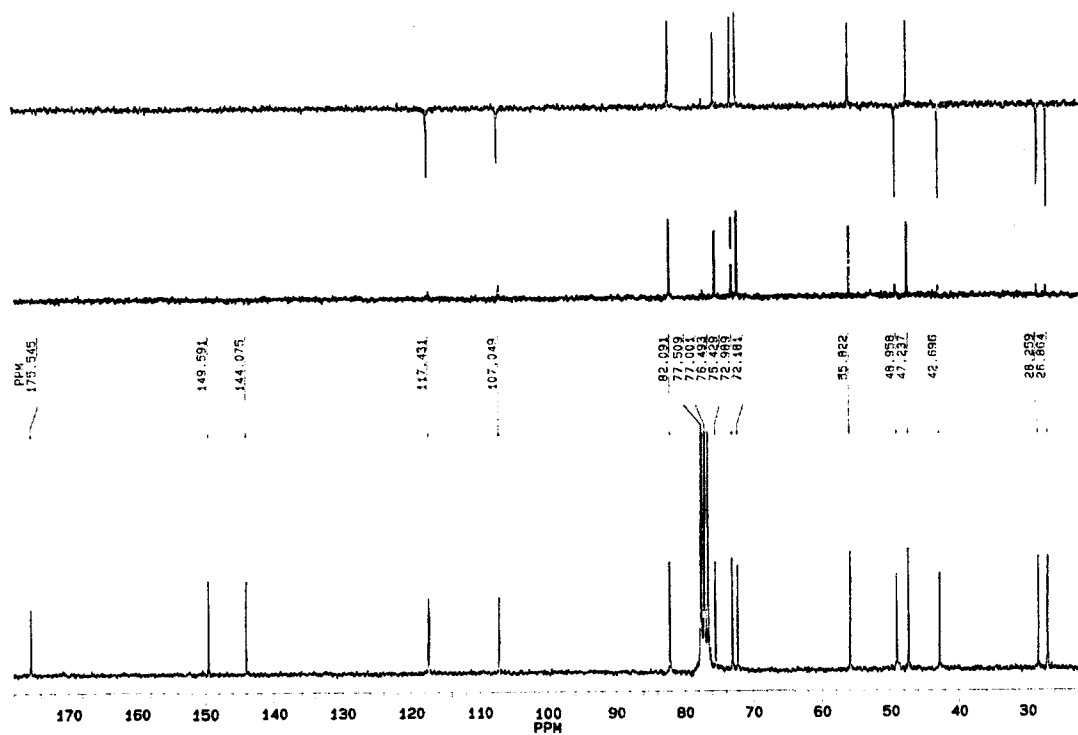


Figura XXXI - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) do composto L

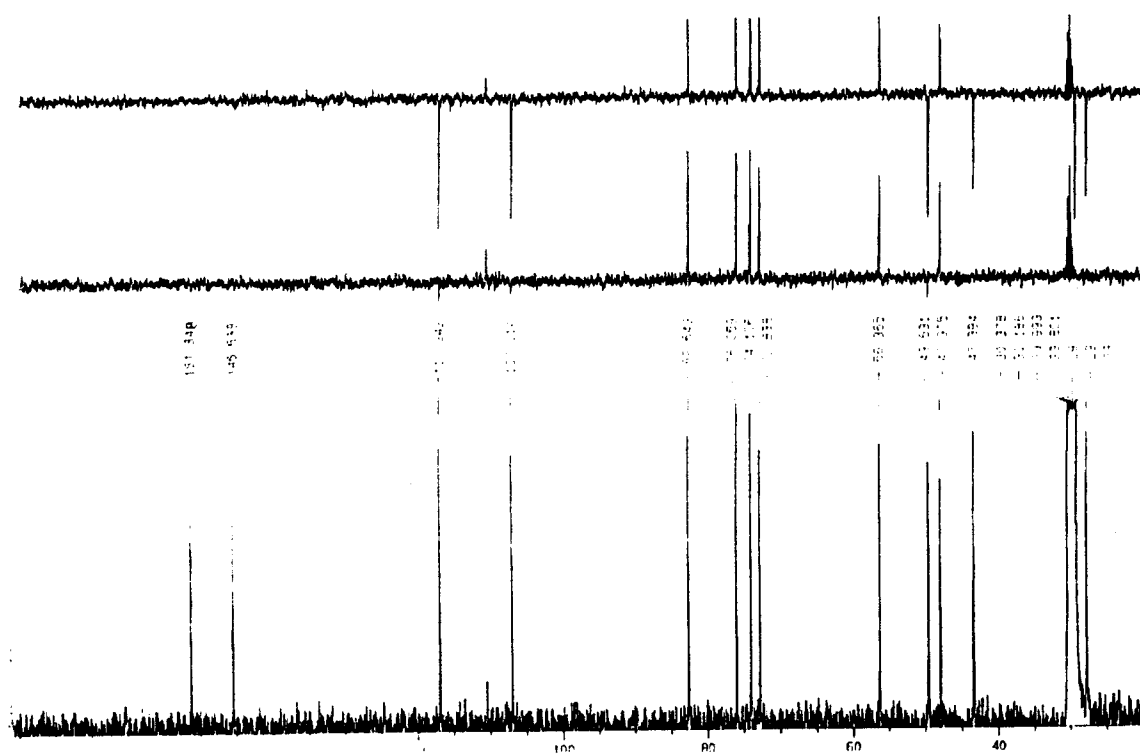


Figura XXXII - Espectro de RMN ^{13}C $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ do composto L

