

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LÊTRAS DE RIBEIRÃO PRÊTO  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ENSAIOS BIOLÓGICOS E/OU FARMACOLÓ-  
GICOS DE VERNONIA EREMOPHILA MART. (ASTERACEAE).

MARIA CRISTINA BONASSOLI VERDI ALARCON  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1989

Este trabalho foi realizado  
sob a orientação do Prof.  
Dr. João Luis Callegari  
Lopes.

A José Carlos  
Rafinha  
e  
Leleco

Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof Dr. João Luis Callegari Lopes, pela orientação, apoio e amizade.

Ao Prof Dr. Hermógenes de Freitas Leitão Filho pela identificação do vegetal estudado.

Aos Profs. Drs. Werner Herz e John Mann pela colaboração na obtenção de alguns espectros e discussões.

Aos Profs. Drs. Fernando Steel Cruz, Cecília Pereira de Souza Rodrigues, Astréa Menucci Giesbrecht e Glória E. Peto de Souza pela realização dos ensaios biológicos e/ou farmacológicos.

Aos Profs. Drs. Diones Aparecida Dias e Gil Valdo José da Silva pelas sugestões e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Faculdade De Filosofia, Ciências e Letras e do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambas de Ribeirão Preto-USP, pela colaboração e amizade.

Aos Técnicos Virgínia, Djalma, Silvana e Pedro pela obtenção dos espectros.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela amizade e carinho.

A José Carlos Porto, Elcio Magnani e funcionários da SMAR-APD, pela digitação da dissertação.

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas de estudo concedidas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

i

	Página
Índice de esquemas .....	iv
Índice de tabelas .....	v
Índice de figuras .....	vi
Símbolos e abreviaturas .....	viii
Resumo .....	x
Abstract .....	xi
1 - Introdução .....	001
1.1 - Biossíntese de flavonóides .....	005
1.2 - Biossíntese de Terpenóides .....	008
1.3 - Lactonas Sesquiterpênicas .....	014
2 - Proposição .....	018
3 - Descrição do vegetal .....	020
4 - Resultados e discussão .....	022
4.1 - Análise da substância V.e.A (glaucolido-B)	023
4.2 - Análise dos produtos das reações de hidro- genação/hidrogenólise do glaucolido-B ....	025
4.2.1 - Análise do glaucolido-B-H <sub>1</sub> (13-desaceto- xi-glaucolido-B) .....	026
4.2.2 - Análise do glaucolido-B-H <sub>2</sub> (13-diidro- desacetoxi-glaucolido-B) .....	027
4.3 - Análise de V.e.B (3,7-dimetoxi-5,3',4'-tri- idroxiflavona) .....	028
4.4 - Análise de V.e.C (8 $\alpha$ -acetoxi-2-epi-verno- margolido) .....	034
4.5 - Análise de V.e.C (8 $\alpha$ -hidroxi-2-epi-verno- margolido-1,4-ciclosemiacetal) .....	038
4.6 - Avaliação da Atividade Biológica dos ex- tratados vegetais e substâncias isoladas....	071

4.6.1 - Ensaio de ação quimioprolático sobre a esquistossomose .....	071
4.6.1.1 - Avaliação da atividade moluscicida sobre caramujos adultos .....	071
4.6.1.2 - Avaliação da atividade sobre desovas de caramujos .....	073
4.6.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana ..	074
4.6.3 - Avaliação da atividade sobre <u>Trypanosoma Cruzi</u> .....	076
4.6.4 - Avaliação da atividade anti-edematogênica .....	076
4.6.5 - Avaliação da atividade antinociceptiva .	077
5 - Parte Experimental .....	079
5.1 - Equipamentos e materiais utilizados .....	080
5.2 - Coleta .....	082
5.3 - Extração .....	082
5.4 - Fracionamento do extrato bruto em acetato de etila de <u>V. eremophila</u> .....	082
5.5 - Fracionamento do extrato metanólico de <u>V. eremophila</u> .....	084
5.6 - Purificação das substâncias isoladas .....	086
5.6.1 - Purificação da substância V.e.A .....	086
5.6.2 - Purificação da substância V.e.B .....	087
5.6.3 - Purificação das substâncias V.e.C e V.e.C .....	088
5.7 - Reação de hidrogenação/hidrogenólise da substância V.e.A e purificação dos produtos .....	088

5.8 - Dados Físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas .....	089
5.8.1 - Glaucólido-B (V.e.A) .....	089
5.8.2 - 13-desacetoxi-glaucólido-B (glaucólido-B-H <sub>1</sub> ) .....	090
5.8.3 - 13-diidrodesacetoxi-glaucólido-B (glaucólido-B-H <sub>2</sub> ) .....	091
5.8.4 - 3,7-dimetoxi-5,3',4'-triidroxiflavona (V.e.B) .....	091
5.8.5 - 8 $\alpha$ -acetoxi-2-epi-vernomargólido (v.e.C) .....	092
5.8.6 - 8 $\alpha$ -hidroxi-2-epi-vernomargólido-1,4-ciclosemiacetal .....	093
5.9 - Ensaios Biológicos .....	094
5.9.1 - Verificação da atividade moluscida sobre caramujos adultos e desovas .....	094
5.9.2 - Verificação da atividade antimicrobiana .....	095
5.9.3 - Inibição do crescimento de <u>T. Cruzi</u> .....	096
5.9.4 - Estudo da atividade antinociceptiva ....	096
5.9.5 - Estudo da atividade anti-edematogênica .	097
6 - Conclusões .....	099
7 - Referências bibliográficas .....	103

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

iv

	Página
Esquema 1 - Biossíntese de Flavonóides .....	006
Esquema 2 - Biossíntese de IPP e DMAPP .....	009
Esquema 3 - Biossíntese de terpenóides .....	011
Esquema 4 - Ciclização de esqueletos sesquiterpênicos .....	012
Esquema 5 - Formação do anel lactônico .....	013
Esquema 6 - Formação dos tipos de esqueletos de lactonas sesquiterpênicas da família Asteraceae .....	017
Esquema 7 - Fragmentações no EM da substância V.e.B	033



# ÍNDICE DE TABELAS

v

	Pagina
Tabela I - Resultados dos ensaios de ação moluscicida sôbre caramujos adultos ( <u>B.Glabrata</u> ) .....	073
Tabela II - Resultados de ação moluscicida sôbre desovas de ( <u>B.Glabrata</u> ) .....	074
Tabela III - Resultados de atividade antimicrobiana	075
Tabela IV - Fracionamento do extrato bruto em acetato de etila .....	083
Tabela V - Frações reunidas após o fracionamento mencionado na tabela IV .....	084
Tabela VI - Fracionamento do extrato bruto metanólico .....	085
Tabela VII - Frações reunidas após o fracionamento mencionado na tabela VI .....	086

# ÍNDICE DE FIGURAS

vi

	Pagina
Fig. 01 - Espectro na região do IV de V.e.A.....	040
Fig. 02 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de V.e.A..	041
Fig. 03 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (20MHz)BB de V.e.A.....	042
Fig. 04 - EM de V.e.A.....	043
Fig. 05 - Espectro na região do IV de glaucolido-B-H	044
Fig. 06 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de glaucolido-B-H .....	045
Fig. 07 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com desacoplamento de glaucolido-B-H .....	046
Fig. 08 - Espectro na região do IV de glaucolido-B-H	047
Fig. 09 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de glaucolido-B-H .....	048
Figs.10-12 - Espectros de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com desacoplamentos de glaucolido-B-H .....	49-51
Fig. 13 - Espectro na região do IV de V.e.B.....	052
Fig. 14 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de V.e.B.	053
Fig. 15 - Espectros na região do UV de V.e.B.....	054
Fig. 16 - EM de V.e.B.....	055
Fig. 17 - Espectro na região do IV de V.e.C.....	056
Fig. 18 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de V.e.C	057
Fig. 19 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de V.e.C	058
Fig. 20 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz, DMSO-d <sub>6</sub> + D <sub>2</sub> O) de V.e.C.....	059
Figs.21-23 - Espectros de RMN <sup>1</sup> H (200MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) com desacoplamentos de V.e.C.....	60-62
Fig. 24 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz, DMSO-d <sub>6</sub> + D <sub>2</sub> O) com desacoplamento de V.e.C.....	063

Fig. 25 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50MHz)BB de V.e.C.....	064
Fig. 26 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50MHz)DEPT de V.e.C.....	065
Fig. 27 - Espectro na região do IV de V.e.C .....	066
Fig. 28 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, DMSO-d <sub>6</sub> + CDCl <sub>3</sub> ) de V.e.C .....	067
Fig. 29 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, DMSO-d <sub>6</sub> + CDCl <sub>3</sub> + D <sub>2</sub> O) de V.e.C .....	068
Fig. 30 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (80MHz, CD <sub>3</sub> OD) de V.e.C ..	069
Fig. 31 - EM de V.e.C .....	070

Acetil - CoA	- acetil coenzima - A
C.C.D.	- cromatografia em camada delgada.
C.C.P.	- cromatografia em camada preparativa.
C.C.	- cromatografia em coluna.
DMSO-d <sup>6</sup>	- dimetil sulfoxido deuterado.
CDCl <sub>3</sub>	- clorofórmio deuterado.
D <sub>2</sub> O	- água deuterada.
CD <sub>3</sub> OD	- metanol deuterado.
IV	- Infravermelho.
UV	- Ultravioleta.
RMN <sup>1</sup> H	- Ressonância Magnética Nuclear de Próton.
RMN <sup>13</sup> C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13.
BB	- Broad band.
DEPT	- Distortionless enhancement by polarization transfer.
u.m.a	- unidades de massa atômica.
m/z	- relação massa-carga.
EM	- Espectro de Massas.
PP	- Pirofosfato.
M <sup>+</sup>	- íon molecular.
PtO <sub>2</sub>	- óxido de platina.
s	- singleto.
d	- dubleto.
dd	- duplo dubleto.
t	- tripleto.
q	- quadrupleto.
m	- multipleto.
l	- largo.

F	- forte.
f	- fraco.
md	- médio.
Me	- metil.
máx.	- máximo.
J	- constante de acoplamento (Hz).
TMS	- tetrametilsilano.
$\delta$	- deslocamento químico (ppm).
$\nu$	- número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

A presente dissertação descreve o isolamento e a elucidação estrutural de constituintes químicos presentes nos extratos em acetato de etila e em metanol de Vernonia eremophila (Vernonieae, Asteraceae), bem como os resultados de ensaios biológicos e/ou farmacológicos realizados com extratos brutos, substâncias isoladas e produtos de reações de uma dessas substâncias.

Do extrato em acetato de etila foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas: glaucolido-B, 8  $\alpha$ - acetoxi-2-epi-vernomargolido, 8  $\alpha$ - hidroxí-2-epi-vernomargolido-1,4-ciclosemiacetal e o flavonol 3,7-dimetoxi-5,3',4'-triidroxiflavona. A substância 8  $\alpha$ - acetoxi-2-epi-vernomargolido não foi reportada anteriormente na literatura.

Do extrato em metanol foi também isolado o flavonol 3,7-dimetoxi-5,3',4'-triidroxiflavona.

O isolamento dos constituintes químicos foi efetuado empregando-se técnicas cromatográficas, enquanto a elucidação estrutural envolveu métodos espectroscópicos usuais (IV<sup>1</sup>UV, RMN de H e C e EM).

Foram realizados ensaios para avaliação de atividade antimicrobiana frente a alguns microorganismos; atividade moluscicida sobre formas adultas e embriões de Biomphalaria glabrata; atividade sobre Thrypanosoma cruzi, atividade antinociceptiva e atividade anti-edematogênica.

This dissertation describes the isolation and structural elucidation of the chemical constituents present in the ethyl acetate and methanol extracts of Vernonia eremophila (Vernonieae, Asteraceae) as well as the results of biological and/or pharmacological tests carried out on crude extracts, isolated substances and reaction products obtained from one of these.

From the ethyl acetate extract, were isolated the sesquiterpene lactones, glaucolide-B, 8  $\alpha$ -acetoxy-2-epi-vernomargolide, 8  $\alpha$ -hydroxy-2-epi-vernomargolide-1,4-cyclohemiacetal and the flavonol 3,7-dimethoxy-5,3',4'-trihydroxyflavone. The substance 8  $\alpha$ -acetoxy-2-epi-vernomargolide has not previously reported in the literature.

From the methanol extract, the flavonol 3,7-dimethoxy-5,3',4'-trihydroxyflavone was also isolated.

The isolation of the chemical constituents was carried out using chromatographic techniques while the structural elucidation involved spectroscopic methods (IR, UV, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR and MS).

Tests were carried out to evaluate antimicrobial activity against several microorganisms; molluscicidal activity against adult and embryonic forms of Biomphalaria glabrata; activity against the parasite Trypanosoma cruzi as well as antinociceptive and anti-edematogenic activity.

1-INTRODUÇÃO:  
5



A preparação de alimentos, corantes e medicamentos, entre outros, são exemplos da utilização pelo homem, dos produtos naturais de origem vegetal e animal. Entretanto, pode-se dizer que somente com o desenvolvimento de métodos de separação e purificação de substâncias, passou a existir efetivamente uma química de produtos naturais.

Paralelamente, o desenvolvimento das técnicas de análise estrutural, antes realizada principalmente por degradação química, permitiu que estruturas mais complexas fossem elucidadas.

Desta forma, à medida que os métodos espectroscópicos de análise foram sendo aperfeiçoados, um número cada vez maior de substâncias foi sendo analisado e identificado, hoje estima-se que este número esteja por volta de 30.000 (1).

Entre as várias famílias do reino vegetal, a Asteraceae é sem dúvida uma das maiores, dividida em 13 tribos, com mais de 1.000 gêneros e cerca de 23.000 espécies (2,3,4), sendo o Brasil considerado uma das regiões de dispersão de espécies desta família.

Espécies de Asteraceae foram e vem sendo muito utilizadas na medicina popular. São citadas na literatura como drogas espasmolíticas, anti-inflamatórias, coleréticas, anti-hepatotóxicas, antibióticas, fungistáticas, virostáticas e anti-helmínticas (5,6,7).

Sob o ponto de vista econômico, plantas desta família têm sido muito utilizadas como plantas ornamentais (8,9), alimento (6,8), plantas aromáticas (9), inseticidas (9), fontes de borracha (9) e madeira (8).

Uma das treze tribos que compõem a família Asteraceae é a Vernoniaeae, que possui cerca de 70 gêneros e 1.300 espécies, dentre estas, cerca de 1.000 são do gênero Vernonia e boa parte encontra-se no Brasil (8,9,10).

Uma das características deste gênero é a grande frequência de ocorrência de lactonas sesquiterpênicas, em suas espécies, principalmente da classe dos germacranolidos. Espécies do Novo e Velho Mundo (América e África) podem ser distinguidas com base na sua complexidade das estruturas destas lactonas, pois as espécies do Novo Mundo são mais simples (9). Outra característica é a diversidade encontrada na classe dos compostos flavonóidicos, pois as espécies do Novo Mundo são ricas em flavonas e flavonóis, enquanto aquelas do Velho Mundo são em flavonas. Outras classes de substâncias naturais encontradas no gênero Vernonia, porém com menor frequência são os diterpenóides, triterpenóides, esteróides e compostos acetilênicos, sendo que os alcalóides são de ocorrência limitada.

O fato das substâncias naturais apresentarem em geral, centros quirais bem definidos tem levado um número cada vez maior de químicos orgânicos sintéticos a utilizá-las como material de partida para novas sínteses.

Outros aspectos da química de produtos naturais que tem merecido uma grande atenção, são a biossíntese e a quimiosistemática, desta forma procurando esclarecer os caminhos metabólicos e a inter-relação entre as várias famílias vegetais.

Finalmente, a rápida devastação que vem sofrendo nossa flora, exige dos químicos de produtos naturais, a

máxima dedicação no sentido de determinar a composição química de nossas espécies nativas, antes que verdadeiros laboratórios naturais desapareçam sob a ação de serras e machados.

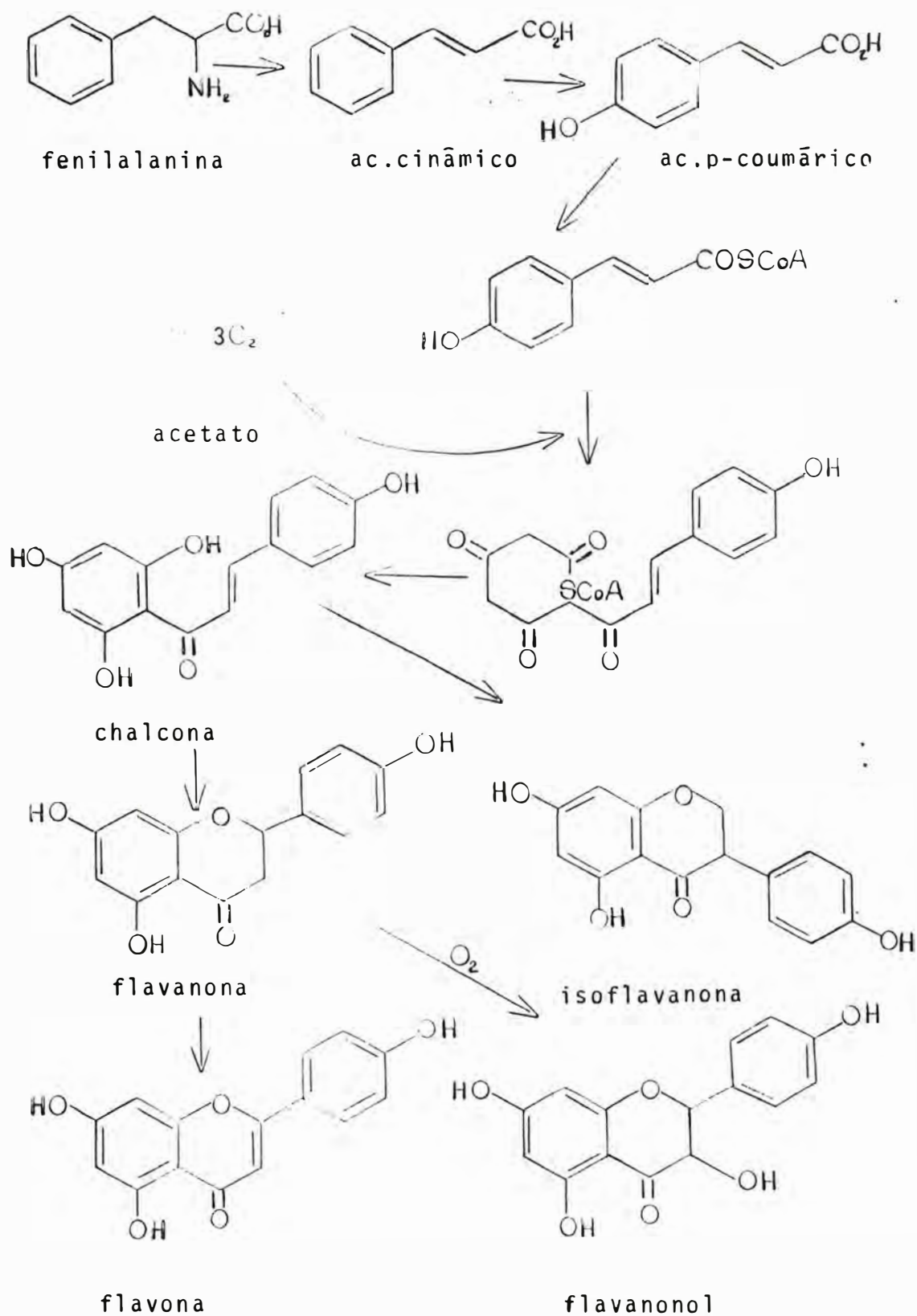
Os flavonóides constituem uma classe de substâncias bastante difundida na família Asteraceae.

Como um dos responsáveis pela coloração das flôres, exerce um importante papel no processo de polinização, funcionando como um atraente de pássaros e insetos, participando então da inter-relação entre animais e plantas. Participa também do processo de defesa do vegetal sob a forma de fitoalexinas (43).

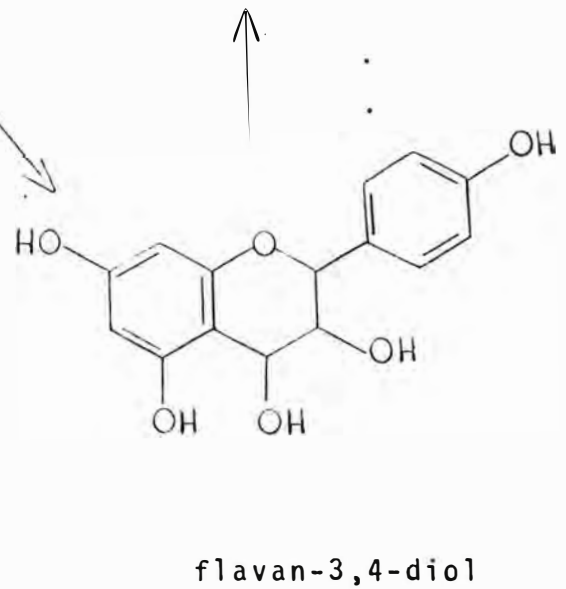
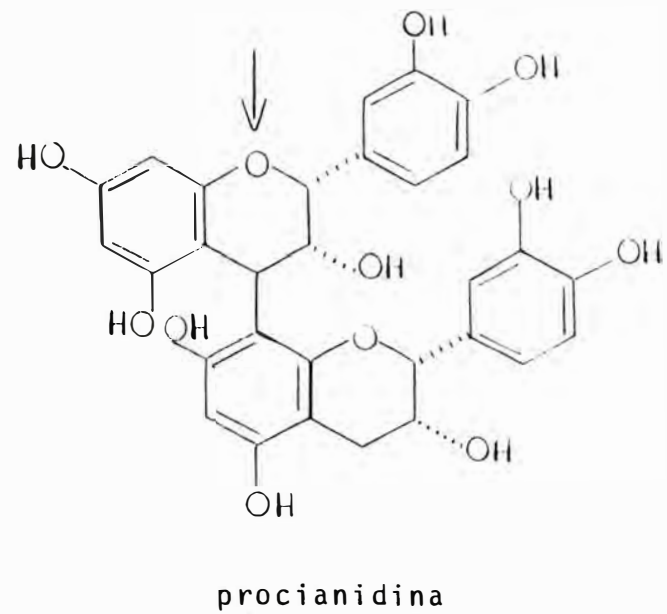
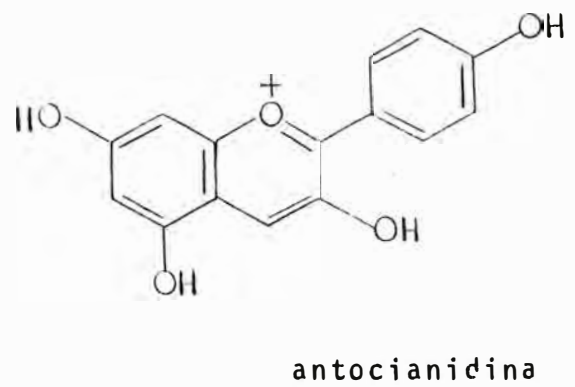
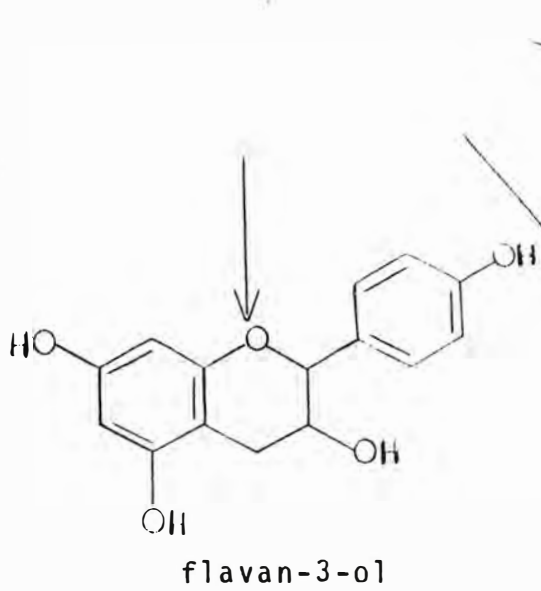
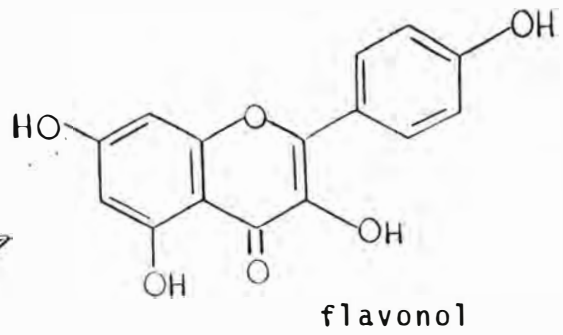
Estas substâncias são encontradas principalmente em plantas superiores, mas foram isoladas também em pequena proporção em plantas inferiores, musgos e em alguns fungos, mas estão ausentes em algas e bactérias (11).

Os compostos flavonoídicos são de origem biossintética mista, possuindo invariavelmente uma unidade básica de  $C_{15}$ , que provém biogeneticamente de três unidades de acetato ( $C_6$ ) e uma unidade de fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) derivada do chiquimato, apresentando portanto um esqueleto do tipo  $C_6-C_3-C_6$ .

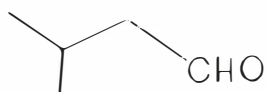
A fenilalanina dá origem ao ácido p-coumárico, o qual se condensa com três unidades de  $C_2$ , provenientes do acetato para produzir as chalconas, que parecem ser as precursoras de todos os outros esqueletos flavonoídicos existentes (12,14). Esquema 1 (12 e 13).



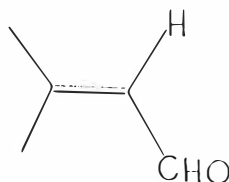
FLAVANONOL



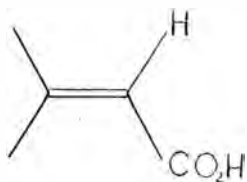
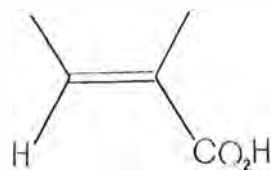
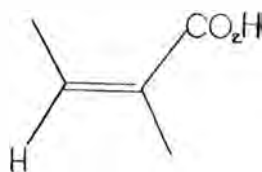
Por muito tempo, houve dúvidas quanto a identidade atual da unidade biológica de  $C_5$ . Um número considerável de ácidos e aldeídos de ocorrência natural com  $C_5$ , era tido como possível precursor dos isoprenóides.



3-metilbutanal

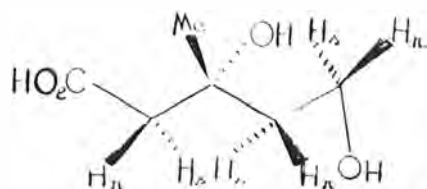


3-metilbut-2-enal

ácido 3-metilbut-2-enoico  
(ácido dimetil acrílico)ácido 2-metilbut-2-(E)-  
enoico (ácido tíglico)ácido 2-metilbut-2-(Z)-enoico  
(ácido angélico)

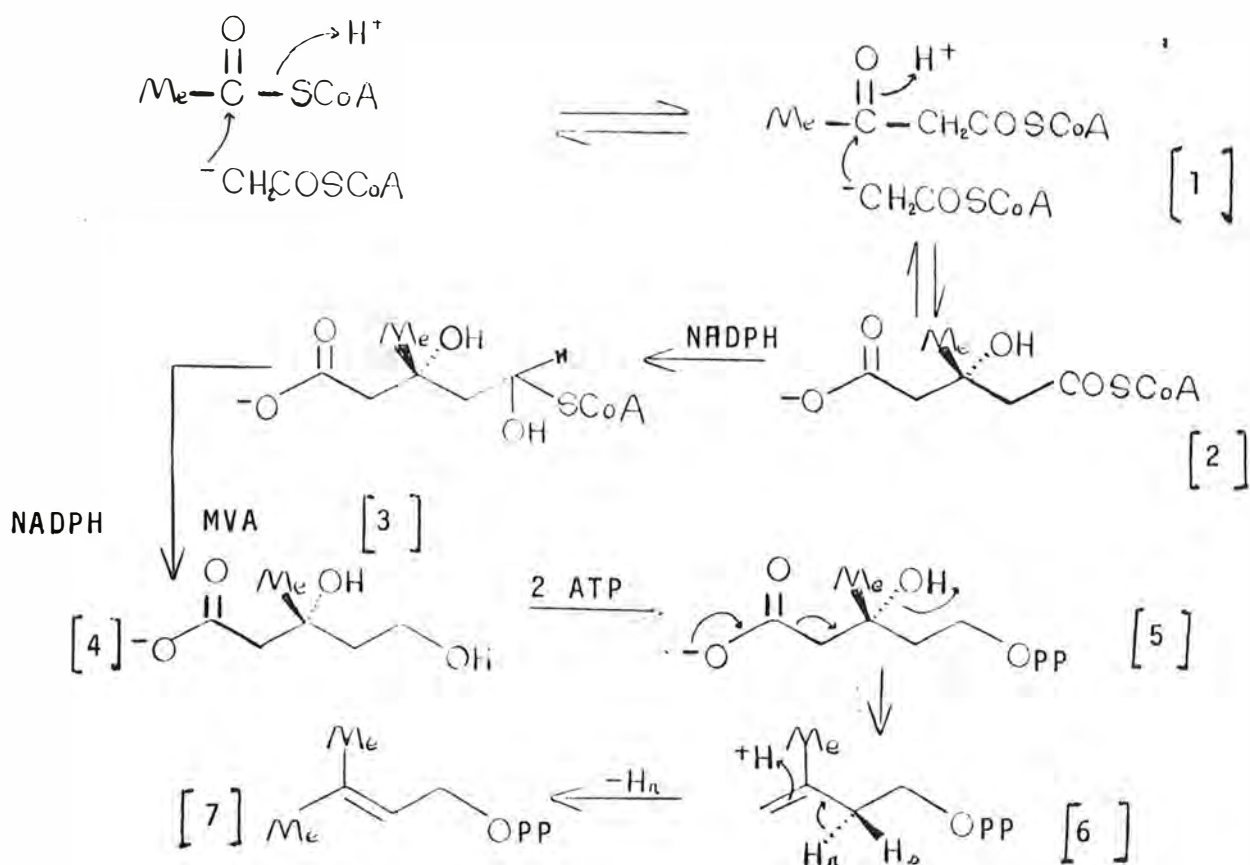
Alguns destes compostos são formados de fato, como produtos paralelos ao longo do caminho biossintético principal dos isoprenóides.

