

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

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE  
PHYLLANTHUS CORCOVADENSIS (EUPHORBIACEAE)  
COM EFEITO ANALGÉSICO; CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA A UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA  
CATARINA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE “MESTRE EM QUÍMICA”

RIVALDO NIERO

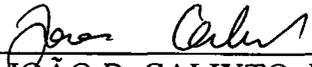
FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA - BRASIL  
AGOSTO DE 1993

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE PHYLLANTHUS  
CORCOVADENSIS (EUPHORBIACEAE) COM EFEITO ANALGÉSICO,  
CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

RIVALDO NIERO

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA  
FINAL PELO ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

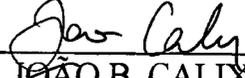
  
\_\_\_\_\_  
Prof. ROSENDO A. YUNES, Ph.D.  
ORIENTADOR

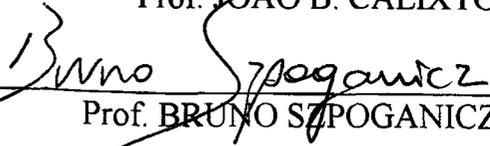
  
\_\_\_\_\_  
Prof. JOÃO B. CALIXTO, Ph.D.  
CO-ORIENTADOR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. BRUNO SZPOGANICZ, Ph.D.  
COORDENADOR

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. ROSENDO A. YUNES, Ph.D.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. JOÃO B. CALIXTO, Ph.D.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. BRUNO SZPOGANICZ, Ph.D.

À minha esposa Ivalda e meus  
filhos Guilherme e Henrique.

Ao meu pai, Derci e a minha mãe  
Valmira (in memorium),  
meus sogros Elias e Geraldina.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Aos professores Rosendo A. Yunes, João B. Calixto e Moacir G. Pizzolatti, pelo incentivo e apoio durante toda a parte experimental.
- Ao meu primo e amigo Valdir Cechinel Filho pelo incansável estímulo, atenção e apoio durante a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- A minha esposa Ivalda pela compreensão, amor e apoio espiritual incansável.
- Aos meus filhos Guilherme e Henrique pelos momentos de tanta alegria e descontração.
- Ao meu pai, Derci e a minha mãe Valmira (in memorium) pela atenção, estímulo e certeza da vitória.
- Aos meus sogros, Elias e Geraldina pelo apoio constante.
- À minha irmã e cunhado, Eia e Valdo pelo apoio e amizade.
- Aos meus irmãos Nado, Berto pelo incentivo e amizade.
- Aos meus sobrinhos, Wiliam, Gabriela e Angela pelos momentos de alegria.
- À nona Angélica pelo incentivo e apoio.
- Aos amigos Edésio, Clóvis, Evandro, Valdenir, Berenice, Vanilde e Ângelo pelo companheirismo nos momentos difíceis deste percurso.
- Aos professores Angelo Pinto e Franco Delle Monache pelo auxílio nos espectros de RMN e Massa.
- Às colegas Mariza e Márcia pela compreensão.
- Aos colegas de laboratório, João, Mauro, Obdúlio, Jacir, Roseane, Inês e Deodósio pelo companheirismo.
- Ao professor João B. Calixto e ao amigo Adair pela realização dos testes farmacológicos.
- Aos demais colegas, professores e funcionários que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- Ao CNPq, CAPES, FINEP e UFSC pelo suporte financeiro.
- À Deus.

## ÍNDICE GERAL

### CAPÍTULO I

#### I - INTRODUÇÃO

	pág.
1.1 - Algumas considerações.....	01
1.2 - Revisão química de algumas espécies do gênero <i>Phyllanthus</i> .....	03
1.3 - Sinopse da família Euphorbiaceae.....	09
1.4 - Sinopse do gênero <i>Phyllanthus</i> .....	09
1.5 - Posição sistemática de <i>Phyllanthus corcovadensis</i> (MUELL. ARG.).....	10
1.6 - Objetivos.....	11
1.7 - Teoria geral da ação dos fármacos.....	12
1.7.1 - Tipos de ação dos fármacos.....	12
1.7.2 - Relação estrutura química e atividade farmacológica.....	12
1.7.3 - Drogas analgésicas: Aspecto geral.....	13
1.7.4 - Mecanismos de ação: Alguns aspectos.....	14
1.7.5 - Ensaios farmacológicos: Aspecto geral.....	14

### CAPÍTULO II

#### II - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - Coleta e identificação do material botânico.....	15
2.2 - Obtenção dos extratos vegetais.....	15
2.3 - Materiais e métodos.....	15
2.3.1 - Procedimento geral para purificação dos compostos.....	16
2.4 - Pesquisa preliminar de alguns grupos químicos.....	17

2.4.1 - Flavonóides	17
2.4.1.1 - Redução pelo hidrogênio (reação de shinoda).....	17
2.4.1.2 - Reação de Pew .....	17
2.4.1.3 - Reação com ácido sulfúrico concentrado.....	18
2.4.2 - Taninos.....	18
2.4.3 - Cumarinas.....	18
2.4.4 - Fenóis com posição <i>orto e para</i> livre.....	18
2.4.5 - Ácidos orgânicos.....	19
2.4.6 - Esteróides.....	19
2.4.7 - Alcalóides.....	19
2.5 - Fracionamento do extrato obtido no item 2.3 (método B).....	19
2.5.1 - Isolamento dos compostos	20
2.5.1.1 - Fração orgânica A <sub>3</sub> .....	20
2.5.1.2 - Fração aquosa A <sub>2</sub> .....	20
2.5.1.2.1 Purificação da subfração A <sub>2</sub> (714).....	24
2.5.1.2.2 - Purificação da subfração A <sub>2</sub> (21-32).....	25
2.6 - Fracionamento do extrato obtido no item 2.3 ..(método A)... ..	27
2.7 - Modificação estrutural para análise do centro ativado composto com o objetivo de otimizar o efeito.....	27
2.7.1 - Síntese do composto stigmasta-3-ol 5,6-22,23 tetrabromo .....	30
2.7.2 - Síntese do composto stigmasta-22-en 3-ol-5,6 epoxi.....	31
2.7.3 - Síntese do composto stigmasta-4,22 dien 3-ona.....	32
2.7.4 - Síntese do composto stigmasta-5,22 dien-3-ol-benzoato.....	33

2.7.5 - Síntese do composto stigmasta-5,22 dien-3-ol-acetato.....	34
2.8 - Testes farmacológicos.....	35
2.8.1 - Modelos de dor induzida pelo ácido acético .....	35
2.8.2 - Modelo de dor induzida pela formalina.....	35
2.8.3 - Análise estatística.....	36

## **CAPÍTULO III**

### **III - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

3.1 - Ensaio preliminares de alguns grupos químicos.....	37
3.2 - Dados espectroscópicos dos compostos isolados e sintetizados.....	38
3.3 - Espectros de IV, <sup>1</sup> H-RMN e <sup>13</sup> C-RMN.....	40

### **ANEXO I**

3.4 - Resultados dos testes farmacológicos dos compostos isolados e modificados do P.corcovadensis.....	58
3.5 - Discussão.....	70
3.5.1 - Correlação estrutura-atividade.....	74

## **CAPÍTULO IV**

<b>IV - PRINCIPAIS CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
--	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1</b> - Esquema utilizado para fracionamento do extrato metanólico obtido pelo método B.....	22
<b>Figura 2</b> - Esquema da coluna usada para fracionamento dos extratos..	23
<b>Figura 3</b> - Cromatografia em camada delgada das frações coletadas na eluição da subfração A <sub>2</sub> (7 - 14).....	25
<b>Figura 4</b> - Cromatografia em camada delgada das frações coletadas na eluição da subfração A <sub>2</sub> (21-32)..	26
<b>Figura 5</b> - Esquema das modificações sintéticas efetuadas no estigmasterol.....	29
<b>Figura 6</b> - Espectro de IV do composto A <sub>2</sub> B <sub>8</sub> .....	41
<b>Figura 7</b> - Espectro de IV do composto A <sub>2</sub> B <sub>20</sub> (frutose).....	42
<b>Figura 8</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN(300 MHz) do composto A <sub>2</sub> B <sub>20</sub> (frutose).....	43
<b>Figura 9</b> - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN(300MHz) do composto A <sub>2</sub> B <sub>20</sub> (frutose).....	44
<b>Figura 10</b> - Espectro de IV do composto PC-10.....	45
<b>Figura 11</b> - Espectro de IV do composto PC-17.....	46
<b>Figura 12</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN(300 MHz) do composto PC-17.....	47
<b>Figura 13</b> - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto PC-17.....	48
<b>Figura 14</b> - Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massa Computadorizada do composto PC-17.....	59
<b>Figura 15</b> -Análise quantitativa do composto PC-17 por Cromatografia Gasosa usando-se coluna capilar OV-1, H <sub>2</sub> 15° /min.....	50
<b>Figura 16</b> - Espectro de IV composto stigmasta-3-ol-5,6 22,23 tetrabromo.....	51

<b>Figura 17</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN(60 MHz) composto stigmasta-3-ol-5,6 - 22,23 tetrabromo esterol.....	52
<b>Figura 18</b> - Espectro de IV(KBr) do composto stigmasta 22-en-3-ol-5,6 epoxi.....	53
<b>Figura 19</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN(60 MHz) do composto stigmasta-22-en-3-ol-5,6 epoxi.....	54
<b>Figura 20</b> - Espectro de IV(KBr)do composto stigmasta 5,22-dien 3-ona.....	55
<b>Figura 21</b> - Espectro de IV (Kbr) do composto-5,22-dien-3-ol-benzoato.....	56
<b>Figura 22</b> -Espectro de IV (KBr) do composto stigmasta 5,22-dien-3-ol-acetato.....	57
<b>Figura 23</b> - Efeito do composto A <sub>2</sub> B <sub>8</sub> no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	58
<b>Figura 24</b> - Efeito do composto A <sub>2</sub> B <sub>20</sub> (frutose) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	59
<b>Figura 25</b> - Efeito do composto PC-10 sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	59
<b>Figura 26</b> - Efeito do composto PC-17 sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos .....	60
<b>Figura 27A</b> - Efeito do composto estigmasterol (sigma) administrado via intraperitoneal sobres as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	61
<b>Figura 27B</b> - Efeito do composto estigmasterol(sigma) administrado via oral sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos. ....	61
<b>Figura 28</b> - Efeito do composto estigmasterol (sigma) administrado intraperitoneal no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos.....	62
<b>Figura 29</b> - Efeito do composto estigmasterol (sigma) administrado via oral no modelo de dor induzidas pela formalina em camundongos.....	63

<b>Figura 30</b> - Efeito do composto estigmasterol(sigma) sobre o edema de pata induzidas pela formalina em camundongos.....	63
<b>Figura 31</b> - Efeito do composto $\beta$ sitosterol(sigma) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	64
<b>Figura 32</b> . Efeito do composto Stigmasterol oxidado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	65
<b>Figura 33</b> - Efeito do composto estigmasterol epoxidado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	66
<b>Figura 34</b> - Efeito do composto estigmasterol tetrabromado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	66
<b>Figura 35</b> - Efeito do composto estigmasterol benzoilado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	67
<b>Figura 36A e B</b> - Efeito do estigmasterol acetato administrado intraperitoneal sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	68
<b>Figura 37A e B</b> - Efeito do estigmasterol acetato administrado intraperitoneal no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos.....	68
<b>Figura 38</b> - Efeito do estigmasterol acetato administrado oralmente no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos .....	69
<b>Figura 39</b> - Efeito do stigmasterol acetato no edema de pata causado pela formalina, administrado intraperitoneal (C) e oral (C1) em camundongos.....	69
<b>Figura 40</b> - Estrutura molecular do composto $A_2B_{20}$ (frutose) obtido do <i>P.corcovadensis</i> .....	71
<b>Figura 41</b> - Cromatografia em Camada Delgada comparativa do composto $A_2B_{20}$ com amostra padrão.....	71

<b>Figura 42</b> - Cromatografia em Camada Delgada comparativa do composto PC-10 com amostras padrão usando-se anisaldeído como revelador.....	72
<b>Figura 43</b> -Estrutura molecular dos compostos obtidos do P. corcovadensis.....	73

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I</b> - Eluentes e frações da cromatografia em coluna da fraçãoA <sub>2</sub> .....	21
<b>Tabela II</b> - Eluentes e frações da cromatografia em coluna da subfração A <sub>2</sub> (7-14).....	24
<b>Tabela III</b> - Eluentes e frações da cromatografia em coluna da subfração A <sub>2</sub> (21-32).....	26
<b>Tabela IV</b> - Eluentes e frações da cromatografia em coluna do extrato obtido no item 2.3 (método A).....	28
<b>Tabela V</b> - Pesquisa preliminar de alguns grupos químicos.....	37

## ABREVEATURAS

EM	Espectro de massa
IV	Infra-Vermelho
$^1\text{H}$ -RMN	Ressonância Magnética de Próton
$^{13}\text{C}$ -RMN	Ressonância Magnética de Carbono 13
Mhz	Megahertz
Fig	Figura
AMCPB	Ácido meta cloro perbenzóico
PDC	Pyridiun Dichromate
Py	Piridina
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diclorometano
$(\text{Ac})_2\text{O}$	Anidrido acético
AcOH	Ácido acético
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$(\text{CD}_3)_2\text{O}$	Acetona deuterada
TMS	Tetrametilsilano
mmoles	Milimoles
CGAR-EM-C	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectroscopia de de Massa
ip	Intraperitoneal
IM	Inibição Máxima

## RESUMO

O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica vem crescendo significativamente, seja pelo baixo poder aquisitivo da população, ou pela fuga de efeitos indesejáveis causados por produtos farmacêuticos industrializados, mas fundamentalmente pela procura de novos e mais específicos fármacos.

Estudos desenvolvidos em nossos laboratórios com algumas espécies do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra), demonstraram que estas plantas possuem interessante perfil farmacológico. Considerando que o extrato hidroalcoólico do *P.corcovadensis* apresentou importante ação analgésica em vários modelos de dor, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de isolar os princípios ativos responsáveis por esses efeitos. Além disso, foram realizadas modificações estruturais desses compostos visando melhorar suas atividades.

Através de métodos cromatográficos, foi possível isolar desta planta quatro frações. No entanto, apenas uma apresentou significativa atividade analgésica que analisada por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução Computadorizada acoplada a Espectrometria de Massa (CGAR-C-MS) revelou a presença de três fitosteróis identificados como: Stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e Campesterol.

Como o Stigmasterol puro (Sigma) apresentou atividade significativa, foram realizadas algumas modificações estruturais e correlacionado sua estrutura com atividade farmacológica. Foi verificado nestas modificações que quando se introduziu o grupamento benzoíla a atividade aumentou consideravelmente.

Além disso, ensaios farmacológicos indicam que o estigmasterol apresenta um mecanismo de ação analgésica semelhante ao mostrado anteriormente para o extrato bruto do *P.corcovadensis* sendo diferente aos observados em analgésicos conhecidos como aspirina e morfina.

Esses resultados indicam que o estigmasterol,  $\beta$  sitosterol e campesterol, podem ser os responsáveis por pelo menos parte das ações analgésicas detectadas no extrato hidroalcoólico do *P.corcovadensis*<sup>6</sup>.

## ABSTRACT

In previous studies we have demonstrated in our laboratories that the crude hydroalcoholic extract obtained from Phyllanthus corcovadensis (Euphorbiaceae), know as “stone-breaker” and used in Brazil and other countries in folk medicine for the treatment of several diseases, exhibited potent analgesic activity in different models of nociception in mice.

In the present work, some constituents present in this plant were isolated and their analgesic actions were evaluated using the writhing test and formalin test in mice. Therefore, from ethyl acetate extract and using chromatographics methods were isolated the fructose, a graxo acid not identified and a crystalline solid denoted PC-17, that was further analyzed by GC/MS, showing to be a mixture of sterols containing B-sitosterol (66.4%), stigmasterol (25.5%) and campesterol (7.95%). Pharmacological test indicated that PC-17 exhibited significant analgesic effect in both models of nociception employed, comparable to the aspirin. Considering this fact, the follow structural modifications were carried out in the stigmasterol: bromination, acetylation, benzoylation, epoxydation and oxidation. The pharmacological results showed that stigmasterol brominated and stigmasterol benzoylated were the most active compounds suggesting that, after analysis of fragmentation constants according to Hansch, the hydrophobicity increase the analgesic activity of these stigmasterol derivates.

# CAPÍTULO I

## I - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Algumas considerações

As plantas têm sido desde a antiguidade um recurso ao alcance do ser humano tanto para sua alimentação bem como para a cura de suas enfermidades, estas últimas chamadas de plantas medicinais.

Eram veneradas por suas virtudes que foram transmitidas de geração em geração, sem saber porque nem como atuavam, porém era um feito inquestionável e parecia mágico.

Na atualidade, não só no Brasil mas em diversos países de outros continentes, um grande número de vegetais vem sendo utilizados como fonte alternativa de medicamentos, juntamente com a ciência moderna analisando e estudando os efeitos terapêuticos destes para comparar e classificar as suas propriedades, não com a finalidade de diminuir a confiança pela natureza, mas para agrupar àquelas de efeitos terapêuticos semelhantes para conhecer os princípios ativos responsáveis pelas ações farmacológicas, determinar sua estrutura química, procurar suas sínteses, promover modificações moleculares com o objetivo de aumentar sua atividade e finalmente passar à toda a humanidade todos os conhecimentos obtidos.

A utilização de plantas na medicina jamais perdeu seu interesse haja visto que não menos de 24% das prescrições médicas utilizam-se de princípios derivados de plantas e que 2,5% utilizam o extrato bruto delas<sup>1</sup>.

Um grande número de espécies das mais variadas famílias encontradas na flora mundial ainda é alvo de estudos no sentido de desvendar suas virtudes sejam elas química, botânica ou farmacológica. Muitas espécies da família das Euphorbiaceae, por exemplo, são conhecidas popularmente com o propósito de facilitar a eliminação de cálculos renais e/ou biliares. Além disso, em outros países latinoamericanos bem como na Europa Oriental, essas espécies de *Phyllanthus* são empregadas para o tratamento a diabetes, nas diarreias, hepatite e afecções espasmolíticas referentes aos intestinos<sup>2,3</sup>.

Estudos recentes sobre algumas espécies do gênero *Phyllanthus* tem revolucionado a medicina popular no que diz respeito a novas ações farmacológicas<sup>4-6</sup>. A boa distribuição destas em nosso país, ligada a existência de

mais de 7 milhões de portadores de cálculos sejam eles renais ou biliares<sup>7</sup>, avaliam o grande potencial destas espécies.

Dentre as mais estudadas estão o *Phyllanthus niruri*, *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus tenellus* e *Phyllanthus urinária*<sup>4,5,8-14</sup>.

Outros estudos realizados com espécies do gênero *Phyllanthus*, mostram a utilização de infusões de ramos e raízes jovens destas plantas, no tratamento a asma brônquica, inflamações, diabetes e icterícia<sup>8,9,12,15-17</sup>, e que princípios ativos inibem "in vivo" a replicação do vírus da hepatite B em marmotas (Marmota Monax)<sup>18</sup>.

Foi também demonstrado que extratos destas plantas possuem atividade a antígenos de superfície do vírus da hepatite B e notadamente a inibição do HIV-RT sendo que o agente inibidor foi determinado espectroscopicamente como sendo o ácido repandusínico<sup>19-21</sup>.

Nos laboratórios de Química e Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, vem sendo estudadas algumas espécies deste gênero, dentre elas o *P.sellowianus*, *P.niruri* e recentemente o *P.corcovadensis*. Do *P.sellowianus* foi isolado um alcalóide cuja potência foi comparada com a papaverina<sup>22</sup> mostrando que o mesmo possui propriedades semelhantes no que diz respeito ao bloquear os canais de cálcio.

Em relação ao *P.niruri*, estudos semelhantes revelaram efeitos característicos aos observados com o *P.Sellowianus*<sup>23</sup>. Pesquisadores da Escola Paulista de Medicina (EPM), relatam que infusões desta planta ministrada a pacientes, apresentam baixa toxicidade e aumentam o teor de creatinina, consequentemente contribuindo para o tratamento das afecções renais<sup>24</sup>.

Esta planta foi patenteada, criando assim um grave problema a respeito da possibilidade de patentes sobre seres vivos.

Em se tratando do *P.corcovadensis*, nossas pesquisas demonstraram que o extrato hidroalcoólico possui potente ação antinociceptiva em vários modelos de dor em camundongos<sup>6</sup>.

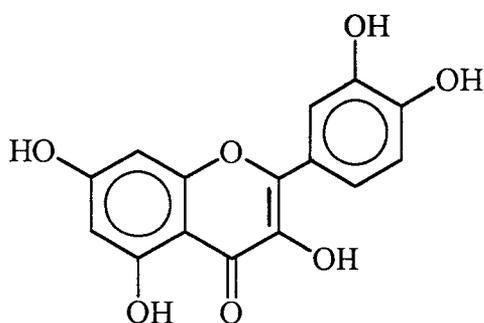
## 1.2 - REVISÃO QUÍMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO PHYLLANTHUS

O estudo fitoquímico do gênero *Phyllanthus* tem destacado as seguintes espécies: *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus urinária* e *Phyllanthus niruri*.

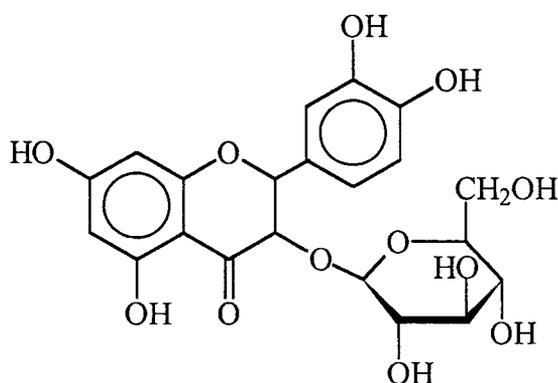
Nestas espécies entre outras foram isolados e identificados algumas classes de compostos como: triterpenos<sup>25,26</sup>, alcalóides<sup>27,28</sup>, flavonóides<sup>29,30</sup>, lignanas<sup>31,32</sup> e esteróis.<sup>33,34</sup> No entanto, ainda são escassos os estudos farmacológicos que comprovam quais destes compostos seriam os responsáveis pelas ações terapêuticas atribuídas popularmente a estas espécies.

Os metabólitos mais abundantes encontrados nestas espécies são de natureza terpênica e flavônicas. Estes compostos são geralmente extraídos das partes aéreas destas espécies no qual corresponde a galhos e folhas jovens.

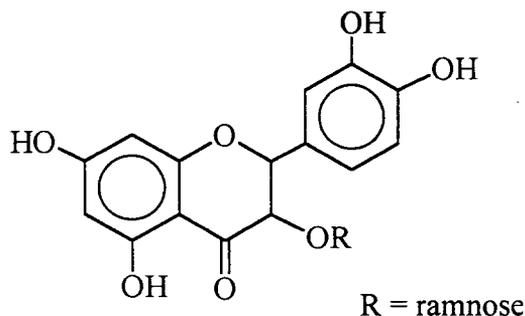
Do *Phyllanthus urinária* foram isolados e identificados cinco flavonóides denominados de quercitina[1], astragalina[2], quercitrina[3], isoquercitrina[4] e rutina[5].<sup>30</sup>



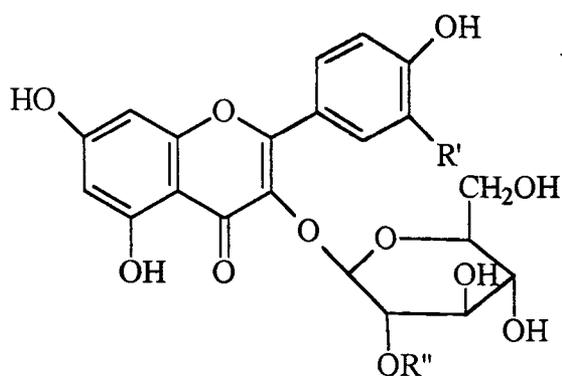
[1]



[2]

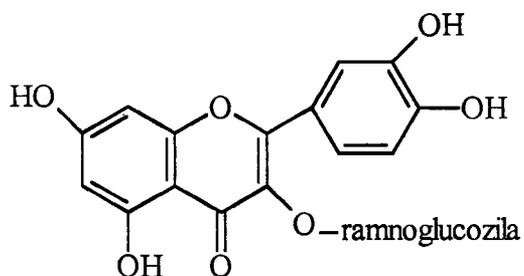


[3]



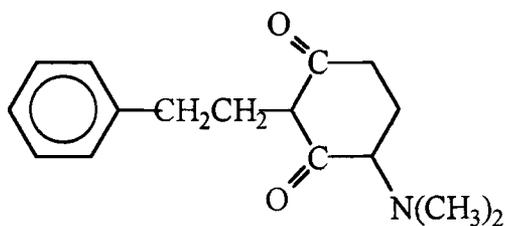
$R' = OH, R'' = H$

[4]

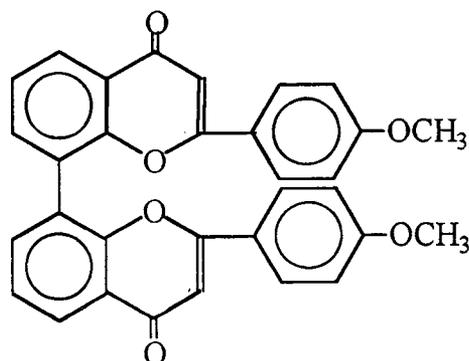


[5]

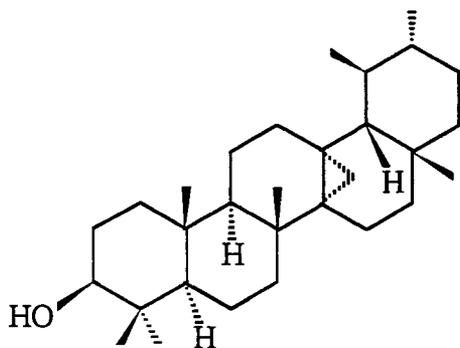
Das partes aéreas do *Phyllanthus sellowianus*, foram isolados um alcalóide denominado de filantimida[6]<sup>28</sup>, o biflavonóide 4'4''Di-O-Metil-Cupressu flavona[7]<sup>29</sup>, o Phyllanthol[8]<sup>35</sup> e uma cumarina denominada de 7-hidroxi,6,8 dimetóxi cumarina[9].<sup>36</sup>



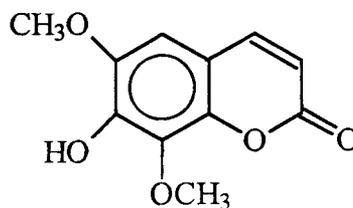
[6]



[7]

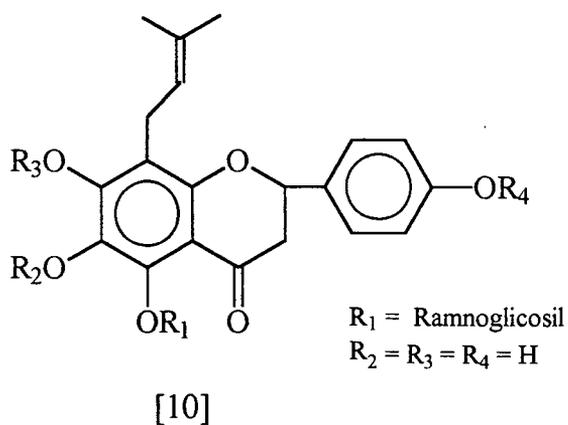


(8)

