

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

COMPONENTES QUÍMICOS DE SEBASTIANA SCHOTTIANA MUELL. ARG., HIPO
TESES SOBRE A CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA A ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

TESE SUBMETIDA A UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE "MESTRE EM CIÊNCIAS".

OBDULIO GOMES MIGUEL

FLORIANÓPOLIS

SANTA CATARINA - BRASIL

JUNHO - 1987.

COMPONENTES QUÍMICOS DE SEBASTIANA SCHOTTIANA MUELL. ARG., HIPO
TESES SOBRE A CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA A ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

OBDULIO GOMES MIGUEL

ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO ORIENTA
DOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA.



PROF. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES
ORIENTADOR



PROF. Dr. HÉDIO JOSÉ MÜLLER
COORDENADOR

BANCA EXAMINADORA:



PROF. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES



PROF. Dr. EDUARDO AUGUSTO MOREIRA



PROF. Dr. JOÃO BATISTA CALIXTO

Aos meus queridos
familiares com a
mais profunda adi
miração e respeii
to.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pela orientação deste traba
lho, incentivo e apoio.

RECONHECIMENTO

A Universidade Federal de Santa Catarina e a Universidade Federal do Paraná.

Por nos ter possibilitado a realização do Curso de Pós-Graduação em Físico-Química.

Ao PICD (Programa Institucional de Capacitação de Docentes) pelo subsídio concedido através de Bolsa de Estudo.

AGRADECIMENTOS

- A Prof. Dr. João Batista Calixto
Pela realização dos testes farmacológicos durante a fase experimental e pelo companheirismo constante.
- Ao Prof. Giles A. Rae
Pelo Auxílio farmacológico durante a fase experimental
- Ao Prof. Dr. Eduardo Augusto Moreira
Chefe do Departamento de Farmácia, por facilitar a minha ida a Florianópolis.
- Ao Prof. Ademir Reis
Pela determinação da espécie botânica
- Ao Prof. Dr. Luiz Manoel Scavazza
Pela valiosa colaboração e interesse demonstrados
- Aos Químicos Cesar Giacomozzi e Valdete Wronski
Pelo apoio durante a fase experimental
- Aos colegas e amigos Carlos Cezar Stadler, Ricardo R. Pereira, Larson R. Hübner, Joselene Moro e Inês Maria.
Pelo companheirismo durante o Curso.
- Ao Prof. Moacir Pizzolatti
Pelo apoio durante a fase experimental
- Aos demais Prof. e amigos
Que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	PAG.
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I	
I - INTRODUÇÃO	
1.1 - Considerações gerais.....	1
1.2 - Considerações sobre a espécie em estudo e sua distribuição geográfica.....	5
1.3 - Posição sistemática de <i>Sebastiania schottiana</i> (Muell. Arg.) Muel. Arg. segundo Engler's.....	10
1.3.1 - Resumo preliminar da espécie segundo Smith, L.: & Downs, R.J.	11
1.4 - Sinópsse da família Euphorbiaceae.....	12
1.5 - Objetivo do presente trabalho.....	14
CAPÍTULO II	
II - PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 - Material botânico.....	15
2.2 - Pesquisa de princípios ativos.....	18
2.2.1 - Preparo de extrato alcoólico e do extrato aquoso por decoção segundo Balback..	18
2.2.2 - Alcalóides.....	18
2.2.3 - Flavonóides.....	19
2.2.3.1 - Redução pelo hidrogênio.....	20
2.2.3.2 - Reação com ácido sulfúrico concentrado.....	20
2.2.3.3 - Reação de Pew.....	20

2.2.3.4 - Reação com cloreto férrico de acordo com Fernandes Costa....	20
2.2.4 - Taninos.....	21
2.2.4.1 - Reação com cloreto férrico....	21
2.2.4.2 - Formol clorídrico.....	21
2.2.5 - Antraquinonas.....	21
2.2.6 - Heterosídeo cardioativos.....	22
2.2.7 - Saponinas.....	22
2.2.8 - Óleo essencial.....	22
2.2.9 - Cumarina.....	23
2.2.10- Fenóis com posição orto e meta livre....	23
2.2.11- Fenóis com posição para livre.....	24
2.2.12- Ácidos Orgânicos.....	24
2.3 - Extração dos princípios ativos.....	24
2.3.1 - Obtenção do extrato bruto metanólico....	24
2.3.2 - Fracionamento do extrato metanólico bruto.....	25
2.3.2.1 - Purificação do extrato éter de petróleo-1.....	27
2.3.2.1.1 - Separação do constituinte ativo da fração éter de petróleo-1.1	27
2.3.2.2 - Purificação do extrato clorofórmico-2	30
2.4 - Identificação dos compostos separados e sintetizados.....	30
2.4.1 - Ensaio cromatográfico.....	32
2.4.2 - Cromatografia em camada delgada (CCD)...	32
2.4.3 - Cromatografia preparativa.....	32

2.4.4 - Eluição dos cromatogramas.....	33
2.4.5 - Visualização dos cromatogramas.....	33
2.5 - Ponto de fusão.....	34
2.6 - Quantificação da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona..	39
2.6.1 - Método.....	39
2.6.2 - Técnica.....	39

CAPÍTULO III

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Ensaio preliminares e pesquisa de princípios ativos.....	41
3.2 - Determinação dos compostos separados empregando espectroscopia (^1H NMR, IR, UV e MS).....	41
3.2.1 - Espectro de absorção ultra-violeta da fração 40 - 150, composto-1.....	45
3.2.2 - Espectro de absorção no infra-vermelho da fração 40-150, composto-1.....	45
3.2.3 - Espectro de ressonância nuclear magnética da fração 40-150, composto-1.....	46
3.2.4 - Espectro de massa da fração 40-150, composto-1.....	46
3.2.5 - Espectro de absorção infra-vermelho da fração 157 - 183, composto-2.....	51
3.2.6 - Espectro de ressonância nuclear magnética da fração 157 - 183, composto-2.....	51
3.2.7 - Espectro de massa da fração 157 - 183, composto-2.....	51
3.2.8 - Espectro de absorção infra-vermelho da fração 185 - 235, composto-3.....	56
3.2.9 - Espectro de ressonância nuclear magnética da fração 185 - 235, composto-3.....	56

3.2.10- Espectro de absorção infra-vermelho da 240 - 300, composto-4.....	59
3.3 - Modificação da estrutura para teste do grupo molecular ativo.....	61
3.3.1 - Acetilação da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-a- cetofenona.....	61
3.3.2 - Metilação da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-ace tofeno <u>na</u>	61
3.3.3 - Síntese da oxima da 2-hidroxi-4,6-dime toxi-acetofenona.....	62
3.3.4 - Síntese da 2,4-dinitrofenilhidrazona da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.....	64
3.4 - Determinação quantitativa da 2-hidroxi-4,6-dime toxi-acetofenona.....	70
3.4.1 - Curva de calibração para a determinação quantitativa da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi- acetofenona.....	70
3.5 - Análise farmacológica do extrato bruto e dos compostos purificados da <i>Sebatiania schottiana</i> Muell. Arg., sobre a musculatura lisa e cardíaca.	73
3.5.1 - Análise do efeito anti-espasmódico da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona em relação a papaverina.....	75
CAPÍTULO IV	
IV - CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1 - Vista parcial do local das coletas da <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg., nas corredeiras do Rio Itajaí-Açu, Município de Apiuna, Estado de Santa Catarina, 12-10-1986.....	16
Figura 2 - Infrutescência da <i>Sebastiania schottiana</i> Muell., Arg., em início de maturação 12-10-1986.....	17
Figura 3 - Esquema de extração dos princípios ativos da <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.....	26
Figura 4 - Esquema da coluna usada para fracionamento dos extratos.....	28
Figura 5 - Esquema de purificação das frações de <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.....	31
Figura 6 - Cromatografia em camada delgada dos compostos separados de <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.	36
Figura 7 - Cromatografia em camada delgada dos compostos sintetizados a partir da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetofenona.....	37
Figura 8 - Espectro de absorção ultra-violeta da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.....	47
Figura 9 - Espectro de absorção infra-vermelho da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.....	48
Figura 10 - Espectro de ressonância nuclear magnética da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.....	49
Figura 11 - Espectro de massa da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.....	50
Figura 12 - Fragmentação de alguns íons principais.....	51
Figura 13 - Espectro de absorção infra-vermelho do Glutinol.	53

Figura 14 - Espectro de ressonância nuclear magnética do Glutanol.....	54
Figura 15 - Espectro de massa do Glutanol.....	55
Figura 16 - Espectro de absorção infra-vermelho do compo <u>s</u> to 3.....	57
Figura 17 - Espectro de ressonância nuclear magnética do composto 3.....	58
Figura 18 - Espectro de absorção infra-vermelho do composto 4.....	60
Figura 19 - Esquema da síntese de derivados de 2-hidroxi-4, 6-dimetoxi-acetofenona.....	65
Figura 20 - Espectro na região do infra-vermelho, em disco de KBr do produto da acetilação da 2-hidroxi-4, 6-dimetoxi-acetofenona.....	66
Figura 21 - Espectro na região do infra-vermelho, em disco de KBr da 2,4,6-trimetoxi-acetofenona.....	67
Figura 22 - Espectro de referencia na região do infra-verme <u>l</u> ho, em nujol da 2,4,6-trimetoxi-acetofenona...	68
Figura 23 - Espectro na região do infra-vermelho, em disco de KBr da oxima de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-aceto <u>l</u> fenona.....	69
Figura 24 - Curva de calibração da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi - acetofenona.....	72
Figura 25 - Curvas concentração-efeito cumulativas médias para Histamina (A) e a Acetilcolina (B) obtida em tiras de músculo longitudinal de íleo de co <u>l</u> baia na ausência ou presença de 2-hidroxi-4,6 - dimetoxi-acetofenona, cada ponto representa a média de 6 a 8 observações e as barras verticais os erros padrões das médias.....	80

- Figura 26 - Registros experimentais isométricos representativos dos efeitos da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona em tiras de bexiga (A) ou de músculo longitudinal de íleo (B) isolados de cobáia..... 81
- Figura 27 - Curvas concentração-efeito cumulativos médias para a Acetilcolina (A) e a Histamina (B) obtidas em tiras de bexiga de cobáia na ausência ou presença de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, cada ponto representa a média de 4 a 6 observações e as barras verticais os erros..... 82
- Figura 28 - Efeito da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre as contrações induzidas por estimulação elétrica de tiras de bexiga ou de músculo longitudinal do íleo isolado de cobaia, cada ponto representa a média de 5 a 9 observações e as barras verticais os erros padrões das médias..... 83
- Figura 29 - Registros experimentais isométricos representativos do efeito da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre as contrações induzidas por estimulação elétrica do músculo longitudinal (A) e as contrações espontaneas do músculo circular (B) do ureter isolado de cão..... 84
- Figura 30 - Efeito da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre as contrações espontaneas da musculatura circular e das contrações induzidas por estimulação elétrica da musculatura longitudinal da ureter de cão, cada ponto representa a média de 4 a 7 observações e as barras verticais os erros padrões das médias..... 85

Figura 31 - Efeito inibitório da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre o isotropismo do átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente, cada ponto representa a média de 5 observações e as barras verticais os erros padrões das médias..... 86

ÍNDICE DE TABELAS

	PAG.
Tabela 1 - Exsicatas de <i>Sebastiania schottiana</i> (Muell. Arg.) Muell. Arg., Depositadas no Herbário do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina.....	6
Tabela 2 - Exsicatas de <i>Sebastiania schottiana</i> (Muell. Arg.) Muell. Arg. Depositadas no Herbário da Universidade Federal do Paraná.....	7
Tabela 3 - Exsicatas de <i>Sebastiania schottiana</i> (Muell. Arg.) Depositadas no Herbário do Museu Botânico Municipal da Prefeitura Municipal de Curitiba..	8-9
Tabela 4 - Sistemas cromatograficos propostos para a separação e identificação da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetofenona.....	35
Tabela 5 - Identificação por cromatografia em camada delgada da substância separadas e sintetizadas da <i>Sebastiania schottiana</i> (Muell. Arg.) Muell.Arg.	38
Tabela 6 - Procedimentos metodológicos empregados na caracterização dos efeitos farmacológicos da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.....	42
Tabela 7 - Potência inibitória CI 50 da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona da <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.	43
Tabela 8 - Ensaio preliminares em <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.	44
Tabela 9 - Investigação química preliminar da <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.	78
Tabela 10 - Relação dos pontos de fusão das substâncias separadas e sintetizadas da <i>Sebastiania schottiana</i> Muell. Arg.	79

RESUMO

Foram estudadas as partes "aéreas", que correspondem às folhas, flores e ramos jovens, da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. Euphorbiaceae com o objetivo de isolar e determinar os compostos com atividade farmacológica.

Do extrato éter de petróleo-1, obtido a partir do extrato metanólico bruto, foram isolados quatro compostos em pregando cromatografia em coluna e em camada delgada.

O composto-1 foi identificado como sendo a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona possuindo pf 81°C., PM 196 (M + para C₁₀H₁₂O₄ teoricamente 196,07), o espectro de massa: 181 (100), 166 (8,2), 138 (5), o RMN¹H (CDCl₃): 2,60 (s, 3H, CH₃CO), 3,82 (s, 3H, CH₃O), 3,85 (s, 3H, CH₃O), 5,92 (d J = 2,5 1H) e 6,06 (d J = 2,5, 1H, 2 arom.), 14,03 (s, 1H, OH). O UV mostrou um máximo em 286 nm. O IV evidenciou a presença de um anel aromático substituído, um grupo carbonila (C = O) e os grupos metoxilas (-OCH₃), mas nenhuma absorção foi detectada para o grupo hidroxila (-OH).

O composto-2 foi identificado como Glutinol um triterpeno com pf 209°C., PM 426 (M+ para C₃₀H₅₀O), o espectro de massa: 426, 411, 308, 274, 259, 245, 218, 205 e 193, o RMN¹H (CDCl₃): ppm: 0,80 (s, 3H, CH₃), 0,87 (s, 3H, CH₃), 0,95 (s, 3H, CH₃), 1,0 (s, 3H, CH₃), 1,05 (s, 3H, CH₃), 1,09 (s, 3H, CH₃), 1,11 (s, 3H, CH₃), 1,14 (s, 3H, CH₃), 3,45 (d, 1H, OH), 5,65 (t, 1H, R₁R₂C=CRH). O IV mostra absorções características de C-H de metila em 2925, 2965 cm⁻¹, e de hidroxila em 3460 cm⁻¹.

O composto 3 apresentou um pf $176^{\circ}\text{C}.$, o RMN^1H (CDCl_3): ppm: 0,75 (s, 3H, CH_3), 0,80 (s, 3H, CH_3), 0,88 (s, 3H, CH_3), 0,90 (s, 3H, CH_3), 0,98 (s, 3H, CH_3), 1,0 (s, 3H, CH_3) , 1,02 (s, 3H, CH_3), 3,2 (d, 1H, OH) e um sinal a 4,6 ppm. O IV apresenta absorções características de metila em 2900, 2840 cm^{-1} , e de hidroxila em 3400 cm^{-1} . O composto seria um triterpeno, cuja estrutura química não foi ainda identificada por falta de dados.

O composto 4, de coloração branca com pf $136^{\circ}\text{C}.$, apresenta no IV absorção de hidroxila em 3420 cm^{-1} e uma banda de absorção de C-H em 2910, 2840 cm^{-1} . Sua estrutura química não foi ainda identificada por falta de dados.

A 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona foi analisada farmacologicamente, sendo eficaz em inibir as respostas contrâteis, induzidas por diferentes agonistas na musculatura lisa isolada, além de inibir também as contrações provocadas por estimulação elétrica transmural em várias preparações isoladas , o que sugere uma ação anti-espasmódica direta a nível das células musculares lisas.

A correlação entre estrutura química e a atividade farmacológica permitiu sugerir que o centro ativo da molécula da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona esteja relacionada com a estrutura $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$.

O significativo rendimento deste composto (0,25 %), no extrato e o seu efeito anti-espasmódico nos tecidos estudados, levam a considerar que os resultados obtidos apóiam o emprego popular desta planta, para o tratamento de afecções renais, a exemplo das espécies conhecidas como "quebra pedra" pertencente a família das Euphorbiaceae.

A B S T R A C T

Leaves and stems of *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., were studied to isolate the compounds that present pharmacological activity. A 90 % methanolic extract of the vegetal material was concentrated under reduced pressure to 1/5 of its initial volume, and then extracted with petroleum ether and later with others solvents. The petroleum ether extract, that present pharmacological activity, was concentrated under reduced pressure and subjected to CC over silica gel to give components 1-4. This components were further purified by prep. TLC on silica gel.

Compound 1: 2-Hydroxy, 4,6-dimethoxyacetophenon : $C_{11}H_{12}O_4$ (M^+196), mp $81^\circ C$, UV λ_{max} nm: 286 IR ν_{max} cm^{-1} : 3100, 1615 ; 1H NMR (100MHz, $CDCl_3$) ppm: 2.60 (s, 3H, CH_3CO-), 3.82 (s, 3H CH_3O-), 3.85 (s, 3H CH_3O-), 5.92 (d, J = 2.5 Hz), 6.06 (d J = 2.5, 1H, 2 arom H), 14.03 (s, 1H, OH); MS m/z (rel. int. %) 196 (3), 166 (8.2), 138 (5).

Compound 2: Glutinol $C_{30}H_{50}O$ (M^+426), mp $209^\circ C$, IR ν_{max} cm^{-1} : 3460, 2925, 1460, 1385; 1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$) ppm : 0.80, 0.87, 0.95, 1.00, 1.05, 1.09, 1.11, 1.14 (8xs, 8x3H , 8 CH_3-), 3.45 (d, 1H, OH), 5.65 (dd J = 5, H-6), MS m/z (rel.int. %): 426 (12), 275 (22), 274 (100), 259 (41), 205 (19).

Compounds 3 and 4 were not identified.

Pharmacological "in vitro" analysis revealed that 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon (1 to 300 μM) caused a concentration related inhibitory effect in both drugs and on electrically-evoked contractions in several smooth muscles. These results indicate that 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon exerts a

direct antispasmodic activity in smooth muscle preparations.

The correlation between the structure of different derivatives of 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon and its pharmacological activity suggest that the active center is related to the group $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$.

The yield of 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon (0,25 %) and its relaxant proprieties on smooth-muscle suggests that the popular use of *Sebastiania schottiana* as a remedy for kidney or bladder calculi may be related to such an action.

CAPÍTULO I

I - INTRODUÇÃO

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

No Brasil, inúmeros vegetais são empregados como fonte alternativa de medicamentos. Na medicina popular várias espécies que pertencem a família das Euphorbiaceae, são empregadas com o propósito de facilitar a remoção de cálculos renais ou biliares. Destaca-se entre elas as espécies do gênero *Phyllanthus* *sellowianus* Muell. Arg., *Phyllanthus tenellus* R., *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., *Phyllanthus diffusus* Klotz., *Phyllanthus acutifolius* Spreng., e *Phyllanthus brasiliensis* Muell. Arg., plantas conhecidas popularmente como "quebra-pedra" ou "erva-pombinha". Alguns autores estendem estes nomes a outras espécies afins, do gênero *Phyllanthus* como *Chamaesyce thymifolia* (L.) Mill., *Euphorbia thymifolia* L. e *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. 8,2,25,28,35,36,39,41,42 e 45.

Pio Correia⁹ não considera "quebra-pedra" e "erva-pombinha" como sinônimos, afirmando que as espécies *Oenanthe phellandrium* Lam., *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., *Saxifraga granulata* L., e *Silene pratensis* Bess., são as "quebra-pedras" e como "erva-pombinhas"; *Phyllanthus acutifolius* Spreng., *Phyllanthus diffusus* Klotz., *Phyllanthus lathyroides* Muell. Arg., *Phyllanthus limbergii* Muell. Arg., e *Phyllanthus niruri* (L.) Muell. Arg..

Em nosso País, a vasta distribuição geográfica destas plantas, aliada a existência de cerca de 7 milhões de brasi

leiros portadores de litíases³⁴, permitem avaliar o enorme potencial medicinal destas espécies, estendendo-se a outros países Latinoamericanos, bem como, em certas regiões da África Ocidental³⁶. Nestas regiões, o consumo destas plantas tem objetivado não apenas a eliminação dos cálculos renais, mas também para o tratamento da diabete, das disenterias e das afecções espasmódicas dos intestinos^{34,36,42}.

A análise química das várias espécies do gênero, incluindo o *Phyllanthus niruri* (L.) Muell. Arg., revelou a existência de diversos alcalóides (securina, dehidrosecurina) flavonóides (quercetina, astragalina, quercetrina, isoquercitrina e rutina)^{25,28,19,35,38,39}, e lignanas (filantina^{20,28,47,48,49,59}, hipofilantina^{6,20,28,47,48,49,50,55,59}, nirantina¹, lintetralina^{20,21,59}, nirtetralina^{1,20,59}, filtetralina^{1,21,47,55,59}, entretanto os efeitos farmacológicos destes compostos não foram ainda avaliados.

Estudos químicos e farmacológicos, que foram conduzidos nos laboratórios de pós-graduação de Físico-Química, e no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, permitiram demonstrar um efeito anti-espasmódico expressivo do extrato hidroalcoólico de ramos jovens do *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg.⁴¹. A análise fitoquímica preliminar desta espécie, indicou a existência de terpenos, flavonóides e de alcalóides. Foi demonstrado que estes alcalóides apresentam propriedades anti-espasmódicas em preparações de músculos lisos, sendo sua potência comparável à da papaverina^{8,62}. Este efeito miorelaxante, foi contudo mais expressivo em tecidos como íleo de cobaia e o ureter de cão, decorrentes de suas propriedades, similares a papaverina, de antagonizar competitivamente os canais

de cálcio existentes na membrana celular. Os resultados parecem, portanto consonantes com o uso popular do vegetal conhecido como "quebra-pedra", contribuindo assim para o esclarecimento do seu mecanismo de ação e, abrindo outras possibilidades terapêuticas para o futuro, no tratamento de quadros diarréicos e outras enfermidades onde os antagonistas de canais de cálcio tem-se mostrado eficazes.

No que se refere especificamente a diarréia, associada ou não à desnutrição, sabe-se que é uma das principais causas de mortalidade infantil principalmente nos países do terceiro mundo. Em vista das dimensões do problema, intensos esforços tem sido dispendidos na busca de fármacos com maior eficácia antidiarréica². Atualmente, a Loperamida constitui-se na droga mais usada devido suas propriedades anti-propulsivas e anti-secretora. Mais recentemente, Reynolds e Col.,⁴⁵ apresentaram evidências que as ações da Loperamida são causadas como consequência de um bloqueio dos canais de cálcio e, conseqüentemente tais resultados, vêm de encontro à postulação de que os alcalóides do *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., poderiam constituir-se também em agentes anti-diarréicos em potencial, pois estes compostos também provocam bloqueio específico de canais de cálcio, além de serem mais seletivos para atuarem no músculo liso intestinal.

No que se refere ao *Phyllanthys niruri* (L.) Muell. Arg.. Os resultados obtidos nos laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina, indicaram a existência de compostos anti-espasmódicos nos diversos extratos analisados, com característica farmacológica semelhante aos estudos realizados com o *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., (resultados em fase de publicação). Recentes observações relatadas por pesquisadores da

Escola Paulista de Medicina, sujeitas a configuração, são bastante encorajadoras quanto ao emprego medicinal do *Phyllanthus niruri* (L.) Muell. Arg., no sentido de que o chá deste vegetal apresenta baixa toxicidade por via oral em paciente, elevando o teor de creatinina, o que poderia contribuir para o tratamento das afecções renais.

No Estado do Paraná e Santa Catarina, viceja a espécie *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., pertencente a família das Euphorbiaceae, sendo esta usada pela medicina popular com as mesmas finalidades do *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg.. Morfológicamente a *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., é semelhante ao *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., o que explica o uso conjunto das mesmas nas preparações da medicina popular, na região onde ela são abundantes, como no vale do Itajaí.

