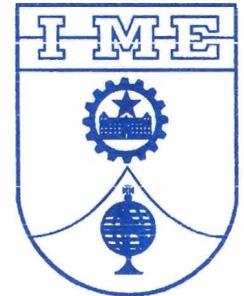


**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
SECRETARIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA**
(Real Academia de Artilharia, Fortificação e Desenho - 1792)



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *IPOMOEA PES-CAPRAE*

LAURA ALVES DAS NEVES VALENTE

IME

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro - RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá i
em base de dados, armazenar em computador, microfilmar ou adotar qualquer fo
arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão
bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que
ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, des
sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) auto
do(s) orientador(es).

615.32

V154e Valente, Laura Alves das Neves

Estudo Fitoquímico de *Ipomoea pes-caprea* / Laura Alves
das Neves Valente - Rio de Janeiro: Instituto Militar de
Engenharia, 2005.

56 p. : il., graf., tab.

Dissertação (mestrado) - Instituto Militar de Engenharia –
Rio de Janeiro, 2005

1. Planta Medicinal - *Ipomoea pes-caprea*. 2. Atividade
biológica. I. Título. II. Instituto Militar de Engenharia.

CDD 615.32

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

LAURA ALVES DAS NEVES VALENTE

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *IPOMOEA PES-CAPREA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientadores: Prof. José Daniel Figueroa Villar - Ph.D.
Prof. Carlos Alberto da Silva Riehl - D. C.

Aprovada em 31 de março de 2005 pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. José Daniel Figueroa Villar – Ph.D. - IME



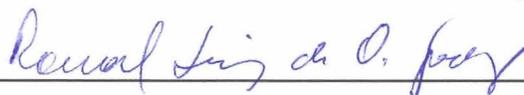
Prof Carlos Alberto da Silva Riehl – D. C. - UFRJ



Prof Alcino Palermo de Aguiar – D. C. - IME



Prof. Flávia Martins da Silva – D. C. - UFRJ



Prof. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy – D. C. – Embrapa

Rio de Janeiro

2005

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
SECRETARIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA**

LAURA ALVES DAS NEVES VALENTE

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *IPOMOEA PES-CAPRAE*

**Rio de Janeiro
2005**

Aos meus pais, Amaro Jorge e Maria do Carmo,
A minha irmã Fabiana,
Ao meu marido Marcio.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fidelidade e força hoje e sempre;

Aos meus pais e eternos amigos, Amaro Jorge e Maria do Carmo por tudo que sou hoje;

Ao Marcio pelo suporte emocional, compreensão, paciência e amor imprescindíveis em todos os momentos;

A minha irmã Fabiana, sinônimo de força e coragem, pelos momentos de descontração;

Aos Drs. José Daniel Figueroa Villar e Carlos Alberto da Silva Riehl pela orientação, amizade e confiança ao longo da realização deste trabalho;

Aos funcionários e professores do Departamento de Química pela cordialidade;

As amigas Evelyn e Silvia pelo companheirismo, pelo ombro amigo e apoio nas horas de desânimo;

A amiga Daniele pela valiosa colaboração;

Ao Fred e ao Rodrigo pela realização dos espectros de RMN;

A Claudia Campinha pela ajuda na realização dos ensaios biológicos;

E a todos aqueles que esquecemos de agradecer, e que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O Gênero <i>Ipomoea</i>	18
1.1.1 Dados químicos do gênero <i>Ipomoea</i>	19
1.1.2 Dados Farmacológicos do gênero <i>Ipomoea</i>	20
1.1.3. A espécie <i>Ipomoea pés-caprae</i>	21
1.2. Objetivo.....	23
2 METODOLOGIA	24
2.1 Materiais e Métodos.....	24
2.1.1 Espectrometria do Infravermelho.....	24
2.1.2 Espectrometria de RMN.....	24
2.1.3 Cromatografia em Camada Fina.....	24
2.1.4 Cromatografia Líquida em Coluna Aberta	25
2.1.5 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.....	25
2.1.6 Espectrometria de Massas.....	25
2.1.7 Ponto de Fusão.....	26
2.2 Coleta da Planta.....	26
2.3 Preparo dos Extratos Brutos.....	26
2.4 Solventes.....	26
2.5 Antibiograma.....	27
2.5.1 Metodologia do Antibiograma.....	28
2.5.1.1 Preparação do Agar Müeller-Hinton.....	28
2.5.1.2 Preparação do Antibiograma.....	28
2.6 Cromatografia do extrato de acetato de etila de <i>Ipomoea pes-caprea</i> ..	29
2.6.1 Preparo da pastilha	30

2.7	Caracterização do ácido <i>p</i> -(1-tridecanil)óxicinâmico.....	31
2.8	Metilação do composto IPCEA-23(2)	31
2.9	Caracterização do composto metilado	32
3	RESULTADO E DISCUSSÃO	33
3.1	Escolha da Planta	33
3.2	Coleta da Planta	33
3.3	Preparo dos Extratos Brutos.....	33
3.4	Antibiograma dos Extratos Brutos	35
3.5	Isolamento e caracterização do ácido <i>p</i> -(1-tridecanil)óxicinâmico.....	38
3.6	Assinalamento dos carbonos do ácido <i>p</i> -(1-tridecanil)óxicinâmico.....	47
3.7	Metilação do ácido <i>p</i> -(1-tridecanil)óxicinâmico.....	48
3.8	Antibiograma do ácido <i>p</i> -(1-tridecanil)óxicinâmico	51
4	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	52
4.1	Conclusões	52
4.2	Sugestões	53
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Substâncias identificadas nas espécies do gênero <i>Ipomoea</i>	20
FIG. 1.2	<i>Ipomoea pes-caprae</i>	21
FIG. 1.3	Compostos com propriedades antiinflamatórias	22
FIG. 2.1	Esquema para obtenção de extratos brutos.....	27
FIG. 2.2	Halos de Inibição.....	29
FIG. 3.1	Esquema para obtenção de extratos brutos.....	34
FIG. 3.2	Parede celular de bactérias gram-positivas.....	35
FIG. 3.3	Parede celular de bactérias gram-negativas.....	36
FIG. 3.4	Difusão dos agentes antimicrobianos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	36
FIG. 3.5	Espectro de IV (pastilha de KBr) do composto IPCEA- 23 (2).....	38
FIG. 3.6	Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do composto IPCEA-23(2).....	39
FIG. 3.7	COSY H-H (300 MHz, CDCl ₃) do composto IPCEA-(23)- (2).....	40
FIG. 3.8	Acoplamentos observados através da análise do espectro COSY	41
FIG. 3.9	Espectro de RMN ¹³ C(300 MHz, CDCl ₃) do composto IPCEA-23(2).....	43
FIG. 3.10	DEPT (300 MHz, CDCl ₃) do composto IPCEA-23(2)	43
FIG. 3.11	HETCOR (300 MHz, CDCl ₃) do composto IPCEA-(2)	44
FIG. 3.12	Espectro de Massas do composto IPCEA-23(2).....	45
FIG. 3.13	Fragmentações sugeridas a partir do espectro de massas do composto IPCEA-23(2).....	46
Fig. 3.14	Estrutura do ácido <i>p-n</i> -(1-tridecanil)oxicinâmico.....	47
FIG. 3.15	Assinalamento dos carbonos do ácido <i>p</i> -(1-tridecanil)oxicinâmico	47
FIG. 3.16	Reação de metilação com diazometano	48
FIG. 3.17	Espectro de IV (pastilha de KBr) do composto IPCEA- 23 (2)-Me	49
FIG. 3.18	Espectro de RMN ¹ H(300 MHz, CDCl ₃) do composto IPCEA-23(2)-Me.....	49

FIG. 3.19	Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do composto IPCEA-23(2)-Me.....	50
FIG. 3.20	Expansão da região de 76ppm a 78ppm do espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do composto IPCEA-23(2).....	50

LISTA DE TABELAS

TAB. 1.1	Estudos e classes de substâncias identificadas nas espécies do gênero <i>Ipomoea pes-caprae</i>	19
TAB. 2.1	Esquema do fracionamento em sílica gel do extrato de <i>Ipomoea pes-caprae</i> em acetato de etila.....	30
TAB. 3.1	Peso dos extratos bruto em relação ao peso de planta moída obtida nos dois métodos de extração	34
TAB. 3.2	Resultado dos Ensaio Biológicos dos Extratos Brutos de <i>Ipomoea pes-caprae</i>	37
TAB. 3.3	Dados de RMN de ¹ H e correlações observadas no espectro COSY para o composto IPCEA-23(2)	40
TAB. 3.4	Dados obtidos a partir dos espectros de RMN ¹³ C e HETCOR.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

CC	Cromatografia em Coluna;
CCF	Cromatografia em Camada Fina;
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado;
CGAR -	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução;
DMSO -	Dimetil-sulfóxido;
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IV -	Infravermelho;
p.f -	Ponto de Fusão
RMN ¹ H -	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;
RMN ¹³ C -	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13;
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

SÍMBOLOS

cm ⁻¹	centímetro inverso
d	dublete
g	grama
Hz	Hertz
J	constante de acoplamento
m	multiplete
mL	mililitro
ppm	parte por milhão
s	singlete
t	triplete
μL	microlitro
δ	deslocamento químico

RESUMO

Estudos preliminares realizados no Instituto de Antibióticos de Recife demonstraram que extratos de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., uma planta característica do ecossistema de restingas do Estado do Rio de Janeiro, possuem atividade antibiótica.

Do fracionamento em coluna de gel de sílica do extrato em acetato de etila de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. foi identificado uma substância inédita na literatura, mas que se mostrou inativa *in vitro* como antibiótico.

A substância foi identificada, com base em seus dados espectrométricos de infravermelho, massas por impacto de elétrons de baixa resolução e RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (DEPT, COSY e HETCOR), como sendo o ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico.

ABSTRACT

Preliminary studies made in Institute of Antibiotics of Recife demonstrated that extracts of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., one plant characteristic of the lowlands ecosystem of Rio de Janeiro State, possess antibiotic activity. From the silica gel column fractions of the ethyl acetate extracts of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. was isolated and identified a new compound, which was shown to be inactive *in vitro* as an antibiotic. This compound was identified, on the basis of its spectroscopic analysis infra-red, low-resolution electron-impact mass spectroscopy and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy (DEPT, COSY and HETCOR), as *p*-(tridecanil oxicinamic) acid.

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as plantas têm grande importância na vida do ser humano. A manipulação dos produtos naturais é, em seus diferentes aspectos, uma ciência muito antiga. A preparação dos alimentos, corantes, fibras, toxinas, medicamentos e estimulantes são exemplos de atividades tão antigas quanto à raça humana. Quando os químicos no século XVIII ultrapassaram a barreira dos mitos para a ciência, as verdadeiras propriedades dos extratos obtidos da natureza despertaram grande curiosidade entre os cientistas. Eles começaram a separar, purificar e finalmente analisar as substâncias produzidas nas células vivas. Nesta época começava a nascer, como ciência, a Química de Produtos Naturais (SILVA, 1999).

Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diferentes doenças. Planta Medicinal é a espécie vegetal designada pelo seu nome científico em latim, utilizada com finalidades terapêuticas. A partir do avanço científico pôde-se estudar mais a fundo quais substâncias possibilitavam tal efeito, ou seja, substâncias naturais ou sintéticas com propriedades de destruir uma ou mais espécies de microorganismos em geral (CORRÊA, 1998).

A pesquisa sistemática para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são:

- ✓ Extração, isolamento e purificação de novas substâncias de fontes naturais, especialmente de origem vegetal ou microbiológica, as quais se caracterizam como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento.

- ✓ Síntese de novas moléculas ou a modificação molecular de substâncias naturais ou sintéticas, com propriedades farmacológicas definidas (MATOS, 1998).

O uso de plantas medicinais está cada vez mais difundido, não só no Brasil como também em outros países, especialmente na Europa, derrubando um tabu de que somente a população do interior, que cultivava até hoje plantas tanto comestíveis como medicinais, utilizavam-nas para a cura das mais diversas enfermidades, por conhecimento adquirido dos seus ancestrais. Atualmente, as populações urbanas, que não têm contato com as plantas medicinais, vêm adquirindo as drogas de origem natural no comércio (CAMPOS, 1991).

A organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, pelo menos oitenta por cento da população mundial confia principalmente, se não na totalidade, nos produtos naturais. Mesmo nos países industrializados, mais de quarenta por cento de todos os medicamentos farmacêuticos são derivados de recursos naturais. Estes fármacos são encontrados no mercado como ingredientes naturais, cópias sintéticas ou formas artificialmente modificadas de produtos químicos naturais (FILHO, 1998).

A investigação de novos fármacos de origem vegetal é decorrente de vários fatores que vão desde a cultura popular, medicina folclórica e misticismo até a curiosidade de estudar novas espécies vegetais, determinando de modo exato e racional a estrutura de uma nova molécula com potencialidades de se transformar em um medicamento disponível e aprovado. O fator da grande biodiversidade de plantas existente no nosso planeta é um importante aspecto em prol destas pesquisas (GUERRA, 2001).

A idéia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde, ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectros de ação mais adequados e, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes. Objetivo secundário, mas não menos importante, seria a valorização das tradições populares e o fornecimento de substratos para o desenvolvimento da indústria farmacêutica (GUERRA, 2001).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GUERRA, 2001).

Esquecidas por muito tempo pelos ocidentais, as ervas medicinais hoje reassumem seu papel como o mais valioso recurso terapêutico oferecido pela natureza. A fitoterapia – forma de tratamento mais simples e natural de prevenir e tratar doenças através de preparos vegetais ou de princípios ativos que deles se pode extrair – é tão velha quanto o ser humano. A história da fitoterapia se confunde com a história da farmácia, em que até o século XIX, os medicamentos eram formulados à base de plantas medicinais (FITOTERAPIA, 2003).

O descobrimento das propriedades curativas das plantas foi, no início, meramente intuitivo, ou a partir da observação dos animais que, quando doentes, buscavam nas ervas cura para suas afecções. Atualmente pode-se afirmar que, 2000 anos antes do aparecimento dos primeiros médicos gregos, já existia uma medicina egípcia organizada (POLUNIN, 1993).

Os conhecimentos médicos iniciados no antigo Egito divulgaram-se mais tarde para a Mesopotâmia. Em 1924, na Inglaterra, os técnicos do Museu Britânico conseguiram identificar 250 vegetais, minerais e substâncias diversas, cujas virtudes terapêuticas eram conhecidas pelos médicos babilônicos. Nos pergaminhos da época são citadas ervas como o cânhamo indiano, utilizado como anestésico nos casos de reumatismo (POLUNIN, 1993).

Foram, sobretudo, os gregos e mais tarde os romanos, que herdaram e aperfeiçoaram os conhecimentos médicos egípcios. Hipócrates reuniu a totalidade dos conhecimentos médicos de seu tempo no conjunto de tratados conhecidos pelo nome de *Corpus Hipocraticum*, onde, para cada enfermidade, descreve um remédio vegetal e o tratamento correspondente (POLUNIN, 1993).

No início da era cristã, Dioscórides inventariou, no seu tratado *De Materia Medica*, mais de 500 drogas de origem vegetal, mineral ou animal (POLUNIN, 1993).

Finalmente, o grego Galeno ligou seu nome ao que ainda se denomina “farmácia galênica”, onde as plantas não são mais usadas na forma de pó e sim de preparações, nas quais são usados solventes como álcool, água ou vinagre, e servem para conservar e concentrar os componentes ativos das plantas, sendo utilizadas em unguentos, emplastos e outras formas de preparações (POLUNIN, 1993).

O longo período que se seguiu no Ocidente, designado por Idade Média, não foi exatamente uma época caracterizada por rápidos progressos científicos. Foi, no

entanto, no Renascimento, com a valorização da experimentação e da observação direta, com as grandes viagens para as Índias e a América, que se deu origem a um novo período de progresso no conhecimento das plantas e suas aplicações (POLUNIN, 1993).

No início do século XIV, o médico suíço Paracelso tentou relacionar as virtudes das plantas com as suas propriedades morfológicas, sua forma e sua cor. Conhecida como “teoria dos sinais”. Paracelso considerava que uma doença se podia curar com aquilo que com ela tivesse semelhança. Este pensamento não era original do médico suíço, pois os índios da América do sul e, possivelmente indígenas de outros continentes, tinham as mesmas idéias sobre os sinais das plantas e suas relações com o valor curativo (POLUNIN, 1993).

A partir do século XV houve uma preocupação em catalogar um grande número de vegetais, identificando-os e classificando-os de acordo com a procedência dos princípios ativos (POLUNIN, 1993).

Finalmente, os esforços de classificação culminaram, em 1735, com a publicação do *Systema Naturae*, de Lineu (POLUNIN, 1993).

No Brasil, relatos datam desde os tempos da colonização, quando Guilherme Piso chegou a Recife, em 1637, na qualidade de médico do príncipe Maurício de Nassau, reconheceu a superioridade da terapêutica indígena. Desta forma, a fitoterapia no Brasil se tornou resultado de uma série de aculturações de técnicas utilizadas pelos portugueses, pelos indígenas e pelos negros (ALMEIDA, 1993).

1.1. O GÊNERO *IPOMOEA*

O gênero *Ipomoea* é numeroso e inclui aproximadamente 650 espécies tropicais sendo ervas, tubérculos ou arbustos, muitas delas amplamente cultivadas, principalmente como plantas ornamentais, pela beleza de suas folhagens e de suas flores (DI STASI, 2002).

Este gênero pertence à família Convolvulaceae que inclui aproximadamente 1.600 espécies, distribuídas em 56 gêneros de ocorrência em regiões tropicais e de clima temperado, incluindo plantas herbáceas, algumas vezes parasitas, ervas, arbustos e raramente árvores (MABBERLEY, 1997).

1.1.1. DADOS QUÍMICOS DO GÊNERO *IPOMOEAE*

Os trabalhos realizados com o gênero *Ipomoea* estão relacionados à presença de carotenóides, alcalóides e flavanóides (Tabela 1.1). Alguns exemplos destas substâncias identificadas nas espécies do gênero *Ipomoea* são mostradas na FIG. 1.1, p.20).

TAB.: 1.1: Estudos e classes de substâncias identificadas nas espécies do gênero *Ipomoea*

Espécies	Ocorrência
<i>I. batatas</i> (BICUDO, 1986)	Carotenóides (1)
<i>I. aquática</i> (WILLS & RANGGA, 1996)	Carotenóides (1)
<i>I. cairica</i> (PASKA, 1999)	β -sitosterol (2)
<i>I. regnellii</i> (MANN, 1999)	Sulfato Flavanóide (3)
<i>I. reticulata</i> (MANN, 1999)	Sulfato Flavanóide (3)

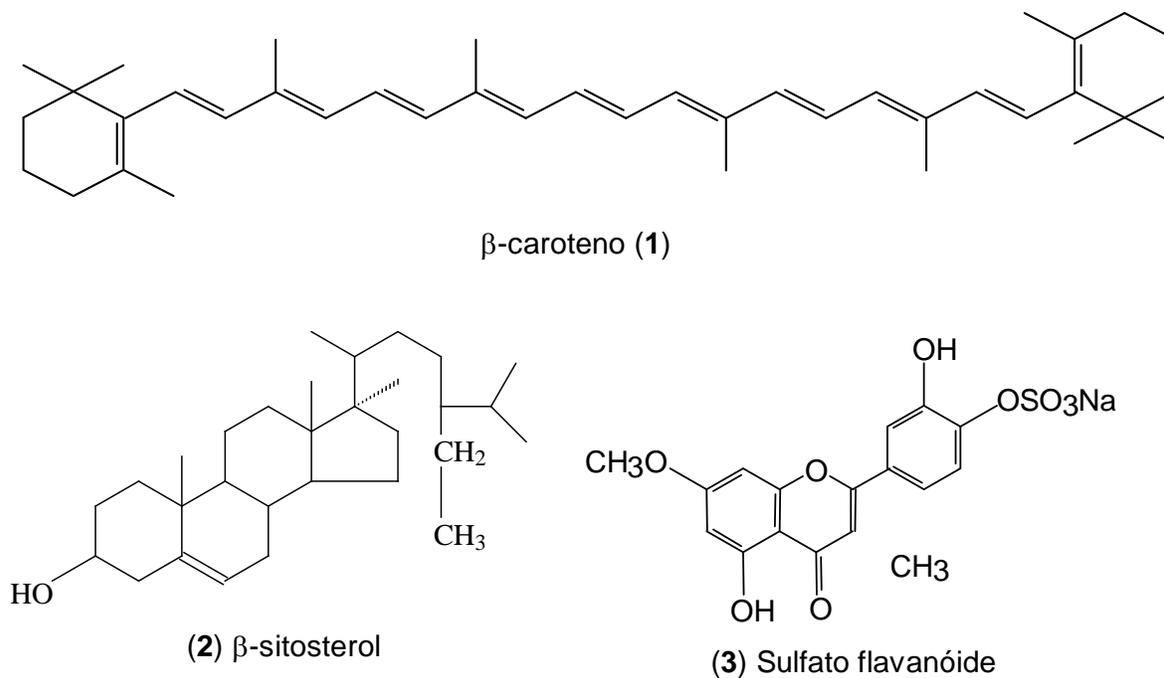


FIG. 1.1: Substâncias identificadas nas espécies do gênero *Ipomoea*.

1.2. DADOS FARMACOLÓGICOS DO GÊNERO *IPOMOEA*

As sementes de *Ipomoea sp.* apresentaram potencial atividade genotóxica em testes com bactérias (FRIEDMAN & HENIKA, 1991). O extrato em diclorometano de *I. fistulosa* apresentou atividade antiinflamatória em teste de edema de pata em camundongos (GORZALCZANY, 1996). A *I. hispida* é citada como droga antileprótica da flora medicinal indígena (KATARIA & GRUPTA, 1996).

Foram isolados de *I. stans* tetrassacarídeos que apresentaram uma pronunciada atividade citotóxica em três linhagens de células tumorais humanas e atividade antibiótica contra duas linhagens de bactérias (REYNOLDS, 1995).

1.1.3. A ESPÉCIE *IPOMOEA pes-caprae* (L.) R. Br.

A *Ipomoea pes-caprea* (L.) R. Br. (FIG. 1.2) é conhecida vulgarmente como salsa-da-praia ou cipó-da-praia. Ocorre nas áreas tropicais no mundo. É empregada freqüentemente na medicina popular como tratamento de inflamações e processos dolorosos (DEVALL, 1990). O seu uso na medicina popular é um argumento para se comprovar suas ações farmacológicas, assim como caracterizar quimicamente seus componentes.

Além disso, estudos realizados no Instituto de Antibióticos, em Recife-PE, interrompidos há mais de 25 anos, demonstraram que o gênero *Ipomoea* apresentava substâncias com atividade antiinflamatória, antimicrobiana e antitumoral (LIMA, 1970).



FIG. 1.2: *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

Embora os sinais de inflamação tenham sido descritos em um papiro egípcio (3.000 a.C.), Celsius, escritor romano do primeiro século d.C., foi o primeiro a citar os quatro sinais cardinais de inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Em 1973, o cirurgião escocês John Hunter observou o que hoje é considerado um fato óbvio: que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que tem efeito salutar sobre o seu hospedeiro. Julius Cohnhein (1939-1884) foi o primeiro a usar o microscópio para observar vasos sanguíneos inflamados em membranas delgadas transparentes. Identificando as alterações iniciais no fluxo sanguíneo, o edema subsequente causado por uma permeabilidade vascular aumentada e a emigração

típica dos leucócitos, ele escreveu descrições que dificilmente poderão ser melhoradas (COLLINS, 2000).

Hoje em dia, já está bem estabelecido o fato de que estes sinais são consequência da liberação de substâncias químicas no local da injúria (por exemplo, histamina, bradicina, prostaglandinas e leucotrienos), originando os dois componentes básicos da inflamação: as alterações vasculares e o acúmulo de células (SPECTOR, 1956).

Em relação à *Ipomoea pes-caprae*, (L.) R. Br., existe na literatura estudo fitoquímico em que foram isolados e caracterizados compostos com propriedades de inibir a síntese de prostaglandinas, ou seja, compostos com propriedades antiinflamatórias.

