



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

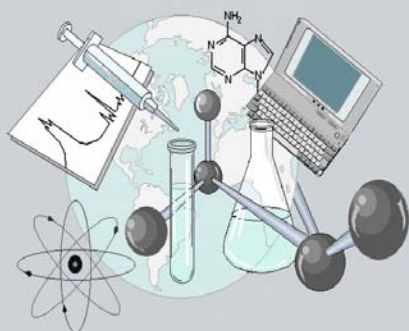
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo químico e biológico de espécies vegetais da família Boraginaceae
(Gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*)

Tese apresentada por
Janaina de Castro Marchi Medina
ao Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

CE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, OUTUBRO/2006



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Janaina de Castro Marchi Medina**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 27 de outubro de 2006.

COMISSÃO JULGADORA:

.....
Prof. Dr. Gentil José Vidotti

PRESIDENTE - DQI/UEM

.....
Prof. Dr. Ernani Abicht Basso

MEMBRO - DQI/UEM

.....
Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto

MEMBRO - DQI/UEM

.....
Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura

MEMBRO - IQ/UNICAMP

.....
Profa. Dra. Tereza Cristina Marinho Jorge

MEMBRO - UNIOESTE



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO:

**Estudo Químico e Biológico de Espécies Vegetais da Família
Boraginaceae (gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*)**

Doutoranda: Janaina de Castro Marchi Medina

Orientador: Dr. Gentil José Vidotti

2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M491e Medina, Janaina de Castro Marchi
Estudo químico e biológico de espécies vegetais da família Boraginaceae (gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*) / Janaina de Castro Marchi Medina. -- Maringá : [s.n.], 2006.
x, 129 f. : il., figs., tabs.

Inclui bibliografia.
Orientador : Prof. Dr. Gentil José Vidotti.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química, 2006.

1. Plantas - Estudos químicos. 2. Boraginaceae - Componentes - Caracterização e identificação . 3. *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* - Componentes - Caracterização e identificação. 4. *Tournefortia procumbens* Mill. - Componentes - Caracterização e identificação. 5. Alcalóides pirrolizidínicos saturados. 6. Boraginaceae - Atividade antiedematogênica. 7. Boraginaceae - Atividade antiproliferativa. I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química. II. Vidotti, Gentil José, orient. III. Título.

CDD 22.ed. 547.593

Janaina de Castro Marchi Medina

**Estudo Químico e Biológico de Espécies Vegetais da Família
Boraginaceae (gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química Aplicada do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Gentil José Vidotti

2006

*Ao José Gabriel e ao
João Pedro, com muito
amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, prestaram sua inestimável colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Professor Gentil, cujo incentivo e apoio foi determinante para realização do doutorado e que, pacientemente orientou desde o mestrado até à elaboração da presente Tese, a gratidão pelos ensinamentos generosamente partilhados, sem os quais este trabalho seria impossível, e minha sincera admiração pessoal.

À Professora Maria Helena Sarragiotto pela disponibilidade com que sempre me ajudou e pelos ensinamentos indispensáveis à realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Ernani Basso pela realização dos cálculos computacionais. Agradeço pelas avaliações biológicas aos Professores Celso e Tânia Nakamura e suas orientandas Patrícia e Telma do Departamento de Análises Clínicas, a Professora Ciomar A. B. Amado e seus orientandos Silmara, Artur e ao Jaílson do Departamento de Farmácia e Farmacologia. À Ivânia, ao Claudemir e a Cris, do Departamento de Química pela incalculável contribuição.

À Professora Conceição Torrado Truiti pelo apoio e incentivo e aos professores Maria Lucila Zamuner e Cleuza Conceição da Silva pelos ensinamentos e conhecimentos partilhados.

Aos companheiros de laboratório, Viviane, Aline, Jacqueline, Elídia, Ana Paula, Juliana Egydio, Andrelson, Adriano, Shirani, Cristiana, Telma, Keila, Letícia, Raíssa, Marcos Leite, Washington e em especial, à Tatiane, à Juliana Luna e ao Marcos que sempre me socorreram quando precisei. Às amigas do Bloco 31, Anelise, Lílian, Bárbara e Gisele.

Agradeço à Capes, pelo incentivo para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Ivo e Neuza, a quem tudo devo.

Aos meus filhos, José Gabriel e João Pedro, que são a motivação da minha vida.

Ao Miguel, com amor.

ÍNDICE ANALÍTICO

Resumo	i
Abstract	ii
Índice de figuras	iii
Índice de figuras – capítulo 1	iii
Índice de figuras – capítulo 3	iii
Índice de tabelas	v
Índice de tabelas – capítulo 1	v
Índice de tabelas – capítulo 3	v
Índice de esquemas e ilustrações	vii
Índice de esquemas – capítulo 2	vii
Índice de ilustrações – capítulo 3	vii
Lista de abreviações e símbolos	ix
CAPÍTULO 1 – Introdução e objetivos	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Dados encontrados na literatura	4
1.2.1. Dados botânicos e quimiotaxonômicos das espécies vegetais	4
1.2.2. Estudos biológicos e químicos de espécies do gênero <i>Heliotropium</i>	9
1.2.3. Estudos biológicos e químicos de espécies do gênero <i>Tournefortia</i>	22
1.3. Objetivos	24

CAPÍTULO 2 - Parte experimental	25
2.1. Materiais e métodos utilizados no estudo químico das espécies vegetais	25
2.2. Procedimentos comuns para o estudo das espécies vegetais <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i>, <i>H. procumbens</i> e <i>T. paniculata</i>	26
2.3. Estudo químico de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell	27
2.3.1. Fracionamento do extrato hexânico (Ht-H)	27
2.3.2. Fracionamento do extrato etanólico (Ht-E)	29
2.3.3. Fracionamento do extrato bruto etanólico (Ht-ET)	29
2.3.3.1. Extração ácido-base (Ht-A e Ht-B)	30
2.3.3.2. Partição de Ht-ET	33
2.4. Estudo químico de <i>Heliotropium procumbens</i> Mill	33
2.4.1. Fracionamento do extrato hexânico (Hp-H)	33
2.4.2. Fracionamento do extrato etanólico (Hp-E)	35
2.4.3. Fracionamento do extrato básico (Hp-B)	36
2.5. Estudo químico de <i>Tournefortia paniculata</i> Cham	36
2.6. Materiais e métodos utilizados nos estudos de atividades biológicas das espécies vegetais	37
2.6.1. Teste de toxicidade geral frente a <i>Artemia salina</i> Leach	37
2.6.2. Teste de atividade antiinflamatória por indução de pleurisia em rato	38
2.6.3. Teste de atividade antiinflamatória por indução de edema de orelha	40
2.6.4. Teste de atividade antiproliferativa	43
2.6.5. Teste de atividade antiviral	44
CAPÍTULO 3 - Resultados e discussão	46
3.1. Análise estrutural dos compostos isolados de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell	46
3.1.1. Análise cromatográfica de HT-I	47
3.1.2. Análise estrutural de HT-II	48
3.1.3. Análise estrutural de HT-III	53
3.1.4. Análise estrutural de HT-IV	66

3.1.5.	Análise estrutural de HT-V	67
3.1.6.	Análise estrutural de HT-VI	67
3.1.7.	Análise estrutural de HT-VII	82
3.1.8.	Análise estrutural de HT-VIII	90
3.1.9.	Análise estrutural de HT-IX	99
3.2.	Análise das frações obtidas do fracionamento dos extratos de <i>Heliotropium procumbens</i> Mill.	102
3.2.1.	Análise cromatográfica de HP-I	102
3.2.2.	Análise cromatográfica de HP-II	101
3.2.3.	Análise cromatográfica das demais frações de Hp-E	104
3.2.4.	Análise estrutural de HP-III	104
3.3.	Estudo químico de <i>Tournefortia paniculata</i> Cham.	105
3.4.	Estudo de atividades biológicas	106
3.4.1.	Estudo do teste de letalidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	106
3.4.2.	Estudo dos extratos totais de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> e <i>H. procumbens</i> sobre a pleurisia em ratos	108
3.4.3.	Estudo dos extratos totais de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> e <i>H. procumbens</i> sobre o edema de orelha em camundongos	109
3.4.3.1.	Estudo dos extratos totais de <i>H. transalpinum</i> sobre o edema de orelha em camundongos	110
3.4.3.2.	Estudo dos extratos totais de <i>H. procumbens</i> sobre o edema de orelha em camundongos	115
3.4.4.	Estudo da atividade antiproliferativa	116
3.4.5.	Estudo da atividade antiviral	117
	Conclusões	119
	Do estudo químico de espécies vegetais da família boraginaceae	119
	Do estudo das atividades biológicas das espécies vegetais	120
	Referências bibliográficas	122

Medina, J.C.M., 2006. Tese: “Estudo Químico e Biológico de Espécies Vegetais da Família Boraginaceae (gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*)” Pós-graduação em Química Aplicada, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO

Palavras-chave: Boraginaceae; *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell; *Heliotropium procumbens* Mill; *Tournefortia paniculata* Cham; alcalóides pirrolizidínicos saturados; atividade antiedematogênica, atividade antiproliferativa.

Heliotropium transalpinum var. *transalpinum* Vell, conhecida popularmente por “Borragem-branca”, *Heliotropium procumbens* Mill, “Borragem-cinzenta” e *Tournefortia paniculata* Cham, “Marmelinho”, são espécies vegetais pertencentes à família Boraginaceae e nativas da mata ciliar do Rio Paraná, no estado do Paraná – Brasil. Nessa região, as folhas da planta *H. transalpinum* var. *transalpinum* são utilizadas topicamente como cicatrizante de feridas e a decocção das folhas de *T. paniculata* como antiinflamatório renal e contra diarreia. Não foram encontrados relatos sobre o isolamento de constituintes e sobre a avaliação das atividades farmacológicas de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens*. Neste contexto, foi realizado o estudo fitoquímico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens*, onde da primeira espécie foram isolados e identificados os triterpenos β -sitosterol e α -D-glucopyranosyl-sitosterol e quatro alcalóides pirrolizidínicos saturados: 1 β -2 β -epóxi-1 α -hidróximetil-8 α -pirrolizidina (**1**) (subulacina), 1 α -2 α -epóxi-1 β -hidróximetil-8 α -pirrolizidina (**47**), N-óxido de 1 β -2 β -epóxi-1 α -hidróximetil-8 α -pirrolizidina (**48**) (subulacina N-óxido), 1 β -2 β -dihidróxi-1 α -hidróximetil-8 α -pirrolizidina (**49**). Destes alcalóides, **48** e **49** são inéditos. Do alcalóide **1** já está relatado na literatura pelo isolamento de outra espécie do gênero *Heliotropium* e, o alcalóide **47** encontra-se descrito na literatura como resultado de síntese orgânica juntamente com **1**. Também foi caracterizada, por experimentos de CG-EM, uma série de ésteres graxos metílicos. Do estudo de *H. procumbens* identificou-se os triterpenos, β -sitosterol e estigmasterol, e caracterizou-se, por CG-EM, duas séries de ésteres graxos, uma delas aminada. Uma comparação dos componentes da espécie *T. paniculata* foi feita com os de *H. transalpinum* var. *transalpinum* por experimentos CG-EM. Os extratos e frações foram submetidos a ensaios biológicos para avaliação das atividades: a) antiinflamatória – modelo pleurisia em ratos, b) antiinflamatória – edematogênica em orelhas de camundongos, c) antiviral – vírus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), d) antiproliferativa – células de câncer colo retal humano (HCT-116), e) letalidade frente à *Artemia salina* Leach. Os alcalóides isolados foram submetidos às avaliações: antiviral – (HSV-1) e antiproliferativa – (HCT-116). O resultado da avaliação da atividade antiinflamatória – modelo pleurisia e antiviral contra HSV-1 não foram significativos. Os extratos brutos de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e de *H. procumbens* apresentaram atividade antiproliferativa significativa mas os alcalóides isolados não. O resultado do teste de letalidade frente à *Artemia salina* foi significativo para todos os extratos e das frações de *H. transalpinum* var. *transalpinum* os mais letais foram as frações de hexano e acetato de etila, resultado que pode ser associado a uma avaliação antibacteriana realizada em estudo anterior que também demonstrou maior atividade bacteriostática nestas frações. Nos extratos etanólico e alcaloídico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e no extrato etanólico de *H. procumbens* o efeito inibitório de edema foi significativo, com respectivamente 31%, 41% e 24% de inibição. Em todas as frações obtidas por partição de *H. transalpinum* var. *transalpinum* houve inibição significativa de edema mas os resultados foram menos significativos que no extrato bruto, indicando que há sinergismo entre os componentes das frações. O resultado da atividade antiedematogênica, modelo para atividade antiinflamatória tópica, e da atividade antibacteriana demonstrou importância etnofarmacológica, justificando o uso destas espécies na medicina popular para o tratamento de feridas.

Medina, J.C.M., 2006. Tese: “Estudo Químico e Biológico de Espécies Vegetais da Família Boraginaceae (gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*)” Pós-graduação em Química Aplicada, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá.

ABSTRACT

Keywords: Boraginaceae; *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell; *Heliotropium procumbens* Mill; *Tournefortia paniculata* Cham; pyrrolizidine alkaloids; anti-inflammatory, and antiproliferative activity.

Heliotropium transalpinum var. *transalpinum* Vell, popularly known as “Borragem-branca”, *Heliotropium procumbens* Mill, “Borragem-cinzenta” e *Tournefortia paniculata* Cham, “Marmelinho”, are plants species belonging to Boraginaceae family and native from Paraná’s river bordering forest, Paraná state – Brazil. In this section, the *H. transalpinum* var. *transalpinum* leaves are topically employed as wound healing and the leaf tea of *T. paniculata* is used on folk medicine as kidney anti-inflammatory and against diarrhea. There was no report about components isolation and the evaluation of biological or pharmacological activities of *H. transalpinum* var. *transalpinum* and *H. procumbens*. In this context, we had made the phytochemical investigation of *H. transalpinum* var. *transalpinum* and *H. procumbens*, which on the first species the triterpenes β -sitosterol and α -D-glucopiranosyl-sitosterol was separated and identified and six saturated pyrrolizidine alkaloids: 1 β -2 β -epoxy-1 α -hydroxymethyl-8 α -pyrrolizidine (**1**) (subulacine), 1 α -2 α -epoxy-1 β -hydroxymethyl-8 α -pyrrolizidine (**47**), 1 β -2 β -epoxy-1 α -hydroxymethyl-8 α -pyrrolizidine N-oxide (**48**) (subulacine N-oxide) e 1 β -2 β -dihydroxi-1 α -hydroxymethyl-8 α -pyrrolizidine (**49**). About the alkaloids, **48** and **49** are unpublished. The alkaloid **1** have the isolation already been reported from other specie of *Heliotropium* genus and alkaloid **47** is reported like product of organic synthesis along with **1**. We also describe with CG-MS experiments a methylic fatty esters series. From *H. procumbens* was separated a triterpene compound, identified like β -sitosterol and stigmasterol, and two fatty esters series was characterized by CG-MS one of them holding within amine groups. A comparison by CG-MS of the *T. paniculata* components had been made with those known in *H. transalpinum* var. *transalpinum*. The biological activities evaluated was: a) anti-inflammatory – pleurisy model in Wistar rats, b) anti-inflammatory – *croton* oil-induced ear edema in Swiss mice, c) antiviral screening – virus *Herpes simplex* type 1 (HSI-1), d) antiproliferative for colorectal human cancer (HCT-116) and e) *Artemia salina* Leach. lethality assays. The results of anti-inflammatory, on pleurisy model, and antiviral (HSV-1) evaluations did not exhibit expressive values. The *H. transalpinum* var. *transalpinum* and *H. procumbens* crude extracts showed significant antiproliferative activity but the isolated alkaloids did not. *Artemia salina* lethality assays were expressive for all *H. transalpinum* var. *transalpinum* extracts and fractions. The hexanic and ethyl acetate fractions showed the best lethality and these could be associated a bactericidal evaluation made previously that exhibited better bactericidal activities and bacterial inhibition on these fractions. On the ethanolic and alkaloidal extract of *H. transalpinum* var. *transalpinum* and on the ethanolic extract of *H. procumbens* the edema inhibitory effect had significative values, respectively 31%, 41% e 24%. All the *H. transalpinum* var. *transalpinum* fractions showed expressive edema inhibitory effect but these results were less significant than those presented to crude extract, indicating there were synergic effects within fraction components. The edema inhibitory effect, topical anti-inflammatory activity model, and antibacterial activity proved ethnopharmacology importance and support the local utilization of the species as wound healing.

Índice de Figuras – Capítulo 1

Figura 1.1.	Foto da espécie vegetal <i>H. transalpinum</i> var <i>transalpinum</i> Vell. e desenho da espécie de 1965	7
Figura 1.2.	Fotos da espécie vegetal <i>H. procumbens</i> Mill.	8
Figura 1.3.	Foto da espécie vegetal <i>T. paniculata</i> Cham.	8

Índice de Figuras – Capítulo 3

Figura 3.1.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CDCl_3) de HT-I	49
Figura 3.2.	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT, 75,5 MHz/ CDCl_3) de HT-I	50
Figura 3.3.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CDCl_3) de HT-II	51
Figura 3.4.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CDCl_3) de HT-III	60
Figura 3.5.	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT, 75,5 MHz/ CDCl_3) de HT-III	61
Figura 3.6.	Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CDCl_3 de HT-III	62
Figura 3.7.	Mapa de contorno de RMN 2D $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ (HMQC), 75,5 MHz/ CDCl_3 de HT-III	63
Figura 3.8.	Mapa de contorno de RMN 2D $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ (HMBC), 75,5 MHz/ CDCl_3 de HT-III	64
Figura 3.9.	Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (NOESY), em CDCl_3 de HT-III	65
Figura 3.10.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CD_3OD) de HT-VI	76
Figura 3.11.	Espectro de RMN de ^{13}C / DEPT (75,5 MHz/ CD_3OD) de HT-VI	77

Figura 3.12.	Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CD_3OD de HT-VI	78
Figura 3.13.	Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMQC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VI	79
Figura 3.14.	Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VI	80
Figura 3.15.	Espectros de RMN de ^1H (NOE diferencial), 300,06 MHz/ CD_3OD de HT-VI . Irradiando δ 4,31 e 4,59	81
Figura 3.16.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CD_3OD) de HT-VII	85
Figura 3.17.	Espectro de RMN de ^{13}C / DEPT (75,5 MHz/ CD_3OD) de HT-VII	86
Figura 3.18.	Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CD_3OD de HT-VII	87
Figura 3.19.	Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMQC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VII	88
Figura 3.20.	Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VII	89
Figura 3.21.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CD_3OD) de HT-VIII	93
Figura 3.22.	Espectro de RMN de ^{13}C / DEPT (75,5 MHz/ CD_3OD) de HT-VIII	94
Figura 3.23.	Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CD_3OD de HT-VIII	95
Figura 3.24.	Mapa de contorno de RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMQC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VIII	96
Figura 3.25.	Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VIII	97
Figura 3.26.	Espectros de RMN de ^1H (NOE diferencial), 300,06 MHz/ CD_3OD de HT-VIII . Irradiando δ 4,81 e 3,99	98
Figura 3.27.	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CHCl_3) de HT-IX	100
Figura 3.28.	Espectro de RMN de ^{13}C / DEPT (75,5 MHz/ CHCl_3) de HT-IX	101

Índice de Tabelas – Capítulo 1

Tabela 1.1.	Classificação botânica das espécies estudadas, segundo Cronquist	5
Tabela 1.2.	Classificação botânica das espécies estudadas, segundo Joly	5

Índice de Tabelas – Capítulo 3

Tabela 3.1.	Ésteres metílicos caracterizados através de dados extraídos da cromatografia de HT-I por CG-EM	47
Tabela 3.2.	Dados de RMN de ^{13}C de HT-II e de sitosterol glicosilado	52
Tabela 3.3.	Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de HT-III e de 1	55
Tabela 3.4.	Correlações homonucleares de RMN 2D (COSY) e heteronucleares (HMBC) de HT-III	56
Tabela 3.5.	Correlações verificadas no mapa de contorno de RMN de ^1H (NOESY) de HT-III	58
Tabela 3.6.	Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de HT-VI e da subulacina	68
Tabela 3.7.	Correlações homonucleares de RMN 2D (COSY) e heteronucleares (HMBC) de HT-VI	70
Tabela 3.8.	Dados de deslocamentos de RMN de ^{13}C de 54 e de 55	71
Tabela 3.9.	Dados estruturais e momento de dipolo para os alcalóides	73
Tabela 3.10.	Energia de interação (Kcal/mol) entre orbitais doadores e aceptores obtidas pela análise de NBO	74
Tabela 3.11.	Dados de deslocamentos de RMN ^1H e de ^{13}C de HT-VII e de 1	83

Tabela 3.12.	Correlações homonucleares de RMN 2D (COSY) de HT-VII	84
Tabela 3.13.	Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de HT-VIII e de 54	92
Tabela 3.14.	Ésters etílicos caracterizados através de CG-EM de HP-I	103
Tabela 3.15.	Ésteres aminados caracterizados através de CG-EM de HP-I	103
Tabela 3.16.	Ésteres etílicos caracterizados através de CG-EM de HP-II	104
Tabela 3.17.	Dados de atividade frente a <i>A. salina</i> para os extratos de <i>Heliotropium procumbens</i> Mill.	106
Tabela 3.18.	Dados de atividade frente a <i>A. salina</i> para os extratos de <i>Heliotropium transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell	107
Tabela 3.19.	Efeito dos extratos etanólicos de <i>Heliotropium procumbens</i> e <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> (volume de exsudato pleural e migração de leucócitos) em pleurisia induzida por carragenina (Cg) em ratos	109
Tabela 3.20.	Efeito da aplicação tópica do extrato etanólico total de <i>Heliotropinum transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> em edema de orelha induzida por óleo de <i>Cróton</i> (porcentagem de inibição de edema)	111
Tabela 3.21.	Efeito da aplicação tópica (porcentagem de inibição) das frações de <i>Heliotropinum transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> em edema de orelha induzida por óleo de <i>Croton</i> (Acetona/água 7:3)	112
Tabela 3.22.	Efeito da aplicação tópica (porcentagem de inibição) da fração Ht-B-1 de <i>Heliotropinum transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> em edema de orelha induzida por óleo de <i>Croton</i> (clorofórmio/água 7:3)	113
Tabela 3.23.	Efeito da aplicação tópica (porcentagem de inibição) do extrato total de <i>Heliotropinum procumbens</i> em edema de orelha (acetona/água 7:3)	115
Tabela 3.24.	Dados de atividade antiproliferativa verificada em células HCT-116	116

Índice de Esquemas – Capítulo 2

Esquema 2.1. Esquema do procedimento experimental geral empregado para o isolamento de substâncias dos extratos hexânico e etanólico de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell (1ª coleta)	28
Esquema 2.2. Procedimento experimental geral de extração ácido-base empregado no isolamento de substâncias de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell (2ª coleta)	32
Esquema 2.3. Esquema geral da partição em solventes de <i>Heliotropium transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell (2ª. coleta)	33
Esquema 2.4. Esquema do procedimento experimental geral empregado para o isolamento de substâncias dos extratos hexânico, etanólico e básico de <i>H. procumbens</i> Mill	34
Esquema 2.5. Esquema da seqüência utilizada na avaliação de atividade antiinflamatória – pleurisia	39
Esquema 2.6. Esquema da seqüência utilizada na avaliação de atividade antiinflamatória – edema de orelha	41

Índice de Ilustrações – Capítulo 3

Ilustração 3.1. Representação da conformação de mais baixa energia adotada pela molécula do alcalóide subulacina	59
Ilustração 3.2. Representação da conformação de mais baixa energia adotada pela molécula do alcalóide 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina	72
Ilustração 3.3. Estruturas otimizadas (B3LYP/cc-pvdz) para os alcalóides subulacina e 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina	73

Ilustração 3.4. Interação repulsiva entre os pares de elétrons livre do nitrogênio e do oxigênio para subulacina e 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina	75
Ilustração 3.5. Gráfico da avaliação da aplicação tópica do extrato etanólico de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> em edema de orelha	111
Ilustração 3.6. Gráfico da avaliação da aplicação tópica da fração Ht-B-1 de <i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> em edema de orelha induzida por óleo de <i>Cróton</i> (clorofórmio/água 7:3)	113
Ilustração 3.7. Gráfico da avaliação da aplicação tópica do extrato etanólico de <i>H. procumbens</i> em edema de orelha induzida por óleo de <i>Cróton</i>	114

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento Químico
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia gasosa
CMI	Concentração mínima inibitória
CMF	Concentração mínima bactericida
COSY	H-H Correlation spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (meio de cultura)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
m/z	Relação massa/carga
MHz	Megahertz

NOE	Nuclear overhauser effect
PBS	Tampão fosfato de solução salina
Ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	singleto
SBF	Soro fetal bovino
SRB	Sulforodamida B
TCID	Tissue Culture Infectious Dosis
TPP	Marca de frascos descartáveis utilizado na cultura de células

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Considerações gerais

O estudo dos constituintes químicos e das atividades biológicas de espécies vegetais, há tempos ocupa espaço relevante em pesquisas científicas. Seja pelo simples conhecimento das estruturas das substâncias envolvidas na ação medicamentosa das plantas, seja para fazer modificações nas estruturas com intenção de adequar as atividades biológicas aos interesses da pesquisa.

A utilização de plantas na cura das enfermidades tem existido desde as origens da humanidade e foi associado a práticas rituais ou mágicas, das quais se reconhecem vestígios até hoje. O desuso da fitoterapia nos séculos XVIII e XIX deu-se paralelamente ao progresso da medicina e da química. As plantas que perduraram até hoje são aquelas para as quais não se encontraram ainda substitutos sintéticos.

A fitoterapia que temos hoje tem a característica de “retorno ao natural” e ao ecologicamente correto que se infiltraram nas áreas de medicina, farmácia, nutrição e cosmética com auxílio da mídia. De maneira indireta este tipo de cultura desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, por exemplo, a botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte de medicina natural: a flora mundial. ¹

Estima-se que medicamentos fitoterápicos movimentam cerca de US\$ 260 milhões por ano no nosso País ² e dados de literatura indicam que, em 1980, os consumidores dos Estados Unidos gastaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos. Em relação ao mercado mundial aproximadamente 80% das pessoas utilizam plantas para curar enfermidades. ³

A seleção etnofarmacológica, que é a escolha da planta de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico, favorece com maior probabilidade a descoberta das substâncias bioativas. O estudo do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico se traduz em economia de tempo e dinheiro, dois dos fatores mais perseguidos pelas economias ocidentais. ¹

A avaliação do potencial terapêutico das plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas etc., tem sido objeto de estudos, que comprovaram suas ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas plantas têm grande possibilidade de virem a ser aproveitadas como agente medicinal. ³

Para o uso correto das plantas como medicamento fitoterápico, se faz necessário o conhecimento das estruturas dos compostos envolvidos na(s) atividade(s) que elas possuem e o descobrimento da(s) substância(s) bioativa(s) que podem levar ao substituto sintético. Ainda, merecem destaque, neste tipo de pesquisa, as modificações estruturais que podem ser feitas nas substâncias isoladas para a quantificação e melhoramento dessa(s) atividade(s).

Heliotropium transalpinum var. *transalpinum* Vell, *Heliotropium procumbens* Mill e *Tournefortia paniculata* Cham são plantas pertencentes à família Boraginaceae e com poucos relatos de estudos fitoquímicos e biológicos reportados em literatura.

Para a realização do presente estudo, as espécies foram selecionadas correlacionando sua ocorrência na planície de inundação do alto rio Paraná, área de preservação ecológica do estado do Paraná. Este trabalho, portanto, faz parte de um estudo maior, multidisciplinar, de pesquisadores das áreas de biologia, química, farmácia e geografia da Universidade Estadual de Maringá.

A família Boraginaceae, se caracteriza quimicamente pela presença de alcalóides do tipo pirrolizidínico, considerados marcadores quimiotaxonômicos de determinados gêneros. Uma das espécies de maior distribuição na região é a espécie *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell, conhecida por boragem branca, é muito utilizada pela população local como cicatrizante.

A espécie *H. procumbens* Mill, conhecida por boragem cinzenta, aparece esporadicamente na região, geralmente depois de enchentes, e não existem relatos de estudos químicos desta espécie na literatura.

Tournefortia paniculata Cham., conhecida vulgarmente por marmelinho, é conhecida e utilizada por sua atividade antiinflamatória sistêmica, fitoterápicos desta em associações com outras plantas já são conhecidas, mas, pouco estudo fitoquímico foi apresentado até o momento.

O estudo destas espécies foi feito com intuito de complementar e enriquecer os estudos fitoquímicos e farmacológicos investigando os usos na medicina popular (etnobotânica), bem como realizando o isolamento, purificação e identificação dos constituintes potencialmente bioativos. Tem-se também o interesse no estudo quimiotaxonômico, isto é, isolar e identificar compostos considerados marcadores e que ajudam a classificar as espécies nas famílias, gêneros, subgêneros, etc.

1.2. Dados encontrados na literatura

1.2.1. Dados botânicos e quimiotaxonômicos das espécies vegetais

A família Boraginaceae possui mais de 100 gêneros, estes com mais de 2000 espécies que se encontram distribuídas por todo mundo e, são especialmente bem desenvolvidas na região mediterrânea, no oeste da América do Norte e no oeste da Ásia. Os gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*, juntamente com o gênero *Cordia*, são os mais numerosos e, cada um deles compreende mais de 200 espécies distribuídas em regiões tropicais e temperadas do globo. ⁴

As boragináceas se caracterizam morfológicamente como ervas ou arbustos, raramente árvores, que possuem grande parte da sua superfície coberta de pêlos (tricomas).⁵ As espécies do gênero *Tournefortia* têm característica subarbusciva e do gênero *Heliotropium* são ervas perenes ou anuais. No Brasil, estes últimos, possuem área de dispersão que compreende o sul da Bahia ao Rio Grande do Sul, sendo encontrada também na Bolívia, Paraguai e Argentina. ⁶

Tabela 1.1: Classificação botânica das espécies estudadas, segundo Cronquist.⁴

	<i>Heliotropium procumbens</i> Mill	<i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell	<i>Tournefortia paniculata</i> Cham
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae	Asteridae	Asteridae
Ordem	Hamiales	Hamiales	Hamiales
Família	Boraginaceae	Boraginaceae	Boraginaceae
Subfamília	Heliotropiaceae	Heliotropiaceae	Heliotropiaceae
Gênero	<i>Heliotropium</i>	<i>Heliotropium</i>	<i>Tournefortia</i>
Espécie	<i>H. procumbens</i>	<i>H. transalpinum</i>	<i>T. paniculata</i>
Variedade	-	<i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i>	-

Tabela 1.2: Classificação botânica das espécies estudadas, segundo Joly.⁷

	<i>Heliotropium procumbens</i> Mill	<i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell	<i>Tournefortia paniculata</i> Cham
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoeae	Dicotyledoeae	Dicotyledoeae
Subclasse	Sympetalae (Gamopetalae)	Sympetalae (Gamopetalae)	Sympetalae (Gamopetalae)
Ordem	Tubiflorae	Tubiflorae	Tubiflorae
Família	Boraginaceae	Boraginaceae	Boraginaceae
Subfamília	Heliotropiaceae	Heliotropiaceae	Heliotropiaceae
Gênero	<i>Heliotropium</i>	<i>Heliotropium</i>	<i>Tournefortia</i>
Espécie	<i>H. procumbens</i>	<i>H. transalpinum</i>	<i>T. paniculata</i>
Variedade	-	<i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i>	-

Os estudos químicos e quimiotaxonômicos com espécies do gênero *Heliotropium* evidenciam alcalóides pirrolizidínicos como principais constituintes.⁴ Nas espécies do gênero *Tournefortia* estudos químicos reportam em sua maioria relatos de isolamento de compostos fenólicos.⁸

Alcalóides pirrolizidínicos (APs) são metabólitos secundários produzidos por muitas espécies de plantas e, são considerados como marcadores quimiotaxonômicos de quase todos os gêneros da família Boraginaceae (*Heliotropium*, *Shymphytum* e outros), em alguns gêneros da família Asteraceae (*Senecio*, *Eupatorium*), esporadicamente nas famílias Convolvulaceae, Orchidaceae, Poaceae e Apocinaceae, isoladamente no gênero *Crotalaria* e na subtribo Fabaceae da família Leguminosae.^{9 10}

Pesquisas fitoquímicas e de atividades biológicas e farmacológicas com espécies de Boragináceas mostram além dos APs outras classes de compostos como flavonóides, terpenos, benzenóides e outras. As atividades mais comuns testadas destas espécies foram as atividades: antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, antioxidante e, recentemente, estes têm sido usados em pesquisas antitumorais com sucesso.¹¹

Algumas espécies vegetais da família Boraginaceae são tidas como ervas daninhas e são conhecidas por casos de intoxicação de animais em pastagens. Alguns autores relacionam os efeitos tóxicos destas plantas, que na maioria das vezes causa danos ao fígado por efeitos carcinogênicos e mutagênicos com os APs 1,2-insaturados presente nessas espécies.^{12, 13, 26}

Espécies do gênero *Heliotropium* e *Tournefortia* e seus alcalóides pirrolizínicos (APs) estão envolvidos com estratégias de defesa de vários insetos. Entre eles algumas espécies de insetos (geralmente borboletas) dos gêneros *Danaid*, *Arctiid*, *Itomiine*, *Utheisa* e *Lepidopterans* foram estudadas e verificou-se que durante o estágio de larva estes se alimentam das boragináceas dos gêneros: *Heliotropium*, *Tournefortia*, *Messerschmidia*, *Myasotis*, *Bothriospermum*, *Echium* e *Trichodesma*. Os APs ficam retidos nos insetos por

todo tempo de metamorfose até o estágio de adulto. Esses alcalóides acumulados servem de repelente para os predadores destes insetos. ^{14, 15}

Estudos recentes também relatam a presença de APs no mel, contaminados por abelhas que usam néctar de flores de boragináceas, onde *Heliotropium*, *Echium* e *Eucryphia* são os gêneros mais comuns. ¹⁶ Também existem relatos da presença de APs oriundos de plantas no leite, uma vez que estas plantas são comumente encontradas em pastagens. ¹² Com base em estudos toxicológicos, países como a Alemanha (pela German Federal health Bureau), Holanda, Austrália e Nova Zelândia (pela Food Standards Australia New Zealand – FSANZ) estabeleceram para estes alimentos o limite de exposição de 1µg de APs/Kg peso/dia. ¹⁷



Figura 1.1: Foto da espécie vegetal *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell. e desenho da espécie de 1965 (arquivo herbário HUM).



Figura 1.2: Fotos da espécie vegetal *H. procumbens* Mill



Figura 1.3: Foto da espécie vegetal *Tournefortia paniculata* Cham

1.2.2. Estudos biológicos e químicos de espécies do gênero *Heliotropium*

A atividade cicatrizante do extrato alcoólico de *Heliotropium indicum* em feridas de ratos juntamente com outras espécies, também consideradas cicatrizantes, *Acalypha indica* e *Plumbago zeylanicum* foi descrita na literatura. A aplicação tópica de 10% peso/volume de *H. indicum* aumentou a porcentagem de contração da ferida e completou a cicatrização em 14 dias indicando rápida epitelização e colagenização. As outras duas espécies também apresentaram atividade cicatrizante, entretanto, a espécie *H. indicum* mostrou maior potencial de cicatrização.¹⁸

A atividade antituberculose de óleos voláteis de *H. indicum* foi testada. Das partes aéreas de *H. indicum* foi isolado um óleo de coloração marrom claro, cuja análise em CG-FID e CG-EM mostrou que este é constituído de fitol (49,1 %), 1-dodecanol (6,4 %) e β -linalol (3,0 %). Este óleo apresentou significativa atividade antituberculose contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, na concentração mínima inibitória de 20,8 $\mu\text{g/mL}$.¹⁹

A atividade antimicrobiana de *Heliotropium ramosissimum* foi avaliada por diferentes métodos de extração da planta. O extrato alcaloídico, obtido por metodologia de extração ácido-base demonstrou melhor atividade de inibição contra *Staphylococcus aureus* NCTC 8532, *Bacillus subtilis* ATCC 6633e *Proteus vulgaris* NCTC 4177 que os extratos não alcaloídicos obtidos de um único líquido extrator (etanol, clorofórmio e hexano).²⁰

As atividades antimicrobianas de sete triterpenóides isolados de *H. ellipticum* foram avaliadas frente às bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Klebsiella pneumoniae*, e aos fungos: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizoctonia phaseoli*, *Penicillium chrysogenum*. Os triterpenos isolados, identificados e testados foram: β -sitosterol, estigmasterol, β -amirina, friedelan- β -ol (epifriedelenol), cicloartenone, acetato de β -amirina e friedelina. O triterpeno cicloartenona e friedelina possuem alto nível de atividade antimicrobiana e amplo espectro quando comparados com

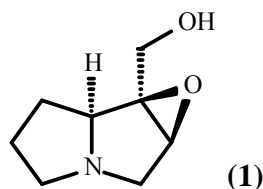
antibióticos de referência. O triterpeno β -amirina demonstrou melhor atividade antibacteriana enquanto o acetato de β -amirina foi mais ativo para fungos.²¹

As atividades antimicrobianas do extrato etanólico e de alcalóides isolados de *H. ellipticum* avaliadas frente às bactérias *E. coli*, *E. cloacae*, *S. aureus* e *S. faecalis*, e aos fungos *A. flavus*, *Curvularia lunata*, *Drechslera tetramera*, *Fusarium moniliforme* e *Candida albicans*. Os alcalóides testados foram: europina, heliotridina, lasiocarpina e N-óxido de lasiocarpina. O alcalóide europina mostrou atividade inibitória significativa contra *E. coli* e, lasiocarpina inibiu *F. moniliforme* os demais alcalóides não foram ativos frente aos microorganismos testados.²²

As atividades antimicrobianas dos extratos de clorofórmio (bruto), de metanol (bruto), do extrato alcaloídico e de alcalóides isolados de *H. bursiferum* foram avaliadas frente à bactéria: *Bacillus subtilis*, e aos fungos: *Aspergillus niger* e *Candida tropicalis*. Os alcalóides testados foram N-óxido de 9-angeloil retronecina, supinina, heliotrina e lasiocarpina. O alcalóide N-óxido de 9-angeloil retronecina inibiu significativamente *B. subtilis* e lasiocarpina inibiu significativamente todos os microorganismos testados. Inesperadamente, o extrato alcaloídico foi mais ativo que os demais componentes contra *B. subtilis*. Desta maneira o autor conclui que esta atividade deve ser associada a efeitos de sinergismo dos alcalóides presente neste extrato e/ou outro alcalóide ainda não identificado do extrato do extrato alcaloídico.²³

Em estudo anterior com a espécie *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell fez-se a avaliação das atividades antimicrobianas frente a *B. subtilis* ATCC 6623, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC dos extratos e frações desta espécie. Todas as frações incluindo o extrato bruto apresentaram atividade inibitória significativa contra *B. subtilis*, sendo que a fração de acetato de etila apresentou também atividade bactericida para *B. subtilis* e *S. aureus* na concentração mínima bactericida (CMB) de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A atividade antifúngica frente a *Aspergillus niger* e *Candida tropicalis* também foi avaliada, mas não houve resultado significativo.²⁴

As atividades antiviral contra *Poliomyelitis*, *Coxsackie*, *Semliki forest*, *Vesicular estomatitis*, *Herpes simples*, *Measles*, antiproliferativa contra Sarcoma 180 e, citotóxica contra células V₇₉ de hamster chinês foram avaliadas para o extrato bruto etanólico e hexânico, e fração de diclorometano da espécie *H. subulatum* e, também para os alcalóides isolados desta espécie: subulacina (**1**), heliotrina, 7-angeloil heliotrina, retronecina, e N-óxido de subulacina. Os extratos etanólico e hexânico foram significativamente ativos contra os vírus *Poliomyelitis* e *Measles* na concentração de 500 e 100 µg/ mL, enquanto os alcalóides heliotrina e 7-angeloil heliotrina foram ativos contra os vírus *Poliomyelitis* e *Vesicular estomatitis* na concentração de 10 µg/ mL.²⁵



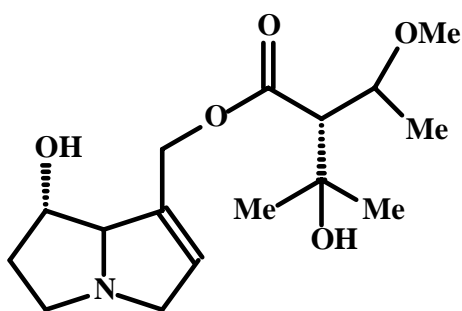
O interesse na toxicologia destas espécies é alta devido a presença de APs, e técnicas analíticas têm sido reportadas para quantificar a porcentagem de hidrólise de APs pela enzima carboxilesterase (GPH-1) e determinar a meia-vida aquosa dos metabólitos pirrólicos, quando APs são administrados em animais de laboratório.¹²

Em relatos de literaturas verifica-se que são atribuídas aos alcalóides pirrolizidínicos 1,2-insaturados as atividades hepatotóxica, pneumotóxica, hemolítica, antimitótica, teratogênica, mutagênica e carcinogênica.²⁶

Estudos realizados com o gênero *Heliotropium* na Argentina relacionam os alcalóides pirrolizidínicos isolados com as atividades: genotóxica, sedativa e antiinflamatória, sendo empregados no tratamento de doenças venéreas.²⁶ A espécie *H. curassavicum* tem amplo espectro terapêutico, o qual inclui gota, reumatismo, neuralgia,

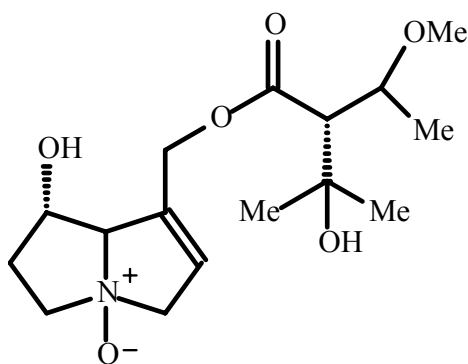
desordens arterioscleróticas, renais, hepáticas, osteoarticulares e circulatórias, entre outras atividades.²⁶

Desde 1954, de quando data o primeiro estudo de espécie do gênero *Heliotropium*, *H. europaeum*, no qual foi reportado o isolamento do alcalóide pirrolizidínico europina (2),²⁷ inúmeros outros APs foram isolados e identificados a partir de espécies do gênero *Heliotropium*.