1.2 - CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE EM ESTUDO E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Sebastiania schottiana Muell. Arg., é encontrada nas florestas pluviais da encostas Atlântica, em áreas do Sudeste do Escudo Rio Grandense, em florestas com presença de Araucárias e também na Bacia do Rio Uruguai. Ocorre normalmente nas barrancas dos rios, e também entre ilhotas de pedras, figura 1 e 2. É conhecida popularmente pelos nomes de "branquilha", "sarandi negro" e "sarandi"^{43,44}. Em Santa Catarina, conforme levantamento realizado no Herbário Flôr da Universidade Federal do mesmo Estado (tabela 1), a espécie foi encontrada nas corredeiras do Rio Itajaí-Açu, no município de Apiuna. Já no Estado do Paraná, foram realizados levantamentos nos Herbários do Museu Botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba e do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (tabela 2 e 3), sendo que a espécie foi localizada nos Municípios de: Ponta Grossa, Palmeiras, Jaguariaíva, Joaquim Murtinho, Guaira, Foz do Iguaçu, Arapoti, Marechal Candido Rondon, enquanto que nos Estados de Mato Grosso e Minas Gerais foi encontrada nos Municípios de: Rio Brilhante e Diamantina. São encontradas ainda, através de permutas de exsicatas depositadas no Herbário do Museu Botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba, e exemplares coletados em "Paso de Los Libres", na Argentina.

TABELA 1 - Exsicatas de *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. depositadas no Herbário do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina.

Nº de registro no Herbário Flor	Nº de Registro	Local de coleta	Coletor
552	12150	Sete Quedas, Guaíra Paraná	Reitz & Klein (27.01.1962)
2968	13159	Itapiranga. Strep slope by Rio Uruguai 3 - 4 Km	L.B. Smith & R.M. Klein
5397	s/nº	Apiúna, SC., Corredeira do Rio Itajaí-Açu	A. Reis & C.I. Leite

TABELA 2 - Exsiccatas da *Sebastiania schottiana* (Muell. Arg.) Muell. Arg., depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Nº de registro no Herbário	Nº de registro	Local de Coleta	Coletor
77175	s.n.	Vinte km de Diamantina, Minas Gerais	Irwin, H, S.
2414	6261	Rio do Funil, Sengés, Paraná	Hatschobach, Gert Smith, L. B.
5623	13937	Lageado, Cinco Reis, Jaguariaiva, Paraná	Hatschbach, Gert Haas, H.
8735	251173	Rio Vacaria, Rio Brilhante, Mato Grosso.	Hatschbach, Gert (24.10.1970)
9878	31107	Corrego três Bocas, Jaguariaiva, Paraná	Hatschbach, Gert (10.01.1973)
4325	2462	Parque Nacional, Foz do Iguaçu Paraná.	Hatschbach, Gert Smith, I. P.
5013	12585	Parque Nacional, Cataratas, Foz do Iguaçu, Paraná.	Hatschbach, Gert

TABELA 3 - Exsiccatas da *Sebastiania schottiana* (Muell. Arg.) Muell. Arg. depositadas no Herbário do Museu Botânico Municipal da Prefeitura Municipal de Curitiba.

Nº de registro no Herbário	Nº de registro	Local de coleta	Coletor
30452	32586	Anfiteatro, Mun. de Ponta Grossa, Paraná.	Hatschbach, Gert (27.09.1973)
48480	18532	Los Paso de Los Libres, Prov. Corrientes, Argentina.	A. C. Schulz (01.11.1973)
51894	38953	Rio Corumbá (Mun. Ipameri) Goiás.	Hatschbach, Gert (04.10.1976)
5803	40225	Rod. do Café, Rio Tibagi (Mun. Palmeira) Paraná.	Hatschbach, Gert (16.11.1977)
102443	4814	Entre Rios Argentina	Boelcke, O.
1967	13937	Lageado, Cinco Reis, Min. de Jaguariaiva, Paraná.	Hatschbach, Gert (02.03.1966)
17083	25173	Rod. Curitiba Ponta Grossa, Rio Tibagi, Mun. Ponta Grossa, Paraná.	Hatschbach, Gert (03.11.1975)

TABELA 3 - Continuação.

Nº de registro no Herbário	Nº de registro	Local de coleta	Coletor
43609	39937	Rio Capivari, Mun. Jaguariava, Paraná.	Hatschbach, Gert
100001	3067	Volta Grande, Lavras do Sul, Rio do Sul, Santa Catarina.	Sobral, M.
105833	s.n.	Joaquim Murtinho, Paraná.	Pirami, J.R. (04.09.1984)
2961	12130	Sete Quedas, Mun. Guaíra, Paraná.	Reitz & Klein (27.01.1962)
7702	31107	Porto Mendes, Mare chal Candido Rondón, Paraná.	Hatschbach, Gert (21.06.1967)
53902	39823	Parque Nac, Sete Que das, Mun. de Guaíra, Paraná.	Hatschbach, Gert (24.03.1977)
52243	60971	Iguaçu Falls Argentina.	Davis, P.H. Hatschbach, Gert

1.3 - POSIÇÃO SISTEMÁTICA DE *SEBASTIANA SCHOTTIANA* (MUELL. ARG.) MUELL. ARG., SEGUNDO ENGLER'S ¹⁶.

Divisão	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Sub-classe	Archichlamydeae
Ordem	Geraniales
Sub-ordem	Euphorbiineae
Família	Euphorbiaceae
Sub-família	Euphorbioideae
Tribo	Hippomaneae
Gênero	<i>Sebastiania</i>
Espécie	<i>Sebastiania schottiana</i>
Sinonimia Vulgar:	Branquicho, Sarandi-negro, Branquilho e Sarandi ^{43,44}

1.3.1 - RESUMO PRELIMINAR DA ESPÉCIE, SEGUNDO SMITH, L.
DOWNS, R. J. 53 .

Sebastiania schottiana (Muell. Arg.) Muell. Arg.

Euphorbiaceae.

Arbustro de 2 - 3,5 m de altura, completamente glabro, ramos eretos ou ascendentes, quase pretos, lenticelados, espinhosos; estípulas ovadas, triangulares cêdas caídas; pecíolo 2 - 4 mm; folhas lanceoladas até espatuladas, obtusas ou largo agudas, longo-estreitas na base, inteiras, subcoriáceas, as nervuras laterais evidentes; espigas terminais sobre raminhos curtíssimos, 1 - 2 cm; eixo filiforme; brácteas masculinas um pouco mais curtas que os pedicelos femininos alargados até 2 cm no fruto; cápsulas com seis cornos em meia altura.

1.4 - SINOPSE DA FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae é muito bem representada na flora brasileira, englobando cerca de 8000 espécies, distribuídas em aproximadamente 300 gêneros e dividida em quatro sub-famílias, de um modo geral, são localizadas mais comumente nas regiões tropicais²⁷. Os representantes desta família apresentam forma e aspecto variável, existindo desde as de porte arbóreo, até as de arbusto, sub-arbusto e trepadeiras, apresentando ainda um número representativo de plantas úteis ao homem.

A mamona, *Ricinus communis* L., é uma das mais conhecidas espécies desta família. Apresenta um óleo a partir de suas sementes que é empregado na Indústria Farmacêutica e na de Plástico²⁷. A seringueira da Amazônia, *Hevea brasiliensis* (Rub.) Muell. Arg., é a maior produtora de borracha natural, a mandioca, *Manihot esculenta* Grantz., cujas raízes tuberosas nos fornece amido e farinha, é considerada como planta relacionada à subsistência de populações rurais, em diversas regiões do Brasil⁵. Existem muitas plantas desta família cultivadas como ornamentais, destacando-se, a espécie do Gênero *Euphorbia*, *Pedilanthus*, *Jatropha* e *Acalypha*, devido ao porte elegante e ao colorido de suas folhas, que são utilizadas nos parques e jardins.

Entre as Euphorbiaceae como uso na medicina popular distingue-se o gênero *Phyllanthus*, popularmente conhecido como "quebra-pedra", "erva-pombinha", "arrebenta-pedras" ou "saxifraga"^{43,44,51}, largamente utilizadas como diuréticos, litotípicos, eméticos e aperientes. São empregadas em cistites, cólicas renais, enfermidades crônicas da bexiga, hidropsia e em distúrbios da próstata. As folhas e sementes são usadas como remédio específico con

contra a diabete.

Segundo Fossat¹⁸, o quebra-pedra é um poderoso diurético e eliminador de ácido úrico, sendo usado na medicina popular com muita confiança, para combater a diabete, a cólica dos rins, as moléstias da bexiga, a retenção urinária e as afecções do fígado como a icterícia.

Embora com uso na medicina popular já consagrada, pouco são os trabalhos científicos relacionados com a ação farmacológica, composição química e morfodiagnose de várias espécies do Gênero⁵.

1.5 - OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Ao consultar a literatura específica realizada em Chemical Abstracts, Biological Abstracts e International Pharmaceutical Abstracts, não foi encontrada referência alguma sobre investigações químicas e farmacológicas com extratos da espécie em estudo, *Sebastiania schottiana* Muell. Arg.. Considerando sua importância na medicina popular de algumas regiões do Brasil, foi desenvolvido o presente trabalho visando:

1 - Determinação preliminar no extrato bruto de alguns grupos químicos de interesse farmacológico.

2 - Extração e isolamento dos princípios com potencial atividade farmacológica.

3 - Identificação dos compostos isolados.

4 - Análise farmacológica do extrato bruto e dos compostos purificados.

5 - Modificação da estrutura para teste de grupo molecular ativo.

CAPÍTULO II

II - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIAL BOTÂNICO

A espécie em estudo foi coletada no Município de Apiúna, no Estado de Santa Catarina. A identificação foi realizada pelos botânicos A. Reis e C. C. Leite, do Herbário Flôr do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina.

Considerando que na medicina popular, é empregada a parte denominada "aérea", que corresponde as folhas, flores e ramos jovens, estes órgãos vegetais foram submetidos a dessecação a 40°C., em estufa, com tiragem de ar úmido. A seguir o material foi fragmentado, reduzido a pó fino (tamis nº 10, Far. Bras. II¹⁵) e acondicionado em recipientes ao abrigo da luz e umidade.



FIGURA 1 - Vista parcial do local das coletas da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., nas corredeiras do Rio Itajaí-Açu, Município de Apiúna, Estado de Santa Catarina, 19.10. 1986.



FIGURA 2 - Infrutescências da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., em início de maturação.

2.2 - PESQUISA DE PRINCÍPIOS ATIVOS

Antecedendo ao estudo dos princípios ativos das partes aéreas, *Sebastiania schottiana* (Muell. Arg.) Muell. Arg., foi realizada a determinação preliminar de alguns grupos químicos de interesse farmacológico de acordo com a marcha sistemática de análise em Fitoquímica, segundo Moreira²³ e Wichtl⁶⁰.

2.2.1 - PREPARO DO EXTRATO ALCOÓLICO E DO EXTRATO AQUOSO POR DECOÇÃO SEGUNDO BALBACK⁷

O material vegetal pulverizado (20 g), foi aquecido em chapa elétrica durante 15 minutos com 100 ml de água destilada. Após um repouso de 10 minutos, foi filtrado e o volume completado para 100 ml.

2.2.2 - ALCALÓIDES

O material vegetal pulverizado (0,5 g) foi aquecido em banho-maria durante 10 minutos, com uma mistura de 1 ml de ácido clorídrico 2 N e 9 ml de água. Após o resfriamento, o extrato foi filtrado, e adicionou-se 3 ml de hidróxido de amônia concentrada. A solução alcalina foi agitada duas vezes com 10 ml da mistura de éter-clorofórmio (3:1 v/v) de cada vez.

A fase orgânica separada foi tratada com sulfato de sódio anidro, e filtrada. O filtrado foi evaporado em banho Maria até a secura. O resíduo foi retomado com 2 ml de ácido clorídrico

2 N., dividido em 5 tubos de ensaio, e adicionou-se separadamente 3 gotas dos reativos: Mayer, Bouchardat, Bertrand e Dragendorff. O quinto tubo foi usado para comparação.

Efetuuou-se, ainda a pesquisa para alcalóides, de acordo com Stanislas e cols.⁵⁴, cuja técnica é a que segue. Cerca de 500 g das partes aéreas do vegetal, foram submetidas a uma maceração com etanol 60% v/v durante 10 horas. A seguir o extrato etanólico foi filtrado, e o resíduo foi lavado com 100 ml de mesmo solvente por duas vezes. Os extratos reunidos foram reduzidos a metade por destilação a vácuo a 40°C.. Em seguida, o extrato foi alcalinizado com hidróxido de amônia concentrada e extraído 4 vezes com porções de 50 ml de clorofórmio. Os extratos clorofórmicos reunidos, foram evaporados à secura e o resíduo foi retomado com 2 ml de ácido clorídrico a 2% e dividido em 5 tubos de ensaio. A seguir pesquisou-se os alcalóides com os reativos: Dragendorff, Mayer, Bouchardat e Bertrand, empregando-se o quinto tubo para o branco.

2.2.3 - FLAVONÓIDES⁵

Cerca de 0,5 g da droga pulverizada, adicionada a 30 ml de metanol, foi mantida em ebulição sob refluxo durante 10 minutos. A solução ainda quente foi filtrada e o filtrado diluído com 10 ml de água destilada. Após o resfriamento, a solução foi agitada 2 vezes com 10 ml de éter de petróleo, e a fase metanólica aquosa separada, foi evaporada até a secura, sob pressão reduzida e a temperatura de aproximadamente 40°C. O resíduo obtido foi dissolvido em 15 ml de acetato de etila, e a solução filtrada. Um volume de 2 ml desta solução foi utilizada em cada uma das reações de identificação.

2.2.3.1 - REDUÇÃO PELO HIDROGÊNIO

(reação de Shinoda ou reação da cianidina)

Foram adicionados a solução de acetato de etila 200 mg de magnésio e gotas de ácido clorídrico concentrado. Os derivados flavônicos, as flavonas, as flavononas e os flavonóis de cor amarela são reduzidas a compostos antociânicos avermelhados.

2.2.3.2 - REAÇÃO COM ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

Na presença de ácido sulfúrico concentrado os compostos flavônicos, em geral formam sais de oxônio e as soluções apresentam fluorescência amarela.

2.2.3.3 - REAÇÃO DE PEW

(redução pelo hidrogênio)

Ao adicionar-se a solução de acetato de etila 200 mg de pó de zinco e gotas de ácido clorídrico concentrado, os derivados flavônicos, de cor amarela reduzem-se a compostos antociânicos avermelhados.

2.2.3.4 - REAÇÃO COM CLORETO FÉRRICO DE ACORDO COM COSTA^{10,11}

As soluções alcoólicas de flavonóides produzem diferentes tonalidades.

2.2.4 - TANINOS

2.2.4.1 - REAÇÃO COM CLORETO FÉRRICO

O extrato aquoso obtido em 2.2.1 (10 ml), foi transferido para um tubo de ensaio onde foi adicionado duas gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O desenvolvimento de coloração verde, azul ou a formação de precipitado, indica ensaio positivo.

2.2.4.2 - FORMOL CLORÍDRICO

(ensaio de Stiasny³⁰)

O extrato aquoso obtido em 2.2.1 (20 ml), foi submetido a refluxo durante 30 minutos, com 10 ml de reagente; (formaldeído 40% - ácido clorídrico fumegante 1:3 v/v). Após o resfriamento foi filtrado e o resíduo foi lavado com água destilada. No precipitado foram pesquisados os taninos condensados enquanto que no filtrado, os taninos hidrolisáveis.

2.2.5 - ANTRAQUINONAS

O extrato alcoólico obtido em 2.2.1 (20 ml), foi refluxado durante 15 minutos com 3 ml de ácido sulfúrico 10%. O filtrado foi esfriado e transferido para um funil de separação. A este filtrado foram adicionados 30 ml de água destilada e extraído três vezes com 10 ml de benzeno.

Os extratos benzênicos foram reunidos e concentrados a 10 ml, sendo transferidos para um tubo de ensaio e agitados com 10 ml de hidróxido de amônia. Os derivados antraquinônicos, de cor amarela, formam radicais cromóforos avermelhados.

2.2.6 - HETEROSÍDEOS CARDIOATIVOS

Ao extrato alcoólico obtido em 2.2.1 (50 ml), foi adicionado 50 ml de água destilada e 5 ml de solução de acetato bãsico de chumbo a 10%. A seguir o líquido sobrenadante foi agitado, centrifugado e, transferido para um funil de separação, onde foram extraídos com três partes de 15 ml de clorofórmio. Os extratos clorofórmicos foram reunidos e concentrado em rota vapor a 40°C, até um volume de 5 ml. Realizou-se as identificações segundo Baljet¹⁴, Liebermann Burchard^{14,12} e Keller Kiliani^{14,12}.

2.2.7 - SAPONINAS

Agitar energicamente 5 ml de extrato aquoso obtido em 2.2.1, em um tubo de ensaio durante 5 minutos e deixar em repouso durante 30 minutos. Espuma persistente indica ensaio positivo.

2.2.8 - ÓLEO ESSÊNCIAL

Os diferentes órgãos vegetais foram esmagados entre os dedos, onde foi realizada a pesquisa olfativa.

2.2.9 - CUMARINAS

Ao extrato alcoólico (50 ml) obtido em 2.2.1 foi adicionado uma quantidade suficiente de ácido clorídrico até a obtenção de pH 1. O volume foi reduzido para 10 ml em rota-vapor a 40°C, em seguida foi transferido para um funil de separação e agitado três vezes, com porções sucessivas de 20 ml de éter etílico. Em seguida o extrato etéreo foi reunido e o seu volume reduzido a 10 ml.

Gotas do extrato etéreo foram depositadas em papel de filtro circular, em três pontos previamente determinados, de modo a obter três manchas de 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com uma gota de solução de hidróxido de sódio N. A mancha 1 foi coberta com uma lâmina de alumínio, e em seguida, o papel de filtro levado para uma câmara de luz Ultra-violeta, ficando exposto a mesma, sob ondas longas (366 nm) durante 3 minutos. O desenvolvimento de fluorescência azul na mancha exposta à luz indica cumarinas.

2.2.10 - FENÓIS COM POSIÇÃO ORTO E META LIVRE

O extrato etéreo (2 ml) obtido em 2.2.9, foi transferido para uma cápsula de porcelana e levado à secura, adicionando-se a seguir 2 gotas de reativo de Liebermann recentemente preparado. Após 5 minutos, foi adicionado 1 gota de água destilada e a mistura homogenizada com um bastão de vidro, logo a seguir foram acrescentadas gotas de hidróxido de sódio 4 N. O desenvolvimento de coloração indica a presença de fenóis.

2.2.11 - FENÓIS COM POSIÇÃO PARA LIVRE

Quatro ou cinco gotas de solução etérea obtida em 2.2.9, foram transferidas para uma cápsula de porcelana escavada, juntando-se 1 gota de reativo de Millon, esperou-se cinco minutos, não ocorrendo desenvolvimento de coloração, aqueceu-se a mistura em estufa, à temperatura de 100°C, durante 3 minutos. O desenvolvimento de coloração vermelha indica presença de fenóis.

2.2.12 - ÁCIDOS ORGÂNICOS

O extrato etéreo restante obtido em 2.2.9, foi levado à secura. Adicionou-se 5 ml de água destilada para a determinação do pH. A reação ácida confirma a presença de ácido orgânico.

2.3 - EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS

2.3.1 - OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO

As partes aéreas (folhas, flores e galhos finos) de *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., (10 kg) recém coletadas, foram moídos e submetidas a extração em metanol a 95% à temperatura ambiente durante duas semanas, com repetidas reposição de solvente. O extrato total metanólico foi concentrado a 1/4 do seu volume em evaporador rotatório a pressão reduzida, resultando num material de verde-amarelado.

O extrato foi armazenado em frasco de cor ambar e deixado repousar em uma câmara fria, por um período de 24 horas.

O extrato foi novamente filtrado, resultando numa solução de cor avermelhada, recebendo a denominação de extrato metanólico bruto. O filtrado foi conservado em câmara fria, eliminando-se os fatores de alteração como, a luz, a temperatura e contaminação microbiológica, sendo somente retirado para o preparo das extrações dos seus constituintes. Aparentemente, estes cuidados foram suficientes, uma vez que a atividade e a composição das soluções, foram constantes durante os experimentos.

2.3.2 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO

O extrato metanólico bruto, foi transferido para um funil de separação e agitado 5 vezes com o dobro do seu volume com: éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila. O líquido restante é o extrato hidroalcoólico. Em cada uma dessas extrações foi esperado a nítida visualização das linhas de separação dos solventes. As fases foram recolhidas em recipientes separados e concentrados em rota-vapor a 40°C até a secura, sendo denominados de extratos de éter de petróleo-1, clorofórmio-2, acetato de etila-3, e hidroalcoólico-4. A figura 3 resume as operações realizadas para obtenção das frações.

Uma amostra de 0.050 g dos extratos acima obtido foram usados nos testes das atividades farmacológicas. O extrato de éter de petróleo-1, e clorofórmio-2, apresentaram atividade farmacológica, estes extratos foram fracionados, visando isolar os seus constituintes ativos.

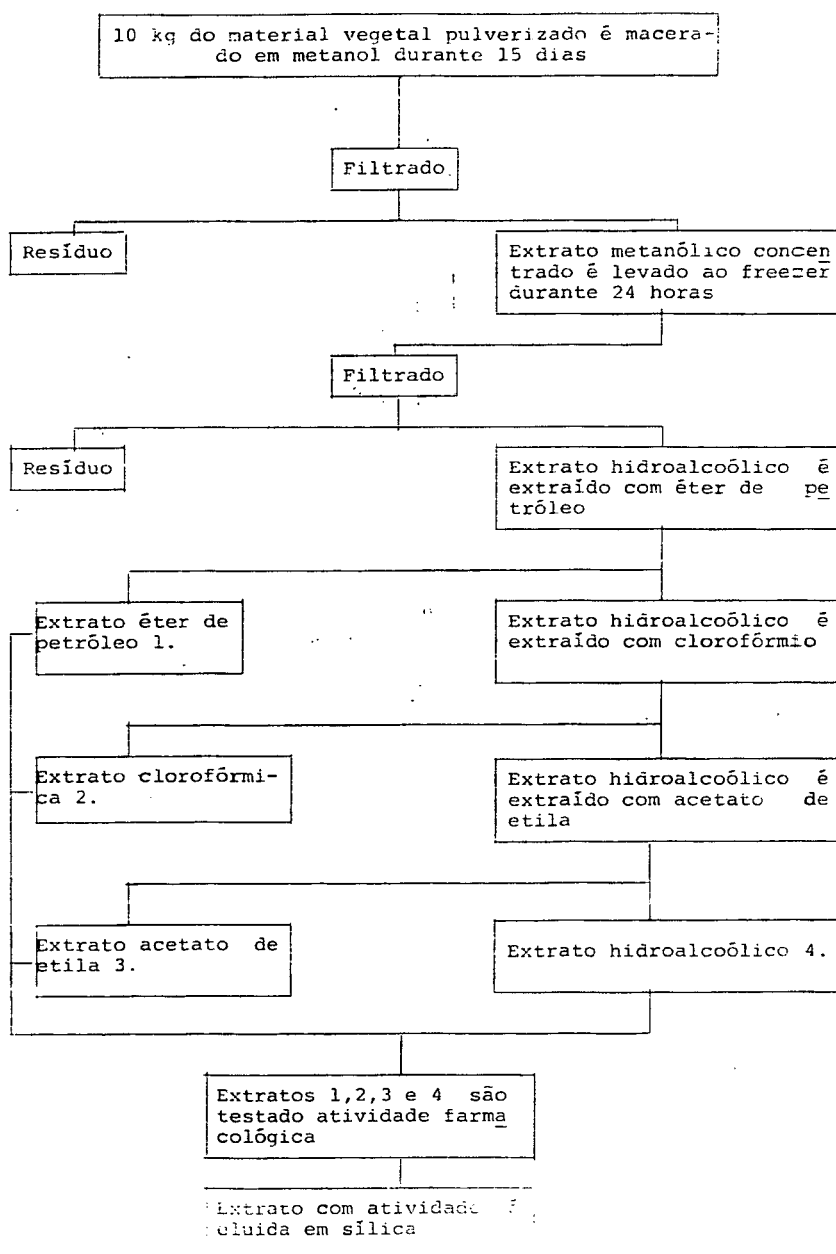


FIGURA 3 - Esquema de extração dos princípios ativos da *Sebastia schottiana* (Muell. Arg.) Muell. Arg.

2.3.2.1 - PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ÉTER DE PETRÓLEO-1

O extrato de éter de petróleo-1, levado a secura apresentou um resíduo verde (40 g) que foi dissolvido com um mínimo de clorofórmio e misturado a 80 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh). A mistura foi submetida a um fracionamento preliminar através de uma coluna contendo 400 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh). A coluna com 8 cm de diâmetro por 15 cm de altura, inicialmente foi eluída com éter de petróleo e, logo após com tolueno, clorofórmio, acetato de etila e metanol (figura 4 e 5).

As frações de 1500 ml de cada solvente, denominaram-se, éter de petróleo 1.1, tolueno 1.2, clorofórmio 1.3, acetato de etila 1.4 e metanol 1.5. Uma amostra de 0,050 g de cada fração concentrada foi utilizada no teste de atividade farmacológica. A fase éter de petróleo-1.1, foi a única a apresentar atividade farmacológica.