São eles: 2-hidroxi-4,4,7-trimetil-1(4H)-naftalenona (1), 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-isocumarina (2), eugenol (3) e 4-vinilguaiacol (4) (PONGPRAYONN, 1991) (FIG. 1.3).

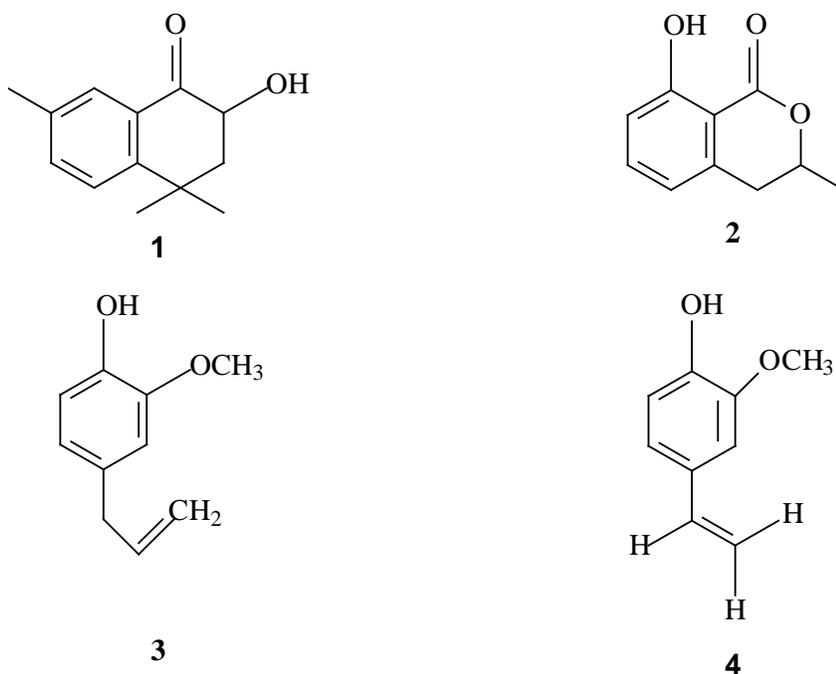


FIG. 1.3: Compostos com propriedades antiinflamatórias isolados de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (PONGPRAYONN, 1991)

1.2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a investigação da espécie vegetal *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., da família Convolvaceae, coletada no Horto da Barra da Tijuca na Cidade do Rio de Janeiro, quanto a sua atividade antibiótica, isolamento e identificação de seus princípios ativos.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetros Perkin Elmer 1600 FTIR e Nicolet-740 FTIR, usando pastilhas de brometo de potássio. Os valores para as absorções foram referidos em unidades de números de onda (cm^{-1}).

2.1.2 ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E CARBONO 13

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian UNTIY-300, sob um campo de 7,05 tesla e frequências de 300 MHz para espectros de ^1H e de 75MHz para espectros de ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 , os deslocamentos químicos foram apresentados em ppm usando TMS como referência interna. Foram obtidos também os espectros DEPT, HETCOR e COSY. As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidade descritas como s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), m (multiplete).

2.1.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA (CCF)

As separações cromatográficas em camada fina analítica foram realizadas sobre sílica Merck PF₂₅₄ em placas preparativas 20x20cm e 1mm de espessura. A

visualização das substâncias foi feita sob lâmpada de ultravioleta Mineralight em 254 e 366 nm e/ou por revelação com solução de sulfato cérico a 2% em ácido sulfúrico 2N e aquecimento.

2.1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM COLUNA ABERTA

A cromatografia líquida em coluna aberta foi utilizada para fracionamento dos extratos brutos e realizada em coluna empacotada com Sílica Gel 60 para cromatografia em coluna com partículas de 70-230 mesh Merck.

2.1.5 CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO

A Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com detector de ionização por chama (CGAR/DIC) foi realizada em cromatógrafo HP 5890 série II, nas seguintes condições: temperatura inicial (forno): 60°C por 2 min; rampa: 10°C/min, temperatura final: 290°C, isoterma por 20 min., tempo de análise: 30 min., temperatura do detector: 300°C e temperatura do injetor: 260°C. O sistema foi operado com divisão de fluxo na razão de 1:20, com hélio como gás de arraste. Coluna RTX-5 (fase estacionária: 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano), 22 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura da fase estacionária.

2.1.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas de baixa resolução por impacto de elétrons, 70 eV, foram obtidos em aparelho CGAR/EM HP 5972. As condições cromatográficas foram as mesmas desenvolvidas para a CGAR/DIC.

2.1.7 PONTO DE FUSÃO

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Fisher-Johns com microscópio.

2.2 COLETA DA PLANTA

As folhas e caule da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. foi coletada no Horto da Barra da Tijuca na Cidade do Rio de Janeiro (aproximadamente 3 Kg) pelo biólogo e funcionário da Fundação Parques e Jardins, Luis Roberto Zaminth, em fevereiro de 2002, desidratada à sombra, em ambiente bem arejado, durante aproximadamente uma semana. Após a dessecação o material foi moído em moinho de martelo na FIOCRUZ.

2.3. PREPARO DOS EXTRATOS

As folhas após secagem à temperatura ambiente, foram moídas e submetidas a extrações utilizando os solventes hexano, acetato de etila e etanol por dois métodos de extração, percolação e soxhlet (FIG. 2.1, p.27) para obtenção dos extratos brutos. Os extratos brutos foram então submetidos a ensaios biológicos.

Os solventes dos extratos brutos obtidos foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

2.4 SOLVENTES

Os solventes Hexano (Vetec), Diclorometano (Vetec), Acetato de Etila (Vetec) e MeOH (Vetec) utilizados na extração por Soxhlet, CCF, CCF preparativa e algumas análises espectroscópicas foram previamente destilados.

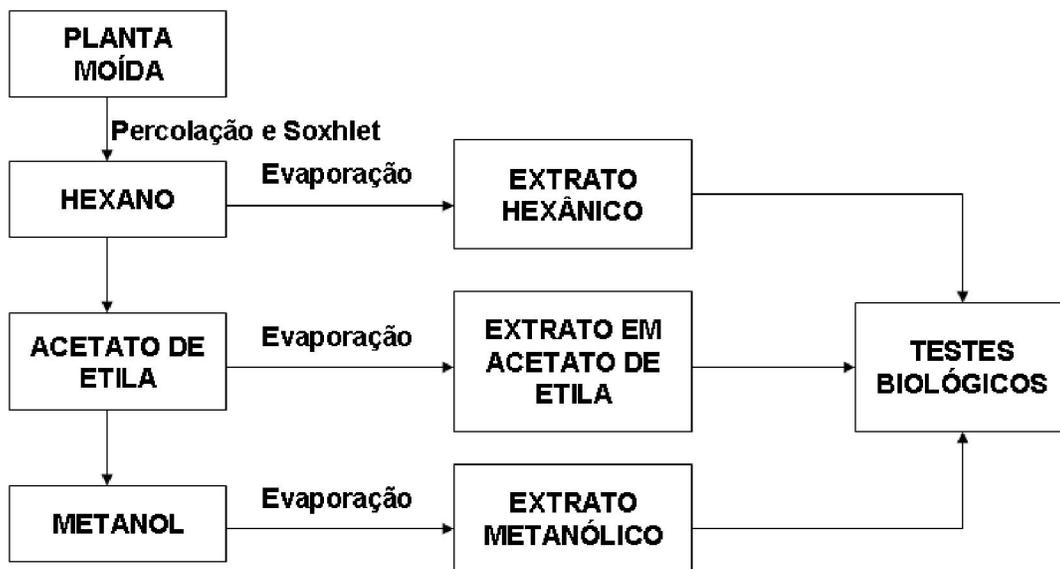


FIG. 2.1: Esquema para obtenção de extratos com solventes de polaridade crescente a partir das folhas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. moídas.

2.5 ANTIBIOGRAMA

Os extratos brutos e o composto isolado foram submetidos a ensaios biológicos de determinação da atividade antibiótica pelo Método de Difusão - Antibiograma - realizado no Laboratório de Bioorgânica do IME – Instituto Militar de Engenharia. Nos ensaios foram utilizados:

Solvente: Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Merck;

Meio de cultura: Agar Muller-Hinton – Isofar;

Discos: S&S Filter Paper 740-E com 13 mm de diâmetro;

Microorganismos:

Escherichia coli (bactéria Gram negativa), INCQS 00310, ATCC 11775, LOTE 0102310;

Staphylococcus aureus (bactéria Gram positiva), INCQS 00039, ATCC 6538, LOTE 0101039.

Todas as cepas fazem parte do acervo da Coleção de culturas de Microorganismos do Laboratório de Bioorgânica do IME.

2.5.1. METODOLOGIA UTILIZADA NO ANTIBIOGRAMA

2.5.1.1 PREPARAÇÃO DO AGAR MÜELLER-HINTON

Foram adicionados 39 g de Agar Müller-Hinton em 1000mL de água destilada. Misturou-se até obter uma suspensão uniforme. A solução foi aquecida até dissolução completa. Após dissolução a solução foi esterilizada em um autoclave à 121°C por 15 minutos. Verteu-se o meio preparado em placas de Petri previamente esterilizadas, e depois deixadas para esfriar, levando a solidificação do meio de cultura.

2.5.1.2 PREPARAÇÃO DO ANTIBIOGRAMA

Com um pipetador esterilizado transferiu-se 100 µL do inóculo de cada microorganismo, para uma placa contendo Agar Müller-Hinton. O microorganismo foi semeado espalhando-o em todas as direções. As placas inoculadas foram deixadas em repouso por cerca de 10 à 15 minutos, até que a superfície estivesse completamente seca e o inóculo absorvido pelo meio de cultura, permitindo assim a melhor fixação dos discos impregnados com os extratos ou compostos.

Aproximadamente cerca de 20 mg do extrato bruto ou cerca de 10 mg do composto isolado foram diluídos a 50 µL em DMSO. Os discos de papel foram então impregnados com 50 µL das soluções obtidas e colocados sobre a superfície do agar inoculado com o auxílio de uma pinça, pressionando levemente e mantendo um espaço de no mínimo 20 mm da borda e entre eles. O branco foi o solvente puro (DMSO). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, as placas foram lidas pela medição do diâmetro da zona de inibição (FIG. 2.2). A interpretação dos resultados do antibiograma foi baseada no tamanho do halo de inibição, em comparação com o controle positivo utilizado de carbenicilina 100 μ g.



FIG. 2.2: Halos de Inibição

2.6 CROMATOGRAFIA DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *IPOMOEA pes-caprae* (L.) R. Br.

5,9555g do extrato de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. obtido através da extração com acetato de etila foram cromatografados em coluna de sílica gel empacotada com hexano. Na cromatografia em coluna utilizou-se uma bureta de 500mL como coluna cromatográfica e aproximadamente 300 g de sílica gel.

O extrato foi colocado na coluna sob a forma de “pastilha”, e a mesma foi eluída com hexano-acetato de etila em gradiente crescente de polaridade e recolhidas frações de 50 mL, conforme mostra a Tabela 2.1 (p.30).

TAB.: 2.1 Esquema do fracionamento em sílica gel do extrato de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. em acetato de etila.

Frações (50mL)	Eluente
1 – 4	hexano(100%)
5 - 7	hexano/acetato de etila (1%)
8 – 10	hexano/acetato de etila (2%)
11 – 13	hexano/acetato de etila (3%)
14 – 16	hexano/acetato de etila (5%)
17 – 19	hexano/acetato de etila (10%)
20 – 22	hexano/acetato de etila (15%)
23 – 25	hexano/acetato de etila (20%)
26 – 28	hexano/acetato de etila (25%)
29 – 31	hexano/acetato de etila (30%)
32 – 34	hexano/acetato de etila (50%)
35 – 37	acetato de etila (100%)
38– 40	metanol (100%)

As frações foram reunidas de acordo com suas características e composição frente a cromatografia em camada fina.