O primeiro maior avanço veio com a descoberta do ácido mevalônico (MVA) [4] como o precursor geral para a formação dos terpenóides.



Sua formação na célula, é mostrada no esquema 2 (12, 14) [4]

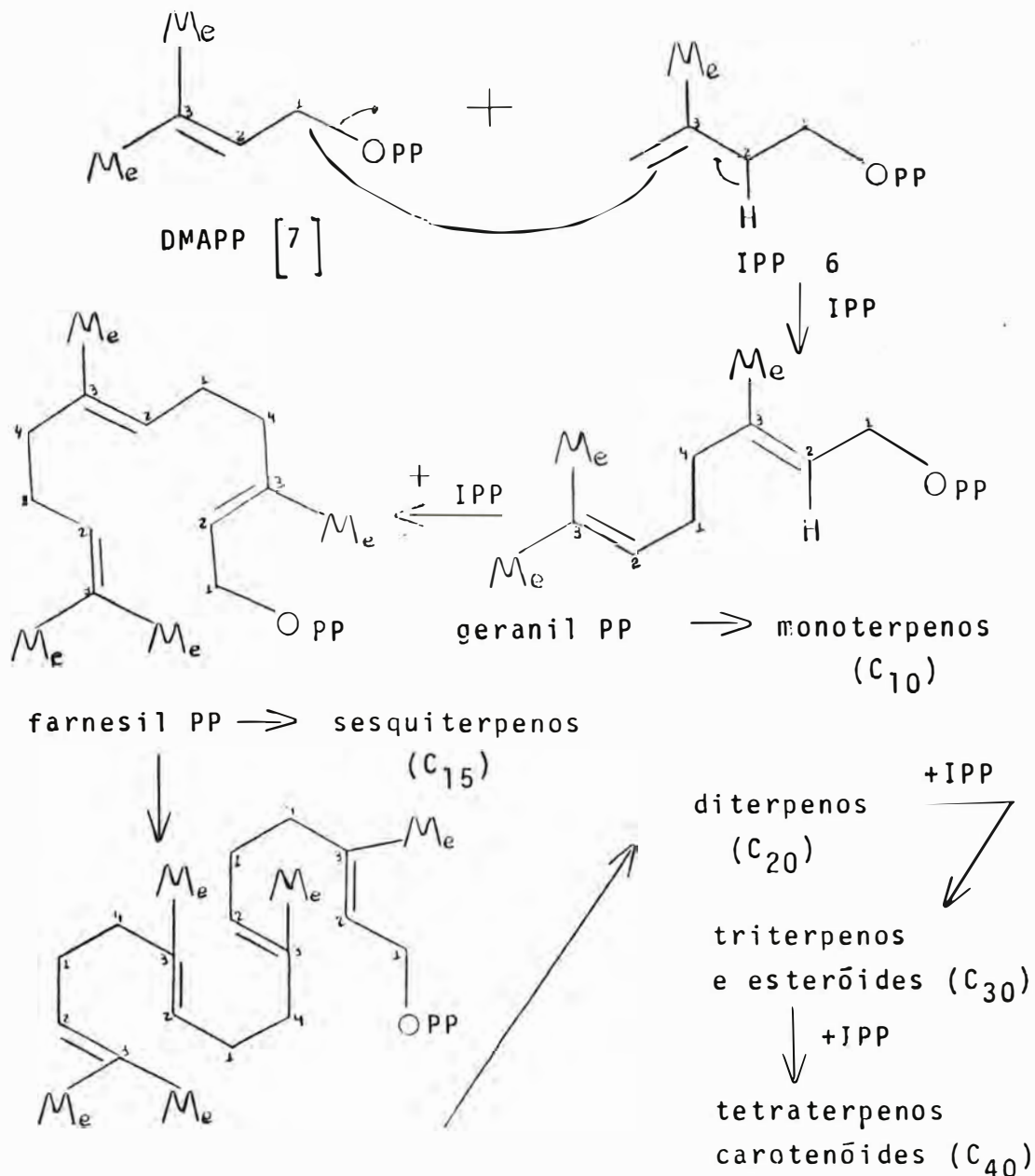
### ESQUEMA 2





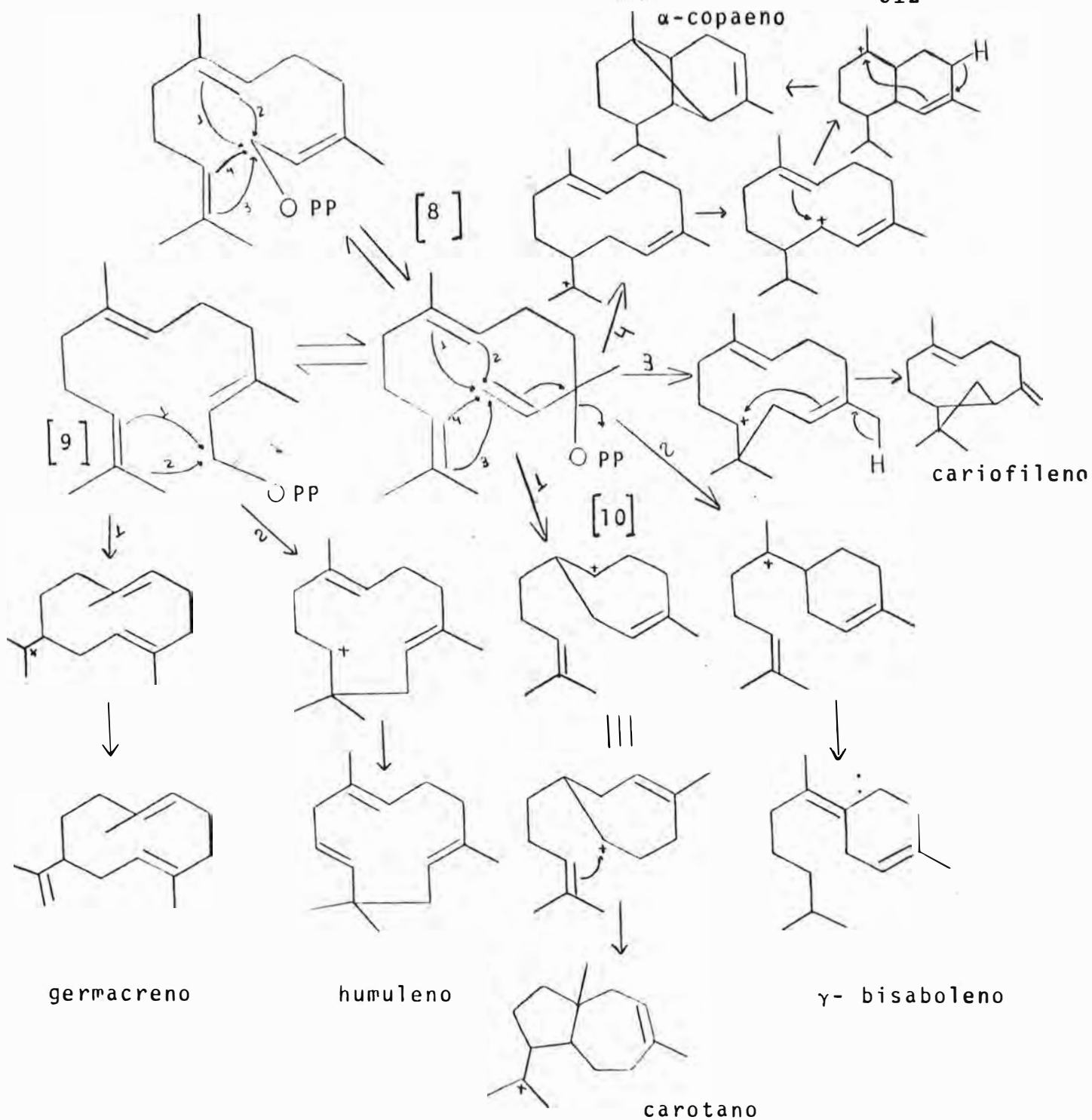
Uma dupla condensação, primeiro do tipo Claisen e posteriormente aldólica, entre moléculas de acetil-SCoA, leva a formação do acetoacetil-SCoA [1], e 3-hidroxi-3-metilglutaril-SCoA [2], HMG - SCoA. Seguem-se então duas reduções irreversíveis, via hemitio-acetal [3] para produzir o ácido mevalônico (3R)-MVA [4]. O ácido mevalônico possui um centro quiral no C<sub>3</sub> e só o enantiômero 3R por ser biologicamente ativo, é utilizado na biossíntese do isoprenóide. O MVA é então fosforilado, e o MVA-5-pirofosfato [5] é descarboxilado e desidratado, formando o pirofosfato de isopentenila IPP [6], que é então isomerizado a pirofosfato de dimetilalila DMAPP [7].

Essas duas unidades de C<sub>5</sub> ativadas são os equivalentes biológicos do isopreno, sendo os isoprenóides ou terpenóides, produtos da sua união, (IPP + DMAPP), esquema 3 (12).

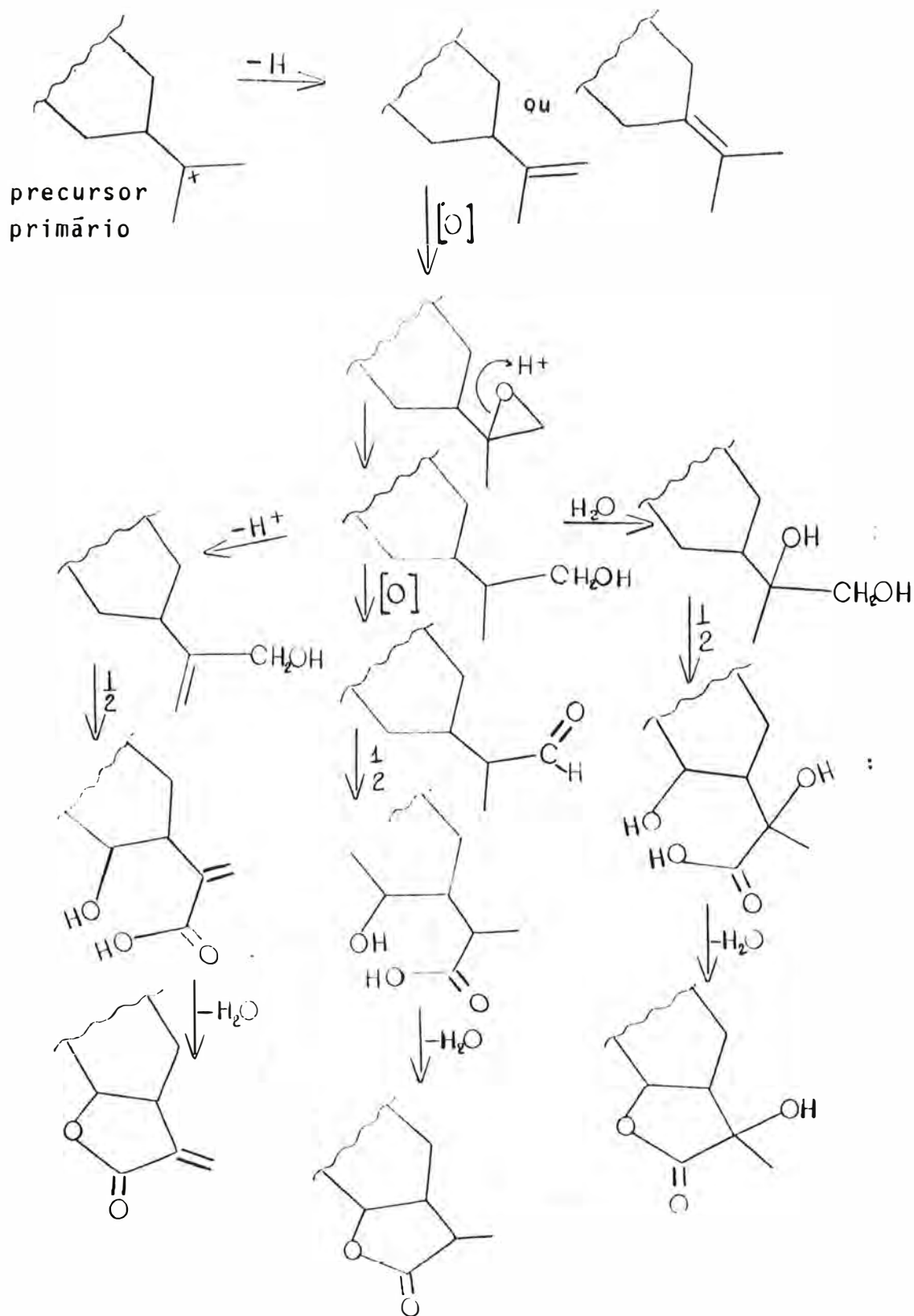


geranyl-geranyl

Entre as estruturas sesquiterpênicas, foram reconhecidas mais de cinquenta tipos de esqueletos básicos, os quais podem ser formados a partir do cis,trans-farnesil PP[8] ou trans,trans-farnesil PP[9] ou ainda nerolidil PP[10]; conforme o esquema 4 (12).



Para a formação do grupo carboxil, originando as lactonas sesquiterpênicas, o resíduo isopropil admite vários estados de oxidação na sua biossíntese, como é mostrado no esquema 5 (15). E esta lactonização pode se dar tanto no C<sub>6</sub> como no C<sub>8</sub>, com fechamento do anel lactônico em cis ou trans.



- 1) - Introdução de oxigênio no anel
- 2) - Oxidação

O interesse pelas lactonas sesquiterpênicas tem aumentado consideravelmente, não só entre os químicos, mas também entre os biólogos, face a sua diversidade estrutural, o que possibilita uma série de transformações químicas, as diferentes atividades biológicas e a importância como marcador quimiosistemático.

Estas substâncias, mesmo sendo encontradas em outras famílias, como Umbeliferae e Magnoliaceae (16), podem ser consideradas como características de Asteraceae, pois a grande maioria das estruturas conhecidas foi isolada desta família (4).

Com o desenvolvimento dos métodos de análise espectroscópica, aumentou consideravelmente o número destas estruturas descritas na literatura, atualmente por volta de 2.500 (17).

As lactonas sesquiterpênicas são compostos geralmente estáveis, lipofílicos e de maneira geral, são responsáveis pelo sabor amargo de alguns vegetais.

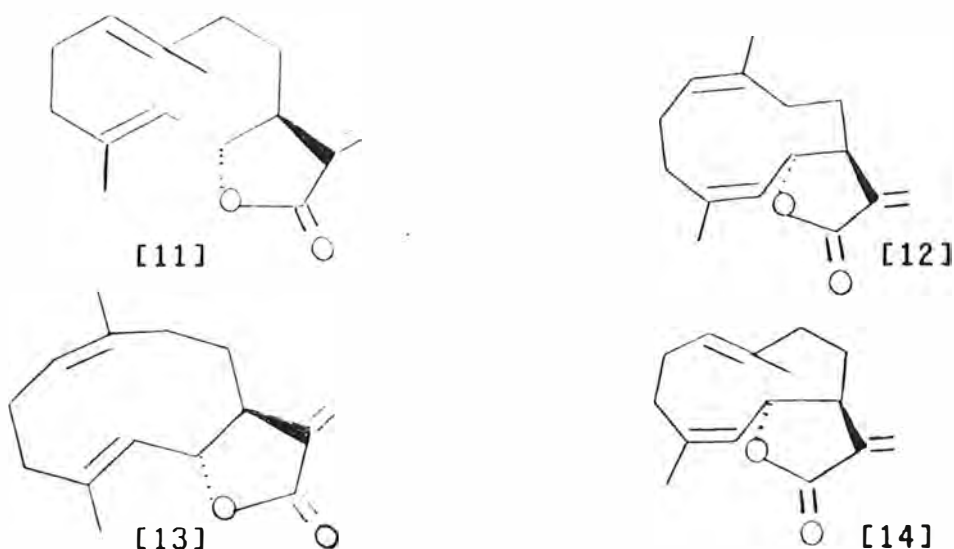
Com relação a atividade biológica, as lactonas sesquiterpênicas podem ser consideradas como tendo: atividade citotóxica e anti-tumor (1,18), anti-helmíntica (19), antibiótica (1,19), alergênica (1,19) e deterrente (20) entre outras.

Para muitos autores, a atividade biológica destas substâncias está relacionada com a presença do grupo  $\gamma$ -butirolactona- $\alpha$ -metilênico, devido a uma possível reação de adição do tipo Michael, onde este grupo funcionaria como um forte agente alquilante em centros nucleofílicos de

sistemas biológicos, tais como grupamentos sulfidrílicos (1,21).

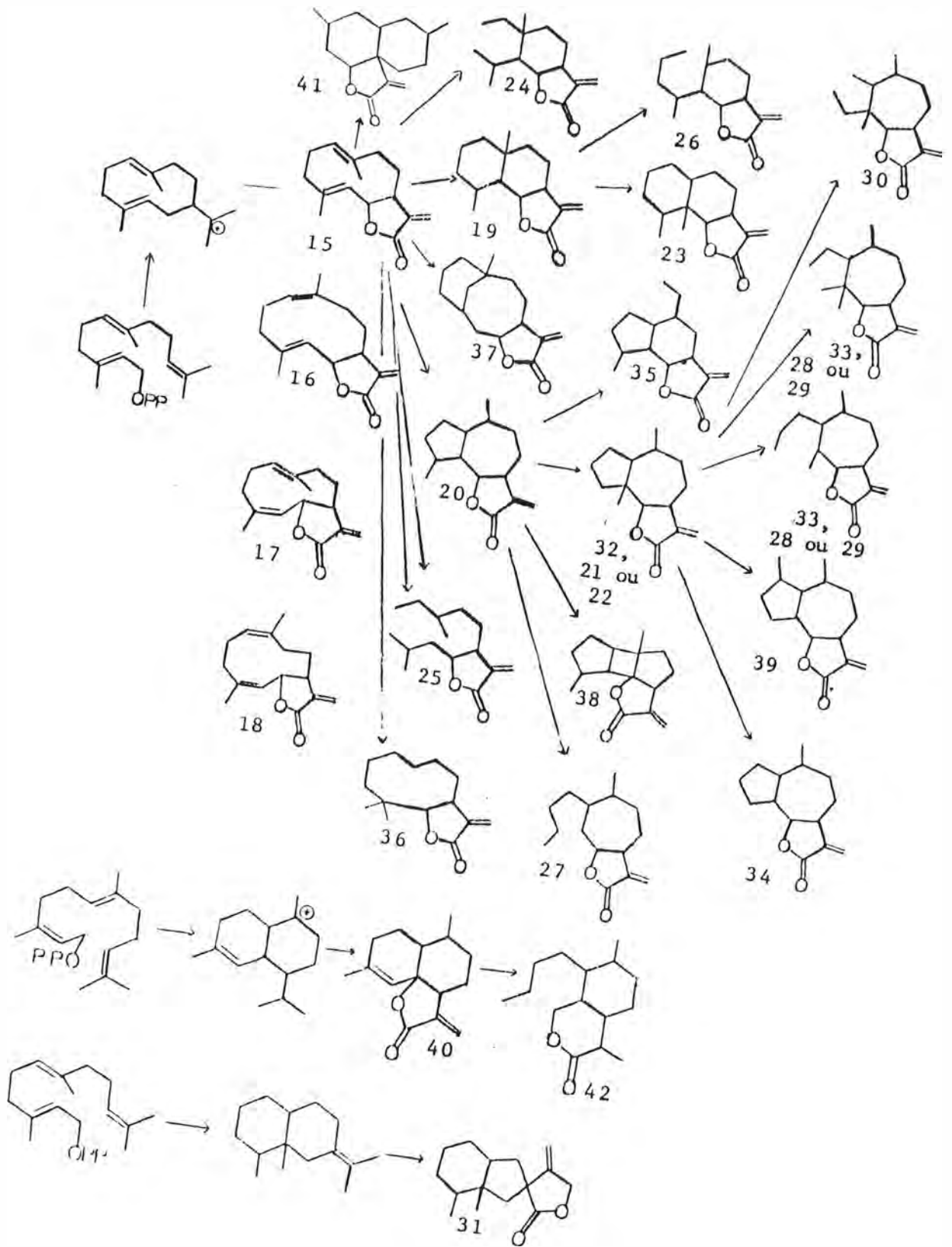
Entretanto, esta proposição de mecanismo de ação ainda não é esclarecedora, pois são conhecidas algumas substâncias, que apesar de não apresentarem o grupamento  $\gamma$ -butirolactona- $\alpha$ -metilênico, também apresentam atividade biológica.

Dentre as lactonas sesquiterpênicas, o tipo mais comum é o germacradienolido, o qual está subdividido em: a) germacrolido [11] isômero trans,trans, formado a partir da ciclização do precursor trans,trans-farnesil PP, b) cis,cis germacradienolido [12], c) cis,trans-germacradienolido (melampolido) [13] e d) trans,cis-germacradienolido (hellanolido) [14]. Até recentemente, a ciclização do trans,trans-farnesil PP, era assumida como sendo o primeiro passo biossintético para a formação de todos os esqueletos do tipo germacrano. No entanto, com a presença destes outros tipos isoméricos, fica a dúvida se a isomerização da dupla ligação ocorre antes ou depois da ciclização. Se ela ocorrer antes, indica que o trans,trans-farnesil PP não é o único precursor das lactonas sesquiterpênicas do tipo germacrano.



São mostrados a seguir, os possíveis passos biossintéticos para a formação da maior parte dos tipos de esqueletos de lactonas sesquiterpênicas da família Asteraceae. Esquema 6 (4).

[15] Germacrolido, [16] Melampolido, [17] Heliangolido [18] cis, cis-germacradienolido, [19] Eudesmanolido, [20] Guaianolido, [21] Ambrosanolido, [22] Helenanolido, [23] Eremofilanolido, [24] Elemanolido, [25] Secogermacranolido, [26] Secoeudesmanolido, [27] Xantanolido, [28] Secoambrosanolido, [29] Secohelenanolido, [30] Norpsilotropin, [31] Bakkenolido, [32] Pseudoguaianolido, [33] Secopseudoguaianolido, [34] Nor-helenanolido, [35] Chrimoranolido, [36] Tricosalviolido, [37] Dislhamifolido, [38] Bourbonolido, [39] Neohelenanolido, [40] Cadinanolido, [41] Vernomargolido, [42] "Quing Hau Sau".





2-PROPOSIÇÃO.

Constituíam objetivos para elaboração do presente trabalho:

- A - Isolar e elucidar as estruturas de componentes químicos da Vernonia eremophila Mart.
- B - Submeter extratos brutos e substâncias isoladas a ensaios para avaliação de atividades biológica e/ou farmacológica.
- C - Com as substâncias mais abundantes, pretendia-se realizar modificações estruturais, visando avaliar as alterações das atividades biológicas e/ou farmacológicas.

3-DESCRIÇÃO DO VEGETAL  
VERNONIA EREMOPHILA MART.

O vegetal encontra-se descrito na Flora Brasiliensis (22), da seguinte forma:

"Subarbusto muito ramificado, ramos sempre com pilosidade velutina castanha; folhas subsésseis estreitamente lanceoladas, inteiras, planas algo coriáceas, coberta de pilosidade castanho-acinzentado; capítulos pequenos, cerca de 10 flôres dispostas mais ou menos espaçadas, formando uma panícula escorpióide, sésseis, com brácteas bem evidentes; involúcro escamoso 4-5 seriado, as do interior lanceoladas, as do exterior deltóides, sempre agúdas, ascendentes, com o dorso com pilosidade velutina; aquênios vilosos; papus esbranquiçados, as cerdas do interior 3-4 vezes maiores que as do exterior.

Ramos sulcados, firmes, totalmente cobertos com pilosidade castanha. Folhas firmemente membranaceas, as inferiores cerca de 3-4 polegadas de comprimento e 3-4 linhas de largura na metade e com base e ápice subagudos, coberta de pilosidade brancacenta, diminutamente pontuada de resinas. Capítulos esparçamente cimeiras escorpióides, solitários com uma bractea lanceolada cerca de 1 polegada de comprimento. Envólucro campanulado cerca de 4 linhas de comprimento, escamas agúdo lanceoladas até acuminadas do exterior menor na parte do dorso com pilosidade serícea castanha. Corola cerca de 4 linhas de comprimento, branca, sem pêlos. Aquênios curtos, densamente vilosos. Papus brancacentos cerca de 2 1/2 - 3 linhas de comprimento, cerdas do interior cerca de 40, subpersistentes. Habitat em Minas Gerais, campos arenosos".

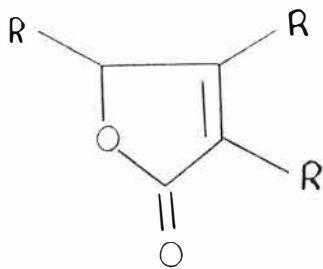
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

## 4.1-ANÁLISE DA SUBSTÂNCIA V.E.A.

O fracionamento em coluna cromatográfica da fase em acetato de etila obtida por tratamento do extrato bruto primeiramente com hexano e depois com acetato de etila, forneceu uma substância de consistência oleosa que foi cristalizada em metanol.

Esta substância codificada como V.e.A (3,28g), após recristalização em hexano/acetato de etila, apresentou intervalo de fusão de 130-132°C e peso molecular 438 observado no espectro de massas de baixa resolução (fig.4).

As bandas de absorção no espectro de IV (fig 1) em 1770 e 1220  $\text{cm}^{-1}$  e os sinais do espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  (fig 3) em 169,4, 162,0 e 125,1 ppm permitiram inferir da existência de um grupamento  $\gamma$ -butirolactona -  $\alpha, \beta$ -insaturado com a dupla ligação endocíclica tetrasubstituída (estrutura I). Esta conclusão pôde ser feita visto o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig.2) não apresentar o duplo dubleto característico da dupla ligação exocíclica (44).



Estrutura I

A presença de um grupamento carbonila cetônico na molécula é sugerido através dos espectros de IV pela banda de absorção em 1720  $\text{cm}^{-1}$  e de RMN-  $^{13}\text{C}$ , pelo sinal em 207,0 ppm.

A banda de absorção em 1735  $\text{cm}^{-1}$  no espectro de IV

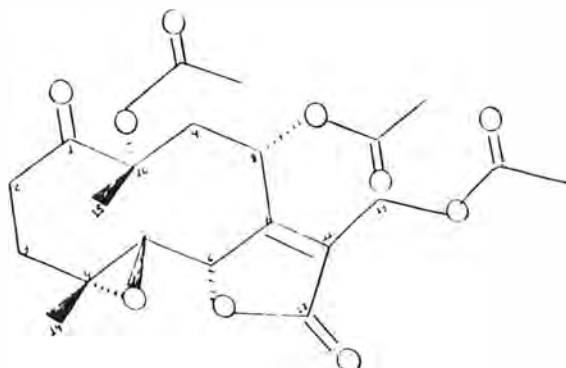
e os três singletos com deslocamento químico de 2,05, 2,10 e 2,15 ppm, com intensidade de 3 prótons cada, no espectro de RMN-<sup>1</sup>H, indicam a presença de três grupamentos acetato na molécula. Esta indicação pode ser verificada também através do espectro de RMN-<sup>13</sup>C, pelos sinais em 169,6, 169,8 e 170,4 ppm (45).

Nota-se também, no espectro de IV, bandas de absorção em 935 e 805 <sup>-1</sup>cm, sugerindo a presença de um grupamento epóxido na molécula, evidência que também pode ser obtida através do espectro de RMN-<sup>13</sup>C, pelos sinais em 54,9 e 58,5 ppm.

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H, observa-se ainda dois singletos com deslocamento químico de 1,50 e 1,60 ppm, atribuídos a dois grupamentos metila presentes na molécula.

Na região de 4,70 a 4,90 ppm, no espectro de RMN-<sup>1</sup>H podem ser observados os prótons ligados aos C<sub>13</sub>, C<sub>6</sub> e C<sub>8</sub>.

Assim sendo, através das análises conjuntas dos espectros de IV, RMN-<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, comparados com dados encontrados na literatura (23-25,47,50) propõe-se a estrutura II, como sendo a da substância V.e.A, descrita na literatura como glaucolido-B. Ela foi isolada anteriormente de algumas espécies de Vernonia e recentemente em nossos laboratórios da Vernonia fruticulosa Mart. (26).

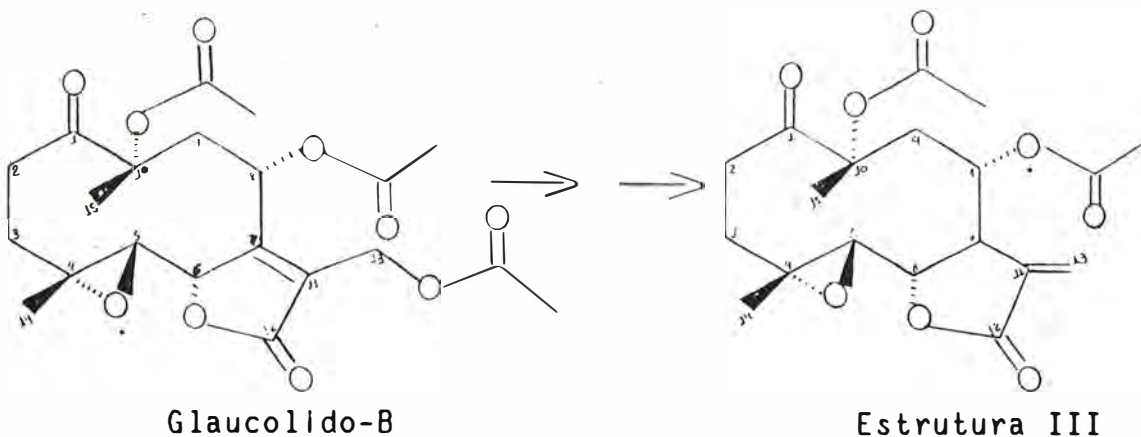


Estrutura II  
Glaucolido-B.

## 4.2-ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE HIDROGENAÇÃO/HIDROGENÓLISE DO GLAUCOLIDO-B.

Como foi citado nos objetivos, pretendia-se realizar modificações estruturais com as substâncias isoladas em maior quantidade, visando avaliar as alterações das atividades biológicas.

Hoffman e Rabi (1) e Kupchan et al (21), relataram que a atividade biológica das lactonas sesquiterpênicas esta relacionada com a presença do grupamento  $\gamma$ -butirolactona- $\alpha$ -metilênico. Em vista disto, pretendeu-se modificar a estrutura lactônica do glaucolido-B, transformando-o na estrutura III para observar a atividade biológica do composto formado.



Usando-se  $\text{PtO}_2$  como catalizador, fêz-se uma reação de hidrogenação/hidrogenólise com parte do glaucolido-B.

Após a purificação, obtêve-se duas substâncias codificadas como glaucolido-B-H<sub>1</sub> e glaucolido-B-H<sub>2</sub>.



