

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

**DETERMINAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES NA *Aleurites*  
*moluccana* L. (WILLD.) (EUPHORBIACEAE).**

**CHRISTIANE MEYRE DA SILVA BITTENCOURT**

**FLORIANÓPOLIS-SC, 2000.**

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

**DETERMINAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES NA *Aleurites*  
*moluccana* L. (WILLD.) (EUPHORBIACEAE).**

**CHRISTIANE MEYRE DA SILVA BITTENCOURT**

*Dissertação realizada para obtenção do título como Mestre em Química sob orientação do Professor Dr. Valdir Cechinel Filho e Co-orientação do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes.*

**FLORIANÓPOLIS-SC, 2000.**

**DETERMINAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES NA  
*Aleurites moluccana* L. (WILLD.) (EUPHORBIACEAE)**

**CHRISTIANE MEYRE DA SILVA BITTENCOURT**

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador, co-orientador e membros da banca examinadora.



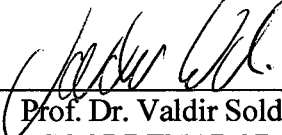
---

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho  
ORIENTADOR



---

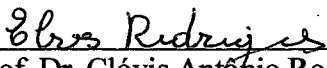
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes  
CO-ORIENTADOR



---

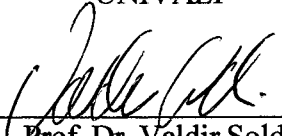
Prof. Dr. Valdir Soldi  
COORDENADOR

Banca Examinadora:



---

Prof. Dr. Clóvis Antônio Rodrigues  
UNIVALI



---

Prof. Dr. Valdir Soldi  
UFSC



---

Prof. Dr. Ricardo J. Nunes  
UFSC

***“Uma planta pode conter centenas de substâncias diferentes. A descoberta de uma só delas pode ser mais importante para a humanidade que a de uma galáxia”***

***(Sir Robert Robinson)***

*Esta Dissertação é dedicada ao amigo e orientador Prof.Dr.Valdir Cechinel Filho, a meus pais Paulo e Lourdes, ao meu irmão Júnior e ao meu marido Roger.*

## AGRADECIMENTOS

Ao grande amigo e orientador Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, pela orientação deste trabalho, pela confiança em mim depositada, e principalmente por sua amizade e ensinamentos deixados que foram as bases para o sucesso. Muito obrigada.

Ao Co-orientador Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes por sua amizade e colaboração neste trabalho.

Ao Prof. MSc. Adair R. S. Santos (NIQFAR/UNIVALI) pela dedicação e contribuição na parte farmacológica.

Aos professores e amigos do NIQFAR/UNIVALI: Rogério, Clóvis, Roberto, Niero, agradeço pela amizade e experiências compartilhadas.

A Jacir Dal Magro pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache, CMR-Instituto di Chimica-UCSC, Roma-Itália, pelo auxílio nas análises, essenciais para a concretização deste trabalho.

Prof. Dr. Chihiro Ito, Yagotoyama, Japan e Prof. Dr. Miguel S. B. Caro do departamento de química, pela realização de alguns espectros.

A Profa. Dra. Suzana Zacchino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Nacional de Rosário, Rosário-Argentina, pela realização dos testes antifúngicos.

Ao Prof. Dr. A. J. Vlietinck, University of Antwerpen-Bélgica, Antwerpen-Bélgica, pelos resultados dos antivirais, de grande relevância.

Ao Sr. Carlos Piccoli, pelo fornecimento do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Ademir Reis, do Departamento de Botânica/UFSC, pela classificação botânica de *Aleurites moluccana*.

Aos secretários da pós-graduação, Graça e Jadir.

Aos órgãos financiadores CAPES e CNPq.

Aos colegas de laboratório pelo convívio e amizade.

Aos meus pais e irmão, obrigado pela confiança, amor e oportunidade concedida e principalmente pela serenidade e sabedoria que possibilitaram-me conhecer o verdadeiro valor da luta e da conquista. Minha eterna gratidão.

Ao meu marido Roger pela paciência, compreensão e seu amor em todos os momentos que precisei.

A Deus, sempre presente em minha vida!

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EH	Extrato Hidroalcolico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano (DCM)
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
AcOEt	Acetato de Etila (AE)
BuOH	Butanol
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
MeOD	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
KBr	Brometo de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Co-CCD	Cromatografia em Camada Delgada em conjunto com amostra padrão
SiO <sub>2</sub>	Dióxido de silício
Rf	Fator de retenção
IV	Espectrometria no Infravermelho
RMN- <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN- <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CGAR/EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada ao Espectro de Massa
FAB-EM	Fast Atom Bombard-Espectrometria de Massas
cm <sup>-1</sup>	unidade de número de onda



ppm	parte por milhão da frequência aplicada
$J$ (Hz)	Constante de acoplamento em Hz
s	Singlete
d	Dublete
DI <sub>50</sub>	Dose Inibitória de 50 %
IM	Inibição Máxima
CE	Concentração Efetiva
i.p.	Intraperitoneal
E.P.M.	Erro Padrão Médio
C	Grupo Controle
P	Significância (Análise estatística)

## RESUMO

A *A. moluccana* L. Willd., planta pertencente à família Euphorbiaceae, conhecida popularmente como Nogueira-da-Índia ou Nogueira-de-Iguape, sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas afecções, incluindo febre, tumores, asma, diarreia, etc. Considerando os efeitos biológicos demonstrados anteriormente para os extratos desta planta, o presente estudo tem como objetivo isolar e identificar os constituintes químicos presentes nestes extratos, bem como avaliá-los através de testes farmacológicos, microbiológicos, além de investigar a atividade antiviral.

O uso de procedimentos cromatográficos convencionais (IV, RMN, EM) e técnicas espectroscópicas usuais permitiu o isolamento e identificação de *n*-hentriacontano (I), mistura de fitoesteróides contendo  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol (II), mistura de triterpenos,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (III), swertisina (IV), e seu derivado 2''-*O*-ramnosilswertisina (V) e o ácido acetil aleuritólico (VI). Os compostos testados, com exceção da swertisina (IV), quando administrados intraperitonealmente na dose de 10 mg/kg, inibiram significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% (10 mg/kg; i.p.) em camundongos, com valores de  $DI_{50}$  de 0,016 (0,012-0,017), 79 (0,63-1,01), e 5,1 (4,2-6,2) mg/kg, com inibições máximas de 94, 42-54, 84 e 92 %, respectivamente, em relação ao grupo controle, para os compostos I, III e V. Os compostos foram mais eficazes que a aspirina e paracetamol,

duas drogas utilizadas na clínica como analgésicas e antiinflamatórias. Com relação à atividade antiviral, das frações testadas, as frações de diclorometano obtidas das cascas e folhas foram ativas no modelo testado contra o vírus-HIV comparado ao grupo controle. Os extratos obtidos das cascas e sementes demonstraram ser efetivos, embora moderadamente, contra o fungo patogênico *Epidermophyton floccosum*.

Os resultados indicam que vários compostos presentes na planta, incluindo hidrocarboneto, esteróides, terpenos e flavonóides parecem ser os responsáveis, pelo menos em parte, pelos consideráveis efeitos biológicos apresentados pela *A. moluccana* e contribuem para justificar seu amplo uso na medicina popular.

## ABSTRACT

*A. moluccana* L. (Willd.), plant belonging the family Euphorbiaceae, is known as Nogueira-da-Índia or Nogueira-de-Iguape, being to employed in folk medicine for the treatment of several ailments, including fevers, tumors, asthma, diarrhoea, etc. Considering the biological effect previously shown by the extracts of this plant, the aim of the present study was isolate and identify the active chemistry constituents present in the extracts, as well as evaluate, through of pharmacological and microbiological assays, in order to achive active compounds.

The use of chromatographic conventional data (IR, NMR, MS) procedures and different spectroscopic techniques permitted the isolation and identification of various compounds: *n*-hentriacontane (I), mixture of steroids,  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol (II), mixture of triterpenes,  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin (III), swertisin (IV) and its derivative 2''-*O*-rhamnosylswertisin (V) and acetyl aleuritolic acid (VI). All the compounds, except swertisin (IV), when administrated intraperitoneally at 10 mg/kg, considerably inhibited the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, with calculated values of  $DI_{50}$  0,016 (0,012-0,017), 0,79 (0,63-1,01) and 5,1 (4,2-6,2) mg/kg, with maximal inhibition of the 94, 84 and 92 %, respectively, in relation to the group control, for compounds I, III and V. The compounds were more efficacious than aspirin and paracetamol, two drugs used clinically as antinflammatory and analgesic. Regarding the antiviral activity, the dichlromethane fractions from the barks and leaves

were active against the HIV-virus compared to control wells. Some extracts from barks and seeds showed weak effect against the pathogenic fungi *Epidermophyton floccosum*.

The results suggest that different compounds, such as hydrocarbons, sterols, terpenes and flavonoids seem to be responsible, at least partially, for the considerable biological effects of *A. moluccana*, justifying its wide use in folk medicine.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. PLANTAS MEDICINAIS: ASPECTOS GERAIS .....	1
1.2. ESTUDOS ANTERIORES DO GRUPO DE PESQUISA .....	5
1.3. FITOFÁRMACOS E FITOTERÁPICOS X FÁRMACOS.....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO ALEURITES</b> .....	<b>9</b>
3.1. CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS.....	9
3.2. USO MEDICINAL .....	13
3.3. ESTUDOS FITOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS ANTERIORES.....	13
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	16
4.2. ANIMAIS .....	16
4.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	17
4.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA (CROMATOGRAFIA GASOSA) .....	22
4.4.1. <i>Descrição das análises feitas por Cromatografia Gasosa (CG)</i> .....	22
4.5. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA.....	22
4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA.....	23
4.6.1. <i>Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos</i> .....	23
4.6.2. <i>Modelo de dor induzida pela formalina</i> .....	24
4.7. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	25
4.7.1. <i>Investigação da atividade antibacteriana</i> .....	25
4.7.2. <i>Atividade antifúngica - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	25
4.8. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA O VÍRUS HIV .....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Plantas medicinais: Aspectos gerais

É notório o crescimento de estudos científicos relacionados às plantas medicinais. Estas são importantes fontes naturais de medicamentos, as quais tem servido ao longo dos anos de suporte para a obtenção de novos fitofármacos. São várias as substâncias naturais utilizadas na fabricação de medicamentos.

O mercado mundial de fitoterápicos, principalmente nos países desenvolvidos, vem crescendo gradativamente devido ao aprimoramento da tecnologia farmacêutica que contribui para um melhor controle de qualidade de fármacos baseados na moderna tecnologia de identificação, determinação e qualificação do compostos químicos obtidos das plantas medicinais e o que permitiu o uso de diversos fitoterápicos na clínica terapêutica como os compostos obtidos do *Hypericum perforatum*, sendo estes utilizados como antidepressivo, antiviral e antinflamatório (UPTON *et al.*, 1997). Outro fitoterápico de grande utilização na Europa e no Brasil é o extrato lipoesterólico da *Serenoa repens*, que tem demonstrado resultados promissores no tratamento da hiperplasia benigna de próstata (LOBACCARO *et al.*, 1997).

Neste contexto, podemos ainda destacar a pilocarpina, a rutina, a morfina, a codeína, entre outros (CECHINEL FILHO *et al.*, 1995; CECHINEL & YUNES, 1998), substâncias estas isoladas há muito tempo e que ainda são usadas na preparação de fármacos. Um dos principais avanços relacionado às plantas medicinais foi a

descoberta do diterpenóide taxol, um eficaz agente anticâncer, isolado de *Taxus brevifolia*, que hoje constitui grande esperança para indivíduos portadores de diferentes tipos de câncer, principalmente de ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; HORWITZ, 1994; Para revisão, ver: CORRÊA, 1995).

É importante salientar o papel fundamental das informações populares sobre o uso terapêutico das plantas, cuja recomendação popular pode levar aos estudos químicos e farmacológicos que poderão proporcionar a descoberta de novos fitoterápicos (MATOS, 1990; CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos, as plantas representam uma importante “ferramenta”, já que a síntese de moléculas ativas a esmo, além de desgastante, pode levar anos de trabalho, ocasionando um grande dispêndio tanto de recursos humanos como materiais. Neste aspecto, se determinado extrato de plantas apresentar efeitos farmacológicos, obviamente algum(s) constituinte(s) químico poderá ser o responsável por tal efeito. Além disso, os compostos naturais podem servir como modelo para a síntese de derivados ou análogos mais potentes (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; Para revisão, ver: YUE-ZHONG, 1998).

O Brasil é um dos 14 países com grande biodiversidade, contendo mais de 10 % de todos os organismos descritos na terra. A grande quantidade de plantas que ainda não foram estudadas do ponto de vista químico, associado à moderna tecnologia de



triagem biológica e técnicas modernas de isolamento e determinação estrutural tem levado aos estudos farmacêuticos e agroquímicos.

Uma vasta quantidade de espécies de plantas medicinais permanece ainda sem qualquer estudo químico ou biológico e representa um potencial econômico valioso. Uma estratégia para o desenvolvimento do Brasil na área de produtos naturais seria proteger e promover a exploração racional da sua biodiversidade, como uma fonte de novas substâncias de utilidade para a espécie humana. O investimento na descoberta de novas drogas advindas de produtos naturais levaram a um grande sucesso na medicina incluindo muitos antibióticos, agentes anticâncer, os imunossuppressores, e antiparasitários (HARVEY & WATERMAN, 1998).

Os programas de avaliação de produtos naturais têm-se voltado à área de anti-infecciosos, antitumorais e principalmente antivirais, voltado para atividade anti-HIV (Para revisão, ver: YUE-ZHONG, 1998). O vírus da imunodeficiência humana é o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o qual é um dos problemas mais sérios de saúde do mundo, principalmente no Brasil, onde leva a um quadro de várias infecções oportunistas pela baixa fator de imunidade em que o ser infectado se encontra. Vários compostos incluindo substâncias derivadas de plantas, tem sido avaliado por seus efeitos inibitórios na replicação do HIV *in vitro* (Para revisão, ver: VLIETINCK *et al.*, 1998).

Outro foco de interesse relativo aos produtos naturais consiste na busca de novos fármacos analgésicos, principalmente devido aos efeitos adversos dos potentes analgésicos disponíveis (Para revisão, ver: CALIXTO *et al.*; 1998).

Dentro de um programa de obtenção de moléculas farmacologicamente ativas a partir de produtos naturais, neste estudo optou-se pela investigação da planta *Aleurites moluccana* (Euphorbiaceae) conhecida popularmente pelo nome “Nogueira-da-Índia” ou “Nogueira-de-Iguape”. Esta planta é amplamente utilizada na medicina popular contra diversas enfermidades incluindo febre, dores, tumores, etc sendo abundantemente distribuída no litoral catarinense (CORRÊA, 1984; KLEIN, 1988; DUKE, 1991). Estudos desenvolvidos anteriormente indicaram que esta planta produz princípios ativos contra bactérias patogênicas (LOCHER *et al.*, 1995), vírus-HIV (LOCHER *et al.*, 1996) e algisia induzida em camundongos (MEYRE-SILVA *et al.*, 1997; 1998), o que levou-nos a determinar os fitoconstituintes responsáveis por estes e outros possíveis efeitos.

Assim, tanto os extratos como os compostos puros obtidos das folhas e das cascas de *A. moluccana* foram inicialmente testados como analgésicos no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%), em camundongos, cujos resultados serão mostrados no decorrer do trabalho.

## 1.2. Estudos anteriores do grupo de pesquisa

Várias pesquisas estão sendo realizadas em nossos laboratórios e em conjunto com pesquisadores da área biológica e tem gerado resultados bastante relevantes. Um importante exemplo seria o efeito analgésico da *Croton urucurana*, onde foram isolados a catequina e galocatequina, os quais exercem significativos efeitos analgésicos em camundongos. Seu efeito se deve a uma associação de vários fitoconstituintes como campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, ácido acetil aleurítico, glicosídeo do  $\beta$ -sitosterol, além dos anteriormente citados (PERES *et al.*, 1998). A *Bauhinia splendens* HBK (Leguminosae), uma planta nativa empregada para combater diversas patologias, principalmente para processos infecciosos, apresentou princípios ativos que exercem ação analgésica, não envolvendo receptores opióides (WILLIAN FILHO *et al.*, 1997). A análise fitoquímica indicou a presença de rutina, quercetina e uma mistura complexa de taninos (SANTOS *et al.*, 1995a; CALIXTO *et al.*, 1998). Os estudos desenvolvidos com a *Wedelia paludosa* D. C. (Compositae), planta ornamental conhecida como margaridão ou pingo-de-ouro, possibilitaram a identificação da luteolina, ácido carenóico e uma nova lactona denominada paludolactona, além de um flavonóide, a chalcona coreopsina (BLOCK *et al.*, 1998 a; 1998 b). A avaliação fitoquímica realizada com a *Rheedia gardneriana* Pl. Tr. (Guttiferae), conhecida como bacopari, revelou a presença de 4 biflavonóides como a volkensiflavone, fukugetina ou morelloflavona, fukugesida e GB-2a, apresentaram considerável efeito analgésico (LUZZI *et al.*, 1997). A *Epidendrum mosenii* Rchb. F.

(Orchidaceae), “orquídea-da-praia”, apresentou excelente efeito analgésico e após análise fitoquímica isolou-se os triterpenos folidotina e 24-metileno-cicloartanol (FLORIANI *et al.*, 1998). Outra planta estudada foi a *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. (Euphorbiaceae), conhecida como quebra-pedra que demonstrou possuir ação antiespasmódica relacionado à presença de xantoxilina (CALIXTO *et al.*, 1990). Os estudos fitoquímicos indicaram a presença de glutinol e moretenona (GAERTNER *et al.*, 1999). Os estudos realizados com a *Rubus imperialis* Chum. Schl. (Rosaceae), amora-branca, utilizada para diabetes e enfermidades relacionadas à dor, proporcionaram o isolamento do triterpeno Niga-ichigoside F1, o qual apresentou potente atividade analgésica em camundongos (BUSATO *et al.*, 1999; NIERO *et al.*, 1999).

Estes promissores resultados obtidos com plantas que ocorrem no Estado de Santa Catarina servem de modelo e de incentivo para novas pesquisas orientadas para o desenvolvimento de novos e importantes fitofármacos.

### 1.3. Fitofármacos e fitoterápicos X fármacos

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo gradativamente. A busca por moléculas com atividade/seletividade, que superem os fenômenos de resistência, efeitos secundários ou tóxicos, tem levado à pesquisa de novas drogas a partir de plantas medicinais, apesar do elevado nível de desenvolvimento da Química Médica, que soma a área de síntese, bioquímica com o

estudo das alterações metabólicas, descobrimentos de alvos moleculares, associados à contribuições da Físico-Química Orgânica e Biologia Molecular (PEDROSA *et al.*, 1999). Existem algumas vantagens que justificam o uso dos fitoterápicos (compreendido como extratos vegetais, ou seja, de uma mistura de vários compostos, química e farmacologicamente quantificados) e fitofármacos (molécula pura, isolada de plantas) como seus efeitos sinérgicos, onde as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares. Um exemplo seria o efeito analgésico da *Croton urucurana*, onde seus compostos isolados separadamente exercem menos efeitos do que a própria fração com os compostos associados (PERES *et al.*, 1998). Outra seria a associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes, uma vez que os compostos ativos apresentam-se em concentração reduzidas nas plantas, possuindo menos riscos de efeitos colaterais, além do desenvolvimento de um novo fitoterápico exigir um custo menor do que a de um fármaco. Neste contexto, podemos ainda salientar que os estudos fitoquímicos de algumas plantas permitiram um grande avanço na busca de novos fármacos, fornecendo moléculas promissoras para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes, com modos de ação definidos, alta seletividade e atividade (PEDROSA *et al.*, 1999).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Obter novas moléculas ativas a partir da planta *A. moluccana*, através de estudos fitoquímicos e farmacológicos ou microbiológicos.

### 2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar, através de procedimentos cromatográficos (CCD), os extratos brutos e semipurificados de *A. moluccana* visando determinar as principais classes de compostos presentes nesta planta.

2) Obter extratos, frações semipurificadas e produtos puros, para a realização de testes farmacológicos ou microbiológicos no intuito de verificar seus possíveis efeitos em diferentes modelos experimentais.

3) Proceder o isolamento, purificação e identificação dos constituintes naturais ativos utilizando procedimentos cromatográficos convencionais (CCD, CC, CG, etc), além de dados espectroscópicos usuais (IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, EM).

4) Comparar o efeito analgésico dos compostos isolados da *A. moluccana* com alguns fármacos usados na clínica.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO *Aleurites*

#### 3.1. Características taxonômicas

A família Euphorbiaceae compreende um grande número de gêneros, (~ 300) e numerosas espécies (~ 8000) (MEYRE-SILVA *et al.*, 1997; VILLALOBOS & CASTELLANOS, 1992). Incluem espécies predominantemente tropicais; porém também amplamente distribuídas em zonas temperadas (VILLALOBOS & CASTELLANOS, 1992).

Dentre os vários gêneros pertencentes às Euphorbiaceae, podem ser citados como os de maior importância, devido a sua diversidade, aplicação e interesse econômico: *Euphorbia*, *Croton*, *Phyllanthus*, *Jatropha*, *Sapium*, *Ricinus*, *Aleurites* (VILLALOBOS & CASTELLANOS, 1992; GNECCO *et al.*, 1996).

O gênero *Aleurites* subdivide-se em *A. trisperma*, *A. cordata*, as quais nada tem sido relatado quanto à estudos químicos e biológicos, *A. montana*, onde foi isolado das cascas o friedelin,  $\beta$ -sitosterol, ácido betulínico e o ácido aleuritólico (MISRA & KHASTGIR, 1970). Extraíu-se das sementes um óleo de grande interesse econômico (VILLALOBOS & CASTELLANOS, 1992). Existe ainda a espécie *fordii*, com importância econômica devido ao óleo de tungue (CRUZ, 1964; CORRÊA, 1984; VILLALOBOS & CASTELLANOS, 1992), indicado na fabricação de vernizes. Com relação a estudos químicos, foi isolado desta espécie a 5,6,7-trimetoxi cumarina, um novo cumarinolignóide, denominado aleuritin (FOZDAR *et al.*, 1989), e alguns taninos

com aleurinins A, B, e C, corilagin, geraniin e ácido chebulagico (NONAKA *et al.*, 1990). Têm-se ainda a *A. moluccana*, abordada neste estudo.

A *A. moluccana* L. (Willd.) (fig. 1), pertence à família Euphorbiaceae, sendo uma árvore exótica, natural da Indonésia, largamente cultivada no Estado de Santa Catarina. É relativamente grande, folhas longo-pecioladas, com revestimento estrelado-tomentoso curto, quase farinoso-ferrugíneo, mais tarde glabras, simples ou 3-5-7-lobuladas, até 20cm de comprimento, pecíolo e nervuras com indumento persistente; flores em regra monóicas, raramente dióicas, floresce de novembro até abril no Estado de Santa Catarina, alvas, pequenas e numerosas, pétalas nas flores masculinas lanceo-ovaladas e nas femininas linguiformes, em ambas com 7-9 mm de comprimento; frutos por fora carnosos, glabros e de ápice aguçados, de 5-6 cm de diâmetro; possui de 1 a 2 sementes, globular-comprimidas; as amêndoas contém aproximadamente 60% de óleo graxo (fig. 2) (CORRÊA, 1984; DUKE, 1991; VILLALOBOS & CASTELLANO, 1992).





**Figura 1.** *A. moluccana* (Euphorbiaceae).



*Aleurites moluccana* (EUPHORBIACEAE)

Figura 2.

### 3.2. Uso medicinal

A *A. moluccana* é uma planta medicinal ocorrendo em várias regiões do Brasil, introduzida da Índia e aclimatada desde São Paulo até o Rio Grande do Sul, conhecida popularmente como “Nogueira-de-Iguape”, “Nogueira-da-Índia” ou simplesmente “Nogueira”; sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, tais como: febre, inflamações, asma, conjuntivite, hepatite, dores de cabeça, úlceras, diarreia, gonorréia e também utilizada como antitumoral, estimulante laxativo e sudorífero e antireumático (CORRÊA, 1984; DUKE, 1991; VILLALOBOS & CASTELLANOS, 1992; LOCHER *et al.*, 1995; HOPE *et al.*, 1993).

Além do amplo uso medicinal desta planta, seu óleo extraído das amêndoas é empregado na fabricação de verniz, sabão e velas. Também é empregado na composição de um unguento anti-reumático. As cascas são usadas para o curtume (CORRÊA, 1984; DUKE, 1991).

