



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS FITOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO DE *Portulaca
pilosa L.***

Rafael Alves Cardoso

BELÉM - PA

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS FITOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO DE *Portulaca
pilosa L.***

Autor: Rafael Alves Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos e Medicamentos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, em cumprimento as exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

*Bolsista



BELÉM-PA
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada
automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

A474e Alves Cardoso, Rafael
 Estudo Fitoquímico e Toxicológico de *Portulaca pilosa* L.
 / Rafael Alves Cardoso. — 2019.
 73 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos
 Coorientação: Prof^a. Dra. Maria Fani Dolabela
 Dissertação (Mestrado) - , , Universidade Federal do Pará,
 Belém, 2019.
 1. *Portulaca pilosa* . 2. Toxicidade aguda oral. 3. Perfil
 fitoquímico. 4. Metabólitos secundários. 5. *Friedelina*. I. Título.

CDD 615.321098115

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAEL ALVES CARDOSO

ESTUDOS FITOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO DE *Portulaca pilosa L.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos e Medicamentos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, em cumprimento as exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos (Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

Profa. Dra. Mara Sílvia Pinheiro Arruda

Programa de Pós-Graduação em Química UFPA

Profa. Dra. Marcieni Ataíde de Andrade (Suplente)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

BELÉM-PA

2019

**À minha querida mãe,
Benicia Alves Cardoso,
matriarca da família Alves,
que sempre foi um exemplo de sabedoria,
de trabalho,
de honestidade,
de fé,
de fortaleza,
e principalmente de muito amor.
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida e pela coragem que Ele me deu para enfrentar e vencer mais uma empreitada.

Aos meus amados pais, **Benicia Alves Cardoso** e **André Cardoso Neto**, pelo amor e carinho pelo qual fui criado e por todos os ensinamentos de dignidade, honestidade e verdade que sempre pautaram e pautarão a minha vida.

À minha irmã, **Débora Alves Cardoso**, pelo carinho e apoio dado em muitos momentos, e ao meu irmão, **Rennan Alves Cardoso**, pelo companheirismo e amizade.

À minha namorada, **Rafaella Alves da Silva**, por todo carinho e incentivo dado, e por proporcionar bons momentos, que me encorajaram nessa longa jornada até o final deste trabalho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos**, pela orientação deste trabalho, e pela amizade e confiança que desenvolvemos ao longo do mestrado.

A co-orientadora, **Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela**, pela co-orientação deste trabalho e apoio concedido ao longo desse trajeto.

Ao **Prof. Dr. José Luiz Vieira**, pelos conselhos, broncas, consolos e brincadeiras que nortearam a nossa amizade no período em que desenvolvi o trabalho no **Laboratório de Toxicologia**.

A **Profa. Dra. Mara Sílvia Pinheiro Arruda**, coordenadora da Central de Extração da UFPA, pelo apoio e parceria, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira**, pela importante colaboração nos exames histopatológicos.

Aos doutorandos **Wandson Braamcamp de Souza Pinheiro** e **José Rodrigues Pinheiro Neto** e ao mestrando **Anderson de Santana Botelho** pelo auxílio e desenvolvimento deste trabalho.

À equipe de pesquisadores do **Laboratório de toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFPA**, pelo apoio e incentivo.

À equipe de pesquisadores do **Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas da Faculdade de Farmácia da UFPA**, pelo importante ajuda concedida nesse trabalho.

À equipe de pesquisadores do **Laboratório de Pesquisa em Estresse Oxidativo da UFPA** e ao **Prof. Dr. Sandro Percário**, pelo espaço cedido para realização do ensaio de toxicidade oral aguda e pela ajuda oferecida.

À equipe de pesquisadores do **Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFPA**, pelas análises iniciais.

À equipe de pesquisadores do **Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular da UFPA** e ao **Prof. Dr. Alberdan Silva Santos**, pela ajuda e espaço concedido para a realização de algumas análises deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPA**, pela amizade edificada no decorrer deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa oferecida e suporte financeiro à pesquisa.

Aos companheiros de pós-graduação, pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus amigos da república e todos outros que contribuíram de alguma forma para a construção desta importante etapa da minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

CARDOSO, R. A. **Estudo fitoquímico e toxicológico de *Portulaca pilosa* L.** 2019. 74p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia/ICS, Universidade Federal do Pará, 2019

As plantas medicinais vêm contribuindo como fonte de fármacos antimaláricos, entretanto, várias espécies utilizadas na medicina popular amazônica ainda carecem de estudos. Um exemplo é a *Portulaca pilosa* L., conhecida popularmente como amor crescido, que tem sido utilizada na medicina tradicional regional para o tratamento de doenças infecciosas, febris e parasitárias. Em estudos prévios realizados pelo grupo de Farmacologia e Doenças Negligenciadas da Universidade Federal do Pará, foi demonstrado que o Extrato Etanólico de *Portulaca pilosa* (EEPp), apresentou significativa atividade antiplasmódica *in vitro* frente ao clone de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina. Entretanto, estudos que avaliem o potencial tóxico ainda são escassos. Assim, este trabalho objetiva realizar estudo fitoquímico e uma triagem toxicológica em modelo *in vivo* do extrato EEPp. O extrato foi obtido pelo processo de maceração com álcool etílico a 96%GL e o perfil fitoquímico por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) permitiu determinar a riqueza fitoquímica, além da presença de classes de metabólitos secundários importantes, como: terpenos / esteroides, compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides. A avaliação do potencial antioxidante por autografia em CCDAE, possibilitou identificar uma moderada ação antioxidante do extrato – EEPp, frente a solução radicalar de DPPH. O fracionamento do extrato foi realizado em Cromatografia em Coluna por Via Úmida (CCVU) utilizando mistura de diclorometano e metanol como fase móvel, em modo gradiente e, após análise por CCDAE, as frações semelhantes foram reunidas e aquelas de maior interesse foram isoladas e purificadas por CCVU, resultando em 13 substâncias. Dados espectrais obtidos por Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ^1H e ^{13}C , além da comparação com dados da literatura, levou a elucidação estrutural da substância **S11**, como sendo o triterpeno pentacíclico - Friedelina. Substância esta, já relatada na literatura com propriedades biológicas, como o efeito antinociceptivo, anti-inflamatório, antiulcerogênico e antimalárico. Os testes toxicológicos realizados em camundongos, *screening* hipocrático e análises histopatológicas, até a dosagem de 2000 mg/kg não demonstraram quaisquer sinais de alterações do sistema nervoso central, autônomo ou motor, mudança de comportamento durante todo o período de experimentação, ou seja, o extrato EEPp não apresentou efeito toxicológico. Sendo assim, esta dissertação contribui para o estudo fitoquímico da espécie *Portulaca pilosa*, bem como, o seu importante potencial farmacológico associado a baixa toxicidade.

Palavras-chave: *Portulaca pilosa*, Malária, Testes toxicológicos, Perfil fitoquímico, Metabólitos secundários, Viabilidade celular, Toxicidade aguda oral, Friedelina.

ABSTRACT

CARDOSO, R. A. **Phytochemical and toxicological studies of *Portulaca pilosa* L.** 2019. 74 p. Master Thesis - Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy / ICS, Federal University of Pará, 2019

Medicinal plants have been contributing as a source of antimalarial drugs, however, several species used in Amazonian folk medicine still need studies. An example is *Portulaca pilosa* L., popularly known with grown love, which has been used in traditional regional medicine for the treatment of infectious, febrile and parasitic diseases. In previous studies carried out by the Pharmacology and Neglected Diseases group of the Federal University of Pará, it was demonstrated that the *Portulaca pilosa* Ethanol Extract (EEPp) showed significant in vitro antiplasmodic activity against the chloroquine resistant Plasmodium falciparum clone. However, studies evaluating the toxic potential are still scarce. Thus, this work aims to perform phytochemical studies and a toxicological screening in an in vivo model of the EEPp extract. The extract was obtained by the maceration process with 96% ethyl alcohol GL and the phytochemical profile by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) allowed to determine the phytochemical richness, besides the presence of important secondary metabolite classes, such as: terpenes / steroids, phenolic compounds, flavonoids and alkaloids. The evaluation of the antioxidant potential by autograph in HPTLC, allowed to identify a moderate antioxidant action of the extract - EEPp, against the radical solution of DPPH. The fractionation of the extract was performed in Humid Column Chromatography (HCC) using dichloromethane and methanol mixture as mobile phase phase gradient and, after analysis by HPTLC, similar fractions were pooled, those of most interest were isolated and purified by HCC, resulting in 13 substances. Spectral data obtained by Nuclear Magnetic Resonance - ^1H and ^{13}C NMR, in addition to comparison with literature data, led to the structural elucidation of the substance **S11** as the pentacyclic triterpene - Friedelin. This substance, already reported in the literature with biological properties, such as antinociceptive, anti-inflammatory, antiulcerogenic and antimalarial effect. Toxicological tests performed in mice, hippocratic screening and histopathological analyzes up to the 2000 mg / kg dosage showed no signs of central, autonomic or motor nervous system changes, behavioral change during the entire experimentation period, ie the EEPp extract had no toxicological effect. Thus, this dissertation contributes to the phytochemical study of the *Portulaca pilosa* species, as well as its important pharmacological potential associated with low toxicity.

Keywords: *Portulaca pilosa*, Malaria, Toxicological tests, Phytochemical profile, Secondary metabolites, Cell viability, Acute oral toxicity, Friedelin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de <i>Portulaca</i> . A) <i>Portulaca oleraceae</i> . B) <i>Portulaca grandiflora</i> . C) <i>Portulaca amilis</i> . D) <i>Portulaca pilosa</i> . E) <i>Portulaca umbraticola</i> . F) <i>Portulaca halimoides</i>	23
Figura 2 - Partes aéreas de <i>Portulaca pilosa</i> L.....	25
Figura 3 - Hábito e características da espécie <i>Portulaca pilosa</i> L.	26
Figura 4 - Diterpenos isolados de <i>Portulaca pilosa</i> L.	27
Figura 5 - Triângulo da seletividade de Snyder	35
Figura 6 - Reação genérica de sequestro do radical DPPH.....	37
Figura 7 - Teste de seletividade dos solventes orgânicos para o EEPp.....	44
Figura 8 - Cromatoplas derivatizadas com os reveladores seletivos: VAS (a), FBS (b), NP/PEG (c), Dragendorff (d) e KOH (e).....	45
Figura 9 - Cromatoplas derivatizada com DPPH.....	46
Figura 10 - Monitoramento das frações 1 a 15 da coluna de fracionamento do EEPp por CCDAE.....	46
Figura 11 - Monitoramento das frações 12 a 30 da coluna de fracionamento do EEPp por CCDAE.....	47
Figura 12 - Cromatoplas com as substâncias isoladas provenientes do refractionamento da R2.....	47
Figura 13 - Cromatoplas com as substâncias isoladas provenientes do refractionamento da R3.....	48
Figura 14 - Fluxograma do método de separação desenvolvido por CCVU, para obtenção das substâncias isoladas S1 a S13.	49
Figura 15 - Estrutura do esqueleto base de um triterpeno pentacíclico da série friedelano.....	51
Figura 16 - Estrutura da friedelina	52

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Determinação do teor de umidade	43
Equação 2: Determinação do rendimento mássico	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos principais solventes orgânicos utilizados em cromatografia.	35
Tabela 2 - Sistema de reveladores e padrões utilizados no estudo do perfil químico de <i>P. pilosa</i>	36
Tabela 3 - Sistema de eluição utilizado no fracionamento cromatográfico por CCVU do EEPp.	38
Tabela 4 - Sistema de eluição utilizado no refracionamento cromatográfico por CCVU da R2.....	38
Tabela 5 - Sistema de eluição utilizado no refracionamento cromatográfico por CCVU da R3.....	39
Tabela 6 - Teor de umidade da planta <i>Portulaca pilosa</i>	43
Tabela 7 - Rendimento mássico da extração por maceração de EEPp.....	43
Tabela 8 - Resultado do teste de seletividade dos solventes orgânicos para o EEPp.	44
Tabela 9 - Resultado do perfil fitoquímico do EEPp.....	45
Tabela 10 - Composição das 7 reuniões após avaliação por CCDAE.	47
Tabela 11 - Dados espectrais de RMN 1H (400MHz) comparados com a literatura para a friedelina.....	53
Tabela 12 - Dados espectrais de RMN 13C (100MHz) comparados a literatura para a friedelina.....	54
Tabela 13 - Resultados da variação de massa corporal média, consumo médio de ração e água por animal, realizados em camundongos fêmeas e machos, tratados com dose oral única (2000 mg/kg) do EEPp e observados durante 14 dias.	58

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μL	Microlitro
g	Gramma
g/L	Gramma/Litro
$^{\circ}\text{GL}$	Gay Lussac
h	Hora
Fr	Fração
β	Beta
α	Alfa
mm	Milimetro
cm	Centimetro
^1H	Hidrogênio 1
^{13}C	Carbono 13
$^{\circ}\text{INPM}$	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
ppm	Partes por Milhão
mL	Mililitro
Kg	Quilograma
MHZ	Mega-hertz
S	Sul
W	Oeste
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
%	Porcentagem
L	Litros

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCDAE	Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência
RMN	Ressonancia Magnetica Nuclear
EM	Espectrometria de Massas
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DDPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
AMD 2	Desenvolvimento Multiplo Automático 2
ATS 4	Aplicador Automatico de Cromatografia 4
EEPP	Extrato Etanólico de <i>Portulaca pilosa</i>
ACS	Grau de Pureza do Reagente
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
P.A	Pureza Analítica
CDCL ₃	Clorofórmio Deuterado
MPEG	Museu Paraense Emilio Goeldi
HJMP	Herbário João Murça Pires
Rf	Fator de Retenção
VAS	Vanilina Ácida Sulfúrica
CCVU	Cromatografia em Coluna por Via Úmida
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
FBS	Fast Blue Salt
NP	Difenilboriloxi-Etilamina
PEG	Propilenoglicol
KOH	Hidróxido de Potássio
UV	Ultravioleta
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCM	Diclorometano
UFPA	Universidade Federal do Pará
DMSO	Dimetilsulfóxido
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CoBEA	Colegio Brasileiro de Experimentação Animal
UFRA	Universidade Federal Rural Amazônica
CEPAE	Comite de Etica em Pesquisa com Animais de Experimentação
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
R1	Reunião 1
R2	Reunião 2
R3	Reunião 3
R4	Reunião 4
R5	Reunião 5
R6	Reunião 6
R7	Reunião 7
ISPA	Instituto da Saúde e Produção Animal
S1	Substância 1
S2	Substância 2
S3	Substância 3
S4	Substância 4
S5	Substância 5
S6	Substância 6
S7	Substância 7
S8	Substância 8
S9	Substância 9
S10	Substância 10
S11	Substância 11
S12	Substância 12
S13	Substância 13
i.p	Intraperitoneal
CHCL ₃	Clorofórmio
HSBC	Correlação quântica única heteronuclear
IL-6	Interleucina 6
TNF	Fator de Necrose Tumoral
NS	Não Significativo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Metabólitos secundários de plantas	22
2.2 Família <i>Portulacaceae</i> e gênero <i>Portulaca</i>	23
2.3 <i>Portulaca pilosa</i>	24
2.4 Avaliação toxicológica de plantas medicinais e drogas vegetais	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Materiais e equipamentos para os estudos fitoquímico e toxicológico	31
4.1.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	31
4.1.2 ESTUDO TOXICOLÓGICO	32
4.2 Procedimento experimental	32
4.2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	32
4.2.2 EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO	33
4.2.3 PERFIL QUÍMICO POR CCDAE	33
4.2.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE POR AUTOGRAFIA	36
4.2.5 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO.....	37
4.2.6 TOXICIDADE AGUDA ORAL	39
4.2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1 Secagem	43
5.2 Extração por maceração	43
5.3 Perfil químico por CCDAE	43

5.4 Fracionamento e isolamento.....	46
5.5 Elucidação estrutural.....	50
5.6 Avaliação da Toxicidade Aguda Oral	55
6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE 1 – ESPECTRO DE RMN ¹H DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl₃ – 400 MHz.	67
APÊNDICE 2 – EXPANSÃO DOS SINAIS ENCONTRADOS NO ESPECTRO DE RMN ¹H DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl₃ – 400 MHz.....	68
APÊNDICE 3 - ESPECTRO DE RMN ¹³C DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl₃ – 100 MHz	69
APÊNDICE 4 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl₃	70
APÊNDICE 5 - MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl₃.	71
ANEXO 1 – TABELA DE ENSAIO HIPOCRÁTICO	72
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA/UFPA	73

1 INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de sintetizar uma vasta diversidade de componentes químicos que podem interferir em várias estruturas biológicas do organismo humano, levando a efeitos benéficos e maléficos. O uso de plantas medicinais sobre várias formas de apresentação é bastante comum em populações de baixa renda. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas medicinais, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos, além do baixo valor comercial e alta acessibilidade. Este aspecto é importante se considerarmos que o conhecimento sobre plantas medicinais é de domínio popular e, em países emergentes, contém um forte componente social e cultural, pois estas plantas muitas vezes representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades. (TORRES et al. 2005; ALVES, 2006).

