

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CÉNTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS ESPÉCIES**

*Phyllanthus sellowianus, Phyllanthus fraternus e*

*Siphocampylus verticillatus*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Co-Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

**OBDULIO GOMES MIGUEL**

**FLORIANÓPOLIS**

**1996**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE - CAIXA POSTAL 476  
CEP 88.040-900 - FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA  
TEL.: (0482) - 34.1000 - TELEX: 0482 240

## CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ata da Sessão de Apresentação e Defesa Pública de Tese de Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, feita perante a Banca designada pelo Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação através da portaria de número quinhentos e cinquenta do ano de mil novecentos e noventa e seis.

Aos vinte dias do mês de dezembro do ano de mil novecentos e noventa e seis, às oito horas e trinta minutos, no Anfiteatro quatrocentos e três do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina, realizou-se a sessão de apresentação e defesa pública de tese de doutorado de **OBdulio GOMES MIGIGUEL**, como requisito final para a obtenção do título de “**Doutor em Química**”, com especialização em Química Orgânica. A Banca Examinadora esteve composta pelos professores: Rosendo Augusto Yunes, Dr. João Batista Calixto, Dr. (Depto. de Farmacologia-UFSC); Eduardo Augusto Moreira, Dr. (Depto. de Farmácia-UFPR); Valdir Cechinel Filho, Dr.(UNIVALI) e Inês Maria Costa Brighente, Dra., sendo o primeiro o orientador do trabalho que teve como título: “ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS ESPÉCIES *PHYLLANTHUS SELLOWIANUS*, *PHYLLANTHUS FRATERNUS* E *SIPHOCAMPYLUS VERTICILLATUS*”. Após a apresentação feita pelo candidato, a qual durou cinquenta e cinco minutos, o mesmo foi argüido pela Banca e pelo plenário durante duas horas e quinze minutos, sendo que o trabalho foi considerado aprovado com distinção e louvor, tendo a Banca estipulado um prazo de noventa dias para que a dissertação seja entregue à Coordenadoria do Curso em sua forma definitiva, com as correções sugeridas. Às onze horas e quarenta minutos foi encerrada a sessão e eu, Inês Maria Costa Brighente, secretária “ad-hoc”, lavrei a presente ata que vai por mim, pelos membros da Banca Examinadora e pelo candidato assinada.

Florianópolis, 20 de dezembro de 1996

\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Inês Maria Costa Brighente

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS ESPÉCIES**

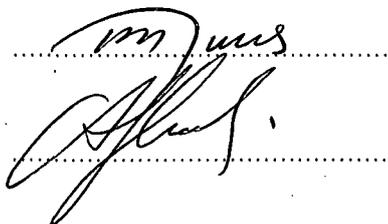
*Phyllanthus sellowianus, Phyllanthus fraternus e*

*Siphocampylus verticillatus*

**OBDULIO GOMES MIGUEL**

Esta tese foi julgada e aprovada no dia 20/12/1996 e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da banca examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes



Coordenador: Prof Dr. Adilson J. Curtius

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rosendo A. Yunes

Orientador

Prof Dr. João B. Calixto

Co-orientador

Prof. Dr. Eduardo A. Moreira

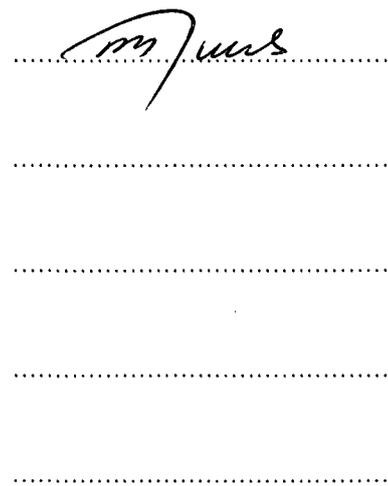
Depto. de Farmácia/UFPr.

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

UNIVALI/ITAJAI

Profª. Dr. Ines M. C. Brighente

Depto. de Química/ UFSC



A Marilis, sempre companheira e amiga.

A Yasmin minha filha,

Pelos longos momentos de separação,  
pelas renúncias, pela compreensão,  
carinho,

dedico.

À memória de meus antepassados, pela  
minha existência, que forneceram toda a  
força e determinação necessárias para  
persistir na luta e concluir mais esta  
etapa, a eles com carinho.

dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer torna-se uma tarefa bastante difícil quando se corre o risco de omitir algum nome, ou de se cometer alguma injustiça em relação a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Assim, desejo expressar minha mais profunda gratidão ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pelo constante apoio, prontidão e amizade, requisitos estes, que sempre marcaram sua orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, o meu especial agradecimento pelo apoio, confiança e estímulo constante que marcaram sua co-orientação neste trabalho, sobretudo no auxílio à interpretação dos dados farmacológicos.

Da mesma forma, agradeço ao Prof. Adair Roberto Soares dos Santos pelo incentivo, amizade, colaboração e sugestões dos dados farmacológicos.

Registro, também, meu profundo reconhecimento ao Dr. Valdir Cechinel Filho, que pacientemente acompanhou o desenrolar deste trabalho, e cuja compreensão e colaboração foram imprescindíveis para sua conclusão.

De forma muito especial, agradeço ao Prof. Dr. Franco D. Monache, pela constante atenção e presteza, além da maneira competente com que sempre conduziu os nossos dados espectrais.

Impossível seria deixar de agradecer ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, cuja colaboração e discussões, durante a realização dos ensaios, foram de inestimável valor para consecução dos objetivos desta etapa.

Não poderia deixar de externar meu sincero agradecimento a Prof.<sup>a</sup> Inês M. Brighente, pelo interesse, preocupação durante esta jornada.

Aos botânicos Dr. Gert Hatschbach, Ronaldo Kummrow e Dr. Olavo Araújo Guimarães pela determinação das espécies, além do constante estímulo e amizade,

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e a Universidade Federal do Paraná. Por nos ter possibilitado a realização do Curso de Pós graduação.

Agradeço, ainda à CAPES, cujo apoio financeiro através de PICD, foi de fundamental importância para que eu frequentasse este curso.

Sou grato também a todos os colegas de curso, em especial ao Niero, ao Jacir, a Marize, ao Guedes e a Tânia pelo incentivo, amizade e companheirismo que marcaram nosso tempo de convivência.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	001
1.1 OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO.....	006
1.2 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DE SISTEMÁTICA.....	007
1.2.1. POSIÇÃO SISTEMÁTICA de <i>Phyllanthus</i> .....	007
2 LITERATURA.....	008
2.1 GENERALIDADES SOBRE A FAMÍLIA EUPHORBIACEA E GÊNERO <i>Phyllanthus</i> .....	008
2.2 DESCRIÇÃO DE <i>Phyllanthus sellowianus</i> Mueller Argoviensis.....	010
2.3 REVISÃO QUÍMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>PHYLLANTHUS</i> .....	011
2.4 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E/OU BIOLÓGICOS REALIZADOS COM ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO.....	018
2.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA CAMPANULACEAE.....	021
2.6 DESCRIÇÃO DE <i>Siphocampylus verticillatus</i> (Cham.) G. Don. Segundo Armando Carlos Cervi.....	021
2.7 POSIÇÃO SISTEMÁTICA DE <i>Siphocampylus</i> Segundo Wagenitz (1964) a classificação ocupa a seguinte posição sistemática.....	023
2.8 REVISÃO SOBRE A QUÍMICA DO GÊNERO <i>Siphocampylus</i> .....	025
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	028
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	028
3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO E SEPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS.....	029
3.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO METANOL BRUTO.....	029
3.2.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANOL BRUTO .....	029
3.2.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS EM 3.2.2.....	030

3.2.4	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO HEXÂNICA 1 <i>Phyllanthus</i> .....	032
3.2.5	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA 2 <i>Phyllanthus</i> .....	034
3.2.6	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA 3. <i>Phyllanthus</i> .....	035
3.2.7	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO HEXÂNICA 1 DE <i>Siphocampylus</i> .....	036
3.2.8	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA 2 DE <i>Siphocampylus</i> .....	037
3.2.9	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA 3 DE <i>Siphocampylus</i> .....	037
3.2.10	SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Siphocampylus</i> .....	038
3.2.11	ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS.....	039
	3.2.11.1 VISUALIZAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS.....	039
3.3	IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUÍNTES ISOLADOS.....	042
3.3.1	IDENTIFICAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 1 .....	042
	3.3.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 1 .....	042
	3.3.1.2 ESPECTRO DE MASSA DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 1 .....	042
	3.3.1.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE <sup>13</sup> C DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 1 .....	044
	3.3.1.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA <sup>1</sup> H DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO 1 .....	045
	3.3.1.5 ESPECTRO DE <sup>1</sup> H RMN DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO ACETILADO 1 .....	045
3.3.2	IDENTIFICAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 2 .....	058
	3.3.2.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO 2 .....	058

3.3.2.2.	ESPECTRO DE MASSA DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO 2.....	058
3.3.2.3	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE $^{13}\text{C}$ DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO 2.....	059
3.3.2.4	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA $^1\text{H}$ DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 2 .....	059
3.3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS ESTERÓIS.....	068
3.3.3.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA GLOCHIDONA .....	068
3.3.3.2	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^1\text{H}$ DA GLOCHIDONA .....	068
3.3.4.	MISTURA DE ESTEROIS DAS FRAÇÕES 69 a 77 <i>Ph.</i> <i>sellowianus</i> .....	072
3.3.4.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA F. 69 a 77 .....	072
3.3.5	MISTURA DE ESTERÓIS DAS FRAÇÕES 25 a 26 De <i>S.</i> <i>verticillatus</i> .....	074
3.3.5.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA F. 25 a 26. ....	074
3.3.6	IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFÓMICA DE <i>S.</i> <i>verticillatus</i> .....	076
3.3.6.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO STIGMASTEROL .....	076
3.3.6.2	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR DE $^1\text{H}$ DO STIGMASTEROL .....	076
3.3.6.3	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$ DO STIGMASTEROL .....	077
3.3.7	IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>S.</i> <i>verticillatus</i> .....	083
3.3.7.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO STIGMASTEROL GLICOSIDEO .....	083
3.3.7.2	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR DE $^1\text{H}$ DO STIGMASTEROL GLICOSÍDEO .....	083
3.3.7.3	ESPECTRO DE RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$ DO STIGMASTEROL GLICOSIDEO .....	084

3.3.8	IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES 3 a 7 DE <i>Ph. sellowianus</i> .....	091
3.3.8.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA XANTOXILINA.....	091
3.3.8.2	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA DA XANTOXILINA .....	091
3.3.8.3	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA XANTOXILINA.....	092
3.3.8.4	ESPECTRO DE MASSA DA XANTOXILINA .....	092
3.3.9	IDENTIFICAÇÃO DOS TANINOS DE <i>Ph. sellowianus</i> .....	099
3.3.9.1	IDENTIFICAÇÃO DO GALATO DE ETILA .....	099
3.3.9.2	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVELHO DO GALATO DE ETILA.....	099
3.3.9.3	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup> H DO GALATO DE ETILA .....	099
3.3.9.4	ESPECTRO DE MASSA DO GALATO DE ETILA.....	099
3.3.9.5	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup> C DO GALATO DE ETILA .....	100
3.3.10	IDENTIFICAÇÃO DO GALATO DE METILA .....	106
3.3.10.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DO GALATO DE METILA.....	106
3.3.10.2	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup> H DO GALATO DE METILA .....	106
3.3.10.3	ESPECTRO DE MASSA DO GALATO DE METILA .....	106
3.3.10.4	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup> C DO GALATO DE METILA .....	104
3.3.11	IDENTIFICAÇÃO DA GERANINA .....	113
3.3.11.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA DA GERANINA.....	113
3.3.11.2	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DA GERANINA .....	113
3.3.11.3	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup> H DA GERANINA .....	113
3.3.11.4	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup> C DA GERANINA.....	114

3.3.12. IDENTIFICAÇÃO DO FUROSINA .....	120
3.3.12.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIAO DO ULTRA VIOLETA DA FUROSINA.....	120
3.3.12.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA FUROSINA.....	120
3.3.12.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>1</sup> H DA FUROSINA .....	120
3.3.12.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup> C DA FUROSINA.....	121
3.3.13. IDENTIFICAÇÃO DA RUTINA .....	127
3.3.13.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA DA RUTINA .....	127
3.3.13.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DA RUTINA .....	127
3.3.13.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup> H DA RUTINA .....	127
3.3.13.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLE DE <sup>13</sup> C DA RUTINA .....	128
3.3.13.5 ESPECTRO DE MASSA DA RUTINA .....	129
3.3.14. IDENTIFICAÇÃO DA QUERCETINA .....	136
3.3.14.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA DA QUERCETINA .....	136
3.3.14.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DA QUERCETINA .....	136
3.3.14.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup> H DA QUERCETINA .....	136
3.3.14.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup> C DA QUERCETINA .....	137
3.3.14.5 ESPECTRO DE MASSA DA QUERCETINA.....	137
3.3.15. IDENTIFICAÇÃO DE HIPOFILANTINA .....	143
3.3.15.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRA VERMELHO DA HIPOFILANTINA .....	143
3.3.15.2 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup> H DA HIPOFILANTINA .....	143
3.3.15.3 ESPECTRO DE MASSA DA HIPOFILANTINA .....	143

3.3.15.4	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^{13}\text{C}$ DA HIPOFILANTINA .....	144
3.3.16	IDENTIFICAÇÃO DA 3' METOXI LUTEOLINA .....	150
3.3.16.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DA ULTRA VIOLETA 3' METOXI LUTEOLINA .....	150
3.3.16.2	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO 3'METOXI LUTEOLINA .....	150
3.3.16.3	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^1\text{H}$ 3'METOXI LUTEOLINA .....	150
3.3.16.4	ESPECTRO DE MASSA DA 3'METOXI LUTEOLINA.....	151
3.3.16.5	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^{13}\text{C}$ DA 3'METOXI LUTEOLINA.....	151
3.4	MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL PARA TESTE DO GRUPO MOLECULAR ATIVO .....	159
3.4.1	METILAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO .....	159
3.4.2	ACETILAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO .....	160
3.4.3	BENZOILAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO .....	161
3.4.3.1	REAÇÃO COM CLORETO DE BENZOÍLA .....	161
3.4.3.2	REAÇÃO COM CLORETO DE p-CORO BENZOÍLA .. .....	163
3.4.3.3	REAÇÃO COM CLORETO DE p-NITRO BENZOÍLA .. .....	164
3.4.3.4	REAÇÃO COM CLORETO DE o-ACETIL BENZOÍLA .. .....	164
3.4.3.5	REAÇÃO COM CLORETO DE p-TOLUÍLA .....	165
3.4.3.6	REAÇÃO COM CLORETO DE 4-BROMO .....	166
3.4.3.7	REAÇÃO COM CLORETO DE o-TOLUÍLA .....	166
4	ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO E DOS COMPOSTOS PURIFICADOS .....	168
4.1	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA .....	168

4.1.1	TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO. ....	168
4.1.2	DOR INDUZIDA PELA FORMALINA.....	169
4.1.3	TESTE DO TAIL-FLICK. ....	170
4.1.4	TESTE DA PLACA-QUENTE. ....	170
4.1.5	DOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA. ....	171
5	RESULTADOS. ....	172
5.1	<i>Siphocampylus verticillatus</i> .....	172
5.1.1	DOR INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO. ....	172
5.1.2	DOR INDUZIDA PELA FORMALINA. ....	172
5.1.3	DOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA. ....	173
5.1.4	EFEITO DO EXTRATO TOTAL E DO ALCALÓIDE DA <i>S. verticillatus</i> NOS TESTES DO TAIL-FLICK E PLACA QUENTE.....	173
5.1.5	ESTUDO DO POSSÍVEL MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO TOTAL E DOS COMPOSTOS OBTIDOS DA <i>S. verticillatus</i> .....	174
5.1.5.1	EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM A NALOXONA .....	174
5.1.5.2	EFEITO DO PRÉTRATAMENTO COM L-ARGININA... ..	174
5.1.5.3	INFLUÊNCIA DA ADRENALECTOMIA. ....	175
5.2	<i>Phyllanthus sellowianus</i> e <i>Phyllanthus fraternus</i>	
5.2.1	DOR INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO. ....	175
5.2.2	DOR INDUZIDA PELA FORMALINA.....	176
5.2.3	DOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA .....	177
6	CONCLUSÃO .....	202
6.1	ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE <i>Siphocampylus</i> . ....	202
6.2	ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE <i>Phyllanthus</i> . ....	203
6.3	COMPOSTOS IDENTIFICADOS. ....	204
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	206

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Investigação química preliminar de folhas e caule de 2 espécies de <i>Siphocampylus</i> .....	026
<b>Tabela 3.</b>	Dados de RMN de <sup>13</sup> C para stigmasterol glicosídeo.....	084
<b>Tabela 4.</b>	Tempo do efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico da <i>S. verticillatus</i> administrada via intraperitoneal ou via oral contra as contrações abdominais induzida pelo ácido acético em camundongos.....	175
<b>Tabela 5.</b>	Efeito dose-dependente do extrato hidroalcoólico da <i>S. verticillatus</i> sobre as contrações abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	176
<b>Tabela 6.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pelo stigmasterol e β-sitosterol administrados por via intraperitoneal ou por via oral sobre as contrações abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em amundongos.....	180
<b>Tabela 7.</b>	Efeito dose-dependente do extrato hidroalcoólico da <i>S. verticillatus</i> em relação a primeira (0 a 5 min) e ou segunda fases (15 a 30 min) e edema induzido pela formalina em camundongos.....	178
<b>Table 8.</b>	Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>S. verticillatus</i> sobre a nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	179
<b>Tabela 9.</b>	Efeito do pretamento da naloxona (i.p.) sobre a antinocicepção causada pela morfina (s.c.) ou EH da <i>S. verticillatus</i> (i.p.) contra as contrações abdominais induzida pelo ácido acético em camundongos.....	180
<b>Tabela 10.</b>	Efeito do L-arginina (i.p.) on L-NOARG (i.p.), morfina (s.c.) ou HE da <i>S. verticillatus</i> (i.p.)-induced antinociception agaisnt formalin-induced pain..	181
<b>Tabela 11.</b>	Efeito do acetoaminofeno, idometacina e da aspirina administrados por via intraperitoneal em relação à primeira (0 - 5 min) e à segunda fase (15 - 30 min) da dor e sobre o edema de pata, induzidos pela injeção de formalina em camundongos. ( <i>Phyllanthus sellowianus</i> e <i>Phyllantus fraternus</i> ).....	182

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Aspectos gerais do local de coleta de <i>Phyllanthus sellowianus</i> nas corredeiras do Rio Itajaí-Açu, Município de Apiúna, Estado de Santa Catarina.....	009
<b>Figura 2.</b>	Aspectos gerais e detalhes da flôr e inflorescência de <i>Siphocampylus verticillatus</i> .....	024
<b>Figura 3.</b>	Esquema do início de extração dos princípios ativos (líquido/líquido).....	031
<b>Figura 4.</b>	Esquema de extração(sólido/líquido).....	033
<b>Figura 5.</b>	Cromatografia em camada delgada dos alcalóides de <i>Siphocampylus verticillatus</i> Cham. 1. N-Metil-2(R)-[2-(S)-hidroxipentil]-6-(S)-[2(R)-hidroxipentil-piperidina cloridrato 2. N-Metil-2(R)-[2-(S)-hidroxipropil]-6-(S)-[2(R)-hidroxipentil-piperidina-cloridrato 3. Fração Metanol..... 4. Fração CHCl <sub>3</sub> .....	040
<b>Figura 6.</b>	Cromatografia em camada delgada dos taninos separados de <i>Phyllanthus</i> l. Geranina, 2. Furosina, 3. Rutina, 4. 3'-metoxi luteolina, 5. Etil gálico, 6. Metil gálico.....	041
<b>Figura 7.</b>	Espectro de Absorção no Infra vermelho do alcalóide piperidínico 1 (KBr).....	048
<b>Figura 8.</b>	Espectro de Massa do Alcalóide piperidínico 1 (ID).....	049
<b>Figura 9.</b>	Fragmentação de alguns íons principais do alcalóide piperidínico 1.....	050
<b>Figura 10.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do alcalóide piperidínico 1 (CD <sub>3</sub> OD).....	051
<b>Figura 11.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do alcalóide piperidínico 1 (CD <sub>3</sub> OD).....	052
<b>Figura 12.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do alcalóide piperidínico acetilado(CD <sub>3</sub> OD).....	053
<b>Figura 13.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear COSY ( <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H) do alcalóide piperidínico acetilado 1 (CD <sub>3</sub> OD).....	054
<b>Figura 14.</b>	Espectro de irradiação de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do alcalóide piperidínico acetilado 1 (CD <sub>3</sub> OD).....	055
<b>Figura 15.</b>	Espectro de irradiação de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do alcalóide piperidínico acetilado 1 (CD <sub>3</sub> OD).....	056
<b>Figura 16.</b>	Espectro do ponto de fusão do alcalóide piperidínico 1.....	057
<b>Figura 17.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho do alcalóide piperidínico 2.....	061
<b>Figura 18.</b>	Espectro de massa do alcalóide piperidínico 2 (ID).....	062

<b>Figura 19.</b>	Fragmentação de alguns íons principais do alcalóide piperidínico 2.....	063
<b>Figura 20.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do alcalóide piperidínico 2 (MeOD).....	064
<b>Figura 21.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do alcalóide piperidínico 2 (DEPT), (MeOD) .....	065
<b>Figura 22.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do alcalóide piperidínico 2 (MeOD).....	066
<b>Figura 23.</b>	Espectro do ponto de fusão do alcalóide piperidínico 2.....	067
<b>Figura 24.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho da glochidona (CDCl <sub>3</sub> ).....	070
<b>Figura 25.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H da glochidona.....	071
<b>Figura 26.</b>	Cromatograma das frações 69 a 77 de <i>P. sellowianus</i> .....	073
<b>Figura 27.</b>	Cromatograma das frações 25 a 26 de <i>S. verticillatus</i> .....	075
<b>Figura 28.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho do stigmasterol .....	078
<b>Figura 29.</b>	Espectro de ressonância nuclear de <sup>1</sup> H do stigmasterol.....	079
<b>Figura 30.</b>	Espectro de ressonância nuclear de <sup>1</sup> H do stigmasterol ampliado.....	080
<b>Figura 31.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do stigmasterol.....	081
<b>Figura 32.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do stigmasterol .....	082
<b>Figura 33.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho do stigmasterol glicosídeo.....	086
<b>Figura 34.</b>	Espectro de ressonância nuclear de <sup>1</sup> H do stigmasterol glicosídeo.....	087
<b>Figura 35.</b>	Espectro de ressonância nuclear de <sup>1</sup> H do stigmasterol glicosídeo ampliado.....	088
<b>Figura 36.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do stigmasterol glicosídeo.....	089
<b>Figura 37.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do stigmasterol glicosídeo.....	090
<b>Figura 38.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho da xantoxilina.....	093
<b>Figura 39.</b>	Espectro de absorção no ultra violeta da xantoxilina.....	094
<b>Figura 40.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da xantoxilina.....	095
<b>Figura 41.</b>	Espectro de massa da xantoxilina.....	096
<b>Figura 42.</b>	Fragmentação de alguns íons principais da xantoxilina.....	097
<b>Figura 43.</b>	Cromatograma da xantoxilina, da fração 3 a 7 de <i>P. sellowianus</i> .....	098
<b>Figura 44.</b>	Espectro de absorção no infra-vermelho do galato de etila.....	101
<b>Figura 45.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do galato de etila.....	102
<b>Figura 46.</b>	Espectro de massa do galato de etila.....	103
<b>Figura 47.</b>	Fragmentação de alguns íons principais do galato de etila.....	104
<b>Figura 48.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do galato de etila (Acetona).....	105
<b>Figura 49.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho do galato de metila.....	108
<b>Figura 50.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H do galato de metila (Acetona).....	109

<b>Figura 51.</b>	Espectro de massa do galato de metila.....	110
<b>Figura 52.</b>	Fragmentação de alguns íons principais do galato de metila.....	111
<b>Figura 53.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C do galato de metila (Acetona).....	112
<b>Figura 54.</b>	Espectro de absorção na região do ultra violeta da geranina.....	116
<b>Figura 55.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho da geranina.....	117
<b>Figura 56.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da geranina (Acetona).....	118
<b>Figura 57.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C da Geranina (Acetona).....	119
<b>Figura 58.</b>	Espectro de absorção na região do ultra violeta da furosina.....	123
<b>Figura 59.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho da furosina.....	124
<b>Figura 60.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da furosina (Acetona).....	125
<b>Figura 61.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C da furosina (Acetona).....	126
<b>Figura 62.</b>	Espectro de absorção na região do ultra violeta da rutina.....	130
<b>Figura 63.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho da rutina.....	131
<b>Figura 64.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da rutina (MeOD).....	132
<b>Figura 65.</b>	Espectro de ressonância magnética de <sup>13</sup> C da rutina (MeOD).....	133
<b>Figura 66.</b>	Espectro de massa da rutina.....	134
<b>Figura 67.</b>	Fragmentação de alguns íons principais da rutina.....	135
<b>Figura 68.</b>	Espectro de absorção na região do ultra violeta da quercetina.....	138
<b>Figura 69.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho da quercetina.....	139
<b>Figura 70.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da quercetina.....	140
<b>Figura 71.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C da quercetina.....	141
<b>Figura 72.</b>	Espectro de massa da quercetina.....	142
<b>Figura 73.</b>	Espectro de absorção na região do infra vermelho da hipofilantina.....	145
<b>Figura 74.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da hipofilantina.....	146
<b>Figura 75.</b>	Espectro de massa da hipofilantina.....	147
<b>Figura 76.</b>	Espectro de ressonância magnética de <sup>13</sup> C da hipofilantina.....	148
<b>Figura 77.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C da hipofilantina (DEPT).....	149
<b>Figura 78.</b>	Espectro de absorção na região do ultra violeta de 3' metoxi-luteolina.....	153
<b>Figura 79.</b>	Espectro de absorção no infra vermelho de 3' metoxi-luteolina.....	154
<b>Figura 80.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H de 3' metoxi-luteolina.....	155
<b>Figura 81.</b>	Espectro de massa da 3' metoxi-luteolina.....	156
<b>Figura 82.</b>	Fragmentação de alguns íons principais da 3' metoxi luteolina.....	157
<b>Figura 83.</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C da 3'' metoxi-luteolina.....	158
<b>Figura 84.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pelo alcalóide piperidínico 1 administrado por via intraperitoneal (A) ou oral (B) em relação as contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, *P< 0.05; **P< 0.01.....	183

<b>Figura 85.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pelo alcalóide piperidínico 1 administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou oral (painel inferior) em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata ( C ) induzidos pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, **P<0.01.....	184
<b>Figura 86.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pelo alcalóide piperidínico 1 administrados por via intraperitoneal sobre a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente controle**P<0.01.....	185
<b>Figura 87.</b>	Efeito do tratamento dos animais com morfina e com o alcalóide piperidínico 1 sobre a dor induzida no testes da Placa quente (A) e Tail-flick (B) em camundongos. Cada grupo representa a média 5 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, **P< 0.01. ....	186
<b>Figura 88.</b>	Influência do tratamento com naloxona sobre a analgesia causada pela administração da morfina e ou do alcalóide piperidínico 1 sobre a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. difere significativamente do controle, **P< 001.....	187
<b>Figura 89.</b>	Influência do pré tratamento com morfina sobre a analgesia causada pela administração da morfina e ou do alcalóide piperidínico 1 sobre a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle,**P<0.01.....	188
<b>Figura 90.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pelos compostos obtidos por modificações do alcalóide piperidínico 1, administrado por via intraperitoneal em relação a segunda fase da dor induzida pela formalina.....	189
<b>Figura 91.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pela geranina (painel superior ) e pela furosina (painel inferior ) isolados das espécies de <i>Phyllanthus sellowianus</i> e <i>Phyllanthus fraternus</i> , administrado por via intraperitoneal em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata ( C ) induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, **P<0.01.....	190
<b>Figura 92.</b>	Efeito analgésico dose dependente causado pela rutina isolado das espécies de <i>Phyllanthus sellowianus</i> e <i>Phyllanthus fraternus</i> administrado por via intraperitoneal (painel superior ) ou oral (painel inferior ) em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata ( C ) induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle , **P<0.01.....	191

- Figura 93.** Efeito analgésico dose dependente causado pelo galato de etila (painel superior) e pela quercetina (painel superior) isolado das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus* administrado por via intraperitoneal em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle \*\*P<0.01.....192
- Figura 94.** Efeito analgésico dose dependente causada pela quercetina (A), geranina (B) e pela rutina (C) isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus* administrado por via intraperitoneal em relação a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*P<0.05; \*\*P<0.01.....193
- Figura 95.** Efeito analgésico dose dependente causada pela dipirona (A), indometacina (B) e pela morfina (C) em relação a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*P<0.05; \*\*P<0.01.....194
- Figura 96.** Efeito analgésico dose dependente causado pela quercetina (painel superior) e pela rutina (painel inferior) isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus*, administrado por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* P<0.01. ....195
- Figura 97.** Efeito analgésico dose dependente causado pela geranina (painel superior) e pela furosina (painel inferior) isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus*, administrado por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\*P<0.01.....196
- Figura 98.** Efeito do tratamento dos animais com morfina e com o extrato de *S. verticillatus* sobre a dor induzida no testes da Placa quente (A) e Tail-flick (B) em camundongos. Cada grupo representa a média 5 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\*P<0.01.....197
- Figura 99.** Influência da adrenalectomia dos animais sobre a absorcividade antinocepsiva do extrato hidroalcoólico obtido de *S. verticillatus*. ....198

## RESUMO

Neste trabalho foram estudadas plantas com efeito analgésico de interesse farmacológico. Iniciamos os nossos estudos com as espécies de *Phyllanthus sellowianus* - *Phyllanthus fraternus* - em seguida trabalhamos com *Siphocampylus verticillatus*, utilizamos como metodologia de separação dos compostos ativos, a maceração das partes aéreas em metanol 95 %, na sequência fracionamos o extrato por um processo de extração por solventes imiscíveis de diferentes polaridades, possibilitando a separação dos compostos aqui citados. As espécies de *Phyllanthus sellowianus* - *Phyllanthus fraternus* viabilizaram o isolamento da Glochidona, glochidonol, sitosterol, stigmasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, xantoxilina, éster etil gálico, quercetina, furosina, rutina, geranina, hipofilantina, éster metil gálico, na espécie *Siphocampylus verticillatus* foram identificados campesterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, stigmasterol glicosídeo, 3'-metoxi luteolina e dois novos alcalóides piperidínicos, N-metil-2(r)-[2(s)hidroxipentil]-6(s)-[2(r)-hidroxipentil]-piperidina clorídrica e N-metil-2(2-hidroxibutil)-6-(2-hidroxipetil)-piperidina clorídrica.

Os testes farmacológicos mostraram que o extrato e os alcalóides de *Siphocampylus verticillatus* administrado por via intraperitoneal ou por via oral, inibiram de forma dose-dependente, as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético. O tratamento dos animais com o alcalóide, causaram significativa inibição da primeira e da segunda fase da dor, induzida pela injeção intraplantar de formalina, sendo contudo, mais efetivo em relação a segunda fase desse modelo. Por outro lado, o alcalóide nas mesmas doses foi efetivo em inibir a dor, e não causou redução significativa do edema da pata de camundongo associado a segunda fase da dor causada pela formalina. O alcalóide causou inibição dose-dependente da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. No entanto, o alcalóide, não apresentou efeito analgésico significativo nos testes da "placa-quente e tail-flick", enquanto que a morfina causou efeito analgésico.

O pré-tratamento dos animais com naloxona, antagonista dos receptores opióides, reverteu significativamente tanto a analgesia induzida pela morfina quanto o alcalóide,

apresentaram seus efeitos antinociceptivos significativamente reduzidos nos animais pré-tratados durante 7 dias com uma dose diária de morfina .

Os resultados indicam que o extrato e o alcalóide da espécie de *Siphocampylus verticillatus* apresentaram pronunciada ação analgésica, tanto por via oral como intra peritoneal, nos modelos de dor de origem neurogênica e inflamatória, cujo mecanismo de ação pareceu envolver em parte, ativação dos sistemas opióides e a via da L-arginina-óxido nítrico.

Os resultados das substâncias isoladas das espécies *Phyllanthus sellowianus* - *Phyllanthus fraternus* confirmam os estudos anteriores, demonstrando que possuem substâncias de natureza química diferente, incluindo alguns taninos, esteróis, flavonóides com potente ação analgésica em diferentes modelos de dor de origem neurogênica e inflamatória em camundongos.

## ABSTRACT

### Genus *Phyllanthus*

The aim of the present study was to evaluate the analgesic effect of the two compounds isolated from the stems, leaves of several species of plants belonging to the genus *Phyllanthus* (*P. sellowianus* and *P. fraternus*) in various models of nociception in mice. The intraperitoneal injection of quercetin, geraniin, rutin or furosin (0.3 - 60 mg/kg) caused graded inhibition of the abdominal constrictions induced by acetic acid (0.6%), with mean ID<sub>50</sub> values of 4.3 (3.3 - 5.7), 19.0 (10.9 - 33.1), 1.3 (0.8 - 2.1) and 12.9 (7.1 - 23.4) mg/kg and the percentage of maximal inhibition (MI) of 93 ± 3, 5 ± 4, 88 ± 4 and 61 ± 4, respectively.

Quercetin, geraniin and rutin given orally (25 - 200 mg/kg) caused significant antinociception, but they were less potent. In the formalin test, quercetin, geraniin, rutin, ethyl galate and furosin (1 - 60 mg.kg, i.p.) inhibited both the early and the late phase of the formalin-induced licking, these compounds being more potent in relation to the late phase of the formalin response. The mean ID<sub>50</sub> values for the late phase were: 14.8 (7.3 - 30.0), 3.5 (2.9 - 4.3), 4.6 (3.5 - 60), 3.9 (3.1 - 4.0) and 24.9 (20.2 - 30.5) mg/kg, and the MI were: 87 ± 8, 98 ± 1, 82 ± 6, 99 ± 1 and 66 ± 5 %, respectively. All compounds failed to affect formalin-induced paw edema. In contrast, aspirin, acetaminophen and indomethacin (1 - 100 mg/kg, i.p) attenuated only the late phase of the formalin-induced licking, with mean ID<sub>50</sub> values of 3.3 (2.7 - 4.0) mg/kg and MI of 74 ± 4%. These results indicate that quercetin, geraniin, rutin, ethyl galate or furosin are responsible for much of the antinociceptive effect against neurogenic pain observed previously for the plants belonging to the genus *Phyllanthus*.

### Genus *Siphocampylus*

The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of an alkaloid isolated from the methanolic extract of *Siphocampylus verticillatus*. The alkaloid was identified on the basis of X-ray analysis as being the (N-methyl-2(R)-(2(S)-hydroxypentyl)-S)-(2(R)-hydroxypentyl)-piperidine hydrochloride dehydrate). When given intraperitoneally (1 - 100

mg/kg, i.p.) or orally (50 - 300 mg/kg), the alkaloid produced graded and significant inhibition of the abdominal constrictions induced by acetic acid (0.6%), with mean ID<sub>50</sub> (i.e. dose necessary to reduce by 50 % relative to control response value) of 61.7 (51.2 - 74.3) and 136.4 (106.2 - 175.2) mg/kg and the percentage of maximal inhibition (MI) of 57 ± 5 and 61 ± 4, respectively. When tested in formalin-induced licking, the alkaloid (10 - 60 mg/kg, i.p. or 25 - 200 mg/kg, p.o.) caused similar inhibition of both phases of formalin-induced pain. The mean ID<sub>50</sub> values for the early and the late phase were > 60 and > 200, 14.1 (10.8 - 18.4) and 66.5 (51.3 - 86.3), with MI of 31 ± 6, 34 ± 7, 88 ± 6 and 88 ± 2 %, respectively. However, the alkaloid failed to affect formalin-induced paw oedema, as well as the response to radiant heat in tail-flick and hot-plate tests, while morphine (10 mg/kg, s.c.) produced a marked increase in the pain latency in both tests. In addition, the analgesic effects of both morphine and the alkaloid were fully reversed by previous treatment of animals with naloxone (5 mg/kg, i.p.). The antinociceptive effect caused by the morphine (5 mg/kg, s.c.), and also the effects induced by the alkaloid (30 mg/kg, i.p.), were inhibited after pretreatment of animals with morphine (5 mg/kg, s.c. once a day, for seven consecutive days). In addition, the alkaloid (10 - 60 mg/kg, i.p.) caused marked and dose-related inhibition of capsaicin-induced licking, with mean ID<sub>50</sub> value of 30.4 (18.7 - 49.3) mg/kg and MI of 53 ± 4%. These results indicate that the alkaloid isolated from *Siphocampylus verticillatus* exhibit systemic antinociceptive properties against neurogenic and inflammatory pain. In addition its effect seem to be partially modulated by the opioid system.

### Chemical composition

The proposed structures were established by spectra analysis and comparisons among closely related compounds. We have isolated and identified: *Phyllanthus sellowianus* (Clochidone, glochidonol, stigmasterol, campesterol, β-sitosterol, α-amirin, β-amirin, xanthoxilin, ethyl galate, quercetin, furosin, rutin and geraniin), *Phyllanthus fraternus* (hiphofilantyn, methyl galate, geraniin, rutin, and furosin), *Siphocampylus verticillatus* (Campesterol, β-sitosterol, stigmasterol, α-amirin, β-amirin, stigmasterol glicosideo, 3'methoxy luteolin and new two alkaloid piperidine, [N-methyl-2(2-hydroxybutyl)-6-(2-hydroxypentil)piperidine hydrochloride] and [N-methyl-2(2-hydroxypentil)-6-(2-hydroxypentil)peridine hydrochoride].

## I. INTRODUÇÃO

Em todas as partes do mundo onde tem se desenvolvido as diversas civilizações humanas temos observado a estreita relação do homem com os vegetais que o rodeiam, tendo influenciado e determinado grandemente sua maneira de viver, marcando suas, formas de alimentação, vestimenta e cura de suas enfermidades. Tal relação vem perpassando os tempos desde a mais remota antigüidade. Provavelmente o uso das plantas no tratamento de diversas enfermidades é inato tanto no homem como nos animais, a aplicação empírica destas adveio de sucessivas observações que se propuseram ao então mundo incognocível das plantas medicinais. Diante desta perspectiva podemos vislumbrar: Estudos realizados em chimpanzés na Tanzânia, verificaram que esses primatas deglutem em jejum certas plantas que os livram de parasitas intestinais ( Gottlieb e col. 1993)<sup>63</sup>. Os primeiros escritos dos chineses, indianos e egípcios revelam que foram utilizados diversas classes de vegetais também por suas propriedades medicinais verdadeiras ou supostas. Os diversos povos primitivos de todo mundo, incluindo as tribos indígenas dos Estados Unidos da América, sempre utilizaram diversas classes de plantas para a cura de diversas enfermidades. Hipócrates (460 - 361 AC) considerado pai da medicina, catalogou e empregou centenas de drogas de origem vegetal bem como Teofrasto (225 AC) e Discóredes (20 DC), que escreveram vários volumes sobre vegetais usados na terapêutica.

Atualmente se estima que existe no mundo cerca de 500.000 espécies vegetais das quais 60 a 70 % delas se encontram na América Latina, principalmente nas florestas tropicais úmida onde poderia se afirmar que de 10 a 12 % devem apresentar atividade biológica, constituindo importante fonte de fármacos ( Estrella, 1993)<sup>49</sup>. No Brasil encontram-se uma das floras mais ricas do mundo, contém cerca de 120.000 espécies vegetais das quais aproximadamente 500 foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico (Wagner & Wolff, 1977)<sup>136</sup>.

As plantas medicinais constituíram durante séculos a base da terapêutica (Schenkel et al. 1988)<sup>116</sup>. Já em 1819 o primeiro laboratório químico criado no Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, para a análise de insumos e produtos vinha atender necessidades geradas na criação do primeiro Jardim Botânico. Com o avanço tecnológico a partir do Sec. XIX, passou-se a

extrair e modificar as substâncias ativas, algumas vezes potencializando a atividade das mesmas (Neves, 1982)<sup>95</sup>. Considerando a variabilidade botânica e complexidade química, convém alertar os possíveis efeitos colaterais e tóxicos das plantas e seus produtos naturais, bioativos extraídos das mesmas. O sistema nacional de informações tóxicas farmacológicas (SINITOX) apresenta dados alarmantes quanto ao número de vítimas de intoxicações pelo uso indevido de plantas e medicamentos. Dentre os 3960 casos de intoxicação e envenenamento humanos adulto notificados a SINITOX no período de 1987 a 1991, provocados pelo uso de plantas medicinais, demonstra um percentual de vítimas: homens adultos (53,9%), mulheres adultas (43,94%) e categoria ignorada (2,12%), dos quais 3447 obtiveram cura, 31 sofreram óbito e 482 foram ignorados, somando aos 1844 casos de intoxicação e envenenamento ocorridos neste mesmo período em crianças de 1 - 5 anos de idade.

Tais recorrências nos empõem a dirigir esforços na análise científica das plantas, afim de extrair as substâncias ditas naturais, consideradas substâncias ativas oriundas de vegetais. Afim de submetê-las a testes farmacológicos e, possivelmente, por meio de síntese química otimiza-las tornando-as mais potentes e menos tóxicas, levando ao caminho da tecnologia industrial de produção de medicamentos, impondo parâmetros de qualidade, validação de métodos, e ensaios de segurança dos mesmos.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta que no ano 2020 a população chegará a 7,5 bilhões de pessoas. Destas cerca de 75% viverão em países em desenvolvimento, os quais consomem atualmente cerca de 15% do mercado total de medicamentos, o que impõe o desenvolvimento de novas tecnologias química a partir de plantas medicinais.

O consumo mundial de medicamentos ascendeu em 1990 cerca de 173 bilhões de dólares e a participação da América Latina foi somente de 8,8 milhões, significando cerca de 5% do consumo mundial, sendo que em 1980 o consumo da América Latina representava cerca de 8% do total mundial (Estrella, 1993)<sup>49</sup>. Estas cifras indicam que o consumo de medicamentos nos países em desenvolvimento vem decrescendo em proporção a deterioração da nossa economia. No Brasil o consumo de medicamento como percentagem do PIB diminuiu de 0,9 a 0,7% entre 1975 a 1990 e consumo percapito de US \$ 12,5 a \$ 10,5

(valores de 1980)<sup>6, 61</sup>. Frente às dificuldades encontradas, a Organização Mundial da Saúde selecionou 252 fármacos básicos dos quais 48,9% são obtidos por síntese, 11,1% são de origem vegetal, 9,1% de origem mineral, 8,7 % de origem animal e 6,4% de origem microbiana, restando 9,5 % para os fármacos obtidos por síntese (Korolkovas, 1989)<sup>77</sup>.

Estima-se que 50% da população da América Latina tem pouco ou nenhum acesso a medicamentos, o que implica em um sistema de Saúde ineficiente. As plantas e seus derivados representam cerca de 25 % dos 173 bilhões Dólares dos fármacos consumidos porém o Brasil importa muitos destes fármacos entre eles os que compõem a relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME), como Glicosídeos, cardiotônicos, digoxine, deslanósideo e tricolchicosideo.

A química de produtos naturais aliada a farmacologia, representam um importante fator em favor da autonomia nacional para desenvolver tecnologia de ponta na produção de fármacos. As plantas compõem enorme arsenal terapêutico já viabilizado cientificamente pelo estudo sistematizado de diversas famílias botânicas. Cabe aqui contarmos algumas espécies que em muito motivam esta pesquisa.

O gênero *Phyllanthus* pertence à família *Euphorbiaceae* e possui uma representação significativa no Brasil. Esta família engloba cerca de 8.000 espécies<sup>66</sup>, distribuídas em aproximadamente 300 gêneros. Este grupo de plantas é constituído de ervas, sub arbustos, trepadeiras e árvores.

Pio Correia (1931)<sup>32</sup> não considera quebra -pedra e erva pombinha como sinônimos, afirmando que as espécies *Oenanthe phellandrium* Lam., *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., *Saxifraga granulata* L., e *Silaus pratensis* Bess., são os quebra - pedras e como erva - pombinha, *Phyllanthus acutifolius* Spreng., *Phyllanthus diffusus* Klotz., *Phyllanthus lathyroides* Muell. Arg., *Phyllanthus limobergii* Muell. Arg., e *Phyllanthus niruri* (L) Muell. Arg..

Entre as *Euphorbiaceae* utilizadas na medicina popular destacam-se os quebra-pedras, pertencentes ao gênero *Phyllanthus*, conhecidos popularmente como erva pombinha, arrebenta -pedras, sarandi branco e saxifraga. São utilizadas na medicina popular como diuréticas, litolíticas, eupépticas, aperientes, também possui em indicação uso no tratamento de cistites, cólicas renais, enfermidades crônicas da bexiga, hidropisia e em

distúrbios da próstata. As folhas e sementes são usadas como medicamento específico contra diabetes<sup>35, 53, 100, 101, 119</sup>

Segundo Cruz (1965)<sup>39</sup>, quebra-pedra é um poderoso diurético e eliminador de ácido úrico. É usado pela medicina popular com muita confiança para combater as afecções do fígado, icterícia, diabete, cólica dos rins, moléstia da bexiga e na retenção urinária. Estudos realizados com espécies do gênero, mostraram a utilização de infusões dos ramos e raízes jovens destas plantas, no tratamento da asma brônquica, inflamações diabéticas e icterícia<sup>8, 20, 27, 34,79</sup>, e que alguns princípios inibem “in vivo”, a replicação do vírus da hepatite B em marmota *Marmota monax*<sup>18</sup>, além de possuir atividade sob antígenos de superfície do vírus da hepatite B e notadamente a ocorrência de inibição do HIV-RT, sendo que, o agente inibidor foi determinado como sendo o ácido repandusínico<sup>55, 131</sup>.

No Brasil, inúmeros vegetais são empregados como fonte alternativa de medicamentos. Na medicina popular várias espécies que pertencem a família das Euphorbiaceae, são empregadas com o propósito de facilitar a remoção de cálculos renais ou biliares. Destacam-se entre elas as espécies do gênero *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., *Phyllanthus tenellus* R., *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., *Phyllanthus diffusus* Klotz., *Phyllanthus acutifolius* Spreng. e *Phyllanthus brasiliensis* Muell. Arg.<sup>8, 32, 105, 117, 124</sup>. A *Sebastiania schottiana* da família Euphorbiaceae foi estudada por Calixto et al., (1986)<sup>22</sup> onde determinou-se a existência de efeito anti-espasmódico sobre a musculatura lisa nos extratos etéreo e clorofórmio. O extrato etéreo foi estudado detalhadamente por Miguel, (1987)<sup>92</sup> onde foram determinados diferentes diterpenos e esteróis: glutinol, alfa e beta amirina, stigmasterol e sitosterol além de 2-hidróxi-4,6-dimetóxi-acetofenona, que apresentou atividade anti-espasmódica (Calixto et al., 1990)<sup>21</sup>.

A análise química das espécies do gênero, incluindo o *Phyllanthus niruri* (L.) Muell. Arg., revelou a existência de alcalóides (securina, dehidrosecurina) flavonóides (quercetina, astragalina, quercitrina, isoquercitrina e rutina)<sup>33, 36, 49, 53, 54</sup>, lignanas (filantina<sup>13, 57, 78, 105, 106, 138</sup>, hipofilantina<sup>13, 57, 78, 104, 105, 112, 124, 138</sup>, filtetralina<sup>6, 58, 78, 124, 138</sup>, nirantina<sup>1</sup>, lintetralina<sup>13, 58, 138</sup>, nirtetralina<sup>119, 57, 138</sup> e filtetralina<sup>119, 58, 78, 124, 138</sup>

Analisando os trabalhos publicados, parece-nos que continua indefinido, quais substâncias químicas, são responsáveis pelas supostas propriedades que atuam nos cálculos

urinários de extratos de *Phyllanthus*. Segundo Bacchi (1983)<sup>9</sup>, é provável que a ação diurética de *Phyllanthus tenellus* Roxb., se deva, pelo menos em parte, a presença de ácido gálico, uma vez que Filomeni (1937)<sup>51, 52</sup> comprovou a ação diurética de ácido gálico em coelhos, apesar de Araújo (1929)<sup>7</sup> contestar a validade do uso de coelhos para testes de diurese.

O gênero *Siphocampylus* pertence a família campanulaceae, que apresenta grande interesse por compor varias espécies medicinais dentre estas destacam-se as lobelias. A *Lobelia inflata*, N.F. possui diversos alcalóides piperidínicos de onde provém a  $\alpha$ -lobelina que caracterizam-se por serem utilizadas na forma de cloridrato e sulfato, apresentam se como substancias cristalinas brancas, facilmente solúveis na água. A  $\alpha$ -lobelina possui ação estimulante respiratório empregado na terapêutica de recém natos, no socorro de acidentes ocorridos durante anestesia, nos casos de envenenamento e entre outros possui importante papel na profilaxia do hábito tabagista, qual utilizada por via oral, promove uma influência negativa entre a nicotina e a  $\alpha$ -lobelina controlando o hábito do tabagista<sup>75</sup>.

Na botânica sistemática do gênero *Siphocampylus*, pertencente a sub família Lobeloidea Schonland., que apresentam características de muitas plantas tropicais produtoras de látex, seus órgãos são ricos em canais lactíferos, sabendo-se que os ovinos, bovinos e eqüinos não comem estas plantas. Algumas espécies de *Siphocampylus* são cultivadas em Santa Catarina como ornamentais exibindo belas flores coloridas de vermelho, rosa, purpura, amarelo, alaranjado outras são bicolores, de vermelho com limbo amarelo (*S. betulaefolius*) e as vezes, de vermelho com manchas amarelas (*S. fimbriatus*). Sobre sua toxicidade descreve F.C. Hoehme (1939)<sup>129</sup> que a presença de maior ou menor quantidade de látex nos órgãos vegetativos, constitui um elemento para avaliar a sua maior ou menor toxicidez.

Segundo Wimmer (1968)<sup>138</sup> a sub família compõem-se de 29 gêneros, somando 1208 espécies, ocorrendo em todos os cinco continentes.

Mc Vaugh<sup>91</sup> indicou que a metade das espécies desta sub família ocorrem na América do Sul, neste continente os três maiores gêneros são *Burmeistera* Triana., *Centropogon* Prest., e *Siphocampylus* Pohl., somando juntos 530 espécies.

## 1.1 OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Ao consultar a literatura científica especializada, constatou-se a ocorrência de grande interesse na busca de analgésicos específicos, com menor efeito colateral. Tal preocupação justifica-se pela ocorrência de 8.000.000 de Brasileiros que necessitam de alternativas no tratamento de cálculos renais.

Isto serviu de estímulo inicial para desenvolver o trabalho de investigação aqui proposto. Desta forma, são objetivos do presente trabalho:

1. O isolamento de constituintes químicos presentes nos extratos das duas espécies em estudo, *Phyllanthus sellowianus*, *P. fraternus* e *Siphocampylus verticillatus*, através do desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas e da otimização de técnicas já existentes.

2. Realização de testes biológicos e farmacológicos com os extratos e compostos puros obtidos, para a identificação dos componentes responsáveis pela(s) atividade(s) encontradas(s).

3. Determinação da estrutura química dos compostos com atividade analgésica, antiinflamatória ou antiespasmódica.

4. Realização de modificações estruturais, com o objetivo de determinar a correlação entre estrutura química e atividade farmacológica, pretendendo-se obter dados que levem a compostos mais potentes, seletivos, que poderão proporcionar a elucidação do mecanismo de ação farmacológica.

## 1.2. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DE SISTEMÁTICA

### 1.2.1. POSIÇÃO SISTEMÁTICA de *Phyllanthus*

De acordo com a classificação de Engler (1964)<sup>48</sup>, *Phyllanthus* tem a seguinte posição sistemática:

<b>Divisão</b>	<b><u>Angiospermae</u></b>	Brongniart
<b>Classe</b>	<b><u>Dicotyledoneae</u></b>	D.C.
<b>Subclasse</b>	<b><u>Archlamydeae</u></b>	Engler
<b>Ordem</b>	<b><u>Geraniales</u></b>	Lindley
<b>Família</b>	<b><u>Euphorbiaceae</u></b>	Jussieu
<b>SubFamília</b>	<b>Phyllanthoideae</b>	Pax
<b>Tribo</b>	<b><u>Phyllantheae</u></b>	Pax
<b>Subtribo</b>	<b><u>Phyllanthinae</u></b>	Pax
<b>Gênero</b>	<i>Phyllanthus</i>	L
<b>Secção</b>	<b><u>Menarda</u></b>	(Commers) Muell. Arg.
<b>Espécie</b>	<i>Phyllanthus selowianus</i>	
	“ <i>fratensis</i>	

## 2 LITERATURA

### 2.1 GENERALIDADES SOBRE A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E GÊNERO *PHYLLANTHUS*

A família Euphorbiaceae caracteriza-se por várias de suas espécies apresentarem caules, folhas e outras partes da planta atravessados por canais laticíferos. São constituídas por células ramificadas, no gênero Euphorbia, por vasos laticíferos como em Manihot, ou ainda por fitas de sacos laticíferos. Na maioria dos casos o látex é branco, encerrando com frequência propriedades cáusticas<sup>145</sup>.

As flores femininas da família Euphorbiaceae, na sua grande maioria, apresentam gineceu formado por carpelos, que ao alcançarem pleno desenvolvimento, assumem aspecto típico de três cornos robustos, constituindo o carácter mais importante no reconhecimento prático da família. A inflorescência pode ser de vários tipos, a mais complexa, denominada de ciatio, encontra-se no gênero Euphorbia.

O gênero *Phyllanthus* foi criado por Linné (1737) sendo descrito pela primeira vez na 1ª edição do "General Plantarum". Apresenta espécies muito variadas, desde árvores a arbustos, e plantas herbáceas, anuais ou perenes, terrestres ou aquáticas. Estas espécies encontram-se nas zonas tropicais e subtropicais, principalmente nas ilhas de Cuba, Madagascar e Nova Caledônia.

Apesar de muitas espécies deste gênero serem conhecidas há longo tempo, Baucilhon (1971)<sup>15</sup> cita que as mesmas ainda não estão bem definidas, por serem morfológicamente muito próximas umas das outras, e suas identificações não serem muito fáceis. As espécies deste gênero, Pax e Hoffmann em Engler (1931)<sup>46</sup>, apresentam flores monóicas ou dióicas, sépalas em número de 4 a 6, normalmente posicionadas em 2 círculos, às vezes petaloídicas, e disco diverso.

Segundo Loefgren (1917)<sup>81</sup>, as flores masculinas apresentam disco desenvolvido, normalmente 3 estames, raramente 2 a 5, mais dificilmente 6, filamentos livres ou soldados, anteras com deiscência longitudinal ou transversal, poucas vezes reunidas em polínia anelar. Quando flor feminina, o ovário pode apresentar-se tricarpelar à multicarpelar,



**Figura 1.** Aspectos gerais do local de coleta de *Phyllanthus sellowianus* nas corredeiras do Rio Itajaí-Açu, Município de Apiúna, Estado de Santa Catarina.

estilete livre ou quase livre, bipartido, recurvado; o fruto é do tipo cápsula. As sementes, em corte transversal, são obtuso triangulares, convexas na parte externa, com embrião reto ou curvado. As folhas normalmente são pequenas.

As flores de espécies do gênero *Phyllanthus* são muito diversas. As espécies apresentam muitas vezes características gerais muito próximas, mesmo pertencendo a secções diferentes, sendo muito importante a análise das flores para a determinação das espécies.

## 2.2 DESCRIÇÃO DE *Phyllanthus sellowianus* Mueller Argoviensis<sup>129</sup>

Se apresentam como **Arbusto**, geralmente simples, com 2 a 3 m. de altura, glabro; **ramos** compridos divididos, com folhas reduzidas a escamas só perto dos ápices; raminhos delgados, sinuosos, algo comprimidos e angulados; **estipulas** decíduas estreito-triangulares, 2 mm. de comprimento, as margens escariosas; **pecíolos** de 1.5 a 2 mm.; **folhas** estreita-elípticas mucronuladas, 3 a 4 (-7) cm de comprimento, delgadas com as nervuras laterais evidentes, planas, a face inferior pálida. **Flores** dióicas, ambos os sexos bastante numerosas em fascículos nas axilas das folhas; pedicelos apenas duas vezes o tamanho dos sépalos; **sépalos masculinos** em regra 5, observados, 1 mm. de comprimento; **glândulas** livres, globosas, carnosas; **estames** 3, filamentos livres, anteras obliquamente deiscentes; **sépalos femininos** 5, até 2.5 mm. Cápsula deprimido-globosa, 2.5 mm. de diâmetros; sementes pouco mais de 1 mm. quase lisas.

**Nomes vulgares** - Sarandi-branco, sarandi-vermelho, sarandi, filanto.

**Dados fenológicos** - Floresce de novembro até fevereiro no planalto e até abril perto do mar.

### 2.3. REVISÃO QUÍMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *PHYLLANTHUS*

É importante analisar os estudos realizados sobre os constituintes químicos do gênero *Phyllanthus*.

Pereira e Campos (1929)<sup>96</sup>, realizaram um trabalho sobre as substâncias ativas de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. e das raízes isolaram cristais não identificados que receberam o nome de xaxifragina

Já Freise (1935)<sup>56</sup>, utilizando folhas e caules novos de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., obteve por arraste à vapor, entre 0,35 a 0,65% de óleo essencial, sendo identificados os principais constituintes como cimol, limoneno e salicilato de metila. Por outro lado, Bachi (1984)<sup>9</sup> contesta estes resultados, sugerindo que Freise trabalhou com outra espécie, mas não com *P. corcovadensis*.

Serra (1944)<sup>111</sup>, investigou a presença de quinina em *Phyllanthus niruri* L., não tendo sido encontrado quinina, nem detectada a presença de alcalóides.

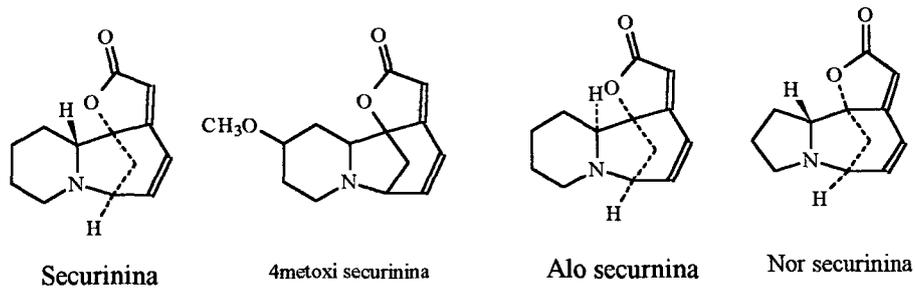
Já Lonstalot e Pagan (1949)<sup>82</sup>, retestaram as folhas e caules de *Phyllanthus niruri* L., no intuito de encontrar alcalóides, obtendo resultados negativos.

Earle (1960)<sup>55</sup>, analisou nas sementes de *Phyllanthus sp.*, o teor em óleo fixos e proteínas, determinando ainda na fração oleosa os índices de iodo, índice de saponificação, índice de hidroxila e ácidos saturados.

Stanistas e cols. (1969)<sup>123</sup> estudaram os constituintes das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L., fracionando o extrato em três frações, onde foram verificadas a presença de três lignanas filantina, hipofilantina e outras não identificadas. Na segunda fração foram isolados três flavonóides, sendo um deles heterosídeo da quercetina e na terceira fração foram obtidos quatro alcalóides, separados por cromatografia.

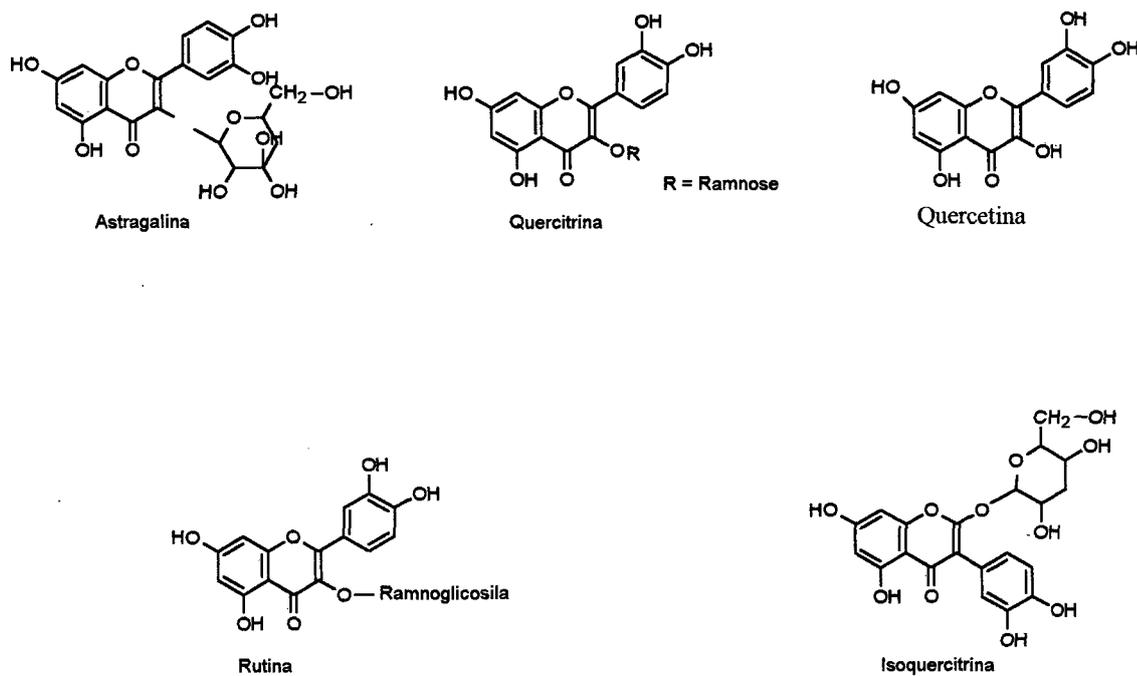
Rouffiac e Parello (1969)<sup>99</sup> isolaram um alcalóide de *Phyllanthus niruri* L. com  $\lambda$  256 nm (EtOH), ( $\alpha$ )<sub>D</sub> 213 (CHCl<sub>3</sub>) o qual ficou comprovado ser um enantiômero da norsecurina.

Raffauf (1970)<sup>100</sup> cita em seu livro os alcalóides existente no gênero *Phyllanthus* levantado no período, 4 metoxi-securinina, securinina, alo-securinina, nor-securinina.

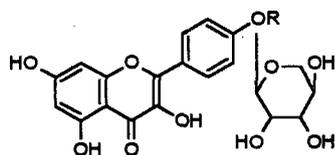


Mannan e Ahmad (1976)<sup>87</sup> verificaram a presença de estradiol em raízes de *Phyllanthus niruri* L. utilizando cromatografia em camada delgada com uma concentração de 3,0.10 /100 g de amostra.

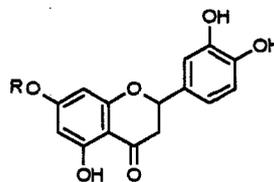
Nara e cols. (1977), isolaram cinco flavonóides das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L., variedade amarus, identificados por espectroscopia no U.V., como quercetina, astragalina, quercitrina, isoquercitrina e rutina.



No mesmo ano, Chanhan e cols., (1977)<sup>26</sup> verificaram a presença de 2 novas glicoflavonas nas raízes de *Phyllanthus niruri* L., elucidadas espectroscopicamente como sendo a 3,5,7 triidroxiflavonol-4 -O-  $\alpha$  -(-) Ramnopiranosídeo e a 5, 3,4 triidroxiflavanona - 7-O-  $\alpha$  -L-(-) Ramnopiranosídeo



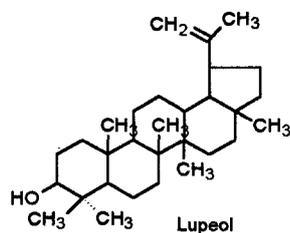
R= Ramnopiranosídeo



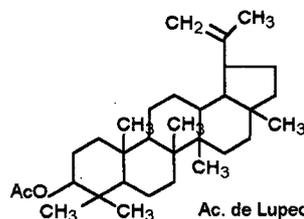
R = Ramnopiranosídeo

Prasad e cols. (1978)<sup>97</sup> analisaram a composição química em amino-ácidos de *Phyllanthus niruri*, *Phyllanthus urinaria* e *Phyllanthus simplex*, por cromatografia em papel. Os autores propuseram a identificação das espécies, em função da composição química dos amino-ácidos.

Já Chauhan e cols. (1979)<sup>26</sup> isolaram lupeol e acetato de lupeol das raízes de *Phyllanthus niruri*.



Lupeol



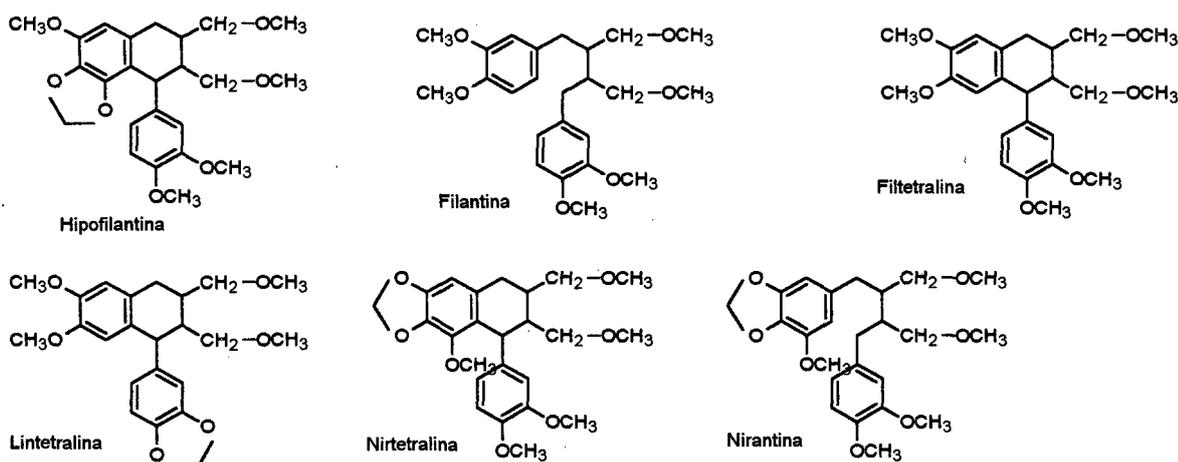
Ac. de Lupeol

Cuellar e Estevez (1980)<sup>40</sup>, estudando as partes áreas de *Phyllanthus niruri*, isolaram três alcalóides não identificados e um triterpeno esterificado, apresentando a estrutura próxima a filocrisina.

Lainetti e cols., (1980)<sup>80</sup> realizaram ensaios prévios com os extratos de *Phyllanthus tenellus* Rubeb. e *Phyllanthus amarus* Schum., onde consideram pelo sinônimo de *Phyllanthus niruri*. Os autores obtiveram resultados positivos para taninos, alcalóides, esteróides e açúcares redutores em *Phyllanthus amarus* Schum. Quanto a *Phyllanthus tenellus* Roxb., os resultados foram positivos para taninos, esteróides, saponinas e açúcares redutores.

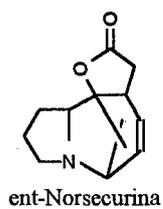
Ahmad e cols., (1981)<sup>1</sup> verificaram que o óleo da semente de *Phyllanthus niruri* L., contém de 1 a 2% de ácido ricinoleico, 21% de ácido linoleico e 51,4% de ácido linolênico.

No mesmo ano Ganeshpure e cols. (1981)<sup>58</sup> confirmam por síntese as estruturas da hipofilantina, filantina, nirantina, nirtetralina, filtetralina e lintetralina. Constituintes isolados de *Phyllanthus niruri* L.

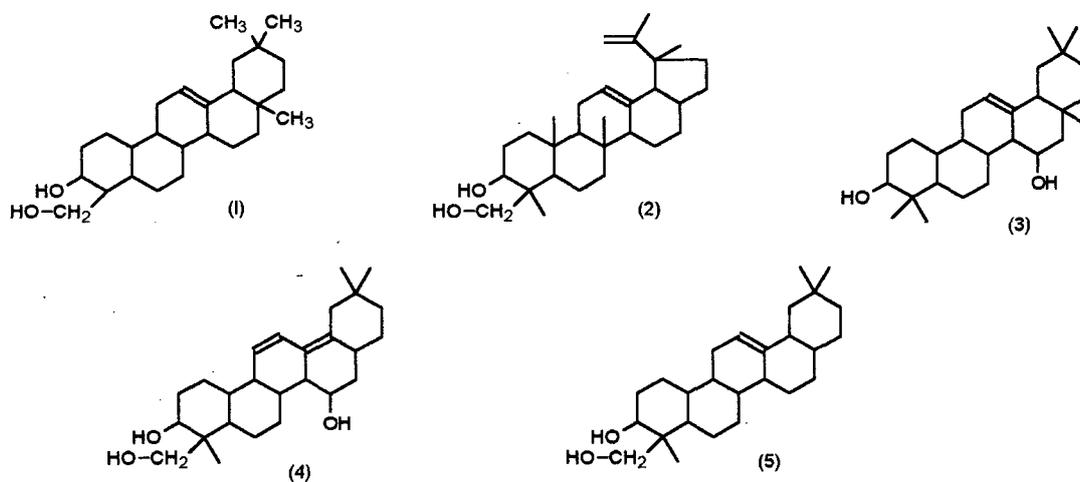


Bhadbhade e cols., (1980)<sup>12</sup> definiram por dados cristalográficos a estrutura da hipofilantina, constituinte de *Phyllanthus niruri*.

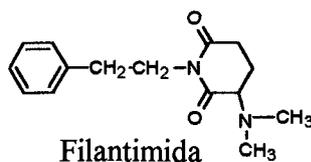
Por outro lado, Joshi e cols. (1980)<sup>76</sup> isolaram e determinaram a estrutura do alcalóide ent-norsecurina de *Phyllanthus niruri*



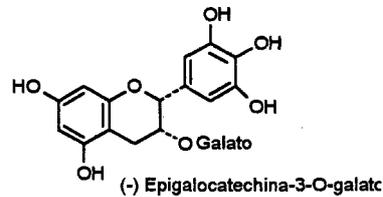
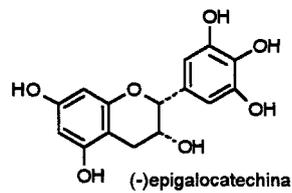
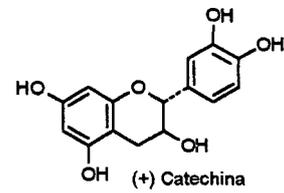
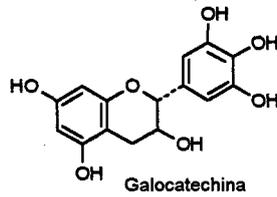
Tanaka e cols., (1988)<sup>125</sup> isolaram das folhas de *Phyllanthus flexuosus* alguns triterpenos cujas estruturas foram caracterizados como olean-12-en-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol (1), Lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,24diol (2), Olean-12-en-3 $\beta$ ,24 diol (3), Olean-11:13 (18) - dien-3 $\beta$  (4), 24-diol e Olean-12-en-3 $\beta$ ,15- $\alpha$ ,24 triol (5).



Nosso grupo de pesquisa, (1988)<sup>127</sup> isolou um novo alcalóide derivado da glutarimida, de *Phyllanthus sellowianus* denominado Filantimida, que pode existir em forma fechada ou aberta, e parece ser o responsável pelo efeito anti-espasmódico detectado anteriormente na fração alcalóica de *Phyllanthus sellowianus* (Calixto et al., 1984)<sup>23</sup>.

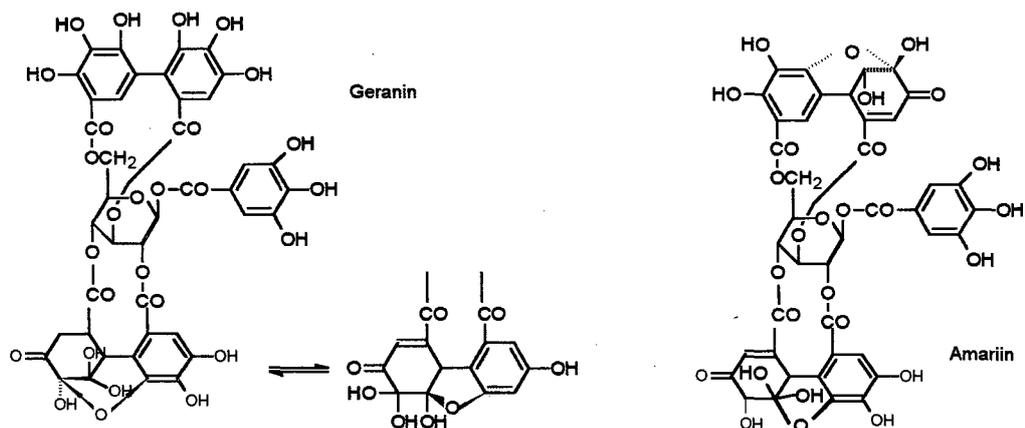


Ishima e cols (1992)<sup>73</sup>, utilizando cultura de tecido proveniente das raízes de *Phyllanthus urinaria*, isolaram vários constituintes fenólicos que foram determinados e identificados, como: ácido gálico (-), epicatequina, (+) catequina, (+) galocatequina, (-) epigalocatequina e (-) epigalocatequina 3-O-galato.

