

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICO-QUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *MANDEVILLA ILLUSTRIS*. DETERMINA
ÇÃO DA ESTRUTURA DO ILLUSTROL, UM NOVO ÁLCOOL NOR-PREGNÂNICO.

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDE
RAL DE SANTA CATARINA PARA A OBTEN
ÇÃO DO GRAU DE "MESTRE EM CIÊNCIAS"

ROSENEI LOUZADA BRUM

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
FEVEREIRO - 1989

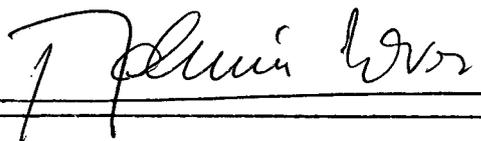
ESTUDO QUIMICO E FARMACOLOGICO DE *MANDEVILLA ILLUSTRIS*. DETERMINA
ÇÃO DA ESTRUTURA DO ILLUSTROL, UM NOVO ÁLCOOL NOR-PREGNANICO.

ROSENEI LOUZADA BRUM

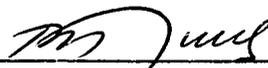
ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO ORIENTA
DOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA.



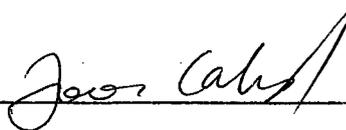
PROFº DR. ROSENDO AUGUSTO YUNES
ORIENTADOR



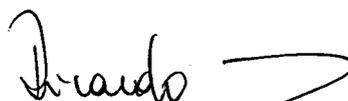
ADEMIR NEVES
COORDENADOR



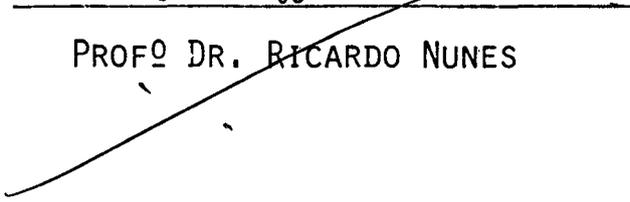
PROFº DR. ROSENDO AUGUSTO YUNES



PROFº DR. JOÃO BATISTA CALIXTO



PROFº DR. RICARDO NUNES



Ao Osvaldino, Daniel e
Rafael pelo apoio e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos:

Ao Prof^o Dr. Rosendo Augusto Yunes pela orientação deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. João Batista Calixto pelo apoio na parte farmacológica.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo estímulo e apoio.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação em Físico-Química, da Biblioteca Setorial e outros pela ajuda prestada.

À CAPES/PICD pela bolsa concedida.

Aos amigos e colegas da Pós-graduação em Físico - Química pela dedicada e desinteressada amizade.

ÍNDICE GERAL

	pág.
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
CAPÍTULO I	
I - INTRODUÇÃO	
1.1 - Sinótese da família Apocinaceae	1
1.2 - Princípios ativos em plantas de família Apocinaceae	2
1.3 - Considerações Gerais sobre estruturas de compostos isolados de família Apocinaceae e compostos <u>estru</u> <u>turalmente</u> relacionados	8
1.4 - Ação biológica da bradiginina (BK) e demais cininas	26
1.5 - Estudo de antagonistas seletivos para a BK e demais cininas na <i>Mandevilla velutina</i> (Apocinaceae).....	28
1.6 - Considerações sobre a espécie em estudo e sua <u>dis</u> <u>tribuição</u> geográfica	31
1.7 - Posição sistemática de <i>Mandevilla Illustris</i> (vell) Woodson, segundo Allorge e Woodson	32
1.8 - Resumo preliminar da espécie segundo Woodson, R.E.	33
1.9 - Objetivos	36

CAPÍTULO II

II - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - Material Botânico	37
2.2 - Extração dos princípios ativos	37
2.2.1 - Obtenção do extrato acetato de etila bruto	37
2.2.2 - Fracionamento do extrato acetato de etila.	38
2.2.3 - Separação dos constituintes ativos da fração diclorometano.....	40
2.2.4 - Purificação do componente da fração M-10..	42
2.2.5 - Purificação do componente da fração M-14..	44
2.3 - Separação de compostos não ativos.....	48
2.3.1 - Fracionamento da fração clorofórmio.....	48
2.3.2 - Separação do componente não ativo da fração DCA 14.....	50
2.3.3 - Separação do componente não ativo da fração HA 6	52
2.4 - Ensaio cromatográfico	55
2.4.1 - Cromatografia em coluna	55
2.4.2 - Cromatografia em camada delgada (CCD).....	55
2.5 - Visualização dos cromatogramas.....	56
2.5.1 - Método físico.....	56
2.5.2 - Método químico	56
2.6 - Pontos de fusão	57
2.7 - Determinações Espectrométricas	58

CAPÍTULO III

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Identificação do composto MI 12 através de métodos espectrométricos (IV e RMN ¹ H, RMN ¹³ C e massa)	59
3.1.1 - Determinação da estrutura do composto MI 12	60
3.1.2 - Estudos dos espectros de RMN ¹³ C	61
3.2 - Análise farmacológica do extrato hidroalcoólico e de compostos isolados da <i>Mandevilla illustris</i> ,....	81

CAPÍTULO IV

IV - CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1 - Florescência da <i>Mandevilla illustris</i>	34
FIGURA 2 - Rizomas da <i>Mandevilla illustris</i>	35
FIGURA 3 - Esquema da filtração preliminar do extrato acetato de etila bruto.....	39
FIGURA 4 - Esquema de extração dos princípios ativos da <i>Mandevilla illustris</i>	46
FIGURA 5 - Esquema de purificação das frações obtidas no fracionamento de fração diclorometano	47
FIGURA 6 - Esquema de purificação do composto não ativo da fração clorofórmio	54
FIGURA 7 - Espectro de Massa de alta resolução do composto MI 12	72
FIGURA 8 - Espectro de absorção no infravermelho do composto MI 12	73
FIGURA 9 - Espectro de absorção no infravermelho do composto MI 12 acetilado	74
FIGURA 10A- Espectro de absorção de RMN ¹ H do composto MI 12	75
FIGURA 10B- Ampliação dos sinais 1,2,3,4,5,6 e 7 no Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto MI 12.	75a
FIGURA 11 - Espectro de absorção de RMN ¹³ C do composto MI 12	76
FIGURA 12 - Espectro de absorção de RMN ¹³ C do composto MI 12 acetilado	77

- FIGURA 13 - Espectro obtido através da técnica APT do composto MI 12 78
- FIGURA 14 - Espectro de COSY'H do composto MI 12 79
- FIGURA 15 - Espectro de absorção de RMN¹H do composto MI 12 acetilado 80
- FIGURA 16 - A) Curvas concentração-resposta médias para a bradicinina no útero isolado de rata na ausência (0) ou na presença de concentrações crescentes do extrato hidroalcoólico da *Mandevilla illustris*. B) Gráfico de Schild..... 85
- FIGURA 17 - A) Curvas concentração-resposta médias para a Lisil-bradicinina no útero isolado de rata na ausência (0) ou na presença de concentrações crescentes do extrato hidroalcoólico de *Mandevilla illustris*. B) Gráfico de Schild.... 86
- FIGURAS 18A e 18B - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a ocitocina (A), acetilcolina (B), no útero isolado de rata na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da *Mandevilla illustris*..... 87
- FIGURA 18C e 18D - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a angiotensina II (C) e cloreto de bário (D) no útero isolado de rata na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da *Mandevilla illustris*... 88

- FIGURA 19 - A) Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicinina no útero isolado de rata na Ausência (0) ou na presença de distintas concentrações do composto MI 15. B) Gráfico de Schild..... 89
- FIGURA 20 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicina (A) e para a acetilcolina (B) no útero isolado de rata na ausência (0) ou na presença de distintas concentrações do composto MI 12 90

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	- Deslocamentos químicos de RMN ¹ H de glicosídeos pregnânicos, (ppm) de TMS em piridina	11
TABELA 2	- Deslocamentos químicos de ¹³ C de glicosídeos pregnânicos, (ppm) de TMS em piridina..	15
TABELA 3	- Deslocamentos químicos para os derivados do colesterol	20
TABELA 4	- Deslocamentos químicos referentes ao androstano, alguns cetoandrostanos e hidróxiandrostanos	23
TABELA 5	- Deslocamentos químicos do ergosterol e alguns ergostadienos e trienos	25
TABELA 6	- Fracionamento da fração diclorometano.....	41
TABELA 7	- Purificação do componente ativo da fração M-10.....	43
TABELA 8	- Purificação do composto da fração M-14....	45
TABELA 9	- Fracionamento da fração clorofórmio	48
TABELA 10	- Separação do componente não ativo da fração DCA 14	51
TABELA 11	- Fracionamento da fração HA 6	53
TABELA 12	- Sistemas cromatográficos empregados para cromatografar em camada fina as frações recolhidas nos processamentos das colunas,...	57

TABELA 13 - Multiplicidade dos átomos de carbono no com <u>post</u> o MI 12	62
TABELA 14 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C do andros <u>tan</u> o (28) e do 3-hidr ^o xiandrostan <u>o</u> (34)....	63
TABELA 15 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para <u>al</u> guns ester ^o ides n ^o saturados.....	64
TABELA 16 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para o com <u>post</u> o MI 12 e compostos estruturalmente <u>re</u> lacionados.....	66
TABELA 17 - Pot ^{en} cia do extrato bruto do composto MI 15 obtido da <i>Mandevilla illustris</i> em antagoni <u>zar</u> as a ^o es da BK e L-BK no <u>u</u> tero isolado da rata.....	84

RESUMO

O estudo da *Mandevilla illustris* (Apocinaceae) foi realizado com o objetivo de determinar sua composição química, em especial os compostos farmacologicamente ativos.

O extrato acetato de etila dos rizomas da planta foi submetido a uma filtração preliminar sobre sílica gel, usando como solvente éter de petróleo, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. Da fração eluída com diclorometano foram isolados os compostos codificados como MI 11, MI 12, MI 18 e MI 21. Da fração clorofórmio, foram isolados os compostos codificados como MI 15, MI 25 e MI 27. Dentre os compostos isolados, apresentaram atividade farmacológica, os codificados como: MI 15, MI 18 e MI 21.

O composto MI 12 teve sua estrutura determinada e correspondeu a de um novo álcool nor-pregnânico que foi denominado Illustrol.

A estrutura deste composto foi determinada através do emprego de técnicas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton, de carbono e espectrometria de massa de alta resolução. Para a completa elucidação da estrutura empregou-se técnicas de COSY e APT.

O extrato hidroalcoólico da *Mandevilla illustris* antagonizou de maneira competitiva a resposta contrátil para a bradicinina e lisil-bradicinina no útero isolado de rata, porém

não foi seletivo em antagonizar as ações das cininas, dado que inibiu também a resposta para a ocitocina, acetilcolina, angiotencina II e cloreto de bário.

O composto MI 15 apresentou uma atividade inibitória da bradicinina, mas foi demonstrado que esta inibição não ocorre através de uma interação simples.

Estes fatos justificam, em grande parte, o uso popular desta planta como antiinflamatória.

ABSTRACT

Mandevilla illustris (Apocynaceae) have studied in order to determine their chemical composition especially of the pharmacological active compounds.

The ethyl acetate extract of the rhizomes was submitted to a preliminar filtration on silica gel using methylene chloride, chloroform and ethyl acetate as solvent. From the methylene chloride fraction were isolated the compounds named MI 11, MI 18 and MI 21. From the chloroform fraction were isolated the compounds named MI 15, MI 25 and MI 27. The compounds MI 15, MI 18 and MI 21 show pharmacological activity.

The structure of the compound MI 12 was determined as a new nor-pregnanic alcohol that was named illustrol.

The structure was determined using infrared, nuclear magnetic resonance of proton and carbon and mass spectrometric methods. For the complete elucidation of the structure have been used COSY and APT techniques.

The crude aqueous alcoholic extract of *Mandevilla illustris* has a competitive antagonistic effect on bradykinin and lisyl-bradykinin contractions of the isolated uterus of the rat although was not selective because it also inhibits the response to acetylcholine, oxytocin, angiotensine II and BaCl_2 .

The compounds MI 15 inhibits the response of bradykinin but was demonstrated that it not occur by a simple interaction.

All this facts support the popular use of the
plant.

CAPÍTULO I

I - INTRODUÇÃO

1.1 - Sinópsse da família *Apocinaceae*

As *Apocinaceae* compõem uma grande família com uma distribuição pantropical e poucos representantes em zonas temperadas do mundo¹. Esta família apresenta cerca de 218 gêneros e 2000 espécies, sendo que, apenas 2 a 11 gêneros ocorrem em regiões temperadas². É representada em todas as formações vegetais na flora brasileira com cerca de 50 espécies.

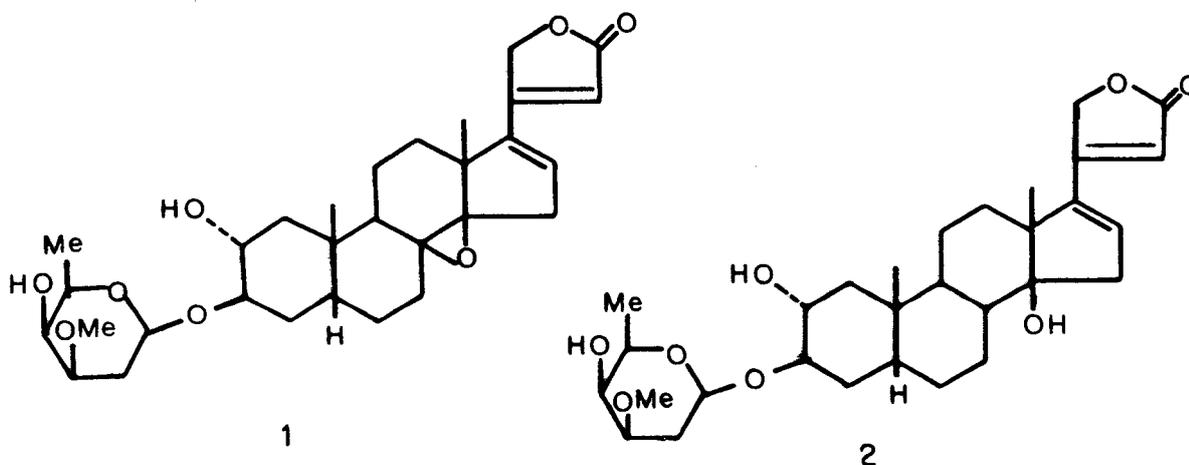
Os representantes desta família apresentam-se principalmente como ervas, subarbustos erectos ou escandentes arbustos, lianas, cipós e ainda como árvores de grande porte. Destaca-se pela importância econômica de muitas de suas espécies. Como madeira cita-se os gêneros *Aspidosperma*, *Couma* e *Peschiera*. As várias espécies dos gêneros *Allamanda*, *Couma*, *Himatantus* e *Mandevilla* são popularmente considerados como tendo propriedades antitérmicas, depurativas, antihelmínticas, purgativas e são usadas no Brasil com estas finalidades^{3,4}. Algumas espécies de *Parahancornia*, *Lacmellea* e *Couma* produzem um látex do qual extrai-se goma de mastigação. Como plantas ornamentais, as *Apocinaceae* destacam-se pelo porte, folhagem e beleza de suas flores. Espécies exóticas de *Thevetia*, *Catharanthus*, *Nerium* e outras são cultivadas no Brasil, além de espécies autoctones de *Mandevilla* e *Allamanda*. Algumas es

pêcies como a *Mandevilla illustris*, *Stipecuma*, *Secondatia* e outras são conhecidas como altamente tóxicas³.

1.2. Princípios ativos em plantas da família *Apocináceae*.

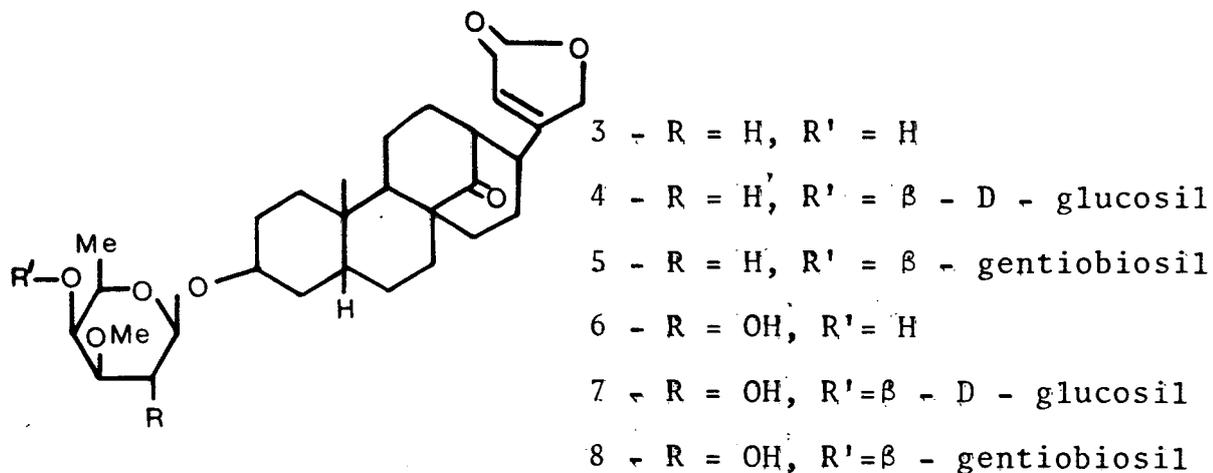
As *Apocináceae* compõem uma grande família largamente distribuída no Brasil. Muitas de suas espécies apresentam atividades cardiotônicas, antiinflamatórias, antibactericidas, entre outras. Estas propriedades são atribuídas a compostos químicamente complexos, incluindo:

1. Os compostos denominados kanerosídeo (1) e nerumosídeo (2), foram isolados de folhas frescas de *Nerium oleander*, e definidos como glicosídeos cardíacos. Suas estruturas foram elucidadas como 3-β-O-(D-diginosil)-2α-hidrôxi-8,14-β-epôxi-5-β-carda-16:17,20:22-dienolídeo e 3-β-O-(D-diglicosil)-2α,14β-dihidrôxi-β-carda-16:17,20:22-dienolídeo, respectivamente⁵.

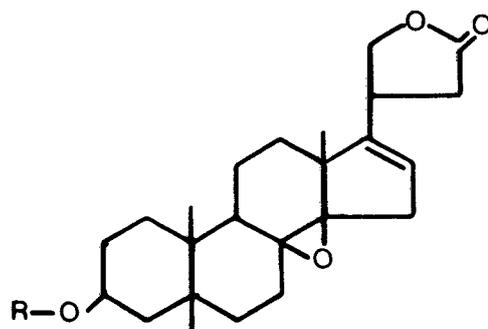


Durante uma investigação de glicosídeos cardíacos de *Nerium*, foram isolados de folhas de *Nerium oleander* seis compos

tos (3-8) que apresentam em comum a aglicona, deagenina, cuja estrutura foi estabelecida como sendo 3- β -hidróxi-15(14 \rightarrow 8) abeo-5- β - (8R) -14-oxo-card-20(22)-enolídeo⁶.

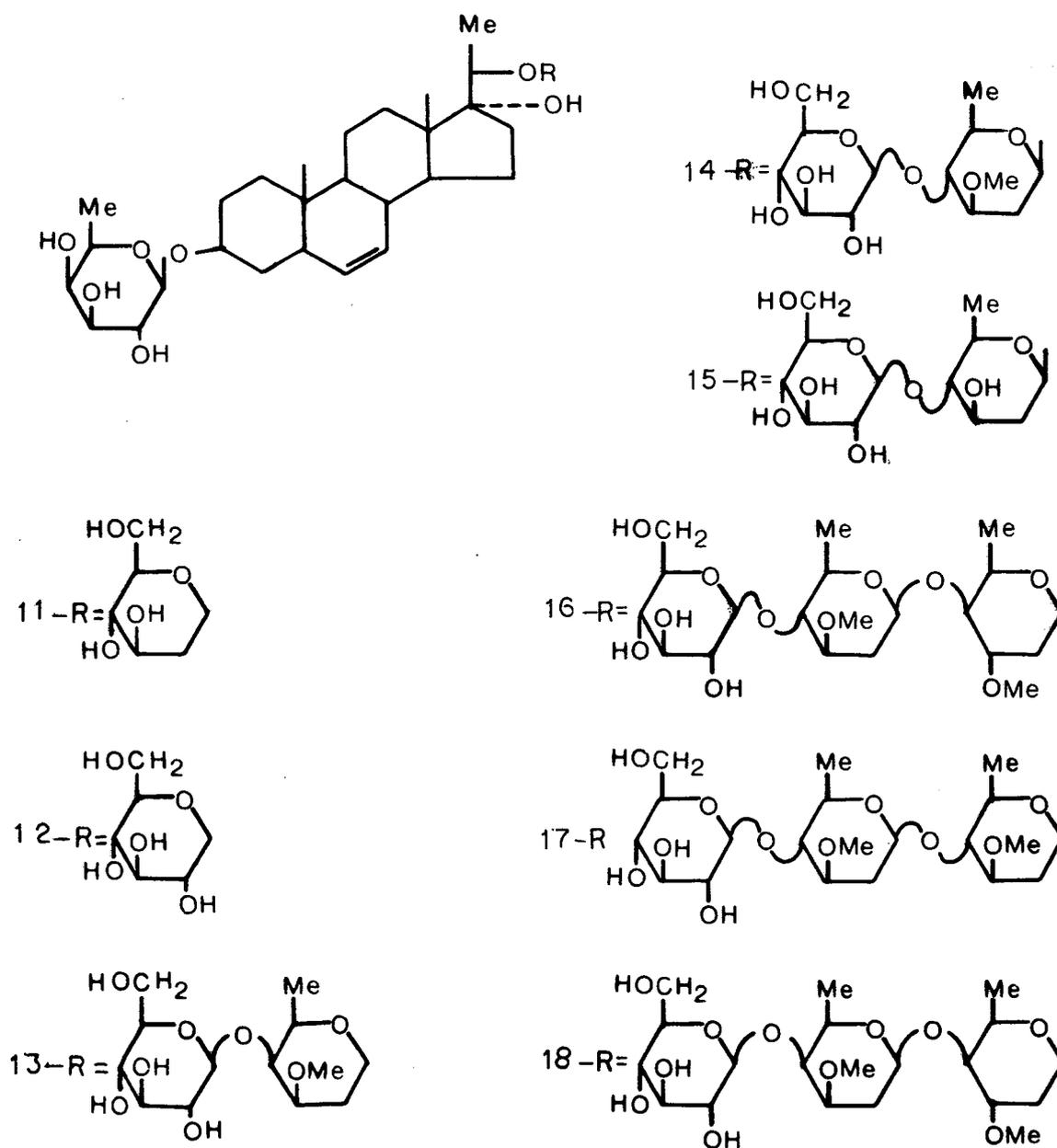


2. As folhas de *Nerium odorum*, da mesma forma, são conhecidas por apresentar glicosídeos cardioativos. Os compostos β -D-diginosídeo (9) e β -D-digitalosídeo(10) foram isolados de folhas frescas, secas em estufa a 80°C. As estruturas destes compostos foram elucidadas como glicosídeos Δ^{16} - dihidroadnerigenina⁷.

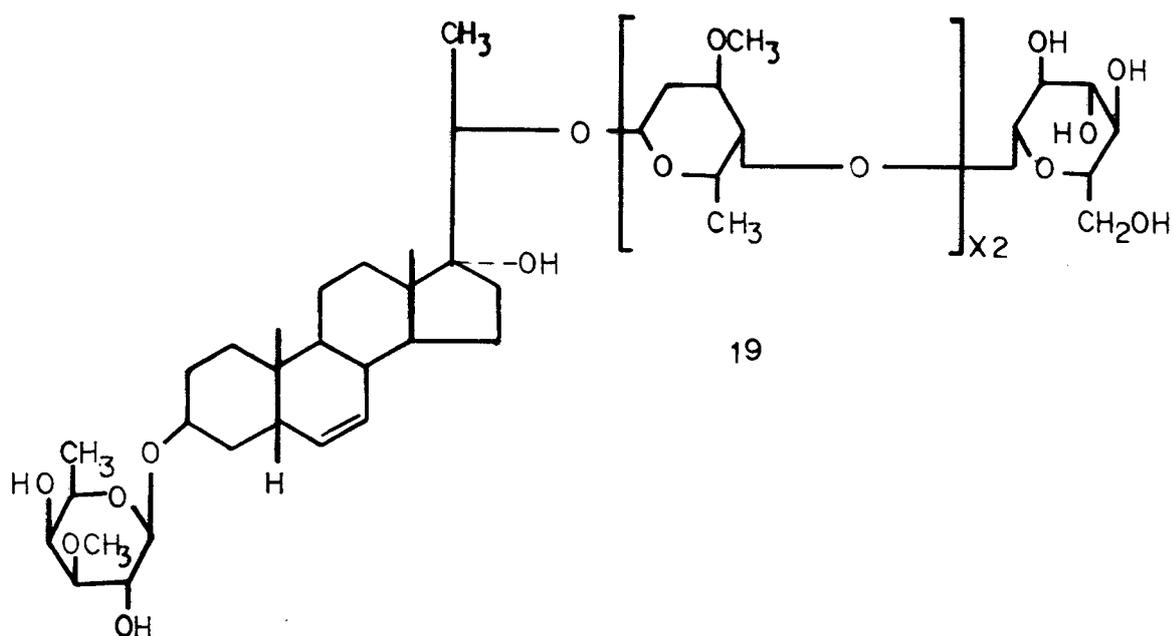


- 9 - R = - β - D - diginosil
 10 - R = - β - D - digitalosil

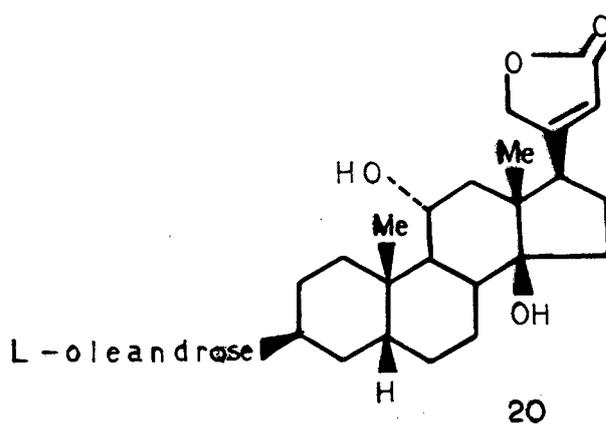
3. Compostos glicosídicos bisdesmosídicos pregnânicos (11-18) foram isolados da espécie *Trachelospermum asiaticum* Nakai, os quais apresentam em comum a estrutura, 3-O- β -D-digitalosil-3 β -17 α - 20 α -trihidroxi-5 α -pregn-6-eno e nesta as unidades de açúcares estão ligadas ao grupo 20 hidroxil⁸.