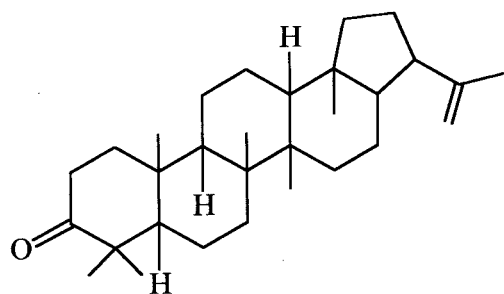
### 3.3. Estudos fitoquímicos e farmacológicos anteriores

Estudos fitoquímicos anteriores demonstraram o isolamento e identificação de vários metabólitos secundários, como o triterpeno moretenone, moretenol,  $\alpha$ -amirina (folhas) e  $\beta$ -sitosterol (folhas e caule) (HUI & HO, 1968) (fig. 2). Um novo cumarinolignóide foi isolado das cascas e denominado moluccanim (SHAMSUDDIN *et al.*, 1988) (fig. 3) e da noz obtêve-se um óleo, chamado kukui, que exibiu um alto perfil tóxico contendo uma elevada concentração de linoleico e ácido linoleico, e tem

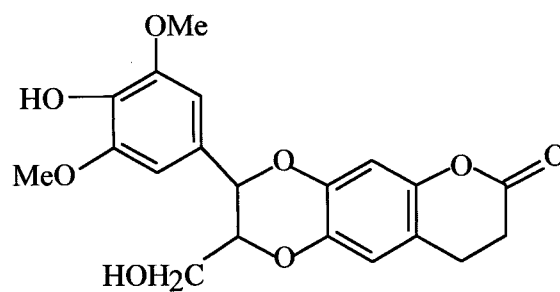
sido utilizado como produto para formulações cosméticas destinadas a indivíduos propensos a acnes (KLEIN, 1988).

Estudos recentes indicaram que vários extratos de *A. moluccana* apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOCHER *et al.*, 1995). Os extratos aquoso e metanólico obtido das hastes e do extrato acetonitrilo das cascas apresentaram atividade contra as bactérias citadas acima, sendo que o extrato metanólico e aquoso obtido das cascas de *A. moluccana* apresentaram somente atividade contra *Staphylococcus aureus*. O extrato metanólico obtido das folhas apresentou importante atividade contra *Streptococcus pyogeneses* (LOCHER *et al.*, 1995). A atividade antibacteriana seletiva contra *Staphylococcus* e *Peudomonas* sugerem que esta planta pode ser usada para aplicação tópica na cura de feridas. No entanto, os extratos obtidos desta planta não foram efetivos contra herpes simples e *Candida albicans* (LOCHER *et al.*, 1995; LOCHER *et al.*, 1996). Alguns extratos, testados para a avaliação da atividade antiviral contra vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), exibiram moderada atividade (LOCHER *et al.*, 1996).

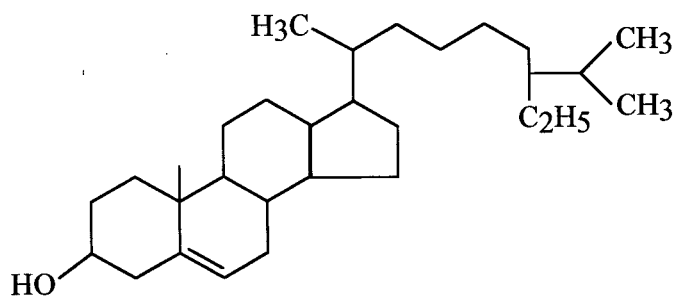
Não foram encontrados dados na literatura especializada referente aos efeitos farmacológicos desta planta. No entanto, estudos preliminares realizados em nossos laboratórios com o extrato bruto de *A. moluccana* indicaram que o mesmo exerce potente ação analgésica em diferentes modelos experimentais de dor em camundongos (MEYRE-SILVA *et al.*, 1996 a, b, 1997).



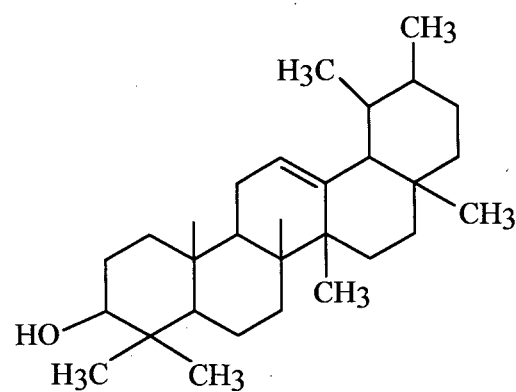
Moretenone



Moluccanin



$\beta$ -Sitosterol



$\alpha$ -amirina

**Figura 3.** Compostos isolados anteriormente da planta *A. moluccana*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Material vegetal

A planta em estudo (*Aleurites moluccana* L. (Willd.), família Euphorbiaceae, foi classificada e identificada pelo Prof. Dr. Ademir Reis (Departamento de Botânica/UFSC), cuja excicata encontra-se depositada no Herbarium Barbosa Rodrigues (HBR), na cidade de Itajaí, registrada sob o código VCFilho 001.

As folhas e as cascas para a análise fitoquímica foram coletadas no município de Itajaí, nos meses de fevereiro/1996 e julho/1996, respectivamente. Para continuação da análise fitoquímica e avaliação da atividade analgésica, antimicrobiana, e antiviral, as folhas e cascas foram coletadas no mês de novembro/1996. As folhas, flores, cascas, raízes, caules e sementes, para a avaliação antifúngica, foram coletadas no município de Itajaí-SC, no mês de abril/1998. Os materiais vegetais foram submetidos à secagem à temperatura ambiente e devidamente armazenados para a realização do presente estudo.

### 4.2. Animais

Foram utilizados, para os testes experimentais, camundongos do tipo “Swiss” machos (25-30 g), os quais foram mantidos durante todo o estudo no biotério da UNIVALI, Itajaí-SC.

### 4.3. Análise fitoquímica

A partir das folhas da planta seca à temperatura ambiente e cortadas em pequenos pedaços foram obtidos dois diferentes extratos, hidroalcolico e etanólico, para análise farmacológica e fitoquímica, respectivamente.

O extrato hidroalcolico foi obtido pela extração com etanol 50%, através de maceração à temperatura ambiente por cerca de 10 dias. O extrato foi então concentrado sob pressão reduzida e estocado a - 20 ° C. Esse extrato foi dissolvido em uma solução de NaCl 0,9% para a realização dos testes.

O extrato etanólico foi preparado como descrito acima (600 g folhas). Porém, tal extrato, após concentrado, foi submetido a sucessivas partições com hexano, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etila (AcOEt) e butanol, respectivamente CECHINEL FILHO *et al.*; 1998). A figura 4 demonstra os procedimentos mencionados. O extrato hexânico (16.0 g) foi submetido à métodos cromatográficos, previamente descritos (COLLINS & BRAGA, 1988; MATOS, 1988), como cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, eluída com hexano:AcOEt, com aumento gradativo de polaridade. Após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações similares foram combinadas e recromatografadas como no caso anterior, obtendo-se três substâncias puras por CCD, as quais foram denominadas inicialmente como I (30 mg), II (80 mg) e III (710 mg).

Os sólidos II e III mostraram reação positiva com anisaldeído sulfúrico e outros reagentes, os quais apresentaram uma mancha única em CCD, no sistema eluente

Hexano:AcOEt 70:30. Os dados espectrais (IV, RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e o uso de Co-CCD, cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) ou CGAR/EM com co-injeção com amostras autênticas, permitiram-nos concluir que o sólido I é o *n*-hentriacontano, enquanto que o sólido II é uma mistura de fitoesteróides contendo  $\beta$ -sitosterol (78,39 %), estigmasterol (16,35 %), campesterol (3,77 %) e um esteroide não identificado (1,49 %). O sólido III foi identificado como uma mistura de triterpenos,  $\alpha$ -amirina (48,93 %) e  $\beta$ -amirina (51,07 %); dados de cromatografia gasosa encontra-se na discussão. Todos os dados espectrais e Co-CCD confirmam tratar-se das amirinas, os quais foram idênticos aos reportados na literatura (SEO *et al.*, 1975; CHANDLER *et al.*, 1982).

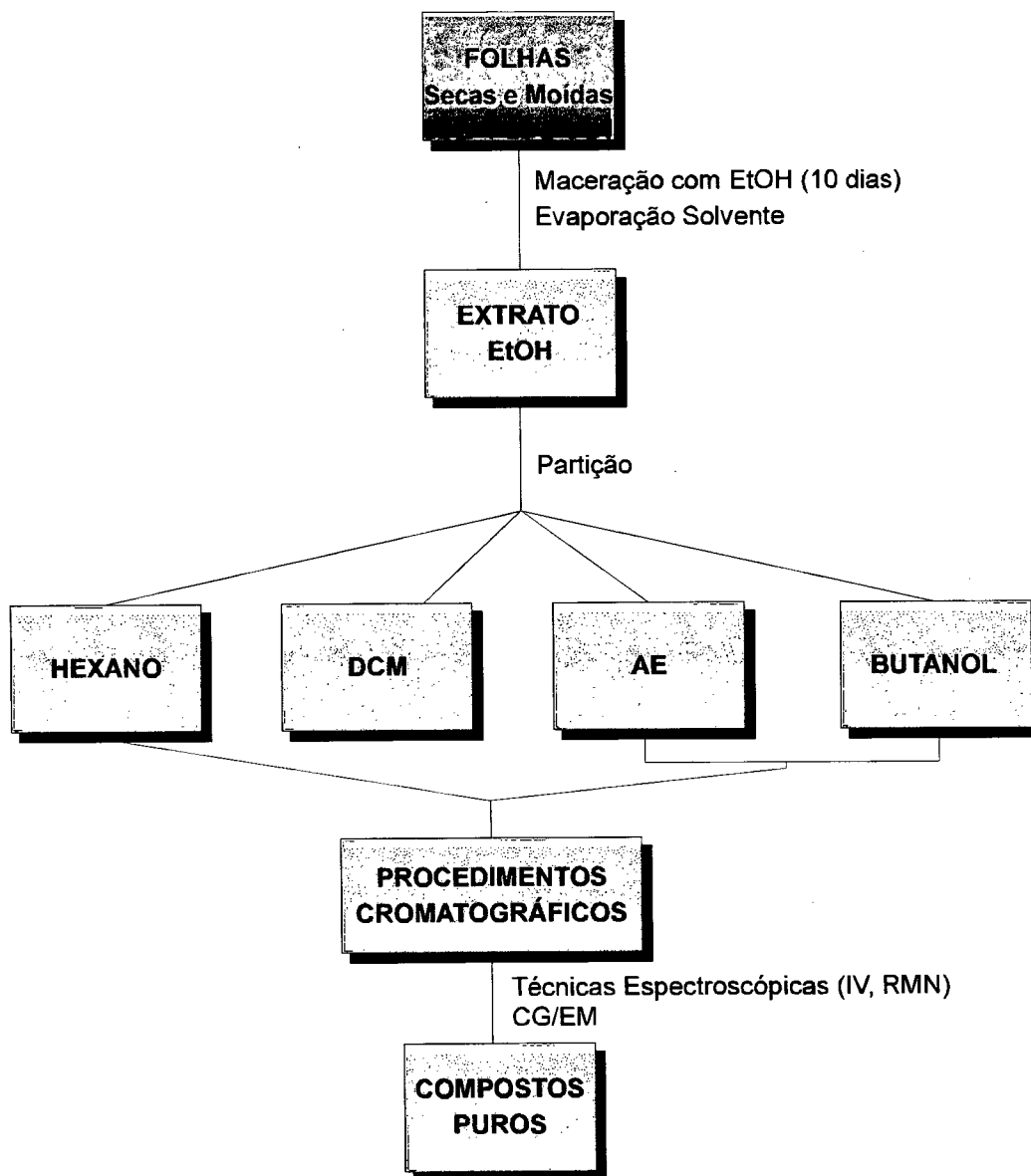
Os constituintes presentes nas frações de AcOEt e butanol foram analisados por CCD, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (MARINI-BETTÓLO *et al.*, 1981; UGAZ, 1994). Essas duas frações mostraram um perfil cromatográfico similar ao verificado por CCD e foram então agrupados. Esse material (3,38 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel (75 g), eluída gradativamente com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH. A eluição com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 1:1 rendeu um sólido amarelo (80 mg), identificado como um flavonóide glicosilado, 6- $\beta$ -D-glucopiranosil-5-hidroxi-2 (4-hidroxifenil)-7-methoxy-4H-1-benzopirano-4-ona (swertisina) (IV). Os dados espectrais, especialmente RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foram idênticos ao relatado na literatura (KOMATSU *et al.*, 1967; AGRAWAL & BANSAL, 1989, KALDAS *et al.*, 1975, DOS SANTOS *et al.*, 1996). Eluição com metanol permitiu o isolamento de um outro composto fenólico e através de uma purificação utilizando coluna de sephadex LH-20, eluída com



MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (100 ml), o flavonóide (V) foi obtido e designado de 2''-O-ramnosilswertisina e sua estrutura confirmada por dados espectroscópicos (IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, FAB-EM) e por comparação com dados da literatura (SHIRANE *et al.*, 1982; HILSENBECK & MABRY, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1994). Embora tais compostos tenham sido isolados de outras plantas, eles são produtos naturais raros, sendo esta a primeira descrição nesta família (MEYRE-SILVA *et al.*, 1997).

As cascas obtidas da *A. moluccana* (570 g) sofreram o mesmo procedimento de secagem das folhas, sendo as mesmas trituradas e submetidas à extração com metanol, à temperatura ambiente, por cerca de 10 dias. Após a remoção do solvente, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida e sucessivamente particionado com hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e butanol, respectivamente, para a obtenção dos extratos semi-puros (fig. 5).

A fração de diclorometano (3,9 g) obtida das cascas foi cromatografada em coluna de sílica gel, eluída com hexano:AcOEt, com acréscimo gradativo de AcOEt. Após monitoramento por CCD, as frações similares foram juntadas e recromatografadas usando o mesmo procedimento, obtendo-se um sólido cristalino branco, identificado como ácido acetil aleuritólico (19 mg) (VI), após comparação direta com uma amostra autêntica (Co-CCD, IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) (PERES, 1997).



**Figura 4.** Esquema da análise fitoquímica desenvolvido com as folhas de *A. moluccana*.

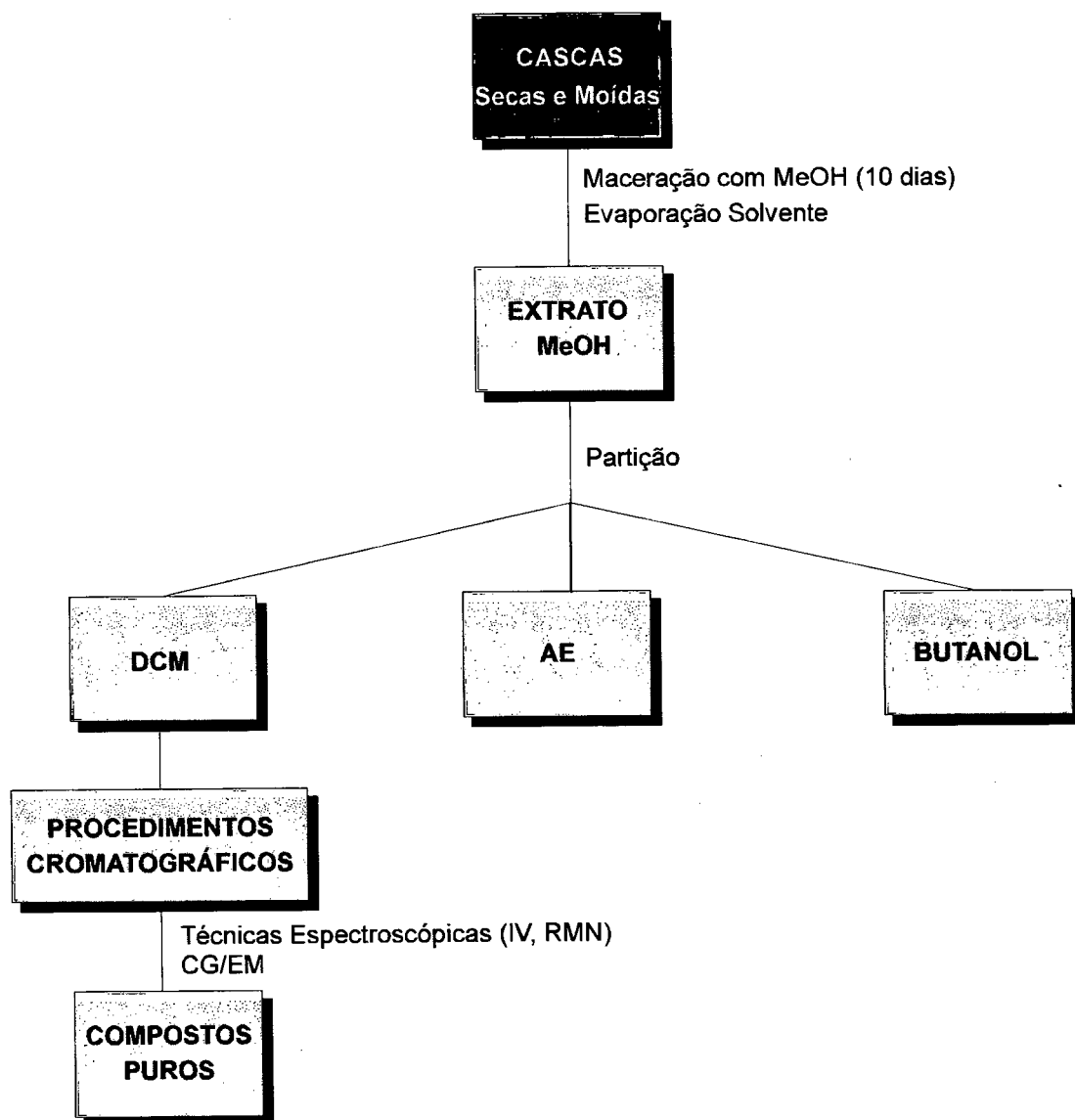


Figura 5. Esquema da análise fitoquímica desenvolvido com as cascas da *A.*

*moluccana*

#### 4.4. Análise Cromatográfica (Cromatografia Gasosa)

##### 4.4.1. *Descrição das análises feitas por Cromatografia Gasosa (CG).*

As análises por CG foram executadas em uma coluna capilar (30m) de fase ligada do tipo LM-1(polimetilsiloxano), hidrogênio como gás carreador (vazão cerca de 1-2 ml/min., taxa de divisão de fluxo 40 ml/min.). A temperatura do injetor foi de 280 °C e a do detector 320°C. O período sem divisão de fluxo, quando utilizado, foi de 1 minuto. As condições de análise foram: temperatura inicial de 100 ° C, temperatura final de 290°C, a programação da temperatura foi de 40 - 240 °C, a 12 °C min<sup>-1</sup> e de 240 - 310° C a 5° C min<sup>-1</sup>. O tempo de isoterma final foi de 30minutos. O cromatógrafo a gás utilizado foi Shimadzu (modelo CG-14B). Os cromatogramas foram armazenados e em seguida processados com auxílio de um “software” da Microquímica.

#### 4.5. Análise Espectroscópica

Os espectros de Infravermelho (IV) foram realizados no NIQFAR/UNIVALI, Itajaí-SC, usando um aparato BOMEM-100 com transformada de Fourier (FT) e pastilha de KBr.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN-<sup>13</sup>C) foram realizados na UFSC Florianópolis-SC, pelo Prof. Dr. Miguel S. B. Caro e no Centro Chimica Recettori, CNR, Roma, Itália pelo Prof. Dr. Franco Delle Monache, utilizando-se os seguintes

aparatos, respectivamente: BRUCKER 200 MHz (RMN-<sup>1</sup>H) e 50 MHz (RMN-<sup>13</sup>C), VARIAN XL 300 MHz (RMN-<sup>1</sup>H) e 75 MHz (RMN-<sup>13</sup>C).

O espectro de FAB-EM MW 593 (Fast Atom Bombard-Espectrometria de Massas) foi realizado pelo Prof. Dr. Chihiro Ito, do Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy Tempaku, Yagotoyama, Japan.

#### 4.6. Avaliação da atividade analgésica

##### 4.6.1. *Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos*

Os camundongos foram mantidos sob temperatura e iluminação controlada, com ração e água “ad libitum”(água à vontade). A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se o teste de contorções com ácido acético (0,6 %, via intraperitoneal), que promove contorções no músculo abdominal (COLLIER *et al.*, 1968; SANTOS *et al.*, 1995).

Os animais foram pré-tratados com diferentes extratos ou compostos (3-60 mg/kg), 30 min. antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de NaCl (0,9 %) (10 ml/kg). Todos os experimentos foram realizados à 20-22°C. As contorções abdominais foram quantificadas durante 20 minutos. A atividade analgésica foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais em relação ao grupo controle.

#### 4.6.2. Modelo de dor induzida pela formalina

Foram utilizados camundongos machos (25-30 g). 20 µl de formalina (2,5%) e salina foram injetados na região dorsal da pata posterior direita do animal, respectivamente. Logo após foi iniciada a observação da reação à dor, cronometrando-se o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante 30 minutos, considerando esse período como indicativo de dor. Duas fases de sensibilidade são observadas neste modelo: a primeira fase, que aparece nos primeiros 5 min. após a injeção de formalina (dor neurogênica) e a segunda fase, que ocorre entre 15 e 30 min. após a formalina, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores químicos (HUNSKAAR *et al.*, 1987; WILLAIN FILHO *et al.*, 1997). Os animais foram pré-tratados por via i.p. com o extrato hidroalcoólico (EH) (3-60 mg/kg), obtido das folhas de *A. moluccana*, 30 min. antes da injeção de formalina. O grupo controle recebeu uma solução de NaCl (0,9 %, 10 ml/kg), utilizado para diluir o extrato. Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores pesadas em balança analítica para quantificação do edema. A diferença do peso da pata direita (injetada com formalina) e da pata esquerda (injetada com salina) corresponde ao volume do edema formado.

#### 4.7. Análise microbiológica

##### 4.7.1. *Investigação da atividade antibacteriana*

Os extratos brutos das folhas e cascas de *A. moluccana* foram testados contra algumas bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil); *Streptococcus pyogeneses*, *Klebsiella sp.* e *Escherichia coli* (ambas adquiridas do Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas, São Paulo, Brasil). O método utilizado foi o de Difusão Radial em Ágar, conforme descrito anteriormente (BAUER *et al.*, 1966). Estes testes foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/UNIVALI, Itajaí-SC.

##### 4.7.2. *Atividade antifúngica - Determinação da Concentração Inibitória*

###### *Mínima (CIM)*

As frações metanólicas obtidas de diferentes partes da *A. moluccana* foram analisadas quanto ao possível potencial antifúngico contra as seguintes espécies fúngicas: *Cândida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *Aspergillus niger* ATCC 9029, *Microsporium canis* C 112, *Trichophyton rubrum* C 113, *Epidermophyton floccosum* C 114, *Microsporium gypseum* C 115 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), usando o método de diluição em ágar

descrito anteriormente (ZACCHINO *et al.*, 1998). Foi usado o ágar Sabouraud-chloranphenicol para dermatófitos e leveduras, sendo que as frações foram dissolvidas em DMSO ou água e a concentração final de DMSO não ultrapassou de 2%. Usando uma micropipeta, os fungos foram inoculados no ágar. O agente antifúngico cloranfenicol foi incluído nos testes como controle positivo. Uma solução sem extrato foi usado como branco. As placas foram inoculadas por 24, 48 ou 72 h a 30°C para os fungos leveduriforme e 5 dias para os dermatófitos. A CIM foi definida como a concentração mais baixa que indica o não crescimento dos fungos. Os testes foram realizados pela equipe da Profa. Dra. Susana Zacchino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas da Universidade Nacional de Rosário (Rosário-Argentina).

#### 4.8. Análise da atividade antiviral contra o vírus HIV

Os extratos metanólicos particionados das raízes, cascas, folhas e alguns compostos isolados, incluindo  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, swertisina e *n*-hentriacontano obtidos da *A. moluccana*, foram submetidos à investigação da atividade antiviral pela avaliação da morte de células e efeito citopático viral, após a indução da doença (AIDS) e administração dos extratos e compostos, como previamente descrito (PAUWELS *et al.*, 1987). Estes testes foram realizados no Departement Farmaceutische Wetenschappen, Laboratory of Pharmacognosy and Phytochemistry, sob orientação do Prof. Dr. A. J. Vlietinck, University of Antwerp, Antwerpen, Bélgica.