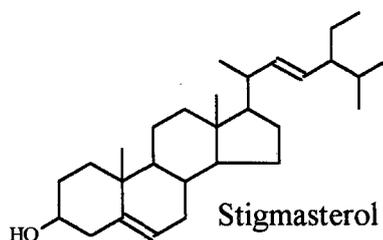
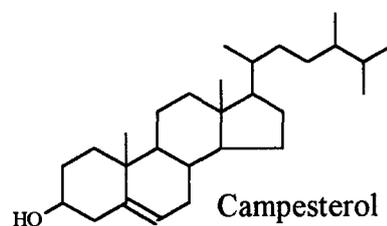
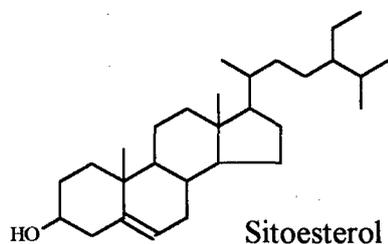


Recentemente, Bachmann e cols.(1993)<sup>11</sup>, isolaram das folhas de *Phyllanthus anisobus*, ácidos glicéridos, squaleno, polyprenol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, menisdaurilide, aquilegiolide, phyllanthostatina e justicidin B

L. Yeap Foo (1993)<sup>83</sup> identificou das folhas de *Phyllanthus amarus*, entre outros dois taninos hidrolisáveis, caracterizados como sendo, amarina e geranina.



No mesmo ano, Niero (1993)<sup>103</sup> usando métodos cromatográficos, determinou por cromatografia de alta resolução computadorizada acoplada à espectrometria de massa, a presença de três fitoesteróis identificados como estigmasterol,  $\beta$ -sitoesterol e campesterol de *Phyllanthus corcovadensis*.



Enquanto que Hnatysyn et all., (1993)<sup>66</sup>, (1987)<sup>67</sup>, e (1984)<sup>68</sup> identificaram de *Phyllanthus sellowianus* Scopoletina, isofraxidina, filantol e um biflavonóide

## 2.4 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E/OU BIOLÓGICOS REALIZADOS COM ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO

Alcides de Araújo (1929)<sup>7</sup>, estudando a ação diurética de extrato fluido, constatou o aumento de diurese após administração de extrato de *Phyllanthus niruri* e uma ligeira queda de pressão .

Já Van der Word (1941)<sup>65</sup> empregando infusão de *Phyllanthus niruri* L., e *Phyllanthus urinaria* L realizando testes em coelhos, obteve resultados negativos para ação diurética.

Freise (1935)<sup>56</sup> em seu trabalho sobre extração de óleo essencial de *Phyllanthus corcovadensis*, cita que o mesmo é utilizado no tratamento de cálculos da vesícula .

Collier e Van der Pij (1949)<sup>20</sup>, estudaram a ação antibacteriana de *Phyllanthus niruri* contra *Staphylococcus*., sendo inativo contra o *Plasmodium* de malária enquanto Cruz et al (1994)<sup>38</sup> demonstraram que os extratos de *P. urinaria* também são efetivos contra outros microorganismos presentes em infecções do trato urinário.

Já Dhar e cols (1968)<sup>15</sup> verificaram que a dose máxima de extrato de *Phyllanthus niruri* L., tolerada por camundongos é de 1g/Kg. O extrato possui ação anticancerígena, testada na Leucemia de Friend.

Ramakrishnan (1969)<sup>49</sup> verificou que extrato aquoso de folhas de *Phyllanthus niruri* L. mostrou efeito hipoglicemiante.

Já Roustalot e Pagon (1949)<sup>36</sup> testando a presença de alcalóides nas partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L., e tendo verificado a sua ausência, concluíram que as propriedades medicinais, se existirem , devem ser motivadas por outro grupo de substâncias, que não este.

Row e cols. (1964)<sup>104</sup>, estudando lignanas de *Phyllanthus niruri* L., indicaram a utilização da planta no tratamento de icterícia , asma e infecções brônquicas.

Calixto e cols. (1984)<sup>23</sup> avaliando o uso de extrato de *Phyllanthus sellowianus* mostraram a evidência de um alcalóide com atividade antiespasmódica em anéis intestinais de cobaias e útero de ratas e ureter de cachorro, o qual explica parcialmente o efeito para calculos renais.

Bacchien (1983)<sup>9</sup>,<sup>10</sup> verificou que a toxicidade aguda de extratos fluidos de *Phyllanthus tenellus* Roxb., em ratos, as condições do experimento foi de 9,3 ml/Kg, sendo a administração de extrato fluido, para determinação da atividade diurética, foi de aproximadamente, 3 ml/Kg. Portanto, a dose tóxica em ratos é bastante elevada em relação à dose administrada nos testes. Os testes de toxicidade foram realizados em 40 ratos fêmeas, com extrato, não ocorrendo alterações de toxicidade aguda à uma dose de 0,1 ml de extrato ou 1,8 mg de peso seco por rato.

Thyagarajan et al., (1982)<sup>129</sup>; (1987)<sup>130</sup>; Jayaran et al. (1987)<sup>74</sup>; Venkateswaran et al., (1987) observaram no extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* potente atividade “in vitro” e “in vivo” no tratamento da hepatite viral “B” induzida experimentalmente.

Posteriormente, Thyagarajan et al. (1988)<sup>128</sup> estenderam esses estudos demonstrando que o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, (confirmando tratar-se de *Phyllanthus amarus*), se administrado cronicamente (200 g, 3 vezes ao dia) por 30 dias mostrou-se efetivo no tratamento da hepatite “B” crônica na espécie humana. Os mesmos autores também demonstraram que além da eliminação completa da hepatite, não foi observado nenhum sinal grave de toxicidade nos pacientes que pudessem comprometer o uso do chá do *Phyllanthus amarus* terapêuticamente. A ausência de toxicidade para os extratos das espécies do gênero *Phyllanthus* foram também confirmadas em animais (Venkateswaran et al., 1987<sup>135</sup>; Jayaram et al., 1987)<sup>74</sup>. Esse estudos comprovam o uso dessas espécies na prática médica indiana para o tratamento da hepatite.

Venkateswaran (1987)<sup>135</sup> verificou que o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, inibe a DNA polimerase endógenas do vírus da hepatite B e liga-se ao antígeno de superfície do vírus da hepatite em marmotas e liga-se ao antígeno de superfície.

Hukpri, et al., (1988)<sup>72</sup> verificaram que na dose de 100 mg/kg. de extrato das folhas de *Phyllanthus fraternus* administrada por via oral em ratos albinos, tratados com aloxana apresentou atividade significativa hipoglicêmica.

Thyagarajan (1988)<sup>128</sup> verificou que em 59 % dos pacientes portadores do vírus da hepatite B, tratados com uma preparação do *Phyllanthus amarus*, por 30 dias, o vírus tinha perdido o antígeno de superfície.

Santos (1990)<sup>112</sup> demonstrou que o infuso do *Phyllanthus niruri* produz marcante redução no crescimento dos cálculos experimentalmente introduzidos na bexiga urinária de ratos Wistar, sugerindo que este efeito possa ser decorrente da modificação dos elementos inibidores e/ou facilitadores da cristalização, além de outros fatores ainda não avaliados. Além disso, demonstrou que a administração do infuso do *Phyllanthus niruri* em pacientes saudáveis, em doses elevadas, não revelou efeito diurético, além de não ter mostrado efeito tóxico aparente que pudesse comprometer seu uso pela população. Observou também uma elevação significativa da filtração glomerular e da excreção de ácido úrico pelos pacientes, bem como efeito benéfico facilitando a eliminação de cálculos renais.

David W. Unander e cols (1991)<sup>42</sup>, estudando *Phyllanthus amarus*, confirmaram que o mesmo inibe, in vitro, a ADN polimerase viral dependente (DNAP) dos hepadna vírus VBH e vírus da hepatite de marmota (VHM), e também mostraram alguma atividade in vivo. O objetivo do seu experimento foi identificar os melhores tipos genéticos de *Phyllanthus* ou as condições ótimas para produzir plantas de alta atividade antiviral.

Já Shead (1992)<sup>115</sup>, estudou o efeito dos extratos de cinco espécies de *Phyllanthus australiano* e demais extratos de plantas, como droga antiviral contra vírus de hepatite B, comparando-se as atividades concluindo que as espécies causam a inibição de 50%.

Em estudos recentes realizados em nossos laboratórios foram demonstrados que os extratos brutos de espécies de *Phyllanthus*, *P. sellowianus*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. carolinienses*, *P. corcovadensis* entre outras apresentaram significativo efeito analgésico em diferentes modelos de dor em camundongos (Santos et al, 1994)<sup>111</sup>.

## **2.5. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA CAMPANULACEAE**

Quase todas as espécies são ervas, poucas sub-arbustivas ou arbustos, em geral são laticíferas; possuem vasos articulados, apresentam folhas alternantes, simples, inteiras ou finalmente serradas, fendidas até lobadas, nunca compostas e sem estípulas. As flôres são tipicamente pentâmeras, hemafróditas, actinomorfas ou zigomorfas, com 5 - 2 carpelos sincarpas. As sépalas são livres. As pétalas sempre conatas, formam uma corola tubulosa ou campanulada. As anteras são livres e os filetes parcialmente livres ou totalmente concrecidos. O ovário é ínfero ou médio, plurilocular com muitos óvulos em placentas central angulares. O fruto é uma cápsula, frequentemente de deiscência por poros apicais, raras vezes é bacáceo. Muitas vezes há flôres vistosas e coloridas, reunidas em inflorescências de vários tipos. As vezes aproximam-se do tipo de um capítulo denso (Phyteuma).

Há cerca de 70 gêneros com 2000 espécies com larga distribuição, possuindo representantes em quase todos os países do globo terrestre. Preferem, porém, as zonas tropicais e sub-tropicais.

## 2.6 DESCRIÇÃO DE *Siphocampylus verticillatus*

(Cham.) G. Don. segundo Armando Carlos Cervi.

Arbusto, geralmente simples, com 1.50 a 2.20 m de altura: caule glabro e levemente tomentoso. Fôlhas verticiladas, de 6 a 10 cm de comprimento por 1.5 a 3 cm de largura, linear oblonga, subséssil, membranácea, glabro ou tomentosa em ambas as superfícies, apice e base subagudos; bordos finamente denteados. Inflorescência terminal e axial. Pedúnculo floral com 2.5 a 3.5 cm de comprimento, tomentoso. Hipanto turbinado, 4 cm de comprimento por 5 cm de largura, lobos estreitamente triangulares, pilosos, com 0.3 a 0.5 cm de comprimento. Corola vermelha ou rosada externamente e internamente amarela, tomentosa, sub ereta, sub equilátera, com 3.5 a 4.5 cm de comprimento e 0.4 a 0.5 cm de largura na parte mais dilatada; lobos superiores lineares, Agudos, com 1.0 a 1.3 cm de comprimento, os lobos inferiores com 1.5 a 1.7 cm de comprimento. Filetes eretos, glabros, com 3.0 a 3.2 cm de comprimento. Tubos das anteras esverdeados, glabros, com 0.8 a 0.9 cm de comprimento. As duas anteras inferiores apresentam-se com um tufo de pêlos no ápice. Gineceu de ovário ínfero, bicarpelar, bilocular, com muitos rudimentos seminiais; estilete de 0.7 a 0.8 cm de comprimento; estigma capitado, com um tufo de pêlos vilosos esbranquiçados. Fruto seco, capsular oval, loculicida, com 1.3 a 1.5 cm de comprimento e com 10 costelos, não sendo observado sementes.

De acordo com Correa (1931)<sup>32</sup> apresenta preferência a beira de riachos, interior de capões, terrenos úmidos e brejosos, sendo conhecido, em Minas Gerais com o nome popular de Jaratataca.

Com relação aos dados fenológicos da espécie, esta floresce de dezembro á fevereiro e frutifica de março á abril

**SINONIMIA:** *Lobelia verticillata* Presl. Prodr.

*Lobelia (Siphocampylus) verticillata* Cham.

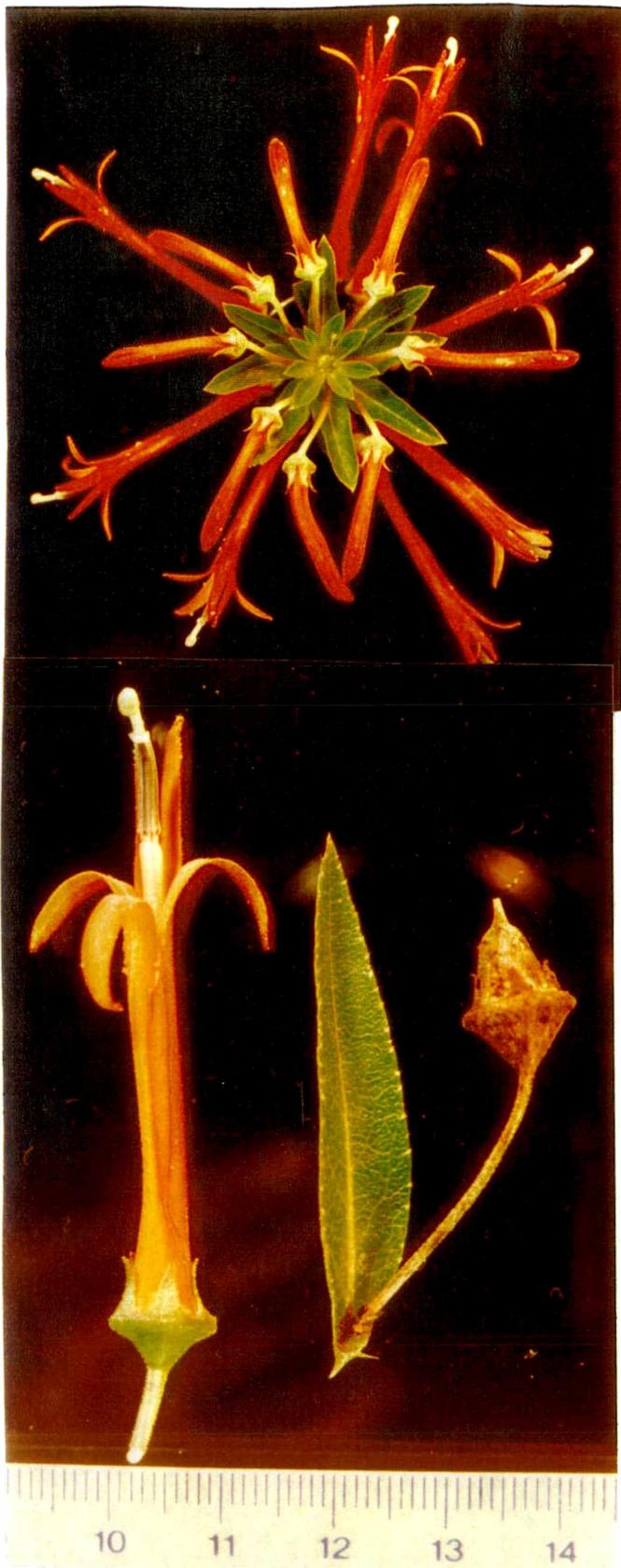
## 2.7 POSIÇÃO SISTEMÁTICA DE *SIPHOCAMPYLUS*

De acordo com Wagenitz (1964)<sup>137</sup> a classificação ocupa a seguinte posição sistemática:

<b>Divisão</b>	<b>Angiospermae</b>
<b>Classe</b>	<b>Dicotyledoneae</b>
<b>Subclasse</b>	<b>Sympetalae</b>
<b>Ordem</b>	<b>Campanulales</b>
<b>Família</b>	<b>Campanulaceae</b>
<b>Sub-família</b>	<b>Lobelioideae</b>
<b>Tribo</b>	<b>Lobelieae</b>
<b>Sub-tribu</b>	<b>Lobeliinae</b>
<b>Gênero</b>	<b><i>Siphocampylus</i></b>
<b>Epíteto específico</b>	<b><i>verticillatus</i></b>
<b>Espécie</b>	<b><i>Siphocampylus verticillatus</i></b>

Segundo Cronquist (1981)<sup>36</sup>, *Siphocampylus verticillatus* tem a seguinte posição;

<b>Divisão</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Classe</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Sub-classe</b>	<b>Asteridae</b>
<b>Ordem</b>	<b>Campanulales</b>
<b>Família</b>	<b>Campanulaceae</b>
<b>Sub-família</b>	<b>Lobelioideae</b>
<b>Gênero</b>	<b><i>Siphocampylus</i></b>
<b>Espécie</b>	<b><i>Siphocampylus verticillatus</i></b>



**Figura 2.** Aspectos gerais e detalhes da flor e da inflorescência de *Siphocampylus verticillatus* (Foto de Guido & Sander)

## 2.8 REVISÃO SOBRE A QUÍMICA DO GÊNERO

### *Siphocampylus*

De acordo com Carello (1950)<sup>60</sup>, o estudo das plantas que pertencem a família Campanulaceae apresentavam interesse por compreender várias espécies de uso na medicina popular, entre elas a *Lobelia inflata* L. de reconhecidas aplicações terapêuticas, devido a presença de alcalóides, destacando-se a lobelina, cuja ação farmacológica principal é de estímulo aos processos respiratórios, funcionando como expectorante e broncodilatadora. Na Botânica Sistemática, o gênero *Siphocampylus* encontra-se muito próximo do gênero da *Lobelia*, e a ele pertencem muitas plantas produtoras de látex. Carello observou que ovinos, bovinos e equinos não se alimentavam de plantas deste gênero, portanto, seria lógico pensar que o látex poderia veicular substâncias tóxicas. Estudou a anatomia da raiz, rizoma, caule e folhas e investigando fitoquimicamente isolou uma substância alcaloídica, que ele denominou de Sifocampilina, sem no entanto ser totalmente identificada. Quanto às provas biológicas, foram testadas tinturas da *Siphocampylus foliosus* em coelhos, confirmando apenas sua toxicidade, devido não ser habitual animais de criação alimentarem-se desta planta.

Já Corral et all. (1970)<sup>30</sup> estudando plantas inteiras dessecadas, isolaram e identificaram : palmitato de amirina (0.34%), ácido ursólico (0.45%) e colina ( 0.07 %). No entanto não conseguiram isolar nenhum alcalóide.

Enquanto Moreira et all. (1984)<sup>93</sup> fizeram uma investigação química preliminar de duas espécies do gênero, *Siphocampylus verticillatus* e *Siphocampylus sulfurens*, onde foram obtidos os dados indicados na (**Tabela I**).

**Tabela I .** Investigação química preliminar de folhas e caule de 2 espécies de *Siphocampylus*<sup>93</sup>

Composto químico estudado	<i>S. verticillatus</i>	<i>S. sulfurens</i>
Heterosídeos saponínicos	-	-
Heterosídeos cianogénicos	-	-
Heterosídeos cardioativos	-	-
Heterosídeos antociânicos	-	-
Heterosídeos flavônicos	+	+
Gomas, mucilagens	+	+
Taninos	+	+
Amino grupos	+	+
Ácidos orgânicos	+	+
Alcalóides	+	-
Fenóis	+	+
Cumarinas	-	-
Hidroxi antraquinonas	-	-
pH	5.0	4.5
Cor	Castanho	Castanho

Como pode-se verificar pelos resultados desta abordagem fitoquímica, é possível fazer a diferenciação das duas espécies pela presença ou ausência de alcalóides.

Magalhães et. all. (1988)<sup>85</sup>, estudando seis espécies de *Lobelia* e quatro espécies de *Siphocampylus*, relataram a ocorrência de poliacetilenos acíclicos C14, possibilitando assim verificar a estreita ligação entre os gêneros. No ano seguinte Magalhães et all. (1989)<sup>59</sup> isolaram três poliacetilenos já previamente isolados de outras espécies de *Siphocampylus* e *Lobelia*.

Enquanto Buras (1985)<sup>20</sup> confirma os resultados obtidos na investigação química preliminar de Moreira et all. <sup>59</sup> e evidencia a presença de esteróides e/ou triterpenos. Além

de testar a sensibilidade bacteriana do extrato hexânico, utilizando-se da técnica de Kirby & Bauer (Difusão em disco ) e MIC (Concentração mínima inibitória). Evidenciou a ação antimicrobiana tanto com plantas recém coletadas como para plantas secas, sendo que as diferenças de atividade variaram em função da técnica bacteriológica empregada, tendo as folhas apresentado melhor resultado.

Godoy em 1989<sup>62</sup> realizou o levantamento florístico e quimiosistemático da família Campanulaceae na região da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, analisando a constituição parafínica na região, correlacionando essas características químicas ao nicho ecológico ocupado pelas mesmas.

Contin 1993<sup>29</sup> isolou e identificou ( Escoparona ) 6,7-dimetoxicumarina, (Luteína) 5,7,3,4-tetrahidroxiflavona, ácido ursólico e um alcalóide que constituiu a substância mais abundante das que foram isoladas, o qual não foi identificado.

Enquanto Biavatti et all. 1994<sup>117</sup> , estudando o extrato clorídrico (HCl 1%) de *S. verticillatus*, tratando com solução de amônia diluída, e posteriormente extraíndo com clorofórmio, identificou o alcalóide denominando de 8-10-di-n-Propil-lobelidiol.

### **3 PARTE EXPERIMENTAL.**

#### **3.1 MATERIAL BOTÂNICO**

As espécies de *Phyllanthus* em estudo foram coletadas no mês de abril de 1994 no Estado de Santa Catarina , o *Phyllanthus sellowianus* foi coletada no Município de Apiúna e *Phyllanthus fraternus*, foi coletado em Florianópolis no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina .

A classificação das espécies *Phyllanthus* foram efetuadas pelas Professoras Leila da Graça Amaral e Mirian Ulyssea, do Herbário Flor do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina. O *Siphocampylus verticillatus* foi coletado no mês de janeiro de 1993 no Município de São José dos Pinhais no Estado do Paraná.

A espécie foi identificada como *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G.Don., pelo botânico Gert Hatschbach do Museu Botânico Municipal, da Prefeitura Municipal de Curitiba.

Considerando que na medicina popular é empregada a parte denominada aérea dos referidos vegetais, que corresponde às folhas e ramos jovens, estes órgãos vegetais foram submetidos à dessecação 40°C. em estufa, com tiragem de ar úmido. A seguir o material foi fragmentado, reduzido a pó fino (tamis n<sup>o</sup> 10, Far. Bras. II) e acondicionado em recipientes ao abrigo da luz e umidade.

Exemplares das espécies de *Phyllanthus* encontram-se depositadas no Herbário Flor do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, enquanto que *Siphocampylus verticillatus* está depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob número UPCB 12401 e no Museu Botânico Municipal, da Prefeitura Municipal de Curitiba, Paraná, sob n<sup>o</sup>. 68920.

## **3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO E SEPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS**

### **3.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO METANOL BRUTO**

As partes aéreas (folhas, flores e galhos finos) de *Phyllanthus sellowianus* (9 kg), *Phyllanthus fraternus* (8.50 g do extrato Acetato de etila) e *Siphocampylus verticillatus* (10 kg) recém coletadas, foram moídas e submetidas à extração em metanol 95% à temperatura ambiente durante duas semanas, com sucessivas reposições de solvente. O extrato total metanólico foi concentrado a ¼ do seu volume em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando num material verde amarelado.

O extrato foi armazenado em frasco de cor ambar e deixado repousar em uma câmara fria, por um período de 24 horas. O extrato foi novamente filtrado, resultando numa solução de cor avermelhada, recebendo a denominação de extrato metanólico bruto. O filtrado foi conservado em câmara fria, eliminando-se os fatores de alterações como a luz, temperatura e contaminações microbiológicas, sendo somente retirado para o preparo das

extrações dos seus constituintes. Aparentemente, estes cuidados foram suficientes uma vez que a atividade e a composição das soluções foram constantes durante os experimentos.

### 3.2.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANOL BRUTO

O fracionamento do extrato foi realizado por um processo de extração por solvente imiscível. (líquido/líquido) de diferentes polaridades

O princípio da extração líquido / líquido é a distribuição do soluto entre dois líquidos em contato: qualquer substância solúvel em ambos sofrerá distribuição ou partição entre as duas fases na razão de suas solubilidades, não havendo reação com qualquer dos dois solventes e existindo na mesma forma em ambos. Em geral um dos líquidos é a água e o outro um solvente orgânico (Figura 3).

Uma vantagem importante do método de separação por extração com solvente imiscível se dá por servir para pré-concentração, seguida imediatamente da análise quantitativa e se, no equilíbrio, a concentração da substância de interesse for muito maior no líquido orgânico do que no inorgânico, o extrato pode, então, ser utilizado diretamente para a determinação quantitativa.

#### Método

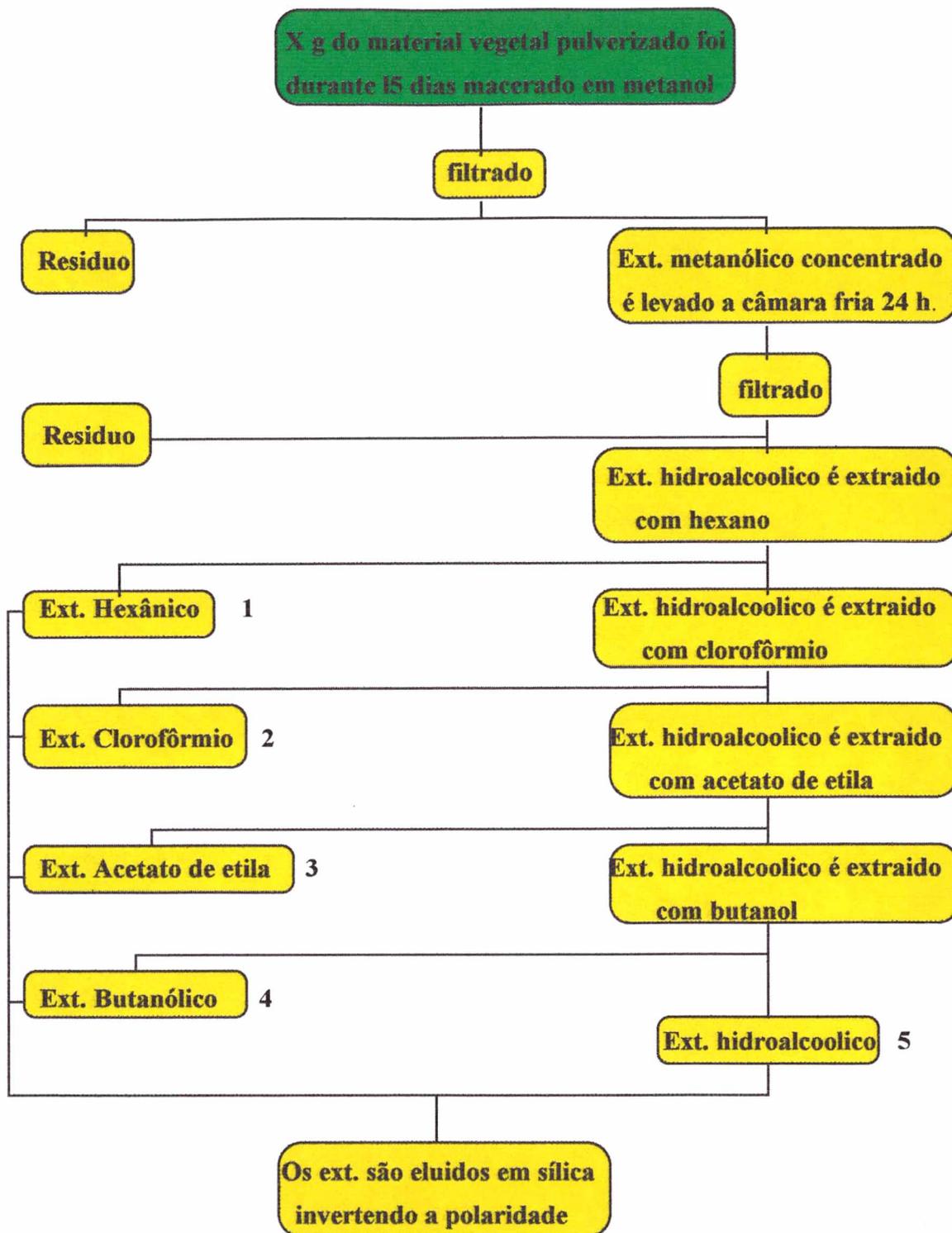
O extrato metanólico bruto, foi transferido para um funil de separação e agitado por cinco vezes com 100 ml dos seguintes solventes: hexana, clorofórmio, acetato de etila e butanol. O líquido restante ficou sendo o extrato hidroalcoólico. Em cada uma dessas extrações, esperamos a nítida visualização das linhas de separação dos solventes. Os extratos foram evaporados em rota vapor até secura, sendo denominados de extratos: hexano 1, clorofórmio 2, acetato de etila 3, butanol 4 e hidroalcoólico 5.

### 3.2.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS EM 3.2.2

O fracionamento dos extratos foram realizados, por um processo de extração por solubilidade (sólido/líquido) com solventes de diferentes polaridades.

Na certeza de termos frações com grupos de polaridade ou estruturas similares, submetemos os extratos a um fracionamento preliminar onde realizamos diversas eluições em que o eluato de cada respectiva eluição foi recolhido em frações distintas, sendo posteriormente analisadas. Se fizermos um gráfico da quantidade de amostra em cada fração, contra o volume de solvente passado através da coluna, após a introdução da amostra, obteremos uma distribuição gaussiana<sup>4</sup>. Na certeza de termos uma fração, com grau de afinidade maior, submetemos os extratos a um fracionamento preliminar através de uma coluna de vidro contendo 300g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh). A coluna com 8 cm de diâmetro e 15 cm de altura (Figura 4).

Iniciamos com o extrato hidroalcoólico, o qual eluimos com acetato de etila (200 ml) em seguida com metanol (300 ml). A fração acetato de etila foi somada ao extrato acetato de etila. Com o extrato acetato de etila e a fração ac. de etila obtida do extrato hidroalcoólico, iniciamos nova coluna cromatográfica, nas mesmas condições do extrato hidroalcoólico,



**Figura 3.** Esquema do início da extração das substâncias ativas (líquido/líquido)

neste caso iniciamos a eluição com clorofórmio (200 ml ), acetato de etila (300 ml ) e metanol (200 ml). A fração clorofórmica foi somada ao extrato clorofórmico, a fração acetato de etila foi somada a fração acetato de etila e a fração metanólica foi somada à fração metanólica. Com o extrato clorofórmico e a fração clorofórmica obtida do extrato acetato de etila, iniciamos nova coluna nas mesmas condições do extrato hidroalcoólico e, neste caso, iniciamos a eluição com hexano (200 ml), clorofórmio (300 ml ), acetato de etila (200 ml ) e metanol (200 ml).

A fração hexânica foi adicionada ao extrato hexânico, a fração clorofórmica foi somada à fração clorofórmica, a fração acetato de etila foi somada à fração acetato de etila, e a fração metanol à fração metanol. O mesmo método foi aplicado ao extrato hexânico e à fração hexânica. (F. Hexânica 1, F. Clorofórmica 2, F. Acetato de etila 3 e F. Metanólica

Com as frações bem definidas, foram retiradas amostras para testes de atividade farmacológica, visando saber qual delas apresentará atividade farmacológica para os modelos testados. Com isso obteremos orientações quanto a fração que apresentará maior ação, e, conseqüentemente, maior proporção de constituintes ativos

### **3.24 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO HEXÂNICA 1 DE *Phyllanthus sellowianus***

A fração hexânica 1 foi acrescida de 2 partes de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) em relação ao seu peso e evaporado à secura (pastilha : fração + sílica).

A pastilha da fração hexânica foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura, contendo 75 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh), usando hexano e acetato de etila na concentração crescente de 2% de acetato de etila de 100 em 100 ml, com vazão de 1 ml por minuto. Foram coletados 100 frascos de 20 ml, os quais foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, com a fase móvel hexano e acetato de etila (70:30).

Nas frações 65 a 67 de *Ph. sellowianus* foram verificadas, presença de um sólido branco, com traços de substâncias oleosas. Estas frações foram dissolvidas em hexano e forçadas a precipitar a frio. O precipitado foi separado por filtração sendo submetidos

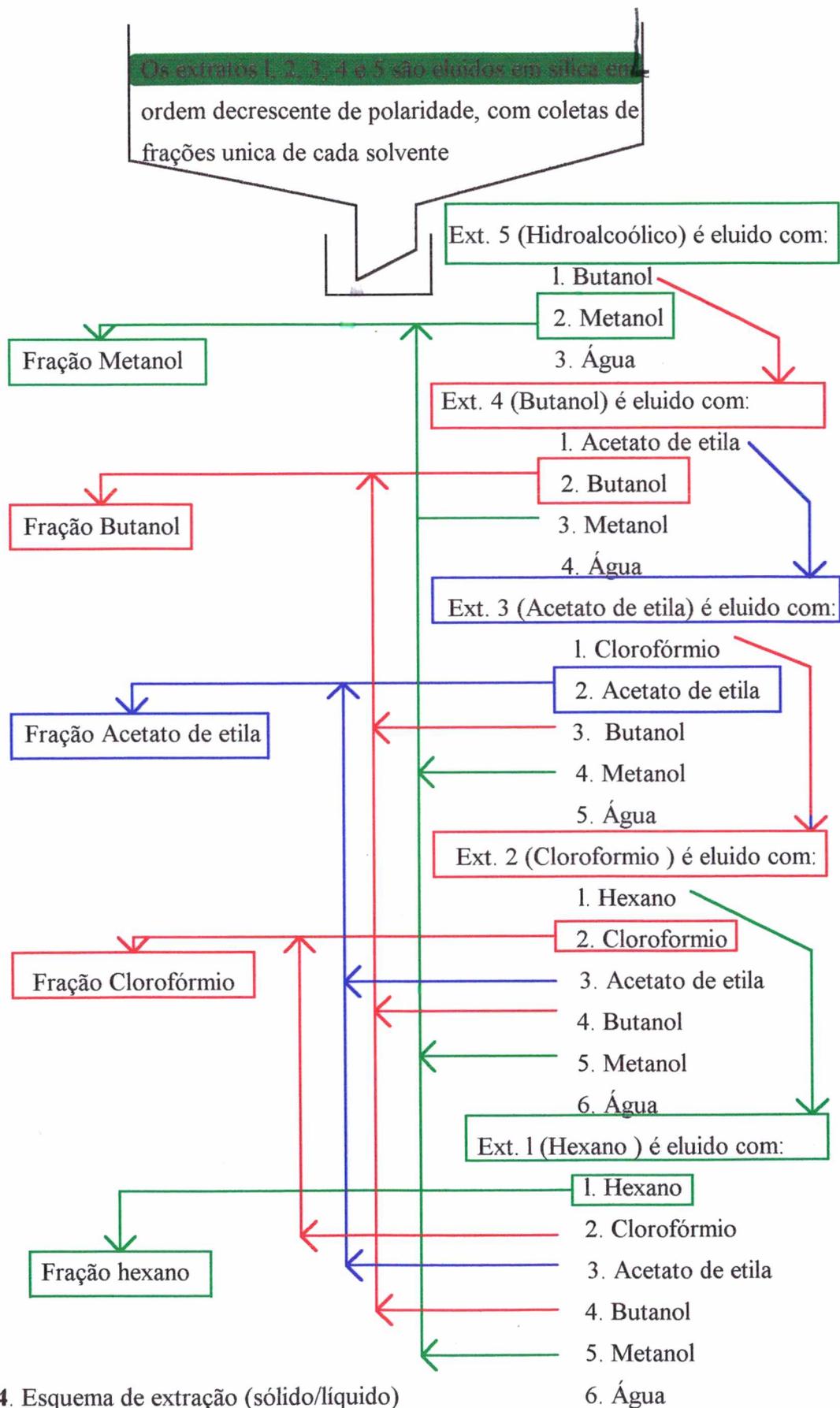


Figura 4. Esquema de extração (sólido/líquido)

à lavagem com hexano a frio, obtendo-se cerca de 0.730 g ( **Glochidona** ) (Pagina 068).

Nas frações 69 a 77 de *Ph. sellowianus*, foi verificado a presença de um sólido branco com traços de substâncias oleosas. Esta fração foi dissolvida em hexano e forçada a sua precipitação a frio. O precipitado foi separado por filtração a frio e submetido a lavagem com hexano frio, obtendo-se cerca de 1.4028 g de **esteróis**, que foram cromatografados em Cromatógrafo a Gás em coluna capilar com co-injeção de padrões, onde ficaram definidas três substâncias, 0.9968 g (  **$\beta$ -sitoesterol**), 0.343 g ( **stigmasterol** ) e 0.063g ( **campesterol** ) (Página. 072)

### **3.2.5 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA 2 DE *Phyllanthus sellowianus***

A fração clorofórmica foi acrescida de duas partes de sílica gel 60 (70 - 230 mesh ) em relação ao seu peso e evaporado à secura (Pastilha: fração + sílica )

A pastilha da fração clorofórmica foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura , com 75 de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) usando hexano e acetato de etila na concentração de 2% de acetato de etila de 100 em 100 ml com uma vazão de 1 ml por minuto, onde foram coletados 70 frascos de 20 ml, os quais foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, usando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (70:30).

As frações 3 a 7 de *Ph. sellowianus* foram recristalizadas com éter de petróleo, obtendo-se cerca de 6 mg ( **xantoxilina** ), (Pagina 091)

### 3.2.6 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA 3 DE *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthys fraternus*

A fração acetato de etila foi acrescida de 2 partes de sílica -gel 60 (70-230 mesh) em relação ao seu peso e evaporado à secura. (Pastilha : fração + sílica )

A pastilha da fração acetato de etila foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura, com 75 de sílica gel 60 (70 230 mesh) usando acetato de etila e metanol na concentração de 2% de metanol de 100 em 100 ml com uma vazão de 1 ml por minuto, onde foram coletados 70 frascos de 20 ml, os quais foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, com a fase móvel clorofórmio e metanol (93.5 : 6,5).

As frações foram cromatografadas em Sephadex, LH 20 com MeOH e H<sub>2</sub>O (70:30), através de uma coluna de 1,5 cm de diâmetro por 20 cm de altura com 12 cm de recheio.:

As frações 4 a 6 de *Ph. sellowianus*, foram coletadas em 20 frascos de 5 ml, onde a fração II apresentou 0.060g de um cristal branco (**Éster Etil gálico**), (Página 099)

As frações 7 a 17 de *Ph. sellowianus*, foram coletadas em 20 frascos de 5 ml, onde a fração 17 apresentou 0.130g de um cristal amarelo (**Quercetina**), (Página 136 ).

As frações 25 a 33 de *Ph. sellowianus*, foram coletadas em 20 frascos de 5 ml, onde as frações de 4 a 9 apresentaram 0.0491 g de um produto amarelo cristalino (**Fitalato** ) , acreditamos que aqui obtivemos um contaminante de fabricação de plástico.

As frações 35 a 36 de *Ph. sellowianus*, foram coletadas em 20 frascos de 5 ml, onde as frações de 9 a 13 apresentaram 0.2724 g de um cristal amarelo (**Furosina**),( Página 120 ).

As frações 42 a 50 de *Ph. sellowianus*, foram coletadas em 25 frascos de 5 ml, onde as frações de 1 a 3, apresentaram 1.0633 g de um sólido amarelo (**Rutina** ), (Página 127) enquanto que as frações de 4 a 5, apresentaram 0.7127 g de um cristal amarelo (**Geranina**), (Página 113 ).

Na fração 5 de *Ph. fraternus*, foram coletadas 20 frações de 5 ml, onde a fração 5 apresentou 0.0463 g de cristais branco (**hipofilantina** ), (Página 143 ).

As frações 8 a 14 de *Ph. fratenus*, foram coletadas em 20 frações de 5 ml, onde as frações 3 a 6 apresentaram 0.1447 (**Éster metil gálico**), (Página 106).

As frações 20 a 23 de *Ph. fratenus*, foram coletadas em 20 frações de 5 ml, onde as frações de 4 a 10, apresentaram 1.5842g de cristais amarelos(**Geranina**), (Página 113), enquanto as frações de 23 a 25 apresentaram 0.0494 g de um sólido amarelo (**Rutina**), (Página 127).

A fração 19 de *Ph. fratenus*, foram coletadas em 20 frações de 5 ml, onde as frações de 5 a 11 apresentaram 0.1036 g de cristais amarelos (**Furosina**), (Página 120).

### **3.2.7 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO HEXÂNICA 1 DE *Siphocampylus verticillatus***

A fração hexânica 1, foi acrescida de 2 partes de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) em relação ao seu peso e evaporado à secura (pastilha : fração + sílica).

A pastilha da fração hexânica foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura contendo 75 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh), usando hexano e acetato de etila na concentração crescente de 2% de acetato de etila de 100 em 100 ml com vazão de 1 ml por minuto, onde foram coletados 100 frascos de 20 ml, os quais foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, com a fase móvel hexano e acetato de etila (70:30).

Nas frações 25 a 26 de *S. verticillatus* foi verificada a presença de um sólido branco com traços de substâncias oleosas. Esta fração foi dissolvida em hexano e forçada a precipitação à frio, este foi separado por filtração a frio. Após lavagem do mesmo com hexano frio, obteve-se cerca de 0.145 g (de 23,93g do resíduo oleoso) o qual foi cromatografado em Cromatógrafo a Gás, usando coluna capilar com padrões, onde definiu-se 5 substâncias: 0.0101 g (**campesterol**), 0.0667g (**β-sitosterol**), 0.0478 g (**stigmasterol**), 0.012 (**α-amirina**) e 0.008 g (**β-amirina**), (Página 074).

### **3.2.8 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA 2 DE *Siphocampylus verticillatus***

A fração clorofórmica foi acrescida de duas partes de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) em relação ao seu peso e evaporado à secura (Pastilha: fração + sílica)

A pastilha da fração clorofórmica foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura, com 75 de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) usando hexano e acetato de etila na concentração de 2% de acetato de etila de 100 em 100 ml com uma vazão de 1 ml por minuto, onde foram coletados 70 frascos de 20 ml que foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, usando como fase móvel, uma mistura de hexano e acetato de etila (70:30).

A fração clorofórmica de *S. verticillatus* foi deixada em repouso para que ocorresse a cristalização, a qual foi lavada com acetona, apresentando 0.1265 g de um cristal incolor. (**Stigmasterol**), (Página 076)

### **3.2.9 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA 3 DE *Siphocampylus verticillatus***

A fração acetato de etila foi acrescida de 2 partes de sílica -gel 60 (70-230 mesh) em relação ao seu peso e evaporado à secura. (Pastilha : fração + sílica)

A pastilha da fração acetato de etila foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura, com 75 de sílica gel 60 (70 230 mesh) usando acetato de etila e metanol na concentração de 2% de metanol de 100 em 100 ml com uma vazão de 1 ml por minuto, onde foram coletados 70 fracos de 20 ml, os quais foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada, com a fase móvel clorofórmio e metanol (93.5 : 6,5).

As frações foram cromatografadas em Sephadex LH 20 com MeOH e H<sub>2</sub>O (70:30), através de uma coluna de 1,5 cm de diâmetro por 20 cm de altura com 12 cm de recheio.

O extrato de acetato de etila (5.7714 g de 10 kg de vegetal fresco de *S. verticillatus*) foi deixado em repouso para que ocorresse a cristalização que foi filtrado e lavado com acetona, apresentando 0.2449 g. (**Stigmasterol glicosídeo**), (Página 083 )

O filtrado da separação do Stigmasterol glicosídeo foi cromatografado, as frações de 4 a 9 de *S. verticillatus* foram cromatografadas em Sephadex, onde foram coletadas em 20 frascos de 5 ml, as frações 6 a 8 apresentaram um cristal amarelo (**3'-metoxi luteolina**), (Pagina 150 ).

### **3.2.10 SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Siphocampylus verticillatus***

A fração metanólica foi acrescida de duas partes de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) em relação ao seu peso e evaporada à secura (Pastilha: Fração + sílica).

A pastilha da fração metanólica foi cromatografada através de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura, com 75 g de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) usando acetato de etila e metanol na concentração de 2% de metanol de 100 em 100 ml com uma vazão de 1 ml por minuto, onde foram coletados 70 frascos de 20 ml, que foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada com a fase móvel Ciclohexano : Dietilamina : Metanol (45:05:05)

As frações de *S. verticillatus* 10 a 31 foram levadas a secura e dissolvidas com algumas gotas de MeOH, acrescidas de acetato de etila e levado à câmara fria 24 horas, Filtrando-se em funil de vidro sinterizado G3 e lavando com acetato de etila a frio, apresentaram 2.9909 g de 30.46 g de extrato MeOH (**alcalóide 1**), (Página 042 ) as frações 53 a 57 foram levadas a secura e dissolvidas com algumas gotas de MeOH e acrescidas de acetato de etila e levado a câmara fria por 24 horas, filtrando em funil de vidro sinterizado, apresentando 0.1070 g. (**alcalóide 2**), (Página 058 ).

### 3.2.11 ENSAIOS CROMATOGRAFICOS

Após vários testes com as fases móveis, optou-se pela que melhor resultado apresentou dentro das condições laboratoriais disponíveis, sendo a seguinte, para os alcalóides piperidínicos: tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (3:4:1 v/v) figura 5., para os triterpenos e esteróis: hexana-acetato de etila (70:30 v/v) e para os flavonóides e taninos: clorofórmio-metanol (95:5 v/v), acetato de etila-acetona-água (25:8:2 v/v) figura 6.

Procedeu-se então a cromatografia ascendente no sistema de solvente indicado. Após o solvente percorrer 15 cm além do local de deposição das amostras dos extratos das frações e substâncias separadas, interrompeu-se o desenvolvimento e os cromatogramas foram secos. A seguir foram examinados sob luz ultra-violeta, e revelados com anisaldeído sulfúrico, cloreto férrico 2% e o reativo Dragendorff acético.

#### 3.2.11.1 VISUALIZAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

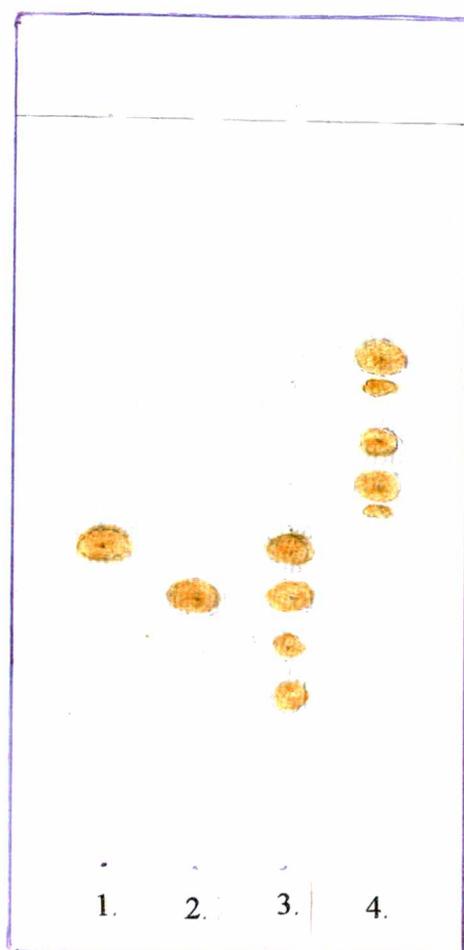
A localização das substâncias separadas no cromatograma foram realizadas com o uso de métodos Físicos e Químicos

##### **Método físico:**

Um dos métodos mais usados para visualização, das substâncias separadas por cromatografia em camada delgada, é a luz Ultravioleta. Neste processo utilizamos placas com indicadores fluorescentes à um determinado comprimento de onda. Os mais comuns são a 250 e 366 nm ou a combinação dos dois comprimentos de onda.

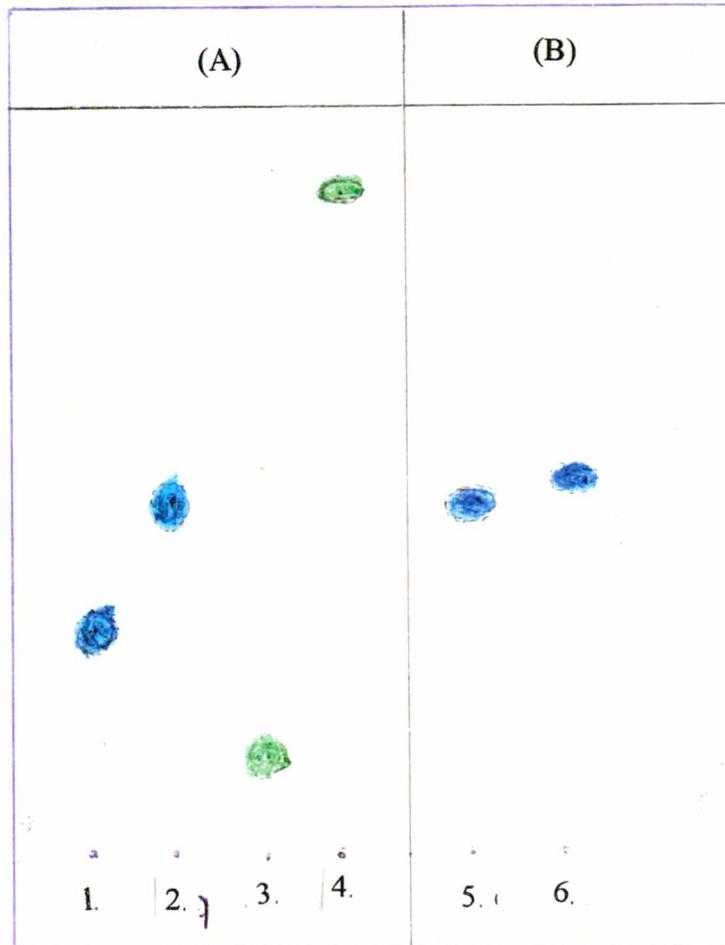
##### **Método químico:**

Nesta técnica, utilizamos reagentes utilizado para visualização, e com o auxílio de um pulverizador manual ou spray com ar comprimido. As placas foram pulverizadas com reagente anisaldeído sulfúrico, cloreto férrico e Dragendorff acético, a uma distância de 15 cm e logo aquecida a 120<sup>o</sup>C., afim de permitir que a reação ocorra, com o reagente cloreto férrico e Dragendorff não havendo necessidade de aquecimento a reação é imediata.



**Figura 5.** Cromatografia em camada delgada dos Alcalóides de *Siphocampylus verticillatus* Cham.

1. N-Metil-2(R)-[2-(S)-hidroxipentil]-6-(S)-[2(R)-hidroxipentil-piperidina cloridrato
2. N-Metil-2(R)-[2-(S)-hidroxipropil]-6-(S)-[2(R)-hidroxipentil-piperidina-cloridrato
3. Fração Metanol
4. Fração Clorofórmio



**Figura 6.** Cromatografia em camada delgada de alguns compostos separados: (A) 1. Geranina, 2. furosina, 3. rutina, 4. 3'-metoxi luteolina. (B) 5. etil gálico, 6. metil gálico

### **3.3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS**

#### **3.3.1 IDENTIFICAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO I**

Das frações 10 a 31 de *Siphocampylus verticillatus*, obteve-se 3 g de cristais que fundiram na faixa de 75.98<sup>o</sup> C. (figura 16).

##### **3.3.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO INFRA VERMELHO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO I**

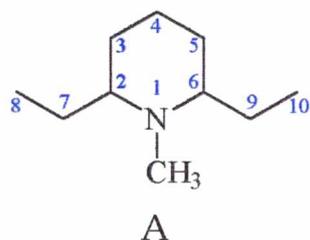
O espectro de infra vermelho (IV) foi obtido num equipamento Perkin-Elmer, modelo 781, a amostra foi preparada em pastilhas comprimidas com brometo de potássio anidro (KBr) (figura 7) evidenciando:

- a. absorção intensa, com terminação em duas pontas correspondente a um estiramento de ligação OH em 3447 cm<sup>-1</sup>.
- b. absorção intensa correspondente a um estiramento de ligação NH em 3258 cm<sup>-1</sup>.
- c. absorção com estiramento de ligação CH metila em 2954 a 2872 cm<sup>-1</sup>.
- d. absorção com deformação angular simétrica de CH<sub>2</sub> em 1448 cm<sup>-1</sup>.

##### **3.3.1.2 ESPECTRO DE MASSA DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO I**

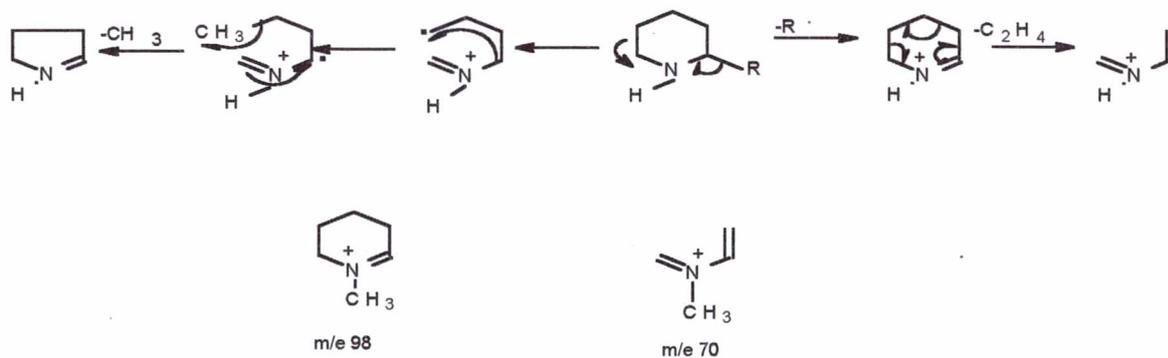
O espectro de massa (EM) foi obtido no espectrometro Micro Mass 12, onde o alcalóide (figura 8, 9) apresentou as características das piperidinas cíclicas<sup>24</sup>, apresentando o íon molecular (M<sup>+</sup>) a m/e 272 (5.47 %) e os seguintes fragmentos principais : a m/e 55 (36.98%), 57 (34.24%), 70 (23.98%), 82 (26.02%), 83 (95.89 %), 84 (83.56 %), 96 (31.50 %), 98 (73.97 %), 184 (100 %), 228 (21.91 %), 271 (2.73 %) e 272 (5.47 %). tipos de fragmentações observadas em alcalóides com núcleo piperidínicos e cadeias laterais nas posições 2 e 6 ao anel, sendo possível prever relação à nomenclatura sistemática

introduzida para os alcalóides da Lobélia de acordo com sua origem biogenética, conforme demonstrado na estrutura A<sup>88, 120</sup>.

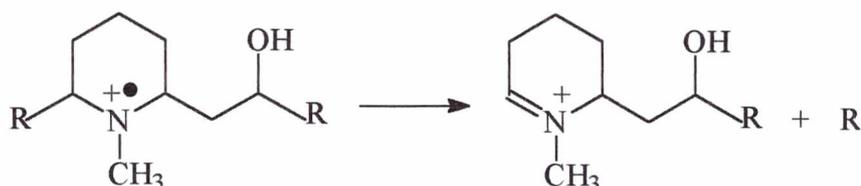


O fragmento a m/e 228 indicou a perda de um grupo n-propil ( $C_3H_7$ ), enquanto o fragmento em m/e 184 indicou a perda do grupo  $C_5H_{11}O$  ( $C_4H_9O + CH_2$ ) que estaria ligado ao anel piperidínico em uma das cadeias laterais<sup>2</sup>.

O fragmento m/e 98 calculado para  $C_6H_{12}N$ , enquanto os fragmentos mais significativos são os que contém nitrogênio das séries m/e 43, 57, 71, ...  $C_nH_{2n+1}N$  e m/e 42, 56, 70, ...  $C_nH_{2n}N$  sendo freqüente sua ocorrência em alcalóide piperidínico, os quais demonstram a presença de metila ligada ao nitrogênio do anel<sup>19, 24, 54, 139</sup>.

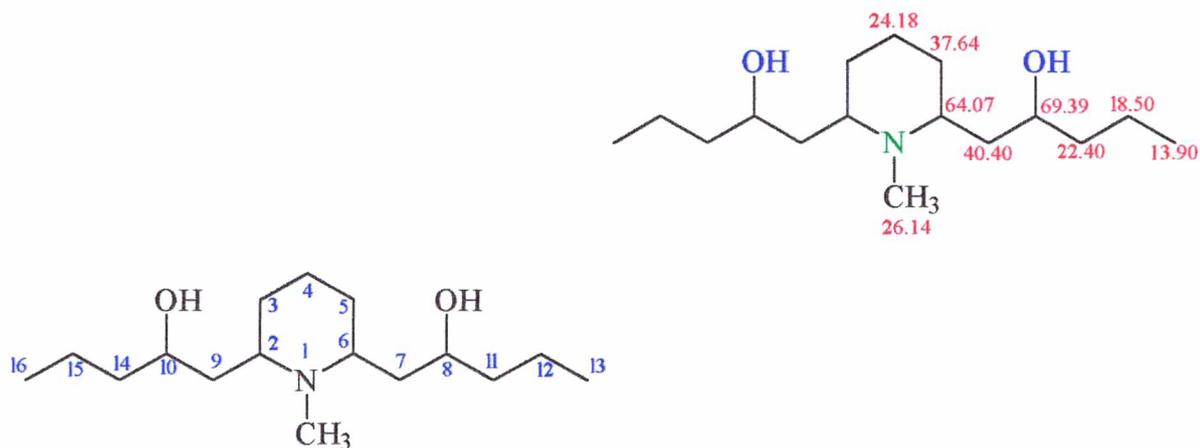


Os fragmentos característicos de alcalóides piperidínicos 2,6 dissustituído<sup>54</sup>, são evidenciados pela presença do íon pai m/e 184, pico base, onde R corresponderia a C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> com m/e 43, a figura 9, representando a fragmentação do alcalóide.



### 3.3.1.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>13</sup>C DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO I

O espectro de ressonância magnética nuclear (<sup>13</sup>C RNM) foi obtido em uma frequência de 300 MHz, onde mostrou-se os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de <sup>13</sup>C RNM, <sup>13</sup>C APT (figura 10) foram compatíveis aos atribuídos pela literatura para alcalóides piperidínicos<sup>2, 1, 147</sup>. A configuração cis dos dois substituintes na posição do C<sub>2</sub> e C<sub>6</sub> foi confirmada pela comparação do <sup>13</sup>C. Mudança do C<sub>4</sub> reportada com valores <sup>13</sup>C de 2,6-dissustituído piperidina, que é de 24.18 ppm ( a literatura reporta 25.1)<sup>2, 46</sup>. Quando o isômero for trans, o valor é de 18.56 ppm. O <sup>13</sup>C atribui (300 Mhz, CDCl<sub>3</sub>) valores δ C<sub>2</sub> 64.07, C<sub>3</sub> 37.64, C<sub>4</sub> 24.18, C<sub>5</sub> 37.64, C<sub>6</sub> 64.07, C<sub>7</sub> 40.42, C<sub>8</sub> 69.39, C<sub>9</sub> 40.42, C<sub>10</sub> 69.39, C<sub>11</sub> 22.40, C<sub>12</sub> 18.50, C<sub>13</sub> 13.90, C<sub>14</sub> 22.40, C<sub>15</sub> 18.50, C<sub>16</sub> 13.90 e NC' 26.14, sugerindo tratar-se de uma estrutura simétrica, apresentando substituições na posições 2 e 6 do anel piperidínico.



### 3.3.1.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^1\text{H}$ DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO I

O espectro de ressonância magnética de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RNM) foi obtido em uma frequência de 300 MHz figura 11 apresentando um triplete distorcido em  $\delta$  0.9 (6H,  $J = 7$  Hz), correspondente aos grupos metilas terminais (H 13/16) adjacentes aos grupos metilenos em C- 12/15 . Um multiplete  $\delta$  1.4 - 1.8 que foi atribuído aos grupos metilenos em C- 3/5, 7/9, 11/14, 4 e 12/15 (16H). Um singlete em  $\delta$  2.68 atribuído a N-CH<sub>3</sub>, enquanto que os multipletes em  $\delta$  2.95 (2H) foram atribuídos para os prótons em C- 2/6 e um multiplete em  $\delta$  3.95 (2H) sugerindo a presença de dois prótons geminais C-8/10, ligados ao grupo hidroxila.

### 3.3.1.5 ESPECTRO DE RMN - $^1\text{H}$ DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO ACETILADO I

Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ) foram obtidos a uma frequência de 50 MHz do composto acetilado (figura 12), associado a experimentos de desacoplamento seletivo, apresentando um quinteto em  $\delta$  4.95 (2H,  $J = 13$  e 6.5 Hz)

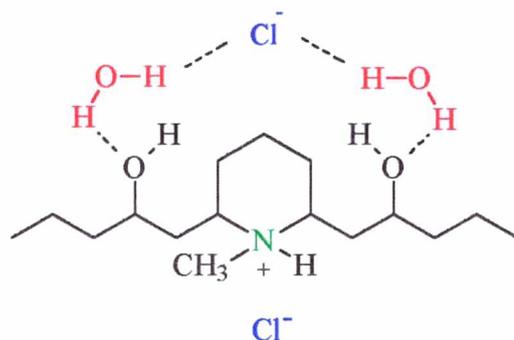
correspondente aos prótons em C-8/10 com acoplamento de 13 Hz com prótons H- 7/9 e de 6.5 Hz com H<sub>2</sub> 11/14, indicando que as hidroxilas foram acetiladas, além dos sinais característicos de acetato em  $\delta$  2.5. A irradiação do composto acetilado  $\delta$  4.95 transformou o quinteto em 1.9 num duplo duplete e o triplete em  $\delta$  1.5 em quarteto mostrando o acoplamento de C- 11 / 14 com C- 12 /15 de C- 7 / 9 com 2 /6 e C- 3 / 5, consistentes com resultado apresentado no espectro de COSY (Correlated SpectroscopY) figura 13, 14 e 15 . Os prótons em C- 2 / 6, apareceram como um largo multiplete em  $\delta$  2.30 que quando irradiados mostraram acoplamento com o quinteto em  $\delta$  1.85 que passou ser um duplo duplete (7 / 9) e com o multiplete em  $\delta$  1.35. Quando  $\delta$  1.85 foi irradiado, o quinteto em  $\delta$  4.90 aparece como um quarteto referente apenas ao acoplamento de C- 8 / 10 com C- 11/ 14. Quando irradiamos  $\delta$  0.9, o triplete referente aos grupos metilas terminais C- 13 /16 mostrou-se como um singlete, sendo assim os acoplamentos referentes a H- 2 / 6, H- 7 / 9 e H- 11 / 14. Comparando os deslocamentos dos prótons do alcalóides com dados da literatura de alcalóides piperidínicos , como o sinal H- 2 / 6 em  $\delta$  2.5 sem acoplamento com H- 8 / 10 atribuindo-se a metil amina<sup>1, 2, 55, 98</sup>.

Como a análise de COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) (figura 13), revelou os acoplamentos da molécula até aqui analisada, estando próximos com os dados de Biavatti (1994)<sup>15</sup>. A análise do CHN apresentou 55.47% de C, 10,84% de H, 3.91% de N e 29,78% para Oxigênio e demais elementos, ficando a formula mínima como C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>N<sub>1</sub>O.... Com a análise de halógenos, segundo Laissaing, confirma-se a presença de cloro na estrutura .

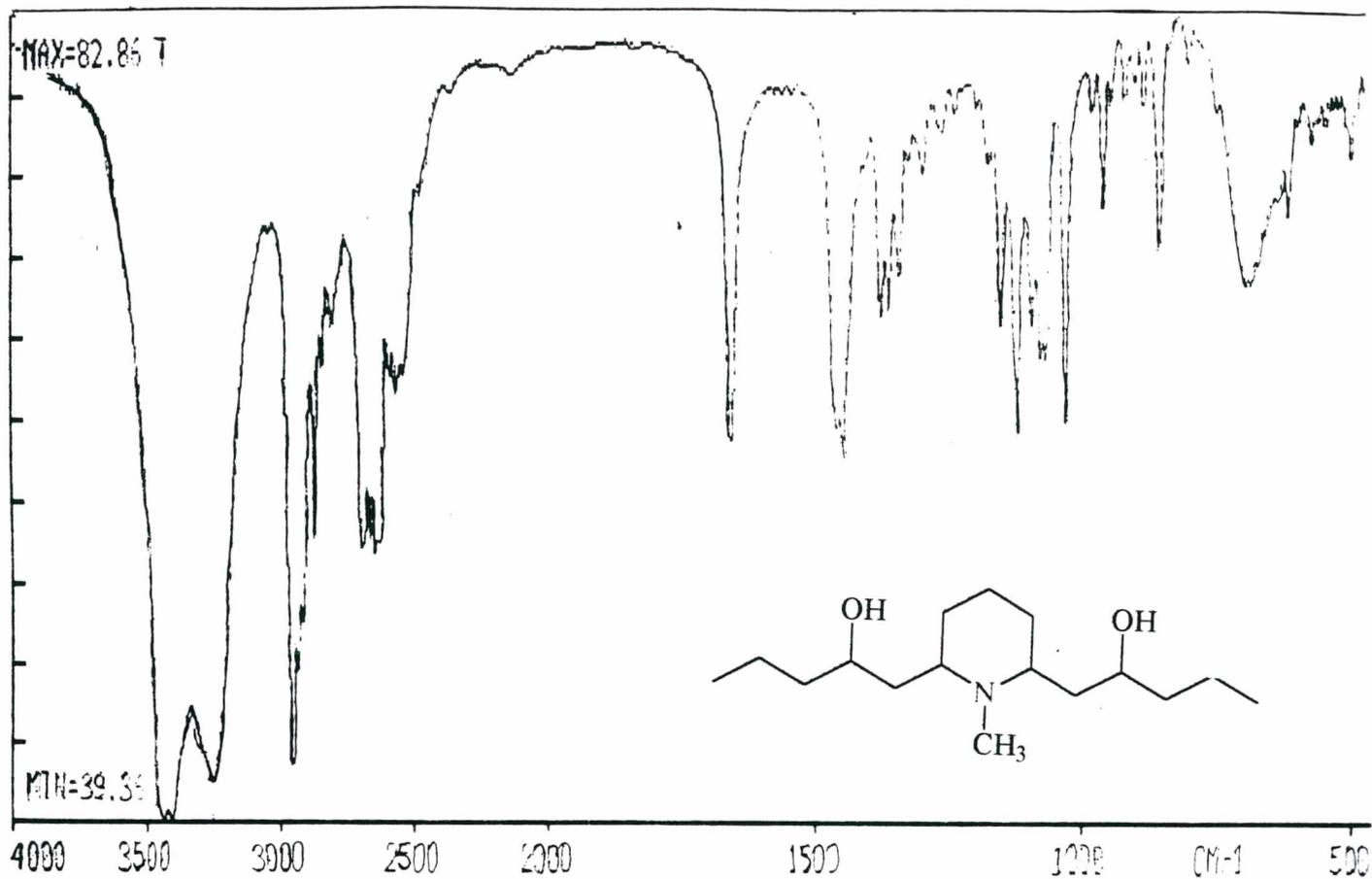
A análise do Raio X foi empreendida a fim de confirmar a estrutura proposta e determinar, especialmente, a configuração absoluta dos carbonos quirais. Definiu-se uma substância na forma clorídrica com duas moléculas de água, esta como uma estrutura simétrica e simetria plana ao átomo C<sub>4</sub>-N-(1- metil) definindo um grupo composto meso, justificando a absorvância da atividade ótica zero . Com o parâmetro geométrico dos dois hidrogênios intermoleculares, foi possível confirmar a estrutura e determinar a absoluta configuração dos carbonos quirais. A estrutura ficou sendo C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>.2H<sub>2</sub>O, determinada pelo Raio-X de difração. Os dados do cristal : orto-rombico, Pbc<sub>a</sub> [nr. 61], a = 8.752 (2), b = 27.084(5), c = 17.973(2) Å<sup>0</sup>, Z = 8, d<sub>c</sub> = 1.063, com 4237 medições e 1617 refrações observadas com parâmetros refinados e o ponto final com R = 6.09 %. Seu ponto

de fusão foi realizado DSC50 Shimadzu differential scanning calorimeter (figura 16 ) apresentando um valor de 75.98<sup>o</sup> C.

A característica da substância que apresentar-se na forma cristalina deve-se ao fato da sua estrutura estar ligada através de ponte de hidrogênio, com duas moléculas de água e uma de cloro. Quando ocorre a quebra desta ponte de hidrogênio a substância apresenta-se na forma líquida, mostrando o seu ponto de fusão ser muito baixo, fugindo das características normais dos alcalóides que apresentam ponto de fusão alto na forma clorídrica. Com base nos dados obtidos a estrutura proposta foi N-Metil-2(R)-[2(S)-hidroxipentil-6(S)-[2(R)-hidroxipentil-piperidina hidrocloreídrica.

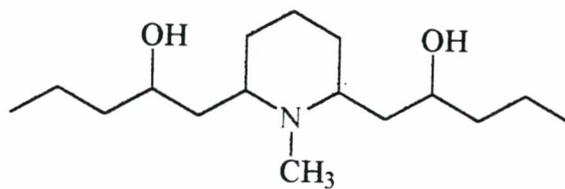
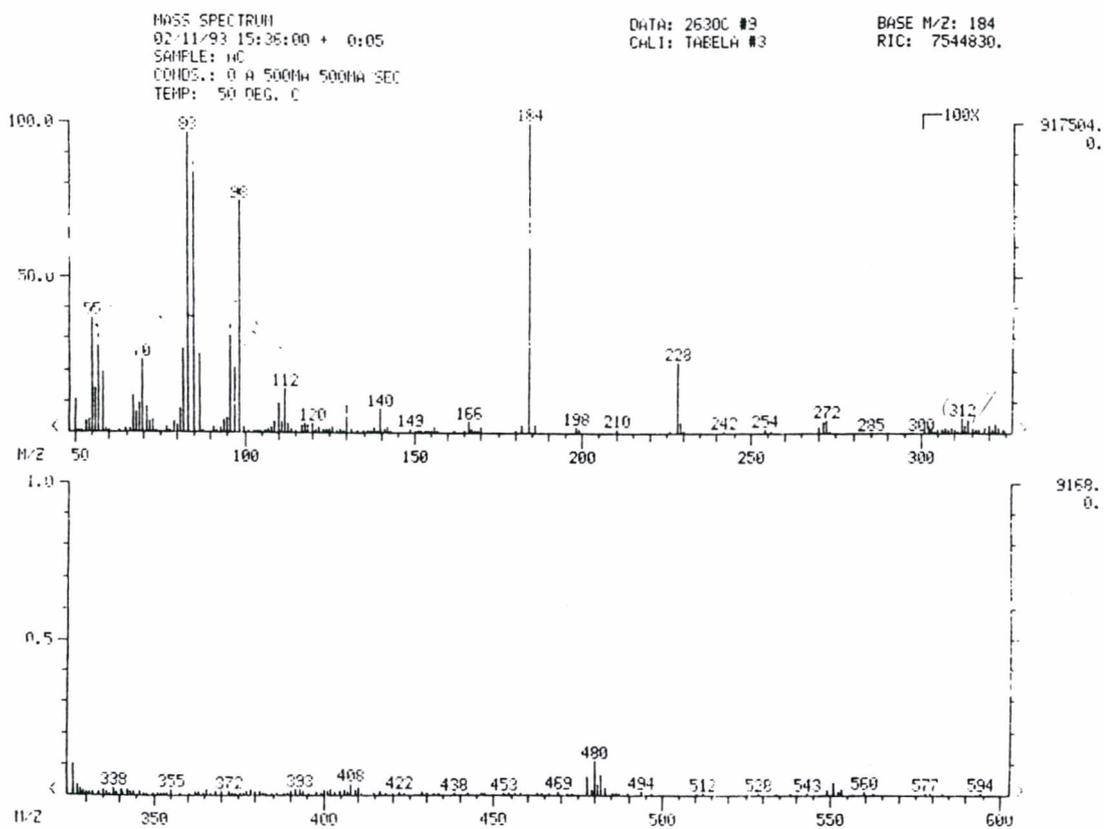


N-Metil-2(R)-[2(S)-hidroxipentil]-6(S)-[2(R)-hidroxipentil  
-piperidina hidrocloreídrica ]



Y:	3551	4000	450	1.00	39.36	32.86	T F	S3	ACB	
ALCALÓIDE										
REF.	4000	81	52	2000	81	00	450			
	3447	39.4	3256	41.6	2954	41.2	2934	47.3	2872	54.7
	2809	66.2	2695	54.2	2661	54.6	2643	53.5	2566	62.5
	1657	59.6	1448	59.4	1375	66.7	1361	67.2	1342	68.7
	1297	74.2	1152	60.0	1121	60.2	1093	65.9	1076	64.5
	1029	60.8	0957	72.5	0917	78.2	0891	77.7	0853	70.3
	0694	68.4	0616	72.4	0573	75.6	0498	75.0		

Figura 7. Espectro de Absorção no Infra vermelho do Alcalóide piperidínico I ( KBr).