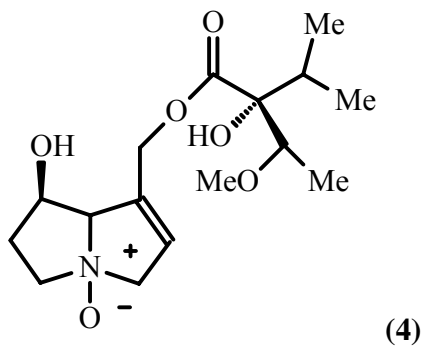
(2)

O estudo químico de duas espécies *H. mais-murtui* e *H. rotundifolium* (1978) resultou no isolamento de um mesmo alcalóide N-óxido de europina (3).²⁸

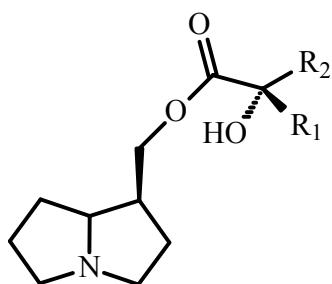


(3)

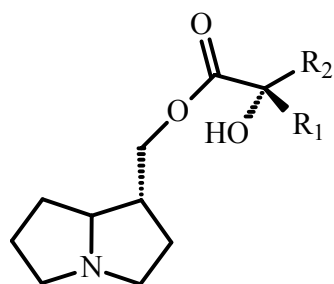
Do estudo químico da espécie *H. ramosissimum*, em 1980, foi reportado o isolamento e a identificação de um novo alcalóide: N-óxido de heliotrina (4).²⁹



Dois estudos químicos da espécie *H. curassavicum* estão reportados na literatura. No primeiro deles, datado de 1982, cita-se o isolamento e identificação dos alcalóides: heliocurassavina (5), heliocoromandelina (6), heliocurassavicina (7), curassavina (8), coromandelina (9) e heliovicina (10).³⁰



- (5) $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
 (6) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
 (7) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$

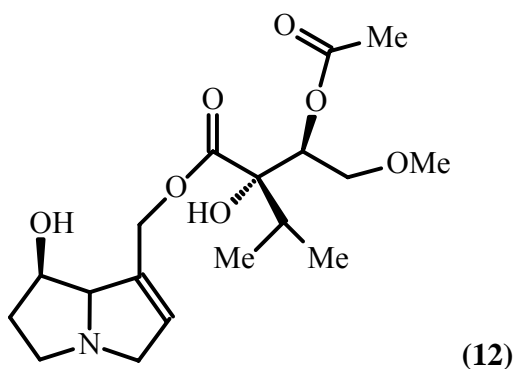
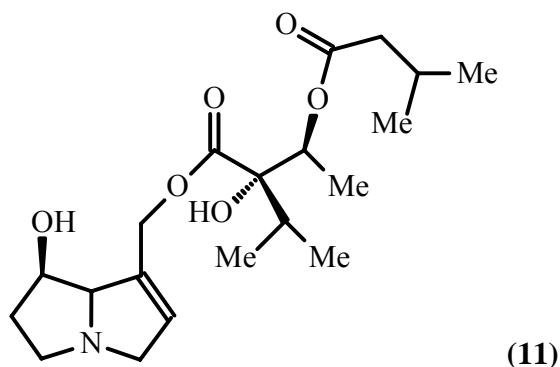


(8) $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

(9) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

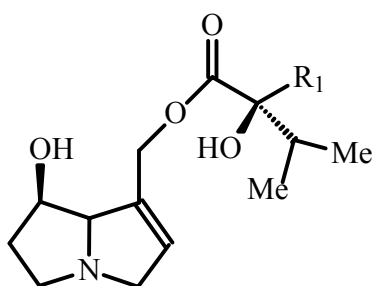
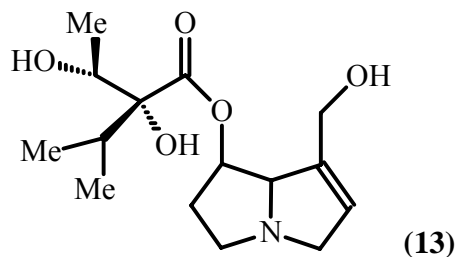
(10) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$

O outro estudo químico desta espécie, realizado em 1988, cita o isolamento e identificação dos alcalóides retronecina 9-(3'-isovaleril)viridifloril (**11**) e acetil indicina (**12**).³¹



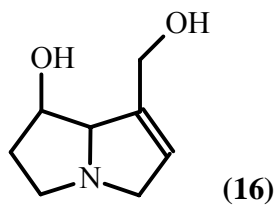
De uma nova espécie, *H. keralense*, encontrada no sul de Kerala (Índia) em 1990, foi isolado e identificado um novo éster-alcalóide pirrolizidínico: iso-licopsamina (**13**),

juntamente com outros alcalóides já conhecidos: indicina (**14**), acetil indicina (**12**), intermedina (**15**) e retronecina (**16**).³²

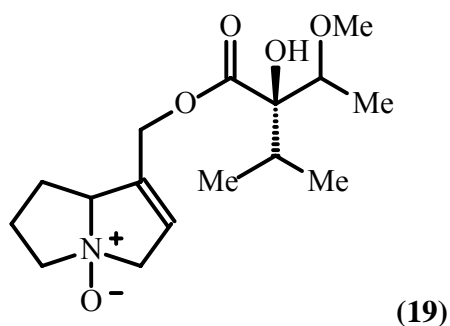
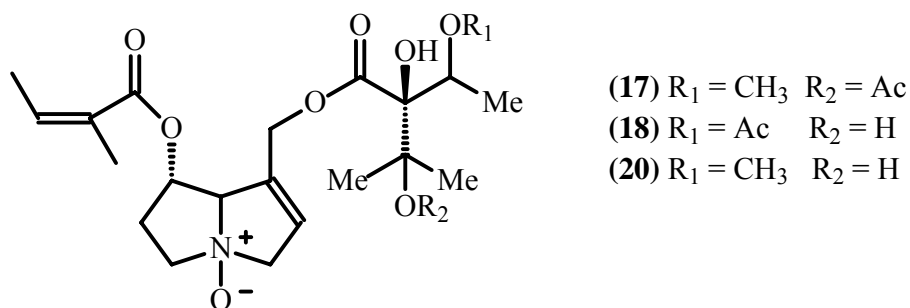


(14) $R_1 = \text{CH(OH)CH}_3$

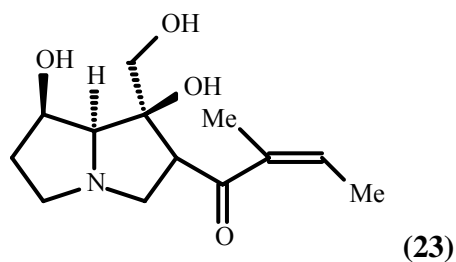
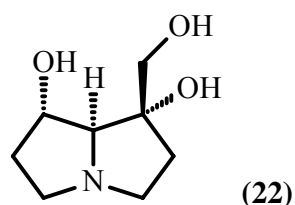
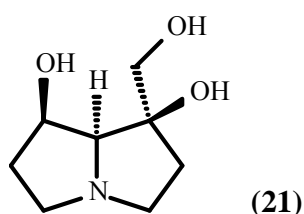
(15) $R_1 = \text{CH(CH}_3\text{)OH}$



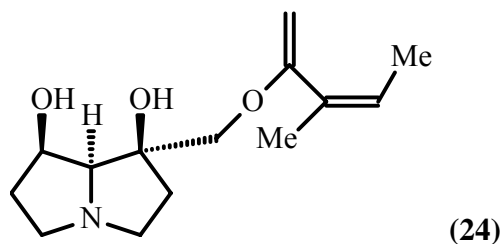
A espécie *H. hirsutissimum* foi pesquisada quimicamente e três novos alcalóides, N-óxido de acetil lasiocarpina (**17**), N-óxido de acetil heliosupina (**18**) e N-óxido de heleurina (**19**), juntamente com outro já conhecido: N-óxido de lasiocarpina (**20**) foram isolados.³³



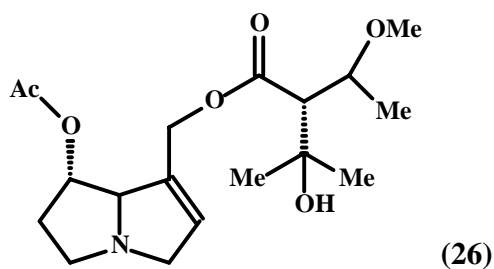
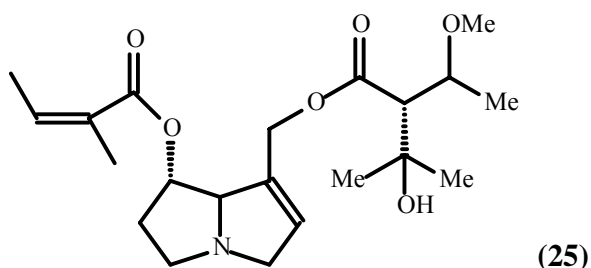
Dois estudos químicos realizados com a planta *H. bracteatum* citam o isolamento e identificação de três novos alcalóides. Em 1994 foi isolado o alcalóide pirrolizidínico helibractinecina (21)³⁴ e em 1995, foram isolados e identificados helibracteatina (22) e helibracteatina (23).³⁵



Da espécie *H. scabrum*, em 1995, foi isolado e identificado um novo alcalóide, a heliscabina (**24**).³⁶

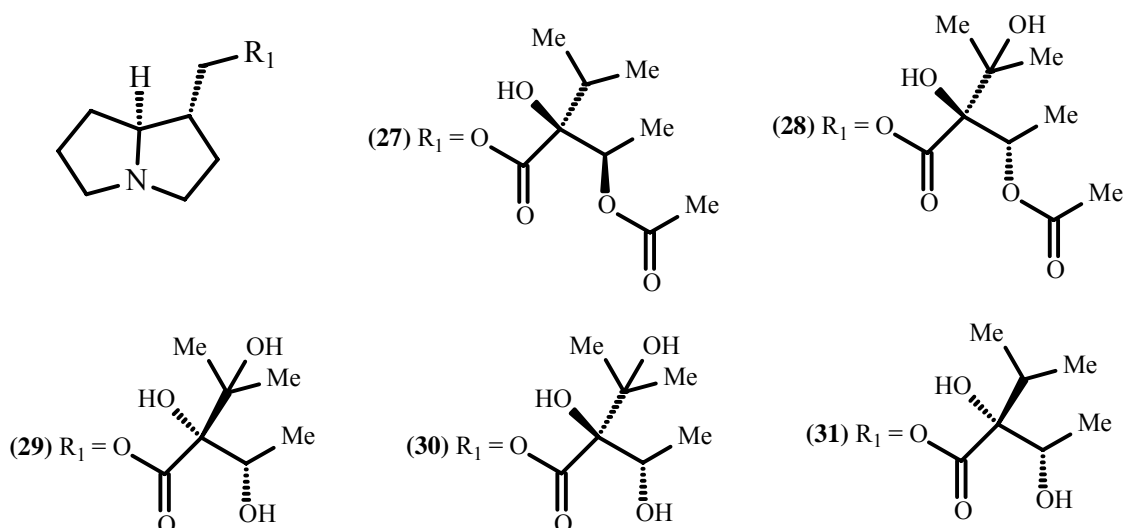


A espécie *H. bovei*, foi estudada quimicamente em 1995, resultando no isolamento e identificação dos alcalóides pirrolizínicos: europina (**2**), N-óxido de lasiocarpina (**20**), lasiocarpina (**25**) e do novo alcalóide, 7-acetil europina (**26**).³⁷

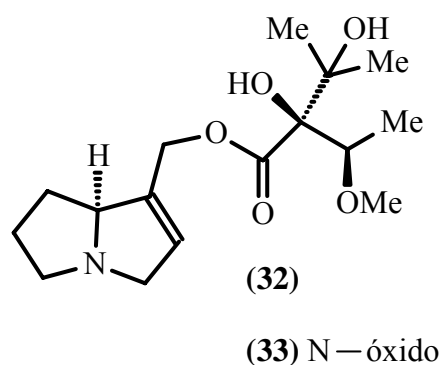


Da espécie vegetal *H. esfandiari*, em 1996, foram isolados e identificados os alcalóides europina (**2**) e N-óxido de europina (**3**).³⁸

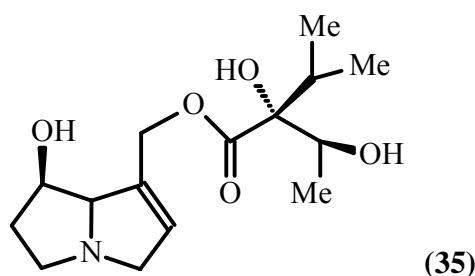
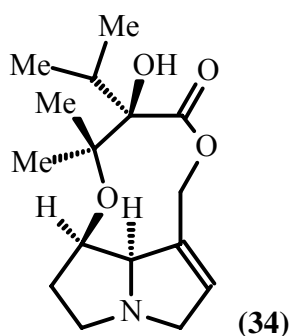
A espécie *H. floridum* foi estudada química e biologicamente em 1997, resultando no isolamento de cinco alcalóides saturados, são eles: 3'-acetil traquelantamidina (**27**), floridina (**28**), floridinina (**29**), floridimina (**30**), heliovicina (**31**).³⁹ O alcalóide floridina apresentou atividade repelente de insetos e os alcalóides heliovicina e floridinina possuiu significativa atividade antifúngica.³⁹



De *H. crassifolium*, em 2000, foram isolados dois alcalóides conhecidos, europina (**2**) e N-óxido de europina (**3**) e dois inéditos, ilamina (**32**) e seu N-óxido (**33**).⁴⁰

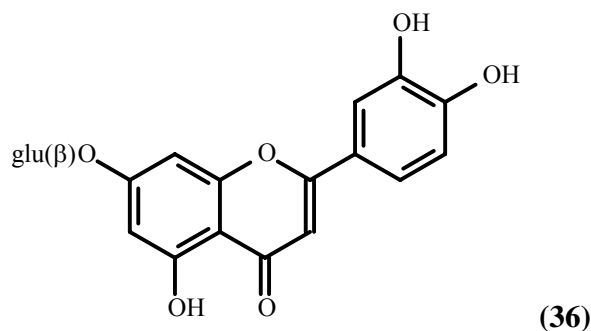


Um novo alcalóide denominado helindicina (**34**), e o conhecido licopsamina (**35**) foram isolados das raízes de *H. indicum*, sendo este o primeiro relato da presença de um alcalóide pirrolizidínico contendo um anel lactônico no gênero *Heliotropium*. Estes alcalóides apresentaram moderada atividade antioxidante.⁴¹



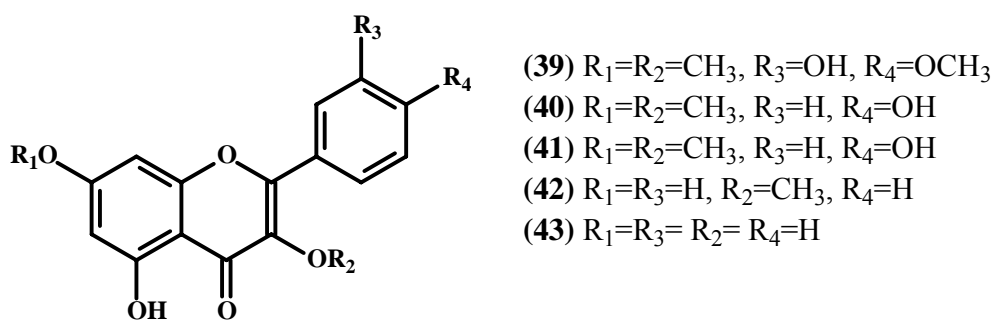
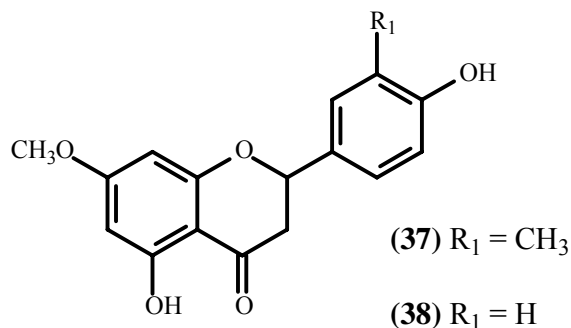
Muitos outros compostos já foram isolados a partir de estudos químicos com plantas do gênero *Heliotropium*. Flavonóides e quinonas são compostos comumente isolados, além dos alcalóides pirrolizidínicos.

O primeiro relato do isolamento de flavonóides data de 1968 quando, do extrato metanólico de *H. tenellum*, foi isolada a luteolina 7-glucosídeo (**36**).⁴²

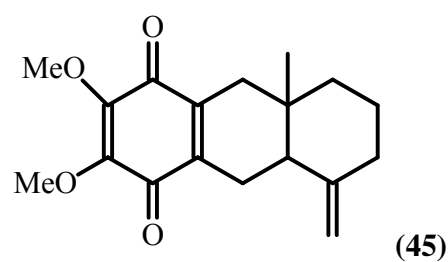
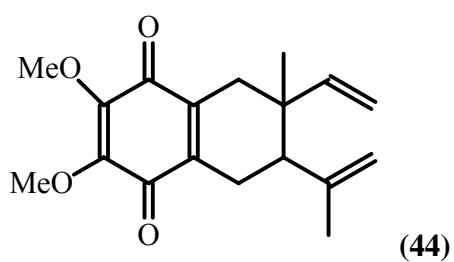


Do exudato resinoso das espécies chilenas *Heliotropium sthenophyllum*, *H. filifolium* e *H. chenopodiaceum*, foram isoladas e identificadas algumas substâncias

polifenólicas, tais como 7-3'-dimetileridictiol (37), ajanina (38), sakuranetina (39), rhamnocitrina (40), kumatakenina (41), 3-metilgalangina (42) e galangina (43).^{43, 44}

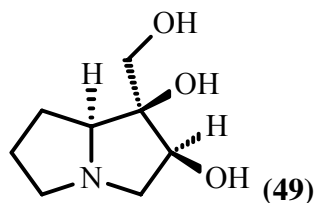
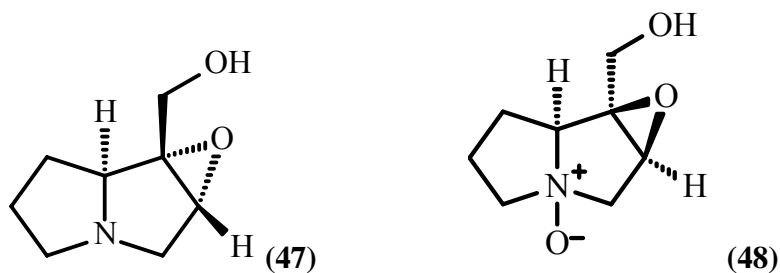


Em 2001, foi reportado a partir do estudo químico de *Heliotropium ovalifolium*, o isolamento e caracterização de substâncias pertencentes à outra classe de compostos, neste caso quinonas, denominadas de heliotropinona A (44) e B (45).⁴⁵



Em nossas pesquisas com a espécie *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell, foi caracterizado, a partir da extração ácido-base, o alcalóide 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-8 α -pirrolizidina (**1**), isolado anteriormente de *Crotalaria trifoliastrum* Willd. (Leguminosae)^{46, 47} e de *Heliotropium subulatum* Hochst. (Boraginaceae).^{48, 49}

No presente estudo foram isolados e identificados da espécie *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell os alcalóides, subulacina (**1**), 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina (**47**), obtido de síntese orgânica, e mais dois alcalóides pirrolizidínicos (**48**), (**49**).



1.2.3. Estudos biológicos e químicos de espécies do gênero *Tournefortia*

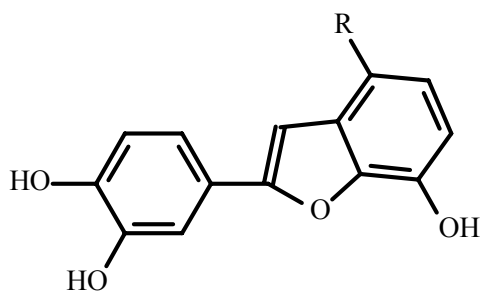
Estudos recentes com espécies do gênero *Tournefortia* relatam a atividade dos extratos brutos contra infecções intestinais e diarreias, sendo que já se tem no mercado do México um fitoterápico desta em associações com outras plantas.

A atividade contra infecções intestinais de extratos de oito plantas medicinais utilizadas na medicina popular para este fim foi testada com os parasitos *Entamoeba histolica* e *Giardia lamblia*. O extrato bruto de *Tournefortia densiflora* foi mais potente que os das espécies *Alternanthera repens*, *Boerhavia coccinea*, *Flaveria trinervia*, *Leucaena esculenta*, e *Vitex mollis*, que também apresentaram atividades antiprotozoárias.⁵⁰

O extrato orgânico de *Tournefortia densiflora*, juntamente com os de outras cinco plantas, que são utilizadas na medicina tradicional mexicana para tratamento de diarreia foram avaliados para atividades antiespasmódica e antimicrobianas frente às bactérias: *Escherichia coli* R166, 25922 e R170, *Salmonella typhi* R1234 e R1330, *Enterobacter cloacae* R819 e ACTT, *Proteus mirabilis* 43071, *Salmonella typhimurium* 14028 e *Shigella sonnei* 11060. O extrato integral de *T. densiflora* possui alto nível de atividade antimicrobiana (MIC < 2 mg/ mL) e pouca atividade antiespasmódica.⁵¹

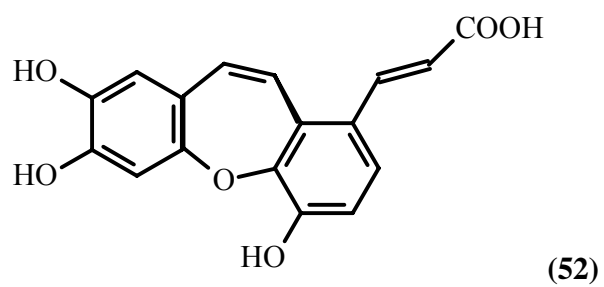
Outros relatos de atividades biológicas do gênero *Tournefortia* incluem o estudo do efeito anti-hiperglicêmico das espécies *T. hirsutissima* e *T. hartwegiana* usadas no controle da diabetes.^{52, 53}

A espécie *T. sarmentosa* foi estudada quimicamente, o que resultou no isolamento e identificação de compostos pertencentes à classe dos benzenóides: tournefolal (**50**), ácido tournefólico A (**51**), ácido tournefólico B (**52**) e ácido salvinólico (**53**).⁸

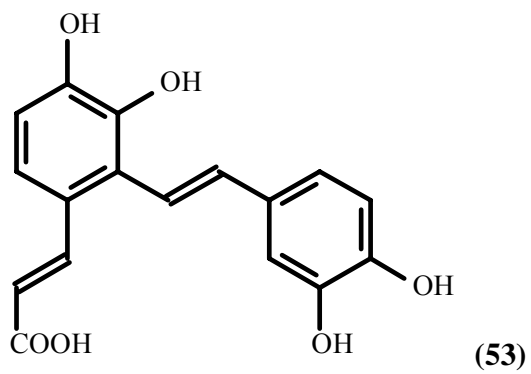


(50) R = CHO

(51) R = C₂H₂COOH



(52)



(53)

1.3. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivos:

A) o estudo químico de espécies da família Boraginaceae, visando separação e identificação dos principais componentes das espécies vegetais em estudo, fracionando-os por métodos cromatográficos até a obtenção de compostos puros ou quase puros para aplicação de técnicas analíticas;

B) a identificação das estruturas dos constituintes isolados através do uso de técnicas espectroscópicas e cálculos teóricos;

C) as avaliações biológicas e farmacológicas, atividades antiinflamatória (modelo pleurisia em ratos e edema de orelha em camundongos), antiviral (virus herpes simples tipo 1 – HSV-1), antiproliferativa (células de câncer colorretal humano – HCT-116) e letalidade frente à *Artemia salina* Leach. de extratos, frações e dos compostos isolados das espécies vegetais em estudo;

D) caracterização de perfil cromatográfico de *Tournefortia paniculata* Cham., visando uma comparação com os componentes isolados das espécies do gênero *Heliotropium*.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e métodos utilizados no estudo químico das espécies vegetais

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e técnicas bidimensionais foram registrados em espectrômetro Varian modelos Gemini 2000 BB e Mercury plus BB (300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos foram apresentados em ppm, tendo como referência interna o TMS ($\delta = 0.0$). Os solventes deuterados utilizados foram DMSO, metanol, piridina, acetona e clorofórmio, da marca Aldrich e/ou Isotec.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um equipamento CG/MS Shimadzu a 70 eV, modelo QP 2000A, com sonda para sólidos.

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, utilizando sílica gel (0,063 – 0,020 mm) da Merck, sílica para cromatografia *flash* (0,035 - 0,070 mm) ou alumina neutra. As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material empregado. Para acompanhamento e análise das frações obtidas das cromatografias em coluna utilizou-se cromatografia de camada delgada – CCD.⁵⁴

As eluições das colunas cromatográficas foram realizadas com solventes orgânicos puros ou em misturas e em ordem crescente de polaridade, exceto nas colunas em Sephadex LH-20 (Sigma) onde foram utilizados sistemas isocráticos ou em ordem decrescente de polaridade. As frações reunidas conforme critérios de semelhança foram concentradas em evaporador rotativo.

As placas para cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram feitas utilizando-se sílica gel GF₂₅₄ (Fluka), suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,25 mm e 1,00 mm de espessura sobre as placas de vidro de 20x5 e 20x20 cm, respectivamente.

A visualização dos compostos em CCD foi realizada utilizando reveladores como o reagente de Dragendorff,⁵⁵ sulfato de ferro 2%, sulfato de cério 0,5%, anisaldeído 1%,⁵⁶ cuba com iodo ou H₂SO₄/ MeOH (1:1) seguido de aquecimento.

As eluições das colunas cromatográficas (CC) foram realizadas com solventes e reagentes tratados segundo metodologias tradicionais e descritas em literatura.⁵⁷

2.2. Procedimentos comuns para o estudo das espécies vegetais *H. transalpinum* var. *transalpinum*, *H. procumbens* e *T. paniculata*

A espécie *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell. - Boragem branca – (**Figura 1.1**) foi coletada no Horto Didático de Plantas Medicinais Professora Irenice Silva em maio de 2001 e em abril de 2003 (duas coletas). Uma amostra encontra-se depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá sob número HUM 3022. Esta espécie vegetal foi coletada no município de Maringá e também faz parte da flora natural da região da planície de inundação do Rio Paraná.⁵⁸

As espécies *Heliotropium procumbens* Mill. - Boragem cinzenta – (**Figura 1.2**) e *Tournefortia paniculata* Cham. – Marmelinho – (**Figura 1.3**) foram coletadas na planície de inundação do Rio Paraná, no Município de Porto Rico – PR em abril de 2003. As exsiccatas de referências encontram-se no herbário da Universidade Estadual de Maringá sob registro número HUM 9981 e HUM 12341, respectivamente.

As plantas coletadas foram desidratadas em estufa de ar circulante (35° C) em seguida moídas. Os componentes foram extraídos, seguindo metodologia de maceração e percolação combinadas, primeiramente com hexano e depois com etanol ou somente com etanol. Os extratos líquidos combinados tiveram seu volume reduzido em evaporador

rotativo e a água residual retirada em liofilizador. Obtiveram-se, desta forma, os extratos secos de hexano e de etanol para cada espécie de planta.

Os extratos obtidos das plantas (hexânicos, etanólicos e alcaloídicos) foram submetidos a sucessivos fracionamentos até a obtenção das substâncias puras. Os procedimentos cromatográficos, coluna cromatográfica (CC) e cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizados usando, geralmente, sílica gel como suporte e sistema de eluição com solventes puros ou em misturas em polaridade crescente.

2.3. Estudo químico de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell.

Foram coletadas: folhas, flores e galhos pequenos em duas datas distintas: 1^{a.}) em maio de 2001, onde a planta desidratada e moída foi primeiramente submetida a extração com hexano (**Ht-H**) seguido da extração com etanol (**Ht-E**). 2^{a.}) em abril de 2003, onde a planta seca e moída foi submetida a extração com etanol (**Ht-ET**).

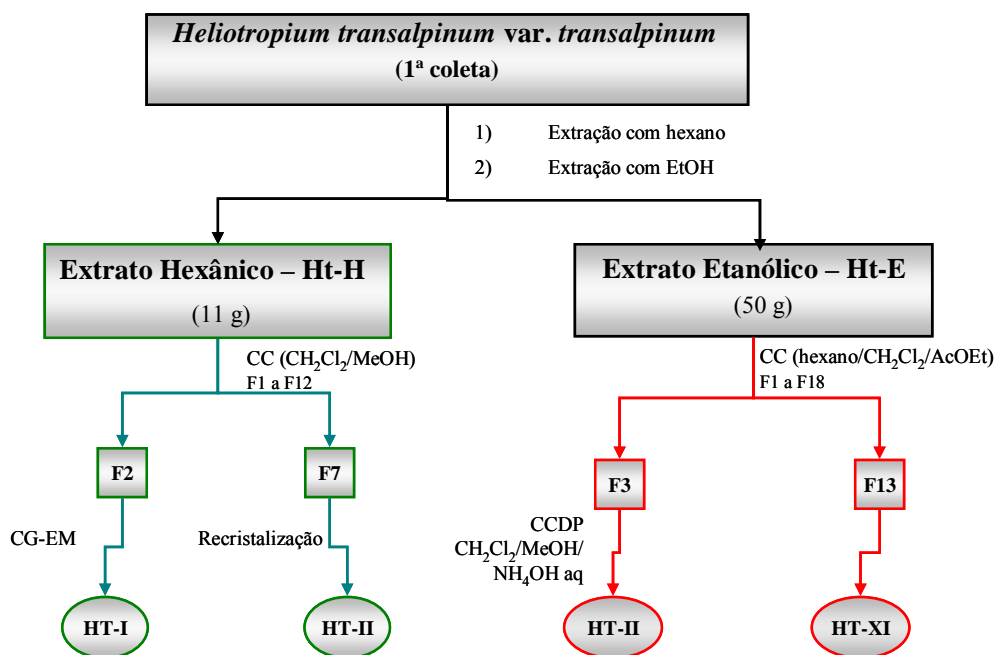
2.3.1. Fracionamento do extrato hexânico (Ht-H)

O extrato hexânico **Ht-H** (1^{a.} coleta) foi submetido à coluna cromatográfica em sílica gel com os solventes CH₂Cl₂ e MeOH, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Este procedimento resultou em 12 frações denominadas Ht-H-1 a Ht-H-12.

A fração Ht-H-2 foi cromatografada em sílica gel com misturas de CH₂Cl₂ e MeOH em ordem crescente de polaridade como eluente, o que resultou na separação de um composto na forma de óleo (**HT-I**) que foi submetido à CG-EM e experimentos de RMN.

A fração Ht-H-7 foi submetida a sucessivas CCs em sílica gel utilizando como eluente misturas de CH₂Cl₂ e MeOH em ordem crescente de polaridade e, após experimentos de CCD, verificou-se apenas uma mancha na placa cromatográfica, indicativo de substância pura. Este composto, codificado como **HT-II**, foi submetido a ensaios de RMN de ¹H e de ¹³C.

O procedimento experimental geral empregado para o isolamento das substâncias dos extratos hexânicos e etanólicos de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell pode ser visualizado no **Esquema 2.1**.



Esquema 2.1.: Esquema do procedimento experimental geral empregado para o isolamento de substâncias dos extratos hexânico e etanólico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell (1ª coleta).

2.3.2. Fracionamento do extrato etanólico (Ht-E)

O extrato etanólico **Ht-E** (1^a. coleta) foi submetido a CC em sílica gel com hexano, CHCl₃ e MeOH, puros ou em misturas, seguindo uma ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 18 frações denominadas Ht-E-1 a Ht-E-18.

A fração Ht-E-3 apresentou uma única mancha na análise cromatográfica por CCD, indicativo de substância pura. A fração Ht-E-13 foi recromatografada em Sephadex LH-20, resultando em 7 subfrações denominadas Ht-E-13-A a Ht-E-13-G. Na subfração Ht-E-13-G, após análises por CCD, verificou-se apenas uma mancha na placa cromatográfica e, esta então codificada de **HT-X** e foi submetida a ensaios de RMN.

2.3.3. Fracionamento do extrato bruto etanólico (Ht-ET)

Com o extrato bruto etanólico **Ht-ET** foi realizado dois procedimentos distintos: 1^o.) extração de alcalóides por metodologia de extração ácido-base, como descrito no item 2.3.3.1 e **Esquema 2.2.**, sendo obtidos os extratos **Ht-A**, **Ht-B-1** e **Ht-B-2** e; 2^o.) partição em sistema de solventes em seqüência crescente de polaridade, onde foram obtidas as frações **Ht-Hex**, **Ht-CH₃Cl**; **Ht-AcOEt**, **Ht-BuOH** e **Ht-H₂O**, como descrito no item 2.3.3.2 e **Esquema 2.3.**

2.3.3.1 Extração ácido-base (Ht-A e Ht-B)

O isolamento de alcalóides foi realizado através da extração ácido-base do extrato bruto etanólico – **Ht-ET** (2ª coleta) e, resultou em um extrato ácido (Ht-A) e dois extratos básicos (alcaloídicos): extrato diclorometânico (Ht-B-1) e o extrato de acetato de etila (Ht-B-2).

A fração Ht-B-1 foi submetida à cromatografia em coluna de alumina neutra eluída com CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH (misturas) e MeOH em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 3 frações (Ht-B-1-A, Ht-B-1-B e Ht-B-1-C). A fração Ht-B-1-A, após realização de CCDP em CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (85:14:1), apresentou mancha única em Rf: 0,35 (**HT-III**, 30 mg). Esta foi submetida a ensaios de RMN de ¹H e de ¹³C.

A fração Ht-B-2 foi submetida à CC em alumina neutra (25 g) com o sistema de eluição em ordem crescente de polaridade: CHCl₃, CHCl₃/AcOEt (misturas), AcOEt, AcOEt/MeOH (misturas) e MeOH. As frações resultantes foram reunidas por critério de semelhança de perfil cromatográfico e denominadas de Ht-B-2-A a Ht-B-2-E. Da fração Ht-B-2-B foi isolada uma substância (**HT-IV**) que foi submetida às análises de RMN de ¹H e de ¹³C.

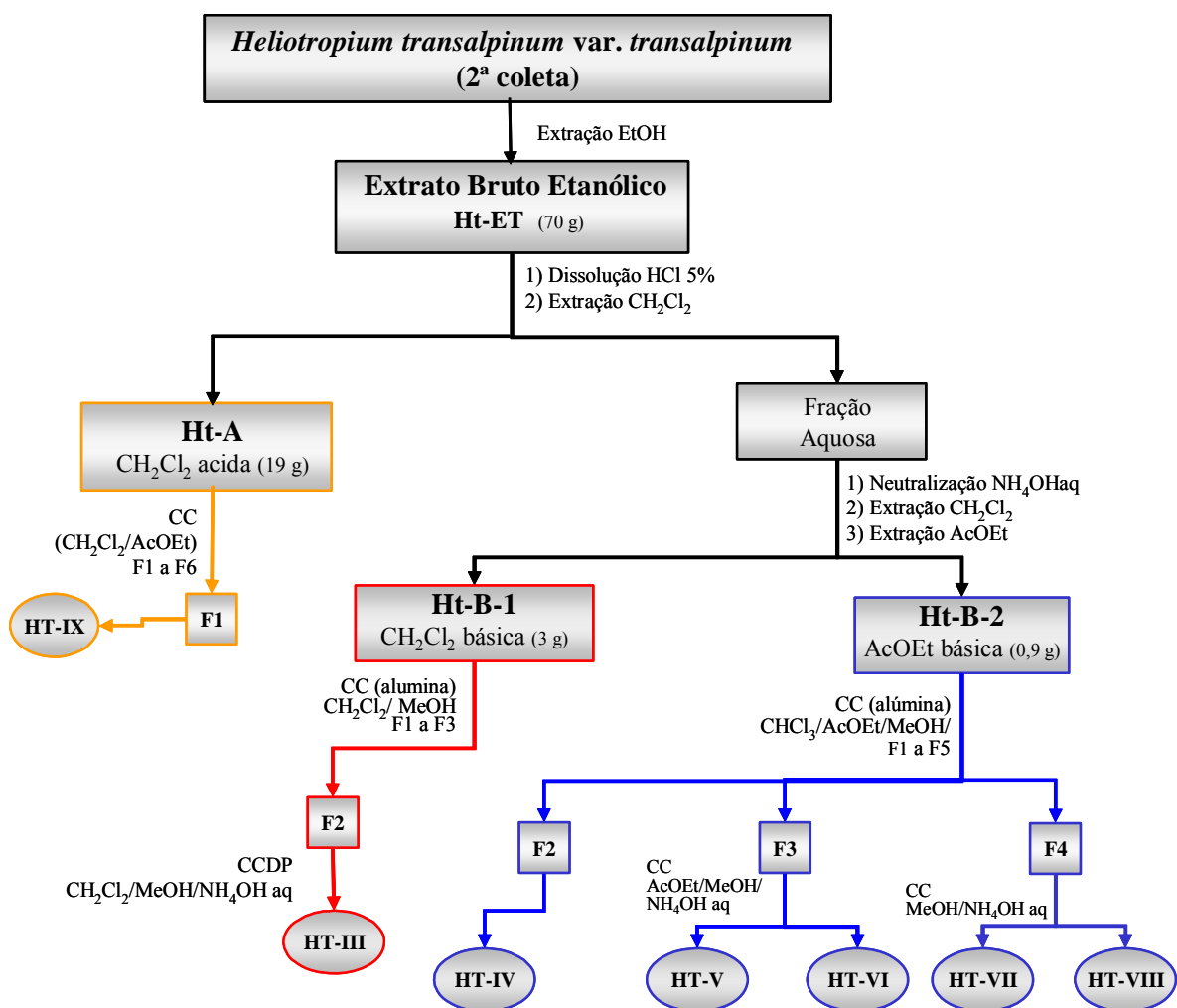
Foram submetidas a outros procedimentos de separação as frações Ht-B-2-C, Ht-B-2-D e Ht-B-2-E por cromatografia *flash* com sistemas de AcOEt/MeOH/hidróxido de amônio 30% e/ou MeOH/hidróxido de amônio 30% (isocráticos ou misturas de polaridade crescente).

