



Figura II.101. Espectro de IV da substância 15 (Canferol)

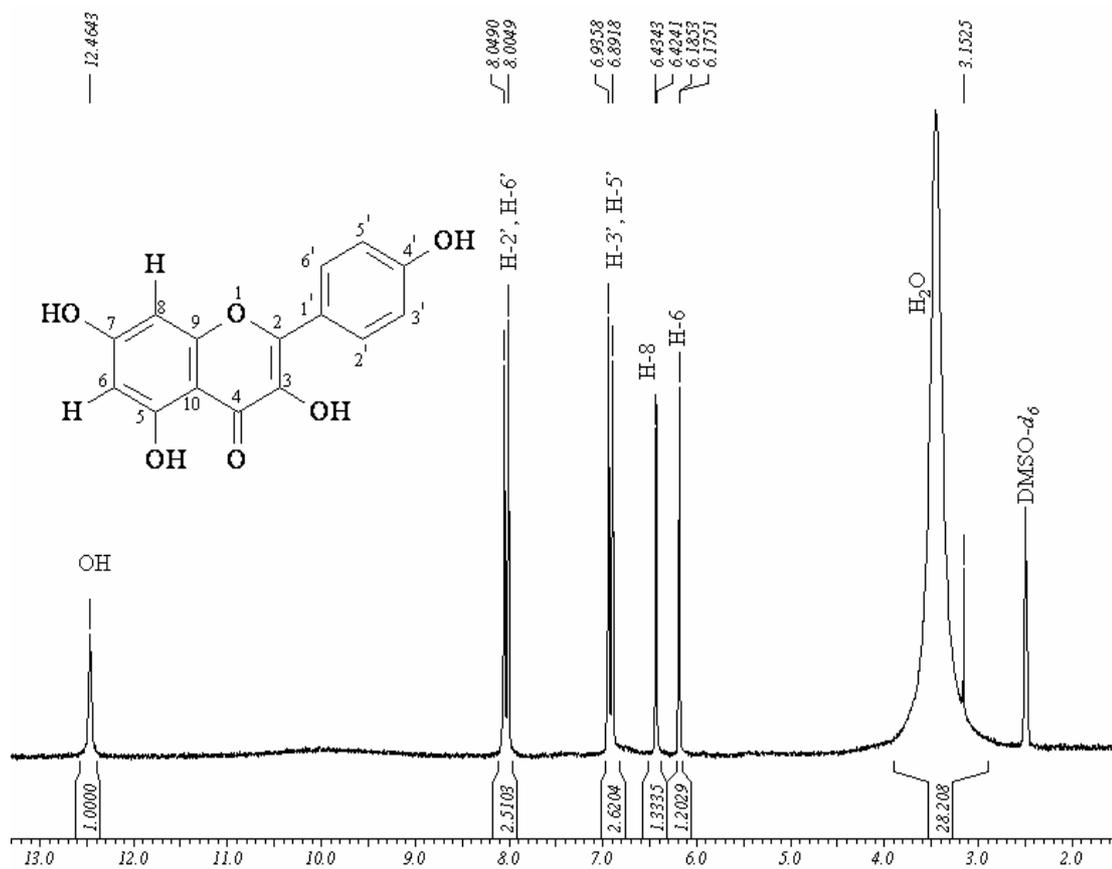


Figura II.102. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) da substância 15 (Canferol)

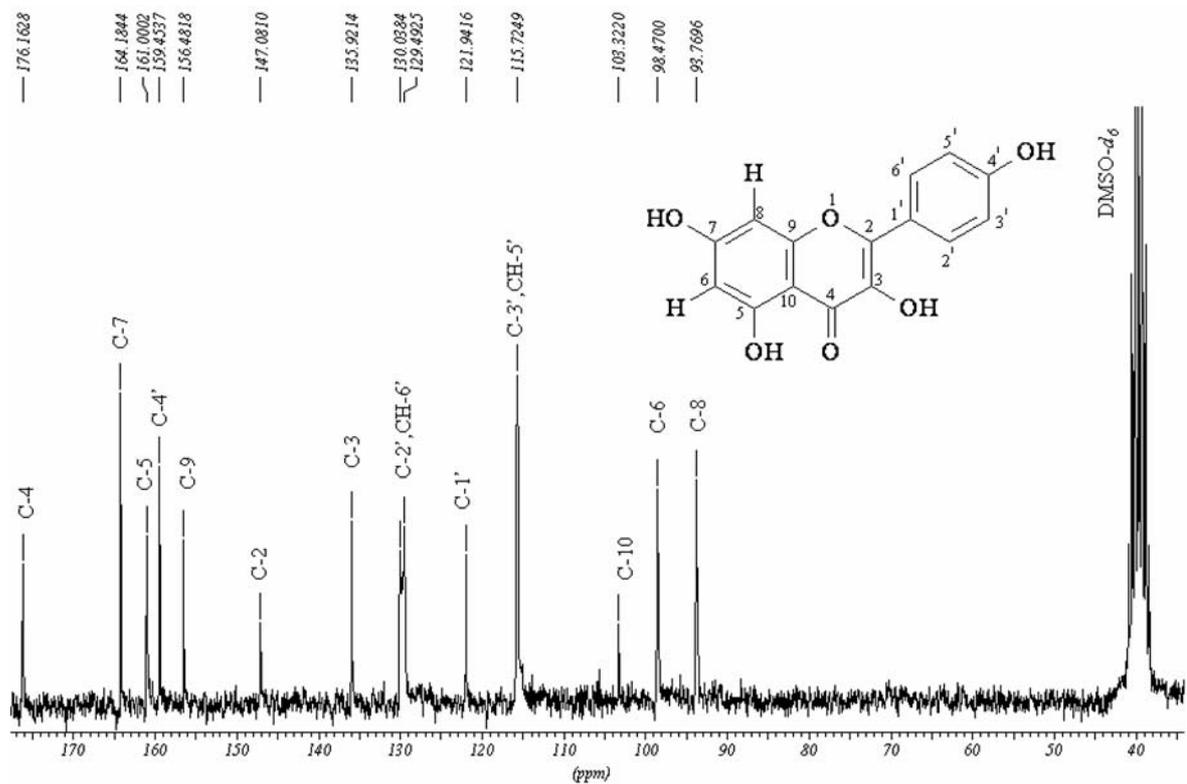


Figura II.103. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **15** (Canferol)

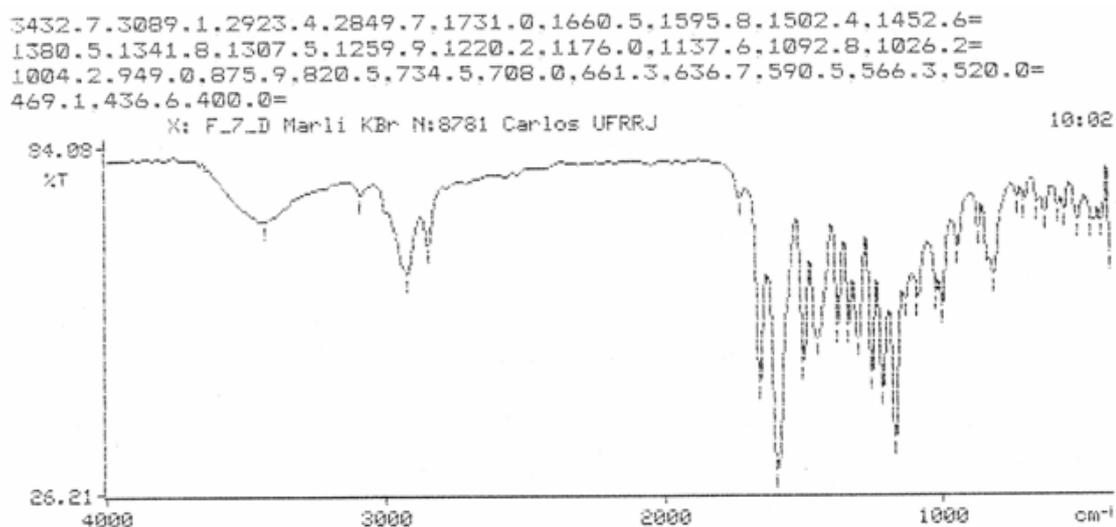


Figura II.104. Espectro de IV da substância **15a** (3,7,4'-trimetil-canferol)

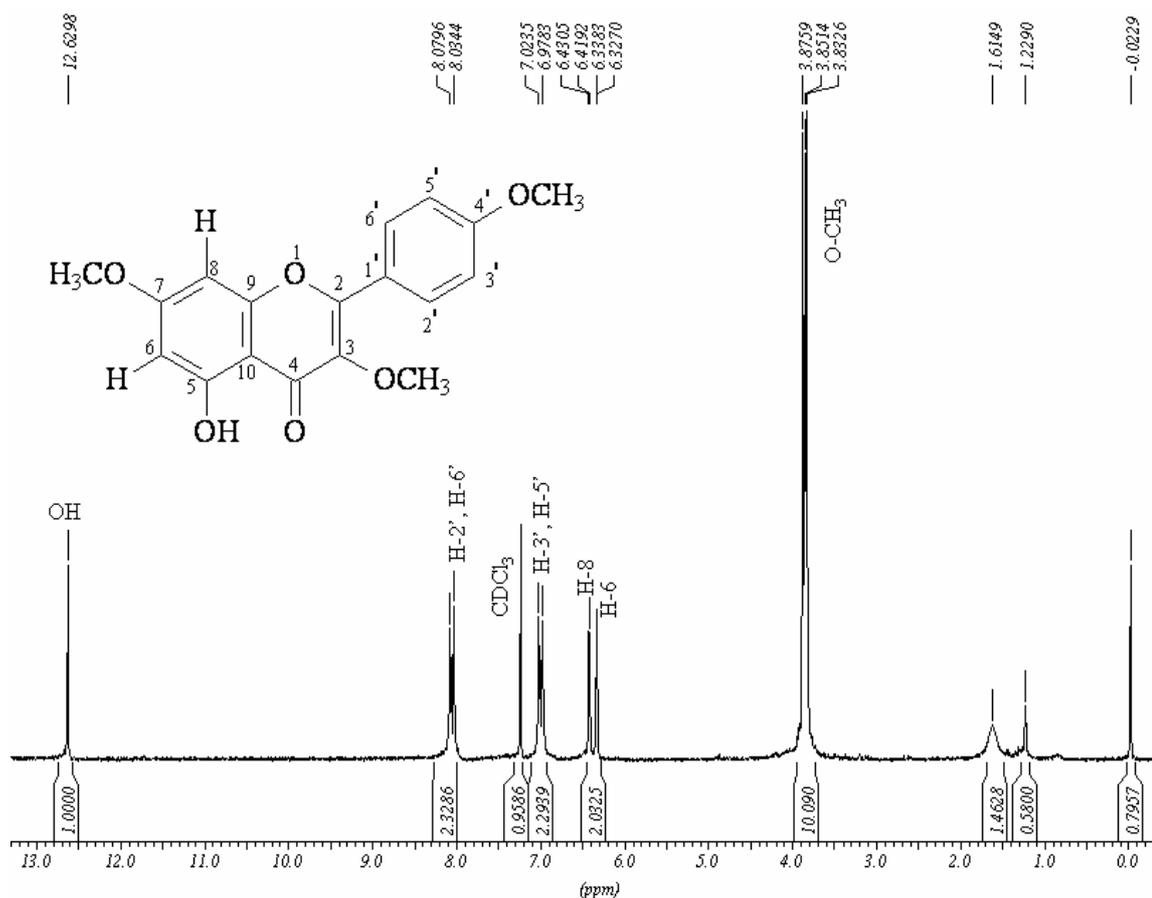


Figura II.105. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **15a** (3,7,4'-trimetil-canferol)

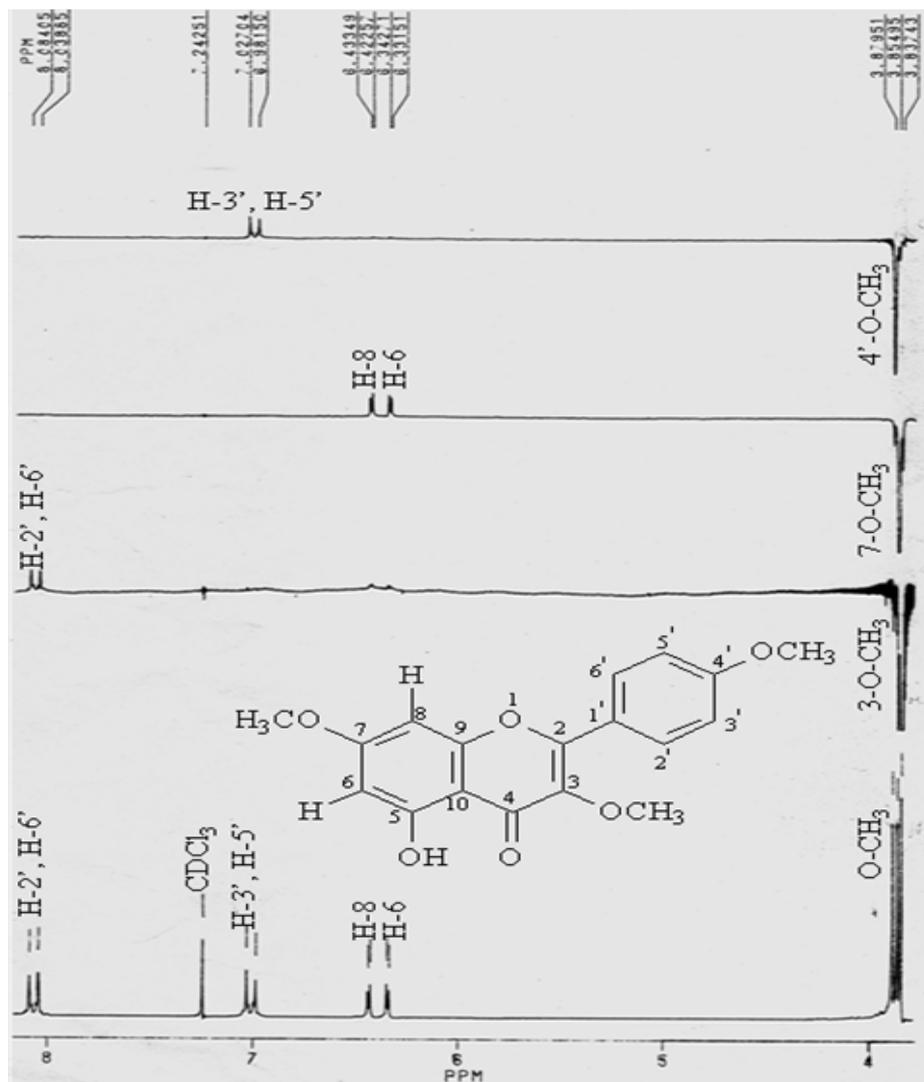


Figura II.106. Espectro de RMN NOE (200 MHz, CDCl₃) da substância **15a** (3,7,4'-trimetilcanferol)

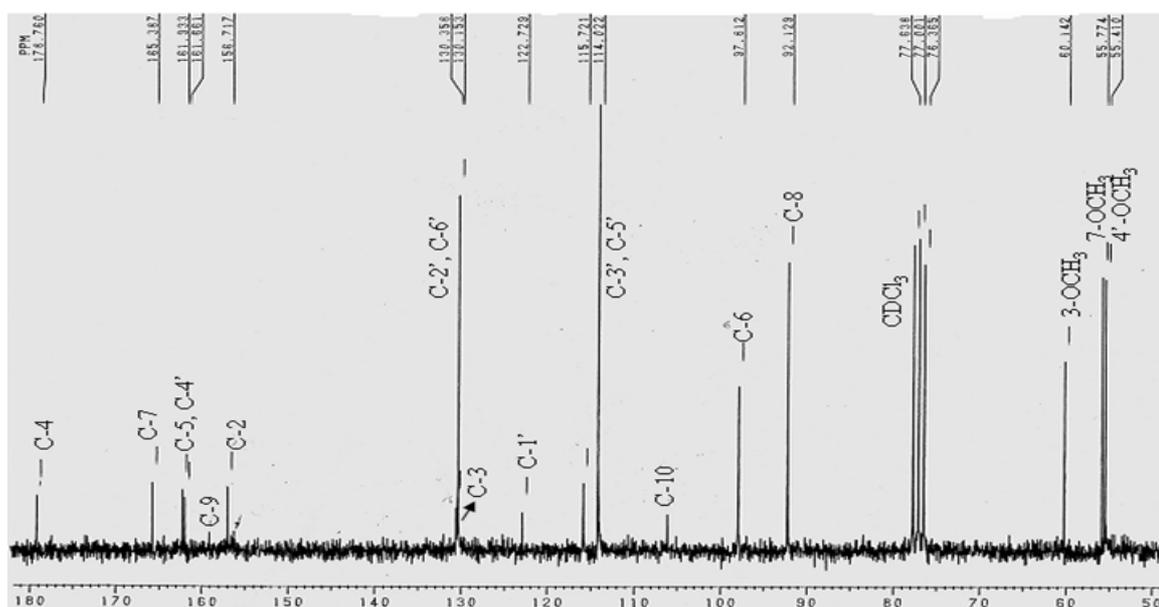


Figura II.107. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) da substância **15a** (3,7,4'-trimetilcanferol)

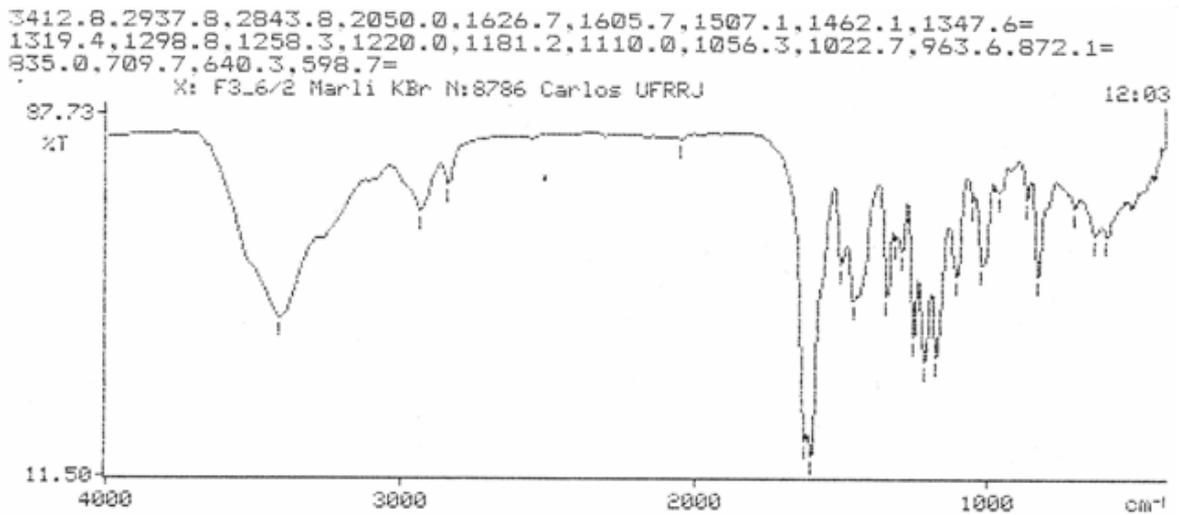


Figura II.108. Espectro de IV da substância **15b** (3,5,7,4'-tetrametil-canferol)

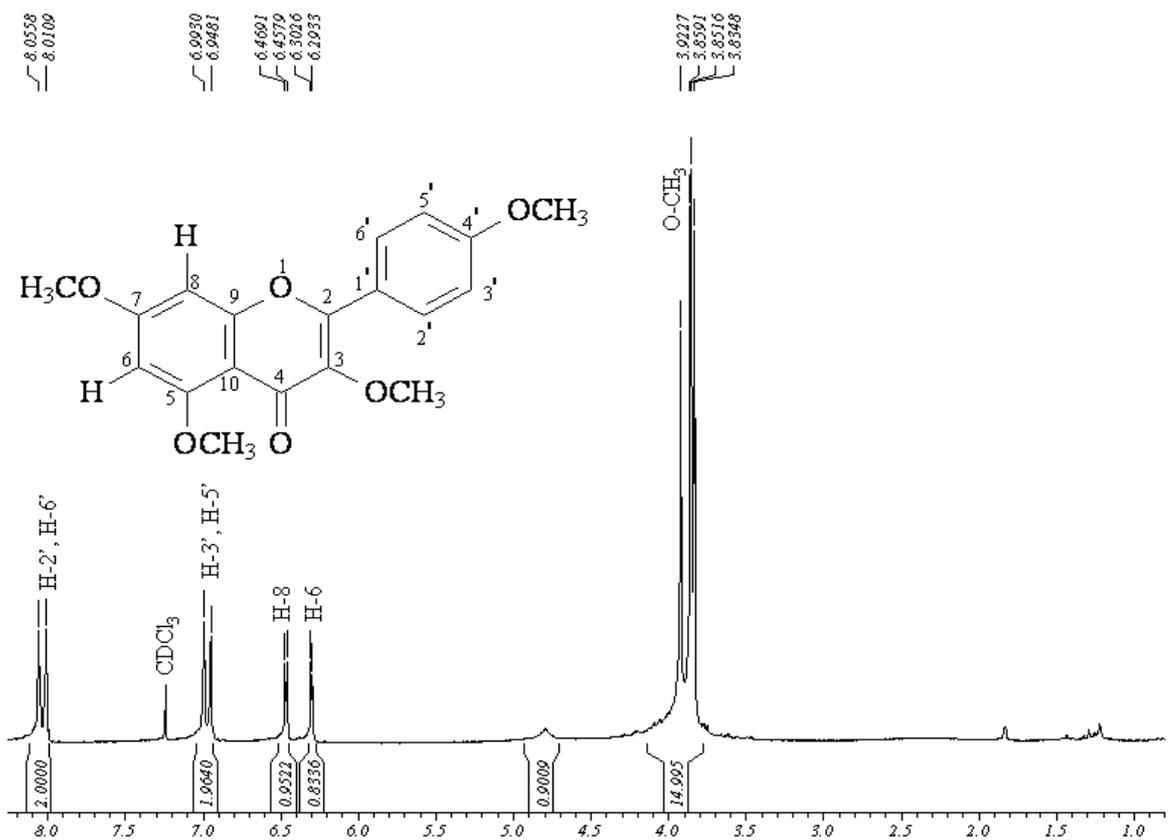


Figura II.109. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **15b** (3,5,7,4'-tetrametil-canferol)

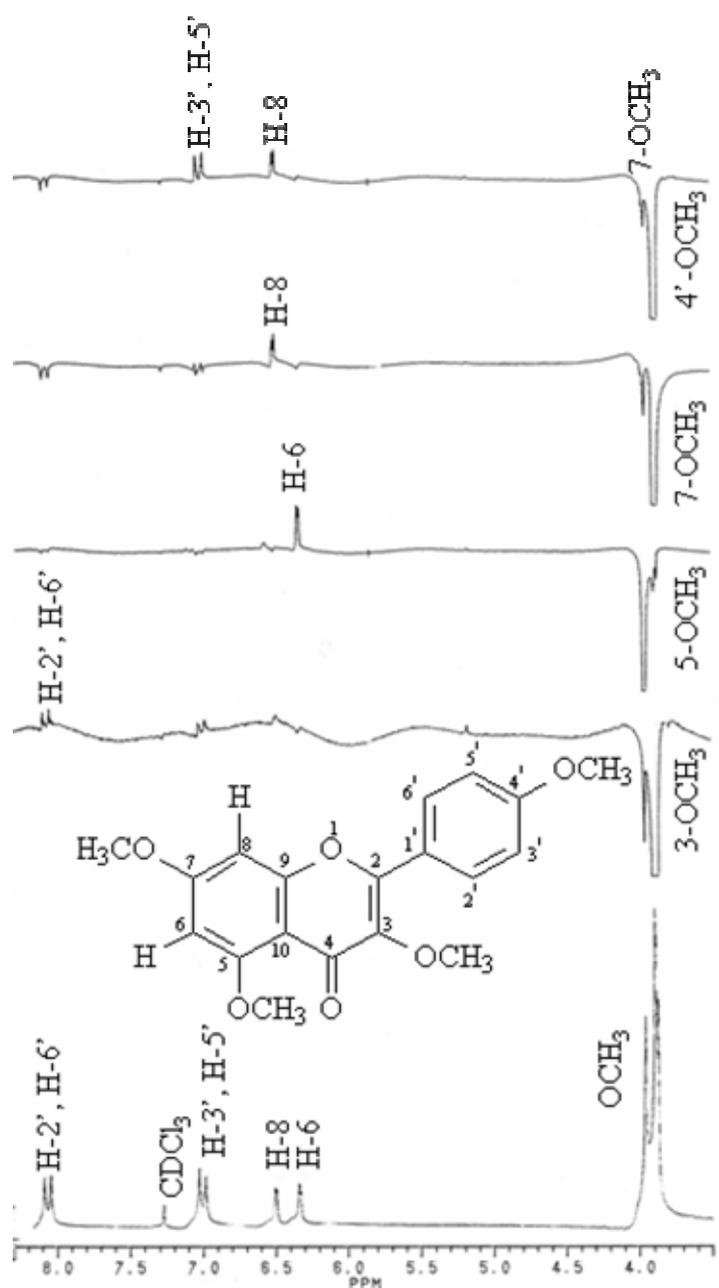


Figura II.110. Espectro de RMN NOE (200 MHz, CDCl₃) da substância **15b** (3,5,7,4'-tetrametil-canferol)

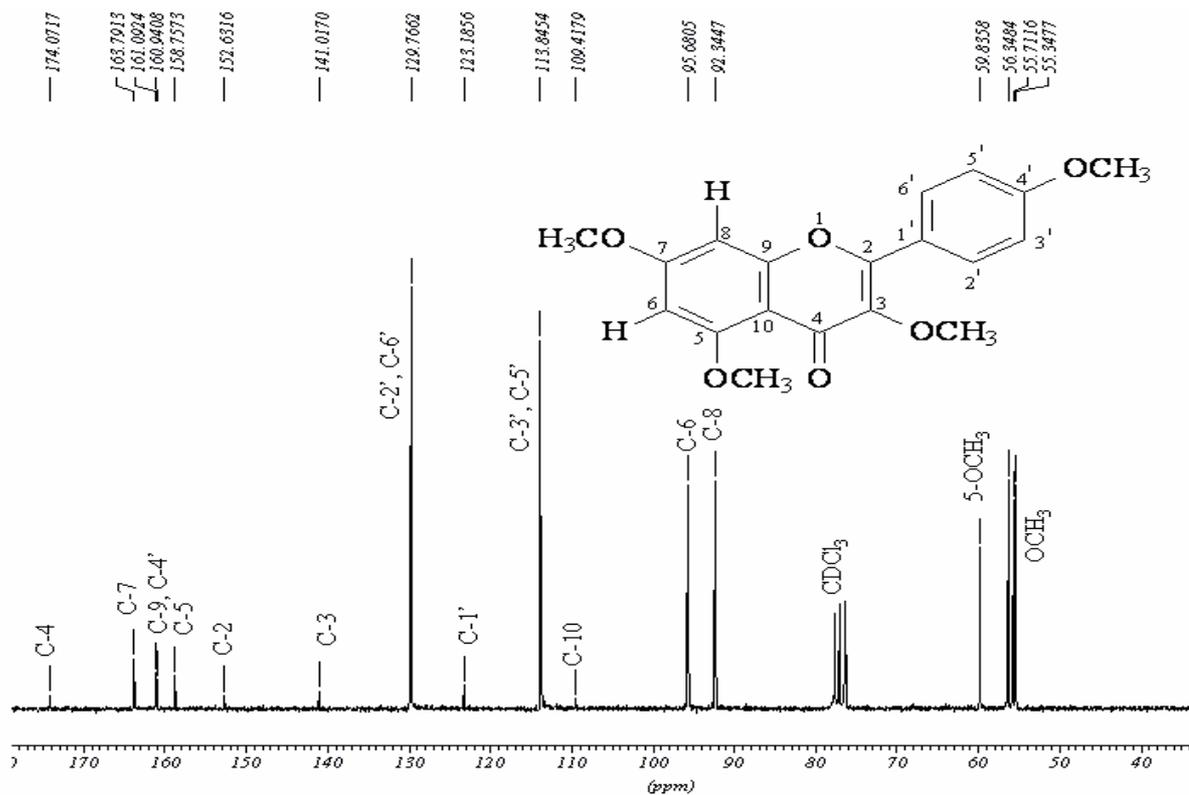


Figura II.111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **15b** (3,5,7,4'-tetrametil-canferol)

