

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DA *Spigelia  
flemmengiana*.**

Jefferson Cunha dos Santos

Recife – 2002

Jefferson Cunha dos Santos

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DA *Spigelia  
flemmengiana*.**

DISERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Área de Concentração: Química de Produtos Naturais  
Orientadora: Márcia Silva Nascimento

Recife – 2002

**DEDICO**

A meus pais, Euzebina e Heronildes  
aos meus Irmãos Hamilca e Gladistone, pelo  
apoio e incentivo durante a realização deste  
trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela força concedida para a realização deste trabalho.

A Pro<sup>a</sup> Dra. Márcia Nascimento, pela orientação e companheirismo durante a realização do trabalho.

A professora Alda Chiappeta, pelo auxílio nas coletas e identificação da planta.

A Prof<sup>a</sup> Cláudia Bevelaqua e a todos do seu laboratório pelo apoio neste trabalho.

A coordenadora do Mestrado Prof<sup>a</sup> Glícia Calazans.

Aos professores do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As companheiras de laboratório, Ana Rosa, Cláudia Maranhão, Janaina e Maria Betânia, pelo carinho e ajuda na produção do trabalho.

As amigas do mestrado, Gláucia, Ivanilda, Silvânia pela ajuda nessa caminhada.

A Leila, pela amizade ajuda e carinho durante todo o tempo de produção deste trabalho.

A todos os funcionários e estagiários do Departamento de Antibióticos, pelo carinho e serviços prestados.

À Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro

“É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas.”

(Karl Marx)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>iii</b>
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1 Família Loganiaceae .....	6
Reino: Plantae.....	6
3.2 Atividade Biológica .....	9
3.3 Biossíntese dos ácidos aromáticos pela via do ácido chiquimico.....	12
3.4 Biossíntese dos esteróides.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Coleta e preparo do material botânico .....	19
4.2 Abordagem fitoquímica.....	19
4.2.1 Alcalóides: .....	19
4.2.2 Esteróides e triterpenóides.....	20
4.2.3 Flavonóides.....	20
4.2.4 Saponinas.....	20
4.2.5 Taninos .....	21
4.3 Obtenção dos extratos brutos da <i>S. flemmingiana</i> .....	21
4.4 Teste de atividade antimicrobiana .....	23
4.4.1 Meios de cultura .....	23
4.4.2 Preparo dos inóculos.....	24

4.4.3 Teste de difusão em disco.....	24
4.5 Teste de atividade anti-helmíntica.....	25
4.5.1 Coleta e preparo dos helmintos.....	25
4.5.2 Teste de eclosão de ovos.....	26
4.6 Separação e Purificação dos extratos brutos.....	26
4.6.1 Material cromatográfico.....	26
4.6.2 Fracionamento dos extratos brutos da <i>S. flemmingiana</i> .....	28
4.6.2.1 Extrato ciclohexano.....	28
4.6.2.2 Extrato bruto em acetato de etila.....	29
4.6.2.3 Extrato etanólico.....	30
4.7 Identificação estrutural.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Abordagem fitoquímica.....	31
5.2 Obtenção dos extratos brutos.....	31
5.3 Atividade antimicrobiana.....	32
5.4 Atividade anti-helmíntica.....	32
5.4.1 Extratos brutos.....	32
5.4.2 Atividade após fracionamento dos extratos ativos.....	33
5.5 Purificação dos extratos brutos da <i>S. flemmingiana</i> .....	35
5.5.1 Extrato ciclohexano.....	35
5.5.2 Extrato acetato de etila.....	36
5.6 Identificação estrutural do composto SFH-1.....	38
5.7 Identificação estrutural do composto SFA-2.....	41
5.7.1 Espectroscopia de <sup>1</sup> H-RMN.....	41
5.7.2 Espectroscopia de massas.....	42
5.8 Estrutura dos compostos isolados e características.....	43
5.8.1 Composto SFH-1.....	43
5.8.2 Composto SFA-2.....	44
6. CONCLUSÕES.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da Quinina e Reserpina (MONTANARI e BOLZANI, 2001). ....	2
Figura 2. Estrutura da Codeína e Morfina (MONTANARI e BOLZANI, 2001). ....	2
Figura 3. Estrutura da Fenotiazina (CRAVEN et al, 1999). ....	3
Figura 4. Estrutura da Arecolina (HAMMOND et al., 1997). ....	4
Figura 5. <i>Spigelia flemmingiana</i> (CHIAPPETA, 1985). ....	8
Figura 6. Estrutura da Estrictina (KOROLKOVAS, 1982). ....	9
Figura 7. Estrutura da Geselmina (LIN et al 1996). ....	10
Figura 8. Estrutura do Verbascoside (AVILA et al, 1998). ....	10
Figura 9. Estrutura da Spigantina (HÜBNER et al 2001). ....	11
Figura 10. Estrutura da Rianodina (HÜBNER et al 2001) ....	11
Figura 11a. Percurso biossintético dos ácidos benzóicos e seus derivados (RICHTER, 1988). ....	14
Figura 11b. Percurso biossintético dos ácidos benzóicos e seus derivados (RICHTER, 1988). ....	15
Figura 12a. Percurso biossintético de esteróides nas plantas superiores. ....	17
Figura 12b. Percurso biossintético de esteróides nas plantas superiores (RICHTER, 1988). ....	18
Figura 13. Esquema de obtenção dos extratos brutos da <i>S. flemmingiana</i> ....	21
Figura 14. Esquema extração de saponinas presentes no extrato EtOH. ....	22
Figura 15. Representação do procedimento para o teste de atividade Antimicrobiana. ....	25
Figura 16. Representação do teste de atividade anti-helmíntica. ....	27
Figura 17. Esquema de fracionamento do extrato C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> . ....	28
Figura 18. Esquema de fracionamento do extrato AcOEt. ....	29
Figura 19. Inibição da eclosão de ovos de <i>Heamonchus contortus</i> por extratos brutos da <i>S. flemmingiana</i> . ....	32
Figura 20: Inibição da eclosão de ovos do <i>Heamonchus contortus</i> pelas frações FC1 e FC2 do extrato C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> da <i>S. flemmingiana</i> . ....	33
Figura 21. Inibição da eclosão de ovos do <i>Heamonchus contortus</i> pelas frações FA1, FA3 e FA4 do extrato AcOEt da <i>S. flemmingiana</i> . ....	33



Figura 22. Inibição da eclosão de ovos do <i>Heamonchus contortus</i> pelas frações FA2, FA5 e FA6 do extrato AcOEt da <i>S. flemmingiana</i> .....	34
Figura 23. Purificação das frações FC1 e FC2.....	35
Figura 24. Representação cromatográfica das frações SFH –1, SFH – 11, SFH – 2 e SFH – 22. ....	36
Figura 25. Purificação das frações com atividade anti-helmíntica do extrato AcOEt. ....	37
Figura 26. Representação cromatográfica das frações FA3-3, FA4-3, FA5-4 e FA6-4. ....	37
Figura 27. Componentes isolados das frações FA3-3, FA4-3, FA5-4 e FA6-4 que apresentaram atividade anti-helmíntica.....	38
Figura 28. Modelo de fragmentação do composto SAF-2 .....	42
Figura 29. Estrutura do composto SFH-1.....	43
Figura 30. Estrutura do composto SFA-2. ....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Testes utilizados para determinação de alcalóides.....	19
Tabela 2. Microrganismos utilizados no teste de atividade antimicrobiana: .....	23
Tabela 3. Concentrações dos extratos brutos utilizados nos testes de eclosão de ovos.....	26
Tabela 4. Resultados da abordagem fitoquímica. ....	31
Tabela 5. Extratos brutos obtidos na extração a partir de 342g da <i>S. flemmingiana</i> .....	31
Tabela 6. Propriedades físicas das frações obtidos na purificação do extrato C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> em coluna de Sílica.....	36
Tabela 7. Características físicas dos compostos isolados das frações com atividade anti-helmintica em coluna de Sephadex LH-20.....	38
Tabela 8. Comparação entre o espectro <sup>1</sup> H-RMN da literatura com o obtido pelo SFH-1, dissolvido em CHCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> .....	39
Tabela 9. Comparação entre os espectros de <sup>13</sup> C-RMN da literatura com o apresentado pelo SHF-1 Dissolvido em CHCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> .....	40
Tabela 10 .Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN do SFA-2 e contantes de acoplamento.....	41

## RESUMO

O Brasil apresenta uma grande quantidade de plantas superiores que não foram estudadas, entre essas temos a *Spigellia flemmingiana*, uma representante da família Loganeaceae, que é utilizada popularmente como anti-helmíntica. No presente trabalho foram estudados os constituintes químicos, atividade antimicrobiana e anti-helmíntica dos extratos brutos de ciclohexano, acetato de etila e etanol da *Spigelia flemmingiana*. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente ao *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida lipolytica* e *Candida parakrusei* pelo método de difusão em disco e a atividade anti-helmíntica foi avaliada pela inibição direta da eclosão de ovos do helminto *Haemonchus contortus* em solução com os extratos da planta. Foram encontrados na planta pelo teste fotoquímico; Saponinas e Esteróides. Os testes de atividade antimicrobiana mostraram que nenhum dos extratos bruto inibiu o crescimento dos microrganismos utilizados. No entanto, os extratos ciclohexano e acetato de etila apresentaram atividade anti-helmíntica nos testes contra o *Haemonchus contortus*. Os extratos que apresentaram atividade anti-helmíntica foram purificados para isolamento e determinação da estrutura do possível composto responsável pela atividade biológica. No extrato ciclohexano foi obtido o composto SFH-1 e no extrato acetato de etila, o composto SFA-2. O presente trabalho comprovou a utilização da *Spigelia flemmingiana* como anti-helmíntica. O composto SFH-1, após análises espectrométricas foi identificado como o  $\beta$ -sitosterol, enquanto que o SFA-2 foi identificado como um derivado do ácido benzóico, o **Ácido Vanilínico**.

## ABSTRACT

Brazil presents a wide variety of superior plants, which have not been yet studied. Among these plants, we may find *Spigellia flemmingiana*, from the family Loganeaceae, which is currently utilized for anti-helmintic treatment. In the present work, the chemical constituents, antimicrobial and anti-helmintic activities were studied using the crude extracts prepared from this plant with the solvents ethanol, cyclohexane and ethyl acetate. With regard to the antimicrobial activity, this was tested through the agar diffusion method using the following test microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida lipolytica* and *Candida parakrusei*. Besides, the anti-helmintic activity was evaluated through the direct inhibition of eggs eclosion of *Haemonchus contortus* in solution with the plant extracts. The antimicrobial activity tests demonstrated that none of the crude extracts inhibited the growth of the utilized microorganisms. Nevertheless, the cyclohexane and ethyl acetate extracts demonstrated anti-helmintic activity on the tests against *Haemonchus contortus*. These extracts were purified for the isolation and structure determination of the possible compounds responsible for the biological activity. From the cyclohexane extract was isolated a compound named SFH-1 and from the ethyl acetate extract, the compound SFA-2. The present study proved the utilization of *Spigelia flemmingiana* as anti-helmintic. Spectroscopic analysis identified the compound SFH-1 as being  $\beta$ -sitosterol and the SFA-2 as a benzoic acid derivative, the **Vanilic acid**.

## 1. INTRODUÇÃO

Os metabólicos secundários produzidos pelos vegetais superiores vêm durante o longo dos tempos despertando o interesse dos pesquisadores, principalmente na busca de compostos que tenham utilidade nas áreas médicas e agrícolas (HARVEY, 1999). A utilização de plantas no combate de doenças pela humanidade vem desde o início da civilização, e continua até os dias de hoje. Este fato se dá porque muitas das plantas utilizadas por nossos ancestrais, para determinadas doenças, tiveram sua eficiência comprovada cientificamente.

Define-se por planta medicinal aquela que contém um ou mais princípios ativos que conferem atividade terapêutica (AKHATAR ; RIFFAT, 1984). O uso de plantas medicinais vem crescendo substancialmente nos últimos anos no Brasil, haja vista a facilidade de acesso, o baixo custo e sua compatibilidade cultural, principalmente na região nordeste (NOGUEIRA et al, 1996). Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que cerca de 80 % da população mundial fez uso de algum tipo de erva para recuperação da saúde (MARTINS, 1992). Além disso, os produtos naturais continuam a desempenhar um grande papel na obtenção de princípios ativos, principalmente na busca de novos núcleos, que servem como modelo em semi-sínteses e sínteses totais (RATES, 2001). Dos medicamentos em uso atualmente no mundo, cerca de 25% são derivados de produtos naturais ou semi-sintéticos.

Num contexto geral das 119 drogas derivadas de plantas em uso na atualidade, 74% são de plantas utilizadas anteriormente na medicina popular e que tiveram seus princípios ativos isolados e esclarecidos. Destes podemos citar exemplos marcantes como os antimaláricos da quinina, isolada da *Chinchona ledgeriana*, os antihipertensivos e agentes tranquilizadores como reserpina (Figura 1), isolada da planta indiana *Rauvolfia serpentina* (L) Bentham ex Kurtz. e os analgésicos codeína e morfina da *Papaver somniferum* (Figura 2), entre outros (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

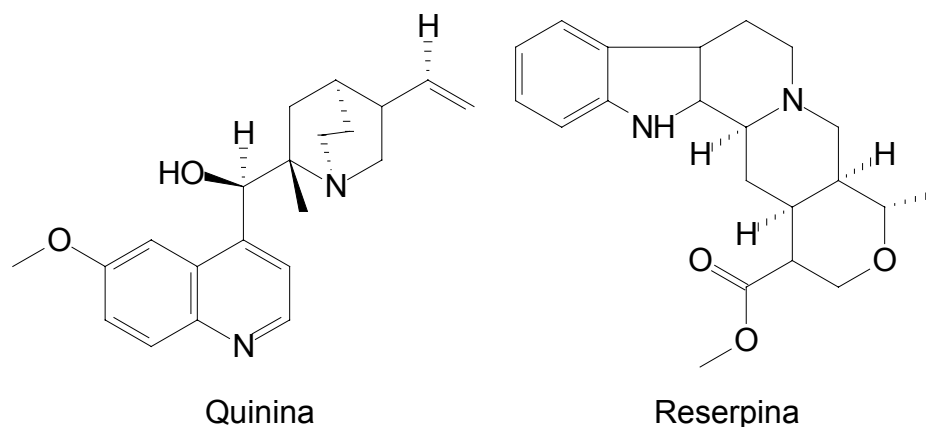


Figura 1. Estrutura da Quinina e Reserpina (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

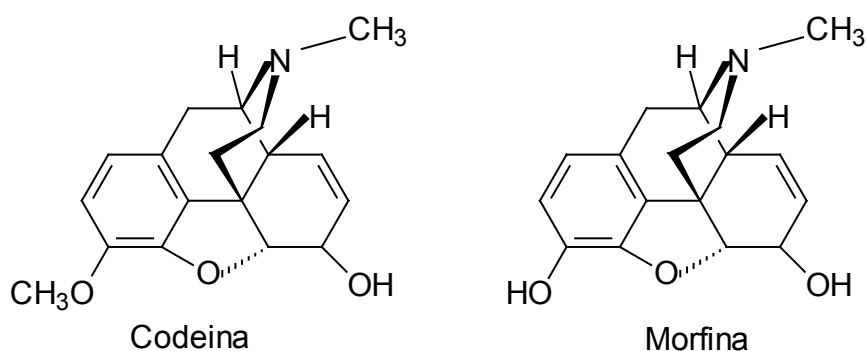


Figura 2. Estrutura da Codeina e Morfina (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Em países como o Brasil, a utilização desses produtos vem gradativamente aumentando, o que revela a necessidade de pesquisas nesta área e de comprovar ou não a sua eficiência no combate as doenças contra as quais elas são utilizadas (TURNER, 1996).

O Brasil contém mais de 10% de todos os organismos vivos descritos na terra. Mais de 20% das plantas floríferas conhecidas são encontradas entre a floresta amazônica, mata atlântica e cerrado. Assim, o Brasil pode ser considerado uma das principais potências biológicas do mundo (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

No entanto, muitas das espécies de plantas que ocorrem no Brasil permanecem sem qualquer estudo químico o que representa no contexto mundial um potencial econômico importante (RATES, 2001). A exploração racional deste potencial pode gerar uma enorme gama de conhecimentos, como a descoberta de novos medicamentos (com novos núcleos), novos agentes inseticidas e de

combate a fitopatógenos que poderão ser de grande utilidade para o homem (HARVEY, 1993).

O descobrimento e o desenvolvimento industrial de produtos químicos utilizados no controle a helmintos, sem causar efeitos indesejáveis custam anos de pesquisas e requerem um investimento econômico elevado (LANUSSE, 1996). Desde o descobrimento da fenotiazina em 1938, muitos esforços têm sido feitos na busca do anti-helmíntico “ideal”. O anti-helmíntico ideal deveria eliminar helmintos adultos e em estádios imaturos sem produzir efeitos tóxicos nos hospedeiros, possuir um curto período de carência, ser inócuo ao meio ambiente e de baixo custo (CRAVEN et al, 1999).

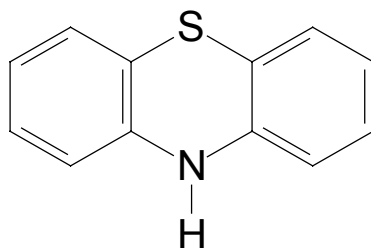


Figura 3. Estrutura da Fenotiazina (CRAVEN et al, 1999).

Na Inglaterra, até recentemente, plantas vinham sendo utilizadas como anti-helmínticas. O óleo de *Chenopodium* (mastruço) foi descrito como útil no controle de *Ascaris* de cavalos e suínos, *Toxocara* de cães, e *Strongylus* de cavalos (HAMMOND et al, 1997). Arecolina (Figura 4), um alcalóide da semente de *Areca catechu*, foi amplamente utilizado contra cestóides de cães e de aves domésticas, como descrito no Códex Veterinário Britânico (1953).