2.6.1. PREPARO DA PASTILHA

Foram misturados 5,9555g do extrato seco de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. obtido através da extração com acetato de etila com 30 g de Sílica Gel 60 para cromatografia em coluna com partículas de 70-230 mesh Merck. Fez-se uma pasta usando quantidade suficiente de CH₂Cl₂ no qual o extrato é solúvel. O solvente foi evaporado à temperatura ambiente até não se sentir mais o odor do solvente no pó obtido.

2.7 CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO *p*-(1-TRIDECANIL)OXICINÂMICO

A fração 23 proveniente da eluição do extrato de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. em acetato de etila em coluna de gel de sílica com hexano/acetato de etila 20%, foi submetida a cromatografia preparativa utilizando sílica Merck PF₂₅₄ como adsorvente e hexano/acetato de etila a 20% como eluente. A banda de R_f 0,55 foi raspada da placa com auxílio de uma espátula e extraída da sílica com o solvente CH₂Cl₂, resultando em 23,00 mg de um sólido branco com ponto de fusão 74-76°C identificado como IPCEA-23(2).

I.V. $\nu_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3369, 2917, 2848, 1633, 1670, 832 e 720 (FIG. 3.4, p.36).

RMN de ¹H [300 MHz, CCl₄ (D₂O) em ppm: 0,82 (t, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 4,20 (t, 2H), 6,26 (d, 2H), 6,84 (d, 2H), 7,42 (d, 1H) e 7,62 (d, 1H). (FIG. 3.6, p.37).

RMN de ¹³C [75MHz, CCl₄ (D₂O) em ppm: 14,39 (CH₃), 22,96 (CH₂), 26,24(CH₂), 28,99 (CH₂), 29,56 (CH₂), 29,63 (CH₂), 29,70 (CH₂), 29,80 (CH₂), 29,86 (CH₂), 29,92 (CH₂), 29,96 (CH₂), 32,18 (CH₂), 65,02 (CH₂), 115,73 (CH), 116,12 (CH), 127,32 (C), 130,19 (CH), 144,72 (CH), 158,14 (C) e 168,05 (C). (FIG. 3.9, p.41).

2.8 METILAÇÃO DE IPCEA-23 (2)

Com a finalidade de se comprovar que a substância isolada é um ácido, realizou-se uma reação para metilação da mesma. A substância IPCEA-23(2) (15,00 mg) foi tratada com solução de diazometano em éter (5 mL) até não se observar mais despreendimento de nitrogênio e a solução ter ficado amarela resultando no composto codificado como IPCEA-23(2)-Me. Evaporou-se o solvente e examinou-se o produto por cromatografia em camada fina, IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C.

2.9 CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO IPCEA-23(2)-ME

I.V. $\nu_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3384, 2928, 2855, 2254, 1702, 1170, 909 e 735 (FIG. 3.14, p.47).

RMN de ^1H [300 MHz, CCl_4 (D_2O) em ppm: 0,82 (t, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,65 (m, 2H) 3,80 (s, 3H), 4,20 (t, 2H), 6,26 (d, 2H), 6,84 (d, 2H), 7,42 (d, 1H) e 7,62 (d, 1H). (FIG. 3.15, p.47).

RMN de ^{13}C [75MHz, CCl_4 (D_2O) em ppm: 14,35 (CH_3), 22,92 (CH_2), 26,23(CH_2), 29,53 (CH_2), 29,59 (CH_2), 29,82 (CH_2), 29,93 (CH_2), 32,15 (CH_2), 29,86 (CH_2), 29,92 (CH_2), 29,96 (CH_2), 32,18 (CH_2), 64,83 (CH_2), 114,51 (CH), 116,00 (CH), 127,44 (C), 129,89 (CH), 144,41 (CH), 162,42 (C) e 167,68 (C). (FIG. 3.16, p.48).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESCOLHA DA PLANTA

A *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., uma planta característica do ecossistema de restingas do Estado do Rio de Janeiro, apresentou estudos preliminares que demonstraram que extratos de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br , possuem atividade antibiótica.

3.2 COLETA DA PLANTA

As folhas e caule da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. foi coletada no Horto da Barra da Tijuca na Cidade do Rio de Janeiro (aproximadamente 3 Kg) pelo biólogo e funcionário da Fundação Parques e Jardins, Luis Roberto Zaminth, em fevereiro de 2002, desidratada à sombra, em ambiente bem arejado, durante aproximadamente uma semana. Após a dessecação as folhas foram moídas em moinho de martelo na FIOCRUZ.

3.3 PREPARO DO EXTRATO BRUTO

Os extratos brutos foram preparados através das folhas secas e moídas por dois métodos de extração, por percolação e soxhlet (FIG.3.1, p.34) com a finalidade de avaliar se a resposta das atividades bacteriológicas seria igual em ambos os métodos. pois na extração por soxhlet é necessário aquecimento o que poderia provocar uma perda das propriedades do extrato.

Os rendimentos dos extratos brutos obtidos nos dois métodos de extração podem ser observados na Tabela 3.1 (p.34).

TAB.: 3.1: Peso dos Extratos Bruto em relação ao peso de planta moída obtidos nos dois métodos de extração

Método de Extração	Massa Planta Moída (g)	Extrato em Hexano (g) (%)	Extrato em Acetato de Etila (g) (%)	Extrato em Metanol (g) (%)
Soxhlet	181,30	4,2329 (2,34%)	5,9555 (3,28%)	5,4801 (3,02%)
Percolação	158,40	3,1050 (1,95%)	3,409 (2,15%)	4,398 (2,77%)

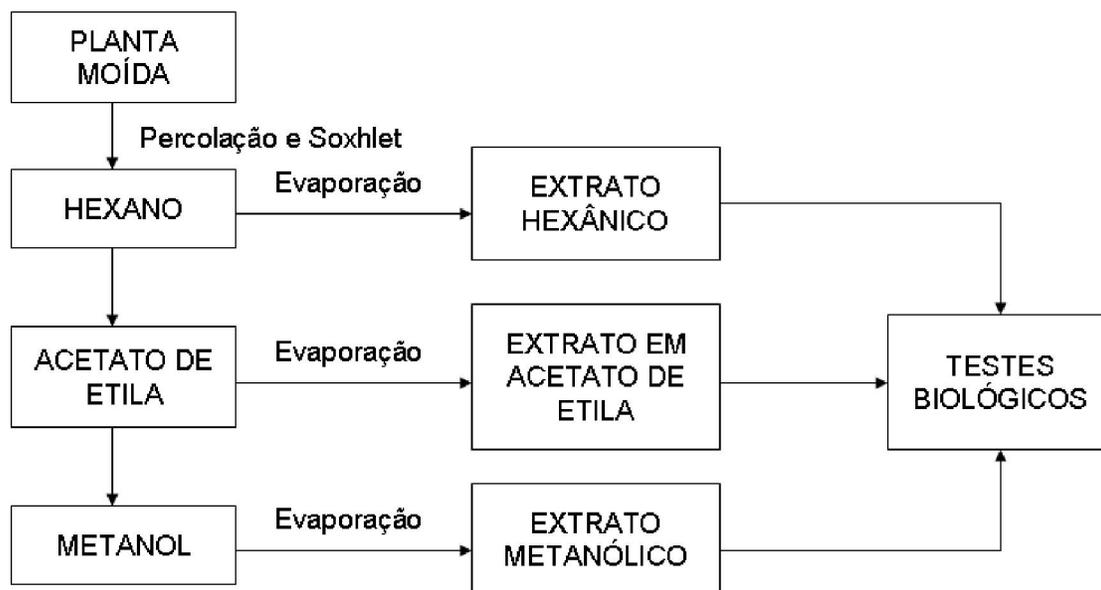


FIG. 3.1: Esquema para obtenção de extratos com solventes de polaridade crescente a partir das folhas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. moídas.

3.4 ANTIBIOGRAMA DOS EXTRATOS BRUTOS

O teste realizado, técnica de difusão em agar (Antibiograma) fundamenta-se na capacidade de difusão do composto através de um meio sólido, inibindo ou não o crescimento de um dado microorganismo. Este método, o mais comumente empregado, consiste na utilização de discos de papel impregnados com quantidades conhecidas das substâncias, as quais são colocados na superfície do meio nutriente apropriado em agar em uma placa de petri previamente inoculada com o microorganismo selecionado (MONTANARI, 1995).

Os testes de avaliação biológica foram realizados no Laboratório de Bioorgânica do Instituto Militar de Engenharia – IME. Para determinar a atividade biológica foram utilizadas culturas de bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus*). Foram escolhidas estas duas bactérias para a realização do teste pelo fato das mesmas se diferenciarem principalmente pela parede celular. As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular espessa de múltiplas camadas, constituídas principalmente em peptidoglicano, ácidos teicóico e lipoteicóico e polissacarídeos complexos (FIG. 3.2).

As paredes celulares das bactérias Gram-negativas são mais complexas que as das Gram-positivas, tanto estruturalmente quanto quimicamente. Em sua estrutura a parede celular das bactérias gram-negativas contém duas camadas externas à membrana citoplasmática, a camada de peptidoglicano e a camada externa que é exclusiva das bactérias Gram-negativas. A parede celular das bactérias gram-negativas carece de ácido teicóico ou lipoteicóico. Na membrana externa encontramos, substituindo os fosfolípidios, os lipopolissacarídeos (LPS) (FIG. 3.3, p.36).

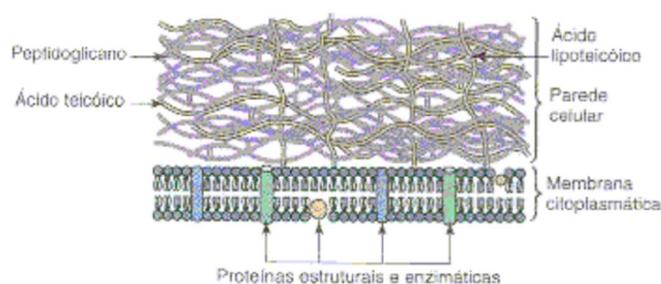


FIG.3.2: Parede celular de bactérias Gram-positivas

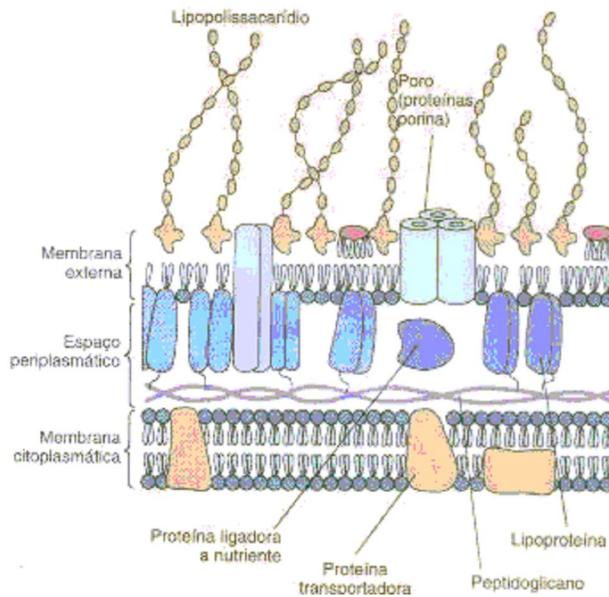


FIG.3.3: Parede celular de bactérias Gram-negativas

O local crítico de ataque dos agentes à parede celular é a camada de peptidoglicano. Esta camada é essencial para a sobrevivência das bactérias em ambientes hipotônicos; a perda ou danos desta camada destrói a rigidez da parede celular bacteriana, tendo por resultado a sua morte.

Os agentes antimicrobianos difundem-se facilmente através da parede celular das bactérias gram-positivas enquanto que na parede celular das bactérias gram-negativas a entrada é dificultada pela presença da membrana externa (FIG. 3.4).

Sendo assim, a maioria das bactérias gram-negativas são patogênicas e difíceis de serem eliminadas.