**Figura 8.** Espectro de Massa do Alcalóide piperídínico 1 (ID)

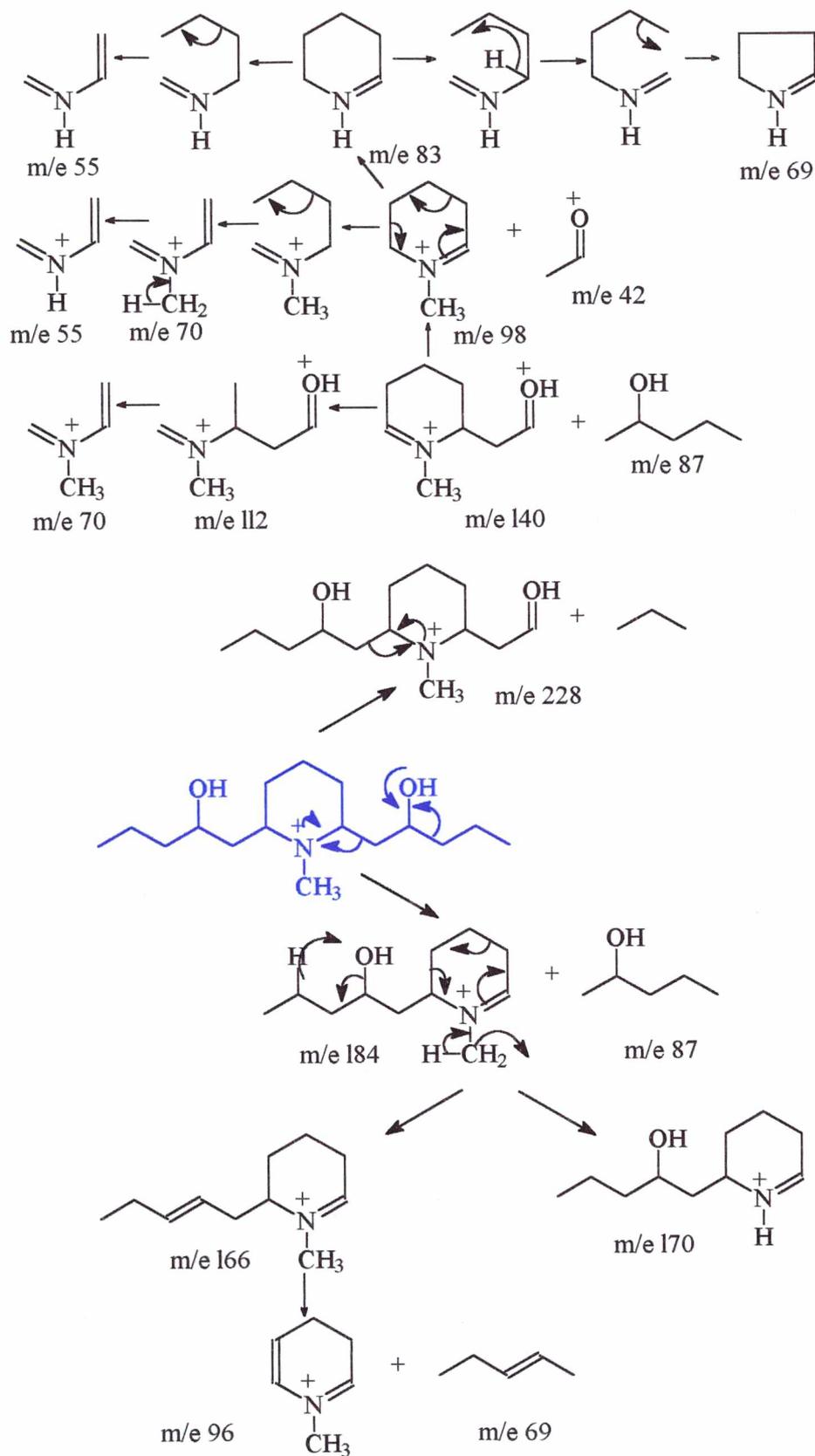


Figura 9. Fragmentação de alguns íons principais do alcalóide piperidínico 1

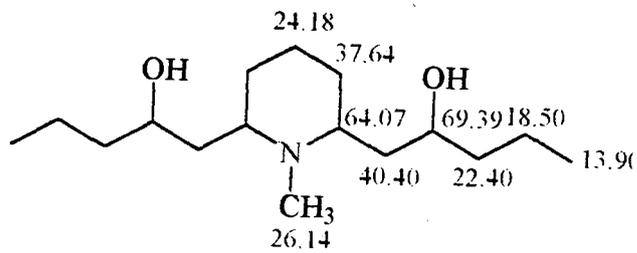
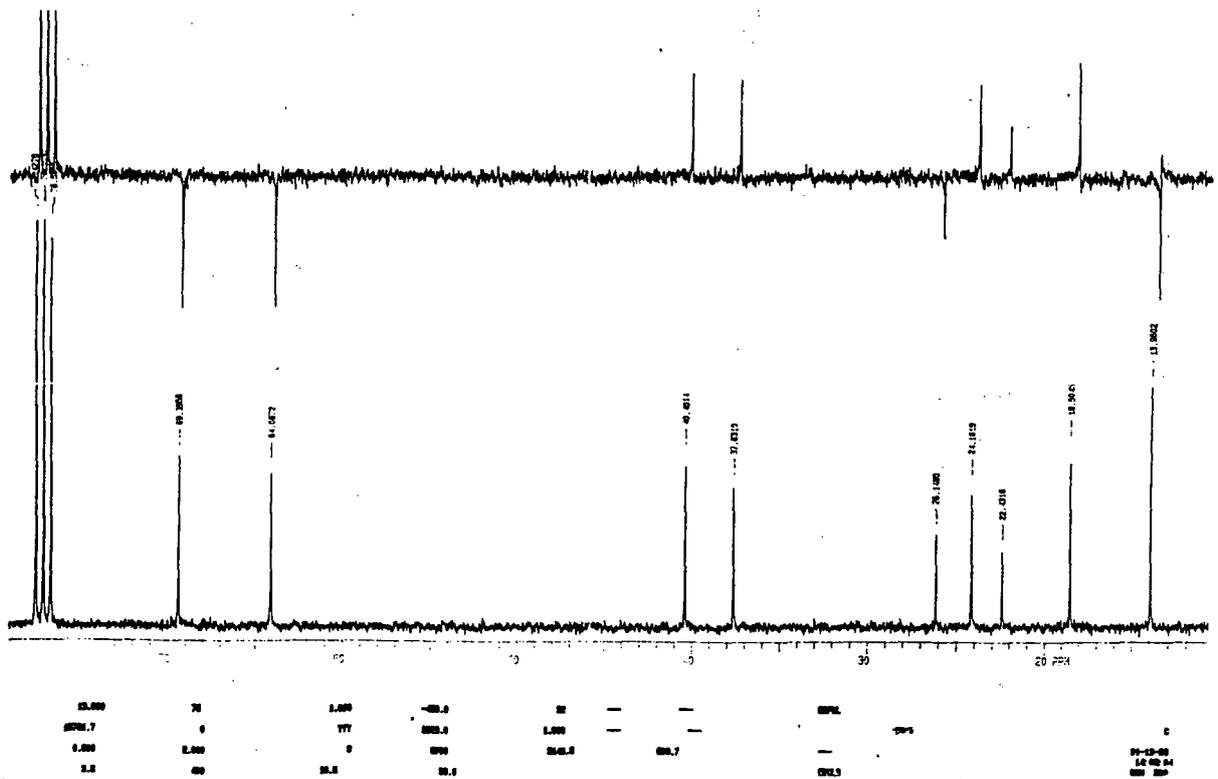


Figura 10. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  do alcalóide piperidínico 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

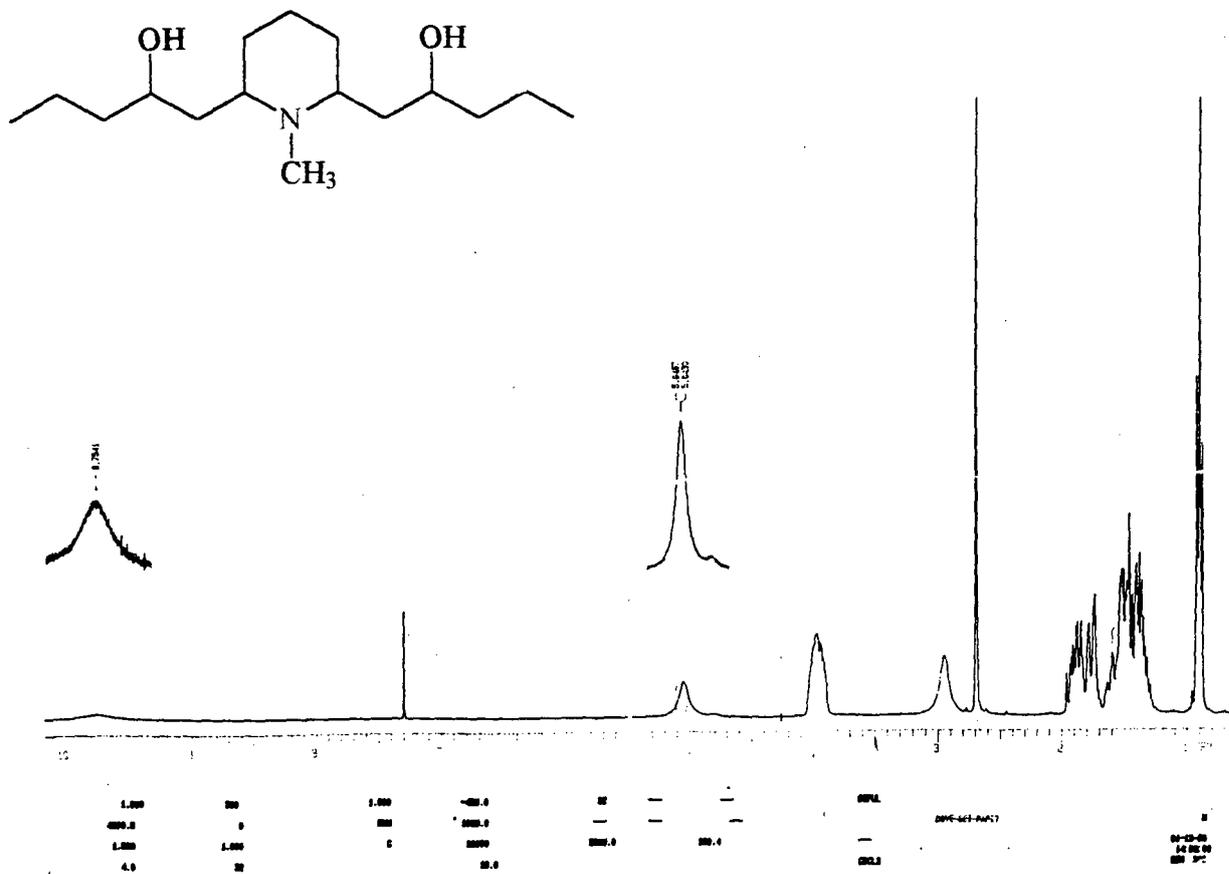
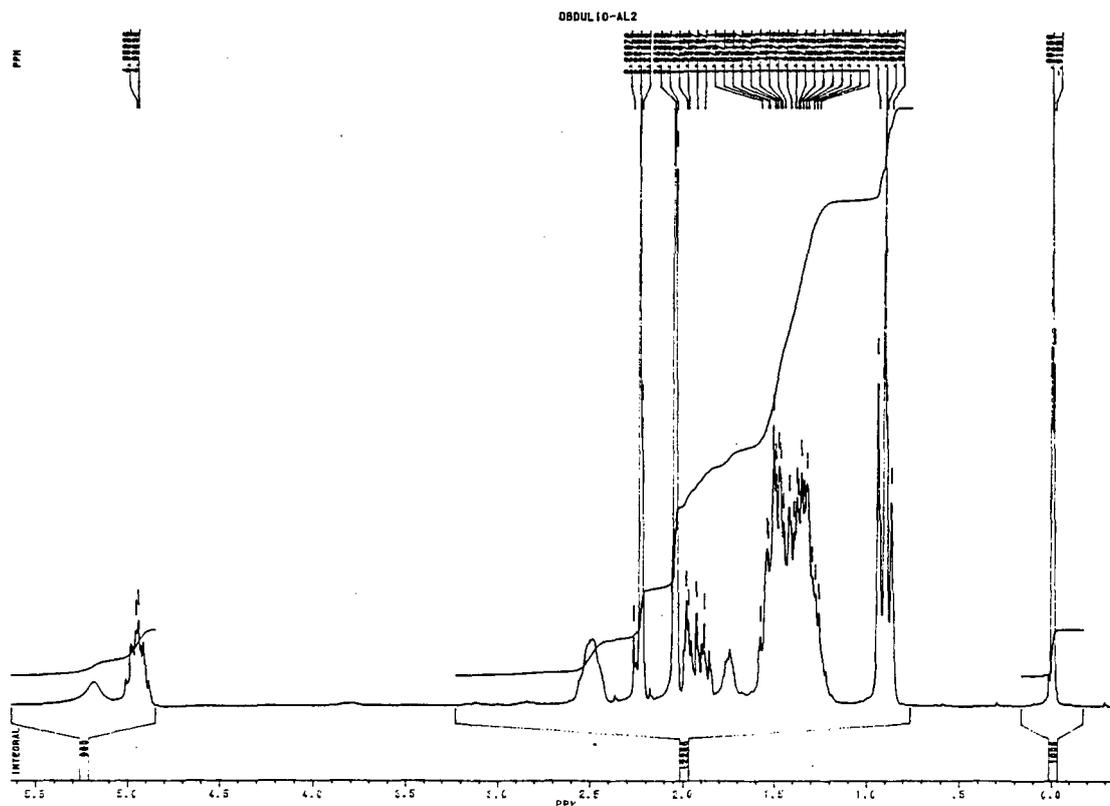
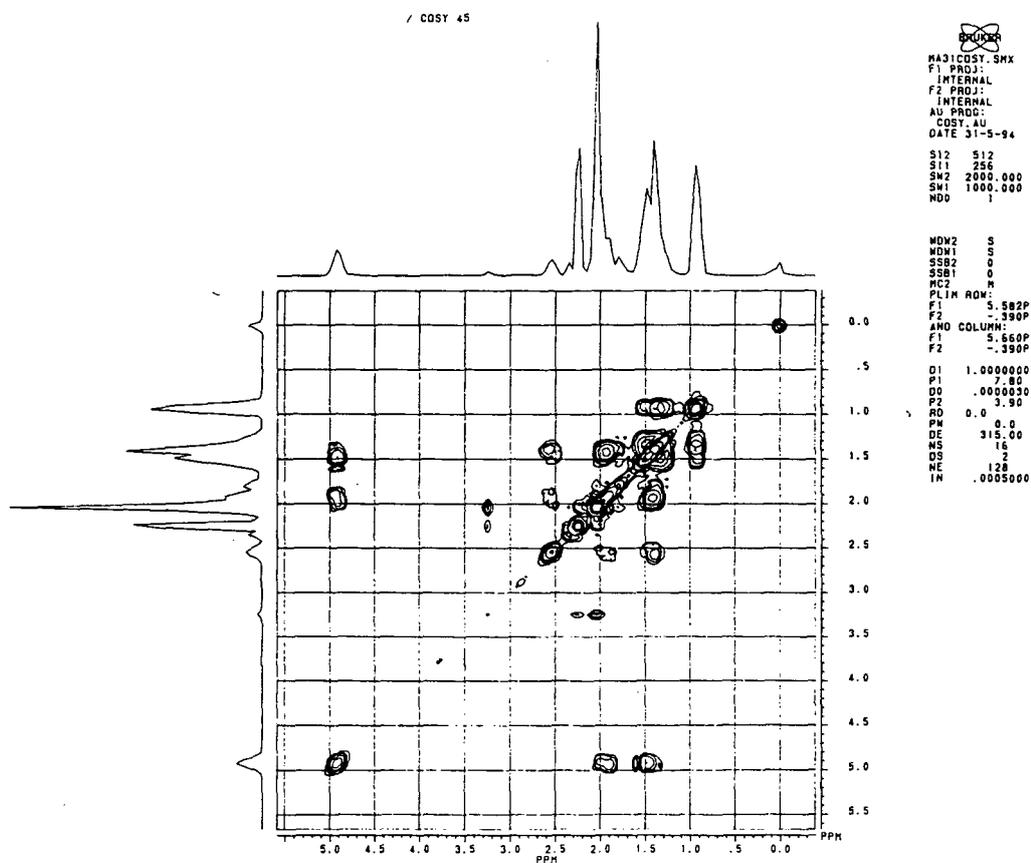


Figura II. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H do alcalóide piperidínico 1 (CD<sub>3</sub>OD).

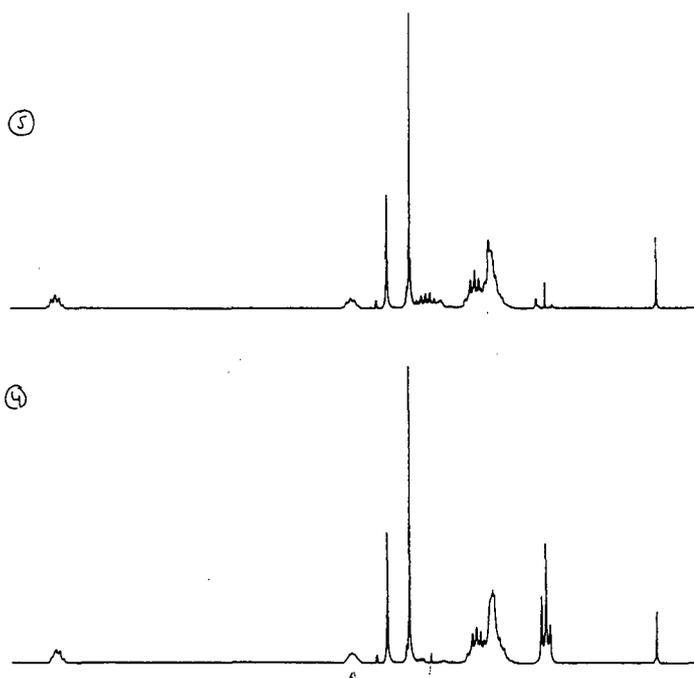


**Figura 12.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do Alcalóide piperidínico Acetilado 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

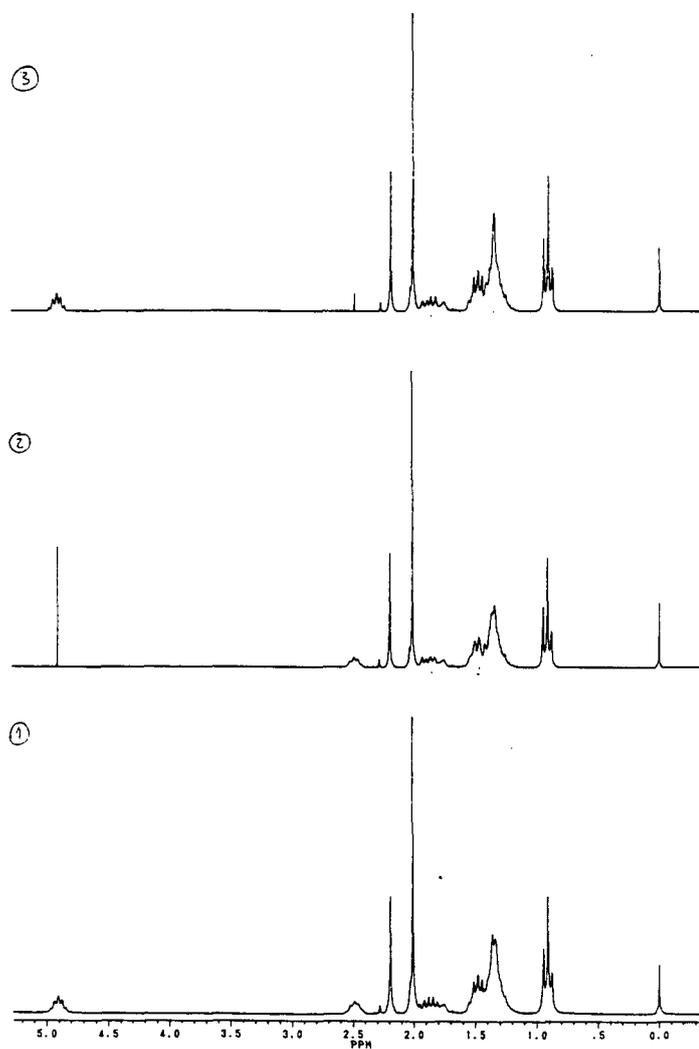


**Figura 13.** Espectro de ressonância magnética nuclear COSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) do alcalóide piperidínico acetilado 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

	$\delta$	Hz ( $O_2 = \text{ivv.}$ )	S3 = 10 1 HD
1	-	Espectro normal	
2	4.9	3310.973	
3	2.5	2827.390	
4	1.8	2698.487	
5	0.9	2512.390	



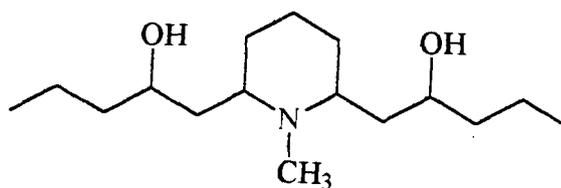
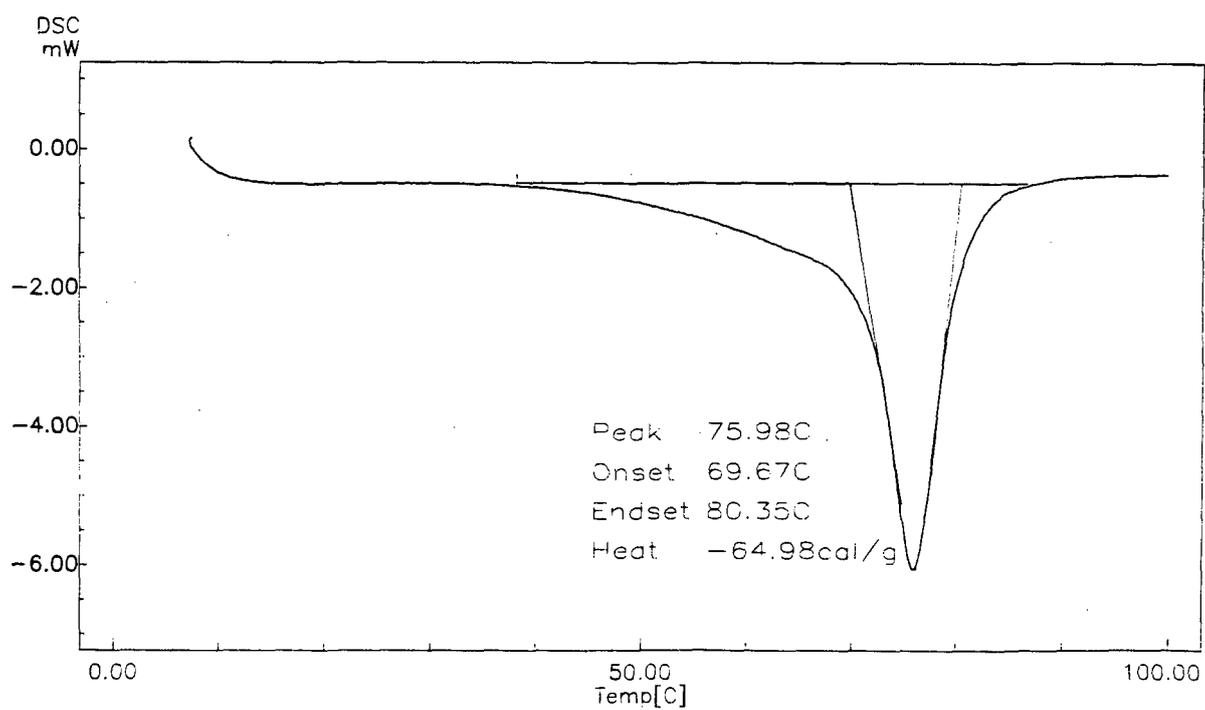
**Figura 14.** Espectro de irradiação de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H do alcalóide piperidínico acetilado 1 (CD<sub>3</sub>OD).



**Figura 15.** Espectro de irradiação de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do alcalóide piperidínico acetilado 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

File Name: A1.D00  
Acquisition Date: 96/03/19  
Sample Name: Amostra 1  
Weight: 1.100[mg]  
Cell: Aluminum  
Atmosphere: Nitrogen  
Rate Flow: 25.00[m<sup>3</sup>/min]  
Operator: Patricia

Temp Program			
Rate	Hold Temp	Hold Time	
[C/min]	[C]	[min]	
10.0	100.0	0.0	



**Figura 16.** Espectro do ponto de fusão do alcalóide piperidínico 1

### 3.3.2 IDENTIFICAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 2

Das frações 53 a 57 de *Siphocampylus verticillatus*, obteve-se 0.1070 g de cristais que fundiram na faixa de 55.52°C. (figura 23).

#### 3.3.2.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO INFRA VERMELHO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 2

O espectro de infra vermelho (IV) foi obtido num equipamento Perkin-Elmer modelo 781, a amostra foi preparada em pastilhas, comprimida com brometo de potássio anidro (KBr) evidenciando (figura 17):

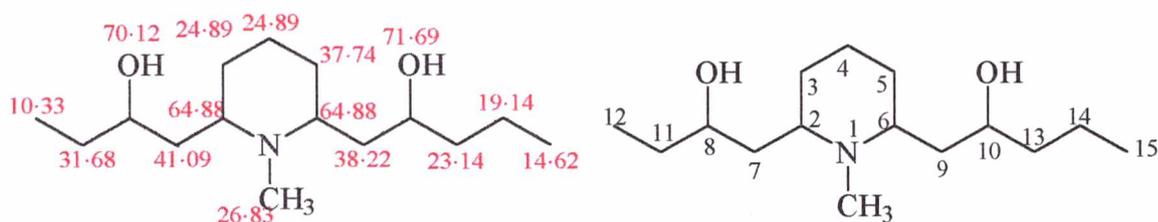
- a. absorção intensa, com terminação em duas pontas correspondente a um estiramento de ligação OH em 3392  $\text{cm}^{-1}$ .
- b. absorção com estiramento de ligação CH metila em 2954 a 2872  $\text{cm}^{-1}$ .
- d. absorção com deformação angular simétrica de  $\text{CH}_2$  em 1448  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.3.2.2. ESPECTRO DE MASSA DO ALCALÓIDE PIPERIDINICO 2

O espectro de massa (EM) foi obtido no espectro Micro Mass 12 (figura 18, 19), onde o alcalóide apresentou as características das piperidinas cíclicas<sup>24</sup>, apresentando o íon molecular ( $\text{M}^+$ ) a m/e 257 (1.1 %), e os seguintes fragmentos principais a m/e 55 (44 %), 70 (30.43 %), 98 (96 %), 112 (11.9 %), 140 (6.5 %), 156 (4.3 %), 170 (100 %), 84 (57 %), 214 (12.8 %), 228 (6.8 %), 242 (0.9 %), e 257 (1.1 %), tipos de fragmentações observadas em alcalóides com núcleo piperidínicos e cadeias laterais nas posições 2 e 6 ao anel, sendo possível prever relação à nomenclatura sistemática introduzida para os alcalóides da *lobélia* de acordo com sua origem biogenética, conforme demonstrado na estrutura A<sup>88, 120</sup> da página 62.

### 3.3.2.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE $^{13}\text{C}$ DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 2

O espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  RMN) foi obtido em uma frequência de (70 MHz), onde mostrou deslocamentos químicos atribuídos pelos espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN, Dept. (figura 20 e 21), os quais foram compatíveis aos atribuídos pela literatura para alcalóides piperidínicos <sup>1, 2, 147</sup>. A configuração cis é confirmada pela comparação do  $^{13}\text{C}$ , mudança do  $\text{C}_4$  reportada com valores 2,6 dissubstituído piperidina é de 24.18 ppm (a literatura 25.1) <sup>2, 46</sup> quando o isômero for trans o valor é de 18.56 ppm. O  $^{13}\text{C}$  atribuí (70 Mhz,  $\text{CDCl}_3$ ) valores  $\delta$   $\text{C}_2$  64.88,  $\text{C}_3$  24.89,  $\text{C}_4$  24.89,  $\text{C}_5$  37.74,  $\text{C}_6$  64.88,  $\text{C}_7$  41.09,  $\text{C}_8$  70.12,  $\text{C}_9$  38.22,  $\text{C}_{10}$  71.69,  $\text{C}_{11}$  31.68,  $\text{C}_{12}$  10.33,  $\text{C}_{13}$  23.14,  $\text{C}_{14}$  19.14,  $\text{C}_{15}$  14.62 e  $\text{C}^1$  26.83, sugerindo tratar-se de uma estrutura assimétrica, apresentando substituições na posições 2 e 6 do anel piperidínico.

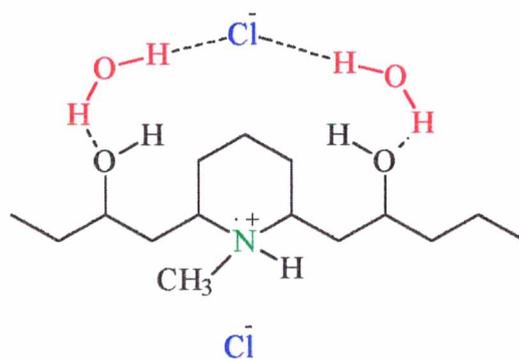


### 3.3.2.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA $^1\text{H}$ DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO 2

O espectro de ressonância magnética de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN) foi obtido em frequência de 70 MHz ( figura 22) apresentando dois metil triplete distorcido  $\delta$  0.9 e 0.97, indicando a presença de dois grupos terminais etil e propil H (12/15) adjacentes aos grupos metilenos em C (11/14). Um multiplete  $\delta$  1.37 - 1.86 que foi atribuído aos grupos metilenos em C 3/5,4, 7/9, 11/13, 14. Um singlete de 3H em  $\delta$  2.70 atribuído a  $\text{N-CH}_3$ , enquanto que o

singlete em  $\delta$  3.46 foram atribuídos para os prótons em C 2/6 e um singlete largo em  $\delta$  3.92 para os prótons C 8/10, estando ligado as hidroxilas. Com a análise de halógenos pela decomposição pelo sódio metálico, foi confirmado a presença de nitrogênio e cloro.

Com base nos dados da literatura e nos dados espectrais, propôs-se a seguinte estrutura, correspondente ao Nmetil-2(R)-[2(s)hidroxipropil)-6-(s)-[2(R)-hidroxipentil)-piperidina hidrocloreídrica:



[N-metil-2(2-hidroxibutil)-6-(2-hidroxipentil)] piperidina

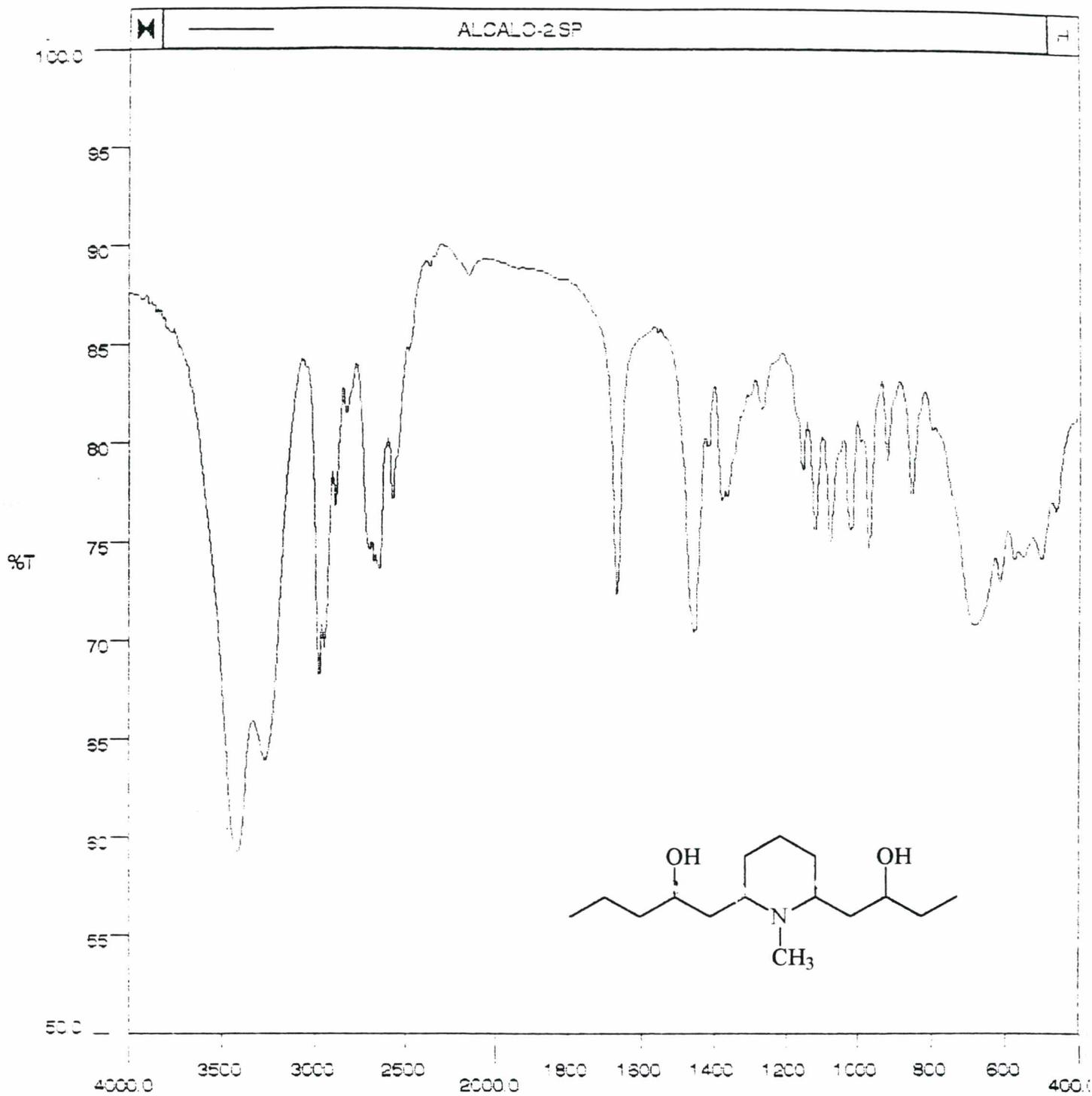


Figura 17. Espectro de absorção no infra vermelho do alcalóide piperidínico 2

Mass Spectrum File: am37 .01 95-11-22 10:29  
Comment: Obdulio - Amostra 37

Scan: 61 ( 0- 0) R.T.: 2.10min Base Peak: 170.0 Int: 70700(=100%)  
100.0%

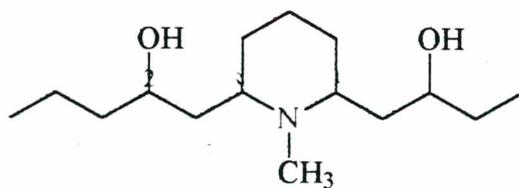
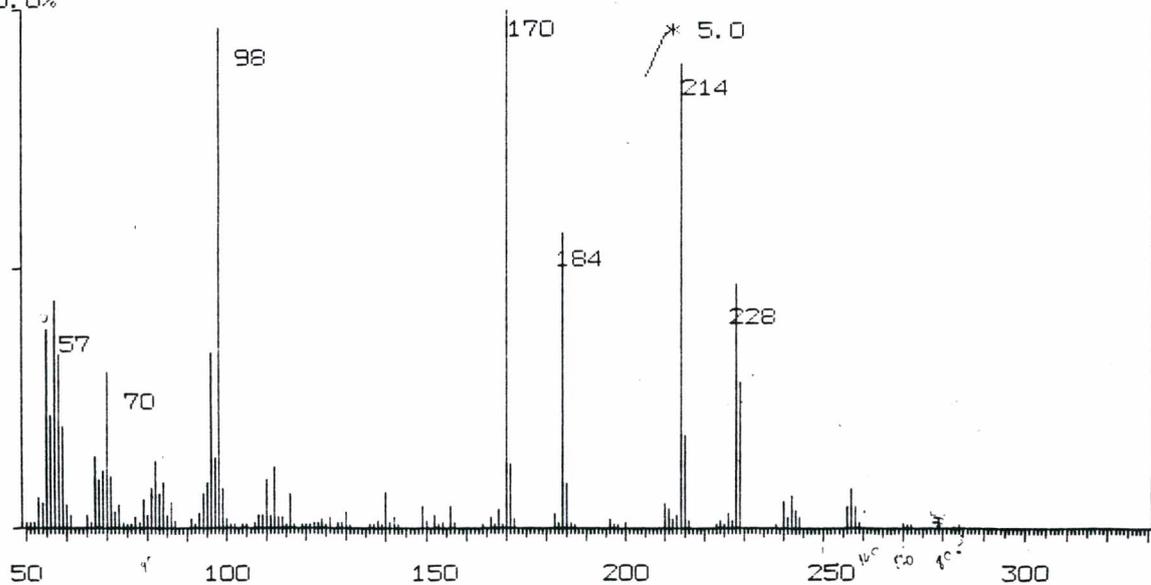
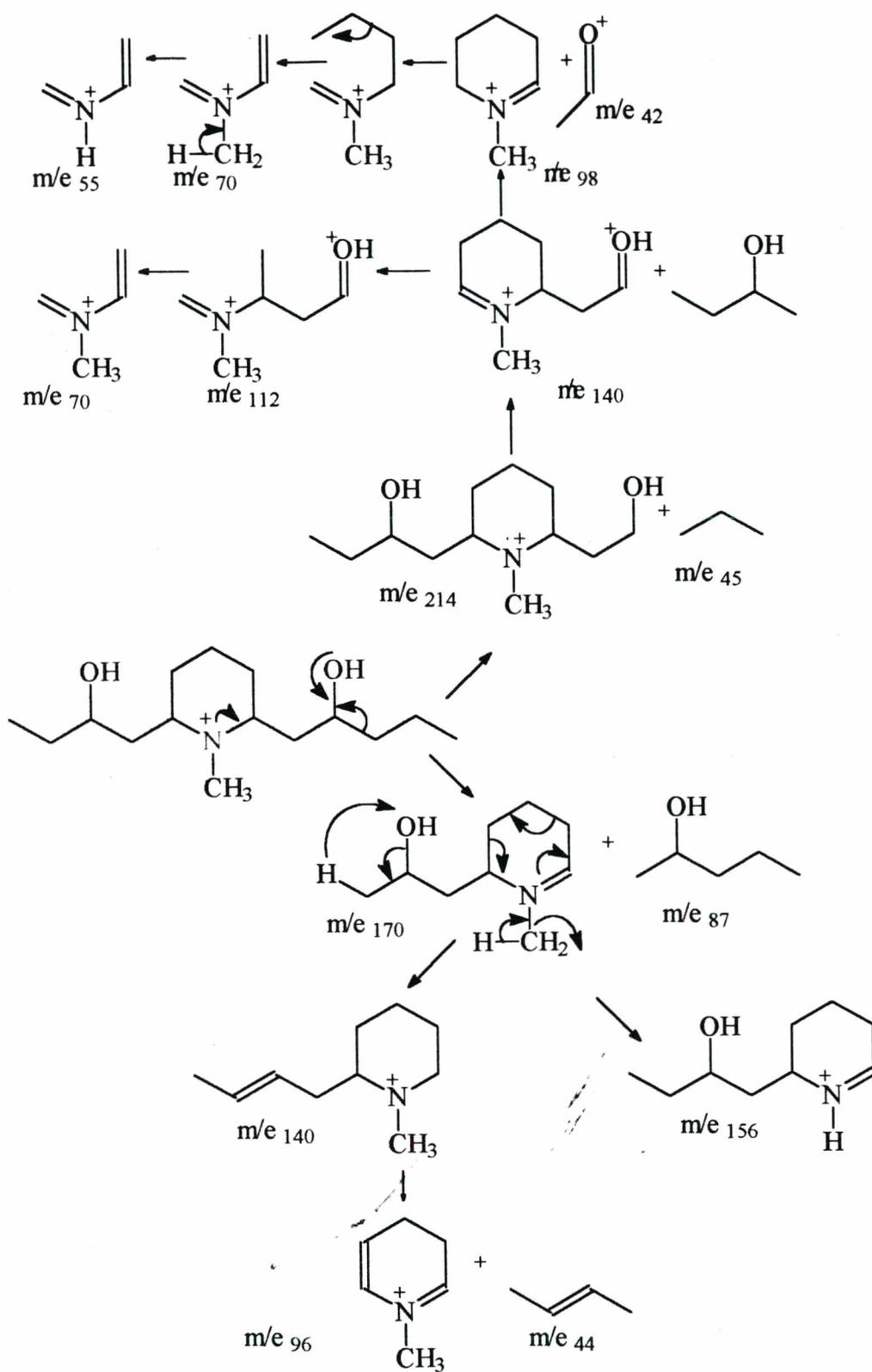
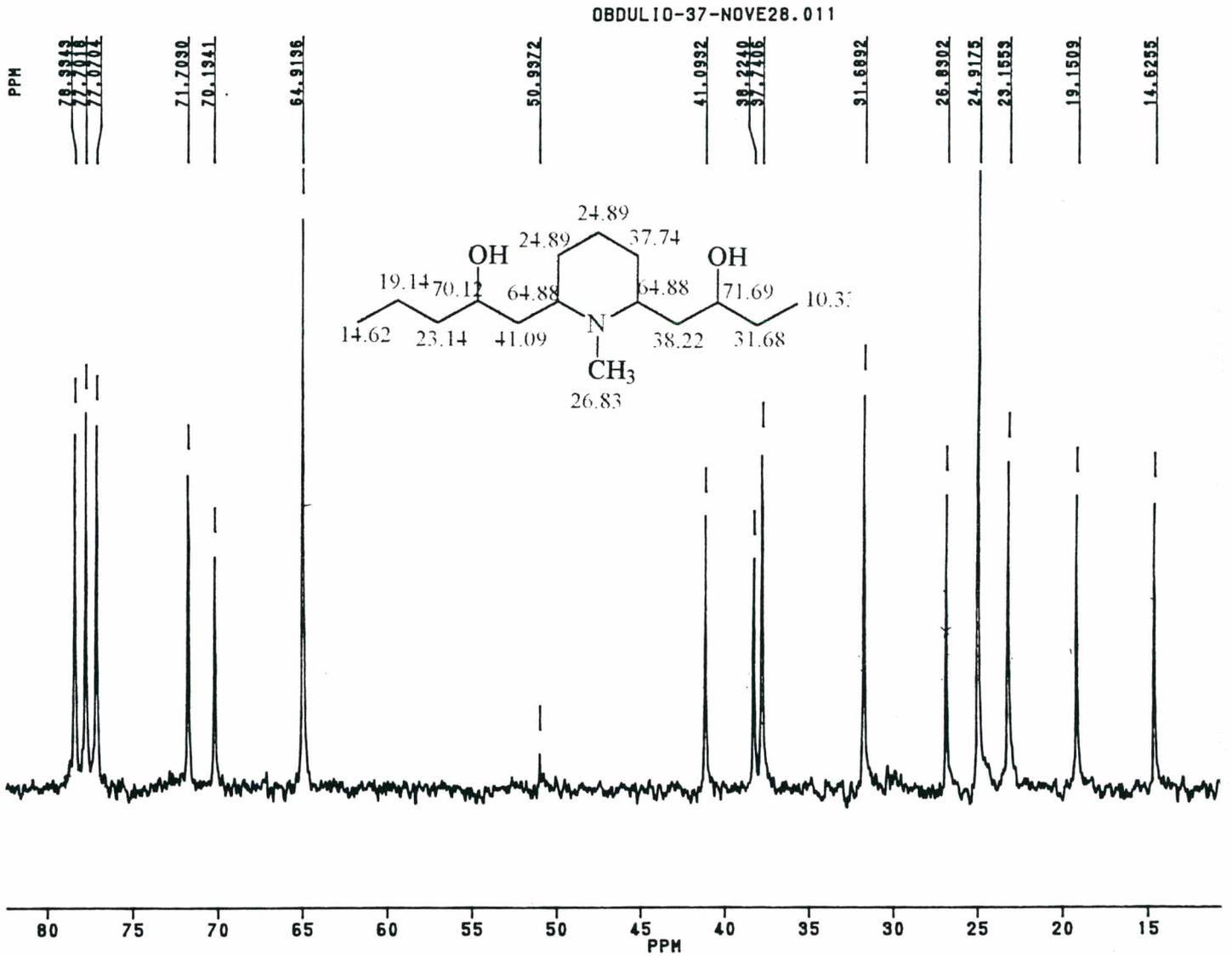


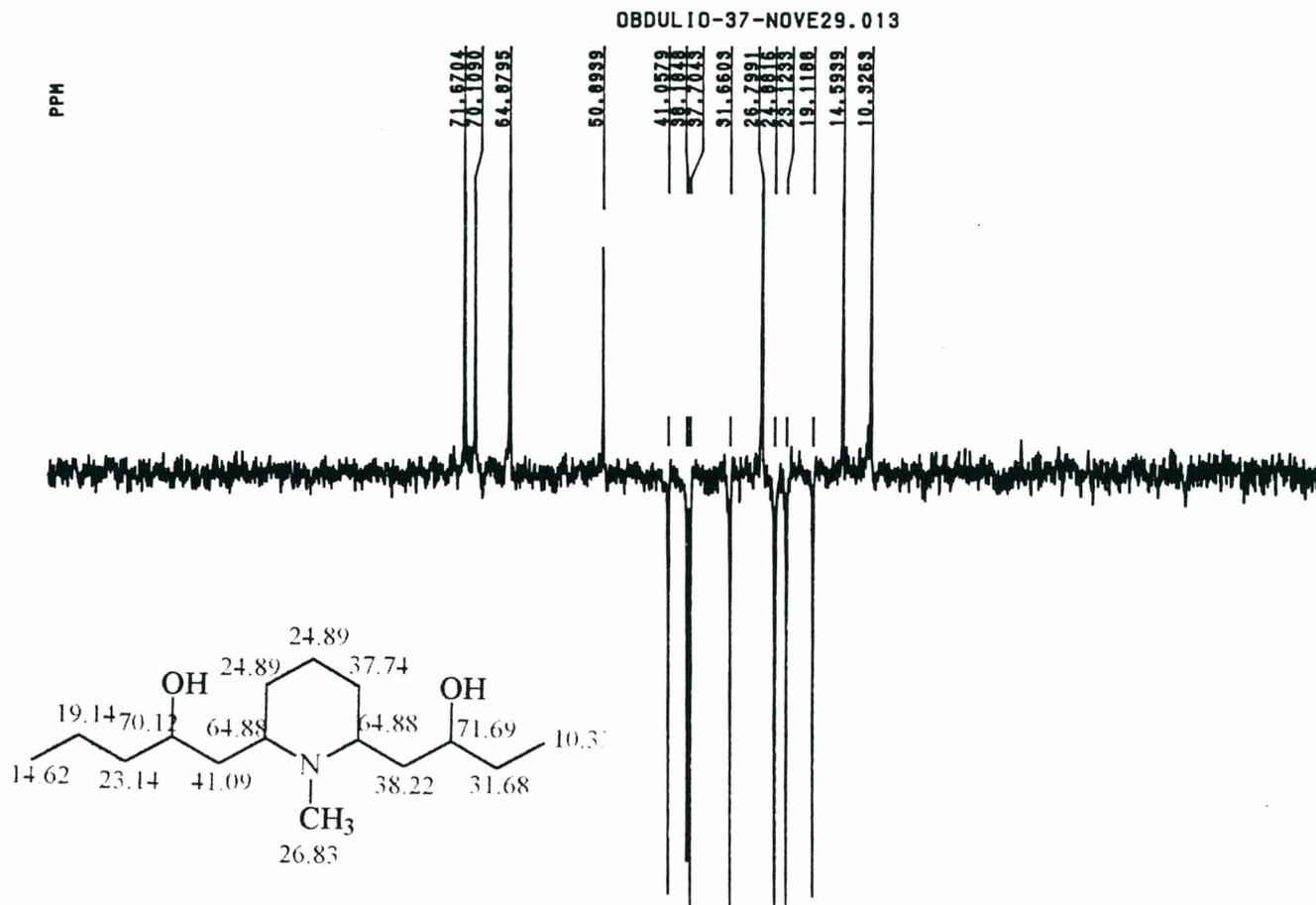
Figura 18. Espectro de massa do alcalóide piperidínico 2 (ID)



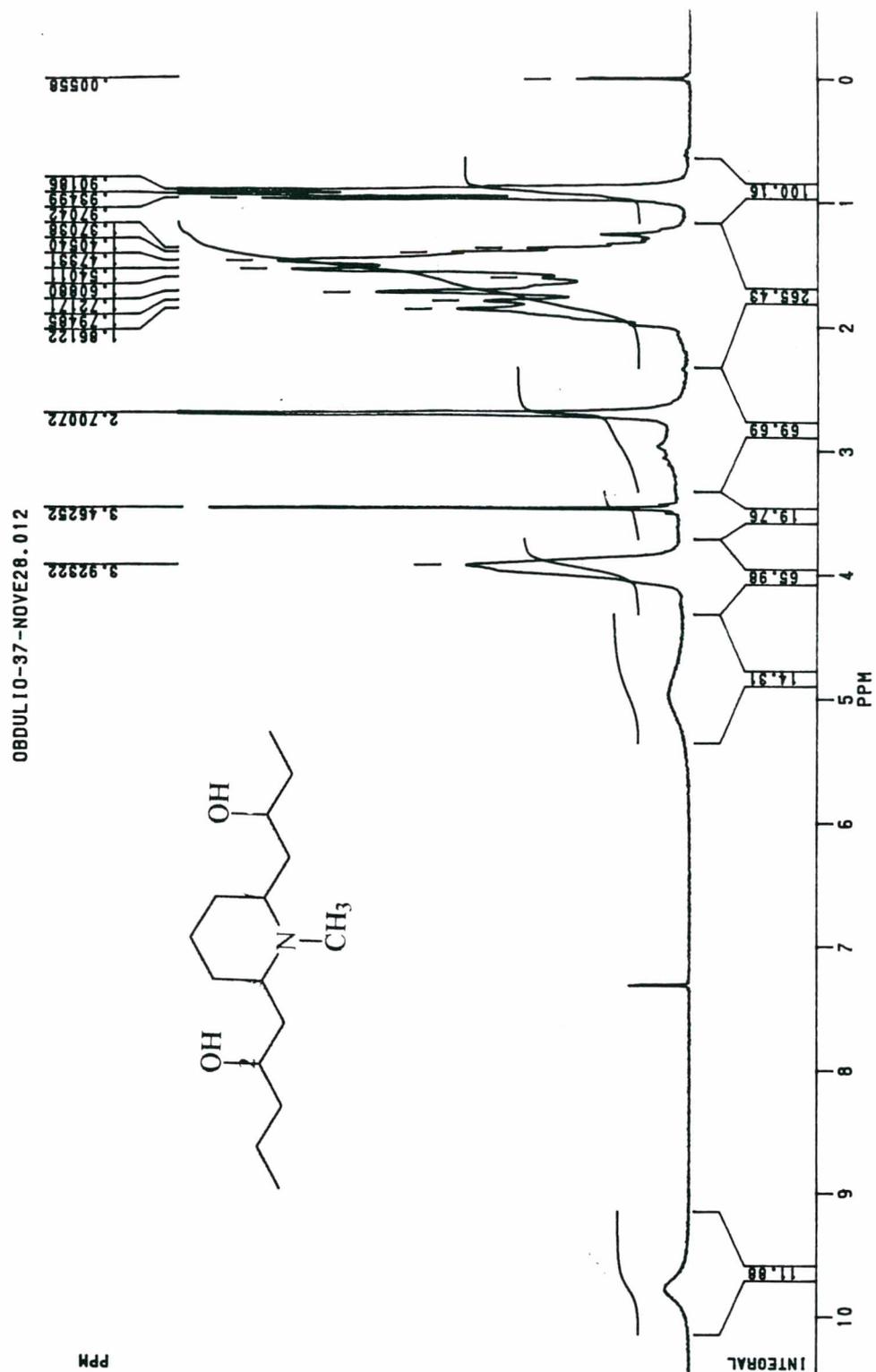
**Figura 19.** Fragmentação de alguns íons principais do do alcalóide piperidínico 2



**Figura 20.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  do alcalóide piperídínico 2 (MeOD).



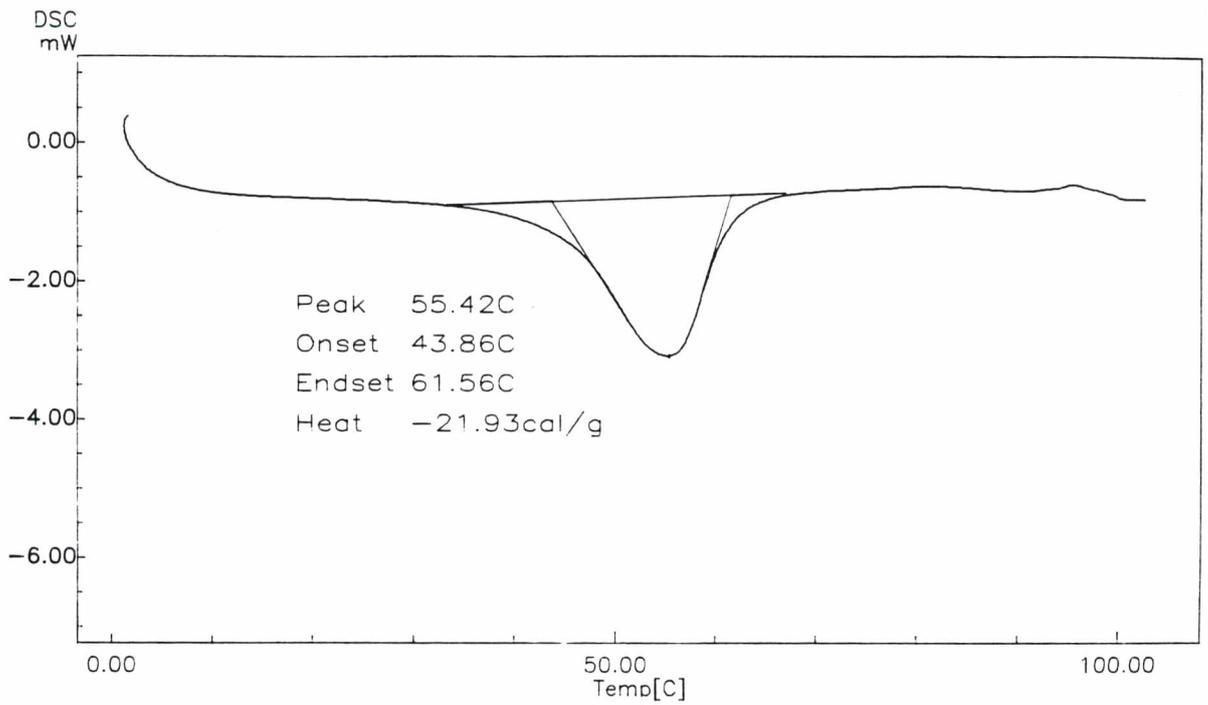
**Figura 21.** Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C do alcalóide piperidínico 2 (DEPT), (MeOD).



**Figura 22.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do alcalóide piperidínico 2 (MeOD).

Acquisition Date: 96/03/19  
Sample Name: Amostra 2  
Weight: 1.700[mg]  
Cell: Aluminum  
Atmosphere: Nitrogen  
Rate Flow: 25.00[ml/min]  
Operator: Patricia

Temp Program  
Rate Hold Temp Hold Time  
[C/min] [C] [min]  
10.0 150.0 0.0



**Figura 23.** Espectro do ponto de fusão do alcalóide piperidínico 2

### 3.3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTERÓIS E TRITERPENOS

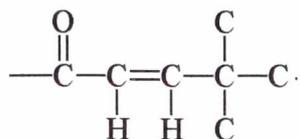
Das frações 65 a 67 obteve-se 0.730 g de um pó branco, que funde-se na faixa de 164 - 165°, enquanto que a análise de CHN mostrou 85.20% C e 10.35% H não apresentou N e 4.45% O<sub>2</sub>.

#### 3.3.3.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA GLOCHIDONA

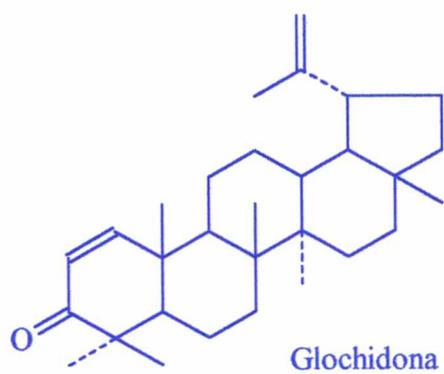
Os espectros de infra vermelho (IV) foram obtidos num equipamento Perkin - Elmer, modelo 781 (figura 24) preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr), mostrando absorção intensa em 2938 cm<sup>-1</sup> de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, 1668 cm<sup>-1</sup> de acetona α e β insaturada e 878 cm<sup>-1</sup> de =CH<sub>2</sub> e um vinil C-CH<sub>3</sub>

#### 3.3.3.2 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup>H DA GLOCHIDONA

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) foi obtido a uma frequência de 300 MHz (figura 25) mostrou a presença de seis sinais referentes aos grupos metilas C-CH<sub>3</sub>, sendo um em δ 1.08 sob ação da dupla ligação, mais sinais para 2 prótons de metila terminal (3.60 a 3.45 δ), dois dubletes centrado em δ 4.64 (d J= 6, =CH<sub>2</sub>) e um par de dubletes (<sup>1</sup>H) em δ 5.75 (J= 10.17 Hz), referente aos prótons olefínicos ou da dupla ligação, e um par de dubletes em (<sup>1</sup>H) δ 7.09 (J= 10.17 Hz) indicando a presença de próton vizinho à carbonila.



Com base nos dados da literatura e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondentes à Glochidona.



já isolado anteriormente (Ganguly, 1966)<sup>59</sup>.

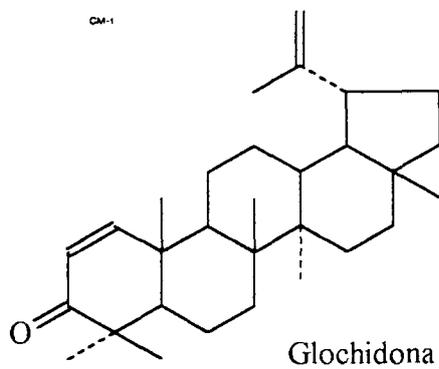
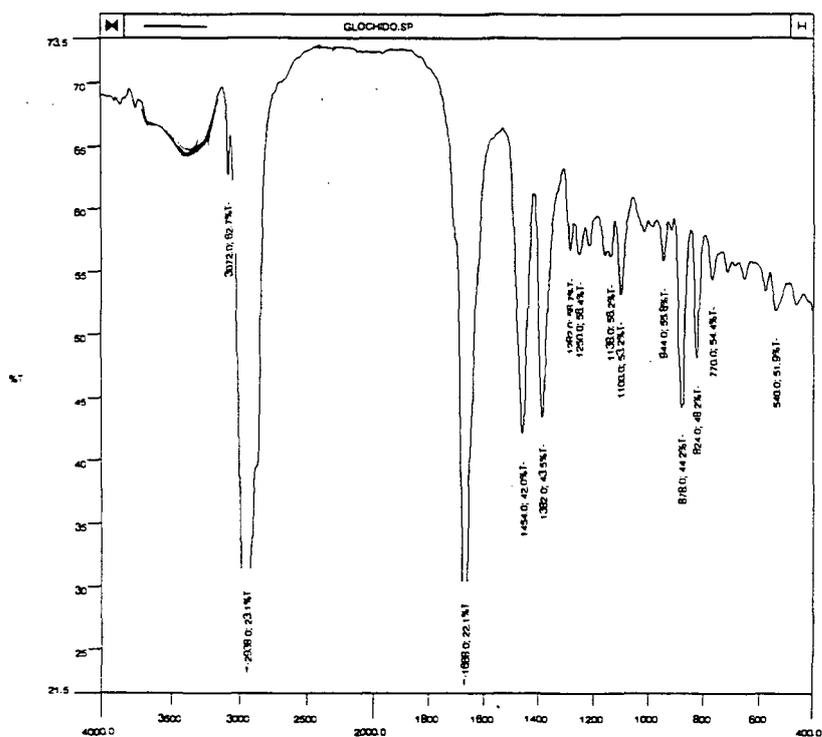


Figura 24. Espectro de absorção no infra vermelho da glochidona (CDCl<sub>3</sub>)

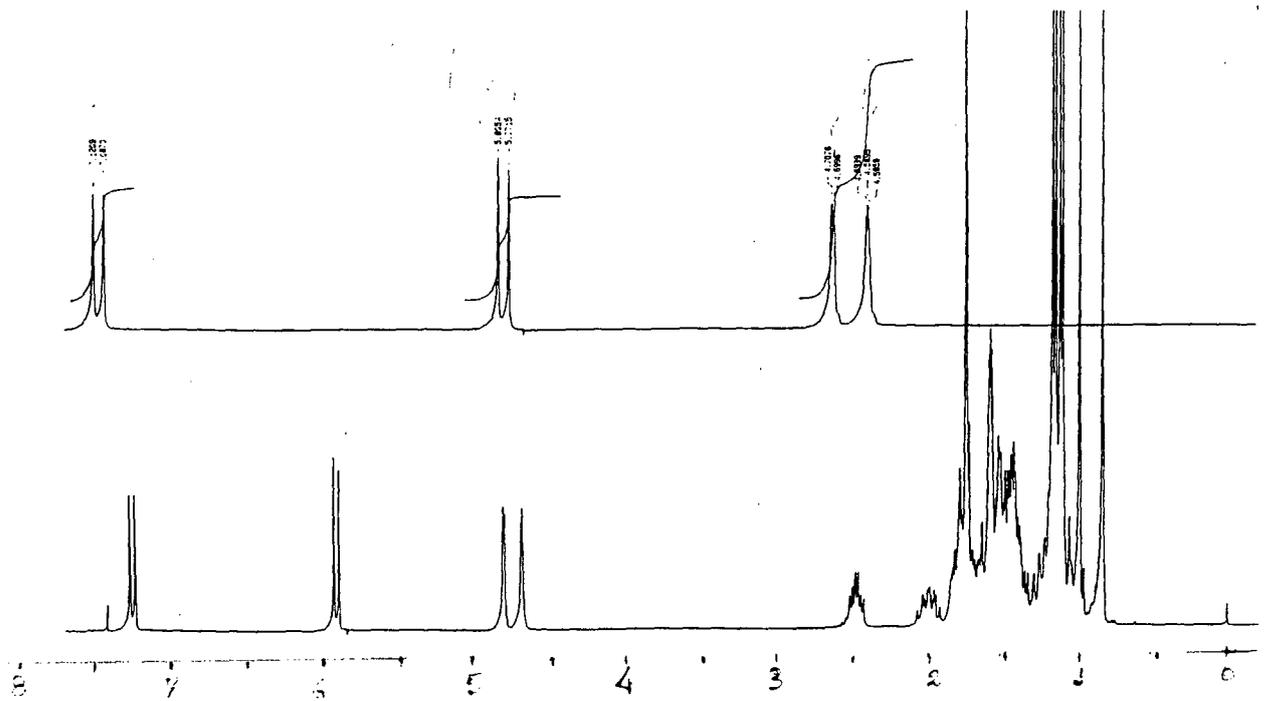
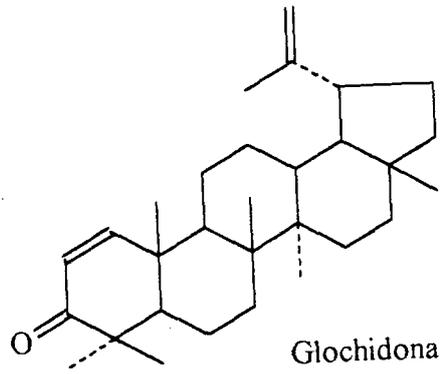


Figura 25. Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup>H da glochidona (CDCl<sub>3</sub>)

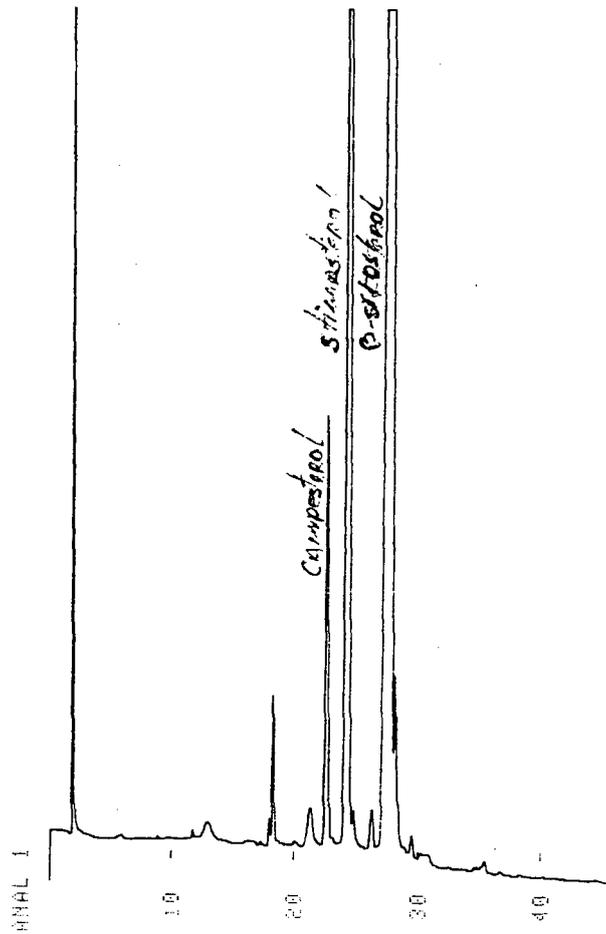
### **3.3.4. MISTURA DE ESTEROIS DAS FRAÇÕES 69 a 77 *Ph. sellowianus***

#### **3.3.4.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA F. 69 a 77**

O espectro de infra vermelho (IV) foi obtido num equipamento Perkin-Elmer, modelo 781 preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr), o qual mostrou absorção de hidroxila em  $3436\text{ cm}^{-1}$  e absorções intensas em 2942, 2866, 1460 e  $1376\text{ cm}^{-1}$ .

As análises por cromatografia gasosa foram eluídas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-14 A, detector de ionização de chama, com coluna capilar de sílica fundida, comprimento de 25 m, e com um filme de  $0.25\text{ }\mu\text{m}$  da fase estacionária Ovl, usando como gás carreador, hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) a uma velocidade de  $31.25\text{ cm/s}$ , temperaturas do injetor e detector mantidas a  $280^\circ$  e  $310^\circ$  (CGAR) mostrando uma mistura de esteróis com a seguinte composição para a mistura: campesterol (0.063g), stigmaterol (0.343g) e  $\beta$ -sitosterol (0.9968 g). A relação percentual relativa destes três esteróis foi fornecida pela integração dos seus respectivos picos cromatográficos.

A mistura de esteróis foi confirmada pelas coinjeções com uma mistura de padrões, em CGAR usando coluna capilar OV 1 (Figura 26).



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.028	3054317	E		83.7149	
2	23.008	17533			0.4806	
3	24.848	122768			3.3649	
4	28.593	453858	SV		12.4397	
TOTAL		3648475			100	

METHOD\$(0)="840"  
ATTEN(0)=1  
ANAL 1

**Figura 26.** Cromatograma das frações 69 a 77 de *P. sellowianus*

### 3.3.5 MISTURA DE ESTERÓIS DAS FRAÇÕES 25 a 26 De *S. verticillatus*

Das frações de *Siphocampylus verticillatus* 25 a 26, obteve-se 0.145 g de um pó branco que fundiu na faixa de 154 a 169° C.

#### 3.3.5.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA F. 25 a 26.

O espectro de infravelho (IV) foi obtido num equipamento Perkin- Elmer , modelo 781, preparada a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr), que mostrou absorção de Hidroxila em 3424  $\text{cm}^{-1}$  e absorções intensas em 2938, 2866, 1462 e 1376  $\text{cm}^{-1}$

As análises por cromatografia gasosa foram eluidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-14 A, detector de ionização de chama, com coluna capilar de sílica fundida comprimento de 25 m, e com um filme de 0,25 $\mu\text{m}$  da fase estacionária OV-1, o gás carreador usado foi hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), a uma velocidade de 31,25 cm/s, as temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 280° e 310° (CGAR), mostrando uma mistura de esteróis, com a seguinte composição para a mistura: Campesterol 0.101 g),  $\beta$ -sitosterol (0.0667 g), Stigmasterol (0.012 g),  $\alpha$ -amirina (0.012 g) e  $\beta$ -amirina (0.008 g). A relação percentual relativa destes esteróis foi fornecida pela integração dos seus respectivos picos cromatográficos.

As misturas de esteróis foram confirmadas por coinjeções de uma mistura de padrões em CGAR. usando coluna capilar OV 1 (Figura 27)

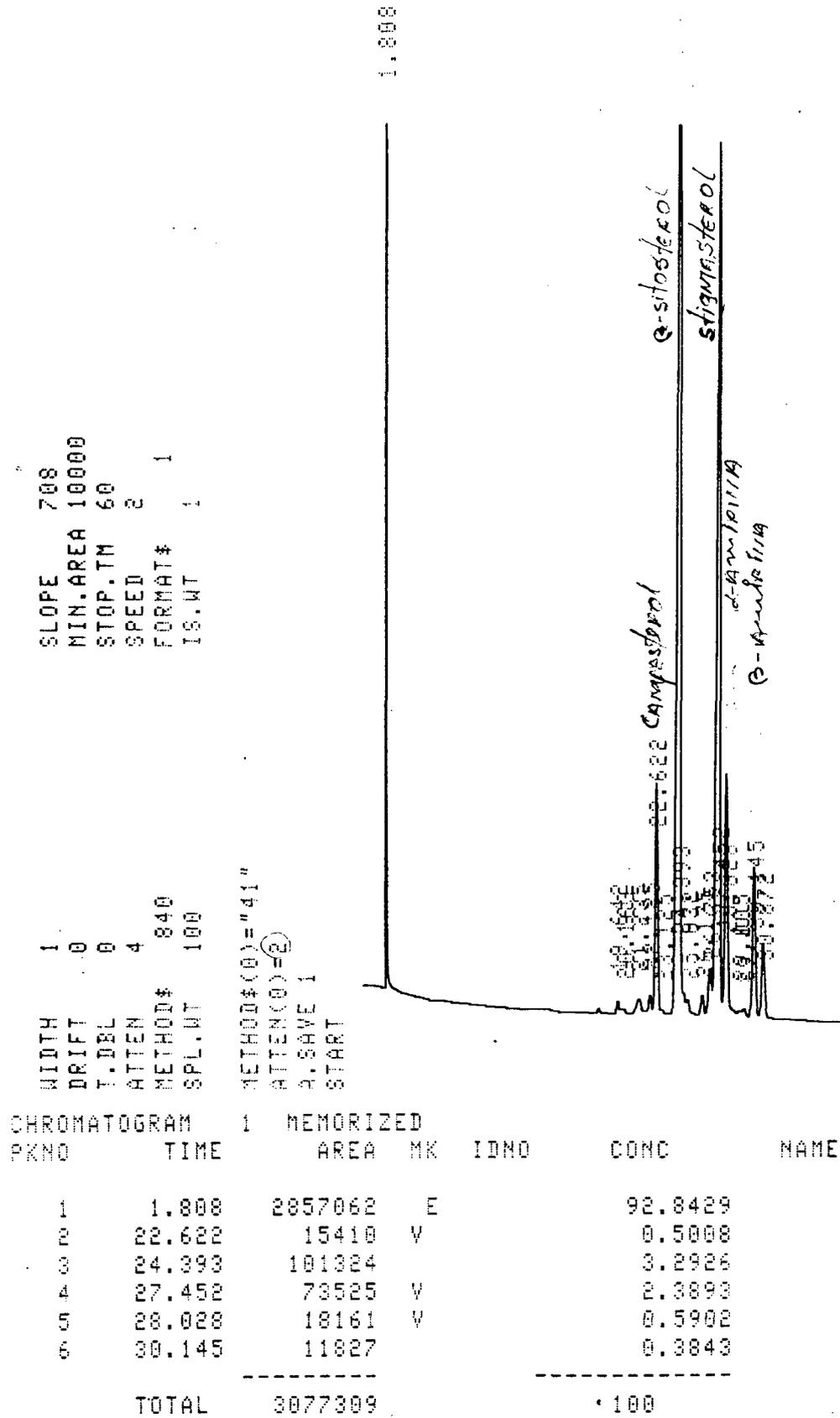


Figura 27. Cromatograma das frações 25 a 26 de *S. verticillatus*

### 3.3.6 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DE *S. verticillatus*

A fração clorofórmica de *S. verticillatus* foi deixada em repouso para que houvesse a cristalização do Stigmasterol, após a cristalização foi filtrada e os cristais lavados com acetona, obtendo-se 0.1305 g de cristais incolores com formato de agulhas, que fundiram na faixa de 129 a 130°C. Sua estrutura foi proposta através de análises espectroscópicas em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação em CG com amostra autêntica e literatura<sup>25, 50, 98</sup>.