B.3 – Espectros de correlação

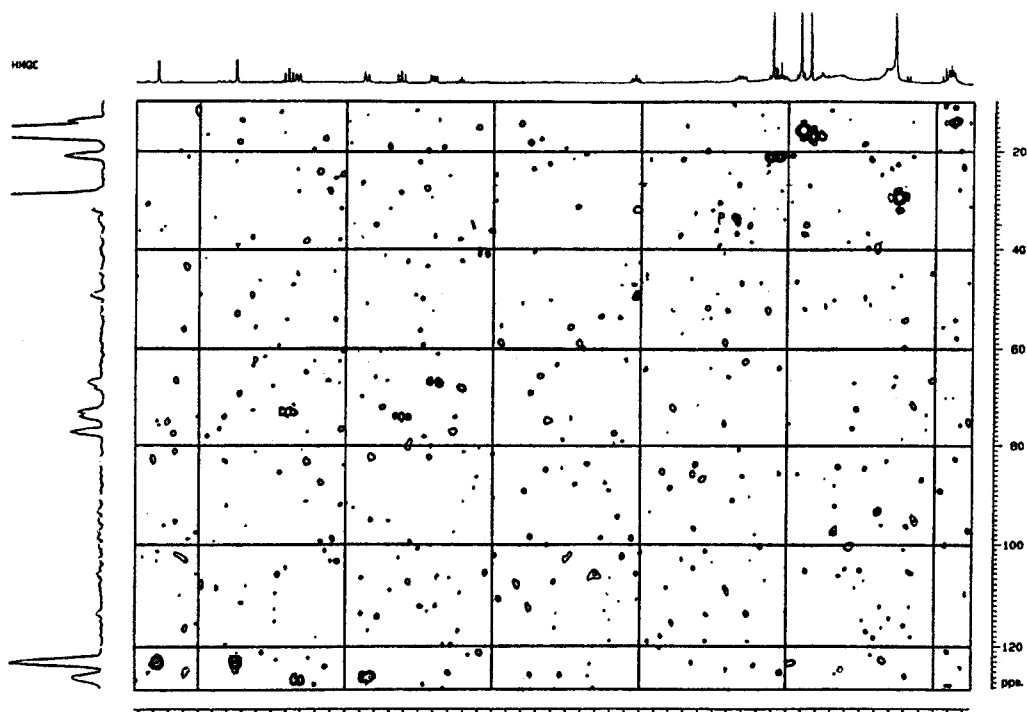


Figura XXXIII – Espectro HMQC do composto E

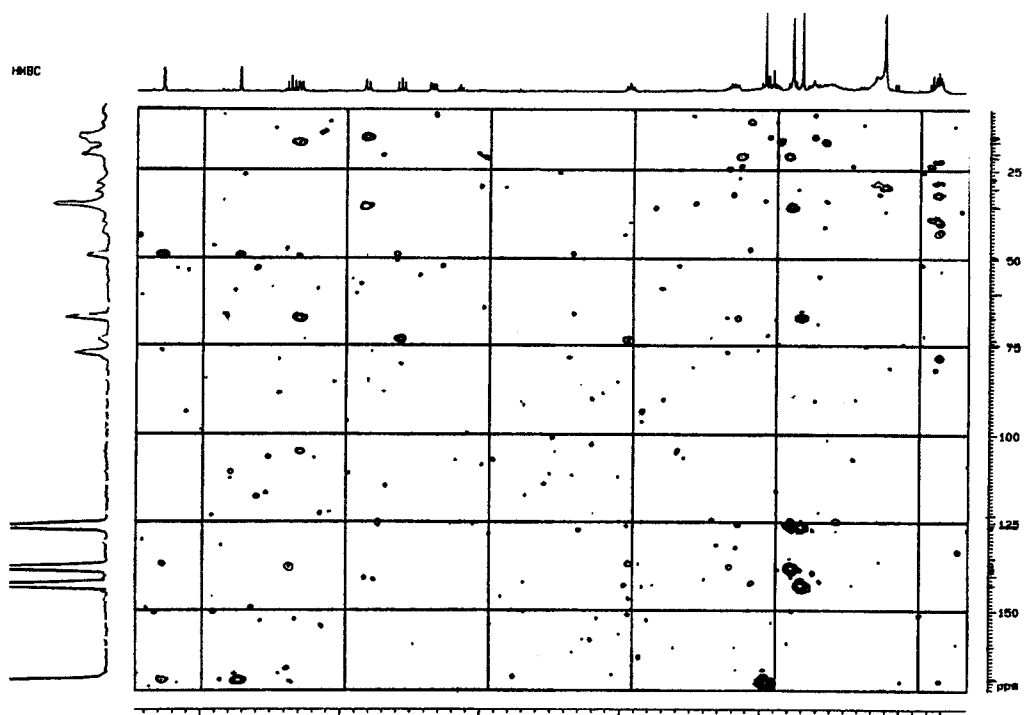


Figura XXXIV - Espectro HMBC do composto E

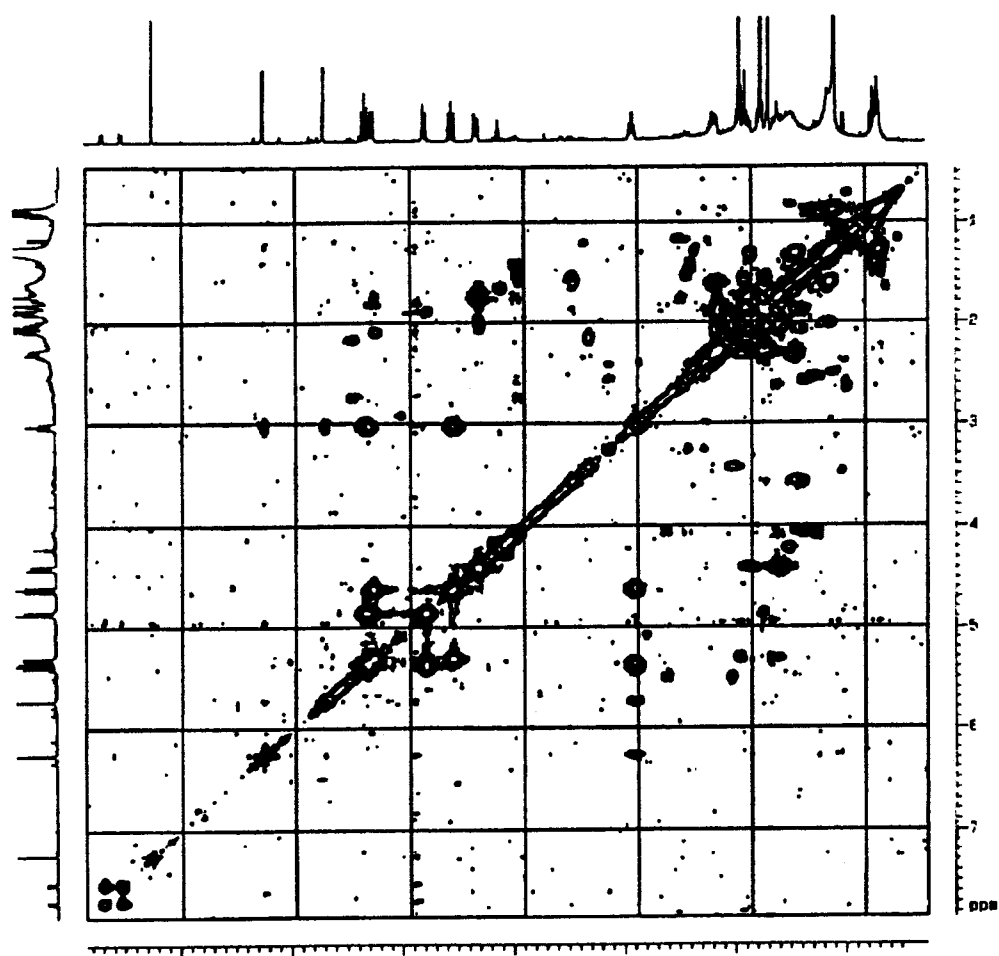


Figura XXXV – Espectro COSY do composto E

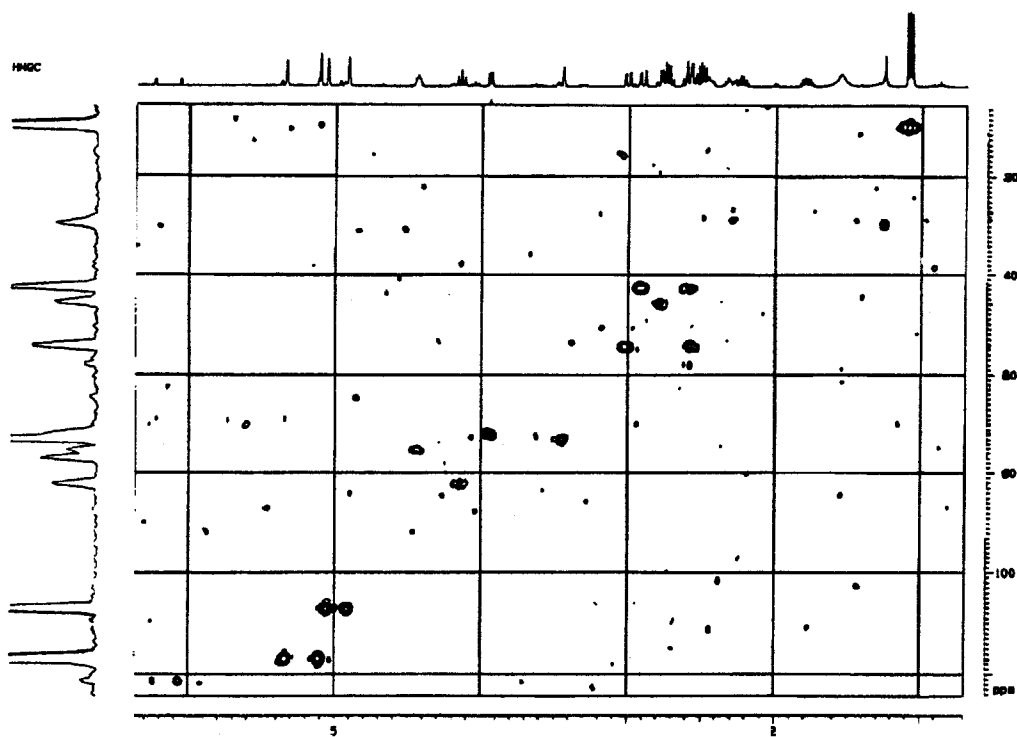


Figura XXXVI – Espectro HMQC do composto J

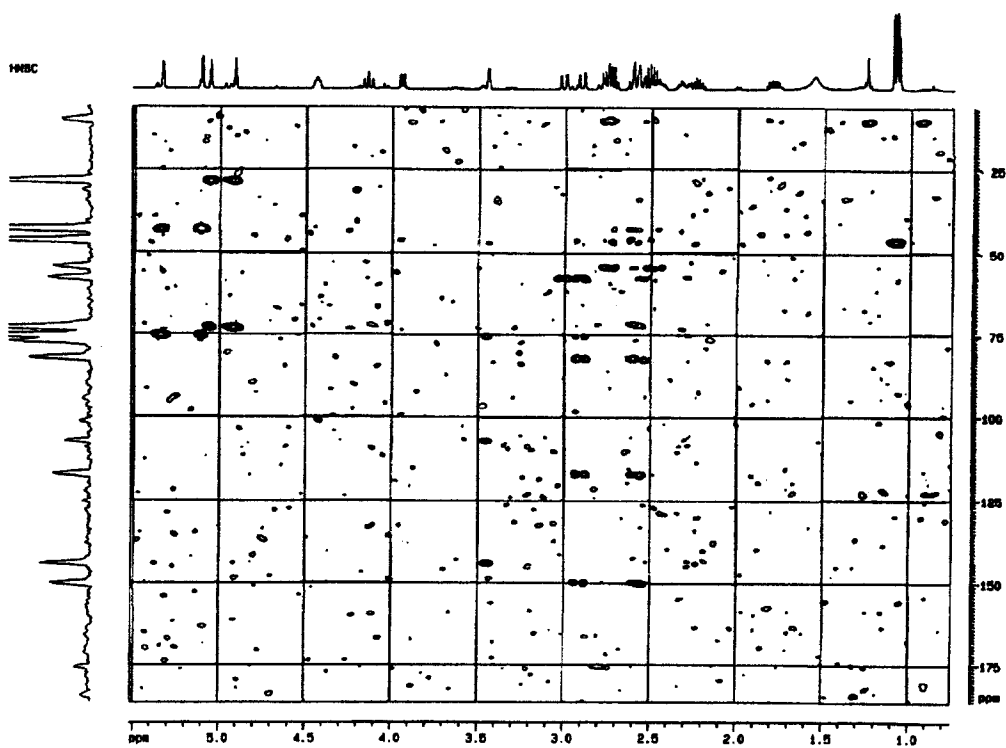


Figura XXXVII – Espectro HMBC do composto J

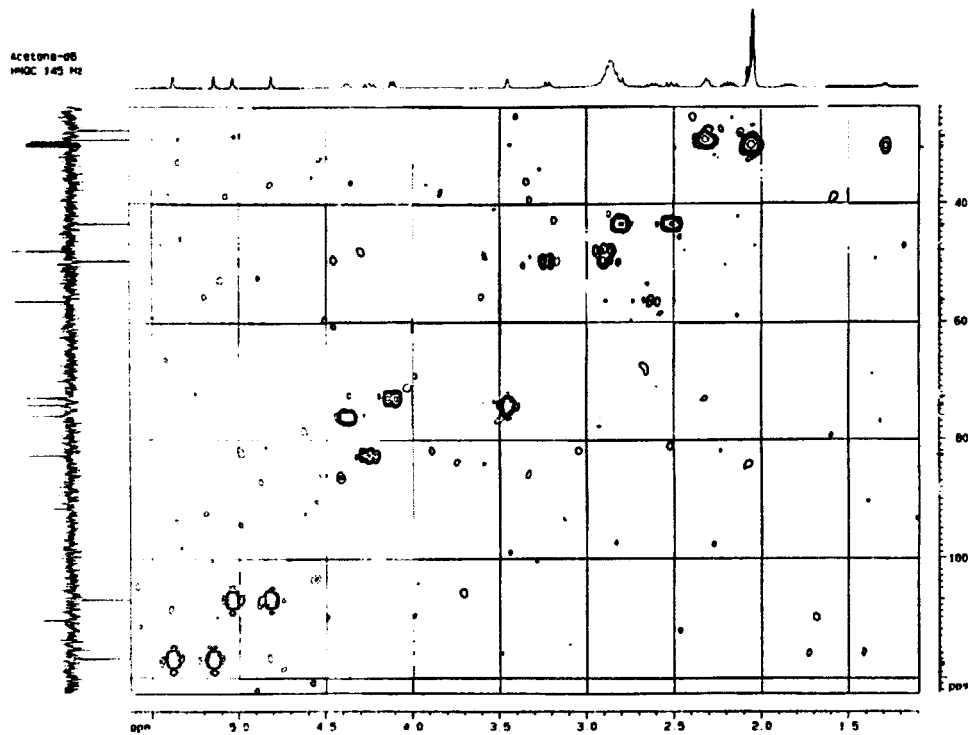


Figura XXXVIII – Espectro HMQC do composto L

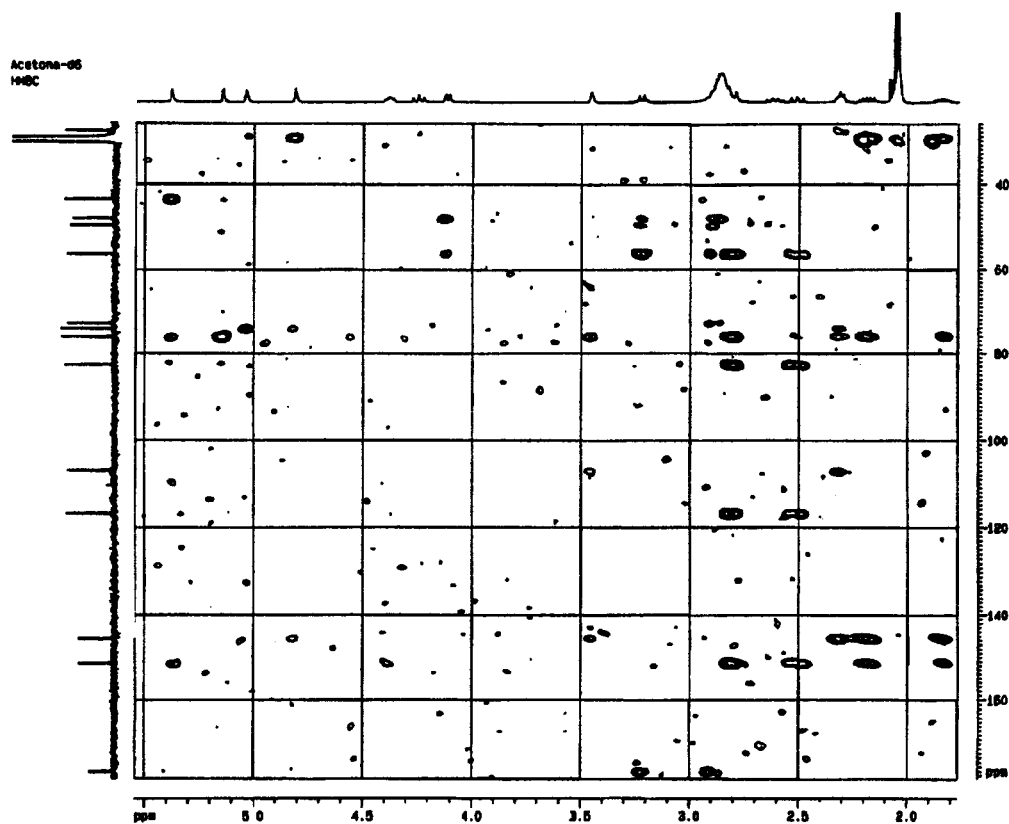


Figura XXXIX – Espectro HMBC do composto L

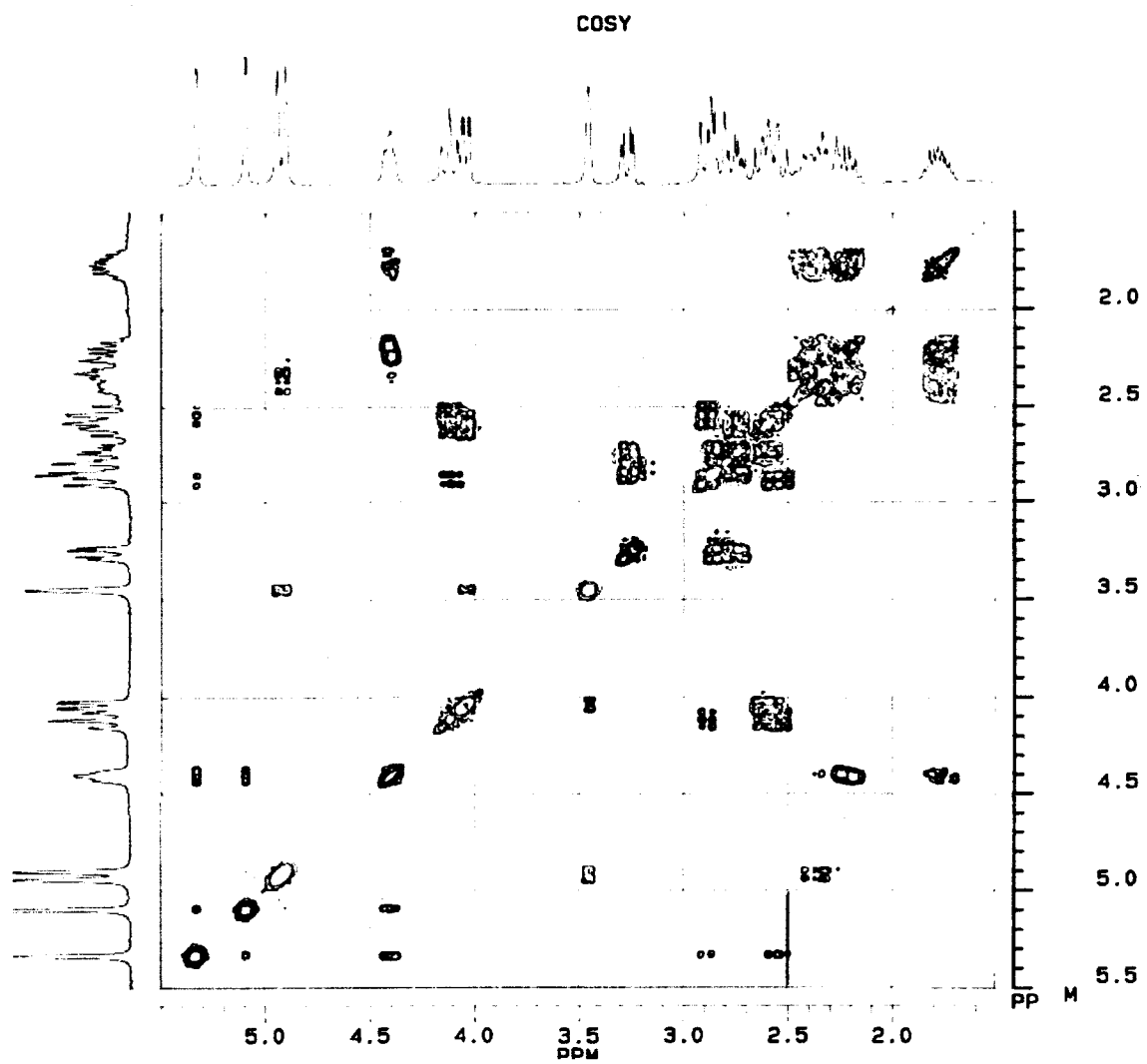


Figura XL – Espectro COSY do composto L

Apêndice C

Espectros de massa

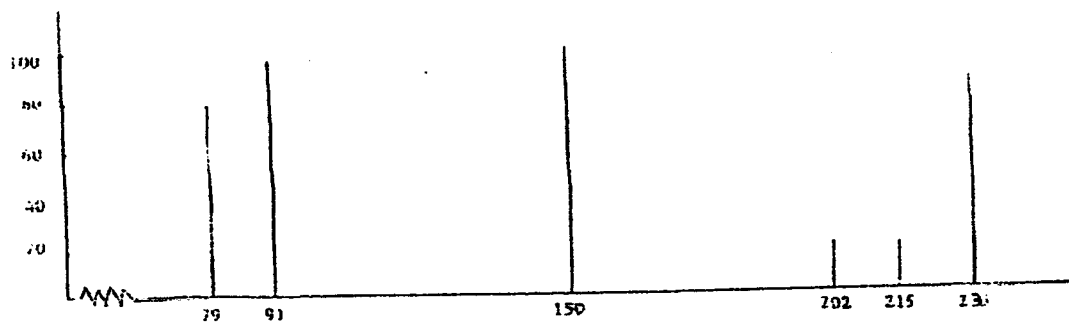


Figura XLI – Espectro de massa do composto A

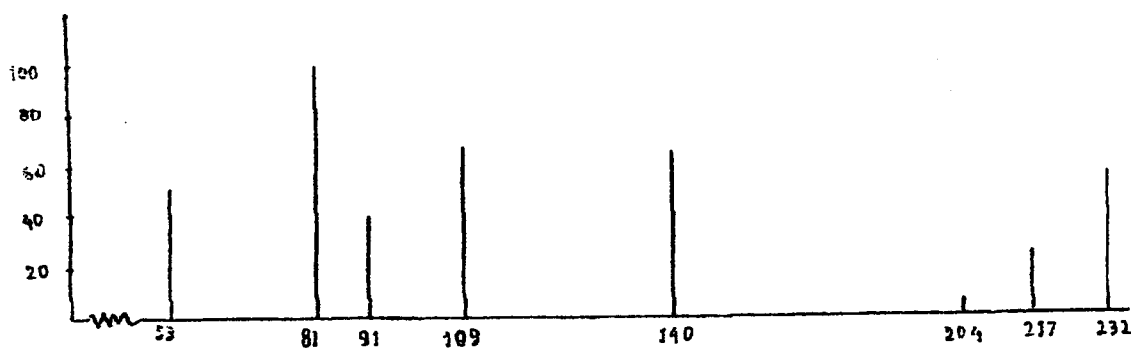