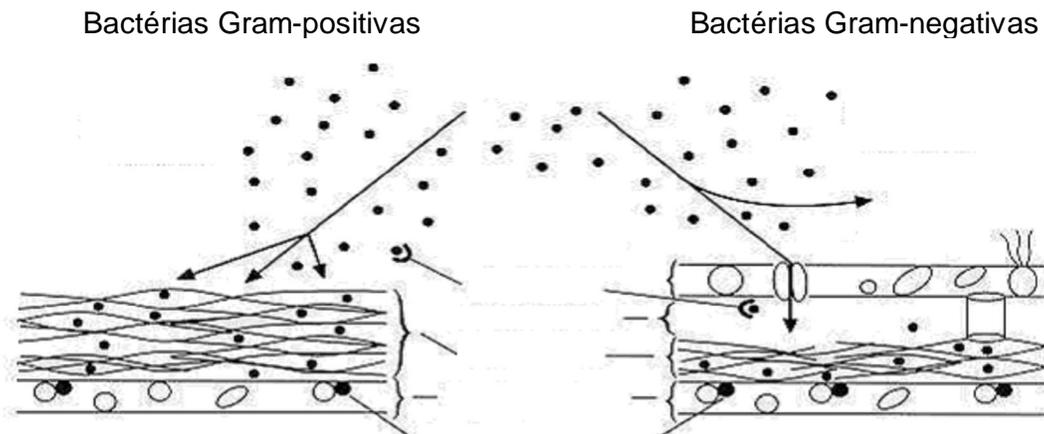


FIG.3.4: Nas bactérias Gram-negativas a difusão dos agentes antimicrobianos é dificultada pela presença da camada externa que não está presente nas bactérias Gram-positivas.

Os testes foram realizados em meio sólido Agar Muller-Hinton em placas de petri previamente esterilizadas. Os discos foram impregnados com 50 μ L dos extratos brutos previamente diluídos em DMSO.

Os microorganismos gram-positivos não tiveram seu crescimento inibido por nenhum dos extratos brutos enquanto os microorganismos gram-negativos tiveram seu crescimento inibido pelo extrato bruto de *Ipomoea pes-caprae* em acetato de etila (TAB.: 3.2).

TAB.: 3.2: Resultado dos Ensaio Biológicos dos Extratos Brutos de *Ipomoea pes-caprae*

Planta (Solvente)	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
<i>Ipomoea pes-caprae</i> (Extrato em hexano)	-	-
<i>Ipomoea pes-caprae</i> (Extrato em acetato de etila)	++	-
<i>Ipomoea pes-caprae</i> (Extrato em metanol)	-	-

+ corresponde a 0,5mm de halo de inibição

Os testes de atividade biológica foram realizados nos extratos obtidos pelos dois métodos e observou-se que a resposta foi a mesma em ambos os processos. Com isso verifica-se que os extratos podem ser obtidos pela extração por soxhlet sendo uma técnica menos dispendiosa, pelo fato de necessitar de uma quantidade bem menor de solvente e em uma menor fração de tempo e também por ter apresentado um melhor rendimento.

O extrato bruto de *Ipomoea pes-caprae* em acetato de etila, por apresentar maior rendimento em relação aos extratos hexânico e metanólico e por apresentar atividade frente ao microorganismo Gram-positivo, *Staphylococcus aureus*, foi fracionado em coluna cromatográfica.

3.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ÁCIDO *p*-(1-TRIDECANIL)OXICINÂMICO

Da fração IPCEA-23 proveniente da eluição do extrato em acetato de etila de *Ipomoea pes-caprae* em coluna cromatográfica de sílica gel com hexano/acetato de etila a 20% foi isolado um sólido branco (23,0 mg), tendo sido recristalizado em hexano-acetato de etila a 5%, e que foi codificado como IPCEA-23(2) com ponto de fusão 74-76°C.

O espectro na região do infravermelho (FIG.3.5) apresentou um sinal largo em 3369cm^{-1} , aparentemente referente ao estiramento de um grupo O-H; e bandas principais em 2917cm^{-1} e 2848cm^{-1} , referentes respectivamente aos estiramentos assimétrico e simétrico de CH_2 ; em 1670cm^{-1} foi encontrada uma das bandas mais significativas, possivelmente referente ao estiramento de uma carbonila conjugada que poderia ser de amida ou de ácido carboxílico, em 1601cm^{-1} apareceu uma banda que poderia ser a correspondente a deformação axial de uma dupla ligação carbono-carbono. Outro conjunto de bandas importantes apareceu em 832cm^{-1} e 720cm^{-1} que parecem corresponder à deformação angular fora do plano de C-H em anel aromático para substituído.

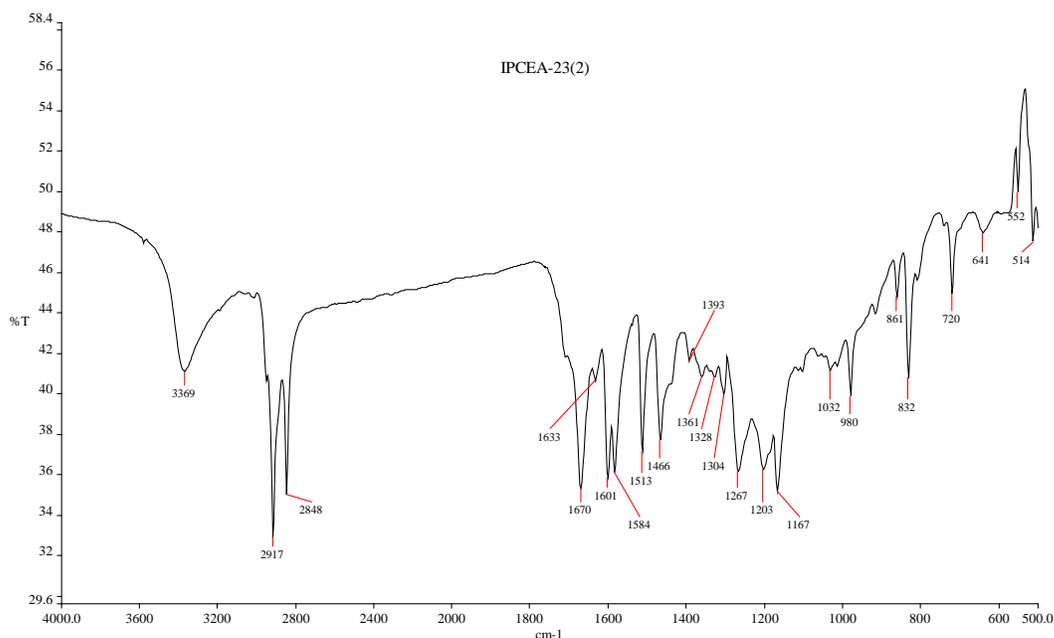


FIG.3.5: I.V. (KBr , cm^{-1}) da substância IPCEA-23(2)

Os espectros de RMN de ^1H (FIG. 3.6) e $^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$ (FIG.3.7, p.40) indicaram a presença de um grupamento metila alifática com sinal em 0,82 ppm (3H, t, $J = 5$ Hz). O sinal em 4,20 ppm (t, 2H, $J = 6,67$ Hz) que integra por dois hidrogênios pode corresponder a um metileno alifático ligado a oxigênio. Os dois dubletos em 6,26 ppm (d, $J = 15,95\text{Hz}$) e 7,62 ppm (d, $J = 15,96$ Hz) podem ser relativos aos hidrogênios de uma dupla ligação 1,2-dissubstituída, que pelo valor de $J = 15,96$ Hz parece ser trans. Os dois dubletos em 6,84 ppm (d, $J = 8,61\text{Hz}$) e 7,42 ppm, $J = 8,63$ Hz) podem ser relativos aos hidrogênios aromáticos em posição *orto* e *para* de um anel aromático *para*-dissubstituído.

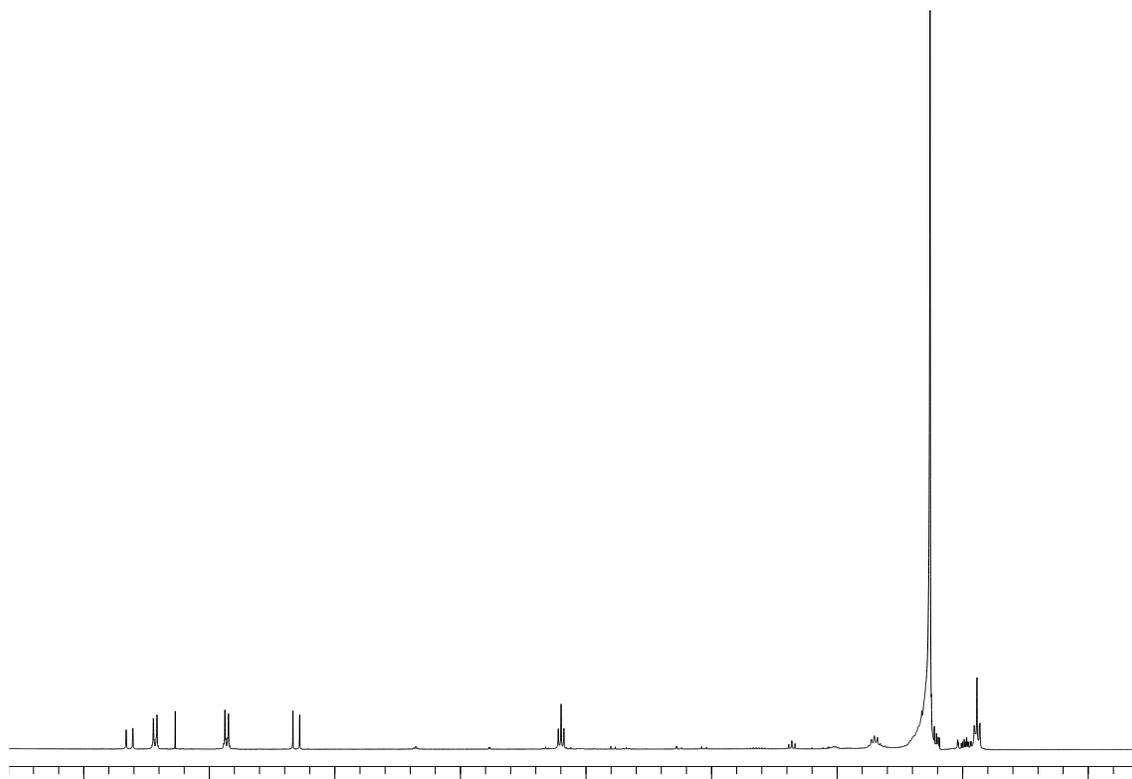


FIG.3.6: RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância IPCEA-23(2)

A Tabela 3.3 (p.40) mostra os sinais observados no espectro de RMN de ^1H (FIG. 3.6) e as correlações observadas no espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$ (FIG. 3.7, p.40), bem como as constantes de acoplamento.