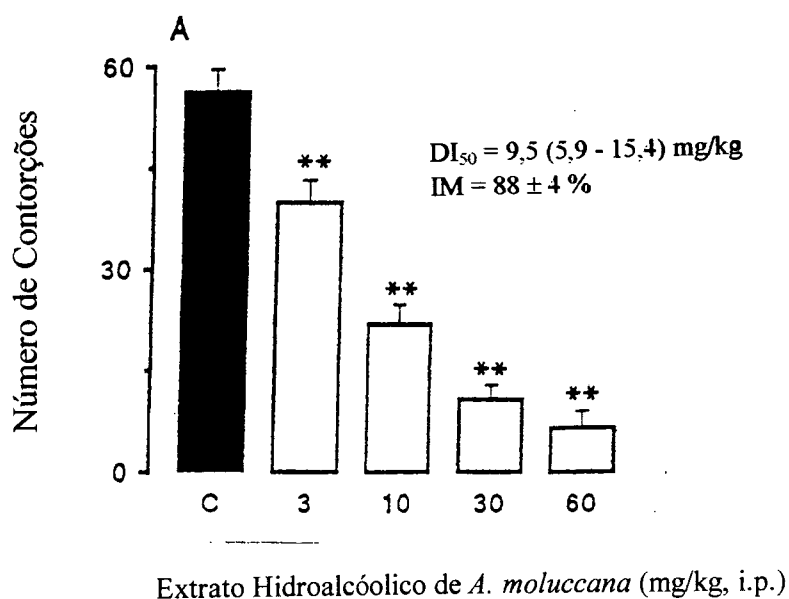


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigação da atividade analgésica da *A. moluccana*, inicialmente foi preparado o extrato hidroalcolólico (EH) das folhas utilizando-se os métodos convencionais. Como pode ser observado na figura 6, tal extrato, quando administrado intraperitonealmente (3-60 mg/kg) exibiu significativa inibição de forma dose-dependente da nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. A  $DI_{50}$  calculada foi de 9,5 (5,9-15,4) mg/kg com inibição máxima de  $88 \pm 4\%$ . Esses promissores resultados estimularam a realização de uma investigação mais detalhada desta planta, visando o isolamento e identificação dos fitoconstituintes responsáveis pelos efeitos farmacológicos indicados (MEYRE-SILVA *et al.*, 1996 a, b, 1997, 1998 a, b).

Assim, foi obtido o extrato etanólico das folhas de *A. moluccana*, o qual foi sucessivamente particionado com solventes de polaridade crescente como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, respectivamente. Considerando que a fração solúvel em hexano foi obtida com alto rendimento (Tabela 1), aproximadamente quinze vezes maior que todas as outras frações, bem como exibiu uma atividade analgésica significativa (resultados não apresentados), esta foi selecionada para análise fitoquímica.

Tal fração foi cromatografada em coluna de sílica gel (Merck), eluída com Hexano:AcOEt, com aumento gradativo de AcOEt. Após os procedimentos usuais (ver



**Figura 6.** Efeitos do extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *A. moluccana* administrado intraperitonealmente sobre as contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético em camundongos. As colunas representam os valores da média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C).

**Tabela 1.** Rendimento dos extratos e frações, em relação ao peso seco do material vegetal, obtidos das folhas e cascas de *A. moluccana*.

Partes da planta	Rendimento (%) dos extratos e frações				
	EtOH	MeOH	Hexano	DCM	AcOEt + BuOH
Folhas	0,04	ND	0,025	0,001	$5,62 \cdot 10^{-3}$
Cascas	ND	0,0008	ND	0,0013	ND

ND = Não Determinado

parte experimental), três sólidos brancos foram obtidos e denominados inicialmente como I, II e III, cuja pureza foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) (COLLINS & BRAGA, 1988; UGAZ, 1994; MARINI-BETTÓLO *et al.*, 1981).

Os dados espectroscópicos (IV, RMN-<sup>1</sup>H) do sólido I, indicaram somente a presença de ligações de hidrocarboneto (C-H), e o uso de CG/EM confirmou um hidrocarboneto saturado, identificado como *n*-hentriacontano, com ponto de fusão 67,8°C (I), o qual é um alcano bastante conhecido presente em diversas plantas da família Euphorbiaceae, particularmente nas espécies de *Euphorbia*, *Colliguaja* e *Argytmnia* (GNECCO *et al.*, 1996). Além disso, recentemente tem sido reportado importante atividade anti-tumoral a baixas concentrações (TAKAHASHI *et al.*, 1995).

Os sólidos II e III apresentaram reação positiva para os reagentes anisaldeído sulfúrico e com o Liebermann-Burchard, sugerindo serem esteróis ou terpenos (MARINI-BETTÓLO *et al.*, 1981; UGAZ, 1994). Análises espectrais adicionais, especialmente RMN-<sup>13</sup>C, indicaram que o composto II apresentava pelo menos dois compostos diferentes. Através de técnicas de CGAR ou CGAR/EM, com co-injeção de amostra autêntica, podemos constatar que a mistura continha principalmente β-sitosterol, estigmasterol e campesterol. Além disso, seu ponto de fusão 136 °C e os dados espectrais foram idênticos àqueles relatados anteriormente (PERES, 1997a, NIERO, 1993). Embora estes fitoesteróis sejam substâncias comumente presentes em várias plantas (HOOPER & CHANDLER, 1984), foi recentemente demonstrado pela primeira vez suas propriedades analgésicas em vários modelos de dor em

camundongos (NIERO *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1995b). Além disso, o  $\beta$ -sitosterol vem adquirindo grande importância na produção de drogas esteroidais, como hormônios, graças ao considerável grau de aceitabilidade do material bruto inicial (KOVGANKO & KASHKAN, 1994). Estes compostos, bem como taninos e flavonóides, parecem ser responsáveis pelo efeito analgésico de outras plantas da família Euphorbiaceae, particularmente de plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* (SANTOS *et al.*, 1994, 1995; MIGUEL *et al.*, 1995, 1996; CECHINEL-FILHO *et al.*, 1996; Para revisão, ver: CALIXTO *et al.*, 1998). Outros estudos tem demonstrado que tais fitoesteróis, além da ação antinociceptiva, exercem potente ação antiedematogênica em ratos, sendo seu efeito comparável com a hidrocortisona (corticóide) e fenilbutazona (antiinflamatório não esteroidal) (HANDA *et al.*; 1992; RECIO *et al.*, 1995).

Estudos recentes tem demonstrado que o  $\beta$ -sitosterol e alguns análogos são efetivos no tratamento de Hiperplasia Benigna de Próstata (LOWE & KU, 1996).

Os dados espectroscópicos (IV, RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e EM), ponto de fusão 156-158 °C do composto III, foram compatíveis com aqueles de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, dois triterpenos conhecidos que exercem ação antiinflamatória (GUPTA *et al.*, 1971; LOGGIA *et al.*, 1994; RECIO *et al.*, 1995), cujos dados espectrais estão de acordo com os da literatura (SEO *et al.*, 1975; CHANDLER *et al.*, 1982). O uso de CGAR, com co-injeção de amostra autêntica, indicou quantidade similar de ambos compostos (aproximadamente 1:1), este dado cromatográfico encontra-se na figura 7.

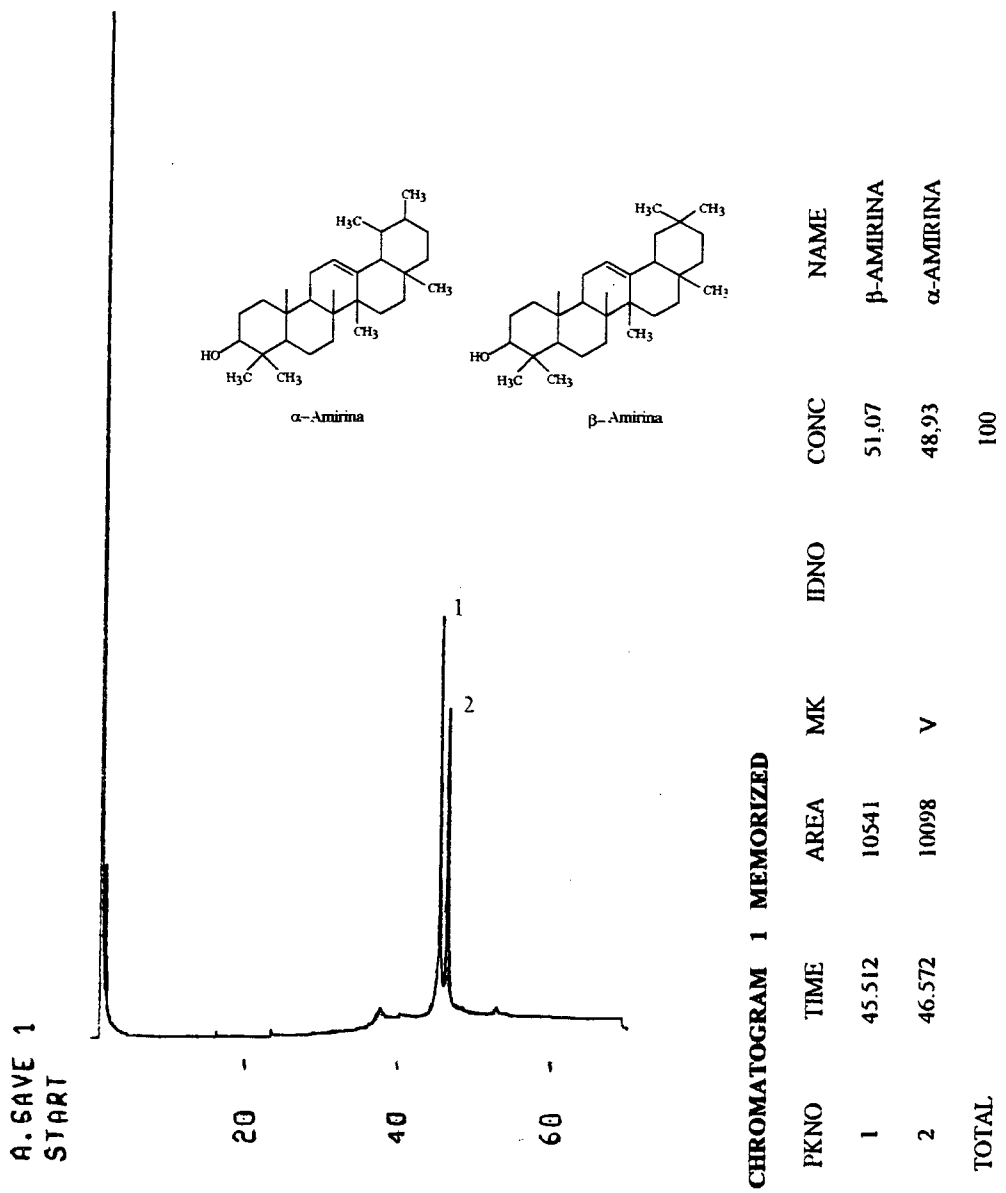


Figura 7. Cromatografia Gasosa (CG) do  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, com co-injeção de amostra autêntica, de *A. moluccana*.

Os extratos das folhas de *A. moluccana* particionado com AcOEt e butanol foram submetidos à cromatografia em camada delgada e como apresentaram similar perfil cromatográfico (CCD), foram reunidos. Usando reagentes específicos visando caracterizar as classes de compostos orgânicos presentes nestas frações, foram utilizados alguns reativos específicos (MARINI-BETTÓLO *et al.*, 1981; UGAZ, 1994), onde evidenciou-se a ausência de alcalóides e a presença de compostos fenólicos, particularmente flavonóides. Posteriormente, as frações de AcOEt/BuOH foram submetidas à cromatografia em coluna, onde foram isoladas duas substâncias fenólicas. Uma delas foi identificada como um flavonóide glicosilado, 6- $\beta$ -D-glucopiranosil-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-7-methoxi-4H-1-benzopirran-4-ona, denominado swertisina, com ponto de fusão 242,6 °C (IV). No espectro de IV (fig. 8) verifica-se a presença de bandas características de flavonóides como em 3.393  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1.654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) e 1605  $\text{cm}^{-1}$  (C=C, Ar). Analisando o espectro de RMN- $^1\text{H}$  (fig. 9), observa-se seis prótons referentes aos anéis aromáticos: 7,8 ppm (2H, d,  $J=8,85$  Hz, C-2' e 6'-H), 6,9 ppm (2H, d,  $J=8,82$  Hz, C3' e C5'-H), 6,71 ppm (1H, s, C8-H) e 6,63 ppm (1H, s, C3-H); um grupo metoxila a 3,94 ppm (3H, s, C7-OCH<sub>3</sub>), dois grupos hidroxilas aromáticos, um na posição 5 aparecendo em 3,305 ppm (1H, s) e outro na posição 4' com 3,3004 ppm (1H, s) e em 4,4 ppm (1H, C-glicosil, C1-H) e 4,2 ppm (1H, C-glicosil, C3-H). No espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (fig. 10) pode-se verificar os seguintes sinais (em ppm): 164,4 (C-2), 96 (C-3), 182,8-182,9 (C-4), 157,5 (C-5), 110,8 (C-6), 164,5 (C-7), 101,4 (C-8), 162,5 (C-9), 101,5 (C-10), 121,8 (C-1'), 128,7

(C-2' e 6'), 116,8 (C-3' e 5'), 161,6 (C-4') e em 55,9-56,3 (7-OCH<sub>3</sub>), C-glicose: 72,4-72,1 (C-1), 80,9 (C-2), 74,6-74,3 (C-3), 71,4 (C-4), 83,2 (C-5) e 63,4-63,5 (C-6). Os dados obtidos estão de acordo com os da literatura para este composto (DOS SANTOS *et al.*, 1996; KALDAS *et al.*, 1975). Após procedimentos convencionais de purificação, um outro composto, possuindo um R<sub>f</sub> menor, portanto mais polar do que o swertisina, foi identificado como um flavonóide 2''-O-ramnosilswertisina, com ponto de fusão 260,5 °C (V). O espectro de IV (fig. 11) deste composto apresenta-se similar ao do swertisina, no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (fig. 12), além dos prótons comuns à swertisina, observa-se o deslocamento químico do próton do grupo ramnosil à 5,1 ppm (1H, s) e 0,6-0,58 ppm (3H, d, J=6,0 Hz) do CH<sub>3</sub> do grupo ramnosil, e na figura 13, contendo o espectro de <sup>13</sup>C-RMN, verifica-se, além dos sinais encontrados para o swertisina, os sinais dos carbonos do grupo 2''-O-ramnosil: 100,4 ppm (C-1), 70,4-71,8 ppm (C-2, 3 e 4), 68,4 ppm (C-5) e 17,7-18,2 ppm (C-6). Este composto foi submetido a análise de FAB-EM (figura 14), onde pode-se comprovar tal composto, juntamente com a hidrólise ácida, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3%, que forneceu o swertisina como aglicona, e o açúcar componente do composto (V) foi identificado como L-ramnose por CCD com amostra autêntica. Os dados obtidos neste estudo condizem com os da literatura (SHIRANE *et al.*, 1982; HILSENBECK & MABRY, 1990). Embora o swertisina e seu derivado tenham sido encontrados em outras plantas, eles são produtos naturais raros, não tendo sido anteriormente descritos para as plantas pertencentes à família Euphorbiaceae.

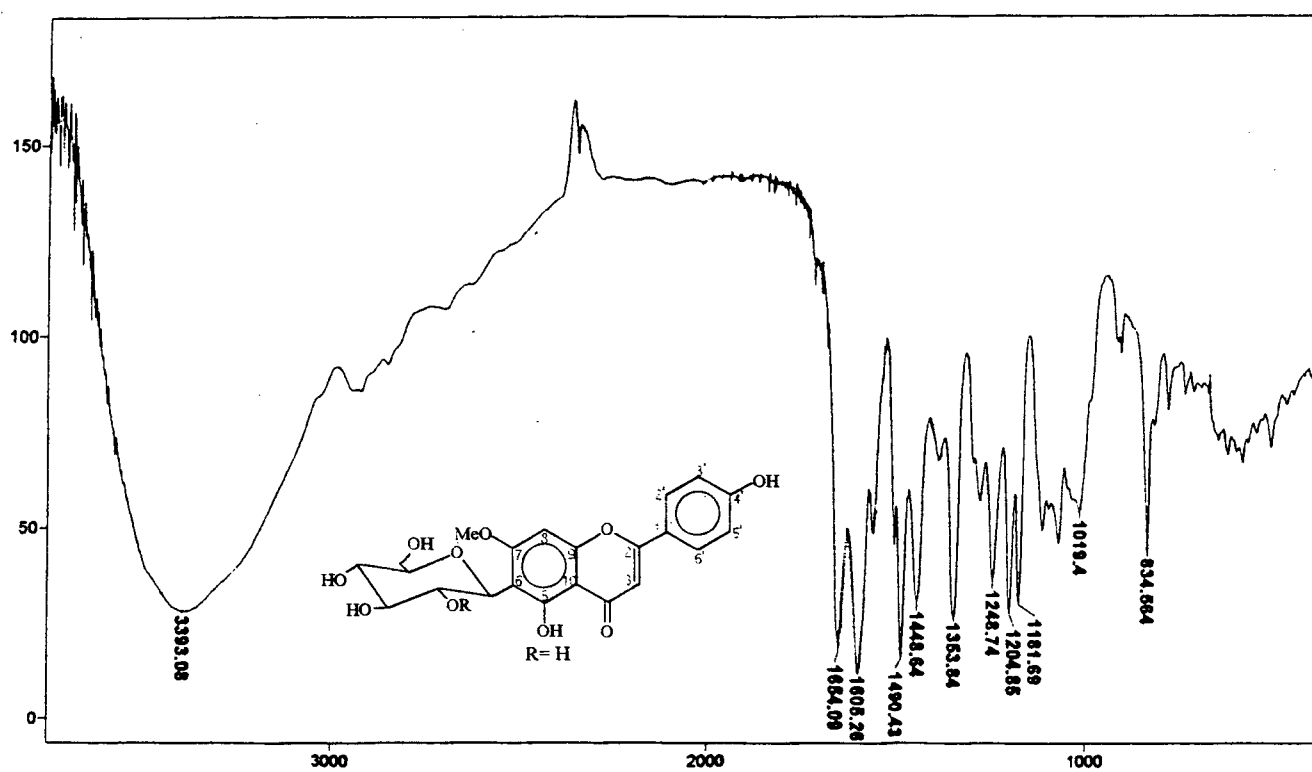
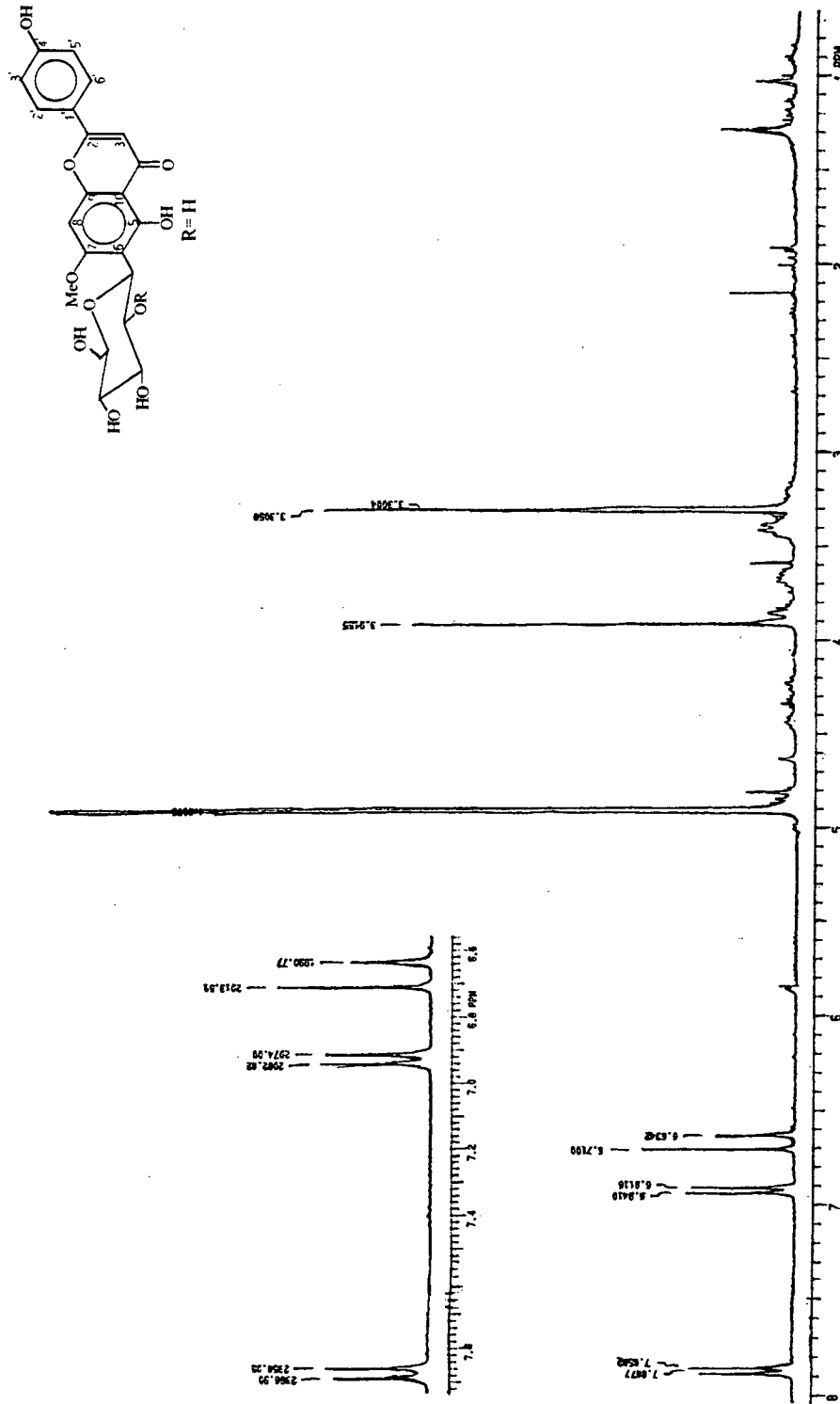


Figura 8. Espectro de Infravermelho (IV) do swertisina, em pastilha de Kbr.





**Figura 9.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) (300MHz) do swertisina em MeOD

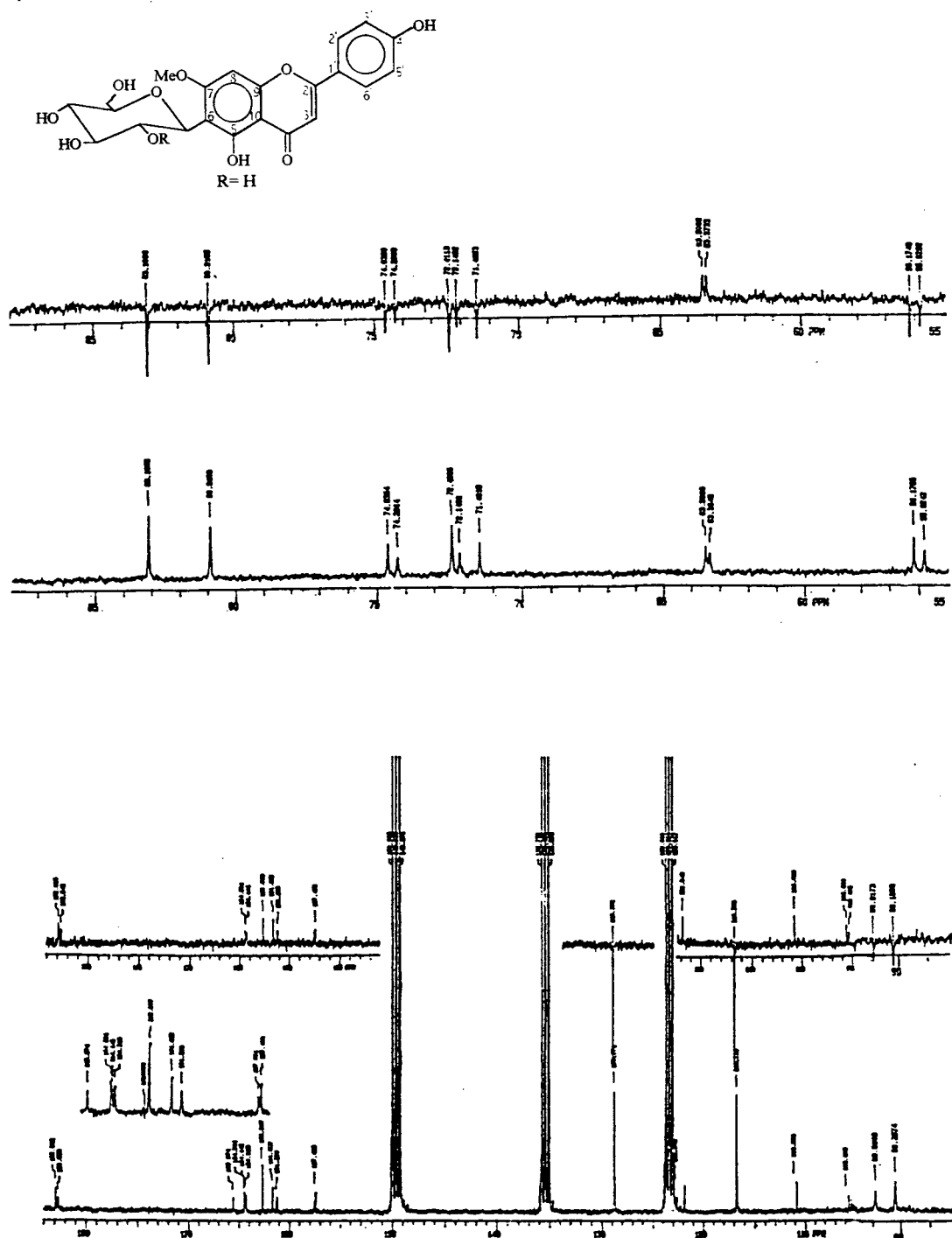


Figura 10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN- $^{13}\text{C}$ ) (75 MHz) do swertisina, em piridina.