A partir de CC de Ht-B-2-C foi isolada uma mistura que foi submetida a novas cromatografias *flash* com AcOEt/MeOH/hidróxido de amônio 30% (sistema isocrático) onde foram separadas duas substâncias **HT-V** e **HT-VI**. Ambas foram submetidas às análises de RMN de ¹H e de ¹³C.

A fração Ht-B-2-D foi inicialmente submetida à CC *flash* com AcOEt/MeOH/hidróxido de amônio 30% (sistema isocrático) e a seguir a outra CC *flash* com MeOH e MeOH/hidróxido de amônio 30% (misturas), obtendo-se o isolamento de mais duas substâncias (**HT-VII** e **HT-VIII**) que foram submetidas as análises de RMN de ^1H e de ^{13}C .

A fração Ht-A foi previamente fracionada por CC em CH_2Cl_2 e AcOEt puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações reunidas desta foram denominadas Ht-A-1 a Ht-A-6. De Ht-AC-1 e Ht-AC-2 foi obtido como um precipitado, insolúvel em MeOH, e que foi lavado várias vezes com este solvente, separando desta forma a mistura (**HT-IX**).

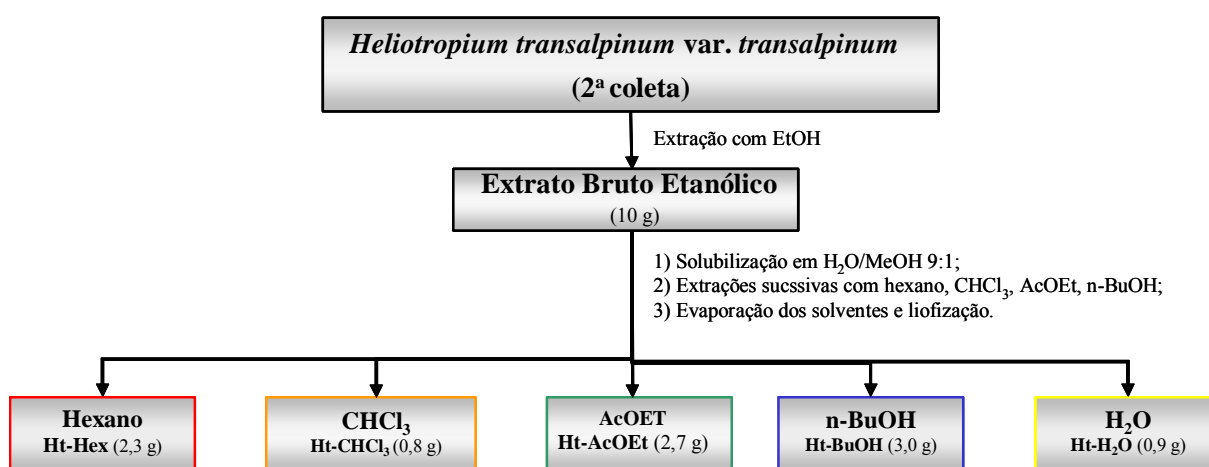
O esquema de isolamento das substâncias isoladas a partir do extrato **Ht-ET** de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* está apresentado a seguir no **Esquema 2.2**.



Esquema 2.2.: Esquema do procedimento experimental geral de extração ácido-base empregado no isolamento de substâncias de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell (2^a coleta).

2.3.3.2. Partição de Ht-ET

O extrato bruto (2^a. coleta) foi submetido à partição em solventes. A ordem de partição foi: 1^o.) hexano (**Ht-Hex**), 2^o.) clorofórmio (**Ht-CHCl₃**), 3^o.) acetato de etila (**Ht-AcOEt**), 4^o.) n-butanol (**Ht-BuOH**), restando a fração aquosa (**Ht-H₂O**). Cada fração foi devidamente evaporada e liofilizada.



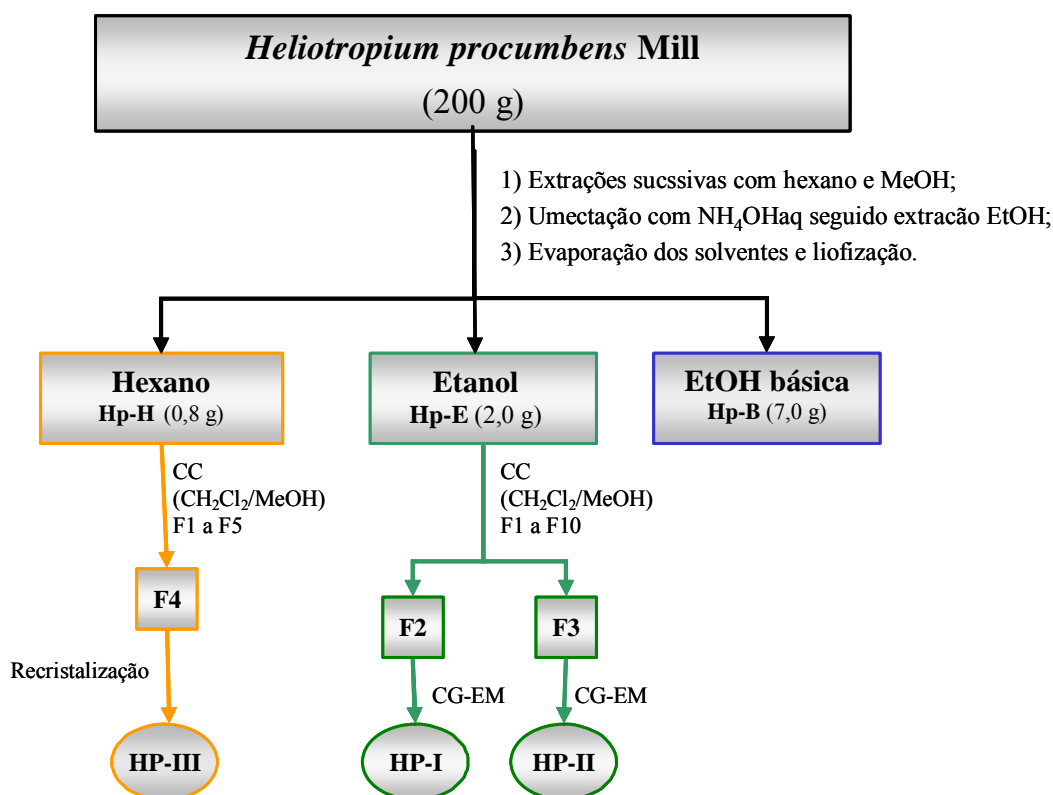
Esquema 2.3.: Esquema geral da partição em solventes de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell (2^a. coleta)

2.4. Estudo químico de *Heliotropium procumbens* Mill.

2.4.1. Fracionamento do extrato hexânico (Hp-H)

O extrato hexânico (Hp-H) foi submetido à coluna cromatográfica em sílica gel com hexano, CH₂Cl₂, MeOH puros ou em misturas eluídas em ordem crescente de

polaridade. Este procedimento resultou em 5 subfrações denominadas Hp-H-1 a Hp-H-5. A subfração Ht-H-4, após experimentos de CCD verificou-se apenas uma mancha na placa cromatográfica, indicativo de substância pura, **HP-III**. Esta então foi submetida a ensaios de RMN de ^1H e de ^{13}C . Um esquema ilustrando esse procedimento está descrito no **Esquema 2.4**.



Esquema 2.4.: Esquema do procedimento experimental geral empregado para o isolamento de substâncias dos extratos hexânico, etanólico e básico de *H. procumbens* Mill.

2.4.2. Fracionamento do extrato etanólico (Hp-E)

A partir de coluna cromatográfica (CC) inicial do extrato etanólico (Hp-E), utilizando como solventes CH_2Cl_2 e MeOH puros ou em misturas em polaridades crescente, foram obtidas 10 frações denominadas Hp-E-1 a Hp-E-10. As frações Hp-E-2, Hp-E-3, Hp-E-6, e Hp-E-10 foram recromatografadas como descrito a seguir. As demais frações não foram estudadas devido a complexidade de seus perfis cromatográficos.

A fração Hp-E-2 foi submetida CC em sílica gel utilizando, como solvente, misturas de hexano, CH_2Cl_2 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 5 frações denominadas: Hp-E-2-A ... E. A fração Hp-E-2-C, denominada de **HP-I**, foi submetida a ensaios em CG-EM.

A Fração Hp-E-3 foi submetida à CC em sílica gel utilizando misturas de hexano, CH_2Cl_2 e MeOH, em ordem crescente de polaridade, onde foram conseguidas 7 frações denominadas: Hp-E-3-A ... G. A fração Hp-E-3-A, codificada como **HP-II**, foi submetida a ensaios de RMN e CG-EM.

Na fração Hp-E-6 foi realizada uma CC em sílica gel utilizando como eluente misturas de CH_2Cl_2 e MeOH em ordem crescente de polaridade. As frações foram denominadas Hp-E-6-A ... M e as cinco ultimas frações foram recromatografadas por CCDP.

A fração Hp-E-10 foi recromatografada em sílica gel, usando como eluente misturas de AcOEt e MeOH em ordem crescente de polaridade, o que resultou em 13 subfrações denominadas Hp-E-10-A a Hp-E-10-M.

2.4.3. Fracionamento do extrato básico (Hp-B)

Após a extração com etanol, o material vegetal foi basificado e submetido novamente à extração, ⁵⁵ na qual o material seco foi umectado com solução de amônia 15% e extraído com etanol. O extrato foi denominado Hp-B e a coluna cromatográfica a que Hp-B foi submetido, com os solventes CH₂Cl₂ e MeOH puros ou em misturas de polaridade crescente, resultou em 26 frações (Hp-B-1 ... 26). As frações Hp-B-3 a Hp-B-6 e, Hp-B-10 foram submetidas a novos ensaios. As demais não foram estudadas por apresentarem grande quantidade de clorofilas que dificultavam as análises por CCD.

As frações Hp-B-3, Hp-B-4, Hp-B-5 e Hp-B-6 foram submetidas separadamente a sucessivas CCs em sílica gel e CCDPs, resultando no isolamento de 13 compostos de natureza graxa. Foram todos caracterizados por ensaios de RMN e CG-EM.

A fração Hp-B-10 foi recromatografada em sílica gel utilizando misturas de acetato de etila e metanol como eluente. Esta CC produziu 10 frações, denominadas de Hp-B-10-A ... J. Nas subfrações de Hp-B muitos procedimentos cromatográficos (CC e CCDP) foram realizados mas não foi possível o isolamento de compostos.

O esquema de isolamento de substâncias dos extratos de *H. procumbens* Mill está apresentado no **Esquema 2.4**.

2.5. Estudo químico de *Tournefortia paniculata* Cham.

A planta foi coletada no município de Porto Rico, às margens do rio São Pedro, em abril de 2004. O material vegetal coletado foi desidratado em estufa de ar circulante (35° C) e moído em moinho de facas.

O material vegetal moído foi submetido à extração com solventes (hexano e etanol) utilizando metodologia de percolação e maceração combinadas. Os extratos resultantes foram evaporados, separadamente, a vácuo e desumidificados em liofilizador.

2.6. Materiais e métodos utilizados nos estudos de atividades biológicas das espécies vegetais

Os materiais e as metodologias utilizadas nos ensaios biológicos se encontram descritas para os seguintes testes de atividades: antiinflamatória (pleurisia e edema de orelha), toxicidade geral frente à *Artemia salina* Leach., antiproliferativo e antiviral.

2.6.1. Teste de toxicidade geral frente a *Artemia salina* Leach.

Um teste de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach., um microcrustáceo marinho, foi realizado com o extrato bruto etanólico (Ht-ET) da espécie vegetal *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell, com as partições deste (Ht-Hex, Ht-CH₃Cl; Ht-AcOEt, Ht-BuOH e Ht-H₂O) e com as frações Ht-B-1 e Ht-B-2 da extração de alcalóides. Também foram testados os extratos Hp-E e Hp-B-A de *Heliotropium procumbens* Mill.

O bioensaio de letalidade frente a *Artemia salina* foi realizado conforme descrito na literatura.⁶⁰ Os teste foram realizados em triplicata, juntamente com o teste branco e com 10 indivíduos em cada amostra. As amostras foram submetidas às mesmas condições de luz, temperatura e meio (água marinha – 33 g NaCl/1L de água) necessária anteriormente para eclosão dos ovos em náupilos.

As amostras das partições foram testadas utilizando-se as concentrações de 1000, 100 e 10 µg/mL em volume de 5 mL, e o extrato etanólico nas concentrações de 1000, 500, 250, 100, 50 e 10 µg/mL em volume de 5 mL. A contagem dos sobreviventes após 24 horas foi realizada com auxílio de uma lupa.

A dose letal para 10, 50 e 90% da população (DL₁₀, DL₅₀ e DL₉₀) foi determinada a partir do ajuste dos pontos (regressão linear) da porcentagem de animais mortos contra o logaritmo da concentração testada.

2.6.2. Teste de atividade antiinflamatória por indução de pleurisia em rato

O protocolo como descrito a seguir e ilustrado no **Esquema 2.5.** para estes experimentos foi aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM e foi realizado no Departamento de Farmácia e Farmacologia, sob coordenação da Professora Dra. Ciomar A. Bersani Amado. A técnica utilizada foi a indução de inflamação na pleura (membrana que recobre o pulmão) – modelo de inflamação sistêmica.

O ensaio foi realizado utilizando ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 180 e 220 gramas. Os animais são mantidos sob temperatura controlada (22°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas e alimento (ração) e água a vontade.

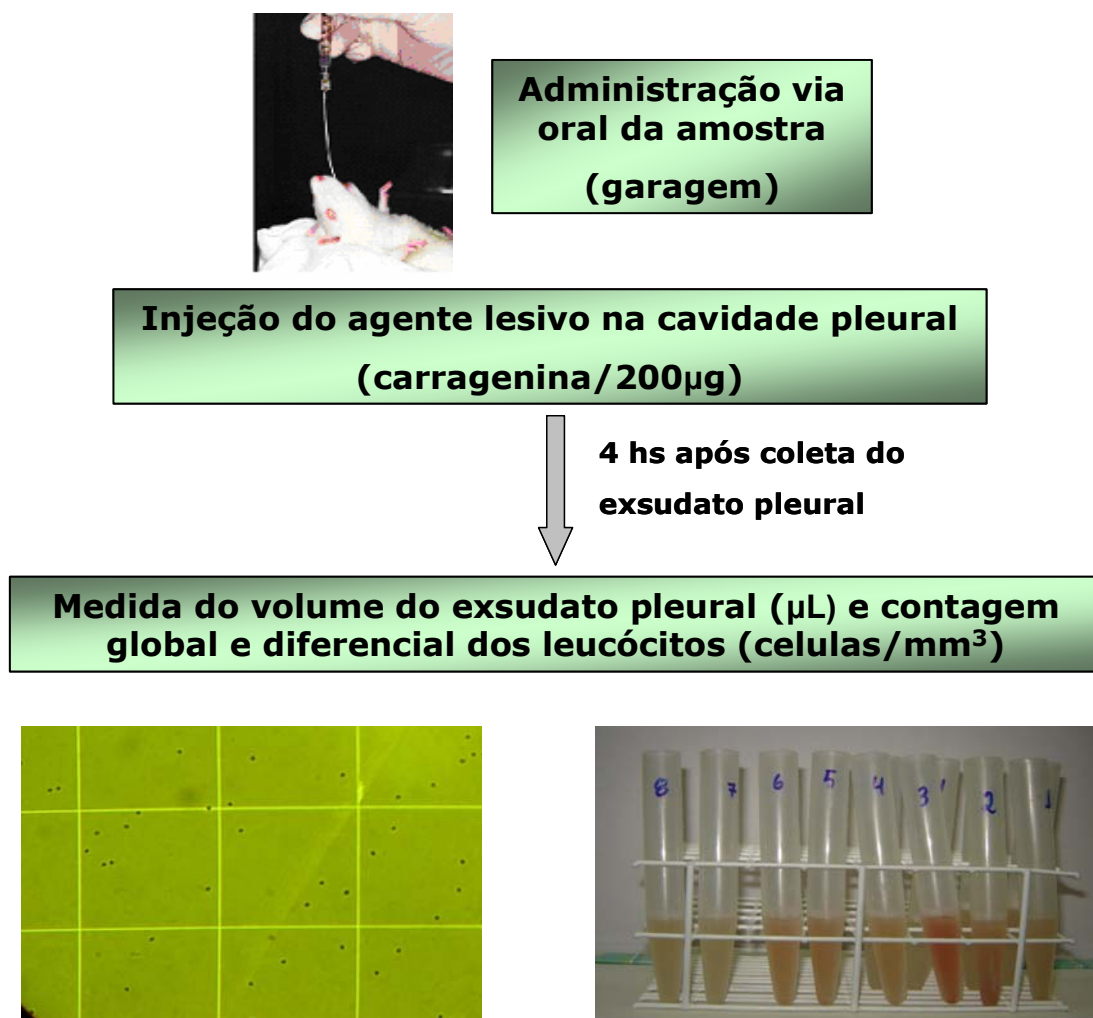
Os ratos utilizados no experimento foram mantidos sem alimentação por um período de 18 horas antecedentes à pleurisia.

A pleurisia foi induzida pela injeção de 0,25 mL de uma suspensão de carregenina (200 µg) na cavidade intrapleural, na região do mediastino direito, entre a 3^a e a 4^a costela, 30 minutos após a administração por via oral (gavagem) dos extratos etanólicos de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell. (**HT-ET**) e *H. procumbens* (**HP-E**) de acordo com a técnica descrita por Vinegar e colaboradores.⁶⁰

A carragenina foi diluída em salina tamponada com fosfato (PBS – pH = 7,4) na 4^a hora após a indução da pleurisia, os animais foram anestesiados com éter etílico P.A. e sacrificados, para a coleta do exudato inflamatório intrapleural.

O material coletado por aspiração foi transferido para tubos cônicos de centrífuga. O volume total do exudato foi medido e uma alíquota de 50 µL usada para determinar o número de leucócitos em câmara de Neubauer.

Os animais com os quais foi realizado o teste controle receberam o veículo (água ou solução de DMSO 16%) por via oral (gavagem) trinta minutos antes da indução da pleurisia.



Esquema 2.5. Esquema da seqüência utilizada na avaliação de atividade antiinflamatória – pleurisia

2.6.3. Teste de atividade antiinflamatória por indução de edema de orelha

O protocolo como descrito a seguir para estes experimentos e ilustrado no **Esquema 2.6.** também é aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM e foi realizado no Departamento de Farmácia e Farmacologia, sob coordenação da Professora Dra. Ciomar A. Bersani Amado. A técnica aplicada foi a que utiliza edema de orelha – modelo de inflamação tópica. ⁶¹

O edema foi induzido através da aplicação de um composto irritante: o óleo de *Croton*, em uma quantidade de 20 µL na concentração de 200 µg/orelha, diluído em solução de acetona/água 7:3. A aplicação é feita em ambas as faces internas das orelhas dos camundongos. A concentração de 200 µg de óleo de *Croton* por orelha é a concentração máxima ideal a ser testada, pois provoca a inflamação necessária e não degenera os tecidos da orelha.

A seguir foi administrada à orelha previamente tratada com óleo de *Cróton*, 20 µL da solução de acetona/água 7:3 contendo o extrato bruto etanólico de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell (**HT-ET**) que foi testado nas doses de 7,5; 5,0; 2,5 e 1,25 mg/orelha. E as frações (**Ht-Hex**, **Ht-CH₃Cl**; **Ht-AcOEt**, **Ht-BuOH** e **Ht-H₂O**) solubilizadas no mesmo veículo do extrato bruto foram testadas na dose de 2,5 mg/orelha.

O extrato bruto etanólico de *Heliotropium procumbens* Mill (**HP-E**) foi testado na dose de 1,25 mg/orelha em solução de acetona/água 7:3.

Outro grupo de camundongos recebeu apenas 20 µg do veículo (acetona/água 7:3) em cada orelha após o agente irritante, óleo de *Croton*.

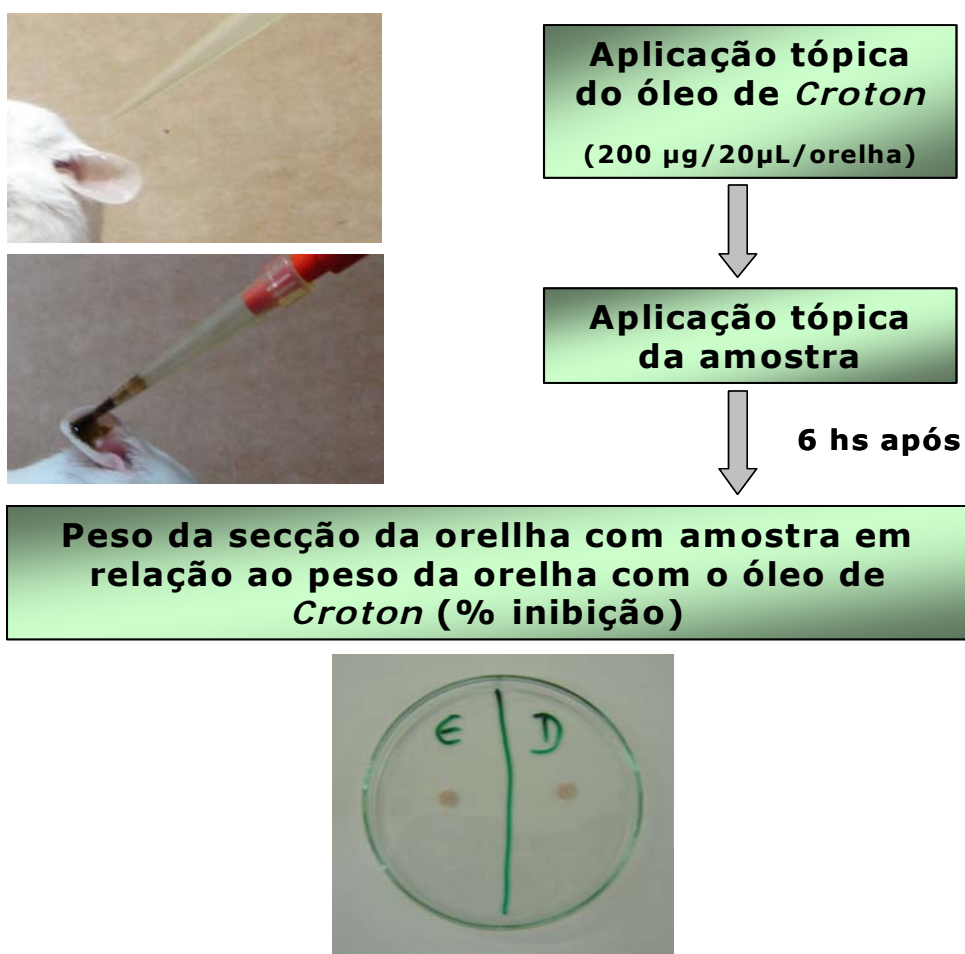
Após 6 horas os animais foram sacrificados com éter etílico e, as orelhas foram seccionadas com um vazador de metal em forma de disco de 6 mm de diâmetro. Essas seções são então pesadas em balança analítica e é calculada a porcentagem de inibição através da fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = (OC-OA/OC) \times 100$$

Onde:

OA = peso da secção circular da orelha + amostra

OC = peso da secção circular da orelha sem amostra com o óleo de *Croton*



Esquema 2.6. Esquema da seqüência utilizada na avaliação de atividade antiinflamatória – edema de orelha

2.6.4. Teste de atividade antiproliferativa

A linhagem celular utilizada foi a de HCT-116 (células de câncer colorretal humano) proveniente do Instituto Nacional do Câncer – RJ. Os ensaios foram realizados junto ao Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Análises Clínicas (Centro de Ciências da Saúde – UEM), sob a responsabilidade da Prof. Dr. Celso Vataro Nakamura.

A avaliação da atividade antiproliferativa foi verificada pelo método colorimétrico da sulforodamida B (SRB) no extrato bruto etanólico (**Ht-ET**), nos extratos alcaloídicos, **Ht-B-1** e **Ht-B-2** de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell, nos alcalóides isolados destes, **HT-III** (subulacina), **HT-IV** (sal de subulacina), **Ht-B-2-F3** (subulacina + 1 α -2 α -epóxi-1 β -hidróximetil-8 α -pirrolizidina), **HT-VIII** (1 β -2 β -hidróxi-1 α -hidróximetil-8 α -pirrolizidina) e no extrato etanólico de *H. procumbens* Mill (**Hp-E**).

Uma suspensão de células HCT-116 (células de câncer colorretal humano), em DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 50 μ g/ml de gentamicina foi distribuída em microplaca de 96 poços (TPP) na concentração de $2,5 \times 10^4$ células / poço. As células foram incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C com tensão de 5 % de CO₂ até subconfluência. As drogas testadas foram preparadas dissolvendo 10 mg dos extratos, frações e substâncias purificadas em 100 μ l de DMSO e depois completando o volume com 900 μ l de DMEM. Foram feitas diluições sucessivas em DMEM acrescido de 10% de SFB, sendo que a concentração máxima de DMSO nos poços foi de 1%. O meio antigo foi retirado e 100 μ l das várias concentrações (1000, 500 e 100 μ g/ml) dos extratos, frações, e dos alcalóides isolados foram adicionados. As células foram incubadas por mais 48 h nas condições descritas acima. Controle de células (sem a adição de compostos) foi realizado.

Passado este período, as células mortas foram retiradas e as células viáveis fixadas com 50 μ l de ácido tricloroacético (Synth) 10% a 4°C por 1 h. A placa foi lavada 5 vezes em água corrente e 50 μ l do corante sulforodamida B 4% (Sigma) foi adicionado. Após incubação de 30 min a 4°C ao abrigo da luz, a placa foi lavada 4 vezes com ácido acético 1%. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 μ l de solução Trisbase 10

mM e a absorbância determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek, modelo Power Wave XS) em 530 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e em dois momentos diferentes. Os resultados foram comparados com o controle de células e a concentração citotóxica capaz de destruir 50% da monocamada (CC₅₀) foi determinada.

2.6.5. Teste de atividade antiviral

A atividade antiviral foi avaliada com o vírus *Herpes simplex* tipo1 (HSV-1) e o método utilizado foi o da sulforodamida B (SRB), uma técnica colorimétrica onde se faz a leitura usando o pigmento (SRB) que cora as proteínas das paredes das células.⁶²

O protocolo como descrito a seguir foi realizado junto ao Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Análises Clínicas (Centro de Ciências da Saúde – UEM), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Tânia Nakamura.

A avaliação da atividade antiviral foi realizada no extrato bruto etanólico (**Ht-ET**), nos extratos alcaloídicos, **Ht-B-1** e **Ht-B-2** de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell e nos alcalóides isolados destes, **HT-III** (subulacina), **HT-IV** (sal de subulacina), **Ht-B-2-F3** (subulacina + 1 α -2 α -epóxi-1 β -hidróximetil-8 α -pirrolizidina), **HT-VIII** (1 β -2 β -hidróxi-1 α -hidróximetil-8 α -pirrolizidina) e no extrato etanólico de *H. procumbens* Mill (**Hp-E**).

A linhagem celular utilizada foi de células VERO (células de rim de macaco verde africano) cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e gentamicina a 37°C com tensão de 5% de CO₂.

A suspensão viral TCID₈₀ (Tissue Culture Infectious Dosis), que é a concentração viral experimentalmente pré-determinada para infectar 80% das células, foi distribuída sobre as monocamadas de células VERO em placas de 96 poços e incubados a 37°C durante 1 hora. As várias concentrações dos extratos e dos alcalóides isolados foram preparadas em DMEM, distribuídas nos poços e incubadas a 37°C com tensão de 5% de CO₂ durante 48 horas. Após esse período foi feita a lavagem retirando-se as células que foram destruídas pela ação do vírus e descolaram do tapete de células. Desta maneira ficam aderidas ao recipiente somente as células onde o vírus não penetrou pela ação de proteção da amostra (que determina por este método a atividade antiviral). A seguir foi realizada a leitura em equipamento ELISA (Bio-Tek FL-600) em densidade óptica (DO) de 530 nm.

As amostras foram solubilizadas em meio DMEM com até 5% de DMSO quando necessário. Os extratos foram testados nas concentrações de 100; 50; 25 µg/ mL e os alcalóides foram testados nas concentrações de 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 µg/ mL. Cada concentração dos extratos e dos alcalóides foi testada em triplicata.

Testes controles foram realizados nas células VERO sem os extratos e sem os alcalóides isolados e com o medicamento antiviral apropriado para o vírus HSV-1, Aciclovir.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão incluem a elucidação estrutural e/ou a caracterização dos componentes isolados de cada espécie vegetal em estudo e as análises das avaliações das atividades biológicas realizadas com os extratos, partições e com os compostos isolados destas.

3.1. Análise estrutural dos compostos isolados de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell.

A análise estrutural dos componentes isolados inclui os resultados do estudo químico e a discussão sobre a elucidação estrutural dos compostos isolados de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell.

O estudo químico desta planta revelou a presença de uma série de ésteres de cadeia longa, codificada como **HT-I**, de triterpenos como **HT-II** e **HT-IX** e, de quatro alcalóides pirrolizidínicos insaturados, codificados de **HT-III**, **HT-VI**, **HT-VII** e **HT-VIII**.

3.1.1. Análise cromatográfica de HT-I

A série de ésteres metílicos de cadeia longa, codificada como **HT-I** foi obtida a partir do fracionamento do extrato hexânico (**Ht-H**) de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell (1ª. Coleta) como descrito no **Esquema 2.1.** (capítulo 2).



(HT-I)

Em uma primeira análise, por CCD e RMN de ^1H inferiu-se que se tratava de uma única substância, mas quando submetido à análise por CG-EM verificou-se que se tratava de uma série de ésteres metílicos, como ilustra a **Tabela 3.1.**

As estruturas de **HT-1** foram caracterizadas através da análise dos espectros de massas, CG-EM (**Tabela 3.1**) e com auxílio de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT e COSY (**Figuras 3.1** e **3.2**, pág. 49 e 50).

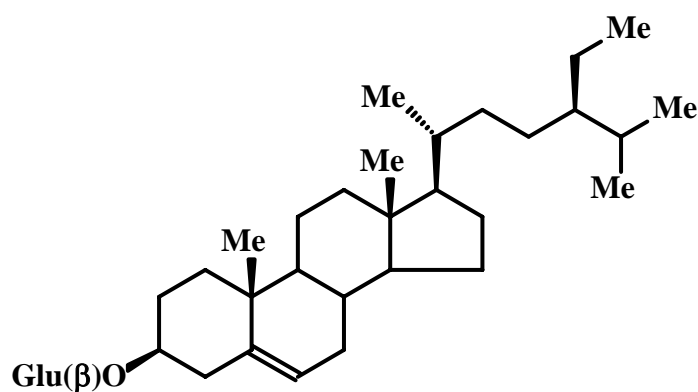
Tabela 3.1.: Ésteres metílicos caracterizados através de dados extraídos da cromatografia de **HT-I** por CG-EM

Tempo de Retenção (min)	Éster metílico	Pico Base [m/z – 100%]	Massa [M ⁺⁺]
11,01	8-oxo-octanoato de metila	43	172
14,58	nonacenoato de metila	74	170
15,30	decenoato de metila	55	216
15,56	hexadecenoato de metila	43	286
17,43	eicosenoato de metila	43	340
19,46	tetracosenoato de metila	43	380

Coluna Apolar/ Solvente CHCl₃.

3.1.2. Determinação estrutural de HT-II

O triterpeno glicosilado **HT-II** foi isolado a partir do fracionamento do extrato hexânico (Ht-H) de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell (1ª. Coleta) como descrito no **Esquema 2.1.** (capítulo 2).



(HT-II)

A identificação foi realizada a partir dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 3.3**, pág 51). Os valores de deslocamentos de RMN de ^{13}C apresentaram-se idênticos aos do triterpeno 3- β -O- β -D-glucopiranosil-sitosterol (**Tabela 3.2**, pág 52).⁶³

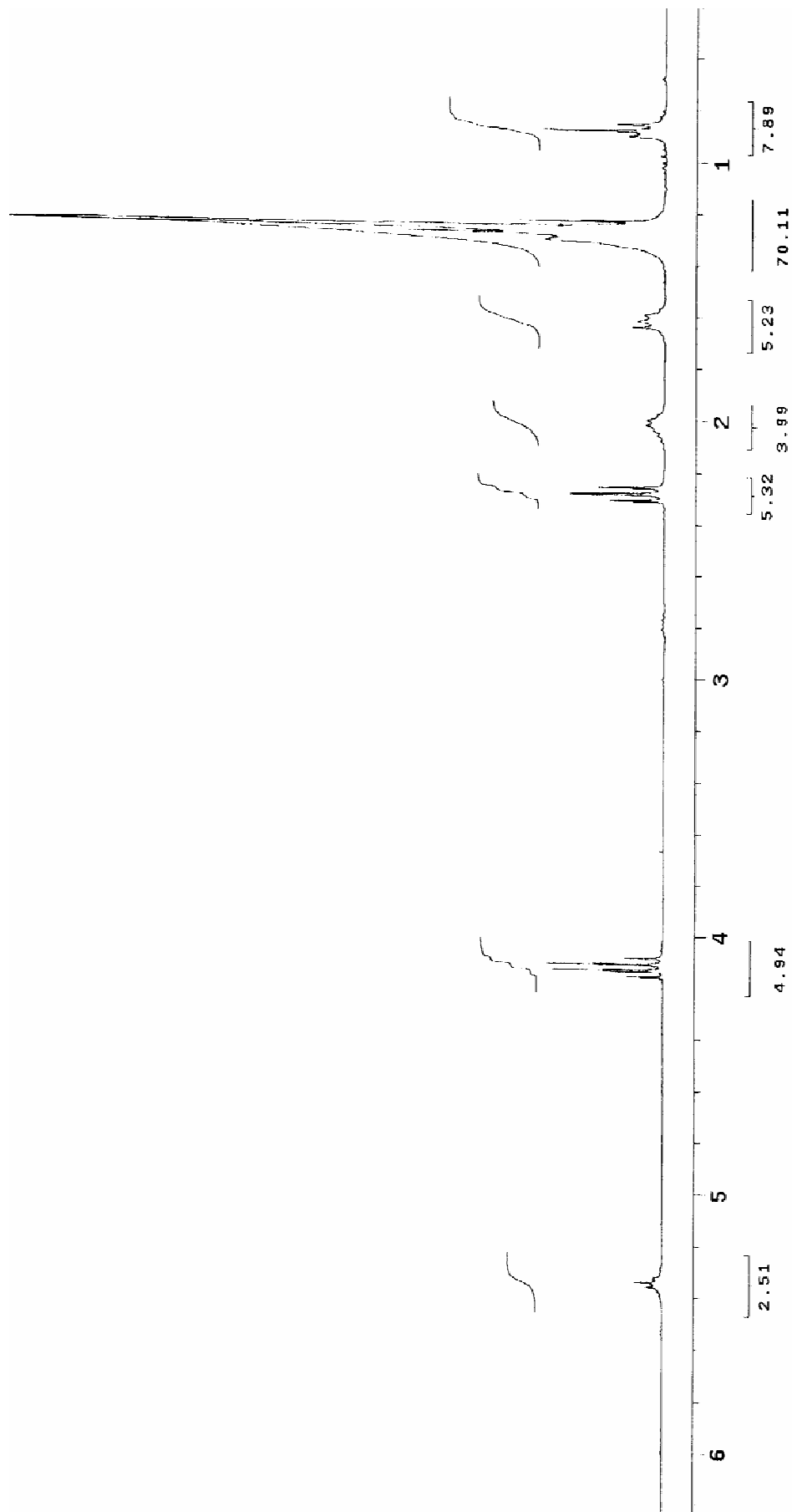


Figura 3.1.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CDCl_3) de **HT-I**

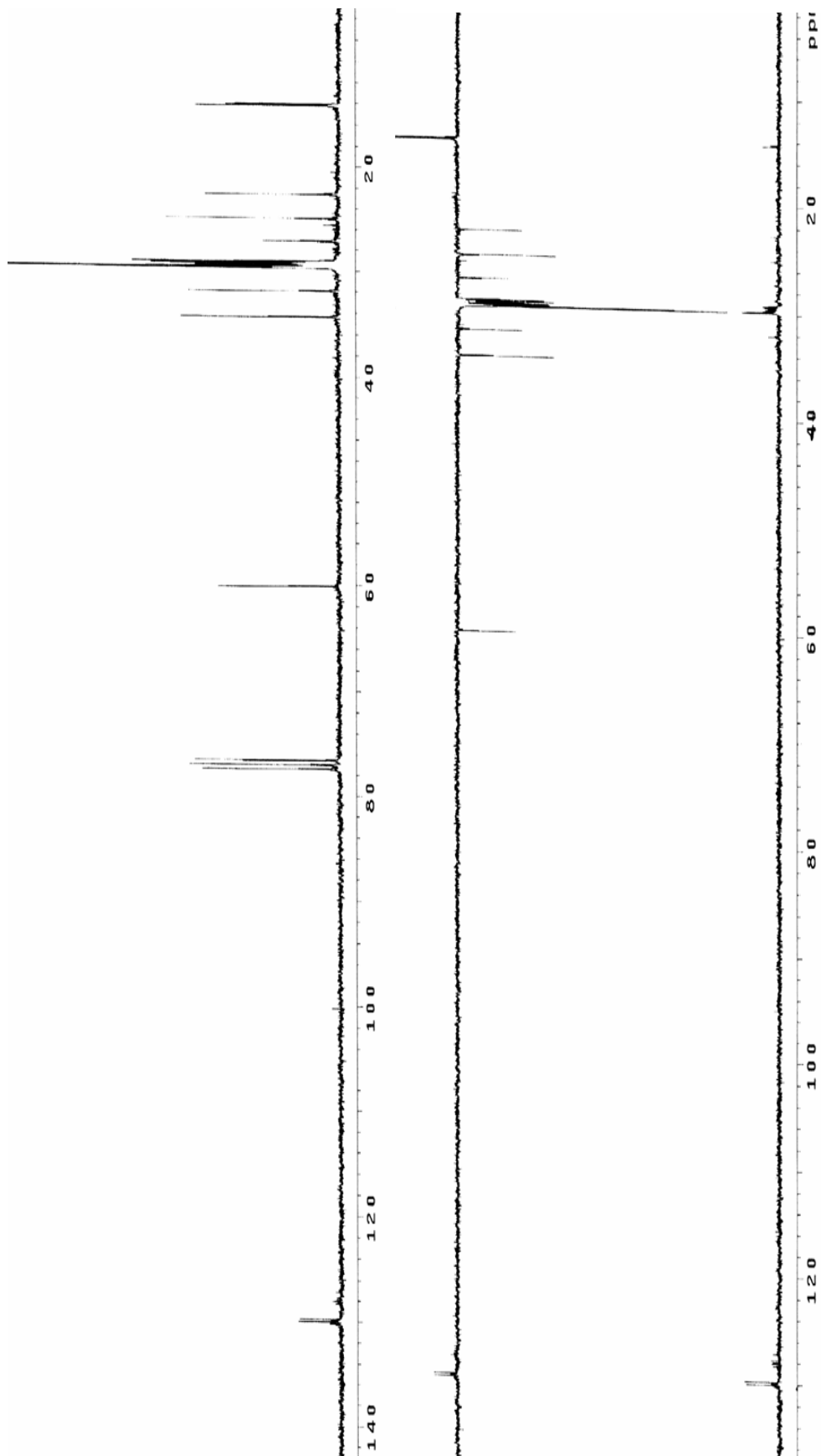


Figura 3.2.: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT, 75,5 MHz/ CDCl_3) de HT-I

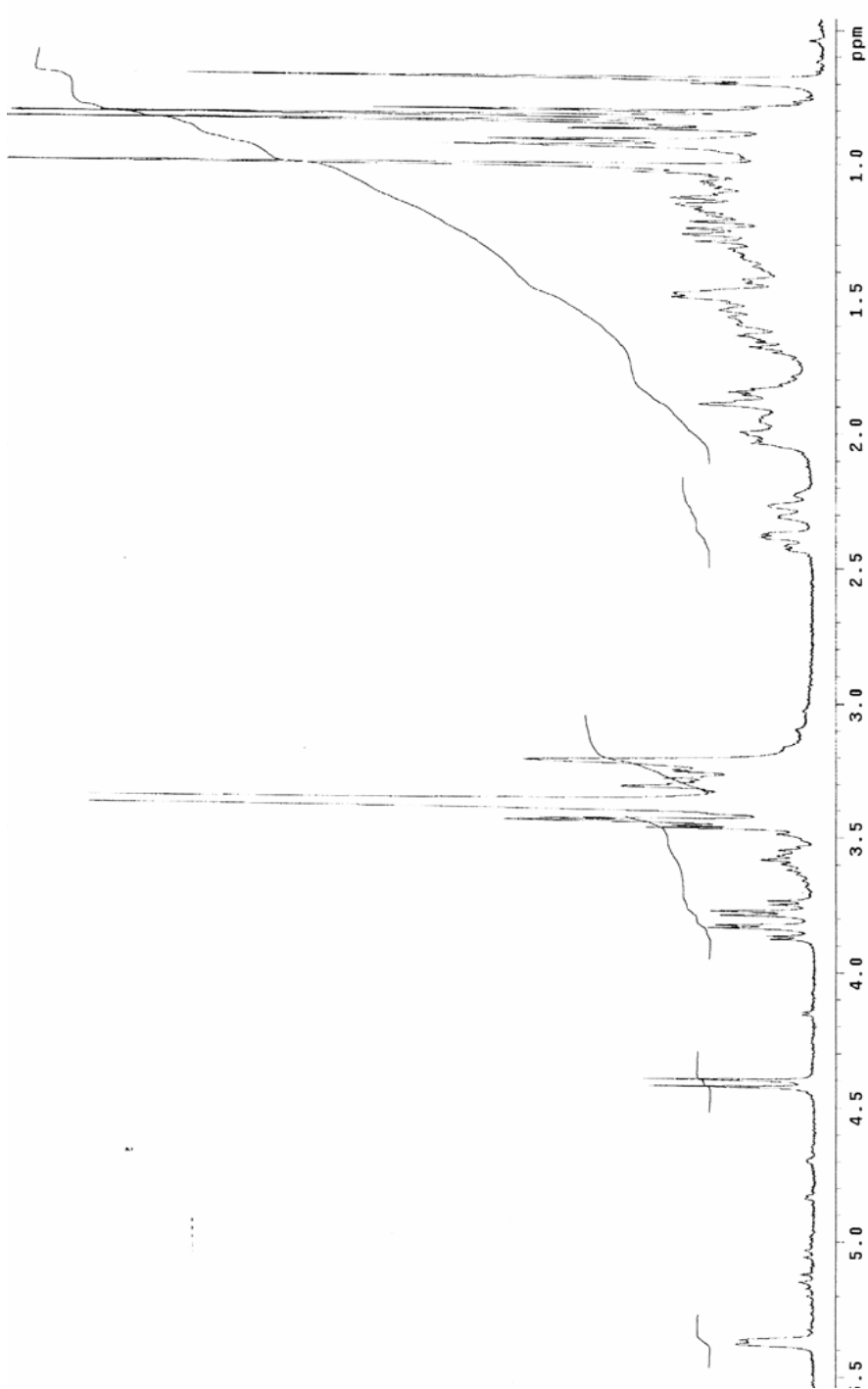


Figura 3.3.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CDCl_3) de **HT-II**

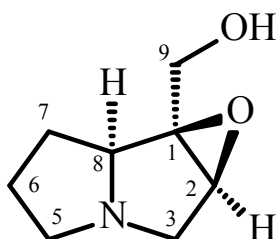
Tabela 3.2.: Dados de RMN de ^{13}C de **HT-II** e de sitosterol glicosilado ⁶³

No. C	HT-II	3 β -O β -D-glicopiranosil sitosterol ⁶³
1	37,24	37,2
2	29,26	29,7
3	78,51	80,0
4	39,15	38,9
5	140,91	140,3
6	121,90	122,1
7	31,86	31,8
8	31,98	31,9
9	50,17	50,1
10	36,74	36,7
11	21,07	21,0
12	39,76	39,7
13	42,30	42,3
14	56,67	56,7
15	24,30	24,3
16	28,34	28,2
17	56,09	56,0
18	11,75	11,8
19	19,20	19,3
20	36,21	36,1
21	18,79	18,8
22	34,01	33,9
23	26,18	26,0
24	45,86	45,8
25	30,07	29,5
26	18,99	19,0
27	19,76	19,8
28	23,18	23,0
29	11,93	11,9
1'	102,52	102,2
2'	75,25	75,0
3'	77,98	77,0
4'	71,58	71,3
5'	78,40	78,1
6'	62,71	62,5

Os espectros de **HT-II** e de 3 β -O β -D-glicopiranosil sitosterol foram obtidos em CDCl_3 .