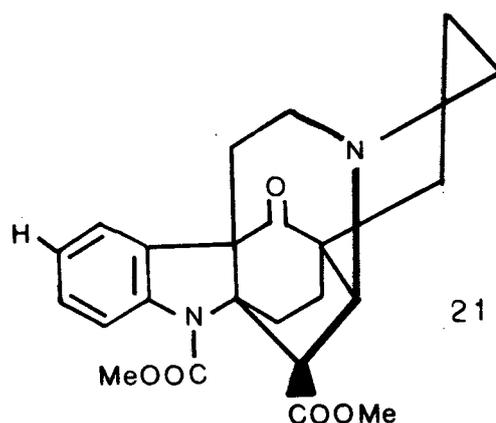
O *Teikaside A* (19), um glicosídeo pregnânico, foi isolado de folhas e caules pulverizados de *trachelospermum*, sendo sua estrutura determinada como 3-0-(β -D-digitalosil)-20-0-(β -D-glucosil- β -D-sarmentosil)-3 β -17 α -20 α -trihidrôxi-5- α -pregn-6-eno.⁹



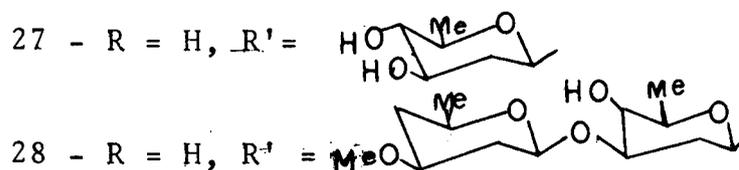
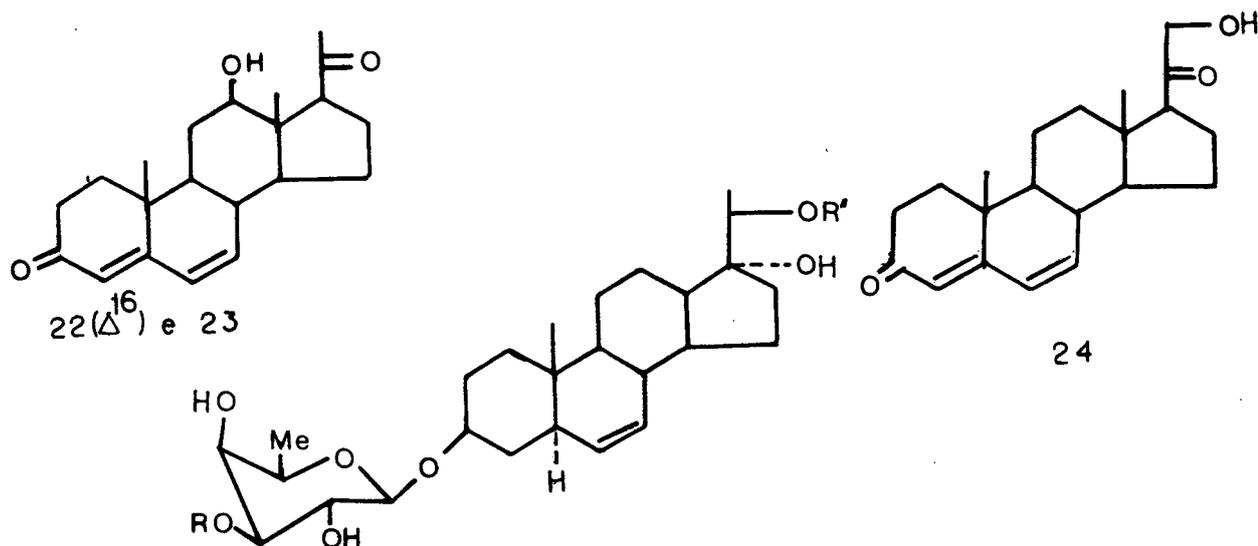
4. O D-strophanthin(20) é um glicosídeo cardiotônico isolado das sementes de *Strophantus divaricatus*¹⁰.



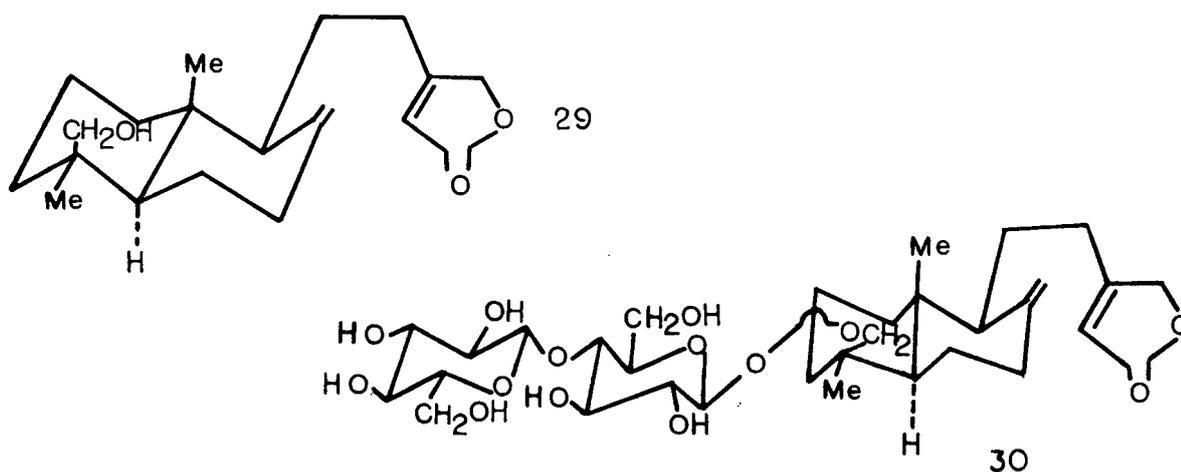
5. Um novo alcalóide indólico identificado como 10-dimetóxicopsidasinina (21) foi isolado de folhas de *Kopsia jasminiflora* Pitar¹¹.



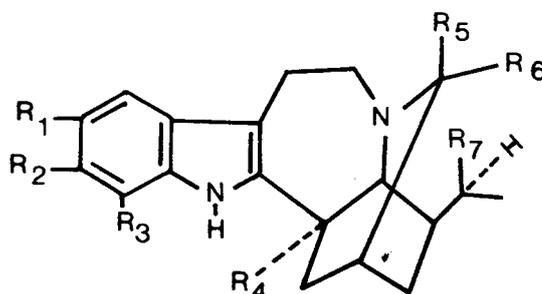
6. Os compostos denominados como neridinona A (22), 12 β -hidróxipregna-4,6-dieno-3,20-diona (23), 21-hidróxipregna-4,6-dieno-3,20-diona (6,7-didihidrocortexona (24), teikagenina-3-0- β -D-fucopiranosídeo (25), 3'-0-acetilteikagenina-3-0- β -D-fucopiranosídeo (26), teikagenina-3-0- β -D-fucopiranosil-20-0- β -D-canarósídeo (27) e teikagenina-3-0- β -D-fucopiranosil-20-0- β -D-diginopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -0-canaropiranosídeo (28), foram isolados de raízes secas de *Apocinum venetum*¹².



7. O composto Labdano diterpeno 16,19-dihidrôxi-en \underline{t} labda-8(17)13-dieno-15-oico lactona (29) e seu glicosídeo 19-O- β -cellobiosídeo (39) foram isolados de cascas de raízes secas de *Melodinus monogynus*.¹³



8. Foram isolados vinte e três alcalóides de cascas de raízes e cascas de caules de *Tabernaemontana pachysiphon*, sendo destes, três novos e dez não haviam sido isolados antes desta espécie. Os três novos alcalóides apresentam propriedades antibactericidas e são denominados como: 3R-hidrôxiconopharyngina (31), 3S-hidrôxiconopharyngina (32) e 11-dimetilconoduramina (33)¹⁴.



- 31 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_5 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = \text{CO}_2\text{Me}$, $R_6 = \text{OH}$
 32 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = \text{CO}_2\text{Me}$, $R_5 = \text{OH}$
 33 $R_1 = 3' \text{ vobasinil}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = \text{CO}_2\text{Me}$

1.3 - Considerações gerais sobre estruturas de compostos isolados da família *Apocinaceae* e compostos estruturalmente relacionados.

A identificação de compostos orgânicos pode ser realizada a partir das informações obtidas de quatro métodos que

são: espectrometria de massa, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectroscopia no ultravioleta.

As bandas que ocorrem entre 4.000 e 660 cm^{-1} no infravermelho são particularmente úteis, pois muitos grupos apresentam vibrações características nesta faixa. O composto kanerosídeo (1) mencionado na página 2 por exemplo, mostrou no IV bandas em 3450 ($-\text{OH}$), 1780 , 1750 cm^{-1} (β -substituído, lactona α,β -insaturada com anel de cinco membros) e em 1625 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$) e não apresentou bandas de aromático⁵.

A espectrometria de massa que consiste no bombardeamento de um composto com um feixe de elétrons, produz fragmentos positivos que são separados em função da razão massa/carga e, deve informar o peso molecular do composto, de forma a se aproximar tanto quanto possível do valor real. Assim a fórmula molecular do kanerosídeo ($\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_8$) composto 1 (página 2) foi obtida através da medida exata da massa do pico molecular observado no espectro de massa^{5,15}.

Uma vez determinada a fórmula molecular, torna-se possível calcular o grau de insaturação, o qual pode indicar a soma do número de anéis, o número de duplas ligações, duas vezes o número de triplas ligações¹⁵.

O espectros de RMN-¹H fornecem fundamentalmente as seguintes informações;

Deslocamentos químicos - Indicam as características da estrutura química em torno do hidrogênio e a área do pico (medida pelo integrador) é proporcional ao número de prótons

que representam. Os efeitos de blindagem ocasionados pelo campo magnético gerado pelos movimentos de elétrons influenciam os deslocamentos químicos.

Acoplamento spin-spin O acoplamento spin-spin fornece a relação especial e o número de hidrogênio vizinho com spin diferente de zero¹⁵.

Assim as informações reunidas na Tabela 1 para o teikagenino-3-0-β-D-digitalosídeo(34) e demais glicosídeos pregnânicos 11-18 (página 4)⁸ permitem: a) definir a orientação espacial dos hidrogênios, b) determinar o número e a posição das metoxilas e o número de unidades de açúcar presente, c) definir o número e a posição dos grupos metilas d) constatar a presença de dupla ligação e de hidroxilas.

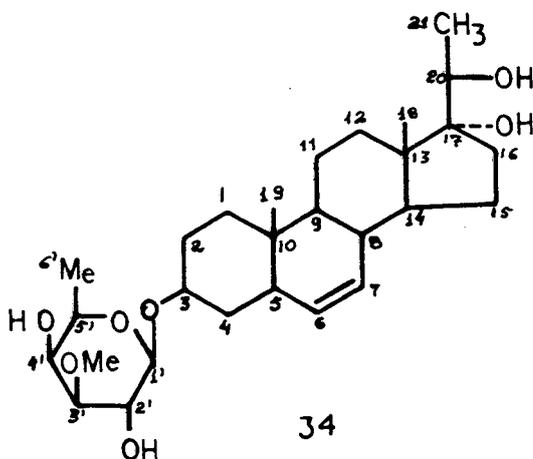


TABELA 1 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN-¹H DE GLICOSÍDEOS, (PPM) DE TMS EM
 PIRIDINA⁸

	34	11	12	13	14	15	16	17	18
H-3α	3.99	3.99	4.00	3.99					
	(m)	(m)	(m)	(m)					
H-6	5.58	5.58	5.60	5.59	5.59	5.58	5.58	5.60	5.58
	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)
H-7	5.35	5.37	5.38	5.38	5.38	5.37	5.37	5.38	5.36
	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,10)	(br d,9)	(br d,10)	(br d,10)
H-18	0.76	0.76	0.77	0.77	0.75	0.74	0.74	0.76	0.74
H-19	0.80	0.78	0.79	0.77	0.77	0.76	0.75	0.77	0.77
H-20	4.13	4.01	4.02	3.98	3.95	3.94	3.95		
	(q, 6)	(q, 6)	(q, 6)	(q, 6)	(q, 6)	(q, 6)	(q, 6)		
H-21	1.50	1.65	1.64 ^{e)}	1.63 ^{e)}	1.61 ^{e)}	1.61 ^{e)}	1.61 ^{e)}	1.64 ^{e)}	1.63 ^{e)}
	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)	(d, 6)
H-1	4.84	4.83	4.84	4.84	4.84	4.84	4.79	4.86	4.78
	(d, 8)	(d, 7)	(d, 7)	(d, 8)	(d, 7)	(d, 7)	(d, 8)	(d, 8)	(d, 8)

cont... Tabela 1

H-6"	1.65 (d, 6)	1.61 ^{e)} (d, 6)	1.54 (d, 6)	1.76 (d, 6)	1.77 (d, 6)	1.52 (d, 6)	1.47 (d, 6)	1.52 (d, 6)
3"-OMe	3.48	3.41	3.54	3.54	3.31	3.31	3.52	3.31
Outros	5.16 (d, 8 H- 1''')	5.13 (d, 8 H- 1''')	4.97 (d, 8 H- 1''')	4.82 (d, 8 H- 1''')	4.92 (dd, 9,1 H- 1''')	4.73 (br d,10, H- 1''')	4.92 (br d,10, H- 1''')	4.73 (br d,9, H- 1''')
					3.54	3.54	3.54	3.54
					(3''-OMe)	(3''-OMe)	(3''-OMe)	(3''-OMe)
					1.76	1.74	1.54	1.54
					(3H, d,6, H-6''')	(3H, d,6, H-6''')	(3H, d,6, H-6''')	(3H, d,6, H-6''')
					5.13	5.14	5.17	5.17
					(d', 8, H-1''''')	(d, 8, H-1''''')	(d, 8, H-1''''')	(d, 8, H-1''''')

LEGENDA TABELA 1 - a) O SINAL PADRÃO E O VALOR J (HZ) SÃO DADOS EM PARÊNTESES, b) AS ATRIBUIÇÕES DE SINAIS FORAM BASEADAS NO ESPECTRO DE $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY), c) AS ATRIBUIÇÕES DE SINAIS MARCADOS PODEM SER REVISADAS, d) AS SEGUINTE ABREVIACÕES FORAM USADAS: s (SINGLETE), d (DUBLETE), t (TRIPLETE), m (MULTIPLETE), dd' (DUBLO DUBLETE) E br d (DUBLETE LARGO)

O emprego de ressonância magnética nuclear de ^{13}C é prática fundamental em vários trabalhos de determinação de estruturas, principalmente em casos de estruturas mais complexas que de outra forma exigiriam tecnologias mais complexas. Por este método, é possível obter além de outros dados o tipo e o número de átomos de carbono. Entre os estudos que empregaram RMN- ^{13}C na determinação de estruturas de compostos orgânicos são citados:

1. Os compostos bisdesmosídicos pregnânicos 11-18 (página 4) tiveram suas estruturas determinadas com base não só nos dados de espectros de RMN- ^1H como também nos dados referentes ao emprego de RMN- ^{13}C ⁸, cujas informações encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C DE GLICOSÍDEOS PREGNÂNICOS
 COSY (PPM) EM PIRIDINA⁸.

	34	11	12	13	14	15	16	17	18
1	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9
2	30.0	30.0	30.1	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	29.9
3	77.6	77.6	77.7	77.7	77.6	77.7	77.7	77.7	77.7
4	32.9	33.0	33.0	32.9 ^{d)}	33.0	33.0	32.9	33.0	32.9
5	45.1	45.1	45.2	45.1	45.1	45.2	45.2	45.2	45.1
6	129.5	129.5	129.6	129.5	129.5	129.5	129.5	129.4	129.5
7	131.1	131.1	131.2	131.1	131.1	131.1	131.1	131.2	131.1
8	38.2	38.2	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.2
9	52.7	52.7	52.7	52.7	52.7	52.7	52.7	52.7	52.6
10	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.5
11	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
12	38.5	37.9	38.1	37.9	37.9	37.9	37.9	38.0	37.9
13	47.0	47.0	47.1	47.0	47.0	47.0	47.0	47.1	47.0

cont... Tabela-2

14	49.5	49.1	49.2	49.1	49.1	49.1	49.2	49.1	49.1
15	23.5	23.5	23.6	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.4
16	32.0	31.9	32.0	32.0	31.9	31.9	31.9	31.9	31.9
17	85.3	85.0	85.0	84.9	84.9	84.9	85.0	85.0	84.9
18	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
19	14.5	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7
20	71.8	82.8	82.9	83.2	82.9	83.0	82.9	83.1	83.2
21	19.4	18.1	18.1	18.2 ^{e)}	18.0	18.1	18.0 ^{d)}	18.1	17.9 ^{d)}
3-0-dgt ^{b)}									
1'	102.6	102.7	102.8	102.7	102.7	102.7	102.6	102.7	102.6
2'	70.8	70.8	70.9	70.8 ^{f)}	70.8	70.8	70.7	70.9	70.7 ^{e)}
3'	85.0	85.0	85.1	85.0	85.0	85.0	85.5	85.1	85.4
4'	68.6	68.6	68.7	68.6	68.6	68.6	68.1	68.6	68.1
5'	71.0	71.0	71.1	71.0	71.0	71.0	71.4	71.1	71.4
6'	17.4	17.4	17.5	17.4	17.4	17.5	17.3	17.5	17.3
Ome	57.2	57.2	57.3	57.2	57.2 ^{d)}	57.2	56.4 ^{e)}	57.2 ^{d)}	56.4 ^{f)}
20-0-sug. ^{e)}		(can.)	(Ole.)	(dgn.)	(Ole.)	(can.)	(sar.)	(ole.)	(sar.)
1''	102.5	102.5	102.2	103.0	101.9	102.2	99.8	100.1	99.8

cont... Tabela-2

2"	41.1	37.3	33.0 ^{d)}	37.4	39.9	31.1	37.6 ^{e)}	31.1
3"	72.1	81.7	73.4	79.5	70.3	80.2	79.3	80.2 ^{g)}
4"	78.5	76.4	80.1	83.5	89.2	75.0	83.1 ^{f)}	74.9
5"	72.9	72.9	70.7 ^{f)}	72.0 ^{e)}	71.5 ^{d)}	70.2	72.1 ^{g)}	70.2 ^{e)}
6"	18.8	18.8	17.9 ^{e)}	19.0	18.6	17.9 ^{d)}	18.9	17.9 ^{d)}
OMe		57.0	56.1	57.1 ^{d)}		58.7	57.2 ^{d)}	58.7
						(ole.)	(ole.)	(dgn.)
1'''						101.9	102.1	102.9
2'''						37.5	37.7	32.9
3'''						79.6	79.6	73.4
4'''						83.4	83.3 ^{f)}	80.1 ^{e)}
5'''						72.0	72.0 ^{e)}	70.5 ^{e)}
6'''						19.0	18.9	18.2 ^{d)}
OMe						57.1 ^{e)}	57.3 ^{d)}	56.1 ^{f)}
term. glc								
1''''	104.7	104.5	105.7	104.4	104.5	104.7		
2''''	75.9	75.7	75.1	75.7	75.7	75.9		
3''''	78.5 ^{g)}	78.6 ^{f)}	78.4	78.6 ^{f)}	78.7 ^{h)}	78.5 ^{h)}		

cont... Tabela-2

4'''	71.9	71.9 ^{e)}	71.6 ^{d)}	72.0	71.5 ^{e)}	71.9
5'''	78.3 ^{g)}	78.0 ^{f)}	78.4	78.1 ^{f)}	78.1 ^{h)}	78.3 ^{h)}
6'''	63.1	63.1	62.5	63.1	63.1	63.1

LEGENDA TABELA 2-a) AS ATRIBUIÇÕES DE SINAIS FORAM BASEADAS NOS ESPECTROS DE DUAS DIMENSÕES (2D) E NMR ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ COSY), b) AS SEGUINTE ABREVIACÕES FORAM USADAS: dgt (β -D-DIGITULOSE), CAN (β -D-CANAROSE), OLE (β -D-OLEANDROSE), dgn (β -D-DIGINOSE), SAR (β -D-SARMENTOSE) E g1c (β -D-GLUCOSE), e-h) ATRIBUIÇÕES DE SINAIS MARCADOS d-h) EM CADA COLUNA PODEM SER REVISADAS.

2. Os compostos 20(22)-dihidrocolesterol (37-38) e 20-22-epoxicolesterol (39a) são propostos como intermediários na formação do (20 OR, 22 R)-20,22-dihidroxicolesterol (36) formado na conversão do colesterol (35) a pregnenolone ^{16,17}. A Tabela 3 evidencia os deslocamentos químicos de ¹³C em comparação com os deslocamentos observados para o colesterol.

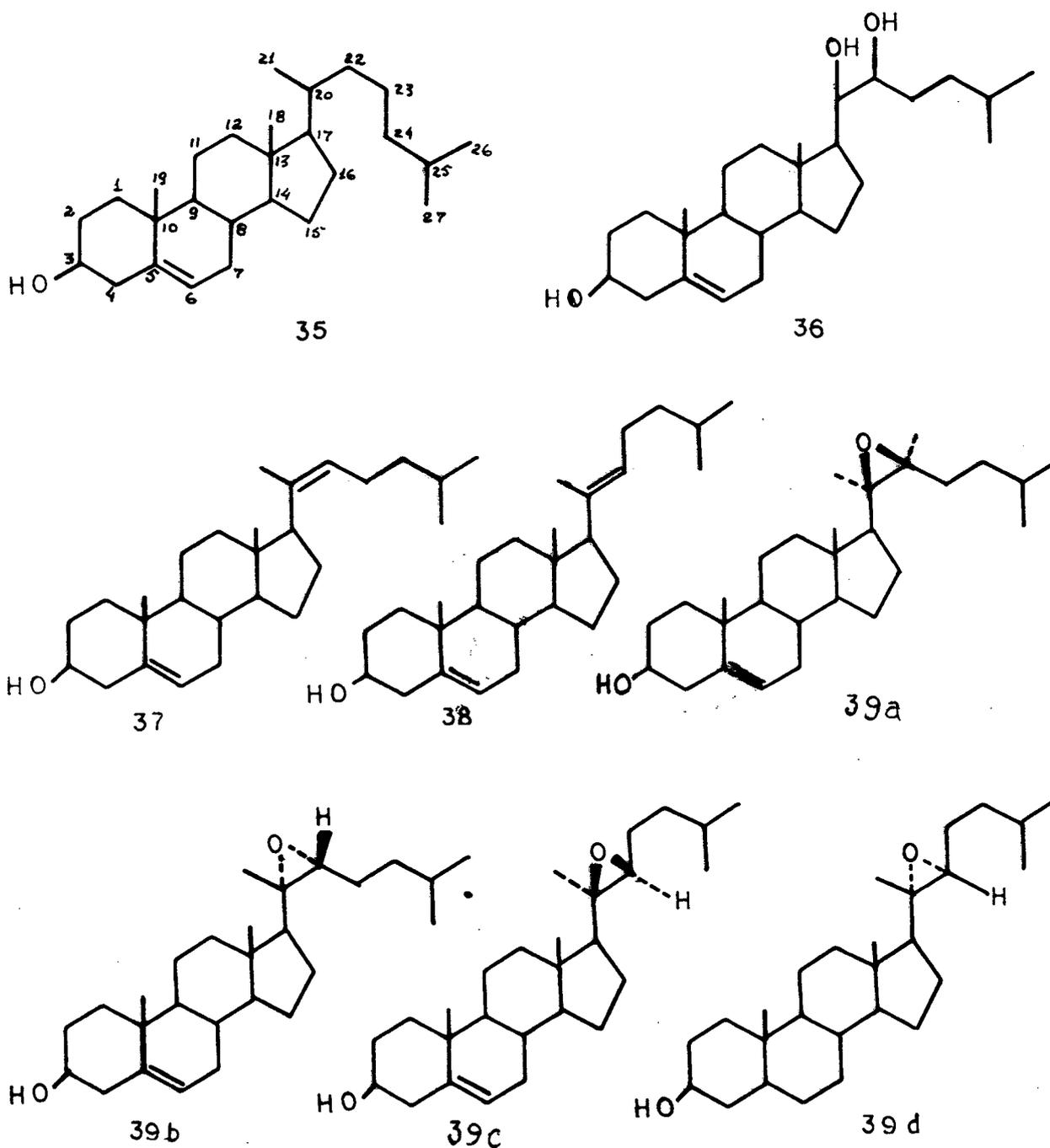
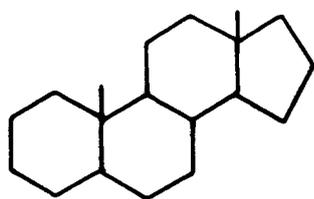


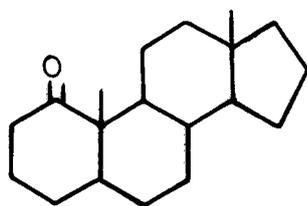
TABELA 3 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA OS DERIVADOS DO COLESTEROL
(37-39d)¹⁶

Carbonos	35	37	38	39a	39d	39c	39d
1	37,4	37,4	37,4	37,4	37,4	37,4	37,4
2	31,5	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1
3	71,2	71,8	71,8	71,8	71,8	71,8	71,8
4	42,3	42,4	42,4	42,4	42,4	42,4	42,4
5	141,1	141,0	141,0	141,0	141,0	141,0	141,0
6	121,2	121,6	121,6	121,6	121,6	121,6	121,6
7	31,9	31,9	31,9	31,9	31,9	31,9	31,9
8	31,9	31,9	31,9	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,4	50,4	50,4	50,4	50,4	50,4	50,4
10	36,4	36,6	36,6	36,6	36,6	36,6	36,6
11	21,1	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
12	28,2	39,6	39,6	39,6	39,6	39,6	39,6
13		45,9	43,6	42,5	42,4	43,2	42,5
14		55,9	56,5	56,4	56,2	57,7	56,8
15		24,7	24,5	24,7	24,7	23,9	24,1
16		26,3	26,0	26,9	26,3	26,2	26,6
17		51,2	59,1	53,3	50,5	56,7	56,8
18		14,0	13,0	14,7	14,4	13,2	13,5
19		19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4
20		134,2	134,1	61,1	61,0	60,0	60,4
21		22,2	17,8	22,6	22,7	17,3	20,3
22		129,6	126,1	66,5	65,1	60,4	59,8
23		24,7	24,9	23,4	24,7	21,9	22,4

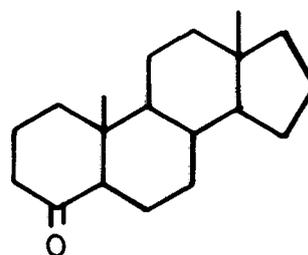
3. Estudos sistemáticos de ceto-esteróides e Hidroxi-esteróides têm sido realizados com o objetivo de explicar os efeitos de blindagem exercidos pelos vários substituintes ¹⁸. Os deslocamentos químicos de ¹³C referentes ao androstano (40), cetoandrostanos (41-42) ¹⁹ e hidroxiandrostanos (43-46) ²⁰ são fornecidos na Tabela 4.