Pesquisas demonstram que, a respeito da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos trabalhos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são usadas somente com base em informações etnofarmacológicas. A caracterização fitoquímica das plantas medicinais é muito importante, pois ao decorrer do ano pode ocorrer alterações no teor de metabolitos secundários, bem como alterações na composição, e isto pode influenciar na resposta farmacológica e toxicológica (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Os estudos fitoquímicos objetivam identificar os compostos naturais, principalmente os metabolitos secundários, presentes nas espécies vegetais e, a partir disto, orientar a sua extração e fracionamento de extratos botânicos, objetivando encontrar os grupos de maior interesse farmacológico (MATOS, 1997; SIMÕES, 2010). Já os estudos toxicológicos colaboram com a validação do uso de uma planta medicinal, ao auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre sistemas biológicos decorrentes dos efeitos dessa ação (OGA, 1996). As análises toxicológicas, aplicadas em organismos biológicos e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos, a partir da extrapolação dos resultados obtidos nestes estudos (BARROS e DAVINO, 1996).

No Brasil, estudos que avaliem o potencial tóxico de plantas medicinais da região amazônica ainda são escassos, mesmo contendo diversos trabalhos nas áreas

de farmacologia, botânica e fitoquímica (BOCHNER et al. 2012; BALBINOT et al. 2013). É de salutar importância ter-se em mente que, embora os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos, não são considerados substâncias inócuas, sendo necessária a realização de ensaios toxicológicos para fornecer a comunidade dados científicos sobre segurança ou toxicidade das plantas (ASSEMI, 2001).

As plantas medicinais sempre contribuíram para a descoberta de fármacos antimaláricos, sendo que várias espécies utilizadas na medicina popular amazônica ainda carecem de estudos, ou possuem estudos incompletos. Algumas espécies têm sido relatadas como fonte de tratamento da malária e doenças febris em diversas comunidades, incluindo populações nativas da região Amazônica (MILLIKEN, 1997). O teste de produtos destas plantas medicinais em modelos animais e em culturas de parasitas tem resultado na identificação de promissoras moléculas (KRETTLI et al. 2001; KRETTLI, 2009; AGUIAR et al. 2012).

Um exemplo é a espécie *Portulaca pilosa* (pertencente à família Portulacaceae), popularmente conhecida como amor crescido, flor de seda e flor de melodia, amplamente utilizada na medicina popular como antihelmíntico, antidiarreico, cicatrizante, carminativo, diurético, anti-inflamatório (SILVA et al. 2001; CAUPER, 2006), doenças febris e infecções diversas (BRANDÃO et al. 1992; PINTO, 2008). Em estudos prévios já realizados no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFPA, que contou com a colaboração e participação de pesquisadores de diferentes instituições e financiamento de projetos para desenvolvimento de fármacos antimaláricos, foi demonstrado que o extrato etanólico obtido de suas partes aéreas mostrou-se significativamente ativo em clone de *P. falciparum* resistente à cloroquina (BRANDÃO, 2012). No entanto, o composto envolvido nesta atividade e seus efeitos tóxicos ainda não foram avaliados.

Levantamentos bibliográficos, inclusive, através do Banco de Dados da Universidade Illinois, Chicago, denominado “Natural Products Alert” (www.napralert.org) demonstraram a ausência de dados sobre possíveis efeitos tóxicos acerca da espécie *P. pilosa*.

Assim, como não foram encontrados relatos científicos no tocante a toxicidade dessa espécie, esta pesquisa se inseriu na perspectiva de prover informações científicas através da realização de um estudo fitoquímico do extrato desta planta, empregando-se técnicas de fracionamento e de caracterização de metabólitos secundários ativos, bem como monitorização (triagem) toxicológica em modelos *in vivo*, fornecendo subsídios

para o isolamento de frações e ou moléculas com promissora atividade antiplasmódica com mais baixa toxicidade possível.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabólitos secundários de plantas

Os metabólitos secundários, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presentes em todos eles. Estes constituintes químicos são extremamente diversos e cada família, gênero, e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas que, por vezes, podem ser utilizadas como marcadores taxonômicos na classificação das plantas de acordo com a presença de cada metabólito secundário presente na mesma (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al. 2008).

Esses compostos são pouco abundantes e com frequência inferior a 1% do conteúdo total de carbono, sendo estocados em órgãos ou células específicas das plantas. O desenvolvimento de técnicas analíticas, como os diversos tipos de cromatografia de alta eficiência, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) e ferramentas de elucidação estrutural como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massas (EM), permitem isolar e identificar, de forma mais objetiva, um número maior de constituintes dos metabólitos secundários (HARBORNE, 1999).

Os metabólitos secundários possuem atividades biológicas importantes, e, do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse está no número elevado de substâncias farmacologicamente ativas. Entretanto, a origem vegetal do metabólito relacionado a ação farmacológica não garante por si só a eficácia e segurança do produto final, dessa forma a análise fitoquímica associada com a farmacológica, garante em parte a eficácia por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos dos efeitos preconizados (SIMÕES et al. 2010).

Sendo assim, a pesquisa fitoquímica, tem como um dos seus objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença, com intuito de identificar e extrair os produtos naturais de maior interesse que poderão ser empregados em diversas formulações farmacêuticas (SIMÕES et al. 2010).

2.2 Família *Portulacaceae* e gênero *Portulaca*

Atualmente a família *Portulacaceae* é representada por um único gênero: *Portulaca* (APG IV, 2016). O gênero é composto por cerca de 110 espécies anuais ou perenes que se distribuem nos neotrópicos, que inclui América Central e do Sul, e em regiões tropicais e subtropicais da África, mas também ocorrem algumas poucas espécies na Austrália, Europa e Ásia (COELHO; GIULIETTI, 2010; OCAMPO, 2013).

A família *Portulacaceae*, ou mais precisamente o gênero *Portulaca*, é caracterizada por incluir ervas suculentas, semi-prostradas, prostradas ou eretas com folhas alternas, subpostas ou opostas em formato de lâminas achatadas, elípticas ou cilíndricas, caules simples ou ramificados com nós que portam tricomas axilares e inflorescências terminais, cimosas, capituliformes com involúcro de folhas e flores sésseis a curto pediceladas, actinomorfas, bissexuadas, com 2 sépalas desiguais, 4-5 pétalas membráceas. (GIULIETTI; COELHO, 2018). Os frutos são do tipo pixídio e as sementes são lisas ou com diferentes padrões de escultura (OCAMPO, 2013). A figura 1 apresenta algumas características dessas espécies.



Figura 1 - Espécies de *Portulaca*. A) *Portulaca oleraceae*. B) *Portulaca grandiflora*. C) *Portulaca amilis*. D) *Portulaca pilosa*. E) *Portulaca umbraticola*. F) *Portulaca halimoides*.

Fonte: FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019

As espécies do gênero apresentam uma grande variedade de classes de substâncias que muitas das vezes apresentam ação biológica que corroboram com o

uso na medicina tradicional. A *Portulaca oleraceae*, a espécie com o maior número de estudos no gênero, por exemplo, é utilizada popularmente para o tratamento de doenças gastrointestinais, inflamações, febre, insônia, dores de cabeça, entre outras (IRANSHAHY et al., 2017), e apresenta como principais constituintes compostos das classes dos flavonoides (YAN et al., 2012; YANG et al., 2018), alcaloides (XIANG et al., 2005) e terpenos (SAKAI et al., 1996), aos quais tem sido atribuído tais atividades.

Além da *P. oleraceae*, em estudos realizados por Farag e Shakour (2019) foi mostrado que as espécies *P. rausii* e *P. granulostellulata* também apresentam alto teor de compostos fenólicos, principalmente flavonoides e alcaloides. Outra espécie de *Portulaca* que pode ser citada é a *P. pilosa* que apresenta ação cicatrizante comprovada, essa relacionada principalmente a flavonoides presentes na espécie (BARROS et al., 2017).

Apesar do gênero *Portulaca* apresentar grande potencial em se tratando de metabólitos de interesse farmacológico, os estudos com o gênero ainda são insuficientes diante do número de espécies disponíveis, fazendo-se necessário mais estudos a cerca dessas espécies.

2.3 *Portulaca pilosa*

A *Portulaca pilosa* L., figura 2 (pag. 25), conhecida popularmente como amor-crescido ou alecrim-de-São-José, é uma planta herbácea com folhas carnosas e flores vermelhas encontrada na América Central e do Sul (MENDES et al., 2011). É considerada não endêmica no Brasil e é distribuída na região Norte, Nordeste e Centro-Oeste (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019). Na região amazônica, a espécie é popularmente utilizada principalmente no tratamento de feridas e inflamações (BARROS et al., 2017; FLOR; BARBOSA, 2015), mas também há relatos de usos como diurético, cicatrizante, analgésico e no tratamento de malária, queimaduras, disenteria, cólicas, hemoptises e úlceras (REVILLA, 2002; BARATA et al., 2009).



Figura 2 - Partes aéreas de *Portulaca pilosa* L.

O amor-crescido é uma erva com caules verdes prostados, ramos de 5-15 cm de comprimento, muito ramificados, tricomas axilares de 4 mm de comprimento, multisseriados, interaxilares, conspícuos, lanosos, esbranquiçados. As folhas apresentam pecíolos cilíndricos com 1,5-2 cm; limbo 12-24 x 1-2 mm, linear-lanceolado, subglobosos, nervura central não evidente; base atenuada; ápice agudo; margem inteira sem bordo esbranquiçado; glabras; persistentes; folhas involucrais com 5-10 por inflorescência, 15-20 x 1-2 mm, linear-lanceolada; base arredondada; ápice agudo; margem inteira sem bordo esbranquiçado; glabras (COELHO; GIULIETTI, 2010).

Inflorescência com 3-7 flores, flores sésseis com 0,4-0,8 cm de diâmetro; sépalas 5-7 mm comprimento, glabra, dorso côncavo, ápices agudos; pétalas 5, purpúreas; lâmina obcordada 4-8 mm, ápice emarginado; estames 15-20; filetes 2-3 mm de comprimento, anteras 0,8-1,0 mm de comprimento; estilete com 1,5-3,0 mm de comprimento, ramos estigmáticos de 4-5, 1,5-2,0 mm de comprimento. Pixídio com 3-5 mm comprimento, pedicelado, pedicelo de 0,5 mm, opérculo cônico com 1-2 mm de altura. Sementes de 10-15 por fruto, negras, opacas, com 0,5-0,7 mm (COELHO; GIULIETTI, 2010). A figura 3 (pág. 26) apresenta algumas dessas características citadas.

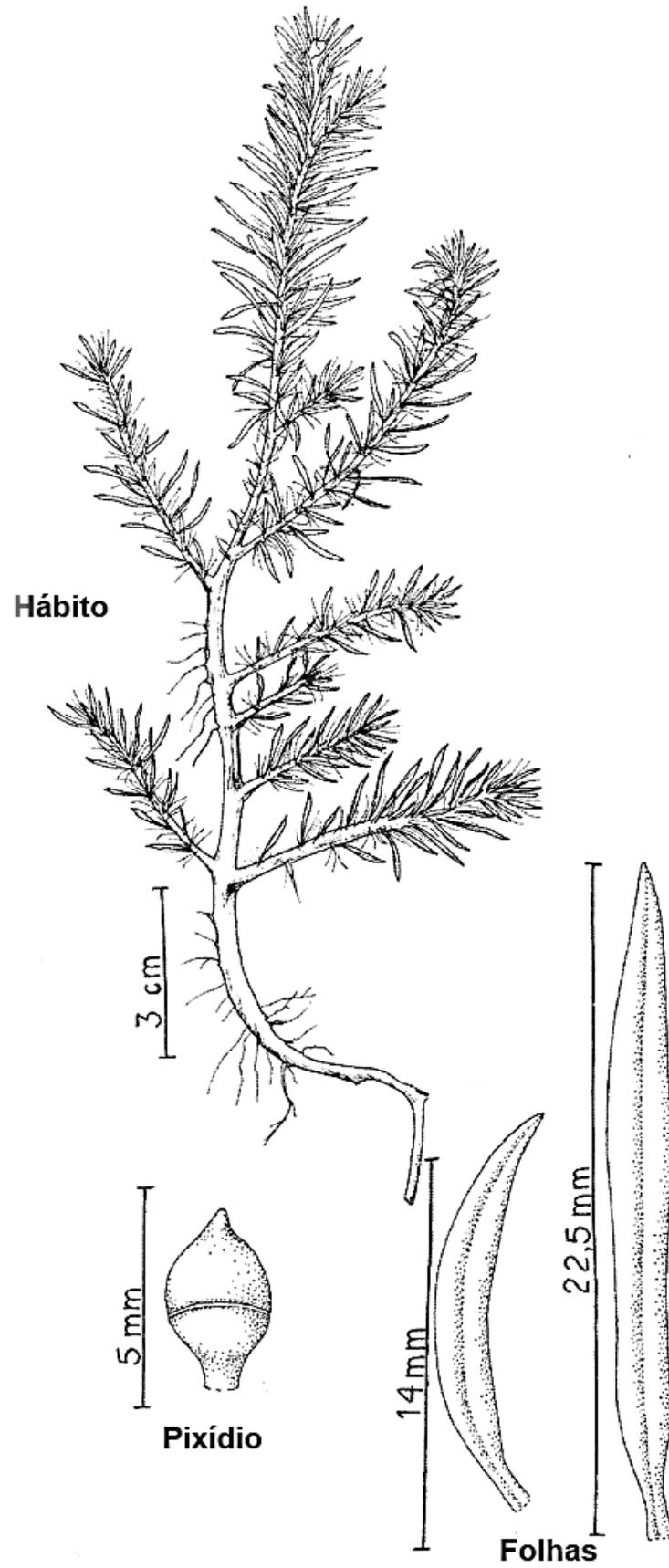


Figura 3 - Hábito e características da espécie *Portulaca pilosa* L.

Fonte: Adaptado de Coelho e Giulietti (2010).

Uma abordagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *P. pilosa* identificou a presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, esteroides, terpenos e carotenoides (MENDES et al., 2011). Além disso, em estudo realizado por Gatea et al. (2017), a *P. pilosa* apresentou maior teor de compostos fenólicos, como ácido gálico, flavonoides, sacarídeos e um potencial antioxidante melhor em comparação com *P. oleracea*, a espécie mais conhecida do gênero.

Até o momento, foram isolados os diterpenos pilosana A e B (OHSAKI et al., 1987) e o diterpeno pilosana C (OHSAKI et al., 1995) da fração acetato de etila do extrato metanólico da parte aérea de *P. pilosa*, enquanto que o pilosanol A, B, e C foram isolados da fração acetato de etila das raízes da mesma (OHSAKI et al., 1991). As estruturas citadas estão apresentadas na figura 4.