TAB.:3.3: Dados de RMN de ^1H e correlações observadas no espectro COSY para a substância IPCEA-23(2)

^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	COSY (ppm)
0,82	t (3H)	5,00	1,24
1,24	m (2H)	-	0,82
1,65	m (2H)	-	1,24
4,20	t (2H)	6,67	1,65
6,26	d (1H)	15,95	7,62
6,84	d (2H)	8,61	7,42
7,42	d (1H)	8,63	6,84
7,62	d (2H)	15,96	6,26

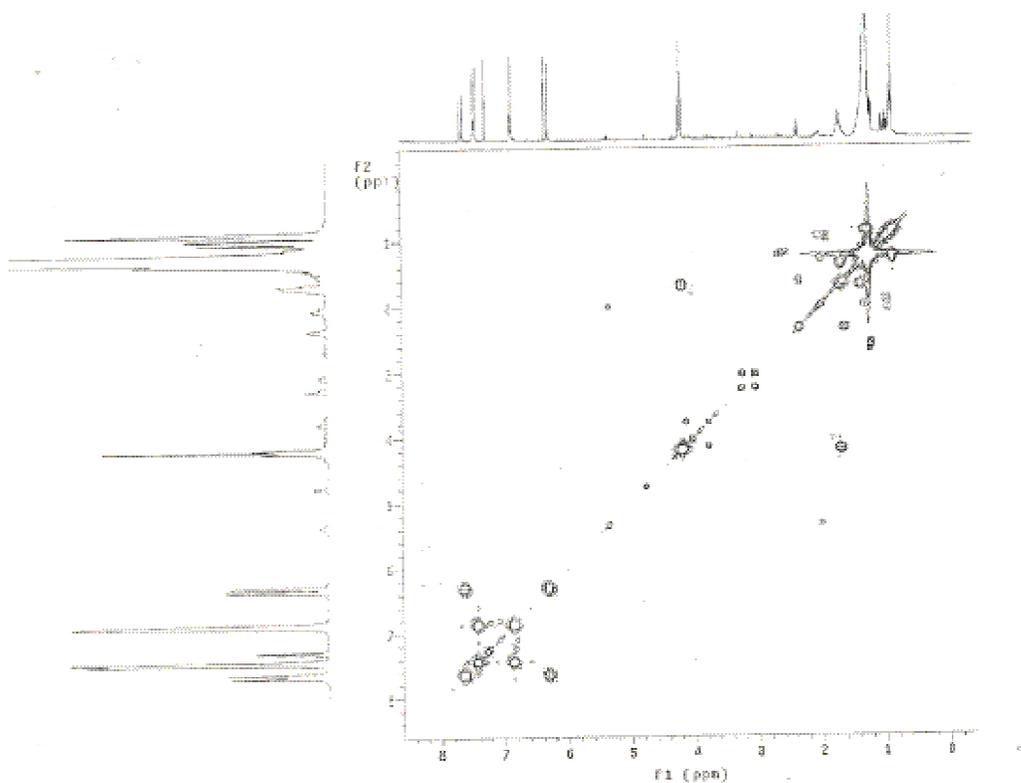
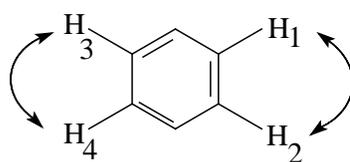


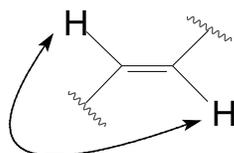
FIG. 3.7: COSY (300 MHz, CDCl_3) da substância IPCEA-23(2)

Através do espectro COSY (FIG. 3.7, p.40), foi possível verificar que existe acoplamentos entre os hidrogênios. Observa-se o acoplamento dos hidrogênios (dubleto em 6,26 ppm acoplando com dubleto em 7,62 ppm) que podem ser hidrogênios vinílicos e os hidrogênios (dubleto em 6,84 ppm acoplando com dubleto em 7,42 ppm) que podem corresponder a hidrogênios aromáticos (FIG. 3.8, 1). Com a análise dos acoplamentos afirma-se que existe uma dupla C=C conjugada visto que só existe acoplamento entre os hidrogênios vinílicos (FIG. 3.8, 2).

A FIG. 3.8 mostra os acoplamentos sugeridos pela análise do espectro COSY.



(1) Acoplamento entre os hidrogênios aromáticos



(2) Acoplamento dos hidrogênios vinílicos

FIG. 3.8: Acoplamentos observados através da análise do espectro COSY

No espectro de RMN de ^{13}C (FIG. 3.9, p.43) observa-se a presença de 22 átomos de carbono. O grupo carbonila de ácidos carboxílicos estão na faixa de 150 a 185 ppm, logo o sinal em 168,5 ppm pode ser referente a um carbono carbonílico. O sinal em 65,02 ppm pode corresponder a um carbono sp^3 oxigenado. Pelo fato do anel aromático ser substituído podemos atribuir os sinais em 115,73 ppm, 116,73 ppm, 127,32 ppm e 158,13 ppm a quatro carbonos aromáticos. e os sinais em 144,72 ppm e 130,19 ppm a carbonos sp^2 não aromáticos confirmando assim que existe uma dupla C=C não aromática.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C com o espectro DEPT (FIG. 3.10, p. 43) definiu a seguinte multiplicidade para cada um dos carbonos:

C	CH	CH ₂	CH ₃
127,32	115,73	22,96	14,39
158,14	116,12 (2 CH)	26,24	
168,05	130,19 (2 CH)	28,99	
	144,72	29,56	
		29,63	
		29,70	
		29,80	
		29,86	
		29,92	
		29,96	
		32,18	
		65,02	
C ₃	C ₆ H ₆	C ₁₂ H ₂₄	CH ₃

Com base nesses dados pode-se afirmar a fórmula molecular parcial do composto: C₂₂H₃₃.

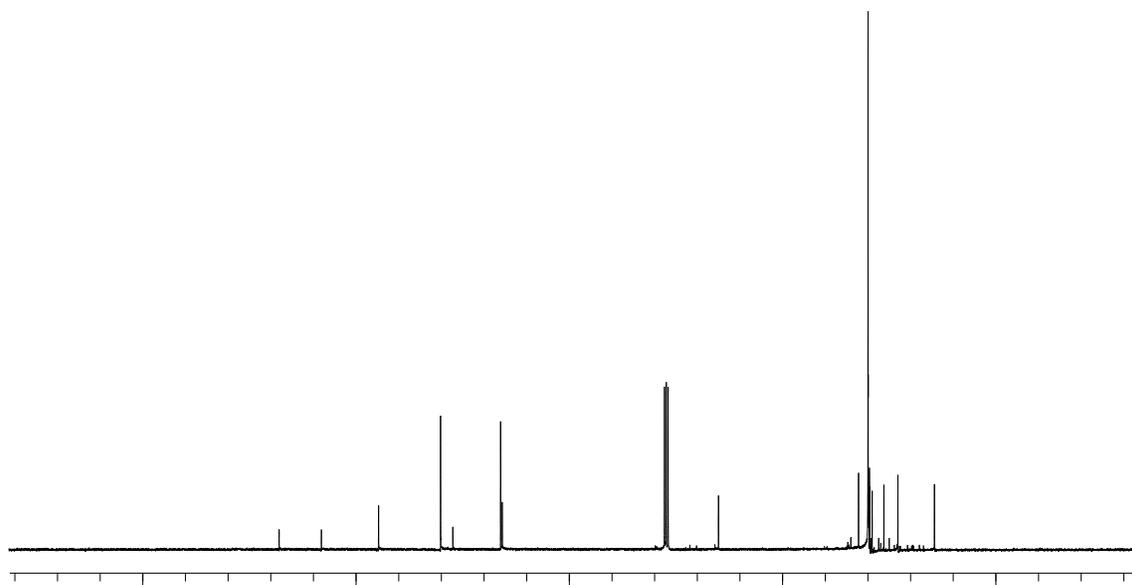


FIG.3.9: RMN de ¹³C(300 MHz, CDCl₃) da substância IPCEA-23(2)

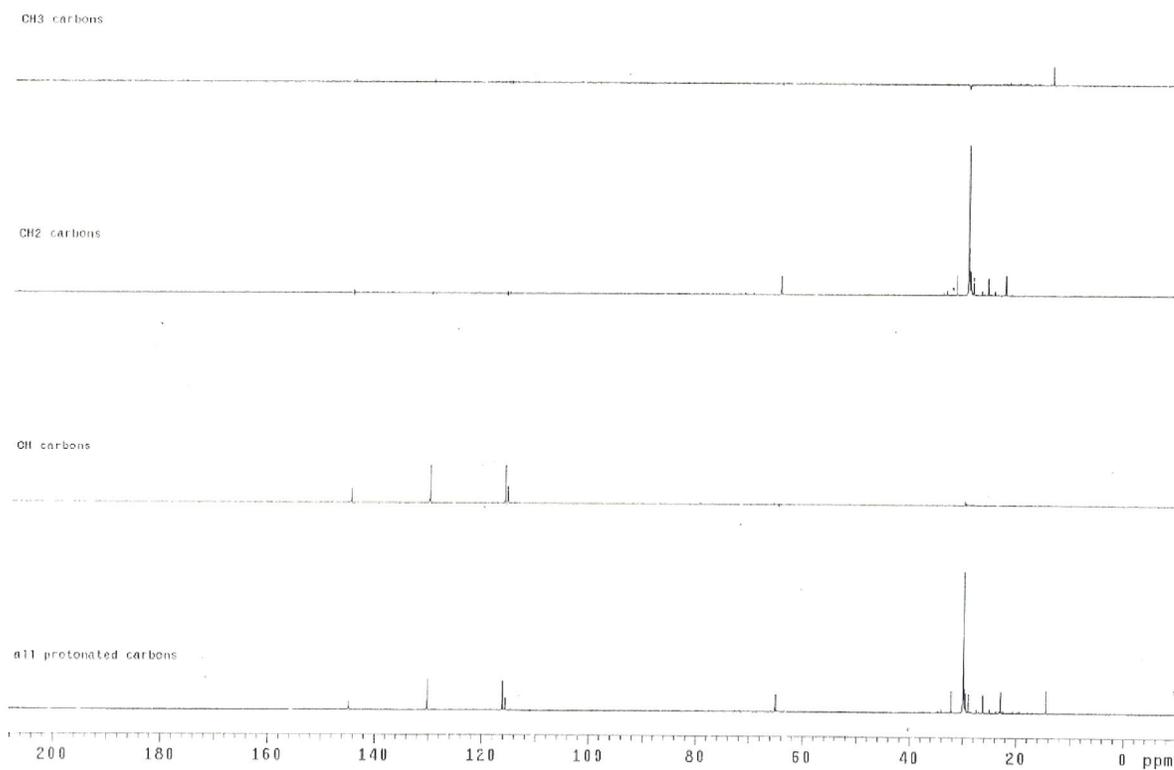


FIG. 3.10: DEPT (300 MHz, CDCl₃) da substância IPCEA-23(2)

O espectro HETCOR (FIG. 3.11, permitiu assinalar os carbonos a cada tipo de hidrogênio. A TAB.3.4 mostra os dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C e HETCOR.

TAB.3.4: Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^{13}C e HETCOR

RMN de ^{13}C (ppm)	RMN de ^1H (ppm)
144,72 (CH)	7,62
130,19 (CH)	7,42
116,73 (CH)	6,84
115,73 (CH)	6,26
65,00 (CH_2)	4,20
14,39 (CH_3)	0,82

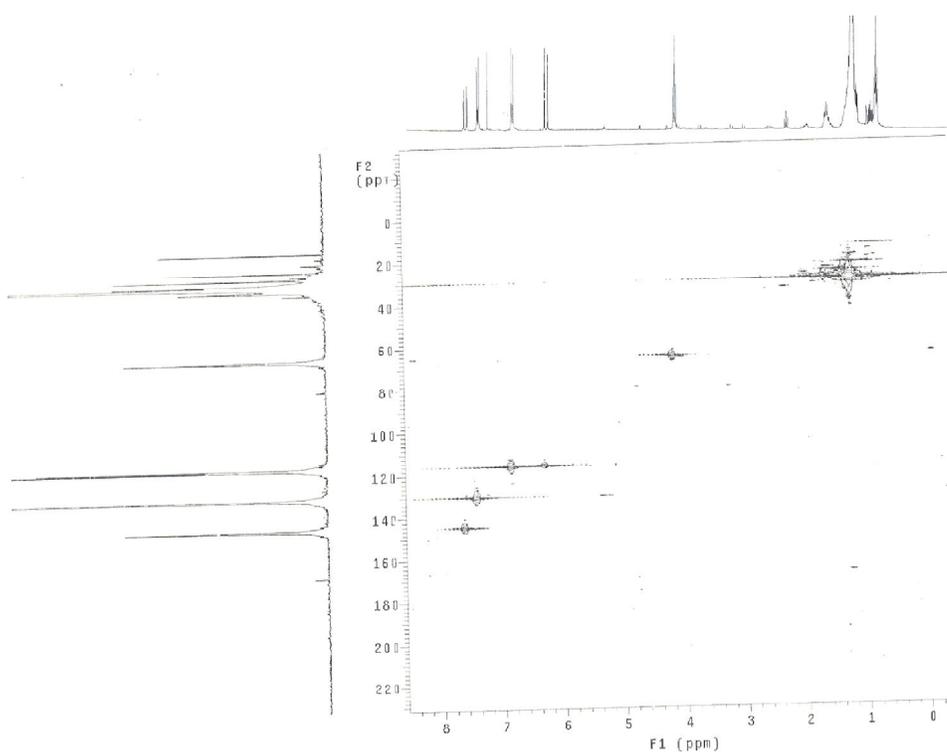


FIG. 3.11: HETCOR (300 MHz, CDCl_3) da substância IPCEA-23(2)

Pela análise do espectro HETCOR foi feita a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos após a posição dos átomos de hidrogênios através do espectro COSY.