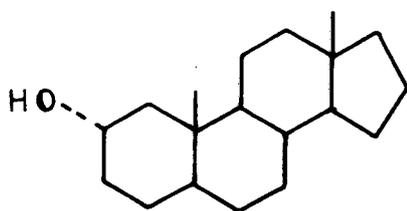
40



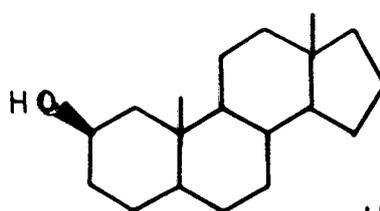
41



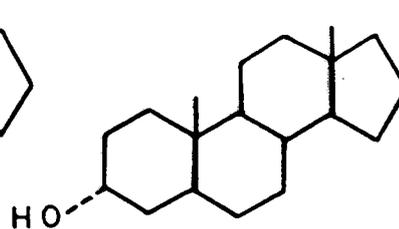
42



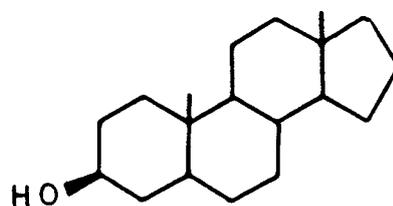
43



44



45



46

TABELA 4 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AO ANDROSTANO, ALGUNS CETOANDROSTANOS E HIDROXIANDROSTANOS^{19,20}

Carbo nos	Andros tano	41	42	43	44	45	46
1	38,8	215,8	37,8	48,2	45,3	32,4	37,1
2	22,3	38,3	20,5	58,0	58,1	29,1	31,5
3	26,9	28,0	41,2	36,3	33,9	66,1	71,2
4	29,2	28,0	212,6	27,7	23,9	36,0	38,3
5	47,1	49,8	59,3	46,4	47,4	39,2	44,9
6	29,2	28,0	22,3	28,2	28,9	28,7	28,8
7	32,6	31,5	30,9	32,4	32,5	32,5	32,5
8	36,0	36,2	35,5	35,3	35,4	36,0	35,9
9	55,1	47,2	54,5	55,0	55,9	56,7	54,5
10	36,4	52,0	42,6	37,6	36,1	36,3	35,6
11	20,8	22,7	21,8	21,1	21,0	20,9	21,3
12	39,0	38,8	38,9	39,0	39,1	39,0	38,9
13	40,8	41,0	40,8	40,9	40,9	40,9	40,8
14	54,7	54,4	54,8	54,6	54,7	54,7	54,5
15	25,5	25,0	25,5	25,6	25,5	25,6	25,5
16	20,5	20,4	20,5	20,5	20,5	20,6	20,5
17	40,5	40,6	40,6	40,5	40,5	40,5	40,6
18	17,6	17,8	17,6	17,6	17,7	17,6	17,6
19	12,3	12,3	13,8	13,4	14,8	11,2	12,6

4. Novos estudos realizados, tendo como padrão o ergosterol marcado, levaram a reatribuições dos carbonos 5, 8, 16, 22 e 23 como mostra os deslocamentos químicos apresentados para alguns ergostadienos e trienos (47-51)²¹, na Tabela 5.

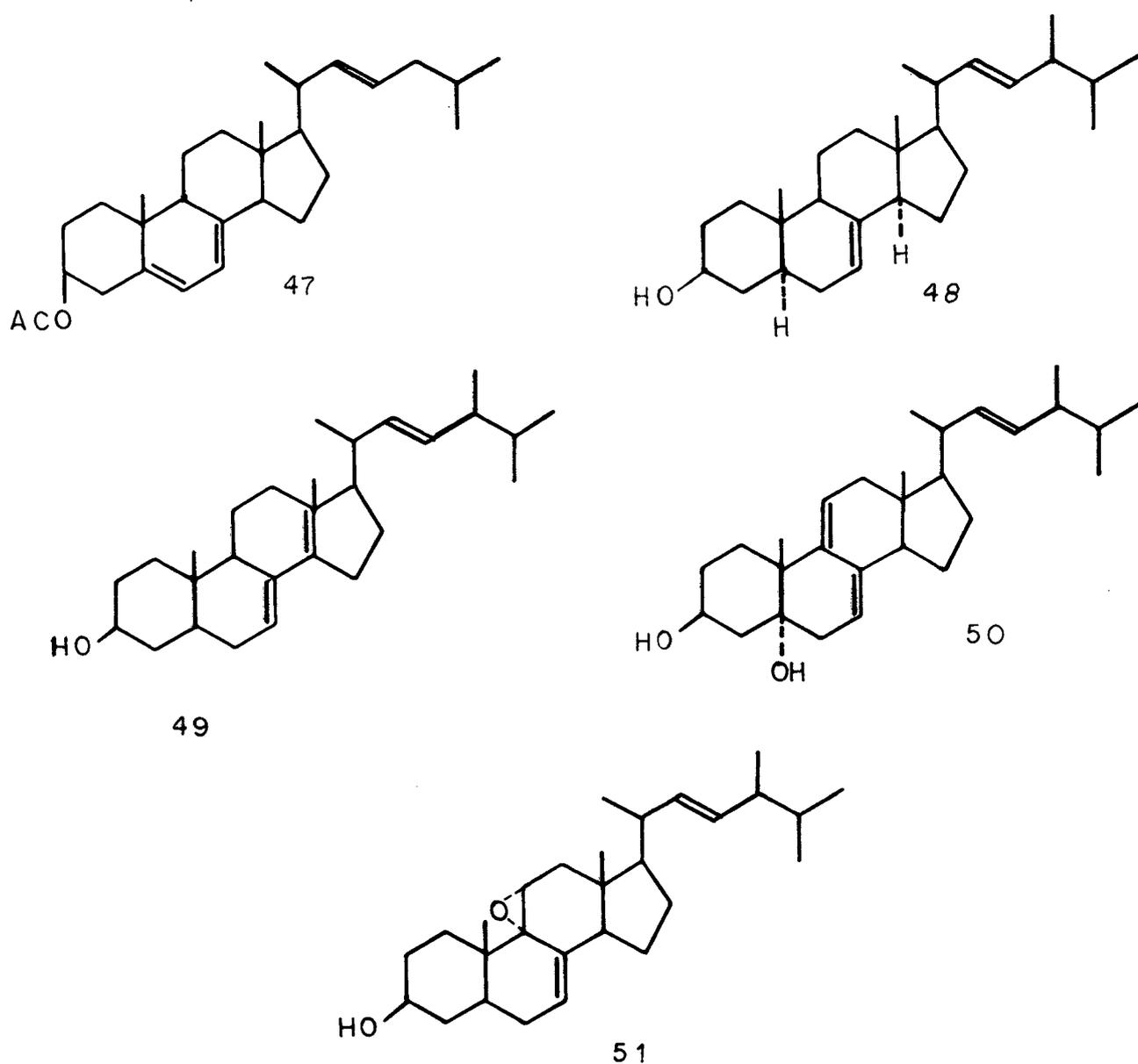


TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ERGOSTEROL E ALGUNS
ERGOSTADIENOS E TRIENOS ²¹

Carbonos	Ergoste rol (47)	48	49	50	51
1	37,88	37,10	34,60	29,70	28,80
2	28,10	31,40	31,60	30,80	30,90
3	72,66	70,80	70,30	67,00	70,00
4	36,62	37,90	37,70	41,80	37,50
5	138,25	40,20	39,10	73,60	36,70
6	120,66	29,60	29,80	37,60	29,70
7	116,16	117,10	118,00	115,80	125,30
8	141,15	139,00	135,70	136,30	134,50
9	46,02	49,60	143,60	140,10	64,50
10	37,06	36,10	35,60	41,10	34,60
11	21,07	21,50	118,80	122,80	55,20
12	39,00	39,40	42,10	42,30	40,50
13	42,78	43,10	42,70	42,30	42,90
14	56,45	55,00	51,50	51,20	46,80
15	23,01	22,90	23,10	23,10	22,40
16	28,10	28,10	28,80	28,70	28,30
17	55,66	55,80	56,00	55,90	56,10
18	12,06	12,10	11,60	11,60	13,70
19	16,03	13,00	19,30	25,00	15,60

 cont... Tabela 5

20	40,40	40,60	40,30	40,20	40,10
21	19,60	19,60	19,60	19,60	19,70
22	135,35	131,60	131,50	131,70	131,70
23	131,76	135,20	135,00	134,80	134,70
24	42,78	42,70	42,70	42,30	42,70
25	33,06	33,00	32,90	38,80	32,80
26	19,90	19,90	19,30	19,80	19,80
27	20,60	20,60	20,60	20,60	20,80
28	17,68	17,50	17,60	17,60	17,60

1.4 - Ação biológica da bradicinina (BK) e demais cininas

A bradicinina é um peptídeo endógeno, liberado da fração globulina pelo veneno da *Bothrops jararaca* ou pela tripsina²². Este peptídeo (composto de nove aminoácidos) e as demais cininas têm ação comprovada em diferentes processos físico-patológicos, tais como, produção de dor, aumento da permeabilidade vascular, contração ao relaxamento de músculos lisos, controle da pressão arterial, na inflamação, no controle da secreção de íons nas alças intestinais, em vários tipos de choques (endotérmico, hemorrágico, anafilático) e na pancreatite aguda²³⁻³¹.

O trabalho de Ferreira (1965)³² demonstrou pela primeira vez a existência de uma substância no veneno de cobra *B. jararaca*, capaz de potencializar as ações das cininas. Esta substância veio posteriormente caracterizar-se como sendo um peptídeo de cinco aminoácidos³³. Estes estudos vieram aumentar o interesse pelas cininas e permitiram o desenvolvimento de uma droga, o captropil, de grande eficiência no tratamento da hipertensão de origem renovascular.

O desenvolvimento no estudo da ação fisiopatológica das cininas, foi de certa forma lento por falta de antagonistas seletivos para estes peptídeos, se bem que vários análogos da bradicinina tenham sido sintetizados e farmacologicamente analisados nos últimos dez anos.^{28,34,35,36} Os estudos das cininas são ainda dificultados por outros pontos a considerar, tais como: a) as respostas para as cininas são indiretas em muitos tecidos e são em parte medidas pela liberação de substâncias endógenas, como as prostaglandinas e acetilcolina,³⁶⁻⁴² b) a existência de quantidades variáveis de enzimas (cininases) nos tecidos, provocam a degradação das cininas, c) há grande variação das respostas entre as espécies animais.

Estudos recentes indicaram que as ações da bradicinina e demais cininas em muitos sistemas biológicos podem envolver pelo menos dois tipos de receptores denominados B₁ e B₂.^{31,43,44} Estes estudos demonstraram que o peptídeo des-Arg⁹-BK, possui alta afinidade para o receptor do tipo B₁, presente na aorta de coelho, ação esta que pode ser inibida especificamente pelo antagonista desse receptor Leu⁸ (-des-Arg⁸)-BK. Enquanto que a bradicinina, apresenta alta afinidade pelo receptor do tipo B₂, uma

ação que não é afetada pelo antagonista de receptor B₁, Leu⁸ (des-Arg⁹)-BK. Portanto, a maioria dos efeitos fisiológicos importantes causados pelas cininas parece ser medida através da ativação do receptor do tipo B₂ e o tipo B₁ parece estar presente apenas em algumas situações em que ocorrem lesão tecidual.^{31,45}

Um grande número de peptídeos foi recentemente sintetizado, em função do interesse das cininas como mediadoras de vários processos físiopatológicos. Alguns destes peptídeos apresentaram-se capazes de bloquear de modo competitivo e seletivo alguns efeitos das cininas, mediadas pelo receptor do tipo B₂.⁴⁶⁻⁵⁴

1.5 - Estudo de antagonistas seletivos para BK na *Mandevilla velutina* (Apocinaceae)

Em 1982, um grupo de pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, começou a procurar um antagonista seletivo para BK, pesquisando uma espécie vegetal. A escolha da planta teve como base o indicativo do emprego popular em Minas Gerais, onde a infusão ou tintura obtida do rizoma da *Mandevilla velutina*, planta da família Apocinaceae é empregada pela população no tratamento do envenenamento por picada de cobra e como antiinflamatórios.

A primeira evidência da seletividade antagonista da *Mandevilla velutina* ficou demonstrada através de um trabalho realizado com o extrato hidroalcoólico (50% etanol-água). O extra

to inibiu seletiva e competitivamente as ações da bradicinina no útero isolado de rata⁵⁵. Os resultados demonstraram pela primeira vez a possibilidade de obtenção de inibidores para a bradicinina de origem vegetal e principalmente por serem princípios ativos não peptídeos poderiam significar um novo grupo de compostos com grande potencial farmacológico.

Em estudos posteriores, foi demonstrado que o extrato da *Mandevilla velutina* era também eficaz em antagonizar não só as ações da BK como das demais cininas,^{56,57} assim como era efetivo em antagonizar as ações das cininas medidas pela estimulação dos receptores B₁ e pelo subtipo B₂⁵⁸. Além das experiências em útero de rata, foram realizados experimentos em outros músculos lisos, como íleo de cobaia e de gato,⁵⁹ bexiga de cobaia,⁶⁰ canal deferente de rato,⁶¹ duodeno de rato,⁵⁹ vasos isolados de cão, ratos e coelhos,⁶² onde o extrato mostrou-se efetivo em antagonizar as respostas contráteis ou relaxantes das cininas.

Estes resultados indicavam que o isolamento dos princípios ativos poderiam dar importantes dados farmacológicos, que explicassem as funções fisiológicas e fisiopatológicas da BK endógena.⁵⁹ Assim o fracionamento químico do extrato mostrou a existência de um número considerável de compostos e algumas frações apresentavam uma mistura de compostos com propriedade de antagonizar de forma competitiva e reversivelmente as ações da bradicinina e da Lisil-bradicinina no útero isolado de rata.⁵⁶ Posteriormente cinco compostos de natureza não peptídica isolados da *Mandevilla velutina* tiveram seus efeitos examinados em íleo isolado de cobaia, onde constatou-se que a maioria destes inibiram seletivamente as ações das cininas,⁵⁷ além disso constatou-se tam

bem a resposta contrátil como o relaxamento causado pela bradicinina no duodeno isolado de rato.⁵⁹ Estes resultados mostraram ainda a ação seletiva destes compostos em inibir tanto o efeito contrátil como o efeito relaxante à bradicinina comparado ao potássio nesta preparação. Mostrou-se ainda, que o extrato e o composto MV 08 86, foram seletivos em inibir o relaxamento endotélio-dependente causado por diversas substâncias em vasos isolados de ratos, coelhos e cães.⁵⁹ Contudo nas mesmas condições, o extrato e o composto MV 08 86 não inibiram o relaxamento independente do endotélio causado pela papaverina e o nitroprussiato de sódio.⁶²

Outros resultados obtidos com o extrato da *Mandevilla velutina* como: a) atividade em inibir o edema de pata e a pleurisia em ratos e camundongos,⁶³ b) inibição do aumento da permeabilidade vascular em ratos causados pela bradicinina e o veneno da *B. jararaca*,⁵⁰ c) edema causado pela administração de ácido araquidônico na orelha de camundongos,⁶⁴ mostraram, que os princípios ativos presentes no extrato da *Mandevilla velutina*, além de antagonizar as ações das cininas, apresentaram forte atividade antiinflamatória por via oral em ratos. O extrato total da planta, no entanto, mostrou baixa atividade analgésica, contudo o composto MV 12 86, mostrou-se bastante efetivo em inibir as contrações abdominais causadas pelo ácido acético em camundongos.⁶⁵

Os compostos MV 08 86 e MV 12 86, ativos contra a BK, foram efetivos, quando administrados por via endovenosa em bloquear parcialmente as ações cardiovasculares induzidas pela administração i.v. da ovalbumina em cobaias ativamente sensibilizadas a este antígeno.⁶⁶ Porém, o extrato assim como os dois compostos protegeram a morte decorrente da anafilaxia ocasionada pela inje

ção do antígeno. O resultado destes estudos sugere uma ação destes compostos sobre a liberação de leucotrienos ou outras substâncias liberadas durante a anafilaxia. Contudo não houve modificação significativa na resposta broncoconstritora e nas variações de pressão arterial (causada pela histamina, acetilcolina e serotonina) induzida pelo extrato da planta ou pelos compostos isolados desta.⁶⁶

Os estudos químicos da *Mandevilla velutina* que vêm sendo desenvolvidos, mostram cerca de cinco compostos ativos, que na sua maioria tratam-se de substâncias de natureza pregnano-glicosídeo.⁶⁰⁻⁶⁷

Face ao grande interesse despertado nesses estudos, o grupo de pesquisadores de química e farmacologia da UFSC julgou de interesse estender estes estudos a outras espécies de *Mandevilla*. Assim foi inicialmente selecionada a *Mandevilla illustris*, planta cujos efeitos serão descritos neste trabalho.

1.6 - Considerações sobre a espécie em estudo e sua distribuição geográfica.

A *Mandevilla illustris*, ocorre no Brasil nos Estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e no Distrito Federal, onde encontra condições próprias ao seu habitat que é essencialmente ambientes de cerrados e campos. O período de floração de *Mandevilla illustris* estende-se de outubro a dezembro e ela pode ser reconhecida pelo hábito subarborescente até 80 cm de altura, pela raiz tuberosa, pelas folhas grandes e elípticas e obovadas, pelas flores grandes e vistosas, com mais de 5 cm de com

primento. É bastante variável quanto a forma e tamanho das folhas, tipo e intensidade do indumento.⁶⁸

1.7 - Posição sistemática de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, segundo Allorge² e Woodson.⁶⁸

Divisão	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Sub-classe	<i>Archychlamideae</i>
Ordem	<i>Gentianales</i>
Família	<i>Apocynaceae</i>
Sub-família	<i>Echitoideae</i>
Tribo	<i>Ichnocarpeae</i>
Sub-tribo	<i>Mandevillinae</i>
Gênero	<i>Mandevilla</i> Lindl
Sub-gênero	<i>Eumandevilla</i>
Seção	<i>Laxa</i>
Espécie	<i>Mandevilla illustris</i>
Sinonímia vulgar	Herva venenosa, Purga do campo, Quina de Camamú, Rosa infalível, Flor de Barbado, Rosa do Campo, (em Minas Gerais). ⁴

1.8 - Resumo preliminar da espécie segundo Woodson, R.E.⁶⁸

Esta planta apresenta-se como erva ou subarbusto ereto com até 80 cm de altura, raízes tuberosas. Suas folhas medindo 5,0-10,0 cm de comprimento e 4,0-8,0 cm de altura, são opostas ou raramente ternadas, oblongo-elípticas, ovadas ou largo-elípticas. Inflorescência em racemos terminais, ocasionalmente subterminal, com 2 a 9 flores vistosas ou róseo-avermelhadas. Os lobos do cálice medem 0,6-1,3 cm de comprimento e as glândulas são dúplices. A corola infundibuliforme, apresenta tubo de 2,6-3,5 cm de comprimento e lobos de 2,0-2,9 cm de comprimento e anteras auriculadas. Ovário ovóide, 2 nectários, da metade do comprimento do ovário; folículos longos e contínuos, com cerca de 20-30 cm de comprimento, (Figuras 1 e 2).



FIGURA 1 - FLORESCÊNCIA DA *Mandevilla illustris*

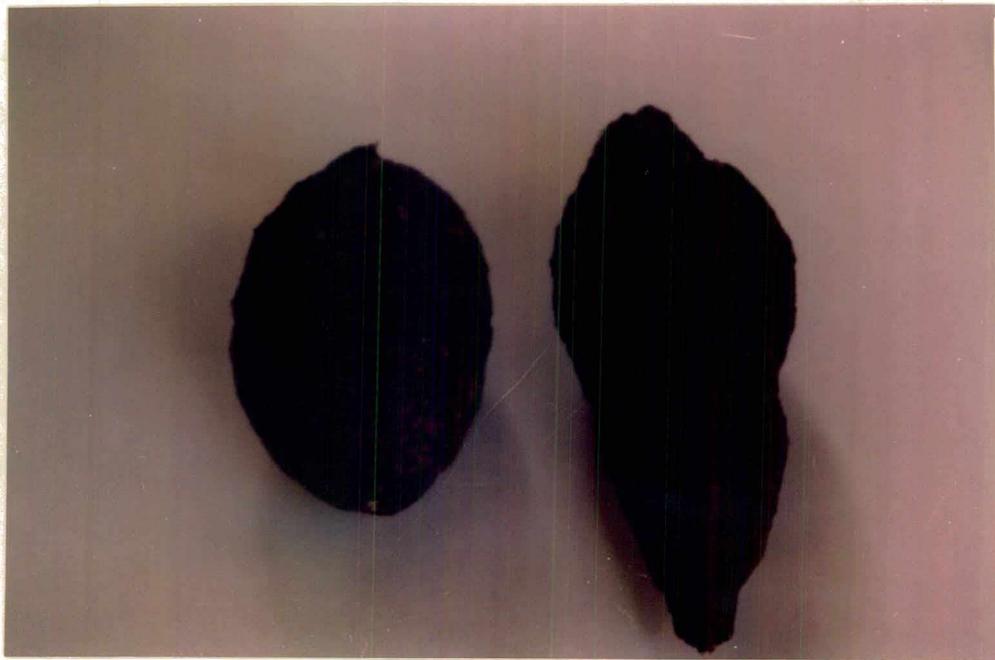


FIGURA 2 - RIZOMAS DA *Mandevilla illustris*

1.9 - Objetivos

Tendo em vista os estudos realizados com a *Mandevilla velutina*, e face ao interesse medicinal e de natureza química inediata de seus compostos, resolvemos estender esses estudos com uma espécie correlata, também portadora de atividade farmacológica semelhante a *Mandevilla velutina* com vistas a obter os seguintes objetivos:

1 - Isolar compostos presentes no extrato da *Mandevilla illustris*.

2 - Determinar a estrutura química de um ou mais compostos isolados.

3 - Realizar estudo químico-farmacológico com vistas a identificar na *Mandevilla illustris* pelo menos um dos compostos responsáveis pela atividade inibidora da bradicinina cujos efeitos foram identificados no seu extrato bruto.

CAPÍTULO II

II - Parte Experimental

2.1 - Material Botânico

A espécie em estudo foi coletada no Estado de Minas Gerais. A identificação foi realizada pelo botânico A.Reis do Herbário Flor do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina.

A medicina popular indica que a infusão ou tintura obtida do rizoma desta planta são empregadas como antiofídicas e para o tratamento de inflamações. Com base nestas informações estudou-se fundamentalmente os princípios ativos extraídos dos rizomas da planta, (Figura 2).

2.2 - Extração dos princípios ativos

2.2.1 - Obtenção do extrato acetato de etila bruto

Os rizomas congelados à -20°C de *Mandevila* illus*tris* (10 Kg) foram triturados e submetidos à extração exaustiva por maceração em acetato de etila a frio durante 15 dias, com repetidas reposições do solvente puro. O extrato total acetato de etila foi concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzi

da, fornecendo um resíduo oleoso de coloração marron que após ser submetido a secagem a vácuo rendeu 76,8g (0,768% do material vegetal).

2.2.2 - Fracionamento do extrato acetato de etila bruto.

O Extrato seco, mantido à temperatura ambiente, foi pulverizado e misturado com duas partes de sílica gel 60 (70-230 mesh). A mistura foi submetida a uma filtração preliminar (Figura 3) em gel de sílica (400 g) e a eluição realizada de forma exaustiva em éter de petróleo, diclorometano e acetato de etila. Após concentração dos extratos à pressão reduzida as frações renderam 2,8g, (0,028% do material vegetal), 13,6g (0,136% do material vegetal) e 23,3g (0,233% do material vegetal), respectivamente.