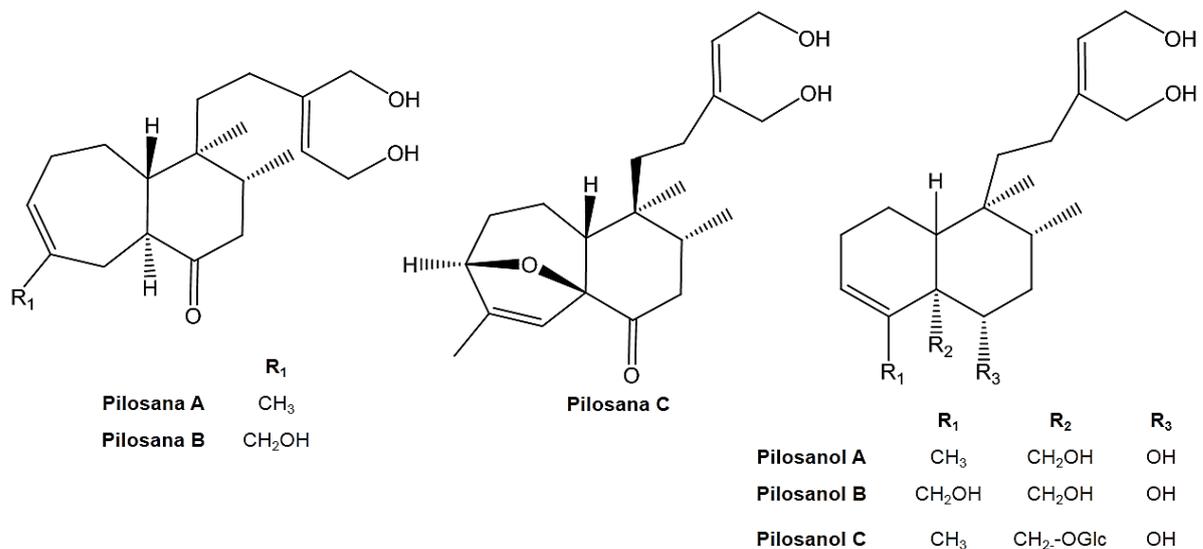


Figura 4 - Diterpenos isolados de *Portulaca pilosa* L.

Fonte: OHSAKI et al., 1987; 1991 e 1995.

Sobre o potencial biológico da espécie, estudos demonstram que a mesma possui notável atividade antioxidante, baixa toxicidade em células normais e alta toxicidade em células tumorais (GAETA et al., 2017), além de atividade antibacteriana

contra *Pseudomonas aeruginosa* (MENDES et al., 2011), atividade anti-tirosinase com ação inibitória acima de 90% (BAURIN et al., 2002) e atividade anti-inflamatória (BARROS et al., 2017), mostrando potencial como fonte de recursos bioativos.

2.4 Avaliação toxicológica de plantas medicinais e drogas vegetais

A avaliação da toxicidade busca prever possíveis efeitos adversos ou nocivos à saúde humana frente a exposição à determinada substância, podendo ser essa um praguicida, um agente químico, ou um medicamento e até mesmo substâncias próprias do organismo, sempre levando em conta o tempo de exposição a substâncias e a sua concentração (ZAGATTO et al. 1988; MEYER, 2003).

O estudo toxicológico das plantas medicinais e drogas vegetais é alvo de investigações de muitos estudiosos. Por mais que tenham um potencial curativo e/ou preventivo, as plantas medicinais podem possuir substâncias que, dependendo da dose, podem ser tóxicas ao organismo, causando reações indesejáveis ou até mesmo levar a óbito (OGA, 1996). Assim, uma mesma planta pode conter componentes medicinais, terapêuticos e também substâncias tóxicas prejudiciais ao organismo humano e animal.

Os protocolos experimentais, são importantes para o desenvolvimento de produtos tanto na fase investigativa quanto no momento do cumprimento das exigências legais para registro e comercialização. Tais estudos se desenrolam em duas grandes fases: a fase pré-clínica, realizada em espécies inferiores à humana na escala evolutiva e a fase clínica, onde os produtos que não demonstraram toxicidade significativa nos estudos pré-clínicos são então testados em voluntários humanos, seguindo rigorosos preceitos técnicos e éticos (MARIZ, 2007).

Um teste de toxicidade bastante utilizado é o teste de toxicidade aguda por dose fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), é um destes métodos alternativos, que avalia a toxicidade aguda oral, na qual se evita utilizar o critério morte dos animais como objetivo final e propõe a observação do aparecimento de sinais de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas; permitindo, desta forma, classificar a substância testada de

maneira compatível com o sistema empregado pela União Europeia, o qual qualificava pelos valores de Dose Letal 50% (DL₅₀) oriundos do teste clássico de toxicidade aguda (OECD 420, 2001; VALADARES, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar os estudos fitoquímico e toxicológico do extrato etanólico das partes aéreas de *Portulaca pilosa* (EEPp).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil fitoquímico do extrato EEPp por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência – CCDAE;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato EEPp pelo método do radical livre DPPH, via autografia por CCDAE;
- Fracionar o extrato EEPp utilizando Cromatografia em Coluna por Via Úmida – CCVU e isolar os metabólitos secundários do mesmo;
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e bidimensionais.
- Avaliar a toxicidade aguda oral do EEPp em camundongos Swiss machos e fêmeas (Teste de Dose Fixa).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos para os estudos fitoquímico e toxicológico

4.1.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

Nos procedimentos cromatográficos e de extração, foram utilizados solventes orgânicos Grau de Pureza do Reagente (ACS) hexano, tolueno, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona da marca Tedia Company®, grau Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/Spectro) - metanol da marca Tedia Company®, álcool etílico 92,8 °INPM (Santa Cruz®) e água ultrapura, obtida em sistema Millipore Direct-Q3 (18,2 MΩ.cm - Beadford®, MA, USA).

Para a obtenção do perfil químico e cromatográfico do extrato (EEPp) foi utilizado sistema automatizado de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência - CCDAE (HPTLC - CAMAG®, Muttenz, Switzerland), sendo o mesmo integrado por quatro módulos: Aplicador Automático de Cromatografia em Camada Fina (ATS 4) - aplicador, Desenvolvimento Múltiplo Automático em Camada Fina 2 (AMD 2) - desenvolvimento, Scanner de Cromatografia em Camada Fina 4 (TLC Scanner 4) - densitometria e Visualizador de Cromatografia em Camada Fina (TLC Visualizer) – fotodocumentador e para o controle e tratamento de dados utilizou-se o software winCATS®.

Utilizou-se como fase estacionária cromatoplacas em sílica gel SiliaPlate Cromatográfica em Camada Fina (TLC) de Alumínio F-254 (Silicycle®), além de pulverizador automático e chapa térmica (CAMAG®, Muttenz, Switzerland) para a derivatização das cromatoplacas foram utilizados os reagentes: Vanilina com Grau de Pureza Analítica (P.A.) da marca (Nuclear®), ácido sulfúrico ACS (Tedia Company®), 2-aminoetil-difenilborinato ACS (Aldrich Chemistry®), polietilenoglicol 4000 P.A. (Synth®), hidróxido de potássio P.A. (Nuclear®), ácido tartárico (Sigma-Aldrich®), ácido fórmico (Isofar®), hidróxido de sódio (Tedia Company®), bicarbonato de potássio (Synth®), iodeto de potássio (Synth®).

No fracionamento do extrato etanólico de *P. pilosa* e purificação de suas frações por Coluna de Cromatografia por Via Úmida (CCVU), fez-se uso de colunas cromatográficas de vidro, com sílica gel SiliaFlash® G60 60-200 µm em pó (Silicycle®) como fase estacionária e solventes orgânicos como eluentes (hexano, diclorometano

e metanol). As frações foram analisadas por CCDAE usando cromatoplasas em sílica gel SiliaPlate TLC Alumínio F-254 (Silicycle®).

Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram empregadas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker®, modelo Ascend TM, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Para o controle e tratamento dos dados utilizou-se o Software TopSpin 3.6.0. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm), tendo como referência interna o sinal do solvente deuterado. O solvente utilizado foi Clorofórmio Deuterado (CDCl_3) (Cambridge Isotope Laboratories®).

4.1.2 ESTUDO TOXICOLÓGICO

Para avaliar a toxicidade oral aguda, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss (variação albina), machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas) com peso corporal inicial de 25-27g provenientes do Biotério Central da UFPA, estes foram confinados em caixas de polipropileno (50 x 35 x 15 cm) com tampa metálica, forradas com maravalha e receberam ração peletizada (Biobase-Biotec®) e água filtrada durante o período de aclimação e do teste de toxicidade oral aguda. Em seguida o EEPp foi reconstituído em água destilada e um pouco de óleo de girassol (Liza®) e administrado por meio de gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm da Becton & Dickinson Co®. Ao final do teste, utilizou-se anestésicos (mistura constituída de 2 partes de Cloridrato de Ketamina® + 1 parte de Xilazina®, na dose de 2,5 mL/kg, via i.p), em seguida foram coletados todos os órgãos, utilizando-se kit cirúrgico (bisturi, pinças, tesouras, da Maryam Trad®). Logo após os órgãos foram fixados em formalina a 10% (Nuclear®), por fim foram confeccionadas lâminas para avaliação anatomohistopatológica, em microscópio ótico (Prolab®).

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Portulaca pilosa* L. (7,5 Kg;) foram coletadas no dia 3 de novembro de 2017 na restinga de Macapazinho no município de Castanhal, estado do

Pará (coordenadas georreferenciadas 01° 30' 54" S e 48° 02' 41" W:). A sua identificação foi realizada pela Dra. Márlia Regina Ferreira Coelho, pesquisadora botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). A exsicata de *Portulaca pilosa* L. foi depositada no Herbário João Murça Pires (HJMP) com o registro MG 228897.

As partes aéreas da *Portulaca pilosa* foram selecionadas e lavadas com água corrente com o intuito de retirar sujidades, musgos e insetos, em seguida, foram transferidas para estufa com circulação de ar controlado, modelo Q314M (Quimis®) a 40°C por uma hora. Logo após foram novamente lavadas em água corrente e borrifadas com álcool 70 °GL e espalhadas sobre papel Kraft em bancada por um dia, à temperatura ambiente, para a primeira secagem, e, finalmente, secas em uma estufa com circulação e renovação de ar controlado, modelo SL- 102 /1540 (Solab®) a aproximadamente 40 °C por um período de 45 dias até o material vegetal atingir massa constante. Em seguida, as partes aéreas secas foram pulverizadas em moinho de martelo e facas (Marconi®) resultando em 3,2 Kg de material seco e triturado.

4.2.2 EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO

Para a obtenção do extrato de *Portulaca pilosa* (EEPp), partiu-se de 3,0 kg das partes aéreas secas e trituradas, adotando o método de extração por maceração e etanol 92,8 °INPM como solvente extrator e adotou-se uma relação massa/volume de 1/10, ou seja, 3,0 kg de material botânico para 30 litros de etanol com período de retenção de 168 horas e agitação periódica a cada 8 horas, o processo foi executado em 2 bateladas (repetições). Em seguida, as soluções obtidas foram concentradas sob pressão reduzida com o auxílio do evaporador rotativo Syncore – R4 (Büchi®) e o extrato foi codificado (EEPp) e guardado em freezer.

4.2.3 PERFIL QUÍMICO POR CCDAE

O perfil fitoquímico do extrato EEPp foi realizado em sistema robotizado de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência – CCDAE (HPTLC - Camag®), usando como fase estacionária: cromatoplasmas de sílica gel G 60 F 254 com suporte em alumínio (SiliCycle®) e a combinação de solventes orgânicos (hexano, tolueno, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol) como fase móvel. As

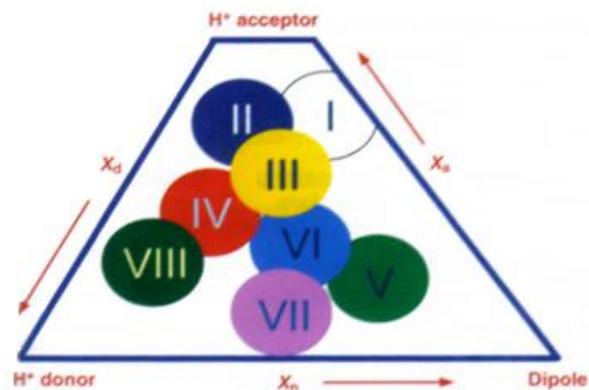
análises dividiram-se em duas etapas: o desenvolvimento do método de eluição e o uso de reveladores químicos seletivos para classes de compostos fitoquímicos de interesse, como: terpenos, flavonoides, cumarinas, alcaloides e compostos fenólicos. (PINHEIRO, 2016; REICH e SCHIBLI, 2006; WAGNER e BLADT, 2001):

- a) Desenvolvimento do método de eluição – Inicialmente 20 µg/inóculo do extrato (EEPp) foi pulverizado nas cromatoplasas com o auxílio do módulo aplicador automático (Automatic TLC Sampler 4, ATS 4 – CAMAG®) para avaliar a seletividade (teste de seletividade) dos principais solventes orgânicos frente ao analito (tabela 1 e figura 5, pág. 35). Nesta etapa, as placas foram eluídas em cubas de eluição contendo 100% de cada solvente orgânico, para então, selecionar as fases móveis que apresentassem melhor seletividade (bandas cromatográficas finas e ausência de difusão – arraste); na etapa seguinte, realizou-se o ajuste da força do solvente escolhido (diclorometano) a partir da adição de solventes modificadores (metanol) e/ou diluentes (hexano) até que as substâncias de interesse apresentassem o Fator de Retenção (R_f) no intervalo de 0,3 a 0,6.

Tabela 1 - Classificação dos principais solventes orgânicos utilizados em cromatografia.

Seletividade	Solvente	Força do Solvente
Diluidor	n-hexano	0.0
	n-heptano	0.0
	Ciclohexano	0.0
I	Éter n-butílico	2.1
	Éter isopropílico	2.4
	Éter metil-t-butílico	2.7
	Éter dietílico	2.8
II	n-Butanol	3.9
	2-Propanol	3.9
	1-Propanol	4.0
	Etanol	4.3
	Metanol	5.1
III	Tetraidrofurano	4.0
	Piridina	5.3
	Metoxietanol	5.5
	Dimetil formamida	6.4
IV	Ácido acético	6.0
	Formamida	9.6
V	Cloreto de metileno	3.1
	1.2-Dicloetanol	3.5
VI	Acetato de etila	4.4
	Metil-etil-cetona	4.7
	Dioxano	4.8
	Acetona	5.1
VII	Acetonitrila	5.8
	Tolueno	2.4
	Nitrobenzeno	4.4
VIII	Clorofórmio	4.1
	Nitrometano	6.0

Fonte: Adaptado de Reich e Schibli (2006)

**Figura 5** - Triângulo da seletividade de Snyder

Fonte: Reich e Schibli (2006).

- b) Derivatização e fotodocumentação – Nesta etapa, foram aplicados 20 µg/inóculo de EEPp e 200 ng/inóculo do padrão fitoquímico (β -amirina, ácido gálico, quercetina, esculina, brucina e ácido ascórbico). As cromatoplasmas foram eluídas em diclorometano / metanol / ácido fórmico 97:2:1. Após eluição, as cromatoplasmas foram fotodocumentadas com o auxílio do módulo TLC Visualizer (CAMAG), em 254 e 366 nm, em seguida derivatizadas (reveladas) com soluções de reveladores seletivos (tabela 2) para terpenos (VAS), compostos fenólicos (FBS), flavonoides (NP/PEG), cumarina (KOH), alcaloides (Dragendorff) e realizado ainda, a autografia para avaliar a capacidade antioxidante por solução radicalar – DPPH 66 µM. As placas derivatizadas foram fotodocumentadas com o módulo TLC Visualizer (CAMAG) sob radiação ultravioleta (366 nm) e na região do visível (luz branca).

Tabela 2 - Sistema de reveladores e padrões utilizados no estudo do perfil químico de *P. pilosa*.

Lista de Padrões e Reveladores			
Padrão	Classe	Revelador / Seletivo	Coloração / Visualização
β -Amirina	Terpeno	Vanilina Ácido Sulfúrico – VAS	Roxa / Visível
<i>t</i> -Resveratrol	Fenólico	Fast Blue Salt – FBS	Marrom / Visível
Rutina	Flavonóide	Difenilboriloxi-etilamina / Polietileno Glicol -NP/PEG	Amarelo - Verde / UV 366nm nm
Esculina	Cumarina	Hidróxido de Potássio - KOH	Azul / UV 366 nm
Brucina	Alcalóide	Nitrato de Bismuto Monobásico, Iodeto de Potássio e Ácido Tartárico – Dragendorff	Laranja / Visível

Fonte: Wagner e Bladt, 2001 (adaptado)

Legenda: Sistema de eluição diclorometano / metanol / ácido fórmico 97:2:1.