Figura XLII – Espectro de massa do composto B

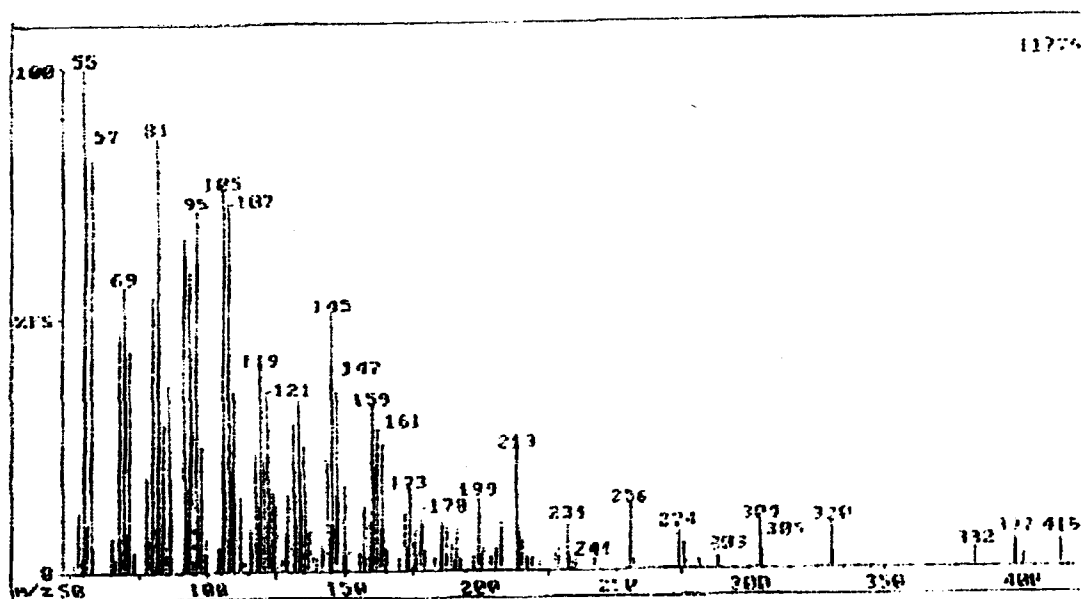


Figura XLIII – Espectro de massa do composto C

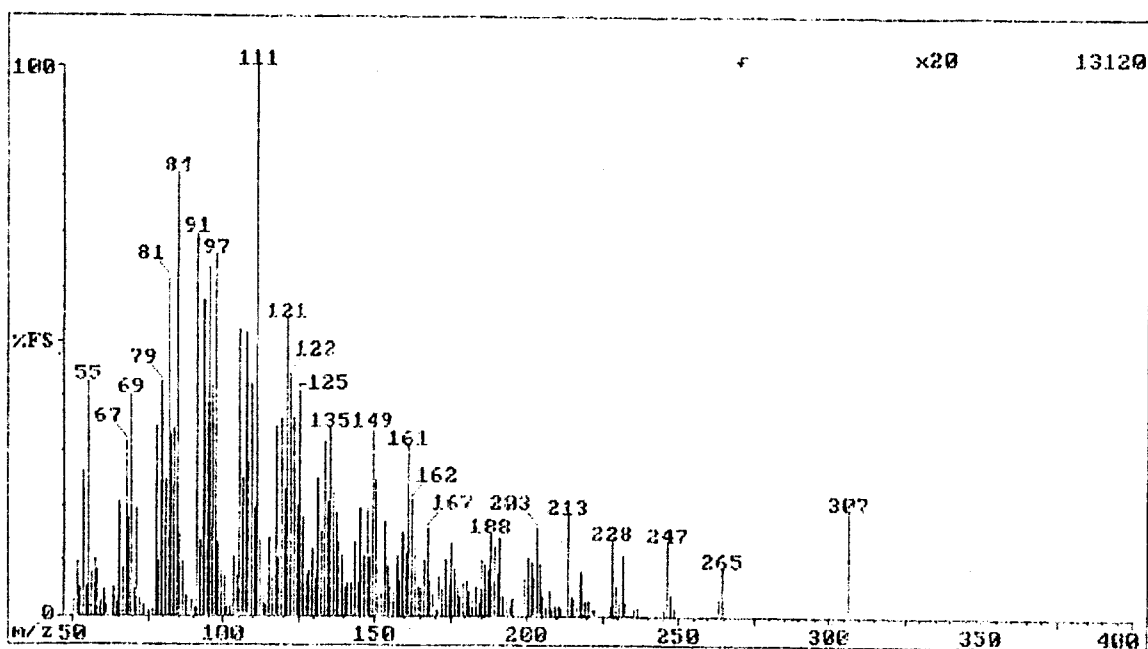


Figura XLIV - Espectro de massa do composto D₁

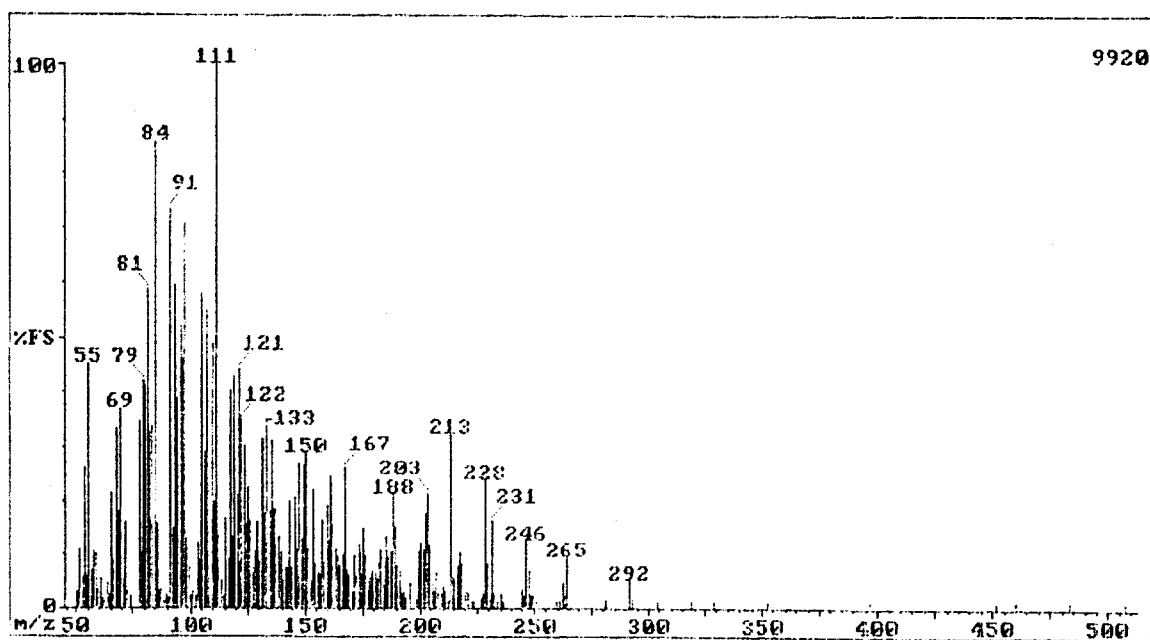


Figura XLV - Espectro de massa do composto D₂

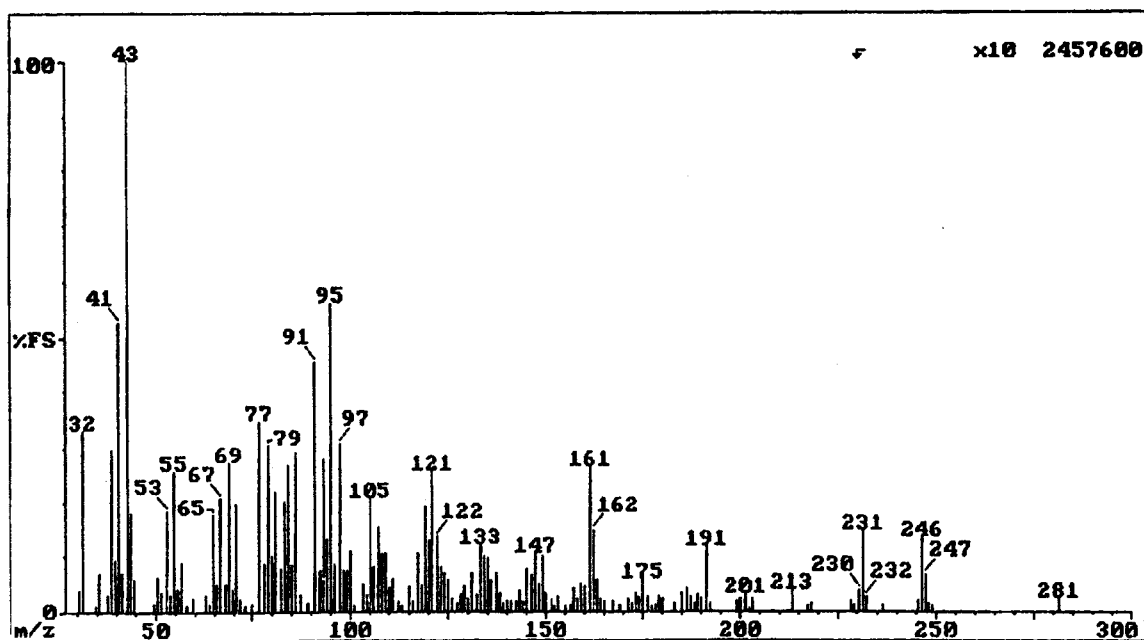


Figura XLVI - Espectro de massa do composto E

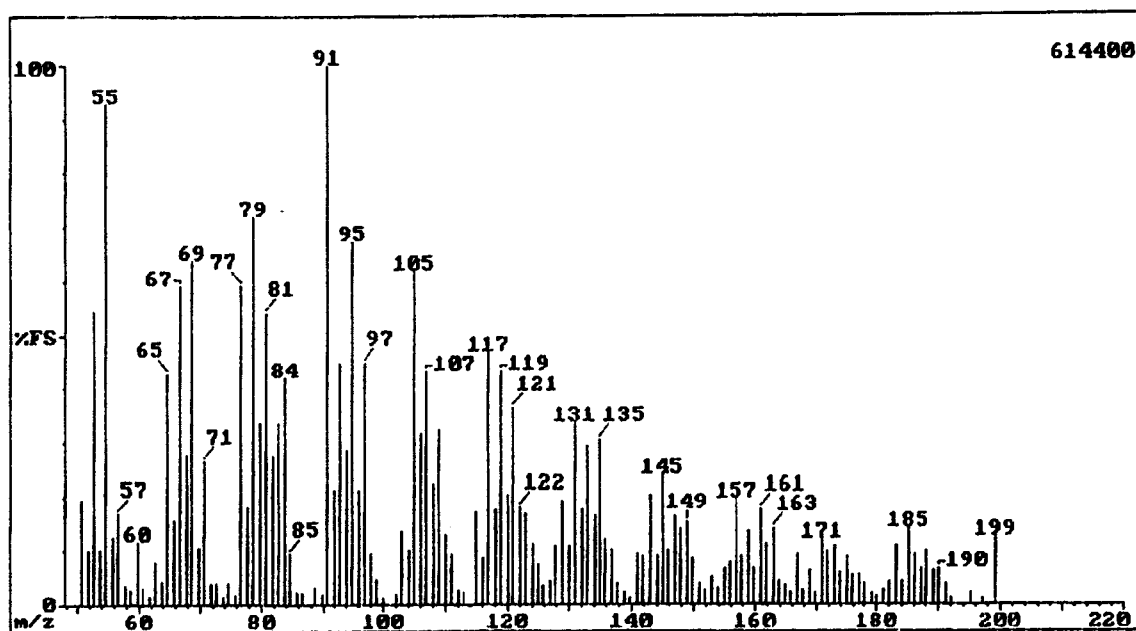


Figura XLVII - Espectro de massa do composto F

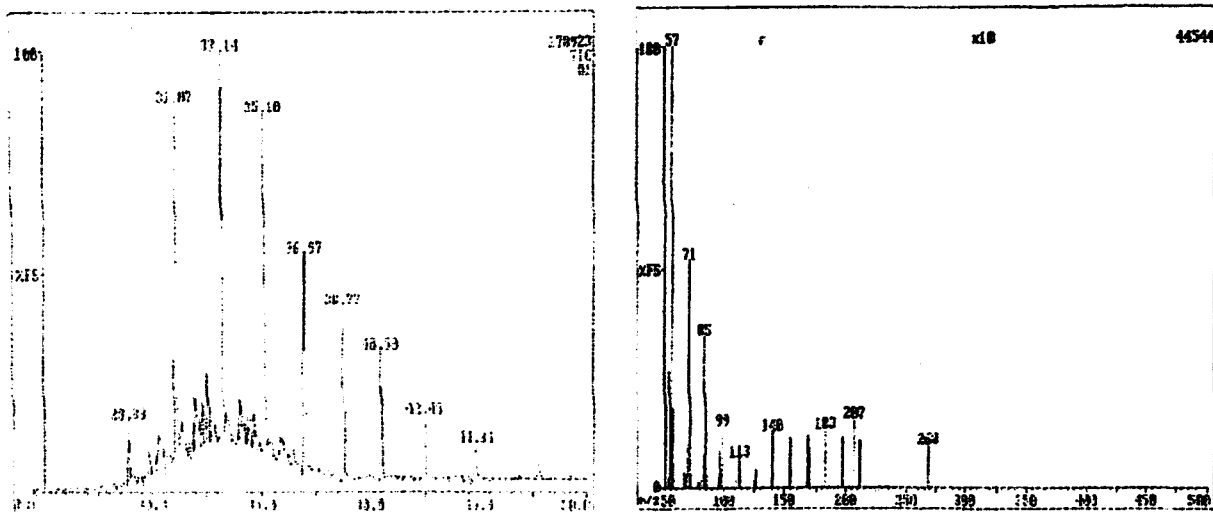


Figura XLVIII – Cromatograma e espectro de massa da mistura I

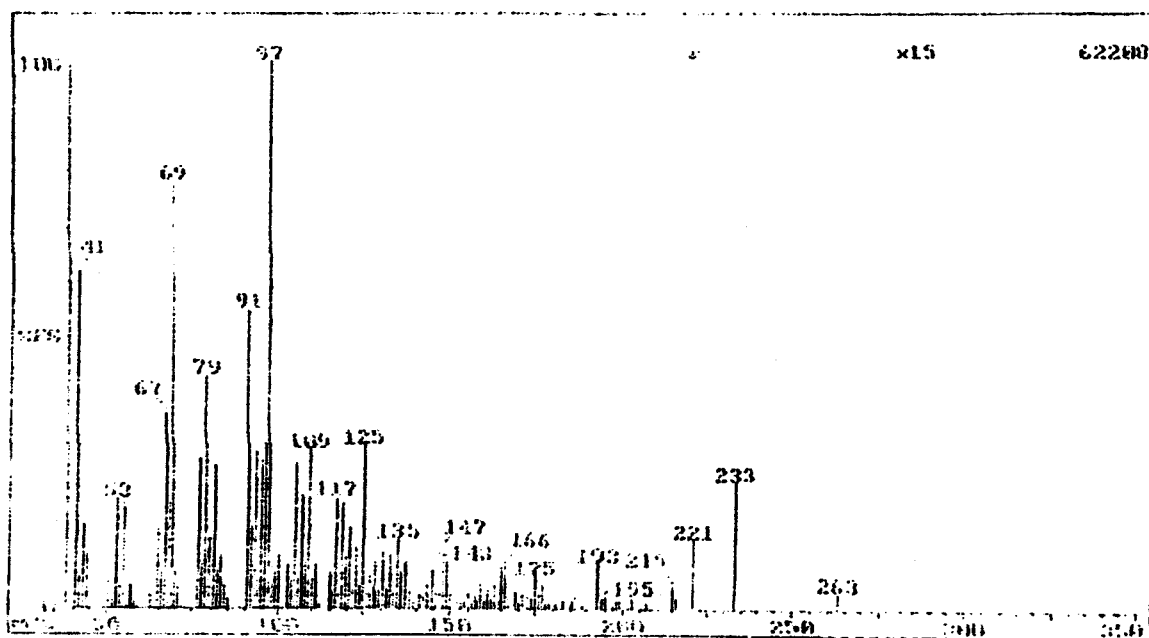


Figura XLIX - Espectro de massa do composto L

Apêndice D

Cromatogramas

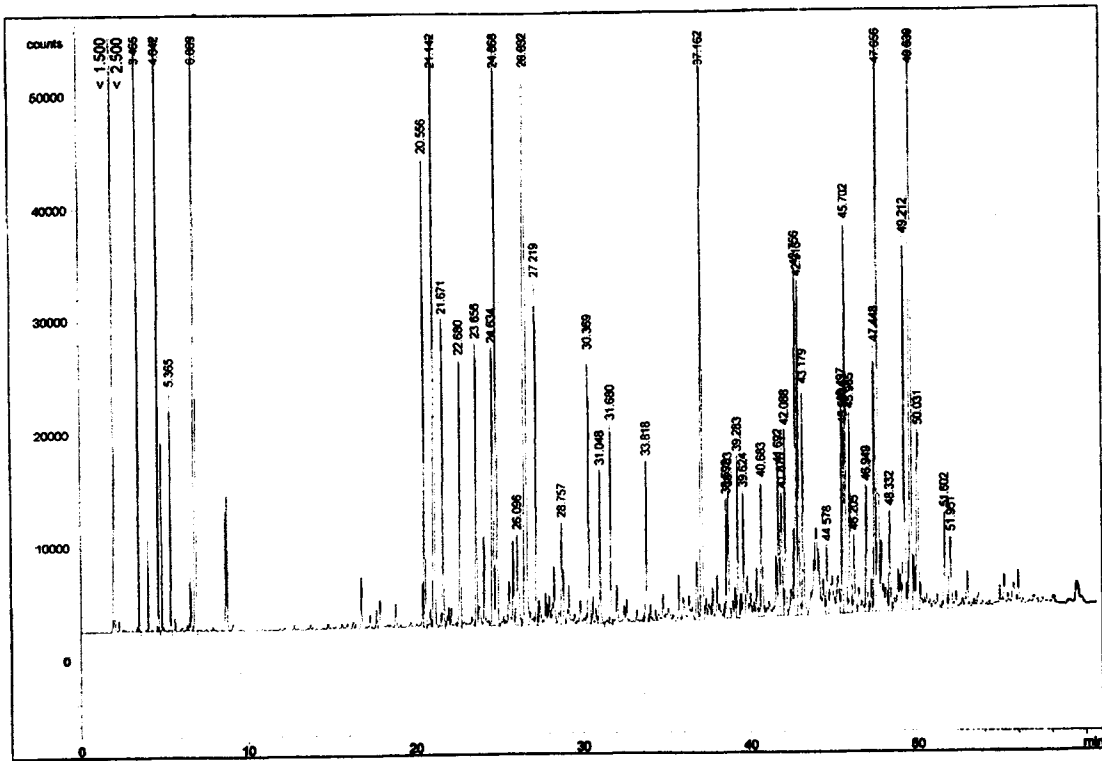


Figura L – Cromatograma do óleo essencial da folha colhida no Outono

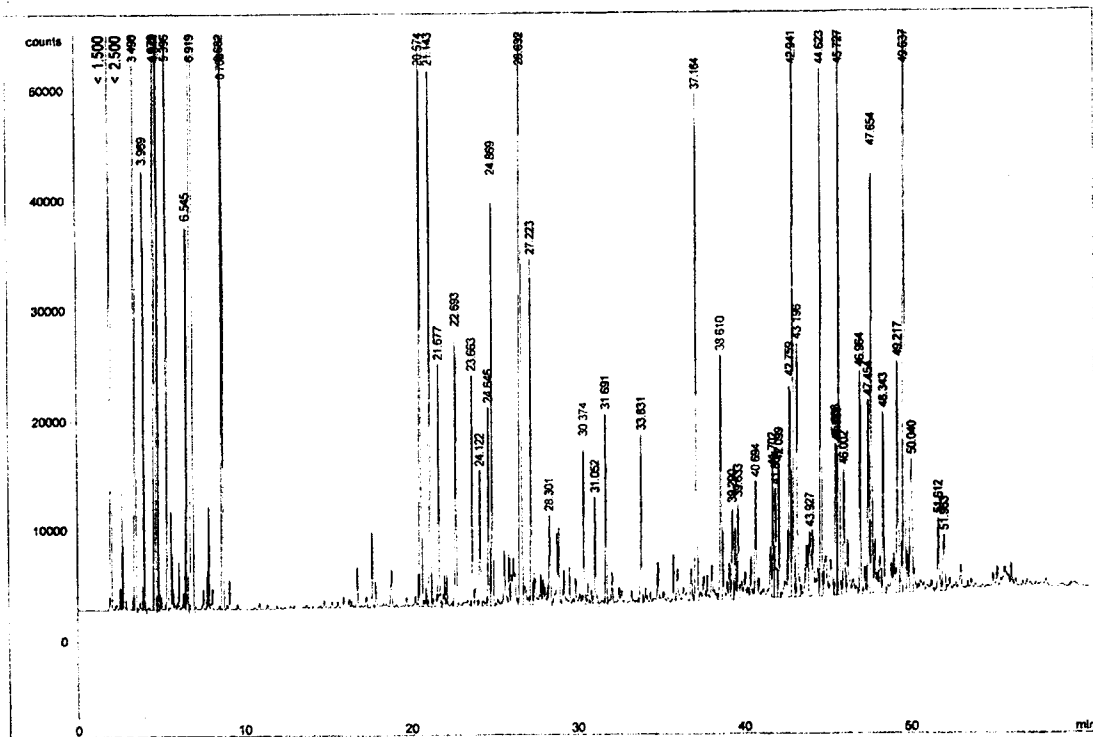