2.3.2.1.1 - SEPARAÇÃO DO CONSTITUINTE ATIVO DA FRAÇÃO ÉTER PETRÓ- LEO-1.1

A fração éter petróleo-1.1, (20,8 g), dissolvida em clorofórmio foi acrescida de 41,6 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh) e evaporado em rota-vapor até a secura. O extrato mais a sílica foram cromatografados através de uma coluna de 2,5 cm de diâmetro por 130 cm de altura contendo 717 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh), usando como eluente o tolueno, com uma vazão de 1 ml por minuto.

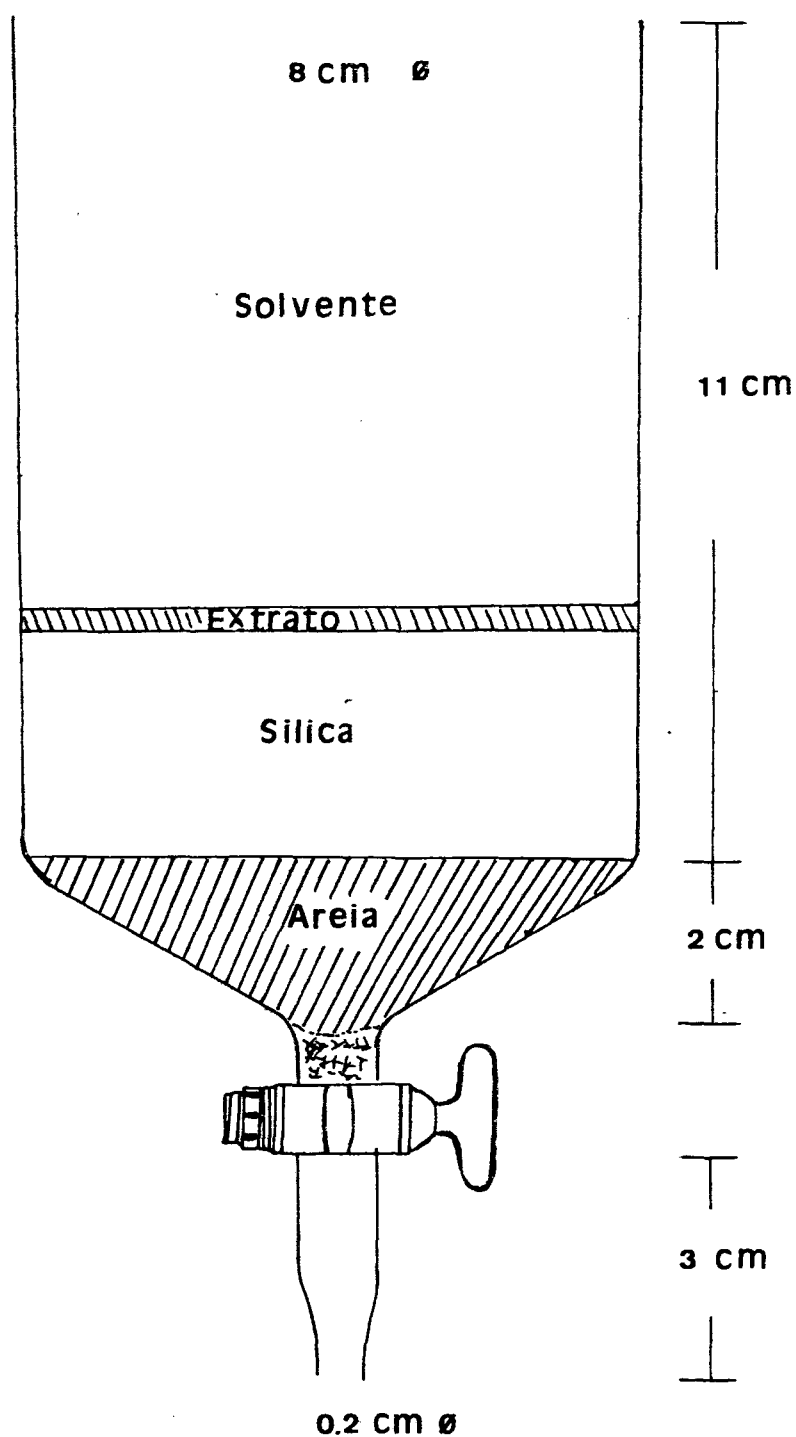


FIGURA 4 - Esquema da coluna usada para fracionamento dos extratos.

Foram coletadas 300 frações de 30 ml e reunidas segundo monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD). Desta forma as frações de nº 14 - 29 mostraram ser de consistência oleosa, as frações de 40 - 150 apresentaram um composto cristalizável e as frações de 157 - 183, 185 - 235 e 240 a 300 um pó branco amorfo. Essas frações foram reunidas e concentradas sob ventilação de ar quente e purificadas segundo metodologia descrita no item 2.4.3.

As frações 14 - 29 (1,5 ml) são constituídas por uma mistura de substâncias oleosas que não apresentaram atividades farmacológicas e não foram estudadas.

As frações 40 - 150 (11,8 g) são constituídas de cristais incolores e traços de substâncias oleosas. Estes cristais foram purificados através de recristalizações em éter de petróleo. Esta fração apresentou atividade farmacológica e foi estudada com maior detalhe.

Nas frações de 157 a 183 foi verificada a presença de um sólido branco com traços de substâncias oleosas. Esta fração foi dissolvida em éter de petróleo e precipitada a frio e o precipitado separado por filtração a frio. Após lavagem com éter de petróleo, obteve-se cerca de 2,4 g.

Nas frações 185 - 235 obteve-se um sólido branco com traços de substâncias oleosas, essas frações foram dissolvidas em éter de petróleo, precipitado a frio e o precipitado separado por filtração a frio. Obtendo-se cerca de 1,5 g.

Nas frações 240 - 300 foi verificada também a presença de um sólido branco que é precipitado com éter de petróleo em câmara fria por duas horas. Após foi separado por filtração

ção a frio. Obteve-se cerca de 0,9 g da substância.

As três últimas frações semi purificadas não apresentaram atividade farmacológica .

2.3.2.2 - PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMIO-2,

A fração clorofórmio-2 constituída de 4,3 g foi adicionada de 9 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh). O extrato mais a sílica foram submetidos a um fracionamento preliminar através de uma coluna contendo 90 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh).

A coluna de 8 cm de diâmetro por 15 cm de altura, foi inicialmente eluída com éter de petróleo e logo após com tolueno, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Foram coletadas frações de 500 ml de cada solvente, assim denominadas éter de petróleo-2.1, tolueno-2.2, clorofórmio-2.3, acetato de etila-2.4 e metanol-2.5.

Amostras de 0,050 g de cada fração, após a completa evaporação do solvente foram utilizadas no teste de atividade farmacológica. A fração denominada clorofórmio-2.3, apresentou atividade farmacológica mas devido a pequena quantidade e complexidade da mistura de seus compostos inviabilizou a separação e elucidação dos compostos ativos pelos métodos convencionais disponíveis.

2.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SEPARADOS E SINTETIZADOS

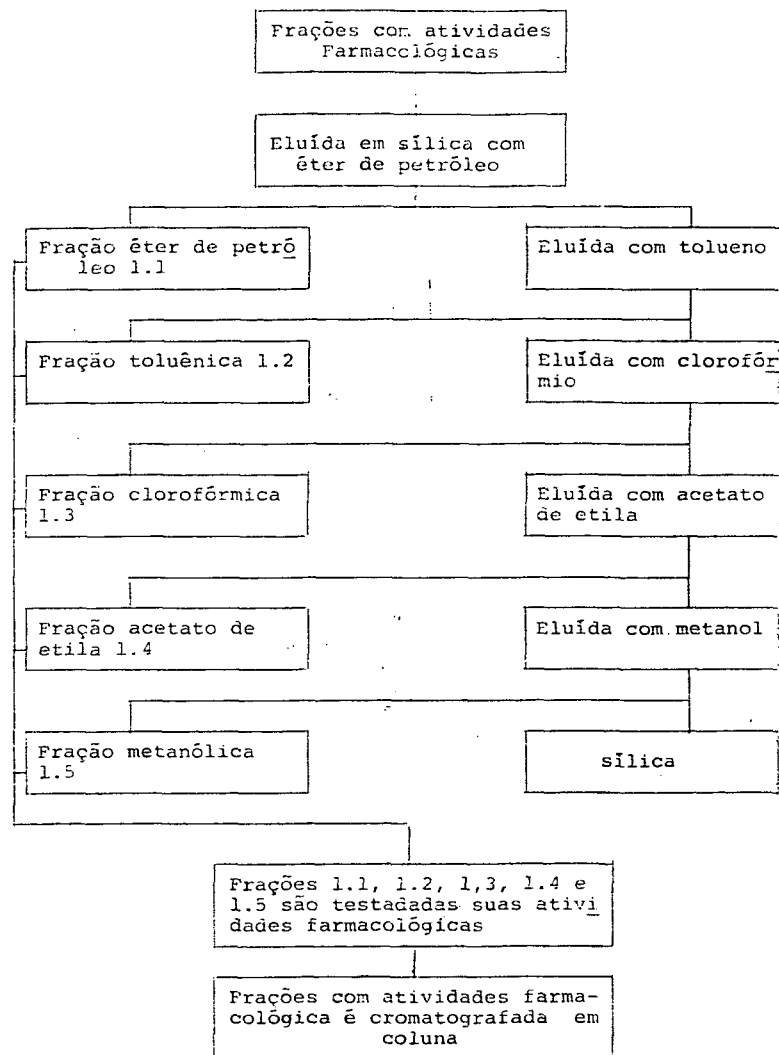


FIGURA 5 - Esquema de purificação das frações de *Sebastiania schottiana* (Muell. Arg.) Muell. Arg.

2.4.1 - ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS

Após testes com as fases móveis (tabela 4) optou-se pela que melhor resultado apresentou dentro das condições laboratoriais disponíveis, sendo a seguinte: diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70 v/v), figura 4 e 5.

Procedeu-se então, a cromatografia ascendente no sistema de solvente indicado. Após o solvente percorrer 15 cm além do local de deposição das amostras dos extratos, interrompeu-se o desenvolvimento e os cromatogramas foram secos. A seguir foram examinados sob a luz ultra-violeta e revelado com vanilina sulfúrica¹⁵, conforme metodologia descrita 2.4.6.

2.4.2 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Empregou-se placas de vidro de 5 x 20 e 20 x 20 cm revestida com sílica-gel GF 60 com 300 u de espessura. Os compostos semipurificados foram depositados em pontos equidistantes de 1,5 cm e a 1,5 cm da extremidade inferior e lateral da placa cromatografica.

2.4.3 - CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Foram empregadas placas de vidro de 20 x 20 cm, revestidas com sílica-gel PF₂₅₄ - 366 artigo 7748 merck com 1,5 mm de espessura. Os extratos foram aplicados sobre uma linha a 2,0 cm da extremidade inferior da placa. As placas foram desen

volvidas pelo método ascendente no sistema descrito no item 2.4. 1. Após o solvente percorrer 15 cm, além da linha de aplicação das amostras dos extratos, os cromatogramas foram secos, logo a seguir examinados sob a luz UV., ou visualizadas com vanilina sulfúrica¹⁵ conforme metodologia 2.4.6.

As regiões correspondentes as manchas mais representativas, foram raspadas da placa e as substâncias recuperadas da sílica com clorofórmio e filtrado em funil com porcelana sintetizada. As soluções clorofórmicas foram levadas à secura em rota-vapor a 40°C, e cristalizadas com éter de petróleo. Essas substâncias purificadas foram submetidas aos testes Físicos - Químicos e Farmacológicos.

2.4.4 - ELUIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Nos ensaios analíticos, foram aplicados 5 ul dos extratos em forma de pontos, e nas preparativas foram aplicadas 100 a 200 mg das substâncias em forma de linha. O solvente foi evaporado completamente e a placa desenvolvida em câmara saturada com a fase móvel.

2.4.5 - VISUALIZAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

A localização das substâncias separadas no cromatograma foi realizada com o uso de métodos Físicos e Químicos (tabela 5).

A - MÉTODO FÍSICO

Um dos métodos mais usados para visualização de substâncias separadas por cromatografia em camada delgada é a luz Ultrá-violeta. Neste processo utilizamos placas com indicadores fluorescentes a um determinado comprimento de onda. Os mais comuns são: a 250 e 366 nm ou a combinação dos dois comprimentos de onda.

B - MÉTODO QUÍMICO

Nesta técnica, utilizamos os reagentes, usados para visualização, com o auxílio de um pulverizador manual ou espray com ar comprimido. As placas foram pulverizadas com reagente vanilina sulfúrica¹⁵ a uma distância de 15 a 20 cm e logo aquecidas a 120°C, para permitir que a reação ocorra.

2.5 - PONTO DE FUSÃO

As determinações dos pontos de fusão das substâncias obtidas por cromatografia preparativa foram realizadas com equipamento da marca Leitzwtz Lar (Orttholuz germani 769403).

Na tabela 10 estão relacionados os pontos de fusão das substâncias separadas e sintetizadas.

Tabela 4 - Sistemas cromatográficos testados para a separação e identificação da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

Nº Adsorvente	Eluentes (Fases móveis)	Percursos	Referências
01 Sílica-gel G Merck	Diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70)	15 cm	---
02 "	Clorofórmio-metanol (97:03)	10 cm	20
03 "	Benzeno-clorofórmio (50:50)	10 cm	20
04 Poliamida-DC-11	Água-etanol-etilmetilcetona (65:15:10)	10 cm	20
05 "	Éter de petróleo-benzeno-etilmetilcetona-metanol (50:40:05:05)	10 cm	20
06 Sílica-gel G Merck	Éter de petróleo-dietileter-ácido acético (80:20:01)	10 cm	02
07 "	Benzeno-dietileter (80:20)	10 cm	02
08 Sílica-gel G Merck 60 PF 254 + 366	Diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70)	15 cm	---

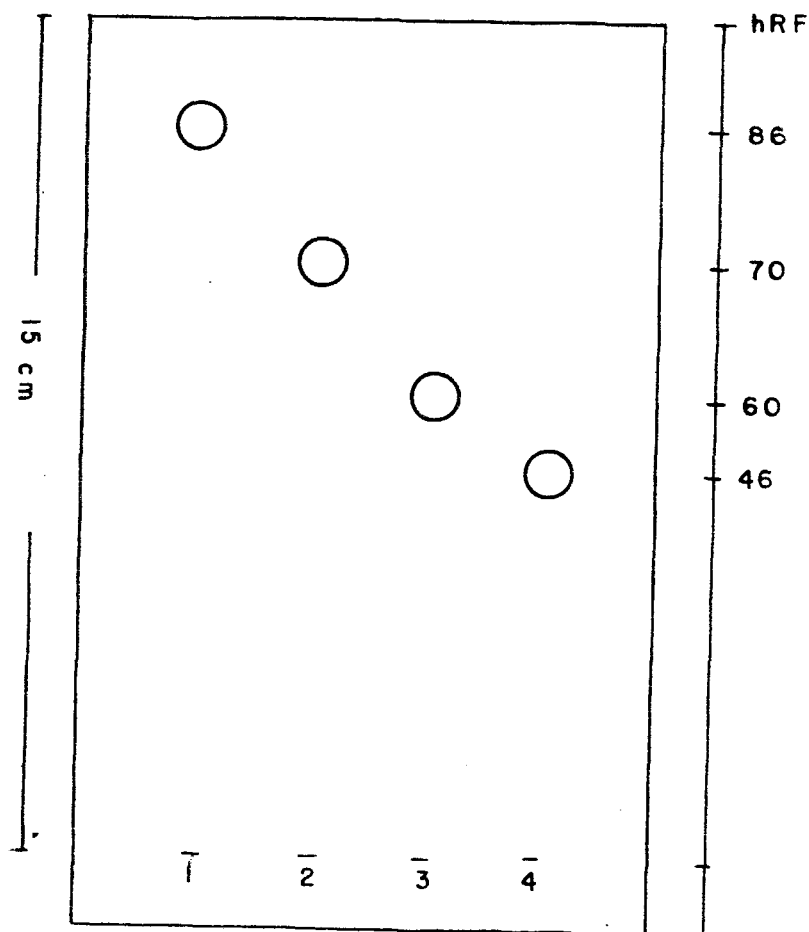


FIGURA 6 - Cromatografia em camada delgada dos compostos separados de *Sebastiania schottiana* Muell. Arg.

1. Fração 40 - 150, 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona
2. Fração 157 - 183, Glutinol
3. Fração 185 - 235, Composto 3
4. Fração 240 - 300, Composto 4

Fase estacionária: Sílica-gel GF Merck

Ativada a 110°C.

Fase móvel: Diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70)

Visualizador: Vanilina sulfúrica

Ultra-violeta ondas curtas (UV)

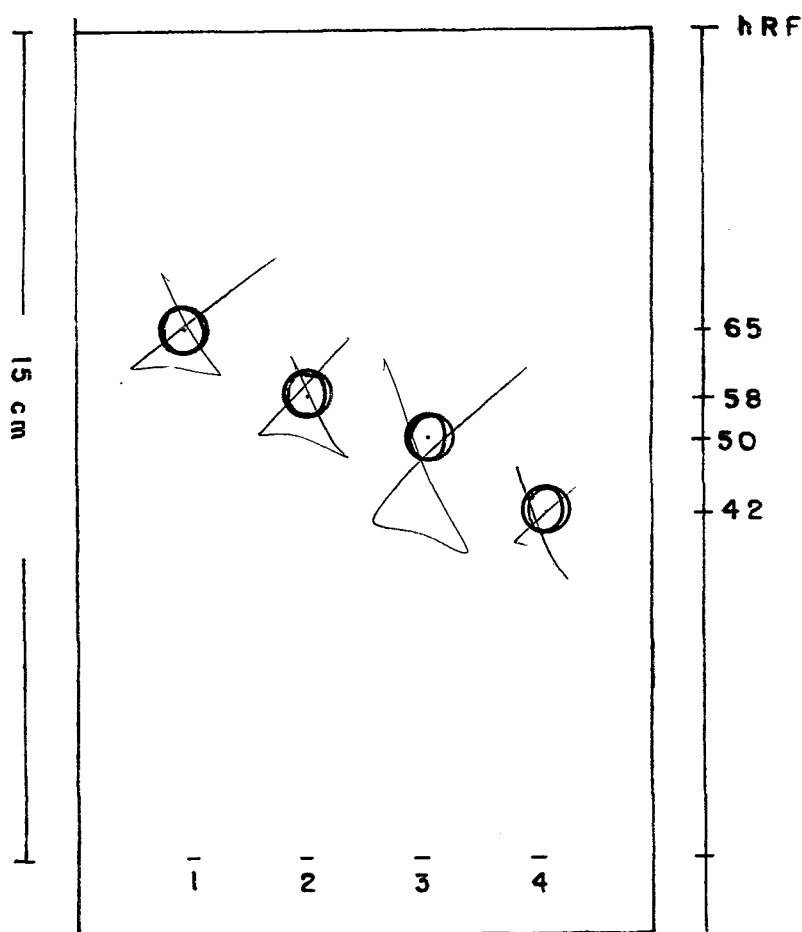


FIGURA 7 - Cromatografia em camada delgada dos compostos sintetizados a partir da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

1. Acetilação
2. Metilação
3. Oxima
4. 2,4-dinitrofenilhidrazona

Fase estacionária: Sílica-gel GF Merck

Ativada a 110°C.

Fase móvel: Diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70)

Visualizador: Vanilina sulfúrica

Ultra-violeta ondas curtas (UV)

Tabela 5 - Identificação por cromatografia em camada delgada da substâncias separadas e sintetizadas da *Sebastiania schottiana*, Muell. Arg.

Substância	Percurso	Fase móvel	Rf.	Visualizadores
2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona	15 cm	Diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70)	0,86	U.V. Vanilina sulfúrica Longas e Curtas
Fração 157 - 183	15 cm	"	0,70	Não absorve Roxo
Fração 185 - 235	15 cm	"	0,60	Azul escuro Roxo
Fração 240 - 300	15 cm	"	0,46	Não absorve Roxo
Acetilação	15 cm	"	0,65	Azul escuro Laranja
Metilado	15 cm	"	0,58	Azul escuro Laranja
Oxima	15 cm	"	0,50	Azul escuro Lilás
2,4-dinitrofenilhidrazona	15 cm	"	0,42	Azul escuro Laranja

2.6 - QUANTIFICAÇÃO DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA

2.6.1 - MÉTODO

O método proposto, adapta-se ao sistema cromatográfico (cromatografia em camada delgada preparativa usando sílica-gel 254 + 366 artigo 7748 merck).

REATIVOS E APARELHO:

A - Metanol p.a.

B - Solução padrão recentemente preparada

Solução metanólica de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona (0,0009 g em 50 ml).

C - Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV - 190. Comprimento de onda 286 nm.

CURVA PADRÃO:

Transferiu-se alíquotas crescentes da solução padrão para balões volumétricos de 10 ml, completando o seu volume com metanol. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 286 nm, contra um branco de metanol. Os dados obtidos foram plotados contra as respectivas concentrações para dar uma linha reta como indicado na figura 25.

2.6.2 - TÉCNICA

Pesou-se 10 g das partes aéreas da *Sebastiania schottiana* (Muell. Arg.) Muell. Arg., reduzidas a pó (tamis nº 10 Farm. Bras. II), refluxadas com 100 ml de metanol 95% durante

60 minutos. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro de 7 cm de diâmetro. Repetiu-se o processo por mais três vezes. Os filtrados foram reunidos e o volume reduzido à metade, por destilação a vácuo a 40°C. O extrato metanólico foi quantitativamente transferido para um funil de separação e, extraído com 4 porções de 50 ml de éter de petróleo 40 - 60°C.

O extrato éter de petróleo foi submetido a cromatografia em coluna de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh) numa relação de uma parte de extrato para dez partes de adsorvente, eluída com éter de petróleo e tolueno, foram coletadas frações de 100 ml de cada solvente.

Na fração de éter de petróleo não foi detectada a presença da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona. A fração toluênica foi concentrada e aplicada em placa de cromatografia preparativa de sílica-gel G PF 254 + 366 artigo 7748 merck, sendo desenvolvida com diclorometano-metanol-benzeno (10:05:70 v/v).

Os padrões das laterais da placa cromatográfica foram visualizados pela reação com vanilina sulfúrica¹⁵. A região correspondente ao padrão da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona foi raspada da placa e recuperada com clorofórmio e em seguida filtrado em funil de porcelana sinterizada. A solução clorofórmica foi levada à secura e o material solubilizado com metanol p.a. e o seu volume completado a 100 ml em balão volumétrico. Três ml desta solução são transferidos para uma célula de quartzo de 10 mm de caminho óptico e levados ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância a 286 nm.

CAPÍTULO III

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - ENSAIOS PRELIMINARES E PESQUISA DE PRINCÍPIOS ATIVOS

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares estão na tabela 8. Na tabela 9, estão resultados obtidos na investigação química preliminar e na tabela 10 estão os resultados obtidos dos pontos de fusão, das substâncias separadas e sintetizadas.

3.2 - DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS SEPARADOS POR MEIO DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS (RMN¹H, IV, UV E MASSA)

Os espectros de absorção na região do infra-vermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 787, com as substâncias incorporadas em pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro. As absorções foram registradas em escala de centímetros recíprocos (cm^{-1}), sendo os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0,5 mm de espessura.

Os espectros de absorção na região do ultra-violeta, foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV - 190, equipado com registrador R. B. 101 do E.C.B. (Equipamento Científico do Brasil), utilizando-se metanol como solvente.

Os espectros de ressonância nuclear magnética de hidrogênio foram obtidos em aparelho Variam XL - 100 de 100 MHz

Tabela 8 - Ensaio preliminares realizados em partes aéreas de
Sebastiania schottiana Muell. Arg.

Pesquisa realizada	Resultados
Olfativa	inodoro
Extrato aquoso	
cor	verde-amarelado
sabor	adstringente
odor	chá
pH	<u>+ 5</u>
Extrato alcoólico	
cor	verde
sabor	adstringente
odor	mascarado pelo álcool
pH	<u>+ 5</u>

Tabela 9 - Investigação química preliminar das partes aéreas da *Sebastiania schottiana*, Muell. Ar.