#### 4.2.1-ANÁLISE DO GLAUCOLIDO-B-H<sub>1</sub>.

Um dos produtos da reação, após a recristalização com hexano/acetato de etila, apresentou-se como um sólido cristalino (80 mg) com intervalo de fusão de 142-144°C e foi codificada como glaucolido-B-H<sub>1</sub>.

Analisando-se o espectro de RMN-<sup>1</sup>H (fig.6) do glaucolido-B-H<sub>1</sub>, pôde ser observado o desaparecimento de um dos grupos acetato, o que levou a conclusão da ocorrência da reação de desacetilação proposta.

Nota-se também, que o multiplete centrado em 4,90 ppm no espectro de RMN<sup>1</sup> H do glaucolido-B (fig.2) com uma intensidade de quatro prótons, relativos aos dois prótons do C<sub>13</sub>, um do C<sub>6</sub> e um do C<sub>8</sub>, aparece agora com uma intensidade de dois prótons, relativos a um no C<sub>6</sub>, e outro no C<sub>8</sub>.

O C<sub>13</sub>, ao sofrer a hidrogenólise foi transformado em uma metila vinílica, conseqüentemente os prótons foram deslocados no espectro de RMN-<sup>1</sup>H para campo mais alto, aparecendo em 1,95 ppm como um dubleto (3H, J=2,5Hz), acoplado homoalilicamente com H<sub>6</sub> ou H<sub>8</sub>, (fig.7).

O intervalo de fusão, obtido para o glaucolido-B-H<sub>1</sub>, é bastante coerente com aquele descrito na literatura para o 13-desacetoxi-glaucolido-B que é de 146-148°C (26,27). Conseqüentemente, pode-se afirmar que a substância codificada como glaucolido-B-H<sub>1</sub> corresponde ao 13-desacetoxi-glaucolido-B (Estrutura IV).

#### 4.2.2-ANÁLISE DE GLAUCOLIDO-B-H<sub>2</sub>.

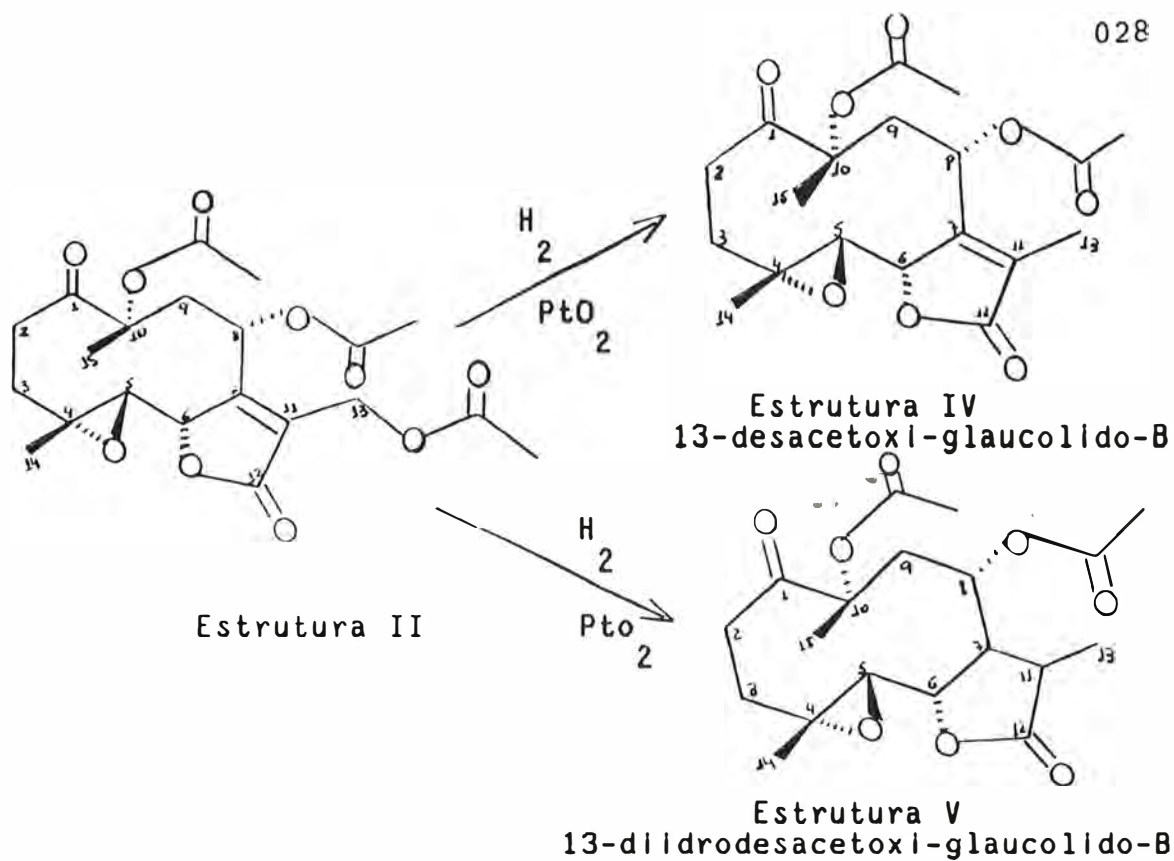
O outro produto da reação também foi recristalizado em hexano/acetato de etila, fornecendo 170 mg de uma substância cristalina, codificada como glaucolido-B-H<sub>2</sub>.

Através da análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (fig.9) pôde-se concluir que ocorreram reações de hidrogenólise de um grupo acetato e de hidrogenação da dupla ligação entre C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>. Na verdade, foi obtida uma mistura de diastereoisômeros, uma vez que pode ser observado no espectro de RMN<sup>1</sup>H, como esperado, algumas alterações no perfil do mesmo. Pode-se notar que os prótons do C<sub>13</sub> aparecem como um dubleto mal resolvido, em 1,28 ppm. Além disso, parece viável a existência de outro dubleto centrado em 1,20 ppm, parcialmente sobreposto.

Observa-se também, no espectro de RMN<sup>1</sup>H um quadrupletto relativo ao próton ligado ao C<sub>11</sub> em 4,12 ppm, bem como os sinais dos prótons ligados ao C<sub>7</sub> em 3,40 ppm (dubleto) e aquele do C<sub>6</sub> e C<sub>8</sub> respectivamente em 5,50 e 4,40 ppm, sendo que os sinais destes dois últimos aparecem mal resolvidos (figs.9,10-12).

São observados também dois singletos em 2,00 e 2,10 ppm, relativos a duas metilas do grupamento acetato, e dois singletos em 1,50 e 1,65 ppm, relativos a duas metilas ligadas a C<sub>4</sub> e C<sub>10</sub>.

Portanto, após a análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H, chegou-se a conclusão de que esta substância corresponde ao 13-diidrodessacetoxi-glaucolido-B (Estrutura V), (27).



Não foram realizadas as reações posteriores para se obter o anel lactônico com a dupla ligação exocíclica, uma vez que as quantidades de 13-desacetoxi-glaucólido-B e 13-dihidrodessacetoxi-glaucólido-B eram insuficientes para serem submetidas a ensaios biológicos e prosseguir com as reações.

#### 4.3-ANÁLISE DE V.E.B

Esta substância, codificada com V.e.B, foi isolada a partir do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato bruto em acetato de etila e apresentou intervalo de fusão de 224-226°C.

A análise do espectro de IV (fig.13), mostra bandas de absorção em 820,915,1110,1495 e 1590 <sup>-1</sup> cm, indicativos da presença de anel aromático. Estes valores, aliados a

existência de uma banda de absorção larga, entre 3100 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ , e outra em 1.300  $\text{cm}^{-1}$ , sugerem a presença de hidroxilas fenólicas na molécula (28).

A presença de um grupamento  $\gamma$  - pirona na estrutura desta substância, pôde ser deduzida pela banda de absorção, no espectro do IV, a 1660  $\text{cm}^{-1}$  (29). A partir destes dados, foi proposto ser a substância V.e.B pertencente a classe dos compostos flavonoídicos.

A análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (fig.14), indica a presença de duas metoxilas, em 3,80 e 3,90 ppm e hidroxilas fenólicas em 12,70 e 9,30 ppm.

Estas informações, aliadas a presença de prótons aromáticos entre 6,20 e 7,70 ppm e sabendo-se ser o peso molecular igual a 330, através de espectro de massas (fig.16), pode-se chegar a uma provavel fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$  para a substância V.e.B, atribuída a uma estrutura flavonoídica com duas metoxilas e três hidroxilas (30).

A análise do espectro de UV desta substância em metanol (fig.15) deixa evidente a presença de bandas de absorção do anel A (banda II) com máximos de absorção em 252 e 264 nm e do anel B (banda I) em 357 nm, típicas de flavonóides.

Este último máximo de absorção foi um indicativo que a substância V.e.B fôsse um flavonol. Segundo Harbone et al (31), as flavonas possuem um máximo de absorção relativo ao anel B entre 304-350 nm, enquanto que nos flavonóis, esta absorção aparece entre 350-385 nm.

Isto também pode ser deduzido a partir do espectro de RMN-<sup>1</sup>H, já que não se observa sinal de um próton vinílico

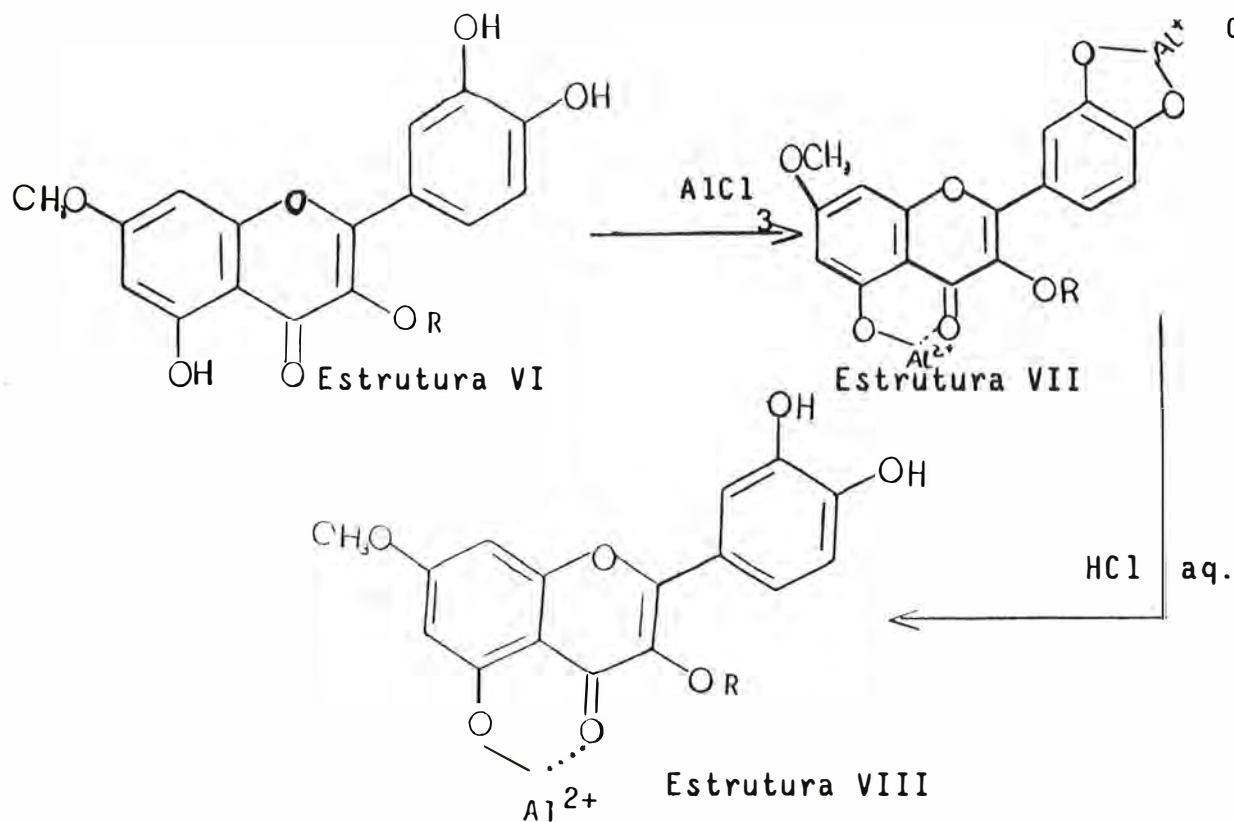
que estaria ligado ao  $C_3$ , em caso de tratar-se de uma flavona (46).

Com o intuito de elucidar o padrão de substituição da molécula, foram registrados os espectros de UV na presença de reagentes de deslocamento, (fig.15).

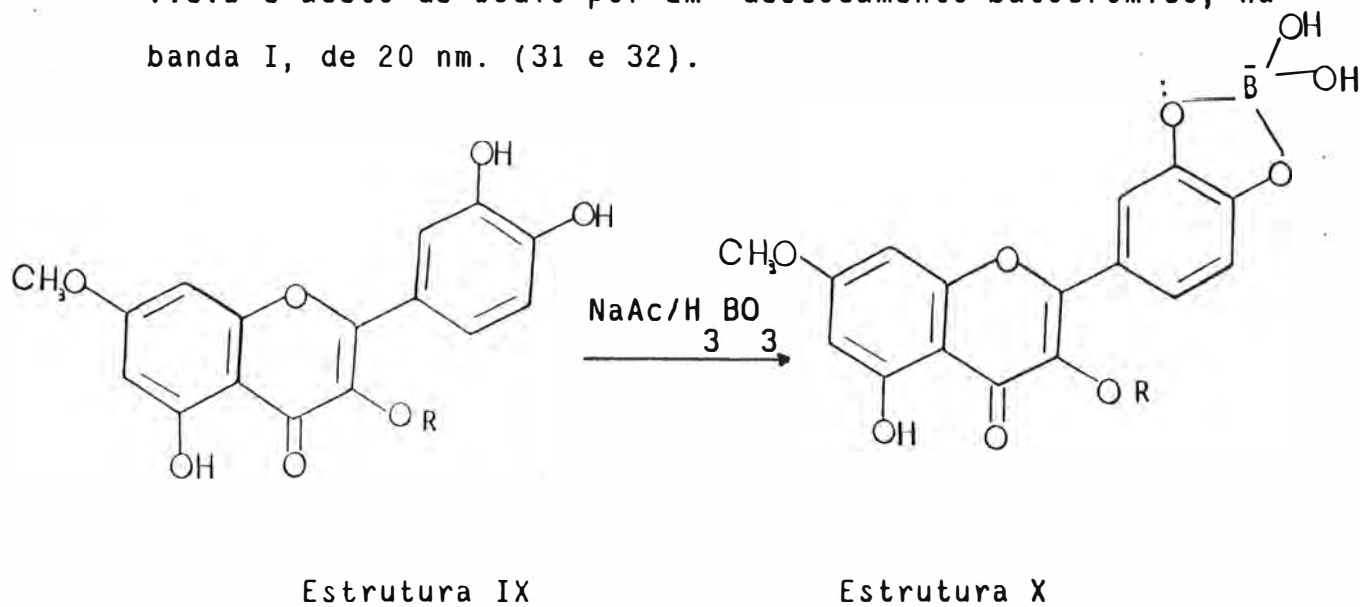
A análise dos resultados, mostra que com a adição de metóxido de sódio, houve um deslocamento batocrômico na banda I de 39 nm, indicando a presença de uma hidroxila ligada ao  $C_{4'}$ .

O acetato de sódio, por ser uma base mais fraca, tende a ionizar significativamente, só as hidroxilas fenólicas mais ácidas. O fato de não ocorrer deslocamento da banda II na presença de acetato de sódio, indicou que a hidroxila do  $C_7$ , provavelmente estivesse metoxilada (31-33).

Quando se adicionou cloreto de alumínio, foi observado deslocamento batocrômico, da banda I, de 86 nm. Com a adição de ácido clorídrico a esta solução, houve um deslocamento hipsocrômico dessa mesma banda, em relação ao espectro com cloreto de alumínio. Ocorreu o aparecimento de uma banda em 400 nm indicando que além de uma hidroxila no  $C_5$ , e ausência de hidroxila no  $C_3$ , tem-se na molécula um grupo o-dihidroxi nos  $C_{4'}$  e  $C_{3'}$ .



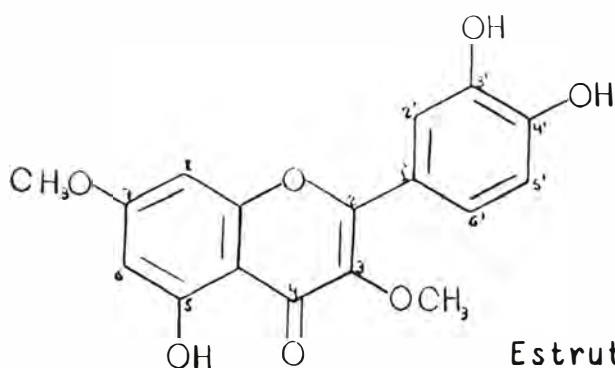
A presença de hidroxilas viciniais também pôde ser observada quando da adição de ácido bórico à solução de V.e.B e aceto de sódio por um deslocamento batocrômico, na banda I, de 20 nm. (31 e 32).



Conseqüentemente, pode-se afirmar que a segunda metoxila esta ligada ao C<sub>3</sub>.

Através da análise conjunta dos espectros obtidos para a substância V.e.B e comparando-se com os dados encontrados na literatura (33-36), chegou-se a conclusão de que a substância V.e.B é o 3,7-dimetoxi-5,3',4'-trihidroxi flavona.

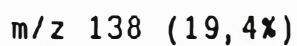
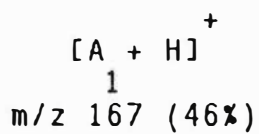
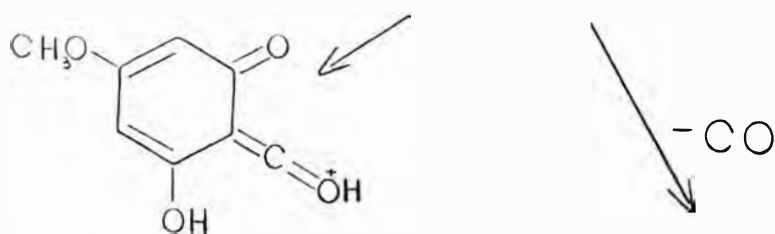
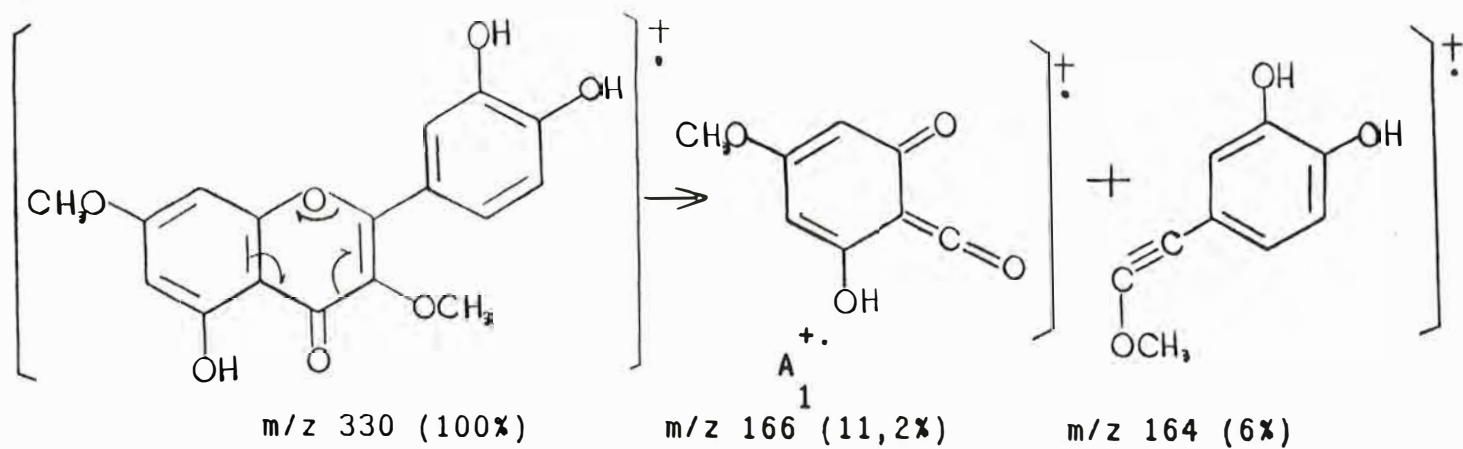
As fragmentações do espectro de massas apresentadas a seguir, (esquema 7) comprovam esta proposta de estrutura.



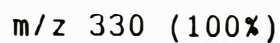
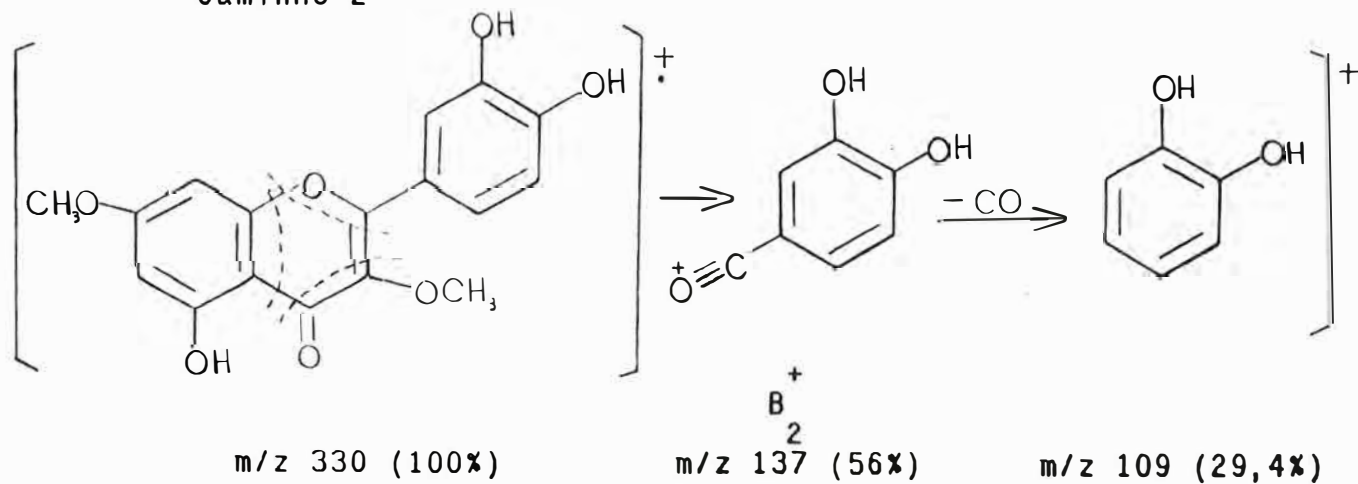
Estrutura XI

3,7-dimetoxi-5,3',4'-trihidroxi flavona

## Caminho 1



## Caminho 2





#### 4.4 - ANÁLISE DE V.E.C.

Esta substância foi isolada, juntamente com V.e.C<sup>1</sup>, do extrato em acetato de etila. As duas substâncias foram separadas e purificadas através de recristalização.

Aquela denominada V.e.C apresentava-se como sólido cristalino, com intervalo de fusão de 205-207° C. Parte do material foi enviado ao Prof. J. Mann na Universidade de Reading para obtenção de espectros de RMN e EM, e o restante, após obtenção do IV, foi enviado aos laboratórios para realização de ensaios biológicos.

Na Inglaterra foram obtidos os espectros de RMN H<sup>1</sup> (400MHz, fig.18) sem a realização de desacoplamento de spins e também os dados do íon molecular, obtidos através de ionização química. Estes dados do espectrometro de massas, permitiram deduzir que a substância V.e.C possuía íon molecular de 372,1663 u.m.a. (correspondente a C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

Restaram 4mg de substância, com traços de impureza com a qual foram obtidos espectros de RMN H<sup>1</sup> (200 MHz, figs.19, 20), com desacoplamento de spins (figs.21-24) e C<sup>13</sup>. Os espectros de RMN H<sup>1</sup> a 200 e 400 MHz mostraram o mesmo perfil, exceto pelas impurezas da amostra remanescente. Na análise a seguir, são mencionados os valores do espectro em 400 MHz.

Através do espectro de IV (fig.17), observa-se bandas de absorção a 1.705, 1.725 e 1.750 cm<sup>-1</sup>, relativos a grupamentos carbonílicos de cetona, de ester alifático e de lactona  $\alpha, \beta$  insaturada.

Estes grupamentos também são evidenciados através do espectro de RMN C<sup>13</sup> (BB, fig.25) com os sinais a 212,0, 170,5 e 169,5 ppm, relativos aos carbonos carbonílicos dos grupa-

mentos cetônico, acetato e lactona  $\alpha,\beta$  insaturada.

Um grupamento acetato está indicado no espectro de RMN <sup>1</sup>H (fig.18) pelo singlete em 1,98 ppm.

Os dois singletos em 5,72 e 6,29 ppm, com intensidade de um próton cada, são indicativos de dois prótons vinylicos ligados ao C<sub>13</sub>. O fato destes sinais se apresentarem como dois singletos, e não como dois dubletos, como normalmente ocorre com as lactonas sesquiterpênicas  $\alpha,\beta$  insaturadas por dupla ligação exocíclicas, indica que o C<sub>7</sub> está tetra substituído. Pensou-se na possibilidade de haver uma hidroxila ligada a este carbono, mas esta idéia foi descartada após observar os espectros de RMN C<sub>13</sub> BB e DEPT (figs.25, e 26), onde se verifica a existência de um sinal em 50,0 ppm no BB, que desaparece no DEPT. Isto é indicativo da existência de um carbono quaternário bicíclico, sugerindo assim que um outro carbono deva estar ligado ao C<sub>7</sub>, originando um esqueleto de lactona sesquiterpênica não muito comum.

A fórmula molecular desta substância indica a presença de oito oxigênios. Sabendo-se que cinco deles pertencem as funções cetona, lactona e acetato, previamente mencionadas, pôde-se deduzir da existência de três hidroxilas já indicadas no espectro de IV (fig.17).

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (fig.18), observa-se dois sinais singletos com intensidade de três prótons cada, em 1,22 e 1,33 ppm, relativos a duas metilas, permitindo inferir que os carbonos aos quais estas metilas estão ligadas, não possuem outros prótons.

Um duplo dubleto centrado em 2,05 ppm (1H, J=3,0 e 16,0) e outro dubleto centrado em 2,11 ppm (1H, J=3,0 e 16,0), indicam que estes prótons estão acoplados entre si,

por acoplamento geminal, e também com o próton do triplete em 4,55 ppm (1H, J=3,0) o qual está ligado ao carbono que possui um grupamento acetato (fig.21).

Estas conclusões foram obtidas através das constantes de acoplamento e desacoplamento de spins eletrônicos. Este mesmo raciocínio foi feito com os outros prótons da substância.

Outro duplo dubleto centrado em 2,44 ppm (1H, J=4,0 e 12,5) indica que este próton tem um acoplamento geminal com o próton responsável pelo dubleto em 1,40 ppm (1H, J=12,5) o qual acopla também com o próton que aparece como um dubleto em 2,77 ppm (1H, J=4,0), o qual deve ter como vizinho uma carbonila (figs.22 e 23) (49).

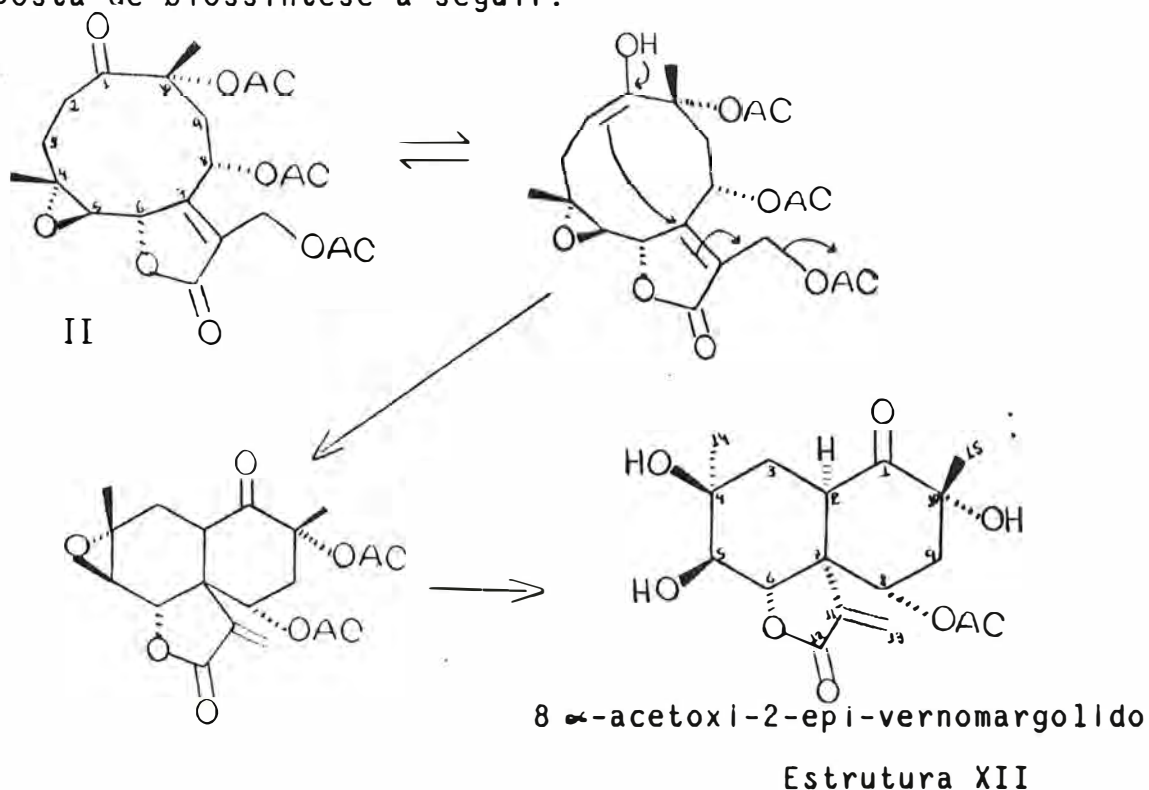
O próton ligado ao C<sub>2</sub>, o qual se encontra em posição equatorial, deve formar com o próton axial ligado ao C<sub>3</sub> um ângulo diedro de aproximadamente 80°, conseqüentemente não deve ser observado um acoplamento entre os dois.