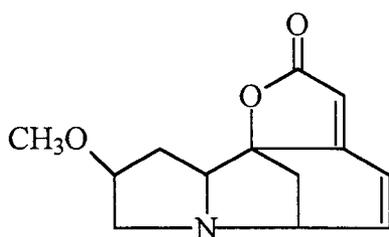
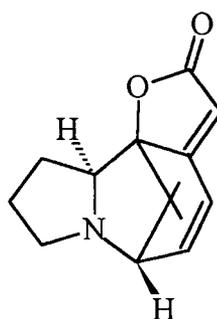
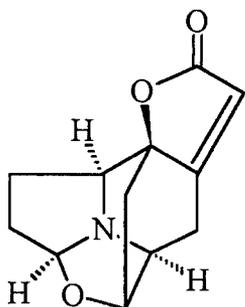


[9]

Com relação ao *Phyllanthus niruri*, além dos cinco flavonóides mencionados para o *P.urinária*, foi isolado um novo glicosídeo flavanona prenilada denominada de nirurina[10].<sup>37</sup>

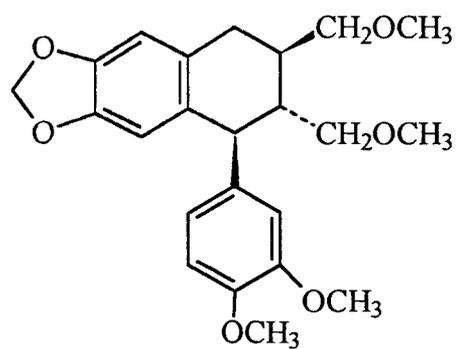
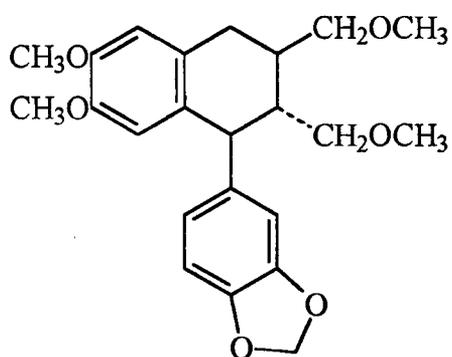
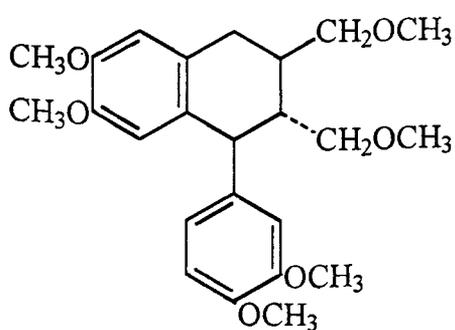
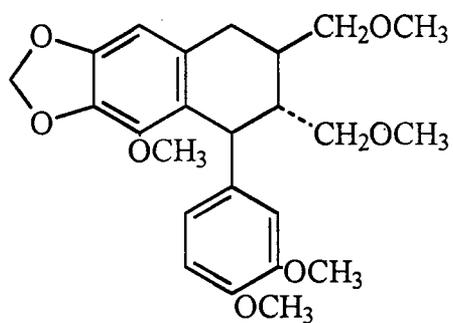
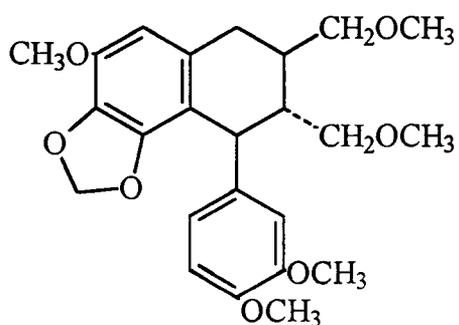


Nesta espécie também foram isolados e caracterizados os alcalóides nirurine[11]<sup>38</sup>, Ent-Norsecurinina[12]<sup>39</sup>; e o 4-metoxi-nor-securinine[13].<sup>40</sup>

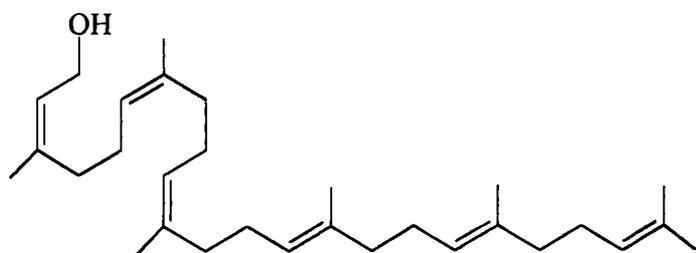


Também foram isolados 4 lignanas: hipofilantina[14], nirtetralina[15], filtetralina[16] e lintetralina[17].<sup>41,42</sup>

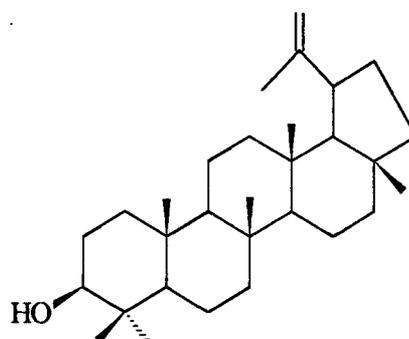
Recentemente, Huang, et al<sup>43</sup> isolaram e identificaram uma nova lignana denominada de isolintetralin[18].



Apenas dois triterpenos foram relatados para esta espécie, o Lupa 20(29)-ene-3biol<sup>44</sup> [19] e o triterpeno acíclico (2Z,6Z,10Z,14E,18E)-Farnesil farnesol [20].<sup>45</sup>

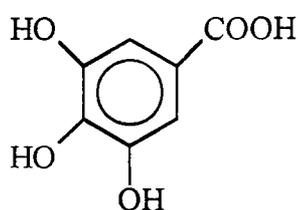


(20)

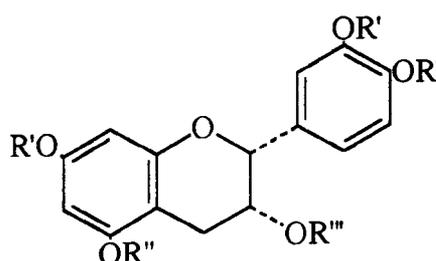


[19]

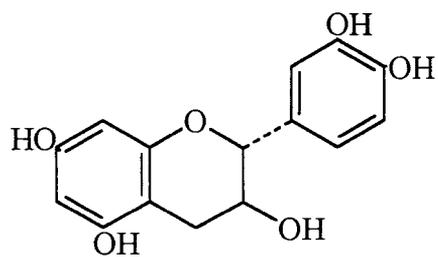
Utilizando cultura de tecidos provenientes das raízes desta espécie, vários constituintes fenólicos foram determinados por Ishima, K. et al.<sup>46</sup> e identificados como ácido gálico[21], (-) epicatequina[22], (+) catequina[23], (+) galocatequina[24], (-) epigalocatequina[25], e (-) epigalocatequina 3-O-galato[26].



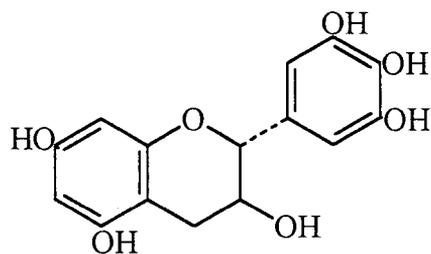
[21]



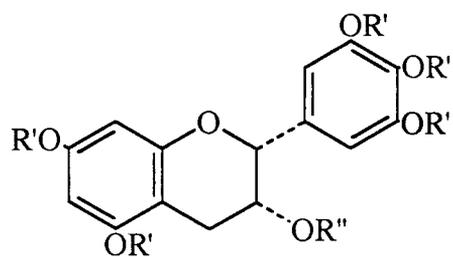
[22]



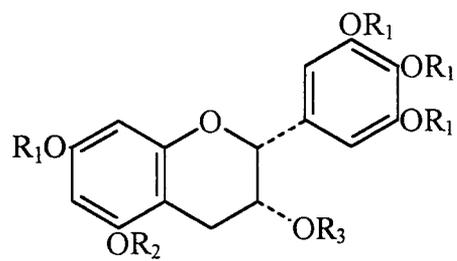
[23]



[24]

 $R' = R'' = H$ 

[25]

 $R_1 = R_2 = H$   
 $R_3 = 3,4,5\text{-trihydroxybenzoyl(galloyl)}$ 

[26]

### 1.3 - SINOPSE DA FAMÍLIA EUPHORBIACEAE<sup>47</sup>

Esta família, uma das maiores das dicotiledôneas, com mais de 300 gêneros e aproximadamente 8000 espécies, distribuídas por todos os continentes principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se na América e na África sendo bem acentuada no Brasil. São plantas de hábito muito variado existindo desde ervas, até porte arbóreo e também trepadeiras. Em geral possuem folhas alternas inteiras ou partidas contendo ou não estípulas latescentes. Flores sempre de sexo separado, monoclamídeas, ocorrendo também diclamídeas, em monóicas, reunidas em inflorescência muito variada geralmente em tipo cacho.

Esta é uma família que inclui uma gama de plantas úteis ao homem. Dentre elas destacam-se a mamona (*Ricinus Cimunis*) originária da região norte americana cuja sementes são ricas em óleos (óleo de rícino), que é empregado tanto na indústria farmacêutica como na indústria de artefatos plásticos. A seringueira (*Havea brasiliensis*) rica em borracha natural e a mandioca (*Maninot esculenta Grantz*), rica em amido.

Além destas, algumas espécies são usadas como plantas ornamentais no embelezamento de ruas e jardins como as espécies do gênero *Pedillanthus* e *Aclypha*. Já as do gênero *Euphorbia* são muitas vezes utilizadas com a finalidade de cercar animais por sua robustez e grande quantidade de espinhos.

Dentre os gêneros nativos no Brasil e conhecidos como plantas medicinais, destacam-se espécies do gênero *Phyllanthus* conhecidas popularmente como "quebra-pedra".

### 1.4 - SINOPSE DO GÊNERO PHYLLANTHUS

O gênero *Phyllanthus* é um dos maiores da família Euphorbiaceae, subdividido em aproximadamente 10 subgêneros e cerca de 700 espécies.<sup>48,49</sup>

*Phyllanthus* provém do grego **Phyllon** = folha e **Anthos** = flor que significa flor na folha<sup>50</sup>. Espécies nativas têm sido encontradas em todos os continente exceto na Antartica, e um grande número delas viceja nas regiões tropicais.<sup>51</sup>

No Brasil, espécies deste gênero podem ser encontradas praticamente em todos os estados, podendo assim, ser adotadas em programas sociais como fonte terapêutica barata, como vêm sendo feito em algumas cidades.

**1.5 - POSIÇÃO SISTEMÁTICA DE PHYLLANTHUS CORCOVADENSIS  
(MUELL.ARG)<sup>52</sup>**

DIVISÃO	- Angiospermae
CLASSE	- Dicotyledoneae
SUBCLASSE	- Archichlamydeae
ORDEM	- Euphorbiales
FAMÍLIA	- Euphorbiaceae
SUBFAMÍLIA	- Euphorbioideae
TRIBO	- Phyllanthae
GÊNERO	- Phyllanthus
ESPÉCIE	- Corcovadensis
NOME VULGAR	- "quebra-pedra"

## 1.6 - OBJETIVOS

Constituem objetivos do presente trabalho:

1 - Procurar isolar os princípios com atividade analgésica presentes no estrato do *P.corcovadensis*.

2 - Identificar através de métodos espectroscópicos as estruturas dos compostos isolados;

3 - Modificação estrutural para determinar os fatores estruturais importantes para a atividade analgésica procurando otimizar seu efeito.

## 1.7 - TEORIA GERAL DA AÇÃO DOS FÁRMACOS

### 1.7.1 - Tipos de ação dos fármacos<sup>53</sup>

Considerando o modo que exercem a ação biológica, os fármacos podem ser divididos em duas classes:

a) Fármacos estruturalmente específicos - São aqueles cuja ação decorre essencialmente de sua estrutura química, que deve adaptar-se à estrutura tridimensional dos receptores existentes no organismo.

Portanto, é evidente que nesses fármacos deverão desempenhar papel decisivo a reatividade química, a forma, o tamanho, a disposição estereoquímica da molécula, bem como efeitos de ressonância, indutivo e as possíveis ligações com o receptor. Resumindo, pode-se dizer que pequenas variações na estrutura química podem resultar em alterações substanciais no efeito farmacológico.

b) Fármacos estruturalmente inespecíficos - São aqueles cuja ação biológica não está subordinada exclusivamente a sua estrutura química, mas pelas propriedades físico-químicas afetadas por ela.

### 1.7.2 - Relação estrutura química e atividade farmacológica<sup>53</sup>

A ação de um fármaco depende basicamente de dois processos:

a) Movimento do fármaco desde o ponto de aplicação ao sistema biológico até os locais de ação (Solubilidade na membrana celular).

b) Ocorrência de uma interação física ou química nos sítios receptores (interação fármaco receptor).

Considerando que um fármaco antes de produzir efeito precisa atravessar uma série de compartimentos constituídos essencialmente de fases aquosas e orgânicas, este processo está relacionado diretamente com a hidrofobicidade. Com isto Hansh parte de uma substância química de ação biológica conhecida e compara a sua atividade com a de compostos de estruturas análogas, diferenciando apenas nos grupos substituintes. Determina os coeficientes de distribuição do composto matriz e dos seus derivados entre a água (solvente polar) e octanol normal (solvente apolar). A diferença entre os respectivos logaritmos dos coeficientes de distribuição recebe o nome de constante de hidrofobicidade  $\pi$  ( eq.1).

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H \quad (1)$$

onde  $P_x$  = coeficiente de distribuição da molécula com o substituinte X;  
 $P_H$  = coeficiente de distribuição da molécula matriz.

Se  $\pi$  apresenta um valor positivo significa que o grupo substituinte aumenta a solubilidade do composto em solventes apolares e caso  $\pi$  apresente um valor negativo, o grupo substituinte aumentará a solubilidade do composto em solvente polares.

Em se tratando do processo B, este está relacionado com os parâmetros  $\sigma$  (característico apenas do substituinte introduzido na molécula matriz, representando a capacidade do grupo em atrair ou repelir elétrons) e  $\rho$  (característico da reação considerada, medindo a sensibilidade deste tipo de reação à substituição no composto matriz).

Além disso, este processo também está relacionado com os efeitos estéricos uma vez que a interação de uma droga com o receptor envolve a aproximação de duas moléculas.

### 1.7.3 - DROGAS ANALGÉSICAS: Aspectos gerais<sup>53</sup>

**Conceito:** Analgésicos são fármacos que aliviam a dor sem causar a perda da consciência.

A palavra analgesia provem do grego `αγαλγησ`α formada por `αγ (sem) + αλγησια (dor), significa portanto, insensibilidade a dor. A Associação Médica Norte-Americana (AMNA) com base na sua potência divide os analgésicos em duas classes:

a) Analgésicos fortes - Estes subdivididos em narcóticos, não narcóticos e hipnoanalgésicos

b) Analgésicos suaves - Estes como os anti-piréticos e anti-reumáticos.

Os fármacos que compõem a primeira classe são empregados para aliviar dores intensas, enquanto que os agentes da segunda classe são utilizados no tratamento de dores suaves a moderadas. São empregados no tratamento de doenças do tecido conectivo, tais como: febre reumática, artrite reumatóide entre outras.

Quanto ao número de pessoas que afetam, estas doenças só perdem para as cardiovasculares. No Brasil estima-se em aproximadamente 8 milhões de reumáticos. Determinados analgésicos encontram emprego principalmente na gota, doença provocada pelo acúmulo de ácido úrico na forma de afiadas agulhas irritantes ao organismo. Há ainda analgésicos específicos para enxaquecas e como antiinflamatórios.

### 1.7.4 - MECANISMO DE AÇÃO: Alguns aspectos

Alguns mecanismos de ação dos diversos fármacos são bem conhecidos enquanto que outros não passam apenas de hipóteses.

Por exemplo, o mecanismo dos analgésicos antiinflamatórios não esteroidais como o ácido acetil salicílico (aspirina) e outros agentes de diferentes grupos químicos atuam reduzindo a temperatura (antipirético), redução de certos tipos de dor (analgésicos) e modificação de reações inflamatória (anti-inflamatórios). Em geral esses efeitos estão relacionados com a inibição da enzima ciclo-oxigenase do ácido araquidônico e portanto inibindo a síntese das prostaglandinas e tromboxano.

Por outro lado, os analgésicos opióides (hipnoanalgésicos) como a morfina, atuam em três categorias de receptores no sistema nervoso central os quais são conhecidos como receptores opióides do tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ . Os opióides atuam inibindo a transmissão sináptica no sistema nervoso central e plexo mioentérico, com redução de neurotransmissores excitatórios.<sup>54</sup>

Já o mecanismo de ação dos agentes uricosúricos tais como, alopurinol e sulfimpirazona, empregados no tratamento da gota, é devido a sua semelhança estrutural com a xantina e hipoxantina. Estes agentes, inibem a xantina oxidase, enzima da biossíntese do ácido úrico que é o agente responsável pela gota.<sup>53</sup>

### 1.7.5 - ENSAIOS FARMACOLÓGICOS: Aspecto geral

Para avaliar a atividade de certas drogas com provável ação biológica, é indispensável a seleção de ensaios farmacológicos adequados que simulam as condições fisiopatológicas em seres humanos. Sendo assim, é fácil compreender as dificuldades de se obter um modelo vivo, que reproduza estas condições.

Entretanto, existem vários modelos descritos na literatura cuja aceitação é quase total no meio científico.

Nos ensaios de drogas analgésicas, os métodos utilizados produzem dor por estímulos químicos, térmicos, mecânicos e/ou elétricos, tomando como observações as alterações fisiológicas e comportamentais dos animais.

Um dos maiores problemas enfrentados, é que os animais não verbalizam o grau da dor, desta forma as medidas das respostas nociceptivas são sempre de forma indireta, e para que se tenha resultados confiáveis, é necessário que os ensaios sejam reproduzíveis e feitos em diversos modelos diferentes.<sup>53,55,56</sup>

## CAPÍTULO II

### II - PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A espécie em estudo *Phyllanthus corcovadensis* MUELL ARG foi coletada no herbário da CPQBA (UNICAMP) e classificada pelo Prof. Dr. Pedro Melillo Magalhães desta mesma instituição.

Considerando-se que na medicina popular são empregadas apenas as partes aéreas desta planta, que correspondem a folhas, flores e ramos jovens, estes órgãos foram submetidos a dessecação em estufa a 40° C e cortados em pequenos fragmentos e acondicionado em recipientes protegidos da luz e umidade.

#### 2.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Na obtenção dos extratos foram utilizados dois métodos:

a) O material botânico como descrito na seção 2.1 (350g) foi deixado em maceração por 5 dias em n-hexano. Este processo extrativo foi repetido com diclorometano, acetato de etila e metanol. Após evaporação em evaporador rotatório à pressão reduzida e monitoramento em cromatografia de camada delgada, os extratos de diclorometano e acetato de etila foram misturados e guardados para uso posterior.

b) Neste método o material botânico preparado conforme item 2.1 (1,2 kg), foi posto em maceração com metanol durante 15 dias. O extrato total foi então evaporado em evaporador rotatório a pressão reduzida resultando um extrato verde-amarelado, que depois de filtrado, foi denominado de "Extrato Metanólico Bruto".

#### 2.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os espectros de absorção na região do infra-vermelho foram obtidos na Universidade Federal de Santa Catarina em espectrofotômetro FT-IR-BOMEM - modelo M-100.

Para a obtenção dos espectros de IV de amostras sólidas, utilizou-se pastilhas de KBr, amostras líquidas e óleos em filme de NaCl.. Os comprimentos de ondas das absorções foram medidos em centímetros recíprocos (cm<sup>-1</sup>).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton ( $^1\text{H-RMN}$ ) foram obtidos a 300 MHz num equipamento Varian XL 300 (Universidade Católica de Roma) e a 60 MHz em espectrofotômetro Varian XL 60 Mhz (Universidade Federal de Santa Catarina). Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais  $\delta$  (ppm), em TMS como padrão interno de referência.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho APF-301-Micro-Química (UFSC).

A elucidação estrutural da fração ativa, foi efetuada por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, acoplada a espectrometria de massa computadorizada (CGAR-EM-C), utilizando um sistema Hewlett-Packard 5987A em coluna capilar SE-54 (UFRJ). A quantificação dos compostos desta fração, foi efetuada por cromatografia gasosa utilizando um sistema SHIMADZU CG-14A com coluna capilar SE-30 - OV-1 (UFSC).

Nos fracionamentos e separações cromatográficas foi utilizado sílica gel-60 de granulometria 70-230 mesh (0,063-0,20 mm) para colunas convencionais, sílica do tipo GF<sub>254</sub> para cromatografia de camada fina analítica de 2,5 X 6,0 cm e placas da Merck.

Na cromatografia de camada delgada, as substâncias foram reveladas por vaporização com solução de anisaldeído seguido de aquecimento da cromatoplaça durante 5 minutos a 110 °C.

Todos os solventes utilizados foram previamente destilados, sendo que aqueles usados nos processos de recristalização eram de uso exclusivo para análise.

Os reagentes usados nas reações de modificações estruturais, eram todos de grau analítica provenientes da Aldrich, Sigma e Merck.

Os testes farmacológicos para confirmação da atividade analgésica das frações e compostos puros foram realizados pela equipe do Prof. Dr. João B. Calixto, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina e encontram-se no anexo I.

### **2.3.1 - PROCEDIMENTO GERAL PARA PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS**

As frações cromatografadas ou produtos das reações contendo material sólido foram lavados sucessivas vezes com hexano/acetona, com leve aquecimento para que somente o material oleoso fosse dissolvido.

A seguir, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido várias vezes até a obtenção de cristais livres de impurezas e logo após o material foi submetido a um processo de recristalização<sup>57</sup> e posteriormente acondicionado em dessecador a vácuo para determinação estrutural e ensaios farmacológicos.

## **2.4 - PESQUISA PRELIMINAR DE ALGUNS GRUPOS QUÍMICOS**

Antecedendo ao estudo dos princípios ativos do *Phyllanthus corcovadensis* MUELL ARG foram realizadas algumas determinações de grupos químicos de acordo com a marcha sistemática de análise fitoquímica segundo Moreira et al.<sup>58</sup>

### **2.4.1 - Flavonóides**

2,5 g de extrato metanólico obtido no item 2.3, foram dissolvido em 20 ml de água destilada. A solução foi extraída 3 vezes com porções de 10 ml de éter etílico e a fase metanólica/aquosa separada, foi evaporada até a *secura* sob pressão reduzida.

O resíduo obtido foi dissolvido com 15 ml de acetato de etila e a solução foi filtrada. Um volume de 2 ml desta solução foi utilizado em cada uma das reações de identificação.

#### **2.4.1.1 - Redução pelo hidrogênio (Reação de Shinoda)**

Cerca de 200 mg de magnésio e gotas de ácido clorídrico concentrado, foram adicionados à solução de acetato de etila (2ml). Os derivados flavônicos são reduzidos a compostos antociânicos avermelhados.

#### **2.4.1.2 - Reação de pew**

Quando se adiciona zinco em pó e gotas de ácido clorídrico concentrado a uma solução contendo compostos flavônicos, estes se reduzem a compostos antociânicos avermelhados.

### **2.4.1.3 - Reação com ácido sulfúrico concentrado**

Em presença de ácido sulfúrico concentrado, os compostos flavônicos, geralmente formam sais de oxônio e a solução passa a apresentar fluorescência amarela quando observada sob luz ultravioleta.

### **2.4.2 - Taninos**

Cerca de 2,5 g do extrato metanólico obtidos no item 2.2 foram dissolvidos em 10 ml de metanol e transferidos para um tubo de ensaio. A este foram adicionado gotas de uma solução de cloreto férrico 1%. O aparecimento de coloração verde, azul ou formação de precipitado, indica teste positivo de taninos.

### **2.4.3 - Cumarinas**

O extrato alcoólico obtido conforme item 2.2 foi dissolvido em 50 ml de água destilada e ajustado o pH com HCl até aproximadamente 1,0. A solução foi transferida para um funil de separação e extraída com 20 ml de éter etílico e em o volume reduzido a 10 ml.

Gotas do extrato etéreo foram depositadas sobre papel filtro em três pontos equidistantes, de modo a obter manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro previamente numeradas. As manchas 1 e 2 foram tratadas com uma gota de hidróxido de sódio 1N. Em seguida a mancha número 1 foi coberta com uma lâmina de papel alumínio e colocada em uma câmara de luz ultra-violeta, deixando exposta durante 3 minutos sob ondas longas (366 nm). O desenvolvimento de fluorescência na mancha exposta à luz indica a presença de cumarinas.

#### **2.4.3.1 - Fenóis com posição orto e meta livre**

Cerca de 2 ml do extrato etéreo obtido em 2.4.3 foi transferido para uma cápsula de porcelana e levado a secura.

A seguir adicionou-se 2 gotas de reativo de Lieberman<sup>59</sup> recentemente preparado e após 5 minutos, foram adicionadas duas gotas de água destilada e gotas de hidróxido de sódio 4N.

O aparecimento de coloração indica a presença de fenóis.

#### **2.4.3.2 - Ácidos orgânicos**

O extrato etéreo restante obtido em 2.4.3 foi levado a secura em evaporador rotatório à pressão reduzida. A seguir adicionou-se 5 ml de água destilada para a determinação do pH.

#### **2.4.4 - Esteróides**

2,5 g do extrato obtido no item 2.2 foram extraídas 3 vezes com porções de 10 ml de clorofórmio.

A seguir o extrato clorofórmico foi reduzido a um volume de 3 ml em evaporador rotatório, transferido para um tubo de ensaio e a este adicionado 2 ml de anidrido acético e cuidadosamente 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada suavemente.

O aparecimento de coloração azul passando a verde indica a presença de esteróis.

#### **2.4.5 - Alcalóides**

Efetou-se esta técnica seguida de algumas modificações. 2,5 g do extrato metanólico obtido no item 2.2, foram alcalinizadas com hidróxido de sódio e extraídas 4 vezes com porções de 10 ml de clorofórmio.

O extrato clorofórmico obtido, foi extraído 4 vezes com 10 ml de uma solução de ácido clorídrico 2%, previamente preparada. O extrato aquoso foi então alcalinizado novamente com hidróxido de amônio e extraído com porções de 10 ml de clorofórmio.

A fase orgânica obtida foi evaporada à pressão reduzida até um volume de 10 ml e dividida em 4 tubos de ensaio. A cada tubo, foram adicionados 4 gotas dos seguintes reativos: Dragendorff, Wagner e Mayer sendo que o último tubo foi usado como padrão.

### **2.5 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO NO ÍTEM 2.3 (MÉTODO B)**

10 g do extrato foi suspenso em 150 ml de água destilada, ajustado o pH em torno de 10 com uma solução de hidróxido de sódio e transferido para um funil de separação. A seguir foram feitas 5 extrações com porções de 30 ml de

diclorometano, sendo que as fases orgânica e aquosa foram denominadas de  $A_1$  e  $A_2$  respectivamente.

A fase orgânica  $A_1$  foi submetida a 5 extrações com volumes de 30 ml de uma solução de ácido clorídrico 2%. A fase orgânica resultante desta extração foi denominada de  $A_3$  e a fase aquosa, na qual o pH foi elevado até 10 com de hidróxido de amônio concentrado e extraída 5 vezes com porções de 30 ml de diclorometano e esta fase foi denominada de  $A_4$  (0,15 g).

A figura 1 resume as operações realizadas para a obtenção destas frações.