Composto químico pesquisado	Resultados
Ácidos fixos	+
Ácidos orgânicos em geral	+
Ácidos voláteis	-
Alcalóides	-
Amino-grupos	
Extrato aquoso	+
Extrato alcoólico	+
Esteróides e/ou triterpenos	+
Fenóis e pos. P livre	-
Fenóis em pos. O e M livre	-
Fenóis em geral	-
Heterosídeos antociânicos	+
Heterosídeos antraquinônicos	+
Heterosídeos cianogênicos	-
Heterosídeos flavônicos	++
Heterosídeos saponínicos	-
Heterosídeos cumarínicos	-
Taninos condensados	+
Taninos hidrolisáveis	++
Óleo essencial	-

- = resultados negativos

+ = traços

++ = resultados positivos

Tabela 10 - Relação dos pontos de fusão das substâncias separadas e sintetizadas da *Sebastiania schottiana* Muell . Arg.

Substância	Ponto de Fusão	Referência
Fração 40 - 150, 2-hidroxi- 4,6-dimetoxi-acetofenona	80,5 - 81,0	60,40,41,53
Fração 157 - 183, Glutinol	209,0	---
Fração 185 - 235, Composto 3	170,5	---
Fração 240 - 300, Composto 4	136,1	---
Acetilação	106 - 107	41,53
Metilação	102,5	51
Oxima	106 - 107	41,53
2,4-dinitrofenilhidrazona	74 - 76	---

em clorofórmio deuterado contendo tetrametilsilano (TMS-o) como padrão interno, sendo os deslocamentos químicos expressos em valores de (ppm) e as constantes de acoplamento (j) em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades indicadas como: s (sinal simples), d (sinal duplo), t (sinal triplo).

Os espectros de massa foram obtidos no espectrômetro Micro Mass 12, existente no NPPN, U.F.R.J.

3.2.1 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO ULTRA-VIOLETA DA FRAÇÃO 40 - 150 COMPOSTO 1

A fração mostra uma absorção máxima em 286 nm Figura 8, típico de grupo carbonílico conjugado.

Uma absorção máxima em 285 nm pode ser calculada a partir da absorção do fragmento carbonila do composto ($C_6H_5 \cdot CO \cdot CH_3$) em 246 nm adicionado do deslocamento do λ_{max} proporcionado pelos grupos -OH em posição orto (+7 nm), o-OCH₃ (+7 nm) e p-OCH₃ (+25 nm)⁵².

3.2.2 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA FRAÇÃO 40 - 150 COMPOSTO 1

O espectro da figura 9 evidencia a presença de um anel aromático substituído, um grupo carbonila (C=O) e grupos metoxila (O-CH₃), mas nenhuma absorção foi detectada para o grupo hidroxila (OH).

O espectro apresenta:

- a - Estiramento de ligação de C-H a $3100 - 3080 \text{ cm}^{-1}$.
- b - Estiramento de C=O a 1615 cm^{-1} .
- c - Bandas de anel aromático $1400 - 1600 \text{ cm}^{-1}$.

3.2.3 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DA FRAÇÃO 40 - 150 COMPOSTO 1

Os sinais (figura 10) do espectro estão caracterizados pela presença de um singlete em 14,80 ppm, atribuído a uma hidroxila aromática com forte ponte de hidrogênio, dois sinais em 5,91 e 6,05 ppm correspondendo a prótons aromáticos em posição meta.

As outras características do espectro, são dois singletes 3,85 e 3,86 ppm atribuídos a dois grupos metoxi aromáticos e um singlete em 2,60 ppm atribuído ao grupo metila de acetila³⁷.

3.2.4 - ESPECTRO DE MASSA DA FRAÇÃO 40 - 150 COMPOSTO 1

O espectro de massa (figura 11) apresenta o íon molecular (M^+) a m/z 196 (29,6 %) e os seguintes fragmentos principais: a m/z 181; 166; 151; 138; 123 e 95 tipos observados em compostos aromáticos carbonílicos. Identificação do composto: o peso molecular, ponto de fusão juntamente com as evidências mostradas pela fragmentação dada pelo espectro de massa, e pelos dados de UV, IV e RNM permitem identificar o composto como sendo 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

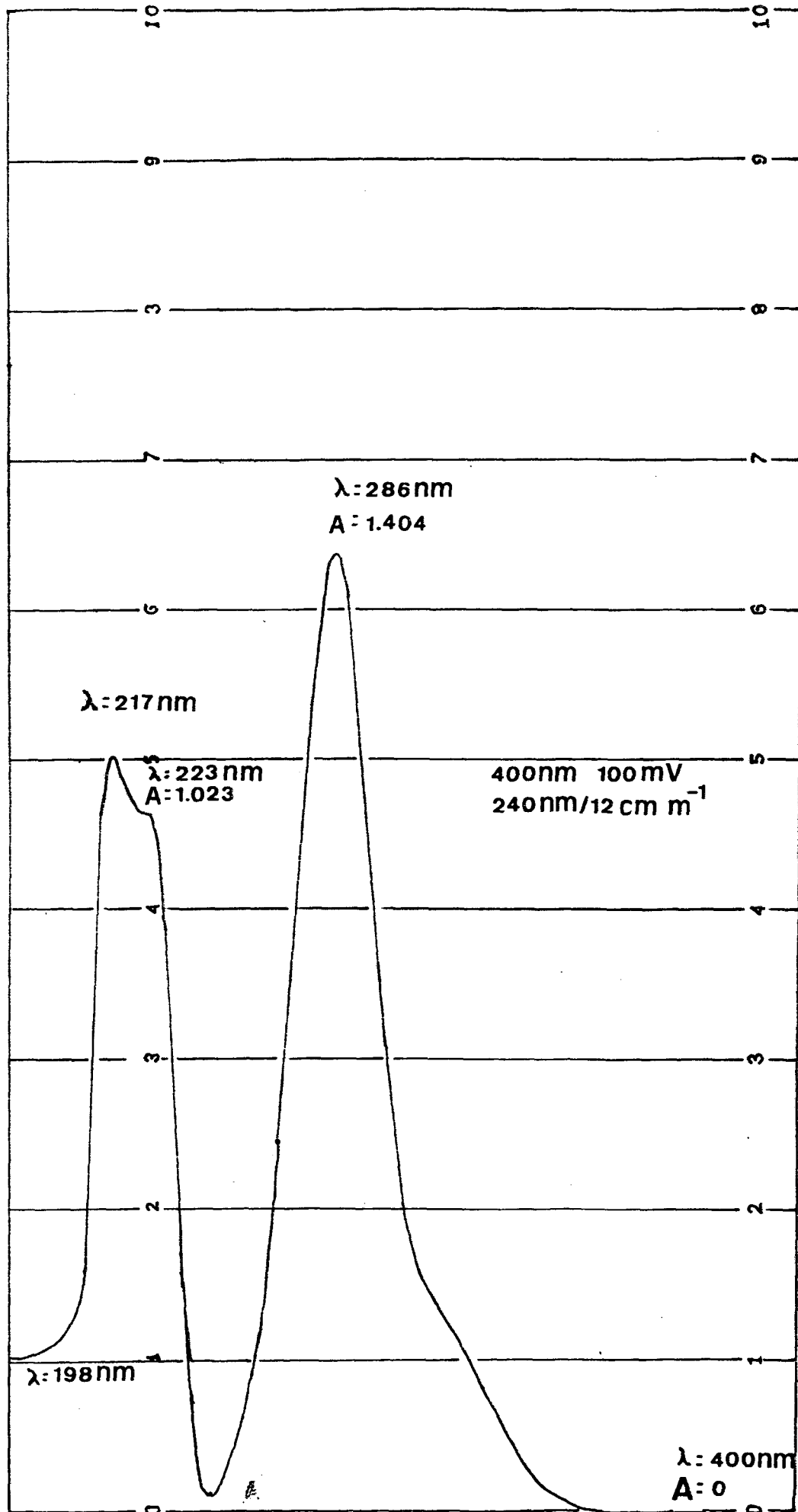


FIGURA 8 - Espectro de absorção ultra-violeta da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

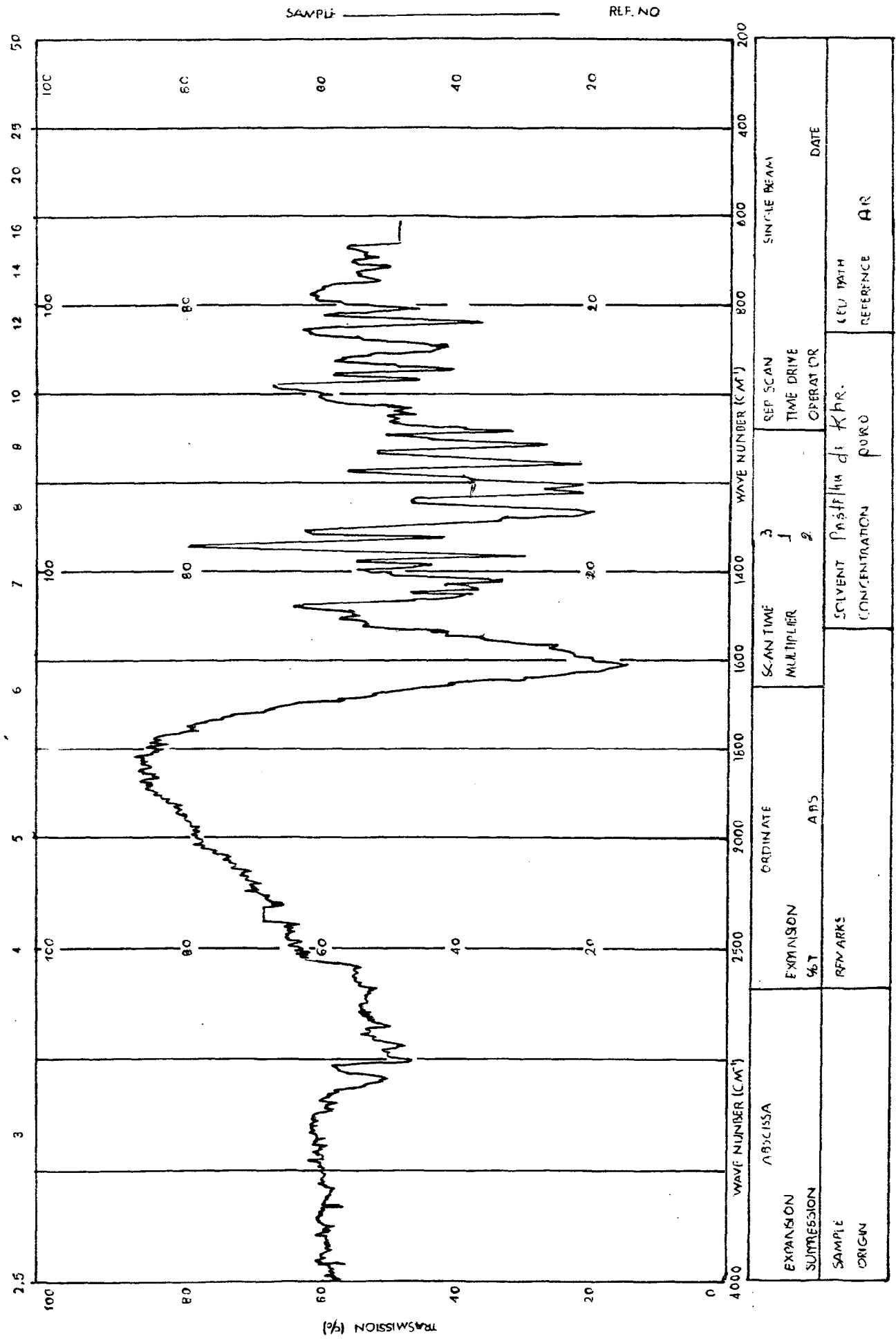
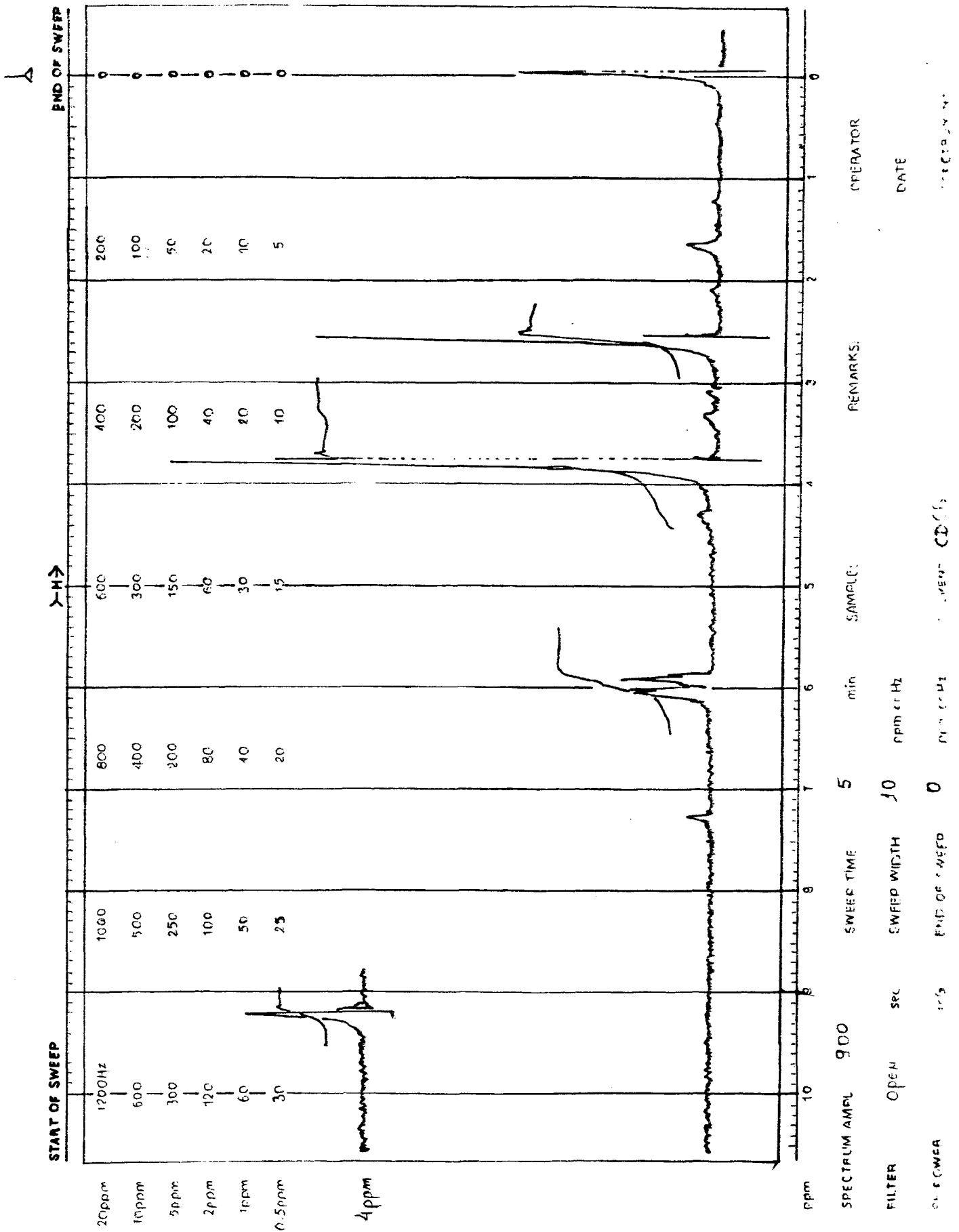


FIGURA 9 - Espectro de absorção infra-vermelho da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.



data also. ca. 2000

varian instruments



FIGURA 10 - Espectro de ressonância nuclear magnética da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

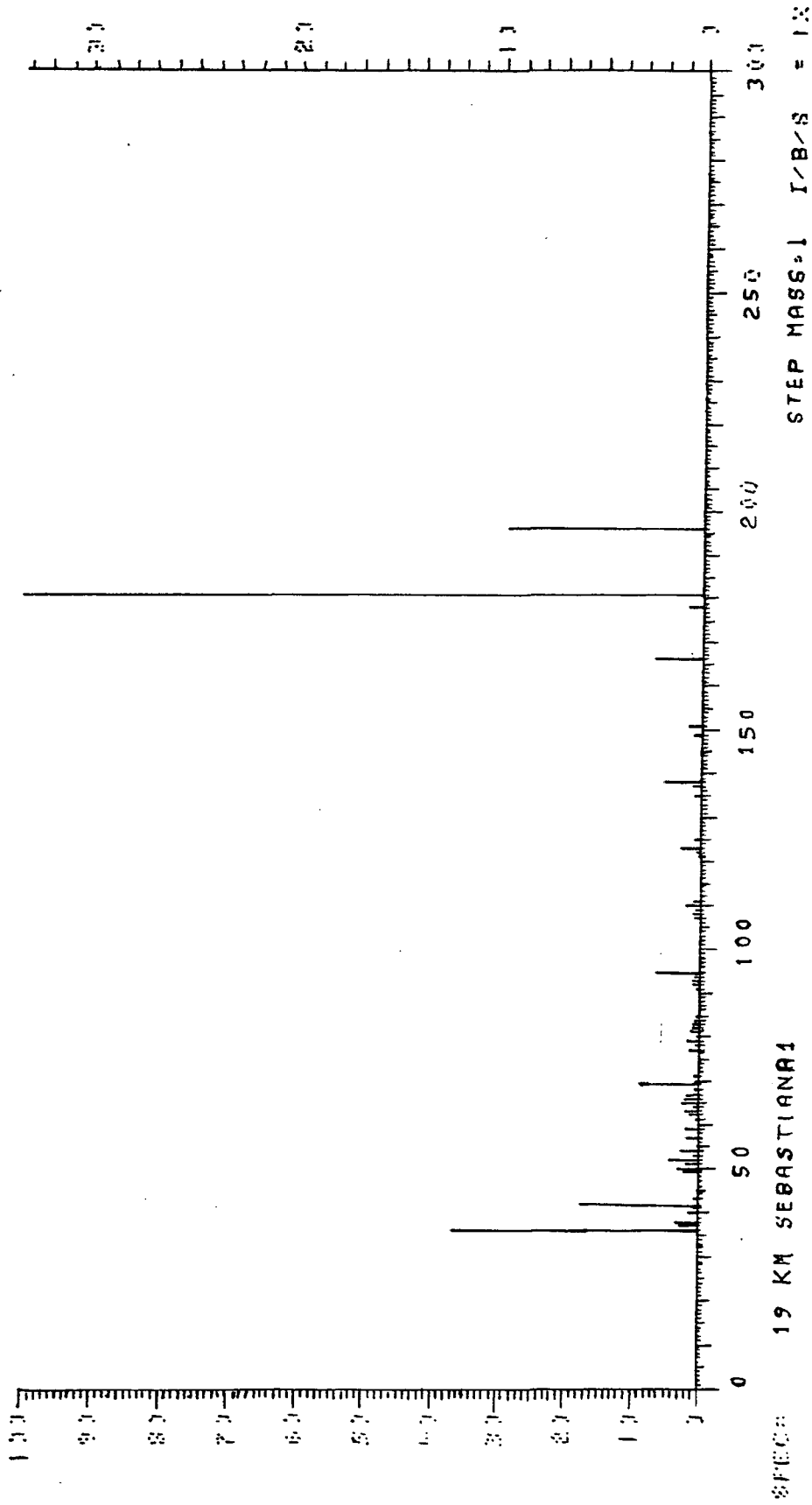


FIGURA 11 - Espectro de massa da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

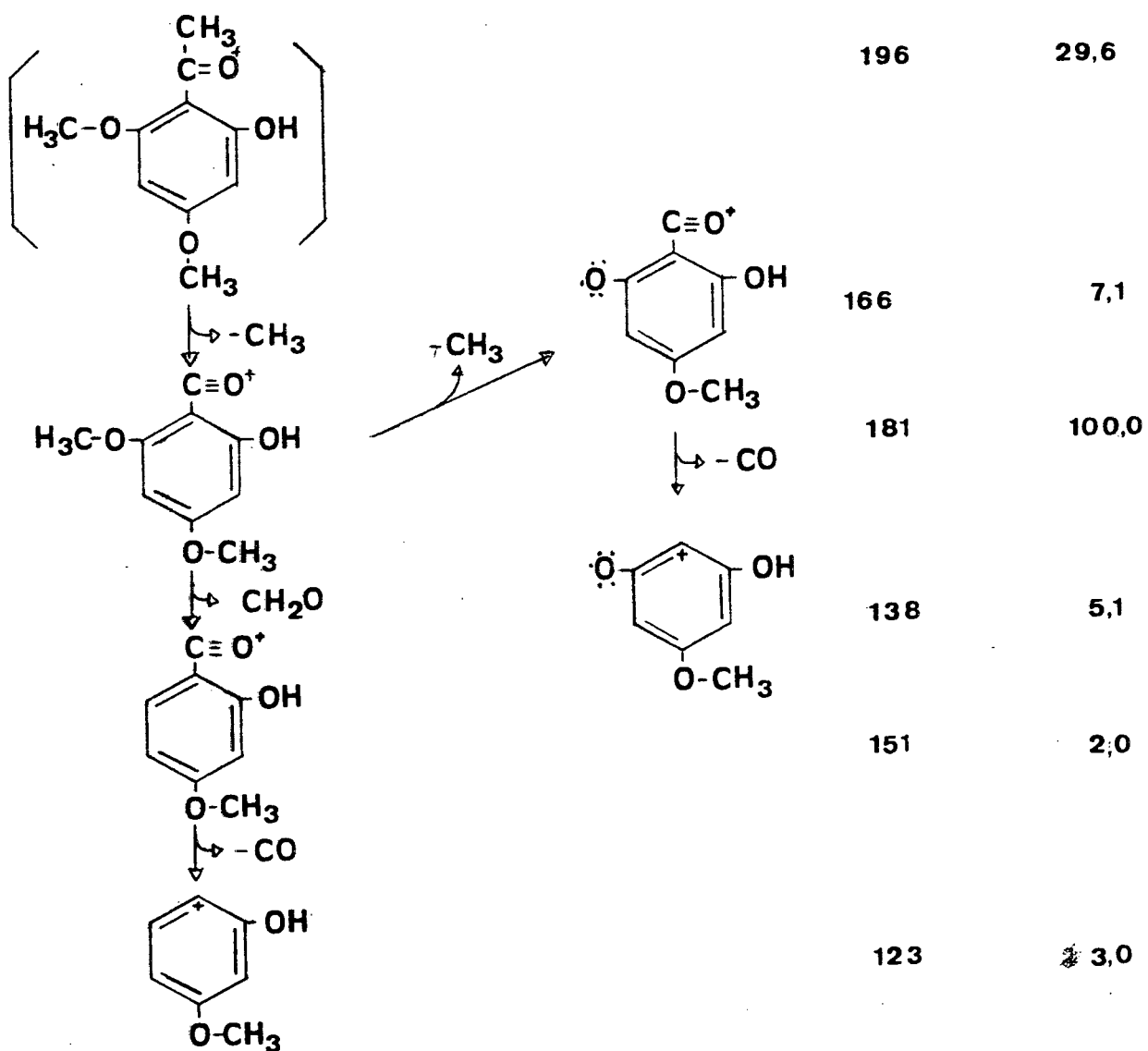


FIGURA 12 - Fragmentação de alguns íons principais.

3.2.5 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA FRAÇÃO 157 - 183 COMPOSTO 2

O espectro (figura 13) evidência a presença:

- a - De uma absorção larga e intensa correspondente a um estiramento de ligação OH em 3460 cm^{-1} .
- b - Estiramento de ligação de C-H de metila em $2925, 2865 \text{ cm}^{-1}$.
- c - Deformação angular simétrica de CH_2 em 1458 cm^{-1} .

3.2.6 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DA FRAÇÃO 157 - 183 COMPOSTO 2

Os sinais (figura 14) do espectro estão caracterizadas pela presença de, ppm: 0,80 (s, 3H, CH_3), 0,87 (s, 3H, CH_3), 0,95 (s, 3H, CH_3), 1,0 (s, 3H, CH_3), 1,05 (s, 3H, CH_3), 1,09 (s, 3H, CH_3), 1,11 (s, 3H, CH_3), 1,14 (s, 3H, CH_3), 3,45 (d, 1H, OH), 5,65 (t, 1H, $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CRH}$).

3.2.7 - ESPECTRO DE MASSA DA FRAÇÃO 157 - 183 COMPOSTO 2

O espectro de massa apresenta o íon molecular (M^+) a m/z 426.

Os picos m/e 462, 411, 308, 274, 259, 218, 205, e 193 observados no espectro de massas (figura 15) retrata caminhos de fragmentação compatíveis com o esqueleto de triperpeno.