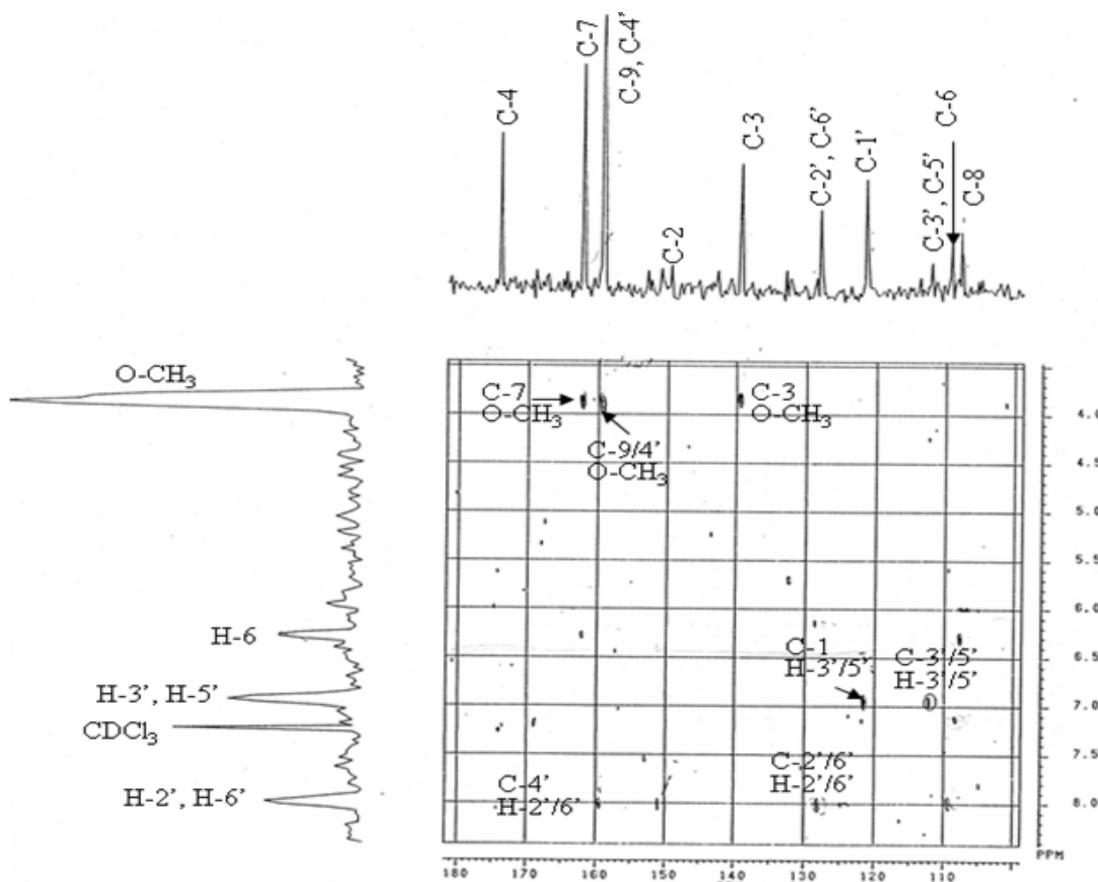


Figura II.112. Espectro de RMN COLOC (^{13}C - 50 MHz, ^1H - 200 MHz, CDCl_3) da substância **15b** (3,5,7,4'-tetrametil-canferol)

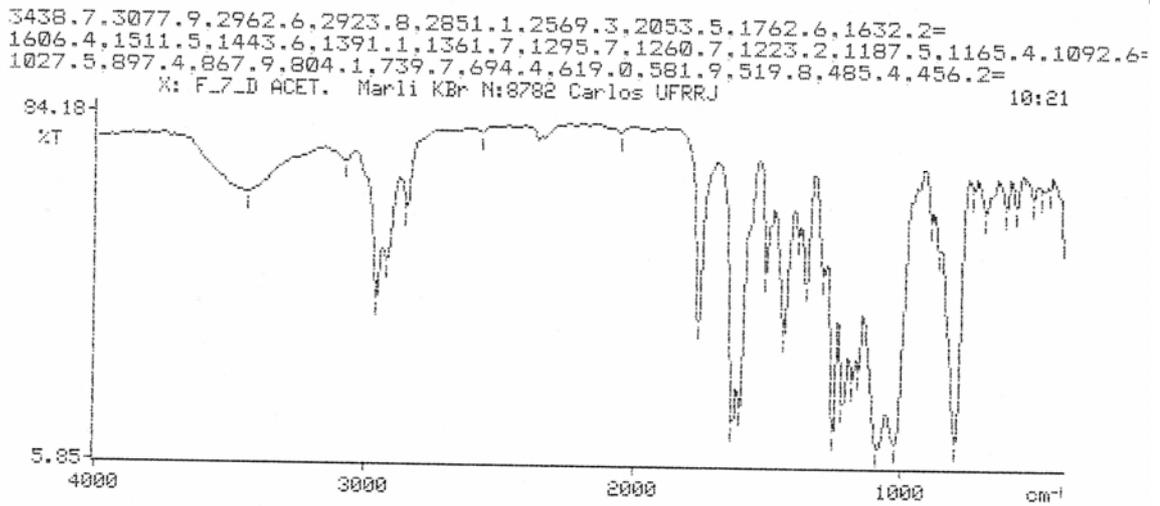


Figura II.113. Espectro de IV da substância **15c** (3,7,4'-trimetil-5-acetoxiflavonol)

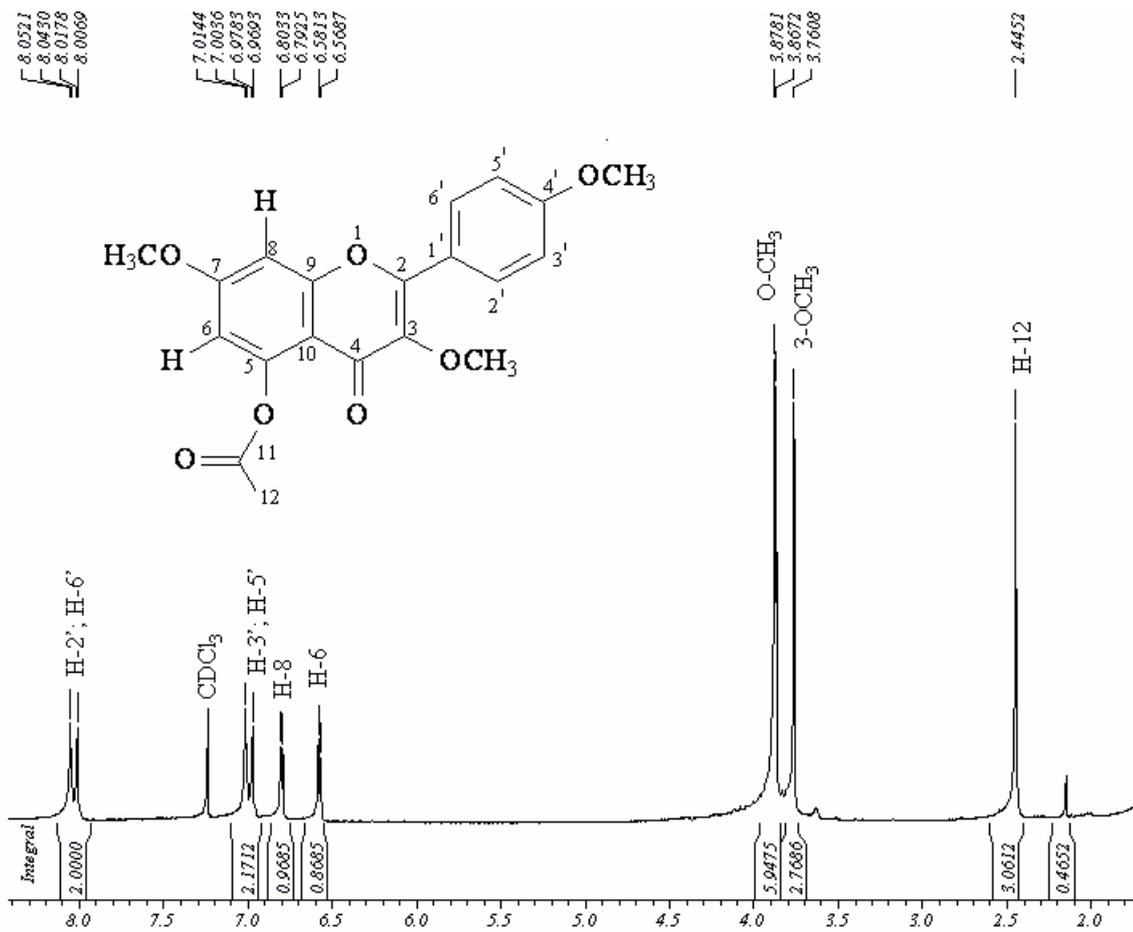


Figura II.114. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **15c** (3,7,4'-trimetil-5-acetoxiflavonol)

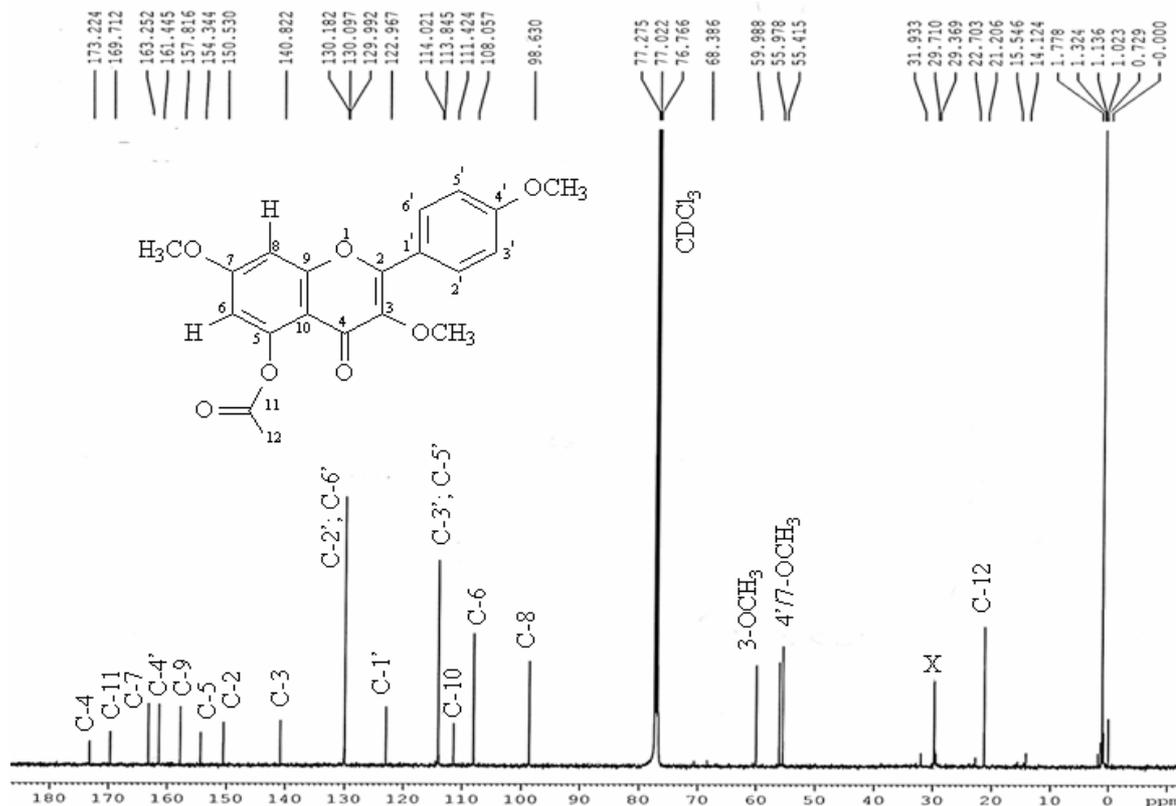


Figura II.115. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **15c** (3,7,4'-trimetil-5-acetoxiflavanol)

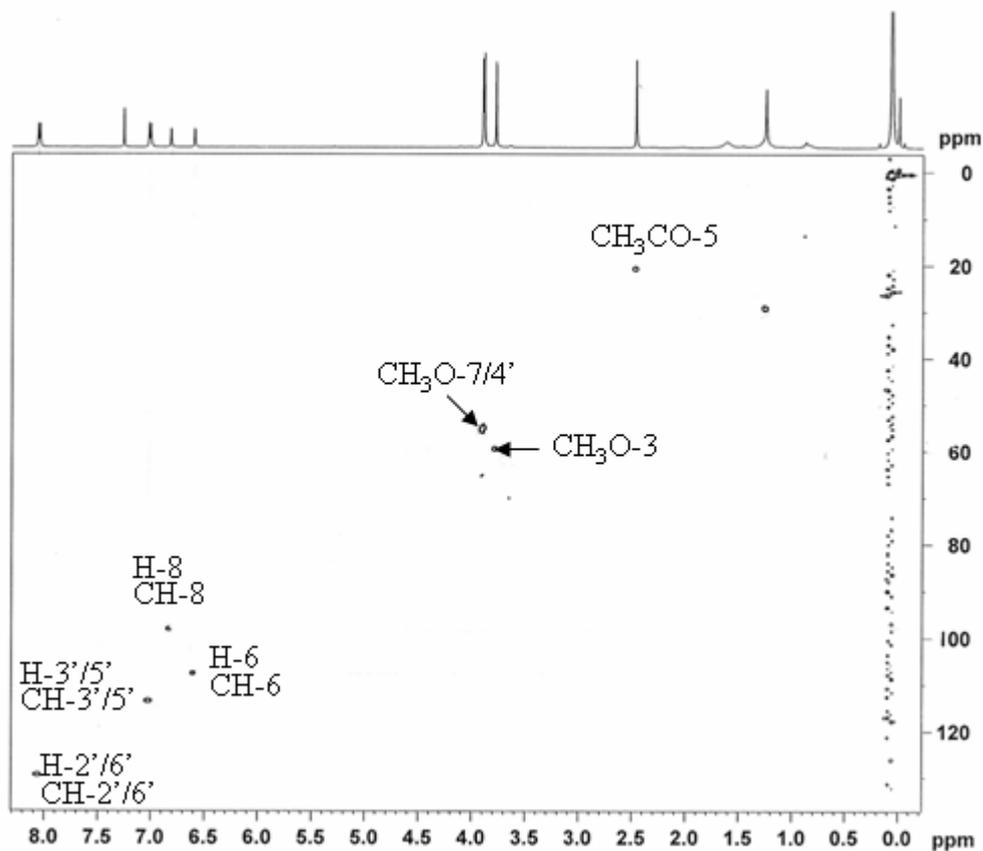


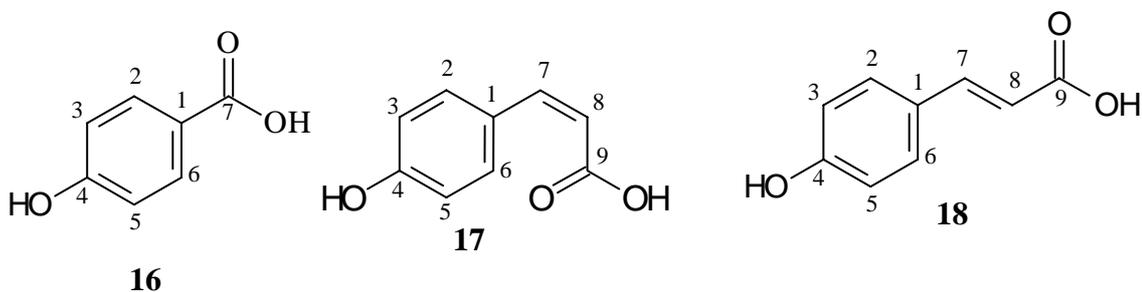
Figura II.116. Espectro de RMN HMQC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, CDCl_3) da substância **15c** (3,7,4'-trimetil-5-acetoxiflavanol)

II.3.6 Determinação estrutural da mistura das substâncias 16 com os isômeros 17 e 18

A substância **16** foi identificada em mistura com os isômeros **17** e **18**. Os espectros de RMM ^1H (Figura II.117, pág. 197) e ^1H - ^1H -COSY (Figura II.118, pág. 197) mostram sinais de hidrogênios aromáticos para **16** em δ_{H} 7,76 (1H, d, 8,5 Hz) acoplando com um dubleto em δ_{H} 6,80 (1H, d, 8,5 Hz), para **17** em δ_{H} 7,50 (1H, d, 9,0 Hz) acoplando com um dubleto em δ_{H} 6,78 (1H, d, 10,5 Hz) e para **18** em δ_{H} 7,60 (1H, d, 9,0 Hz) acoplando com um dubleto em δ_{H} 6,71 (1H, d, 10,5 Hz). Os sinais em δ_{H} 6,58 (1H, d, 13,8 Hz) acoplando com δ_{H} 5,71 (1H, d, 13,8 Hz) foram atribuídos a dupla ligação em *cis* (*Z*) de **17** e o sinal em δ_{H} 7,45 (1H, d, 15,0 Hz) acoplando com δ_{H} 6,29 (1H, d, 16,0 Hz) para dupla ligação em *trans* (*E*) de **18**.

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura II.119, pág. 198), DEPT (Figura II.120, pág. 198) e HMQC (Figura II.121, pág. 199) asseguram que a substância **16** é o ácido benzóico e a substância **17** e **18** são os isômeros *cis* (*Z*) e *trans* (*E*) respectivamente do *p*-ácido cumárico. A tabela II.12 (pág. 196) mostra os dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C comparados com a literatura (RASMUSSEN *et al.*, 1996).

Tabela II.12. Dados da mistura das substâncias **16** (ácido benzóico), **17** (*cis-p*-ácido cumárico) e **18** (*trans-p*-ácido cumárico) em RMN ^1H (500 MHz) em Metanol- d_4 e ^{13}C (125 MHz) em DMSO- d_6 , comparados com a literatura (RASMUSSEN *et al.*, 1996)



C	16		17		18		(RASMUSSEN <i>et al.</i> , 1996)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	122,06	-	125,32	-	125,32	-	126,7	-
2,6	131,41	7,76 (d, 8,5)	129,91	7,50 (d, 9,0)	131,41	7,60 (d, 9,0)	132,0	7,57 (dm)
3,5	115,0	6,80 (d, 8,5)	115,00	6,78 (d, 10,5)	115,00	6,71 (d, 8,0)	115,0	6,83 (dm)
4	161,41	-	159,53	-	159,53	-	157,3	-
7	167,56	-	144,00	6,58 (d, 14,0)	144,00	7,45(d, 16,0)	143,7	6,86 (d,12,6)
8	-	-	115,00	5,71 (d, 14,0)	115,72	6,29 (d, 16,0)	116,4	5,81 (d, 12,6)
9	-	-	167,56	-	167,56	-	167,56	-

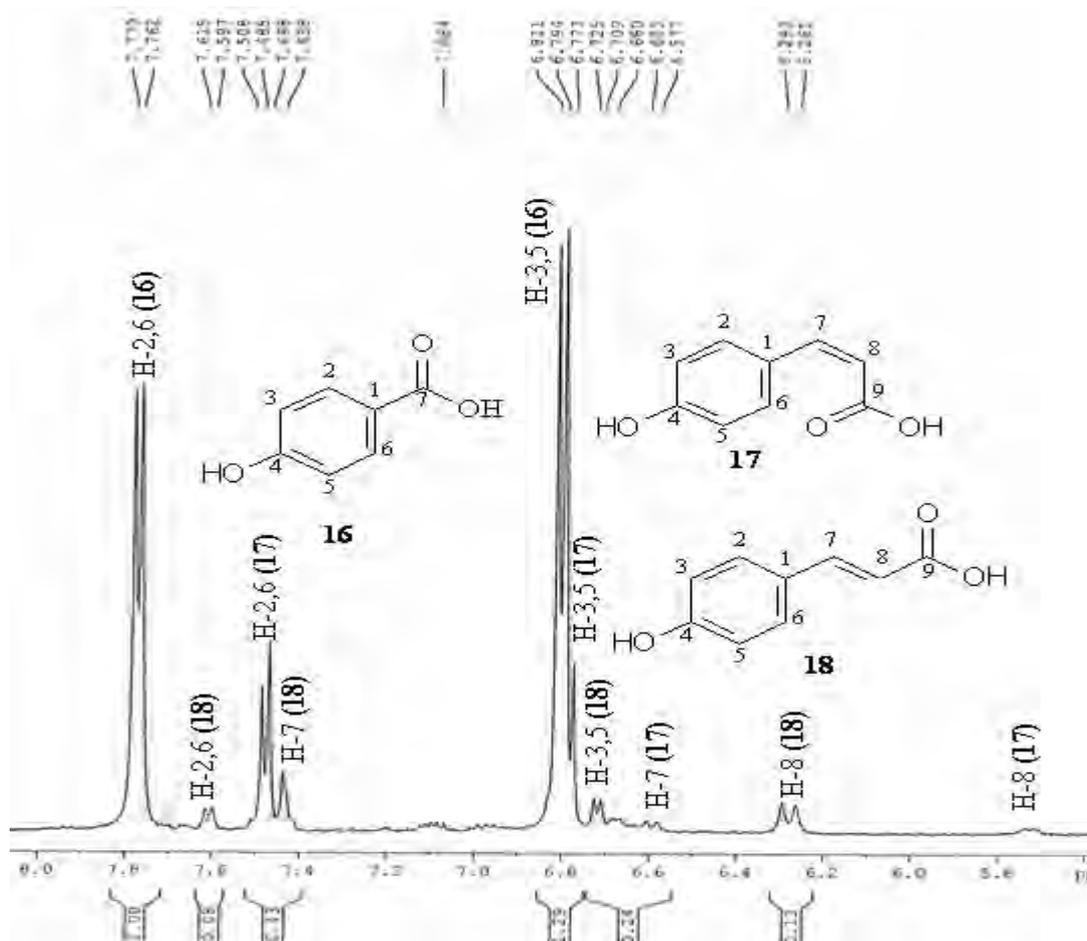


Figura II.117. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Metanol- d_4) mistura das substâncias **16** (ácido benzóico), **17** (*cis-p*-ácido cumárico) e **18** (*trans-p*-ácido cumárico)

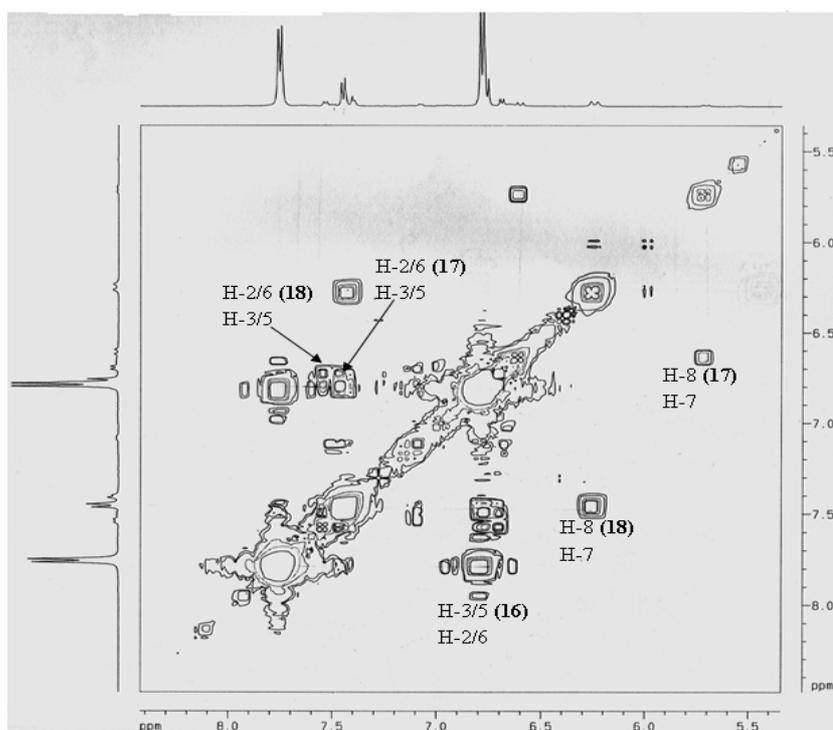


Figura II.118. Espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) mistura das substâncias **16** (ácido benzóico), **17** (*cis-p*-ácido cumárico) e **18** (*trans-p*-ácido cumárico)

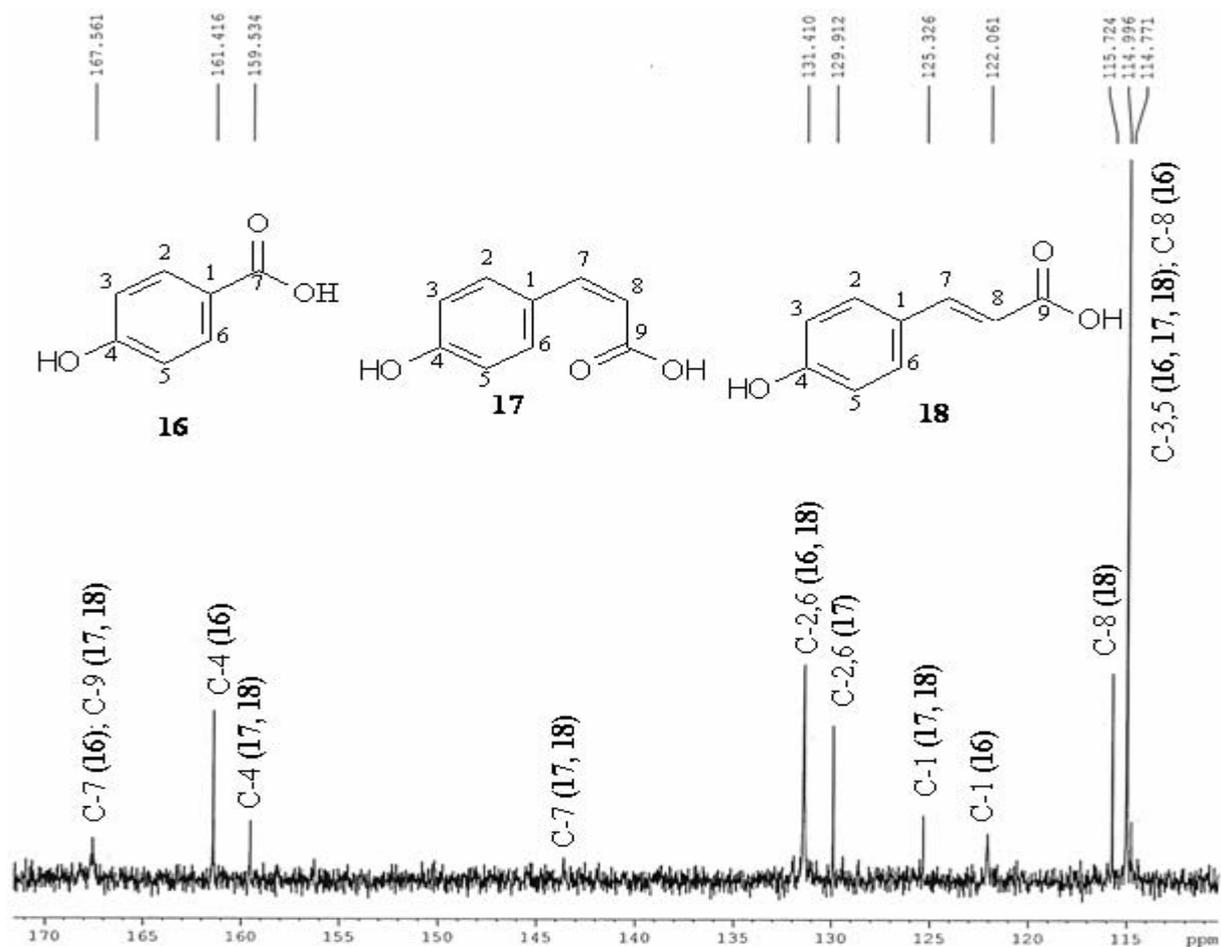


Figura II.119. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O) mistura das substâncias **16** (ácido benzóico), **17** (*cis-p*-ácido cumárico) e **18** (*trans-p*-ácido cumárico)

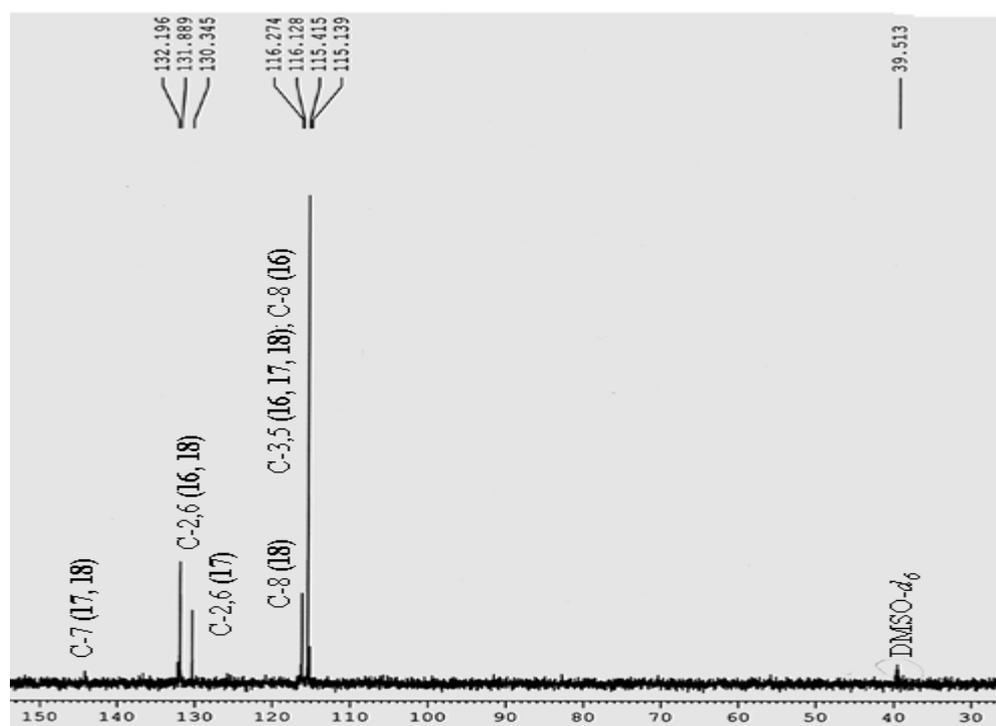


Figura II.120. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta=135^\circ$, 125 MHz, DMSO- d_6) mistura das substâncias **16** (ácido benzóico), **17** (*cis-p*-ácido cumárico) e **18** (*trans-p*-ácido cumárico)