Dentre as plantas brasileiras dotadas de atividade anti-helmíntica, destacam-se algumas plantas do gênero *Spigelia* conhecidas popularmente como erva “lombrigueira”. Entre elas podemos citar a *Spigelia anthelmia* e *Spigelia flemmingiana*. Em ensaio *in vitro* com o extrato aquoso da *S. anthelmia* foi verificado o efeito anti-helmíntico desta planta a qual mostrou ser capaz de inibir o desenvolvimento de ovos e imobilizar larvas de *H. contortus* (BATISTA et al., 1999).

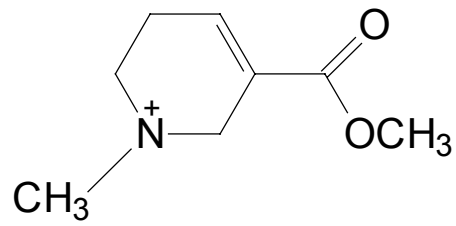


Figura 4. Estrutura da Arecolina (HAMMOND et al., 1997).

Baseando-se nestes resultados e sabendo que nenhum estudo de atividade anti-helmíntica foi conduzido com a *S. flemmingiana* esse estudo tem como proposta fazer um estudo fitoquímico e verificar a atividade anti-helmíntica e antimicrobiana e se possível identificar o(s) princípio(s) ativo(s) desta planta.



## **2. OBJETIVOS**

- Confirmar a atividade antimicrobiana e avaliar a atividade anti-helmíntica dos extratos ciclohexânico, acetado de etila e etanólico da *S. flemmingiana*.

- Por meios cromatográficos, fracionar os componentes dos extratos que apresentaram atividade biológica.

- Avaliar as atividades biológicas das frações principais isoladas.

- Por meio de métodos espectroscópicos determinar a estrutura química dos compostos purificados.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### 3.1 Família Loganiaceae

A família Loganiaceae compreende 29 gêneros e 470 espécies, e está distribuída por todo o mundo, nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (SCHULTZ, 1985). Essa família compreende tanto árvores, arbustos, como cipós e ervas, com folhas opostas, simples, inteiras, serradas ou lobadas, com estípulas, às vezes com pêlos glandulosos. No Brasil essa família é representada principalmente pelos gêneros *Buddleja*, *Strychnos* e *Spigelia*, (CHIAPPETA, 1985).

A família loganiaceae está organizada na seguinte posição taxonômica:

---

**Reino: Plantae**

**Filo: Magnoliophyta**

**Classe: Magnoliopsida**

**Ordem: Gentinales**

**Família: Loganiaceae**

---

Pertencem a esta família alguns exemplos de plantas das quais se extraem venenos alcalóides muito potentes, como a estricnina. Em particular, as espécies *Strychnos toxifera* e *S. crevauxiana*, de onde os indígenas sul-americanos retiram o curare, que utilizam para impregnar seus instrumentos de caça, envenenando suas presas por imobilização (SCHULTZ, 1985).

A gênero *Spigelia*, ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano. Segundo CORREA (1969) o gênero *Spigelia* está distribuído em quase todo o território nacional, representado pelas seguintes espécies: *S. anthelmia*, *S. humboldtiana*, *S. trifoliata*, *S. lanceolata* e *S. viscosa* e *S. flemmingiana*.

Dentre o gênero *Spigelia* a *S. anthelmia* encontra-se em posição de destaque, esta espécie é conhecida popularmente como “arapabaca”, termo indígena que significa expulsar vermes. Esta planta teve sua eficiência comprovada em relação ao combate a helmintos por MELO et al (1999), embora a sua propriedade anti-helmíntica já tenha sido descrita desde o século XVI.

Entre as plantas representantes do gênero *Spigelia* que ocorrem no Brasil, temos a *Spigelia flemmingiana* Cham. Et Schlecht, que é o alvo de nosso estudo.

Em Pernambuco, a *S. flemmingiana* foi localizada habitando à sombra da mata e constantemente nas proximidades de fontes de água, em terrenos não alagados, com flores e frutos de março a dezembro (CHIAPPETA, 1985). Não existe referência desta planta na medicina popular, embora ela seja apresentada como soporífica e anti-helmíntica.

Segundo CHIAPPETA (1985), a *S. flemmingiana* está classificada como uma erva de caule cilíndrico, glabro e ramoso, entre 70 – 90cm de altura, de folhas opostas, sendo as últimas ou superiores sob inflorescências e geralmente quatro verticilados, flores brancas com estrias púrpuras, dispostas em espigas terminais solitárias. Com sementes reunidas ao redor da placenta formando uma massa arredondada, testa verrugosa ou reticulada, endosperma carnosos, embrião pequeno e reto (Figura 5).



Figura 5. *Spigelia flemmingiana* (CHIAPPETA, 1985)

A *S. flemmingiana*, que é usada popularmente, assim como *S. anthelmia*, na medicina popular no combate de helmintos, nunca teve seus compostos, os quais apresentam atividade biológica, isolados. NASCIMENTO (1998) obteve resultados com o extrato EtOH bruto da *Spigelia flemmingiana*, que apresentou ação inibitória contra algumas bactérias Gram-positivas e álcool ácido-resistentes, o que condiz com resultados obtidos por CHIAPPETA (1985). Nenhum trabalho, até o presente momento, foi realizado para determinar ou não a ação anti-helmíntica dessa espécie e conseqüentemente o isolamento dos seus constituintes responsáveis por esta atividade.

### 3.2 Atividade Biológica

As atividades biológicas encontradas nas Loganiaceae estão basicamente relacionadas com os seguintes gêneros.

- *Strychnos*: agrupa quase 190 espécies distribuídas por todas as regiões tropicais do mundo de algumas das quais foram isolados cerca de 200 alcalóides, alguns deles apresentam atividades farmacológicas interessantes, tais como ação sobre o sistema nervoso central e sobre a musculatura lisa. O constituinte químico mais representativo deste gênero é a estricnina, isolada em 1818 por Pelletier e Caventou das sementes da *Strychnos nux-vomica* L. (Figura 6). Esta árvore do sudoeste asiático foi introduzida na Europa no século XVI para eliminar animais indesejáveis, principalmente ratos.

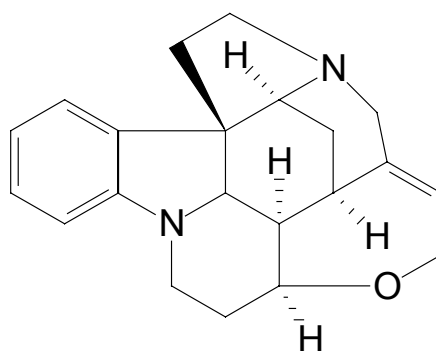


Figura 6. Estrutura da Estrictina (KOROLKOVAS,1982)

- *Gelsemium*: representado pela *G. sempervirens*, conhecida como Jasmim de Carolina e usualmente encontrada no sudeste dos Estados Unidos. Desta planta foi isolada a geselmina, que apresenta atividade antineurálgica, analgésica e antiespasmódica (Figura 7). Esta planta é utilizada na homeopatia como analgésico em crises de enxaquecas, cefaléias e neuralgias, (LIN et al 1996). A geselmina, apesar de apresentar atividade contra células carcinogênicas, apresenta uma alta toxicidade ao homem.

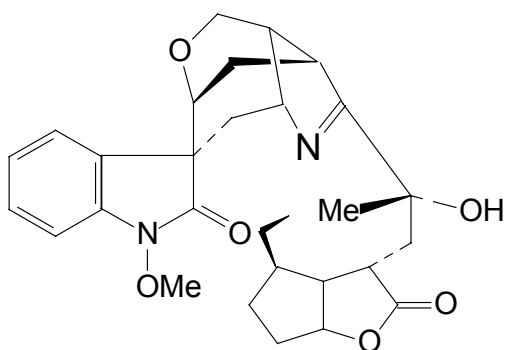


Figura 7. Estrutura da Geselmina (LIN et al 1996)

- Gênero *Buddleja*: representado pela *Buddleja cordata*. Esta planta possui uma significativa atividade antimicrobiana contra o *Mycobacterium tuberculosis*; tendo sido isolados e identificados, do seu extrato etanólico, oito compostos fenólicos responsáveis por esta atividade (ACEVEDO et al, 2000).

AVILA et al. (1998) em sua pesquisa determinou o modo de ação do verbascoside um produto encontrado na *Buddleja cordata*, árvore conhecida com “tepozán” no México (Figura 8). Esta substância é conhecida pela sua atividade antimicrobiana, principalmente contra *Staphylococcus aureus*.

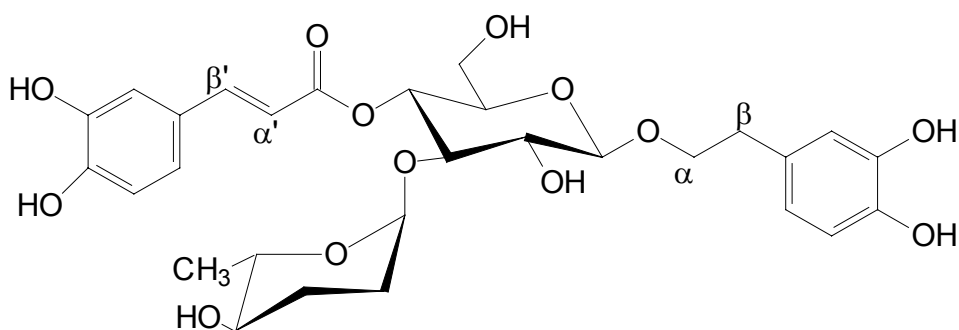


Figura 8. Estrutura do Verbascoside (AVILA et al, 1998)

LENTZ et al (1998) em estudos realizados com diversas espécies de plantas, incluindo a *Buddleia americana*, *Strychnos taboscana* e *Spigelia humboldtiana* todas da família Loganiaceae, encontrou atividade contra vários microrganismos, entre eles; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, essas plantas foram escolhidas para estudo por serem utilizadas pela população como plantas medicinais.

Gênero *Spigelia*: estudos químicos realizados com a *S. antheimia* permitiram o isolamento dos alcalóides spigantina e rianodina (ACHENBACH, 1995 e HÜBNER et al 2001). A partir do extrato Acetato de etila, isolou 20 novos derivados da spigantina e rianodina, estes compostos também apresentaram atividade cardíaca, sendo o principal composto dele isolado a spigantina (Figura 9). HUBNER et al (2001) determinou que a atividade inseticida da *Spigelia antheimia*, esta relacionada principalmente com a presença da rianodina (Figura 10).

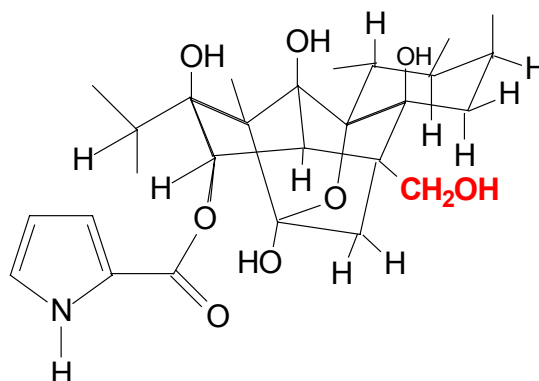


Figura 9. Estrutura da Spigantina (HÜBNER et al 2001)

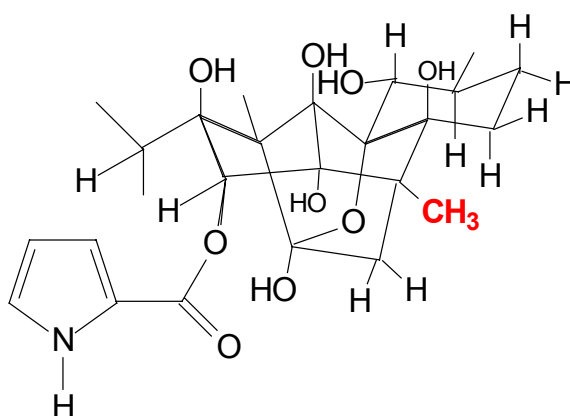


Figura 10. Estrutura da Rianodina (HÜBNER et al 2001)

### 3.3 Biossíntese dos ácidos aromáticos pela via do ácido chiquímico

Nas plantas esta rota é a precursora dos compostos aromáticos, dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptófano e alcalóides derivados da quinoleína e processa-se no citosol da célula vegetal (LEHNINGER, 1988).

A biossíntese inicia-se pela reação do ácido fosfoenolpirúvico e do açúcar fosfatado eritrose-4-fosfato para formar um cetoadúcar ácido de 7 carbonos também fosforilado, o ácido 3-desoxi-*D*-arabino-heptulosônico-7-fosfato, reação catalizada pela 3-desoxiarabinoheptulose-7-fosfato aldolase. A reação de ciclização deste composto leva a formação do ácido desidroquinico reação também catalizada pela mesma aldolase (RICHEY, 1988)

A rota biossintética prossegue pela perda de uma molécula de água levando a formação do ácido 5-dehidrochiquímico, esta reação é catalizada pela dehidroquinato desidratase. A redução do ácido 5-dehidrochiquímico pela ação da chiquimato desidrogenase com a participação do NADPH + H<sup>+</sup> leva a formação do ácido chiquímico.

Pela fosforilação e reação com o ácido fosfoenolpirúvico forma-se o ácido corísmico ponto chave na via do ácido chiquímico. Nesta etapa ocorre um importante ponto de ramificação metabólica que pode ser direcionada para a formação de:

---

tirosina e fenilalanina.

triptofano e alcalóides derivados da quinoleína.

ácido salicílico e ácidos *p*-aminobenzóicos.

Pela ação da corismato mutase ocorre a formação do ácido prefênico, o último composto não aromático nesta sequência biossintética. O ácido prefênico pode ser aromatisado por desidrogenação e subsequente descarboxilação levando a formação do ácido *p*-hidroxifenilpirúvico precursor da tirosina.

A reação de formação da tirosina ocorre por transaminação e descarboxilação simultânea, catalizada por uma aminotransferase.



As enzimas que participam desta biossíntese sofrem regulação dos seguintes compostos:

- Por feed-back – aldolase e chiquimato dehydrogenase – tirosina, fenilalanina, corismato e prefenato. A aldolase é também regulada pelo triptofano.
- Complexo corismato mutase – sofre regulação pelo excesso de tirosina e fenilalanina.

A luz é um fator importante na regulação da chiquimato quinase, a ação desta enzima aumenta consideravelmente na presença da luz.

A desaminação da fenilalanina para ácido *p*-cumárico ocorre pela presença da fenilalanina aminoliase. Esta enzima aumenta atividade pela ação da luz, temperatura ou sob condições de stress.

As enzimas que atuam nas etapas subsequentes a formação da fenilalanina não estão ainda bem caracterizadas (Figura 11).