Identificação do composto: O peso molecular e os espectros I.V. RNM e de massas indicam a presença de um triterpeno apresentando

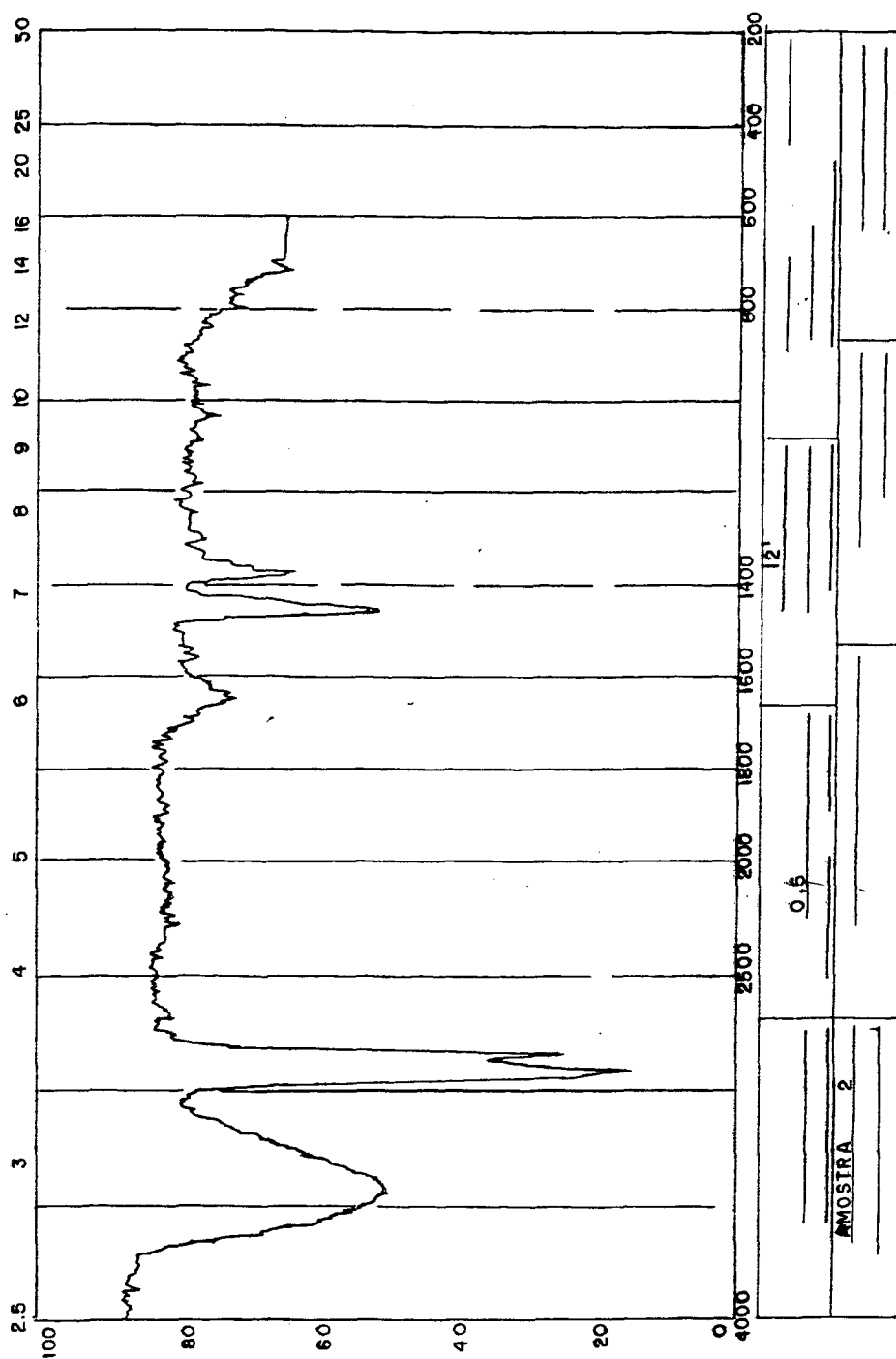


FIGURA 13 - Espectro de absorção infra-vermelho do Glutinol.

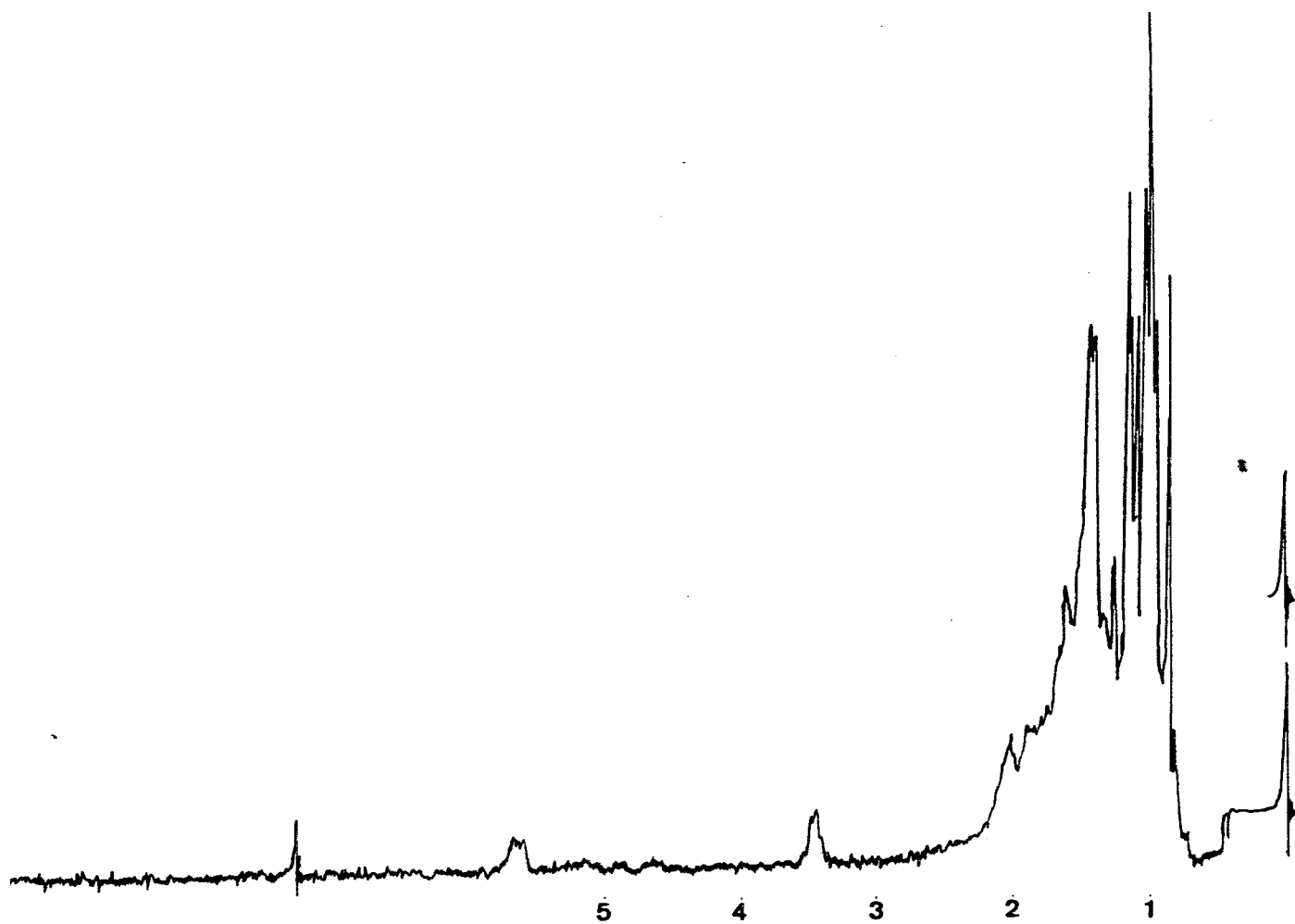


FIGURA 14 - Espectro de ressonância nuclear magnética do Glutinol.

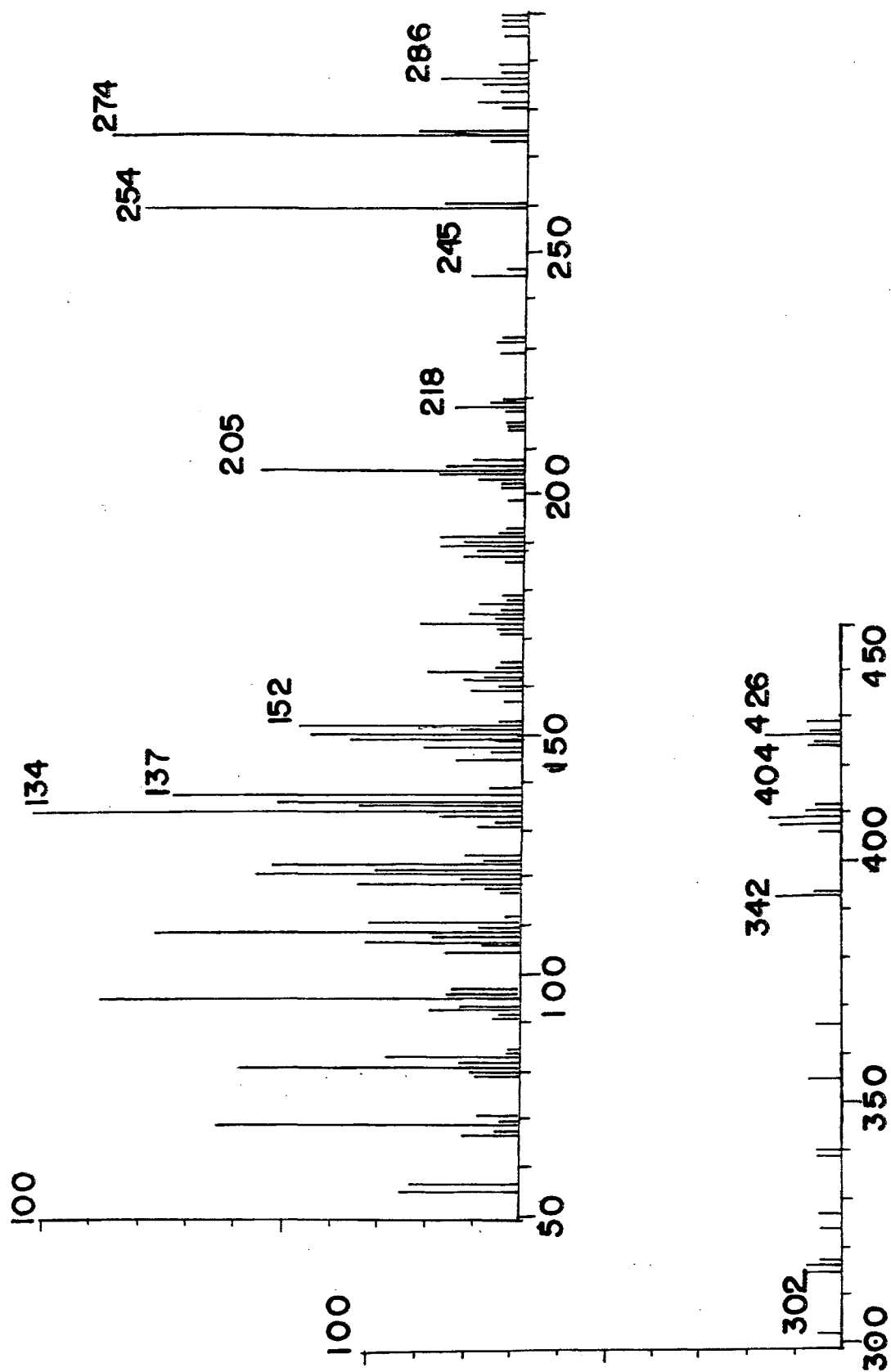


FIGURA 15 - Espectro de massa do Glutininol.

um grupo hidroxila e uma dupla ligação.

Desta forma comparando o I.V. com espectro de um padrão (enviado pelo Prof. Franco Della Monache CNR Itália) de glutinol e realizadas as medidas de ponto de fusão (209°C) e de RF de cromatografia em camada delgada em dois sistemas de solvente foi demonstrada que era o mesmo composto.

3.2.8 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO INFRA-VERMELHO DA FRAÇÃO 185 - 235 COMPOSTO 3

O espectro (figura 16) evidência a presença:

- a - De uma absorção larga e intensa correspondente a um estiramento de ligação OH em 3400 cm^{-1} .
- b - Estiramento de ligação C-H de metila em $2900, 2840\text{ cm}^{-1}$.
- c - Deformação angular simétrica de CH_2 em 1458 cm^{-1} .

3.2.9 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DA FRAÇÃO 185 - 235 COMPOSTO 3

Os sinais na figura 17 do espectro estão caracterizados pela presença de sinais em ppm: 0,75 (s, 3H, CH_3), 0,80 (s, 3H, CH_3), 0,88 (s, 3H, CH_3), 0,96 (s, 3H, CH_3), 0,98 (s, 3H, CH_3), 1,0 (s, 3H, CH_3), 1,02 (s, 3H, CH_3), 3,2 (d, 1H, OH) e um sinal 4,6 ppm.

Obs.: Por falta de dados não foi possível identificar este composto. No entanto os espectros I.V., e RNM indicam que seria um triterpeno, semelhante ao glutinol.

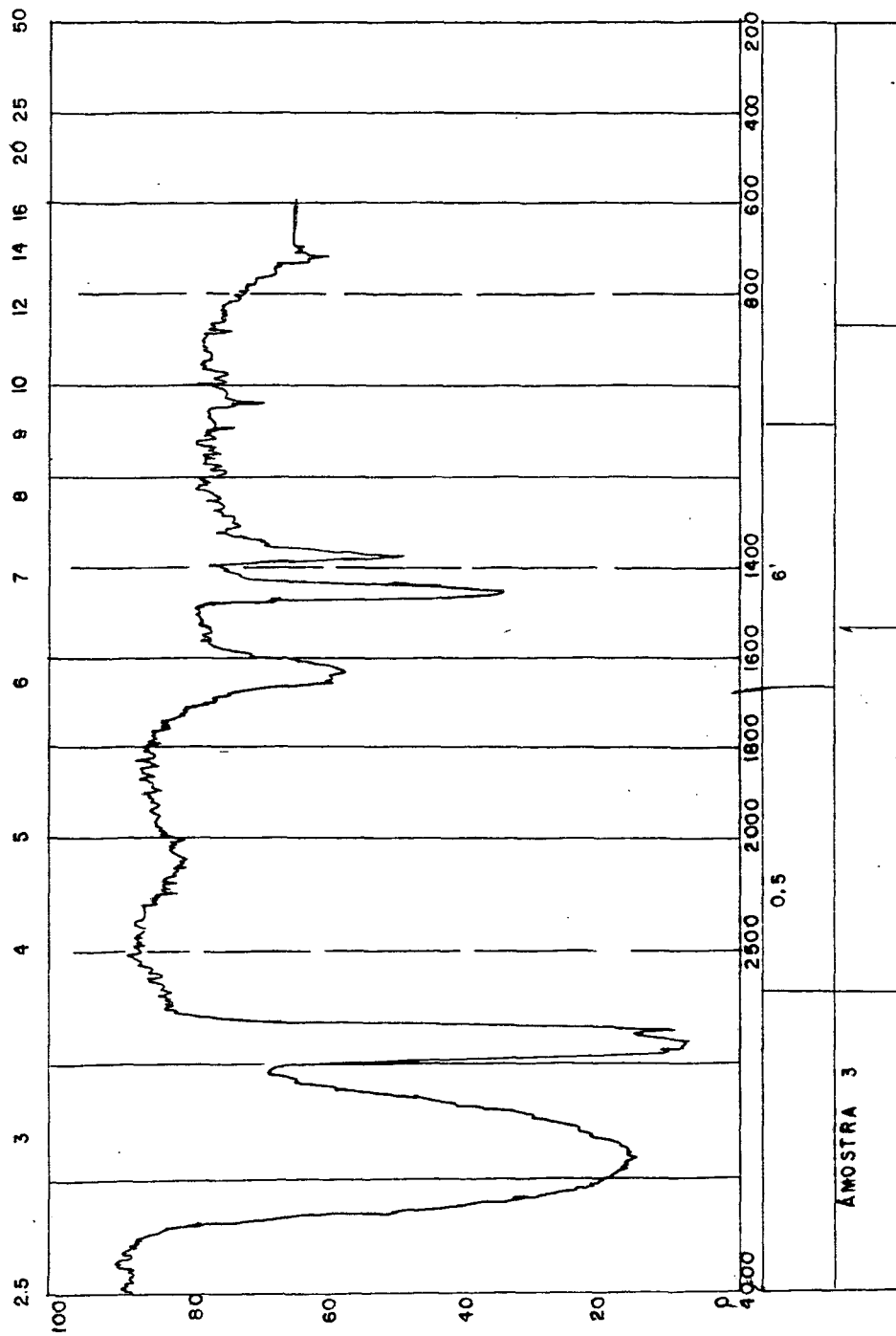


FIGURA 16 - Espectro de absorção infra-vermelho do composto 3.

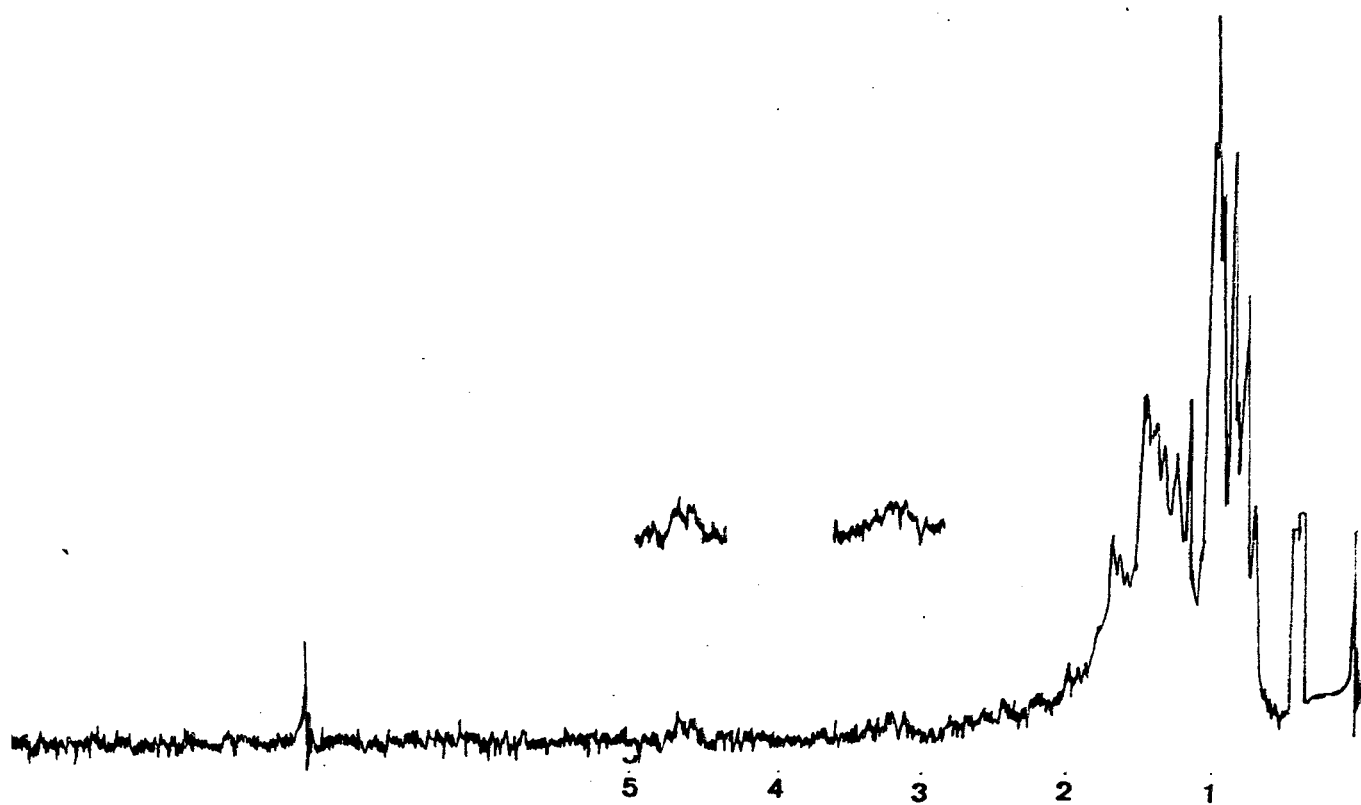


FIGURA 17 - Espectro de ressonância nuclear magnética do composto 3.

3.2.10 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO DA FRAÇÃO 240 - 300 COMPOSTO 4

O espectro (figura 18) evidência a presença:

- a - De uma absorção larga e intensa correspondente a um estiramento de ligação OH em 3400 cm^{-1} .
- b - Estiramento de ligação de C-H de metila em $2900, 2840 \text{ cm}^{-1}$.

Obs.: Este composto não pôde ser identificado por falta de dados.

A semelhança do espectro I.V. deste composto com o correspondente ao composto 2 e 3 induzem a pensar que o composto 4 seria também um triterpeno.

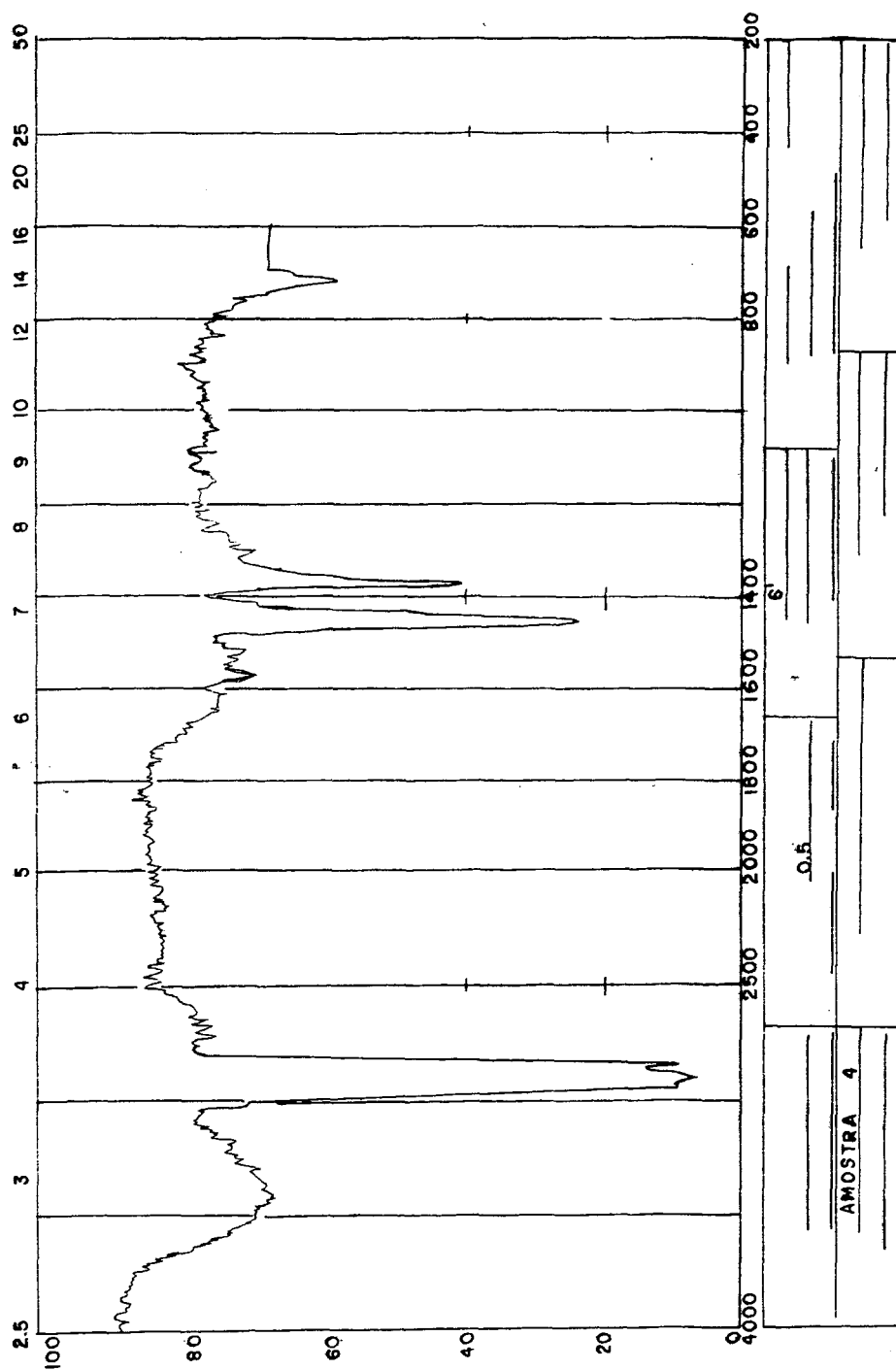


FIGURA 18 - Espectro de absorção infra-vermelho do composto 4.