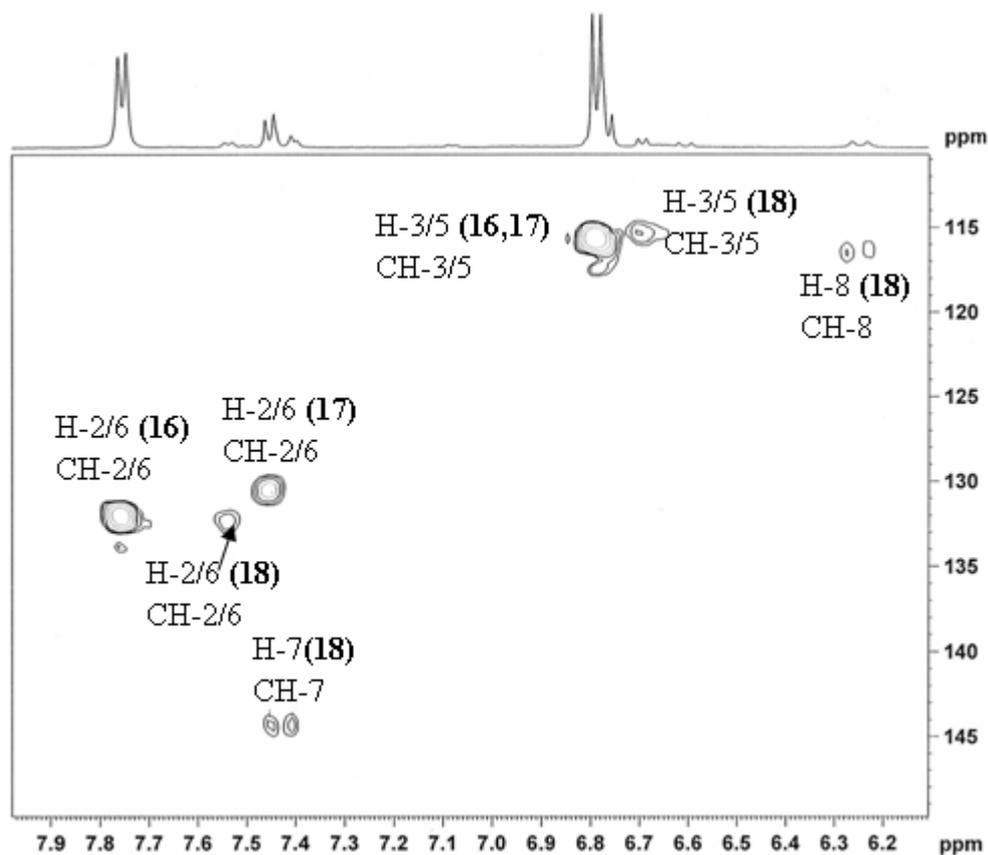
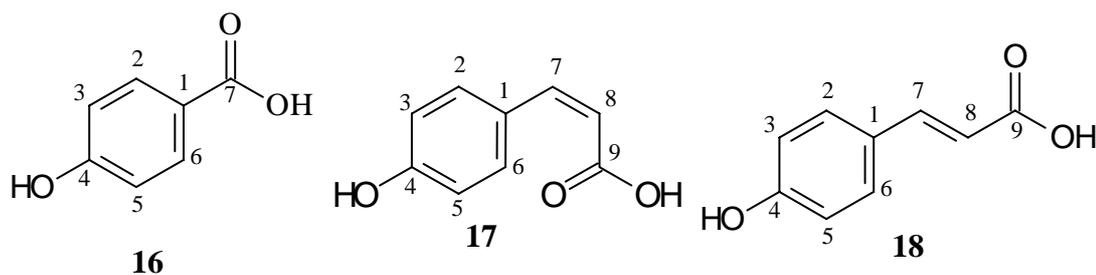


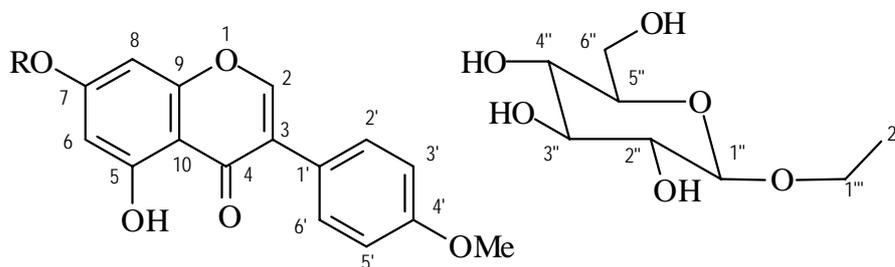
Figura II.121. Espectro de RMN HMQC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) mistura das substâncias **16** (ácido benzóico), **17** (*cis-p*-ácido cumárico) e **18** (*trans-p*-ácido cumárico)



II.3.7 Determinação estrutural da substância 19

O espectro de RMN ^1H de **19** (Figura II.122, pág. 202) apresenta sinais característicos de absorção para isoflavona, tendo sinais para átomos de hidrogênio atribuídos ao sistema AA'BB' do anel B em δ_{H} 7,53 (2H-2'/6', $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 7,02 (2H-3'/5', $J=8,5$ Hz) e sistema AB do anel A em δ_{H} 6,45 e δ_{H} 6,70 referente a H-6 e H-8. Esses sistemas foram confirmados pelo mapa de contorno do espectro ^1H - ^1H -COSY (Figura II.123, pág. 202) através da interação desses sinais. O singlete em δ_{H} 8,45 foi atribuído à H-2 e em δ_{H} 12,95 ao HO-5.

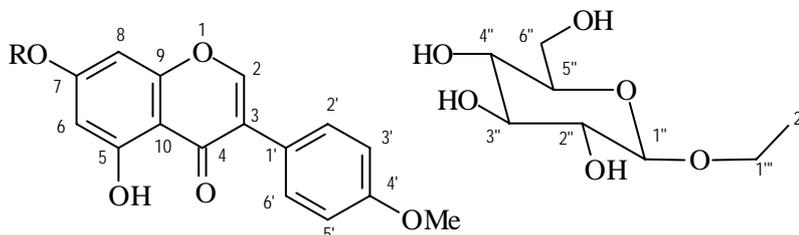
O deslocamento químico dos carbonos CH-3' e CH-5' observados nos espectros de RMN ^{13}C (Figura II.124, pág. 203) e DEPT (Figura II.125, pág. 203) permitiu localizar a metoxila em C-4'. Os sinais de absorção de açúcar representado pelos sinais de hidrogênio (δ_{H} 3,00 a δ_{H} 4,50) que estão ligados a carbono carbinólico na região de δ_{C} 61,00 a δ_{C} 77,00. A unidade de carboidrato poderia ser localizada no C-7. Entretanto, a semelhança dos deslocamentos químicos dos carbonos de **19** com os da biochanina isolada de espécies de *Andira* (SILVA *et al.*, 2000) e a presença dos sinais de um grupo etoxila δ_{CH_2} 63,75 e δ_{CH_3} 15,1 sugeriu propor a mistura do etil-glicosídeo com a isoflavona sustentando o carboidrato em C-7. Os espectros de HMQC (Figura II.126, pág. 204) e HMBC (Figura II.127, pág. 204) permitiram confirmar essa proposta para **19** como sendo a Biochanina A em mistura com unidades carboidratos e contendo predominantemente a unidade Etil-1 β -O-glicopiranosil. A Tabela II.13, pág. 201, apresenta esses valores de deslocamento.



R= unidades carboidráticas.
Mistura contendo predomina-
mente Etil-1 β -O-glicopiranosil

19

Tabela II.13. Dados da substância **19** (mistura de flavonóides glicosilados e derivado etílico da glicose) em RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$, comparados com a literatura (SILVA *et al.*, 2000)



R= unidades carboidráticas.
Mistura contendo predominantemente Etil-1 β -O-glicopiranosil

	HMQC		HMBC		SILVA <i>et al.</i> , 2000	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
Aglicona						
C						
3	122,00	-		H-2'/H-6'	122,80	-
4	181,00	-		H-2	180,49	-
5	162,0	-			163,00	-
7	162,85	-			161,70	-
9	157,00	-		H-2	157,32	-
10	109,88	-			106,24	-
1'	122,50	-		H-2; H-3'/H-5'	122,31	-
4'	159,21	-	H-3'/H-5'	H-2'/H-6', MeO-4'	159,30	-
CH						
2	154,90	8,45 (s)			154,93	8,43 (s)
6	99,74	6,45 (sl)			99,86	6,47 (d, 2,2)
8	94,00	6,70 (sl)			94,69	6,72 (d, 2,2)
2'/6'	130,10	7,53 (d, 8,5)			130,25	7,00 (d, 8,8)
3'/5'	113,73	7,02 (d, 8,5)			113,84	7,52 (d, 8,8)
MeO-4'	55,15	3,80 (s)			55,25	3,78 (s)
OH-5	-	12,95 (sl)				12,90 (s)
Açúcar						
1''	102,57	4,11 (d, 7,5)			99,75	4,05 (d, 7,3)
2''	73,38	2,94			73,10	
3''	76,73	3,15			76,36	
4''	70,05	3,02			69,85	
5''	76,78	3,05			75,59	
6''	67,07	a)3,65; b)3,42			67,76	
1'''	63,75	a)3,82; b)3,50				
2'''	15,11	1,03 (t)				

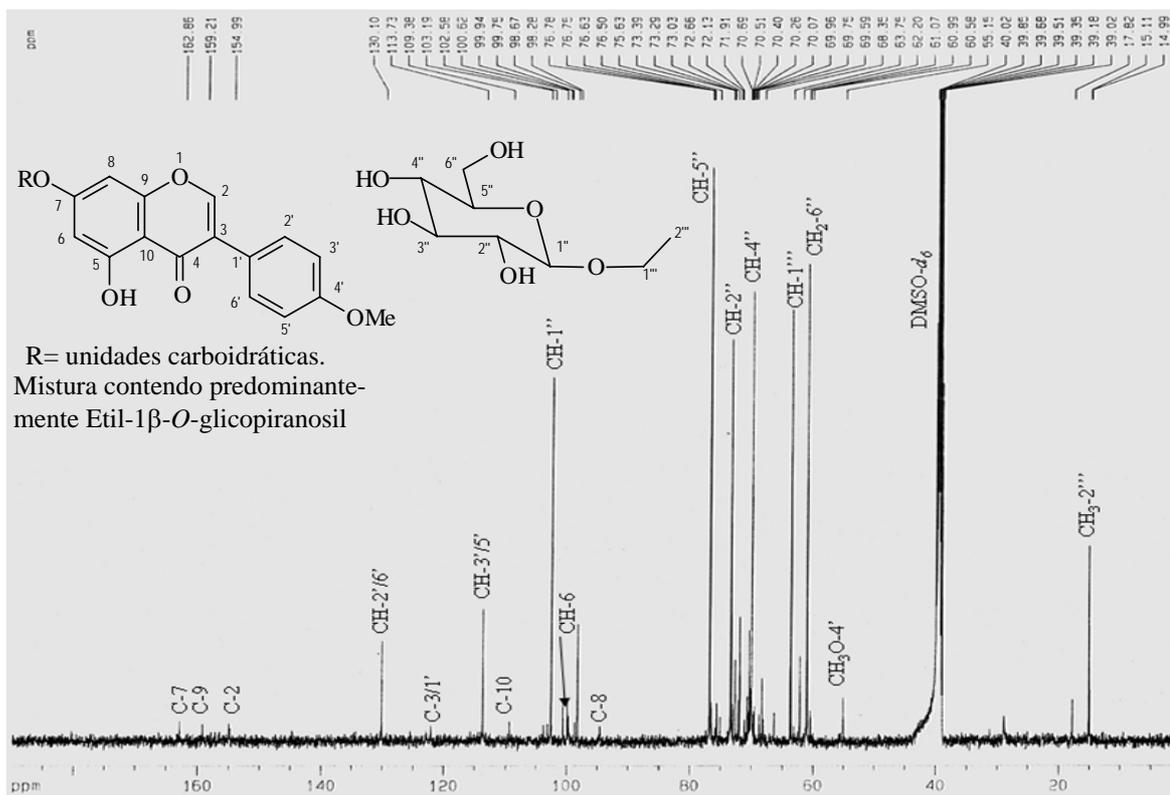


Figura II.124. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **19** (mistura de flavonóides glicosilados e derivado etílico da glicose)

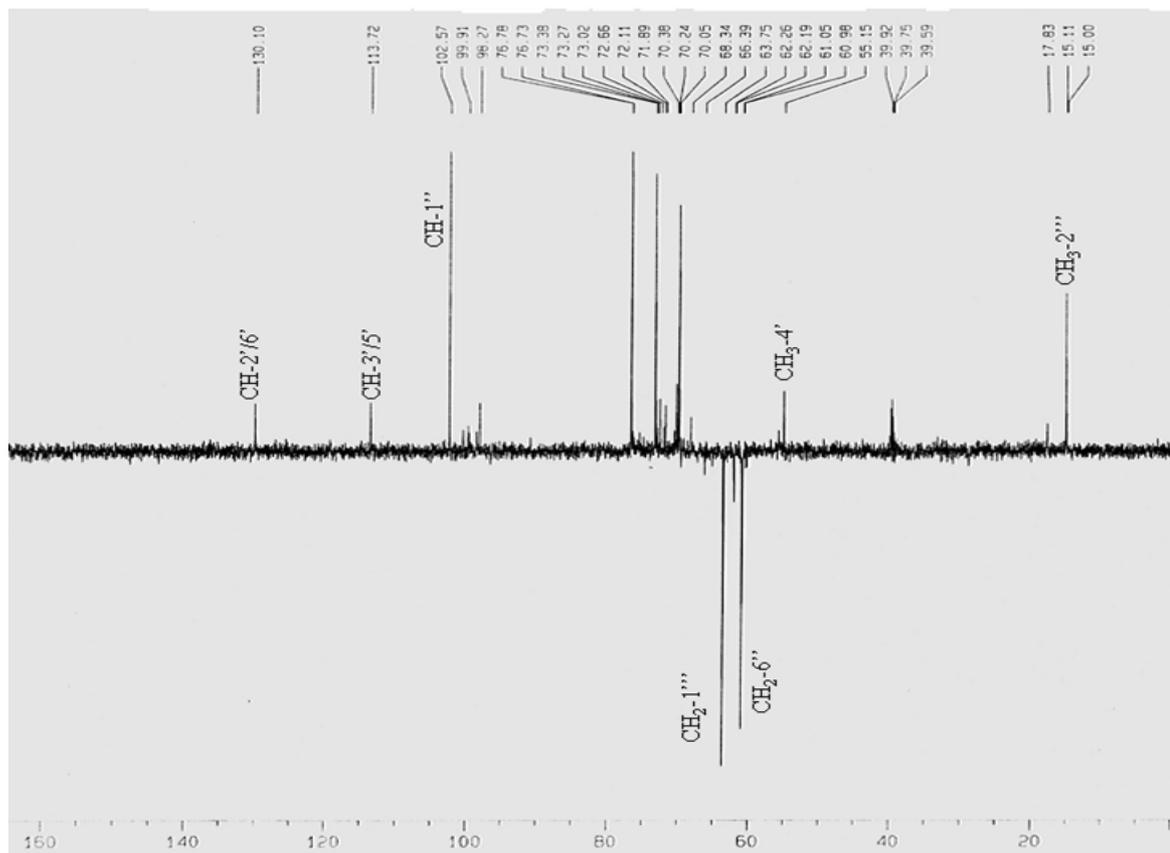


Figura II.125. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta=135^\circ$, 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **19** (mistura de flavonóides glicosilados e derivado etílico da glicose)

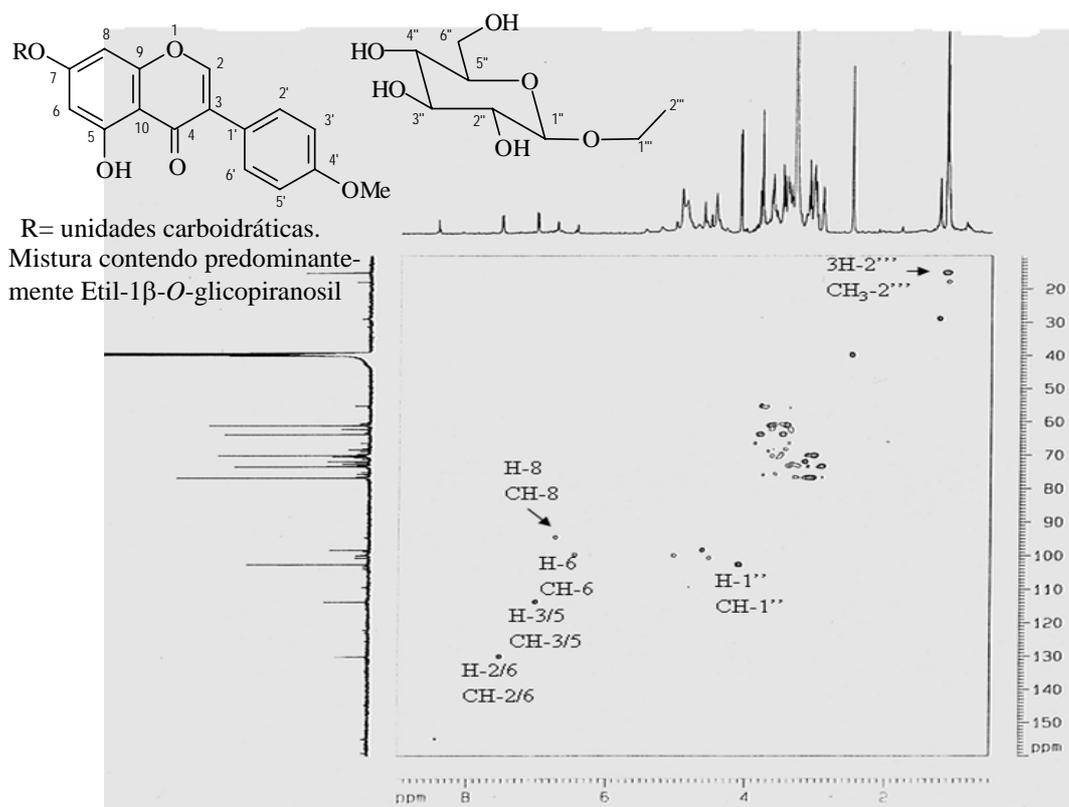


Figura II.126. Espectro de RMN HMQC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **19** (mistura de flavonóides glicosilados e derivado etílico da glicose)

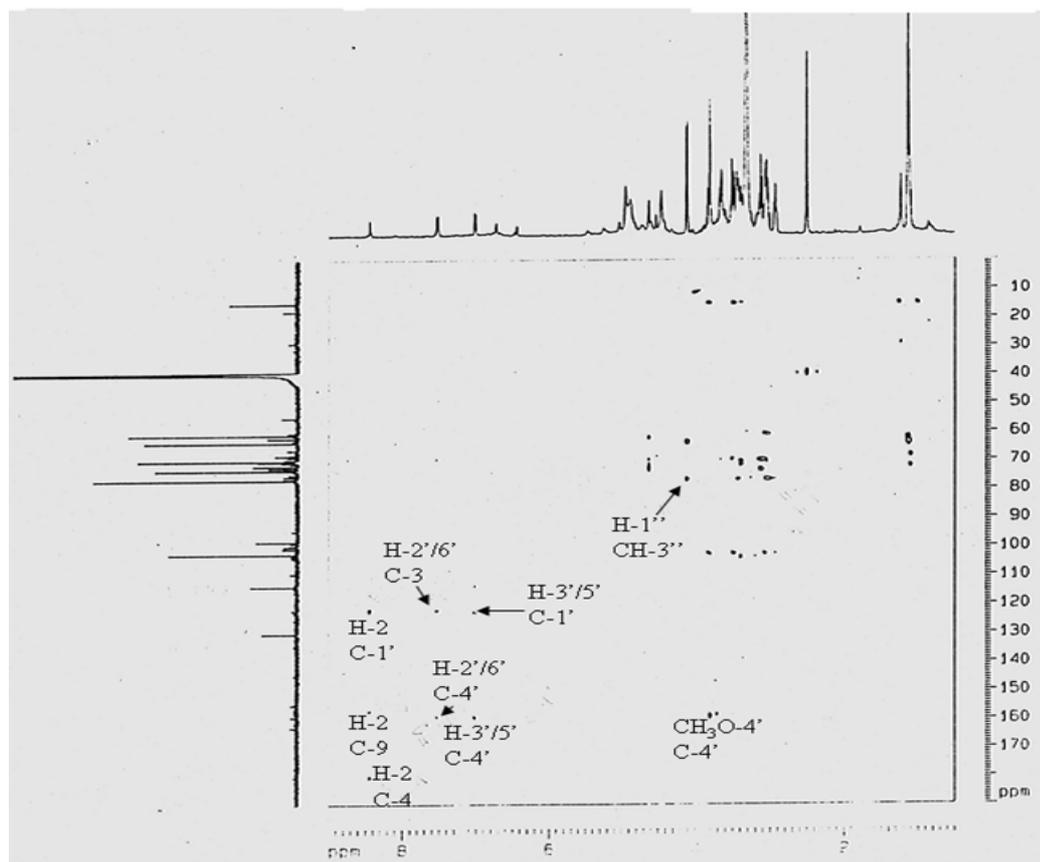


Figura II.127. Espectro de RMN HMBC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **19** (mistura de flavonóides glicosilados e derivado etílico da glicose)

II.3.8 Determinação estrutural da substância 20

O espectro de RMN ^1H (Figura II.128, pág. 207) revelaram sinais de grupo hidroxila em ponte em δ_{H} 12,96 (s) e metoxila em $\delta_{3\text{H}}$ 3,84 (s), sinais para sistema aromático para substituído formando um sistema AA'BB' em δ_{H} 7,53 (H-2'/6', $J=7,5$ Hz) e δ_{H} 7,01 (H-3'/5', $J=7,5$ Hz) e sinais para sistema AB em δ_{H} 6,74 (H-8, sl) e δ_{H} 6,47 (H-6, sl) do anel A. O singlete em δ_{H} 8,44 foi atribuído a H-2, sugerindo assim a presença de uma isoflavona. O espectro $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY (Figura II.129, pág. 207) mostra os acoplamentos nesses sistemas. Esse espectro mostra sinais de absorções para unidades de açúcares destacando sinais em δ_{H} 5,06 (d, 7,5) e δ_{H} 4,83 (s) atribuídos para H-1 de β -glicosil e duas unidades de β -apiosi, respectivamente.

Os sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C (Figura II.130, pág. 208) e DEPT (Figura II.131, pág. 208), HMQC (Figura II.132, pág. 209) e HMBC (Figuras II.133, pág. 210 e II.34, pág. 211) confirmam a estrutura proposta para isoflavona. O deslocamento em δ_{C} 154,92 foi atribuído para CH-2 e δ_{C} 122,24 para C-3. O sinal em δ_{CH_3} 55,20 foi atribuído ao carbono da metoxila ligada no C-4' (δ_{C} 159,24); esta correlação é observada no espectro de HMBC (Figura II.133, pág. 210). Sinal em δ_{C} 180,45 foi atribuído ao carbono da carbonila. Esta análise e comparação com dados da literatura (SILVA *et al.*, 2000) confirmaram essa proposta. A Tabela II.14 (pág. 206), apresentam esses valores de deslocamentos.

Os sinais de CH em δ_{CH} 99,76, δ_{CH} 109,01 e δ_{CH} 109,01 e dois carbonos quaternários em δ_{C} 77,46 e δ_{C} 78,77 além de outros sinais de carbonos de unidades de açúcar ligados a mais de um hidrogênio conduziu a comparação desses valores ao sistema glico-apio-apiosídeo registrado na literatura. O espectro de RMN HMBC (Figura II.133, pág. 210) mostra a ligação da aglicona (δ_{C} 162,97, C-7) com o CH-1'' (δ_{C} 99,76) da glicose, entre o CH-6'' (δ_{C} 67,67) da glicose com o CH-1''' (δ_{C} 109,01) da apiose (Figura II.134A e B, pág. 211) e o CH-5''' (δ_{C} 69,34) terminal da apiose com o C-1'''' (δ_{C} 109,01) da outra apiose (Figura II.134B, pág. 211). Esses dados foram comparados com os divulgados por SILVA *et al.*, 2000 (Tabela II.14, pág. 206).

O espectro de massas de de alta resolução MS/MS (Figura II.135, pág. 212) obtido com ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons positivos mostrou pico para o íon molecular em m/z 733,2082 que foi atribuído a um complexo da substância com o Na^+ ($\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{18} + \text{Na}^+$). O picos m/z 449,1490 e m/z 317,1338 confirmaram a presença de três monossacarídeos sendo uma glicose e duas unidades de apiose. O Esquema II.7 (pág. 213) mostra as propostas de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas de **20**.

As análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com os dados da literatura (SILVA *et al.*, 2000) permitiram determinaram a substância **20** como sendo a isoflavona Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo. Este é o primeiro registro de ocorrência deste flavonóide no gênero *Solanum*.

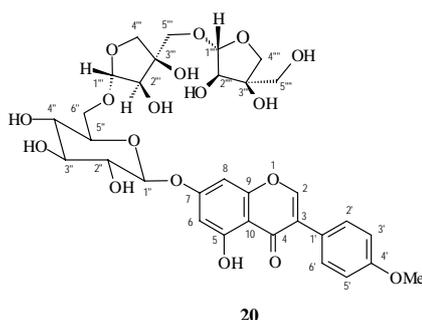
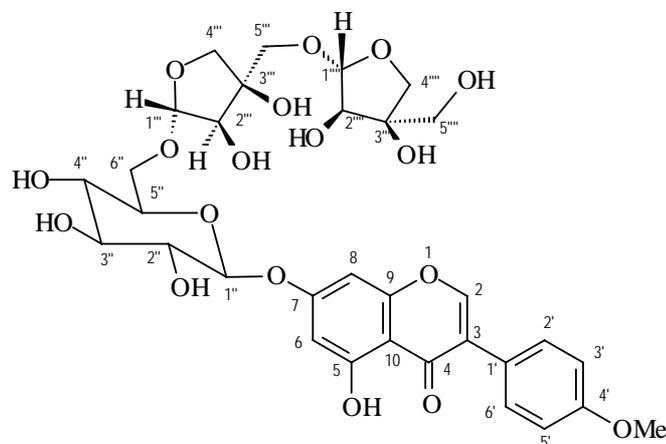


Tabela II.14. Dados da substância **20** [Biochanina A 7-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo] em RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) em DMSO-*d*₆, comparados com a literatura (SILVA *et al.*, 2000)



	HMQC		HMBC		SILVA <i>et al.</i> , 2000	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
Aglicona						
C						
3	122,24	-	H-2	H-2'/H-6'	122,80	-
4	180,45	-		H-2	180,49	-
5	161,65	-			163,00	-
7	162,97	-			161,70	-
9	157,28	-		H-2	157,32	-
10	106,17	-		H-6	106,24	-
1'	122,76	-		H-2; H-3'/H-5'	122,31	-
4'	159,24	-	H-3'/H-5'	H-2'/H-6'; MeO-4'	159,30	-
CH						
2	154,92	8,44 (s)			154,93	8,43 (s)
6	99,67	6,47 (sl)			99,86	6,47 (d, 2,2)
8	94,60	6,74 (sl)			94,69	6,72 (d, 2,2)
2'/6'	130,21	7,53 (d, 7,5)			130,25	7,00 (d, 8,8)
3'/5'	113,71	7,01 (d, 7,5)			113,84	7,52 (d, 8,8)
MeO-4'	55,20	3,84 (s)			55,25	3,78 (s)
HO-5	-	12,96 (s)			-	12,90 (s)
Açúcar						
1''	99,76	5,06 (d, 7,5)			99,75	5,05 (d, 7,3)
2''	73,03	3,28			73,10	
3''	76,36	3,32			76,36	
4''	69,76	3,15		H-6''b	69,85	
5''	75,65	3,80			75,59	
6''	67,67	a)3,87; b)3,45		H-1'''	67,76	
1'''	109,01	4,83 (s)		2H-4'''b; H-6''b	109,09	4,80 (d, 3,1)
2'''	76,25	3,78		H-4'''b; 2H-5'''	75,74	
3'''	77,46	-	H-4'''b; 2H-5'''	H-1'''	77,54	-
4'''	73,40	a)3,90; b)3,62		H-1'''b; H-5'''a	73,49	
5'''	69,34	a)3,55; b)3,40		H-4'''a	69,43	
1''''	109,01	4,83 (s)		2H-4''''b; H-5''''	109,09	4,80 (d, 3,1)
2''''	75,52	3,80		H-4''''b	75,74	
3''''	78,77	-	2H-4''''		78,86	-
4''''	73,40	a)3,86; b)3,58		H-5''''b	73,49	
5''''	63,09	a)3,40; b)3,30		2H-4''''	63,20	

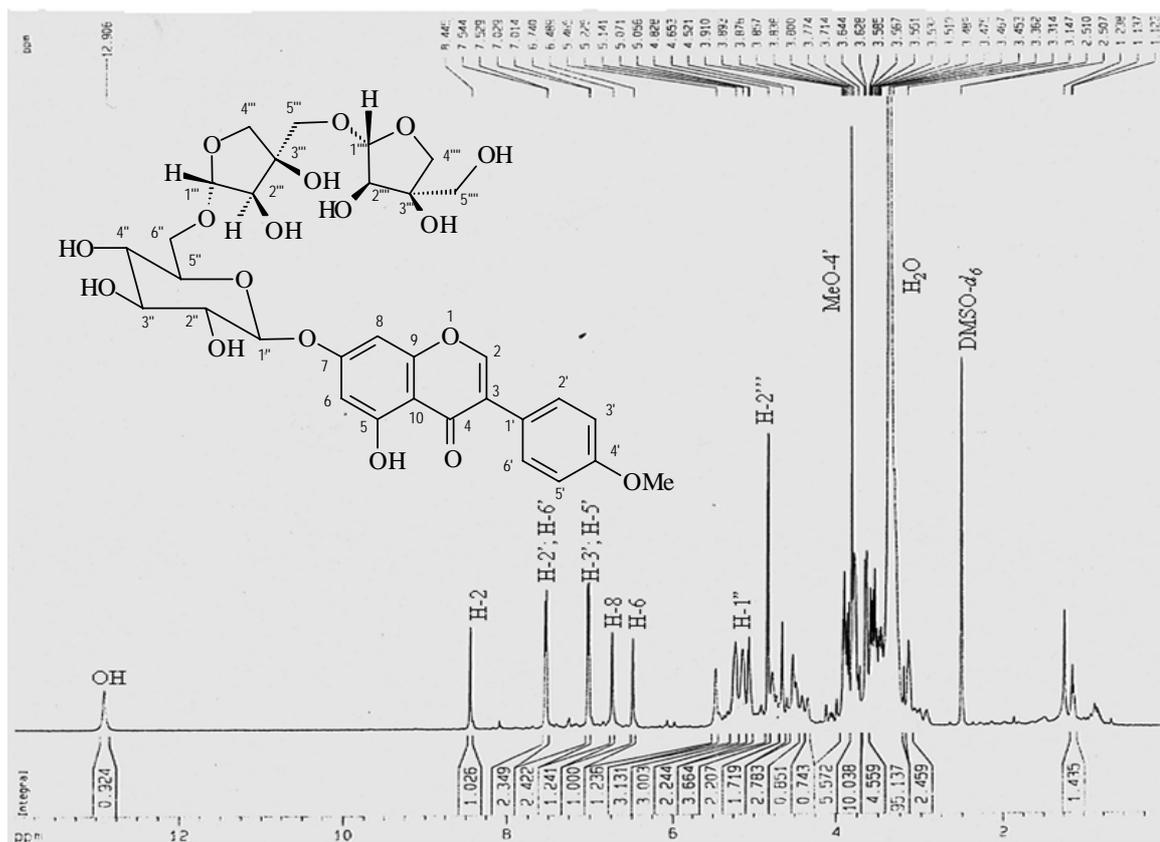


Figura II.128. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]