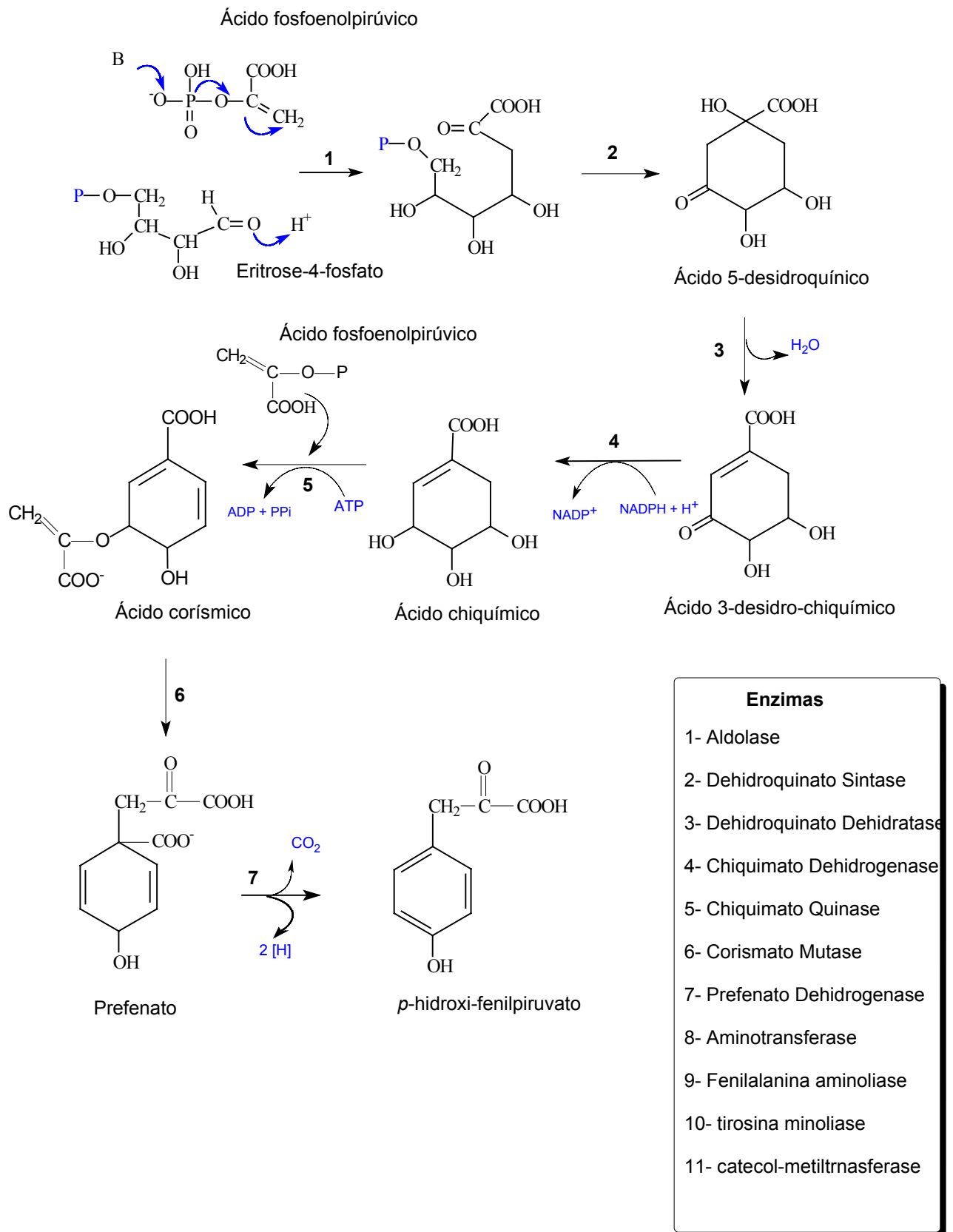
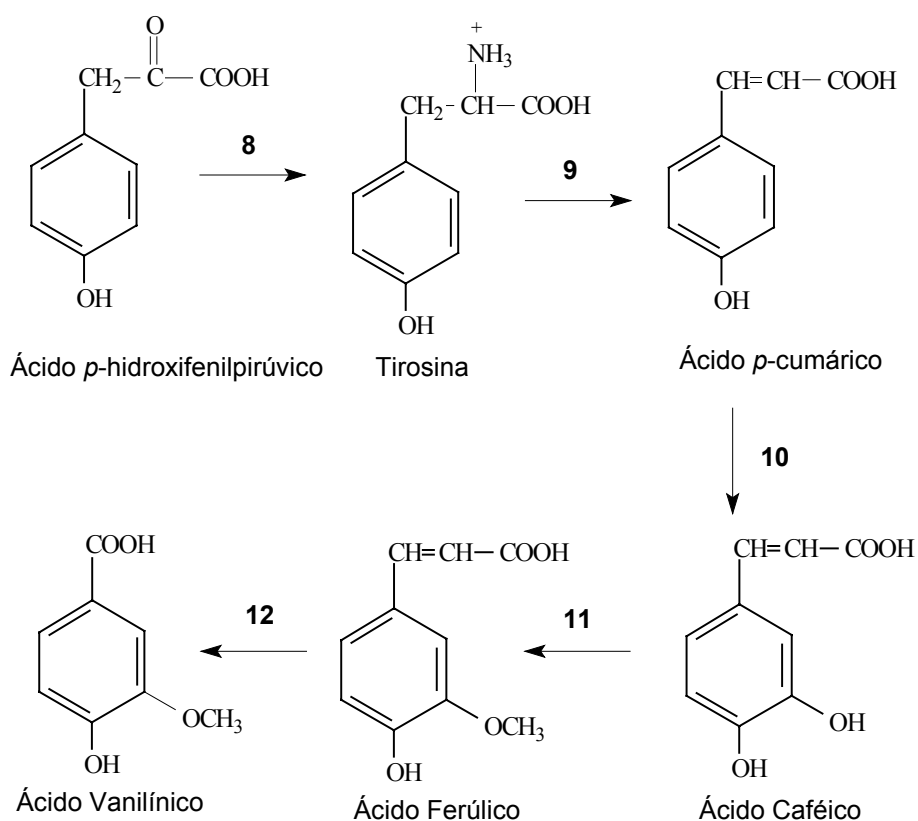


Figura 11a. Percurso biosintético dos ácidos benzóicos e seus derivados (RICHTER, 1988).



Figurab. Percurso biossintético dos ácidos benzóicos e seus derivados (RICHTER, 1988).

### 3.4 Biossíntese dos esteróides

A biossíntese destes compostos ocorre no citosol da célula vegetal, sendo estes transportados para os cloroplastos e posteriormente para as mitocôndrias (RICHTER, 1988).

Devido ao grande número de estruturas terpênicas se tem uma grande dificuldade em generalizar a sua biossíntese (SCOTT e EAGELESON, 1988).

Existem três reações principais, que são:

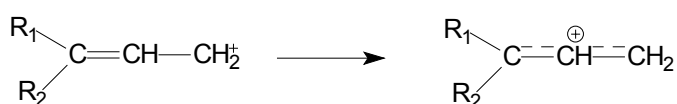
Formação do *Isopreno* Ativo (Partindo do Acetato – Via Ácido Mevalônico)

Acoplamento Cabeça-Cauda ( $C_5$ ) (Monoterpenos, Sesquiterpenos-, Diterpenos, Sesterterpenos e Politerpenos)

Acoplamento Cauda-Cauda ( $C_{15}$  E  $C_{20}$ ) (Triterpenos, Esteroides e Carotenos)

A união de duas moléculas de Acetil-CoA para formar a Acetoacetil-CoA. Uma terceira molécula de Acetil-CoA liga-se por condensação ao Acetoacetil-CoA resultando como produto desta reação a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Observa-se uma reação de redução do grupo carbonila para álcool envolvendo a utilização do NADPH + H<sup>+</sup> para NADP<sup>+</sup>. Nesta etapa ocorre a formação do ácido mevalônico, ponto principal na biossíntese dos terpenos e esteróides, por estar situado na etapa anterior a formação do “Isopreno ativo”. Através da descarboxilação e eliminação de água obtém-se o isopentenildifosfato (*Isopreno ativo*).

A isomerização de isopentenildifosfato para 3,3-dimetilalildifosfato (Prenildifosfato) ocorre pela participação de uma isomerase. A formação do cátion alila dá-se pela ruptura do ânion difosfato (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>, ppi), o cátion alila é então estabilizado por isomeria segundo esquema descrito abaixo:



O cation alila reage então com o isopentenildifosfato (5 carbonos) numa reação de condensação (cabeça - cauda), na presença da dimetilaliltransferase, para gerar o geranildifosfato (10 carbonos) que é o precursor dos **Monoterpenos**. Na reação seguinte, uma condensação (cabeça – cabeça) ocorre a ligação de uma unidade isopentenildifosfato que conduz a formação do farnesildifosfato (15 carbonos) precursor dos **sesquiterpenos**.

A condensação cauda – cauda de duas moléculas de farnesildifosfato catalizada pela esqualeno sintase leva a formação do pré-esqualenodifosfato, um intermediário solúvel em água.

A ciclização do esqualeno dá-se na presença da esqualenomoxigenase. Nesta etapa ocorre a formação de um epóxido na posição três que depois conduzira a formação de um grupo hidroxila presente nos esteróides. O composto formado é o Cicloartenol precursor dos esteróides nos vegetais superiores (Figura 12).

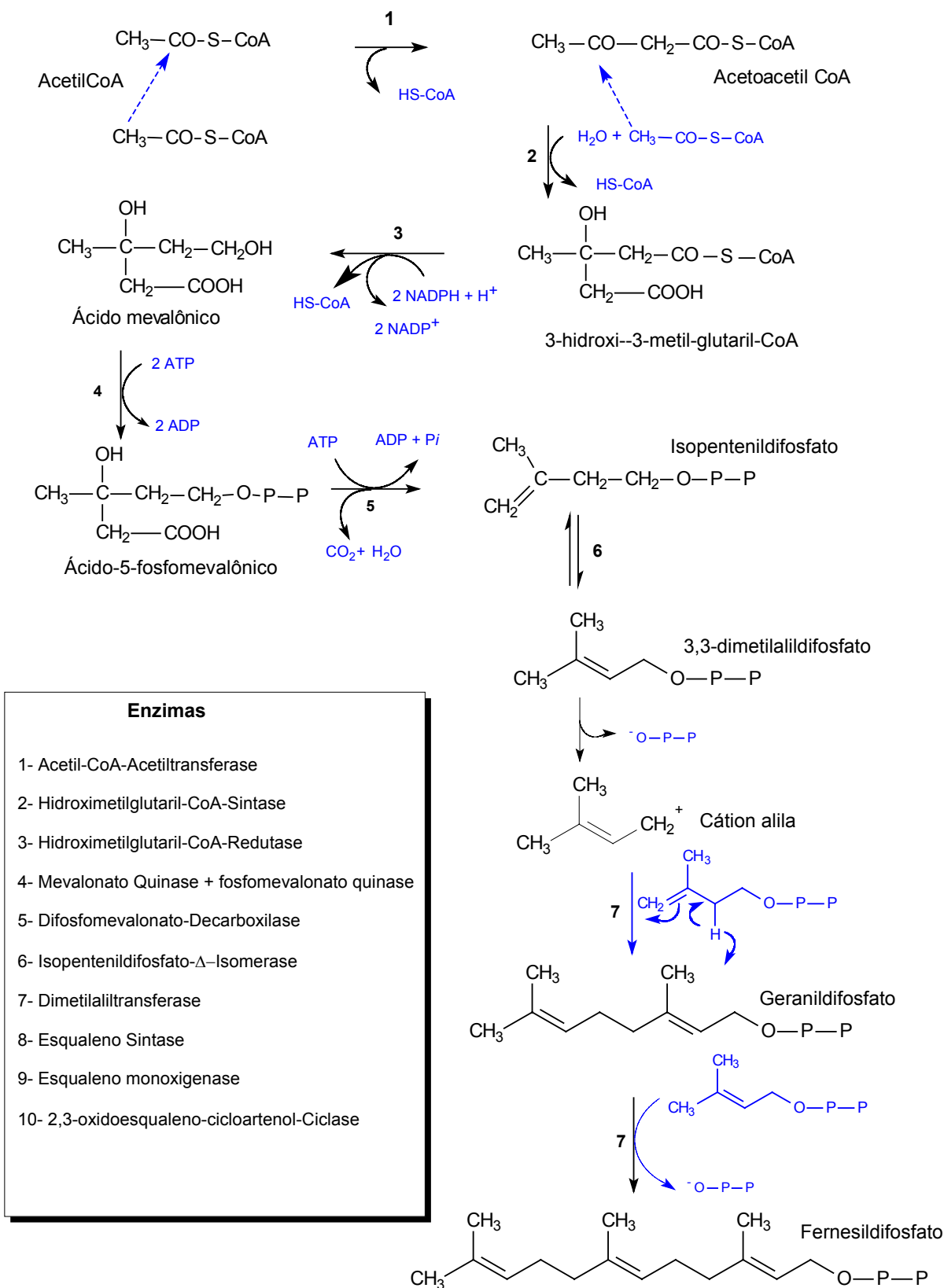
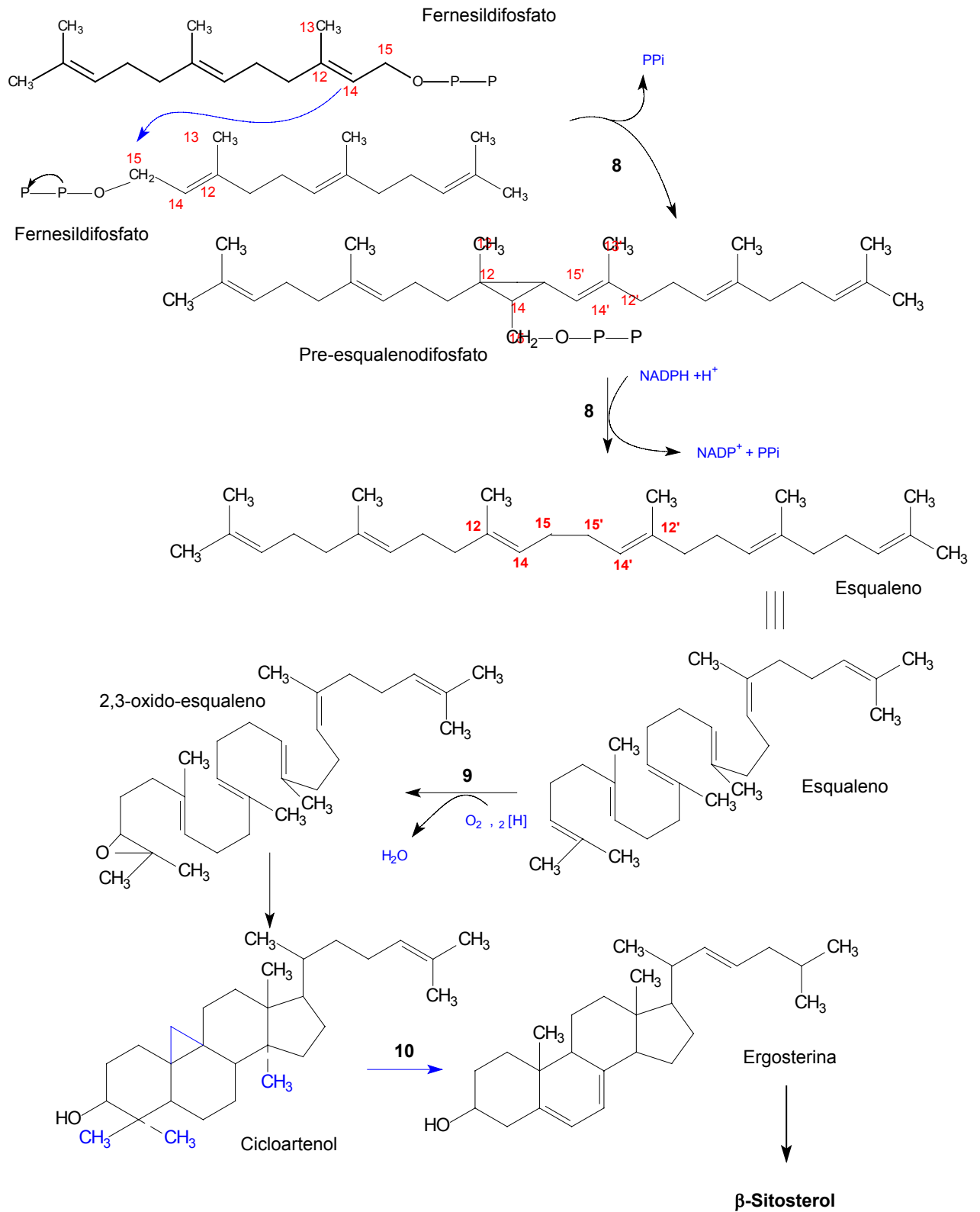


Figura 12a. Percurso biossintético de esteróides nas plantas superiores.



Percorso biosintético de esteróides nas plantas superiores.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e preparo do material botânico

A planta foi coletada na mata do Horto Zoobotânico de Dois Irmãos, situado no Recife (PE) e nas matas da Reserva Florestal do Grujaú, no município do Cabo de Santo Agostinho (PE), em março e setembro de 2000. As plantas foram identificadas pela Prof<sup>ª</sup> Dra. Alda Chiappeta do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todas as partes da planta foram, posteriormente, secas à temperatura ambiente e trituradas em moinho.

### 4.2 Abordagem fitoquímica

Os ensaios fitoquímicos foram realizados para determinar as principais classes de compostos presentes na planta seguindo a metodologia descrita por COSTA, 1982.

#### 4.2.1 Alcalóides:

A presença de alcalóides na planta foi investigada por ensaios confirmativos específicos, que consiste em dissolver cerca de uma grama da planta seca em 10mL de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%, em seguida aquecer a mistura em banho-maria a 100°C por 2 minutos, filtrando a solução, utilizando-se alíquotas do filtrado para determinação da presença de alcalóides conforme os testes descritos na Tabela 1:

Tabela 1-Testes utilizados para determinação de alcalóides.

Teste/reagente	Confirmação
Drogendorff	Aparecimento de precipitado vermelho alaranjado.
Mayer	Aparecimento de precipitado esbranquiçado.

#### **4.2.2 Esteróides e triterpenóides**

Os esteróides e triterpenóides tiveram sua presença determinada pelo teste de *Liebermann-Buchard*, que consiste em tomar cerca de 1g da planta seca em tubo de ensaio e dissolver em 3mL de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), filtra-se a solução, junta-se ao filtrado 2mL de anidrido acético e agita-se vagarosamente. Adicionar à solução obtida cinco gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (pela parede do tubo). O aparecimento sucessivo de cores do róseo ao azul e verde caracterizará a presença de esteróides e triterpenóides.

#### **4.2.3 Flavonóides.**

A presença de flavonóides foi determinada por dois testes distintos:

Teste de Shinoda; trata-se cerca de 1g de planta em 5mL de metanol. Filtra-se e adiciona-se 1mL de HCl concentrado. Deixa-se a solução reagir com 1cm de fita de magnésio. O teste será considerado positivo com o aparecimento de uma coloração rósea.

Reação oxalo-bórica; dissolve-se cerca de 1g da planta com 10mL de acetona. Filtra-se e concentra-se em banho-maria até 0,5mL e adiciona-se 0,05mg de ácido oxálico e a mesma quantidade de ácido bórico. Aquece-se a solução em banho-maria durante 5 minutos. Coloca-se 10mL de éter etílico e observar no UV, o aparecimento de fluorescência indicará a presença de flavonóides.

#### **4.2.4 Saponinas**

As saponinas na planta foram avaliadas pelo teste de espuma, que consiste no tratamento de cerca de 1g da planta seca e triturada em 5mL de água destilada colocados em tubo de ensaio. Agitar vigorosamente por cerca de 5 minutos. A formação de espuma persistente por 30 minutos evidenciará a presença de saponinas.



#### 4.2.5 Taninos

Os taninos tiveram sua presença determinada pelo método do cloreto férrico, onde, trata-se cerca 1g da planta com 10mL de água. Filtra-se, sendo o filtrado testado com solução de cloreto férrico a 1%. O surgimento de uma coloração ou precipitado verde ou azul indicará reação positiva para taninos.

