

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

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANALGÉSICA E ANTIMICROBIANA DE *HEDYOSMUM  
BRASILIENSE* MART. EX. MIQ. (CHLORANTHACEAE).**

ALESSANDRO GUEDES


Dissertação submetida à Universidade de Santa Catarina para a obtenção do grau de  
“Mestre em Química”

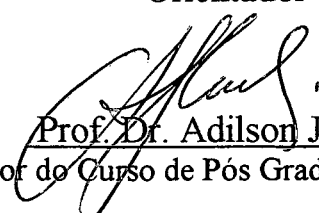
FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA, BRASIL  
Março 1997

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANALGÉSICA E ANTIMICROBIANA DE *Hedyosmum Brasiliense*  
MART. EX. MIQ.(CHLORANTHACEAE).**


**Alessandro Guedes**


Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora.

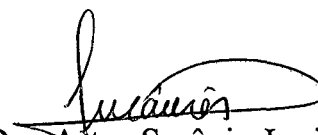
  
Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti  
Orientador

  
Prof. Dr. Adilson José Curtius  
Coordenador do Curso de Pós Graduação em Química.

Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

  
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

  
Prof. Dr. Artur Smânia Junior

Florianópolis, 07 de março de 1997.  
Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC

**“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito...Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que eramos.”**

**Martin Luther King**

Aos meus pais,  
Oswaldo e Jane  
pelo incentivo e dedicação  
em todos os momentos.

**A minha esposa,  
Marli pelo amor, compreensão  
e ajuda em todos os momentos  
deste trabalho**

## **Agradecimentos**

Ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti, pela orientação, apoio e incentivo.

Aos meus irmãos, por serem meus companheiros.

Aos colegas de laboratório : Jacir ,Tânia, Marize, Obdúlio, Niero, Inês e Renata pelos bons momentos e por tornarem a jornada mais amena.

Aos professores, que colaboraram para meu crescimento profissional.

Aos demais professores e amigos que colaboraram com a realização deste trabalho.

A CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro

Acima de tudo, à DEUS.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS.....   | iv |
| LISTA DE ESPECTROS.....   | vi |
| LISTA DE TABELAS .....  | ix |
| RESUMO.....   | x  |
| ABSTRACT.....   | xi |
| 1. - INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 2. - OBJETIVOS.....   | 2  |
| 3. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 3  |
| 3.1.- Considerações Gerais Sobre a Família Chloranthaceae.....  | 3  |
| 3.2.- Considerações Gerais Sobre o Gênero <i>Hedyosmum</i> .....  | 4  |
| 3.2.1.- Descrição Botânica do Gênero <i>Hedyosmum</i> SW. Segundo Reitz.                                | 5  |
| 3.3.- Considerações Gerais Sobre a Espécie <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart.<br>Ex. Miq.....           | 6  |
| 3.3.1.- Posição Taxonômica da Espécie <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart.<br>Ex. Miq .....               | 10 |
| 3.3.2.- Descrição Botânica da Espécie <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart.<br>Ex. Miq. Segundo Reitz..... | 11 |
| 3.4 -Características Químicas da Família Chloranthaceae.....  | 13 |
| 3.5- Atividades Biológicas Relacionadas Para a Família Chloranthaceae.....                              | 20 |
| 3.6- Proposta Biosintética Para os Sesquiterpenos com Núcleo Lindenano...                               | 21 |
| 4. - PARTE EXPERIMENTAL.....  | 25 |
| 4.1. - Materiais e Métodos. ....  | 25 |
| 4.2. - Coleta e Identificação da Planta.....  | 26 |
| 4.3. - Preparação dos Extratos.....   | 27 |
| 4.4. - Fracionamento dos Extratos Brutos Hidroalcoólicos.....   | 27 |
| 4.4.1 - Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico das Raízes<br>HBER.....                           | 27 |
| 4.4.2 Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico das Folhas HBEF                                     | 30 |

|   |    |
|---|----|
| 4.5. - Extração do Óleo Essencial.....  | 32 |
| 4.6. - Análise das Subfrações Obtidas do Extrato Hidroalcoólicos das Raízes HBER.....                                       | 32 |
| 4.6.1 - Análise da Subfração 45 do Extrato HBER.....  | 32 |
| 4.6.2 - Análise da Subfração Hexano Acetato de Etila 20% Obtida do Extrato Hidroalcoólico das Raízes HBER .....             | 32 |
| 4.6.3 - Análise da Subfração Acetato de Etila do Extrato Hidroalcoólico das Raízes HBER.....                                | 33 |
| 4.6.4. - Análise da Subfração Metanólica do Extrato Hidroalcoólico das Raízes HBER.....                                     | 34 |
| 4.7 - Análise das Subfrações Obtidas do Extrato Hidroalcoólico das Folhas....   | 35 |
| 4.7.1 - Análise da Subfração Hexano Acetato de Etila 30% do Extrato Hidroalcoólico das Folhas.....                          | 35 |
| 4.8- Acetilação do Composto HB-15.....  | 35 |
| 4.9- Hidrolise do Composto HB-AC22. ....  | 36 |
| 4.10- Ensaio Farmacológicos.....  | 36 |
| 4.10.1 - Animais.....   | 36 |
| 4.10.2- Preparação do Extrato Hidroalcoólico para os Testes Farmacológicos  | 36 |
| 4.10.3 - Análise Farmacológica .....  | 37 |
| 4.10.3.1 - Atividade Antinociceptiva.....   | 37 |
| 4.10.3.2 -Estudo do Possível Mecanismo de Ação Analgésica do EH e do Composto Obtido da Espécie <i>H. brasiliense</i> ..... | 41 |
| 4.10.4 - Análise Estatística.....   | 41 |
| 4.11- Ensaio Microbiológicos .....  | 42 |
| 5.- RESULTADOS E DISCURSSÃO.....  | 43 |
| 5.1- Método de Extração e Isolamento dos Compostos.....   | 43 |
| 5.2- Identificação do Composto HB-15 .....  | 45 |
| 5.3 - Identificação do Composto HB-8.....   | 71 |
| 5.4 - Identificação do Composto HB-5.....   | 87 |
| 5.5 - Identificação do Composto S2,811.....   | 96 |



|  |     |
|--|-----|
| 5.6 - Identificação do Composto HB-AC22.....   | 101 |
| 5.7 - Análise do Óleo Essencial.....   | 104 |
| 5.8 - Resultados Farmacológicos.....   | 110 |
| 5.8.1- Dor Induzida pela Injeção Intraperitoneal de Ácido Acético.....   | 110 |
| 5.8.2 - Dor Induzida pela Formalina.....   | 110 |
| 5.8.3 - Dor Induzida pela Capsaina.....  | 110 |
| 5.8.4 - Efeito do EH do Composto HB-15 Obtidos de <i>H. brasiliense</i><br>nos Testes de Tail-Flick e da Placa Quente..... | 111 |
| 5.8.5 - Estudo do Possível Mecanismo de Ação Antinociceptiva do EH<br>de <i>H. brasiliense</i> .....                       | 111 |
| 5.9 - Resultado dos Testes Antimicrobianos.....  | 118 |
| 6 - CONCLUSÕES.....  | 120 |
| 7 - BIBLIOGRAFIA.....  | 121 |
| ANEXO.....   | 127 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 1 - Aspecto Geral da Espécie <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. Ex Miq.....   | 8   |
| FIGURA 2 - Aspecto das Folhas de <i>Hedyosmum brasiliense</i> .....  | 9   |
| FIGURA 3 - Esquema Biosintético para o Isopentenil e o Dimetilalil Apartir do<br>Acido Acético.....  | 22  |
| FIGURA 4 - Esquema de Formação do Nucléo Lindenano.....  | 23  |
| FIGURA 5 - Esquema de Formação da Lactona.....   | 24  |
| FIGURA 6 - Esquema do Fracionamento do Extrato HBER Demonstrando as<br>Subfrações Obtidas.....   | 29  |
| FIGURA 7 - Esquema do Fracionamento do Extrato HBEF e as Subfrações<br>Obtidas.....  | 31  |
| FIGURA 8 - Esquema Demontra a Origem dos Compostos Isolados do Extrato<br>HBER.....  | 44  |
| FIGURA 9 - Estrutura Proposta para o Composto HB-15.....   | 48  |
| FIGURA 10 - Estrutura do Composto HB-15 Obtida Atráves de Análise por<br>Difração de Raio X .....  | 66  |
| FIGURA 11 - Estrutura Demonstrando a Ligação de Ponte de Hidrogênio<br>Intermoleculares que Ocorrem para Estabilizar a Rede Cristalina.....  | 67  |
| FIGURA 12 - Estrutura do Composto HB-15.....   | 70  |
| FIGURA 13 - Proposta Estrutural para o Composto HB-8.....  | 72  |
| FIGURA 14 - Estrutura do Stigmasrterol (A) e $\beta$ - Sitosterol (B).....   | 88  |
| FIGURA 15 - Cromatograma da Mistura HB-5 em CGAR Com Coluna.....   | 90  |
| FIGURA 16 - Cromatograma do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> em Coluna Apolar<br>OV-1.....  | 104 |
| FIGURA 17 - Efeito Analgésico Dose-Dependente Causado Pelo Extrato<br>Hidroalcoólico de <i>H. brasiliense</i> Admininstrado por Via Intraperitoneal<br>(A) ou Oral (B) em Relação as Contorções Abdominais Causadas pela<br>injeção de Ácido Acético em Camundongos..... | 112 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 18 -Efeito Analgésico Dose-Dependente Causado pelo Extrato Hidroalcoólico de <i>H. brasiliense</i> Administrado por Via Intraperitoneal ou Oral em Relação a Primeira (A), Segunda Fase (B) da Dor e Edema de Pata (C) Induzidos Pela Formalina..... | 113 |
| FIGURA 19 - Efeito Analgésico Dose-Dependente ausado pelo Composto Isolado de <i>H. brasiliense</i> Administrado por Via Intraperitoneal em Relação a Primeira (A), Segunda Fase (B) da Dor e Edema de Pata (C) Induzidos pela Formalina.....               | 114 |
| FIGURA 20 -Efeito Analgésico Dose-Dependente Causado pelo Extrato Hidroalcoólico de <i>H. brasiliense</i> Administrados por Via Intraperitoneal (A) ou pelo Composto Isolado (B) Sobre a Dor Induzida pela Capsaicina.....                                  | 115 |
| FIGURA 21 -Efeito do Tratamento dos Animais com Morfina e com o Extrato Hidroalcoólico de <i>H. brasiliense</i> Sobre a Dor Induzida no Testes da Placa Quente (A) e Tail-Flick (B) em Camundongos.....   | 116 |
| FIGURA 22 - Influência do Tratamento com Naloxona Sobre a Ação Antinociceptiva do Extrato Hidroalcoólico de <i>H. brasiliense</i> ou da Morfina Sobre a Primeira e a Segunda Fase do Teste da Formalina .....   | 117 |

## LISTA DE ESPECTROS

|  |    |
|--|----|
| ESPECTRO 1- A) Espectro de UV $\lambda_{\max}$ (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) do Composto HB-15.....   | 49 |
| ESPECTRO 2 - B) Espectro de IV (KBr) do Composto - HB-15.....  | 49 |
| ESPECTRO 3 - Espectro de Massas do Composto -HB-15.....  | 50 |
| ESPECTRO 4 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 Mhz) em CDCl <sub>3</sub> do composto HB-15..   | 51 |
| ESPECTRO 4a - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 Mhz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Ampliada de 20 a 155 ppm.....                         | 52 |
| ESPECTRO 5 - Espectro RMN <sup>13</sup> C/DEPT 135 do Composto HB-15.....  | 53 |
| ESPECTRO 6 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15...   | 54 |
| ESPECTRO 6a - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Expandido na Região de 0.7 ppm a 3.2 ppm.....          | 55 |
| ESPECTRO 7-Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Irradiado a 1.68 ppm.....                                 | 56 |
| ESPECTRO 7a - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Irradiado a 0.94 ppm.....                              | 57 |
| ESPECTRO 7b - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Irradiado a 2.0 ppm.....                               | 58 |
| ESPECTRO 7c - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Irradiado a 2.37 ppm.....                              | 59 |
| ESPECTRO 7d - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Irradiado a 2.97 ppm.....                              | 60 |
| ESPECTRO 8 - Espectro de RMN HETCOR do Composto HB-15.....   | 61 |
| ESPECTRO 9 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Acetilado.....  | 62 |
| ESPECTRO 9a -Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-15<br>Acetilado Expandido na Região de 0.6 ppm a 3.6 ppm..... | 63 |
| ESPECTRO 10 -Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (50MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-<br>15 Acetilado.....                                      | 64 |
| ESPECTRO 11 - Espectro de RMN COSY do Composto HB-15 Acetilado.....  | 65 |

|  |    |
|--|----|
| ESPECTRO 12 - Espectro de IV (KBr) do Composto HB-8 .....  | 74 |
| ESPECTRO 13 - Espectro de Massas do composto HB-8.....   | 75 |
| ESPECTRO 14 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50MHz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-8....  | 76 |
| ESPECTRO 14a -Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50mhz) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-8<br>Expandido na Região de 5 ppm a 55 ppm.....      | 77 |
| ESPECTRO 15 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT do Composto HB-8.....   | 78 |
| ESPECTRO 16 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-8...  | 79 |
| ESPECTRO 16a -Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-<br>8 Expandido na Região de 1.5 ppm a 3.2 ppm..... | 80 |
| ESPECTRO 17 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) em CDCl <sub>3</sub> Co composto HB-<br>8 Irradiado na Região de 1.97 ppm.....          | 81 |
| ESPECTRO 17a -Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-8<br>Irradiado na Região de 2.4 ppm.....            | 82 |
| ESPECTRO 17b -Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-8<br>Irradiado na Região de 2.60 ppm.....           | 83 |
| ESPECTRO 17c -Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) em CDCl <sub>3</sub> do Composto HB-<br>8 Irradiado na Região de 4.1 ppm.....           | 84 |
| ESPECTRO 18 - Espectro de RMN COSY do Composto HB-8.....   | 85 |
| ESPECTRO 19 - Espectro de RMN HETCOR do Composto HB-8.....   | 86 |
| ESPECTRO 20- Espectro de IV (KBr) do Composto HB-5.....  | 89 |
| ESPECTRO 21 - Espectro de Massas do Composto Eluído a 26.63 min.....   | 91 |
| ESPECTRO 22 - Espectro de Massas do Composto Eluido e 27.33 min.....   | 92 |
| ESPECTRO 23 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200MHZ) em CDCl <sub>3</sub> da Mistura HB-5.....  | 93 |
| ESPECTRO 24 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (50MHZ) em CDCl <sub>3</sub> da Mistura HB-5.   | 94 |
| ESPECTRO 25 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/ DEPT da Mistura HB-5.....   | 95 |
| ESPECTRO 26 - Espectro de IV (Kbr) do Composto S2-811.....   | 97 |
| ESPECTRO 27 - Espectro de Massas do Composto S2-811.....   | 98 |
| ESPECTRO 28- Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200MHZ) em CD <sub>3</sub> OD do Composto S2-<br>811.....                                      | 99 |

|   |     |
|---|-----|
| ESPECTRO 29- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHZ) em $\text{CD}_3\text{OD}$ do Composto S2-811.....                | 100 |
| ESPECTRO 30 - Espectro de IV (KBr) do Composto HB-AC22.....   | 102 |
| ESPECTRO 31- Espectro de Massas da Fração Aglicona do Composto HB-AC22. Após Hidrolise Ácida.....                         | 103 |
| ESPECTRO 32 - Espectro de Massas do Composto Sabinemo Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasilienses</i> .....            | 105 |
| ESPECTRO 33 - Espectro de Massas do Composto $\alpha$ -pineno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....     | 105 |
| ESPECTRO 34 - Espectro de Massas do Composto $\alpha$ -felandreno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> ..... | 106 |
| ESPECTRO 35 - Espectro de Massas do Composto p-cimeno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....             | 106 |
| ESPECTRO 36 - Espectro de Massas do Composto $\beta$ -felandreno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....  | 107 |
| ESPECTRO 37 - Espectro de Massas do Composto Terpeneol-4 Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....          | 107 |
| ESPECTRO 38 - Espectro de Massas do Composto Caraleno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....             | 108 |
| ESPECTRO 39 - Espectro de Massas do Composto Cadineno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....             | 108 |
| ESPECTRO 40 - Espectro de Massas do Composto $\alpha$ -Humuleno Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....   | 109 |
| ESPECTRO 41 - Espectro de Massas do Composto Espatulenol Obtido do Óleo Essencial de <i>H. brasiliense</i> .....          | 109 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1- Fracionamento do Extrato Bruto HBER Mostrando a Taxa de Gradiente e as Frações Resultantes.....   | 28  |
| TABELA 2- Fracionamento do Extrato HBEF Mostrando a Taxa de Gradiente e as Frações Resultantes.....   | 30  |
| TABELA 3- Dados de RMN do Composto HB-15 <sup>13</sup> C (50 Mhz) DEPT e <sup>1</sup> H (200 Mhz) e Suas Conectividades Atribuídas por Análise de HETCOR e Irradiação Seletiva..... | 48  |
| TABELA 4- Distância de Ligação em Å para o Composto HB-15 Determinados por Difração de Raio X.....  | 68  |
| TABELA 5- Ângulo de Ligação Entre os Átomos do Composto HB-15 em Graus.....   | 69  |
| TABELA 6- Dados de RMN <sup>13</sup> C (50 Mhz) DEPT e <sup>1</sup> H (200 Mhz) e Suas Conectividades Obtidas por HETCOR, COSY e IRR do Composto HB-8.....                          | 73  |
| TABELA 7- Atividade Antibacteriana das Frações Obtidas e dos Compostos Isolados HB-15 e HB-8, Determinadas pelo Teste de Difusão gm Gel, Valores Expressos Em Mg.....               | 118 |

## RESUMO

*Hedyosmum brasiliense*, planta utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de enxaquecas, doenças do ovários entre outras afecções.

O extrato bruto hidroalcoólico das folhas e das raízes (HBEF e HBER) analisados através de várias técnicas cromatográficas, que permitiram o isolamento de várias substâncias de origem terpênica e de um ácido dicarboxílico.

A estrutura de um sesquiterpenolactona com núcleo lindenano **HB-15**, foi identificado como sendo o composto Onoseriolídeo. Sua estrutura foi confirmada através da análise por difração de Raio X.

A identificação dos fitoesteróis conhecidos como stigmaterol e  $\beta$ -sitoesterol foi realizada através de técnicas espectroscópicas (IV, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , CG-EM) e CG com coinjeção de padrões.

Além destes compostos foi isolado um ácido dicarboxílico **S2-811** conhecido como ácido fumárico, um sesquiterpeno lactona **HB-8** e um fitoesterol glicosídico identificado como  $\beta$ -sitoesterol glicosídico.

Analisado farmacologicamente o extrato bruto **EH** e o composto **HB-15**, apresentou importante atividade analgésica, sendo que o **EH** inibiu de forma dose-dependente as contorções abdominais induzida pelo ácido acético com dose inibitória 50% ( $\text{ID}_{50}$ ) de 13 mg/kg, inibição máxima **IM** de  $91 \pm 4\%$ , sendo efetivo por até 4 horas. O **EH** (10-100 mg/kg, i.p.) e o composto **HB-5** (30-150 mg/kg, i.p.) inibiram de forma significativa ambas as fases da dor induzidas pela formalina. As  $\text{DI}_{50}$ s foram: 31,1 e 33,1 para a primeira fase e 21,7 e 87,9 para a segunda fase, com inibição máxima de  $71 \pm 4$ ,  $85 \pm 8$ ,  $91 \pm 9$  e  $90 \pm 7$ , respectivamente.

As análises da atividade antimicrobiana demonstram que o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico das raízes **HBER** e o extrato hidroalcoólico das folhas **HBEF** foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no volume de 50, 40, 12,5 mg respectivamente.

O composto **HB-8** apresentou uma concentração mínima inibitória (c.m.i.) de 1,75mg/ml para *P. aeruginosa* enquanto o composto **HB-15** apresentou c.m.i. de 0,44mg/ml e concentração mínima bactericida (c.m.b.) de 1,75mg/ml contra *S. aureus*.

Desta forma, a análise destes resultados demonstram que *Hedyosmum brasiliense* apresenta forte efeito analgésico e importante atividade antimicrobiana, justificando em parte sua utilização na medicina popular.



## ABSTRACT

*Hedyosmun brasiliense* is used in Brazil folk medicinal to treatment of megrim, diseases of ovary and other affections, this present study was therefore, to isolate and identify the components responsible for the analgesic and antibacterial activity of this plant.

The crude extract (EH) was subjected to several chromatographic technics permitted a isolation the uncommon sesquiterpenlactone called onoseriolid (HB-15), this compound were characterized from their spectroscopic data and confirmed by X-ray analysis. In addition were isolated and identificados other terpenics components and one carboxilic acid, the structures these compounds were established by comparison of their spretral datas (IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ - NMR, mass and other technics spectroscopy) with those reported in the literature.

The pharmacological studies showed that the crude extract EH and the isolated sesquiterpenlactone HB-15 exhibited potent analgesic activity, The EH dose-dependently inhibiting acetic acid induced nociception in mice with inhibitory dose  $\text{ID}_{50}$  13mg /Kg and inhibition maxim IM  $91 \pm 4\%$ , remain ativity for four hours. Both the EH and compound HB-15 dose-dependently inhibiting both phases of pain induced by formalin in mice. The  $\text{ID}_{50\text{s}}$  31.1 and 33.1 for the first phase and 21.7 and 87.9 for the second phase, with MI  $71 \pm 4$ ,  $85 \pm 8$ ,  $91 \pm 9$  and  $90 \pm 7$ , respectively.

The study of antibacterial activity showed that the essential oil, the hidroalcoholic extract of roots (HBER) and of leaves (HBEF) exhibited activity against *Staphylococcus aureus*, and only the HBEF showed activity against *Escherichia coli*.

The compound HB-8 showed an minimal inhibitory concentration (M.I.C) 1.75mg/ml for *Pseudomonas aeruginosa* and the compound HB-15 showed an M.I.C. 0,44mg/ml and an minimal bactericidal concentration (M.B.C). 1,75mg/ml against *S. aureus*.

These results indicate that, *Hedyosmun brasiliense* exhibit potent analgesic e antibacterial properties, In summary, it may be concluded that the results obtained in this study could patly justify the popular use of *H. brasiliense*.

## 1. - INTRODUÇÃO.

O Brasil possui em torno de 40 a 200 mil espécies vegetais, correspondendo aproximadamente a um terço da existente no planeta, sendo que dez mil destas são utilizadas como plantas medicinais. Assim, a flora brasileira é considerada uma das floras mais ricas do mundo. O Brasil apesar disso é um grande importador de plantas e matérias primas vegetais<sup>1</sup>.

O potencial químico desta flora, despertou as indústrias químico farmacêuticas, que a tem explorado de forma desorganizada e indiscriminada, provocando danos irreparáveis a esse laboratório vivo que demonstra ainda ser uma das mais importantes fontes para obtenção de novos fármacos, como exemplo, o ácido acetil salicílico (Aspirina) que foi isolado pela primeira vez de *Salix alba*<sup>2</sup>.

Estas questões, junto da estimativa de que 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são quase completamente dependentes da medicina caseira, utilizando-se de plantas para suas necessidades básicas de saúde<sup>2</sup>, reforçam a necessidade de mais estudos nessa área.

*H. brasiliense*, pertencente a família Chloranthaceae. É conhecida por vários nomes populares em diferentes regiões do Brasil como, âmbar vegetal, canela cânfora, chá de índio, chá de soldado, chá de bugre, erva almíscar, hortelã do brejo, hortelã silvestre, cidreira e erva cidreira, os dois últimos mais usados em Santa Catarina<sup>3,4</sup>.

Muito comum no centro e sul do país, é amplamente utilizada na medicina popular devido a seus princípios aromáticos, analépticos e febrífugos, sendo recomendada para o tratamento de enxaquecas, doenças do ovário, frieiras e reumatismos causados pelo frio<sup>3</sup>.

Por ser uma planta de rápido desenvolvimento e fácil cultivo, esta poderá vir a ter grande importância econômica como matéria prima para produção de fitoterápicos ou como chá, uma vez que a infusão das folhas de *H. brasiliense* é semelhante ao chá da índia, bem conhecido no mercado<sup>3,4</sup>.

Pelos motivos expostos desenvolvemos estudos sobre a constituição química e a atividade biológica de *H. brasiliense*.

## 2. - OBJETIVOS

### Objetivos gerais:

Isolar e identificar os compostos majoritários de *Hedyosmum brasiliense*, através de diferentes técnicas cromatográficas.

### Objetivos específicos:

Determinar a estrutura dos compostos isolados através de técnicas espectroscópicas de UV, IV, EM, RMN e Raio X, e realizar modificações estruturais quando necessárias.

Fracionar o extrato bruto em grupos de compostos, segundo sua polaridade e controle de suas atividades farmacológicas e antimicrobianas.

Realizar análise farmacológica e antimicrobiana dos compostos isolados, para determinar se possível, o(s) composto(s) ativo(s).

### 3. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

#### 3.1- Considerações Gerais Sobre a Família Chloranthaceae.

Chloranthaceae R. Brow ex. Lindley (1821) é um nome preservado da família Chloranthus cujo vocábulo é de origem grega e significa “flor verde-claro”, de Chloros = verde claro e ánthos = flor<sup>3,4</sup>. Essa família é composta por apenas 5 gêneros e cerca de 70 espécies<sup>4,5,6</sup>, sendo que o gênero Hedyosmum possui o maior número de espécies 45, Chloranthus com 15 espécies, Ascarina com 11 espécies, Sarcandra com 3 espécies e Ascarinopsis com somente 1 espécie. Cárdenas<sup>7</sup> e Todzias<sup>8</sup> excluem o gênero Ascarinopsis, enquanto Reitz<sup>3</sup> cita apenas três gêneros e 78 espécies.

A família Chloranthaceae caracteriza-se pelo porte herbáceo e arbustivo com ramos marcados por nós e entrenós acentuados, ou arbóreas com folhas opostas muitas vezes com bordas serradas, tendo os pecíolos soldados na base formando uma espécie de bainha pequena e com estípulas. Flores dispostas em inflorescências axilares, pequenas flores hermafroditas (Chloranthus) ou de sexos separados (Hedyosmum)<sup>3,4,5,6</sup>.

Família com muitas características de plantas anemófilas<sup>6</sup>.

As plantas da família, distribuem-se pelas regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo no Brasil nas regiões sul e sudeste, segundo Reitz<sup>3</sup>, ocorrendo também na América tropical, Polinésia, Ásia tropical e subtropical, mais raramente na Ásia boreal, inexistente na África e Europa<sup>4</sup>. Esta representada no Brasil apenas pelo gênero Hedyosmum, quanto as espécies existentes no Brasil, existem divergências na literatura, Joly<sup>5</sup> indica uma única espécie denominado como *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex. Miq. Barroso<sup>6</sup> indica a presença de 15 a 5 espécies.

De acordo com Joly<sup>5</sup>, essa família não tem grande importância econômica, de um modo geral a importância da família está no seu emprego na medicina popular principalmente para o gênero Chloranthus e Hedyosmum e no seu cultivo como plantas ornamentais<sup>3,4,6,9</sup>, como demonstramos com alguns exemplos abaixo:

- *Ascarina polustachis* Forts - no Taití, sua utilização é devido as suas propriedades aromáticas<sup>10</sup>;
- *Chloranthus inconspicuus* - usada na China, para perfumar chás<sup>11</sup>;
- *Chloranthus officinales* Blume. - sua raiz é utilizada como febrífugo<sup>12</sup>;
- *Hedyosmum nutans* Sw. - nas Antilhas é considerado como estomáquico<sup>13</sup>;
- *Hedyosmum blompaladium* - na Colômbia é usada como analgésico<sup>7</sup>;
- *Chloranthus japonicus* - no Japão é utilizada como antifúngico<sup>14</sup>;
- *Sarcandra glabra* (Thunb) Nakai - nas regiões sudeste do pacífico, é cultivado como planta ornamental<sup>12</sup>;
- *Chloranthus glaber* - na China utilizado como antibacteriano e antitumoral<sup>9</sup>;

### **3.2 Considerações Gerais Sobre o Gênero Hedyosmum .**

O nome do gênero provêm do grego “hedy-osmos” e significa que “cheira doce”, ou “de odor agradável” devido ao aroma agradável que emana de suas folhas<sup>3, 4</sup>. Sua espécie genérica é o *Hedyosmum nutans* Swart.<sup>3</sup>, e as espécies deste gênero, estão distribuídas pela América tropical e subtropical do México até o Peru, Bolívia, Paraguai, centro e sul do Brasil, sendo em Santa Catarina, no município de Palhoça, seu limite austral<sup>3, 4</sup>.

As espécies encontradas na Índia, não ocorrem em nenhum outro lugar e o *Hedyosmum orientale* é encontrado somente no sudeste da Ásia<sup>4</sup>.

Segundo Todzias<sup>8</sup>, as plantas do gênero *Hedyosmum* tem seu habitat principal em lugares frios e úmidos ocorrendo em flora de montanha com altitude em torno de 600 a 3000 metros.

Algumas espécies, como *Hedyosmum racemosum*, têm ampla tolerância ecológica, ocorrendo desde florestas úmidas, até florestas tropicais de montanhas.

O gênero apresenta pequena periodicidade de floração, frutificação ou aparecimento de folhas jovens. As folhas senescentes são substituídas por novas folhas, sendo que todas as espécies permanecem verdes durante todo o ano<sup>8</sup>.

Várias espécies do gênero, são citadas pela medicina popular utilizadas para o tratamento de uma grande variedade de enfermidades, a saber:

- *Hedyosmum sprucei* - no Equador, contra mordida de cobra e inchaços<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum crenatum* - na Venezuela, contra gripe e também utilizado como fumo<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum scaberrimum* - no Panamá, utilizada pelos índios Una contra dor de cabeça e problemas de estômago<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum scabrum* - no Equador, usada nas disfunções estomacais e para estimular a concepção<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum angustifolium* - no Peru, Bolívia e nos Andes, usada amplamente como chá<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum maximum* - na Bolívia, é empregada como bebida estimulante<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum cumbalense* - na Colômbia e Equador, é utilizada contra cólicas, problemas estomacais e depressão. As folhas são utilizadas para flavorizar bebidas alcoólicas<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum cuatrecazanum* - na Colômbia, Equador e Peru é utilizada como chá medicinal e no Peru a madeira é usada como lenha<sup>8</sup>;
- *Hedyosmum brasiliense* - no Brasil, recomendado contra enxaquecas, doenças do ovários, frieiras e reumatismo causados pelo frio<sup>3, 4, 15</sup>;
- *Hedyosmum bonplandianum* - na Colômbia, é utilizada para acalmar a dor e como antitérmico<sup>7</sup>.

### **3.2.1 Descrição Botânica do Gênero Hedyosmum SW. Segundo Reitz.**

“*Hedyosmum*\*\*Sw. Prodr. fl. Ind. OCC. 847.1788. Miguel in Martii Fl. Brasil. 4(1): 4. 1852 Tafalia Ruiz et Pav. Prodr. 136. t. 29. 1794.

INFLORESCÊNCIA com flôres unissexuais, sendo as plantas monóicas ou dióicas. FLÔRES MASCULINAS em espigas, sésseis, com um estame, inteiramente destituídas de brácteas; anteras biloculares, com os lóculos paralelos; conectivos superando as tecas e apiculado ou truncado, isto é plano. FLÔRES FEMININAS tanto em glomérulos ramificados em muitas flôres, como cimosas, cimeiras, ou isoladas na axila das folhas, ou se

dispõe em pseudo-racimos, mais ou menos ramificados, com 1-5 flôres, bracteadas, sendo as brácteas freqüentemente soldadas; ovário ínfero, glabro, triangular, coroado pelo perigônio subtubuloso e tridentado no ápice; estigma filiforme, liguiforme ou subclavado, irregularmente trilado, asas alternando com os lacínios do perigônio.

FRUTO drupa subcarnosa, com endocarpo duro, nua ou circundada por brácteas persistentes e soldadas entre si; embrião muito reduzido, incluído em abundante endosperma, quase indiviso, com os cotilédones insignificantes.

ÁRVORES e arbustos aromáticos, resiníferos. RAMOS opostos, articulados entre os nós, por um espaço mais ou menos longo, soldados com o ramo que lhe deu origem. FOLHAS decussadas, peninérvias, em sua maioria serreadas, pecioladas, estipuladas com as estípulas livres só no ápice e soldadas com o pecíolo em uma bainha muito grande, em forma de ócrea e frouxamente amplexicaule.

### **3.3 Considerações Gerais Sobre a Espécie *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. Miq.**

A espécie está presente na Bolívia, Paraguai e Brasil. No Brasil pode ser encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina<sup>3, 4</sup>. Sendo uma espécie desjunta que ocorre no Brasil central e estende-se até o sul<sup>8</sup>.

Em Santa Catarina, a espécie *H. brasiliense* encontra-se presente nos municípios de Araquari, Brusque, Itajaí, São Francisco do Sul, Garuva e Palhoça este último seu possível limite austral<sup>3</sup>, planta com habitat quase que exclusivamente nas margens de rios ou locais onde se encontra bastante água, independente da estação do ano<sup>4</sup>, sendo uma espécie exclusiva da floresta pluvial da encosta Atlântica, em Santa Catarina entre os municípios de São Francisco do Sul e Araquari, ocorre de preferência nas planícies costeiras, chegando a ser em algumas ocasiões, a espécie de maior importância no extrato

médio. Apresentando em determinadas regiões, uma densidade de 15 indivíduos por 100m<sup>2</sup>. No interior da floresta pluvial, sua presença é muito irregular e descontínua<sup>3,4</sup>.

É uma planta perene folheada, floresce de outubro a março e frutifica de janeiro a abril<sup>3</sup>.

*H. brasiliense* segundo Occhioni<sup>10</sup>, possui características de plantas anemófilas devido as dimensões e características de seu pólen. A forma feminina predomina na natureza<sup>3</sup>.

Esta espécie é muito utilizada na medicina popular para combater várias enfermidades, desta forma, sua maior importância está na sua utilização como planta medicinal<sup>3,4,15</sup>.

Levantamentos bibliográficos junto ao Chemical Abstract, Chemical Research e Biological Abstract, não apresentaram nenhuma referência ao estudo químico da espécie *H. brasiliense*. e somente um artigo foi encontrado sobre o gênero *Hedyosmum*.

No entanto, foram encontrados alguns trabalhos apresentados nos anais do XII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais do Brasil 1992<sup>16,17</sup>, que abordaram somente a análise cromatográfica do óleo essencial de *H. brasiliense*.



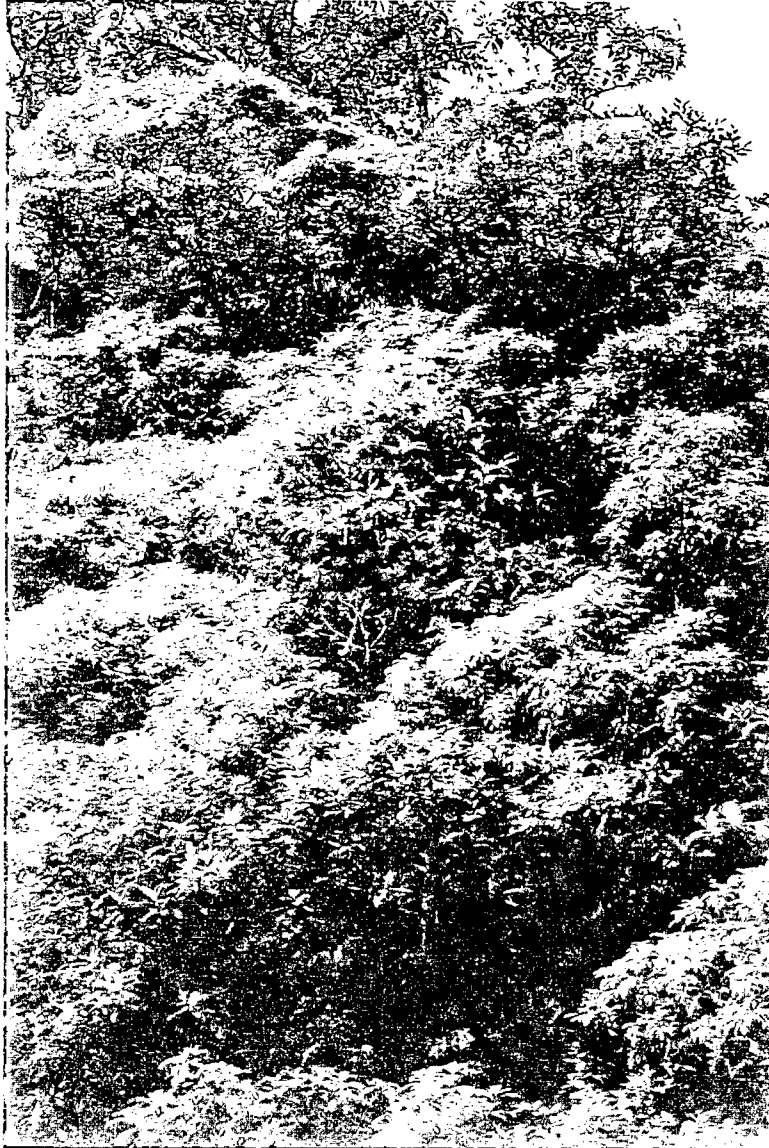


FIGURA 1- Aspecto geral da espécie *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq.



FIGURA 2- Aspecto das folhas de *Hedyosmum brasiliense*.

### **3.3.1 Posição Taxonômica da Espécie *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. Miq.**

Classificação taxonômica segundo Engler (1964)<sup>4,6</sup> :

|           |   |
|-----------|---|
| Divisão   | Angiospermae                                |
| Classe    | Dicotyledoneae                              |
| Subclasse | Archiclamydeae                              |
| Ordem     | Piperales                                   |
| Família   | Chloranthaceae                              |
| Gênero    | Hedyosmum                                   |
| Espécie   | <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex. Miq. |

Classificação taxonômica segundo Cronquist<sup>11</sup>:

|           |   |
|-----------|---|
| Divisão   | Magnoliophyta                               |
| Classe    | Magnoliopsida                               |
| Subclasse | Magnoliidae                                 |
| Ordem     | Piperales                                   |
| Família   | Chloranthaceae                              |
| Gênero    | Hedyosmum                                   |
| Espécie   | <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex. Miq. |

**3.3.2. Descrição Botânica da Espécie *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. Miq. Segundo Reitz :**

“*Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. Miq., Miguel In Fl., Brasil, 4(1):3.1852; *Hedyosmum bonplandiamum* Mart. Syst. Mat. Medicae 100, non HBK; *H. acutifollum* Cordem ex. Baill, Adansonia 3:306.1862-3; *H. weddellianum* Cordem. ex. Baill. Adansonia 3:306,1862-3.

ARBUSTO dióico, 3-6 m, caule ereto, curto, cilíndrico, frequentemente noduloso nos pontos correspondentes aos ramos caídos. RAMOS decussados, angulados, (também cilíndricos quando vivos), entre-nó espessado. FOLHAS muito variadas, glabérrimas, luzídias, herbáceas (secas subcoriáceas), oblongas ou oval oblongas, base cuneada, ápice acuminado, margens comumentes serreadas, subserreadas, mais raramente crenadas subcrenadas ou subinteiras havendo exemplares em que na mesma planta, aparecerem todos estes tipos de margens folheares, limbo 5-30 cm de compr., 3-7 cm de larg., pecíolo pouco marginado, 5-20 mm de compr., costa saliente, espessa, nervuras secundárias 14-18, arco-paraleras, evidentes; bainha arroxeadada (in vivo), carnosa ventricosas ob-piramidal, 10-12 mm de alt., estípulas filiformes ou assoveladas simples ou com maior frequência plurilaciniadas.

INFLORESCÊNCIA: CIMAS FEMININAS dispostas em pequenas e densas panículas, pedúnculo glabérrimo, anguloso, 1-4 mm de diâmetro por 2-6 cm de compr., cimas bi ou mais freqüentemente triflóras, raro com mais flôres: flôres pequenas, esverdeadas, inodoras, sésseis, brácteas carnosas e unidas entre si, sub-orbiculares e ultrapassando o ovário; ovário trígono, 3-4 mm de compr. por 1-2 mm de diâmetro, ápice coroado por cálice com 3 lacínias curtas, de aspecto ciatiforme, estigma curto 1-1,5 mm de compr., deltóide ou de ápice triangular, margens densamente papilosas; óvulo ovalado, com 600 micra de compr. por 380 micra de diâmetro na extremidade inferior, brácteas foliáceas, ovais, acuminadas, margens serreadas, 4-18 mm de compr. por 2-10 mm de larg. ESPIGAS MASCULINAS ovais ou

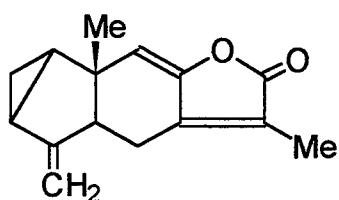
cilíndricas, 6-15 mm de compr., dispostas em panículas axiliares pouco ramificadas, pedúnculo cilíndrico ou sub anguloso, 2-4 cm de compr., glabro; brácteas lineares ou triangulares lanceoladas, 1,5 - 5 mm de compr. por 1mm de larg., anteras sésseis, imbricadas, quadrado-cuneadas, 1-5 mm de compr. por 600-700 micra de diâmetro no ápice, deiscência longitudinal por 2 fendas; pólen de cor amarelo-sulfúrea, abundantíssimo, esférico ou oval, exina lisa, poro germinativo único em fenda, monocolpado.

FRUTO, pequena drupa, 3-5mm de compr. por 2-3mm de diâmetro, trígono, ápice carunculado, endocarpo liso de consistência pétrea, brácteas envolventes carnosas e durante a maturação são de viva coloração branco-láctea.

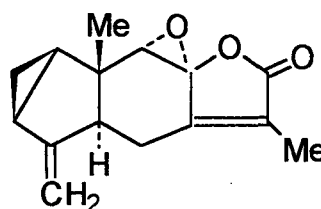
### 3.4. - Características Químicas da Família Chloranthaceae.