#### 3.3.6.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO STIGMASTEROL

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (figura 28) foi obtido em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 787 com a substância incorporada em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr). As absorções foram registradas em escala de centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ), sendo os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0.5 mm de espessura. Evidenciando absorção de hidroxila em  $3304\text{ cm}^{-1}$  e absorção intensa em  $2960\text{ cm}^{-1}$  de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , e deformação angular simétrica de  $\text{CH}_2$  em  $1464\text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.3.6.2 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR DE $^1\text{H}$ DO STIGMASTEROL

O espectro de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  (figura 29, 30), foram obtidas a uma frequência de 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ , ( $\delta$ , ppm). O espectro apresenta vários sinais característicos de um esqueleto esteroídico. Assim os dubletes a  $\delta$  0.82, 0.93 com  $J= 6.54$  Hz correspondente às metilas em C-26, C-27 respectivamente. O triplete a  $\delta$  0.82  $J= 6.34$  Hz é atribuído à metila em C-29, e os tripletes a  $\delta$  0.67, 0.84 e 1.00 referem-se às metilas em C-18, C-19 e C-21, identificando-se assim os seis grupos metílicos. O multiplete centrado a  $\delta$  3.54 é relativo ao próton em C-3.

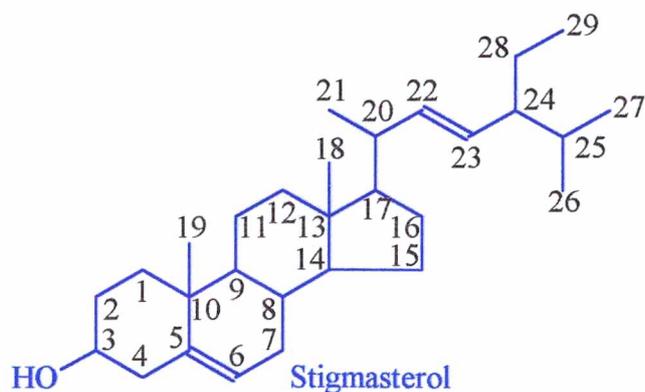
### 3.3.6.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$ DO STIGMASTEROL

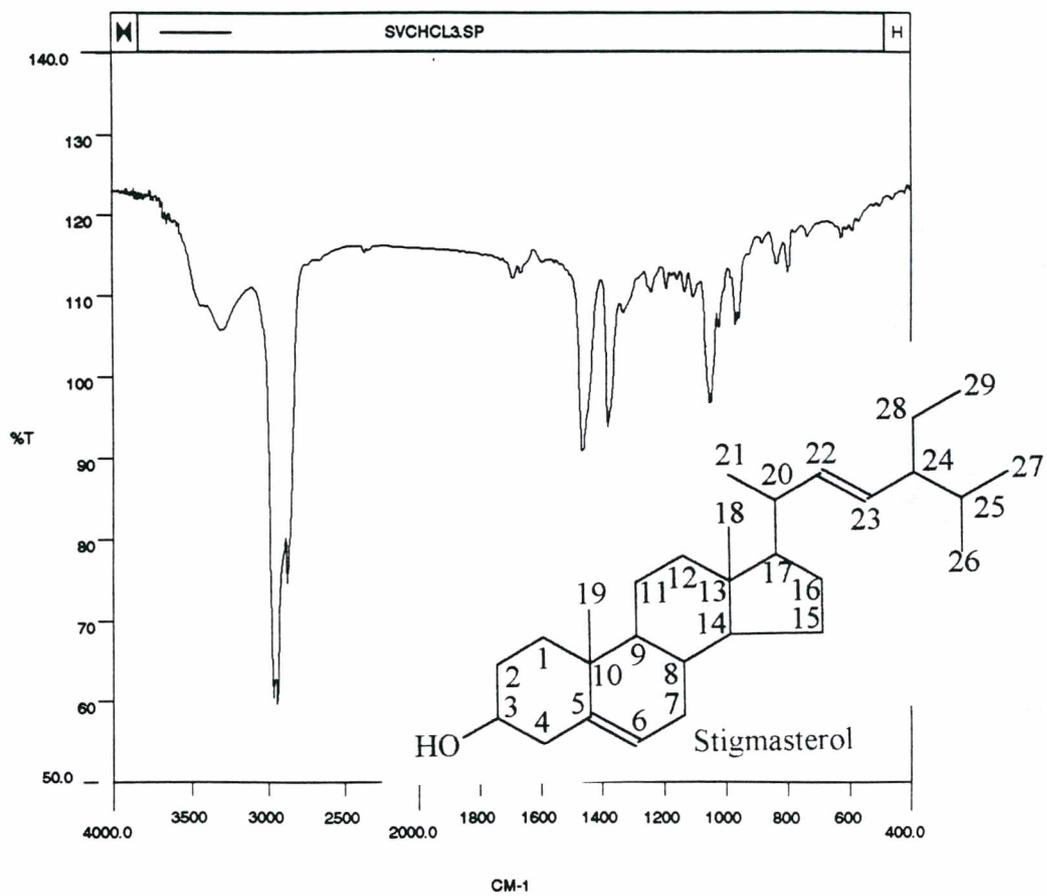
Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectros de  $^{13}\text{C}$ , à 75 MHz , em  $\text{CDCl}_3$ . (figura 31, 32).

**Tabela 2:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para Stigmasterol

C	1	37.22	C	2	31.62	C	3	71.74
C	4	42.26	C	5	142.72	C	6	121.70
C	7	31.87	C	8	31.87	C	9	50.09
C	10	36.56	C	11	21.06	C	12	39.74
C	13	42.18	C	14	56.18	C	15	24.34
C	16	28.92	C	17	56.06	C	18	12.03
C	19	19.39	C	20	40.50	C	21	21.06
C	22	138.31	C	23	129.22	C	24	51.21
C	25	31.94	C	26	21.06	C	27	19.01
C	28	25.40	C	29	12.25			

Com base nos dados da literatura e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente ao Stigmasterol.





**Figura 28.** Espectro de absorção no infra vermelho do Stigmasterol

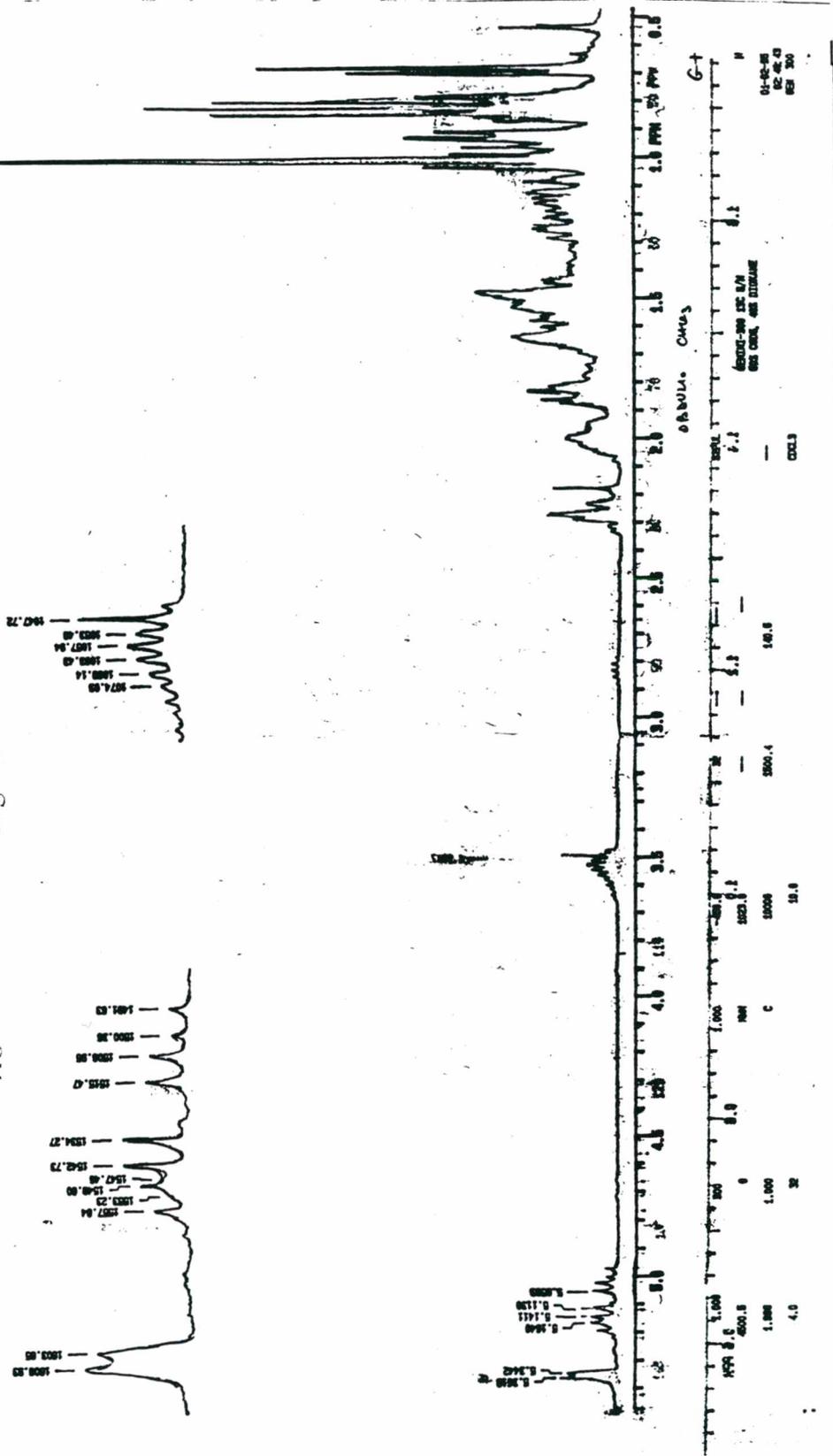
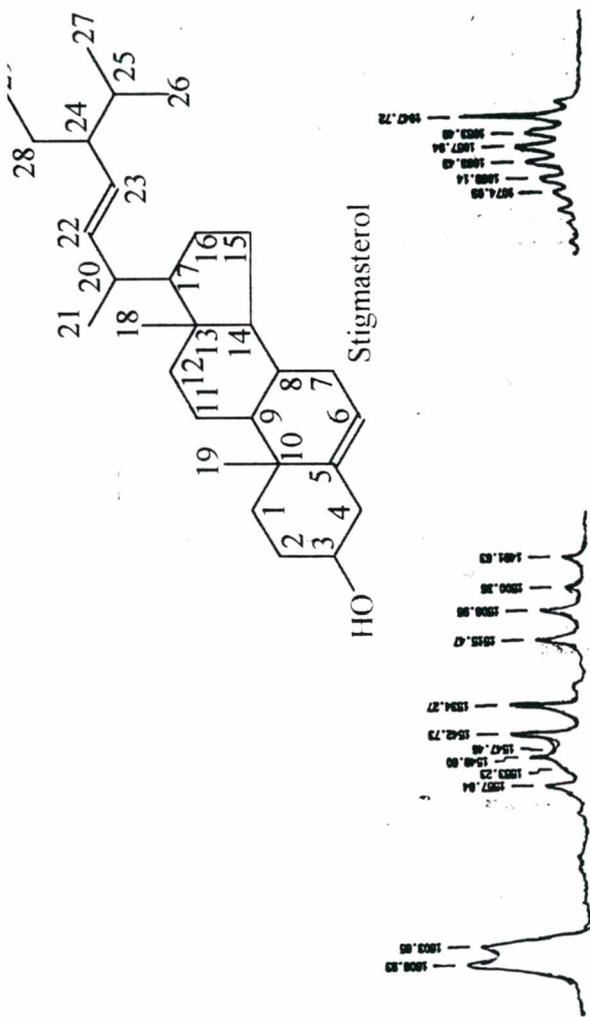


Figura 29. Espectro de ressonância nuclear de  $^1\text{H}$  do Stigmasterol

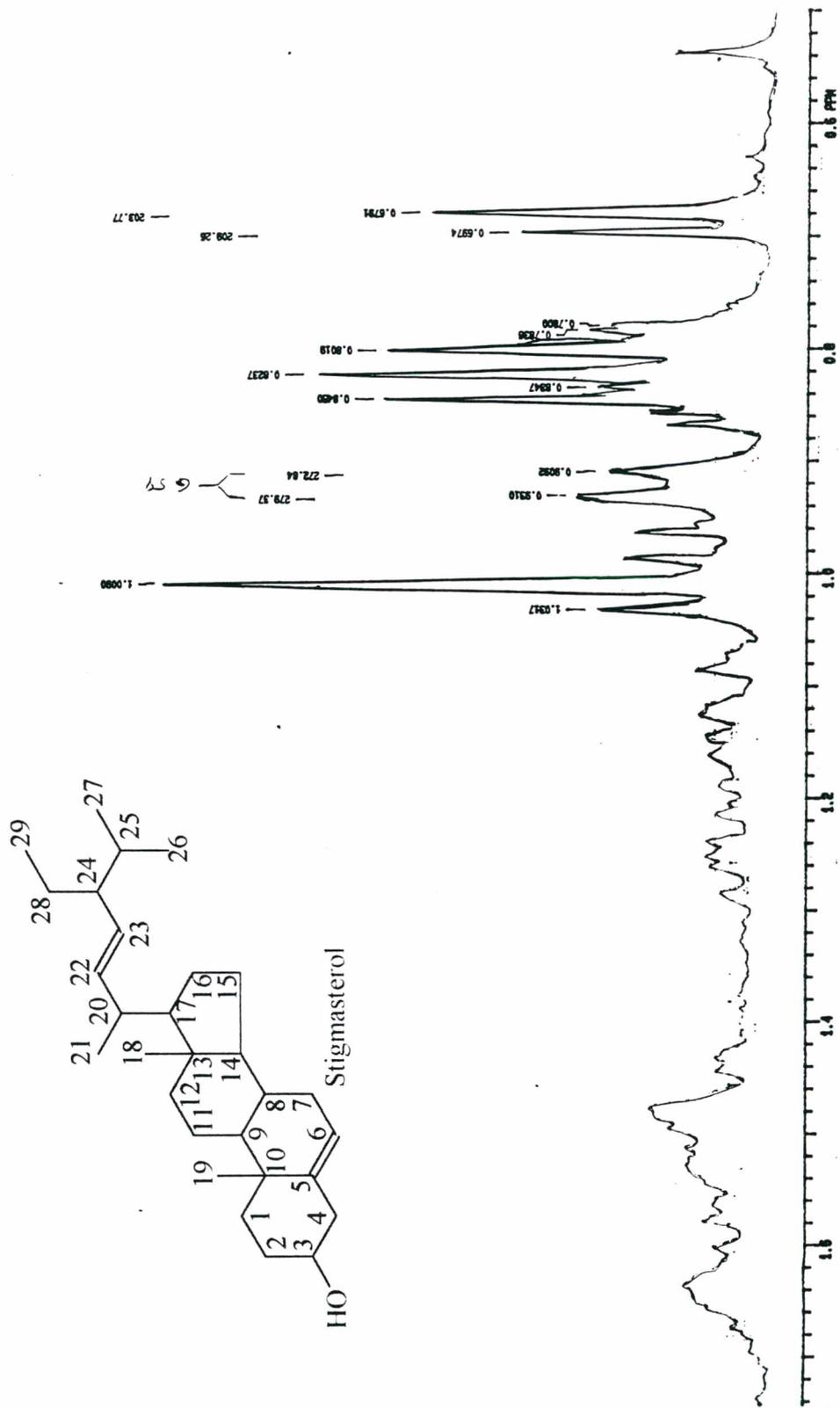


Figura 30. Espectro de ressonância nuclear de  $^1\text{H}$  do Stigmasterol ampliado

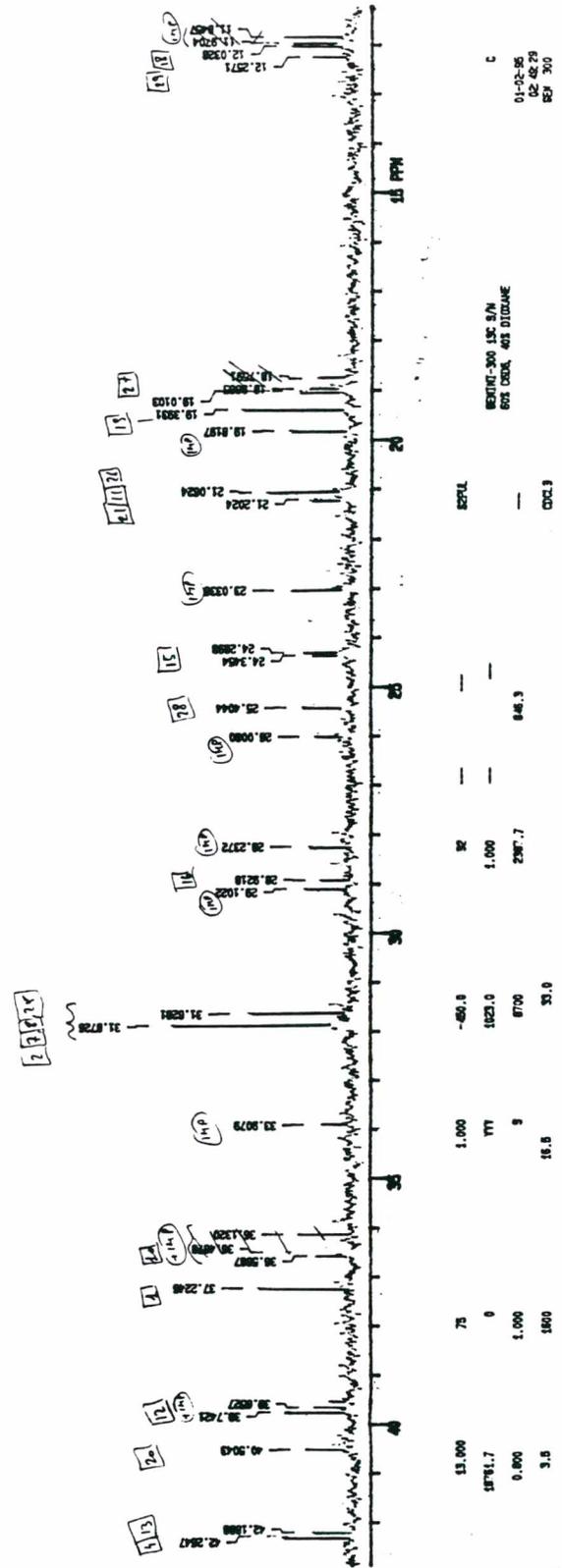
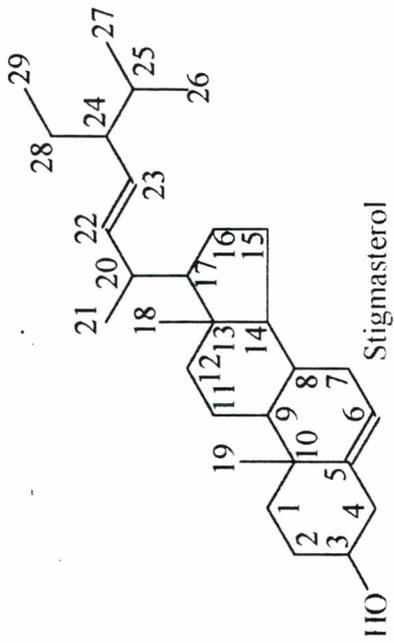


Figura 31. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C do Stigmasterol

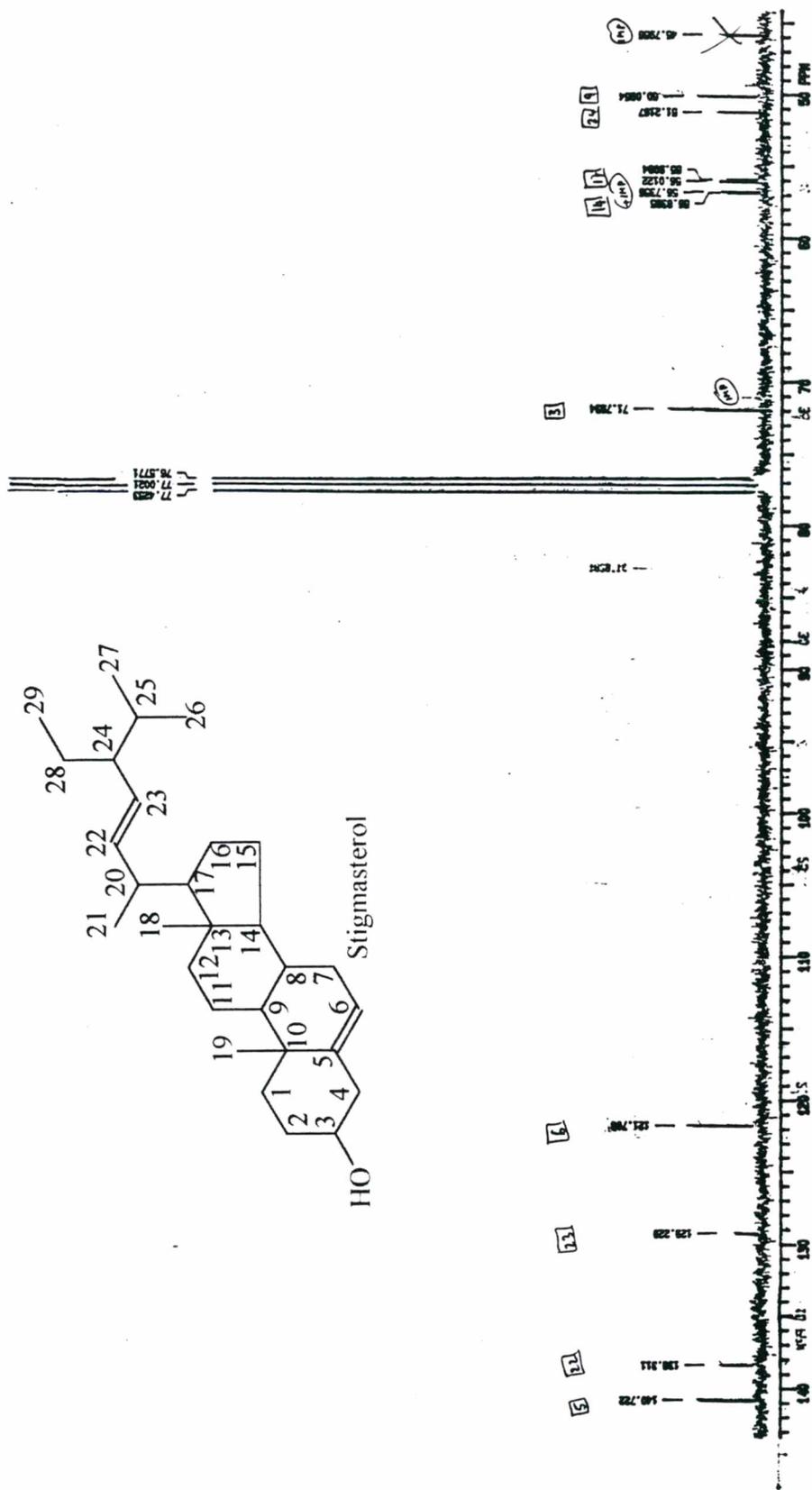


Figura 32. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C do Stigmasterol

### **3.3.7 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *S. verticillatus***

A fração acetato de etila de *S. verticillatus* foi deixada em repouso onde houve uma cristalização cujo sólido foi filtrado e lavado com acetona, apresentando 0.2349 g de pó amorfo que fundiu na faixa de 168 a 169<sup>o</sup> C. Sua estrutura foi proposta através de análises espectroscópicas em RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C e comparação em CCD com amostra autêntica e dados da literatura <sup>25, 50, 98</sup>.

#### **3.3.7.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO STIGMASTEROL GLICOSÍDEO**

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (figura 33) foi obtido em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 787 com a substância incorporada em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr). As absorções foram registradas em escala de centímetros recíprocos (cm<sup>-1</sup>), sendo os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0.5 mm de espessura. Evidenciando absorção de hidroxila em 3304 cm<sup>-1</sup> e absorção intensa em 2960 cm<sup>-1</sup> de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, e deformação angular simétrica de CH<sub>2</sub> em 1464 cm<sup>-1</sup>

#### **3.3.7.2 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR DE <sup>1</sup> H DO STIGMASTEROL GLICOSÍDEO**

O espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup>H (figura 34, 35), foi obtida a uma frequência de 300 MHz em CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm. O espectro apresentou vários sinais característicos de um esqueleto esteroídico. Assim os dubletes à δ 0.70, 0.85 e 0.95 com J = 6 Hz correspondente às metilas em C-26, C-27 e C-21 respectivamente. Os singletes à δ 1.01, 1.03 e 1.25 referem-se as metilas em C-18, C-19 e C-29 identificando-se assim os seis grupos metílicos. O multiplete centrado à δ 2.25 é relativo ao próton metínico em C-3. Pode-se observar na região entre δ 3.2 e 4.5, vários sinais que podem ser relativos à prótons

do fragmentos glico piranosídeo. Os sinais à  $\delta$  5.0 e 5.50 ppm, referem-se respectivamente ao próton anomérico da glicose e ao próton olefínico em C-5 do esqueleto esteróidico.

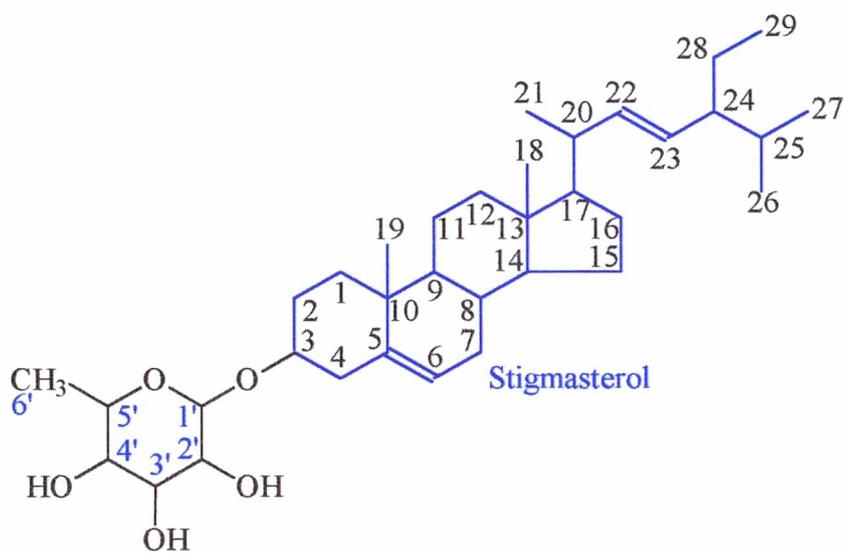
### 3.3.7.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$ , STIGMASTEROL GLICOSÍDEO

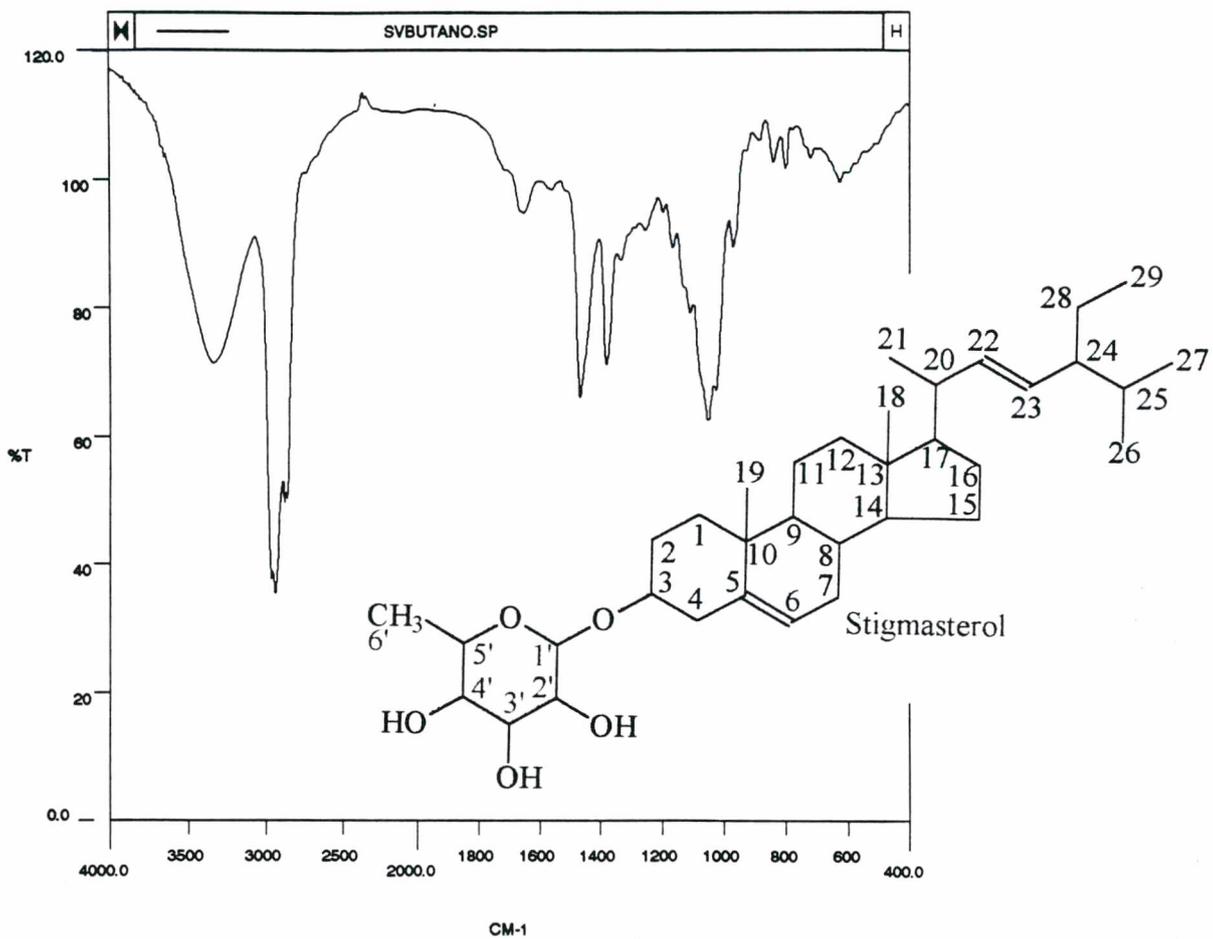
Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectros de  $^{13}\text{C}$ , à 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$ , (figura 36, 37).

**Tabela 3:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para Stigmasterol glicosídeo

C1	37.01	C2	31.66	C3	78.91	C4	42.07
C5	140.02	C6	121.37	C7	31.66	C8	31.66
C9	49.91	C10	36.47	C11	20.82	C12	39.52
C13	41.96	C14	56.63	C15	24.05	C16	28.86
C17	55.79	C18	11.77	C19	19.53	C20	40.32
C21	20.94	C22	138.14	C23	129.00	C24	51.21
C25	31.66	C26	20.82	C27	19.05	C28	25.19
C29	11.97	C1'	100.8	C2'	73.27	C3'	76.94
C4'	69.84	C5'	75.51	C6'	61.56		

Com base nos dados da literatura e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente à Stigmasterol glicosídeo





**Figura 33.** Espectro de absorção no infra vermelho do Stigmasterol glicosídeo

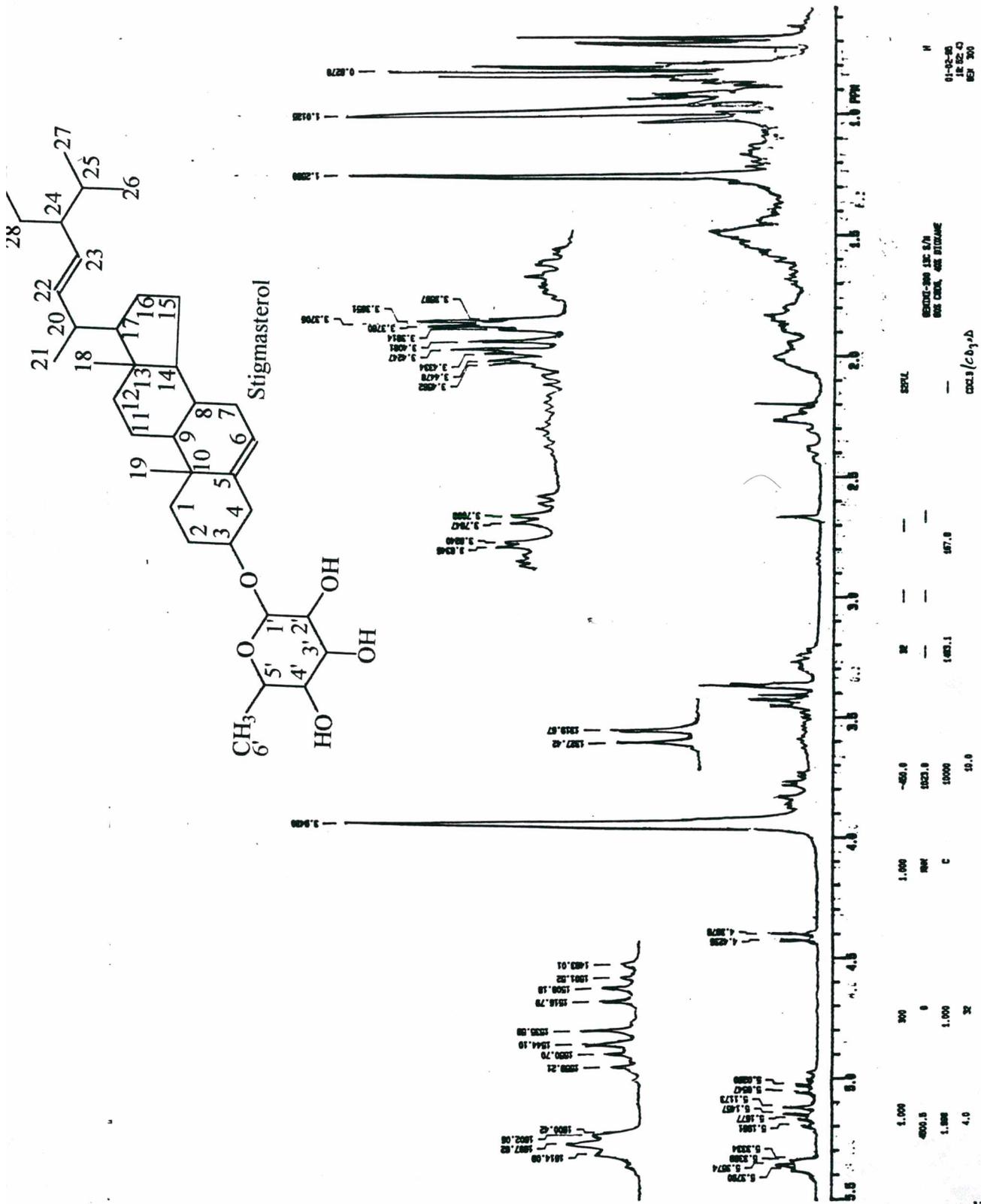


Figura 34. Espectro de ressonância nuclear de <sup>1</sup>H do Stigmasterol glicosídeo

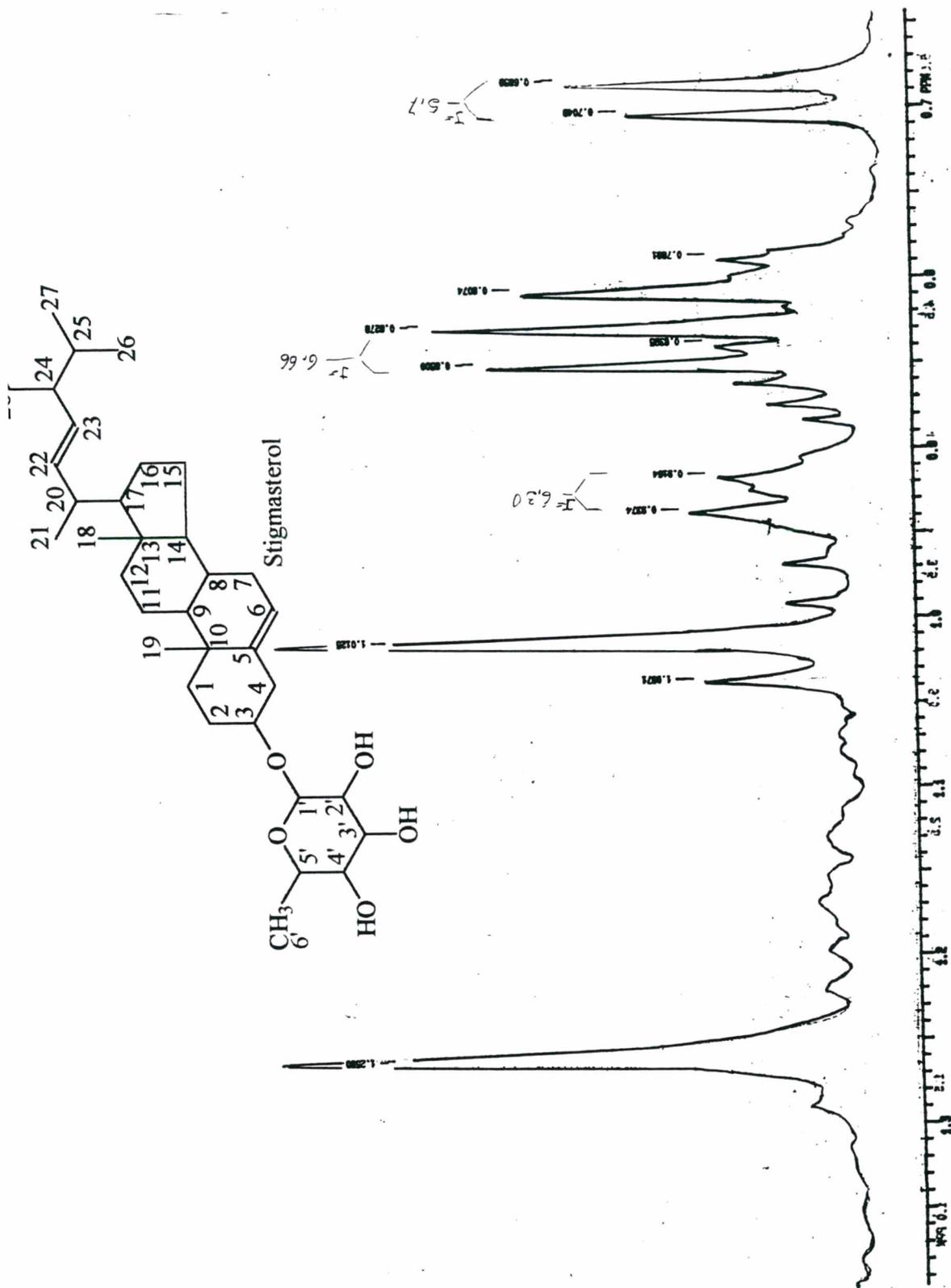


Figura 35. Espectro de ressonância nuclear de  $^1\text{H}$  do Stigmasterol glicosídeo ampliado

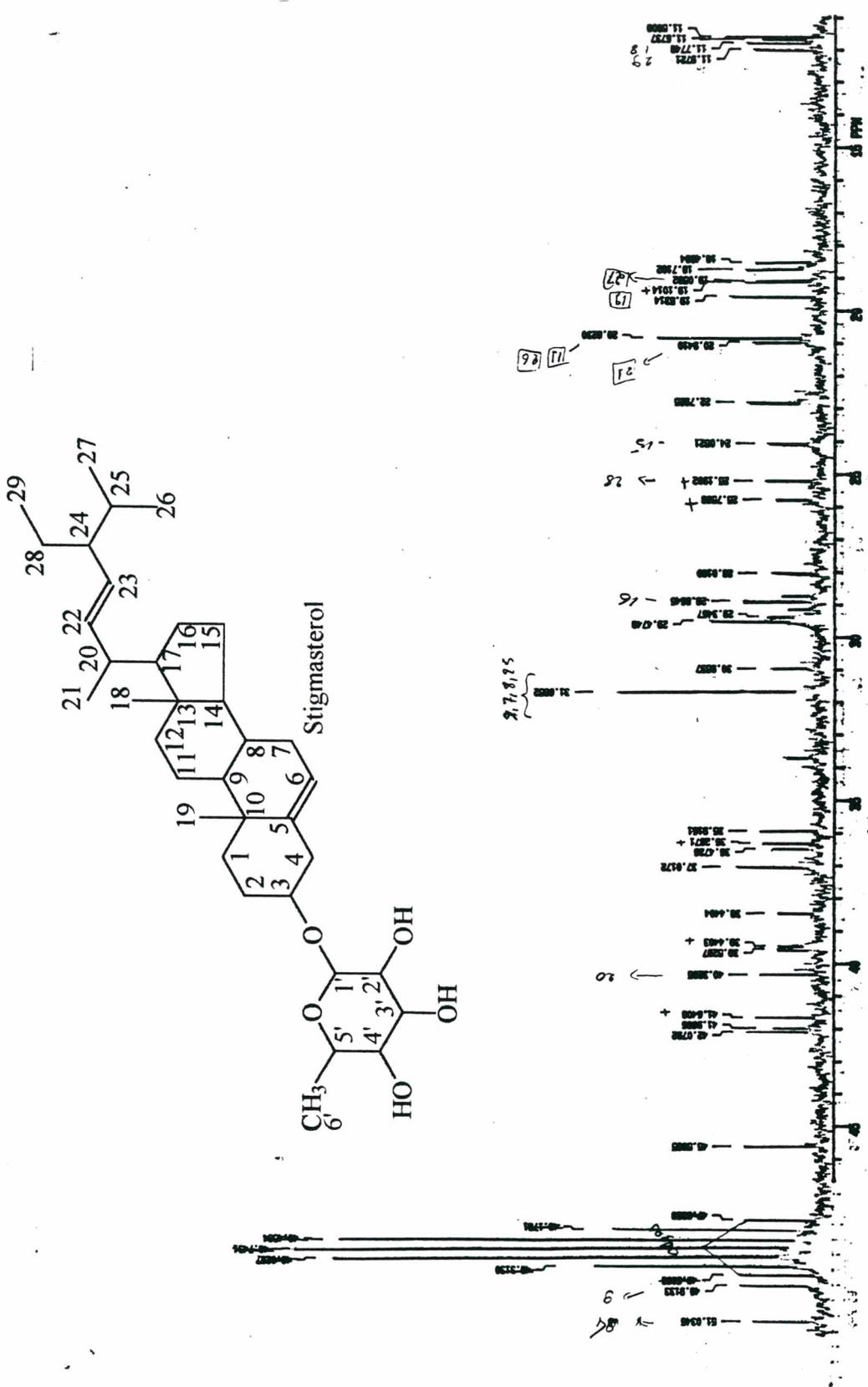


Figura 36. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C do Stigmasterol glicosídeo

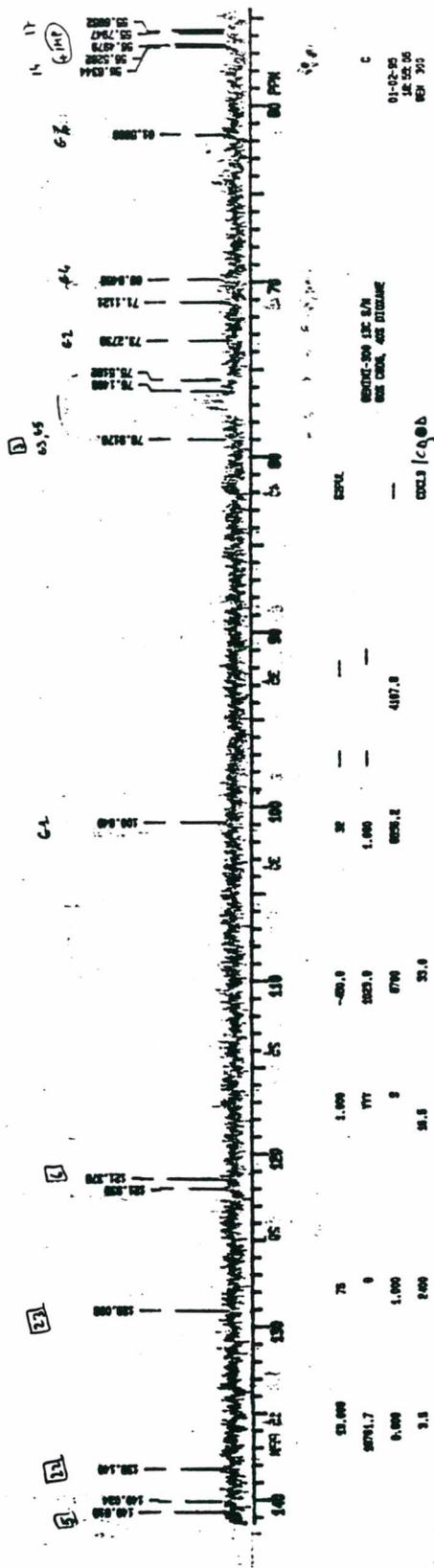
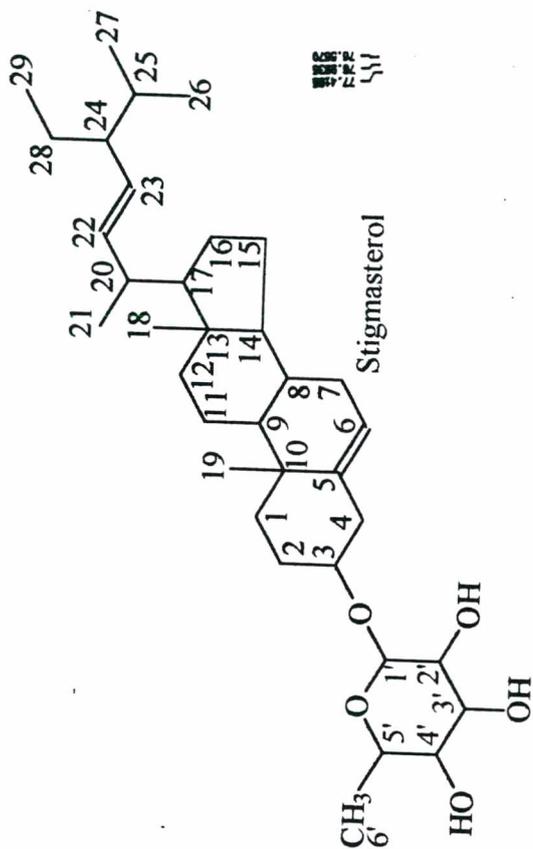


Figura 37. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  do Stigmasterol glicosídeo

### 3.3.8 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÕES 3 a 7 DE *Ph. sellowianus*

Das frações 3 a 7 de *Ph. sellowianus*, obteve-se 0.006 g de cristais que fundiram na faixa de 80.5 a 81°C.

#### 3.3.8.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA XANTOXILINA

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV), (Figura 38), foi obtido em espectrofotometro Perkin-Elmer, modelo 787 com a substância incorporada em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr). As absorções foram registradas em escala de centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ), sendo os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0.5 mm de espessura. Evidenciando a presença de um anel aromático substituído, um grupo carbonílico (C=O) e grupos metoxila (O-CH<sub>3</sub>), porém nenhuma absorção foi detectada para o grupo hidroxila (OH), o espectro apresenta ainda:

- a. Estiramento de ligação de C-H a 3100 - 3080  $\text{cm}^{-1}$
- b. Estiramento de C=O a 1615  $\text{cm}^{-1}$
- c. Bandas de anel aromático a 1400 - 1600  $\text{cm}^{-1}$

#### 3.3.8.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA XANTOXILINA

O espectro de absorção na região do ultravioleta, (UV) (figura 39), foi obtido em espectrofotometro Shimadzu modelo UV-190, equipamento com registrador R.B. 101, utilizando-se metanol como solvente.

As frações mostraram uma absorção máxima em 286 nm, típica de grupo carbonílico conjugado. Uma absorção máxima em 285 nm pode ser calculada a partir da absorção do fragmento da carbonila do composto (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> . CO . CH<sub>3</sub>) em 246 nm adicionado do

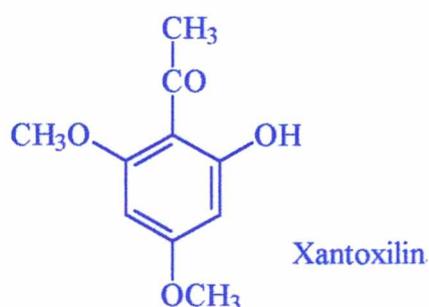
deslocamento do  $\lambda_{\max}$  proporcionado pelos grupos -OH em posição orto (+ 7 nm), o-OCH<sub>3</sub> (+ 7 nm) e p-OCH<sub>3</sub> (+ 25 nm )<sup>122</sup>, (246 +7 + 7 + 25 = 285).

### 3.3.8.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA XANTOXILINA

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), (figura 40), foi obtido em aparelho Variam XL - 100 MHz, em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) contendo tetrametilsilano (TMS-O) como padrão interno, sendo os deslocamentos químicos expressos em valores de (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os sinais mostram um singlete em 14.80 ppm, atribuído a uma hidroxila aromática com forte ponte de hidrogênio, dois sinais em 5.91 e 6.05 ppm correspondendo a prótons aromáticos em posição meta, dois singletes em 3.85 e 3.86 ppm atribuídos a dois grupos metoxi aromático e um singlete em 2.60 ppm atribuído ao grupo metila de acetila<sup>113</sup>.

### 3.3.8.4 ESPECTRO DE MASSA DA XANTOXILINA

O espectro de massa (EM), (figura 41, 42), foi obtido no espectrometro Micro Mass 12. Sua confirmação foi feita, também, por coinjeção do padrão de xantoxilina em CGAR, usando coluna capilar OV1 (figura 43), já isolado anteriormente (Miguel. 1987)<sup>64</sup>.



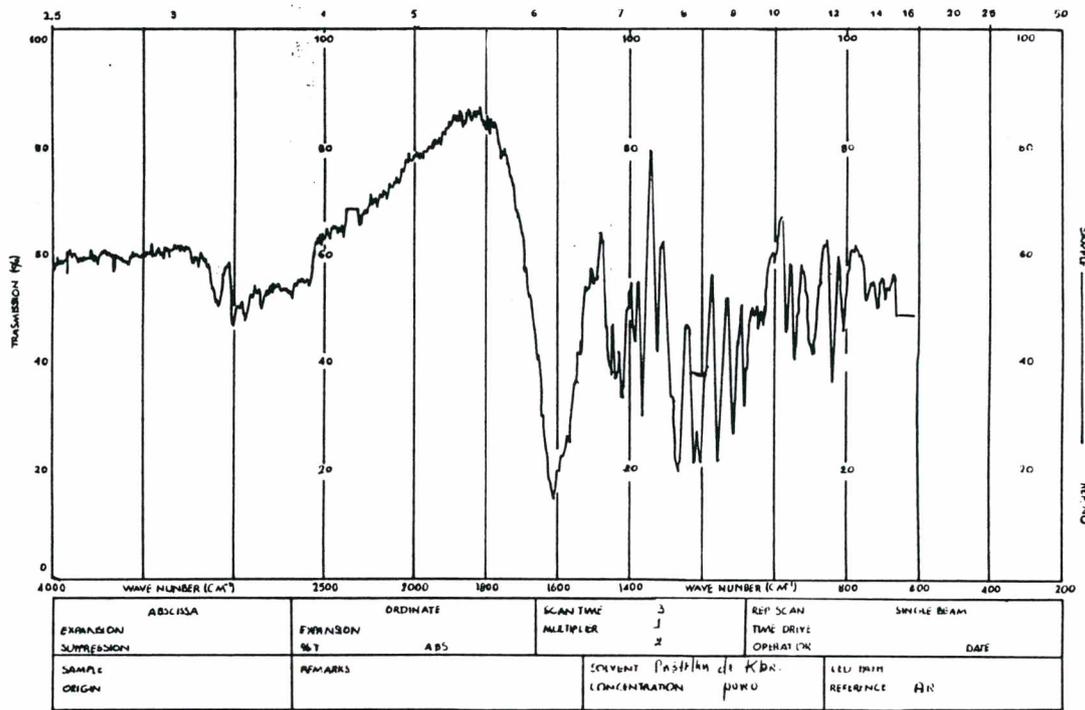
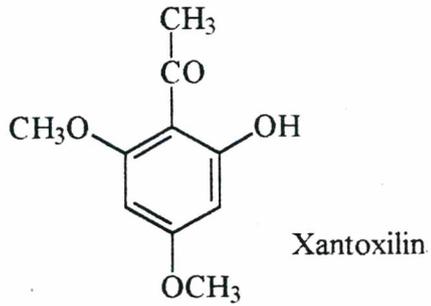
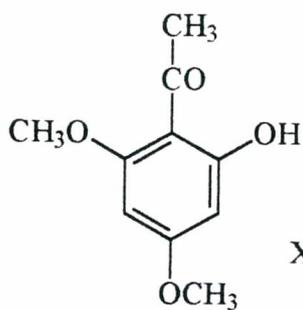


Figura 38. Espectro de absorção no infra vermelho da xantoxilina



Xantoxilin

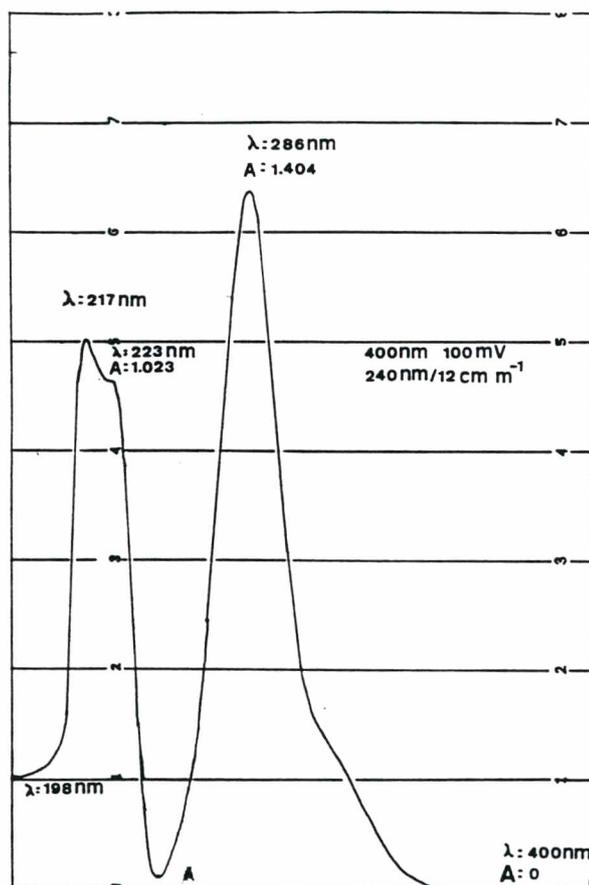


Figura 39. Espectro de absorção no ultra violeta da xantoxilina

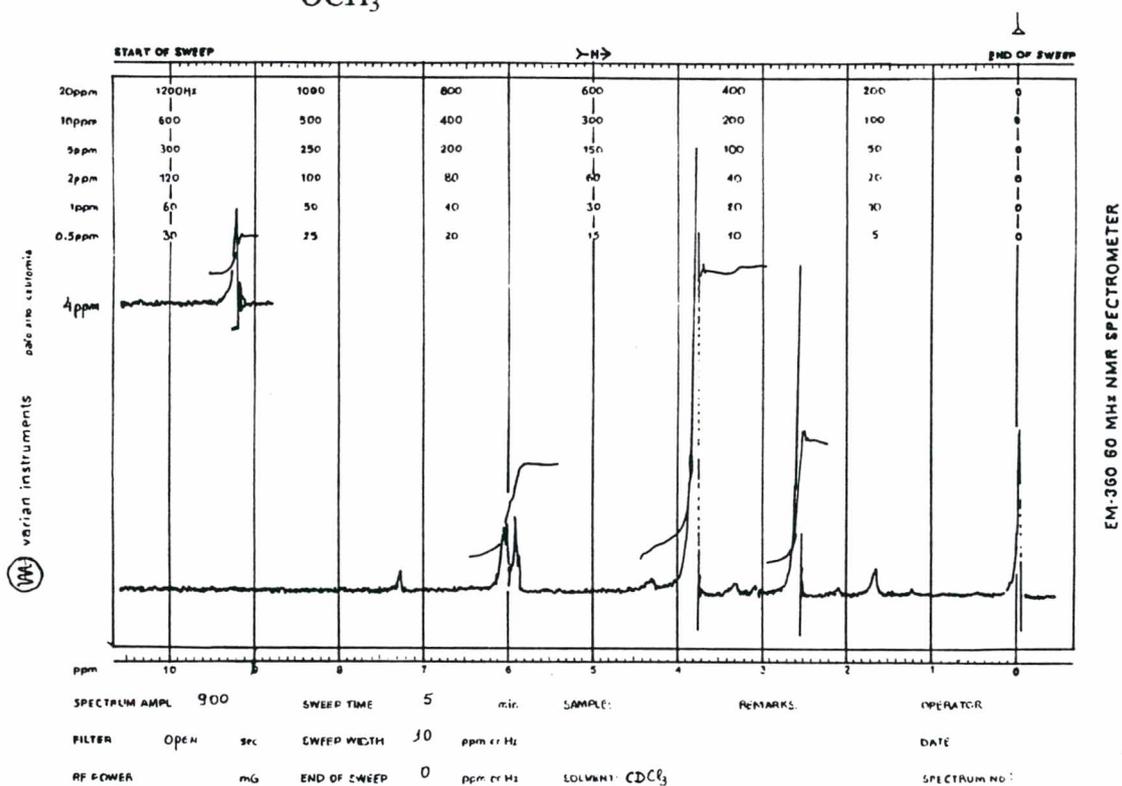
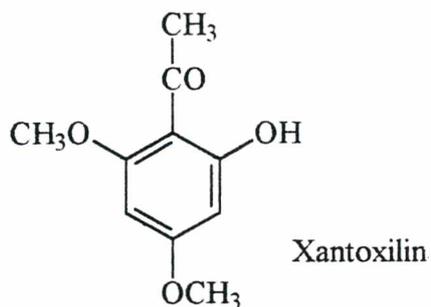
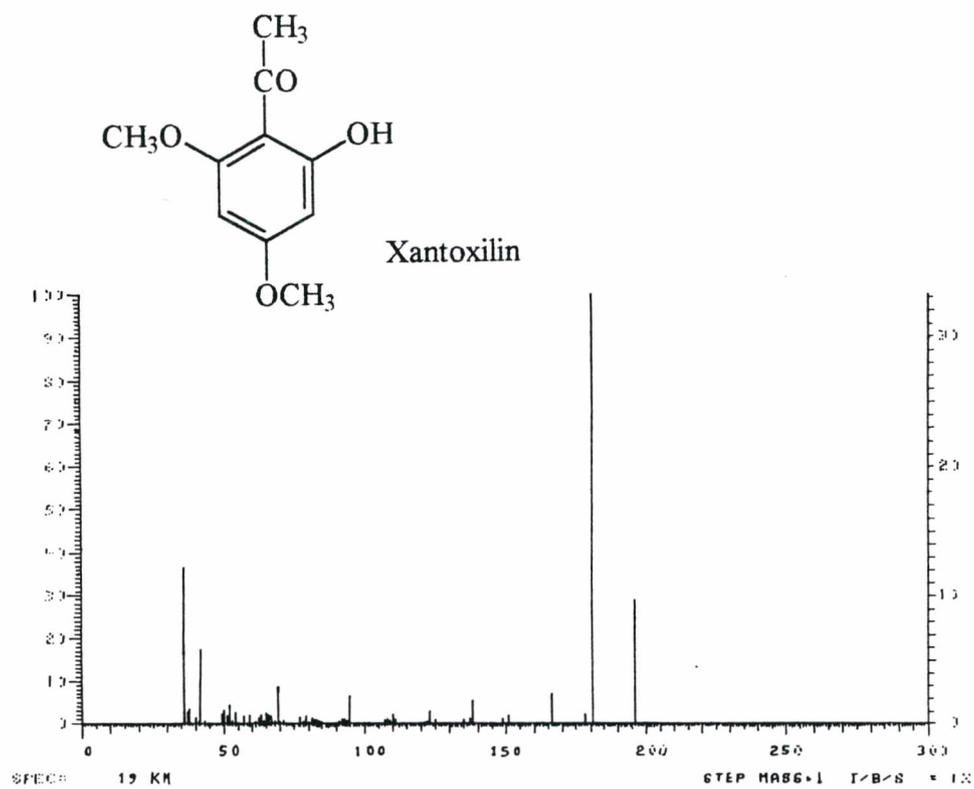
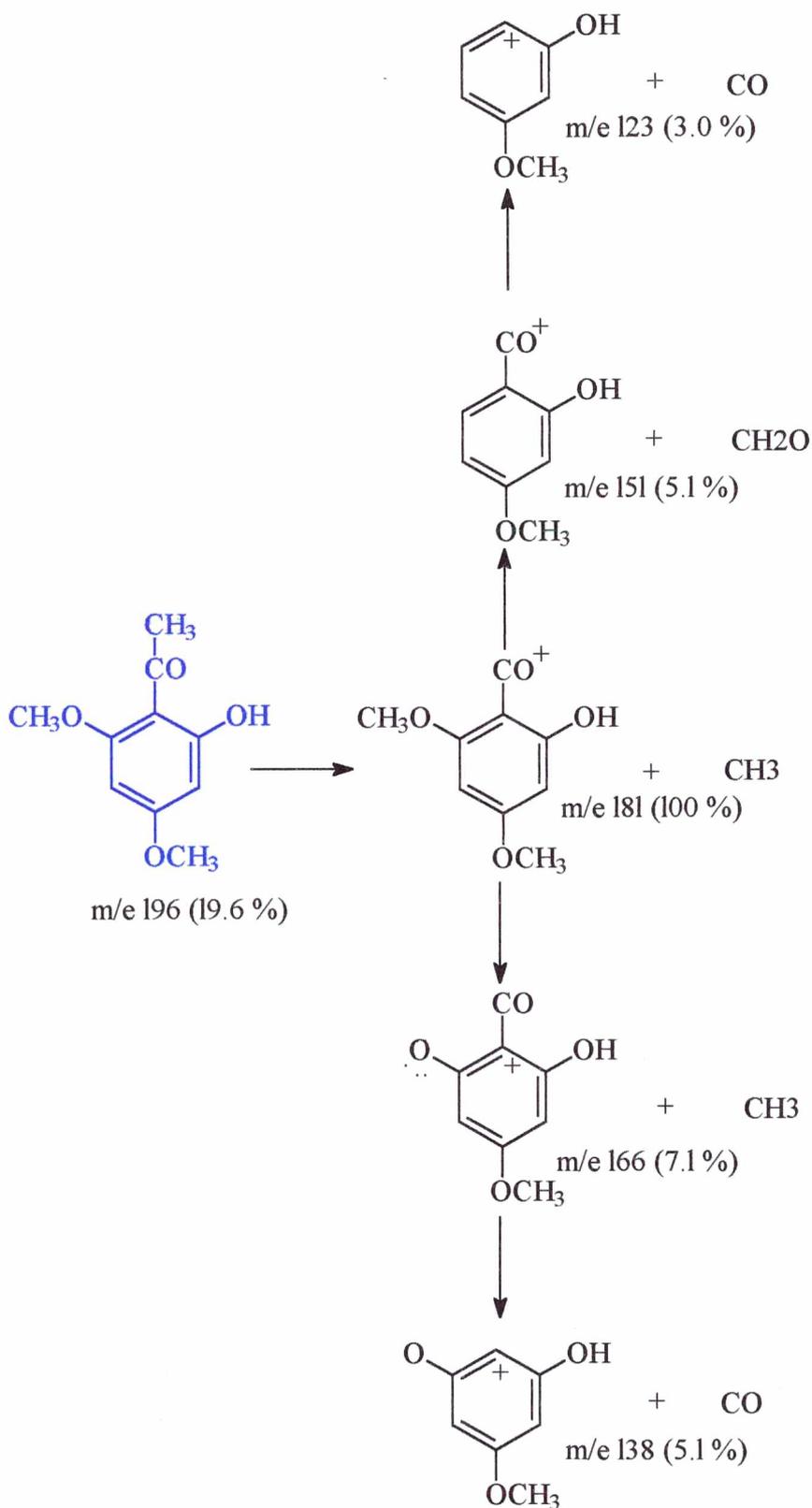


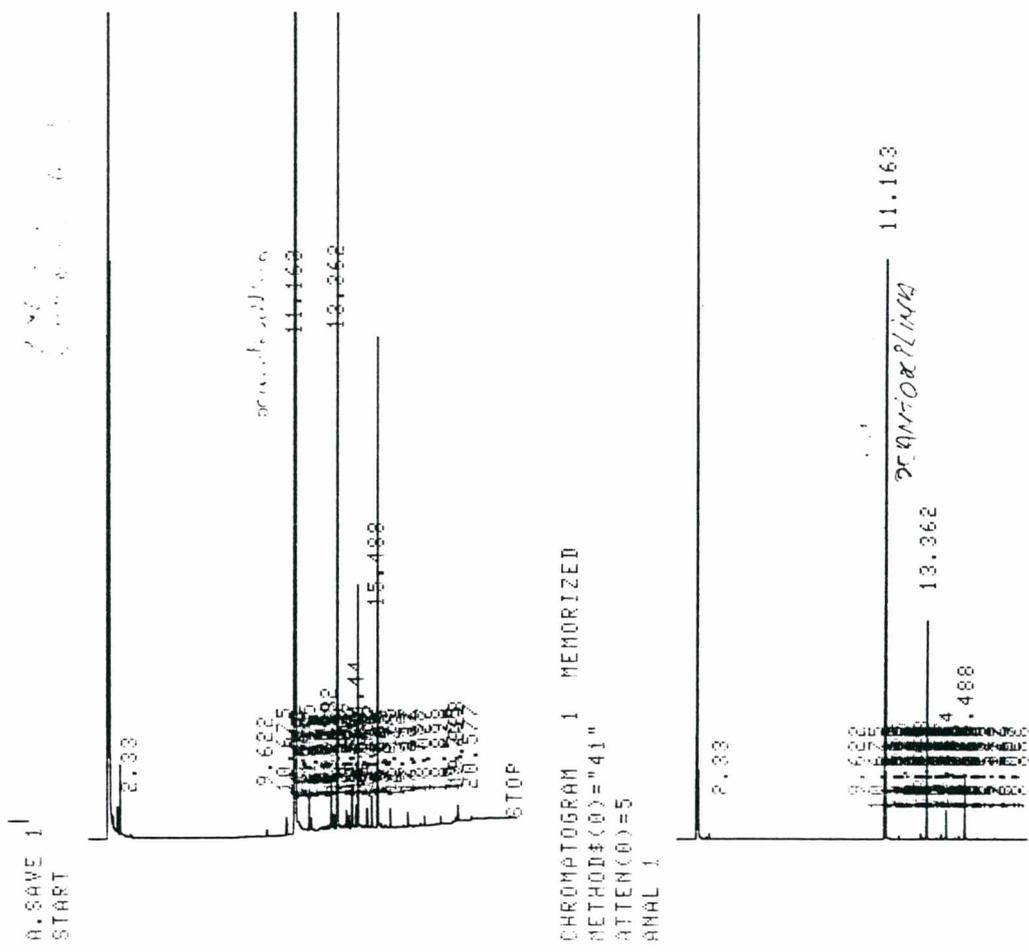
Figura 40. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H da xantoxilina



**Figura 41.** Espectro de massa da xantoxilina



**Figura 42.** Fragmentação de alguns íons principais da xantoxilina



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	11.163	71587			76.9813	
2	13.362	14815			15.9309	
3	14.44	2112			2.2715	
4	15.488	4479			4.8164	
TOTAL		92993			100	

T.I. 80°, 10°C min., T.F. 280°, T.V. 290°, T.D. 300°, G. 3 ml/min.

Coluna OV-1 Se-30

Figura 43. Cromatograma da xantoxilina, da fração 3 a 7 de *P. sellowianus*

### **3.3.9 IDENTIFICAÇÃO DOS TANINOS DE *Ph. sellowianus***

Das frações de 4 a 6 do extrato de acetato de etila de *Ph sellowianus*, obteve-se 0.060 g de cristais brancos que fundiram na faixa de 157.5 a 158°C.

#### **3.3.9.1 IDENTIFICAÇÃO DO GALATO DE ETILA**

#### **3.3.9.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO GALATO DE ETILA**

O espectro de infra vermelho (IV) foi obtido num equipamento Perkin - Elmer, modelo 781, (figura 44), preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr), mostrando absorção de hidroxila em 3450 e 3302  $\text{cm}^{-1}$  e absorções intensas em 1706  $\text{cm}^{-1}$  de carbonila, 1620, 1534, 1468, 1384, 1316, 1256, 1198 e 1040  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.3.9.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^1\text{H}$ DO GALATO DE ETILA**

No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RNM  $\text{H}^1$ ) (figura45) foi obtidos a uma frequência de 300 MHz, que mostra entre outras um triplete em  $\delta$  1.3 equivalente a 3 prótons de  $\text{CH}_3$  (3H, t,  $J= 7$ ), um quarteto centrado em  $\delta$  4.25 equivalente a 2 de grupo  $\text{CH}_2$  ( $J= 7$  Hz), e um singlete em 7.11 equivalente a dois simétricos prótons de anel aromáticos.

#### **3.3.9.4 ESPECTRO DE MASSA DO GALATO DE ETILA**

O espectro de massa do tanino (figura 46, 47), apresenta o íon molecular ( $\text{M}^+$ ) a  $m/z$  198 (57.47 %) e os seguintes fragmentos principais a  $m/z$  79 (12,64 %), 125 (22.98 %) para perda de, 153 (100 %) para a perda de  $\text{OC}_2\text{CH}_5$ , 178 (25,86 %), 183 (7.47 %) para a perda

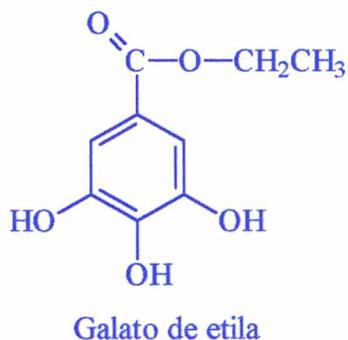
de CH<sub>3</sub> e 198 (57.47 %), tipos de fragmentos observados em taninos derivados do ácido gálico.

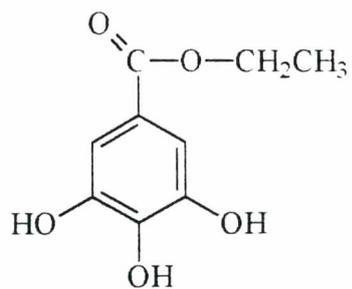
### 3.3.9.5 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup>C DO GALATO DE ETILA

Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectros de RMN <sup>13</sup>C (figura 48), foram compatíveis aos atribuídos na literatura para taninos: 166.64 de C=O , 145.91,

138 carbonos oxigenados do anel, 122.03 e 109.64 atribuído ao anel aromático, 60.84 atribuído a O-CH<sub>2</sub> e 14.59 atribuído a CH<sub>3</sub>.

Com base nos dados espectrais propôs-se a seguinte estrutura. correspondente ao Ester etil gálico (Galato de etila).