#### 4.3 Obtenção dos extratos brutos da *S. flemmingiana*

O material botânico seco teve seus princípios ativos extraídos em tratamentos sucessivos com ciclohexano ( $C_6H_{12}$ ), em seguida com acetato de etila (AcOEt) e posteriormente com etanol (EtOH), nas condições ambiente a sobre agitação orbital contínua, segundo o esquema de extração abaixo (Figura 13):

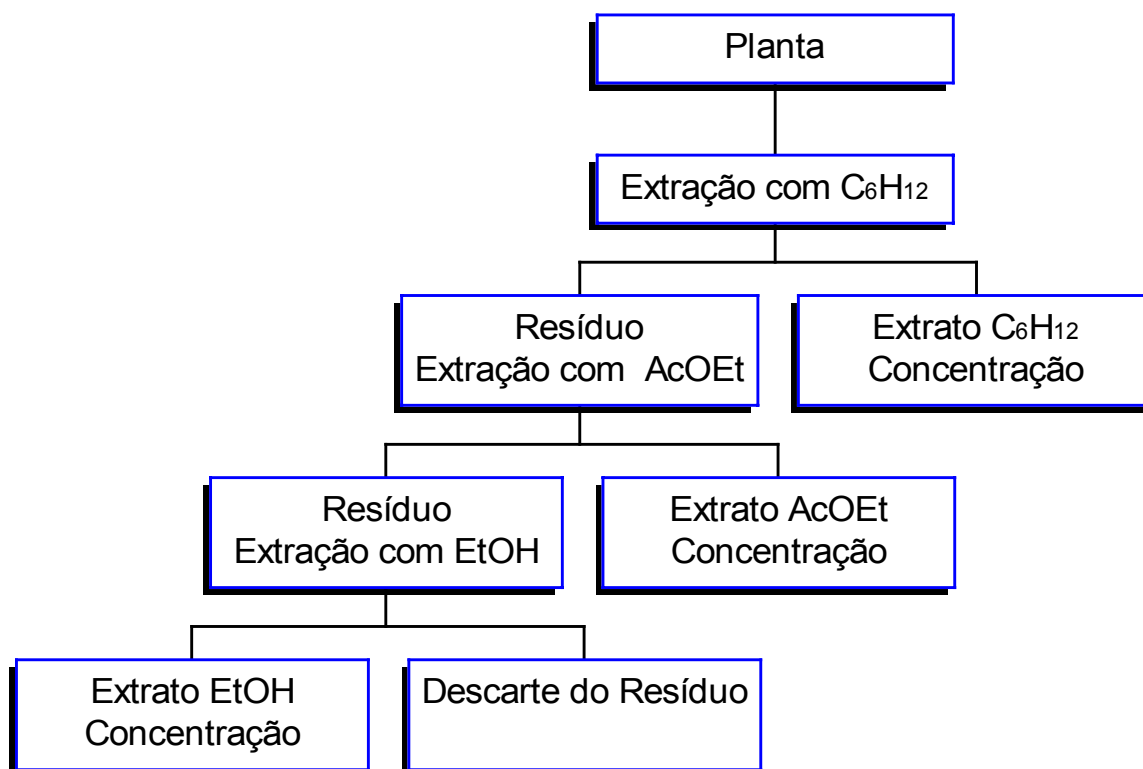


Figura 13. Esquema de obtenção dos extratos brutos da *S. flemmingiana*

Todos os extratos foram secos em Rota-evaporador.

O extrato EtOH foi posteriormente redissolvido em MeOH, para extração de saponinas. O processo de separação encontra-se na Figura 14.

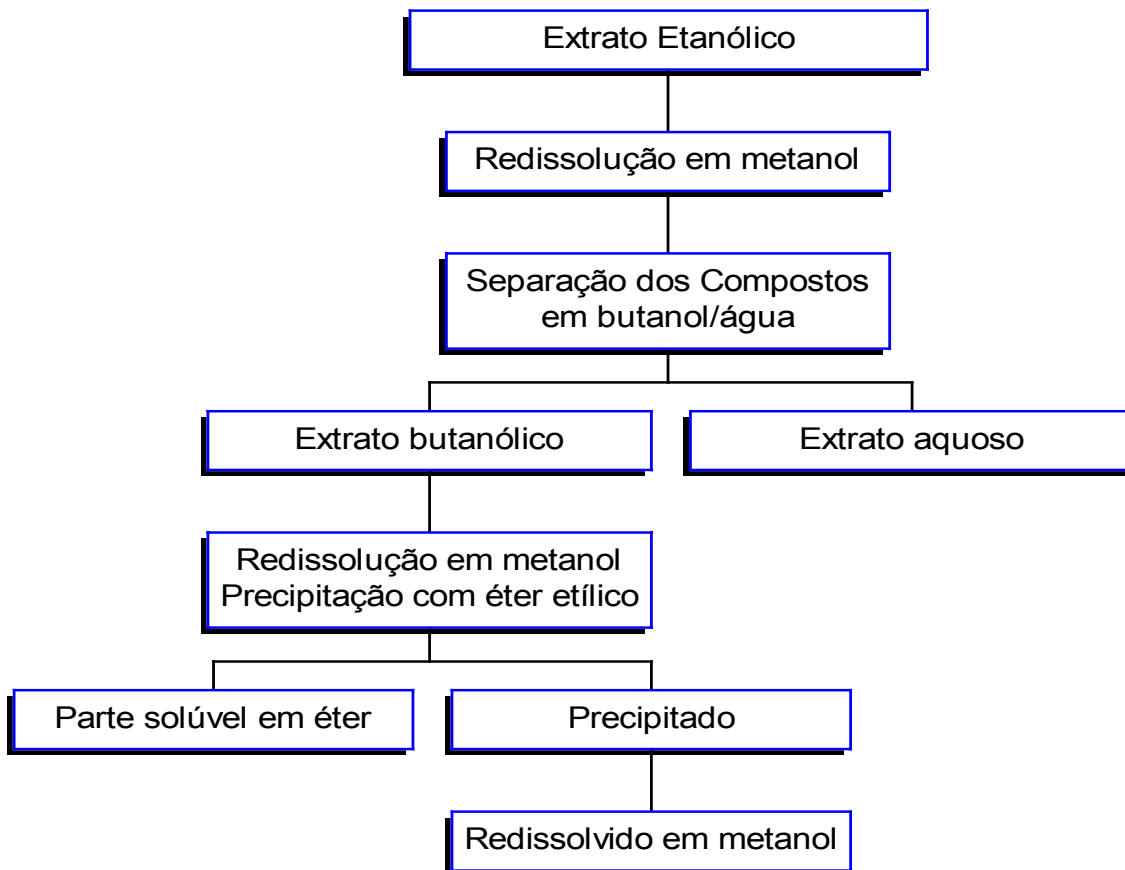


Figura 14. Esquema extração de saponinas presentes no extrato EtOH.

#### 4.4 Teste de atividade antimicrobiana.

Este teste foi realizado com os extratos C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, AcOEt e EtOH. A atividade antimicrobiana foi determinada, pelo método de difusão em disco de papel (BAUER et al, 1966; ACAR e GOLDSTEIN, 1986).

Este estudo foi realizado frente a microrganismos patógenos tais como: bactérias Gram-negativas Gram-positivas e fungos leveduriformes, que apresentaram-se sensíveis ao extrato EtOH da *S. flemmingiana* no estudo realizado por NASCIMENTO et al (1998), listados na Tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos utilizados no teste de atividade antimicrobiana:

Bactérias / Nº de Registro	Fungos Leveduriformes/ Nº de Registro
<i>Staphylococcus aureus</i> / DAUFPE* 01	<i>Candida albicans</i> / DAUFPE* 1007
<i>Bacillus subtilis</i> / DAUFPE 16	<i>Candida lypolytica</i> / DAUFPE 1055
<i>Escherichia coli</i> / DAUFPE 224	<i>Candida parakrusei</i> / DAUFPE 1005

\*DAUFPE = Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

##### 4.4.1 Meios de cultura

Os meios de culturas utilizados para a realização dos testes foram adequados a cada tipo de microrganismo. As bactérias foram cultivadas em Agar Mueller Hinton e as leveduras foram cultivadas em Agar Sabouraud.

Composição dos meios de cultura:

##### Agar Mueller-Hinton

Infusão de carne desidratada	300,0g
Caseína hidrolisada	17,5g
Amido	1,5g
Agar	17,0g
Água destilada	1000ml
pH= 7,4	

### **Agar Sabouraud**

Peptona	10,0g
Maltose	40,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000ml
pH= 5,6	

#### **4.4.2 Preparo dos inóculos**

Os inóculos utilizados partiram de pré-culturas com aproximadamente 18-24 horas de incubação à 35° C em caldo Mueller-Hinton, para as bactérias, enquanto que as leveduras foram utilizados a partir de culturas de Sabouraud-agar a 30° C por 24-48 horas (Figura 15). As suspensões dos inóculos tiveram a concentração padronizada pela densidade óptica de 0,2 de absorbância a 600 nm, que corresponde a turvação 0,5 na escala de McFarland (KONEMAN, et al 1997).

#### **4.4.3 Teste de difusão em disco**

Para este teste, esquematizado na Figura 15, foram utilizados discos com cerca de 6mm de diâmetro, saturados com o extrato a ser testado e colocados sobre a superfície do meio semeado com os microrganismos-teste, tendo como prova em branco o solvente utilizado na extração/diluição.

As placas testes foram incubadas por cerca de 24 - 48 horas, sendo as de bactérias na temperatura de 35°C e as leveduras a 30°C.

A avaliação dos resultados foi realizada através da medida do diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano ao redor do disco de papel, expressa em mm.

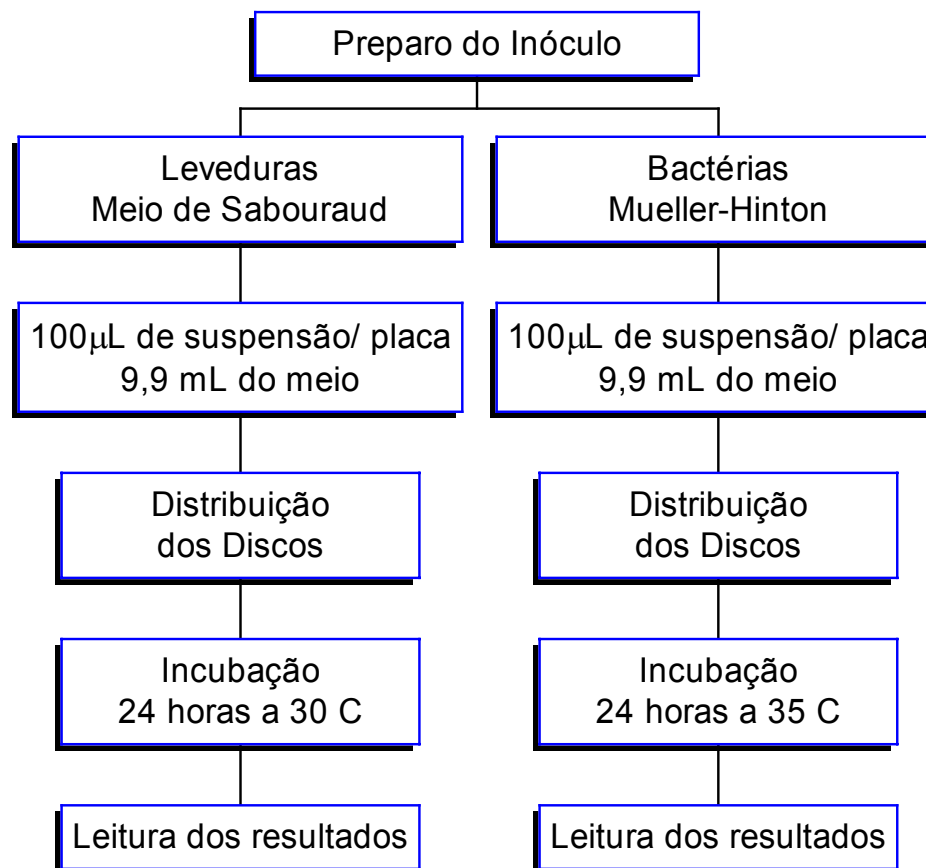


Figura 15. Representação do procedimento para o teste de atividade Antimicrobiana.

#### 4.5 Teste de atividade anti-helmíntica.

Este teste foi realizado com os extratos  $C_6H_{12}$ , AcOEt e EtOH, frente ao *Haemonchus contortus*, um dos principais helmintos causadores de prejuízos na pecuária nordestina (BATISTA et al, 1999). Os extratos que apresentaram atividade anti-helmíntica foram fracionados e testados.

##### 4.5.1 Coleta e preparo dos helmintos.

O helminto testado, o *Haemonchus contortus*, foi coletado em estágio de ovos nas fezes de caprino infectado, aproximadamente 10g de fezes, as quais passaram por sucessivas filtrações em peneiras com 590, 149, 101 e 30µ de abertura, sendo os ovos posteriormente separados segundo o método descrito por COLES e SIMPKIM. (1977).

#### 4.5.2 Teste de eclosão de ovos.

Os extratos obtidos C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, AcOEt e EtOH foram testados na presença de uma suspensão de ovos de *H. contortus* com cerca de 40 ovos/100µL, seguindo o método de COLES et al. (1992), nas concentrações mostradas na tabela 3: A determinação da atividade anti-helmíntica, foi observada pela inibição da eclosão dos ovos nas diferentes concentrações, na proporção de 1/1 (volume da suspensão/extrato).

Tabela 3. Concentrações dos extratos brutos utilizados nos testes de eclosão de ovos.

Extratos	Concentração				
EtOH	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL	6,25mg/mL	3,125mg/mL
AcOEt	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL	6,25mg/mL	3,125mg/mL
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL	6,25mg/mL	3,125mg/mL

A metodologia do teste de inibição de ovos esta esquematizada na Figura 16.

#### 4.6 Separação e Purificação dos extratos brutos

##### 4.6.1 Material cromatográfico

Foram utilizados, no processo de separação e purificação dos extratos brutos, os seguintes materiais cromatográficos:

- Colunas Cromatográficas: Diâmetro de 1,6 cm e 4,1 cm
- Suporte Sílica-gel 60 e Sephadex LH-20
- Placas cromatográficas em camada delgada de sílica-gel, POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>.
- Cubas cromatográficas e reveladoras: Diâmetro: 5cm e Comprimento: 10cm

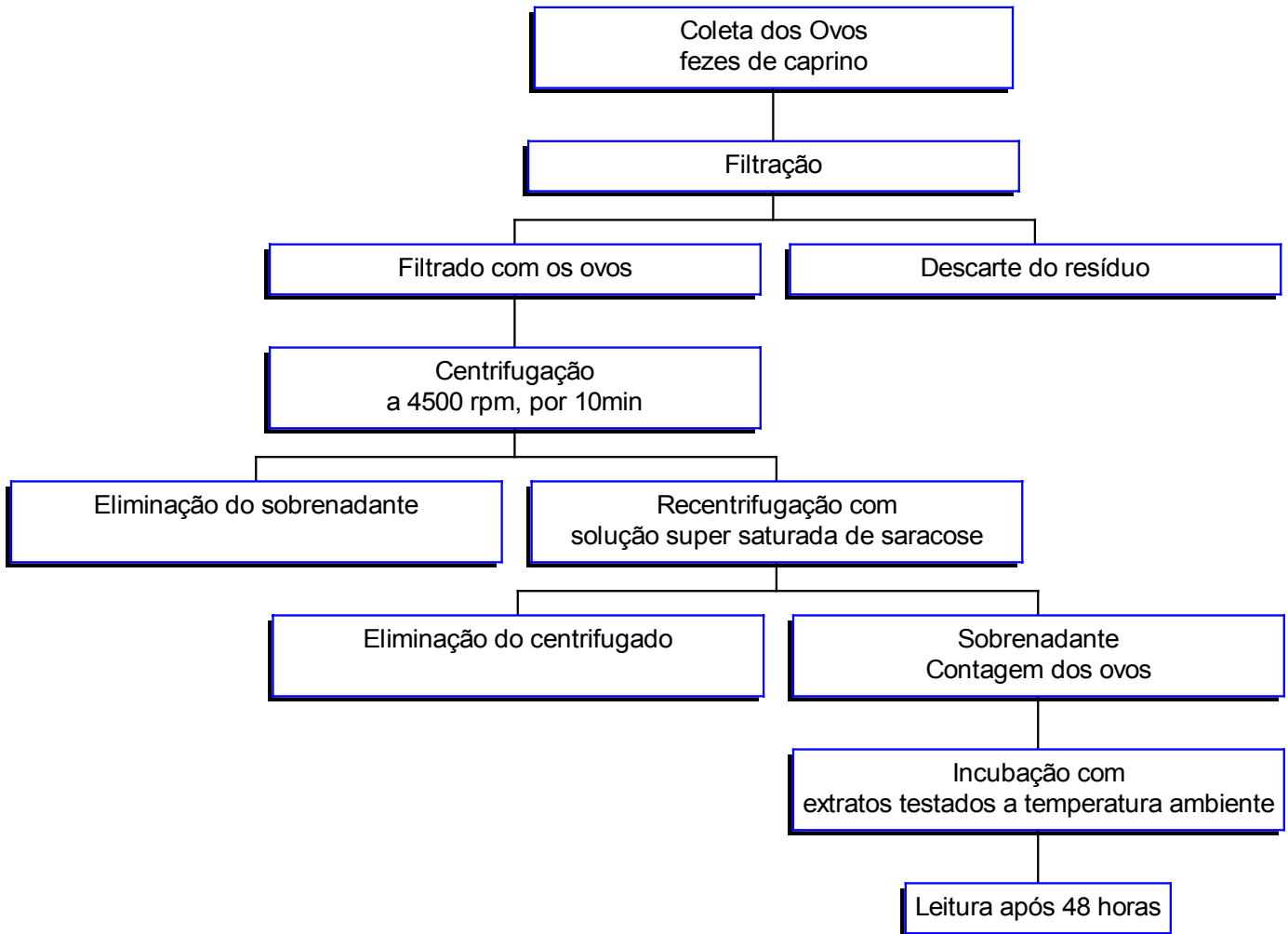


Figura 16. Representação do teste de atividade anti-helmíntica

## 4.6.2 Fracionamento dos extratos brutos da *S. flemmingiana*.

### 4.6.2.1 Extrato ciclohexano.

O extrato em  $C_6H_{12}$  foi cromatografado em coluna de sílica gel 60, utilizando como eluente inicial  $C_6H_{12}$  (100%) sendo a polaridade gradativamente aumentada com o acréscimo de AcOEt até 20% (Figura 17).