Uma amostra de 50 mg de cada fração obtida acima, foi usada nos testes farmacológicos e as frações  $A_2$  e  $A_3$  deste extrato foram as que apresentaram maior atividade farmacológica. Sendo assim, foram estas as estudadas visando isolar os constituintes ativos.

## 2.5.1 - ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

### 2.5.1.1 - Fração orgânica $A_3$

A fração  $A_3$  (2,5 g) foi cromatografada em uma coluna 2,0 x 50,0 cm, empacotada com sílica gel 60 (100 g) em hexano.

O material foi adsorvido em sílica na proporção 1:1 em forma de pastilha (2,0 cm) aplicada no topo da coluna e eluído inicialmente com hexano seguido de um gradiente de polaridade crescente usando-se misturas de hexano/acetato de etila (fig. 2).

Desta coluna foram coletadas alíquotas de 50 ml, concentradas em evaporador rotatório e reunidas conforme monitoramento por cromatografia em camada delgada.

### 2.5.1.2 - Fração aquosa $A_2$

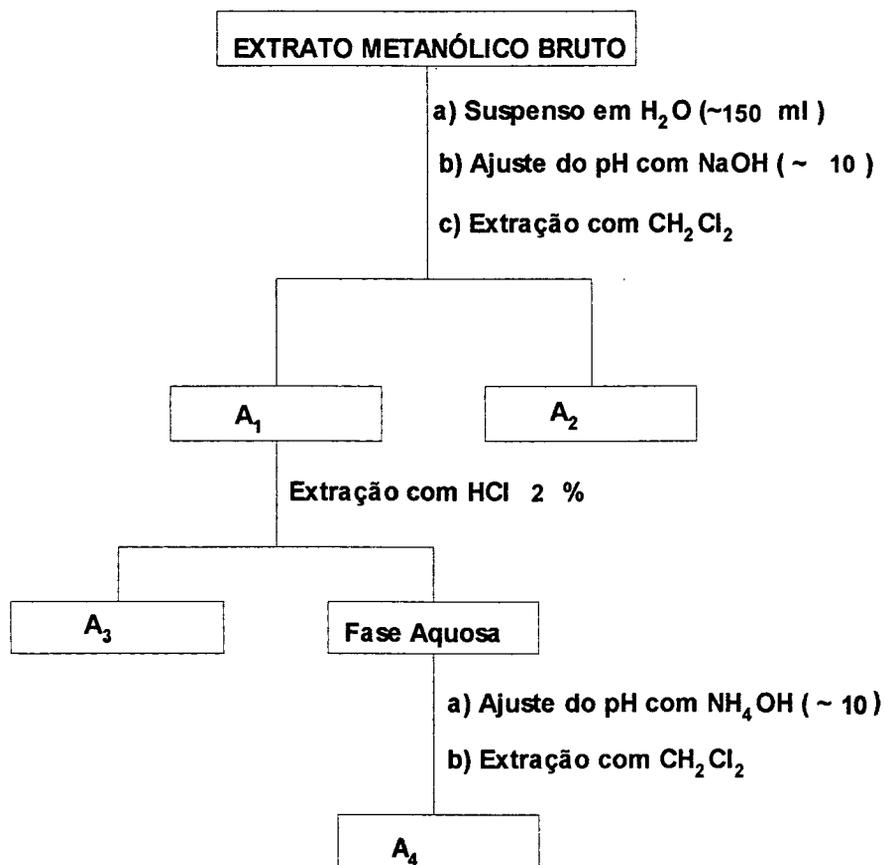
A fração  $A_2$  foi neutralizada e extraída 4 vezes com porções de 30 ml de clorofórmio e evaporada em evaporador rotatório a pressão reduzida.

O material (4,2 g) foi cromatografado em coluna 2,0 X 50,0 cm de sílica gel 60 (120 g). Depositado no topo da coluna em forma de pastilha (fig.2), o material foi eluído inicialmente com acetato de etila seguido de um gradiente crescente de polaridade usando-se misturas de acetato de etila/metanol.

Como no procedimento anterior, a tabela I mostra as frações coletadas da coluna e reunidas através do monitoramento com cromatografia de camada delgada.

TABELA I - Eluentes e frações da Cromatografia em coluna da fração A<sub>2</sub>

<b>ELUENTE</b>	<b>%</b>	<b>FRAÇÕES COLETADAS</b>	<b>FRAÇÕES ESTUDADAS</b>
Acetato de etila	100	1-6	
Ac.Etila/MeOH	95/5	7-14	7-14
Ac.Etila/MeOH	90/10	15-20	
Ac.Etila/MeOH	85/15	21-32	21-32
Ac.Etila/MeOH	80/20	33-40	
Ac.Etila/MeOH	75/25	41-44	
Ac.Etila/MeOH	70/30	45-48	
Ac.Etila/MeOH	50/50	49-50	
MeOH	100	51	



**Figura 1** - Esquema utilizado para o fracionamento do Extrato Metanólico obtido pelo Método B.

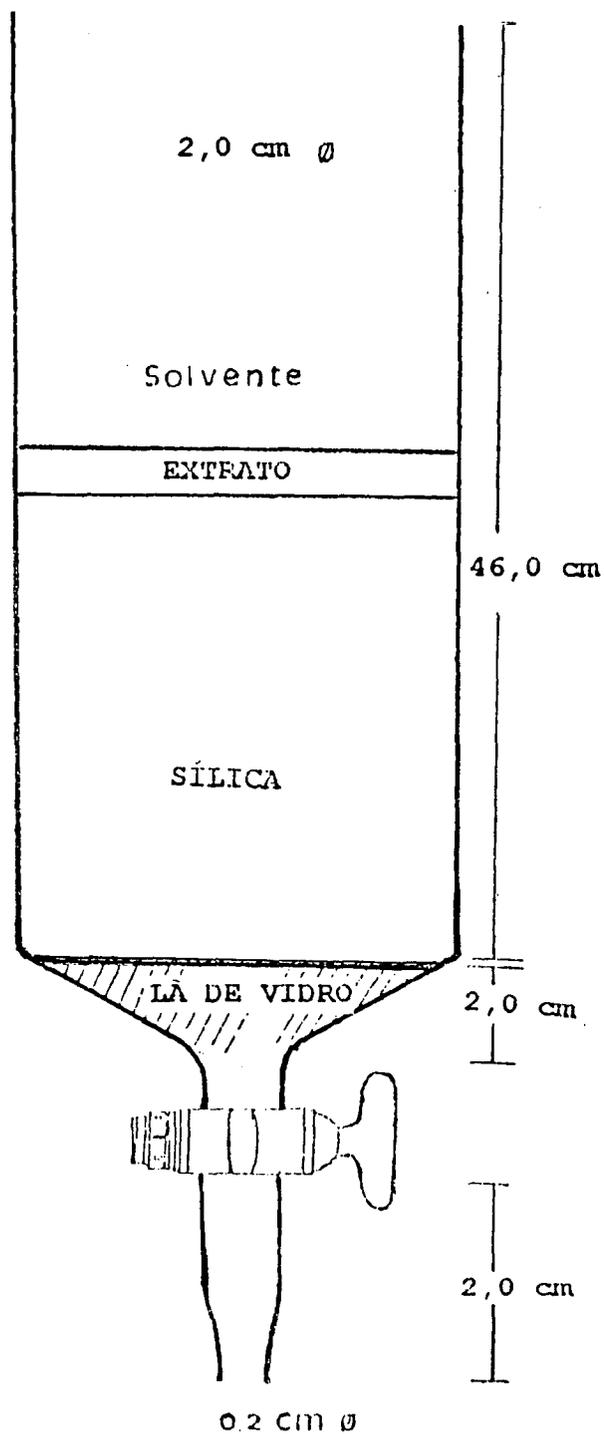


Figura 2 - Esquema de coluna usada para fracionamento dos extratos

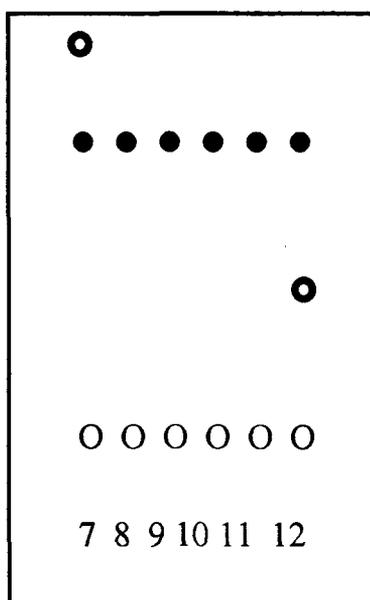
### 2.5.1.2.1 - Purificação da subfração A<sub>2</sub>(7-14)

Esta subfração (230 mg) foi depositada no topo de uma coluna previamente empacotada com sílica gel 60 (30 g) em diclorometano, eluída com um gradiente de polaridade crescente usando uma mistura de diclorometano/metanol e coletadas em alíquotas de 75 ml.

Após evaporação do solvente em evaporador rotatório e monitoramento com cromatografia em camada delgada, observou-se que apenas as frações de número 8 a 11 apresentaram uma única mancha após a revelação da cromatoplaça (fig.3 e tabela II). Este composto foi denominado de A<sub>2</sub>B<sub>8</sub> (72 mg).

**TABELA II**-Eluentes e frações da Cromatografia em coluna da subfração A<sub>2</sub> (7-14)

ELUENTE	%	FRAÇÕES COLETADAS(100ml)	FRAÇÕES ESTUDADAS
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-2	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	98/2	3-4	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	96/4	5-7	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	92/8	8-11	8-11
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	85/15	12-13	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	80/20	14-16	
MeOH	100	17	



**Figura 3** Cromatografia em camada delgada das frações coletadas na eluição da subfração A<sub>2</sub> (7-14)

Fase móvel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH - 64/36

Visualizador: Anisaldeído

#### 2.5.1.2.2 - Purificação da subfração A<sub>2</sub> (21-32)

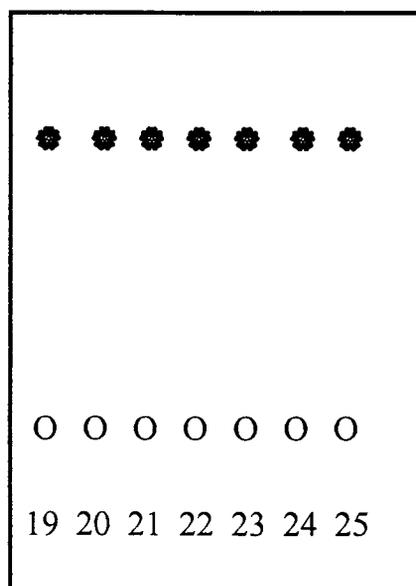
Após evaporação para pesagem do material (720mg), o mesmo foi depositado em forma de pastilha em uma coluna empacotada e eluída conforme o item 2.5.1.2.1.

Foram coletadas alíquotas de 100 ml, evaporadas em evaporador rotatório, monitoradas por cromatografia em camada delgada e reunidas conforme a tabela III e fig.4. A fração 19-24 foi a que apresentou maior pureza após a revelação da cromatoplaca.

Este composto foi denominado de A<sub>2</sub>B<sub>20</sub> (40 mg) e guardado em dessecador para posterior identificação e testes farmacológicos.

**TABELA III** - Eluentes e frações da cromatografia em coluna da subfração A<sub>2</sub> (21-32)

ELUENTE	%	FRAÇÕES COLETADAS (100ml)	FRAÇÕES ESTUDADAS
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-2	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	98/2	3-8	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	95/5	9-10	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	90/10	11-18	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	85/15	19-24	19-24
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	80/20	25-30	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	50/50	31-40	
MeOH	100	41	



**Figura 4** - Cromatografia em Camada Delgada das frações coletadas na eluição da subfração A<sub>2</sub> (21-32)

Fase móvel - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH - 64/36

Visualizador - Anisaldeído

## **2.6 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO NO ÍTEM 2.3 PELO MÉTODO A**

Após evaporação à pressão reduzida, o extrato obtido (2,7 g) foi cromatografado em uma coluna 2,0 X 50,0 cm empacotada com sílica gel 0,062-0,02 mm(100 g) em n-hexano.

Depositado no topo da coluna, o extrato impregnado em sílica na proporção 1:1 sob forma de pastilha (fig.2), foi eluído inicialmente com hexano seguido de um gradiente de polaridade crescente usando-se misturas de hexano/acetato de etila.

Foram coletadas alíquotas de 75 ml e evaporadas em evaporador rotatório. Após monitoramento em cromatografia de camada delgada, foram reunidas e estudadas ( Tabela IV).

As frações 6-10 e 11-19 após evaporação do solvente, apresentaram cristais brancos e foram denominados de PC-10 e PC-17 respectivamente.

Estas frações passaram por um processo de purificação<sup>57</sup> identificação e testadas farmacologicamente.

## **2.7 - MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL PARA ANÁLISE DO CENTRO ATIVO DO COMPOSTO COM O OBJETIVO DE OTIMIZAR O EFEITO**

As modificações realizadas não tiveram como objetivo principal o rendimento, mas sim a obtenção de quantidades suficientes dos produtos modificados para a realização dos testes farmacológicos.

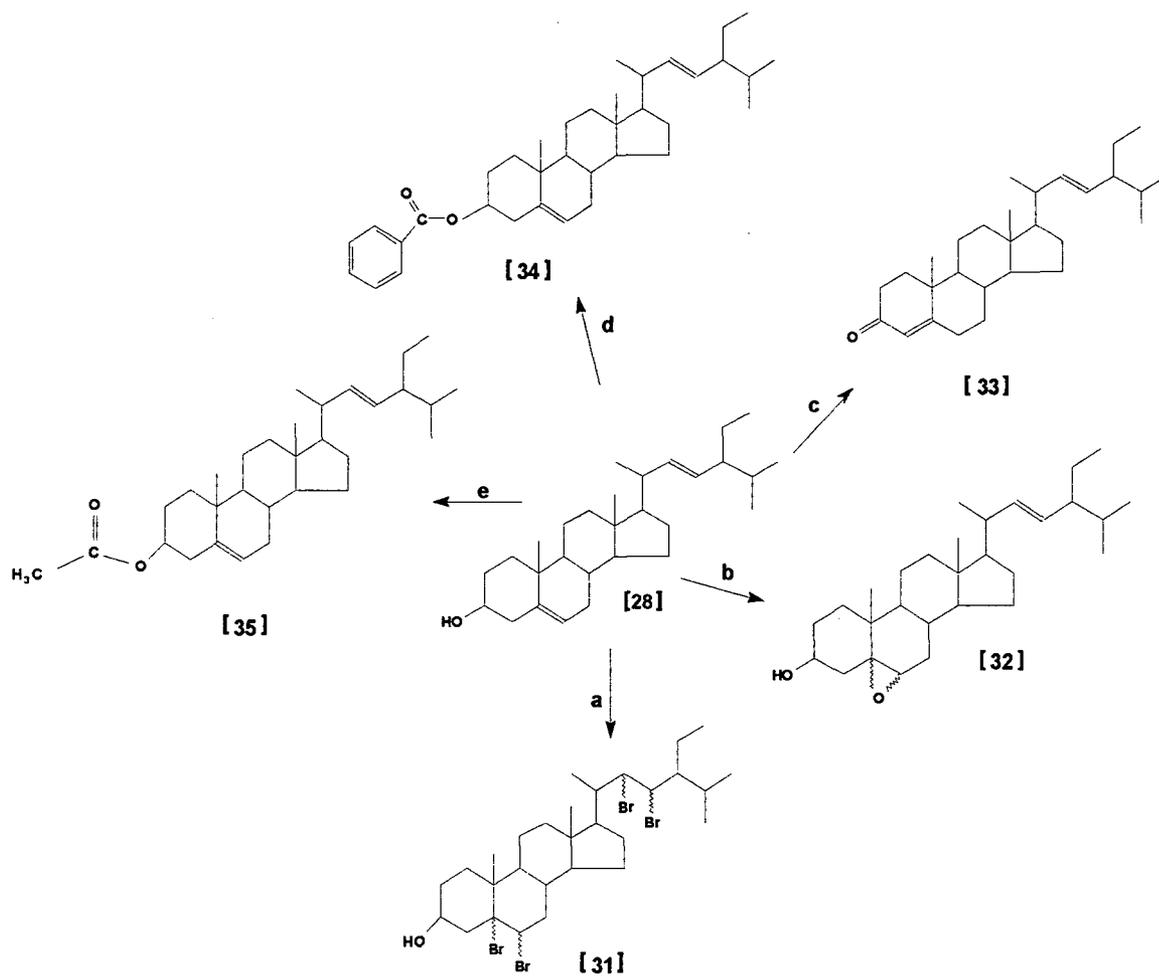
Os grupos funcionais que poderiam ser facilmente modificados no estigmasterol são: o grupo hidroxila em posição 3, a dupla ligação em posição 5-6 e a dupla ligação em posição 22-23.

Considerando que o estigmasterol bem como  $\beta$ -sitosterol apresentaram praticamente a mesma atividade analgésica, optou-se pela compra do estigmasterol já que o custo era bem inferior ao  $\beta$ -sitosterol.

Todas as rotas sintéticas já foram reportadas na literatura sendo e algumas sofreram modificações. Um esquema das mesmas está mostrado na figura 5.

**TABELA IV** - Eluentes e frações da Cromatografia em coluna do extrato obtido no ítem 2.3 - Método A

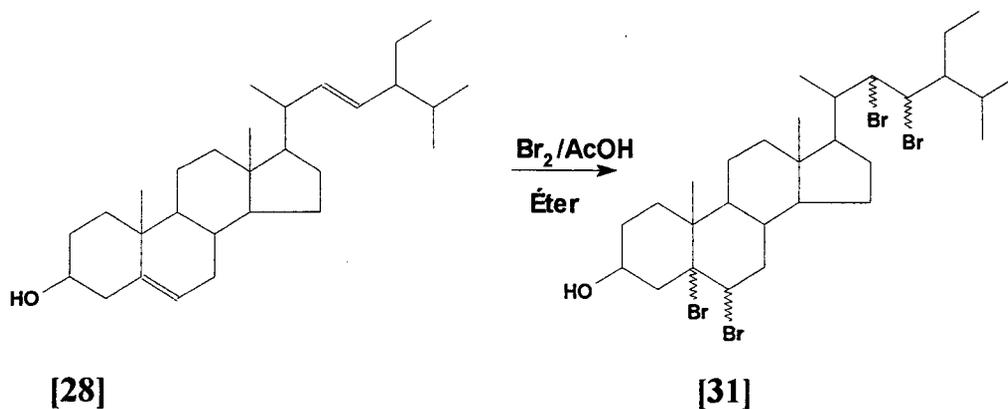
<b>ELUENTE</b>	<b>%</b>	<b>FRAÇÕES COLETADAS(75ml)</b>	<b>FRAÇÕES ESTUDADAS</b>
Hexano	100	1-5	
Ac.Etila/Hexano	2/98	6-10	6-10
Ac.Etila/Hexano	4/96	11-15	
Ac.Etila/Hexano	6/94	16-19	16-19
Ac.Etila/Hexano	8/92	20-25	
Ac.Etila/Hexano	10/90	26-29	
Ac.Etila/Hexano	15/85	30-37	
Ac.Etila/Hexano	20/80	38-41	
Ac.Etila/Hexano	25/75	42-45	
Ac.Etila/Hexano	30/70	46-48	
Ac.Etila/Hexano	50/50	49-50	
Ac.Etila/Hexano	80/20	51-53	
Ac.Etila	100	54-56	



- (a)  $\text{Br}_2/\text{AcOH}$   
 (b)  $\text{AMCPB}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
 (c)  $\text{PDC}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
 (d) Cloreto de benzoila/Py  
 (e)  $(\text{Ac})_2\text{O}/\text{Py}$

**Figura 5** - Esquema das modificações sintéticas efetuadas no estigmasterol

### 2.7.1 - Obtenção de stigmasta-3-ol-5,6-22,23 tetrabromo [31]



#### Método experimental<sup>60</sup>

0,1 g de estigmasterol (0,24 mmoles) foi dissolvida em 2 ml de éter etílico e a esta solução adicionou-se 1,2 ml de uma solução de bromo-ácido acético (0,15 ml de bromo em 10 ml de ácido acético).

Após resfriamento em freezer, o estigmasterol tetrabromado foi filtrado e deixado secar na capela.

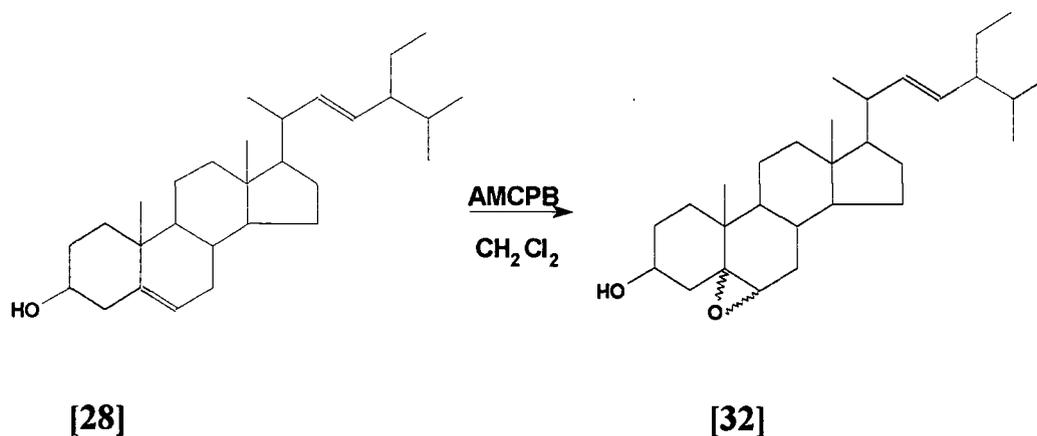
#### Caracterização do composto:

Ponto de fusão: 117-119 °C<sup>60</sup>

Solubilidade: Acetona, clorofórmio

Rendimento: 50%

## 2.7.2 -Obtenção de stigmasta-22-en-3ol-5,6 epoxi [32]



### Método Experimental<sup>57</sup>:

0,1 g (0,24 mmoles) de estigmasterol foi dissolvida em 20 ml de diclorometano seco, adicionou-se 0,94 g (5,4mmoles) de ácido m-cloro perbenzóico e manteve-se o meio reacional sob agitação constante à temperatura ambiente durante 18 horas. O final da reação foi acompanhada através do monitoramento com cromatografia em camada delgada.

A seguir, a mistura resultante, foi suspensa em uma solução de carbonato de potássio e extraída 3 vezes com porções de 10 ml de diclorometano. O produto assim obtido foi purificado por cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila na proporção 3:1.

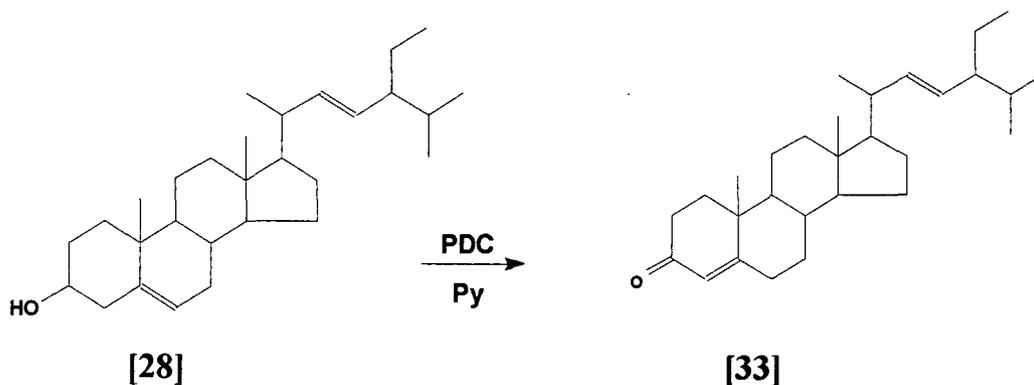
### Caracterização do composto:

Ponto de fusão: 144-146 °C<sup>61</sup>

Solubilidade: Acetona; clorofórmio e diclorometano

Rendimento: 58%

### 2.7.3 - Obtenção de stigmasta-5,22 dien-3-ona [33]



#### Método experimental<sup>62</sup>:

Em um balão de 50 ml foi dissolvido 0,1 g (0,24 mmoles) de estigmasterol em 10 ml de diclorometano seco. A seguir, sob agitação, adicionou-se 0,2 g (0,53 mmoles) de PDC e após 18 horas a reação foi interrompida e extraída 3 vezes com porções de 10 ml de éter etílico. Após a evaporação do solvente observou-se a formação de cristais amarelo que foram purificados por recristalização em meOH/acetona (4:1).

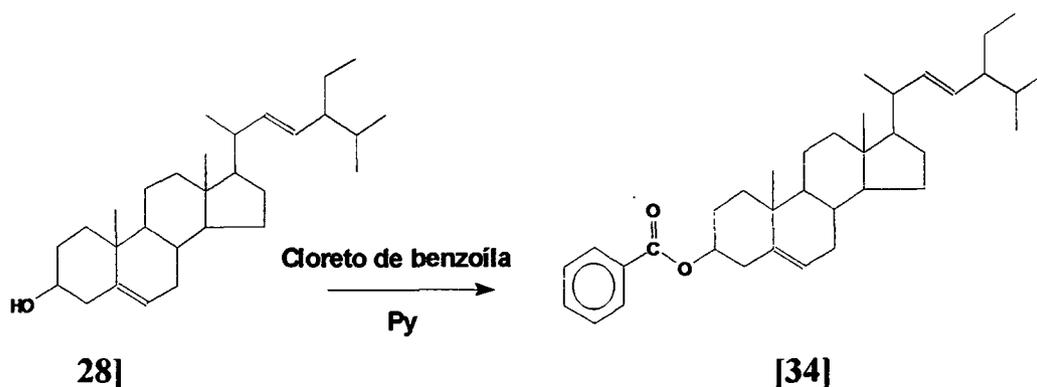
#### Caracterização do composto:

Ponto de fusão: 154-156 °C<sup>63</sup>

Solubilidade: acetona e clorofórmio

Rendimento : 45%

### 2.7.4 - Obtenção de stigmasta-5,22-dien-3-ol-benzoato [34]



#### Método experimental<sup>64</sup>:

0,1 g de estigmasterol (0,24 mmoles) foi dissolvida em 10 ml de diclorometano seco e 1 ml de piridina. A seguir foi adicionado 0,2 ml (4,7mmoles) de cloreto de benzoila e a mistura mantida em refluxo durante 12 horas.

Logo após a interrupção da reação, foi adicionado ácido clorídrico para neutralizar e extraído 3 vezes com porções de 10 ml de diclorometano. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de magnésio e deixado evaporar o solvente.

Os cristais obtidos foram recristalizados numa mistura de MeOH/Acetona na proporção de 4:1 e acondicionado em dessecador para posterior identificação e testes farmacológicos.