4.2.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE POR AUTOGRAFIA

Os métodos de autografia por CCDAE, parte de princípios químicos que combinam separação cromatográfica com avaliação *in situ* do potencial biológico da matriz estudada, o que facilita o estudo dirigido de amostras complexas como extratos vegetais até o isolamento do princípio ativo (PINHEIRO, 2016). Dessa forma, neste trabalho avaliou-se o perfil antioxidante do extrato EEPp por autografia, adotando os mesmos parâmetros cromatográficos desenvolvidos no perfil químico.

Para a realização dos testes antioxidantes foi preparada uma solução de 0,66 mM do radical DPPH· em metanol. Parte-se do princípio que a solução no seu estágio radicalar apresenta uma coloração roxa e que após o sequestro do radical DPPH·, realizado por uma substância dita antioxidante, ocorre a mudança da coloração para amarelo (CHOMA e GRZELAK, 2011) (Figura 6). Adotou-se como padrão de antioxidante 1 µg de t-Resveratrol. As cromatoplasmas desenvolvidas foram borrifadas com a solução radicalar, envolvidas com papel alumínio por 40 minutos, em seguida foram fotodocumentadas e avaliada a formação de bandas amarelas.

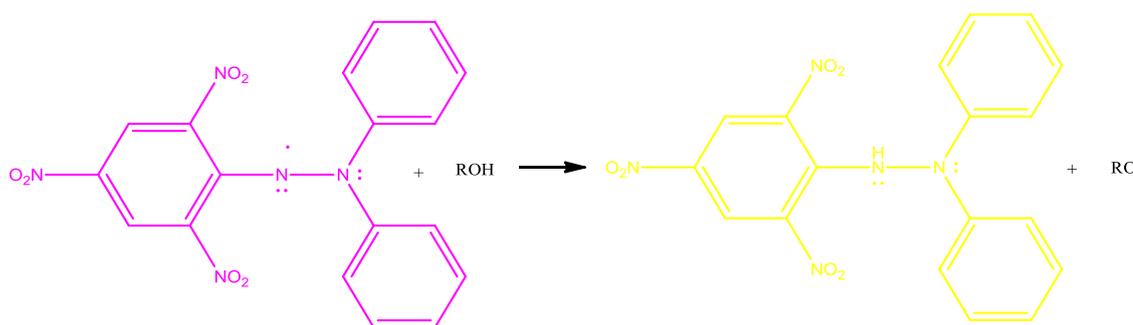


Figura 6 - Reação genérica de sequestro do radical DPPH.

Fonte: Pinheiro (2016).

4.2.5 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO

Com o objetivo de fracionar o extrato EEPp, adotou-se o método de Cromatografia em Coluna por Via Úmida – CCVU, para a separação dos constituintes em grupos de polaridade semelhantes. Para tanto, aproveitou-se os indicativos da boa seletividade determinada no perfil químico, onde, destacou-se o diclorometano como solvente base e metanol como modificador, dessa forma, utilizou-se como fase móvel a combinação de diclorometano e metanol em diversas proporções com força / polaridade crescente (tabela 3, pág. 38), cada volume de sistema (1 L) foi coletado em 5 partes (200 mL cada – gerando uma fração). Como fase estacionária foi utilizado sílica gel G 60 (SiliCycle) com percurso cromatográfico de 18 cm e coluna de vidro (raio = 3,5 cm) como suporte cromatográfico.

Tabela 3 - Sistema de eluição utilizado no fracionamento cromatográfico por CCVU do EEPp.

Sistema	%Diclorometano	%Metanol	Fração*
1º	100	0	1 a 5
2º	95	5	6 a 10
3º	85	15	11 a 15
4º	75	25	16 a 20
5º	50	50	21 a 25
6º	0	100	26 a 30

Legenda: *Cada sistema de 1 L foi coletado em frascos de 200 mL cada.

Foram coletadas 30 frações e julgadas as suas complexidades e semelhanças por meio da avaliação por CCDAE, onde inoculou-se 50 µg de cada amostra em uma cromatoplaça com dimensão 20x10 cm, com bandas medindo 5 mm e aplicadas em modo *Spray-on*, mantendo uma distância de 7,5 mm de entre elas, respeitando a margem de 10 mm da borda para o primeiro inóculo e 8 mm de altura em relação a base da cromatoplaça. O sistema de eluição seguiu os parâmetros desenvolvidos no perfil químico (item 4.2.3, pág. 33).

Segundo MATSUTANI (2008), os fármacos antimaláricos caracterizam-se por apresentarem uma estrutura química de baixa polaridade, devido a via bioquímica de ação dos mesmos dentro dos eritrócitos, dessa forma, para a continuidade do estudo elegeu-se as reuniões **R2** (Frações de 5 a 7) e **R3** (Frações de 8 a 12).

Para o reagrupamento dos constituintes da **R2**, foi adotado o método de CCVU tendo como fase estacionária sílica gel G 60 (SiliCycle) (coluna de vidro – raio de 1,5 cm e percurso cromatográfico de 18 cm) e como fase móvel a combinação de hexano, diclorometano e metanol (V = 150 mL) (Tabela 4), tendo a força dos sistemas ajustados a partir da análise por CCDAE das frações na medida em que eram coletadas. Os volumes dos sistemas foram coletados em frascos de penicilina (8 mL).

Tabela 4 - Sistema de eluição utilizado no refracionamento cromatográfico por CCVU da R2.

Sistema	% Hexano	% Diclorometano	% Metanol	Quantidade*
1º	70%	30%	0%	3 Volumes
2º	60%	40%	0%	2 Volumes
3º	50%	50%	0%	3 Volumes
4º	40%	60%	0%	2 Volumes
5º	30%	70%	0%	1 Volume
6º	20%	80%	0%	1 Volume
7º	10%	90%	0%	1 Volume
8º	0%	100	0%	1 Volume
9º	0%	90%	10%	2 Volumes

Legenda: *Cada sistema de 150 mL foi coletado em frascos de penicilina de 8 mL cada.

Para o reagrupamento das substâncias presentes na **R3**, foi adotado a mesma metodologia utilizado na **R2**, mudando somente a força dos sistemas utilizados (Tabela 5).

Tabela 5 - Sistema de eluição utilizado no refração cromatográfico por CCVU da R3.

Sistema	% Hexano	% Diclorometano	% Metanol	Quantidade*
1º	50%	50%	0%	5 Volumes
2º	40%	60%	0%	2 Volumes
3º	30%	70%	0%	2 Volumes
4º	20%	80%	0%	2 Volumes
5º	10%	90%	0%	1 Volume
6º	0%	100%	0%	3 Volumes
7º	0%	95%	5%	2 Volumes
8º	0%	90%	10%	1 Volume
9º	0%	80%	20%	2 Volumes
10º	0%	70%	30%	1 Volume
11º	0%	50%	50%	1 Volume
12º	0%	0%	100%	1 Volume

Legenda: *Cada sistema de 150 mL foi coletado em frascos de penicilina de 8 mL cada.

4.2.6 TOXICIDADE AGUDA ORAL

4.2.6.1 Animais de experimentação e condições de acomodação

Para a realização do teste de toxicidade aguda foram utilizados camundongos (*Mus musculus L.* (1758), família Muridae), var. albino, linhagem Swiss, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), ambos os gêneros com cerca de 5 -9 semanas e peso inicial de 25-30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Pará. Os mesmos, foram mantidos separadamente (machos e fêmeas) previamente aclimatados por 7 dias, mantidos na Sala de Experimentação da Faculdade de Farmácia da UFPA (fêmeas), e no Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo do ICB/UFPA (machos), em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade em torno de 50-60%, ciclo de luz/escuro de 12 h, baixos níveis de ruídos e com contínua exaustão de ar. Não houve necessidade de procedimentos como o enriquecimento do ambiental.

Os animais foram mantidos com água filtrada (oferecida através de “bebedouros” próprios) e ração peletizada para roedores (Biobase - biotec®) ad libitum em caixas de polipropileno (50x35x15cm) com tampa metálica, forradas com

maravilha, isenta de qualquer tratamento antiparasitário ou antimicrobiano (para evitar qualquer interferência nos testes de toxicidade) em número máximo de 5 animais por caixa (que foi devidamente etiquetada para constar todos os dados de variação de peso, consumo de água e ração e o estado fisiológico diário dos mesmos) durante todo período, da aclimação ao último dia de experimentação, e submetidos a sedação e inconsciência profunda para a realização dos procedimentos de eutanásia descritos abaixo.

Em animais totalmente inconscientes por utilização de anestesia profunda (induzida pela mistura de 2 partes de Cloridrato de Cetamina 100 mg/mL + 1 parte de Xilazina 25 mg/mL, na dose de 2,5 mL/kg, totalizando uma dose (em mg/kg) aproximada de 166,7 mg de Cloridrato de Cetamina e 20,8 mg Xilazina, por via intraperitoneal), foi realizada a abertura das cavidades abdominais, torácica e craniana, para retirada de todos os órgãos (baço, pâncreas, intestino, estômago, rins, fígado, pulmões, coração e cérebro) com auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas próprias, para ressecção total dos órgãos e acondicionamento em recipientes previamente preenchidos com formalina tamponada a 10%, para avaliação anatomohistopatológica. As demais partes (carcaça) foram mantidas congeladas em sacos próprios para descarte biológico até o momento de serem recolhidas para incineração, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFPA.

Todos os procedimentos com animais foram realizados dentro das mais rígidas normas de experimentação animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo as Normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CoBEA) e do recém-criado CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Lei nº. 11.794, publicada no DOU de 08/10/2008).

Para garantir o cumprimento das diretrizes preconizadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais de Laboratório, o trabalho envolvendo animais (manuseio, treinamento e inspeção geral da qualidade de acomodação dos animais) contou com o apoio e supervisão do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, médico veterinário e patologista clínico, professor Titular da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA - CEPAE/UFPA (Parecer 1385090218, em ANEXO 2).

4.2.6.2 Procedimentos para avaliação da toxicidade aguda oral

A Avaliação da Toxicidade Aguda Oral foi realizada de acordo com os procedimentos de Dose Fixa da OECD 420, na sua versão revista adotada em 2001 (OECD *GUIDELINE* 420), com algumas adaptações. Este procedimento, apesar de usar muito menos animais do que o da Dose Letal 50% (DL₅₀) provê informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método da DL₅₀, onde a morte do animal não é uma meta. Observa-se cuidadosamente o aparecimento de sinais claros de toxicidade em uma de uma série de níveis de doses fixas (BRITO, 1994).

O EEPp foi reconstituído em óleo de girassol e a solução cuidadosamente administrada por meio de gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm (Becton & Dickinson™ Co®). Os animais foram divididos em caixas de uma maneira que não impedia a observação precisa de cada um, a temperatura local, umidade e ciclo luz/escuro e outras condições foram as mesmas já supracitadas. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo.

Os níveis de dose para EEPp foram estabelecidos para, no máximo, 3 doses suficientemente espaçadas (2000, 200 e 20 mg/kg), a fim de mostrar os efeitos tóxicos e as diferentes taxas de mortalidade. Caso a dose de 2000 mg/kg não produza mortalidade nos grupos tratados, não haverá a necessidade de ser administradas doses inferiores. O volume administrado nos animais da substância-teste não deverá exceder a 10 mL/kg de peso corporal do animal. Foi utilizado um número de 5 animais por grupo.

Os animais foram observados durante um período de 14 dias, sendo realizada uma avaliação ou screening hipocrático, fornecendo uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica de uma substância em questão, como: estado consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o SNC e SNP (MALONE e ROBICHAUD, 1983; BRITO, 1994).

Ao final dos 14 dias de observação, os animais foram submetidos à eutanásia, segundo descrito acima, e os órgãos resseccionados para avaliação anatomohistopatológica. O procedimento de ressecção dos órgãos de cada animal não ultrapassou 10 minutos de duração, suficiente para não causar lesão tecidual por hipóxia celular antes da fixação por formalina. As análises anátomo-histopatológicas foram

realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (ISPA/UFRA).

4.2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a avaliação da citotoxicidade, os dados foram expressos como média desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido do *pos-hoc* teste de Mann-Whitney. No ensaio de toxicidade aguda oral, para avaliar se houve diferença significativa da evolução ponderal, do consumo de ração e água entre os animais controles e tratados com EEPp, estes resultados foram expressos em média \pm desvio padrão para cada grupo de animais e analisados pelo Teste “t” de Student, sendo considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Secagem

O processo de assepsia e secagem das partes aéreas de *Portulaca pilosa* permitiu a remoção de sujidades, microrganismos e umidade. A partir da equação 1 foi possível determinarmos o teor de umidade presente na planta (tabela 6).

Equação 1 – Determinação do teor de umidade

$$\%U = \frac{\text{Massa (in natura)} - \text{Massa (seco)}}{\text{Massa (in natura)}} \times 100$$

Tabela 6 - Teor de umidade da planta *Portulaca pilosa*.

Massa in natura (g)	Massa seco (g)	U (%)
7500 g	3200 g	57,53 %

5.2 Extração por maceração

A extração por maceração de 3200g de material seco e triturado usando etanol 92,8 °INPM em duas bateladas de 168 horas resultou em 260g de EEPp com rendimento mássico de 7,45 % (Equação 2; tabela 7).

Equação 2 – Determinação do rendimento mássico

$$\dot{m} = \frac{\text{Massa (seco)} - \text{Massa (extrato)}}{\text{Massa (seco)}} \times 100$$

Tabela 7 - Rendimento mássico da extração por maceração de EEPp.

Massa seco (g)	Massa extrato (g)	\dot{m} (g)
3200 g	260 g	8,12 g

5.3 Perfil químico e cromatográfico por CCDAE

A determinação do perfil químico e cromatográfico por CCDAE permitiu avaliar a complexidade e as características química e cromatográfica dos metabolitos presentes no extrato EEPp. Análises preliminares visaram avaliar a seletividade (formação das bandas e ausência de arrastes cromatográficos) e a força dos

solventes orgânicos (capacidade de deslocar as substâncias): tolueno, diclorometano, acetona, acetato de etila, metanol e clorofórmio, para que, em seguida, a fase móvel fosse composta pelos mesmos. Dessa forma, os solventes tolueno, diclorometano e clorofórmio foram os que apresentaram melhor seletividade (tabela 8), ou seja, apresentaram bandas mais definidas com boa separação e pouco arraste (figura 7, pág. 45). Para compor a fase móvel em modo isocrático selecionou-se como solvente base o diclorometano, porém, como o diclorometano apresentou pouca força para eluir as substâncias mais polares, decidiu-se utilizar como modificador o metanol e ácido fórmico para afinar as bandas. Sendo assim, o sistema utilizado foi 97:2:1 de diclorometano / metanol / ácido fórmico.

Tabela 8 - Resultado do teste de seletividade dos solventes orgânicos para o EEPp.

Solvente	Seletividade
Tolueno	++
Diclorometano	++
Acetona	-
Acetato de etila	+
Metanol	-
Clorofórmio	++

Legenda: (++) muito seletivo; (+) seletivo; (-) não seletivo

Sistema de Eluição: 97:2:1 de diclorometano / metanol / ácido fórmico.

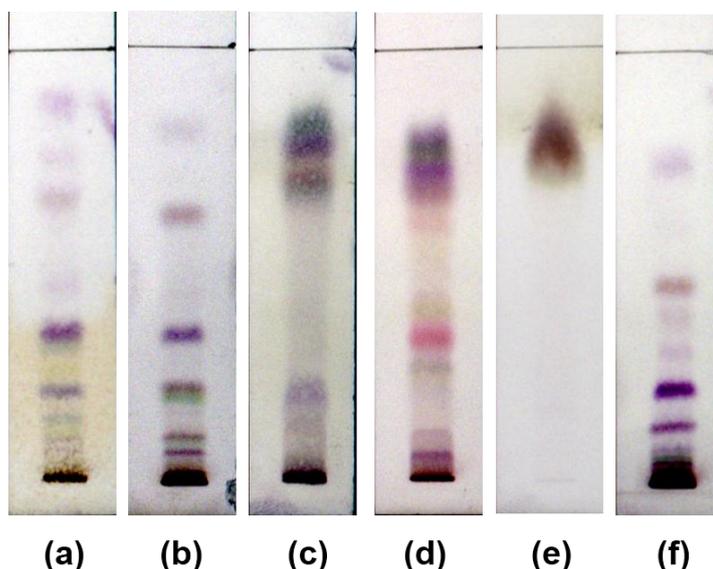


Figura 7 - Teste de seletividade dos solventes orgânicos para o EEPp.