A fração diclorometano foi escolhida para efeito de estudos, pois, de acordo com os testes farmacológicos foi a que mostrou resultados semelhantes ao extrato total. Esta fração apresentou a formação de um precipitado branco, durante a evaporação do solvente (diclorometano) e o precipitado foi retirado do sistema por filtração em funil de vidro sintetizado. Após repetidas lavagens com éter dietílico, obteve-se 212 mg do composto (sublimável) que recebeu o código MI 12. Este composto é insolúvel em água, metanol, etanol e pouco solúvel em diclorometano. Experimentos realizados por emulsão com gotas de *Tween* não apresentaram atividade farmacológica.

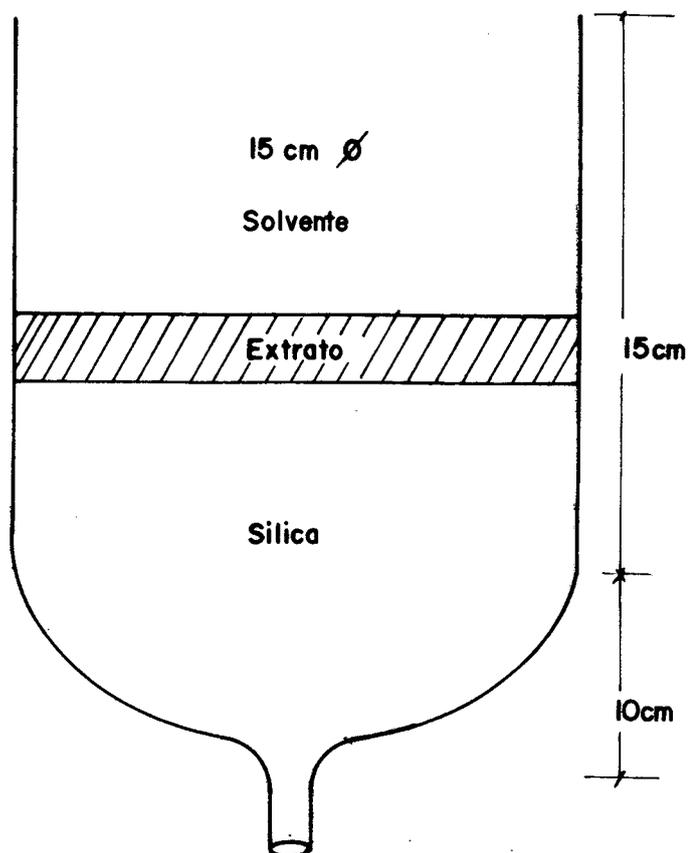


FIGURA 3. - ESQUEMA DE FILTRAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO.

2.2.3 - Separação dos constituintes ativos da fração diclorometano.

A fração diclorometano (13,6g) obtida na filtração preliminar, foi fracionada em uma coluna cromatográfica de 80 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro, contendo 400 g de sílica gel (70-200 mesh). A coluna foi eluída em uma mistura de hexano e acetona (Tabela 6) e as frações recolhidas em erlenmeyer de 200 ml, sendo que a partir da fração 133 aumentou-se o volume para 250 ml. Depois de concentradas à pressão reduzida, as frações foram comparadas em camada fina e as que se apresentaram cromatograficamente idênticas, foram reunidas.

TABELA 6 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO.

ELUENTE	%	FRAÇÕES RECOLHIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	CÓDIGO
Hexano-acetona	90 - 10	1 - 9	1 - 2	M - 1
			3 - 7	M - 2
Hexano-acetona	87 - 13	10 - 15	8 - 12	M - 3
			13 - 29	M - 4
Hexano-acetona	85 - 15	26 - 38	30 - 35	M - 5
			36 - 43	M - 6
	82 - 18	39 - 132	44 - 54	M - 7
			59 - 72	M - 8
	75 - 25	130 - 150	73 - 80	M - 9
			81 - 85	M - 10
	70 - 30	151 - 158	86 - 87	M - 11
			88 - 92	M - 12
			101 - 121	M - 13
			122 - 144	M - 14
145 - 149			M - 15	
150 - 155			M - 16	
		156 - 158	M - 17	
Acetona	100	159 - 161	159 - 161	M - 19
Metanol	100	162 - 165	162 - 165	M - 20

Considerando que as frações M-6, M-7, M-10, M-11, M-12 e M-14 apresentaram atividade farmacológica, estas foram recolhidas para efeito de estudos.

A fração M-6 foi solubilizada em acetona e após evaporação do solvente em evaporador de ar quente, apresentou-se em forma de um material cristalino misturado a um óleo amarelo. Repetidas lavagens com éter dietílico deixaram cristais incolores 125 mg (ponto de fusão 207°C) e recebeu o código MI 11.

A fração M-7, quando solubilizada em acetona mostrou a formação de um precipitado branco que foi separado do material graxo que o envolvia por filtração em papel filtro. Após repetidas lavagens com acetona, o precipitado foi solubilizado em etanol a quente e durante a evaporação do solvente, cristalizou em forma de finas agulhas incolores, 71,4 mg (sublimável). Um espectro infravermelho revelou tratar-se do composto MI-12, isolado anteriormente na filtração preliminar do extrato bruto acetato de etila (página 38). Obteve-se portanto um total de 284,2 mg deste composto, o que constitui 0,0028% do material vegetal.

As frações M-10, M-11 e M-12 mostraram em cada uma fina, um composto em considerável grau de pureza e foram reservadas para posterior purificação. Igualmente, a fração M-14 ao ser cromatografada revelou um outro composto em considerável grau de pureza e também foi reservada para purificação.

2.2.4 - Purificação do componente da fração M-10

A fração M-10 (220 mg) foi cromatografada através

de uma coluna de 55 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro, contendo 65 g de sílica gel 60 (0,040-0,060 mm) e a eluição realizada com uma mistura de hexano-acetona (Tabela 7). Desta coluna coletou-se 42 frações das quais as 9 primeiras foram de 125 ml, as 32 seguintes de 30 ml e a última de 250 ml. As frações de maior volume foram concentradas à pressão reduzida e as de menor volume em evaporador de ar quente. Após comparação em camada fina, as frações que se mostraram idênticas foram reunidas.

TABELA 7 - PURIFICAÇÃO DO COMPONENTE ATIVO DA FRAÇÃO M-10

ELUENTE	%	FRAÇÕES RECOLHIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	CÓDIGO
Hexano-acetona	90- 10	1	11 - 12	M - 10.1
		2	13 - 16	M - 10.2
	88- 12	3	17 - 20	M - 10.3
Hexano-acetona	86- 14	4	21 - 37	M - 10-4*
	84- 16	5	39 - 41	M - 10.5
	82- 18	10 - 41		
Acetona	100	42		M - 10.6

* Fração estudada.

A fração M-10.4, despertou maior interesse, pois ao ser cromatografada em camada fina, mostrou apenas um composto. Após a evaporação do solvente, apresentou um sólido branco (sublimável), constituindo 0,00105% do material vegetal, sendo que 6,0 mg deste, foram separados para o teste de atividade farmacológica, revelando ser o mesmo ativo em antagonizar a bradicinina. Este composto, mostrou-se solúvel em álcool etílico e acetona e foi codificado como MI 18.

2.2.5 - Purificação do componente da fração M-14.

A fração M-14 (379 mg), foi purificada em uma coluna cromatográfica de 55 cm de largura e 2,5 cm de diâmetro contendo 75 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e a eluição realizada com uma mistura de tolueno e acetona (Tabela 8). As frações foram recolhidas em frascos de 30 ml e depois de concentradas em evaporador de ar quente, foram comparadas em camada fina e as que se apresentaram idênticas, foram reunidas.

TABELA 8 - PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO DA FRAÇÃO M-14.

ELUENTES	%	FRAÇÕES RECOLHIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	CÓDIGO
Tolueno-acetona	90-10	1 - 48	1 - 44	M-14.1
			45 - 54	M-14.2
			60 - 76	M-14.3*
	88-12	49 - 150	77 - 85	M-14.4
			86 - 88	M-14.5
			89 - 95	M-14.6
			96 - 111	M-14.7
			112 - 141	M-14.8
Acetona	100	151 - 152	151 - 152	M-14.9
Metanol	100	153 - 154	153 - 154	M-14.10

* Fração estudada.

A fração M-14.3 foi solubilizada em éter diiso propílico e esta, apresentou-se em forma de cristais incolores. 66,5 mg (ponto de fusão 206^o C). O composto recebeu o código MI - 21. Este composto, não é solúvel em água porém é solúvel em álcool etílico, acetona e outros solventes orgânicos e mostrou atividade nos testes farmacológicos "in vitro".

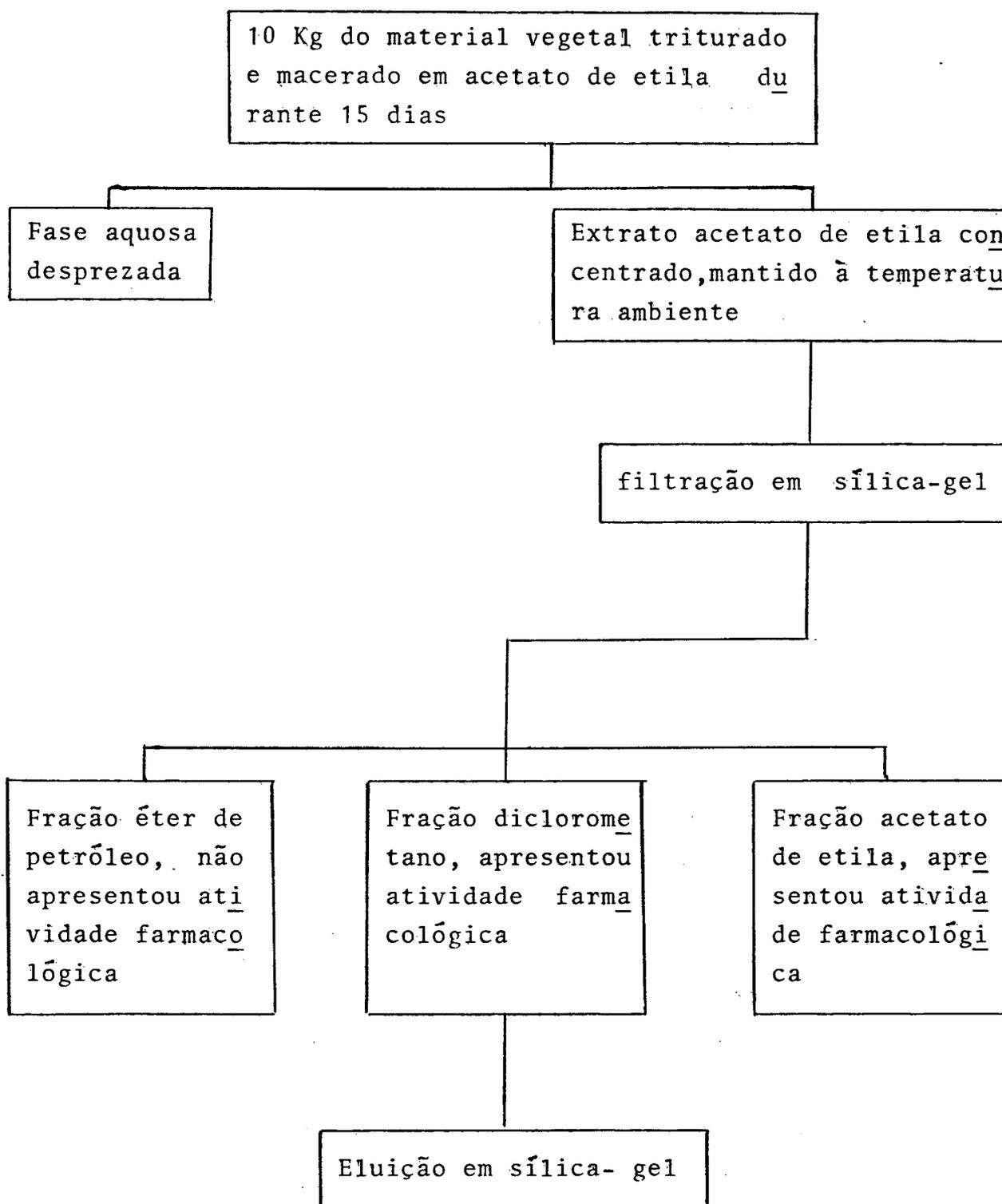


FIGURA 4 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DA *Mandevilla illustris*.

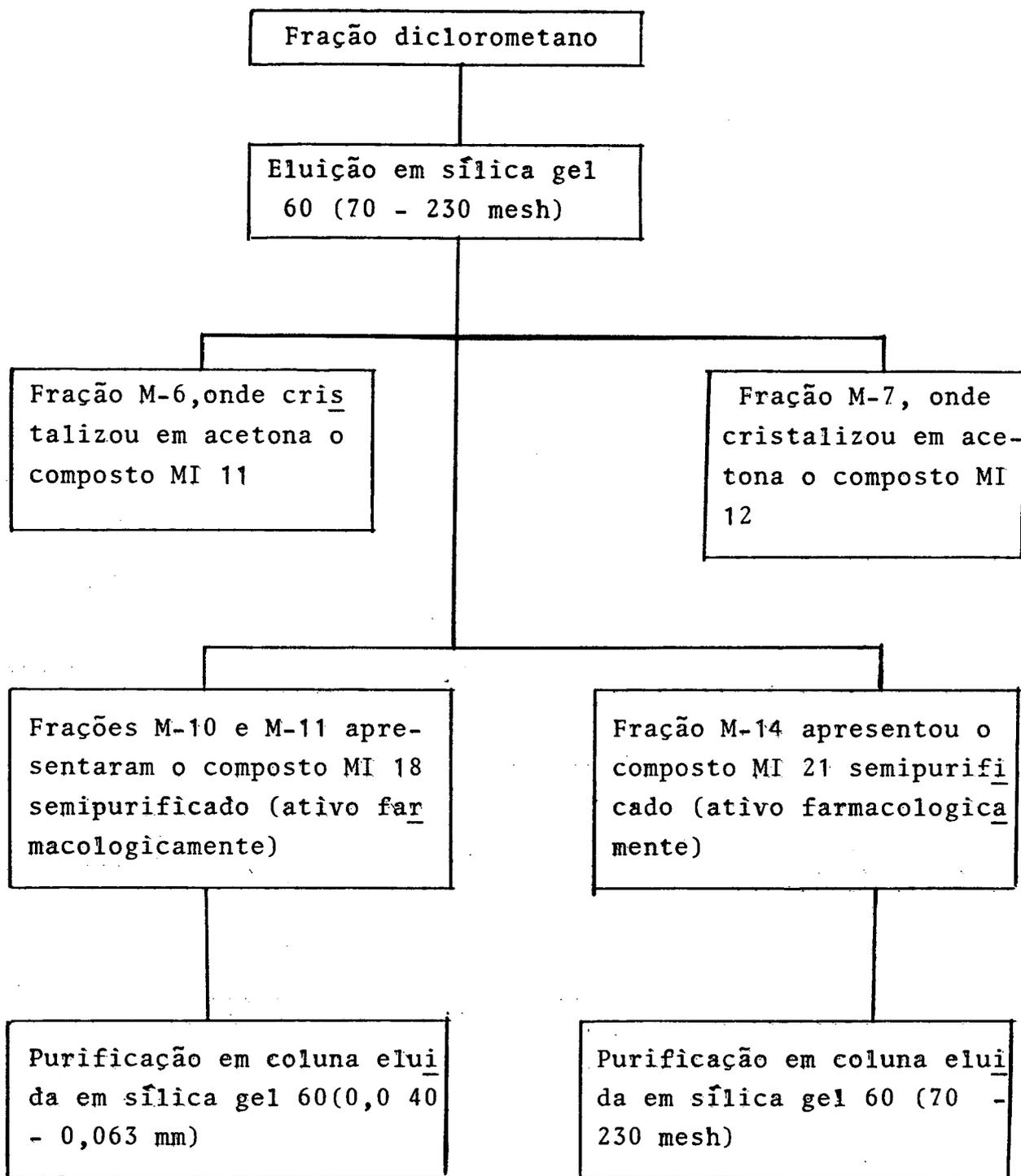


FIGURA 5 - ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO FRACTIONAMENTO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO.

2.3 - Separação de compostos não ativos

2.3.1 - Fracionamento da fração clorofórmio

A fração clorofórmio (60 g), obtida de uma filtração preliminar de um extrato bruto acetato de etila (do processamento de 30 Kg de planta), foi cromatografada através de uma coluna de 145 cm de altura por 8 cm de diâmetro, contendo 600g de sílica-gel 60(70 - 230 mesh). A coluna foi empacotada com diclorometano e a eluição realizou-se aumentando-se a polaridade do solvente, pela adição de acetona (Tabela 4). As frações foram recolhidas em erlenmeyer de 500 ml e depois concentradas à pressão reduzida, a seguir foram comparadas em camada fina e as que se apresentaram cromatograficamente idênticas, foram reunidas.

TABELA 9- FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO

ELUENTE	%	FRAÇÕES RECOLHIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	CÓDIGO
Diclorometano	100	1 - 24	2 - 3	DC 1
			5 - 6	DC 2
Diclorometano- acetona	95-5	25 - 27	8 - 11	DCA 3
			12 - 21	DCA 4*
			22 - 24	DCA 5*
Diclorometano- acetona	90-10	28 - 55	26 - 29	DCA 6*
			30 - 31	DCA 7*
			32 - 34	DCA 8

 cont... Tabela - 9

Diclorometano-	80-20	56 - 285	36 - 38	DCA 9
acetona			39 - 42	DCA 10
			43 - 45	DCA 11
			46 - 47	DCA 12
			48 - 50	DCA 13*
			53 - 54	DCA 14*
			56 - 57	DCA 15
			58 - 59	DCA 16
			60 - 63	DCA 17
			64 - 65	DCA 18
			67 - 74	DCA 19
			81 - 101	DCA 20
			141 - 159	DCA 21
			160 - 285	DCA 22

* Frações estudadas

Foram separadas 0,050 g das frações DCA 4, DCA7, DCA 13 e DAC 14 para os testes de atividade farmacológica. As frações DCA 4, DCA 7 e DCA 13 mostraram-se ativas, enquanto a fração MDC 14 não apresentou atividade.

A fração DCA 4 (740,5 mg), foi solubilizada em éter etílico e precipitada a frio. O precipitado, após lavagem com hexano, rendeu 60 mg (ponto de fusão 211 °C) e recebeu o código MI 15. Este composto constitui 0,0002% do material vegetal,

não é solúvel em água, sendo solúvel em álcool etílico e outros solventes orgânicos. Os testes farmacológicos realizados, revelaram ser o mesmo ativo em antagonizar a bradicinina.

As frações DCA 4, DCA 5, DCA 6 e DCA 7, mostraram em camada fina os compostos MI 18 e MI 21 isolados em procedimentos anteriores.

2.3.2 - Separação do componente não ativo da fração DCA 14

A fração DCA 14 (2,712 g), foi cromatografada a través de uma coluna de 85 cm de altura por 4 cm de diâmetro contendo 300 g de sílica gel 60 (70 - 230 mesh). A coluna foi empacotada no sistema hexano - acetona (80 - 20) e a eluição realizada aumentando-se a polaridade do solvente adicionando-se quantidades crescentes de acetona, até a coleta da fração 9, a partir da qual foram coletadas 199 frações de 10 ml (Tabela 10). As frações de maior volume foram concentradas à pressão reduzida e as de menor volume em evaporador de ar quente. Depois de concentradas as frações foram comparadas em camada fina e as que se apresentaram idênticas foram reunidas.

TABELA 10 - SEPARAÇÃO DO COMPONENTE NÃO ATIVO DA FRAÇÃO DCA 14.

ELUENTE	%	VOLUME ML	FRAÇÕES RECOLHIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	CÓDIGO
Hexano - acetona	80 - 20	600	1	2 - 3	HA1
				10 - 80	HA2
	78 - 22	500	2 - 3	81 - 84	HA3
				85 - 91	HA4
	76 - 24	500	4	92 - 97	HA5
				98 - 109	HA6
	74 - 26	500	5	110 - 145	HA7
				146 - 149	HA8
	72 - 28	600	6	150 - 209	HA9
	70 - 30	800	7		
66 - 34	850	8			
50 - 50	2500	9			
		10	10 - 209		
Acetona	100	350	210		
Metanol	100	350	211		
Metanol - ac. acético	99 - 1	500	212 - 213		HA10

A fração HA6 (362,9 mg) apresentou de acordo com camada fina, basicamente dois compostos e foi reservada para posterior purificação.

A fração HA10 formou uma abundante massa gelatinosa pela adição de acetona. Após repetidas lavagens com acetona e metanol, rendeu 762,8 mg (ponto de fusão superior a 300°C) e recebeu o código MI 27. Este composto é solúvel em água, porém não é solúvel em solventes orgânicos e constitui 0,0025% do material vegetal e não apresenta atividade farmacológica.

2.3.3 - Separação do componente não ativo da fração HA6

A fração HA6 (362,9 mg), foi cromatografada em uma coluna de 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro contendo 74 g de sílica-gel 60 (70 - 233 mesh).

A coluna foi empacotada no sistema hexano-acetona (87 - 13), sendo a eluição realizada por adição de quantidades crescentes de acetona. Foram obtidas nove frações de 250 ml nas polaridades indicadas na Tabela 11, mas, estas primeiras frações não foram consideradas para efeito de coleta, pois o material graxo, eluído até o sistema atingir 29% em acetona não era de interesse. A eluição do material graxo foi acompanhada com luz ultravioleta e a seguir foi coletada uma fração de 250 ml e cento e cinquenta e cinco frações de 10 ml e finalmente uma fração de 500 ml (fração acetona). As frações de maior volume foram concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida e as de menor volume em evaporador de ar quente. Depois de comparadas em camada

fina, as frações que se mostraram idênticas foram reunidas.

TABELA 11 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HA 6

ELUENTES	%	FRAÇÕES RECOLHIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	CÓDIGOS	
Hexano-Acetona	87 - 13		2 - 21	HA 1.1	
	85 - 15		22 - 27	HA 1.2	
	83 - 17		78 - 79	HA 1.3	
	81 - 19		80 - 87	HA 1.4	
	79 - 21		88 - 97	HA 1.5	
	77 - 23		98 - 114	HA 1.6	
	75 - 25		195 - 116	HA 1.7	
	73 - 27		117 - 125	HA 1.8	
	71 - 29		1	126 - 130	HA 1.9
	71 - 29		2 - 156	131 - 141	HA 1.10
				146 - 155	HA 1.11
Acetona	100	157		HA 1.12	

A fração HA 1.3 de acordo com a camada fina, apresentou apenas um composto, 200,9 mg (sublimável) e recebeu o código MI 25. Este composto não é solúvel em água porém, solúvel em solventes orgânicos como álcool e acetona. Constitui 0,0067% do material vegetal e não apresenta atividade farmacológica.

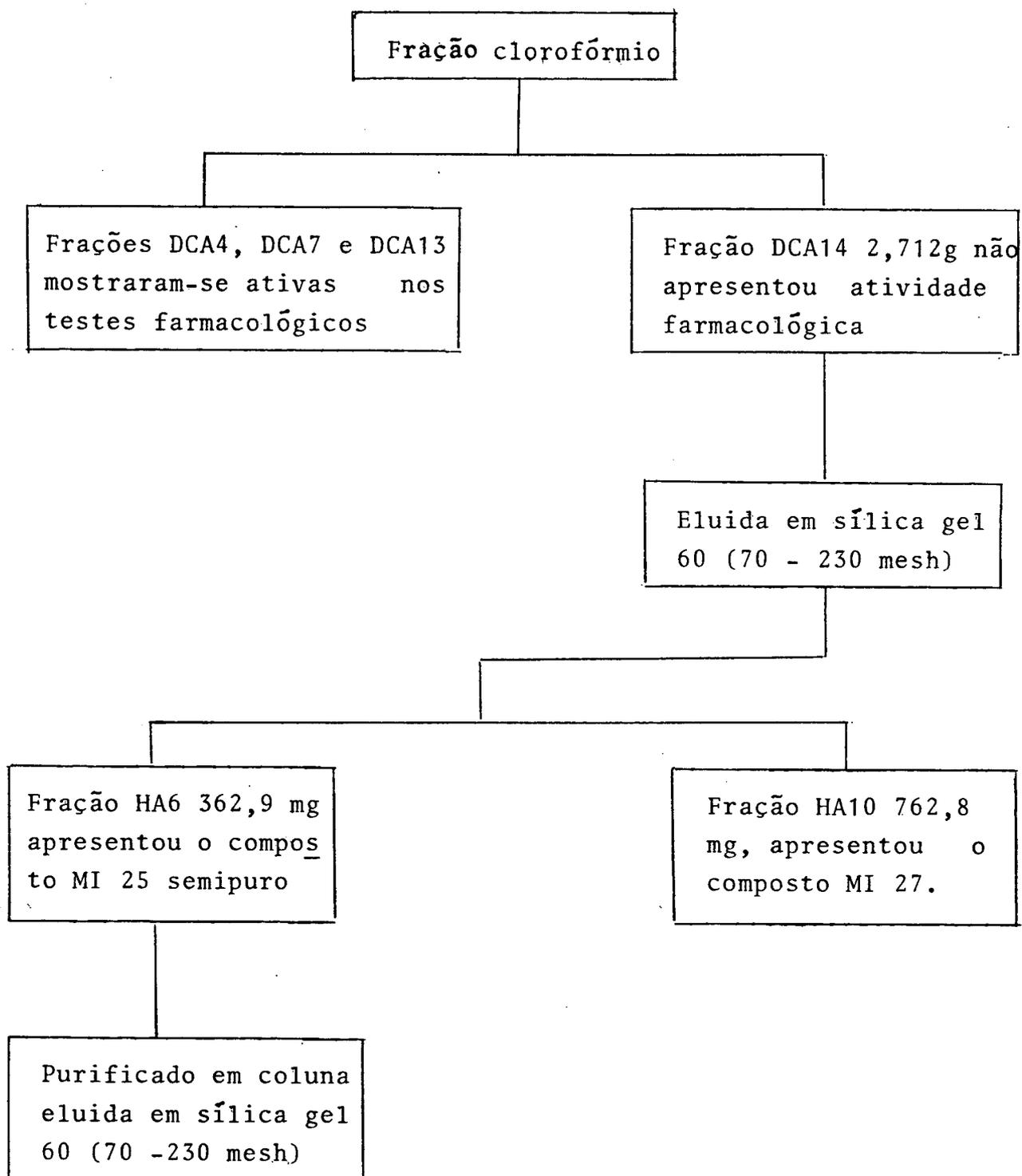


FIGURA 6 - ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO NÃO ATIVO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO.