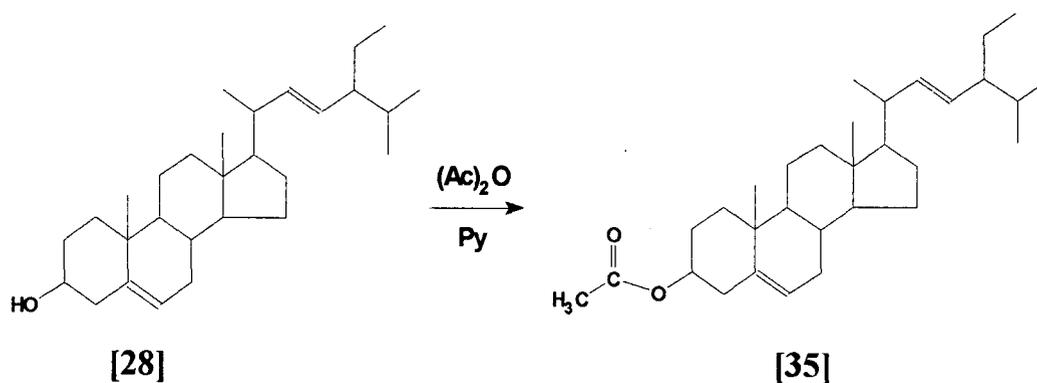
#### Caracterização do composto:

Ponto de fusão: 154-155 °C<sup>65</sup>

Solubilidade: Diclorometano, Acetona

Rendimento: 62%

### 2.7.5 - Obtenção do stigmasta-5,22-dien-3-ol-acetato [35]



#### Método experimental<sup>66</sup>:

0,1 g ( 0,14 mmoles) de estigmasterol foi dissolvida em uma mistura contendo 1,0 ml de anidrido acético ((Ac<sub>2</sub>)O) e 1,5 ml de piridina . Após esta mistura ser aquecida em banho-maria, a cerca de 80 °C durante 2,5 horas, foi derramada em água gelada. O precipitado branco formado foi filtrado e lavado com água destilada . A seguir, este composto foi seco e posterior identificação.

#### Caracterização do composto:

Ponto de fusão: 139-140 °C<sup>67</sup>

Solubilidade: acetona

Rendimento: 72%

## 2.8 - TESTES FARMACOLÓGICOS

Estão descritos abaixo os modelos para analisar a atividade analgésica dos extratos e compostos obtidos, bem como os compostos modificados do *P.corcovadensis*. No entanto, em alguns casos devido a complexidade e custos elevados dos mesmos, optou-se por uma simplificação fazendo com que alguns compostos fossem analisados apenas no modelo de contorções induzidas pelo ácido acético.

### 2.8.1 - Modelos de dor induzida pelo ácido acético

Camundongos Suiços machos (25-30 g) foram acondicionados em sala a temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e mantidos em ciclos de 12 horas ao abrigo e a exposição da luz.

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Estas respostas consistem em contrações do músculo abdominal do animal.

Os animais foram tratados com cada um dos compostos (sejam eles isolados da planta ou produto sintético) por via intra peritoneal e oral (3-200 mg/kg) 30 e 60 minutos antes da injeção de ácido acético respectivamente. Os animais controle foram tratados com um volume de NaCl 0,9% (10ml/kg).

Após a injeção da substância irritante, pares de animais foram colocados em box separados e o número de contorções foi analisado por um período de 20 minutos

Atividade analgésica foi demonstrada pela diminuição do número de contorções entre os animais controle e aqueles pré-tratados com as drogas em estudo (figs. 23-39 do anexo I).

### 2.8.2 - Modelo de dor induzida pela formalina

Este modelo permite avaliar duas fases de dor, sendo a primeira fase compreendida entre os 10 minutos iniciais denominada de dor de origem neurogênica e a segunda fase compreendida entre 15 e 60 minutos após a injeção da formalina, denominada de dor inflamatória(dor prolongada), bem como o edema da pata.

Camundongos Suiços machos (25-30 g) foram selecionados como no item 2.8.1 e 20  $\mu$ l de uma solução de formalina 2,5% preparada sob um tampão fisiológico (BPS) foram injetados subcutaneamente em uma das patas posterior.

Dois camundongos foram observados simultaneamente (tratado e controle) durante 30 minutos, sendo observado o número de vezes que o mesmo lambe a pata afetada (indicativo de dor).

Os animais foram tratados por via oral (50-200 mg/kg) ou por via intraperitoneal (10-100 mg/kg) 60 e 30 minutos antes da injeção de formalina respectivamente. Os animais controle foram tratados com solução fisiológica (NaCl 0,9% 10ml/kg).

### **2.8.3 - Análise estatística**

Todos os resultados foram analisados por meio de análise de variância seguido pelos testes de Dunnett.

Os valores de P menores que 0,05 foram considerados como significantes e quando possível a  $DI_{50}$  foi calculada (dose da droga que reduz a resposta em 50%). Todos estes cálculos foram feitos por um programa de computador.

## CAPÍTULO III

### 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Ensaio preliminares de alguns grupos químicos

A tabela V mostra os resultados da pesquisa de alguns grupos químicos efetuados segundo Moreira et al<sup>58</sup> com algumas modificações.

TABELA V - Pesquisa preliminar de alguns grupos químicos

COMPOSTO QUÍMICO PESQUISADO	RESULTADO
Cumarinas	-
Fenóis com posição orto e meta livre	+
Ácidos orgânicos	+
Taninos	+
Flavonóides	+
Alcalóides	+
Esteróides	+

(-) negativo

(+) positivo

## 3.2 - DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS E SINTETISADOS

### 3.2.1 - Identificação do composto A<sub>2</sub>B<sub>8</sub>

i) Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.6):

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{NaCl}}$ : 3373 (O-H); 2928 (C-H); 1669 (C=O)

### 3.2.2 - Identificação do composto A<sub>2</sub>B<sub>20</sub> (frutose)

i) principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.7)

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{NaCl}}$ : 3337(O-H); 2927(C-H); 1023 (O-C-O)

ii) Os principais sinais de deslocamento químico em <sup>1</sup>H-RMN (300 Mhz) e estão mostrados na figura 8.

<sup>1</sup>H-RMN (300 Mhz); MeOD; ppm: 4,03 (1H,d); 3,85 (1H,m); 3,69 (2H,s)

iii) Os sinais dos deslocamentos químicos em <sup>13</sup>C-RMN (300mhz) estão mostrados na figura 9.

<sup>13</sup>C-RMN(300MHZ);CHCl<sub>3</sub>; ppm:60,9(C-6); 63,3 (C-1); 79,4 (C-4); 83,0 (C-5); 85,1 (C-3); 109,7 (C-2).

### 3.2.3 - Identificação do composto PC-10

i) Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.10)

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 2919-2848 (C-H); 1709 (C=O); 1466 (O-C-O)

### 3.2.4 - Identificação do composto PC-17

Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.11).

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 3397(O-H); 2921(C-H); 1693 (C=C); 1055 (C-O).

ii) Os principais sinais de deslocamento químico em<sup>1</sup>H-RMN(300 Mhz) estão mostrados na figura 12.

<sup>1</sup>H-RMN(300 Mhz); (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; ppm:3,55 (1H,m); 5,1 (2H,dd); 5,9 (1H,d).

iii) Os principais sinais de deslocamento químico em <sup>13</sup>C-RMN (300mhz) estão mostrados na figura 13.

$^{13}\text{C}$ -RMN (300MHz);  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ; ppm:50,1(C-9); 71,7(C-3); 121,7(C-6); 129,2 (C-23); 138,3 (C-22).

### 3.2.5-Identificação do composto stigmasta-3-ol-5,6-22,23tetrabromo[31]

i) Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.16)

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 3397 (O-H); 2918 (C-H); 1050 (C-O); 1350-1300 (C-Br).

ii) O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN(60 MHz) na figura 17 mostra o desaparecimento dos sinais característicos de dupla ligação na região de  $\delta = 5,1$  e  $5,9$  ppm, bem como o aparecimento de um sinal característico de próton ligado a carbono em que está ligado um halogênio, na região de  $4,2$  a  $4,7$  ppm.

### 3.2.6 - Identificação do composto stigmasta-22-en-3-ol-5,6 epoxi [32]

i) Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho ( fig.18).

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 3390 (O-H); 2916 (C-H); 1050 (C-O).

ii) O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN(60 MHz) na fig 19 mostra o desaparecimento dos sinais em  $\delta = 5,9$  ppm característicos de prótons ligados a carbono de dupla ligação trissubstituída, bem como o aparecimento de um sinal característico do próton do epóxido em  $\delta = 3,2$  ppm.

### 3.2.7 - Identificação do composto stigmasta-5,22 dien 3-ona [33]

i) principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.20).

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 2870-2950 (C-H); 1683 (C=O); 1229 (C-O-C).

### 3.2.8 - Identificação do composto stigmasta-5,22-dien-3-ol-benzoato[34]

i) Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho ( fig.21).

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 2925(C-H); 1713(C=O); 1262 (C-C(=O)-O).

### 3.2.9 - Identificação do composto stigmasta-5,22-dien-3-ol acetato [35]

i) Principais frequências observadas no espectro de Infra-Vermelho (fig.22).

IV:  $\lambda_{\text{cm}^{-1}}^{\text{KBr}}$ : 2209 (C-H); 1733 (C=O); 1255 (C-C(=O)-O); 1033 (C-O).

### 3.3 - Espectros de IV, $^1\text{H}$ -RMN e $^{13}\text{C}$ -RMN

As figuras a seguir mostram dados espectroscópicos dos produtos obtidos da planta em estudo bem como os obtidos sinteticamente

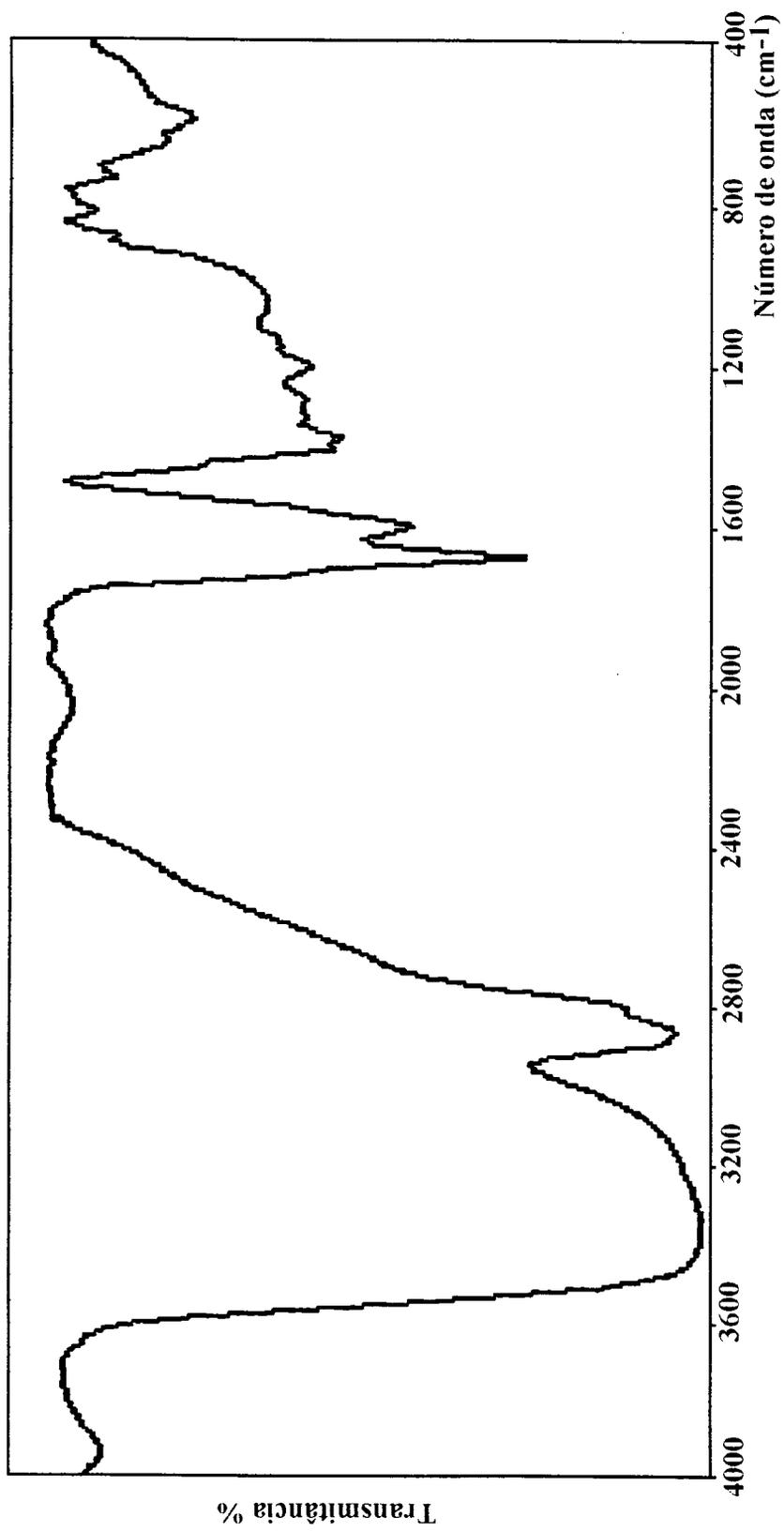


Figura 6 - Espectro de IV (filme de NaCl) do composto A<sub>2</sub>B<sub>8</sub>

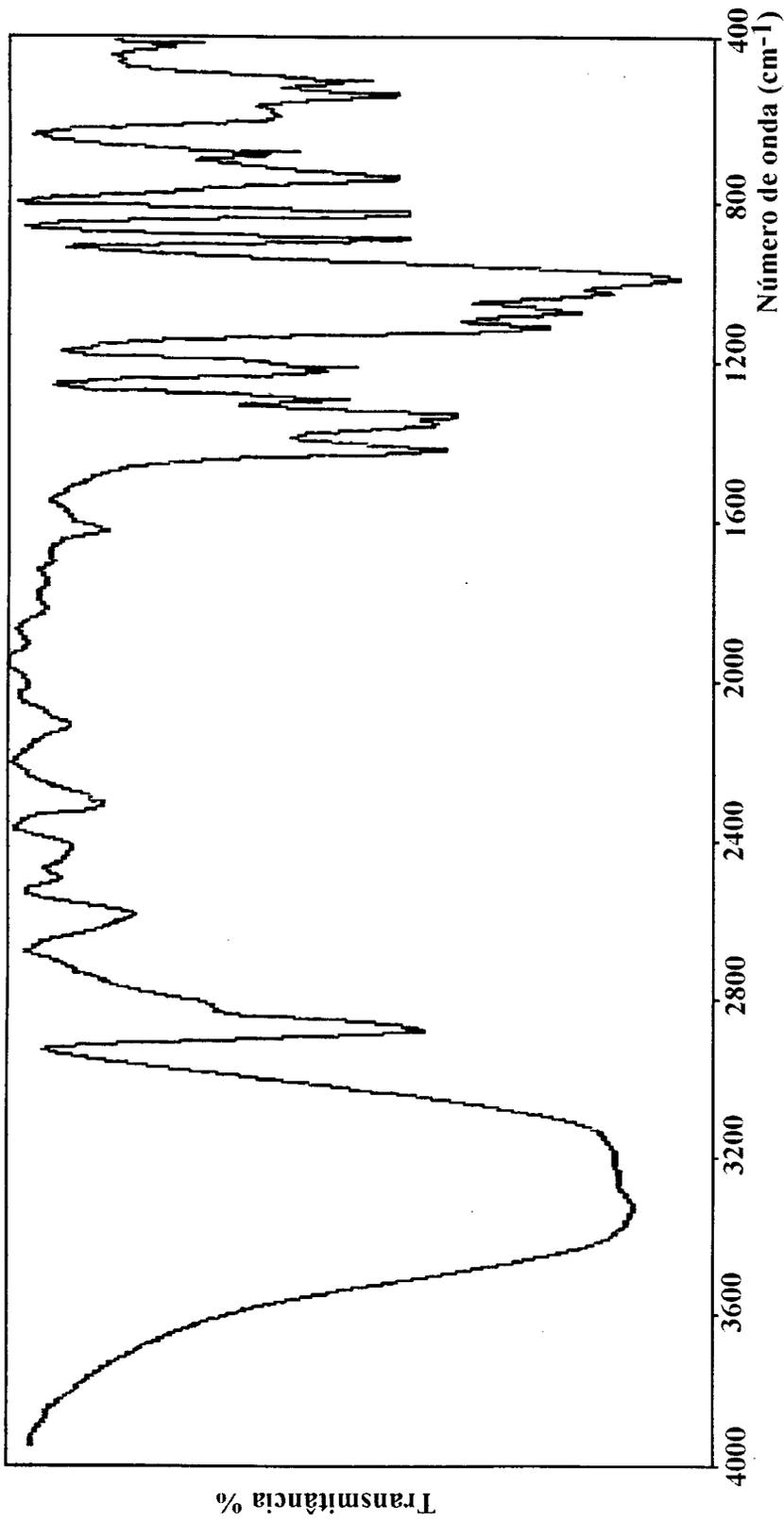
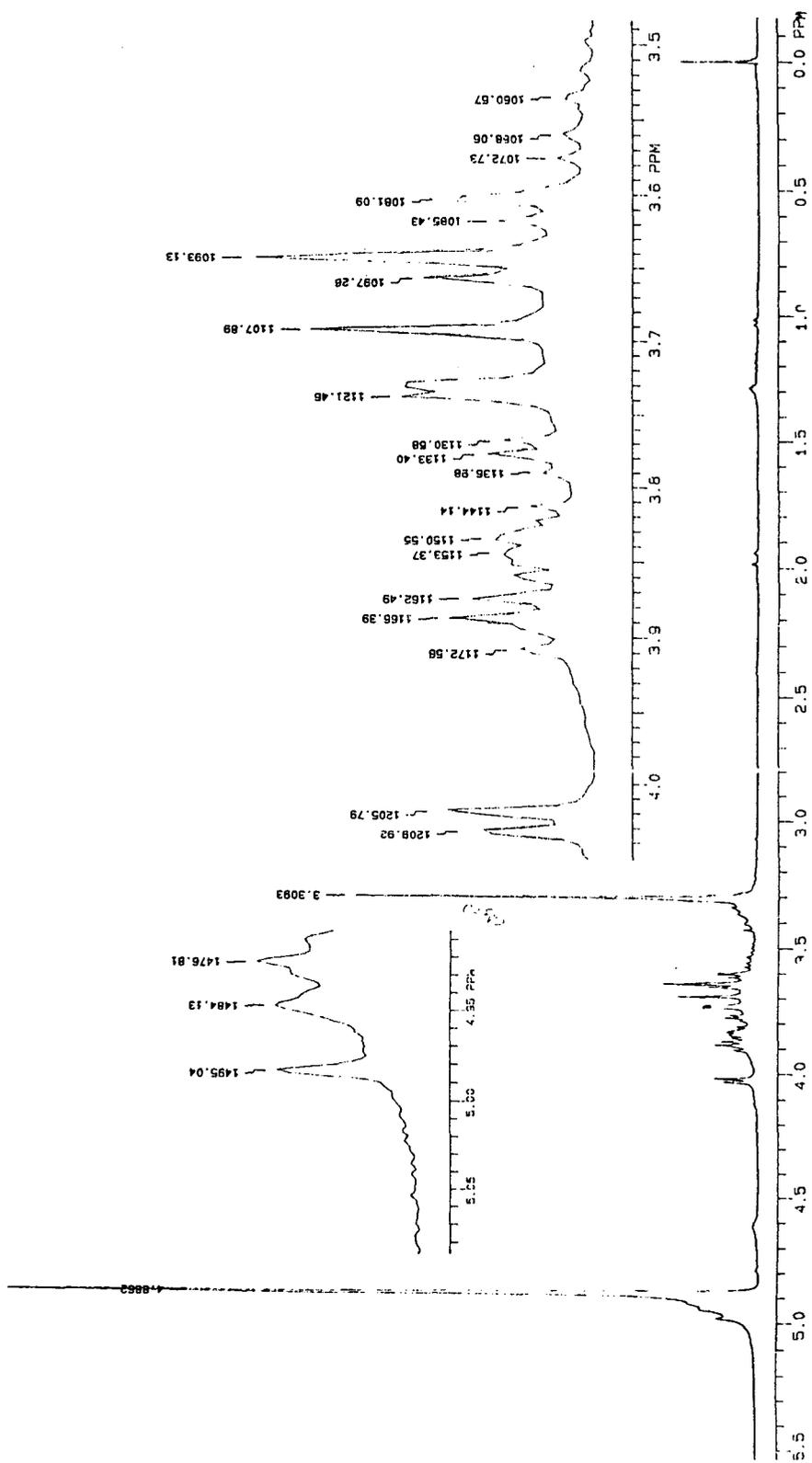


Figura 7 - Espectro de IV (filme de NaCl) do composto A<sub>7</sub>B<sub>20</sub>(frutose)



**Figura 8** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (300 Mhz, MeOD) do composto  $\text{A}_2\text{B}_{20}$  (frutose)

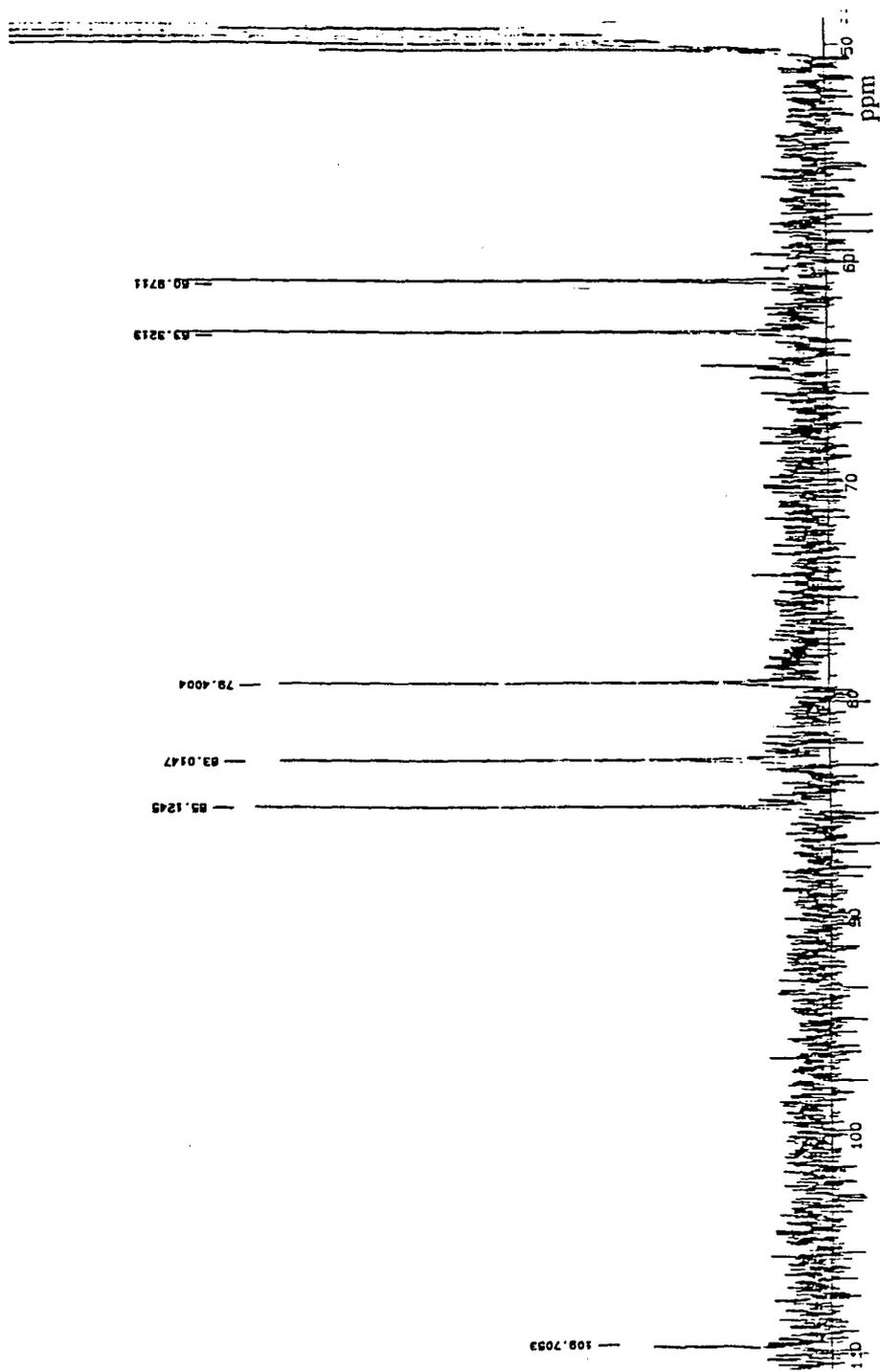


Figura 9- Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (300 Mhz, MeOD) do composto  $\text{A}_2\text{B}_2\text{O}$  (frutose )