O último duplo dubleto que aparece no espectro de RMN<sup>1</sup> H (fig.18), centrado em 3,27 ppm (1H, J=5,5 e 7,0), sugere que este próton, ligado a carbono carbinólico, esteja acoplado ao próton do C<sub>6</sub>, que aparece como um dubleto em 4,27 ppm (1H, J=5,5) (fig.24) e também acoplado ao próton da hidroxila geminal, que aparece como um dubleto em 5,57 ppm (1H, J=7,0). Segundo Silverstein(24), "hidroxila ligada a carbono secundário, quando em presença de DMSO ou acetona (deuterados), podem aparecer como um dubleto acoplado com o próton geminal no espectro de RMN<sup>1</sup> H."

Os outros dois singletos, que aparecem em 3,86 e 5,20 ppm, são provavelmente das outras duas hidroxilas existentes na molécula.

Através das análises conjuntas dos espectros, principalmente os desacoplamentos realizados, aliados aos dados da literatura relativos a uma substância com estrutura semelhante isolada de Vernonia marginata, (37) pode-se propor uma estrutura [XII] para a substância V.e.C, a qual parece ser inédita até o momento.

Esta proposta de estrutura é reforçada pelo fato de ocorrer neste vegetal a substância glaucólido-B, possível precursora de V.e.C e V.e.C<sub>1</sub>, como demonstrado na proposta de biossíntese a seguir.



A substância isolada de V. marginata, difere de V.e.C por apresentar no C<sub>8</sub> o substituinte 8  $\alpha$ -tigloxi, e no C<sub>2</sub>, o H em  $\beta$ .

A estereoquímica foi definida comparando-se as constantes de acoplamento observadas no RMN H (fig.18) com o modelo molecular, e comparando-se também com dados da literatura (38).

#### 4.5 - ANÁLISE DE V.E.C.<sub>1</sub>

Esta substância foi obtida da mesma fração cromatográfica que 8  $\alpha$ -acetoxi-vernomargolido(V.e.C), e separada após diversas recristalizações. Os cristais apresentaram intervalo de fusão de 158-160°C.

No espectro de IV(fig.27), observa-se uma banda de absorção forte em 1.750  $\text{cm}^{-1}$ , relativa a um grupamento carbonílico de lactona  $\alpha, \beta$  insaturada, além de bandas de absorção de hidroxilas.

Não são observadas, no espectro de IV, bandas de absorção de cetona ou de ester alifático, como ocorre em V.e.C.

Quando da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , de V.e.C<sub>1</sub> (figs.28,29e30), pode ser percebido que eles tem perfis semelhantes aos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de V.e.C, (fig.18), mesmo as constantes de acoplamento dos sinais comuns no RMN  $^1\text{H}$  de V.e.C e V.e.C<sub>1</sub> são muito próximas. Isto sugere que ambas devam ter esqueletos semelhantes, porém com alguns substituintes diferentes.

No C<sub>1</sub> de V.e.C não ocorre grupamento cetônico como em V.e.C, conforme pode ser observado no espectro de IV. Ao invés do grupo ceto, ocorre um hemiacetal, o que é indicado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig.25) através do sinal em 106,0 PPM (37,38). Este dado leva a conclusão que deve ter ocorrido uma reação entre a hidroxila do C<sub>4</sub> e o C<sub>1</sub>, resultando na formação de um ciclo-hemiacetal.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , obtido após a adição de D<sub>2</sub>O (fig.29), observa-se na região de 3,30-3,50 ppm, um sinal de

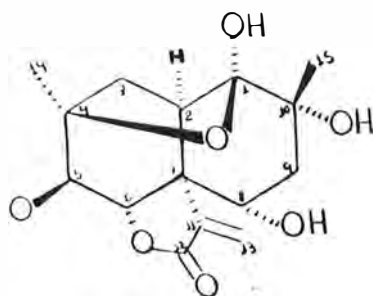
um duplete (1H, J=5,0), acoplado com o próton do C<sup>6</sup> em 4,20 ppm (1H, J=5,0) e também um outro sinal, parcialmente sobreposto ao sinal duplete do próton no C<sup>5</sup> (1H), indicando a existência de outro carbono carbinólico na molécula. Desta forma, pode-se afirmar que no carbono de V.e.C onde existe um grupamento acetato, em V.e.C ocorre uma hidroxila.

Os outros sinais nos espectros de RMN H de V.e.C são muito semelhantes aos de V.e.C, e as atribuições de cada sinal ao seu respectivo próton são as mesmas.

O espectro de massas de V.e.C não apresentou o pico do íon molecular, mas sim aquele relativo a M-18 em 294, (7,5%) u.m.a (fig.31).

Através da análise conjunta dos espectros, da comparação com os dados espectrais de V.e.C e dados da literatura (37,38), pode-se concluir que V.e.C corresponde a 8 $\alpha$ -hidroxi-2-epi-vernomargolido-1,4-cliclosemiacetal [XIII].

Esta substância foi citada anteriormente como tendo sido isolada somente do vegetal Vernonia marginata (37).



8 $\alpha$ -hidroxi-2-epi-vernomargolido-1,4-cliclosemiacetal

Estrutura XIII

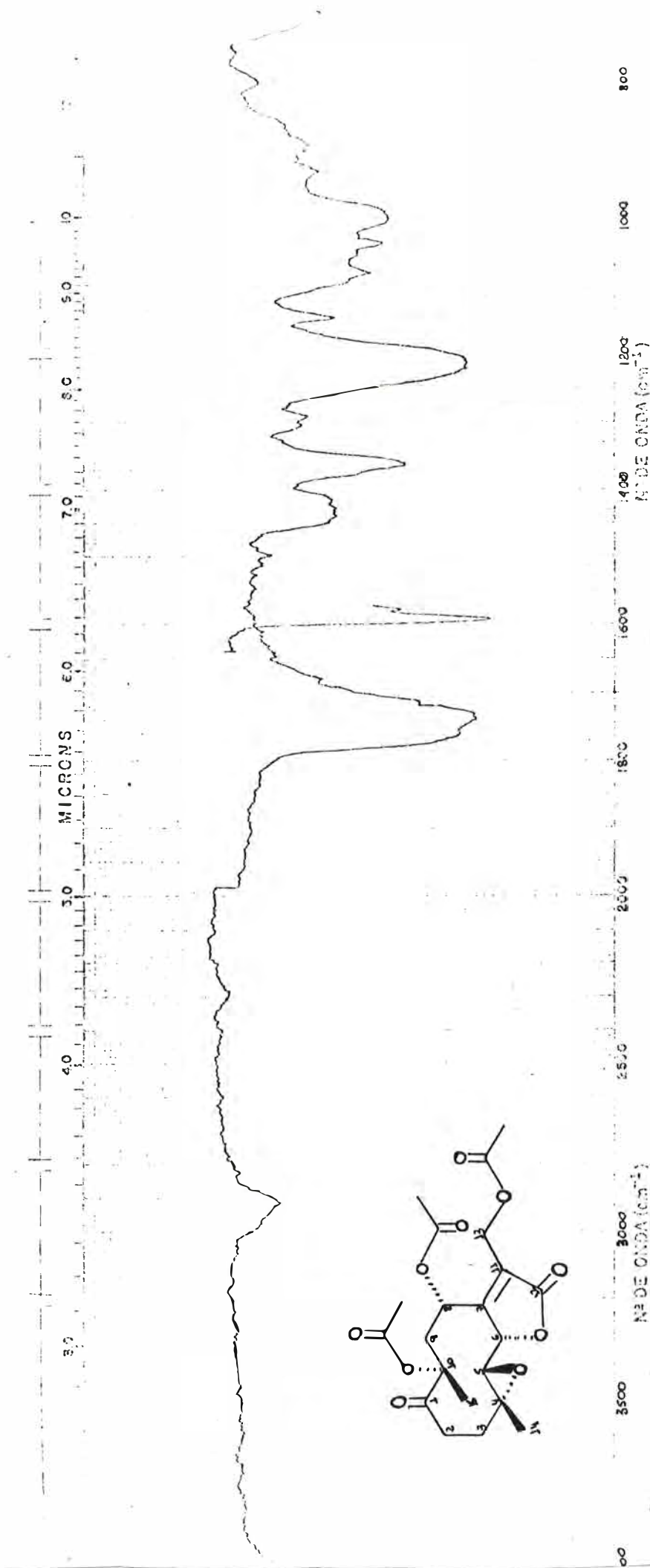


Fig. 01 - Espectro na região do IV de V.e.A.





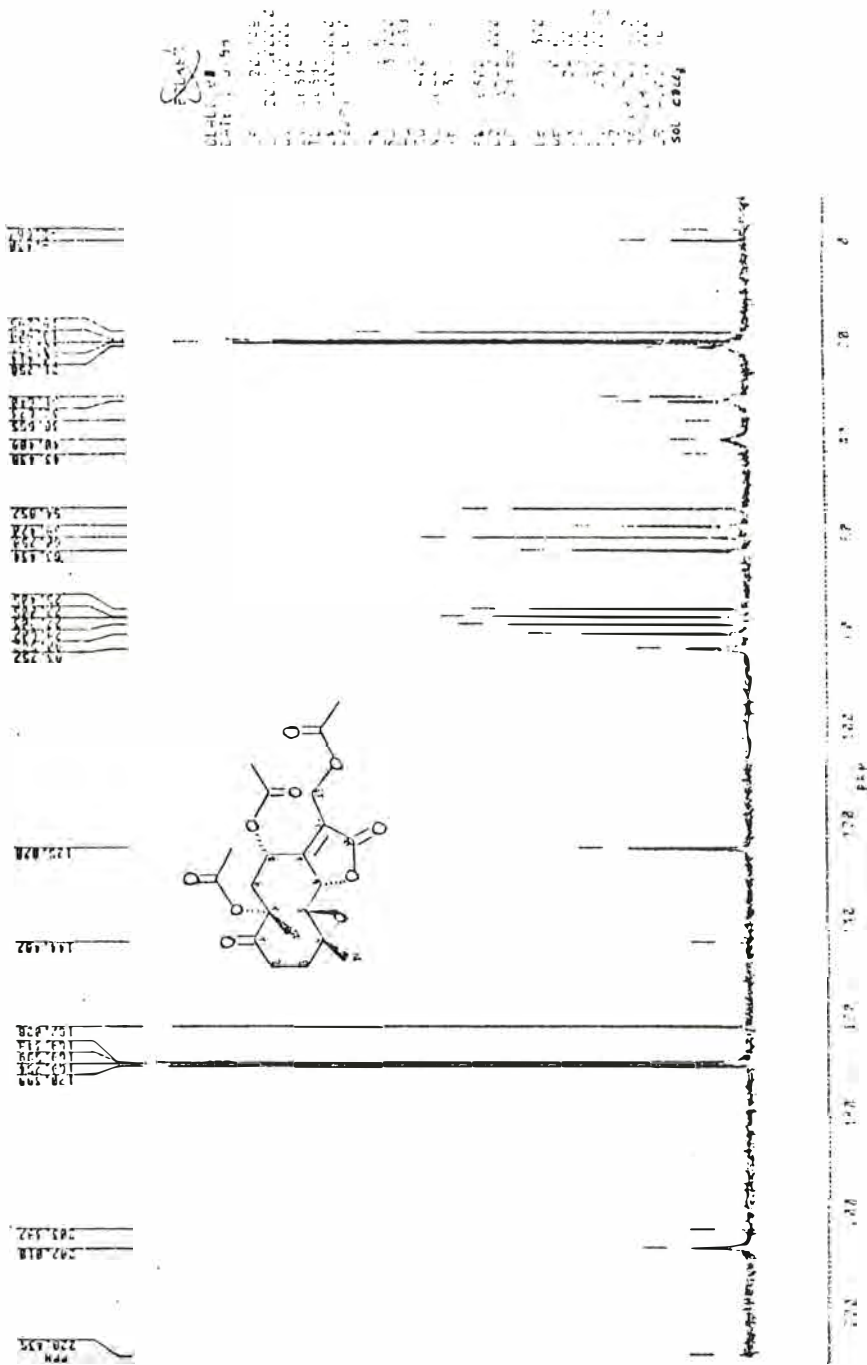
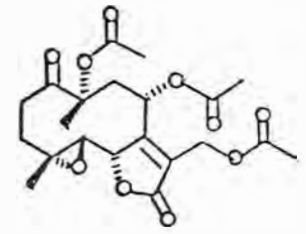
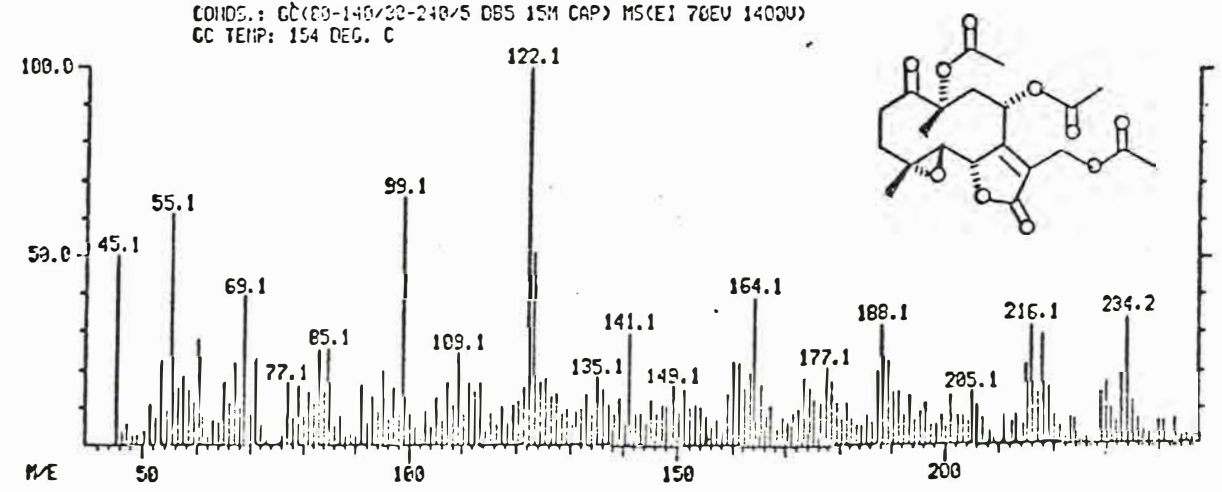


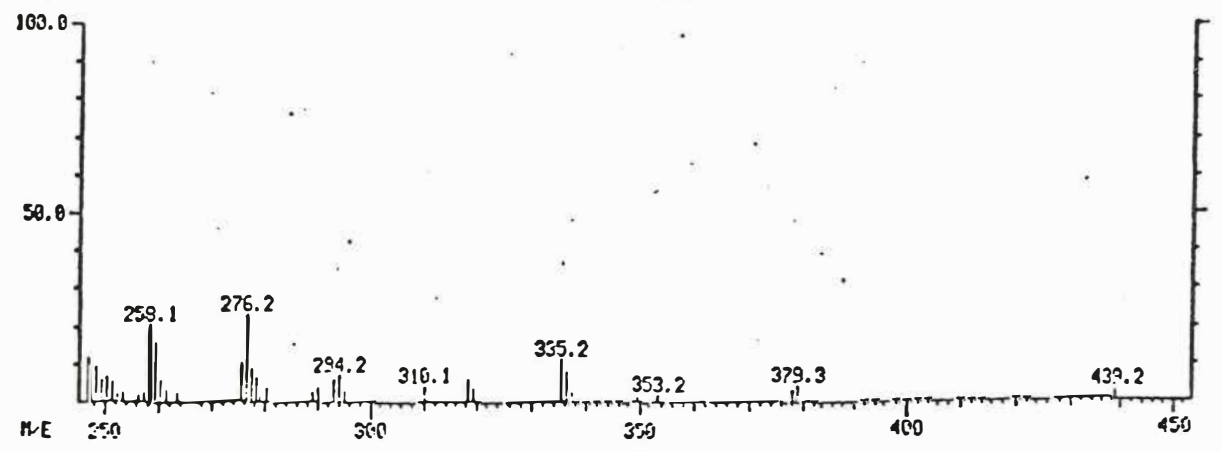
Fig. 03 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (20MHZ)BB de V.e.A

MASS SPECTRUM  
03/06/85 9:25:00 + 3:40  
SAMPLE: UE-A (SOSA/HERZ)  
CONDOS.: GC(00-140/20-240/S DB5 15M CAP) MS(EI 70EV 1400U)  
GC TEMP: 154 DEG. C

DATA: 305UEA #220  
CALI: 305CAL #3  
BASE M/E: 122  
RIC: 23038.



879.



879.

Fig. 04 - EM de V.e.A

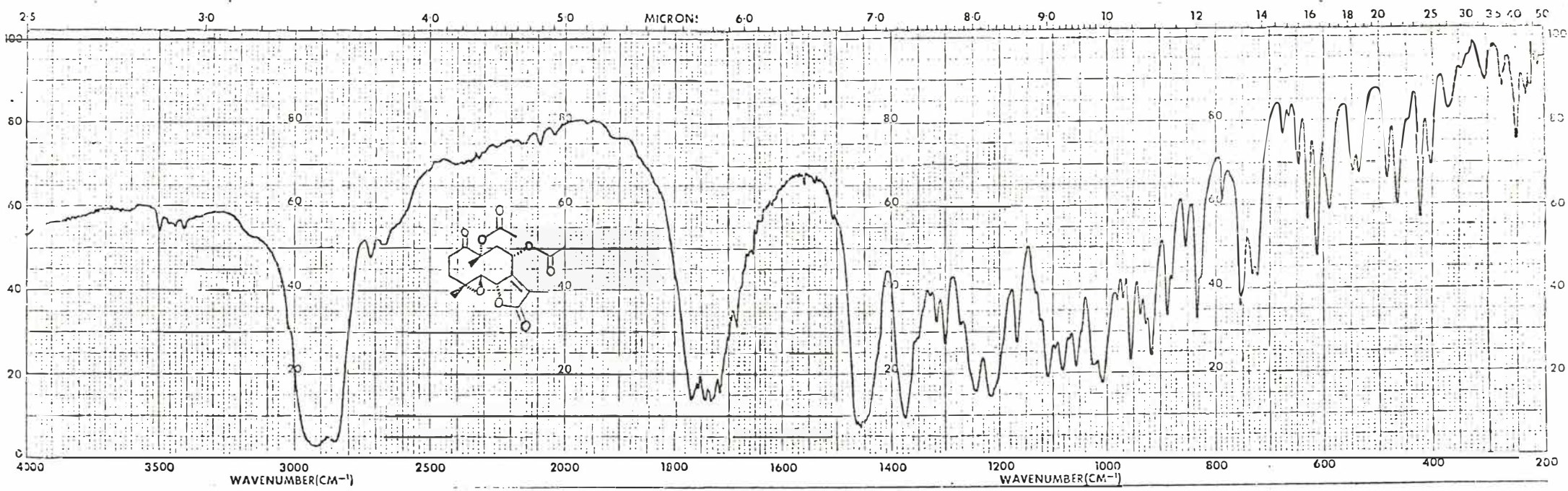


Fig. 05 - Espectro na região do IV de glucolido-B-H<sub>1</sub>

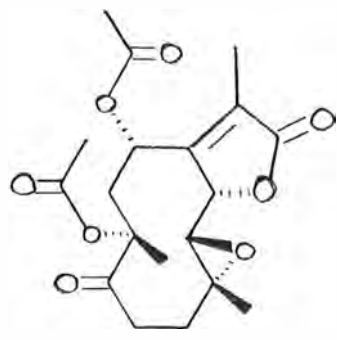
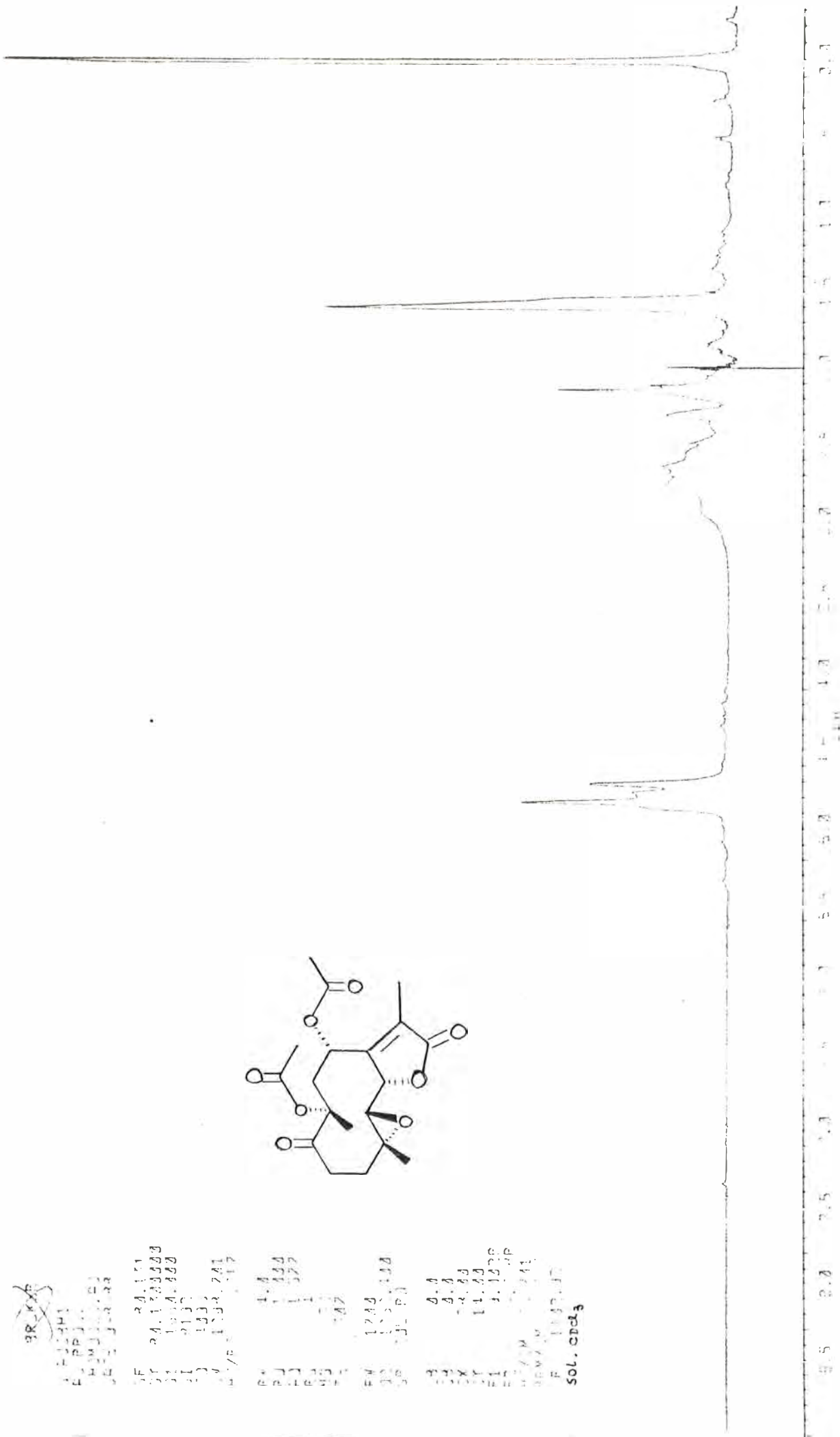


Fig. 06 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, CDCl<sub>3</sub>) de glaucolido-B-H<sub>1</sub>

PR. 107

100-341  
107-107-107

RF 24.101  
SF 24.100000  
DI 1100.000  
SI 21.00  
TJ 1110  
VW 111.001  
W/P 1000

RF 1.0  
PJ 0.4  
PI 1.000  
SI 1  
TJ 110  
VW 111

RF 1.00  
SF 0.4  
DI 100.00

RF 0.4  
SF 0.4  
DI 0.40  
SI 11.00  
TJ 0.4010  
VW 11.00  
W/P 1000  
SOL CDCl<sub>3</sub>

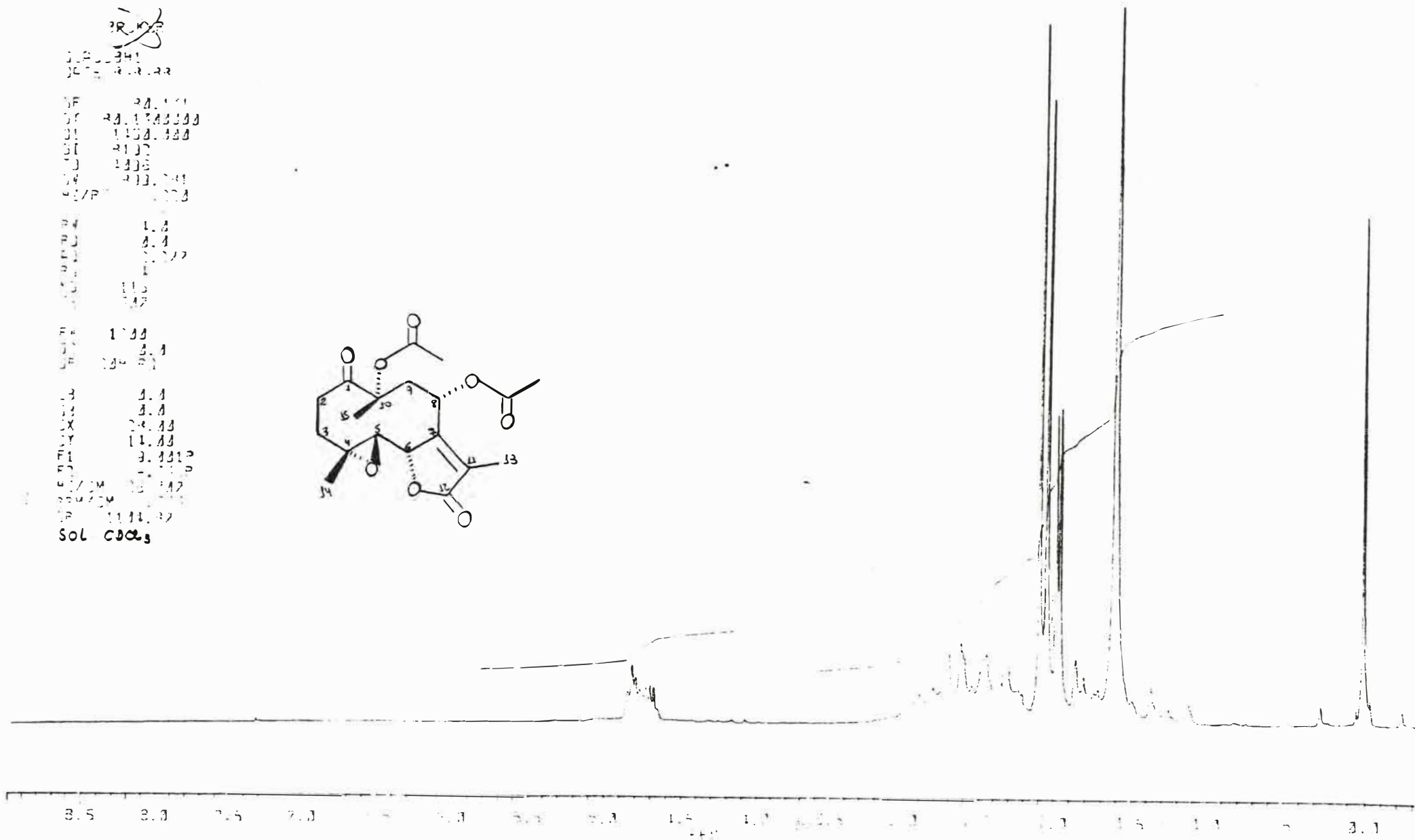
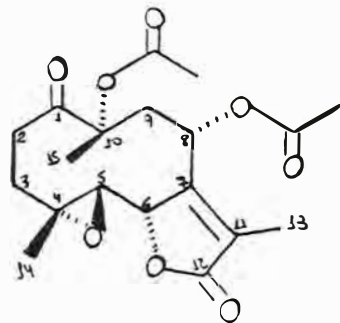


Fig. 07 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, CDCl<sub>3</sub>) com desacoplamento de glucolido-B-H<sub>1</sub>

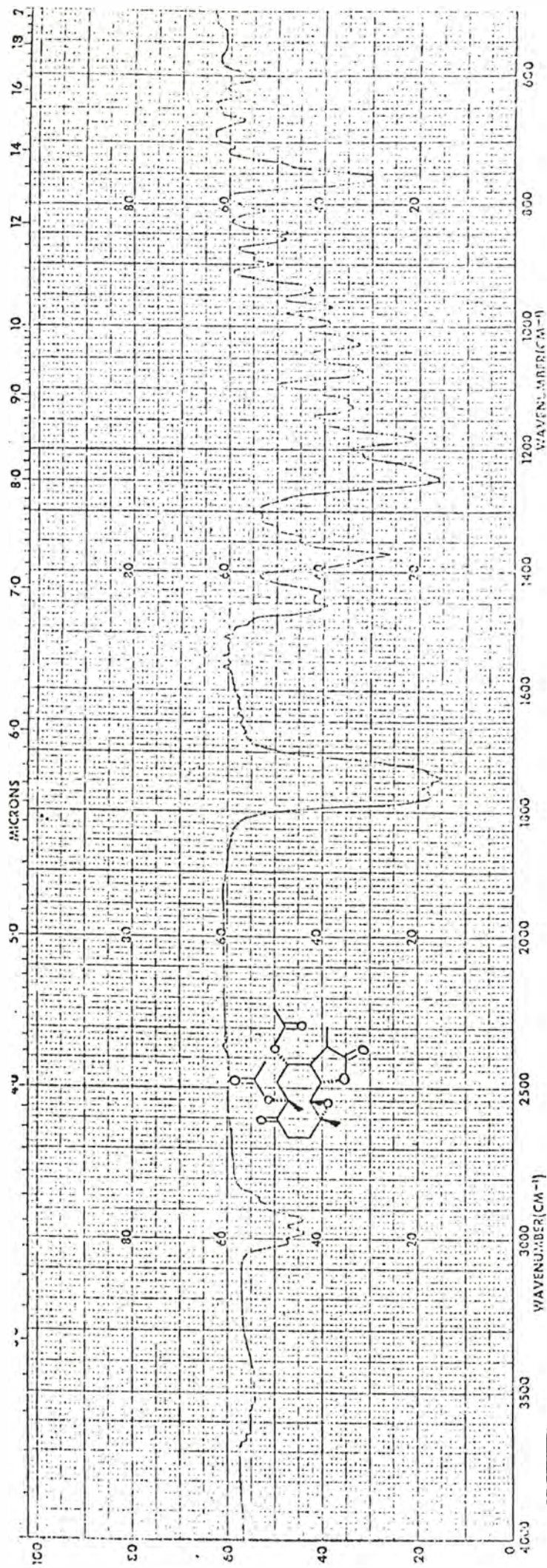


Fig. 08 - Espectro na região do IV de glucofido-B-H<sub>2</sub>







~~61.414~~

61-41402 66  
 ml 50.00  
 200.0000 ml  
 100.0000 g

1	51	5
2	51	50.000
3	41	20
4	51	20
5	41	20
6	41	20
7	51	20
8	41	20
9	51	20
10	41	20
11	51	20
12	41	20
13	51	20
14	41	20
15	51	20
16	41	20
17	51	20
18	41	20
19	51	20
20	41	20
21	51	20
22	41	20
23	51	20
24	41	20
25	51	20
26	41	20
27	51	20
28	41	20
29	51	20
30	41	20
31	51	20
32	41	20
33	51	20
34	41	20
35	51	20
36	41	20
37	51	20
38	41	20
39	51	20
40	41	20
41	51	20
42	41	20
43	51	20
44	41	20
45	51	20
46	41	20
47	51	20
48	41	20
49	51	20
50	41	20
51	51	20
52	41	20
53	51	20
54	41	20
55	51	20
56	41	20
57	51	20
58	41	20
59	51	20
60	41	20
61	51	20
62	41	20
63	51	20
64	41	20
65	51	20
66	41	20
67	51	20
68	41	20
69	51	20
70	41	20
71	51	20
72	41	20
73	51	20
74	41	20
75	51	20
76	41	20
77	51	20
78	41	20
79	51	20
80	41	20
81	51	20
82	41	20
83	51	20
84	41	20
85	51	20
86	41	20
87	51	20
88	41	20
89	51	20
90	41	20
91	51	20
92	41	20
93	51	20
94	41	20
95	51	20
96	41	20
97	51	20
98	41	20
99	51	20
100	41	20