2.4 - Ensaio Cromatográficos

2.4.1 - Cromatografia em coluna

A eluição de cada coluna precedeu-se de uma pesquisa realizada em fases móveis para a definição do melhor sistema de solvente para o desenvolvimento das mesmas. O empacotamento das colunas foi efetuado em sistemas de polaridades inferiores às dos sistemas em que foram desenvolvidas as camadas delgadas e a partir daí, as eluições foram realizadas seguindo um gradiente de polaridade⁶⁹.

2.4.2 - Cromatografia em camada delgada (CCD)

Empregou-se placas de vidro de 5 x 20 e 20 x 20 cm revestidas com sílica-gel 60 H Merck com 0,5mm de espessura. A aplicação das amostras foi realizada em pontos equidistantes de 1,5 cm e a 0,5 cm da extremidade inferior e lateral da placa cromatográfica. Cada ponto de aplicação recebeu 5 μ l de amostra e o desenvolvimento dos cromatogramas deu-se de forma ascendente no sistema de solvente adequado. Após o solvente percorrer 18,5 cm além do ponto de aplicação das amostras, as placas após secagem eram examinadas em luz ultra-violeta.

Depois de repetir o procedimento acima descrito , por mais três vezes, os cromatogramas eram revelados com o reagente anizaldeido sulfúrico.⁷⁰ Na Tabela 12 estão os sistemas onde desenvolveram-se os cromatogramas realizados com as frações obtidas das colunas.

2.5 - Visualização dos cromatogramas

A localização das substâncias separadas nos cromatogramas, foi realizada pelo uso de métodos físico e químico.

2.5.1 - Método físico

O método usado para a visualização das substâncias separadas por cromatografia em camada delgada foi a luz ultravioleta, mas por este método apenas eram visualizadas as substâncias graxas existentes nos extratos, uma vez que substâncias não graxas não apresentaram absorção no ultra-violeta.

2.5.2 - Método químico

Neste método, foi usado um pulverizador manual ou spray com ar comprimido para pulverizar o reagente anizaldeido sulfúrico⁷⁰ nas placas cromatográficas a uma distância de 15 à 20 cm. Em seguida, as placas eram aquecidas a 110°C para que a reação ocorresse.

2.6 - Pontos de fusão

As determinações dos pontos de fusão das substâncias isoladas foram realizadas com equipamentos da marca Micro Química APF-301.

TABELA 12 - SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS PARA CROMATOGRAFAR EM CAMADA FINA AS FRAÇÕES RECOLHIDAS NO PROCESSAMENTO DAS COLUNAS.

Nº	FRAÇÃO PROCESSADA	ADSORVENTE	ELUENTE	PERCURSO
01	F.diclorometano	Sílica gel 60 H Merck	Hexano-acetona (75 - 25)	18,5 cm
02	M - 14	"	Tolueno-acetona	"
03	M - 10	"	Hexano-Acetona (75 - 25)	"
04	F.clorofórmio	"	Hexano-éter diisopropílico - acetona (40 - 40 - 30)	"
05	DCA14	"	Hexano-acetona (70 - 30)	"
06	HA6	"	Hexano-acetona (70 - 30)	"

2.7 - Determinações espectrométricas

Um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 787 foi utilizado para registrar em escala de centímetro (cm^{-1}), as absorções na região do infravermelho. Para tanto, as substâncias em análise foram misturadas a brometo de potássio anidro e transformadas sob pressão em pastilhas.

Um aparelho BRUKER forneceu os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio em uma frequência de 400 MHz em clorofórmio deuterado, usando tetrametilsilano (TMS=0) como referencial interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (HZ).

As áreas correspondentes aos sinais foram determinadas por integração eletrônica e as respectivas multiplicidades representadas como: s (singlete), d (dublete), t (triplete), q (quadruplete), m (multiplete), dd (duplo dublete) e dt (duplo triplete).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram registrados em aparelho BRUKER de 100 MHz em clorofórmio deuterado, usando tetrametilsilano como referencial interno.

Os espectros de massa foram registrados usando um espectrometro de massa FINNINGAN Mod. 400, de alta resolução.

CAPÍTULO III

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Identificação do composto MI 12 através dos métodos: Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Protons, Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Massa.

Dos sete compostos isolados, o composto codificado como MI 12, teve sua estrutura determinada através do emprego intensivo das técnicas de COSY e APT, além dos dados espectrométricos que são:

IV ν KBr cm^{-1} (Fig. 8 pág.73) 3480,2920
MAX

RMN¹H (400 MHz, CDCL₃) (Fig. 10a pág.75)

3,50 (1H, m, J=Ind.), 5,38 (1H,dt, J=4,0 e 2,0), 4,58 (1H, dt, J= 3,0, 3,0 e 1,0), 3,94 (1H, dd, J=10 e 2,25), 2,56 (1H, t, J=3,0 e 3,0), 5,55 (1H, d, J=3,0 e 1,0), 4,10 (1H, d, J=2,5), 2,3 (3H, s), 2,0 (2H, s), 1,10 (3H, s), 1,24 (1H, s), 1,0 (3H, s).

RMN¹³C (100 MHz, CDCL₃) (Fig. 11 pág.76)

139,56 (s), 121,54 (d), 108,67 (d), 103,29 (s), 78,19 (d), 73,31 (t), 71,66 (d), 55,85 (d), 48,74 (s), 45,69 (d), 42,31 (t), 37,33 (t), 36,50 (s), 31,67 (t), 31,25 (d), 30,50 (t), 24,89 (t), 20,38 (t), 19,27 (q), 16,08 (q).

MS (alta resolução) m/z (Fig. 7 pág.72)

332 M⁺(42), 315 (14,5), 314 (68), 299 (12,5), 281 (28), 263 (20),
247 (10), 246 (42,5), 228 (46,8), 227 (48,2), 210 (26,2), 170 (24)
145 (24,5), 131 (12,5), 119 (18), 105 (32), 95 (28), 91 (32), 81
(28), 69 (38), 67 (18), 55 (14), 43 (14), 41 (20,5).

IV $\begin{matrix} \text{KBr} \\ \text{Y} \\ \text{MAX.} \end{matrix}$ cm⁻¹ (Fig. 9 pág 74 , do MI 12 acetilado) 2940, 1730

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃ / CHCl₃) (Fig. 15 pág. 80, do MI 12 acetilado)
5,40 (1H, m, J=Ind.), 5,55 (1H, d, J=3,0), 4,6 (1H, t, J= 3,0) ,
4,6 (1H, m, J=Ind.), 2,58 (1H, t, J=3,0 e 3,0), 3,95 (1H, dd, J=
10,0 ou 3,0), 4,1 (1H, d, J= 10,0), 2,02 (2,02 (2H, s), 1,12(3H,
s), 1,02 (3H, s).

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) (Fig. 12 pág.77, do MI 12 acetilado)
170 (s), 138,55 (s), 122,49(d), 108,58 (d), 103,29 (s), 78,20(d),
73,83 (t), 73,32 (d), 55,89 (d), 48,75 (s), 45,62 (d), 38,12 (t),
37,07 (t), 36,64 (s), 31,25 (d), 30,49 (t), 27,85 (t), 24,94 (t),
21,49 (q), 20,34 (d), 19,18 (q), 16,67 (q).

3.1.1 - Determinação da estrutura do composto MI 12

A fórmula molecular do composto MI 12 C₂₀H₂₈O₄ ,
foi obtida através da medida exata do íon molecular observado no
espectro de massa de alta resolução, (Figura 7 pág.).

Como a fórmula de um hidrocarboneto saturado é C_nH_{2n+2} , o número de hidrogênio deste composto deveria ser 42, contudo a diferença de 14 hidrogênio indicou 7 deficiências de hidrogênios na molécula.

O espectro no infravermelho (Figura 8), mostrou um pico em 3480 cm^{-1} que indicou a presença de um grupo hidroxila e não registrou bandas de aromático. A acetilação do composto MI 12 com anidrido acético em piridina à temperatura ambiente, forneceu o correspondente acetato (ponto de fusão $\sim 210^\circ$). O espectro no infravermelho (Figura 9) mostrou ausência de bandas de hidroxilas, porém a presença de uma banda intensa de 1742 cm^{-1} indicou o grupo carbonil do grupo acetila.

Os valores de RMN¹H (Figura 10) e RMN¹³C (Figura 11) indicaram a presença de dois grupos metílicos, pelo menos uma dupla ligação e a presença de uma hidroxila, o que confirma os dados do espectro no infravermelho. Assim, foi sugerido um composto com seis ciclos o qual poderia ser do tipo pregnânico altamente modificado ou diterpênico.

3.1.2 - Estudos dos espectros de RMN¹³C.

Os valores atribuídos aos picos dos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C (Figura 11 e 12) e do espectro obtido através da técnica APT⁷¹ (Figura 13), juntamente com os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN¹H (Figura 10) permitiram definir a multiplicidade de cada átomo de carbono como indica a Tabela 13.

TABELA 13 - MULTIPLICIDADE DOS ÁTOMOS DE CARBONO DO COMPOSTO MI
12

CARBONO	CH	CH ₂	CH ₃
36,50	31,25	20,38	16,68
48,74	45,69	24,89	19,27
108,67	55,85	30,50	
139,56	71,66	31,67	
	78,19	36,50	
	103,29	37,33	
	121,54	42,31	
		48,74	
		73,31	

Os valores tabelados levaram a sugerir primeiramente que o composto estudado poderia ser um pregnânico altamente modificado.

Para comparar estes valores foram tomados como referência alguns compostos cujas estruturas foram determinadas por diferentes métodos espectrométricos. Assim como ponto de partida considerou-se os deslocamentos químicos (tomados na Tabela 4) atribuídos para o androstano (40)¹⁹ e o 3-hidroxiandrostano (46)²⁰ (página 23) evidenciados na Tabela 14.

TABELA 14 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN¹³C DO ANDROSTANO (40)
E DO 3-HIDROXIANDROSTANO (46)^{19,20}

CARBONOS	40	46
1	38,8	37,1
2	22,3	31,6
3	26,9	71,2
4	29,2	38,3
5	47,1	44,9
6	29,2	28,8
7	32,6	32,5
8	36,0	35,9
9	55,1	54,5
10	36,4	35,6
11	20,9	21,3
12	39,0	38,9
13	40,8	40,8
14	54,7	54,5
15	25,5	25,5
16	20,5	20,5
17	40,5	40,6
18	17,6	17,6
19	12,3	12,6

Uma segunda aproximação foi considerar as atribuições que apresentam alguns esteróides não saturados⁷² que são indicados na Tabela 15.

TABELA 15 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN¹³C PARA ALGUNS ESTERÓIDES NÃO SATURADOS⁷².

C	A	B	C	D	E	F
1	135,5	39,8	34,2	37,9	40,0	36,4
2	124,5	125,7	23,5	19,5	22,7	22,0
3	25,4	125,6	125,1	25,8	28,1	27,0
4	26,0	30,4	131,2	118,8	33,0	27,2
5	44,5	41,5	45,9	144,7	143,4	47,7
6	28,5	28,9	27,5	32,7	118,9	131,7
7	32,0	32,3	32,1	33,7	32,2	128,6
8	35,7	36,0	35,7	36,4	32,2	38,2
9	51,5	54,4	53,5	54,3	51,0	53,3
10	37,3	34,8	34,9	37,1	37,7	35,0
11	21,1	21,0	21,1	21,5	20,9	20,9
12	40,1	39,0	40,1	38,9	38,9	40,4

A = Δ^1 colesteno, B = Δ^2 androsteno, C = Δ^3 colesteno,
 D = Δ^4 androsteno, E = Δ^5 androsteno, F = Δ^6 colesteno.

Na terceira aproximação foi considerada a mudança de picos dos esteróides não saturados com a introdução do grupo hidroxila em posição três como substituinte. Para isso foram analisados os deslocamentos químicos do RMN¹³C de Δ^6 colesteno (Tabela 15) em comparação com os deslocamentos químicos do Δ^6 -3-beta-colestenol que são os seguintes: C-1 (δ 34,7), C-2(δ 31,5), C-3 (δ 71,5), C-4(δ 36,3), C-5(δ 45,1), C-6(δ 129,3), C-7 (δ 130,6) , C-8(δ 38,2), C-9 (δ 52,7), C-10 (δ 34,2), C-11(δ 21,2), C-12 (δ 40,2).⁷²

Portanto, foi observado que os deslocamentos dos carbonos 1, 5 e 6 mudam para campos mais altos enquanto os deslocamentos de 2, 3, 4 e 7 mudam para campos mais baixos.

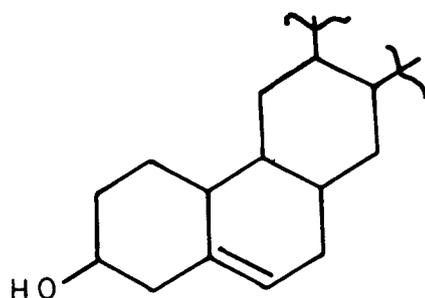
Finalmente, considerando que a posição mais comum da hidroxila é a posição três e que os deslocamentos ¹³C da dupla ligação apresentam valores que não correspondem aos carbonos 6 e 7 como indicam dados referentes ao Δ^6 -3-beta-colestenol (parágrafo anterior), e dados atribuídos ao glicosídeo pregnânico (34), (tomados da Tabela 2) e considerando que os valores atribuídos aos carbonos 4 e 5 seriam mais elevados que os correspondentes valores no composto MI 12, concluiu-se que a dupla ligação deveria ocupar as posições 5 e 6 após comparação (Tabela 16) com os valores atribuídos ao colesterol (35)⁷³, e seu derivado (37)^{16,17} (tomados da Tabela 3) e com os valores atribuídos ao ergosterol (47)²¹, (tomados da Tabela 5). Estes valores estão evidenciados na Tabela 16.

TABELA 16 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C DO COMPOSTO MI 12 E
COMPOSTOS ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS.

Carbono	MI 12	35 ⁷³	37 ^{16,17}	47 ^{21,74}
1	37,33	37,40	37,40	37,88
2	30,50	31,50	32,50	28,10
3	71,66	71,20	71,80	72,66
4	42,31	42,30	42,40	36,62
5	139,56	141,10	141,00	138,25
6	121,54	121,20	121,60	120,66
7	31,67	31,90	31,90	116,16
8	31,25	31,90	31,90	141,16
9	45,09	50,40	50,40	46,02
10	36,50	36,40	36,60	37,06
11	20,38	21,10	21,00	21,07
12	24,89	28,20	39,60	39,00

A correspondência entre os valores atribuídos ao composto MI 12 com os valores do colesterol (35) e seu derivado (37), bem como aproximação com alguns valores do ergosterol (47), levou até então, a definir três ciclos, uma dupla ligação (C-5) e uma hidroxila (C-3) para o composto MI 12 como está indicado na

estrutura (52)

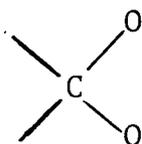


52

Os deslocamentos em 19,27 e 16,68 ppm foram considerados como correspondentes a grupos metilas ligados a C-13 e C-10 respectivamente. Assim, restava identificar a posição de seis carbonos e três oxigênios que deveriam estar formando três ciclos, o que explica as sete deficiências de hidrogênio já mencionadas.

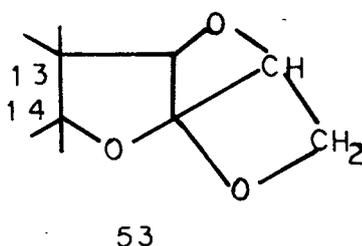
Os carbonos que faltavam definir, eram os que apresentam as multiplicidades que se seguem: C (108,67 ppm e 48,74 ppm), CH (103,29 ppm, 78,69 ppm e 55,85 ppm) e CH₂ (73,31 ppm).

O carbono quartenário (48,74 ppm) foi considerado como sendo o C-13 e o carbono quartenário (108,67 ppm) somente pôde ser explicado como um carbono cetálico do tipo,¹⁸



Desta forma faltava atribuir as posições de cinco carbonos e três oxigênios os quais formariam três ciclos.

Considerando a existência de um carbono terciário em 103,29 ppm e que este também seria do tipo cetálico, algumas possibilidades como a estrutura (53) não seriam viáveis.



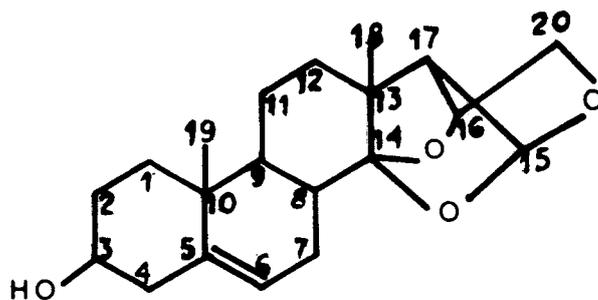
Em razão do exposto sugeriu-se existir pelo menos, três possibilidades de posicionar cinco carbonos e três oxigênios em três ciclos, sendo que um dos carbonos foi considerado como sendo o C-14 o qual fecharia o terceiro anel pregnânico, como propõem as estruturas (54), (55) e (56) cujas atribuições de RMN¹³C estão delineadas nas mesmas.

bém não é coerente para a estrutura (54) a qual deveria apresentar dois singletes, sendo um do próton ligado ao carbono em 103,29 ppm e outro do próton ligado ao carbono em 78,69 ppm.

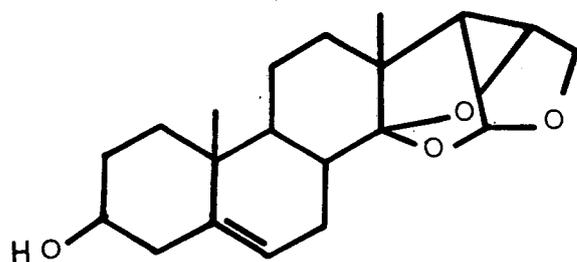
Para estabelecer as conectividades entre os prótons acoplados foi realizado um espectro de COSY,^{77,78} o qual esclarece algumas atribuições. Conforme era esperado, os picos 3,94 e 4,10 ppm mostram-se relacionados entre si e com o pico de 4,58 ppm. O pico em 4,58 ppm que corresponde ao próton de C-16, está relacionado com os prótons em 2,56, 3,94 e 5,55 ppm, o que parece coerente. O próton que aparece em 5,55 ppm que é ligado ao carbono em 103,29 ppm, está relacionado a um próton em 2,56 ppm o qual encontra-se ligado ao carbono terciário, que absorve em 55,85 ppm no espectro de RMN¹³C (Figura 11) e a 4,58 ppm do H do carbono que absorve em 78,69 ppm.

O pico em 5,38 ppm que foi atribuído ao próton ligado ao C-6 está relacionado com os picos em 2,30 e 2,00 ppm, o que pareceu bastante coerente.

Desta forma foi sugerido que as conformações (57) e (58) podem ser as que melhor representam os dados experimentais e portanto, são consideradas as conformações possíveis de um novo álcool nor-pregnânico denominado illustrol.



57



58

Algumas outras experiências com Raio-X, oxidação etc. devem ser realizadas para caracterizar definitivamente a molécula.

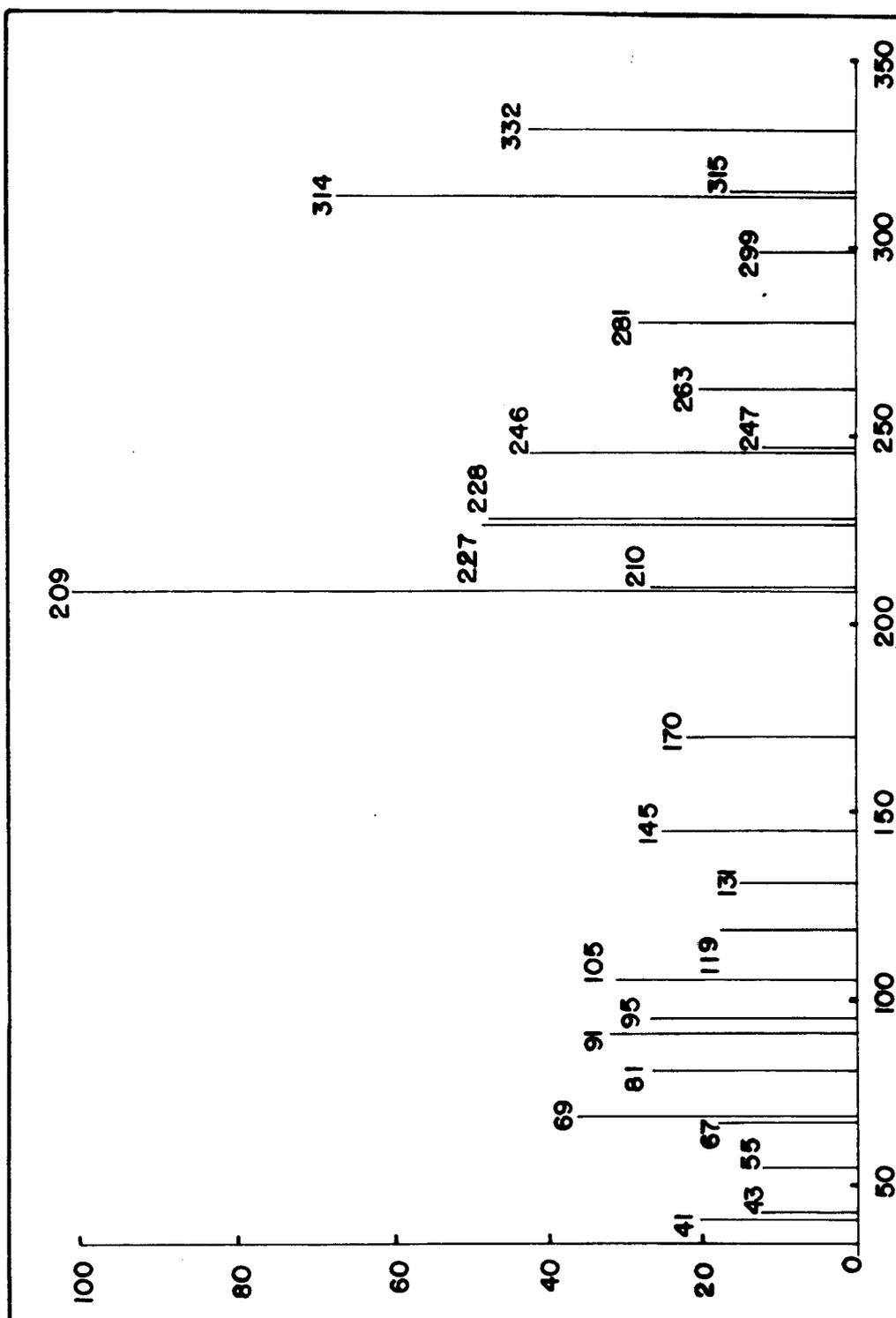


FIGURA 7 - ESPECTRO DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO DO COMPOSTO MI 12.

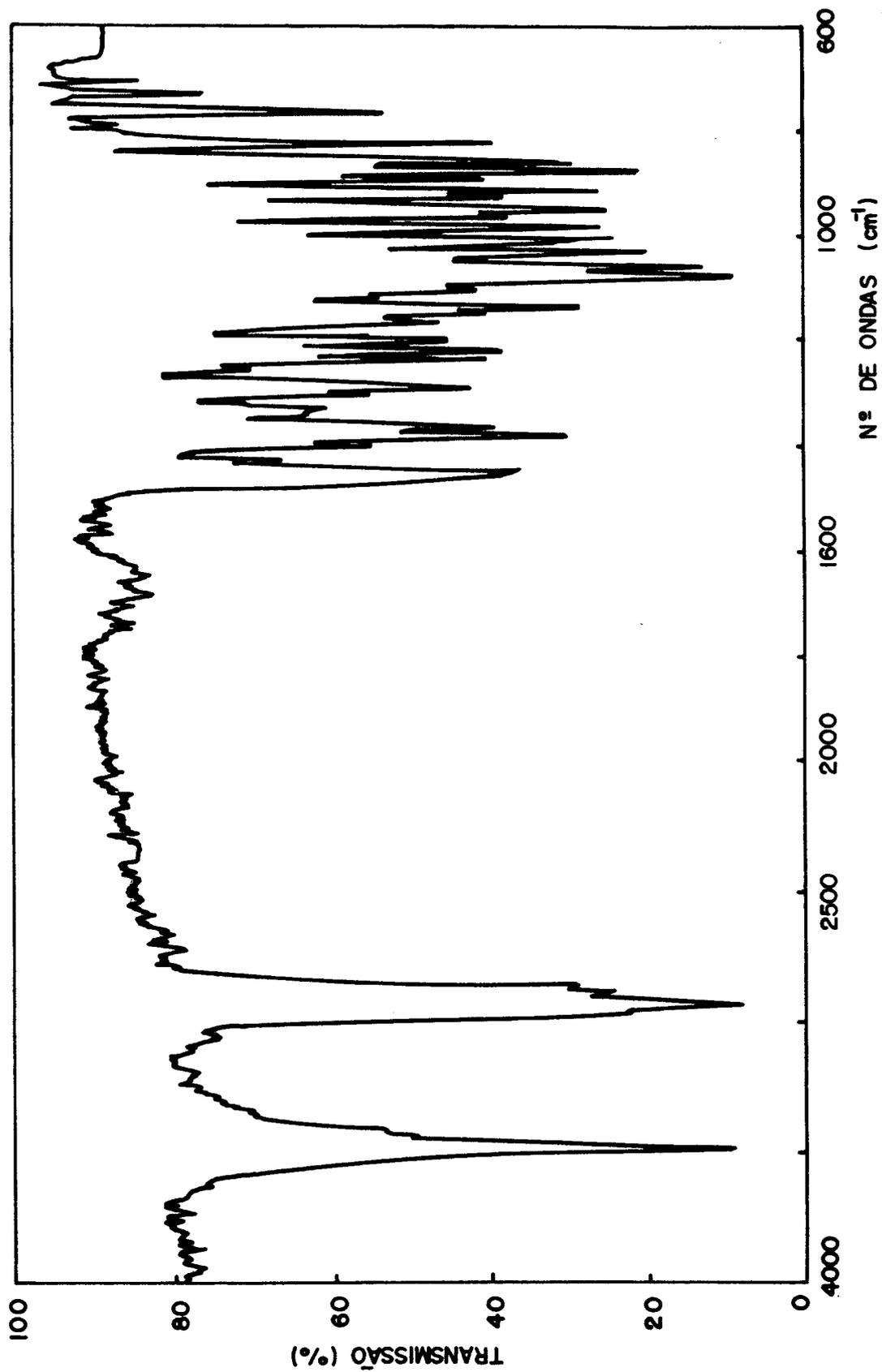


FIGURA 8 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO MI 12.