3.1.3. Análise estrutural de HT-III

A substância **HT-III** foi isolada da fração alcaloídica obtida da extração ácido-base realizada com o extrato bruto etanólico, da 2ª coleta de *H. transalpinum* var. *transalpinum* (**Ht-ET**). Os extratos alcaloídicos **Ht-B-1**, extrato diclorometânico e **Ht-B-2**, extrato de acetato de etila foram fracionados por CC e CCDP até obtenção de compostos consideravelmente puros. O alcalóide **HT-III** foi isolado do fracionamento de **Ht-B-1** onde se obteve depois de seco um sólido amorfo alaranjado, como descrito no capítulo 2 (**Esquema 2.1**).



(**HT-III**)

A estrutura de **HT-III** foi elucidada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC, HMQC, NOESY e por comparação destes com os dados descritos na literatura para subulacina (1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-8 α -pirrolizidina) já isolada anteriormente de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell.,²⁴ de *Crotalaria trifoliastrum* Wild. (Leguminosae) e,^{46, 47} de *Heliotropium subulatum* Hochst. (Boraginaceae).^{48, 49}

Dados de **HT-III**:

RMN de ^1H , 300,06 MHz/ CDCl_3 , δ ppm (**Figura 3.4**, pág 60) e RMN de ^{13}C , DEPT, 75,5 MHz/ CDCl_3 (**Figura 3.5**, pág 61), δ ppm, estão descritos na **Tabela 3.3**.

RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CDCl_3 , δ ppm, (**Figura 3.6**, pág 62), com os dados descritos na **Tabela 3.4**

RMN 2D de ^1H e ^{13}C (HMQC), 75,5 MHz/ CDCl_3 , δ ppm, (**Figura 3.7**, pág 63), e dados relacionando hidrogênios e carbonos descritos na **Tabela 3.3**

RMN 2D de ^1H e ^{13}C (HMBC), 75,5 MHz/ CDCl_3 , δ ppm, (**Figura 3.8**, pág 64) e dados relacionando hidrogênios e carbonos descritos na **Tabela 3.4**.

RMN 2D de ^1H (NOESY), 300,06 MHz/ CDCl_3 , δ ppm, (**Figura 3.9**, pág 65), com os dados descritos na **Tabela 3.5**.

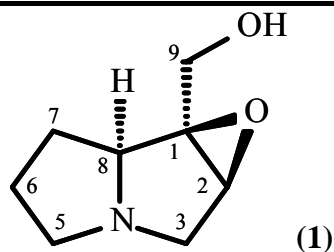
EM m/z (int. rel. %): 155 (11,2) [M^{+}]; 124 (8,9); 122 (8,1); 96 (9,4); 71 (6,9); 70 (100,0); 68 (7,9); 55 (49,5); 54 (9,2); 43 (15,1); 42 (20,8); 41 (31,0) e 39 (13,1).

O espectro de RMN de ^{13}C / DEPT de **HT-III** apresentou sinais concordantes com os de alcalóide pirrolizidínico, mostrando deslocamentos correspondentes ao esqueleto pirrolizidínico em δ 53,9 (C-3) e 56,6 (C-5), que são os carbonos metilênicos vizinhos do átomo de nitrogênio. Os sinais em δ 27,2 e 25,5 relativos aos carbonos metilênicos C-6 e C-7, respectivamente, confirmam que um dos anéis do sistema pirrolizidínico não possui substituintes. O deslocamento em δ 59,6 (C-9) sugere um grupo hidroximetilênico em um dos anéis.

Os deslocamentos de ^1H e de ^{13}C da substância em análise apresentaram-se idênticos aos de subulacina (**1**), ^{46, 47, 49} que possui além do esqueleto pirrolizidínico um anel epóxido nos carbonos C-1 e C-2, caracterizados pelos sinais em δ 72,2 (C) e 64,7 (CH).

Além da coincidência dos valores de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C com os da literatura, evidencia-se pelo mapa de contorno de RMN de ^1H (COSY) a correlação de hidrogênios metilênicos geminais δ_{H} 3,00 com δ_{H} 3,15 (H-3 β e 3 α), δ_{H} 2,60 com δ_{H} 3,03 (H-5a e 5b), δ_{H} 1,82 com δ_{H} 1,95 (H-6a e 6b), δ_{H} 1,76 com δ_{H} 1,90 (H-7a e 7b) e δ_{H} 3,85 com δ_{H} 3,95 (H-9a e 9b).

Tabela 3.3.: Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de **HT-III** e de **1** ⁴⁹



		HT-III	(1) ⁴⁹	
Nº H/C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	72,2		72,0	
2	64,7	3,68 sl	64,4	3,63
3	53,9	3,15 dd (13,8 e 0,6)	53,7	3,09
		3,00 d (13,8)		2,95
5	56,6	2,60 m	56,3	2,54
		3,03 sobreposto		3,00
6	27,2	1,82 m	26,9	1,68
		1,95 m		1,95
7	25,5	1,76 m	25,3	
		1,90 m		
8	63,9	3,57 dd (6 e 7,5)	63,7	3,51
9	59,6	3,85 d (12,9)	59,7	3,85
		3,95 d (12,9)		

Espectros e mapas de contorno de **HT-III** e **1** foram obtidos utilizando como solvente CDCl_3 .

Tabela 3.4: Correlações homonucleares de RMN 2D (COSY) e heteronucleares (HMBC) de **HT-III**

¹H		COSY	HMBC
Nº H	δ multiplicidade (<i>J</i> em Hz)	posição (<i>J</i> em Hz)	posição (δ ¹³ C)
1			
2	3,68 sl	H-3α (0,6) H-3β	C-3 (53,9)
3α	3,15 dd (13,8 e 0,6)	H-3β (13,8) H-2 (0,6)	
3β	3,00 d (13,8)	H-3α (13,8) H-2	C-1 (72,2); C-5 (56,6); C-8 (63,9)
5a	2,60 m	H-5b (sobreposto) H-6a / H-6b	
5b	3,03 sobreposto	H-5a H-6a / H-6b	
6a	1,82 m	H-6b H-7a / H-7b	
6b	1,95 m	H-6a H-7a / H-7b	
7a	1,76 m	H-7b H-8 (6 ou 7,5) H-6a / H-6b	
7b	1,90 m	H-7a H-8 (6 ou 7,5) H-6a / H-6b	
8	3,57 dd (6 e 7,5)	H-7a (6 ou 7,5) H-7b (6 ou 7,5)	
9a	3,85 d (12,9)	H-9b (12,9)	C-1 (72,2); C-2 (64,7); C-8 (63,9)
9b	3,95 d (12,9)	H-9a (12,9)	C-1 (72,2); C-2 (64,7); C-8 (63,9)

Espectros e mapas de contornos de **HT-III** foram obtidos utilizando como solvente CDCl₃.

A correlação a três ligações no mapa de contorno de ¹H (COSY) é verificada para os sinais em δ_H 3,57 com δ_H 1,76/ 1,90, relativas as correlações de H-8 com H-7a e 7b; δ_H 3,68 com δ_H 3,15, sendo H-2 com um dos hidrogênios da posição 3 (H-3α); δ_H 1,82/1,95 com δ_H 3,03 e δ_H 2,60, sendo H-6a/6b com H-5a e com H-5b e, δ_H 1,76/1,90 com δ_H 1,82/1,95, sendo H-7a/7b com H-6a/6b.

Verifica-se também no mapa de contorno de ^1H (COSY) o acoplamento de H-2 (δ_{H} 3,68) com os hidrogênios H-9, δ_{H} 3,85 e δ_{H} 3,95 (H-9a e H-9b), sugerindo possivelmente um acoplamento em “W”.

No mapa de contorno de HMBC observam-se as correlações dos hidrogênios H-9 (δ_{H} 3,85 e 3,95) com o carbono C-1 a duas ligações (δ_{C} 72,2) e com os carbonos C-2 e C-8 a três ligações (δ_{C} 64,7 e δ_{C} 63,9, respectivamente). Ainda pode-se observar as correlações do hidrogênio H-3 β (δ_{H} 3,00) com os carbonos C-1, C-5 e C-8 a três ligações (δ_{C} 72,2, δ_{C} 56,6 e δ_{C} 63,9, respectivamente) e do hidrogênio H-2 (δ_{H} 3,68) com o carbono C-3 (δ_{C} 53,9), a duas ligações.

Outras correlações de menor intensidade sejam por duas ou por três ligações são vistas no mapa de contorno de HMBC que também são concordantes com a estrutura proposta para **HT-III**.

No mapa de contorno de NOESY de **HT-III** (**Figura 3.9**), observa-se, além da vizinhança física entre hidrogênios geminais, a vizinhança física entre os hidrogênios H-5 (δ_{H} 2,60 e δ_{H} 3,03) com os H-6 (δ_{H} 1,82 e δ_{H} 1,95) e, um dos hidrogênios de H-7 (δ_{H} 1,90) com o H-8 (δ_{H} 3,57).

Observa-se também, um sinal pequeno no espectro de NOESY, sugerindo interação entre os hidrogênios H-2 (δ_{H} 3,68) e H-8 (δ_{H} 3,57), indicando que estes dois hidrogênios estariam na posição α . Assim confirma-se a estereoquímica de **HT-III** como 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-8 α -H-pirrolizidina (**Tabela 3.5**).

Tabela 3.5.: Correlações do mapa de contorno de ^1H (NOESY) de **HT-III**

	^1H	NOESY
No. H	δ multiplicidade (J em Hz)	δ multiplicidade (posição)
1		
2	3,68 sl	3,57 (H-8)
3a	3,00 d (13,8)	
3b	3,15 dd (13,8 e 0,6)	
5a	2,60 m	3,03 (H-5b) 1,82 (H-6a) / 1,95 (H-6b)
5b	3,03 sobreposto	2,60 (H-5a) 1,82 (H-6a) / 1,95 (H-6b)
6a	1,82 m	1,95 (H-6b)
6b	1,95 m	1,82 (H-6a)
7a	1,76 m	1,90 (H-7b) 1,82 (H-6a) / 1,95 (H-6b)
7b	1,90 m	3,57 (H-8) 1,76 (H-7a) 3,57 (H-8)
8	3,57 dd (6 e 7,5)	1,90 (H-7b) 3,68 (H-2)l
9a	3,85 d (12,9)	3,95 (H-9b)
9b	3,95 d (12,9)	3,85 (H-9a)

A análise dos dados acima exposta confirmou que **HT-III** é o alcalóide pirrolizidínico conhecido como subulacina ou $1\beta,2\beta$ -epóxi- 1α -hidroximetil-pirrolizidina e os dados da literatura existentes para esta substância confirmaram a estrutura e estereoquímica proposta.

Verificou-se que a elucidação estrutural publicada para este alcalóide encontra-se com dados de RMN de ^1H incompletos ou mesmo com alguns equívocos em elucidações por alguns pesquisadores.^{46, 47, 48, 49} Como pode ser observado na **Tabela 3.3** concluímos as atribuições dos hidrogênios H-7a, H-7b e H-9b que se encontravam incompletos nas atribuições do alcalóide subulacina.^{48, 49}

A seguir apresentamos a conformação mais estável adotada para subulacina através de cálculos que empregam o método *ab initio* HF (Hartree Fock) para otimização da geometria da molécula e o conjunto de bases 6-31G*, programa Gaussian 98.

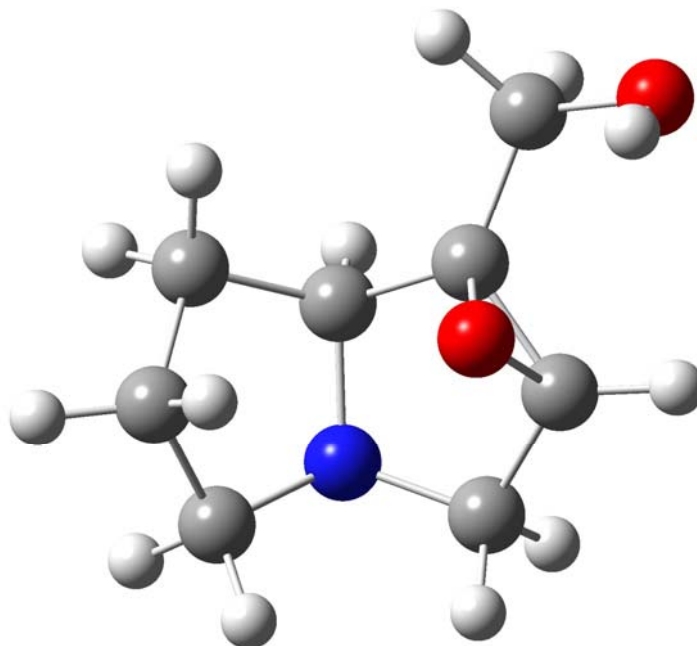


Ilustração 3.1.: Representação da conformação de mais baixa energia adotada pela molécula do alcalóide subulacina.

A análise dos dados obtidos dos espectros e mapas de contorno de RMN unidimensional e bidimensional de ^1H e de ^{13}C de **HT-III**, do espectro de massas e dos dados publicados sobre o alcalóide subulacina ou 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-8 α -pirrolizidina (**1**) confirmaram a estrutura de **HT-III**.

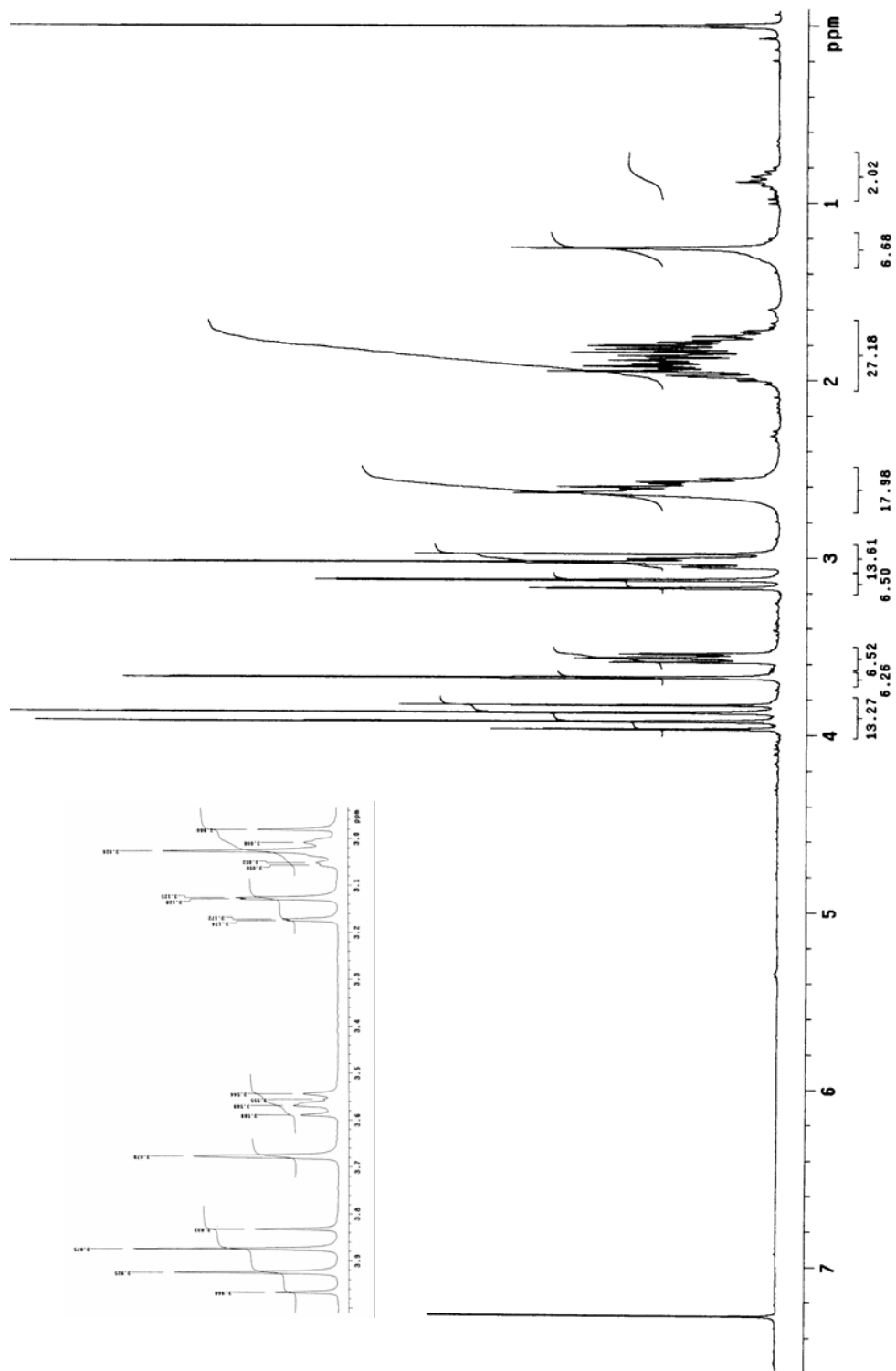


Figura 3.4.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CDCl_3) de HT-III

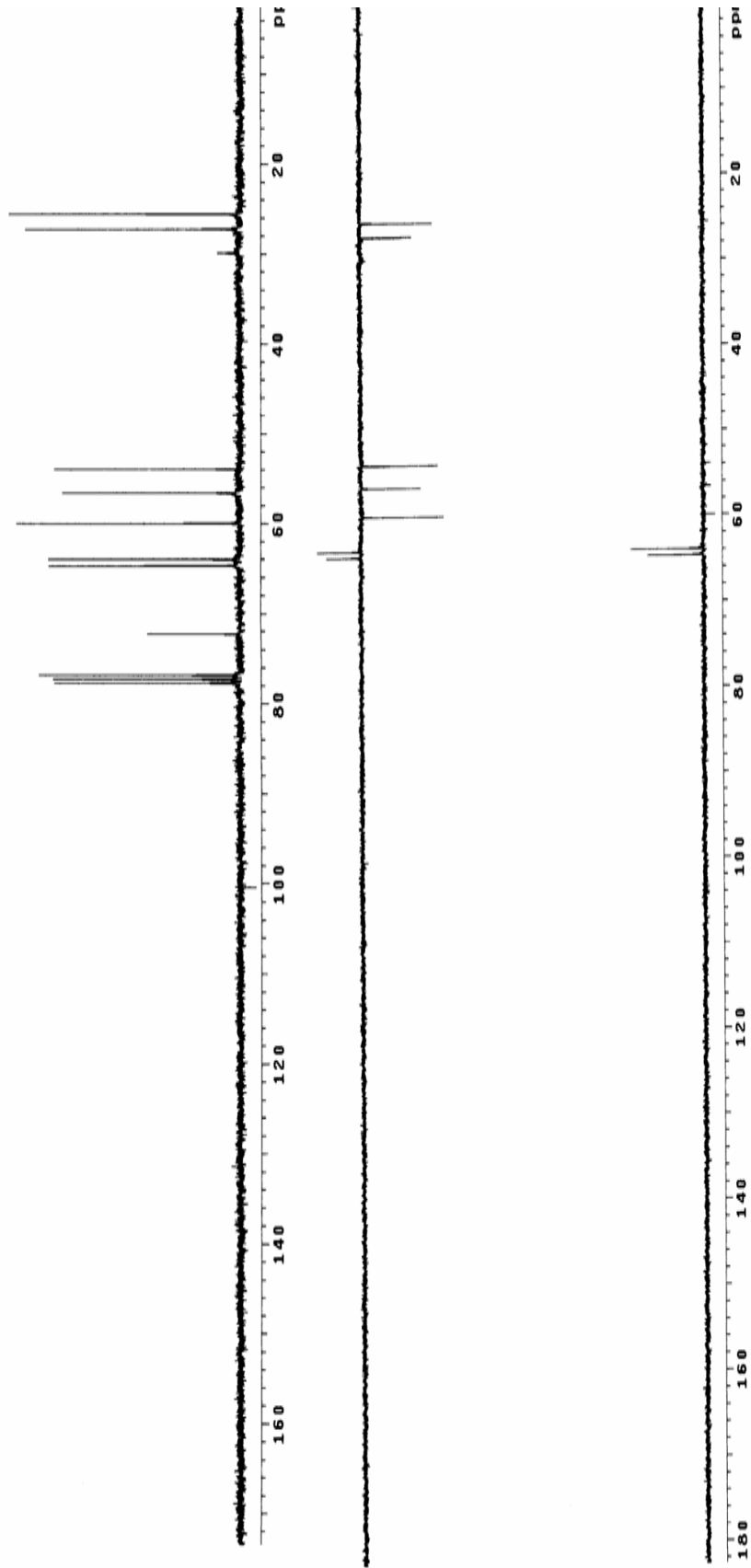


Figura 3.5.: Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT (75,5 MHz/ CDCl_3) de **HT-III**

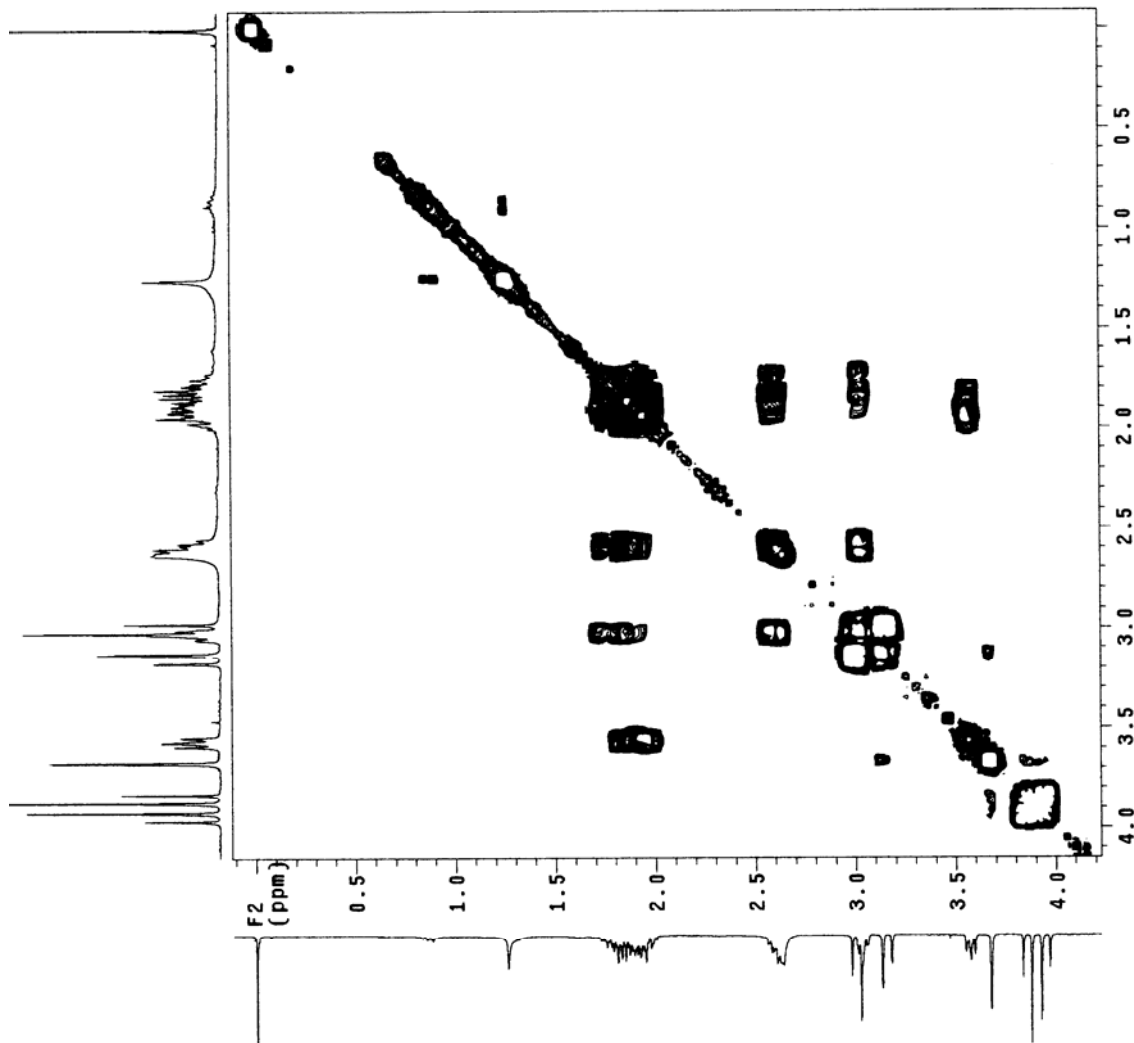


Figura 3.6.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CDCl_3 de **HT-III**

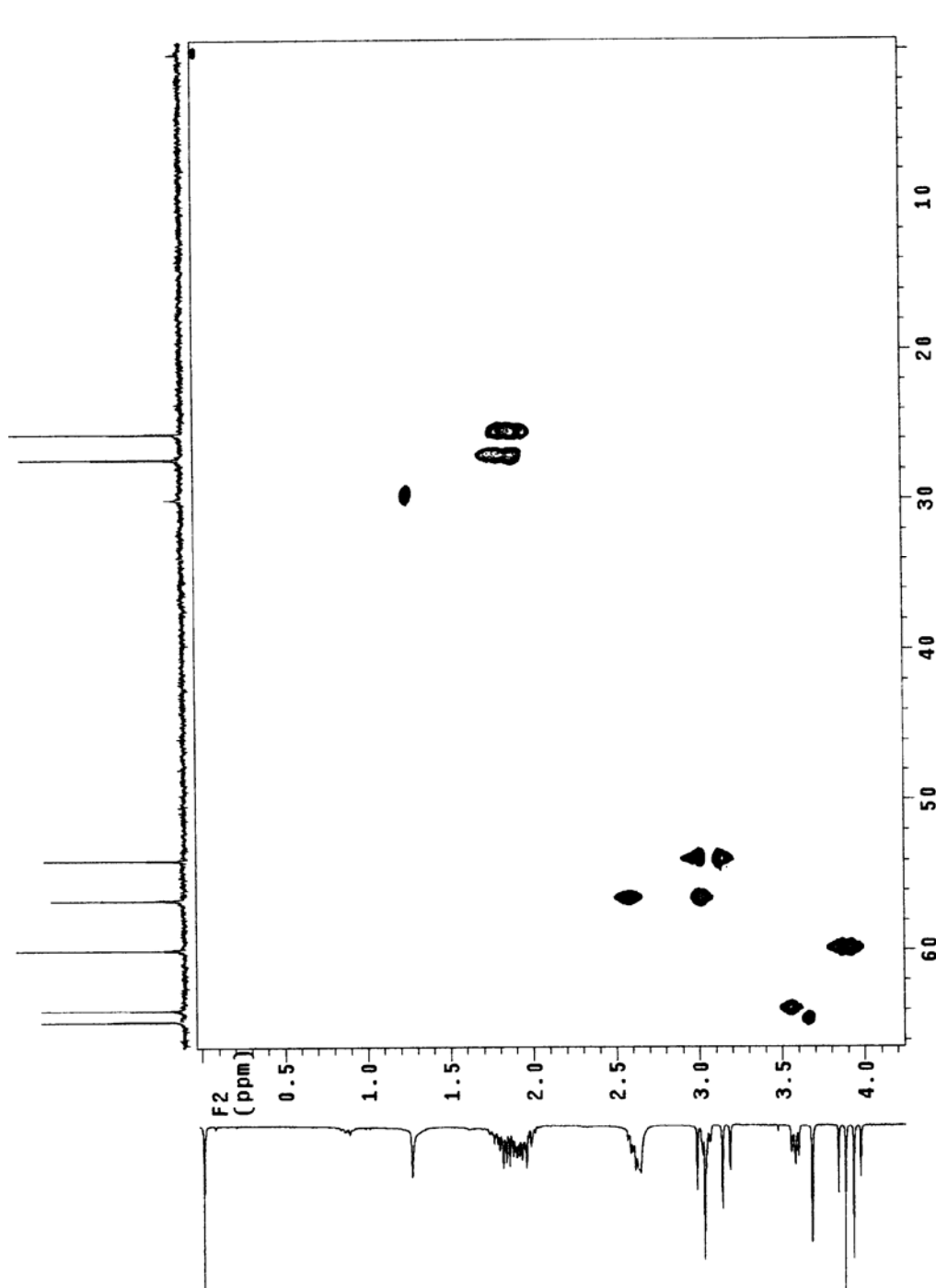


Figura 3.7.: Mapa de contorno de RMN 2D de $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ (HMQC), 75,5 MHz/ CDCl_3 de **HT-III**

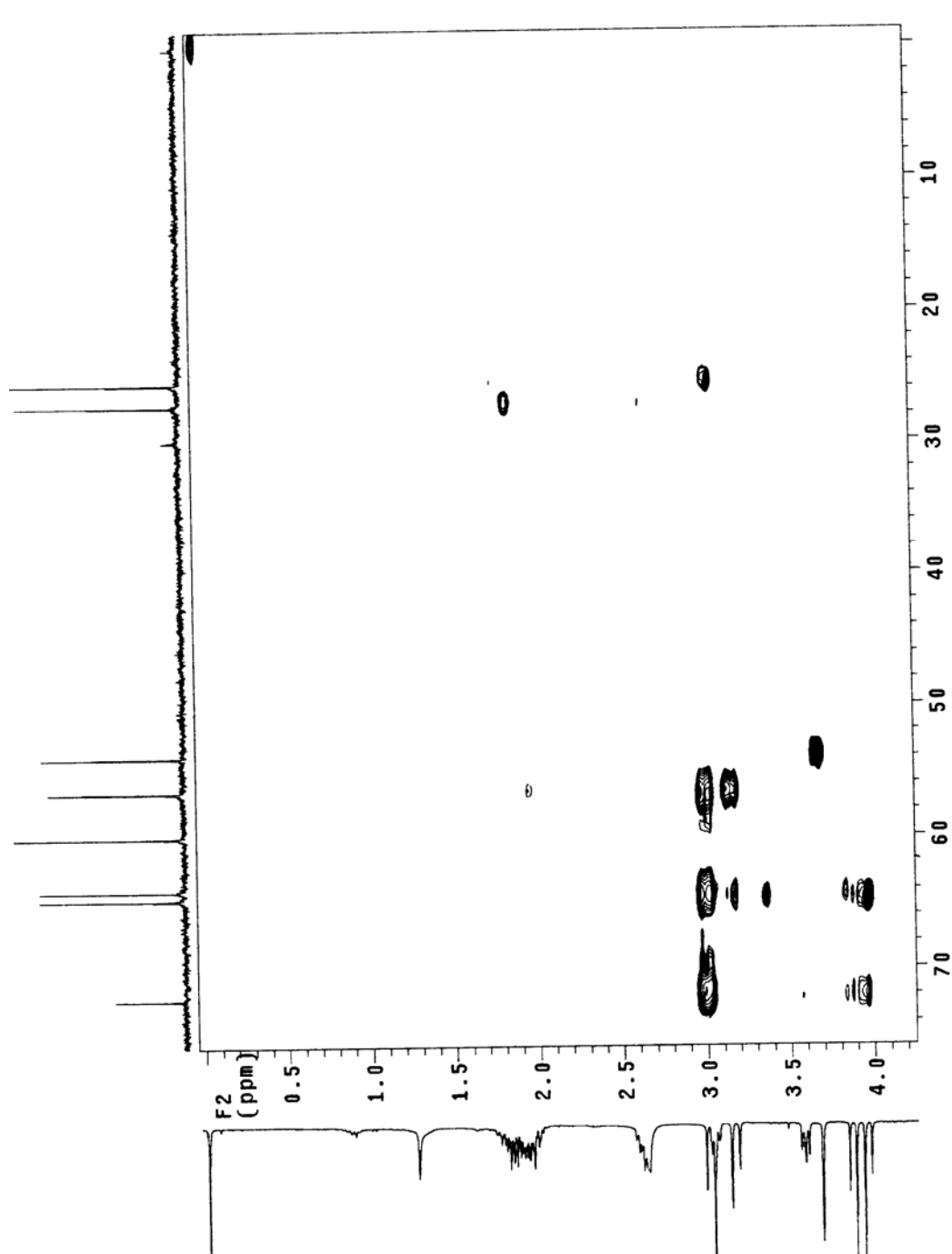


Figura 3.8.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^{13}C x ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CDCl_3 de **HT-III**

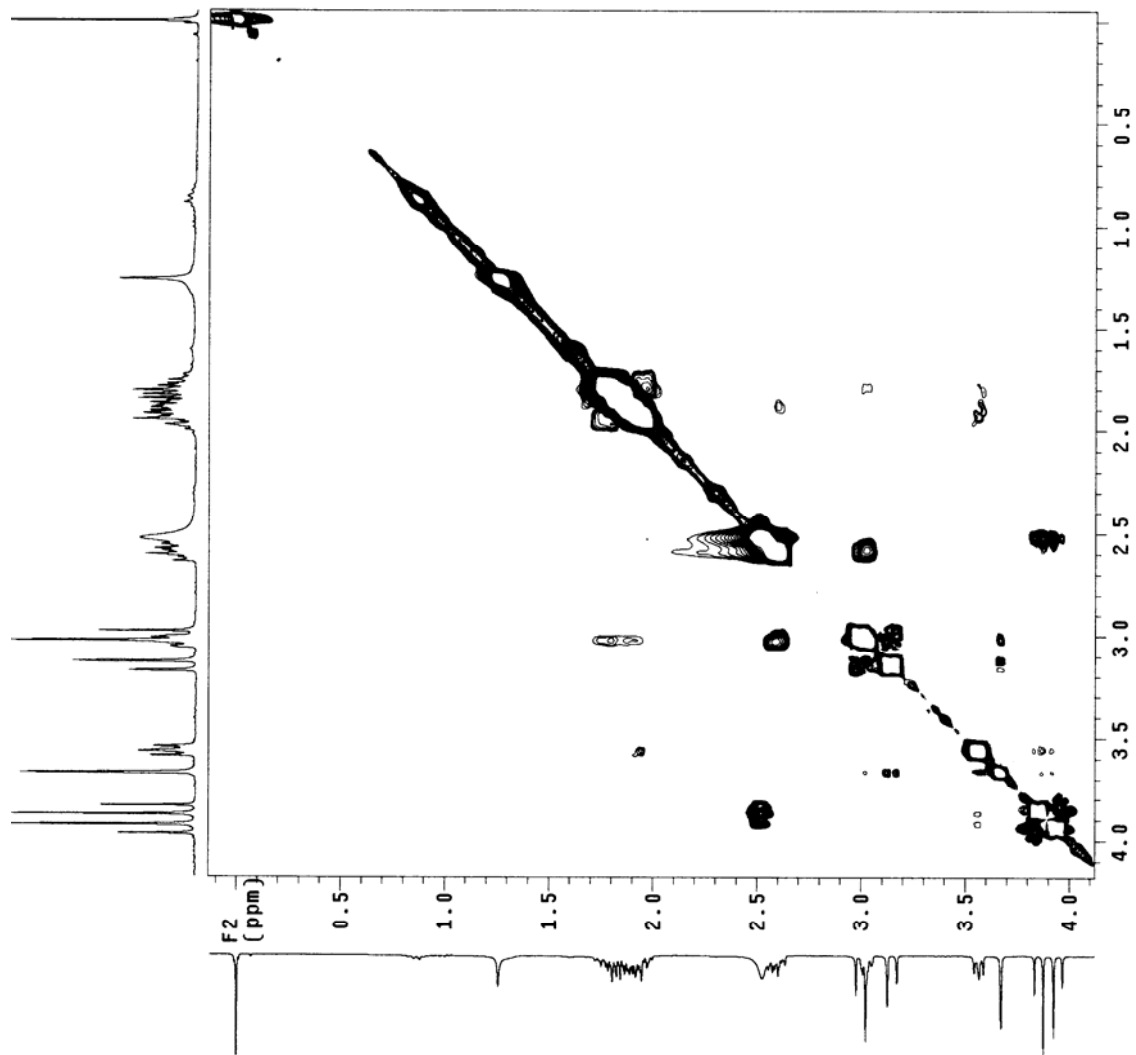


Figura 3.9.: Mapa de contorno de RMN 2D de ¹H (NOESY) de **HT-III** (CDCl₃)

3.1.4. Análise estrutural de HT-IV

A substância **HT-IV** foi isolada na forma de sólido amorfo marrom amarelado, do extrato de alcalóides obtido da extração ácido-base realizada com o extrato bruto etanólico (**Ht-ET**). O alcalóide **HT-IV** foi isolado do fracionamento de **Ht-B-2** (extrato alcaloídico de acetato de etila) e apresentou diferenças de Rfs consideráveis quando cromatografada junto com a substância subulacina. (**HT-III**).