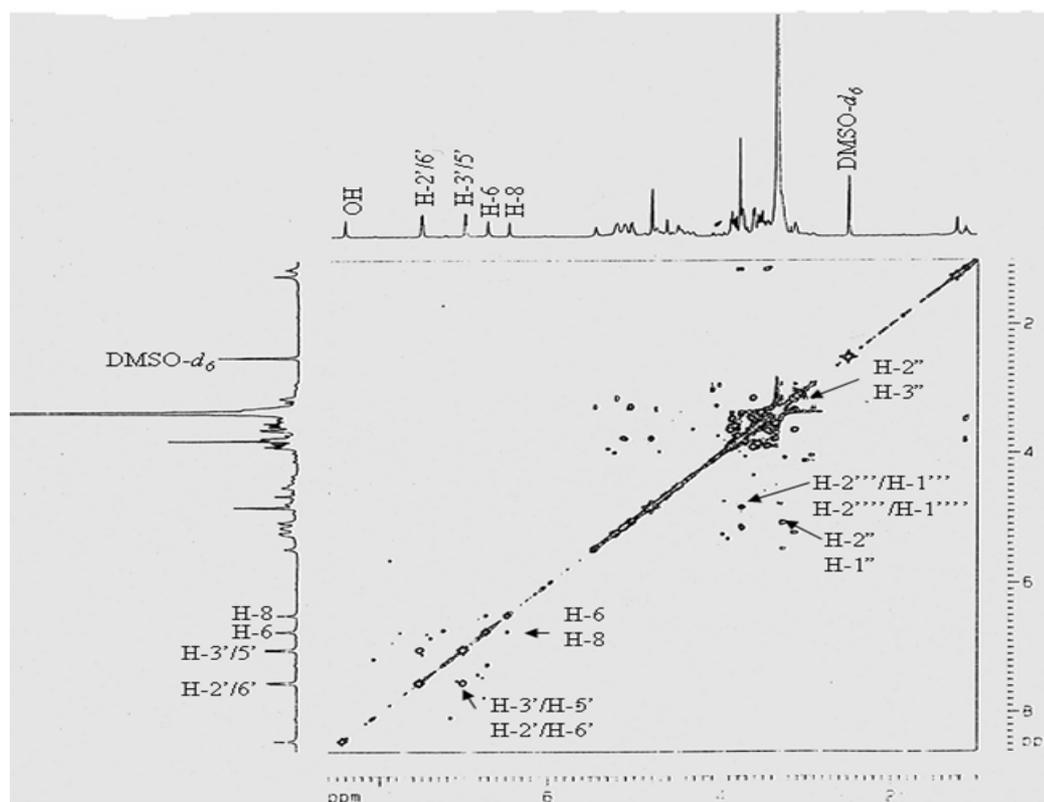


Figura II.129. Espectro de RMN COSY- ^1H - ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]

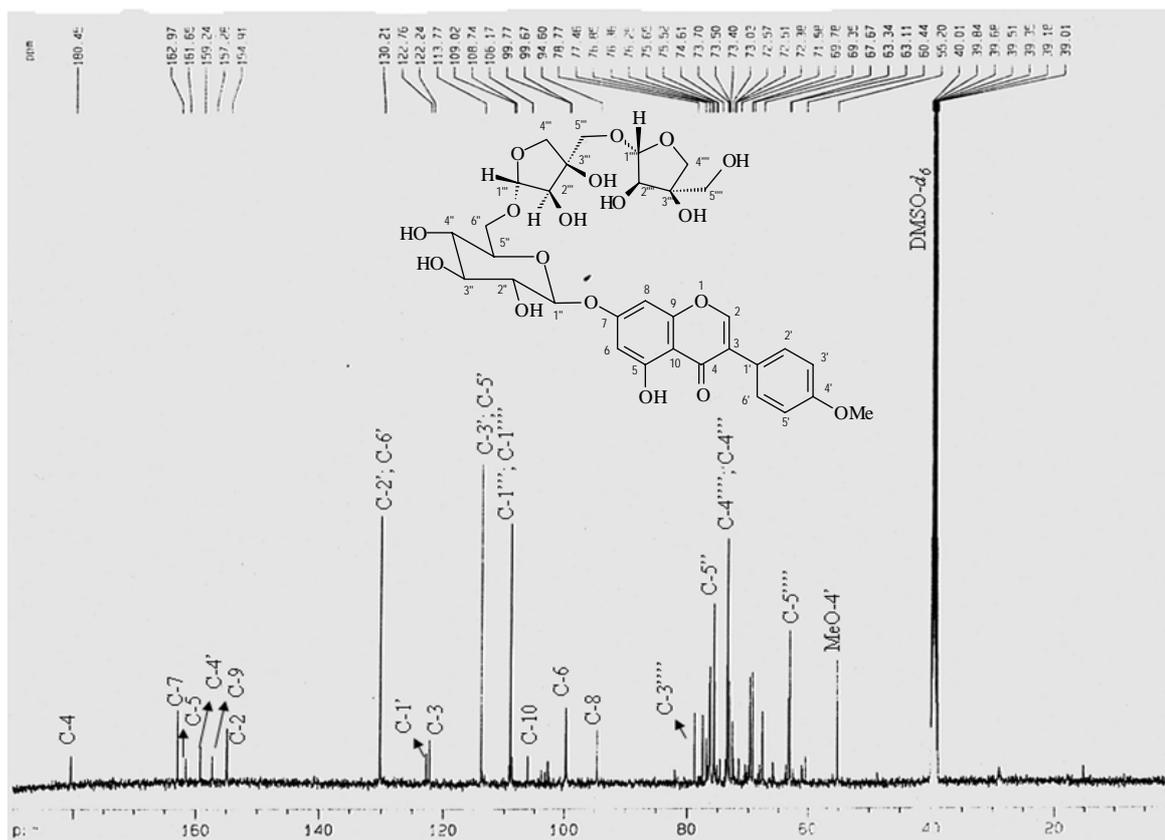


Figura II.130. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]

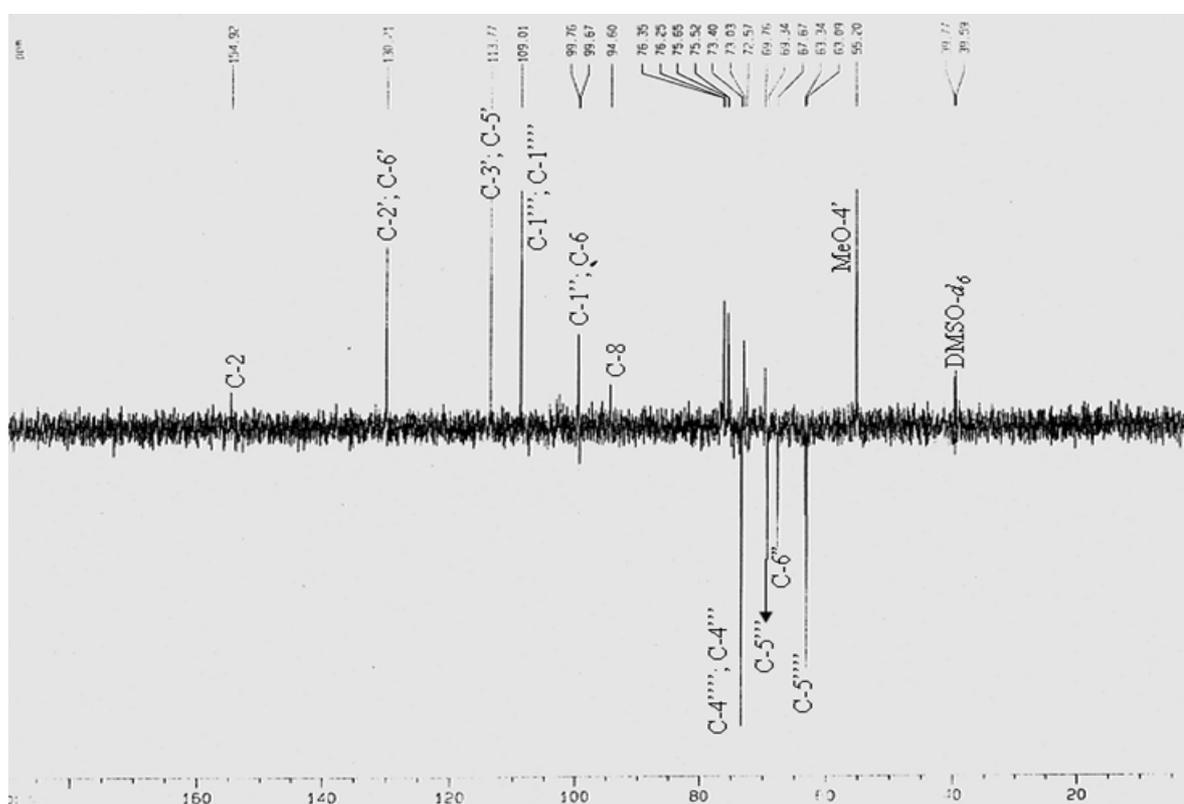


Figura II.131. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta=135^\circ$, 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]

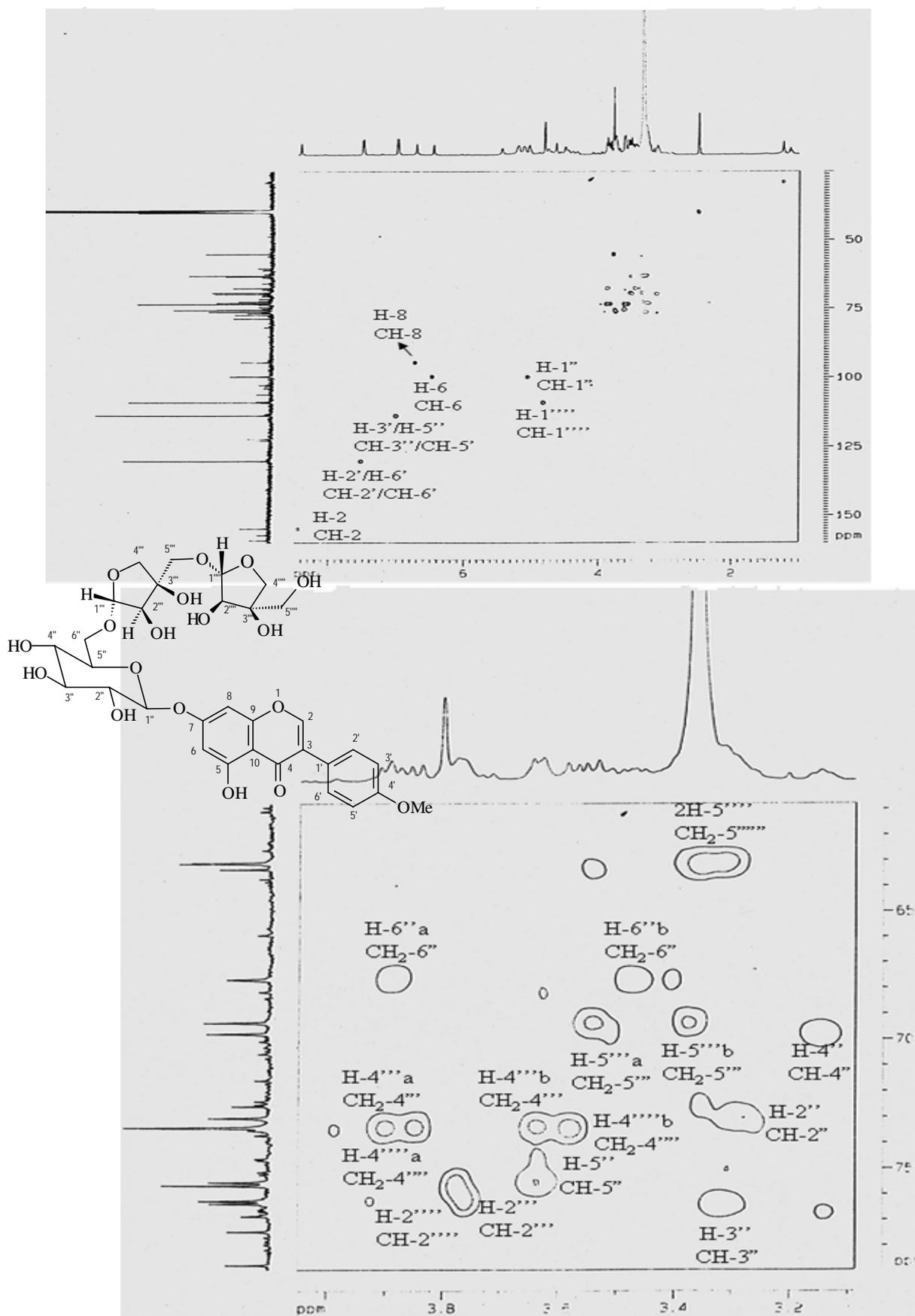


Figura II.132. Espectro de RMN HMQC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]

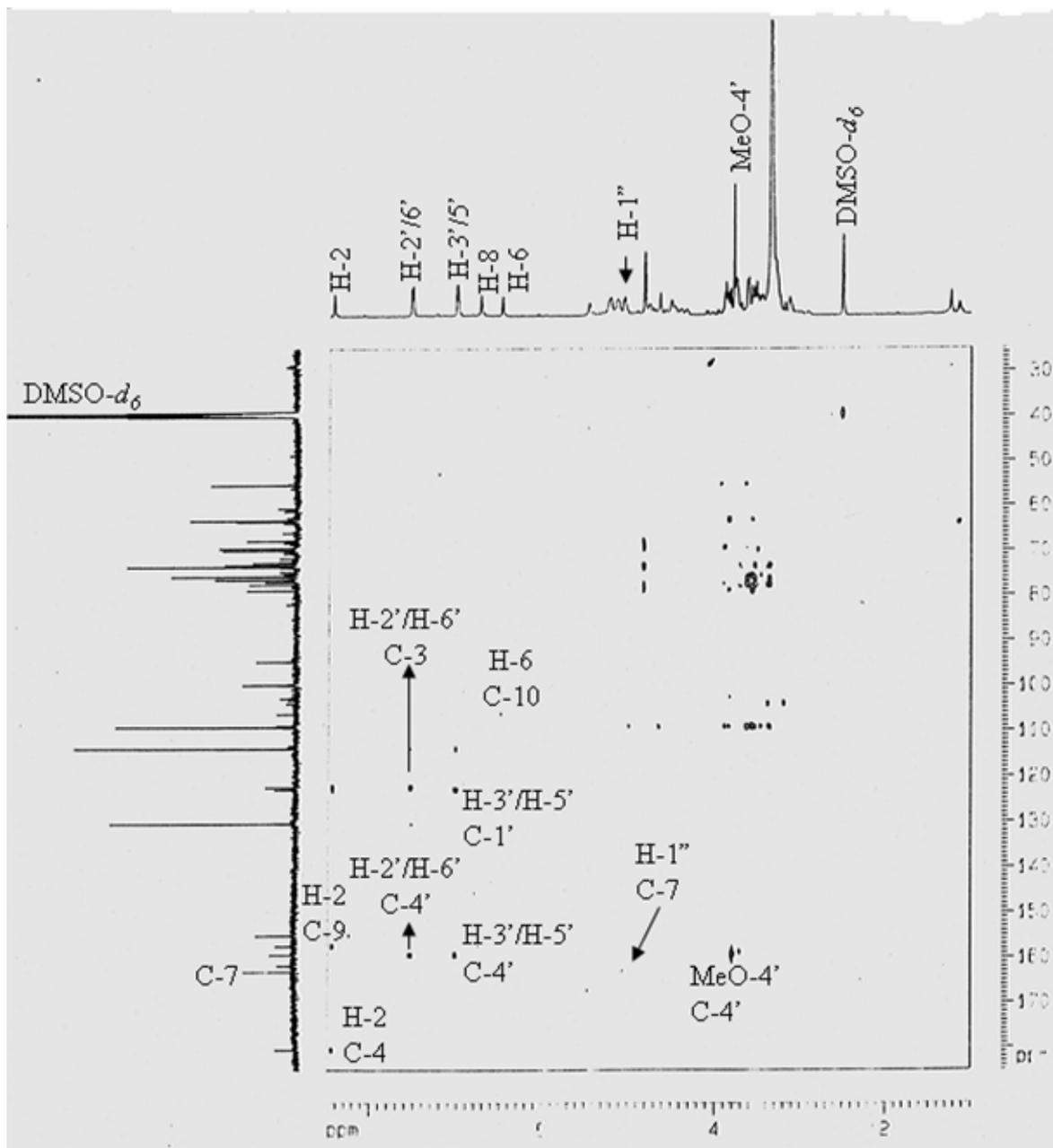
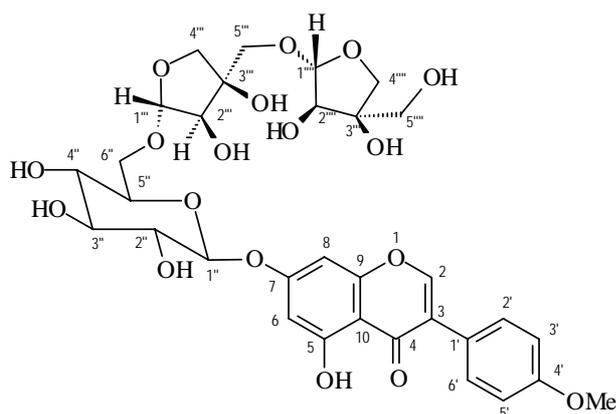


Figura II.133. Espectro de RMN HMBC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]



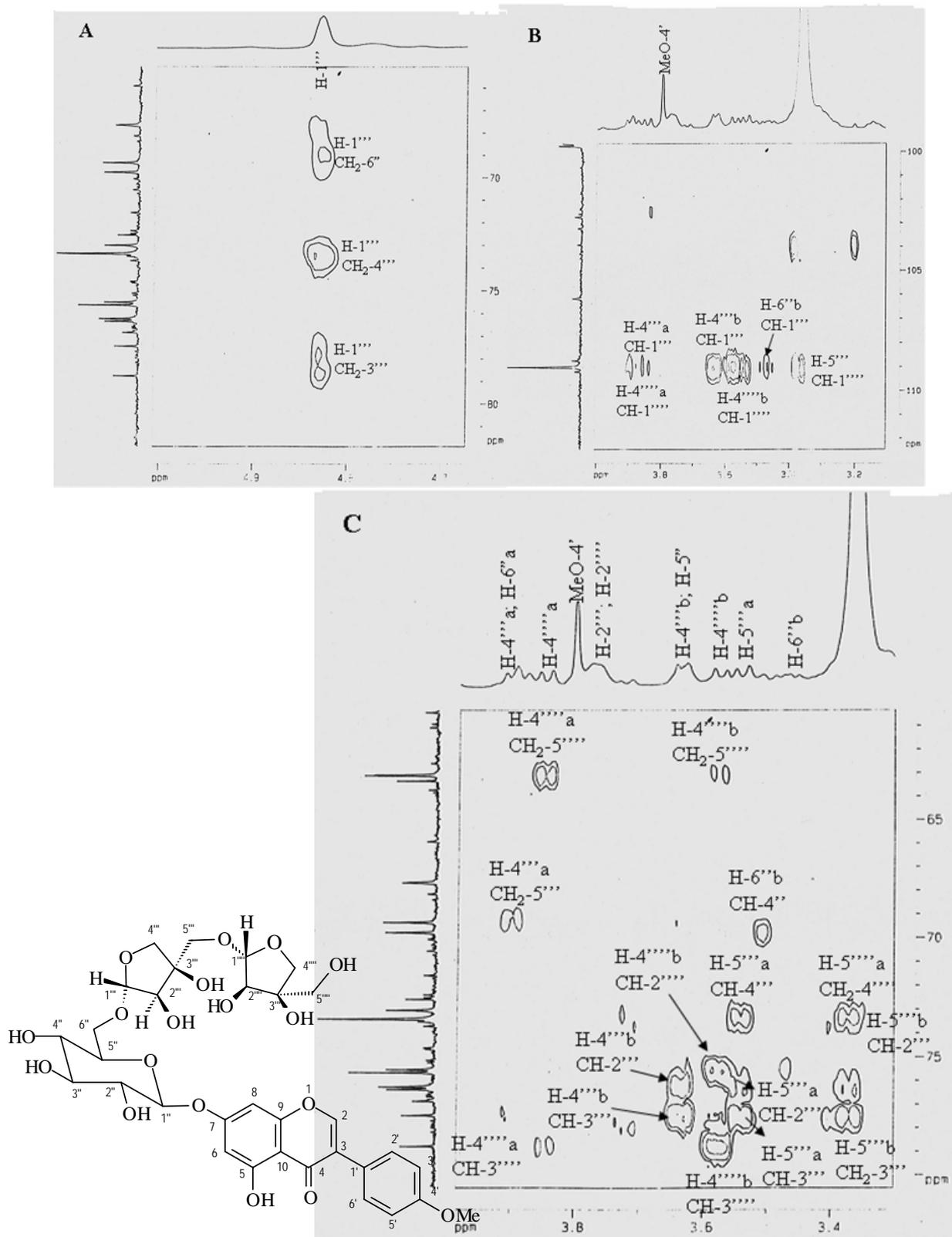


Figura II.134. Espectro de RMN HMBC (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]. Regiões ampliadas: **A** (δ 4,7-5,0x65-83 ppm), **B** (δ 3,2-4,0x100-112 ppm) e **C** (δ 3,3-4,0x60-80 ppm)

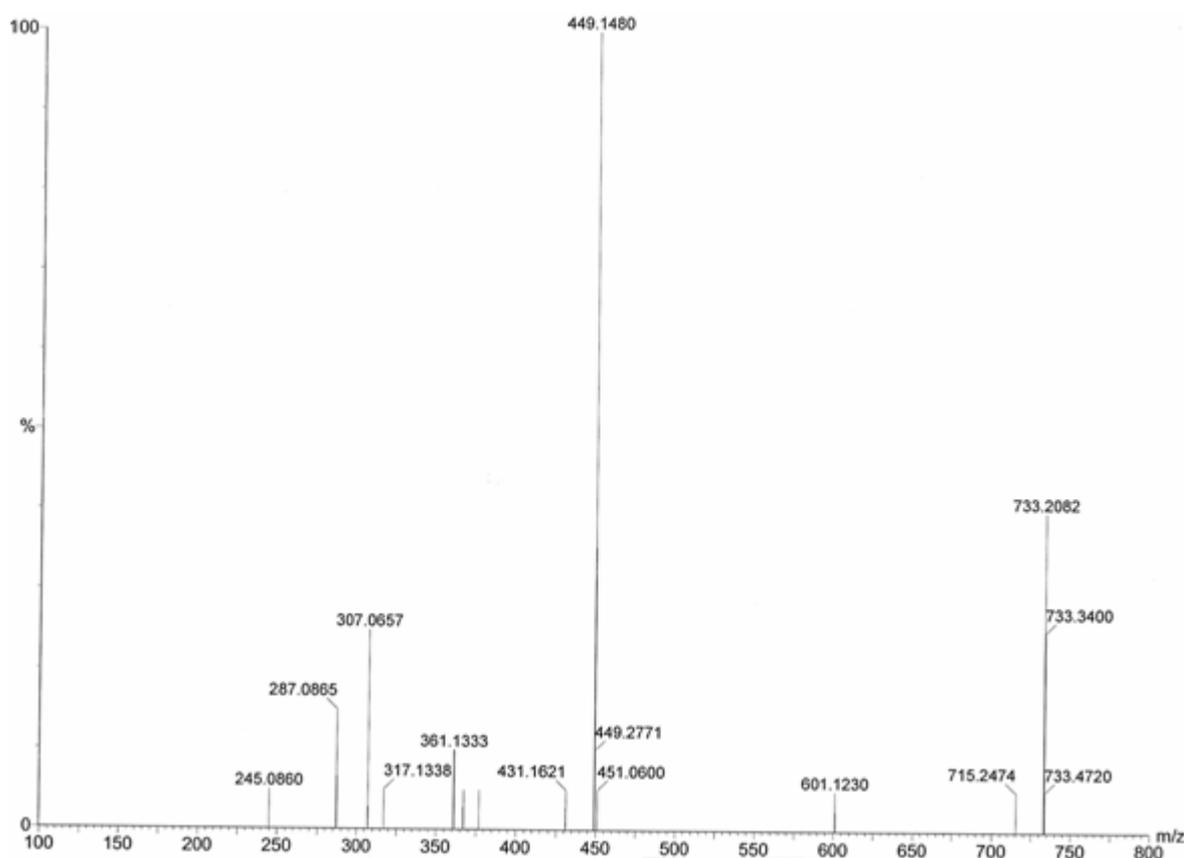
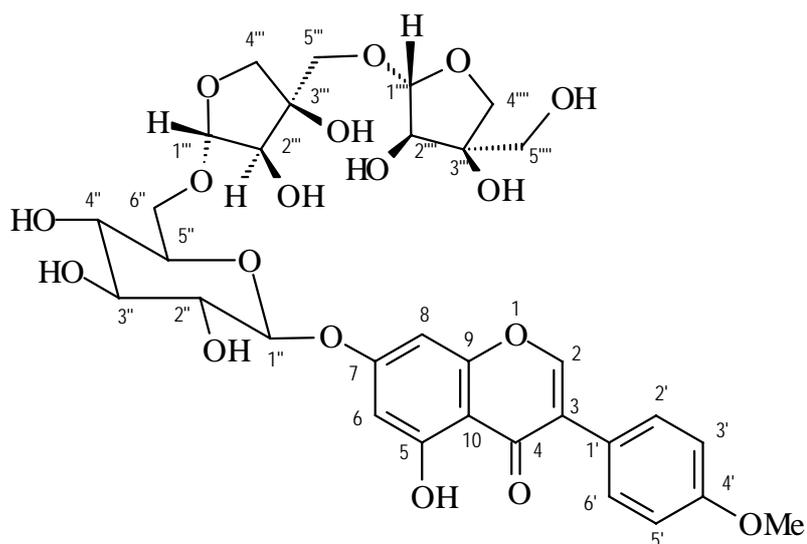
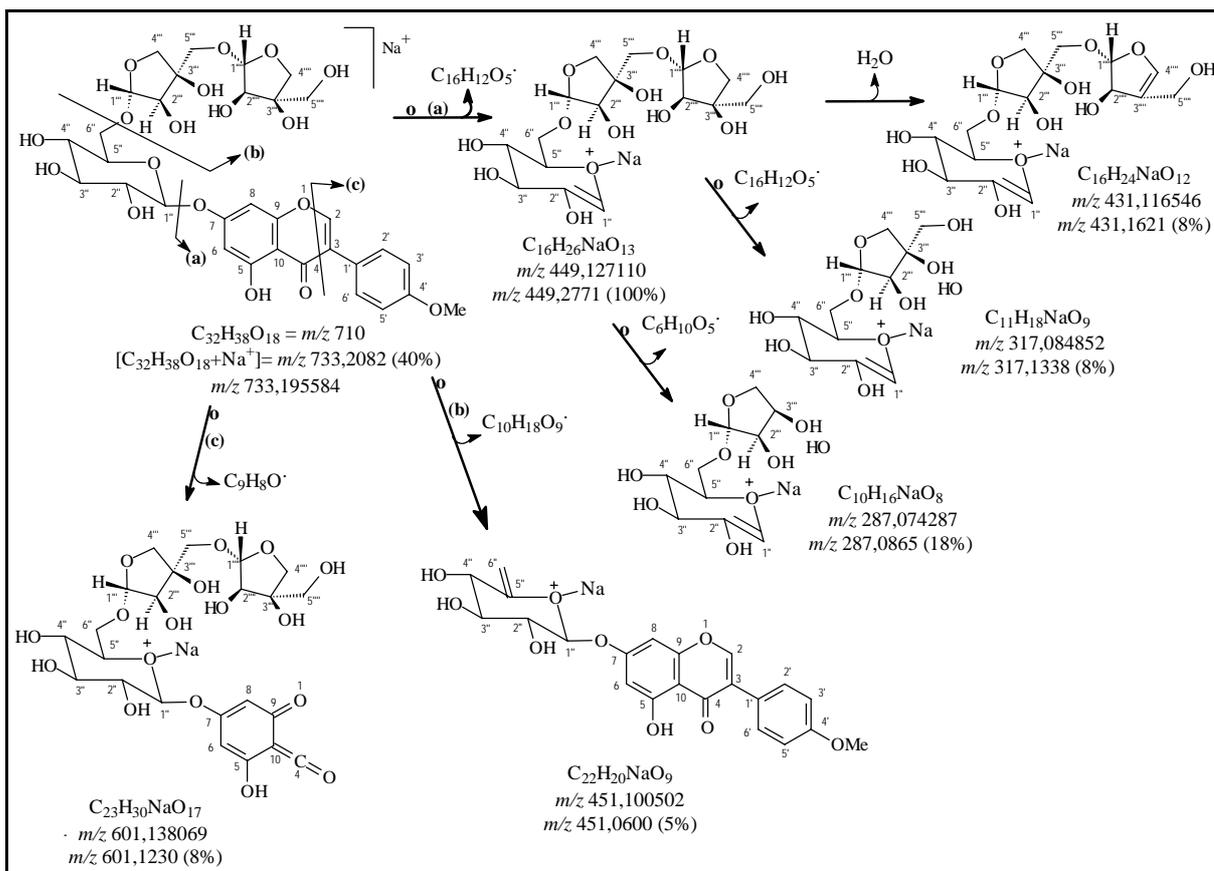


Figura II.135. Espectro de massas de alta resolução MS/MS da substância **20** [Biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo], obtido com ionização *eléttron spray* (IES) e detecção de íons positivos





Esquema II.7. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos resultantes da ionização em íons positivos detectados no espectro de massas MS/MS de alta resolução da substância **20** [Biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]

II.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M. F. New Species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. *Novon*, v. 9, p. 292-295, 1999.
- AGRA, M. F. *Revisão taxonômica de Solanum sect. Erythrotrichum Child (Solanaceae)*. São Paulo, SP, 2000. Tese (Doutorado em Biociências) Universidade de São Paulo.
- AGRAWAL, P. K. *Methods in signal assignement*. In: *Carbon-13 NMR of flavonoids, studies in organic chemistry*. Amsterdam: Ed. Elsevier, 1989, p. 153.
- a) ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; NETO, J. J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. *Floresta e Ambiente*, v. 10, n. 1, p. 93-97, 2003.
- b) ALVES, C. C. F. *Metabólitos especiais isolados de Luxemburgia octandra (Ochnaceae), Laseguea erecta (Apocynaceae), do látex de Parahancornia amapa (Apocynaceae) e de Solanum crinitum (Solanaceae)*. Seropédica, RJ, 2003, 197 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- ANDERSON, G. J.; STEINHARTER, T. P.; COOPER-DRIVER, G. A. Foliar flavonoids and the systematics of *Solanum* sect. *Basarthurum*. *Systematic Botany*, v. 12, n. 4, p. 534-540, 1987.
- ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I. Chemistry and biology of steroidal alkaloids. In: CORDELL, G. A. *The alkaloids*. San Diego: Academic Press, 1998, v. 50, p. 61-108.
- D'ARCY, W. G. In: *The biology and taxonomy of the Solanaceae* (Hawkes, J. G., Lester, R. N. and Skelding, A., eds). London: Academic Press, 1979, p. 3-49.
- DEWICK, P. M. *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. 2º ed. New York: John Willey & Sons, 2002, p. 390.
- DIAS-FILHO, M. B. Physiological response of *Solanum crinitum* LAM. to contrasting light environments. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, n. 8, p.789-796, 1997.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas medicinais da Amazônia e na mata atlântica*. 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002, 592 p.
- DONG, H.; GOU, Y. L.; CAO, S. G.; CHEN, S. X.; SIM, K. Y.; GOH, S. H.; KINI, R. M. Eicosenones and methylated flavonols from *Amamum koenigii*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 899-902, 1999.
- EVANS, W. C. *Trease and Evans: Pharmacognosy*. 15º ed. Edinburgh: Editora W. B. Saunders, 2002, p. 34.