Legenda: Cromatoplasas eluídas com 100% de: (a) Tolueno; (b) diclorometano; (c) acetona; (d) acetato de etila; (e) metanol; (f) clorofórmio. Derivatizadas em VAS e visualizadas no visível.

Com base na ocorrência ou não das reações seletivas de cada revelador fitoquímico, foi possível constatar a rica composição fitoquímica do extrato EEPp, onde identificou-se a presença de classes de metabólitos importantes como: terpenos

(figura 8a), compostos fenólicos (figura 8b), flavonoides (figura 8c), alcaloides (figura 8d) e ausência cumarinas (8e). O sistema utilizado foi 97:2:1 de diclorometano / metanol / ácido fórmico. (Tabela 9, pág. 46).

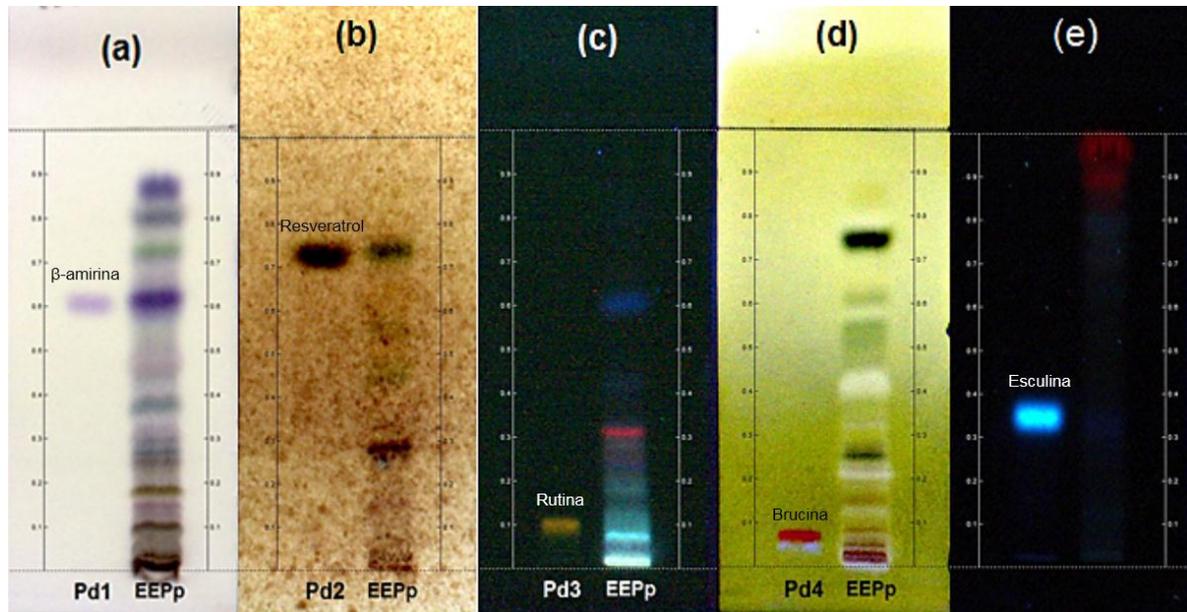


Figura 8 - Cromatoplas derivatizadas com os reveladores seletivos: VAS (a), FBS (b), NP/PEG (c), Dragendorff (d) e KOH (e).

Legenda: EEPp: Extrato Etanólico de *P. pilosa*. **Pd1:** β -amirina, **Pd2:** t-resveratrol, **Pd3:** Rutina, **Pd4:** Brucina e **Pd5:** Esculina.

Tabela 9 - Resultado do perfil fitoquímico do EEPp

Metabólito Secundário	Resultado
Terpenos	++
Fenóis Totais	+
Flavonóides	+
Cumarinas	-
Alcalóides	+

Legenda: (++) abundante; (+) presente; (-) ausente

Os testes por autografia com o DPPH· demonstraram atividade antioxidante do EEPp frente a solução radicalar, indicada pela formação de bandas amareladas semelhantes ao padrão ácido ascórbico (Pd5) característicos da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (coloração roxa) a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (coloração amarelada). O sistema utilizado foi 97:2:1 de diclorometano / metanol / ácido fórmico, (figura 9).

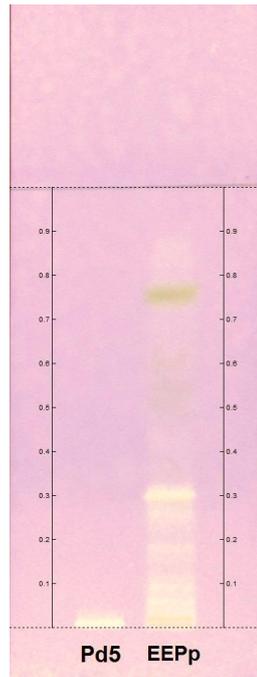


Figura 9 - Cromatoplaça derivatizada com DPPH

Legenda: Cromatoplaça eluída em diclorometano / metanol / ácido fórmico 97:2:1 e derivatizada com solução de VAS, visualizada no visível.

5.4 Fracionamento e isolamento

O fracionamento do extrato EEPp por CCVU permitiu separá-lo em 30 frações (figura 10 e 11 pag. 47) que após análise por CCDAE resultou em 7 reuniões (**R1** a **R7**) de acordo com as similaridades (tabela 10).

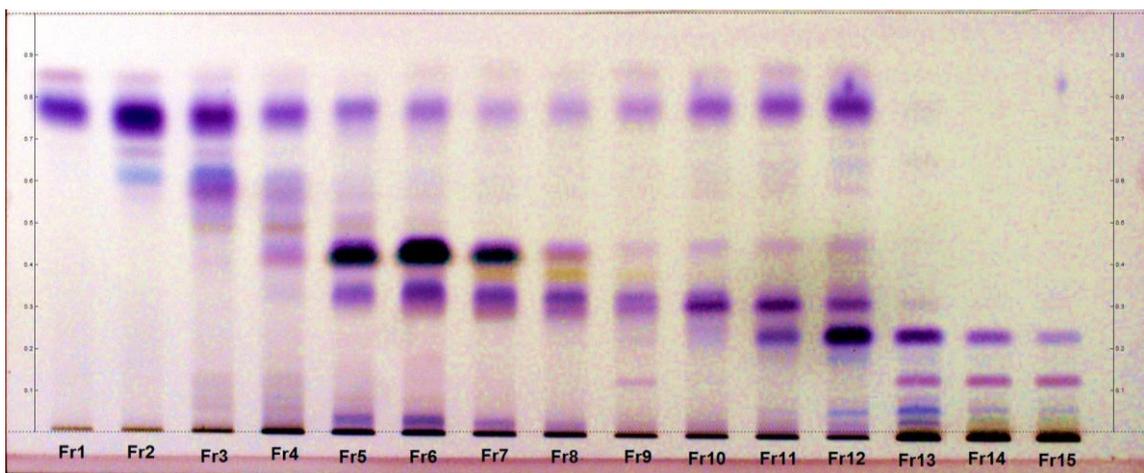


Figura 10 - Monitoramento das frações 1 a 15 da coluna de fracionamento do EEPp por CCDAE.

Legenda: Cromatoplaça eluída em diclorometano e derivatizada com solução de VAS, visualizada no visível

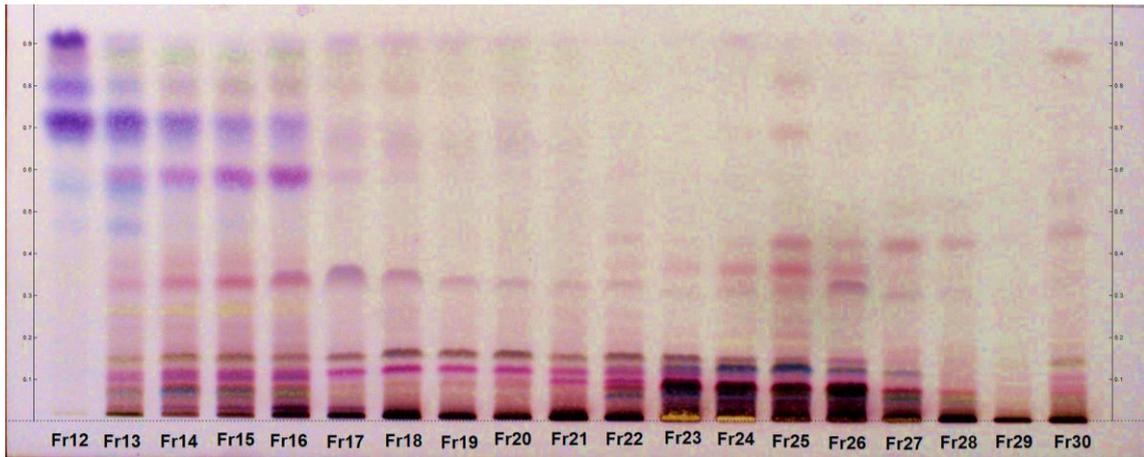


Figura 11 - Monitoramento das frações 12 a 30 da coluna de fracionamento do EEPp por CCDAE.

Legenda: Cromatoplaça eluída em diclorometano / metanol 80:20 e derivatizada com solução de VAS, visualizada no visível.

Tabela 10 - Composição das 7 reuniões após avaliação por CCDAE.

Reuniões	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Frações	Fr1-Fr4	Fr5-Fr7	Fr8-Fr12	Fr13-Fr16	Fr17-Fr20	Fr21-Fr27	Fr28-Fr30

Legenda: Reunião (R), Fração (Fr)

Com o objetivo de isolar as substâncias de caráter apolar presentes no EEPp, deu-se continuidade ao estudo através do refractionamento da reunião **R2** (Fr 5 a 7) por CCVU resultando em 248 frações, dentre elas sete substâncias aparentemente isoladas, denominadas de **S1** a **S7** (figura 12, pág. 48).

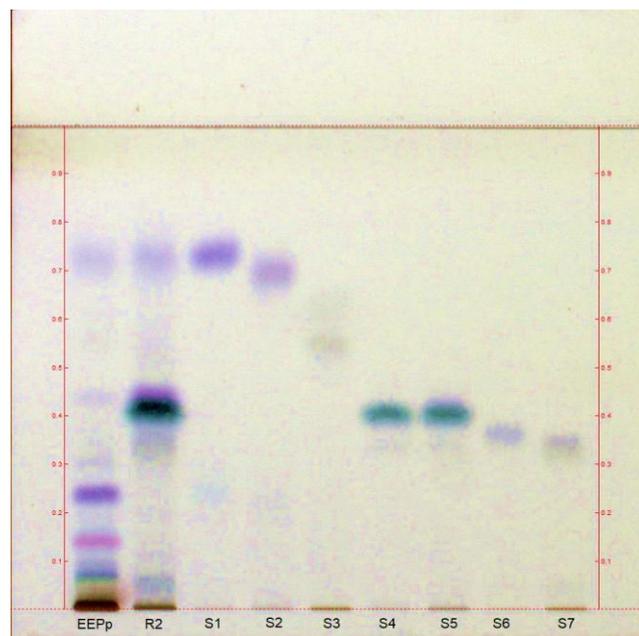


Figura 12 - Cromatoplaça com as substâncias isoladas provenientes do refractionamento da R2.

Legenda: Cromatoplaça eluída em diclorometano / metanol / ácido fórmico 97:2:1, derivatizada com solução de VAS e visualizada no visível.

Já no refração da fração **R3** (Fr 8 a 12) por CCVU, obteve-se 340 frações, entre estas, mais seis substâncias isoladas (**S8 a S13**) (figura 13, pág. 49), sendo que apenas a substância **S11** foi elucidada, por meio de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensionais.

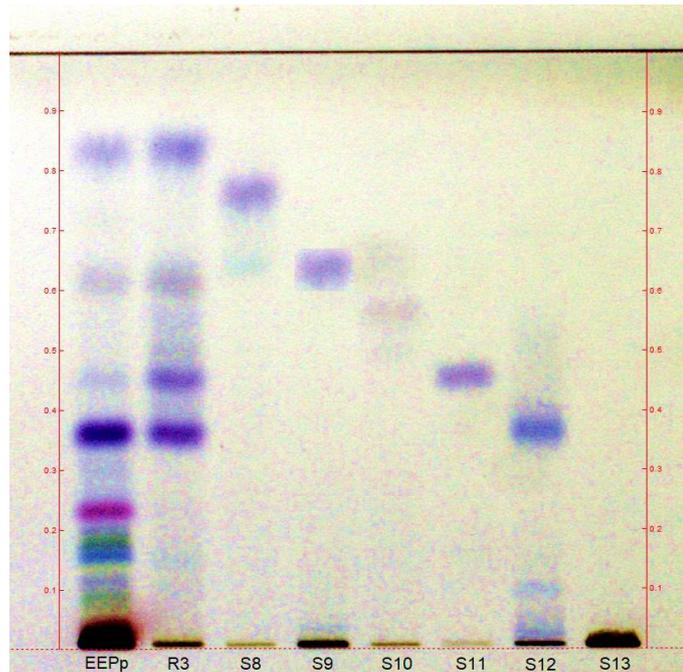


Figura 13 - Cromatoplaça com as substâncias isoladas provenientes do refração da R3.

Legenda: Cromatoplaça eluída em diclorometano / metanol / ácido fórmico 97:2:1, derivatizada com solução de VAS e visualizada no visível.

Dessa forma, o estudo fitoquímico do extrato das partes aéreas de *Portulaca pilosa* possibilitou o isolamento de treze substâncias. Os métodos de separação desenvolvidos para obtenção das substâncias isoladas estão resumidos no fluxograma apresentado na Figura 14 (pág. 50).

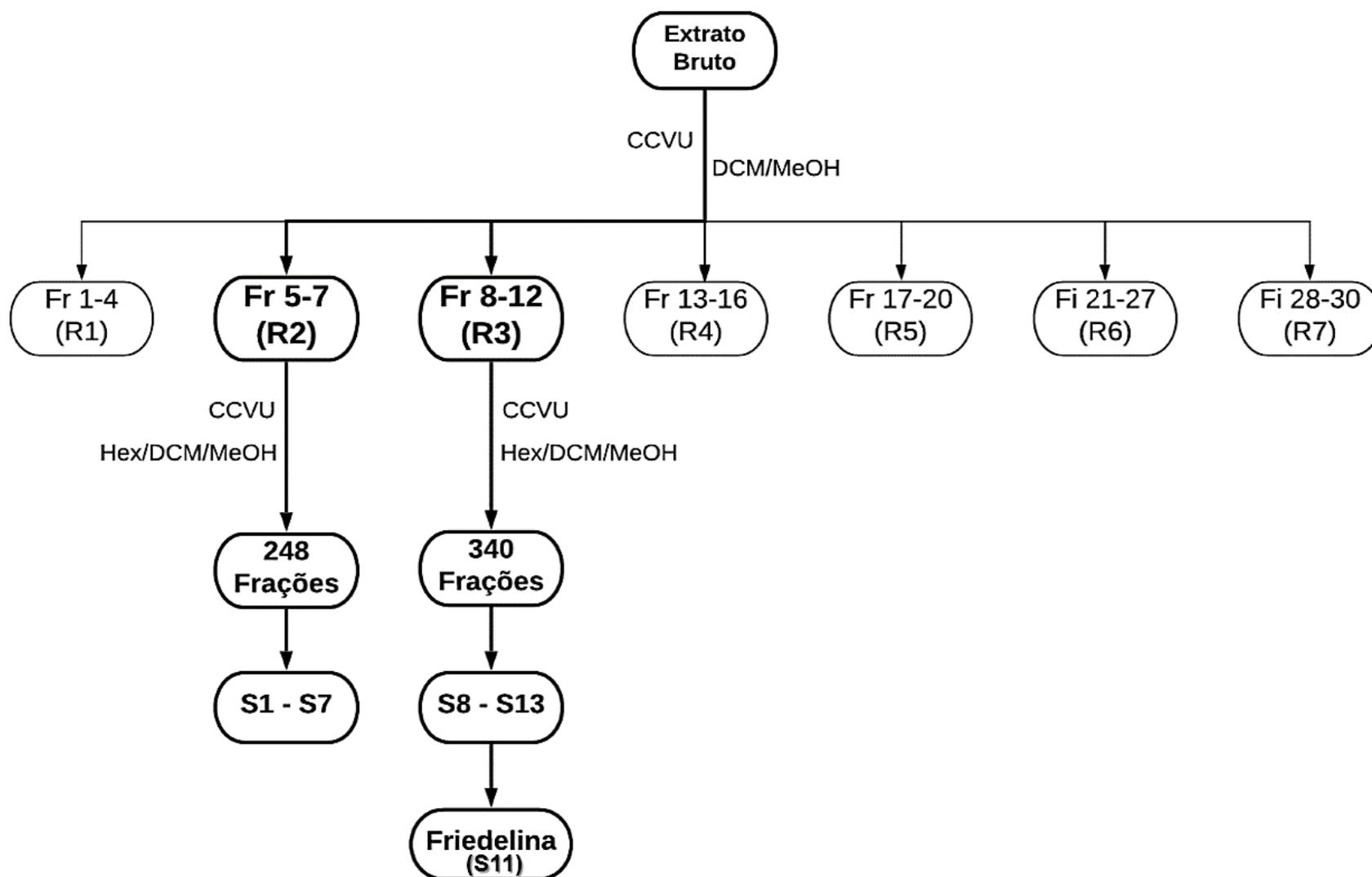


Figura 14 - Fluxograma do método de separação desenvolvido por CCVU, para obtenção das substâncias isoladas S1 a S13.