A constituição química da família Chloranthaceae é ricamente discutida para os taxôns do gênero *Chloranthus* em relação aos demais. Citamos abaixo alguns dos resultados obtidos junto a literatura utilizando Chemical Abstract e Medline:

*Chloranthus glaber* Makino: foram isolados Chlorantholactona A(1) e B(2)<sup>18</sup>,

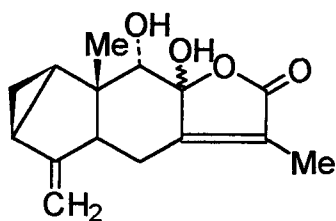


1

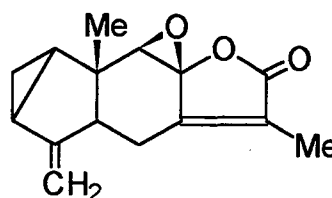


2

Chlorantholactona E(3) e F(4),  $(-)-4-\beta 7\alpha$  dihydroxyacoromadendrano, Atractylenolide<sup>9</sup>,

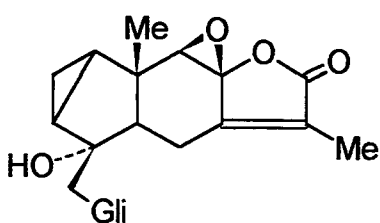


3

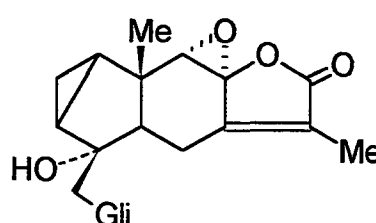


4

Chloranosideo A(5) e B(6)<sup>19</sup>,

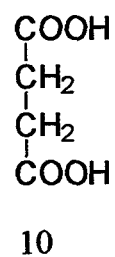
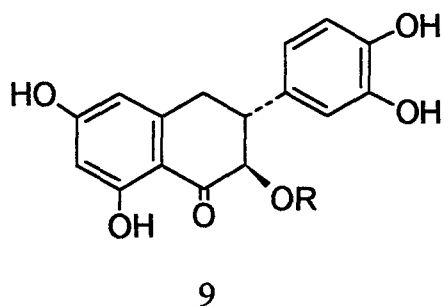
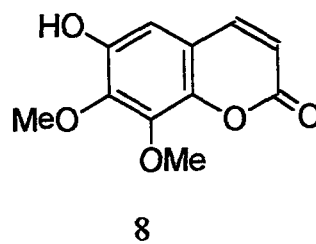
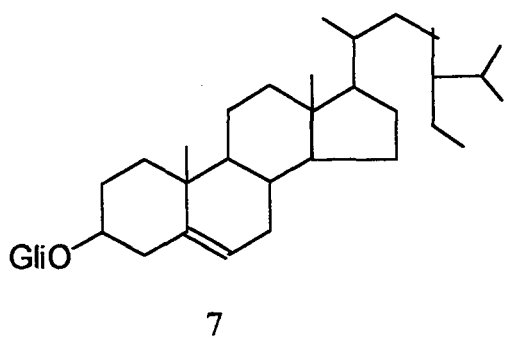


5

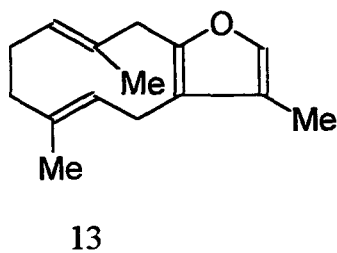
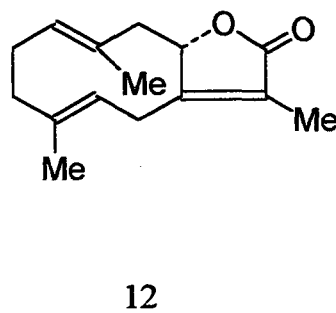
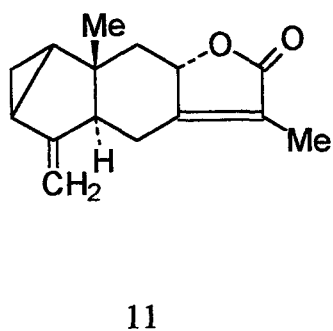


6

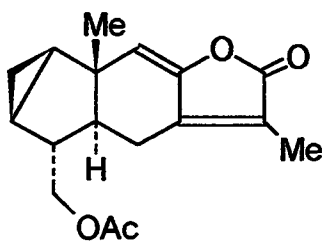
$\beta$ -sistosterol-D-O-Glicosídeo(7), Isofraxidina(8), Astilbina(9)<sup>20</sup>, Ácido succínico(10)<sup>21</sup>,



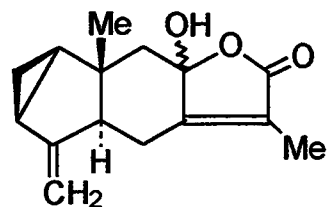
*Chloranthus japonicus* foram isolados: Shizukanolide(11), Chlorantholactona A(1) (DihidroShizukanolide), Glechomanolide(12), Isofuranodieno(13)<sup>9, 22</sup>,



Chlorantholactona B(2), C(14), D(15), E(3), F(4) Atractlylenolide<sup>14, 23</sup>,

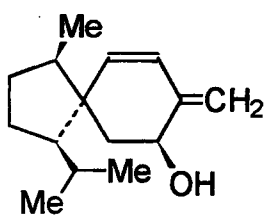


14

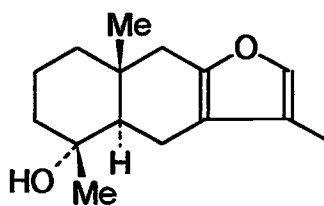


15

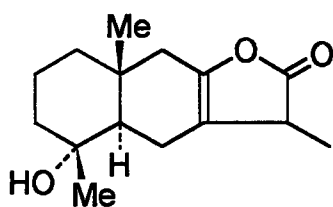
Shizuka-acoradienol(16), Shizukafuranol(17), Shizukolidol(18), Furanodienona(19), Escopoletina(20a), Isoescopoletina(20b)<sup>24</sup>,



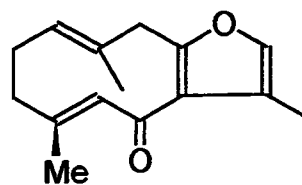
16



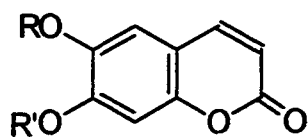
17



18



19

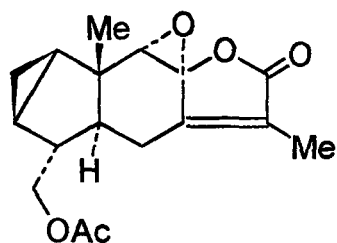


20a R= Me, R'= H

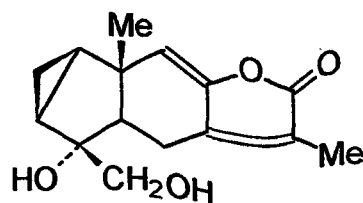
20b R=H, R'= Me

Shizukanolide D(21), E(22), e F(23)<sup>25</sup>,

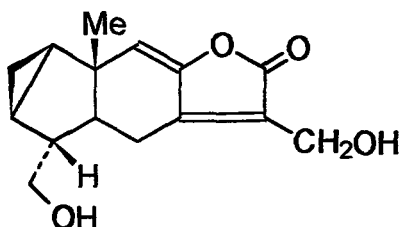




21

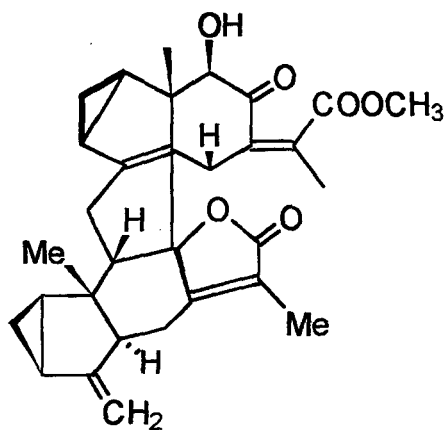


22

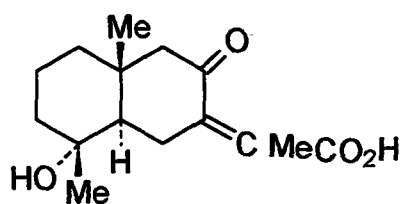


23

Shizukaol A (24)<sup>26</sup>, Ácido Chlothalico (25)<sup>27</sup>.

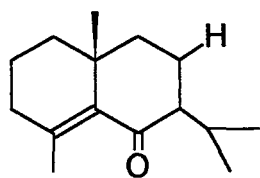


24

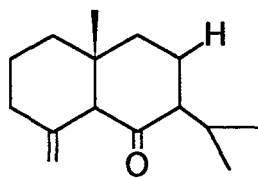


25

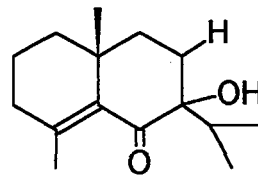
*Chloranthus serratus* foram isolados: N-fenil-3(3,4-metilenodioxyfenil e N-fenil-3 (3,4-dimetoxifenil)propenamida, (-)-dihidropirocurzerenona, Pirocurzerenona, Neoacolanona(26), Acolanona(27), 7 $\alpha$ -hidroxineoacolanona(28), Acoragermacrona(29), Zederona(30),



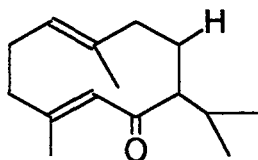
26



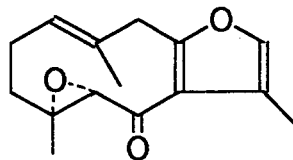
27



28

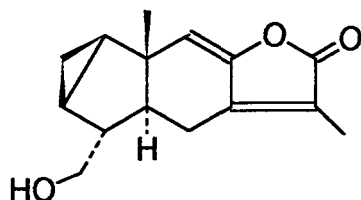


29



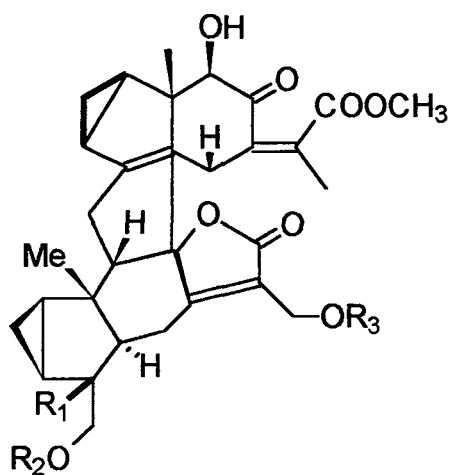
30

Isofuradieno(13), Furanodienona(19), Chloranthalactona C(14), Shizukanolide C(31)<sup>28</sup> e E(22) e F(23)<sup>25</sup>.

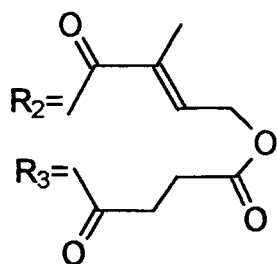


31

Além de vários dímeros como Shizukaol A(24), B(32), C(33), D(34)<sup>29</sup> juntamente com,

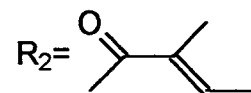


R<sub>1</sub>=OH



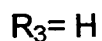
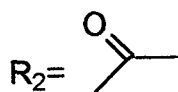
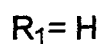
32

R<sub>1</sub>=OH



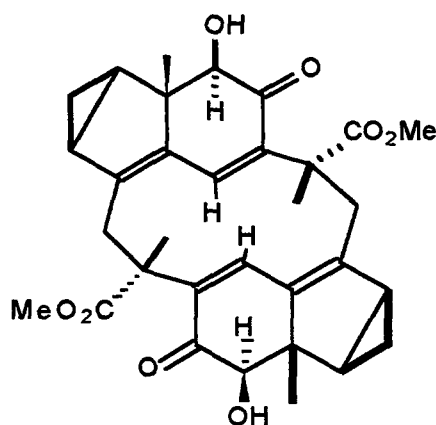
R<sub>3</sub>=H

33



34

um sesquiterpeno dimérico macrocíclico Ciclo shizukaol A (35)<sup>30</sup>.

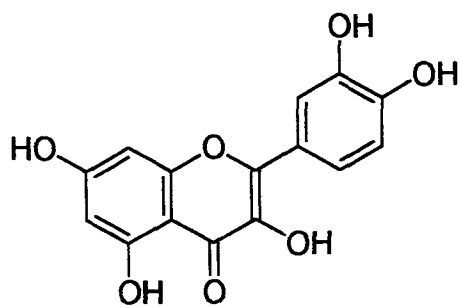


35

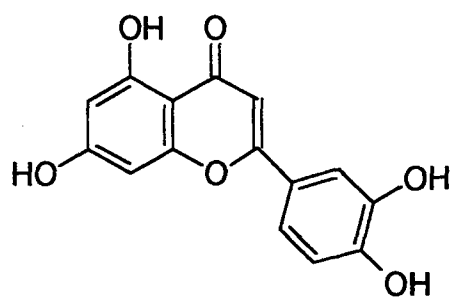
*Chloranthus Spicatus*: Do óleo essencial das flores foram isolados 11 monoterpenos, 11 sesquiterpenos e 7 compostos contendo oxigênio tendo como constituintes principais Cis-metiljasmonato, Cis  $\beta$ -ocinemo e  $\beta$ -pineno<sup>31</sup>.

*Chloranthus hostelgirus*:  $\beta$ -sistosterol,  $\beta$ -sistosterol D-O-glicosídeo (7), Ácido palmítico, Fraxidin 8-O- $\beta$  glicosídeo e Chlorantholactona C (14)<sup>32</sup>.

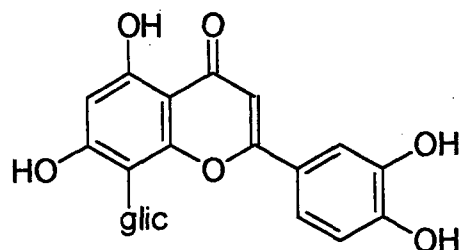
*Ascarina Lucida Hook*: Quercitina(36), Kaemperol 3-o-mono e diglicosídeo, Orientina(37), Isoorientina, Vitexina(38), Isovitexina<sup>33</sup>.



36

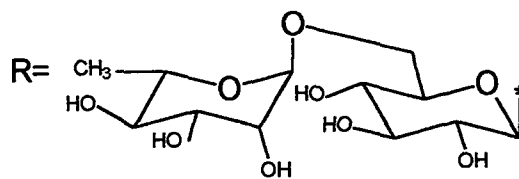
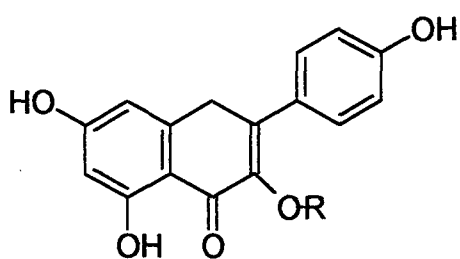


37

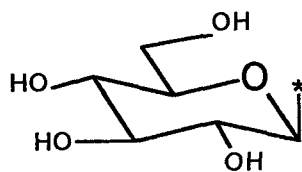


38

*Hedyosmum bonplandianum*: Kaempferol 3-O- $\{\alpha$ -L-rhamnopyranosil(1-6)- $\beta$ -D-glicopiranosideo(39) e Kaempferol 3-O-( $\beta$ -D-glicopinasideo)(40)<sup>7</sup>.



39



40

Portanto, o perfil químico da família Chloranthaceae segundo Gabriel<sup>4</sup>, compreende flavonóides, lignóides, amidas, terpenóides e sesquiterpenóides, sendo que os sesquiterpenos com um sistema de anéis em linha 3:5:6 com núcleo lindenano<sup>19</sup>,

denominados Shizukanolides e Chloranthalactona<sup>25</sup>, são destaques para essa família por serem pouco comuns em fontes naturais, pois os sesquiterpenos com núcleo lindenano são encontrados nas famílias Lauraceae (*Lindera strychnifolia* e *Neolisea sericea*) Compositaeae (*Onoseris albicans* e *Wunderlichia mirabilis*) e Chloranthaceae<sup>28</sup>.

Portanto, tais sesquiterpenos podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos, onde pode-se relacionar as famílias Chloranthaceae e Lauraceae, pois pertencem a mesma subclasse Magnoliidae. Dalgren (1975)<sup>4,6</sup> chegou a classificar as Chloranthaceas como pertencentes a família Laurales confirmando a relação entre estas famílias, embora não seja possível explicar uma correlação para a família Compositaeae, que se encontra distante na classificação botânica.

### **3.5.- Atividades Biológicas Relacionadas para a Família Chloranthaceae:**

A grande importância desta família está baseada em sua utilização como planta medicinal. Alguns dos compostos citados anteriormente, estão descritos na literatura apresentando atividades biológicas como citamos abaixo.

Shizukanolide(11), Glechomanolide(12) e Isofuranodieno (13) demonstram pequena atividade contra microrganismos<sup>9</sup>.

Dihidro-shizukanolideo(1) demonstra considerável atividade antifúngica principalmente contra crescimento de gênero *Mucor* e *Rhizopus*<sup>9</sup>.

Astilbina(9), Isofraxidina(8) e Acido succínico(10) apresentam atividade antitumoral em animais expostos<sup>20, 21</sup>.

$\beta$ -sitosterol e Stigmasterol apresentaram atividade analgésica<sup>33</sup>.

Kaempferol mono e diglicosídeo (45,44) apresentam atividade analgésica<sup>7</sup>.

Furanodienona (19) apresenta certa atividade inseticida<sup>28</sup>.

Quercitina (36) apresenta atividade alelopática .

Vários sesquiterpenos lactonas contendo em sua estrutura uma lactona  $\alpha\beta$ , ou  $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$  insaturada, são relacionados com inúmeras atividades biológicas como antiinflamatórias<sup>24, 34, 35</sup>, antifúngicas<sup>23, 24</sup>, antibacterianas<sup>19</sup>, Atividades gástricas citoprotetoras<sup>36</sup>, entre outras.

Portanto, a família Chloranthaceae em relação a sua característica química está relacionada com atividades antitumorais, antiinflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, alelopáticas e inseticidas.

### **3.6.- Proposta Biossintética para os Sesquiterpenos com Núcleo Lindenano.**

Os sesquiterpenos são compostos contituídos de 15 átomos de carbonos, formando uma estrutura isoprenóide ou isoprenóide modificada<sup>37</sup>, constituindo a classe de compostos de ocorrência naturais mais universalmente distribuídos, esta classe possui uma ampla variação estrutural o que vem provocando muitas dificuldades no campo da investigação química destes compostos. Entretanto, a frequente relação da origem botânica com as características estruturais destas moléculas tem facilitado por muitas vezes a sua investigação<sup>38</sup>.

A grande quantidade de sesquiterpenos isolados da família Chloranthaceae com um núcleo lindenano, considerado bastante incomum, nos levou a propôr uma rota biossintética para a formação destes núcleo<sup>18 a 30</sup>.

Os sesquiterpenos são formados por três unidades de isopreno. Na Figura 3 descrevemos a formação de isopentenil pirofosfato e sua isomerização a dimetilalil pirofosfato, apartir da AcetilCOA.

A ligação de uma molécula de isopentenil e dimetialalil pirofosfato forma o geranilpirofosfato, que ao receber mais uma molécula de isopentenil pirofosfato forma o farnesil pirofosfato, dando origem a maior parte dos esqueletos sesquiterpenos. A Figura 4 mostra a formação deste precursor até a formação do esqueleto Lindenano através de modificações na estrutura do esqueleto eudesmano, que é considerado por Bolmamm<sup>39, 40</sup> como a chave biossintética para a formação dos lindenanos.

As funções presentes na estruturas dos compostos naturais são formadas através de reações enzimáticas, motivo pelo qual muitas vezes, a síntese de um composto isolado de planta é muito complicada, devido a especificidade destas reações, embora o conhecimento da rota biossintética destes compostos possa ser útil como um modelo para a síntese destes compostos. A Figura 5 mostra a formação do anel lactona que é muito

comum em sesquiterpenos<sup>37, 38, 41</sup>, e explica a formação dos compostos conhecidos como Shizukanolide e Chlorantholactonas estes, como demonstrado anteriormente, abundantes na família Chloranthaceae.

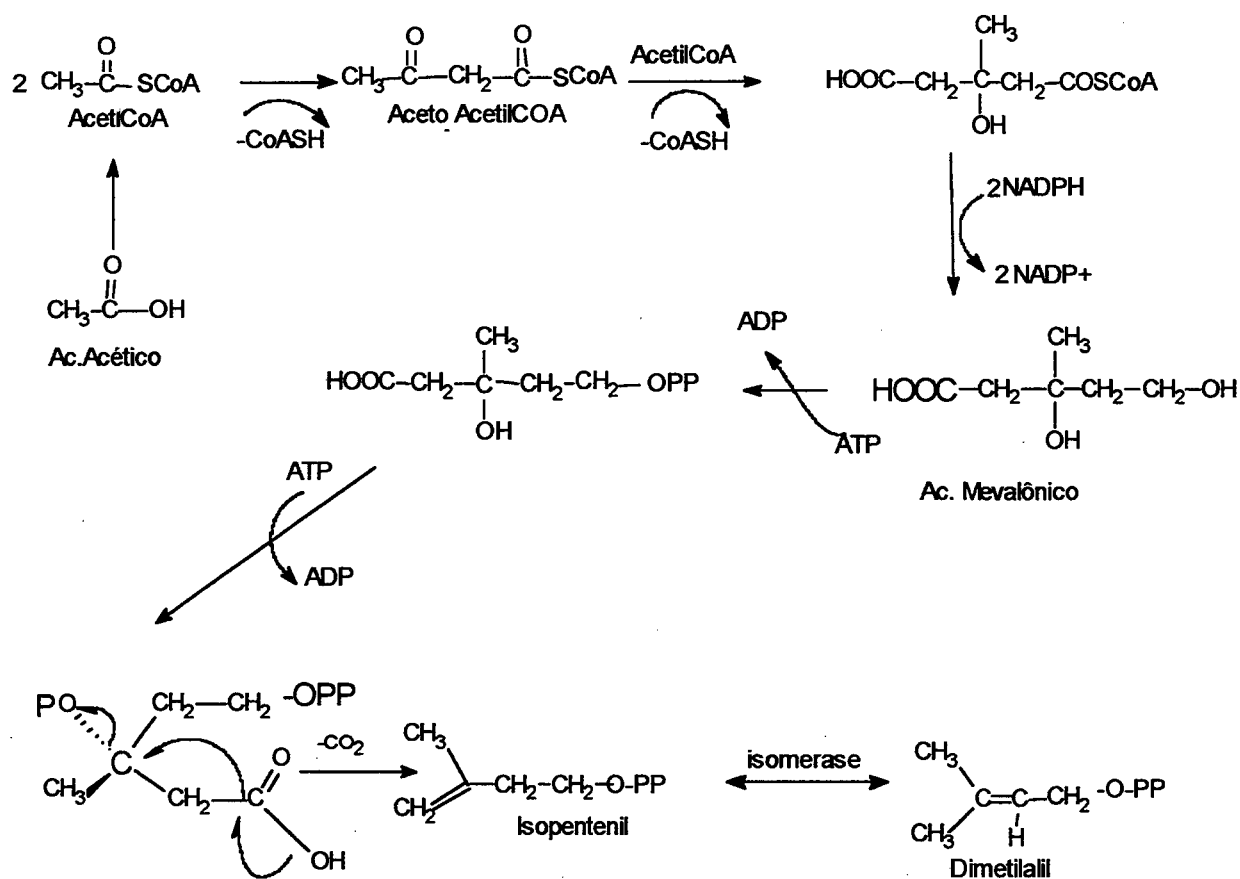


FIGURA 3 - Esquema biossintético para a formação de isopentenil e o dimetilalil a partir do ácido acético.

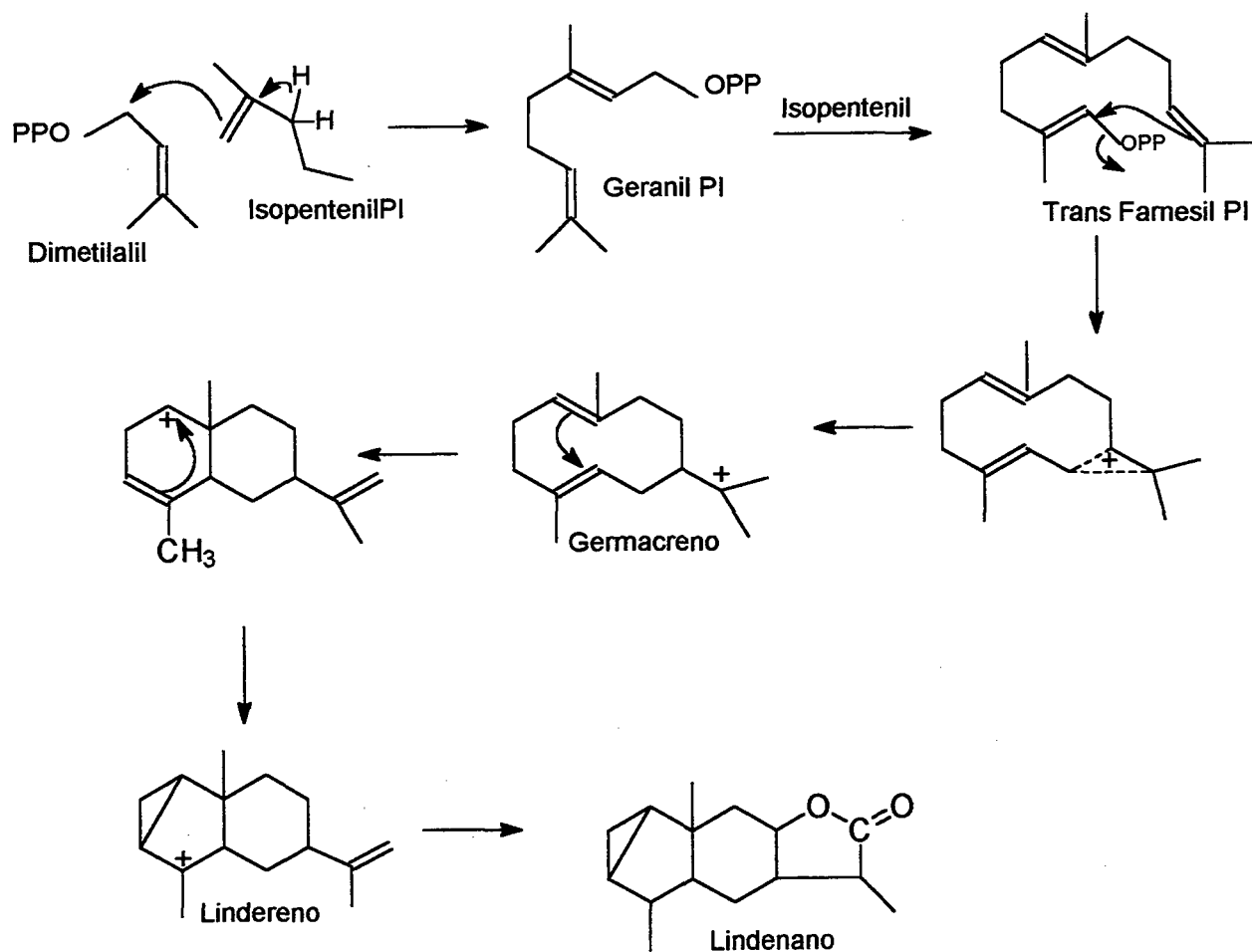


FIGURA 4 - Esquema de formação do núcleo Lindenano.



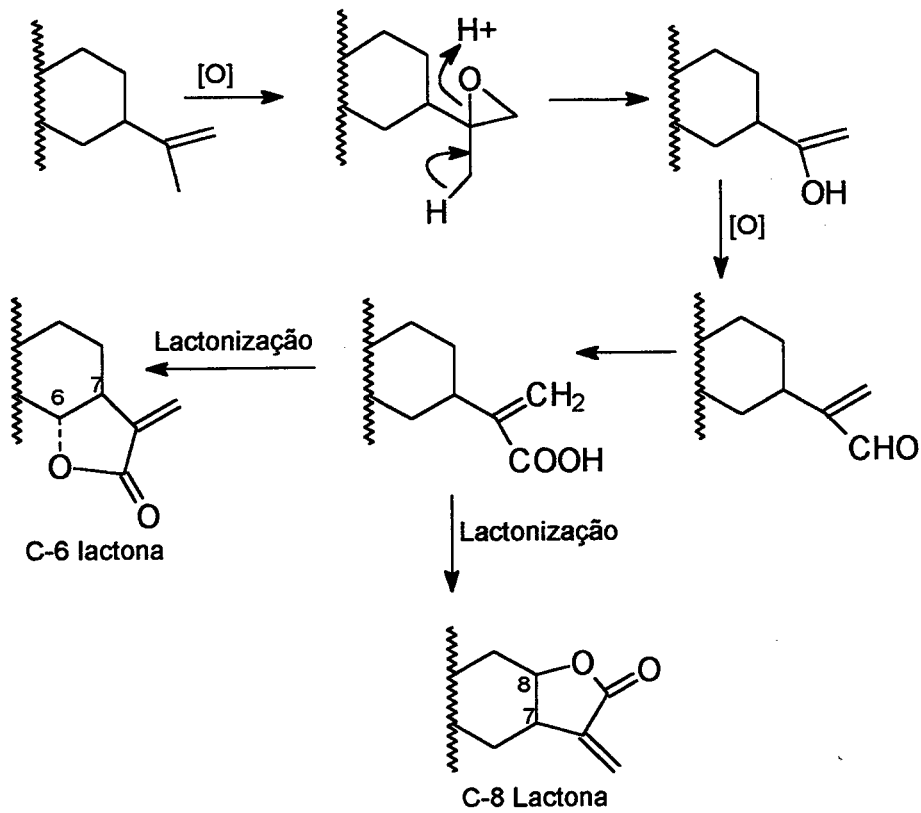


FIGURA 5 - Esquema de formação do anel lactona.

## 4. -PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. - Materiais e Métodos.

Solventes utilizados nos experimentos foram de grau p.a.(para análise).

Para as cromatografias em colunas (CC) foram utilizadas sílica gel 60 de granulometria 70-230 mesh (0,063-0,20mm), ou sephadex LH 20 .

As cromatografias em camada delgada (CCD) das frações mais impuras foram realizadas em placas de vidros com 2,5 centímetros de largura por 7,5cm de comprimento revestidas por sílica gel GF<sub>254</sub> e para frações mais purificadas ou compostos isolados utilizou-se placas de camada delgada de alta resolução (CCDAR ) com sílica gel PF<sub>254</sub> em folhas de alumínio.

As placas foram reveladas no primeiro momento sob a luz ultra violeta Minerallight 254 e 365 nm, seguido de reveladores pulverizados sobre as mesmas. Os reveladores utilizados foram anisaldeído sulfúrico, metanol: ácido sulfúrico (50:50), câmara de iodo, cloreto férrico e dragendorf, aquecidas em estufa a 110 °C quando necessário.

A concentração das frações de grande volume e dos extratos foi realizada utilizando um rotavapor com pressão reduzida e temperatura controlada.

Análise do óleo essencial e das frações mais apolares foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu 14A, equipado com coluna capilar de 25 metros, revestida com um filme de 0,25µm da fase SE 30-OV1 ou LM 1 ambas apoiadas, acoplado a um registrador e detector de ionização de chama. As condições cromatográficas são descritas em cada experimento.

O material vegetal foi triturado por turbólise, utilizando-se um liquidificador doméstico marca Wallita.

A determinação dos pontos de fusão foram realizadas em um aparelho tipo prato quente APF- 301 da Microquímica e não sofreram correções.

As análises de CHN foram determinadas em um analisador elementar CHN Perkin Elmer 2400.

Os espectros de ultra violeta (UV) foram obtidos em um espectrofotômetro UV-VIS- Hitachi U- 2000, os dados são fornecidos em nanômetros (nm) versus absorção (A).

Para obtenção dos espectros na região do infravermelho (IV), utilizou-se um espectrofotômetro FT Perkin Elmer16 PC. Os valores foram registrados em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de massas foram obtidos num aparelho Shimadzu- CGMS- QP 2000A sobre impacto de feixe eletrônico a 70 ev, utilizando a técnica de inserção direta (PROB) para os compostos puros ou acoplado a cromatografia gasosa (CG) para óleo essencial ou misturas.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Depto, HETCOR, Irradiação seletiva, foram obtidos em um aparelho Bucker Ac 200F. Os deslocamentos químicos foram registados em valores adimensionais  $\delta$  (ppm), utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamentos foram fornecidas em Hertz (Hz). Os solventes deuterados usados na diluição são descritos em cada experimento.

Os dados difratométricos foram coletados no difratômetro automático de mono cristais CAD4- Enraf do departamento de química da UFSC pelo Prof<sup>o</sup> Dr Ivo Vencato.

Os ensaios farmacológicos foram realizados sob orientação do Prof<sup>o</sup> Dr João B. Calixto do Depto de Farmacologia da UFSC.

Os testes antimicrobianos foram realizados pelo Prof<sup>o</sup> Dr Artur Smânia Jr no Depto de Microbiologia da UFSC.

#### **4.2. - Coleta e Identificação da Planta.**

O material vegetal foi coletado e identificado pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Ademir Reis no parque botânico Morro do Baú, município de Ilhota Santa Catarina, registrado com o número 2543 (25/09/96) no Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, S.C. (HBR) , ibidem A. Reis , 2542 (25/set/96), ibidem, 2266 (29/abr./95), ibidem, 2403 (28/out/95).

### **4.3. - Preparação dos Extratos.**

Após a coleta, o material vegetal foi armazenado em freezer a temperatura de 0 °C por 18 horas. Folhas e caules verdes (8 Kg) foram trituradas por turbólise em etanol e deixados em maceração com solução hidroalcoólica 20% por 7 dias. Após esse período o solvente foi percolado, concentrado em evaporador rotatório com pressão reduzida, e o solvente recuperado, adicionado novamente ao vegetal. Este procedimento foi repetido por 5 vezes, sendo que após a última percolação, o material foi prensado para maior recuperação do solvente. Este procedimento forneceu um rendimento de 450 gramas de extrato hidroalcoólico bruto das folhas denominado **HBEF**.

O mesmo procedimento foi utilizado para processar 3,5 (Kg) de raízes, fornecendo 180 gramas de extrato hidroalcoólico bruto denominado **HBER**.

### **4.4. - Fracionamento dos Extratos Brutos Hidroalcoólicos.**

#### **4.4.1 - Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico das Raízes HBER.**

O extrato bruto hidroalcoólico das raízes **HBER** (150 g) foi impregnado em 150 gramas de sílica gel, para obtenção da “pastilha” e a seguir, o extrato foi submetido a uma filtração cromatográfica em coluna de sílica gel (300g), de 73 cm de altura por 10 cm de diâmetro interno (d.i.), empacotada com hexano.

A amostra foi eluída com sistema de solventes na forma gradiente de polaridade crescente, usando hexano: acetato de etila (100:0:0: 100) e finalmente com metanol 100% que foi coletado numa fração única.

Este procedimento resultou na obtenção de 52 frações as quais foram reunidas de acordo com o perfil apresentado pela análise por CCD conforme demonstra a Tabela 1.

**TABELA-1** Fracionamento do extrato bruto **HBER** mostrando a taxa de gradiente e as frações resultantes.

| Frações        | % de Hexano: Acetato de etila<br>(00:00) | Frações Reunidas |
|----------------|--|------------------|
| Fração Hexano  | 100% hexano                              | 0                |
| Fração 1       | (99:1)                                   | 1                |
| Fração 2       | ( 99:1) a (95:5)                         | 2 a 7            |
| Fração 3       | (90:10)                                  | 8 a 12           |
| Fração 4       | (80:20)                                  | 13 a 20          |
| Fração 5       | (70:30)                                  | 21 a 27          |
| Fração 6       | (65:35)                                  | 28 a 30          |
| Fração 7       | (60:40)                                  | 31 a 35          |
| Fração 8       | (50:50)                                  | 36 a 40          |
| Fração 9       | ( 40:60) a (30:70)                       | 41 a 45          |
| Fração 10      | (20:80)                                  | 46-49            |
| Fração Acetato | (10:90) a (0:100)                        | Fração única     |
| Fração Metanol | 100% Metanol                             | Fração única     |

As frações obtidas do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico das raízes foram reunidas da seguinte forma :

- As frações 1, 2, 3, (Tabela 1) após reunidas formaram uma fração oleosa de coloração laranja formando a subfração hexano:acetato de etila 20%

- A frações 4, 5 foram reunidas formando a subfração 45 das raízes.

- As frações 6, 7, 8 foram reunidas resultando numa pasta escura e viscosa que nas análises por CCD aparecem como uma única mancha alongada verde escura, e revelando sob luz ultra violeta uma cor avermelhada, demonstrando ter uma grande quantidade de clorofila e outros pigmentos que dificultam o isolamento e purificação de outras substâncias, assim reservadas para análises posteriores.

- As demais frações até acetato de etila 100% inclusive foram reunidas fornecendo a subfração acetato de etila das raízes

A fração metanol formando a subfração metanol das raízes

Este procedimento esta resumido na Figura 6

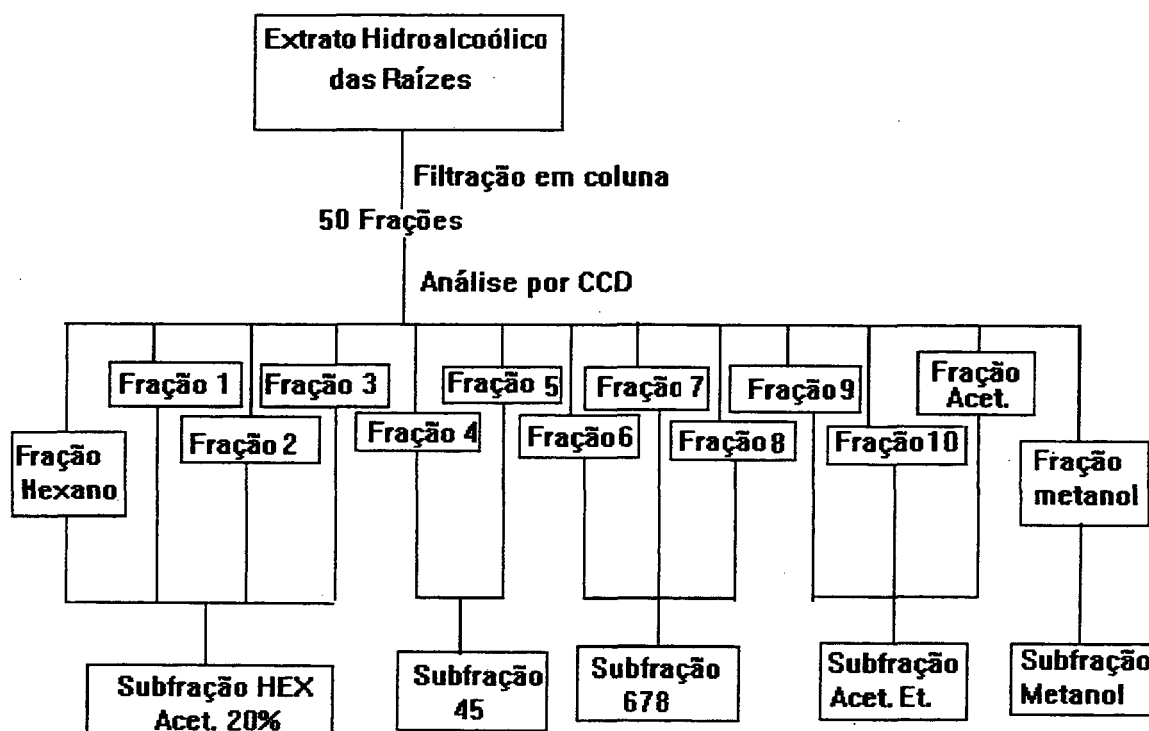


FIGURA 6 -Esquema do fracionamento do extrato **HBER** demonstrando as subfrações obtidas.

#### **4.4.2 Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico das Folhas HBEF.**

Usando o mesmo procedimento acima descrito, procedeu-se o preparo da “pastilha” (400g HBEF + 400g de sílica), o extrato HBEF foi submetido a filtração em coluna, recheada com 300g de sílica e empacotada com hexano. A amostra foi eluída no modo gradiente, de polaridade crescente, com o sistema de solventes Hex:AcOEt fornecendo 67 frações que foram reunidas após análise por CCD, como indicado na Tabela 2.

TABELA 2 - Fracionamento do extrato HBEF mostrando a taxa de gradiente e as frações resultantes.

| Frações                    | % Hexano: Acetato de etila (00:00) | Frações reunidas |
|----------------------------|------------------------------------|------------------|
| Fração Hexano              | (100:0)                            | 0                |
| Fração 1                   | (99:1)                             | 1                |
| Fração 2                   | (99:1) a (95:1)                    | 2 a 7            |
| Fração 3                   | (90:1)                             | 8 a 11           |
| Fração 4                   | (85:15) a (80:20)                  | 12 a 17          |
| Fração 5                   | (75:25)                            | 18 a 25          |
| Fração 6                   | (70:30)                            | 26 a 31          |
| Fração 7                   | (60:40)                            | 32 a 40          |
| Fração 8                   | (50:50)                            | 40 a 46          |
| Fração 9                   | (40:60)                            | 47 a 54          |
| Fração 10                  | (20:80)                            | 55 a 63          |
| Fração Acetato             | (15:85) a (0:100)                  | Fração única     |
| Fração Metanol             | 100% Metanol puro                  | Fração única     |
| Fração Metanol/Ác. Acético | Metanol 10% de Ácido Acético       | Fração única     |

As frações obtidas anteriormente foram reunidas da seguinte forma:

As frações 1, 2, 3, 4, 5, 6 (tabela 2) foram reunidas em uma única fração fornecendo a subfração hexano acetato de etila 30% das folhas.

As frações apartir de 7 até a fração acetato de etila foram reunidas em uma única fração, que foi denominada subfração acetato de etila das folhas.

A fração metanol que foi coletada em fração única forma a subfração metanólica das folhas.

A fração metanol: ácido acético que foi coletada como fração única corresponde a subfração ácido acético das folhas.

Um esquema resumido deste procedimento é mostrado na Figura 7.

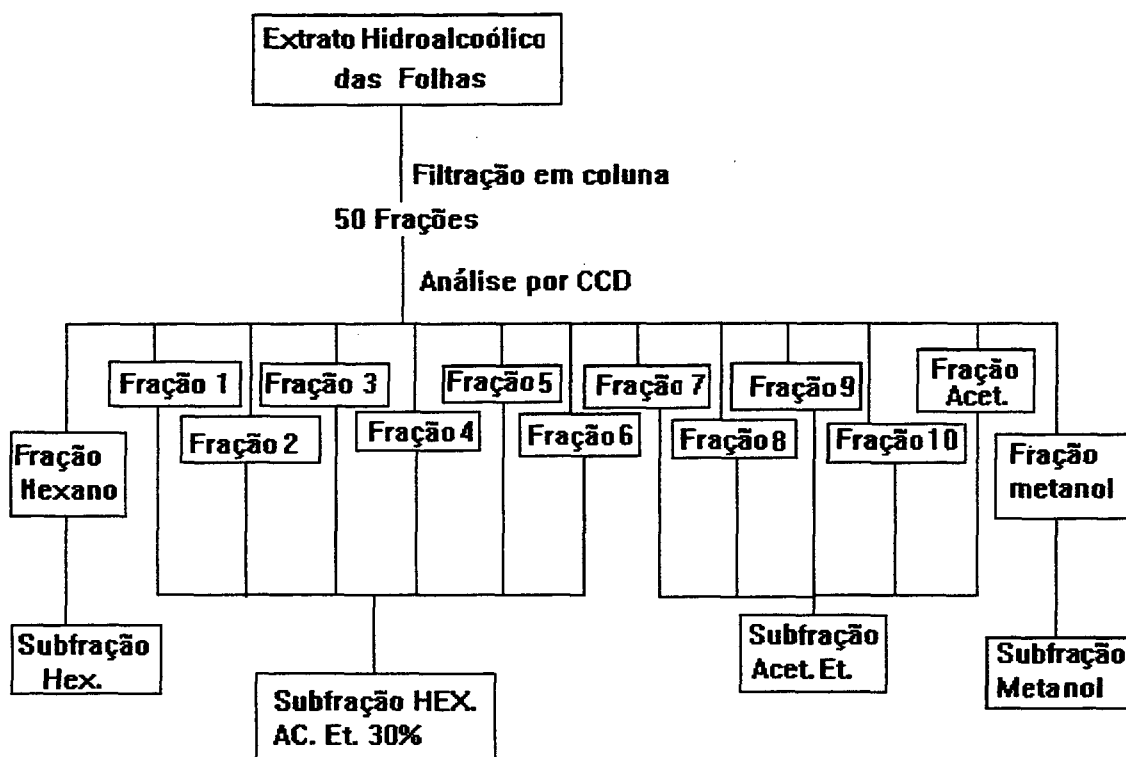


FIGURA7- Esquema do fracionamento da extrato HBEF e as subfrações obtidas.



#### **4.5. - Extração do Óleo Essencial.**

Folhas e talos (1Kg) foram moídas por turbólise com água, e colocados em um balão de destilação de 6 litros. O óleo foi obtido através de um aparelho Clevenger acoplado ao balão. O material foi destilado por 10 horas onde obteve-se 1,5 ml de óleo essencial. No dia seguinte submeteu-se o material por mais 5 horas de extração onde foi obtido apenas 0,2 ml, perfazendo um total de 1,7 ml.

Alíquotas do óleo foram enviadas à farmacologia e à microbiologia para as respectivas análises farmacológicas e microbiológicas.

Uma alíquota do óleo essencial foi submetido a análise por CGAR-EM, e os EM foram obtidos para cada componente.

#### **4.6. - Análise das Subfrações Obtidas do Extrato Hidroalcoólicos das Raízes HBER.**

##### **4.6.1 - Análise da Sub Fração 45 do extrato HBER.**

A subfração 45 (2 g) foi recromatografada em CC, com 14 cm de altura por 3cm de diâmetro preenchida com 7 gramas de sílica gel , utilizando gradiente de polaridade crescente hexano: acetato de etila (100:0;50:50). As frações 3 a 16 (95:2 a 90:10) renderam um precipitado (ppt) branco que após recristalização rendeu 600 mg de cristais incolores, com ponto de fusão 90 a 93 °C, sendo denominado composto **HB 15**.

##### **4.6.2 -Análise da Subfração Hexano Acetato de Etila 20% Obtida do Extrato Hidroalcoólico das Raízes HBER .**

A subfração hexano: acetato de etila 30% (10 g.) foi suspendida em metanol: água (1:9), em seguida submetida a extração líquido/líquido com éter etílico onde a

fração aquosa foi adicionada a subfração acetato de etila obtida no fracionamento do extrato **HBER**.

A fração orgânica (5 g.) resultante da extração, foi submetida a CC (14cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 10 gramas sílica gel em hexano) eluída com gradiente crescente de polaridade com hexano: acetona, acetona: metanol.

Nas frações eluídas com 4% acetona em hexano, houve a formação de cristais em forma de agulhas finas, que foram filtrados através de funil de vidro sinterizado que após recristalização, obteve-se 200 mg de um ppt branco, com ponto de fusão 127-130 °C, denominado **HB-5**.

A frações eluídas a 10%, acetona em hexano (200 mg), foram recromatografadas nas mesmas condições, fornecendo 150 mg de um composto cristalino, que após análise de CCDAR, IV e CGAR demonstrou ser idêntico ao composto **HB-15** obtido da subfração 45 como descrito anteriormente.

#### **4.6.3 Análise da Subfração Acetato de Etila do Extrato Hidroalcoólico das Raízes HBER.**

A subfração acetato etila (20g.) foi submetida a CC (40cm de altura por 2,5 de diâmetro, empacotada com 36 gramas de sílica gel em hexano) e foi eluída com gradiente de polaridade crescente hexano: acetato de etila, acetato de etila: metanol. As frações obtidas entre 10 a 15% acetato de etila em hexano, após serem analisadas por CCD, foram reunidas (350mg) e recromatografadas nas mesmas condições, que após serem recristalizadas, forneceram 100mg de cristais incolores. Os dados obtidos nas análises de CCDAR, IV, ponto de fusão, CG e CG-EM demonstram tratar-se do mesmo composto descrito na subfração 45 denominado **HB-15**.

Análise das frações obtidas a 80% acetato de etila em hexano demonstrou a presença de ppt esbranquiçado, que foi lavado sucessivamente com misturas de solventes (hexano: acetato de etila; acetato de etila: metanol) obtendo-se 30 mg de um composto, com ponto fusão acima de 250 °C, muito pouco solúvel em metanol denominado **HB-AC22**.

#### **4.6.4. - Análise da Subfração Metanólica do Extrato Hidroalcoólico das Raízes HBER.**

A subfração metanólica do **HBER** (45 g.) foi suspendida em água:metanol (8:2) e extraído com hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. As fases orgânicas obtida para cada solvente, foram reunidas em frações únicas, fornecendo as seguinte frações, fração hexano (50mg), fração clorofórmica (3 g.) e fração acetato de etila (14 g.), que foram analisadas separadamente como descrito a seguir:

A fração clorofórmica foi submetida a CC nas mesmas condições decritas no item 4.6.3. utilizando 9 gramas de sílica gel como fase estacionária.

Os cristais obtidos (80mg) nas fracões eluidas entre 3 e 5 % acetato de etila após serem filtrados com ajuda de uma pipeta Pauster, foram analisados e demonstraram tratar-se do mesmo composto, denominado como **HB-5** isolado anteriormente na subfração hexano; acetato de etila 20%.

A frações eluídas entre 12 e 15% foram analisadas por CG, reunidas e submetidas a nova cromatografia em coluna, onde se obteve cristais incolores (100 mg) com pf 91-93°C que demonstraram ser idênticos ao composto já isolado anteriormente denominado **HB-15**.