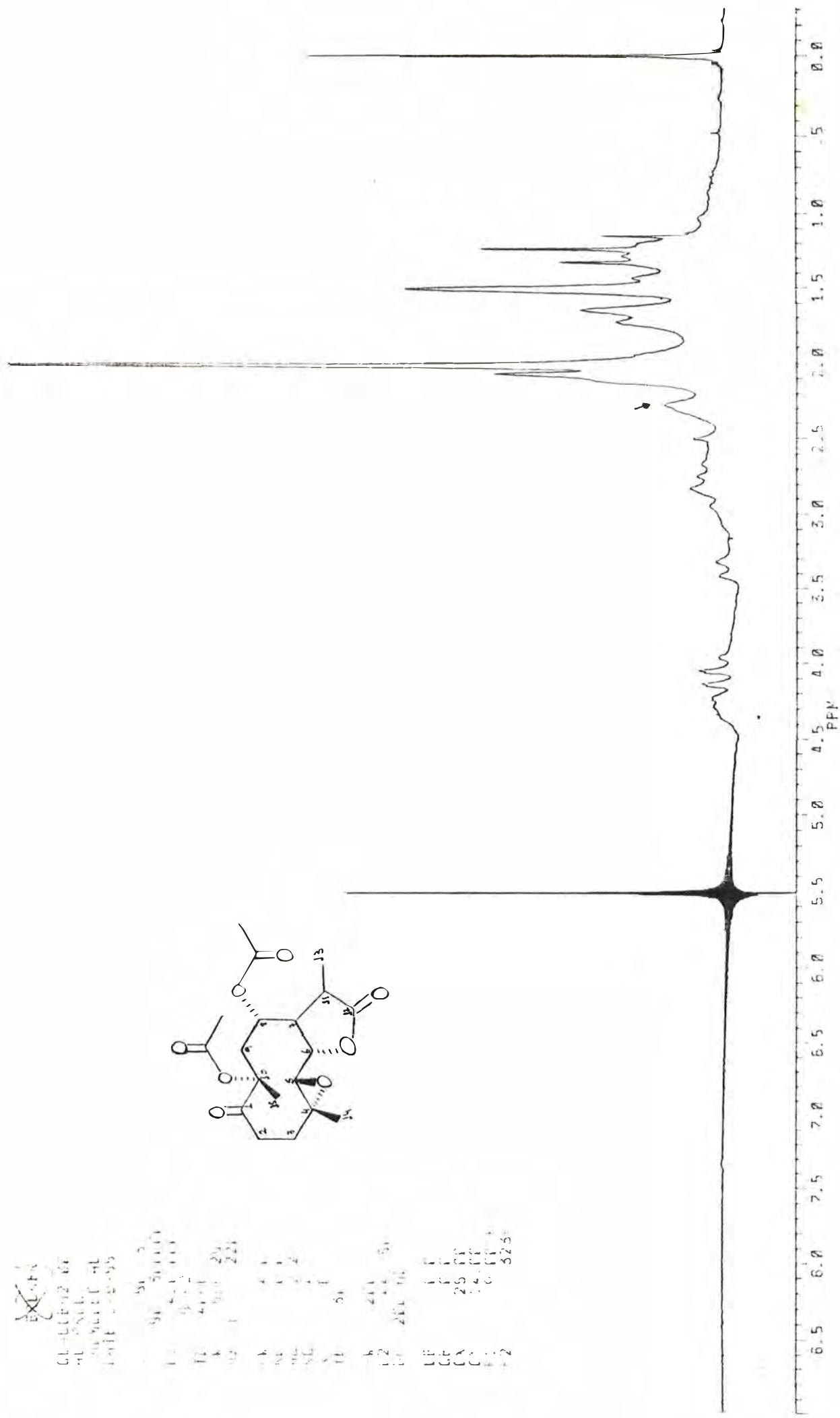
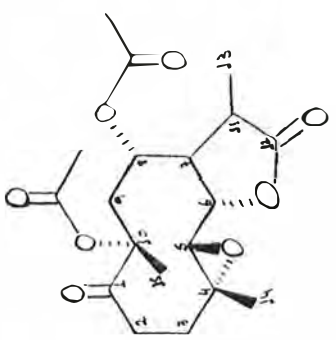


Fig. 11 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, CDCl<sub>3</sub>) com deslocamento de glaucólido-B-H<sub>2</sub>

BRUNO

EXPERIMENT: 001  
PROJ: 001  
PROJECT: 001  
DATE: 5-3-88

BF 20.131  
BY 20.170000  
GL 1450.000  
SI 8197  
TD 1000  
SW 299.281  
HZ/PT 100

PW 4.0  
RD 0.0  
F1 2.227  
RF 1  
NS 16  
SE 347

FV 1.00  
G1 1207.340  
GP 201.00

L3 4.0  
L8 4.0  
DX 24.00  
CY 14.00  
F1 3.001P  
F2 -3.332P  
HZ/CM 26.207  
PPM/CM 3.333  
DR 1402.15

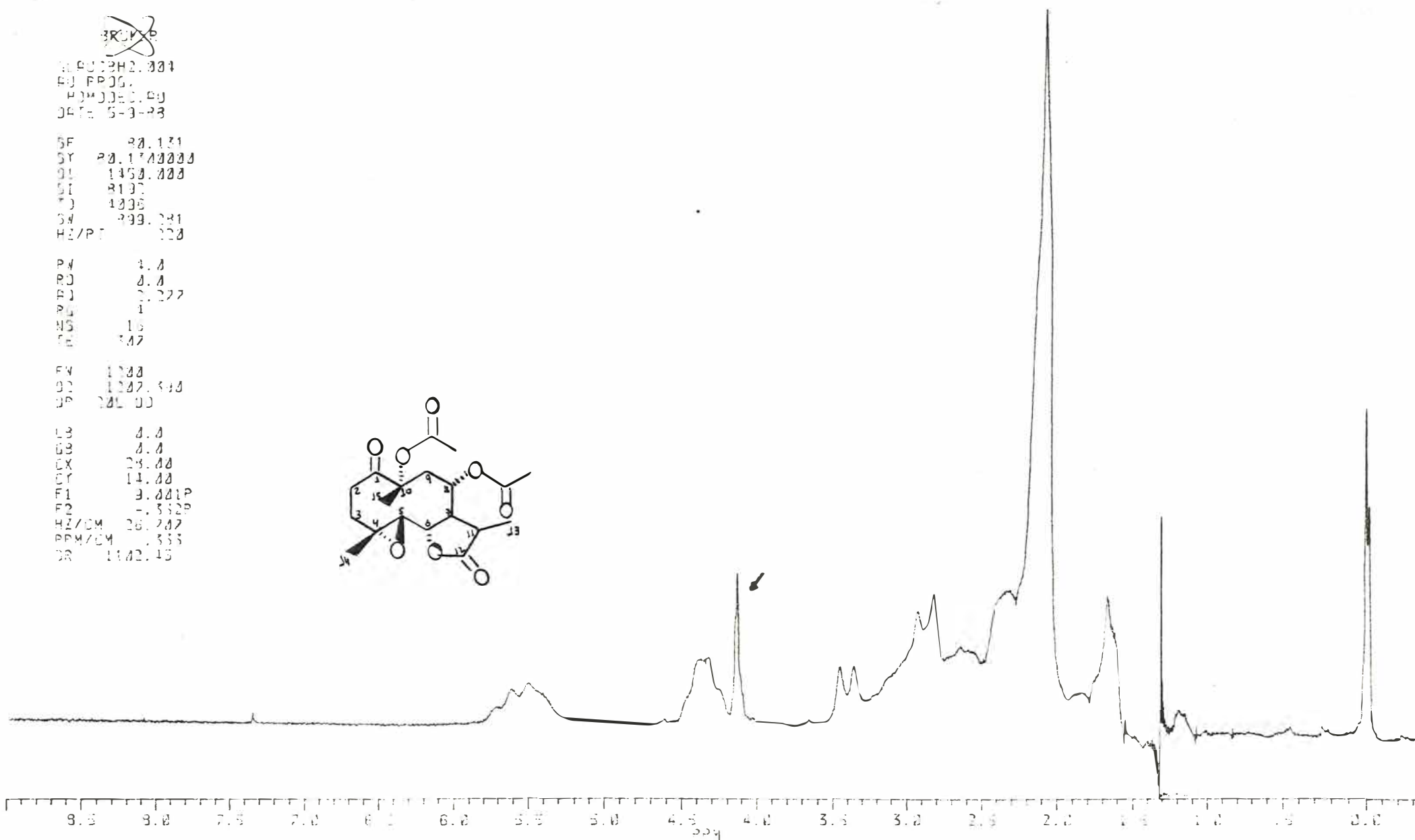
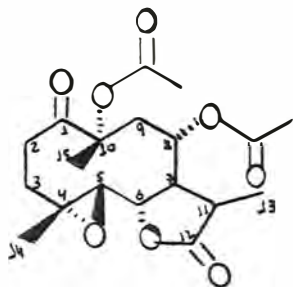


Fig. 12 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, CDCl<sub>3</sub>) com desacoplamento de gluconolido-B-H<sub>2</sub>

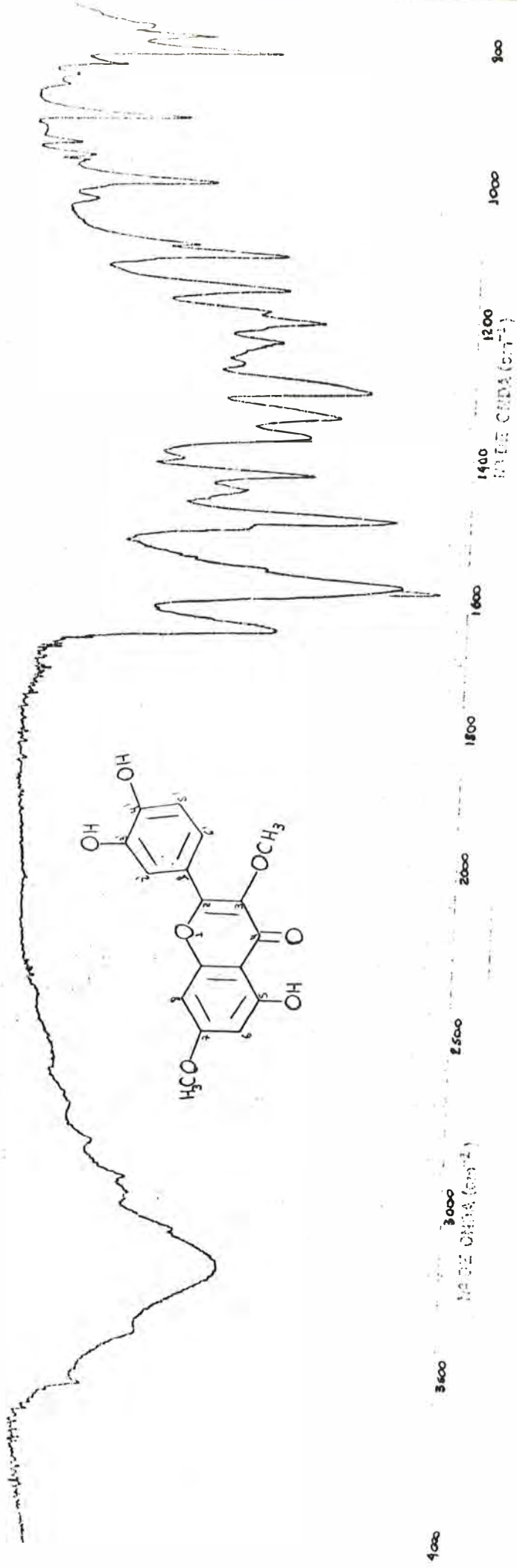


Fig. 13 - Espectro na região do IV de V.e.B

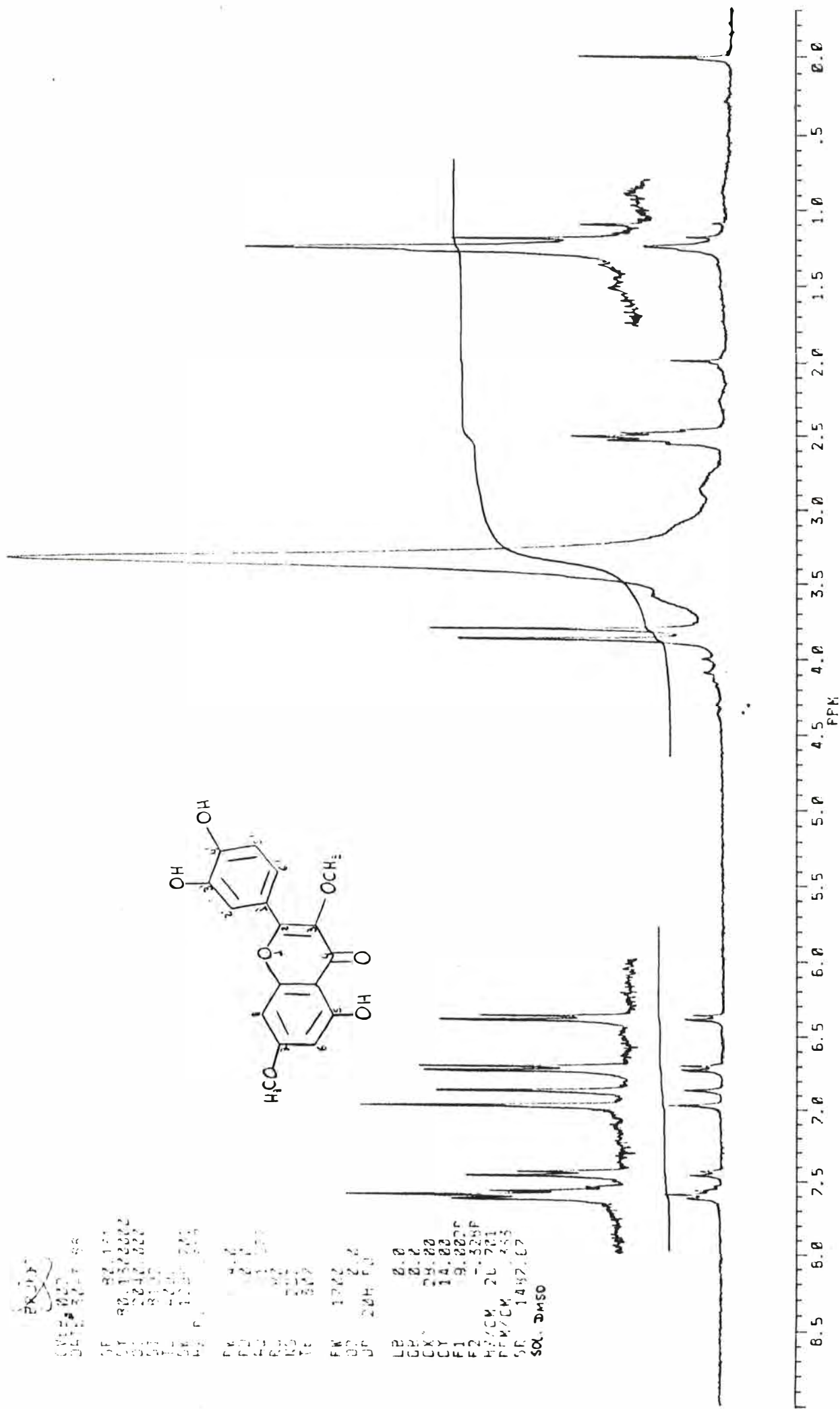


Fig. 14 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (80MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) de V.e.B

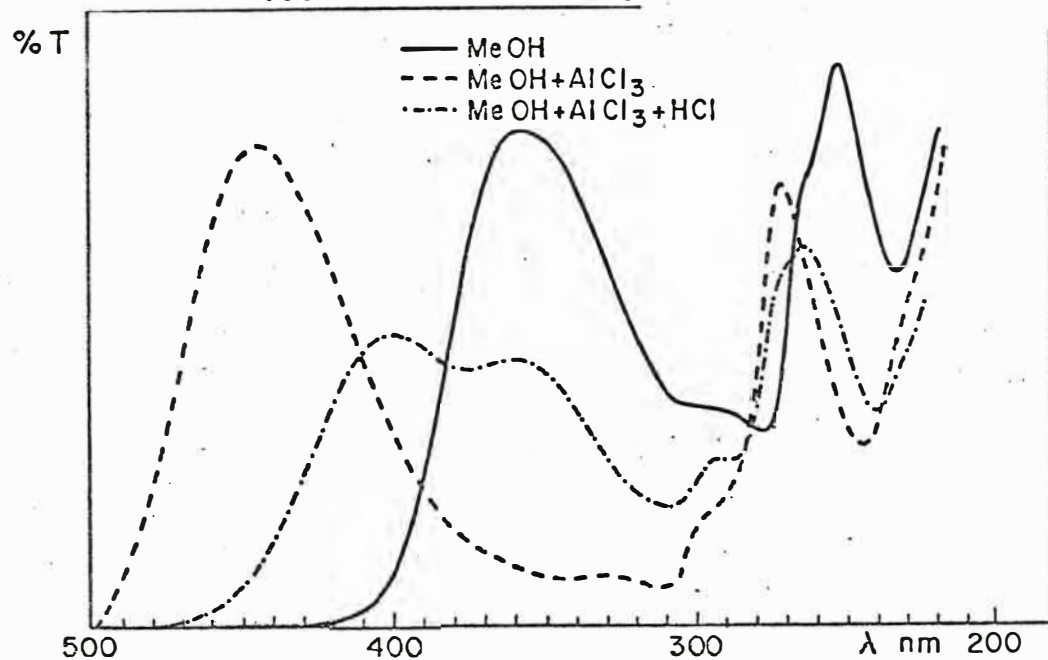
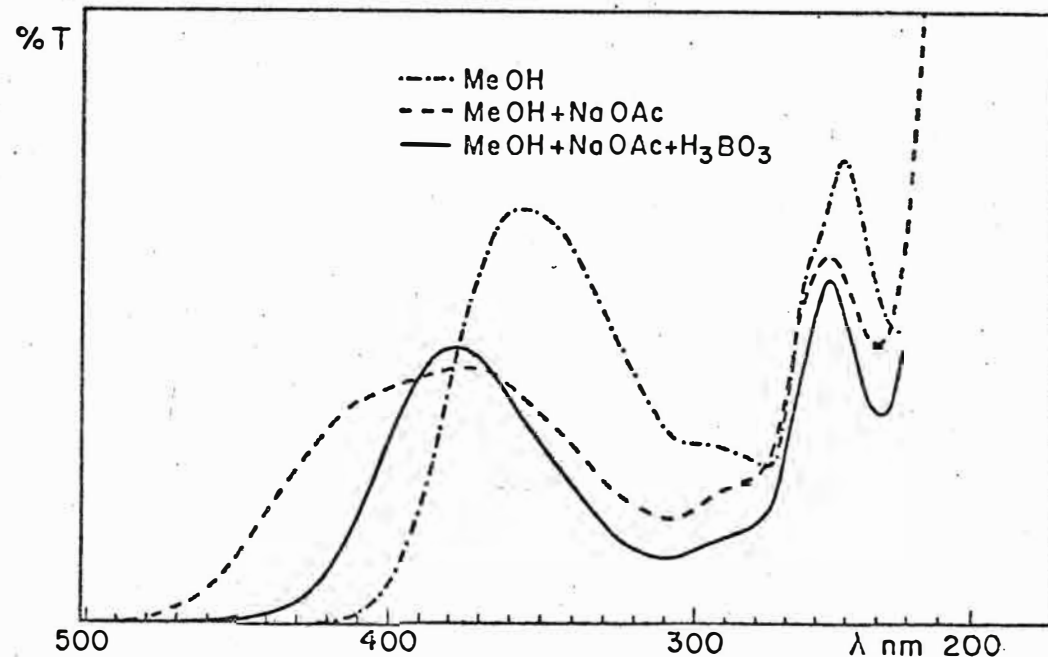
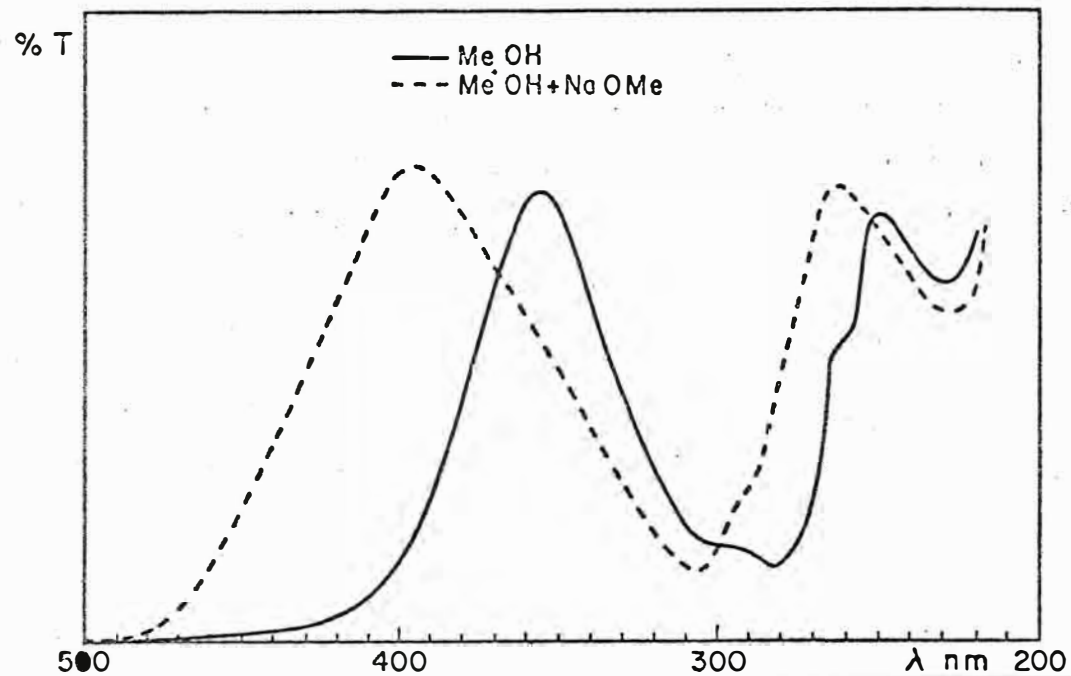


Fig. 15 - Espectros na região do UV de V.e.B

SPECTRA PLOT/TAB PROGRAM, [Rev 4/27/81]

\*\*IIP SAMPLE # 321 dated: 5/23/1988 9:39 AM Monday  
\*\* Spectrum 8, Disk ID 2 \*\* Sample # 321 Retention Time 2.86 min  
Scanned from 40 to 800 euv Number of Peaks Detected = 194  
File type = processed

Base Peak = 330.6 Base Peak Abundance = 170 Total Abundance = 3477

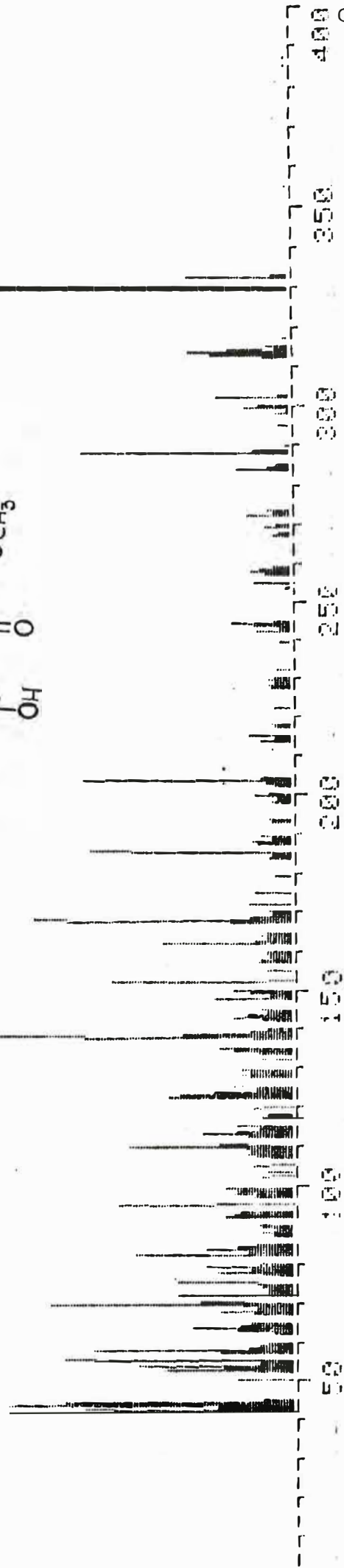
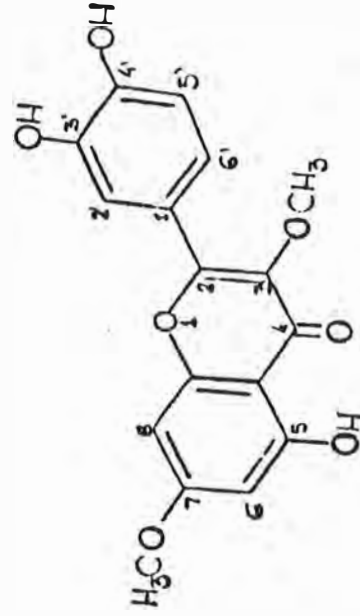