FAMÍLIA SOLANACEAE/*Solanum capsicoides*/. Disponível em:<
[http://www.plantamed/Família Solanaceae/Solanum capsicoides/ Solanum_capsicoide.htm](http://www.plantamed/Família_Solanaceae/Solanum_capsicoides/Solanum_capsicoide.htm)>.
Acesso em: 14 de abril de 2005.

FAMÍLIA SOLANACEAE/Editando *Solanum* (secção). Disponível em:<
[http://www.wikipédia.com/Família Solanaceae/Editando Solanum \(secção\) wikipédia.htm](http://www.wikipédia.com/Família_Solanaceae/Editando_Solanum_(secção)_wikipédia.htm)>.
Acessado em: 10 de julho de 2006.

FEWELL, A. M.; RODDICK, J. G. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine. *Phytochemistry*, v. 33, p. 323-318, 1993.

FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incamim* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*, v. 30, n. 2, p. 685-687, 1991.

GÜNTNER, C.; GONZÁLES, A.; DOS REIS, R.; GONZÁLES, G.; VÁZQUEZ, A.; FERREIRA, F.; MOYNA, P. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *J. Chem. Ecol.*, v. 23, p. 1651-1659, 1997.

HARBORNE J. B. Plant polyphenols.6. Flavonol glycosides of wild and cultivated potatoes. *Biochem J.*, v. 84, n. 1, p. 100-&, 1962.

HARBORNE, J. B. Flavonoids and Evolution of angiosperms. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 5, n. 1, p. 7-22, 1977.

HARBORNE, J. B. & SWAIN, T. In: *The biology and taxonomy of the Solanaceae* (Hawkes, J. G., Lester, R. N. and Skelding, A. D., eds). London: Academic Press, 1979, p. 257-268.

HARBORNE, J. B. *Flavonoids: advances in research since*. 1st ed. New York: Ed. Chapman @ Hall, 1994, p. 453-483.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. *Saponins*. Cambridge: Editora Cambridge University, 1995.

LEVIN, R. A.; WATSON, K.; BOHS, L. A four-gene study of evolutionary relationships in *Solanum* section *Acanthophora*. *American Journal of Botany*, v. 92, n. 4, p. 603-612, 2005.

LOREY, S.; PORZEL, A.; RIPPERGER, H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum coccineum*. *Phytochemistry*, v. 41, n. 6, p. 1633-1635, 1996.

MAGA, J. A. Glycoalkaloids in Solanaceae. *Food Rev. Int.*, v. 10, p. 285-314, 1994.

MOLA, J. L.; ARAUJO, E. R.; MAGALHÃES, G. C. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do distrito federal. *Química Nova*, v. 20, n. 5, p. 460-462, 1997.

RADEGLIA, R.; ADAM, G.; RIPPERGER, H. ¹³C NMR spectroscopy of *Solanum* steroid alkaloids. *Tetrahedron letter*, v. 18, n. 11, p. 903-906, 1977.

RASMUSSEN, S.; WOLFF, C.; RUDOLPH, H. 4'-O- β -D-glucosyl-*cis-p*-coumaric acid-A natural constituent of *Sphagnum fallax* cultivated in bioreactors. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 81-87, 1997.

REZNIK, H. & WIETSCHER, G. The flavonoid patterns of tuber-bearing *Solanum* species. I Characterization of flavonoid glycosides. *Z. Pflanzenphysiol.*, v. 95, n. 3, p. 239-253, 1979.

RIPPERGER, H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum*. *Phytochemistry*, v. 39, n. 6, p. 1475-1477, 1995.

RODDICK, J. G.; OSMAN, S. F.; RIJNENBERG, A. L. Synergistic interaction between potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to destabilization of cell membranes: ecological implications. *J. Chem. Ecol.*, v. 14, p. 889-902, 1988.

SANFORD, L. L.; DOMEK, J. M.; CANTELO, W. W.; KOBAYASHI, R. S.; SINDEN, S. L. Mortality of potato leafhopper adults on synthetic diets containing seven glycoalkaloids synthesized in the foliage of various *Solanum* species. *Am. Potato J.*, v. 73, p. 79-88, 1996.

SCHILLING, E. E. Foliar flavonoids of North American *Solanum* Section *Solanum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 12, n. 1, p. 53-55; 1984.

SILVA, B. P.; VELOZO, L. S. M.; PARENTE, J. P. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 663-667, 2000.

SILVA, T. M. S. da. *Estudo químico de espécies de Solanum*. Seropédica, RJ, 2002, 197 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (SOLANACEAE). *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS, 2004, 1102 p.

SOUZA, A. E.; SILVA, T. M. S.; ALVES, C. C. F.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* Species. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 13, n. 6, p. 838-842, 2002.

STEINHARTER, T. P.; COOPER-DRIVER, G. A.; ANDERSON, G. J. The phylogenetic relationship of *Solanum* flavonols. *Bioche. Syst. Ecol.*, v. 14, n. 3, p. 299-305, 1986.

SWAIN, T. *In Pigments in Plants*. Stuttgart: Editora Fischer, 1980, p. 224-236.

USUBILLAGA, A.; AZIZ, I.; TETTAMANZI, M. C.; WAIBEL, R.; ACHENBACH, H. Steroidal alkaloids from *Solanum sycophanta*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 3, p. 537-543, 1997.

VÁLQUEZ, A. *Química y biología de Solanaceas (estructura y actividad de los glicósidos del género Solanum)*. Montevideo, 1997. Tese de Doctorado. Faculdade de Química.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. *Manual of the flowering plants of Hawaii*. Honolulu: Revised edition. University of Hawaii Press, 1999, p. 1269-1270.

WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. *Phytochemistry*, v. 59, p. 79-84, 2002.

WEISSENBERG, M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. *Phytochemistry*, v. 58, p. 501-508, 2001.

WHALEN, M. D. Foliar flavonoids of *Solanum* section *Androceras*-Systematic survey, *Syst. Botany.*, v. 3, n. 3, p. 257-276, 1978.

WHALEN, M. D. & MABRY, T. J. New 8-hydroxyflavonoids from *Solanum* section *Androceras*. *Phytochemistry*, v. 18, p. 263-265, 1979.

YUSUPH, M.; MANN, J. A triglyceride from *Punica granatum*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 7, p. 1391-1392, 1997.

CAPÍTULO III

ACETANILIDA ISOLADA DO EXSUDADO DE *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998)



III.1 INTRODUÇÃO

Há séculos as plantas são consideradas a principal fonte de substâncias ativas para obtenção de novos produtos farmacêuticos. As atividades detectadas podem ser das substâncias puras naturais ou com modificação estrutural para aumentar o seu potencial de ação. Nos últimos anos, a procura de novos fármacos de origem natural tem se intensificado e percebe-se a procura de outras fontes além das plantas. Uma indicação desse interesse em novas substâncias naturais com possível significado médico foi provido por uma conferência: “Discovering Drugs from Nature: Novel Approaches and New Sources” organizado pela International Business Communications (I.B.C.) Technical Service Limited, que aconteceu em Londres nos dias 8-9 de dezembro de 1994 (CLARKE, 1997).

A descobertas de novas substâncias com estruturas diferentes podera conduzir diretamente ou indiretamente para a criação de uma nova geração de fármacos mais ativos dos que já estão em uso. Além disso elas podem ser de interesse acadêmico contribuindo para estudos em outras áreas de conhecimento como ecologia, bioquímica, agronomia, biofísica, etc (CLARKE, 1997).

Uma fonte alternativa de novas substâncias encontra-se nas secreções das glândulas de pele de anfíbios, vertebrados que possuem uma pele lisa ou áspera, rica em glândulas (CLARKE, 1997). Anfíbios são quase cosmopolitas na sua distribuição, sendo achados em todos o continentes do mundo com exceção da Antártica (SAVAGE, 1976). São animais que possuem a pele permeável, nua, mantida ligeiramente úmida pela respiração cutânea, mantendo a temperatura do corpo só alguns graus acima dos ambientes. São capazes de se adaptarem a uma variedade extraordinária de habitats e condições climáticas variando de desertos áridos a lagos fundos de água doce, ou de vida subterrânea na floresta tropical. Algumas espécies do Ártico e de zona Alpinas sobrevivem a longos períodos de frio (CLARKE, 1997).

Essa habilidade dos anfíbios de sobreviverem a diferentes habitats é atribuída a sua evolução tendo diferentes morfologias, fisiologias e bioquímicas de acordo com o local de adaptação. O que fez com que eles também desenvolvessem um sistema de defesa formidável contra vários agentes agressores, desde microorganismos a predadores (CLARKE, 1997).

A pele dos anfíbios é caracterizada basicamente pela presença de dois tipos de glândulas as mucosas e as granulares (ou veneno), um terceiro tipo, glândulas tubulosacular ou alveolar são encontradas em um pequeno grupo de rãs com função especializada e limitada (CLARKE, 1997). Essas glândulas encontram-se espalhadas por toda pele dos anfíbios, acumuladas em regiões especiais como as glândulas parótide nos sapos que segregam muitas substâncias diferentes. As finalidades dessas substâncias são de defesa contra o ataque de predadores potenciais ou contra infecções por bactérias e fungos (glândulas granulares), ou ainda contra dessecação, deixando a pele úmida, escorregadia e prevenindo danos mecânicos para a pele delicada (glândulas mucosas) (CLARKE, 1997; TOLEDO & JARED, 1995). A pressão da mordida ou quando o anfíbio é submetidos em condições de estresse fazem com que estas glândulas liberam essas secreções (TOLEDO & JARED, 1995).

Essas secreções contêm uma variedade de composições químicas de proteínas, peptídeos (oligopeptídios menores e polipeptídios), esteróides (bufogeninas e bufotoxinas), alcalóides e aminas biogênicas, todas apresentando atividades farmacológicas como cardiotoxícos, miotóxicos, neurotóxicos, vasoconstritores, convulsivantes, alucinógenos, hipotensivos e agentes colinérgicos (CLARKE, 1997; EDSTROM, 1992; MACIEL *et al.*, 2003; TOLEDO & JARED, 1995).

Esse número diversificado de combinações químicas produzidas dentro das glândulas dos anfíbios é surpreendentemente alto, até mesmo dentro de uma única espécie. É esta diversidade bioquímica que faz com que a prospecção química seja satisfatória para encontro de novas substâncias, pois normalmente o estudo de substâncias naturais esta, mais frequentemente, associado a produtos naturais derivados de plantas e insetos (TOLEDO & JARED, 1995).

A grande parte destas substâncias secretadas, em torno de 400 são produto do próprio metabolismo dos anfíbios, porém estudos recentes sugerem que a fonte primária para alguns alcalóides secretados podem ser provenientes da sua dieta, como por exemplo, de insetos. Os microorganismos presentes na pele também podem fazer um papel adicional importante, modificando as combinações segregadas, aumentando a potência antibiótica destas secreções (CLARKE, 1997).

DALY, *et al.*, (1987) dividiu os tipos moleculares achados em anfíbios em quatro categorias principais: aminas biogênicas, bufodienolidas, alcalóides, peptídeos e proteínas.

As aminas biogênicas encontradas em anfíbios são derivadas das catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) e indolalquilaminas (bufotenina, bufoviridina dehidrobufotenina), Figura III.1, pág. 222. Essas substâncias possuem propriedades alucinógenas e hipertensivas, sendo vasoconstritoras e algumas produzem convulsões. Elas também podem ser usadas para caracterizar a linhagens evolutivas sendo de importância na taxonomia (CLARKE, 1997).

Bufogeninas e bufotoxinas são esteróides derivadas do colesterol. A bufogenina mais conhecida é a bufotalina (Figura III.1, pág. 222). Bufotoxinas são estéres de suberilargina ligados a uma bufogenina, exemplo a bufotoxina (Figura III.1, pág. 222). Essas substâncias possuem a propriedade de aumentar a força de contração do coração e diminuir a frequência cardíaca. A pele do sapo seca contendo secreções foi usada na medicina oriental no passado a mais de 3000 anos sendo introduzida na Europa nos anos de 1600 como cardiotônico, até serem substituídos por digitálicos há 200 anos. Muitas bufogeninas e bufotoxinas também possuem efeito anestésico (CLARKE, 1997).

Alcalóides são achados principalmente em rãs que lançam veneno (Família Dendrobatidae) e além de serem encontrados em alguns grupos isolados de rãs e sapos, foram também encontrados em salamandras (*S. salamandra*). Identificaram-se mais de 200 alcalóides usando cromatografia e espectros de massas de alta-resolução em mais de 41 espécies de rãs da família Dendrobatidae. Recentes trabalhos indicam que muitos, se não todos os alcalóides encontrados nas rãs dessa família são derivados de insetos e milípedes dos quais fazem parte da dieta (CLARKE, 1997).

A descoberta de novos peptídeos, polipeptídeos e proteínas nas secreções granulares dos anfíbios encorajaram o estudo e exploração bioquímica nesses animais. Isso permitiu a descoberta de uma nova classe de peptídeos, as magaininas na pele do sapo africano, *Xenopus laevis* por ZASLOFF (1987). Magaininas exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro, inibindo o crescimento de bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e espécies de fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*). Também induziu a lise das membranas plasmáticas em várias espécies de protozoário, por exemplo *Paramecium caudatum*, *Ameba proteus* e *Euglena gracilis* (CLARKE, 1997).

Ao contrário dos alcalóides, aminas e peptídeos não são originados da dieta ou de bactérias, a sua biossíntese é regulada pelo código genético (CLARKE, 1997).

III.1.1 Família Hylidae

São encontrados dois tipos de glândulas granulares no dorso da pele de *Hyla arborea* com dimensões maiores ou menores de acordo com os grânulos que secretam. Reações

histoquímicas revelam que estes grânulos são de natureza proteica (TOLEDO & JARED, 1995). Na pele de *Gastrotheca marsupiata*, uma hílida dos Andes, a secreção produzida pelas glândulas granulares ocorre no núcleo da camada basal. A forma desses núcleos podem ser do tipo esferoidal ou elipsoidal de acordo com a pressão exercida pelo conteúdo glandular.

As secreções granulares produzidas por *Corythomantis greeningi*, um hílida do nordeste do Brasil são do tipo esferoidais dando reação positiva para o férrico utilizando a técnica de ferricianida, mostrando assim a presença de peptídeos ou aminas biogênicas envolvidos no processo de defesa (TOLEDO & JARED, 1995).

Na pele de *Hyla* são encontrados vários tipos peptídeos e aminas biogênicas. Sendo encontradas as aminas biogênicas histamina e serotonina (Figura III.1, pág. 222). Histamina é uma substância hipotensiva e estimulante das secreções biliares estando envolvida com as reações de hipersensibilidade e com impulsos cutâneos sensoriais que provocam coceira e dor (TOLEDO & JARED, 1995).

Foram encontrados peptídeos como a sauvagina (formado pela sequência de 40 aminoácidos) e peptídeos opióides semelhante a caeruleina (Figura III.1, pág. 223). A sauvagina é hipotensiva, diurética e exerce influência nos hormônios da adenohipófise. Na pele de *Phyllomedusa rohdei* foram encontrados peptídeos com estrutura semelhantes dos neuropeptídeos de mamíferos. Os peptídeos opióides encontrados são as dermorfinas (Figura III.1, pág. 223) e a deltorfinas. As dermorfinas são heptapeptídeos isoladas também da pele da rã argentina *Phyllomedusa sauvagei* (MONTECUCCHI *et al.*, 1981). Possuem na sua estrutura D-alanina, um aminoácido que tem ação analgésica maior que a morfina, e atividade opióide das dermorfinas esta atribuída a D-alanina. Dermorfinas mesmo em doses baixas induzem sedação quando administradas em ratos e em doses altas provocam catalepsia. As deltorfinas, também heptapeptídeos, foram isoladas da pele de *Phyllomedusa bicolor*. Estes também contêm D-alanina ou D-metionina na sua estrutura (TOLEDO & JARED, 1995).

A adenoregulina, um novo peptídeo que interage com receptores de adenosina, foi encontrada nas secreções de hílidas (TOLEDO & JARED, 1995).

Vários peptídeos bioativos foram descobertos na pele de outras espécies de phyllomedusinas, como: filocaeruleina (Figura III.1, pág. 223), filoquinina e filomedusina (Figura III.1, pág. 224). Os efeitos farmacológicos destas substâncias são semelhantes a caeruleina (Figura III.1, pág. 223), bradiquinina (Figura III.1, pág. 224) e fisalemina (Figura III.1, pág. 224), respectivamente (TOLEDO & JARED, 1995).

Índios Matses, do nordeste do Peru usam uma substância resinosa obtida da pele da rã-árvore (*Phyllomedusa bicolor*) nos rituais de xamanismo para que traga sorte na caça. Quando seca, esta substância é conhecida como "sapo". Os primeiros efeitos são êmese, náusea, diarreia, taquicardia, sudorese, alterações na pressão sanguínea e desejo de defecar. Ocorrem efeitos associados com o sistema nervoso central, como resistência a fome e a sede, insensibilidade à dor, aumento dos sentidos, aumento da força física e capacidade de enfrentar situações de tensão. Os efeitos gastrointestinal e cardiovasculares estão associados com os peptídeos bioativos: filocaeruleina (Figura III.1, pág. 223), filomedusina (Figura III.1, pág. 224), filoquinina (Figura III.1, pág. 224) e sauvagina os quais foram identificados no "sapo". Os outros efeitos estão associados com o peptídeo filocaeruleina (Figura III.1, pág. 223) e sauvagina (TOLEDO & JARED, 1995).

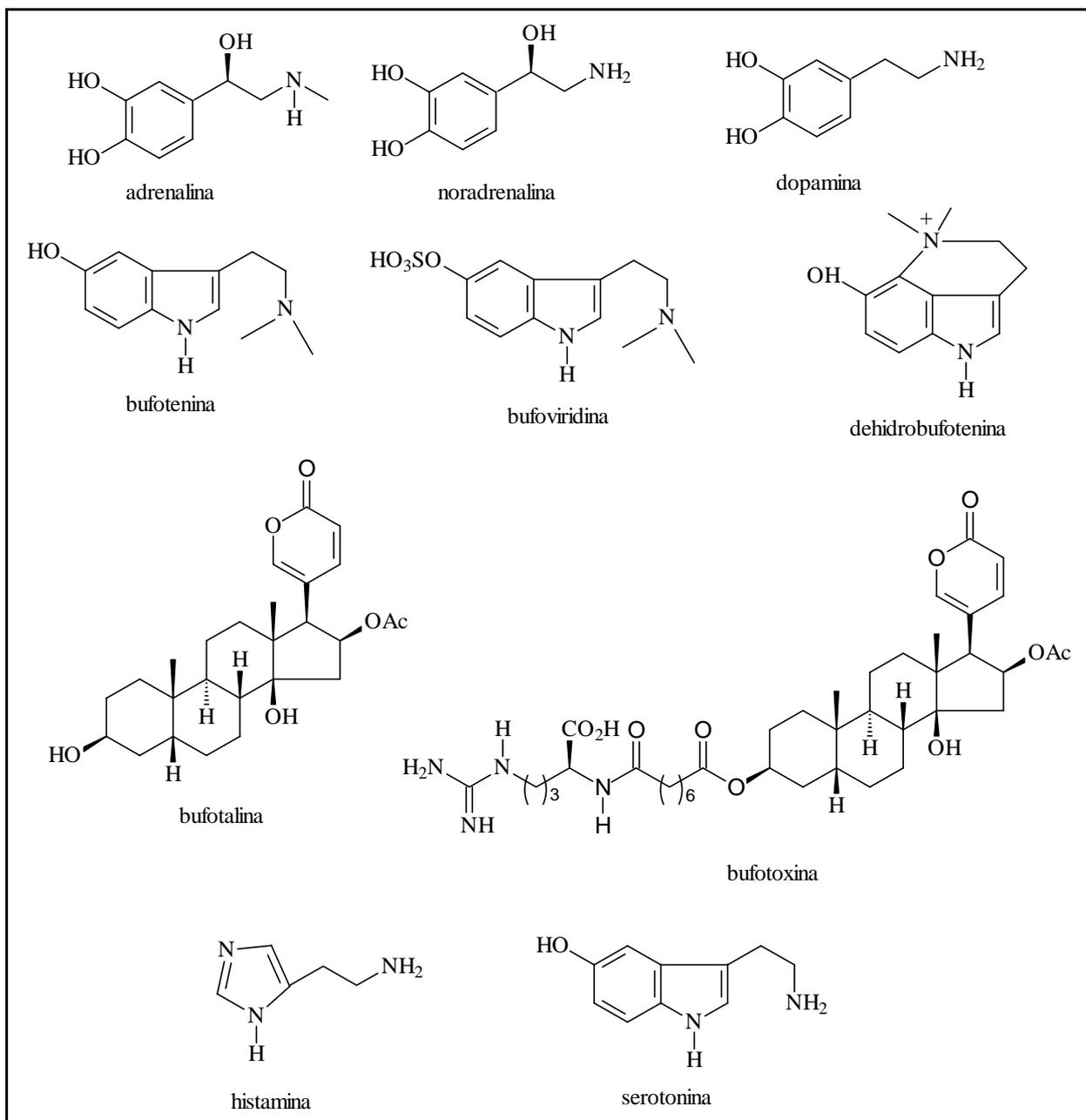


Figura III.1. Estruturas químicas de substâncias isoladas de anfíbios anuros

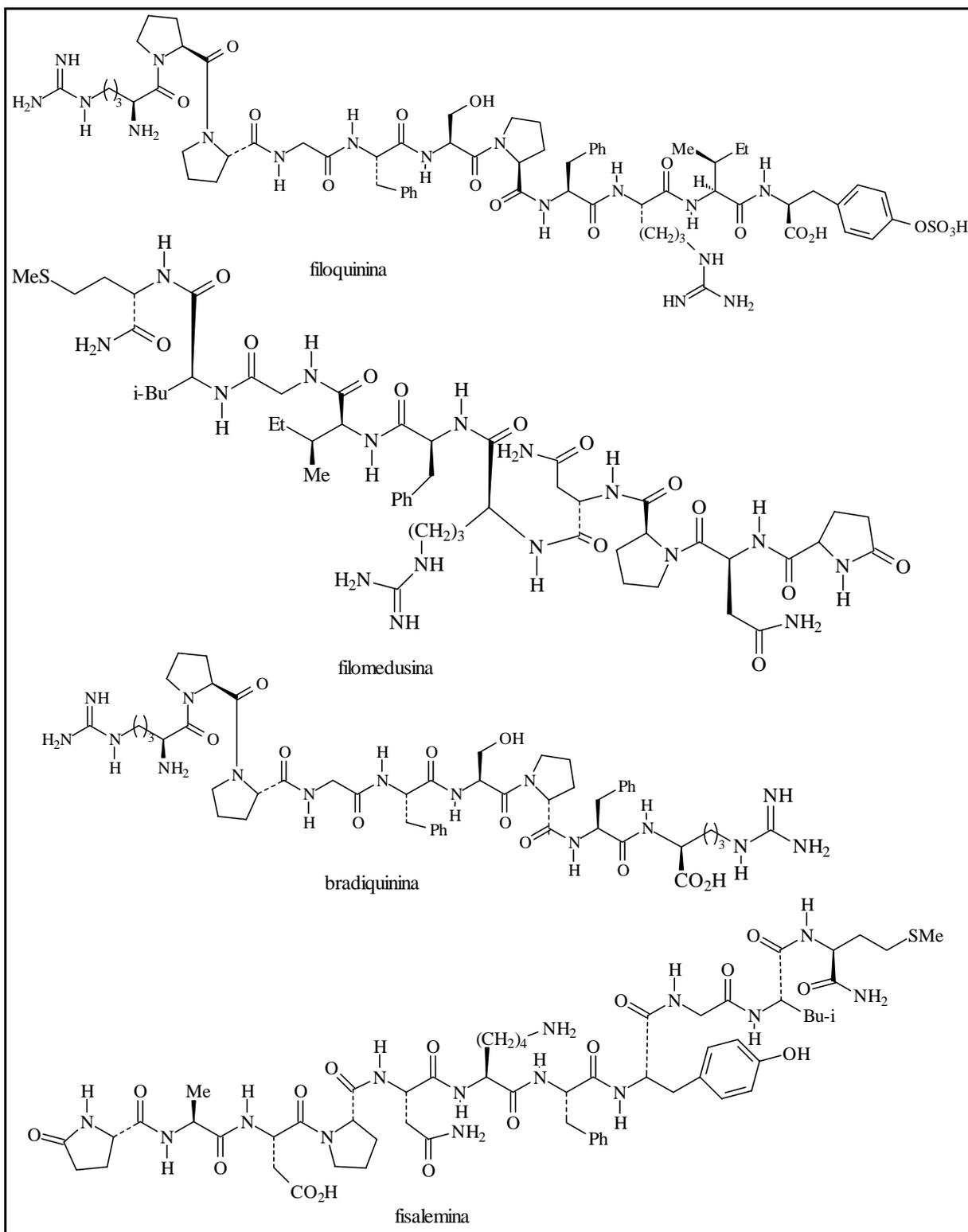


Figura III.1. Continuação

III.1.2 *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998)

Xenohyla truncata (IZECKSOHN, 1998) pertence à família Hylidae e é, até o momento, o único anfíbio anuro já identificado que se alimenta de frutos por isso auxilia na propagação de plantas. Mede em torno de 3,0 centímetros de comprimento e se esconde no interior das bromélias em regiões de restinga no Norte Fluminense, Rio de Janeiro (IZECKSOHN, 1998).

Assume uma postura de defesa quando se sente ameaçada, estirando seu membros inferiores e inflando os pulmões, tornando-se imóvel. O estiramento de seus membros inferiores associado a sua imobilização, o que dificulta a ingestão dos predadores. E em situações de estresse assume uma postura semelhante de uma rã o que causa uma impressão visual de predador, a Figura III.2, pág. 225 mostra este estado de defesa (NAPOLI, 2001).

Sua posição sistemática é:

Reino:	Animal
Filo:	Chordates
Subfilo:	Vertebrado
Classe:	Anfíbio (LINNAEUS, 1758)
Subclasse:	Lissamphibia
Ordem superior:	Salientia
Ordem:	Anura (MERREM., 1820)
Família:	Hylidae (RAFINESQUE, 1815)
Sufamília:	Hylinae (RAFINESQUE, 1815)
Gênero:	<i>Xenohyla</i> (IZECKSOHN, 1998)
Espécie:	<i>Xenohyla truncata</i> (IZECKSOHN, 1998)



Xenohyla truncata (IZECKSOHN, 1998)
Fonte: (NAPOLI, 2001)

Figura III.2. Estado de defesa de *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998)

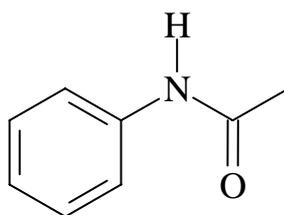
III.2 OBTENÇÃO DO EXSUDADO DE *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998)

Dois espécimes de *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998) foram capturados em julho de 2004 na restinga de Maricá, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (coordenadas 22°59' latitude Se 44°05' longitude W.) e identificados pelo professor Hélio da Silva através da comparação com uma espécie depositada na Coleção de Vertebrados do Departamento de Zoologia da UFRuralRJ.