Uma alíquota da fração acetato de etila (7 g.) foi submetida CC (45 cm de comprimento por 2,5 de diâmetro, empacotado com sephadex LH 20, eluída com metanol: água (9:1), onde foram eluídas um total de 36 frações e reunidas de acordo com seu perfil cromatrográfico em CCD.

As frações 9 a 19 obtidas da coluna de Sephadex LH 20 foram reunidas e recromatografadas nas mesmas condições, usando como fase movél metanol: água (70:30). A análise das frações obtidas, demonstrou a presença de ppt nas frações 8 e 11 que foram recristalizadas, obtendo-se 20 mg de um pó bege com ponto de fusão superior a 200 °C, denominado **S2-811**.

#### **4.7 - Análise das Subfrações Obtidas do Extrato Hidroalcoólico das Folhas.**

##### **4.7.1 - Análise da Subfração Hexano Acetato de Etila 30% do Extrato Hidroalcoólico das Folhas.**

A subfração hexano acetato de etila 30% de HBEF (40 g.) foi suspensa em água: metanol (9:1) e particionada com éter etílico. A fase orgânica (10 g.) foi submetida a CC (45 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro, preenchida com 35 gramas de sílica gel, empacotada com hexano) utilizando como fase móvel, um gradiente de polaridade crescente hexano: acetato de etila; acetato de etila: metanol. Este procedimento permitiu o isolamento de dois compostos, que após análise por CCDAR, IV e CG observou tratar-se dos compostos **HB-5** (250 mg) e **HB-15** (150mg), isolados anteriormente.

Neste procedimento, foi possível isolar outro composto obtido a 10% acetato de etila hexano, que apresentou  $pf^{\circ}$  110°C, denominado **HB-8** (110 mg).

##### **4.8 Acetilação do Composto HB-15.**

Ao composto **HB-15** (10mg) foram adicionados 0,5 ml de acetato de etila, 0,1 ml de ácido acético e 0,2 ml de anidrido acético e DMAP como catalizador a reação foi deixada a temperatura ambiente e controlada por CCDAR. Após 30 minutos foi evaporado o solvente, o produto foi solubilizado em 0,5 ml de acetato de etila e filtrado em coluna de sílica gel.

O solvente foi concentrado rendendo 13 mg do composto **HB-15 acetilado**.

#### **4.9 Hidrólise do Composto HB-AC22.**

Ao composto **HB-AC22** (20mg) foi adicionado 1ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% e colocado sobre agitação com aquecimento 60 °C acompanhado por CCDAR. A solução foi neutralizada com NaOH e extraída com CHCl<sub>3</sub> repetidas vezes. A fase orgânica obtida, corresponde a fração aglicona que foi concentrada até 0,5 ml.

#### **4.10 Ensaio Farmacológicos.**

##### **4.10.1 - Animais.**

Foram utilizados camundongos suíços machos (25 a 35 g) , criados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram mantidos à temperatura controlada (23 ± 2 °C), em ciclo claro/escuro de 12 h e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1h antes da realização dos experimentos que foram conduzidos geralmente entre 8 h e 17 h.

##### **4.10.2 - Preparação do Extrato Hidroalcoólico para os Ensaio Farmacológicos.**

O extrato foi obtido e preparado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química (UFSC). As folhas, caules e raízes da espécie de *H. brasiliense*, depois de secos em estufa à 40 °C, foram moídos, macerados em etanol 50% numa relação de 1:3 e mantidos em temperatura ambiente durante 15 dias. O solvente foi filtrado e evaporado. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, à temperatura de 50 - 70 °C e mantido em freezer até o momento da utilização. O fracionamento do extrato foi realizado através de técnica cromatográficas também no Departamento de Química da UFSC.

### **4.10.3 - Análise Farmacológica**

#### **4.10.3.1 - Atividade Antinociceptiva**

##### **- Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.**

Preliminarmente foi verificado o efeito do EH de *H. brasiliense* no teste das contorções abdominais, que permite avaliar a atividade analgésica de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. 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>42</sup>; Collier et al., 1968<sup>43</sup>, Santos et al., 1994<sup>44</sup>, 1995<sup>45</sup>). Grupos distintos de animais foram pré-tratados com o EH de *H. brasiliense*, por via intraperitoneal (3 - 60, mg/kg) ou oral (100 - 800 mg/kg) antes da injeção do ácido acético. Os grupos controles receberam o mesmo volume do veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg) utilizado para diluir o extrato.

Após a injeção do ácido acético os animais 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 o EH de *H. brasiliense*, administrados por via oral ou intraperitoneal, comparados com o número das contorções abdominais dos animais controles (salina).

##### **- Dor induzida pela formalina**

Para confirmação do efeito analgésico do EH e do composto obtido de *H. brasiliense*, foi utilizado 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>46</sup> ; Hunskaar et al., 1985<sup>47</sup>; Murray et al., 1988<sup>48</sup> , Santos et al., 1995<sup>45</sup>). Os animais receberam 20 µl 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>49</sup>).

Os animais foram tratados com o EH de *H. brasiliense* por via oral (400 - 800 mg/kg) ou via intraperitoneal (10 - 100 mg/kg), antes da injeção da formalina. Grupos distintos de animais foram tratados intraperitonealmente com o composto (30 - 150 mg/kg) isolado da espécie de *H. brasiliense*, antes da injeção da formalina. Os animais controles receberam igual volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir o EH e o composto isolado da espécie de *H. brasiliense* . Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas na junção tíbio-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.

### - Teste do tail-flick

A atividade analgésica do extrato da *H. brasiliense*, foi 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 analgesi 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>50</sup>, com pequenas modificações.

Os animais foram selecionados 24 horas antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que permanecerem 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 o EH de *H. brasiliense* (100 mg/kg) por via intraperitoneal, ou com morfina (10 mg/kg, s.c), que foi utilizada como controle positivo. 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 o EH ou morfina.

### - 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 lambear, 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>51</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 o EH ( 100 mg/kg) ou com o composto obtido da espécie de *H. brasiliense* (150 mg/kg) por via intraperitoneal, ou com morfina (10 mg/kg, s.c., utilizada como controle) antes do experimento. 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 o EH , o composto isolado da espécie de *H. brasiliense* e a morfina.

#### - Dor induzida pela capsaicina

Esse modelo foi proposto recentemente por Sakurada et al. (1992)<sup>52</sup> para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. 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) (Sakurada et al., 1992<sup>52</sup>; 1993<sup>53</sup>). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos extrato ou do composto isolado da espécie de *H. brasiliense* 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 permanecer lambendo ou mordendo a pata. Cada animal recebeu 20 µl de solução de capsaicina (1,6 µg/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 (Sakurada et al., 1992<sup>52</sup>; 1993<sup>53</sup>). Os animais foram tratados com o EH ( 30 - 300 mg/kg) e com o composto obtido de *H. brasiliense* (10 - 60 mg/kg) por via intraperitoneal antes da injeção da capsaicina. O grupo controle recebeu somente os veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir o composto e o EH de *H. brasiliense*.

#### **4.10.3.2 -Estudo do possível mecanismo de ação analgésica do EH e do composto obtido da espécie de *H. brasiliense*.**

##### **- Efeito do tratamento com naloxona.**

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opióide sobre o possível efeito analgésico do extrato e do composto obtido da espécie de *H. brasiliense*, os animais foram pré-tratados com antagonista opióide não seletivo, naloxona (5 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração do EH de *H. brasiliense*, ou da injeção de morfina (5 mg/kg, s.c., utilizada como controle positivo). Decorridos 30 min após a administração do extrato ou morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à primeira e à segunda fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos utilizados como controles foram tratados com o EH de *H. brasiliense* (100 mg/kg), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir o extrato e a morfina, 30 min antes da injeção da formalina.

#### **4.10.5 - Análise estatística.**

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média, exceto as  $DI_{50S}$  (doses das drogas, composto ou extrato que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle), que foram apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett e ou Newman-Kuels, quando apropriado. Valores de  $P < 0.05$  ou menos foram considerados como indicativos de significância. As  $DI_{50S}$  foram estimadas a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica em papel semi-logaritmo.

#### **4.11- Ensaio Microbiológicos.**

Atividade antibacteriana para os compostos HB-15 e HB-8 juntamente com as frações obtidas do extrato HBEF foram realizadas pelo método de difusão em gel (Smânia et al., J. Etnopharmacol 45,1995.)<sup>54</sup> utilizando como bactérias indicadoras as estripes de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosas* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O meio de cultura utilizado foi o agar de Mueller Hinton e o inóculo bacteriano contou de uma suspensão  $10^5$  ufc/ml. Os resultados são expressos em mg .

As concentrações mínimas inibitórias (c.m.i.) foram determinadas pelo método da diluição em caldo (Smânia et al., J. Etnopharmacol 45,1995.)<sup>54</sup> As bactérias teste foram as mesmas utilizadas no ensaio anterior e o meio de cultura foi o caldo de Mueller-Hinton. A menor concentrações da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano foi considerada a c.m.i..

Para a determinação da concentração mínima bactericida (c.m.b.) 0,1 mL de cada cultura sem crescimento visível foi espalhado na superfície do ágar de Mueller-Hinton contido em placas. A c.m.b. foi definida como a menor concentração da substância capaz de matar pelo menos 99% do inóculo original, sendo o resultado expresso em mg/ml.

Para determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos brutos hidroalcoólicos de *H brasiliense*, foi utilizado o método por difusão em gel e os resultados são apresentados em forma de halo de inibição.

## 5. -RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Método de Extração e Isolamento dos Compostos.

Para a realização do trabalho foram obtidos os extratos brutos hidroalcoólicos das raízes, e das folhas separadamente, onde obteve-se um rendimento de 4,2 % de extrato seco por peso de material vegetal para as raízes e 5,6% para o extrato obtido das folhas.

O fracionamento do extrato das raízes permitiu o isolamento de 4 compostos com os seguintes rendimentos, **HB-5** 0,008%, **HB-15** 0,024%, **HB-AC22** 0,0008% e **S2-811** 0,0006% sendo o composto **HB-15**, o composto majoritário para o extrato **HBER**.

A única fração estudada do extrato **HBEF**, permitiu o isolamento de três compostos **HB-5** (250 mg), **HB-15** (150 mg) e **HB-8** (110mg) e demonstrou que o composto **HB-15** majoritário para o extrato das raízes, não é encontrado de forma tão abundante no extrato das folhas.

A utilização de filtração em coluna cromatográfica não demonstrou ser muito eficiente para o fracionamento dos extratos brutos de *Hedyosmum brasiliense* pois houve uma grande perda de material, como exemplo para o extrato **HBER**, o peso das frações obtidas não correspondeu a 50% do peso total de extrato inicial, demonstrando que uma grande parte ficou retida na coluna, e a dificuldade de analisar as frações obtidas neste fracionamento devido o seu perfil em CCD que foi praticamente idêntico para várias polaridades diferentes.

O fracionamento da subfração metanólica do extrato **HBER**, demonstra claramente que uma grande parte dos compostos de baixa e média polaridades ficaram nesta subfração, isto pode ser devido a presença de uma função álcool nas moléculas e a metodologia utilizada que não foi capaz de separar corretamente os compostos de acordo com suas polaridades.

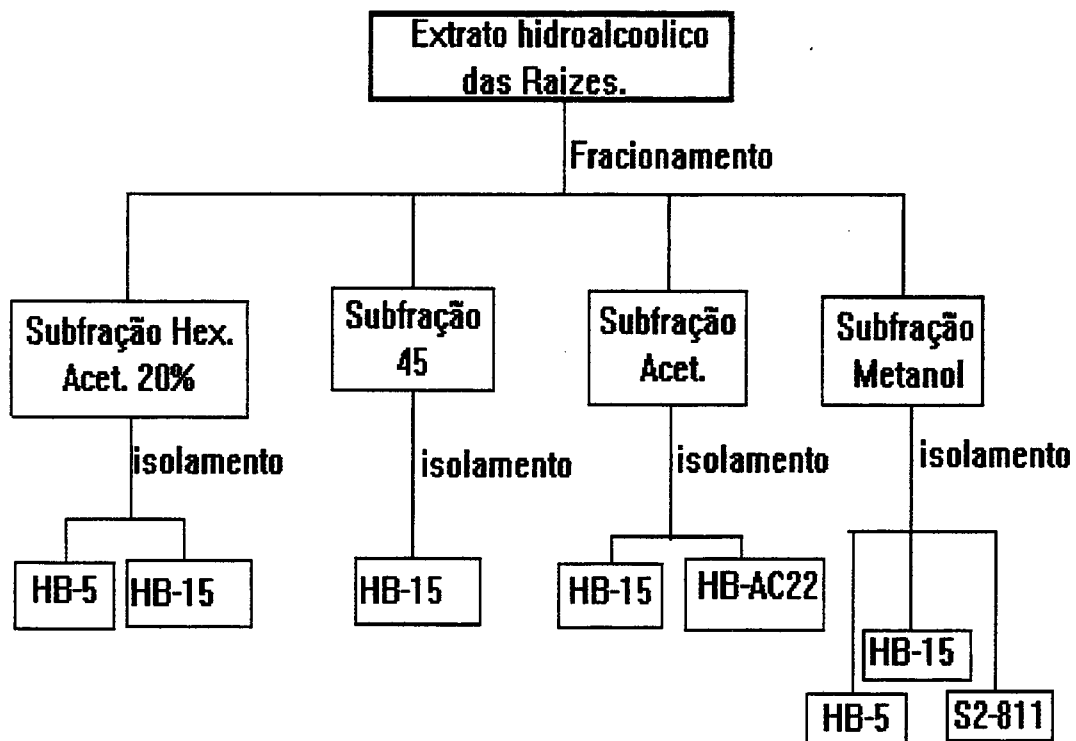


FIGURA 8- Esquema demonstra a origem dos compostos isolados do extrato **HB**ER.

## 5.2- Identificação do Composto HB-15.

O composto **HB-15** (850mg) obtido das subfrações dos extrato hidroalcoólico das raízes como demonstra a Figura 7, e da subfração hexano: acetato de etila 30% do extrato hidroalcoólico das folhas HBEF (150mg) apresentou ponto de fusão 93° C.

O espectro na região do ultra violeta UV (Espectro 1) mostrou a existência de uma banda com máximo de absorção em 282 nm, e outra banda pequena em 220 nm, indicando a presença do cromóforo carbonila  $\alpha$ - $\beta$  insaturada.

As absorções na região espectral do infra vermelho (Espectro 2), permitiu identificar a presença de um grupo OH, através da forte banda de absorção em 3538  $\text{cm}^{-1}$ , de um grupo lactona através do estiramento C=O em 1758  $\text{cm}^{-1}$ . Outras absorções foram observadas em 3074  $\text{cm}^{-1}$  e 3028  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a estiramentos C-H olefinicos, 2990  $\text{cm}^{-1}$  e 2968  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento C-H alifático, as absorções em 1641 e 1664  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento da ligação (C=C) e a absorção em 1034, 1012  $\text{cm}^{-1}$  referente aos estiramentos C-O.

Espectro de massas (Espectro 3) apresentou o pico molecular  $m/z$  (% rel.) a 244 (8) u.m.a. e os fragmentos a [M-15] 229 (29) referente a perda de uma metila, [M-18] 226 (15) indicando a saída de uma molécula de água, [M-33] 211 (32) indicando a perda sequencial de uma metila e de uma molécula de água, os fragmentos [M-31] 213 (11) referente a perda de  $\text{CH}_2\text{OH}$  e [229-31] 198 (14) referente a perda de  $\text{CH}_3 + \text{CH}_2\text{OH}$ , indicando uma cadeia lateral hidroximetileno. Os demais fragmentos são observados em 183 (32), 155 (43), 128 (38), 115 (50), 105 (40), 91 (100) pico base, referente a  $\text{C}_7\text{H}_7^+$  característico para terpenos e 77 (79).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 4) analisado juntamente com o espectro DEPT (Espectro 5) apresentou sinais para quinze átomos de carbono assim distribuídos: uma metila (22.7), três metilenos alifáticos (17.7, 22.1 e 55.8), um metileno exocíclico (107.5), três metinos alifáticos (23.1, 27.0 e 62.5), um metino olefínico (123.6), um carbono quaternário alifático (40.6), quatro carbonos quaternários olefínicos (124.9, 150.0, 150.3 e 150.7) e uma carbonila (170.9). Estes dados juntamente com o íon molecular a  $m/z$  244 do espectro de massas, e análise elementar CHN: C=73.11%, H=6.93% e O=19.91%, permitiram determinar a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$  com oito insaturações, referindo-se

a uma molécula tetracíclica, contendo uma carbonila e três ligações duplas, compatível com um sesquiterpeno lactona.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 6) apresentou absorções características para um próton olefínico de uma dupla trissubstituída, na forma de um singlete em 6,42 ppm (1H, s) e para prótons de um grupo exometileno, representado por dois singletes em 5.07 ppm (1H, s) e 4.80 ppm (1H,s). O sinal simples em 4.48 (2H, s), referente a dois prótons carbinólicos, analisados juntamente com o singlete largo em 2.54 ppm (1H sl) para um próton hidroxílico, permite propor a presença de um grupo hidroximetileno num sistema de spin isolado. Esta proposta é confirmada com a acetilação da amostra, onde no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 8, 8a) do acetil derivado, observamos o desaparecimento do sinal em 2.54 ppm, atribuído ao próton da hidroxila, o aparecimento de um singlete em 2.08 (3H, s) para o grupo acetil e o deslocamento do sinal 4.48 ppm para 4.86 ppm, devido a desproteção anizotrópica do metileno carbinólico conferida pela adição do grupo acetil, que é prevista em aproximadamente 0.4 ppm, deslocamento obtido 0.38 ppm.

As demais absorções apresentadas no espectro de próton, embora tenha pouca resolução, pode-se identificar a presença de uma metila quaternária em 0,81 ppm (3H, s), um multiplete centrado em 0,94 ppm (2H, m), um duplo duplo duplete centrado em 1.68 ppm (1H, ddd,  $J=6.95, 6.95$  e  $4.5$  Hz) e um duplo duplete largo centrado em 1.98 ppm (1H, ddl) atribuídos a dois grupos metínicos angulares. Podemos ainda observar um próton metínico cujo sinal tem a feição de um duplo duplete centrado em 3.00 ppm (1H, dd) e dois prótons com constante de acoplamento geminal e vicinal centrados em 2.95 ppm (1H, dd,  $J=15$  e  $3.6$  Hz) e 2,37 ppm (1H, dd,  $J=15$  e  $1.2$  Hz) foram atribuídos um grupo metileno alílico.

Experimentos de dupla irradiação (Espectros.7 a -e ) permitiram identificar dois sistemas de spins independentes. Irradiando o próton em 1.68 ppm, observou-se alteração no multiplete centrado em 0.94 ppm e o sinal em 1.94 ppm, apresentou-se na forma de um duplo duplete com constantes de acoplamento vicinal 9.2 Hz e 4.5 Hz; a irradiação do próton em 1.94 ppm também alterou o multiplete centrado em 0,94 ppm e o próton em 1,68 ppm apresentou-se na forma de um duplo duplete com constantes de acoplamento vicinal 9.3 Hz e 4.6 Hz, e irradiando o multiplete centrado em 0.94 ppm resultou na

simplificação dos sinais centrados em 1.68 ppm (1H, d, J=7.5 Hz) e 1.94 ppm (1H, d, 7.5 Hz) permitindo assim propor uma metade ciclopropano na molécula e sendo um dos metinos alílico (1.94 ppm) e outro (1.68 ppm) ligado a um carbono quaternário alifático.

O outro sistema de spin foi identificado pela irradiação dos sinais em 2.95 ppm e 2,37 ppm, que resulta na simplificação somente do sinal referente ao próton metínico em 3,00 ppm e a irradiação em 3,00 ppm causou alteração nos sinais centrados em 2.95 ppm e 3.00 ppm. Este resultado, juntamente com os valores dos deslocamentos químicos dos respectivos prótons, permitiu propor uma outra metade para a molécula, como sendo um grupo -CH-CH<sub>2</sub>- situados entre dois carbonos quaternários olefinicos.

Os dados apresentados até o presente momento, juntamente com as informações da literatura a respeito da quimiotaxônomia da família Chloranthaceae e do gênero Hedyosmum permitiu propor uma estrutura sesquiterpênica com esqueleto lindenano.

Na Figura 8 é apresentada uma proposta estrutural para **HB-15** sem a definição dos centros quirais. A atribuição dos carbonos e prótons para a estrutura proposta foi feita com base nos dados espectrais e principalmente com o resultado das correlações heteronucleares do espectro HETCOR.

O espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HETCOR (Espectro 11) permitiu fazer as atribuições aos carbonos e hidrogênios de acordo com as suas conectividades que são apresentadas na Tabela 3. O cruzamento do carbono 123.6 ppm com o próton 6.42 ppm confirma um próton olefínico, num sistema de spin isolado, de uma dupla trissubstituída. O cruzamento do carbono 107.5 ppm com os prótons 5.07 ppm e 4.80 ppm confirma o grupo exometileno. O cruzamento do carbono 62.5 ppm com o próton 3,00 ppm está de acordo com um grupo metínico alílico. O cruzamento do carbono 55.8 ppm com os prótons em 4.48 ppm confirma o grupo hidroximetileno ligado a um carbono quaternário olefínico.



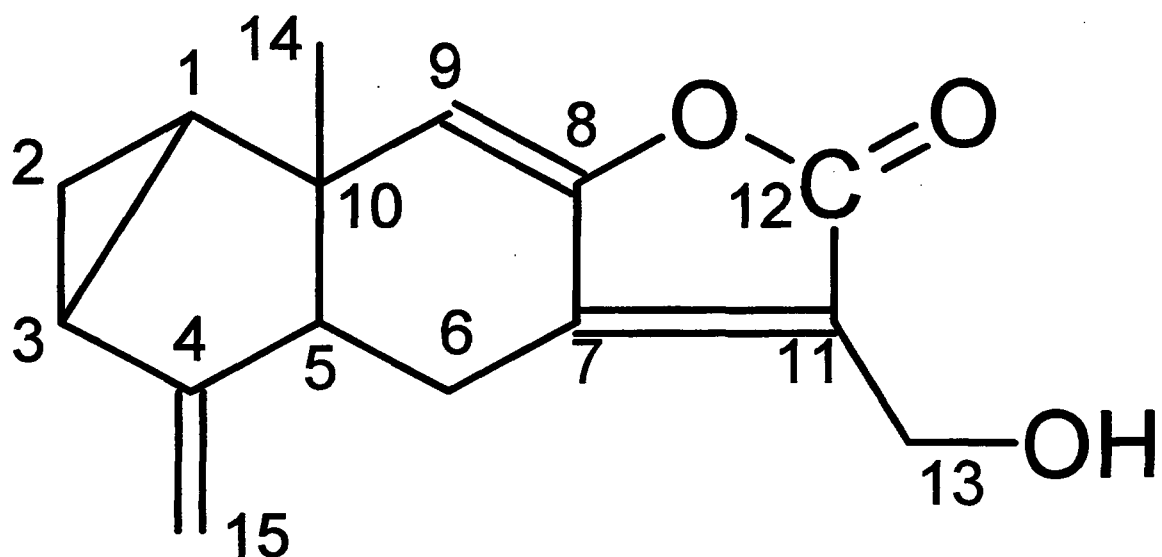


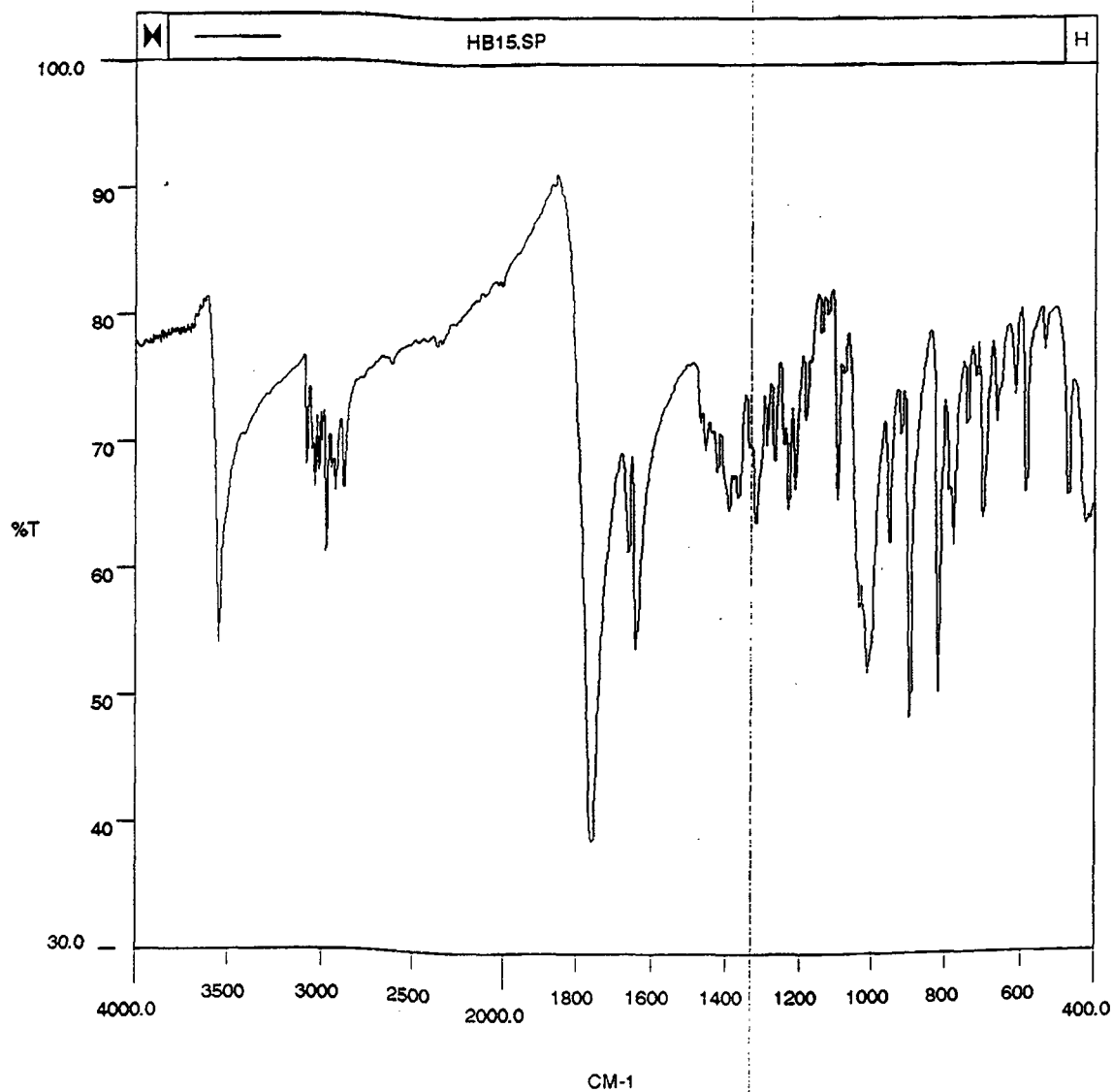
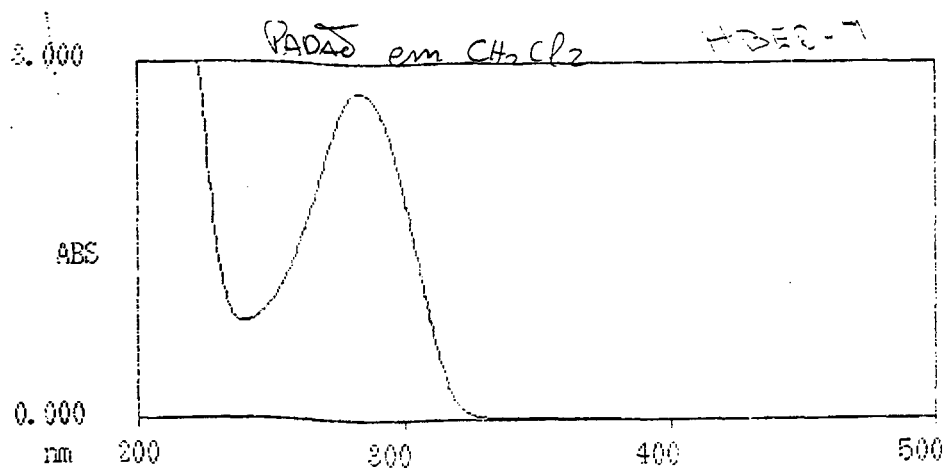
FIGURA 9 - Estrutura proposta para o composto HB-15.

TABELA 3- Dados de RMN do composto HB-15  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) DEPT e  $^1\text{H}$  (200 MHz) e suas conectividades, atribuídas por análise do HETCOR e Irradiação seletiva.

| C  | RMN $^{13}\text{C}$ | DEPT            | HETCOR-RMN $^1\text{H}$              | IRR.                       |
|----|---------------------|-----------------|--------------------------------------|----------------------------|
| 1  | 23.1                | CH              | 1.68, 1H, ddd, J=6.95, 6.95 e 4.5 Hz | irr <sup>1</sup> , ②③      |
| 2  | 17.7                | CH <sub>2</sub> | 0.94, 2 H, m                         | ①, irr <sup>2</sup> , ⑤    |
| 3  | 27.0                | CH              | 1.94, 1H, ddl                        | ①, ②, irr <sup>3</sup>     |
| 4  | 124.9               | C               |                                      |                            |
| 5  | 62.5                | CH              | 3.00, 1H, m                          | irr <sup>4</sup> , ⑤       |
| 6  | 22.16               | CH <sub>2</sub> | 2.95, 1H,<br>2.37, 1H,               | ④, irr <sup>5</sup> ,<br>⑥ |
| 7  | 150.3               | C*              |                                      |                            |
| 8  | 150.7               | C               |                                      |                            |
| 9  | 123.6               | CH              | 6.42, 1H, s                          |                            |
| 10 | 40.6                | C               |                                      |                            |
| 11 | 150.0               | C*              |                                      |                            |
| 12 | 170.9               | C               |                                      |                            |
| 13 | 55.8                | CH <sub>2</sub> | 4.48, 1H, s                          |                            |
| 14 | 22.7                | CH <sub>3</sub> | 0.81, 3H, s                          |                            |
| 15 | 107.5               | CH <sub>2</sub> | 5.08, 1H, s e 4.80, 1H, s            |                            |

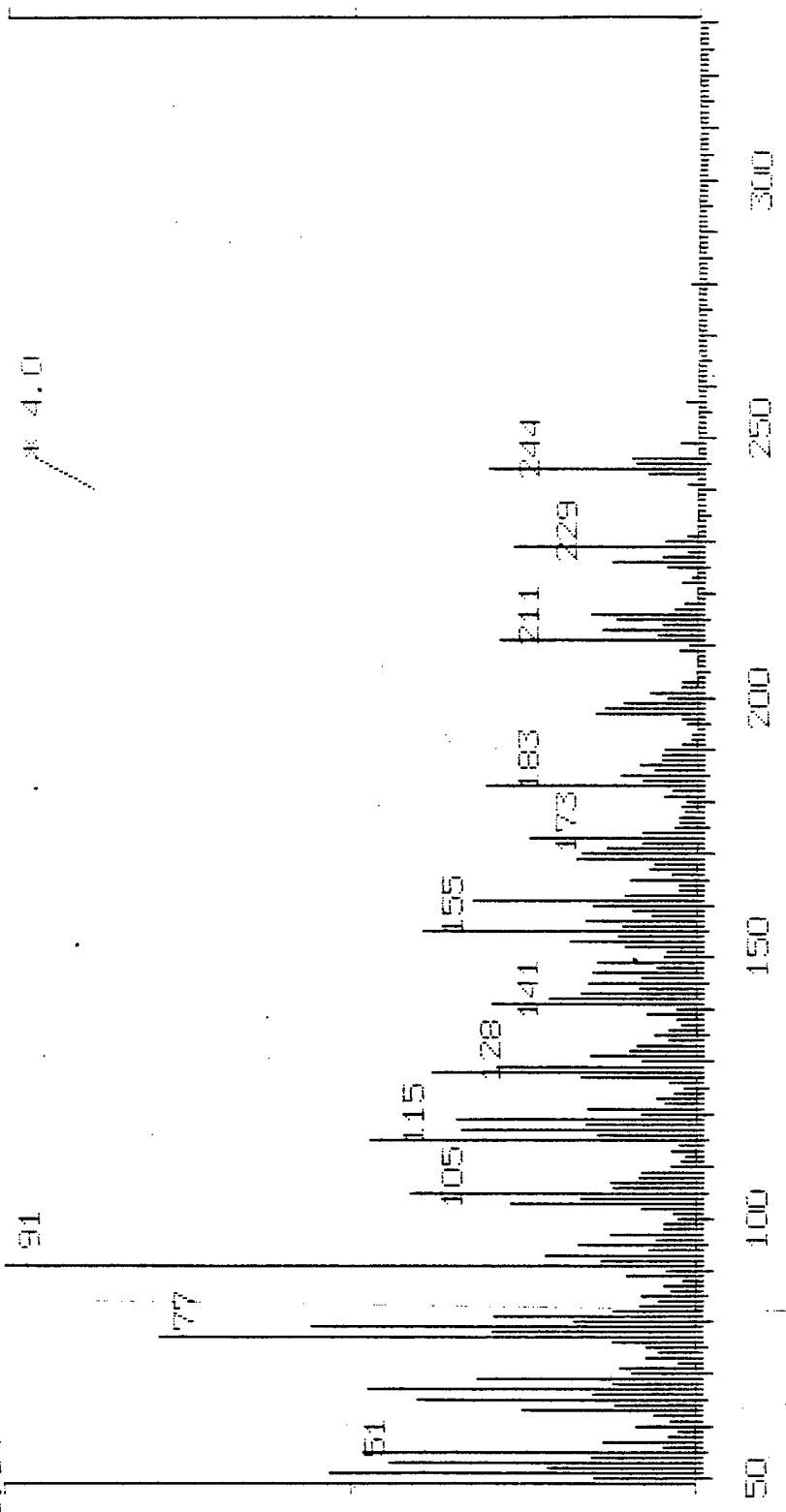
ESPECTRO 1- A) Espectro de UV  $\lambda_{\max}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) do composto **HB-15**.

ESPECTRO 2 - B) Espectro de IV (KBr) do composto - **HB-15**.

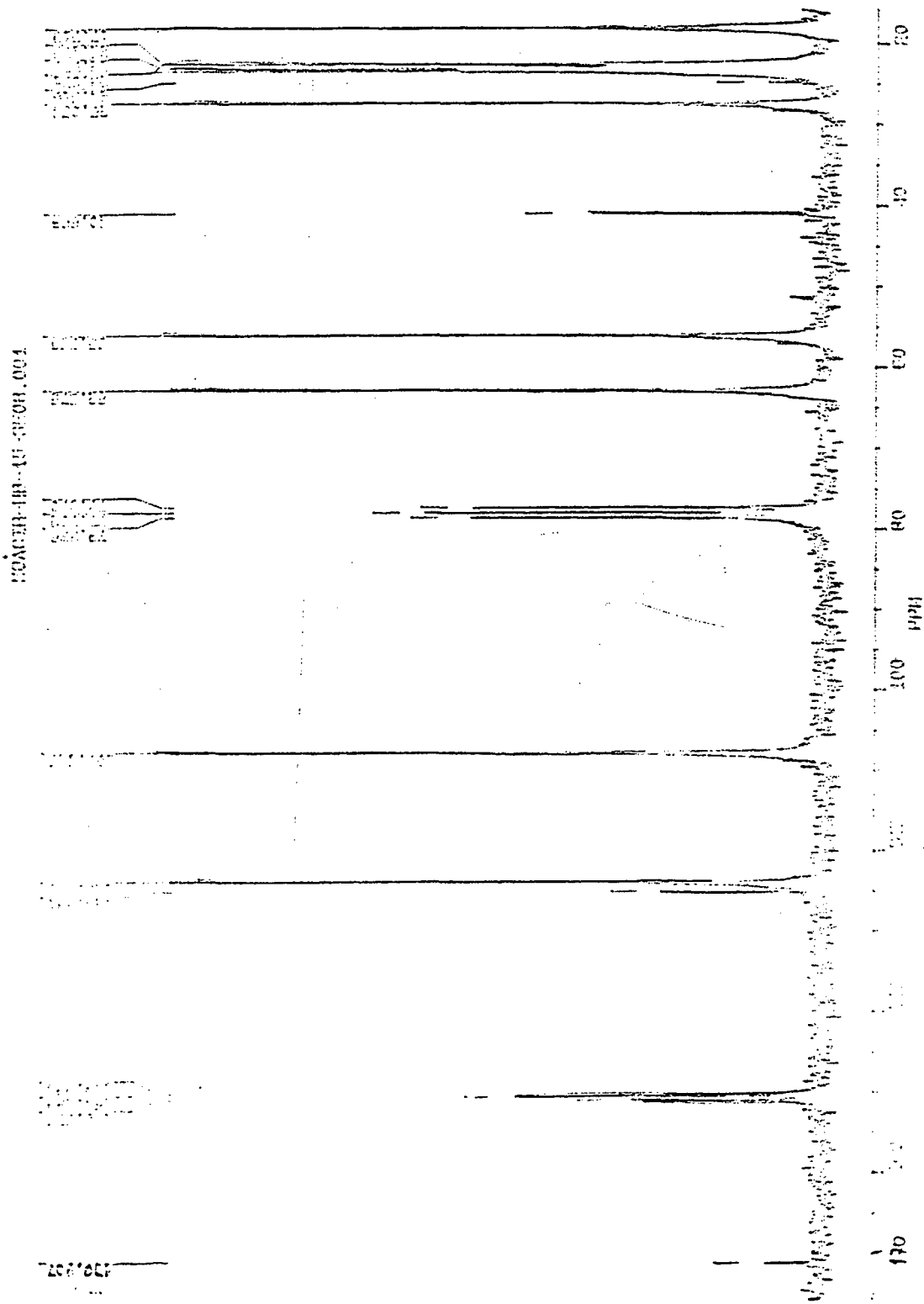


Mass Spectrum File: hb15 .01 95-09-13 15:39  
Comment: Moacir HB15 - 60C/min

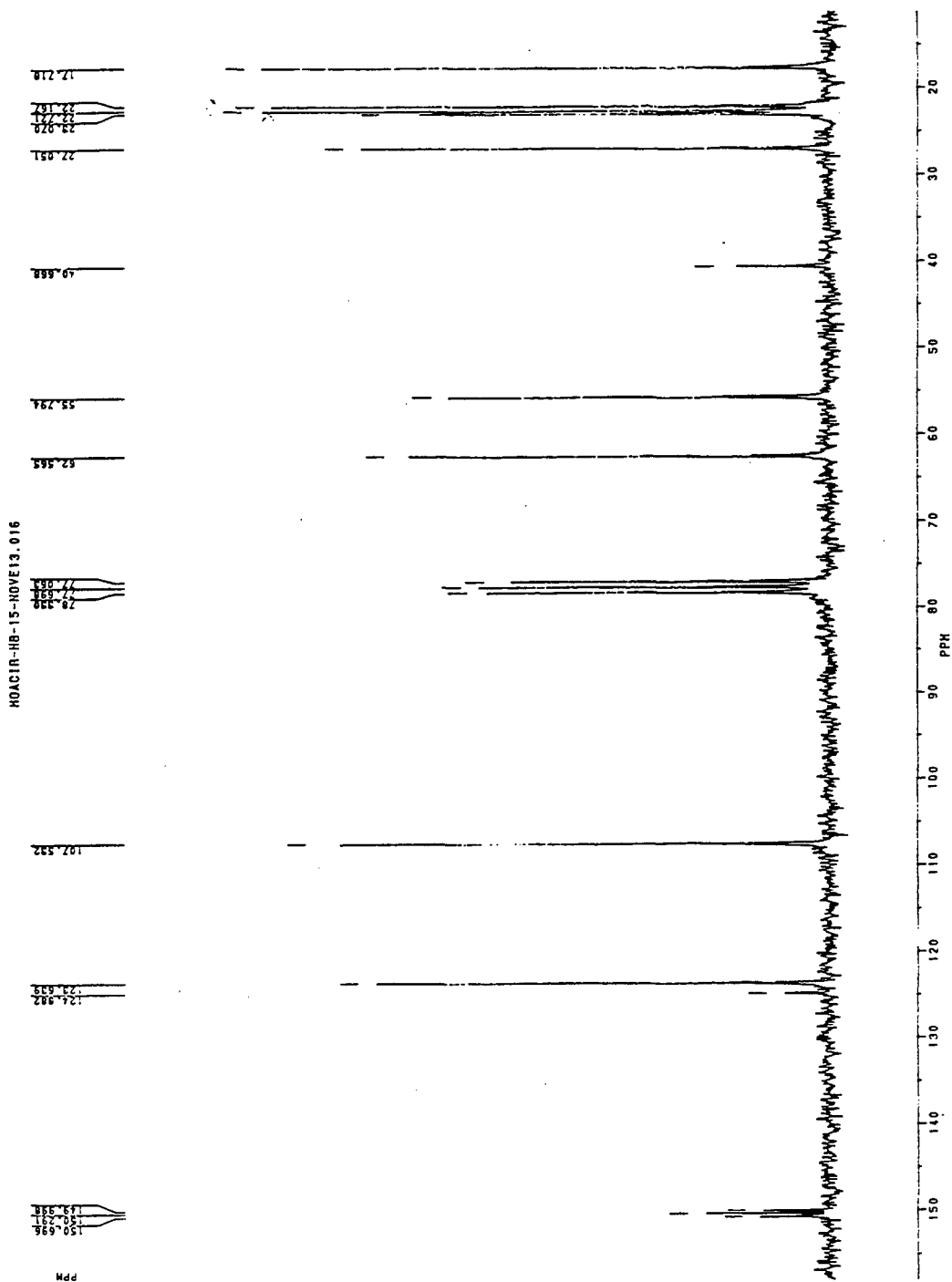
Scan: 735 (0-0) R.T.: 34.50min Base Peak: 91.0 Int: 14070(=100%)  
100.0%



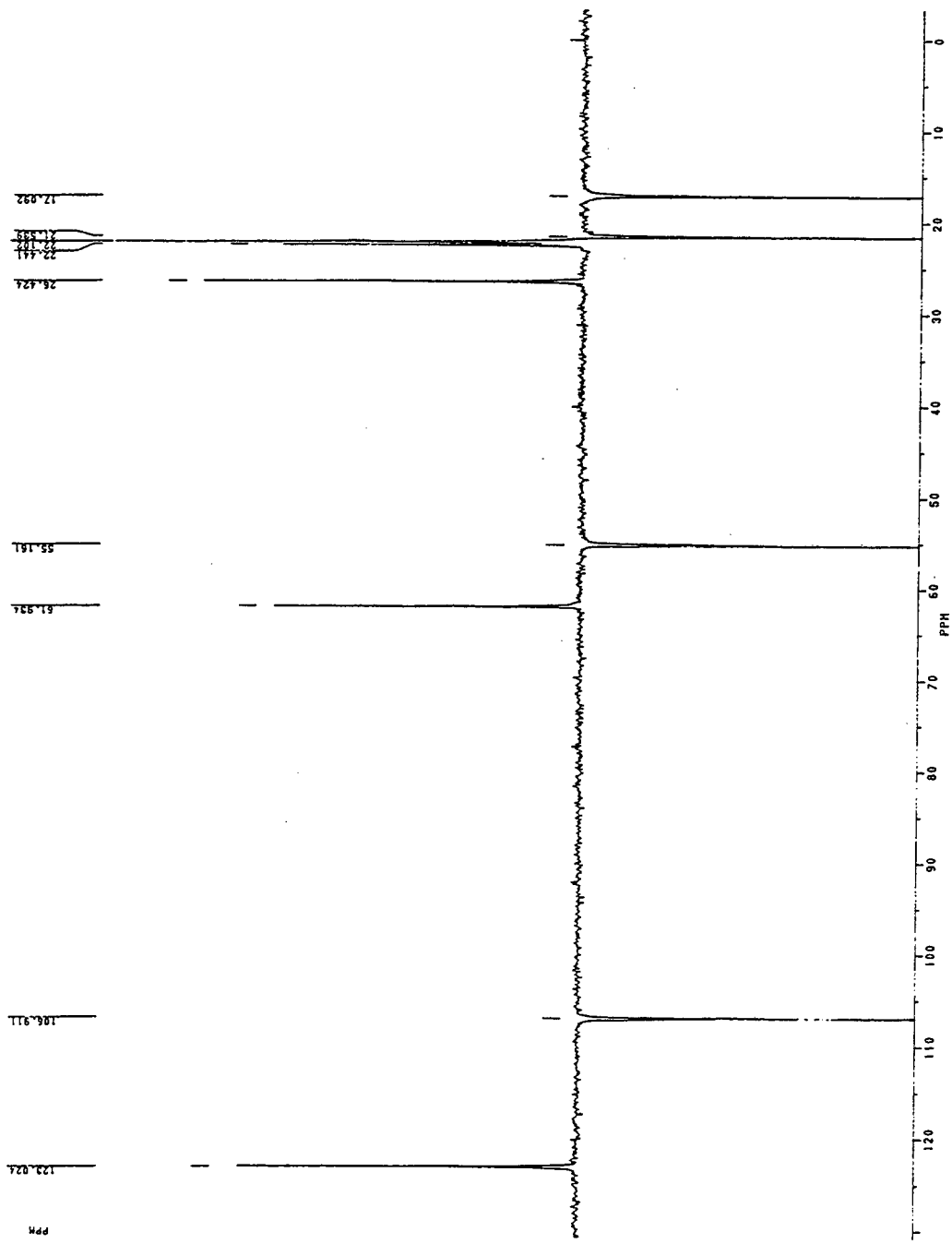
ESPECTRO 3 - Espectro de massas do composto -HB-15.



ESPECTRO 4 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 Mhz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto HB-15.