Fig. 16 - EM de V.e.B

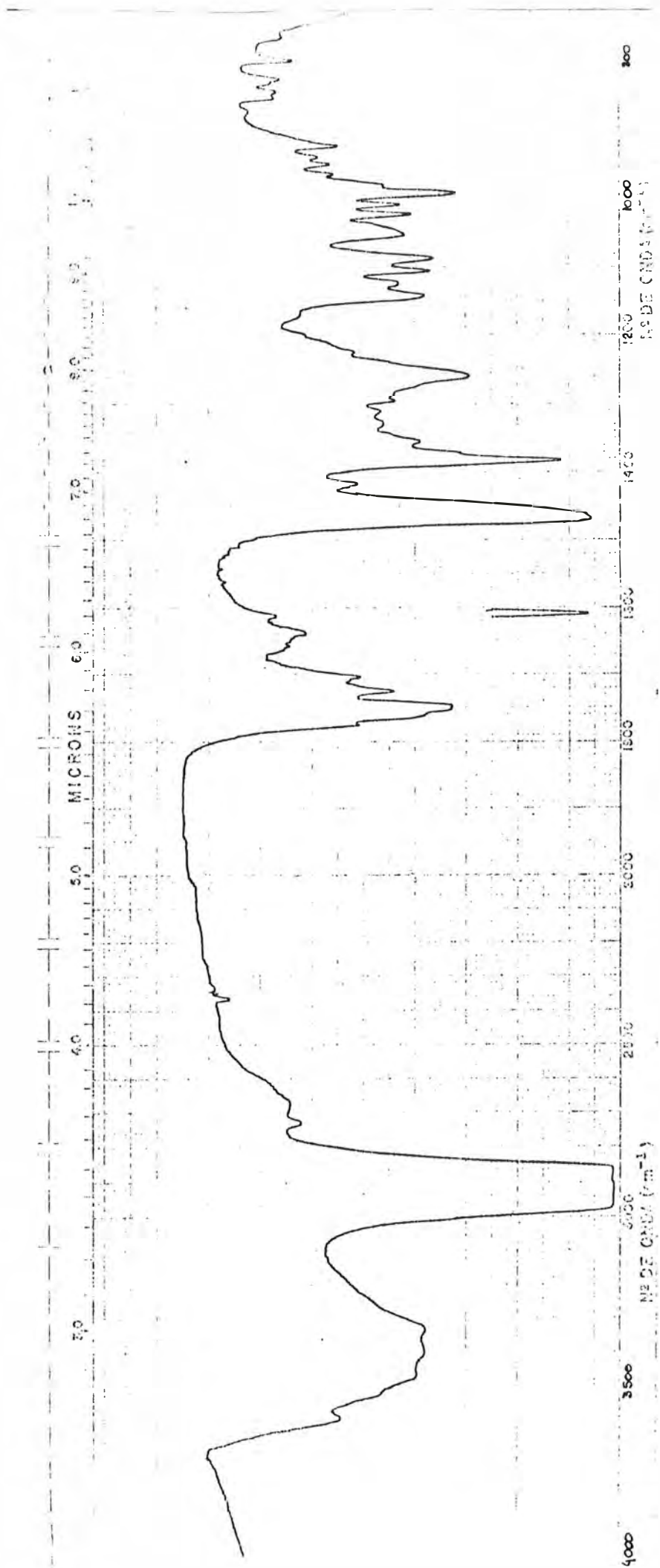


Fig. 17 - Espectro na região do IV de V.e.C

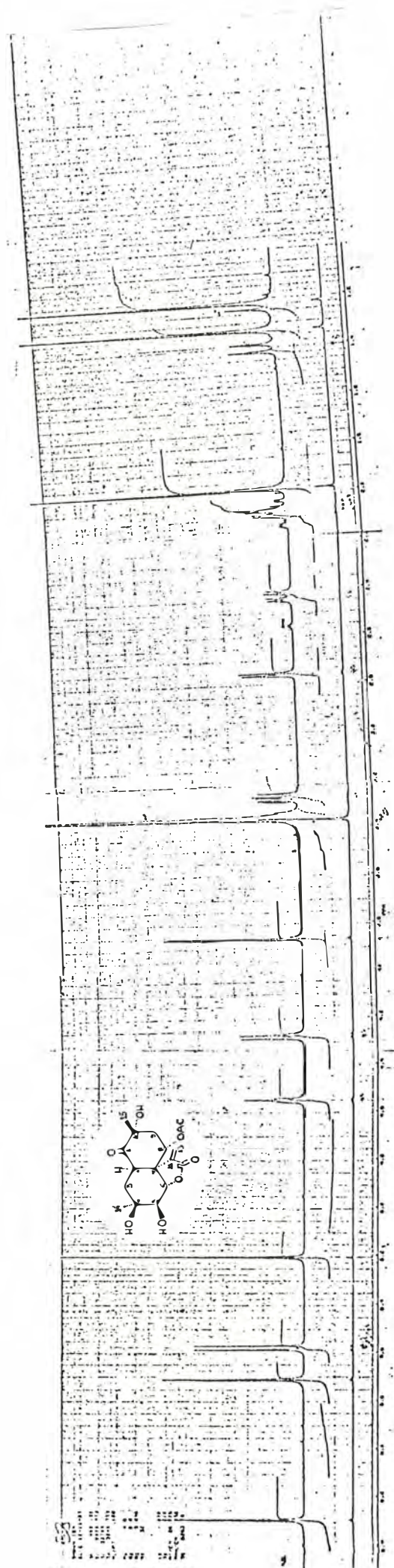
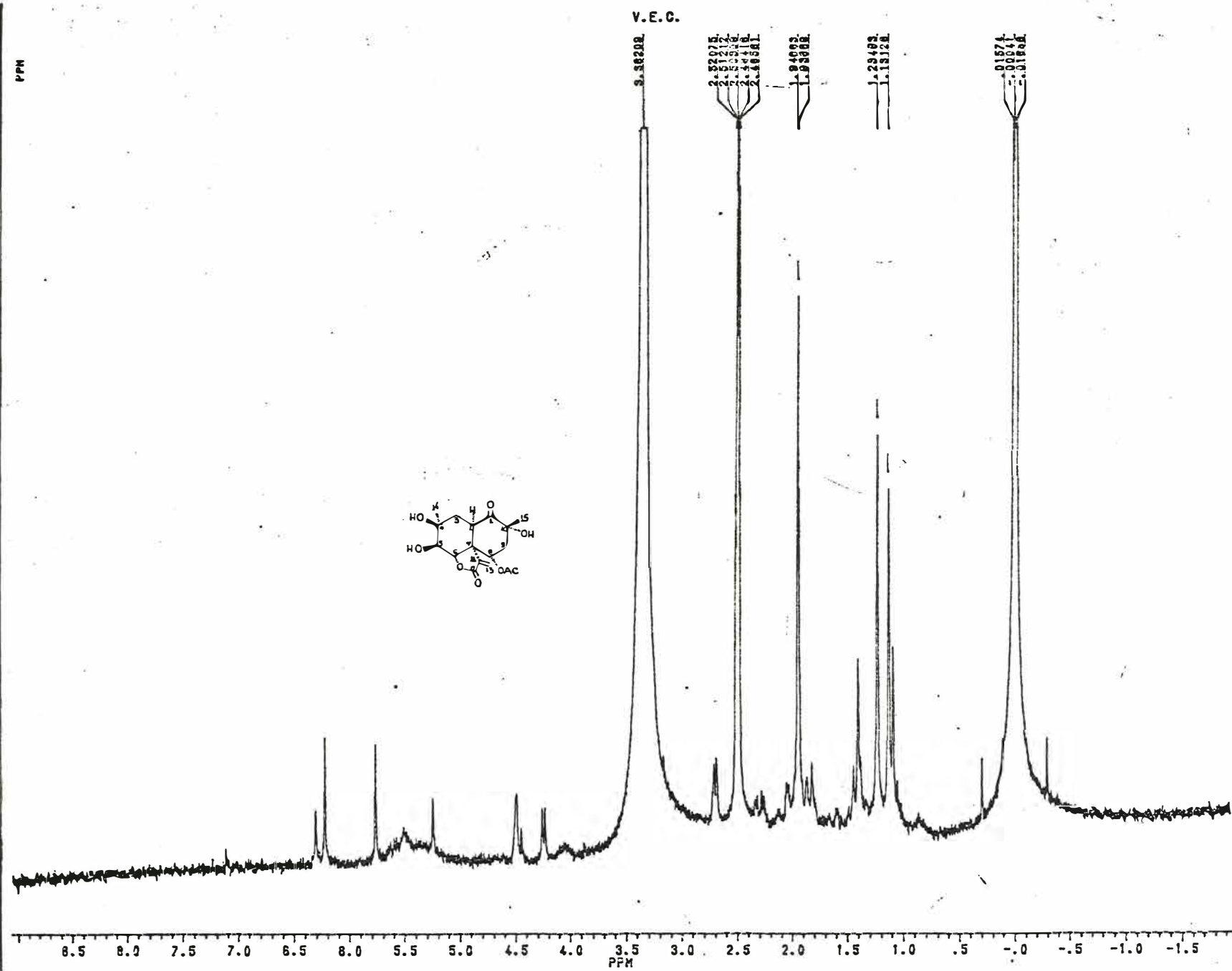


Fig. 18 - Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de V.e.C






  
 PROTON  
 DATE 21-12-88  
 SF 200.133  
 SY 80.1300000  
 Q1 4000.000  
 SI 16384  
 TD 16384  
 SW 2202.843  
 HZ/PT .238  
 FW 2.0  
 RD 3.000  
 AQ 3.718  
 RG 10  
 NS 20  
 TE 287  
 FW 2800  
 QZ 1500.000  
 DP 83L FC  
 LB .200  
 GB 0.0  
 CX 36.00  
 CY 400.00  
 FI 8.050P  
 F2 -1.845P  
 HZ/CM 62.320  
 PPM/CM .314  
 SR 3287.21

Fig. 19 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de V.e.C



PPM

CR18.001

0.22802

3.77408

4.49072

9.08672

2.71084

2.02280

2.59384

2.49804

2.04519

1.83774

1.81112

1.49909

1.39264

1.31112

1.30909

2.98909

2.18809

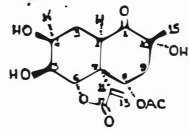
1.1221

0.0023

1.1991

2.2406

2.2806



CR18.001  
 AU PROC:  
 HOMODEC. AU  
 DATE 27-12-88

SF 200.133  
 SY 80.1300000  
 O1 4000.000  
 S1 18384  
 TD 18384  
 SW 2202.843  
 HZ/PT .289

PW 2.0  
 RD 0.0  
 AQ 3.718  
 RG 10  
 NS 18  
 TE 287

FW 2800  
 O2 4185.530  
 DP 20L HD

LB .200  
 GB 0.0  
 CX 35.00  
 CY 200.00  
 F1 9.087P  
 F2 -1.837P  
 HZ/CM 82.825  
 FPM/CM .314  
 SR 3285.58

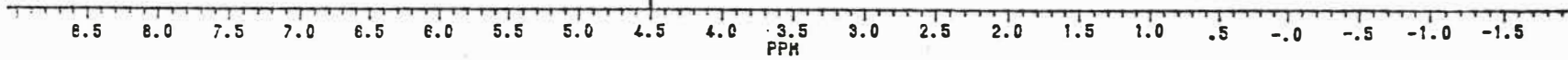


Fig. 21 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) com desacoplamento de V.e.C

PPM

CR18.005

9.22819

5.77388

3.37078

2.70719

2.59340

2.48022

2.36677

2.05539

1.94221

1.82882

1.49278

1.23409

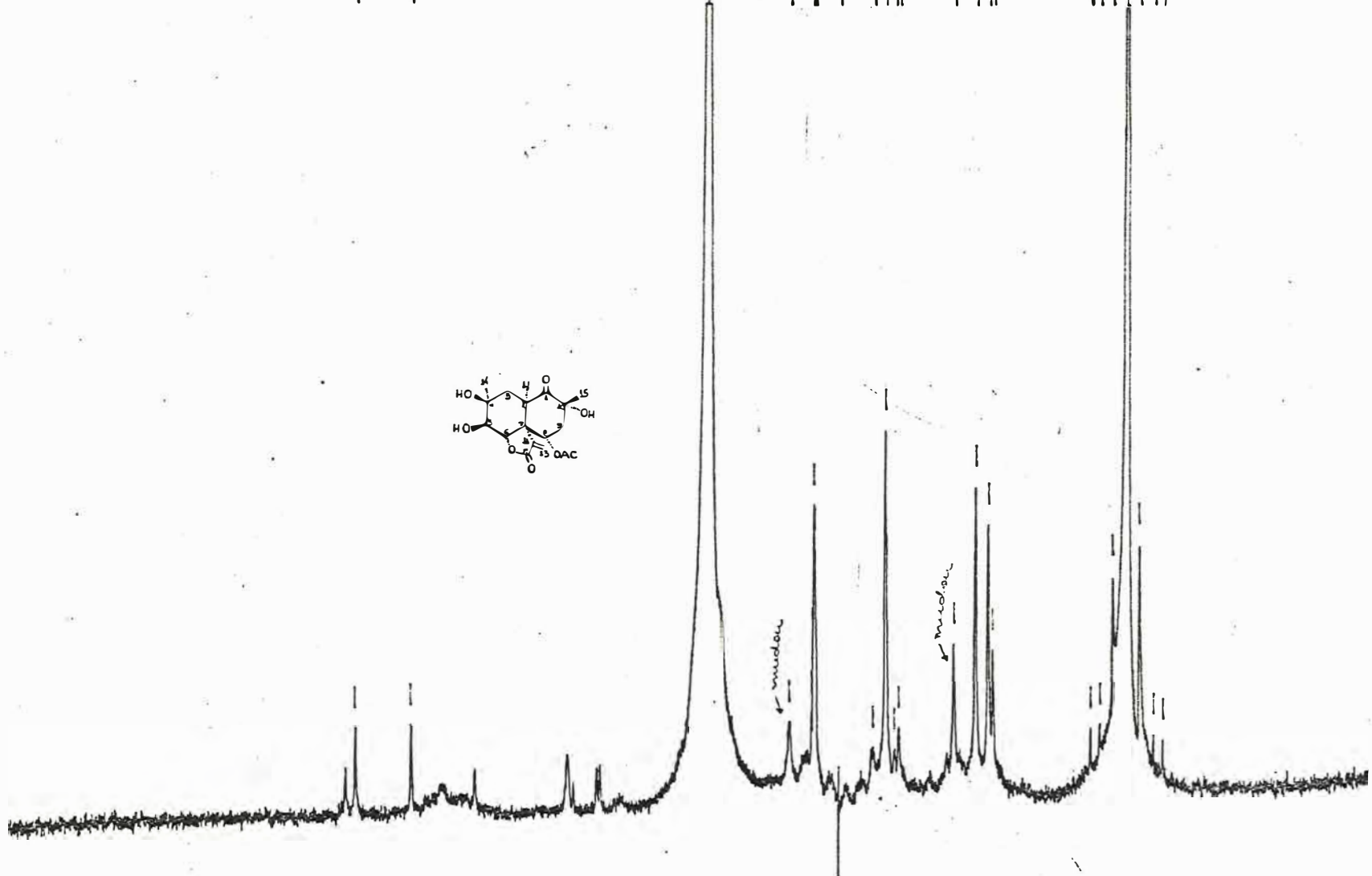
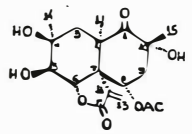
1.12072

1.00734

0.9017

0.78832

0.6827




  
 CR18.005  
 AU PRG:  
 HOMDEC.AU  
 DATE 27-12-88  
 SF 200.133  
 SY 60.1350000  
 Q1 4000.000  
 QI 18884  
 TD 18884  
 SQ 2202.848  
 HZ/PT .220  
 PW 2.0  
 RD 0.0  
 AQ 3.718  
 RG 12  
 NS 18  
 TE 227  
 FK 2800  
 Q2 3740.720  
 DP 20L HD  
 LB .200  
 CB 0.0  
 CX 35.00  
 CY 200.00  
 F1 8.002P  
 F2 -1.002P  
 HZ/CH 62.834  
 PFM/CH .314  
 SR 3285.58

Fig. 22 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) com desacoplamento de V.e.C

CRIS.003

PPM

0.22880

5.77480

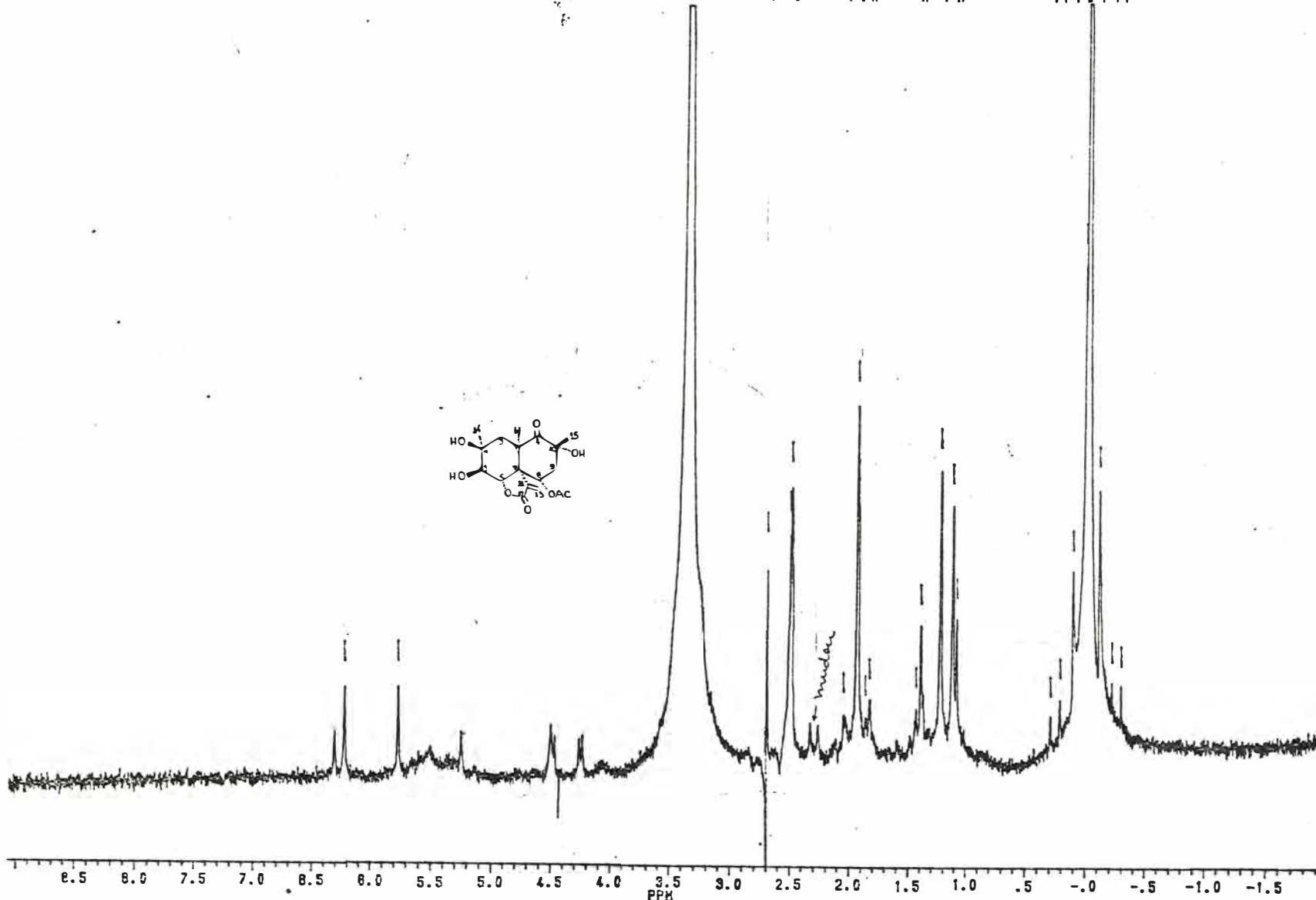
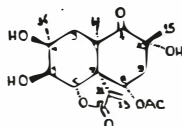
3.37102

2.29418  
2.27128  
2.16898  
2.15852

2.08161  
1.89017  
1.87727  
1.84211

1.48615  
1.40225  
1.28611  
1.30922

0.89907  
0.71815  
0.65572  
0.60002  
0.10002  
0.08480  
0.06880



CRIS.003  
 AU PROG:  
 HQMODEC.AU  
 DATE 27-12-88

SF 200.139  
 SY 80.130000  
 O1 4000.000  
 SI 18254  
 TD 18284  
 SW 2202.843  
 HZ/PT .268

PW 2.0  
 RD 0.0  
 AQ 3.718  
 RG 10  
 NS 18  
 TE 287

FW 2800  
 O2 3628.570  
 DP 20L HD

LB .200  
 GB 0.0  
 CX 35.00  
 CY 200.00  
 F1 8.087P  
 F2 -1.837P  
 HZ/CM 82.825  
 PPM/CM .314  
 SR 3265.58

Fig. 23 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) com desacoplamento de V.e.C

PPM

CRIS.002

8.23000

6.70318

4.51298

4.21918

4.21312

4.09898

3.99002

3.87712

3.26312

2.88092

2.80318

1.82792

1.80318

1.28018

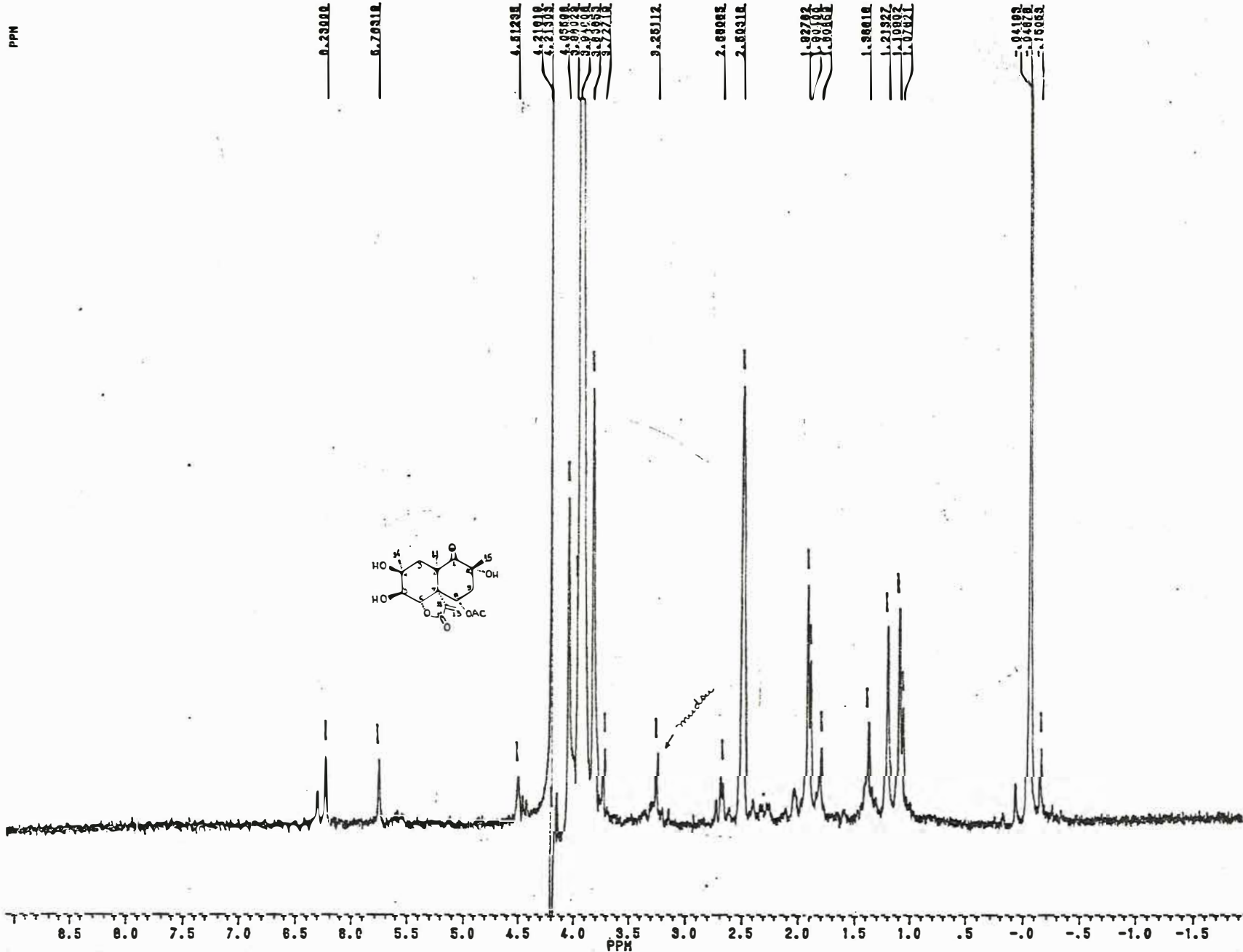
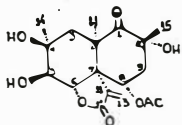
1.21902

1.07812

0.44992

0.41802

0.16062




  
 CRIS.002  
 AU PROD:  
 HCHCDEC.AU  
 DATE 27-12-88  
  
 SF 200.133  
 SY 89.1360000  
 O1 4000.000  
 S1 18384  
 TD 18384  
 SW 2282.843  
 HZ/PT .288  
  
 PK 2.0  
 RD 0.0  
 AQ 3.718  
 RS 10  
 NS 20  
 TE 287  
  
 FW 2800  
 G2 4128.081  
 DP 20L HD  
  
 LB .200  
 GB 0.0  
 CX 35.00  
 CY 400.00  
 F1 8.078P  
 F2 -1.825P  
 HZ/CM 82.825  
 PPM/CM .314  
 SR 3285.58  
 SOL DMSO + D2O

Fig. 24 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+ d<sub>2</sub>O) com desacoplamento de V.e.C

V. E. C.

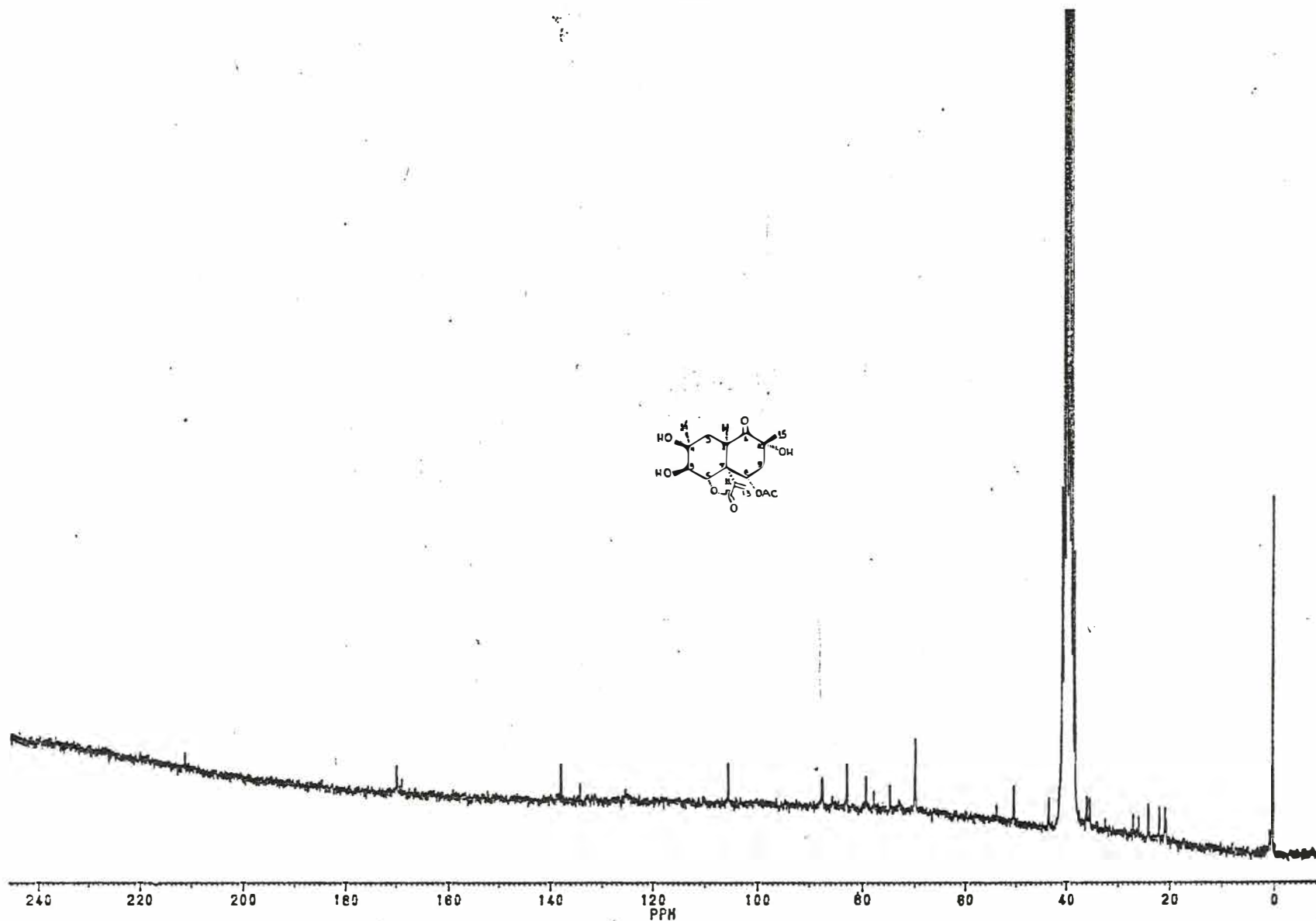
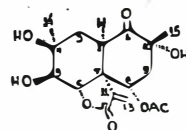


Fig. 25 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C (50MHz)BB de V.e.C

PPM

V. E. C.

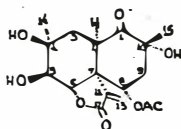
97.2494

99.8887

99.9115



99.9115



BRUKER

C13PQWOT  
 AU PROG:  
 DEPT. AU  
 DATE 2-10-88 17-13-89

SF 50.324  
 SY 50.3270000  
 Q1 2500.000  
 S1 32788  
 TD 32788  
 SM 12820.513  
 HZ/PT .793

PW 0.0  
 RD 0.0  
 AQ 1.278  
 RG 800  
 NS 48873  
 TE 287

FW 18100  
 O2 3200.000  
 DP 24H DO

LB 2.000  
 OB 0.0  
 CX 35.00  
 CY 15.00  
 F1 244.885P  
 F2 -9.532P  
 HZ/CM 365.820  
 PPM/CM 7.271  
 SR -3415.72



Fig. 26 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C (50MHz)DEPT de V.e.C



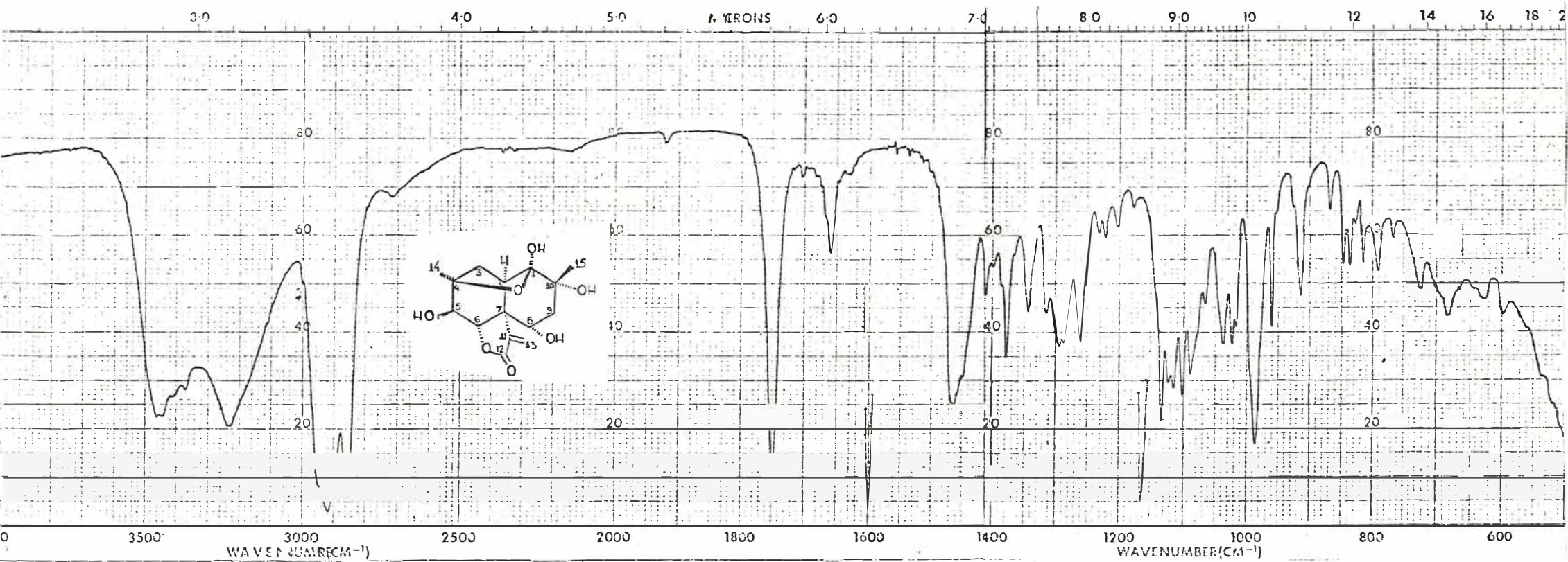


Fig. 27 - Espectro na região do IV de V.e.C<sub>1</sub>

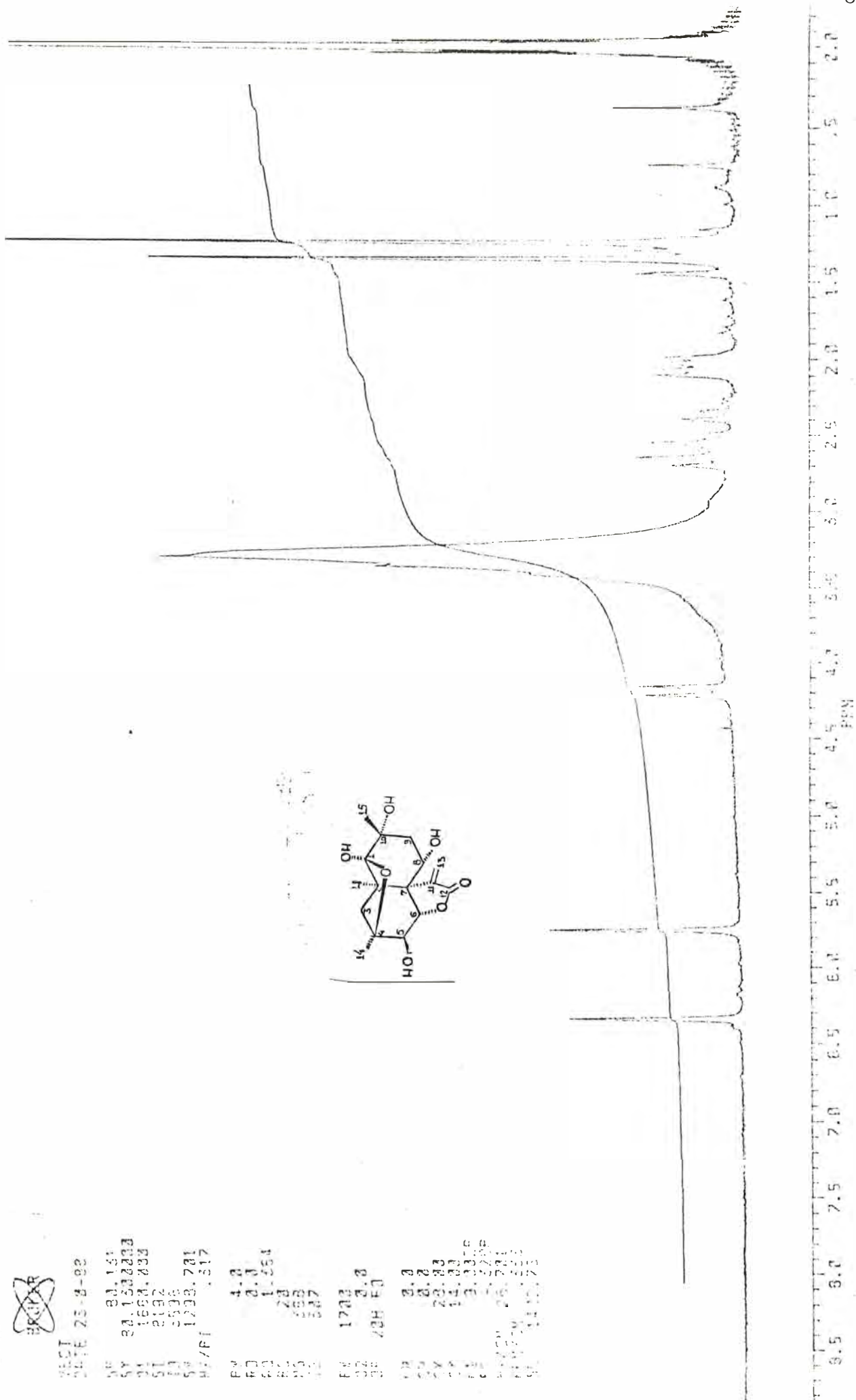


Fig. 28 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>) de V.e.C<sub>1</sub>.