3.3 - MODIFICAÇÃO DA ESTRUTURA PARA TESTE DO GRUPO MOLECULAR ATIVO

3.3.1 - ACETILAÇÃO DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENO NA

A 100 mg da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona fo
ram adicionados a 0,5 ml de piridina e 0,5 ml anidrido acético e
deixados a temperatura ambiente por 24 horas. Ao adicionar água
destilada gelada a mistura, ocorre rapidamente a formação de um
precipitado que foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada.

Após recristalização em metanol, obteve-se 80 mg
de um composto sólido de coloração branca, com ponto de fusão
106 - 107°C , (referência 106° - 108°C ,^{41,52}. O espectro infra-
vermelho deste produto (figura 20) mostra claramente a duplica
ção da absorção que corresponde a carbonila devido a introdução
de um segundo grupo.

3.3.2 - METILAÇÃO DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA

MÉTODO 1:

200 mg da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona e
42,8 mg de hidróxido de sódio foram mantidos sob refluxo em 0,5
ml de água. Posteriormente 0,2 ml de sulfato de metila foram adi
cionados num período de 2 horas. Logo após, foi esfriado, adicio
nado água destilada e transferido para um funil de separação. Re
moveu-se a camada inferior e se levou à secura, sendo extraída
com éter de petróleo.

Obs.: Obteve-se uma mistura complexa, com um rendimento muito baixo do metilado.

MÉTODO 2:

420 mg da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, 420 mg de carbonato de potássio e 230 mg de sulfato de dimetila, foram refluxados em acetona, sob agitação, por um período de 5 horas. A mistura foi filtrada e depois levada à secura, sendo extraída com éter de petróleo.

Após a análise do espectro de IV, P.F e RF da CCD verificou-se que a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona não reagiu nestas condições.

MÉTODO 3:

140 mg de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, 106 mg de sulfato de dimetila e 0,1 ml de hidróxido de sódio a 10 %, foram deixados em repouso durante 24 horas em acetona. A mistura foi levada à secura e extraída com éter de petróleo.

Obteve-se 82,16 mg, de um composto sólido com ponto de fusão $102,5^{\circ}\text{C}$, (bibliografia $102,4 - 104^{\circ}\text{C}$ ⁴⁰). A figura 21 apresenta o espectro de infra-vermelho do ponto obtido desta síntese que é igual ao espectro de IV da 2,4,6 dimetoxi-acetofenona (figura 22) do catálogo da Aldrich⁴⁰.

3.3.3 - SÍNTESE DA OXIMA DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA

MÉTODO 1:³¹

1 g da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona 1 g de

cloridrato de hidroxilamina e 1 ml de piridina foram refluxados com 10 ml de álcool etílico por um período de 2 horas. O volume foi concentrado a 5 ml e acrescido de 10 ml de água destilada gelada. Foi filtrado e o resíduo lavado com água destilada gelada.

Obs.: obteve-se um rendimento muito baixo.

MÉTODO 2:²³

A uma solução de 200 mg de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetofenona em 10,2 ml de etanol e água (v/v) foram adicionados 200 mg de cloridrato de hidroxilamina e 400 mg de acetato de sôdio cristalino. Solubilizada a mistura, foi deixada em repouso durante 24 horas.

A análise do espectro de IV, PF e RF do CCD mostra que nestas condições a reação não ocorre.

MÉTODO 3:

500 mg de cloridrato de hidroxilamina em 2 ml de água, foram adicionados a 200 mg de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-aceto fenona em 2 ml de hidróxido de sódio a 10 % e álcool etílico suficiente para que a mistura fosse transformada em uma solução límpida. Esta, logo após, foi refluxada por 30 minutos e em seguida o álcool foi destilado e a mistura acrescida de 3 ml de água destilada gelada, formando um precipitado.

Obs.: Obteve-se uma mistura complexa com um rendimento muito baixo.

MÉTODO 4:

500 mg de cloridrato de hidroxilamina em 2 ml de água, misturou-se com 2 ml de solução de hidróxido de sódio a 10 % e 200 mg de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona. Acrescen

tou-se o metanol em suficiente quantidade para que a mistura fosse transformada numa solução límpida. A mistura refluxada durante 3 horas, logo a seguir foi adicionado água destilada gelada para a purificação do produto que é então filtrado.

Obteve-se 149 mg, uma substância sólida de coloração branca com ponto de fusão $106 - 107^{\circ}\text{C}$, (na bibliografia $107 - 110^{\circ}\text{C}$,⁴¹). Considerando o valor do ponto de fusão e o espectro de IV da figura 23 fica demonstrado que foi obtido o produto procurado na síntese.

3.3.4 - SÍNTESE DA 2,4-DINITROFENILHIDRAZONA DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA

Numa suspensão de 0,25 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina em 5 ml de metanol foi diluída cuidadosamente com ácido sulfúrico 2 N, a solução aquecida é adicionada de uma solução de 0,100 g de 2-hidróxi-4,6-dimetóxi-acetofenona em metanol, ocorrendo assim a formação de precipitados. A solução foi filtrada e o precipitado lavado com um mínimo de metanol.

Obs.: Obteve-se 60 mg da substância sólida com ponto de fusão $74 - 76^{\circ}\text{C}$.

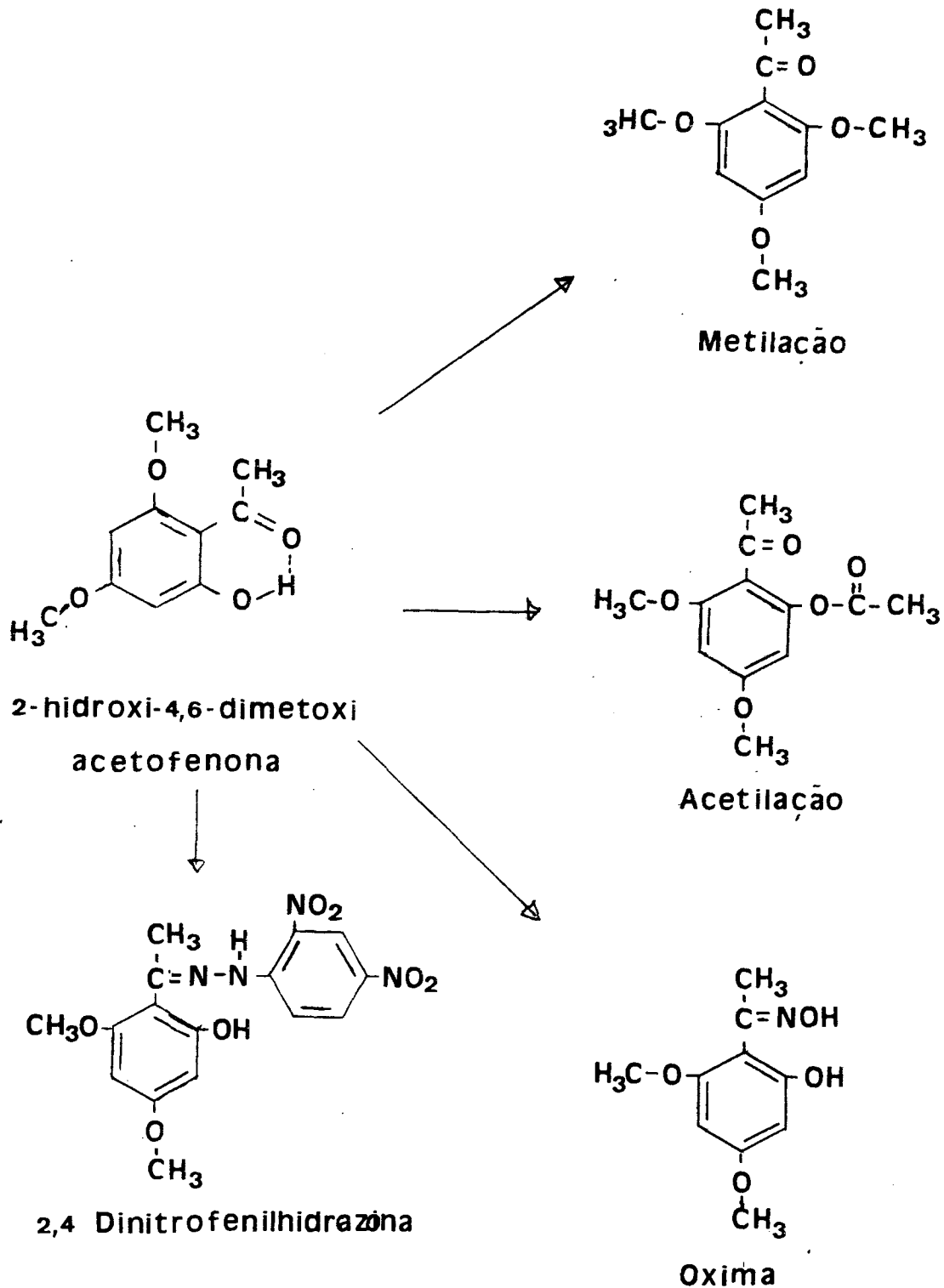


FIGURA 19 - Esquema da síntese de derivados de 2-hidroxi-4,6-di-
metoxi-acetofenona.

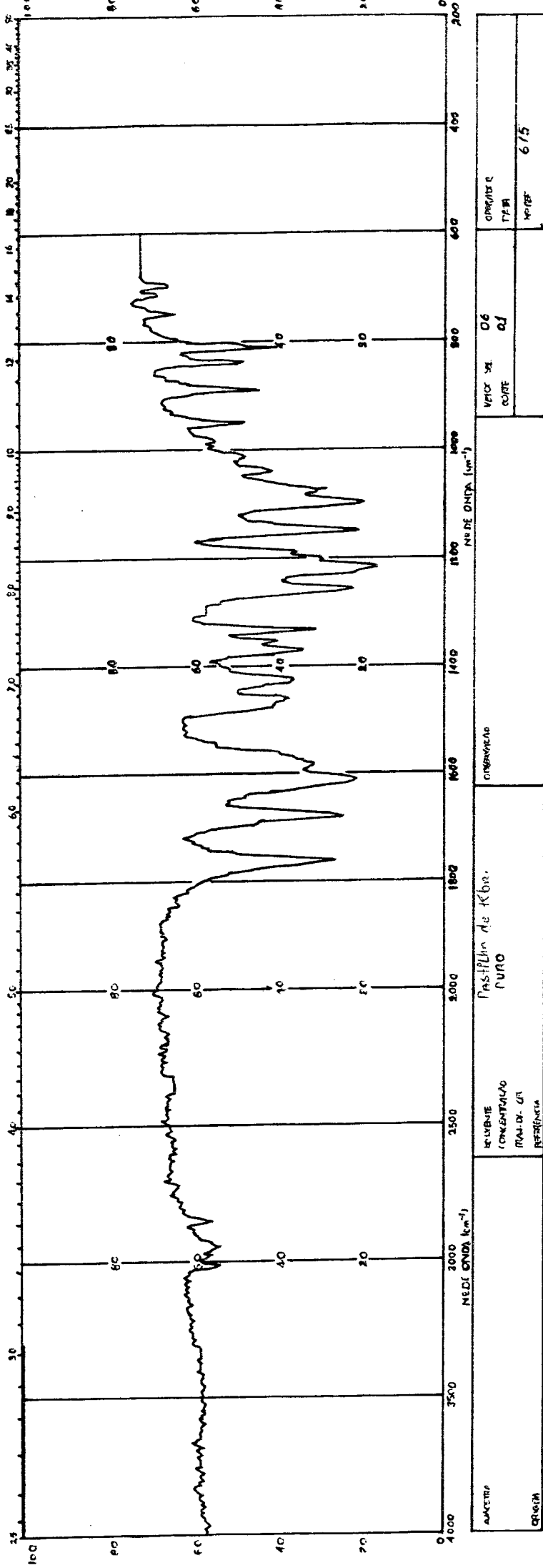


FIGURA 20 - Espectro na região do infra-vermelho, em disco de KBr, do produto obtido da acetilação de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona.

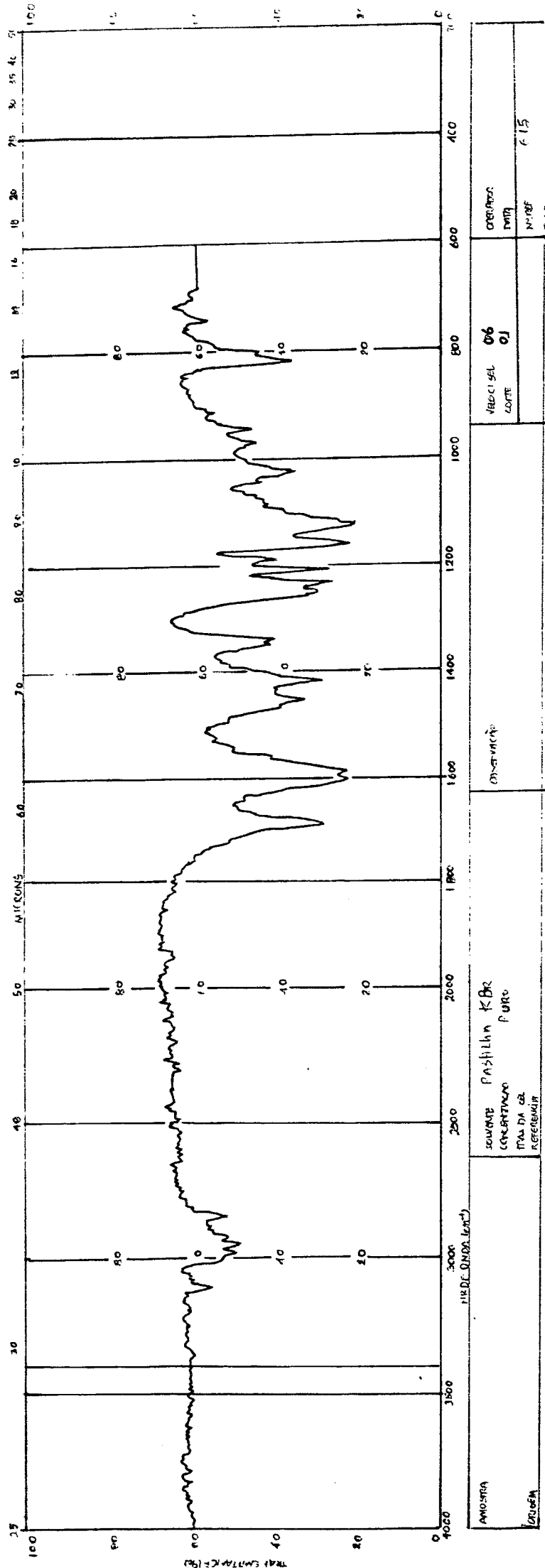


FIGURA 21 - Espectro na região do infra-vermelho, em disco de KBr da 2,4,6-trimetoxi-acetofenona

obtida da síntese.

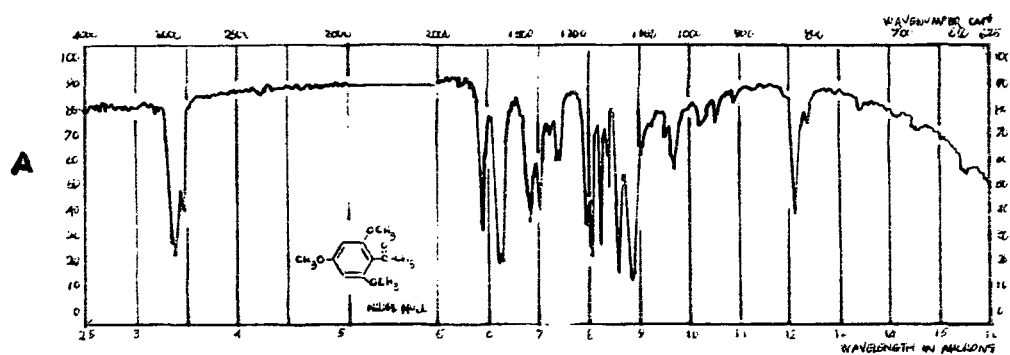


FIGURA 22 - Espectro na região do infra-vermelho, em nujol da 2, 4,6-trimetoxi-acetofenona (40).

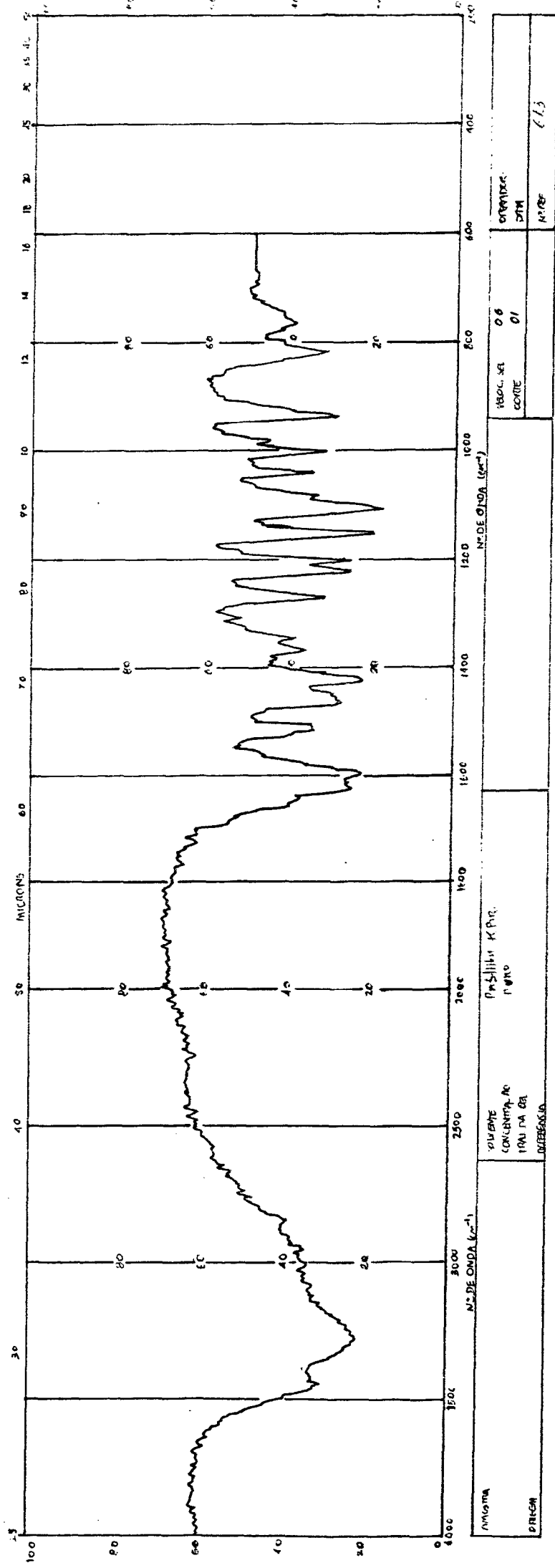


FIGURA 23 - Espectro na região do infra-vermelho, em disco de KBr, da oxima de 2-hidroxi-4,6-di-metoxi-acetofenona.

3.4 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI ACETOFENONA

3.4.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA

No quadro 1, estão relacionados os valores das absorvâncias médias obtidas no traçado da curva de calibração da 2-hidroxi-acetofenona.

QUADRO 1: Dados de absorvância em função da concentração de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona em metanol, caminho ótico 10 mm obtidos a 286 nm.

2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona em g/ml	Absorvâncias médias	Absorvâncias corrigidas
$1.80 \cdot 10^{-5}$	1.522	1.531
$1.44 \cdot 10^{-5}$	1.198	1.224
$1.10 \cdot 10^{-5}$	0.940	0.945
$0.72 \cdot 10^{-5}$	0.621	0.612
$0.36 \cdot 10^{-5}$	0.310	0.306

* Absorvância corrigida é obtida pelo método dos quadrados mínimos passando pela origem.

Um plote de absorbâncias de concentração deu uma reta passando pela origem com um coeficiente angular (B) de 85057,73 como mostra a figura 24.

$$B = \frac{\sum (x \cdot y)}{\sum x^2}$$

$$y = A + B x$$

Onde: A = 0 (zero)

$\sum (x \cdot y)$ = Somatória dos produtos dos valores de x e y (0,000061)

$\sum x^2$ = Somatório dos valores de x^2 ($7,1716 \cdot 10^{10}$)

A percentagem da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona é obtida aplicando a equação:

$$\% \text{ de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona} = \frac{y}{B} \cdot F \cdot \frac{100}{M}$$

Onde: y = Absorbância

B = Coeficiente angular

F = Fator de diluição da amostra

M = Peso inicial da amostra

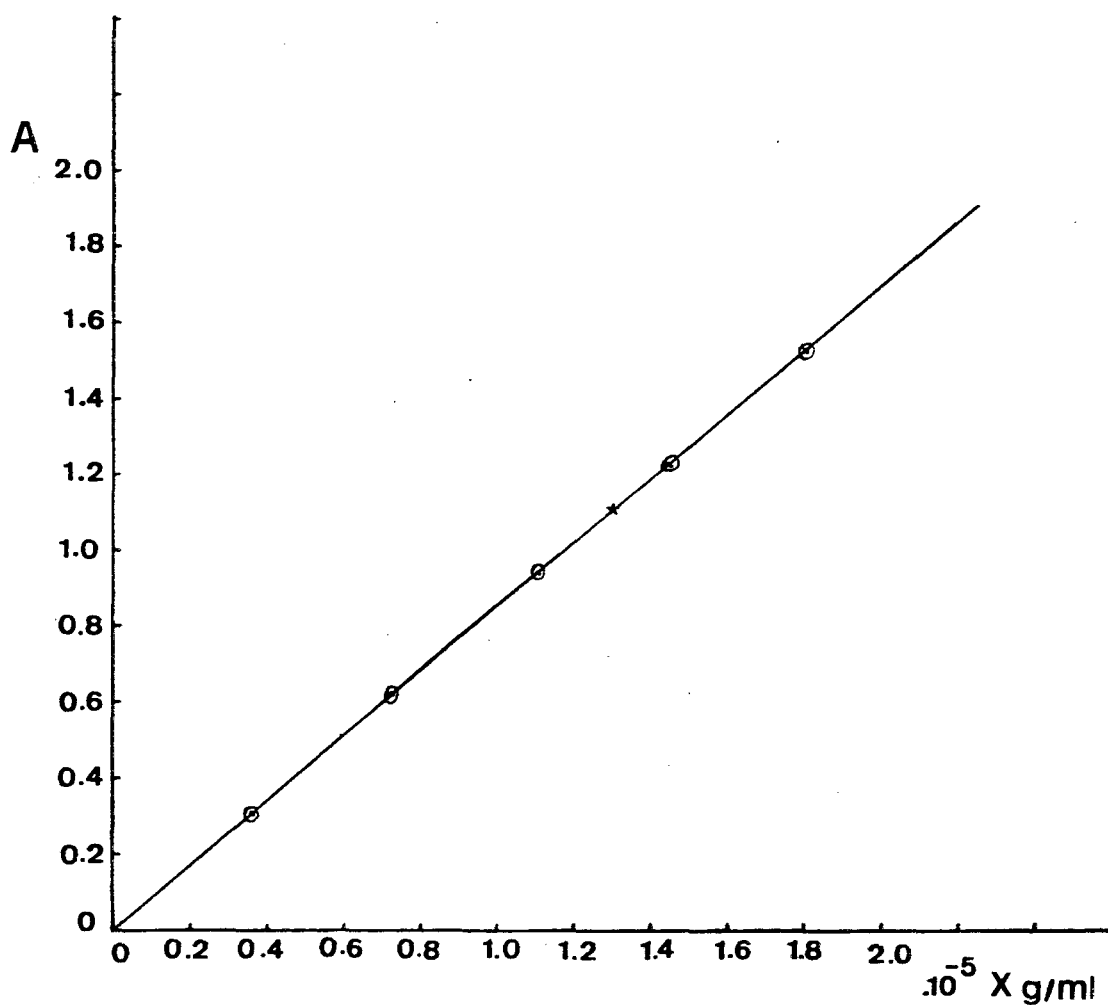


FIGURA 24 - Curva de calibração da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona

o - pontos experimentais

* - ponto calculado pelo método dos quadros mínimos

A - Absorbância

X - g de acetofenona / ml

3.5 - ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO E DOS COMPOSTOS PURIFICADOS DA *SEBASTIANIA SCHOTTIANA* MUELL. ARG., SOBRE A MUSCULATURA LISA E CARDÍACA

No Brasil, o chá ou a infusão de várias plantas conhecidas popularmente como "quebra-pedra" têm sido amplamente utilizado pela população no tratamento renal.