A análise dos dados de RMN de **HT-IV** mostrou muita semelhança destes com os do alcalóide subulacina (1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-pirrolizidina)^{47, 49}, anteriormente isolado, mas com dois sinais de carbono a mais no espectro de RMN de ¹³C, sugerindo pelos valores de δ_C 176,2 e 22,4 um grupamento acetil. Isto nos levou a propor, inicialmente, a estrutura de **HT-IV** como sendo de um derivado acetilado de subulacina (**1**), com um grupo acetóxi-metilênico ligado ao C-1.

No entanto, como os valores de deslocamento para H-9 e C-9 mostraram-se praticamente idênticos aos da subulacina (**1**), descartamos essa hipótese, uma vez que no composto acetilado estes hidrogênios e carbono deveriam ser desblindados, tendo então maiores valores de deslocamento químico. Desta forma, propôs-se que estes sinais seriam de um sal de acetato que estaria como contra íon do alcalóide subulacina, explicando desta maneira as diferenças de Rfs.

O espectro de massas de **HT-IV** apresentou o [M^{+•}] em m/z 215 (155 + CH₃COO⁻ + H⁺), referentes às massas do alcalóide subulacina (m/z 155) formando um sal com o ácido acético (m/z 60) e, também, outras massas idênticas àquelas encontradas no espectro de massas de subulacina (**HT-III**), mostrando o mesmo padrão de fragmentação.

3.1.1.5. Análise estrutural de HT-V

O composto **HT-V** foi isolado como um sólido amorfo alaranjado do fracionamento de **Ht-B-2** (extrato alcaloídico de acetato de etila) como organizado no **Esquema 2.2** (capítulo 2).

Os dados de RMN de **HT-V** foram idênticos aos verificados para **HT-III**, o alcalóide 1β-2β-epóxi-1α-hidroximetil-pirrolizidina (subulacina).^{47, 49}

3.1.1.6. Análise estrutural de HT-VI

A realização de várias *CC flash* de **Ht-B-2** (extrato alcaloídico de acetato de etila, como ilustrado no **Esquema 2.2**) levou ao isolamento de **HT-VI**, que foi obtido na forma de cristais sólidos amarelados. Os dados dos experimentos de RMN e de EM de **HT-VI** estão relacionados a seguir:

RMN de ^1H de **HT-VI**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm (**Figura 3.10**, pág. 76) e RMN de ^{13}C , DEPT, 75,5 MHz/ CD_3OD (**Figura 3.11**, pág. 77), δ ppm, os valores de deslocamentos estão descritos na **Tabela 3.6**.

Dados de RMN 2D de ^1H (COSY) de **HT-VI**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm, (**Figura 3.12**, pág. 78) estão descritos na **Tabela 3.7**.

Dados de RMN 2D ^{13}C e ^1H (HMQC) de **HT-VI**, 75,5 MHz/ CD_3OD , δ ppm, (**Figura 3.13**, pág. 79) relacionando hidrogênios e carbonos estão descritos na **Tabela 3.6**.

Dados de RMN 2D ^{13}C e ^1H (HMBC) de **HT-VI**, 75,5 MHz/ CD_3OD , δ ppm, (**Figura 3.14**, pág. 80) relacionando hidrogênios e carbonos estão descritos na **Tabela 3.7**.

RMN de ^1H (diferenças de NOE) de **HT-VI**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm, pode ser visualizado na **Figura 3.15**, pág. 81.

EM m/z (int. rel. %): 155 (3,6) [M^{+}]; 138 (3,0); 124 (3,9); 112 (2,6); 96 (5,7); 83 (13,5); 71 (6,2); 70 (100,0); 68 (5,7); 55 (16,3); 43 (10,8); 42 (12,3); 41 (19,1) e 39 (7,0).

Os dados espectroscópicos de RMN de **HT-VI** (Figuras 3.10 a 3.15 e Tabelas 3.6 e 3.7) levaram à sugestão da estrutura **47**, na qual, ao invés do anel epóxido 1β , 2β como em **(1)** sugere-se um anel epóxido 1α , 2α .

Tabela 3.6.: Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de **HT-VI** (**47**) e da subulacina (**1**)

HT-VI			Subulacina	
Nº H/C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J em Hz)
1	83,7		70,9	
2	65,2	4,59 d (3,6)	63,4	3,95 sobreposto
3	62,3	3,81 dd (3,6 e 12,9)	54,0	3,38 d (13,8)
		3,89 d (12,9)		3,79 dd (13,8 e 1,2)
5	56,2	3,23 m (11,4)	58,4	2,97m (5,4)
		3,50 m (11,4 e 6,3)		3,62 m
6	27,9	2,08 m	27,1	1,96 m
		2,23 m		2,24 m
7	25,0	2,00 m	26,2	2,19 m
		2,30 m		2,26 m
8	72,1	4,31 dd (4,2 e 8,7)	67,9	4,45 dd (6,3 e 8,1)
9	64,0	3,69 d (11,4)	60,2	3,97 d (12,9)
		3,93 d (11,4)		3,78 d (12,9)

Espectros e mapas de contorno de **HT-VI** (**47**) e da Subulacina (**1**) foram obtidos utilizando como solvente o CD_3OD .

O alcalóide (**47**) foi obtido através de síntese por Culvenor e colaboradores (1967), e teve sua estereoquímica definida pela comparação dos dados de RMN de ^1H com os de subulacina (**1**).⁴⁷ Os autores basearam seus estudos no efeito do grupo epóxido (1α , 2α em **47** e 1β , 2β em **1**) sobre o deslocamento químico de H-3 e H-8.



Em nosso trabalho foram utilizadas dados de experimentos de RMN 2D de COSY e de HMBC (**Tabela 3.7**), de diferenças de NOE, de RMN de ^{13}C e também, comparação com os dados da subulacina (**1**), para a determinação da estereoquímica de **HT-VI (47)**.

No experimento de RMN de COSY **HT-VI** não se verifica o acoplamento em “W” dos hidrogênios H-2 com os H-9a e H-9b, como observado no caso da subulacina (**1**). Isto indica que este hidrogênio H-2 (δ_{H} 4,59; dubleto) se encontra em posição β , onde se pode verificar no desenho de otimização da molécula (**Ilustração 3.2**) que este acoplamento em “W” não mais existiria.

No espectro de RMN de diferenças de NOE de **HT-VI (Figura 3.15)** não foi verificada interação dos hidrogênios H-2 (δ_{H} 4,59) com o H-8 (δ_{H} 4,31). Desta forma, sugere-se que estes estejam de lados opostos do esqueleto pirrolizidínico do alcalóide **HT-VI** como se propõe na estrutura (**47**).

Tabela 3.7: Correlações homonucleares de RMN 2D de COSY e heteronucleares de RMN 2D de HMBC de **HT-VI**

¹H		COSY	HMBC
Nº H	δ multiplicidade (<i>J</i> em Hz)	posição (<i>J</i> em Hz)	posição (δ ¹³ C)
1			
2	4,59 d (3,6)	H-3α (3,6) H-3β	C-3 (62,3)
3α	3,81 dd (12,9 e 3,6)	H-3β (12,9) H-2 (3,6)	
3β	3,89 d (12,9)	H-3α (12,9) H-2	C-1 (83,7); C-5 (56,2); C-8 (72,1)
5a	3,23 m (11,4)	H-5b (11,4)	
5b	3,50 m (11,4 e 6,3)	H-6a / H-6b (6,3) H-5a (11,4) H-6a / H-6b	
6a	2,08 m	H-6b H-7a / H-7b	
6b	2,23 m	H-6a H-7a / H-7b	
7a	2,00 m	H-7b H-8 (4,2 ou 8,7) H-6a / H-6b	
7b	2,30 m	H-7a H-8 (4,2 ou 8,7) H-6a / H-6b	
8	4,31 dd (6 e 7,5)	H-7a (4,2 ou 8,7) H-7b (4,2 ou 8,7)	
9a	3,69 d (11,4)	H-9b (11,4)	C-1 (83,7); C-2 (65,2); C-8 (72,1)
9b	3,93 d (11,4)	H-9a (11,4)	C-1 (83,7); C-2 (65,2); C-8 (72,1)

A comparação dos deslocamentos de ¹³C com os dos compostos (**54**) e (**55**) relatados na literatura (**Tabela 3.8**) foi também utilizada para a proposição da estereoquímica de **HT-VI**. Observa-se que os valores de deslocamento químico de **HT-VI** são mais coerentes com os do composto (**55**) com relação aos C-1, C-3 e C-5.

Os deslocamentos químicos de C-1, C-3 e C-5 foram confirmados pelas correlações, observadas no HMBC (**Tabela 3.7**), entre os sinais δ_H 4,59 (H-2) com δ_C 62,3

(C-3); δ_{H} 3,81 (H-3) com δ_{C} 83,7 (C-1); δ_{C} 56,2 (C-5) e com 72,1 (C-8), além daqueles entre H-9a/H-9b com C-1, C-2 e C-8.

Tabela 3.8.: Dados de deslocamentos de RMN de ^{13}C de **HT-VI**, **54**⁶⁴ e **55**⁶⁵

No. C	HT-VI ($\delta^{13}\text{C}$)	54 ($\delta^{13}\text{C}$)	55 ($\delta^{13}\text{C}$)
1	83,7	80,2	82,5
2	65,2	38,9	33,3
3	62,3	55,7	64,1
5	56,2	53,8	60,0
6	27,9	25,1	25,1
7	25,6	27,7	28,5
8	72,1	70,9	70,9
9	64,0	67,8	65,6

Os valores de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações observadas pelo uso das técnicas de HMQC, HMBC, COSY e do espectro de massas apresentaram-se coerentes com a estrutura proposta.

Para confirmação desta estrutura foram realizados cálculos computacionais empregando-se o método *ab initio* HF (Hartree Fock) na otimização da geometria da molécula. Com o conjunto de bases 6-31G*, programa Gaussian 98 obteve-se a conformação mais estável. A conformação de mais baixa energia adotada pela molécula está representada na **Ilustração 3.2**.

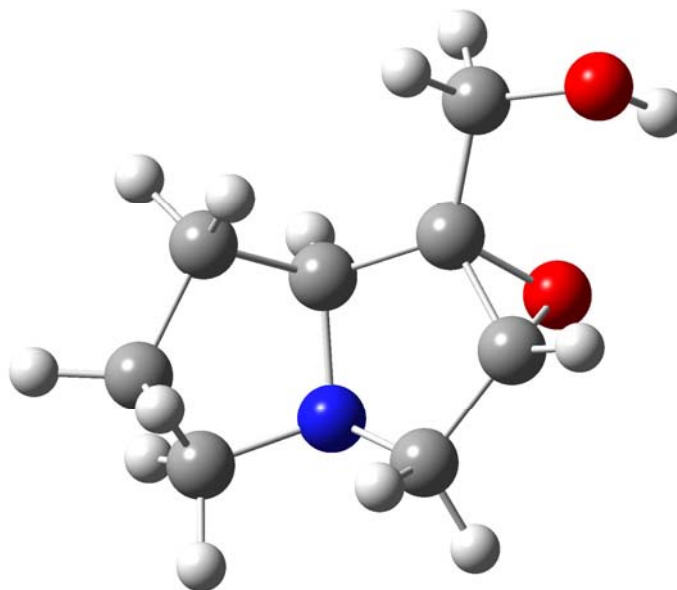


Ilustração 3.2.: Representação da conformação de mais baixa energia adotada pela molécula do alcalóide 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina.

Alguns valores de deslocamentos de RMN de ^1H e também de ^{13}C das estruturas **47** e **1** são semelhantes outros variam bastante (ver **Tabela 3.6**). O valor de deslocamento de ^{13}C de C-1 de **HT-VI** se encontra em δ_{C} 83,7 enquanto que, na subulacina este valor (C-1) se encontra em δ_{C} 70,9, isto se deve a diferenças na polarização da molécula quando o grupo epóxido está em α ou em β . Os valores de deslocamentos de C/H-2 em **HT-VI** em δ_{C} 65,2/ δ_{H} 4,59 em comparação com os de subulacina (CD_3OD) na **Tabela 3.6** (δ_{C} 63,4/ δ_{H} 3,95) parece que não foram tão afetados.

Com intuito de explicar algumas destas diferenças espectrais dos dois isômeros, cálculos teóricos foram realizados com o Programa Gaussian 03.⁶⁶ Para localizar a estrutura mais estável o grupo hidroximetilênico foi girado de 10 em 10 graus e a estrutura pré-otimizada em cada uma das etapas. As geometrias mais estáveis dos compostos foram otimizadas utilizando o nível de teoria B3LYP/cc-pvdz. Estas estruturas apresentam (**Ilustração 3.3**) o grupo OH orientado em direção ao epóxido formando ligação de hidrogênio com o mesmo.

O arquivo de saída dos cálculos de otimização apresentam além de todos os dados estruturais do composto os valores de momento de dipolo apresentados na **Tabela 3.9**. Estes valores estão de acordo com o observado experimentalmente durante o isolamento dos compostos, onde a subulacina apresentou um menor tempo de retenção em relação ao 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina.

De acordo com a **Tabela 3.6** observa-se para a subulacina, um dubleto de dubletos (13,8 e 1,2 Hz) apenas para H-3 α . No caso do composto alfa, um dubleto de dubletos (12,9 e 3,6 Hz) é observado apenas para o H-3 β . Estes acoplamentos estão de acordo com os valores dos ângulos diedros formados entre estes hidrogênios e o H-2. Na subulacina o diedro H2-C2-C3-H3 β e no composto alfa o diedro H2-C2-C3-H3 α estão muito próximos de 90°, não se observando, portanto o acoplamento entre estes hidrogênios.

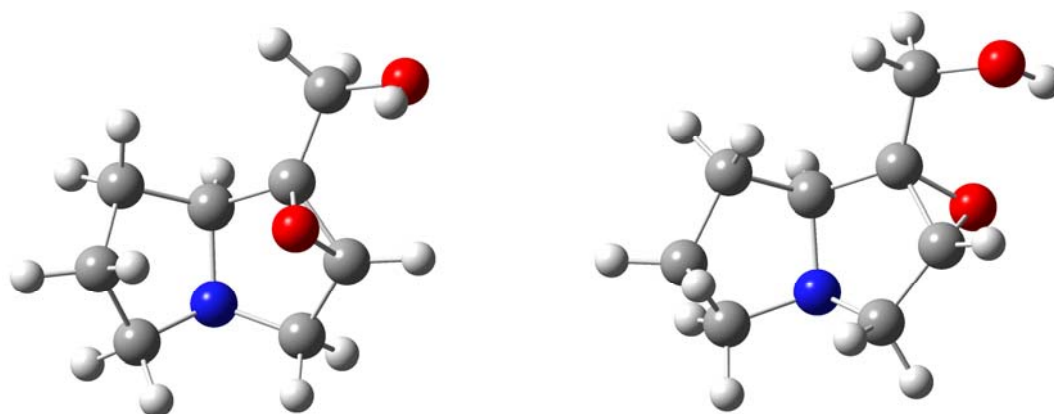


Ilustração 3.3.: Estruturas otimizadas (B3LYP/cc-pvdz) para os alcalóides subulacina e 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina

Tabela 3.9.: Dados estruturais e momento de dipolo para os alcalóides

	Subulacina	1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina
μ (D)	0,8226	2,5586
\angle C2-C3-N (°)	106,3	104,6
ϕ H2-C2-C3-H3 α (°)	139,7	108,1
ϕ H2-C2-C3-H3 β (°)	78,0	46,8

Embora a diferença principal com respeito a estrutura dos dois compostos seja apenas a posição alfa ou beta do epóxido, foram observadas diferenças significativas na blindagem de alguns átomos de carbono.

Para investigar estes efeitos de blindagem observados, foram realizados cálculos de interações de orbitais utilizando a teoria dos orbitais naturais de ligação (NBO).⁶⁷ Estas interações podem refletir a transferência eletrônica (efeito hiperconjugativo) entre os orbitais localizados nestes átomos, de forma que podemos determinar a diferença entre as energias de transferência eletrônica envolvida na doação e recepção. Em outras palavras, é possível avaliar variação da densidade eletrônica sobre o átomo em questão.

Considerando o exposto, foram analisadas todas as interações entre orbitais doadores e aceptores envolvendo C-1 e C-8 para ambos os compostos. Os somatórios dessas energias estão apresentados na **Tabela 3.10**. Através dos dados obtidos, pode-se notar que o C-1 na subulacina recebe uma maior densidade eletrônica que no alcalóide 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina, sendo, portanto este carbono mais blindado. Da mesma forma, observa-se que o C-8 na subulacina doa menos densidade eletrônica através da hiperconjugação, ocasionando desse modo, uma maior blindagem sobre este átomo.

Tabela 3.10.: Energia de interação (kcal/mol) entre orbitais doadores e aceptores obtidas pela análise de NBO.

	Subulacina		1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina	
	C-1	C-8	C-1	C-8
NBO doador	48,45	37,14	49,30	36,75
NBO aceptor	60,39	30,72	57,29	27,54
Diferença*	-11,94	6,42	-7,99	6,40

*Diferença = NBO doador – NBO aceptor

No caso do C-3 os resultados obtidos através dos cálculos de NBO foram contrários ao esperado, desse modo, não são as interações hiperconjugativas que

determinam a blindagem deste átomo. Optou-se por investigar a influência dos fatores estéricos envolvidos em cada um dos compostos. Considerando que a diferença principal entre os compostos é a orientação do epóxido optou-se por gerar, a partir da análise de NBO, os orbitais dos pares de elétrons livres do nitrogênio e do oxigênio do epóxido, para visualizar as interações repulsivas entre os mesmos (**Ilustração 3.3**).

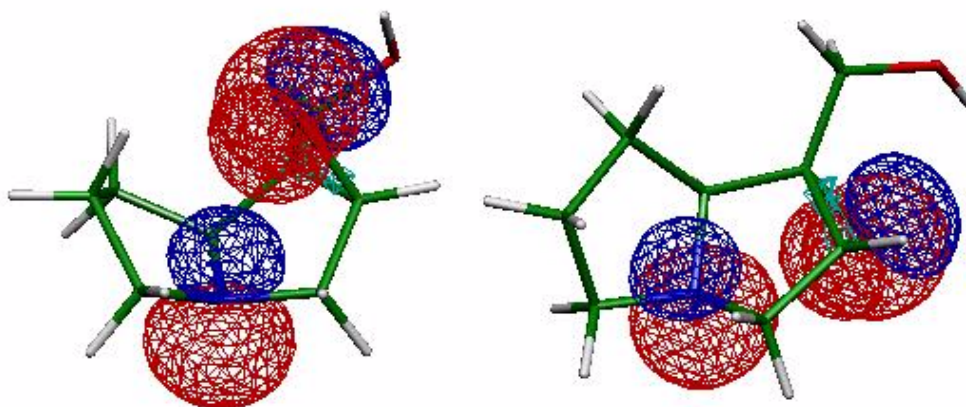


Ilustração 3.4: Interação repulsiva entre os pares de elétrons livre do nitrogênio e do oxigênio para subulacina e 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina.

Pode-se notar que na subulacina, tanto o par de elétrons livre do nitrogênio quanto do oxigênio (epóxido) exercem uma compressão estérica sobre o H-3 α e H-3 β , respectivamente, ocasionando a blindagem no C-3. No caso de 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina, a interação repulsiva entre os pares de elétrons livres do nitrogênio e do oxigênio, faz com que eles se afastem um do outro, provocando uma diminuição nesta compressão estérica. Para confirmar estas interações repulsivas, os ângulos de ligação C-2/C-3/N foram comparados para os dois compostos (**Tabela 3.9**). No composto 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidroximetil-8 α -pirrolizidina, o ângulo de ligação é menor (104,6°) do que na subulacina (106,3°) de modo a diminuir a interação repulsiva entre os pares de elétrons livres.

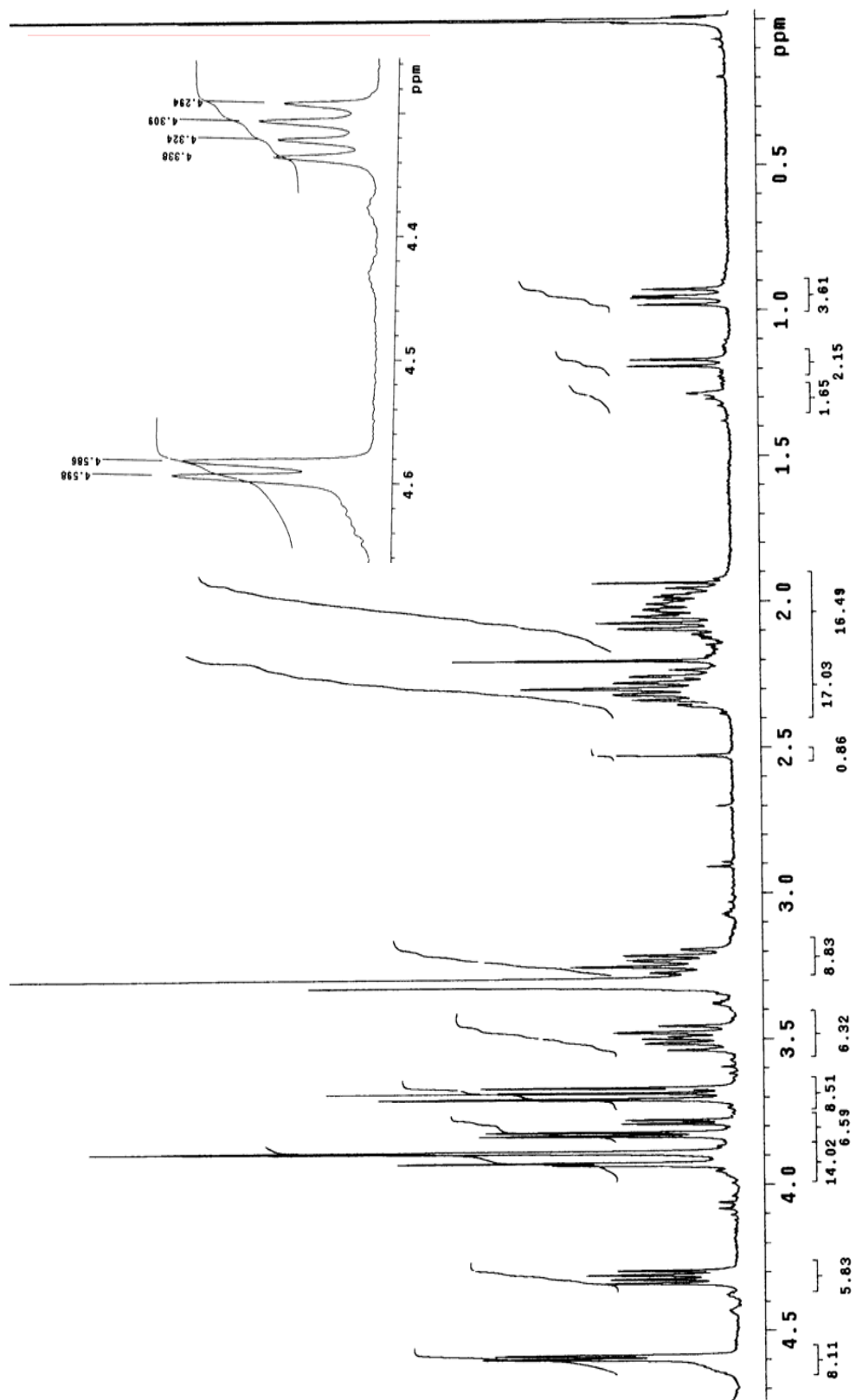


Figura 3.10.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CD_3OD) de HT-VI

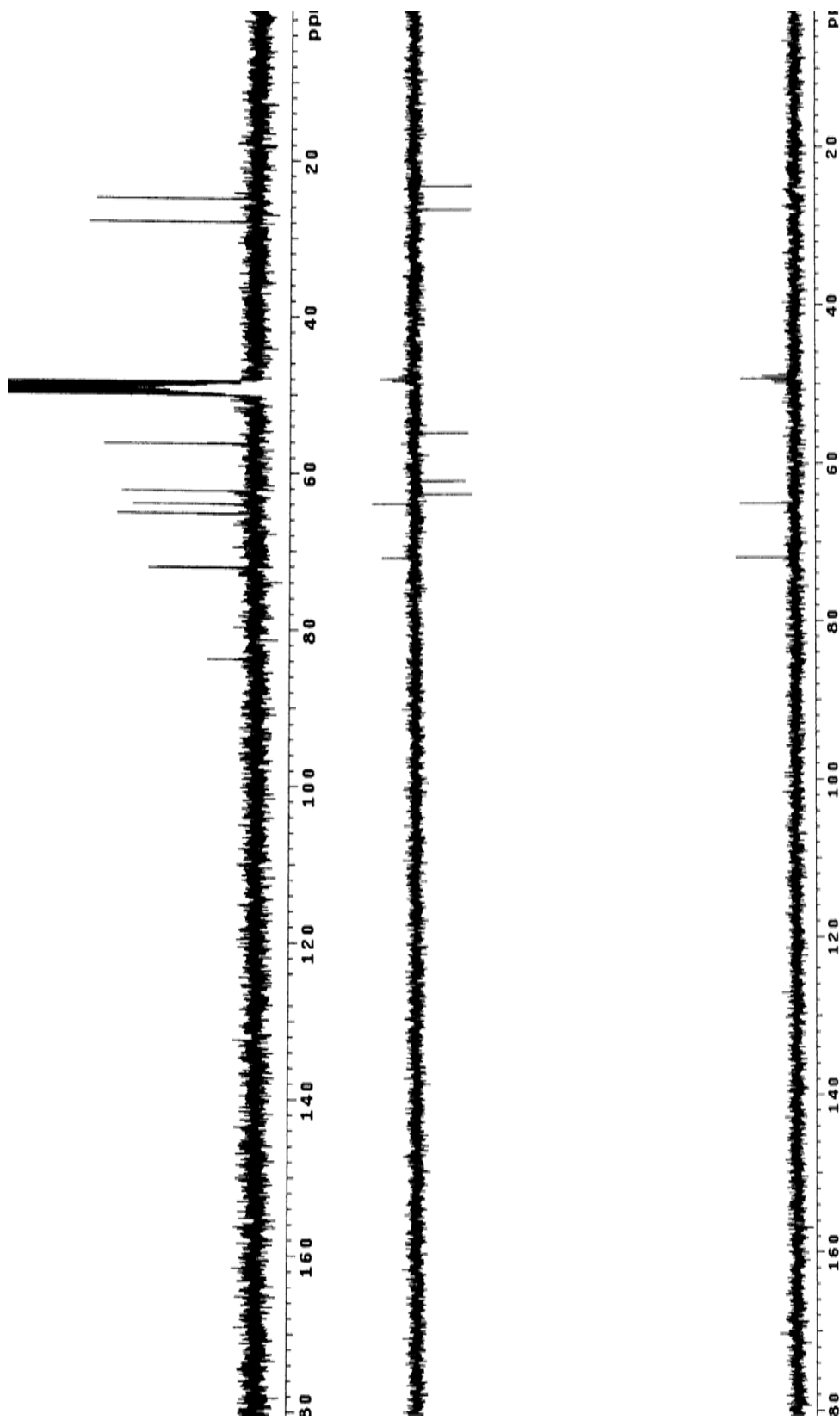


Figura 3.11.: Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT (75,5 MHz/ CD_3OD) de HT-VI

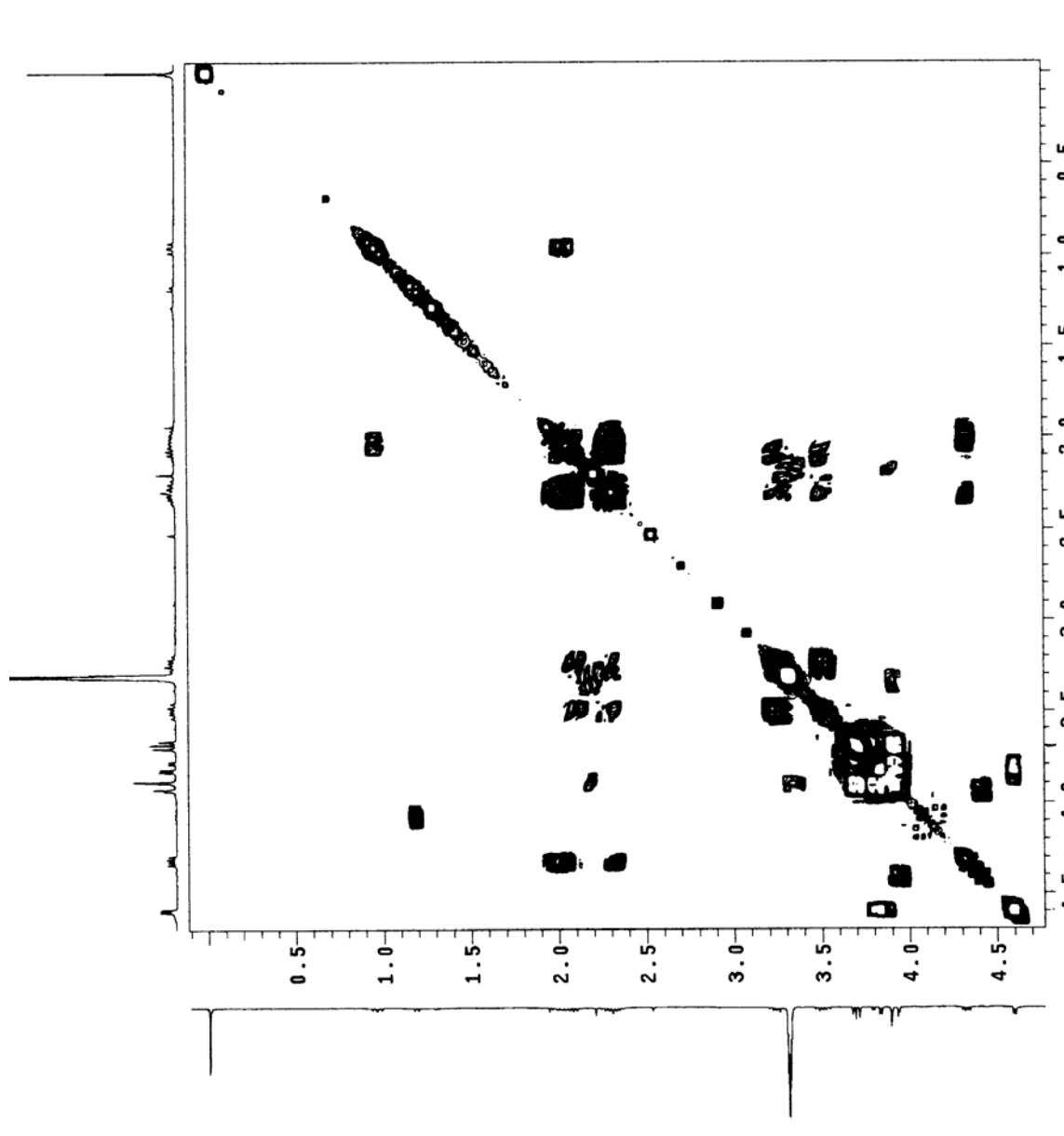


Figura 3.12.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CD_3OD de **HT-VI**

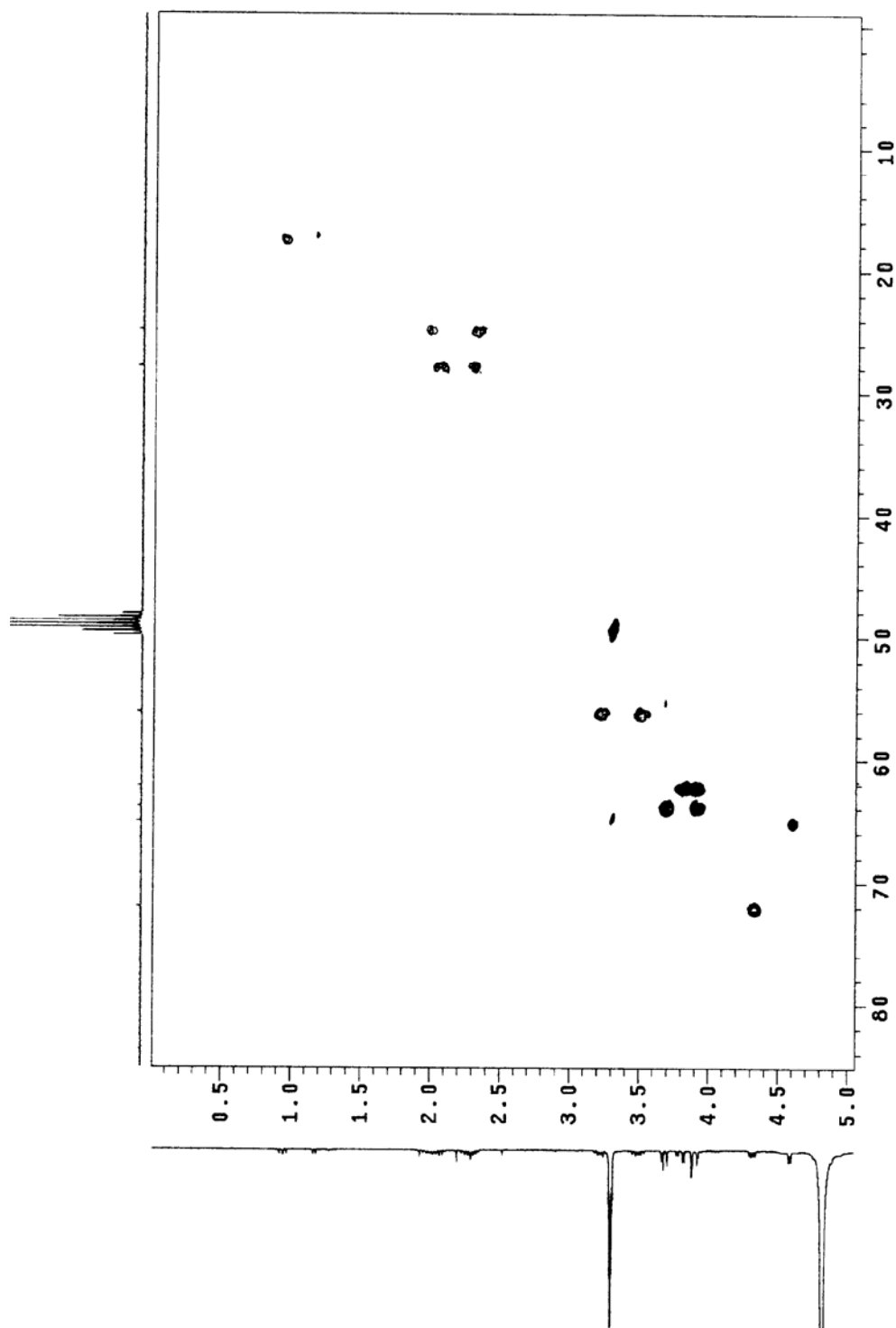


Figura 3.13.: Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMQC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VI

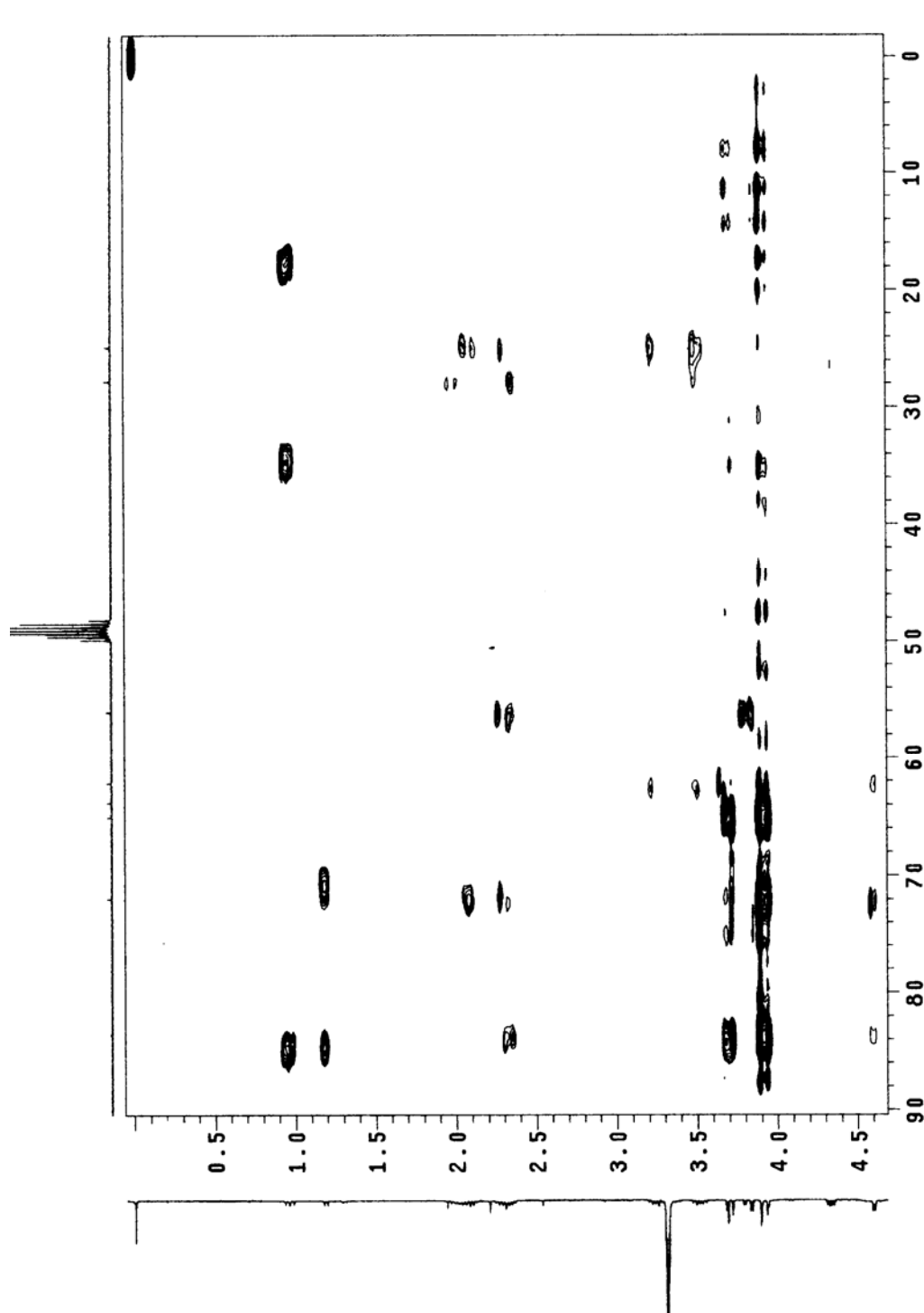


Figura 3.14.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CD_3OD de HT-VI

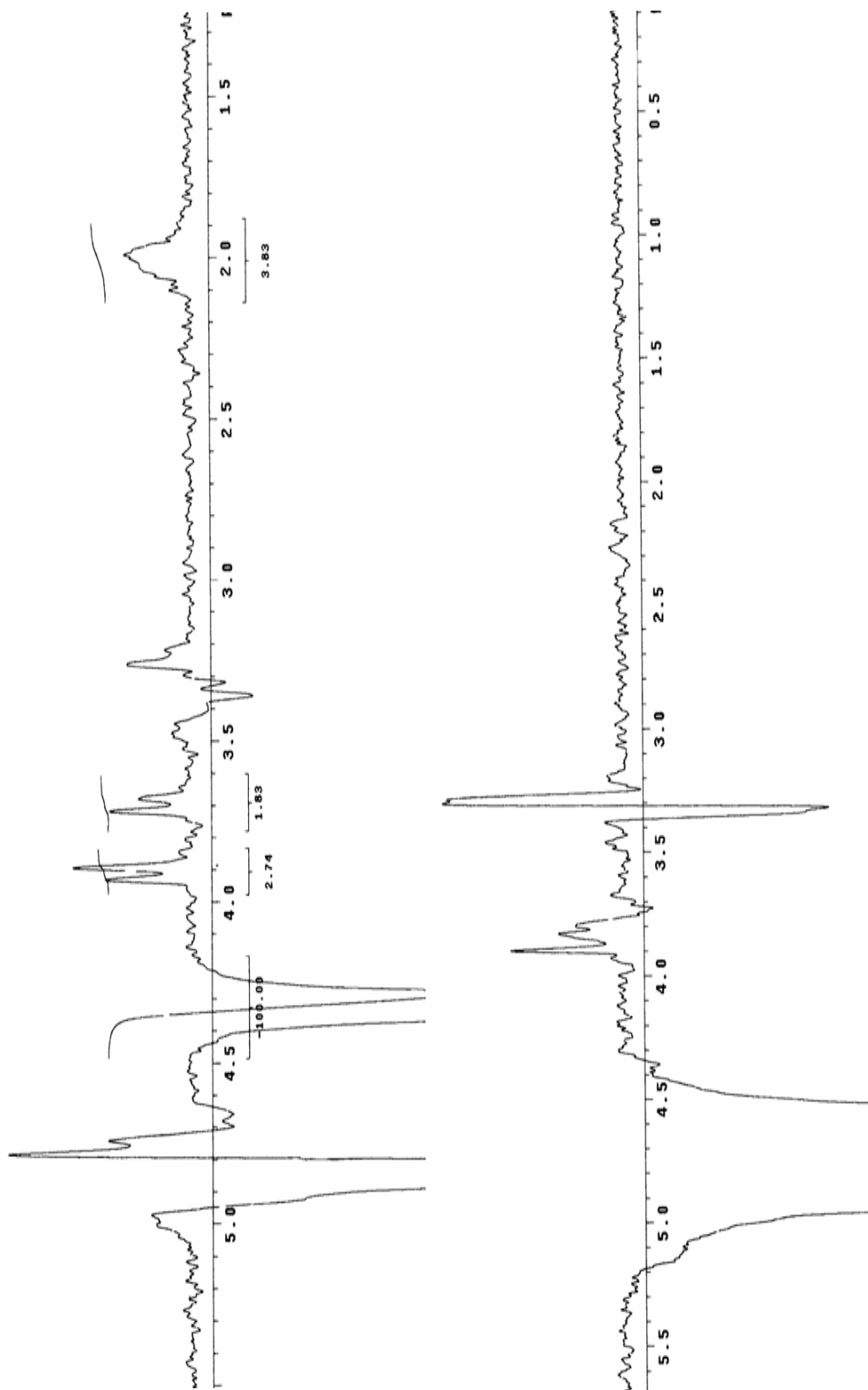


Figura 3.15: Espectros de RMN de ¹H (NOE diferencial), 300,06 MHz/ CD₃OD de **HT-VI**. Irradiando δ 4,31 e 4,59

3.1.7. Análise estrutural de HT-VII

A substância **HT-VII** foi isolada como um sólido amorfo marron amarelado, do fracionamento de **Ht-B-2**. A análise dos espectros e mapas de contorno de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, sugerem para esta substância um esqueleto de alcalóide pirrolizidínico como os alcalóides anteriormente identificados.