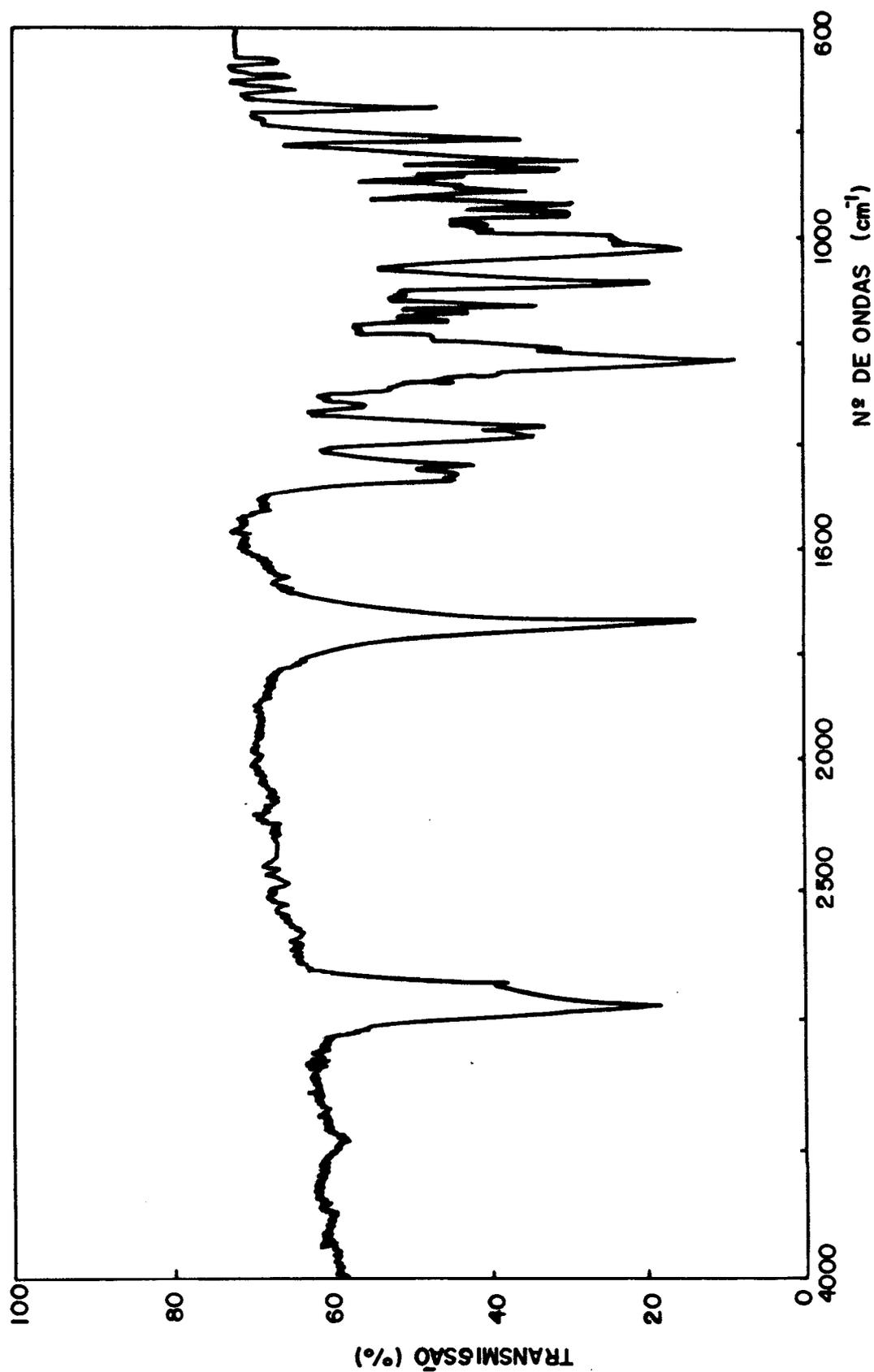


FIGURA 9 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO MI 12 ACETILADO.

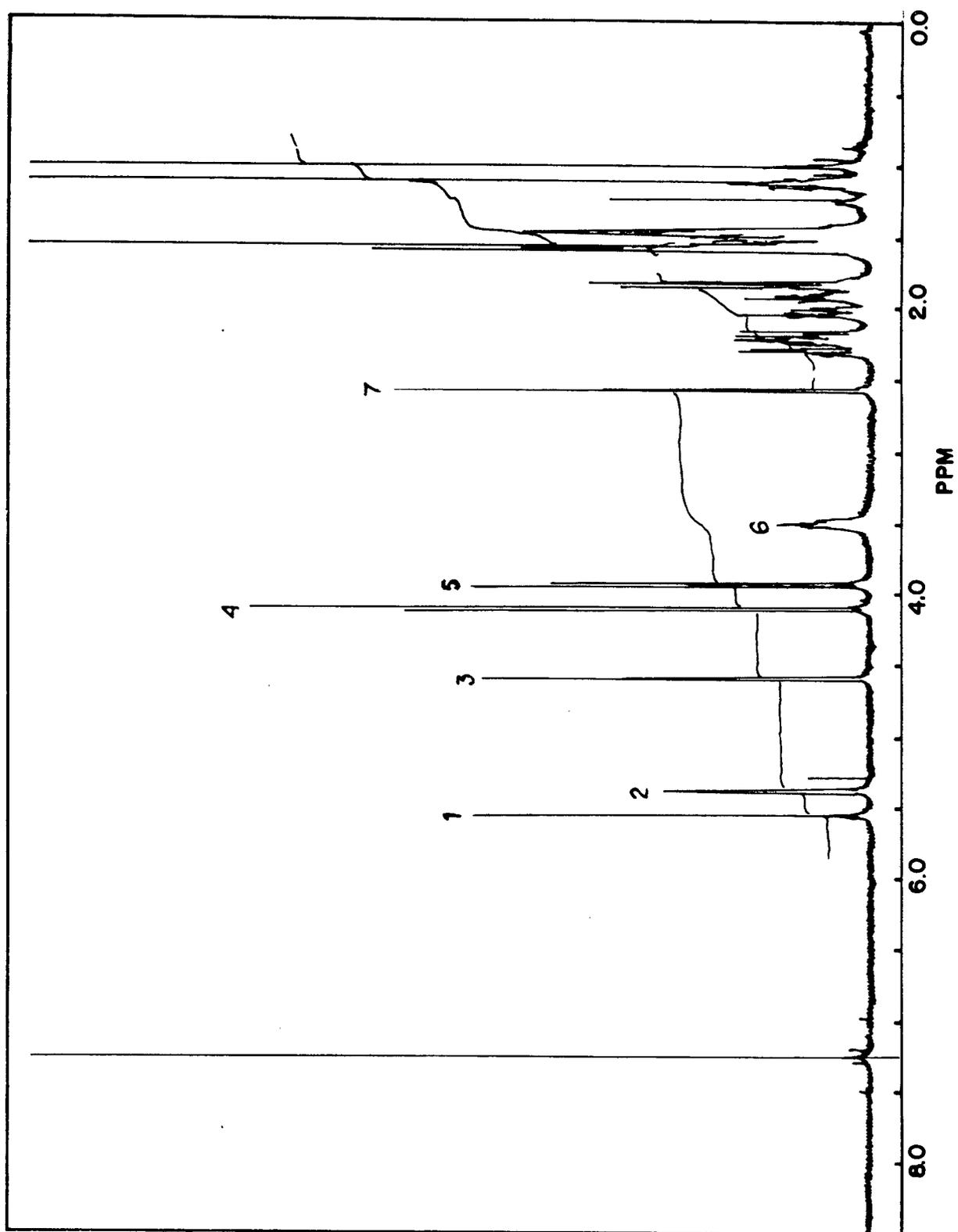


FIGURA 10A- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE RMN ^1H (400 MHZ) DO COMPOSTO MI 12.

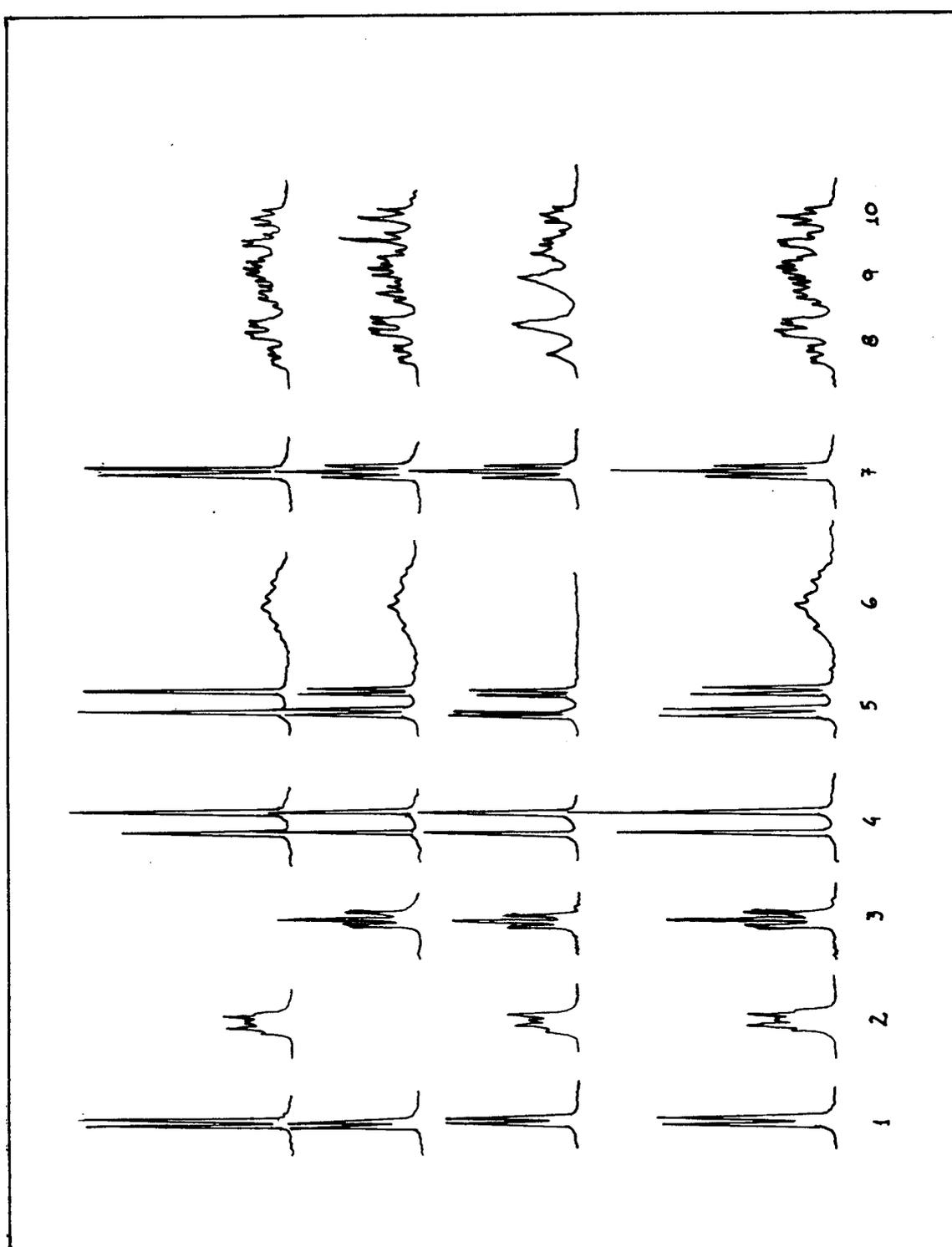


FIGURA 10B - AMPLIAÇÃO DOS SINAIS 1,2,3,4,5,6 E 7 NO ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz) DO COMPOSTO MI 12.

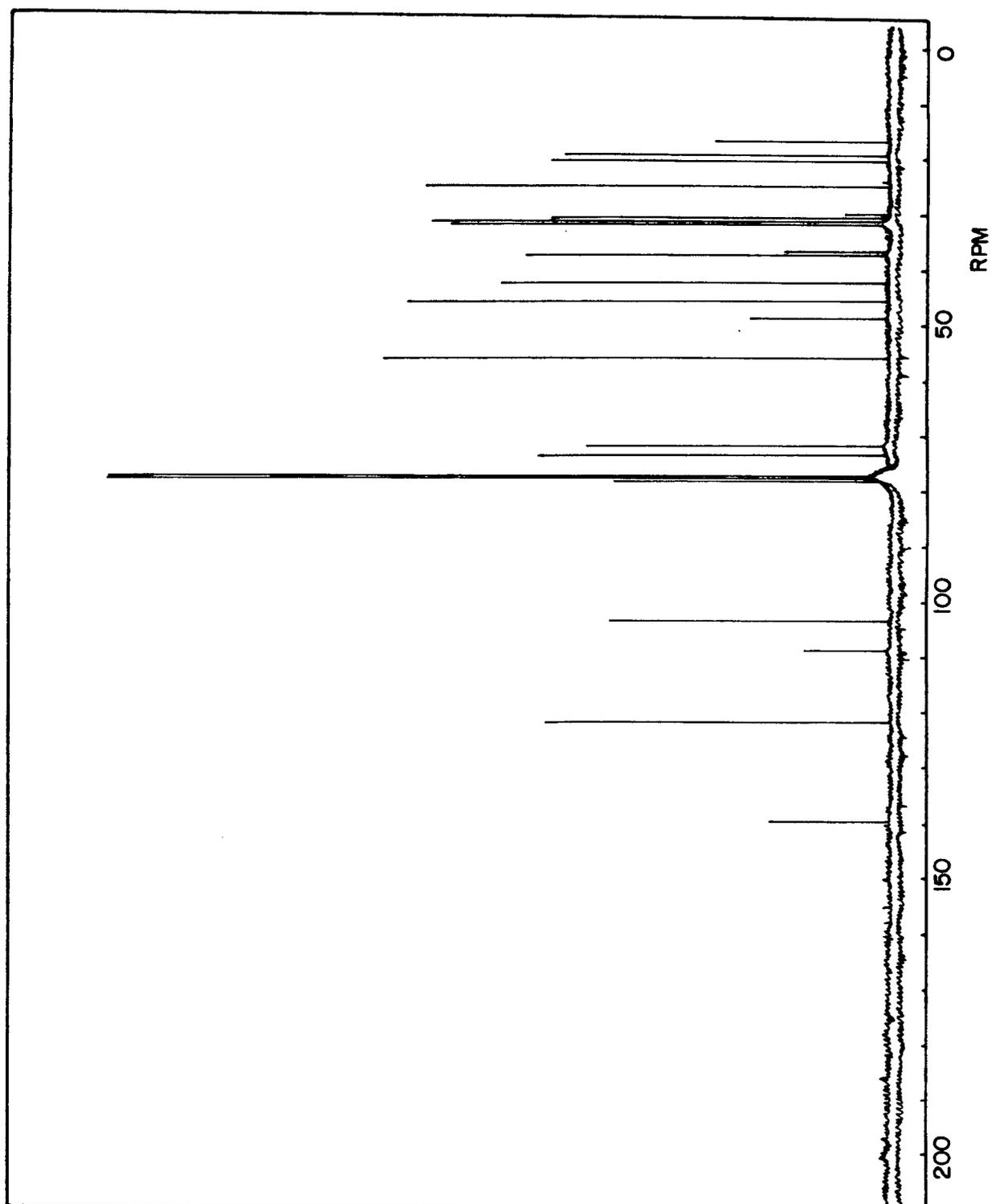


FIGURA 11 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE RMN ^{13}C (100 MHz) DO COMPOSTO MI 12.

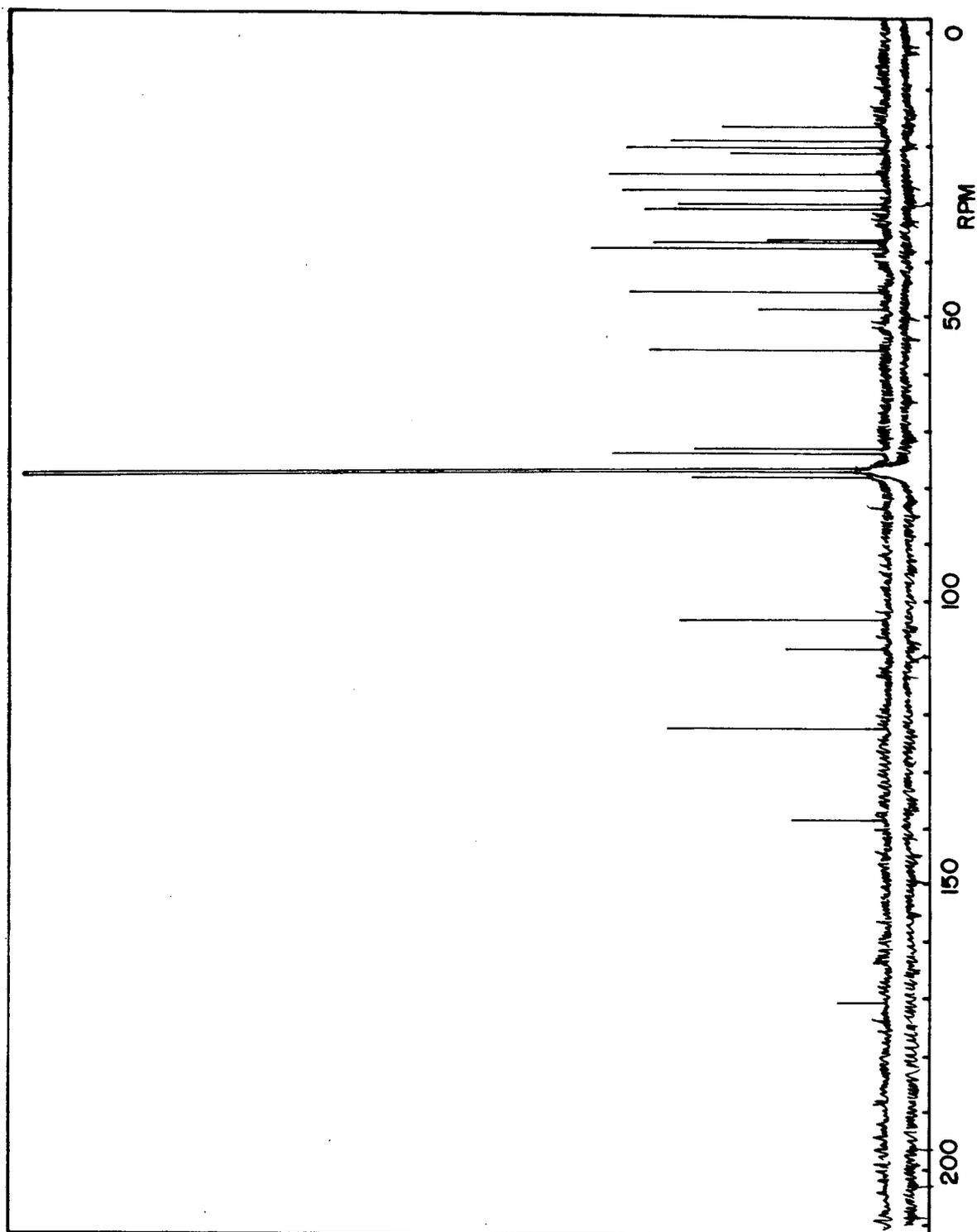


FIGURA 12 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE RMN ^{13}C (100 MHZ) DO COMPOSTO MI 12 ACETILADO.

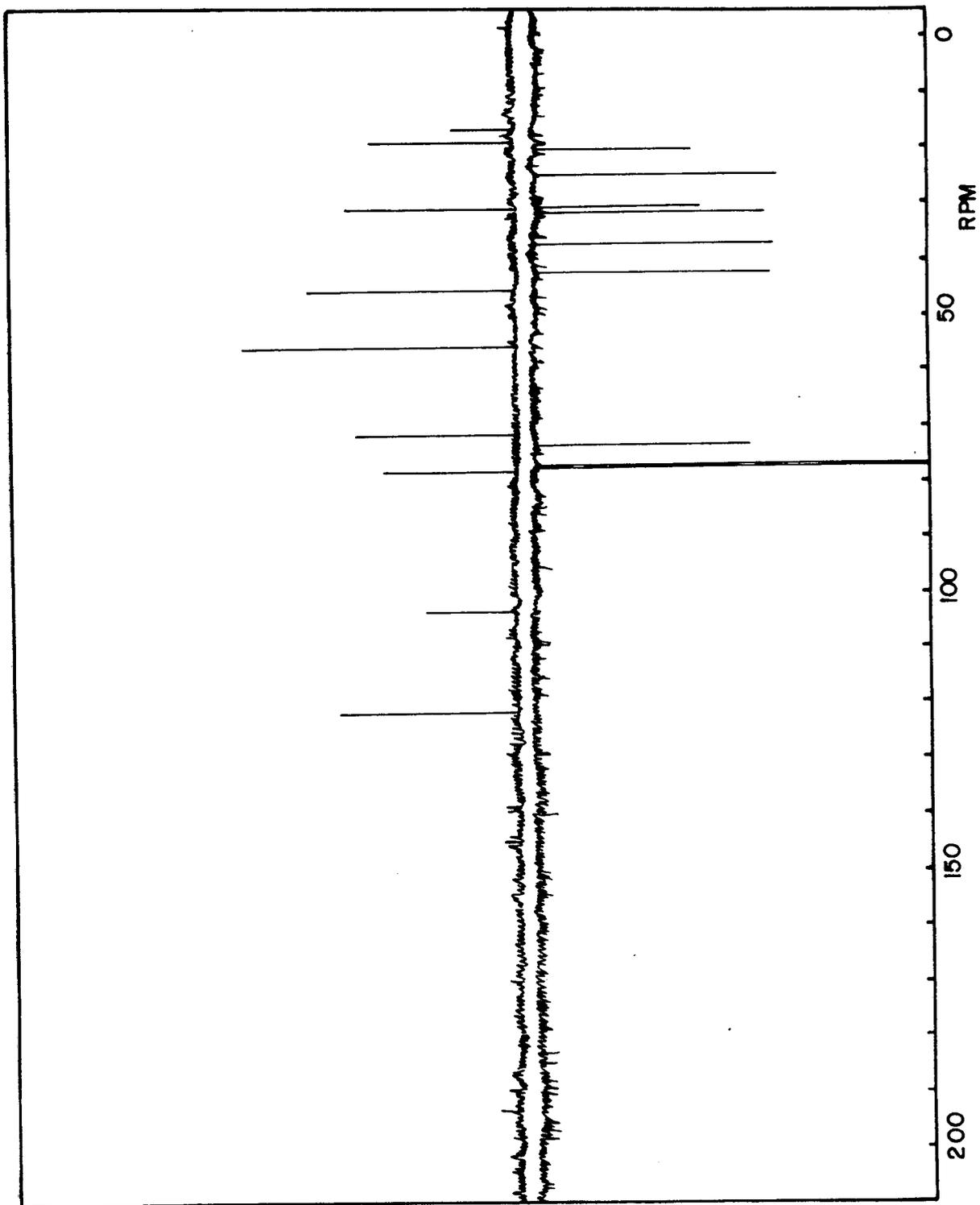


FIGURA 13 - ESPECTRO OBTIDO ATRAVÉS DA TÉCNICA APT. DO COMPOSTO
MII-12

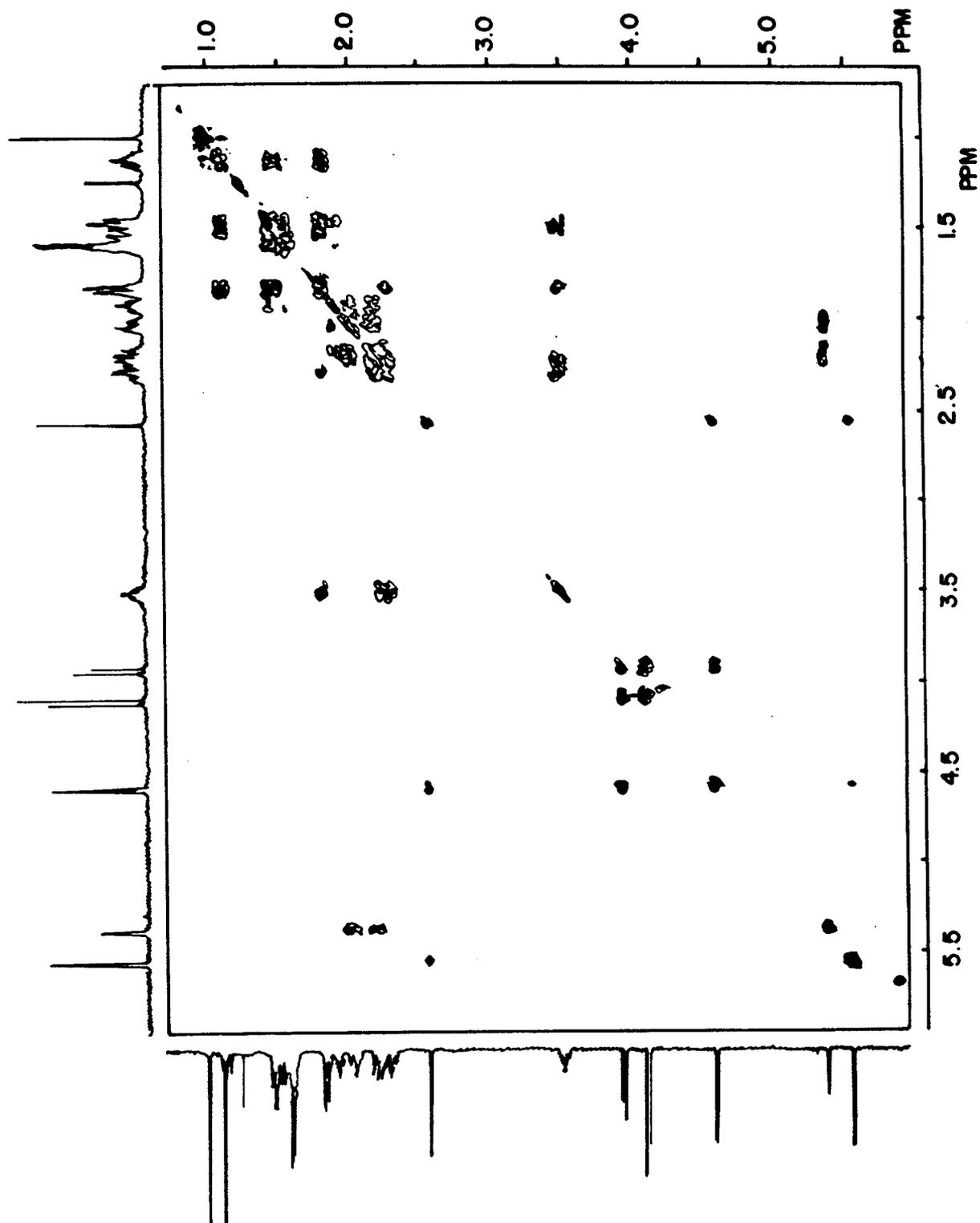


FIGURA 14 - ESPECTRO DE COSY' H (400 MHZ) DO COMPOSTO MI 12.