Figura LI – Cromatograma do óleo essencial da folha colhida na Primavera

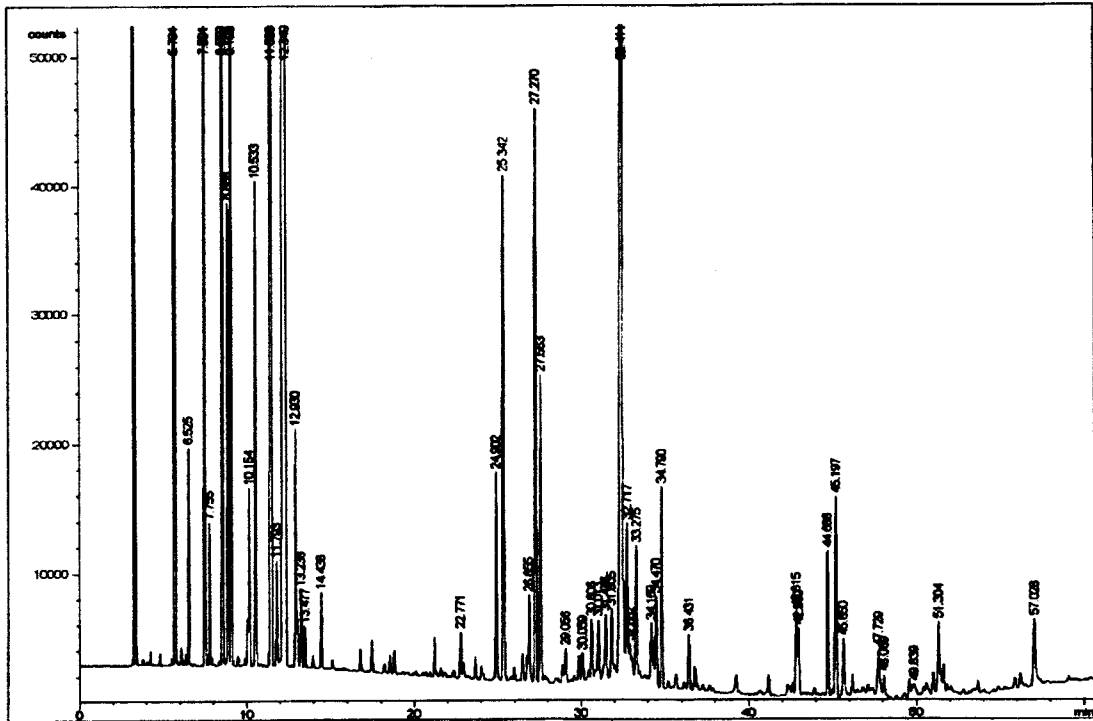


Figura LII – Cromatograma do óleo essencial do fruto maduro

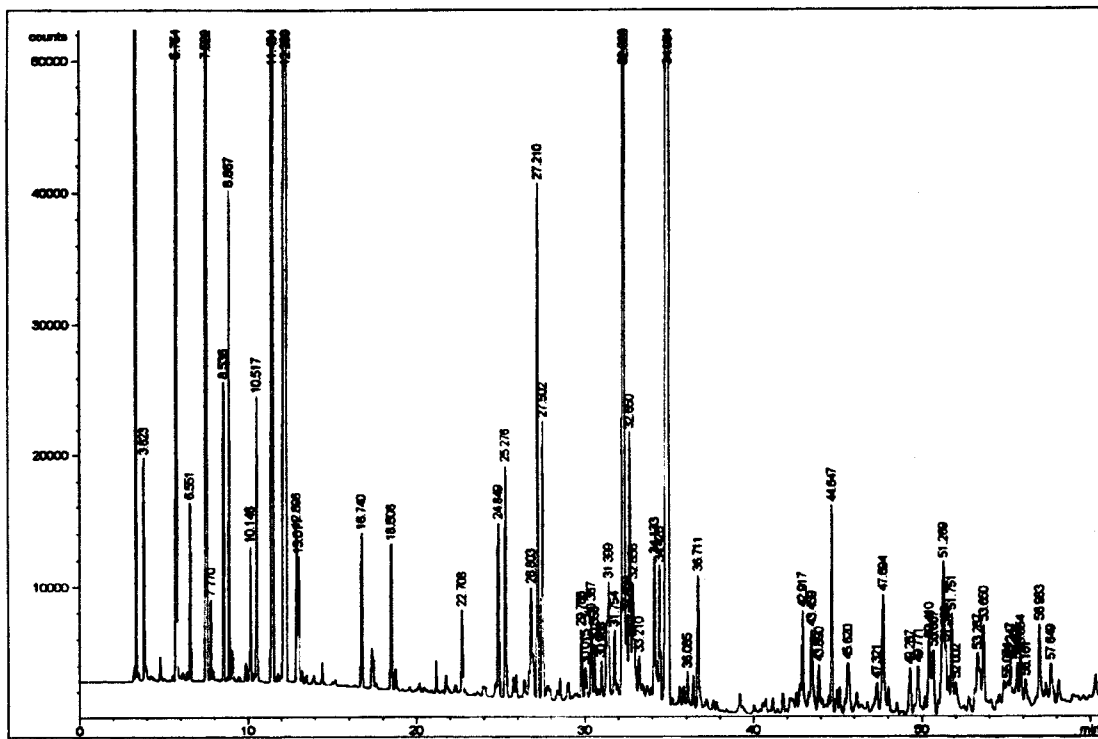


Figura LIII – Cromatograma do óleo essencial do fruto verde

Apêndice E

Termogramas

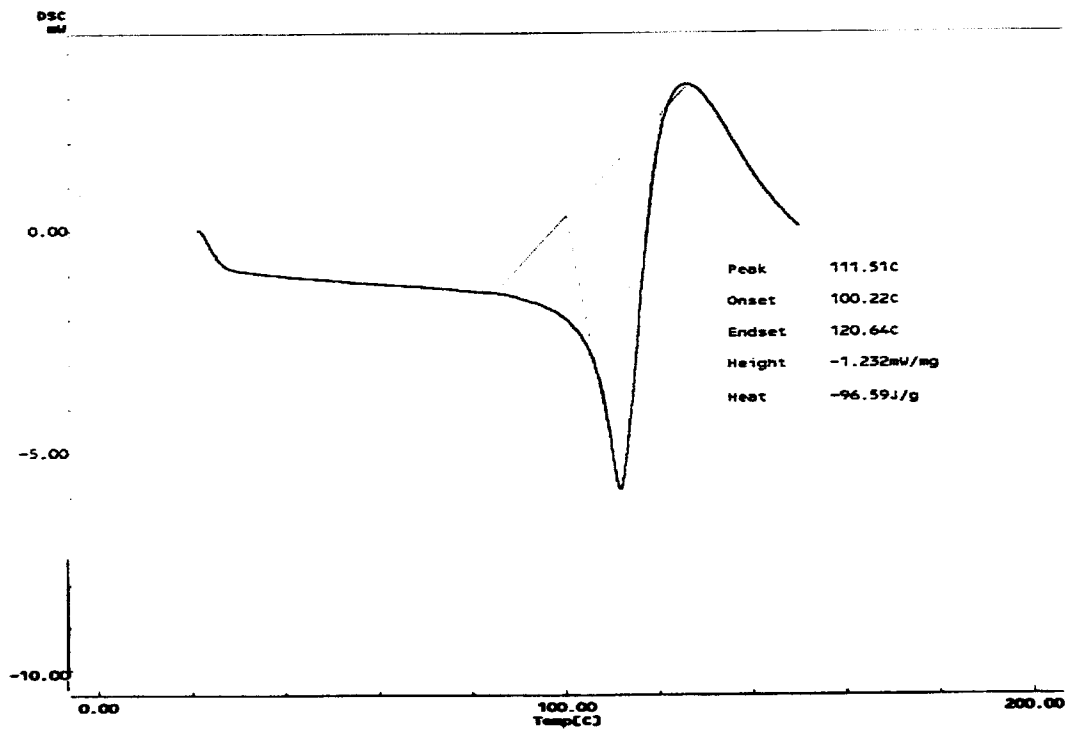


Figura LIV – Termograma do composto B

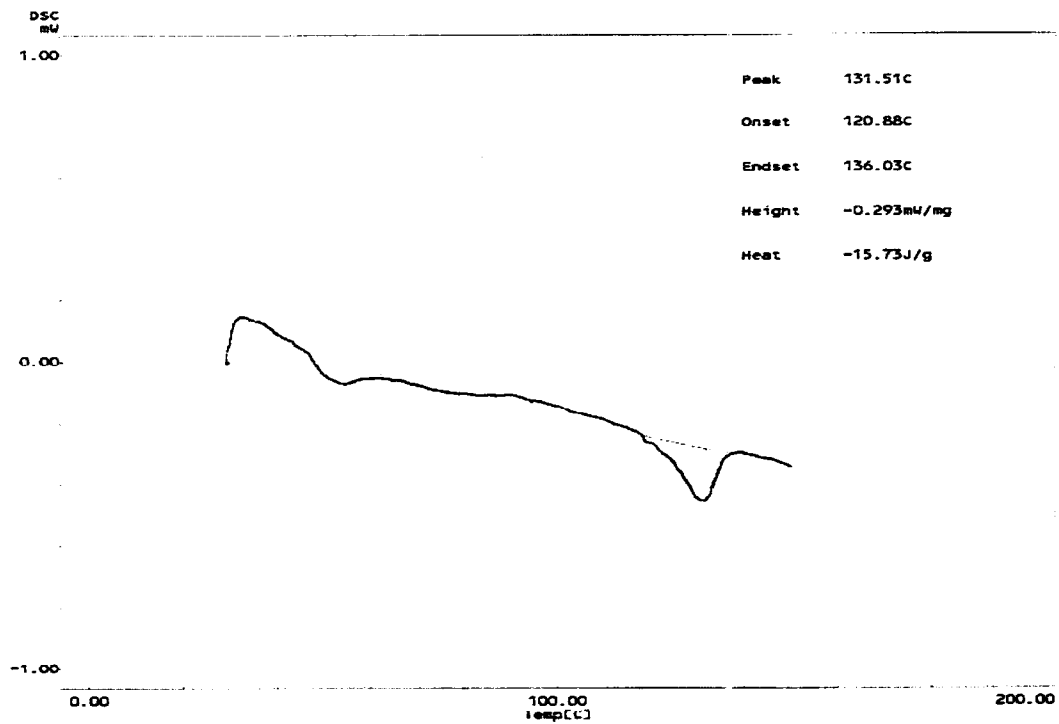


Figura LV – Termograma do composto C

Apêndice F

Parâmetros avaliados na triagem hipocrática

Curva de calibração para a proteína total (método de Lowry)

"TRIAGEM HIPOCRÁTICA"

REALIZADOR

EVALUADOR

Teste Nº:
 Data :
 Hora :
 Animal :

Jejum:
 Sexo :
 Peso :
 Raça:

Dose :
 Veículo:
 Extrato/Composto
 Via :
 M: Injecção

	TESTES APÓS INJEÇÃO SINTOMAS OBSERVADOS	0	5'	10'	15'	30'	1h.	2h.	3h.	4h.	24h.	48h.