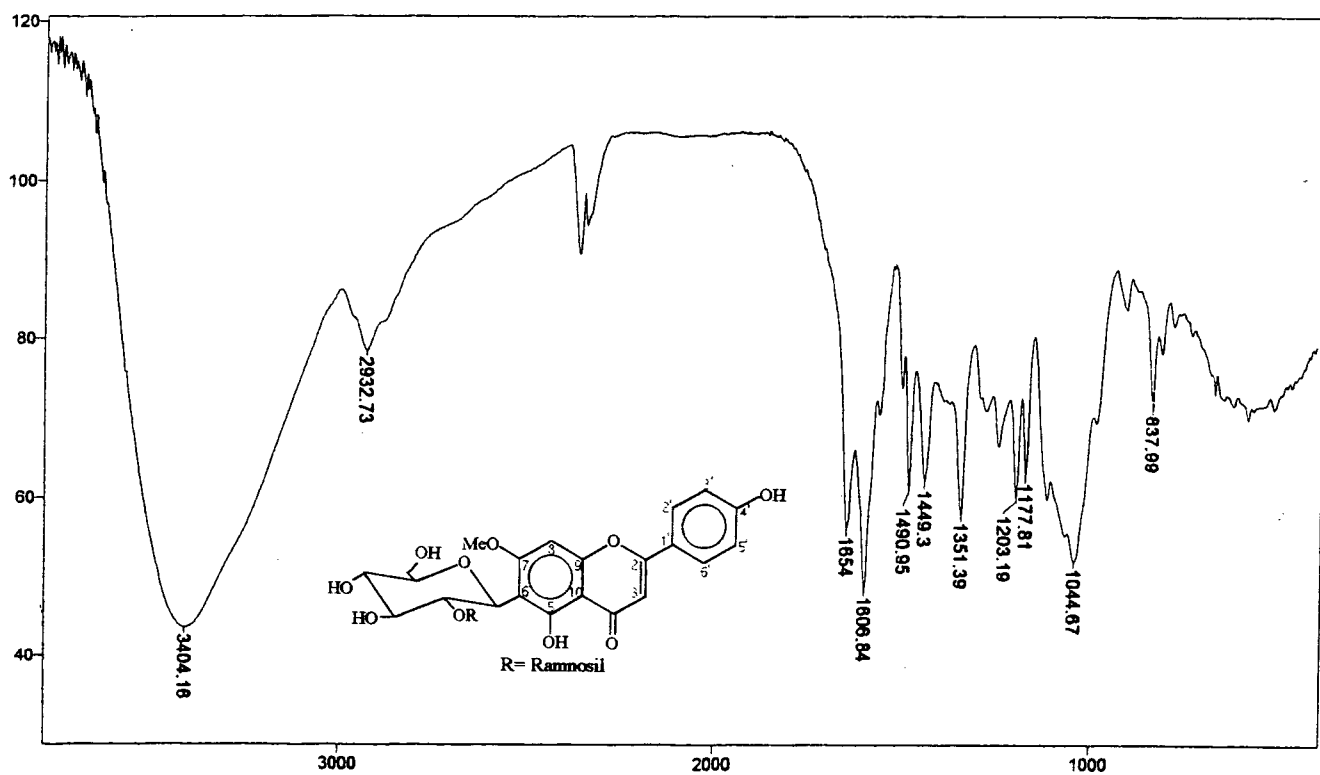


Figura 11. Espectro de Infravermelho (IV) do 2''-O-ramnosilwertisina, em pastilha de Kbr.

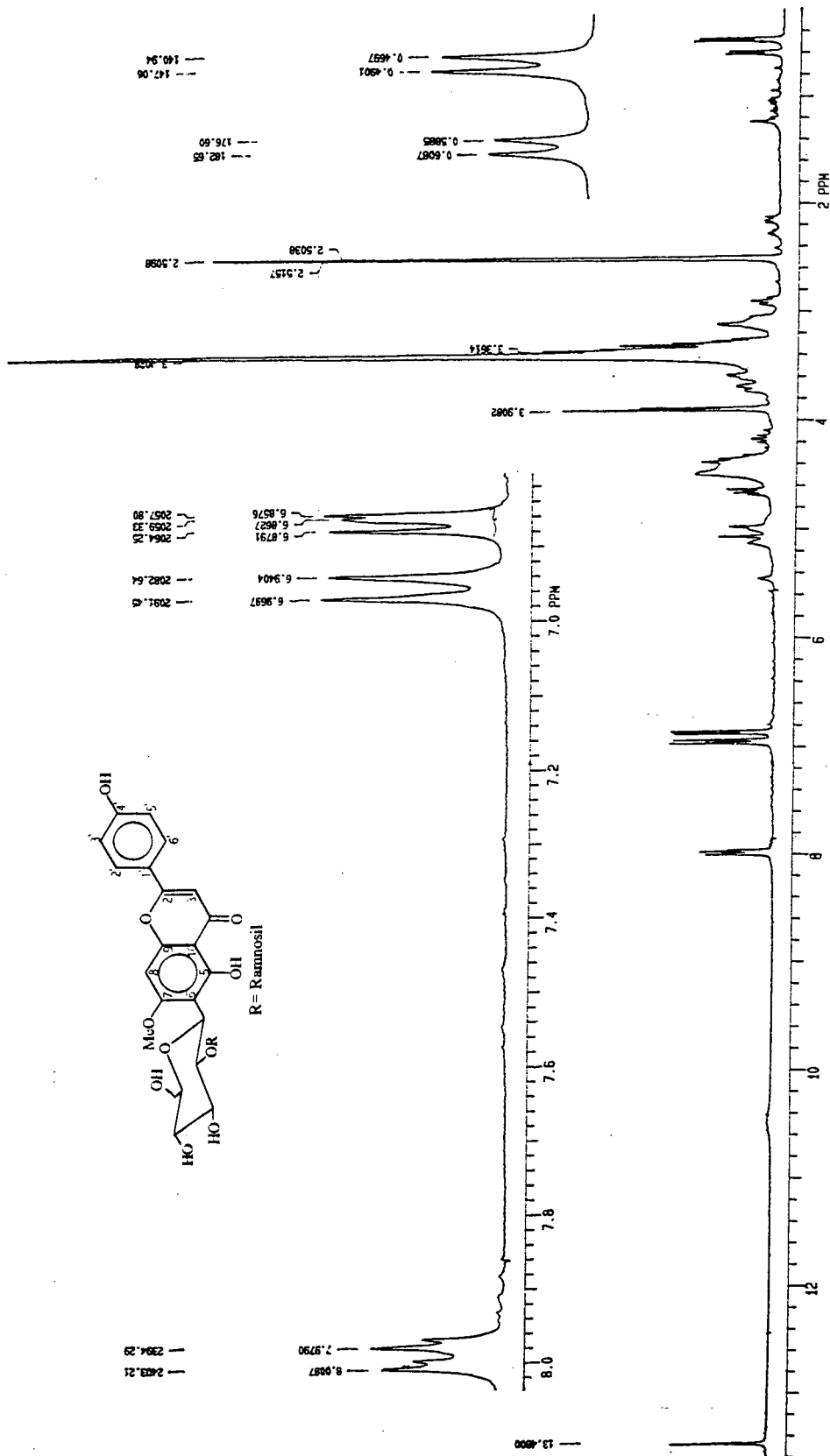


Figura 12. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) (300MHz) do 2''-O-ramnosilswertisina, em MeOD

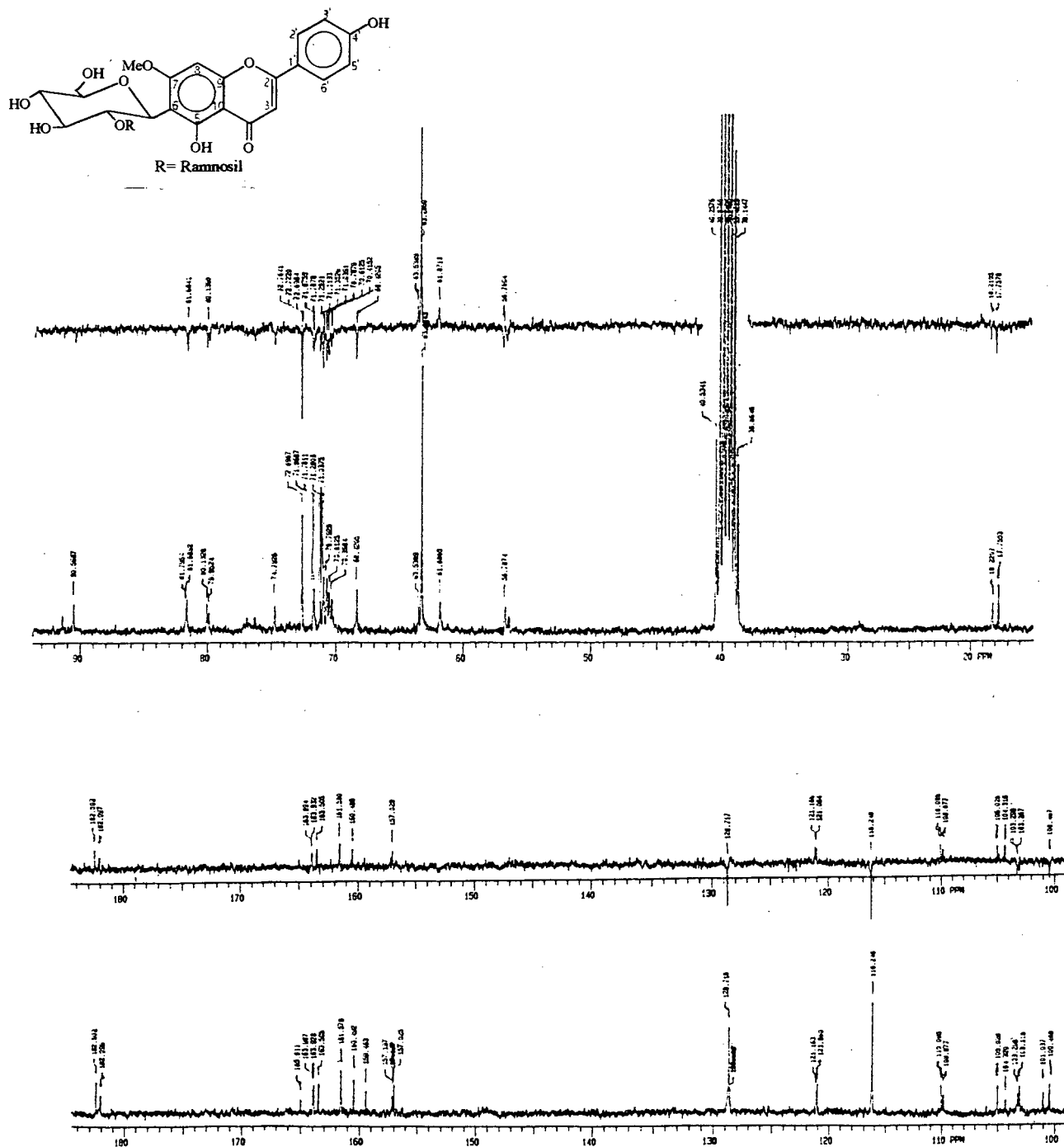


Figura 13. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN- $^{13}\text{C}$ ) (75 MHz) do 2''-O-ramnosilswertisina, em MeOD.

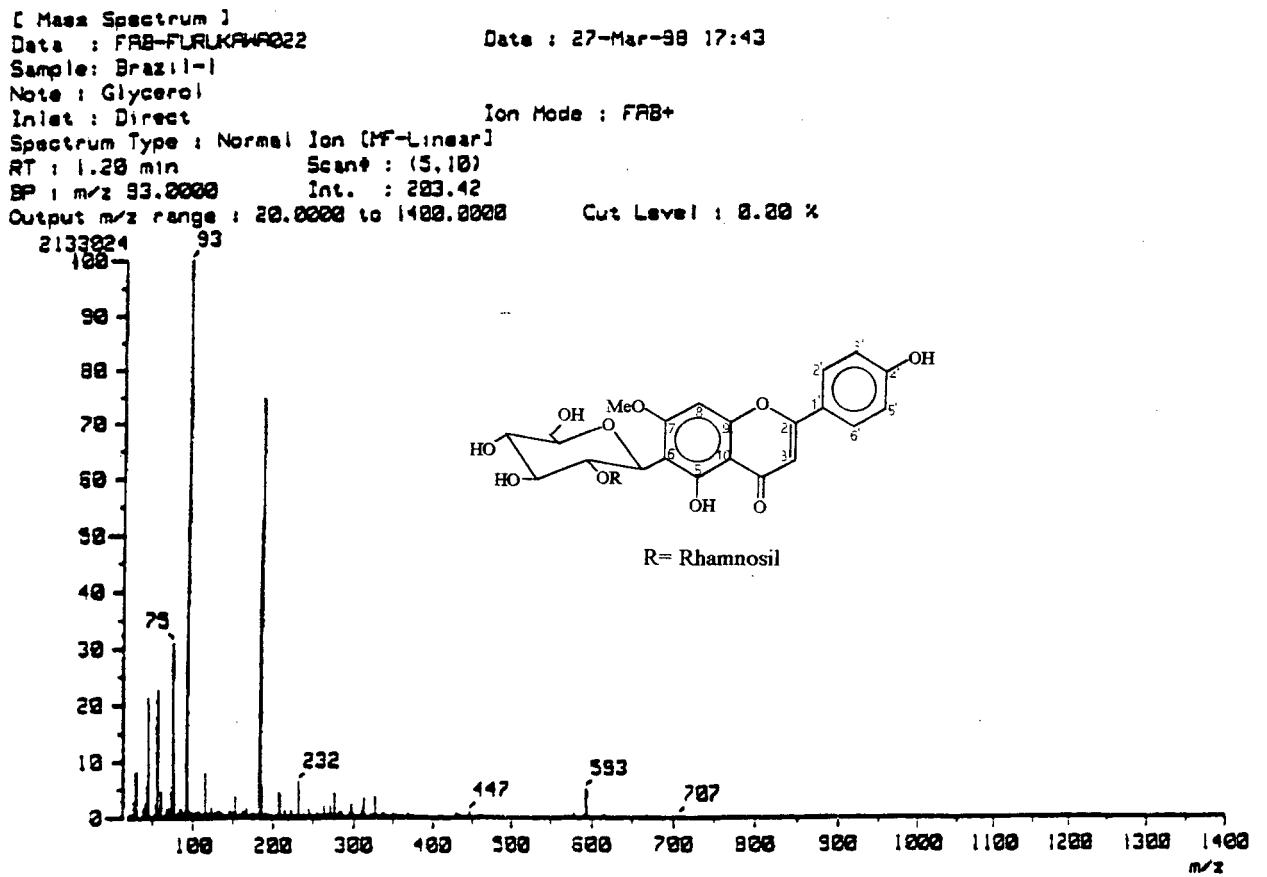


Figura 14. Espectro de Massas (FAB-EM) do 2''-O-ramnosilswertisina

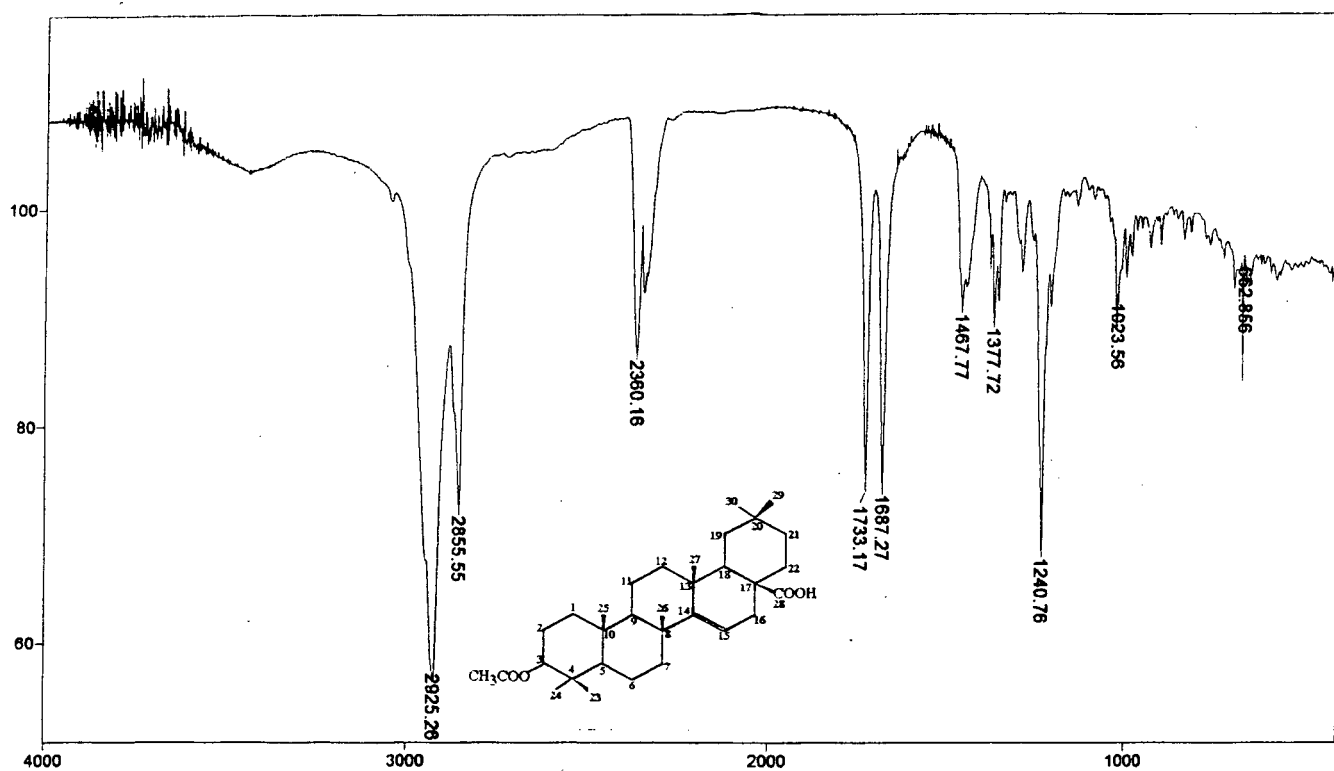
Com relação aos compostos mencionados anteriormente, molucanim (SHAMSUDDIN *et al.*, 1988) e os triterpenos, moretenone e moretenol (HUI & HO, 1968), os quais foram isolados previamente da *A. moluccana*, não foram observados na presente investigação. Esse fato sugere que fatores ambientais podem estar influenciando na produção destas substâncias na planta.

A partir do extrato metanólico das cascas de *A. moluccana*, particionado com solventes de polaridade crescente, obteve-se diferentes frações, entre as quais, a fração de diclorometano, que foi submetida à análise por CCD, apresentando evidências sobre a presença de compostos de natureza terpênica diferentes dos encontrados nas folhas desta planta. Após o uso de procedimentos cromatográficos (CCD, CC), utilizando-se Hexano:Ac.Etila 95:5 como eluente, isolou-se um sólido cristalino branco com ponto de fusão 261-263 °C, identificado como ácido acetil aleuritólico (19 mg) (VI) (MEYRE-SILVA *et al.*, 1997). Os dados espectrais de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para este composto encontram-se na figura 15, 16 e 17, respectivamente. O espectro de IV apresenta além das bandas características à vibrações de ligações C-C e C-H, estiramento de grupos OH (3400 cm<sup>-1</sup>) e bandas em 1733,17 e 1687,27 cm<sup>-1</sup>, referentes à carbonila. Analisando o espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) (fig. 16), observa-se duplo dublete em 4,5 ppm referente à substituição do grupo acetil em C-3, em 5,5 ppm caracteriza próton olefínico H-15. No espectro de <sup>13</sup>C-RMN observa-se em 183 ppm, sinal do grupamento ácido ligado ao C-17 (51 ppm), em 171 ppm referente a substituição do grupo éster em C-3 (81 ppm), 161 ppm caracteriza o grupo olefínico no

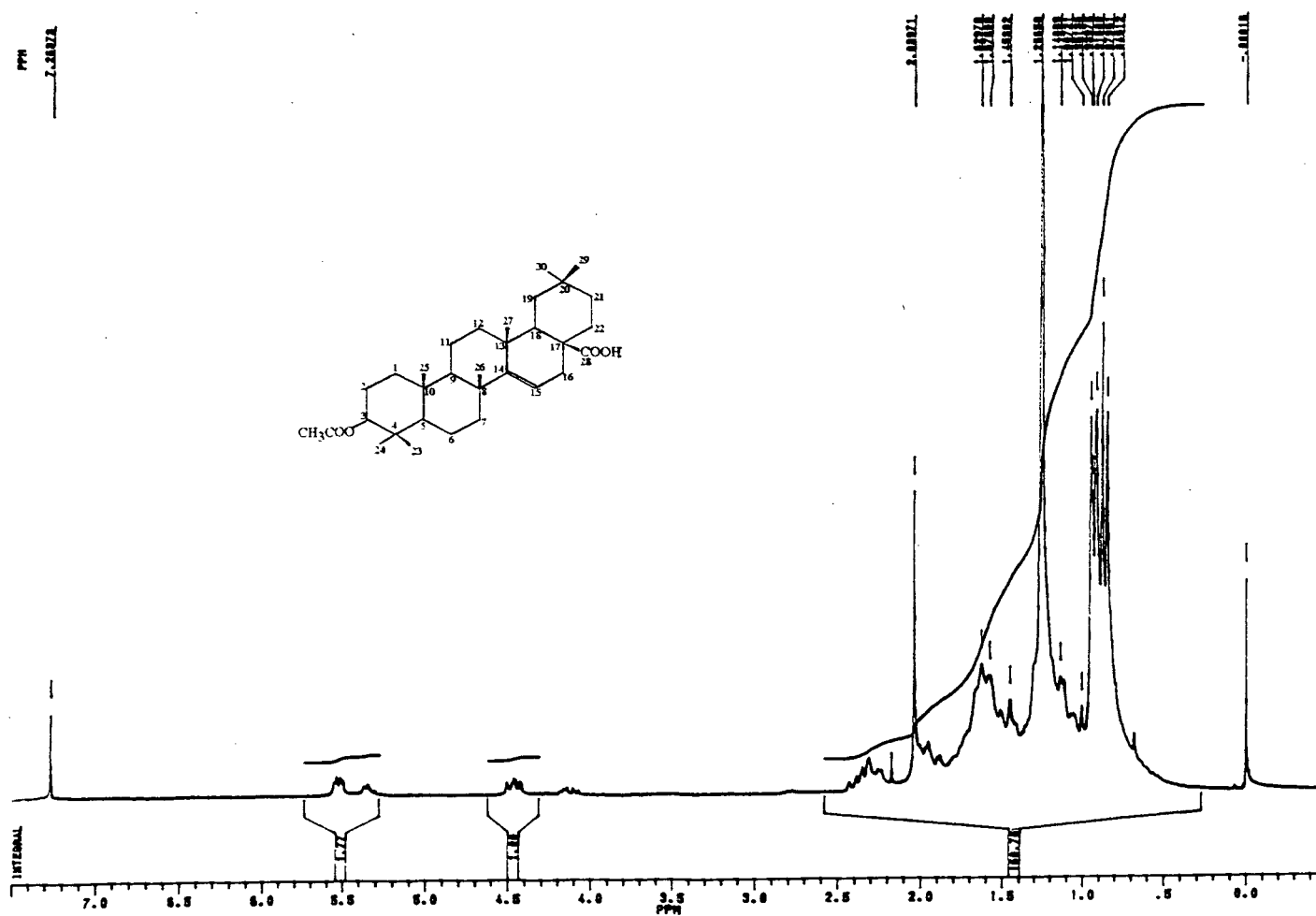
C-14 do anel. Todos os dados estão de acordo com os da literatura para o ácido acetil aleurítico (PERES, 1997). Tal composto, também foi isolado anteriormente em nossos laboratórios da planta *Croton urucurana*, o qual demonstrou apresentar importante efeito antimicrobiano contra diferentes bactérias patogênicas (PERES *et al.*, 1997), considerável ação analgésica (SANTOS *et al.*, 1997; PERES *et al.*, 1998). Trabalhos realizados com outra espécie de *Aleurites*, *A. montana*, demonstraram o isolamento de um triterpeno denominado de ácido aleurítico e algumas modificações sintéticas, foram feitas obtendo-se também o ácido acetil aleurítico (MISRA & KHASTGIR, 1970).

A Tabela 2 demonstra os rendimentos obtidos para os compostos isolados de *A. moluccana*, em relação ao extrato etanólico das folhas e extrato metanólico das cascas.





**Figura 15.** Espectro de Infravermelho (IV) do ácido acetil aleuritólico, em pastilha de Kbr.



**Figura 16.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ) (200 MHz) do ácido acetil aleuritólico, em  $\text{CDCl}_3$ .