5.5 Elucidação estrutural

A substância **S11**, identificada como Friedelina foi obtida a partir do método de separação desenvolvido por CCVU para a reunião R3 (Fr 8 a 12). A fração analisada apresentou-se como um sólido branco cristalizado em forma de agulhas e possuindo solubilidade em DCM e CHCl_3 . Sua estrutura foi identificada a partir das informações espectrais de RMN ^1H , ^{13}C , uni e bidimensionais em conjunto com os dados relatados na literatura (ALMEIDA, 2011; MAHATO, 1994).

No espectro de RMN ^1H da substância **S11**, observou-se sinais de grupos metínicos, metilênicos e metílicos, sendo esse último grupo de sinais constituído por sete simpletos em δ_{H} 0,71 (s, 3H); δ_{H} 0,85 (s, 3H); δ_{H} 0,94 (s, 3H); δ_{H} 0,98 (s, 3H); δ_{H} 0,99 (s, 3H); δ_{H} 1,03 (s, 3H) e δ_{H} 1,17 (s, 3H), além de um duplete centrado em δ_{H} 0,86 (*d*, $J = 6$ Hz, 3H) (Apêndice 1 e 2, pág. 68 e 69). Um dos picos do duplete está sobreposto pelo sinal em δ_{H} 0,85 (s, 3H), essa sobreposição pode ser identificada no espectro de RMN ^1H devido a integral para o conjunto de sinais de δ_{H} 0,87 a δ_{H} 0,85 indicando uma relação de seis hidrogênios para esse grupo de sinais (Apêndice 2, pág. 69). O conjunto de singletos metílicos, juntamente com o sinal do duplete integrando para três hidrogênios são indicativos de esqueleto de triterpeno pentacíclico da série friedelano (figura 15, pág. 52).

No espectro de RMN ^{13}C , verificou-se trinta sinais, sendo que vinte e nove sinais são encontrados entre δ_{C} 6,8 e δ_{C} 59,4, região característica de carbonos metínicos, metilênicos e metílicos. O sinal mais desprotegido deste espectro é observado em δ_{C} 213,2, sinal típico de carbono cetônico. Já o sinal mais protegido do espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 6,8 é característico do carbono C – 23 do esqueleto friedelânico, sendo que este deslocamento tão baixo ocorre devido a proteção eletromagnética causada pelo efeito γ – gauche entre essa metila e a carbonila do carbono C – 3 (Apêndice 3, pág. 70). Esse conjunto de informações confirmam o esqueleto tipo friedelano para a substância **S11**.

O espectro de HMBC apresentou correlação entre o sinal de carbono cetônico em δ_{C} 213,2 com três sinais no espectro de RMN ^1H , o duplete metílico em δ_{H} 0,86 (*d*, $J = 6,6$ Hz, 3H); o quarteto centrado em δ_{H} 2,23 (*q*, $J = 6,5$ Hz, 1H) e dos multipletos em δ_{H} 2,23 (*m*, 1H) e δ_{H} 2,38 (*m*, 1H) com sinal em δ_{C} 213,2. Esses dados, juntamente com os dados obtidos por meio dos mapas de correlação heteronuclear a $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ HSQC

(Apêndice 4, pág. 71) e a outras correlações a $^{2,3}J_{C,H}$ HMBC (Apêndice 5, pág. 72), além da comparação com os dados da literatura (ALMEIDA, 2011; MAHATO, 1994) (Tabelas 10 e 11, págs. 54 e 55) foi possível atribuir o restante dos sinais referentes aos carbonos do triterpeno e confirmar que a substância **S11** correspondia ao triterpeno friedelina (Figura 16, pág. 53), composto este descrito pela primeira vez na espécie *Portulaca pilosa*.

A friedelina é um importante triterpeno pentacíclico, devido as suas propriedades biológicas descritas na literatura, como efeito antinociceptivo, anti-inflamatório, antiulcerogênicos e antimalárico (BAPELA, 2019; FARIAS et al., 2012; DE SOUZA FERRO et al., 2013; JIAO et al., 2007). Estudos recentes ainda reportam a capacidade da friedelina de reduzir a formação do edema induzido por carragenina na pata de ratos. Além disso, essa substância interfere nos níveis locais de IL – 6 e TNF – α , causando uma redução da inflamação gástrica em camundongos (ANTONISAMY et al., 2015).

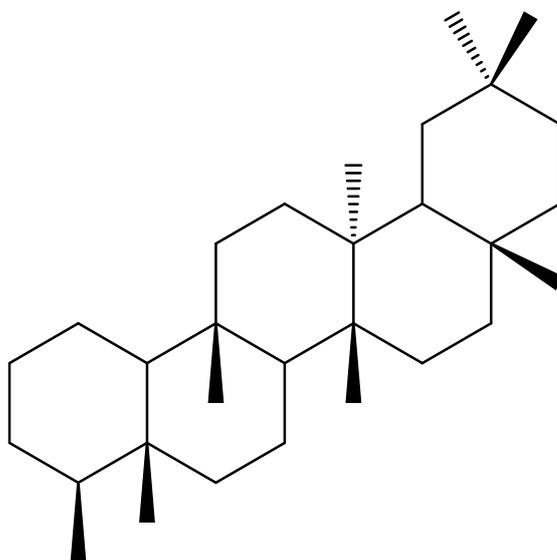


Figura 15 - Estrutura do esqueleto base de um triterpeno pentacíclico da série friedelano.

Fonte: Kvasnica et al. (2015)

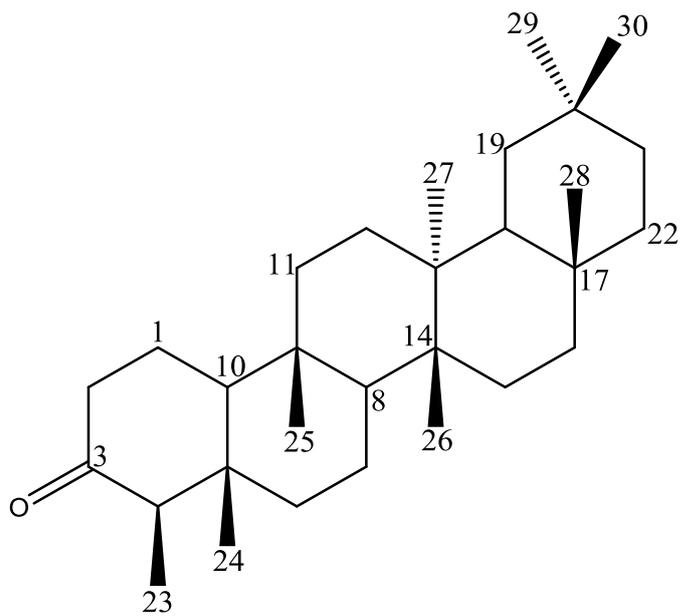


Figura 16 - Estrutura da friedelina

Tabela 11 - Dados espectrais de RMN 1H (400MHz) comparados com a literatura para a friedelina.

H	S1	Friedelina ^a
	(CDCl ₃)	(CDCl ₃)
	δ_H	δ_H
1a	1,96 (<i>m</i>)	1,96 (<i>m</i>)
1b	1,68 (<i>m</i>)	1,68 (<i>m</i>)
2a	2,38 (<i>m</i>)	2,39 (<i>ddd</i>)
2b	2,29 (<i>m</i>)	2,29 (<i>m</i>)
4	2,23 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	2,24 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)
6a	1,75 (<i>m</i>)	1,75 (<i>m</i>)
6b	1,27 (<i>m</i>)	1,27 (<i>m</i>)
7a	1,59 (<i>m</i>)	1,59 (<i>m</i>)
7b	1,47 (<i>m</i>)	1,47 (<i>m</i>)
8a	1,44 (<i>m</i>)	1,44 (<i>m</i>)
8b	1,39 (<i>m</i>)	1,39 (<i>m</i>)
10	1,55 (<i>m</i>)	1,55 (<i>m</i>)
11	1,38 (<i>m</i>)	1,38 (<i>m</i>)
12	1,35 (<i>m</i>)	1,35 (<i>m</i>)
15a	1,47 (<i>m</i>)	1,47 (<i>m</i>)
15b	1,27 (<i>m</i>)	1,27 (<i>m</i>)
16a	1,54 (<i>m</i>)	1,54 (<i>m</i>)
16b	1,36 (<i>m</i>)	1,36 (<i>m</i>)
18	1,56 (<i>m</i>)	1,56 (<i>m</i>)
19	1,37 (<i>m</i>)	1,37 (<i>m</i>)
21	1,49 (<i>m</i>)	1,49 (<i>m</i>)
22	1,48 (<i>m</i>)	1,48 (<i>m</i>)
23	0,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, 3H)	0,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H)
24	0,71 (<i>s</i> , 3H)	0,73 (<i>s</i> , 3H)
25	0,85 (<i>s</i> , 3H)	0,88 (<i>s</i> , 3H)
26	0,99 (<i>s</i> , 3H)	1,01 (<i>s</i> , 3H)
27	1,03 (<i>s</i> , 3H)	1,05 (<i>s</i> , 3H)
28	1,16 (<i>s</i> , 3H)	1,18 (<i>s</i> , 3H)
29	0,98 (<i>s</i> , 3H)	1,00 (<i>s</i> , 3H)
30	0,94 (<i>s</i> , 3H)	0,95 (<i>s</i> , 3H)

Fonte: ^aAlmeida, 2011

Tabela 12 - Dados espectrais de RMN 13C (100MHz) comparados a literatura para a friedelina.

C	S1	friedelina ^a
	(CDCl ₃)	(CDCl ₃)
	δ_c	δ_c
1	22,2	22,3
2	41,5	41,5
3	213,2	213,2
4	58,2	58,2
5	42,1	42,1
6	41,2	41,3
7	18,2	18,2
8	53,0	53,3
9	37,4	37,5
10	59,4	59,5
11	35,6	35,6
12	30,4	30,5
13	39,6	39,7
14	38,2	38,3
15	32,7	32,8
16	35,9	36,0
17	29,9	30,0
18	42,7	42,8
19	35,3	35,4
20	28,1	28,2
21	32,4	32,4
22	39,2	39,3
23	6,8	6,8
24	14,6	14,7
25	17,9	17,9
26	20,2	20,3
27	18,6	18,7
28	32,0	32,1
29	31,7	31,8
30	35,0	35,0

Fonte: ^aMahato, 1994

5.6 Avaliação da Toxicidade Aguda Oral

Por definição, a toxicidade aguda avalia o efeito nefasto produzido dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única. Neste contexto, a avaliação da toxicidade aguda fornece uma estimativa das propriedades tóxicas de uma substância, visando dar subsídios a cerca dos riscos à saúde resultantes de uma exposição de curta duração e servir de alicerce para estabelecer um regime posológico para pesquisas sobre toxicidade crônica (BRITO, 1994).

Segundo OGA e CAMARGO e BATISTUZZO (2008) a toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. Sendo a dose única utilizada para determinar a potência da substância em casos de ingestão ou envenenamento acidental e as doses múltiplas são usadas para avaliar os efeitos cumulativos, escolhendo a via de administração de acordo com o modo de exposição humana.

O teste de toxicidade aguda por dose fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), é um destes métodos alternativos, que avalia a toxicidade aguda oral, na qual se evita somente utilizar o critério morte dos animais como objetivo final e propõe a observação do aparecimento de sinais de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas, permitindo, desta forma, classificar as substâncias testadas de maneira compatível com o sistema empregado pela União Européia, o qual qualificava pelos valores de DL₅₀ oriundos do teste clássico de toxicidade aguda (OECD 420, 2001; VALADARES, 2006).

Neste trabalho, os animais foram submetidos a administração oral única do EEPp, na dose de 2000 mg/kg, pois como não houve mortes ou aparecimento de quaisquer sinais e sintomas de toxicidade com esta dose, evidenciado pelo *screening* hipocrático e pela avaliação da evolução ponderal, consumo de água e ração e ainda pelos resultados anátomo e histopatológicos, não houve necessidade de administração de doses menores do extrato.

A triagem farmacológica e comportamental (avaliação ou *screening* hipocrático) foi realizada de acordo com avaliação proposta por MALONE e ROBICHAUD (1983) modificado por BRITO (1994) (Anexo 1). Os animais tratados

com o EEPp (2000 mg/kg) não apresentaram quaisquer sinais de alteração do sistema nervoso central, autônomo ou motor, mudança de comportamento ou outros descrito no Anexo 1, durante todo o período de experimentação.

A administração do extrato também não alterou significativamente a variação de massa corporal, calculada pela diferença média entre o peso final e inicial dos animais, bem como consumo médio de ração e água, conforme mostra a Tabela 12 (pag. 59).

Além do exame morfológico externo, foram analisados macro e microscopicamente o cérebro e cerebelo, estômago, intestinos, mesentério, o coração, pulmão, fígado e rins de todos os animais. Características da pele e pelos normais (cor, textura, densidade, espessura, comprimento dos pelos), sem sinal de alterações nos membros, orelhas, língua, dentes e olhos.

Como observado nos resultados da análise anátomo e histopatológica, os pulmões revelaram arquitetura lobulares parenquimatosas preservadas, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. Nenhum sinal da presença de células envolvidas em processos inflamatórios e líquido no interior dos alvéolos.

Cérebro e cerebelo com estruturas celulares normais. Região da cárdia (estômago), com epitélio estratificado e porção glandular sem alterações na estrutura tecidual interior. Segmento do intestino delgado (íleo) estruturalmente normal.

Rins apresentando superfície externa envolvida por cápsula opalescente, que se destaca com facilidade do parênquima. Às secções seriadas, observa-se superfície compacta, pardacenta, com limites córtico-medulares nítidos e perfeita visualização pirâmides e cálices renais. Cotos ureterais representando remanescentes de amputação proximal. O estudo histológico mostrou arquitetura lobular e “população” glomerular preservadas. Nos glomérulos, tufo capilares e mesângio delicados estavam separados da cápsula de Bowman por espaço de retração artefactual. Não foram observadas lesões fibróticas, hemorrágicas ou áreas de enfarte.

O coração apresentava-se recoberto por epicárdio fino, transparente e delicadamente vascularizado, vasos da base proporcionais às dimensões do órgão e cavidades átrio-ventriculares revestidas por endocárdio liso e brilhante sendo ora

vazias, ora ocupadas por coágulos sanguíneos (alteração natural *post-mortem*). As válvulas atrioventriculares e semilunares (pulmonar e aórtica) tinham bordas livres. Ao exame microscópico, o tecido cardíaco mostrou-se também dentro dos limites da normalidade histológica. Também não houve sinais de inflamação, agregados linfocitários, necrose ou alterações circulatórias no fígado.