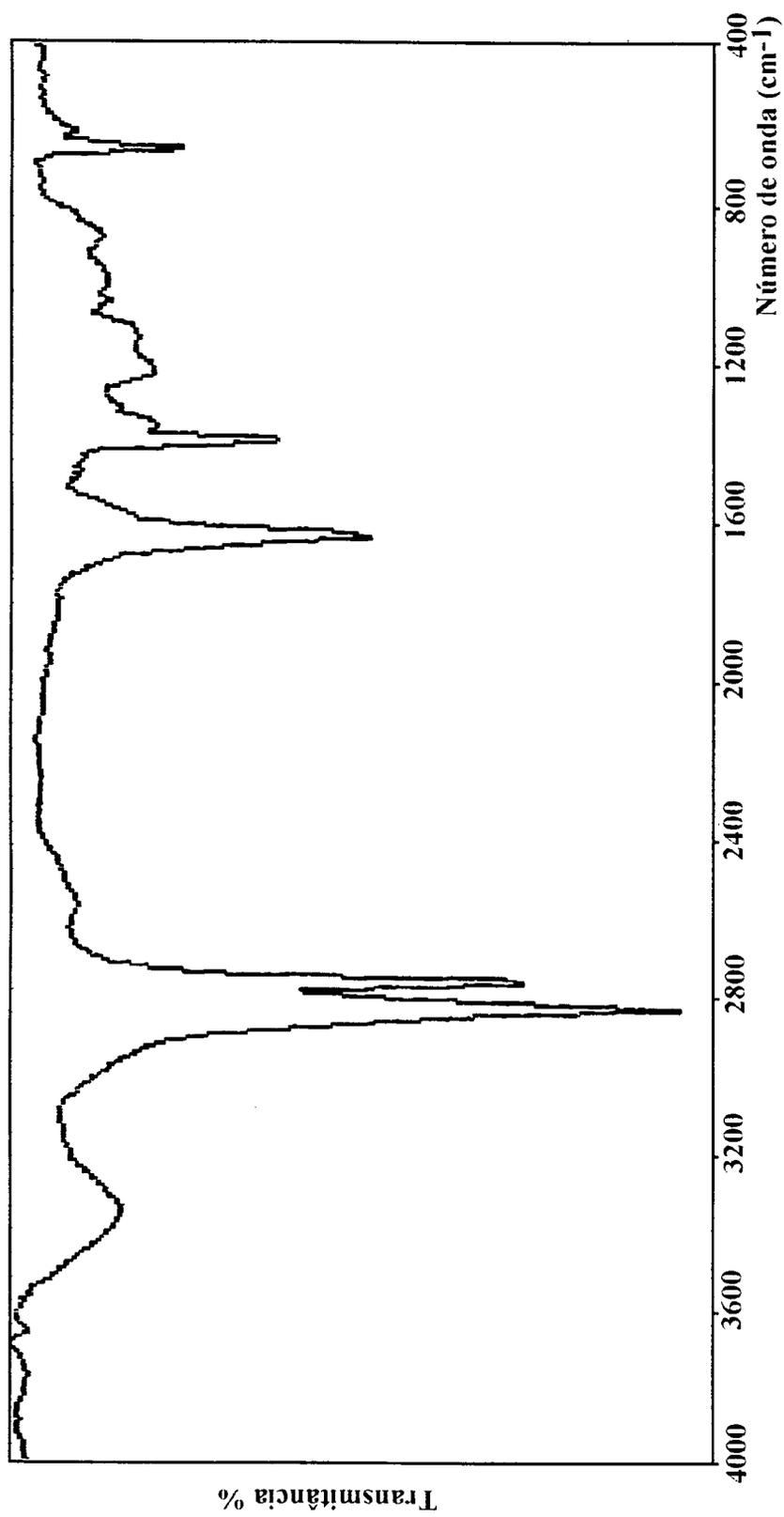


Figura 10 - Espectro de IV(KBr) do composto PC - 10

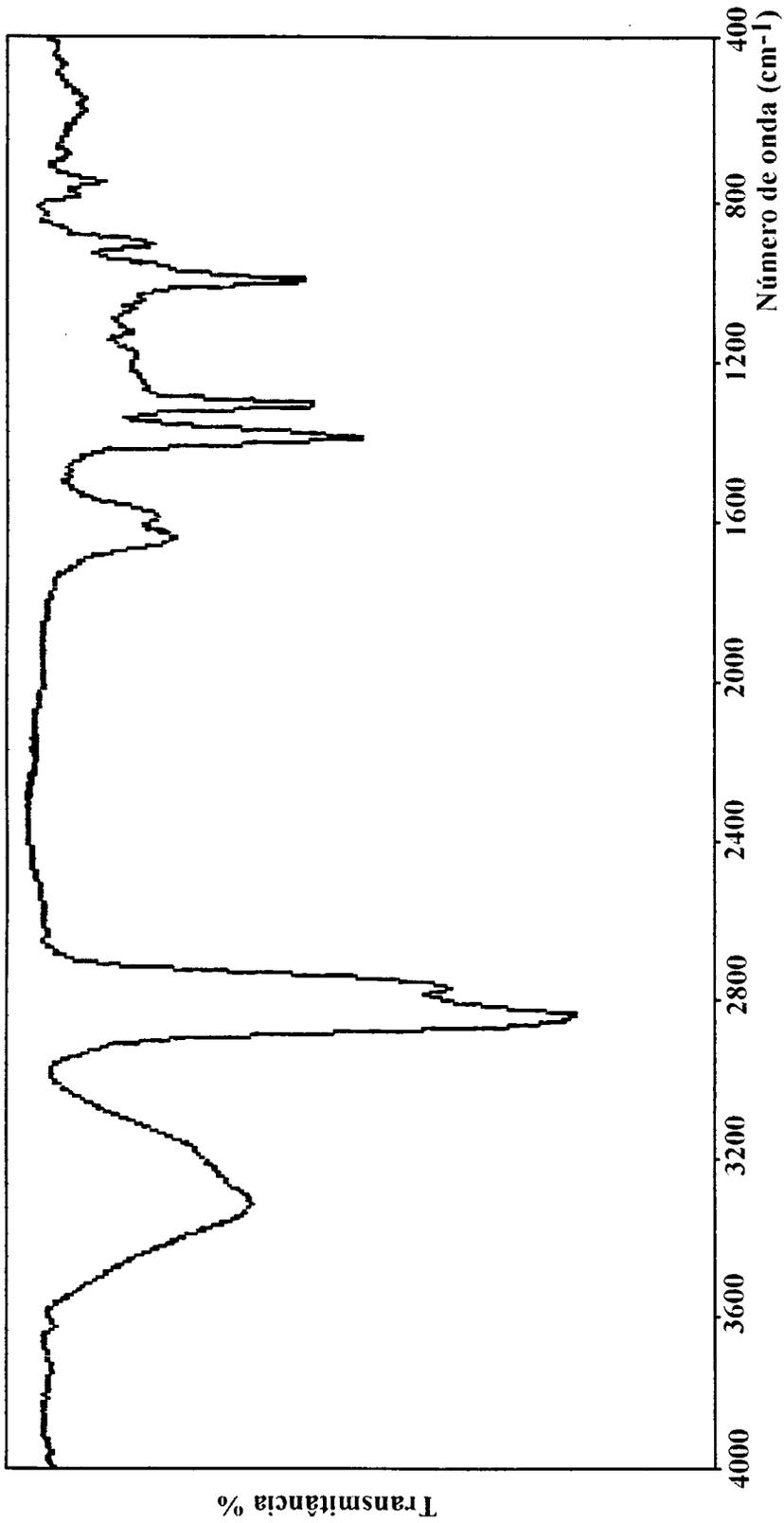


Figura 11- Espectro de IV(KBr) do composto PC - 17



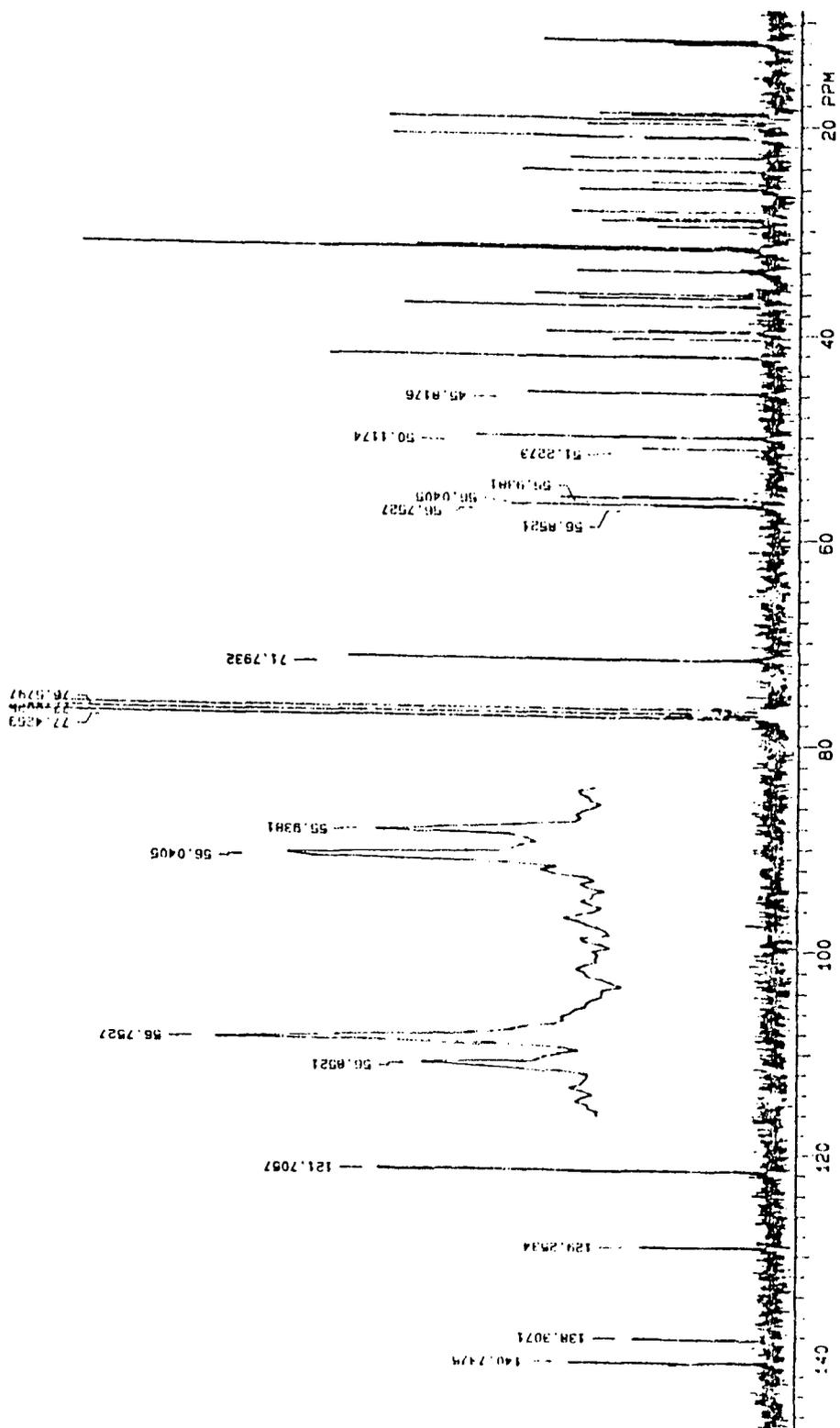
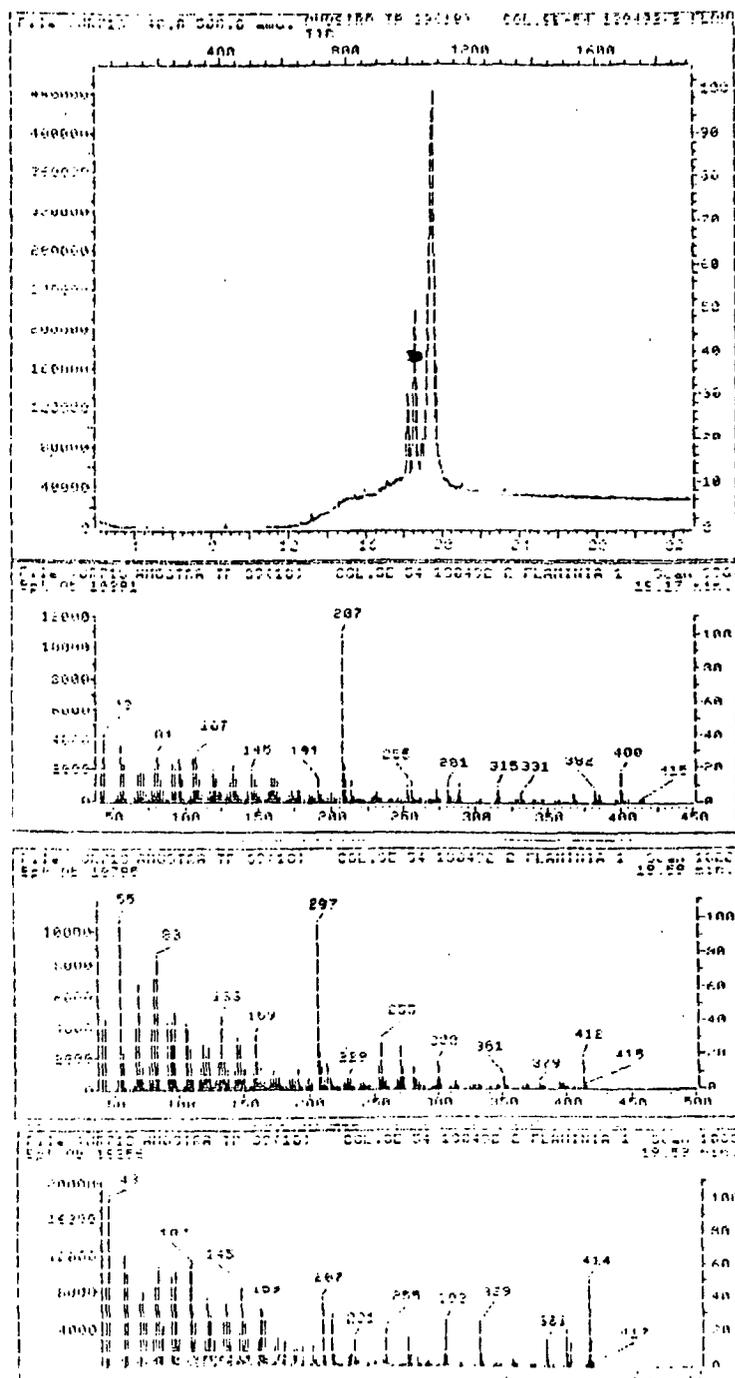
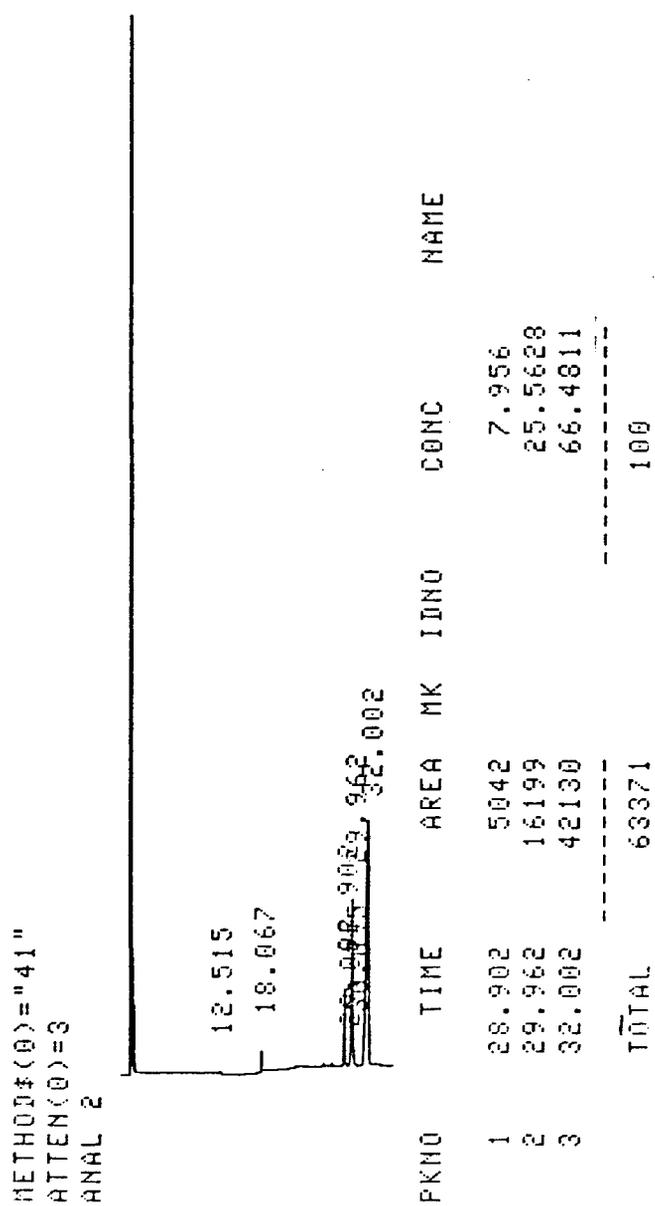


Figura 13- Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (300 Mhz, CDCl<sub>3</sub>) do composto PC-17



**Figura 14** Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectometria de Massa Computadorizada do composto PC-17



**Figura 15** Análise quantitativa do composto PC-17 por Cromatografia Gasosa usando-se coluna capilar OV-1, H<sub>2</sub> - 15<sup>o</sup>/min

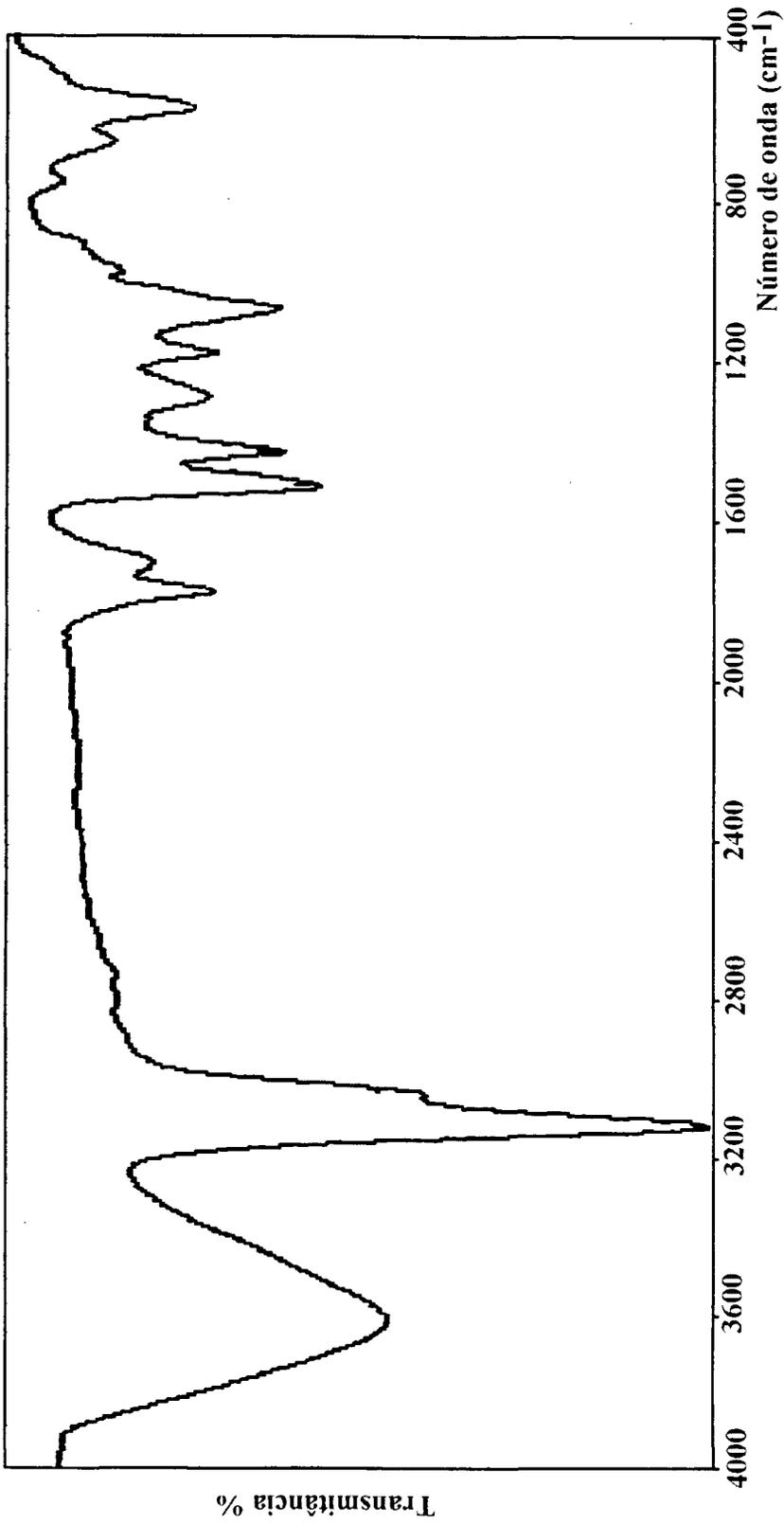


Figura 16 - Espectro de IV(KBr) do composto stigmasta-3 ol-5,6,22,23 tetrabromo

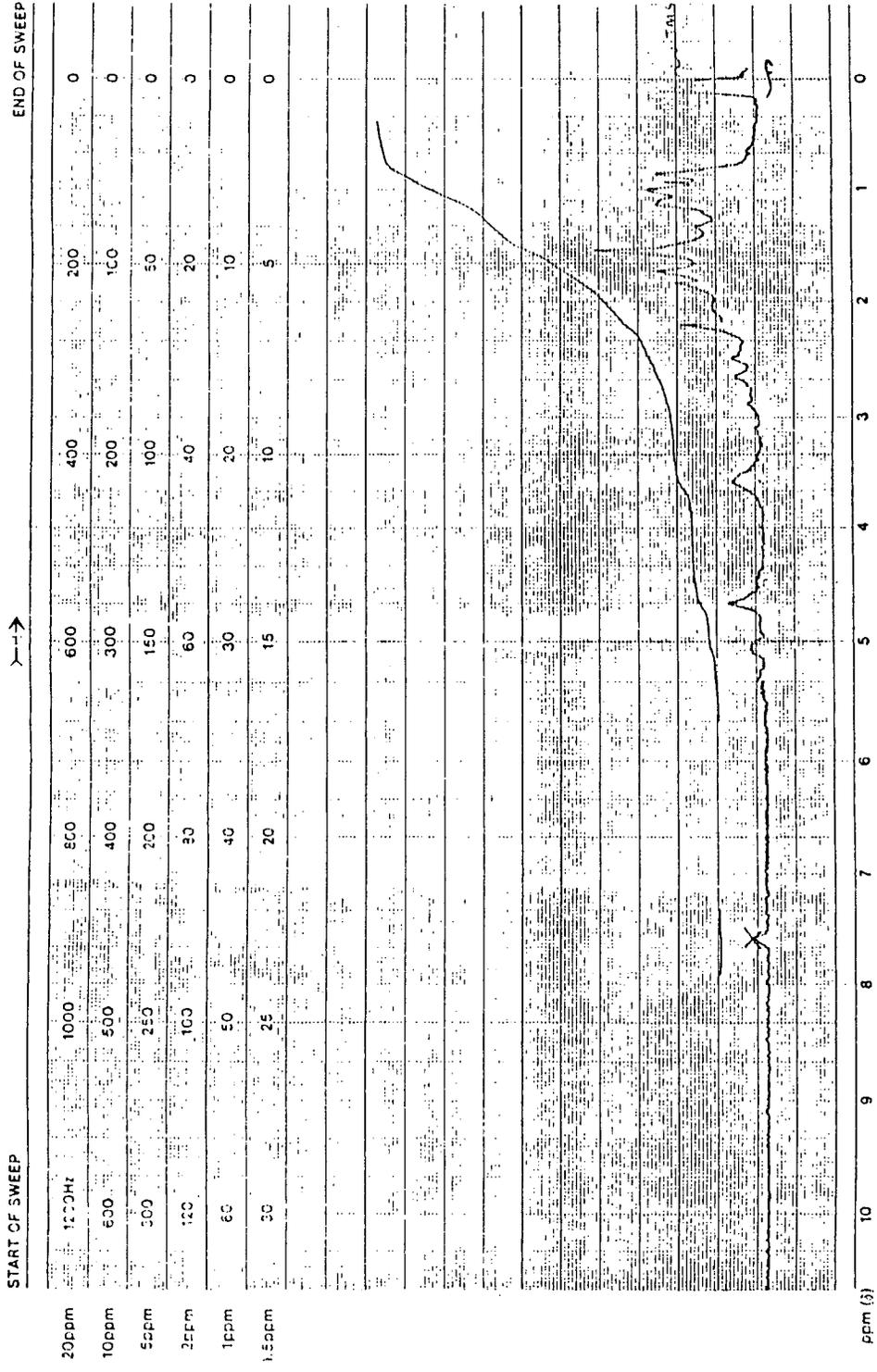


Figura 17 - Espectro de  $^1\text{H-RMN}$ (60 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) do composto stigmasta-3-ol-5,6,22,23-tetrabromo [31]

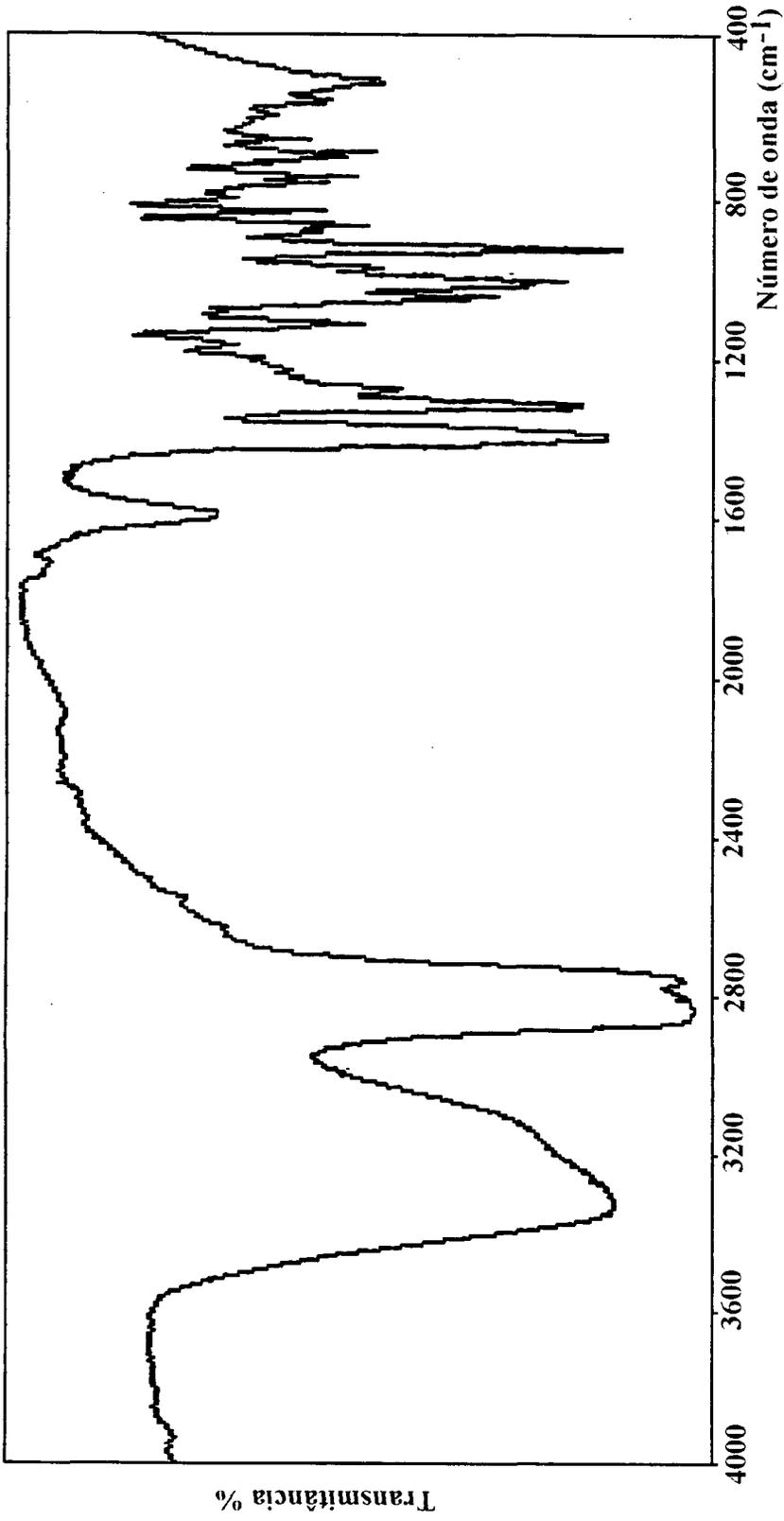


Figura 18- Espectro de IV(KBr) do composto stigmasta-22-en-3ol-5,6 epoxi

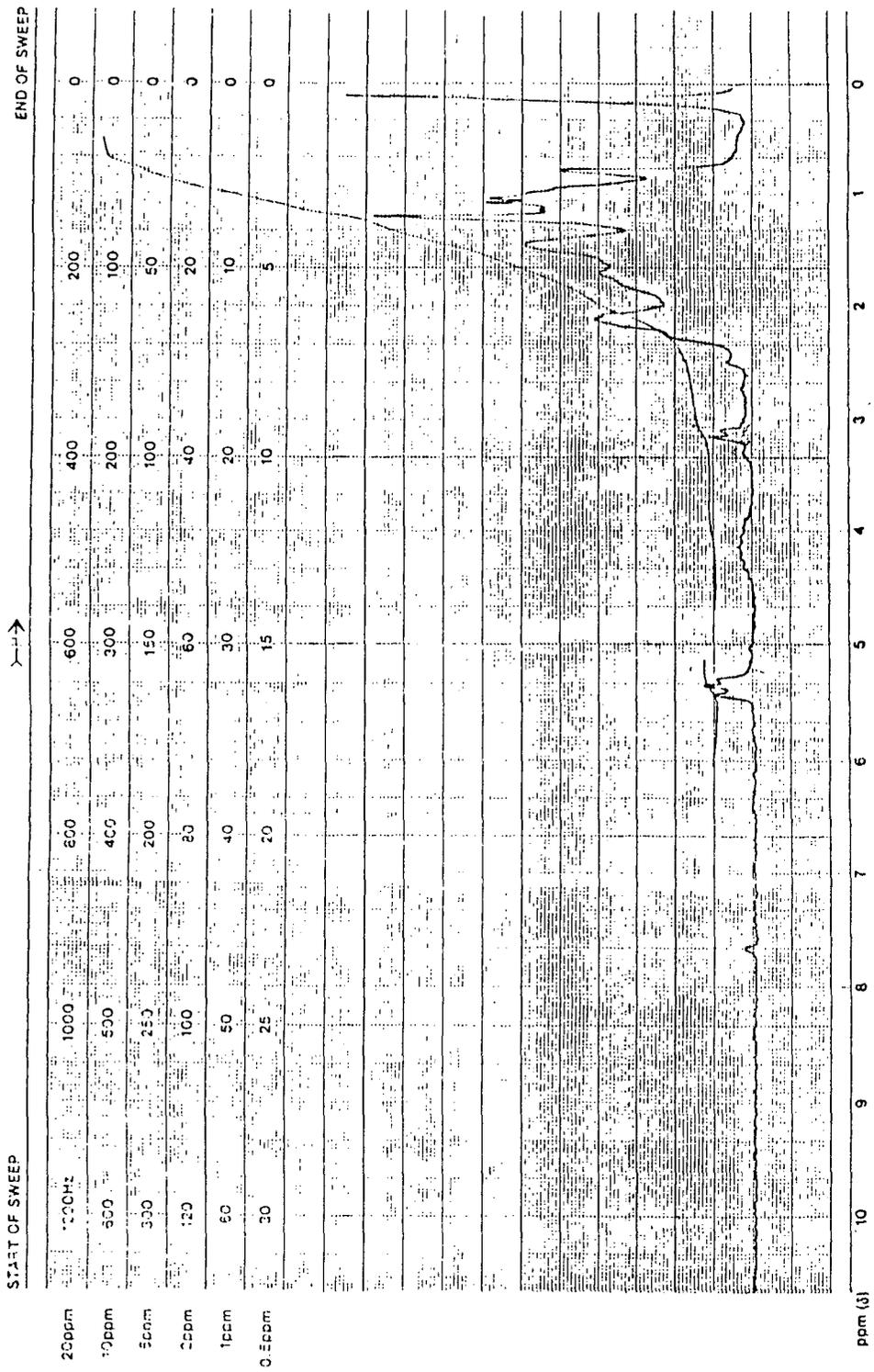


Figura 19 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN(60 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) do composto stigmasta-22-en-3-ol-5,6 epoxi[32]