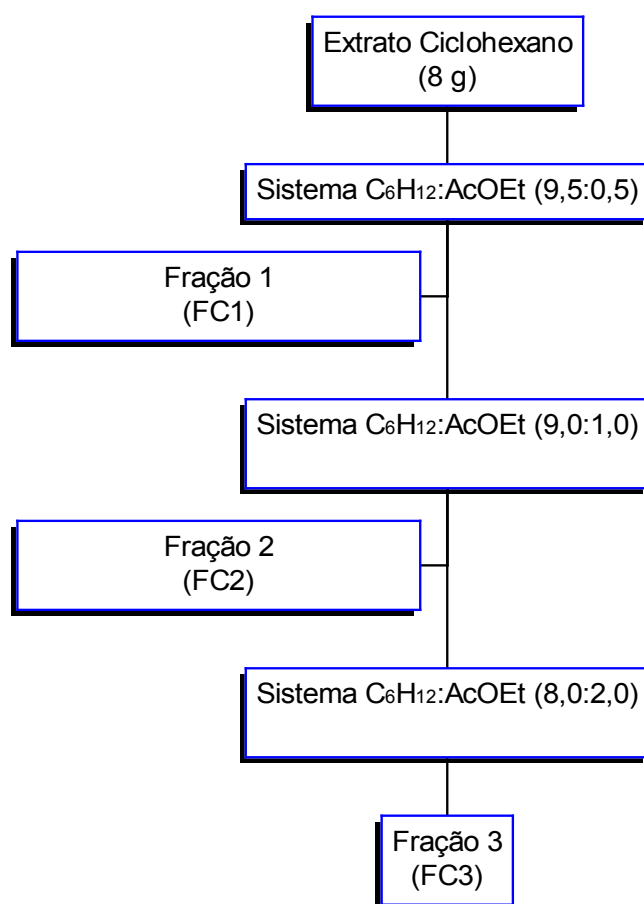


Figura 17. Esquema de fracionamento do extrato  $C_6H_{12}$ .



#### 4.6.2.2 Extrato bruto em acetato de etila.

O fracionamento foi realizado em coluna de sílica gel 60, em sistemas cromatográficos com acréscimo de polaridade, segundo o esquema abaixo representado (Figura 18):

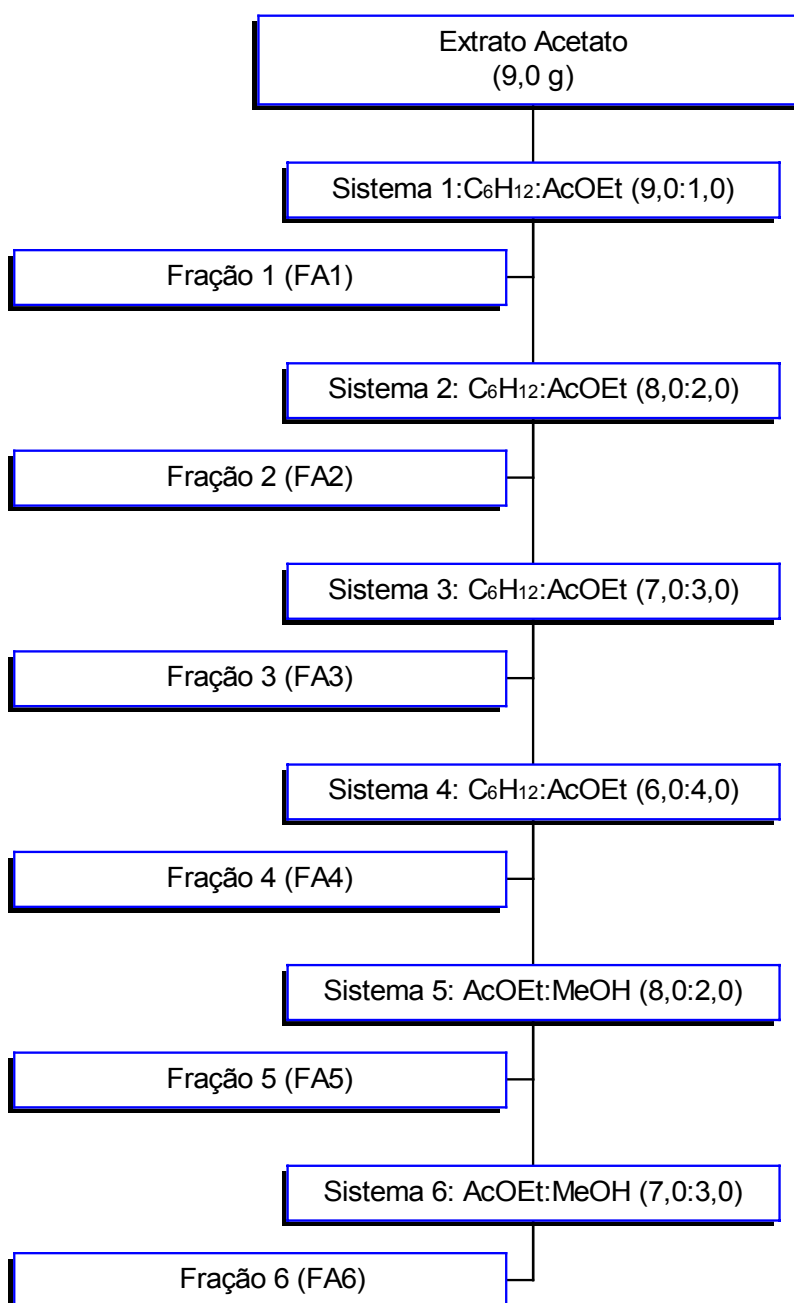


Figura 18. Esquema de fracionamento do extrato AcOEt.

#### 4.6.2.3 Extrato etanólico

O extrato EtOH após sofrer pré-fracionamento (Figura 14), teve os seus constituintes químicos separados em coluna de Sephadex LH-20 utilizando metanol (MeOH) como eluente.

#### 4.7 Identificação estrutural

Os compostos isolados e purificados tiveram suas estruturas determinadas por métodos espectroscópicos. As análises foram realizadas na Central Analítica no Departamento de Química Fundamental.

- ◆ Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foram obtidos a 300 MHz e os de  $^{13}\text{C}$ -RMN 75 MHz - **Varian**. As amostras foram dissolvidas em deuteroclorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e como referência interna foi usado o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos foram medidos em ppm ( $\delta$ ) em relação à referência interna.

- ◆ Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

Equipamento **GCQ FINNIGAN MAT – ION TRAP**, gás utilizado  $\text{NO}$ , à temperatura entre 175 a 280°C. Coluna DB-5, comprimento 30 m e 0,25mm diâmetro externo.

- ◆ Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos cristais obtidos foram realizados em aparelho digital de Ponto de Fusão, **MQAPF – 301**.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Abordagem fitoquímica

Na Tabela 4 encontram-se descritos os resultados obtidos na abordagem fitoquímica da *S. flemmingiana*:

Tabela 4. Resultados da abordagem fitoquímica.

Teste	Resultado
Alcalóides	Negativo
Esteróides / terpenos	Positivo
Flavonóides	Negativo
Saponinas	Positivo
Taninos	Negativo

### 5.2 Obtenção dos extratos brutos

A partir de 342 g de planta seca e pulverizada, foram obtidos os rendimentos descritos na tabela 5.

Tabela 5. Extratos brutos obtidos na extração a partir de 342g da *S. flemmingiana*

Extratos	Quantidade (g)	Rendimento (%)
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	8,0	2,5
AcOEt	9,0	2,8
EtOH I	15,0	4,68

Os extratos C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> e AcOEt apresentaram rendimentos equivalentes, enquanto que o extrato ETOH apresentou o maior rendimento.

### 5.3 Atividade antimicrobiana.

Os testes antimicrobianos realizados com os extratos brutos da *S. flemmingiana*, não apresentaram halos de inibição para nenhum dos microrganismos testados (Tabela 2). Esses resultados confrontam-se com os encontrados por NASCIMENTO et al. (1998). O não aparecimento da atividade antimicrobiana está possivelmente relacionado a mudanças ambientais sofridas pela planta. Outros fatores como época do ano e local da coleta, mudanças climáticas podem estar associadas a este resultado. Isso vêm enfatizar a importância de se determinar em qual período e condições ambientais a planta produz compostos biologicamente ativos. A relação entre o ambiente e a produção de metabólitos secundários foi observada por PRICE (1984).

### 5.4 Atividade anti-helmíntica

#### 5.4.1 Extratos brutos.

A *S. flemmingiana* demonstrou atividade anti-helmíntica semelhante a *S. anthelmia* (MELO, 1999), o que confirma a sua eficácia no uso contra helmintos. O extrato AcOEt em relação os demais, apresentou o melhor resultado no teste de inibição de eclosão de ovos na concentração de 25mg/mL. A redução de eclosão de ovos pode ser observada na Figura 19.

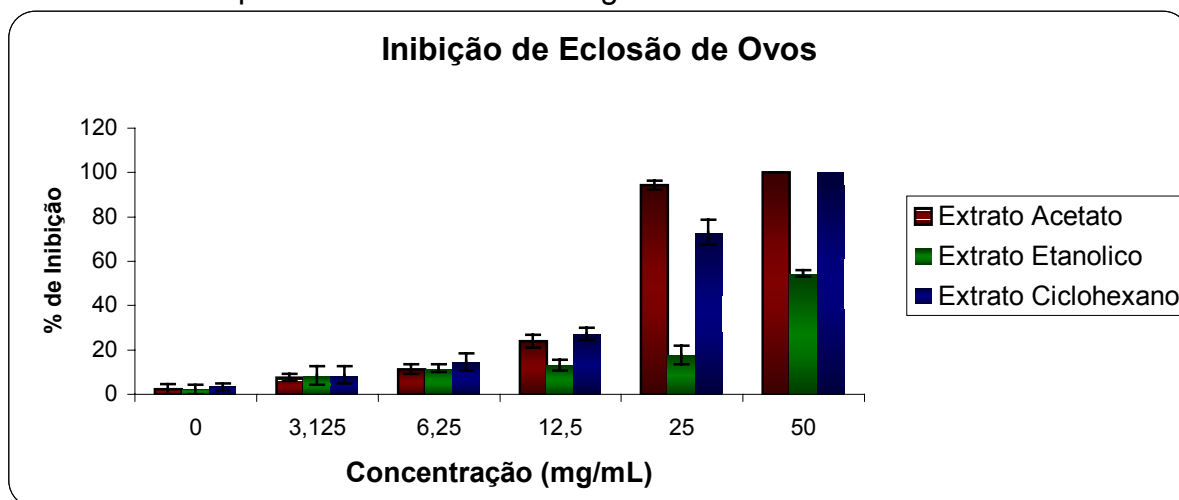


Figura 19. Inibição da eclosão de ovos de *Heamonchus contortus* por extratos brutos da *S. flemmingiana*.

#### 5.4.2 Atividade após fracionamento dos extratos ativos.

Após fracionamento dos extratos  $C_6H_{12}$  (Figura 17) e AcOEt (Figura 18), foram realizadas novos testes de atividade anti-helmíntica. As frações do extrato  $C_6H_{12}$  (FC2 e FC1) como pode ser observado na Figura 20 apresentaram uma baixa atividade sobre a eclosão de ovos *H. contortus*. Os resultados obtidos indicaram que o(s) princípio(s) ativo(s) da *S. flemmingiana*, estavam contidos principalmente nas frações resultantes do extrato em AcOEt (FA-3, FA-4, FA5 e FA-6) (Figuras 21 e 22).

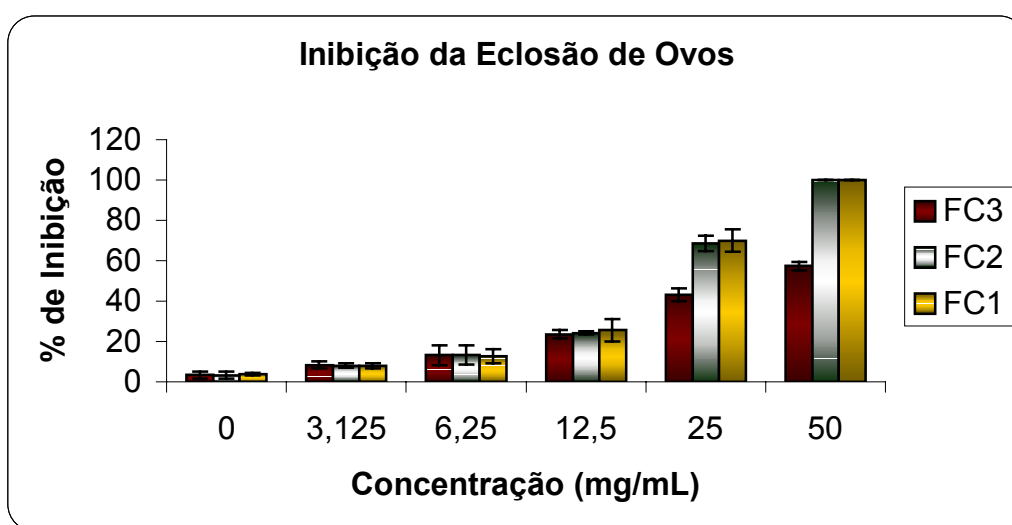


Figura 20: Inibição da eclosão de ovos do *Heamonchus contortus* pelas frações FC1, FC2 e FC3 do extrato  $C_6H_{12}$  da *S. flemmingiana*.

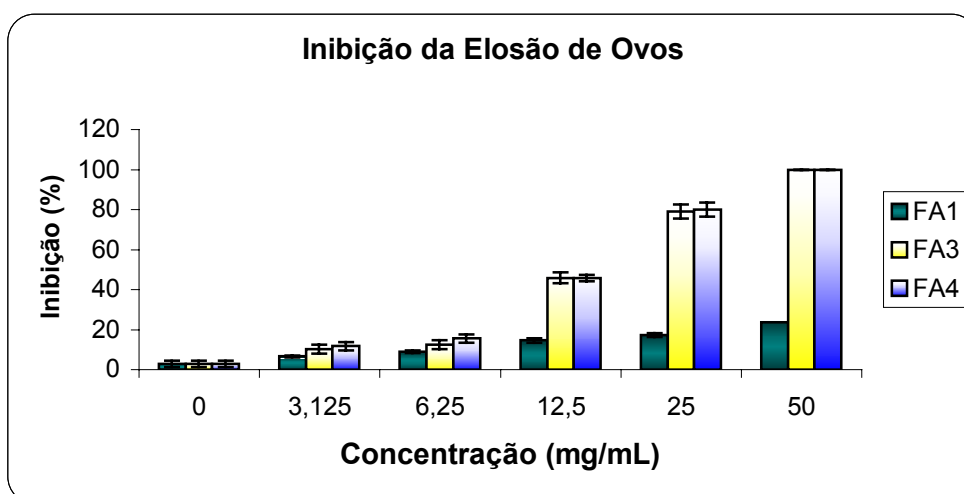


Figura 21. Inibição da eclosão de ovos do *Heamonchus contortus* pelas frações FA1, FA3 e FA4 do extrato AcOEt da *S. flemmingiana*.

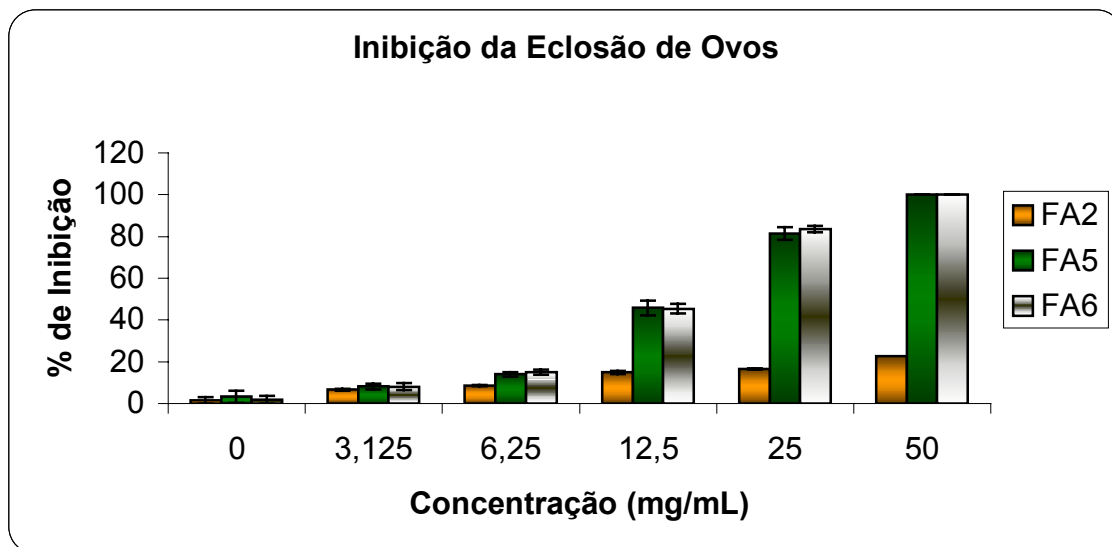


Figura 22. Inibição da eclosão de ovos do *Heamonchus contortus* pelas frações FA2, FA5 e FA6 do extrato AcOEt da *S. flemmingiana*.