Dados de RMN de ^1H de **HT-VII**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm (**Figura 3.16**, pág 85) e RMN de ^{13}C , DEPT, 75,5 MHz/ CD_3OD (**Figura 3.17**, pág 86), δ ppm, estão com os valores de deslocamentos descritos na **Tabela 3.11**.

Dados de RMN 2D de ^1H (COSY) de **HT-VII**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm, (**Figura 3.18**, pág 87) estão descritos na **Tabela 3.12**.

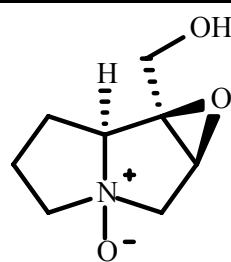
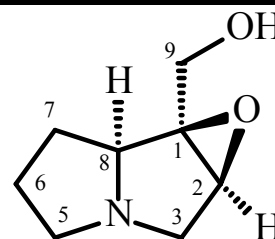
Dados de RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMQC) de **HT-VII**, 75,5 MHz/ CD_3OD , δ ppm, (**Figura 3.19**, pág 88) relacionando hidrogênios e carbonos estão descritos na **Tabela 3.11**.

Dados de RMN 2D ^{13}C e de ^1H (HMBC) de **HT-VII**, 75,5 MHz/ CD_3OD , δ ppm, podem ser visualizados na **Figura 3.20**, pág 89.

A substância proposta para **HT-VII** é a N-óxido de $1\beta,2\beta$ -epóxi- 1α -hidroximetil-pirrolizidina ou N-óxido de subulacina (**48**).

Os mapas de contorno COSY e de HMBC de **HT-VII** mostraram as mesmas correlações entre os hidrogênios e carbonos que aquelas verificadas nos experimentos com a subulacina (**HT-III**).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **HT-VII** apresentam os mesmos números de sinais e multiplicidades que os de subulacina (**1**). No entanto, os carbonos C-3 (δ_{C} 70,1); C-5 (δ_{C} 72,9) e C-8 (δ_{C} 84,1) e os hidrogênios destas posições (**Tabela 3.11**) apresentam-se bem mais desprotegidos que os do alcalóide subulacina (**1**),^{47, 49} desta forma sugeriu-se que o nitrogênio deste alcalóide se encontra quaternarizado, na forma de N-óxido.

Tabela 3.11: Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de **HT-VII** e de **1**^{46, 47}**HT-VII****(1)**

N ^o	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	68,5		70,9	
2	61,1	3,94 d (1,5)	63,4	3,95 sobreposto
3	70,1	3,78 m (13,8)	54,0	3,38 d (13,8)
		4,23 m (13,8)		3,79 dd (13,8 e 1,2)
5	72,9	3,35 m	58,4	2,97 m (5,4)
		3,46 m		3,62 m
6	25,0	2,37 m	27,1	1,96 m
		1,94 m		2,24 m
7	25,7	2,08 m	26,2	2,19 m
		2,08 m		2,26 m
8	84,1	4,21 sobreposto	67,9	4,45 dd (6,3 e 8,1)
9	60,6	3,75 d (13,2)	60,2	3,78 d (12,9)
		3,90 d (13,2)		3,97 d (12,9)

Espectros e mapas de contorno de **HT-VII** e **HT-V (1)** foram obtidos utilizando como solvente CD_3OD .

O alcalóide N-óxido de subulacina se encontra erroneamente descrito na literatura como alcalóide majoritário isolado de *Heliotropium subulatum* por Malik e Rahman (1988).⁴⁸ Winkler e Heckendorn esclareceram que tal atribuição se encontrava equivocada, e que na realidade se tratava de 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-pirrolizidina (subulacina).^{47, 49} Desta forma, até o momento não se tem relatado na literatura o isolamento e a identificação de N-óxido de subulacina.

Os valores de deslocamento de RMN de ^{13}C e de ^1H da substância tida como subulacina N-óxido por Malik e Rahman,⁴⁸ têm os valores de deslocamento de RMN de ^1H descritos por Culvenor e colaboradores,^{46, 47} mas considerados para o alcalóide subulacina, isto é, **HT-III** e **HT-V**, do nosso estudo. Entretanto, os deslocamentos de ^{13}C de C-3, C-5 e C-8, vizinhos do nitrogênio quaternário da subulacina N-óxido agora isolada são bem diferentes da subulacina (**1**).⁴⁶

Tabela 3.12: Correlações homonucleares de RMN 2D de COSY e de HMBC de **HT-VII**

	^1H	COSY	HMBC
N ^o H	δ multiplicidade (<i>J</i> em Hz)	Posição (<i>J</i> em Hz)	Posição (δ)
1			
2	3,94 d (1,5)	H-3a; H-3b	C-3 (70,1)
3a	3,78 m (13,8)	H-3b (13,8); H-2	C-1 (68,5); C-5 (72,9); C-8 (84,1)
3b	4,23 m (13,8)	H-3a (13,8); H-2	C-1 (68,5); C-5 (72,9); C-8 (84,1)
5a	3,35 m	H-5b; H-6a / H-6b	
5b	3,46 m	H-5a; H-6a / H-6b	
6a	2,37 m	H-6b; H-7a / H-7b	
6b	1,94 m	H-6a; H-7a / H-7b	
7a	2,08 m	H-7b; H-8; H-6a / H-6b	
7b	2,08 m	H-7a; H-8; H-6a / H-6b	
8	4,21 sobreposto	H-7a; H-7b	
9a	3,75 d (13,2)	H-9b (13,2)	C-1 (68,5); C-2 (61,1); C-8 (84,1)
9b	3,90 d (13,2)	H-9a (13,2)	C-1 (68,5); C-2 (61,1); C-8 (84,1)

Espectros e mapas de contornos de **HT-VII** foram obtidos utilizando como solvente CD_3OD .

A estrutura proposta para o alcalóide N-óxido de $1\beta,2\beta$ -epóxi- 1α -hidroximetil-pirrolizidina ou N-óxido de subulacina (**HT-VII**) foi confirmada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C e das técnicas bidimensionais de HMQC, (**Tabela 3.11**) e de COSY e HMBC (**Tabela 3.12**) e também por comparação dos valores de deslocamento deste com os do alcalóide subulacina.

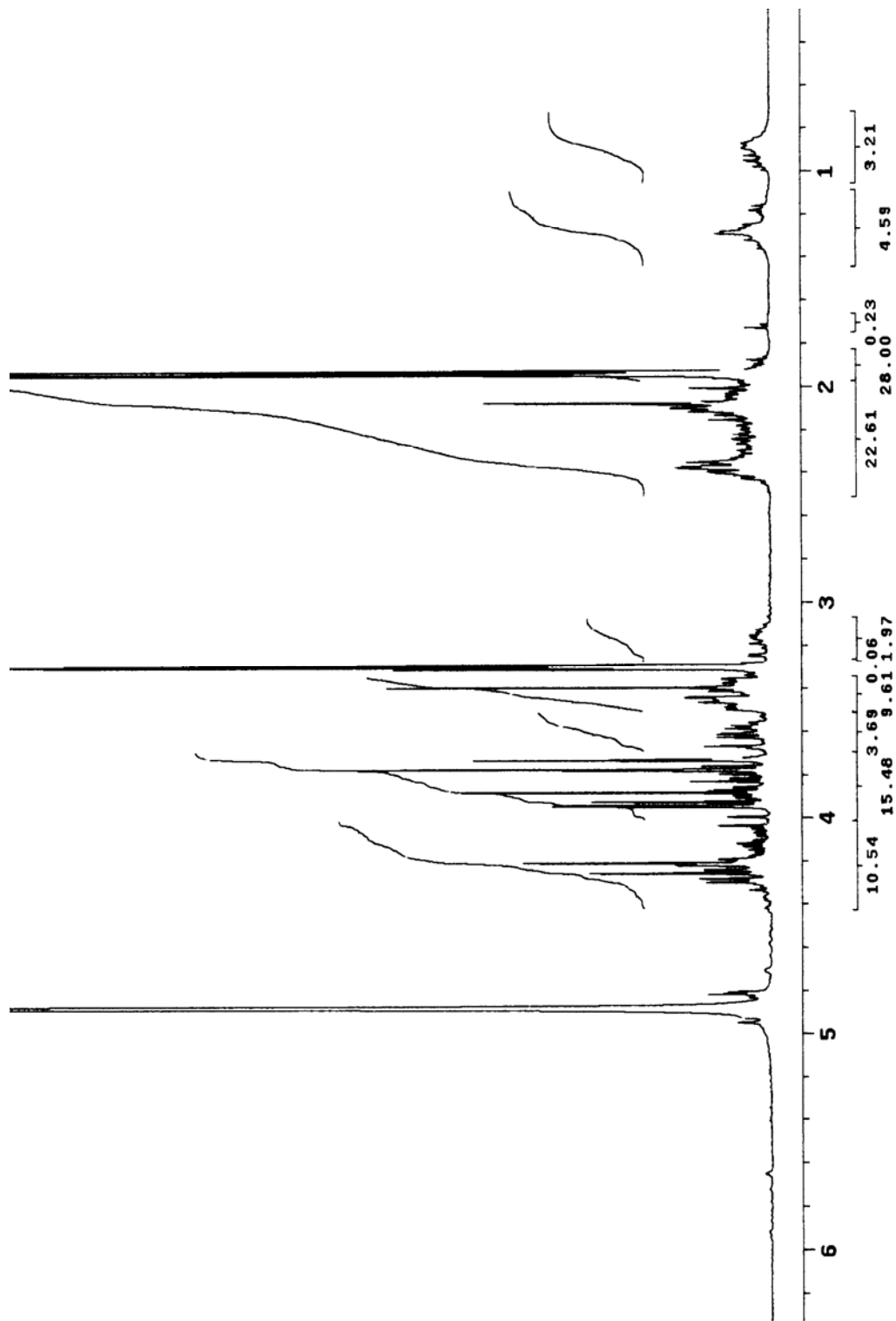


Figura 3.16.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CD_3OD) de HT-VII

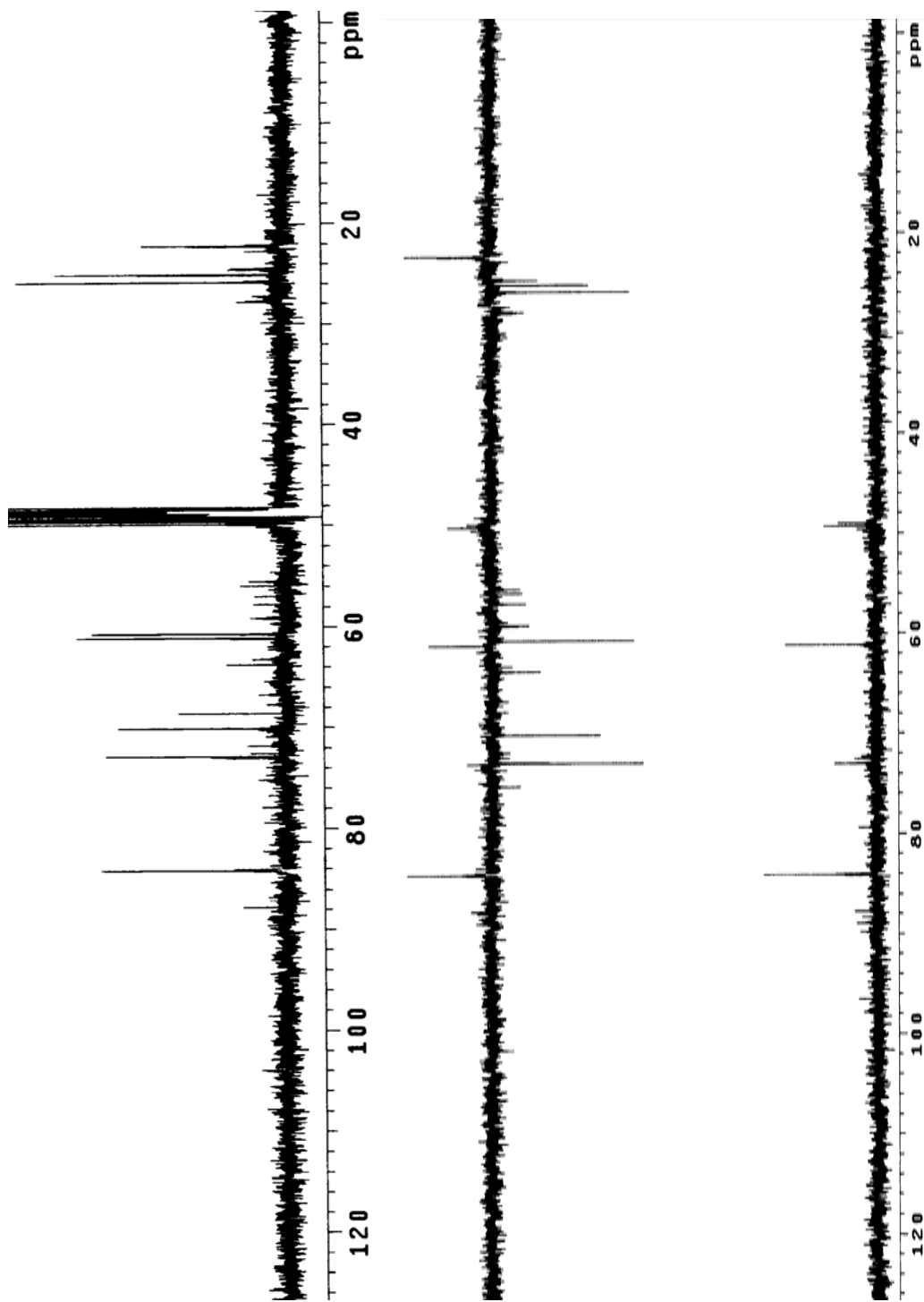


Figura 3.17.: Espectro de RMN de ^{13}C / DEPT (75,5 MHz/ CD_3OD) de HT-VII

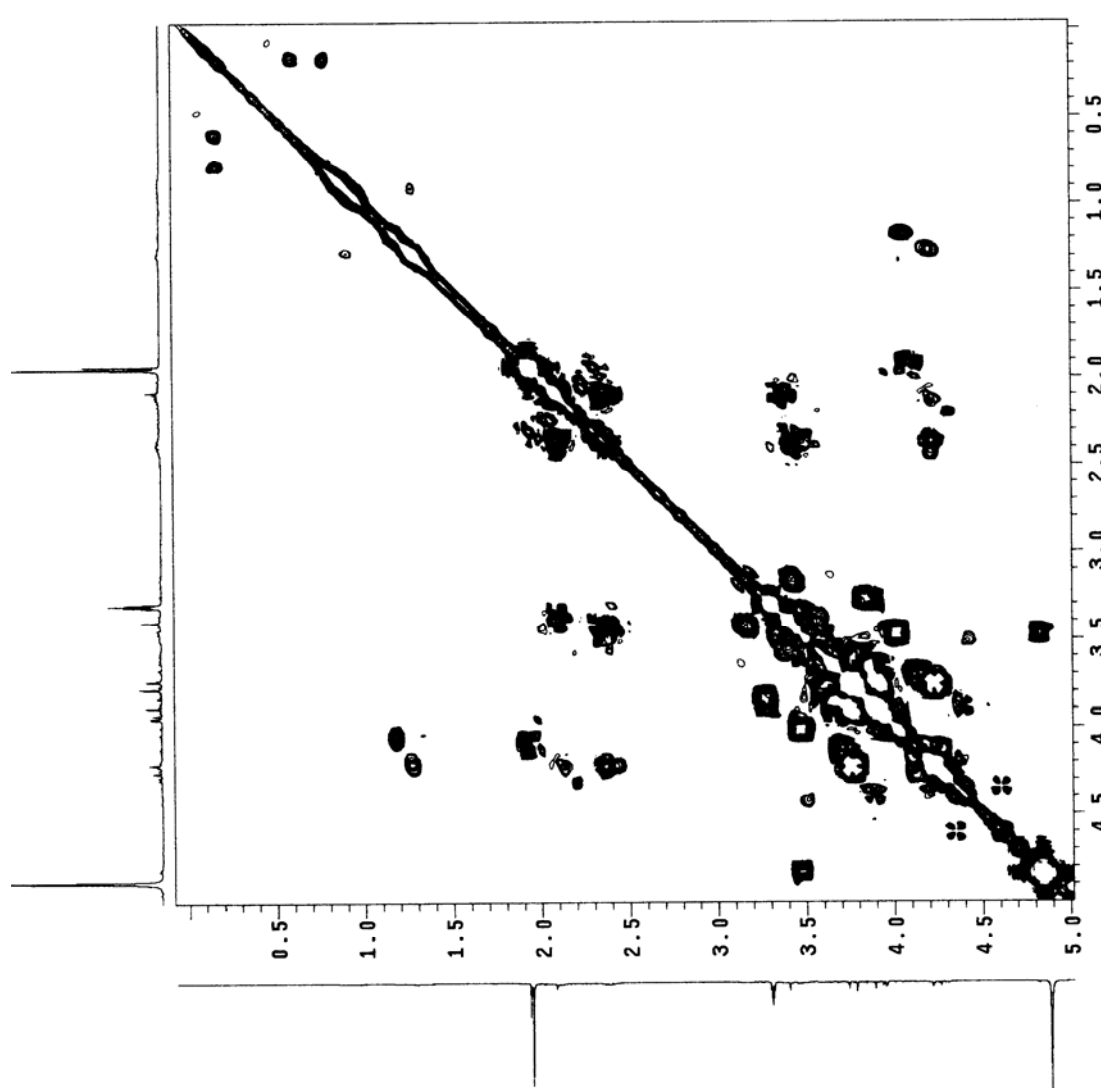


Figura 3.18.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^1H (COSY), 300,06 MHz/ CD_3OD de **HT-VII**

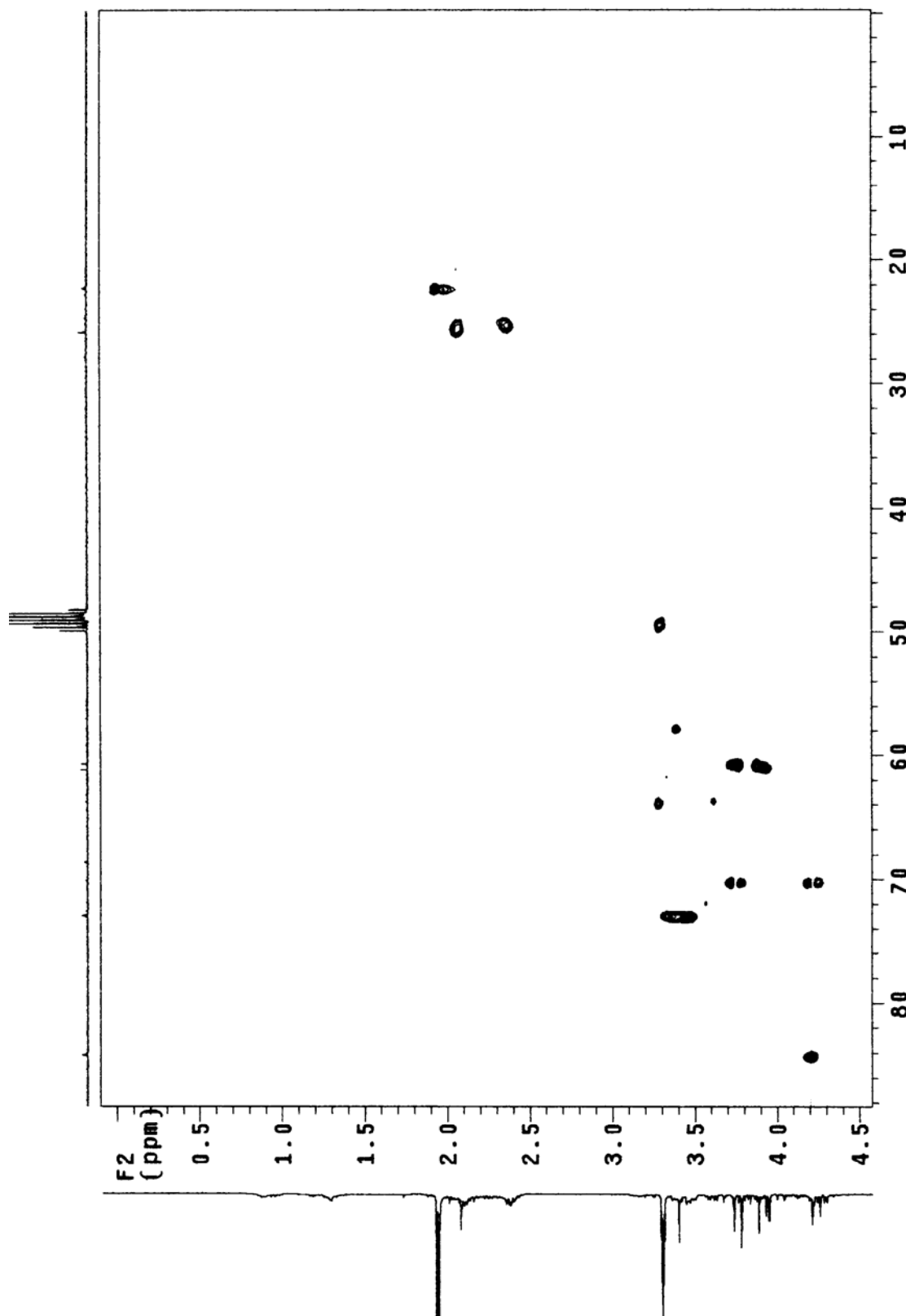


Figura 3.19.: Mapa de contorno de RMN 2D $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ (HMQC), 75,5 MHz/ CD_3O de HT-VII

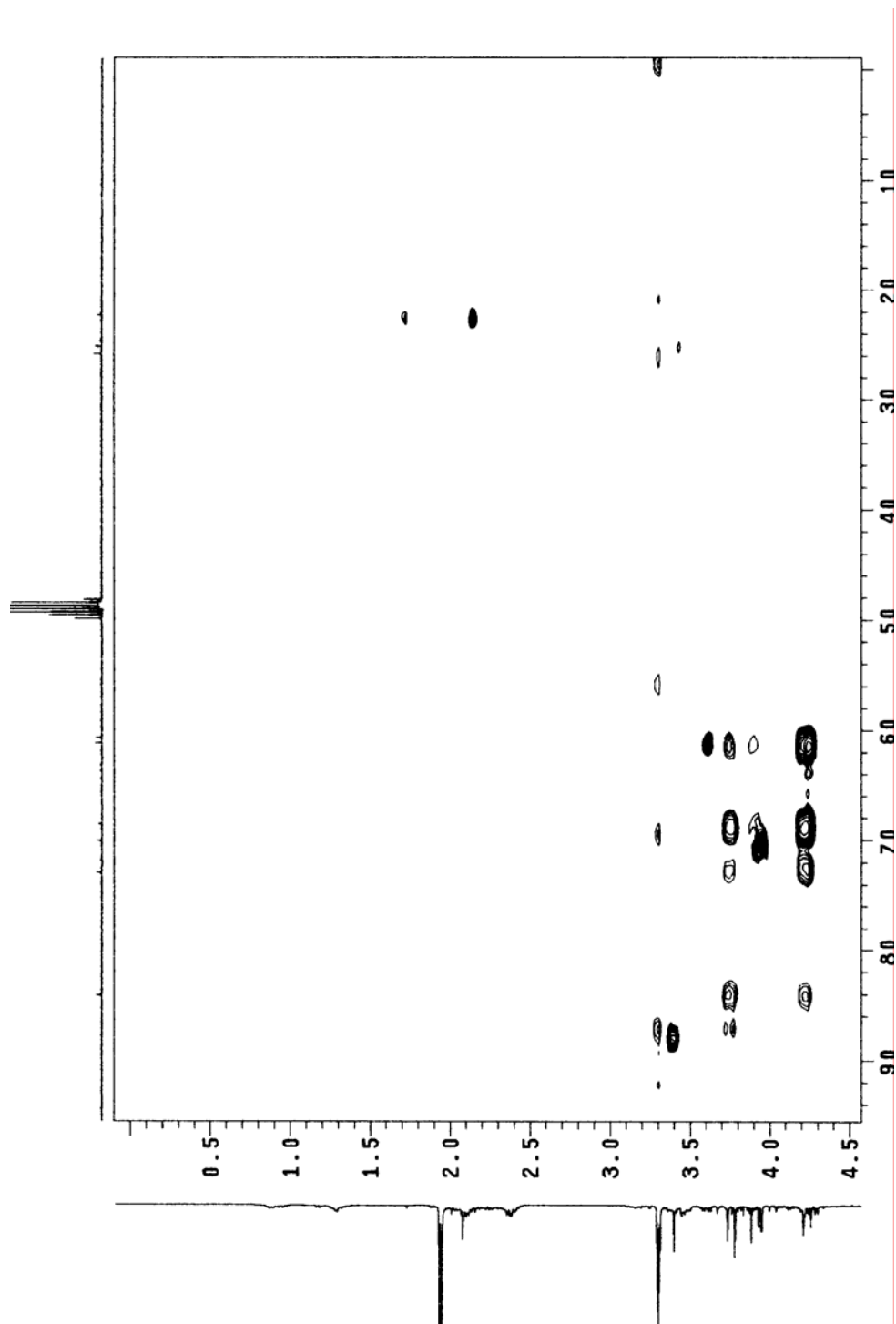


Figura 3.20.: Mapa de contorno de RMN 2D ^{13}C x ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CD_3O de **HT-VII**

3.1.8. Análise estrutural de HT-VIII

O alcalóide **HT-VIII** foi isolado como cristal amarelado a partir do fracionamento por CC de **Ht-B-2** e com a análise dos espectros das técnicas uni e bidimensionais de RMN de ^1H e de ^{13}C (**Figuras 3.21 a 3.26**) construiu-se as **Tabelas 3.13 e 3.14**.

Dados de **HT-VIII**:

RMN de ^1H de **HT-VIII**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm (**Figura 3.21**, pág. 93) e RMN de ^{13}C , DEPT, 75,5 MHz/ CD_3OD (**Figura 3.22**, pág. 94), δ ppm, estão descritos na **Tabela 3.13**.

RMN 2D de ^1H (COSY) de **HT-VIII**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm, podem ser visualizados na **Figura 3.23** (pág. 95), estão descritos na **Tabela 3.14**.

RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMQC) de **HT-VIII**, 75,5 MHz/ CD_3OD , δ ppm, podem ser visualizados na **Figura 3.24** (pág. 96) e, relacionando hidrogênios e carbonos elaborou-se a **Tabela 3.13**.

RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMBC) de **HT-VIII**, 75,5 MHz/ CD_3OD , δ ppm, podem ser visualizados na **Figura 3.25** (pág. 97).

RMN de ^1H (NOE diferencial) de **HT-VIII**, 300,06 MHz/ CD_3OD , δ ppm, podem ser visualizados na **Figura 3.26** (pág. 98): Espectros de diferenças de NOE.

EM m/z (int. rel. %): 173 (3,4) [M^{*+}]; 98 (24,6); 84 (13,4); 83 (100,0); 82 (26,9); 83 (13,5); 71 (8,1); 70 (44,0); 69 (11,0); 55 (47,0); 44 (27,2); 43 (28,9) e 41 (29,5).

O espectro de RMN de ^1H de **HT-VIII** apresentou sinais em regiões próximas às dos alcalóides anteriormente discutidos, sendo então característicos do núcleo pirrolizidínico. Os dupletos em δ_{H} 3,90 e 3,61, com constante de acoplamento $J = 12,3$ Hz indicaram a presença do grupo hidróxi-metilênico.

Os valores dos deslocamentos de RMN de ^{13}C sugerem um sistema heterocíclico pirrolizidínico como os dos compostos anteriormente isolados e identificados, sendo 5 (CH_2), 2 (CH) e 1 (C). A inexistência de sinais de RMN de ^{13}C com valores de deslocamentos correspondentes ao grupo 1,2-epóxido em δ_{C} 70 a 72 (C-1) e δ_{C} 64 a 65 (C-2) sugerem que este alcalóide não possua o grupo epóxido. No lugar destes sinais acima citados, tem-se outros mais desprotegidos em δ_{C} 82,3 e δ_{C} 84,4 correspondentes a um carbono não ligado a hidrogênios (C) e a um CH, respectivamente.

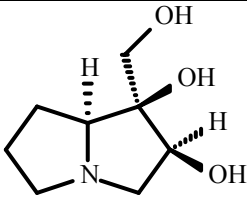
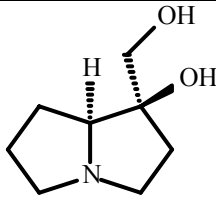
No espectro de HMBC observa-se a correlação do sinal em δ_{C} 82,3 com o H-7 (δ 2,16) e do sinal em δ_{C} 84,4 com os dos hidrogênios H-8 (δ 3,99) e H-9a/ H-9b (δ 3,90 e 3,61).

Estes dados sugeriram a estrutura de um alcalóide 1,2-di-hidróxi-1-hidroxi-metil-pirrolizidina para **HT-VIII**.

A **Tabela 3.13** mostra uma comparação dos dados de RMN de **HT-VIII** com os de um alcalóide pirrolizidínico descrito na literatura, a currassanecina (**54**), isolada da espécie *Heliotropium currassavicum*.⁶⁵ e que contém um grupo hidróxi em C-1.

A principal diferença é no carbono C-2, pois onde em **HT-VIII** observa-se o valor de δ_{C} 84,4, em **54** verifica-se o valor de δ_{C} 38,9, o que é coerente com o efeito de desproteção causado pela introdução de um grupo hidroxila no C-2 em **HT-VIII**. Os carbonos adjacentes a C-2, no caso C-1 (δ_{C} 82,3) e C-2 (δ_{C} 59,2) também apresentam uma desproteção em relação aos mesmos carbonos de **54**, devido ao efeito- β resultante da introdução do grupo hidroxila no C-2.

Tabela 3.13.: Dados de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de **HT-VIII** e **(54)** ⁶⁵.

					
		HT-VIII		(54)	
N ^o	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J em Hz)		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J em Hz)
1	82,3			80,2	
2	84,4	4,81 d (3,3)		38,9	2,30 dt 2,22 dt
3	59,2	3,86 d (12,0) 3,38 dd (12,0 e 3,3)		55,7	3,35 m 3,00 m
5	55,9	3,06 dt (10,8 e 6,6) 3,36 sobreposto		53,8	3,11 m 2,78 m
6	28,0	1,95 m 2,16 m		25,1	1,79 m
7	24,6	1,88 m 2,26 m		27,7	2,39 m 2,03 m
8	72,3	3,99 dd (4,8 e 8,7)		70,9	3,36 t
9	63,9	3,61 d (12,3) 3,90 d (12,3)		67,8	3,98 s d

Espectros e mapas de contorno de **HT-VIII** e **(54)** foram obtidos utilizando como solvente CD_3OD .

A estereoquímica foi determinada por diferenças de NOE, onde irradiando-se o sinal em δ_{H} 3,99 (H-8) houve um aumento do sinal em δ_{H} 3,90 e 3,61 (H-9a/H-9b) e em δ_{H} 1,88 (H-7 α), mostrando que o H-8 e o grupo hidróxi-metilênico no C-1 encontram-se do mesmo lado da molécula.

A irradiação de H-2 (δ_{H} 4,81) resultou no aumento de sinal de H-3 α (δ_{H} 3,38) e do H-9a (δ_{H} 3,61) e H-9b (δ_{H} 3,90), desta maneira, confirmou-se a posição- β para os grupos hidróxi ligados ao C-1 e C-2.

A análise dos dados espectroscópicos confirmou que **HT-VIII** é o alcalóide pirrolizidínico di-hidroxilado: 1 α -hidróxi-metil-1 β , 2 β -hidróxi-8 α H-pirrolizidínico (**49**) cujo isolamento e identificação não foram encontrados na literatura.