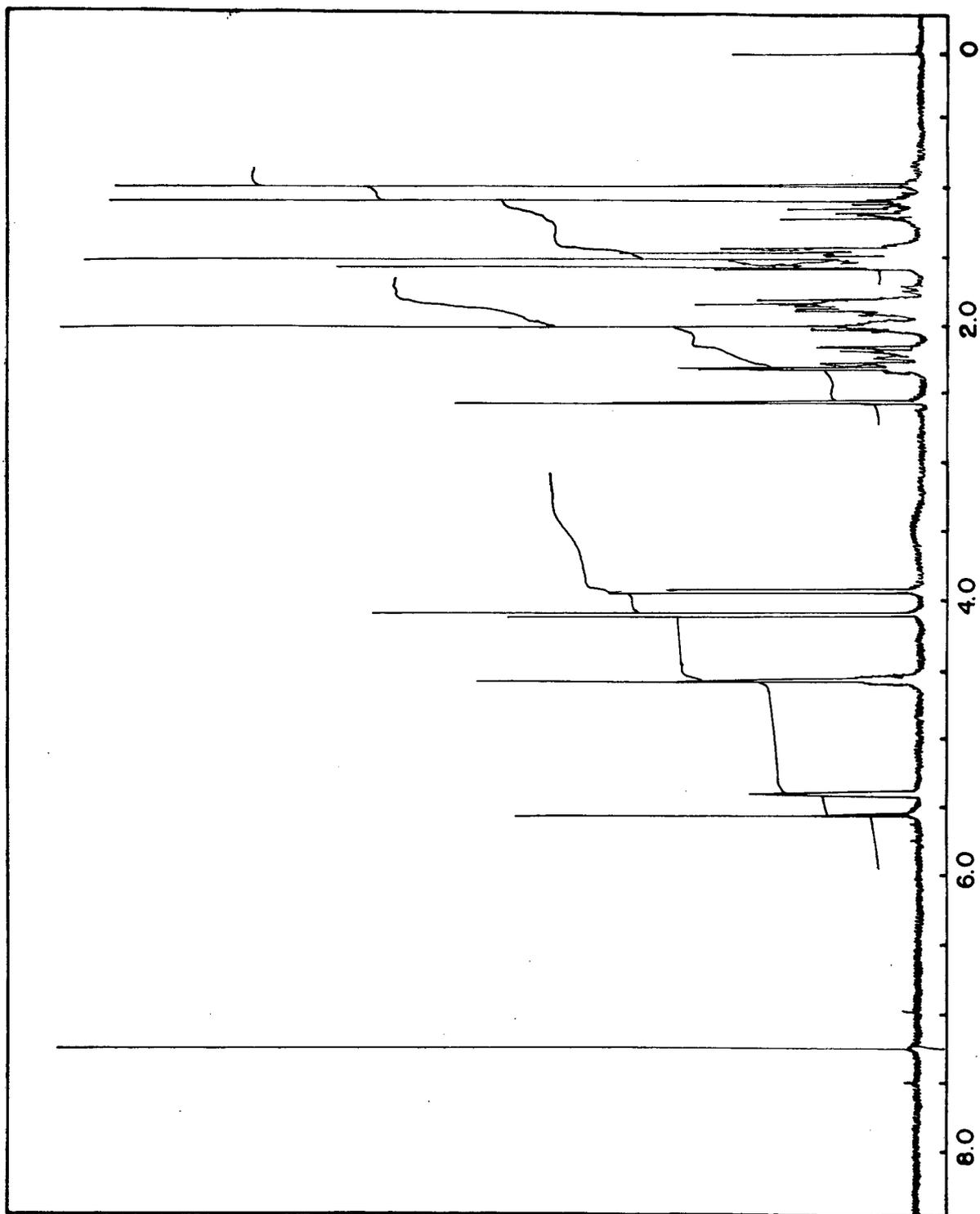


FIGURA 15 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE RMN ^1H (400 MHz) DO COMPOSTO MI 12 ACETILADO.

3.2 - Análise farmacológica do extrato hidroalcoólico e de compostos isolados da *Mandevilla illustris*.

Como descrito anteriormente para o extrato da *Mandevilla velutina*, o extrato hidroalcoólico obtido dos rizomas da *Mandevilla illustris*, planta usada popularmente para o tratamento da picada de cobra e como antiinflamatória, também antagonizou de maneira competitiva e de modo concentração-dependente a resposta contrátil para a bradicinina (BK) no útero isolado de rato (Figura 16A). Além disso como demonstrado para o extrato da *M. velutina*, o extrato da *M. illustris* também antagonizou competitivamente a resposta contrátil para a lisil-BK, indicando que o antagonismo não é restrito à BK (Figura 17A). No entanto, o gráfico de Schild (Figura 16A e 16B) revelou que o antagonismo, embora seja competitivo, ele não parece envolver uma interação simples, uma vez que as inclinações das retas de regressão obtidas a partir do gráfico de Schild são estatisticamente diferentes da unidade (2,6 e 2,5). Tais resultados indicam que a exemplo dos resultados observados para a *M. velutina*, é provável que exista no extrato *M. illustris* mais de um composto capaz de interagir com diferentes afinidades com as ações da BK e demais cininas. Em termos de potência, o extrato da *M. illustris* também foi equipotente em antagonizar as respostas contráteis a BK e a L-BK, uma vez que os valores de PA_2 não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 17). Além disso os extratos brutos da *M. velutina* e *M. illustris* foram equi

potentes em antagonizar as ações das cininas.

Contrariando os resultados observados com o extrato da *M. vellutina*, o mesmo extrato obtido da *M. Illustris* não foi seletivo em antagonizar as ações das cininas (BK e L-BK), uma vez que nas mesmas concentrações que causou marcado deslocamento à direita sobre a resposta contrátil para esses peptídeos, observu-se também inibição marcante sobre a resposta contrátil para a ocitocina, acetilcolina, angiotensina II e para cloreto de bário, associado com deslocamento à direita das curvas concentração-resposta para esses agonistas (Figura 18A, 18B, 18C e 18D). Esses resultados sugerem fortemente que os princípios ativos presentes na *M. illustris*, embora aparentemente semelhantes não devem ser completamente iguais aos obtidos da *M. vellutina*, podendo existir também nesta planta um ou mais compostos dotados de forte atividade anti-espasmódica.

O fracionamento químico desta planta (ver capítulo cap II) permitiu identificar na fração clorofórmio a atividade inibitória da BK, evidenciada no extrato bruto. A partir desta fração foi possível isolar o composto MI 15, que em concentrações cerca de 100 vezes menores (5 a 20 μ g/ml) causou também deslocamento paralelo e concentração-dependente para a direita sobre a curva do se-resposta à BK no útero isolado de rata (Figura 19A). O gráfico de Schild representado na Figura 19B, indica que existe uma boa correlação entre o aumento da concentração desse composto e o deslocamento observado à direita para a resposta a BK ($r = 0,99$), porém a inclinação da reta de regressão obtida ainda foi maior que a unidade (1,7), indicando que o antagonismo embora competitivo em relação as ações da BK, não ocorre através de uma interação sim

ples. Resultados muito semelhantes foram observados para o composto MV 8608 isolado da *M. velutina*, indicando que muito provavelmente esses dois compostos devem ser semelhantes. Esse composto foi também ativo em antagonizar as ações da L-BK no útero de rata, mas não interferiu com a resposta contrátil à acetilcolina neste tecido (resultados não apresentados). Comparado ao extrato bruto, o composto MI 15 foi cerca de 251,1886 mais potente como antagonista para a BK (Tabela 17).

No entanto, o composto MI 12, nas concentrações entre 10 e 40 μ g/ml foi completamente destituído de atividade anti-BK no útero isolado de rata (Figura 20A). Além disso, esse composto (10 a 20 μ g/ml), também não interferiu com a resposta contrátil à acetilcolina nesse tecido, enquanto na maior dose (40 mg/ml) , causou inibição da resposta à acetilcolina (Figura 20B).

TABELA 17 - POTÊNCIA DO EXTRATO BRUTO E DO COMPOSTO MI 15 OBTIDO DA *Mandevilla Illustris* EM
ANTAGONIZAR AS AÇÕES DA BK E L-BK NO ÚTERO ISOLADO DE RATA.

ANTAGONISTA	AGONISTA	PA ₂ (L.C, 95%)	INCLINAÇÃO (L.C.95%)	CORRELAÇÃO (X ⁺ EPM)	POTÊNCIA RELATIVA	
EXTRATO BRUTO	BK	3,6 (3,1-3,9)	2,6 (1,5-3,8)	0,97	0,1	1
EXTRATO BRUTO	L-BK	3,2 (2,9-3,4)	2,5 (2,0-3,3)	0,95	0,02	2,5118
COMPOSTO MI 15	BK	6,0 (5,7-6,3)	1,7 (0,9-2,4)	0,99	0,003	251,1886

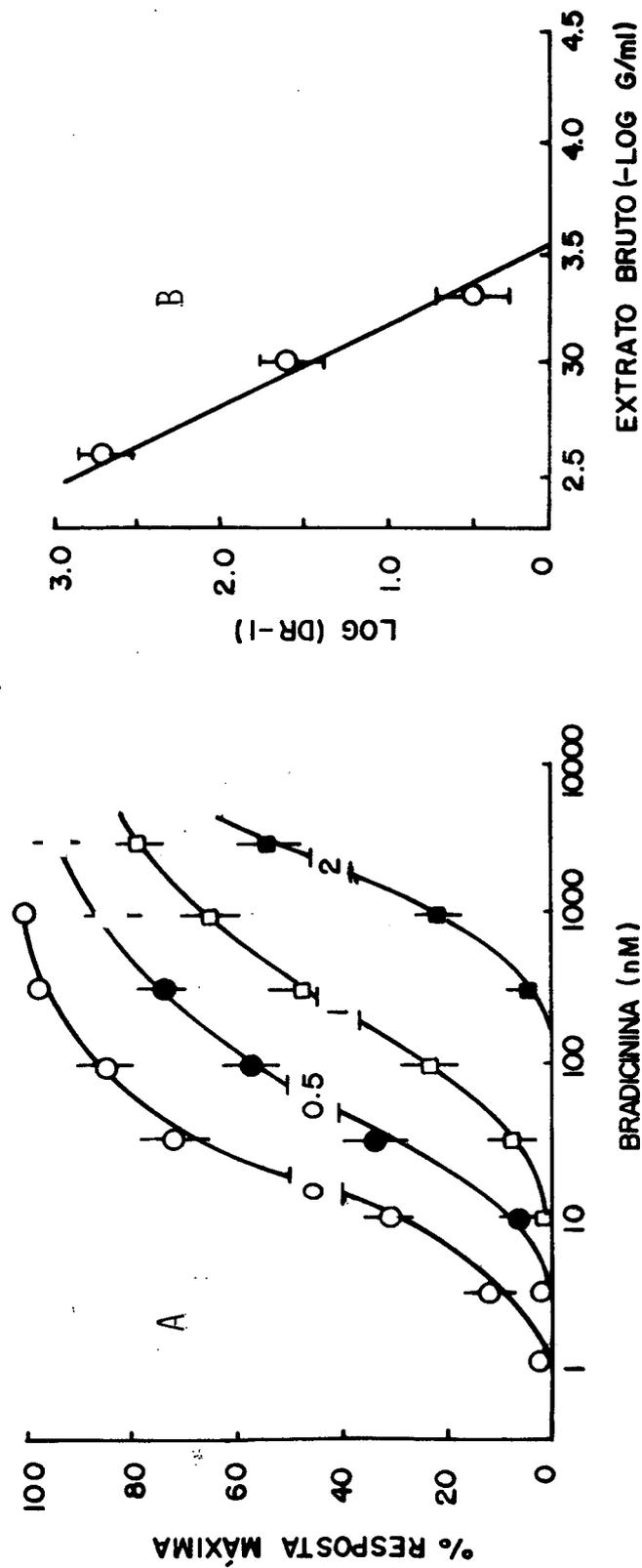


FIGURA 16 - A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA MÉDIAS OBTIDAS PARA A BRADICININA NO ÚTERO ISOLADO DE RATA NA AUSÊNCIA DE (O) OU NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA *Mandevilla illustris*. O EXTRATO FOI INCUBADO DURANTE 20 MINUTOS NA SOLUÇÃO NUTRIENTE. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DE 5 A 6 EXPERIMENTOS E AS BARRAS VERTICAIS INDICAM OS ERROS PADRÃO DAS MÉDIAS. AS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ESTÃO INDICADAS PRÓXIMO A CADA CURVA (MG/ML). B) GRÁFICO DE SCHILD EVIDENCIANDO O ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE O EXTRATO E AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS À BRADICININA NO ÚTERO ISOLADO DE RATA. OS VALORES MÉDIOS DE PA_2 OBTIDOS POR CORRELAÇÃO LINEAR A PARTIR DESSES RESULTADOS ESTÃO INDICADOS NA TABELA 17.

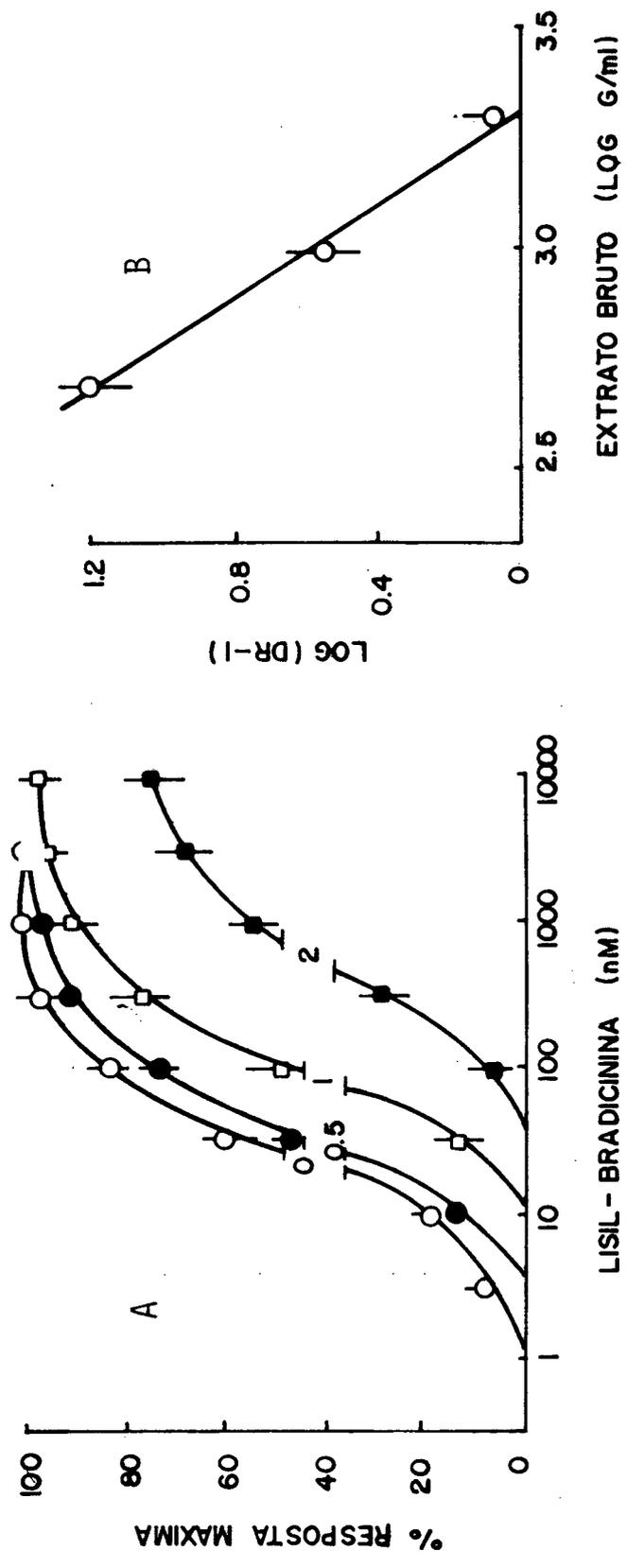
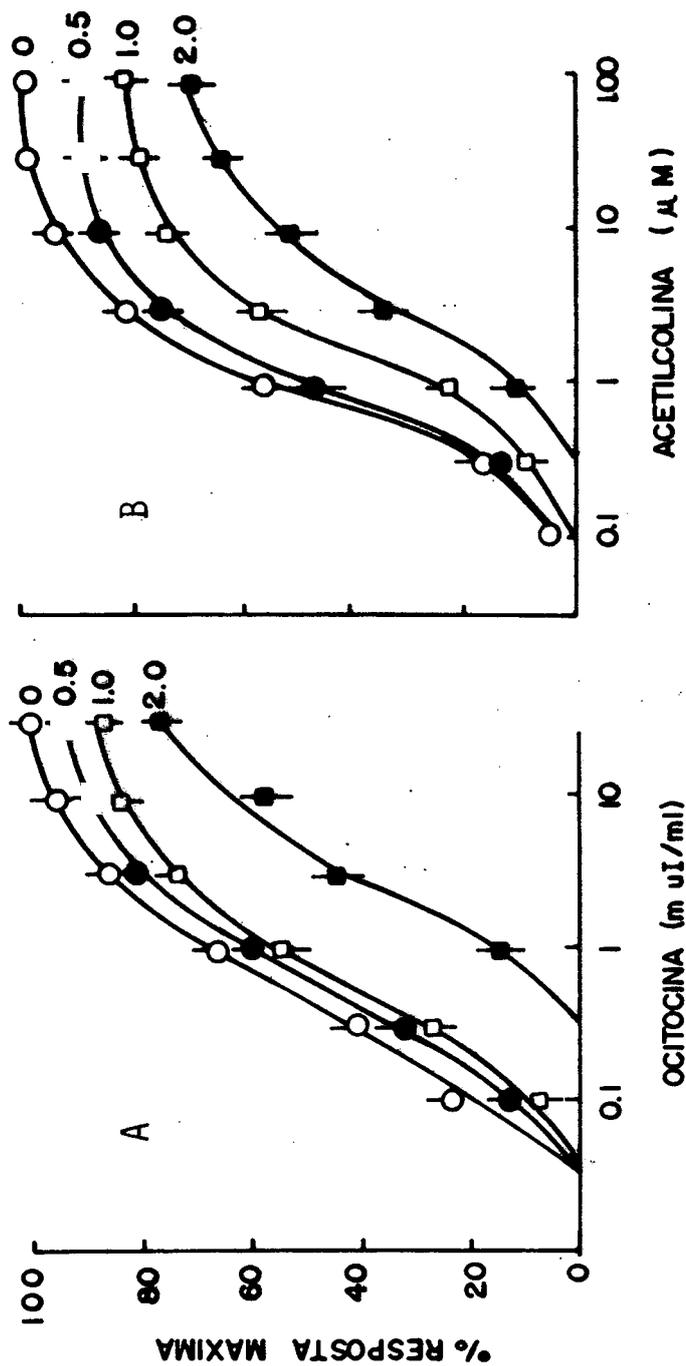
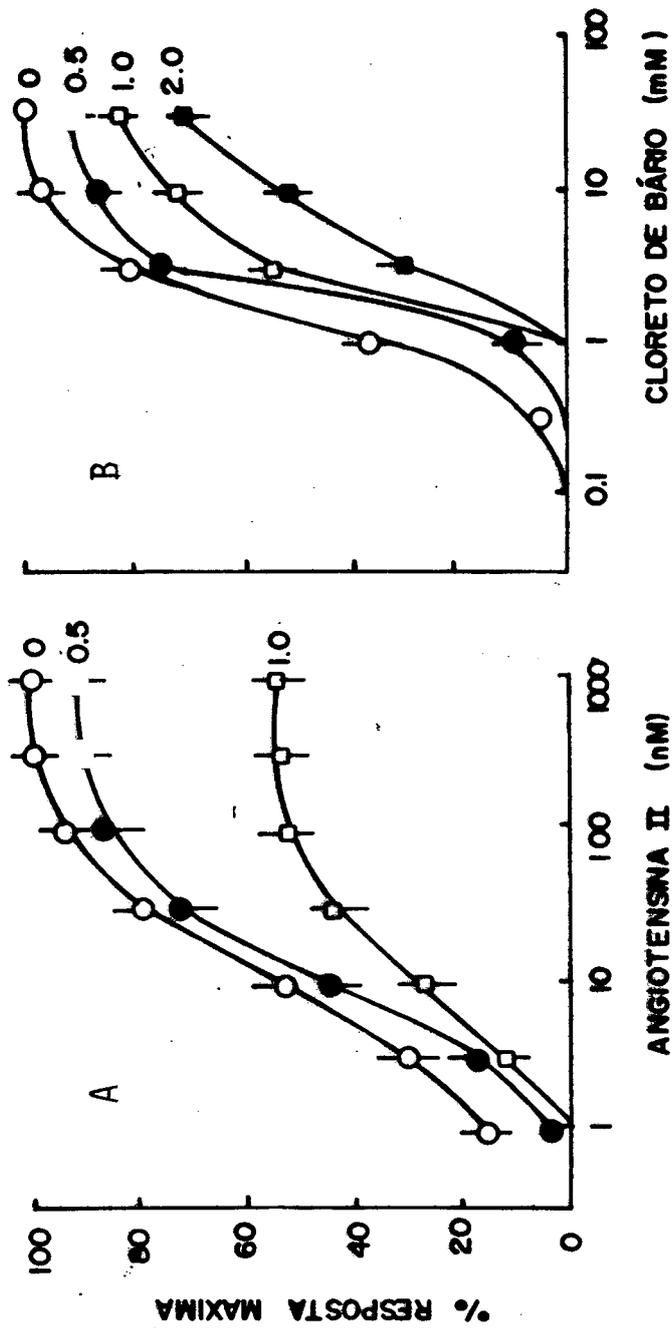


TABELA 17 - A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA MÉDIAS PARA A LISIL-BRADICININA NO ÚTERO ISOLADO DE RATA NA AUSÊNCIA (○) OU NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Mandevilla illustris*. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DE 6 EXPERIMENTOS E AS LINHAS VERTICAIS OS ERROS PADRÃO DAS MÉDIAS. AS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ESTÃO INDICADOS PRÓXIMO A CADA CURVA (MG/ML). B) GRÁFICO DE SCHILD REPRESENTANDO O ANTAGONISMO COMPETITIVO DO EXTRATO SOBRE AS RESPOSTAS-CONTRÁTE-
IS À LISIL-BRADICININA NO ÚTERO ISOLADO DE RATA. OS VALORES DE PA₂ OBTIDOS A PARTIR DESSES GRÁFI-
COS POR CORRELAÇÃO LINEAR ESTÃO RELACIONADOS NA TABELA 17.



FIGURAS 18A E 18B - CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA MÉDIAS OBTIDAS PARA A OCITOCINA (A), ACETILCOLINA (B), NO ÚTERO ISOLADO DE RATA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Mandevilla illustris*. OS NÚMEROS PRÓXIMOS A CADA CURVA INDICAM AS CONCENTRAÇÕES EMPREGADAS (MG/ML). CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DE 5 A 7 EXPERIMENTOS E AS LINHAS VERTICAIS INDICAM OS ERROS PADRÃO DAS MÉDIAS.