Assim, as análises histopatológicas não mostraram nenhuma alteração com particularidade de natureza toxicológica (degenerativa/necrótica, etc). As discretas alterações inflamatórias (fígado, estômago, rins, coração), quando esporadicamente encontradas, tanto em animais controles como nos testes, possuem caráter infeccioso preexistente, causadas provavelmente por algum parasita murino.

Tabela 13 - Resultados da variação de massa corporal média, consumo médio de ração e água por animal, realizados em camundongos fêmeas e machos, tratados com dose oral única (2000 mg/kg) do EEPp e observados durante 14 dias.

PARÂMETROS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Fêmeas ♀		Machos ♂	
	Controle	EEPp (2000 mg/kg)	Controle	EEPp (2000 mg/kg)
Varição média de massa corporal ^Δ (g)	1,51 ± 0,36	1,49 ± 0,27 ^{NS}	1,85 ± 0,47	1,97 ± 0,59 ^{NS}
Consumo médio de ração (g/dia/animal)	5,88 ± 0,38	5,56 ± 0,48 ^{NS}	5,81 ± 0,49	5,72 ± 0,46 ^{NS}
Consumo médio de água (mL/dia/animal)	8,00 ± 0,42	8,18 ± 0,54 ^{NS}	9,24 ± 0,42	8,89 ± 0,43 ^{NS}

Os valores estão expressos em Média ± Desvio Padrão da Média (n=5-10 animais).

* Significativo para $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (Teste "t" de Student)

^{NS} Não significativo em relação ao respectivo controle (Teste "t" de Student)

^Δ Peso final (após 14 dias) — Peso inicial dos animais

6 CONCLUSÃO

A avaliação do perfil fitoquímico e cromatográfico do extrato etanólico de *Portulaca pilosa* (EEPp), obtido por CCDAE, permitiu identificar a riqueza e diversidade química da planta, através da identificação de classes fitoquímicas importantes, como terpenos / esteroides, compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides.

A avaliação qualitativa da capacidade antioxidante do extrato, via autografia em CCDAE, permitiu identificar o acentuado potencial antioxidante do extrato EEPp no combate aos radicais livres, bem como, sugerindo um possível efeito em outras patologias que envolvam a produção de radicais livres e o estresse oxidativo, como aqueles envolvidos em processos inflamatórios, carcinogênicos, cardiovasculares, dentre outros.

O estudo fitoquímico do extrato EEPp, permitiu o isolamento de 13 metabólitos secundários. Análises realizadas por CCDAE nos mesmos utilizando solução de VAS, apresentaram indicativo de terpenos e esteroides. Problemas técnicos associados a baixa quantidade de amostra e logística, até o momento, impossibilitaram a identificação das substâncias S1 a S10, S12 e S13, porém, as mesmas estão em processo de elucidação estrutural e integrarão publicações futuras.

Dados espectrais obtidos por RMN ^1H e ^{13}C , além da comparação com aqueles da literatura, possibilitaram a elucidação estrutural da substância **S11**, como sendo o terpeno pentacíclico Friedelina, substância esta isolada pela primeira vez na espécie *P. pilosa* e amplamente relatada na literatura com diversas propriedades biológicas, como o efeito antinociceptivo, anti-inflamatório, antiulcerogênicos e antimalárico.

Testes toxicológicos *in vivo* realizados em camundongos, não demonstraram quaisquer sinais de alterações do sistema nervoso central, autônomo ou motor, mudança de comportamento durante todo o período de experimentação, mesmo quando utilizado dosagens de 2000 mg / Kg, ou seja, o extrato EEPp não apresentou efeito toxicológico significativo.

Sendo assim, esta dissertação contribui para o estudo fitoquímico da espécie *Portulaca pilosa*, bem como, o seu importante potencial farmacológico associado a baixa toxicidade.

7 REFERÊNCIAS

AGUIAR A.A.C., SANTOS R.M., FIGUEIREDO F.J.,CORTOPASSI W.A., PIMENTEL A.S., FRANÇA T.C., MENEGHETTI M.R., KRETTLI A.U. Antimalarial activity and mechanisms of action of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. **Plos One**, 2012.

ALMEIDA, Maria de Fátima Oliveira et al. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). **Quim Nova**, v. 34, n. 7, p. 1182-7, 2011.

ALVES, M. J. Q. F. Estudos pré-clínicos com plantas medicinais: base para a fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 181, n. 1, p.1-20, 24 mar. 2016.

ANTONISAMY, Paulrayer et al. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms.**European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 167-175, 2015.

ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Gingko, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.44, n.4, p.824-835, 2001.

BALBINOT, S.; VELASQUEZ, P.G.; DÜSMAN, E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro – Paraná. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.15, n.4, p.632-638, 2013.

BAPELA, M. Johanna et al. ¹H NMR-based metabolomics of antimalarial plant species traditionally used by Vha-Venda people in Limpopo Province, South Africa and isolation of antiplasmodial compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 228, p. 148-155, 2019.

BARATA, Lauro Euclides Soares et al. Plantas Medicinais Brasileiras II: *Portulaca pilosa* L. (Amor-crescido). **Revista Fitos**, São Paulo, v. 4, n. 1, p.126-128, mar. 2009.

BARROS, Albenise Santana Alves et al. Study of the non-clinical healing activities of the extract and gel of *Portulaca pilosa* L. in skin wounds in wistar rats: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 96, p.182-190, dez. 2017.

BARROS, S.B.M., DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 61-70.

BAURIN, Nicolas et al. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 82, n. 2-3, p.155-158, out. 2002

BOCHNER, R.I.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

BRANDAO, M.G.L.; GRANDI, T.S.M.; ROCHA, E.M.M.; SAWYER, D.R.; KRETTLI, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **J. Ethnopharmacology**. v.36, p 175-182, 1992.

BRANDAO, N. L. D. ***Portulaca pilosa* L. e *Geissospermum vellossi*. Estudos botânicos, farmacognósticos, fitoquímicos e atividades biológicas**. 2012. p. 127. Dissertação de mestrado (mestranda em Ciências Farmacêuticas) instituto de ciências da saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

BRITO, A.S. **Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo**. Campina, SP: Editora da UNICAMP, 1994.

CÁUPER, G.C.B. **Biodiversidade Amazônica – volume I**. Centro Cultural dos Povos da Amazônia – CCPA. Manaus – Am.p.162, 2006.

CHOMA, I. M.; GRAZELAK, E. M. Byoautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p.2684-2691, 2011.

COELHO, Alexa Araujo de Oliveira Paes; GIULIETTI, Ana Maria. O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.655-670, set. 2010.

DE SOUZA FERRO, Janylle Nunes et al. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. **Chinese journal of natural medicines**, v. 11, n. 4, p. 385-390, 2013.

FARAG, Mohamed Ali; SHAKOUR, Zeinab T. Abdel. Metabolomics driven analysis of 11 *Portulaca* leaf taxa as analysed via UPLC-ESI-MS/MS and chemometrics. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 161, p.117-129, maio 2019.

FARIAS, José Alex C. et al. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *Clusia nemorosa* both in vitro and in vivo animal models. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 764-771, 2012.

FLOR, Alessandra Simone Santos de Oliveira; BARBOSA, Wagner Luiz Ramos. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá - PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 41, p.757-768, 2015.

GATEA, Florentina et al. Chemical constituents and bioactive potential of *Portulaca pilosa* L vs. *Portulaca oleracea* L. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.1516-1527, 20 mar. 2017.

GIULIETTI, Ana Maria; COELHO, Alexa Paes. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: **Portulacaceae**. *Rodriguésia*, [s.l.], v. 69, n. 1, p.197-203, mar. 2018.

HARBORNE, J.B. **Classes and functions of secondary products**, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. London: Imperial College, p.1-25, 1999.

IRANSHAHY, Milad et al. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Portulaca oleracea* L. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 205, p.158-172, jun. 2017.

JIAO, Jingjing et al. Antihyperlipidemic and antihypertensive effect of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings and vasodilator effect of friedelin on phenylephrine-induced vasoconstriction in thoracic aortas of rats. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 12, p. 1135-1141, 2007.

KRETTLI A.U.; ADEBAYO J.O.; KRETTLI L. G. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. **Curr Drug Targ**, v. 10, p. 261–270, 2009.

KRETTLI A.U.; ANDRADE V.F.; NETO-B. M.G.L; FERRARI W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1033–1042, 2001.

MAHATO, Shashi B.; KUNDU, Asish P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The Pharmacological Evaluation of Natural Products – General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 8, p.127-147, 1983.

MARIZ, S. R. Estudo **Toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 2007. p.186. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2007.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MATSUTANI, Guilherme Costa. **Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de fármacos dirigidos de antimetabólitos de serina**. 2008. Tese (Doutorado em Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; MENDONÇA, L. C. V. M.; VIEIRA, A. B. R.; VIEIRA, J. M. S. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de duas plantas utilizadas na medicina popular do Pará**. In SIMPOSIO DE MICROBIOLOGIA, 2009. Resumo, 2011.

MENDES, Lorena Paula Mercês et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 1, p.121-125, jun. 2011.

MEYER. O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicol. Letters**. V- 140, p. 21-30. 2003.

MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, New York, v. 51, n. 3, p. 212-237, 1997.

OCAMPO, Gilberto. Morphological characterization of seeds in Portulacaceae. **Phytotaxa**, [s.l.], v. 141, n. 1, p.1-24, 30 out. 2013.

OGA, S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 515 p.

OGA S, CAMARGO M. M. A, BATISTUZZO J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3^a ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

OHSAKI, Ayumi et al. A diterpenoid from *Portulaca pilosa*. **Phytochemistry**, [s;l], v.40, p.205-207, 1995.

OHSAKI, Ayumi et al. Clerodane diterpenoids from the roots of *Portulaca pilosa* L. **Phytochemistry**, [s.l.], v.30, p.4075-4077, 1991.

OHSAKI, Ayumi et et al. Structure of pilosanones A and B: novel diterpenoides with a bicyclo[5.4.0]undecane skeleton from *Portulaca pilosa* L. **Journal of the Chemical Society**, Chemical Communication, [s.l.], v.3, p.151-1533, 1987.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**. OECD guideline for testing of chemicals, n. 420. Adopted: 17th December 2001.

PINHEIRO, W. B. S. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antioxidante do resíduo madeireiro de *Bagassa guianensis* (MORACEAE)**. 2016. p. 40. Dissertação de mestrado (mestrando em química) Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas por comunidades do município de Igarapé Miri, Pará – Etnofármacia do município de Igarapé Mirim –PA**. 2008. p. 98. Dissertação de (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Instituto de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

Portulacaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20625>>. Acesso em: 09 Out. 2019.

REICH E.; SCHIBLI A. **High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants**. Thieme Medical Publisher Inc.; New York, NY: 2006. p. 234–237.

REVILLA, Juan. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: Sebrae-am: Inpa, 2002.

SAKAI, Naomi et al. Portuloside A, a monoterpene glucoside, from *Portulaca oleracea*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.1625-1628, ago. 1996.

SILVA, F. A.; PETROVICK, P. R.; LANGELOH, A. Efeito do extrato seco liofilizado de *Portulaca pilosa* L. (Portulacaceae) sobre a reatividade uterina a oxitocina de ratas Wistar. **Revista Acta Farnz. Bonaerense**, v. 20, nº1, p.47-52, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição. Editora Universidade/UFRGS. Porto Alegre. 2010.

TÔRRES, A.R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.2, p.199-306, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer, 2 ed., Munchen, Germany, 2001.

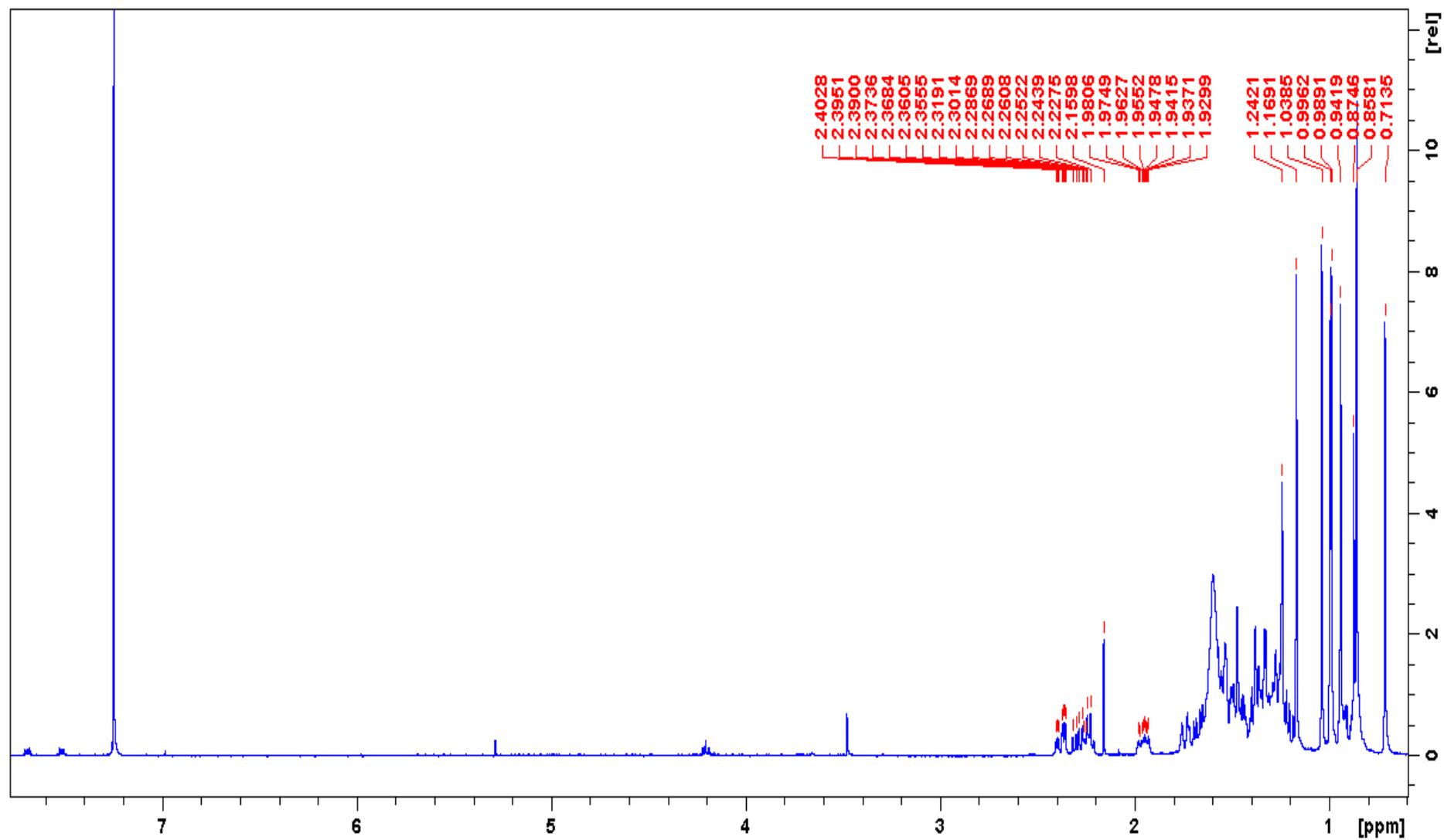
WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. **Chromatographic science series**, volume 99, 2008.