		<p>SISTEMA NERVOSO CENTRAL</p> <p>Diminuição da actividade motora</p> <p>Ataxia</p> <p>Perda de reflexos normais</p> <p>Analgesia</p> <p>Perda de reflexo corneal</p> <p>Perda de reflexo pineal</p> <p>Parálise posterior</p> <p>Parálise anterior</p> <p>Perda de reflexo ipsilateral anterior</p> <p>Perda de reflexo ipsilateral posterior</p> <p>Respiração</p> <p>Aumento ritmo respiratório</p> <p>Diminuição do ritmo respiratório</p> <p>Aumento da respiração profunda</p> <p>Diminuição da respiração profunda</p> <p>Aumento da actividade motora</p> <p>Tremuras</p> <p>Convulsões clónicas</p> <p>Convulsões tónicas</p> <p>Convulsões mistas</p>										
<p>OLHO</p> <p>Enftalmos</p> <p>Exoftalmos</p> <p>Proptis palpebral</p> <p>Tamanho das pupilas</p> <p>Diminuição do tamanho das pupilas</p> <p>Diâmetro da pupila à luz</p> <p>Aumento do diâmetro da pupila</p> <p>Diminuição do tamanho de pupila</p> <p>Mistagmo/lacrimação</p> <p>Aumento do lacrimejo</p> <p>Diminuição do lacrimejo</p> <p>Derriórreia</p>												