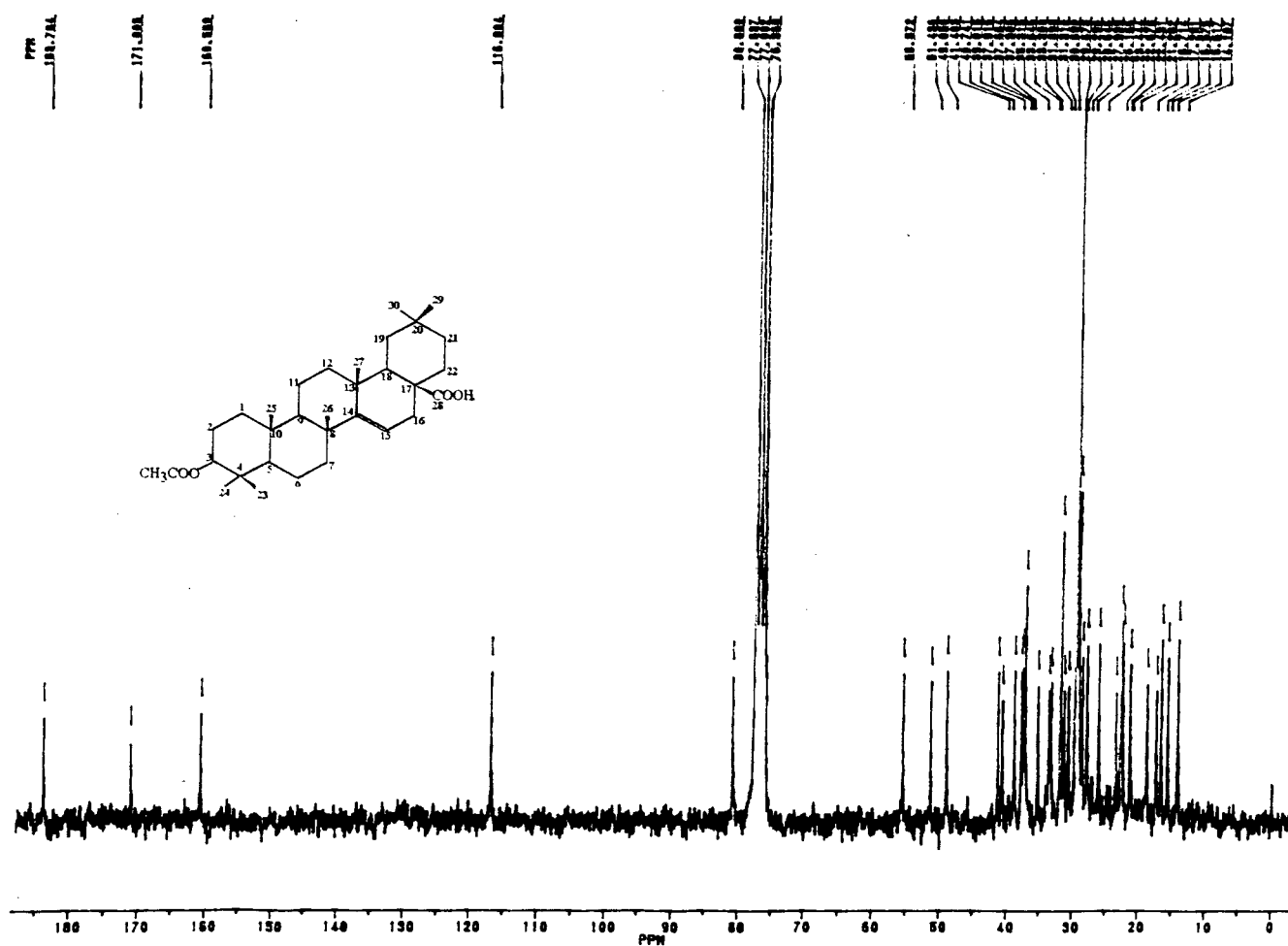


Figura 17. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN- $^{13}\text{C}$ ) (50 MHz) do ácido acetil aleurítico, em  $\text{CDCl}_3$ .

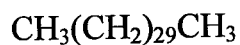
**Tabela 2.** Rendimento dos compostos isolados neste estudo, obtidos das folhas e cascas de *A. moluccana*.

Compostos isolados	Rendimento (%) dos compostos isolados
<i>n</i> -hentriacontano <sup>a</sup>	$9,98 \cdot 10^{-5}$
$\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol <sup>a</sup>	$3,33 \cdot 10^{-4}$
$\alpha, \beta$ -amirina <sup>a</sup>	$1,34 \cdot 10^{-3}$
Swertisina <sup>a</sup>	$3,13 \cdot 10^{-4}$
2''- <i>O</i> -ramnosilswertisina <sup>a</sup>	$1,08 \cdot 10^{-4}$
Ácido acetil aleuritólico <sup>b</sup>	$1,35 \cdot 10^{-4}$

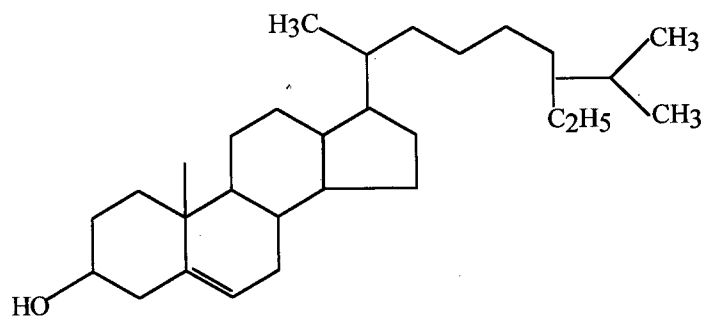
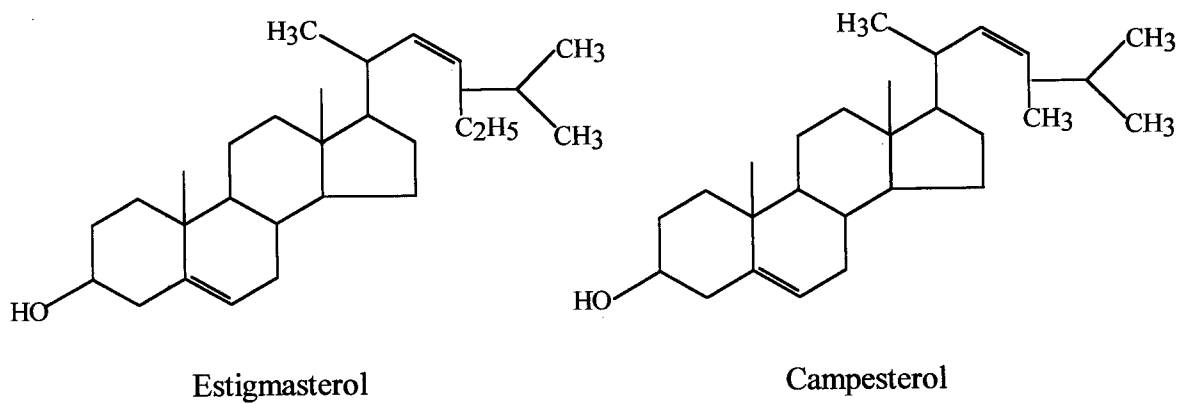
<sup>a</sup> Em relação ao extrato etanólico das folhas

<sup>b</sup> Em relação ao extrato metanólico das cascas

Os compostos isolados neste estudo da planta *A. moluccana* estão apresentados a seguir.



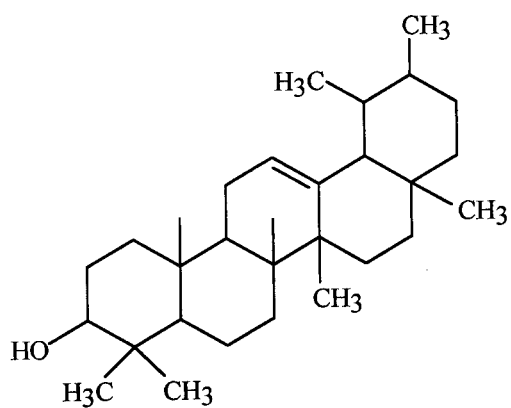
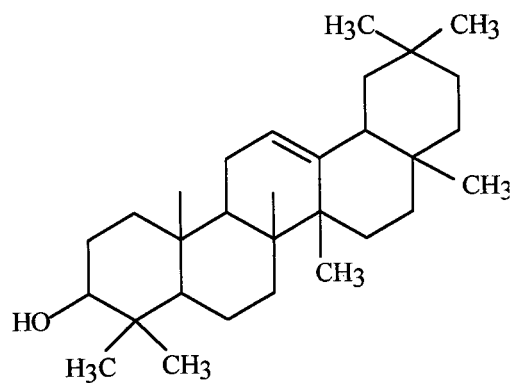
(I)

 $\beta$ -Sitosterol

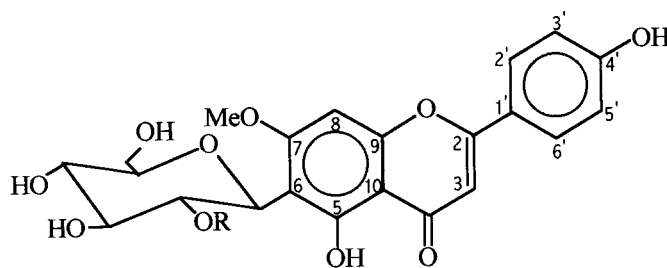
Estigmasterol

Campesterol

( II )

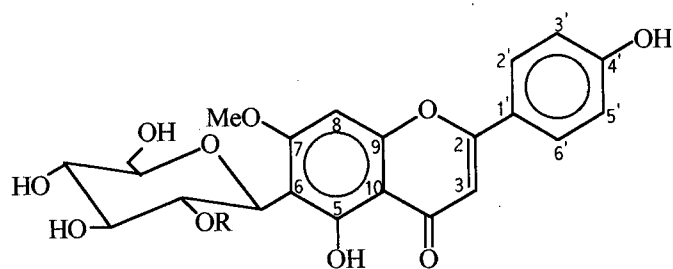
 $\alpha$ -Amirina $\beta$ -Amirina

( III )



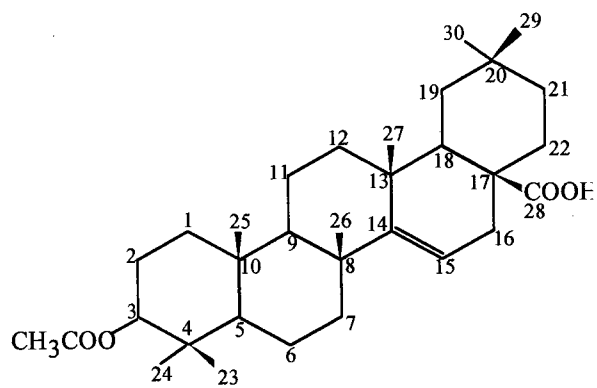
R= H

( IV )



R= Ramnosil

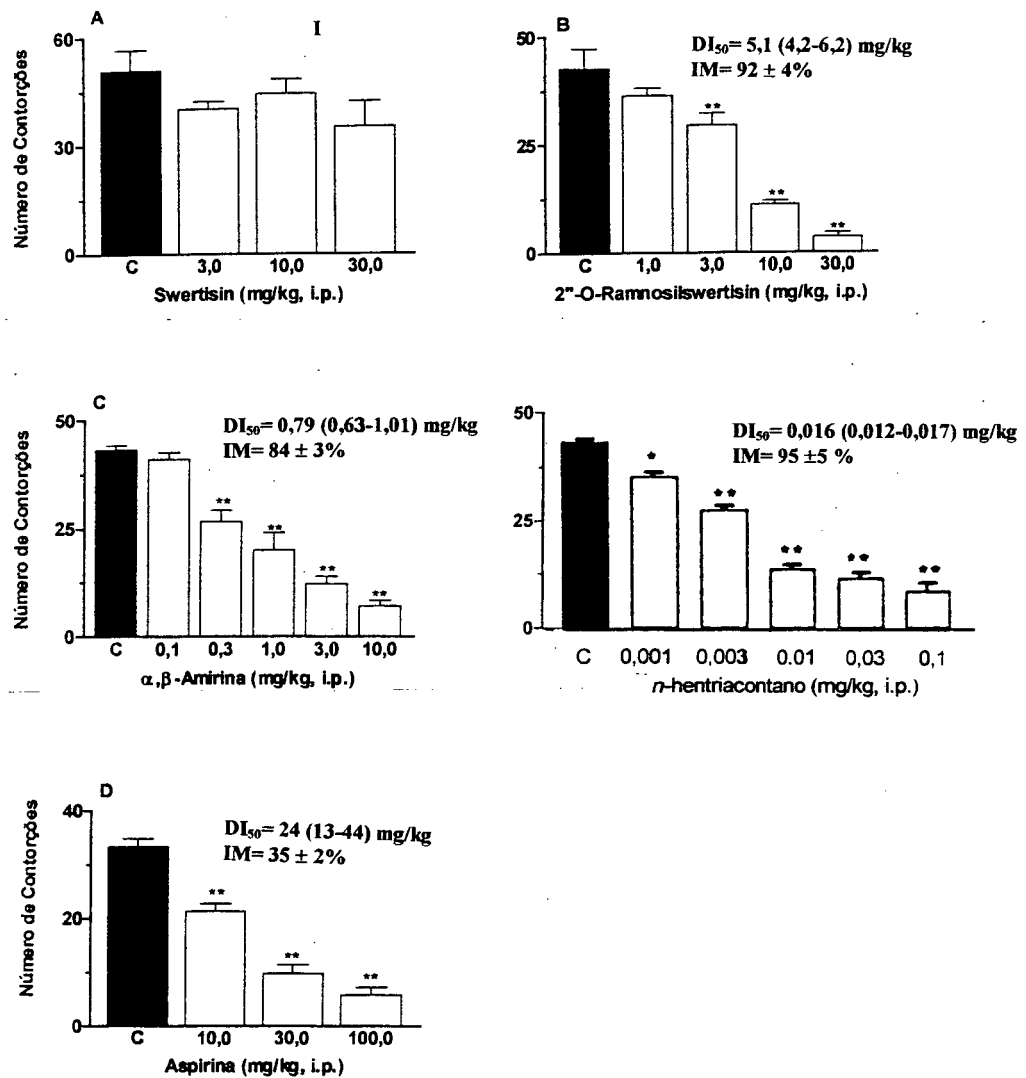
(V)



(VI)

Com intuito de investigar se o *n*-hentriacontano, a mistura de triterpenos, o swertisina e 2''-*O*-ramnosilswertisina, contribuem para a atividade analgésica encontrada para os extratos de *A. moluccana*, estes foram avaliados através do teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos (figura 18). Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram as  $DI_{50}$  para estes compostos, exceto para swertisina, que foi inativo, foram inferiores a 10 mg/Kg. As inibições máximas das contorções abdominais observadas foram  $95 \pm 5$ ,  $84 \pm 3\%$ ,  $92 \pm 4$ , para o *n*-hentriacontano, triterpenos e 2''-*O*-ramnosilswertisina, respectivamente (MEYRE-SILVA *et al.*, 1998 a, b). Por outro lado, a aspirina e o paracetamol (drogas analgésicas e antiinflamatórias não-esteroidais, usadas para efeito de comparação), administradas intraperitonealmente na mesma dose, tiveram valores de  $DI_{50}$  de 24 (13-44) e 19 (16-23) mg/kg, com inibição máxima de  $35 \pm 2$  e  $38 \pm 1\%$ , respectivamente (CECHINEL-FILHO *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1995b). Esses resultados sugerem que o *n*-hentriacontano, os triterpenos e o 2''-*O*-ramnosilswertisina foram mais eficazes que os fármacos de referência utilizados, justificando, ao menos em parte, que esses compostos podem estar contribuindo para a importante atividade analgésica apresentada pelos extratos hidroalcoólico e hexânico obtidos das folhas de *A. moluccana*. Além disso, a diferença encontrada para os dois flavonóides, sugere que o grupo ramnosil é importante para a atividade antinociceptiva (MEYRE-SILVA *et al.*, 1999).





**Figura 18 .** Efeito antinociceptivo causado pelo swertisina, 2"-O-ramnosil swertisina,  $\alpha, \beta$ -amirina, *n*-hentriacontano, isolados das folhas da *A. moluccana* e a aspirina, droga utilizada na clínica, administrado via intraperitoneal em relação às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais os E.P.M.

**Tabela 3:** Efeitos dos compostos isolados das folhas de *A. moluccana*, aspirina e paracetamol administrados intraperitonealmente na dose de 10 mg/kg sob às contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético em camundongos.

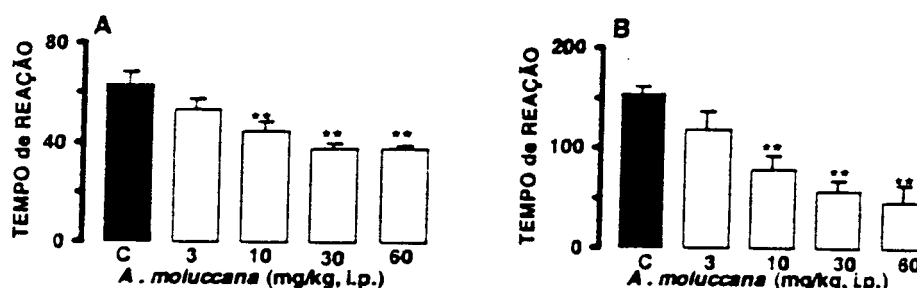
Compostos	DI <sub>50</sub> (mg/kg)	Inibição (%)
<i>n</i> -hentriacontano	0,016 (0,012-0,017)	94 ± 6
α e β-amirina	0,79 (0,63-1,01)	84 ± 3
*β-sitosterol	9 (3,5-23,2)	54 ± 2
*estigmasterol	16 (13,6-20,3)	42 ± 1
Swertisina	I	I
2''- <i>O</i> -ramnosilswertisina	5,1 (4,2-6,2)	92 ± 4
Aspirina	24 (13-44)	35 ± 2
Paracetamol	19 (16-23)	38 ± 1

I = Inativo (não inibiu as contorções abdominais)

\* (NIERO, 1993; SANTOS *et al.*, 1995b).

Os resultados apresentados na figura 19 demonstram que o extrato hidroalcolico (EH), obtido das folhas, administradas por via intraperitoneal (3-10

mg/kg), causou inibição dose-dependente sobre ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo, contudo, mais efetivo em relação à segunda fase desse modelo, relacionado à fase inflamatória da dor. A  $DI_{50}$  calculada para a segunda fase foi de 18,4 (12,2-27,7) mg/kg com inibição máxima de  $69,0 \pm 10\%$ .



**Figura 19.** Efeito antinociceptivo causado pelo EH da *A. moluccana* administrado pela via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*P<0,05, \*\*P<0,01.

O extrato etanólico das folhas e o extrato metanólico das cascas da *A. moluccana* foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar, através da técnica anteriormente descrita (BAUER *et al.*, 1996), contra bactérias Gram (+) (*Streptococcus pyogeneses* e *Staphylococcus aureus*) e para Gram (-) (*Klebsiella sp* e *Escherichia coli*). Os extratos não apresentaram inibição significativa para tais bactérias, sendo que esses resultados diferem, em parte, dos obtidos anteriormente com o extrato metanólico das cascas, o qual demonstram considerável efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* (LOCHER *et al.*, 1995). Provavelmente, essa diferença de resultados deve-se principalmente a fatores ambientais que de alguma forma podem estar alterando a composição química desta planta.

Os resultados da investigação antifúngica realizada com as frações obtidas das diferentes partes da *A. moluccana*, demonstraram que os mesmos são pouco ativos no modelo testado. Somente o extrato metanólico das cascas e das sementes foram ativos contra *Epidermophyton floccosum*. Com relação à avaliação da atividade antiviral para esta planta, somente a fração de diclorometano das cascas e folhas foram ativas no modelo, demonstrando uma boa atividade contra o vírus HIV-2 quando comparado a estudos realizados anteriormente com esta e outras plantas, onde os autores consideraram efetivos os extratos os quais apresentaram para a concentração efetiva 50% de 2,3 e 1,7 µg/ml com completa proteção celular (100%) contra HIV-induzido comparado ao grupo controle (LOCHER *et al.*, 1996). Os resultados obtidos para o

extrato das cascas de *A. moluccana* foram de 0,89 µg/ml de CE 50% , tendo proteção de 58 % e o extrato das folhas, particionado também com diclorometano de 3 µg/ml com proteção celular de 93 %.

Finalmente, os resultados obtidos indicam que a *A. moluccana* apresenta constituintes químicos com relevante ação farmacológica, especialmente analgésica, justificando seu uso na medicina popular contra processos dolorosos em geral.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que:

- 1- Os extratos e frações obtidos das folhas de *A. moluccana* exercem importantes efeitos analgésicos em camundongos.
- 2- As ações analgésicas parecem estar relacionadas, em grande parte, com a presença de diferentes substâncias, como o hidrocarboneto *n*-hentriacontano, os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina e o flavonóide 2''-*O*-ramnosilswertisina.
- 3- Os extratos e compostos obtidos das folhas da *A. moluccana*, exceto o flavonóide swertisina, foram mais potentes e eficazes do que a aspirina e o acetaminofeno (paracetamol), dois fármacos analgésicos e antiinflamatórios disponíveis no mercado farmacêutico e utilizados clinicamente.
- 4- Dos extratos submetidos à investigação antifúngica, somente o extrato das cascas e sementes demonstraram atividade moderada contra o fungo patogênico *Epidermophyton floccosum*.
- 5- Com relação à avaliação da atividade antiviral, somente os extratos de diclorometano obtidos das cascas e folhas desta planta foram ativos no modelo testado para HIV, sugerindo a continuidade destes estudos para determinação dos componentes ativos.

- 6- Os estudos fitoquímicos indicaram que as folhas de *A. moluccana* produzem substâncias químicas estruturalmente diferentes das substâncias encontradas nas cascas.
- 7- Os resultados obtidos no presente estudo confirmam e justificam o uso medicinal desta planta para o tratamento de processos dolorosos em geral.

Diante dos promissores resultados químicos e farmacológicos obtidos com a planta *A. moluccana*, sugere-se a continuidade destas investigações. Assim, seria de interesse a avaliação destes extratos em outros modelos farmacológicos, além da análise dos possíveis efeitos tóxicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K. & BANSAL, M. C. Carbon-13 of flavonoids. *Elsevier*, New York, 1989, p. 283-264.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single method. *The American J. Clin Pathol.*, 45: 493-496 (1966).
- BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; DELLE MONACHE, F. AND CECHINEL FILHO, V. Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paludosa*. *J. Ethnopharmacol.*, 61: 85-89 (1998).
- BLOCK, L. C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N. L. M.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC. (Compositae). *Die Pharmaz.*, 53: 716-778 (1998).
- BUSATO, A. C.; MOSER, R., SOUZA, M. M.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; Antinociceptive action of different extracts from *Rubus imperialis*. *Fitoterap.*, 1999 (in press).
- CALIXTO, J. B.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; RAE, G. A.. Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-acetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. *Planta Med.*, 56: 31-34 (1990).
- CALIXTO, J. B.; SANTOS; A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A Review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.*, 18(4): 225-258 (1998).



- CECHINEL-FILHO, V. Modificação da estrutura molecular da xantoxilina e estudo da atividade farmacológica dos derivados. Florianópolis, 1991. Dissertação de Mestrado (Graduação em Química). Universidade Federal de Santa Catarina.
- CECHINEL-FILHO, V., BREVIGLIERI, E.; WILLIAN FILHO, A. & SANTOS, A. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. *Rev. Bras. Farm.*, 76(4): 115-117 (1995).
- CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, R. O. P.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; FERRARI, F.; MESSANA, I. AND CALIXTO, J. B. Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48: 1231-1236 (1996).
- CECHINEL-FILHO, V. & YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, 21(1): 99-105 (1998).
- CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Quím. Nova*, 1999 (in press).
- CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HOOPER, D. L.; JAMIESON, W. D. AND LEWIS, E. Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). *Lipids*, 17(2): 102-106 (1982).
- COLLIER, H. D. J.; DINNEN, L. C.; JOHNSON, C. A., SCHNEIDER, C.. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 32: 295-310 (1968).
- COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. Introdução à métodos cromatográficos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988, p. 72-85.

- CORRÊA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, 1984, p. 294-295.
- CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Quim. Nova*, 18(5): 460-467 (1995).
- CRUZ, G. L. Dicionário das plantas úteis do Brasil. 4 ed. Rio de Janeiro: Bertrand, 1964, p. 560.
- DOS SANTOS, R. I.; DOS SANTOS, M. A.; SCKENKEL, E. P. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. *International J. Pharmacog.*, 34(4): 300-302 (1996).
- DUKE, James A.. Handbook of medicinal herbs. U.S.A.: CRC Press, 1991, p. 29.
- FLORIANI, A. E. O.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic compounds from *Epidendrum mosenii*. *Die Pharmaz.*, 53(6): 426-427 (1998).
- FOZDAR, B. I.; KHAN, S. A.; SHAMSUDDIN, T.; SHAMSUDDIN, K. M. AND KINTZINGER, J. P. Aleuritin, a coumarinolignoid, and a coumarin from *Aleurites fordii*. *Phytochem.*, 28(9): 2459-2461 (1989).
- GAERTNER, M.; MULLER, L.; ROOS, J. F.; CANI, G. S.; SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. *Phytomed.*, 6(1): 41-44 (1999).
- GNECCO, S.; PÉREZ, C.; BITTNER, M.; BECERRA, J. Y SILVA, M.. Distribucion de n-alcanos en especies chilenas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 41: 229-233 (1996).

- GUPTA, M. B.; BHALLA, T. N.; TANGRI, K. K. AND BHARGAVA, K. P.. Biochemical study of the anti-inflammatory activity of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin acetate. *Pharmacol.*, 20: 401-405 (1971).
- HANDA, S. S., CHAWLA, A. S. and SHARMA, A. K. Plants with antiinflammatory activity. *Fitoterap.*, 63(1): 3-31 (1992).
- HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.*, 30(12): 3864-3874 (1991).
- HARVEY, A. L. & WATERMAN, P. G. The continuing contribution of biodiversity to drug discovery. *Drug Discov. and Developm.*, 1(1): 71-76 (1998).
- HILSENBECK, R. A. & MABRY, T. J. Flavonoidchemistry of Siphonoglossa. *Phytochem.*, 29(7): 2181-2185 (1990).
- HOOPER, S. N. & CHANDLER, R. F. Herbal Remedies of the maritime indians: Phytosterols and triterpenes of 67 plants. *J. Ethnopharmacol.*, 10: 181-194 (1984).
- HOPE, B. E.; MASSEY, DG.; FOURNIER-MASSEY, G. Hawaiian materia medica for asthma. *Hawaii Med.*, 56(6): 160-166 (1993).
- HORWITZ, S. B. How to Make Taxol from Stratch. *Nature*, 367: 593-594 (1994).
- HUI, W. H. & HOI, C. T. An Examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. *Aust. J. Chem.*, 21: 1675-7 (1968).
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30: 103-114 (1987).

JAFFÉ, H. H. A reexamination of the Hammett equation. *Chem. Rev.*, 53: 191-261 (1953).

KALDAS, M.; HOSTETTMANN, K. AND GUILLARMOND, A. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*, XII(1). Etude des composés flavoniques et canthoniques dans les feuilles de *Gentiana campestris* L. *Helv. Chimica Acta*, 58(7): 234-235 (1975).

KINGSTON, D. G. The Chemistry of Taxol. *Pharm. Ther.*, 52: 1-34 (1991).

KLEIN, K. Kukui and macadamia nut oils. *Cosm. & Toiletries*, 106: 87-90 (1991).

KOMATSU, M.; TOMIMORI, T. AND ITO, M. Studies on the constituents of *Swertia japonica*. I. On the structures of swertisin and isowertisin. *Chem-Pharm-Bull-Tokyo*, 15(3): 263-9 (1967).

KOVGANKO, N. V. & KASHKAN, Zh. N. Advances in the chemical transformation of  $\beta$ -sitosterol. *Chem. of Nat. Comp.*, 30(5): 533-546 (1994).

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 49: 23-32 (1995).

LOBACCARO, J. M.; BOUDON, C.; LUMBROSO, S.; LECHEVALLIER, E.; MOTTET, N.; REBILLARD, X.; SULTAN, C.. *Annales d'Endocrinol.*, 58: 381 (1997).

LOCHER, C. P.; WITVROUW, M.; BÉTHUNE, M.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; DAVIS, H.; LASURE, A.; PAUWELS, R.; CLERCQ, E.; VLIETINCK, A. J.; ISAAC, O.. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1). *Phytomed.*, 2(3): 259-264 (1996).

- LOGGIA, R. D.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, ST. AND ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, 60: 516-520 (1994).
- LOWE, FC; KU, JC. Phytotherapy in treatment of Benign Prostatic Hyperplasia: a critical review. *Urology*, 48(1): 12-20 (1996).
- LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL FILHO, V. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. *Phytomed.*, 4: 141-144 (1997).
- MARINI-BETTÓLO, G. B.; NICOLETTI, M. AND PATAMIA, M.. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *J. Chromatogr.*, 213: 113-127 (1981).
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Ceará: EUFC, 1988, p. 101-106.
- MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais - Um Desafio para nossos Químicos Orgânicos. *Rev. de Extensão-Desafio*, 3(1): 5-13 (1990).
- MEYRE-SILVA, C. M.; MORA, T. C.; WILLIAN FILHO, A.; BIAVATTI, M. W.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S. E CECHINEL FILHO, V.. Análise Fitoquímica e Atividade Analgésica de *Aleurites moluccana*. In: XIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1996 a, Florianópolis.
- MEYRE-SILVA, C. M.; MORA, T. C.; BIAVATTI, M. W.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; CECHINEL FILHO, V.. Isolamento de substâncias com efeito analgésico a partir das folhas de *Aleurites moluccana*. In: II SEMINÁRIO INTEGRADO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1996 b, Chapecó.

- MEYRE-SILVA, C. M.; MORA, T. C.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J. YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F & CECHINEL FILHO, V.. A triterpene and a flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana* L. (Willd.) (Euphorbiaceae). *Acta Farm. Bon.*, 16(3): 169-72 (1997).
- MEYRE-SILVA, C. M.; MORA, T. C.; BIAVATTI, M. W.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R. A. AND CECHINEL FILHO, V.. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves L. (Willd.). *Phytomed.*, 5(2): 109-113 (1998) a.
- MEYRE-SILVA, C.; MORA, T. C.; DELLE MONACHE, F.; DAL MAGRO, J.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A. AND CECHINEL FILHO, V. Investigação fitoquímica e análise farmacológica das folhas e cascas de *Aleurites moluccana* L. (Willd.). *Alcance*, 2: 71-76 (1998)b.
- MEYRE-SILVA, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; DELLE-MONACHE, F. AND CECHINEL-FILHO, V. Isolation of a C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. *Planta Med.*, 65: 293-294 (1999).
- MIGUEL, O. G.; CECHINEL FILHO, V.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; FERRARI, F.; MESSANA, I.; YUNES, R. A.. A triterpene and phenolic compounds from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.*, 61: 391 (1995).
- MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; CECHINEL FILHO, V.; PIZZOLATTI, M. G. AND YUNES, R. A.. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.*, 62: 146-149 (1996).
- MISRA, D. R. & KHASTGIR, H. N. Chemical investigation of *Aleurites moluccana* and the structure of Aleuritolic acid - a new triterpene acid. *Tetrahed.*, 26(12): 3017-3021 (1970).

- NIERO, R. Isolamento e identificação de compostos do *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico; correlação estrutura-atividade. Florianópolis, 1993. (Dissertação de Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- NIERO, R.; AMARAL, F. L.; PIZZOLATTI, M. G.; CALIXTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A. Isolation of triterpenes and a acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. ex Boiss. (Euphorbiaceae). *Acta Farm. Bon.*, 15(4): 239-42 (1996).
- NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M. N.; MONTANARI, J. L.; DELLE MONACHE, F. YUNES, R. A. Antinociceptive effects of extracts and a triterpene obtained from *Rubus imperialis*. *J. Nat. Prod.*, 62(8): 1145-1146 (1999).
- NONAKA, G.; HAYASHI, M.; TANAKA, T.; SAIJO, R. AND NISHIOKA, I.. Isolation and characterization of cyanogenic ellagitannis, aleurinis A and B, and a related o-glycosidic ellagitannin, aleuritin C, from *Aleurites fordii* Hemsley. *Pharmac. Society*, 38(4): 861-865 (1990).
- PAUWELS, R.; DECLERCQ, E.; DESMYTER, J.; BALZARINI, J.; GOUBAU, P.; HERDEWIJN, P.; WANDEPUTTE, M. *J. Virol. Methods*, 16:171 (1987).
- PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. AND YUNES, R. A. Fármacos X fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitofármacos e fitoterápicos no Brasil. *Quim. Nova*, 1999 (in press).
- PERES, M. T. L. P. Estudos de compostos ativos (biológicos e farmacológicos) de *Croton urucurana* Baillon. Avaliação do efeito alelopático de extratos de *Gleichenia pectinata* Willd. (Pr.) e de seus aleloquímicos. Florianópolis, 1997. Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, UFSC.
- PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; BELLA CRUZ, A.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol*, 56: 223-226 (1997).

- PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Bailon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation *Phytother. Res.*, 12: 209-211 (1998).
- RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁNEZ, S. AND RÍOS, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.*, 61: 182-185 (1995).
- SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R.; VIANA, A. M.; MORENO, F. N.; CAMPOS, M. M; YUNES, R. A. AND CALIXTO, J. B.. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46: 755-759 (1994).
- SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A., PIZZOLATTI, M. G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J. B. Estudo dos efeitos antibacterianos das folhas de *Bauhinia splendens* (Leguminosae). In: SEMINÁRIO INTEGRADO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1995a, Blumenau.
- SANTOS, A. R. S., NIERO, R., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R. A., PIZZOLATTI, M. G., DELLE MONACHE, F., CALIXTO, J. B.. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Med.*, 61: 329-332 (1995b).
- SANTOS, A. R. S.; NEIRO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. AND CALIXTO, J. B.. Departamentos de Química e Farmacologia. Florianópolis: UFSC, 1997 (Resultados não publicados).
- SANTOS, A. R.; MORA, T. C.; CECHINEL-FILHO, V.; DAL MAGRO, J.; MEYRE-SILVA, C. Atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico e de compostos isolados da *Aleurites moluccana* (L.) (Willd.). *Alcance*, (2): 46-52 (1998).



- SEO, S. TOMITA, Y. and TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. *Tet. Lett.*, 1: 7-10 (1975).
- SHAMSUDDIN, T.; RAHMAN, W.; KHAN, A. S.; SHAMSUDDIN, K. M. AND KINTZINGER, J. P. . Moluccanin, a coumarinolignoid from *Aleurites moluccana*. *Phytochem.*, 27(6): 1908-1909 (1988).
- SHIRANE, S.; OHYA,S.; MATSUO, T.; HIROSE, R.; KOGA, D.; IDE, A. AND YAGISHITA, K. C-glycosyl compounds in the leaves of *Gemmingia chinensis* O. KUNTZE. *Agric. Biol. Chem.*, 46(10): 2595-2597 (1982).
- TAKAHASHI, C.; KIKUCHI, N.; KATOU, N.; MIKI, T.; YANAGIDA, F.; UMEDA, M.. Possible anti-tumor-promoting activity of components in japanese soybean fermented food Natto: effect on gap junctional intercellular communication. *Carcinogen.*, 16(3): 471-476 (1995).
- UGAZ, O. L. Investigación Fitoquímica. Fondo Editorial, Lima-Peru, 1994, p. 255-267.
- UPTON, R.; GRAFF, A.; WILLIAMSON, E.; BUNTING, D.; GATHERUM, D. M.; COTT, J.. St. Jojn's Wort: *Hypericum perforatum*, In: American herbal Pharmacopoeia T. M. and Therapeutic Compendium, Carnegie Mellon University, Pittsburh, USA, 1997, p. 3.
- VILLALOBOS, M. J. P. & CASTELLANOS, E. C. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. *Grasas y Aceites.*, 43(1): 39-44 (1992).
- VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S. AND PIETERS, L. A. *Planta Med.*, 64: 97-109 (1998).

- WILLIAN FILHO, A.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49: 823-827 (1997).
- WILLIAMS, C. A.; TOSCANO DE BRITO, A. L.; HARBORNE, J. B.; EAGLES, J. AND WATER MAN, P. G. Methylated C-glycosylflavones as taxonomic markers in orchids of the subtribe ornithocephalinae. *Phytochem.*, 37(4): 1045-1053 (1994).
- YUE-ZHONG, S. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, 61: 1053-1071 (1998).
- ZACCHINO, S.; SANTECCHIA, C.; LÓPEZ, S.; GATTUSO, S.; MUNÓZ, J. D.; CRUANES, A.; VIVOT, E.; CRUANES, M. C.; SALINAS, A.; RUIZ, R. E. AND RUIZ, S. *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from Argentina flora. *Phytomed.*, 5(5): 389-395 (1998).

## **8. ANEXOS**

Trabalhos publicados com a participação do autor  
em periódicos.

## A Triterpene and a Flavonoid C-Glycoside from *Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae)

Christiane MEYRE-SILVA<sup>1</sup>, Ticiana C. MORA<sup>1</sup>, Adair R. SOARES SANTOS<sup>1</sup>,  
Jacir DAL MAGRO<sup>2</sup>, Rosendo Augusto YUNES<sup>3</sup>,  
Franco DELLE MONACHE<sup>4</sup> & Valdir CECHINEL-FILHO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/FAQFAR, Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI, 88302-202, Itajaí-SC, Brazil. <sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC, Chapecó-SC, Brazil. <sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, 88040-900, Florianópolis-SC, Brazil.  
<sup>4</sup> Centro de Chimica dei Recettori, CNR, Università Cattolica S. Cuore, Largo F. Vito 1, 00168, Rome, Italy.

---

**SUMMARY.** This paper describes the isolation of two phytoconstituents from the leaves and barks of *Aleurites moluccana*, a medicinal plant widely employed in folk medicine for the treatment of several ailments. On the basis of spectroscopic evidence, these compounds were identified as swertisin (leaves), a flavonoid C-glycoside yet not described for the family Euphorbiaceae and acetyl aleuritolic acid (bark), a triterpene which was recently reported as an antimicrobial agent.

**RESUMEN.** "Un triterpeno y un flavonoide glicosídico de *Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae)". El presente trabajo describe el aislamiento de dos componentes de hojas y corteza de *Aleurites moluccana*, una planta medicinal ampliamente empleada en medicina popular para el tratamiento de varias dolencias. Sobre la bases de la evidencia espectroscópica existente, estos compuestos fueron identificados como swertisina (hojas), un flavonoide glicosídico aún no descrito para la familia Euphorbiaceae y el ácido acetyl-aleuritico (corteza), un triterpeno que ha sido recientemente citado como agente antimicrobiano.

---

### INTRODUCTION

*Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae), known as "Nogueira-da-India" or "Nogueira-de-Iguape" is a medicinal plant frequently employed in folk medicine for the treatment of tumours, ulcers, headache, fevers, diarrhea and gonorrhoea<sup>1</sup>, and also have been used as antiinflammatory<sup>2</sup>.

Previous phytochemical studies with this plant have revealed the presence of triterpenes<sup>3</sup> and a new coumarinolignoid, denominated moluccanin<sup>4</sup>, whereas biological investigations have shown antimicrobial<sup>5</sup> and antiviral<sup>6</sup> activities.

Preliminary pharmacological studies conducted by our laboratories have demonstrated that hydroalcoholic extract obtained from *A. moluccana* leaves exhibited potent analgesic effect in mice, which could be related with the presence of hydrocarbons, sterols and triterpenes<sup>7</sup>.

In the present report, we have extended our previous chemical findings and analysed other constituents present in the leaves and barks of *A. moluccana*.

**KEY WORDS:** Acetyl aleuritolic acid, *Aleurites moluccana*, Chromatography, Swertisin

**PALABRAS CLAVE:** Acido acetyl-aleuritico, *Aleurites moluccana*, Cromatografía, swertisina

\* Author to whom correspondence should be addressed.

## MATERIAL & METHODS

### *Plant material*

The plant was collected in Itajaí (State of Santa Catarina, Brazil), in January 1996 (leaves) and July 1996 (barks) and classified by Dr. Ademir Reis (HBR). A voucher specimen was deposited in Herbarium Barbosa Rodrigues (HBR), Itajaí (V.C. Filho, 001).

### *Isolation of constituents*

The air-dried leaves (600 g) and barks (570 g) were powdered and separately extracted with ethanol and methanol, respectively, at room temperature for approximately two weeks. After solvent removal, the extracts were concentrated (reduced pressure) and successively partitioned with hexane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt and butanol, respectively. However, we have initially examined the extracts obtained from leaves. Thus, hexane fraction furnished n-hentriacontane,  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, according previously described <sup>7</sup>. The AcOEt and butanol fractions exhibited a similar chromatographic profile (TLC) and were then combined. This material (3.38 g) was chromatographed on a silica gel column eluted with a  $\text{CHCl}_3$ :MeOH gradient. Elution with  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 5:5 yielded a yellow solid (80 mg), identified as a glycoside flavonoid, 6- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4H-1-benzopyran-4-one (swertisin) (**1**). The spectroscopic data, especially <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR, are identical to those reported in the literature <sup>8,9</sup>.

The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction (3.9 g) obtained from *A. moluccana* barks was chromatographed as in previous case, eluted with hexane:AcOEt gradient. After monitoring by TLC, the similar fractions were combined and rechromatographed using the same procedure to afford a white crystalline solid, identified as acetyl aleuritic acid (19 mg) (**2**), directly compared with authentic sample and spectral data (IR, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR), which were found to be identical to those previously described <sup>10</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

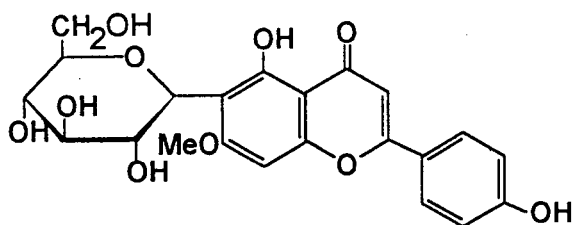
In order to isolate and identify other constituents responsible for the analgesic effects previously shown by some extracts and non polar compounds present in *A. moluccana*, we have now reinvestigated both ethyl acetate and dichloromethane fractions obtained from leaves and barks of this plant, respectively. Chromatographic procedures carried out with ethyl acetate fraction gave a yellow solid which gave positive reaction with  $\text{FeCl}_3$ -reagent. The spectral data, especially NMR-<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C were compatible with those of swertisin (**1**), a flavonoid glycoside, isolated by the first time from *Swertia japonica* <sup>8</sup>. Although such compound have been earlier isolated from other plants, it is an uncommon natural product, being here the first report of them from the family Euphorbiaceae.

On the other hand, swertisin was not detected in the barks of this plant. However, the preliminar analysis by using TLC in the conventional manner revealed the presence of some terpenes in this part of *A. moluccana*. One of them was isolated from the dichloromethane extract and identified as acetyl aleuritic

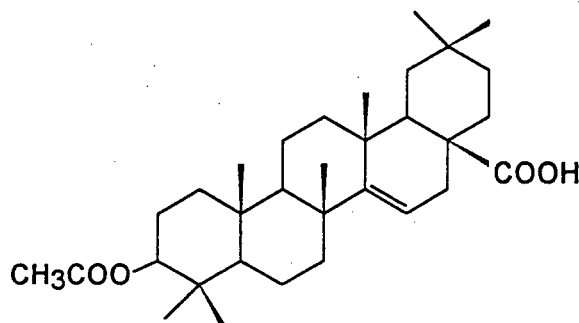
acid (2). The spectroscopic characteristics were in accordance with literature data <sup>10</sup> and Co-TLC with authentic sample confirmed such structure.

This compound have been earlier isolated by two of us (RAY and FDM) from *Croton urucurana*, which have shown antimicrobial effects against different pathogenic bacteria <sup>11</sup>.

Presently, the phytochemical and pharmacological studies are in progress in order to examine which compounds contributes for explain, in addition to compounds previously described, the potent analgesic effects demonstrated for the hydroalcoholic extract of *A. moluccana*.



(1)



(2)

**Acknowledgements.** The authors are grateful to Mrs. Carlos Picolli and Paulo José da Silva, for collection of the plant material. This work was supported by grants from CNPq and ProBIC/ProPPEX/UNIVALI, Brazil.

#### REFERENCES

1. Pio Correia, M. (1984) "Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas", IBDF, Brasília-DF, Vol. V, pp. 294-5
2. Duke, J.A. (1991) "Handbook of Medicinal Herbs", U.S.A.: CRC Press, 29
3. Hui, W.H. & C.T. Ho (1968) *Aust. J. Chem.* **21**: 1675-7
4. Shamsuddin, T., W. Rahman, S.A. Khan, K.M. Shamsuddin, J.B. Kintzinger (1988) *Phytochemistry* **27**: 1908-9
5. Locher, C.P., M.T. Burch, H.F. Mower, J. Berestecky, H. Davis, B. Van Poel, A. Lasure, D.A. Vanden Berghe, & A.J. Vlietinck (1995) *J. Ethnopharmacol.* **49**: 23-32
6. Locher, C.P., M. Witvrouw, M.P. Béthune, M.T. Burch, H.F. Mower, H. Davis, A. Lasure, R. Pauwels, E. Clercq, & A.J. Vlietinck (1996) *Phytomedicine* **2**: 259-64

7. Meyre-Silva, C., T.C. Mora, M.W. Biavatti, A.R.S. Santos, J. Dal Magro, R.A. Yunes & V. Cechinel Filho (1997) *Phytomedicine* (in press)
8. Komatsu, M., & T. Tomimori (1967) *Chem. Pharm. Bull.* **15**: 263-9
9. Agrawal, P.K., & M.C. Bansal (1989) *Carbon-13 NMR of Flavonoids* (Agrawal, P.K., Editor), Elsevier, New York, pp. 264-83
10. Mahato, S.B., A.K. Nandy, & G. Roy (1992) *Phytochemistry* **31**: 2199-249
11. Peres, M.T.L.P., F. Delle Monache, A. Bella Cruz, M.G. Pizzolatti, & R.A. Yunes (1997) *J. Ethnopharmacol.* **56**: 223-6



## Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L.] Willd.

C. Meyre-Silva<sup>1</sup>, T. C. Mora<sup>1</sup>, M. W. Biavatti<sup>1</sup>, A. R. S. Santos<sup>1</sup>, J. Dal-Magro<sup>2</sup>, R. A. Yunes<sup>3</sup> and V. Cechinel-Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/FAQFAR, Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI, Itajaí-SC, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC, Chapecó-SC, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis-SC, Brazil.

### Summary

In the present work we have investigated the analgesic activity of various extracts prepared from *Aleurites moluccana* leaves by using the writhing test in mice. The results showed that the hydroalcoholic extract and the hexane fraction exhibit potent antinociceptive action. We have also isolated and identified some chemical constituents from the hexane fraction. In addition, the nature of substances present in ethyl acetate and butanol fractions were evaluated by TLC. Such fractions revealed the presence of phenolic compounds. Chromatographic procedures carried out with hexane fraction revealed the presence of n-hentriacontane,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and campesterol, which were identified by spectroscopic data and HRGC or HRGC/MS techniques. The compounds considerably inhibited acetic acid-induced abdominal constrictions, being more efficacious than aspirin and paracetamol. In addition, preliminary HPLC analysis indicated, using a UV detector, one main constituent in alcoholic extract.

Keywords: *Aleurites moluccana*, analgesia, writhing test, hydrocarbon, phytosterols, triterpenes.

### Introduction

The family Euphorbiaceae comprises of several genus and numerous species, and a great number of papers have been published on their chemical constituents and pharmacological activities.

We have previously investigated some members of this family and have identified some important classes of active compounds including acetophenones, sterols, flavonoids and tannins (Calixto et al., 1990; Cechinel Filho et al., 1996; Miguel et al., 1996; Santos et al., 1995a; Niero et al., 1996).

In the present study, we have selected another Euphorbiaceae for investigation, *Aleurites moluccana*, a tree known as “Nogueira-da-Índia” or “Nogueira-do-Iguape”, widely-distributed in the south of Brazil. Its leaves and stem bark are frequently employed in folk medicine against a variety of ailments, including for

treatment of tumors, ulcers, headache, fevers, diarrhea, dysentery and gonorrhoea (Duke, 1991).

Previous reports have shown that this plant contains triterpenes (Hui and Ho, 1968) and a new coumarinolignoid, denoted moluccanin (Shansuddin et al., 1988). To our knowledge, no pharmacological investigation has so far been published on this plant. However, *Aleurites moluccana* was recently reported to have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Locher et al., 1995) and antiviral property (Locher et al., 1996).

In the present study we have analysed the analgesic effects of *Aleurites moluccana* leaves by using acetic acid-induced writhing in mice, as well as isolated and identified some active constituents.

## Materials and Methods

### Plant material

*A. moluccana* was collected in Itajaí, State of Santa Catarina, Brazil, in January 1996, and identified by Dr. Ademir Reis (HBR). A voucher specimen has been deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium, Itajaí (V.C. Filho, 001).

### Isolation and identification of active constituents

Dried leaves were cut in to small pieces and two different extracts, hydroalcoholic and ethanolic, were prepared for pharmacological and phytochemical analysis.

The hydroalcoholic extract was obtained by extraction with 50% ethanol-water, after maceration at room temperature for 10 days. The extract was then concentrated (reduced pressure) to desired volume and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The resulting extract was dissolved in 0.9% NaCl solution to desired concentration just before use.

Ethanolic extract was prepared as described above (600 g leaves). This extract was however concentrated and then successively partitioned with hexane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc and butanol, respectively. The hexane extract (16.0 g) was chromatographed on a silica gel column eluted with a hexane: EtOAc gradient. After monitoring by TLC, fractions were combined and re-chromatographed as described above, affording three solids, which were first denominated I (30 mg), II (80 mg) and III (710 mg).

Solids II and III gave positive reaction with sulphuric anisaldehyde and other reagents, and appeared one spot on TLC (system: hexane-EtOAc 7:3). Further analysis of spectral data (IR,  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR) and high resolution gas chromatography (HRGC) or HRGC/EM techniques by co-injection with authentic samples, allowed us to conclude that compound I is n-hentriacontane whereas II is a mixture of phytosterols containing  $\beta$ -sitosterol (78.39%), stigmasterol (16.35%), campesterol (3.77%) and an additional unidentified sterol (1.49%). Solid III was identified as a mixture of triterpenes,  $\alpha$ -amyrin (48.93%) and  $\beta$ -amyrin (51.07%). All spectroscopic data are identical to those reported in the literature (Seo et al., 1975; Chandler et al., 1982).

The constituents present in EtOAc and butanol fractions were analysed by TLC, according to the previously described methodology (Marini-Bettólo et al., 1981; Ugaz, 1994).

### HPLC-fingerprint analysis

The alcoholic extract of *A. moluccana* was analysed by HPLC-fingerprint, using a Beckman-166 apparatus. The extract was dissolved in methanol (10 mg/ml), filtered and analysed (injection volume of 10  $\mu\text{l}$ ) through a reversed phase, C-18 column with water-methanol 80:20 v/v at a flow rate of 1 ml/min using U.V. detector at 300 nm (Fig. 1).

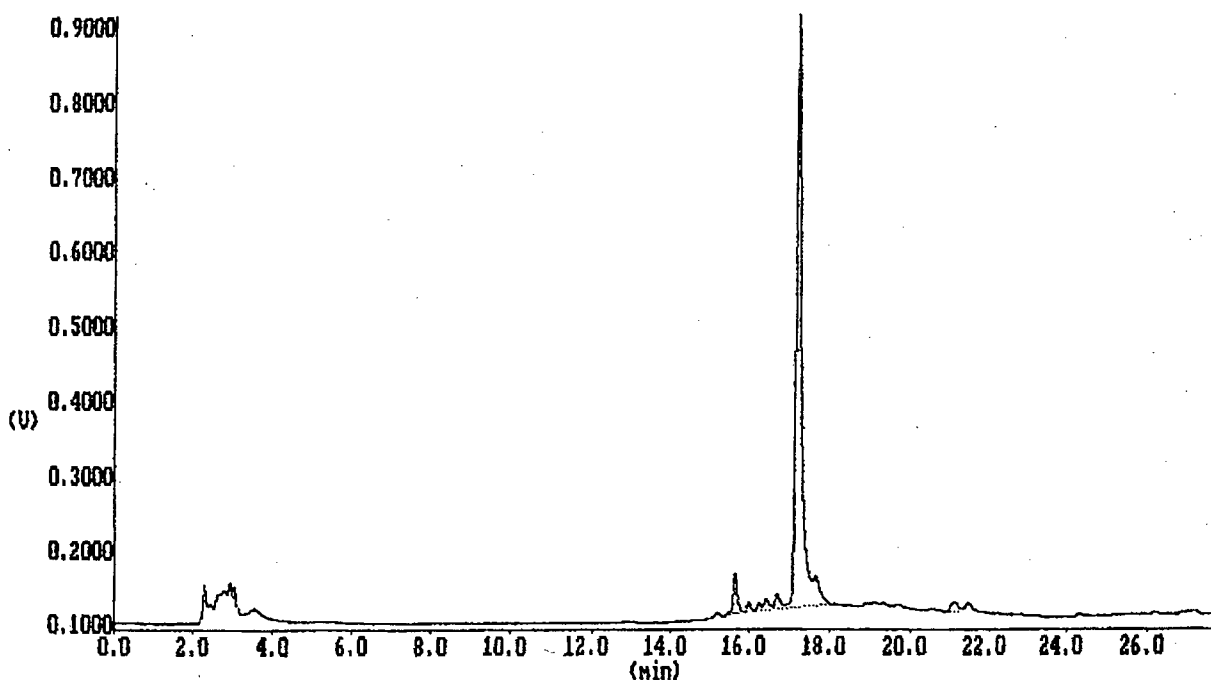


Fig. 1. HPLC profile of alcoholic extract of *A. moluccana* leaves. Chromatographic conditions: experimental part.

### Pharmacological analysis: Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of dilute acetic acid

Male Swiss mice, 25–30 g, were kept in a temperature controlled environment ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12-h light-dark cycle. Food and water were freely available. The abdominal constriction resulting from intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%), consisting of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of hind limbs, was carried out according to procedures described previously (Collier et al., 1968; Santos et al., 1994). Animals were pretreated with the extracts or compounds through intraperitoneal administration (1–30 mg/kg) 30 min prior to acetic acid injection. Control animals received a similar volume of 0.9% NaCl (10 ml/kg). All experiments were carried out at  $20\text{--}22^\circ\text{C}$ . After challenge, pairs of mice were placed in separate boxes and the number of abdominal constrictions was cumulatively counted over a period of 20 min.

### Statistical Analysis

The results are presented as mean  $\pm$  s.e.m., and the statistical significance between the groups was analysed by means of analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. *P* values less than 0.05 were considered as indicative of significance. When appropriate, the  $\text{ID}_{50}$  values (the dose of extract that reduced responses by 50% relative to control value) were estimated by graphical interpolation from individual experiments.

## Results and Discussion

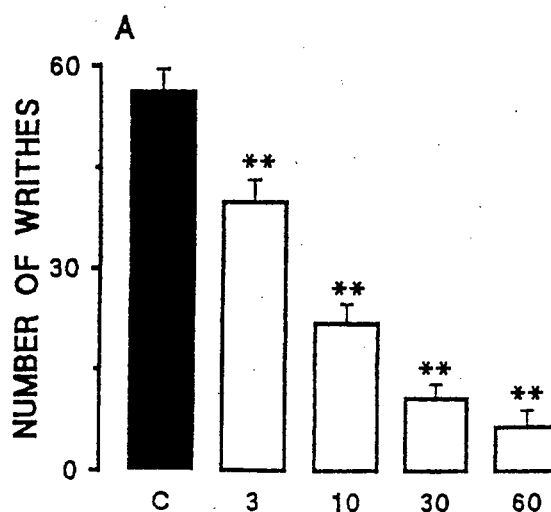
In order to investigate the analgesic activity of *A. moluccana*, a hydroalcoholic extract (HE) prepared from the leaves was investigated for inhibitory effect on acetic acid-induced abdominal constriction. As can be seen in Fig. 2, this extract, given intraperitoneally (3 to 60 mg/kg) exhibited potent and dose-dependent antinociceptive effect against acetic acid-induced writhing response in mice. The mean  $\text{ID}_{50}$  value was  $9.5$  ( $5.9\text{--}15.4$ ) mg/kg with a maximal inhibition of  $88 \pm 4\%$ . These promising results led us to investigate this plant in more detail, in order to isolate and identify the phytoconstituents responsible for the indicated pharmacological effects.

Thus, we have prepared another extract (ethanolic) of *A. moluccana* leaves, which was successively partitioned with solvents of increasing polarity, i.e. hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol. Since the hexane soluble fraction yielded approximately 15-fold more than all other extracts, and exhibited a significant

analgesic activity (results not shown), it was selected for phytochemical analysis.

The extract was chromatographed on a silica gel column eluted with increasing amount of EtOAc in hexane. After fractionation, three white solids were obtained and denominated as I, II and III. The purity of each was first verified TLC.

Spectral data (IR,  $^1\text{H-NMR}$ ) of compound I indicated only the presence of carbon and hydrogen atoms and the use of GC/MS confirmed to be a saturated hydrocarbon, n-hentriacontane (1), which is a well-known alkane present in several plants of the family Euphorbiaceae, particularly in species of *Euphorbia*, *Colliguaja* and *Argytmnia* (Gnecco et al., 1996). This compound was recently reported to be a potent anti-tumor agent (Takahashi et al., 1995).



### Hydroalcoholic extract of *A. moluccana* (mg/kg, i.p.)

Fig. 2. Effect of the hydroalcoholic extract obtained from *A. moluccana* leaves, against acetic acid-induced abdominal constrictions in mice. Each column represents mean  $\pm$  s.e.m. of eight to twelve experimental values. \*\* Significantly different from controls;  $P < 0.01$ .

Table 1. Effect of compounds isolated from *A. moluccana* leaves, aspirin and paracetamol, against acetic acid-induced abdominal constrictions in mice.

Compound	Inhibition (%)
n-hentriacontane	$94 \pm 6$
$\alpha$ and $\beta$ -amyrin	$84 \pm 3$
$\beta$ -sitosterol	$54 \pm 2$
stigmasterol	$42 \pm 1$
aspirin	$35 \pm 2$
paracetamol	$38 \pm 1$

Solids II and III showed positive reactions with sulphuric anisaldehyde and Liebermann-Burchard reagents, suggesting them to be sterols or terpenes (Marini-Bettólo et al., 1981; Ugaz, 1994). Further spectral analysis, especially  $^{13}\text{C}$ -NMR, indicated the presence of at least two compounds. The use of HRGC or HRGC/MS techniques revealed a mixture containing mainly  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and campesterol. Moreover, spectral data were identical to those reported previously (Aragão et al., 1990; Ikan, 1991). Although these phytoosterols are common constituents of higher plants, we have recently reported their analgesic properties in several models of pain in mice (Niero, 1993; Santos et al., 1995b). These compounds, in addition to tannins and flavonoids, are responsible for the analgesic effects of other members of Euphorbiaceae, particularly those belonging to the genus *Phyllanthus* (Santos et al., 1994, 1995a,b; Miguel et al., 1995, 1996; Cechinel Filho et al., 1996). Other studies have shown that such phytoosterols, besides antinociceptive actions, exert potent antiinflammatory action against carrageenan and cotton pellet induced oedema in rats, the effect being comparable to that of hydrocortisone and phenylbutazone (Handa et al., 1992).

On the other hand, spectral data (IR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR and EM) of solid III were compatible with those of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin (Seo et al., 1975; Chandler et al., 1982), two well-known antiinflammatory triterpenes (Loggia et al., 1994; Recio et al., 1995). The use of HRGC indicated similar amounts of both compounds.

In order to investigate if n-hentriacontane and triterpenes contribute to the analgesic activity, we have analysed them for inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions. The results shown in Table 1 suggest a  $\text{ID}_{50}$  lower than 10 mg/kg. Hentriacontane and the triterpenes inhibited the constrictions by  $94 \pm 6$  and  $84 \pm 3\%$ , respectively. In contrast, aspirin and paracetamol, two well-known nonsteroidal antiinflammatory drugs caused an inhibition of  $35 \pm 2\%$  and  $38 \pm 1\%$ , respectively (Cechinel Filho et al., 1995). These results, together with results previously reported (Niero, 1993; Santos et al., 1995a) strongly suggest that n-hentriacontane as well as phytoosterols and triterpenes may be responsible, at least in part, for the analgesic activity demonstrated by hydroalcoholic and hexane extracts of *A. moluccana* leaves.

It is interesting to mention that moluccanin (Shamsuddin et al., 1988) and the triterpenes moretenone and moretenol (Hui and Ho, 1968), substances previously isolated from *A. moluccana*, were not observed in our investigation. This suggests that environmental factors may be acting on the plant.

We have also examined the chromatographic profile of the ethyl acetate and butanol fractions of this plant by TLC, using specific reagents (Marini-Bettólo et al.,

1981; Ugaz, 1994). The results indicated the presence of phenolic compounds, particularly flavonoids, and the absence of alkaloids. Preliminary HPLC analysis showed one main peak, but it was not yet identified (Fig. 1).

Finally, our results showed that extracts obtained from *A. moluccana* leaves exhibit analgesic properties, which are mainly related with the presence of n-hentriacontane, phytoosterols and triterpenes in hexane fraction. Further studies are now in progress in order to isolate and identify other possible active principles present in the plant.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Franco Delle Monache for donation of authentic samples of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin, to Mrs. Carlos Picolli and Paulo José da Silva, for collection of the plant material and to Dr. Angelo A. Ruzza, for HPLC analysis. The authors are also indebted to Dr. Ademir Reis for botanical classification of *A. moluccana* and to Ms. Joanésia M. J. Rotnstein (Central Biotério, UFSC) providing the animals. This work was supported by grants from CNPq and ProB-IC/PROPPEX/UNIVALI, Brazil.

#### References

- Aragão, P. C. A., Toledo, J. B., Morais, A. A., Braz-Filho, R.: Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Quim. Nova*, 13 (4): 254 – 259 (1990).
- Calixto, J. B., Miguel, O. G., Yunes, R. A., Rae, G. A.: Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxy acetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. *Planta Med.*, 56: 31– 35 (1990).
- Cechinel Filho, V., Breviglieri, E., Willain Filho, A., Santos, A. R. S.: Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. *Rev. Bras. Farm.*, 76 (4): 115 – 117 (1995).
- Cechinel Filho, V., Santos, A. R. S., Campos, R. O. P., Miguel, O. G., Yunes, R. A., Ferrari, F., Messana, I., Calixto, J. B.: Chemical and Pharmacological Studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48: 1231– 1236 (1996).
- Collier, H. O. J., Dinnen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C.: The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 32: 295 – 310 (1968).
- Chandler, R. F., Hooper, S. N., Hooper, D. L., Jamieson, W. D., Lewis, E.: Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Tanacetum vulgare* L. (*Tansy*). *Lipids*, 17 (2): 102 – 106 (1982).
- Duke, J. A.: *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, USA, 29 (1991).
- Gnecco, S., Pérez, C., Bittner, M., Becerra, J., Silva, M.: Distribución de n-alcanos en especies chilenas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 41: 229 – 233 (1996).

- Handa, S. S., Chawla, A. S., Sharma, A. K.: Plants with anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, 63 (1): 3 – 31 (1992).
- Hui, W. H., Ho, C. T.: An examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. I. The occurrence of triterpenoids. *Aust. J. Chem.*, 21: 1675 – 1677 (1968).
- Ikan, R.: *Natural Products: a Laboratory Guide*. 2nd ed., Academic Press, USA, 138 – 139 (1991).
- Locher, C. P., Witvrouw, M., Béthune, M. P., Burch, M. T., Mower, H. F., Davis, H., Lasure, A., Pauwels, R., Clercq, E., Vlietinck, A. J.: Antiviral Activity of Hawaiian Medicinal plants against Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1). *Phytomedicine*, 2 (3): 259 – 264 (1996).
- Locher, C. P., Burch, M. T., Mower, H. F., Berestecky, J., Davis, H., Van-Poel, B., Lasure, A., Vanden-Berghe, D. A., Vlietinck, A. J.: Anti-microbial activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 49 (1): 23 – 32 (1995).
- Loggia, R. D., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saor, S., Isaac, O.: The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, 60: 516 – 520 (1994).
- Marini-Bettólo, G. B., Nicoletti, M., Patamia, M., Galeffi, C., Messana, I.: Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *J. Chromatogr.*, 213: 113 – 127 (1981).
- Miguel, O. G., Cechinel Filho, V., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. S., Calixto, J. B., Ferrari, F., Messana, I., Yunes, R. A.: A triterpene and phenolic compounds from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.*, 61: 391 (1995).
- Miguel, O. G., Calixto, J. B., Santos, A. R. S., Messana, I., Ferrari, F., Cechinel Filho, V., Pizzolatti, M. G., Yunes, R. A.: Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.*, 62: 146 – 149 (1996).
- Niero, R.: Isolamento e identificação de compostos do *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae), MSc. Thesis, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil, p. 84 (1993).
- Niero, R., Amaral, F. L., Pizzolatti, M. G., Calixto, J. B., Cechinel Filho, V., Delle Monache, F., Yunes, R. A.: Isolation of triterpenes and an acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* (Euphorbiaceae). *Acta Farm. Bon.*, 15 (4): 239 – 242 (1996).
- Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S., Rios, J. L.: Structural requirements for the antiinflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.*, 61: 182 – 185 (1995).
- Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V., Niero, R., Viana, A. M., Moreno, F. N., Campos, M. M., Yunes, R. A., Calixto, J. B.: Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46: 755 – 759 (1994).
- Santos, A. R. S., Niero, R., Cechinel Filho, V., Yunes, R. A., Pizzolatti, M. G., Delle Monache, F., Calixto, J. B.: Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Med.*, 61: 329 – 332 (1995a).
- Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V., Yunes, R. A., Calixto, J. B.: Further studies on the antinociceptive action of the hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 47: 66 – 71 (1995b).
- Shamsuddin, T., Rahman, W., Khan, S. A., Shamsuddin, K. M., Kintzinger, J. B.: Moluccanin, a coumarinolignoid from *Aleurites moluccana*. *Phytochemistry*, 27 (6): 1908 – 1909 (1988).
- Seo, S., Tomita, Y., Tori, K.: Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. *Tet. Lett.*, 1: 7 – 10 (1975).
- Takahashi, C., Kikuchi, N., Katou, N., Miki, T., Yanagida, F., Umeda, M.: Possible anti-tumor-promoting activity of components in Japanese soybean fermented food, Natto: effect on gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis*, 16 (3): 471 – 476 (1995).
- Ugaz, O. L.: *Investigación Fitoquímica*, 2nd ed., Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Perú, 255 – 267 (1994).

#### □ Address

Valdir Cechinel Filho, Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/FAQFAR/UNIVALI, Rua Uruguai, 458; Cx.P. 360; CEP 88302-202, Itajaí, SC-BRAZIL.  
Fax: 00 55 473 41 7601/7600.

# INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ANÁLISE FARMACOLÓGICA DAS FOLHAS E CASCAS DE *Aleurites moluccana* L. (WILLD.)

<sup>1</sup>Valdir CECHINEL FILHO  
<sup>2</sup>Christiane Meyre da SILVA  
<sup>3</sup>Adair Roberto Soares dos SANTOS  
<sup>4</sup>Jacir Dal MAGRO  
<sup>5</sup>Franco Delle MONACHE  
<sup>6</sup>Rosendo A. YUNES  
<sup>7</sup>Ticiano Camina MORA

<sup>1</sup>Professor do Curso de Farmácia da Univali (Orientador)  
<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia da Univali (Bolsista)  
<sup>3</sup>Professor do Curso de Farmácia da Univali (Colaborador)  
<sup>4</sup>Professor do Curso de Ciências Biológicas da Unoesc (Colaborador)  
<sup>5</sup>Professor do Instituto di Chimica da Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Itália (Colaborador)  
<sup>6</sup>Professor do Departamento de Química da UFSC (Colaborador)  
<sup>7</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia da Univali (Colaboradora)

## Resumo

*Aleurites moluccana* L. Willd, conhecida como “Nogueira-da-Índia” ou “Nogueira-de-Iguape”, é uma planta frequentemente utilizada na medicina popular para o tratamento de tumores, úlceras, dor de cabeça, febre, diarreia e também tem sido utilizada como antiinflamatória. O uso de procedimentos cromatográficos e técnicas espectroscópicas permitiu o isolamento e a identificação de *n*-hentriacontano,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol,  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina, ácido acetil aleuritólico e swertisina, um flavonóide glicosilado. Os quatro primeiro compostos (10 mg/kg; i.p.) inibiram significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos, com inibições de 94, 54, 42, 84%, respectivamente, em relação ao grupo controle, enquanto a swertisina foi inativa neste modelo. Os resultados indicam que os compostos apolares da planta parecem ser os responsáveis, pelo menos em parte, pelos consideráveis efeitos analgésicos apresentados pela *A. moluccana*.

**Palavras-chave:** *Aleurites moluccana*; *n*-hentriacontano;  $\beta$ -sitosterol; estigmasterol;  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina; ácido acetil aleuritólico; swertisina.

## Abstract

*Aleurites moluccana* L. Willd., known as “Nogueira-da-Índia” or “Nogueira-de-Iguape”, is a medicinal plant frequently employed in folk medicine for the treatment of tumors, ulcers, headache, fevers, and diarrhea and it is also used as anti-inflammatory. The use of chromatographic procedures and spectroscopic techniques permitted the isolation and identification of the *n*-hentriacontane,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin, acetyl aleuritolic acid and swertisin, a glycoside flavonoid. The first four compounds (10 mg/kg), considerably inhibited the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, with inhibition of 94, 54, 42, 84%, respectively, in relation to the control animals, while swertisin was inactive in this model. The results indicate that the non polar compounds of this plant seem to be responsible, at least partially, for the considerable analgesic effects shown by *A. moluccana*.

**Key Words:** *Aleurites moluccana*; *n*-hentriacontane;  $\beta$ -sitosterol; stigmasterol;  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin; acetyl aleuritolic acid; swertisin.

## INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae compreende um grande número de gêneros, (~300) e numerosas espécies (~8000) (Corrêa, 1984; Villalobos & Castellanos, 1992). Incluem espécies

predominantemente tropicais; também amplamente distribuídas em zonas temperadas (Villalobos & Castellanos, 1992).

A *Aleurites moluccana* é uma planta medicinal presente em várias regiões do Brasil, utilizada na medicina popular para o tratamento

de diversas afecções, como febre, inflamações, úlceras e também utilizada como estimulante laxativo e sudorífero (Corrêa, 1984; Duke, 1991).

Estudos fitoquímicos anteriores demonstraram o isolamento e a identificação de vários metabólitos secundários, como os triterpenos moretenone, moretenol,  $\alpha$ -amirina (folhas) e o esteróide  $\beta$ -sitosterol (folhas e caule) (Hui & Ho, 1968). Um novo cumarinolignóide foi isolado das cascas e denominado moluccanin (Shamsuddin *et al.*, 1988) e da noz obteve-se um óleo, chamado kukui, que exibiu um alto perfil tóxico contendo uma elevada concentração de linoleico e ácido linoleico, e tem sido utilizado como produto para formulações cosméticas destinadas a indivíduos propensos a acnes (Klein, 1991).

Estudos recentes indicaram que vários extratos de *A. moluccana* apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Locher *et al.*, 1995).

No presente estudo, foi realizada uma análise fitoquímica e a identificação de compostos, através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e técnicas espectroscópicas (IV, CG-EM, RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) das folhas e cascas de *A. moluccana*, bem como avaliação farmacológica do extrato das folhas e dos compostos isolados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material Vegetal

A planta em estudo foi identificada pelo Prof. Dr. Ademir Reis, cuja excisata encontra-se depositada no Herbarium Barbosa Rodrigues (HBR), na cidade de Itajaí, registrada pelo código V.C.Filho 001. As folhas e cascas foram coletadas no município de Itajaí - SC e devidamente tratadas para a realização do presente estudo.

### Análise Fitoquímica

As folhas (600 g) e cascas (570 g) de *A. moluccana* foram trituradas e submetidas à extração com etanol e metanol, respectivamente, à temperatura ambiente por aproximadamente duas semanas. Após remoção do solvente, o

extrato foi concentrado sob pressão reduzida e sucessivamente particionado com hexano, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etila (AcOEt) e butanol, respectivamente. Inicialmente, partiu-se para investigação do extrato obtido das folhas. Assim, a fração de hexano, após procedimentos cromatográficos, possibilitou o isolamento e a identificação de *n*-hentriacontano,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. As frações de AcOEt e butanol exibiram um perfil cromatográfico similar, sendo, então, combinadas para separação cromatográfica. Este material (3,38 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel, eluída com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  com aumento gradativo de polaridade, onde se isolou um sólido amarelo (80 mg), identificado como um flavonóide glicosilado denominado swertisina (1) a partir de dados espectroscópicos, especialmente RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A fração de diclorometano (3,9 g), obtida das cascas de *A. moluccana*, foi cromatografada como no caso anterior, eluída com Hexano:AcOEt, com acréscimo gradativo de polaridade. Após monitoramento por CCD, as frações similares foram reunidas e recromatografadas usando o mesmo procedimento, obtendo-se um sólido cristalino branco, identificado como ácido acetil aleuritólico (19 mg) (2), após comparação direta com uma amostra autêntica (IV, RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).

### Avaliação da Atividade Analgésica

#### *Modelo das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético 0,6% em Camundongos*

Foram utilizados camundongos do tipo "Swiss" machos ou fêmeas (25-35 g). Os camundongos foram mantidos sob temperatura e iluminação controlada, com ração e água *ad libitum*. A resposta nociceptiva foi induzida, utilizando-se "writhing test" com ácido acético (0,6%, via intraperitoneal), que promove contorções abdominais seguido de extensão de uma das patas posteriores (Collier *et al.*, 1968; Santos *et al.*, 1995).

Os animais foram pré-tratados com diferentes extratos ou compostos (3-60 mg/kg), 30 min. antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de NaCl

(0,9%) (10 ml/Kg). Todos os experimentos foram realizados a 20-22°C. As contorções abdominais foram quantificadas durante 20 minutos. A atividade analgésica foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais em relação ao grupo controle.