Estes animais foram colocados em câmaras individualizadas de 3,0 cm diâmetro e 15,0 cm comprimento, contendo 3,0 mL de água bidestilada estéril, submetidos a uma corrente contínua de 15V e 1A durante um minuto. Como resposta ao estímulo elétrico, ambos os animais liberaram secreção dérmica que em solução aquosa originou um precipitado branco e cristalino. Esse material foi isolado por filtração a vácuo com funil Büchner e seco em pistola Abderhalden, obtendo-se 2,2 g da substância **21**. Esse material cristalino correspondeu a 9,0 mg de peso vivo do animal. Trata-se da principal substância presente nos exalados cutâneos do *Xenohyla truncata*.

A cromatografia analítica em camada delgada do precipitado, revelou uma única mancha (azul escura) observada sob a luz UV. Não foram detectados alcalóides na água mãe, pelo resultado negativo ao reagente de Dragendorff. O precipitado apresentou ponto de fusão de 112-114°C e solúvel em clorofórmio.

III.2.1 Substância Isolada



21

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1 Determinação Estrutural da Substância 21.

A análise no espectro IV (Figura III.3, pág. 228) apresentou bandas em 3.294 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-H}}$), 1.663 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) e 1.601 cm^{-1} , 1.550 cm^{-1} e 1.495 cm^{-1} atribuídos ao anel aromático, sendo compatível para amidas aromáticas.

O espectro de RMN ^1H (Figura III.4, pág. 228) apresentou sinais em δ_{H} 7,49 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7,29 (t, $J=8$ Hz, 2H) e 7,08 (t, $J=8$ Hz, 1H), 2,15 (s, 3H) e singlete em δ_{H} 7,61 (N-H) cuja interação por acoplamento foi confirmada pelo espectro de RMN ^1H - ^1H -COSY (Figura III.5, pág. 229).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura III.6, pág. 229) apresentou sinais de δ_{CH} em 119,9 (CH-2, 6), 128,9 (CH-3, 5), 124,4 (CH-4), δ_{CH_3} 24,4 e δ_{C} em 168,7 (C=O) e 137,9 (C-1). Estes dados confirmaram a proposta da acetanilida (**21**). A Tabela III.1 (pág. 227), apresenta os valores de deslocamento químicos.

O espectro de massas (Figura III.7, pág. 230) apresentou o pico do íon molecular em m/z 135 (95%) e os picos e m/z 93 (100%, $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}$) e m/z 65 (15%, $93\text{-H}_2\text{CN}$) (Esquema III.1, pág. 230). O valor de m/z 93 garante o nitrogênio ligado no anel aromático, pois os dados de IV e RMN não se diferenciam muito da metil-benzamida. Com isso definiu-se a estrutura como acetanilida.

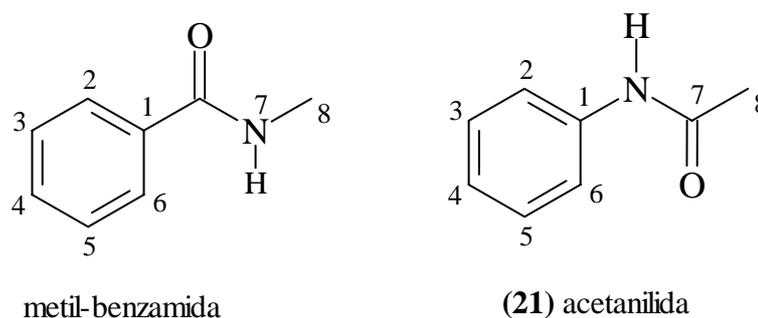


Tabela III.1. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) em CDCl_3 da substância

21 (acetanilida)		
C	δ_{C}	δ_{H}
1	137,92	-
7	168,70	-
CH		
2, 6	119,97	7,49
3, 5	128,88	7,29
4	124,24	7,08
CH₃		
8	24,44	2,15
NH	-	7,61

3294.2,3194.2,3135.7,3062.2,3021.8,2925.9,2855.8,2800.8=
 2700.1,2620.3,2275.6,1951.6,1875.0,1799.2,1663.1,1601.2=
 1553.7,1495.8,1434.6,1367.9,1320.2,1261.1,1177.7,1080.1=
 1039.1,1011.9,959.9,906.2,841.8,755.3,693.3,605.5=
 532.5,507.4,455.7,439.6=

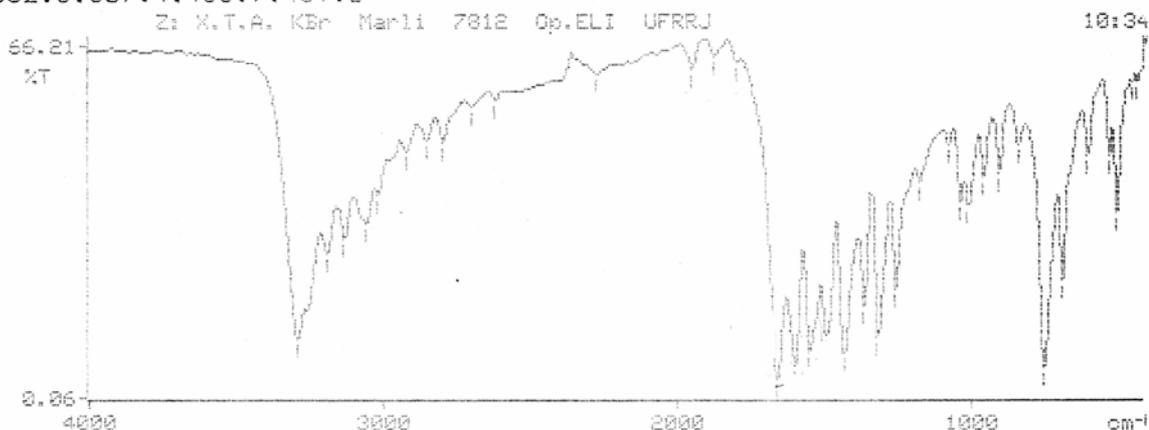


Figura III.3. Espectro de IV da substância 21 (acetanilida)

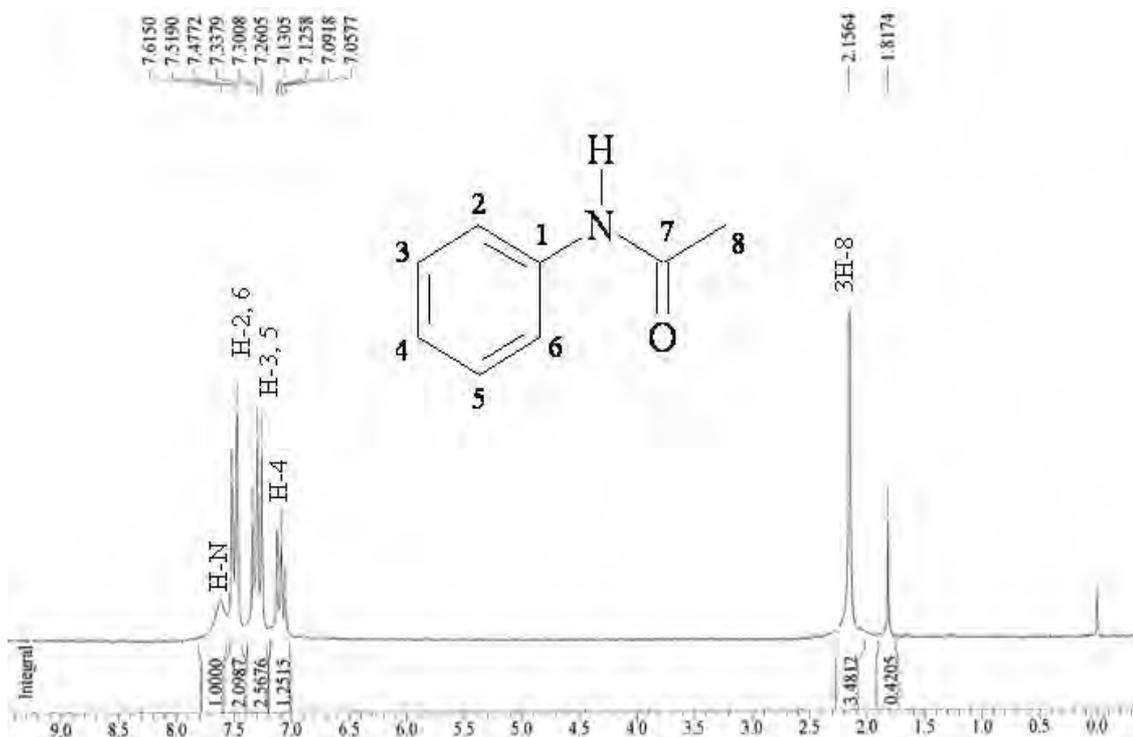


Figura III.4. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 21 (acetanilida)

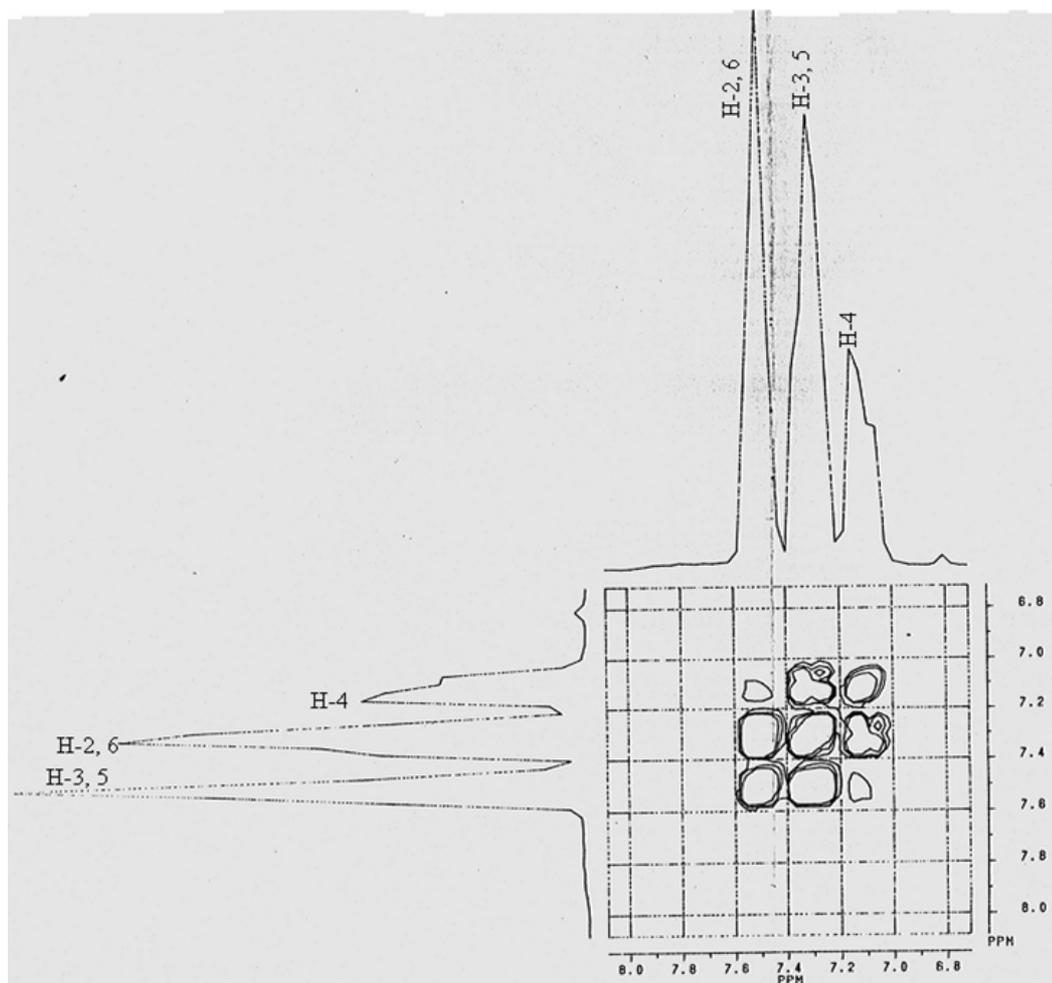


Figura III.5. Espectro de RMN COSY (200 MHz, CDCl_3) da substância **21** (acetanilida)

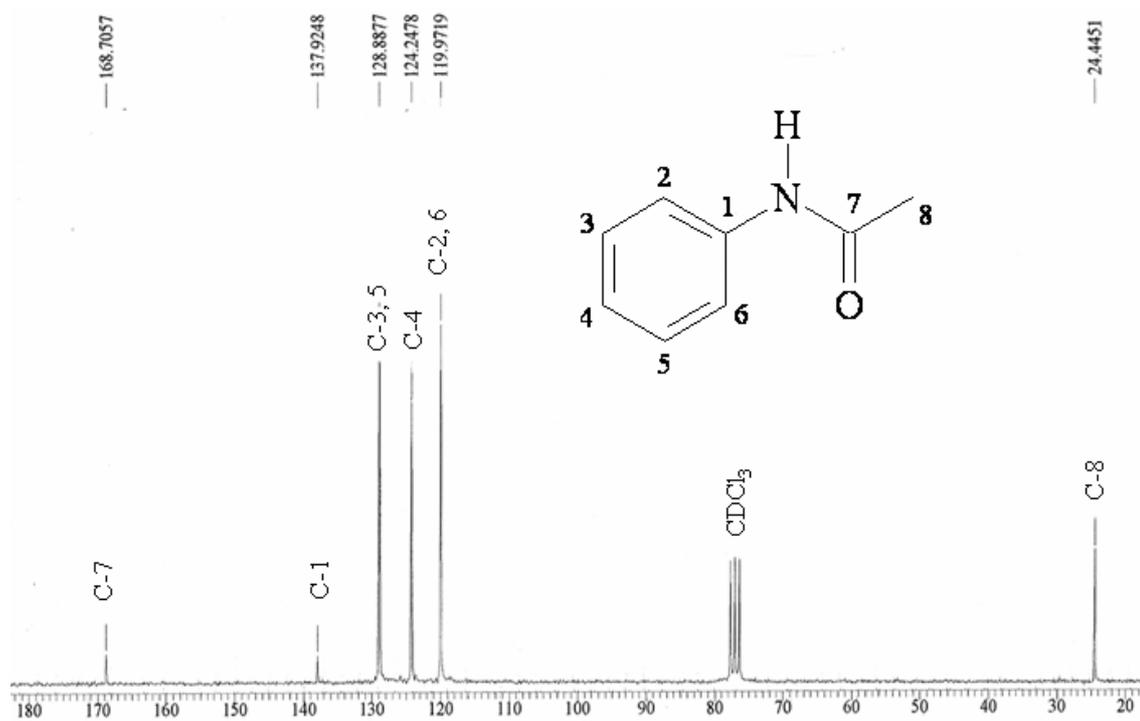


Figura III.6. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **21** (acetanilida)

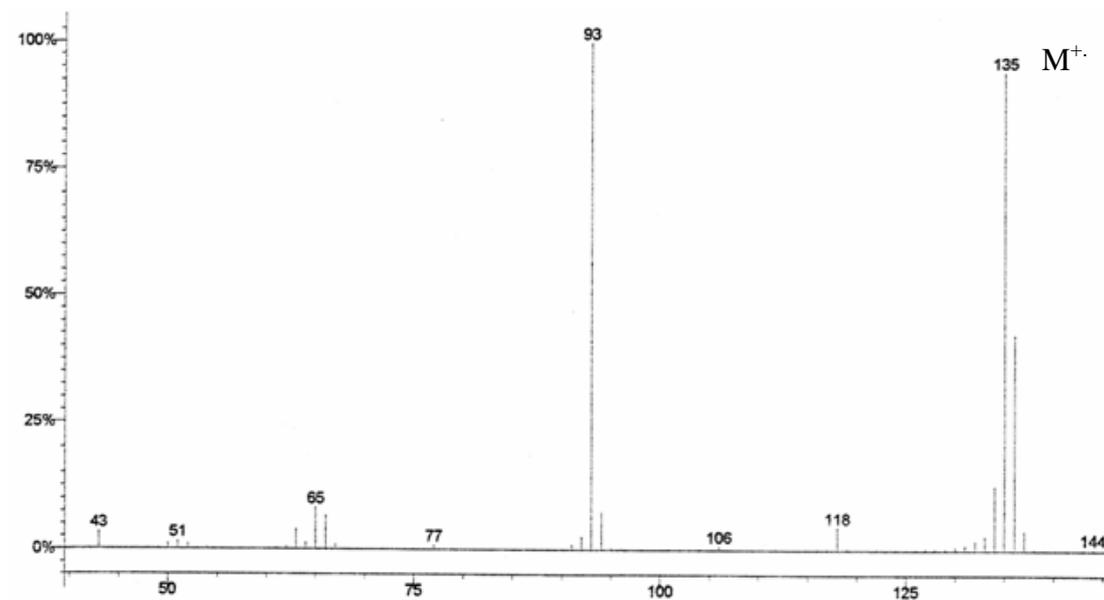
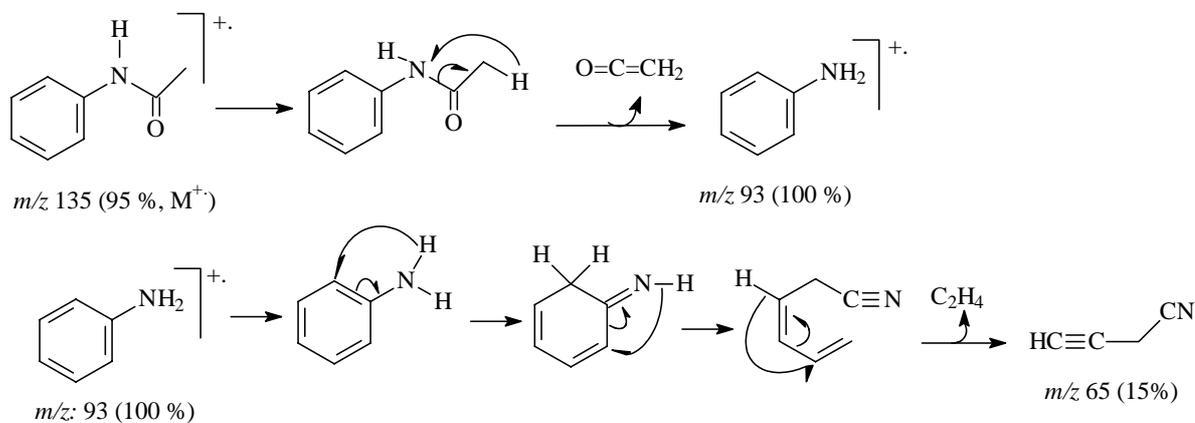


Figura III.7. Espectro de massas da substância **21** (acetanilida)



Esquema III.1. Principais fragmentos referentes aos picos do espectro de massas da substância **21** (acetanilida)

III.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLARKE, By B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potencial medical applications. *Biol. Rev.*, v. 72, p. 365-379, 1997.

DALY, J. W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the Amphibian. *Toxicon*, v. 25, p. 1023-1095, 1987.

EDSTROM, A. *Venomous and Poisonous Animals*. Florida: Krieger Publishing Company, 1992, p. 115-123.

IZECKSOHN, E. Novo gênero de Hylidae brasileiro (Amphibia, Anura). *Rev.Univ. Rural, Ser. Cienc. Vida*, v. 18, p. 47-52, 1998.

MACIEL, N. M.; SCHWARTZ, C. A.; PIRES Jr, O. R.; SEBBEM, A.; CASTRO, M.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; SCHWARTZ, E. N. F. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 134B, p. 641-649, 2003.

MONTECUCCHI, P. C.; de CASTIGLIONE R.; PIANI, S.; GOZZIM, L.; ERSPAMER, V. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int. J. Peptide Prot. Res.*, v. 17, p. 275-283, 1981.

NAPOLI, M. F. *Xenohyla truncata* (NCN). Antipredator behavior. *Herpetological Review*, v. 32, n. 1, p. 36-37, 2001.

SAVAGE, J. M. *The geographic distributions of frogs: patterns and predictions*. In *Evolutionary Biology of the Anurans, Contemporary Research on Major Problems*. Colombia: ed. J. L. Vial, University of Missouri Press, 1976, p. 351-445.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous grandular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 111A, n. 1, p. 1-29, 1995.

CAPÍTULO IV
ATIVIDADES BIOLÓGICAS

IV.1 ATIVIDADE MOLUSCICIDA

Este experimento foi realizado em colaboração com o Departamento de Biologia Animal, Laboratório de Biologia, DBA-IB, UFRuralRJ, com a ajuda da professora bióloga Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini e as graduandas em biologia Luciana da Silva Paschoal e Kelly Zolly Alves (bolsistas do PIBIC, LQPN-DEQUIM-UFRuralRJ), orientadas pelo Prof. Mário G. de Carvalho.

IV.1.1 Introdução

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta 200 milhões de pessoas nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Tendo a água (doce) como seu principal veículo de transmissão. Esta doença encontra-se em franca expansão devido à situação precária de saneamento básico e ao baixo nível sócio econômico de algumas regiões (NARVAÉZ, 1983; PRATA, 1987).

A doença é causada pela presença de esquistossomo (*Schistosoma haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*) no intestino ou na bexiga da pessoa infestada. Dentre as espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem somente o *S. mansoni* existe na América, sendo responsável pela esquistossomíase mansônica ou intestinal. No Brasil calcula-se que existam entre 8 a 12 milhões de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, que tem como principal hospedeiro intermediário o caramujo *Biomphalaria glabrata* (NARVAÉZ, 1983; PRATA, 1987, SOUZA & LIMA, 1990).

A esquistossomose mansônica tem com sinônimas: Esquistossomose, Esquistossomíase, Bilharziose ou Bilharzíase Mansônica, Mansoni ou Intestinal, Doença de Manson – Pirajá da Silva (PRATA, 1987).

A esquistossomose mansônica caracteriza-se por uma fase aguda, muitas vezes despercebida, e uma crônica, na qual podem surgir formas graves, evidenciadas principalmente pela hipertensão porta hepática ou pulmonar. Em muitos casos a gravidade que assume a doença é a deficiência orgânica que geralmente faz da esquistossomose um dos mais sérios problemas de saúde pública, em escala mundial e tem se tornado um verdadeiro flagelo para as populações das áreas endêmicas. Na atualidade, é considerada uma das doenças humanas mais importantes, dentre as causadas por parasitas de animais (PRATA, 1987).

A fase aguda da doença se divide em fase pré-postural e fase aguda. A fase pré-postural se caracteriza por uma sintomatologia variada que ocorre cerca de 10-30 dias após a infecção. Neste período há pacientes que não se queixam de nada (forma inaparente ou assintomática) e outros reclamam de mal estar, com ou sem febre, problemas pulmonares (tosse), dores musculares, desconforto abdominal e um quadro de hepatite aguda. A fase aguda aparece em torno do 50º dia e dura até cerca de 120 dias após a infecção. Nesta fase, o paciente apresenta mal-estar, febre alta, emagrecimento, fenômenos alérgicos, tosse, diarreia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia. Pode haver a morte do paciente nesta fase ou então evoluir para a esquistossomose crônica, cuja evolução é lenta, e na grande maioria dos casos, benigna.

Esquistossomose crônica pode apresentar grandes variações clínicas, sendo as alterações predominantemente intestinais, hepatointestinais ou hepatoesplênicas. As alterações dos órgãos atingidos são:

- a) **Intestino:** em muitos casos, o paciente apresenta diarreia mucossanguinolenta e dor abdominal. Nos casos crônicos graves pode haver diminuição do peristaltismo e constipação constante. Na maioria dos casos o paciente queixa-se, esporadicamente, de dores abdominais, com fases de diarreia mucossanguinolenta e outras de constipação, intercaladas por longos períodos normais.
- b) **Fígado,** apresenta-se com volume maior e bastante doloroso à palpação. Em uma fase mais adiantada, este órgão, pode estar menor e fibrosado (Fibrose de Symmers). Em seguida, ocorrerá a manifestação mais típica e mais grave, a hipertensão porta hepática. Com a evolução da doença, a hipertensão poderá intensificar-se causando no paciente uma série de alterações como a esplenomegalia e a ascite (barriga d'água) (DOS SANTOS, 1997).

No Brasil, 8 milhões são infectados, com distribuição em vastas regiões, desde Belém do Pará até o Norte do Paraná, com dois focos isolados em Santa Catarina (KATZ, 1997) e um caso no Rio Grande do Sul (CARVALHO *et al.*, 1998). As principais zonas endêmicas estão situadas na região Nordeste e em Minas Gerais. O ciclo evolutivo é mantido por seu principal hospedeiro definitivo, o homem (embora acometa também roedores silvestres, gado, etc.), e por hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria* (KATZ, 1997). Ao gênero *Biomphalaria* pertencem as três espécies hospedeiras de *Schistosoma mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. As outras sete espécies de *Biomphalaria* (*B. peregrina*, *B. amazonica*, *B. intermédia*, *B. occidentalis*, *B. schrammi*, *B. oligoza* e *B. kuhniana*) e uma sub-espécie (*B. tenatophila guaibensis*) descritas até o momento, não foram encontradas com infecção natural por *S. mansoni*. Entretanto, a *B. peregrina* e *B. amazônica* mostraram-se susceptíveis ao *S. mansoni* em infecções experimentais, podendo ser consideradas hospedeiras em potencial do trematódeo no Brasil (SOUZA & LIMA, 1990).

Entre as maneiras de controlar a esquistossomose pode-se destacar a quimioterapia com drogas esquistomicidas administradas oralmente, como o praziquantel, metrifonato e oxamniquina. Entretanto, as drogas sintéticas são caras e, em muitos casos, a re-infecção pode voltar (HOSTETTMANN, 1991). Os esquistomicidas mais utilizados são: praziquantel e oxamniquina (Figura IV.1, pág. 234).

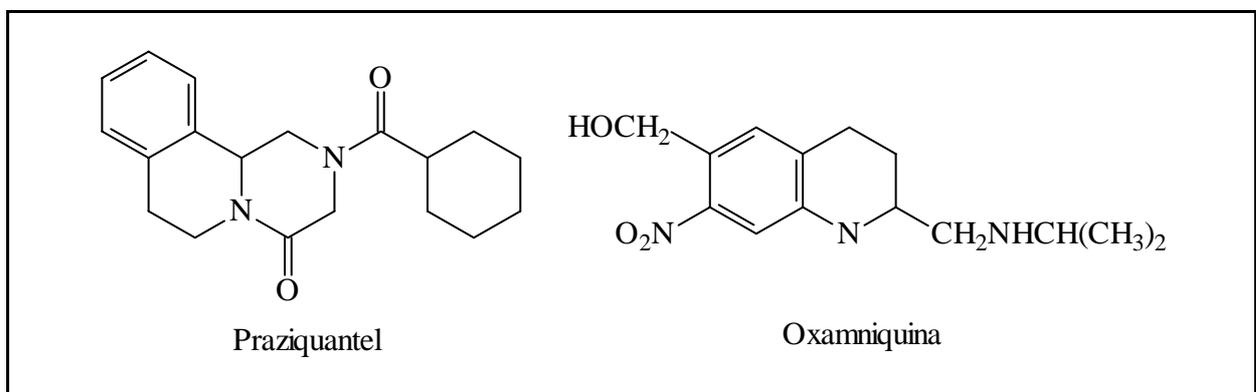


Figura IV.1. Esquistomicidas utilizados em pacientes com esquistossomose

Outra maneira de controlar a esquistossomose em regiões endêmicas, é associar o tratamento dos doentes ao combate dos moluscos transmissores através do uso de moluscidas (SOUZA & LIMA, 1990)

Os moluscidas mais usados em nosso País são:

- A) Cal: útil para tratar cacimbas e poços de água parada, pois a água pode ser usada 24 horas após.
- B) Sais de cobre: carbonato e sulfato de cobre não são tóxicos para animais superiores. O carbonato de cobre pode ser empregado em locais de criação de peixes.
- C) Niclosamida (=Bayluscide): é bastante eficaz no campo para matar os moluscos e suas desovas, mas é tóxico para os peixes, sendo pouco tóxico para mamíferos nas concentrações utilizadas.

Atualmente um campo de pesquisa que tem se desenvolvido é o que visa a obtenção de substâncias tóxicas de origem vegetal, para os moluscos transmissores da esquistossomose. Isso se deve-se principalmente a problemas envolvendo o uso de moluscidas sintéticas como: biodegradação lenta, toxicidade para outros organismos, alto custo, necessidade de importação, entre outros (DOS SANTOS, 1997).

A primeira tentativa para o controle da esquistossomose pelo uso de plantas moluscidas foi realizada em 1930, quando ARCHIBALD *et al.*, 1933 e WAGNER, 1936 plantaram palma do deserto (*Balanites aegyptiaca* e *B. maughamii*), ao longo do curso das águas do Sudão e Sudeste da África, respectivamente.

Testes no campo e em laboratório, realizados por estes cientistas, indicaram que os frutos destas plantas derrubadas na água inibiam o aumento da densidade populacional dos caramujos (KLOOS & MCCULLOUGH, 1982). Desde então, mais de 1100 espécies de plantas foram testadas e muitas apresentaram atividade moluscida significativa.