## 5.5 Purificação dos extratos brutos da *S. flemmningiana*

### 5.5.1 Extrato ciclohexano.

As frações FC1 e FC2 (Figura 17) que apresentaram atividade biológica (Figura 20), foram purificadas, por cromatografia em Silica-gel 60 sendo obtidas 4 frações; SFH-1, SFH-11, SFH-2 e o SHF-22 (Figura 23).

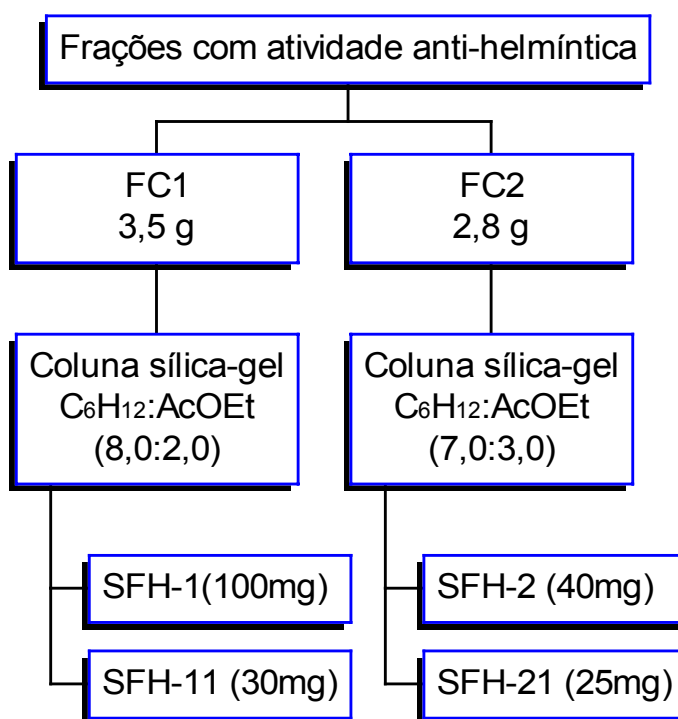


Figura 23. Purificação das frações FC1 e FC2.

Para determinar a pureza das frações foram realizadas análises físicas, solubilidade e Rf (Tabela 6). Apenas SFH-1 apresentou uma única fração, as demais apresentaram duas ou mais frações (Figura 24). Após recristalização em AcOEt obtive-se apenas o composto SFH-1 puro, que apresentou ponto de fusão de 138 - 140 °C.

Tabela 6. Propriedades físicas das frações obtidos na purificação do extrato C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> em coluna de Sílica.

Composto	Rf*
SFH-1	0,58
SFH-11	0,32 – 0,45 – 0,63
SFH-2	0,58 - 0,63
SFH-22	0,27 – 0,39

\*Rf foi determinado no sistema: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>:AcOEt (9:1)

Todos os compostos são solúveis em C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> e CHCl<sub>3</sub>

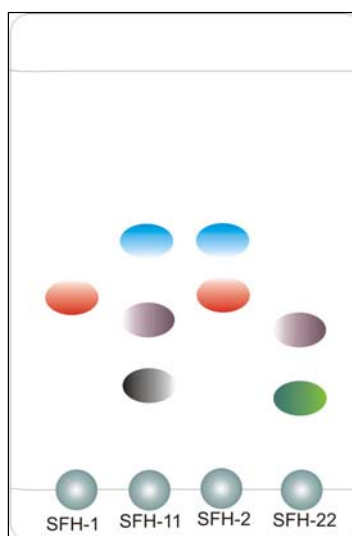


Figura 24. Representação cromatográfica das frações SFH –1, SFH – 11, SFH – 2 e SFH – 22.

### 5.5.2 Extrato acetato de etila.

As frações com atividade anti-helmíntica, FA3, FA4, FA5 e FA6 foram fracionadas em coluna cromatográfica, utilizando como suporte o Sephadex LH – 20 e sistema de eluição: AcOEt:MeOH (7:3). Como apresentado na Figura 25.



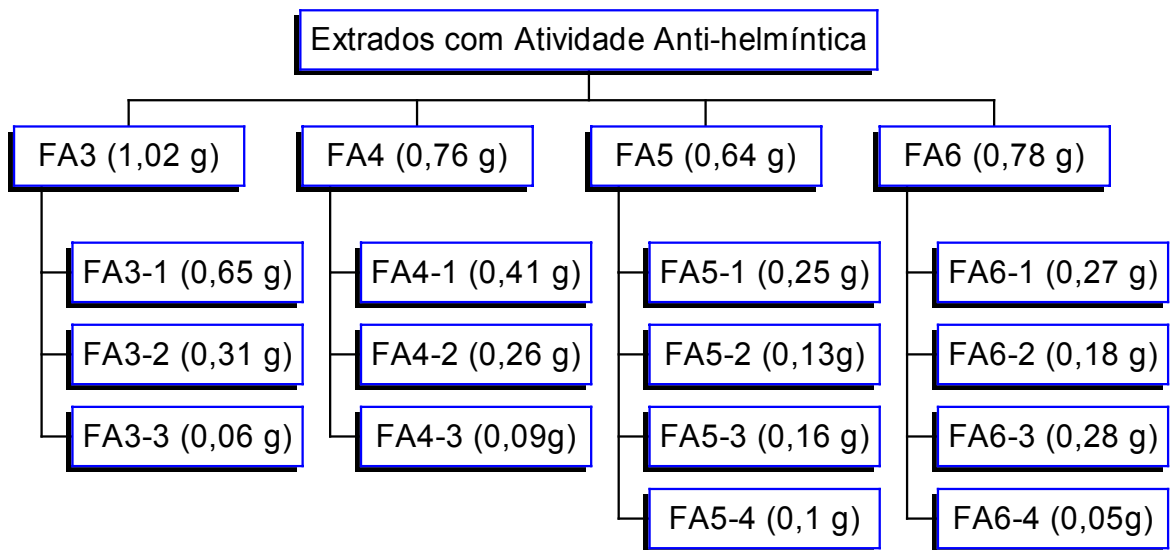


Figura 25. Purificação das frações com atividade anti-helmíntica do extrato AcOEt.

As frações obtidas nesta purificação (Figura 25) foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica 60 no sistema Toluol: AcOEt (7:3). Foi observado que as frações FA3-3, FA4-3, FA5-4 e FA6-4, apresentaram um menor número de constituintes e comportamento cromatográfico semelhante (Figura 26). Em vista disso optou-se por reunir estas frações e tentar obter alguns de seus constituintes puros.

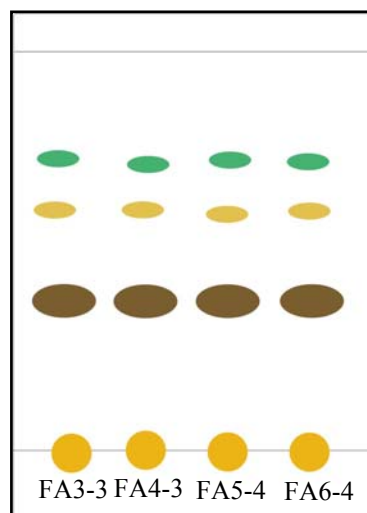


Figura 26. Representação cromatográfica das frações FA3-3, FA4-3, FA5-4 e FA6-4.

Essas frações foram então reunidas e re-cromatografadas em coluna de Sephadex LH-20, com sistema AcOEt:MeOH (8:2), obtendo-se assim as frações SFA-1, SFA-2, SFA-3, Figura 27.

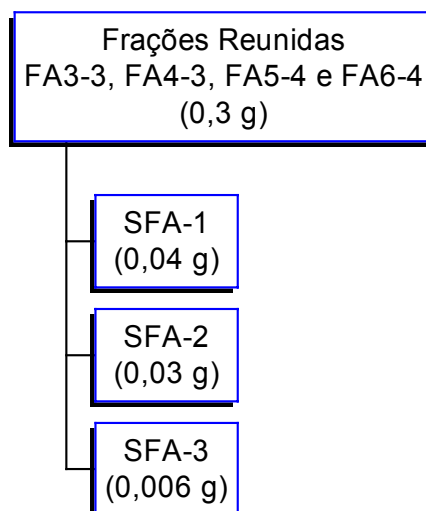


Figura 27. Componentes isolados das frações FA3-3, FA4-3, FA5-4 e FA6-4 que apresentaram atividade anti-helmíntica.

Estes compostos purificados apresentaram as características apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características físicas dos compostos isolados das frações com atividade anti-helmíntica em coluna de Sephadex LH-20.

Compostos	Rf em Toluol/:AcOEt (3:7)
SFA –1	0,78
SFA-2	0,48
SFA – 3	0,67

Todos os compostos são solúveis em AcOEt e MeOH.

Não foram determinados os pontos de fusão dos compostos SFA-1 e SFA-3 uma vez que estes compostos não se encontravam puros. O composto SFA-2 purificado apresentou ponto de fusão de 206-208 °C.

### 5.6 Identificação estrutural do composto SFH-1

No espectro de <sup>1</sup>H-RMN (em Anexo) deste composto observou-se grande complexidade de sinais em campo alto, mesmo assim podemos evidenciar a presença de 2 singletes em  $\delta_H$  1,186 e  $\delta_H$  0,94 características de metilas ligadas a carbono quaternário. Identificou-se ainda um multiplete em  $\delta_H$  3,455 atribuído ao hidrogênio ligado ao mesmo carbono da hidroxila (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre o espectro  $^1\text{H}$ -RMN da literatura com o obtido pelo SFH-1, dissolvido em  $\text{CHCl}_3\text{-d}_1$

Próton	SFH-1(ppm)	$\beta$ sitosterol*(ppm)
H-3	3,46 m	3,52 m
H-6	5,29 m	5,35 m
CH <sub>3</sub> -18	0,63 s	0,68 s
CH <sub>3</sub> -19	01,19 s	1,01 s
CH <sub>3</sub> -21	0,94 d	0,92 d
CH <sub>3</sub> -26	0,84 d	0,83 d
CH <sub>3</sub> -27	0,79 d	0,81 d
CH <sub>3</sub> -29	0,77 t	0,80 t

\* FERREIRA e ASCENSO (1998).

Os deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  5,80 e  $\delta_{\text{H}}$  4,94 são típicos de hidrogênios metilênicos. O deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  5,28 foi atribuído a hidrogênio ligado a carbono insaturado.

Através da análise do  $^{13}\text{C}$ -RMN (Tabela 9) e  $^1\text{H}$ -RMN (Tabela 8) evidenciamos para o composto SFH-1 uma estrutura esteroidal. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto SFH-1 mostrou 29 sinais dos quais 4 estavam relacionados a carbonos insaturados e 1 sinal referente a carbono hidroxilado. Observamos ainda a presença de 2 sinais que atribuímos a carbonos quaternários (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  40,748,  $\delta_{\text{C}}$  138,303,  $\delta_{\text{C}}$  129,279 e  $\delta_{\text{C}}$  121,718 são sinais característicos de carbonos insaturados (Tabela 8). A presença de uma hidroxila neste composto foi confirmada pela absorção em  $\delta_{\text{C}}$  71,815.

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN mostrou absorções que permitiram confirmar que o composto SFH-1 (Tabela 6) é um esteróide. Estes valores estão de acordo com os dados encontrados na literatura para o  $\beta$ -Sitosterol (FERREIRA e ASCENSO, 1998; NES et al, 1991).

Tabela 9. Comparação entre os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN da literatura com o apresentado pelo SHF-1 Dissolvido em  $\text{CHCl}_3\text{-d}_1$

Carbonos	SFH-1 (ppm)	$\beta$ - stosterol(ppm)*.
1 - $\text{CH}_2$	37,24	37,20
2 - $\text{CH}_2$	31,65	31,60
3 - $\text{CH}$	71,80	71,80
4 - $\text{CH}_2$	42,30	42,50
5 - $\text{C}$	140,00	140,00
6 - $\text{CH}$	121,70	121,70
7 - $\text{CH}$	31,65	31,80
8 - $\text{CH}$	31,90	31,90
9 - $\text{CH}$	50,10	50,10
10 - $\text{C}$	36,14	36,50
11 - $\text{CH}_2$	21,07	21,10
12 - $\text{CH}_2$	39,70	39,70
13 - $\text{C}$	42,28	42,30
14 - $\text{CH}$	56,76	56,70
15 - $\text{CH}_2$	24,29	24,30
16 - $\text{CH}_2$	28,20	28,20
17 - $\text{CH}$	56,00	56,00
18 - $\text{CH}_3$	11,85	11,90
19 - $\text{CH}_3$	19,38	19,40
20 - $\text{CH}_3$	36,13	36,10
21 - $\text{CH}$	18,77	18,80
22 - $\text{CH}_2$	33,94	33,90
23 - $\text{CH}_2$	26,00	26,00
24 - $\text{CH}_3$	45,80	45,80
25 - $\text{CH}$	29,15	29,10
26 - $\text{CH}_3$	19,80	19,80
27 - $\text{CH}_3$	19,06	19,10
28 - $\text{CH}_2$	23,06	23,00
29 - $\text{CH}_3$	11,85	12,00

\* NES et al. (1991)

## 5.7 Identificação estrutural do composto SFA-2

### 5.7.1 Espectroscopia de $^1\text{H}$ -RMN

O espectro de prótons do composto SFA-2 (em Anexo) em  $\text{CHCl}_3\text{-d}_1$  apresenta em campo baixo sinais característicos de compostos aromáticos com *meta* a *para* substituições (Tabela 10).

O composto SFA-2 apresenta um sistema – ABX de deslocamento de prótons em anel aromático com sinais H-2 em 7,71 ppm em dubleto, H-6 em 7,58 ppm apresenta um duplo dubleto e H-5 em 6,27 ppm um dubleto. As constantes de acoplamento estão descritas na tabela 10. Observou-se também um singlete característico de metoxila ligado a anel aromático em 3,96 ppm.

Tabela 10 .Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN do SFA-2 e contantes de acoplamento

Prótons	SFA-2	
	$\delta_{\text{H}}$	J [Hz]
H-2	7,71 (d)	J[1,8]
H-5	6,27 (d)	J[8,4]
H-6	7,58 (dd)	J[8,4, 1,8]
CH <sub>3</sub> O	3,96 (s)	

Os resultados dos espectros de  $^1\text{H}$ -NMR permitem deduzir que o composto SFA-2 apresenta uma estrutura aromática e bastante simples.

Análise de  $^{13}\text{C}$ -RMN não foi realizada, pois este composto apresenta-se em pequena quantidade, impossibilitando a realização deste espectro e, conseqüentemente, a obtenção de um dado importante na determinação estrutural de qualquer composto orgânico. Apesar da ausência da análise de  $^{13}\text{C}$ -RMN foi possível a determinação estrutural deste composto, pois a espectroscopia de massas nos forneceu subsídios para isto.

## 5.7.2 Espectroscopia de massas

Os principais fragmentos do composto SAF-2 estão representados na Figura 28.

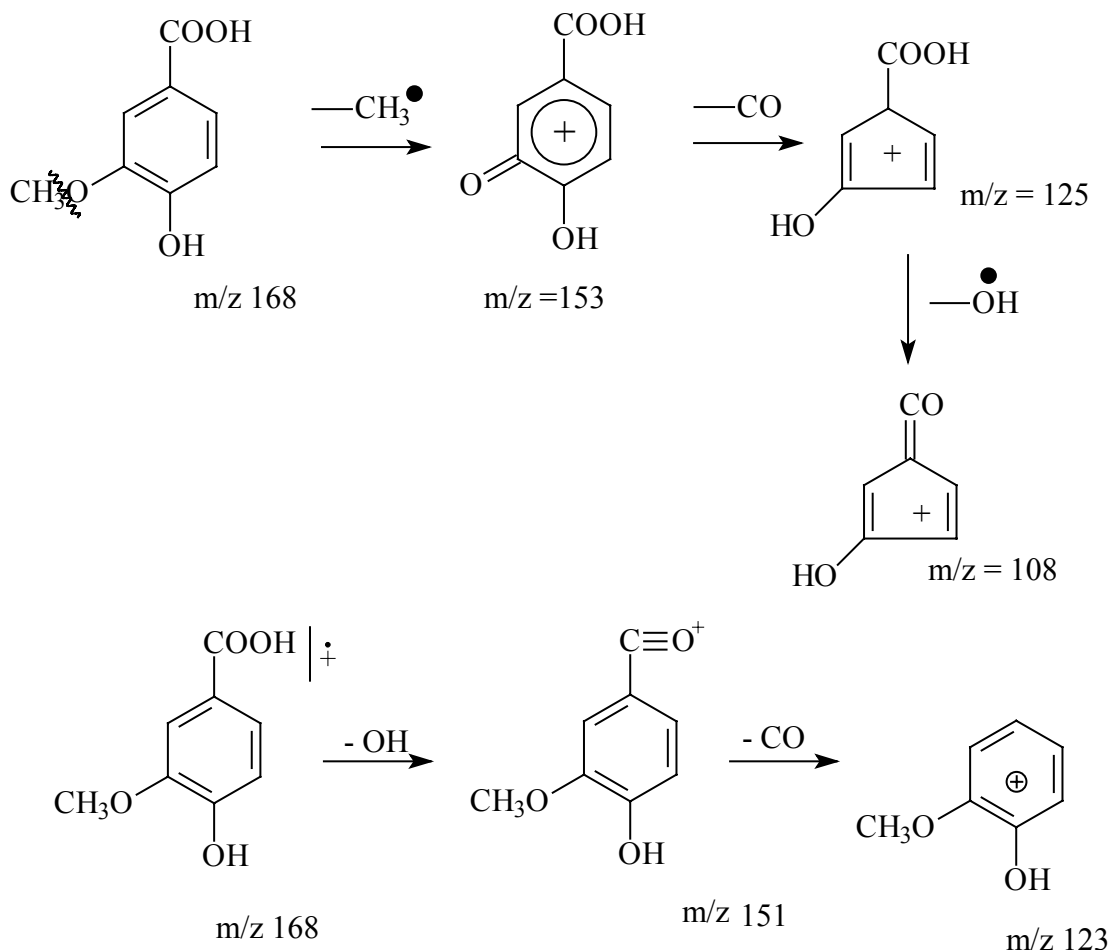


Figura 28. Modelo de fragmentação do composto SAF-2

A primeira característica de compostos ácidos aromáticos é apresentarem o pico do íon molecular intenso no espectro de massas (em Anexo) (HAMMING e FOSTER, 1972). Outro pico importante é aquele formado pela eliminação de OH ( $M - 17$ ) e o de ( $M - 45$ ) que corresponde a perda do  $-\text{COOH}$ . Observa-se a eliminação de uma molécula de água quando existe no anel um grupo contendo hidrogênio em posição orto (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Este fragmento não é observado neste composto, o que nos permite deduzir que não existe

substituinte na posição orto no anel aromático. O pico m/z 140 correspondente a perda da carbonila [M - CO] de um grupo fenólico. Outras quebras características estão representadas na Figura 27

Com base nos dados do espectro de massas confirmou-se a estrutura aromática já observada no espectro de  $^1\text{H-NMR}$  e apresentando a seguinte

**Fórmula molecular:  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$**

## 5.8 Estrutura dos compostos isolados e características

### 5.8.1 Composto SFH-1

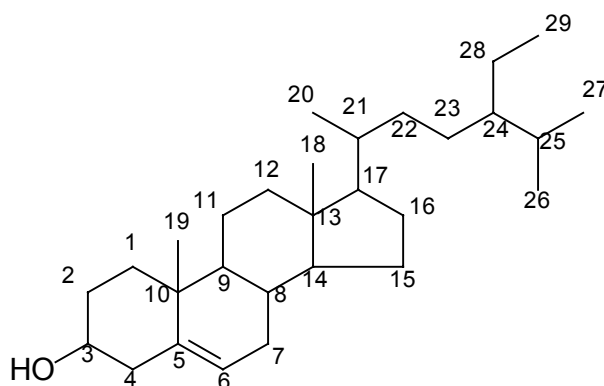


Figura 29. Estrutura do composto SFH-1.