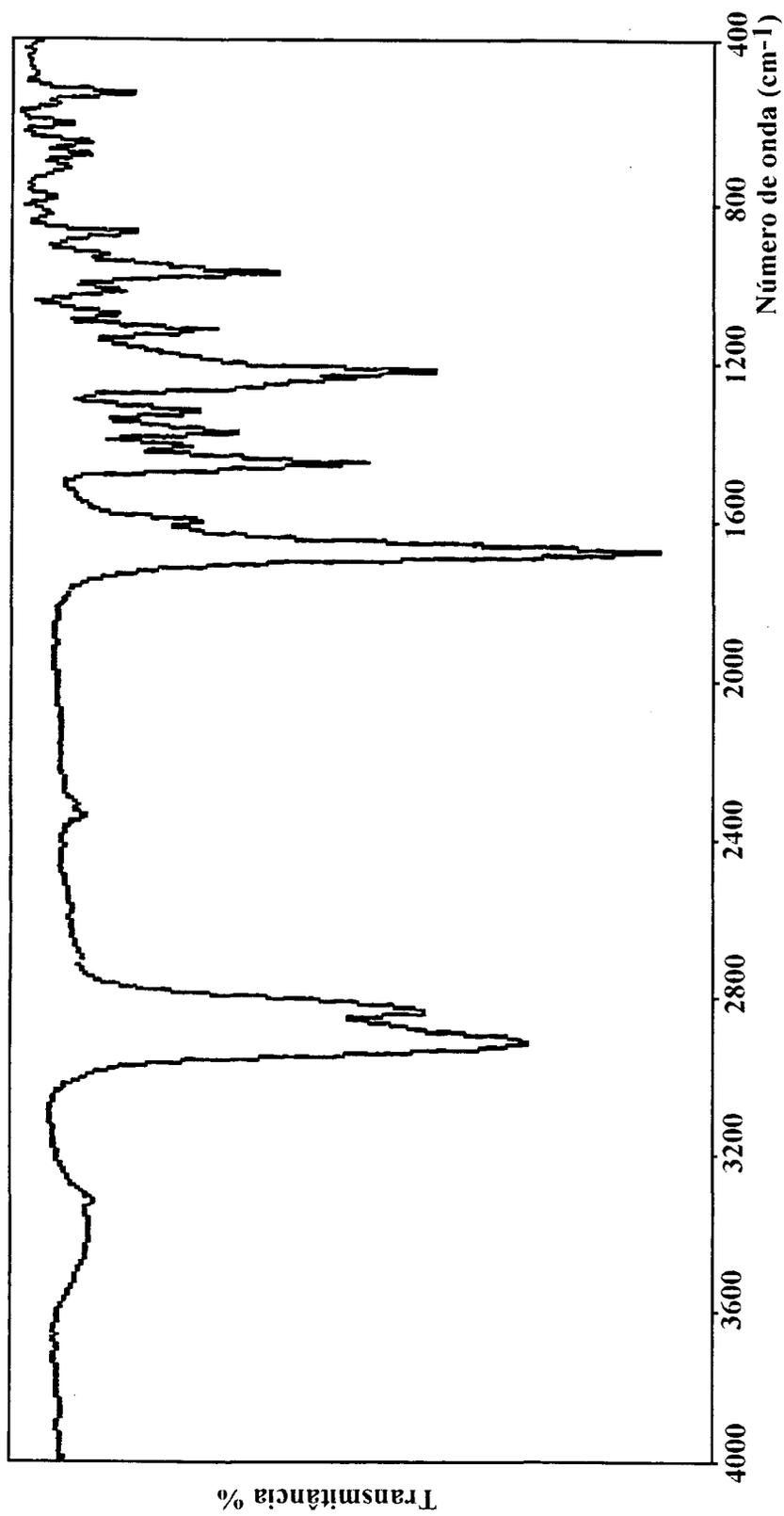


Figura 20 - Espectro de IV(KBr) do composto stigmasta-5,22 dien-3 ona

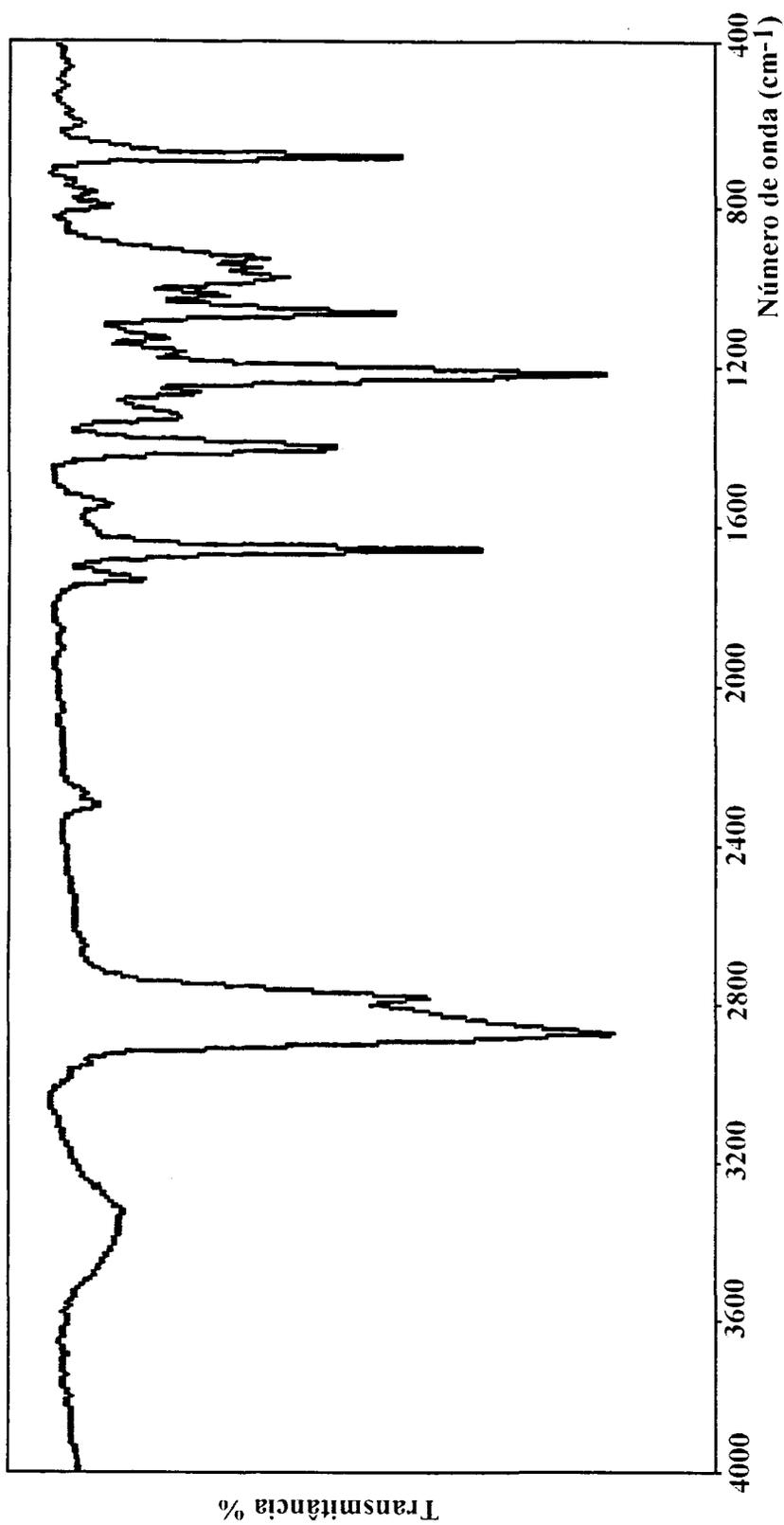


Figura 21- Espectro de IV(KBr) do composto stigmasta-5,22 dien-3ol benzoato

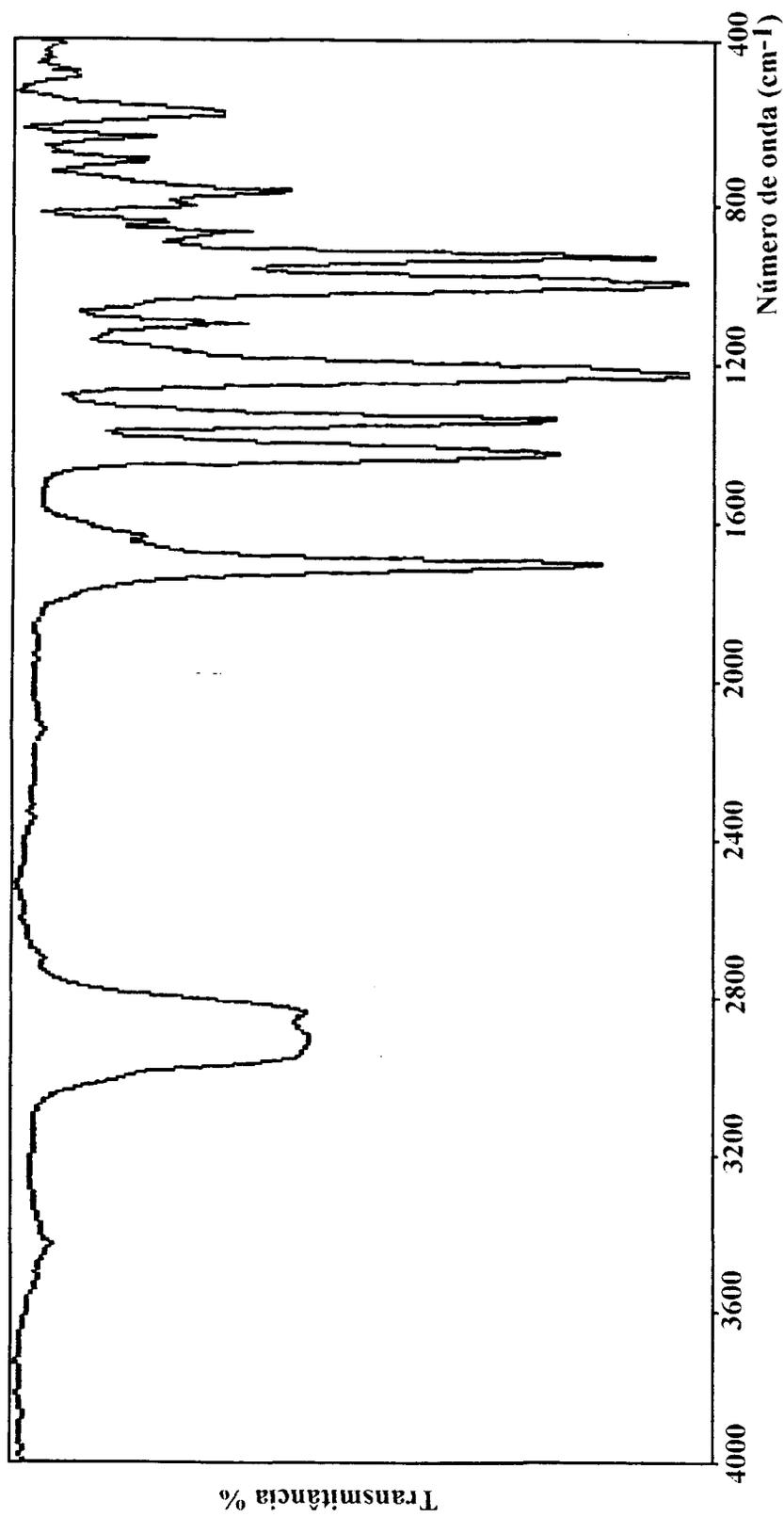


Figura 22 - Espectro de IV(KBr) do composto stigmasta-5,22 dien-3ol acetato

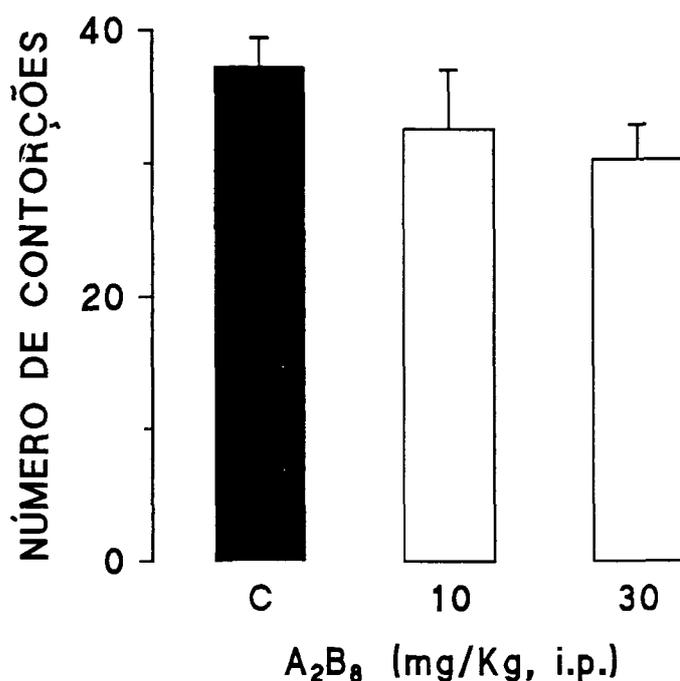
## ANEXO I

**3.4 - Resultados dos testes farmacológicos dos compostos isolados e modificados do *P.corcovadensis***

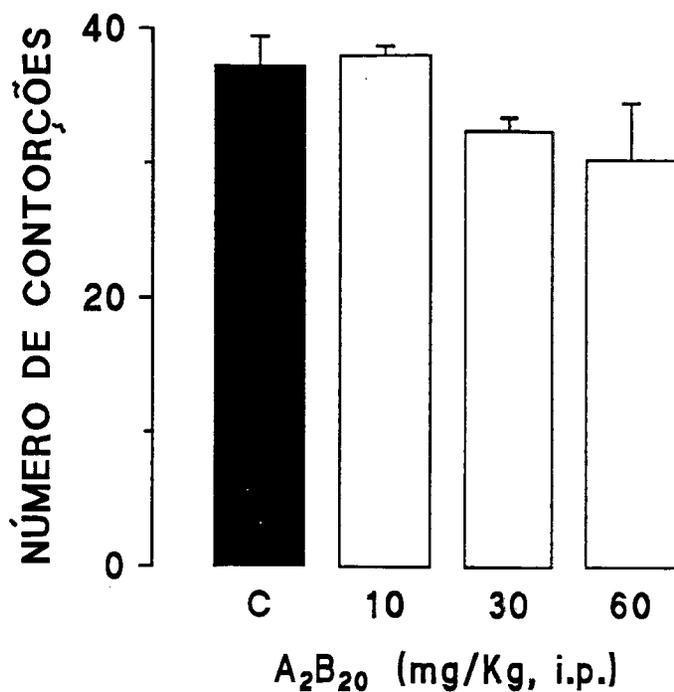
A figura 23 apresenta o resultado experimental do tratamento intraperitoneal (ip) dos animais com o composto  $A_2B_8$  (10 a 60 mg/kg, 30 minutos antes) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. Observa-se que o número de contorções dos animais tratados não foram significativamente diferentes do grupo controle.

Resultados semelhantes foram encontrados para os animais tratados com os compostos  $A_2B_{20}$  e PC-10 nas doses de 30 e 60 mg/kg, respectivamente (figs.24 e 25).

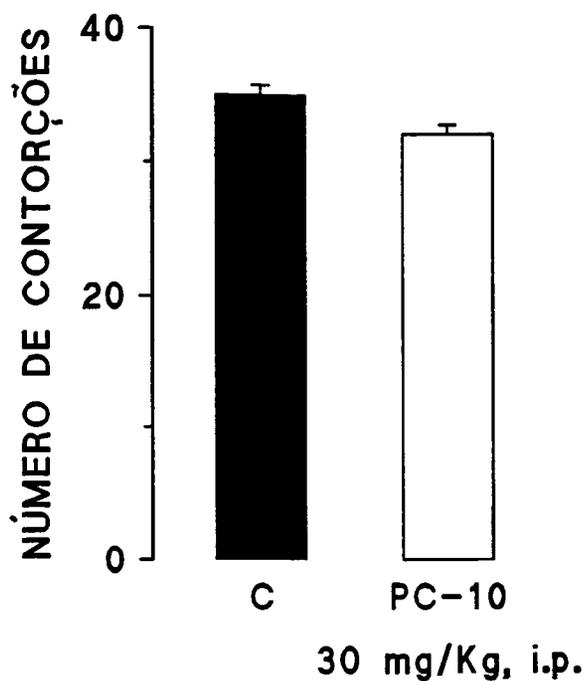
Cada grupo representa uma média de 4 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão das médias.



**Figura 23** - Efeito do composto  $A_2B_8$  sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos controle (■) e tratados (□)



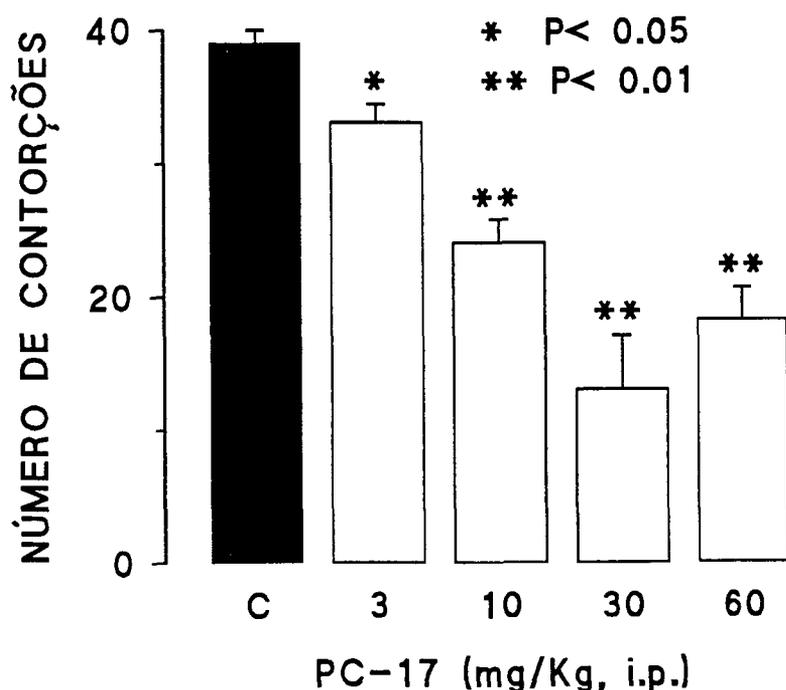
**Figura 24** - Efeito do composto A<sub>2</sub>B<sub>20</sub>(frutose) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)



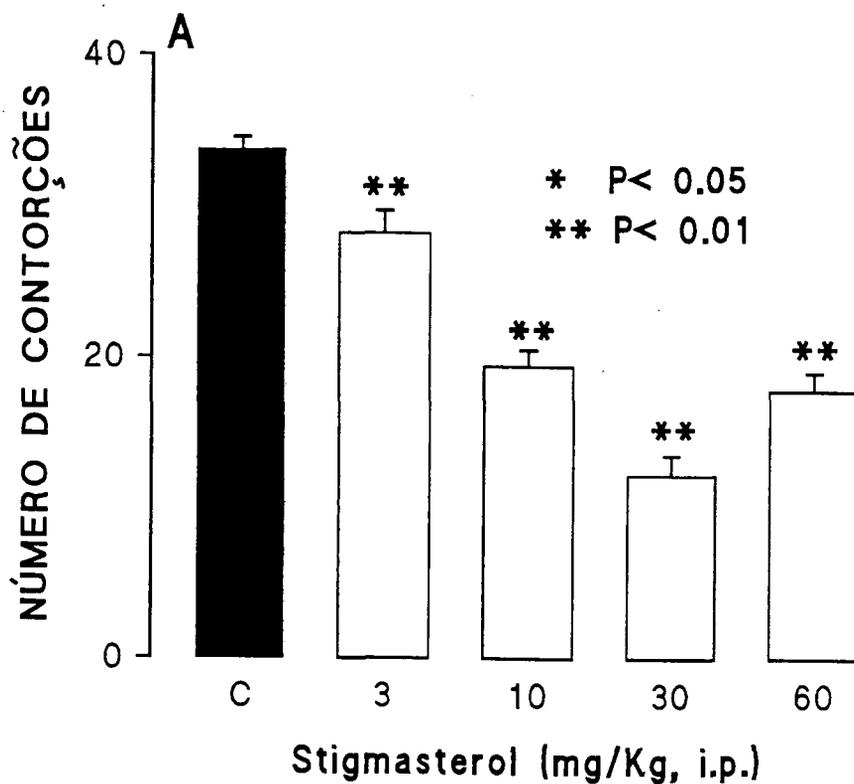
**Figura 25** - Efeito do composto PC-10 sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)

As figuras 26, 27 A mostram o efeitos analgésico dos compostos PC-17 e estigmasterol (sigma) nas doses de 30 a 60 mg/kg intraperitoneal. Observa-se que tanto o PC-17 como o estigmasterol apresentam uma significativa inibição dose-dependente com a  $DI_{50}$  de 16 mg/kg e inibição máxima de 64%.

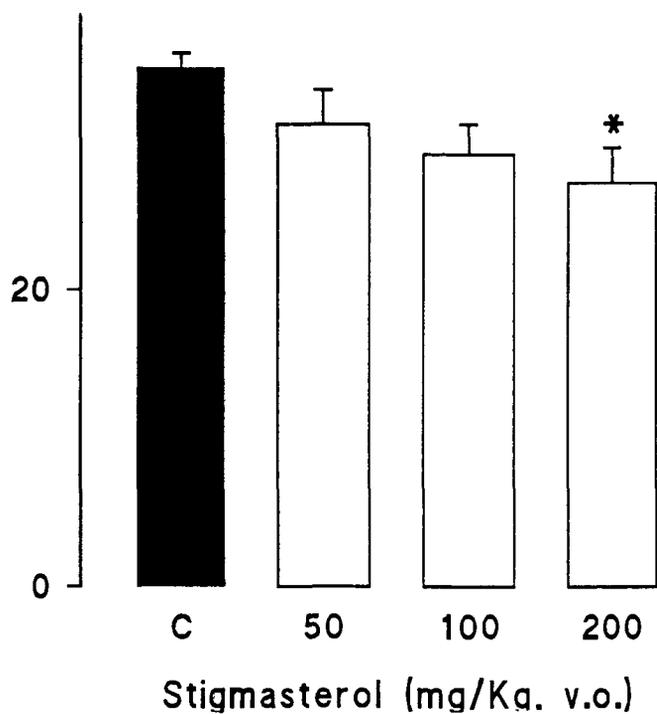
Quando administrado oralmente(50 a 200mg/kg), o estigmasterol apresentou uma discreta inibição(fig.27 B). Cada grupo apresenta uma média de 6 animais, as linhas verticais indicam os erros padrão das médias e os asteriscos as significâncias em relação aos valores controle (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ).



**Figura 26** - Efeito do composto PC-17 sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)



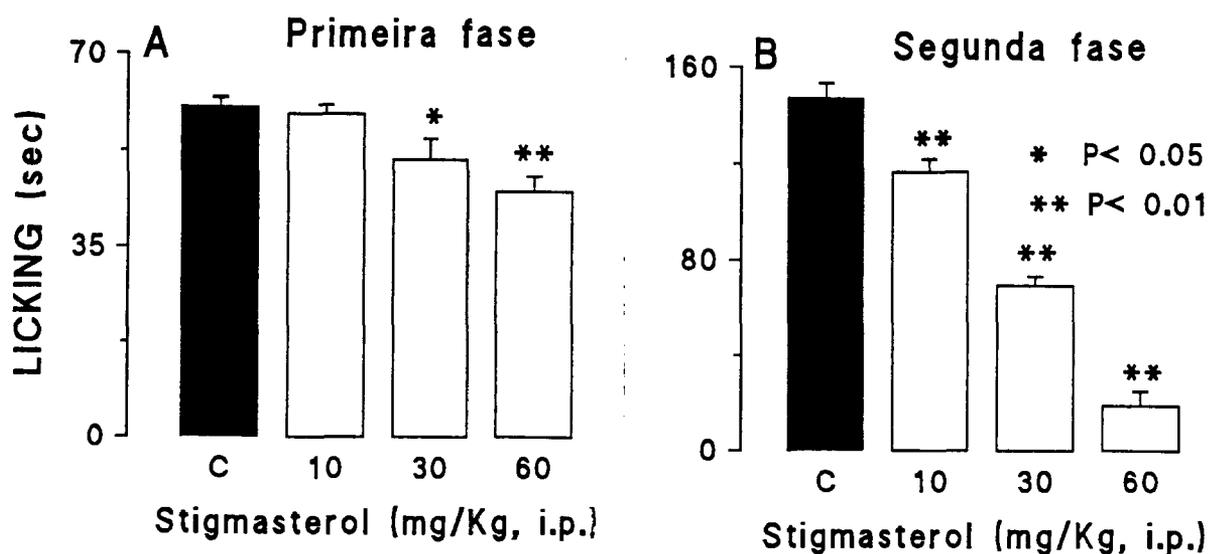
**Figura 27A** - Efeito do composto estigmasterol(Sigma) administrado via intraperitoneal sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)



**Figura 27B** - Efeito do composto estigmasterol(Sigma) administrado via oral sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos controle (■) e tratados (□)

No modelo de dor causado pela formalina, o estigmasterol (10 a 60 mg/kg,ip) causou significativa inibição dose-dependente de ambas as fases da dor induzida pela formalina (fig.28 A e B). Contudo o estigmasterol foi mais efetivo contra a segunda fase da dor, com  $DI_{50} >$  de 60 e 27 mg/kg e uma inibição máxima de 26 e 88% para a primeira fase(dor neurogênica) e segunda fase(dor inflamatória), respectivamente.