De forma geral a maioria destas plantas e seus compostos naturais com atividade moluscida reconhecida, ainda não tiveram uma aplicação efetiva no campo, porque não preencheram a todos os pré-requisitos de uma planta moluscida comercialmente viável, cujas principais características são (McCULLOUGH, 1992; WHO, 1983):

- a) O extrato bruto da planta (peso seco) é ativo quando mata 90% dos caramujos expostos por 24 hs com a temperatura da água constante e a concentração igual ou menor a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ppm) (WHO, 1983);
- b) O extrato aquoso frio ou quente da planta é ativo quando mata 90% dos caramujos expostos por 24 hs com a temperatura da água constante e a concentração igual ou menor a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (WHO, 1983);
- c) Opcionalmente, um extrato alcoólico (metanólico) de planta é ativo quando mata 90% dos caramujos expostos por 24 hs com a temperatura da água constante e a concentração igual ou menor a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (WHO, 1983);
- d) Opcionalmente, um extrato lipofílico de planta é ativo quando mata 90% dos caramujos expostos por 24 hs com a temperatura da água constante e a concentração igual ou menor a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MARSTON & HOSTETTMANN, 1991);
- e) As plantas devem ser de crescimento abundante na área endêmica ou de fácil cultivo. Além disso, é preferencial que as partes utilizadas sejam os frutos, folhas ou flores (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985);
- f) Visando a redução do custo financeiro, é preferível que os constituintes ativos sejam extraídos com água ao invés de solventes orgânicos (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985);
- g) O extrato da planta moluscida deve apresentar uma baixa toxicidade para organismos não alvos (incluindo o homem). Sendo vantajoso para o estudo do impacto ambiental e toxicológico, o isolamento dos princípios ativos da planta (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985);

- h) As técnicas de aplicação devem ser simples e seguras para o operador (WHO, 1983);
- i) O custo deve ser baixo (WHO, 1983);

Os problemas que envolvem a obtenção de moluscidas vegetais se relacionam, principalmente, com técnicas de extração e solventes utilizados, que podem aumentar, diminuir ou anular a ação tóxica para moluscos. Existem ainda diferenças intra-específicas, segundo o local da procedência ou época de coleta da planta, que influem na sua ação tóxica. Além disso, torna-se necessário fazer um grande número de testes biológicos e estudos diversos com uma substância tóxica, antes de chegar a seu emprego no campo, em grande escala (SOUZA *et al.*, 1987).

IV.1.2 Materiais e Métodos

IV.1.2.1 Obtenção dos extratos e substâncias puras

Os extratos testados de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. foram obtidos de acordo com os Esquemas I.1 (pág. 33) e I.2 (pág. 34) descritos no Capítulo I. Os extratos *Solanum crinitum* Lam. dos frutos glicocalcóides totais foram obtidos conforme Esquema II.1 (pág. 96) descrito no Capítulo II e o da parte aérea através de maceração com hexano e MeOH, após evaporação dos solventes.

A β -amirina (**1a**) e o ácido ursólico (**3**) (Figura IV.2, pág. 236) foram obtidos de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. de acordo com os Esquemas I.1 (pág. 33) e I.2 (pág. 34) descritos no Capítulo I.

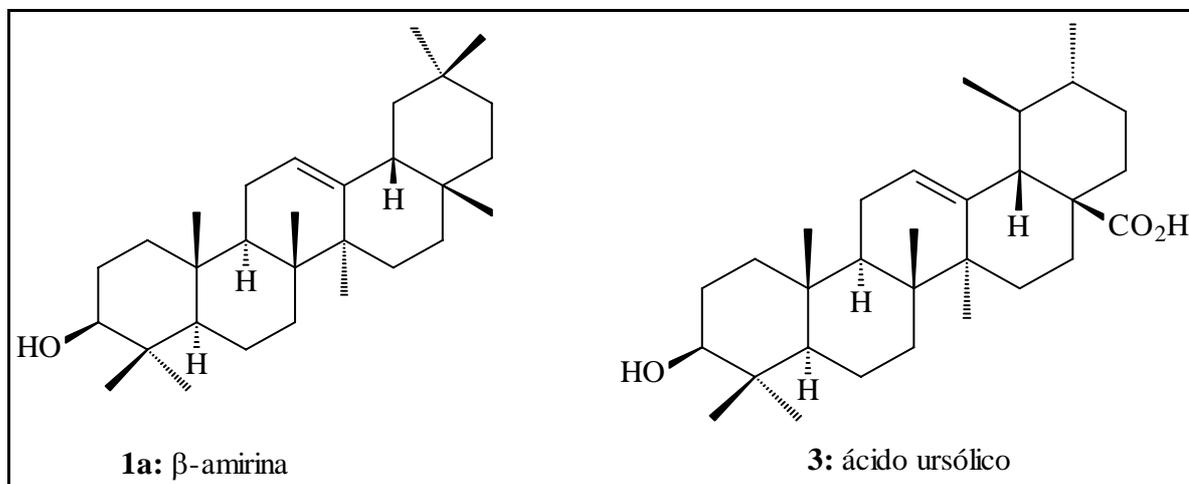


Figura IV.2. Estrutura das substâncias submetidas ao teste de atividade moluscida

IV.1.2.2 Bioensaio com o caramujo

O teste para verificação da atividade moluscida envolve basicamente a introdução da substância ou extrato da planta em um recipiente contendo os caramujos e depois observar a mortalidade. Para plantas, o ensaio pode ser feito através da suspensão do extrato da planta na água.

A OMS recomenda um método padrão para o *screening* da atividade moluscida em laboratório (WHO, 1965; citado no livro de MARSTON & HOSTETTMANN, 1991), mas na

prática a procedência é difícil devido à viabilidade do local dos caramujos, qualidade da água e outros fatores (MARSTON & HOSTETTMANN, 1991).

Foram utilizados caramujos das espécies *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e descendentes de exemplares, não infectados por trematódeos, oriundos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

a) Materiais

1. Caramujos com 10-23 mm de diâmetro (adultos);
2. Água desclorada;
3. Provetas;
4. Pipetas aferidas de 0,5 e 1 mL, seringas de 50-500 μ L, ou micropipeta de 20-200 μ L;
5. Recipientes (copos) de 125 mL e 250 mL para cinco concentrações diferentes e em duplicata;
6. Cremophor (detergente para ajudar na solubilidade da amostra);
7. Solvente dimetil sulfóxido (DMSO);
8. Placa de Petri;
9. Balões volumétricos.

b) Procedimento (modificado de MARSTON & HOSTETTMANN, 1991; DOS SANTOS, 1997)

1. Solução estoque de 100 μ g/mL: é colocado uma gota de cremophor (detergente) no extrato previamente pesado e adicionado DMSO (0,1%) e completado o volume para 1L;
2. Para o ensaio preliminar são transferidos 125 mL da solução estoque para os copos e em seguida foi mergulhado 5 caramujos (n=2). A relação é sempre de 25 mL de solução por caramujo. Se o extrato apresenta atividade, o ensaio é feito nas concentrações de 50 e 10 μ g/mL;
3. Para o ensaio final: São escolhidas 5 concentrações para o ensaio definitivo de acordo com o resultado preliminar. Alíquotas da solução estoque são completadas com água desclorada para dois copos de 250 mL cada, em seguida 10 caramujos são mergulhados. Para cada concentração são utilizados 20 caramujos (n=2);
4. Após 24 hs os caramujos são transferidos para uma placa de Petri onde é feita a verificação dos batimentos cardíacos com um microscópio. Para confirmação da mortalidade, os caramujos são transferidos para o copo contendo apenas água (sem cloro) e após 24 hs, faz-se novo exame;
5. Controle: uma gota de cremophor, DMSO (0,1%) e água sem cloro. Para o teste preliminar são transferidos 5 caramujos para um copo com 125 mL e n=2 e para o teste definitivo são transferidos 10 caramujos para um copo com 250 mL e n=2;
6. Faz-se o cálculo da CL_{50} analisando a concentração em função da percentagem de vivos pela reta da regressão linear.

IV.1.3 Resultados

Os resultados dos testes preliminares (triagem) com os extratos de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. e *Solanum crinitum* Lam. das substâncias β -amirina (**1a**) e ácido ursólico (**3**) sobre os moluscos *B. tenagophila* e *B. glabrata* são apresentados nas Tabelas IV.1, IV.2 e IV.3 na pág. 238.

Apenas o extrato dos frutos verdes contendo glicoalcalóides totais de *Solanum crinitum* Lam. apresentou-se ativo frente ao caramujo *Biomphalaria tenagophila*, com CL_{50} =31,87 μ g/mL e CL_{90} =37,03 μ g/mL. A Tabela IV.4, (pág. 238) apresenta as

concentrações testadas e o Gráfico IV.1 (pág. 239) demonstra a reta de regressão linear onde foram encontrados os valores da concentração letal.

Tabela IV.1. Triagem da ação moluscicida dos extratos sobre *Biomphalaria tenagophila* (5 caramujos por concentração) em laboratório após exposição por 48 horas, pH 5-7

Espécies de plantas	Partes testadas (extrato*)	Diâmetro do caramujo (mm)	Conc. testada µg/mL	Mortalidade (%)	Atividade
<i>P. lancifolia</i>	galho (MM)	10-14	100	0	Inativo
<i>P. lancifolia</i>	folha (MM)	9-13	100	0	Inativo
<i>S. crinitum</i>	parte aérea (H)	11-14	100	0	Inativo
<i>S. crinitum</i>	parte aérea (M)	11-14	100	0	Inativo
<i>S. crinitum</i>	frutos verdes (E)	10-11	100	0	Inativo
<i>S. crinitum</i>	frutos verde glicoalcalóides totais	9-14	100	100	Ativo
			50	100	
			10	40	

* E=etanol; H=hexano; M=metanol; M/M=metanol/metanol;

Tabela IV.2. Triagem da ação moluscicida dos extratos sobre *Biomphalaria glabrata* (5 caramujos por concentração) em laboratório após exposição por 48 horas, pH 5-7

Espécies de plantas	Partes testadas (extrato*)	Diâmetro do caramujo (mm)	Conc. testada µg/mL	Mortalidade (%)	Atividade
<i>P. lancifolia</i>	galho (DH)	10-14	100	0	Inativo
<i>P. lancifolia</i>	folha (D)	10-14	100	0	Inativo

* D=diclorometano; DH=diclorometano/hexano;

Tabela IV.3. Triagem da ação moluscicida de substâncias sobre *Biomphalaria tenagophila* (5 caramujos por concentração) em laboratório após exposição por 48 horas, pH 5-7

Substâncias testadas	Diâmetro do caramujo (mm)	Conc. testada µg/mL	Mortalidade (%)	Atividade
β-amirina	10-14	100	0	Inativo
Ácido ursólico	10-14	100	0	Inativo

Tabela IV.4. Atividade moluscicida do extrato dos frutos verdes glicoalcalóides totais de *S. crinitum* Lam. sobre *Biomphalaria tenagophila* (10 caramujos por concentração) em laboratório após exposição por 48 horas, pH 5

Espécie de Planta	Partes testadas (extrato*)	Diâmetro do caramujo (mm)	Conc. testada µg/mL	CL ₉₀ /CL ₅₀ (µg/mL)
<i>S. crinitum</i>	frutos verdes glicoalcalóides totais	9-13	50	37,03/31,87
			40	
			30	
			20	
			10	

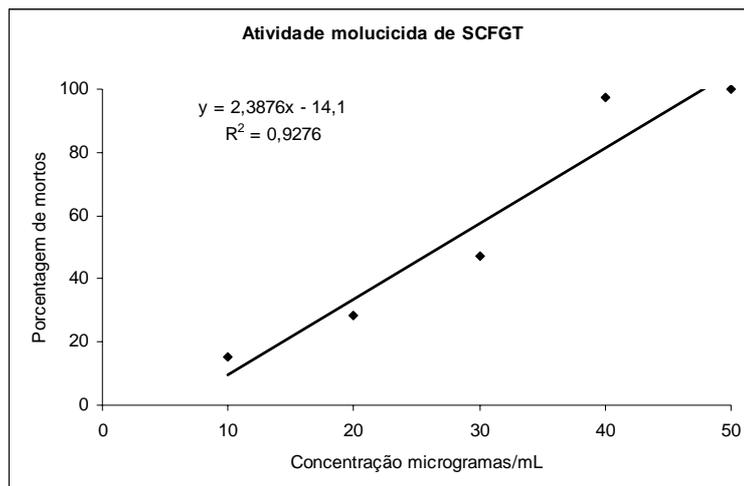


Gráfico IV.1. Reta de regressão linear da atividade moluscicida do extrato dos frutos verdes glicoalcalóides totais de *S. crinitum* Lam. sob *Biomphalaria tenagophila*

IV.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Este experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Toxicologia Ambiental (Imunotoxicologia) - LATA, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Ronald Bastos Freire.

IV.2.1 Introdução

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO (Espécies reativas de oxigênio) ou ERN (Espécies reativas de nitrogênio). As principais ERO encontram-se divididas em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido (O_2^\bullet), peroxila (ROO^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante (BARREIROS *et al.*, 2006).

Danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio têm sido chamadas de “estresse oxidativo”. Em organismos aeróbicos, o oxigênio molecular é o aceptor final de elétrons em diferentes sistemas de transporte, os quais estão presentes nas mitocôndrias (MARR & MÜLLER, 1995).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, exemplo da GPx (Se-glutationa peroxidase), CAT (catalase) e SOD (superóxido dismutase) ou não-enzimaticamente a exemplo de GSH (glutationa), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH₂. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS *et al.*, 2006). Todavia, quando gerados em excesso, seja por um aumento da produção por processos mórbidos ou fatores ambientais, seja por redução da capacidade antioxidante, tornam-se deletérias para todas as estruturas orgânicas. Esta situação é agravada na presença de íons metálicos, tais como ferro e cobre. (ARUOMA, 1996a).

Dentre os aspectos preventivos, é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o

aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral.

A busca de novos antioxidantes, mais específicos, mais potentes e a compreensão de seus mecanismos de ação tornam esta área muito atraente. Outro interesse ligado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativo desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS *et al.*, 2006).

Em consequência disso, a pesquisa de drogas que também apresentam efeito antioxidante (ARUOMA *et al.*, 1991; PUPPO *et al.*, 1990) e antioxidantes de origem natural, têm progressivamente, assumido um papel de destaque (AKANMU *et al.*, 1991).

Muitos estudos têm demonstrado a existência de capacidade antioxidante em extratos vegetais. Extratos de plantas que são geralmente empregadas como condimento (alecrim) apresentam excelentes atividades antioxidantes (ARUOMA, 1996a) e antiviral (ARUOMA *et al.*, 1996b).

IV.2.2 Materiais e Métodos

IV.2.2.1 Preparação dos extratos

Os extratos das folhas de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg., dos frutos verdes e tricomas dos frutos verdes de *Solanum crinitum* Lam. usados para os testes foram obtidos de acordo com o Esquema I.2 (pág. 34), descrito no Capítulo I e Esquemas II.1 (pág. 96), II.2, (pág. 100) descritos no Capítulo II, respectivamente.

IV.2.2.2 Procedimento experimental

Neste ensaio, as substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram expressas em termos da concentração de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) em nmol/mL (RIBEIRO *et al.*, 2002; OHKAWA *et al.*, 1979), visando a identificação de substâncias capazes de interagir com modelos geradores de radicais livres (RL). Os RL podem ser oriundos da lipoperoxidação de membranas eritrocitárias induzida por Fe^{++} /ácido ascórbico com formação de MDA ou de sistemas não enzimáticos formados por agentes oxidantes, na presença de sulfato ferroso e ácido octanóico, com formação de HNE.

Os testes foram realizados em quadruplicata, onde 10,0 mg dos extratos foram dissolvidos em 10,0 ml de etanol 0,1% por 24 hs (veículo). Controles apropriados foram realizados para eliminação de interferências no ensaio. Para o controle, as membranas eritrocitárias foram tratadas somente com etanol 0,1% e foram usados 2000 UI de vitamina E (α -tocoferol). Os ensaios foram otimizados para cada amostra e medidos a concentração de MDA e HNE antes e após a exposição ao extrato (KIM *et al.*, 2002; GAD, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2002; OHKAWA *et al.*, 1979). A atividade biológica relacionada á geração de radicais livres foi realizada após a incubação a 37 °C de ambos os sistemas após 60 minutos, em seguida acrescenta-se o ácido tiobarbitúrico (1,0 mL de ácido tricloroacético 10% e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%), que após incubação a 90°C durante 10 minutos, desenvolve cor, medida fotocolorimetricamente a 532 nm.

Análise estatística: Os valores médios dos dados foram analisados estatisticamente através da análise unidimensional da variância (ANOVA). As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas através do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) com o intuito de detectar diferenças significativas entre as amostras analisadas

*($p < 0,05$). Para as comparações de dados entre dois grupos, utilizou-se o teste de Student
**($p < 0,01$). As correlações bidimensionais seguiram os critérios de correlação de Pearson.

IV.2.3 Resultados

IV.2.3.1 Atividade antioxidante de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg.

O extrato metanólico da folha de *Plumeria lancifolia* (PLFM) apresentou atividade antioxidante semelhante ao controle (Gráfico IV.2, pág. 242), em pequenas concentrações inibiu a formação de radicais livres, porém em doses crescentes induziu a formação de radicais livres (Gráfico IV.3, pág. 243).

O extrato metanólico partição metanol da folha de *Plumeria lancifolia* (PLFMM) avaliado frente a sistemas geradores de radicais livres (Gráficos IV.2, pág. 242 e IV.4, pág. 243) induziu a a formação de radicais livres nos dois sistemas testados, o que significa que substâncias polares existentes em *Plumeria lancifolia*, possivelmente iridóides, aumentam a ação tóxica dos radicais livres nas células.

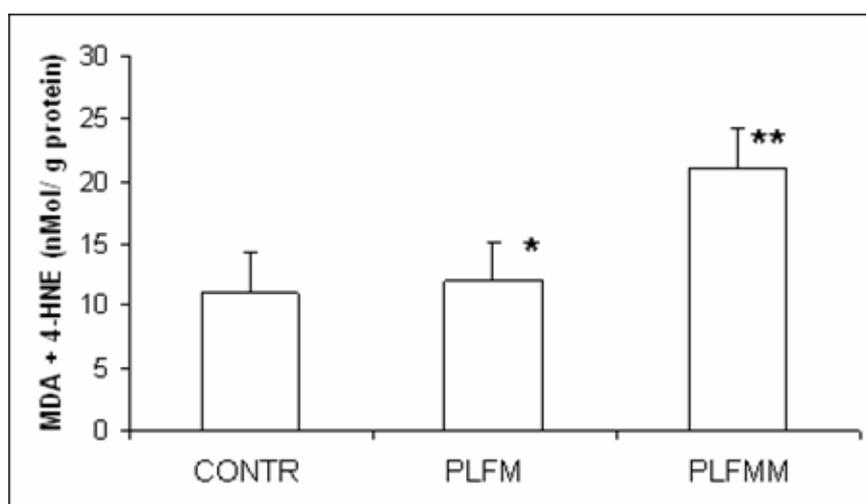


Gráfico IV.2. Atividade antioxidante dos extratos metanólico (PLFM) e metanólico partição metanol das folhas (PLFMM) de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. em malondialdeído com 4-hidroxinonenal (MDA+4-HNE) gerados em membranas eritrocitárias * valores para $p < 0,05$ e **valores para $p < 0,01$

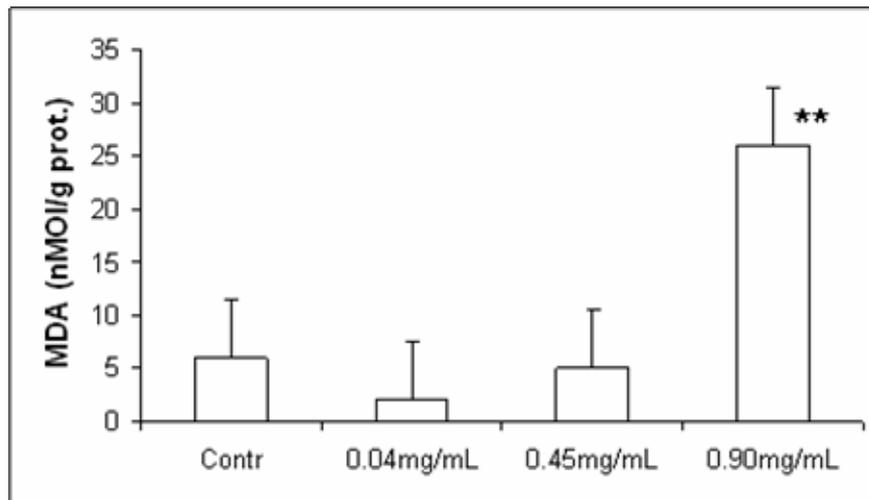


Gráfico IV.3. Determinação de TBARS em membranas de células de eritrócitos tratadas em diferentes concentrações com o extrato metanólico de folhas de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. (PLFM) ** valores para $p < 0,01$

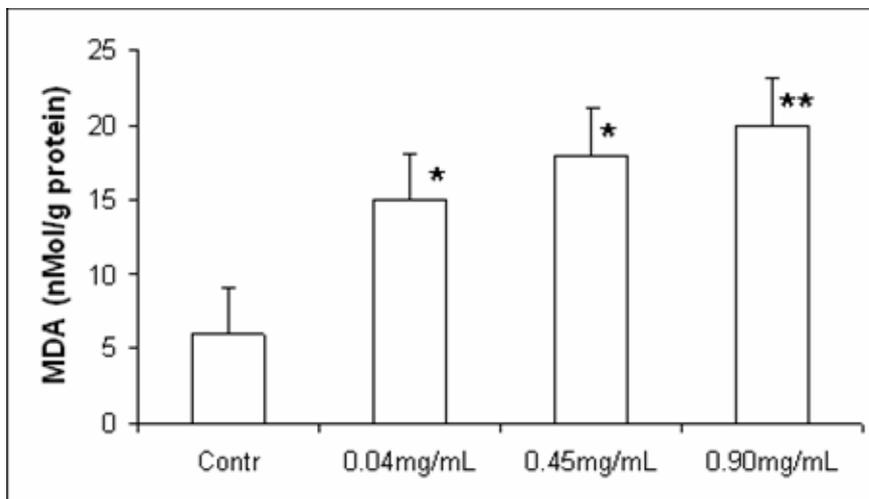


Gráfico IV.4. Determinação de TBARS em membranas de células de eritrócitos tratadas em diferentes concentrações com o extrato metanólico partição metanol de folhas de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. (PLFMM) * valores para $p < 0,05$ e **valores para $p < 0,01$.

IV.2.3.2 Atividade antioxidante de *Solanum crinitum* Lam.

Foram testados os extratos metanólico dos tricomas dos frutos verdes de *Solanum crinitum* (SCTFVM) e glicoalcalóides totais dos frutos verdes de *Solanum crinitum* (SCFVG) frente a sistemas geradores de radicais livres (Gráficos IV.5, pag. 244, IV.6 e IV.7, pág. 245). O extrato SCTFVM em doses baixas (0,04 mg/mL e 0,45 mg/mL) reduziu a formação de radicais livres, porém em doses mais elevadas ocorreu a perda desta propriedade de proteção. Este efeito de proteção é atribuído à presença de substâncias fenólicas e flavonóides isolados deste extrato, estas substâncias são consideradas potencialmente seqüestradores de radicais livres, porém pelo que demonstra o Gráfico IV.6 (pág. 245) esta atividade de proteção esta diretamente relacionado com a concentração.

O extrato SCFVG aumentou a concentração de radicais livres nos dois sistemas testados (Gráficos IV.5, pag. 244 e IV.7, pág. 245). Deste extrato foram isolados os glicoalcalóides esteroidais solasonina (**12**), solamargina (**10**) e seu isômero *epi*-solamargina (**11**). Essas substâncias podem ser consideradas como substâncias potencialmente geradoras de radicais livres.

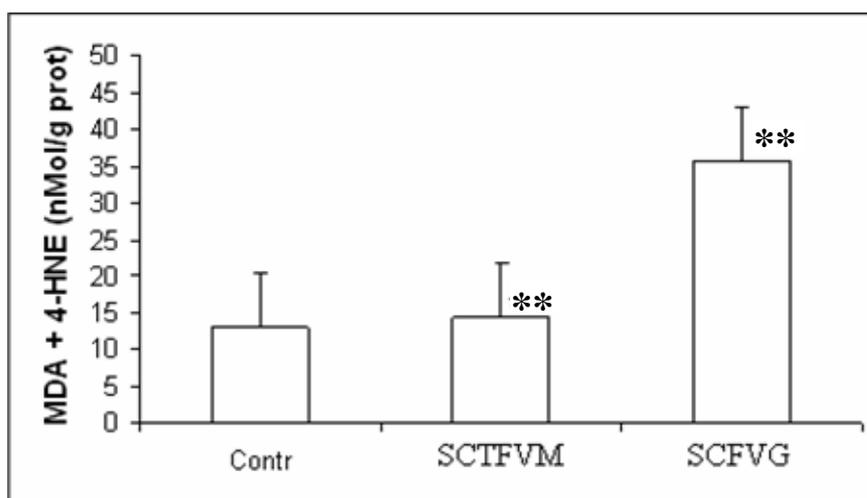


Gráfico IV.5. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos tricomas dos frutos verdes (SCTFVM) e dos glicoalcalóides totais dos frutos verdes (SCFVG) de *Solanum crinitum* Lam. em malondialdeído com 4-hidroxinonenal (MDA+4-HNE) gerados em membranas eritrocitárias **valores para $p < 0,01$

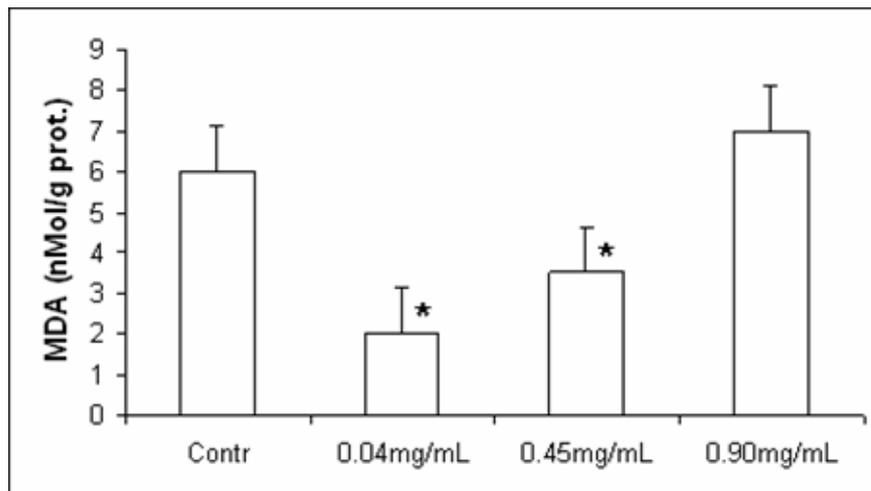


Gráfico IV.6. Determinação de TBARS em membranas de células de eritrócitos tratadas em diferentes concentrações com o extrato metanólico dos tricomas dos frutos verdes de *Solanum crinitum* Lam. (SCTFVM) * valores para $p < 0,05$

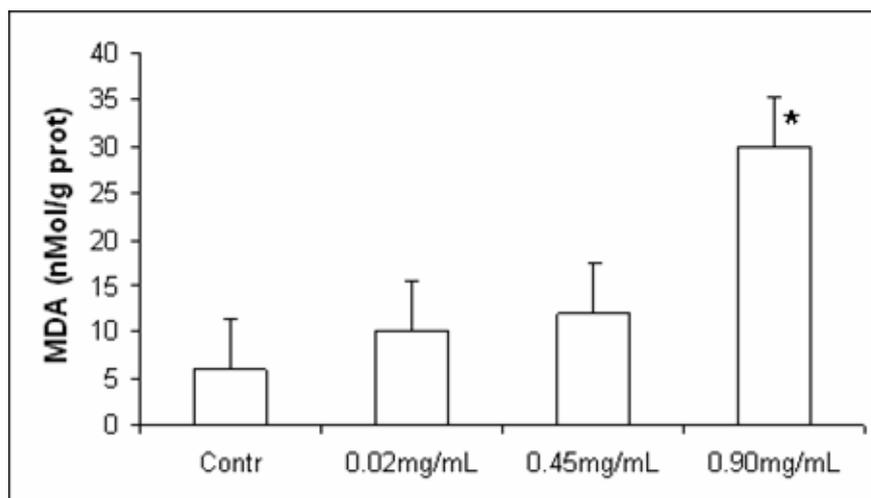


Gráfico IV.7. Determinação de TBARS em membranas de células de eritrócitos tratadas em diferentes concentrações com o extrato de glicoalcalóides totais dos frutos verdes de *Solanum crinitum* Lam. (SCFVG) * valores para $p < 0,05$

IV.3 TESTE DO EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS ALBINOS (SW)

Este experimento foi realizado em colaboração com grupo de pesquisa do professor Dr. Ronald Bastos Freire do Laboratório de Toxicologia Ambiental (Imunotoxicologia) - LATA, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com a participação da aluna do Curso de Medicina Veterinária Viviam de Assunção Nogueira (bolsista do PIBIC), mestranda do curso de Pós-graduação de Ciências Veterinárias – Sanidade Animal Renata de Oliveira Tavares e aluna bolsista do PIBIC (DEQUIM-LQPN) Kelly Zolly Alves orientada pelo Prof. Mário G. de Carvalho.

IV.3.1 Materiais e Métodos

Avaliou-se a toxidez do extrato bruto metanólico das folhas de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. sobre células peritoneais de camundongos albinos após 24 horas a uma temperatura de 37°C. O extrato testado foi obtido de acordo com o Esquema I.2 (pág. 34) descrito no Capítulo I. Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos (SW). Camundongos, machos, pesando em torno de 25,0 g foram anestesiados (Ketamina) e submetidos à lavagem peritoneal com 15,0 mL de meio TC199 (Difco, Inglaterra) estéril, para obtenção da suspensão de macrófagos, que foram purificados, quantificados e transferidos para tubos de ensaio estéreis mantidos a 37°C, sob condições padronizadas de cultivo.