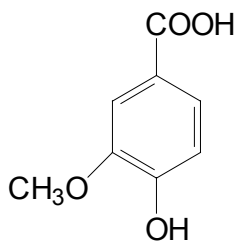
Características do composto SFH-1

#### $\beta$ -Sitosterol – [(3b)-estigmast-5-em-3-ol]

Fórmula Molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{OH}$ .

- Solubilidade:  $\text{C}_6\text{H}_{12}$
- Cristalização: AcOEt
- Cristais amorfos, brancos.
- Sistema de eluição  $\text{C}_6\text{H}_{12}:\text{AcOEt}$  (9:1)
- Ponto de fusão:  $140^\circ\text{C}$

### 5.8.2 Composto SFA-2



Ácido Vanilínico

Figura 30. Estrutura do composto SFA-2.

Características do composto SFA-2

#### **Ácido Vanilínico. [4-hidroxi-3-methoxi – ácido benzóico]**

Fórmula Molecular **C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>**.

- Solubilidade: AcOEt
- Cristalização: MeOH
- Cristais brancos.
- Sistema de eluição: AcOEt:MeOH (8:2)
- Ponto de fusão: 205°C

O isolamento do Ácido Vanilínico, derivado metoxilado do ácido benzóico na *S. flemmingiana* condiz com o trabalho de RASHID (1996), que isolou outros derivados do ácido benzóico em outra espécie da família Loganiaceae.



## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- A fração EtOH apresenta o maior rendimento 4,68 % quando comparado com os demais extratos.
- Os testes utilizados na abordagem fitoquímica indicaram a presença de esteróides, terpenos e saponinas.
- Os extratos obtidos da *S. flemmingiana* não apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos testados.
- A *Spigelia flemmingiana* apresenta atividade inibitória sobre a eclosão de ovos do *Heamonchus contortus*, o que comprova sua indicação popular como anti-helmíntico.
- Esta atividade está relacionada aos extratos C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> e AcOEt desta planta.
- Dos extratos ativos foram isolados 2 constituintes, o SFH-1 e o SFA-2.
- O composto SFH-1 trata-se do **β-sitosterol**
- O composto SFA-2 é o **Ácido Vanilínico**, derivado metoxilado do ácido benzóico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ACAR, J.F., GOLDSTEIN, F.W. Disk Suscetibility Test. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. USA. 1986: Williams e Wilkins. 2<sup>nd</sup> Edition.

ACEVEDO, et al. New phenylethanoids from *Buddleja cordata subsp cordata*. **Planta Medica**. v. 66, n. 3, p 257 – 261, abril 2000.

ACHENBACH, et al Spiganthine, the cardioactive principle of *Spigelia anthelmia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 7, p. 1092 – 1096, julho 1995.

AKHTAR, M. S. ;RIFFAT, S. Efficacy of *Melia azedarach*, Linn. (Bahain) and Morantel against naturally acquired gastrointestinal nematodes in goats. **Pakistan Veterinary Journal**. v.4, p.176-179, 1984.

AVILA, J. G. et al. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology** 66 75-78. 1999.

BATISTA, L. M. et al. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**. v.9, p.7-73, 1999.

BAUER, et al. Antibiotic Susceptibility testing by a Standardized Single Disk Method. **The American Journal of Clinical Patology**. 1966. Vol. 45(4) pp. 493-496.

CHIAPPETA, A. Estudo das Loganiaceae do estado de Pernambuco. **Tese de Mestrado do Departamento de Botânica**, CCB, UFPE, 1985.

COLES, G.C. et al.. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology** 44, 35-44. 1992.

COLES, J. C.; SIMPKIM, K. G.. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles. **Research in Veterinary Science** 22, 386-387, 1977.

CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, IBDF, vol.5 p.389.1969.

COSTA, A, F. **Farmacognosia**. v. I II e III, 2<sup>a</sup>. Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

CRAVEN, J. et al. A comparison of *in vitro* tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology** 85, 49-59, 1999.

FERREIRA, M. J. U, ASCENSO, J. R. steroids and a tetracyclic diterpene from *Euphorbia boetica*. **Phytochemistry**, 51 p 439 – 444. 1998.

HAMMING, M. C, FOSTER, N. G. **Interpretation of mass spectra of organic compounds**. New York: Academic Press, 1972.

HAMMOND, J. A., et al. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications** 21, 213-228, 1997.

HARVEY, A. L. An introduction to drugs from natural products. In: HARVEY, A. L. **Drugs from Natural Products pharmaceuticals and agrochemicals**. London: Ellis Horwood, 1999. p. 1 – 6.

HUBNER, H. et al. Minor constituents of *Spigelia anthelmia* and their cardiac activities. **Phytochemistry** 57: 285-296.2001.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico Microbiológico Médico**. J.B. Lippincott Co.,pp. 570. 1997.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A.1988.

LANS. C. et al. Medicinal plants used for dogs in trinidad an tobago. **Preventive Veterinary Medicine** 45: 201-220. 2000.

LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In PADILHA, T. (ed), EMBRAPA-CNPGL. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. 258p. p.1-52. 1996.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. v..3. 2ª edição São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1988.

LENTZ, D. L et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants **Journal of Ethnopharmacology** 63 253-263. 1998.

LIN, L. Z. et al. 19- $\alpha$ -Hydroxygelsamydine from *Gelsemium elegns*. **Phytochemistry**. v 43 n 3 723 – 726. 1996.

MARTINS , **Plantas medicinais e aromáticas**. [online] (1992). Disponível na internet via WWW.URL:<http://nutrinet.jfa.zaz.com.br/medicinais.htm>.

MELO, L. M. Atividade anti-helmítica in vitro de extratos e frações isoladas de *Spigelia antelmia*. In: **IV Senama Universitária da UECE**, Fortaleza, Anais, v. 1, 1999.

MONTANARI, C. A. e BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, Vol. 24, n. 1, 105-111, 2001.

NASCIMENTO, M. S. XIMENES, E. A. SILVA, L. L. D. Antibacterial activity of *Spigelia flemmingiana*, **Fitoterapia**, v. 69, n. 3, p. 281 –282. 1998.

NES, W. et al. Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [<sup>13</sup>C] mevalonates. **Phytochemistry**, vol. 31, n 3, 805 – 811. 1991.

NOGUEIRA, C. M. D, et al. Análises químicas em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.77, p.5-6, 1996.

PRICE, P. W. **Insect ecology**. New York, Wiley-interscience, 1984

RASHID, M. A. et al. A benzoic acid glycoside from *Geniostoma antherotrichum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p 1205 – 1027. 1996.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon** 39: 603-613. 2001.

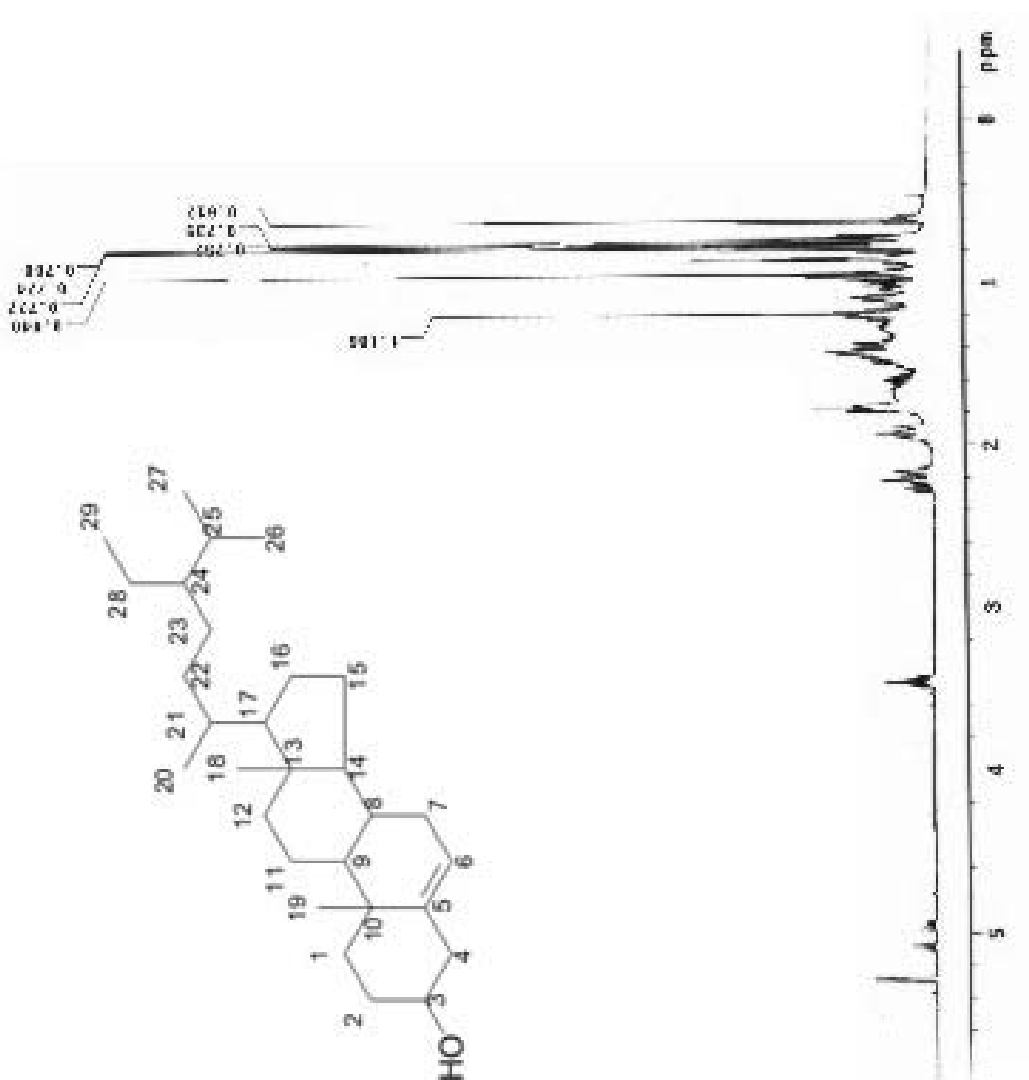
RICHTER, G. **Stoffwechselphysiologie der Pflanzen**. New York: Thieme, 1988.

SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. 5<sup>ed</sup>. Porto Alegre, Ed. da Universidade UFRGS, p. 261, 1985.

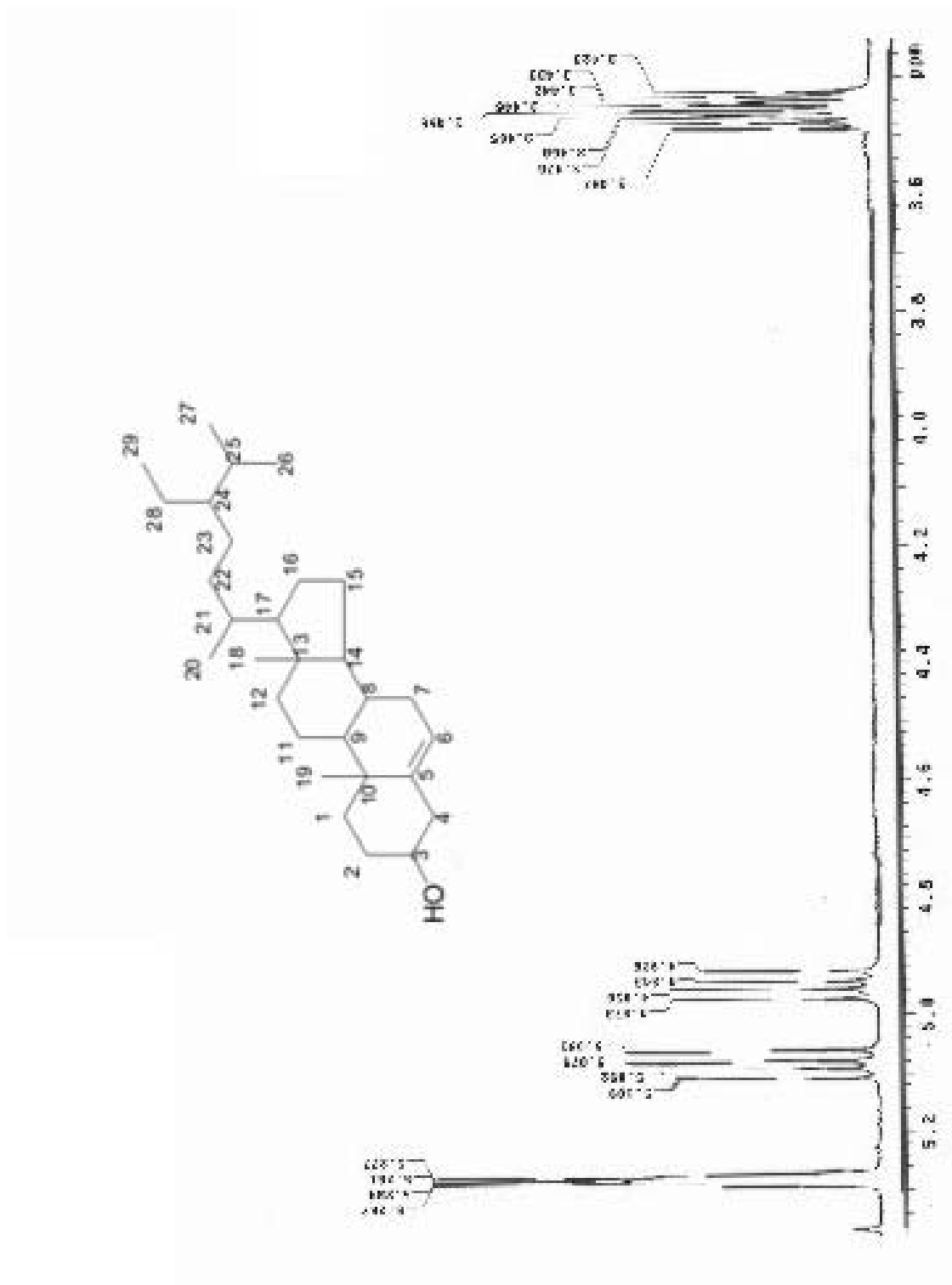
SCOTT, T., EAGLESON, M. **Concise Encyclopedia Biochemistry**. 2<sup>a</sup> edição, New York: Walter de Gruyter, 1988.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 6<sup>a</sup> edição, 2000. 456 p.