Com base nos dados espectrais podemos concluir que a estrutura a ser elucidada possui 22 carbonos sendo um anel aromático para substituído, um grupamento vinílico isolado, um carbono sp^2 oxigenado, três carbonos quaternários e um carbono carbonílico. Sendo assim as informações anteriores acrescidas do espectro de massas (FIG. 3.12) e as fragmentações sugeridas (FIG. 3.13, p.46) forneceram o embasamento necessário para a proposição da estrutura mostrada na FIG. 3.14, p. 47) de fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_3$.

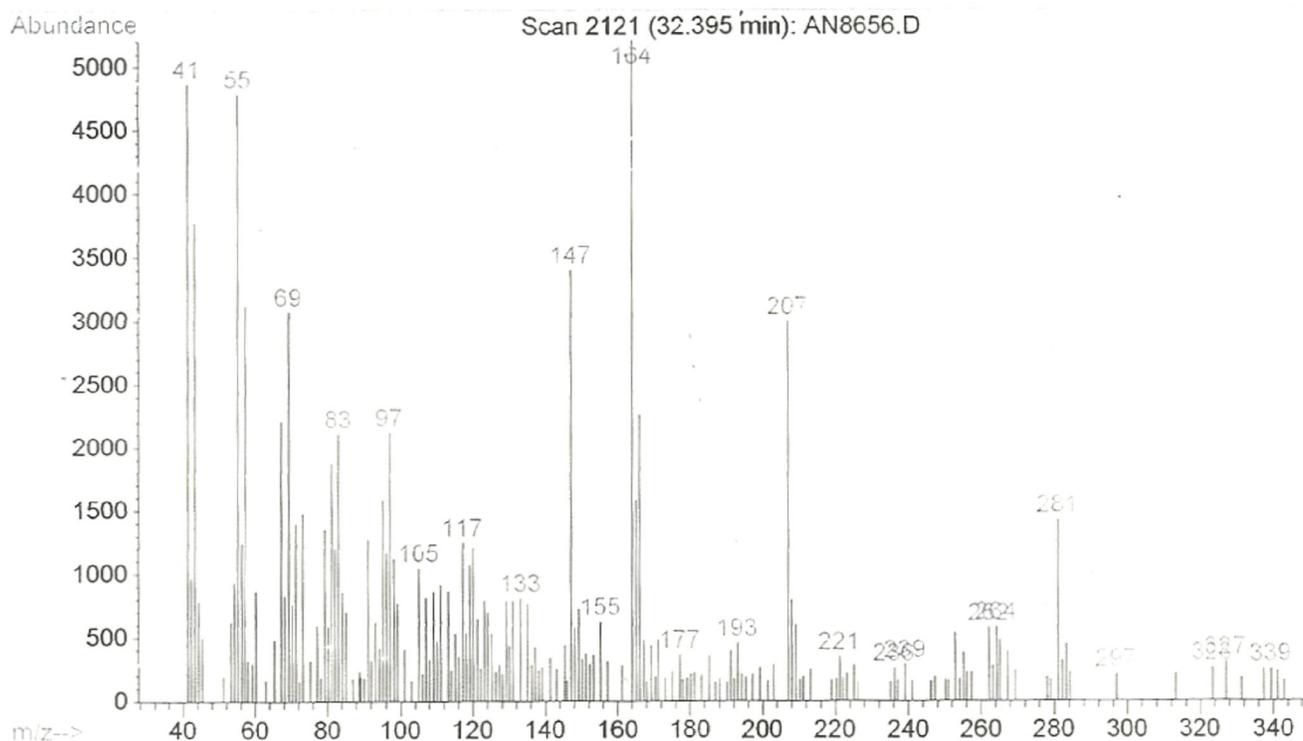


FIG. 3.12: Espectro de Massas da substância IPCEA-23(2)

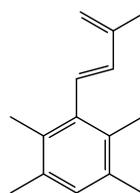
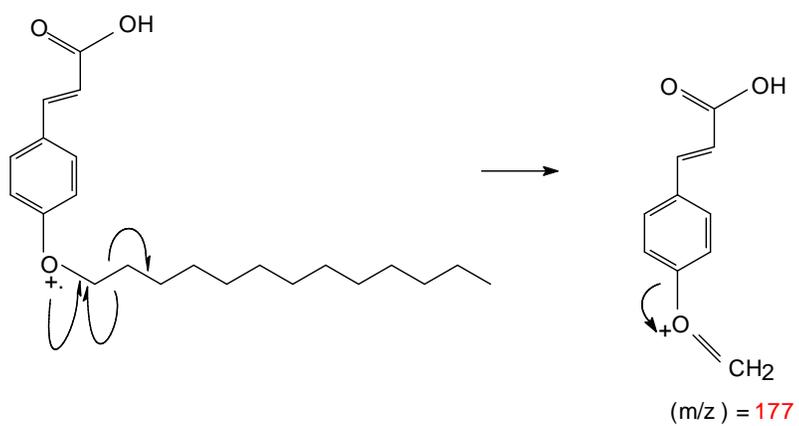
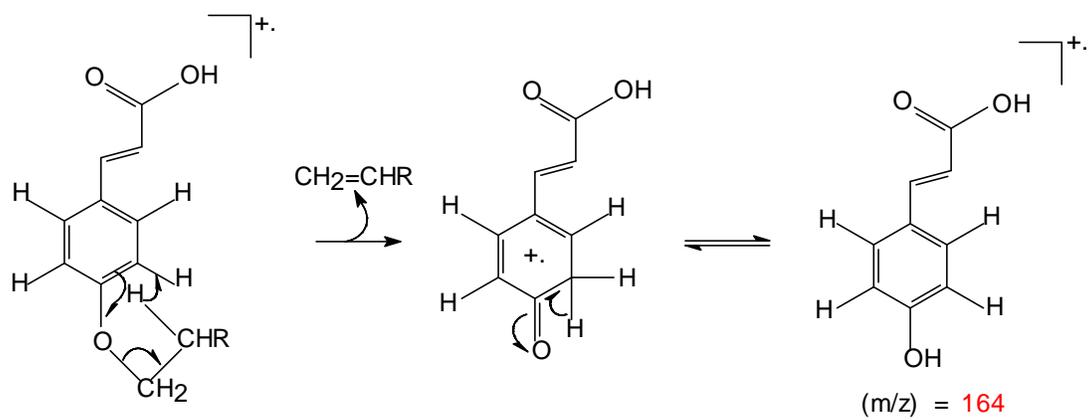


FIG. 3.13: Fragmentações sugeridas a partir do espectro de massas da substância IPCEA-23(2)

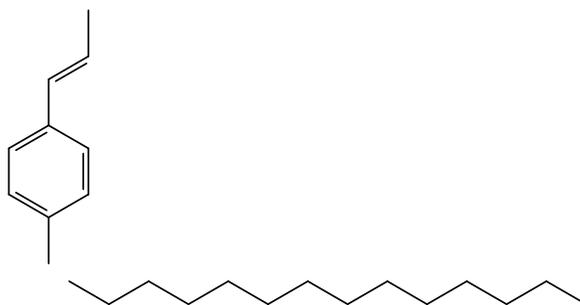


FIG.3.14: Estrutura do ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico

Das 6 insaturações existentes na molécula, quatro são referentes ao anel aromático; uma referente à carbonila e outra a ligação dupla carbono-carbono não aromática presente na molécula.

3.6 ASSINALAMENTO DOS CARBONOS DA SUBSTÂNCIA ÁCIDO *p*-(1-TRIDECANIL)OXICINÂMICO

O assinalamento dos deslocamentos químicos (ppm) dos carbonos do ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico (FIG. 3.15). foi feito com base nas correlações no espectro HETCOR.

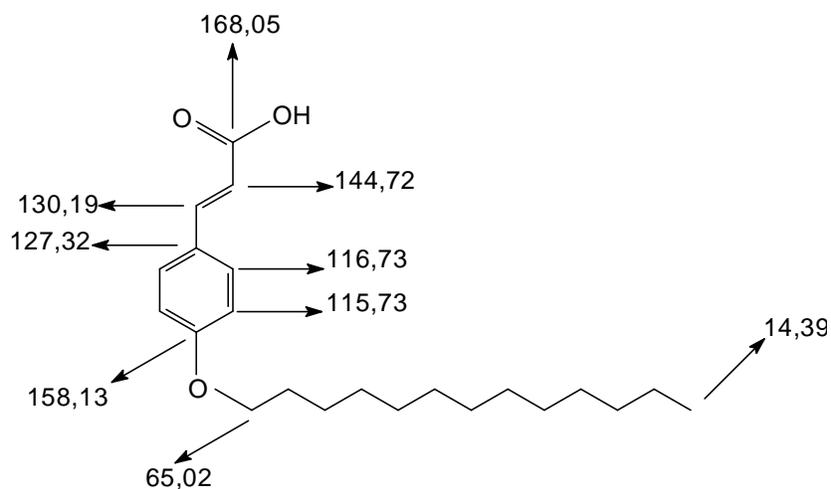


Fig. 3.15: Assinalamento dos carbonos do ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico

3.7 METILAÇÃO DO ÁCIDO *p*-(1-TRIDECANIL)OXICINÂMICO

Com a finalidade de se comprovar que a substância isolada trata-se de um ácido, o mesmo foi tratado com solução de diazometano em éter até não se observar mais despreendimento de nitrogênio (FIG. 3.16) resultando em um líquido amarelado que foi codificado como IPCEA-23(2)-Me. Obteve-se o espectro de infravermelho (FIG. 3.17, p.49) , RMN de ^1H (FIG. 3.18, p.49) e RMN de ^{13}C (FIG. 3.19, p.50).

No espectro de infravermelho de IPCEA-23(2)-Me (FIG.3.17, p.49) observa-se uma banda em 1702cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ de éster α,β -insaturado e comparando-se com o espectro de IPCEA-23(2) (FIG. 3.5, p.36) observa-se que houve diminuição da banda em 3369cm^{-1} , banda referente à hidroxila.

No espectro de RMN de ^1H de IPCEA-23(2)-Me (FIG. 3.19, p.50) observa-se um sinal em 3,8 ppm, singlete, referente a metoxila.

No espectro de RMN de ^{13}C de IPCEA-23(2)-Me (FIG. 3.19, p.50) observa-se um sinal em 55,59 ppm referente a metoxila, o qual não aparece no espectro de RMN de ^{13}C de IPCEA-23(2) (FIG. 3.11, p.43) que comprova que a substância IPCEA-23(2) foi metilado. Na FIG. 3.20 (p.50) temos a expansão da região de 65 ppm e 55 ppm do espectro de RMN de ^{13}C de IPCEA-23(2)-Me.

Com base nestes dados podemos afirmar que a substância IPCEA-23(2) é um ácido carboxílico confirmando a estrutura proposta.