FIGURAS 18C E 18D - CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA MÉDIAS OBTIDAS PARA A ANGIOTENSINA II (C) E CLORETO DE BÁRIO (D) NO ÚTERO ISOLADO DE RATA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Mandevilla illustris*. OS NÚMEROS PRÓXIMOS A CADA CURVA INDICAM AS CONCENTRAÇÕES EMPREGADAS (MG/ML). CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DE 5 A 7 EXPERIMENTOS E AS LINHAS VERTICAIS INDICAM OS ERROS PADRÃO DAS MÉDIAS.

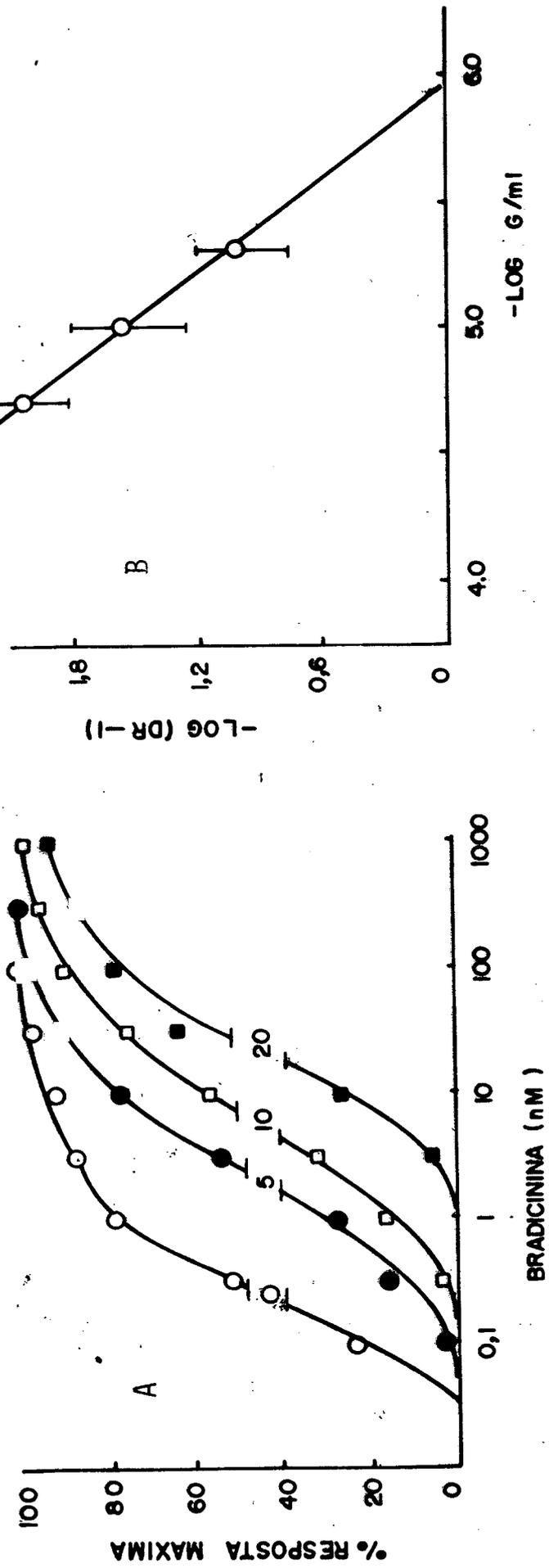


FIGURA 19 - A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA MÉDIAS OBTIDAS PARA A BRADICININA NO ÚTERO ISOLADO DE RATA NA AUSÊNCIA (O) OU NA PRESENÇA DE DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO MI 15 ISOLADO DA *Mandevilla illustris*. OS NÚMEROS PRÓXIMOS A CADA CURVA REPRESENTAM AS CONCENTRAÇÕES FINAIS DO COMPOSTO NO BANHO ($\mu\text{g}/\text{ML}$). O COMPOSTO FOI INCUBADO NO BANHO DURANTE 20 MINUTOS. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA 5 EXPERIMENTOS E AS LINHAS VERTICAIS REPRESENTAM OS ERROS PADRÃO DAS MÉDIAS. O COMPOSTO FOI DISSOLVIDO EM ETANOL ABSOLUTO A 10 MG/ML E EXPERIMENTOS CONTROLES USANDO SOMENTE O VEÍCULO FORAM REALIZADOS PARA DESCARTAR A AÇÃO TÓXICA DO SOLVENTE.

B) GRÁFICO DE SCHILD EVIDENCIANDO O ANTAGONISMO ENTRE O COMPOSTO MI 15 E A BRADICININA NO ÚTERO ISOLADO DE RATA. OS VALORES MÉDIOS DE PA_2 OBTIDOS POR REGRESSÃO LINEAR A PARTIR DESSES RESULTADOS ESTÃO REPRESENTADOS NA TABELA.

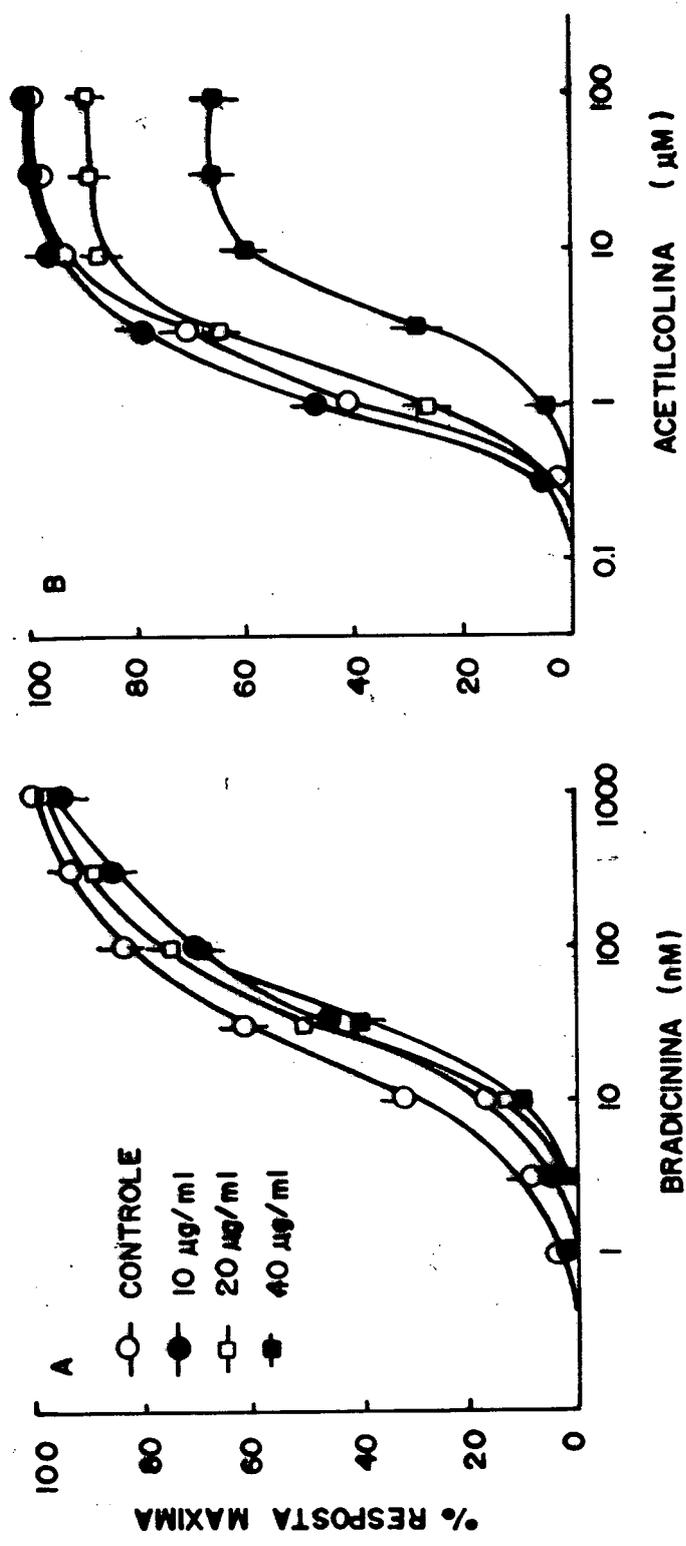


FIGURA 20 - CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA MÉDIAS OBTIDAS PARA BRADICININA (A) E PARA A ACETILCOLINA (B) NO ÚTERO ISOLADO DE RATA NA AUSÊNCIA (0) OU NA PRESENÇA DE DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO MI 12 ISOLADO DA *Mandevilla illustris*. AS CONCENTRAÇÕES DO COMPOSTO ESTÃO INDICADOS PELOS NÚMEROS PRÓXIMOS A CADA CURVA (µG/ML). O COMPOSTO MI 12 FOI APLICADO EM EMULSÃO COM GOTAS DE *Tween* (10 MG/ML). FÔRAM REALIZADOS EXPERIMENTOS CONTROLES USANDO SOMENTE O VEICULO UTILIZADO PARA EMULSIONAR O COMPOSTO. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DE 5 A 6 EXPERIMENTOS E AS LINHAS VERTICAIS REPRESENTAM OS ERROS PADRÃO DAS MÉDIAS.

CAPÍTULO IV

IV - CONCLUSÕES

Estudou-se a *Mandevilla illustris* com o objetivo de determinar suas propriedades farmacológicas e sua composição química, especialmente referente a presença de compostos farmacologicamente ativos.

As principais conclusões obtidas neste estudo foram:

- 1) O extrato acetato de etila obtido dos rizomas da planta apresenta aproximadamente entre 26 a 30 compostos, dos quais, sete foram isolados, purificados e codificados como: MI 11, MI 12, MI 15, MI 18, MI 21, MI 25 e MI 27.
- 2) Destes sete compostos, três apresentaram interessantes efeitos farmacológicos.
- 3) O composto codificados como MI 12 teve sua estrutura determinada aplicando-se técnicas de espectrometria de massa de alta resolução, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e carbono. Pa

ra a elucidação completa da estrutura foram empregadas as técnicas de COSY e APT na espectroscopia de RMN.

Assim determinou-se uma estrutura, não existente na literatura de um álcool nor-pregnânico que recebeu a denominação *illustrol*.

- 4) O extrato hidroalcoólico da *Mandevilla illustris* antagonizou de maneira competitiva a resposta contrátil para a bradicinina e lisil-bradicinina no útero isolado de rata. No entanto, não foi seletivo em antagonizar as ações destas cininas, dado que, inibiu também a resposta para ocitocina, acetilcolina, angiotensina II e cloreto de bário.
- 5) O composto MI 15 apresentou uma atividade inibitória da bradicinina, mas foi demonstrado no gráfico de Schild que o antagonismo embora competitivo em relação as ações da BK não ocorre através de uma interação simples.

Estes dados justificam, em grande parte, sob o ponto de vista científico, o uso desta planta na medicina popular como antiinflamatório.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - EZCURRA, Cecília. Revisão de Las Apocináceas de La Argentina. Darwiniana, 23 : (2-4), 367-474, 1981.
- 2 - ALLORGE, L. et alii Morphologie et chimiotaxonomie et Apocynaceae. Conclusions phylogenetique et Biogeographiques. C.R. Soc. Biogeogr. 57 (3): 112-126, 1980.
- 3 - AZAMBUJA, D. Contribuição ao conhecimento das Apocynaceae encontradas no Brasil. Arq. Ser. Florestal. Rio de Janeiro, 3, 9-112, 1947.
- 4 - CORREIA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, 3. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, pgs. 423-429, 530 IV, 1984.
- 5 - SINDDIQUI, S. et alii. Isolation and structure of two cardiac glycosides from leaves of Nerium oleander. Phytochemistry 26 (1): 237-241, 1987.
- 6 - ABE, F. & YAMAUCHI T. Oleasides, Novel cardenolides with an Unusual Framework in Nerium. Chem. Pharm. Bull. 27 (7) 1604-1610, 1979.
- 7 - YAMACHI, T. et alii Δ^{16} - Dehydroadynenerigenin glycosides of Nerium odorum. Phytochemistry 12: 2737-9, 1973.
- 8 - ABE, F. & YAMAUCHI, T. Pregnane glycosides from trachelospermum asiaticum. Chem. Pharm. Bull 36(2), 621-6, 1988.
- 9 - ABE, F. & YAMAUCHI, T. Teikaside A. A pregnane glycoside of trachelospermum asiaticum. Chem. Pharm. Bull 29(2) 416-420, 1981.

- 10 - HOOK & Hrn. Study of a cardiotoxic glycoside extracted from seeds of Strophantus divasicatus. Rev. Med. 132-143, 1975
- 11 - HAMBURGER, M. O. et alii. 10-Demethoxykopsidasineine from Kopsia jasminiflora. Phytochemistry. 27 (8): 2719 - 2712, 1988.
- 12 - ABE, F. et alii Pregnanes and glycosides from the roots, of Apocynum venetum var. basikurumon (Apocynum I). Chem. Phar Bull . 35 (10): 4087-4092 (1987).
- 13 - SETHI , A. et alii. A Labdane diterpene and its glycoside from Melodinus monogynus. Phytochemistry. 27 (7):2255-9, 1988.
- 14 - VAN BEEK, T.A. et alii. Antimicrobially active alkaloids from Tabernaemontana Pachysiphon. Phytochemistry. 23 (8): 1771-8, 1984.
- 15 - SILVERSTEIN, M.R. et alii. Spectrometric Identification of compounds 4th ed. John Wiley & Sons. New York, 184,185,189, 1981.
- 16 - ANDERSON, W.G., et alii. ¹³C NMR Studies of the four 22,22 - Epoxy - Cholesterols and the two 20(22)- Dehydrocholesterols. Tetrahedron Letters 2193-6, 1976.
- 17 - BANNAI, K. et alii. Studies on Steroids Part. 37. Synthesis of the four Stereoisomers of 20,22 - Epoxy-Cholesterol . J.C.S. Perkin I, (19): 2116 - 20, 1976.
- 18 - WEHLI, F.W. in "Zechmeister L. Progress in the chemistry of organic Natural Products, "Spring-verlag, New York. 36, 105, 180, 1982.

- 19 - EGGERT, H., et alii. Carbon-13 Nuclear magnetic Resonance Spectra of Keto Steroids. J. Org. Chem. 38, 3788, 1973.
- 20 - EGGERT, H., et alii Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of hydroxy Steroids. J. Chem. 41(1), 71-78, 1976.
- 21 - ABRAHAM, R.J., & J.R. Monasterios. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of some Ergosta-dienes and trienes. J.C.S. Perkin II, 662, 1974.
- 22 - ROCHA e SILVA., M. et alii Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma by snake venoms and by trypsin. Am. J. Physiol. 156: 261-273, 1949.
- 23 - CHASE, A. & Volicer, L. Bradykinin receptors in isolated intestinal smooth muscle. Dev. Development, Res. 2: 1-16, 1982.
- 24 - CUTHEBERT, A.W. & Margolius, H.S. Kinins stimulate ret chloride secretion by the rat colon. Br. J. Pharmac. 75 :587-598, 1982.
- 25 - CUTHEBERT, A.W. et alii Kinin effects on ion transport in monolayers of HCA-7 Cells, a line from a human colonic adenocarcinoma. Br. J. Pharmac. 86 : 3-5, 1985
- 26 - MANNING, D.C. et alii Bradykinin receptor-mediated chloride Secretion in intestinal function, Nature. 299 : 256-9, 1982.
- 27 - ROCHA e SILVA, M. The physiological significance of bradykinine. Ann. Ny Acad. Sc. 104: 190, 1963.

- 28 - ROCHA e Silva, M. Kinin Hormones. Charles, C. Thomas. Publisher Springfield, illinois. USA. 1970.
- 29 - KELLERMEYER, R.W. & GRAHAM, R.C. Kinins-Possible physiologic and pathologica roles in man. New Engl. J. Med., 279: 754 - 9, 802-7, 859-66, 1968.
- 30 - COLMAN, R.W. & Wong, P.Y. Kallikrein - Kinin system in pathologic conditions In: Erdős, E.G. ed. Handbook of experimental pharmacology. Berlim, Springer, 1979. C. 25 suppl., p. 569-96.
- 31 - REGOLI, D. & Barabé, J. Pharmacology of bradykinin and related Kinins. Pharmacol. Rev. 32 : 1 - 46, 1980
- 32 - FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Brothrops Jararaca. Br J. Pharmac. 24: 163-9, 1965.
- 33 - FERREIRA, S.H. et alii. Isolation of bradykinin potentiating peptides from Brothrops Jararaca Venom. Biochemistry. 9: 2583-92, 1970.
- 34 - SHROEDER, F. Structure-activity relationships of Kinins. Handb. Exp. Pharmacol. 25: 324-50, 1970.
- 35 - STWART, J.M. Chemistry and biologic activity os peptides related to the bradykinin. In: Erdős, E.G. ed. Handbook of experimental pharmacology. Berlim, Springer, 1979. V. 25 suppl., p. 225-72.
- 36 - GODSTEIN, D.J. et alii. Bradykinin reverses the effects of opiates in the gut by enchanhing acetylcholine release. J. Biol. Chem. 258: 12122-24, 1983.

- 37 - YAN, W.M. et alii. Bradykinin release acetylcholine from myentric plexus by prostaglandin-mediated mechanism. Pep tides, 7: 289-92, 1986
- 38 - WARREN, J.B. et alii Bradykinin-stimulated prostaglandin synthesis in conscious rabbits. Br. J. Pharmacol. 92 : 895-900, 1987.
- 39 - HOJVAT, S.A. et alii Stimulation of prostaglandin producti on in rabbit ileal mucosa by bradykinin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226 : 749-55, 1983.
- 40 - NAKAHATA, N. et alii Regulation of inositol trisphosphate accumulation by muscarinic cholinergic and H_1 - histami ne receptors on human a strocytoma cells. Differential induction of desensitization by agonists. Japan. J. Pharmacol. 43 : 351-59, 1987.
- 41 - LAWSON, L.D. & Powel, D.W. Bradykinin-stimulated licosanoid synthesis and secretion by rabbit ileal components. An. J. Physiol. 252 : 783-97, 1987.
- 42 - HOWT, J.R.S. & PHILLIPS, J.A. Kinin-induced prostaglandin release in rat colon does not display serosal mucosal si dedness'after ephitelial removal. Br. J. Pharmacol., 88: 3-5, 1986.
- 43 - REGOLI, D. et alii Receptors for bradykinin in rabbit aor ta. Can. J. Physiol. Pharmacol. 55: 855-67, 1977.
- 44 - REGOLI, D. et alii Induction of B_1 - receptor for kinins in the rabbit by a bacterial hippdy sacharide. Eur.J. Phar mac. 71 : 105-115, 1981.

- 45 - MARCEAU, F. et alii Pharmacology of Kinins their relevance to tissue injury and inflammation. Gen Pharmacol. 14: 209-29. 1983.
- 46 - VAVREK, R.J. & STEWART, J. M. Competitive antagonists of bradykini. Peptides 6: 161-64, 1985.
- 47 - REGOLI et alii The actions of Kinin antagonists on B₁ and B₂ receptors. Eur. J. Pharmacol. 123:61 - 5, 1986.
- 48 - SCHARCHTER et alii New synthetic antagonists of bradykinin Br. J. Pharmac. 92 : 851-55, 1987.
- 49 - RIFO, J. et alii Bradykinin receptor antagonists used to characterize the heterogen city of bradykinin-included responses in rat vas deferens. Eur.J. Pharmacol. 142 : 305-12, 1987.
- 50 - LLONA, I. et alii Identification of pre and postsynaptic bradykinin receptor sites in the rat vas deferens evidence for different structural requisites. J. Pharmacol. Exp ther. 241 : 608-14, 1987.
- 51 - GRIES BACHER, T & LEMBECK, F. Effect of bradykinin antago nists on bradykinin-induced plasma extravasation, veno constriction, prostaglandin E₂ release, nociceptor sti mulation and contraction of iris sphincter muscle in the rabbit. Br J. Pharmacol 92 : 33-40, 1987.
- 52 - STERANKA, L.R. et alii Antinociceptive effects of bradyki nin antagonists. Eur. J. Pharmacol. 136 : 261-2, 1987.
- 53 - MORGAN-BOYD, R. et alii Effects of bradykinin and angioten sin II on intracellular Ca²⁺ dynamics in endothelial cells. Am. J. Physiol. 253 : 588-98.

- 54 - KACHUR, J.F. et alii Bradykinin receptors functional similarities in guinea-pig gut muscle and mucosa. Regul. Peptides. 17 : 63-70, 1987.
- 55 - CALIXTO, J.B. et alii The selective antagonism of bradykinin action on isolated rat uterus by crude extracts Mandevilla velutina . Br. J. Pharmacol. 85 : 729-31, 1985.
- 56 - CALIXTO, J.B. et alii Kinin antagonist activity of compounds from Mandevilla vetutina in the isolated rat uterus. Br. J. Pharmacol 91 : 199-204, 1987a.
- 57 - CALIXTO, J.B. et alii The competitive antagonism effect of compounds from Mandevilla velutina on Kinin-induced contractions of rat uterus and guinea-pig ileum " in vitro". Br. J. Pharmacol 94 : 1133-42, 1988a.
- 58 - CALIXTO, J.B. & YUNES, R.A. Effect of crude extract of Man devilla velutina on bradykinin and [Des-Arg⁹] BK induced contractions of isolated rabbit vessels. IV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. S.Paulo. Brasil. J. Med. Biol. Res. 19:573A, 1986.
- 59 - CALIXTO, J.B. et alii Antagonistic effect of Mandevilla velutina extract on Kinin - induced contractions of guinea-pig and cat ileum longitudinal smooth muscle. Gen.Pharmacol. 19 : 1595-599, 1988.
- 60 - CALIXTO, J.B. & YUNES, R.A. Efeito do extrato da Mandevilla Velutina sobre a resposta contratil à bradicinina na bexiga isolada de cobaia. V Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Rio de Janeiro, 1987.

- 61 - NICOLAU, M. et alii. Effect of Mandevilla velutina crude extracts in eutaneous rat vascular permeability and mouse Carregeanin induced pleurisy. Proceeding of the French Brazilian Symposiun of Chemistry and Pharmacology of natural substance in inflammation, allergy and thrombose, Rio de Janeiro, 1986.
- 62 - CALIXTO, J.B. et alii Bloqueio Seletivo do extrato e do composto MV 8608 obtido da Mandevilla velutina sobre o relaxamento endotélio-dependente causado pela bradici na acetilcolina e A 23187 em vasos isolados de rato, coelho e ação. VI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Caxambú, 1988d.
- 63 - CALIXTO, J.B. et alii Pharmacological actions of tannic ácid I. Effect os isolated smooth and cardiac muscles and blood pressure. Planta Media 1: 32-5, 1986.
- 64 - CALIXTO, J.B. et alii. Ação anti-edematogênica tópica e sistêmica do extrato e de alguns compostos isolados da Mandevilla velutina sobre o edema causado pelo ácido ara quidônico na orelha de camundongos. VI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Caxambu, 1988
- 65 - BAUMAN, Y et alii Efeito do extrato bruto e de compostos isolados da Mandevilla velutina sobre vários modelos de nocicepção e na artrite reumatóide experimental. X Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. São Paulo-SP, 1988a

- 66 - BAUMAN, Y et alii Efeito do extrato e composto isolados obtidos da Mandevilla velutina sobre a pressão arterial e a bronco-constricção em cobaias sensibilizados ativamente pela ovalbumina. X Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais, S.Paulo-SP, 1988b
- 67 - CALIXTO, J.B. et alii The competitive antagonistic effect of compounds from Mandevilla velutina on Kinin-induced Contractions of rat uterus and guinea-pig ileum "in vitro". Br. J. Pharmacol, 94 : 1133-42, 1988.
- 68 - WOODSON, R.E. Studies in the Apocynaceae IV - The American Genera of Echioideae. Ann Mo Bot. Gard, 20 (4) : 605 - 790, 1933.
- 69 - LEDERER, E. & LEDERER, M. Cromatografia revision de sus, principios y aplicaciones. El Ateneo, Bs. Aires, 1960.
- 70 - WAGNER, H et alii Spray Reagentes, In: Plant Dryg Analissis. New York, Ed. Springer-Verlag, 1984. p. 299.
- 71 - DODDRELL, D. M. et alii Distortionless enhancement of NMR SIGNALS By polarization transfer. J. Mag. Res. 48 : 323 -7, 1982.
- 72 - EGGERT, H. & DJERASSI, C. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of monounsaturated steroids. Evaluation of Rules for Predicting their chemical Shifts. J. Org. Chem. 46, 5399-5401, 1981.
- 73 - REICH, H.J. et alii Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Carbon-13 Spectra of Steroids. J. Am. Chem. Soc. 91, 7445, 1969.

- 74 - CUSHALEY, R.J. & Fiilipenko, J.D. ^{13}C . Fourier Transfor
N.M. R.Xiii Reassignment of the ^{13}C Spectrum of
Ergosterol. Org. Magn. Ress. 8, 308, 1976.
- 75 - BHACCA, D.W. Applications of NMR Spectroscopy in Organic
Chemistry. Holden-Day IC. USA 2 nd ed. 1966.
- 76 - OKAMOTO, T. & KAWAZOE, K. Applications of nuclear magnetic
resonan (NMR) to Stereochemistry. III, the apatial inte
raction effect of, the hydroxyl group to proton ressonan
ce. Chem. Pharm. Bull. 11, 643-50, 1963.
- 77 - BAX, A & LERNER LAURA Two - Dimensional Nuclear magnetic
Ressonance Spectroscopy. Science, 232 : 960-7, 1986.
- 78 - BAX, A. & FREEMAN R. Investigation of Complex Networks of
Spin-Spin Coupling by two-dimensional NMR. J. of magnetic
Ressonance. 44, 542-61, 1981.