<p>BOCA E MUCOSAS</p> <p>Esbranquiçades</p> <p>Hiperemia</p> <p>Cianose</p>												
<p>GENA</p> <p>Salivação</p> <p>Erecção da cauda</p> <p>Erector pilomotor</p> <p>Urina</p> <p>Diarreia</p> <p>Teve de Robertshaw</p> <p>Movimentos circulatorios</p> <p>Contorções</p> <p>Temperatura rectal °C</p> <p>Hiperemia</p> <p>Hipertermia</p> <p>Peso corporal</p> <p>Aumento do peso corporal</p> <p>Diminuição do peso corporal</p>												
<p>COMPORTAMENTO</p> <p>Tónus</p> <p>Aumento do tónus</p> <p>Diminuição do tónus</p> <p>Conducta agressiva</p> <p>Conducta passiva</p> <p>Temor</p> <p>Agarra objecto com agressividade</p> <p>Agarra objecto com passividade</p> <p>Agarra objecto com temor</p> <p>Catalepsia</p> <p>Excesso de curiosidade</p>												
<p>QUÍMICO</p> <p>Glucose no sangue</p> <p>Aumento da glucose no sangue</p> <p>Diminuição da glucose no sangue</p>												

Sobrevivência no fim da experiência
 Morre com necrose
 Sacrificado
 Morre profunda, sem necrose

COMENTÁRIOS

(1ª após injeção)
 (2ª após injeção)
 (3ª após injeção)

COELÓTIPO: Latido Sem latido
 FÍGADO: Normal Hemorragia petequeal
 ÍNTESTINO: Motilidade Imobilidade
 PULMÕES: Normal Hemorragia petequeal
 RINS: Normal Hemorragia petequeal

Tamanho aumentado
 Tamanho diminuído
 Alongado

Engrossado
 Vazio
 Hemorragia por ruptura
 Hemorragia por ruptura

Quadro I – Parâmetros avaliados na triagem hipocrática

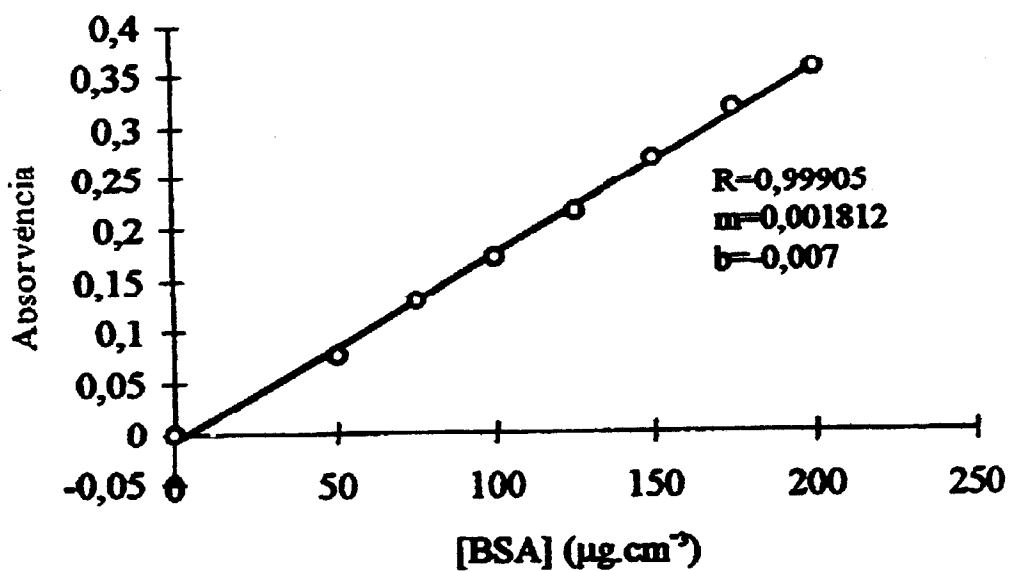


Figura LVI – Curva de calibração utilizada na determinação da concentração de proteína total, construída com soluções contendo 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ de albumina do soro bovino, respectivamente.