No entanto o estigmasterol quando administrado oralmente (50 a 200 mg/kg) causou apenas inibição parcial em ambas as fases de dor induzida pela formalina, com uma inibição máxima de 40 e 25 % para a primeira e segunda fase de dor (fig.29 A e B). Observa-se também, que tanto por via oral como intraperitoneal, não houve diminuição do edema causado pela formalina (fig. 30 C). Cada grupo representa uma média de 6 animais, as linhas verticais indicam o erro padrão da média e os asteriscos mostram as diferenças significantes em relação ao controle.



**Figura 28A e B** - Efeito do composto estigmasterol (Sigma) administrado via intraperitoneal no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos controle ( ) e tratados (□)

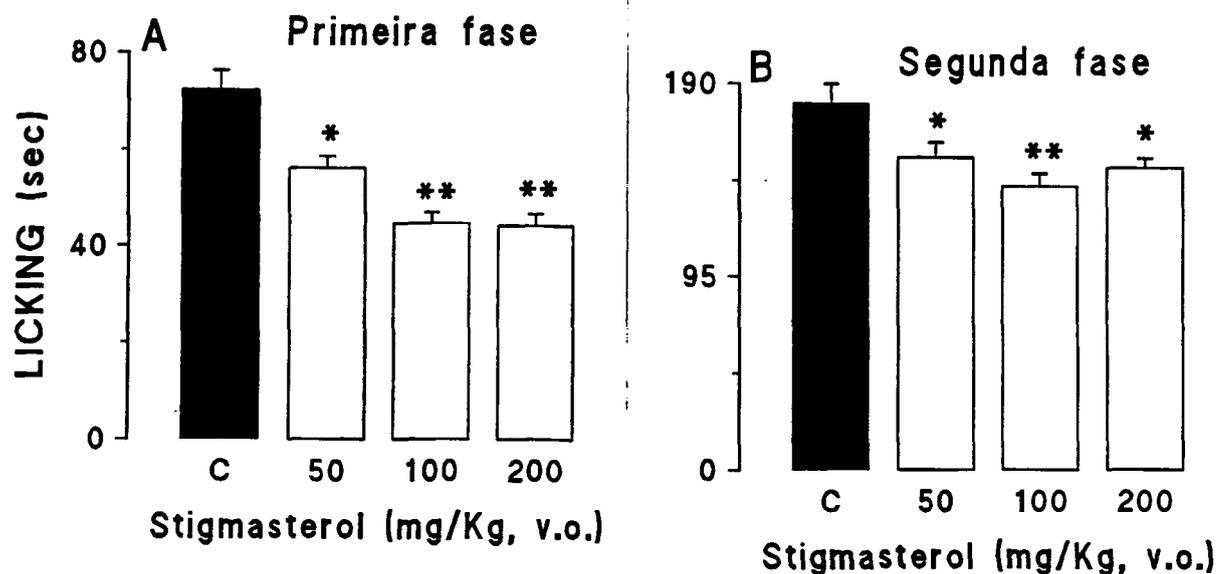


Figura 29A e B - Efeito do composto estigmasterol (Sigma) administrado via oral no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos controle (■) e tratados (□)

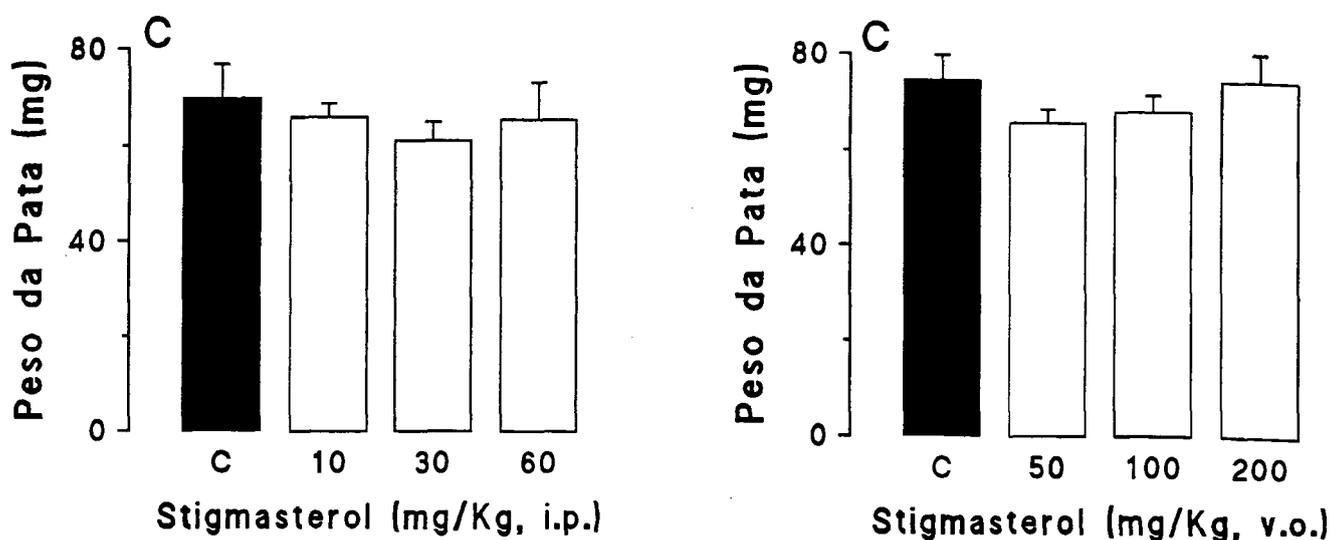
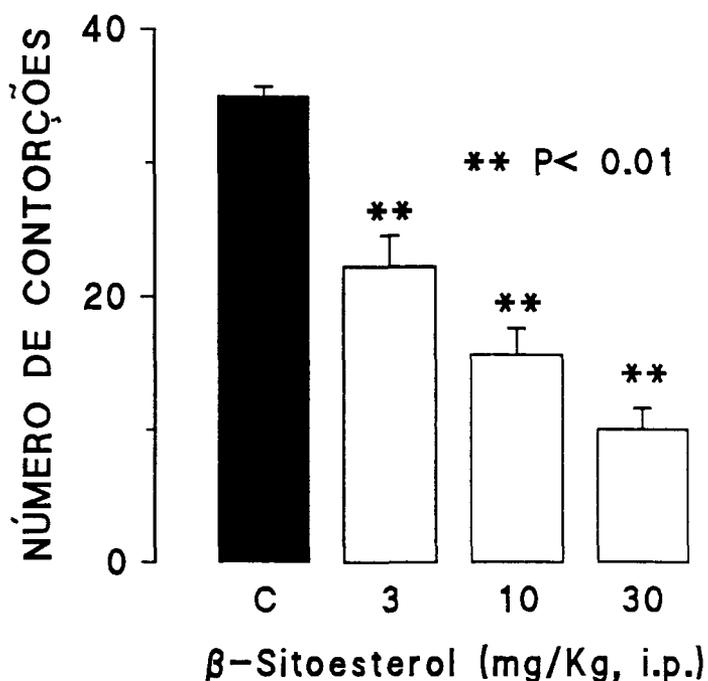


Figura 30C - Efeito do composto estigmasterol (Sigma) sobre o edema de pata induzido pela formalina em camundongos controle (■) e tratados (□)

Interessantemente,  $\beta$  sitosterol (sigma) 3 a 30 mg/kg,ip causou significativa e potente redução das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com uma  $DI_{50}$  de 6 mg/kg e inibição máxima de de 72% (fig.31). Cada grupo representa uma média de 6 animais, as linhas verticais indicam o erro padrão das médias e os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores controle.

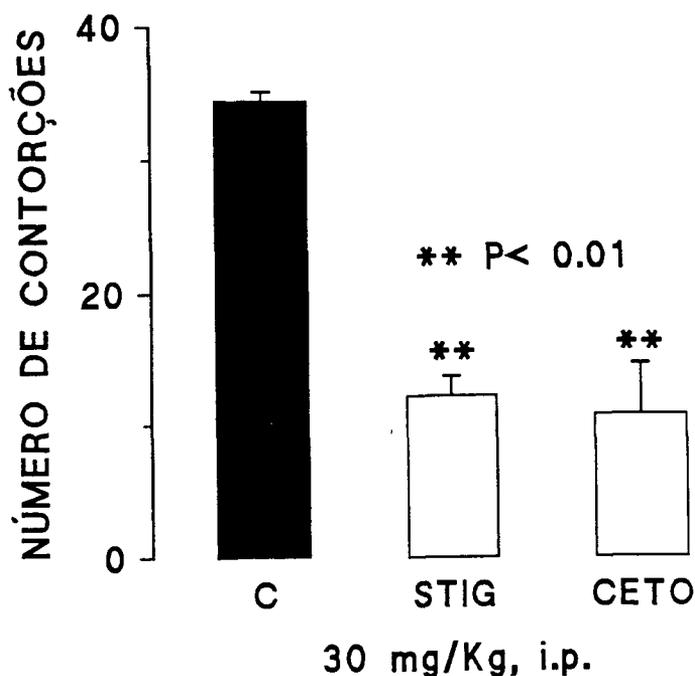


**Figura 31** - Efeito do composto  $\beta$ -sitosterol (Sigma) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)

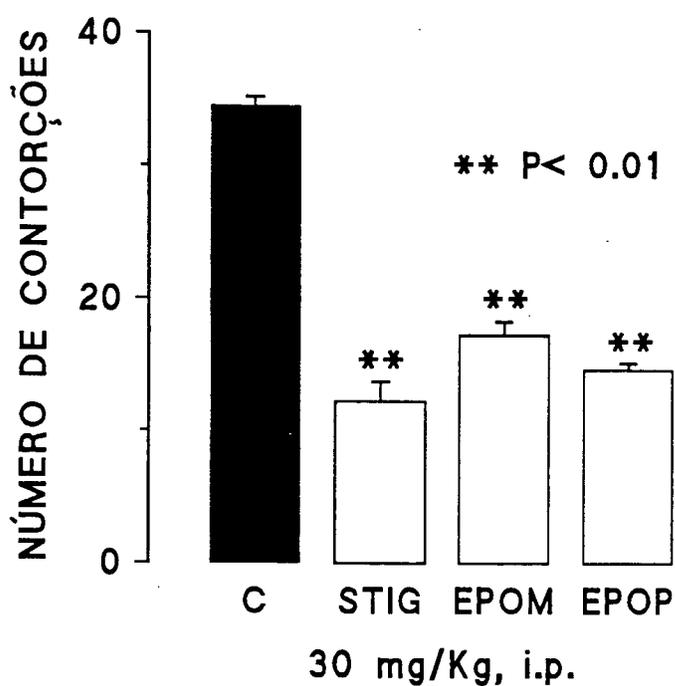
As figuras 32 a 35 mostram o efeito analgésico dos compostos modificados em relação ao estigmasterol no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, utilizando-se dose única de 30 mg/kg e administrado intraperitonealmente.

Cada grupo corresponde a uma média de 4 animais, as barras verticais indicam o erro padrão das médias e os asteriscos mostram as variações significantes em relação ao controle. Observa-se que o composto oxidado não alterou significativamente o efeito analgésico, causando uma inibição máxima de 68% (fig.32), ao passo que o estigmasterol epoxidado houve até uma diminuição do efeito analgésico (comparado com o estigmasterol 64%) apresentando uma inibição máxima de 48% (fig.33).

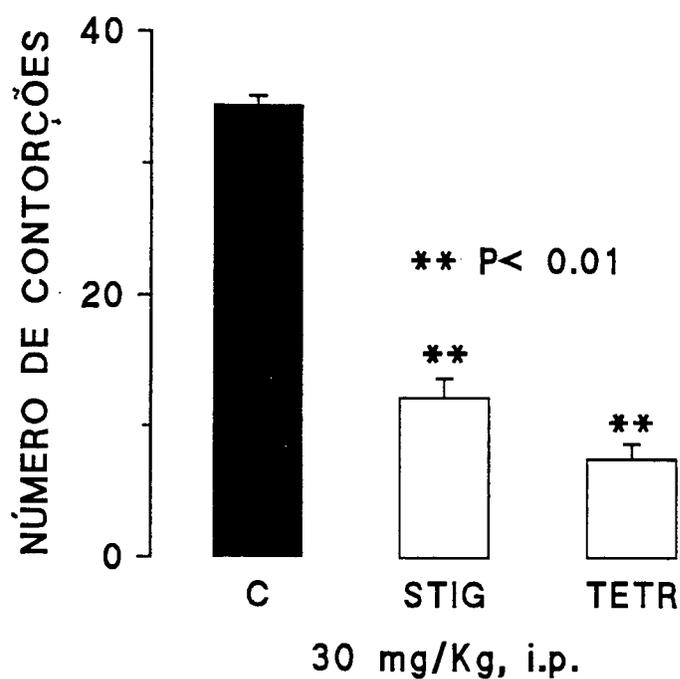
No entanto, quando se analisa o estigmasterol tetrabromado observa-se um considerável aumento no efeito, com uma inibição máxima de 78% (fig.34). Surpreendentemente quando se analisa o estigmasterol benzoilado observa-se um grande aumento na atividade analgésica com uma IM de 88% (fig.35).



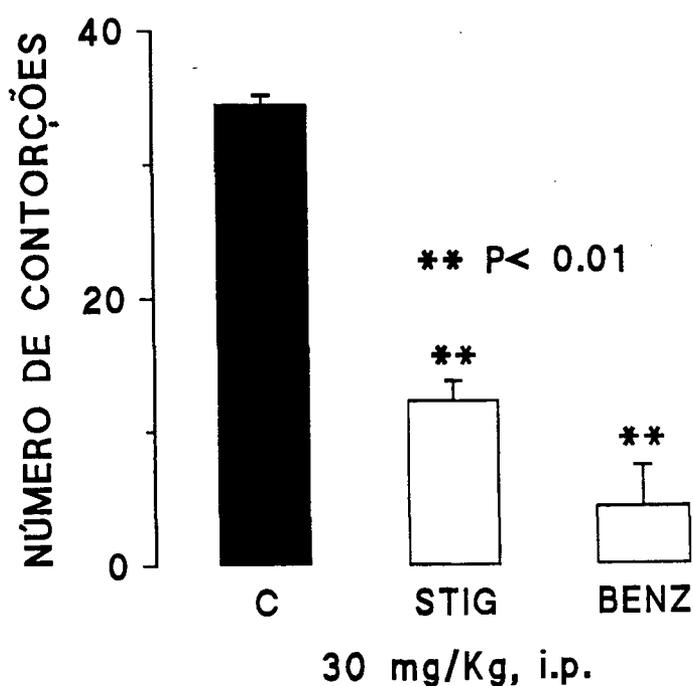
**Figura 32** - Efeito do estigmasterol oxidado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)



**Figura 33** - Efeito do estigmasterol epoxidado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)



**Figura 34** - Efeito do estigmasterol tetrabromado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)



**Figura 35** - Efeito do estigmasterol benzoilado sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)

A figura 36 A e B mostra que o efeito analgésico do estigmasterol acetato teve um aumento significativo, tanto por via intraperitoneal (3 a 60 mg/kg) como via oral (50 a 200 mg/kg) no modelo de dor causada pelo ácido acético, apresentando uma  $DI_{50}$  de 9 mg/kg e inibição máxima de 58%.

A figura 37 A e B mostra que o tratamento intraperitoneal com o estigmasterol acetilado (10 a 60 mg/kg) causou um significativo efeito analgésico nas duas fases da dor causada pela formalina, sendo mais efetiva na segunda fase, apresentando uma  $DI_{50}$  > 60 e 38,5 mg/kg e inibição máxima de 39 e 75% para a primeira e segunda fase da dor respectivamente. Porém quando administrado oralmente (50 a 200 mg/kg), houve uma inibição parcial em ambas as fases da dor (fig.38 A e B).

Já a figura 39 mostra que o estigmasterol acetilado quando administrado tanto pela via oral (50 a 200 mg/kg) como intraperitoneal (10 a 60 mg/kg), não reduziu o edema de pata causado pela formalina, sugerindo que estes compostos da mesma forma que o extrato hidroalcoólico do *P.corcovadensis*, não possui atividade antiinflamatória.

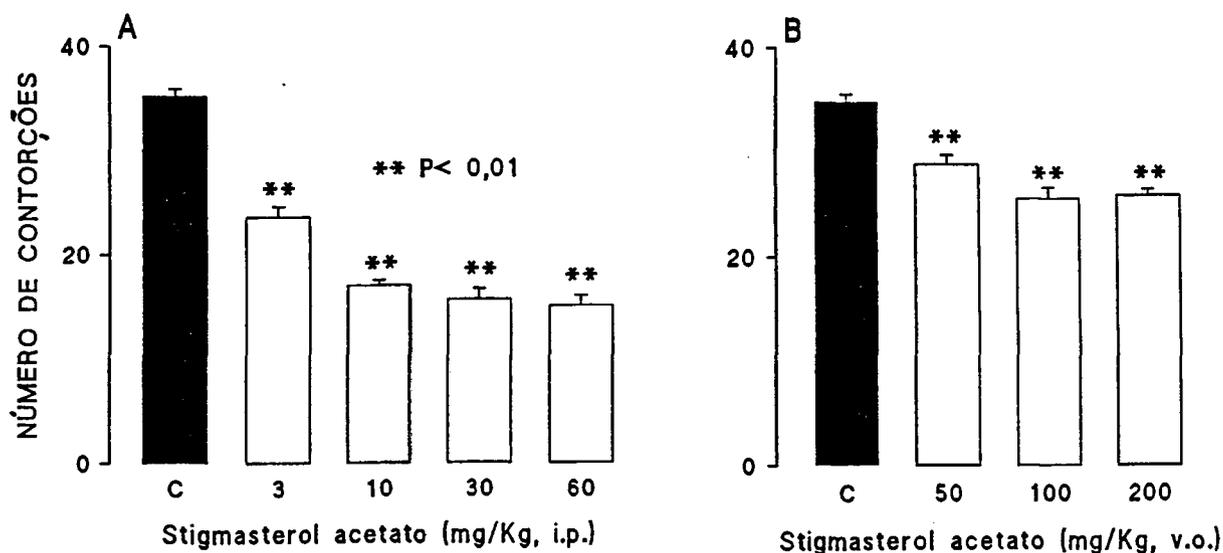


Figura 36A e B - Efeito do estigmasterol acetato administrado intraperitoneal sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos controle (■) e tratados (□)

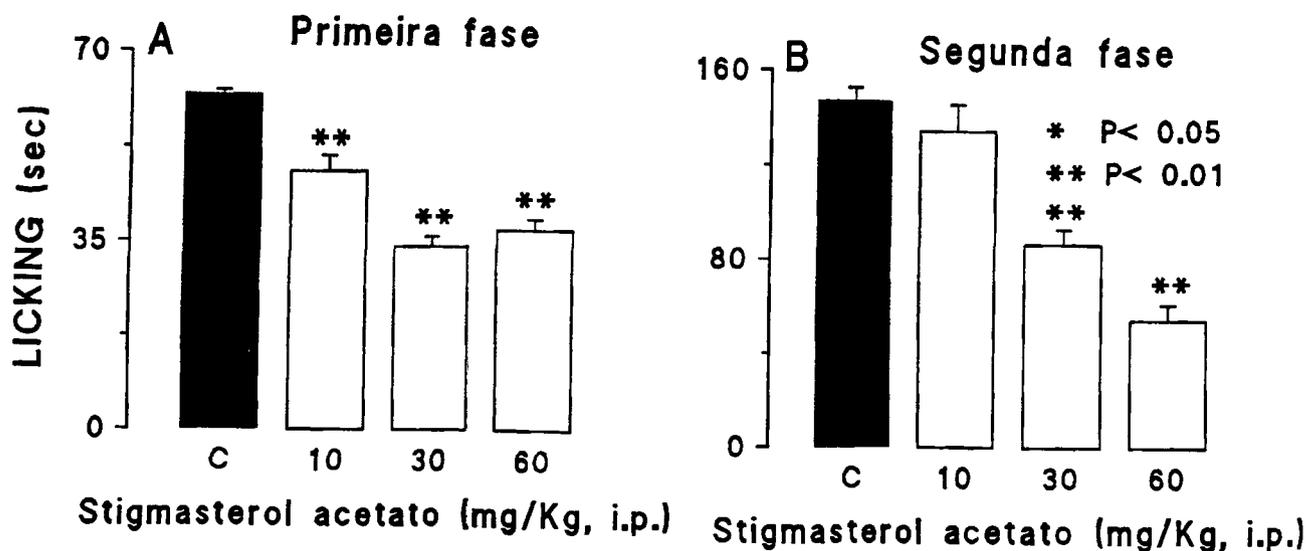
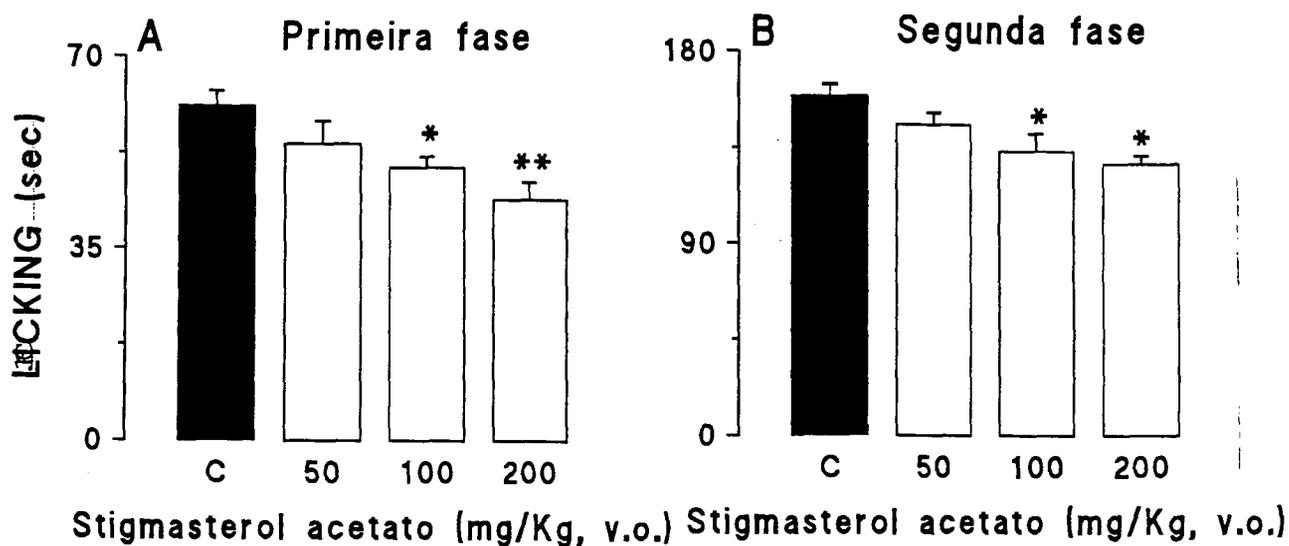
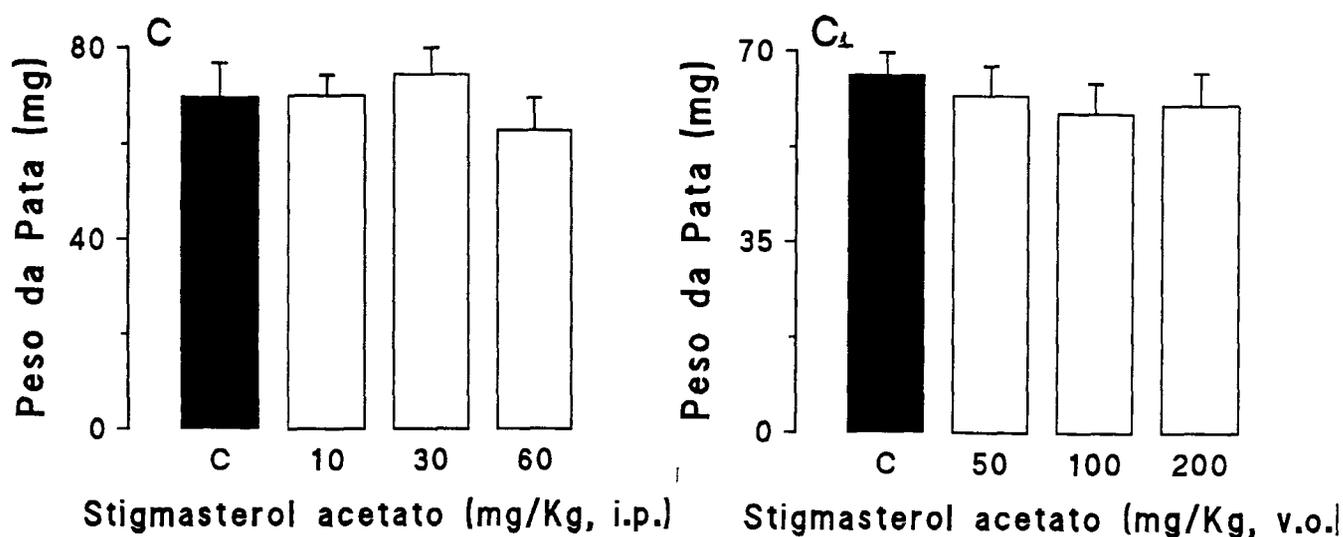


Figura 37 A e B - Efeito do estigmasterol acetato administrado intraperitoneal no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos controle (■) e tratados (□)



**Figura 38 A e B** - Efeito do estigmasterol acetato administrado oralmente no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos controle(■) e tratados (□)



**Figura 39** - Efeito do estigmasterol acetato no edema de pata causado pela formalina administrado intraperitoneal (C) e oral (C1) em camundongos controle (■) e tratados (□)

### 3.5 - DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a procura pelas plantas medicinais como fonte de medicamentos, vem aumentando significativamente. Contudo, os princípios ativos responsáveis por estes efeitos farmacológicos, bem como seus mecanismos de ação são pobremente conhecidos.

Buscando comprovar os efeitos terapêuticos das plantas usadas na medicina popular e encontrar novas abordagens para o tratamento de várias doenças, a ciência vem progredindo cada vez mais no sentido de desvendar os mistérios da natureza e usá-los em auxílio ao homem.

Como exemplo disto, estudos recentes neste sentido mostraram que pode ser extraído das plantas um promissor agente anticancer denominado de TAXOL<sup>68</sup>.

A hepatite B, que atinge aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo e também a AIDS, que vem crescendo assustadoramente são algumas das enfermidades cujos estudos farmacológicos "pré-clínicos" estão dando esperanças para seus tratamentos através do uso de plantas<sup>5,6,21</sup>. Estes dados promissores são apenas alguns dos exemplos da importância do estudo científico das plantas medicinais.

O estudo químico e farmacológico de várias espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* vem se desenvolvendo há alguns anos em nossos laboratórios. Foi demonstrado que os extratos do *Phyllanthus niruri* apresentaram potente ação antiespasmódica em vários modelos farmacológicos, onde o extrato de éter de petróleo foi cerca de 27 vezes mais potente do que o extrato total<sup>23</sup>. Por outro lado, os estudos realizados com o *Phyllanthus sellowianus* mostraram a presença de um alcalóide com atividade antiespasmódica em íleo de cobaia e útero de rata similar à papaverina<sup>22</sup>. Posteriormente, este alcalóide foi isolado e caracterizado, sendo denominado de filantimida<sup>28</sup>.