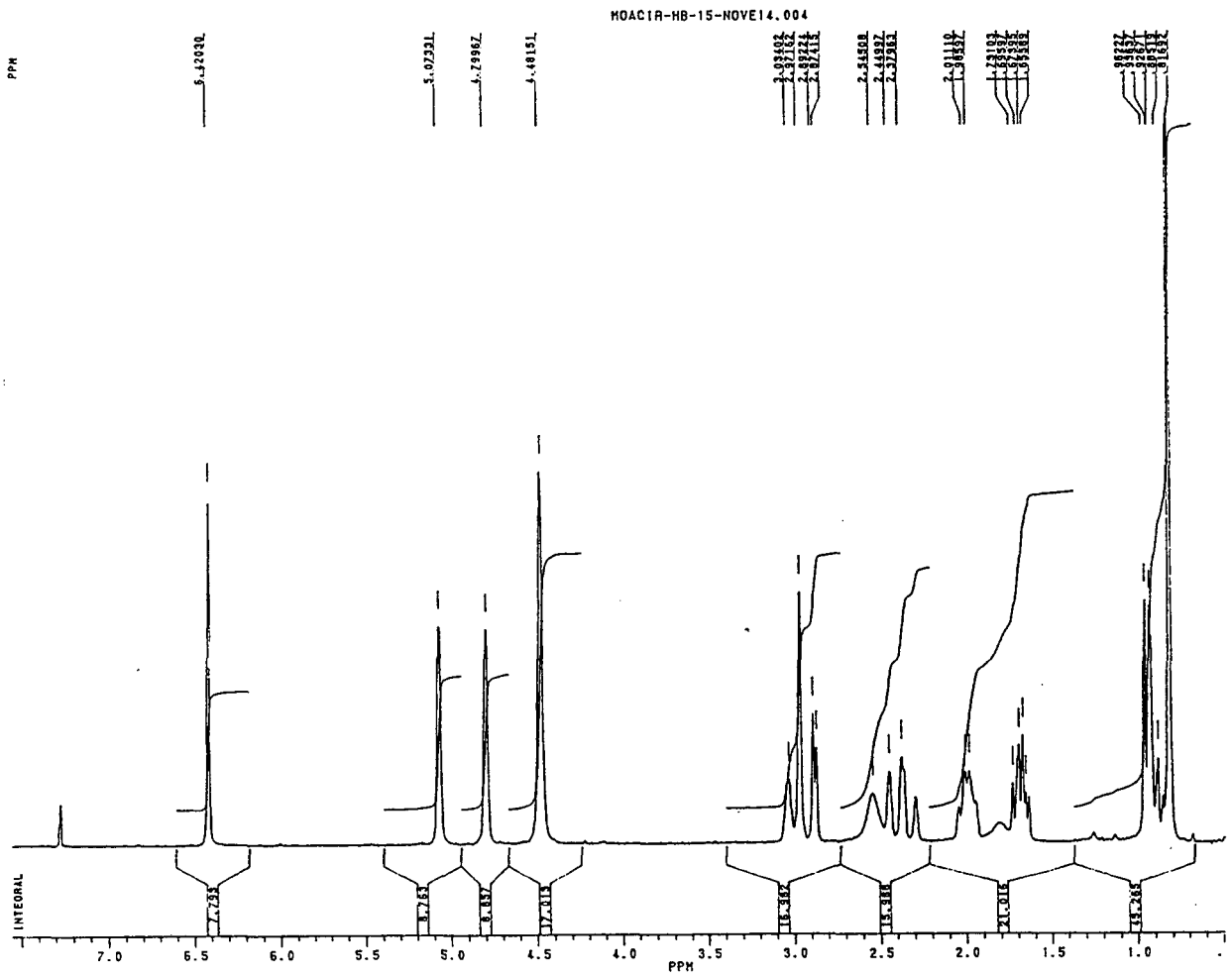


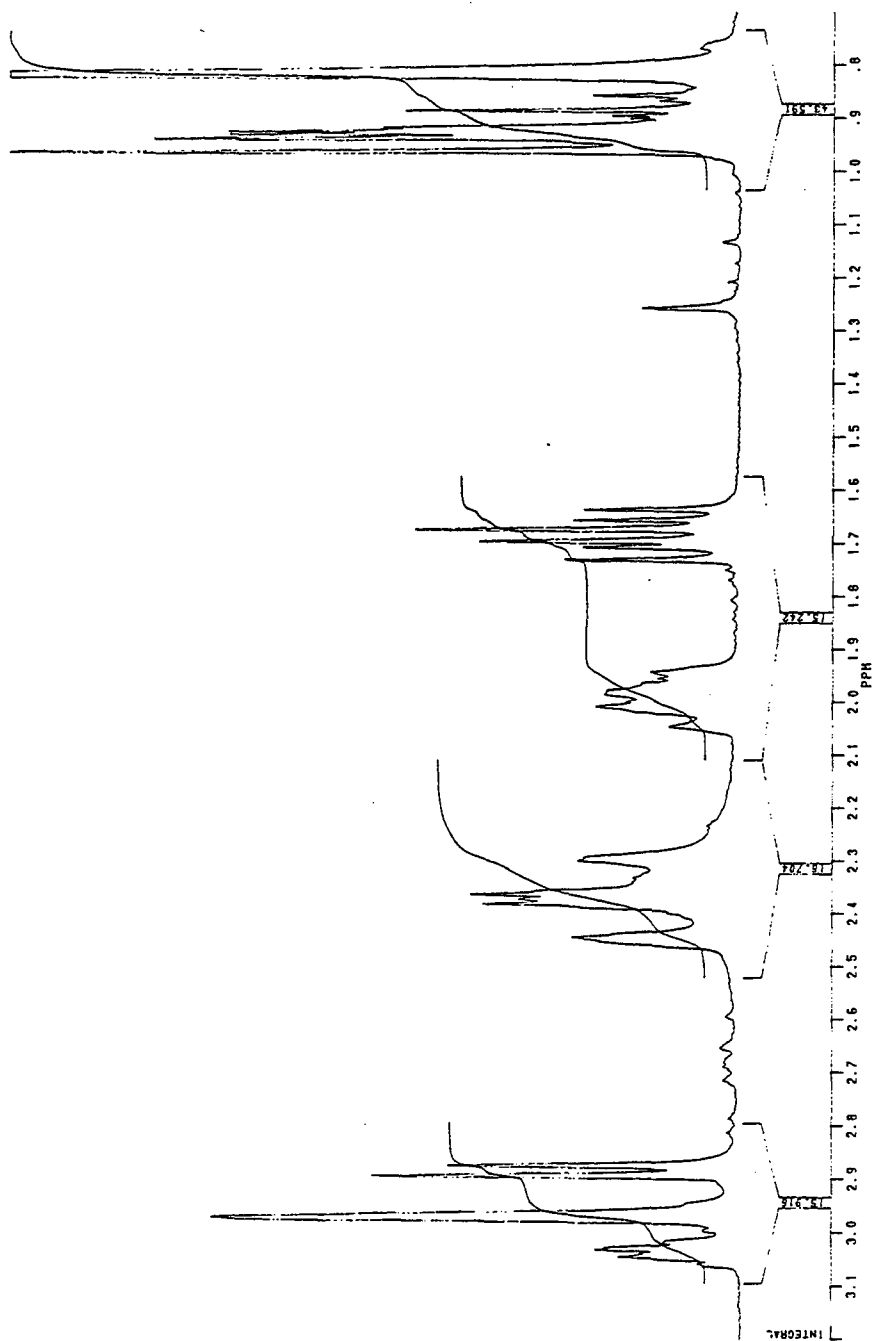
ESPECTRO 4a - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 Mhz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto HB-15 ampliada de 20 a 155 ppm.



ESPECTRO 5 - Espectro RMN <sup>13</sup> C/DEPT 135 do composto HB-15.

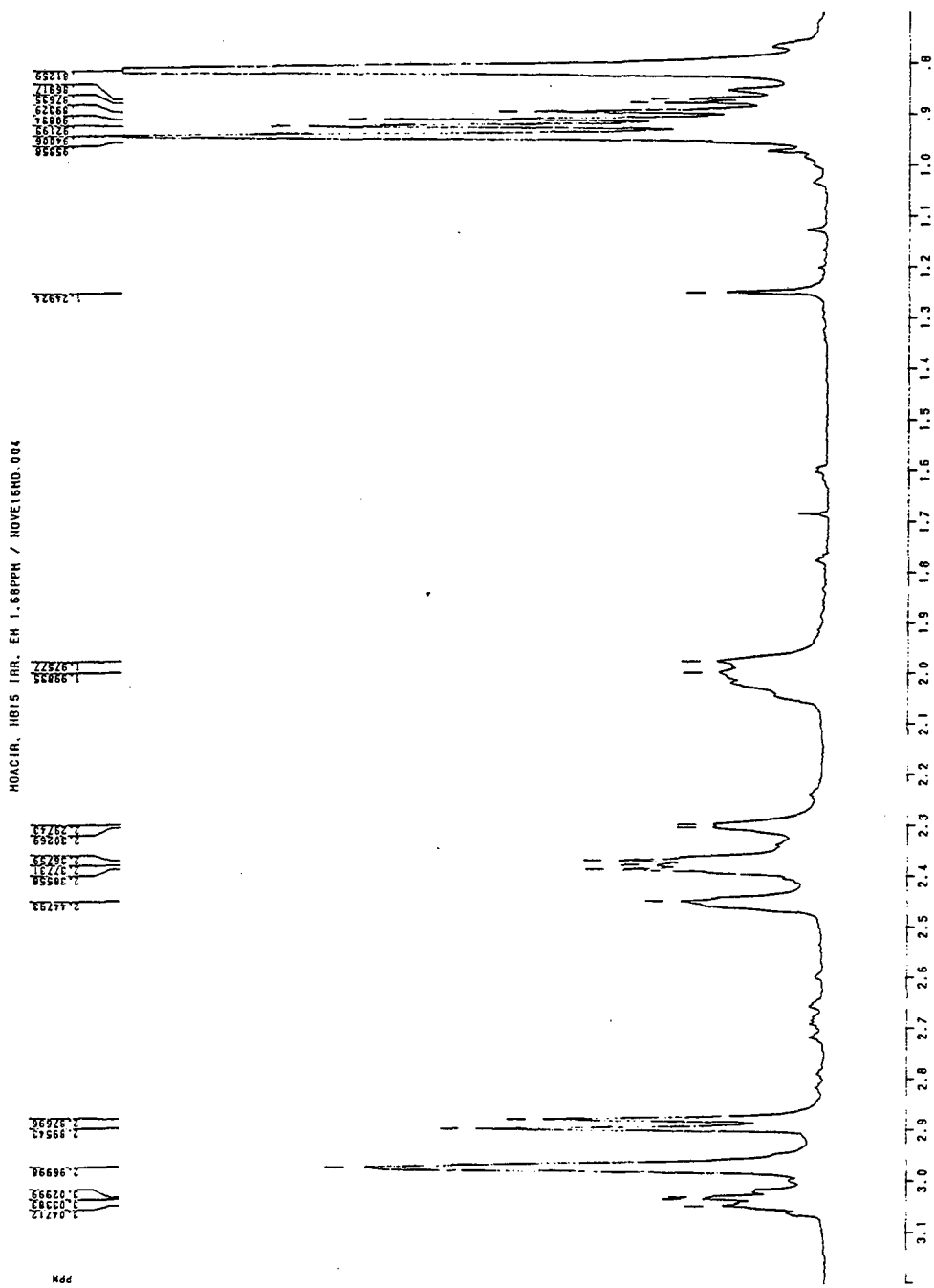
ESPECTRO 6 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15**.





ESPECTRO 6a - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto HB-15 expandido na região de 0.7 ppm a 3.2 ppm.

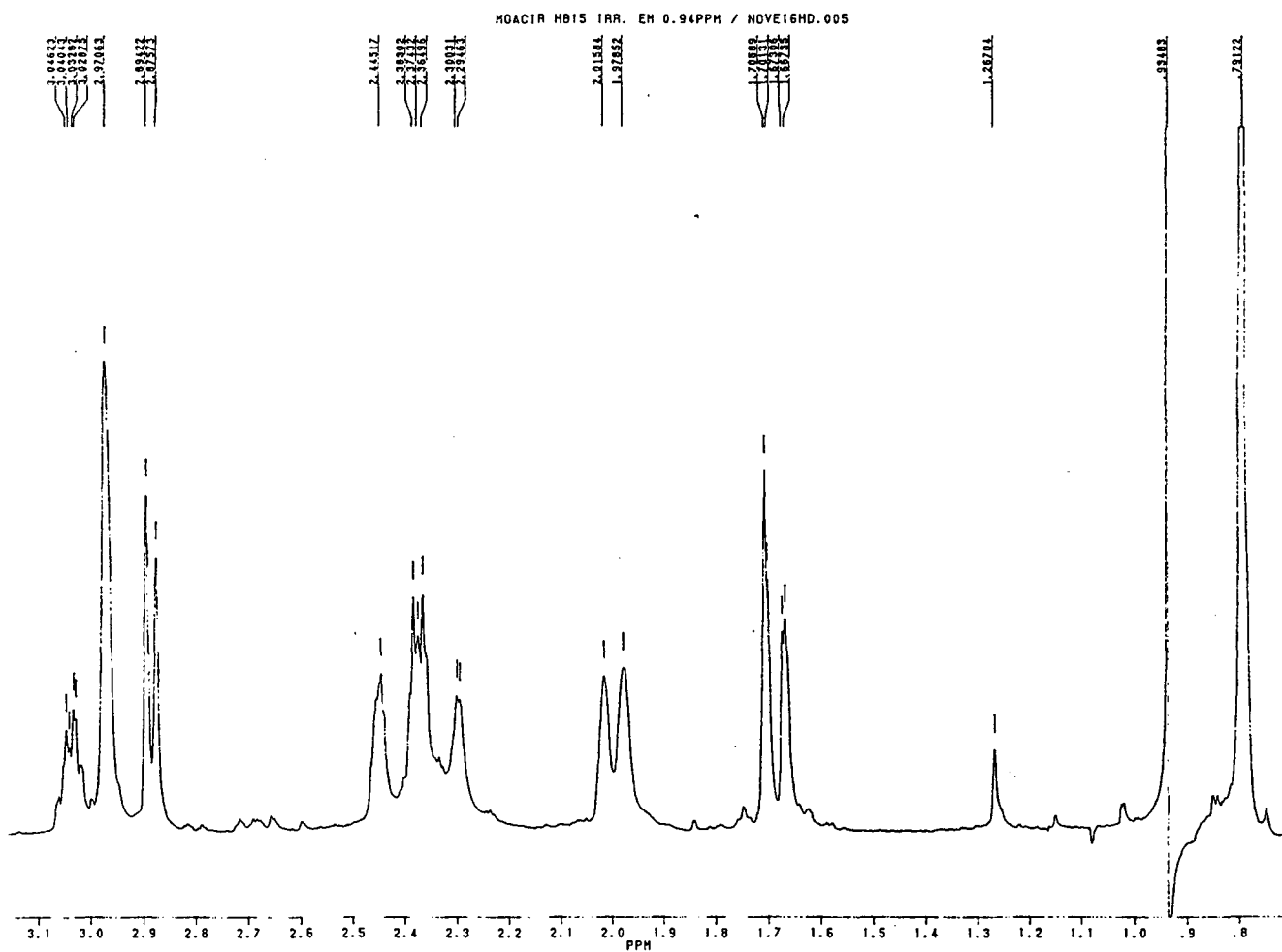




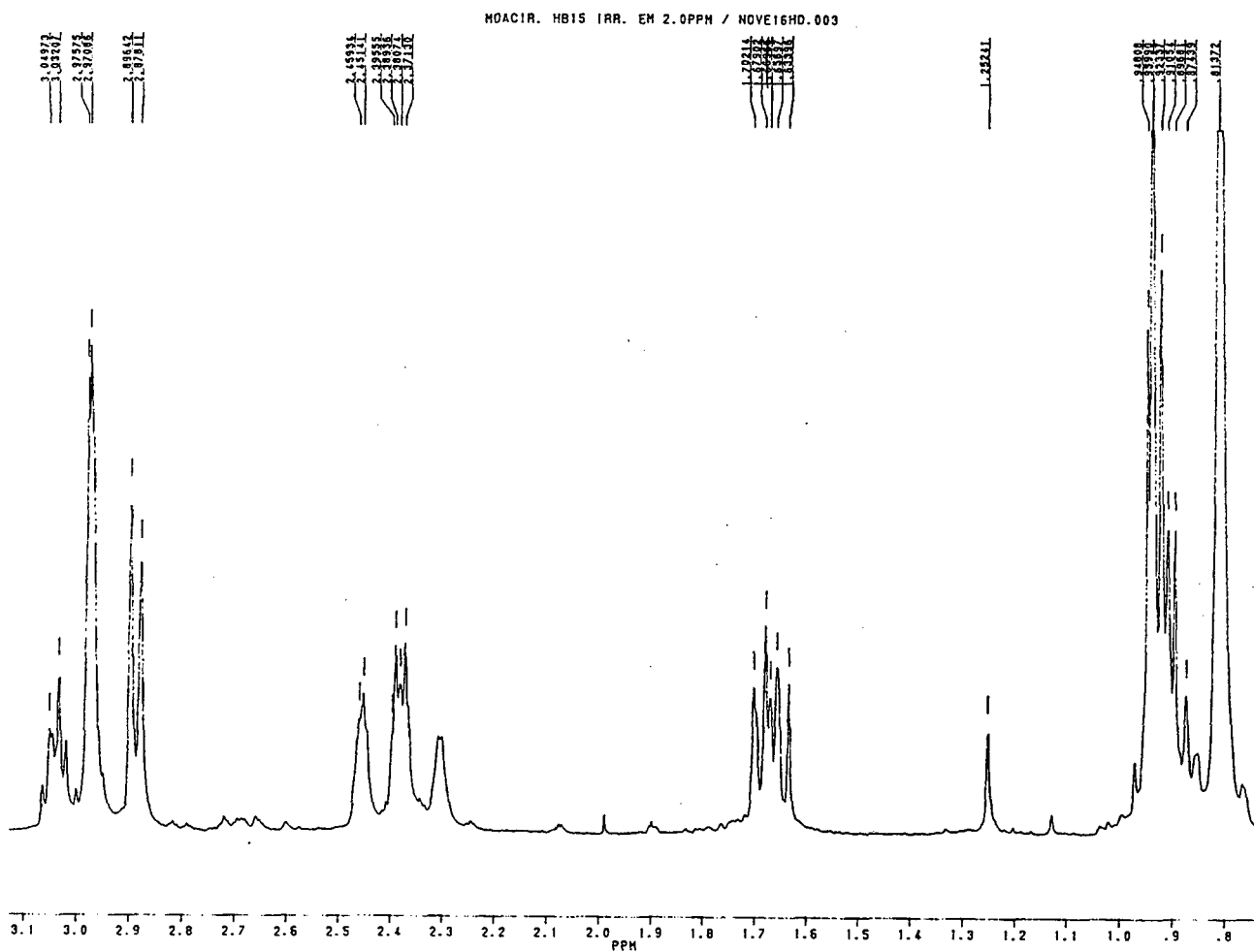
ESPECTRO 7 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200MHz) em CDCl<sub>3</sub> do composto HB-15

irradiado a 1.68 ppm.

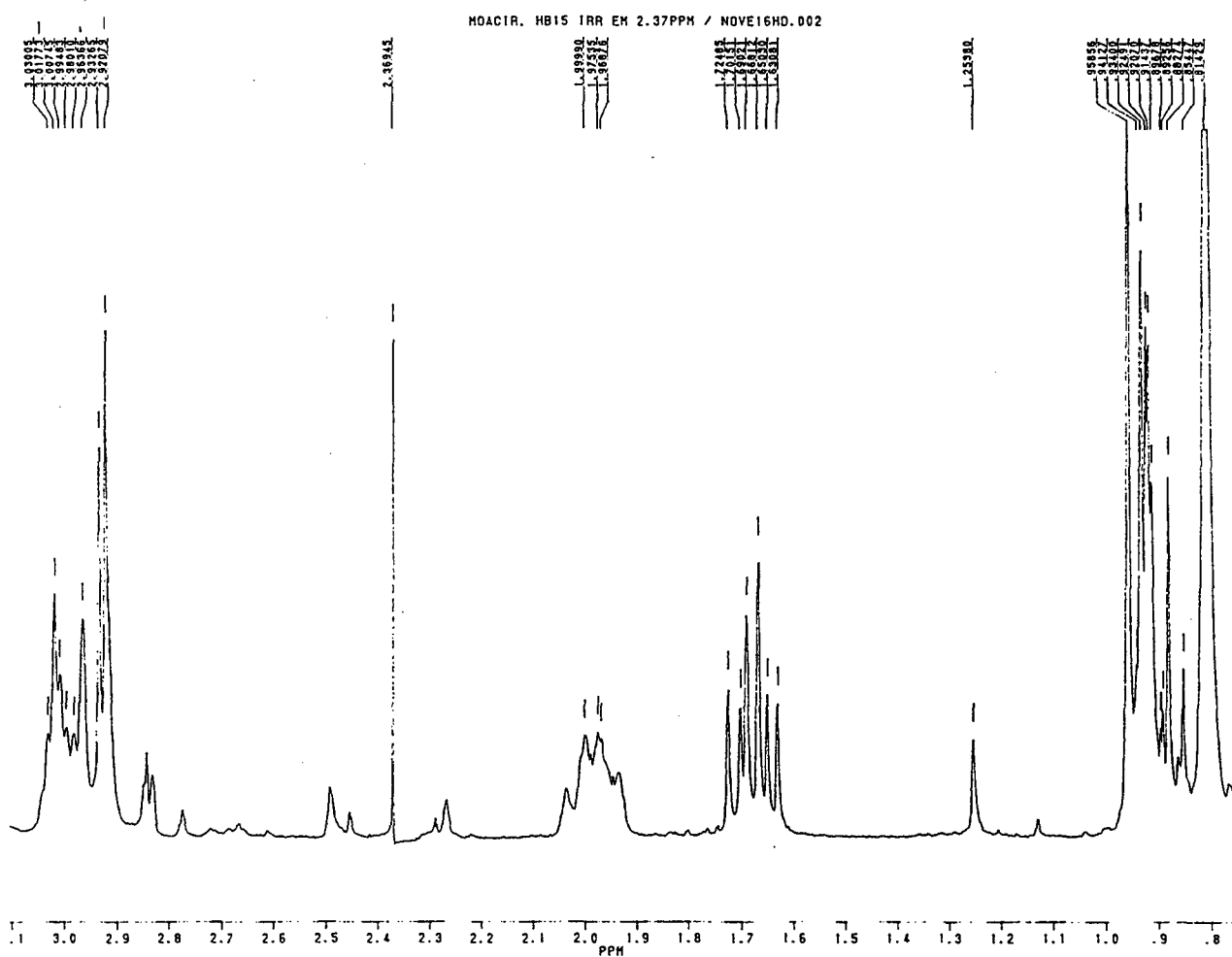
ESPECTRO 7a - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15** irradiado a 0.94 ppm.



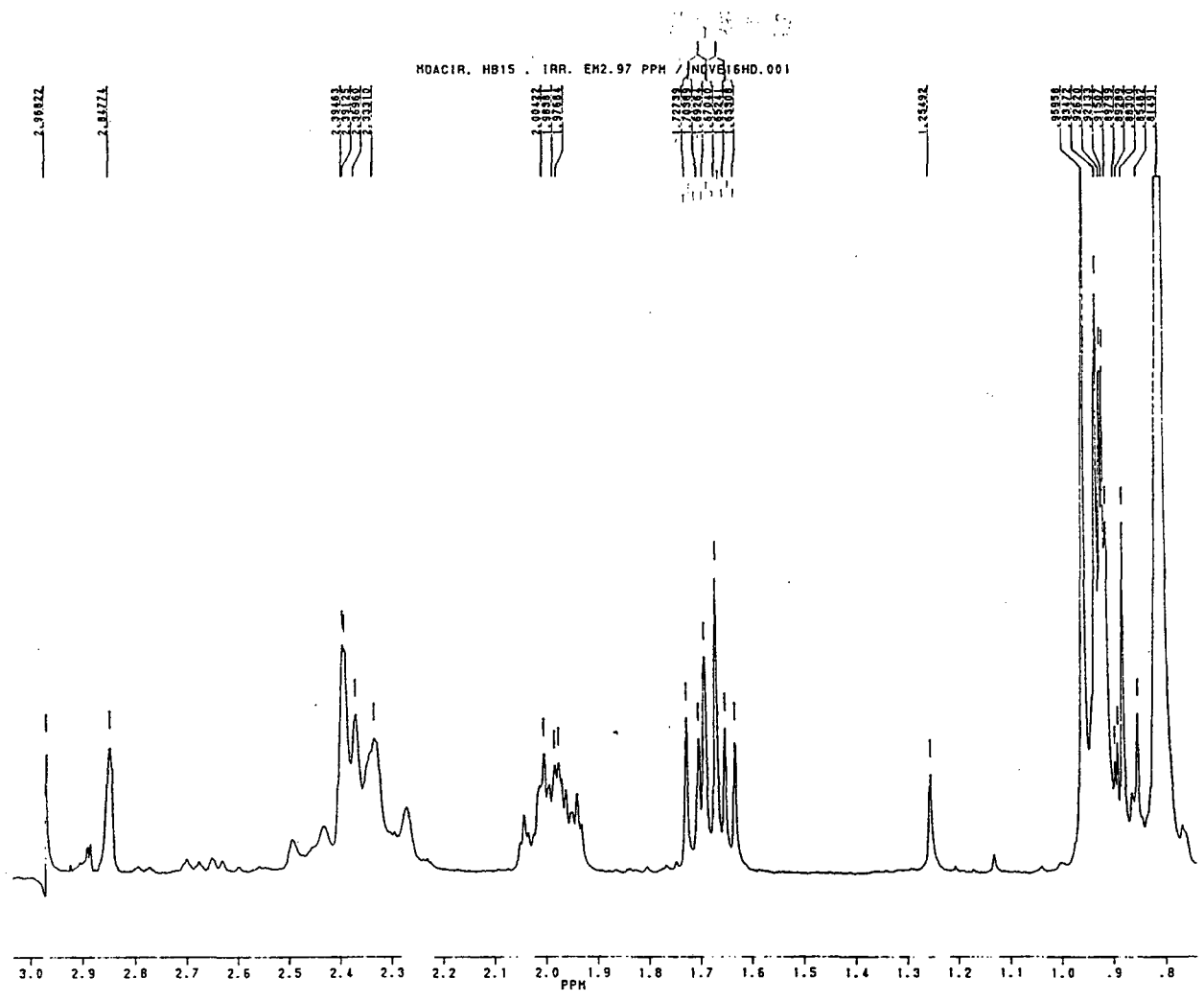
ESPECTRO 7b - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15** irradiado a 2.0 ppm.

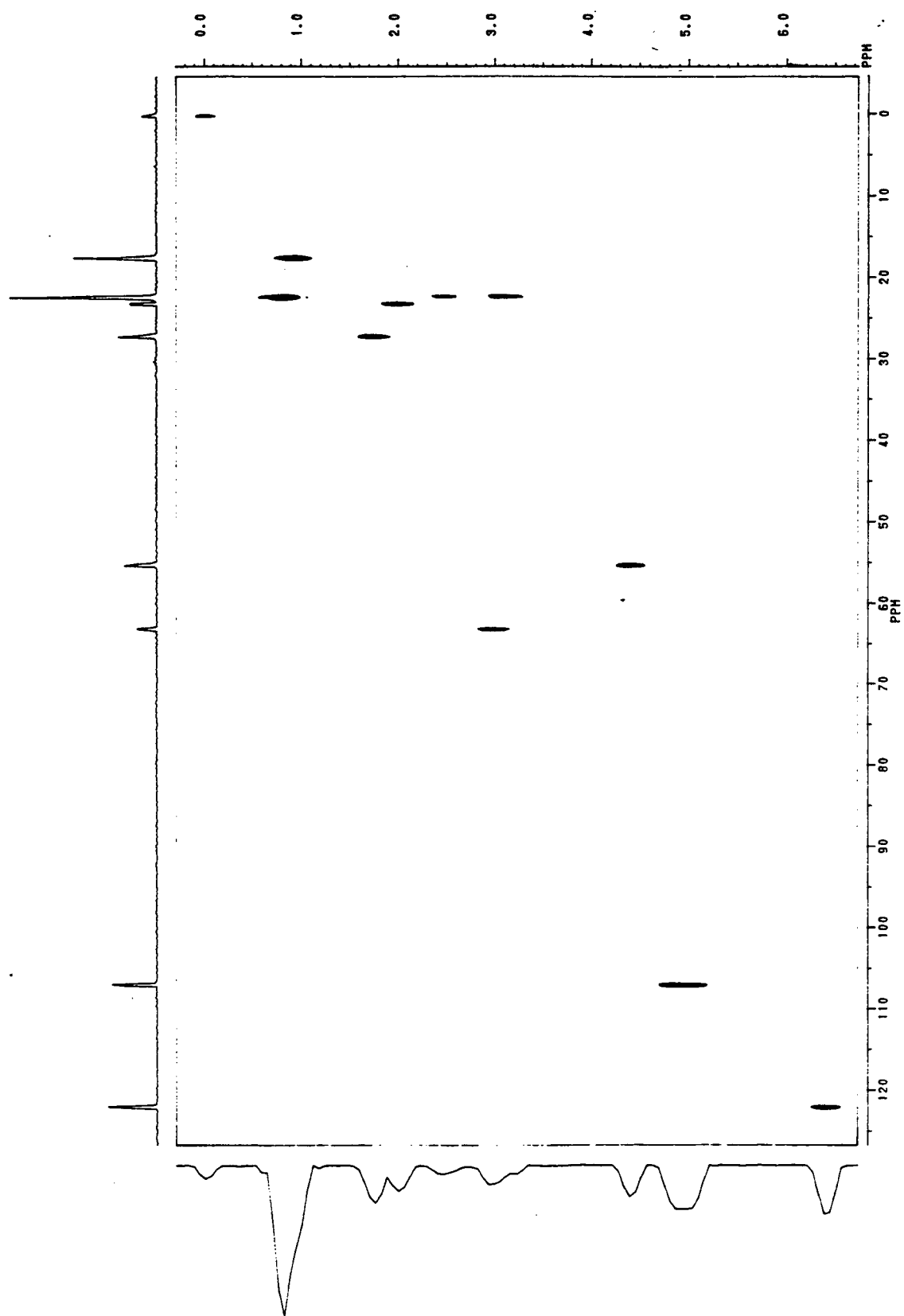


ESPECTRO 7c - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15** irradiado a 2.37 ppm.



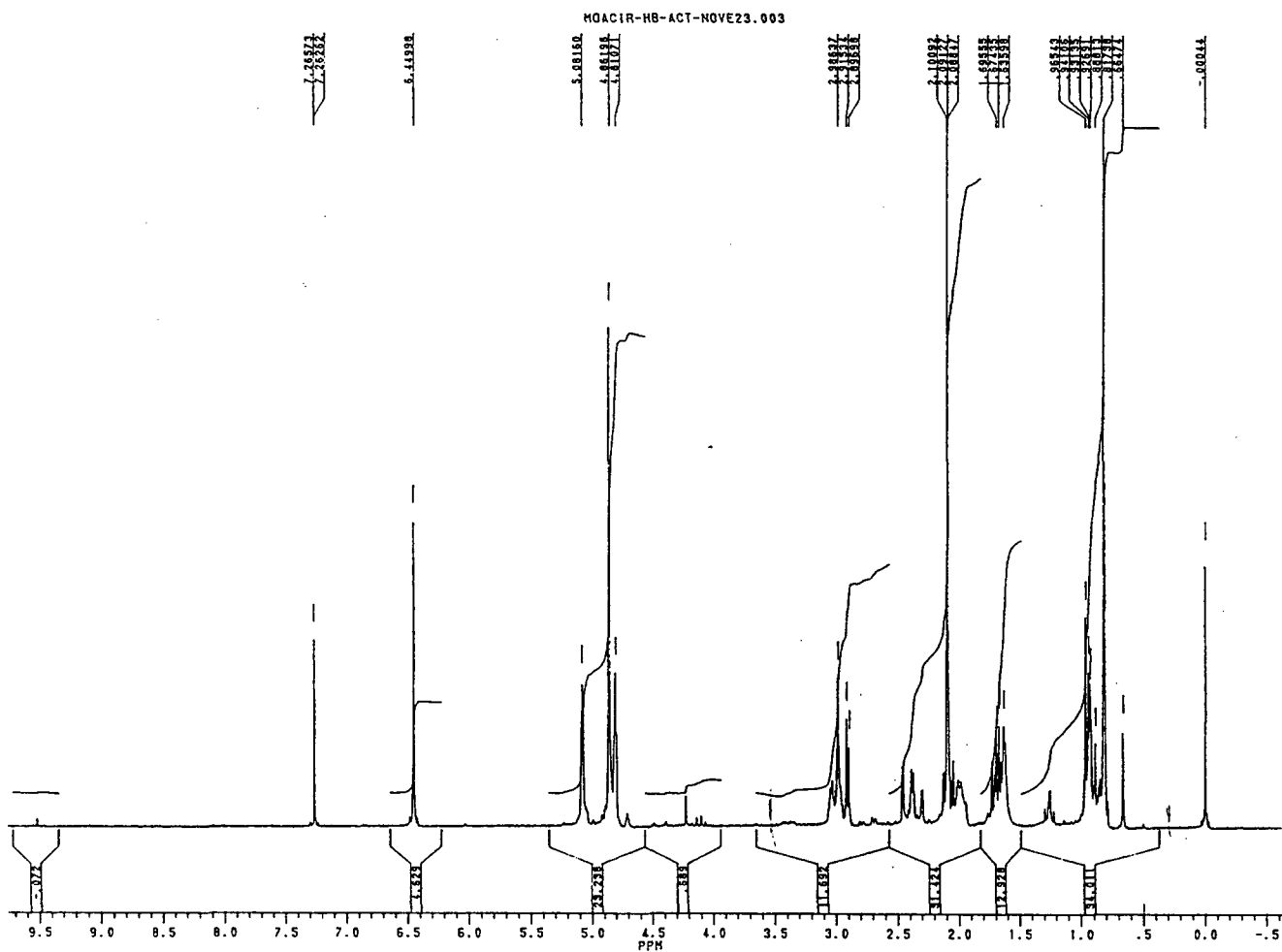
ESPECTRO 7d - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15** irradiado a 2.97 ppm.



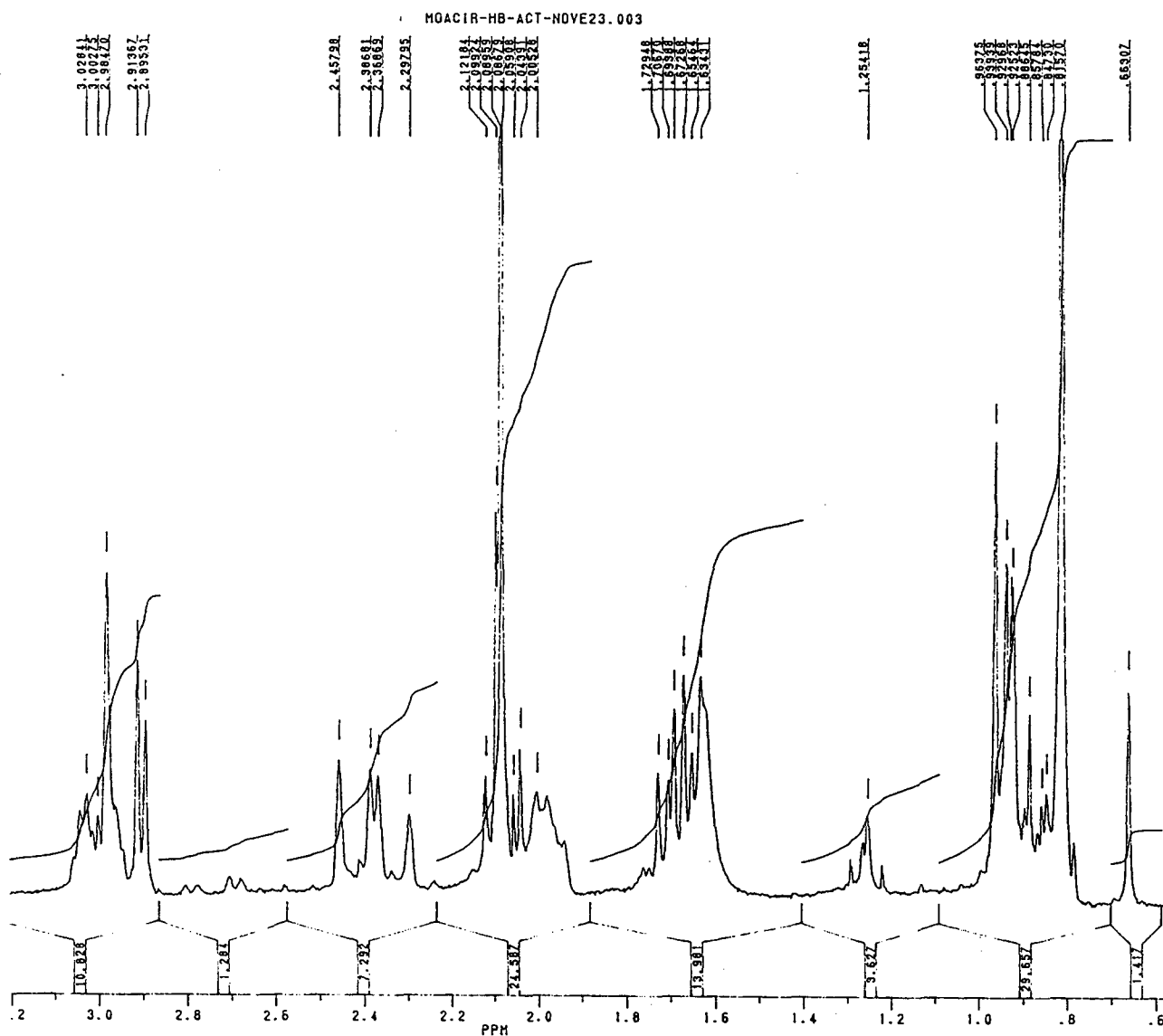


ESPECTRO 8 - Espectro de RMN HETCOR do composto **HB-15**.

ESPECTRO 9-Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHZ) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15 Acetilado**.

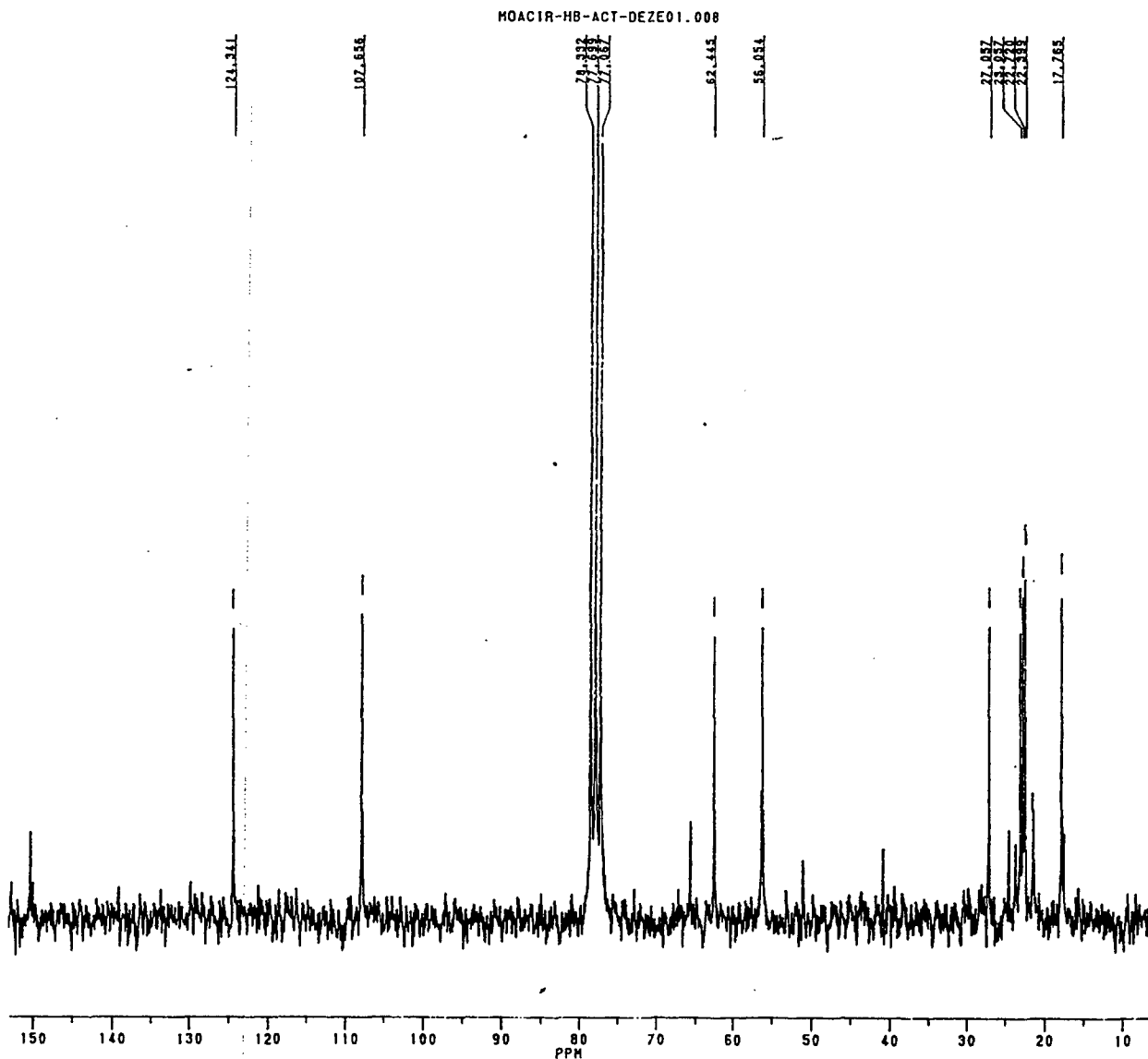


ESPECTRO 9a - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHZ) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15 Acetilado** expandido na região de 0.6 ppm a 3.6 ppm.

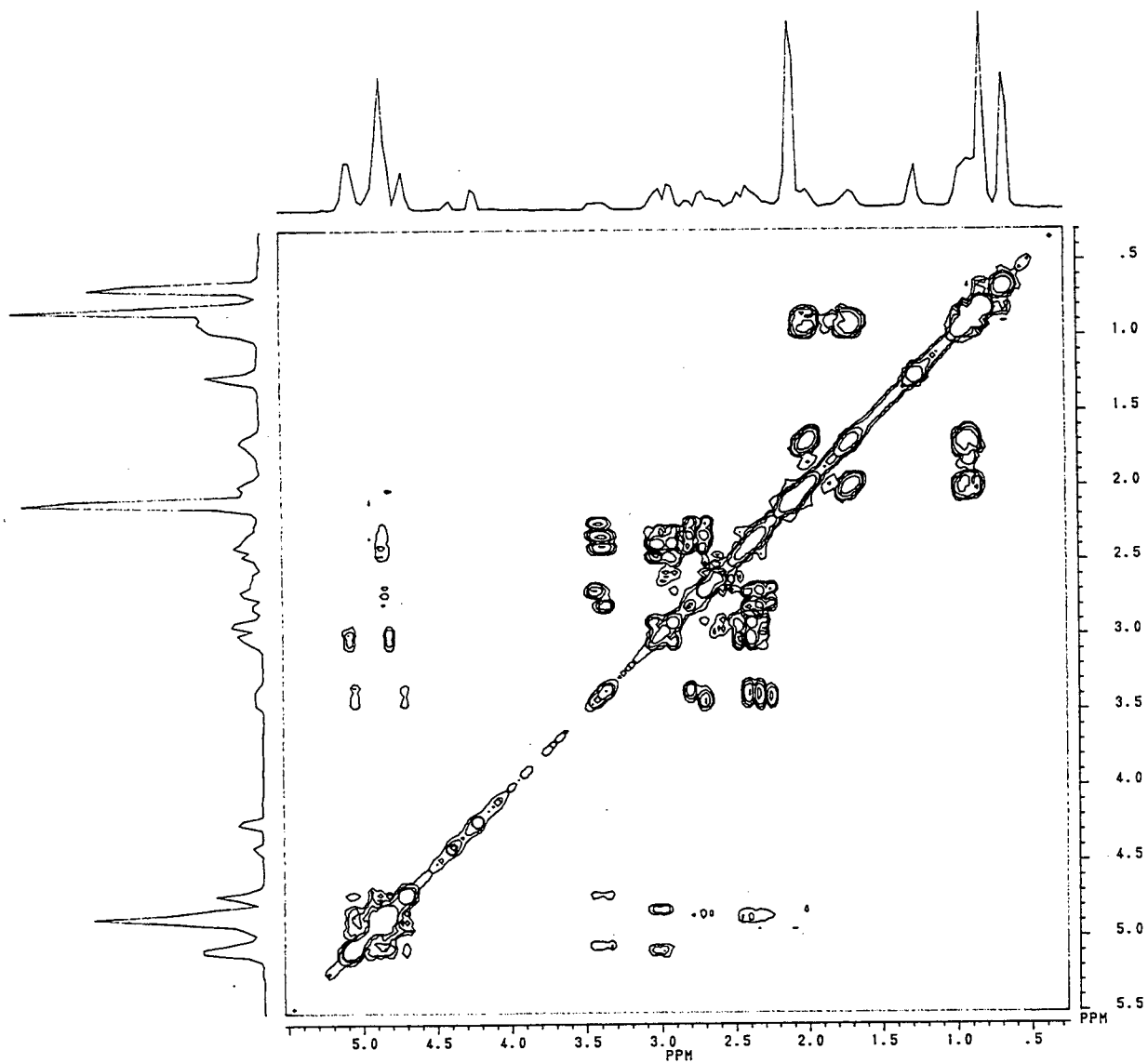




ESPECTRO 10 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50MHZ) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-15 Acetilado**.



ESPECTRO 11 - Espectro de RMN COSY do composto **HB-15 Acetilado**.



A recristalização lenta em hexano: acetato de etila (95:5) do composto **HB-15**, resultou na obtenção de monocristais, que foram selecionados quanto a tamanho e pureza, com auxílio de um microscópio de luz polarizada .

Assim, foi selecionado um monocristal adequado e submetido a análise por difração de raio-X, obtendo-se os seguintes dados estruturais:

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| <b>C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub></b> | <b>β = 93,34 (2)<sup>0</sup></b> |
| <b>monoclínico</b>                               | <b>Z = 2</b>                     |
| <b>grupo espacial P2<sub>1</sub> (nr.4)</b>      | <b>R = 3,31%</b>                 |
| <b>a = 7,293(1) Å</b>                            | <b>Rw = 3,66%</b>                |
| <b>b = 5,825 (2) Å</b>                           | <b>1277 reflexões medidas</b>    |
| <b>c = 14,419(3) Å</b>                           | <b>1182 reflexões observadas</b> |
|  | <b>170 parâmetros refinados</b>  |

A estrutura é estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre O3 (doador, oxigênio da hidroxila ) e O2' (receptor, oxigênio da carbonila). [distância: 2,851(4)Å].