Galato de etila

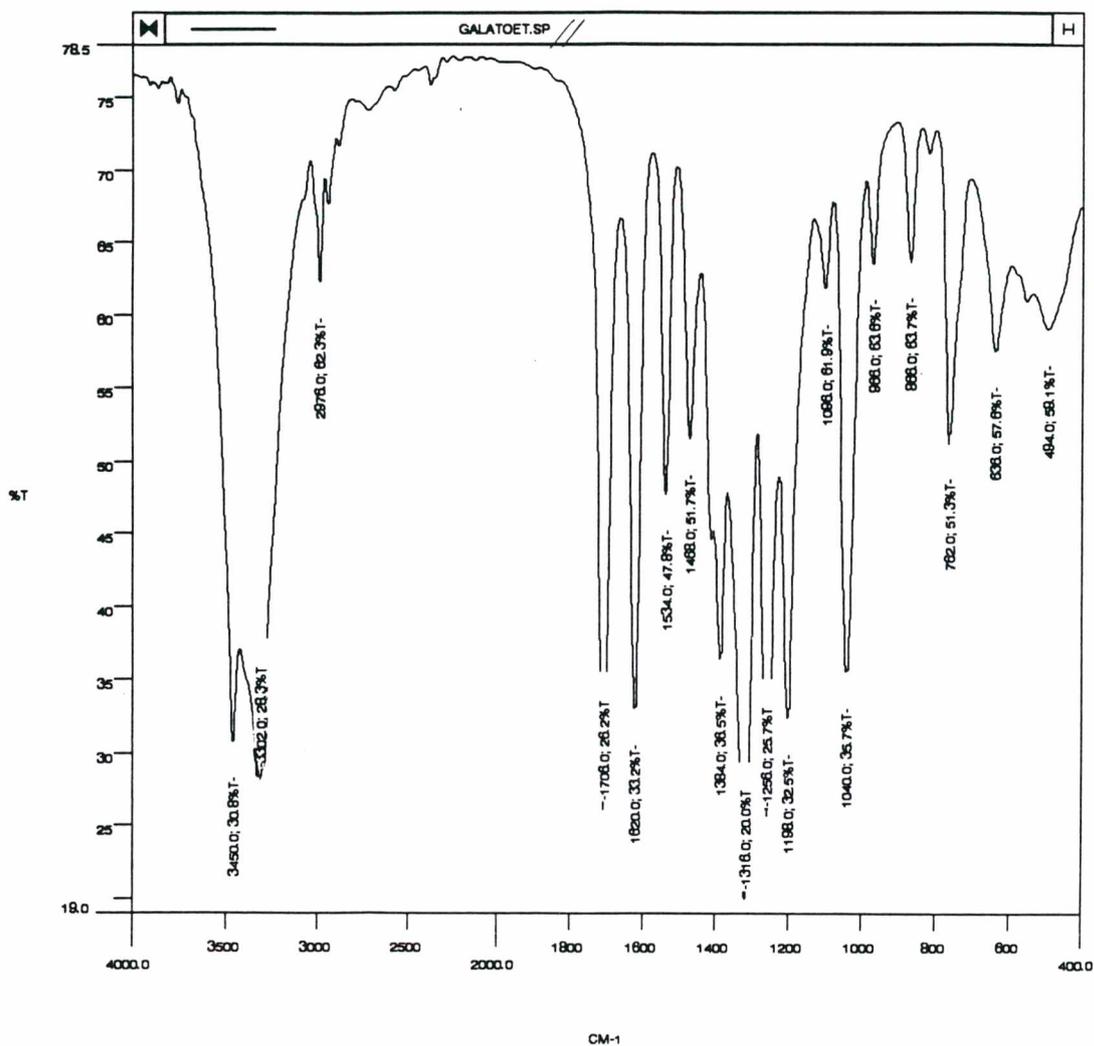


Figura 44. Espectro de absorção no infra-vermelho do galato de etila

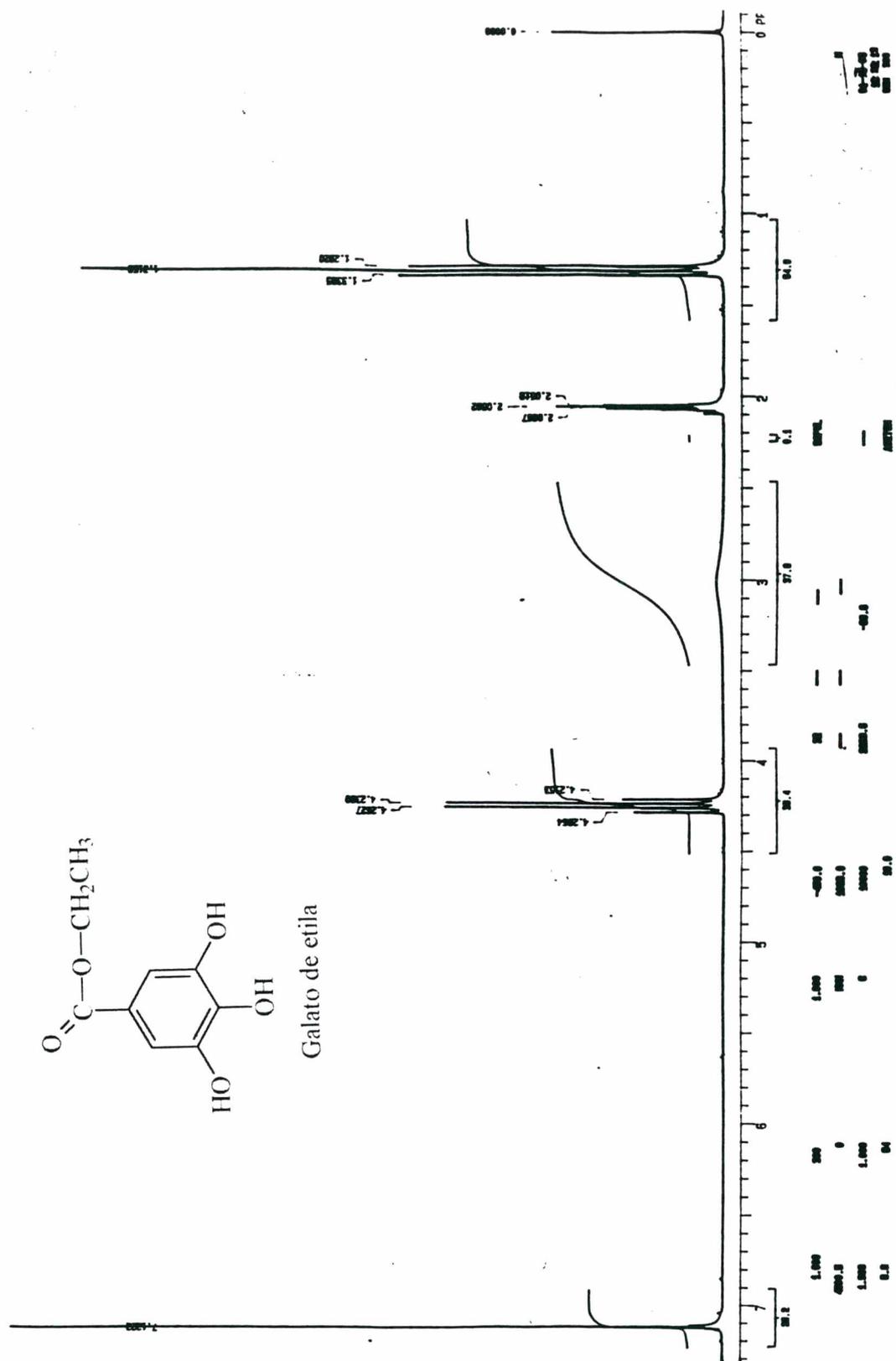
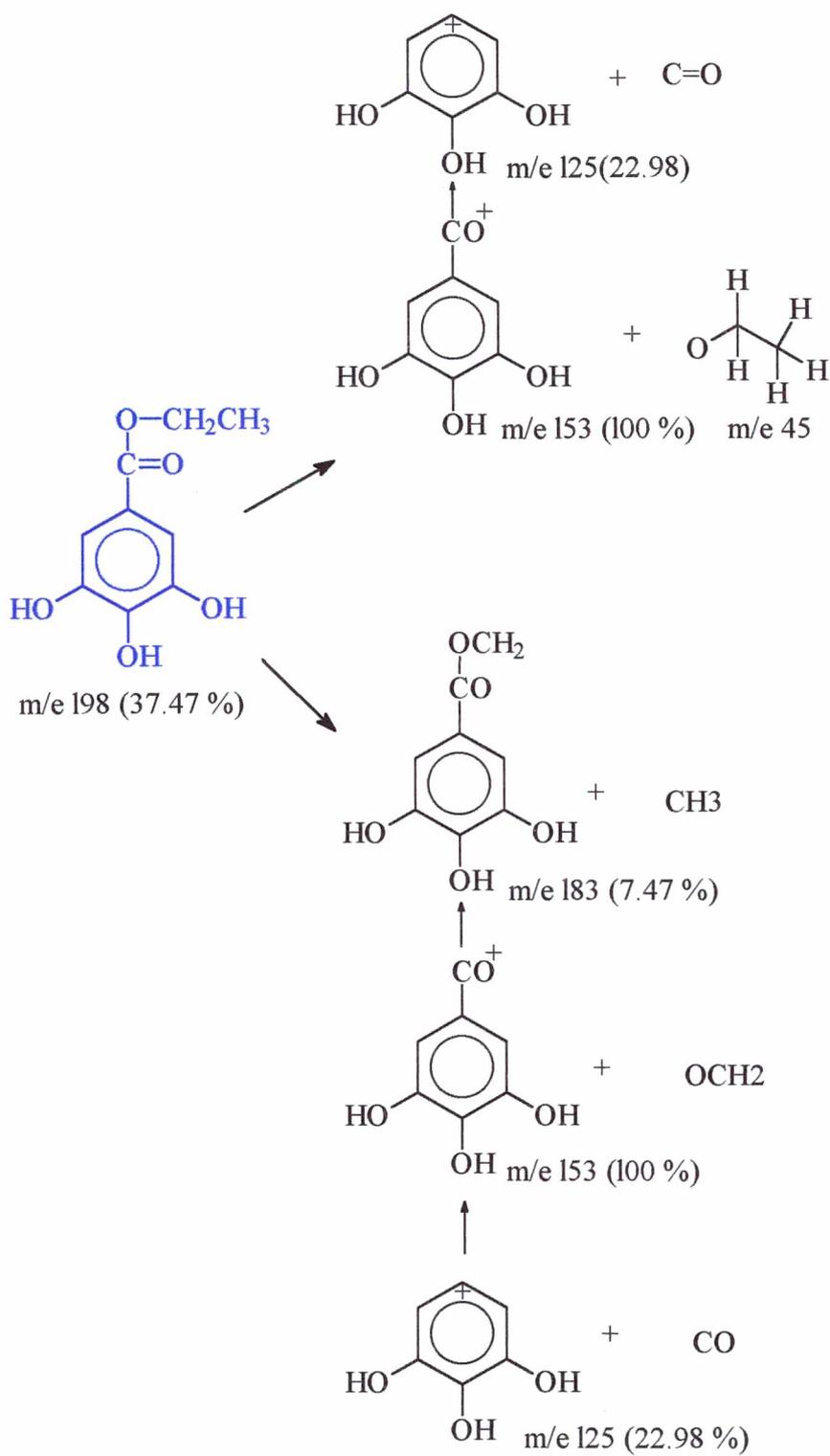
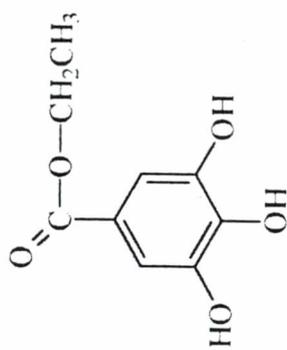


Figura 45. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do galato de etila





**Figura 47.** Fragmentação de alguns íons principais do galato de etila



Galato de etila

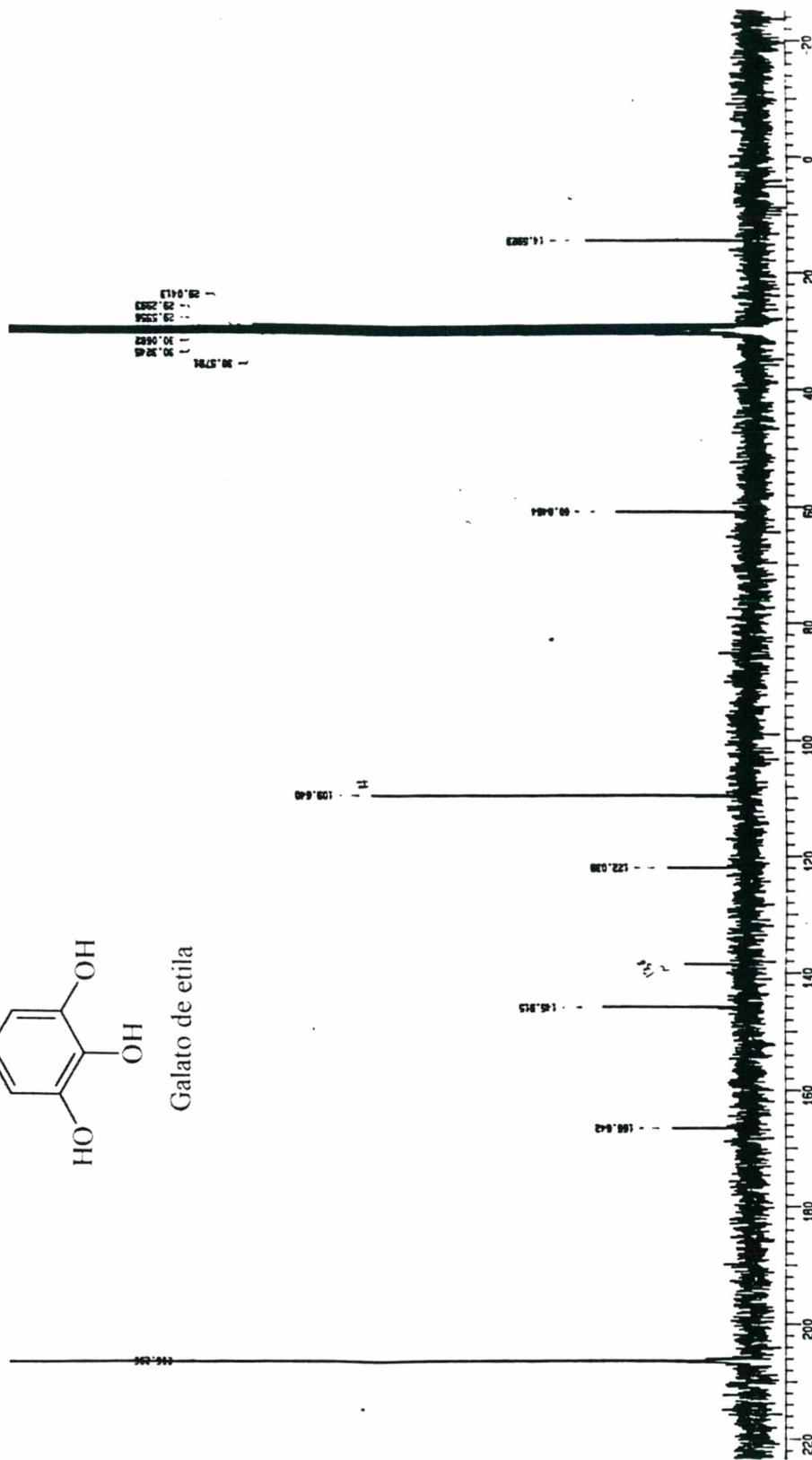


Figura 48. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  do galato de etila (Acetona)

### **3.3.10 IDENTIFICAÇÃO DO GALATO DE METILA**

Das frações de *Ph. fratermus* das frações de 8 a 14, obteve-se 0.1447 g de cristais brancos que fundiram na faixa de 157.2 °C.

#### **3.3.10.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DO GALATO DE METILA**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 49) foi obtido num equipamento Perkin - Elmer, modelo 781, preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr ), mostrando absorção de hidroxila em 3524 e 3366  $\text{cm}^{-1}$  e absorções intensas em 1692  $\text{cm}^{-1}$  de carbonila, 1620  $\text{cm}^{-1}$  de ligação C-O , 1536, 1448, 1370, 1330, 1264 e 1052  $\text{cm}^{-1}$

#### **3.3.10.2 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^1\text{H}$ DO GALATO DE METILA**

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RNM) (figura 50) foram obtidos a uma frequência de 70 MHz que apresentou entre outras um singlete em  $\delta$  3.79 equivalente a 3 prótons de O-CH<sub>3</sub> (3H, t) e um singlete em  $\delta$  7.11 equivalente a dois prótons simétricos do anel aromático

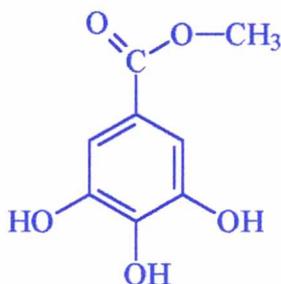
#### **3.3.10.3 ESPECTRO DE MASSA DO GALATO DE METILA**

O espectro de massa do tanino (figura 51, 52) , apresenta o íon molecular ( $\text{M}^+$ ) a m/z 184 (47.82 %) e os seguintes fragmentos principais a m/z 153 (100 %), 125 (23.91 %) e 79 (17.39), tipos de fragmentos observados em taninos derivados do ácido gálico

### 3.3.10.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^{13}\text{C}$ DO GALATO DE METILA

O deslocamento químico atribuídos pelo espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN figura 53, foram compatíveis aos atribuídos com a literatura para taninos 167.15 da  $\text{C}=\text{O}$ , 145.98 e 138.67 atribuídos aos carbonos oxigenados, 121.62 e 109.68 atribuído ao anel aromático, 51.85 atribuído a  $\text{OCH}_3$

Com base nos dados espectrais, propôs-se a seguinte estrutura correspondente ao Ester metil gálico (Galato de metila)



Galato de metila

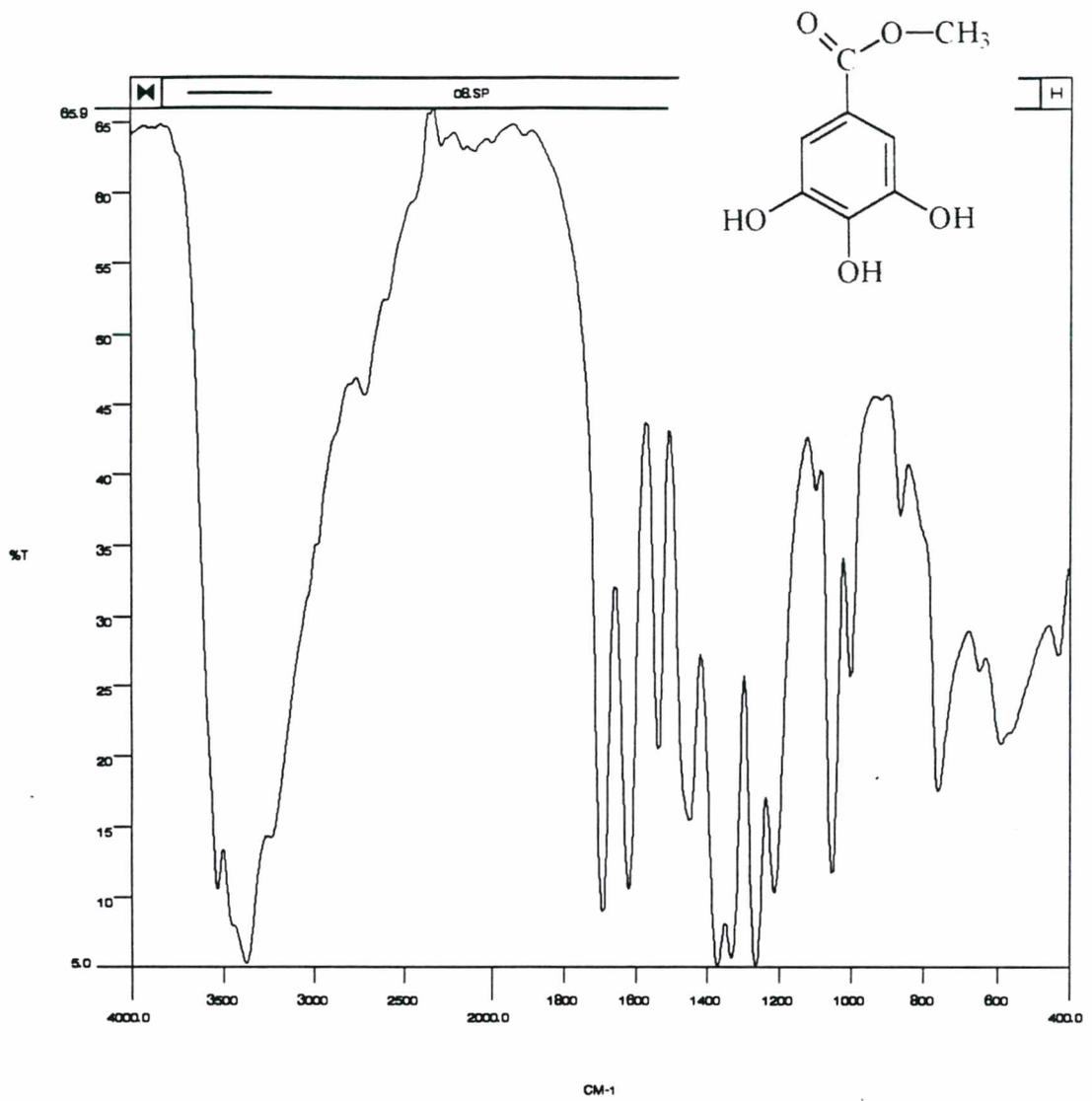
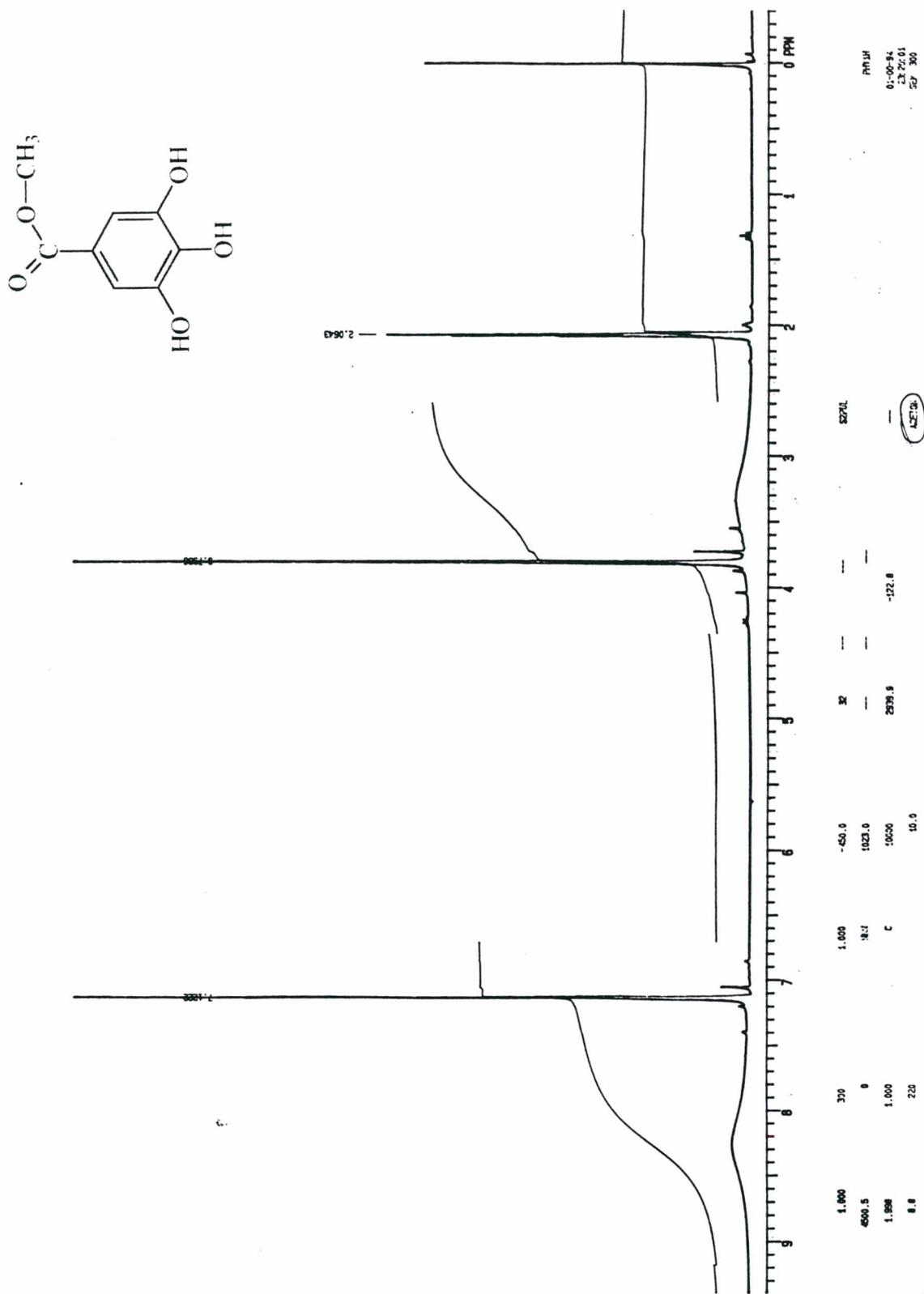


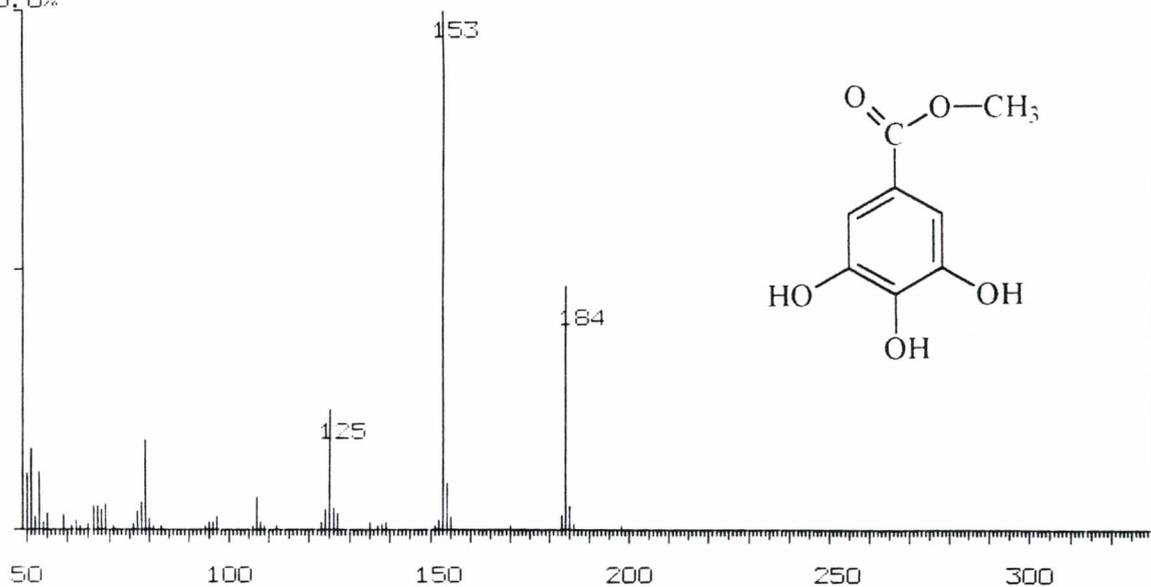
Figura 49. Espectro de absorção no infra vermelho do galato de metila



**Figura 50.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do galato de metila (Acetona)

Mass Spectrum File: es-meg.01 95-10-19 12:51  
Comment: Ester Metilgalico - Obdulio

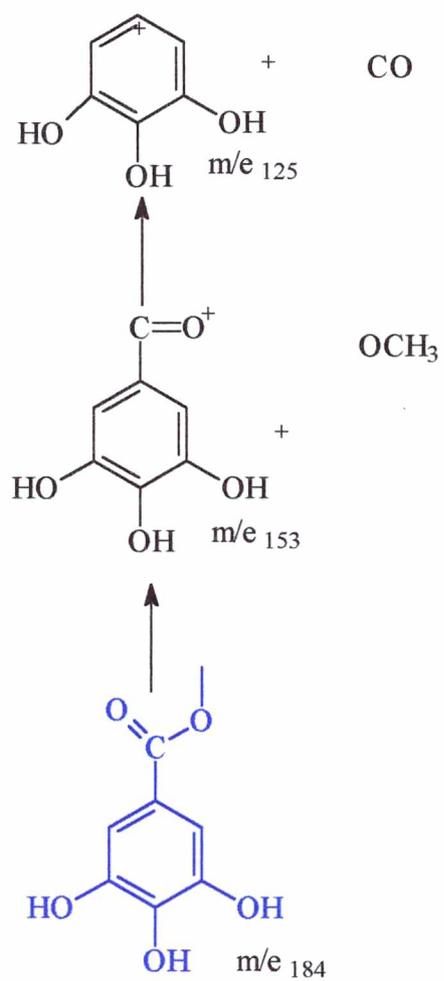
Scan: 152 ( 0- 0) R.T.: 5.13min Base Peak: 153.0 Int:130000(=100%)  
100.0%



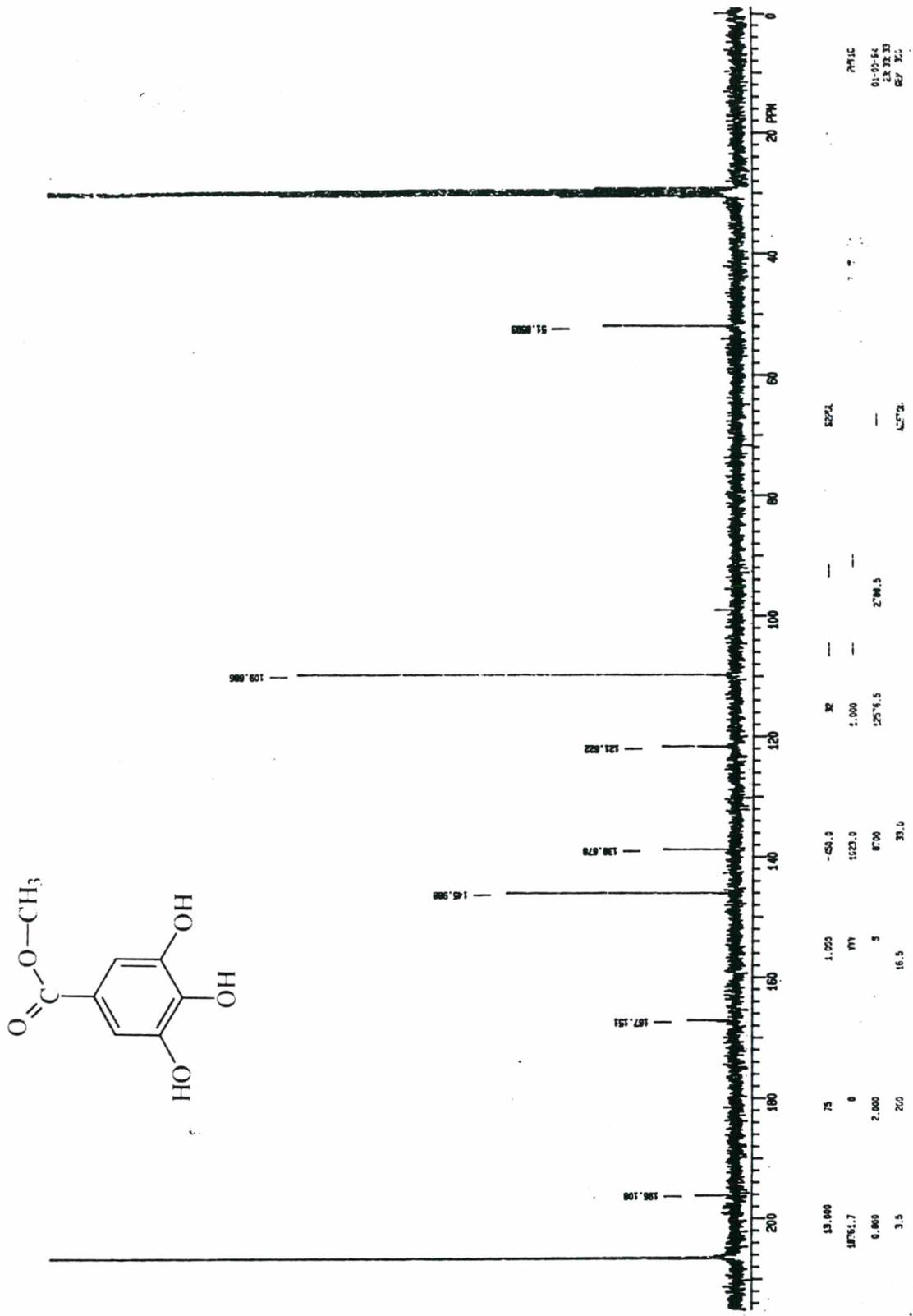
<SPECT>

1. BaseP	2. MsRng	3. Thres	4. Magni	5. Peak	6. Int*2	7. Int/2	8. Init	9. MoreK	10. Exit
----------	----------	----------	----------	---------	----------	----------	---------	----------	----------

Figura 51. Espectro de massa do galato de metila



**Figura 52.** Fragmentação de alguns íons principais do galato de metila



**Figura 53.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  do galato de metila (Acetona)

As frações de 42- 50 do extrato de acetato de etila de *Ph. sellowianus* foram cromatografadas em Sephadex LH 20 com MeOH e H<sub>2</sub>O (70 :30), coletadas em 25 frascos de 5 ml onde as frações 4-5 apresentaram 0.7127 g de um cristal amarelo

### **3.3.11 IDENTIFICAÇÃO DA GERANINA**

#### **3.3.11.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA**

O espectro de absorção na região do ultra violeta (UV), (figura 54), foi obtido em espectrofotômetro HP, utilizando-se metanol como solvente.

As frações mostraram um  $\lambda$  max. (MeOH) 221 e 281 nm , típica de grupo carbonila conjugado.

#### **3.3.11.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DA GERANINA**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 55), foi obtido num equipamento Perkin-Elmer, modelo 781, preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr) , mostrando absorção intensa de hidroxila em 3414 cm<sup>-1</sup> e absorção intensa em 1722 cm<sup>-1</sup> de carbonila, apresentando ainda deformação axial da ligação C - C do anel em 1614 cm<sup>-1</sup> , deformação axial de C-C(=O)-O de acetato e deformação axial assimétrica de O-C - C, 1202 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.3.11.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup>H GERANINA**

O espectro de ressonância nuclear de hidrogênio ( R-NMH<sup>1</sup> ), (figura 56), foram obtidas a uma frequência de 300 MHz em CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> : 7.30 - 7.26 (2H no total, Ar.H),

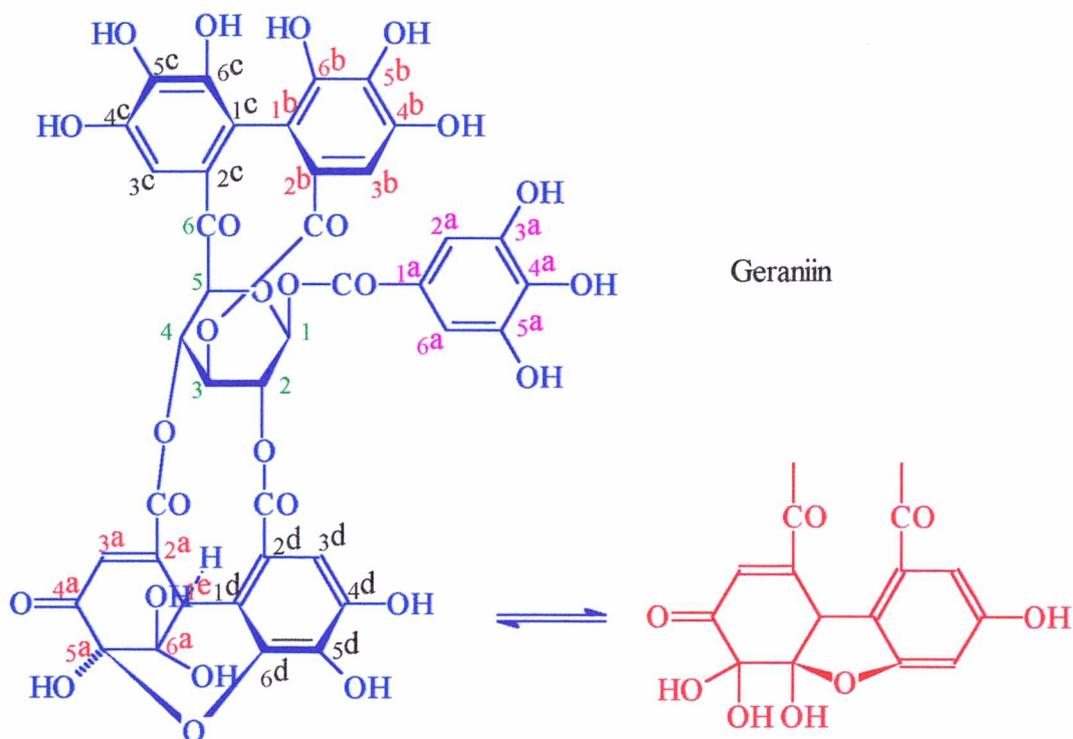
7.24 e 7.20 (2H no total, galloyl), 6.70 (3/5H, s) e 6.68 (2/5 H, s) (1H no total), 6.56 (2/3H, d) e 5.20 (3/5H, d) (1H no total, glicose 1 H), 6.59 - 4.35 (5 H no total, glicose 2-6 H), 5.33 (3/5H, t) e 4.92 (2/5 H, t) (1 H no total, e 5.2 (3/5 H, s) e 5.22 (2/5 H, s) (1H no total).

### 3.3.11.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^{13}\text{C}$

Os deslocamentos, químicos atribuídos pelo espectros de RMN $^{13}\text{C}$ , figura 57.

Anel A	1a	120	Anel E	1e	45.6
	2a(6a)	110.8		2e	154.1
	3a(5a)	146.8		3e	128.7
	4a	139.9		4e	191.8
Anel B	1b	115.7		5e	96.1
e	1c	117.1		6e	92.2
Anel C	2b	125.5	Glicose	1	91.2
	2c	124.1		2	72.9
	3b	110.6		3	70.5
	3c	108.5		4	65.8
	4b	145.8		5	63.3
	4c	145.5		6	63.8
	6b	145.1	Ester		169.0
	6c	145.0			166.8
	5b	137.8			165.9
	5c	137.4			165.8
Anel D	1d	115.3			165.0
	2d	119.6			
	3d	113.5			
	4d	144.7			
	5d	139.1			
	6d	143.0			

Com base nos dados espectrais propôs-se a estrutura correspondentes à geranina.



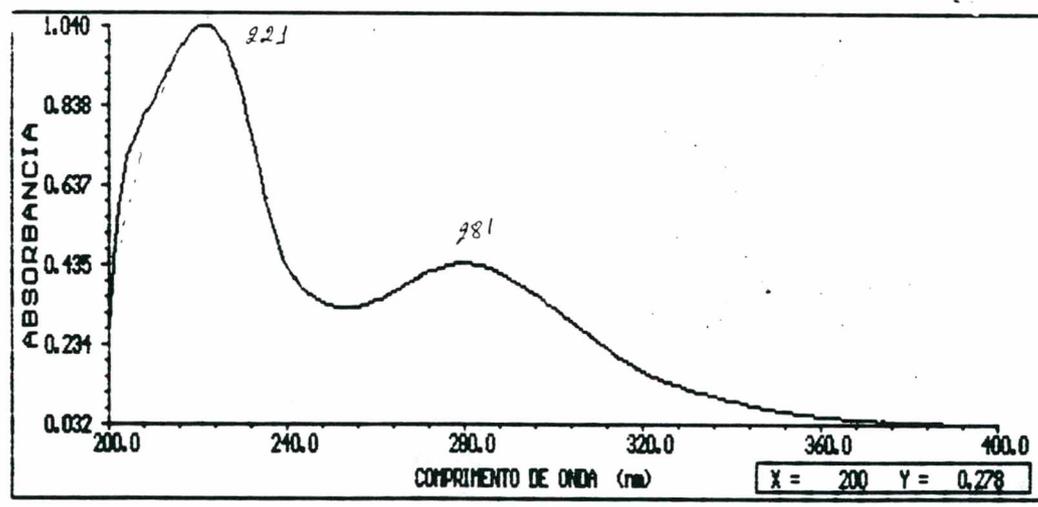
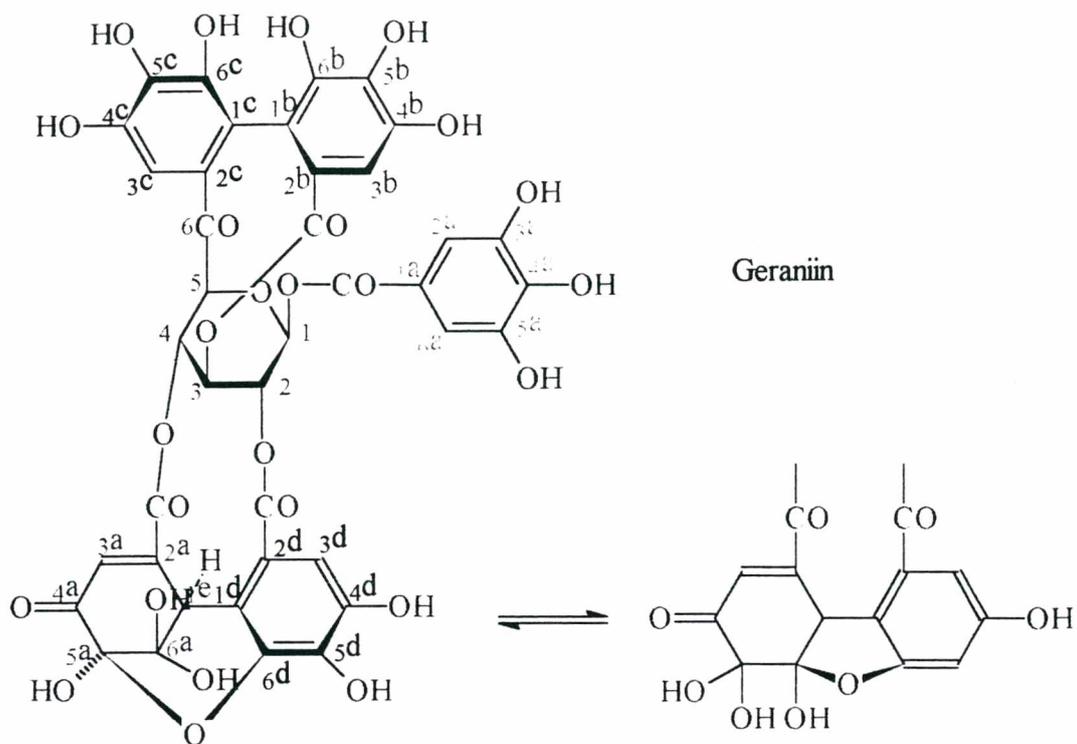
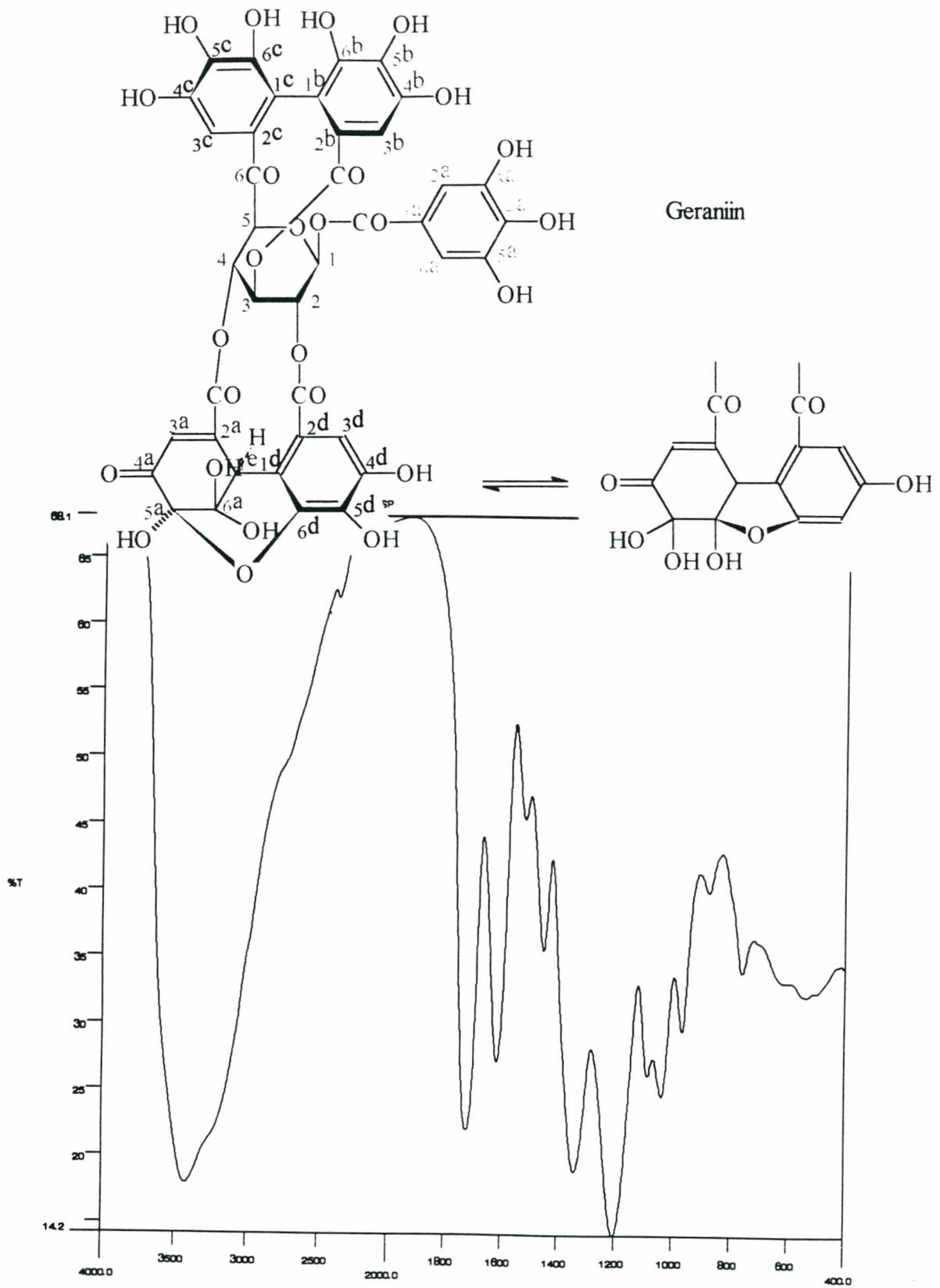
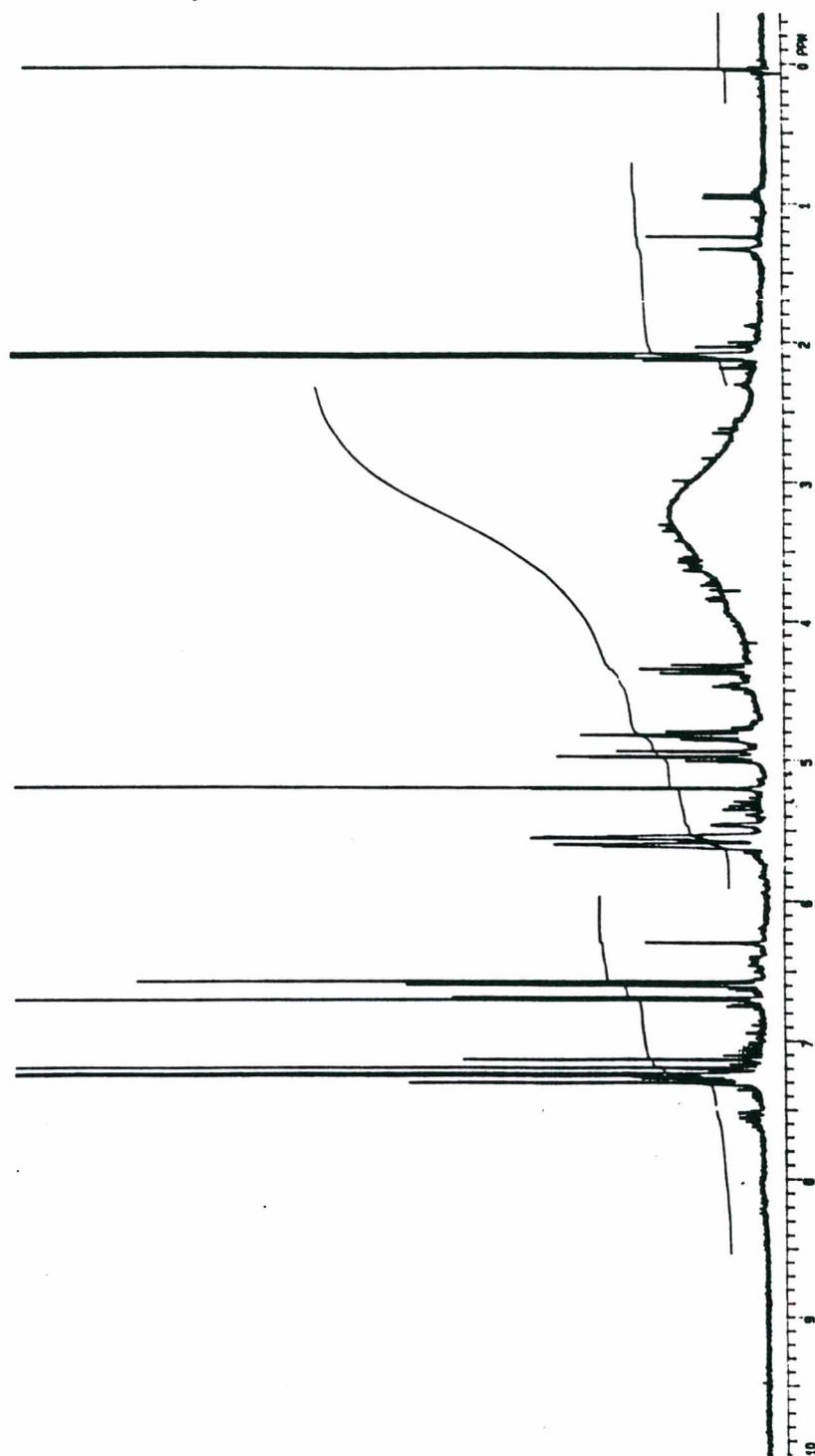


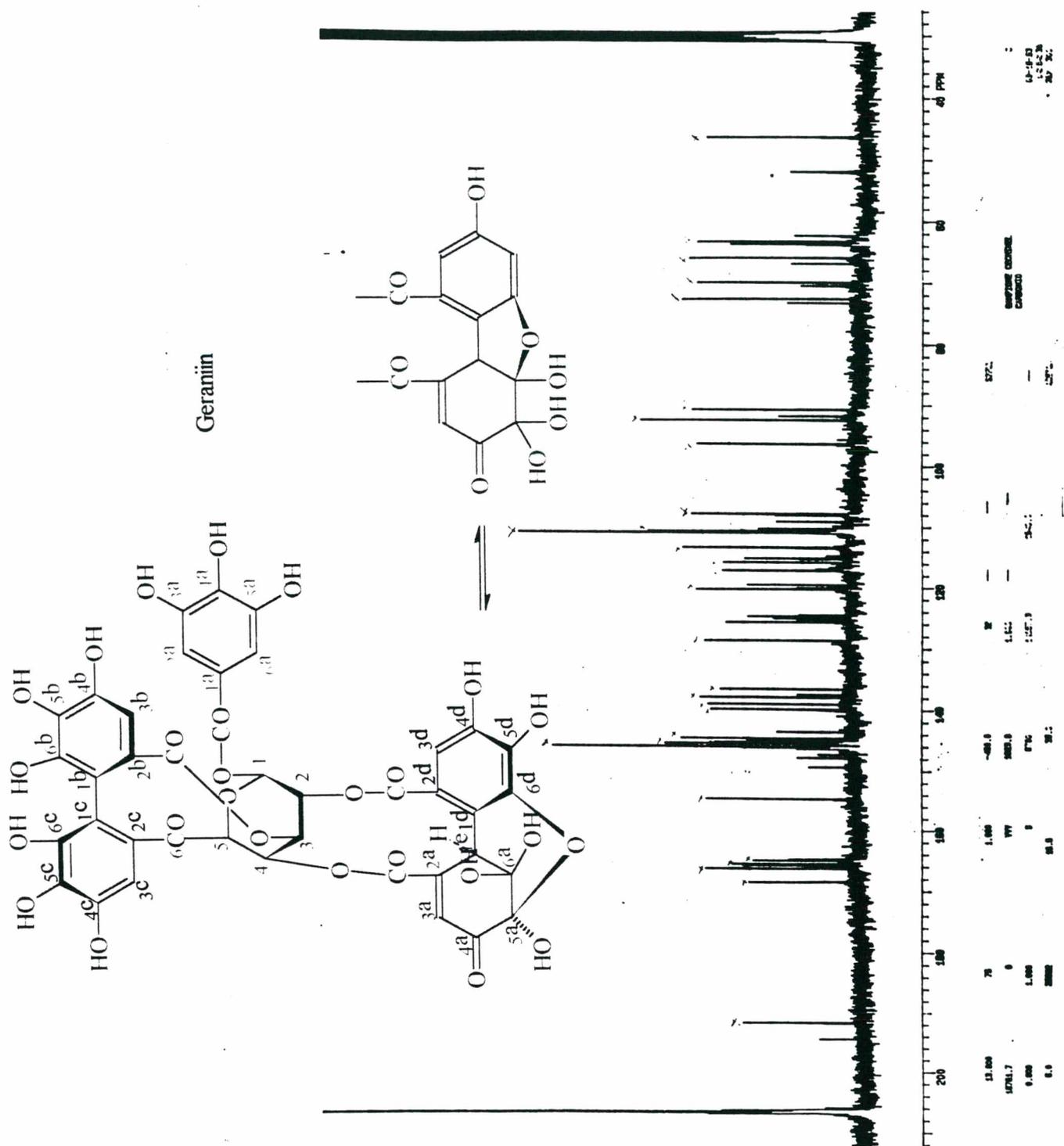
Figura 54. Espectro de absorção na região do ultra violeta da geraniina



**Figura 55.** Espectro de absorção no infra vermelho da geraniina



**Figura 56.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do geraniol (Acetona)



**Figura 57.** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  da geraniina (Acetona)

Das frações de Ac. Etila de *Ph. sellowianus* de 35 a 36 foram coletados em 20 frascos de 5 ml onde as frações de 9 a 13 apresentaram 0.2724 g de um cristal amarelo identificados como (furosina)

### **3.3.12. IDENTIFICAÇÃO DA FUROSINA**

#### **3.3.12.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA**

O espectro de absorção na região do ultra violeta (UV) (figura 58), foi obtido em espectrofotômetro HP, utilizando-se metanol como solvente.

As frações mostraram uma absorção máxima na Banda I em 281 nm, típica de grupo carbonílico conjugado

#### **3.3.12.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 59), foi feito num equipamento Perkin Elmer, modelo 781, preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (K Br), mostrando absorção intensa de hidroxila em  $3320\text{ cm}^{-1}$  e absorção intensa em  $1700\text{ cm}^{-1}$  de carbonila, de formação axial de ligação C=C do anel  $1620, 1452\text{ cm}^{-1}$ , deformação assimétrica de C-C(=O)-O de acetato  $1220\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial assimétrica de O-C=C em  $1190\text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.3.12.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^1\text{H}$**

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (figura 60), foram obtidas a uma frequência de 300 MHz em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ; 7.25 (1H, s, Ar H), 7.17 (2H, s, galloil), 6.51 (1H, s, vinil), 6.45 (1H, s, glicose 1H), 5.30 (2H, s, glicose 2-H e metina), 5.11 (1H, d, glicose 4-H), 4.50 - 3.90 (4H, m, glicose 3-, 5-He 6-H<sub>2</sub>), um sinal  $\delta$  4.98 (d) assinala para um grupo de prótons vinil (1/2 H) e um próton metila (1/2 H) respectivamente.

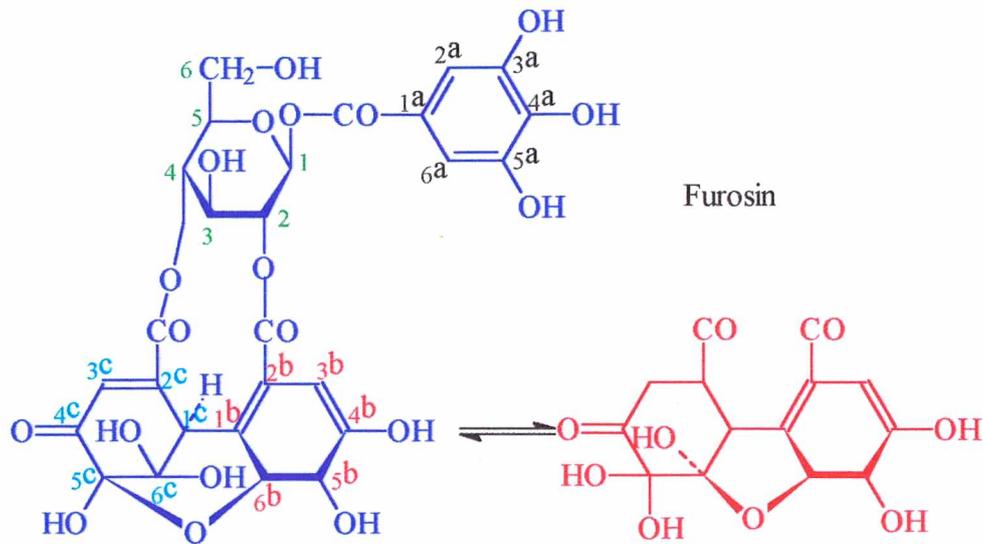
### 3.3.12.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup> C

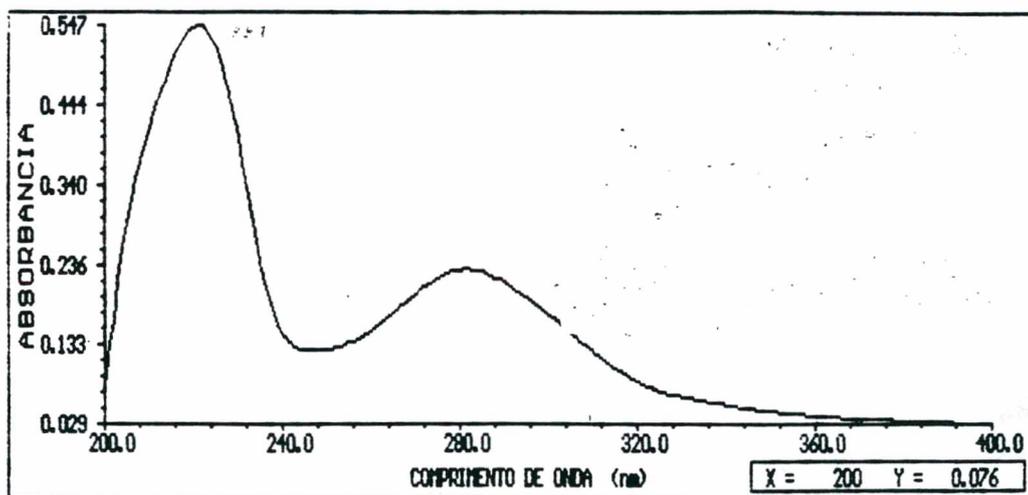
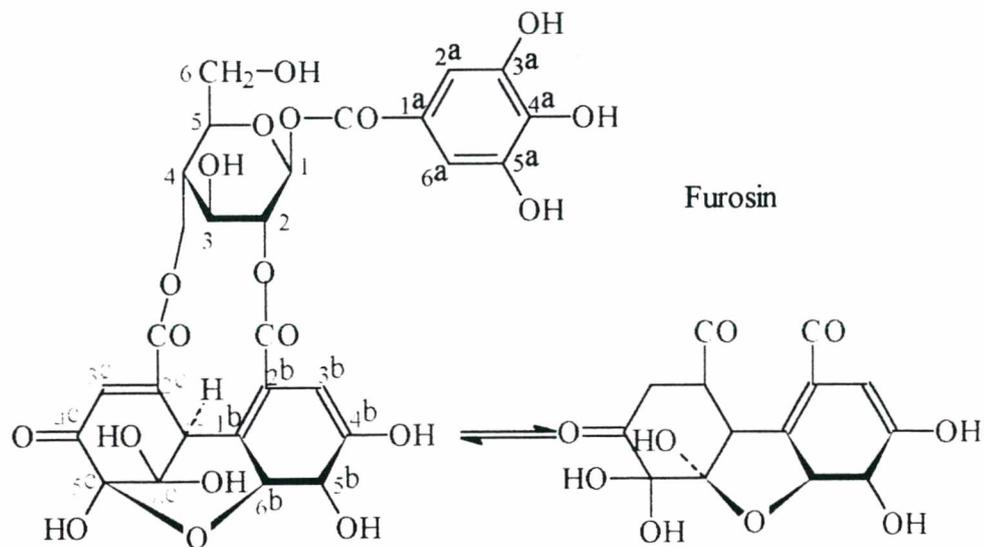
Os deslocamentos, químicos atribuídos pelo espectros de RMN, de <sup>13</sup> C, figura 61.

Anel A	1a		120.2 (1)	Glicose	1	92.3 (1/2)
	2a, 6a		110.1 (2)			92.0 (1/2)
	3a, 5a		146.0 (2)			78.3 (1/2)
	4a		139.6 (1)			77.6 (1/2)
Anel B	1b	6	117.2 (1/2)		2-5	73.4 (1/2)
						72.2 (1/2)
						71.9 (1/2)
						70.8 (1/2)
						63.0 (1)
		5	115.8 (1/2)			
	2b	6	120.0 (1/2)		6	62.4 (1)
		5	119.7 (1/2)			
	3b	6	113.6 (1/2)	Ester		166.4 (1/2)
		5	113.2 (1/2)			166.1 (1/2)
	4b	6	145.6 (1/2)			165.8 (1/2)
		5	146.9 (1/2)			165.5 (1/2)
	5b	6	139.1 (1/2)			165.2 (1/2)
		5	137.2 (1/2)			
	6b	6	143.0 (1/2)			
		5	147.5 (1/2)			
Anel C	1c	6	45.5(1/2)	4c	6	192.0 (1/2)
		5	51.6(1/2)		5	194.8 (1/2)
	2c	6	154.5 (1/2)	5c	6	96.0 (1/2)
		5	149.8 (1/2)		5	92.3 (1/2)
	3c	6	128.4 (1/2)	6c	6	92.5 (1/2)
		5	125.5 (1/2)		5	108.7 (1/2)

# 6 indica sinal de carbono de estrutura de 6 membros e 5 de estrutura de cinco.

Com base nos dados espectrais propôs-se a estrutura abaixo correspondente à furosina





**Figura 58.** Espectro de absorção na região do ultra violeta da furosin

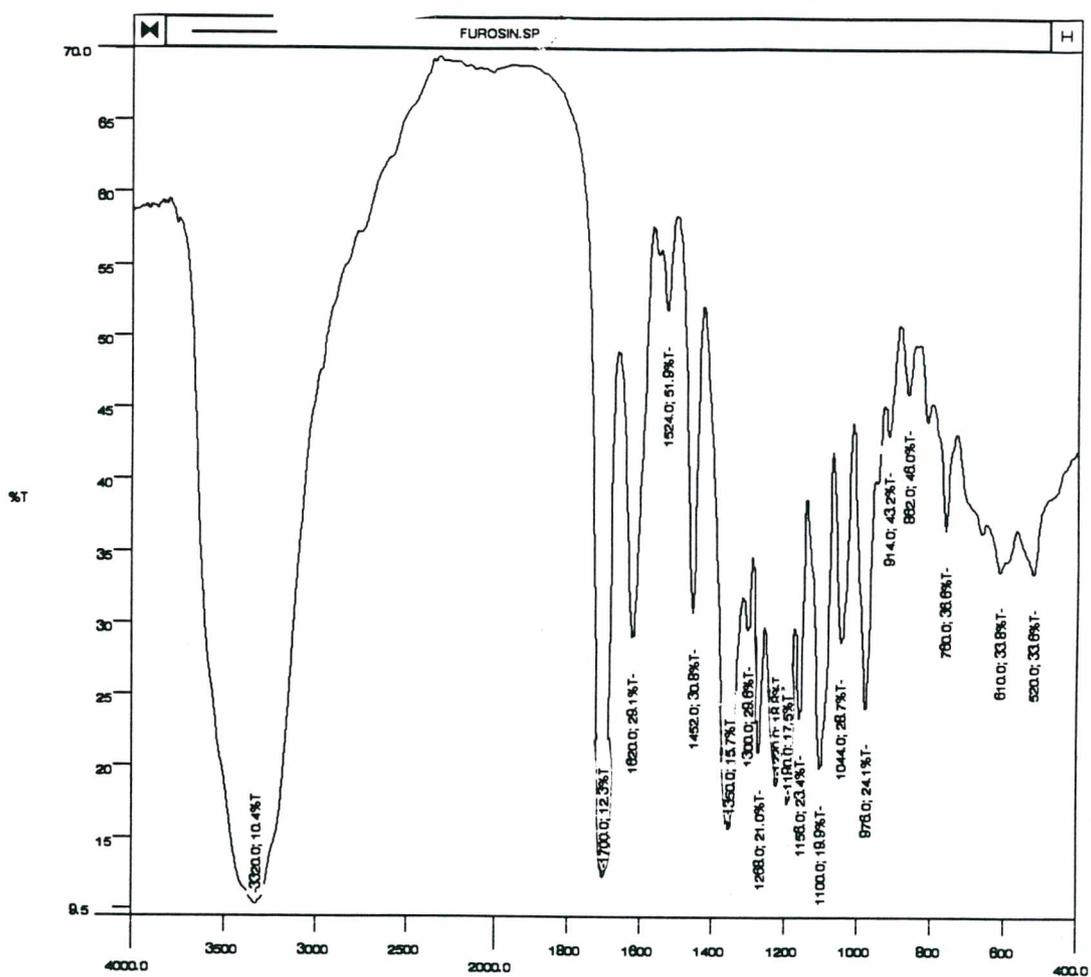
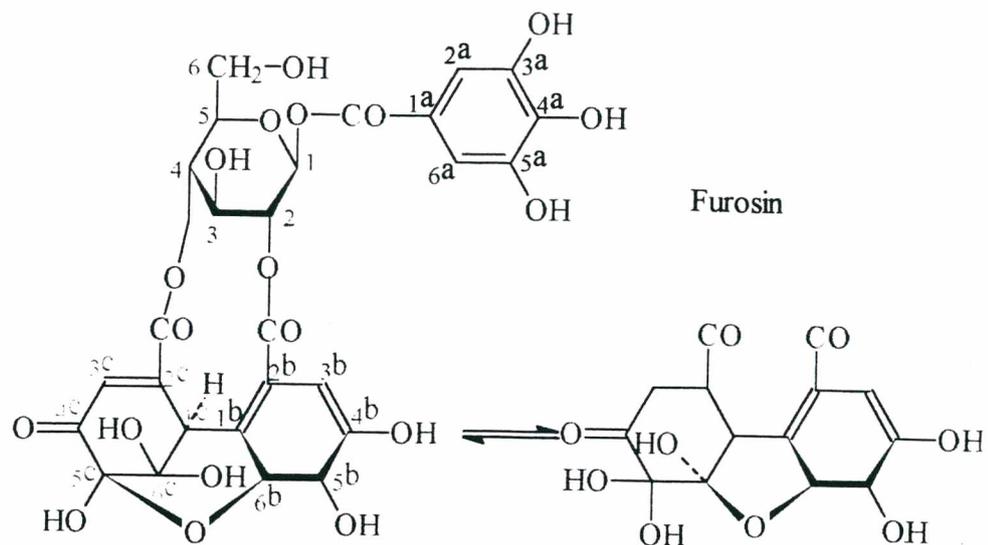


Figura 59. Espectro de absorção no infra vermelho da furosin

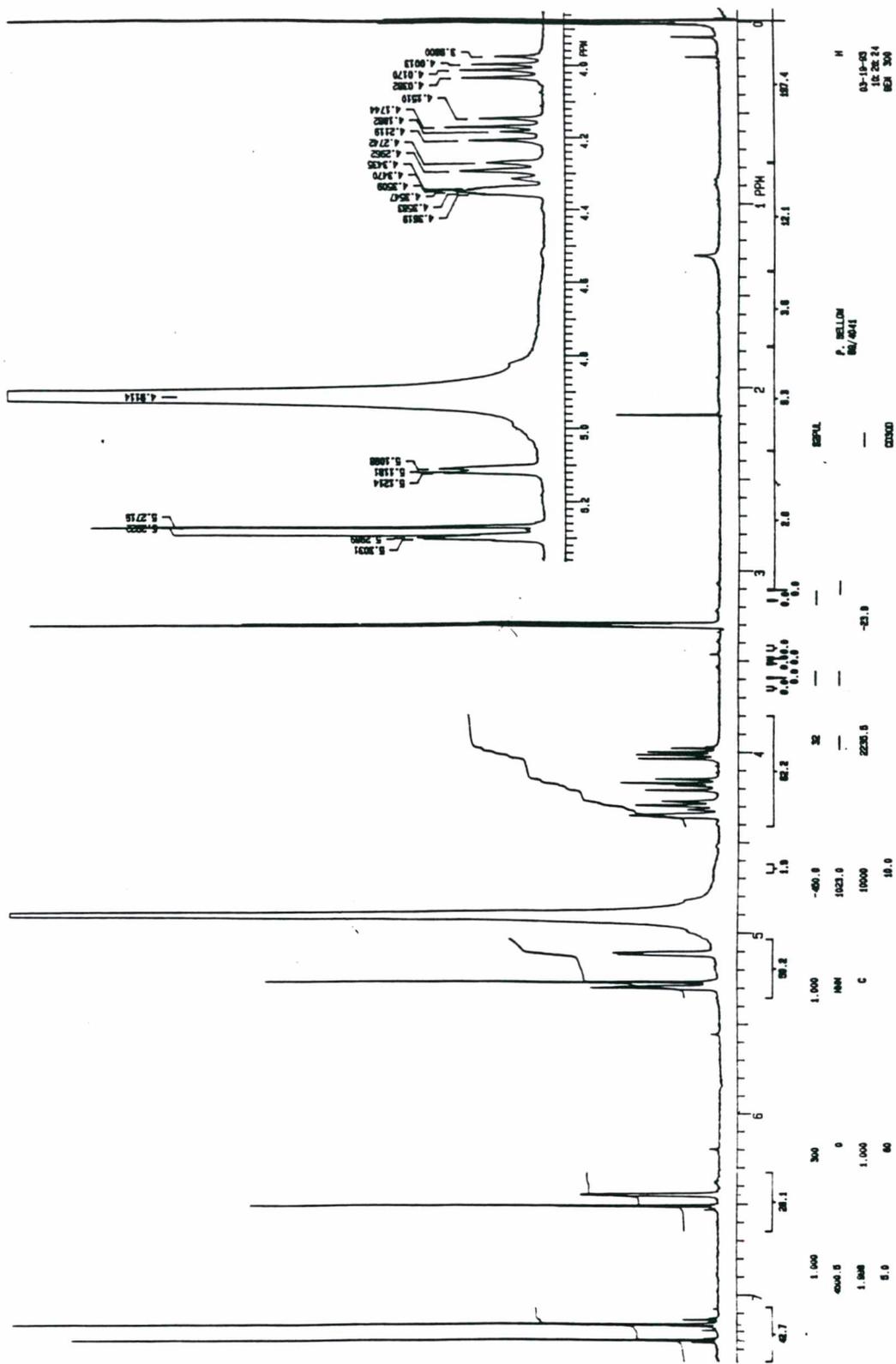


Figura 60. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H da furosina (Acetona)

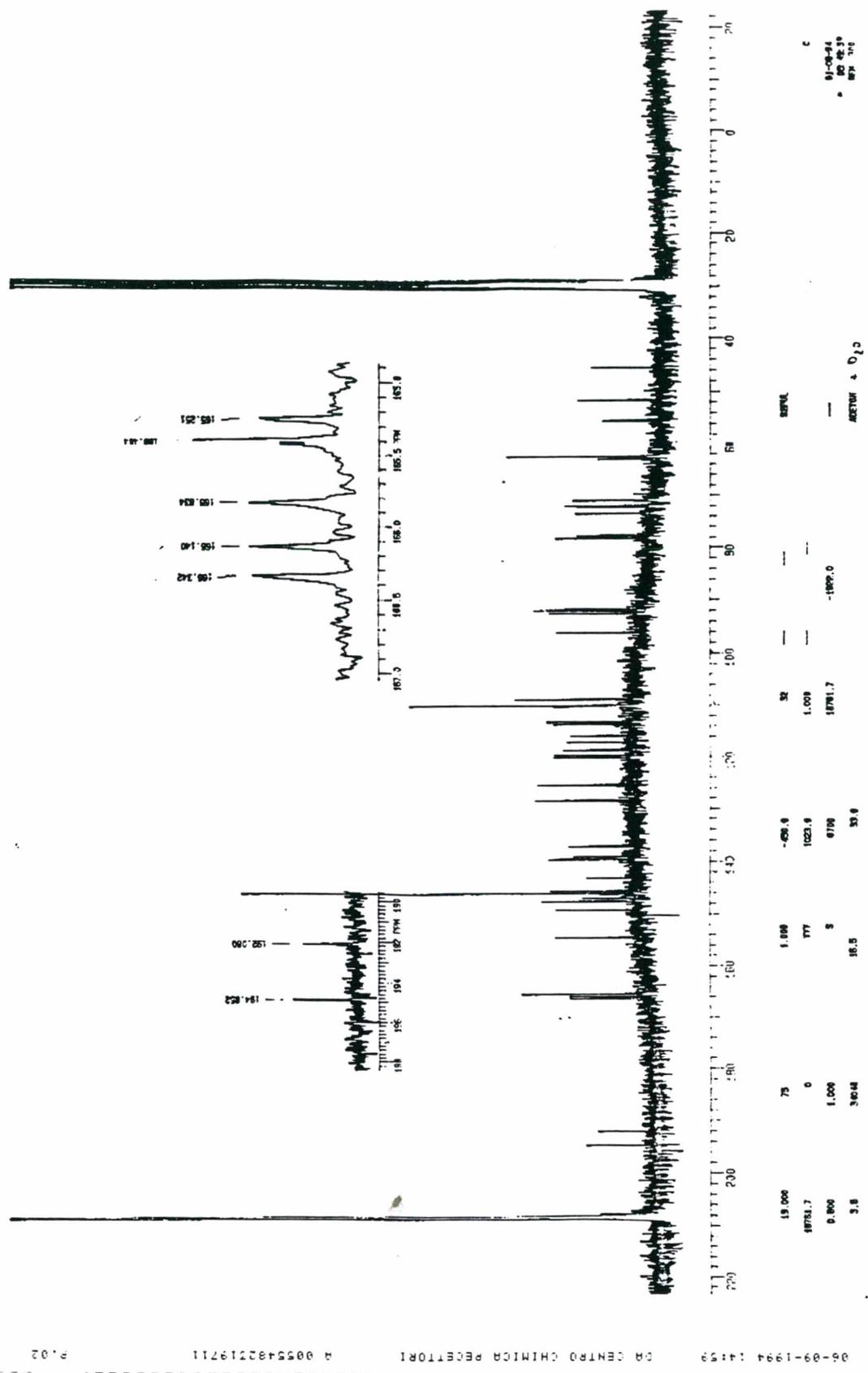


Figura 61. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C da furosina (Acetona)

As frações 42 a 50 do extrato acetato de etila de *Phyllanthus sellowianus* foram cromatografada em Sephadex LH 20 coletadas em 25 frascos de 5 ml onde as frações de 1 a 3 apresentaram 1.0633 g. de um solido amorfo de cor amarela com ponto de fusão 188 - 190 °C., identificada como (Rutina ).