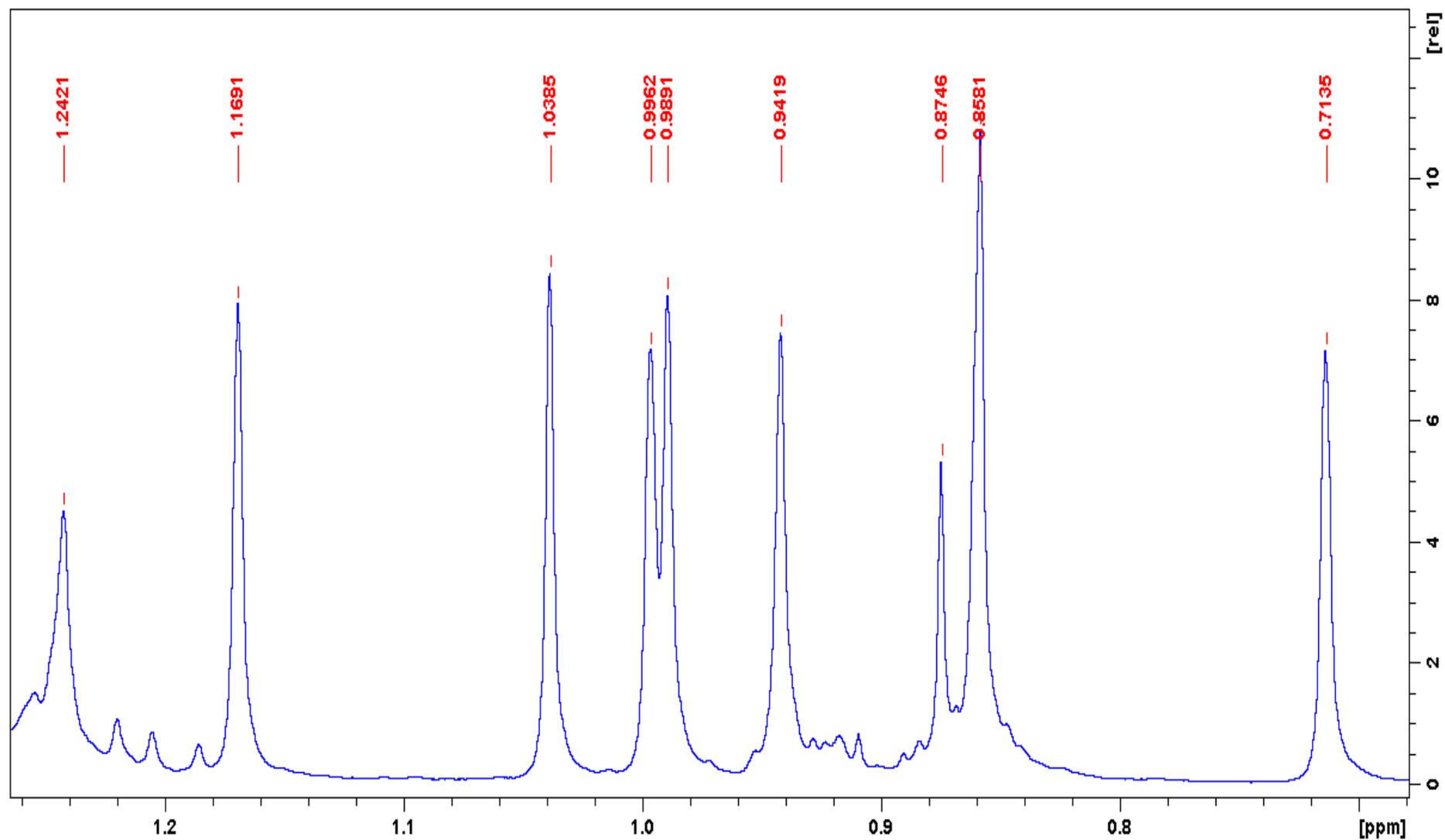
XIANG, Lan et al. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 66, n. 21, p.2595-2601, nov. 2005.

YAN, Jian et al. Homoisoflavonoids from the medicinal plant *Portulaca oleracea*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 80, p.37-41, ago. 2012.

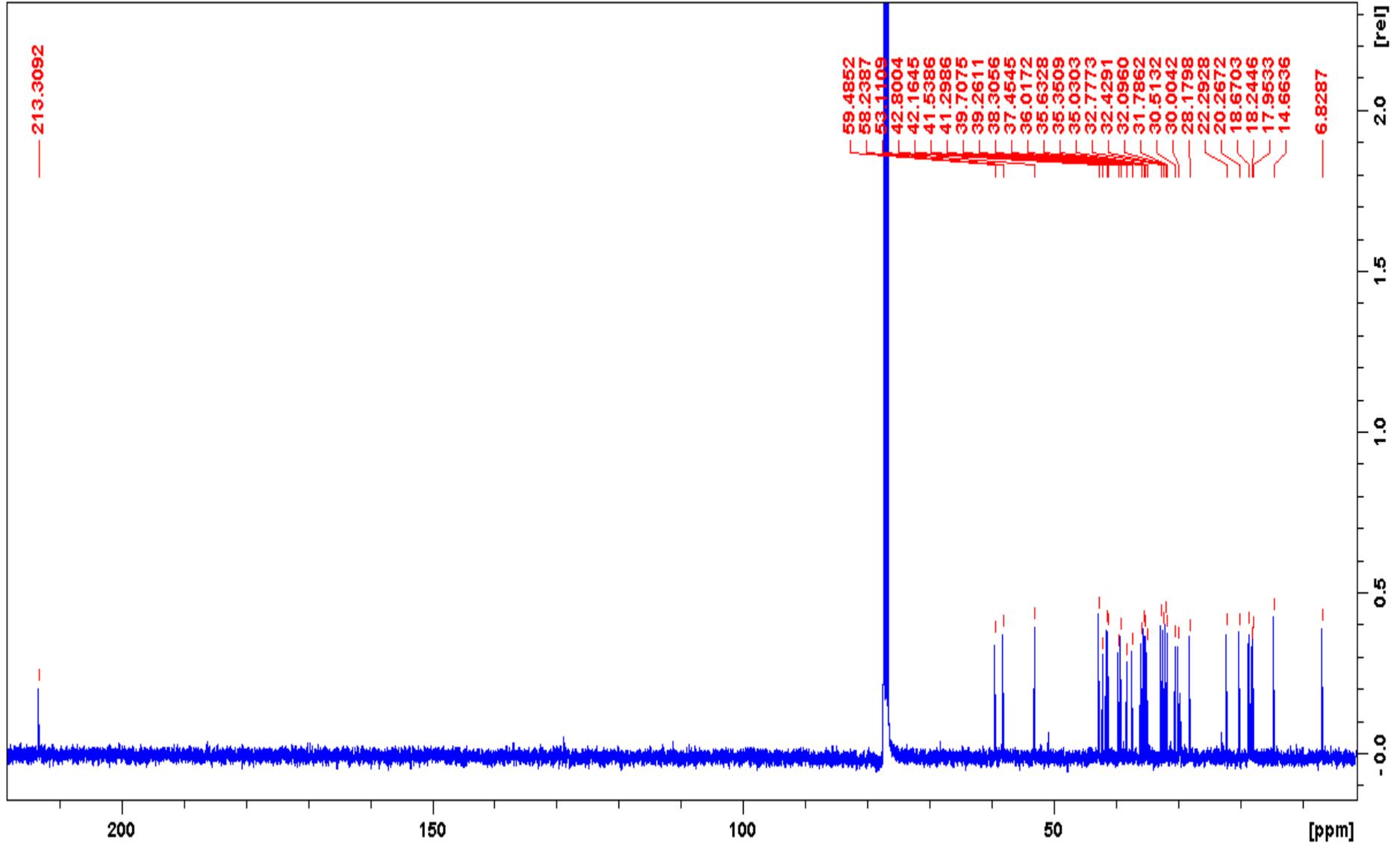
YANG, Xu et al. New flavonoids from *Portulaca oleracea* L. and their activities. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 127, p.257-262, jun. 2018.

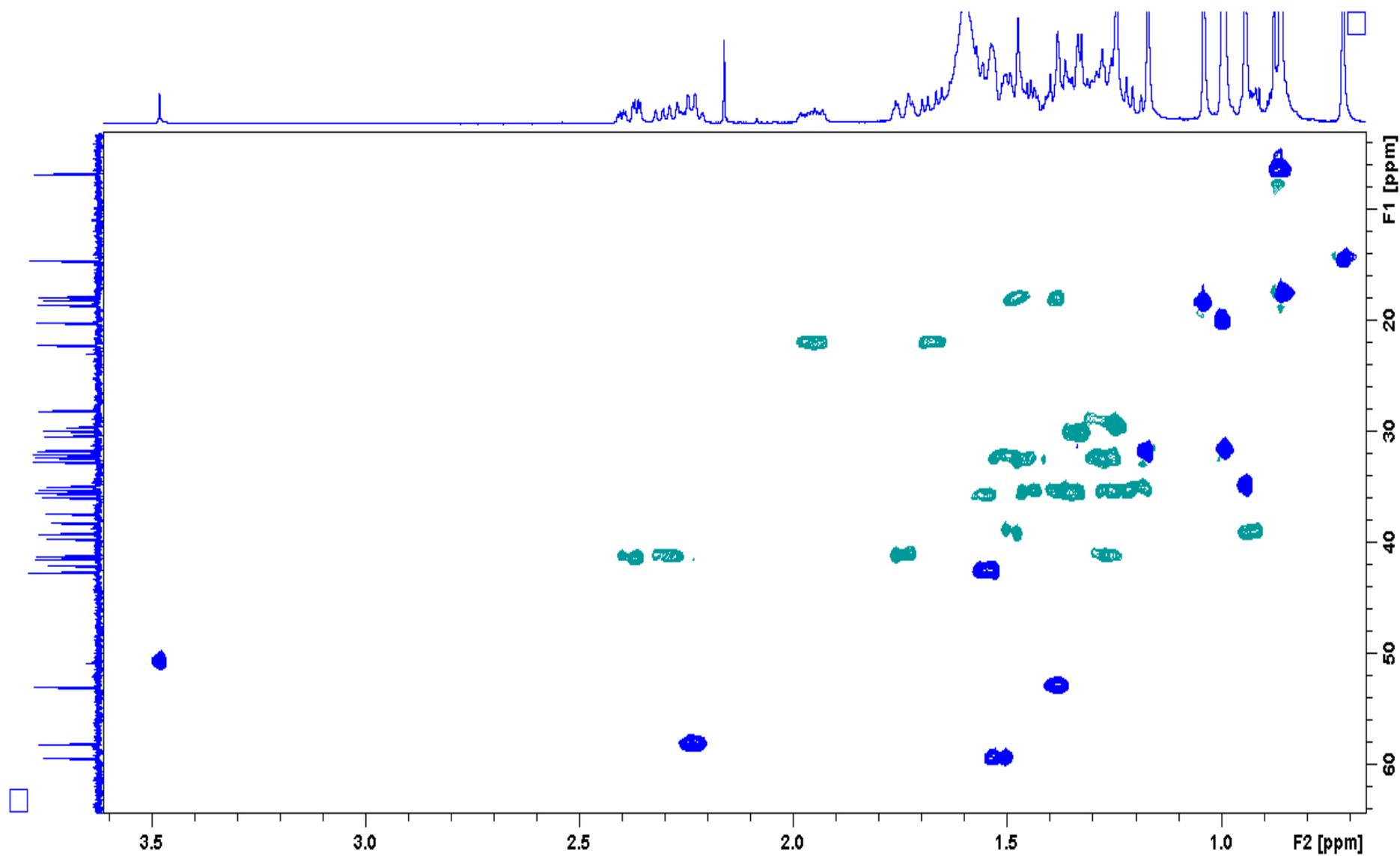
ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.; GHERARDI-GOLDSTEINE. Toxicidade de efluentes industriais da bacia do rio Piracicaba. **Revista Ambiente**. Vol. 2, p:39-42. 1998.

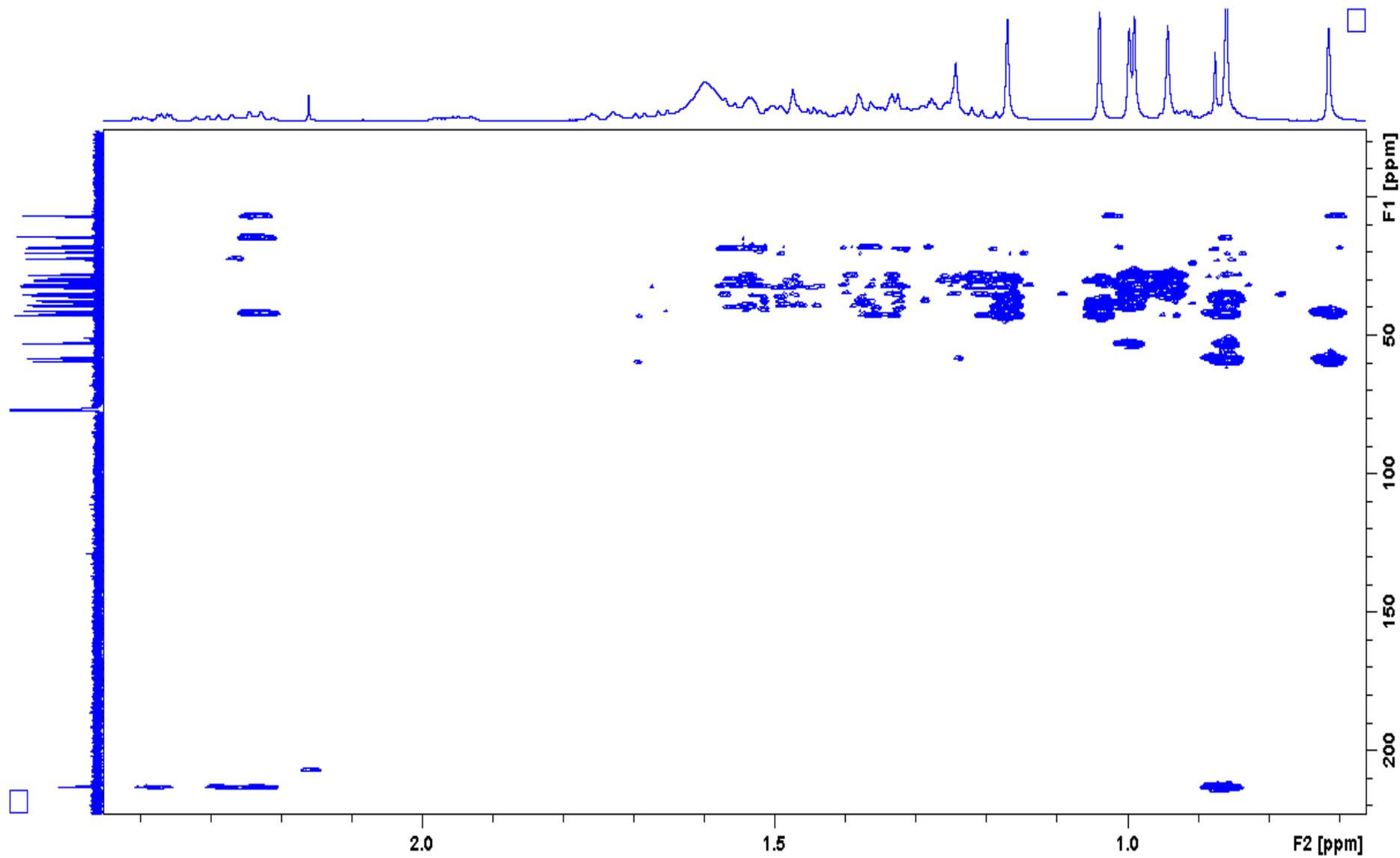
APÊNDICE 1 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBTÂNCIA S11, CDCl_3 – 400 MHz.

APÊNDICE 2 – EXPANSÃO DOS SINAIS ENCONTRADOS NO ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl_3 – 400 MHz

APÊNDICE 3 - ESPECTRO DE RMN ¹³C DA SUBSTÂNCIA S11, CDCI₃ – 100 MHz



APÊNDICE 4 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl_3 

APÊNDICE 5 - MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DA SUBSTÂNCIA S11, CDCl₃

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA/UFPA



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação toxicológica do extrato etanólico de *Portulaca pilosa* L. (Portulacaceae)", protocolada sob o CEUA nº 1385090218 (ID 000775), sob a responsabilidade de **Flávio Vasconcelos e equipe; Maria Fani Dolabela; Rafael Alves Cardoso; Washington Luiz Assuncao Pereira; Dayse Lúcia do Nascimento Brandão** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 22/03/2018.

We certify that the proposal "Toxicological assessment of the ethanolic extract from *Portulaca pilosa* L. (Portulacaceae)", utilizing 48 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 1385090218 (ID 000775), under the responsibility of **Flávio Vasconcelos and team; Maria Fani Dolabela; Rafael Alves Cardoso; Washington Luiz Assuncao Pereira; Dayse Lúcia do Nascimento Brandão** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 03/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2018 a 03/2019** Área: **Farmácia**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **5 a 9 semanas**

N: **48**

Linhagem: **suiços**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/Instituto de Ciências da Saúde/UFPA (Câmpus Guamá)

Belé, 23 de junho de 2018

M^{te} Viviana B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Joia de Mello

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará