

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

***OBTENÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANALGÉSICA E  
ANTIINFLAMATÓRIA A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS***

**RIVALDO NIERO**

**Florianópolis – 2000**

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

***OBTENÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANALGÉSICA E  
ANTIINFLAMATÓRIA A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS.***

**Trabalho apresentado ao Curso de  
Pós-Graduação em Química para a  
Obtenção do Grau de Doutor em  
Química Orgânica.**


**Orientador: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho**

**RIVALDO NIERO**

**FLORIANÓPOLIS**

**2000**



“UMA PLANTA PODE CONTER  
CENTENAS DE SUBSTÂNCIAS  
DIFERENTES. A DESCOBERTA  
DE UMA SÓ DELAS PODE SER  
MAIS IMPORTANTE PARA A  
HUMANIDADE DO QUE UMA  
NOVA GALÁXIA”

SIR ROBERT ROBINSON

**OBTENÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANALGÉSICA  
E ANTIINFLAMATÓRIA A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS  
BRASILEIRAS**

**RIVALDO NIERO**

**ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL  
PELO ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. ROSENDO AUGUSTO YUNES**  
Orientador

\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. VALDIR CECHINEL FILHO**  
Co-orientador

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. VALDIR SOLDI**  
Coordenador

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. ANTONIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA**  
Universidade Federal de Alagoas

  
\_\_\_\_\_  
**PROF.ª. DR.ª. SÔNIA CORINA HESS**  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. JOSÉ CARLOS GESSER**  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. MARCUS MANDOLESI SÁ**  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
**PROF.ª. DR.ª. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO**  
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado especialmente à minha esposa Maria Ivalda e aos meus filhos Guilherme e Henrique, com quem desejo compartilhar o sucesso obtido.

Aos meus pais Derci Niero e  
Valmira Cechinel Niero (*in memoriam*)

Aos meus sogros Geraldina Geraldi Fratoni e  
Elias Fratoni

À minha irmã Mariléia e seu esposo Evaldo

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Rosendo A. Yunes, pela orientação deste trabalho, pela amizade, incentivo, apoio e muitas vezes assumindo posições distintas até mesmo a de um verdadeiro pai, fatores estes essenciais para a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho não só pela co-orientação deste trabalho, mas pelo espírito incansável de amizade, dedicação e exemplos de verdadeiro ser humano. Com certeza, sem estes requisitos eu não estaria neste momento, redigindo estas palavras.
- Ao Prof. Dr. João Batista Calixto e ao Ricardo Alves do Departamento de Farmacologia pelos ensaios farmacológicos e fornecimento da *Mandevilla illustris*.
- Aos Profs. Dr. Franco Delle Monache, da Universidade de Sacro Cuore – Roma e ao Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana da Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio e dedicação na parte espectroscópica.
- Ao Prof. Msc. Rogério Corrêa Coordenador do Curso de Farmácia da UNIVALI, que não mediu esforços para que este trabalho se concretizasse.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer torna-se uma tarefa difícil porque se corre o risco de omitir nomes de pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Porém, não poderia deixar de expressar meus agradecimentos a:

- À minha amada esposa Maria Ivalda e aos meus filhos Guilherme e Henrique, pela paciência, compreensão e força para superar todos os obstáculos muitas vezes quase que impossíveis.
- Aos Meus pais, Derci e Valmira pelo incentivo constante e incansável.
- Aos meus irmãos Rafael, Ronaldo, Roberto e Mariléia pelo apoio e incentivo, principalmente a Éia que assumiu o papel de mãe na família.
- Aos meus sogros Geraldina e Elias pelo incansável apoio espiritual.
- À todos os cunhados e cunhadas pelo apoio e amizade.
- Aos meus queridos sobrinhos, principalmente, Gustavo, Gabriela, Willian, Everton, Eduarda, Angela e Klalter pelos momentos de alegria e descontração.
- Ao pessoal do Ribeirão D'Areia pelos momentos alegres do futebol e da canastra.
- Aos colegas de laboratório, Guedes, Sônia, Marize, Chris, Angela, Berenice, Renata, Thiago e Paula, pelo companheirismo e apoio que marcaram este tempo de convivência.
- Aos amigos Clóvis, Bird, Jacir e a Lu, pela amizade e estímulo permanente.
- Aos colegas de trabalho Cris, Ruth, Roberto, Benedito, Márcia, Valfredo e Adair pelo companheirismo constante.
- Ao Pareeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeent!! “ Biá e fameia ” Sem palavras!
- Aos professores que fizeram parte da banca examinadora da qualificação pelas sugestões que enriqueceram este trabalho
- Aos Profs. Márcia Maria de Souza e Adair Roberto Soares Santos pelos ensaios farmacológicos
- Aos alunos de iniciação científica, Ronize, Ana Carolina, Renata (NIQFAR/UNIVALI) e ao John pelo auxílio constante na parte experimental.
- Ao Prof. Dr. Ademir Reis pela identificação botânica das espécies estudadas.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Química que me auxiliaram na realização deste trabalho.
- À UNIVALI e CAPES, através do PICDT, pelo apoio sem o qual dificultaria muito este trabalho.
- Sou eternamente grato À DEUS, por mais esta etapa da minha vida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

EH	Extrato Hidroalcoólico
AE	Extrato de Acetato de Etila
EB	Extrato Butanólico
MeOH	Metanol
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Co-CCD	Cromatografia em Camada Delgada simultaneamente com amostra Padrão
IV	Infra-Vermelho
RMN- <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RMN- <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
EM	Espectrometria de Massas
ppm	parte por milhão da frequência aplicada
<i>J</i> (Hz)	Constante de acoplamento em Hertz
<i>s</i>	singlete
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo dublete
DI <sub>50</sub>	Dose Inibitória de 50%
IM	Inibição Máxima
i.p.	intraperitoneal
i.c.v.	intracerebroventricular
C	grupo Controle
P	significância em análise estatística
MI	Composto relacionado a <i>Mandevilla illustris</i>
SS	Composto relacionado a <i>Sebastiania schottiana</i>
Ri	Composto relacionado a <i>Rubus imperialis</i>



## RESUMO

O presente trabalho descreve os resultados fitoquímicos e farmacológicos obtidos a partir de três plantas medicinais brasileiras: *Mandevilla illustris*, *Rubus imperialis* e *Sebastiania schottiana*. Em relação a *M. illustris*, cinco compostos foram isolados utilizando-se procedimentos cromatográficos a partir do extrato de acetato de etila. Quatro deles foram identificados com base em dados espectrais, como ácido cafeico, illustrol, heterosil illustrol e acetil illustrol. Os dois últimos são compostos novos e estão sendo relatados na literatura pela primeira vez. Os experimentos de raio-x permitiram conhecer a fórmula isomérica e determinar a unidade incomum 8-metil-2,5,9-trioxatriciclo[4.2.1.0<sup>3,7</sup>]nonano, do acetil illustrol. Alguns destes compostos revelaram considerável ação antiedematogênica, inibindo a formação de edemas de pata de ratos causados pela dextrana, carragenina e bradicinina quando injetados localmente, confirmando estudos anteriores realizados com esta planta em nossos laboratórios.

O extrato metanólico das partes aéreas de *R. imperialis*, apresentou potente ação analgésica em camundongos. Três compostos foram isolados e identificados como ácido tormêntico, ácido-23-hidroxi tormêntico e Niga-ichigosídeo F1. O componente majoritário desta planta (Niga-ichigosídeo F1), foi mais ativo do que alguns fármacos analgésicos usados clinicamente (aspirina e paracetamol), quando avaliados frente a dois modelos de dor em camundongos: formalina e contorções abdominais. No modelo das contorções abdominais induzidos pelo ácido acético, este composto foi cerca de 30 vezes mais potente do que os fármacos usados para efeito de comparação, apresentando uma  $DI_{50}$  de 3,1 mg/kg,i.p.

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com a *S. schottiana* permitiram o isolamento de diversos compostos ativos, incluindo a xantoxilina, 2,4-dihidroxi-6-metoxi-acetofenona, ácido protocatético, quercetina e luteolina. O último foi investigado em diferentes modelos de dor em camundongos por duas rotas distintas de administração, mostrando interessante perfil farmacológico. Quando administrado via intraperitoneal, a luteolina mostrou uma  $DI_{50}$  de 26,2 mg/kg para a segunda fase de dor no teste da formalina. Este composto foi cerca de cinco vezes mais efetivo do que os fármacos usados em comparação.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes sob o ponto de vista medicinal, visto que alguns compostos ativos foram detectados nas plantas estudadas, os quais confirmam o uso popular no tratamento de processos dolorosos e inflamatórios. Além disso, estes compostos podem ser futuramente usados para obter derivados ou análogos mais potentes, podendo representar novas possibilidades terapêuticas.

## ABSTRACT

The present work describes the phytochemical and pharmacological results obtained from studies with three Brazilian medicinal plants: *Mandevilla illustris*, *Rubus imperialis* and *Sebastiania schottiana*. Concerning *M. illustris* rhizomes, five components were isolated using chromatographic procedures from ethyl acetate fraction, and four were identified on basis of their spectral data as caffeic acid, illustrol, heterosyl illustrol and acetyl illustrol. The two late are new compounds, being reported for the first time in the literature. The X-ray experiments of permitted to know the correct isomeric structural formula, and to determine the unusual 8-methyl-2,5,9-trioxatricyclo[4.2.1.0<sup>3,7</sup>] nonane moiety of acetyl illustrol. Some of these compounds revealed considerable anti-oedematogenic action, inhibiting the formation of paw oedema in rat caused by dextran, carageenan and bradykinin when injected locally, confirming previous studies carried out with this plant.

The methanolic extract from *R. imperialis* aerial parts exhibited analgesic potential in mice. The active compounds were isolated and identified as being tormentic acid, 23-hydroxi-tormentic acid and F1. The main component of the plant (Niga-ichigoside F1), was more active than some well-known analgesic drugs (aspirin and paracetamol) when evaluated against two models of pain in mice: writhing and formalin test. This compound was about 30-fold more potent than the standard drugs in writing test with ID<sub>50</sub> value of 3.1 mg/kg, i.p.

The phytochemical and pharmacological studies carried out with *S. schottiana* permitted the isolation of several active compounds, including xanthoxyline, 2,4-dihydroxi-6 methoxi-acetophenone, protocatechuic acid, quercetin and luteolin. The late was

investigated in different models of pain in mice by distinct routes of administration, showing interesting pharmacological profile. When administered by intraperitoneal route, luteolin exhibited an ID<sub>50</sub> value of 26.2 mg/kg for second phase in formalin test. This compound was about 5-fold more effective than the standard drugs used for comparison.

These results are important under the medicinal point of view, since several active compounds were detected in the studied plants, which confirm their popular use to treat inflammatories and dolorous processes. Moreover, these findings may be useful to obtain, in the future, new and more potent analogues or derivatives compounds, which might be represent new therapeutic possibilities.

## SUMÁRIO

Pg.

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. Plantas medicinais: aspectos gerais.....	01
1.2. Importância dos produtos de origem natural .....	02
1.3. Recentes avanços da fitoquímica voltada à obtenção de novos fármacos.....	04
1.4. O futuro do desenvolvimento de novos medicamentos.....	06
1.5. Objetivos da tese .....	08
1.6. Revisão bibliográfica .....	09
1.6.1. <i>Mandevilla illustris</i> (Apocynaceae) .....	09
1.6.1.1. Família <i>Apocynaceae</i> .....	09
1.6.1.2. Estudos anteriores realizados com o gênero <i>Mandevilla</i> .....	10
1.6.1.3. Características da espécie <i>Mandevilla illustris</i> .....	11
1.6.2. <i>Rubus imperialis</i> (Rosaceae) .....	12
1.6.2.1. Família Rosaceae .....	12
1.6.2.2. Características da espécie <i>Rubus imperialis</i> .....	12
1.6.2.3. Estudos anteriores sobre o gênero <i>Rubus</i> .....	13
1.6.3. <i>Sebastiania schottiana</i> (Euphorbiaceae) .....	14
1.6.3.1. Família Euphorbiaceae .....	14
1.6.3.2. Características da espécie <i>Sebastiania schottiana</i> .....	15
1.6.3.3. Estudos anteriores as espécie <i>Sebastiania schottiana</i> .....	16
1.7. Reagentes e equipamentos .....	18
<b>2 - CAPÍTULO II – <i>Mandevilla illustris</i> (Apocynaceae)</b> .....	<b>20</b>
2.1. Material botânico .....	20
2.2. Análise fitoquímica .....	20
2.3. Análise de Raio-X .....	22
2.4. Análise farmacológica .....	22
2.4.1. Atividade antiedematogênica .....	22
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24

2.5.1. Análise química.....	24
2.5.2. Análise farmacológica.....	31
Anexo I .....	35
<b>3 - CAPÍTULO III - <i>Rubus imperialis</i> (Rosaceae) .....</b>	<b>55</b>
3.1. Metodologia .....	55
3.1.1. Material botânico .....	55
3.1.2. Análise fitoquímica .....	55
3.1.3. Análise farmacológica .....	57
3.1.3.1. Atividade analgésica .....	57
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
3.2.1. Análise química .....	59
3.2.2. Análise farmacológica .....	62
Anexo II .....	65
<b>4 - CAPÍTULO IV – <i>Sebastiania schottiana</i> (Euphorbiaceae) .....</b>	<b>78</b>
4.1. Metodologia .....	78
4.1.1. Material botânico .....	78
4.1.2. Análise fitoquímica .....	78
4.1.3. Análise farmacológica .....	80
4.1.3.1. Atividade analgésica .....	80
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
4.2.1. Análise fitoquímica.....	82
4.2.2. Análise farmacológica .....	88
Anexo III .....	94
<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>
<b>7 – TRABALHOS PUBLICADOS PELO AUTOR .....</b>	<b>126</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Florescência e rizomas de <i>Mandevilla illustris</i> (Apocynaceae).....	11
<b>Figura 2</b> – Partes aéreas de <i>Rubus imperialis</i> (Rosaceae) .....	12
<b>Figura 3</b> – Partes aéreas de <i>Sebastiania schottiana</i> .....	15
<b>Figura 4</b> – Etapas realizadas no fracionamento dos rizomas de <i>M. illustris</i> .....	21
<b>Figura 5</b> - Resumo das etapas realizadas no fracionamento do extrato de diclorometano .....	24
<b>Figura 6</b> – Espectro de IV do composto MI-3 em KBr .....	36
<b>Figura 7</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-3 em CD <sub>3</sub> OD .....	37
<b>Figura 8</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto MI-3 em CD <sub>3</sub> OD.....	38
<b>Figura 9</b> – Espectro de massa do composto MI-3 em 70 eV .....	39
<b>Figura 10</b> – Espectro de IV do composto MI-5 em KBr .....	40
<b>Figura 11</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	41
<b>Figura 12</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido entre 4,2 e 5,7 ppm .....	42
<b>Figura 13</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido entre 3,65 e 3,8 ppm .....	43
<b>Figura 14</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido entre 1,0 e 2,8 ppm .....	44
<b>Figura 15</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	45
<b>Figura 16</b> – Espectro de DEPT do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	46
<b>Figura 17</b> – Espectro de DEPT e <sup>13</sup> C do composto MI-5 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	47

<b>Figura 18</b> – Estruturas moleculares isoméricas do composto MI-5 .....	28
<b>Figura 19</b> – Espectro de IV do composto MI-4 em KBr .....	48
<b>Figura 20</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-4 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	49
<b>Figura 21</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-4 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido entre 4,5 e 5,7 ppm .....	50
<b>Figura 22</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto MI-4 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido entre 3,0 e 3,9 ppm .....	51
<b>Figura 23</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto MI-4 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	52
<b>Figura 24</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto MI-4 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido entre 15,0 e 33,0 ppm .....	53
<b>Figura 25</b> – Espectro de DEPT e <sup>13</sup> C do composto MI-4 em (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO expandido. entre 15,0 e 47,0 ppm .....	54
<b>Figura 26</b> - Efeito dos compostos isolados da <i>M. illustris</i> no edema de pata induzidos pela carragenina em ratos .....	32
<b>Figura 27</b> - Efeito dos compostos isolados da <i>M. illustris</i> no edema de pata induzidos pela Dextrana em ratos .....	33
<b>Figura 28</b> – Efeito dos compostos MI-1 e MI-3 isolados da <i>M. illustris</i> no edema de pata induzido pela Bradicinina em ratos .....	34
<b>Figura 29</b> – Etapas realizadas no fracionamento e purificação de <i>R. imperialis</i> ....	56
<b>Figura 30</b> – Espectro de IV do composto Ri-1 em KBr .....	66
<b>Figura 31</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto Ri-1 em Piridina-d <sub>5</sub> .....	67
<b>Figura 32</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto Ri-1 entre 77 e 180 ppm, em Piridina-d <sub>5</sub> .....	68



<b>Figura 33</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN do composto Ri-1 entre 14 e 80 ppm, em Piridina- $\text{d}_5$ .....	69
<b>Figura 34</b> – Espectro de IV do composto Ri-2 em KBr .....	70
<b>Figura 35</b> – Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto Ri-2 em piridina- $\text{d}_5$ .....	71
<b>Figura 36</b> – Espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN e APT do composto R1-2 em Piridina- $\text{d}_5$ .....	72
<b>Figura 37</b> – Espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN e APT do composto R1-2 em Piridina- $\text{d}_5$ .....	73
<b>Figura 38</b> – Espectro de IV do composto Ri-3 em KBr .....	74
<b>Figura 39</b> – Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto Ri-3 em Piridina- $\text{d}_5$ .....	75
<b>Figura 40</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN e APT entre 55 e 180 ppm do composto Ri-3 em Piridina- $\text{d}_5$ .....	76
<b>Figura 41</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN e APT entre 15 e 5 ppm do composto Ri-3 em Piridina- $\text{d}_5$ .....	77
<b>Figura 42</b> – Esquema da análise fitoquímica realizada com as partes aéreas de <i>Sebastiania schottiana</i> .....	79
<b>Figura 43</b> – Cromatograma da mistura de fitoesteróis (SS-1) .....	83
<b>Figura 44</b> – Espectro de IV do composto SS-3 em KBr .....	95
<b>Figura 45</b> – Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto SS-3 em $\text{CDCl}_3$ .....	96
<b>Figura 46</b> – Cromatograma comparativo do composto 2,4-dihidroxi-6-metoxiacetofenona (A) e co-injeção com padrão autêntico (B) .....	84
<b>Figura 47</b> – Espectro de IV do composto SS-4 em KBr .....	97
<b>Figura 48</b> – Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto SS-4 em acetona .....	98
<b>Figura 49</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN do composto SS-4 em acetona .....	99
<b>Figura 50</b> – Espectro de Massa do composto SS-4 a 70 eV .....	100

<b>Figura 51</b> – Espectro de IV do composto SS-5 em KBr .....	101
<b>Figura 52</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto SS-5 em acetona .....	102
<b>Figura 53</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto SS-5 entre 90 e 190 ppm, em acetona .....	103
<b>Figura 54</b> – Espectro de IV do composto SS-6 em KBr .....	104
<b>Figura 55</b> – Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto SS-6 em acetona .....	105
<b>Figura 56</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto SS-6 entre 90 e 180 ppm, em acetona .....	106
<b>Figura 57</b> - Curva dose-resposta inibitória do EH no modelo de dor induzida pelo ácido acético 0,6% i.p. ....	88
<b>Figura 58</b> – Curva dose-resposta inibitória do EH no modelo de dor induzida pela formalina .....	88
<b>Figura 59</b> – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% i.p. ....	89
<b>Figura 60</b> – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de dor induzidas pela formalina i.p., em relação a 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> fases de dor .....	90
<b>Figura 61</b> – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% i.c.v. ....	91
<b>Figura 62</b> - Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de dor induzidas pela formalina i.c.v. em relação a 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> fases de dor .....	91

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Ângulos das principais ligações e ORTEP do composto MI-5.....	29
<b>Tabela 2</b> – Efeito antinociceptivo do extrato de Acetato de Etila e Niga-ichigosídeo F1 obtido de <i>R. imperialis</i> , no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos, i.p. ...	62
<b>Tabela 3</b> – Efeito antinociceptivo do extrato de Acetato de Etila (AE) e Niga-ichigosídeo F1 obtido de <i>R. imperialis</i> , no modelo da formalina (1 <sup>a</sup> fase), i.p. ....	63
<b>Tabela 4</b> – Efeito antinociceptivo do extrato de AE e Niga-ichigosídeo F1 obtido de <i>R. imperialis</i> , no modelo da formalina (2 <sup>a</sup> fase), i.p. ....	63
<b>Tabela 5</b> – Efeito antinociceptivo comparativo entre Ác. 23-OH-tormêntico e Niga-ichigosídeo F1 obtido de <i>R. imperialis</i> , no modelo da formalina (10mg/kg, i.p.) .....	64
<b>Tabela 6</b> – Comparação dos dados de <sup>13</sup> C-RMN da Quercetina e Luteolina com valores descritos na literatura .....	87
<b>Tabela 7</b> – Efeito antinociceptivo comparativo entre o EH, luteolina, aspirina e paracetamol no modelo contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos, i.p. ....	92
<b>Tabela 8</b> – Efeito antinociceptivo comparativo entre o EH, luteolina, aspirina e paracetamol no modelo da formalina, i.p. ....	93

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Plantas medicinais: Aspectos Gerais**

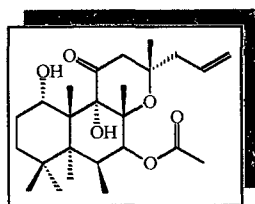
As plantas, desde os primórdios dos tempos, são fundamentais tanto na alimentação como para a cura de enfermidades <sup>1,2</sup>. A utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na crença popular e várias formações culturais fazem os seus usos como recurso terapêutico<sup>3</sup>. Apesar de seu emprego empírico, as plantas medicinais continuam a ser usadas pela população e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos. Acredita-se que, entre os motivos que explicam a opção pelo uso de plantas medicinais estão: a insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos, aliados à admiração pelos “produtos naturais” <sup>1,4</sup>. Tal valorização destas plantas ocasionou um crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre sua segurança e eficácia terapêutica<sup>1</sup>.

Atualmente, não só no Brasil, mas também em diversos países, um grande número de vegetais vem sendo utilizado como fonte alternativa de medicamentos. Segundo a análise feita pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, cerca de 60 % das drogas que foram lançadas no mercado norte-americano entre 1985 e 1995, têm origem natural. A mesma proporção também já faz parte do cotidiano dos europeus e asiáticos. É um aumento de 35 % desde a década de 70, o que significa dizer que o mundo está voltando as atenções cada vez mais para a natureza. Estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimentava cerca de US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$20 bilhões são oriundos de fontes naturais. No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ oito bilhões do faturamento da indústria farmacêutica sejam derivados de plantas<sup>3</sup>.

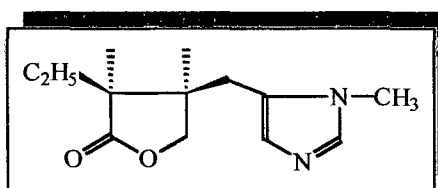
Atualmente são desenvolvidos estudos científicos baseados em modernas técnicas, visando à obtenção de dados que levam a conhecer os princípios ativos responsáveis pelas ações farmacológicas, determinar sua estrutura química, procurar suas sínteses e promover modificações estruturais com o objetivo de aumentar sua atividade e possibilitar a produção de novos fármacos.) Para desenvolver tais estudos, é necessária uma interdisciplinaridade entre farmacologia, química, botânica, agronomia, biotecnologia, computação, entre outros<sup>5</sup>.

### 1.2. Importância dos Produtos de Origem Natural

As plantas representam uma fonte inesgotável de compostos farmacologicamente ativos e estes, por sua vez, podem servir de modelos para a obtenção de novas moléculas mediante reações químicas<sup>6</sup>. Os compostos de origem natural desempenham papéis importantes na medicina moderna. Em primeiro lugar, fornecem alguns medicamentos cuja produção via síntese é inviável economicamente. Entre eles estão a forskolina (1), obtida do *Coleus barbatus*, que apresenta efeitos promissores contra hipertensão e asma; e a pilocarpina (2), isolada do *Pilocarpus jaborandi*, usada na produção de medicamentos para o tratamento de glaucoma<sup>5</sup>.



(1)



(2)

De fontes naturais também são retirados compostos, chamados “moléculas líderes” que com pequenas modificações estruturais podem levar a compostos extremamente potentes e seletivos<sup>1,5,7</sup>.

Um fator importante, que deve ser levado em consideração, consiste na utilização dos compostos inativos presentes nas plantas como marcadores químicos no controle de qualidade, principalmente nas fitopreparações, uma vez que se observa cada vez mais comum o uso de composições adulteradas por plantas de morfologia semelhantes, ocasionando assim, um sério problema de saúde pública<sup>8</sup>. Neste contexto, podemos citar como exemplo a adulteração de fitofármacos de *Maytenus ilicifolia*, conhecida como “Espinheira Santa” (Celastraceae), pela *Sorocea bomplandii* (Moraceae). As plantas citadas fazem parte de famílias totalmente diferentes, mas são muito semelhantes morfológicamente, impedindo a sua classificação até mesmo por botânicos especializados<sup>9,10</sup>.

Das cerca de 250.000 espécies de plantas existentes no planeta, menos de 15% foram investigadas com vistas ao descobrimento de suas propriedades terapêuticas<sup>11</sup>. Considerando que o Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitofármacos (cerca de 1/3 do total) e que apenas 8% foram estudadas, é de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de medicamentos, visando no futuro a obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos<sup>3,6</sup>.

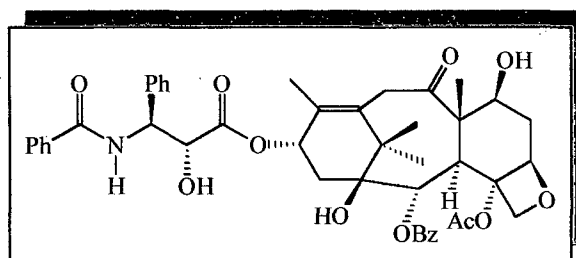
### 1.3. Recentes Avanços da Fitoquímica Voltada à Obtenção de Novos Fármacos

Um método alternativo, rápido e de baixo custo para a obtenção de novos fármacos, consiste em isolar e identificar os princípios ativos naturais, uma vez que a natureza é pródiga em produzir tais moléculas. Partindo-se de vegetais, as chances de acerto para a obtenção de compostos biologicamente ativos, são de uma para cada cinco mil tentativas, enquanto que se partindo de formulações produzidas em laboratório, a relação é de uma para cem mil<sup>12</sup>. Neste contexto, pode-se citar como exemplo três dos principais avanços relacionados com as plantas medicinais como:

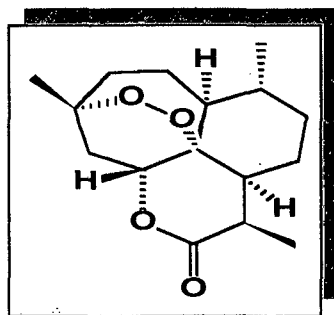
1) a descoberta do terpenóide Taxol (**3**), isolado de *Taxus brevifolia*, uma das grandes promessas para pessoas portadoras de câncer de ovário e pulmão<sup>13-15</sup>;

2) a artemisinina (**4**), um potente anti-malárico, isolado de *Artemisia annua*, planta medicinal chinesa, a qual permitiu o tratamento de milhares de pacientes<sup>16,17</sup>;

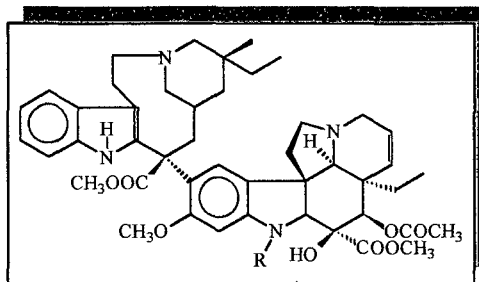
3) a vincristina (**5**) e vimblastina (**6**), dois alcalóides isolados das folhas de *Catharanthus roseus*, sendo muito usados no tratamento de certos tipos de câncer, como o mal de Hodgkin e leucemia infantil<sup>16,17</sup>. As vendas dos referidos fármacos atingem valores anuais de 160 milhões de dólares<sup>3</sup>.



(3)



(4)



(5) Vincristina: R = CHO

(6) Vimblastina: R = CH<sub>3</sub>

Cabe destacar também, dois recentes artigos de revisão em que são avaliadas as perspectivas da indústria farmacêutica no que tange a novos princípios que podem revolucionar a medicina do próximo milênio, principalmente, contra doenças relacionadas com distúrbio sanguíneo, como anemia, trombose, leucemia e AIDS<sup>18,19</sup>.

Por outro lado, não podemos deixar de mencionar os modernos fitoterápicos, cujo mercado mundial cresce gradativamente. Neste sentido, vale ressaltar os efeitos antidepressivos do extrato de *Hypericum perforatum*, a ação vasodilatadora e antioxidante do *Ginkgo biloba* e o efeito altamente promissor do extrato lipoesterólico de *Serenoa repens*, no tratamento de pessoas portadoras de Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP), uma doença em franca expansão que afeta cerca de 50% dos homens acima de 50 anos<sup>20,21</sup>.

Algumas espécies vegetais vêm sendo alvo de estudos em nossos laboratórios, como as plantas do gênero *Phyllanthus*, conhecidas popularmente como “quebra-pedra”, que foram efetivas como analgésicas, cujos efeitos parecem estar relacionados com compostos de natureza esteroidal ou fenólica<sup>22-28</sup>. É importante destacar também os efeitos analgésicos demonstrados pela *Bauhinia splendens* (Leguminosae), *Epidendrum mosenii* (Orchidaceae) e *Aleurites moluccana* (Euphorbiaceae), ações estas relacionadas com a



presença de flavonóides, taninos e triterpenos<sup>12, 29-31</sup>. Outra planta que apresentou efeitos antiespasmódicos promissor foi a *Marrubium vulgare*, que antagonizou as respostas contráteis induzidas por vários neurotransmissores em distintos órgãos isolados de cobaia<sup>32</sup>. Recentemente também foi demonstrado o importante perfil fito-farmacológico de *Drymis winteri*, relacionados com a presença de sesquiterpenos<sup>33-35</sup>.

#### **1.4. O Futuro do Desenvolvimento de Novos Medicamentos**

Recentemente tem sido estimado que o faturamento com medicamentos derivados de plantas somam quantias superiores a US\$ 22 bilhões de dólares anuais<sup>36</sup>. Relacionado a este fato, houve também um crescimento anual de 10% em novas indústrias farmacêuticas, além de uma série de fusões entre grandes empresas deste setor. Além disso, há uma necessidade urgente de se descobrir novos e efetivos fármacos para o tratamento de doenças em diferentes áreas. Como exemplo, podemos citar a área anti-infecciosa, a qual vem gerando sérios problemas de saúde pública e na área oncológica, no que se refere ao tratamento de neoplasmas sólidos, semelhante ao câncer de seios, pâncreas e cólon<sup>18</sup>. Baseado no exposto, deve-se ter em mente que o sucesso somente é alcançado com a interação maciça entre os mais variados segmentos da ciência como citado anteriormente, além de uma interação intensa Indústria – Universidade.

Com esta interação multidisciplinar, surgem novas estratégias, como a química combinatória, que permite a síntese de milhares de compostos; a cultura de tecidos, que permite a produção de compostos “in vitro”; a síntese dendrímica, que procura produzir macromoléculas (dendrímeros), como as ciclodextrinas, capazes de melhorar a farmacocinética e aumentar a especificidade de determinados fármacos. Além disso, cabe

---

destacar o recente avanço na área de projetos de fármacos, usado quando se conhece a topografia do receptor ou o centro ativo <sup>5,30,37,38</sup>.

Como pode ser notado, existem inúmeras dificuldades no percurso que vai da intenção de se fabricar o medicamento até que o mesmo chegue ao mercado: longo tempo, custo altíssimo, necessidade de domínio de novas tecnologias e multidisciplinaridade. Isto faz com que apenas as grandes empresas possam desenvolver novos medicamentos.

### **1.5. OBJETIVOS DA TESE**

Considerando que os estudos anteriores realizados em nosso grupo revelaram interessantes perfis farmacológicos no que se refere aos extratos totais das espécies estudadas, e o grande interesse da comunidade científica em buscar novas moléculas com ação analgésica e antiinflamatória mais específicas, os principais objetivos deste trabalho são:

- Isolar e identificar os principais constituintes químicos presentes em *Mandevilla illustris*, *Sebastiania schottiana* e *Rubus imperialis*, a partir de procedimentos cromatográficos e espectroscópicos;
- Testar os compostos isolados em diferentes modelos experimentais em animais, com o intuito de verificar os possíveis efeitos farmacológicos;
- Comparar os efeitos farmacológicos dos compostos isolados com fármacos usados em terapêutica.

## **1.6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.6.1. *Mandevilla illustris* (Apocynaceae)**

#### **1.6.1.1. Família Apocynaceae**

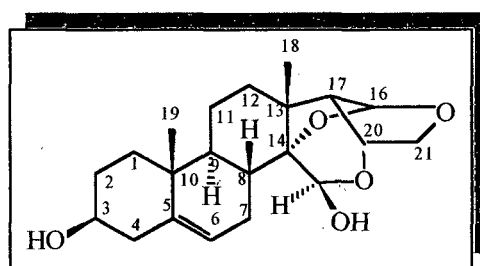
As plantas pertencentes à família Apocynaceae são inúmeras, com uma distribuição tropical e poucos representantes nas zonas temperadas. Compreendem cerca de 218 gêneros e mais de 200 espécies. Na flora brasileira, são encontradas não mais de 50 espécies. Os representantes desta família apresentam-se de diversas formas, podendo ser encontrados como ervas, arbustos, cipós e ainda como árvores de grande porte. Algumas se destacam economicamente como madeira, outras pela beleza de suas flores e algumas pela extração do látex usado principalmente na confecção de goma de mascar <sup>39</sup>.

A família Apocynaceae destaca-se, especialmente, por apresentar uma grande diversidade no que se refere às ações farmacológicas e classes de metabólitos secundários. Alguns gêneros são ricos em alcalóides com atividade antileishmanial, antibacteriana e principalmente alta afinidade para receptores opióides do tipo  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  <sup>40-42</sup>. Outros possuem uma série de triterpenos e diterpenos <sup>43</sup>. Além disso, outras classes de compostos como glicosídeos cardioativos, como os compostos isolados de *Neriun oleander*, *Neriun odorun*, *Trachelospermum asiaticum* entre outras <sup>44</sup>.

### 1.6.1.2. Estudos anteriores realizados com o Gênero *Mandevilla*

A *M. velutina* e a *M. illustris* são plantas nativas do Brasil e a infusão de seus rizomas é usada popularmente no combate a processos inflamatórios e contra picadas de cobras <sup>23,45</sup>. Embora a família Apocynaceae seja alvo de inúmeros estudos, o Gênero *Mandevilla* tem sido investigado somente em nossos laboratórios e por um grupo de pesquisa da Argentina <sup>46</sup>.

Em relação à *M. velutina*, podemos mencionar os estudos com os diferentes extratos, os quais se mostraram efetivos em inibir as contrações induzidas pela bradicinina na aorta isolada de coelho, bem como o efeito antagonista seletivo à bradicinina em útero isolado de rata <sup>47-49</sup>. Os estudos fitoquímicos realizados com este Gênero evidenciaram distintas classes de compostos, como esteróides, terpenóides e glicosídeos pregnânicos de interessante perfil farmacológico <sup>50-52</sup>. Neste sentido, cabe ressaltar os efeitos sobre edema de pata induzido pela fosfolipase A2 e fosfolipase C <sup>53</sup>, entre outros efeitos de importância químico-medicinal, relacionado com a presença de um composto pregnânico denominado velutinol A (7) <sup>54-59</sup>.



(7)

Recentemente, este composto proporcionou o depósito de uma patente realizada entre a UFSC e a Universidade de Sherbrooke do Canadá <sup>60</sup>. Considerando que *M. illustris* faz parte do mesmo Gênero e tem apresentado resultados promissores sob o ponto de vista químico-medicinal, nos propomos a reinvestiga-la.

### 1.6.1.3. Características da espécie *Mandevilla illustris*

A *Mandevilla illustris* ocorre nos estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso e principalmente em Minas Gerais<sup>39,45</sup>. Conhecida popularmente como Purga-do-Campo ou Rosa-do-Campo apresenta-se como erva ou subarbusto com até 80 cm de altura e com raízes tuberosas. São opostas, raramente alternadas, elípticas ou largo elípticas. Sua inflorescência ocorre em racemos terminais, com duas a nove flores vistosas róseo-avermelhadas. Os lobos do cálice medem de 0,6 a 1,3 cm de comprimento e as glândulas são dúplices. A corola infundibuliforme apresenta tubo de 2,6 a 3,5 cm de comprimento com anteras auriculadas. Ovário ovóide, dois nectários, folículos longos e contínuos<sup>39</sup> (figura 1).

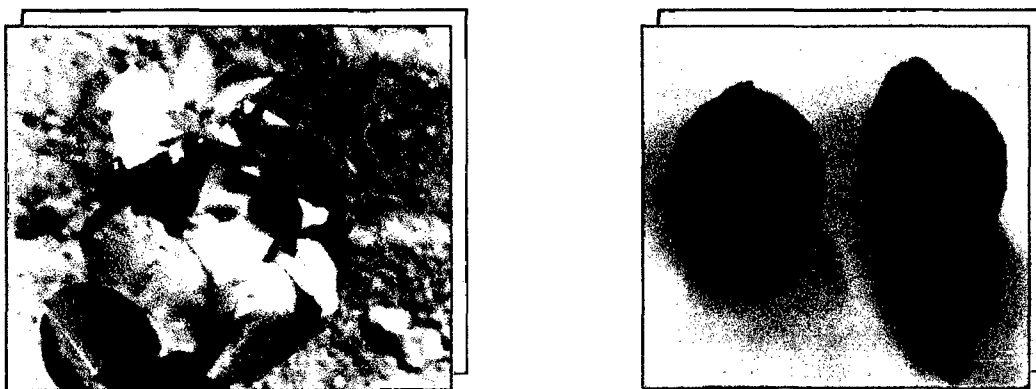


Figura 1 – Florescência e rizomas de *Mandevilla illustris* (Apocynaceae)

## **1.6.2. *Rubus imperialis* (Rosaceae)**

### **1.6.2.1. Família Rosaceae**

A família Rosaceae compreende cerca de 100 gêneros com mais de 700 espécies, sendo que a maioria é encontrada em climas temperados. Na flora brasileira é representada por cinco gêneros, habitando principalmente o Sul do país<sup>61,62</sup>.

### **1.6.2.2. Características da espécie *Rubus imperialis***

Em nossa região, *R. imperialis* é conhecida popularmente como amora-branca ou amora do mato e usada na medicina caseira contra várias enfermidades, especialmente, diabetes<sup>63, 64</sup>. *R. imperialis* é um arbusto sarmentoso de ramos angulosos, pubescentes quando novos, sempre armados de acúleos largos na base; folhas compostas de 3-5 folíolos peciolados, oblongos ou oblongo-ovalado membranosos, ligeiramente pubescentes na parte inferior, com pecíolos espinescentes de 4-10 cm; flores grandes com lacínias lanceoladas e dispostas em panícula subcorimbosa (**figura 2**)<sup>64</sup>.



**Figura 2** – Partes aéreas de *Rubus imperialis* (Rosaceae)

### 1.6.2.3. Estudos anteriores sobre o gênero *Rubus*

Embora existam inúmeras referências a respeito de outras espécies do gênero *Rubus*, não há estudos científicos realizados com *R. imperialis*, químicos quanto farmacológicos. Neste aspecto, estudos realizados com o este gênero, tem destacado que algumas espécies têm grande potencial químico-medicinal. Assim, podemos mencionar que o óleo extraído das sementes de *Rubus ideaus* demonstra possuir atividade antioxidante, sugerindo a utilização deste, em formas galênicas para a conservação de princípios ativos facilmente oxidáveis<sup>65</sup>.

Uma série de outras espécies como *Rubus lambertianus*, possuem uma constituição química muito variada como esteróides, triterpenos e uma classe de elagitaninos, os quais foram eficazes contra diversos tipos de alergia e asma e patenteadas recentemente<sup>66-68</sup>. Estudos revisando a etnofarmacologia nas cidades de Madeira e Porto Santo verificou-se que *Rubus bolle*, *R. grandifolius* e *R. imernis*, estão sendo utilizadas nos casos de disenteria e diabetes, devido as suas propriedades adstringentes<sup>69</sup>. Tem-se demonstrado também que frutos de algumas espécies vem sendo utilizadas tradicionalmente como alimento e tônico para pessoas idosas, além de anticancerígenos e antibacterianos<sup>70,71</sup>.

É importante salientar, que a *Rubus ulmifolius* é utilizada contra diabetes na medicina popular chinesa e que, recentemente, foi avaliada em ratos hiperglicêmicos induzidos por Aloxana e Streptozotocin, sendo que a infusão desta planta demonstrou extraordinário efeito hipoglicêmico em ambos modelos experimentais<sup>72</sup>. Outra espécie bastante promissora é a *Rubus pinfaensis*, que cresce no Sudoeste da China e cujo extrato das raízes tem sido usado na medicina popular para a promoção da cicatrização de queimaduras. Estudos das propriedades antibacterianas dos constituintes de *R. pinfaensis*,



sugere que eles inibem, *in vitro*, um elevado número de organismos infecciosos, podendo tais atividades estar relacionadas ao sucesso da cicatrização das feridas<sup>67,73</sup>.

### 1.6.3. *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae)

#### 1.6.3.1. Família Euphorbiaceae

Esta família é uma das maiores das dicotiledôneas, com mais de 300 gêneros e aproximadamente 8000 espécies, distribuídas por todos os continentes, principalmente, nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se na América e na África, sendo bem acentuada no Brasil. São plantas de hábito muito variado, existindo desde ervas até porte arbóreas e trepadeiras. Em geral, possuem folhas alternas inteiras ou partidas, contendo ou não estípulas latescentes. Flores sempre de sexo separado, em monoclamídeas, ocorrendo também diclamídeas, em monóicas, reunidas em inflorescências muito variadas geralmente, em tipo cacho<sup>61</sup>.

A família Euphorbiaceae inclui uma gama de plantas úteis ao homem. Dentre elas destacam-se a mamona (*Ricinus communis*) originária da América do Norte, cujas sementes são ricas em óleos (óleo de rícino), que é empregado tanto na indústria farmacêutica como na indústria de artefatos plásticos. A seringueira (*Hevea brasiliensis*), rica em borracha natural e a mandioca (*Manihot esculenta* Grantz), rica em amido<sup>61</sup>. Além destas, algumas espécies da família Euphorbiaceae são usadas como plantas ornamentais no embelezamento de ruas e jardins, como as espécies do gênero *Pedilantulus* e *Acypha*. Já as do gênero *Euphorbia* são muitas vezes utilizadas com a finalidade de cercar animais por sua robustez e grande quantidade de espinhos (ibidem).

### 1.6.3.2. Características da espécie *Sebastiania schottiana*

Dentre as espécies nativas no Brasil conhecida como plantas medicinais, destaca-se a *S. schottiana* conhecida popularmente como “sarandi negro” ou “branquilha”. Viceja abundantemente nos estados do Paraná e Santa Catarina especificamente na região do Município de Apiúna nas encostas ou pequenas ilhotas de pedras do rio Itajaí-Acú <sup>74</sup>. *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae) é um arbusto de 2–3,5m de altura, completamente glabro, com ramos eretos ou ascendentes, quase pretos, lenticelados, espinhosos; estípulas ovadas, triangulares cêdas caídas; pecíolo 2 – 4mm; folhas lanceoladas até espatuladas, obtusa ou largo agudas, longo – estreitas na base, inteiras, subcoriáceas, as nervuras laterais são evidentes; espigas terminais sobre ramos curtíssimos, 1 – 2cm; eixo filiforme; brácteas masculinas denticuladas, frutíferos muito alongados, atingindo até 2 cm de extensão <sup>75</sup> (figura 3).



**Figura 3-** Partes aéreas de *Sebastiania schottiana*

### 1.6.3.3. Estudos anteriores da espécie *Sebastiania schottiana*

Estudos com esta espécie vêm sendo desenvolvidos desde 1986, tendo apresentado interessante perfil farmacológico, com resultados extremamente importantes. Neste aspecto, verificou-se que os extratos hidroalcoólico, clorofórmico e uma fração semipurificada de flavonóides inibiram contrações de útero de rato induzidas por acetilcolina ou ocitocina em íleo de cobaia por estimulação elétrica. Entretanto, a fração clorofórmica apresentou maior ação antiespasmódica<sup>76</sup>.

Alguns metabólitos secundários como a xantoxilina, glutinol, e  $\beta$  amirina, estigmasterol, e  $\beta$ -sitosterol foram isolados da *S. schottiana*. Dentre esses compostos, somente a xantoxilina apresentou atividade antiespasmódica sobre o músculo liso<sup>77</sup>. A xantoxilina é o componente majoritário isolado, com rendimento de 0,25%. É um potente inibidor dose-dependente e de maneira não-competitiva das contrações induzidas por agonistas em preparações de músculo liso e cardíaco “in vitro”<sup>78</sup>. A xantoxilina presente nas partes aéreas da *S. schottiana* também demonstrou potente ação antibacteriana contra algumas bactérias freqüentemente encontradas no trato urinário, como *R. rubra*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, *T. mentagrophytes* e *E. floccusum*<sup>25</sup>. Além disso, exibiu importante atividade contra alguns fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Aspergillus* e *Penicillium*<sup>79</sup>.

Com o objetivo de melhorar a eficácia, várias modificações estruturais foram realizadas com a xantoxilina, obtendo-se compostos com efeitos antiespasmódicos mais potentes que a papaverina<sup>12, 80</sup> e analgésico cerca de 100 vezes superior à aspirina e acetaminofeno, quando analisados frente a modelos de dor do tipo neurogênica e

---

inflamatória. Xantoxilina e seus derivados demonstraram considerável propriedade contra edemas induzidos por dextrana, carragenina e bradicinina sendo que, dentre estes, a eficácia de alguns foi similar a indometacina e ibuprofeno - drogas encontradas atualmente no mercado<sup>81</sup>. Recentemente, estudos envolvendo as raízes desta espécie, revelaram outros compostos com interessante perfil antinociceptivo<sup>82</sup>.

## **1.7. REAGENTES E EQUIPAMENTOS**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na Universidade Federal de Santa Catarina em espectrofotômetro FT-IR-BOMEM - modelo M-100. Para a obtenção dos espectros de infravermelho, utilizou-se pastilhas de KBr. Os comprimentos de ondas das absorções foram medidos em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono 13 foram obtidos a 300 e a 75 MHz num equipamento Varian XL 300 (Universidade Católica de Sacro Cuore/Roma), a 400 e 100,6 MHz em equipamento Bruker (King's College, Londres) e a 200 e 50 MHz em espectrofotômetro Varian XL 200 MHz (Universidade Federal de Santa Catarina).

Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais (ppm), em TMS como padrão interno de referência.

Os espectros de massa (EM), foram obtidos em espectrômetro Shimadzu QP-2000 A (UFSC).

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho do tipo APF-301 (UFSC).

A análise de Raios-X foi feita em aparelho CAD4 – ENRAF NONIUS para monocristais (UFSC). As análises elementares foram determinadas em aparelho PERKIN-ELMER – 2400 CHN (UFSC).

As determinações da variação do volume da pata foram realizadas em plestímômetro Ugo Basile.

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

---

da Merck. Todos os reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico PA. Na cromatografia de camada delgada, as substâncias das classes dos terpenóides e esteróides foram reveladas por vaporização com solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento da cromatoplaça durante 5 minutos à 110°C. As substâncias de características fenólicas, foram vaporizadas com solução de FeCl<sub>3</sub> 1% e secas a temperatura ambiente (método químico). Além disso, as placas também foram visualizadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 250 e 366 nm.

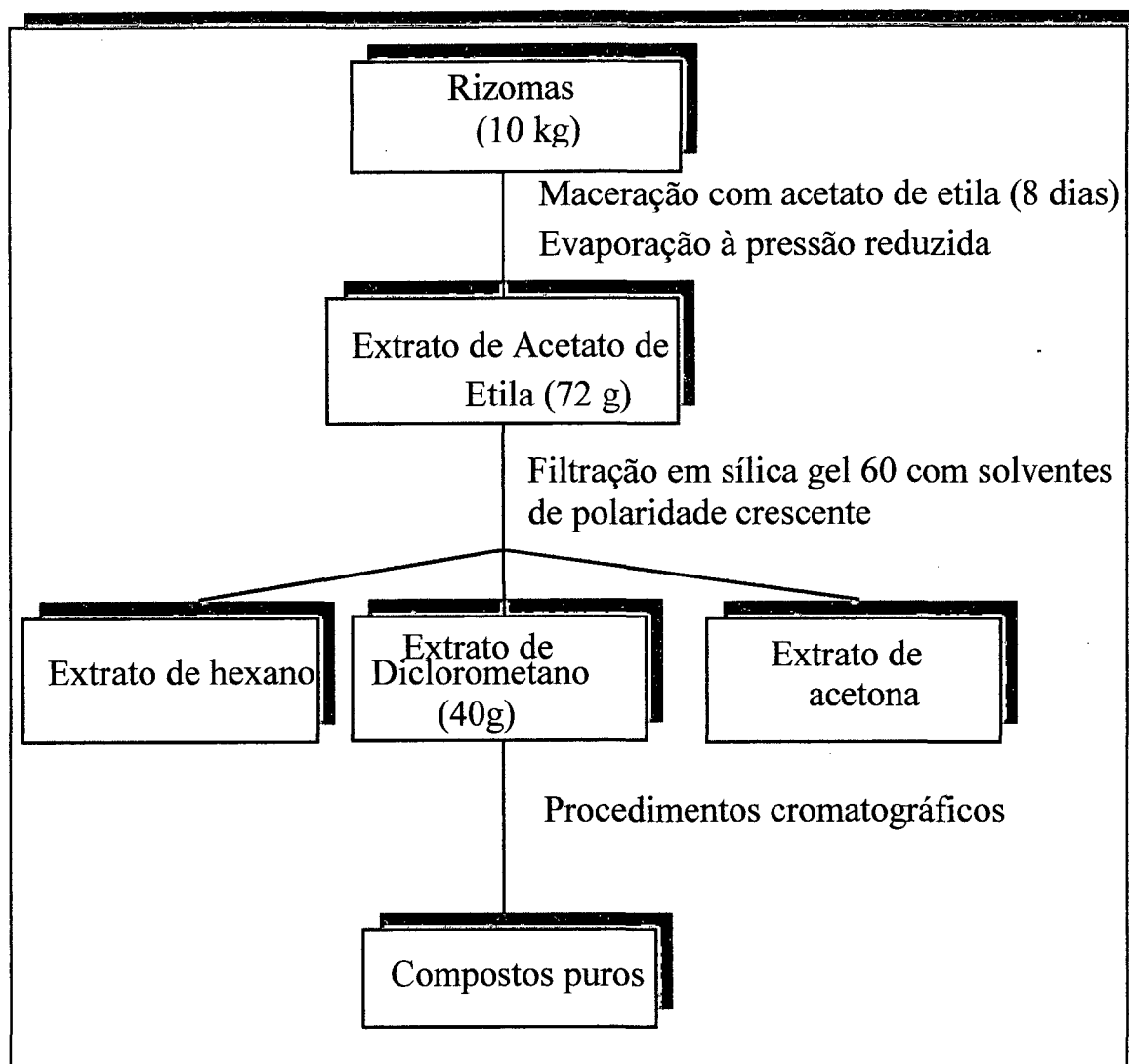
## 2.0. CAPÍTULO II - *Mandevilla illustris* (Apocynaceae)

### 2.1. Material Botânico

A *M. illustris* foi coletada no Estado de Minas Gerais, em janeiro de 1996 e identificada pelo professor Dr. Ademir Reis, do Departamento de Botânica da UFSC. Uma exsicata está depositada no Herbarium FLOR da UFSC sob o número 17871.

### 2.2. Análise fitoquímica

A partir dos rizomas frescos e moídos (10 kg), foi preparado um extrato de acetato de etila mediante maceração a temperatura ambiente durante 8 dias. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida, foram obtidos 72 g do respectivo extrato de acetato de etila. 40 g deste material foram filtrados em coluna de sílica gel com diferentes solventes de polaridade crescente, como hexano, diclorometano e acetona para a obtenção dos respectivos extratos semi-puros. Embora todos os extratos apresentassem atividade farmacológica, somente o de diclorometano foi analisado fitoquimicamente em função de apresentar os melhores resultados<sup>39</sup>. Nesta etapa foram utilizados métodos cromatográficos como CC (Cromatografia em Coluna) e CCD (Cromatografia em Camada Delgada). No processo de elucidação estrutural foram empregados métodos espectroscópicos como Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono-13 (RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), além de Espectrometria de Massa (EM) e Co-CCD. A **figura 4** demonstra os procedimentos mencionados acima.



**Figura 4** - Etapas realizadas no fracionamento dos rizomas de *M. illustris*



### 2.3. Análise de Raios-X

Mono cristais do composto MI-5, foram obtidos por recristalização usando-se uma mistura de hexano/acetona 3:1. A análise de Raio-X foi realizada pelo prof. Dr. Ivo Vencato, do Departamento de Química da UFSC, baseado nos seguintes dados e parâmetros:

*Dados cristalográficos:* C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>, M = 374,46, ortorrômbico, grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, (Nr. 19), a = 8,144 (1), b = 10,004 (1), c = 24,101(2) Å, Z = 4, 2024 reflexões medidas, 2000 únicas, 1644 com  $I \pm 2\sigma$  (I), 245 parâmetros refinados. A estrutura foi refinada anisotropicamente com o programa SHELXL-97 alcançando no refinamento final R1= 4,53% e wR2 = 15,37%. O empacotamento molecular é obtido com uma ligação C-H ...O de 3.227(7) Å [ C19-H19...O5<sup>i</sup> ] onde i = -1+x, 1+y, z.

### 2.4. Análise farmacológica

Os testes farmacológicos foram realizados pela equipe do Prof. Dr. João B. Calixto, do Departamento de Farmacologia da UFSC.

#### 2.4.1. Atividade Antiedematogênica

Este experimento foi conduzido usando-se grupos de seis animais (ratos suíços com cerca de 200 g) em ambiente a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ$  C) com ciclo de 12 h claro/escuro. Os animais foram anestesiados com éter e receberam em uma das patas

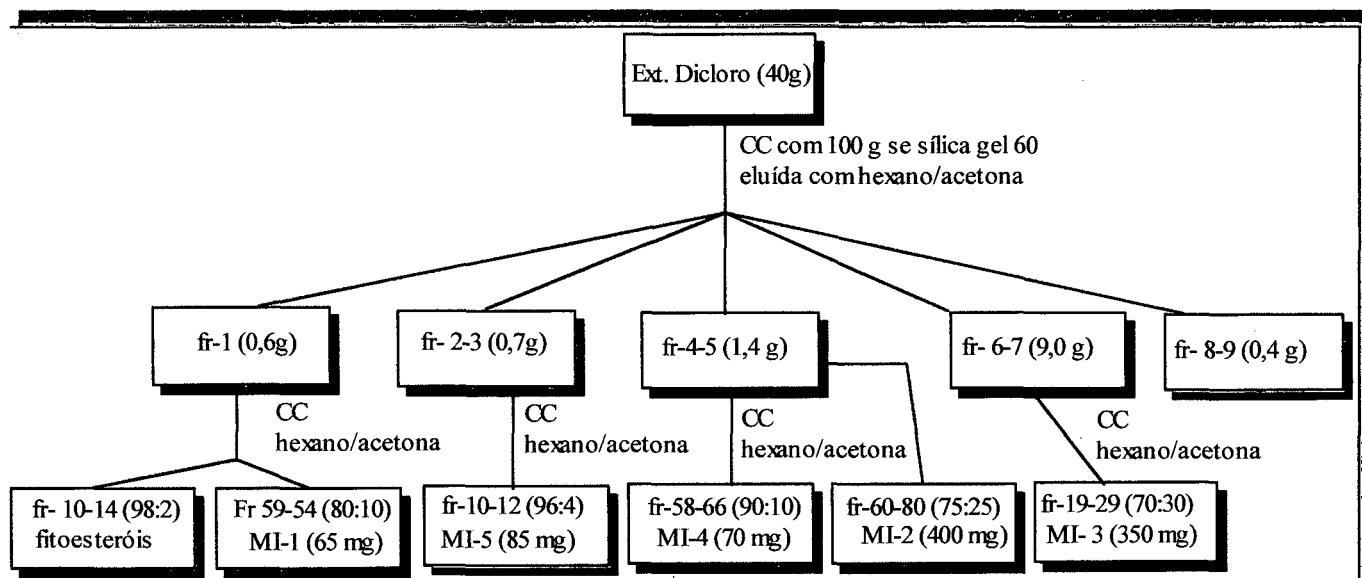
---

posterior, 0,1 mL de PBS (Phosphate-Buffered Saline), contendo carragenina (300 ug/pata), dextrana (300 ug/pata) ou bradicinina (3 umol/pata), co-injetado com os compostos (10 ug/pata). A pata contralateral recebeu apenas 0,1 mL de solução de BPS e foi usada como controle. Nos experimentos com bradicinina, os animais foram tratados com captopril (5mg/kg,i.p) 1 h antes para prevenir a degradação da bradicinina. Os edemas foram medidos, usando-se um pletismômetro (Ugo Basile), medindo-se o volume da pata em distintos intervalos de tempo após a injeção dos mediadores inflamatórios. O edema foi expresso pela diferença do volume (mL) da pata testada com controle<sup>35,81</sup>.

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

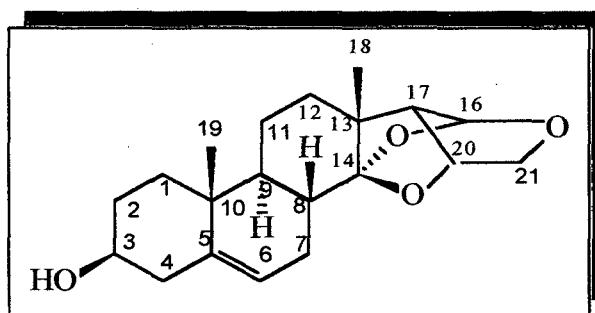
### 2.5.1. Análise Química

Considerando que o extrato de diclorometano apresentou ação farmacológica importante no que diz respeito ao antagonismo de cininas<sup>39</sup>, este foi cromatografado em coluna de sílica gel, usando-se uma mistura de hexano/acetona como eluente, com aumento gradativo da polaridade. Tais procedimentos permitiram a seleção de várias frações que foram posteriormente recromatografadas utilizando-se o mesmo sistema de eluentes mencionados acima, possibilitando o isolamento de cinco compostos denominados inicialmente de **MI-1, MI-2, MI-3, MI-4 e MI-5**, além de uma mistura de fitoesteróis. Um esquema simplificado das etapas realizadas está demonstrado na **figura 5**.



**Figura 5** – Resumo das etapas realizadas no fracionamento do extrato de diclorometano obtidos dos rizomas de *M. illustris*

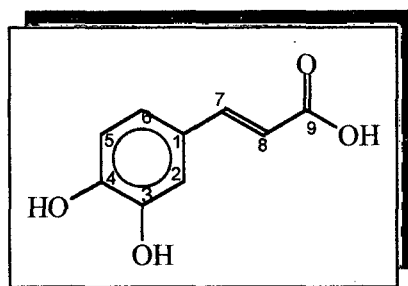
Todos os compostos foram analisados identificados através de dados espectroscópicos (IV,  $^{13}\text{C}$ , RMN- $^1\text{H}$ , MS) em comparação com dados encontrados na literatura. A análise espectroscópica do composto **MI-1** está em andamento o que ainda não nos permite estabelecer sua estrutura. Por outro lado, analisando espectros do composto **MI-2**, observou-se uma grande similaridade dos sinais tanto na espectroscopia de RMN- $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$ , quando comparado ao composto illustrol, isolado anteriormente em nossos laboratórios da mesma espécie. Neste aspecto, podemos destacar os sinais de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  5,3 (*t*, H-6),  $\delta$  5,5 (*d*, H-16),  $\delta$  2,51 (*t*, H-17),  $\delta$  4,4 (*m*, H-3), bem como os sinais de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  71,5 (C-3);  $\delta$  138,9 (C-5);  $\delta$  122,0 (C-6);  $\delta$  108,5 (C-14);  $\delta$  104,2 (C-16) e  $\delta$  73,4 (C-20). Além disso, o uso de Co-CCD e ponto de fusão ( $162^\circ\text{C}$ ) com uma amostra autêntica, utilizando distintos sistemas de eluentes e reveladores específicos, mostrou apenas uma mancha na cromatoplaça, permitindo concluir que **MI-2** trata-se do illustrol<sup>39,45</sup>.



(MI-2)

Quando se analisa os espectros de IV do composto **MI-3**, observam-se absorções em  $3500\text{ cm}^{-1}$ (OH);  $1760\text{ cm}^{-1}$ (C=O) características de grupos hidroxilas e carbonila, respectivamente (**figura 6 anexo I**). Os dados de RMN- $^1\text{H}$  mostram sinais de prótons olefinicos a  $\delta$  6,2 (*d*,  $J=16\text{ Hz}$ , H-8) e  $\delta$  7,5 (*d*,  $J=16\text{ Hz}$ , H-7), além de prótons aromáticos com sinais a  $\delta$  7,0 (*d*,  $J=1,5\text{ Hz}$ , H-2);  $\delta$  6,7 (*d*,  $J=8,0\text{ Hz}$ , H-5);  $\delta$  6,9 (*dd*,  $J=1,5$  e  $8\text{ Hz}$ ,

H-6) (**figura 7 anexo I**). O RMN-<sup>13</sup>C indica sinais característicos em  $\delta$  171,0 (C=O);  $\delta$  115,4 (C-8) e  $\delta$  147,0 (C-7) (**figura 8 anexo I**). No espectro de massas, observa-se o pico do íon molecular  $m/z$  (180) (**figura 9 anexo I**). Estes dados aliados a Co-CCD e ponto de fusão (224°-226 C) com padrão autêntico e comparados com dados da literatura, são consistentes com o ácido 3,4-dihidroxi-cinâmico (ác. cafeico) <sup>83,84</sup>.

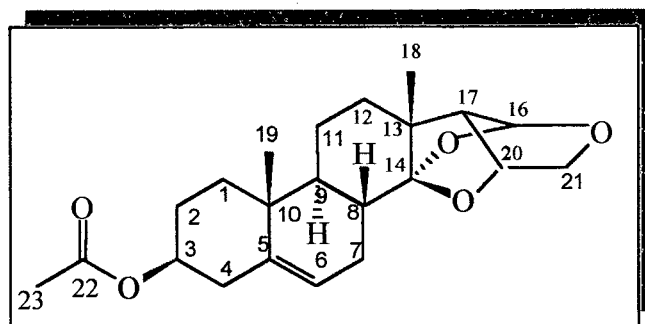


(MI-3)

O composto **MI-5** (p.f. 213,3° C) também apresenta sinais semelhantes ao ilustrado anteriormente, porém observa-se claramente o desaparecimento da banda de absorção característica de OH em 3450 cm<sup>-1</sup> e o aparecimento de uma banda em 1760 cm<sup>-1</sup> típica de carbonila de éster tratando-se, de um composto acetilado (**figura 10 anexo I**). Outras evidências podem ser observadas nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (**figuras 11-15 anexo I**) com sinais  $\delta$  1,96 (*s*, H-23),  $\delta$  5,40 (*t*, H-6;  $J=2,2$  Hz),  $\delta$  4,56 (*d*, H-20;  $J=2,0$  Hz),  $\delta$  5,51 (*d*, H-16;  $J=2,5$  Hz),  $\delta$  4,51 (*m*, H-3),  $\delta$  3,90 (*d*, H-21 $\alpha$ ),  $\delta$  3,88 (*d*, H-21 $\beta$ ),  $\delta$  139,9 (C-5),  $\delta$  122,8 (C-6),  $\delta$  78,8 (C-20),  $\delta$  73,6 (C-21),  $\delta$  103,9 (C-16),  $\delta$  108,3 (C-14) e  $\delta$  170,3 ppm (C=O).

Da mesma forma, no espectro de DEPT, observa-se a diferença com o aparecimento de um sinal em  $\delta$  21,15 (C-23), além de três sinais de grupo metilas ( $\delta$  16,71; 19,35 e 21,15), sete para grupo metileno ( $\delta$  20,97; 25,23; 28,45; 30,99; 37,20; 37,30; 38,80 ppm), sete sinais de grupo metino ( $\delta$  38,0; 46,6; 56,40; 73,61; 78,82; 103,80 e 122, 83 ppm),

restando portanto cinco sinais de carbonos tetrassubstituídos (**figuras 16-17 anexo I**). Todos estes dados em conjunto, permitiram estabelecer a estrutura do composto **MI-5** como acetilillustrol<sup>39,45</sup>.



(MI-5)

Embora tenha sido proposta uma fórmula estrutural, as duas estruturas isoméricas **I** e **III**, poderiam existir (**figura 18**). Uma análise de Raios-X revelou um comprimento de ligação de 1,327 Å entre C5-C6 e ângulos de 125,2° entre C5-C6-C7, confirmando o caráter  $sp^2$  de C6. Além disso, uma característica interessante na estrutura parcial do trioxotriciclo, com ângulos altamente tensionados de 91,1° e 95,9° entre as ligações C14-C13-C16 e C15-C16-C19 respectivamente (**tabela 1**). Parâmetros de Cremer<sup>85</sup> mostram que o anel *A* está em conformação de cadeira [ $Q = 0,556$  Å,  $\theta = 9,5$  e  $\varphi = 213^\circ$ ], o anel *B* se encontra em meia-cadeira tendendo a conformação bote [ $Q = 0,455$  Å,  $\theta = 53,2$  e  $\varphi = 78,6^\circ$ ], anel *C* está em conformação cadeira [ $Q = 0,558$  Å,  $\theta = 4,3$  e  $\varphi = 184^\circ$ ], o anel *D* adota uma conformação envelope com C13 *endo* [ $Q = 0,561$  Å e  $\varphi = 65,9^\circ$ ], anel *E* em conformação envelope com C13 em flap [ $Q = 0,562$  Å e  $\varphi = 66,7^\circ$ ] e o anel *F*, assume uma conformação envelope com C16 *exo* [ $Q = 0,416$  Å e  $\varphi = 66,8^\circ$ ]. Estes dados permitem sugerir que se trata do isômero **I**. Considerando que se trata de uma molécula inédita, a mesma foi depositada na Base de dados em Cambridge.

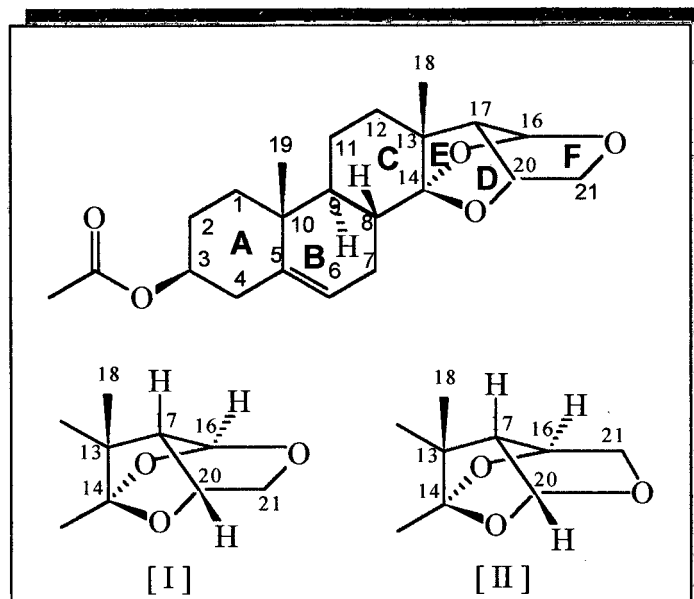
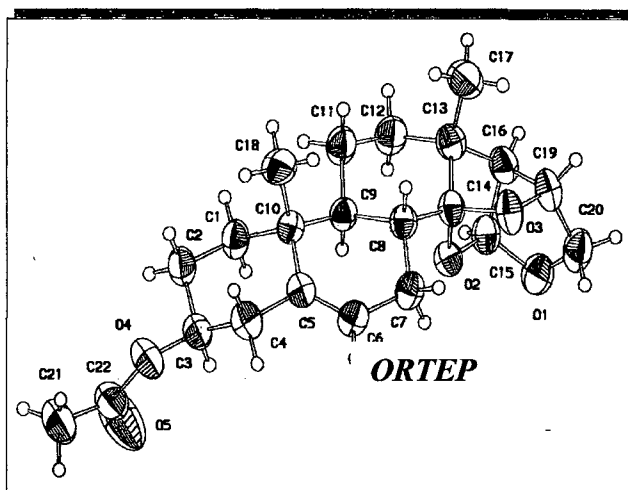


Figura 18 - Estruturas moleculares isoméricas do composto MI-5

Ligações		Ângulos	
C(13)	C(12) C(11)	110.0(4)	
C(16)	C(13) C(14)	91.1(3)	
C(16)	C(1) C(12)	118.3(4)	
C(14)	C(13) C(12)	108.5(4)	
C(16)	C(13) C(17)	112.5(4)	
C(14)	C(13) C(17)	113.5(4)	
C(12)	C(13) C(17)	111.3(4)	
O(3)	C(14) O(2)	106.7(3)	
O(3)	C(14) C(8)	114.4(3)	
O(2)	C(14) C(8)	108.7(3)	
O(1)	C(15) O(2)	111.6(4)	
O(1)	C(15) C(16)	107.9(4)	
O(2)	C(15) C(16)	102.6(3)	
C(15)	C(16) C(13)	104.0(4)	
C(15)	C(16) C(19)	95.9(4)	
C(13)	C(16) C(19)	103.4(4)	
O(3)	C(19) C(20)	109.8(4)	
O(3)	C(19) C(16)	102.6(3)	
C(20)	C(19) C(16)	104.6(4)	
O(1)	C(20) C(19)	106.4(4)	
O(5)	C(22) O(4)	121.8(5)	
O(5)	C(22) C(21)	125.5(5)	
O(4)	C(22) C(21)	112.7(5)	



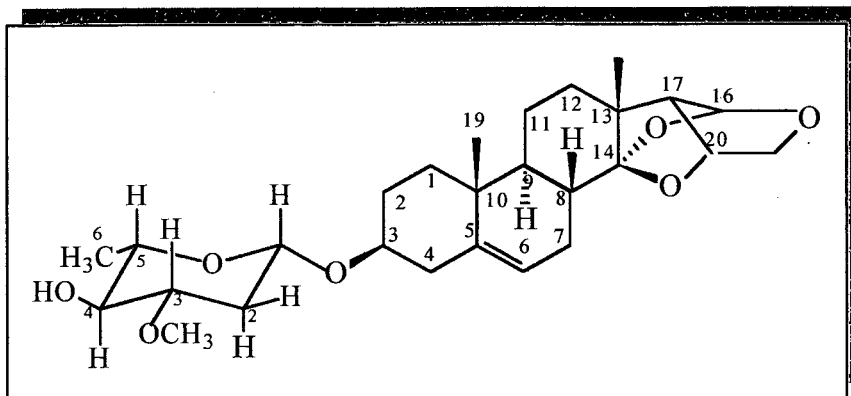
**Tabela 1** - Ângulos das principais ligações e *ORTEP* do composto **MI-5**



Com relação ao composto **MI-4** (p.f. 193,8° C), o mesmo apresentou características cromatográficas semelhantes ao acetilillustrol comentado acima, sugerindo ser uma molécula com alguma semelhança estrutural. A análise elementar revelou percentuais de 68,06, 8,40 e 23,52% para C, H e O, respectivamente, levando a uma fórmula molecular  $C_{27}H_{40}O_7$ , com um número de insaturações igual a 8.

O espectro de IV mostra absorções características de OH em  $3450\text{ cm}^{-1}$  e uma banda de absorção de média intensidade em  $1660\text{ cm}^{-1}$ , típica de C=C (**figura 19 anexo I**). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra sinais em  $\delta$  4,80 (*dd*,  $J = 9,5$  e  $2,0$  Hz; G-1), característicos de próton anomérico (**figuras 20 e 21 anexo I**). Outros sinais foram observados em  $\delta$  3,40 (*s*, OCH<sub>3</sub>) e  $\delta$  1,17 (*d*, CH<sub>3</sub>-G6), atribuídos à unidade heterosídica (**figura 22 anexo I**). Da mesma forma, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostra um sinal em  $\delta$  96,4 (G1), também na região típica de carbono anomérico.

Uma análise no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  permite observar sinais em  $\delta$  31,03 (G-2),  $\delta$  77,2 (G-3),  $\delta$  74,0 (G-4),  $\delta$  71,03 (G-5) e  $\delta$  18,79 (G-6) atribuídos aos respectivos carbonos da unidade heterosídica (**figuras 23-24 Anexo I**). Estes dados sugerem ser um derivado heterosídico do illustrol. No espectro de DEPT, é possível observar o aparecimento de um sinal em  $\delta$  31,02 (G-2), além de dois sinais  $\delta$  18,79 (G-6, CH<sub>3</sub>) e  $\delta$  57,83 (OCH<sub>3</sub>) (**figura 25 , anexo I**). Estes dados possuem grande relação com aqueles publicados na literatura<sup>39, 45, 86</sup>, permitindo sugerir a estrutura de **MI-4** como sendo  $\beta$ -D-oleandro-piranosilillustrol, embora outros experimentos serão necessários para afirmar a correta estrutura molecular deste composto.

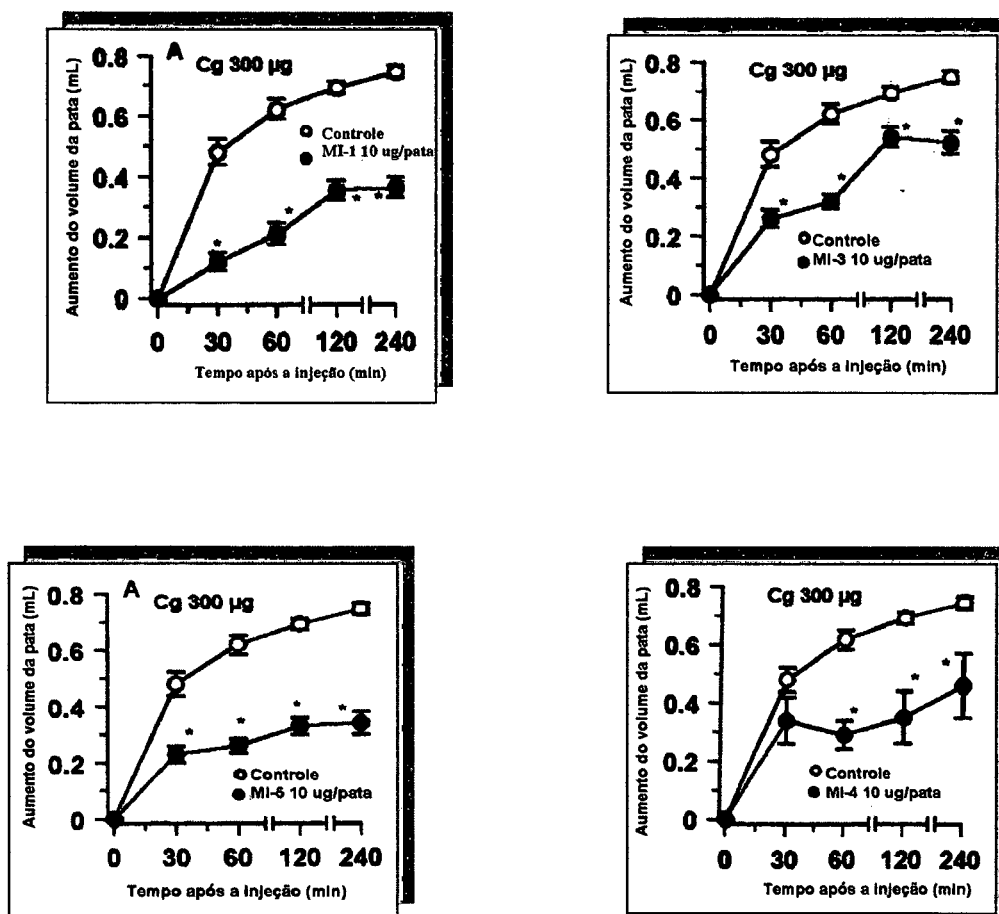


(MI-4)

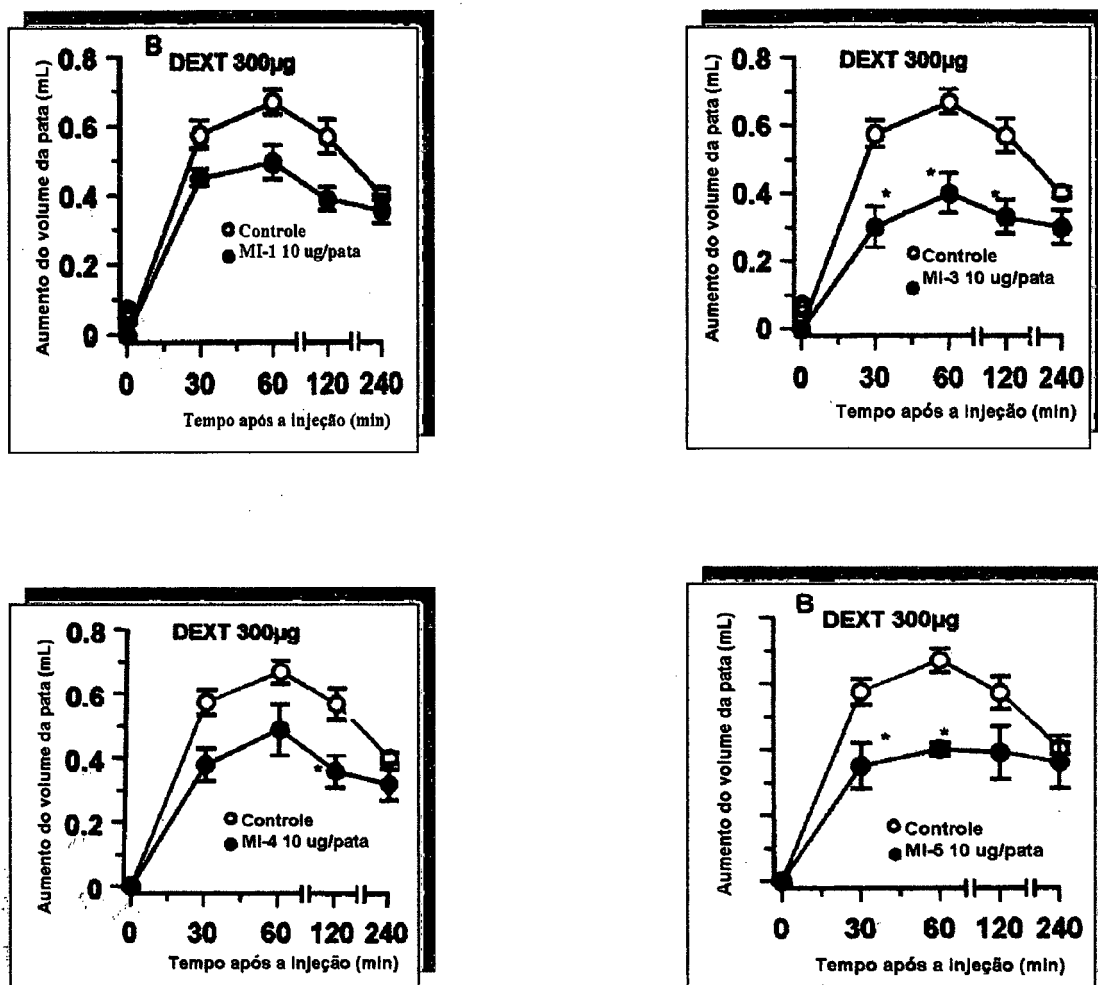
### 2.5.2. Análise Farmacológica

Em estudos anteriores foi demonstrado que compostos pregnânicos isolados de *Mandevilla velutina* inibiram seletivamente as respostas mediadas por diversas cininas. Considerando que os compostos isolados de *M. illustris* apresentam muita semelhança com aqueles isolados de *M. velutina* e que estudos anteriores revelaram importante ação farmacológica nos extratos, os compostos isolados desta espécie também foram analisados. Neste aspecto, os resultados demonstraram que os compostos MI-1, MI-3, MI-4 e MI-5 (10 ug/pata), inibiram significativamente os edemas induzidos pela carragenina (300 ug/pata), com inibições de  $66 \pm 3\%$ ,  $59 \pm 3\%$ ,  $53 \pm 5\%$  e  $58 \pm 3\%$ , respectivamente (**figura 26**). Quando testados no edema causado pela Dextrana, os compostos causaram inibições de  $41 \pm 2\%$ ,  $43 \pm 6\%$ ,  $41 \pm 5\%$  e  $39 \pm 7\%$  % respectivamente (**figura 27**). Por outro lado, quando co-injetados com bradicinina, apenas os compostos MI-1 e MI-3 inibiram o edema (3 nmol/pata), com inibições de  $38 \pm 2\%$  e  $45 \pm 4\%$  % respectivamente, conforme demonstrado na **figura 28**.

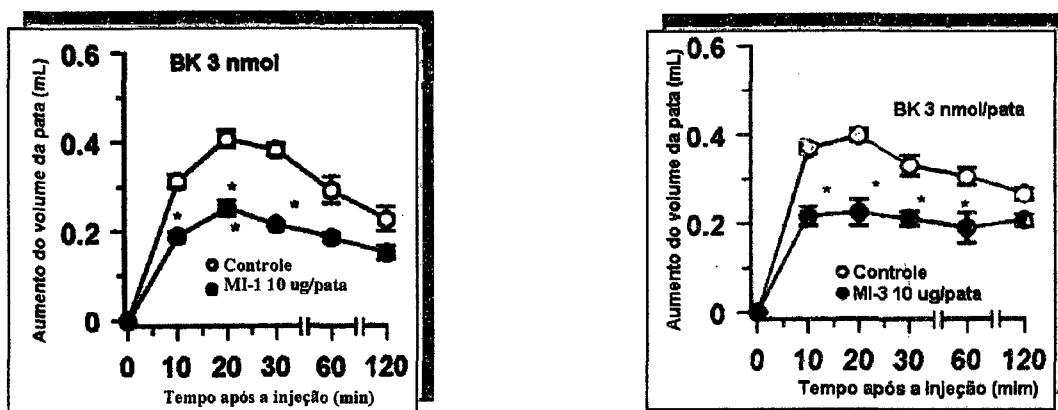
É importante mencionar que estes compostos apresentam percentuais de inibição de edema, semelhantes ao de fármacos usados na clínica, como a indometacina e o ibuprofeno, principalmente quando comparados aos mediadores do processo inflamatório carragenina e dextrana<sup>81</sup>.



**Figura 26** – Efeito dos compostos isolados da *M. illustris* no edema de pata induzidos pela carragenina em ratos. Cada ponto representa uma média de 6 animais e as barras verticais erro padrão médio. Valores de  $*P < 0,05$  foram considerados como significantes.



**Figura 27** – Efeito dos compostos isolados da *M. illustris* no edema de pata induzidos pela Dextrana em ratos. Cada ponto representa uma média de 6 animais e as barras verticais erro padrão médio. Valores de  $*P < 0,05$  foram considerados como significantes.



**Figura 28** – Efeito dos compostos MI-1 e MI-3 isolados da *M. illustris* no edema de pata induzidos pela bradicinina em ratos. Cada ponto representa uma média de 6 animais e as barras verticais erro padrão médio. Valores de  $*P < 0,05$  foram considerados como significantes.

**ANEXO I**

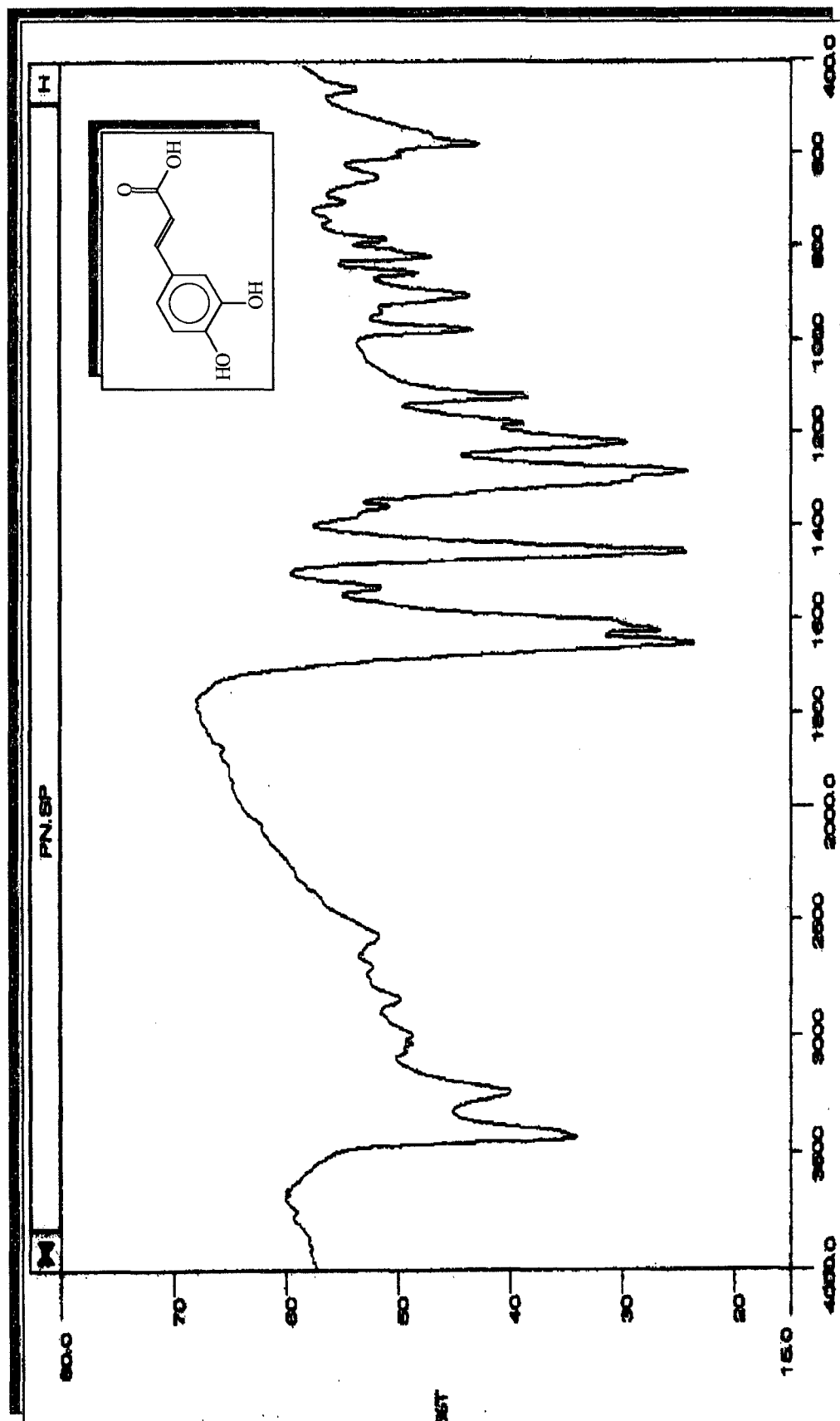


Figura 6 – Espectro de IV do composto MI-3 em KBr





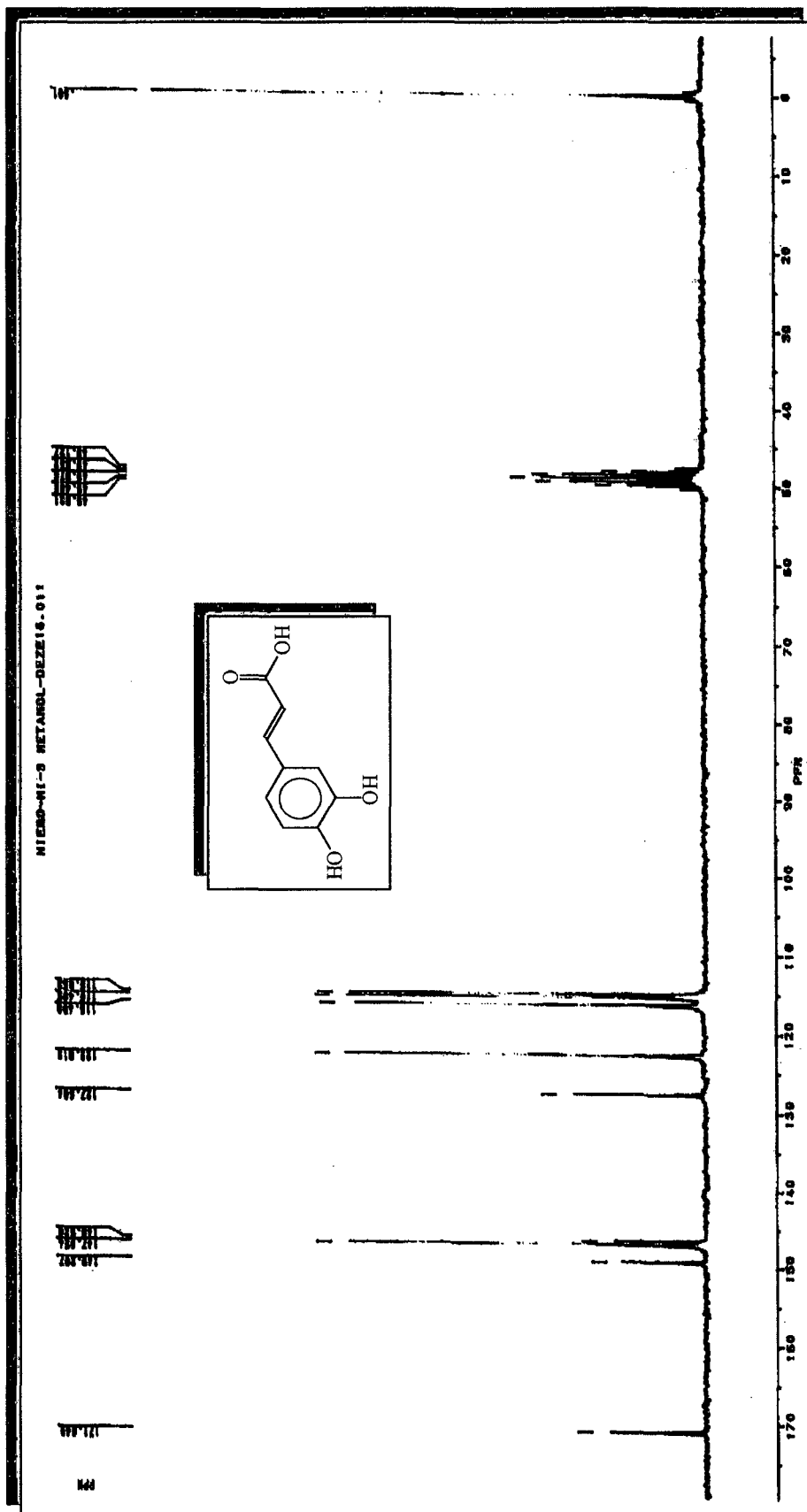


Figura 8 – Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto MI-3 em CD<sub>3</sub>OD

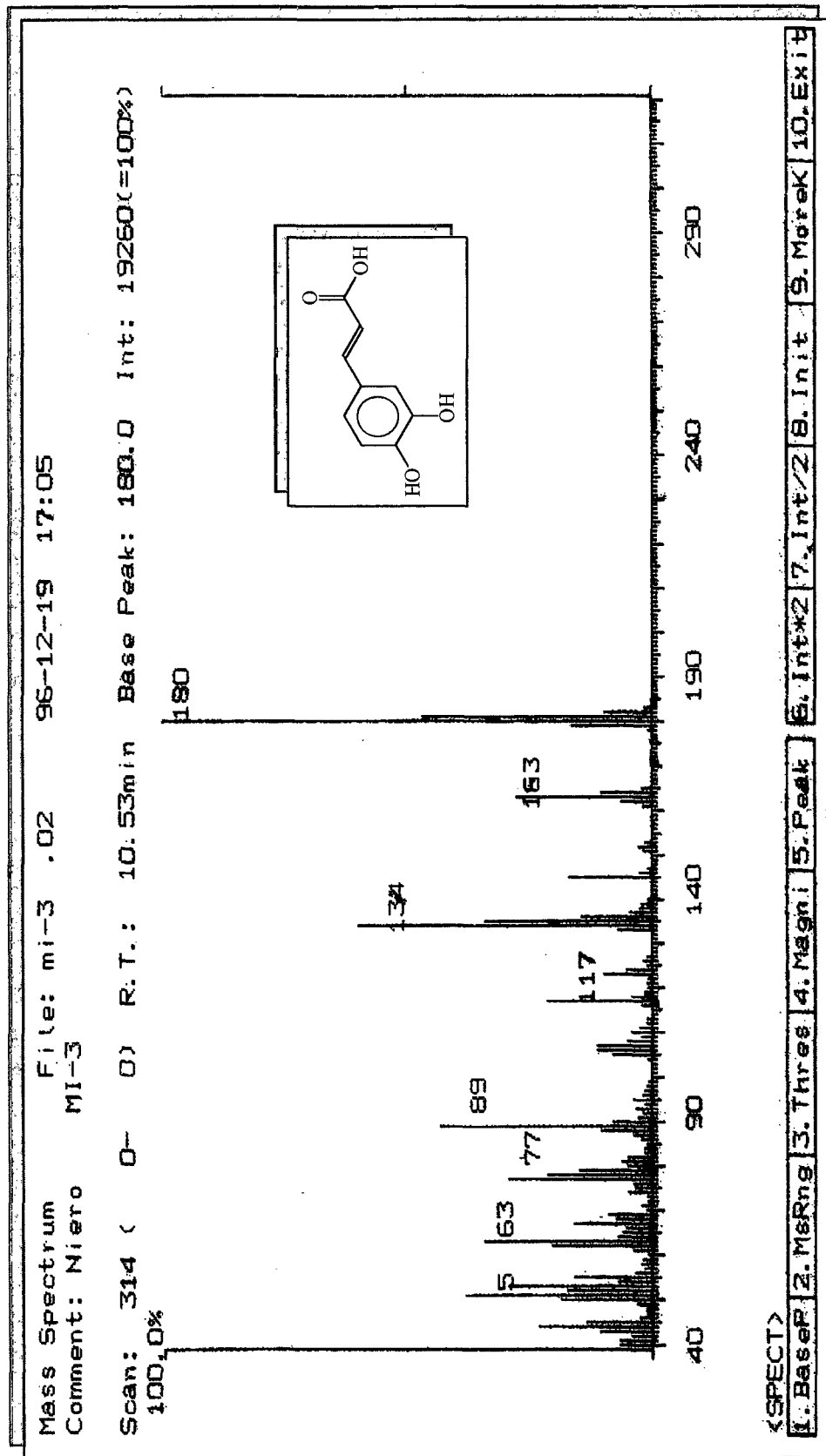


Figura 9 – Espectro de massa do composto MI-3 em 70 eV.

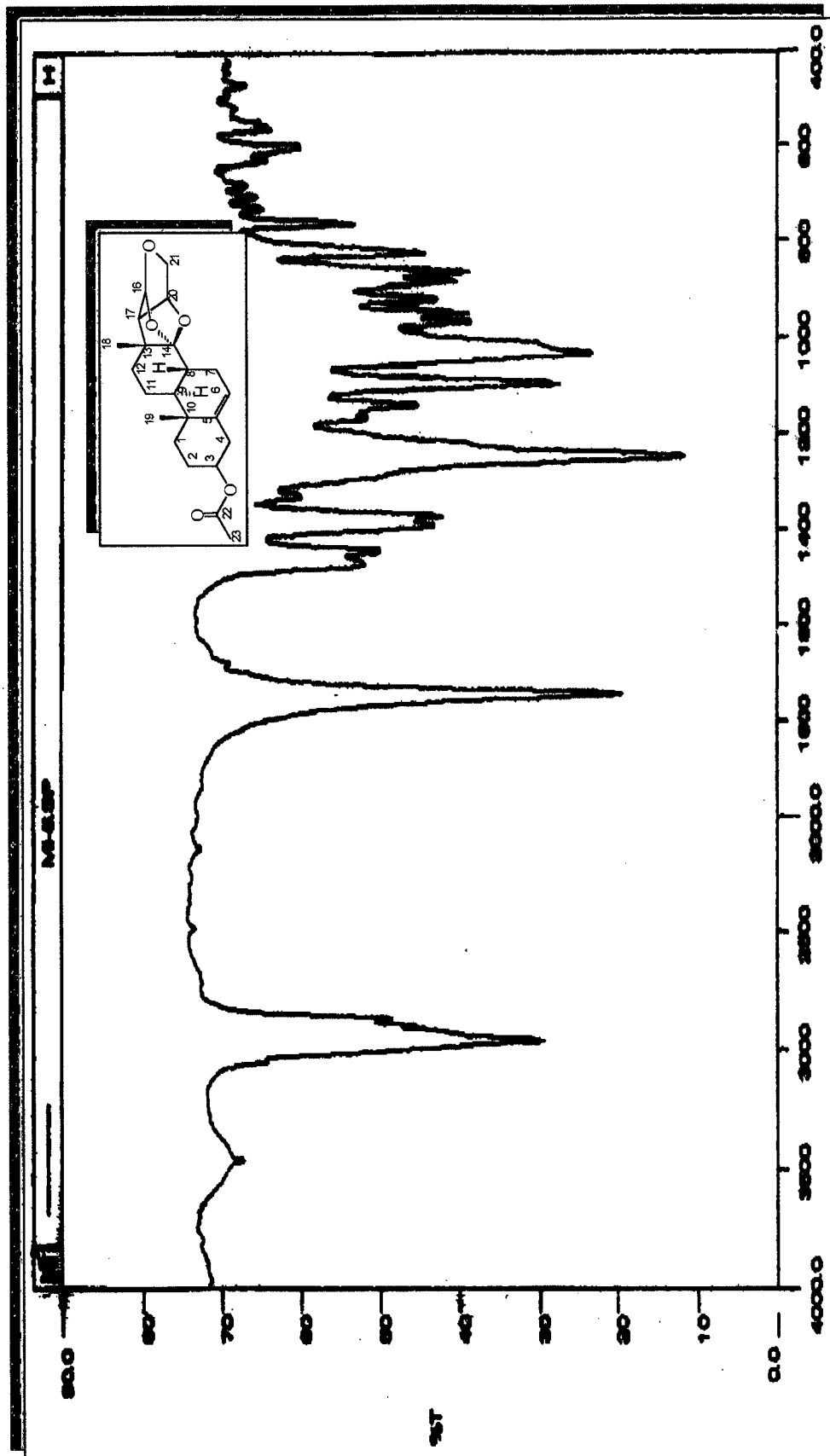


Figura 10 – Espectro de IV do composto MI-5 em KBr



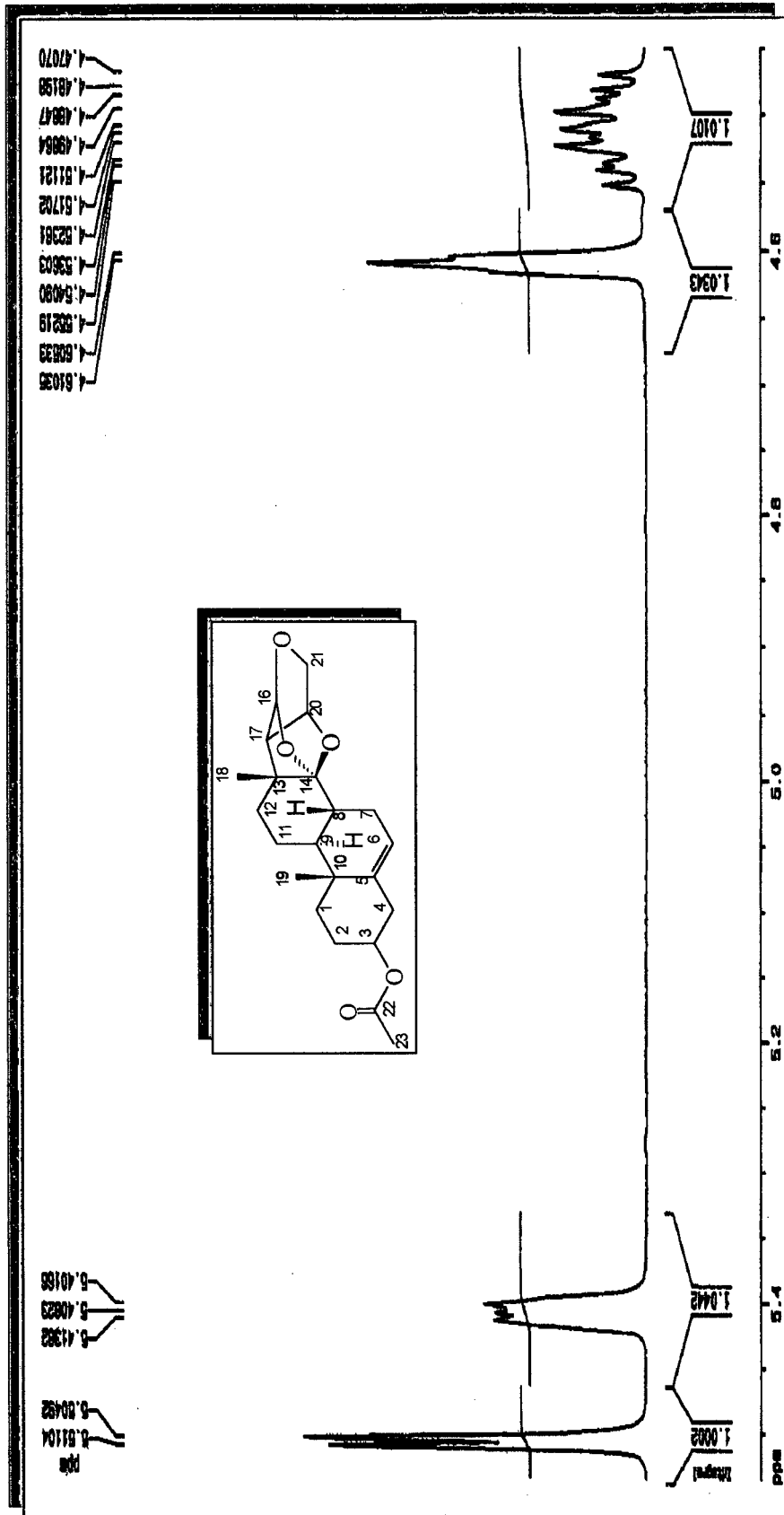


Figura 12 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-5 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 4,2 e 5,7 ppm

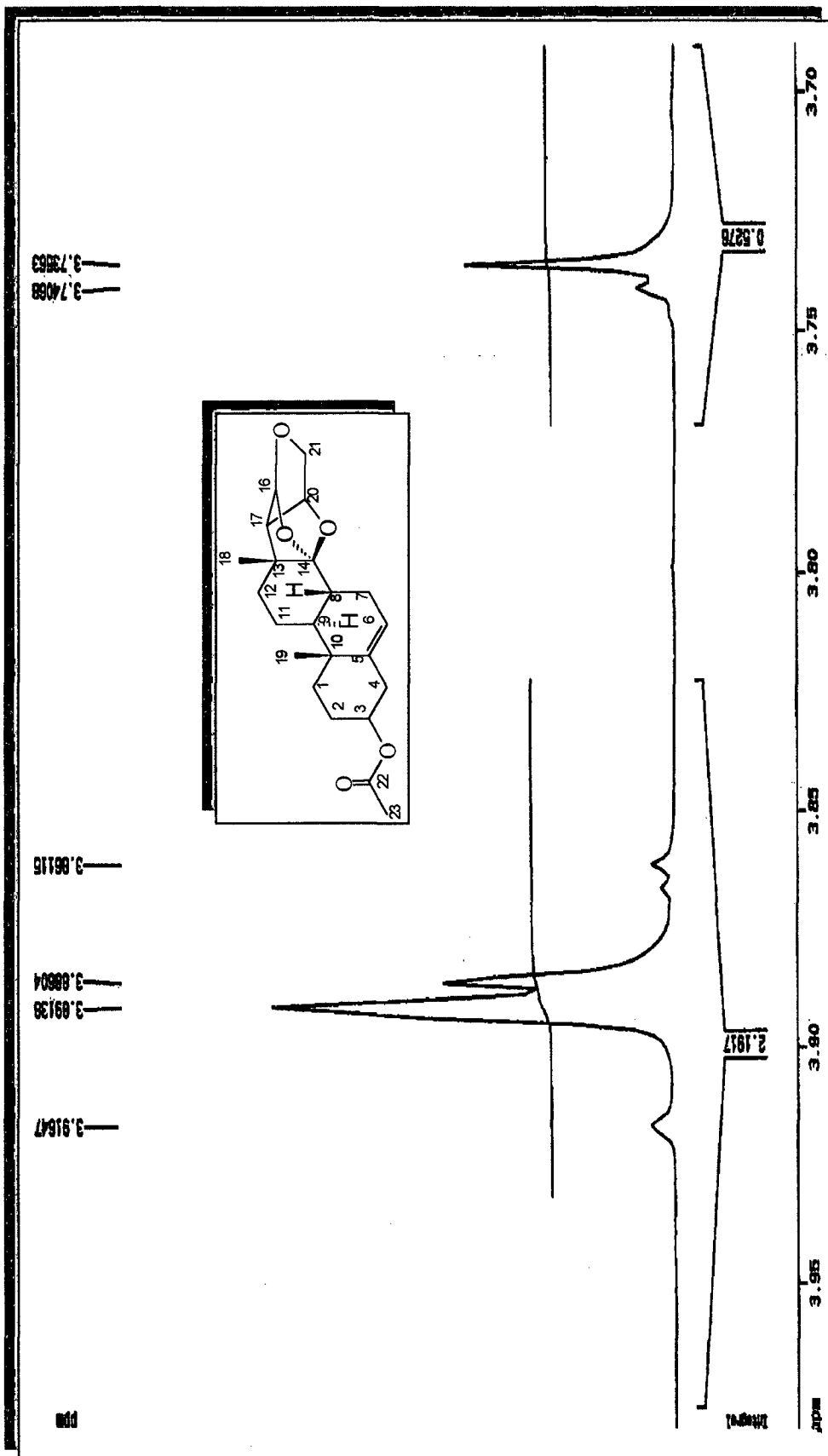


Figura 13 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-5 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 3,65 e 3,8 ppm

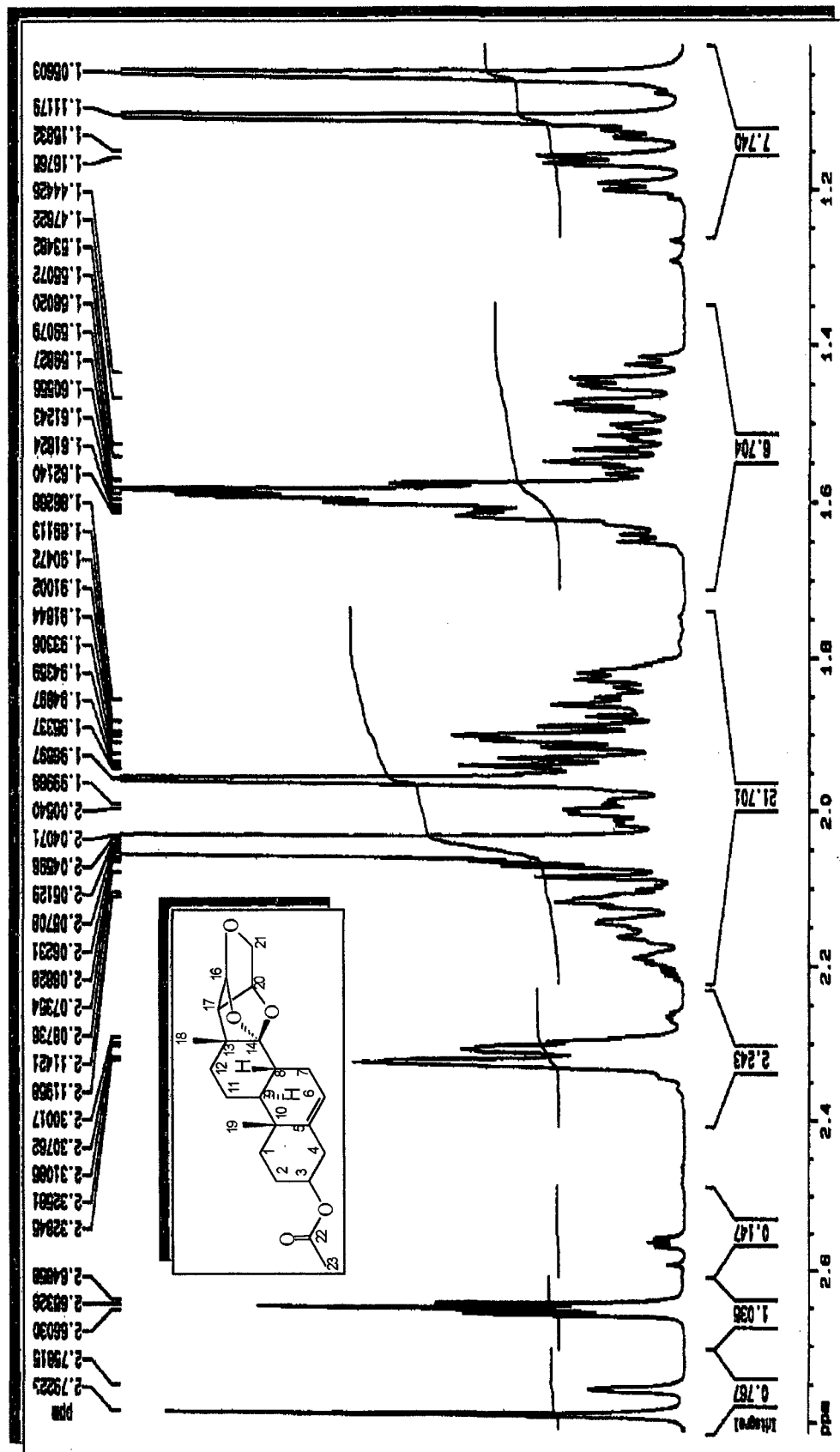


Figura 14— Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-5 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 1,0 e 2,8 ppm

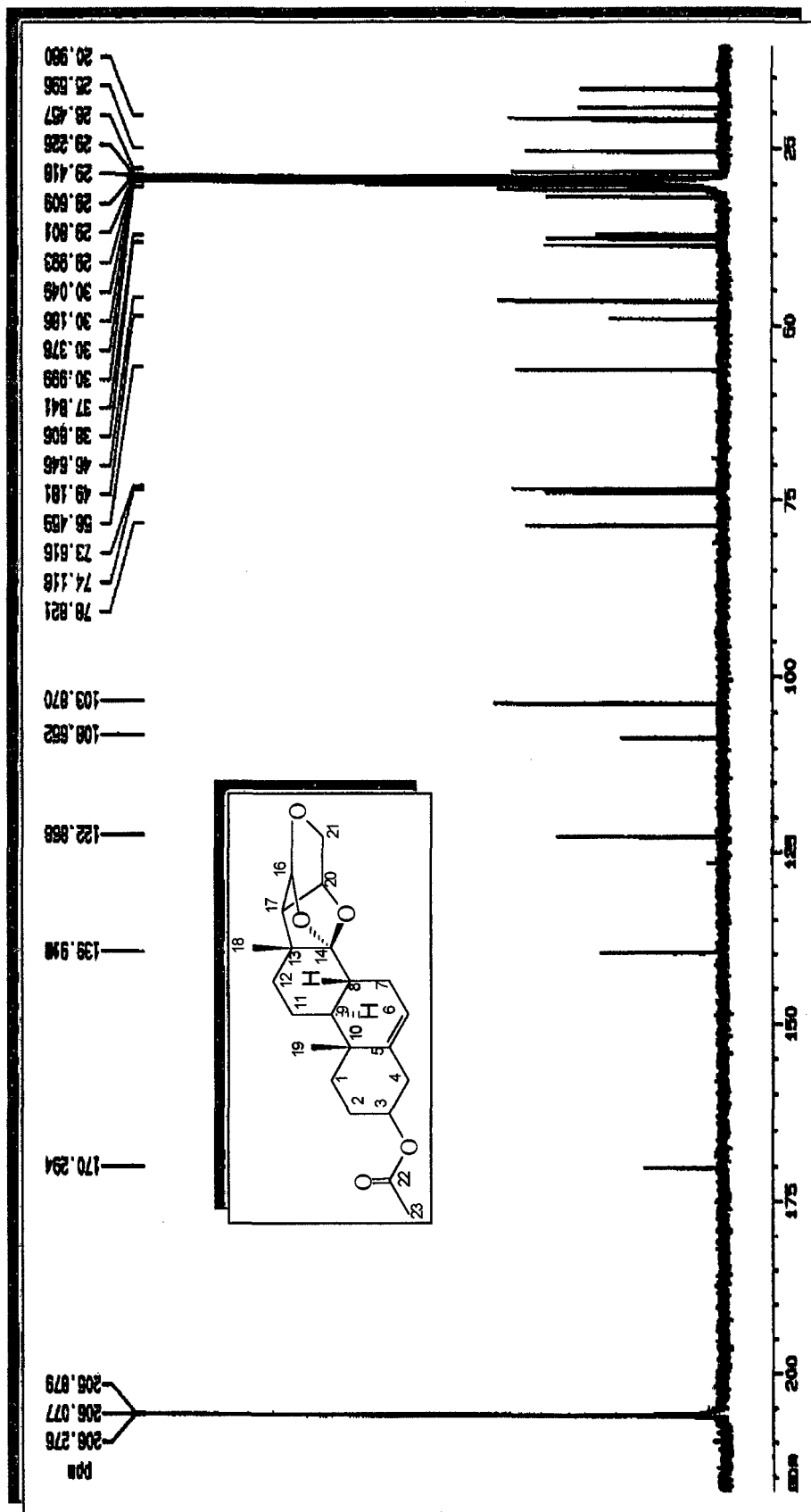


Figura 15 – Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto MI-5 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO



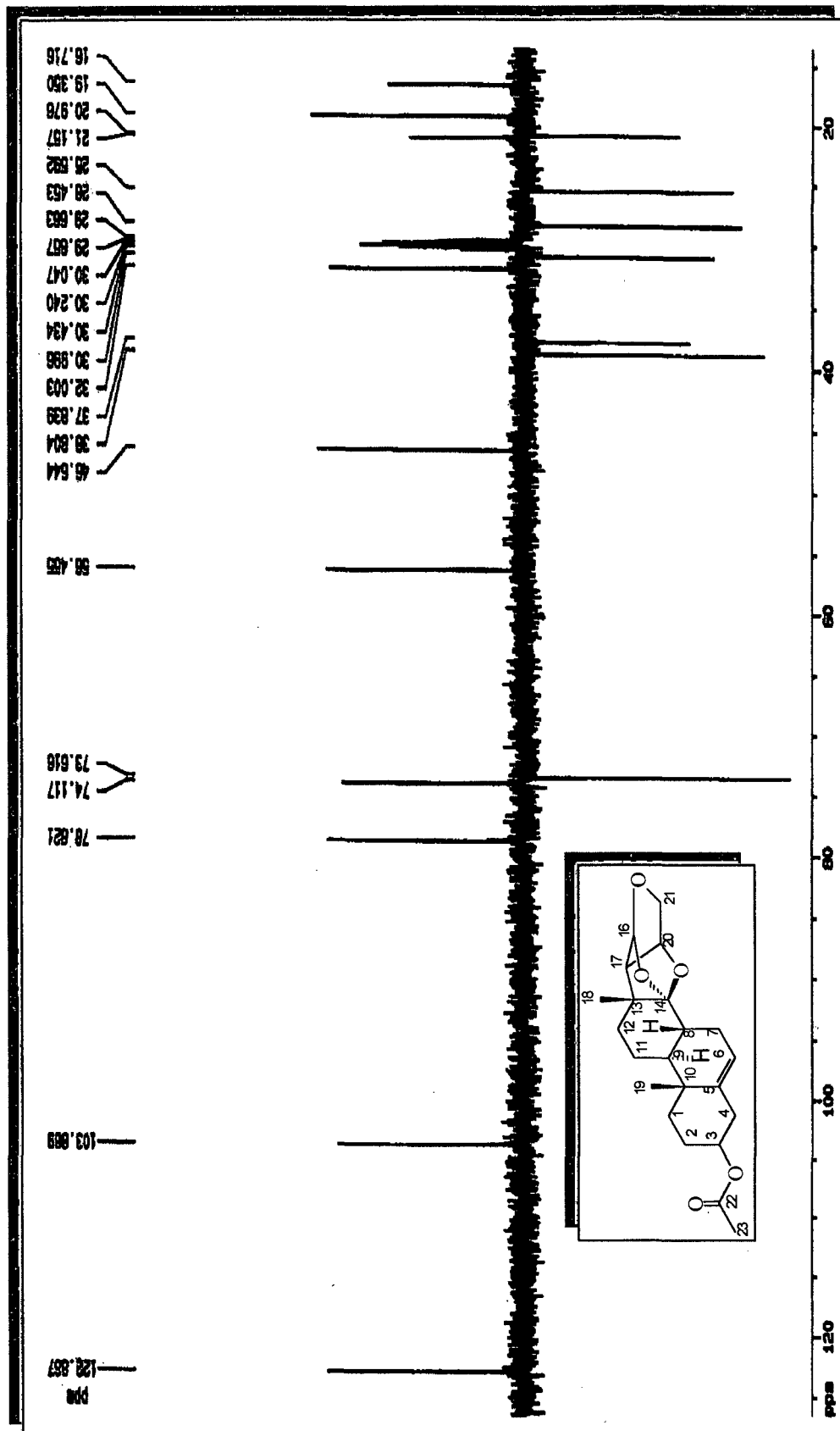


Figura 16 – Espectro de DEPT do composto MI-5 em  $(CD_3)_2CO$

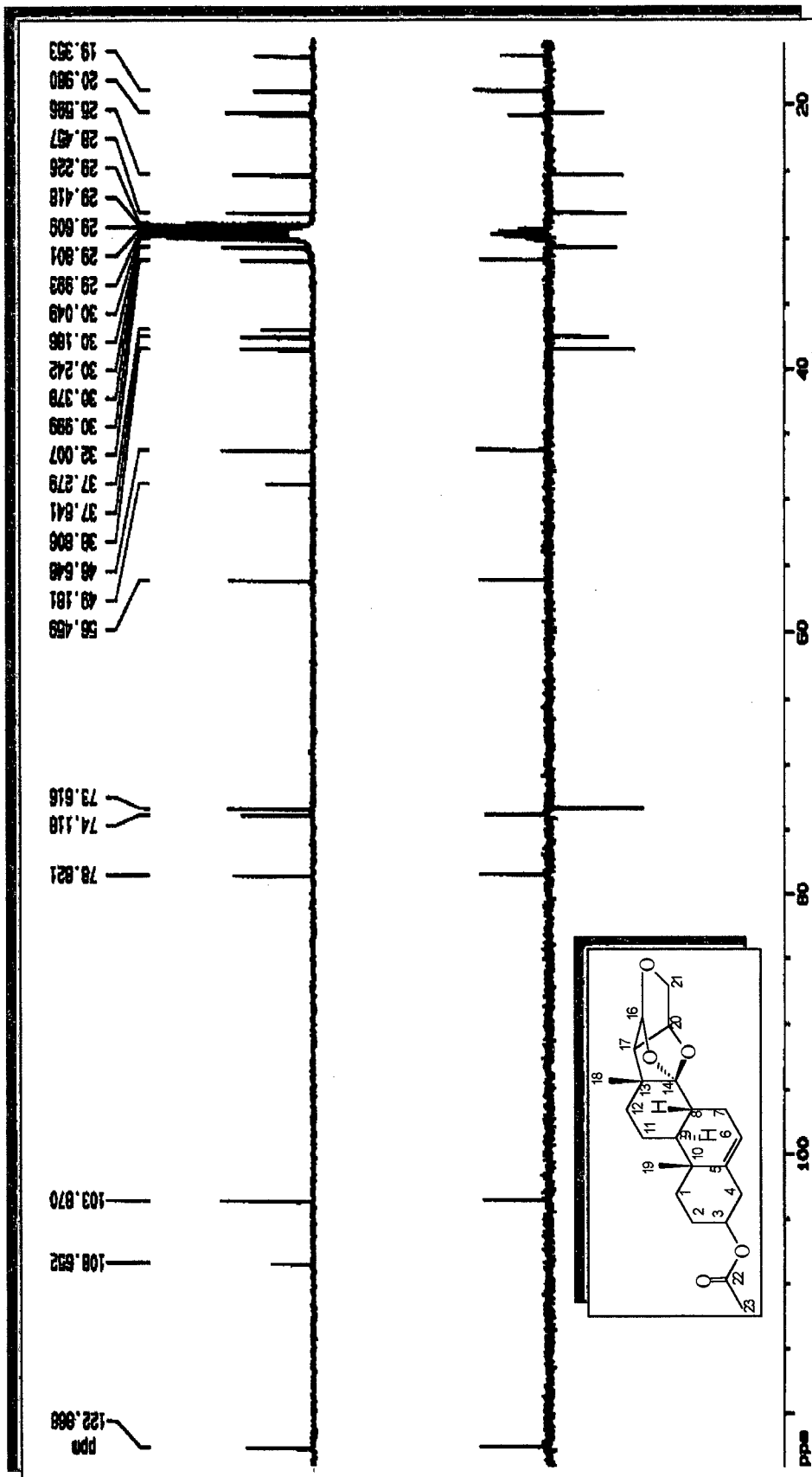


Figura 17 – Espectro de DEPT e <sup>13</sup>C-RMN do composto MI-5 expandido em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

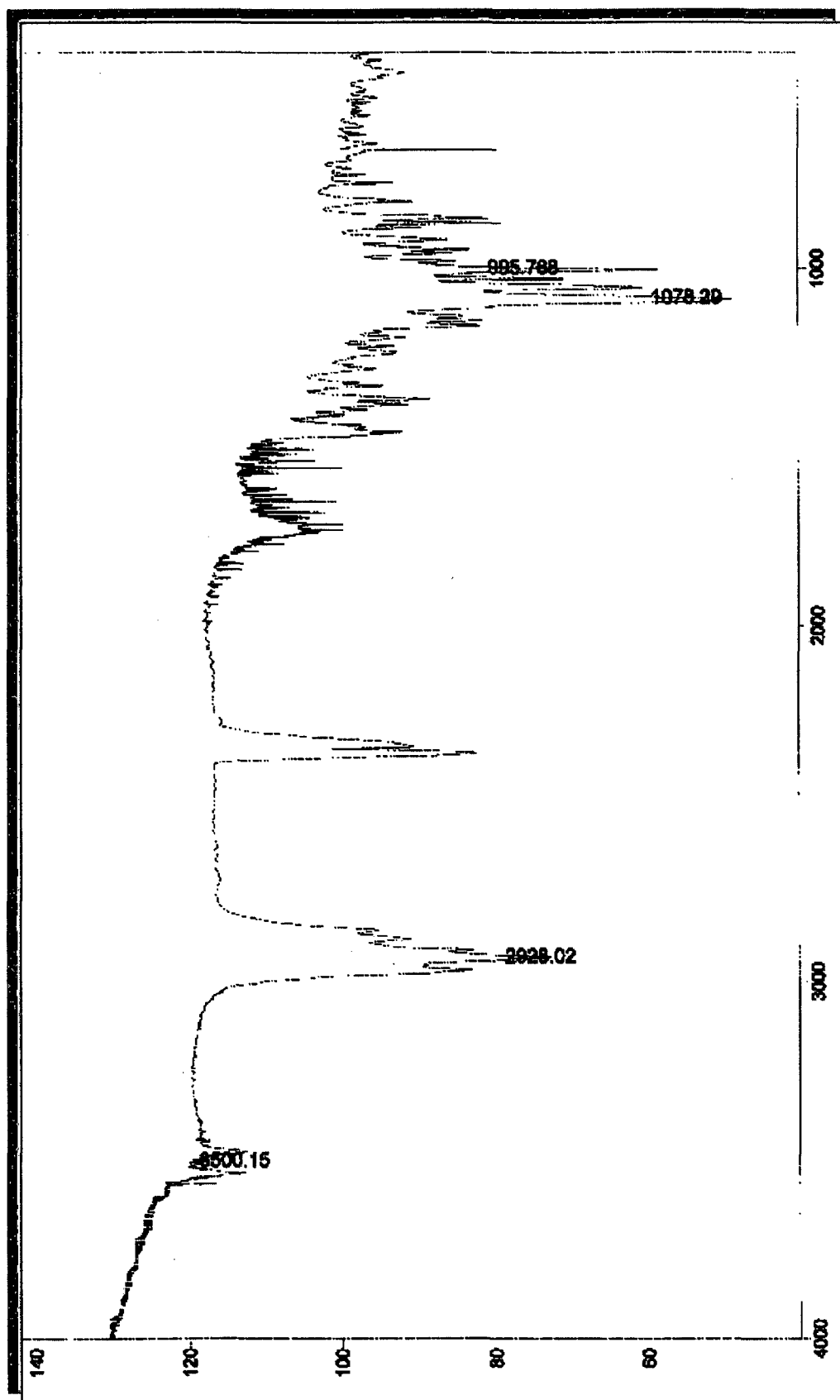


Figura 19 – Espectro de IV do composto MI-4 em KBr

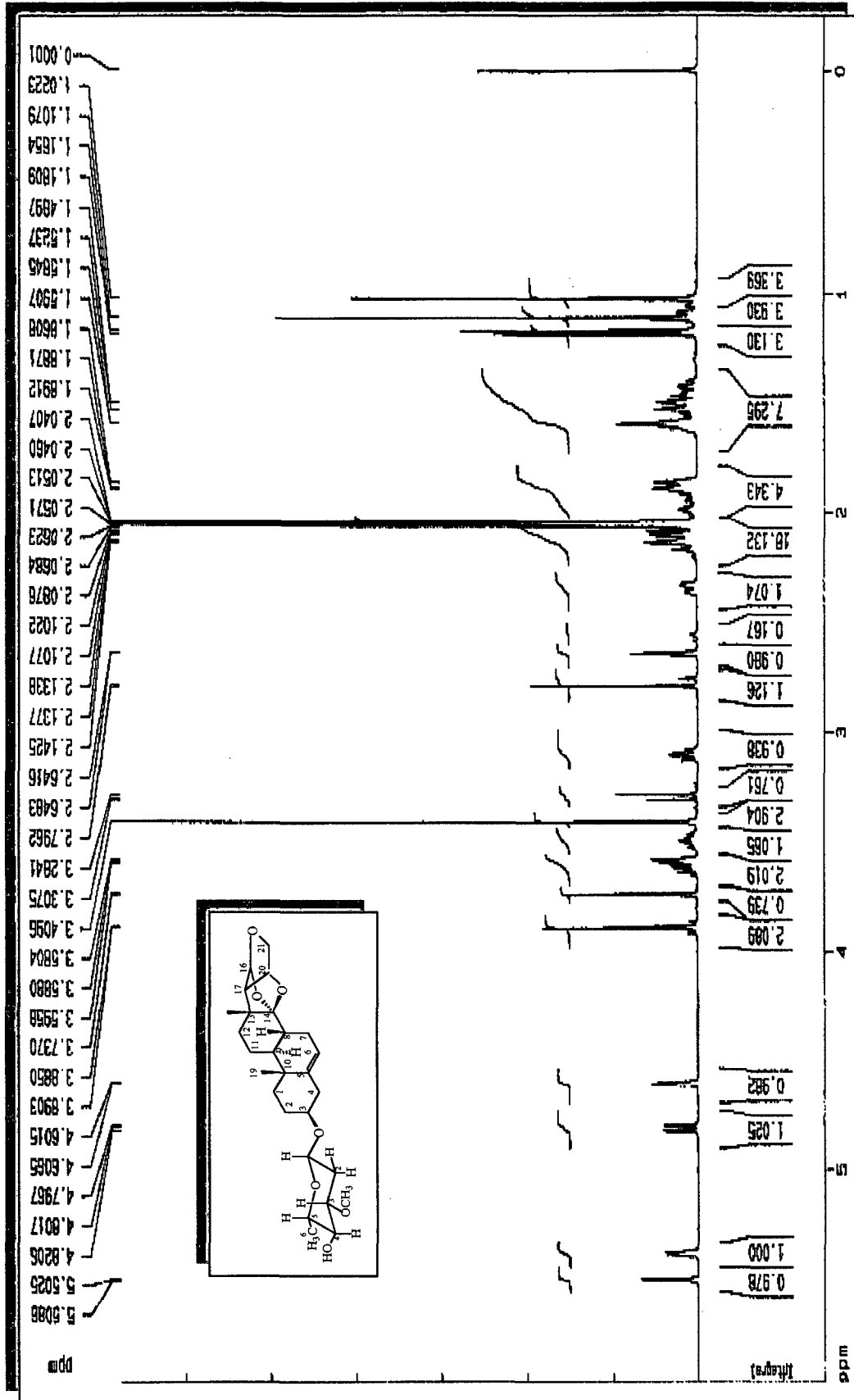


Figura 20 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-4 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

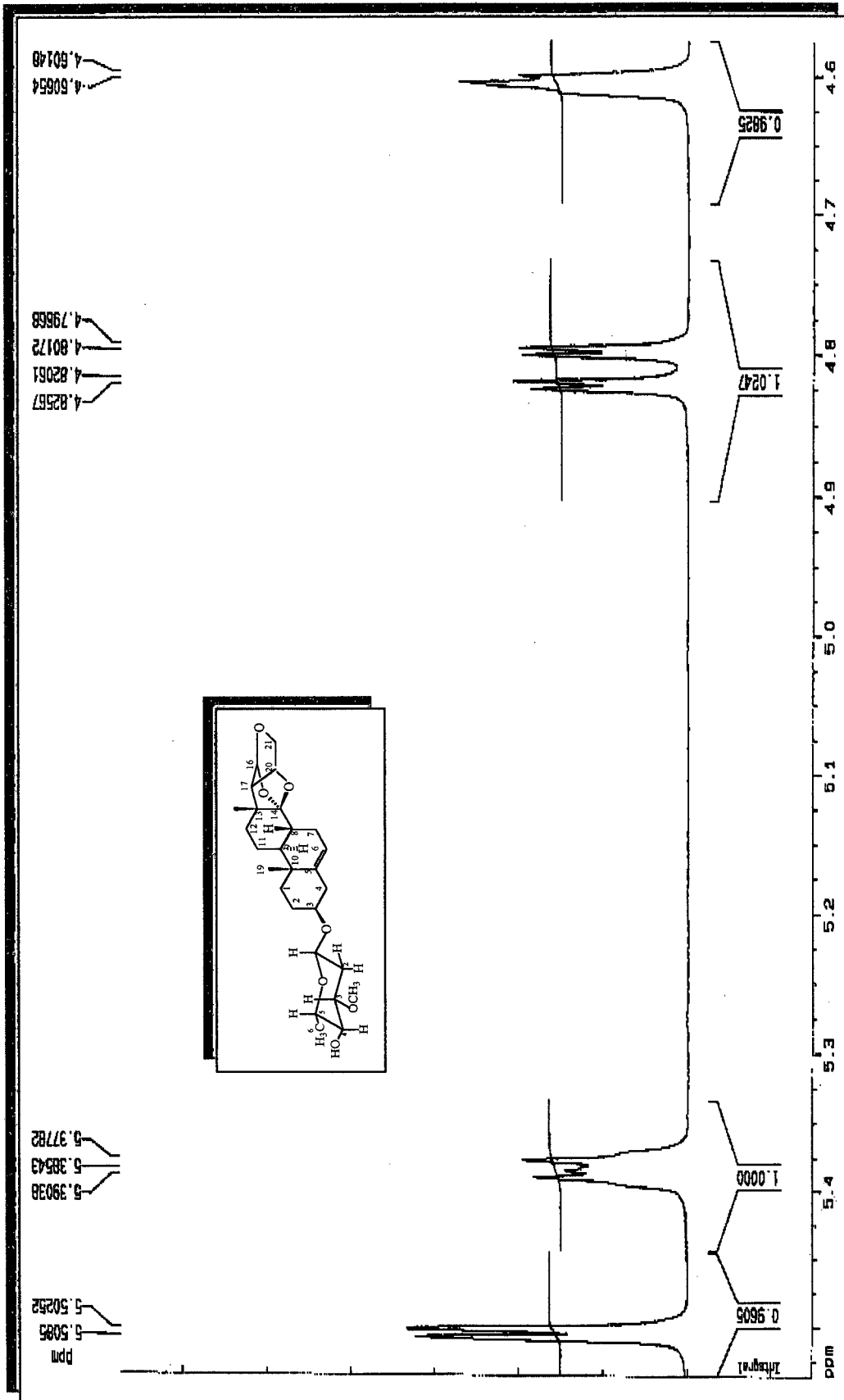


Figura 21 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-4 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 4,5 e 5,7 ppm

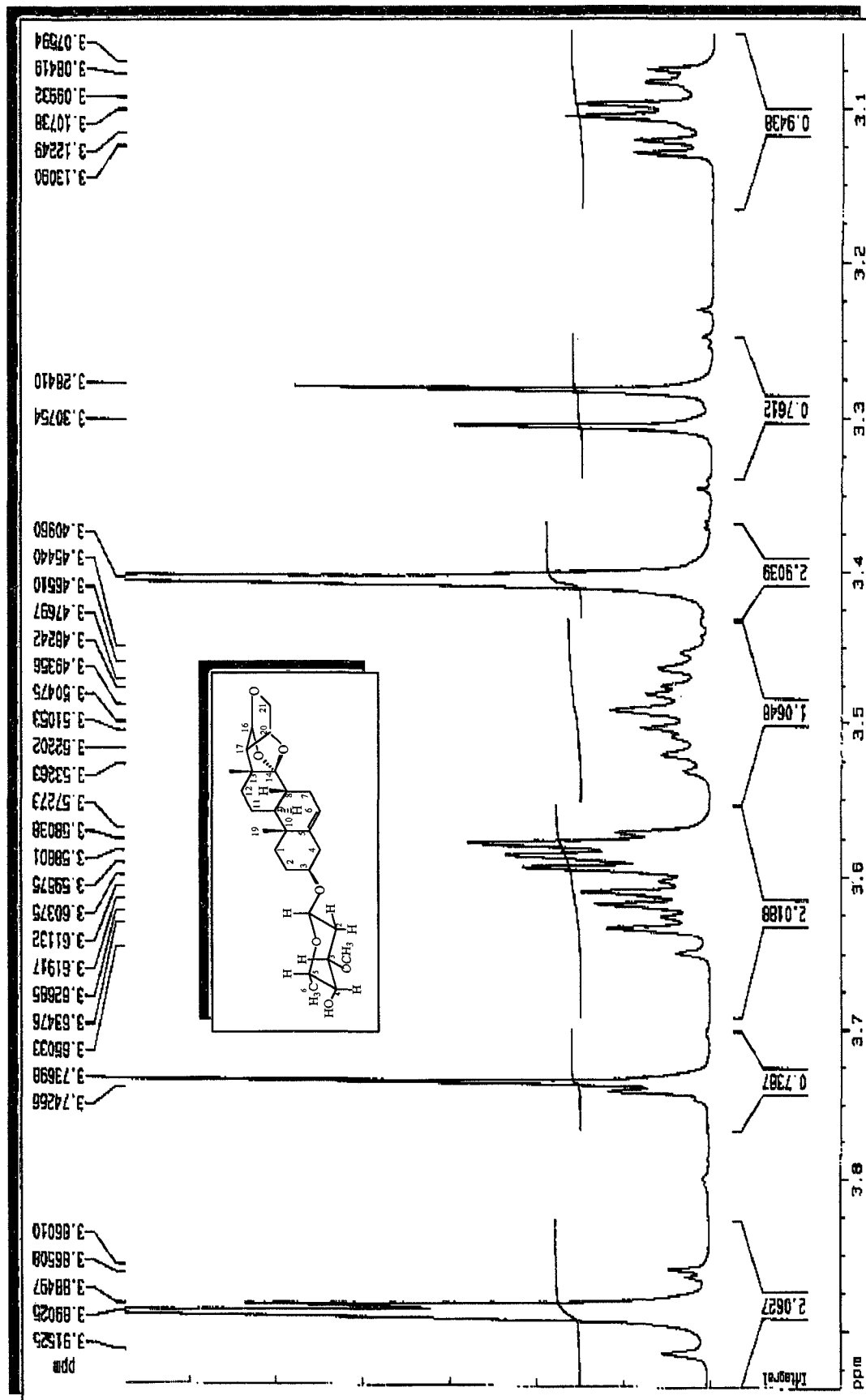


Figura 22 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-4 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 3,0 e 3,9 ppm

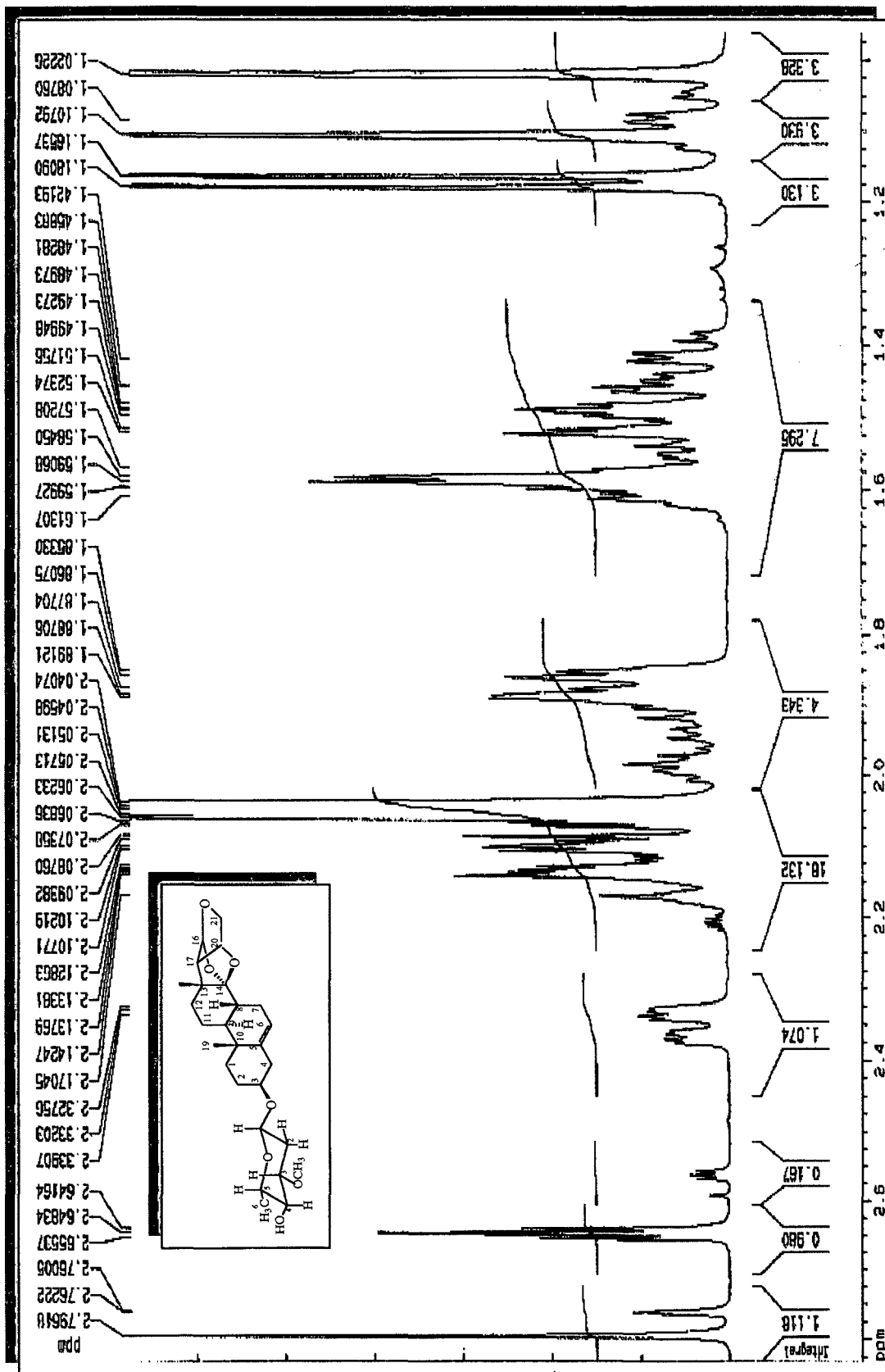


Figura 22 – Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto MI-4 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 1,0 e 2,5 ppm

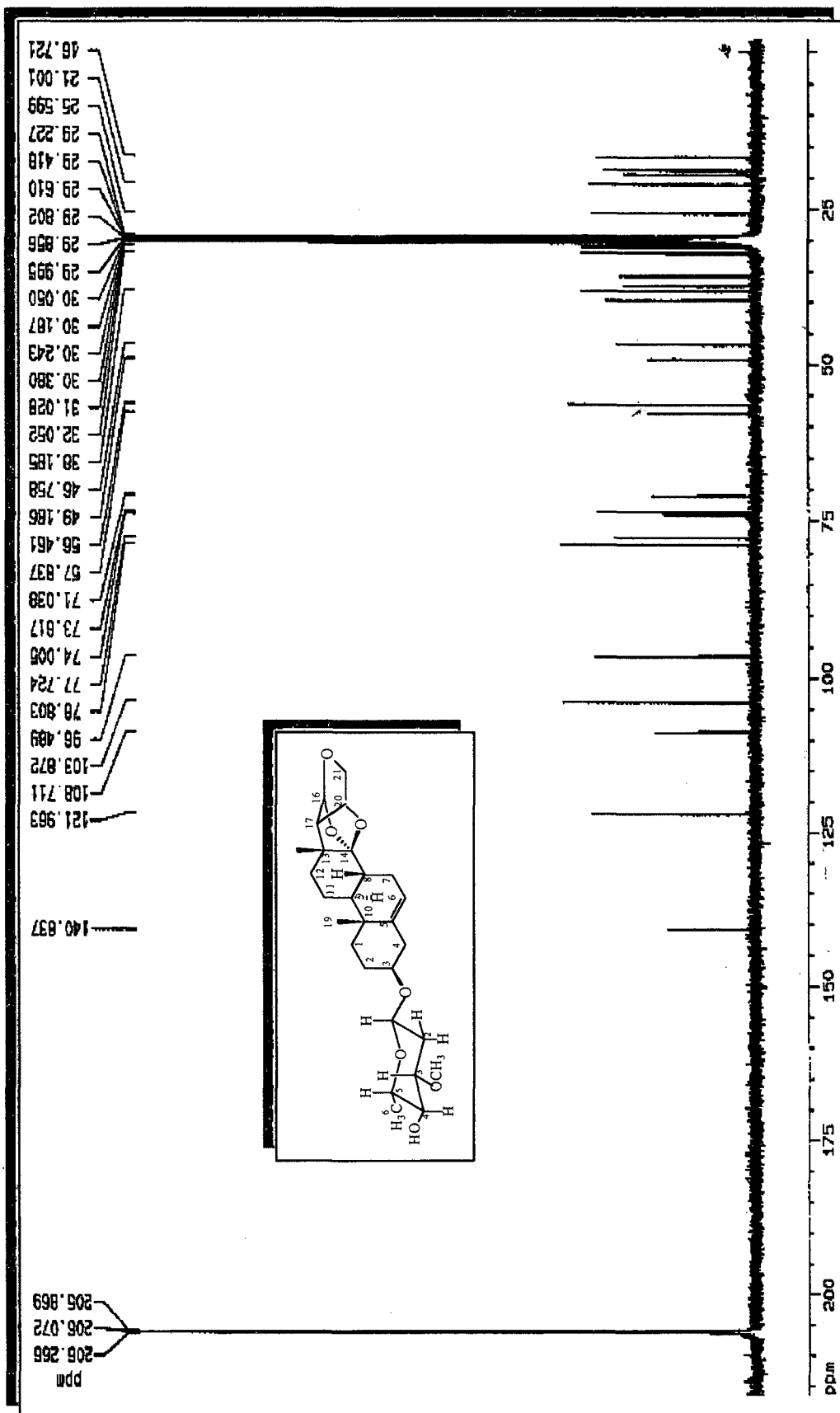


Figura 23 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto MI-4 em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$



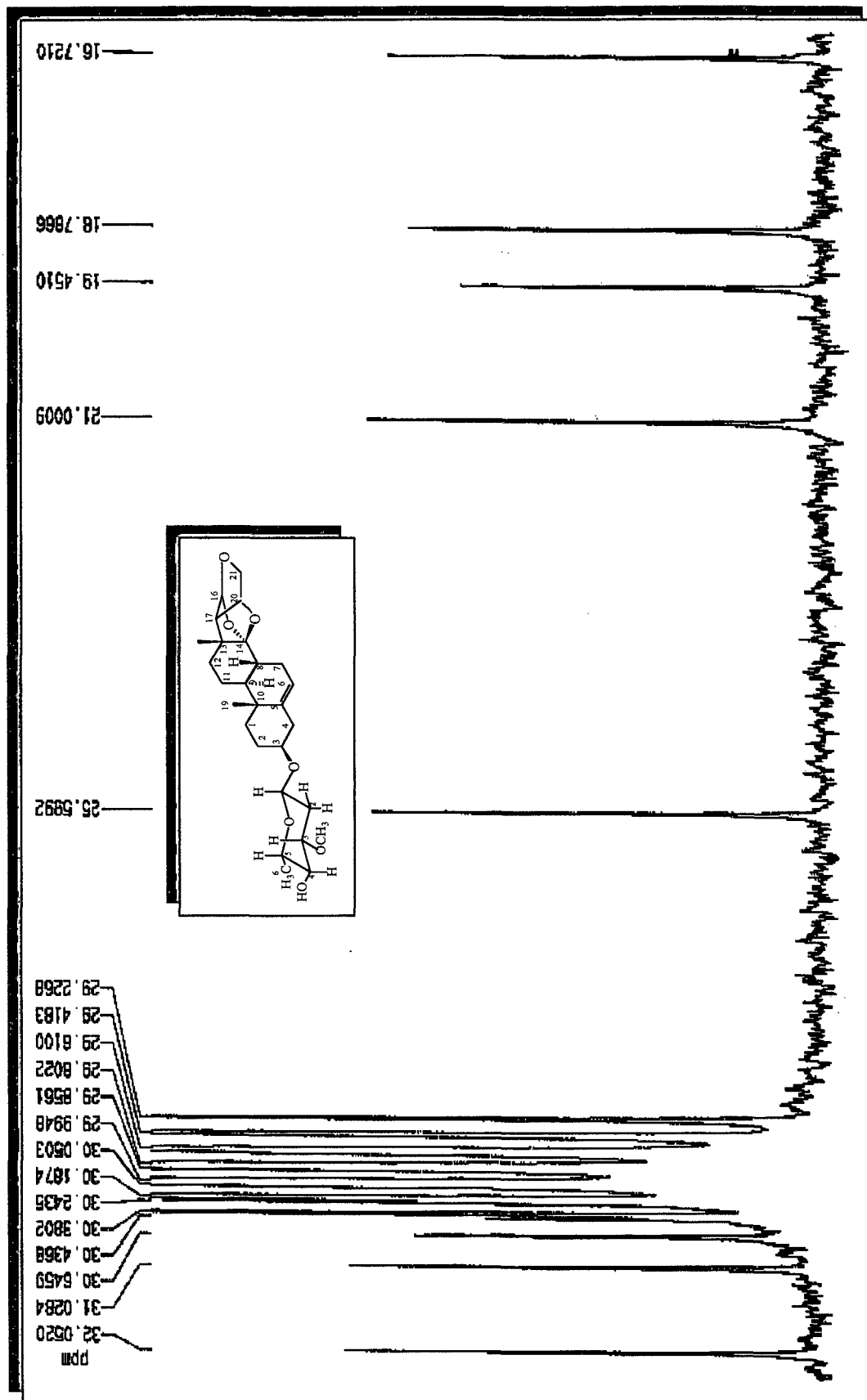


Figura 24 – Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto MI-4 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 15,0 e 33,0 ppm

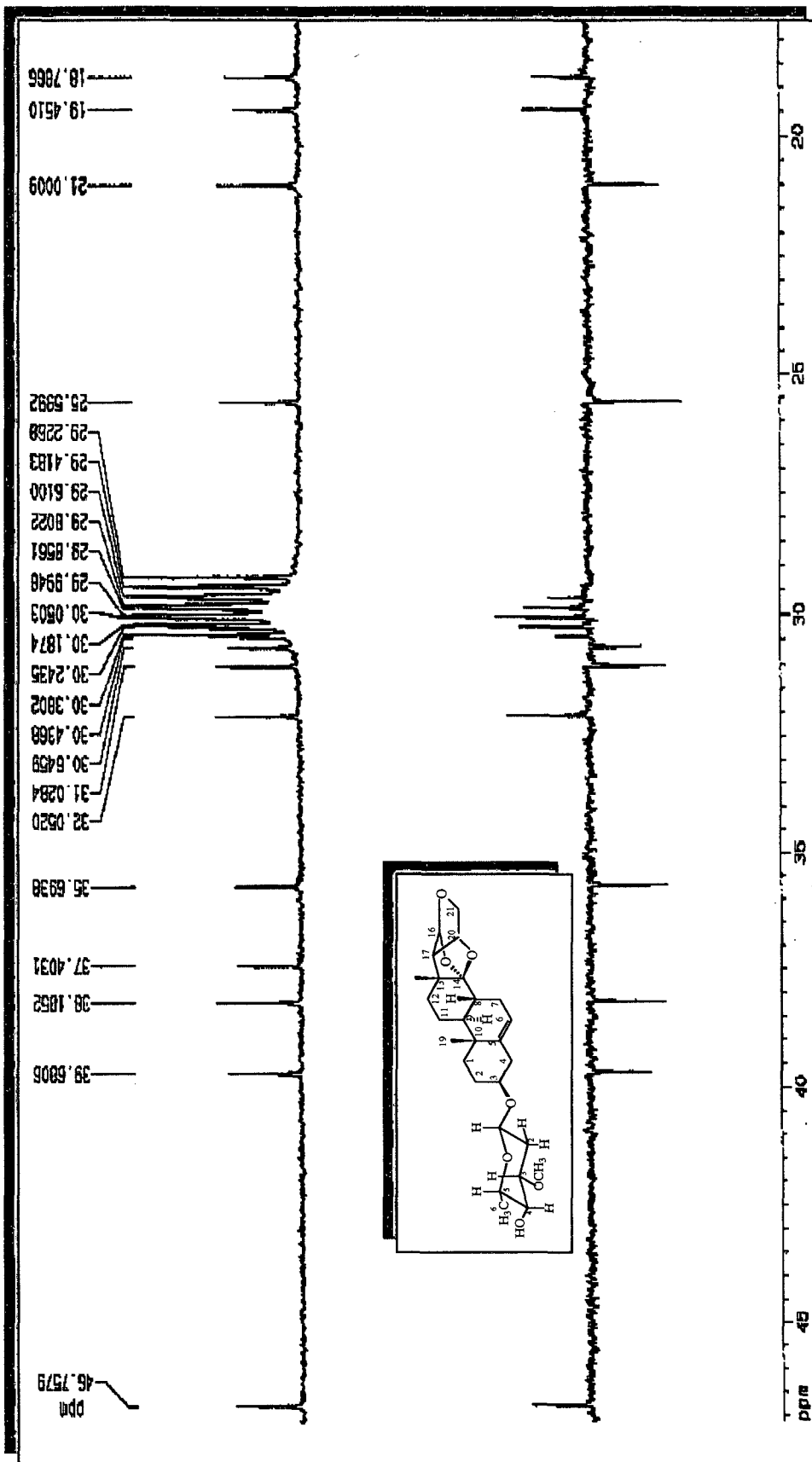


Figura 25 – Espectro de DEPT e <sup>13</sup>C-RMN do composto MI-4 em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO expandido entre 15,0 e 47,0 ppm

### **3.0. CAPÍTULO III: *Rubus imperialis* (Rosaceae)**

#### **3.1. METODOLOGIA**

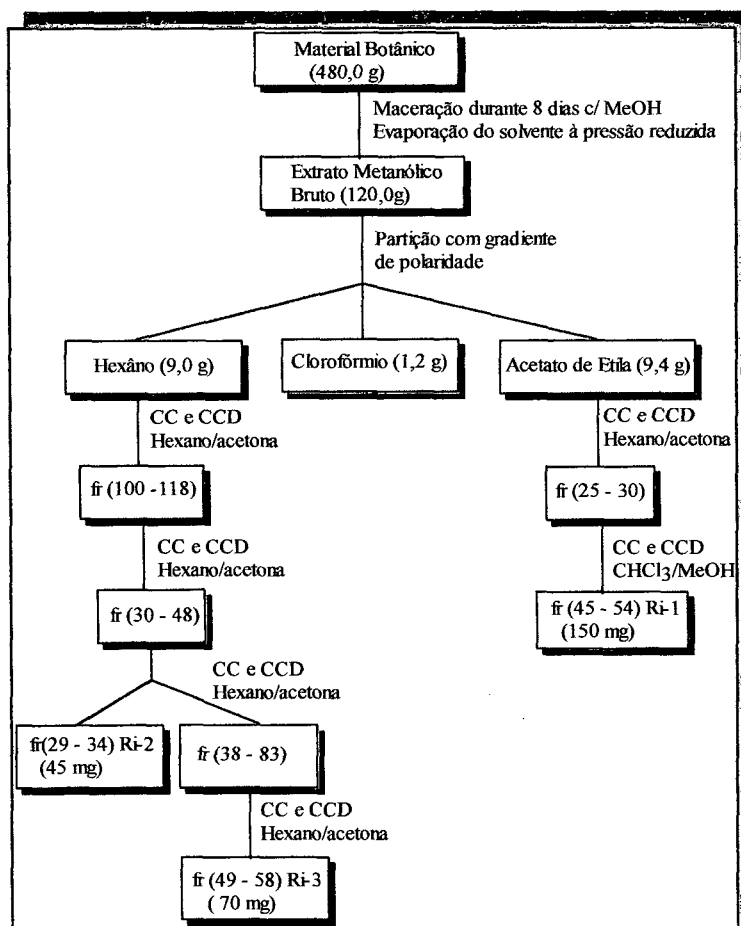
##### **3.1.1. Material Botânico**

As partes aéreas de *Rubus imperialis* foram coletadas no Horto-Botânico do Ibama, Córrego Grande, Florianópolis – SC, em junho de 1997 e identificada pelo Prof. Dr. Ademir Reis (Departamento de Botânica, UFSC). Uma exsicata está depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí – SC) sobre número V.C. Filho 012.

##### **3.1.2. Análise Fitoquímica**

O material vegetal moído e seco a temperatura ambiente (480 g), foi extraído mediante maceração com metanol durante 15 dias e posterior evaporação do solvente à pressão reduzida. Este extrato foi denominado de “Extrato Metanólico Bruto”. Este, foi particionado com diferentes solventes de polaridade crescente, como hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol para a obtenção das respectivas frações semi-purificadas<sup>5,22</sup>. Considerando que as frações de hexano e acetato de etila apresentaram interessante perfil fitoquímico, estas foram selecionadas para análise. Nesta etapa foram utilizados métodos cromatográficos convencionais como Cromatografia em coluna (CC) e Cromatografia em camada delgada (CCD). No processo de elucidação estrutural foram empregados métodos espectroscópicos como Infravermelho (IV), Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C). A fração de acetato de etila (9,4g), foi cromatografada em

coluna (2,0 x 50,0 cm) usando-se sílica gel 60 como adsorvente e eluída com um gradiente crescente de polaridade usando uma mistura de hexano/acetona. As frações coletadas foram reunidas através do monitoramento com cromatografia de camada delgada e recromatografadas usando-se uma mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  com aumento crescente de polaridade fornecendo 150 mg de um composto cristalino denominado **Ri-1**. Da mesma forma, a fração de hexano (9,0g), passou pelo mesmo processo de fracionamento com exceção do eluente, permitindo o isolamento de dois compostos denominados de **Ri-2** e **Ri-3** respectivamente. Um resumo das etapas realizadas se encontram na **figura 29**.



**Figura 29** – Etapas realizadas no fracionamento e purificação de *R. imperialis*

### **3.1.3. Análise Farmacológica**

Os teste farmacológicos foram, realizados pela equipe da Prof<sup>a</sup>. Márcia Maria de Souza, pertencente ao NIQFAR /CCS/UNIVALI.

#### **3.1.3.1. Atividade Analgésica**

**Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos:** Camundongos “Suiços” machos (25-30 g) foram mantidos sob temperatura controlada (~23°C) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “ad libitum”. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se “Teste das contorções abdominais” com ácido acético (0,6%, via intraperitoneal), que promove contorções abdominais seguido de extensão de uma das patas posteriores<sup>87,88</sup>. Os animais foram pré-tratados com os compostos isolados (1-60 mg/kg) via intraperitoneal, 30 min. antes da injeção de ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de uma solução salina (NaCl 0,9%, 10 mg/kg). Após a injeção do ácido acético, os animais foram colocados em cilindros de vidros individuais, e o número de contorções abdominais foi quantificada cumulativamente durante um período de 20 min.. A atividade analgésica foi então determinada tomando-se como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com o extrato ou compostos, comparados com o número de contorções abdominais dos animais controle (salina)<sup>87,88</sup>.

***Dor induzida pela formalina:*** Camundongos “suíços” machos (25-30 g) foram mantidos sob temperatura controlada (~23°C) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “ad libitum”. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se 20 µL de formalina (2,5%, s.c.) ou salina, injetados na região dorsal da pata posterior direita e esquerda do camundongo. Logo após, iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se durante 30 min., o tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata, considerando esse indicativo de dor. Os animais foram pré-tratados com o extrato de acetato de etila (1-30 mg/kg) ou com os compostos isolados (1-60 mg/kg) via intraperitoneal, 30 min antes. Foram injetados na região dorsal da pata posterior direita e esquerda do camundongo 20 µL de formalina (2,5%, s.c.) ou salina, respectivamente. Logo após, iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se durante 30 min.. O tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata, considerando esse indicativo de dor. Duas fases de sensibilidade são observadas nesse modelo, a primeira fase (dor neurogênica), aparece nos primeiros 5 min., e a segunda fase (dor inflamatória) ocorre entre 15 e 30 min. após a injeção da formalina, representando a resposta tônica a dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores químicos<sup>89,90</sup>.

## 3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

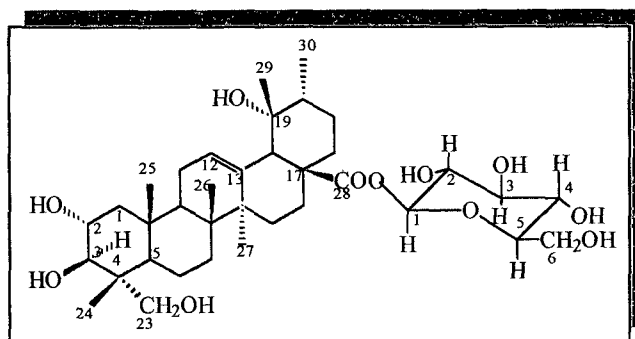
### 3.2.1. Análise Química

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, foi verificado que o extrato metanólico bruto da *R. imperialis* apresenta interessante ação antinociceptiva em camundongos (resultados não publicados), atraindo a atenção para uma investigação tanto química, quanto farmacológica. Através de uma análise fitoquímica preliminar, utilizando-se reagentes específicos e CCD, foi possível evidenciar a presença de distintas classes de compostos como esteróides, terpenóides, flavonóides e taninos<sup>91</sup>. As frações de acetato de etila e hexano por apresentarem uma melhor resolução cromatográfica, foram submetidas a sucessivas cromatografias em coluna, permitindo o isolamento de compostos denominados inicialmente de **Ri-1**, **Ri-2** e **Ri-3** além de uma mistura de fitoesteróis.

O composto **Ri-1** apresentou um ponto de fusão entre 230-231° C. No espectro de IV apresenta bandas de absorções de alguns grupos funcionais característicos como : 3418 cm<sup>-1</sup> (OH); 2930 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>); 1732 cm<sup>-1</sup> (COO); 1640 cm<sup>-1</sup> (C=C) (**figura 30 anexo II**).

O espectro de <sup>1</sup>H-RMN (**figura 31 anexo II**), apresenta sinais em δ 6,2 (*d*, *j* = 8,1 Hz), típico de próton anomérico; δ 5,54 (*s*, H-12); δ 2,92 (*s*, H-18); δ 3,25 (*t*, H-5); δ 3,71(*d*, *J*= 7,8Hz; H-3α); δ 5,15 (*q*, *J* = 10,5 Hz; H-23); e na região entre δ 1,0 - 1,61 (*s*, 6x CH<sub>3</sub>). Analizando-se o espectro de <sup>13</sup>C-RMN (**figuras 32-33 anexo II**), observa-se sinais característicos em δ 128,9 e 139,1 (C12-13C); δ 176,8 (C28). δ 95,61(G1); δ 79,1(G5); δ 78,61(G3); δ 70,9(G4); δ 73,7 (G2); δ 62,05 (G6); δ 78,0 (C3); δ 68,64 (C2); δ 72,33

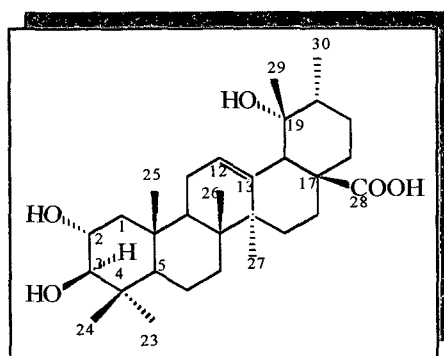
(C19). Um estudo comparativo destes sinais permitiram concluir que a estrutura do composto denominado anteriormente de **Ri-1**, tratata-se do triterpenóide glicosilado Nigaichigosideo F1. Todos os dados estão de acordo com aqueles reportados na literatura<sup>68, 92-93</sup>.



(Ri-1)

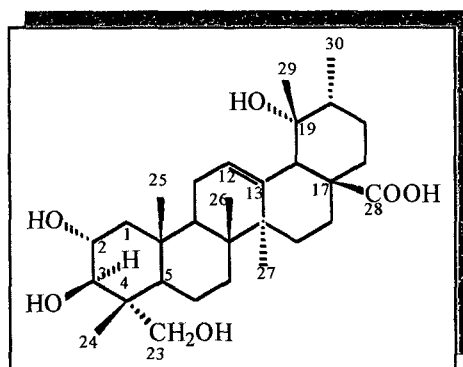
Da mesma forma, o composto **RI-2** apresentou ponto de fusão de 242-245<sup>0</sup>C, bandas de absorção no IV em 3450 cm<sup>-1</sup> (OH), 2924 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>), 1700 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1653 cm<sup>-1</sup>(C=C) e 1100 cm<sup>-1</sup> (figura 34 anexo II). Os espectros de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C, mostram sinais semelhantes ao **Ri-1** mencionado anteriormente, com exceção aos referentes à unidade glicosídea em C-28 e à função álcool em C-23. Assim se observa sinais em δ 3,05 (*s*, H-18); δ 3,13 (*t*, H-5); δ 3,68 (*d*, H-3 $\alpha$ ); e na região entre δ 1,01 - 1,72 (*s*, 7x CH<sub>3</sub>) (figura 35 anexo II). No espectro de RMN - <sup>13</sup>C, observa-se sinais em δ 139,7 e 127,6 (C12-13C); δ 83,6 (C3); δ 68,3 (C2); δ 72,43 (C19) e δ 180,4 (C28) (figuras 36-37 anexo II). Estes dados são consistentes com a literatura<sup>93</sup>, permitindo concluir que **Ri-2** trata-se do ácido tormêntico ou ácido-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19-hidroxi, 12 en, 28-oico.





(Ri-2)

Em relação ao composto **Ri-3**, também observa-se grande semelhança com o **Ri-1**, com exceção apenas dos sinais da unidade glicosídica. O espectro de IV mostra bandas características em  $3397\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $2929\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ ) e  $1689\text{ cm}^{-1}$  (C=O), (**figura 38 anexo II**). Os espectros de  $^1\text{H-RMN}$  e  $^{13}\text{C}$  mostram sinais semelhantes ao **Ri-1** com exceção apenas aos referentes a unidade glicosídica em C-28. Desta forma observa-se sinais de RMN - $^1\text{H}$  em  $\delta$  5,58 (s, H-12);  $\delta$  3,04 (s, H-18);  $\delta$  3,11 (t, H-5);  $\delta$  3,71 (d, H-3 $\alpha$ ) e na região entre  $\delta$  1,07 - 1,65 (s, 6x  $\text{CH}_3$ ). No espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$ , observa-se sinais característicos em  $\delta$  139,8 e 127,6 (C12-13C);  $\delta$  78,1 (C3);  $\delta$  68,7 (C2);  $\delta$  72,5 (C19);  $\delta$  66,2 (C23) e  $\delta$  180,5 (C28) (**figura 39-41 anexo II**). Estes dados estão de acordo com a literatura<sup>94-96</sup> e permite concluir que **Ri-3** se trata do ácido-23-hidroxi-tormentico ou ácido-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19,23-tetra-hidroxi, urs-12 en, 28-oico .



(Ri-3)

### 3.2.2. Análise Farmacológica

No intuito de avaliar a contribuição da ação antinociceptiva do extrato de acetato de etila e do composto isolado, estes foram analisados através de dois modelos de dor. Como pode ser observado na **tabela 2**, ambos causaram inibição significativa no número de contorções induzidas pelo ác. acético 0,6% i.p., com  $DI_{50}$  de 6,8 e 3,1 mg/kg e inibição máxima de 94,0 e 67,5 %, respectivamente. Da mesma forma, quando analisados no modelo de dor induzido pela formalina, tanto o extrato de acetato de etila como o composto exibiram interessante ação antinociceptiva em ambas as fases de dor. Como pode ser notado nas **tabelas 3 e 4**, o composto Niga-ichigosídeo F1 foi cerca de 30 vezes mais potente do que alguns fármacos usados na clínica, como a aspirina e o paracetamol<sup>97</sup>.

**Tabela 2** - Efeito antinociceptivo do Acetato de Etila (AE) e Niga-ichigosídeo F1 obtido de *R. imperialis*, no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos, i.p

Tratamento	$DI_{50}$ (mg/kg, i.p.)	$DI_{50}$ ( $\mu$ mol/kg, i.p.)	% IM <sup>b</sup>
AE	6,8 ( 1,8 – 5,0)	-	94,0 $\pm$ 1,5
Niga-ichigoside F <sub>1</sub>	3,1 (1,7 – 5,6) <sup>a</sup>	4,6 (2,6-8,5)	67,6 $\pm$ 1,8
Aspirina	24,0 (13,0-44,0)	133,0 (73,0 – 243,0)	83,0 $\pm$ 1,4
Paracetamol	19,0 (16,0 – 23,0)	125,0 (104,0-250,0)	88,0 $\pm$ 1,0

<sup>a</sup>Limite de confiança de 95%, com cada grupo representando uma média de 6 animais Valores de P < 0.05 foram considerados como indicativo de significância. <sup>b</sup>Inibição Máxima

**Tabela 3** - Efeito antinociceptivo do extrato de Acetato de Etila (AE) e Niga-ichigosídeo F1 obtido de *R. imperialis*, no modelo da formalina (1ª fase), i.p.

tratamento	Primeira Fase		
	DI <sub>50</sub> (mg/kg, i.p.)	DI <sub>50</sub> (μmol/kg, i.p.)	% IM <sup>b</sup>
AE	35,7(18,6 – 68,5) <sup>a</sup>	-	72,3 ± 2,0
Niga-ichigosídeo F1	2,6 (1,4 – 4,7)	3,9 (2,1-7,1)	70,4 ± 6,0
aspirina	inativo	-	-
paracetamol	inativo	-	-

<sup>a</sup>Limite de confiança de 95%, com cada grupo representando uma média de 6 animais Valores de P < 0.05 foram considerados como indicativo de significância. <sup>b</sup>Inibição Máxima

**Tabela 4**- Efeito antinociceptivo do extrato de AE e Niga-ichigosídeo F1 obtido de *R. imperialis*, no modelo da formalina (2ª fase), i.p.

Tratamento	Segunda Fase		
	DI <sub>50</sub> (mg/kg, i.p.)	DI <sub>50</sub> (μmol/kg, i.p.)	% IM <sup>b</sup>
AE	23.9 (12.5 -45.9) <sup>a</sup>	-	89.9 ± 3.8
Niga-ichigosídeo F1	2.7 (1.5 - 4.9)	4.1 (2.3-7.4)	94.0 ± 3.5
Aspirina	22.1(13.9-37.6)	123.0 (77.0-209.0)	88.0 ± 3.0
Paracetamol	18.1(13.6-24.3)	120.0 (90.0-161.0)	85.0 ± 3.5

<sup>a</sup>Limite de confiança de 95%, com cada grupo representando uma média de 6 animais Valores de P < 0.05 foram considerados como indicativo de significância. <sup>b</sup>Inibição Máxima

Um dado relevante foi observado quando se investigou o **Ri-3** (ácido 23-hidroxi-tormentico). Quando analisado no modelo da formalina, este composto apresentou efeito antinociceptivo moderado somente na segunda fase (inflamatória), sendo praticamente inativo na primeira fase (neurogênica) do teste. Comparando estes resultados com Niga-ichigosídeo F1 (**tabela 5**), observa-se que, embora tenham estruturas semelhantes, o **Ri-3** foi muito menos ativo, sugerindo que a unidade glicosídica é um fator importante na ação farmacológica destes compostos. Outro dado importante pode ser observado quando o ác. 23-hidroxi-tormêntico (**Ri-3**), é comparado com o ác. 24-hidroxi-tormêntico. O fato do grupo hidroxila estar no carbono 24, contribui para um aumento do percentual de inibição (**tabela 5**).

**Tabela 5** - Efeito antinociceptivo comparativo entre Ác. 23-OH-tormêntico e Niga-ichigosídeo F1 obtido de *R. imperialis*, no modelo da formalina (10 mg/kg, i.p.)

Tratamento	Primeira Fase (% IM)	Segunda Fase (% IM)
Ác. 24-OH-tormêntico	45,5 ± 2,0	54,6 ± 5,0
Ác. 23-OH-tormêntico	14,4 ± 3,0	42,7 ± 4,0
Niga-ichigosídeo F <sub>1</sub>	70,4 ± 6,0	94,0 ± 3,5
Aspirina §	17,3 ± 2,0	38,7 ± 4,0
Indometacina*	6,6 ± 1,0	33,0 ± 5,0

Valores de  $P < 0.05$  foram considerados como indicativo de significância, com cada grupo representando uma média de 6 animais

\* Macedo et al 1999<sup>98</sup> ; § Campos et al, 1997<sup>99</sup>

**ANEXO II**

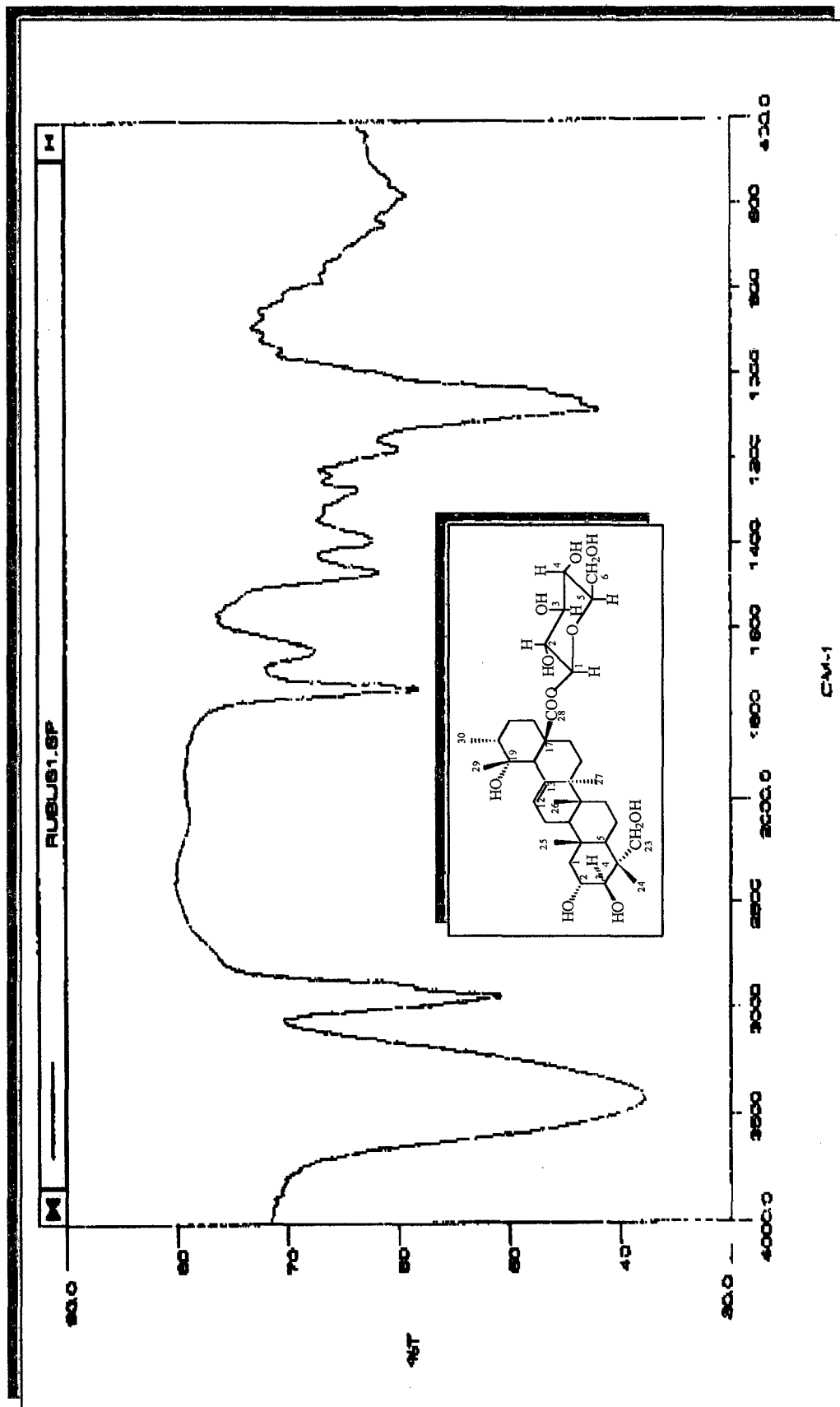


Figura 30 - Espectro de IV do composto Ri-1 em KBr

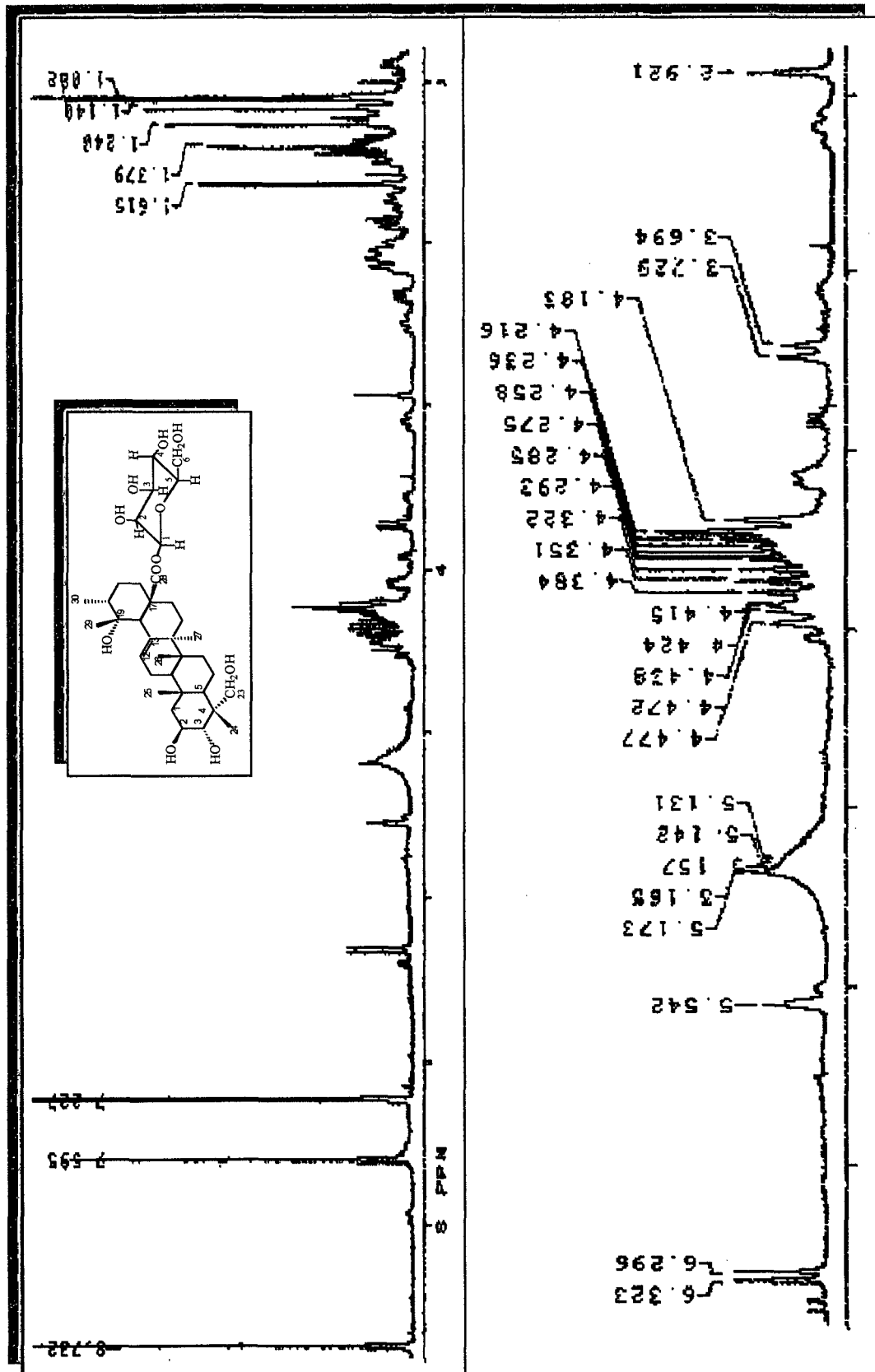


Figura 31 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto Ri-1 em Piridina-d<sub>5</sub>

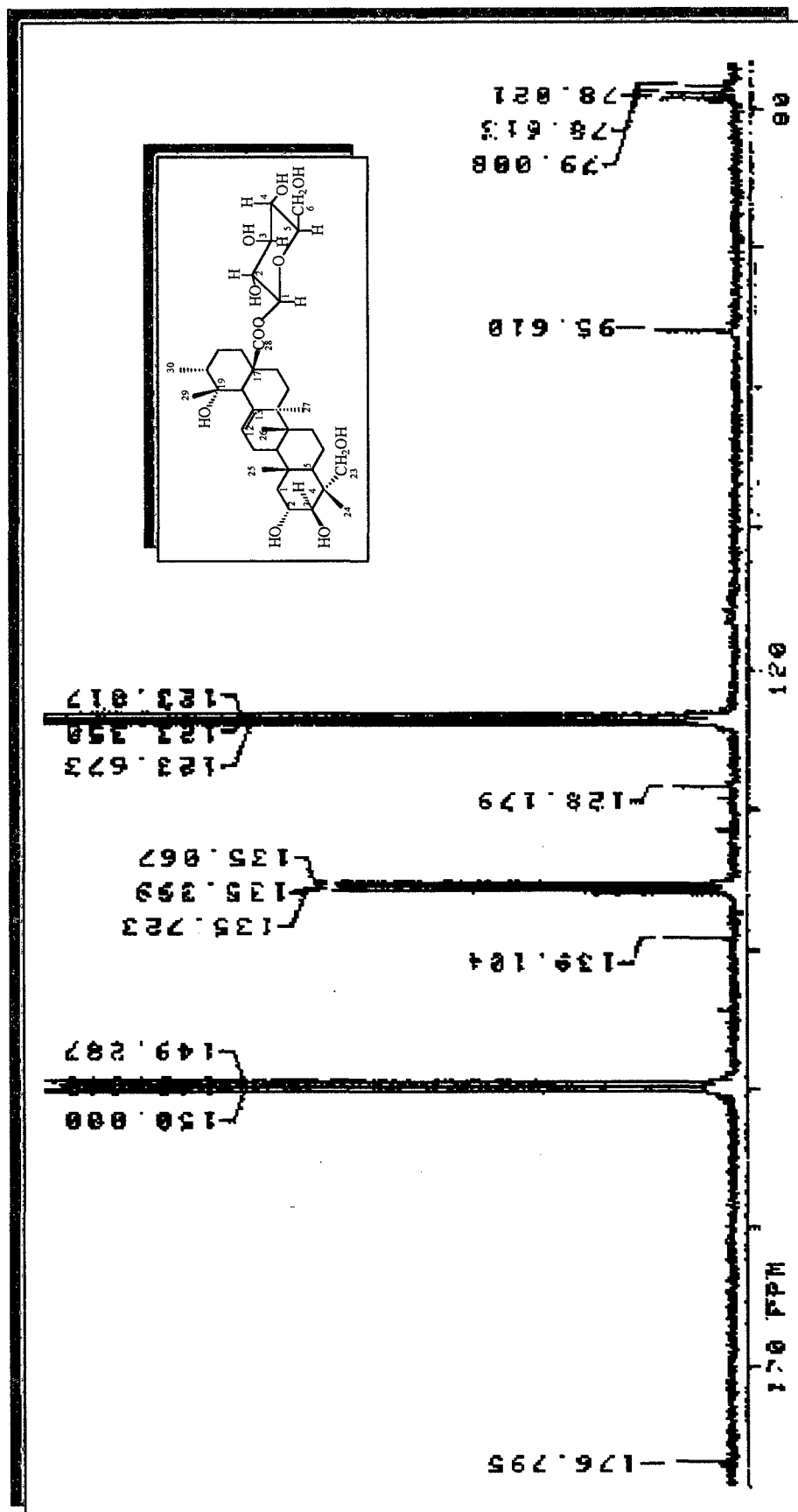


Figura 32 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto Ri-1 entre 77 e 180 ppm, em Piridina-d<sub>5</sub>



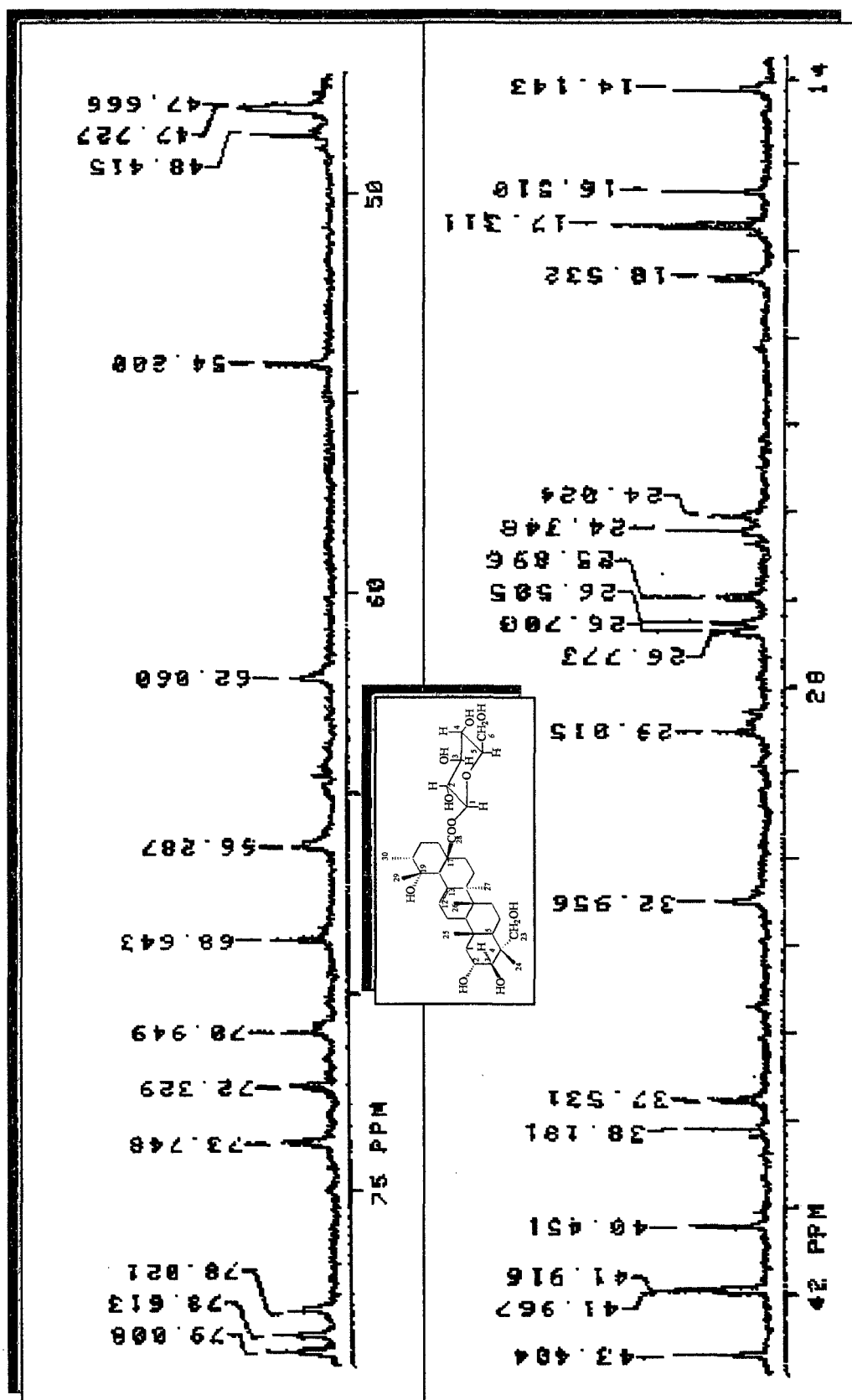


Figura 33 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto Ri-1 entre 14 e 80 ppm, em Piridina-d<sub>5</sub>

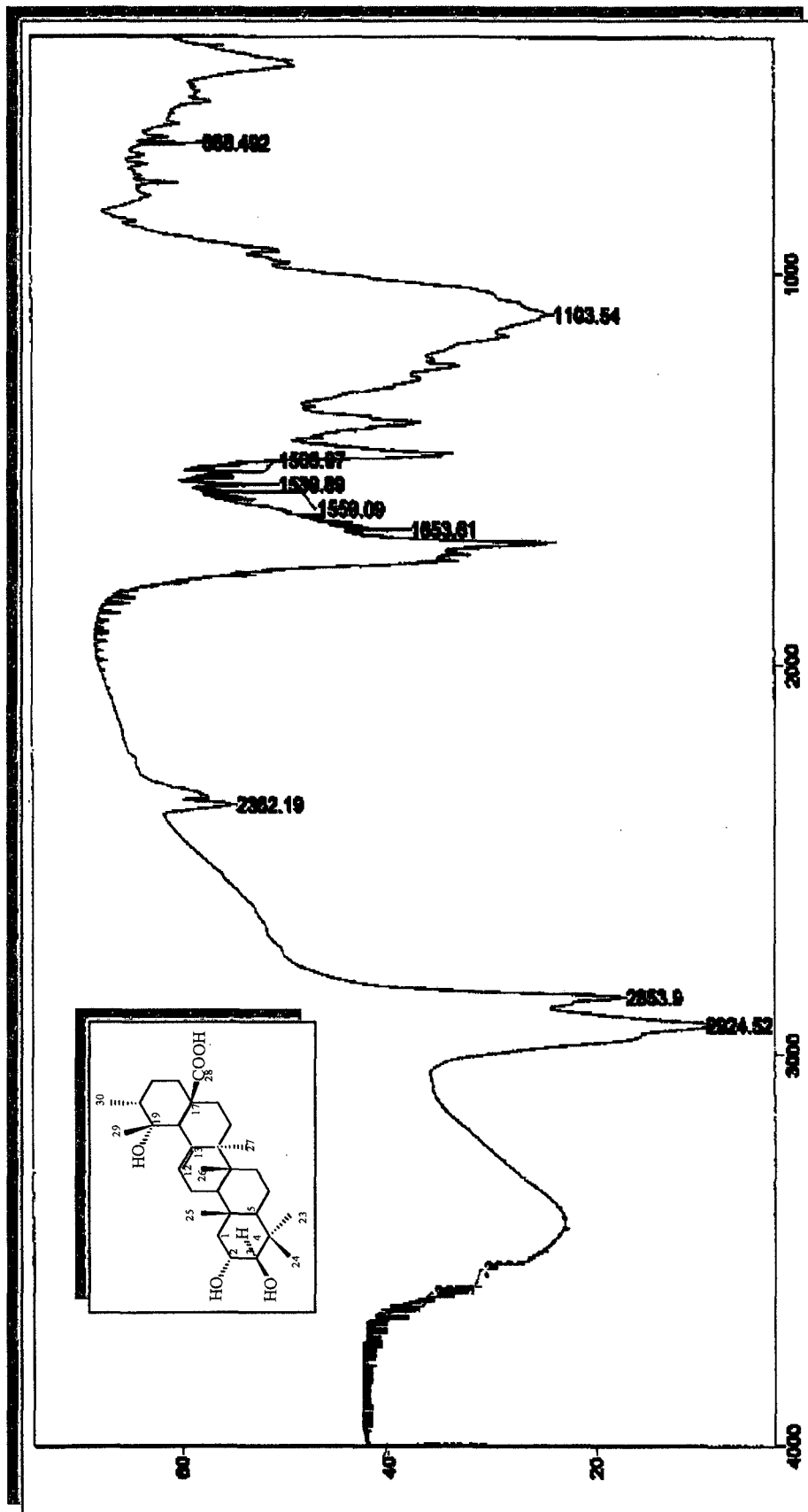


Figura 34 - Espectro de IV do composto Ri-2 em KBr



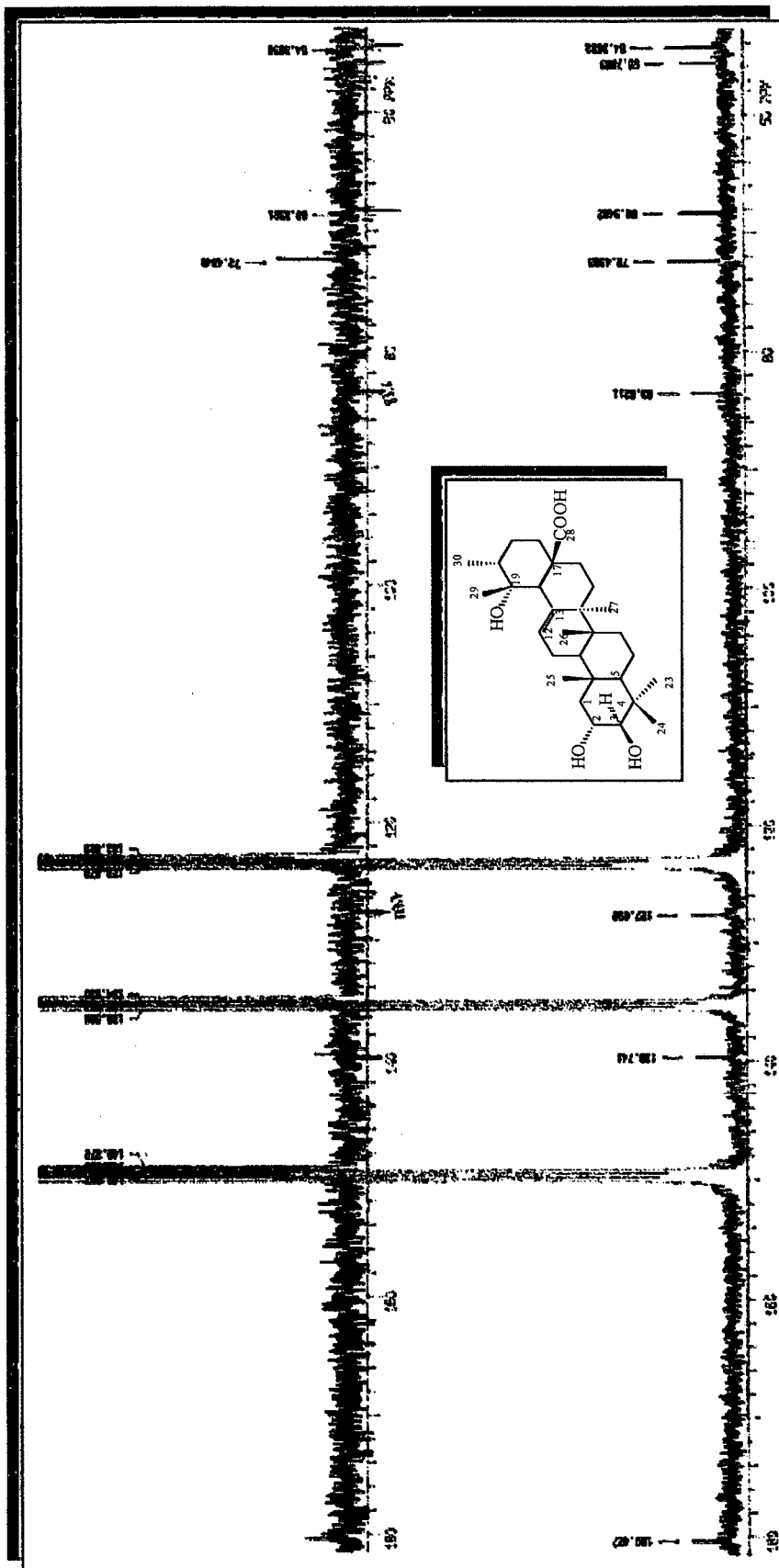


Figura 36 - Espectros de <sup>13</sup>C-RMN e APT do composto R1-2 em Piridina-d<sub>5</sub>

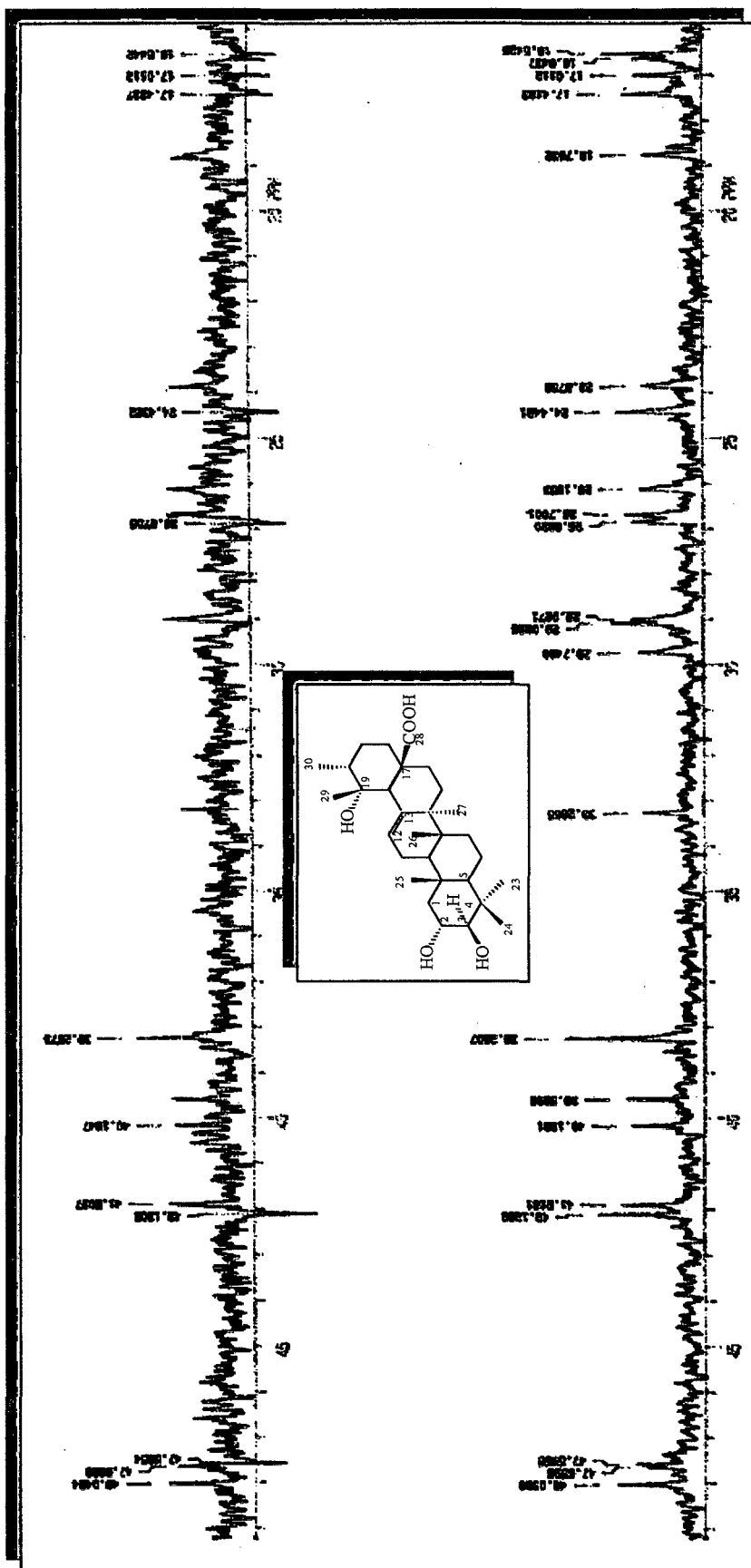


Figura 37 - Espectros de <sup>13</sup>C-RMN e APT do composto R1-2 em Piridina-d<sub>5</sub>

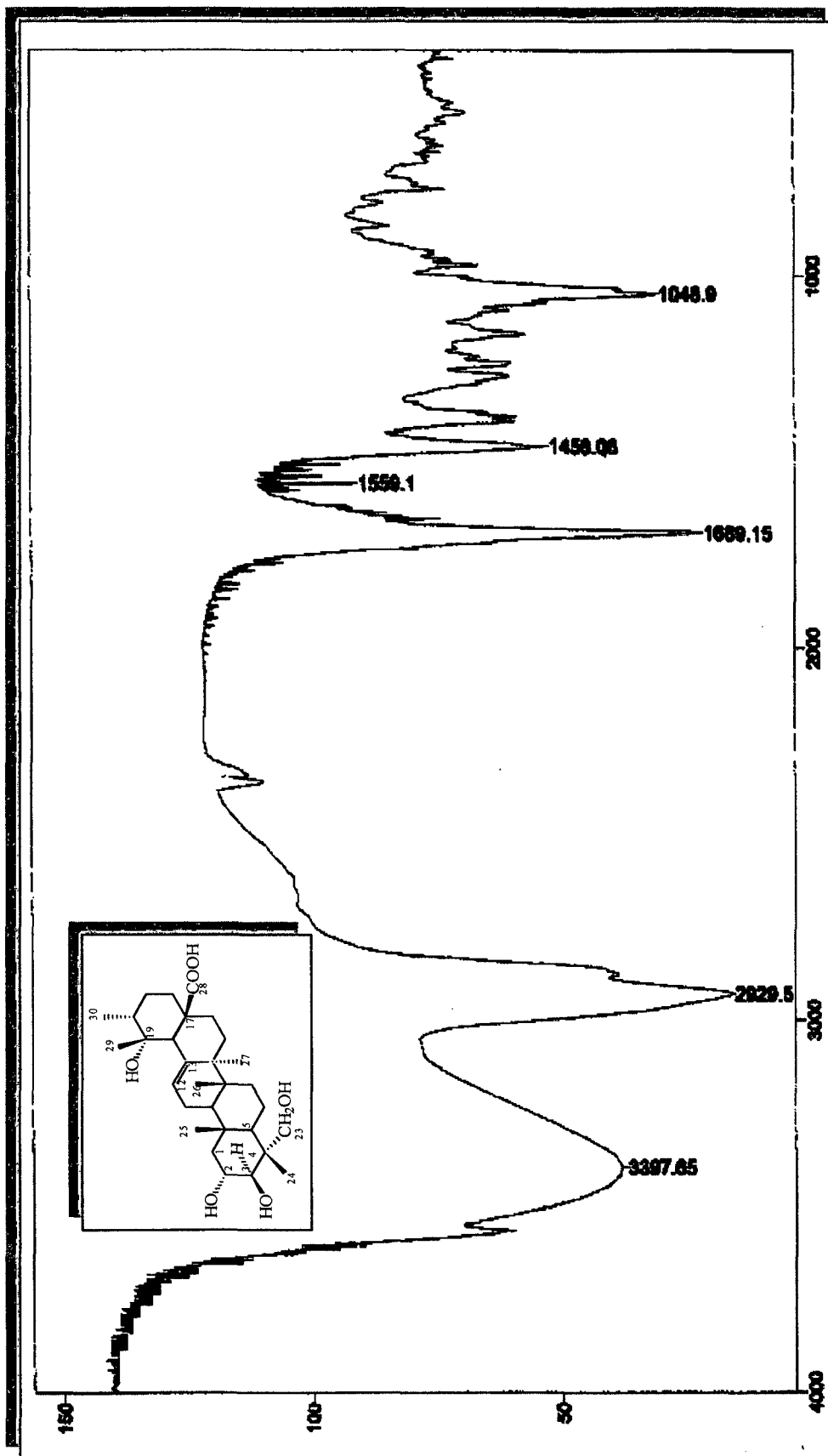


Figura 38 - Espectro de IV do composto Ri-3 em KBr

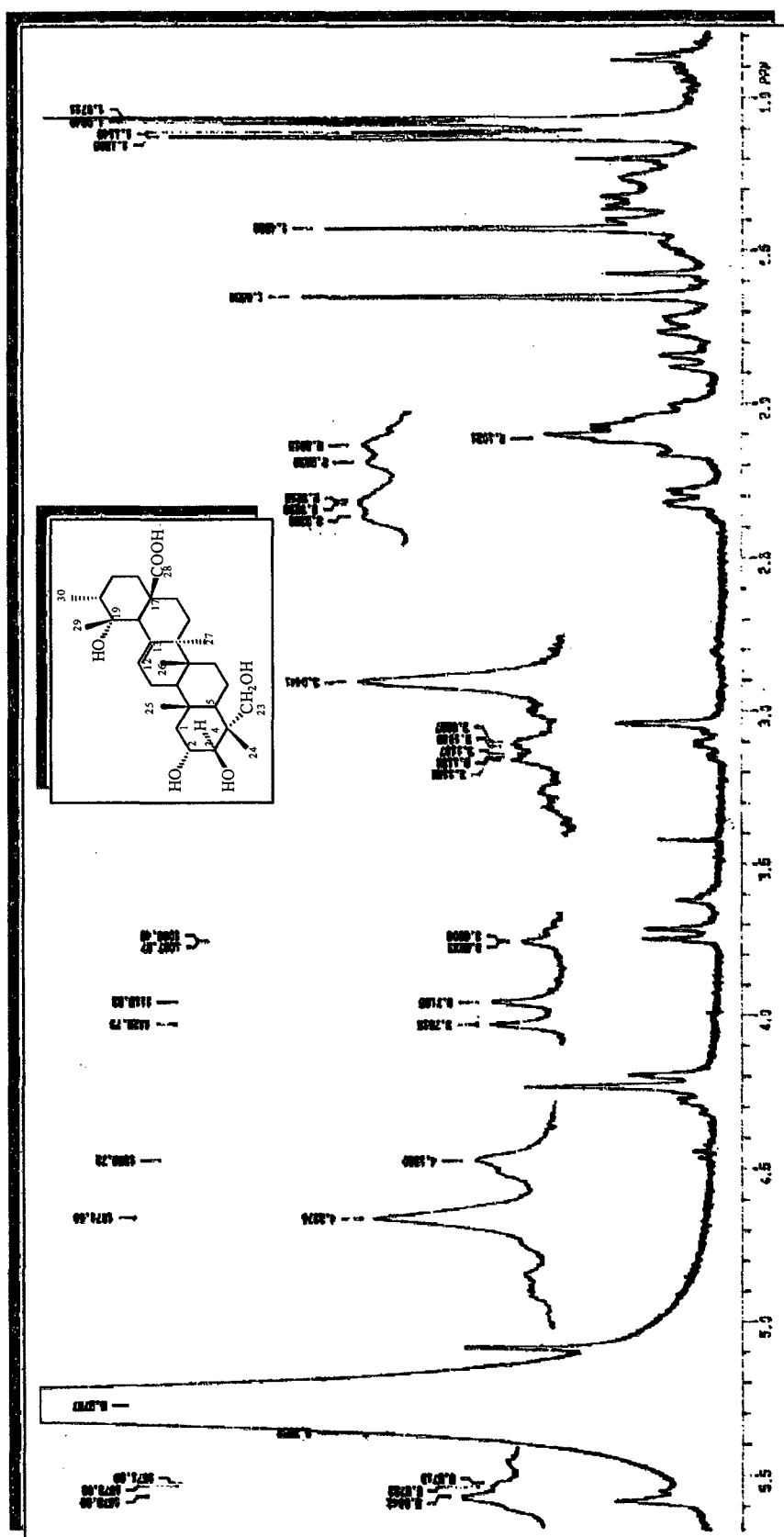


Figura 39 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto Ri-3 em piridina-d<sub>5</sub>





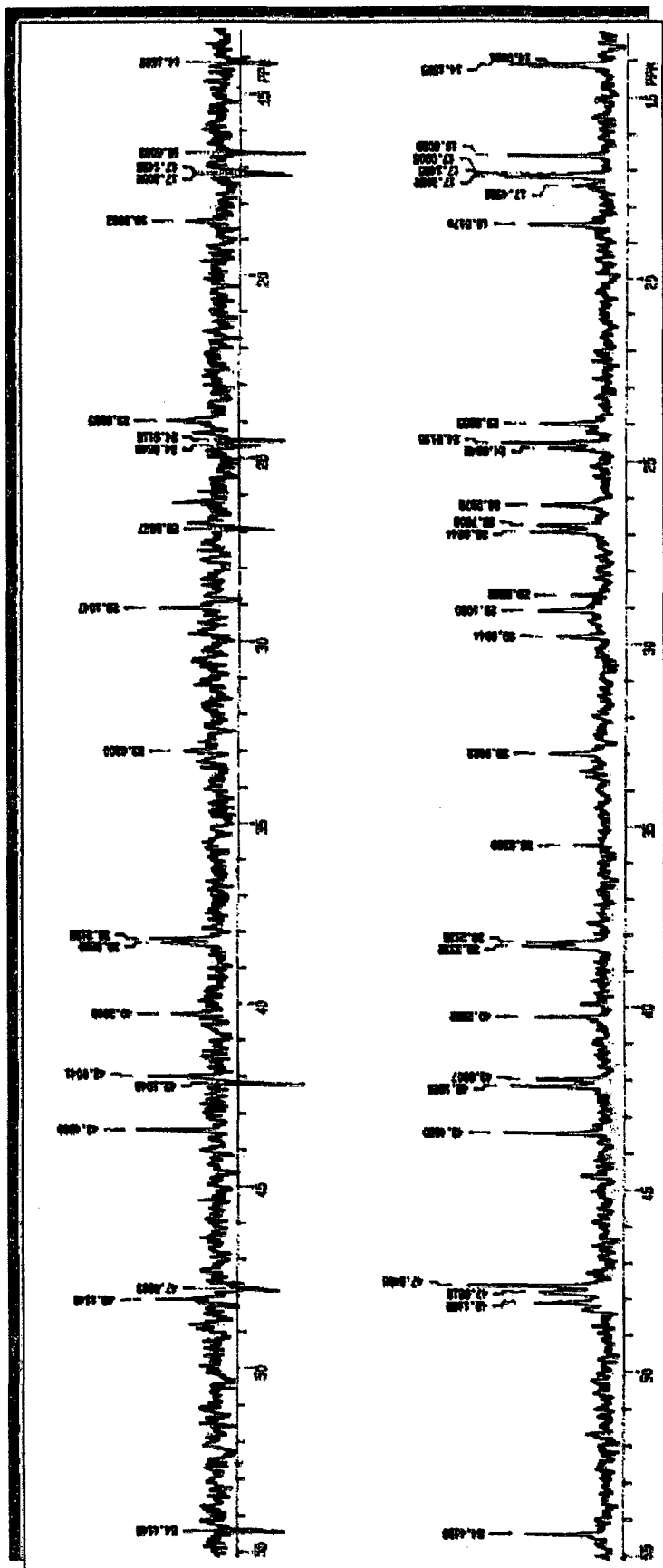


Figura 41 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C e APT entre 15 e 5 ppm do composto Ri-3 em piridina-d<sub>5</sub>

#### **4.0. CAPÍTULO IV – *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae)**

##### **4.1. METODOLOGIA**

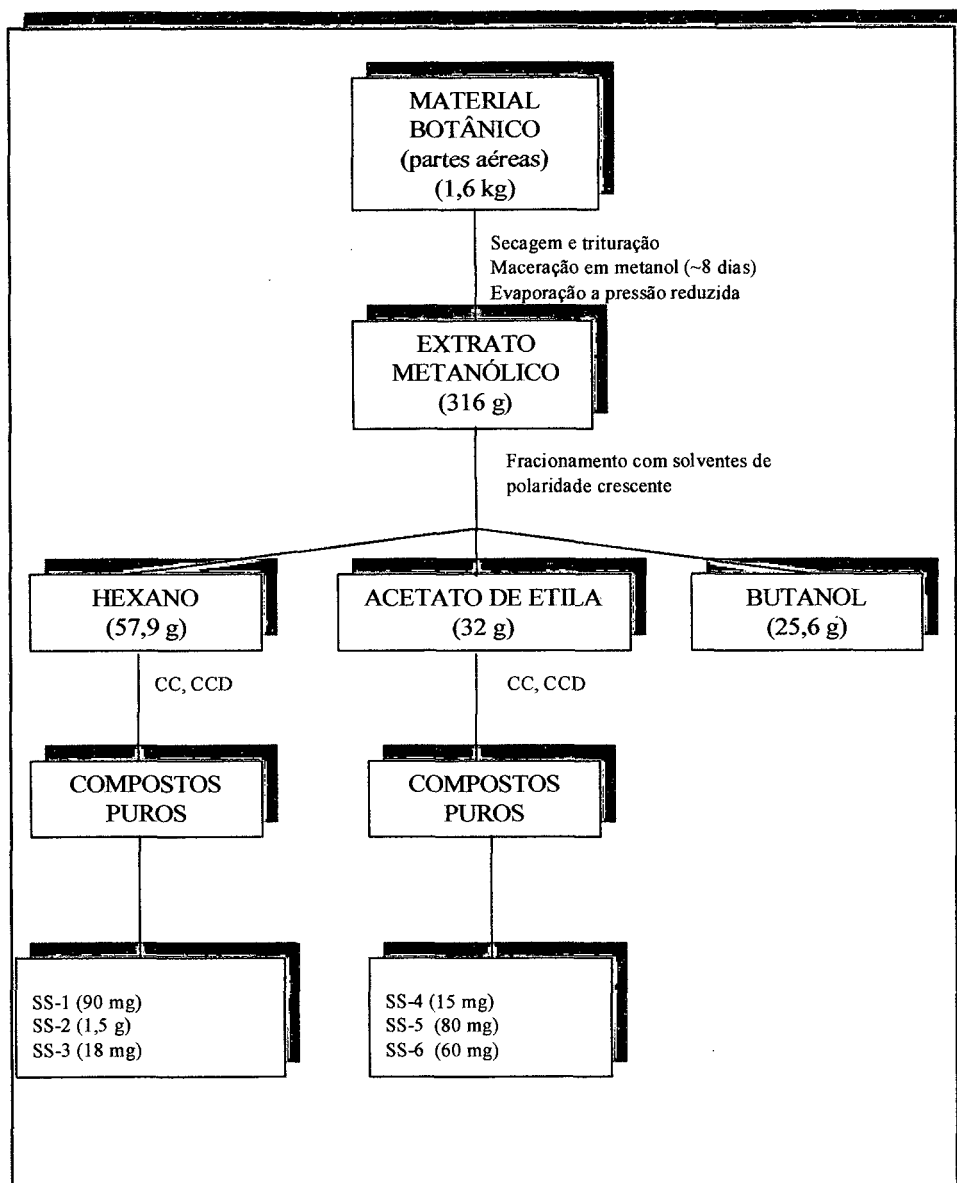
###### **4.1.1. Material Botânico**

As partes aéreas de *S. schottiana*, foram coletadas no município de Apiúna – SC, sendo identificadas pelo professor Dr. Ademir Reis, do Departamento de Botânica da UFSC, cuja exsicata está depositada no Herbarium FLOR (UFSC), sob o número 5397.

###### **4.1.2. Análise Fitoquímica**

A partir das partes aéreas, foi preparado um extrato alcoólico mediante maceração com metanol durante 8 dias e evaporação do solvente até a concentração desejada. Este extrato foi denominado de “Extrato Metanólico Bruto”. Posteriormente, este extrato foi particionado com diferentes solventes de polaridade crescente, como hexano, acetato de etila e n-butanol para a obtenção dos respectivos extratos semi-puros. Paralelamente foi preparado um extrato hidroalcoólico 50/50 (Etanol/Água). Estes extratos foram posteriormente testados farmacologicamente. Os extratos Hexano, e Acetato de Etila foram analisados fitoquimicamente em função de apresentarem o melhor perfil cromatográfico, em testes preliminares. Nesta etapa foram utilizados métodos cromatográficos como CC (Cromatografia em Coluna), CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR). No processo de elucidação estrutural foram empregados métodos espectroscópicos como Infravermelho (IV), Ressonância Magnética

Nuclear de hidrogênio e Carbono-13 (RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), e Co-CCD. A **figura 42** apresenta os procedimentos mencionados acima.



**Figura 42** - Esquema da análise fitoquímica realizada com as partes aéreas de *Sebastiania schottiana*.

### **4.1.3. Análise farmacológica**

Os testes farmacológicos foram realizados pela equipe do Prof. Adair R. S. Santos, pertencentes ao NIQFAR/CCS/UNIVALI.

#### **4.1.3.1. Atividade analgésica**

**Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos:** Camundongos “suíços” machos (25-30 g) foram mantidos sob temperatura controlada (~23°C) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “ad libitum”. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se “Teste das contorções abdominais” com ácido acético (0,6%, via intraperitoneal), que promove contorções seguido de extensão de uma das patas posteriores<sup>87,88</sup>. Os animais foram pré-tratados com o extrato metanólico (10 mg/kg) ou com os compostos isolados (1-60 mg/kg) vias intraperitoneal, 30- min. e intra cérebro ventricular (I.C.V.), 10 min. antes da injeção de ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de uma solução de NaCl (0,9%, 10 mg/kg). Após a injeção do ácido acético, os animais foram colocados em cilindros de vidros individuais, e o número de contorções abdominais foi quantificada cumulativamente durante um período de 20 min.. A atividade analgésica foi então determinada tomando-se como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com o extrato ou compostos, comparados com o número de contorções abdominais dos animais controle (salina)<sup>87,88</sup>.

***Dor induzida pela formalina:*** Camundongos “suíços” machos (25-30 g) foram mantidos sob temperatura controlada (~23°C) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “ad libitum”. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se 20 µL de formalina (2,5%, s.c.) ou salina, injetados na região dorsal da pata posterior direita e esquerda do camundongo. Logo após, iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se durante 30 min., o tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata, considerando esse indicativo de dor. Os animais foram pré-tratados com o extrato hidroacoólico (1-30 mg/kg) ou com os compostos isolados (1-60 mg/kg) via intraperitoneal, 30 min antes. Duas fases de sensibilidade são observadas nesse modelo, a primeira fase (dor neurogênica), aparece nos primeiros 5 min., e a segunda fase (dor inflamatória) ocorre entre 15 e 30 min. após a injeção da formalina, representando a resposta tônica a dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores químicos<sup>89,90</sup>.

## **4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.2.1. Análise química**

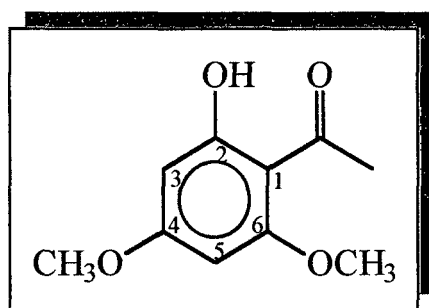
Embora estudos anteriores relativos às ações biológicas e análise fitoquímica tenham sido reportados, o efeito analgésico do extrato e de compostos isolados das partes aéreas da *S. schottiana* estão sendo demonstrados pela primeira vez.

Com o intuito de avaliar este efeito, foi preparado um extrato hidroalcoólico (EtOH/H<sub>2</sub>O; 50:50) das partes aéreas da *S. schottiana*, o qual causou uma significativa inibição tanto no número de contorções quanto no tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata, quando analisados nos modelos de dor do ácido acético e da formalina. Estes promissores efeitos farmacológicos nos estimularam a re-investigar fitoquimicamente esta planta, a fim de determinar os constituintes que poderiam estar relacionados com o efeito indicado. Assim, o extrato metanólico foi sucessivamente particionado com solventes de polaridade crescente, como hexano, acetato de etila e butanol, para a obtenção das respectivas frações semi-purificadas.

Considerando que os extratos de hexano e acetato de etila foram o que mostraram melhor perfil cromatográfico, quando analisados através de CCD, estes foram selecionados para posterior fracionamento. Através de CCD e reveladores específicos, constatou-se a presença de compostos pertencentes a grupos terpênicos e esteroidais.

O uso de CC permitiu o isolamento de três compostos denominados: **SS-1**, **SS-2** e **SS-3**.

Os compostos SS-1 e SS-2 demonstraram manchas de coloração semelhantes a compostos isolados anteriormente nesta espécie, quando revelados com anisaldeído sulfúrico. Desta forma, análises por co-CCD e CGAR com amostras autênticas em diferentes sistemas de eluentes, confirmaram que SS-1 consiste em uma mistura de fitoesteróis conhecidos como: Campesterol (a),  $\beta$ -sitosterol (b) e estigmasterol (c) (figura 43) e SS-2 a 2-hidroxi-4,6-dimetóxi-acetofenona (Xantoxilina), respectivamente<sup>74,75</sup>.



(SS-2)

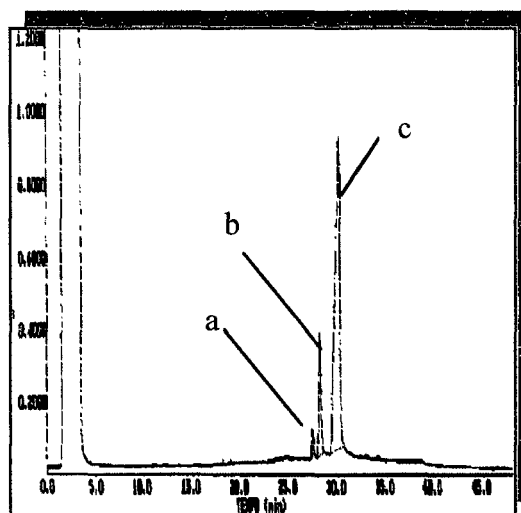
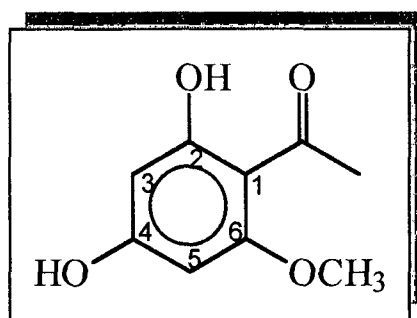


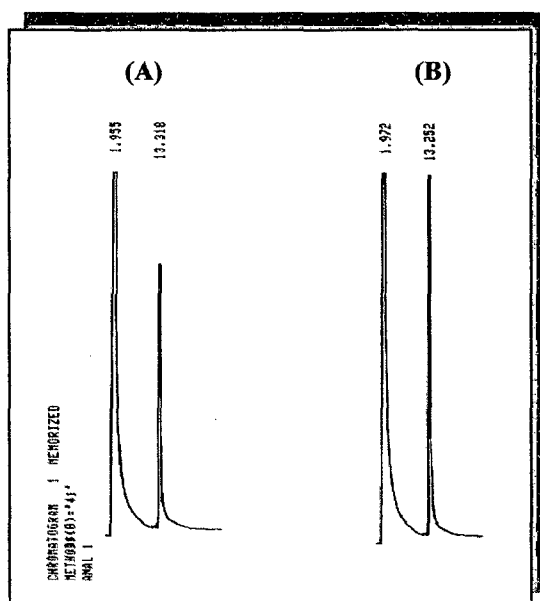
Figura 43 – Cromatograma da mistura de fitoesteróis (SS-1)

Com relação ao SS-3 podemos observar no espectro de absorção na região de infravermelho uma absorção em  $3102\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da hidroxila; em  $1637,8\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento da carbonila conjugada e em  $1560,9\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento de  $C = C$  (figura 44 anexo III). Quando se analisa o espectro de  $^1\text{H-RMN}$ , observa-se sinais de dois prótons aromáticos; em  $\delta\ 5,98$  e  $5,91$  (*dd*,  $J = 2,3\text{ Hz}$ ; H3 e H5);  $\delta\ 13,9$  (*s*, OH);  $\delta\ 3,87$  (*s*,  $\text{OCH}_3$ ) e  $\delta\ 2,61$  (*s*,  $\text{CH}_3$ ) (figura 45 anexo III). Estes dados permitiram concluir que SS-3 trata-se da 2,4-dihidroxi-6-metoxi-acetofenona e estão de acordo com aqueles encontrados na literatura<sup>74, 82, 100</sup>.



(SS-3)

A estrutura do composto (SS-3) foi confirmada por cromatografia gasosa de alta resolução em comparação com uma amostra autêntica (figura 46).

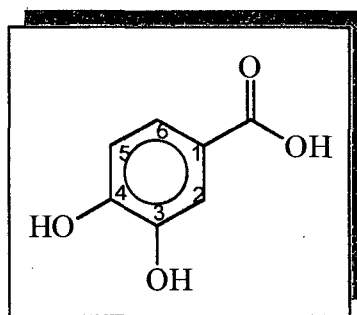


**Figura 46** – Cromatograma comparativo do composto 2,4-dihidroxi-6-metoxiacetofenona (A) e co-injeção com padrão autêntico (B).



Da mesma forma, o extrato acetato de etila foi cromatografado em coluna de sílica gel, permitindo o isolamento dos compostos **SS-4**, **SS-5** e **SS-6**.

Quanto ao composto **SS-4**, o espectro de infravermelho apresenta absorções nas regiões de  $3330\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento de hidroxila; em  $1662$  e  $1602\text{ cm}^{-1}$  referentes a estiramentos de carbonila de ácido e  $\text{C}=\text{C}$ , respectivamente (**figura 47 anexo III**). Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$ , observa-se sinais característicos na região de anel aromático  $\delta\ 6,93$  e  $7,5$  (*dd*,  $J = 8,2\text{ Hz}$ ; H-5 e H-6);  $\delta\ 7,55$  (*d*,  $J = 2,0\text{ Hz}$ ; H-2),  $\delta\ 7,51$  (*dd*,  $J = 2,0\text{ Hz}$ ; H-2 e H-6) (**figura 48 anexo III**). Além disso, quando se analisa o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , observa-se sinais em  $\delta\ 170,5$  (C=O);  $\delta\ 151,8$  (C-3); e  $\delta\ 146,3$  (C-4); quatro sinais entre  $116,0$  e  $123,9\text{ ppm}$  atribuídos aos quatro carbonos restantes (**figura 49 anexo III**). Além disso, o espectro de massa mostra um íon molecular  $m/z(154)$  (**figura 50 anexo III**). Estes dados permitem concluir que **SS-4** corresponde ao ácido protocatético ou ácido 3,4-dihidroxi-benzóico, confirmado pelos dados da literatura <sup>101</sup>.

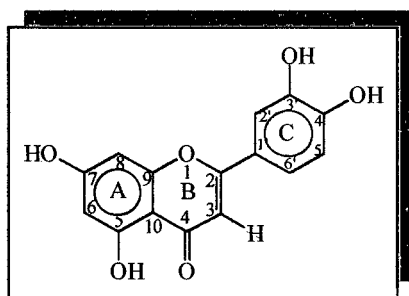


(**SS-4**)

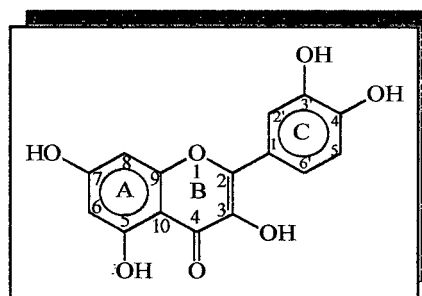
Em relação aos compostos **SS-5** e **SS-6**, os espectros de IV revelaram absorções atribuídas aos estiramentos das hidroxilas fenólica em  $3381$  e  $3271\text{ cm}^{-1}$ ; absorções em  $1708$  e  $1613$ , referentes ao estiramento de  $\text{C}=\text{C}$  do anel aromático e bandas em  $1757$  e  $1868$ , correspondente ao estiramento da carbonila conjugada, respectivamente (**figuras 51 e 54 anexo III**).

A análise dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN mostram dois sinais característicos de prótons aromáticos  $\delta$  6,26 e 6,52 (*d e d*,  $J = 2,0$  Hz; H-6 e H-8) dos anéis A, respectivamente e três sinais  $\delta$  7,0 e 7,7 (*dd*,  $J = 8,5$  Hz; H-5' e H-6' ) e  $\delta$  7,8 (*dd*,  $J = 2,1$ Hz; H-2') dos anéis C.

Por outro lado, nota-se um sinal  $\delta$  6,5 (*s*, H-3) em **SS-5** o qual não aparece em **SS-6** (figuras 52 e 55 anexo III). Quando se analisa os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, observa-se outra clara distinção entre os C-3 e C-4, com sinais em  $\delta$  104 e 183 ppm para **SS-5**, e sinais em  $\delta$  136,7 e 176,5 para **SS-6** (tabela 6 e figuras 53, 56 do anexo III). Todos estes sinais estão de acordo com dados descritos na literatura<sup>102,103</sup> e nos permite concluir que **SS-5** e **SS-6** correspondem aos flavonóides luteolina e quercetina, respectivamente.



(SS-5)



(SS-6)

Cabe destacar que os compostos **SS-3** e **SS-6** foram isolados pela primeira vez nesta espécie e que o composto **SS-3** vem sendo alvo de estudos por outros centros de pesquisa com resultados extremamente importantes no que se refere às ações antifúngica, antioxidante e contra determinados tipos de câncer<sup>104-110</sup>. É relevante salientar as diferenças existentes entre as diferentes partes desta planta, uma vez que estudos anteriores realizados com as raízes não evidenciaram a presença de flavonóides. Além disso, foi encontrado apenas traços da xantoxilina nas raízes (componente majoritário nas partes aéreas)<sup>75</sup>.

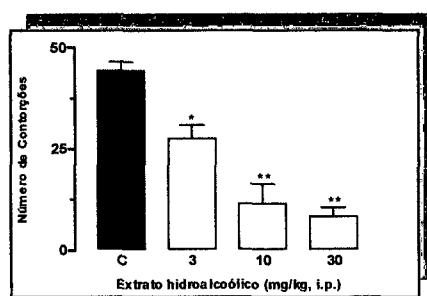
**Tabela 6:** Comparação dos dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN da Quercetina e Luteolina com valores descritos na literatura (AGRAWAL, 1989)<sup>102</sup>.

C	Quercetina	Luteolina	Quercetina (Literatura)	Luteolina (Literatura)
2	148,28	164,96	147,5	164,50
3	136,70	104,25	136,50	103,30
4	176,52	189,05	176,5	182,20
5	162,27	163,05	161,00	157,5-161,0 <sup>a</sup>
6	99,09	99,66	99,5	99,20
7	164,82	165,10	166,0	164,70
8	94,39	94,71	94,50	94,20
9	156,50	158,79	156,70	156,2-161,4 <sup>a</sup>
10	104,08	104,25	104,00	104,20
1'	121,39	120,12	123,00	119,30
2'	115,69	114,07	116,00	113,80
3'	145,77	146,03	145,70	146,20
4'	148,28	150,09	148,10	150,10
5'	116,15	116,59	116,50	116,40
6'	123,71	123,75	121,00	122,10

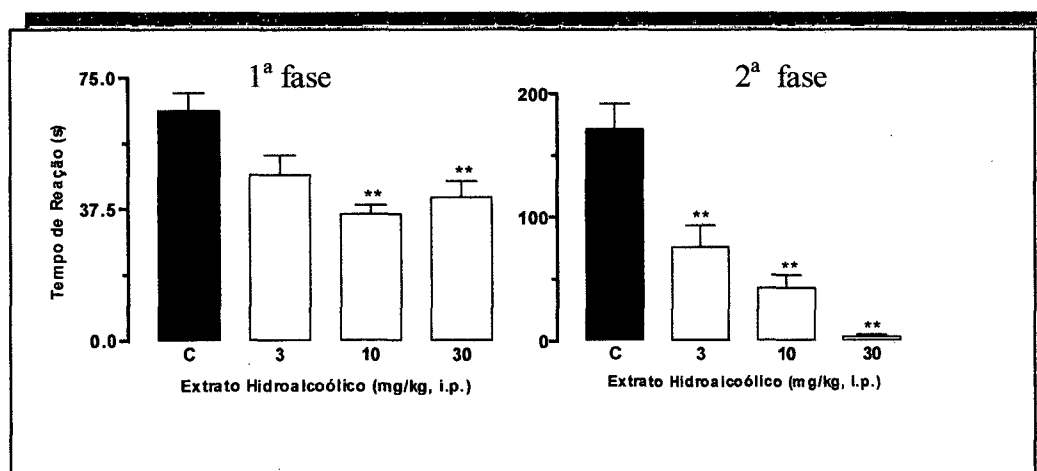
<sup>a</sup> = Faixas de valores atribuídos para os diferentes exemplos na literatura.

#### 4.2.2 Análise farmacológica

Analisando-se a **figura 57** observa-se que o Extrato Hidroalcoólico causou um efeito dose-dependente com inibição máxima de  $81 \pm 5\%$  e  $DI_{50}$  de 6,32 (5,4-7,3) mg/kg, no modelo do ácido acético. Da mesma forma, a **figura 58** mostra que o EH causou também significativa ação analgésica quando analisado no modelo da formalina, apresentando IM de  $45 \pm 4$  e  $93 \pm 5\%$  e uma  $DI_{50} > 30$  e 5,8 (4,4-7,8) mg/kg para ambas as fases de dor, respectivamente.



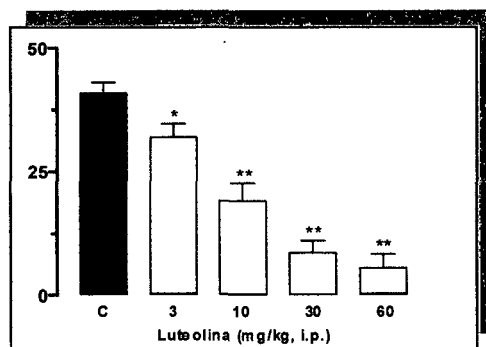
**Figura 57** - Curva dose-resposta inibitória do EH no modelo de dor induzida pelo ácido acético 0,6%, i.p.



**Figura 58** – Curva dose-resposta inibitória do EH no modelo de dor induzida pela formalina

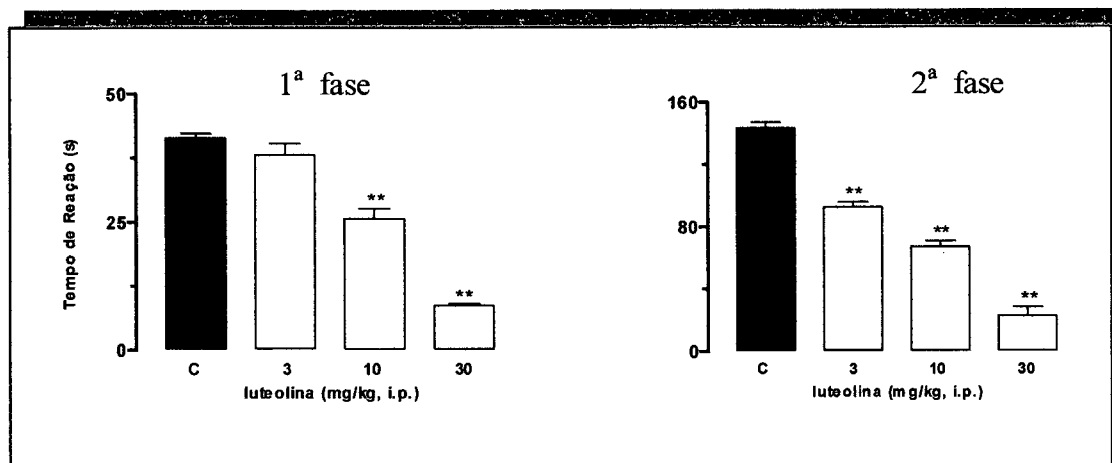
Os flavonóides, por serem compostos fenólicos, agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com os metais. Eles agem contra vírus, bactérias, fungos e na alimentação, reprodução e desenvolvimento animal. Podem também interferir na germinação de sementes e reprodução de mudas<sup>110</sup>. Devido a importância e a potencialidade química dos flavonóides, evidencia-se a necessidade da intensificação das investigações principalmente sobre efeitos biológicos destas substâncias.

Correlacionando estes fatores com o razoável rendimento obtido para a luteolina, a mesma foi submetida a testes farmacológicos para avaliar sua possível ação analgésica. Assim, quando analisada no teste das contorções abdominais, apresentou uma  $DI_{50}$  de 13 mg/kg, i.p. e uma inibição máxima (IM) de  $87 \pm 7\%$ , respectivamente (**figura 59**).



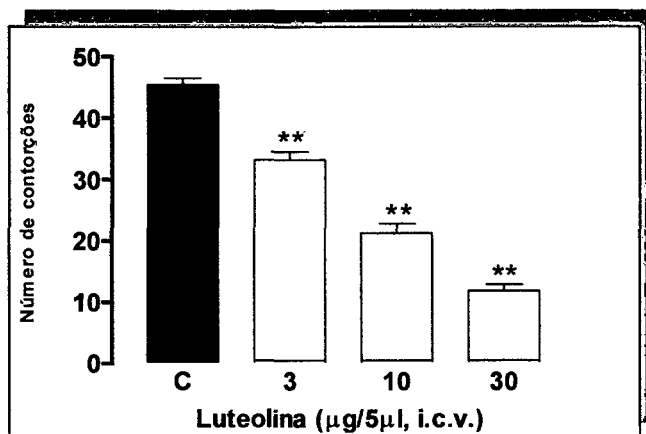
**Figura 59** – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% i.p.

Da mesma forma, quando analisado no modelo de dor induzido pela formalina, a luteolina apresentou um efeito bastante pronunciado. Como pode ser observado na **figura 60**, a luteolina foi mais efetiva na segunda fase de dor, com inibições máximas de  $75 \pm 1$  e  $79 \pm 3$  % e  $DI_{50}$  de 14,2 e 7,5 mg/kg para 1ª e 2ª fases da dor, respectivamente.

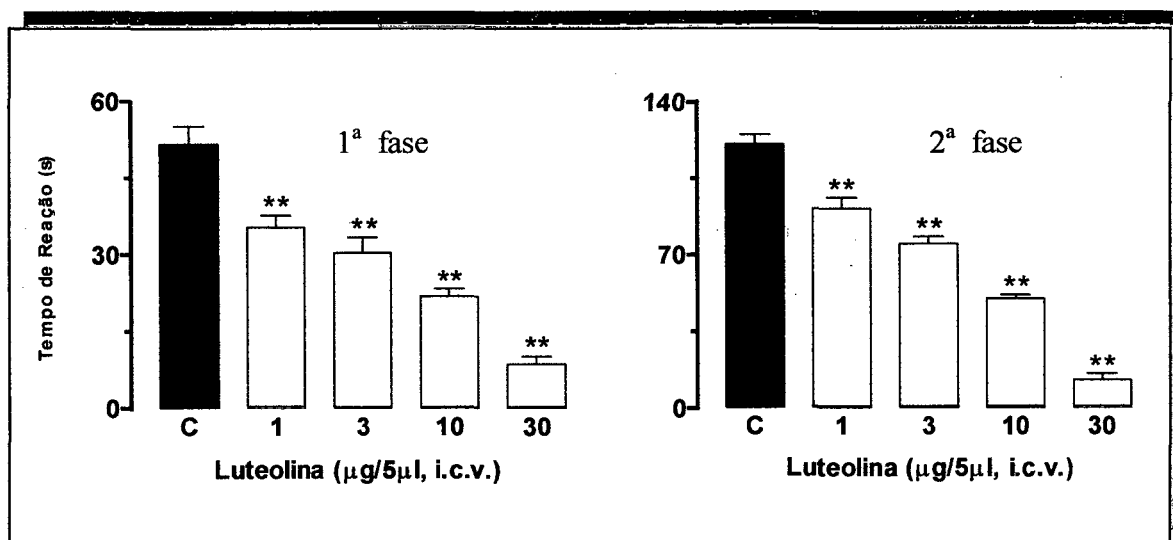


**Figura 60** – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de dor induzidas pela formalina, i.p., em relação a 1ª e 2ª fases de dor.

Foi observado também um perfil muito interessante quando a luteolina foi analisada pela via intra-cerebro-ventricular (I.C.V.), a qual sugere o possível nível de atuação (periférico ou central) do composto administrado. Como pode ser observado nas **figuras 61** e **62**, em ambos modelos de dor (ácido acético e formalina), a luteolina causou significativa ação analgésica, com  $DI_{50}$  de 11,25  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  e inibição máxima de  $74 \pm 2\%$  para dor induzida pelo ácido acético e  $DI_{50}$  de 8,9  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  e 9,0  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  com inibições máximas de  $83 \pm 3\%$  e  $89 \pm 2\%$  para 1ª e 2ª fase de dor, respectivamente.



**Figura 61** – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, i.c.v.



**Figura 62** – Curva dose-resposta inibitória da luteolina no modelo de dor induzidas pela formalina, i.c.v. em relação a 1ª e 2ª fases de dor.

É importante notar que, independente da via de administração ou modelo de dor, há uma grande similaridade tanto na potência quanto na eficácia da luteolina, em comparação com o extrato hidroalcoólico. Isto sugere que, pelo menos em parte, a luteolina é responsável pelo efeito analgésico apresentado pelo extrato hidroalcoólico, atuando a nível de sistema nervoso central. Outro fato interessante é que tanto o EH como a luteolina são mais potentes do que a aspirina e paracetamol, dois medicamentos usados na clínica (tabelas 7 e 8).

**Tabela 7** - Efeito antinociceptivo comparativo entre o EH, luteolina, aspirina e paracetamol no modelo contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos, i.p..

Tratamento	DI <sub>50</sub> (mg/kg, i.p.)	DI <sub>50</sub> (μmol/kg, i.p.)	IM (%) <sup>b</sup>
EH	6,3 (5,4 – 7,3) <sup>a</sup>	NC	81,0 ± 5
Luteolina	13,0 (7,0 – 5,6)	ver	87,0 ± 7
Aspirina	24,0 (13,0 - 44,0)	133,0 (73,0 – 243,0)	83,0 ± 1,4
Paracetamol	19,0 (16,0 – 23,0)	125,0 (104,0 – 250,0)	88,0 ± 1,0

<sup>a</sup> 95% Limite de confiança, sendo que cada grupo representa uma média de 6 animais.

Valores de P < 0.05 foram considerados indicativos de significância. <sup>b</sup>Inibição Máxima

NC = Não Calculada



**Tabela 8** - Efeito antinociceptivo comparativo entre o EH, luteolina, aspirina e paracetamol no modelo da formalina, i.p..

Tratamento	DI <sub>50</sub> (mg/kg, i.p.)	DI <sub>50</sub> (μmol/kg, i.p.)	IM (%) <sup>b</sup>
	35,7 (18,6 – 68,5) <sup>a</sup>	NC <sup>1</sup>	45,0 ± 4,0 <sup>1</sup>
EH	5,8 (4,4 - 7,8) <sup>2</sup>	NC <sup>2</sup>	93,0 ± 5,0 <sup>2</sup>
Luteolina	14,0 (11,6 – 16,8) <sup>1</sup>	49,6 (40,5 – 58,7) <sup>1</sup>	79,0 ± 1 <sup>1</sup>
	7,5 (5,5 – 10,2) <sup>2</sup>	26,2 (19,2 – 35,6) <sup>2</sup>	81,0 ± 3,0 <sup>2</sup>
Aspirina	Inativa <sup>1</sup>	NC <sup>1</sup>	NC <sup>1</sup>
	22,1 (13,9-37,6) <sup>2</sup>	123,0 (77,0 – 209,0) <sup>2</sup>	88,0 ± 3,0 <sup>2</sup>
Paracetamol	Inativa <sup>1</sup>	NC <sup>1</sup>	NC <sup>1</sup>
	18,1 (13,6 - 24,3) <sup>2</sup>	120,0 (90,0 – 161,0) <sup>2</sup>	85,0 ± 3,5 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>: 1ª fase

<sup>2</sup>: 2ª fase

<sup>a</sup> 95% Limite de confiança, sendo que cada grupo representa uma média de 6 animais.

Valores de P < 0.05 foram considerados indicativos de significância. <sup>b</sup>Inibição Máxima

NC = Não Calculada

**ANEXO III**

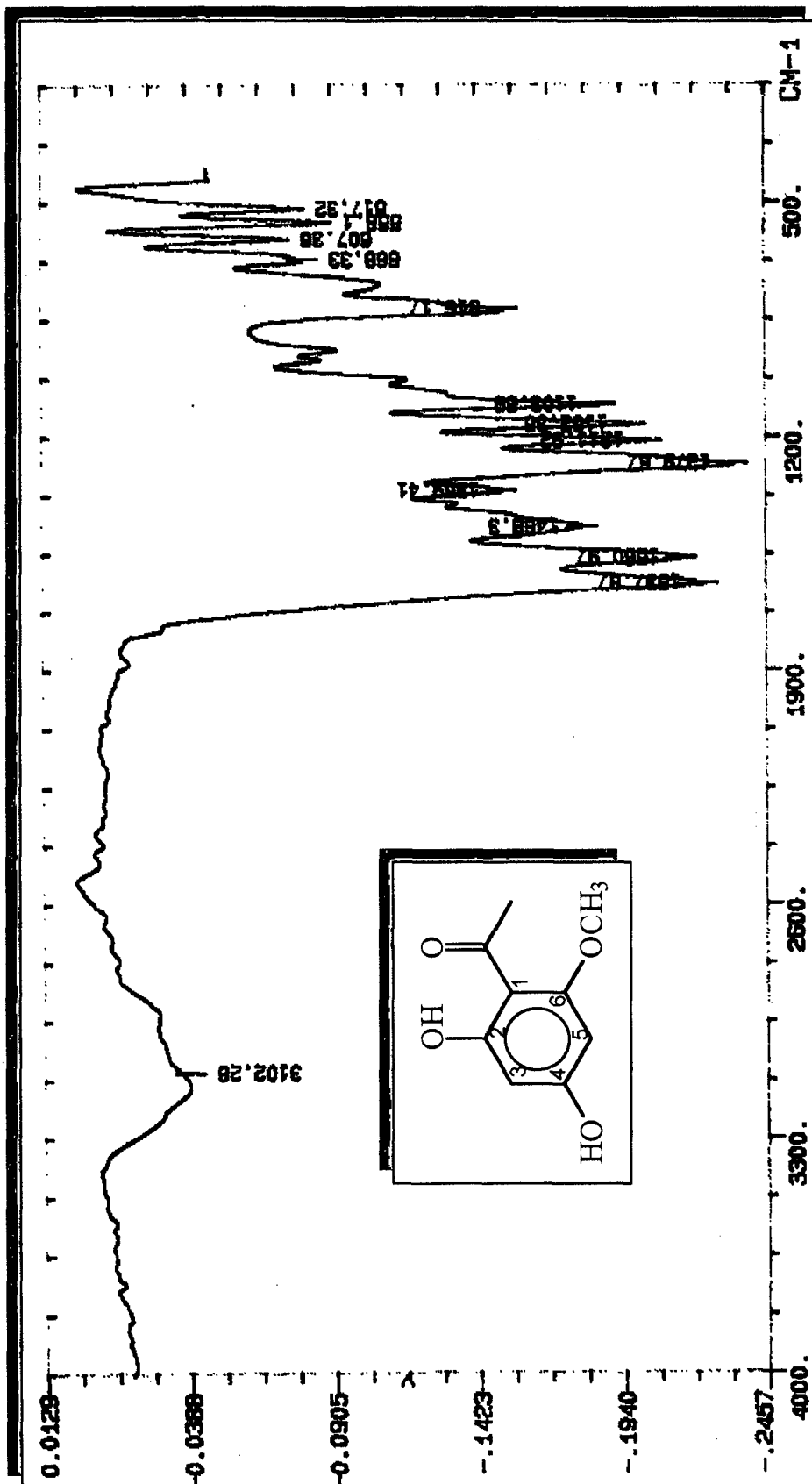


Figura 44 - Espectro de IV do composto SS -3 em KBr

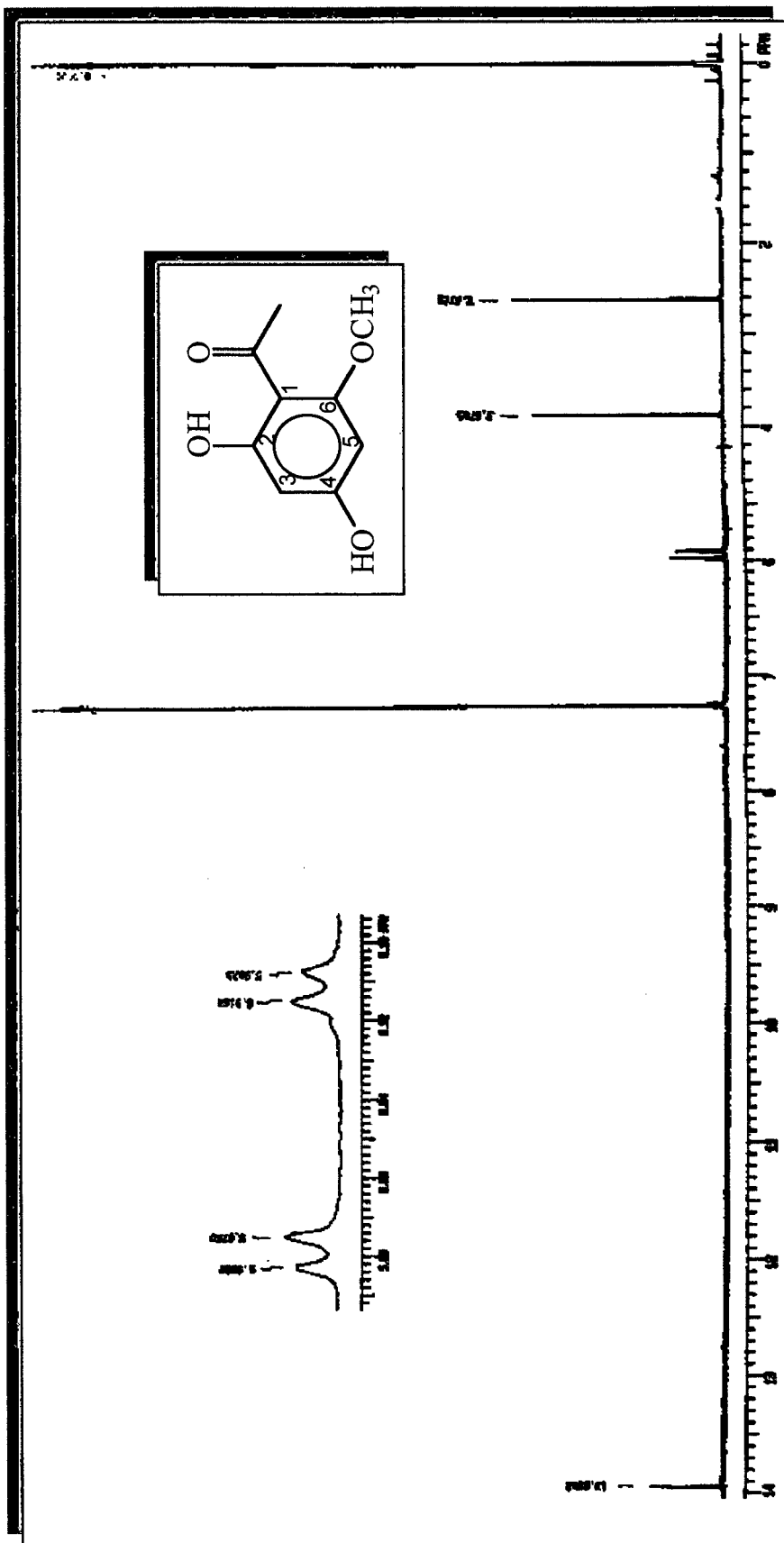


Figura 45 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto SS-3 em CDCl<sub>3</sub>

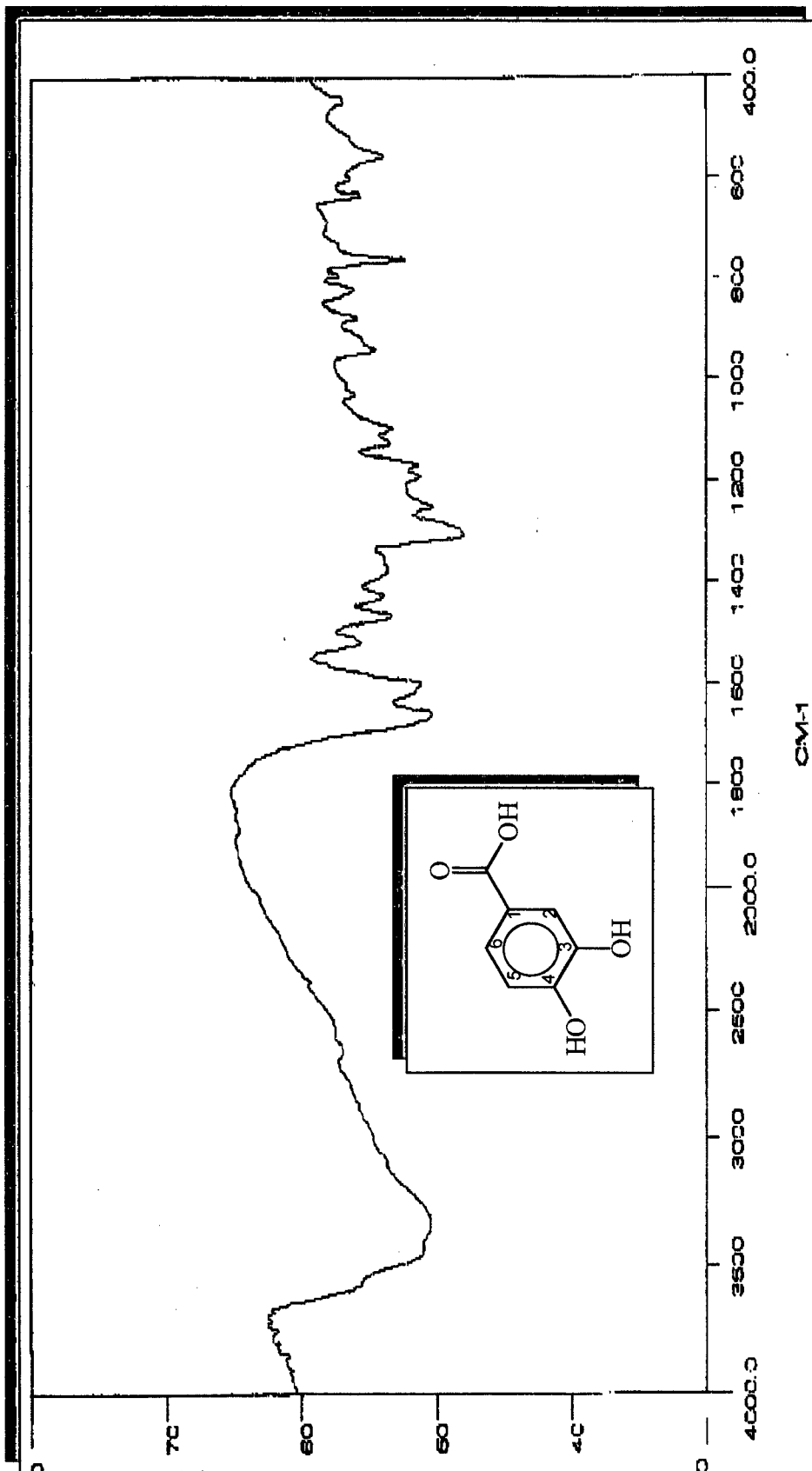


Figura 47 - Espectro de IV do composto SS - 4 em KBr

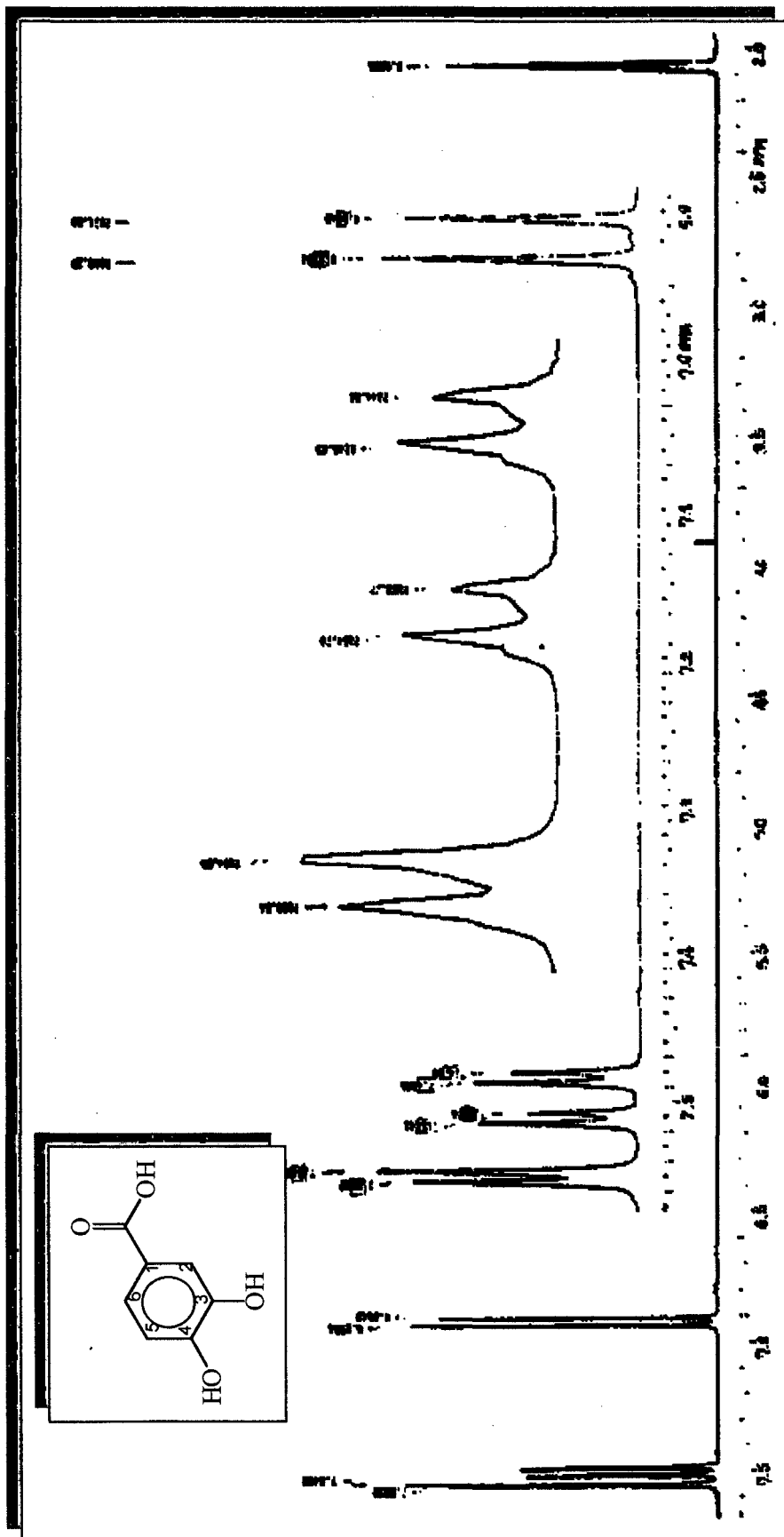


Figura 48 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto SS-4 em acetona-d<sub>6</sub>

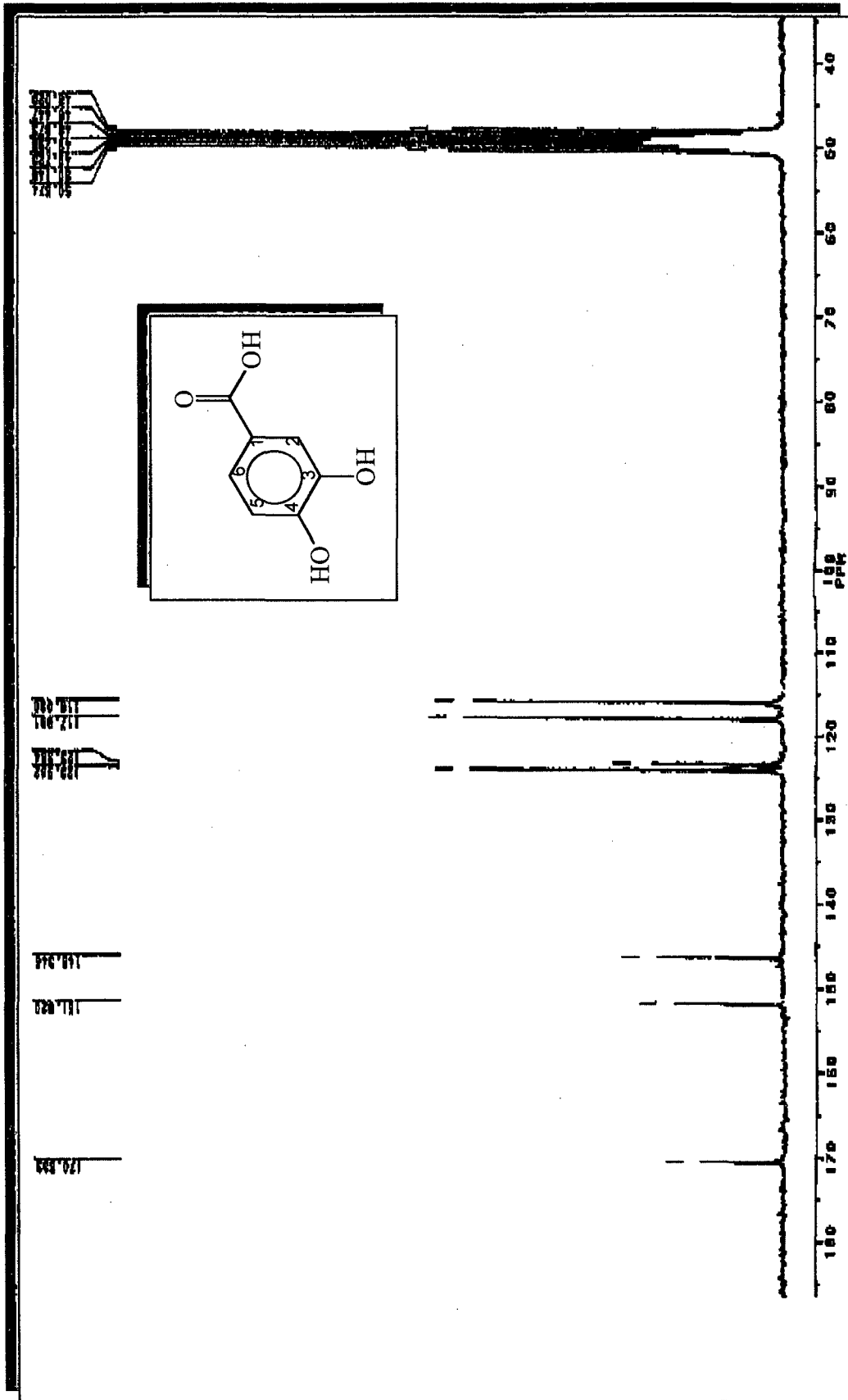


Figura 49 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto SS-4 em acetona-d<sub>6</sub>

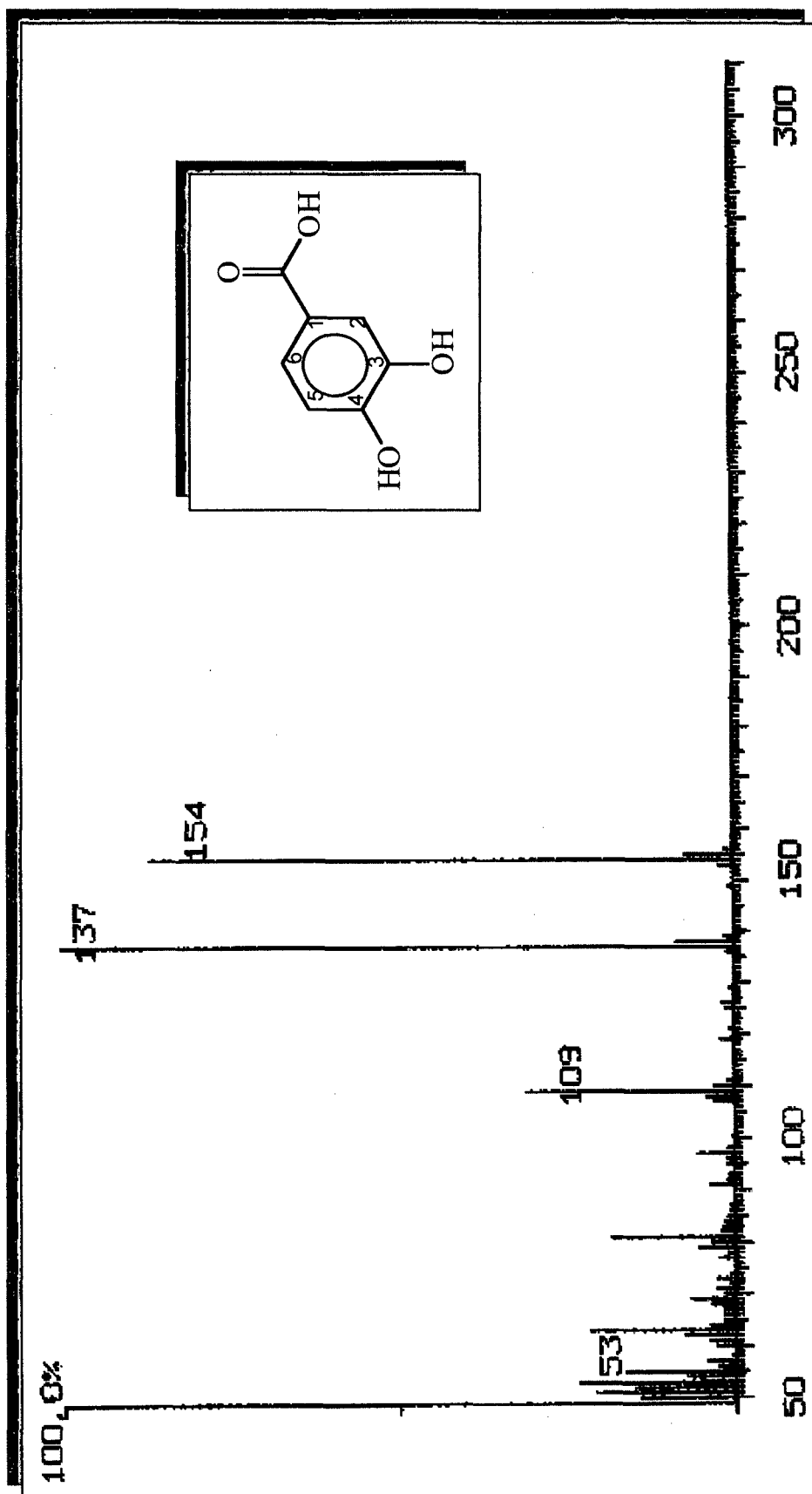


Figura 50 - Espectro de Massa do composto SS-4 a 70 eV.





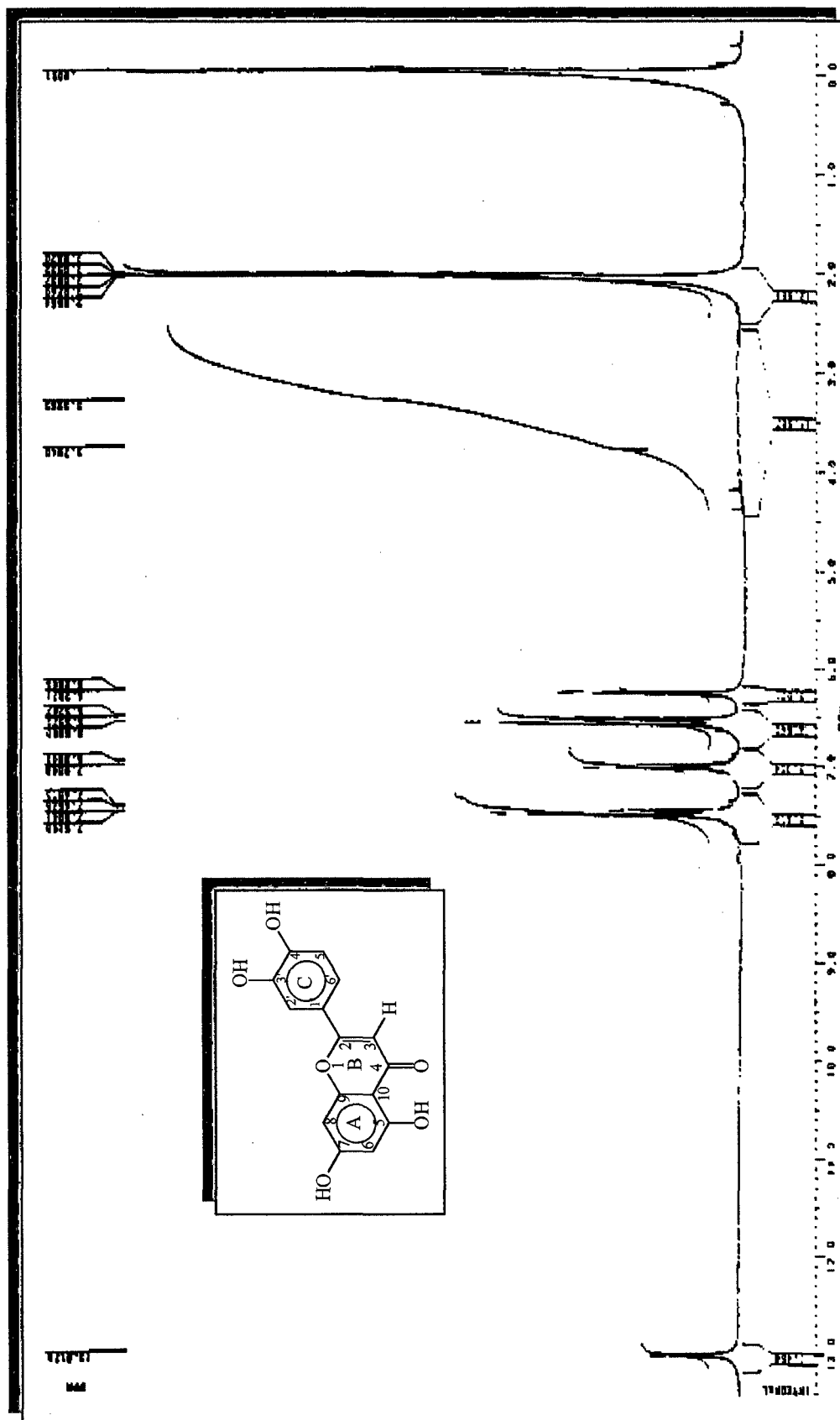


Figura 52 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto SS-5 em acetona-d<sub>6</sub>

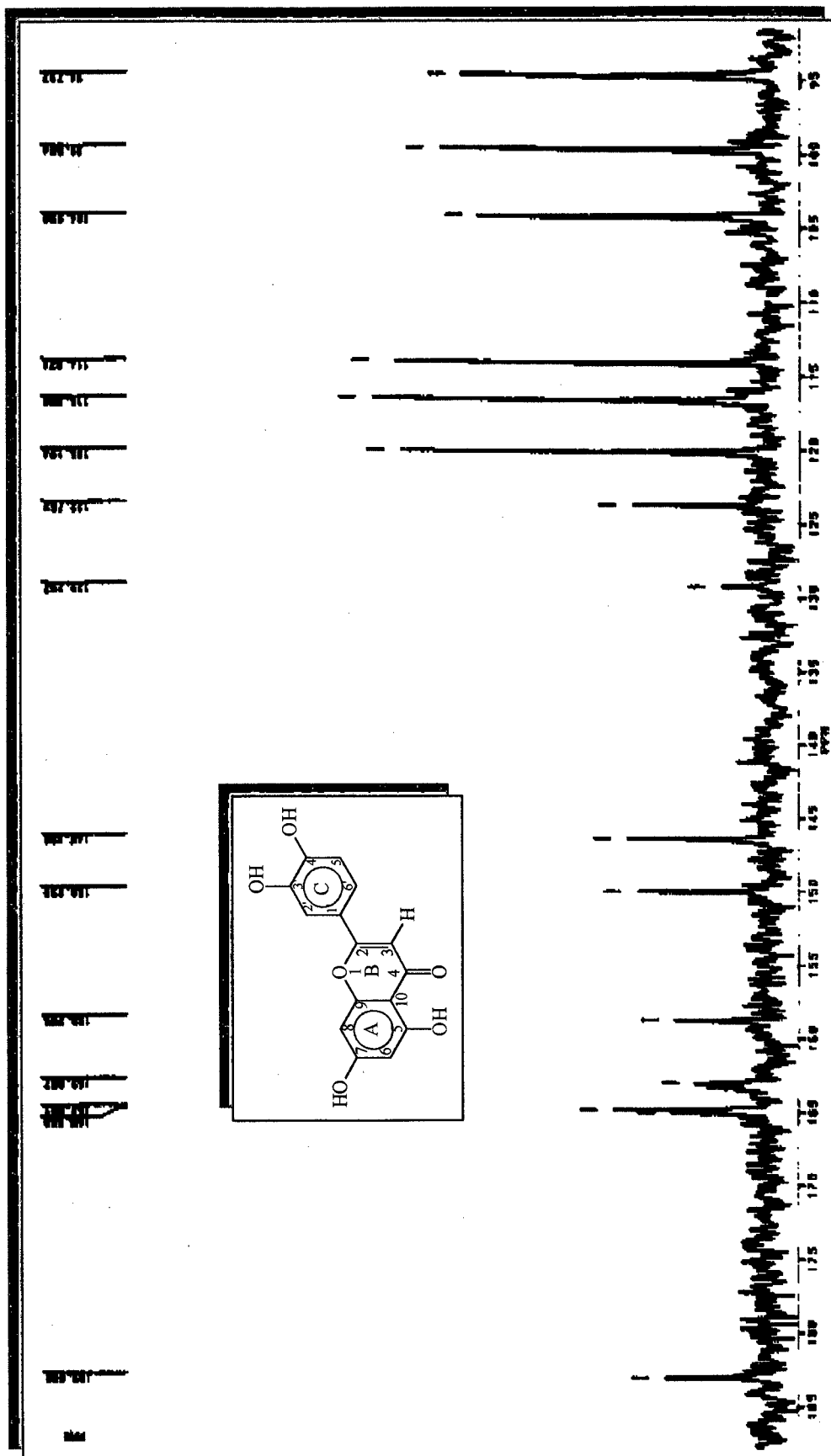


Figura 53 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto SS-5 entre 90 e 190 ppm, em acetona-d<sub>6</sub>

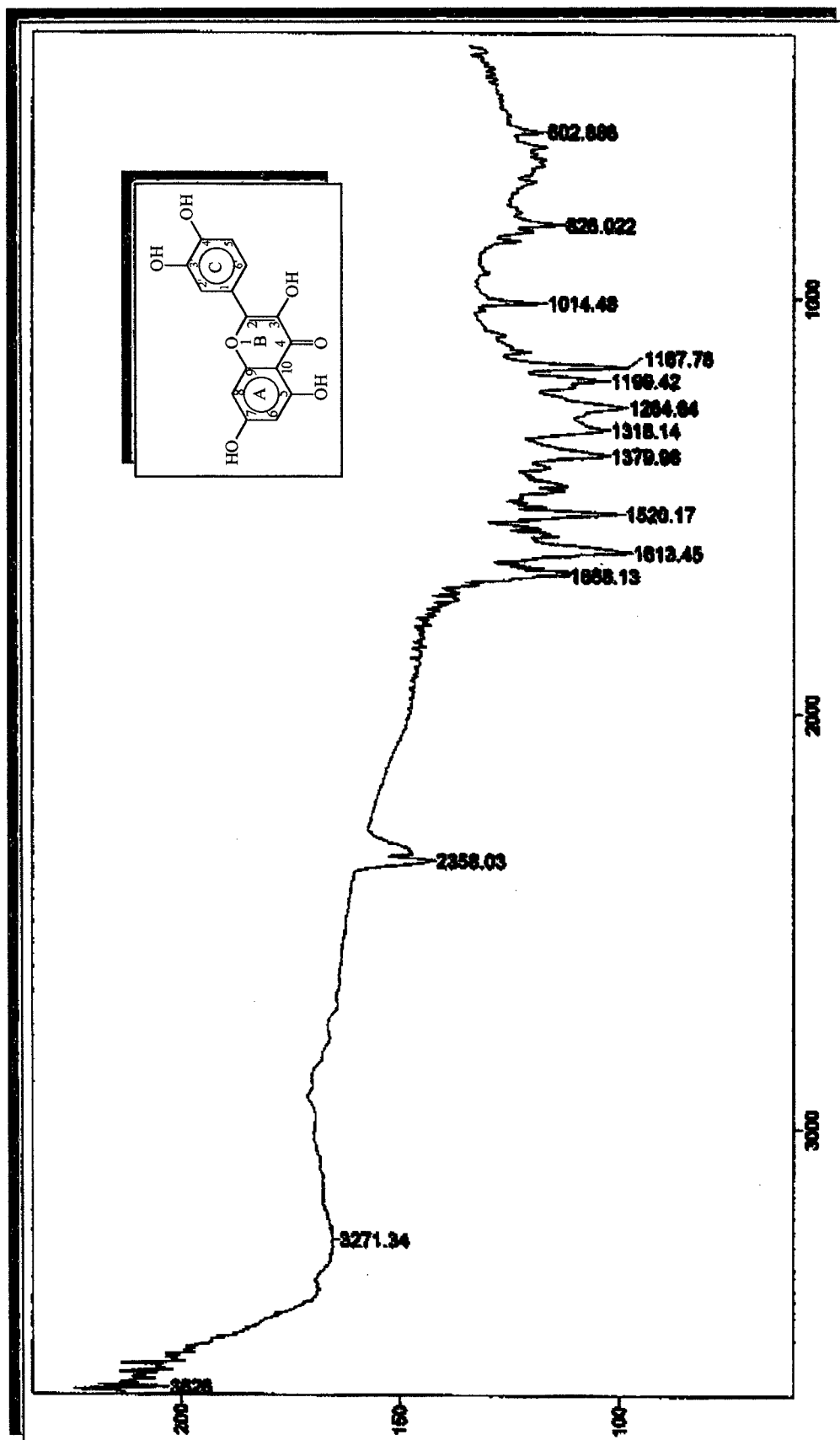


Figura 54 - Espectro de IV do composto SS -6 em KBr

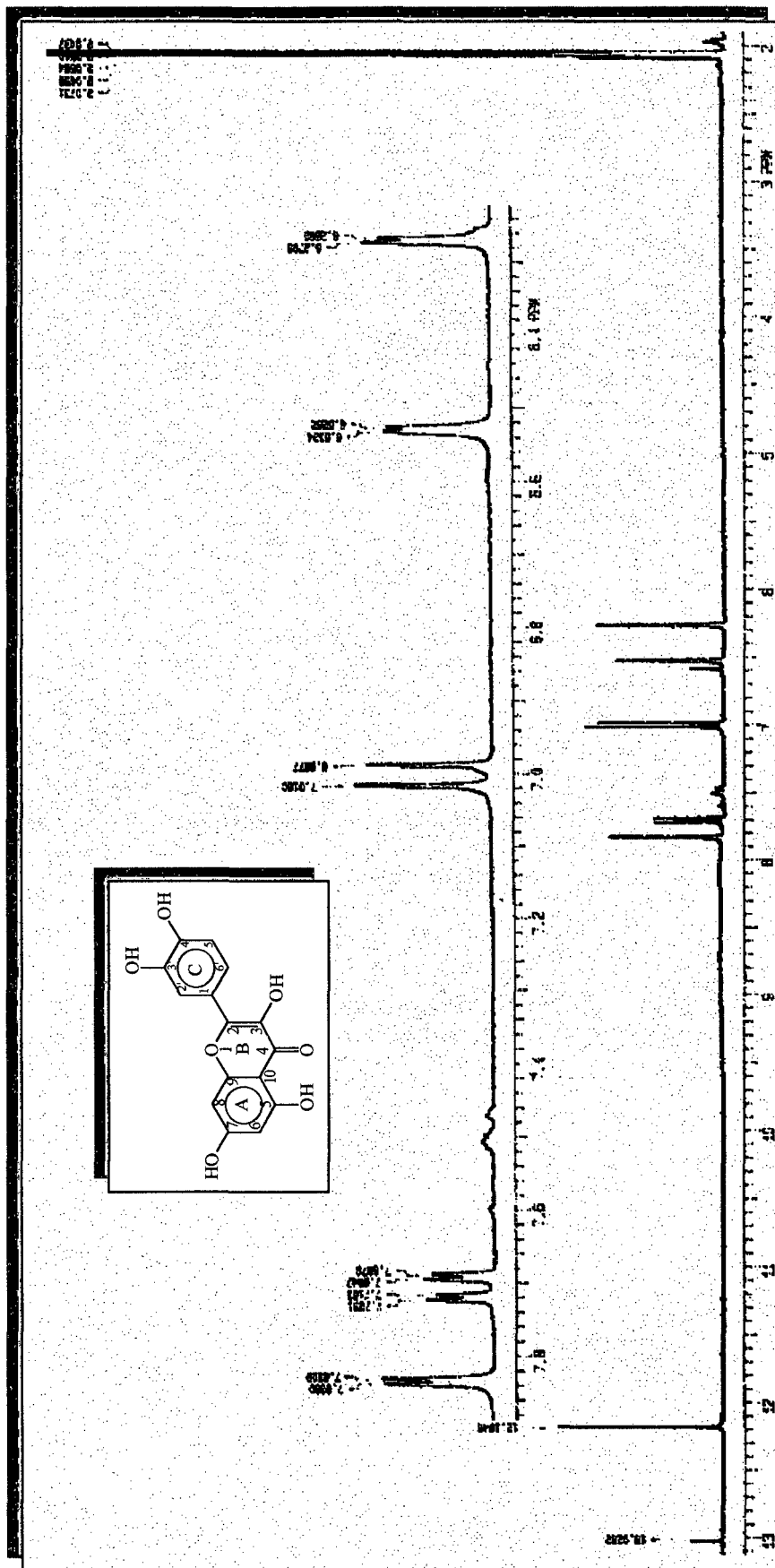


Figura 55 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto SS-6 em acetona-d<sub>6</sub>

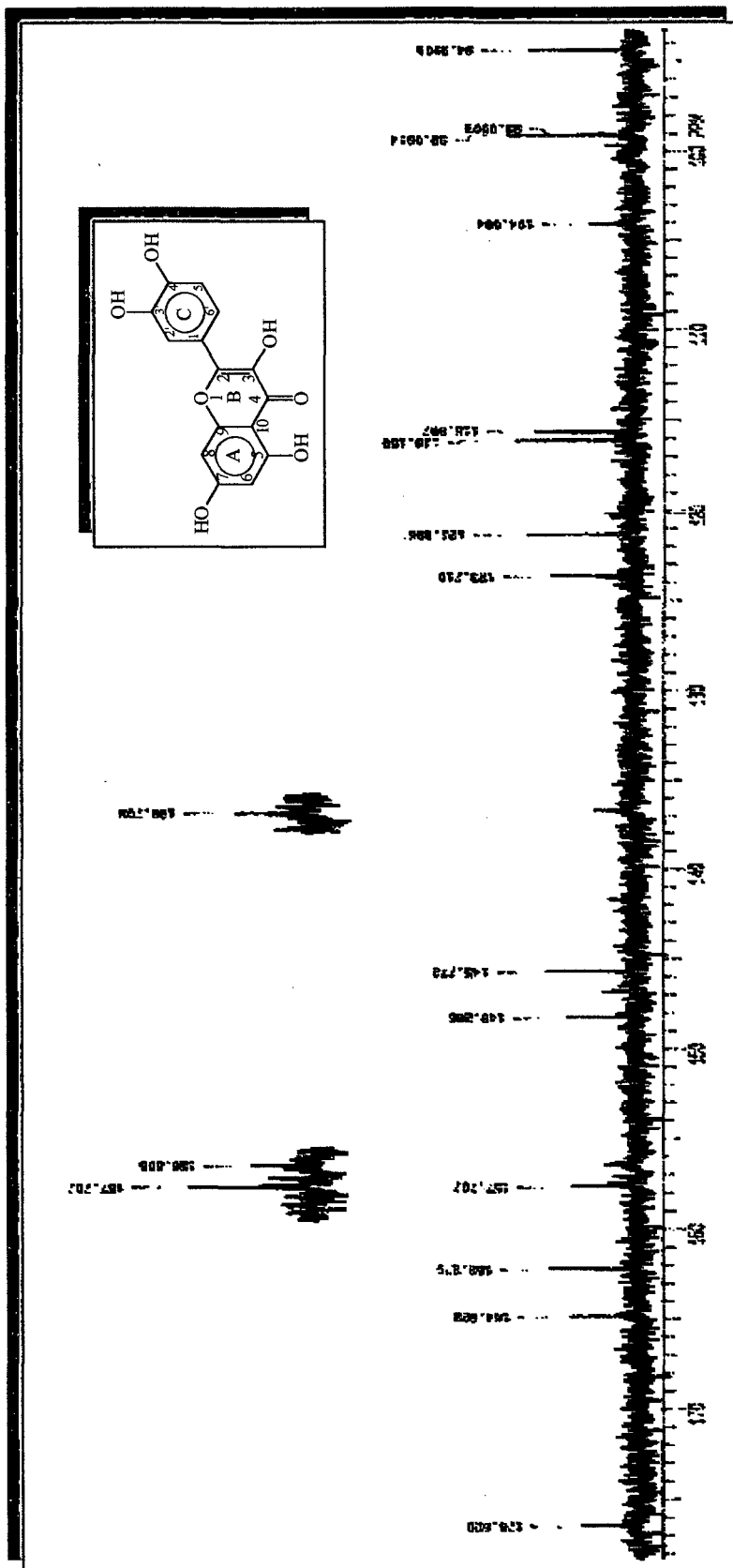


Figura 56 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto SS-6 entre 90 e 180 ppm, em acetona-d<sub>6</sub>

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 - ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e Farmacobiotecnologia. Colômbia: Premier, 1-15, 1997.
- 2 - UGAZ, O. L., Investigación Fitoquímica. Fondo Editorial: Lima, Peru, 1994, 2ª ed. Pontificia Universidad Católica del Peru.
- 3 - SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P. e PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. Porto Alegre, 1999. 1ª ed. Editora da Universidade/ UFRGS.
- 4 - COSTA, A. F. Farmacognosia. 1994, 5.ed. v.1:Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian
- 5 - CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Quím. Nova. v.21, n.1, p. 99-105, 1998.
- 6 - BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. Quím. Nova. v.17, n.5, p.405 - 445, 1994.
- 7 - LOZOYA, X. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. Rev. Investigación y Ciencia. Noviembre, 1997.

- 
- 8-BAUER, R. e TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. Phytomedicine, v.2, n.3, p.193-198, 1996.
- 9 - VILEGAS, J. H. Y., LANÇAS, F. M. e CERVI, A. C. High resolution gas chromatography analysis of “espíneira santa”( *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. Phytother. Res. v.8, p. 241-244, 1994.
- 10 - CORSINO, J.; ALECIO, A. C.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B. e FRANÇA, S. C.. Quantitative determination of maitenin and 22 $\beta$ -hidroximaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. Phytochemistry. v.9, p.245-247, 1998.
- 11 - FERREIRA, S. H. (Organizador); Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro, 1998. Academia Brasileira de Ciências.
- 12 - CECHINEL-FILHO, V. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais, correlação estrutura química - atividade biológica. Florianópolis, 1995. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.
- 13 - KINGSTON, D. I. The chemistry of taxol. Pharm. Ter. v.52, p.1-34, 1991.
- 14 - HORWITZ, S. B. How to make taxol from strack. Nature. v.367, p.593-594, 1994.



- 
- 15 - PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. Med. Res. Rev. v.18, n.5, p. 333-346, 1998.
- 16 - SALATINO, A. e SALATINO, M. L. F. Plantas Mediciniais e Tóxicas. Florianópolis, 1996. Resumo do conteúdo de Mini-curso oferecido durante a Reunião Anual da SBPC, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica.
- 17 - VROMAN, J. A.; GASTON, M. A. e AVERY, M. A. Current progress in the chemistry, medicinal chemistry and drug design of artemisinin based antimalarials. Curr. Pharm. Des. v.5, p.101-138, 1999.
- 18 - SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod. v.61, p.1053- 1071, 1998.
- 19 - MILES, D. H., NGUYEN, C. L. e MILES, D. H. Utilization of natural products for treatment of blood diseases. J. Nat. Prod. v. 5, p.421-440, 1998.
- 20 - CECHINEL-FILHO, V. e YUNES, R.A . Algumas considerações sobre a função e importância da fitoquímica de plantas medicinais para a obtenção de novos medicamentos. Quim. Nova. 2000, ( in press)

- 
- 21 - PEDROZA, C. R.; CECHINEL-FILHO, V. e YUNES, R. A. Fármacos x Fitoterápicos: A necessidade de desenvolvimento da indústria de fitofármacos e fitoterápicos no Brasil. Quim. Nova, 2000 ( in press)
- 22 - NIERO, R. Isolamento e identificação de compostos de *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico ; correlação estrutura-atividade. Dissertação de Mestrado. UFSC. Florianópolis, SC, 1993.
- 23 - NIERO, R.; MONTANARI, J. L.; ALVES, R. V.; SANT' ANA, A. E. G.; PIZZOLATTI, M .G., CALIXTO, J. B. e YUNES, R. A. Isolamento, caracterização química parcial e atividade antiedematogênica de compostos isolados de *Mandevilla illustris* (Apocynaceae). XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. M-64, pg 164, 17-20 de setembro de 1996 – Florianópolis – SC.
- 24 - SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V., NIERO, R., PIZZOLATTI, M. G., MONACHE F. D., YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis*. Planta Med. v.61, p.329-331, 1995.
- 25 - CECHINEL FILHO, V.; DAL MAGRO, J. e YUNES, R. A. Importância dos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais brasileiras. Grifos. v. 3, p. 36 -70, 1996.

- 
- 26 - CECHINEL FILHO, V.; LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, T. A. ; MIGUEL, O. G. e YUNES. R. A. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxylone. J. Ethnopharmacol. v. 53, p.171-173, 1996.
- 27-CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V. e 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.
- 28-CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V., NIRALDO, P. e YUNES, R. A. The plants of the genus *Phyllanthus* as a potential source of new drugs. Ciência e Cultura. v.49, n. 5/6, p.422-432, 1998.
- 29 - MEYRE-SILVA, C.; MORA, T. C.; BIAVATTI, M. W.; SANTOS, A. R. S.; DALMAGRO, J.; YUNES, R. A. e CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L.] Willd. Phytomedicine. v.5, n. 2, p.109-113, 1998.
- 30 - SAVI, A. O. S., BREVIGLIERI, E., CRUZ, A. B., YUNES, R. A. e CECHINEL FILHO, V. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves. Rev. Biol. Trop. v.44/45, p.601 - 603, 1996 /1997.
- 31 - FLORIANI, A. E. O., FERREIRA, J., SANTOS, A. R. S., DELLE-MONACHE, F., YUNES, R. A. e CECHINEL-FILHO,V. Analgesic compounds from *Epidendrum mosenii* stems. Pharmazie. v.53, n.6, p.426-427,1998.

- 
- 32 - SCHLEMPER, V., RIBAS, A., NICOLAU, M. e CECHINEL FILHO, V. Antispasmodic Effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. Phytomedicine. v.3, n.2, p.167-172, 1996.
- 33 - MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; DELLE MONACHE, F. e YUNES, R. A. a new sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *drimys winteri* barks. Phytochemistry. 2000 (in press).
- 34 - CECHINEL-FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; SANTOS, A. R. S.; PINHEIRO, T. R. ; YUNES, R. A.; MENDES, G. L.; CALIXTO, J. B. e MONACHE, F. D. Isolation and identification of active compounds from *drimys winteri* barks. J. Ethnopharmacol. v.62, p. 223-227, 1998.
- 35 - TRATSK, K. S.; CAMPOS, M. M.; VAZ, Z. R.; CECHINEL-FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by extract of *Drymis winteri*. Inflamm. Res. v.46, p. 509-514, 1997.
- 36 - HARVEY, L. A. e WATERMAN, G. P. The continuing contribution of biodiversity to drug discovery. Current Opinion in Drug Discovery and Development. v.1, n.1, p.71-76, 1998.
- 37 - MONTANARI, M. L.C.; MONTANARI C. A. e VELOSO-PILÓ, D. Sistemas transportadores de drogas. Quim. Nova, v.21, n.4, p.470-476, 1998.

- 
- 38 - BARREIRO, E. J. e FRAGA, C. A. M. Utilização do safrol. Principal constituinte químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. Quim. Nova. v.22, n.5, p.744-759, 1999.
- 39 - BRUM, R. L. Estudo químico e farmacológico de *Mandevilla illustris*. Determinação da estrutura do illustrol, um novo álcool nor-pregnano. Florianópolis, Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 1989.
- 40 - MENZIES, J. R. W.; PATERSON, S. J.; DUWIEJUA, M. e CORBETT, A. D. Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida*(Apocynaceae). Eur. J. Pharmacol. v.350, p.101-108, 1998.
- 41 - MUÑOZ, V.; MORETTI, C.; CARON, C.; MASSIOT, G. e Le MEN-OLIVIER. Isolation of Bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii*. Planta Med. v.60, p.455-459, 1994.
- 42 - BEEK, T. A.; KUIJLAARS, F. L. C.; THOMASSEN, P. H. A. M.; VERPOORTE, R. e SVENDSEN, A. B. Antimicrobially active alkaloids from *Tabernaemontana pachysiphon*. Phytochemistry. v.23, n.8, p.1771-1778, 1984.
- 43 - HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. e RUAGRUNGI, N. 10-Demethoxykopsidasinine from *Kopsia jasminiflora*. Phytochemistry. v.27, n.8, p. 2719-2723, 1988.

- 
- 44 - SIDDIQUI, S.; HAFEEZ, F.; BEGUM, S. e SIDDIQUI, B. S. Isolation and structure of two cardiac glycosides from the leaves of *Nerium oleander*. Phytochemistry. v.26, n.1, p.237-241, 1987.
- 45 - YUNES, R. A.; BRUM, R.; CALIXTO J. B. e RIMPLER, H.; Illustrol, a secosteroid derivative from *Mandevilla illustris*, Phytochemistry. v.34, n.3, p.787-790, 1993.
- 46 - CABRERA, G. M.; PALERMO, J.A. ; SELDES, A. M.; GROS, E. G. e OBERTI, J. C. Steroidal derivatives from the roots of *Mandevilla pentlandiana*. Phytochemistry, v.30, n.4, p.1239-1241, 1991.
- 47 - CALIXTO, J.B., NICOLAU, M. e YUNES, R.A. The selective antagonism of bradykinin action on rat-isolated uterus by crude *Mandevilla velutina* extract. Brit. J. Pharmacol. v.85, p.729-731,1985.
- 48 - CALIXTO, J.B., NICOLAU, M., PIZZOLATTI, M.G. e YUNES, R.A. Kinin antagonist activity of compounds from *Mandevilla velutina* in the rat-isolated uterus. Brit. J. Pharmacol. v.91, p.199-204, 1987.
- 49 - HENRIQUES, M. G.; FERNANDES, P. G.; VEG, V. D.; YUNES, R. A.; CORDEIRO, R. S. e CALIXTO, J. B. Inhibition of rat paw oedema and pleurisy by the extract from *Mandevilla velutina*. Agents and Actions, v.33, n.3/4, p. 272-278, 1991.

- 
- 50 - CABRERA, G. M.; OBERTI, J. C.; GROS, E. G. e SELDES, A.M. Aromadendrane sesquiterpene from *Mandevilla pentlandiana*. Phytochemistry, v.34, n.6, p.1642-1643, 1993.
- 51 - CABRERA, G. M.; PALERMO, J.A .; DELUCA, M. E.; SELDES, A. M.; GROS, E. G.; OBERTI, J. C.; CROCKET, J. e GROSS, M. L. Cardenolide glycosides from the roots of *Mandevilla pentlandiana*. Phytochemistry, v.32, n.5, p.1253-1259, 1993.
- 52 - YUNES, R. A.; PIZOLATTI, M.G.; SANT'ANA, A. E. G.; HAWKES, G. E. e CALIXTO, J. B. The structure of velutinol A, an anti-inflammatory compound with a novel pregnane skeleton. Phytochem. Anal. v.4, p.76-81, 1993.
- 53 - NEVES, P. C.; NEVES, M. C.; CRUZ, A. B.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES R. A. e CALIXTO J. B. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A2 and phospholipade C. Eur. J. Pharmacol. v.243 n.3, p.213-219, 1993.
- 54 - CALIXTO, J. B., NICOLAU, M., PIZZOLATTI, M. G. e YUNES, R. A. Kinin antagonist activity of compounds from *Mandevilla velutina* in the rat-isolated uterus. Brit. J. Pharmacol. v.91, p.199-204, 1987.
- 55 - CALIXTO, J.B., NICOLAU, M. e YUNES, R.A. Antagonistic effect of *Mandevilla velutina* extract on kinin-induced contractions of guinea-pig and cat ileum longitudinal smooth muscle. Gen. Pharmacol. v.19, p. 595-599, 1988.

- 
- 56 - CALIXTO, J. B., PIZZOLATTI, M. G. e YUNES, R. A. The competitive antagonistic effect of *Mandevilla velutina* on kinin-induced contractions of rat uterus and guinea-pig ileum "in vitro". Brit. J. Pharmacol. v.94, p.1133-1142, 1988.
- 57 - CALIXTO, J.B., YUNES, R.A., ERA, G. A. e MEDEIROS, Y.S. Nonpeptides bradykinin antagonists. In: Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research Burch, R.M. ed. , p. 98-127, New York ,Marcel Dekker, 1991.
- 58 - CALIXTO, J.B., ZANINI, JR., J.C., CRUZ, A. B. e MEDEIROS, Y.S. Extract and compound obtained from *Mandevilla velutina* inhibit arachidonic acid-induced ear oedema in mice, but not rat stomach contraction. Prostaglandins. v.41, p.515-525, 1991.
- 59 - CALIXTO, J.B. e YUNES, R.A. antagonist of kinin-induced contraction of isolated rat uterus by the crude hydroalcoholic extract from *Mandevilla illustris.* Gen. Pharmacol. v.22, p.99-102, 1991.
- 60 - BKAILY,G.; ORLEANS, P. D.; CALIXTO. J. B. e YUNES, R. A . Specific steady-state R-type Ca<sup>2+</sup> channel and used thereof. Patent N<sup>o</sup> 70857-228, Canadá, 1998.
- 61 - JOLY, A. B. Introdução a Taxonomia Vegetal. São Paulo: Nacional, p.398-406, 1998.



- 
- 62 - ZONTA C. M. e RUEDIGER R. Estudo experimental sobre o efeito hipoglicemiante da amora branca, *Rubus imperialis* Chum. (Rosaceae). Monografia de Estágio Universidade do Vale do Itajaí – Faculdade de Ciências Químico-Farmacêutica, Itajaí, SC, 1996.
- 63 - CIRILO, V.K. Manual de Plantas Mediciniais, Francisco Beltrão-Paraná: Assessor, 1993. 44th ed.
- 64 - CORRÊA, Pio M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro : Imprensa Nacional. v.5, p.137, 1984.
- 65 - ROBERTSON, G. W.; GRIFFITHS, D. W.; WOODFORD, J. A. T. e BIRCH, B. Changes in the chemical composition of volatiles released by the flowers and fruits of the red raspberry (*Rubus idaeus*) cultivar glen prosen. Phytochemistry. v.38, n.5, p. 1175-1179, 1995.
- 66 – MIYAGAWA, K., KODAMA, T., e FUJII, W. EP 0 727 218 A2 – EUROPEAN PATENT APPLICATION – Anti-allergic composition containing a god-tipe ellagitannin as active ingredient. Date of publication : 21.08.1996 Bulletin 1996/34. Application number : 96101937.9. Date of filing : 09.02.1996.
- 67 - DURHAN, DAVID G. ; LIU, XIAOJUN ; RICHARDS E. e MICHAEL R. A triterpene from *Rubus pinfaensis*. Phytochemistry. v.36, n.6, p. 1469-1472, 1994.

- 
- 68 - RICHARDS, R. M. E. ; DURHAM, D. G. e LIU, X. Antibacterial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. Planta Med. v.60, p.471-473, 1994.
- 69 - RIVERA, D. e OBON, C. The ethnopharmacology of Madeira and Santo Islands, a review. J. Ethnopharmacol. p.73-93, 1995.
- 70 - WANG, B.G. SHEN, M. X. YANG, L. e JIA. J. Z. Pentacyclic triterpenoid glycosyl esters from *Rubus pileatus*. Phytochemistry. v.46, n.3, p.559-563, 1997.
- 71 - WANG, B.G. e JIA. J. Z. Triterpenes and triterpene glycosyl ester from *Rubus pungens* Camb. Var *Oldhamii*. Phytochemistry. v.49, n.1, p.185-188, 1998.
- 72 - LEMUS, I.; GARCIA, R.; DELVILLAR, E. e KNOP, G. Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. Phytother Res. v.13, n.2, p. 91-94, 1999.
- 73 - DURHAM, D. G.; LIU, X. I. e RICHARDS, E. M. Unsaturated E-ring triterpenes from *Rubus pinfaensis*. Phytochemistry. v.42, n.2, p. 505-508, 1996.
- 74 - MIGUEL, O. G. Componentes químicos de *Sebastiania schottiana* Muell Arg. hipóteses sobre a correlação entre a estrutura e atividade farmacológica. Florianópolis, 1987. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

- 
- 75 - GAERTNER, M. Isolamento e identificação de compostos farmacologicamente ativos, presentes nas raízes de *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae). Itajaí, 1997. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI.
- 76 - CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; MIGUEL, O. G. e RAE, G. A. Effects of *Sebastiania schottiana* extracts on isolated smooth muscle contraction. Planta Med. v.6, p. 444-445, 1986.
- 77 - YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; MIGUEL, O. G. e DELLE MONACHE, F. Triterpenes from *Sebastiania schottiana*. Planta Med. v.56, p. 242-243, 1990.
- 78 - LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, S. T. A.; CALIXTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O. G. e YUNES, R. A. Preliminary evaluation of antifungal activity of xanthoxyline. Acta Farm. Bon. v.14, p. 1-4, 1995.
- 79 - CALIXTO, J. B.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A. e RAE, G. A. Action of 2-Hydroxy-4,6- dimethoxyacetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. Planta Med. v.56, p. 31-35, 1990.
- 80 - CECHINEL FILHO, V.; LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; CALIXTO, J. B.; MIGUEL, O. G. e YUNES, R. A. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxyline. J. Ethnopharmacol. v.53, p.171-173, 1996 .

- 
- 81 - CECHINEL FILHO, V.; VAZ, Z. R.; CALIXTO, J. B. e YUNES, R. A. Synthesis of xanthoxiline derivates with antinociceptive and antioedematogenic activities. Eur. J. Med. Chem. v.31, p. 833-839, 1996.
- 82 - GAERTNER, M.; MÜLLER, L.; ROOS, J. F.; CANI, G.; SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. e CECHINEL-FILHO, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. Phytomedicine. v.6, n.1, p. 41-44, 1999.
- 83 - SIDDIQUI, B. S.; NAEED, A.; BEGUM, S. e SIDDIQUI, B. Minor iridoids from the lesves of *Plumeria obtusa*. Phytochemistry. v.37, n.3, p. 769-771, 1994.
- 84 - SAITO, N.; TATSUZAWA, F.; YODA, K. e HONDA, T. Acylated cianidin glycosides in the violet-blue flowers of *Ipomoea purpurea*. Phytochemistry. v.40, n.4, p. 1283-1289, 1995.
- 85 - CREMER, D. e POPLE, J. A. J. Am. Chem. Soc. v.97, p. 1354-1358, 1975.
- 86 - SUGAMA, K. e HAYASHI, K. A glycoside from dried roots of *Cynanchum paniculatum*. Phytochemistry. v.27, n.12, p. 3984-3986, 1988.
- 87 - COLLIER, H. D. J.; DINNIN, L. C. e JOHNSON, C. A. The abdominal response and its supression by analgesic drugs in the mouse. Br. J. Pharmacol. v.32, p. 295-310, 1968.

- 
- 88 - SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V., NIERO, R., PIZZOLATTI, M. G., MONACHE F. D., YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis*. Planta Med. v.61, p. 329-331, 1995.
- 89 - HUNSKAAR, S.; FASMAR, O. B. e HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain. V.30, p.103-114, 1987.
- 90 - LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; FLORIANI, A. E. O. e CECHINEL-FILHO, V. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. Phytochemistry. v.4, p.141-144, 1997.
- 91 - MARINI-BETTÓLO, G. B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M.; GALEFFI, C. e MESSANA, I. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. J. Chromat.A. v.213, p. 113-127, 1981.
- 92 - HOUGHTON, P. J. e LIAN, M. L. Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*. Phytochemistry. v.25, n.8, p. 1939-1944, 1986.
- 93 - SETO, T.; TANAKA, T. ; TANAKA, O. e NARUHASHI, N.  $\beta$ -Glucosyl esters of 19 $\alpha$ - hidroxyursolic acid derivatives in leaves of *Rubus* species. Phytochemistry. v.23, n.12, p. 2829-2834, 1984.

- 
- 94 – MAHATO, S. B. e KUNDU, A. P.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids. A compilation and salient features . Phytochemistry. v.37, n.6, p. 1517-1575, 1994.
- 95 – ZHOU, X.H.; KADSAI, K.; OHTAMI, O.; TANAKA, O.; NIER, R.; YANG, C.; ZHOU, J. e YAMASAKI, K. Oleanane and ursane glucosides from *Rubus* species. Phytochemistry. v.31, p. 3642-3644, 1992.
- 96 – HESS, S. C. Estudos químicos biológicos e farmacológicos com *Vochysia divergens* POHL (Vochysiaceae) e com *Ocotea suaveolens* (Meissn) Hassler (Lauraceae). Florianópolis, 1995. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 163p.
- 97 - NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; SOUZA, M. M.; MONTANARI, J. L.; YUNES, R. A. e DELLE MONACHE, F. Antinociceptive activity of Niga-ichigoside F1 from *Rubus imperialis*. J. Nat. Prod. v.62, p. 1145-1146, 1999.
- 98 – CAMPOS, R. O . P.; SANTOS A . R. S.; VAZ, Z.R.; PINHEIRO, T.R.; PIZZOLATTI, M. G.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A . e CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthones isolated from *Polygala cyparissias* (Polygaceae). Life Science. v.61, n.16, p. 1619-1630, 1997.

- 
- 99 - MACEDO, A . F.; BARBOSA, N. C.; ESQUIEL, M. A . SOUZA, M. M. e CECHINEL FILHO, V. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternantera brasiliiana*. Pharmazie. v.54, n.10, p.776-779, 1999.
- 100 - NIERO, R.; AMARAL, F.; PIZZOLATTI, M. G.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F. e YUNES, R. A Isolation of triterpenes and an acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. ex Boiss (Euphorbiaceae). Acta Farm. Bon. v.15, n.4, p. 239-242, 1996.
- 101 - FUKUOCA, M. Chemical and toxicological studies on *Bracken Fern*. Isolation of 5-o-caffeoylshikimic acid as an antithiamine factor. Chem. Pharm. Bull. v.30, n.9, p. 3219-3224, 1982.
- 102 - AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. P. 103, 135 e 155, 1989.
- 103 - OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. e FERREIRA, D. T. F. Flavonóides das flores de *Siffitia chrysantha* Mikan, Quím. Nova, v. 22, n.2, p. 182-184, 1999.
- 104 - AZIZ, N. H.; FARAG, S. E. e MOUSA, L. A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios. v.93, n.374, p.43-54, 1998.
- 105 - LARANJINHA, J. A.; ALMEIDA, L. M. e MADEIRA, V. M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant upon low density lipoprotein peroxidation. Biochem Pharmacol. v.48, n.3, p. 487-494, 1994.

- 
- 106 - KAWAMORI, T.; TANAKA, T. e KOJIMA, T. Supression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. J. Cancer Res. v.85, n.7, p. 686-691, 1994.
- 107 - HIROSE, Y.; TANAKA, T. e KAWAMORI, T. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. Carcinogenesis. v.16, n.10, p. 2337-2342, 1995.
- 108 - OHNISHI, M.; YOSHIMI, N. e KAWAMORI, T. Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and contunolide on 7,2-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. Jpn: J. Cancer Res. v.88, p. 111-119, 1997.
- 109 - TANAKA, T.; KOJIMA, T. e KAWAMORI, T. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. Cancer. v.75, n.6, Suppl, p. 1433-1439, 1995.
- 110 - TSENG, T. H.; HSU, J. D. e L O, M. H. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. Cancer Lett. v.126, n.2, p. 199-207, 1998.



N1—C6	1.441 (3)	C7—C8	1.514 (3)
N2—C1	1.350 (3)		
O1—N1—O2	121.5 (2)	N2—C7—C8	113.8 (2)
C1—N2—C7	123.9 (2)	F1—C11—C10	118.7 (3)
C2—C1—C6	115.3 (2)	C10—C11—C12	122.6 (2)
C1—C2—C3	122.3 (2)	C11—C12—C13	118.4 (2)
C1—C6—C5	122.0 (2)		
O1—N1—C6—C5	3.9 (3)	C2—C3—C4—C11	-178.2 (2)
C7—N2—C1—C2	-3.4 (3)	N2—C7—C8—C9	-146.7 (2)
C1—N2—C7—C8	73.9 (2)	F1—C11—C12—C13	178.9 (2)

Table 2. Hydrogen-bonding geometry (Å, °)

D—H...A	D—H	H...A	D...A	D—H...A
N2—HN...O2	0.79 (2)	2.03 (2)	2.624 (2)	132 (2)
N2—HN...O2 <sup>i</sup>	0.79 (2)	2.49 (2)	3.048 (3)	129 (2)

Symmetry code: (i) 1 - x, 1 - y, 1 - z.

H atoms, except for the amino H atom, were placed geometrically 0.95 Å from their parent atoms and a riding model was used with  $U(H) = 1.3U_{eq}(C)$ . The amino H atom was taken from a difference Fourier map and was refined isotropically.

Data collection: CAD-4 EXPRESS (Enraf-Nonius, 1990). Cell refinement: CAD-4 EXPRESS. Data reduction: MolEN (Fair, 1990). Program(s) used to solve structure: MolEN. Program(s) used to refine structure: MolEN. Molecular graphics: ORTEPII (Johnson, 1976) in MolEN. Software used to prepare material for publication: MolEN. Hydrogen bonds were calculated with PARST (Nardelli, 1995).

The authors acknowledge the purchase of the CAD-4 diffractometer under Grant DPT/TBAG1 of the Scientific and Technical Research Council of Turkey.

Supplementary data for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: FR1168). Services for accessing these data are described at the back of the journal.

## References

- Dhaneshwar, N. N., Tavale, S. S. & Pant, L. M. (1978). *Acta Cryst.* **B34**, 2507–2509.
- Dickinson, C., Stewart, J. M. & Holden, J. R. (1966). *Acta Cryst.* **21**, 663–670.
- Domenicano, A., Vaciago, A. & Coulson, C. A. (1975). *Acta Cryst.* **B31**, 221–234.
- Enraf-Nonius (1990). CAD-4 EXPRESS. Version 1.1. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands.
- Fair, C. K. (1990). MolEN. An Interactive Intelligent System for Crystal Structure Analysis. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands.
- Göker, H., Kuş, C. & Abbasoğlu, U. (1995). *Arch. Pharm.* **328**, 425–430.
- Johnson, C. K. (1976). ORTEPII. Report ORNL-5138. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- Low, J. N., Doidge-Harrison, M. S. V. & Cobo, J. (1996). *Acta Cryst.* **C52**, 964–966.
- Maurin, J. & Krygowsky, T. M. (1988). *J. Mol. Struct.* **172**, 413–421.
- Nardelli, M. (1995). *J. Appl. Cryst.* **28**, 659.
- North, A. C. T., Phillips, D. C. & Mathews, F. S. (1968). *Acta Cryst.* **A24**, 351–354.
- Prasad, L., Gabe, E. J. & Le Page, Y. (1982). *Acta Cryst.* **B38**, 674–675.
- Punte, G. & Rivero, B. E. (1991). *Acta Cryst.* **C47**, 2118–2122.
- Punte, G., Rivero, B. E., Socolovsky, S. E. & Nudelman, N. S. (1989). *Acta Cryst.* **C45**, 1952–1957.
- Punte, G., Rivero, B. E., Socolovsky, S. E. & Nudelman, N. S. (1991). *Acta Cryst.* **C47**, 1222–1227.

*Acta Cryst.* (1999). **C55**, 827–829

## A new 14:15-seco-15-norpregnane derivative from *Mandevilla illustris* Woodson (Apocynaceae)

IVO VENCATO,<sup>a</sup> RIVALDO NIERO,<sup>a</sup> JOÃO L. MONTANARI,<sup>a</sup> JOÃO B. CALIXTO,<sup>b</sup> ANTONIO E. G. SANT'ANA<sup>c</sup> AND ROSENDO A. YUNES<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento Química, UFSC, 88040-900 Florianópolis SC, Brazil, <sup>b</sup>Departamento Farmacologia, UFSC, 88040-900 Florianópolis SC, Brazil, and <sup>c</sup>Departamento Química, UFAL, 57072-970 Maceió AL, Brazil. E-mail: vencato@qmc.ufsc.br

(Received 29 June 1998; accepted 11 January 1999)

## Abstract

The structure of a new 14:15-seco-15-norpregnane derivative, 3'-14-epoxy-4',15-dioxaandrost-5-en-3β-yl acetate, C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>, isolated from the ethyl acetate extract of *Mandevilla illustris* (Apocynaceae), is described. Its chemical substructure contains an unusual 1-methyl-2,5,9-trioxatricyclo[4.2.1.0<sup>3,7</sup>]nonane moiety. Features of the packing include an intermolecular C—H...O contact (C19—H...O5) of 3.230 (7) Å.

## Comment

*Mandevilla velutina* and *M. illustris* (Apocynaceae) are native Brazilian plants, and infusions or alcoholic extracts of their rhizomes are used in popular medicines as anti-inflammatory agents and in the treatment of snakebites. Extracts and different compounds from these plants have been shown to antagonize bradykinin-induced muscle contraction and to have potent inflammatory activity (Calixto *et al.*, 1985; 1987; Calixto, Nicolau, Pizzolatti & Yunes, 1988; Calixto, Nicolau & Yunes, 1988; Calixto *et al.*, 1991). We have previously isolated from *M. velutina*, a compound with a novel pregnane structure, which was named velutinol A and which showed bradykinin antagonist activity (Yunes, Pizzolatti *et al.*, 1993); the structure of velutinol A was confirmed in a previous report (Bento *et al.*, 1996). The isolation from *M. illustris* of a compound named illustrol, (I), with a closely related 14:15-seco-15-norpregnane structure, was subsequently reported (Yunes, Brum *et al.*, 1993). Although alcoholic extracts of *M. illustris* antagonize bradykinin, illustrol was shown to be inactive in isolated rat uterus and isolated guinea pig ileum bradykinin-induced muscle contraction assays (Yunes, Brum *et al.*, 1993).

In this study, we report the crystal structure of the acetylated derivative of illustrol, (II), a new natural compound isolated from *M. illustris*, to define clearly

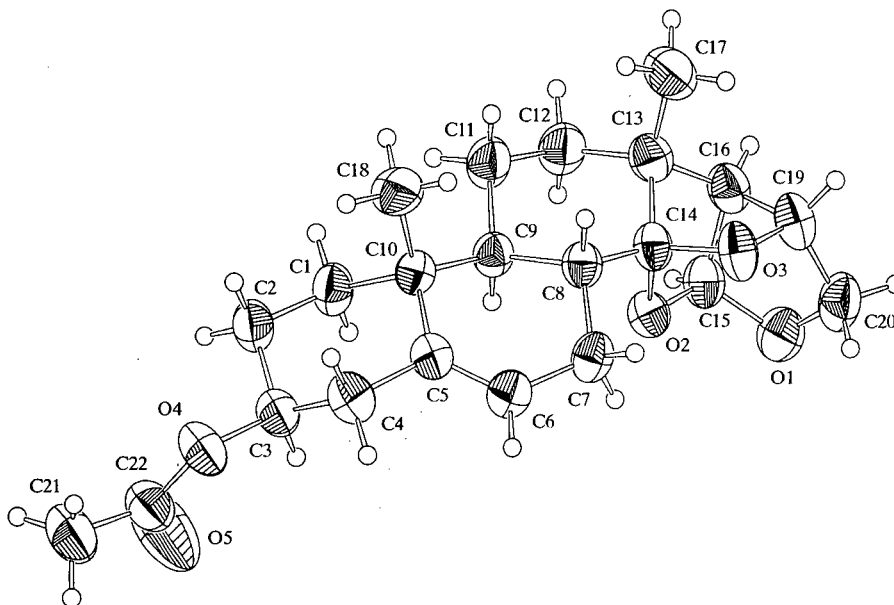
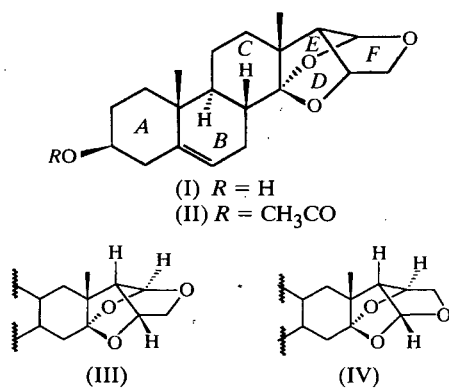


Fig. 1. A ZORTEP (Zsolnai *et al.*, 1996) drawing of the molecular structure of (II). Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level and H atoms are shown as spheres of an arbitrary radius.

the isomer, (III) or (IV), to which this compound corresponds, and to determine the molecular structure of the unusual 1-methyl-2,5,9-trioxatricyclo[4.2.1.0<sup>3,7</sup>]-nonane moiety assigned from one- and two-dimensional NMR spectroscopy (Yunes, Brum *et al.*, 1993). We have found no examples of this tricyclic system in the Cambridge Structural Database (1997).



A ZORTEP (Zsolnai *et al.*, 1996) illustration of the molecular structure of (II) is shown in Fig. 1 and selected bond distances and angles are given in Table 1. Based on the known absolute stereochemistry at six of the chiral centres shown in (II) (Yunes, Brum *et al.*, 1993), the present crystal structure defines the absolute stereochemistry at the other three chiral centres, and it is clear that the molecular structure corresponds to isomer (III). The C5—C6 distance of 1.327(6) Å is consistent with a C=C double bond. The C5—C6—C7 bond angle of 125.2(4)° confirms the *sp*<sup>2</sup> character of C6. The tricyclo rings show several distortions in bond distances and angles. Within the cage, the C—C

lengths vary from 1.503(7) to 1.539(7) Å and the C—C—C angles lie in the range 91.1(3)–104.6(4)°. As a consequence, the bond angles involving atoms C13 and C14 also show distortions. These distortions would presumably contribute to the potential instability of the molecule.

Cremer & Pople (1975) puckering parameters show that ring A (C1—C5, C10) is in a chair conformation [ $Q = 0.556(5)$  Å,  $\theta = 9.5(5)$  and  $\varphi = 213(3)^\circ$ ], ring B (C5—C9) is in a half-chair, distorted towards a half-boat conformation [ $Q = 0.455(4)$  Å,  $\theta = 53.2(5)$  and  $\varphi = 78.6(7)^\circ$ ] and ring C (C8, C9, C11—C14) is in a chair conformation [ $Q = 0.558(5)$  Å,  $\theta = 4.3(5)$  and  $\varphi = 184(7)^\circ$ ]. Ring D (C13, C14, O3, C19, C16) adopts an envelope conformation with C13 *endo* [ $q_2 = 0.561(5)$  Å and  $\varphi_2 = 65.9(5)^\circ$ ], ring E (C13, C14, O2, C15, C16) is in an envelope conformation with C13 in the flap position [ $q_2 = 0.562(5)$  and  $\varphi_2 = 66.7(5)^\circ$ ] and ring F (C15, O1, C20, C19, C16) is in an envelope conformation with C16 *exo* [ $q_2 = 0.416(5)$  and  $\varphi_2 = 66.8(7)^\circ$ ].

The intermolecular packing is stabilized by a C—H...O interaction (Desiraju, 1996) [C19...O5<sup>i</sup> 3.230(7), H19...O5<sup>i</sup> 2.33(6) Å and C19—H19...O5<sup>i</sup> 155(5)°; symmetry code: (i)  $x - 1, 1 + y, z$ ]. Examination of the structure with PLATON (Spek, 1990) showed that there were no solvent-accessible voids in the crystal lattice.

## Experimental

The ethyl acetate extract was prepared as described previously by Yunes, Brum *et al.* (1993). This extract (40 g) was filtered

Chair and Department of Pharmaceutical Botany<sup>1</sup>, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Toxicological Laboratory<sup>2</sup>, Department of Laboratory Diagnostics, L. Rydygier's Hospital, Kraków, Poland

## Coumarin compounds in *Ammi majus* L. callus cultures

H. EKIERT<sup>1</sup> and E. GOMÓLKA<sup>2</sup>

Callus cultures of *Ammi majus* L. (bishop's weed), *Apiaceae*, were maintained on variants of Linsmaier-Skoog's (L-S) medium differing in the content of the phytohormones,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (BAP) (0.1–10.0 mg/l). The increments of callus tissue fresh weight showed considerable differences (1.4 bis 4.4-fold) during 4-week subcultures on the media tested. HPLC analysis revealed the presence of six compounds in the extracts of callus tissues, which are known metabolites in plants growing under natural conditions: the linear furanocoumarins psoralen, bergapten, xanthotoxin, isopimpinellin, imperatorin and their precursor umbelliferone. The total contents of coumarin compounds under examination showed marked differences dependent on the phytohormone concentrations in the medium. They ranged from 40.95 to 871.05 mg/100 g of dry weight. Imperatorin was the metabolite dominating among the furanocoumarins in calli from almost all tested variants of L-S medium (maximum content of 169.27 mg/100 g). Callus tissue cultured on one of the variants (0.1 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAP) yielded in high content of xanthotoxin (145.33 mg/100 g). On the majority of media, umbelliferone was also accumulated at high quantities (maximum content of 536.29 mg/100g). The medium containing 0.1 mg/l NAA and 0.1 mg/l BAP was the best for the accumulation of analysed coumarins. This medium favoured the formation of embryogenic callus. Xanthotoxin also dominated quantitatively among the furanocoumarins in the tested vegetative organs and fruits of the plant grown under natural conditions (leaves: 26.10 mg, roots: 5.55 mg, fruits: 3010.41 mg/100 g). Maximum contents of this metabolite in *in vitro* culture were many times higher than those found in vegetative plant organs but manifold lower than in fruits. On the other hand, maximum contents of imperatorin obtained in *in vitro* culture were many times higher in comparison with those detected in vegetative organs and fruits (leaves: 14.10 mg, roots: 3.30 mg, fruits: 94.70 mg/100 g of dry weight.). The *A. majus* L. callus culture, established in the course of the present experiments, can be considered a valuable model for studies of the biosynthesis of coumarin compounds, and a potential source of the psoralen 8-alkoxy derivatives imperatorin and xanthotoxin and their precursor umbelliferone.

### 1. Introduction

*Ammi majus* L., bishop's weed (*Apiaceae*) is a species growing mainly in the Mediterranean Basin. In Poland and other countries of Central and Eastern Europe, this species does not grow under natural conditions, though there have been attempts to grow it experimentally. In temperate climates, the fruits do not ripen in cooler and less sunny years. The plants are also frequently attacked by pathogens. *A. majus* L. fruits are considered the richest natural source of linear furanocoumarins, namely psoralen derivatives. The fruits of various origin were shown to contain about 20 compounds belonging to the aforementioned group [1–3]. Only a few reports demonstrated in the species under examination the occurrence of other secondary metabolites, mainly, coumarins, angular furanocoumarins, flavonoids [1, 2].

Among the linear furanocoumarins present in *A. majus* L. fruits, xanthotoxin, bergapten, isopimpinellin and imperatorin are the most important, in terms of their therapeutic potential. These furanocoumarins, psoralen derivatives, exhibit photosensitising and antiproliferative actions [4]. *A. majus* L. fruits are the basis for manufacturing most of the preparations used in dermatology (e.g. Meladinine<sup>®</sup> (Promedica), Oxsoralen<sup>®</sup>, Geralen<sup>®</sup> (Gerot), Psoraderm<sup>®</sup>-5 (Pharmagal)). Furanocoumarins can also act as calcium channel blockers [5]. For the aforementioned reasons, they were chosen as research object in this study.

*A. majus* L. was the research object for biotechnological studies aimed at both, the development of micropropagation methods [6–8] and the assessment of coumarin compounds production either endogenously [9] or stimulated by biotic and abiotic elicitors [10, 11]. Studies on determination of biosynthetic pathways of linear furanocoumarins were performed, too [12–14]. Recently, an attempt of its

genetic transformation has been undertaken using *Agrobacterium rhizogenes* to enhance furanocoumarin production [15]. Studies on furanocoumarin accumulation in *in vitro* cultures of this species were performed in our laboratory as early as in the eighties [9, 16]. The present study was conducted on callus cultures characterised by a higher furanocoumarin production capacity derived from another parent material. This paper analyses the effect of the phytohormone concentration on the content of these metabolites in *in vitro* cultures. The results of HPLC analysis of extracts from tissues cultured on different variants of the medium as well as of extracts from vegetative parts and fruits of plants grown under natural conditions, used for comparison, are presented below.

### 2. Investigations, results and discussion

*A. majus* L. callus tissue was derived from hypocotyl parts of sterile seedlings. Linsmaier-Skoog's medium (L-S) [17] containing 2 mg/l NAA and 2 mg/l BAP proved valuable for both callus initiation and supporting tissue growth. These results are in agreement with our previous experiments on callus cultures of *Anethum graveolens* L. (unpublished) and *Pastinaca sativa* L. [18], and *Ruta graveolens* L. shoot cultures [19]. They are also similar to our findings on previously established *A. majus* L. cultures [9, 16]. On the other hand, for the initiation of cultures of this species, Purohit et al. [8] and Króllicka et al. [10] proposed Murashige-Skoog's [20] medium that is richer in vitamins than L-S medium. Purohit et al. [8] proposed also other phytohormone composition,  $\alpha$ -indoleacetic acid (IAA) and kinetin.

In the present study, we observed a 1.4 bis 4.4-fold increase in callus fresh mass during a culture period of 4 weeks on the tested variants of L-S medium. These data

---

**ORIGINAL ARTICLES**

- 6 Gaertner, M.; Muller, L.; Roos, J. F.; Cani, G.; Santos, A. R. S.; Niero, R.; Cechinel Filho, V.; Delle Monache, F. Yunes, R. A.; Calixto, J. B.: *Phytomedicine* **6**, 41 (1999)
- 7 Tratsk, K. S.; Campos, M. M.; Vaz, Z. R.; Cechinel Filho, V.; Schlemper, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.: *Inflamm. Res.* **46**, 509 (1997)
- 8 Niero, R.; Calixto, J. B.; Filho, S. D. J.; Yunes, R. A.; Sant'Ana, A. E. G.: *Nat. Prod. Lett.* **13**, 63 (1999)
- 9 Santos, A. R. S.; Niero, R.; Cechinel-Filho, V.; Pizzolatti, M. G.; Delle Monache, F. Yunes, R. A.; Calixto, J. B.: *Planta Med.* **61**, 329 (1995)
- 10 Block, L. C.; Santos, A. R. S.; Souza, M. M.; Scheidt, C.; Yunes, R. A.; Santos, M. A.; Delle Monache, F.; Cechinel Filho, V.: *J. Ethnopharmacol.* **61**, 85 (1998)
- 11 Meyre-Silva, C.; Mora, T. C.; Biavatti, M. W.; Santos, A. R. S.; Dal-Magro, J.; Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V.: *Phytomedicine* **5**, 109 (1998)
- 12 Floriani, A. E. O.; Ferreira, J.; Santos, A. R. S.; Delle Monache, F.; Yunes, R. A.; Cechinel-Filho, V.: *Pharmazie* **53**, 426 (1998)
- 13 Collier, H. D. J.; Dinnen, L. C.; Johnson, C. A.; Schneider, C.: *Br. J. Pharmacol.* **32**, 295 (1968)
- 14 Hunskaar, S.; Hole, K.: *Pain* **30**, 103 (1987)
- 15 Hunskaar, S.; Fasmar, O. B.; Hole, K.: *J. Neurosc. Methods* **14**, 69 (1985)
- 16 Sakurada, T.; Katsumata, K.; Yogo, H.; Tan-no, K.; Sakurada, S.; Kishara, K.: *Neurosci. Lett.* **151**, 142 (1993)

Received January 7, 2000

Accepted February 15, 2000

Prof. Rivaldo Niero

Núcleo de Investigações Químico-

Farmacêuticas (NIQFAR)

Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)

R. Uruguai, 458, Cx. P. 360

88302-202, Itajaí – SC

Brazil

niero@mbox1.univali.br

**Table 3: Effect of the hydroalcoholic extract of *S. schottiana* given either intraperitoneally or orally, on capsaicin-induced neurogenic pain in mice**

HE	Dose (mg/kg)	Licking (s)	
		Intraperitoneal	Oral
	0	42.6 ± 1.8	43.4 ± 3.8
	3	34.7 ± 5.0	35.1 ± 1.5
	10	21.8 ± 2.6**	31.2 ± 3.3*
	30	9.7 ± 2.7**	29.8 ± 1.7**
	100	6.2 ± 2.6**	—
<sup>a</sup> ID <sub>50</sub>		13.3 (11.4–15.6)	ND
Maximum Inhibition (%)		85.0 ± 6.0	31.0 ± 4.0

Each group represents mean ± sem of 8 to 10 animals. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01 when compared with respective control values (ANOVA). <sup>a</sup> (mg/kg) with 95% confidence limits. ND: Not determined

nociceptive effect on neurogenic pain, this extract also showed strong activity when administered intraperitoneally, with ID<sub>50</sub> (mg/kg) of 13.3 (11.4–15.6), but to a lesser extent than when given orally (ID<sub>50</sub> > 100 mg/kg (Table 3)).

These results suggest that *S. schottiana* produces different constituents which may interfere with some mediators involved in both neurogenic and inflammatory pain responses. They seem to be poorly absorbed through the gastrointestinal tract. Further investigations are necessary to determine the mechanism of the antinociceptive effects of this extract and of the components of this plant.

Since we previously showed that two triterpenes from the roots of this plant, moretenone and glutinol, exhibited antinociceptive effects in mice [6], we evaluated using TLC whether these compounds are present in the aerial parts of *S. schottiana*. The results indicated that both compounds are also produced by the aerial parts of the plant. For this reason, we partitioned the hydroalcoholic extract to obtain three distinct fractions: hexane, ethyl acetate, and butanol. They were then analysed in writhing test at 10 mg/kg, intraperitoneally, causing inhibitions of 75 ± 6, 59 ± 7 and 95 ± 2%, respectively. This suggests that other polar components, besides triterpenes previously detected in this plant [6], exert antinociceptive effects in mice.

In summary, the results reported in this study show that the hydroalcoholic extract obtained from the aerial parts of *S. schottiana* exhibits pronounced antinociceptive effects in the experimental models used. Our studies confirm the antinociceptive activity of *S. schottiana* and support, at least partially, its use in folk medicine for the treatment of dolorous processes. Phytochemical and pharmacological investigations are currently being carried out to determine other active compound(s) present in this part of the plant as well as to elucidate the mechanism(s) of antinociceptive action.

### 3. Experimental

#### 3.1. Plant material

Leaves and stems of *S. schottiana* were collected in Apiúna in the State of Santa Catarina, Brazil, in September 1997 and classified by Dr. Ademir Reis (Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina). A voucher was deposited in the Herbarium FLOR (UFSC) under number 5397.

#### 3.2. Extract preparation

Dried aerial parts of *S. schottiana* (1.6 kg) were powdered and macerated with EtOH/H<sub>2</sub>O (50/50) at room temperature for seven days. The extract

was then concentrated under reduced pressure to the desired volume and stored at -20 °C. The resulting extract was dissolved in 0.9% NaCl solution to the desired concentration just before use.

#### 3.3. Pharmacological analysis

##### 3.3.1. Writhing test in mice

Abdominal constriction induced by intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%) was carried out according to the procedures described previously [9, 13] with minor modifications. Animals were pretreated with the extracts (3–30 mg/kg) or orally (50–400 mg/kg) 30 or 60 min before the acetic acid injection. Control animals received a similar volume of 0.9% NaCl (10 ml/kg, i.p.). All experiments were carried out at 23 ± 2 °C. After the challenge, pairs of mice were placed in separate boxes and the number of abdominal constrictions of the abdominal muscles together with stretching, were cumulatively counted over a period of 20 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction of the number of abdominal contractions between control animals and mice pretreated with extracts studied.

##### 3.3.2. Formalin-induced pain test

The procedure used was essentially similar to that previously described [14, 15]. The animals were acclimatized to the laboratory for at least 24 h. Animals from the same strain were slightly anesthetized with diethyl ether, except when used to analyze the first phase of formalin-induced pain, and 20 µl of 2.5% of 0.92% formaldehyde made up of PBS (phosphate buffered solution, containing NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM and phosphate buffer 10 mM), was injected subcutaneously under the plantar surface of the left hindpaw using a Hamilton syringe. The animals were treated with normal saline (10 ml/kg, i.p.) or with hydroalcoholic extract (3–30 mg/kg, i.p.) or (40–400 mg/kg, v.o.) obtained from *S. schottiana* 60 min before formalin injection. After intraplantar irritant application, the animals were immediately placed into a glass cylinder (20 cm diameter). The time spent by animals licking or biting the injected paw was timed with a chronometer and was considered indicative of pain. Two mice (control and treated) were simultaneously observed from 0 up to 30 mins following formalin injection. The initial nociceptive scores normally peaked 5 min after (first phase, representing the neurogenic pain), and 15–30 min after formalin injection (second phase, representing the inflammatory pain).

##### 3.3.3. Capsaicin-induced pain test

The procedure used was similar to that described previously [16]. The animals were placed individually in transparent glass cylinders. Following the adaptation period, 20 µl of capsaicin (1.6 µg/paw) was injected under the skin of the plantar surface of the right hindpaw, using a microsyringe. The animals were observed individually for 5 min following capsaicin injection. The amount of time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. The animals were treated with the hydroalcoholic extract (10 mg/kg, i. p.) or saline (10 ml/kg, i.p.) or (25–100 mg/kg, v.o.), 1 hour before administration of capsaicin. Control animals received a similar volume of 0.9% NaCl (10 ml/kg, i.p.).

#### 3.4. Statistical analysis

The results are presented as mean ± s.e.m, except the mean ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of drugs or compounds reducing the antinociceptive responses by 50% relative to control value) which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The statistical significance among groups was first analyzed by ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test to check significance between groups. P-values of less than 0.05 were considered significant. The ID<sub>50</sub> values were determined by graphical interpolation from individual experiments.

Acknowledgements: The authors are grateful to Prof. Dr. A. Reis for the botanical identification and to CAPES, CNPq and ProPPEX/UNIVALI for financial support.

#### References

- Calixto, J. B.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; Rae, G. A.: *Planta Med.* **56**, 31 (1990)
- Calixto, J. B.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; Rae, G. A.: *Planta Med.* **52**, 444 (1986)
- Cechinel-Filho, V.; Lima, E. O.; Morais, V. M. F.; Calixto J. B.; Yunes, R. A.: *J. Ethnopharmacol.* **53**, 171, (1996)
- Cechinel-Filho, V.; Vaz, Z. R.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.: *Eur. J. Med. Chem.* **31**, 833 (1996)
- Miguel, O. G. Componentes químicos de *Sebastiania schottiana* Muell Arg., hipóteses sobre a correlação entre a estrutura e atividade farmacológica. p. 88 MSc. Thesis, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil, 1986

Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas (NIQFAR)<sup>1</sup>, Curso de Farmácia/CCS, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, Departamento de Farmacologia<sup>2</sup>, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88.040-900, Florianópolis, and Departamento de Química<sup>3</sup>, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88.040-900, Florianópolis, SC, Brazil

## Antinociceptive activity of a hydroalcoholic extract obtained from aerial parts of *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae)

R. LUZZI<sup>1</sup>, C. SCHEIDT<sup>1</sup>, J. F. ROOS<sup>1</sup>, V. CECHINEL FILHO<sup>1</sup>, A. R. S. SANTOS<sup>1</sup>, J. B. CALIXTO<sup>2</sup>, R. A. YUNES<sup>3</sup> and R. NIERO<sup>1,3</sup>

This study analyzed the antinociceptive effects of a hydroalcoholic extract obtained from the aerial parts of *Sebastiania schottiana*, a Brazilian medicinal plant used to treat various painful diseases. For this purpose, the writhing test, capsaicin and formalin induced-pain in mice were used. The results showed that the hydroalcoholic extract exhibited considerable antinociception in all the models studied, being more potent than aspirin.

### 1. Introduction

The genus *Sebastiania* consists of a group of plants which are used in several parts of the Brazil and South America to treat different diseases, especially as a remedy for kidney bladder calculi and dolorous process [1,2]. Biological studies have confirmed that these plants produce active principles which exert antispasmodic, fungicidal and fungistatic [3, 4] activities. *S. schottiana* (Euphorbiaceae) grows abundantly in the South of Brazil, being known as "sarandi negro", "branquicho" or "branquilha"[5]. No reports have been found regarding antinociceptive properties of extracts and compounds of the aerial parts, although we have previously shown the presence of triterpenes with this activity from roots [6].

The aim of our research group is to discover naturally occurring active constituents and in recent years many plants which grow in our region have been investigated. Some of them have shown promising pharmacological results *in vitro* or *in vivo* [7–12]. As part of our continuing research in this field and based on the scarcity of studies about its pharmacological properties, we initially prepared a hydroalcoholic extract from the aerial parts of *S. schottiana*, and evaluate it as antinociceptive in mice.

### 2. Investigations, results and discussion

Considering that a hydroalcoholic extract of the aerial parts of this plant inhibit acetic acid induced abdominal constrictions in mice we studied its activity in two other models using formalin and capsaicin. Aspirin as reference drug was included for comparison.

In the writhing test, the hydroalcoholic extract, when given intraperitoneally, caused graded and dose-dependent inhibition of abdominal constrictions, with ID<sub>50</sub> (mg/kg) of 6.3 (5.4–7.3). It was about 3 times more potent than aspirin a standard clinically used drug (Table 1). Orally, this extract also exhibited activity, but to a lesser extent, with a maximal inhibition of 39% at 400 mg/kg. When analysed against formalin induced pain, a useful technique for obtaining neurogenic and inflammation continuous pain [13–15], the hydroalcoholic extract, administered intraperitoneally, displayed significant and dose-related antinociceptive effects against both phases of pain. However, it was more pronounced in the second phase with ID<sub>50</sub> (mg/kg) of 5.8 (4.4–7.8), being 4 times more potent than aspirin (Table 2). Given orally, the hydroalcoholic extract showed just weak activity against the first phase of the formalin induced-pain, but considerably inhibited the inflammatory phase, with ID<sub>50</sub> (mg/kg) of 132.8 (106–

**Table 1: Effect of the hydroalcoholic extract of *S. schottiana* given either intraperitoneally or orally, against acetic acid-induced abdominal constriction in mice**

HE	Dose (mg/kg)	Number of abdominal constrictions	
		intraperitoneally	Dose orally (mg/kg)
	0	44.3 ± 2.1	0
	3	27.5 ± 3.4**	50
	10	11.5 ± 4.9**	100
	30	8.3 ± 2.1**	200
	–	–	400
<sup>a</sup> ID <sub>50</sub>		6.3 (5.4–7.3)	
Maximal inhibition (%)		81.0 ± 5.0	39.0 ± 11.0
Aspirin ( <sup>a</sup> ID <sub>50</sub> )		24 (13.1–43.8)	50– 109 (93–127)
			300

Each group represents mean ± sem of 8 to 10 animals. \*\**p* < 0.01 when compared with respective control values (ANOVA). <sup>a</sup> (mg/kg) with 95% confidence limits

**Table 2: Effect of hydroalcoholic extract of *S. schottiana* given either intraperitoneally or orally against the first phase (0–5 min) or against the second phase (15–30 min) in the formalin test in mice**

HE	Dose (mg/kg)	Licking (s)	
		0–5 min	15–30 min
Intraperitoneally	0	65.7 ± 5.1	171.0 ± 21.1
	3	47.4 ± 5.6*	104.4 ± 14.1*
	10	36.0 ± 2.6**	42.9 ± 10.4**
	30	41.0 ± 4.6**	12.2 ± 7.6**
<sup>a</sup> ID <sub>50</sub>		ND	5.8 (4.4–7.8)
Maximal Inhibition (%)		37.0 ± 7.0	93.0 ± 5.0
Aspirin (ID <sub>50</sub> )		inactive	18.1 (13.6–24.3)
Oral	0	64.3 ± 2.5	129.0 ± 7.4
	50	59.4 ± 3.6	122.4 ± 10.5
	100	55.1 ± 3.6	81.1 ± 14.9*
	200	57.4 ± 4.3	33.0 ± 6.8**
	400	50.5 ± 4.5	49.2 ± 3.4**
<sup>a</sup> ID <sub>50</sub>		ND	132.8 (106–165.4)
Maximal Inhibition (%)		21.0 ± 7.0	74.0 ± 5.0
Aspirin ( <sup>a</sup> ID <sub>50</sub> )		inactive	282 (243–328)

Each group represents mean ± sem of 8 to 10 animals. \**p* < 0.05. \*\**p* < 0.01 when compared with respective control values (ANOVA). <sup>a</sup> (mg/kg) with 95% confidence limits. ND: not determined

165.4). It was about 2 times more potent than the reference drug (Table 2). When tested on capsaicin induced-pain [16], a model which provides evidence of the anti-

over silica gel using hexane and dichloromethane as solvents. Removal of these solvents gave 0.9 and 14 g of the respective fractions. The latter fraction (14 g) was then submitted to repeated column chromatography on silica gel (120 g) with a hexane/acetone gradient, giving compound (II) (80 mg). Crystals of (II) were obtained by recrystallization from a hexane/acetone (4:1) solution.

#### Crystal data

$C_{22}H_{30}O_5$	Mo $K\alpha$ radiation
$M_r = 374.46$	$\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$
Orthorhombic	Cell parameters from 25 reflections
$P2_12_12_1$	$\theta = 17.54\text{--}20.86^\circ$
$a = 8.144 (2) \text{ \AA}$	$\mu = 0.088 \text{ mm}^{-1}$
$b = 10.004 (2) \text{ \AA}$	$T = 293 (2) \text{ K}$
$c = 24.101 (5) \text{ \AA}$	Prismatic
$V = 1963.6 (7) \text{ \AA}^3$	$0.52 \times 0.42 \times 0.33 \text{ mm}$
$Z = 4$	Colourless
$D_x = 1.267 \text{ Mg m}^{-3}$	
$D_m$ not measured	

#### Data collection

Nonius CAD-4 diffractometer	$R_{\text{int}} = 0.015$
$\omega/2\theta$ scans	$\theta_{\text{max}} = 25^\circ$
Absorption correction: none	$h = 0 \rightarrow 9$
2023 measured reflections	$k = -11 \rightarrow 0$
2000 independent reflections	$l = -28 \rightarrow 0$
1644 reflections with $I > 2\sigma(I)$	3 standard reflections
	frequency: 60 min
	intensity decay: 0.4%

#### Refinement

Refinement on $F^2$	$(\Delta/\sigma)_{\text{max}} = 0.076$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.045$	$\Delta\rho_{\text{max}} = 0.236 \text{ e \AA}^{-3}$
$wR(F^2) = 0.143$	$\Delta\rho_{\text{min}} = -0.198 \text{ e \AA}^{-3}$
$S = 1.069$	Extinction correction:
2000 reflections	<i>SHELXL97</i> (Sheldrick, 1997)
248 parameters	Extinction coefficient:
H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement	0.031 (3)
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.057P)^2 + 1.534P]$	Scattering factors from <i>International Tables for Crystallography</i> (Vol. C)
where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	

Table 1. Selected geometric parameters ( $\text{\AA}$ ,  $^\circ$ )

O1—C15	1.406 (5)	C5—C6	1.327 (6)
O1—C20	1.440 (6)	C13—C16	1.521 (6)
O2—C15	1.437 (5)	C13—C14	1.524 (6)
O2—C14	1.450 (5)	C15—C16	1.518 (6)
O3—C14	1.419 (5)	C16—C19	1.539 (7)
O3—C19	1.469 (5)	C19—C20	1.503 (7)
O5—C22	1.191 (7)		
C15—O1—C20	106.6 (3)	O3—C14—C13	104.3 (4)
C15—O2—C14	106.0 (3)	O2—C14—C13	102.5 (3)
C14—O3—C19	104.6 (3)	C8—C14—C13	119.0 (4)
C22—O4—C3	116.6 (4)	O1—C15—O2	111.6 (4)
C16—C13—C14	91.1 (3)	O1—C15—C16	107.9 (4)
C16—C13—C12	118.3 (4)	O2—C15—C16	102.6 (3)
C14—C13—C12	108.5 (4)	C15—C16—C13	104.0 (4)
C16—C13—C17	112.5 (4)	C15—C16—C19	95.9 (4)
C14—C13—C17	113.5 (4)	C13—C16—C19	103.4 (4)
C12—C13—C17	111.3 (4)	O3—C19—C20	109.8 (4)

O3—C14—O2	106.7 (3)	O3—C19—C16	102.6 (3)
O3—C14—C8	114.4 (3)	C20—C19—C16	104.6 (4)
O2—C14—C8	108.7 (3)	O1—C20—C19	106.4 (4)
C10—C5—C6—C7	4.0 (7)	C14—O3—C19—C16	7.9 (4)
C14—O2—C15—C16	-6.5 (4)	C15—O1—C20—C19	-5.1 (5)

All H atoms, except H19, for which only the coordinates were refined, were included in the calculations in idealized positions, with  $U_{\text{iso}} = 1.5U_{\text{eq}}$  that of the parent atom. Atom O5 has an unusually large  $U_{\text{eq}}$  value, reflecting highly anisotropic displacement parameters. As this could be related to disorder, the anisotropic atom was replaced with two isotropic half atoms. Refinement with this model was worse than with the anisotropic model. The absolute structure could not be determined by X-ray methods but is known from the chemical studies of Yunes, Brum *et al.* (1993).

Data collection: *CAD-4 EXPRESS* (Enraf-Nonius, 1994). Cell refinement: *SET4* in *CAD-4 EXPRESS*. Data reduction: *MolEN* (Fair, 1990). Program(s) used to solve structure: *SHELXS97* (Sheldrick, 1990). Program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 1997). Molecular graphics: *ZORTEP* (Zsolnai *et al.*, 1996). Software used to prepare material for publication: *SHELXL97*.

This work was supported by PADCT, CNPq and FUNAPE/UFG.

Supplementary data for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: SX1075). Services for accessing these data are described at the back of the journal.

#### References

- Bento, E. S., Calixto, J. B., Hawkes, G. E., Pizzolatti, M. G., Sant'Ana, A. E. G. & Yunes, R. A. (1996). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp. 1359–1366.
- Calixto, J. B., Nicolau, M., Pizzolatti, M. G. & Yunes, R. A. (1987). *Br. J. Pharmacol.* **91**, 199–204.
- Calixto, J. B., Nicolau, M., Pizzolatti, M. G. & Yunes, R. A. (1988). *Br. J. Pharmacol.* **94**, 1133–1142.
- Calixto, J. B., Nicolau, M. & Yunes, R. A. (1985). *Br. J. Pharmacol.* **85**, 729–731.
- Calixto, J. B., Nicolau, M. & Yunes, R. A. (1988). *Gen. Pharmacol.* **19**, 595–599.
- Calixto, J. B., Yunes, R. A., Rae, G. A. & Medeiros, Y. S. (1991). *Bradykinin Antagonist: Basic and Clinical Research*, edited by R. M. Burch, pp. 98–127. New York: Marcel Dekker.
- Cambridge Structural Database (1997). Version 5.14. Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge, England.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- Desiraju, G. R. (1996). *Acc. Chem. Res.* **29**, 441–449.
- Enraf-Nonius (1994). *CAD-4 EXPRESS*. Version 5.1/1.2. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands.
- Fair, C. K. (1990). *MolEN. An Interactive Intelligent System for Crystal Structure Analysis*. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands.
- Sheldrick, G. M. (1990). *Acta Cryst.* **A46**, 467–473.
- Sheldrick, G. M. (1997). *SHELXL97. Program for the Refinement of Crystal Structures*. University of Göttingen, Germany.
- Spek, A. L. (1990). *Acta Cryst.* **A36**, C-34.
- Yunes, R. A., Brum, R. L., Calixto, J. B. & Rimpler, H. (1993). *Phytochemistry*, **34**, 787–789.
- Yunes, R. A., Pizzolatti, M. G., Sant'Ana, A. E. G., Hawkes, G. E. & Calixto, J. B. (1993). *Phytochem. Anal.* **4**, 76–81.
- Zsolnai, L., Pritzkow, H. & Huttner, G. (1996). *ZORTEP*. University of Heidelberg, Germany.

**ACETYLLILLUSTROL: A NEW COMPOUND FROM MANDEVILLA  
ILLUSTRIS (VELL.) WOODSON (APOCYNACEAE)**

<sup>1</sup>RIVALDO NIERO, <sup>2</sup>JOÃO B. CALIXTO, <sup>3</sup>JOSÉ DIAS DE S. FILHO,

<sup>1</sup>ROSENDO A. YUNES AND <sup>4</sup>ANTONIO EUZÉBIO G. SANT'ANA\*

Departamentos de <sup>1</sup>Química e <sup>2</sup>Farmacologia - UFSC - 88040-900,  
Florianópolis - SC, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Química - UFMG - 31270-901,  
Belo Horizonte - MG, Brasil, <sup>4</sup>Departamento de Química - UFAL - 57072-970,  
Maceió - AL, Brasil,

(Received 15th September 1998)

**Abstract-** Aqueous alcoholic extracts from rhizomes of *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, which are used in certain regions of Brazil for the treatment of inflammations and venomous snake bites antagonise the responses of isolated rat uterine muscles to bradykinin and related kinins. The isolation and structural characterisation of a new active compound, acetylillustrol, from *M. illustris* is described. This compound exhibits selective *in vivo* action against the inflammatory response involving kinin.

**Keywords -** *Mandevilla illustris*, Apocynaceae, acetylillustrol, seco-pregnane.



## INTRODUCTION

*Mandevilla velutina* and *M. illustris* are native Brazilian plants used in folk medicine to treat snake bites<sup>1,2</sup>. Extracts of these plants have potent anti-inflammatory activity and antagonize bradykinin, a nonapeptide generated in plasma during tissue trauma<sup>3-8</sup>. Two closely related constituents, velutinol A, active as a bradykinin antagonist<sup>1,9</sup> and the inactive illustrol (1)<sup>10</sup>, have been isolated earlier from *M. velutina* and *M. illustris*. This paper reports the isolation of 3-acetyllustrol (2), not previously described as a natural product, from the ethyl acetate extract of rhizomes of *M. illustris*. The structure determination was based on IR, UV, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and mass spectra.

When injected locally into the rat paw, acetyllustrol (2) (10 nmol/paw) caused a significant inhibition of carageenan and bradykinin-mediated rat paw oedema. However, at the same dose, this compound failed to interfere with paw oedema caused by B1 selective kinin agonist, des-Arg (9)-bradykinin, indicating selective *in vivo* action against inflammatory response involving kinin through activation of B<sub>2</sub> receptors.

## RESULTS AND DISCUSSION

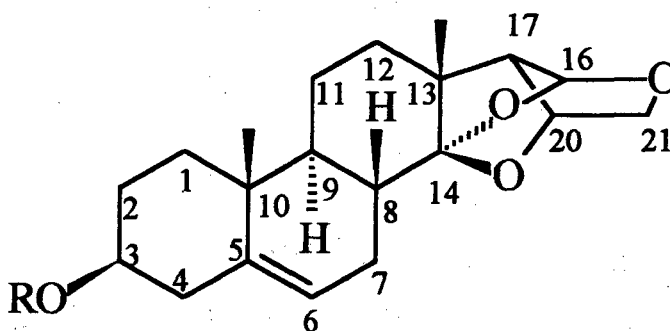
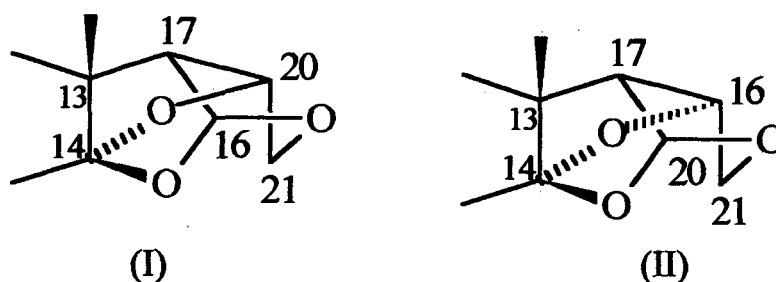
Column chromatography of the ethyl acetate extract from rhizomes of *M. illustris* furnished 2. Its molecular formula was determined by high-resolution electron impact mass spectrometry as C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>, with a molecular ion at *m/z* 374.008 (calc. for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> 374.0094), with an unsaturation index of 7. The UV spectrum exhibited strong end-absorption [ $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) 234 nm (6400)]. The presence of a carbonyl, in an ester group, and the absence of

hydroxyl groups were confirmed by IR ( $\nu_{\max}$  1760 and 1240  $\text{cm}^{-1}$ ), with appropriate signals in  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$  1.96, s, 3H) and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta$  170.3 and  $\delta$  21.2). One trisubstituted C=C was also detected by  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$  5.40, m) and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta$  139.9 and 122.8). Since neither NMR or IR spectra provided evidence for an additional C=C or C=O, a hexacyclic structure was suggested for **2**. Chemical shifts ( $\delta$  108.7, s;  $\delta$  103.9, d and  $\delta$  5.50, d) of **2** indicated the presence of one ketal and one acetal group. Apart from the carbon bearing the secondary acetyl group ( $\delta$  74.1, d), only two additional carbons connected to oxygen ( $\delta$  78.8, d, C-20 and 73.6, t) were observed. These data indicated a direct connection of the ketal and acetal group through an oxygen atom common to both groups. CH connectivities (Table 1) support these assumptions already described for the acetyl derivative of illustrol<sup>10</sup>.

The interpretation of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum for the rest of the molecule was complicated due to the spin-spin systems and the partial overlapping of the signals. Comparison of the one-dimensional  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  and DEPT spectra gave the assignment of the  $^{13}\text{C}$  resonances as being from 3 x  $\text{CH}_3$ , 7 x  $\text{CH}_2$ , 7 x CH and 5 non-protonated carbons, and the  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  one bond correlation spectrum allowed the assignment in the crowded regions of the  $^1\text{H}$  spectrum. The analysis of the  $^1\text{H}$  spectrum, which proceeded with the COSY spectrum, allowed the division of the spectrum into four essentially isolated spin systems. The first system consisting of nine intercoupled protons used, as a starting point, the vinyl proton resonance at  $\delta$  5.40; the second system, of seven protons, started with the assignment of a CHO resonance at  $\delta$  4.55; the third system, of five protons, started with the assignment of an OCHO resonance at  $\delta$  5.50; the fourth system is very complex and started with the

assignment of a CH<sub>2</sub> resonance at  $\delta$  2.35. The <sup>13</sup>C chemical shifts associated with these systems are identical with those published for acetylillustrol (2), which had been synthesised from illustrol (1)<sup>10</sup>, confirming the structure.

The strong NOE interactions observed between H-16 and H-12 $\alpha$  and between H<sub>3</sub>-18 and H-20 are only compatible with the stereochemistry already described for illustrol. The configuration at C-3, deduced from the large coupling constants of H-3 to H-4 $\beta$  and H-2 $\beta$ , was confirmed by a strong NOE between H-1 $\alpha$  and H-3. Although the present spectrum has been obtained using (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO instead of CDCl<sub>3</sub> or a C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N-CDCl<sub>3</sub> mixture, the data could be used for comparison with those earlier reported for acetylillustrol<sup>10</sup>. Acetylillustrol (2), similar to illustrol (1) exhibits two isomeric possibilities (I) and (II) but we cannot distinguish between them by the NMR spectra.



1 R = H; 2 R = Ac

**Table 1 –  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift assignments for acetyllustrol**

Position	$\delta\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.16dt ( $\alpha$ ) (J = 12 and 4 Hz) 1.90 ( $\beta$ )	37.2
2	1.60 ( $\alpha$ ) 1.95 ( $\beta$ )	28.5
3	4.55	74.1
4	2.30 ( $\alpha$ ) 2.35 ( $\beta$ )	38.8
5		139.9
6	5.40	122.8
7	1.95-2.05 ( $\alpha$ ) 2.15-2.25 ( $\beta$ )	25.6
8	1.90	32.0
9	1.45	46.6
10		37.3
11	1.60 ( $\alpha$ ) 1.95 ( $\beta$ )	21.0
12	1.40-1.65 ( $\alpha, \beta$ )	31.0
13		49.2
14		108.7
16	5.50	103.9
17	2.65	56.5
18	1.11	16.7
19	1.05	19.4
20	4.60	78.8
21	3.90 ( $\alpha$ ) 3.88( $\beta$ )	73.6
$\text{CH}_3\text{CO}$	1.96, s	170.3 and 21.2

Shifts are in ppm, related to high frequency of TMS,  $\text{CDCl}_3$  as solvent

## EXPERIMENTAL PART

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with *ca.* 15 mg of acetylillustrol in  $\text{CDCl}_3$  solution using TMS as internal reference on a Bruker WH-400 spectrometer, at 400 and 100.6 MHz, respectively.

For  $^1\text{H}$  NOE difference spectra,  $^1\text{H}$  homonuclear two-dimensional NMR experiments, COSYPHDQ and NOESY, spectra were acquired using typical data acquisition parameters including a sweep width of 3000 KHz (2K data points) and 512 time increments zero-filled to 2k points in the second-dimension. The  $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$  heteronuclear chemical shift correlations were measured with a  $^{13}\text{C}$  observation sweep width of 130ppm (2K data points) and 256 time increments zero-filled to 2K points in the second dimension. For both homo and hetero-nuclear two-dimensional experiments, 16 scans were accumulated for each time increment with a relaxation delay of 2s between each scan. UV spectra were recorded in MeOH solution, IR from KBr discs.

### *Plant material*

The collection and extraction of rhizomes of *M. illustris* (Vell.) Woodson were as already described<sup>10</sup>. An aliquot (40 g) of this extract was filtered over silica gel using hexane and dichloromethane. After removal of the solvent, the fraction eluted with  $\text{CHCl}_3$  (14 g) was chromatographed using the same technique with mixtures of hexane/acetone of increasing polarity giving 45 fractions. The fractions (33-38), which showed positive reaction with anisaldehyde/sulfuric acid reagent, were combined and rechromatographed over silica gel, with the same solvent system, to yield 80 mg of compound (2).

Compound 2 - C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>. White crystals. UV(MeOH) $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) 234 nm (6400); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  1740 (C=O), 1465, 1440, 1240 (C-O), 1160, 1130 cm<sup>-1</sup>; EIMS 70 eV, m/z: 374 [M<sup>+</sup>] (1), 314 (5), 296 (100), 281(20), 278 (20), 263 (85), 228 (50), 209 (90), 195 (25), 170 (20), 145 (70).

## REFERENCES

1. J.B.Calixto, M. Nicolau and R.A Yunes. (1985) *Brit. J. Pharmacol.* **85**, 729-731.
2. J.B.Calixto, R.A.Yunes, G.A. Rae and Y.S.Medeiros, (1991). Nonpeptides bradykinin antagonists. In *Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research* ed. R.M Burch, Marcel Dekker, New York, pp. 98-127.
3. J.B.Calixto and R.A. Yunes (1991) *Gen. Pharmacol.* **22**, 99-102.
4. J.B. Calixto, M. Nicolau, M.G. Pizzolatti and R.A. Yunes (1987) *Brit. J. Pharmacol.* **91**, 199-204.
5. J.B. Calixto, M. Nicolau and R.A.Yunes (1988) *Gen.Pharmacol.* **19**, 595-599.
6. J.B.Calixto, M.G. Pizzolatti and R.A. Yunes (1988) *Brit. J. Pharmacol.* **94**, 1133-1142.

7. J.B. Calixto, G.R. Strobel, A.B. Cruz and R.A. Yunes (1988) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21**, 1015-1018.
8. J.B. Calixto, J.C. Zanini Jr., A.B. Cruz and Y.S. Medeiros (1991) *Prostaglandins* **41**, 515-525.
9. R. A. Yunes, M.G.Pizzolatti, A.E.G. Sant'Ana, E.G. Hawkes and J.B. Calixto (1993) *Phytochem. Anal.* **4**, 76-81.
10. R.A.Yunes, R.L. Brum, J.B. Calixto and H. Rimpfer, (1993) *Phytochemistry* **34**, 787-790.

Antinociceptive Activity of Niga-ichigoside F<sub>1</sub> from *Rubus imperialis*R. Niero,<sup>†</sup> V. Cechinel Filho,<sup>†</sup> M. M. Souza,<sup>†</sup> J. L. Montanari,<sup>‡</sup> R. A. Yunes,<sup>\*,‡</sup> and F. Delle Monache<sup>§</sup>

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Curso de Farmácia/CCS, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), 88.302-202, Itajaí, SC, Brazil, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88.040-900, Florianópolis, SC, Brazil, and Centro Chimica Recettori (CNR), Largo F. Vito 1, Rome, Italy

Received September 25, 1998

This work describes the antinociceptive effect of a triterpene glycoside, niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1), obtained from an EtOAc extract of the aerial parts of *Rubus imperialis*. When evaluated against an HOAc-induced writhing model, it exhibited an ID<sub>50</sub> value of 3.1 mg/kg (ip). Moreover, in a formalin-induced pain model, both phases of pain were inhibited by compound 1, with ID<sub>50</sub> values of 2.6 (first phase) and 2.7 (second phase) mg/kg, (ip), respectively.

The genus *Rubus* consists of many species that are employed in various countries of the world to treat different diseases, especially diabetes.<sup>1,2</sup> Chemical and pharmacological studies have confirmed that some of these plants produce active principles that exert hypoglycemic activity, antibacterial effects against Gram-positive bacteria, and anti-allergic activities against allergic rhinitis, atopic dermatitis, and asthma.<sup>3-5</sup>

*Rubus imperialis* Chum. Schl. (Rosaceae) grows abundantly in the south of Brazil, being known as "amora-branca", "amora-do-mato", or "amora-brava".<sup>6</sup> It is used in traditional medicine as a remedy to treat diabetes. However, no reports have been found regarding its pharmacological and phytochemical investigation. A MeOH extract of this plant inhibited acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, so we have studied its antinociceptive properties in more detail. Thus, different extracts obtained from *R. imperialis* were subjected to pharmacological studies using two classical models of pain in mice, acetic acid-induced writhing and formalin-induced pain. In addition, we have tested a triterpene glycoside F<sub>1</sub>, niga-ichigoside (1), which was isolated and identified for the first time in this plant, from the EtOAc extract.

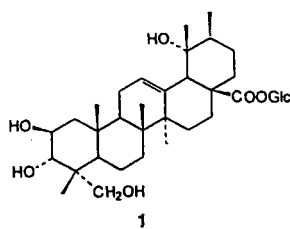


Table 1 shows the antinociceptive effect of the *R. imperialis* EtOAc extract and compound 1 when given intraperitoneally (ip), on acetic acid-induced abdominal constriction, with aspirin and paracetamol used in comparison. The EtOAc extract caused a dose-dependent antinociceptive effect, with an ID<sub>50</sub> of 6.8 mg/kg and a maximal inhibition of 94.0%. When given orally (200 mg/kg, ip), it inhibited the abdominal constrictions by 37%. The active principle of the *R. imperialis* EtOAc extract was identified as niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1) on the basis of the

comparison of its spectral data with literature values.<sup>7</sup> This compound significantly inhibited the abdominal constrictions, with an ID<sub>50</sub> value of 3.1 mg/kg (4.6 μmol/kg). Because of its limited quantity, compound 1 was not analyzed orally. The crude EtOAc extract and niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1) were more potent than the standards, aspirin or paracetamol (Table 1).

When analyzed in a formalin-induced pain model, a useful technique for evaluating neurogenic and inflammatory continuous pain,<sup>8-10</sup> the EtOAc extract and compound 1 displayed significant and dose-related antinociceptive effects against both phases of pain. However, the EtOAc extract was more effective in preventing the inflammatory effects in the second phase than the first phase of formalin-induced nociception. The calculated mean ID<sub>50</sub> values for EtOAc extract were 35.7 mg/kg, (ip) for the first phase and 23.9 mg/kg (ip) for the second phase, respectively (Table 2). Niga-ichigoside F<sub>1</sub>(1) exhibited potent antinociceptive effects against both phases of the formalin test, with ID<sub>50</sub> values (μmol/kg, ip) of 3.9 for the first phase and 4.1 for the second phase. Given that compound 1 is about 1.5% of the weight of the EtOAc extract of *R. imperialis*, other compounds present may also contribute toward the observed antinociceptive activity of the crude extract. Further investigations are necessary to determine the mechanism of the antinociceptive effects of niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1).

### Experimental Section

**General Experimental Procedures.** The melting point was determined on a Microquímica AP-300 apparatus and is uncorrected, and the optical rotation was run on a Polartronic E polarimeter. The IR spectrum was recorded with a Bomem MB 100 instrument. The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Varian XL-300 NMR spectrometer at 300 and 75 MHz, respectively, in C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>N. The FABMS was obtained on a VG 70-250 S instrument. Si gel 60 (70-230 mesh, Merck) was used for chromatography. TLC was performed on pre-coated TLC plates with Si gel 60 (F<sub>254</sub>, Merck).

**Plant Material.** *Rubus imperialis* was collected at Florianópolis, Brazil, in June 1997, and identified by Dr. Ademir Reis (Department of Botany, UFSC). A voucher specimen was deposited at Barbosa Rodrigues Herbarium under number V. C. Filho 012.

**Extraction and Isolation.** The dried aerial parts of the plant (1.2 kg) were powdered and macerated with MeOH for 7 days at room temperature. After evaporation of solvent under reduced pressure, the MeOH extract was successively partitioned with hexane, CHCl<sub>3</sub>, and EtOAc, affording 8.9, 1.2, and 9.4 g of each dried fraction, respectively. Although all extracts

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: (048) 331-9219. Fax: (048) 331-9711. E-mail: ryunes@qmc.ufsc.br.

<sup>†</sup> Universidade do Vale do Itajaí.

<sup>‡</sup> Universidade Federal de Santa Catarina.

<sup>§</sup> Centro Chimica Recettori.



**Table 1.** Antinociceptive Effects of the *Rubus imperialis* Ethyl Acetate Extract and Niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1) against Acetic Acid-induced Abdominal Constrictions in Mice

treatment	ID <sub>50</sub> (mg/kg, ip)	ID <sub>50</sub> (μmol/kg, ip)	maximal inhibition (%) <sup>a</sup>
ethyl acetate extract	6.8 (5.3–7.9)		94.0 ± 3.5
niga-ichigoside F <sub>1</sub> (1)	3.1 (1.7–5.6) <sup>b</sup>	4.6 (2.6–8.5)	67.6 ± 1.8
aspirin <sup>c</sup>	24.0 (13.0–44.0)	133.0 (73.0–243.0)	83.0 ± 1.4
paracetamol <sup>c</sup>	19.0 (16.0–23.0)	125.0 (104.0–250.0)	88.0 ± 1.0

<sup>a</sup> *p* values < 0.05 were considered as indicative of significance. <sup>b</sup> 95% Confidence limits, with each group representing the mean ± S.E.M. of five to seven experiments. <sup>c</sup> Positive control.

**Table 2.** Antinociceptive Effects of the *R. imperialis* Ethyl Acetate Extract and Niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1) in the First (0 to 5 min) and Second (15 to 30 min) Phases in a Formalin Test in Mice

treatment	First phase			Second phase		
	ID <sub>50</sub> (mg/kg, ip)	ID <sub>50</sub> (μmol/kg, ip)	maximal inhibition (%) <sup>a</sup>	ID <sub>50</sub> (mg/kg, ip)	ID <sub>50</sub> (μmol/kg, ip)	maximal inhibition (%) <sup>a</sup>
ethyl acetate extract	35.7 (18.6–68.5) <sup>b</sup>		72.3 ± 2.0	23.9 (12.5–45.9)		89.9 ± 3.8
niga-ichigoside F <sub>1</sub> (1)	2.6 (1.4–4.7)	3.9 (2.1–7.1)	70.4 ± 6.0	2.7 (1.5–4.9)	4.1 (2.3–7.4)	94.0 ± 3.5
aspirin <sup>c</sup>	inactive			22.1 (13.9–37.6)	123.0 (77.0–209.0)	88.0 ± 3.0
paracetamol <sup>c</sup>	inactive			18.1 (13.6–24.3)	120.0 (90.0–161.0)	85.0 ± 3.5

<sup>a</sup> *p* values < 0.05 were considered as indicative of significance. <sup>b</sup> 95% Confidence limits, with each group representing the mean ± S.E.M. of five to seven experiments. <sup>c</sup> Positive control.

exhibited antinociceptive activity, the EtOAc extract was chosen for further study. On column chromatography over Si gel 60, by elution with CHCl<sub>3</sub>–MeOH (80:20), 150 mg of a major constituent of the EtOAc extract were obtained: white solid pure by TLC; mp 230–231 °C; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> +11.5°, *c* 1.01, MeOH; FABMS (*m/z*) 667 (M + H)<sup>+</sup>, 689 (M + Na)<sup>+</sup>, identified as niga-ichigoside F<sub>1</sub> (1) on the basis of spectroscopic data (IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS) compared to literature values.<sup>7</sup>

**Pharmacological Evaluation**—Abdominal Constriction Response Caused by Intraperitoneal Injection of Dilute Acetic Acid. The abdominal constriction induced by intraperitoneal injection of HOAc (0.6%) was carried out according to the procedures described previously,<sup>11,12</sup> with minor modifications. Male Swiss mice (25–30 g) were pretreated with EtOAc extract (10–60 mg/kg) and compound 1 (1–10 mg/kg) intraperitoneally or orally (EtOAc extract at 200 mg/kg), 30 min before the HOAc injection. Control animals received a similar volume of 0.9% NaCl (10 mL/kg, ip). All experiments were carried out at 23 ± 2 °C. After challenge, pairs of mice were placed in separate boxes, and the number of constrictions of the abdominal muscles, together with stretching, were counted cumulatively over a period of 20 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction of the number of abdominal contractions between control animals and mice pretreated with the test materials.

**Formalin-Induced Pain.** The procedure used was essentially similar to that previously described.<sup>9,12</sup> Mice from the same strain as described above were acclimatized to the laboratory for at least 24 h before the experiment and were slightly anesthetized with Et<sub>2</sub>O, except when used to analyze the first phase of formalin-induced pain. Next, 20 μL of 2.5% of 0.92% formaldehyde made up with PBS (phosphate buffered solution containing NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, and phosphate buffer 10 mM) were injected subcutaneously under the plantar surface of the left hindpaw with a Hamilton syringe. Animals were treated 60 min before the formalin injection with normal saline (10 mL/kg, ip), with EtOAc extract (10–60 mg/kg, ip) or with compound 1 (1–10 mg/kg, ip) obtained from *R. imperialis*. After intraplantar irritant application, the animals were then placed immediately into a glass cylinder (20 cm diameter). The time spent by animals licking or biting the injected paw was timed with a chronometer and was considered indicative of pain. Two mice (control and treated) were

simultaneously observed from 0 up to 30 min after formalin injection. The initial nociceptive scores normally peaked 5 min (first phase, representing the neurogenic pain) and 15–30 min (second phase, representing the inflammatory pain) after formalin injection.<sup>8</sup>

**Statistical Analysis.** The results are presented as mean ± S. E. M., except the mean ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of the test material reducing the antinociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The statistical significance among groups was first analyzed by ANOVA, then followed by up Dunnett's multiple comparison test to check the significance between groups; *p* values less than 0.05 were considered significant. The ID<sub>50</sub> values were determined by graphical interpolation from individual experiments.

**Acknowledgment.** The authors are grateful to Prof. Dr. A. Reis for the botanical identification and to CNPq, CAPES, and UNIVALI/Brazil for financial support.

## References and Notes

- Alonso, R.; Cadavid, I.; Calleja, J. M. *Planta Med.* 1980, 46 (Suppl.), 102–106.
- Zonta, C. M.; Ruediger, R. *Monografia de Estágio, Curso de Farmácia*; Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI): Itajaí, SC, Brazil, 1996.
- Swanston-Flatt, S. K.; Day, C.; Bailey, C. J.; Flatt, P. R. *Diabetologia* 1990, 33 462–464.
- Richards, R. M.; Durhan, E. D. G.; Liu, X. *Planta Med.* 1994, 60, 471–473.
- Nakahara, K. EP 0727218, Sep. 30, 1996, YY pp.; *Chem. Abstr.* 1996, 125, 230780h
- Cirilo, V. K. *Manual de Plantas Mediciniais*, 44th ed.; Assessorar, Francisco Beltrão: Paraná, Brazil, 1993.
- Seto, T.; Tanaka, T.; Tanaka, O.; Naruhashi, N. *Phytochemistry* 1984, 23, 2829–2834.
- Hunskar, S.; Hole, K. *Pain* 1987, 30, 103–114.
- Hunskar, S.; Fasmar, O. B.; Hole, K. *J. Neurosci. Methods* 1985, 14, 69–76.
- Vaz, Z. R.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 278, 304–312.
- Collier, H. D. J.; Dinnen, L. C.; Johnson, C. A.; Schneider, C. Br. *J. Pharmacol.* 1968, 32, 295–310.
- Santos, A. R. S.; Cechinel Filho, V.; Niero, R.; Pizzolatti, M. G.; Delle Monache, F.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *Planta Med.* 1995, 61, 329–332.

NP9804177