Os extratos foram diluídos em meio TC199 e adicionados aos cultivos. Todos os ensaios foram realizados com quatro repetições. A morte celular foi estabelecida pela contagem microscópica de células viáveis na presença de 0,1% de corante vital (azul de trypan). A concentração capaz de causar 50% de mortes celulares foi estabelecida. O índice de ação tóxica cumulativa foi determinado pela manutenção dos cultivos celulares na presença da concentração relativa ao tempo de contato durante períodos de 12, 16 e 24 horas (Gráfico IV.8, pág. 247). Os resultados obtidos demonstraram que a concentração do extrato que causa efeito antibiótico (0,1 µg/mL de MeOH), que foi definida em testes preliminares, foi à mesma que causou 50% das mortes celulares em 16 horas de contato com 10⁶ macrófagos/mL.

IV.3.2 Resultados

Os efeitos cumulativos do extrato, através de cultivos por diferentes períodos de tempo, indicaram um número crescente de morte de células, proporcional ao tempo de exposição (Gráfico IV.8, pág. 247). Uma vez que o número de células mortas estabeleceu-se de forma linear em relação ao tempo de exposição, concluiu-se que os constituintes biologicamente ativos contidos no extrato metanólico podem exercer um efeito citotóxico cumulativo em sistemas biológicos vivos.

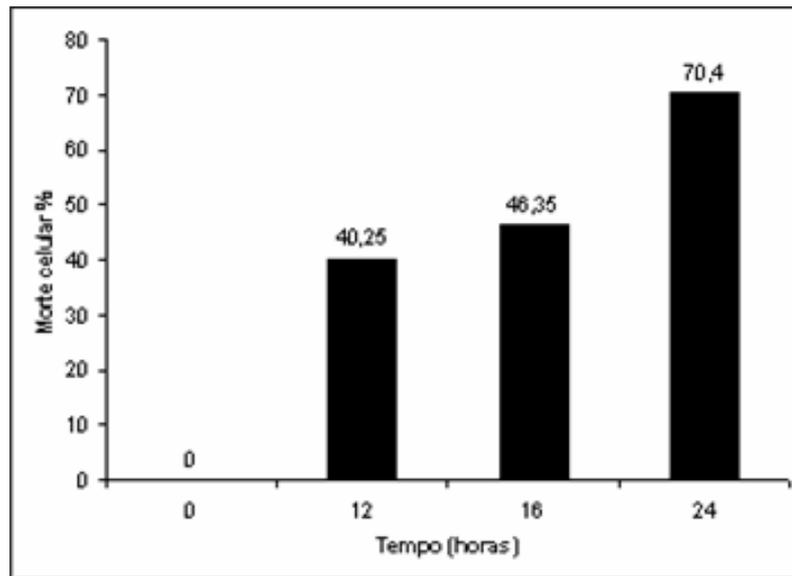


Gráfico IV.8. Morte de células por tempo de exposição ao extrato metanólico das folhas de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg.

IV.4 ENSAIO DE EDEMA AURICULAR

Este experimento foi realizado em colaboração com o doutorando Germán Matiz da Universidad de Cartagena – Colômbia, que realizou estágio sanduíche no LQPN-DEQUIM-UFRuralRJ.

IV.4.1 Introdução

Triterpenos, especialmente ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico são encontrados em grandes quantidades em plantas. Estes triterpenos e seus derivados são descritos na literatura como substâncias bioativas contra HIV (provocam inibição do HIV protease). A literatura descreve uma significativa atividade citotóxica para linhagens de células tumorais do ácido ursólico e seus derivados esterificados (MA *et al.*, 2005). Muitos triterpenos da classe oleanano e ursano são descritos na literatura por possuírem interessantes atividades biológicas, farmacológicas e medicinais semelhantes aos rotenóides e esteróides na atividade antiinflamatória, além de promoverem a supressão de tumores, a supressão da síntese de imunoglobulinas, proteção contra intoxicação no fígado, induzirem a produção de colágenos e a diferenciação em células leucêmicas e carcinomas (HONDA *et al.*, 1997).

O emprego de flavonóides na terapêutica é vasto e ainda empírico, uma vez que a prática de uso é mais antiga que o desenvolvimento de análises farmacológicas modernas. Embora alguns resultados tenham mostrado que os flavonóides podem apresentar efeito mutagênico, em geral são considerados como benéficos. Alguns medicamentos contêm flavonóides, e são indicados, em particular, para tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como co-fator de vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides possuam uma ação antitumoral considerável, podendo ser agentes antivirais, anti-hemorrágicos entre outros abordados (SIMÕES *et al.*, 1997).

O ensaio de edema auricular com o ácido ursólico (**3**) e seus derivados (**3a**, **3b**, **3c** e **3d**), do canferol (**15**) e seus derivados (**15a**, **15b** e **15c**) e do glicoalcalóide *epi*-solamargina (**11**) e derivado (**11**), teve como objetivo determinar a atividade inflamatória e inibitória destas substâncias.

IV.4.2 Materiais e Métodos

IV.4.2.1 Obtenção das substâncias

O ácido ursólico (**3**) foi obtido de galho e folha de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. e seus derivados: ácido ursônico (**3a**), ursolato de metila (**3b**), 3-*O*-acetil-ursolato de metila (**3c**) e 3-oxo-ursolato de metila (**3d**) foram obtidos através de reações, veja Esquemas I.1 (pág. 33) e I.2 (pág. 34) descritos no Capítulo I. Dos frutos verdes de *Solanum crinitum* Lam. foi obtida a *epi*-solamargina (**11**) e seu derivado peracetilado (**11a**) (Esquema II.1, pág. 96) e dos tricomas dos frutos verdes foi obtido flavonóide canferol (**15**) e seus derivados: 3,7,4'-trimetil-canferol (**15a**), 3,5,7,4'-tetrametil-canferol (**15b**), 3,7,4'-trimetil-5-acetoxiflavonol (**15c**) de acordo com Esquema II.2 (pág. 100) descritos no Capítulo II. A Figura IV.3, pág. 249) apresenta a estrutura dessas substâncias.

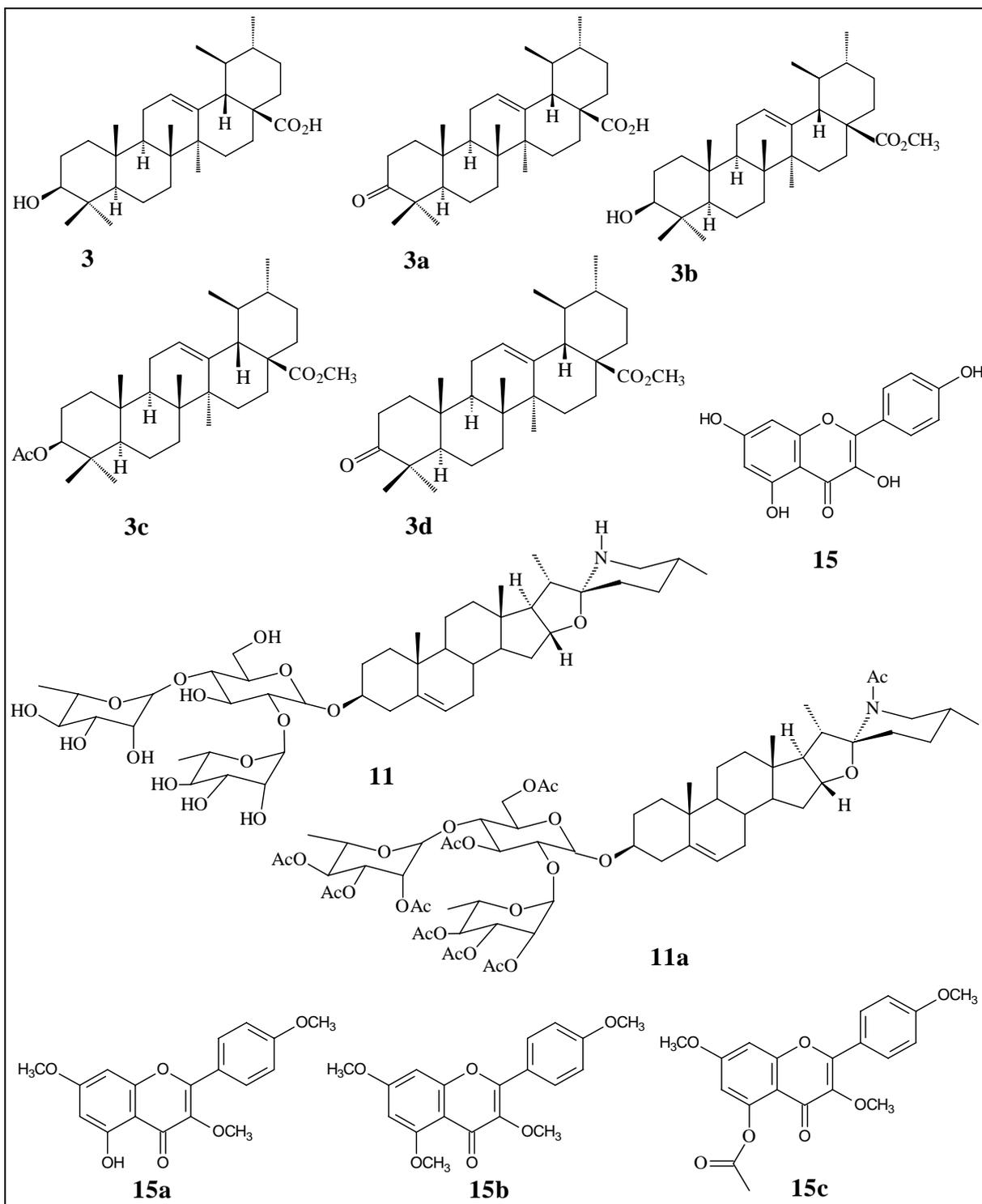


Figura IV.3. Estrutura das substâncias submetidas ao teste de edema auricular

IV.4.2.2 Reagentes

13-acetato de 12-tetradecanoil-forbol (TPA) e indometacina, obtidos de Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA).

IV.4.2.3 Animais

Camundongos ICR, machos tendo 8-10 semanas de vida e peso de 25-35 g foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e fotoperiodismo (luz entre 6:00 e 18:00 horas), com acesso *ad libidum* de água e alimento. Durante o experimento os animais foram tratados de acordo com as normas éticas de cuidados de animais em laboratório.

IV.4.2.4 Procedimento experimental para o ensaio de edema auricular

Para cada ensaio, os animais foram ordenados por peso e distribuídos em caixas em seis grupos, de modo que em cada caixa foram encontrados todos os pesos. Em cada caixa são encontrados um controle (TPA), um padrão positivo (indometacina) e a substância testada. Nos animais controles foram aplicados somente TPA: 2,5 µg na orelha direita sendo 10 µL na concentração de 0,125 µg/µL para cada lado da orelha. Nos animais padrões foram aplicados a mesma dose de TPA mais 500 µg de indometacina na orelha direita de forma consecutiva, 10 µL na concentração de 25 µg/µL para cada lado da orelha. Nos animais tratados foram aplicados a mesma dose de TPA mais 1000 µg da substância teste na orelha direita, sendo 10 µL na concentração de 50 µg/µL para cada lado da orelha. Quatro horas depois de aplicados os tratamentos os animais foram sacrificados com deslocamento da coluna cervical. Com a ajuda de um perfurador foram retiradas as seções circulares da orelha direita tratada e da orelha esquerda não tratada sendo pesadas em balança analítica Sartorius BP 221S. O peso líquido da orelha tratada menos o peso da orelha não tratada determinou a variação do peso devido a presença de inflamação. Uma variação alta representa uma inflamação extensa, um peso baixo, uma inibição na inflamação. As orelhas foram pesadas individualmente.

IV.4.3 Análises dos Dados

Os dados experimentais são apresentados como $\text{media} \pm \text{SD}$. As análises são calculadas usando ANOVA de uma via seguida de análise de Dunnett. As diferenças significativas são expressas como $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

IV.4.4 Resultados

O Gráfico IV.9 (pág. 251) demonstra a porcentagem da resposta inflamatória das substâncias analisadas em comparação com o controle TPA e o padrão antiinflamatório indometacina. O Gráfico IV.10 (pág. 251) demonstra a porcentagem de inibição das substâncias frente a indometacina. Observando os dois gráficos vemos que a *epi*-solamargina peracetilada (**11a**) apresentou efeito inibitório de inflamação maior de todas as substâncias analisadas superando o padrão indometacina. Observamos que a presença de grupos acetilas na estrutura do glicoalcalóide esteroide *epi*-solamargina (**11**) aumentou o efeito antiinflamatório. Já para o canferol (**15**) e seus derivados (**15a**, **15b** e **15c**) e o ácido ursólico (**3**) e seus derivados (**3a**, **3b**, **3c** e **3d**) o efeito de inibição foi mais significativo quando havia a presença de grupos OH na estrutura. A *epi*-solamargina peracetilada (**11a**) apresentou uma respostas de inibição de inflamação maior que o padrão indometacina, já o canferol (**15**) e o ácido ursólico (**3**) apresentaram esta resposta semelhante a indometacina. Esses resultados estimularam a continuidade de novas pesquisas.

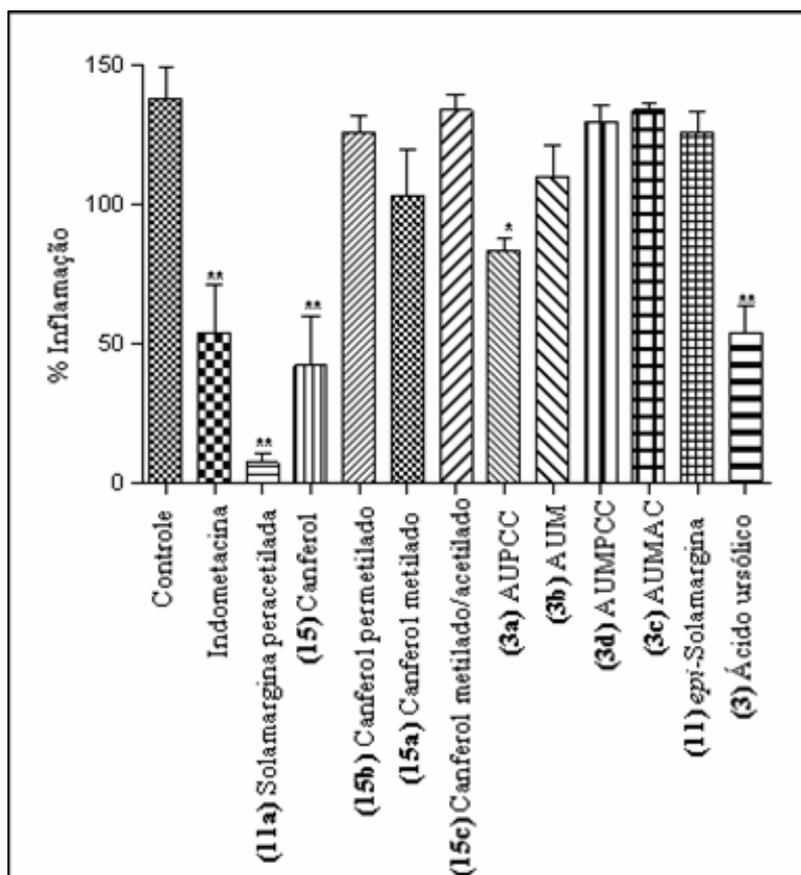


Gráfico IV.9. Resposta inflamatória das substâncias testadas

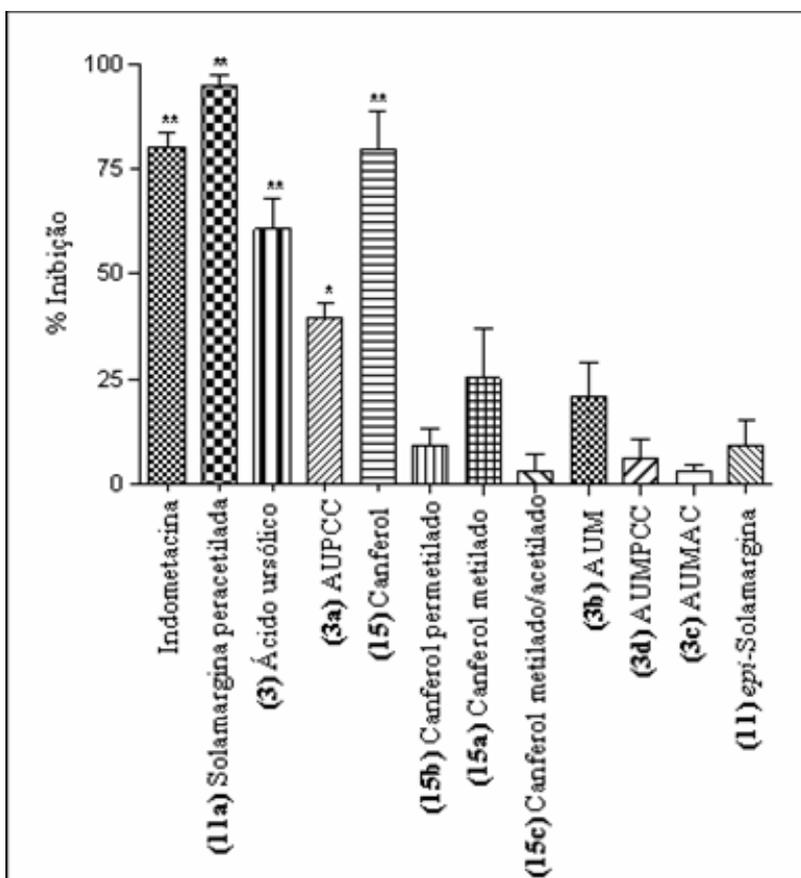


Gráfico IV.10. Resposta inibitória das substâncias testadas

IV.5 INIBIÇÃO METABÓLICA EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Este experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Toxicologia Ambiental (Imunotoxicologia) - LATA, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Ronald Bastos Freire com a participação da aluna de Iniciação Científica-PIBIC-UFRuralRJ: Vivian de Assunção Nogueira e mestrandas em Parasitologia veterinária, IB-DBA-UFRuralRJ Renata de Oliveira Tavares e Deise da Silva Jacques.

IV.5.1 Introdução

A leishmaniose tegumentar americana é uma zoonose amplamente distribuída no território brasileiro. A quimioterapia para a leishmaniose tem sido realizada com o uso de drogas antimoniais pentavalentes antimonial glucantime desenvolvidas há mais de 50 anos. Essas drogas são tóxicas e, devido à necessidade de utilizarem-se baixas doses, permitem a resistência do parasita aos tratamentos, sem um prognóstico de cura significativo. Recentemente a anfotericina B, vem sendo utilizada como alternativa aos efeitos tóxicos causados pelos agentes antimoniais. Apesar disso, essas drogas, por apresentarem efeitos diretos sobre as membranas celulares, sem seletividade específica para o parasita, mostra-se igualmente tóxicas e, muitas vezes ineficazes, representando, com isso, uma relação custo-benefício desfavorável (FRANÇA *et al.*, 1996; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2000).

A literatura descreve o uso de plantas como a *Cephaelis ipecacuanba* (Brot.) A. Rich (Rubiaceae), *Jacaranda brasiliana* Piers (Bignoniaceae), *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), *Clidemia hirta* (Melastomataceae), *Plectranthus amboinicus* (Lamiaceae), *Chenopodium ambrosioides* (Benopodiaceae), *Solanum americanum* (Solanaceae) e *Plantago major* (Plantaginaceae) como tratamento alternativo para a leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FRANÇA *et al.*, 1996). Um estudo recente sugeriu que diversos princípios ativos presentes em plantas medicinais, tais como alcalóides, flavonóides e triterpenóides poderiam originar medicamentos alternativos, sem contra indicações, para doenças como as protozooses que afetam as regiões tropicais e subtropicais do mundo (KAYSER *et al.*, 2000).

IV.5.2 Materiais e Métodos

IV.5.2.1 Preparação dos extratos

As partes aéreas de *Solanum crinitum*, utilizadas nesse experimento foram submetidas à maceração contínua com o solvente hexano, originando um resíduo sólido (extrato hexânico).

IV.5.2.2 Procedimento experimental

a) Medidas de citotoxicidade: A citotoxicidade foi medida através do ensaio de exclusão de azul de Trypan. Diferentes concentrações dos extratos (0,1; 1,0; 10,0; 100,0 µg/mL) foram adicionados a 10⁶ promastigotas de *Leishmania braziliensis*, mantidos sob condições de cultivo (37 ± 1°C, 5% CO₂) por uma hora. Os protozoários foram lavados e novamente

incubados, na ausência de extratos, por 24 horas adicionais, para que a reversão dos efeitos observados durante a primeira exposição fossem avaliados. Acrescentou-se igual volume de azul de Trypan (6,2 mM, NaCl 0,8 M) sobre as células do protozoário, que foram suavemente homogeneizadas e deixadas em repouso a temperatura ambiente. Após dois minutos as células viáveis (que excluíram o azul de Trypan) foram quantificadas em câmara hemocitométrica. O percentual de exclusão do corante também foi estimado após a primeira incubação. Todos os ensaios foram realizados com cinco repetições e comparados com um sistema controle constituído de células adicionadas somente do veículo: 0,1% de DMSO diluído em solução salina tamponada com fosfatos (PBS - pH 7,2).

b) Atividade mitocondrial: A atividade mitocondrial parasitária foi estimada comparando-se a capacidade de reduzir significativamente sais de tetrazólio (MTT) nas células normais e nas células tratadas com extratos (KATI-SISKO *et al.*, 2004). As células foram cultivadas em microplacas de poliestireno (de fundo chato) numa concentração de 10^6 macrófagos por mL e, após 12 hs de pré-condicionamento, as células foram tratadas com as várias concentrações de extratos e incubadas por 24 hs. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, adicionando-se, a cada orifício, 100 μ L de MTT-PBS na concentração de 1,0 mg/mL (P/V), procedendo-se a nova incubação (4 hs a 37 °C). Os cristais de formazana, gerados pela redução do corante nas células viáveis foram dissolvidos utilizando-se isopropanol acidificado com HCl 0,1 N. A atividade mitocondrial foi estimada pela medida da densidade ótica (OD), medida a 570 nm, relativa à coloração produzida pela redução do MTT. Os níveis de desenvolvimento de cor nos orifícios controle foram considerados como representando 100% de viabilidade, sendo que todas as comparações posteriores foram baseadas nesse nível de referência. Os valores do branco, indicativas da absorbância do MTT adicionado ao veículo (V/V) foram subtraídos de todas as amostras.

c) Análise estatística: Os valores médios dos dados foram analisados estatisticamente através da análise unidimensional da variância (ANOVA). As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas através do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) com o intuito de detectar diferenças significativas entre as amostras analisadas ($p < 0,05$). Para as comparações de dados entre dois grupos, utilizou-se o teste de Student ($p < 0,01$). As correlações bidimensionais seguiram os critérios de correlação (Pearson).

IV.5.3 Resultados

Não se observou, em nenhum dos casos, a absorção do azul de Trypan em nenhum dos tratamentos realizados. De outro modo, a adição de 3,5 μ g do extrato/ 10^6 nas formas promastigotas do parasita resultou na imobilidade imediata de 100% dos parasitas que permaneceram completamente imóveis por todo o período de observação (desde o contato imediato até 24 horas). As formas promastigotas não se recuperaram quando transferidas para meio de cultivo na ausência do extrato, morrendo após 24 h de tratamento por falência metabólica.

Não foi observado redução de MTT nas células de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, justificando assim o esgotamento metabólico das enzimas de cadeia respiratória como sendo o provável mecanismo de ação de falência metabólica.

Através de análises de espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C foi possível identificar no extrato hexânico das partes aéreas de *Solanum crinitum* Lam. uma mistura de alcanos de cadeias alifática.

IV.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANMU, D.; CECCHINI, R.; ARUOMA, O. I. The antioxidant Action of ergothioneine. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 288, n. 1, p. 10-16, 1991.

ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, v. 27, p. 207-211, 1933.

ARUOMA, O. I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to scavenge reactive oxygen species. *Chem. Biol. Interactions*, v. 77, p. 303-314, 1991.

a) ARUOMA, O. I. Eat, Drink and be Healthy. *Chemistry in Britain*, p. 29-31, 1996.

b) ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; MAHMOOD, N. Evaluation of the antioxidant and antiviral actions of herbal preparations: Rovital and Carciverin V (C1983). *Phytother. Resear.*, v.10, p. 152-155, 1996.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação ente geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29 n. 1, p. 113-123, 2006.

CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M.; CALDEIRA, R. L. First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 1, p. 39-40, 1998.

DOS SANTOS, A. D. Estudo de plantas com atividade nematicida e/ou moluscicida e re-exame da *Jatropha elliptica* Muell. Arg. Alagoas, CE, 1997. 231 p. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in an endemic area of de Bahia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, n.3, p. 229-232, 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Vigilância Epidemiológica. Casos confirmados, segundo período de diagnóstico e local de residência. Brasil, 1980-2000. Disponível em <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em 10 de maio de 2002.

GAD, S. C. *In vitro toxicology*. 2nd ed. New York: Academic Press, 2000p. 268.

HONDA, T.; FINLAY, H. J.; GRIBBLE, G. W.; SUH, N.; SPORN, M. B. New enone derivatives of oleanólico acid and ursólico acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 7, n. 13, p. 1623-1628, 1997.

KAYSER, O.; KIDRELEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S. L. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica*, v.76, p.131-138, 2000.

KATI-SISKO, V.; PAAVO, H.; ARTO, U. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 23, p. 181-188, 2004.

KATZ, N. Vacina polivalente anti-helmínticos? *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 1, n. 2, p. 34-35, 1997.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, v. 172, p. 149-156, 2002.

KLOOS, H. & MC CULLOUGH, F. S. Plant Molluscicides. *Planta Medica*, v. 46, p. 195-209, 1982.

MA, C. M.; CAI, S.-Q.; CUI, J.-R.; WANG, R.-Q.; TU, P.-F.; HATTORI, M.; DANESH TALAB, M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 582-589, 2005.

MARR, J.; MÜLLER, M. Biochemistry and Molecular Biology of parasites. *Academic Press Limited*, p. 147-160, 1995.

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. *Phytochemistry*, v. 24 n. 4, p. 639-652, 1985.

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Assays for molluscicidal, cercaricidal, schistotomicidal and Piscicidal Activities. In: DEY, P. M. AND HARBONE, J. B. *Methods in Plant Biochemistry*, eds. 6, London: Academic Press, 1991, p. 153-178.

McCULLOUGH, F. S. The role of mollusciciding in schistosomiasis control. *World Health Organization/Schist.*, p. 92-107, 1992.

NARVÁEZ, A. J. R. Relação entre estrutura química e atividade biológica nos fármacos esquistossomicidas. *Química Nova*, v. 6, n. 4, p. 134-140, 1983.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGIKI, S. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, v. 95, p. 351-358, 1979.

PRATA, A. *Esquistossomose mansoni. Em doenças infecciosas e parasitárias*. 7ª edição. Rio de Janeiro : Editora Guanabara, 1987 p. 885-904.

PUPPO, A.; CECCHINI, R.; ARUOMA, O. I. Scavenging of hypochlorous acid and myoglobin-derived oxidants by the cardioprotective agent mercaptopropionylglycine. *Free Rad. Res. Comms.*, v. 10, n. 6, p. 371-381, 1990.

RIBEIRO, L.; TRIBESS, T.; TORRES, M. A.; SOARES, C. H. L.; PEDROSA, R. C.; AGOSTINI, J. D. *Oxidative stress in Oreochromis niloticus exposed to the tissue-industrial effluent*. *Ecotoxicology: Perspectives for the XXI secul*, São Carlos, Brazil: Ed Rima, 2002, p. 441-449.

SIMÕES , C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. 3ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1989, p. 513.

SOUZA, C. P.; MENDES, N. M.; JANNOTI-PASSOS, L. K.; PERREIRA, J. P. O uso da casca da castanha de caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 459-466, 1992.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. *Série de esquistossomose-Fiocruz*, Belo Horizonte, n. 1, 1990.

WAGNER, V. A. The possibility of eradicating billarzia by extensive planting of the tree *Balanites*, *South Afr. Méd. J.*, v.10, p. 10-11, 1936.

WHO. *Report of the scientific working group on plant molluscicides*. TDR/SCH(4)/83.3, 1983.

CONCLUSÕES

A realização do estudo fitoquímico das espécies *Plumeria lancifolia* Mull. Arg. e *Solanum crinitum* Lam. forneceu novas informações sobre a química destes vegetais, além de poder identificar a presença de uma amida na secreção dérmica do anfíbio anuro *Xenohyla truncata* (IZECKSON, 1998).

O estudo químico de galhos e folhas de *Plumeria lancifolia* Mull. Arg. permitiu identificar quatorze substâncias, sendo um esteróide e dois triterpenos isolado pela primeira vez no gênero.

Identificaram-se dezesseis substâncias com o estudo químico de frutos verdes e tricomas dos frutos verdes de *Solanum crinitum* Lam., sendo um flavonóide novo no gênero, uma substância e dois derivados inéditos na literatura.

A acetanilida corresponde à única substância identificada na secreção dérmica do anfíbio anuro *Xenohyla truncata*.

Os estudos biológicos dos extratos de *Plumeria lancifolia* Mull. Arg. e *Solanum crinitum* Lam., das substâncias naturais e seus derivados mostraram resultados promissores para utilização dessas plantas como fonte de drogas que possam ser usadas na terapêutica como moluscicidas, antioxidantes, antiinflamatórios e no combate a Leishmaniose, merecendo avaliações mais minuciosas.

Este trabalho forneceu dados de espectroscopia RMN da *epi*-solamargina e dos derivados *epi*-solamargina peracetilada e solasonina peracetila que não estão registrados na literatura.

Propomos uma nova rota de biosíntese para formação dos alcalóides esteroidais do tipo espirossolanos.