Apêndice G

Quadro II - Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsomal e do citosol do fígado de ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 0,02 e 0,1 mL/Kg do óleo do fruto do *Laurus azorica*.

Conc. ou Activ. enz.	Origem da variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
ALT (U/L)	Entre grupos	19,912	2	9,956	5,419	,029
	No interior dos grupos	16,534	9	1,837		
	Total	36,446	11			
AST (U/L)	Entre grupos	429,119	2	214,559	1,774	,224
	No interior dos grupos	1088,406	9	120,934		
	Total	1517,524	11			
Fosf.alc. (mg/dL)	Entre grupos	9677,322	2	4838,661	7,362	,013
	No interior dos grupos	5915,095	9	657,233		
	Total	15592,417	11			
[CIT.P450] (nmol/mg)	Entre grupos	3,403E-02	2	1,702E-02	3,628	,070
	No interior dos grupos	4,221E-02	9	4,690E-03		
	Total	7,624E-02	11			
[CIT.B5] (nmol/mg)	Entre grupos	3,227E-03	2	1,613E-03	3,030	,099
	No interior dos grupos	4,793E-03	9	5,325E-04		
	Total	8,019E-03	11			
NADPHRED (nmol/min.mg)	Entre grupos	13004,108	2	6502,054	53,968	,000
	No interior dos grupos	1084,326	9	120,481		
	Total	14088,434	11			
EROD (pmol/min.mg)	Entre grupos	4,797	2	2,398	41,738	,000
	No interior dos grupos	,517	9	5,746E-02		
	Total	5,314	11			
ECOD (nmol/min.mg)	Entre grupos	1,386E-04	2	6,929E-05	2,574	,131
	No interior dos grupos	2,423E-04	9	2,692E-05		
	Total	3,809E-04	11			
END (nmol/min.mg)	Entre grupos	11,670	2	5,835	26,959	,000
	No interior dos grupos	1,948	9	,216		
	Total	13,618	11			
GST (nmol/min.g)	Entre grupos	3,078E-02	2	1,539E-02	3,689	,068
	No interior dos grupos	3,754E-02	9	4,172E-03		
	Total	6,833E-02	11			
GR (nmol/min.g)	Entre grupos	2,301E-04	2	1,150E-04	,405	,678
	No interior dos grupos	2,555E-03	9	2,839E-04		
	Total	2,786E-03	11			

Quadro III - Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsossomal e do citosol do fígado de ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 0,02 e 0,1 mL/Kg do óleo essencial da folha do Laurus azorica.

Conc. ou Activ. enz.	Origem da variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
ALT (U/L)	Entre grupos	14,681	2	7,340	2,949	,104
	No interior dos grupos	22,405	9	2,489		
	Total	37,086	11			
AST (U/L)	Entre grupos	149,807	2	74,904	,404	,679
	No interior dos grupos	1669,559	9	185,507		
	Total	1819,367	11			
Fosf.alc. (mg/dL)	Entre grupos	300,162	2	150,081	,186	,833
	No interior dos grupos	7267,275	9	807,475		
	Total	7567,437	11			
[CIT.P450] (nmol/mg)	Entre grupos	7,091E-03	2	3,545E-03	1,109	,371
	No interior dos grupos	2,876E-02	9	3,196E-03		
	Total	3,585E-02	11			
[CIT.B5] (nmol/mg)	Entre grupos	8,383E-04	2	4,192E-04	1,200	,345
	No interior dos grupos	3,143E-03	9	3,492E-04		
	Total	3,982E-03	11			
NADPHRED (nmol/min.mg)	Entre grupos	2242,008	2	1121,004	10,228	,005
	No interior dos grupos	986,385	9	109,598		
	Total	3228,393	11			
EROD (pmol/min.mg)	Entre grupos	3,724	2	1,862	27,454	,000
	No interior dos grupos	,610	9	6,783E-02		
	Total	4,335	11			
ECOD (nmol/min.mg)	Entre grupos	6,594E-04	2	3,297E-04	11,839	,003
	No interior dos grupos	2,506E-04	9	2,785E-05		
	Total	9,100E-04	11			
END (nmol/min.mg)	Entre grupos	14,782	2	7,391	37,277	,000
	No interior dos grupos	1,784	9	,198		
	Total	16,566	11			
GST (nmol/min.mg)	Entre grupos	6,254E-03	2	3,127E-03	,513	,615
	No interior dos grupos	5,481E-02	9	6,090E-03		
	Total	6,106E-02	11			
GR (nmol/min.mg)	Entre grupos	9,058E-05	2	4,529E-05	,150	,863
	No interior dos grupos	2,725E-03	9	3,027E-04		
	Total	2,815E-03	11			

Quadro IV - Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsossomal e do citosol do fígado de ratos fêmeas Wistar, controlo e tratados com 0,4 mL de tóxico e com as doses de 0,1; 0,3 e 0,9 mL de óleo essencial da folha de Laurus azorica adicionadas de 0,4 ml de tóxico

Conc. ou Activ. enz.	Origem da variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
ALT (U/L)	Entre grupos	142266,280	4	35566,570	42,228	,000
	No interior dos grupos	12633,834	15	842,256		
	Total	154900,115	19			
AST (U/L)	Entre grupos	473423,327	4	118355,832	144,047	,000
	No interior dos grupos	12324,697	15	821,646		
	Total	485748,024	19			
[CIT.P450] (nmol/mg)	Entre grupos	4,099E-02	4	1,025E-02	4,576	,013
	No interior dos grupos	3,359E-02	15	2,239E-03		
	Total	7,457E-02	19			
CIT.B5 (nmol/mg)	Entre grupos	7,240E-03	4	1,810E-03	1,987	,148
	No interior dos grupos	1,367E-02	15	9,111E-04		
	Total	2,091E-02	19			
NADPHRED (nmol/min.mg)	Entre grupos	6320,479	4	1580,120	6,010	,004
	No interior dos grupos	3943,608	15	262,907		
	Total	10264,087	19			
EROD (pmol/min.mg)	Entre grupos	930,127	4	232,532	40,858	,000
	No interior dos grupos	85,369	15	5,691		
	Total	1015,495	19			
ECOD (nmol/min.mg)	Entre grupos	1,237E-02	4	3,093E-03	12,889	,000
	No interior dos grupos	3,600E-03	15	2,400E-04		
	Total	1,597E-02	19			
END (nmol/min.mg)	Entre grupos	39,805	4	9,951	62,316	,000
	No interior dos grupos	2,395	15	,160		
	Total	42,200	19			
GST (nmol/min.g)	Entre grupos	,293	4	7,315E-02	10,388	,000
	No interior dos grupos	,106	15	7,042E-03		
	Total	,398	19			
GR (nmol/min.g)	Entre grupos	3,230E-03	4	8,075E-04	9,743	,000
	No interior dos grupos	1,243E-03	15	8,288E-05		
	Total	4,473E-03	19			

Quadro V - Concentração e actividades enzimáticas do soro, da fracção microsomal e do citosol do fígado de ratos fêmeas Wistar, controlo e tratados com uma droga hepatoprotectora adicionada de 0,4 mL de tóxico

Conc. ou Activ. enz.	Origem da variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
ALT (U/L)	Entre grupos	160,414	2	80,207	11,235	,004
	No interior dos grupos	64,249	9	7,139		
	Total	224,663	11			
AST (U/L)	Entre grupos	594,537	2	297,268	20,681	,000
	No interior dos grupos	129,367	9	14,374		
	Total	723,904	11			
[CIT.P450] (nmol/mg)	Entre grupos	1,388E-03	2	6,938E-04	,326	,730
	No interior dos grupos	1,918E-02	9	2,131E-03		
	Total	2,057E-02	11			
[CIT.B5] (nmol/mg)	Entre grupos	8,950E-04	2	4,475E-04	,483	,632
	No interior dos grupos	8,330E-03	9	9,256E-04		
	Total	9,225E-03	11			
NADPHRED (nmol/min.mg)	Entre grupos	741,640	2	370,820	1,796	,221
	No interior dos grupos	1858,676	9	206,520		
	Total	2600,315	11			
EROD (pmol/min.mg)	Entre grupos	55,808	2	27,904	5,059	,034
	No interior dos grupos	49,643	9	5,516		
	Total	105,451	11			
ECOD (nmol/min.mg)	Entre grupos	4,759E-03	2	2,379E-03	6,366	,019
	No interior dos grupos	3,364E-03	9	3,738E-04		
	Total	8,122E-03	11			
END (nmol/min.mg)	Entre grupos	8,959	2	4,479	21,169	,000
	No interior dos grupos	1,904	9	,212		
	Total	10,863	11			
GST (nmol/min.g)	Entre grupos	8,820E-02	2	4,410E-02	8,467	,009
	No interior dos grupos	4,687E-02	9	5,208E-03		
	Total	,135	11			
GR (nmol/min.g)	Entre grupos	,114	2	5,685E-02	,918	,434
	No interior dos grupos	,557	9	6,192E-02		
	Total	,671	11			