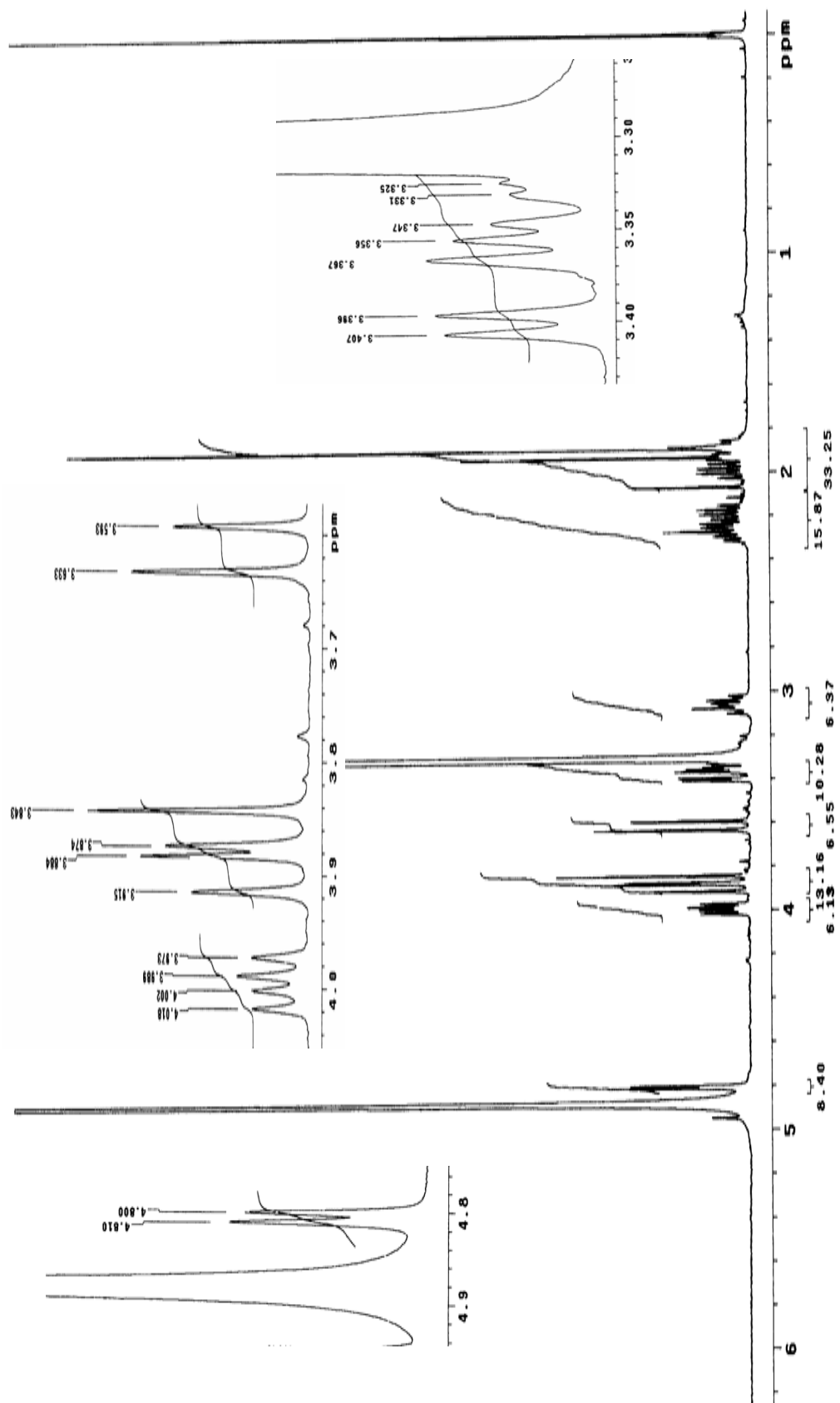


Figura 3.21.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CD_3OD) de HT-VIII

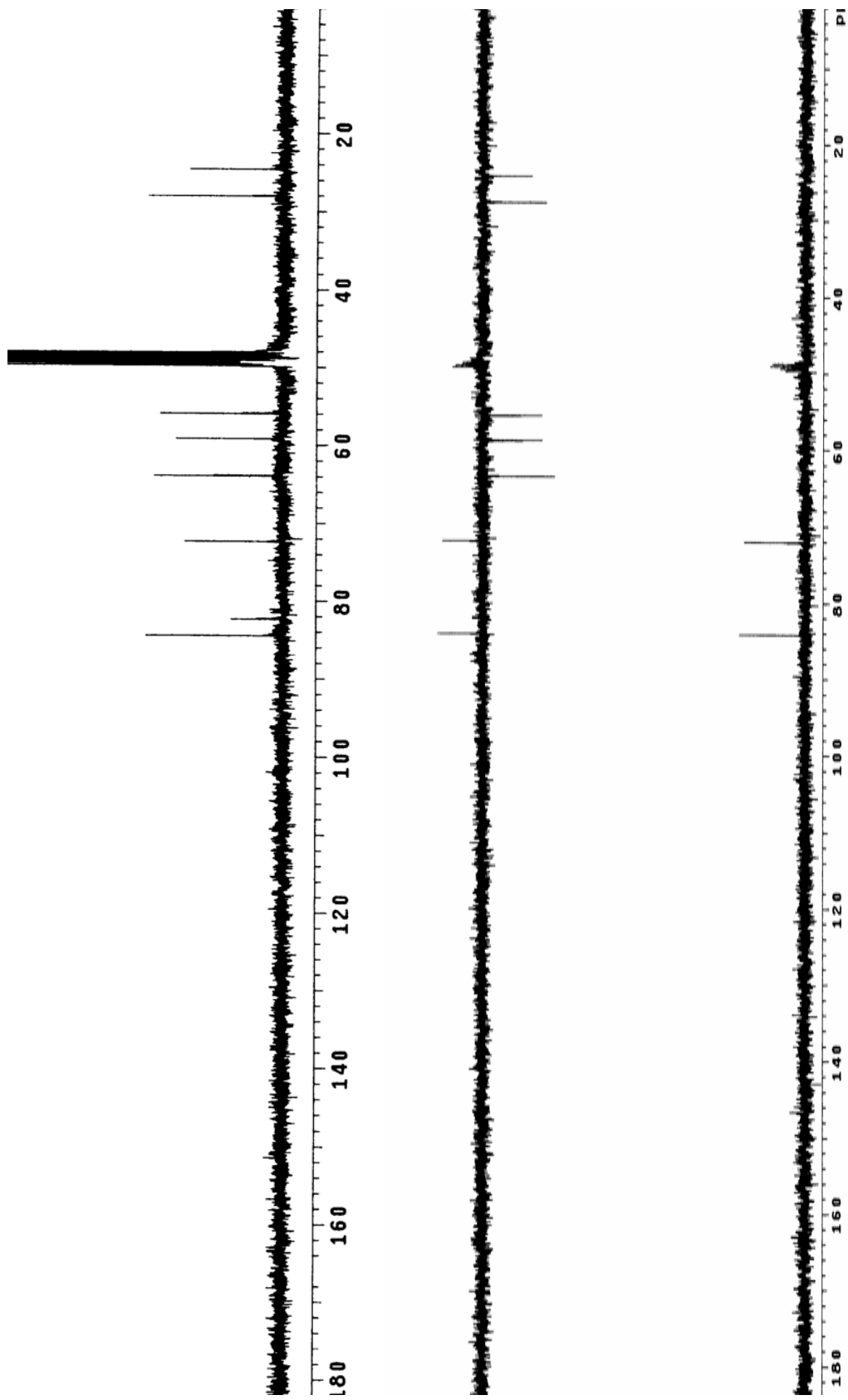


Figura 3.22.: Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT (75,5 MHz/ CD_3OD) de HT-VIII

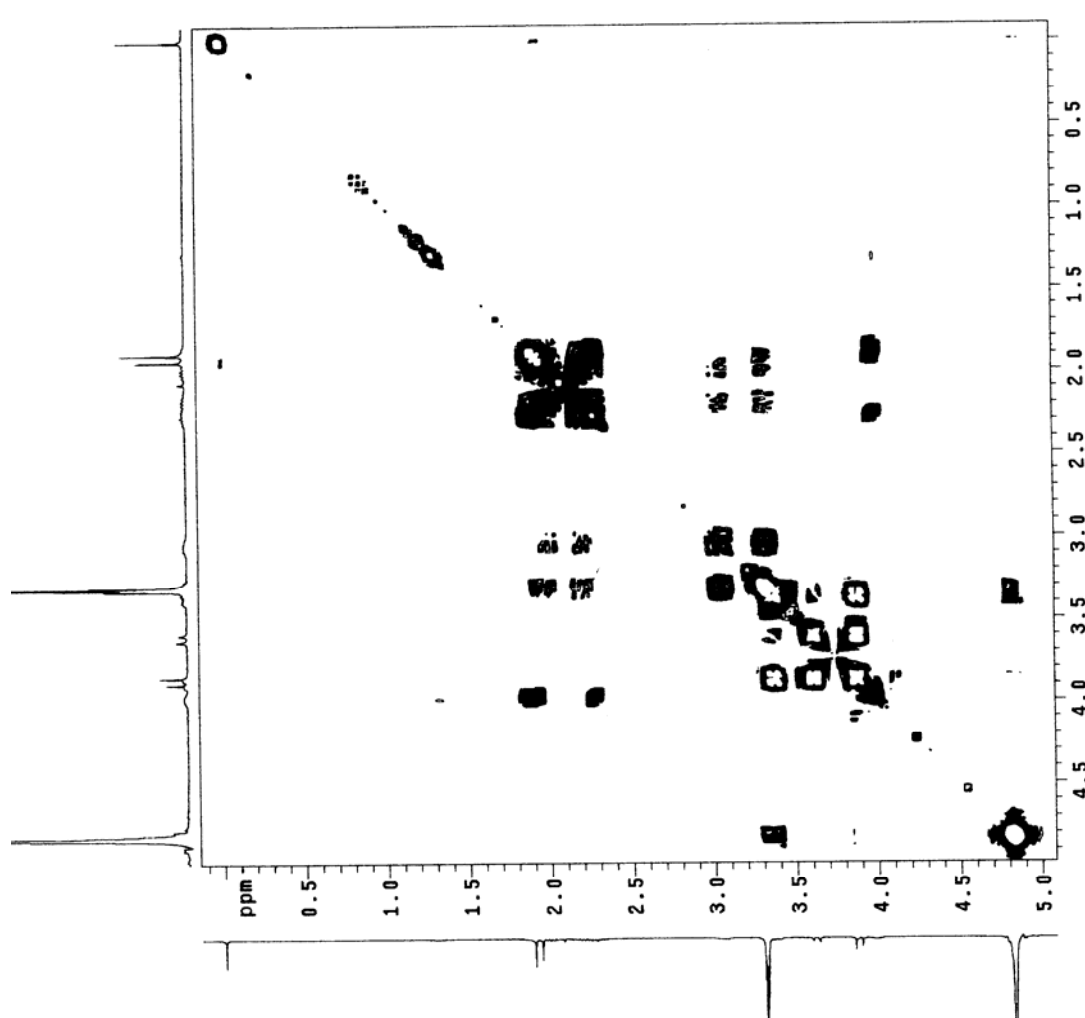


Figura 3.23.: Mapa de contorno de RMN 2D de ¹H (COSY), 300,06 MHz/ CD₃OD de **HT-VIII**

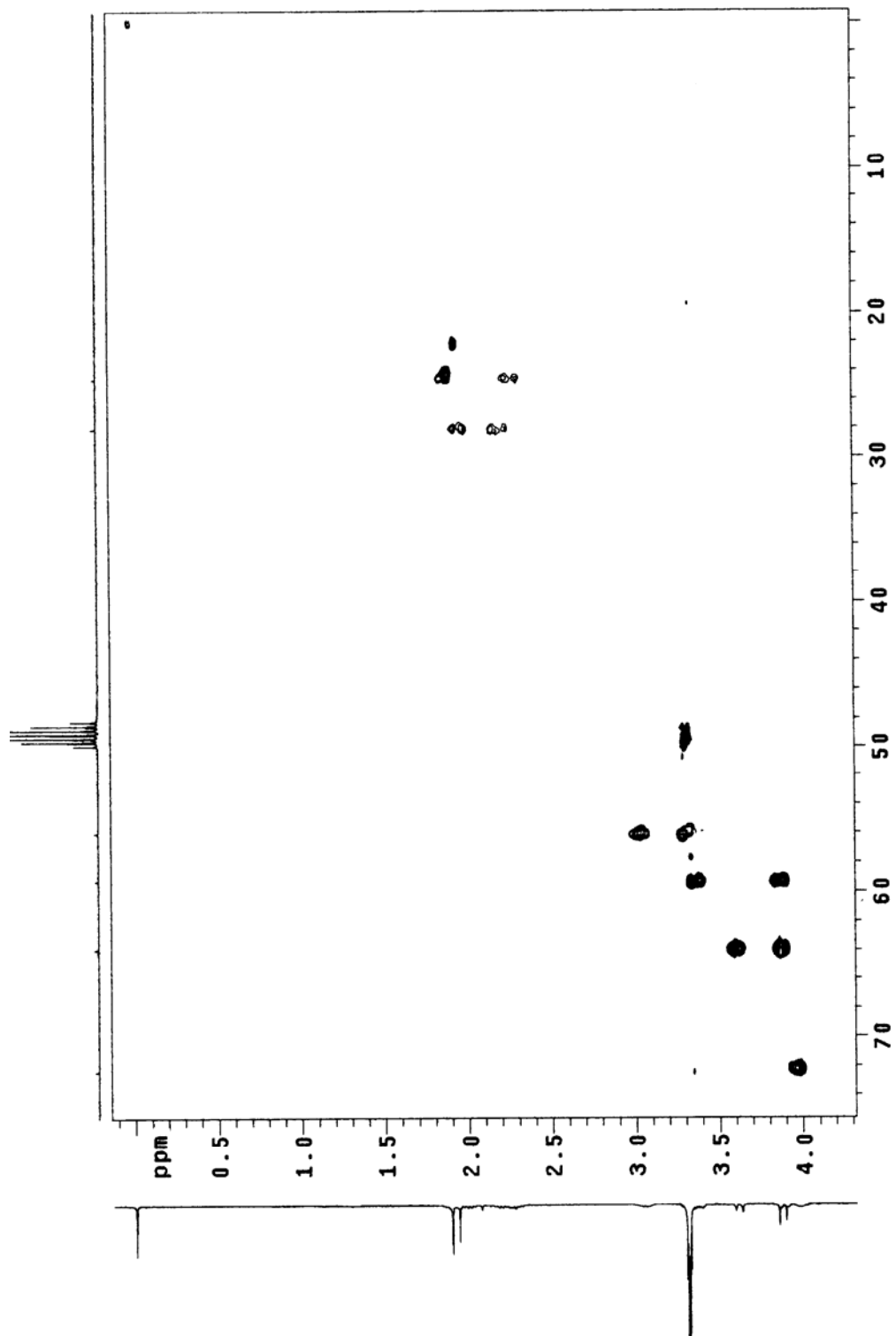


Figura 3.24.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMQC), 75,5 MHz/ CD_3OD de **HT-VIII**

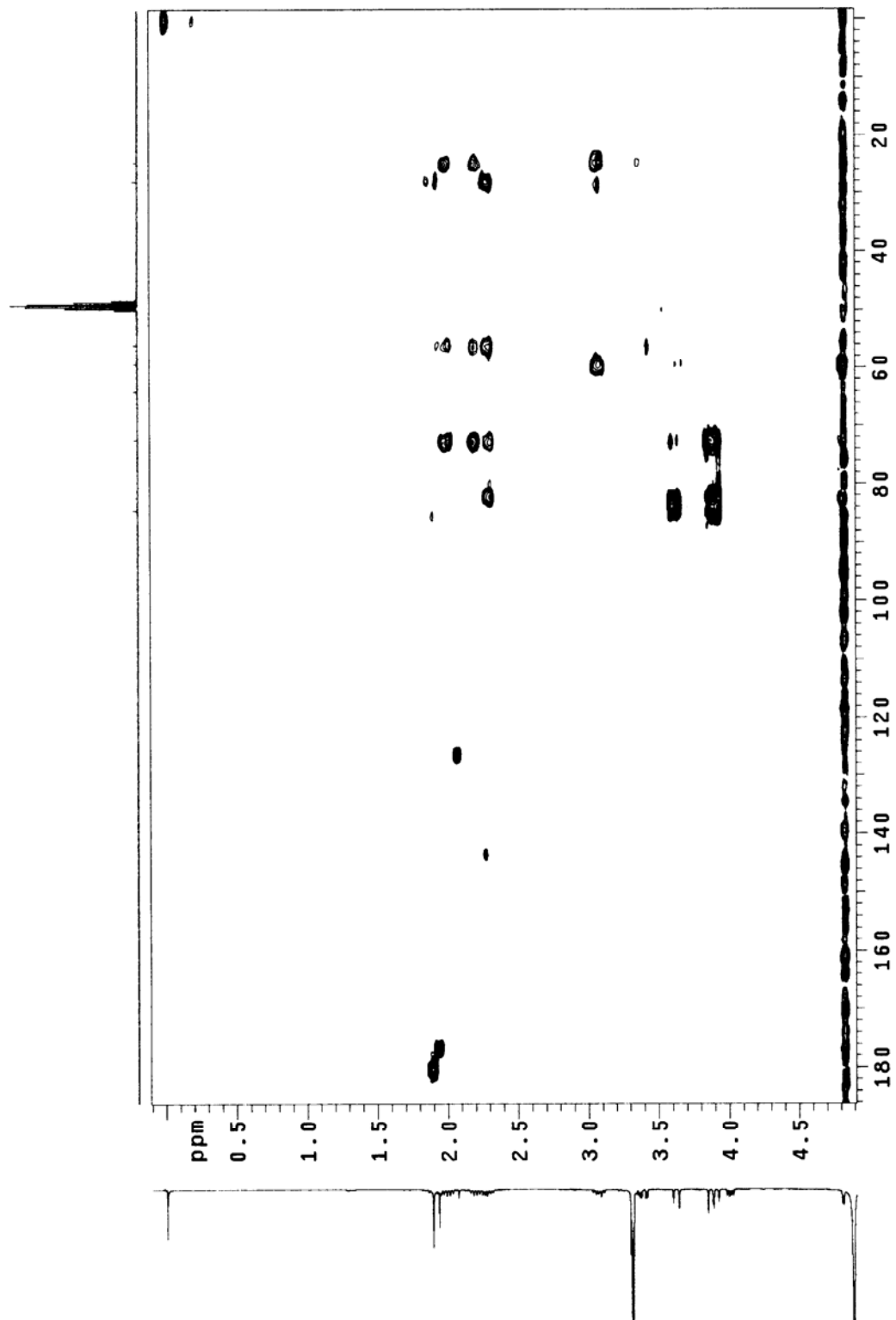


Figura 3.25.: Mapa de contorno de RMN 2D de ^{13}C e de ^1H (HMBC), 75,5 MHz/ CD_3OD de **HT-VIII**

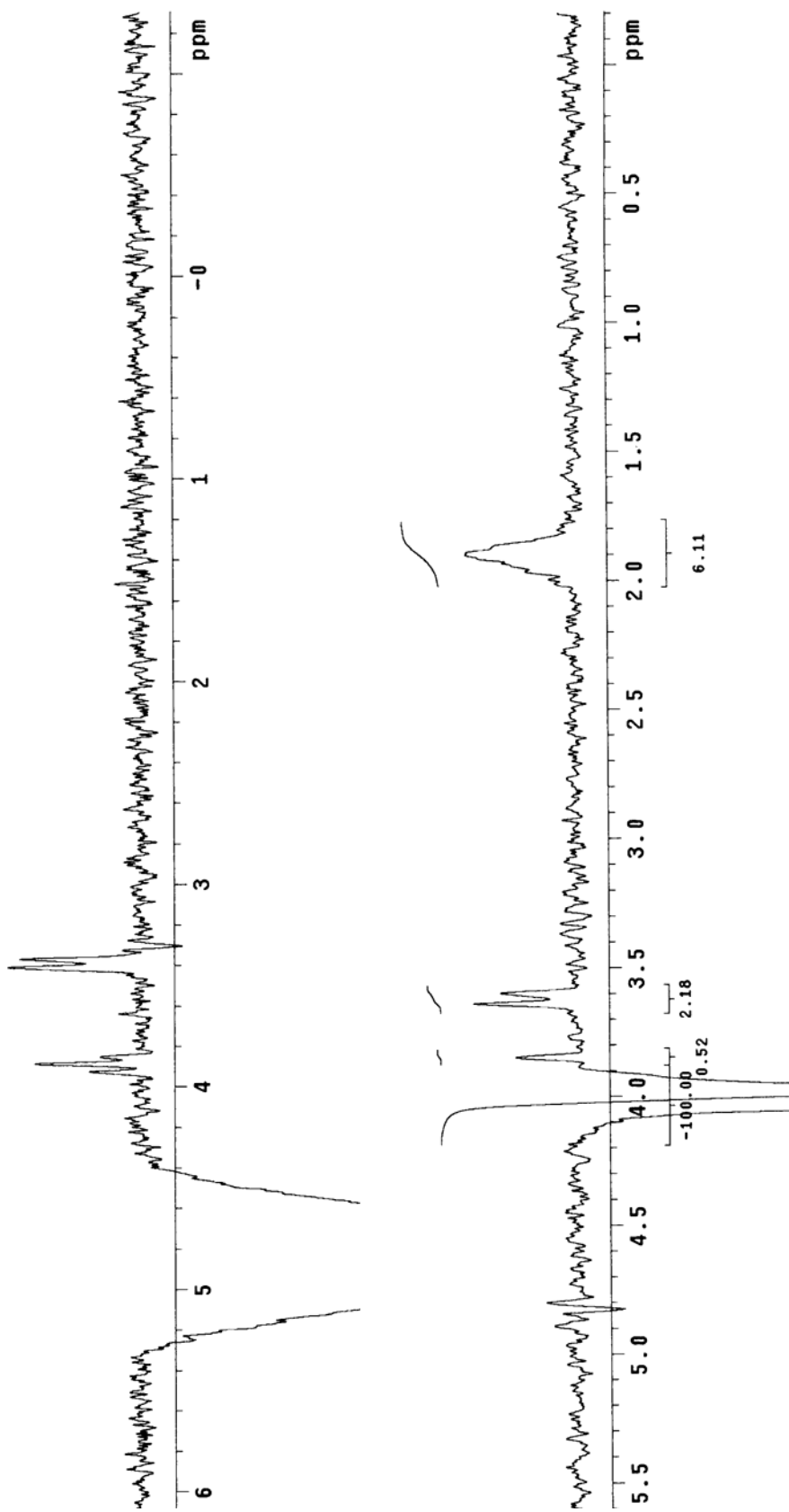
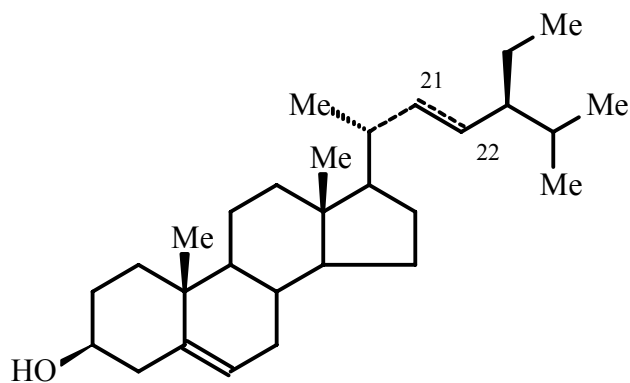


Figura 3.26. Espectros de RMN de ^1H (NOE diferencial), 300,06 MHz/ CD_3OD de **HT-VIII**. Irradiando δ 4,81 e 3,99

3.1.9. Análise estrutural de HT-IX

O composto **HT-IX** foi identificado como uma mistura, a partir dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , que apresentaram sinais de deslocamento característicos dos compostos denominados, β -sitosterol e estigmasterol (**Figuras 3.27 e 3.28**, pág. 100 e 101). Com base na integração dos sinais de deslocamento de ^1H verificou-se que o composto majoritário é o β -sitosterol.



β -sitosterol: 21, 23 – dihidro

Estigmasterol Δ^{21}

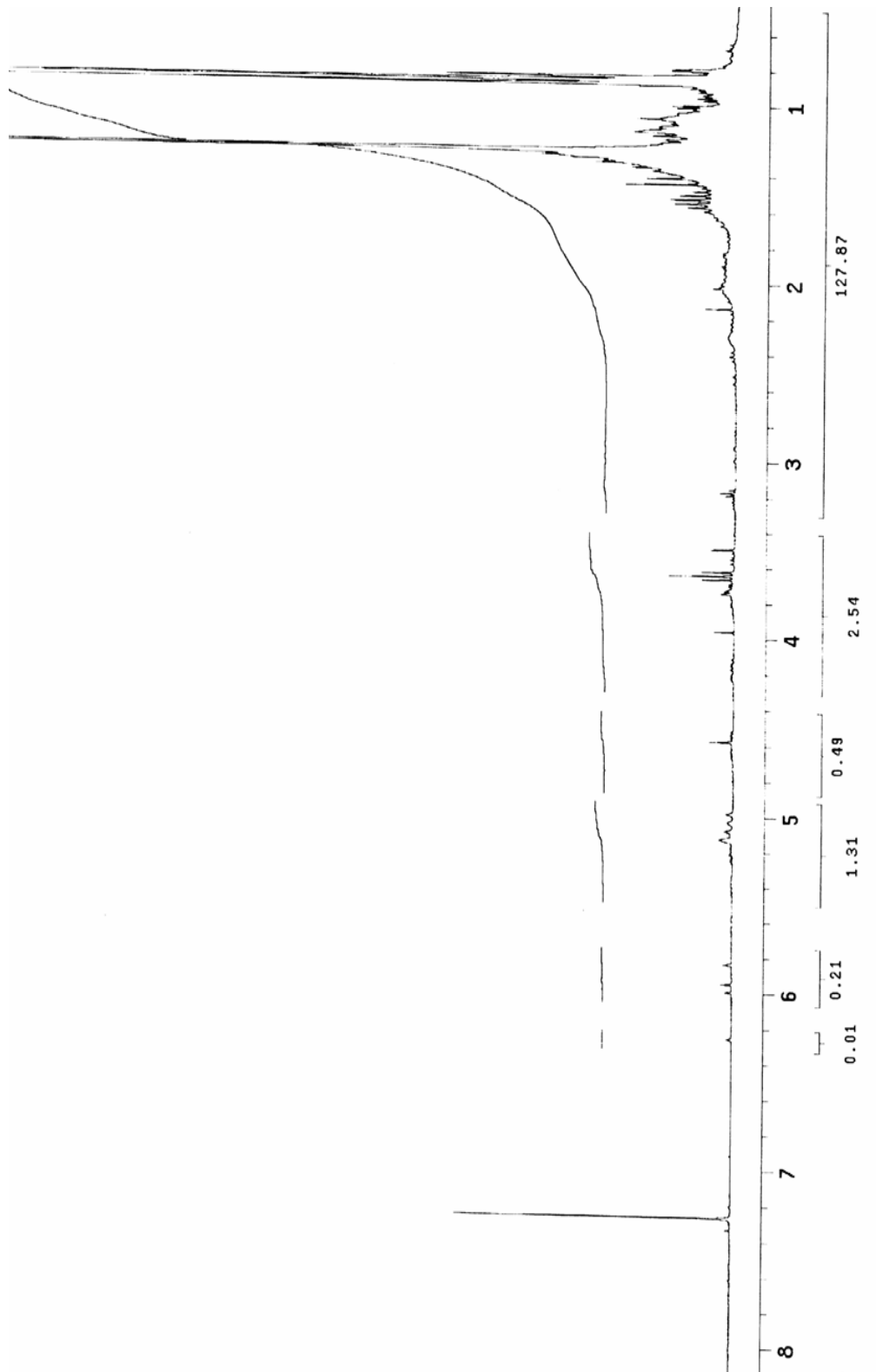


Figura 3.27.: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz/ CHCl_3) de **HT-IX**

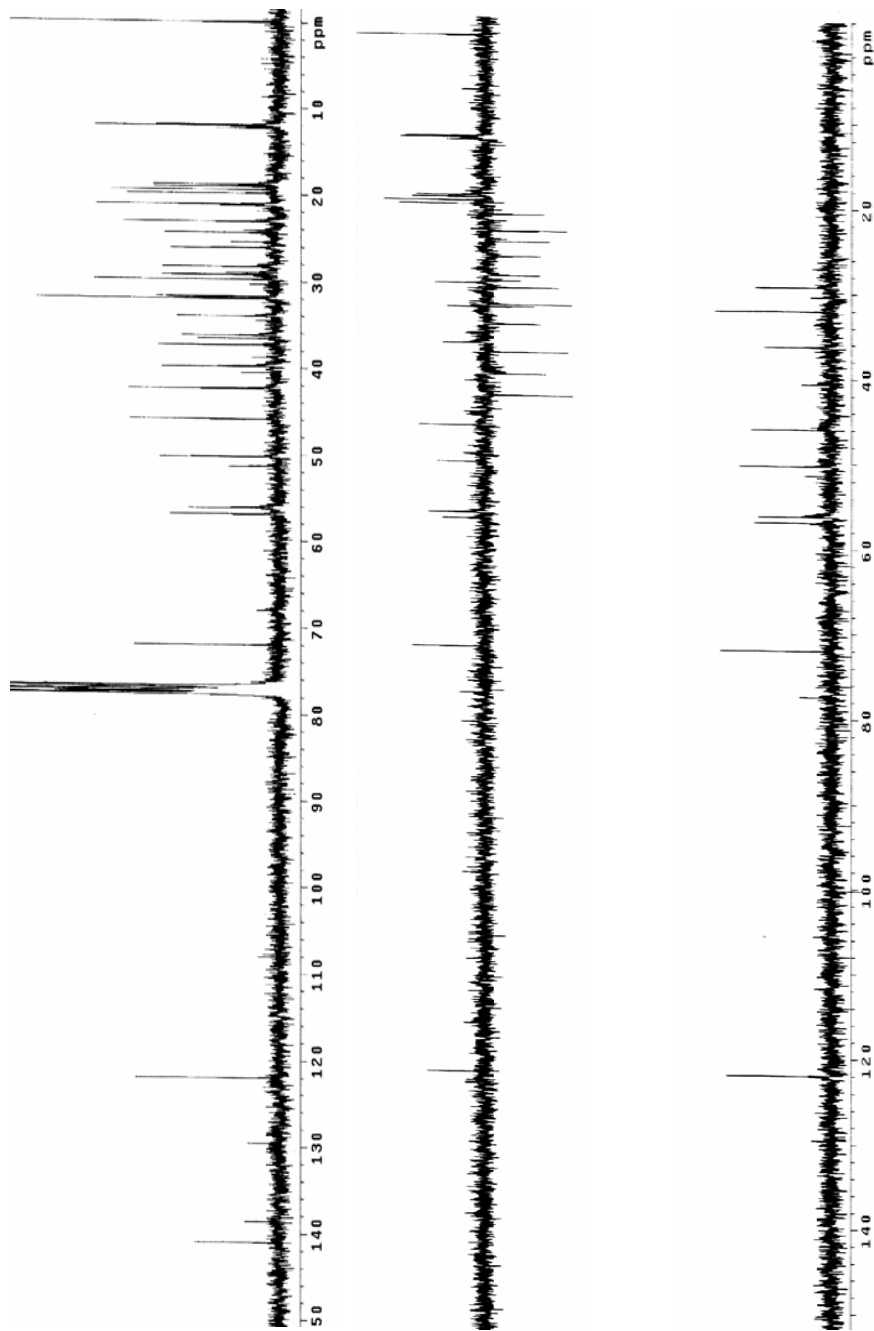


Figura 3.28.: Espectro de RMN de ^{13}C (75,5 MHz/ CHCl_3) de HT-IX

3.2. Análise das frações obtidas do fracionamento dos extratos de *Heliotropium procumbens* Mill.

O extrato bruto etanólico - **Hp-E** (7 g) foi fracionado em coluna cromatográfica com 7 g do extrato etanólico. Deste fracionamento foram estudadas as subfrações Hp-E-2 (220,6 mg), Hp-E-3 (658,6 mg), Hp-E-6 (1,2 g) e Hp-E-10 (0,9 g) que apresentaram menor complexidade de constituintes quando analisadas por CCD. De Hp-E-2 foi isolado **HP-I** e de Hp-E-3 foi isolado **HP-II**.

Da coluna cromatográfica com 8 g do extrato básico (**Hp-B**) as frações Hp-B-3 a Hp-B-6 e, Hp-B-10 foram as que apresentaram massa para se prosseguir o estudo químico. Dos procedimentos cromatográficos realizados com as frações de Hp-B, foram isolados vários compostos caracterizados por experimentos de RMN como ácidos graxos.

O extrato hexânico de *H. procumbens* (0,8 g) foi submetido a CC em sílica gel fornecendo cinco frações Hp-H-1 a Hp-H-5. Na subfração Hp-H-5 foi isolado **HP-III** (4 mg) realizando sucessivas lavagens em metanol.

3.2.1. Análise cromatográfica de **HP-I**

A fração **HP-I** (120 mg) foi isolada da fração Hp-E-2 de CC realizada no extrato bruto etanólico de *H. procumbens* (Hp-E), apresentou-se como um óleo e foi analisada por RMN e CG-EM. As **Tabelas 3.14** e **3.15** relacionam os compostos caracterizados segundo análise do tempo de retenção e de espectro de massas.

Tabela 3.14.: Ésters etílicos caracterizados através de CG-EM de **HP-I**

Tempo de Retenção (min)	Ésters etílicos	Pico Base [m/z – 100%]	Massa [M⁺]
13,63	Hexadecanoato de etila	88	284
14,58	Heptadecanoato de etila	88	298
15,30	Octadecenoato de etila	55	310
15,56	Octadecanoato de etila	88	312
17,43	Icosanoato de etila	88	340
19,46	Docosanoato de etila	88	368

Coluna Apolar/ Solvente CHCl₃**Tabela 3.15.:** Ésteres aminados caracterizados através de CG-EM de **HP-I**

Tempo de Retenção (min)	Ésters aminados	Pico Base [m/z – 100%]	Massa [M⁺]
20,61	Docosanoato de etila (NH ₂)	88	383
21,95	Tricosanoato de etila (NH ₂)	88	397
23,43	Tetracosanoato de etila (NH ₂)	88	411
25,21	Pentacosanoato de etila (NH ₂)	88	425

Coluna Apolar/ Solvente CHCl₃

3.2.2. Análise cromatográfica de **HP-II**

A fração **HP-II** (20 mg) isolado de Hp-E-3, apresentou-se como um óleo e foi analisada por técnicas de RMN e por CG-EM. A **Tabela 3.16** relaciona os dados obtidos pela análise de CG-EM e a caracterização dos compostos feita com base do valor de sua massa e comparação com o banco de dados do aparelho.

Tabela 3.16.: Ésteres etílicos caracterizados através de CG-EM de **HP-II**

Tempo de Retenção (min)	Ésters etílicos	Pico Base [m/z – 100%]	Massa [M⁺]
7,90	Octanoato de etila	88	172
9,01	Dodecanoato de etila	88	228

Coluna Apolar/ Solvente CHCl₃

3.2.3. Análise cromatográfica das demais frações de Hp-E

A CC realizada com a fração Hp-E-6 resultou em 13 subfrações denominadas Hp-E-6A ... Hp-E-6M. Nas frações Hp-E-6E, 6G, 6H, 6I e 6M foram separados várias vezes os mesmos pigmentos (clorofilas) de difícil identificação e por esse motivo não foi possível o estudo destas frações.

Todas as subfrações da CC de Hp-E-10 (0,9 g) foram analisadas por CCD com sistemas: 1) n-butanol:ácido acético:água - BAW e 2) metanol 100% em cuba saturada de vapor de amônia, mas estes não demonstraram diferenças nos R_fs das substâncias onde fosse possível a separação da mistura por CCDP.

O estudo dessas frações isoladamente rendeu 13 compostos. Estes compostos foram analisados por RMN de ¹H e de ¹³C, verificando se tratar de compostos de natureza graxa.

3.2.4. Análise estrutural de HP-III

A partir dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C **HP-III** foi verificada a presença de uma mistura de compostos que apresentaram sinais de deslocamento característicos dos compostos denominados, β-sitosterol e estigmasterol já caracterizada anteriormente do estudo de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell.

3.3. Estudo químico de *Tournefortia paniculata* Cham.

O extrato etanólico (**Tp-E**) de *Tournefortia paniculata* Cham. rendeu 215,8 g e o extrato hexânico (**Tp-H**) rendeu 0,8 g.

Uma extração de alcalóides (extração ácido-base) foi realizada com o extrato etanólico, na mesma seqüência e com os mesmos solventes descritos no **Esquema 2.2** (cap. 2) para a espécie *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum*. Foram obtidos os extratos alcaloídicos de diclorometano (**Tp-B-1**) e acetato de etila (**Tp-B-2**). O extrato **Tp-B-2** foi submetido a experimento de CG-EM, com o propósito de se comparar os tempos de retenção/espectro de massas com os dos alcalóides obtidos de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell, cujas estruturas foram elucidadas em nosso estudo.

Considerando o anteriormente exposto, uma análise de cromatografia em camada delgada - CCD em diversos solventes foi realizada juntamente com o extrato alcaloídico (**Ht-B-2**) e não foi verificada a coincidência de Rfs com os alcalóides isolados de *H. transalpinum* var. *transalpinum*.

A análise de **Tp-B-2** por CG-EM revelou substâncias com massas entre m/z 250-340 para $[M^{++}]$, diferentes dos alcalóides isolados de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum*, que apresentaram massas entre m/z 155 e 200 para $[M^{+}]$.

O rendimento do extrato alcaloídico realizado com **Tp-B-1** foi muito baixo e o estudo químico do mesmo não pode ser viabilizado.

3.4. Estudo das atividades biológicas

Os resultados e a discussão das atividades biológicas compreendem as avaliações de letalidade frente à *Artemia salina* Leach., as atividades antiinflamatórias (antiedematogênica em orelha de camundongo e por indução de pleurisia em ratos), atividade antiproliferativa em células de câncer colo retal humano (HCT-116) e antiviral em vírus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1).

3.4.1. Estudo do teste de letalidade frente a *Artemia salina* Leach

A avaliação da toxicidade frente a esta espécie de microcrustáceo deve-se ao fato de que dados da literatura relacionam esta atividade com as atividades antifúngica, antimicrobiana, antiviral, parasiticida, antiproliferativa e tripanocida.⁵⁹

Os extratos **Hp-E** e **Hp-B** de *Heliotropium procumbens* Mill (**Tabela 3.17**) não demonstraram atividade letal com os microcrústaceos nas concentrações testadas.

Tabela 3.17: Dados de atividade frente a *A. salina* para os extratos de *Heliotropium procumbens* Mill.

Extratos/Frações	Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade em 24hs)		
	DL ₁₀ (µg/mL)	DL ₅₀ (µg/mL)	DL ₉₀ (µg/mL)
Hp-E	65,7 ± 6,8 *	>1000	>1000
Hp-B	210 ± 15,3 *	>1000	>1000

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). * P < 0,05 foi considerado como nível de significância. Cada valor representa a média de 4 curvas de % de mortalidade/concentração ± EPM de 4 amostras com 10 indivíduos cada. Um grupo de indivíduos foi submetido apenas à imersão em água salina + DMSO (Concentração 0,0). **Hp-E** = extrato etanólico de *H. procumbens*; **Hp-B** = extrato básico de *H. procumbens*.

O extrato bruto de *H. transalpinum* var. *transalpinum*, **Ht-ET**, as frações obtidas pela partição deste, **Ht-Hex**, **Ht-CHCl₃**, **Ht-AcOEt**, **Ht-BuOH**, e **Ht-H₂O** e os extratos alcaloídicos **Ht-B-1** e **Ht-B-2** foram testados em diferentes concentrações para a determinação das concentrações necessárias para mortalidade de 10% (DL₁₀), 50% (DL₅₀) e 90% (DL₉₀) dos micro crustáceos. Estes dados estão compilados na **Tabela 3.18**.

Pela análise dos dados pode-se verificar que o extrato etanólico (**Ht-ET**) e as frações de hexano (**Ht-Hex**) e acetato de etila (**Ht-AcOEt**) apresentaram melhores resultados que as demais frações, com letalidade em menores concentrações. A fração **Ht-AcOEt** foi a que apresentou melhor resultado com valores de DL de 1,9; 6,2 e 9,7 µg/mL para DL₁₀, DL₅₀ e DL₉₀.

Tabela 3.18.: Dados de atividade frente a *A. salina* para os extratos de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell

Extratos/Frações	Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade)		
	DL ₁₀ (µg/mL)	DL ₅₀ (µg/mL)	DL ₉₀ (µg/mL)
Ht-ET	2,5 ± 0,9*	8,9 ± 3,0*	85,6 ± 27,8*
Ht-Hex	2,3 ± 0,9*	9,3 ± 1,6*	68,9 ± 8,9*
Ht-CHCl₃	31,2 ± 5,8*	153,7 ± 16,8*	540,1 ± 63,3*
Ht-AcOEt	1,9 ± 0,8*	6,2 ± 2,7*	9,7 ± 3,7*
Ht-BuOH	45,1 ± 4,2*	98,4 ± 17,7*	659,3 ± 35,9*
Ht-H₂O	154,4 ± 12,3*	349,6 ± 51,1*	768,3 ± 53,0*
Ht-B-1	67,9 ± 9,4*	>1000	>1000
Ht-B-2	4,7 ± 0,8*	40,7 ± 15,8*	>1000

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). * P < 0,05 foi considerado como nível de significância. Cada valor representa a média de 4 curvas de % de mortalidade/concentração ± EPM de 4 amostras com 10 indivíduos cada. Um grupo de indivíduos foi submetido apenas a imersão em água salina + DMSO (Concentração 0,0). **Ht-ET** = extrato etanólico de *H. transalpinum*; **Ht-Hex** = partição de hexano de *H. transalpinum*; **Ht-CHCl₃** = partição de clorofórmio de *H. transalpinum*; **Ht-AcOEt** = partição de acetato de etila de *H. transalpinum*; **Ht-BuOH** = partição de n-butanol de *H. transalpinum*; **Ht-H₂O** = partição aquosa de *H. transalpinum*; **Ht-B-1** = extrato alcaloídico de diclorometano de *H. transalpinum*; **Ht-B-2** = extrato alcaloídico de acetato de etila de *H. transalpinum*.

Com as amostras testadas da espécie *Heliotropium transalpinum* var *transalpinum* bons resultados, isto é, alta letalidade dos microcrustáceos, foi obtida para o extrato etanólico (**Ht-ET**), frações de hexano (**Ht-Hex**) e de acetato de etila (**Ht-AcOEt**).

Os testes realizados nas partições do extrato etanólico e no extrato básico de *Heliotropium procumbens* Mill. não apresentaram letalidade frente a *Artemia salina* significativa como as amostras testadas da espécie *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell..

3.4.2 Efeito dos extratos totais de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens* sobre a pleurisia em ratos

A administração intrapleural de carragenina (Cg) em grupos de animais pré-tratados, via oral com solução salina 0,9 % (Cg + salina) ou dimetil sulfóxido 16 % (Cg + DMSO) induziu uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por um aumento no volume de exsudato pleural e no número de leucócitos migrados para a cavidade, quando comparada com parâmetros basais (obtidos de animais normais que receberam injeção de PBS na cavidade pleural).

Os ensaios de atividade antiinflamatória, verificada pelo modelo de pleurisia induzida em ratos, dos extratos de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell e *H. procumbens* não mostraram efeito significativo para ambas as espécies. A redução do volume de exsudato inflamatório e a diminuição do número de células representativas da resposta inflamatória - leucócitos (**Tabela 3.19**) que seria esperado em uma atividade antiinflamatória não foram observados.

Assim os dados indicam que os extratos brutos das duas espécies vegetais não apresentam atividade antiinflamatória sistêmica neste modelo experimental.

Os resultados da avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos etanólicos de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens* foram estatisticamente processados e tabelados (**Tabela 3.19**). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da

média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado como nível de significância.

Tabela 3.19.: Efeito dos extratos etanólicos de *Heliotropium procumbens* e *H. transalpinum* var. *transalpinum* (volume de exsudato pleural e migração de leucócitos) em pleurisia induzida por carragenina (Cg) em ratos

Grupos	Volume (mL) de exsudato inflamatório	Número de leucócitos/mm ³
Basal	0,10	6 700 ± 450
Cg + salina (n = 4)	0,85 ± 0,10	62 310 ± 8 979
Cg + indo (n = 4)	0,42 ± 0,07	60 270 ± 3 910
Cg + Ht-E (n = 6)	1,10 ± 0,05*	70 380 ± 2 410*
Cg + Hp-E (n =4)	1,23 ± 0,07	72 210 ± 5 133

Carragenina (200 µg) foi o agente indutor da pleurisia. A solução salina de extratos vegetais, **Ht-E** (extrato etanólico de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum*) e **Hp-E** (extrato etanólico de *H. procumbens*) foi administrada em dose única de 500 mg/Kg nos ratos Wistar (180 – 220 g). A indometacina (indo) administrada por dose oral de 5 mg/Kg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo). Um grupo de animais recebeu apenas a injeção intrapleural de PBS (Basal). Os valores representam a média ± E.P.M. de grupos de 4 a 6 ratos, 4 hs após injeção de carragenina. * $P < 0,01$ quando comparados aos grupos controles. ANOVA (teste de Tukey).