### **3.3.13. IDENTIFICAÇÃO DA RUTINA**

#### **3.3.13.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA DA RUTINA**

O espectro de absorção na região do Ultra violeta (UV) (figura 62), foi obtido em espectrofotômetro HP utilizando-se metanol como solvente.

As frações mostraram uma absorção máxima em 259, 266, 298, 359 nm.

#### **3.3.13.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DA RUTINA**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 63), foi obtido num equipamento Perkim Elmer, modelo 781, preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr), mostrando absorção intensa de hidroxila em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de ligação C --- C do anel  $1600, 1450\text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.3.13.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^1\text{H}$ DA RUTINA**

O espectro de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  (figura 64), foram obtidos a uma frequência de 300 MHz em MeOD,  $\delta$  ppm) 2.20 -3.85 (10 H, m), 4.55 (1H, s), 4.9(1H, d), 6.27(1H, d, J=2.07 Hz), 6.42 (1H, d, J= 2.13 Hz), 6.88 (1H, d, J= 8.49 Hz), 7.60 (1H, s), 7.64 (1H, d, J= 2.19 e 8.49 Hz), 7.72 (1H, d, J= 2.16 Hz).

### 3.3.13.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$ DA RUTINA

Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD, TMS,  $\delta$  ppm), figura 65.

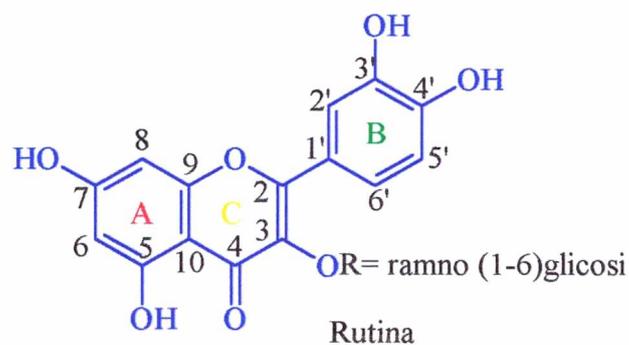
Anel A	5	162.84	Anel B	1'	123.54
	6	99.20		2'	116.00
	7	145.75		3'	145.75
	8	94.90		4'	149.75
	9	158.30		5'	116.67
	10	105.53		6'	123.30
	2C $\alpha$	159.27			
	3C $\beta$	135.59			
	4C=O	179.29			

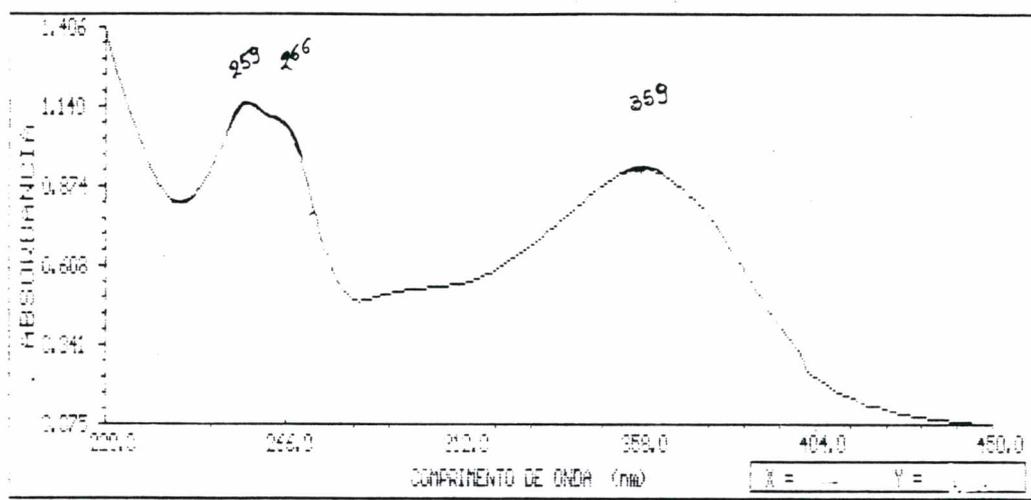
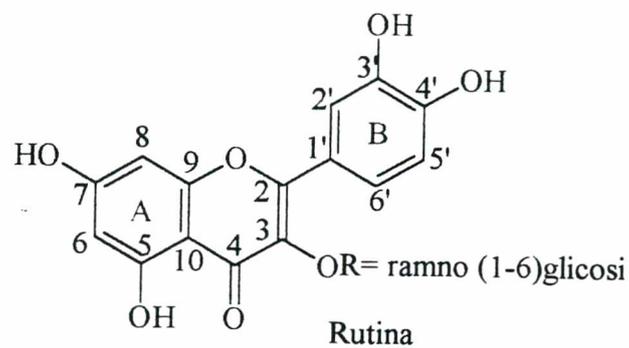
Grupo Ramno glicosil	C $^{1''}$	104.5	C $^{1'''}$	108.36
	C $^{2''}$	75.68	C $^{2'''}$	71.32
	C $^{3''}$	78.11	C $^{3'''}$	72.04
	C $^{4''}$	77.11	C $^{4'''}$	73.89
	C $^{5''}$	77.67	C $^{5'''}$	69.67
	C $^{6''}$	68.51	C $^{6'''}$	17.89

### 3.3.13.5 ESPECTRO DE MASSA DA RUTINA

O espectro de massa (EM) (figura 66, 67) , foi obtido no espectrômetro Shimadzu CGMS -QP. 2000 A. O qual apresenta o íon molecular ( $M^+$ ) a m/e 302 (100 %)e os seguintes fragmentos principais 273 (11.95), 153 (14.13), 150 (5.43), 137 (22.82), 128 (21.73), 125 (5.43), 124 (3.26), 81 (16.34), 69 (59.78), 60 (63.04), que são fragmentos comuns observados nos flavonóides

Com base nos dados espectrais propôs-se a estrutura correspondente à rutina





**Figura 62.** Espectro de absorção na região do ultra violeta da rutina

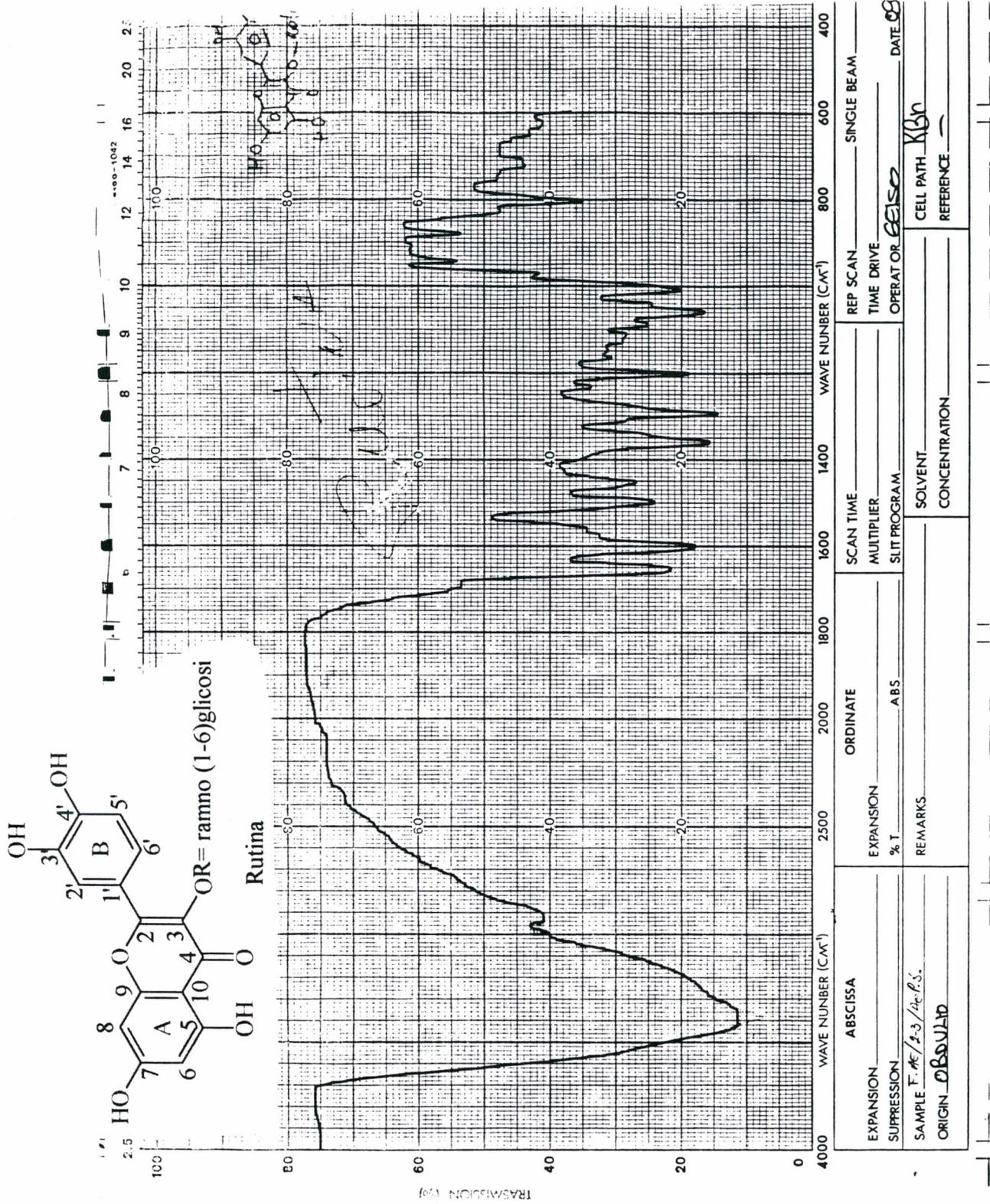


Figura 63. Espectro de absorção no infra vermelho da rutina

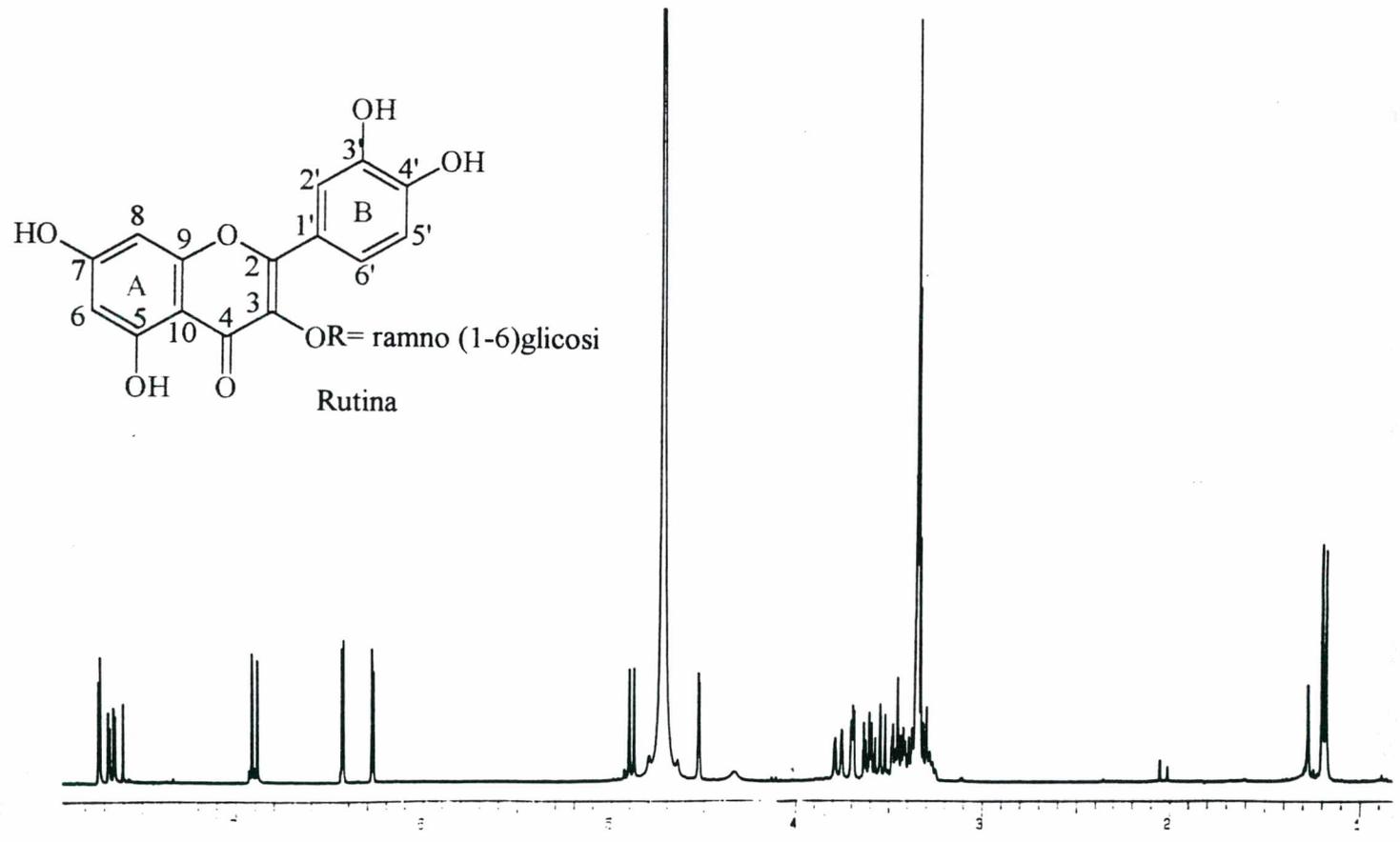
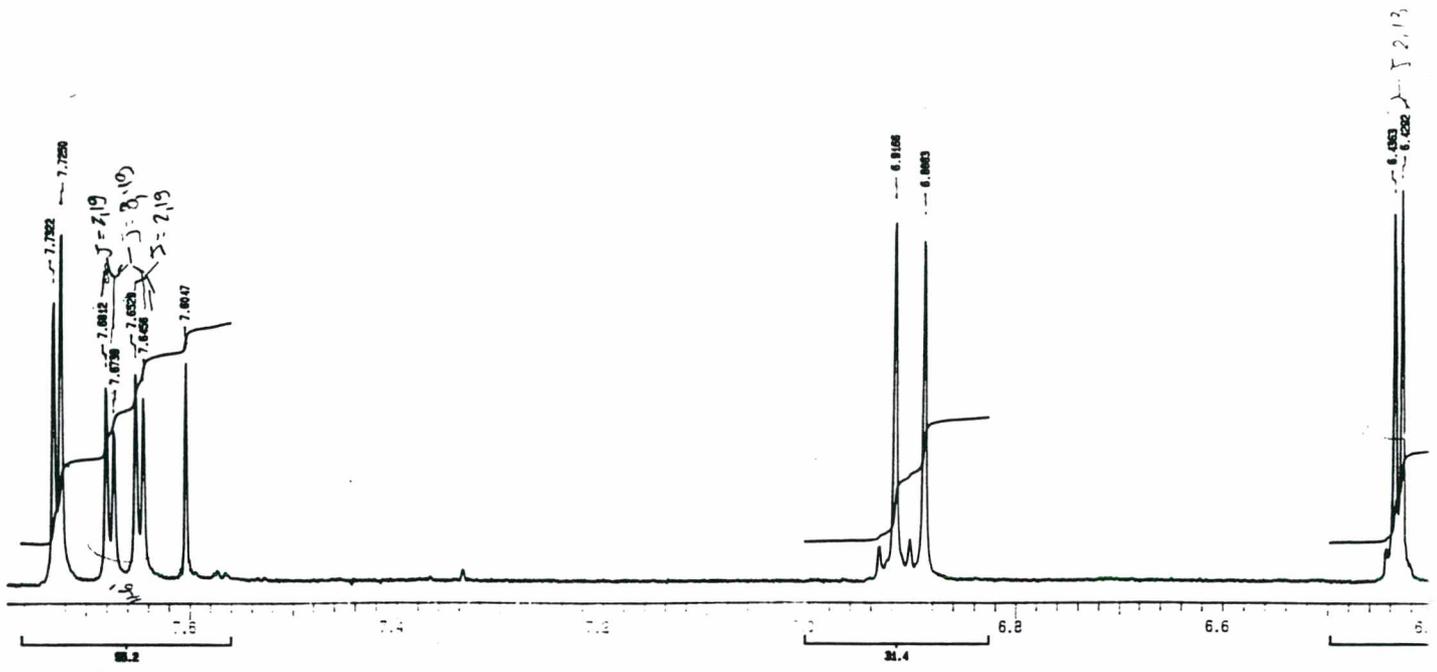


Figura 64. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H da rutina (MeOD)

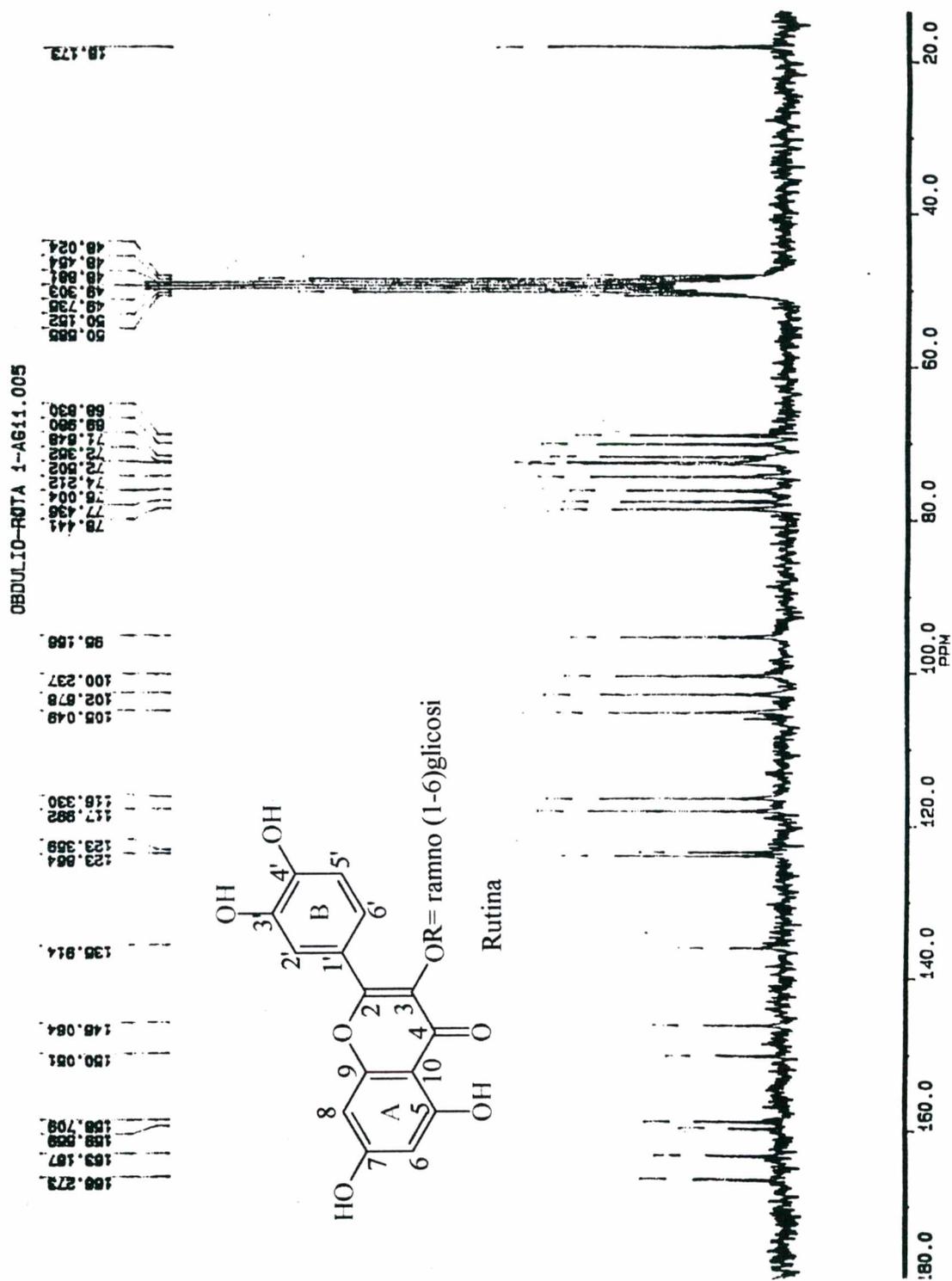
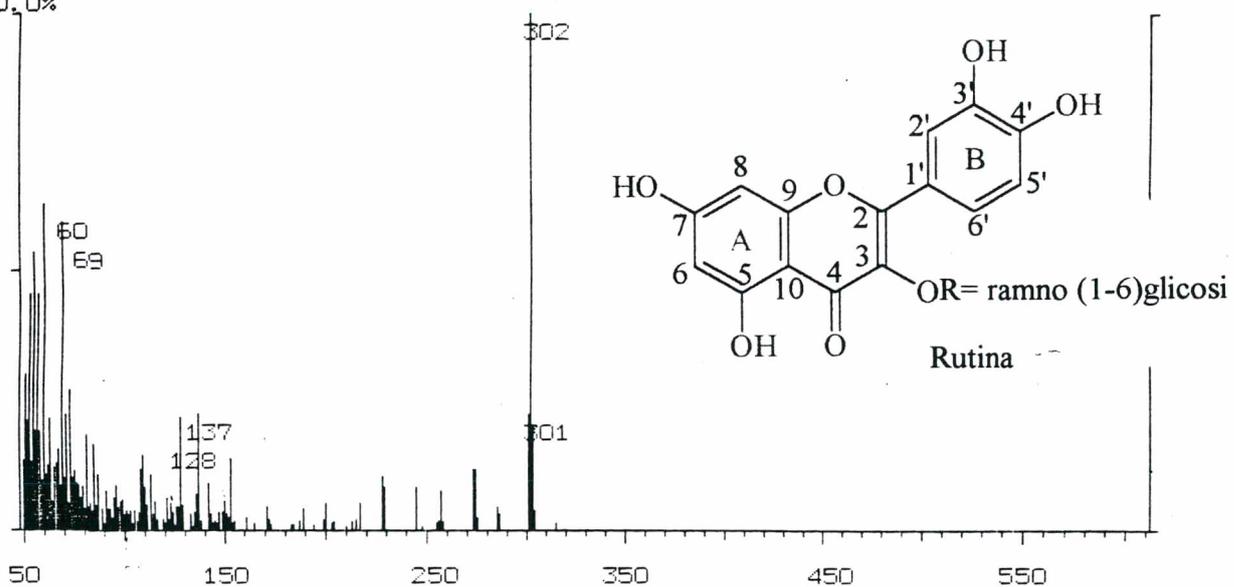


Figura 65. Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  da rutina (MeOD)

Mass Spectrum File: rutina.01 95-10-19 09:29  
Comment: Rutina - Obdulio

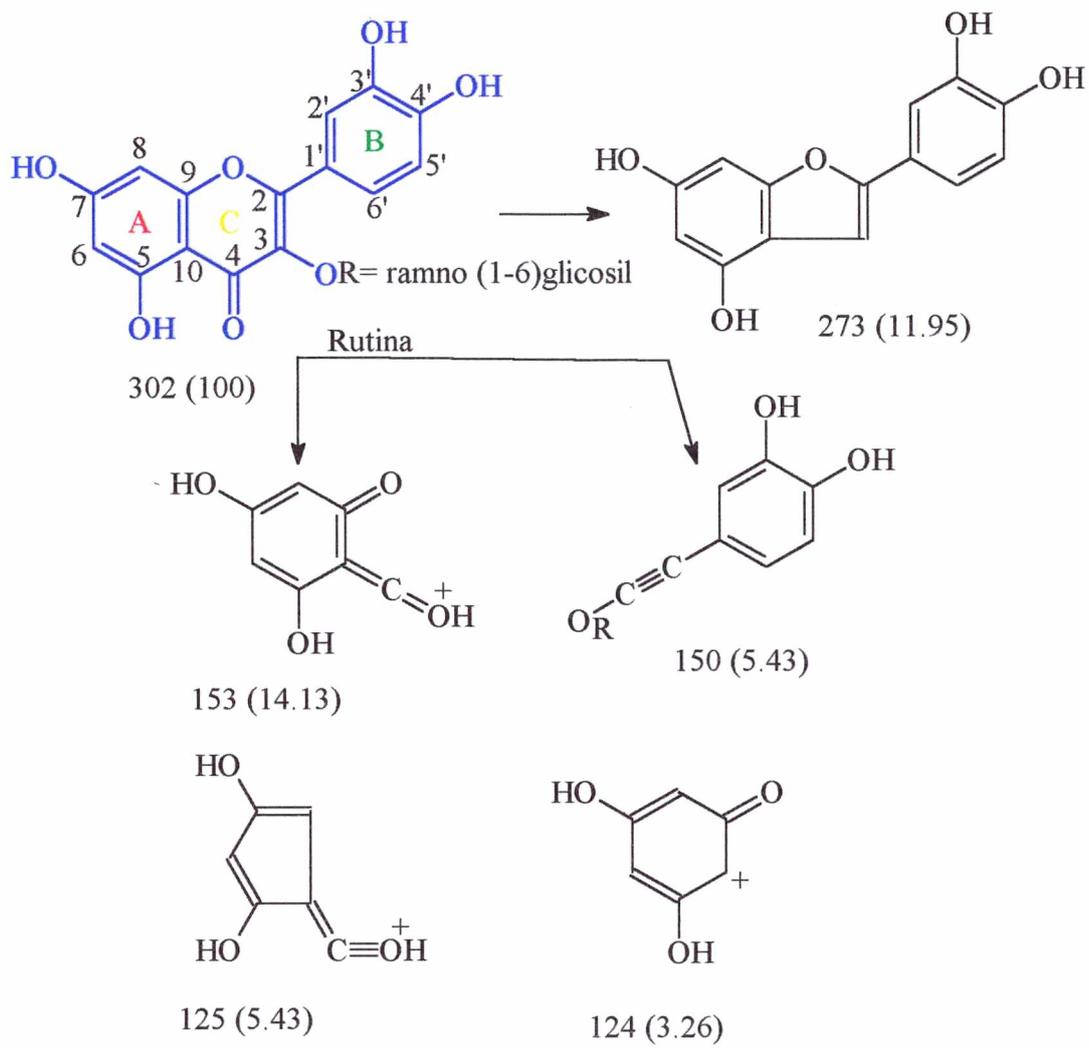
Scan: 469 ( 0- 0) R.T.: 15.70min Base Peak: 302.0 Int: 4340(=100%)  
100.0%



<SPECT>

1. BaseP	2. MsRng	3. Thres	4. Magni	5. Peak	6. Int*2	7. Int/2	8. Init	9. MoreK	10. Exit
----------	----------	----------	----------	---------	----------	----------	---------	----------	----------

Figura 66. Espectro de massa da rutina



**Figura 67.** Fragmentação de alguns íons principais da Rutina

As frações 7 a 17 do extrato acetato de etila de *Ph. sellowianus* foram cromatografados em Sephadex LH 20 com MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30), coletadas em 20 frascos de 5 ml, onde a fração 17 apresentou 0.130 g de um pó amorfo de cor amarelo com ponto de fusão 290<sup>o</sup> C. (quercetina ).

### **3.3.14. IDENTIFICAÇÃO DA QUERCETINA**

#### **3.3.14.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA DA QUERCETINA**

O espectro de absorção na região do ultra violeta (UV) (figur 68), obtido em espectrofotômetro HP, utilizando-se Metanol como solvente.

As frações mostraram uma absorção máxima em 255, 269, 301, 370 nm.

#### **3.3.14.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO DA QUERCETINA**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 69), foi obtido num equipamento Perkim Elmer 16 PC., preparando a amostra em pastilha comprimida de Brometo de potássio anidro (KBr), mostrando absorção de hidroxila em 3408 cm<sup>-1</sup> e outras absorções: 1664, 1612, 1559, 1383, 1319,1261, 1169 cm<sup>-1</sup> .

#### **3.3.14.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup>H DA QUERCETINA**

O espectro de ressonância magnética <sup>1</sup>H (figura 70), foram obtidos a uma frequência de 70 MHz em MeOD, δ, ppm, 6.2 (1H, d), 6.42 (1H, d), 6.9 (1H, d) 7.55 (1H, dd) e 7.70 (1H, d).

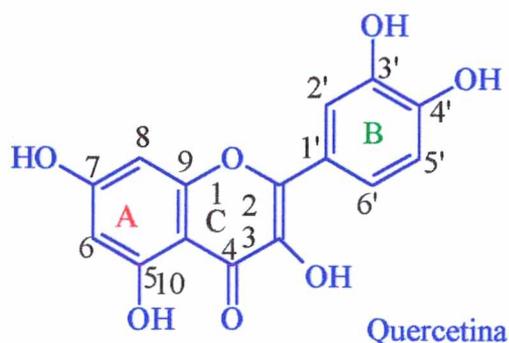
### 3.3.14.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup>C DA QUERCETINA

Os deslocamentos químicos atribuídos pelos espectrais de RMN <sup>13</sup>C (MeOD), TMA, δ, ppm), (figura 71).

Anel A	5.	165.95	Anel B	1	122.33
	6	98.40		2	115.39
	7	164.10		3	145.26
	8	93.40		4	147.89
	9	156.43		5	115.89
	10	103.30		6	120.35
2Cα		145.26			
3Cβ		135.95			
4CO		176.05			

### 3.3.14.5 ESPECTRO DE MASSA DA QUERCETINA

O espectro de massa (e/m) (figura 72), foi obtido no espectrômetro Shimadzu CGMS-Qp. 2000 A, Apresenta o íon (M<sup>+</sup>) a m/e 302 (100) e os seguintes fragmentos principais 273 (27.0), 257 (7.0), 229 (14.8), 153 (23.8), 137 (38,0), 109 (14.2) tipos de fragmentos observados nos flavonóides. Com base nos dados da literatura <sup>84, 89, 126, 134</sup> e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente a Quercetina.



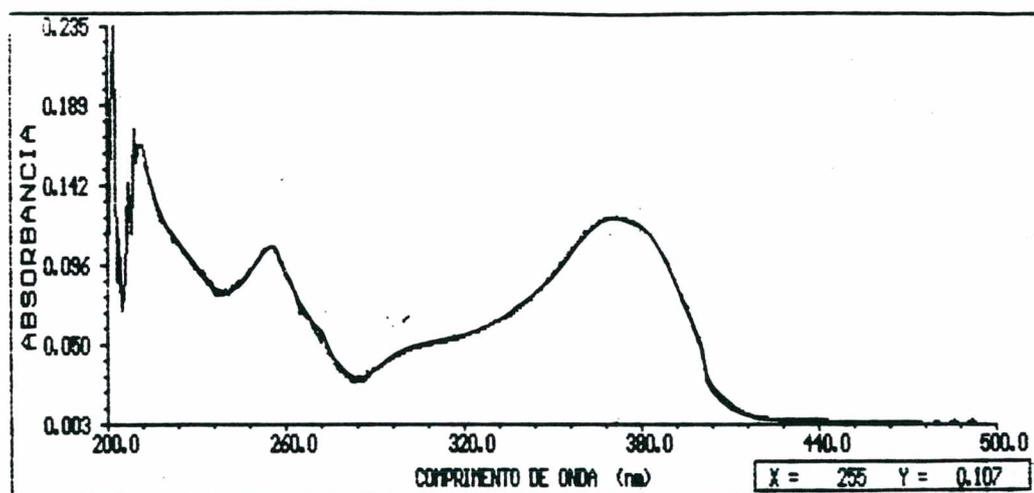
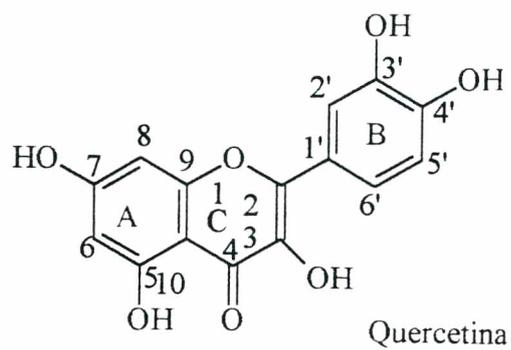
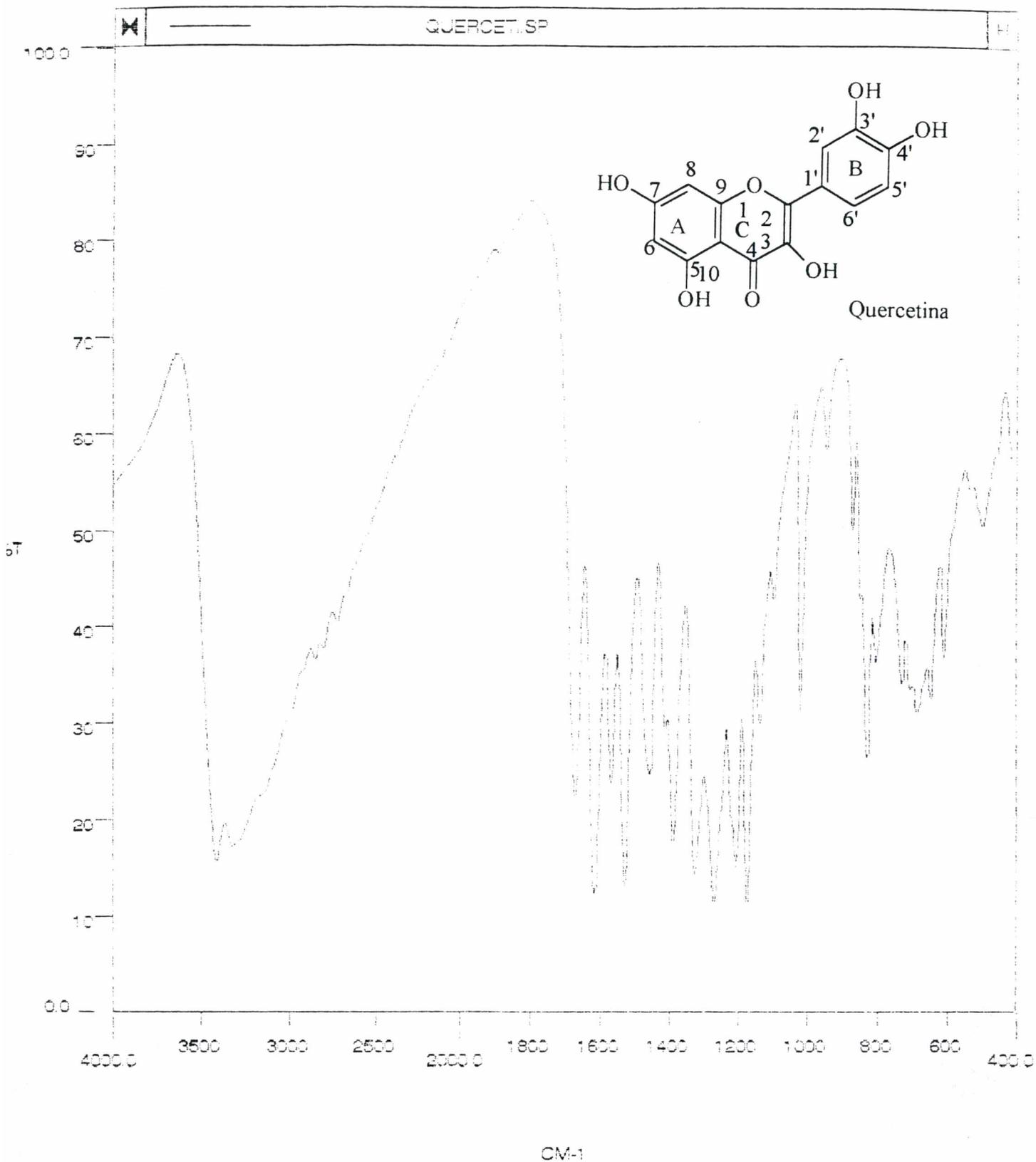
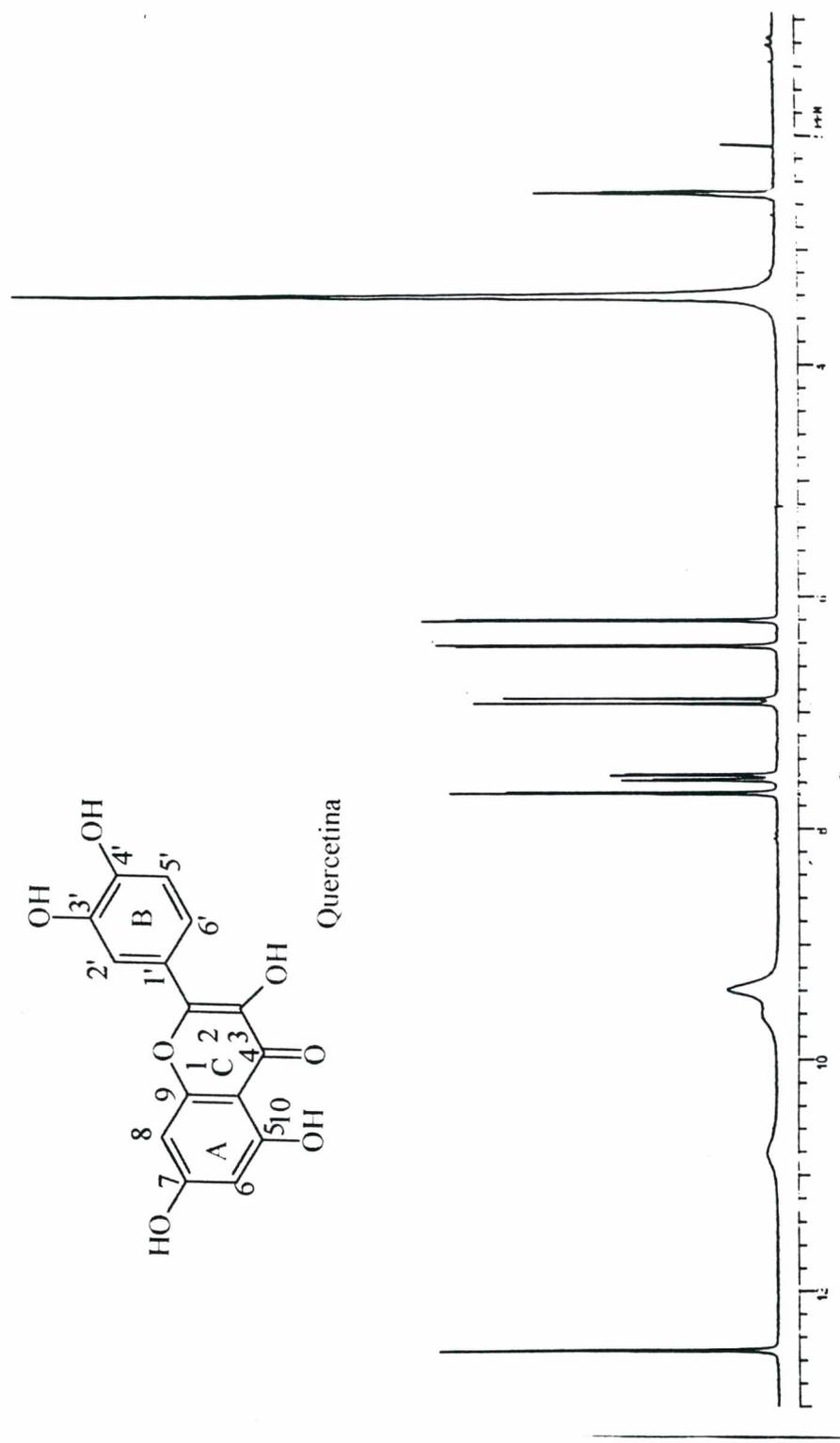


Figura 68. Espectro de absorção na região do ultra violeta da quercetina



**Figura 69.** Espectro de absorção no infra vermelho da quercetina



**Figura 70.** Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H da quercetina

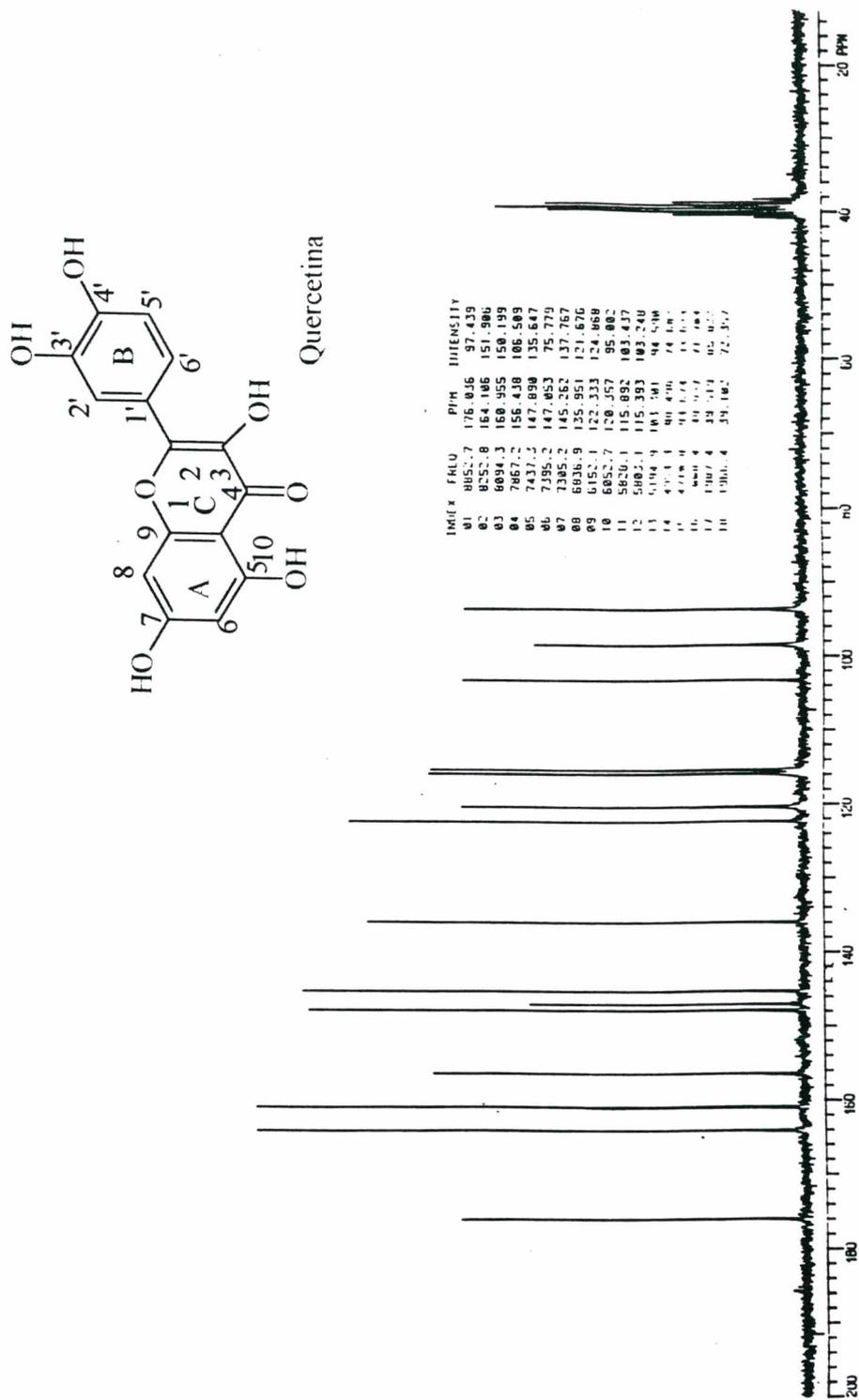


Figura 71. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  da quercetina

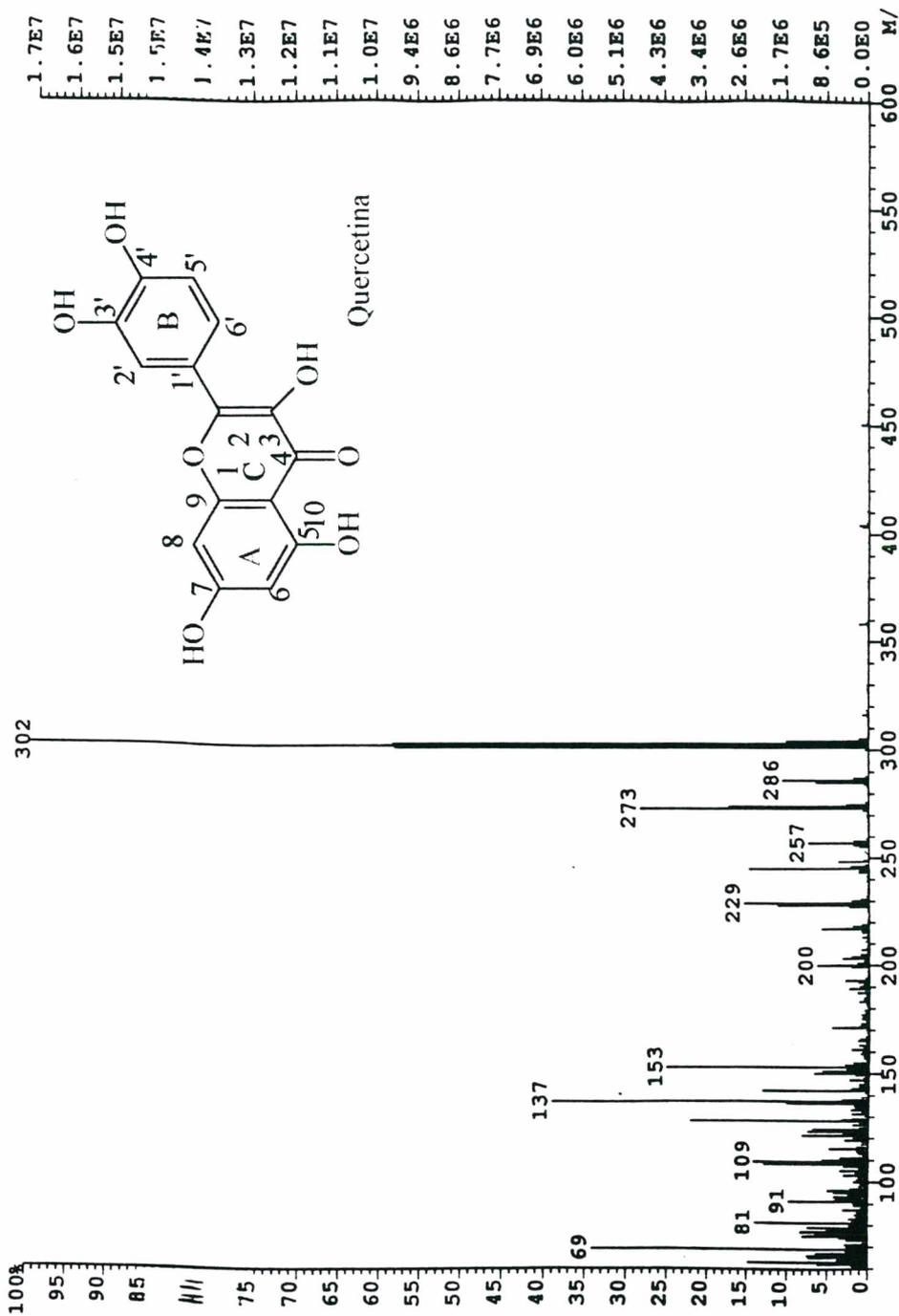


Figura 72. Espectro de massa da quercetina

A fração 5 do extrato acetato de etila de *Ph. fraternus*, foi cromatografada em Sephadex LH 20 com MeOH e H<sub>2</sub>O (70:30), coletadas em 20 frascos de 5 ml onde a fração 5 apresentou 0.0463 g de cristais branco com ponto de fusão 109-110<sup>o</sup> C. (hipofilantina )

### **3.3.15. IDENTIFICAÇÃO DE HIPOFILANTINA**

#### **3.3.15.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRA VERMELHO DA HIPOFILANTINA**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 73), foi obtido num equipamento Perkin Elmer 16 PC, preparando a amostra em pastilha comprimida de brometo de potássio anidro (KBr), mostrando absorção de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> em 2900 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de ligação C --- C do anel 1640, 1510 cm<sup>-1</sup>, deformação axial simétrica de C-O-C 1028 cm<sup>-1</sup>, deformação axial assimétrica de C-O-C 1258 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.3.15.2 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup>H DA HIPOFILANTINA**

O espectro de ressonância magnética <sup>1</sup>H (figura 74), foi obtido a uma frequência de 300 MHz em CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm : 1.8 - 2.1 ( m, 2 e 3-H), 2,77 (mm, 4-H), 3.35 (s, CH<sub>2</sub>OMe), 3.36 (s, CH<sub>2</sub>OMe), 3.81 (s, 6-OMe), 3.86 (s, 3'-OMe), 3.88 (s, 4'-OMe), 4.10 (d, J= 7.95 Hz, 1-H), 5.65 - 5.73 (dd, J = 1.41 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 6.33 (s, 5-H), 6.66 (s, 8-H), 6,73 (d, J= 8.10 Hz, 2'-, 5'-H).

#### **3.3.15.3 ESPECTRO DE MASSA DA HIPOFILANTINA**

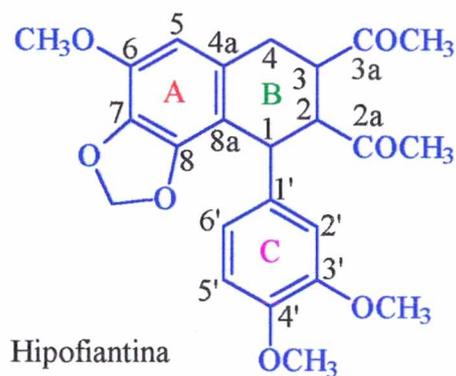
O espectro de massa (EM) (figura 75), foi obtido no espectrometro Shimadzu CGMS-QP-2000 A. Apresentou o íon molecular (M<sup>+</sup>) a m/e 151 (100) e os seguintes fragmentos principais 430 (50), 415 (11,9), 367 (35.86), 353 (60.86), 335 (28.26), 215 (39.13).

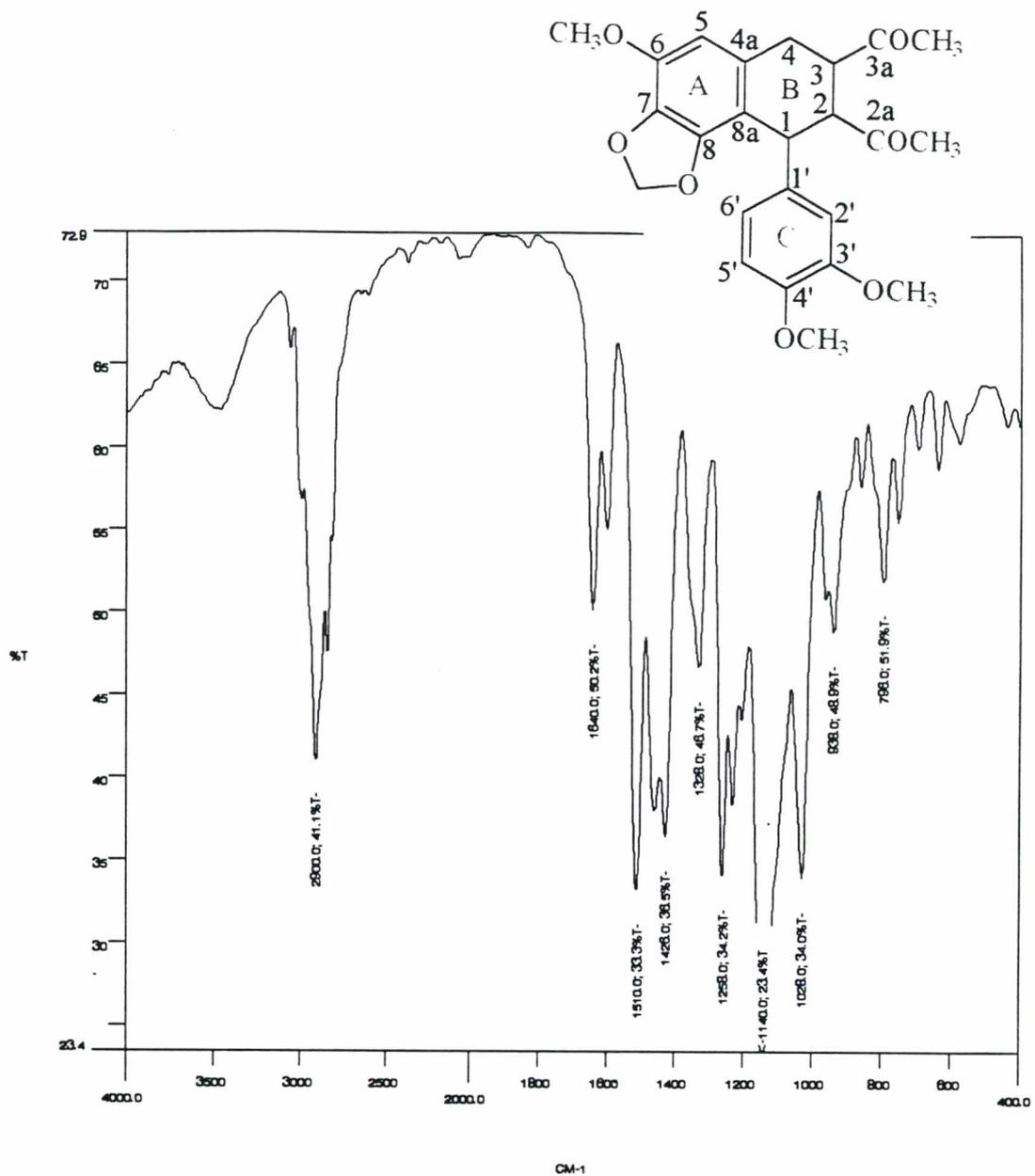
### 3.3.15.4 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^{13}\text{C}$ DA HIPOFILANTINA

Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectros, de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ , ppm): figura 76, 77.

Anel A	5	142.02	Anel B	1	45.35
	6	147.02		2	41.85
	7	131.73		3	36.85
	8	106.40		4	33.30
	4a	137.95		2a	171.63
	8a	120.35		3a	175.36
Anel C	1'	133.19	Ar O-Me	55.80	
	2'	111.62		55.88	
	3'	148.43		58.98	
	4'	146.96			
	5'	110.50	OCH <sub>2</sub> O	101.07	
	6'	115.01			

Com base nos dados da literatura <sup>114</sup> e espectrais propões a seguinte estrutura correspondente a hipofilantina





P-E 16    Filename: F5PHF.SP    Date: 94/08/30    Time: 11:18:05.00  
 Scans: 10    Resolution: 4.00    Operator:  
 Sample: fração5 Phyl. Fraternus (Obdulio)

**Figura 73.** Espectro de absorção na região do infra vermelho da hipofilantina

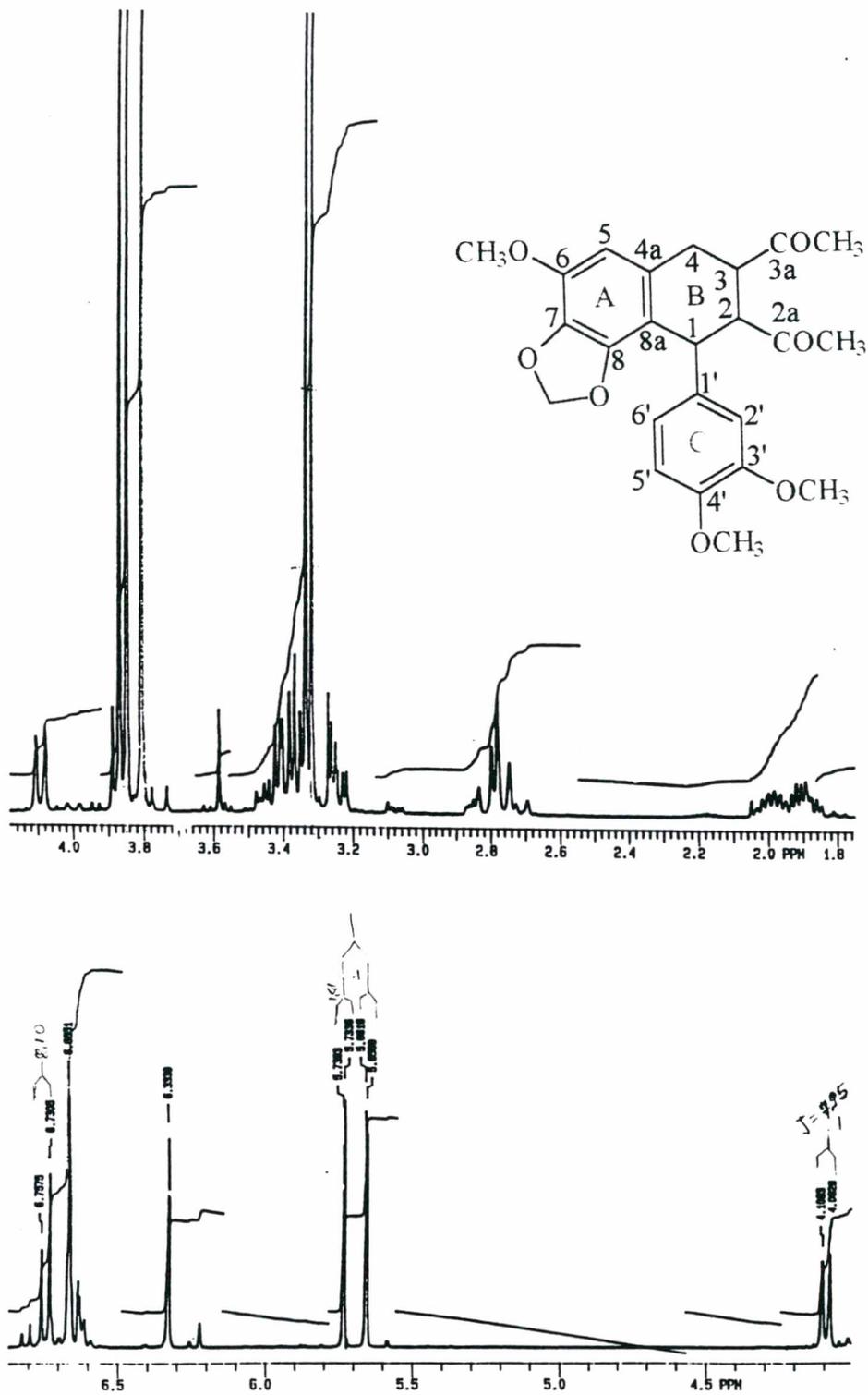
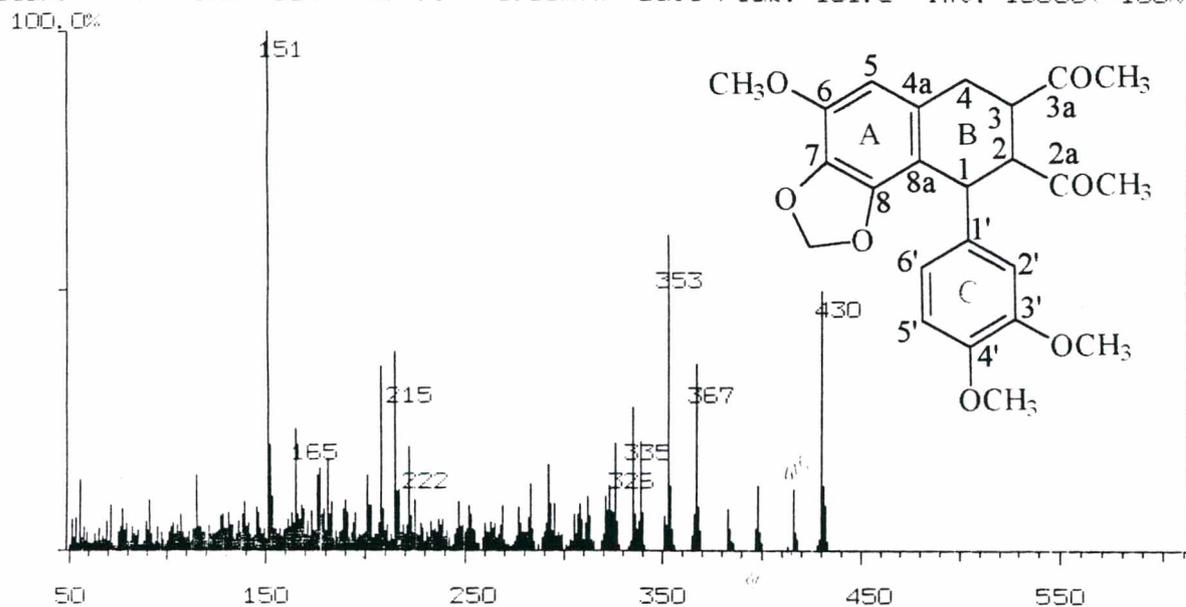


Figura 74. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  da hipofilantina

Mass Spectrum File: hypopy.02 95-10-18 09:59  
Comment: EGS Input: hypopy.01 Hypophyllantin - Obdulio

Scan: 7 (105- 164) R.T.: 3.56min Base Peak: 151.0 Int: 13660(=100%)



<SPECT>

1. BaseP	2. MsPng	3. Thres	4. Magni	5. Peak	6. Int*2	7. Int/2	8. Init	9. Morek	10. Exit
----------	----------	----------	----------	---------	----------	----------	---------	----------	----------

Figura 75 Espectro de massa da hipofilantina

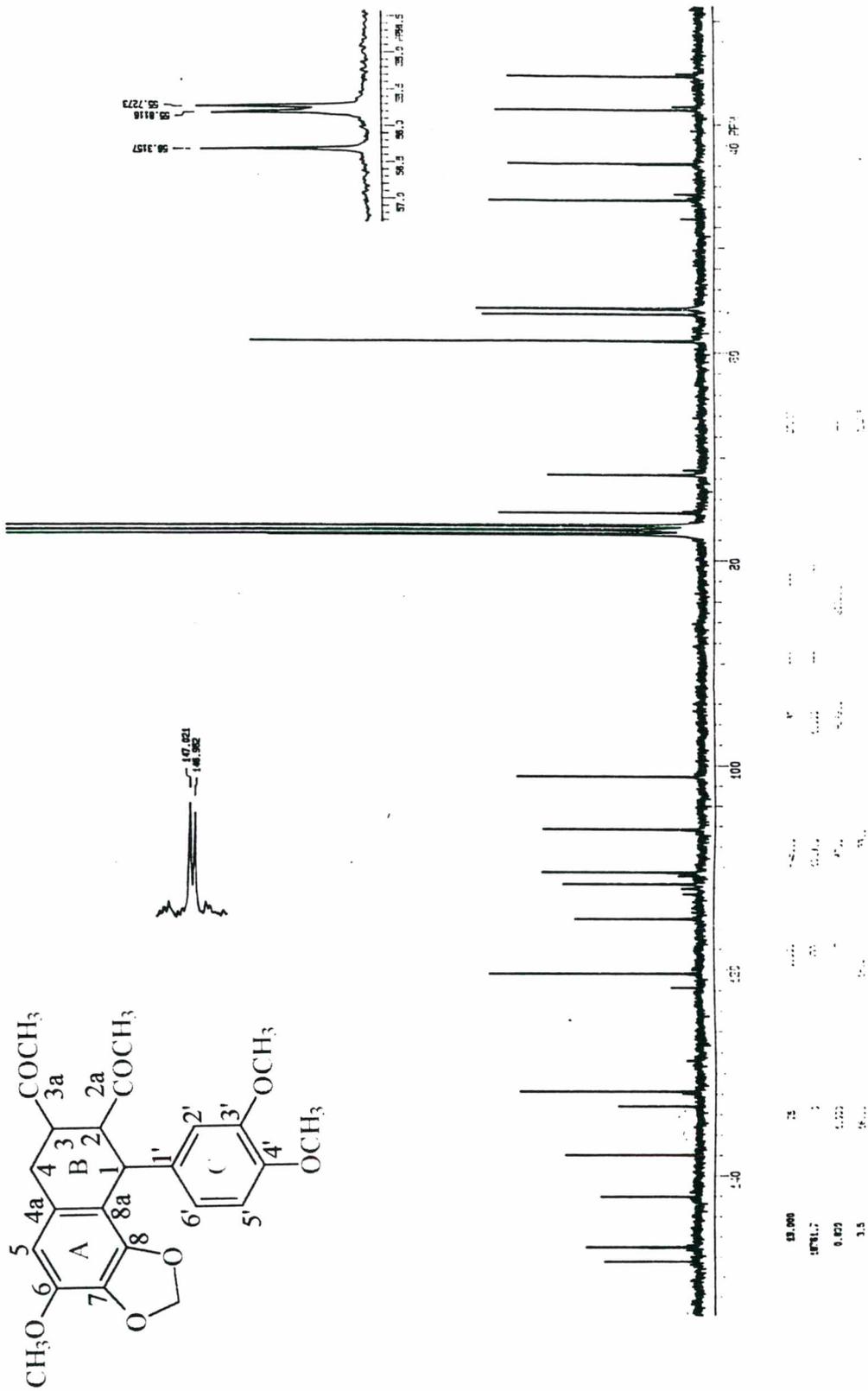


Figura 76. Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  da hipofilantina

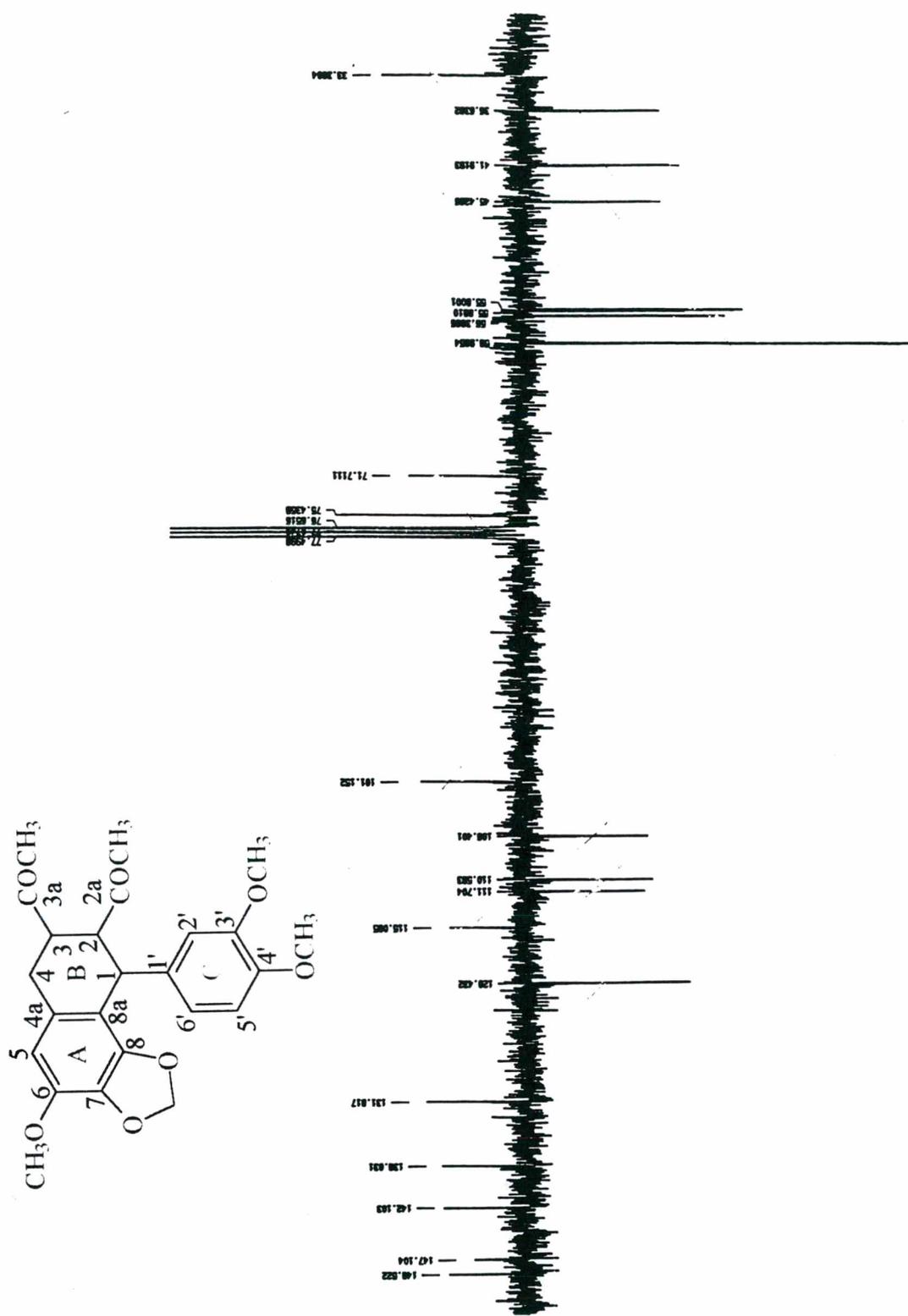


Figura 77. Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  da hipofilantina (DEPT)

As frações de 4 a 9 do extrato acetato de etila de *Siphocampylus verticillatus*, foram cromatografadas em Sephadex LH 20 com MeOH e H<sub>2</sub>O (70:30), foram coletadas em 20 frascos de 5 ml, onde as frações de 6 a 8 apresentaram 0.0172 g de um cristal amarelo identificadoda como (3' metóxi luteolina).

### **3.3.16 IDENTIFICAÇÃO DA 3' METÓXI LUTEOLINA**

#### **3.3.16.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DA ULTRA VIOLETA 3' METÓXI LUTEOLINA**

O espectro de absorção na região do ultra violeta (UV) (figura 78), obtido em espectrofotômetro Hitachi-U-2000, utilizando-se metanol como solvente.

As frações mostraram uma absorção máxima em 238.5, 247.0 e 341.0 nm.

#### **3.3.16.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA VERMELHO 3' METÓXI LUTEOLINA**

O espectro de infra vermelho (IV) (figura 79), foi obtido num equipamento Perkin Elmer 16 PC, preparando a amostra em pastilha comprimida de Brometo de potássio anidro (KBr), mostrando absorção de hidroxila em 3348 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de ligação C---C do anel 1598, 1450 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.3.16.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>1</sup>H 3' METOXI LUTEOLINA**

O espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H (figura 80), foi obtido a uma frequência de 300 MHz em MeOD, δ, ppm): 3.82 (s, 3H, Ome, 3'-H), 6.78 (d, 1H, J=2.13

Hz, H-8), 6.88 (d, 1H, J= 2.10 Hz, H-6), 6.99 (s, 1H, H-2), 7.21 (s, 1H), 7.30 (d, 1H, J= 8.34, 5'-H), 7.58 (s, 1H) 7.62 (d, 1H, J=1.90, 2'-H), 7.68 (dd, 1H, J= 2.13 e 8.31 Hz, 6'-H), 13.83 (a, 1H, OH quelado).

### 3.3.16.4 ESPECTRO DE MASSA DA 3' METÓXI LUTEOLINA

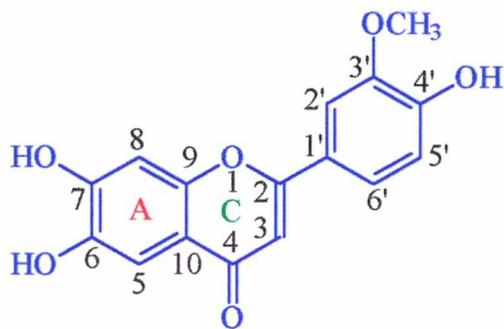
O espectro de massa (EM) (figura 81, 82), foi obtido no espectrofotômetro Shimadzu CGMS-QP-2000 A. Apresenta o íon molecular (M<sup>+</sup>) o m/e 300 (100) e os seguintes fragmentos principais 272 (4.34), 257 (15.12), 153 (25.00) 148 (11.95), 133 (14.13), 125 (11.95), 124 (10.86), tipos de fragmentos observados nos flavonóides.