Recentemente Calixto et al⁸ demonstraram que o *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., apresenta dois alcalóides com fortes propriedades anti-espasmódicas, sobre a musculatura lisa vascular e não vascular, comparáveis à papaverina. Foi então sugerido que esses alcalóides poderiam facilitar a eliminação do cálculo renal através de um relaxamento da musculatura do trato urinário.

A *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. pelo menos no Estado de Santa Catarina, vem sendo usada pela população com o mesmo objetivo terapêutico que o *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., talvez devido a sua semelhança morfológica e distribuição geográfica. O extrato bruto da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., (0,5 - 1,0 mg/ml) determinou o relaxamento na concentração dependente sobre o útero isolado de rata, contraído pela Acetilcolina (concentração inibitória de 50 %, CI 50 de 1.6 mg/ml). Resultados semelhantes foram também observados para a Ocitocina neste tecido.

A potência anti-espasmódica do extrato éter de petróleo 1., no útero de rata, foi cerca de 55 vezes maior que o extrato bruto (CI 50, 39,5 ug/ml), enquanto o extrato clorofórmio 2., produziu apenas 30 % de inibição da resposta contrátil à Acetilcolina.

No íleo de cobaia estimulado eletricamente, o extrato éter de petróleo, foi mais eficaz em relaxar essa preparação (CI 50, 2,8 ug/ml), enquanto que a fração clorofórmio 2. , foi cerca de 17 vezes menos potente que o extrato éter de petróleo (CI 50, 48,8 ug/ml). Nos dois tecidos, os efeitos anti-espasmódicos dos extratos da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., foram completamente reversíveis após a lavagem das preparações.

A análise química do extrato éter de petróleo, revelou a existência de três triterpenos sem atividade anti-espasmódicas, além da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona que é ativa. Procedimentos metodológicos empregados na caracterização dos efeitos farmacológicos, mostraram a atividade relaxante sobre diversos músculos liso isolados, tabela 6.

Quando incubado sobre o íleo isolado de cobaia, contraído pelo estímulo elétrico ou pela Acetilcolina e Histamina na figura 25 e 26 a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona (1 - 1000 uM), produziu inibição dose dependente com CI 50 de 113, 78 e 47 uM, respectivamente, ver tabela 7.

Na musculatura uterina de rata contraída pela Acetilcolina e Ocitocina a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, produziu um relaxamento em CI 50 de 190 e 100 uM.

Na bexiga isolada de cobaia estimulada eletricamente, figura 27 e 28 a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona produziu um efeito bifásico: inibição em concentrações menores, seguida de potenciação das respostas (CI 50, 140 uM), enquanto que no ureter isolado de cão, figura 29 e 30 a 2-hidroxi-4,6-acetofenona produziu inibições tanto das contrações espontâneas, como da aquelas induzida pelo estímulo elétrico (CI 50, 40 e 36 uM) res

pectivamente).

Quando analisado, sobre a musculatura cardíaca no átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente, figura 31, a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona também produziu a inibição concentração dependente (CI 50, 51 μ M). Todas as atividades da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, nos tecidos analisados, foram totalmente revertidas após a lavagem das preparações com solução nutriente.

As modificações de estrutura para testes de grupos moleculares ativos da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, demonstraram que a metilação, torna esse produto cerca de duas vezes mais ativo como anti-espasmódico, a acetilação não modificou a potência da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, a oxima diminuiu sua potência e a fenilhidrazona apresentou uma atividade muito mais prolongada em relação aos outros derivados.

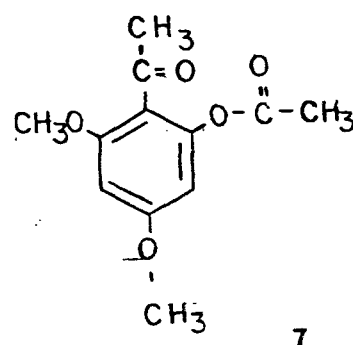
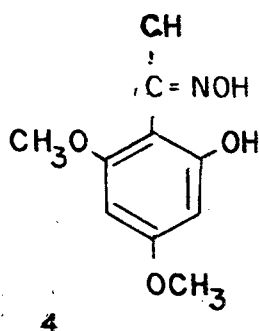
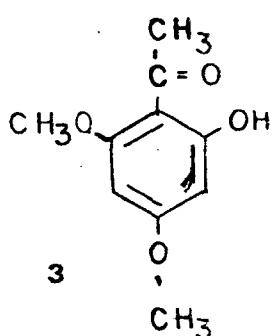
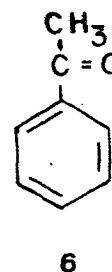
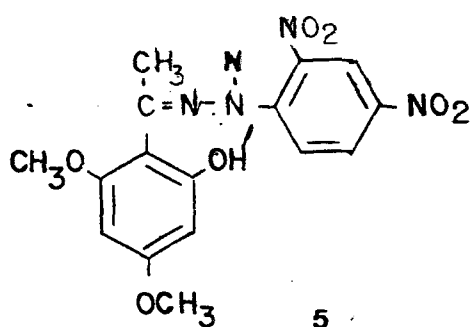
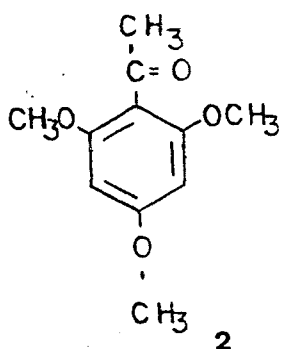
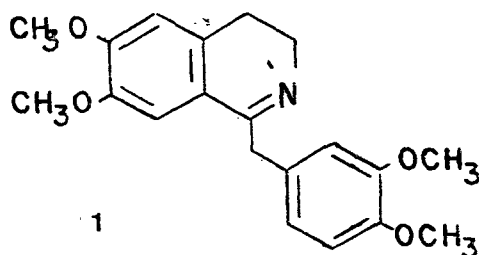
Estes estudos serão continuados após a apresentação desta dissertação.

3.5.1 - ANÁLISE DO EFEITO-ESPASMÓDICO DA 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA EM RELAÇÃO A PAPAVERINA

A papaverina constitui um exemplo clássico de um relaxante inespecífico da musculatura lisa (anti-espasmódica). Sendo utilizada como um padrão de referência no relato de atividade anti-espasmódica. A papaverina pode relaxar muitas estruturas de músculo liso in vitro, independente da contração a que está

submetido o tecido. A papaverina apresenta entre outros efeitos uma inibição sobre a enzima fosforodiesterase, responsável pela inativação do AMPc (Adenosina 3,5 monofosfato cíclico) encontrada em muitos tecidos, podendo assim aumentar a concentração de AMPc. Desde que a AMPc parece estar relacionada com o efeito relaxante dos agentes beta adrenérgicos no musculo liso, a participação do AMPc no mecanismo de ação relaxante da papaverina parece plausível.

Analizando a estrutura da papaverina (1) em relação aos compostos aqui estudados (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). Observa-se uma semelhança referente ao possível centro comum de atividade.



A relação entre o grupo metoxi na posição 6 do anel isoquinolínico e a dupla ligação entre C₁ e o nitrogênio a apresenta uma estrutura CH₃-O-C=C-C=C-C=N semelhante a estrutura entre 4- metoxi e a carbonila da acetofenona CH₃=O-C=C-C=C-C=O , o qual seria o centro ativo da molécula. Esta hipótese é apoiada pela ausência de atividade da acetofenona (6).

O fato de que a 2,4,6-trimetoxi-acetofenona (2) apresenta cerca de duas vezes mais atividade que a 4,6-dimetoxi-2-acetoxiacetofenona (3), sugere a importância da presença do grupo carbonila livre, sem a ponte de hidrogênio que liga a hidroxila na posição 2, nesta atividade relaxante. Por outro lado, indica também que a presença dos grupos metoxi em posição 4 e 6 aumenta a atividade anti-espasmódica do composto.

Além disso, a importância do grupo carbonila fica claro ao demonstrar que a oxima (4) derivada da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona é menos ativa que o composto de origem. Aparentemente o grupo dimetoxifenil ligado ao anel isoquinolínico é importante na papaverina. Tal ação é interessante, se consideramos que o efeito da 2,4-dinitrofenilhidrazona (5) derivada da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona apresenta uma atividade muito mais prolongada que os outros derivados, ou seja, a incorporação de outro anel aromático na molécula aumenta a duração da atividade de o qual é do maior interesse farmacológico.

Tabela 6 - Procedimentos metodológicos empregados na caracterização dos efeitos Farmacológicos da 2-hidroxi-4,6-acetofenona.

Preparação	Solução Fisiológica	Tensão (T) ou carga (C)	Tempo de Equilíbrio	Agonista	Estimulação Elétrica
Útero de Rata (1,5 a 2 cm)	de Jalon (30°C)	1G (C)	60 min.	Acetilcolina Ocitocina	---
Íleo de Cobaia	Krebs Henseleit	1G (C ou T)	60 min.	Acetilcolina Histamina	0,1 Hz: 1m sec Voltagem supra máxima
Musculo longitudinal de íleo de cobaia (3 a 4 cm)					
Bexiga de Cobaia (2,0 a 0,4 cm)	Krebs Henseleit	1G (C ou T)	50 min.	Acetilcolina Histamina	10 Hz: 0,6 m sec. Voltagem supra-máxima 0,5 sec e cada 10 sec.
Ureter Cão (3,0 cm)	Krebs Henseleit	1G (T)	60 min.	Concentrações espontâneas (músculo circular)	
músculo longitudinal ou 0,5 cm muscular circular)					
Átrio esquerdo de Rata	Krebs Henseleit	1G (T)	60 min.	----	2 a 3 Hz: 1.0 m sec 1,5 x voltagem limiar

Tabela 7 - Potência inibitória CI 50 da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona da *Sebastiania*

schottiana, Muell. Arg. em várias preparações isoladas.

Preparações	Contração	Contração inibitória (CI 50, $\cdot 10^{-5}$ M)	Nº
Útero de Rata	Acetilcolina	19,0 (4,7 - 7,6)	6
	Ocitocina	10,2 (3,5 - 7,5)	6
Íleo de Cobaia	Acetilcolina	4,7 (3,5 - 6,4)	8
	Histamina	7,8 (6,5 - 9,5)	6
	E. elétrico	11,3 (5,4 - 23,6)	5
Bexiga de Cobaia	Acetilcolina	14,1 (8,5 - 22,3)	4
	Histamina	22,2 (8,5 - 14,8)	6
	E. elétrico	48,5 (34,4 - 68,5)	9
Ureter de Cão	C. espontânea	5,4 (3,0 - 9,7)	7
	E. elétrico	3,6 (1,8 - 7,3)	4
Átrio de Rato	E. elétrico	5,1 (1,1 - 14,5)	5

ÍLEO DE COBAIA
2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA (µM)

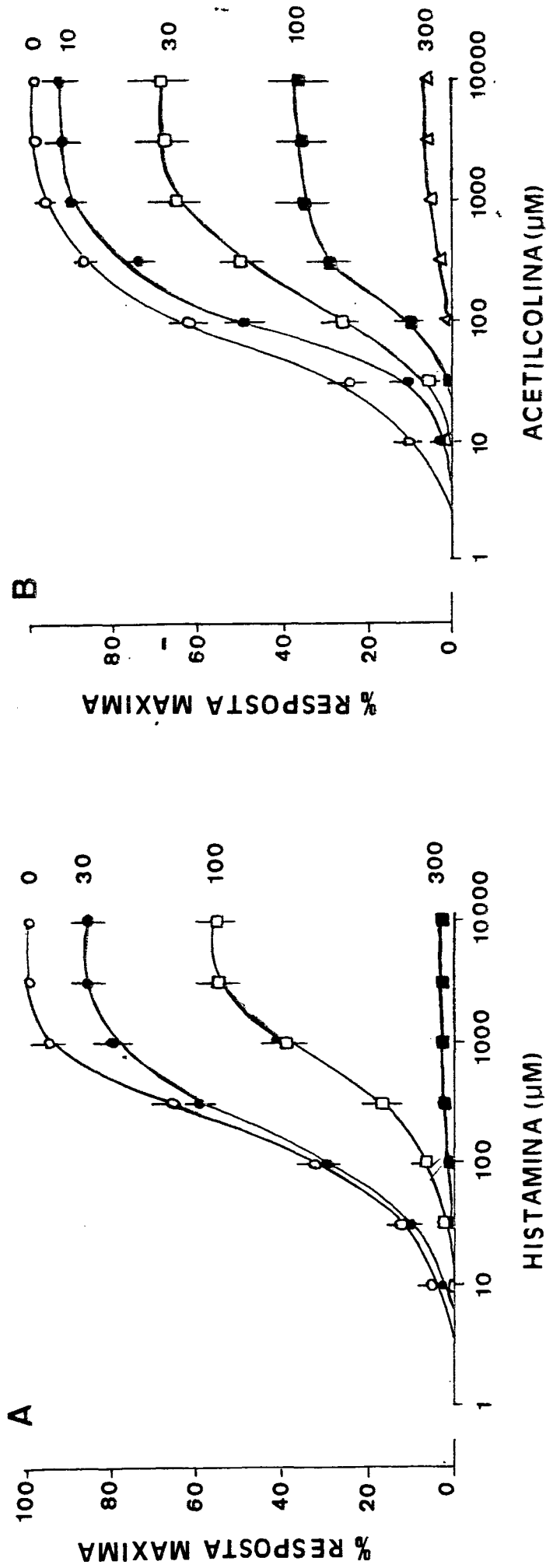
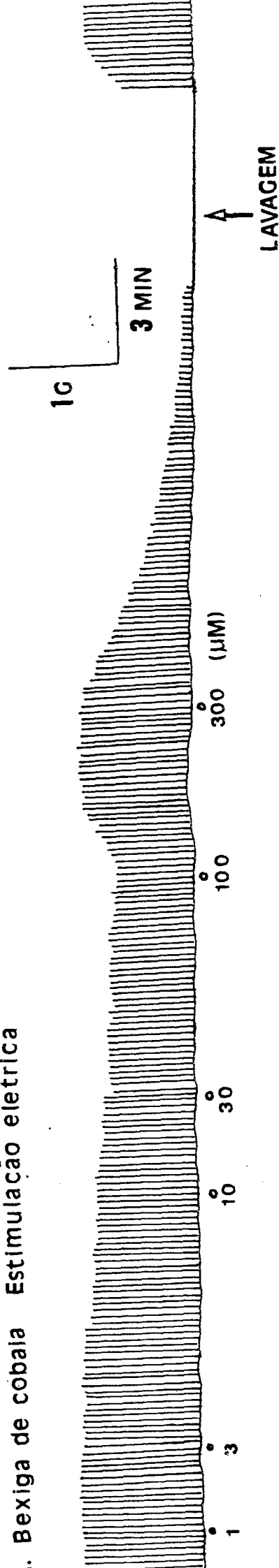


FIGURA 25 - Curvas concentração=efeito cumulativas médias para a Histamina (A) e a Acetilcolina (B) obtidas em tiras de músculo longitudinal de íleo de cobaia na ausência ou presença de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, cada ponto representa a média de 6 a 8 observações e as barras verticais os erros padrões das médias.

2-HIDRÓXI-4,6-DIMETÓXI-ACETOFENONA

A. Bexiga de cobaia Estimulação elétrica



B. Músculo longitudinal de íleo de cobaia Estimulação elétrica

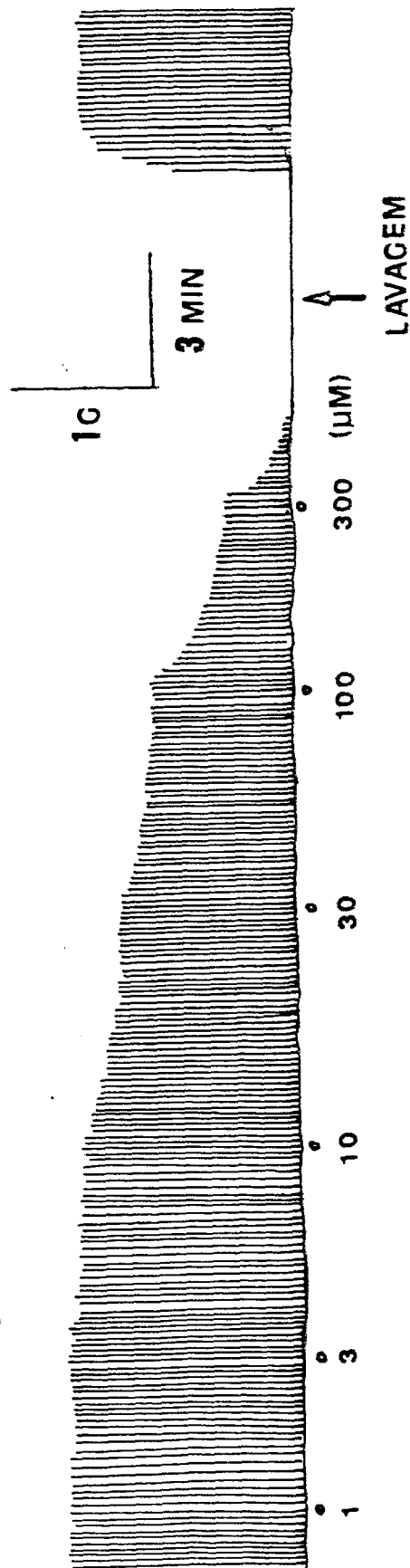


FIGURA 26 - Registros experimentais isométricos representativos do efeito da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetofenona em tiras de bexiga (A) ou de músculo longitudinal de íleo (B) isolados de cobaia.

BEXIGA DE COBAIA

2-HIDROXI-4,6-DIMETOXI-ACETOFENONA (μM)

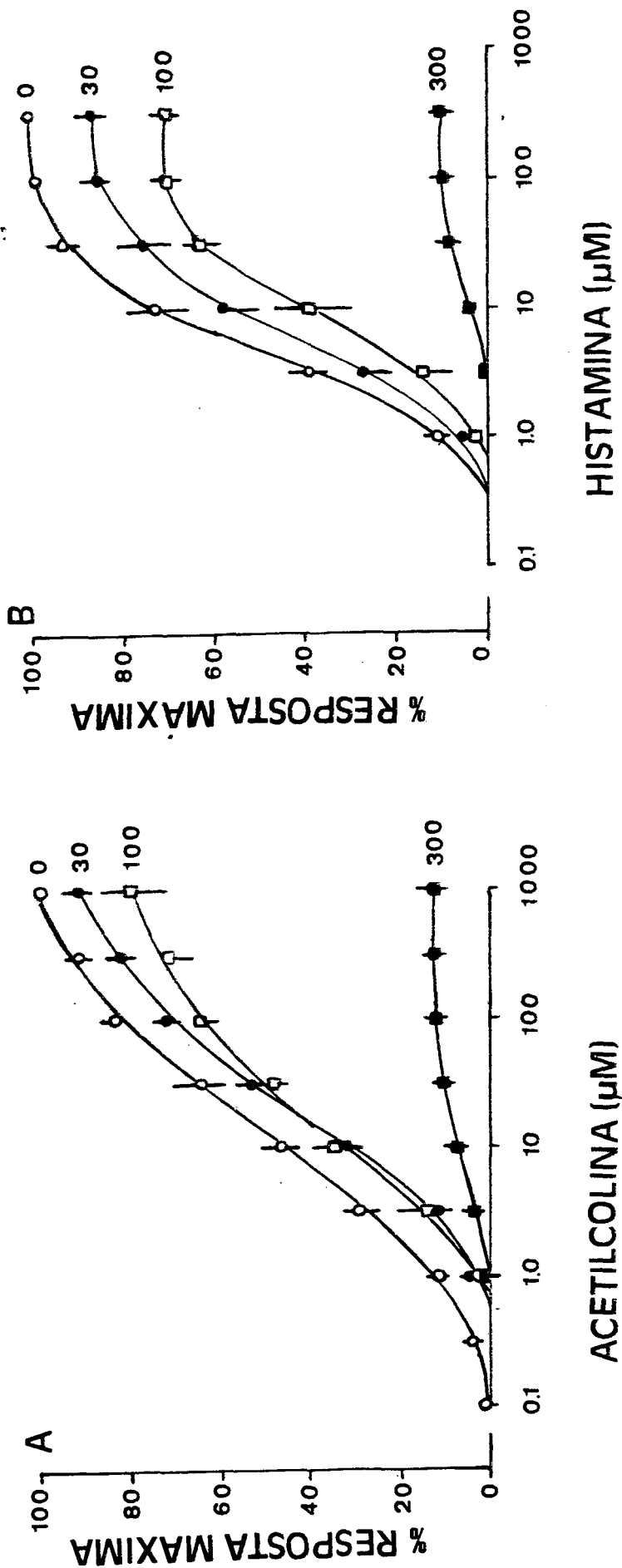


FIGURA 27 - Curvas concentração-efeito cumulativas médias para a Acetilcolina (A) e a Histamina (B) obtidas em tiras de bexiga de cobaia na ausência ou presença de 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, cada ponto representa a média de 4 a 6 observações e as barras verticais os erros padrões das médias.

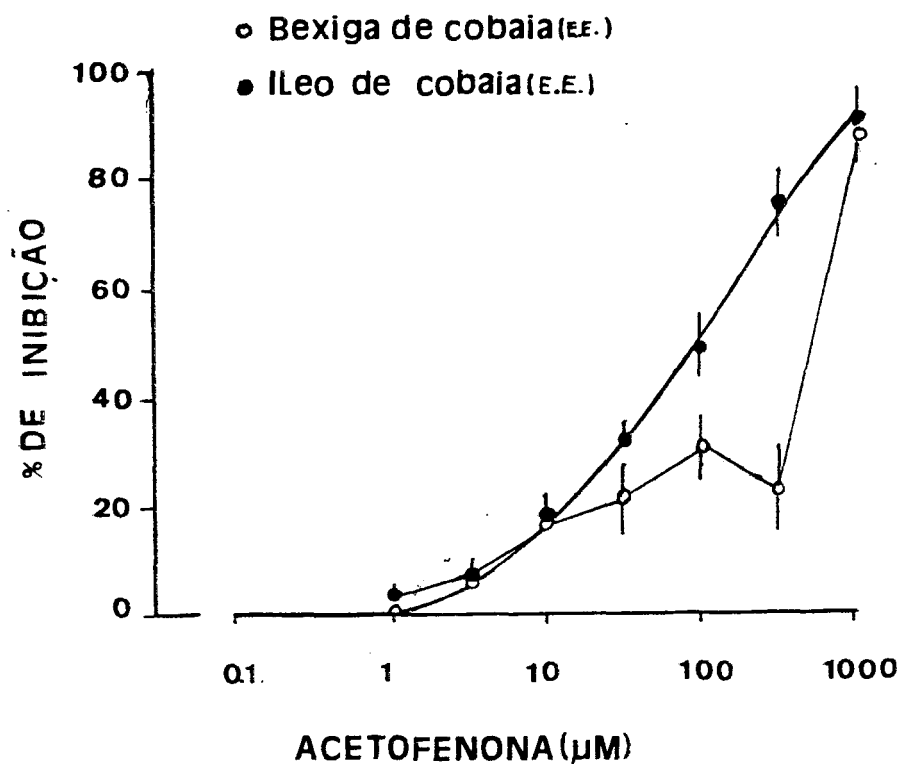


FIGURA 28 - Efeito inibitório da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre as contrações induzidas por estimulação elétrica de tiras de bexiga ou de músculo longitudinal do íleo isolado de cobaia, cada ponto representa a média de 5 a 9 observações e as barras verticais os erros padrões das médias.