Figura 11.

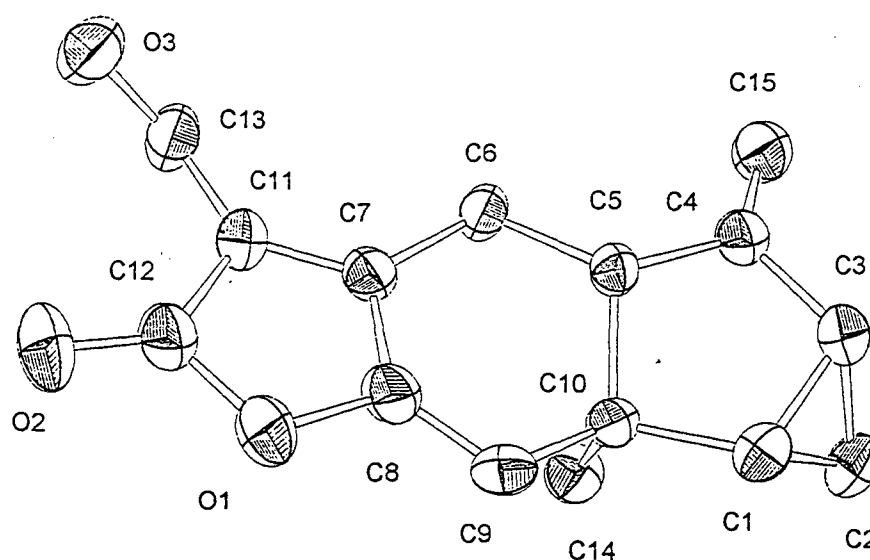


FIGURA 10- Estrutura do composto HB-15 obtida através de análise por difração de raio X.

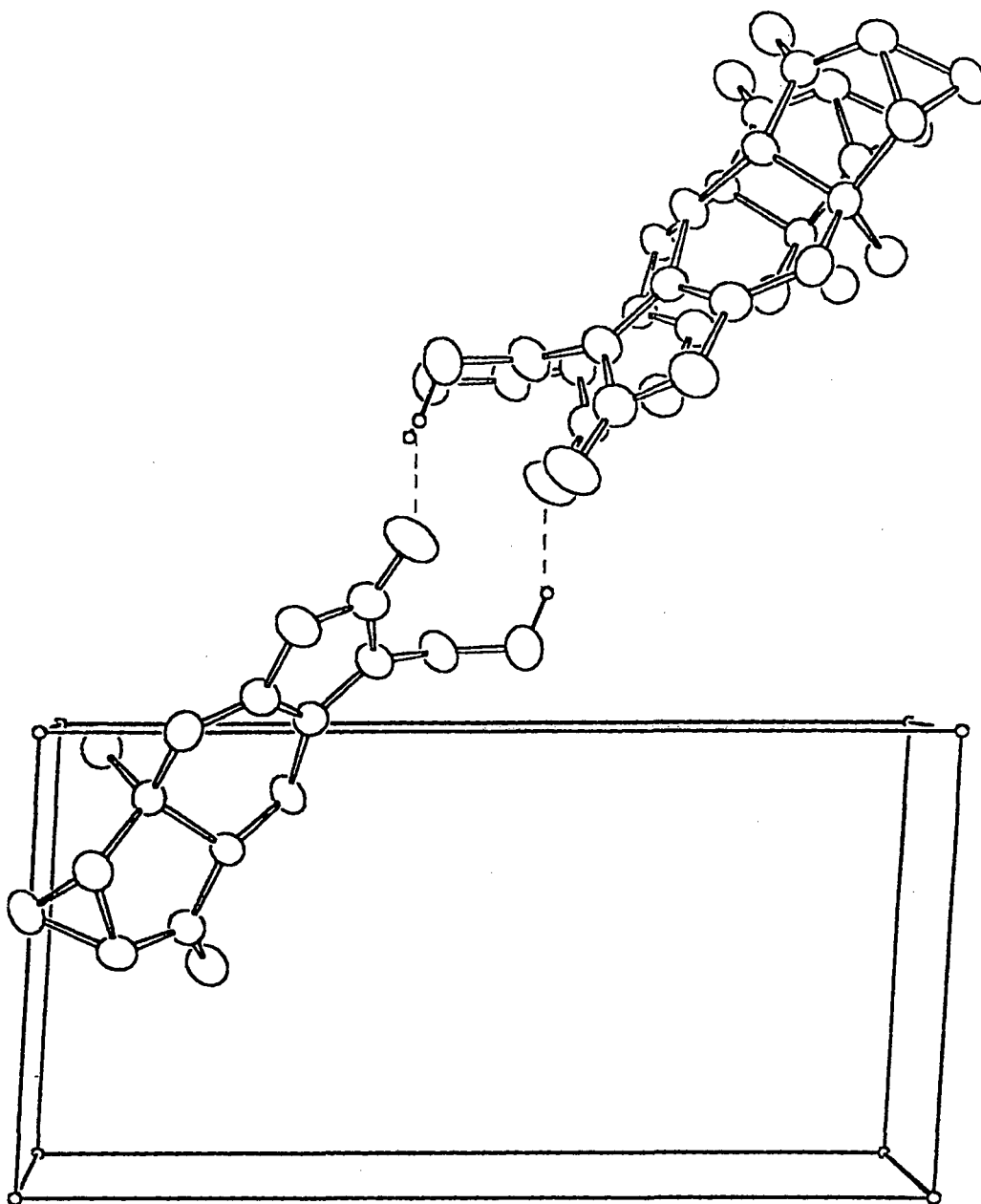


Figura 11 - Estrutura demonstrando a ligação de ponte de hidrogênio intermoleculares que ocorrem para estabilizar a rede cristalina.

TABELA 4 - Distância de ligação em Å para o composto **HB-15** determinados por difração de raio X.

| Atomo 1 - Atomo 2 | Distância |
|-------------------|-----------|
| O(1) - C(12)      | 1.387(3)  |
| O(1) - C(8)       | 1.391(3)  |
| O(2) - C(12)      | 1.201(3)  |
| O(3) - C(13)      | 1.409(3)  |
| C(1) - C(2)       | 1.498(4)  |
| C(1) - C(3)       | 1.515(4)  |
| C(1) - C(10)      | 1.539(3)  |
| C(2) - C(3)       | 1.509(3)  |
| C(3) - C(4)       | 1.503(4)  |
| C(4) - C(15)      | 1.307(4)  |
| C(4) - C(5)       | 1.509(3)  |
| C(5) - C(6)       | 1.524(3)  |
| C(5) - C(10)      | 1.553(3)  |
| C(6) - C(7)       | 1.504(3)  |
| C(7) - C(11)      | 1.346(3)  |
| C(7) - C(8)       | 1.450(3)  |
| C(8) - C(9)       | 1.328(3)  |
| C(9) - C(10)      | 1.510(3)  |
| C(10) - C(14)     | 1.540(3)  |
| C(11) - C(12)     | 1.464(4)  |
| C(11) - C(13)     | 1.494(4)  |

TABELA 5 - Ângulo de ligação entre os átomos do composto HB-15 em graus.

| Átomo 1- Átomo 2- Átomo 3 | Ângulo de ligação |
|---------------------------|-------------------|
| C(12)- O(1)- C(8)         | 106.9(2)          |
| C(2)- C(1)- C(3)          | 60.1(2)           |
| C(2)- C(1)- C(10)         | 118.7(2)          |
| C(3)- C(1)- C(10)         | 107.1(2)          |
| C(1)- C(2)- C(3)          | 60.5(2)           |
| C(4)- C(3)- C(2)          | 120.1(2)          |
| C(4)- C(3)- C(1)          | 106.7(2)          |
| C(2)- C(3)- C(1)          | 59.4(2)           |
| C(15)- C(4)- C(3)         | 127.9(2)          |
| C(15)- C(4)- C(5)         | 127.6(2)          |
| C(3)- C(4)- C(5)          | 104.4(2)          |
| C(4)- C(5)- C(6)          | 122.2(2)          |
| C(4)- C(5)- C(10)         | 103.2(2)          |
| C(6)- C(5)- C(10)         | 113.7(2)          |
| C(7)- C(6)- C(5)          | 106.7(2)          |
| C(11)- C(7)- C(8)         | 108.2(2)          |
| C(11)- C(7)- C(6)         | 131.6(2)          |
| C(8)- C(7)- C(6)          | 120.2(2)          |
| C(9)- C(8)- O(1)          | 124.3(2)          |
| C(9)- C(8)- C(7)          | 126.8(2)          |
| O(1)- C(8)- C(7)          | 108.7(2)          |
| C(8)- C(9)- C(10)         | 115.7(2)          |
| C(9)- C(10)- C(1)         | 116.4(2)          |
| C(9)- C(10)- C(14)        | 107.0(2)          |
| C(1)- C(10)- C(14)        | 112.4(2)          |
| C(9)- C(10)- C(5)         | 108.0(2)          |
| C(1)- C(10)- C(5)         | 101.3(2)          |
| C(14)- C(10)- C(5)        | 111.8(2)          |
| C(7)- C(11)- C(12)        | 107.2(2)          |
| C(7)- C(11)- C(13)        | 129.4(2)          |
| C(12)- C(11)- C(13)       | 123.3(2)          |
| O(2)- C(12)- O(1)         | 120.1(3)          |
| O(2)- C(12)- C(11)        | 131.1(3)          |
| O(1)- C(12)- C(11)        | 108.8(2)          |
| O(3)- C(13)- C(11)        | 112.1(2)          |

A distância de ligação entre o C4 e o C15 1.307 Å, entre o C8 e C9 1.328 Å e entre C7 e C11 1.346 Å, demonstra trata-se de uma ligações  $\pi$  confirmando o posicionamento das duplas ligações na molécula.

A distância entre o O2 e C12 1.201Å em relação ao O1 e C8 e O1 e C12, demonstra que o C12 trata-se de uma carbonila C=O, a qual está ligada a outro oxigênio que por sua vez está ligado a um carbono de dupla ligação formando nitidamente uma metade lactona.

O ângulo descrito entre os carbonos C1-C3-C2 (60°) e C1-C2-C3 (60.5°) mostra claramente a existência de um anel ciclopropano, presente na molécula.

Os dados obtidos pela análise por difração de Raio X, confirmam a estrutura proposta anteriormente estabelecendo as estereoquímicas relativas do anel ciclopropano, da metila C14 e do exometileno com o próton H5 (FIGURA 12).

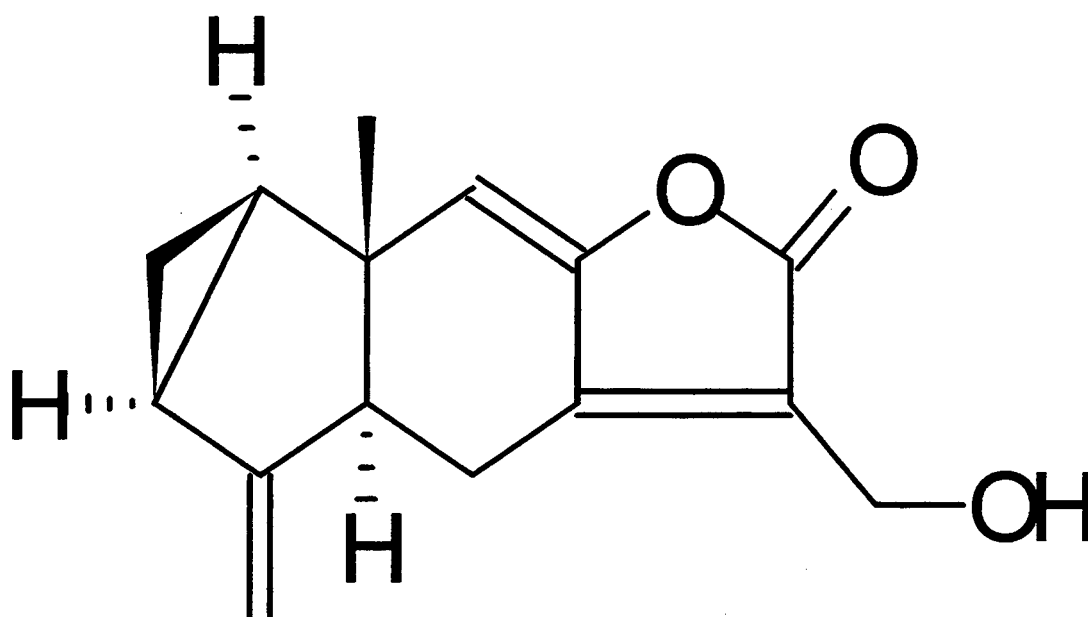


FIGURA 12 - Estrutura do composto **HB-15**

A estrutura do composto apresenta-se idêntica a do Onoseriolídeo isolado pela primeira vez de *Onoseris Albicans* (Compositae) em 1981, a literatura descreve apenas os dados de próton para esse composto.

### 5.3- Identificação Do composto HB-8

O composto obtido do fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *Hedyosmum brasiliense*, após recristalização em hexano: acetato de etila 1%, resultou na obtenção de cristais (110mg) com ponto de fusão 110<sup>0</sup>C. A análise por CGAR mostrou um único composto com tempo de retenção de 15.36 minutos.

O espectro de infra vermelho (Espectro 12) mostrou absorções em 3042 cm<sup>-1</sup> para estiramento =C-H olefínico, 2966 e 2946 cm<sup>-1</sup> para estiramento CH alifático, 1750 cm<sup>-1</sup> para carbonila de lactona, 1672 cm<sup>-1</sup> para estiramento C=C, 1400 cm<sup>-1</sup> para desdobramento de CH e 1064 cm<sup>-1</sup> para C-O.

O espectro de massas (Espectro 13) apresentou o íon molecular m/z (%rel) a 230 (32) u.m.a. e os fragmentos [M-15] 215 (8.5) para perda de um radical metil, e mais dois fragmentos em m/z 120 (48) e 105 (100).

O espectro de RNM <sup>13</sup>C (Espectro 14) analisado juntamente com o espectro DEPT (Espectro 15) apresenta sinais referentes a quinze átomos de carbono assim distribuídos: três grupos metila ( 8.9, 15.5 e 22.5 ppm), três grupos metilenos alifáticos (31.9, 37.5 e 39.9 ppm), dois grupos metínicos alifático (50.2 ppm, 80 ppm), um grupo metínico olefínico (124.9 ppm), cinco carbonos quaternários olefínicos (122.0, 123.3, 141.3, 143.5 e 164.2ppm) e uma carbonila (174.3 ppm).

Os dados espectrais de RMN <sup>13</sup>C e DEPT, juntamente com o pico molecular a m/z 230 do espectro de massas, permitiram determinar a fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> compatível com a estrutura de um sesquiterpeno lactona tricíclico contendo três ligações duplas.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 16) pode-se identificar a presença de três metilas quaternárias em 1.70 ppm (3H, s), 1.84 ppm (3H, s) e 1.85 ppm (3H, s) estas ressonâncias em campos mais baixos é uma forte indicação de que as metilas correspondentes estão ligadas diretamente a carbonos quaternários de ligação dupla

Um multiplete na região de 2.8 a 3.1 ppm com integração para 4 prótons foi atribuído, através do espectro de HETCOR (Espectro 19), a dois grupos metilenos, cujo os carbonos absorvem em 31,9 ppm e 37,5 ppm considerando seus deslocamentos químicos tipicamente alílicos em RMN <sup>1</sup>H e análise do experimento de dupla irradiação e



HOMOCOSY indicando que estes metilenos correlacionan-se entre si, propôs-se uma metade estrutural  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  entre dois carbonos quaternários de ligação dupla

O espectro de Correlação C-H (HETCOR Espectro 19) mostra o próton em 4.45 ppm está ligado ao carbono oxigenado em 80 ppm, experimentos de dupla irradiação (Espectro 17a a 17d) mostraram que este próton correlaciona-se com o sinal em 2.26 ppm do grupo metino em 50.2 ppm. Por outro lado, a irradiação do próton 2.26 ppm mostra correlações com os prótons 4.45 ppm e 2.59 ppm. O sinal em 2.59 ppm foi atribuído a um dos prótons do grupo metileno em 39.9 ppm. Estas conectividades foram confirmadas através da realização de experimentos bidimensionais HOMOCOSY (Espectro 18) levando a proposição de um metade estrutural  $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{O}-$ .

Analisando as demais correlações obtidas nos espectros de dupla irradiação e HOMOCOSY, observou-se que o próton olefínico em 5.49 ppm apresentava fracas correlações com a metila 1.70 e com o multiplete centrado em 3 ppm. Assim, considerando a existência de correlações H-H a longa distância (alílica e homoalílica) propôs-se uma metade estrutural  $\text{CH}_3-\text{C}=\text{CH}-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$ .

Com base na análise dos dados espectrais apresentada propôs-se a seguinte estrutura para uma sesquiterpenlactona Figura 13.

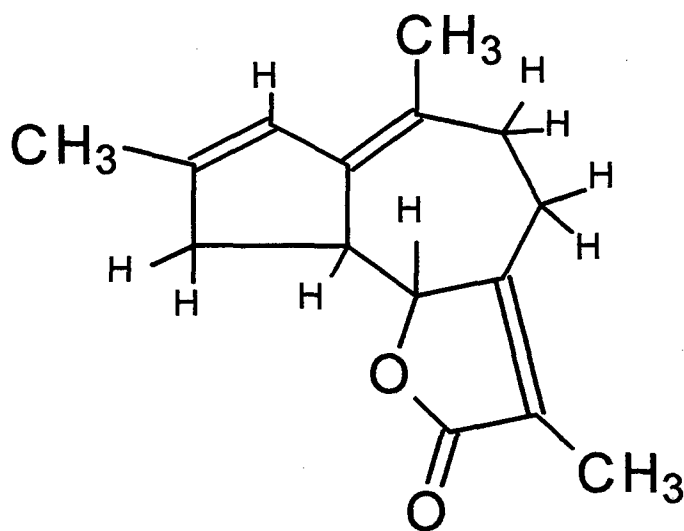
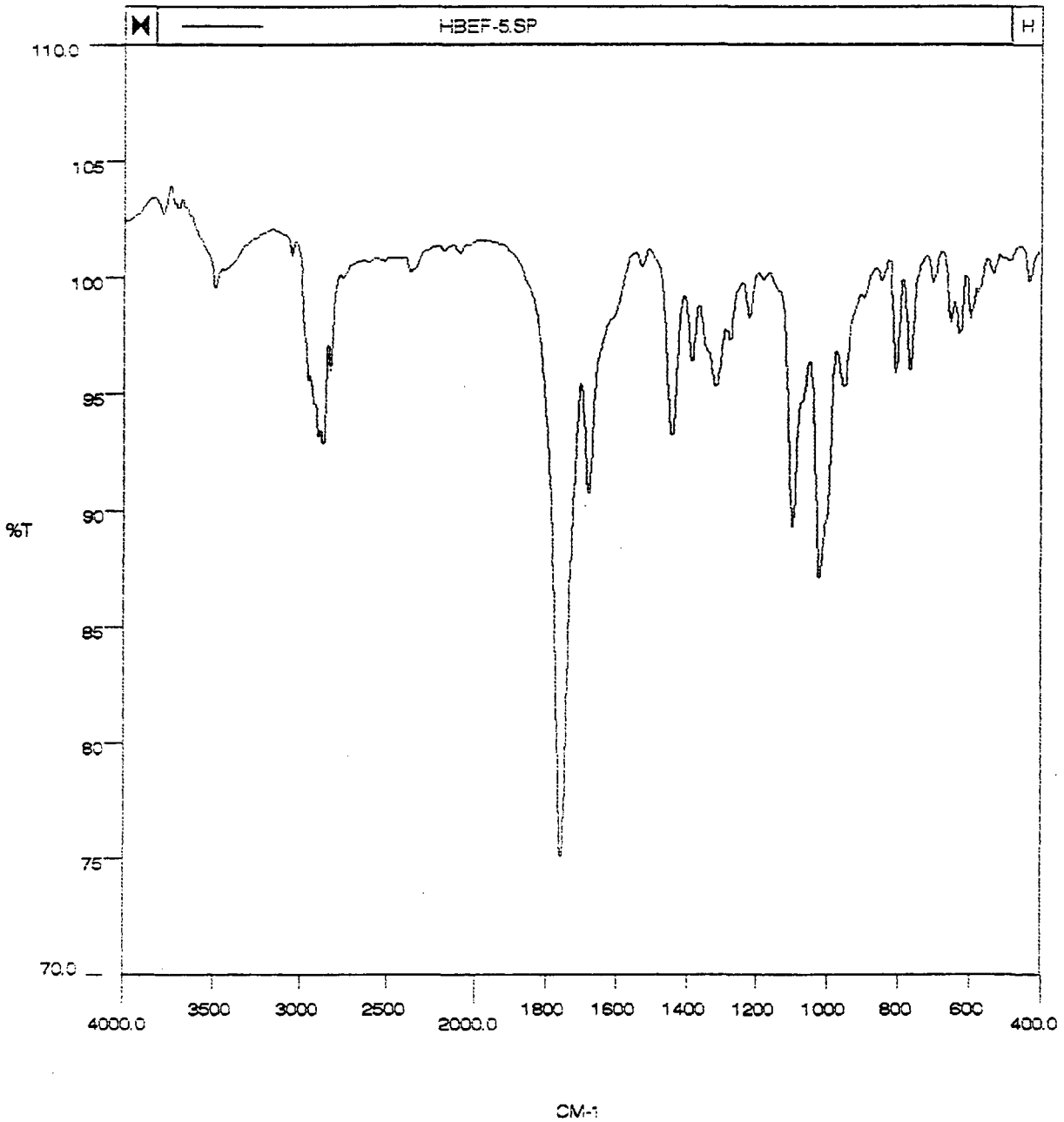


FIGURA 13- Proposta estrutural para o composto **HB-8**

TABELA 6 - Dados de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz) DEPT e <sup>1</sup>H (200 MHz) e sua conectividades obtidas por HETCOR, COSY e IRR.

| RMN <sup>13</sup> C | DEPT | HETCOR-RMN <sup>1</sup> H                          | IRR. e COSY   |
|---------------------|------|--|---------------|
| 8.9                 | CH3  | 1.85 s, 3H   |               |
| 15.5                | CH3  | 1.84 s, 3H   |               |
| 22.5                | CH3  | 1.70 s 3H  | cosy 3.0      |
| 31.9                | CH2  | 3.0 m 4H   | cosy 5.49,    |
| 37.5                | CH2  |  | 2.65 e 1.70   |
| 39.9                | CH2  | 2.59 ddd, 1H, J=13, 3.5 e 1<br>2.88 dl, 1H, J=11.8 | 2.26          |
| 50.2                | CH   | 2.26, tl, 1H, J=12.5                               | 4.45 e 2.59   |
| 80.0                | CH   | 4.45, dl, 1H, J=11.5                               | 2.26 e 2.59   |
| 122.0               | C    |  |               |
| 123.3               | C    |  |               |
| 124.9               | CH   | 5.49, 1H, sl                                       | cosy3.0 e 1.7 |
| 141.3               | C    |  |               |
| 143.5               | C    |  |               |
| 164.2               | C    |  |               |
| 174.3               | C    |  |               |

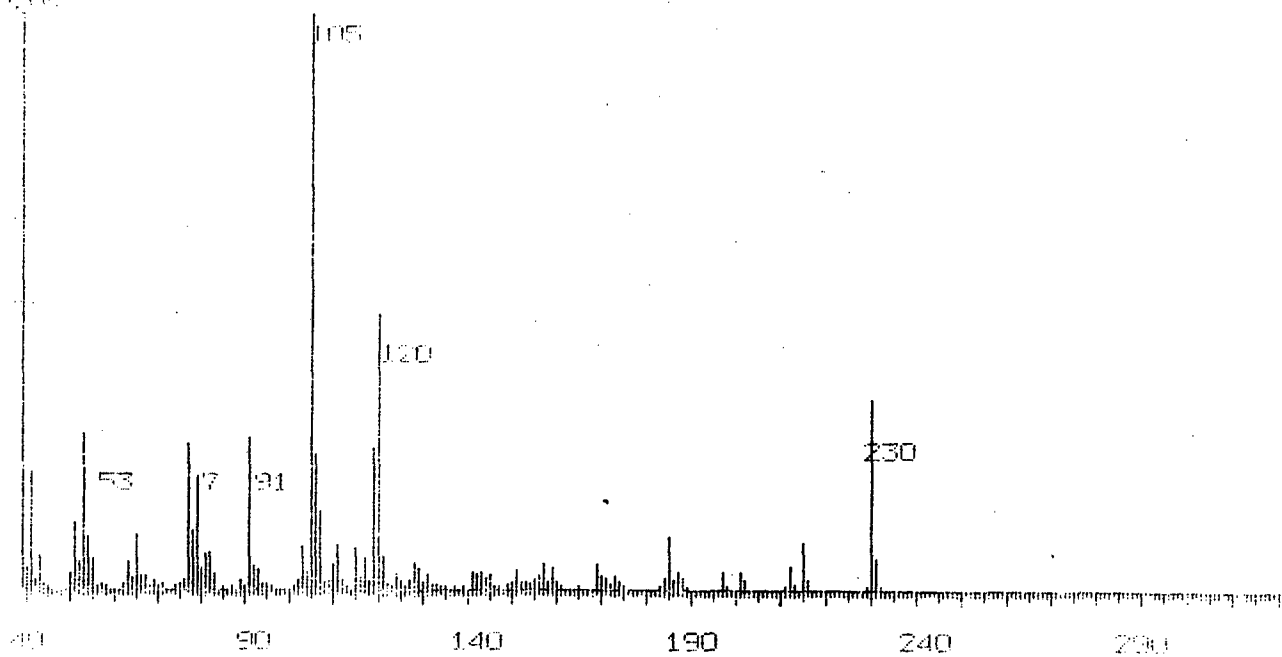
ESPECTRO 12 - Espectro de IV (KBr) do composto **HB-8**.

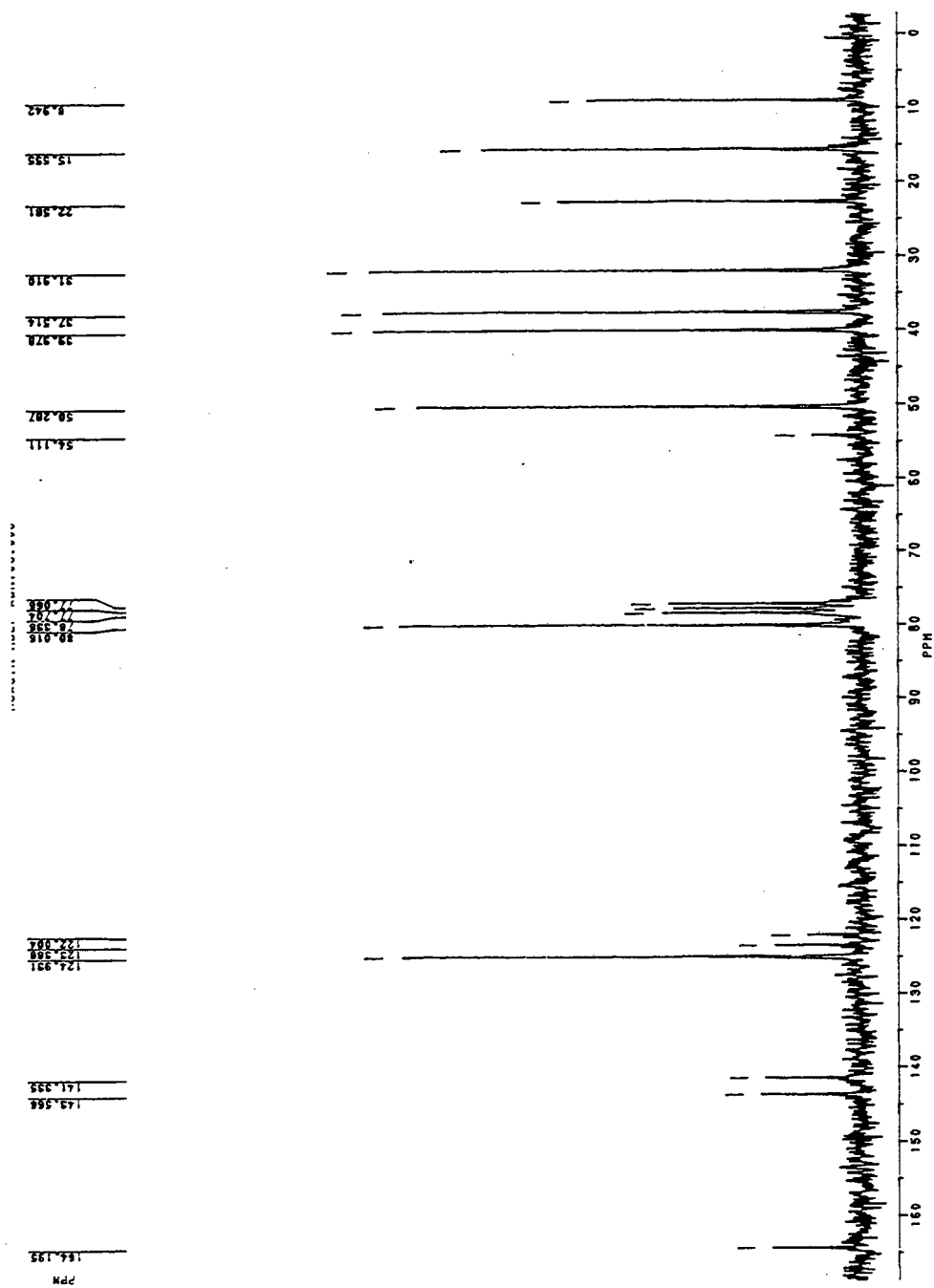


# ESPECTRO 13 - Espectro de massas do composto HB-8.

File: hbef4 .01 96-04-11 15:44  
Sample: Hbafiy - HBFF-4

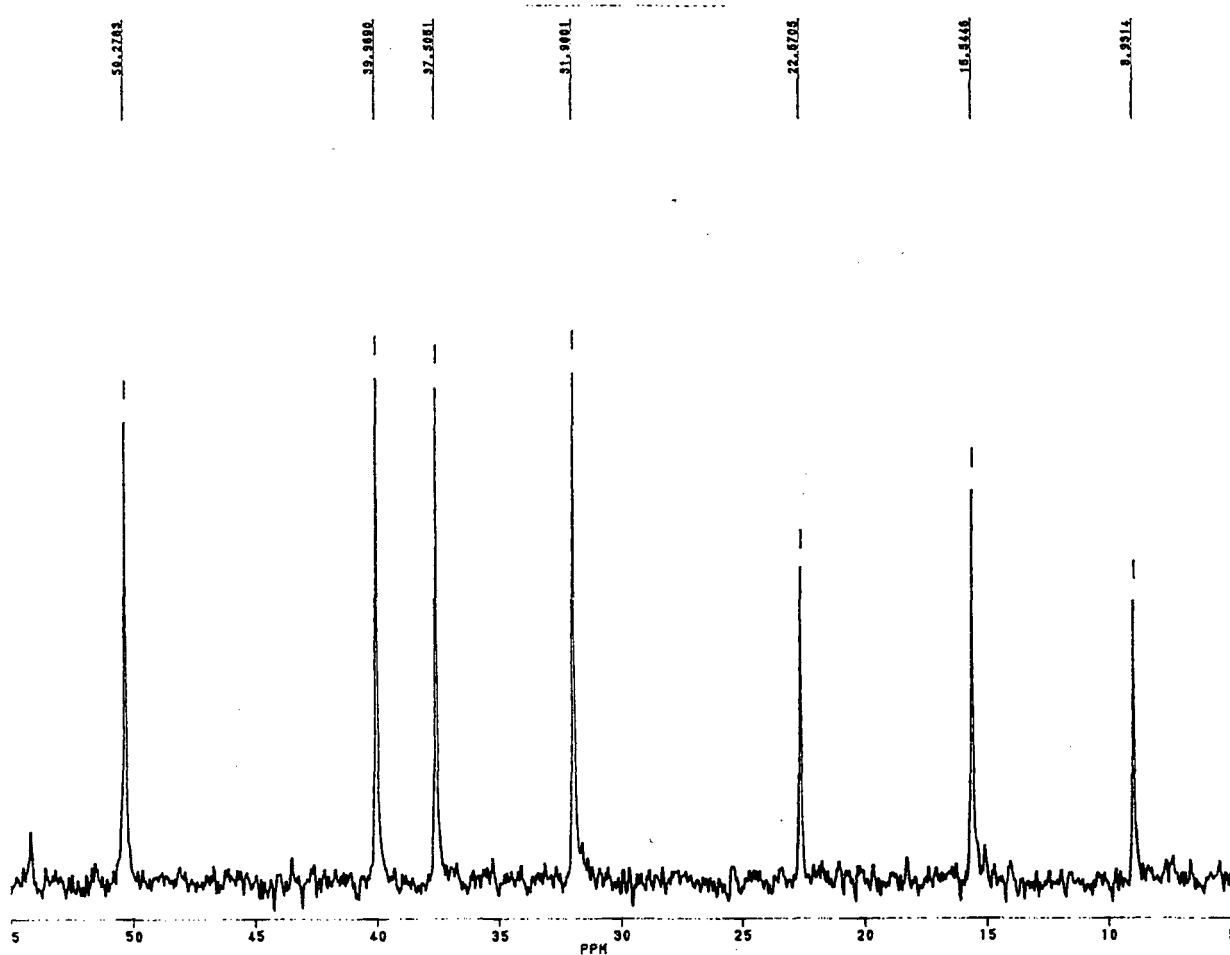
Scan: 35.0 0.00 P.T.: 1.16min Base Peak: 105.0 Int: 641000 (100%)

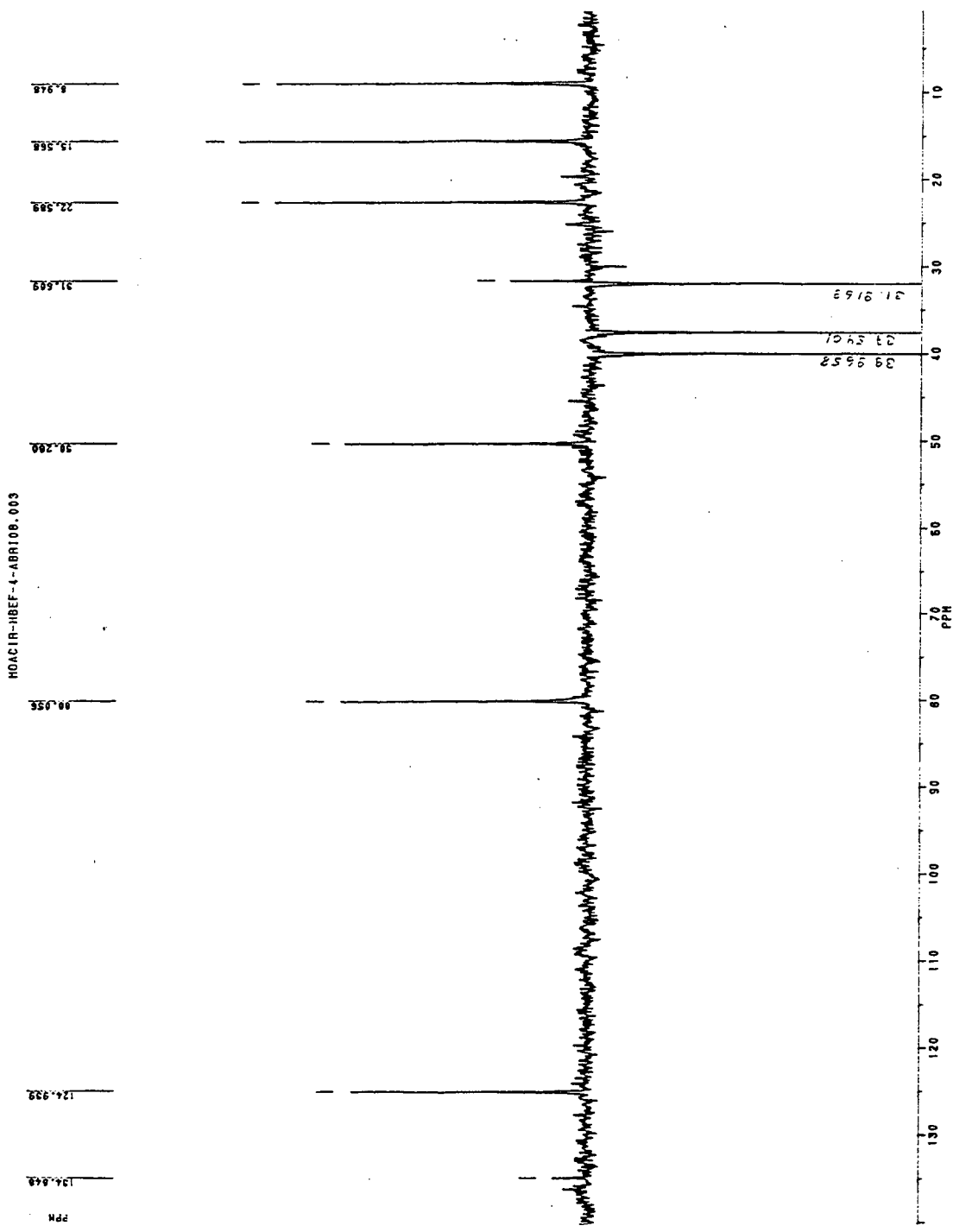




ESPECTRO 14 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto HB-8.

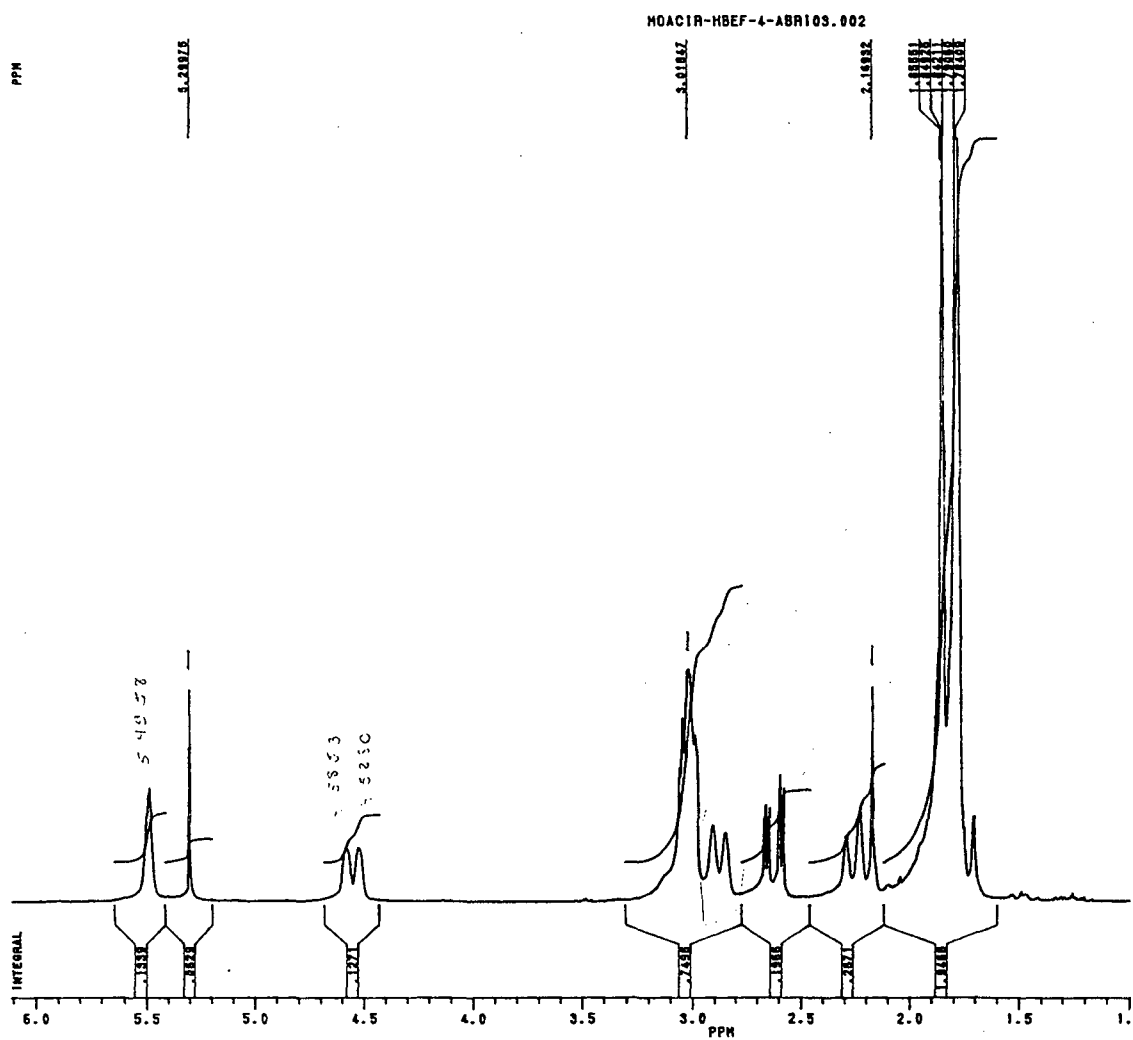
ESPECTRO 14a - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8** expandido na região de 5 ppm a 55 ppm.





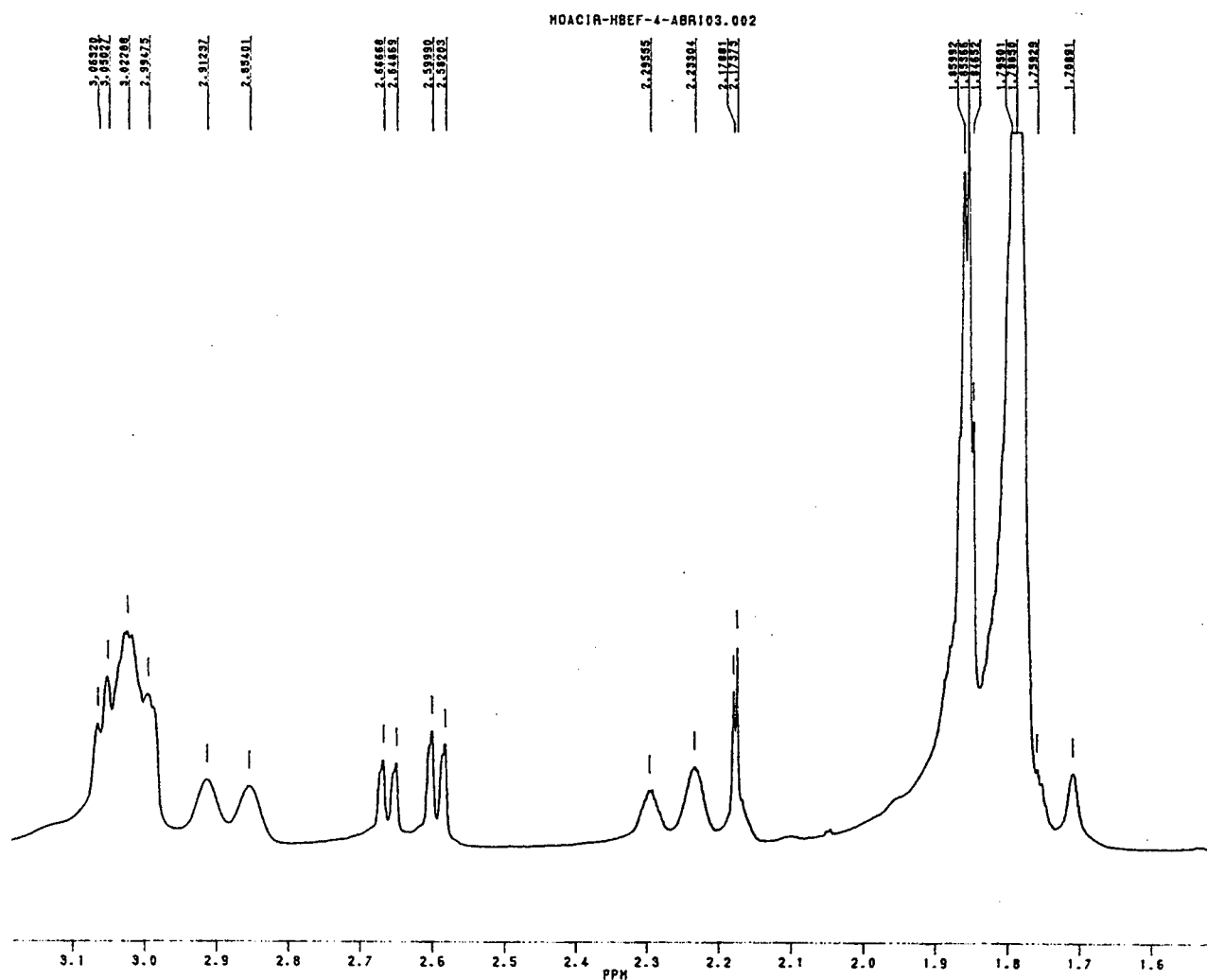
ESPECTRO 15 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT do composto HB-8.

ESPECTRO 16 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8**.