### 3.3.16.5 ESPECTRO DE RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR <sup>13</sup>C

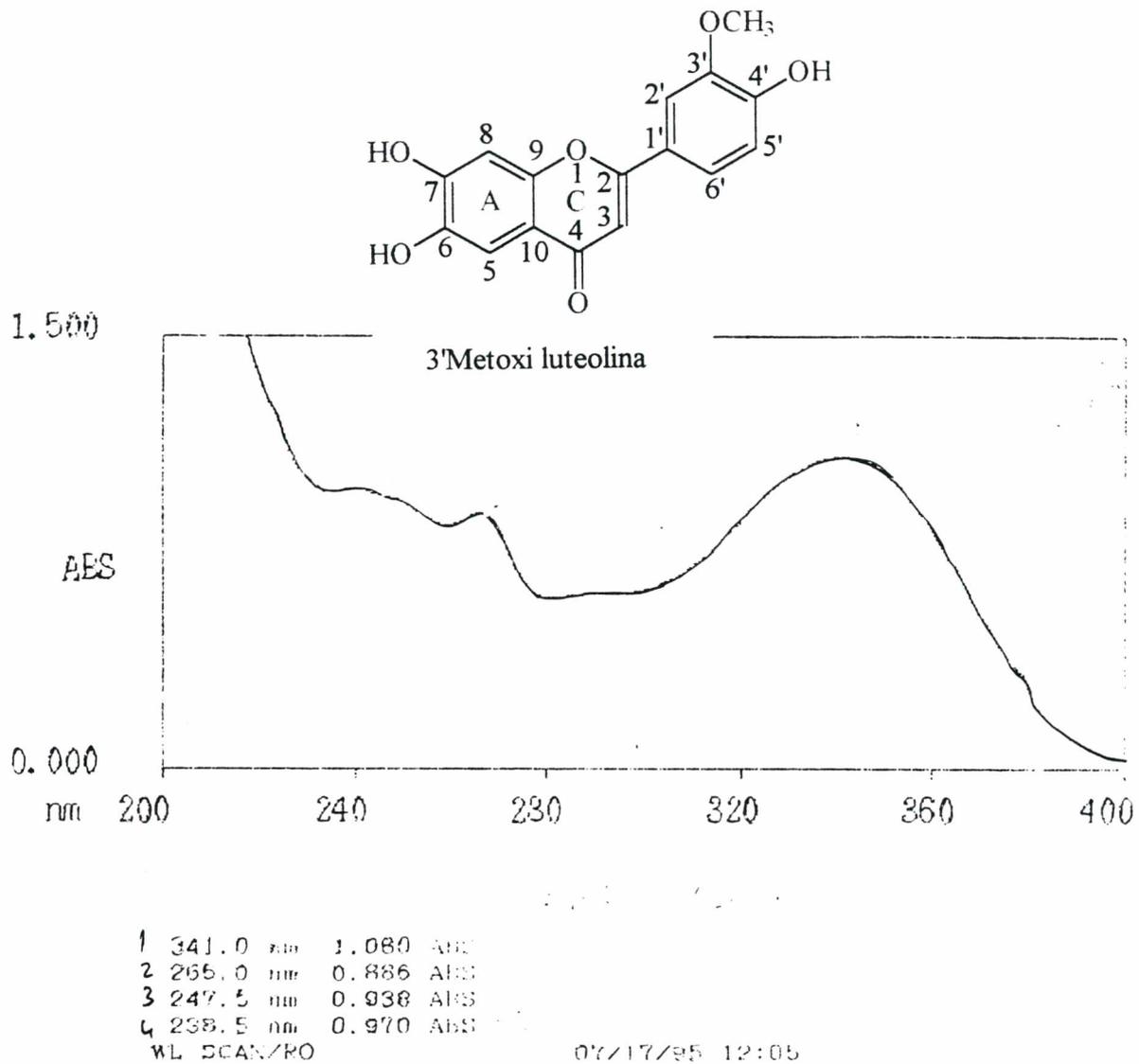
Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectros de RMN <sup>13</sup> C (MeOD, TMS, δ, ppm) figura 83.

Anel A	5	158.33	Anel B	1'	122.33
	6	99.76		2'	110.05
	7	165.69		3'	148.73
	8	94.72		4'	152.18
	9	162.94		5'	116.72
	10	104.77		6'	121.10
2C $\alpha$		164.32			
3C $\beta$		103.97			
4C=O		182.10			

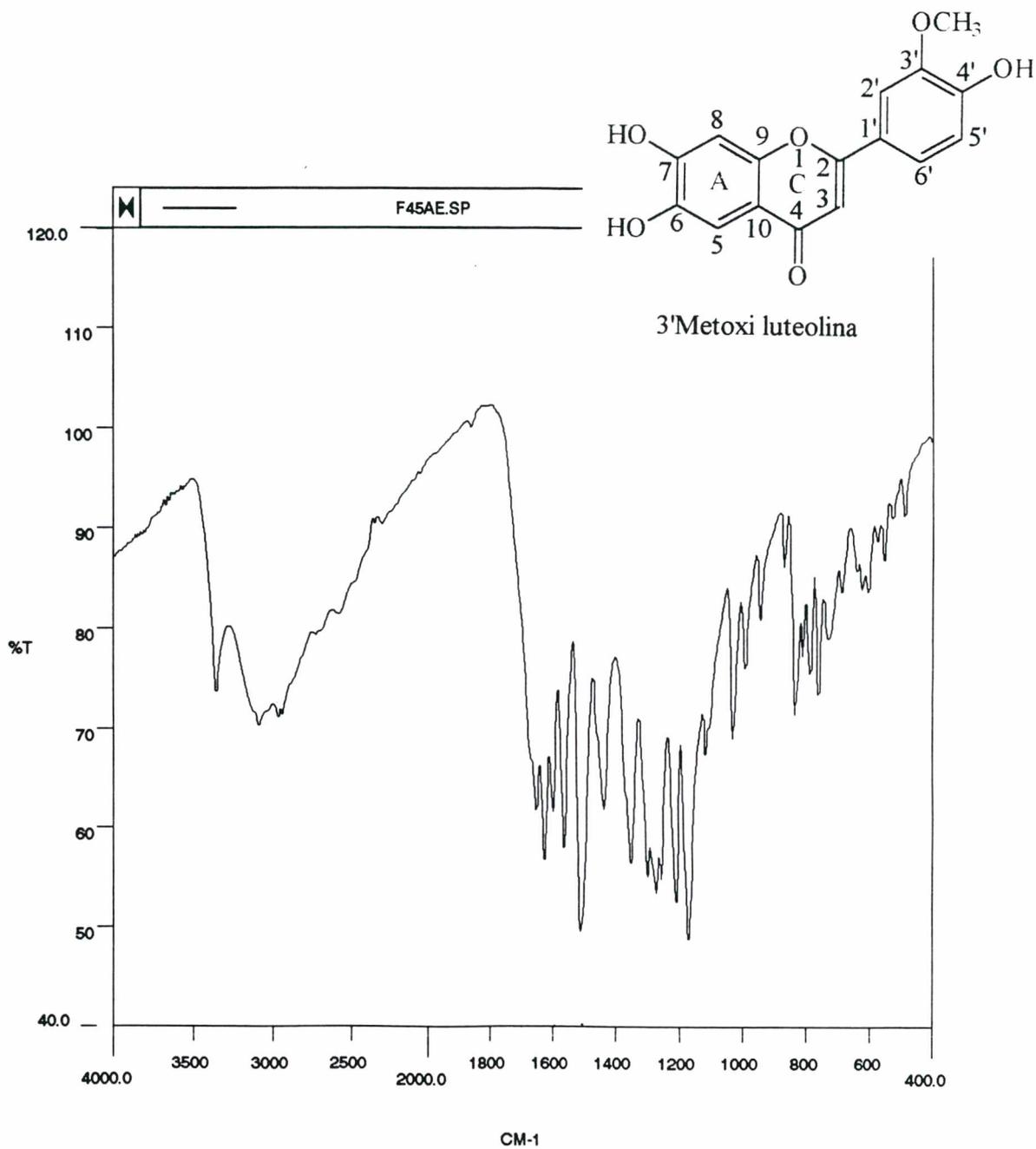
Com base nos dados da literatura<sup>84, 89, 126, 134</sup> e espectrais propôs-se a seguinte estrutura correspondente a 3' metóxi luteolina.



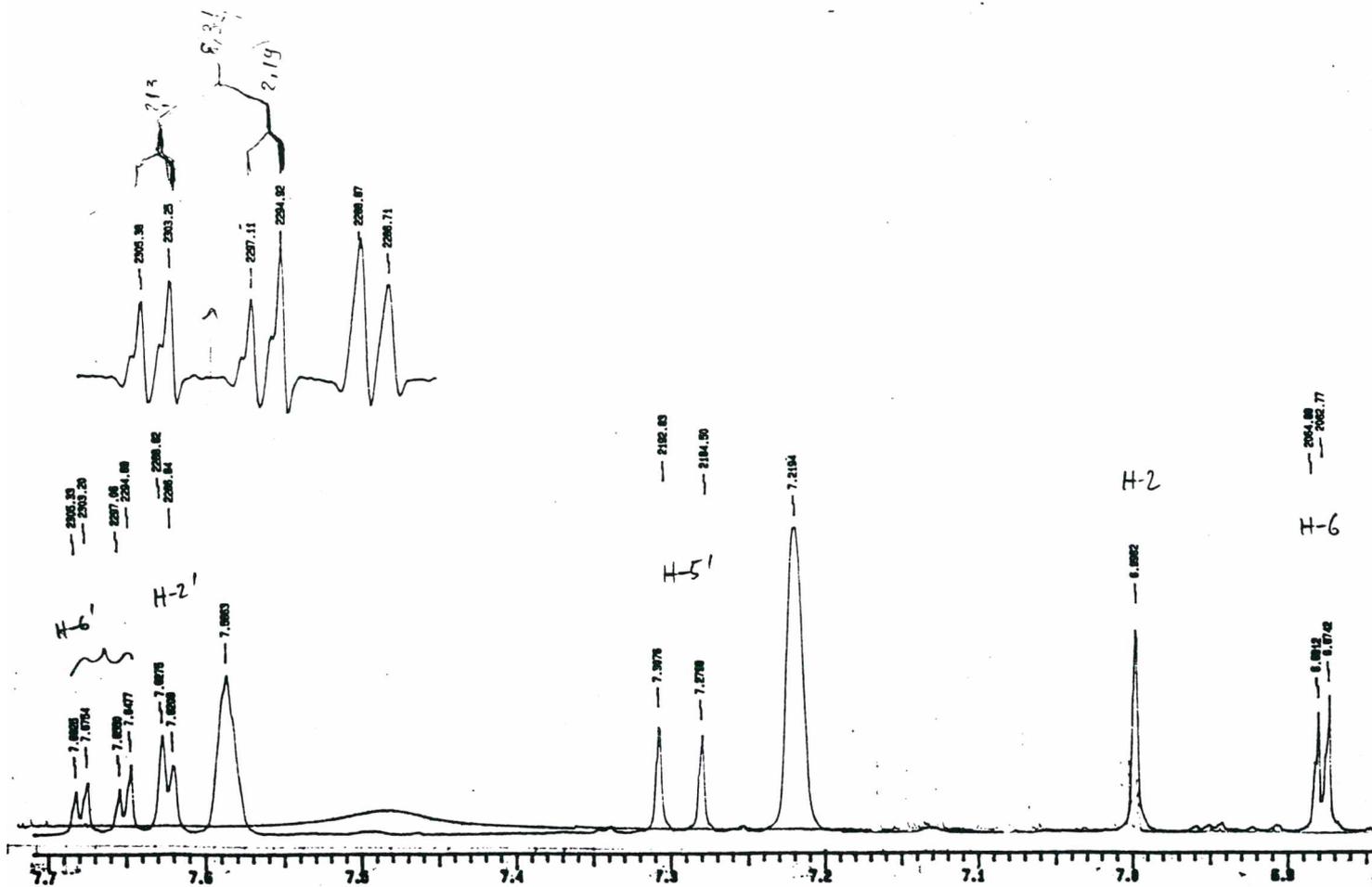
3'Metoxi luteolina



**Figura 78.** Espectro de absorção na região do ultra violeta de 3'metoxi-luteolina

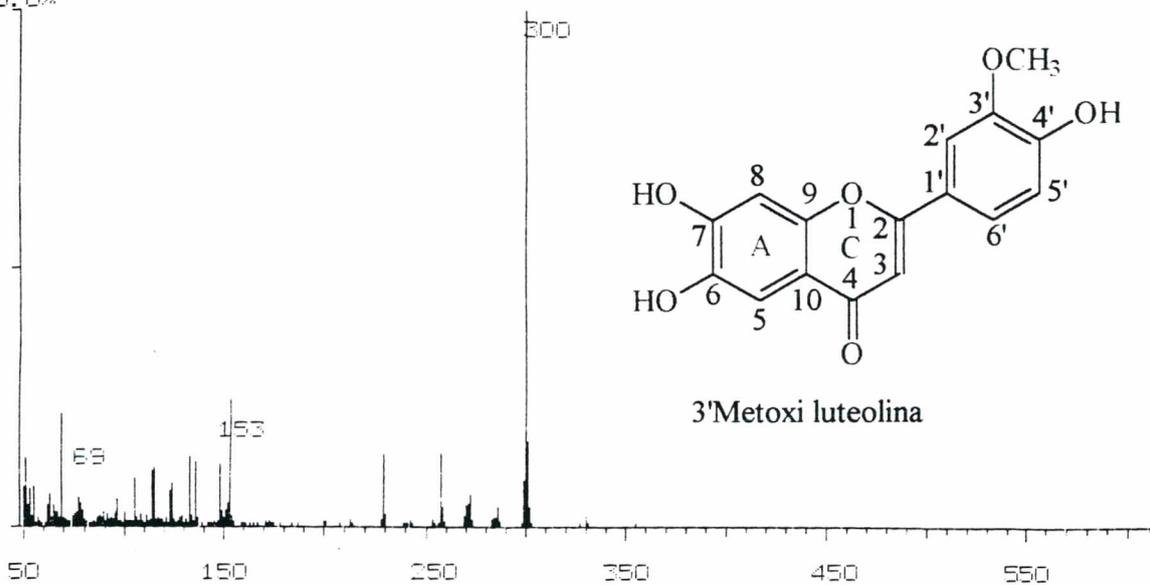


**Figura 79.** Espectro de absorção no infra vermelho de 3'metoxi-luteolina



Mass Spectrum File: 3metox.01 95-10-30 10:08  
Comment: Obdulio - 3Metoxi Luteolina

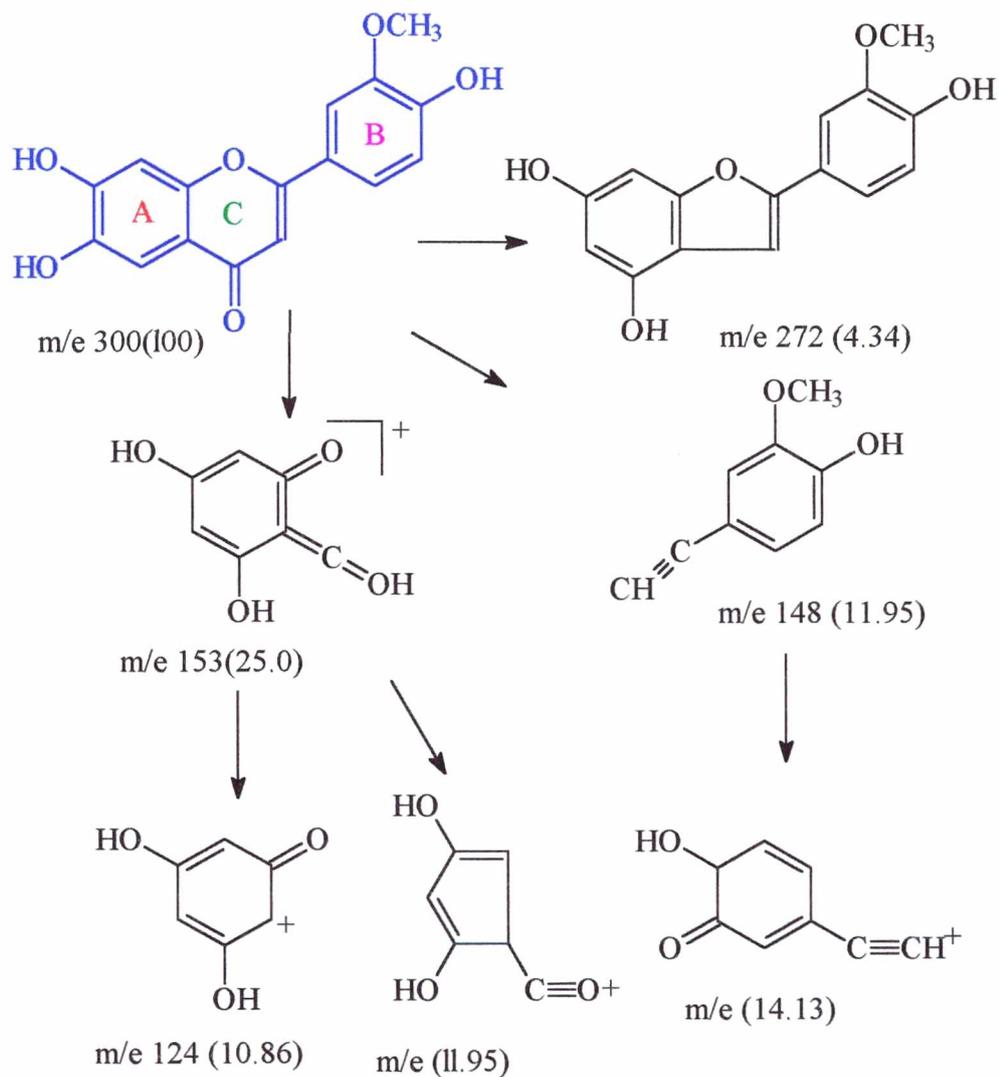
Scan: 486 ( 0- 0) R.T.: 16.26min Base Peak: 300.0 Int: 81300(=100%)  
100.0%



<SPECT>

1. BaseP	2. MsRng	3. Thres	4. Magni	5. Peak	6. Int*2	7. Int/2	8. Init	9. Morek	10. Exit
----------	----------	----------	----------	---------	----------	----------	---------	----------	----------

**Figura 81.** Espectro de massa da 3'metoxi-luteolina



**Figura 82.** Fragmentação de alguns íons principais da 3' metóxi luteolina

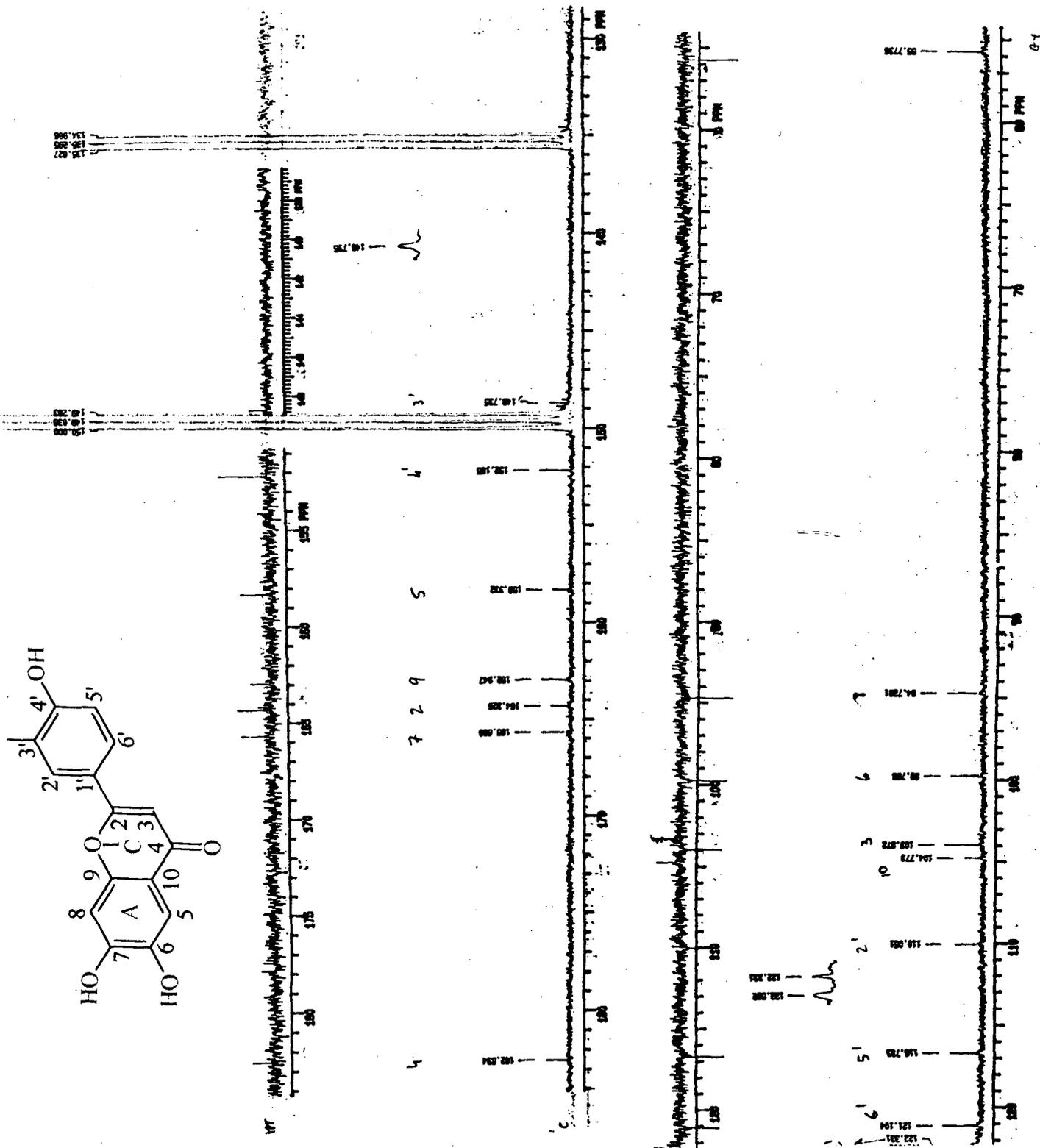


Figura 83. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C da 3''metoxi-luteolina

### **3.4 MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL PARA TESTE DO GRUPO MOLECULAR ATIVO.**

#### **3.4.1 METILAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO**

##### **Preparação do Diazometano:**

Uma solução de 1 g de Diazald (N-nitroso-toluol-4-sulfometilamina) em 20 ml de éter etílico, mantido sob refrigeração em banho de gelo, foram adicionados 3 ml de uma solução a 4 % de KOH em Et OH 96 %. O éter etílico foi destilado em Kit apropriado (Aldrich), em banho maria a 50°C.. O destilado de cor amarela (Solução etérea de Diazometano) foi coletado num banho de gelo seco-cetona.

Esta solução é adicionada diretamente a 100 mg do alcalóide, lentamente, à temperatura ambiente, até persistir a coloração amarelada do Diazometano e cessar o desprendimento de hidrogênio. O excesso de reagente foi destruído adicionando-se gotas de ácido acético. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida fornecendo um rendimento de 64 % do produto impuro.

##### **a: Identificação no espectro de IV**

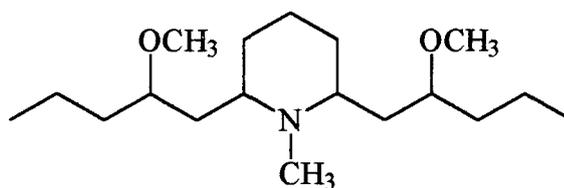
- Ausência da absorção de hidroxila em 3524  $\text{cm}^{-1}$
- Absorção em 1598  $\text{cm}^{-1}$  de ligação C-O

##### **b: Tempo de reação**

- 2. horas.

##### **c: Rendimento**

- 40 %



### 3.4.2 ACETILAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO

A 100 mg do alcalóide foram adicionados a 0.5 ml de piridina e 0.5 ml de anidrido acético e deixados a temperatura ambiente por 24 horas. Ao adicionarmos água destilada gelada à mistura, ocorreu rapidamente a formação de um precipitado, o qual foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada.

Após recristalização em metanol obtivemos rendimento de 54 % do produto.

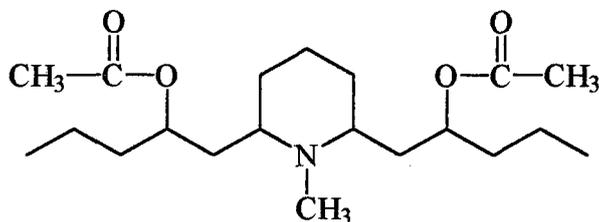
#### a: Identificação no espectro de ressonância magnética de hidrogênio

O espectro de ressonância magnética de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN) foram obtidos a uma frequência de 50 MHz do composto acetilado (fig.12, pag. 53), associado a experimentos de desacoplamento seletivo, apresentando um quinteto em  $\delta$  4.95 (2H,  $J=13$  e 6.5 Hz) correspondente aos prótons em C-8/10 com acoplamento de 13 Hz com prótons H-7/9 e de 6.5 Hz com H<sub>2</sub> 11/14, indicando que as hidroxilas foram acetiladas, além dos sinais de CH<sub>3</sub> característicos de acetato em  $\delta$  2.5. A irradiação do composto acetilado  $\delta$  4.95 transformou o quinteto em 1.9 num duplo duplete e o triplete em  $\delta$  1.5 em quarteto mostrando o acoplamento de C- 11 / 14 com C- 12 /15 de C- 7 / 9 com 2 /6 e C- 3 / 5, consistentes com resultado apresentado no espectro de COSY (Correlated Spectroscopy) (fig. 13, pag. 54). Os prótons em C- 2 / 6 apareceram como um largo multiplete em  $\delta$  2.30 que quando irradiados mostraram acoplamento com o quinteto em  $\delta$  1.85 que passou ser um duplo duplete (7 / 9) e com o multiplete em  $\delta$  1.35. Quando  $\delta$  1.85 foi irradiado o quinteto em  $\delta$  4.90 aparecem como um quarteto referente apenas ao acoplamento de C- 8 / 10 com C- 11/

14, quando irradiamos  $\delta$  0.9 o triplete referente aos grupos metilas terminais C- 13 /16 mostrou-se como um singlete, sendo assim os acoplamentos referentes a H- 2 / 6, H- 7 / 9 e H- 11 / 14. Comparando os deslocamentos dos prótons do alcalóides com dados da literatura de alcalóides piperidínicos , como o sinal H- 2 / 6 em  $\delta$  2.5 sem acoplamento com H- 8 / 10 atribuindo-se a metil amina<sup>1, 2, 55, 140</sup>.

#### **b: Identificação no espectro de $^{13}\text{C}$**

O desaparecimento da absorção intensa, com terminação em duas pontas correspondente a um estiramento de ligação OH em  $3447\text{ cm}^{-1}$  no espectro de IV, com o aparecimento do sinal da C=O no  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  170.92 ppm. Podendo afirmar que o produto sintetizado foi o procurado.



### **3.4.3 BENZOILAÇÃO DO ALCALÓIDE PIPERIDÍNICO**

#### **3.4.3.1 REAÇÃO COM CLORETO DE BENZOÍLA**

100 mg do alcalóide foi adicionado a 3 ml de piridina e 150  $\mu\text{l}$  de cloreto de benzoila, ficando a mistura em repouso por 24 horas.

Após o período de 24 horas a solução foi acrescida de 30 ml de acetato de etila e levado à funil de separação, acrescido de 30 ml de água saturada com KCl . Agitou-se e deixou-se decantar onde retirou-se a água saturada (repetindo por 2 vezes) para retirar o

excedente de água. Transferiu-se a fase orgânica para um elemayer com sulfato de Magnésio anidro.

A solução isenta de água foi transferida para um balão de 250 ml e levada a secura. Adicionou-se 20 ml de EtOH absoluto e evaporou-se até a secura (repetindo por 2 vezes) passando lentamente uma corrente de ar, onde foram obtido 70.32 % produto impuro.

#### **a: Identificação no espectro de IV**

- Desaparecimento da absorção intensa correspondente a um estiramento de ligação OH em  $3447\text{ cm}^{-1}$ .

- Absorção em  $1690\text{ cm}^{-1}$  deformação axial da C=O em frequência mais baixa devido a conjugação com grupo fenila.

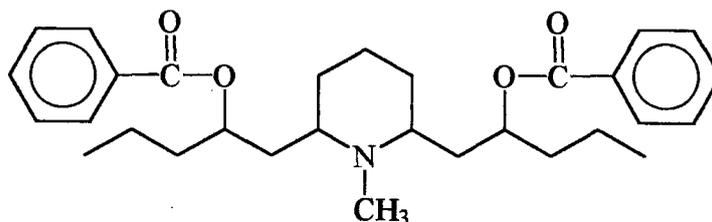
- Deformação axial de C---C do anel 1591, 1422 e  $1324\text{ cm}^{-1}$ . Podendo assim afirmar que o produto sintetizado é o produto procurado.

#### **b: Tempo de reação**

- 12 horas

#### **c: Rendimento**

- 64.41 %



### 3.4.3.2 - REAÇÃO COM CLORETO DE p-CLORO BENZOÍLA

#### a: Identificação no espectro de infra vermelho

- absorção em  $1684\text{ cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de C=O.
- deformação axial C---O do anel em 1590, 1490 e  $1424\text{ cm}^{-1}$

#### b: Identificação no espectro de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$

- podemos assinalar no espectro o pico pequeno em 166.77 ppm ao grupo C=O.
- o pico pequeno em 139 ppm ao átomo de carbono aromático igualmente substituído, os picos intensos em 132.20 ppm e 129.59 ppm aos átomos de carbono restante do anel aromático

#### c: Identificação no espectro de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$

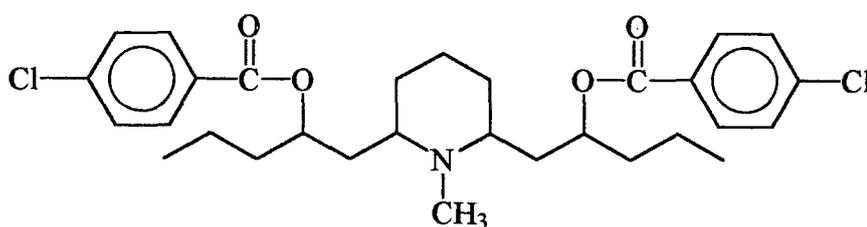
- A presença de dois dubletes distorcidos em  $\delta$  7.45 e 8.05 ppm. Podendo assim afirmar que o produto sintetizado foi o esperado.

#### d: Tempo de reação

- 6 horas

#### e: Rendimento

- 80 %



### 3.4.3.3 - REAÇÃO COM CLORETO DE p-NITRO BENZOÍLA

#### a: Identificação no espectro de de ressonância magnética nuclear de H<sup>1</sup>

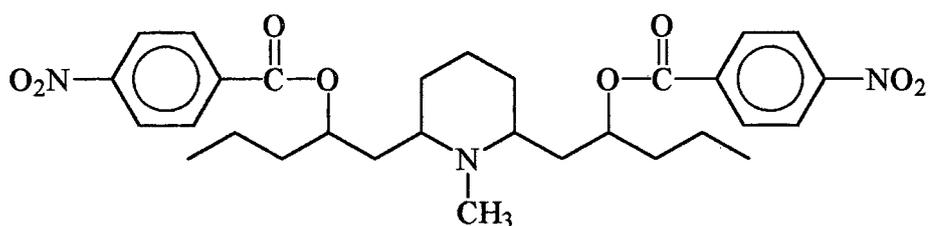
- Apresenta dois dubletes distorcidos em  $\delta$  7.55 e 8.55 ppm podendo-se assim afirmar, que o produto sintetizado foi o esperado.

#### b: Tempo de reação

- 50 minutos

#### c: Rendimento

- 50.9 %



### 3.4.3.4 REAÇÃO COM CLORETO DE o-ACETIL BENZOÍLA

#### a: Identificação no espectro de infra vermelho

- Deformação axial de C=O,  $1.688\text{ cm}^{-1}$ , em frequência mais baixa do que a observada, devido à conjugação.

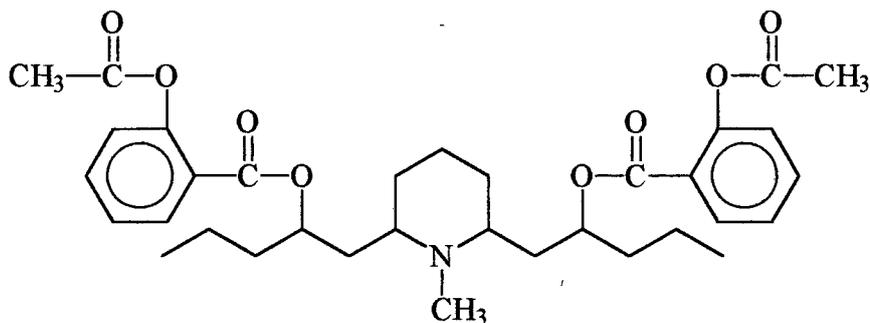
- Desaparecimento da absorção intensa correspondente a um estiramento de ligação OH em  $3447\text{ cm}^{-1}$ .

#### b: Tempo de reação

- 6 horas

#### c: Rendimento

- 15 %



### 3.4.3.5 REAÇÃO COM CLORETO DE p-TOLUÍLA

#### a: Identificação no espectro de infra vermelho

- deformação axial de C=O em  $1700\text{ cm}^{-1}$
- deformação axial C=C do anel 1600, 1550 e  $1324\text{ cm}^{-1}$

#### b: Identificação no espectro de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ .

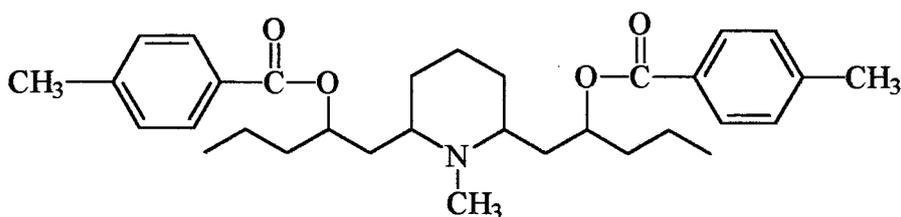
- O deslocamento químico atribuídos pelo espectro mostra em 170.50 ppm ao grupo C=O equivalente, em 143.00 ppm ao átomo de carbono aromático igualmente substituído, em 129.81 e 128.95 ppm aos átomos de carbono restantes do anel aromático.

#### c: Tempo de reação

- 6 horas

#### d: Rendimento

- 80.2



### 3.4.3.6 REAÇÃO COM CLORETO DE 4-BROMO

#### a: Identificação no espectro de infra vermelho

- deformação axial de C=O em  $1676\text{ cm}^{-1}$ .
- deformação axial C---O do anel 1586, 1486 e  $1426\text{ cm}^{-1}$ .

#### b: Identificação no espectro de de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$

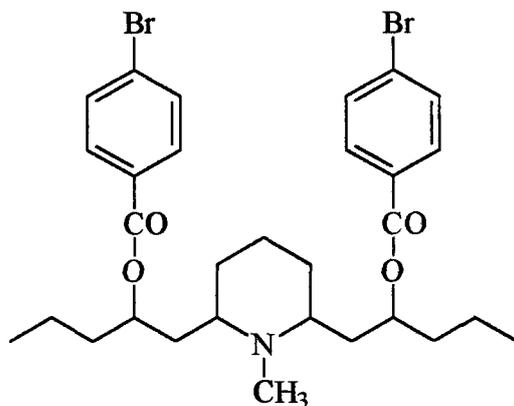
- apresentou dois dubletes distorcidos em  $\delta$  7.58 e 7.92 ppm. Podendo assim afirmar que o produto sintetizado foi o prucurado.

#### c. Tempo de reação

- 4 horas

#### d. Rendimento

- 79.9 %



### 3.4.3.7 REAÇÃO COM CLORETO DE o-TOLUÍLA

#### a: Identificação no espectro de infra vermelho

- deformação axial de C=O em  $1688\text{ cm}^{-1}$
- deformação angular fora do plano de C-H do anel aromático em  $742\text{ cm}^{-1}$

#### b: Identificação no espectro de de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$

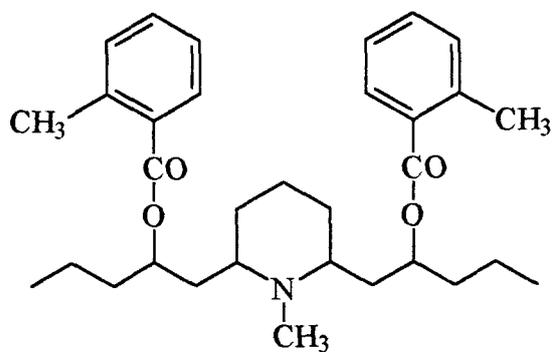
- apresentou dois dubletes distorcidos em  $\delta$  7.36 e 7.28 ppm.

**c: Tempo de reação**

- 6 horas

**d: Rendimento**

- 38 %



## **4 ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO E DOS COMPOSTOS PURIFICADOS**

Os testes farmacológicos foram realizados pela equipe do Prof. Dr. João Batista Calixto, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **4.1 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA**

#### **4.1.1 TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO**

Camundongos “Swiss” machos (25 - 30 g) foram mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e iluminação em ciclo de 12 h com ração e água “ad libitum”. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (0,9%). Basicamente as contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (Bentley et al., 1981<sup>12</sup>; Collier et al., 1968<sup>28</sup>; Santos et al., 1994<sup>110</sup>). Grupos distintos de animais foram pré-tratados com os extratos brutos (EB) ou com os compostos (isolados das diferentes plantas em estudo) por via intraperitoneal (1 - 100 mg/kg), ou oral (50 - 400 mg/kg), 30 e 60 min antes da injeção do ácido acético, respectivamente. Os grupos controles receberam o mesmo volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os extratos e/ou compostos puros.

Após a injeção do ácido acético os camundongos foram observados em pares, colocados em funis de vidro individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min. A atividade analgésica foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com os EHs ou com os compostos isolados das diferentes plantas em estudo, administrados por via oral ou intraperitoneal, comparados com o número das contorções abdominais dos animais controles (salina).

#### 4.1.2 DOR INDUZIDA PELA FORMALINA

Para confirmação do efeito analgésico dos EB e dos compostos utilizamos o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, um modelo mais específico que o teste de contorções abdominais, permitindo avaliar dois tipos de dor: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (Corrêa e Calixto, 1993<sup>31</sup>; Hunskaar et al., 1985, 1986<sup>69, 70</sup>; Murray et al., 1988<sup>94</sup>). Os animais receberam 20 ml de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) ou salina na região intraplantar da pata posterior direita e esquerda, respectivamente.

Logo após a injeção de formalina os animais foram colocados, individualmente, dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após foi medido, durante 30 min, o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse tempo cronometrado e considerado como indicativo de dor. Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção da formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda, que ocorre entre 15 a 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios (Hunskaar e Hole, 1987<sup>71</sup>).

Os animais foram tratados com os EB ou compostos por via oral (10 - 400 mg/kg) ou intraperitoneal (1 - 100 mg/kg), 60 e 30 min antes da injeção da formalina, respectivamente. O grupo controle recebeu igual volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os EBs, os compostos isolados das diferentes plantas. Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas na junção tibio-tarsal e pesadas em balança analítica para quantificação do edema induzido pela formalina. A diferença entre o peso (em mg) da pata direita (injetada com formalina) e a pata esquerda (injetada com salina) foi considerada como índice do edema.

#### 4.1.3 TESTE DO TAIL-FLICK

A atividade analgésica dos extratos ou compostos das várias espécies de plantas foram a seguir analisada no teste do tail-flick, um modelo de dor muito sensível para drogas que atuam centralmente, como a morfina e seus derivados. Foi utilizado o aparelho do tail-flick (Albarsch, model Tail-flick analgesia meter) para medir o tempo de reação (s) à exposição do feixe de luz (90 W) incidido sobre a cauda dos animais, de acordo com o método descrito previamente por D'Amour e Smith (1941<sup>41</sup>), com pequenas modificações.

Os animais foram selecionados 24 horas antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 8 s no aparelho. Os animais normalmente respondem ao estímulo térmico (feixe luminoso, 90 W) movendo sua cauda, expondo assim uma fotocélula localizada na base do aparelho, que controla o tempo em que o animal permanece com o feixe de luz incidido sobre sua cauda. Os animais foram pré-tratados com os EB ou compostos por via oral (100 - 500 mg/kg), ou com morfina (10 mg/kg, s.c), que foi utilizada como controle positivo, administrados 60 e 30 min antes do experimento, respectivamente. O tempo máximo permitido de permanência do estímulo nocivo sobre a cauda do animal foi de 20 s para não causar danos teciduais aos animais, o qual foi considerado como índice total de analgesia. O grupo controle recebeu o mesmo volume de veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir os EB, compostos ou morfina.

#### 4.1.4 TESTE DA PLACA-QUENTE

O teste da placa-quente possui, de maneira geral, as mesmas características e sensibilidade que o modelo do tail-flick, ou seja, as drogas que apresentam efeito analgésico no tail-flick geralmente são ativas no teste da placa-quente. Os animais foram colocados dentro de um cilindro de vidro sobre a superfície de uma placa de metal previamente aquecida à  $56 \pm 1$  °C utilizando-se o aparelho de placa quente (Ugo Basile, Modelo-DS 37). O tempo em segundos que o animal levou para lambar, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo, conforme

descrito anteriormente (Eddy e Leimback, 1953<sup>41</sup>). Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos de acordo com sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico.

Os animais foram pré-tratados com os EHs ou com os compostos isoladas das diferentes plantas por via oral (500 mg/kg), ou com morfina (10 mg/kg, s.c., utilizada para comparar com o efeito dos EHs) 60 e 30 min antes do experimento, respectivamente. O tempo máximo permitido de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30 s, para não causar danos teciduais aos animais, sendo considerado como índice total de analgesia. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir os EH e compostos isoladas das diferentes plantas ou morfina.

#### **4.1.5 DOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA**

Esse modelo foi proposto recentemente por Sakurata et al. (1992<sup>110</sup>) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurôgenica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (Sakurata et al., 1992; 1993<sup>112</sup>). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos extratos ou dos compostos isolados das espécies de plantas com o sistema taquicinérgico.

Cada animal foi colocado individualmente dentro de um funil de vidro transparente por um período de adaptação de no mínimo 20 min que, posteriormente, foi utilizado para observar a reação à dor induzida pela capsaicina, cronometrando-se durante 5 min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata. Cada animal recebeu 20 ml de solução de capsaicina (1,6 mg/pata), injetada na região intraplantar da pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi considerado como indicativo de dor (Sakurata et al., 1992; 1993<sup>112</sup>). Os animais foram tratados com o EH por via oral (25 - 200 mg/kg) ou intraperitoneal (1 - 30 mg/kg), 60 e 30 min antes da injeção da capsaicina, respectivamente. Outros grupos de animais foram tratados por via intraperitoneal com

os compostos isolados das espécies de planta (1 - 100 mg/kg), 30 min antes da injeção de capsaicina. O grupo controle recebeu somente os veículos (10 ml/kg) utilizados para os compostos e os EHs das espécies de planta.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 *Siphocampylus verticillatus***

#### **5.1.1 DOR INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO**

Os resultados apresentados nas **tabelas 4, 5 (A e B)** mostram que os EH da *S. verticillatus* administrados por via intraperitoneal (100 - 600 mg/kg) ou por oral (100 - 1000 mg/kg), 0,5 e 4 h antes, causou inibição dose-dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos, sendo efetivo 6 a 8 h após sua administração. As  $DI_{50}$ s calculadas (juntamente com os intervalos de confiança) foram de 204 (140 - 300) e ~1000 mg/kg e inibição máxima (IM) de  $78 \pm 4$  e  $49 \pm 2\%$ , respectivamente. Quando os compostos foram testados eles também inibiram de forma dose e tempo dependente as contorções abdominais causada pela acido acético com as  $DI_{50}$ s de 61,7 (51,2 - 74,3) e 136,4 (106,2 - 175,2) mg/kg com IM de  $57 \pm 5$  e  $61 \pm 4 \%$ , quando administrado por via intraperitoenal ou oral, respectivamente. (**figura 84 A e B**).

#### **5.1.2 DOR INDUZIDA PELA FORMALINA**

Os resultados representados nas **tabela 7 (A e B)** mostram que o EH da *S. verticillatus* administrado por via intraperitoneal ou por via oral (100 - 1000 mg/kg) causou inibição dose-dependente sobre ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo contudo mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) para a primeira fase foram: 491 (283 - 853) e 640 (355 - 1150) e as IMs (%) observadas foram de  $60 \pm 5$  e  $87 \pm 5\%$ ,

enquanto que para segunda fase as  $DI_{50}$ s (mg/kg) obtidas foram: 185 (103 - 332) e 371 (238 - 580) e IM (%) de  $54 \pm 2$  e  $68 \pm 7$ , respectivamente.

O alcalóide administrado intraperitonealmente (3 - 60 mg/kg) ou oralmente (25 - 200 mg/kg), 30 e 60 min antes, causou significativa inibição dose-dependente de ambas as fases da dor induzida pela formalina e, a exemplo dos EH, foi mais efetivo em relação à segunda fase desse modelo. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) estimadas para primeira fase foram de: aproximadamente  $> 60$  e  $> 200$  e IM (%) de  $31 \pm 6$  e  $34 \pm 7$ , respectivamente (**figura 85**). As  $DI_{50}$ s (mg/kg) calculadas para a segunda fase da dor à formalina foram de 14,1 (10,8 - 18,4) e 66,5 (51,3 - 86,3) com IM (%) de  $88 \pm 6$  e  $88 \pm 2$ , respectivamente.

### 5.1.3 DOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA

O tratamento dos animais com o EH do *S. verticillatus* (100 - 1000 mg/kg, i.p.) causou inibição dose-dependente da dor causada pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 mg/pata) (**tabela 8**). As  $DI_{50}$  calculada foi: 420 (357 - 492) mg/kg e IM (%) de  $67 \pm 4$ . Quando o EH foi administrado por via oral (100 - 1000 mg/kg), também causou inibição dose-dependente no modelo da capsaicina com as seguintes  $DI_{50}$ s: 485 (373 - 633) mg/kg e IM (%) de  $68 \pm 7$ .

A **figura 86**, demonstra que o alcalóide (10 - 60 mg/kg, i.p.) causou inibição dose-dependente da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. A  $DI_{50}$  (mg/kg) calculada foi de 30,4 (18,7 - 49,3) e IM (%) de  $53 \pm 4$ , respectivamente

### 5.1.4 EFEITO DO EXTRATO TOTAL E DO ALCALÓIDE DA *S. verticillatus* NOS TESTES DO TAIL-FLICK E PLACA QUENTE

O tratamento dos animais com os EH do *S. verticillatus* administrados por via intraperitoneal na dose de 300 mg/kg, não causou nenhum efeito analgésico quando analisado nos testes de tail-flick e da placa-quente (**Figura 98**). Ao contrário, o tratamento dos animais com morfina (10 mg/kg, s.c.) 30 min antes causou potente efeito analgésico nos dois modelos

(**tabela 6**). Contudo, o alcalóide isolada da *S. verticillatus* na dose de 100 mg/kg, i.p., também não causou efeito analgésico significativo nesse dois testes (**figura 87**).

## **5.1.5 ESTUDO DO POSSÍVEL MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO TOTAL E DOS COMPOSTOS OBTIDOS DA *S. verticillatus***

### **5.1.5.1 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM A NALOXONA**

#### ***Siphocampylus verticillatus***

Os resultados apresentados na **tabela 9** demonstram que o pré- tratamento dos animais com naloxona (5 mg/kg, i.p., antagonista opióide) causou reversão de forma significativa da analgesia induzida pela administração de morfina (5 mg/kg, s.c., agonista opióide) e/ou pelo EH de *S. verticillatus* (300 mg/kg, i.p.). Da mesma forma que o EH, o efeito analgésico causado pelo alcalóide isolado da *S. verticillatus* (30 mg/kg, i.p.) foi significativamente revertido pelo pré-tratamento com naloxona (**figura 88**).

Os efeito analgésico, dose dependente causado pelos compostos obtidos por modificações estruturais do alcalóide piperidinico, administrado por via intraperitoneal em relação a segunda fase de dor induzida pela formalina podendo observar (**figura 90**) que o alcalóide metilado foi revertido completamente pela naloxana no modelo da formalina.

### **5.1.5.2 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ARGININA**

#### ***Siphocampylus verticillatus***

Os dados relacionados na **tabela 10** mostram que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/kg, i.p., precursor do óxido nítrico) reverteu completamente a ação antinociceptiva causada pela administração de L-NOARG (75 mg/kg, i.p., inidor da óxido nítrico sintase) em ambas as fases da dor causada pela formalina, enquanto o efeito do EH (600 mg/kg, i.p.) foi revertido somente na segunda fase desse modelo. No entanto, o mesmo tratamento com

L-arginina reverteu de forma significativa a ação analgésica causada pelo alcalóide em relação ambas as fases da dor induzida pela formalina (**figura 89**).

### 5.1.5.3 INFLUÊNCIA DA ADRENALECTOMIA

#### *Siphocampylus verticillatus*

Os resultados sumarizados na **Figura 99**, mostram que os animais adrenalectomizados bilateralmente e 2 semanas após tratados com o *S. verticillatus* (300 mg/kg, i.p.) ou alcalóide (30 mg/kg, i.p.) apresentaram redução da atividade analgésica de forma significativa, quando comparados com os animais controles (falso-operados), quando testados em relação a ambas fases da dor induzida pela formalina.

## 5.2. *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus*

### 5.2.1 DOR INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO

Quanto aos compostos isolados de *P. sellowianus* e *P. fraternus* que foram testados:

Os esteróis, stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (3 - 60 mg/kg, i.p.) 30 min. antes, causou inibição significativa e dose dependente das contorções abdominais causadas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos (**Tabela 6**). As  $DI_{50}$ s (mg/kg) calculadas foram de 16.0 (13.6 - 20.3) em 9.0 (3.5 - 23.2) e IM (%) de  $64 \pm 4$  e  $72 \pm 5$  para o stigmasterol e  $\beta$  sitosterol. O stigmasterol administrado oralmente também causou significativa inibição das contorções abdominais, porém menos potente. A  $DI_{50}$  (mg/kg) estimada foi  $> 200$  e Im (%) de  $23 \pm 7$ .

Os compostos, quercetina, geranina, rutina e furosina administrado por via intraperitoneal (0.3 - 60 mg/kg), causaram inibição dose-dependente das contorções abdominais

provocadas pelo ácido acético em camundongos. As  $DI_{50}$  (intervalo de confiança de 95%) calculadas foram: 4.3 (3.3 - 5.7), 19.0 (10.9 - 33.1), 1.3 (0.8 - 2.1) e 12.9 (7.1 - 23.4) mg/kg e a inibição máxima  $93 \pm 3$ ,  $51 \pm 4$ ,  $88 \pm 4$  e  $61 \pm 4$  %, respectivamente. Quando administrado oralmente (25 - 200 mg/kg), os compostos quercetina, geranin e rutina não foram efetivos em reduzir as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (**Figura 96, 97**).

### 5.2.2 DOR INDUZIDA PELA FORMALINA

Quanto aos compostos isolados de *P. sellowianus* e *P. fraternus* que foram testados:

Os animais foram tratados por via intraperitoneal com as seguintes drogas padrão, aspirina, acetoaminofen e a indometacina e/ou com quercetina, geranina, rutina, galato de etila e furosina. (1 - 100 mg/kg), 30 min. antes da injeção da formalina, respectivamente. O grupo controle recebeu o veículo (solução de NaCl 0.9%, 10 ml/kg) utilizado para diluir as drogas e o compostos isolados das espécies de *Phyllanthus*. As **figuras 91, 92, e 93 (A e B)** mostraram que a quercetina, geranina, rutina, galato de etila e furosina isolados (1 - 60 mg/kg), i.p.), inibiram significativamente ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo contudo, mais efetivos em relação a segunda fase desse modelo. As  $DI_{50}$ s para a segunda fase foram 14.8 (7.3 - 30.0), 3.5 (2.9 - 4.3), 4.6 (3.5 - 6.0), 3.9 (3.1 - 4.9) e 24.9 (20.2 - 30.5) mg/kg e as inibição máxima (%) foram:  $87 \pm 8$ ,  $98 \pm 1$ ,  $82 \pm 6$ ,  $99 \pm 1$  e  $66 \pm 5$ , respectivamente, para a quercetina, geranin, rutina, galato de etila, e furosin. Por outro lado, todos os compostos nas mesmas doses que inibiram a dor, não causaram redução significativa do edema da pata de camundongo associado a segunda fase da dor causada pela formalina (**figura 91, 92 e 93 C**). Ao contrário, do que foi observado para os compostos, a aspirina, acetoaminofen e a indometacina apresentaram inibição significativa apenas da segunda fase da dor à formalina com as seguintes  $DI_{50}$ s 18.1 (13.6 - 24.3), 22.1 (13.8 - 37.6) e 4.8 (3.7 - 6.3) mg/kg e inibição máxima (%) de  $85 \pm 4$ ,  $88 \pm 3$  e  $64 \pm 4$ , respectivamente (**Tabela 11**). No entanto, apenas a indometacina causou redução significativa do edema de pata induzida pela formalina.

### 5.2.3 DOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA

Quanto ao composto isolado de *Phyllanthus* a **figura 94 ( C )** mostra que a rutina (3 - 30 mg/kg, i.p.) causou potente inibição dose dependente da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. A  $DI_{50}$  ( mg/kg) foi 3.3 (2.7 - 4.0) e a inibição foi de  $74 \pm 4$  %, enquanto que a quercetina e o geranina ( 3 - 60 mg/kg, i.p.) causaram inibição parcial da dor induzida pela capsaicina (**Figura 94 A e B**), respectivamente. Por outro lado a indometacina (1 - 10 mg/kg, i.p.) foi completamente destituída de efeito (**Figura 95 B**), enquanto a morfina (0.5 - 2.5 mg/kg, s.c.) e a dipirona (1 - 100 mg/kg, i.p.) apresentaram significativa inibição da dor causada pela injeção intraplantar de capsaicina com as seguintes  $DI_{50}$ s : 1.0 (0.8 - 1.3) e 47.0 (38.0 - 58.0) mg/kg e inibição máxima (%) de  $89 \pm 8$  e  $72 \pm 7$ , respectivamente (**Figura 95 C e A**).

**Tabela 4.** Tempo do efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico da *S. verticillatus* administrada via intraperitoneal ou via oral contra as contorções abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos.

Tempo (h)	Numero das contorções abdominais	
	Extrato Hidroacoólico	
	Intraperitoneal (300 mg kg <sup>-1</sup> )	Oral (600 mg kg <sup>-1</sup> )
0	42.5 ± 1.9	44.6 ± 2.7
0.5	8.6 ± 1.5**	-
1.0	5.0 ± 2.2**	-
2.0	10.7 ± 2.4**	28.1 ± 1.7**
4.0	17.0 ± 4.9**	23.4 ± 3.8**
6.0	27.2 ± 2.0**	23.4 ± 3.5**
8.0	35.1 ± 1.8	25.0 ± 2.6 **
10.0	41.7 ± 2.0	30.3 ± 2.6*
12.0	-	38.7 ± 2.1

Cada grupo representa à média ± e.p.m de 4 a 10 animais. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  quando comparado com o grupo controle.

**Tabela 5.** Efeito dose-dependente do extrato hidroalcoólico da *S. verticillatus* sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Tratamento	Numero das contorções abdominais			
	Dose (mg/kg)	Intraperitoneal	Dose (mg/kg)	Oral
<i>S. verticillatus</i>	0	40.1 ± 2.8	0	49.2 ± 3.2
	60	32.0 ± 3.3	100	37.5 ± 4.1
	100	24.8 ± 4.7*	300	33.0 ± 5.7
	300	8.5 ± 1.5**	600	25.0 ± 1.0
	600	13.3 ± 2.0**	1000	25.2 ± 1.1
DI <sub>50</sub> <sup>a</sup>		204.1 (140.0 - 300.0)		~ 1000
IM (%) <sup>b</sup>		78.0 ± 4.0		49.1 ± 1.1

Cada grupo representa a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais. \*\*P < 0.01 quando comparado com o respectivo controle. <sup>a</sup>DI<sub>50</sub> (mg/kg) com seu respectivo limite de confiança 95%. <sup>b</sup>Inibição máxima (%).

**Tabela 6** - Efeito analgésico dose dependente causado pelo stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol administrados por via intraperitoneal ou por via oral sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos.

Tratamento	Dose(mg/kg)	Número de contorções abdominais		
		Intraperitoneal	Dose (mg/kg)	oral
Stigmasterol	0			
	3	28.2 $\pm$ 1.5 *	50	31.0 $\pm$ 2.3 *
	10	19.4 $\pm$ 1.1 **	100	29.0 $\pm$ 2.0 *
	30	12.2 $\pm$ 1.3 **	200	28.0 $\pm$ 2.4 **
	60	17.8 $\pm$ 1.2 **	-	-
$\beta$ sitosterol	0	35.0 $\pm$ 0.7	-	-
	3	22.0 $\pm$ 2.3 **	-	-
	10	16.0 $\pm$ 2.0 **	-	-
	30	10.0 $\pm$ 1.6 **	-	-
	60	7.5 $\pm$ 1.1 **	-	-
stigmasterol glicosideo	não testado			
3'metoxi-luteolina	não testado			

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 - 6 animais. Difere significativamente em relação ao controle, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01. (Resultados obtidos também por Niero 1993. e Santos et al, 1995).

**Tabela 7.** Efeito dose-dependente do extrato hidroalcoólico da *S. verticillatus* em relação a primeira (0 a 5 min) e ou segunda fases (15 a 30 min) e edema induzido pela formalina em camundongos.

Extrato hidroalcoólico	Dose (mg/kg)	Tempo de Reação (s)		Δ Peso da Pata (mg)
		0 - 5 min	15 - 30 min	
Intraperitoneal	0	63.3 ± 2.6	186.0 ± 8.0	74.1 ± 4.9
	100	46.1 ± 6.2*	130.2 ± 9.4**	77.0 ± 6.6
	300	33.5 ± 4.7**	76.6 ± 11.0**	74.4 ± 4.3
	600	24.8 ± 2.9**	23.5 ± 9.7**	79.5 ± 5.0
	1000	24.4 ± 2.8**	28.5 ± 13.6**	78.5 ± 5.5
ID <sub>50</sub> <sup>b</sup>		491.0 (283.5 - 853.5)	185.6 (103.7 - 332.3)	
MI (%) <sup>b</sup>		61.0 ± 5.0	87.0 ± 5.0	
Oral	0	62.1 ± 2.5	164.8 ± 17.4	71.2 ± 3.3
	100	43.8 ± 1.9**	127.4 ± 9.0**	75.6 ± 4.2
	300	34.6 ± 3.7**	73.3 ± 9.0**	74.9 ± 4.9
	600	30.7 ± 1.7**	63.5 ± 7.8**	76.5 ± 3.5
	1000	27.3 ± 1.0**	57.8 ± 9.5**	69.1 ± 2.5
ID <sub>50</sub> <sup>a</sup>		640.0 (355.0 - 1150.0)	440.8 (226.0 - 735.0)	
MI (%) <sup>b</sup>		55.0 ± 2.4	68.0 ± 5.7	

Cada grupo representa a média ± e.p.m. de 6 a 14 animais. \*\*P < 0.01 quando comparado com o respectivo controle. <sup>a</sup>DI<sub>50</sub> (mg/kg) com seu respectivo limite de confiança 95%. <sup>b</sup>Inibição máxima (%).

**Table 8.** Efeito do extrato hidroalcoólico da *S. verticillatus* sobre a nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.

Tratamento	Tempo de Reação (s)			
	Dose (mg/kg)	Intraperitoneal	Dose (mg/kg)	Oral
<i>S. verticillatus</i>	0	42.1 ± 2.5	0	41.0 ± 2.8
	60	32.2 ± 2.8	100	24.4 ± 3.0**
	100	24.9 ± 3.0**	300	21.4 ± 2.3**
	300	18.6 ± 1.5**	600	18.2 ± 2.6**
	600	13.6 ± 2.0**	1000	17.3 ± 2.2**
	1000	15.0 ± 2.1		
DI <sub>50</sub> <sup>a</sup>		420.0 (357.3 - 492.0)		485.0 (372.7 - 633.3)
MI (%) <sup>b</sup>		67.0 ± 4.3		54.3 ± 6.1

Cada grupo representa a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais. \*\*P < 0.01 quando comparado com o respectivo controle. <sup>a</sup>DI<sub>50</sub> (mg/kg) com seu respectivo limite de confiança 95%. <sup>b</sup>Inibição máxima (%).

**Tabela 9.** Efeito do pretratamento da naloxona (i.p.) sobre a antinocicepção causada pela morfina (s.c.) ou EH da *S. verticillatus* (i.p.) contra as contorções abdominais induzida pelo ácido acético em camundongos.

Drogas	Dose	Numero de contorções abdominais
	(mg/kg)	
Controle	0	41.2 ± 2.0
Naloxona	5	43.1 ± 2.6
Morfina	5	0 ± 0**
<i>S. verticillatus</i>	300	9.5 ± 1.6**
Naloxona + <i>S. verticillatus</i>	5 ± 300	20.1 ± 3.9 <sup>+</sup>
Naloxona + morfina	5 ± 5	27.2 ± 4.6 <sup>+</sup>

Cada grupo representa a média ± de 6 - 10 animais. \*\*P < 0.01 quando comparado com o respectivo controle. <sup>+</sup>P < 0.01 quando comparado ao agonista mais antagonistas contra o agonista sozinho.

**Tabela 10.** Efeito do L-arginina (i.p.) on L-NOARG (i.p.), morfina (s.c.) ou HE da *S. verticillatus* (i.p.)-induzida pela ação antinociceptiva contra a dor induzida pela formalina.

Drogas	Dose (mg/kg)	Tempo de Reação (s)	
		0 - 5 min	15 - 30 min
Controle	0	56.0 ± 2.1	189.2 ± 18.8
L-arginina	600	59.1 ± 5.0	160.0 ± 15.0
L-NOARG	75	36.3 ± 3.2**	32.3 ± 10.8**
Morfina	5	20.3 ± 1.6**	31.1 ± 9.3**
<i>S. verticillatus</i>	600	32.2 ± 2.7**	10.5 ± 10.5**
L-arginina + <i>S. verticillatus</i>	600 + 600	36.3 ± 3.0 <sup>NS</sup>	104.2 ± 13.3 <sup>+</sup>
L-arginina + L-NOARG	600 + 75	54.0 ± 4.3 <sup>+</sup>	144.4 ± 22.3 <sup>+</sup>
L-arginina + morfina	600 + 5	22.1 ± 2.3 <sup>NS</sup>	141.1 ± 20.6 <sup>+</sup>

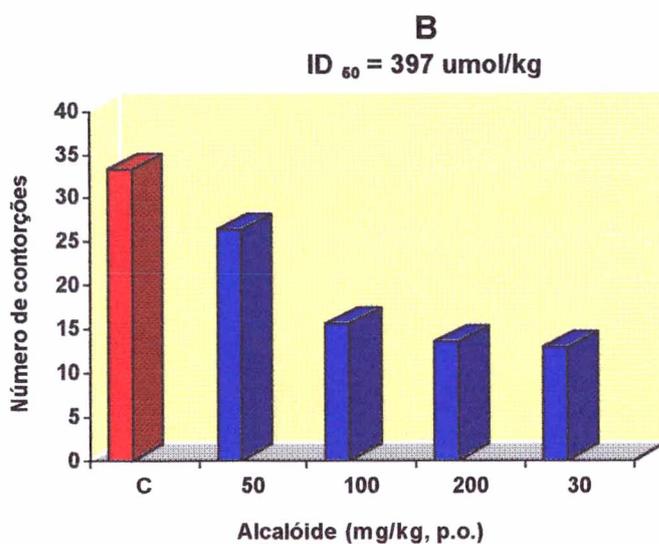
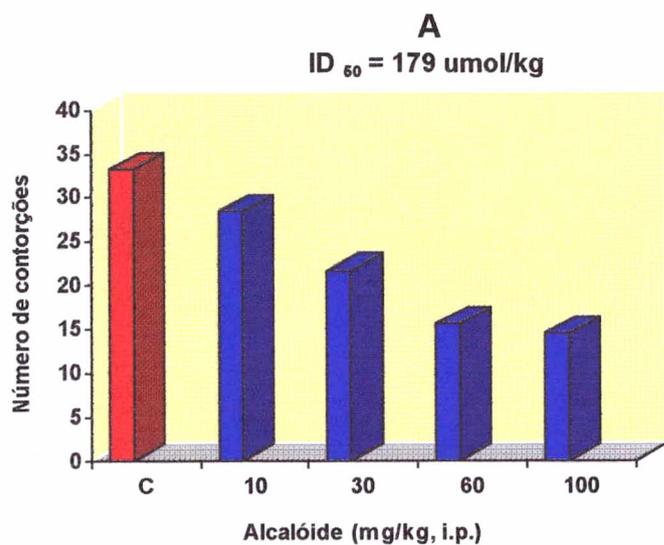
Cada grupo representa a media ± e.p.m. de 6 a 10 animais. \*\*P < 0.01 quando comparado ao valor do controle; <sup>+</sup>P < 0.01 quando comparado ao sinal de adição do agonista ao agonista mais antagonistas contra o agonista sozinho. NS, não significativo estatística quando comparado com o agonista mais o antagonista contra o agonista sozinho.

**Tabela 11.** Efeito do acetoaminofen, idometacina e da aspirina administrados por via intraperitoneal em relação à primeira (0 - 5 min) e à segunda fase (15 - 30 min) da dor e sobre o edema de pata, induzidos pela injeção de formalina em camundongos. (*Phyllanthus sp.*)

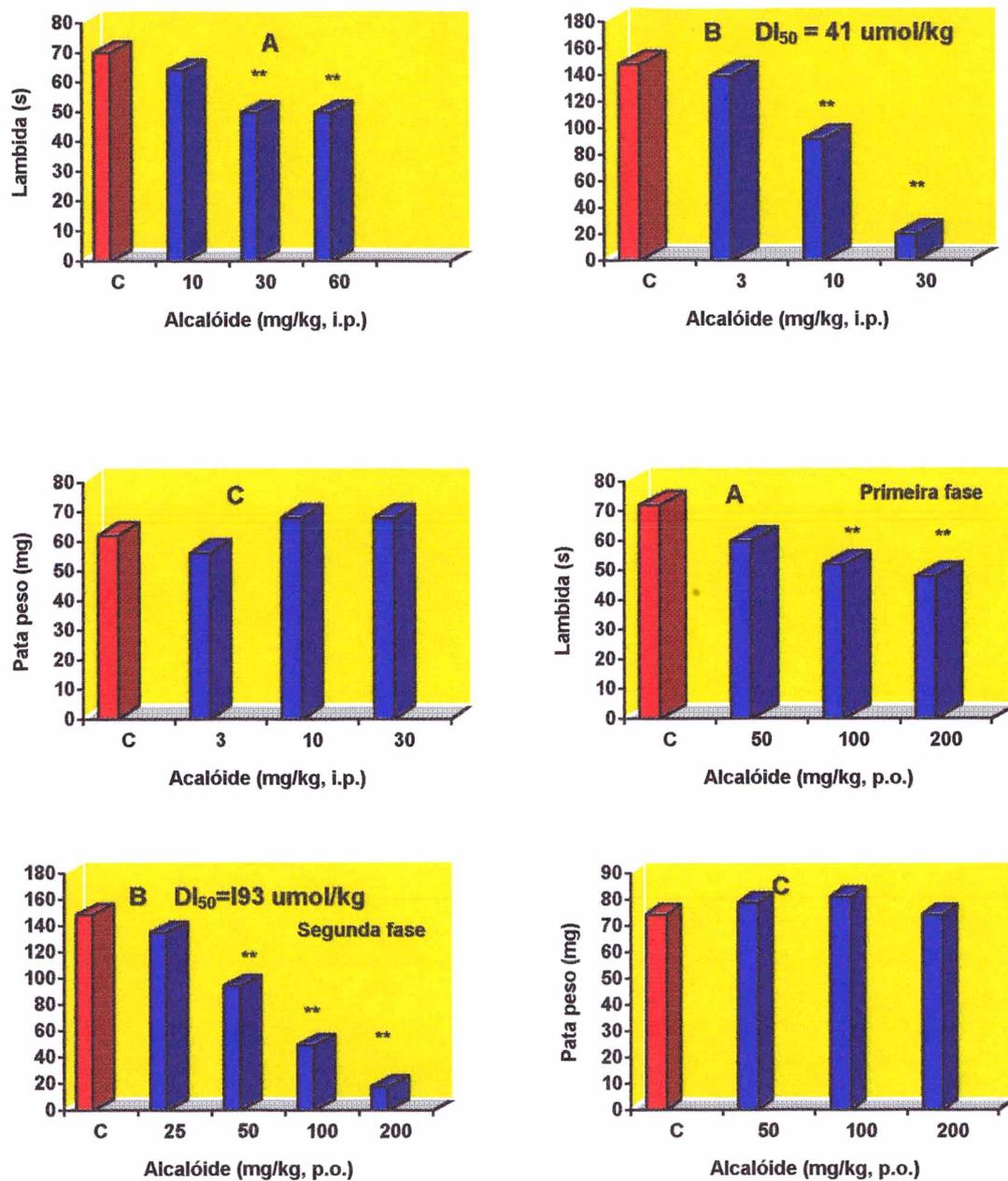
Drogas (mg/kg, i.p.)	Tempo de reação (s)		Peso da Pata (mg)
	0 - 5 min	15 - 30 min	
<b>Acetoaminofen</b>			
0	81.3 ± 3.0	129.2 ± 8.7	50.0 ± 4.9
10	74.0 ± 1.7	80.40 ± 7.3 **	40.0 ± 3.0
30	69.4 ± 2.8	56.40 ± 5.7 **	48.0 ± 3.6
60	72.4 ± 3.0	36.00 ± 3.2 **	42.6 ± 3.3
100	-	19.10 ± 3.8 **	47.8 ± 1.8
<b>Indometacina</b>			
0	63.5 ± 5.0	137.8 ± 11.0	65.0 ± 2.0
1	61.0 ± 4.0	154.2 ± 7.7	66.0 ± 5.0
3	56.5 ± 6.0	81.30 ± 4.3 **	56.0 ± 4.0 *
10	70.1 ± 5.0	56.60 ± 6.3 **	47.0 ± 3.0 **
<b>Aspirina</b>			
0	84.4 ± 2.0	116.2 ± 3.9	44.0 ± 6.1
10	69.8 ± 2.0	71.20 ± 4.0 **	44.0 ± 6.1
30	71.1 ± 0.9	63.30 ± 3.3 **	40.0 ± 3.0
60	69.8 ± 2.5	41.70 ± 8.2 **	44.0 ± 3.6
100	-	14.50 ± 2.6 **	48.6 ± 2.6

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 - 8 animais.

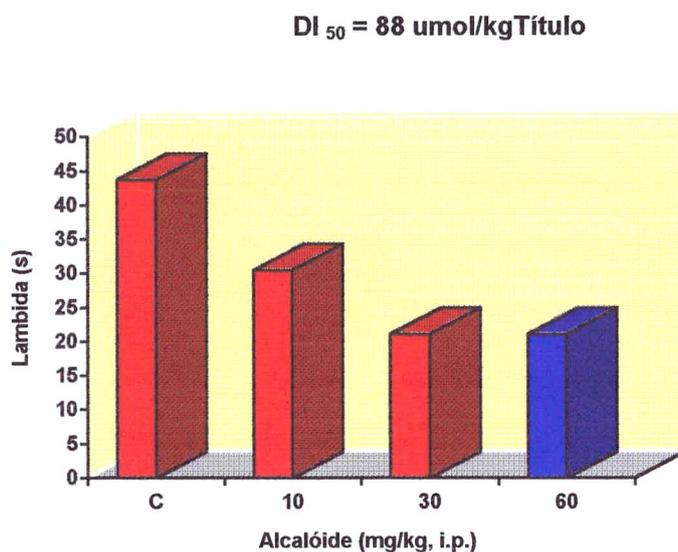
Difere significativamente em relação ao grupo controle, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



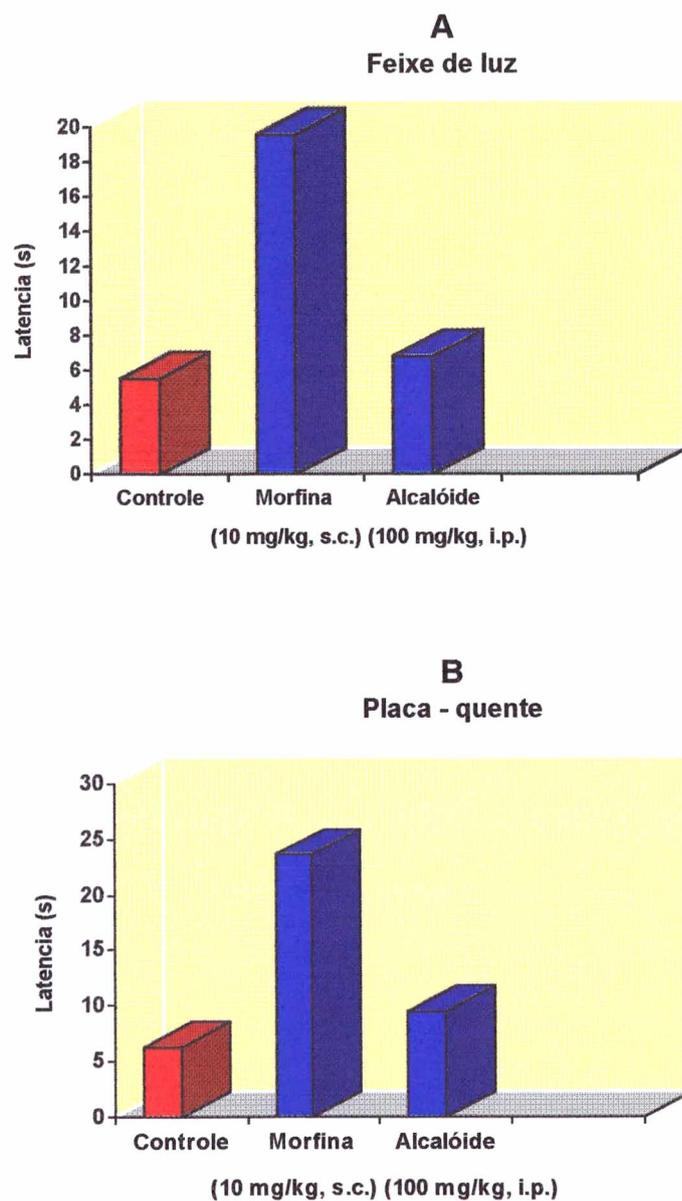
**Figura 84.** Efeito analgésico dose dependente causado pelo alcalóide administrado por via intraperitoneal (A) ou oral (B) em relação as contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.