3.4.3. Efeito dos extratos de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens* sobre o edema de orelha em camundongos

A iniciativa da avaliação da atividade antiinflamatória deve-se ao fato de que a família Boraginaceae compreende espécies consagradas popularmente como cicatrizantes de uso externo. Particularmente pode-se citar a espécie *Symphytom officinale* (conhecida como confrei) que tem essa atividade.

A avaliação da atividade antiedematogênica, antiinflamatória tópica, seria então o parâmetro de atividade tópica com maior relação com as atividades cicatrizantes acima

citadas. Assim fez-se esse estudo etnofarmacológico, uma vez que a espécie *H. transalpinum* (conhecida por boragem) é usada em nossa região como cicatrizante de feridas, onde se abstrai relatos de que as folhas aquecidas em vapor de água são colocadas nas feridas como um curativo. Essa atividade também se encontra documentada em literatura direcionada a população leiga.⁶⁸

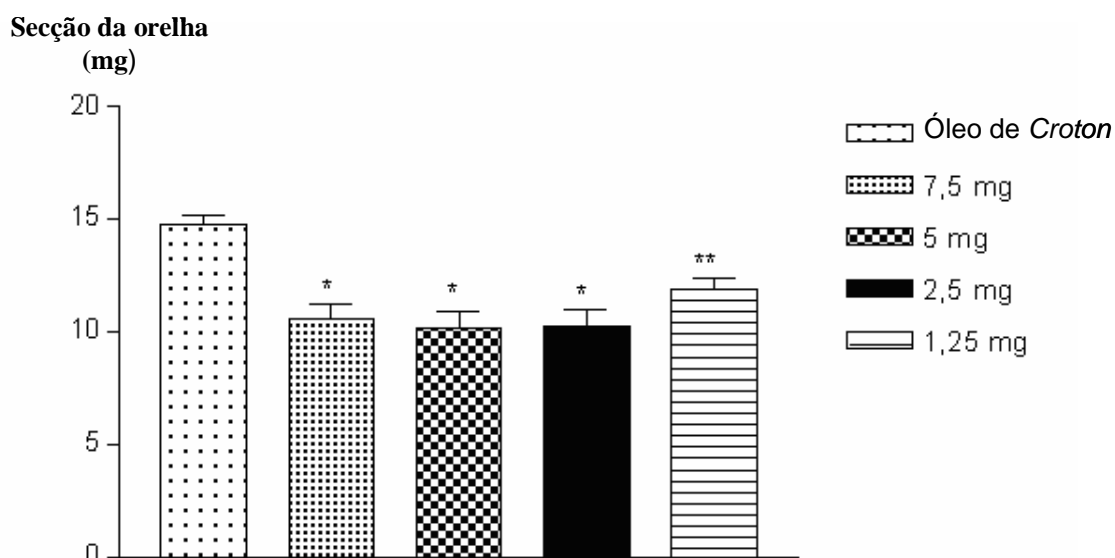
3.4.3.1. Efeito do extrato total e de frações de *H. transalpinum* var. *transalpinum* sobre o edema de orelha em camundongos

A ação antiedematogênica foi avaliada a partir de uma reação inflamatória provocada na orelha de camundongo usando como agente irritante o óleo de *Cróton* que induziu uma resposta inflamatória bastante clara 6 hs após a aplicação tópica.

O extrato etanólico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* reduziu significativamente a intensidade do edema nas doses de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/ orelha (**Ilustração 3.5**), onde foi observado porcentagem de inibição de edema semelhante para as doses de **Ht-E_{2,5}** = 31 %, **Ht-E_{5,0}** = 31 % e **Ht-E_{7,5}** = 28 % e menor para a dose de **Ht-E_{1,25}** = 20 %, mostrando a uma diminuição do efeito com a diminuição da dose (relação dose/efeito). Desta forma, o extrato etanólico total de *H. transalpinum* var. *transalpinum* tem efeito antiinflamatório tópico sobre edema em orelha de camundongo induzido por óleo de *Cróton*, e pode ser considerado como um antiinflamatório para este modelo.

Os resultados da avaliação da atividade antiedematogênica do extrato etanólico de *Heliotropinum transalpinum* var. *transalpinum* foram expressados em termos de porcentagem de inibição de edema (**Tabela 3.20**). No gráfico de colunas apresentado na **Ilustração 3.5** pode-se comparar o resultado da avaliação da dose em relação a seu efeito antiinflamatório.

Ilustração 3.5.: Gráfico da avaliação da aplicação tópica do extrato etanólico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* em edema de orelha



Óleo de *Croton* (200 µg/orelha). A solução do extrato etanólico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* foi administrada nas doses de 7,5; 5,0; 2,5; 1,25 mg/ orelha. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 camundongos. *P < 0,01 e **P < 0,05 quando comparado com controle. ANOVA (teste de Tukey).

Tabela 3.20.: Efeito da aplicação tópica do extrato etanólico total de *Heliotropinum transalpinum* var. *transalpinum* em edema de orelha induzida por óleo de *Cróton* (porcentagem de inibição de edema)

Tratamento (n)	% Inibição
Óleo de <i>Croton</i> (n = 46)	-
Ht-E _{7,5} (n = 8)*	28
Ht-E _{5,0} (n = 8)*	31
Ht-E _{2,5} (n = 8)*	31
Ht-E _{1,25} (n = 8)**	20

Óleo de *Croton* (200 µg/orelha). A solução do extrato etanólico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* foi administrada nas doses de 7,5; 5,0; 2,5; 1,25 mg/ orelha.

Como complementação do estudo da atividade antiedematogênica de *H. transalpinum* var. *transalpinum* foi conduzida a mesma avaliação nas frações **Ht-Hex**, **Ht-CHCl₃**, **Ht-AcOEt**, **Ht-BuOH**, **Ht-H₂O** particionadas do extrato etanólico (descrito cap. 2) e, também das frações **Ht-B-1** e **Ht-B-2** da extração alcaloídica desta planta (**Tabela 2.21**).

Todas as frações, exceto **Ht-B-1**, foram solubilizadas ou suspensas de forma homogênea em acetona/água 7:3. A fração **Ht-B-1** foi solubilizada em clorofórmio/água 7:3 e para melhor análise uma aplicação com óleo de *Croton* em clorofórmio/água 7:3 também foi realizada (**Tabela 3.22**).

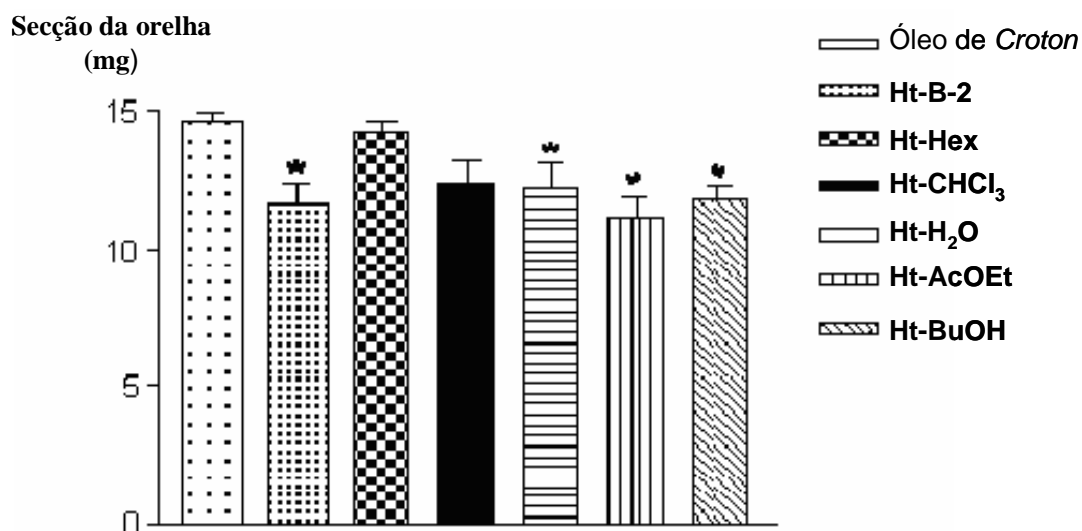
O resultado da atividade antiinflamatória foi expresso em termos de porcentagem de inibição de edema como tabelado a seguir. Também no gráfico de colunas apresentado nas **ilustrações 3.6** e **3.7** pode-se comparar o resultado da avaliação das frações em relação a seu efeito antiedematogênico.

Tabela 3.21.: Efeito da aplicação tópica (porcentagem de inibição) das frações de *Heliotropinum transalpinum* var. *transalpinum* em edema de orelha induzida por óleo de *Croton* (Acetona/água 7:3)

Grupos	% Inibição
Óleo de <i>Croton</i> (n = 18)	-
Ht-Hex (n = 8)	2,5
Ht-CHCl₃ (n = 8)	14,9
Ht-AcOEt (n = 8)*	23,5
Ht-BuOH (n = 8)*	18,8
Ht-H₂O (n = 8)*	16,1
Ht-B-2 (n = 8)*	20,1

A solução de óleo de *Croton* (200 µg/orelha) e das frações de *H. transalpinum* var. *transalpinum*, **Ht-Hex** = fração de hexano, **Ht-CHCl₃** = fração de clorofórmio, **Ht-AcOEt** = fração de acetato de etila, **Ht-BuOH** = fração de n-butanol, **Ht-H₂O** = fração aquosa e **Ht-B-2** = fração alcaloídica de acetato de etila administradas na dose de 2,5 mg/ orelha foram solubilizadas em acetona/água 7:3.

Ilustração 3.6.: Gráfico da avaliação da aplicação tópica das frações de *H. transalpinum* var. *transalpinum* em edema de orelha



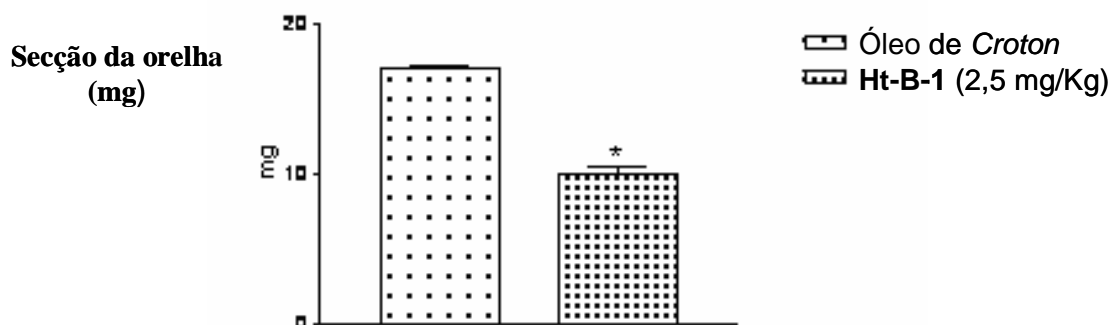
A solução de óleo de *Croton* (200 µg/orelha) e das frações de *H. transalpinum* var. *transalpinum*, **Ht-Hex** = fração de hexano, **Ht-CHCl₃** = fração de clorofórmio, **Ht-AcOEt** = fração de acetato de etila, **Ht-BuOH** = fração de n-butanol, **Ht-H₂O** = fração aquosa e **Ht-B-2** = fração alcaloídica de acetato de etila administradas na dose de 2,5 mg/ orelha foram solubilizadas em acetona/água 7:3. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 camundongos. *P < 0,01 e **P < 0,05 quando comparado com controle. ANOVA (teste de Tukey).

Tabela 3.22.: Efeito da aplicação tópica (porcentagem de inibição) da fração **Ht-B-1** de *Heliotropinum transalpinum* var. *transalpinum* em edema de orelha induzida por óleo de *Croton* (clorofórmio/água 7:3)

Grupos	% Inibição
Óleo de <i>Croton</i> (n = 4)	-
Ht-B-1 (n = 8)*	41,1

Óleo de *Croton* (200 µg/orelha) e a solução de **Ht-B-1**, extrato alcaloídico de diclorometano de *H. transalpinum* var. *transalpinum* foram administrados na dose de 2,5 mg/ orelha suspensos em clorofórmio/água 7:3.

Ilustração 3.7.: Gráfico da avaliação da aplicação tópica da fração **Ht-B-1** de *H. transalpinum* var. *transalpinum* em edema de orelha induzida por óleo de *Cróton* (clorofórmio/água 7:3)



Óleo de *Croton* (200 µg/orelha) e a solução de **Ht-B-1**, extrato alcaloídico de diclorometano de *H. transalpinum* var. *transalpinum* foram administrados na dose de 2,5 mg/ orelha suspensos em clorofórmio/água 7:3. ANOVA (teste de Tukey). *P < 0,01.

Com base nos resultados obtidos na avaliação da atividade antiedematogênica das frações **Ht-Hex** (2,5 %), **Ht-CHCl₃** (14,9 %), **Ht-AcOEt** (20 %), **Ht-BuOH** (18,8 %), **Ht-H₂O** (16,1 %), observa-se uma menor porcentagem de inibição em relação ao extrato etanólico de *H. transalpinum* var. *transalpinum* (31%) (**Tabelas 3.21 e 3.22**). Esses dados indicam que houve sinergismo entre os componentes do extrato total (**Ht-E**), consolidando uma ação antiedematogênica mais intensa que nas frações isoladamente.

Um dos componentes isolados do estudo químico desta espécie foi o triterpeno, β-sitosterol, cuja atividade antiinflamatória por vários modelos experimentais têm sido relatada. Sugere-se, então, que este triterpeno seja possivelmente um dos responsáveis pelo efeito antiinflamatório. ⁶⁹

3.4.3.2. Estudo da atividade antiedematogênica de *H. procumbens*

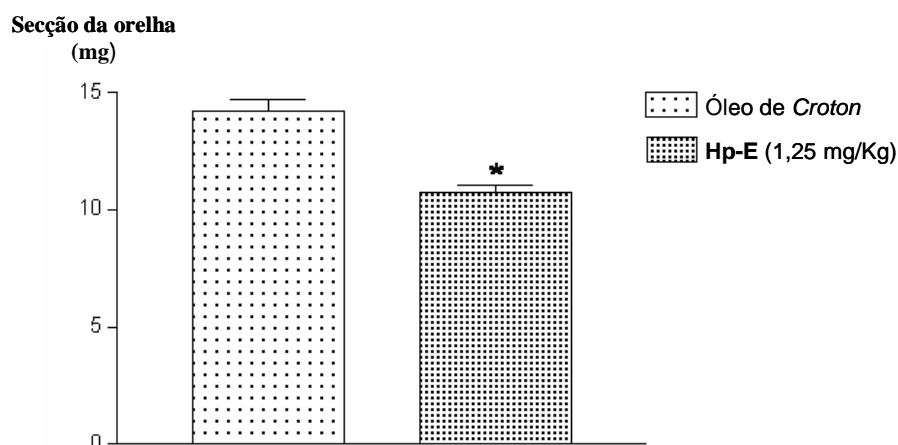
Os resultados da avaliação da atividade antiedematogênica do extrato etanólico de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* foram estatisticamente processados e tabelados (**Tabela 3.23**). Elaborou-se um gráfico de colunas apresentado na **Ilustração 3.8** comparando o resultado da avaliação da atividade antiedematogênica em relação a redução da inflamação causada pelo óleo de *Croton*.

Tabela 3.23.: Efeito da aplicação tópica (porcentagem de inibição) do extrato total de *Heliotropium procumbens* em edema de orelha (acetona/água 7:3)

Grupos	% Inibição
Óleo de <i>Croton</i> (n = 8)	-
Hp-E (n = 10)*	24,3

Óleo de *Croton* (200 µg/orelha). A solução do extrato total de *H. procumbens* (**Hp-E**) foi administrada na dose de 1,25 mg/ orelha. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 camundongos.

Ilustração 3.8.: Gráfico da avaliação da aplicação tópica do extrato etanólico de *H. procumbens* em edema de orelha induzida por óleo de *Croton*.



Óleo de *Croton* (200 µg/orelha). A solução do extrato total de *H. procumbens* (**Hp-E**) foi administrada na dose de 1,25 mg/ orelha. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 camundongos. *P < 0,01 quando comparado com controle. ANOVA (teste de Tukey).

3.4.4. Estudo da atividade antiproliferativa

Os ensaios de atividade antiproliferativa, verificada em células de câncer colo retal humano (HCT-116), dos extratos brutos de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell (**Ht-ET**) e de *H. procumbens* (**Hp-E**), dos extratos alcaloídicos (**Ht-B-1** e **Ht-B-2**) e dos alcalóides isolados de *H. transalpinum* var. *transalpinum* mostraram efeito significativo para os extratos brutos de ambas espécies e para o extrato alcaloídico **Ht-B-1**. As porcentagens de inibição do crescimento celular HCT-116 comparados com o controle de células e a concentração citotóxica capaz de destruir 50% da monocamada (CC_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ foi determinada (**Tabela 3.24**).

Tabela 3.24.: Dados de atividade antiproliferativa verificada em células HCT-116.

Amostras	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Hp-E	305,4 \pm 106,0
Ht-ET	387,2 \pm 12,7*
Ht-B-1	935,5 \pm 91,2*
Ht-B-2	>1000
HT-III	>1000
HT-IV	>1000
HT-V	>1000
HT-VIII	>1000

Os resultados estão apresentados como média da concentração citotóxica que destruiu 50% das células \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). * $P < 0,05$ foi considerado como nível de significância. **Hp-E** = extrato etanólico de *H. procumbens*; **Ht-ET** = extrato etanólico de *H. transalpinum*; **Ht-B-1** = extrato alcaloídico de diclorometano de *H. transalpinum*; **Ht-B-2** = extrato alcaloídico de acetato de etila de *H. transalpinum*. **HT-III** = subulacina; **HT-IV** = acetato de 1β - 2β -epóxi- 8α -pirrolizidinium; **HT-V** = subulacina + 1α - 2α -epóxi- 1β -hidróximetil- 8α -pirrolizidina; **HT-VIII** = 1β - 2β -dihidróxi- 1α -hidróximetil- 8α -pirrolizidina.

A CC_{50} , concentração citotóxica capaz de destruir 50% da monocamada de células foi obtida a partir do gráfico das concentrações testadas pela porcentagem de inibição dada experimentalmente em cada uma delas. A porcentagem de inibição de crescimento celular foi dose-dependente para os extratos que apresentaram atividade significativa.

Os alcalóides pirrolizidínicos N-óxido são citados na literatura como possuidores de atividades inibitórias de tumores, como foi investigado clinicamente para o alcalóide N-óxido de indicina, que apresentou alta porcentagem de inibição para vários tipos de células tumorais e toxicidade limitada.⁷⁰ Wassel e colaboradores relatam a importância da triagem dos extratos de plantas da família Boragináceae em busca de APs N-óxidos para teste de atividades antitumorais.⁷¹

Os extratos etanólicos totais Ht-ET e Hp-E, apresentaram atividade antiproliferativa (**Tabela 3.24**), enquanto entre os alcalóides testados e o extrato **Ht-B-1** nenhum deles apresentou atividade significativa. Vale ressaltar que nenhum deles era do tipo N-óxido.

O fato de a atividade ser mais expressiva nos extratos brutos que nos extratos alcaloídicos pode-se sugerir que houve baixa extração dos APs N-óxido pela extração ácido-base realizada no extrato bruto, e que os alcalóides testados (nenhum deles N-óxido) não apresentam atividade antiproliferativa significativa para as células HCT-116.

3.4.5. Estudo da atividade antiviral

O vírus testado, *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) apresenta como genoma DNA de fita dupla envolvido por um capsídeo de simetria icosaédrica com envoltório. É um vírus humano e a infecção causa a doença comumente denominada de herpes simples ou herpes labial (lugar onde aparece com maior frequência), mas ele pode aparecer em qualquer lugar da pele incluindo na região genital.⁷²

Os extratos testados, **Ht-ET**, **Ht-B-1**, **Ht-B-2** de *H. transalpinum* var. *transalpinum* Vell, **Hp-E** de *H. procumbens* Mill e os alcalóides isolados **HT-III**, **HT-IV**, **HT-V** e **HT-VIII** não apresentaram atividade expressiva frente ao vírus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1).

Uma análise preliminar com um outro vírus, Pólio vírus, foi realizada e verificou-se que a maioria dos extratos e os alcalóides isolados apresentavam atividade antiviral, mas problemas de ordem técnica com as células VERO deixaram a análise inconclusiva, mas ainda estão em progresso.

O Pólio vírus tem outro tipo de estrutura, é um vírus RNA e sem o envoltório, como possuía o vírus *Herpes simplex*. Dados da literatura relatam atividade antiviral dos APs para o modelo de estrutura viral do Pólio vírus.²⁵

CONCLUSÕES

Do estudo químico de espécies vegetais da família Boraginaceae

Do estudo químico da espécie vegetal *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell. foram isolados e identificados os alcalóides pirrolizidínicos:

- a) 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-8 α H-pirrolizidina (subulacina), já isolado anteriormente em estudo com a mesma planta (HT-III e HT-V);
- b) 1 α ,2 α -epóxi-1 β -hidróxi-8 α H-pirrolizidina, já identificado como produto de síntese orgânica, ainda sem relatos de isolamento como produto natural na literatura (HT-VI);
- c) N-óxido de 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-8 α H-pirrolizidina (N-óxido de subulacina), cujo isolamento foi descrito por Malik e Rahman (1988)⁴⁸ e que foi comprovado por Winkler e Heckendorn (1988)⁴⁹ que não se tratava de N-óxido de subulacina e sim de 1 β ,2 β -epóxi-1 α -hidroximetil-pirrolizidina (subulacina). Desta forma, talvez, esse seja o primeiro isolamento e identificação de subulacina-N-óxido (HT-VII) e;
- d) 1 β ,2 β -di-hidróxi-1 α -hidróximetil-pirrolizidina (HT-VIII), que se trata de um composto inédito.

Também foi isolado como mistura β -sitosterol e estigmasterol, 3- β -O- β -D-glucopiranosil-sitosterol e foi caracterizada uma série de ésteres graxos.

Da espécie vegetal *Heliotropium procumbens* Mill. foram analisadas e caracterizadas por CG-EM duas frações HP-I e HP-II fracionadas do extrato etanólico da planta. O estudo do cromatograma mostrou picos referentes às substâncias que diferem apenas no número de carbonos (com aumento de um carbono na cadeia alifática), Tratando-se de uma série de ésteres etílicos de ácidos graxos. Também foi caracterizada outra série de ésteres graxos aminados e foi identificado o composto β -sitosterol.

Uma comparação dos cromatogramas dos alcalóides isolados de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* foi realizada com o cromatograma do extrato alcaloídico de *Tournefortia paniculata* onde não foi constatada nenhuma coincidência dos índices de retenção e nas massas dos mesmos. Conclui-se que se trata de alcalóides diferentes.

Do estudo biológico de espécies vegetais da família Boraginaceae

O estudo de atividade frente à *Artemia salina* demonstrou que a espécie vegetal *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell possui indicativo de ter outras atividades biológicas, como foi comprovado pelas avaliações das atividade antiinflamatória e antiproliferativa. Estas ainda foram mais significativas no extrato bruto do que nas frações. Os componentes bioativos, segundo o ensaio da *Artemia salina*, deveriam estar em maior quantidade na fração de hexano e de acetato de etila o que não foi correspondido pela avaliação da atividade antiinflamatória, mas apresentou coerência para atividade antibacteriana testada em estudo anterior com a mesma espécie.

O estudo de letalidade frente à *Artemia salina* demonstrou que a espécie vegetal *Heliotropium procumbens* Mill não apresentou boa atividade contra esta espécie de microcrustáceo o que sugeriria pouca atividade antibacteriana, antifúngica, tripanocida, entre outras. Entretanto não foi observado na prática, pois o extrato bruto desta espécie apresentou atividade antiedematogênica e antiproliferativa.

A atividade antiinflamatória sistêmica avaliada pelo modelo de pleurisia induzida por carragenina, não teve resultados significativos para os extratos totais de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e de *H. procumbens*.

A atividade antiinflamatória tópica avaliada pelo modelo de edema de orelha induzida por óleo de *Croton*, apresentou resultados significativos de inibição de edema para extratos totais de *H. transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens* e, também para frações obtidas de partição e de extração de alcalóides de *H. transalpinum* var. *transalpinum*.

A atividade antiviral frente ao vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) foi avaliada para o extrato bruto e alcaloídico de *H. transalpinum* var. *transalpinum*, para as substâncias isoladas deste e para o extrato bruto de *H. procumbens*. Para nenhuma destas amostras testadas foi obtido resultado expressivo.

Os extratos brutos de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* e *H. procumbens* Mill. apresentaram resultados significativos quando testados frente às células HCT-116 (células de câncer colo retal humano). O resultado negativo da avaliação dos alcalóides testados (**HT-III**, **HT-IV** e **HT-VIII**) revelam que eles não são os componentes responsáveis pela atividade antiproliferativa do extrato bruto.

REFERÊNCIAS

- ¹ Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F.; Grynberg, N. M. e Echevarria, A. 2002. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, no. 3, pp 429-438.
- ² Rodrigues, M. e Rios, G. Plantas Medicinais Geram Altos Lucros. **Folha de São Paulo**, 29 março de 2006, seção B5.
- ³ Cechinel, V. F. e Yunes, R. 1998. Estratégias para Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceito sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, vol. 21, no. 1, pp 99-105.
- ⁴ Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. N.Y., pp 917-920.
- ⁵ Corrêa, M.P. 1930. Dicionário da Plantas Úteis no Brasil, vol. 3. ED. Ministério da Agricultura – Serviço de informação Agrícola.
- ⁶ Reitz, R. 1968. Boaginaceae de Santa Catarina. 1ª. Edição. Ed. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina.
- ⁷ Joly, A.B. 1991. Botânica, Introdução a Taxonomia Vegetal. 10ª. Edição. Ed. Companhia Editora Nacional.
- ⁸ Lin, Y.L.; Chang, Y.Y.; Kuo, Y.H. e Shiao, M.S. 2002. Anti-Lipid-Peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*. **Journal of Natural Products**, vol. 65, pp. 745-747.
- ⁹ Robins, D. J. 1994. Pyrrolizidine Alkaloids. **Natural Products Reports**, vol. 11, p. 613-619.

- ¹⁰ Smith, L.W. e Culvenor, C.C.J. 1981. Pyrrolizidine Alkaloids. **Journal of Natural Products**. Vol. 44, pp 129-152.
- ¹¹ Ogawa, T.; Niwa, H. 1993. An Efficient Enantio-Selective Synthesis Of Indicine N-Oxide An Antitumor Pyrrolizidine Alkaloid. **Tetrahedron**, Vol.279, n. 4, pp 1571-1578.
- ¹² Liddell, J.R. 1997. Pyrrolizidine Alkaloids. **Natural Products Reports**, vol. 12, pp 665-660.
- ¹³ El-Shazly, A., Abdel-Ghani, A. e Wink, M.. 2003. Pyrrolizidine Alkaloids from *Onosma arenaria* (Boraginaceae). **Biochemistry Systematic and Ecology**, vol. 31, pp 477-485.
- ¹⁴ Hartmann, T.; Theuring, C. Beuerle, T. e Bernays, E.A. 2004. Phenological Fate of Plant-Acquired Pyrrolizidine Alkaloids in the Polyphagous Arctiid *Estigmene acrea*. **Chemoecology**, vol. 14, pp. 207-216.
- ¹⁵ Albelo, L. R. et al. 2002. Chemical defense and aposematism: the case of *Utetheisa galapagensis*. **Chemoecology**, vol.12, pp 153-157.
- ¹⁶ Beales, K.A.; Betteridge, K. et al. 2004. Solid-Phase Extraction and LC-MS Analyses of Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, pp. 6664-6672.
- ¹⁷ <http://www.foodstandards.gov.au/mediareleasepublications/technicalreportseries/index.cfm> (acessado em 15 junho 2006).
- ¹⁸ Reddy, J.S.; Rao, P.R. e Reddy, M.S. 2002. Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* e *Acalypha indica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 79, pp 249-251.
- ¹⁹ Machan, T.; Korth, J.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S. e Pyne, S.G. 2006. Composition and Antituberculosis Activity of the Volatile oil of *Heliotropium indicum* Linn. Growing in Phitsanulok, Thailand. **Journal of Natural Products**, vol. 68, pp. 77-79.

- ²⁰ Nadir, M.T.; Dhahir, J.; Abdual, S.M.; Al-Sarraaj, W.A.; Hussein, W.A. 1986. The Effect of Different Methods of Extraction on the Antimicrobial Activity of Medicinal Plants. **Fitoterapia**. Vol. LVII, N. 5, pp. 117-118.
- ²¹ Jain, C.S.; Singh, B. e Jain, R. 2001. Antimicrobial Activity of Triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. **Chemical Pharmacological Bulletin**, vol. 38, n. 8, pp. 3487-3489.
- ²² Jain, C.S.e Sharma, R. 1987. Antimicrobial Activity of Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium ellipticum*. **Fitoterapia**, vol. 72, pp. 666-668
- ²³ Maquina, G.; Laguna, A.; Franco, P.; Fernandez, R.; Perez, R. e Valiente, O. 1989. Antimicrobial Activity of Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium bursiferum* Wr ex Griselbach. **Pharmazie**, vol. 44, pp 870-871.
- ²⁴ Marchi, J. C. 2001. Dissertação: “Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* (VELL.) Boraginaceae.” Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Pós-graduação em Química – UEM.
- ²⁵ Singh, B.; Sahu, P.M.; Jain, S.C. e Singh, S. 2002. Antineoplastic and Antiviral Screening of pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Pharmaceutical Biology**, vol. 40, n. 8, pp 581-586.
- ²⁶ Carballo, M.; Mudry, M. D.; Larripa, I. B.; Villamil, E. & D’aquino, M, 1992. Genotoxic Action of on Aqueous Extract of *Heliotropium Currassavicum* var. *Argentinum*. **Mutation Research**, Vol. 279, pp. 245-253.
- ²⁷ Robins, D. J. 1994. Pyrrolizidine Alkaloids. **Natural Products Reports**, vol. 11, p. 630.
- ²⁸ Zalkow, L.H.; Gelbaum, L. e Keinan, E. 1978. Isolation of the Pyrrolizidine Alkaloid Europine N-oxide from *Heliotropium maris-murtui* e *H. rotundifolium*. **Phytochemistry**, vol. 17, p. 172.
- ²⁹ Khan, M.A. e Khan, A.S. 1980. Isolation of Heliotrine N-oxide from *Heliotropium ramosissimum*. **Planta Medica**, vol. 40, n. 4, pp. 383-385.

- ³⁰ Mohanraj, S.; Subramanian, P.S. e Herz, W. 1982. Minor Alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. **Phytochemistry**, Vol. 21, n. 7, pp 1775-1779.
- ³¹ Davicino, J.C; Pestchanker, M. I. e Giordano, O.S. 1988. Pyrrolizidine Alkaloids From *Heliotropium Currassavicum*. **Phytochemistry**, Vol. 27, n. 3, pp 960-962.
- ³² Ravi, S.; Lakshmanan, A.J. e Herz, W. 1990. Iso-lypcopsamine, a Pyrrolizidine Alkaloid from *Heliotropium keralense*. **Phytochemistry**, vol. 29, n. 1, pp. 361-364.
- ³³ Constantinidis, T.; Harvala, C. e Skaltsounis, 1993. A. Pyrrolizidine N-óxide Alkaloids of *Heliotropium hirsutissimum*. **Phytochemistry**, vol. 32, n. 5, pp. 1335-1337.
- ³⁴ Lakshmanan, A.J. e Shanmugasundaram, S. 1994. Helibractinecine, a Pyrrolizidine Alkaloid of *Heliotropium bracteatum*. **Phytochemistry**, vol. 36, n. 1, pp. 245-248.
- ³⁵ Lakshmanan, A.J. e Shanmugasundaram, S. 1995. Ester Alkaloids of *Heliotropium bracteatum*. **Phytochemistry**, vol. 40, n. 1, pp. 291-294.
- ³⁶ Lakshmanan, A. J. e Shanmugasundaran, S. 1995 Heliscabine: A Pyrrolizidine Ester Alkaloid From *Heliotropium Scabrum*. **Phytochemistry**, vol. 39, N. 2, Pp 473-475.
- ³⁷ Reina, M.; Mericli, A.; Cabrera, R. e González-Coloma, A. 1995. Pyrrolizidine Alkaloids of *Heliotropium bovei*. **Phytochemistry**, vol. 38, n. 2, pp. 355-358.
- ³⁸ Yassa, N.; Farsan, H.; Shafiee, A. e Rustaiyan, A. 1996. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium esfandiarii*. **Planta Medica**, vol. 62, pp. 583-584.
- ³⁹ Reina, M.; Cabrera, R.; González-Coloma, A.; Gutierrez, C.; Henriquez, J. e Villarroel, L. 1997. Bioactive Saturated Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium floridum*. **Phytochemistry**, vol. 46, n. 5, pp. 845-853.
- ⁴⁰ Farsan, H.; Yassa, N.; Sarkhail, P. e Shafiee, A. 2000. New Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium crassifolium*. **Planta Medica**, vol. 66, pp. 389-391.
- ⁴¹ Souza, J.S.N.; Machado, L.L.; Pessoa, O.D.L.; Braz-Filho, R.; Overk, C.R.; Yao, P.; Cordell, G.A. e Lemos, T.L.G. 2005. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium indicum*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Vol. 16, n.6B, pp. 1410-1414.

- ⁴² Kagan, J. 1968. Luteolin 7-glucoside, the Pigment of *Heliotropium tenellum*. **Phytochemistry**, vol. 7, pp. 505-506.
- ⁴³ Urzúa, A; Villarroel, L.; Torres, R. 1993. Flavonoides En El Exudato Resinoso de Especies Chilenas del Genero *Heliotropium* Seccion Cochranea: Importancia Taxonomica. **Biochemistry Systematic and Ecology**, vol. 744, N. 21.
- ⁴⁴ Urzúa, A; Modak, B. Villarroel, L.; Torres, R. e Andrade, L. 1998. Comparative Flavonoid Composition of Resinous Exudates from *Heliotropium chenopodiaceum* var. *chenopodiaceum* e *H. chenopodiaceum* var. *ericoideum*. **Biochemical Systematic and Ecology**, vol. 26, pp. 127-130.
- ⁴⁵ Guntern, A.; Ioset, J.R.; Queiroz, E.F.; foggin, C.M. e Hostettmann, K. 2001. Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. **Phytochemistry**, vol. 58, pp. 631-635.
- ⁴⁶ Culvenor, C.C.J., Morrison, J.D., Nicholson, A.J.C., e Smith, L;W. 1962. Alkaloids of *Crotalaria trifoliastrum* Willd. **Australian Journal of Chemistry**, vol. 16, N. 1, pp 131-135.
- ⁴⁷ Culvenor, C.C.J., O'Donovan, G.M. e Smith, L;W. 1966. Alkaloids of *Crotalaria trifoliastrum* Willd.and *C. aridicola* Domin. **Australian Journal of Chemistry**, vol. 20, pp 757-768.
- ⁴⁸ Malik, A. e Rehman, K. 1988. Stereostructure of subulacine-N-oxide: A New Pyrrolizidine Alkaloid from *Heliotropium subulatum* Hoest. **Heterocycles**, vol. 27, pp. 707-710.
- ⁴⁹ Winkler, T. e Heckendorn, R. 1988. The structure of Subulacine-N-oxide. **Heterocycles**, vol. 27, N. 10, Pp 2331-2332.
- ⁵⁰ Tapia-Perez, M.E.; Tapia-Contreras, A.; Cedillo-Rivera, R. e Meckes, M. 2003. Screening of Mexican Plants for Antiprotozoal Activity – Part II. **Pharmaceutical Biology**, vol. 41, n. 3, pp. 180-183.
- ⁵¹ Osuna, L.; Tapia-Perez, M.E.; Jimenez-Ferrer, J.E.; Carrilho-Quiroz, B.A.e Siva-Sanchez, J.. 2005. Screening of *Alternantera repens*, *Boerhavia coccinea*, *Flaveria trinervia* *Tournefortia densiflora* e *Vitex mollis* Extracts to Evaluate their Antibacterial

- Activity and Effect on Smooth Muscle – Part I. **Pharmaceutical Biology**, vol. 43, n. 9, pp. 749-753.
- ⁵² Ortiz-Andrade, R.R.; Rodruguez-lopez, V.; Gardunho-Ramirez, M.L.e Estrada-Soto, S. 2005. Anti-diabetic effect on alloxanized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia hartwegiana*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 101, pp. 37-42.
- ⁵³ Alarcon-Aguilara, F.J.; Roman-Ramos, R.; Perez-Guitierrez, S.e Flores-Saenz, J.L. 1998. Study of the Anti-hyperglycemic effect of Plants Used as Anti-diabetic. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 61, pp. 101-110.
- ⁵⁴ Mattocks, A.R. 1967. Detection of Pyrrolizidine Alkaloids on Thin-Layer Chromatograms. **Journal of Chromatography**, vol. 27, pp 505-508.
- ⁵⁵ Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.;Mentz, L. A. e Petrovick, P. R. 1999. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 1^o Ed. Porto Alegre: Editora da UFRS.
- ⁵⁶ Lang, G. et al. 2001. Non-toxic pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium semialatum*. **Biochemistry Systematic and Ecology**, vol. 29, pp143-147.
- ⁵⁷ Perry, J. R. Chemical Preparations and Analyses. 2004. 7^a. Edição. Ed. Academic press, London – UK.
- ⁵⁸ Vazzoler, A.E.; Agostinho, A.A.; Hahn, N.S. 1997. A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná – Aspectos Físicos, Biológicos e Sócio-econômicos. 1^a. Edição. Maringá: Ed. Eduem.
- ⁵⁹ Dey, P.M. and Harborne, J.B. 1993. Methods in Plant Biochemistry (Assays for Bioactivity). Vol. 6. Ed. Academic Press, pp 7-10.
- ⁶⁰ Vinegar, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L. 1973. Some Qualitative Temporal Characteristics of Carrageenin-Induced Pleurisy in the Rats (37397). **Procedure Society Experimental Biology**, vol 143, pp. 711.

- ⁶¹ Van Arman, G.C. 1974. Anti-inflammatory Drugs. **Clinical Pharmacological and Therapeutical**, vol. 16, pp. 900-904.
- ⁶² Skehan P.; Storeng, R.; Scudeiro, D. Monks, A.; McMahon, J.; Vistiga, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S. e Boyd, M.R.. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal National Cancer Institute**, vol. 82, p. 1107.
- ⁶³ Matida, A.K., Rossi, M.H., Bluemnthal, E.E.A., Schuquel, I.T.A., Malheiros, A. e Vidotti, G.J. 1996. 3-β-O-β-D-glucoopyranosylsitosterol in species of Labiatae, Verbenaceae and Apocinaceae. **Anais da Associação Brasileira de Química**, Vol. 45, N. 3. pp 147-151.
- ⁶⁴ Lakshmanan, A.J. e Shanmugasundaram, S. 1994. Helibractinecine, a Pyrrolizidine Alkaloid of *Heliotropium bracteatum*. **Phytochemistry**, vol. 36, n. 1, pp. 245-248.
- ⁶⁵ Subramanian, M. e Herz, W. 1982. High resolution ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of saturated pyrrolizidine monoesters alkaloids. **Journal of Natural Products**, vol 45, n. 3, pp. 328-336.
- ⁶⁶ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Jr., T. V.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; G. Liu; Liashenko; PiskorzI, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; J. A. Pople, , *GAUSSIAN 03W (Revision 8.02)*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, 2003.

- ⁶⁷ Glendening, E. D.; Badenhop, J. K.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Weinhold, F. NBO Version 3.1, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison.
- ⁶⁸ Reits R., 1963. Boragináceas de Santa Catarina, Ed. Da universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.
- ⁶⁹ Li, D. e Sinclair, A. 2002. Macronutrients Innovations: The Role of Fats and Sterols in Humam Health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrients**. Vol 11, n. s6, pp. 155–162.
- ⁷⁰ Kovach, J.S.; Ames, M.M.; Powis, G.; Moertel, C.G.; Hahn, R.G. e Creagen, E.T. 1979. Antitumor activity for some Pyrrolizidine Alkaloids. **Cancer Res.**, vol. 39, p.4540.
- ⁷¹ Wassel, G.; El-Menshawi, Saeed, A.; Mahran e El-Merzabani. 1987. Screening of Selected Plants for Pyrrolizidine Alkaloids and Antitumor Activity. *Pharmazie*, vol. 42, n. 10, pp. 709-710.
- ⁷² www.dermatologia.net/neo/base/doencas/herpeslabial.htm. Acessado em 04/10/2006.