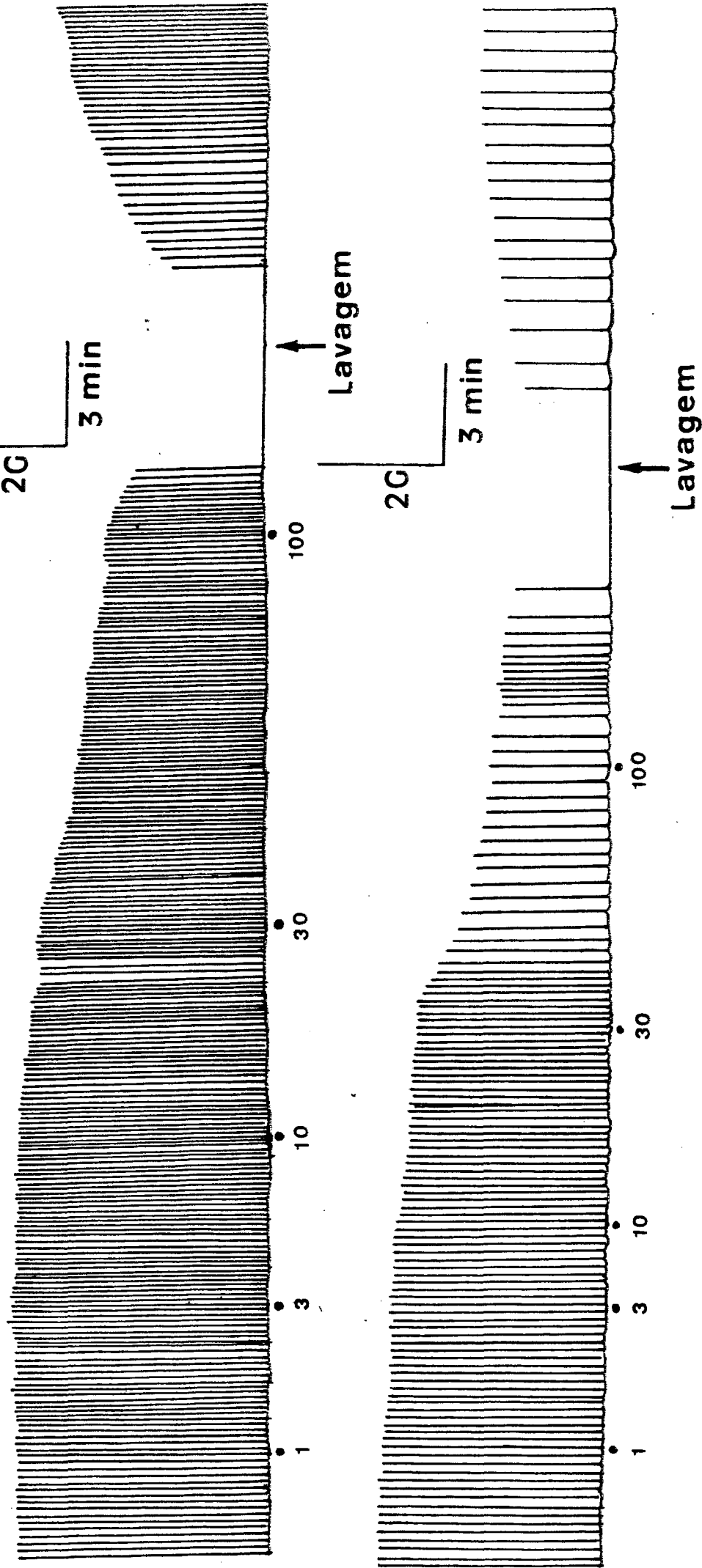


FIGURA 29 - Registros experimentais isométricos representativos do efeito da 2-hidroxi-4,6-dimetilacetofenona sobre as concentrações induzidas por estimulação elétrica do músculo longitudinal (A) e as concentrações espontâneas do músculo circular (B) do ureter isolado de cão.

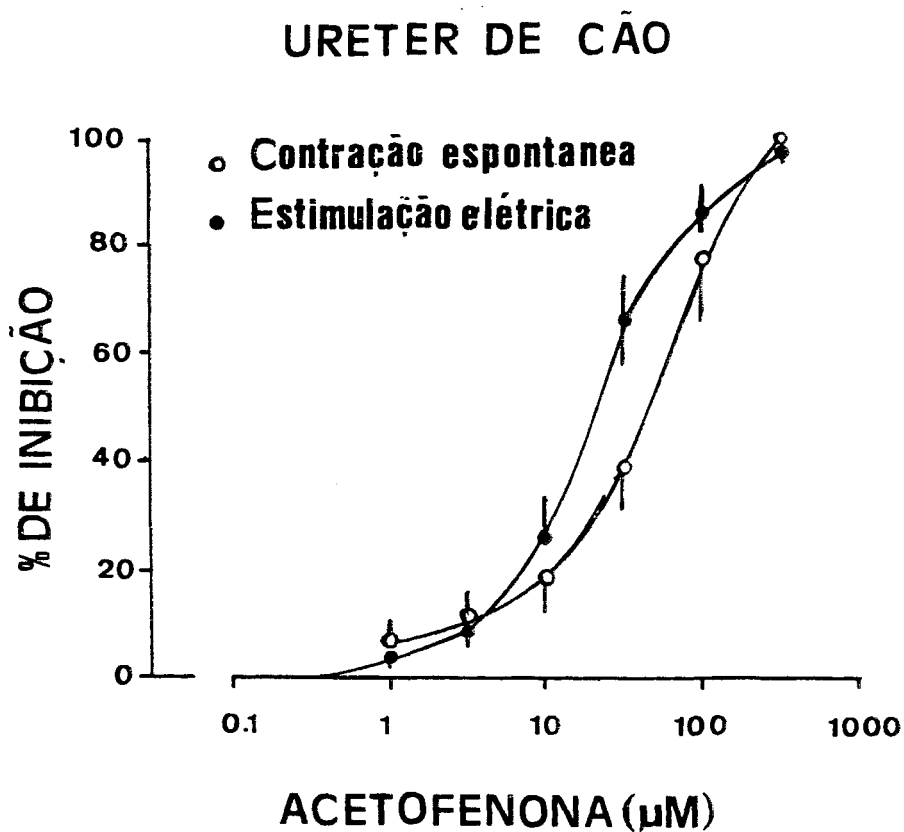


FIGURA 30 - Efeito da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre as contrações espontâneas da musculatura circular e das contrações induzidas por estimulação elétrica da musculatura longitudinal da ureter de cão. Cada ponto representa a média de 4 a 7 observações e as barras verticais os erros padrões das médias.

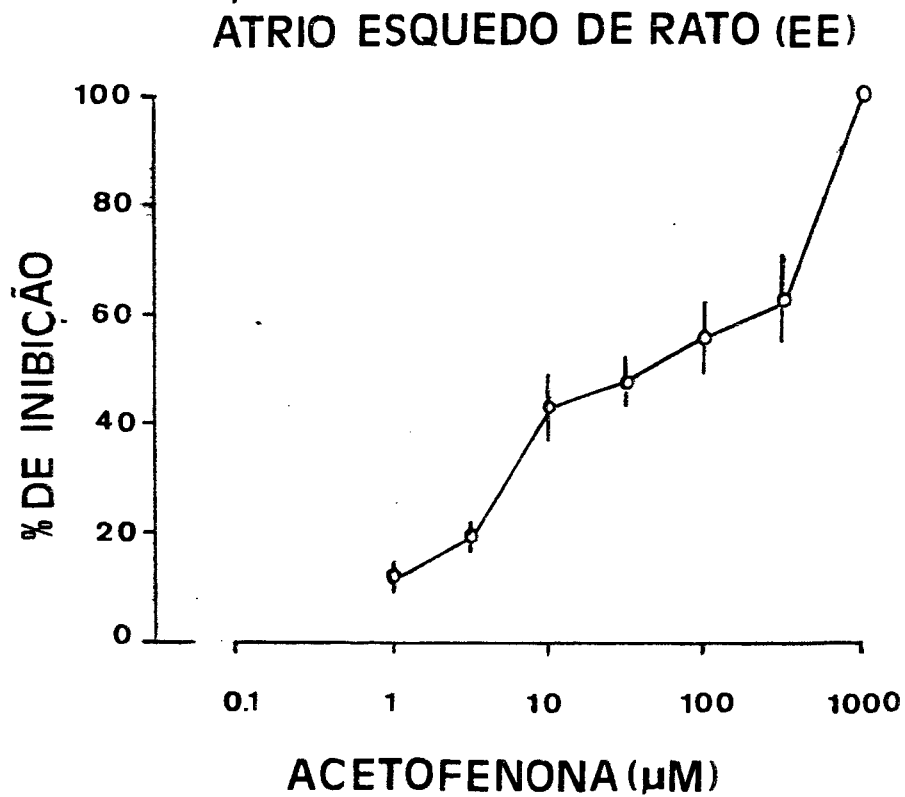


FIGURA 31 - Efeito inibitório da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona sobre o isotropismo do átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente, cada ponto representa a média de 5 observações e as barras verticais os erros padrões das médias.

CAPÍTULO IV

IV - CONCLUSÕES

Considerando os resultados experimentais do presente trabalho, podemos concluir:

1. As partes "aéreas" da *Sebastiania schottiana*, Muell. Arg., apresentam 4 compostos que foram isolados e purificados por cromatografia em coluna e em camada delgada. O composto 1 apresenta cristais incolores, pf 81°C, identificado como 2-hidroxi,4,6-dimetoxi-acetofenona, conhecido também como Xantoxilina.

A identificação baseou-se numa completa análise espectral (UV, RMN¹H e MS). O UV mostrou um máximo em 286 nm típico de uma acetofenona substituída, nm: 246 (C₆H₅.CO.CH₃), 7 (-OH), 7 (o-OCH₃) e 25 (p-OCH₃). O IV confirmou a presença de um anel aromático substituído, grupo carbonila e grupos metoxila, mas nenhuma absorção foi detectada para o grupo hidroxila.

A caracterização principal do espectro RMN¹H foi um singlete em 14,03 ppm atribuído a um grupo hidroxila aromático quelado, dois singletes centrados em 5,91 e 6,05 ppm, atribuídos a prótons aromáticos meta. As outras características do espectro, foram dois singletes em 3,85 e 3,86 ppm atribuídos a dois grupos metoxila e um singlete em 2,60 ppm atribuído para o grupo metila do acetil.

Estas preposições recebem suporte de fragmentação de massa que mostrou um padrão dominante para os principais íons em, m/z 196 (C₁₀H₁₂O₄) (M⁺), 181 (M-CH₃), 166, 151, 138, 123 e 95 típico ao observado em cetonas aromáticas.

O composto 2 apresentou pf 209, PM 426, o espectro de Massa que apresentou também como principais íons m/z 426 ($C_{30}H_{50}O$) (M^+), 411 ($M-CH_3$), 308, 274, 259, 245, 218, 205 e 193. O espectro de RMN^1H ($CDCl_3$) apresentou ppm: 0,80 (s, 3H, CH_3), 0,87 (s, 3H, CH_3), 0,95 (s, 3H, CH_3), 1,0 (s, 3H, CH_3), 1,05 (s, 3H, CH_3), 1,09 (s, 3H, CH_3), 1,11 (s, 3H, CH_3), 1,14 (s, 3H, CH_3), 3,45 (d, 1H, OH), 5,65 (t, 1H, $R_1R_2C=CRH$) correspondente ao H da dupla ligação endocíclica (5)6.

O espectro IV evidencia a presença de um estiramento de ligação C-H de metila em 2925, 2865 cm^{-1} , um estiramento de ligação OH em 3460 cm^{-1} . Comparando com um padrão já conhecido mostrou o mesmo RF em camada delgada. Assim foi identificado como um triterpeno de fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ denominado Glutinol⁶³.

O composto 3 apresentou um pf 176°C, o espectro RMN^1H ($CDCl_3$) apresentou ppm: 0,75 (s, 3H, CH_3), 0,80 (s, 3H, CH_3), 0,88 (s, 3H, CH_3), 0,90 (s, 3H, CH_3), 0,98 (s, 3H, CH_3), 1,0 (s, 3H, CH_3), 1,02 (s, 3H, CH_3), 3,2 (d, 1H, OH) e, um pico 4,6 ppm. O espectro IV apresentou um estiramento de ligação de C-H de metila em 2900, 2840 cm^{-1} . Corresponde a um triterpeno similar ao glutinol que por falta de dados não foi ainda identificado.

O composto 4 com pf 136°C, o IV apresentou um estiramento de ligação OH em 3420 cm^{-1} , um estiramento de ligação de C-H de metila em 2910, 2840 cm^{-1} . Não foi solúvel em clorofórmio deuterado, razão pela qual não foi realizado alguns espectros e, por falta de dados não foi identificado.

2. Quando analisada farmacologicamente, a 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona determinou a inibição concentração dependente da contratilidade de diversas preparações isoladas de musculatura lisa e cardíaca, cuja potência anti-espasmódica varia de acordo com o tecido analisado.

A maior eficácia do composto em inibir as contrações induzidas por Agonista, em relação aquelas provocadas por estimulação elétrica transmural, sugere uma ação anti-espasmódica direta ao nível das células musculares lisas.

3. A correlação entre estrutura e atividade quando comparada com a papaverina, permite sugerir que o centro ativo das moléculas de 2-hidro-4,6-dimetoxi-acetofenona seja $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$. A modificação da estrutura demonstrou que a metilação torna esse produto cerca de duas vezes mais ativo como anti-espasmódico, enquanto que a acetilação apresentou a mesma potência e a Oxima tornou-se menos potente.

4. Finalmente, o alto rendimento observado para 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona (0,25 %) nas partes aéreas da *Sebastiania schottiana*, Muell. Arg., aliada a suas ações anti-espasmódicas em vários tecidos isolados, não só confirmam, como também estendem as observações populares a respeito do emprego medicinal desta planta para o tratamento das afecções renais. Além disso, a atividade anti-espasmódica desse composto pode ser aumentada, por substituição químicas em sua molécula com observada para a 2,4,6-trimetoxi-acetofenona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANJANEYEULU, A.S.R.; RAO, K.J. & SUBRAHMANYAN, C. Crystalline constituents of *Euphobiaceae* XIII Isolation and leaves of *Phyllanthus niruri* L. Tetrahedron, 29(10): 1291-98, 1973.
2. AWONTERS, R.; NIEMEGER, C.J. & JANSSEN, A.J. Pharmacology of antidiarrheal drugs. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 23: 279-301, 1983.
3. AYOUB, H.S.M. & ELASSAM, O.E. Isolation of acetophenone dimethyl ether from the leaves of *Pulicaria undulata*. Fitoterapia, 6: 247-9, 1981.
4. BACCHI, R.M. & OLIVEIRA, F. Caracterização química da droga e do extrato fluido de *Phyllanthus tenellus* Robx., Quebra-pedra. An.Farm.Quím., 23(1-2): 19-27, 1983.
5. BACCHI, E.M. Estudo farmacognóstico de *Phyllanthus tenellus* Robx., quebra-pedra. São Paulo, Tese (M.Sci), USP. São Paulo, 1983. 131 p.
6. BHADHADE, M.M.; SUBRA RAO, G.S.R. & VENKATESAN, K. Concerning hypophyllonin. Tetrah.lett., 21(32): 3097-8, 1980.
7. BALBACK, J.B. Flora nacional na medicina doméstica. São Paulo, A Edificação do lar, s/d. p. 915 v. 2.
8. CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.; VALE, R.M.R. & RAE, G. A. Anti-spasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*, a comparative study with papaverine, Brazilian. J.Med.Biol.Res., 17: 313-21, 1984.
9. CORREA, M.P. Dicionário de plantas uteis do Brasil. Rio de Janeiro, Guanabara, 1974. v. 5, p 562-3.

10. COSTA, A.F. Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calouste Gulberkian, 1970. v. 3, p 641.
11. COSTA, A.F. Farmacognosia. 2 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulberkian, 1978. p 1117.
12. COSTA, A.F. Farmacognosia. Coimbra, Fundação Calouste Gulberkian, 1972. v. 3, p. 1032.
13. CRUZ, G. Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. Belo Horizonte, 1965. v. 2, p. 439-708.
14. DOMINGUES, X.A. Método de investigacion fitoquímica. México, Lamusa S.A., 1973. 281 p.
15. EGON STHAL. Thin-layer chromatographys. A laboratory handbook. 2 ed., New York, Springer-Verlag, 1969. p. 904.
16. ENGLER, A. Syllabus der pflanzenfamilien, 12. Aufl., Berlin-Nikolassee, Verlag von Geloruder Borntraeger, 29 Vol. , 666 p., 1964.
17. FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 3 ed. São Paulo , Gráfica Siqueira, 1959. p. 554-5.
18. FOSSAT, A.G. A cura pelas plantas, Rio de Janeiro, Eco, 1970. 159 p.
19. BLANPIN, F., QUEVUVILLIER, A. & BOURRINET, P. Sur larphylo chrysine, alcalóide du *Phyllanthus discoïdes* Muell. Arg., Euphorbiaceae. Therapie. 22: p. 303-7, 1967.
20. GANESHPURE, P.A.; SCHNEIDERS, G.E. & STEVENSON, R. Structure and synthesis of hypolyllanthin, nirtetralin, phyltetralin e lintetraltin. Tetrah.lett., 22(5): p. 393-6, 1981.

21. GANESHPURE, P.A. & STEVENSON, R. Synthesis of aryltetralin and dibenzylbutyltolcactone lignans (+)-linteralinalin, (+)-phylltetralin and (+)-kusunokinin. J.Chem.Soc.Perkin Trans. I, 6: p. 1681-4, 1981.
22. GILDMEISTER, E. & HOFFMANN, F. Die Atherischen Ole, 1: 3 ed. p. 623, 1975.
23. HARDEGGER, E. Introducion a las praticas de química orgânica. Barcelona, Reverté, 1965. p. 78.
24. HARTMANN, G. & NIENHAUS, F. The isolation from the bark of phytopbtbora and mendersonula infected, *Citrus linon*, and its Fungitoxic effect. Phytopath Z, 81: p. 97-113, 1974.
25. JANOT, M.M.; MAINIL, J. & GOUTAREL, R. La phyllacrisine, nouvel alcaloide isole du *Phyllanthus discoideus* L., Ann.Pharmac.Franc., 16: p. 148, 1958.
26. JOANES, M. Flora brasileira martius., 1959. v. 9, p. 568-469.
27. JOLY, A.B. Botânica introdução a taxonomia vegetal, São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1967. p. 398-406.
28. KRISHANAMURTI, G.V. & SESHARDRI, T.R. Bitter principal of *Phyllanthus niruri*, L. Proc.Indian.Acad.Sci., 24 A: 357-64, 1946.
29. LAINETTI, R.; FREIRE, R.B. & COSTA, J. Contribuição ao estudo farmacognóstico dos "quebra-pedra". Bol.Rodolpho Albino, 1(2): p. 38-47, 1980.
30. LEBEAU, P. & JANOT, M.M. Traité de pharmacie chimique. Paris, Masson et Cie, 1956. v. 5, p. 3597.

31. MCELVAIN, S.M. La caracterizacion de compostos orgânicos. México, Ed. Continental, 1941. p. 194.
32. MOREIRA, E.A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia Hassleri* A. Zarhlb e *Lobelia stefedli*. Trib.Farm., 47(1): p. 12-23, 1979.
33. MOREIRA, E.A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zarhlb e *Lobelia stefedli* R. Braga, Campanulaceae. Tese (Conc. Prof. Titular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1978. 135 p.
34. MORTON, J.F. Atlas of medicinal plants of middle américa. Charles C. Thomas, Springfield, p. 458-62, 1981.
35. NARA, T.K.; CLEYE, L.; LAVERGNE DE CERVAL, L. & STANISLAS, E. Flavonoides de *Phyllanthus niruri* L. *Phyllanthus orbiculatus* L. Rich.. Plan.Med.Phytothe, 11: p. 82-6, 1977.
36. OLIVER BEVER, B. Medicinal plants in tropical west Africa II plants acting on the nervous system. J.Ethmo.Pharmacol., 1-7: p. 1-93, 1983.
37. SCHAR, P. Nuclear Magnetic. Resonance spectroscopy. C.R.C. Press, Inc. Florida, 1984. v. 3, p. 51-3.
38. PARELLO, J.; MELERA, A. & GOUTAREL, L. Phyllochrysiane at securine, alcaloides du *Phyllanthus discoideus* Muell. Arg., Bull.Soc.Chim. de France. p. 198-9, 1963.
39. PARELLO, J. Les alcaloides du *Phyllanthus discoideus* Muell. Arg., (Euphorbinaceae) Isolament et determination des Structure. These du Science. Physique, Paris. Appud Oliver-Bever, B. Medicinal plants in tropical west Africa. J.Ethnopharmacol, 7: p. 1-93, 1983.

40. POUCHERD, C.J. The Aldrich Library of Infrared Spectro.
3 ed. Aldrich Chemical 601, Milwaukee, 1981. p. 869-A.
41. RAE, G.A.; CALIXTO, J.B.; LEMOS, C.F.; LIMA, T.C.M.; MORATO, G.S.; NICOLAU, M.; TAKAHASHI, R.N.; VALLE, R.M.R. & UNES, R.A. Perfil químico e farmacológico de quebra-pedra, *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg., Euphorbiaceae. Anais do Simpósio de plantas medicinais do Brasil 8. Manaus, 1984. p. 77.
42. RAMAKRISHNAN, P.N. A study of hypolycemic action of *Phyllanthus niruri* L. Indian.J.Pharm., 31: p. 175, 1969.
43. REITIZ, R.; KLEIN, R.M. & REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul, Sellowia, 43-45: p. 34, 1983.
44. REITIZ, R.; KLEIN, R.M. & REIS, A. Projeto madeira de Santa Catarina, Sellowia, 28-30: p. 24, 1978.
45. REYNOLDS, I.J.; GOULD, R.L. & SNYDER, S.H., Loperamide blockade of calcium channels as a mechanism for antidiarrheal effects. J.Pharmacol. Exp.Ther, 231: p. 268, 1984.
46. ROW, L.R.; SATYANARAYANA, P. & SRINIVASULU, C. Crystalline hypophyllanthin from *Phyllanthus niruri* L. Tetrahedron, 26(12): p. 3051-7, 1970.
47. ROW, L.R.; SATYANARAYANA, P. & SUBRA, G.S.R. Crystalline constituents of *Euphorbiaceae* VI. The synthesis and absolute configuration of phyllanthin. Tetrahedron, 23: p. 1915-8, 1967.
48. ROW, L.R.; SRINIVASULU, G.; SMITH, H. & SUBRA, G.S.R. Crystalline constituents of *Euphorbiaceae* V. New lignans from *Phyllanthus niruri* L. The constitution of phyllanthin. Tetrahedron, 22(8): p. 2899-909, 1966.

49. ROW, L.R.; SRINIVASULU, C.; SMITH, M. & SUBRA RAO, G.S.R.
New lignans from *Phyllanthus niruri* L. Tetrahedron Lett.
24: p. 1957-67, 1964.
50. SCHNEIDERS, G.E. & STEVENSON, R. Structure and synthesis of
the aryltetralin lignans hypophyllanthin and nirtetralin.
J.C.S. Perkin Trans. I, 4(4): p. 999-1003, 1982.
51. SCHULTZ, A.R. Introdução ao estudo da botânica sistemática.
Rio de Janeiro, Globo, 1963. V. 2, p. 167.
52. SILVERSTEIN, R.M.; CLAYTON, B.G. & MORRIL, T.C. Identificação
espectrométrica de compostos orgânicos. 3 ed. Rio de Ja-
neiro, Guanabara dois, 1979. p. 219.
53. SMITH, L.B. & DOWNS, R.J. Anais botânica do Barbosa Rodri-
gues, Itajaí, SC., 11: p. 219-20, 1959.
54. STANISLAS, E.; ROUFFIAC, R. & FOYARD, J.J. *Phyllanthus niruri*
L. Alkaloids, Flavonoids and Lignans, Planta Med. Phyto-
ther, 1(2-3): p. 136-41, 1967.
55. SUBRA RAO, C. & BRAMLEY, R. Hypophyllanthin. Tetrahedron
Lett., 34: p. 3175-78, 1971.
56. THE MERCK INDEX. 10 ed. Kahway, U.S.A. Merck e Co. Inc. 1983.
57. VIGEL, A.L. Análise orgânica qualitativa. Rio de Janeiro, Li-
vro Técnico, 1982. v. 2, p. 760.
58. VOGEL, A.J. Análise orgânica qualitativa. Rio de Janeiro, Li-
vro Técnico, 1983. v. 2, p. 706.
59. WARD, R.; STYNARAYANA, P.; RAMACHANDRA ROW, L. & GOPALLA RAO,
B.V. The case for a revised structure for hypophyllan-
thin - an analysis of the ¹³CNMR Spectra of aryltetralins.
Tetrahe. Lett., 32: p. 3043-6, 1979.

60. WICHTL, M. Die pharmakognostisch - chemische analyse. Frankfurt an Main, Akademische Verlagsgesellschaft, 1971. p. 479.
61. WILLIAMS, D.H. & FLEMING, I. Spectroscopic methods. In Organic Chemistry, London, 1966.
62. YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; GIACOMOZZI, C.A.; RAE, C.A. & CALIXTO, J.B. Efeito antiespasmódico de um segundo alcalóide obtido do *Phyllanthus sellowianus* Euphorbiaceae. Simposio de plantas medicinais do Brasil 8. Manaus, Amazonas, 1984.
63. DEVON, T.K. & SCOTT, A.J. Handbook of naturally occurring compounds. São Francisco, 1975. v. 2, p. 340.