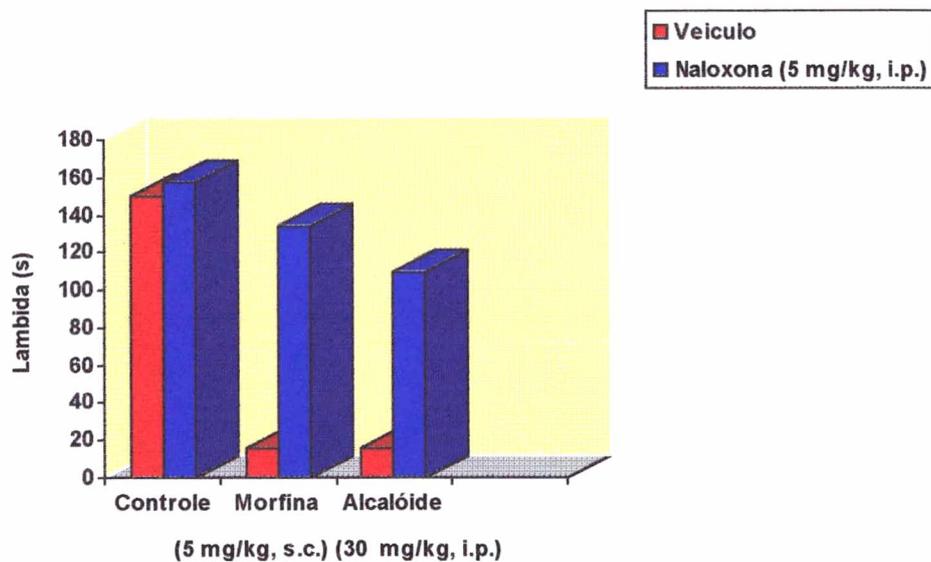
**Figura 85.** Efeito analgésico dose dependente causado pelo alcaloide administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou oral (painel inferior) em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata ( C ) induzidos pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* $P < 0.01$ .



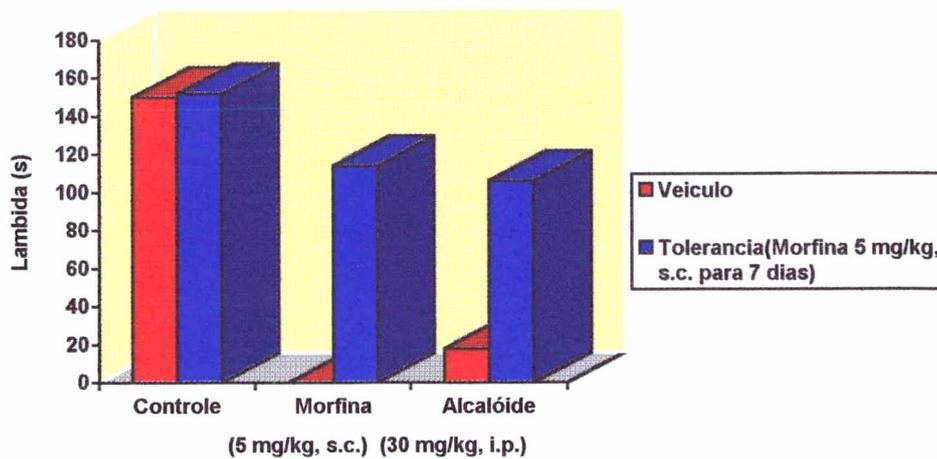
**Figura 86.** Efeito analgésico dose dependente causado pelo alcalóide administrados por via intraperitoneal sobre a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente controle\*\*P<0.01.



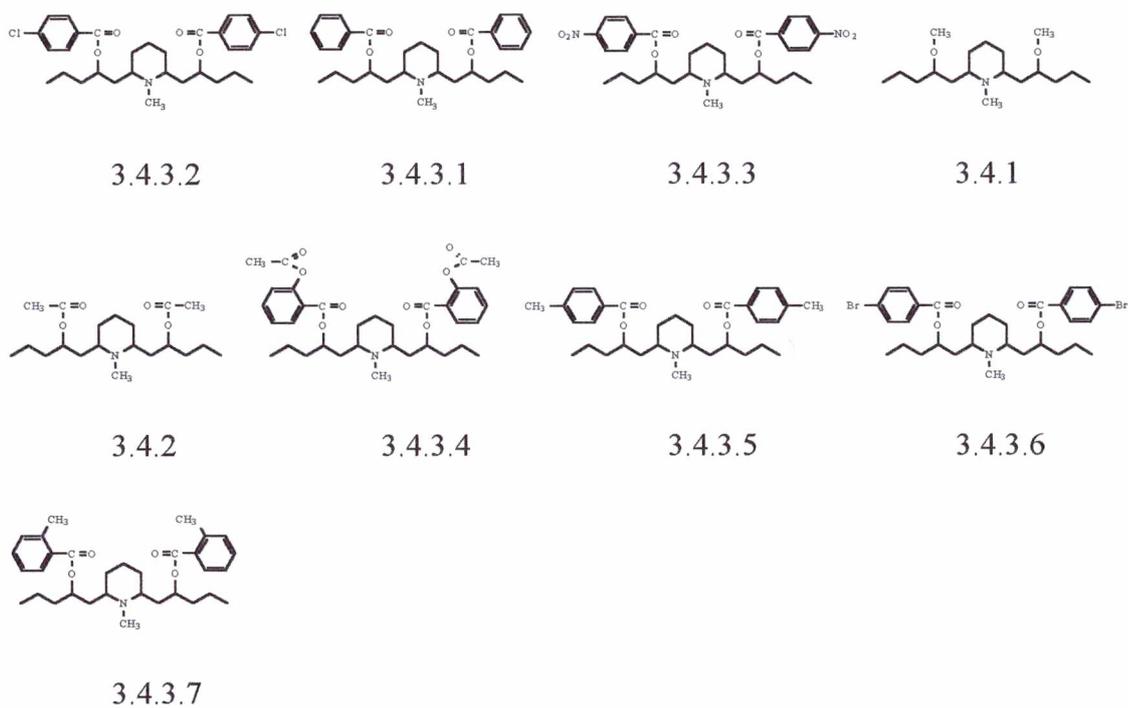
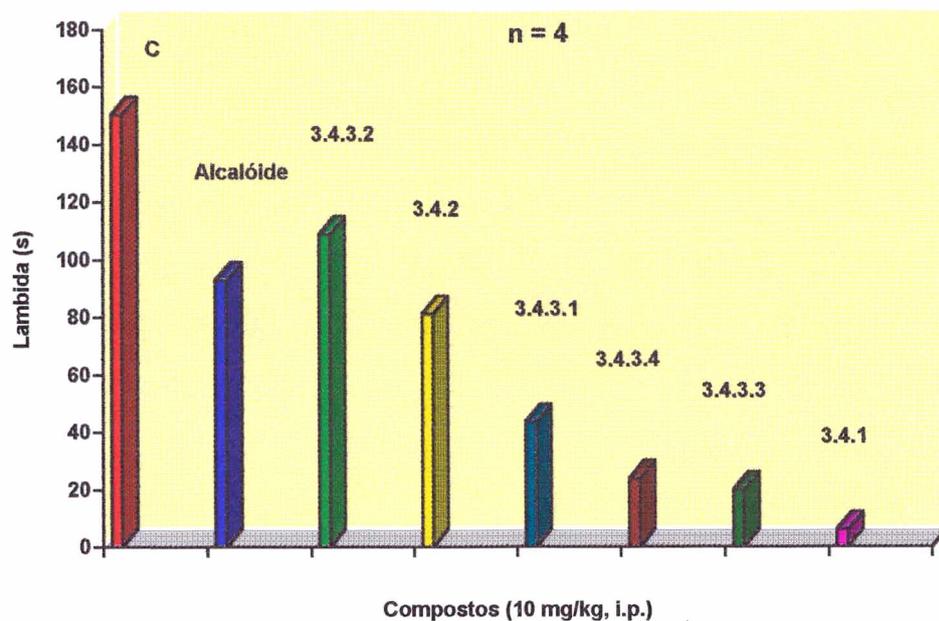
**Figura 87.** Efeito do tratamento dos animais com morfina e com o alcalóide sobre a dor induzida no testes da Placa quente (A) e Tail-flick (B) em camundongos. Cada grupo representa a média 5 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle,  $**P < 0.01$ .



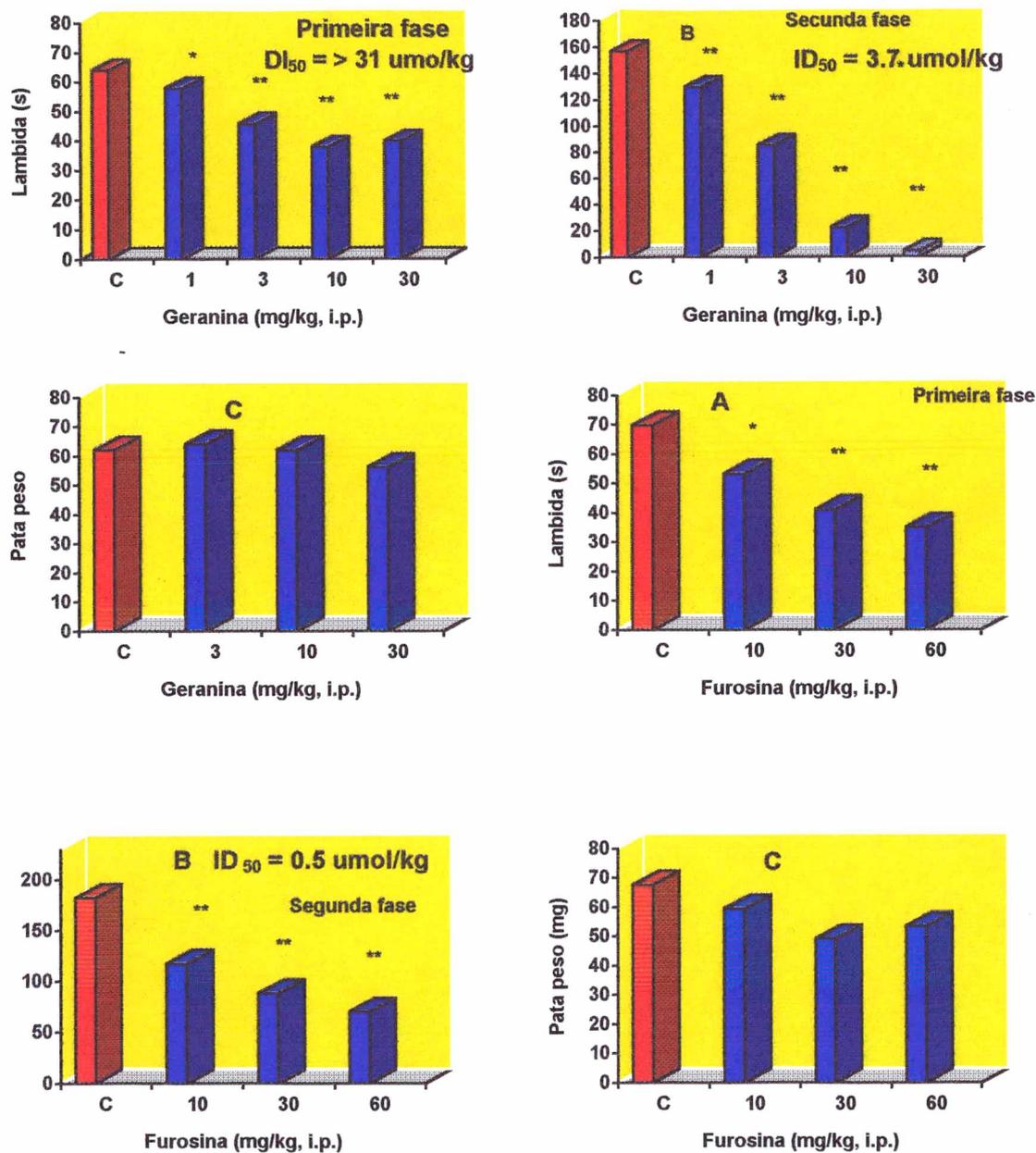
**Figura 88.** Influência do tratamento com naloxona sobre a analgesia causada pela administração da morfina e ou do alcalóide sobre a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. difere significativamente do controle,  $**P < 0.01$ .



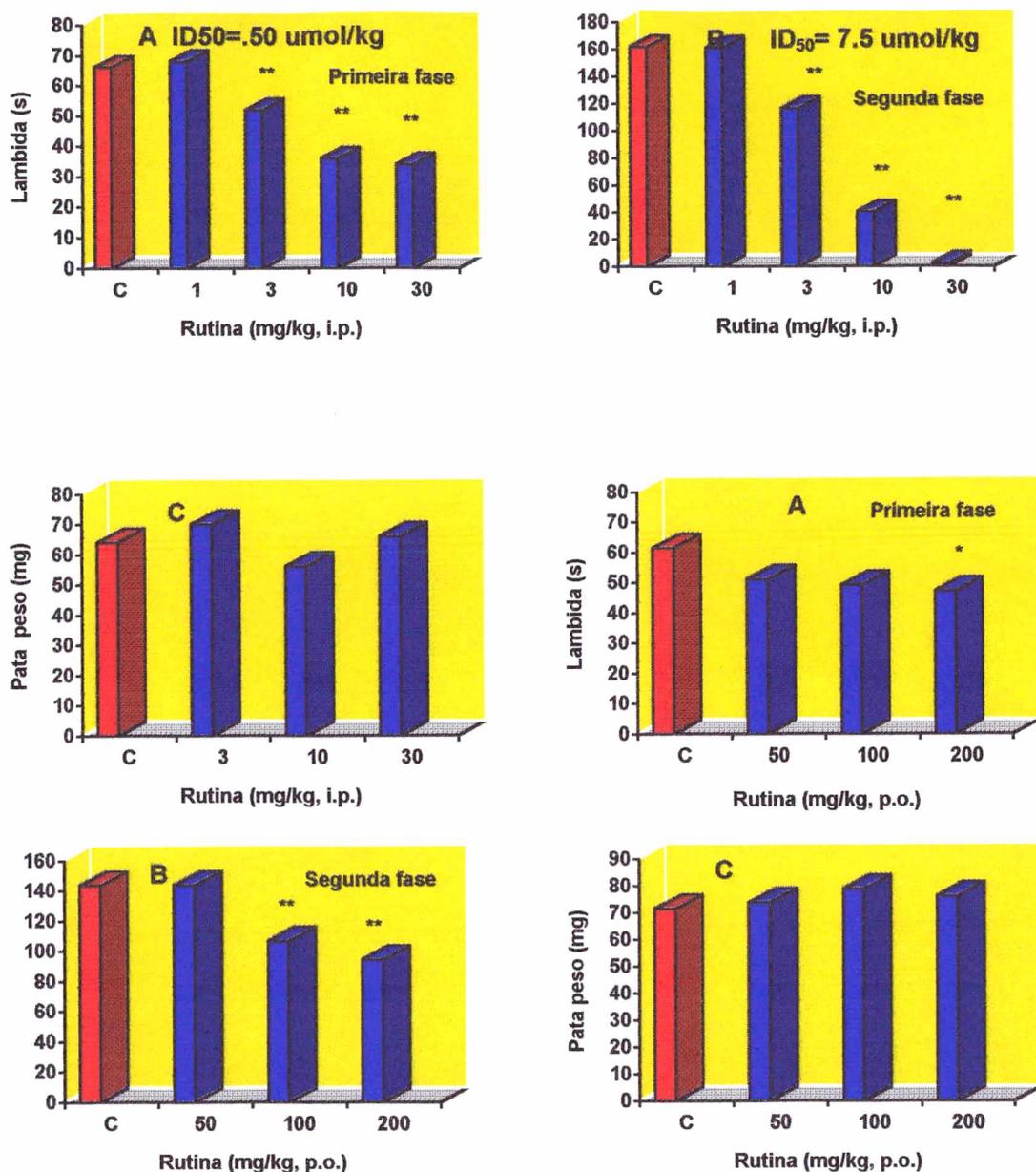
**Figura 89.** Influência do pré tratamento com morfina sobre a analgesia causada pela administração da morfina e ou do alcalóide sobre a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* $P < 0.01$



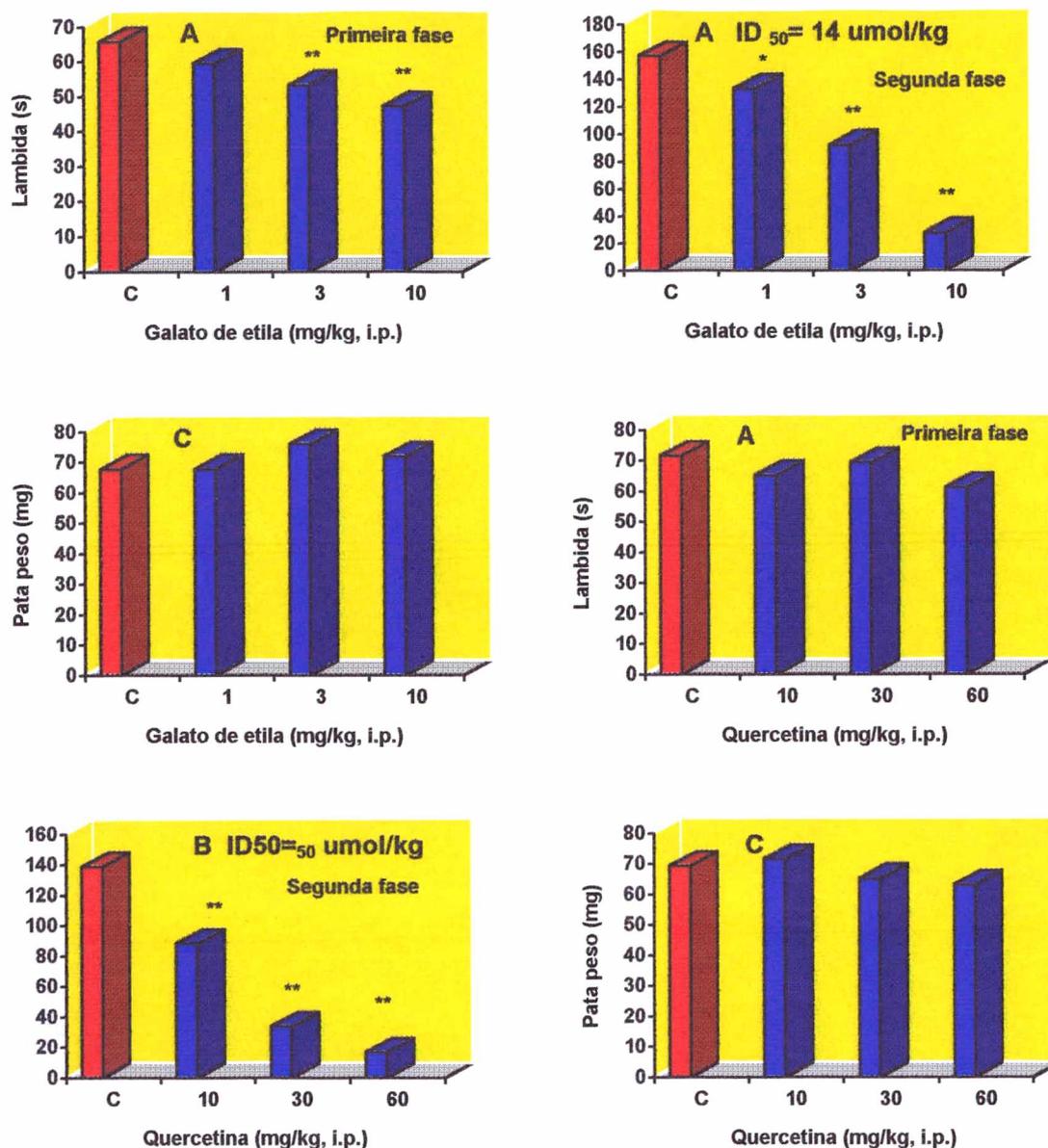
**Figura 90.** Efeito analgésico dose dependente causado pelos compostos obtidos por modificações do alcalóide, administrado por via intraperitoneal em relação a segunda fase da dor induzida pela formalina.



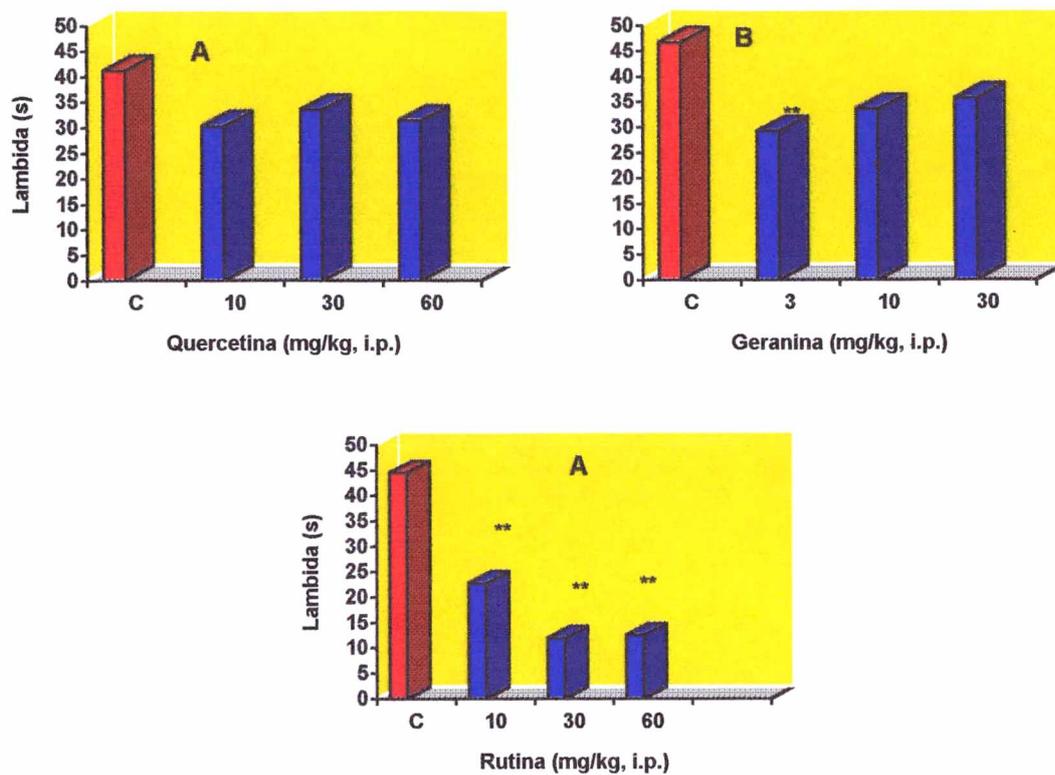
**Figura 91.** Efeito analgésico dose dependente causado pela geranina (painel superior) e pela furosina (painel inferior) isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus*, administrado por via intraperitoneal em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* $P < 0.01$ .



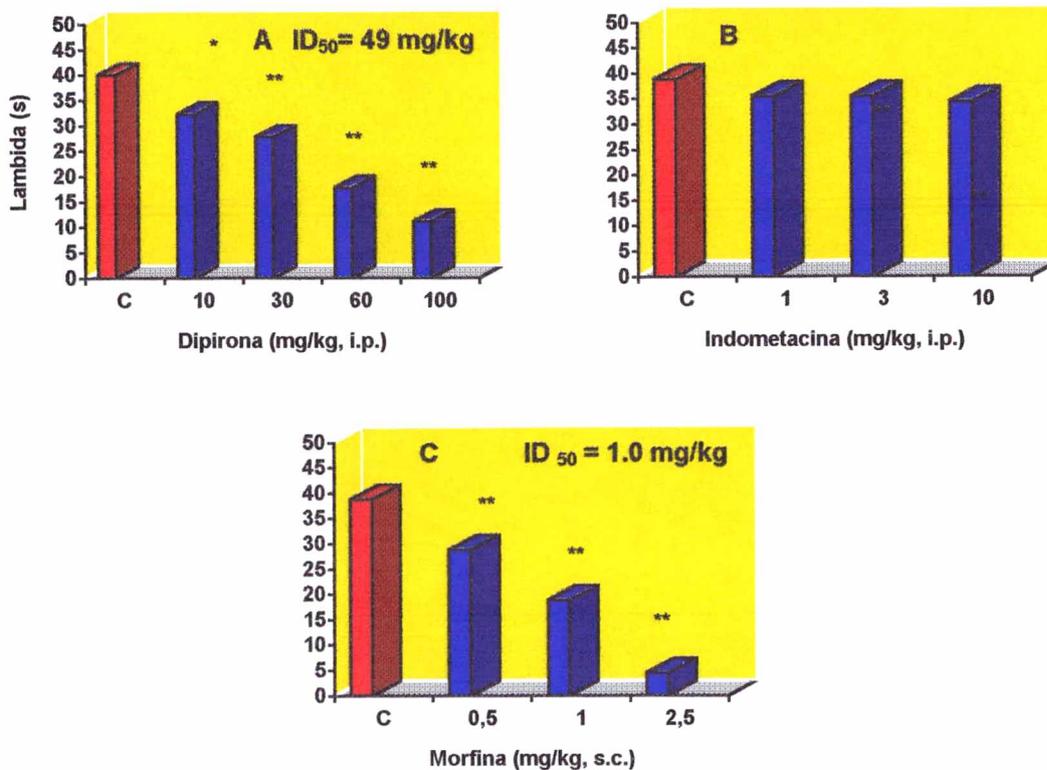
**Figura 92.** Efeito analgésico dose dependente causado pela rutina isolado das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus* administrado por via intraperitoneal (painel superior ) ou oral (painel inferior ) em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata ( C ) induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle , \*\*P<0.01.



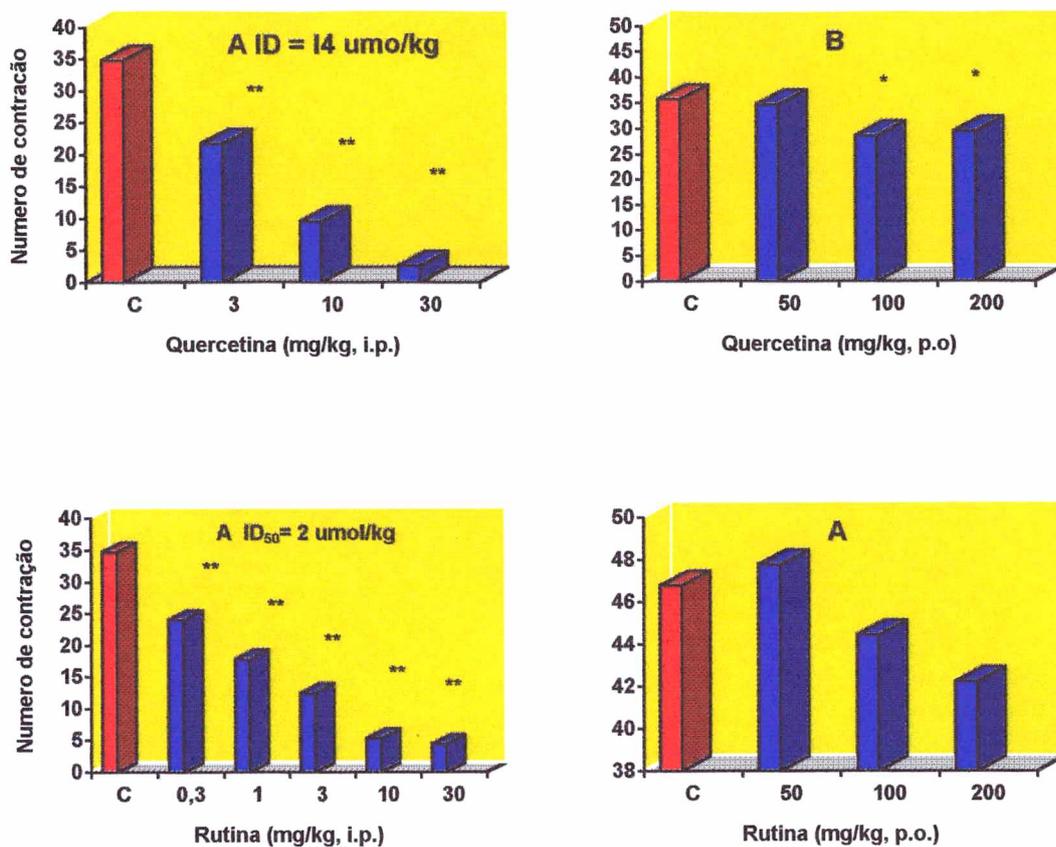
**Figura 93.** Efeito analgésico dose dependente causado pelo galato de etila (painel superior) e pela quercetina (painel superior) isolado das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus* administrado por via intraperitoneal em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle \*\*P<0.01.



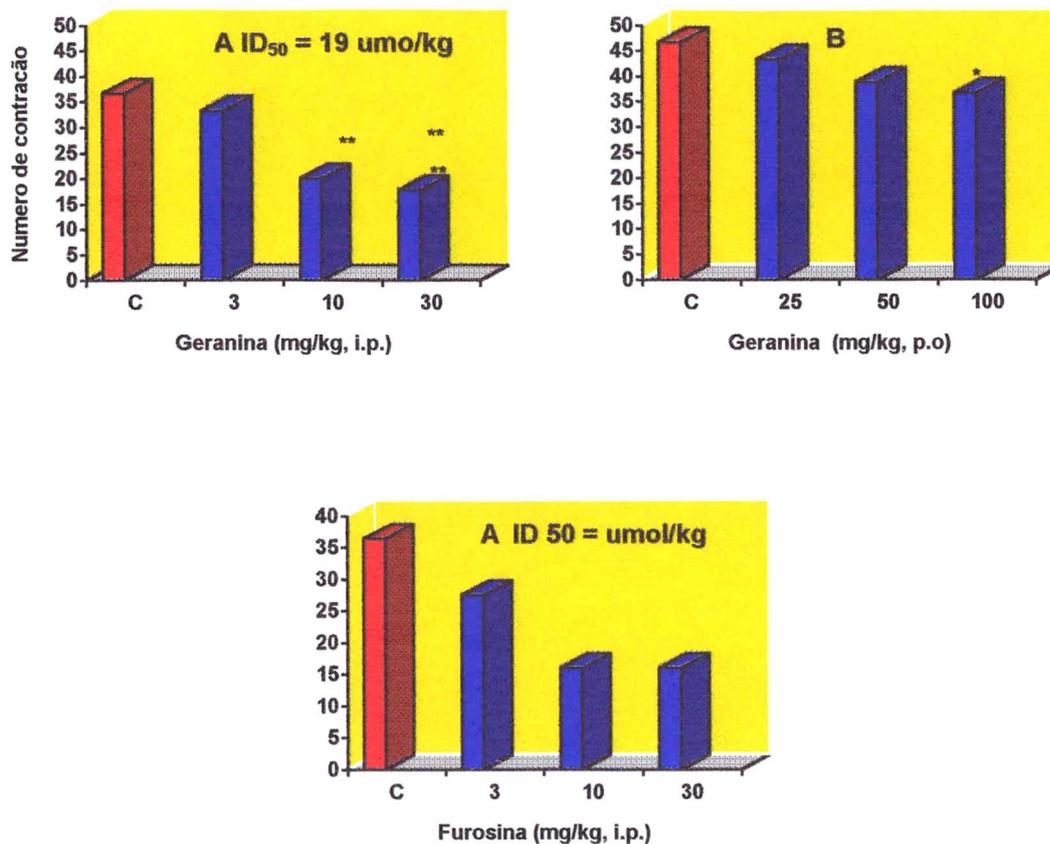
**Figura 94.** Efeito analgésico dose dependente causada pela quercetina (A), geranina (B) e pela rutina ( C) isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus* administrado por via intraperitoneal em relação a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



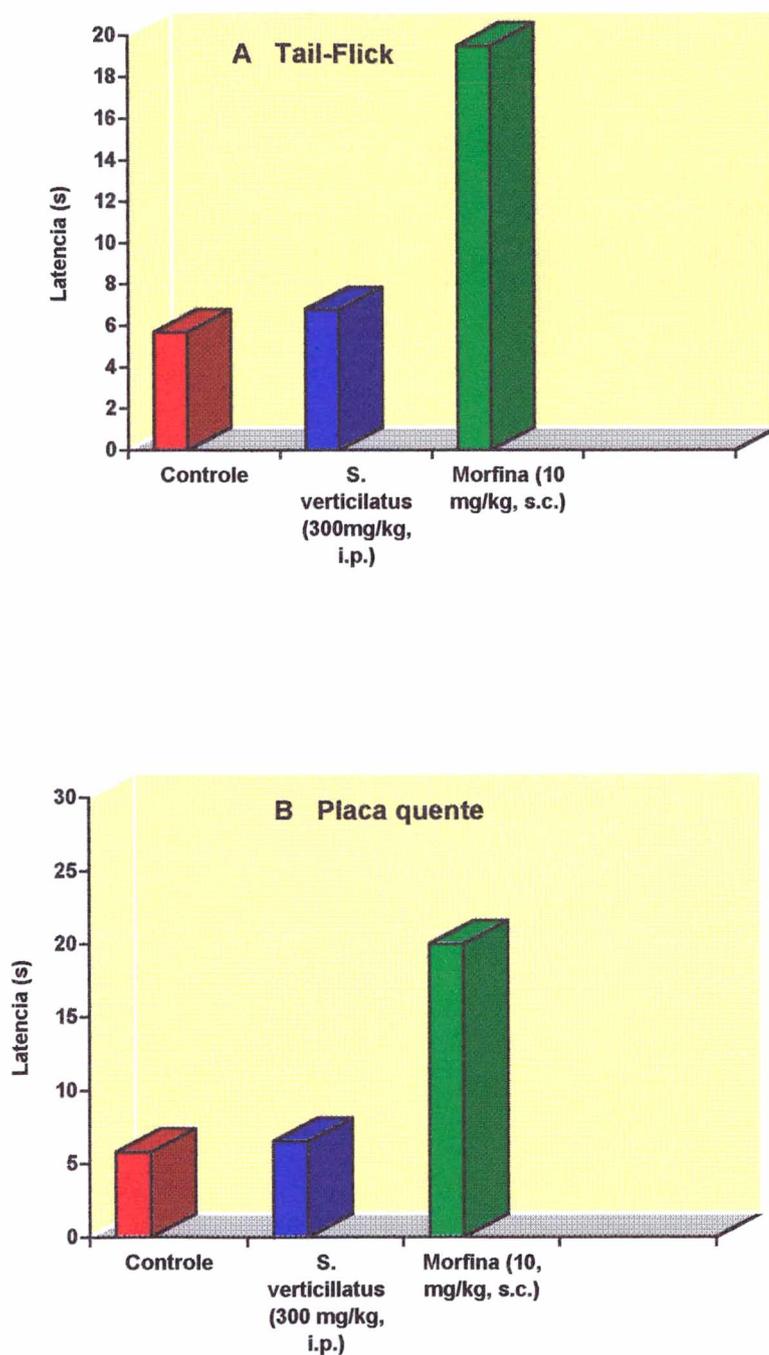
**Figura 95.** Efeito analgésico dose dependente causada pela dipirona (A), indometacina (B) e pela morfina ( C) em relação a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*P<0.05; \*\*P<0.01.



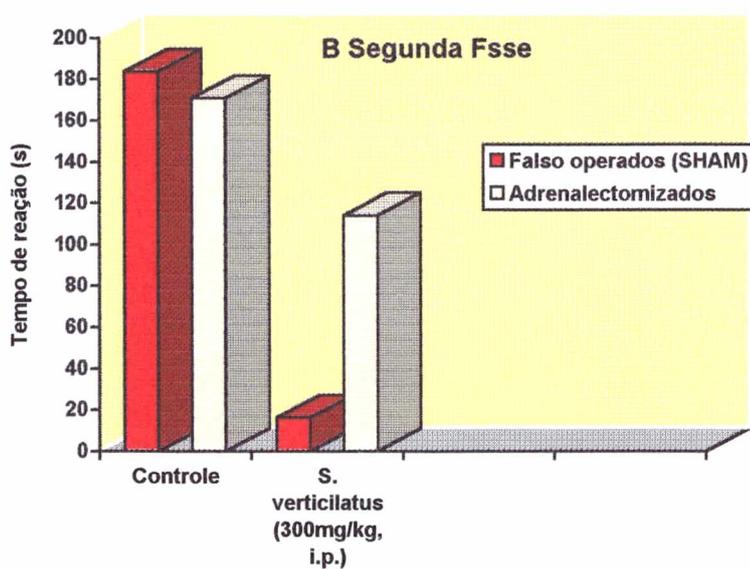
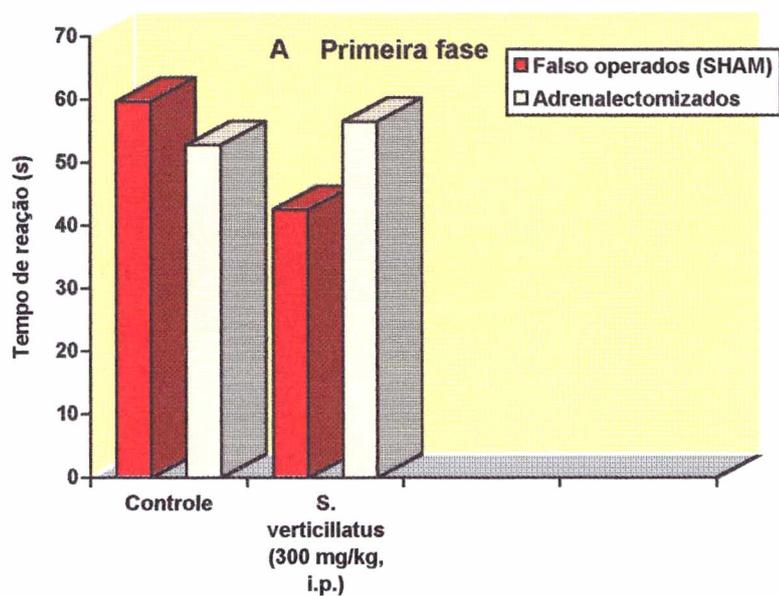
**Figura 96.** Efeito analgésico dose dependente causado pela quercetina (painel superior) e pela rutina (painel inferior isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus* , administrado por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* P<0.01.



**Figura 97.** Efeito analgésico dose dependente causado pela geranina (painel superior) e pela furosina ( painel inferior ) isolados das espécies de *Phyllanthus sellowianus* e *Phyllanthus fraternus*, administrado por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\*P<0.01.



**Figura 98.** Efeito do tratamento dos animais com morfina e com o Extrato *S. verticillatus* sobre a dor induzida no testes da Placa quente (A) e Tail-flick (B) em camundongos. Cada grupo representa a média 5 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* $P < 0.01$ .



**Figura 99.** Influência da adrenalectomia dos animais sobre a atividade antinoceptiva do extrato hidroalcoólico obtido de *S. verticillatus*

## 6 CONCLUSÃO

### 6.1 ANÁLISE FARMACOLÓGICA DE *Siphocampylus*

#### **Extrato**

O extrato do gênero *Siphocampylus verticilatus*, administrado por via intra peritoneal (i.p.) ou por via oral (v.o.) em camundongos, inibiu de forma dose-dependente, com longa duração as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No teste de indução pela formalina, o extrato inibiu ambas as fases da dor. Administrado por v.o. ou i.p., o extrato inibiu de forma dose-dependente a dor neurogênica induzida pela capsaicina. Nos modelos da placa quente e do tail-flick a morfina (s.c.), causou significativo efeito de analgesia, enquanto o extrato (i.p.) demonstrou-se inativo. A naloxona (i.p.), reverteu significativamente as ações do extrato e da morfina no modelo da formalina. O tratamento dos animais com L-arginina (i.p.), (precursor do óxido nítrico), reverteu completamente o efeito analgésico causado pela L-NOARGININA (i.p.) em ambas as fases da dor. Enquanto o efeito do extrato (i.p.) causado pela formalina foi revertido somente na segunda fase desse modelo. O extrato (i.p.) não afetou a performance motora dos animais quando analisado no modelo da rota-rod.

#### **Alcalóide**

A análise da ação antinociceptiva do alcalóide, administrado por via i.p. ou v.o., causou inibição na dose-dependente das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No teste da formalina ocorreu significativa inibição da primeira e segunda fase da dor, induzida pela injeção intraplantar de formalina. O alcalóide administrado via i.p. ou via v.o. causou efeito analgésico de maneira dose dependente na dor de origem neurogênica induzida pela capsaicina. No teste da placa quente a morfina causou analgesia, enquanto que o alcalóide (i.p.) foi menos potente. Os efeitos do alcalóide e da morfina foram revertidos completamente pela naloxona (i.p.) no modelo da formalina. Podendo observar que tanto a morfina (s.c.) quanto o alcalóide (i.p.), apresentaram seus efeitos antinociceptivos significativamente reduzidos nos animais pré tratados durante 7 dias com uma dose diária de morfina (s.c.). As modificações estruturais apresentaram o efeito

analgésico, administrado por via intra peritoneal, em relação a segunda fase da dor induzida pela formalina podendo-se observar que o alcalóide metilado foi revertido completamente, pela naloxona, no modelo da formalina.

Os resultados do extrato e do alcalóide de *Siphocampylus veticillatus* apresentam pronunciada ação analgésica, tanto por via oral como intra peritoneal, nos modelos de dor, de origem neurogênica e inflamatória, cujo mecanismo de ação parece envolver em parte a ativação dos sistemas opióides e a via da L-arginina-óxido nítrico.

## 6.2 ANÁLISE FARMACÓLOGICA DE *Phyllanthus*

Os resultados mostraram que os compostos quercetina, geranina, rutina e furosina isolados das espécies de *Phyllanthus* quando administrados por via intraperitoneal, causaram inibição dose dependente das contorções abdominais, provocadas pelo ácido acético em camundongos. Quando administradas oralmente, os compostos quercetina, geranina e rutina não foram efetivos em reduzir as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

As análises mostraram que a quercetina, geranina, rutina, galato de etila e furosina, inibiram significativamente ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo contudo, mais efetivos em relação a segunda fase desse modelo, respectivamente, para a quercetina, geranina, rutina, galato de etila e furosina. Por outro lado, todos os compostos que nas mesmas doses inibiram a dor, não causaram redução significativa do edema da pata de camundongo, associada a segunda fase da dor causada pela formalina. Ao contrário, do que foi observado para os compostos, a aspirina, acetoaminofen e a indometacina (i.p.) apresentaram inibição significativa apenas da segunda fase da dor à formalina. No entanto, apenas a indometacina causou redução significativa do edema de pata induzido pela formalina.

A análise mostra que a rutina (i.p.) causou potente inibição dose dependente da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos, enquanto que a quercetina e a geranina (i.p.) causaram inibição parcial da dor induzida pela capsaicina. Por outro lado a indometacina (i.p.) foi completamente destituída de efeito, enquanto a morfina (s.c.) e a

dipirona (i.p.) apresentaram significativa inibição da dor causada pela injeção intraplantar de capsaicina.

Os resultados confirmam os estudos anteriores e demonstram que o gênero *Phyllanthus*, contém compostos de natureza química diferente, incluindo alguns taninos, esteróides e flavonóides com potente ação analgésica em diferentes modelos de dor de origem neurogênica e inflamatória em camundongos.

### 6.3 COMPOSTOS IDENTIFICADOS

Até o presente, as investigações com a espécie *Phyllanthus sellowianus* levaram ao isolamento e identificação das substâncias, Glochidona, glochidonol, sitosterol, stigmasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, xantoxilina, éster etil gálico, quercetina, furosina, rutina e geranina, enquanto que para a espécie de *Phyllanthus fraternus* foram isolados e identificados, hipofilantina, éster metil gálico, geranina, rutina, furosina, salientando que só foi analisado o extrato acetato de etila de *Phyllanthus fraternus*. Para a espécie de *Siphocampylus verticillatus* foram isolados e identificados, campesterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, stigmasterol glicosídeo, 3'-metóxi luteolina e dois novos alcalóides piperidínicos, N-metil-2(r)-[2(s)hidroxipentil]-6(s)-[2(r)-hidroxipentil]-piperidina hidrocloreídrica e N-metil-2(2-hidroxibutil)6-(2-hidroxipentil)-piperidina clorídrica.

Parte desses resultados encontram-se publicados ou em vias de publicação nas seguintes revistas:

1. Fitoterapia, LXVI, nº 3, 275, 1995.
2. Planta Médica, 61, 391, 1995.
3. Planta Médica, 62, 146-149, 1996.
4. Acta Crystallographica Section C, 52, 1223-1225, 1996.
5. Journal of Ethnopharmacology, 1996 (in press)
6. Acta Farm. Bonaerense, 14, nº 3, 213-216, 1995.
7. J. Pharm. Pharmacol. 48, 1996. (in press).
8. J. Pharm. Pharmacol. 1996 (in press).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. AHMAD, V.U.; NASIR, M.A.; Andrachcine, an alkaloid from *andrachne aspera* Phytochemistry, 26: 585, 1987.
002. AHMAD, V.U.; NASIR, M.A., Andrachamine a new alkaloid from *Andrachne aspera* Heterocycles, 24: p2841, 1986
003. AHMAD, M.V.; KUSAIN, S.K.; Ricinoleie acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 58 (6): 673 - 674, 1981.
004. AIDA ESPINOLA, Separações analíticas e pré concentração, 1989, 287p., Editora a UFRJ.
005. ANGELY, J., Flora analítica e fitogeográfica do Estado de São Paulo 1ª ed., São Paulo, Edições Phytton, 2: , p 309 - 313, 1970.
006. ANJANEYULU, A.S.R.; RAO, K.J.; ROW, L.R.; SUBRAHMANYAN, C. Crislaine constituents of Euphorbiaceae XII. Isolation and structural elucidation of three new lignans from the leaves of *Phyllanthus niruri* L. Tetrahedron, 29 (10): p 1291 - 98, 1973.
007. ARAUJO, A., On diuresis and its modifications under the influence of varioms fluido extracts of brasilian plants. Thesis lab. of Pharmacology. Falculty of Medicin, São Paulo, 1929 Brasil,
008. AWONTERS, R.; NIEMEGER, C.J. & JANSSEM, A.J. Pharmacology of antidiarrheal drugs. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23: p. 279 - 301, 1983.
009. BACCHI, E.M., Farmacognosia de Algumas espécies de *Phyllanthus* conhecidas como quebra pedra. An. Farm. Quim., 24 (1,2): p. 39 - 44, 1984.
010. BACCHI, E. M. Estudo farmacognóstico do *Phyllanthus tenellus* quebra pedra. Dissertação de Mestrado - U.S.P., 131p., 1963.
011. BACHAMANN, T.C.; GHIA, F.; and TORSSELL, K.B.G., Lignans and lactones from *Phyllanthus anisolobus*. Phytochemistry, 33: 1., p. 189 - 91, 1993.

012. BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve ending in the mouse peritoneum. Br. J. Pharmacol. 73: p 325 - 333, 1981.
013. BHADBHADE, M.M.; SUBBA RAO, G.S.R.; VENKATESAN, K., Concerning hypophyllanthin. Tetrahedron Letters, 22 (5): p. 3097 -98, 1981.
014. BHADBADE, M.M.; SUBBA RAO, G.S.R. and VENKATESAN, K., Concerning hypophyllanthin. Tetrahedron letters, 21: p. 3097 - 98, 1980.
015. BAUCILLON, L., Contribution al etude taxonomique du genre Phyllanthus (Euphorbiaceae). Boissiera, 18: 9 -81, 1971.
016. BARROSO, G.M., Sistemática de angiospermas do Brasil Viçosa: Imprensa da Univ. Fed. de Viçosa, v. 3, 1986.
017. BIAVATTI, M.W.; BROWN, R.T.; CONTIN, A.; LEONART, R.; SANTOS, C.A.M., 8,10-n-Propil-Lobelidiol, um novo alcalóide piperidínico de *Siphocampylus verticillatus* z(Chsm.) G. Don. Campanulaceae. Anais XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 1994.
018. BIAVATTI, M.W. Estudos sobre 8,10-Din-Propil-lobelidiol: um novo alcalóide isolado de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G. Don, Campanulaceae. UFPr. 1994. Tese de mestrado em química.
019. BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIANS, D.H., Interpretation of mass spectra of organic compounds, 1964 - Holden day, Inc. São Francisco.
020. BURAS, J.S., Verificação da sensibilidade bacteriana aos princípios de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G. Don., Campanulaceae. Curitiba, 1985. Tese de mestrado em Botânica . UFPr., 1985.
021. CALIXTO, J.B., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A. and RAE, G.A. Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-acetofenone (xanthoxyline) isolated from *Sebastiania schottiana*. Planta Médica 56, 31 - 35, 1990.

022. CALIXTO, J. B., YUNES, R. A., MIGUEL, O. M., and RAE, G. A. Effects of *Sebastiania schottiana* extracts on isolated smooth muscle contraction. Planta Medica 6, 444 - 447, 1986.
023. CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; VALLE, R.M.R.; RAE, G.A., Antiespasmotic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus* a comparative study with papaverine. Brazilian J. Biol. Res., 17: 313 - 21, 1984.
024. CALDERON, J.; Stud, M., Espectrometria de massa . Ed. Alhambra, 1970, p. 152 - 153.
025. CARNEIRO, E. Estudo químico e farmacológico de *Hymenea martiana*. Dissertação de Mestrado - UFSC. 1989.
026. CHAUHAN, J.S.; SULTAN, M.; SRIVASTAVA, S.K., Chemical Investigation of the roots of *Phyllanthus niruri*. J. Indian Chem. Soc. 56 (3): 326, 1979.
027. CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, J.C., Glossary of indian medicinal plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India, 1, 330, 1956.
028. COLLIER, H.D.J.; DINNIN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br. J. Pharmacol. 32: p 295 - 310, 1968.
029. CONTIN, A., Contribuição ao estudo fitoquímico de *Shiphocampylus verticillatus* (Charm.) G. Don. Campanulaceae. Curitiba, Tese de mestrado em Botânica. UFPr., 1993.
030. CORRAL, R.A.; ORAZI, O.O.; PIZZORNO, M.T., Constituyentes de *Siphocampylus foliosus* Gris. Anales Asoc. Quim. Argentina La Plata, 58, 4, 285 - 90, 1970.

031. C.R. & CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B 1 and B 2 kimin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 110: p. 193 - 198, 1993.
032. CORREA, M.P., Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de, Janeiro, Ministério da Agricultura, 2, 404, 1931.
033. COSTA, A.F., Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calustes Gulbenkian, v. 3, 1977
034. CRISTIANI, L.D.; AMORIN, J.L., Estudo botânico de *Phyllanthus sellowianus* (sarandi-branco) Rev. Farm. (Buenos Aires), 114: 84, 1972
035. CRISTIANI, L.Q. e AMORIN, J.I., Estudio preliminar del. "sarandi blanco" *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). Revista Farmacêutica, 114, 5 - 6, 84 - 92, 1972.
036. CROQUIST, A., An integrated system of classification of flowering plants. New York. Columbia University press, 1981, v.2
037. CROVETTO, M. Las planatas utilizadas em medicina popular en el norest de corrientes - República Argentina. Tucuman: Ministério de Cultura y Educacion , Fundação Miguel Lillo, 1981, p. 66.
038. CRUZ, A, B; MORETTO, E; CECHINEL FILHO, V; NIERO, R; MONTARARI, J. L; YUNES, R. A. Antibacterial activity of *Phyllanthus urinaria*. Fitoterapia, 65, 5, 461 - 462, 1994.
039. CRUZ, G.L., Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. 1ª ed., Belo Horizonte, 1965, 2, 439 e 708.
040. CUELLAR CUELLAR, A.; ESTEVEZ, P.F., A preliminar phytochemical study of Cuban plants *Phyllanthus niruri*, Euphorbiaceae. Rev. Cubana Farm., 14 (1): 63 - 68, 1980.
041. D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss of pain sensation. J. Pharmacol. Exp. Ther., 72: 74-79, 1941.
042. DAVID, W.; UNANDER, P.S.; VENKATESWARAN, I.M.; BARUCH, S.B., Inhibicion de la ADN polimerasa viral dependiente de virus hepatitis B por

especies de *Phyllanthus*, efectos genéticos y ambientales sobre esta actividad. Brenesia, 34: 2740, 1991.

043. EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. J. Pharmacol. Exp. Ther., 107: 385-393, 1953.
044. STHAL. E. Thin-layer chromatographys. A laboratory hand book. 2 ed., New York, Springer-verlag, 1969, p. 9044.
045. ELIEL, E.L.; KANDASAMY, D.; YEN, C. AND HARGRAVE, K. D. Conformational analysis. 39. <sup>1</sup> <sup>13</sup>C NMR spectra of saturated heterocycles. 9.<sup>2</sup> piperidine and n- methylpiperidine. J. Am. Chem. Soc., 102, 3698 - 3707, 1980.
046. ENGLER, A., Die natuerlichen pflanzenfamilien, 19, Verlag von Wilhelm. Engelmann, Leipzig, 1931, 60 - 66.
047. ENGLER, A., Syllabus der pflanzenfamilien, 11 anfl., Belin . Verlag von Gerbrunder Borntraeger, 1936, 419 p.
048. ENGLER, A., Syllabus dr pflanzenfamilien 12 Aufl., Berlin Nikolasse, Verlag von Gebruder. Borntraeger, 2 v., 1964, 666 p.
049. ESTRELLA, E., Utilização industrial de plantas medicinais, Seminário apresentado em Taller sobre utilizacion industrial de plantas medicinais - organizado por la ONUDI, Guatemala, 1993.
050. FANG, J.M. et al. Steroids and triterpenoids from *Rosa laevigata* Phytochemistry , 30: 3383, 1991.
051. FILOMENI, M., Pharmacology of gallic acid III action of gallic acid on diuresis from intravenous injection of distilled water. Arch. Farmacol. Sper., 64: 1 - 52, 1937.
052. FILOMENI, M., Pharmacology of gallic acid II action of gallic acid on diuresis from hypertonic solutions of sodium chloride. Arch. Farmacol. Sper., 63: 193 - 224, 1937.
053. FOSSAT, A.G., A cura pelas plantas . Ed. Eco, Rio de Janeiro, 1970, 159 p.

054. FRANCIS, L.P.S.; FRANCIS, G.W., Sedum alkaloids Planta Medica, 32, 268, 1977.
055. FRANCK, B., Struktur und biosynthese des sedinins. Chem. Ber., 93, 2360, 1960.
056. EISE, F.W., Essential oils from Brazilian. Euphorbiaceae, Perfumery Essent. Oil Record, 26: 219 - 220, 1935.
057. GANESPURE, P.A.; SCHEIDERS, G.E.; STEVENSON, R., Structure and synthesis of hypophyllanthin, nitetralin, phyltetralin and lintetralin. Tetrahedron letter, 22: 393 - 396, 1981.
058. GANESPURE, P.A.; STEVENSON, R., Synthesis of aryltetralin and dibenzylbutyrolactone, L intetralin, phyltetralin and Kusunokinin. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 6, 1681 -1684, 1981.
059. GANGULY, A.K.; GOVINDACARI, P.A.; MOHAMED, A.D.; RAHIMTLA, A.D. and VISWANATHAN, N. Chemical constituents of *Glochidion hohenackeri*, Tetrahedron, 22: 1513 - 1599, 1966.
060. GARELIO, F., Estudio del *Siphocampylus foliosus* Gris. Archivos de Farmácia y Bioquímica, Tucuman, 5: 5 - 46, 1950.
061. GEREZ, J.C., Indústria farmacêutica: histórico, mercado e competição, Ciência hoje, 89, 15, 21 -30, 1993.
062. GODOY, S.A.P., Levantamento florístico e quimiosistemática da família campanulaceae - Região da Cadeia do Espinhaço - 1989, Dissertação de mestrado em botânica - U.S.P.
063. GOTTFLEB, O. & KAPLAN, M.A., Das plantas medicinais aos farmacos naturais. Ciência Hoje, 15: n 89, 51 - 54, 1993.
064. HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der pflanzen, Birkhauser verlag base, 1966, v. 4
065. HEGMAUER, R., Chemotaxonomie der pflanzen. Birkhauser verlag basel, 1966., v. 4 106.
066. ZYN, O., FERRARO, G. and COUSSIO, J. D. Coumarins of *Phyllanthus sellowianus*, Fitoterapia LXIV, nº. 6, 556, 1993.

067. HNATYSZYN, O., FERRARO, G. Phyllanthol from *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiacee), Planta Medica 5, 467, 1985.
068. HNATYSZYN, O., FERRARO, G. and COUSSIO, J. D. A biflavonoid from *Phyllanthus sellowianus*, Journal of Natural Producty 50, n<sup>o</sup>. 6, 1156 - 1157, 1987.
069. HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, auseful technique for evaluating mild analgesia. J. Neurosci. Meth., 14: 69-76, 1985.
070. HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive abd anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. Pain, 25: 125-132, 1986.
071. HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain, 30: 103-114, 1987.
072. HUKPRI, V. I., KALYANI, G. A., KAKRANI, H. K. Hypoclycemic activity of flavonoids of *Phyllanthus fraternus* in rats. Fitoterapia LIX, n<sup>o</sup>. 1, 1988.
073. ISHIMARU, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA, H. and SHIMOMURA, R. Phytochemistry, 31(6): 2015 - 18,1992.
074. YAYARAN, S., THAYAGARAN, S.P. PANCHANADAM, M. e SUBRAMANIAN, S., Antihepatitis B prorperties of *Phyllanthus niruri* Linn. and *Elipta alba* Hassk. in vivo safety studies. Biomedicine 7, 9 - 16 (1987).
075. JENKINS, G. L.; HARTUNG, W.H. Química médica farmacêutica Marin & Manuel Cia , editores Barcelona, p 468.
076. JOSHI, B.; GAWARD, D.; PILLIINR, S.W.; KARTHA, G. and BHANDARY, K., Isolation and structure (x ray analysis) of Ent norsecurinine an alkaloid from *Phyllanthus niruri*, Journal of Natural Products, 49: 4, 614 - 620, 1986.

077. KOROLKOVAS, A. Planejamento de Fármacos., Ciência e cultura, 41, 6 , 528 - 537, 1989.
078. KRISHNAMURTI, G.V.; SESHADRI, T.R., Bitter principle of *Phyllanthus niruri*, Proc. Indian Acad. Sci., 24 A: 357 - 364, 1946.
079. KRISHANAMURTI, G.V. & SESHARDRI, T.R., Bitter principal *Phyllanthus niruri* L. Proc. Indian Acad. Sci. 24 A: 1972.
080. LAINETTI, R.; FREIRE, R.B.; COSTA, J., Contribuição ao estudo farmacognóstico dos “quebra pedra”. Bol. Rodolfo Albino, 1 (2) 38 - 47, 1980.
081. LOEFGREN, A., Manual das famílias naturais phanerogamas Imprensa Nacional, Rio de Janeiro , 1917, p. 281.
082. LOUSTALOT, A.J.; PAGAN, C., Local fever plants tested for presence of alkaloids. El. Crisol. Puerto Rico, 3 (5): 3 - 5, 1949.
083. L YEAR FOO, Amariin, A Di-dehydroxide hahydroxidiphenoxyl hidrolisable taninin from *Phyllanthus amarus*. Phytochemistry, 33: 2, 447 - 491, 1993.
084. MABRY, T.J.; MARKHAM, R.R.; and THOMAS, M.B. The systemaitic identification of flavonoids, 1970, 353 p.
085. MAGALHÃES, A.F.; VIEIRA, D.M.; MAGAHÃES, E.G.; SHEPHERD, G.J., C<sup>14</sup> polyacetylenes from brasilian Lobelioideae. Phytochemistry, 27 12, 3827 - 3830, 1988.
086. MAGALHÃES, A.F.; VIEIRA, D.M.; MAGALHÃES, E.G.; SHEPHERD, G.J., Poliacetilenos de *Siphocampylus humilis*, Wimm. (Lobeliaceae). São Paulo, Química nova, 12:3, 298 - 299, 1989.
087. MANNAN, A.; AHMAD, K., A short note on the occurrence of sex hormones in Brangladesh plants. Bangladensh J. Biol. Sci., 5 (1): 45, 1976.
088. MANSKE, R.H.F., The alkaloids - chemistry and physiology, Ed. Academic Press Inc., New York, 1968, v. XI.

089. MARKHAM, K.R., Techniques of flavonoid identification, 1982, 113 p.
090. MARTIUS, C.F.P., Flora brasileira. Berlin. J. Kramer, 1967, v. 6. parte 4.
091. VANGH, R., Studies in South America. *Lobeliodeae*, (Campanulaceae) with special reference to Colombian species. Brittonia, 6: 450 - 93, 1949.
092. MIGUEL, O.G., Componentes químicos de *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., hipóteses sobre a correlação entre estrutura a atividade farmacológica. Tese de mestrado - UFSC. 1987, Florianópolis
093. MOREIRA, E.A.; SANTOS, C.A.M.; LEORNAT, R.; LAMB. L., Investigação química preliminar de 2 espécies de *Siphocampylus*, Campanulaceae. Tribuna Farmacêutica, 51 (52): 1 (2), 26 - 31, 1984.
094. MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw phormalin test. An animal model of tonic pain. J. Pharmacol. Meth., 20: 175-186, 1988.
095. NEVES, E.S., Plantas medicinais na saúde pública, São Paulo, 16a: 181 - 186, 1982.
096. PEREIRA, J.R.; CAMPOS, M.D., Sobre o princípio activo de *Phyllanthus corcovadensis* (quebra pedra). Trabalho do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, An. Paul. Med. Cir., 20 (2, 2): 9, 1928 - 1929.
097. PRASAD, A.M.; DROGA, J.V.V.; SINHA, S.K.P., Observations on the amino acid composition of some species of *Phyllanthus*. Camp. Physiol. Ecol., 3(1): 41 - 43, 1978.
098. RAPHAEL IKAN, Natural products, Academic Press, Inc., 1991, 359 p.
099. RAUFFIAC, R.; PARELLO, J., *Phyllanthus niruri* alkaloides presence of the optical antipode of norsecurinine. Plant. Med. Phytother, 3 (3): 220 - 223, 1969.
100. RAUFFANF, R.F., A handbook of alkaloids and alkaloid containing plants Wiley - Interscience, New York, 1970.

101. REITZ, R.; KLEIN, R.M. & REIS, A., Projeto madeira de Santa Catarina. Sellowia, 28 -30: 24, 1978.
102. REITZ, R.; KLEIN, R.M. & REIS, A., Projeto madeira do Rio de Grande do Sul. Sellowia, 43 (45): 34, 1983.
103. NIERO, R. Isolamento e identificação de composto do *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico, correlação estrutura atividade. Tese de Mestrado - UFSC., 1993.
104. ROW, L.R.; SRINIVASULU, C., Smith, M.; SUBBA RAO, G.S.R., New lignan from *Phyllanthus niruri*. Tetrahedron letters, 23(24): 1557 - 1567, 1964,
105. ROW, L.R.; SRINIVASULU, C.; SMITH, M.; SUBBA RAO, G.S.R., Crystalline constituents of Euphorbiaceae V. New lignans from *Phyllanthus niruri* the constitution of phyllanthin. Tetrahedron, 22 (80): 2899 - 2908, 1966
106. ROW, L.R.; SATYANARAYANA, P.; SUBBA RAO, G.S.R., Crystalline constituents of Euphorbiaceae VI. The synthesis and absolute configuration of phyllanthin. Tetrahedron, 23: 1915 - 1918, 1967.
107. ROW, L.R.; SATYANARAYANA, P.; SRINIVASULU, C., Crystalline constituents of Euphorbiaceae XI. Revised structure of hypophyllanthin from *Phyllanthus niruri* L. Tetrahedron, 26 (12):3051 - 3057, 1970.
108. SAKURATA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURUDA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin test, Neurosci. Lett., 151,142-145, 1993.
109. SAKURATA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURUDA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology, 31: 1279-1285, 1992.
110. SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R.; VIANA, A.M.; MORENO, F.N.; CAMPOS, M. M.; YUNES, R.A. and CALIXTO, J.B. Analgesic

effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice.  
J. Pharm. Pharmacol 46, 755 - 759, 1994.

111. SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. and CALIXTO, J.B. , J. Pharm. Pharmacol 47, 66 - 71, 1995.
112. SANTOS, D.R., Chá de quebra pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e em ratos. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1990, 157 p.
113. SCHAR, P., Nuclear magnetic resonance spectroscopy. CR.C. Press. Inc. Florida, 1984, v3., 51 - 53.
114. SCHNEIDERS, G.E.; STEVENSON, R. Structure and synthesis of the aryltetralin lignans hypophyllanthin and nirtetralin. J.C.S. Perkin, 1, pp 999 - 1003, 1982.
115. SEAD, A.; VICKERY, K.; PAJKOS, A.; MEDHURST, R.; DIXON, R.; COSSAT, Y., Effects of *Phyllanthus* plants extracts on duck hepatitis B virus in vitro and in vivo. Antiviral Research, 18: 127 - 138, 1992.
116. SCHENKELI, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENQUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E. e STEHMANN, J.R., O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica, Cad. Farm. Porto Alegre, 1: 2, 65 - 72, 1985.
117. SCHNEIDERS, G.E.; STEVENSON, R., Structure and synthesis of the aryltetralin lignans hypophyllanthin and nirtetralin. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I, 4 (4): 949 - 1003, 1982.
118. SCHULTZ, A.R., Introdução ao estudo da Botânica sistemática , Ed. Globo, 559 p.
119. SCHULTZ, A.R., Introdução ao estudo da botânica sistemática, Rio de Janeiro, Globo, 1963, V2, 167.
120. SCHOPF, C.; Kauffmann, T., Uber die starker hydrophilen nebenalkaloide aus *Lobelia inflata* L.; ein beitrage zur biogenese der Lobelia-alkaloide Justus Liebig Ann. Chem., 1957, 608 - 688.
121. SERRA, R.A., Investigation of guanine in *Phyllanthus niruri* L Anales Univ. Santo Domingo, 8: 295 -297, 1944.

122. SILVESTEIN, R.M.; CLAYTON, B.G. e MORRIL, T.C., Identificação espectrometrica de compostos organicos. 3 ed. Rio de Janeiro , Guanabara dois , 1979, p.219.
123. STANISTAS, E.; ROUFFIAC, R.; FOYARD, J.J., *Phyllanthus niruri* alkaloids, flavonoids and lignans. Plant. Med. Phytother, 2-3: 126 - 141, 1969
124. SUBBA, RAO, G.; BRANLEY, R., Hypophyllanthin. Tetrahedron letters, 34: 3175 - 78, 1971.
125. TANAKA, R., TABUSE, M., e MATSUNAGA, S., Triterpenes from the stem bark of *Phyllanthus flexuosus*. Phytochemistry, 27: 11, 3563 - 67, 1988.
126. TAKEMURA, O.; IINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O.G.; MOREIRA, E.A. and NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* F. Cuprea, Phytochemistry, 38, nº 5, pp. 1299 - 1300, 1995.
127. TEMPESTA, M.S.; CORLEY, D.G.; BEUTTER, J.A.; METRAL, C.J.; YUNES, R.A.; GIACIMOZZI, C.A. e CALIXTO, J.B., Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus* . Journal of Natural Products, 51: 3, 617 - 618, 1988.
128. THYAGARAJAN, S.P. Effect of *Phyllanthus amarus* on Chorinic carriers of hepatitis B virus. The Lancet, Oct, 764 - 6, 1988.
129. THYAGARAJAN, S.P., THIRUNEELAKANTAN, K., SUBARAMANIAN, S., SUNDARAVELU, T., In vitro inactivation of HBsAG by *Elipta alba* Hassk and *Phyllanthus niruri* Linn. Ind. F. Med. Res. 76, 120 - 130, 1982.
130. THYAGARAJAN, S.P., THIRUNEELAKANTAN, K., SUBRAMANIAN, S., NAMMALWAR, B.R. E PROBHA, V., Effect of a medicinal plant on hepatitis B surface antigen carriage: A double blind clinical trial (a research report) Virus inform exchange newsletter (Western Australia) 4, 9, 1987.
131. TYAGARAJAN, S.P.; TIRUNEELAKANTAN, K.; SUBRAMAIAN, S.P.; SUNDARAVELU, T., In vitro inactivation of Hbs Ag by *Elipta alba* hassk and *Phyllanthus niruri*. J. Med. Res., 76: 124, 1982

132. TRINTA, E.F., SANTOS, E.; Flora ilustrada catarinense campanulaceae, Ed. Raulino Raitz. p. 39 - 42, 1989.
133. TRINTA, E.F., SANTOS, E.; Flora ilustrada catarinense euphorbiaceae, Ed. Raulino Raitz. p. 17 - 35, 1989.
134. UGAZ, O.L., Investigacion fitoquímica, 1994, 300p.
135. UNANDER, W.D.; VENKATESWARAN, P.S.; MILMAN, J. and BLUMBER, G.S., Inibicion dela ADN Polimerasa viral dependiente de virus hepatitis B por especies de Phyllanthus efectos geneticos y ambientales sobre esta atividade. Brinesia, 34: 27 - 40 1991.
136. WAGNER, H. and WOLFF, New natural products and plant drug with pharmacological, biological and therapeutical activity - Springer, Nova York, 1977.
137. WAGENITZ, G., Campanulatae. In Engler, A. Syllabus der pflanzenfamilien. Berlin. Gebruder Borntraeger, 1964.
138. WARD, R.S.; SATYANARAYANA, P.; RARNACHANDRA ROW, L.; GOPALA RAO, B.V., The case of a revised structure for hypophyllanthin an analysis of the <sup>13</sup>C NMR spectral of aryltetralins. Tetrahedron Letters, 32: 3043 - 46, 1979.
139. WILLIAMS, H.J.; RAY, A.C.; KIM, H.L., Piperidine alkaloids from the toxic plant Lobelia berlandieri J. Agr. Food. Chem., 35: 19 - 22, 1987.
140. WIMMER, E.F., Campanulaceae - Lobeliodeae, Suplementon et campanulaceae - Cyphioideae In . Enmgler, A. Das Pflanzenreich, 4: 1968.
141. YAZAKI, K.; HATANO, T.; AND OKUDA, T. Constituents of Geranium thumbergii Sieb. et Zucc. Part 14: Structures of didehydrogeraniin, furosinin, and furosin. J. Chem. Soc. Perkin , 1, pp. 2289 - 2296
142. YEAP FOO, L.; Amariin, A di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from Phyllanthus amarus , Phytochemistry, 33,n<sup>o</sup> 2, pp. 487 - 491, 1993

143. YEAP FOO, L.; Amariinic ACD and related ellagitaninins from *Phyllanthus amarus*, Phytochemistry, 39, n<sup>o</sup> 1, pp. 217 - 224, 1995.
144. YEH, S.F.; HONG, C.Y.; HUANG, Y.L.; LIU, T.Y.; CHOO, K.B.; CHOU, C.K., Effect of extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells. Antivirus Research. 20: 3, 185 - 192, 1993.
145. YOUNGKEN, H.W., Tratado de Farmacognosia, Ed. Atlante , S.A. México , 1959, p.671.
146. YOSHIDA, T. AND OKUDA, T. <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance spectra of corilagin and geraniin , Heterocycles, v. 14, n<sup>o</sup> 11, pp. 1743 - 1749, 1980.
147. ZHANG, M.Z.; WANG, J.C.; ZHOU, S.H., Alkaloids and triterpenoids of *Lobelia davidii*. Phytochemistry, 29: 1353, 1990.