1957  
207E 25-B-82

MP 81.151  
NY 21.1532203  
SI 1668.433  
ST 2192  
SD 5536  
SA 1293.781  
M/PF 1.517

PM 4.8  
PD 4.8  
PC 1.264  
PE 28  
PF 382

PV 1733  
PW 2.8  
PX 28H 40

PY 3.2  
PZ 3.2  
QA 23.83  
QB 14.03  
QC 13.3376  
QD 12.791  
QE 12.791  
QF 11.50173

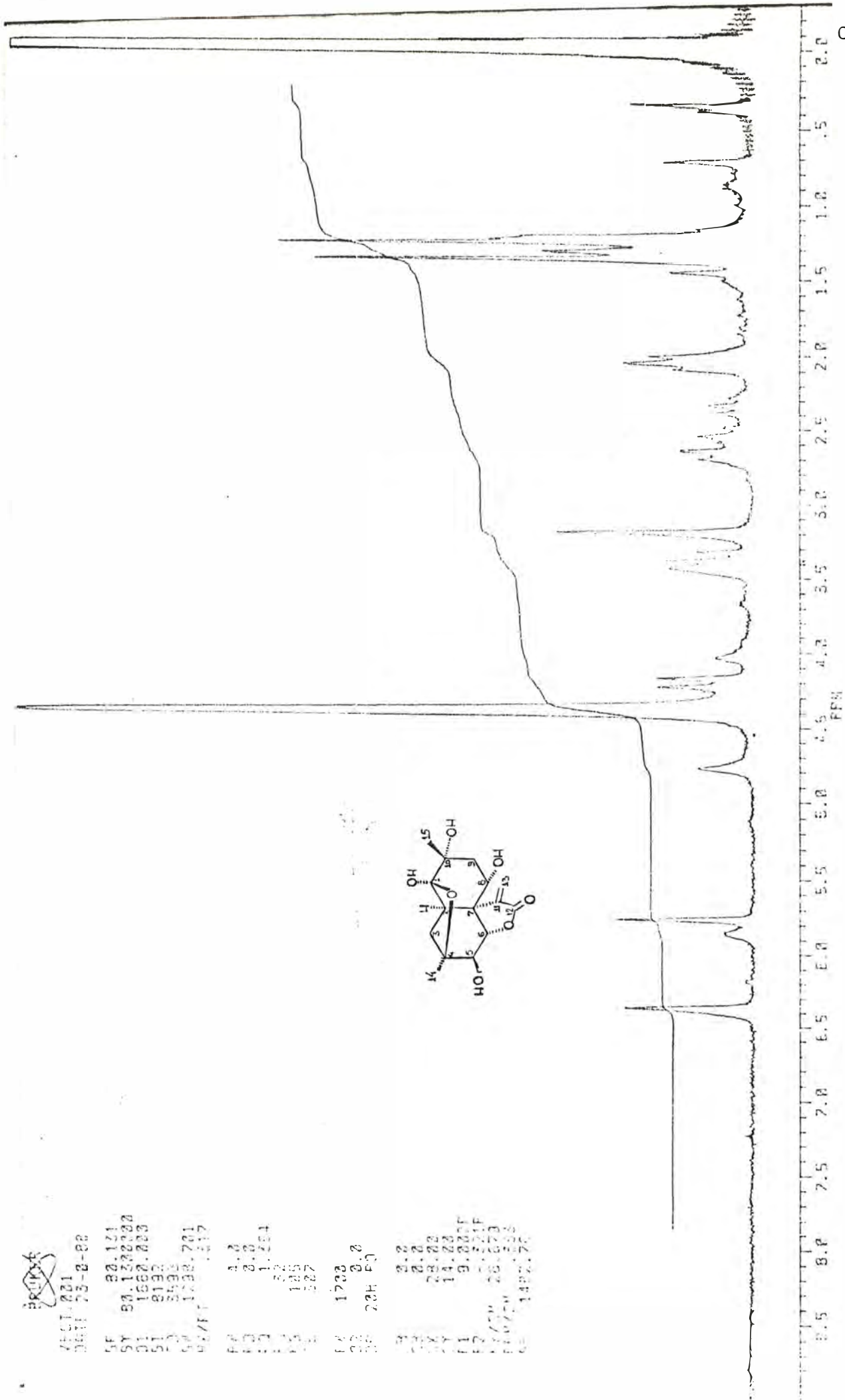


Fig. 29 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O) de V.e.C<sub>1</sub>

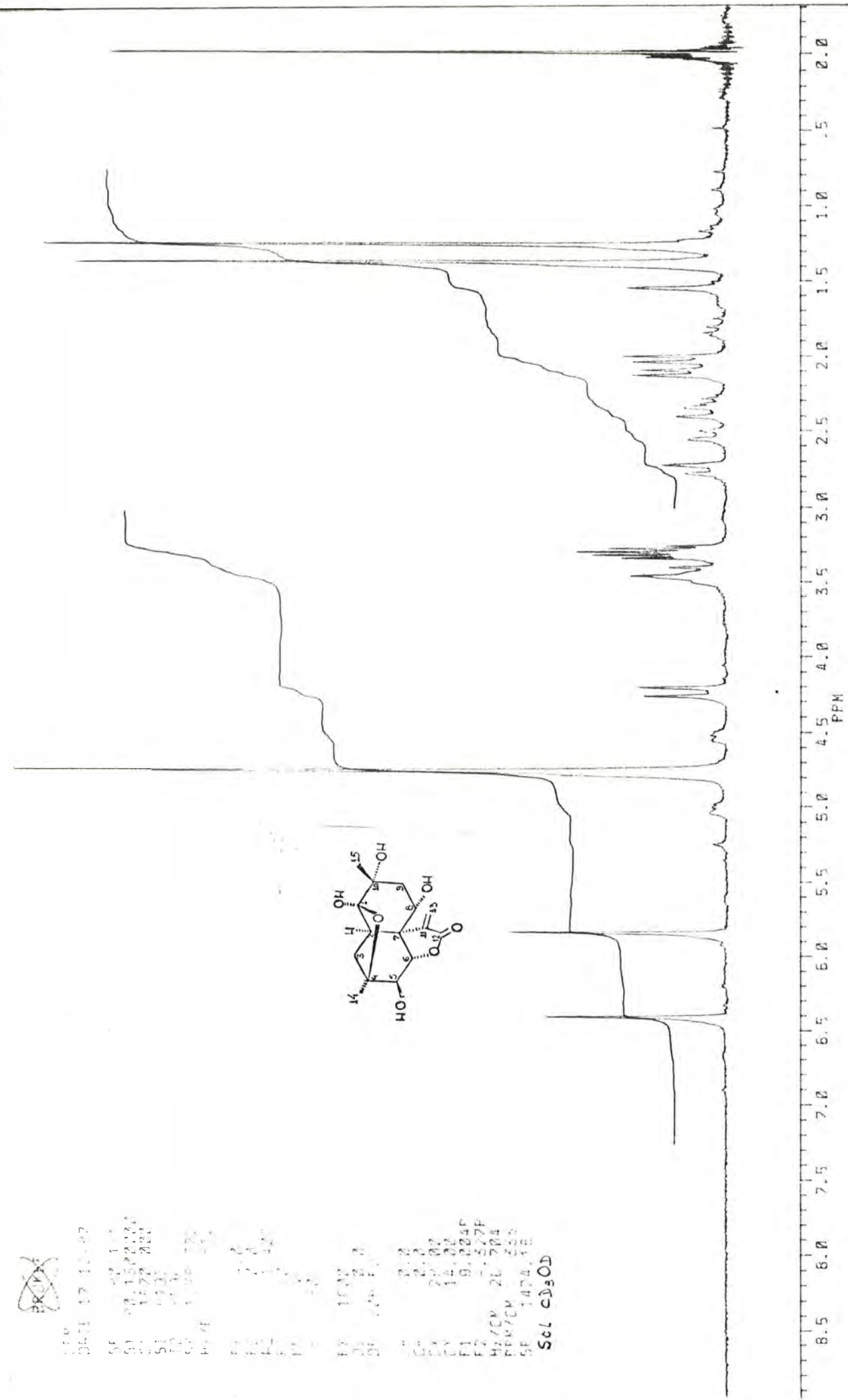


Fig. 30 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (80MHz, CD<sub>3</sub>OD) de V.e.C<sub>1</sub>

SPECTRA PLOT/TAB PROGRAM, [Rev 4/27/81]

\*\*\*DIP SAMPLE # 278 dated: 5/31/1988 11:20 AM Tuesday

\*\* Spectrum C, Disk ID 2442 Sample # 070 Retention Time 0.98 min

Scanned from 40 to 800 amu Number of Peaks Detected = 236

File type = processed

Base Peak = 43.1 Base Peak Abundance = 3088 Total Abundance = 29166

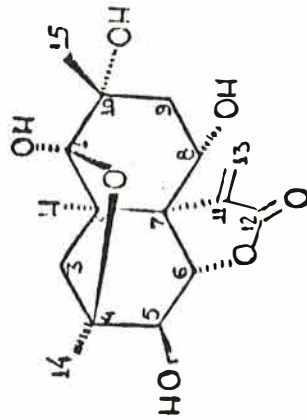


Fig. 31 - EM de V.e.C<sub>1</sub>

#### 4.6 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS VEGETAIS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.

##### 4.6.1 - ENSAIO DE AÇÃO QUIMIOPROFILÁTICA SÔBRE A ESQUISTOSSOMOSE.

A esquistossomose ainda é considerada como uma das grandes endêmias que assolam o Brasil, devido principalmente a persistência de higiene precária e ao frequente contato com águas infestadas, o que torna difícil o seu controle, apesar dos esforços das autoridades sanitárias.

Para combater o Schistosoma mansoni, trematóda causador da enfermidade, é necessário interromper o seu ciclo evolutivo, e isto pode se dar em vários pontos do mesmo, tais como, tratamento de esgoto, extermínio do molusco, ou da cercária, bloqueio da penetração da cercária e medicamento para tratamento dos doentes. Parece que o extermínio do molusco, em coleções de águas naturais e artificiais é um dos meios eficazes de profilaxia.

##### 4.6.1.1-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA SÔBRE CARAMUJOS ADULTOS.

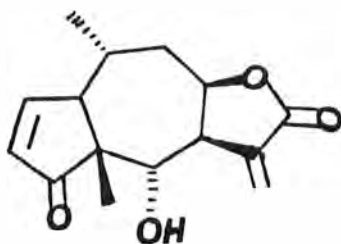
Como pode ser observado na tabela I, somente a substância glaucólido-B (V.e.A), apresentou boa atividade sobre caramujos adultos, causando 90% de mortalidade na concentração de 100,0 ppm, e 40% a 10,0 ppm. Entre os extratos brutos, aqueles obtidos com metanol e acetato de etila, mostraram ser ativos a 100,0 ppm.

O uso de moluscicidas naturais vem sendo Incentivado pela Organização Mundial de Saúde, visto que os produtos sintéticos tem apresentado alta toxicidade aos seres vivos do meio ambiente e também de custo elevado.

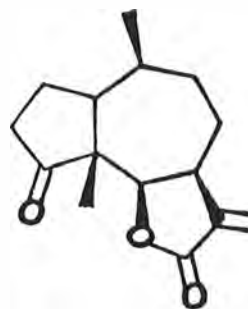
Desde 1933, quando os frutos de Balanites aegyptiaca foram utilizados no contrôlê da esquistossomóse, mais de de 1.000 espécies vegetais, de várias partes do mundo, foram testadas com esta finalidade.

Entretanto, apesar de várias espécies terem apresentado alguma atividade, muito pouco se sabe a respeito dos constituintes químicos das plantas responsáveis pela ação moluscicida.

Entre as substâncias mais ativas, incluem-se os triterpenos pentacíclicos (saponinas) (39). Entre os sesquiterpenóides, algumas lactonas sesquiterpênicas foram reportadas como altamente tóxicas a moluscos (40), sendo que o helenalin [43] apresentou 100% de atividade moluscicida a 10,0 ppm e 80% a 7,0 ppm em relação a Blomphalaria glabrata enquanto que o damsín [44] estruturalmente muito semelhante, não mostrou atividade.



[43]



[44]

TABELA I - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE AÇÃO MOLUSCICIDA SÔBRE CARAMUJOS ADULTOS (B.GLABRATA).

Vegetal/Substância	Tipo de extrato	Atividade*			Resultados
		Concentração(ppm)			
		1,0	10,0	100,0	
V.eremophila	M	1/10	3/10	9/10	Ativo a 100 ppm
V.eremophila	H	0/10	0/10	0/10	Inativo
V.eremophila	Ac	1/10	2/10	7/10	Ativo a 100 ppm
V.e.A(glaucólido-B)	-	1/10	4/10	9/10	Ativo a 100 ppm
Glaucólido-B-H <sub>1</sub>	-	0/10	0/10	1/10	Inativo
Glaucólido-B-H <sub>2</sub>	-	0/10	0/10	0/10	Inativo
V.e.B	-	1/10	2/10	3/10	Inativo
V.e.C + V.e.C <sub>1</sub>	-	0/10	1/10	2/10	Inativo

Solventes : M = metanol, H = hexano, Ac = acetato de etila

\* : número de caramujos mortos/números de caramujos utilizados no ensaio.

#### 4.6.1.2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SÔBRE DESOVAS DE CARAMUJOS

Uma outra forma de combater a proliferação de moluscos, é a destruição de seus ovos antes da eclosão, o que ocorre em média 10 dias após a postura.

Os extratos vegetais e as substâncias isoladas de V.eremophila, foram testadas para verificação de suas atividades sôbre desovas de B.glabrata, sendo os resultados obtidos reunidos na tabela II.

Nota-se que somente o glaucólido-B (V.e.A), apresentou atividade sôbre desovas na concentração de 100,0 ppm, com um índice de não eclosão de 72%.



TABELA II - RESULTADOS DE AÇÃO MOLUSCICIDA SÔBRE DESOVAS DE  
B. GLABRATA.

Vegetal/Substância	Tipo de Extrato	Desovas*			Resultados
		Concentração (ppm)	1,0	10,0	
V. eremophila	M	4/54	20/41	0/55	Inativo
V. eremophila	H	4/54	2/58	6/66	Inativo
V. eremophila	Ac	10/52	8/44	12/57	Inativo
V.e.A (glaucólido-B)	-	1/100	3/95	69/95	Ativo a 100 ppm
Glaucólido-B-H	-	0/70	0/64	0/84	Inativo
Glaucólido-B-H <sub>1</sub>	-	0/79	0/122	2/69	Inativo
Glaucólido-B-H <sub>2</sub>	-	1/74	0/43	0/57	Inativo
V.e.B	-	0/69	2/58	0/54	Inativo
V.e.C + V.e.C <sub>1</sub>	-				

Solventes : M = metanol, H = hexano, Ac = Acetato de etila

\* : número de desovas mortas/número de desovas utilizadas no ensaio.

#### 4.6.2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Existem na literatura, várias referências sôbre a utilização de extratos vegetais, bem como de lactonas sesquiterpênicas em ensaios contra bactérias e fungos.

Foi observado que a maior parte destas substâncias apresentava alguma atividade (41).

Portanto, com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana do vegetal em estudo, foram realizados ensaios com os extratos em hexano, metanol e acetato de etila, e as substâncias V.e.A (glaucólido-B), glaucólido-B-H<sub>1</sub>, glaucó-

lido-B-H<sup>2</sup>, V.e.B e V.e.C + V.e.C<sup>1</sup>.

Os resultados estão reunidos na tabela III, onde observa-se que somente a substância glaucolido-B, apresentou boa atividade, ou seja, uma inibição moderada contra S.aureus e forte inibicao contra B.cereus.

TABELA III-RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Vegetal/Substância	Tipo de Extrato	Microorganismos						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
V. eremophila	H	-	+	-	-	-	-	x
V. eremophila	M	-	+	-	-	-	-	x
V. eremophila	Ac	-	++	-	-	++	-	x
V.e.A(glaucolido-B)	-	-	+++	-	-	++	-	-
Glaucolido-B-H	-	-	-	-	-	-	-	-
Glaucolido-B-H <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Glaucolido-B-H <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
V.e.B	-	-	-	-	-	-	-	x
V.e.C + V.e.C <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	x

Solventes : H = hexano, M = metanol, Ac = acetato de etila  
 X = nao foi realizado  
 +++ = forte inibição  
 ++ = inibição moderada  
 \* microorganismos  
 I - Candida albicans  
 II - Bacillus cereus  
 III - Escherichia coli  
 IV - Klebsiella pneumoniae  
 V - Staphylococcus aureus  
 VI - Mycobacterium smegmatis  
 VII - Staphylococcus epidermidis

#### 4.6.3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SÔBRE TRYPANOSOMA CRUZI.

A Doença de Chagas é também um dos grandes problemas brasileiros na área da Saúde Pública, dada a sua grande incidência em diversas regiões do Brasil, principalmente nas regiões interioranas, além de estar disseminada também em outras regiões da América Latina (42).

Extratos vegetais ensaiados anteriormente (2), mostraram-se ativos sôbre culturas de T.cruzi, o que levou a a realização de ensaios para a avaliação das atividades dos extratos brutos e substâncias isoladas neste trabalho.

Os resultados porém não foram satisfatórios, porque nenhum dos extratos brutos e substâncias puras ensaiadas apresentaram atividade sobre T.cruzi, nos testes " in vitro ".

#### 4.6.4 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-EDEMATOGÊNICA

Resposta edematogênica induzida pela dextrana ou pela carragenina.

A resposta edematogênica é um dos sinais da resposta inflamatória que é decorrente do aumento de permeabilidade vascular, que ocorre na microcirculação devido a ação dos mediadores liberados. A liberação dos mediadores no processo inflamatório é altamente dependente do estímulo flogogênico.

Estes estímulos flogogênicos podem ser a carragenina (polissacarídeo sulfatado) que produz edema com um pi-

co máximo em torno da terceira ou quarta hora, edema esse consequente da formação de prostaglandinas e cininas, ou a dextrana (polímero da glicose, PM = 70.000) que, pela sua capacidade de degranular mastócitos, promovem a liberação de histamina e de serotonina que irá produzir edema com um pico máximo entre a primeira e segunda hora.

Os resultados obtidos nos estudos anti-edematogênicos do glaucólido-B, glaucólido-B-H<sub>1</sub> e glaucólido-B-H<sub>2</sub> não mostraram nenhum efeito sobre os edemas induzidos pela caragenina e pela dextrana.

#### 4.6.5 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.

Método da contorção em camundongos.

O modelo da contorção abdominal induzida por substâncias irritantes, como por exemplo o ácido acético, injetadas na cavidade peritoneal de camundongos, tem como objetivo testar fármacos que poderiam apresentar alguma atividade analgésica, associada com a ação antiinflamatória.

Através das contorções intermitentes do abdomen, torção do tronco extensão das patas traseiras, pode-se quantificar a algesia induzida pela injeção intraperitoneal do agente irritante e dessa forma evidenciar se uma droga pode ou não apresentar ação analgésica.

Os resultados obtidos nos mostrou que o glaucólido-B na dose de 160 mg/kg reduziu a resposta de contorção em camundongos em 58%, enquanto que nas doses de 80 e 40 mg/kg reduziu parcialmente as contorções, 36 e 28% respectivamente.

Já o glaucolido-B-H<sub>1</sub> na dose de 160 mg/kg também reduziu parcialmente as contorções em 24%, e galucolido-B-H<sub>2</sub> reduziu em 11% na mesma dose.

Diante dos resultados obtidos, concluímos que o glaucolido-B na dose de 160 mg/kg é altamente analgésica, quando comparada com a indometacina (bloqueador da síntese de prostaglandinas), 5mg/kg promove uma inibição de cerca de 50 a 60% desta resposta. Ao mesmo tempo, pode-se afirmar que os produtos da reação de desacetilização e de hidrogenação apresentaram redução nesta atividade farmacológica do glaucolido-B.

5 - PARTE EXPERIMENTAL.

## 5.1 - EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS.

- 1 - Os solventes e reagentes empregados foram:
  - <a> Para RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, utilizou-se solventes deuterados Merck.
  - <b> Para as análises de UV, utilizou-se solvente Merck grau Uvasol.
  - <c> Para o isolamento e purificação das substâncias, utilizou-se solventes comerciais que foram purificados e tratados por destilação e secagem.
- 2 - Nas separações por C.C. utilizou-se sílica gel 60(0,040-0,063 mm), para a C.C.D. utilizou-se sílica gel 60 GF e para a C.C.P. sílica gel 60 PF<sup>254</sup>, todas da Merck.  
254
- 3 - Para cromatografia em coluna filtrante, utilizou-se carvão ativo da Merck.
- 4 - Para a purificação do flavonóide em mini coluna, utilizou-se Poliamida 11 da Merck, e as cromatoplasmas do mesmo adsorvente, foram da Schleider & Schuell.
- 5 - Nas reações de hidrogenação/hidrogenólise, foi usado como catalizador, PtO<sub>2</sub> da Merck.
- 6 - Foram usados como reveladores cromatográficos, lâmpadas de UV(254 e 366 nm), exposição a vapores de iodo e purificação com ácido sulfúrico seguido de aquecimento a aproximadamente 100°C por alguns minutos.
- 7 - Os critérios de pureza adotados foram a niti-

dez no intervalo de fusão e a observação de uma única mancha em C.C.D. frente aos reveladores citados, variando-se a fase móvel.

- 8 - As medidas do intervalo de fusão foram determinadas em aparelho Fisher-Johns, montado com lente de aumento, sem correção do termômetro.
- 9 - Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em rotavaporadores.
- 10- O aparelho utilizado para as reações de hidrogenação/hidrogenólise foi o hidrogenador catalítico de Parr.
- 11- Os espectros na região de IV foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo 1.430 utilizando pastilhas de KBr ou emulsão com nujol. Usou-se filme de poliestireno como referência.
- 12- Os espectros na região do UV foram registrados em espectrofotômetro Varian, modelo 634-S.
- 13- Os EM foram registrados em espectrômetros Hewlett-Packard, modelo 5.995 na UFSCar, e A.E.I. modelo MS-12, na Universidade de Reading, Inglaterra.
- 14- Os espectros de RMN <sup>1</sup>H, foram registrados em espectrômetros Brucker Ac80(80MHz), Brucker Ac 200(200MHz) no DQFM/SC-USP e Brucker Ac400 (400 MHz), na Universidade de Reading, utilizando-se TMS como referência interna.
- 15- Os espectros de RMN <sup>13</sup>C, foram registrados em espectrômetros Brucker Ac80(20MHZ) e Brucker Ac 200(50MHz)DQFM/SC-USP.



## 5.2 - COLETA.

O vegetal foi coletado nas proximidades de Diamantina(MG) e identificado por Hermógenes de Freitas Leitão Filho, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da UNICAMP.

## 5.3 - EXTRAÇÃO.

O vegetal completo, depois de sêco e estabilizado em estufa de ar circulante a 40°C, foi pulverizado em moimho de martelo, fornecendo 11,4 kg de pó, o qual foi extraído sucessivamente com hexano, acetato de etila e metanol. As soluções foram filtradas, e os solventes eliminados em evaporador rotatório, fornecendo 124 g de extrato hexânico, 114 g de extrato em acetato de etila e 299 g de extrato metanólico, denominados extratos brutos.

## 5.4 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO EM ACETATO DE ETILA DE V. EREMOPHILA.

O extrato bruto em acetato de etila(114g), foi solubilizado em clorofórmio, sendo que a parte solúvel (70g), foi adsorvida em pequena porção de sílica gel. Esta mistura depois de sêca, foi fracionada por cromatografia de adsorção em uma coluna de vidro com 1.000 g de sílica gel. A coluna foi desenvolvida com hexano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade, retirando-se frações de 350ml, conforme descrito na tabela IV.

TABELA IV- FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO EM ACETATO DE ETILA.

Frações	Eluente
1 - 3	Hexano
4 - 6	Hexano/Acetato de etila 98:2
7 - 22	Hexano/Acetato de etila 96:4
23 - 46	Hexano/Acetato de etila 90:10
47 - 61	Hexano/Acetato de etila 80:20
62 - 72	Hexano/Acetato de etila 60:40
73 - 84	Hexano/Acetato de etila 20:80
85 - 99	Acetato de etila
100- 105	Acetato de etila/Metanol 95:5
106- 123	Acetato de etila/Metanol 90:10
124- 129	Acetato de etila/Metanol 80:20
130- 137	Acetato de etila/Metanol 60:40
138- 144	Acetato de etila/Metanol 20:80
145- 159	Metanol

As frações retiradas da coluna, foram analisadas por C.C.D.e reunidas quando apresentavam comportamento cromatográfico semelhante, conforme mostrado na tabela V.

TABELA V - FRAÇÕES REUNIDAS APÓS O FRACIONAMENTO MENCIONADO NA TABELA IV.

Frações	Substância isolada	massa (g)
1 (1 - 12)		
2 ( - 13)		
3 (14 - 16)		
4 (17 - 31)		
5 (32 - 39)		
6 (40 - 61)		
7 (62 - 68)		
8 (69 - 71)		
9 (72 - 76)	V.e.A	3,2806
10 (77 - 79)	V.e.B	0,0813
11 (80 - 83)		
12 (84 - 90)		
13 (91 - 96)		
14 (97 - 98)	V.e.C + V.e.C <sub>1</sub>	0,2010
15 (99 -104)		
16 (105-109)	V.e.E	0,0033
17 (110-159)		

#### 5.5 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DE V.EREMOPHILA.

Parte do extrato metanólico(60,0g), depois de solubilizado em uma mistura de cloroformio e metanol 1:1, foi adsorvido em 700g de silica gel, e submetido a cromatogra-

fia de adsorção em coluna. A eluição foi realizada com hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade, retirando-se frações de 300ml, conforme descrito na tabela VI.

TABELA VI- FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO

Frações	Eluente
1	Hexano
2 - 8	Hexano/Acetato de etila 80:20
9 - 13	Hexano/Acetato de etila 70:30
14 - 18	Hexano/Acetato de etila 50:50
19 - 24	Hexano/Acetato de etila 20:80
25 - 32	Acetato de etila
33 - 35	Acetato de etila/Etanol 95:5
36 - 44	Acetato de etila/Etanol 90:10
45 - 49	Acetato de etila/Etanol 80:20
50 - 59	Acetato de etila/Etanol 60:40
71 - 80	Etanol

As frações retiradas da coluna, foram analisadas por C.C.D. sobre sílica gel, e reunidas quando apresentavam comportamento cromatográfico semelhante, conforme mostrado na tabela VII.

TABELA VII - FRAÇÕES REUNIDAS APÓS O FRACIONAMENTO MENCIONADO NA TABELA VI.

Frações	Substância isolada	massa (g)
1 (1 - 8)		
2 (9 - 14)	V.e.F	0,0220
3 (15 - 18)		
4 (19 - 27)	V.e.B	0,0350
5 (28 - 30)		
6 (31 - 37)		
7 (38 - 42)		
8 (43 - 48)		
9 (49 - 52)	V.e.G	0,0072
10 (53 - 65)		
11 (66 - 69)		
12 (70 - 80)		

## 5.6 - PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

### 5.6.1 - PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA V.E.A

A fração cromatográfica que continha esta substância apresentava-se como um óleo de cor amarelo claro. Esta fração foi recromatografada em uma pequena coluna utilizando-se sílica gel como adsorvente. Como apresentava-se ainda

com consistência oleosa, foi cristalizada em metanol e recristalizada em hexano/acetato de etila, obtendo-se 3,28g de cristais incolores, codificados como V.e.A.

### 5.6.2 - PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA V.E.B

Verificou-se que nas frações 77-79 do extrato em acetato de etila, e frações 19-27 do extrato metanólico formaram-se cristais amarelos escuros, que foram dissolvidos em metanol e a solução passada através de uma coluna filtrante de carvão ativo. Após a concentração da solução, precipitou um sólido amarelo, que foi recristalizado em acetato de etila/metanol, obtendo-se 116mg de cristais amarelos aparentemente puros frente a C.C.D. Entretanto, como foi admitido tratar-se de um flavonoide, fêz-se uma cromatoplaça de poliamida, usando-se metanol/AcOH/H<sub>2</sub>O (90:5:5) como fase móvel para avaliação da pureza da substância.