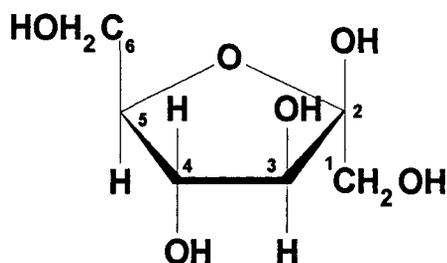
Considerando a relevância dos estudos de plantas do gênero *Phyllanthus* e a potente ação analgésica descrita anteriormente para o *P. corcovadensis*,<sup>6</sup> procurou-se isolar e caracterizar quimicamente os compostos responsáveis por esse efeito.

O fracionamento dos extratos forneceu quatro frações. Da fração mais polar (A<sub>2</sub>) foi isolado um composto denominado de A<sub>2</sub>B<sub>8</sub> (item 2.5.1.2.1), cuja estrutura não foi possível determinar, mas que o espectro de Infra-Vermelho e sua solubilidade em água faz supor que seja uma mistura de açúcares (fig.6).

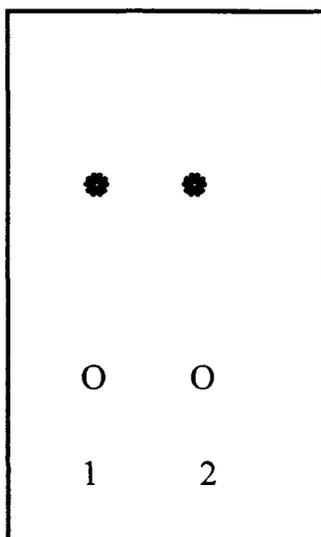
A continuação deste fracionamento permitiu isolar um outro composto denominado de A<sub>2</sub>B<sub>20</sub> (item 2.5.1.2.2), onde os espectros de <sup>1</sup>H-RMN, IV e <sup>13</sup>C-RMN mostraram ser a frutose (fig.7-9). Esta estrutura (fig.40), foi comprovada

comparando-se o espectro obtido com o descrito na literatura<sup>69</sup> e também através de cromatografia em camada delgada com amostra padrão (fig.41).

Estes compostos não apresentaram efeito analgésico quando analisados no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (fig.23 e 24 do anexo I).



**Figura 40** - Estrutura molecular do composto  $A_2B_{20}$  (frutose) obtido do *P. corcovadensis*



**Figura 41** Cromatografia em Camada Delgada comparativa com amostra padrão

Fase móvel:  $CH_2Cl_2/MeOH$ ; 64/36 %

Visualizador: Anisaldeído

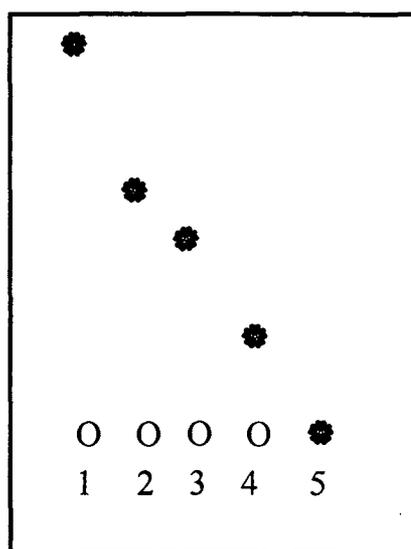
1 - composto isolado

2 - amostra padrão

Já a fração  $A_2$  possui ação analgésica maior do que os dois compostos isolados, sugerindo existir algum(s) composto(s) com forte atividade, mas em baixas concentrações, podendo sua(s) estrutura(s) estar relacionada com compostos polares como flavonóides glicosilados, fenóis ou compostos similares.

Trabalhando-se com uma fração de caráter mais apolar (item 2.3 a) foi possível isolar um composto denominado de PC-10 (item 2.6), que ainda não foi identificado (fig.10).

No entanto, a cromatografia em camada delgada comparativa com alguns compostos padrão como  $\beta$ -amyrina, glutinol, acetato de lupeol e ácido betulínico mostrou que o PC-10 possui  $R_f$  diferente (fig.42).



**Figura 42** - Cromatografia em Camada Delgada comparativa com padrões usando-se anisaldeído como revelador

1 - PC-10

2 -  $\beta$ -amyrin

3 - acetato de lupiol

4 - glutinol

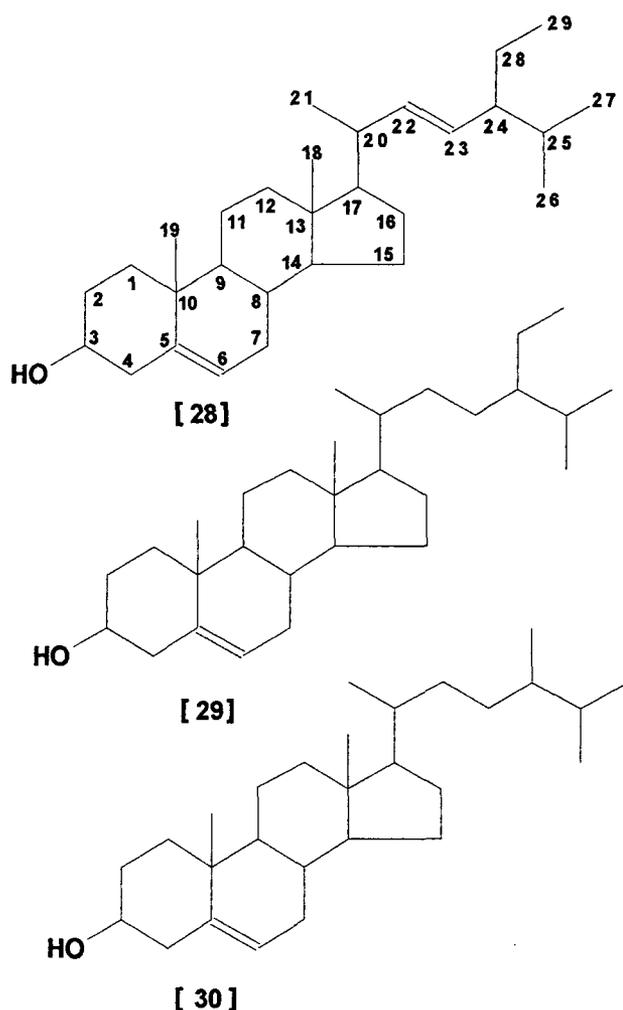
5 - ác. betulínico

Fase móvel: hexano/acetato; 9:1

Os testes farmacológicos demonstraram que o PC-10 não apresentou atividade analgésica (fig.25 do anexo I). Desta fração também foi possível isolar um outro composto denominado de PC-17 cujas placas cromatográficas utilizando-se várias misturas de solventes mostraram apenas uma única mancha.

Este composto demonstrou atividade analgésica significativa (fig.26 do anexo I) e foi estudado mais detalhadamente. Os dados espectroscópicos mostraram que se tratava de um fitosterol conhecido como stigmasterol mas inédito nesta espécie de *Phyllanthus* (fig.11-13).

Com o emprego da cromatografia gasosa de alta resolução computadorizada acoplada a espectrometria de massa (CG AR-C-EM) fig.14, foi possível observar que na verdade o PC-17 se tratava de uma mistura de fitoesteróis conhecidos como: Estigmasterol[28],  $\beta$ -sitosterol[29] e Campesterol[30] (fig.43).



**Figura 43** - Estrutura molecular dos compostos (mistura de fitoesteróis) obtido do *P.corcovadensis*

A análise quantitativa destes esteróis foi realizada por cromatografia gasosa usando-se coluna capilar OV-1, sendo que o estigmasterol [28],  $\beta$  sitosterol [29] e campesterol [30] estão presentes em 25,5, 66,4 e 7,95 por cento nesta fração respectivamente (fig.15 do anexo I).

Considerando que o produto obtido da planta em estudo foi em pequena quantidade (110 mg; 0,032% da planta seca) e extremamente difícil de separá-los, optou-se pela aquisição do Estigmasterol[28] e  $\beta$ -sitosterol[29] para avaliar qual composto seria o responsável pela atividade analgésica e possíveis modificações estruturais.

Os resultados mostraram que tanto o estigmasterol [28] como o  $\beta$ -sitosterol [29] apresentaram praticamente a mesma atividade analgésica (fig.27-31 do anexo I) e que devido a semelhança estrutural, provavelmente o campesterol[30] apresente atividade semelhante.

Uma vez que o estigmasterol foi mais fácil de se obter comercialmente, este foi estudado com mais profundidade. Este composto apresentou importante efeito analgésico, quando administrado intraperitonealmente, no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, contudo o stigmasterol foi menos ativo quando administrado oralmente (fig.27 A e B do anexo I).

No modelo de dor causada pela formalina, o estigmasterol apresentou efeito antinociceptivo em ambas as fases de dor com inibição da primeira fase (dor neurogênica) e da segunda fase (dor inflamatória), respectivamente (fig.28 e 29 do anexo I). No entanto, este composto não reduziu o edema provocado pela formalina na pata do camundongo (fig.30 C do anexo I), sugerindo que não possui atividade antiinflamatória.

### **3.5.1 - Correlação estrutura-atividade**

Na tentativa de correlacionar a estrutura química com atividade farmacológica visando melhorar a atividade analgésica, foram realizadas algumas modificações na estrutura do, estigmasterol.

Assim, a dupla ligação foi epoxidada e tetrabromada e o grupo hidroxila foi oxidado, acetilado e benzoilado (fig.5).

Analisando os dados farmacológicos dos compostos modificados a acetilação do estigmasterol aumentou o efeito analgésico (fig.36 A e B do anexo I), apresentando uma  $DI_{50}$  de 9 mg/kg,ip e IM de 58% no modelo de dor induzida pelo ácido acético. Além disso, este derivado foi ativo em ambas as fases da dor

provocada pela formalina apresentando uma  $DI_{50} > 60$  mg/kg e  $IM = 38,5\%$  para a primeira fase e  $DI_{50} = 38,5$  mg/kg,  $IM = 75\%$  para a segunda fase respectivamente.

Da mesma forma não afetou o edema de pata causado pela formalina (figs.37-39 A, B e C do anexo I).

Os compostos oxidado, epoxidado, tetrabromado e benzoilado apresentaram na dose de 30 mg/kg,ip, quando analisado no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético forte ação analgésica com inibições de 59, 58,79 e 88% (figs.32-35 do anexo I).

Podemos observar que o composto no qual foram introduzidos os grupos bromo e benzoila, houve uma tendência no aumento da atividade analgésica quando comparado com o estigmasterol[28], abrindo assim, perspectivas para futuras alterações no grupamento benzoila com a introdução de substituintes no anel aromático, permitindo uma análise por correlação estrutura-atividade de quais são os fatores predominantes do efeito analgésico.

Analisando os efeitos das mudanças dos diferentes grupos introduzidos na molécula do stigmasterol[28], foi possível observar que no caso do composto oxidado e epoxidado existe um claro aumento da hidrofobicidade e tendência a diminuição do efeito analgésico com inibição máxima de 59 e 48%.

No caso do grupo epoxi, a dupla ligação tem um valor de constante de fragmento da molécula respeito da medida do coeficiente de partição que indica a hidrofobicidade de -0,55 enquanto que o grupo epoxi é de -1,84 aumentando a hidrofobicidade. Trocando-se o grupo hidroxila (-1,64) pelo grupo cetônico (-1,90) também aumentou ligeiramente a hidrofobicidade. Nos casos dos compostos acetilado, benzoilado e bromado existe um aumento da hidrofobicidade como se indica a seguir:

Ao substituir o grupo hidroxila(-1,64) pelo grupo  $-CO_2-$  (-1,49) e  $-CH_3-$  (0,89) passamos para -0,60 aumentando a hidrofobicidade.

Ao trocar o grupo hidroxila (-1,64) pelo grupo benzoila ( $C_6H_5-$ (+1,90 e  $-CO_2-$  aromático (-1,40)) passamos para 0,50 com grande mudança para a hidrofobicidade.

No caso do derivado bromado passamos de uma dupla ligação (-0,55) para dois átomos de bromo ( $2 \times 0,20 = 0,40$ ), ou seja, também há uma mudança para a hidrofobicidade. Com os derivados bromado e benzoilado existe uma clara tendência na atividade mostrando que provavelmente o fator que induz a atividade deve ser possivelmente a hidrofobicidade.

No entanto este fato deve ser confirmado mediante estudos de compostos benzoilados substituídos e outros tipos de substituintes<sup>70</sup>.

Relacionando os dados obtidos para o extrato hidroalcoólico desta planta<sup>6</sup> com aqueles encontrados para os compostos isolados observa-se claramente que estes compostos não são os principais que conferem a atividade analgésica nesta planta, devido ao fato que o extrato bruto apresentou maior atividade analgésica do que os compostos purificados, sugerindo a existência de outros compostos com maior potência analgésica nesta espécie.

Sendo assim, os resultados encontrados para estes fitoesteróis vem de encontro com os obtidos para o extrato hidroalcoólico do *P.corcovadensis*, que apresenta atividade analgésica no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Contudo, os compostos isolados foram menos ativos que o extrato hidroalcoólico do *P.corcovadensis*.

O mecanismo responsável pela ação analgésica destes fitoesteróis são semelhantes aos descritos anteriormente para o extrato desta planta<sup>6</sup>, cuja ação parece não envolver a ativação de receptores opióides (tipo morfina), pelo fato de que o extrato não foi ativo no modelo de Tail flick (modelo sensível para a morfina) e o efeito não foi revertido pela naloxona. Por outro lado, também não inibiu o edema de pata causado pela formalina, já que a iodometacina, que atua interferindo a síntese de prostaglandina (tipo aspirina), diminuiu<sup>6</sup>.

## CAPÍTULO IV

### IV - PRINCIPAIS CONCLUSÕES

O presente trabalho sugere que:

1) O isolamento do composto PC-17(estigmasterol) e testes farmacológicos indicam que além deste, existem outro(s) composto(s) ativo(s) nesta planta porém em baixas concentrações.

2) A atividade demonstrada pelo composto conforme indicam as figuras não é dose-dependente.

3) Os efeitos das mudanças dos diferentes grupos introduzidos na molécula do stigmasterol está em parte relacionado com a hidrofobicidade.

4) A maior atividade do composto benzilado indica que modificações estruturais com introdução de um grupo aromático são importantes e possibilitam no futuro, aplicação de outros métodos de correlação estrutura-atividade.

5) A não inibição do edema de pata induzido pela formalina, indica que o composto isolado não é antiinflamatório, cujo mecanismo de ação apresenta o mesmo perfil demonstrado pelo extrato hidroalcoólico do *P. corcovadensis*.

A continuação destes estudos podem possibilitar a identificação de compostos extremamente ativos.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1-UGAZ,O.L. Investigação Fitoquímica. Pontifica Universida Católica del Chile, fondo editorial. 1<sup>a</sup>ed. (1988).
- 2 -RAMAKRISHANAN, P.N. A study of hypolycemic action of Phyllanthus niruri L. Indian.J.Pharm. 31: 175(1969).
- 3 - MORTON, J.F. Atlas of Medicinal Plants of Middle America., Charlas C.Thomas, Springfield. 458-62 (1981).
- 4-SHEAD,A.; VICKERY,K.; PAIKOS,A.; MEDHURST,R.; TREIMAN,J.; DIXON,R.and COSSART, Y. Effects of Phyllanthus plants extracts on duck hepatitis B virus in vitro and in vivo. Antiviral Research. 18: 127-38 (1992).
- 5-THYAGARAJAN, S.P.; SUBRAMANIAN,S.; THIRUNALASUNDARI,T.; VENKATESWARAN, P.S. and BLUMBERG, B.S. Effects of Phyllanthus amarus on chronic carriesof hepatitis B virus. Lancet.1: 764 (1988).
- 6-GORSKI, F.; CORREA, C.R.; CECHINEL FILHO,V.; YUNES, R.A. and CALIXTO,J.B. J.Pharmacy & Pharmacol.(in press) (1993).
- 7 - CORREA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, editora Guanabara, v.5.p.562-3 (1974).
- 8-AWONTERS, R.; NIEMEGER, C.J.& JANSSEM, A.J. Pharmacology of auttidiarrheal drugs. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 23: 279-301 (1983).
- 9-UNANDER, W.D.; VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I. and BLUMBER, B.S. Inibicion dela ADN Polimerasa viral dependiente de virus hepatitis B por especies de Phyllanthus,efectos geneticos y ambientales sobre esta atividade. Brinesia. 34: 27-40 (1991).
- 10-HAICOUR, M.R. Comparaison chez Phyllanthus urinaria de l'activité antibactériene des decoctions de diverses portions de la plante et de cultures de tissus qui ou provient. C.R.Acad.Sc.Paris, t.278 série D 3322-25 (24 de junho de 1974).

- 11-BALBACK, J.B. Flora nacional na medicina doméstica. São Paulo, A edificação do lar, p. 915 vol. 2.
- 12-KRISHANAMURTI, G.V.& SESHARDRI, T.R. Bitter principal of Phyllanthus niruri, L. Proc. Indian Acad. sci. 24A: 357-64 (1946).
- 13-FREISE, F.W. Essential oils from Brazilian Euphorbiaceae. Perfumery Essent Oil Record. 26: 219-20 (1935).
- 14-BACCHI, R.M.& OLIVEIRA, F. Caracterização química da droga e do extrato fluido de Phyllanthus tenellus Robx., Quebra-pedra. An. Farm. Qui. 23: (1-2), 19-27 (1983).
- 15-CRISTIANI, L.D.; AMORIM, J.L. Estudo Botânico del Phyllanthus sellowianus (Sarandi Blanco). Rev. Farm. (Buenos Aires) 114: 84 (1972).
- 16-SYAMASUNDAR, K.V.; SINGH, B.; HUSAIN, A.; KISO, Y. and HIKINO, H. Antihepatotoxic principles of Phyllanthus niruri herbs. J. Ethnopharmacol. 14: (1) 41 (1985).
- 17-CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. Glossary of Indian medicinal plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India, Vol.1, 330 (1956).
- 18-VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S; Effects of an extract from Phyllanthus niruri on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses. In vitro and in vivo studies. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 274 (1987).
- 19-TYAGARAJAN, S.P.; TIRUNEELAKANTAN, K.; SUBRAMAIAN, S.P.; SUNDARAVELU, T. In vitro inactivation of HBsAg by Elypta alba Hassk and Phyllanthus niruri. J. Med. Res. 76: 124 (1982).
- 20-UGATA, T.; HIGUCHI, M.; MOCHIDA, S.; MATSUMOTO, M.; KATO, A.; ENDO, T.; KAJI, A. and KAJI, M. HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor from Phyllanthus niruri. Aids Research and Human Retrovirus. 8: (11), 1937-44 (1992).

- 21-YEH, S.F.; HONG, C.Y.; HUANG, Y.L.; LIU, T.Y.; CHOO,K.B.; CHOU, C.K.  
Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface Antigen Gene Expression in Human hepatoma cells. Antivirus Research. 20: (3), 185-192 (1993).
- 22-CALIXTO,J.B.; YUNES. R.A.; NETO, A.S.; VALE, M.R.M. and RAE, G.A.  
Anti-spasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*, a comparative study with papaverine, Brazilian. J.Med.Biol.Res. 17: 313-21 (1984).
- 23-YUNES, R.A.; Calisto, J.B.; GIACOMOZZI, C.A.; TRIBIEN, H.A. Avaliação Fitoquímica e perfil Farmacológico do *Phyllanthus niruri*. XXXIX Congresso Nacional de Botânica. Belém do Pará. Pará, 24-31 de janeiro de 1988.
- 24-SANTOS, D.R. Chá de Quebra-pedra(*Phyllanthus niruri*) na Litíase Urinária em Humanos e em Ratos. Tese de Doutorado.Escola Paulista de Medicina, São Paulo-SP, 1990.
- 25-ADASIDA, G. A.; GIRGIS, P. and TAYLOR, D.A.H. Friedelin derivatives from *Phyllanthus muellerianus*. Phytochemistry. 11: 851-52 (1972).
- 26-SENGUPTA, P.and MUKHOPADHYAY, J. Triterpenoids of *Phyllanthus acidus* skeels. Phytochemistry. 5: 531-34 (1986).
- 27- MULCHANDANI, N.B.; HASSARAJANI, S.A. Planta Medica. 50: 104 (1984).
- 28-TEMPESTA, M.S.; CORLEY,D.C.;BEUTLER, J.A.; METRAL, C.J.; GIACOMOZZI, C.A.; YUNES, R.A. and CALIXTO, J.B. J. Nat. Prod. 3: 617-18 (1988).
- 29-HNATYSZYN, O.; FERRARO, G, and COUSSIO, J.D. A biflavonoid from *Phyllanthus sellowianus*. J. Nat. Prod. 50: 6: 1156-57 (1987).
- 30-NARA, T.K.; GLEYE, J.; CERVAL,E.L. et STANILAS, E. Plantas Medicinales et Phytotherapie. Tome XI, Nº2 p. 82-86 (1977).

- 31-HUANG, Y.L.; CHEN, C.C. and OU, J.C. Isotetralin a new lignan from *Phyllanthus niruri*. Planta Med. 58:473-74 (1992).
- 32-ROW, L.R. and SRINIVASULU. New lignans from *Phyllanthus niruri* LINN - The constitution of Phyllanthin. Tetrahedron 22: 2899-2908 (1966).
- 33-MATSUNAGA, S.; TANAKA, R.; TAKAOKA, Y.; IN, I.; ISHIDA, T.; RAHMANI, M. and ISMAIL, H.H.B. 26 NOR-D. A friedooleanane triterpenes from *phyllanthus watsonii*. Phytochemistry. 32: 165-170 (1993).
- 34-TANAKA, R. and MATSUNAGA, S. Triterpene dienois and other constituents from the bark of *Phyllanthus flexuosus*. Phytochemistry. 27: (7) 2273-77 (1988).
- 35-HNATYSZYN, O.; FERRARO, G. Phyllanthol from *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae). Planta Med. 5: 467 (1985).
- 36-HNATYSZYN, O.; FERRARO, G. and COUSSIO, J.D. *Phyllanthus selowianus* MUELL. ARG. (Euphorbiaceae). Aislamiento de una cumarina. XII Congreso Latinoamericano de Quimica-Buenos Aires - Argentina. P.576 (1990).
- 37-GUPTA, D.R.; and AHMED, B. Nirurin: A new prenilated flavanone glycoside from *Phyllanthus niruri*. J.Nat.Prod. 47:(6) 958-63 (1984).
- 38-PETCHNAREE, P. and BUNYAPRAPHATSARA, B. X-ray crystal and molecular structure of nirurine, a new alkaloid related to the securinega alkaloid skeleton from *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae). J.Chem.Soc.Perkin Trans I, 1551-56 (1986).
- 39-JOSHI, B. and GAWAD, D.H. Isolation and structure (X-ray analyses) of Ent-Norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus niruri*. J.Nat. Prod. 49: (4) 614-20 (1986).
- 40-MULCHANDANI, N.B. and hassarajani, s.a. 4-metoxi-nor-securinine. A new alkaloid from *Phyllanthus niruri*. BIO-Organic Division Bhabha Atomic Research Centre. Trombay-400085-India. Reports pp.104.

- 41-BHADDBHADE, M.M.; SUBBA, G.S.R.and VENKATESAN, K. Concerning hipophyllanthin. Tetrahedron Letters 21: 3097-98 (1980).
- 42-GANESHPURE, P.A.; SCHNEIDERS, G.E. and STVENSON, R. Structure and sinteses of hipophyllanthin, nirtetralin, phyltetralin and lintetralin. Tetrahedron Letters 22: 393-96 (1981).
- 43-HUANG, Y.L.; CHEN, C.C.and OU, J.C. Isolintetralin. A new lignan from *Phyllanthus niruri*. *Planta Med.* 58: 473 (1992).
- 44-CHAUCHAN, J.S. and SUHAN,S.K. J.Indian. Chem.Soc. 56: 1326 (1979).
- 45-SINGH, B.; AGRAWAL, P.K. and THAKUR, R.S. An aciclic triterpen from *Phyllanthus niruri*. Phytochemistry 28: (7) 1980-81 (1989).
- 46-ISHIMA, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA,H.and SHIMOMURA, K. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. Phytochemistry 31:(6) 2015-18 (1992).
- 47-JOLY, A.B. Introdução a Taxonomia Vegetal. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 398-406 (1967).
- 48-HOLM-NIELSEN, L.B. Comments on the distribution and evaluation of the genus *Phyllanthus*(Euphorbiaceae). Tropical Botany Academic.Press. New York, 277-290 (1979).
- 49-WEBSTER, G.L. A monographic study of the west indian species of *Phyllanthus*. J.Arnold. Arbor. 37: 91-212 (1956).
- 50-DI STASI, C.L. Plantas Mediciniais da amazonia. editora unesp, p.123, S!ao Paulo, 1989.
- 51-UNANDER, W.D.; WEBSTER,G.I.and BLUNBERG, B.S. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). J.Ethnopharmacology. 30: 233-64 (1990).

- 52-SMITH, B.L.; DOWNS, J.R. and KLEIN, M.R. Flora Ilustrada Catarinense. vol. EUFO, p.408, 1988.
- 53-KOROLKOVAS, A. Química Farmacêutica. editora Guanabara Dois S.A Rio de Janeiro-RJ, p. 84-217, 1982.
- 54-GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica. 8ª ed. editora Guanabara Koogam. Rio de Janeiro-RJ, p.421-447, 1991.
- 55-COLLIER, H.O.J.; DINNEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br.J.Pharmacol. 32: 295-310 (1986).
- 56-D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss pain sensation. J.Pharmacol. 72: 74-79 (1941).
- 57-PIZZOLATTI, M.G. Constituintes químicos de velósias brasileiras e reatividade de derivados. Tese de Doutorado, UFRJ. Rio de Janeiro, P.174, 1992.
- 58-MOREIRA . E.A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *lobelia hassleri* A. Zarhlb e *lobelia stefedli*. Trib.Farm. 47: (1) 12-23 (1979).
- 59-DOMINGUES, X.A. Método de investigacion fitoquímica. México, Lamusa S.A., 141, 1973.
- 60-IKAN, R. Natural Products. A laboratory guide, 2a ed. p.122, 1976.
- 61-KNAPP, F.F.; GOAD, L.J. and GOODWIN, T.W. Phytochemistry, 16: 1677-81 (1977).
- 62-COREY, E.J. and SCHIMIDT, . Useful procedures for the oxidation of alcohols involving Pyridinium Dichromate in aprotic media. Tetrahedron Letters. 9: 399-402 (1979).
- 63-HEYI, F.W. and HERR, M.E. J.Am.Chem.Soc. 75, 1918-20 (1953).

- 64-CECHINEL FILHO, V. Modificação da Estrutura Molecular da Xantoxilina e estudo da atividade farmacológica dos dos derivados. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis- SC,1991.
- 65-NISHIOKA, I. YAGI, A. and TSUKAMOTO, T. Studies on the plants sterols and triterpenes. J. Chem. Pharm.bull. 13 (3), 379-384 (1965).
- 66-MIGUEL, O.G. Componentes químicos da sebastiania schottiana MUELL ARG, Hipóteses sobre a correlação entre a estrutura e atividade farmacológica. Tese de Mestrado,UFSC, Florianópolis-SC, 1987.
- 67-KUBALA, T. and STELLA, R. Components from the herb *cnicus benedictus*. Roczniki Chem. 39, 869-73 (1965).
- 68-KINGSTON, D.G.I. The chemistry of taxol. Pharmac.Ther. 52: 1-34 (1991).
- 69-POUCHERT, C.J. The Aldrich Library of NMR Spectra. Edition II, Vol.2 p.909D (1983).
- 70- HANSCH, C. and LEO, A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. Jonh & Sons, New York - USA - pag.13-18, 1979.