## RESULTADOS

Para investigação da atividade da *A. moluccana*, inicialmente foi preparado o extrato hidroalcolóico (EH) das folhas, utilizando-se os métodos convencionais. Como pode ser observado na Gráfico 1, tal extrato, quando administrado intraperitonealmente (3-60 mg/Kg) causou significativa inibição de forma dose-dependente da nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. A  $DI_{50}$  calculada foi 9,5 (5,9-15,4) mg/kg com inibição máxima de  $88 \pm 4\%$ . Esses promissores resultados estimularam a realização de uma investigação mais detalhada desta planta, visando ao isolamento e à identificação dos fitoconstituintes responsáveis pelos efeitos farmacológicos indicados (Meyre-Silva *et al.*; 1996a, b, 1997a).

Assim, foi obtido o extrato etanólico das folhas de *A. moluccana*, o qual foi sucessivamente particionado com solventes de polaridade crescente, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, respectivamente. Considerando que a fração solúvel em hexano foi obtida com alto grau de rendimento, aproximadamente quinze vezes maior que todas as outras frações, bem como exibiu uma atividade analgésica significativa (resultados não apresentados), o mesmo foi inicialmente selecionado para análise fitoquímica.

Tal fração foi cromatografada em coluna de sílica gel (Merck), eluída com hexano: AcOEt, com aumento gradativo de AcOEt. Após os procedimentos usuais (ver parte experimental), três sólidos brancos foram obtidos e denominados inicialmente como I, II e III, cuja pureza foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) (Collins & Braga, 1988).

Dados espectroscópicos (IV,  $^1H$ -RMN) do composto I indicaram somente a presença de ligações de hidrocarboneto (C-H), e o uso de CG/EM confirmou um hidrocarboneto saturado, *n*-hentriacontano (I), o qual é um alceno bastante

conhecido, estando presente em diversas plantas da família Euphorbiaceae, particularmente nas espécies de *Euphorbia*, *Colliguaja* e *Argytmnia* (Gnecco *et al.*, 1996). Este composto foi recentemente reportado como um importante agente antitumoral (Takahashi *et al.*, 1995).

Os sólidos II e III apresentaram reação positiva para os reagentes Anisaldeído sulfúrico e com o Liebermann-Burchard, sugerindo serem esteróis ou terpenos (Marini-Bettólo *et al.*, 1981; Ugaz, 1994). Análises espectrais adicionais, especialmente  $^{13}C$ -RMN, indicaram que o sólido II apresentava pelo menos dois compostos diferentes. Através de técnicas de CGAR ou CGAR/EM pôde-se constatar que a mistura continha principalmente  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Além disso, os sinais dos dados espectrais foram idênticos àqueles relatados anteriormente (Niero, 1993; Santos *et al.*, 1995). Embora estes fitoesteróis sejam substâncias comumente presentes em várias plantas (Niero, 1993; Hooper & Chandler, 1984), foi recentemente demonstrado, pela primeira vez, suas propriedades analgésicas em vários modelos de dor em camundongos (Niero, 1993; Santos *et al.*, 1995). Além disso, o  $\beta$ -sitosterol vem adquirindo grande importância na produção de fármacos esteroidais, como hormônios (Kovganko & Kashkan, 1994). Estes compostos, bem como taninos e flavonóides, parecem ser os responsáveis pelo efeito analgésico de outras plantas da família Euphorbiaceae, particularmente aquelas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* (Santos *et al.*; 1994, 1995; Miguel *et al.*, 1995, 1996; Cechinel-Filho *et al.*, 1996). Outros estudos têm demonstrado que tais fitoesteróis, além da ação antinociceptiva, exercem potente ação antiedematogênica em ratos, sendo seu efeito comparável com a hidrocortisona (corticóide) e fenilbutazona (antiinflamatório não esteroide) (Handa, Chawla and Sharma, 1992; Recio *et al.*, 1995).

Os dados espectroscópicos (IV, RMN- $^1H$ ,  $^{13}C$ ) do sólido III, foram compatíveis com aqueles de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, dois triterpenos bastante conhecidos que exercem ação antiinflamatória (Gupta *et al.*, 1971; Loggia *et al.*, 1994; Recio *et al.*, 1995), cujos dados espectrais estão de acordo com os da literatura (Seo, Tomita



& Tori, 1975; Chandler *et al.*, 1982). O uso de CGAR indicou quantidade similar de ambos compostos.

No intuito de investigar se o *n*-hentriacontano, a mistura de triterpenos e swertisina contribuem para a atividade analgésica encontrada para os extratos de *A. moluccana*, estes foram avaliados através do teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram as  $DI_{50}$  para estes compostos, exceto para swertisina, que foi inativo, foram inferiores a 10 mg/Kg. As inibições máximas das contorções abdominais observadas foram  $94 \pm 6$  e  $84 \pm 3\%$  para o *n*-hentriacontano e a mistura dos triterpenos,  $\alpha, \beta$ -amirina, respectivamente. Por outro lado, a aspirina e o paracetamol (drogas antiinflamatórias não-esteroidais usadas para efeito de comparação), administradas intraperitonealmente na mesma dose, causaram inibição de  $35 \pm 2$  e  $38 \pm 1\%$ , respectivamente (Cechinel-Filho *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem que o *n*-hentriacontano e os triterpenos foram mais eficazes que as drogas antiinflamatórias utilizadas, justificando, ao menos em parte, que esses compostos podem estar contribuindo para a importante atividade analgésica apresentada pelos extratos hidroalcoólico e hexânico obtidos das folhas de *A. moluccana*.

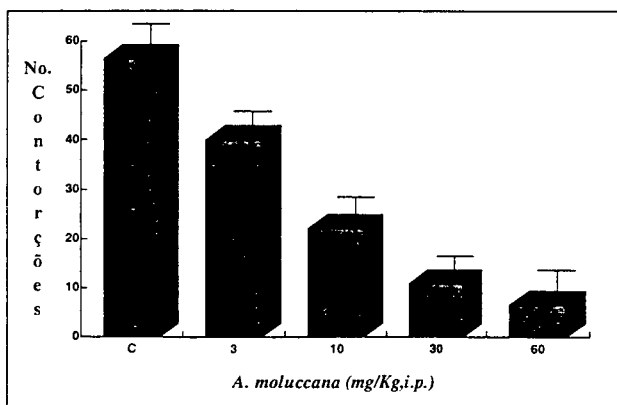


Gráfico 1. Efeitos do extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *A. moluccana* administrado intraperitonealmente sobre as contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético em camundongos. As colunas representam os valores da média  $\pm$ E.P.M. de 6-8 animais.

Tabela 1. Efeitos dos compostos isolados das folhas de *A. moluccana*, aspirina e paracetamol administrados intraperitonealmente na dose de 10 mg/kg sob as contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético em camundongos.

Compostos	Inibição
<i>n</i> -hentriacontano	$94 \pm 6$
$\alpha$ e $\beta$ -amirina	$84 \pm 3$
* $\beta$ -sitosterol	$54 \pm 2$
*estigmasterol	$42 \pm 1$
swertisina	I
aspirina	$35 \pm 2$
paracetamol	$38 \pm 1$

I = Inativo (não inibiu as contorções abdominais)

\* (NIERO, 1993; SANTOS *et al.*, 1995)

Os extratos das folhas de *A. moluccana*, particionados com AcOEt e butanol, foram submetidos à cromatografia em camada delgada e como apresentaram similar perfil cromatográfico (CCD), foram reunidos. Usando reagentes específicos visando caracterizar as classes de compostos orgânicos presentes nestas frações, foram utilizados alguns reativos específicos para detecção em CCD (Marini-Bettólo *et al.*, 1981; Ugaz, 1994), em que se evidenciaram a ausência de alcalóides e a presença de compostos fenólicos, particularmente flavonóides. Posteriormente, os extratos de AcOEt/BuOH foram submetidos à cromatografia em coluna, sendo isoladas duas substâncias fenólicas. Uma delas foi identificada como um flavonóide glicosilado, denominado swertisina (Figura 1). O outro composto possui um  $R_f$  menor do que o swertisina, e acredita-se que seja também um flavonóide glicosilado, devido a algumas características físico-químicas similares.

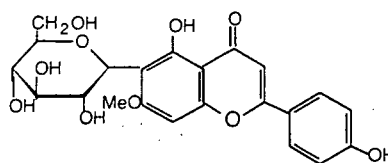


Figura 1. Estrutura molecular da Swertisina isolada de *A. moluccana*.

Embora a swertisina tenha sido encontrada em outras plantas, é um produto natural raro, não tendo sido anteriormente descrito para as plantas

pertencentes à família Euphorbiaceae. Como pode ser visto na Tabela 1, este composto não causou inibição das contorções induzidas pelo ácido acético, sendo totalmente inativo no modelo de dor avaliado.

Com relação aos compostos mencionados anteriormente, moluccanin (Shamsuddin *et al.*, 1988) e os triterpenos, moretenone e moretenol (Hui & Ho, 1968), os quais foram isolados previamente da *A. moluccana*, na presente investigação não foram observados. Esse fato sugere que fatores ambientais podem estar influenciando na biossíntese dessas substâncias nesta planta.

A partir do extrato metanólico das cascas de *A. moluccana*, particionado com solventes de polaridade crescente, obtiveram-se diferentes frações, entre as quais, a fração de diclorometano, que foi submetida à análise por CCD, apresentando evidências sobre a presença de compostos de natureza terpênica diferente dos encontrados nas folhas desta planta. Após o uso de procedimentos cromatográficos (CCD, CC), isolou-se um sólido cristalino branco, identificado como ácido acetil aleuritólico (Figura 2) (Meyre-Silva *et al.*, 1998), o qual foi anteriormente relatado

para a *A. montana* (Misra & Khastgir, 1970). Tal composto também foi isolado anteriormente da planta *Croton urucurana*, o qual foi demonstrado apresentar importante efeito antimicrobiano contra diferentes bactérias patogênicas (Peres *et al.*, 1997), além de importante ação analgésica (Santos *et al.*, 1997).

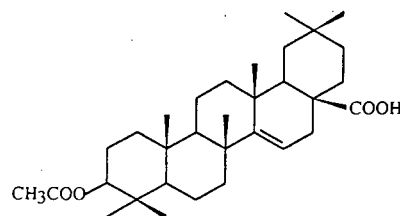


Figura 2. Estrutura molecular da ácido acetil aleuritólico isolado de *A. moluccana*.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a *A. moluccana* apresenta constituintes químicos com relevante ação analgésica, justificando seu uso na medicina popular contra processos dolorosos em geral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CECHINEL-FILHO, V. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. *Res. Bras. Farm.*, v. 76, n. 4, p. 115-117, 1995.
- CECHINEL-FILHO, V. *et al.* Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus carolinensis* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, [s.l.], v. 48, p. 1231-1236, 1996.
- CHANDLER, R. F. *et al.* Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). *Lipids*, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 102-106, 1982.
- COLLIER, H. D. J. *et al.* The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, Britan, v. 32, p. 193-198, 1968.
- CORRÊA, P. M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, 1984, p. 294-295.
- COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. *Introdução à métodos cromatográficos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988, p. 72-85.
- DUKE, James A. *Handbook of medicinal herbs*. U.S.A.: CRC Press, 1991, p. 29.
- GNECCO, S. *et al.* Distribucion de n-alcenos en especies chilenas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, Santiago, n. 41, p. 229-233, Jun. 1996.
- GUPTA, M. B. *et al.* Biochemical study of the anti-inflammatory activity of a and b-amyrin acetate. *Pharmacology*, [s.l.], v. 20, p. 401-405, jul. 1971.
- HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S. & SHARMA, A. K. Plants with antiinflammatory activity. *Fitoterapia*, Milano, v. 63, n. 1, p. 3-31, 1992.
- HOOPER, S. N. & CHANDLER, R. F. Herbal Remedies of the maritime indians: Phytosterols and triterpenes of 67 plants. *J. of Ethnopharmacol.*, [s.l.], v. 10, p. 181-194, Oct. 1984.
- HUI, W. H. & HOI, C. T. An examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. *Aust. J. Chem.*, Austrália, v.21, p. 1675-7, jan. 1968.
- KLEIN, K. Kukui and macadamia nut oils. *Cosmetics & Toiletries*, [s.l.], v. 106, p. 87-90, nov. 1991.
- KOVGANKO, N. V. & KASHKAN, Zh. N. Advances in the chemical transformation of b-sitosterol. *Chemistry of Natural Compounds*, New York, v. 30, n. 5, p. 533-546, Oct. 1994.
- LOCHER, C. P. *et al.* Anti-microbial activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, [s.l.], v. 49, p. 23-32, 1995.
- LOGGIA, R. D. *et al.* The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 60, p. 516-520, Mar. 1994.
- MARINI-BETTÓLO, G. B. *et al.* Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *J. Chromatogr.*, v. 213, p. 113-127, 1981.
- MEYRE-SILVA, C. M. *et al.* Análise fitoquímica e atividade analgésica de *Aleurites moluccana*. In: XIV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Florianópolis, 1996.

- MEYRE-SILVA, C. M. et al. Isolamento de substâncias com efeito analgésico a partir das folhas de *Aleurites moluccana*. In: II SEMINÁRIO INTEGRADO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1996 b. Chapecó, p. 102.
- MEYRE-SILVA, C. M. et al. A triterpene and a flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana*. *Acta. Farm. Bon.*, Buenos Aires, v. 16, n. 3, p. 169-172, 1997a.
- MEYRE-SILVA, C. M. et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves. *Phyromedicine*, Stuttgart, v. 5, n. 2, p. 109-113, 1998.
- MIGUEL, O. G. et al. A triterpene and phenolic compounds from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 61, p. 391, 1995.
- MIGUEL, O. G. et al. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 62, p. 146-149, 1996.
- MISRA, D. R. & KHASTGIR, H. N. Chemical investigation of *Aleurites moluccana* and the structure of Aleuritolic acid - a new triterpene acid. *Tetrahedron*, [s.l.], v. 26, n. 12, p. 3017-3021, Jun. 1970.
- NIERO, R. *Isolamento e identificação de compostos do Phyllanthus corcovadensis (Euphorbiaceae) com efeito analgésico: correlação estrutura-atividade*. Florianópolis, 1993. (Dissertação de Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- PERES, M. T. L. P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. of Ethnopharmacol.*, 1997, (in press).
- RECIO, M. C. et al. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.*, n. 61, p. 182-185, 1995.
- SANTOS, A. R. S. et al. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 46, p. 755-759, 1994.
- SANTOS, A. R. S. et al. Antinociceptive properties of steroids from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 61, p. 329-332, 1995.
- SANTOS, A. R. S. et al. *Departamentos de Química e Farmacologia*. Florianópolis: UFSC, 1997 (Resultados não publicados).
- SEO, S. TOMITA, Y. & TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. *Tet. Lett.*, [s.l.], v. 1, p. 7-10, 1975.
- SHAMSUDDIN, W. et al. Moluccanin, a coumarinonignoid from *Aleurites moluccana*. *Phytochemistry*, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 1908-1909, out. 1988.
- TAKAHASHI, C. et al. Possible anti-tumor-promoting activity of components in japanese soybean fermented food Natto: effect on gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis*, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 471-476, 1995.
- UGAZ, O. L. *Investigación fitoquímica*. Lima: Fondo Editorial, 1994. p. 255-267.
- VILLALOBOS, M. J. P. & CASTELLANOS, E. C. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnouímica. *Grasas y Aceites*, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 39-44, 1992.

## Isolation of a C-Glycoside Flavonoid with Antinociceptive Action from *Aleurites moluccana* Leaves

Christiane Meyre-Silva<sup>1</sup>, Rosendo A. Yunes<sup>1</sup>,  
Adair R. S. Santos<sup>2</sup>, Jacir Dal Magro<sup>3</sup>,  
Franco Delle-Monache<sup>4</sup>, and Valdir Cechinel-Filho<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/Curso de Farmácia-CCS, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Chapecó, Brazil

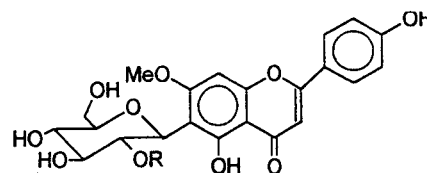
<sup>4</sup> Centro Chimica dei Recettori, Rome, Italy

Received: September 1, 1998; Revision accepted: November 8, 1998

*Aleurites moluccana* L. (Willd.) (Euphorbiaceae), known as "Nogueira-da-Índia" in Brazil, is frequently used in folk medicine to treat fevers, headache, tumours, diarrhoea and asthma (1–3). We have previously shown that the hydro-alcoholic extract obtained from the leaves of this plant exhibit antinociceptive properties which could be related to the presence of triterpenes, steroids and flavonoids (4, 5). In the present study, we have extended our investigations in order to determine other active flavonoids present in the *A. moluccana* leaves. The plant material was collected in Itajaí, state of Santa Catarina, Brazil, in October 1997 and classified by Dr. Ademir Reis (BRH). A voucher specimen was deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium (BRH), Itajaí-SC, Brazil under number VC Filho 001.

The air-dried leaves (750 g) of *A. moluccana* were extracted with EtOH/MeOH (2 : 1) for 10 days. The resulting extract was then partitioned with dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA) and butanol (BuOH), respectively. The EA and BuOH fractions were combined (3.4 g) because they exhibited a similar chromatographic profile (TLC); they were chromatographed on a column of silica gel (75 g) using the following eluents: CHCl<sub>3</sub> (100 ml), CHCl<sub>3</sub> : MeOH (9 : 1) (200 ml), CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8 : 2) (300 ml), CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5 : 5) (200 ml), MeOH (100 ml). Elution with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5 : 5) yielded a phenolic compound, swertisin (**1**) (80 mg) (5), whose spectroscopic data are identical to those reported in the literature (6, 7). Elution with MeOH allowed to the isolation of another phenolic compound and through the final purification using Sephadex LH-20 column eluted with MeOH/H<sub>2</sub>O (70 : 30) (100 ml), the flavonoid **2** was obtained (90 mg). It is designated 2''-O-rhamnosylswertisin and its structure was confirmed by spectroscopic data (<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR, IR, FAB/MS) and comparison with the data described in the literature (8).

The antinociceptive effect of both **1** and **2** was evaluated by the writhing test in mice (9). The results shown in Figure 1 indicated that **2** inhibits dose-dependently the abdominal constrictions caused by acetic acid, with a calculated ID<sub>50</sub>



1: R = H  
2: R = Rhamnosyl

value of 8.4 (6.9–10.2 μmol/kg) and maximal inhibition of 92% ± 4. When compared with aspirin, which was previously analysed in our laboratory (ID<sub>50</sub> = 133 μmol/kg) (9), **2** was about 16 fold-more potent. On the other hand, **1** did not show any effect in the same experimental procedure, suggesting that the rhamnosyl group is important for the antinociceptive activity. Our results demonstrate that besides compounds previously described (4, 5), **2** also strongly contributes to explain the antinociceptive action of *A. moluccana*.

Information in detail about the work procedure and copies of the original spectra can be obtained from the author of correspondence.

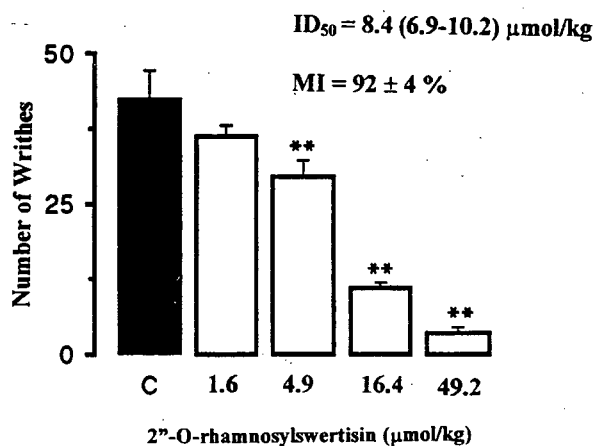


Fig. 1 Antinociceptive effect for 2''-O-rhamnosylswertisin (**2**) given intraperitoneally, against acetic acid-induced abdominal constrictions in mice. Each group represents the mean of 6 to 8 experiments and the vertical bars indicate the s.e.m. \*\* P < 0.01 compared with corresponding control value.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Mrs. Carlos Picolli and Paulo José da Silva, for collection of the plant material. This work was supported by grants from CNPq and ProPPEX/UNIVALI.

### References

- Pio Correia, M. (1984) Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, IBDF, Brasília, Brazil, p. 294–295.
- Duke, J. A. (1991) Handbook of Medicinal Herbs, U.S.A.: CRC Press, p. 29.
- Hope, B. E., Massey, D. G., Fournier-Massey, G. (1993) Hawaii Med. J. 52, 160–166.

- <sup>4</sup> Meyre-Silva, C., Mora, T. C., Biavatti, M. W., Santos, A. R. S., Dal-Magro, J., Yunes, R. A., Cechinel-Filho, V. (1998) *Phytomedicine* 5, 109–113.
- <sup>5</sup> Meyre-Silva, C., Mora, T. C., Santos, A. R. S., Dal-Magro, J., Yunes, R. A., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V. (1997) *Acta Farm. Bon.* 16, 169–172.
- <sup>6</sup> Komatsu, M., Tomimori, T. (1967) *Chem. Pharm. Bull.* 15, 263–269.
- <sup>7</sup> Agrawal, P. K., Bansal, M. C. (1989) in: *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, (Agrawal, P. K., eds.), Elsevier, p. 283–284.
- <sup>8</sup> Williams, C. A., De Brito, A. L. T., Harborne, J. B., Eagles, J., Waterman, P. G. (1994) *Phytochemistry* 37, 1045–1053.
- <sup>9</sup> Santos, A. R. S., Niero, R., Cechinel-Filho, V., Yunes, R. A., Pizzolatti, M. G., Delle-Monache, F., Calixto, J. B. (1995) *Planta Med.* 61, 329–332.

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)  
Curso de Farmácia/CCS  
Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)  
88302-202, Itajaí-SC  
Brazil  
E-mail: cechinel@mbx1.univali.rct-sc.br  
Fax: +55 47 3417601

## 6,7-Dioxygenated and 5,6,7-Trioxxygenated Coumarins from *Pterocaulon polystachium*

P. S. Palacios<sup>1</sup>, A. A. Rojo<sup>1</sup>, J. D. Coussio<sup>1</sup>, N. De Kimpe<sup>2</sup>, and S. L. Debenedetti<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Capital Federal, Argentina

<sup>2</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, State University of Gent, Gent, Belgium

Received: October 15, 1998; Accepted: November 7, 1998

As a continuation of our investigations on the polyphenol compounds of Argentine medicinal *Pterocaulon* species, we now report the isolation of two 5,6,7-trioxxygenated coumarins and six 6,7-dioxygenated coumarins from the aerial parts of *Pterocaulon polystachium* DC (Compositae), collected and identified from the Experimental Station INTA of Entre Ríos (Argentina). A herbarium specimen No SD-050 is being preserved in the department.

*P. polystachium* is an aromatic plant which has the property to act as a repellent of fleas and flies (1) and which has been traditionally used in decoctions for insolation cases (2). In our previous work the isolation and identification of flavonoids and caffeoylquinic acids from the aerial parts of this plant were reported (3, 4). This is the first report on the isolation of coumarins from this species.

Dried powdered aerial parts of the plant (900 g) were successively extracted with petroleum ether (60–80 °C), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and MeOH in a Soxhlet apparatus. The petroleum ether extract was evaporated under reduced pressure to afford a syrup residue (36 g), of which one portion (2 g) was chromatographed on a silica gel column (200 g, 2.5 cm × 40 cm). Elution was performed by a gradient of petroleum ether (60–80 °C)-EtOAc (70:30 to 0:100, 1600 ml) affording 90 mg of 5-(3-methyl-2-butenyloxy)-6,7-methylenedioxy-coumarin (1) (5) and 53 mg of 5-methoxy-6,7-methylenedioxy-coumarin (2) (5) after crystallisation from MeOH from Fr. II (petroleum ether-EtOAc, 70:30, 40–100 ml) and Fr. IV (petroleum ether-EtOAc, 70:30, 120–200 ml), respectively. Repeated preparative TLC (silica gel F<sub>254</sub>, Tol/CHCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>CO, 100:100:8) from Fr. V (petroleum ether-EtOAc, 60:40, 200–320 ml) yielded 36 mg of ayapin (6,7-methylenedioxy-coumarin) (3) (6, 7) (R<sub>f</sub> = 0.45) and 25 mg and 7-(3-methyl-2-butenyloxy)-6-methoxycoumarin (4) (8) (R<sub>f</sub> = 0.40). 23 mg of prenyletin (5) (8) was obtained after crystallisation of Fr. VI (petroleum ether-EtOAc, 60:40, 320–400 ml) from MeOH, and 35 mg of virgatenol (7-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyloxy)-6-methoxycoumarin) (6) (6) was crystallized from MeOH from Fr. VIII (petroleum ether-EtOAc, 50:50, 440–500 ml). The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract was evaporated under reduced pressure to give a viscous solid (18 g). A portion of the residue