A revelação sob luz UV, evidenciou a presença de duas manchas bem separadas entre si, além de uma terceira quase sobreposta a mancha mais polar.

Fêz-se uma mini coluna de poliamida, como adsorvente, e metanol como fase móvel.

Obteve-se um flavonoide puro codificado como V.e. B, além de outro impuro (as duas manchas quase sobrepostas não se separaram). Foram realizadas várias recristalizações bem como novas colunas de poliamida, mudando-se a polaridade do solvente, sem conseguir separar as duas substâncias. Consequentemente esta mistura foi deixada para estudos posteriores.

### 5.6.3 - PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS V.E.C E V.E.C<sub>1</sub>.

Nas frações 97-98 do extrato em acetato em etila, formaram-se cristais incolores, lavados com eter etílico e analisados através de C.C.D. Como havia indicação de pelo menos duas substâncias com polaridades bem próximas, fêz-se uma cromatografia em coluna. Foram utilizados silica gel como adsorvente e acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade, até atingir 50% de cada um, como eluente.

As substâncias sólidas foram submetidas a sucessivas recristalizações em hexano/acetato de etila, até a obtenção de duas substâncias cristalinas e incolores, codificadas como V.e.C(40mg) e V.e.C<sub>1</sub>(8,3mg).

As substâncias ou misturas de substâncias, codificadas como V.e.E, V.e.F e V.e.G, não foram analisadas, uma vez que as várias tentativas de purificação se mostraram infrutíferas. Pretende-se tentar a purificação através de cromatografia liquida de alta pressão ou técnica similar, em futuro próximo.

### 5.7. - REAÇÃO DE HIDROGENAÇÃO/HIDROGENÓLISE DA SUBSTÂNCIA V.E.A E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS.

Uma solução de 1.000mg de V.e.A em 300ml de etanol absoluto foi submetida a hidrogenação em recipiente fechado à temperatura ambiente, com a agitação na presença de 600mg de PtO<sub>2</sub>, durante aproximadamente 24 horas, consumindo-se cer-

ca de 0,016 moles de hidrogênio.

Após este tempo de reação filtrou-se o catalizador, o filtrato foi concentrado e analisado por C.C.D. Verificou-se ter havido a formação de uma mistura de vários produtos.

Fracionou-se esta mistura em coluna, utilizando-se sílica gel como adsorvente e hexano/acetato de etila a 50% até acetato de etila/metanol a 50% como eluente, em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidos cristais ainda impuros, separados através de C.C.P., após sucessivas recristalizações obteve-se duas substâncias em maior quantidade.

Estas substâncias apresentaram-se como sólidos cristalinos brancos, e foram codificadas como glaucólido-B<sub>1</sub> (80mg, 9,2%) e glaucólido-B<sub>2</sub> (170mg, 19,5%).

## 5.8 - DADOS FÍSICOS E ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.

### 5.8.1 - GLAUCOLIDO-B(V.E.A).

Intervalo de fusão de 130-132°C.

IV	KBr -1 √ (cm) max.	2.920(md, C-H), 1.770(F, C-O), 1.735(F, C-O), 1.720(md, C-O), 1.440(md, C-H), 1.370(md, C-H), 1.220(F, C-O), 935(f, C-O), 805(f, C-O).
----	-----------------------------	--



<sup>1</sup>  
 RMN H (80MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,30-3,00(m, H<sub>2,2',3,3',9,9',5</sub>),  
 4,70-4,90(m, H<sub>6,8,13,13'</sub>), 1,55(s, H<sub>14</sub>),  
 1,65(s, H<sub>15</sub>), 2,05(s, C<sub>8</sub> AcO-Me), 2,15  
 (s, C<sub>10</sub> AcO-Me), 2,10(s, C<sub>13</sub> AcO-Me).

<sup>13</sup>  
 RMN C (20MHz, CDCl<sub>3</sub>), BB, δ 207,0(C<sub>1</sub>), 40,4(C<sub>2</sub>), 31,6  
 (C<sub>3</sub>), 54,3(C<sub>4</sub>), 58,5(C<sub>5</sub>), 80,6(C<sub>6</sub>),  
 125,1(C<sub>7</sub>), 83,8(C<sub>13</sub>), 63,4(C<sub>8</sub>), 32,7  
 (C<sub>9</sub>), 60,8(C<sub>10</sub>), 162,0(C<sub>11</sub>), 169,4(C<sub>12</sub>)  
 18,3(C<sub>14</sub>), 19,8(C<sub>15</sub>), 169,6(C<sub>8</sub>-C<sub>1'</sub>),  
 20,4(C<sub>8</sub>-C<sub>2'</sub>), 169,8(C<sub>10</sub>-C<sub>1'</sub>), 20,3(C<sub>10</sub>-  
 C<sub>2'</sub>), 170,4(C<sub>13</sub>-C<sub>1'</sub>), 21,3(C<sub>13</sub>-C<sub>2'</sub>).

EM (baixa resolução)m/z 438[M]<sup>+</sup>, 177[C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>(3AcO)]<sup>+</sup>  
 (20%), 122[C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup> (100%).

### 5.8.2 - 13-DESACETOXI-GLAUCOLIDO-B(GLAUCOLIDO-B-H<sub>1</sub>).

Intervalo de fusão de 142-144° C.

IV nujol -1  
 √ (cm) 1.770(F, C-O), 1.730 e 1.740(F, C-O)  
 max. 1.715(F, C-O), 1.655(md, C=C).

<sup>1</sup>  
 RMN H (80MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,20-3,00(m, H<sub>2,2',3,3',9,9',5</sub>),  
 4,60-4,85(m, H<sub>6,8</sub>), 1,95(d, H<sub>13</sub>; J=2,5),  
 1,60(s, H<sub>14,15</sub>), 2,08(s, C<sub>8</sub> AcO-Me),  
 2,12(s, C<sub>10</sub> AcO-Me).

5.8.3 - 13-DIIDRODESASETOXI-GLAUCOLIDO-B(GLAUCOLIDO-B-H)<sub>2</sub>

IV  $\sqrt{\text{KBr}}^{-1}$  (cm) 1.775(F, C-O), 1.730-1750(F, C-O), 1.720  
max (md, C-O).

<sup>1</sup>RMN H (80MHz, CDC1<sub>3</sub>)  $\delta$  2,15-3,00(m, H<sub>2,2',3,3',9,9',5</sub>),  
4,35(1, H<sub>8</sub>), 5,50(1, H<sub>6</sub>), 4,10(q, H<sub>11</sub>),  
J=6,5), 3,40(d, H<sub>7</sub>, J=7,5), 1,25(d, H<sub>13</sub>,  
J=6,5), 1,50(s, H<sub>14</sub>), 1,62(s, H<sub>15</sub>), 2,00  
(s, C<sub>8</sub>-AcO-Me), 2,10(s, C<sub>10</sub>-AcO-Me).

## 5.8.4 - 3,7-DIMETOXI-5,3',4'-TRIIDROXIFLAVONA(V.e.B).

Intervalo de fusão de 224-226° C.

IV  $\sqrt{\text{KBr}}^{-1}$  (cm) 3.100-3550(md, C-O), 1.660(md, C-O),  
max. 1.590(F, C-H), 1.495(F, C-H), 1.110(md,  
C-H), 915 e 820(md, C-H).

<sup>1</sup>RMN H (80MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  6,35(d, H<sub>6</sub>, J=2,5), 6,70(d, H<sub>8</sub>,  
J=2,5), 6,90(d, H<sub>5'</sub>, J=9,0), 7,50(dd, H<sub>6'</sub>,  
J=2,5 e 9,0), 7,58(d, H<sub>2'</sub>, J=2,5), 3,80  
(s, C<sub>7</sub>-OMe), 3,90(s, C<sub>3</sub>O-Me).

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  (nm) 252, 264, 357; (MeOH + AlCl<sub>3</sub>) 271,  
300(om), 443; (MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl)  
263, 272(om), 360(om), 400; (MeOH +  
NaOMe) 262, 396; (MeOH + NaOAc) 255,  
374, 410(om); (MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)  
255, 377.

EM (baixa resolução)m/z 330 [M]<sup>+</sup>(100%), 315 [M-15]<sup>+</sup>(4%), 312 [M-18(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>(18%), 299 [M-31(CH<sub>3</sub>O)]<sup>+</sup>(8%), 287 [M-43(CH<sub>3</sub>CO)]<sup>+</sup>(37%), 244 [M-2(43)]<sup>+</sup>(10%), 166 [A]<sup>+</sup>(11%), 167 [A<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup>(46%), 137 [B<sub>2</sub>]<sup>+</sup>(56%).

#### 5.8.5 - 8 $\alpha$ -ACETOXI-2-EPI-VERNOMARGOLIDO(V.E.C).

Intervalo de fusão de 205-207°C.

IV nujol -1  
 $\checkmark$  (cm) 3.300-3.600(F,C-O), 1.750(F,C-O),  
 max 1.760 e 1.775(ressonancia de Fermi),  
 1.725(md,C-O), 1.705(md,C-O), 1.640  
 (f,C=C), 1.260(md,C-O).

<sup>1</sup>RMN H (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)<sup>0</sup> - 2,77(d, H<sub>2</sub>, J=4,0), 2,44  
 (dd, H<sub>3</sub>, J=4,0 e 12,5), 1,40(d, H<sub>3'</sub>,  
 J=12,5), 3,27(dd, H<sub>5</sub>, J=5,5 e 7,0), 4,27  
 (d, H<sub>6</sub>, J=5,5), 4,55(t, H<sub>8</sub>, J=3,0), 2,05  
 (dd, H<sub>9</sub>, J=3,0 e 16,0), 2,11(dd, H<sub>9'</sub>, J=3,0  
 e 16,0), 5,72(s, H<sub>13</sub>), 6,29(s, H<sub>13'</sub>),  
 1,22(s, H<sub>14</sub>), 1,33(s, H<sub>15</sub>), 1,98(s, C<sub>8</sub>-  
 -AcO-Me).

<sup>13</sup>RMN C (50MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), BB,  $\checkmark$  211,0(C<sub>6</sub>), 70,0(C<sub>1</sub>),  
 35,5(C<sub>3</sub>), 74,5(C<sub>4</sub>), 77,0(C<sub>2</sub>), 79,0  
 (C<sub>5</sub>), 50,0(C<sub>7</sub>), 87,0(C<sub>8</sub>), 34,5(C<sub>9</sub>),  
 82,0(C<sub>10</sub>), 137,0(C<sub>11</sub>), 168,5(C<sub>12</sub>),  
 134,0(C<sub>13</sub>), 20,5(C<sub>14</sub>), 21,5(C<sub>15</sub>),  
 170,0(C<sub>8</sub>-C<sub>1</sub>), 24,09(C<sub>8</sub>-C<sub>2</sub>).

Como este espectro é de V.e.C, com impureza de V.e.C, observam-se sinais em 105,0(C<sub>1</sub>), 53,5(C<sub>1</sub>), 43,0(C<sub>2</sub>), relativos à substância V.e.C<sub>1</sub>.

5.8.6 - 8 $\alpha$ - HIDROXI-2-EPI-VERNOMARGOLIDO-1,4-CICLOSEMI-ACETAL.

Intervalo de fusão de 158-160° C.

IV nujol -1  
 $\checkmark$  (cm) 3.220-3460(F,C-O), 1.750(F,C-O),  
 max. 1.660(md,C=C), 990(md,C-O).

RMN<sup>1</sup> H (80MHz, DMSO-d + CDCl<sub>3</sub>) $\delta$  2,70(d, H<sub>2</sub>, J=5,0),  
 2,40(dd, H<sub>3</sub>, J=5,0 e 11,0), 1,40(d, H<sub>3'</sub>,  
 J=11,0), 4,20(d, H<sub>6</sub>, J=5,0), 1,95(dd, H<sub>9</sub>,  
 J=2,5 e 14,0), 2,10(dd, H<sub>9'</sub>, J=2,5 e  
 14,0), 5,75(s, H<sub>13</sub>), 6,40(s, H<sub>13'</sub>), 1,25  
 (s, H<sub>14</sub>), 1,35(s, H<sub>15</sub>).

RMN<sup>1</sup> H (80MHz, DMSO-d + CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O) $\delta$  - 3,40(d, H<sub>5</sub>, J=5,0), e  
 3,35-3,45(H<sub>8</sub>, parcialmente sobreposto)

EM (baixa resolução) m/z - 294 [M-18]<sup>+</sup> (7,5%), 43  
 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (100%)

## 5.9 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 5.9.1 - VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA SOBRE CARAMUJOS ADULTOS E DESOVAS.

Este ensaio foi realizado por gentileza da Dra. Cecília Pereira de Sousa, no Centro de Pesquisas "Rene Rachou" da FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG.

As amostras (30mg) foram dissolvidas em 1,0ml de solvente universal de Ritchie e o volume final completado para 500,0ml com água desclorada (utilizando uma solução a 2% de tiosulfato de sódio), obtendo-se assim uma solução final com concentração de 100,0ppm da amostra.

A partir desta solução, foram preparadas diluições de forma a obter ao final concentrações de 10,0 e 1,0ppm. Cada uma das soluções preparadas como descrito acima, foi colocada em frascos de 250ml contendo dez caramujos adultos de B.glabrata com variação no diâmetro da concha de 13 e 20 mm.

Paralelamente, foram distribuídas desovas de 0-1 dia de idade em frascos contendo 10,0ml de cada solução preparada, sendo uma desova para cada frasco.

Os caramujos adultos e desovas ficaram expostos às soluções por um período de 24 horas, tendo sido utilizada água desclorada como controle. Após este período, caramujos e desovas foram lavados com água corrente e deixados em água desclorada durante 4 dias, havendo a renovação da água dos frascos diariamente. Durante esta fase, foram realizadas

anotações quanto a mortalidade e ao aspecto geral, tanto dos caramujos adultos, como das desovas. Foram considerados ativos os produtos que mataram de 40 a 100% dos exemplares adultos e 50 a 100% dos embriões.

#### 5.9.2 - VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados por gentileza da Dra. Astréa M. Giesbrecht, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Para os ensaios microbiológicos, as amostras das substâncias puras e extratos vegetais, foram dissolvidas em DMSO em concentrações de 0,1 e 2,0mg/ml. A partir destas soluções, foram retiradas alíquotas de 0,03ml e colocados em poços cavados em meio de cultura sólidos já inoculados (método de difusão no Agar), sendo utilizados os seguintes microorganismos no ensaio: C.albicans, B.cerius, E.coli, K.pneumoniae, S.aureus, M.smegmatis.

Como meios de cultura, foram utilizados o meio de Saboureaud e Triptycase Soy Agar. Como contrôles positivos, foram utilizados anfotericina B(1mg/ml) para C.albicans, e estreptomicina (1mg/ml) para as bactérias, e como contrôles negativos foram utilizados solventes puros e placas inoculadas sem amostra.

### 5.9.3 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE TRYPANOSOMA CRUZI (CHAGAS).

Ensaio realizado no Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por gentileza do Dr. Fernando S.Cruz.

Tanto extratos brutos do vegetal, como substâncias puras isoladas, previamente solubilizadas em etanol, foram adicionados em tubos de cultura contendo meio de Waree(5,0 ml) nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0ug/ml. Antes da realização dos ensaios, foram realizados contrôles de microorganismos (meio de cultura + células) e do solvente (meio de cultura + células + volume maior do solvente utilizado no experimento).

O inócuo foi realizado a partir de uma cultura de T.cruzi de 4 a 6 dias de crescimento no mesmo meio de cultura, sendo adicionados com pipeta de Pasteur 4 gotas do meio em cada tubo. A leitura do resultado foi realizada, observando-se a turvação do meio de cultura em comparação com o tubo controle. Os resultados são expressos por : (++++) droga sem ação, crescimento igual ao controle, (+++) pequena ação, (++) 50% de ação, (+) 90% de ação, (0) 100% de inibição.

### 5.9.4 - ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.

Ensaio realizado no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP,

por gentileza da Dra. Glória Emilia Peto de Sousa.

Os camundongos utilizados (pesando entre 20-25g), foram anteriormente mantidos em jejum durante 12 horas (à noite) e os experimentos foram sempre realizados no período matutino, para obter uniformidade das respostas.

Inicialmente os animais recebiam o tratamento oral com a substância em teste diluída em cremophor RH-40 a 10% através de uma cânula de polietileno, num volume padronizado de 0,5ml. Trinta minutos depois, os animais recebiam intraperitonealmente a injeção do agente irritante, no caso, o ácido acético a 0,5% em volume de 0,2ml. O número total de contorções foi obtido pela soma do número de contorções nos intervalos 5, 10 e 15 minutos.

Os ensaios com o glaucolido-B, foram nas doses de 40, 80 e 160mg/kg, e com glaucolido-B-H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, foram na dose 160mg/kg.

#### 5.9.5 - ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-EDEMATOGÊNICA.

Ratos Wistar, pesando entre 170-200g, eram mantidos em jejum durante 12 horas (à noite). A produção do edema era realizada 30 minutos após a administração da substância em teste, em uma das patas traseiras dos ratos, pela injeção intraplantar de carragenina(200ug/0,1ml) ou dextrana (200ug/0,1ml), sendo que a pata contra lateral recebeu igual volume de salina. O método utilizado foi o de Ferreira (1979). Este método baseia-se na reposição do líquido (Lauril sulfato de sódio) deslocado pela imersão da pata do animal em uma cuba contendo o referido líquido.

A reposição é feita por uma bomba de infusão com



um fluxo constante de 2,4ml/min.

A pata do animal é imersa durante 20seg., após o que é retirado, e observado o tempo da reposição do líquido na cuba.

A diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata injetada e aquele pela pata controle, multiplicado pelo fluxo do líquido de preenchimento (40ml/seg), corresponde à medida do edema produzido.

## 6-CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

A análise fitoquímica realizada com o vegetal Vernonia eremoplila Mart. permitiu obter as seguintes conclusões:

1 - Do extrato em acetato de etila, da planta total, foram isoladas e identificadas três lactonas sesquiterpênicas: glaucolido-B,  $8\alpha$ -acetoxi-2-epi-vernomargolido e  $8\alpha$ -hidroxi-2-epi-vernomargolido-1,4-ciclosemiacetal, bem como um flavonol: 3,7-dimetoxi-5,3',4'-trihidroxiflavona.

2 - Do extrato em metanol, da planta total, foi também isolado o flavonol 3,7-dimetoxi-5,3',4'-trihidroxiflavona.

3 - Das quatro substâncias isoladas e identificadas uma é provavelmente inédita, o  $8\alpha$ -acetoxi-2-epi-vernomargolido. Esta substância apresenta esqueleto não usual para esta classe de produtos naturais, possivelmente formado a partir do glaucolido-B. Jakupovic et al (37) ao proporem o esqueleto dos vernomargolidos, mencionaram não haver isolado o precursor no vegetal em estudo. Entretanto, no presente trabalho foram isolados os dois tipos de esqueletos, o que de alguma forma corrobora a proposta daqueles pesquisadores.

4 - Esses resultados se constituem em informações iniciais para o estudo fitoquímico desta espécie vegetal.

5 - Com a substância glaucolido-B, por ser a mais abundante em um dos extratos, foram realizadas reações para modificação da estrutura, a fim de avaliar as alterações de atividade biológica e/ou farmacológica. Foram obtidos 13-desacetoxi-glaucolido-B, por hidrogenólise e 13-dihidrodessacetoxi-glaucolido-B, por hidrogenação e hidrogenólise.

Com os extratos brutos, substâncias isoladas e produtos de reações, foram realizados ensaios biológicos, cujos resultados permitiram concluir que:

1 - Dos três extratos brutos ensaiados, aqueles obtidos com metanol e acetado de etila, apresentaram ação tóxica para forma adulta de Biomphalaria glabrata, respectivamente com 90 e 72% de atividade a 100,0 ppm. Por outro lado, nenhum dos extratos inibiu a eclosão dos ovos deste molusco.

2 - Dentre as substâncias puras, somente o glaucólido-B mostrou-se ativo, com 90% de toxicidade a 100,0 ppm e 40% a 10,0 ppm, com relação a forma adulta de B. glabrata. Com relação a desovas, a mesma substância foi ativa a 100,0 ppm, com redução de 72% na eclosão de ovos.

3 - Nenhum dos extratos brutos ou substâncias puras evidenciou atividade sobre Trypanosoma cruzi.

4 - Com relação a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, somente aquele obtido em acetato de etila mostrou atividade, moderada contra Bacillus cereus e Staphylococcus aureus.

5 - Dentre as substâncias puras, o glaucólido-B apresentou forte inibição no crescimento de B. cereus e moderada no de S. aureus.

6 - Com o glaucólido-B e produtos de reações, foram realizados ensaios farmacológicos para avaliação de atividade anti-edematogênica e antinociceptiva. Os resultados obtidos, mostraram que o glaucólido-B reduziu a resposta de contorção em camundongos (ação antinociceptiva) em 58% a

160mg/kg, enquanto que os produtos das reações, na mesma dose, apresentaram redução bem menos significativa. Portanto, o glaucolido-B apresentou ação altamente analgésica, quando comparado com a indometacina. Nenhuma das três substâncias evidenciou atividade anti-edematogênica.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - HOFFMAN, H.M.R. and RABI, J. "Synthesis and Biological Activity of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butirolactones". Ange-wandte Chemie, 24, 94-110, 1985.
- 2 - LOPES, J.L.C. Lactonas Sesquiterpênicas e Atividades Biológicas de Espécies Brasileiras de Vernonia Screb. Tese de livre-docência (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Prêto-USP) Ribeirão Prêto, 1980.
- 3 - TURNER, B.L. "Summary of the Biology of the Compositae". In Heywood, V.H., Harborne, J.B., e Turner B.L. The Bio-logy and Chemistry of the Compositae. Academic Press, London, 2, 1977.
- 4 - SEAMAN, F. "Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Charac-teres in the Asteraceae." The Botanical Review, 48, 121-596, 1982.
- 5 - HOENE, F.G. Plantas e Substâncias Tóxicas e Medicinais, Graphicars, Sao Paulo, 1939.
- 6 - VICHNEWSKI, W. Estrutura e Estereoquímica de Lactonas Isoladas de Eremanthus goyazensis, Vanillosmopsis ery-thropappa e Baccharis trimera. Tese de Livre-Docência, (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Prêto-USP) Ribeirão Prêto, 1976.
- 7 - WAGNER, H. "Pharmaceutical and Economic uses of the Compositae". In Heywood V.H., Harborne J.B. E Turner B. L. The Biology and Chemistry of the Compositae. Academic Press, London, 1, 1977.

- 8 - LEITÃO FILHO, H.F. Contribuição ao Conhecimento Taxonômico da Tribo Vernonieae no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado (Escola Superior de Agricultura "Luz de Queiroz"), Piracicaba, 1972.
- 9 - HARBORNE, B.J., WILLIAMS, C.A. "Vernonieae Chemical Review." In the Biology and Chemistry of the Compositae. Academic Press, London, 1, 1977.
- 10 - LEITÃO FILHO, H. "A Família Asteraceae no Brasil: Aspectos Taxonômicos". Conferência realizada na IX Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, 1987.
- 11 - SWAINT, "Evolution of Flavonoid Compounds" In Harborne j., Mabry T.J. and Mabry H. The Flavonoids. Chapman and Hall, London, 1<sup>st</sup> ed., 1975.
- 12 - MANN, J. Secondary Metabolism, Clarendon Press, Oxford, 2<sup>nd</sup> ed., 1987.
- 13 - GROS, E.G., POMILIO, A.B., SELDES, A.M., BURTON, G. Introducción al Estudio de Los Productos Naturales. The General Secretariat of the Organization of American States, Washington, D.C., 1985.
- 14 - TORSSELL Kurt, B.G. Natural Product Chemistry, John Wiley & Sons Press, Great Britain, 1<sup>st</sup> ed., 1983.
- 15 - GEISSMAN, T.A., CROUT, D.H.G., Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman, Cooper and Company, California, 1969.



- 16 - HERZ, W. "Sesquiterpene Lactones in the Compositae". In Harborne j.B., Heywood, V.H. and Turner, B.L. The Biology and Chemistry of the Compositae. Academic Press, London, 1, 1977.
- 17 - HERZ, W. "Biogenetic Relationship in Sesquiterpene Lactones". Conferência realizada no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, 1988.
- 18 - LEE, K., HUANG, E., PIANTADOSI, C., PAJANO, J.S. and GEISMAN, T.A. "Citotoxicity of Sesquiterpene Lactones". Cancer Research, 31, 1649-54, 1971.
- 19 - RODRIGUES, E., TOWERS, G.H.N. and MITCHELL, J.C. "Biological Activities of Sesquiterpene Lactones." Phytochemistry, 15, 1573-80, 1976.
- 20 - BURNETT, W.C., JONES, S.B., MABRY, T.J. and PADOLINA, W.G. "Sesquiterpene Lactones Insect Feeding Deterrents in Vernonia". Biochemical Systematic and Ecology, 2, 25, 1974.
- 21 - KUPCHAN, S.M., FESSLER, D.C., EAKIN, M.A. and GIACOBRE, T. J. "Reaction of  $\alpha$ -methylene Lactone Tumor Inhibitors with model Biological Nucleophyles". Science, 168, 376-7, 1970.
- 22 - BAKER, J. "Compositae", Flora Brasiliensis, Lipsiae, 6, (2), 78, 1873.
- 23 - BOHLMANN, F., WALMEYER, M. and JAKUPOVIC, J. "Glaucolide from Vernonia stachelinioides" Phytochemistry, 21, (6), 1445-7, 1982.

- 24 - SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. and MORRIL, T.C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons Inc. New York, 3<sup>rd</sup> ed., 1981.
- 25 - CATALAN, C.A.N., IGLESIAS, D. KANKA, J. "Glaucolides and Related Sesquiterpene Lactones from Vernonia chamaedrys". Phytochemistry, 27, (1), 197-202, 1988.
- 26 - NAGAMITI, K. Contribuicao ao Estudo Químico e Biológico de Espécies Nativas de Asteraceae. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, 1987.
- 27 - PADOLINA, W.G., YOSHIOKA, H., WAKATANI, N. MABRY, T.J. "Glaucolide-A and B, a new Germacranolide type Sesquiterpene Lactones from Vernonia (Compositae)." Tetrahedron, 30, 1161-70, 1974.
- 28 - NAKANISHI, K., SOLOMON, P.M. Infrared Absorption Spectroscopy. Holden Day Inc., San Francisco, 1977.
- 29 - MURRAY, R., MENDEZ, J. BROWN, S. The Natural Coumarins. John Wiley & Sons Inc. New York, 1982.
- 30 - WOLLENWEBER, E., DIETZ, V.H. "A table of mass spectral parent ions as an aid in flavonoids analyses." Phytochemical Bulletin, 12, (4), 48-52, 1979.
- 31 - MARKHAN, K.R. and MABRY, H. "Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In Harborne, J., Mabry, T.J. and Mabry, H. The Flavonoids. Chapman and Hall, London, 1 ed., 1975.

- 32 - MABRY, T.J. and THOMAS, M.B. The Systematic Identification of Flavonoids. Chapman and Hall, New York, 1970.
- 33 - RODRIGUEZ, E. and VELDE, V. "Methylated Flavonols in Larrea cuneifolia." Phytochemistry, 11, 2821-26, 1972.
- 34 - UBATSH, E.L. et al. "Flavonol Methyl Ether from Ericameria difusa." Phytochemistry, 15, 440-41, 1976.
- 35 - RAMACHANDRAN, N.A.G. et al. "Rare methylated Flavonols from Angelonia grandiflora". Phytochemistry, 17, 591-92, 1978.
- 36 - ŠAKAKIBARA, M., DIFEO, D.J. NAKATANI, N. "Flavonoide Methyl Ethers on the external Leaf Surface of Larrea tridentata and Larrea divaricata." Phytochemistry, 15, 727-31, 1976.
- 37 - JAKUPOVIC, J., GAGE, D.A., BOHLMANN, F., MABRY, T.J. "Sesquiterpene Lactones from Vernonia marginata." Phytochemistry, 25, (5), 1179-83, 1986.
- 38 - RODRIGUEZ-HAHN, L. et al "transannular Cyclization of Glaucolide-A" Journal of Organic Chemistry, 53, 2965-68, 1988.
- 39 - MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. "Review article number 6. Plant Molluscicides". Phytochemistry, 24, (4), 639-52, 1985.

- 40 - MARCHANT, Y.Y., BALZA, F., ABEYSEKERA, B.F., TOWERS, G.H.N. "Molluscicidal Activity of Sesquiterpene Lactones". Biochemical Systematic and Ecology, 12, (3), 285-6, 1984.
- 41 - PICMAN, A.K. "Biological Activities of Sesquiterpene Lactones". Biochemical Systematic and Ecology, 14, (3), 255-81, 1986.
- 42 - SAMPAIO, M.C.R. Testes in Vitro da Atividade de Drogas em Trypanosoma cruzi de Critidia fasciculata. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal do Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, 1978.
- 43 - MCCLURE, J.W. "Physiology and Functions of Flavonoids". In Harborne, J.B., MABRY, T.J. and MABRY, H., The Flavonoids. Chapman & Hall, London, 1<sup>st</sup> ed., 1975.
- 44 - YOSHIOKA, H., MABRY, T.J., TIMERMANN, B.N. Sesquiterpene Lactones. University of Tokyo Press. Japan, 1973.
- 45 - SILVERSTEIN, R., BASSLER, C., MORRIL, T. Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, New York, 4<sup>th</sup> ed., 1981.
- 46 - GOTTLIEB, O.R. Espectrometria de Ressonância Magnética Protônica, Diretoria de Bibliografia e Documentação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1971.
- 47 - RUSTAIYAN, A., NAZARIANS, L. BOHLMANN, F. "Germacranolides from Erlangea cordifolia." Phytochemistry, 19, 1230-32, 1980.

- 48 - BELLAMY, L.T. The Infrared Spectra of Complex Molecules.  
John Wiley & Sons Press, Inc., New York, 3<sup>rd</sup> ed., 1, 1975.
- 49 - SZYMANSKI, H., YELIN, R. NMR Band Handbook, IFI/Plenum,  
New York, 1968.
- 50 - BOHLMANN, F., SCHUDGER, C., MISRA, L.N. and JAKUPOVIC, J.  
"Further Glaucolides from South African Vernonia spe-  
cies." Phytochemistry, 23, (8), 1795-8, 1984.
-