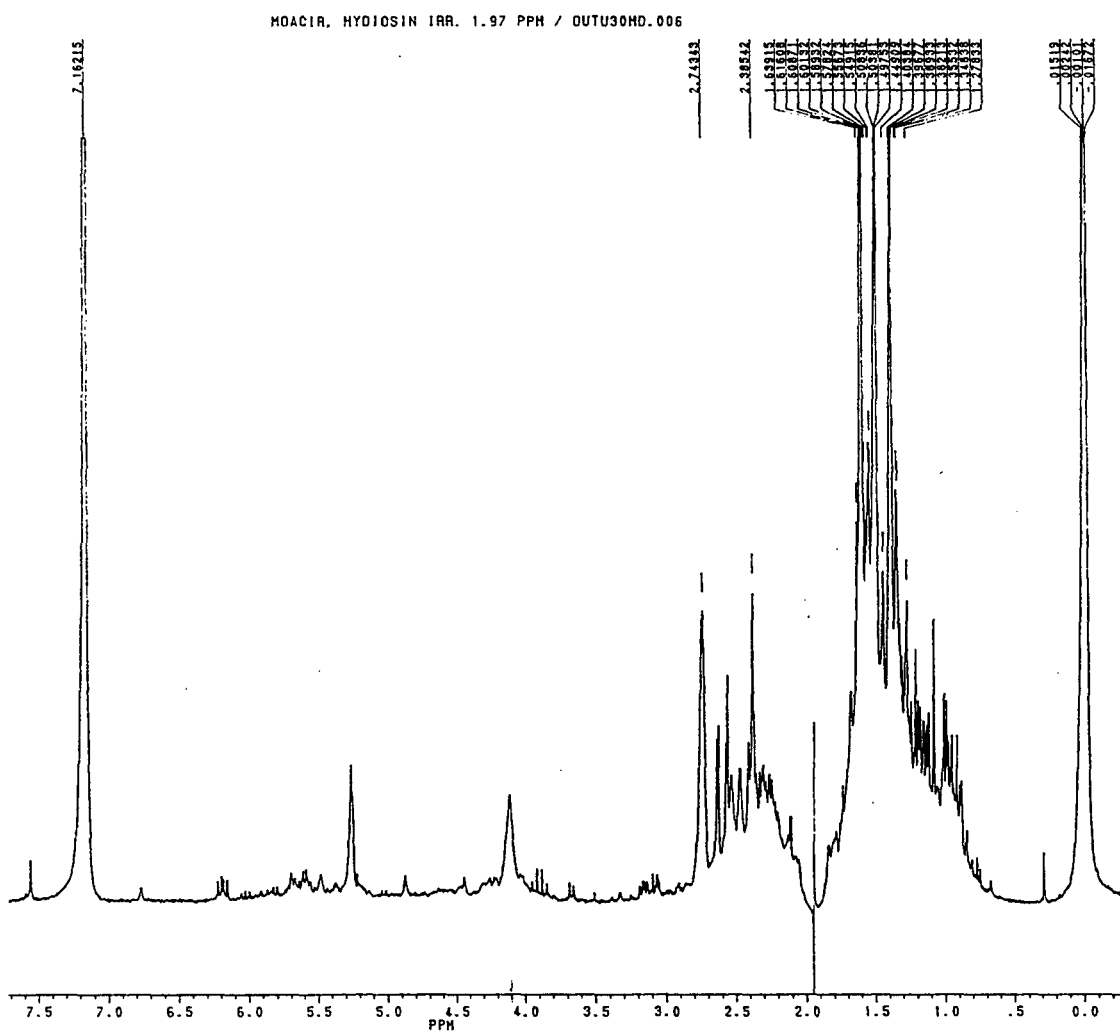




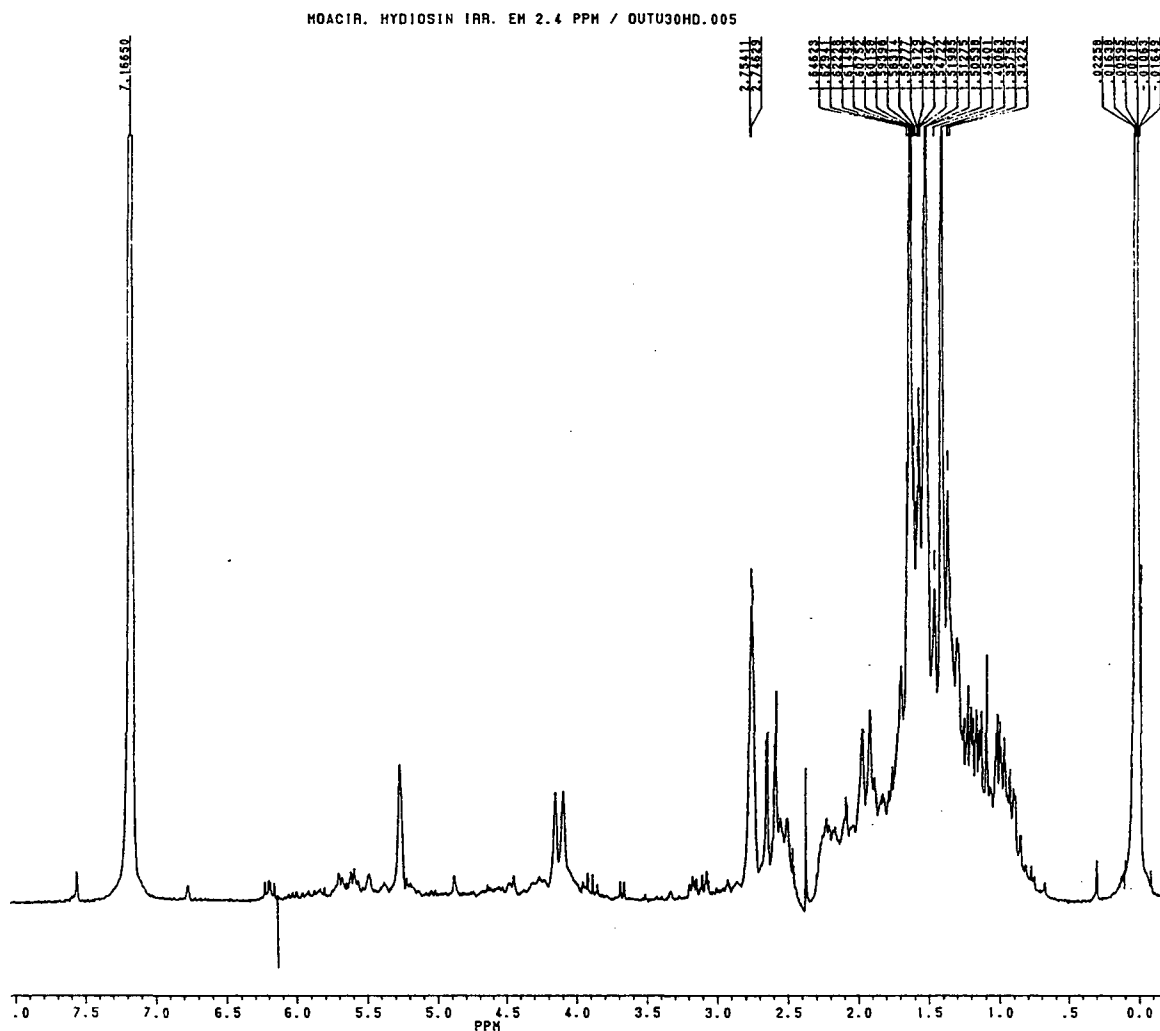
ESPECTRO 16a - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8** expandido na região de 1.5 ppm a 3.2 ppm.



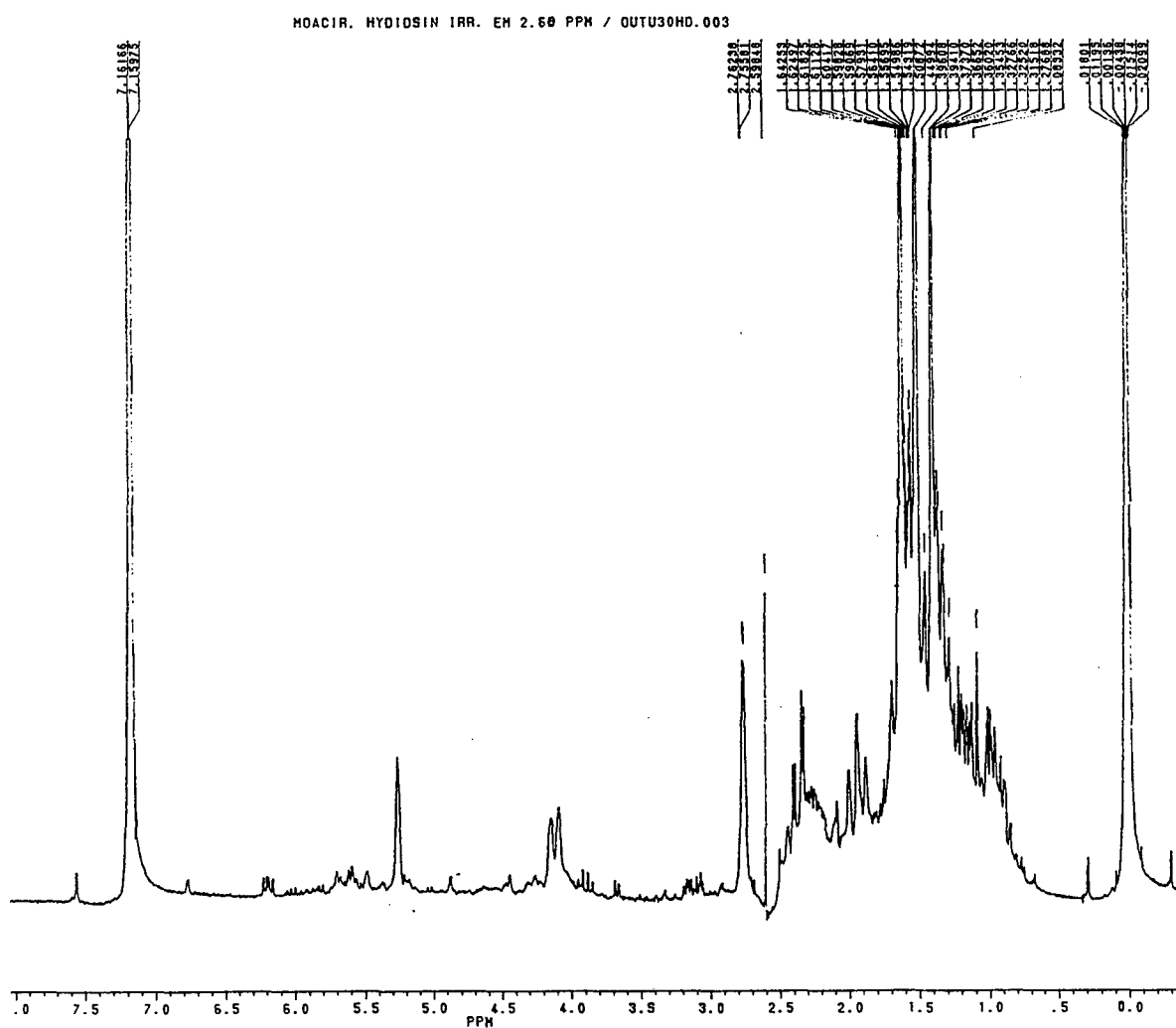
ESPECTRO 17 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8** irradiado na região de 1.97 ppm



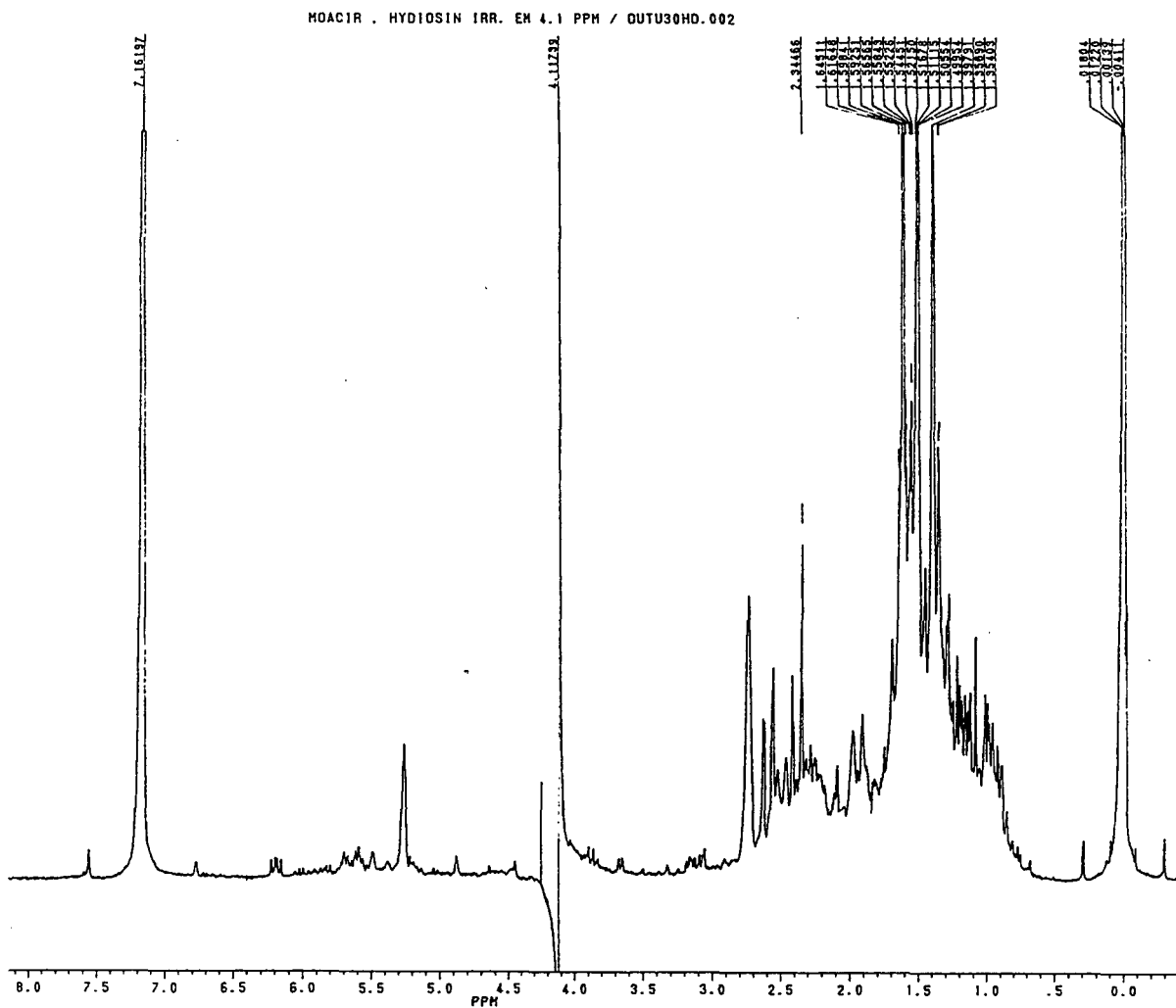
ESPECTRO 17a - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8** irradiado na região de 2.4 ppm



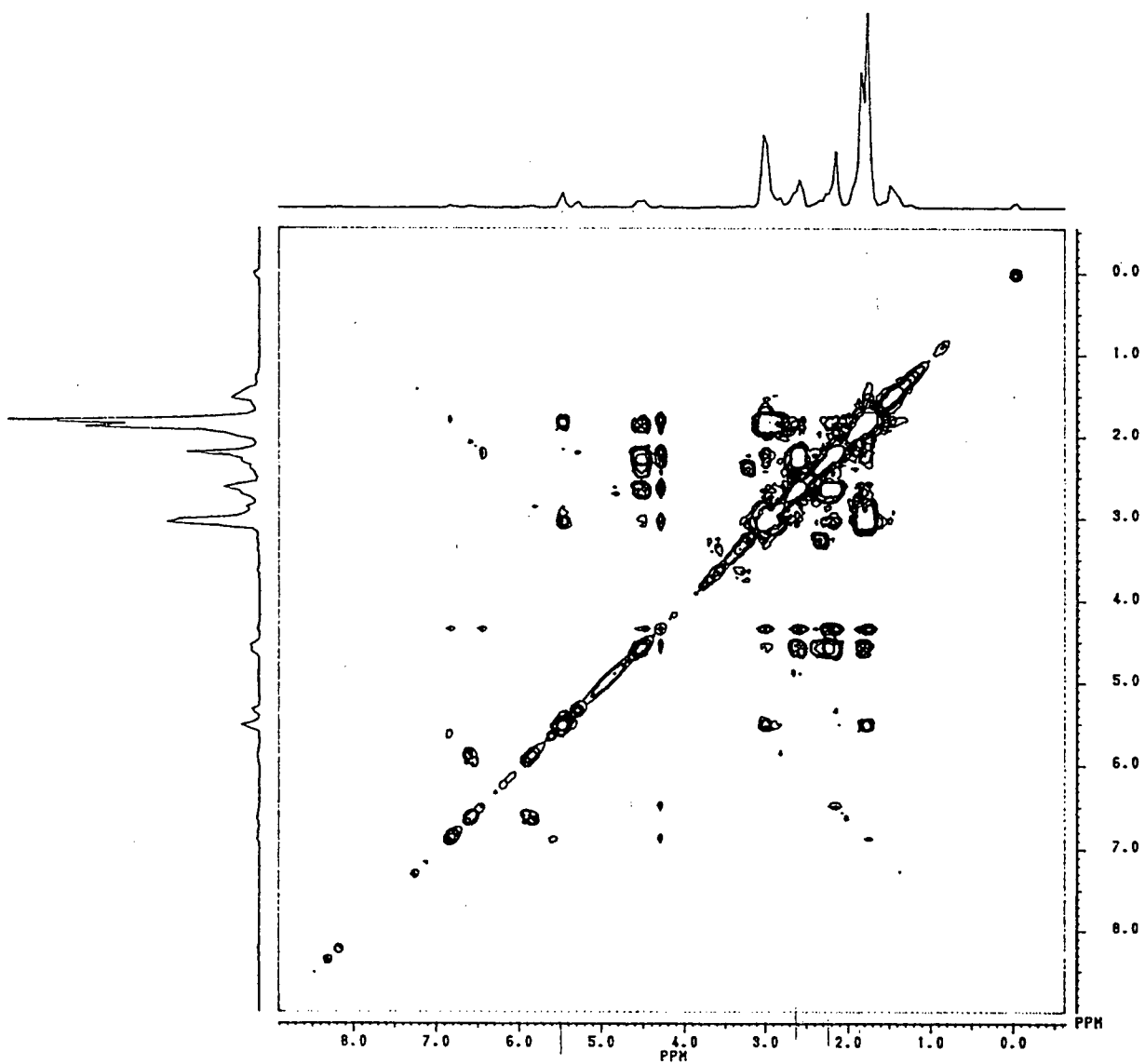
ESPECTRO 17b - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8** irradiado na região de 2,60 ppm.

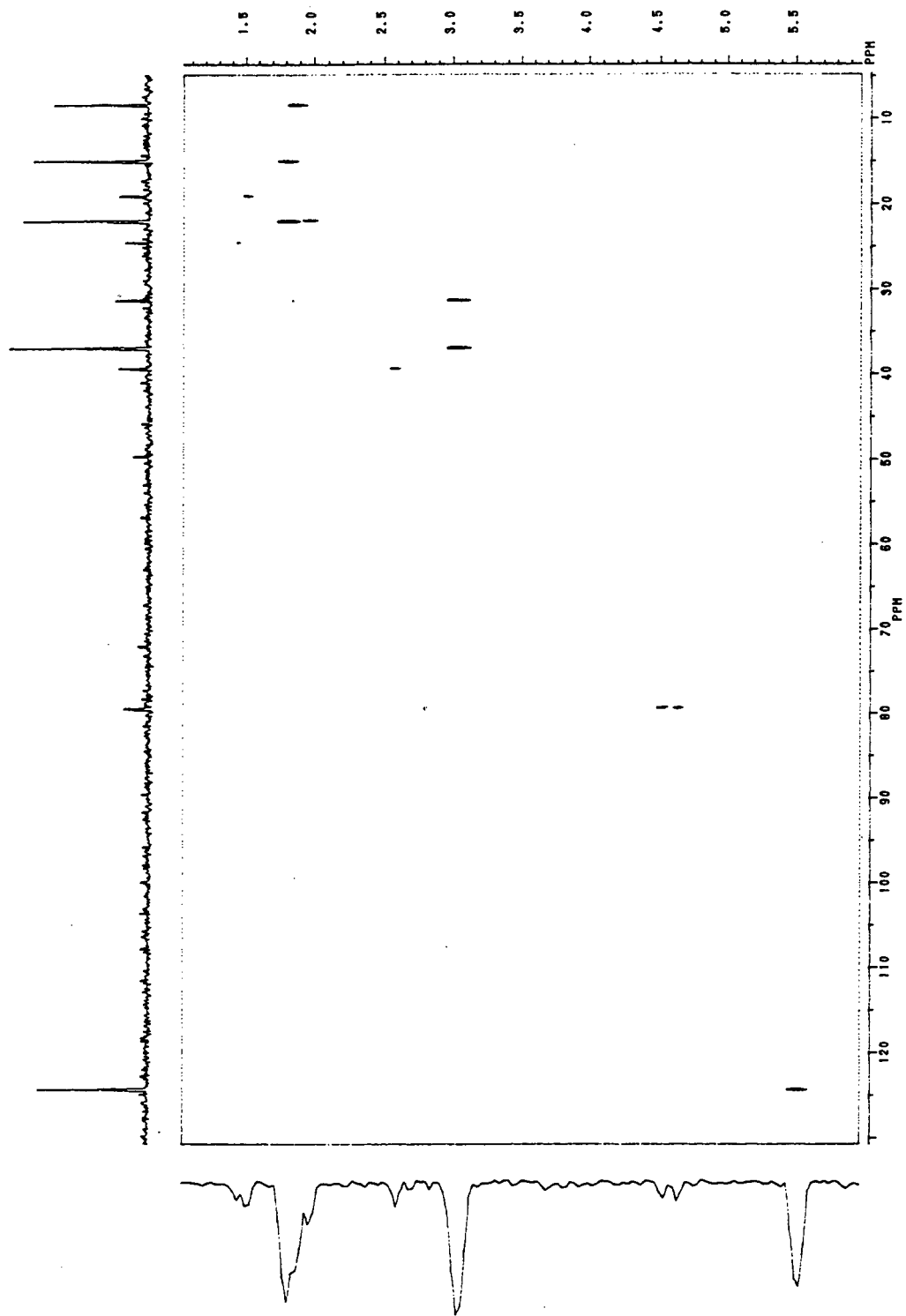


ESPECTRO 17c - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do composto **HB-8** irradiado na região de 4.1 ppm.



ESPECTRO 18 - Espectro de RMN COSY do composto **HB-8**.





ESPECTRO 19 - Espectro de RMN HETCOR do composto HB-8.

#### **5.4 - Identificação do Composto HB-5.**

O composto **HB 5** (250 mg) foi isolado do extrato hidroalcoólico das raízes e do extrato hidroalcoólico das folhas, como já foi descrito no item 4 Materiais e Métodos.

O material obtido foi recristalizado em uma solução 1% acetato de etila em hexano, onde se obteve 200 mg de cristais com ponto de fusão 127-130 °C.

No espectro de infra vermelho (Espectro20) além das bandas características para CH<sub>2</sub> (metilenos) e CH<sub>3</sub> (metilas) em 2936 cm<sup>-1</sup> e 2846 cm<sup>-1</sup>, observa-se uma banda de absorção em 3430 cm<sup>-1</sup> para hidroxilas, bandas de absorção de fraca intensidade em 1661 cm<sup>-1</sup> referente a deformação de olefinas e, uma banda em 960 cm<sup>-1</sup> para uma ligação dupla trans disubstituída.<sup>55</sup>

A análise por CGAR (Figura 15) em coluna OV-1, mostrou a existência de dois compostos eluídos a 26.36 mim (25%) e 27.36 mim (75%), cujos tempo de retenção são indicativos para compostos esteroidais<sup>56, 57</sup>.

A análise da mistura por CGAR-EM resultou na obtenção dos respectivos espectros de massas (Espectro 21, 22).

Para o composto eluído a 26.36 min, o espectro de massa apresentou íon molecular [M<sup>+</sup>] a m/z (rel%) 412 (4), com um padrão de fragmentação idêntico ao do esteroide Stigmasterol.

Da mesma forma, o espectro de massa do composto eluído a 27.33 min, apresenta o íon molecular [M<sup>+</sup>] a m/z 414 (21%) e o mesmo padrão de fragmentação do β-sitosterol. Os dados obtidos indicam a presença de dois fitoesteroides, que foram confirmados como sendo Stigmasterol e β-sitosterol através da coinjeção com os respectivos padrões na mistura em um sistema de CGAR.

O espectro de <sup>1</sup>H (Espectro 23), apresenta dois sinais na região de campo baixo, região para prótons alifáticos, um sinal em 5.29 ppm como um duplete largo que pode ser atribuído ao próton olefínico H6 dos fitoesteroides, e um multiplete centrado em 5,05 ppm que pode ser atribuído aos prótons H22 e H23 da dupla ligação da cadeia lateral.

O próton carbinólico H3 é representado pela ressonância a 3.5 ppm, como um multiplete.



Os sinais na região de 0.65 ppm até 1.45 ppm são referentes a ressonância das metilas, metilenos e metinos presentes na molécula.

Através do deslocamento dos sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 24) e o espectro DEPT (Espectro 25) em comparação com os dados da literatura, foi possível confirmar a estrutura dos dois compostos<sup>57, 58</sup>.

A posição da dupla ligação do esqueleto básico da mistura, foi confirmada com os deslocamentos químicos dos carbonos C5 e C6, comparados com os deslocamentos químicos dos esteróis com dupla  $\Delta^5$  com os  $\Delta^7$ . Verifica-se diferenças significantes nos valores de deslocamento químico para o carbono C19<sup>57, 58, 59, 60, 61, 62</sup>. Para os esteróides  $\Delta^5$ , o valor para os deslocamentos químico fica em torno de 19.3 ppm, enquanto que para os esteróides  $\Delta^7$ , fica em torno de 13.2 ppm. O valor observado para o deslocamento químico da mistura é em torno de 19.3 a 19.5 ppm.

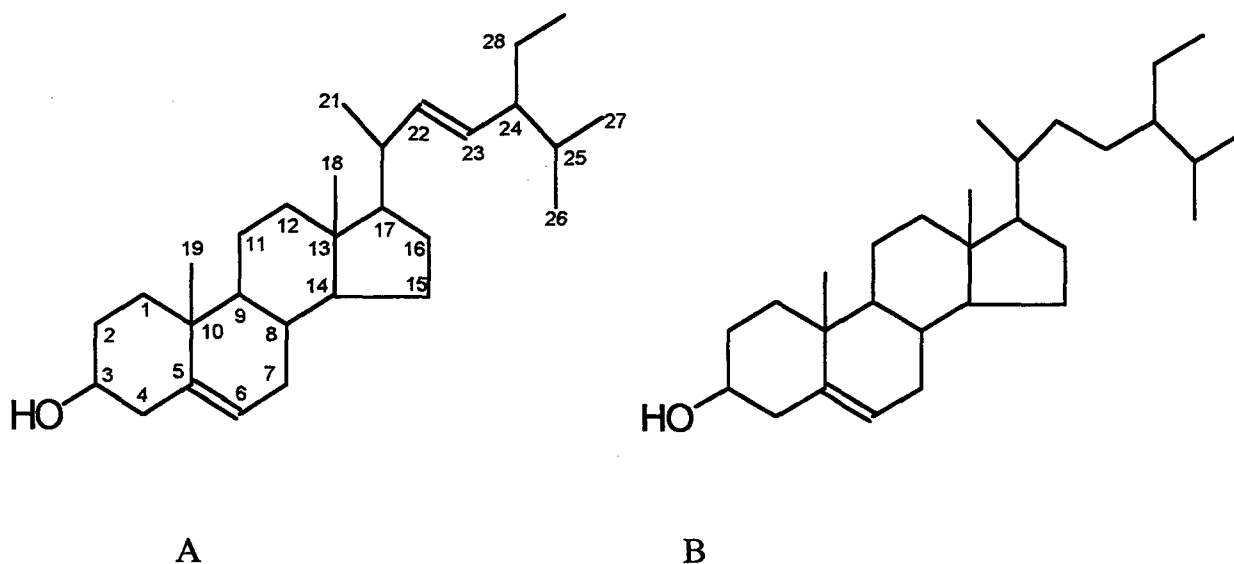


FIGURA 15- Estrutura do Stigmasrterol (A) e  $\beta$ - Sitosterol (B).

ESPECTRO 20- Espectro de IV (KBr) do composto **HB-5**.

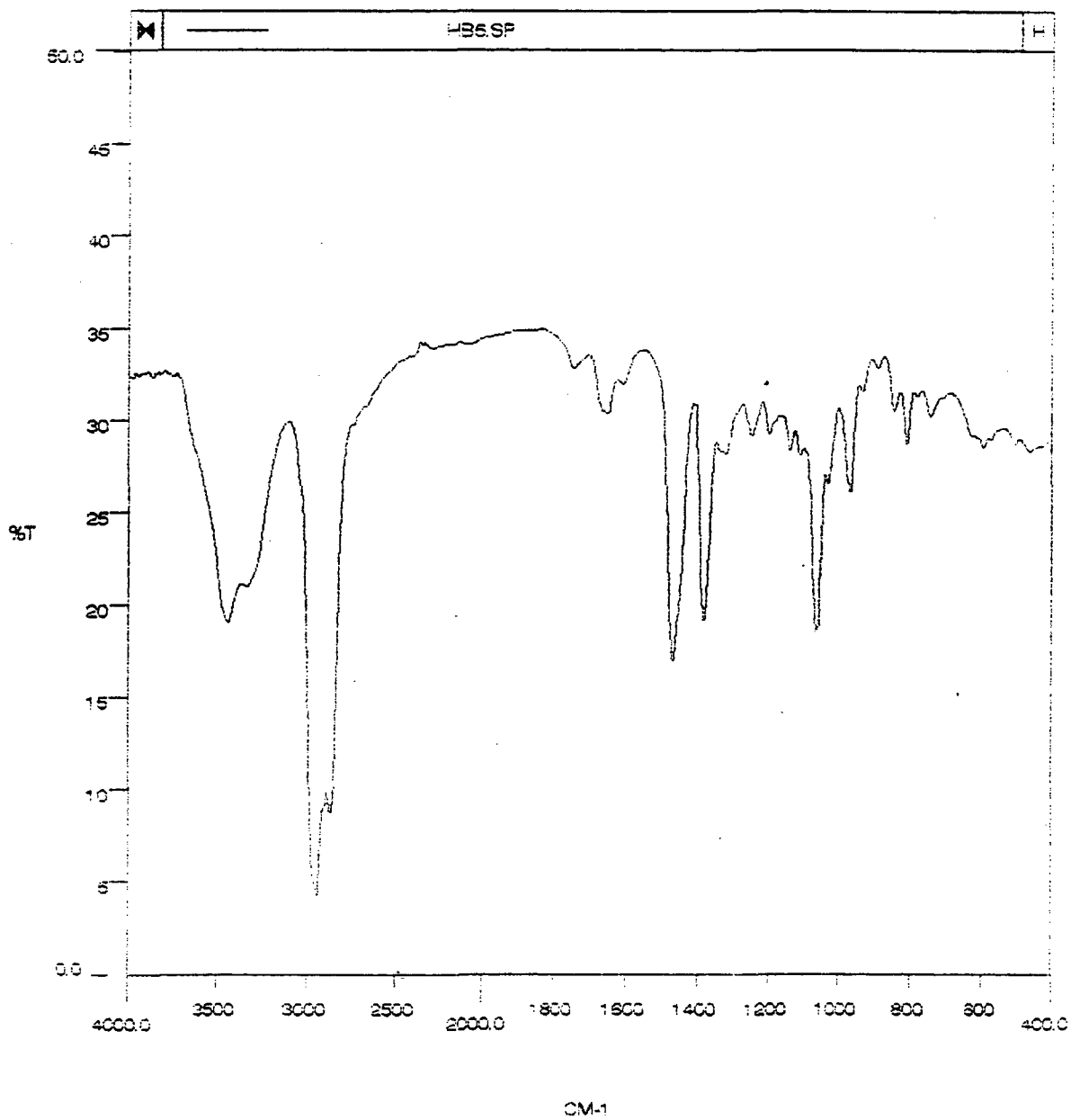
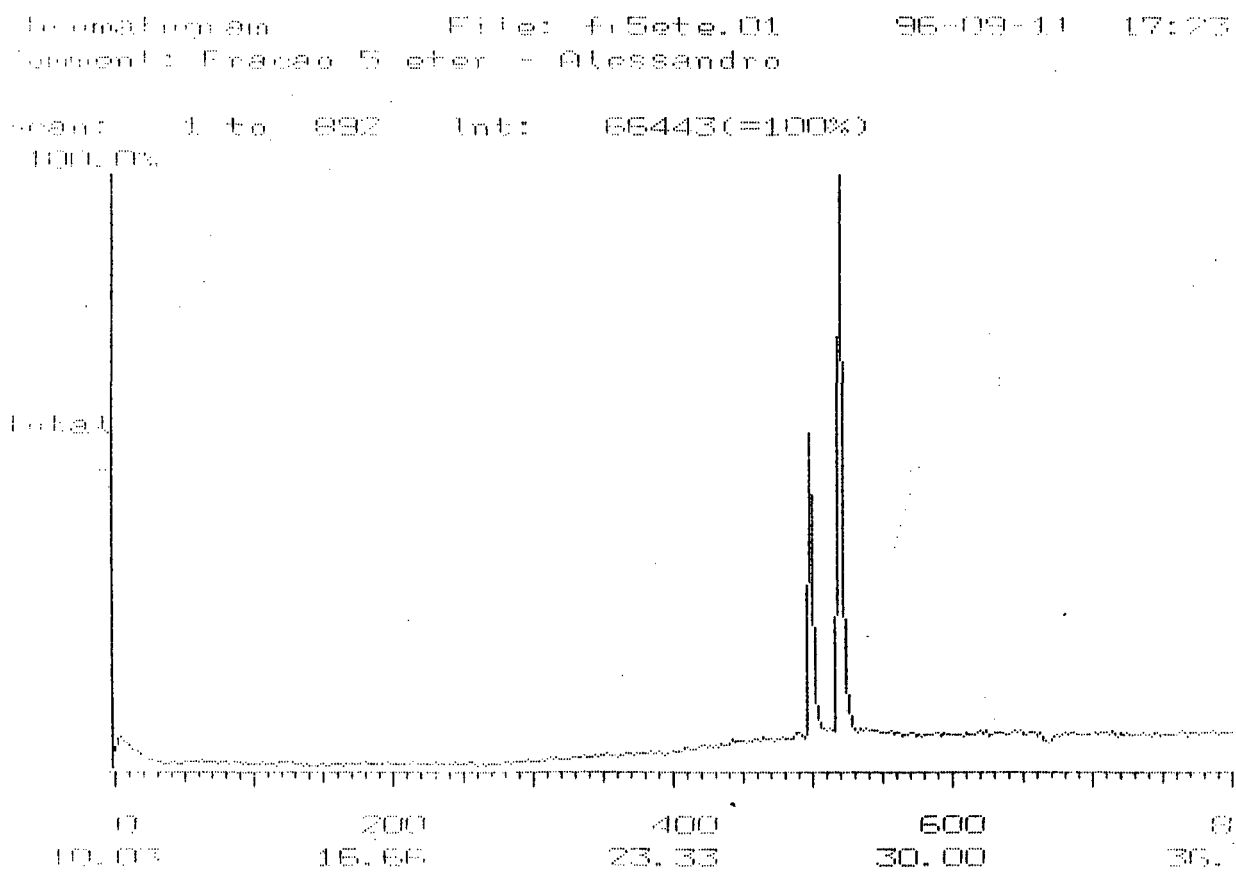


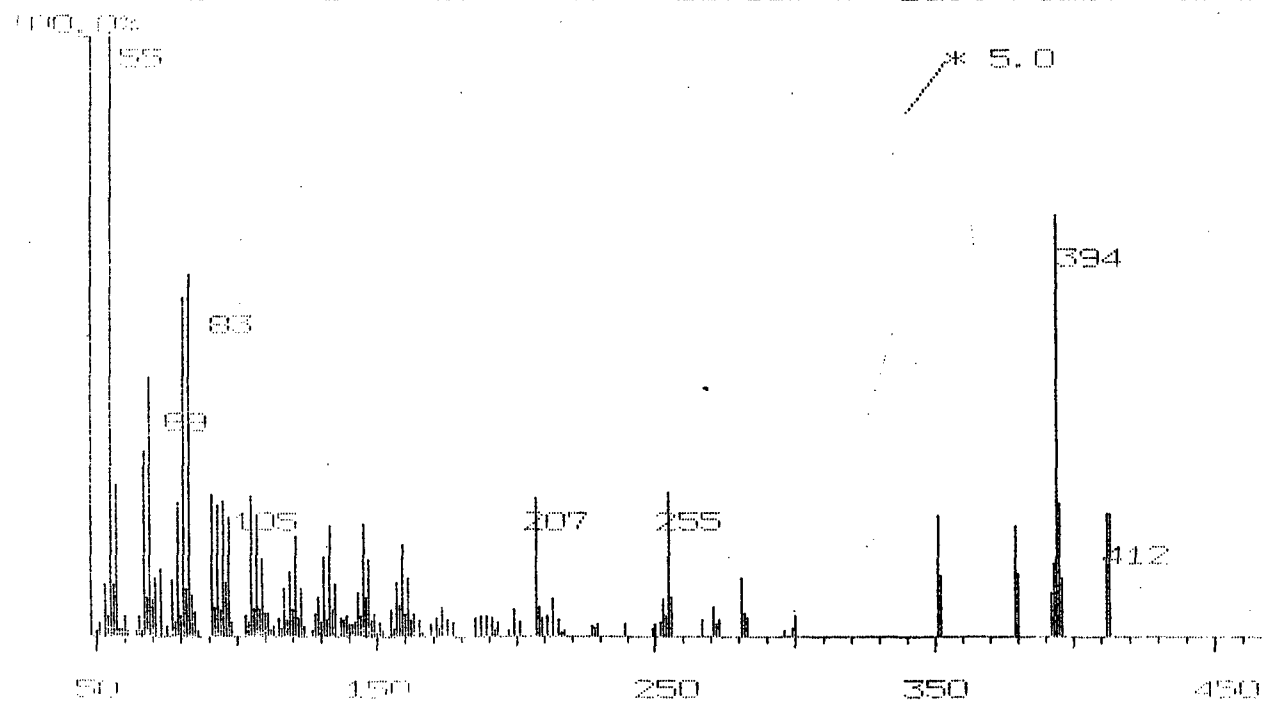
FIGURA 14 - Cromatograma da mistura **HB-5** em CGAR com coluna apolar LM-1 temperatura 80 a 290 °C.



ESPECTRO 21 - Espectro de Massas do composto eluído a 26,63 min .

Amplific: Fracao 5 eter - Alessandro

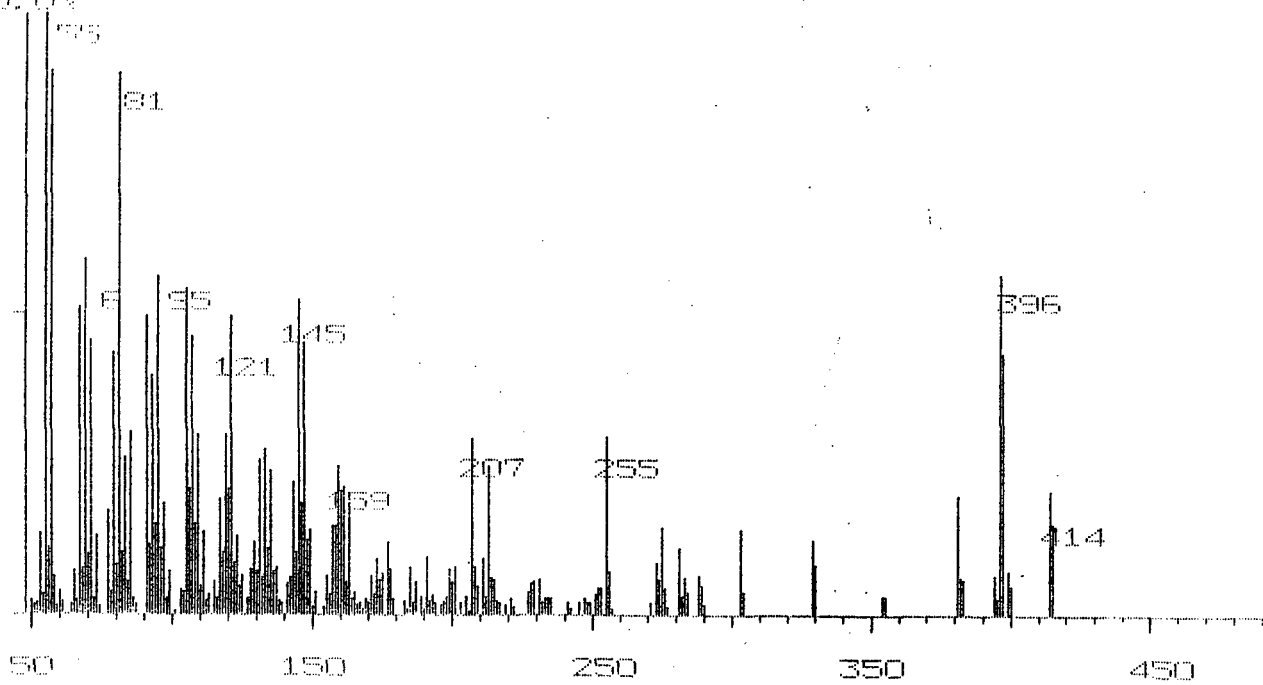
Temp: 499 C 0- 0) R.T.: 26.63min Base Peak: 55.0



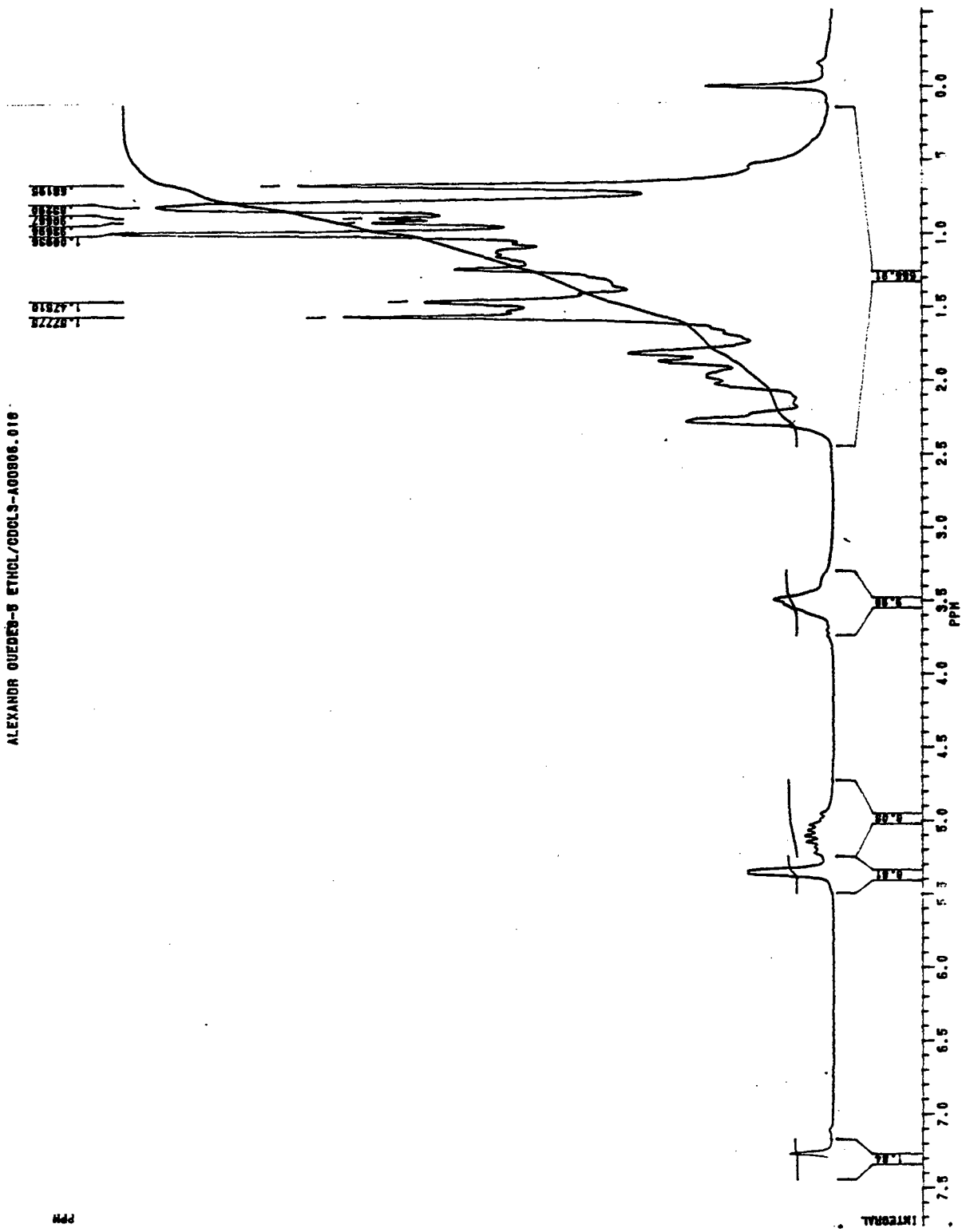
# ESPECTRO 22 - Espectro de Massas do composto eluído e 27.33 min

coment: Fracao 5 eter - Alessandro

can: 520 ( 0- 0) R.T.: 27.33min Base Peak: 55.0 (100.0%)

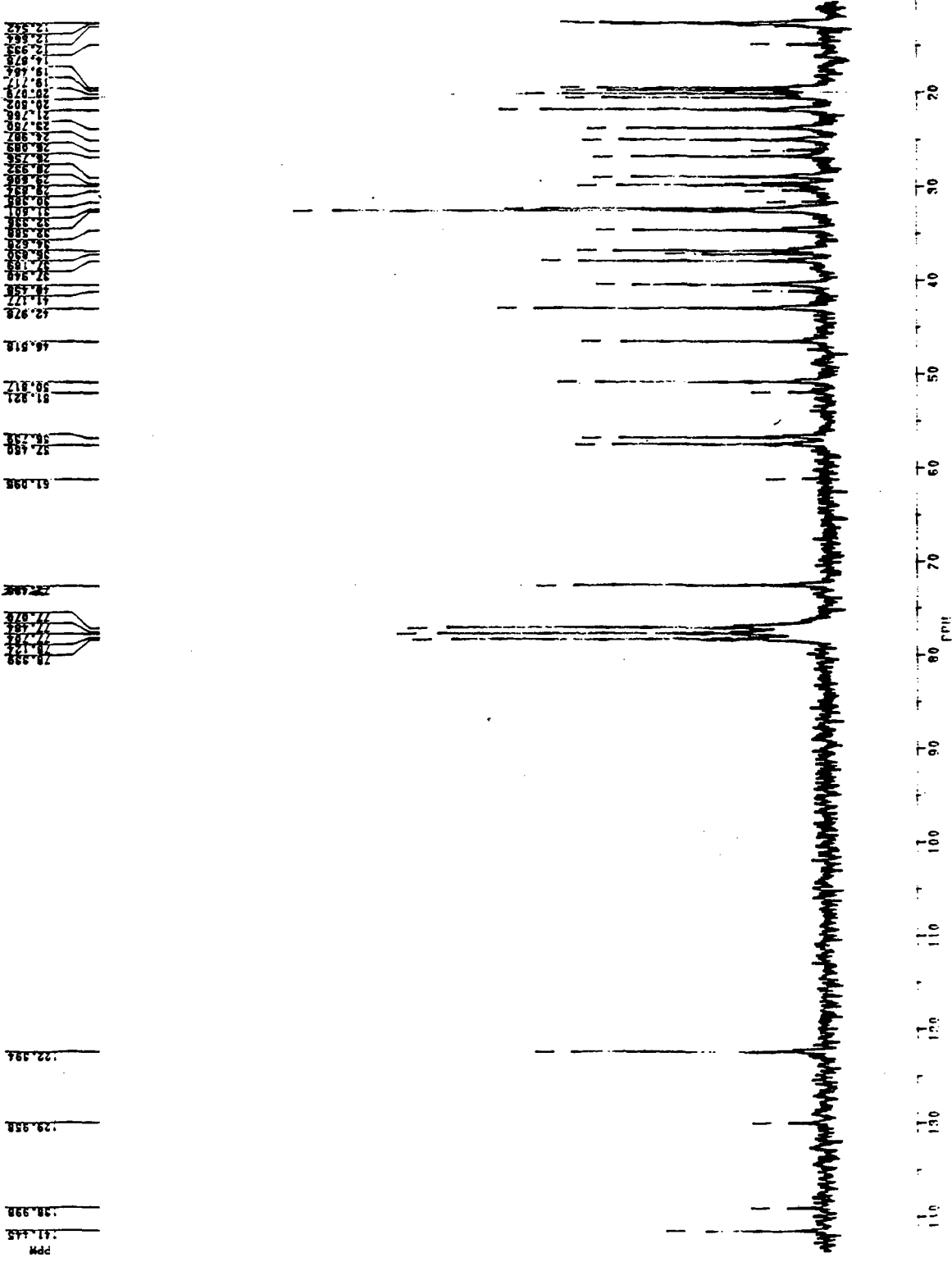


ALEXANDR QUEDES-S ETHCL/CDCL3-A00806.010



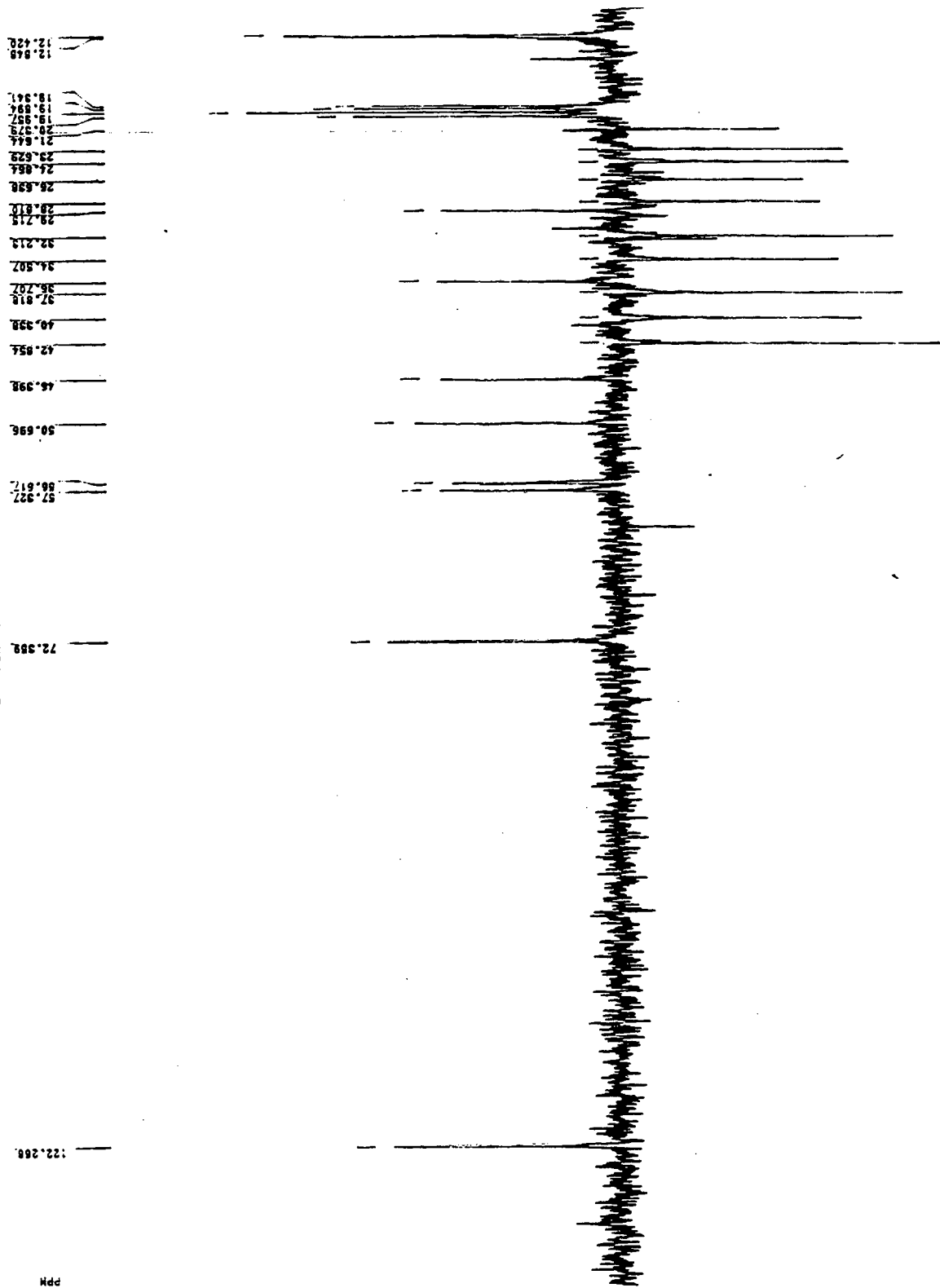
ESPECTRO 23 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200MHZ) em CDCl<sub>3</sub> da mistura HB-5.