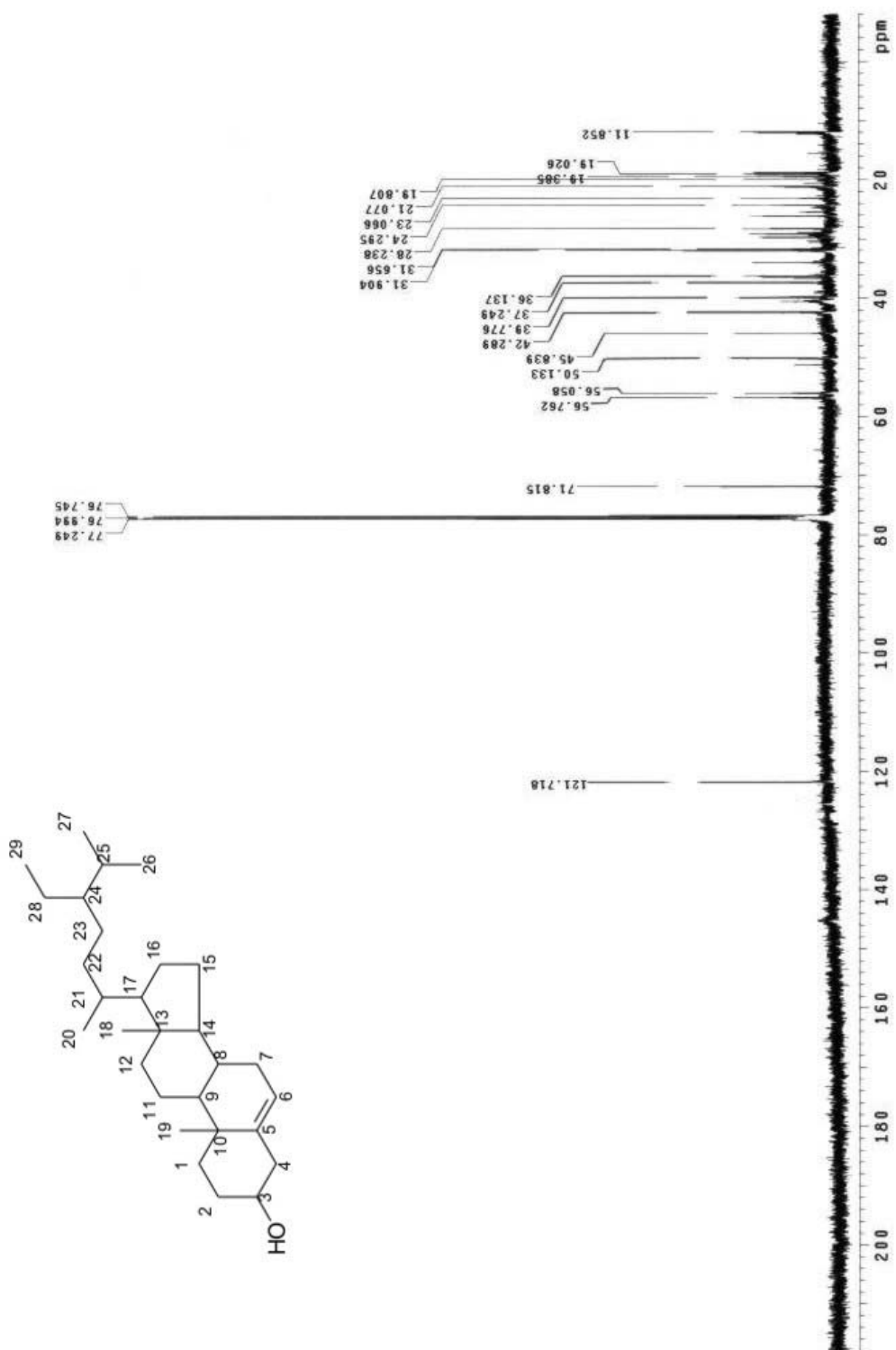
TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology** 51: 29-38.1996.



Anexo 1. Espectro de RNM – H<sup>1</sup> do composto SFH – 1.

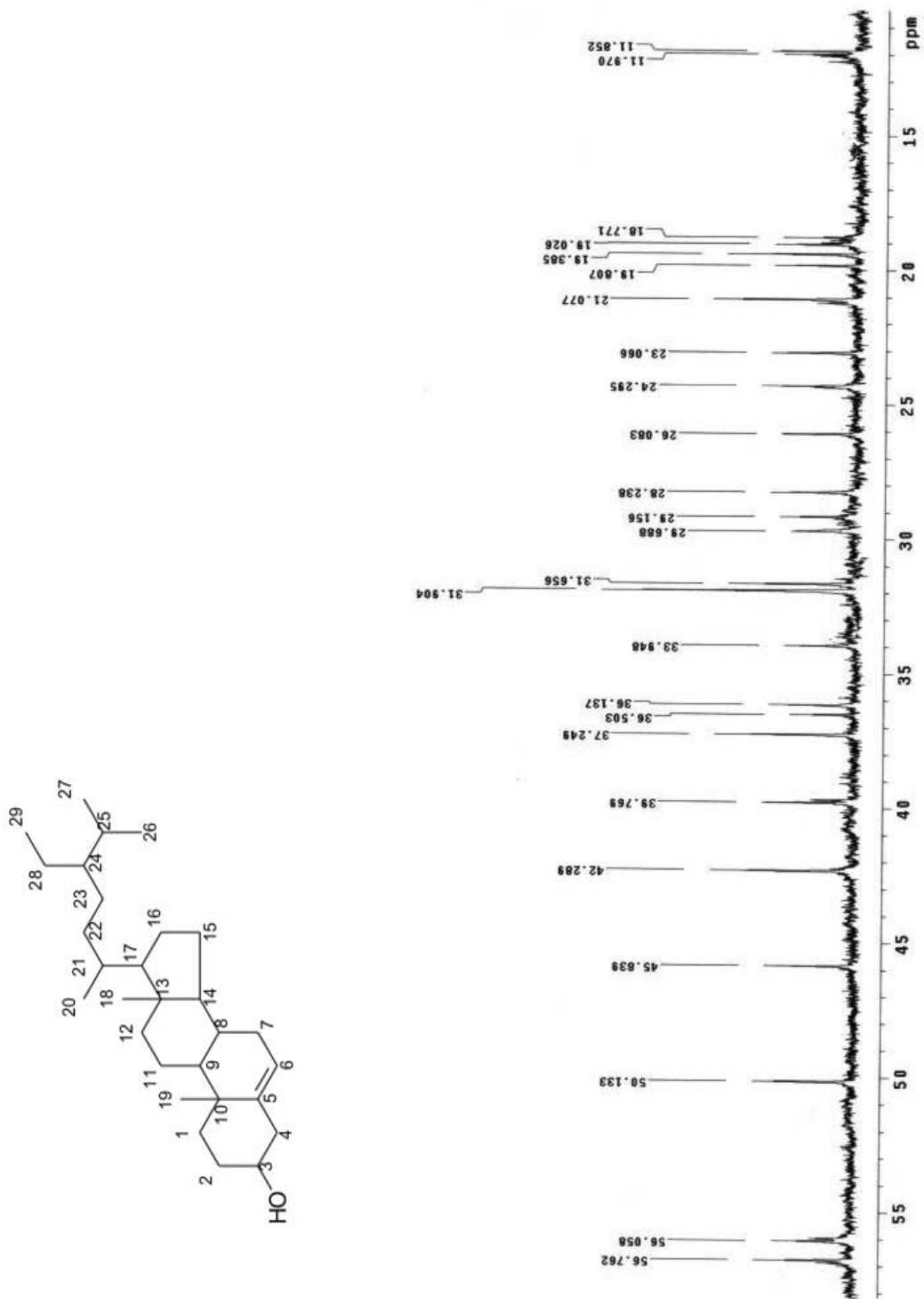


Anexo 2. Espectro de RNM –  $\text{H}^1$  do composto SFH –1.

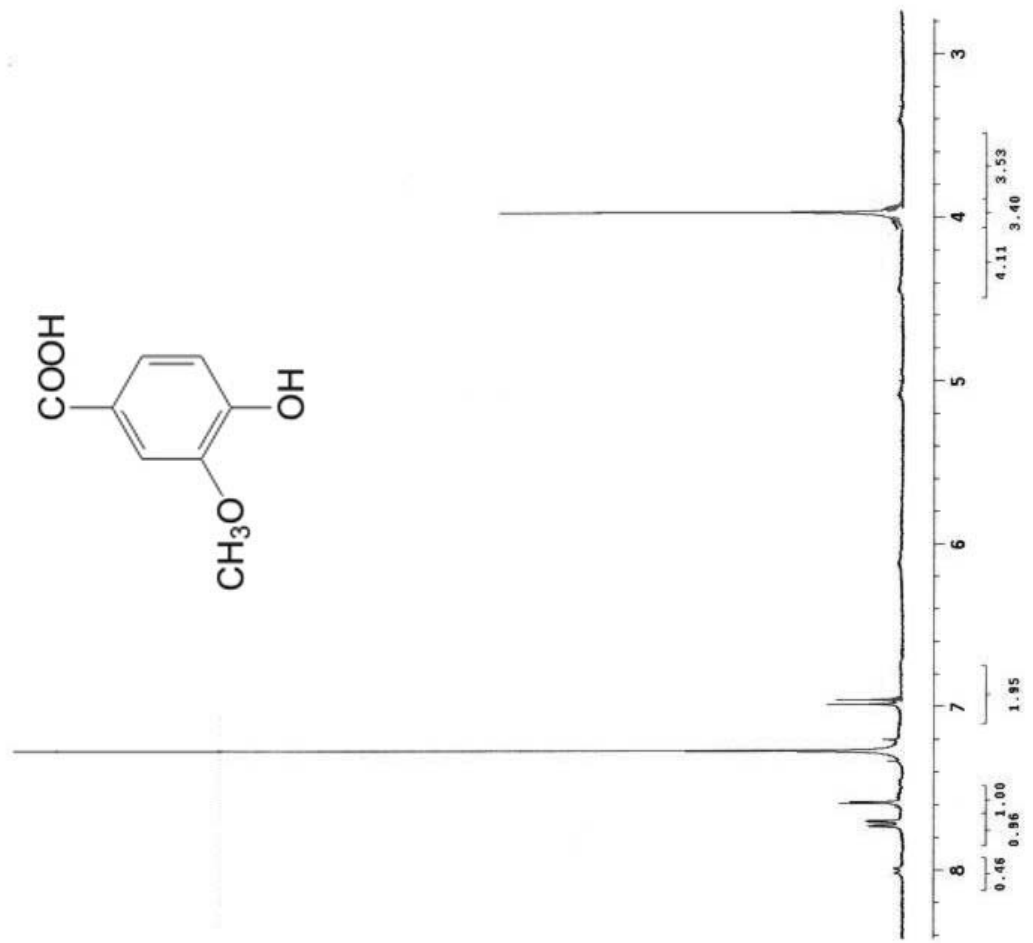


Anexo 3. Espectro de RNM – C<sup>13</sup> do composto SFH – 1.

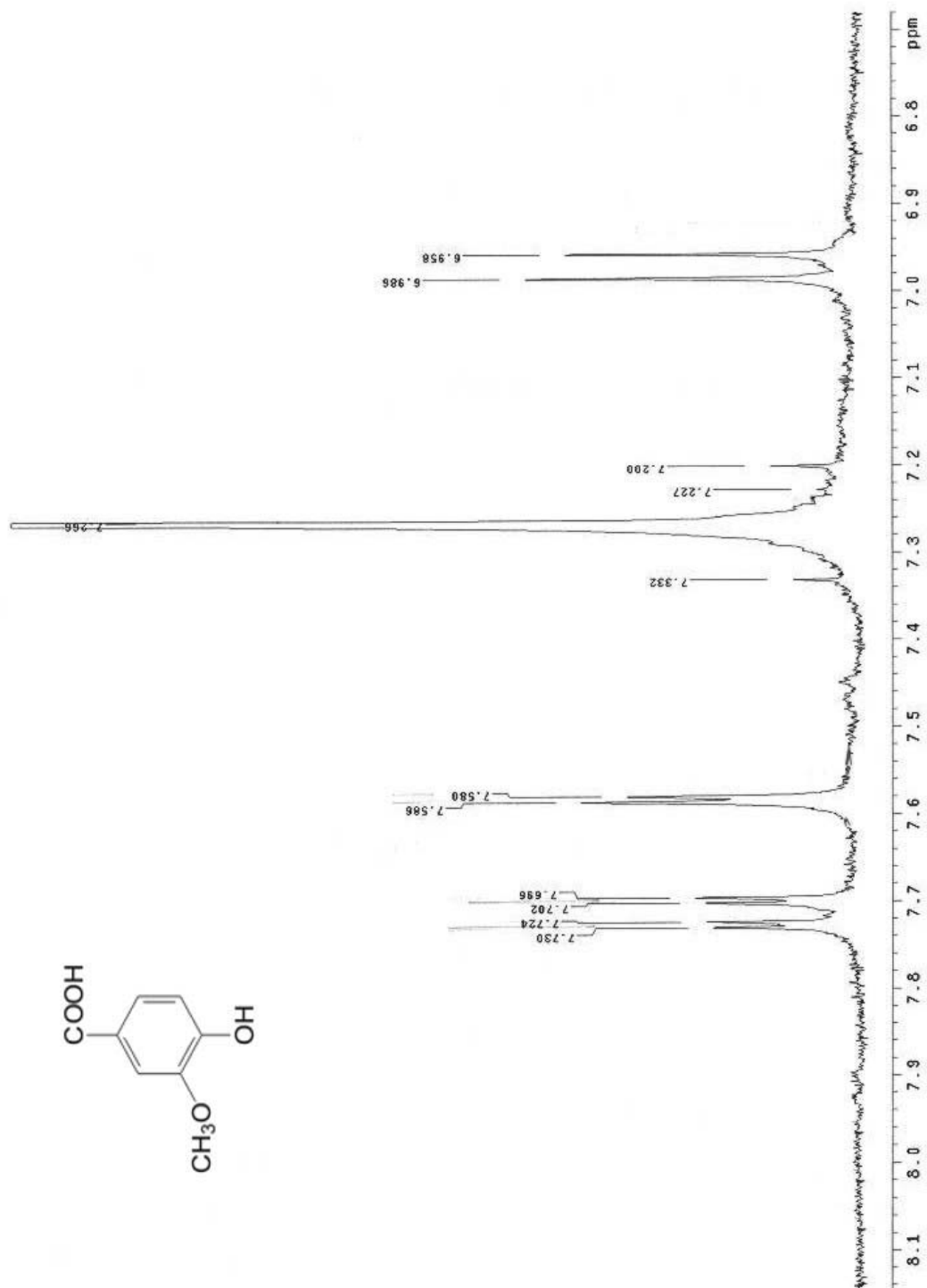




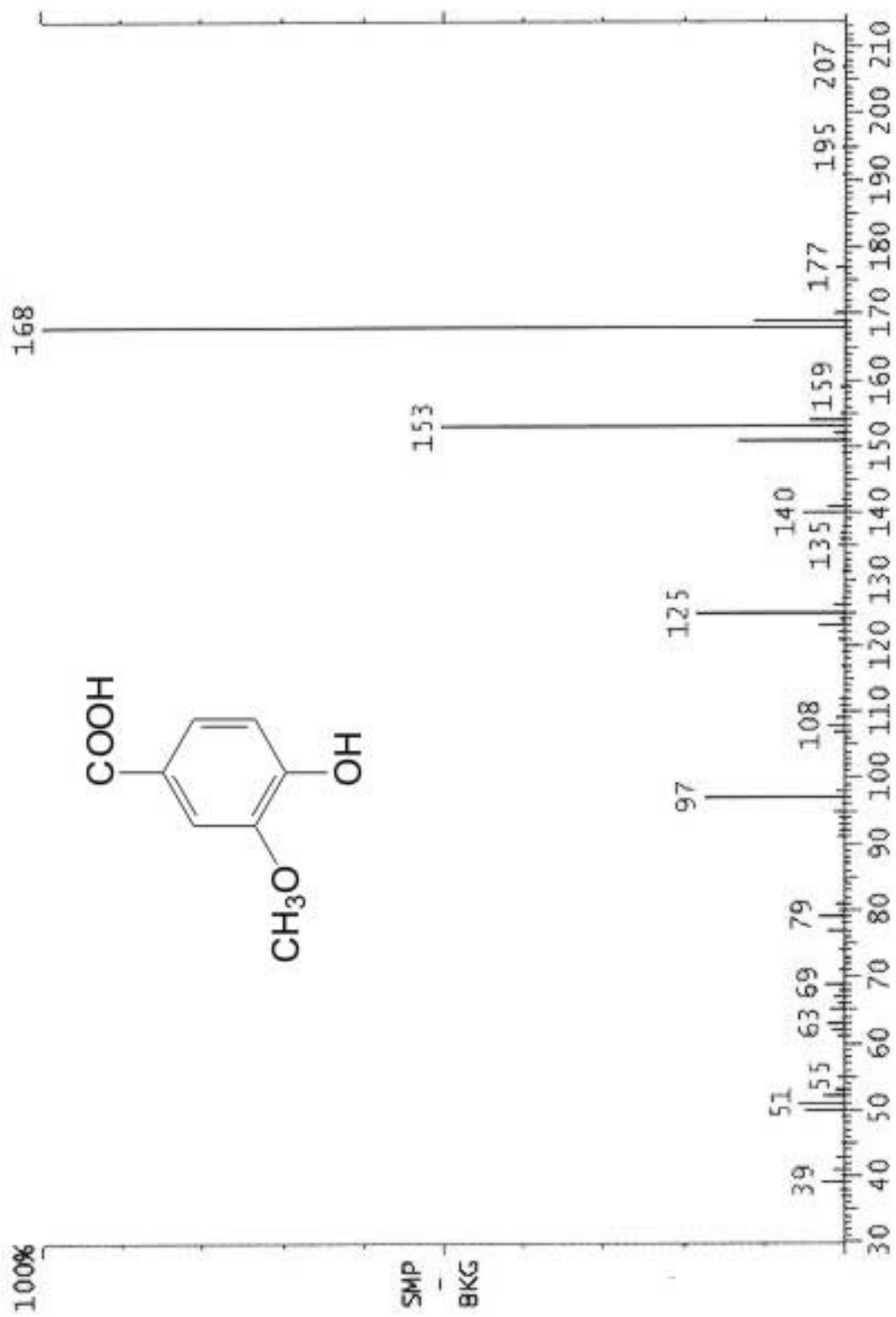
Anexo 4. Espectro de RNM – C<sup>13</sup> do composto SFH – 1.



Anexo 5. Espectro de RNM – H<sup>1</sup> do composto SFA – 2.



Anexo 6. Espectro de RNM –  $\text{H}^1$  do composto SFA –2.



Anexo 7. Espectro de massas do composto SFA -2.