ALESSANDRO-14 HBETER-JUP.125.005



ESPECTRO 24 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (50MHZ) em CDCl<sub>3</sub> da mistura HB-5.

ALESSANDRO-14 HBETER-JUL125.012



ESPECTRO 25 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ / DEPT da mistura HB-5.



## 5.5 - Identificação do Composto S2-811.

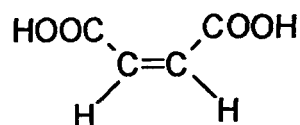
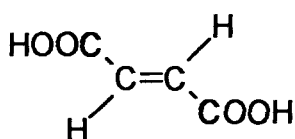
O composto isolado da subfração metanólica do extrato da raízes (20mg), com ponto de fusão 300 °C, apresentou no espectro de infravermelho IV (Espectro 26), absorção na região de 3500 cm<sup>-1</sup> para OH carboxílico, em 3080 cm<sup>-1</sup> para CH olefínico, uma intensa banda em 1672 cm<sup>-1</sup> para carbonila e em 1422 cm<sup>-1</sup> para uma ligação dupla bisubstituída.

O espectro de massas (Espectro 27), apresentou o íon molecular a m/z (% rel) 116 (42%) e os fragmentos [M-18] 98 (84%) para a perda de uma molécula de água, [M-45] 71 (21) para a perda de um grupo carboxílico, 53 (44) para a perda sucessiva de água e um grupo carboxila a partir do íon molecular.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 28) , apresentou apenas um sinal em 6.75 ppm indicando um hidrogênio olefínico sugerindo uma molécula simétrica.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Espectro 29) apresenta um sinal em 168.5 ppm deslocamento compatível com um carbono carbonílico de ácido e um sinal em 135,6 ppm para um carbono sp<sup>2</sup>, confirmando assim uma simetria molecular.

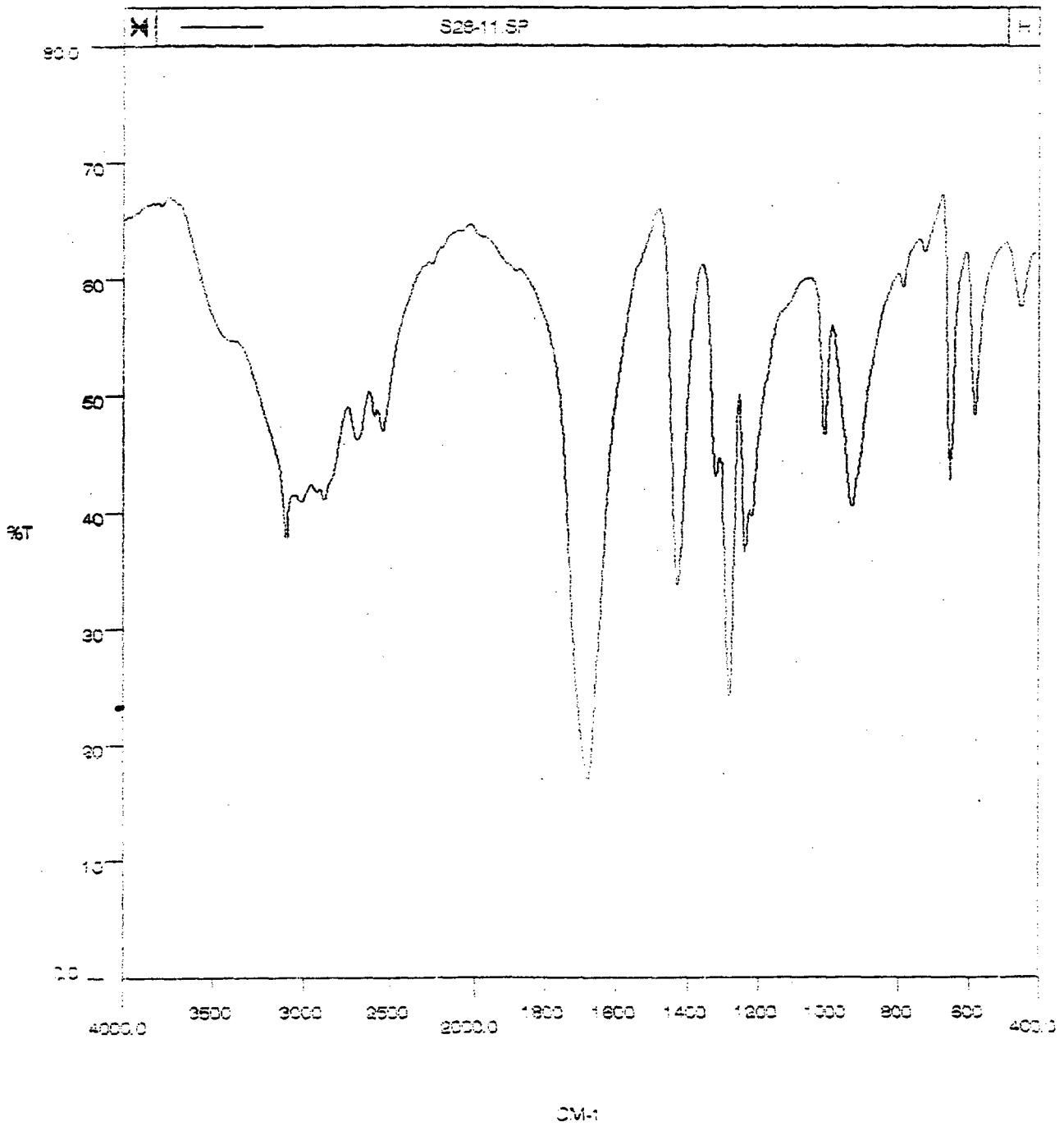
Estes dados nos levaram a propor a estrutura com fórmula molecular C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> , da qual é possível propor 2 estruturas: acido fumárico (A) e acido maleíco (B)



O deslocamento de <sup>13</sup>C é determinante das posições relativas do grupo carboxílico, para o acido maleíco. As ressonâncias dos carbonos carbonílicos e olefínicos são obtidas respectivamente em 166.1ppm e 130.4 ppm, e para o acido fumárico 166.1ppm e 134.2 ppm<sup>63</sup>.

O deslocamento químico calculado para o hidrogênio olefínico da estrutura cis é 6.33 ppm e para o H da estrutura trans é calculado 6.83 ppm., portanto a comparação dos dados obtidos do composto obtido com os dados da literatura<sup>55, 63</sup>, confirmam a estrutura do composto S2-811 com sendo o Acido Fumárico.

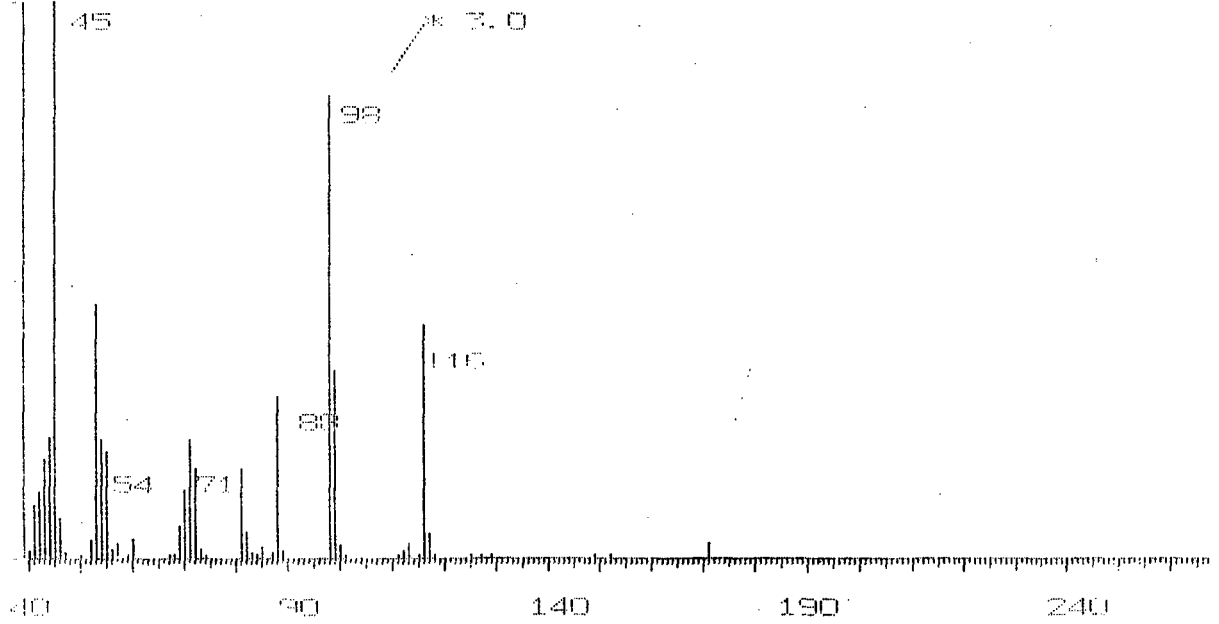
ESPECTRO 26 - Espectro de IV (Kbr) do composto S2-811.



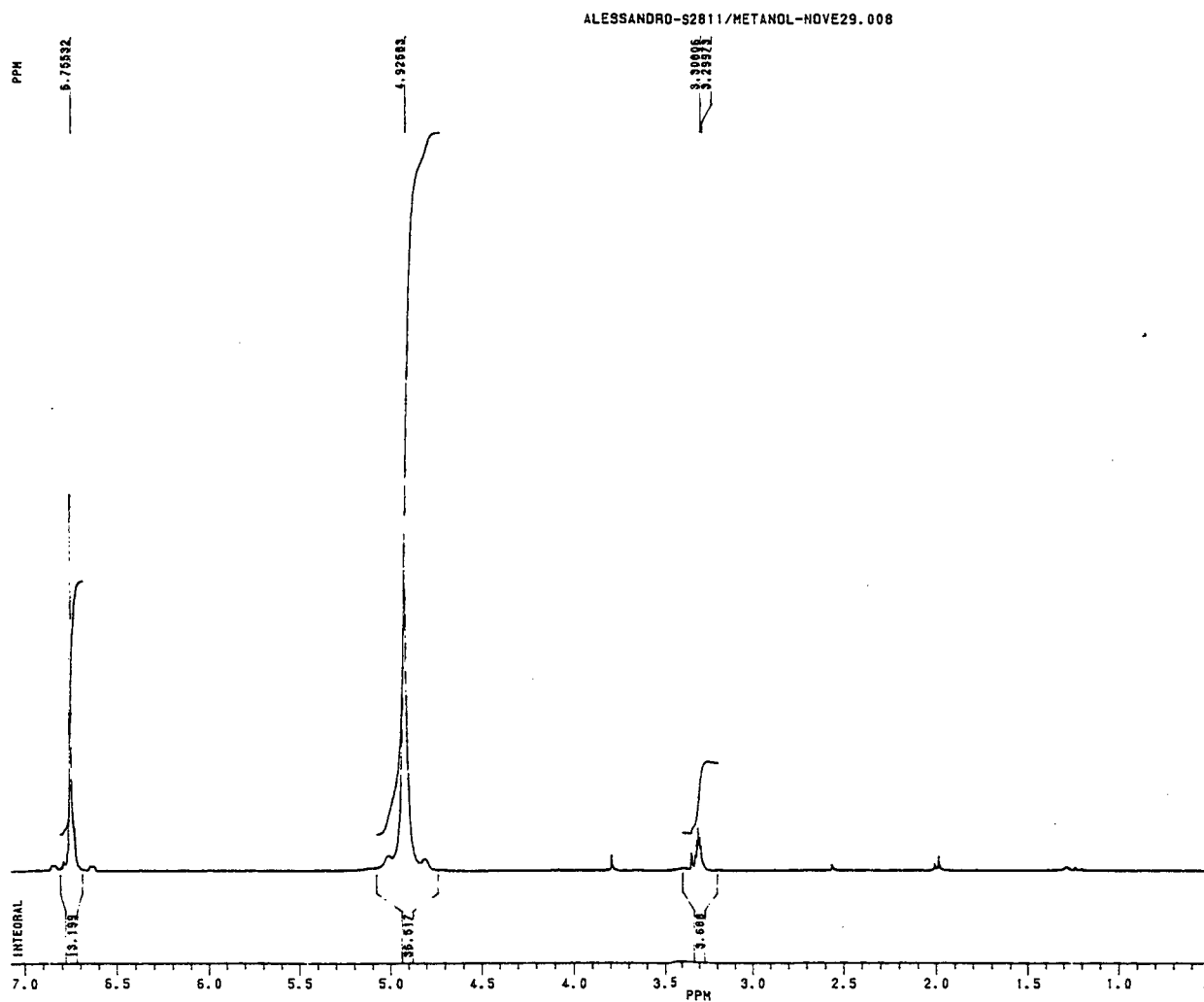
**ESPECTRO 27 - Espectro de Massas do composto S2-811.**

Amovent: Alessandro - S2811

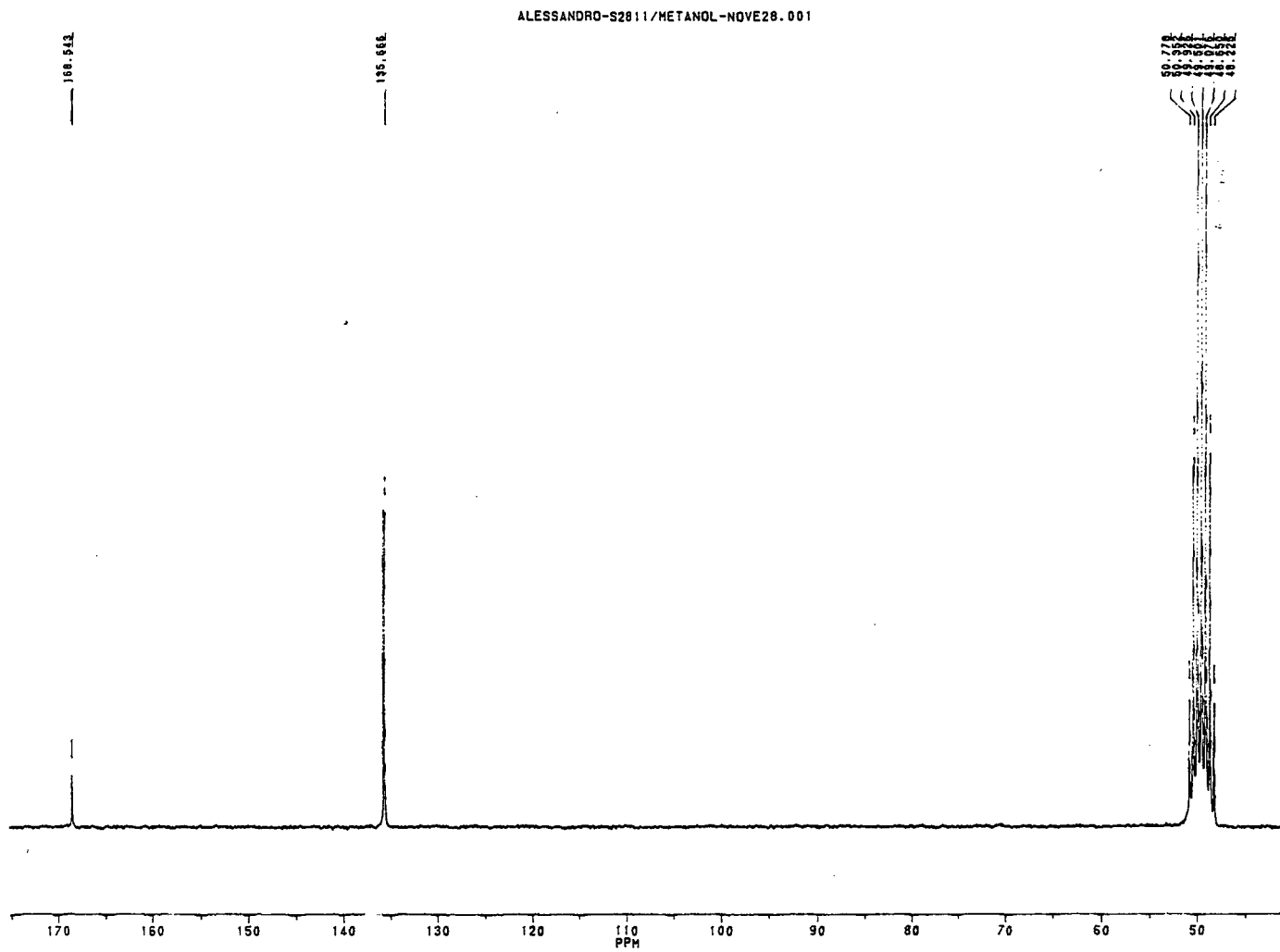
Temp: 84 C 0- 01 R.T.: 2.86min Base Peak: 45.0 Int  
100.00%



ESPECTRO 28 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200MHZ) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  do composto S2-811



ESPECTRO 29 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  do composto S2-811.



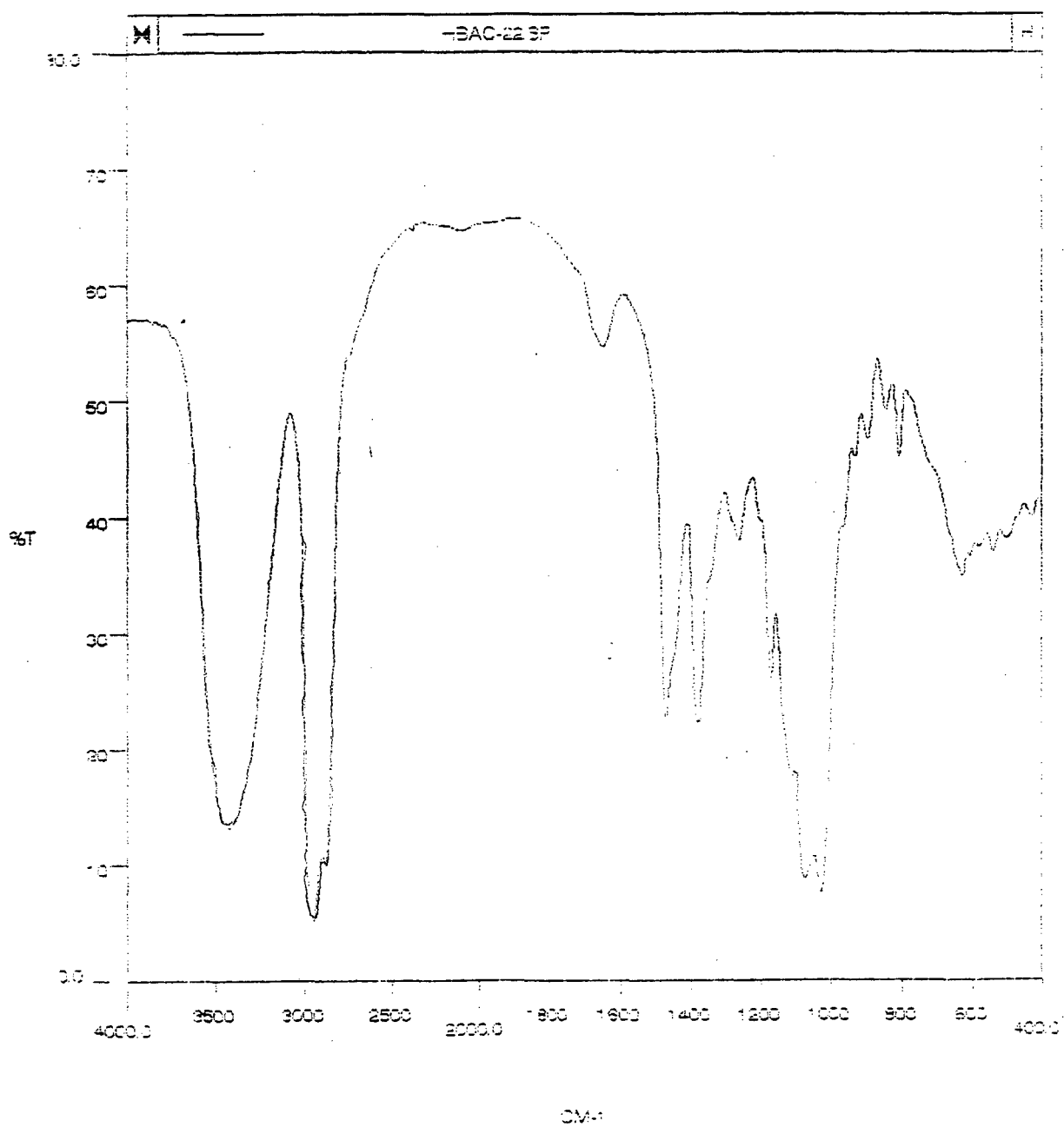
## **5.6- Identificação do composto HB-AC22**

O composto isolado da subfração acetato de etila do extrato hidroalcoólico das raízes HBER apresentou perfil de absorção no espectro de IV (Espectro 30) idêntico ao composto  $\beta$ -sitoesterol glicosídico, isolado anteriormente em nosso laboratório.

Para comprovação desta hipótese utilizou-se CCDAR eluída com dois sistemas de solventes distintos acetato de etila: hexano: metanol (7:2:1) e tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (4:3:1), sendo que o composto foi aplicado a placa e sobreposto com um padrão de identidade confirmada e as amostras coeluíram, indicando tratar-se do mesmo composto. Para se ter uma confirmação mais segura desta proposta, procedeu-se a hidrólise ácida deste composto.

A aglicona obtida da hidrólise do composto **HB-AC22** foi analisada em um sistema de CGAR e coinjectada com um padrão de identidade confirmada de  $\beta$ -sitosterol onde houve coeluição dos picos, análise de CGAR-EM da fração aglicona apresentou espectro de massas (Espectro 31) idêntico ao  $\beta$ -sitosterol confirmando a estrutura do composto **HB-AC22** como sendo o  $\beta$ -sitosterol glicosídico.

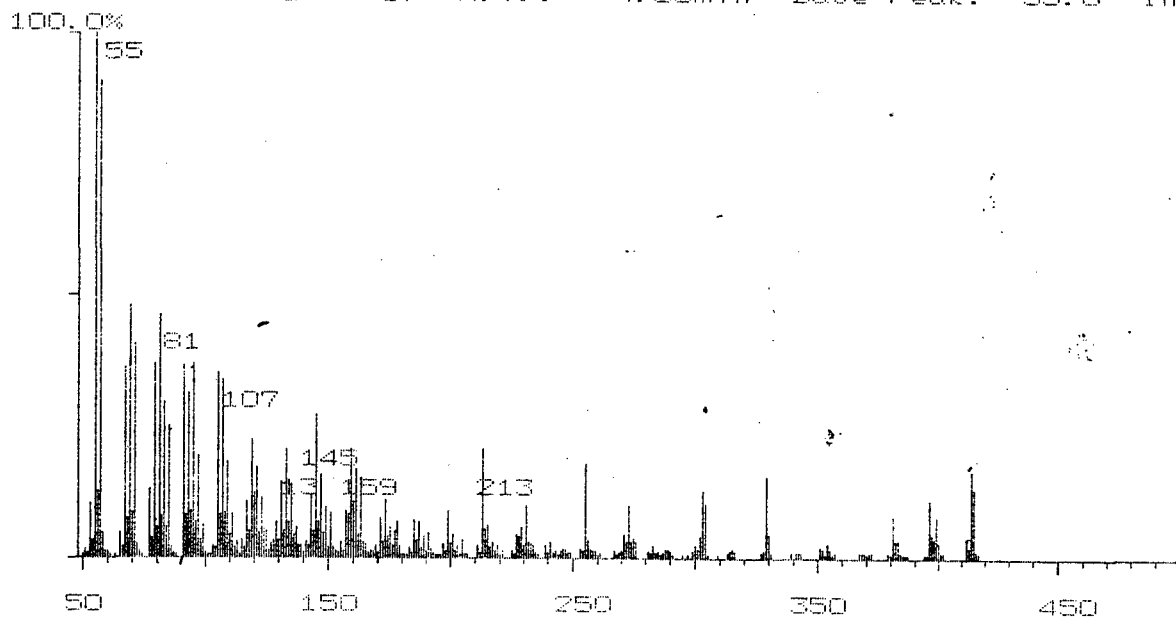
ESPECTRO 30- Espectro de IV (Kbr) do composto **HB-AC22**.



Espectro 31 - Espectro de Massas da fração aglicona do composto **HB-AC22** após hidrólise ácida.

Comment: Alessandro - 4/2% HB

Scan: 129 ( 0- 0) R.T.: 4.36min Base Peak: 55.0 Int





## 5.7 Análise do Óleo Essencial.

O óleo essencial obtido de *Hedyosmum brasiliense*, extraído das folhas e caules jovens apresentou um perfil cromatográfico como demonstrado na figura 16 quando analisado por cromatografia gasosa de alta resolução utilizando-se fase apolar. Nesse perfil podemos verificar uma grande quantidade de compostos sendo vários deles na região dos sesquiterpenos<sup>64</sup>.

O rendimento obtido 0,017ml por quilograma de folhas, não permitiu o isolamento das substâncias para sua identificação. Por não posuímos os padrões necessários para a determinação dos índices de Kovatz, o óleo essencial foi analisado somente por CG-EM e a identificação de alguns de seus componentes foi feita comparando se os dados com a literatura<sup>3, 64, 66, 67, 68</sup>.

Portanto, esta análise permitiu indicar a presença de vários compostos de origem terpênica, os compostos são apresentados a seguir, juntamente com a sua estrutura e seu espectro de massas o espectrograma de íons totais está em anexo..

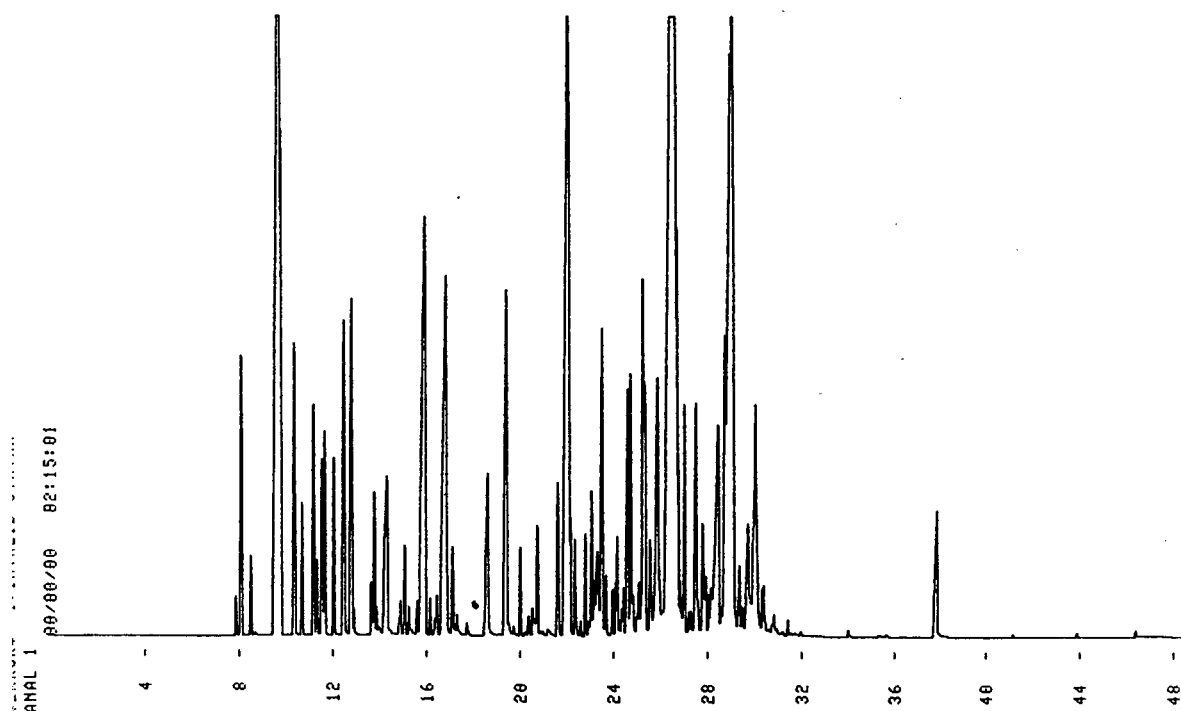
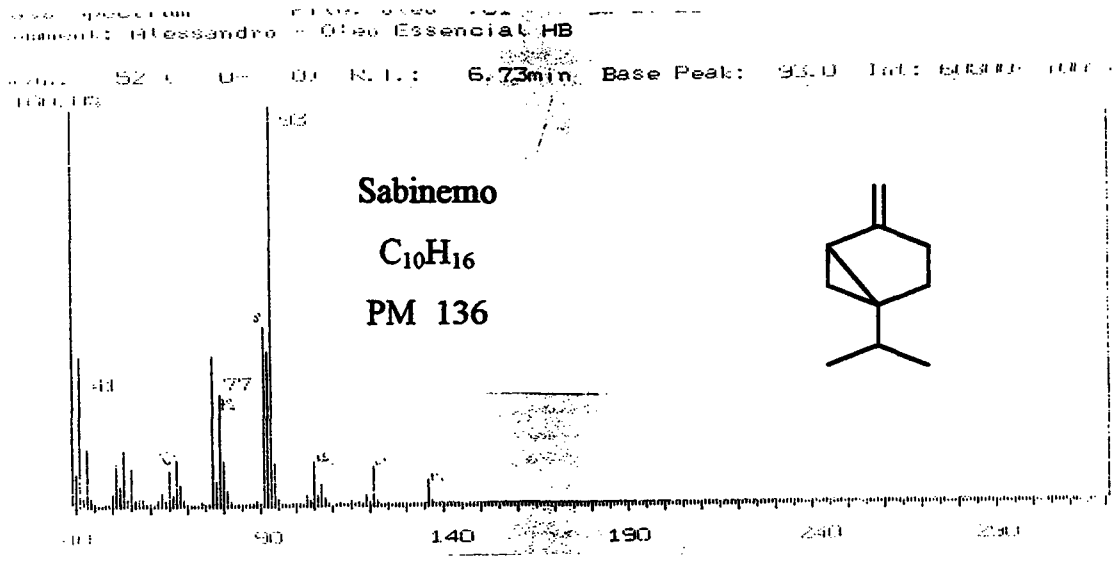
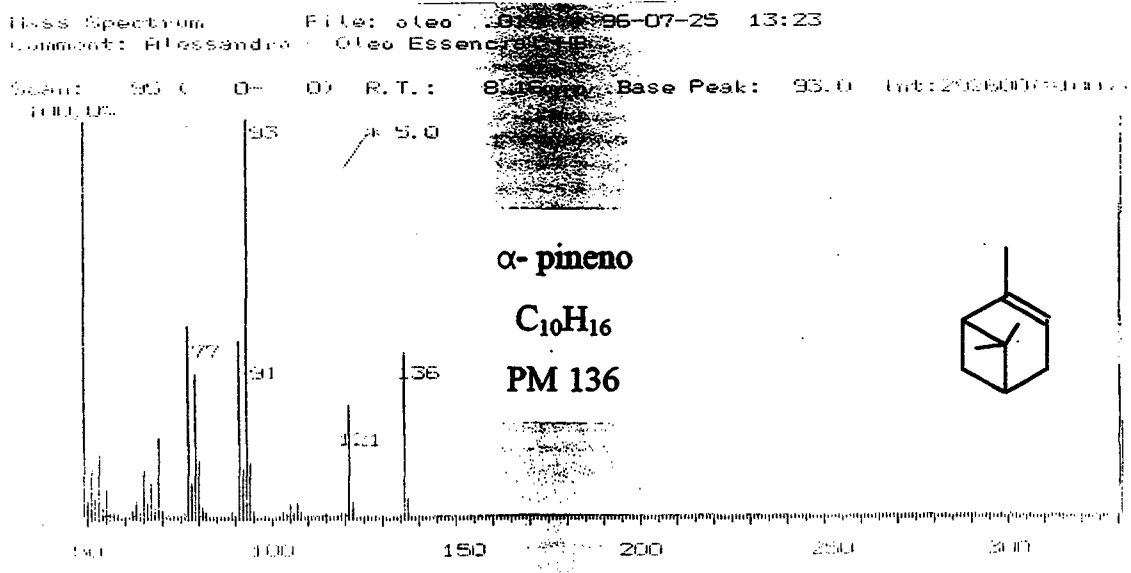


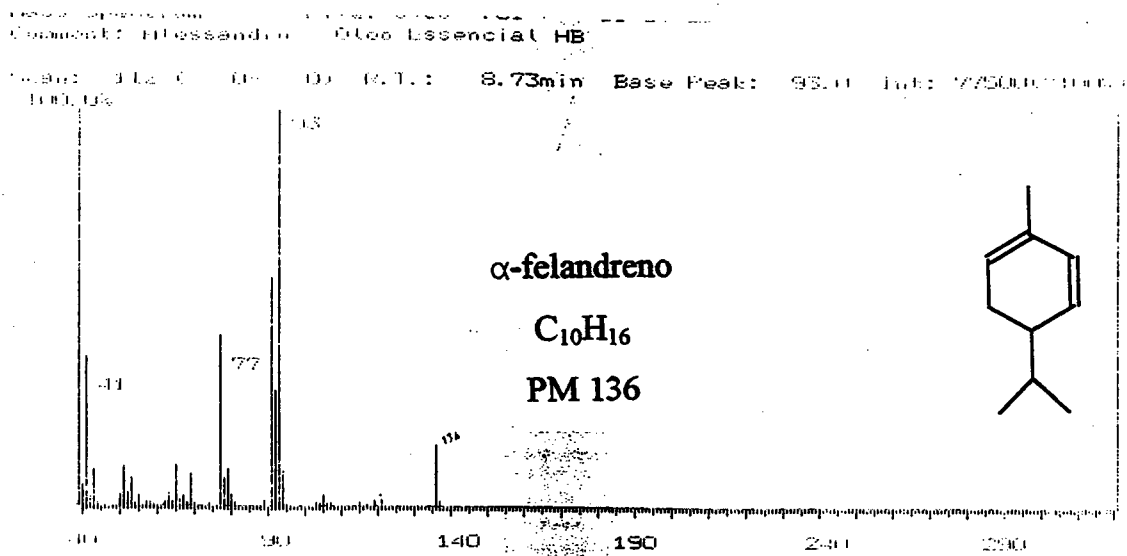
FIGURA 16- Cromatograma do óleo essencial de *H. brasiliense* em coluna apolar OV-1



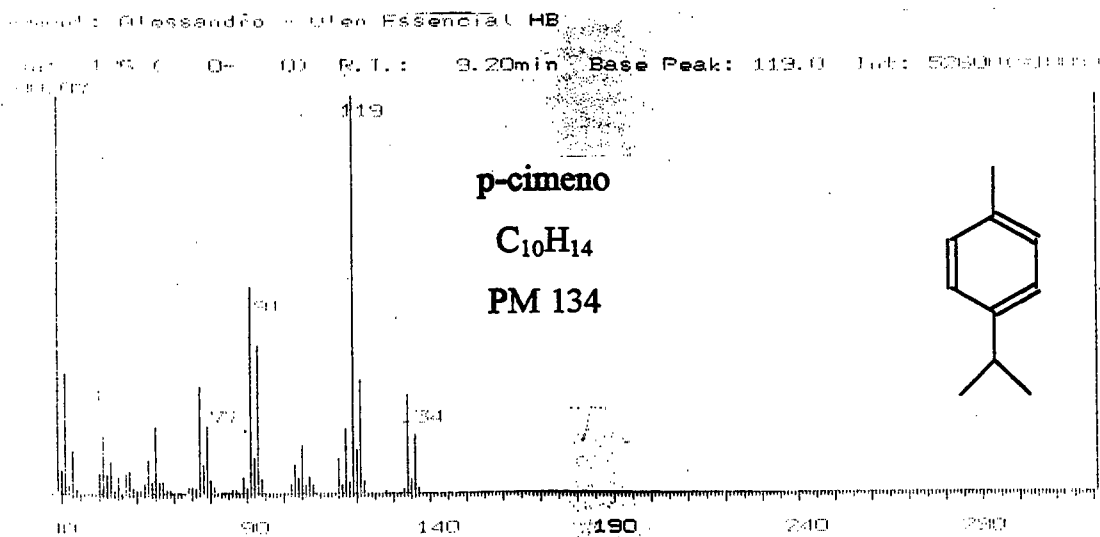
**ESPECTRO 32 - Espectro de massas do composto Sabinemo obtido do óleo essencial de *H. brasilienses*.**



**ESPECTRO 33 - Espectro de massas do composto  $\alpha$ -pineno obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**



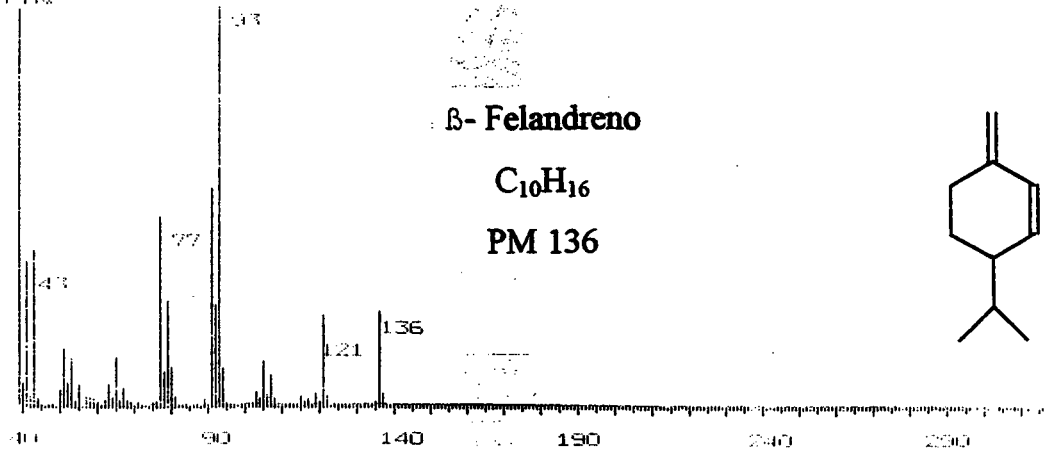
**ESPECTRO 34 - Espectro de massas do composto  $\alpha$ -felandreno obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**



**ESPECTRO 35 - Espectro de massas do composto p-cimeno obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

Comment: Massandro - Oleo Essencial HB

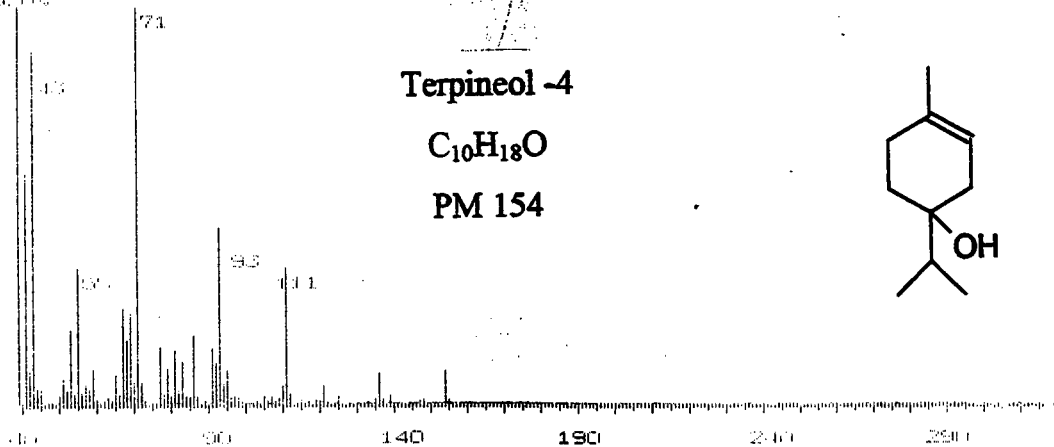
Scan: 104.0 (100.0%) R.T.: 10.46min Base Peak: 93.0 In: 11775000-1000



**ESPECTRO 36- Espectro de massas do composto β- felandreno obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

Comment: Massandro - Oleo Essencial HB

Scan: 38.7 (100.0%) R.T.: 14.36min Base Peak: 71.0 In: 11770000-1000

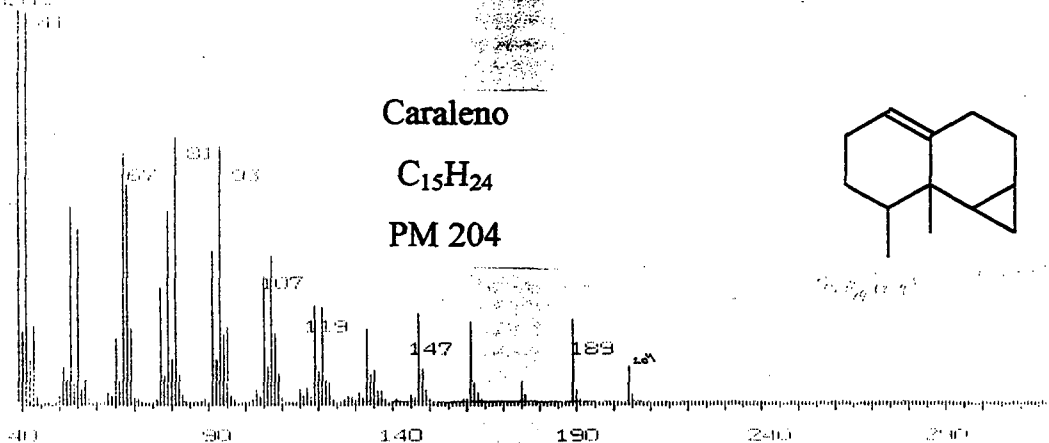


**ESPECTRO 37 - Espectro de massas do composto Terpineol -4 obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

nome: Alessandro - Oleo Essencial HB

data: 17/5/07 09:00 R.T.: 20.83min Base Peak: 41.0 Int: 5200000000

100.0%

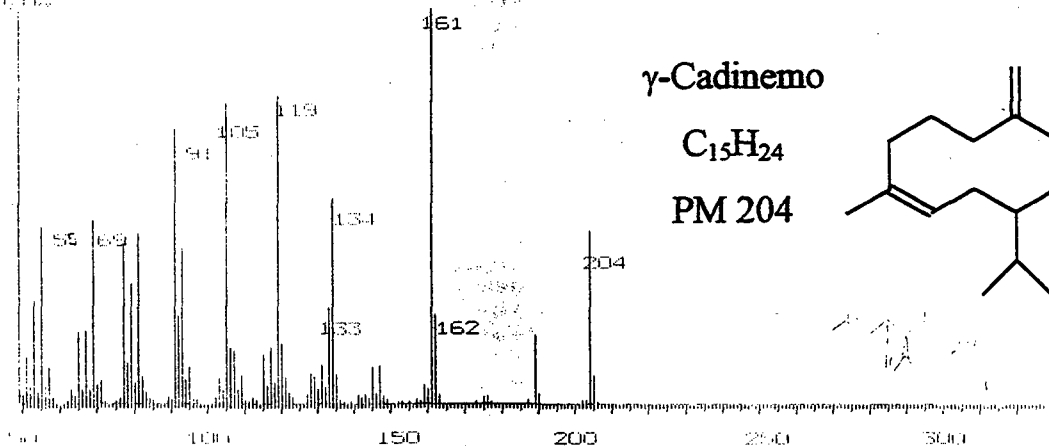


**ESPECTRO 38 - Espectro de massas do composto Caraleno obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

nome: Alessandro - Oleo Essencial HB

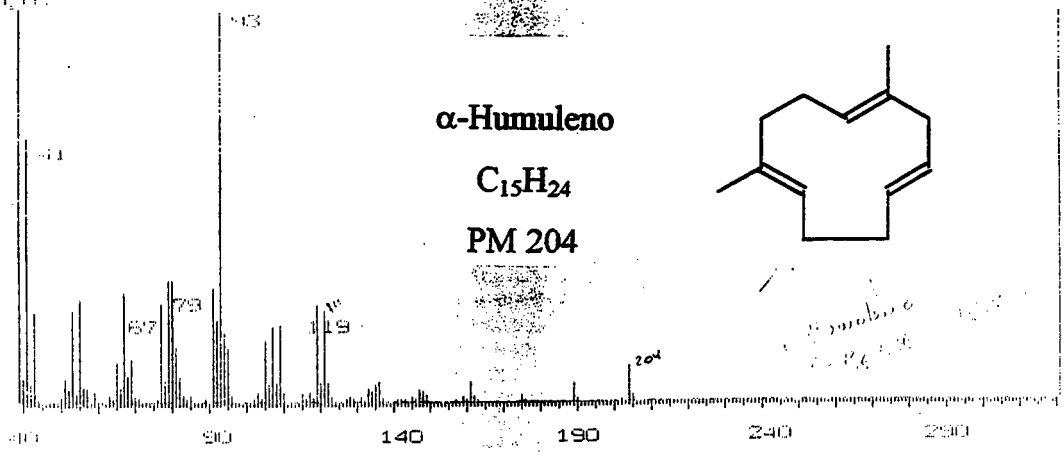
data: 17/5/07 09:00 R.T.: 24.16min Base Peak: 161.0 Int: 7740000000

100.0%



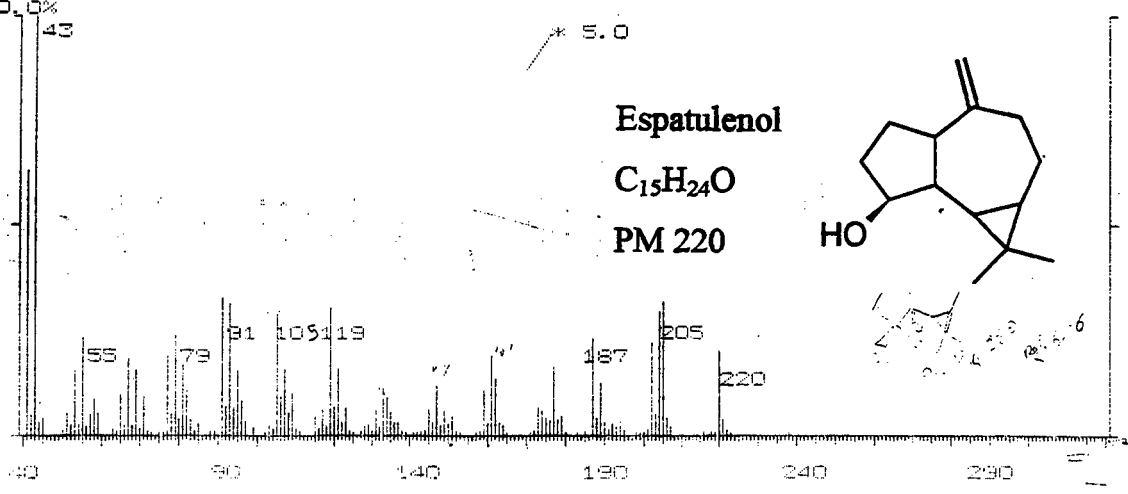
**ESPECTRO 39 - Espectro de massas do composto Cadinemo obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

Mass Spectrum File: 0120\_101...  
 Comment: Alessandro - Oleo Essencial HB  
 Scan: 503 (0) R.T.: 24.40min Base Peak: 93.0 Int: 122500(=100%)



**ESPECTRO 40- Espectro de massas do composto α-Humuleno obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

Mass Spectrum File: 0120\_101...  
 Comment: Alessandro - Oleo Essencial HB  
 Scan: 633 (0) R.T.: 26.10min Base Peak: 43.0 Int: 96400(=100%)



**ESPECTRO 41 - Espectro de massas do composto Espatulanol obtido do óleo essencial de *H. brasiliense*.**

## **5.8-Resultados Farmacológicos.**

### **5.8.1- Dor Induzida Pela Injeção Intraperitoneal de Ácido Acético.**

Os resultados da Figura 17 (A e B) mostram que o EH de *H. Brasiliense* administrado por via intraperitoneal (3 - 60 mg/Kg), inibiu de forma dose-dependente as contorções abdominais, induzidas pela injeção de ácido acético (0.6%) com a  $DI_{50}$  (intervalo de confiança de 95%) de 12.7 (8.7 - 19.0) e com inibição máxima (IM) de  $91 \pm 4\%$ , sendo seu efeito de longa duração (até 4 horas). Administrado oralmente (100 - 800 mg/kg) o EH não causou efeito analgésico de forma significativa em relação a dor induzida pelo ácido acético.

### **5.8.2 - Dor Induzida Pela Formalina.**

O tratamento dos animais com o EH (10 - 100 mg/kg, i.p.) ou com o composto (30 - 150 mg/kg, i.p.) administrado via intraperitoneal 0.5 horas antes, causou inibição de forma significativa de ambas as fases da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina (2.5%). As  $DI_{50}$ s (mg/Kg) foram: 31.1 (22.2 - 43.5) e 33.1 (17.6 - 62.0) para a primeira fase e 21.7 (13.6 - 34.6) e 87.9 (54.8 - 140.9) para a segunda fase, com inibição máxima (%) de  $71 \pm 4$ ,  $85 \pm 8$ ,  $91 \pm 9$  e  $90 \pm 7$ , respectivamente, Figura 18 (A e B). No entanto, o EH administrado por via oral (400 - 800 mg/kg) não foi efetivo em inibir a dor causada pela formalina. Por outro lado, o EH e o composto nas mesmas doses que foram efetivos em inibir a dor, não causaram redução significativa do edema da pata de camundongo associado a segunda fase da dor causada pela formalina, Figura 19 (C).

### **5.8.3 - Dor Induzida Pela Capsaicina.**

A Figura 20 (A e B) mostra que o EH (30 - 300 mg/kg) ou o composto (10 - 60 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, causaram inibição dose-dependente da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos com  $DI_{50}$  de 69,1 (40.6 - 117.7) e 20.9 (8.14 - 54.0) mg/kg e inibição máxima de  $71 \pm 7$  e  $60 \pm 5\%$ .

#### **5.8.4 - Efeito do EH do Composto HB-15 Obtidos de *H. Brasiliense* Nos Testes do Tail-Flick e da Placa Quente.**

A administração do EH (100 mg/kg, i.p.) 0.5 horas antes, não apresentou efeito analgésico significativo nos teste da "placa-quente e tail-flick" (Figura 21 A e B). Além disso, o composto (150 mg/kg) isolado da *H. brasiliense*, da mesma forma que o EH, não foi efetivo quando analisado no teste da "placa quente" (resultado não apresentado). No entanto, a morfina (10 mg/kg, s.c.) causou marcado efeito analgésico nos dois modelos.

#### **5.8.5 - Estudo do Possível Mecanismo de Ação Antinociceptiva do EH de *H. brasiliense***

A Figura 22 mostra que o pré-tratamento dos animais com naloxona (5 mg/kg, i.p.), antagonista dos receptores opióides, reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (5 mg/kg, s.c., agonista opióide). Contudo, o mesmo tratamento não foi capaz de interferir na ação analgésica causada pelo EH da *H. Brasiliense* (100 mg/kg, i.p.) quando analisado em relação a primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina.



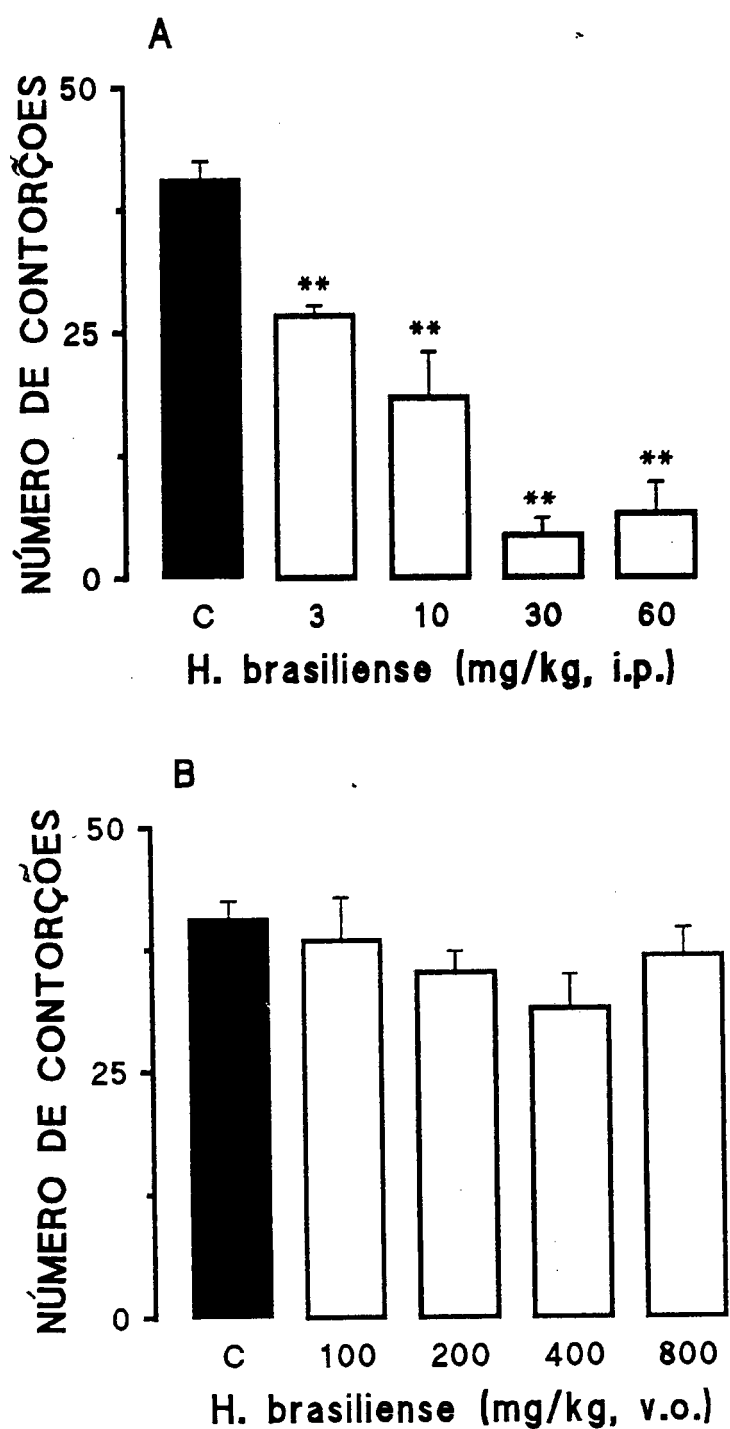


FIGURA17 - Efeito analgésico dose-dependente causado pelo extrato hidroalcoólico da *H. brasiliense* administrado por via intraperitoneal (A) ou oral (B) em relação as contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente do controle, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

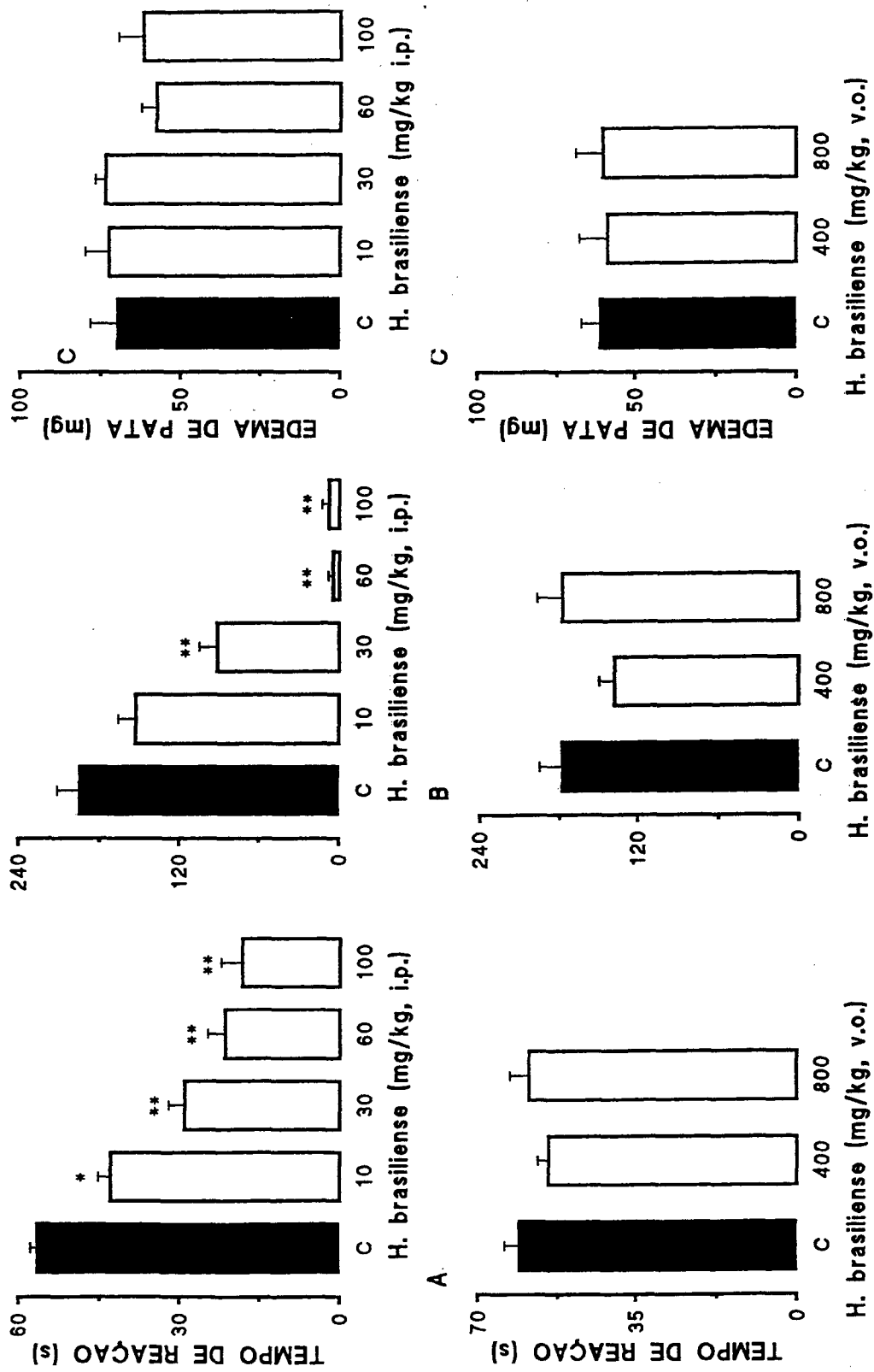


FIGURA 18 - Efeito analgésico dose-dependente causado pelo extrato hidroalcoólico da *H. brasiliense* administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou oral (painel inferior) em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente do controle, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

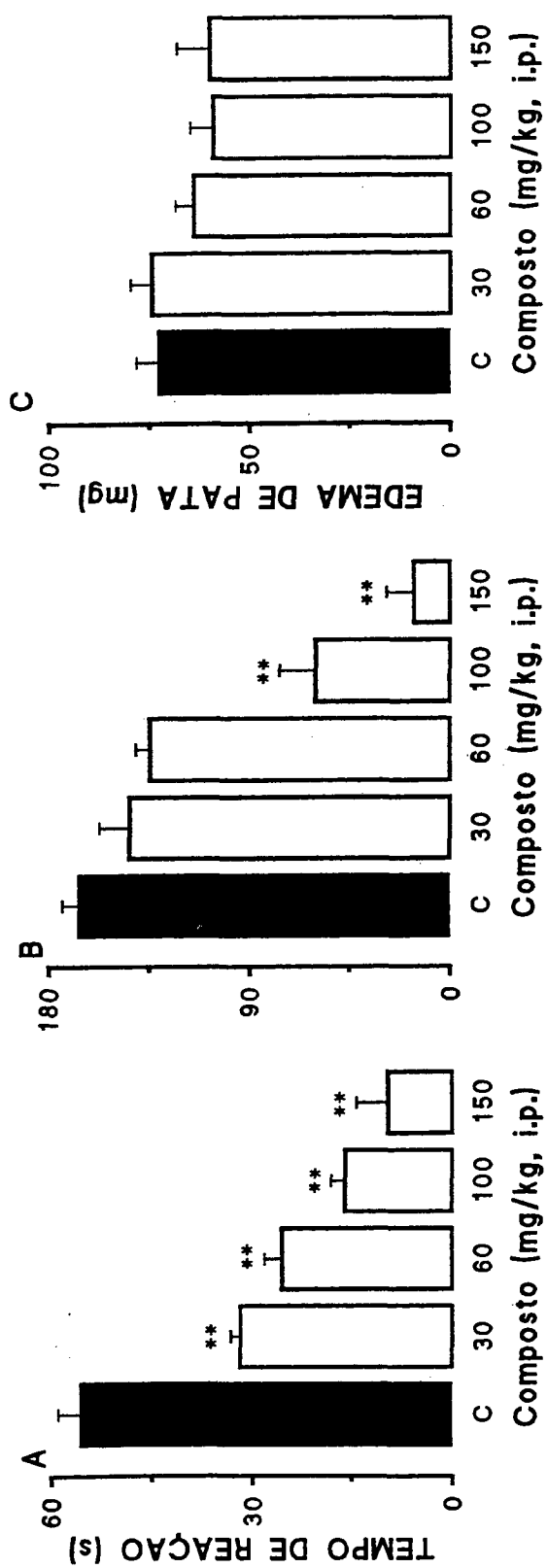


FIGURA 19 - Efeito analgésico dose-dependente causado pelo o composto isolado da *H. brasiliense* administrado por via intraperitoneal em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina. Cada grupo representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente do controle, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

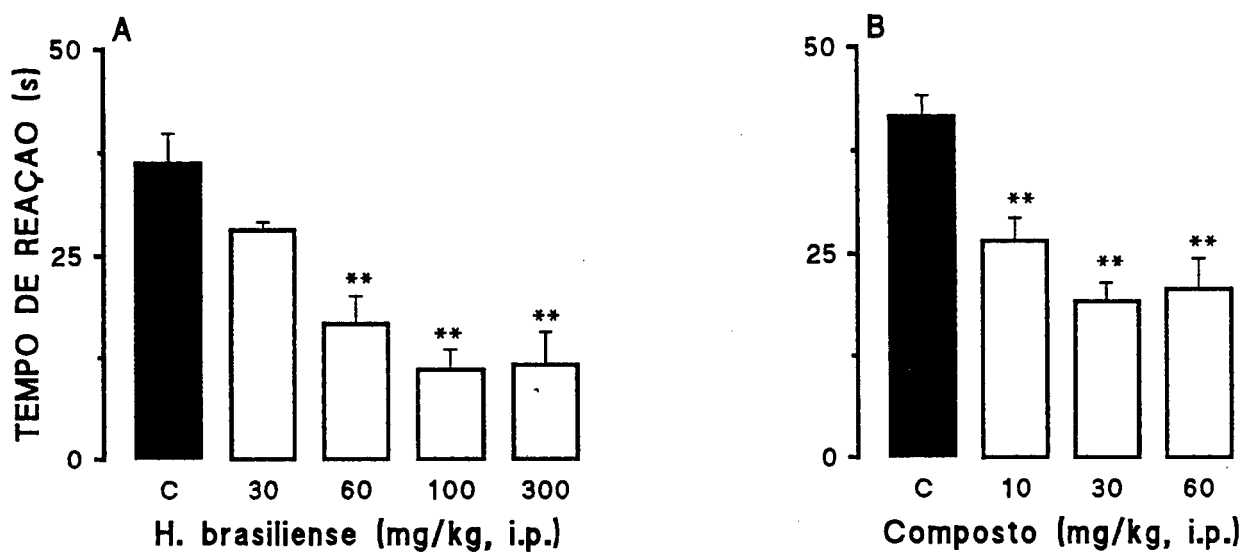


FIGURA 20- Efeito analgésico dose-dependente causado pelo extrato hidroalcoólico da *H. brasiliense* administrados por via intraperitoneal (A) ou pelo composto isolado (B) sobre a dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os EPM. Difere significativamente do controle, \*\*P < 0.01.

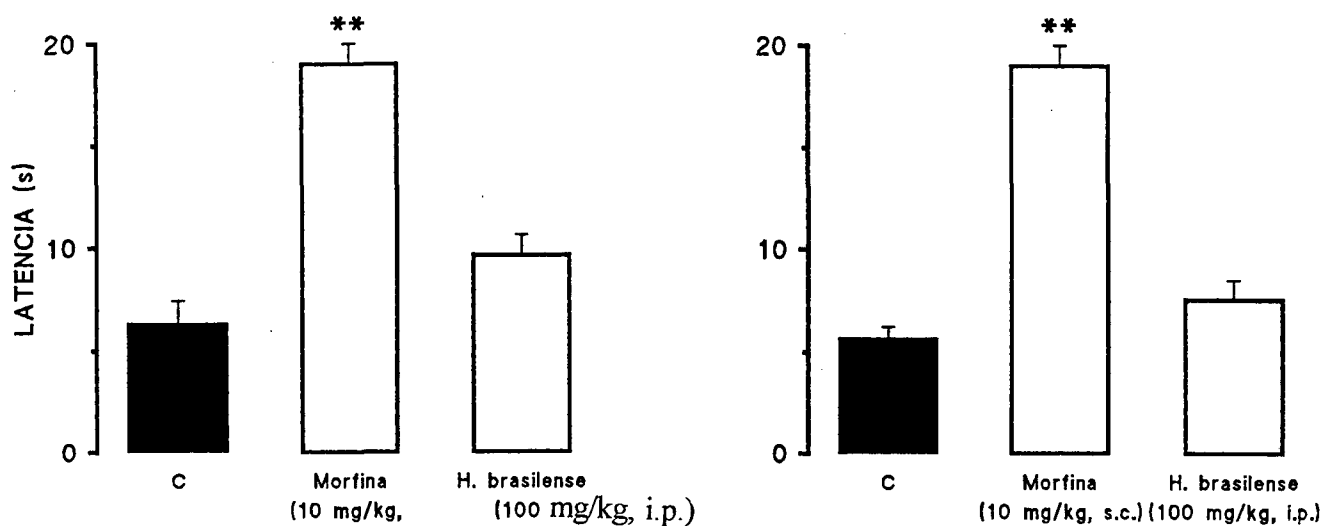


FIGURA 21 - Efeito do tratamento dos animais com morfina e com o extrato hidroalcoólico da *H. brasiliense* sobre a dor induzida no testes da placa quente (A) e tail-flick (B) em camundongos. Cada grupo representa a média 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\*P < 0.01.

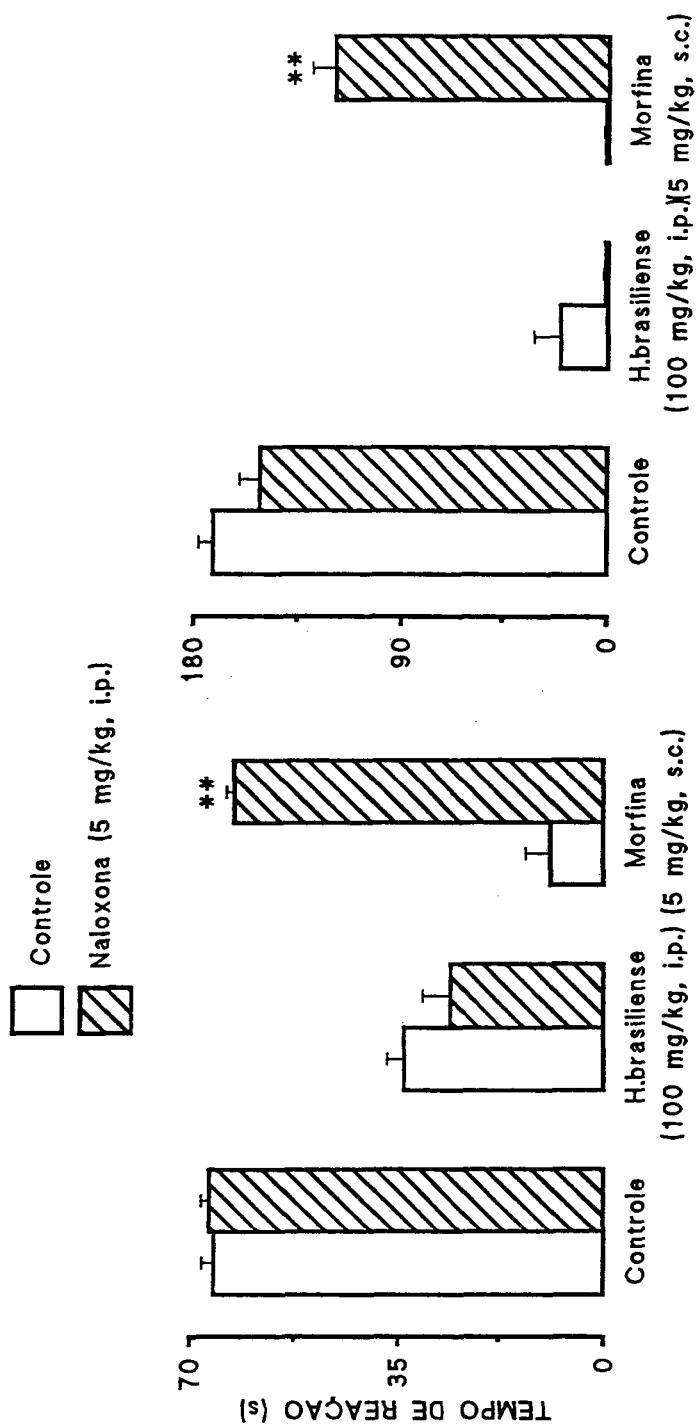


FIGURA 22 - Influência do tratamento com naloxona sobre a ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da *H. brasiliense* ou da morfina sobre a primeira e à segunda fase do teste da formalina. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*\* $P < 0.01$ .

## 5.9 Resultado dos Testes Antimicrobianos.

Os resultados obtidos mostram que o óleo essencial e os extratos hidroalcoólico das raízes **HBER** e hidroalcoólico das folhas **HBEF** foram ativos contra *Staphylococcus aureus* no volume de 50, 40, 12.5 mg, respectivamente, e que somente o extrato **HBEF** foi ativo contra *Escherichia. coli* no volume de 50mg .

Extrato **HBEF** foi fracionado e as subfrações obtidas e os compostos **HB-15** e **HB-8** foram testadas para determinar quais frações retinham a atividade microbiana. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

A subfração HBMeA foi ativa contra as 3 espécies de bactérias testadas, no entanto, por ser pouco solúvel nos diluentes usados na experiência o resultado não pode ser expresso em mg.

TABELA 7 - Atividade Antibacteriana das frações obtidas do extrato HBEF e dos compostos isolados **HB-15**, **HB-8**, pelo teste de difusão em gel, valores expressos em mg.

|                               | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> |
|-------------------------------|----------------------|------------------|----------------|
| <b>HB-15</b><br>Onoseriolídeo | v.i.> 1,6            | 0.3              | v.i. > 1.6     |
| <b>HB-8</b>                   | 0.3                  | c.i.> 1.6        | 0.3            |
| HBAC                          | 1.6                  | 1.6              | c.i.> 3.2      |
| HBMe                          | 1.0                  | 0.5              | 4.33           |
| HBMeA                         | ativo                | ativo            | ativo          |

\*c.i. concentração de inibição.

O composto **HB-8** apresentou uma c.m.i. de 1.75mg/ml para *P. aeruginosa* não produzindo inibição de crescimento *E. coli* e *S. aureus*, o composto **HB-15** apresentou c.m.i. de 0.43 mg/ml e c.m.b. de 1.75mg/ml, mostrando- se inativa contra *P. aeruginosa* e *E. coli* até a concentração de 1.75mg/ml.

Os resultados obtidos demonstram que *Hedyosmum brasiliense* possui uma importante atividade antibacteriana contra bactéria Gram negativas, como demonstrado no extrato bruto das folhas e pelo composto **HB-8**, que apresentam atividade contra *P.aeruginosa*, microorganismo considerado como um dos maiores responsáveis pelas infecções hospitalares por apresentar altos níveis de resistência aos agentes antimicrobianos usados na clínica , além de possuir uma forte atividade contra bactérias Gram positivas como demonstrado pelo composto **HB-15**.



## 6- CONCLUSÕES

O presente trabalho nos permite concluir que:

- A espécie *Hedyosmum brasiliense* possui importantes atividades analgésicas e antimicrobianas, o que vem de encontro a sua utilização na medicina popular.
- Os compostos isolados são todos inéditos para o gênero *Hedyosmum*, sendo os compostos **S2-811**, **HB-5** e **HB-8** inéditos para a família *Chloranthaceae*.
- Novos teste biológicos devem ser realizados, devido ao grande diversidade de atividade biológicas com que a família está relacionada.
- O composto **HB-15** apresentam vários sítios reativos importantes o que sugere ser viável a realização de estudos de relação estrutura atividade.

## 7 - BIBLIOGRAFIA

- 1-BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química nova**, v.17, n. 5, p. 405-20,1994.
- 2-MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v.18, n. 1, p. 56-64, 1995.
- 3- REITZ, R. **Chloranthaceas. In: Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 10 p., 1965.
- 4 -GABRIEL, M. M. Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. - Chloranthacea. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Curitiba,1991.
- 5-JOLY, A. B. **Botânica, Introdução A Taxonomia Vegetal**, 2ª ed. São Paulo: Editora Nacional, p. 306-14, 1975.
- 6-BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v. 1, 1978.
- 7-CÁRDENAS, L. C.; JAIME, R. et al. The analgesic Activity of *Hedyosmum bonpladianum*: flavonoid glicosides. **Planta Med.**, v. 59, p. 26-7. 1993.
- 8 -TODZIAS, C. A. **Flora Neotropica.** New York: The New York Botanical Garden, v. 48, 1988.
- 9-KAWABATA, J.; TAHARA S. et al. Isolation and structural elucidation of four sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae). **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, p. 1447-53, 1981.
- 10-OCCHIONI, P. Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw.. **Tese Professor Catedrático.** Faculdade de Farmácia, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro, 1954.
- 11-SCHULTZ, A. R. **Introdução ao Estudo da Botânica Sistemática.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Globo, v.2, 1963.
- 12-CRONQUIST, A. **An Intregrated System of Classification of Flowering Plants.** New York: Columbia University Press., p. 83-5, 1981.
- 13-LÖFGREN, A. **Manual Das Famílias Naturaes Phanerogamas.** Rio Janeiro: Imprensa nacional. p.137-8, 1917.

- 14 -TAHARA, S.; FUKUSHI, Y. et al. Lindenanolides in the root of *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae). **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, p. 1511-2, 1981.
- 15-CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v. 2, Rio de Janeiro : Imprensa nacional, p. 209, 1926.
- 16-GABRIEL, M. M.; MOREIRA, E. A.; et al. Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense*. **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, UFPR, Curitiba. PR. 15-17 de setembro 1992.
- 17-ZARTERKA, L.; ALVARENGA, M. A. et al. Atividade antifúngica de *Hedyosmum brasiliense*. **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, UFPR, Curitiba. PR. 15-17 de setembro 1992.
- 18-UCHIDA, M.; KUSANO, G. et al. Two new sesquiterpenoids from *Chloranthus glaber* Makino. **Heterocycles**, v. 9 , n. 2, p. 139-144, 1978.
- 19-OKAMURA, H.; NAKASHIMA, N. et al. The structures of two lindenane sesquiterpene glucosides from *Chloranthus glaber*. **Chemistry Letters**, p.1541. 1994.
- 20- SASHIDA, Y.; SHIMOMURA, H. et al. The constituents of *Chloranthus Glaber* and our preparation. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 33, p. 217-20, 1981.
- 21-TAI, P.; HUNG Y. Antitumor constituents in *Chloranthus glaber* Makino. **Chung Teo Yao**, v. 12, n. 2, p. 9, 1981.
- 22-KAWABATA, J.; TAHARA, S.; et al. Studies on the constituents of Chloranthaceae: sesquiterpene lactones of *Chloranthus japonicus* Sieb. **Koen Yoshihu**, 22nd. p. 153-6, 1979.
- 23-KAWABATA, J.; MIZUTANI, J. Distribution of lindenanolides in the Chloranthaceae. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, n. 11, p. 2965-6, 1988.
- 24-KAWABATA, J.; FUKUSHI, S. et al. Structures of novel sesquiterpene alcohols from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae). **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, n. 3, p. 713-7, 1984.
- 25-KAWABATA, J.; MIZUTANI, J. Shizukanolides D, E and F, novel lindenanolides from *Chloranthus* ssp. (Chloranthaceae). **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, n. 1, p. 203-7, 1989.

- 26-KAWABATA, J.; FUKUSHI, Y. et al. Shizukaol A, a sesquiterpene dimer from *Chloranthus japonicus*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2332-4, 1990.
- 27-KUSANO, G.; ABE, M. et al. Studies on the constituents of *Chloranthus* ssp. Further studies on the constituents of *Chloranthus japonicus*. **Yakugaku Zasshi**, v.111, n. 12, p. 756-64, 1991.
- 28-KAWABATA, J.; FUKUSHI, S. et al. Structures of novel sesquiterpene ketones from *Chloranthus serratus* (Chloranthaceae). **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, n. 5, p. 1479-85, 1985.
- 29-KAWABATA, J.; MIZUTANI, J. Dimeric sesquiterpenoid esters from *Chloranthus serratus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1293-6, 1992.
- 30-KAWABATA, J.; FUKUSHI, E. Symmetric sesquiterpene dimer from *Chloranthus serratus*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1347-9, 1993
- 31-WANG, T.; HUANG, A. et al. Isolation and identification of the constituents of volatiles of flowers of *Chloranthus spicatus* (tunb.) Makino. **Acta Bot. Sin.**, v. 29, n. 2, p. 189-92, 1987.
- 32-CHENGWEL, G.; YUSHU, C. et al. Studies on the chemical constituents of the *Chloranthus holostetegius* (Hand-Mazz). **Chem. J. Chin. Univ.**, v. 8, n. 2, p. 141-2, 1987.
- 33-SOLTIS, D. E.; BOHM, B. A. Flavonoids of *Ascarina lucida*. **J. Nat. Prod. (Lloydia)**, v. 45, n. 4, p. 415-7, 1982.
- 34-NIERO, R. Isolamento e identificação de compostos de *Phylhanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico; correlação estrutura atividade. **Dissertação de Mestrado**, UFSC, Florianópolis, 1993.
- 35-HALL, I. H.; LEE, K. H. et al. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. **J Pharm. Sci.**, v. 69, p. 537-43, 1980
- 36-HALL, I. H.; LEE, K. H. et al. Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. **J. Pharm. Sci.**, v. 68, p. 537-42, 1979.
- 37-UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales**. 2ª ed. Peru: Fondo Editorial, 299 p.
- 38-GEISSMAN, T. A. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. Freeman, Cooper & Company, San Francisco. 1969.

- 39-BOHLMANN, F.; ZDERO, D. et al. Onoseriolid, ein neus sesquiterpenlacton aus *Onoseris albicans*. **Phytochemistry**, v. 20, p.1631, 1980.
- 40-BOHLMANN, F.; ZDERO, C. et al. Modified eudesmanolides and other sesquiterpene lactones from *Wunderlichia mirabilis* and *Actinoseris polymorpha*; **Phytochemistry**, v. 20, p. 1623, 1981.
- 41-GROS, E. G.; POMILIO, A. B. et al. **Introduccion al Estudio de los Productos Naturales**. Facultad de ciencias exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 1985.
- 42-BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H. The abdominal constriction response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 73, p. 325-33, 1981.
- 43-COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C. et al. The abdominal constriction response and its suppression by drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.
- 44-SANTOS, A.R.S; CECHINEL FILHO V. et al. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus*., **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 755-759, 1994.
- 45-SANTOS, A.R.S; CECHINEL FILHO V. et al. Analysis of the mechanism sunderlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*., **Gen. Pharmac.**, v. 26, n. 7, p. 1495-506, 1995.
- 46-CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced antinociceptive response in mouse., **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-8, 1993.
- 47-HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B. et al. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics., **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- 48-MURRAY, C.W; PORRECA, F. et al. Methodological refinements in the mouse paw formalin test-an animal model of tonic pain., **J. Pharmacol. Meth.**, v. 20, p. 175-86, 1988.
- 49-HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain., **Pain**, v. 30, p. 103-14, 1987.
- 50-D'AMOUR, F.E.; SMITTH, J. A method for determning loss pain sensation **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 72, p. 74-9, 1941.

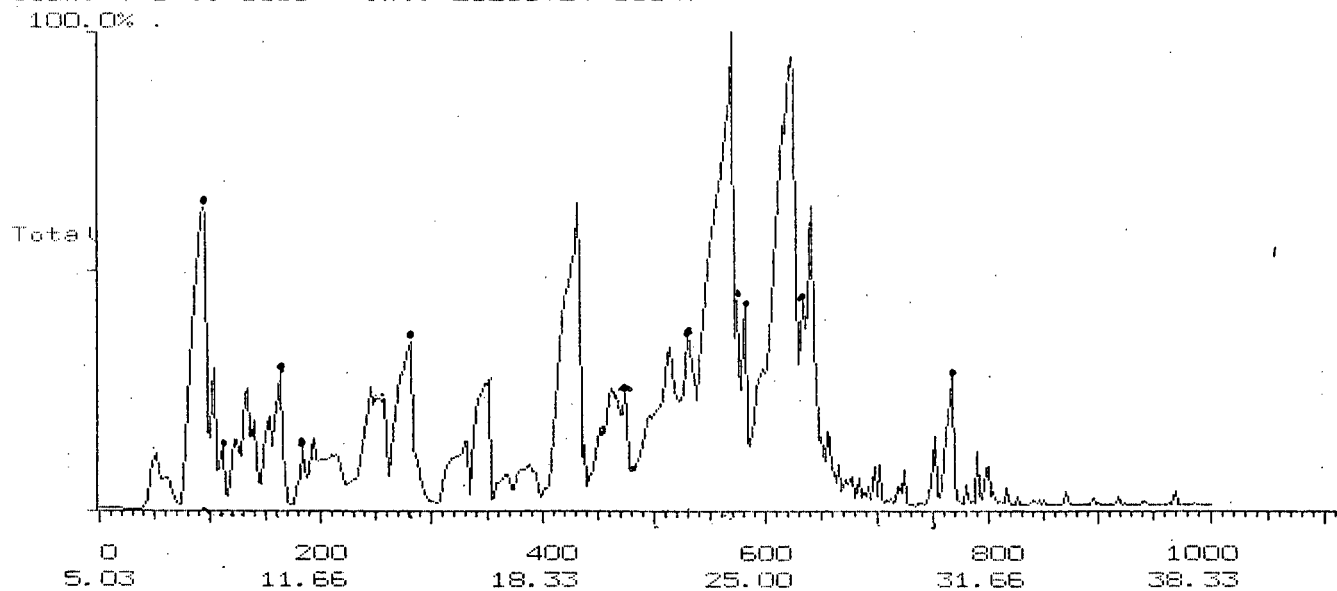
- 51-EDDY, N.B; LEIMBACK, D. Synthetic analgesic II. Dithienylbutenyl and dithienylbutyllamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-93, 1953.
- 52-SAKURADA, T.; KATSUMADA, K. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord., **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-85, 1992.
- 53-SAKURADA, T.; KATSUMADA, K. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists., **Neurosci. Lett.**, p. 131-42, 1993.
- 54- SMÂNIA, A. JR.; DELLE MONACHE, F. et al Antibacterial activity of a substance prduced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **J. Ethnopharmacol**, v. 45, p. 177-81, 1995a
- 55-SILVERSTAIN, R. M. et al. **Spectrometric Identifiction of Organic Compounds**. 5<sup>a</sup> ed. John Wiley e Sons,inc. 1991.
- 56-XU, S.; NORTON, R. A. et al. Comparison of the chromatographic properties of sterol, select additional steroids and triterpenoids: gravity-flow column liquid chromatography, thin-layer chromatography, gas-liquid chrmatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, n.456, p. 377-9, 1988.
- 57-PALERMO, J. A.; SELDES, A.M. et al. Free sterol of the red alga *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2688-9, 1984.
- 58-RUBINSTEIN, I. GOAD, L. J. et al. The 220 NMR spectra of phytosterol. **Phytochemistry**, v. 15, p. 195-200, 1976.
- 59-AKIHISA, T. SHIMIZU, N. et al. Sterols of the Curcubinaceae. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1693-700, 1987.
- 60-GARG, V. K.; NES, W. R. Ocurrence of  $\Delta^5$ -sterols in plants producing predominantly  $\Delta^7$ -sterols: studies on the sterol compositionsof six curcubitaceae seeds. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 2591-97, 1986.
- 61-AKIHISA, T.; MATSUBARA, Y. et al. The 24 $\alpha$  and 24 $\beta$ -epimers of 24-ethylcholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol in two Clerodendium species. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 1169-72,1988
- 62-THOMPSON, M. J.; DUTKY, S.R. et al. Nmr spectra of C-24 isomeric sterol. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1781-90, 1972.

- 63-HORST, F. **Basic One-and Two-Dimensional Nmr Spectroscopy**. 2<sup>a</sup> ed., Ed. VCH, New York, 1993.
- 64-PATITUCCI, M. L.; VEIGA, V. F. JR. et al. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 262-6, 1995.
- 65-MASADA, Y. **Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry**. John wiley, New York, 334p., 1976.
- 66-GUENTHER, E. **The Essential Oils**. Robert E. Krieger Publishing, New York, v.1, 852 p., 1972.
- 67-EKUNDAYO, O.; LAAKSO, I. et al. Essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Plant Med.**,v.54, n. 1, p. 55-7, 1988.

# ANEXO

Chromatogram File: oleo .01 96-07-25 13:23  
Comment: Alessandro - Oleo Essencial HB

Scan: 1 to 1000 Int: 2329972(=100%)



<TIC> Scan No. Range:1 to 1000

|          |          |          |          |          |  |         |         |          |     |
|----------|----------|----------|----------|----------|--|---------|---------|----------|-----|
| 1. Scale | 2. ScRng | 3. Int*2 | 4. Int/2 | 5. BaseL |  | 7. Area | 8. Init | 9. MoreK | 10. |
|----------|----------|----------|----------|----------|--|---------|---------|----------|-----|