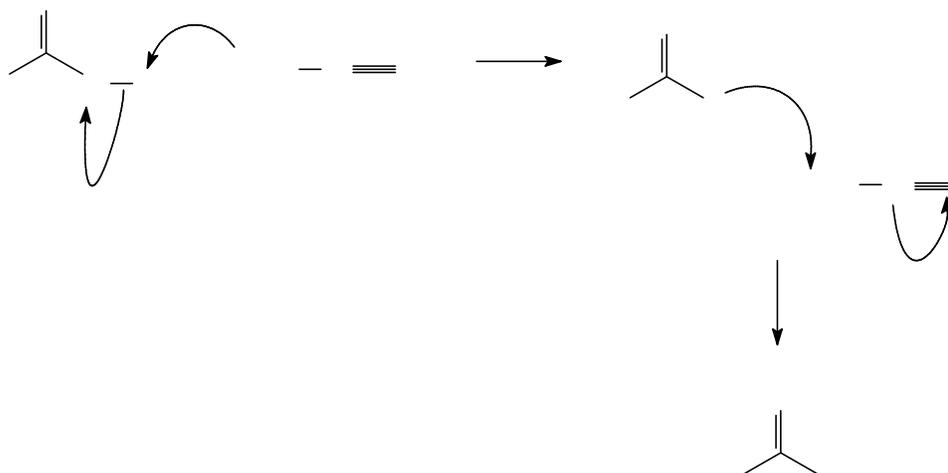


FIG. 3.16: Reação de metilação com diazometano

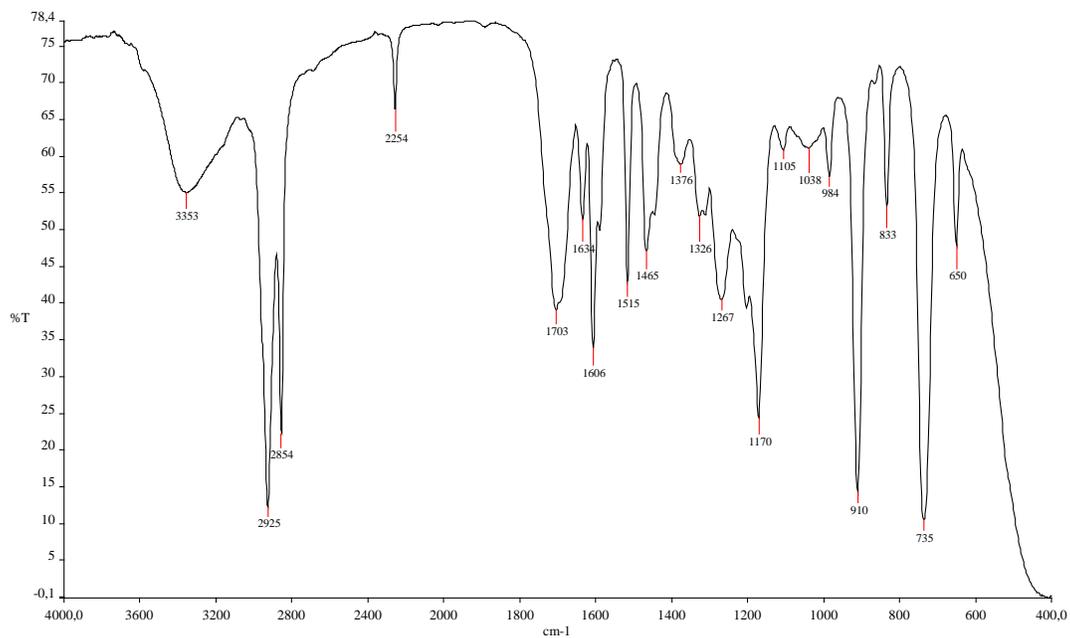


FIG. 3.17: I.V. (filme em NaCl) da substância IPCEA-23(2)-Me

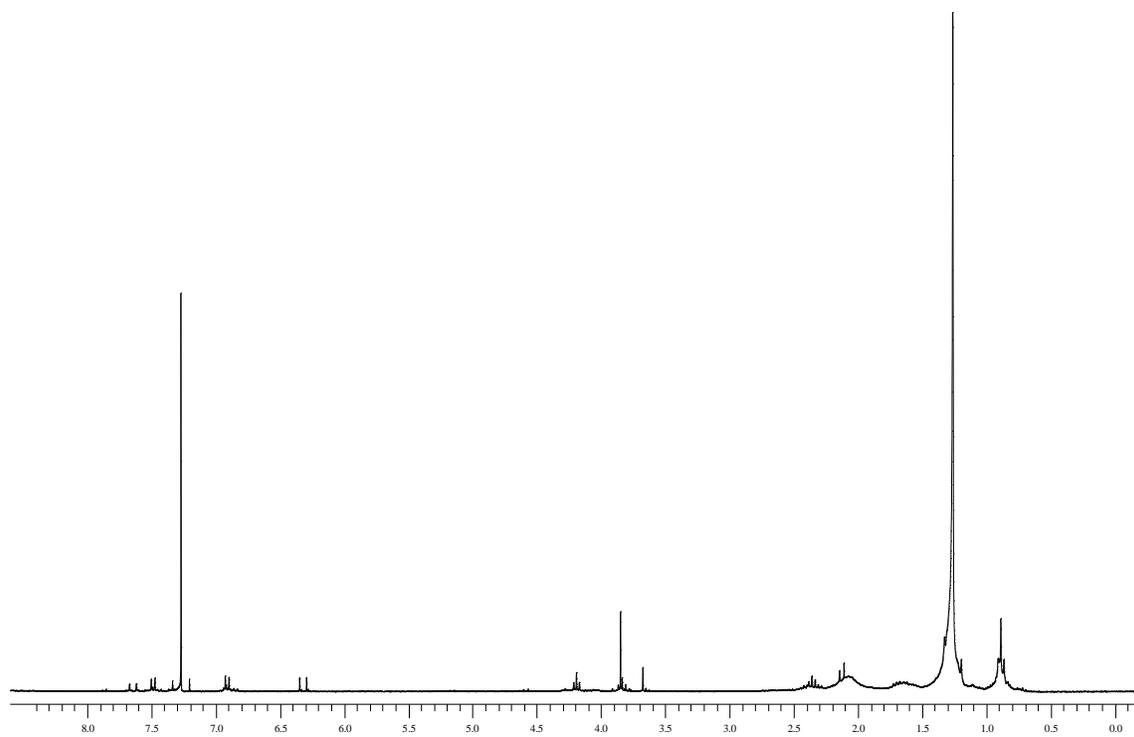


FIG.3.18: Espectro de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância IPCEA-23(2)-Me

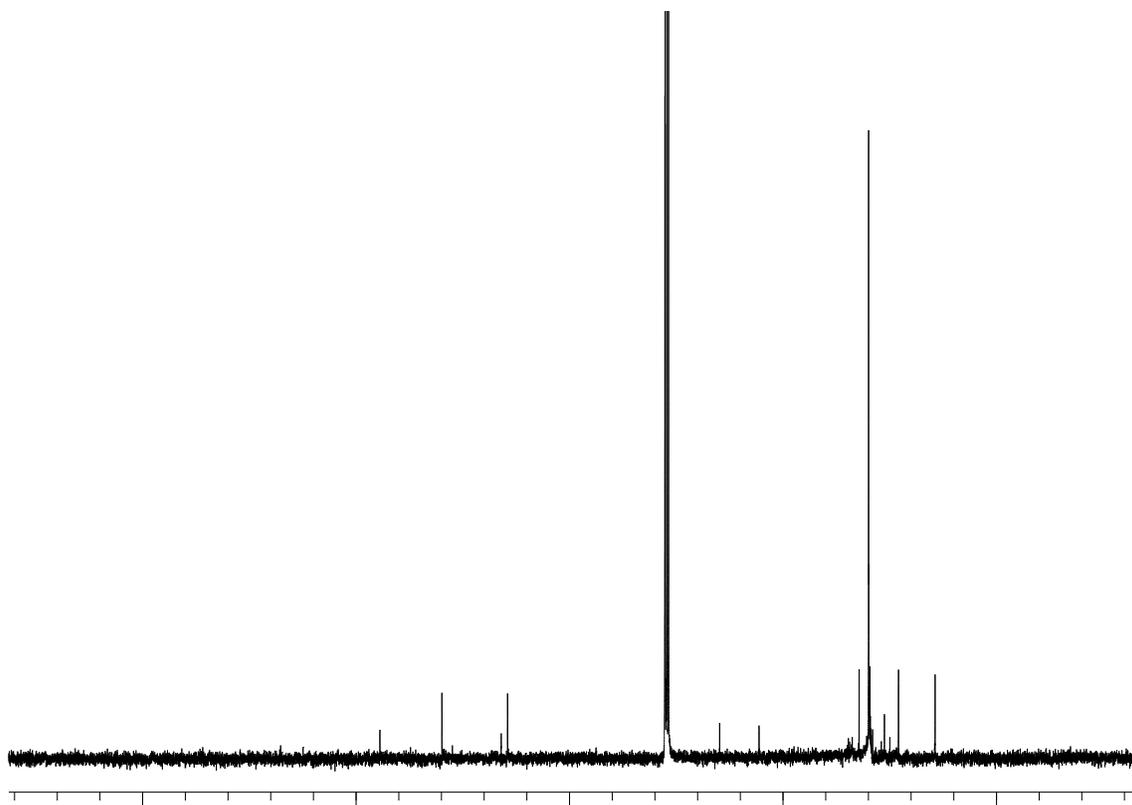


FIG. 3.19: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da substância IPCEA-23(2)-Me

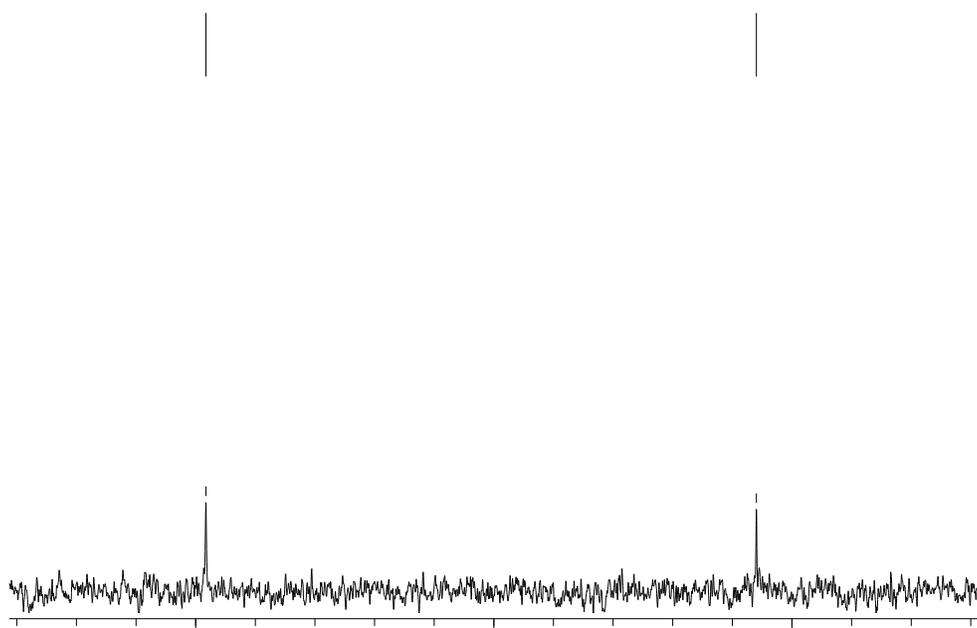


FIG. 3.20: Expansão da região de 55 ppm a 65 ppm do espectro de ^{13}C da substância IPCEA-23(2)-Me

3.8. ANTIBIOGRAMA DO *p*(1-TRIDECANIL)OXICINÂMICO

A substância isolada, o ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico, mostrou-se inativo *in vitro* contra as bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus*).

4 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

4.1. CONCLUSÕES

O presente trabalho é uma singela contribuição, apesar de preliminar e pequena, para que espécies nativas sejam priorizadas nos estudos de plantas medicinais no Brasil; para sugerir que as pesquisas com plantas medicinais sejam pensadas também pelo seu caráter social e econômico.

Nos testes biológicos realizados nos extratos brutos obtidos através dos dois métodos de extração, percolação e soxhlet, pode-se afirmar que a melhor técnica a ser utilizada na preparação dos mesmos é a extração por soxhlet por ser uma técnica menos dispendiosa, pela obtenção dos extratos brutos em uma menor fração de tempo, por apresentar um melhor rendimento e mesma resposta aos ensaios biológicos quando comparada ao método de extração por percolação.

Foram realizados teste de atividade biológica nos extratos brutos e verificou-se que o extrato bruto em acetato de etila apresentou atividade contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e os extratos brutos em hexano e metanol não apresentaram atividade biológica.

Como contribuição foi identificado um dos principais metabólitos secundários de *Ipomoea pes-caprae*, o ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico, inédito na literatura e se mostrou inativo *in vitro* contra bactérias Gram negativa (*Escherichia coli*) e Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) no teste de atividade biológica.

4.2 SUGESTÕES

Analisar as outras frações principalmente as provenientes do extrato bruto em acetato de etila, o qual apresentou atividade biológica, com a finalidade de se chegar ao composto responsável por essa atividade.

Sendo o ácido isolado, o ácido *p*-(1-tridecanil)oxicinâmico, inédito na literatura, sugerimos atribuir ao mesmo o nome de ácido ipomeiólico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**: São Paulo. Hemus, 1993.

BICUDO DE ALMEIDA, L. Isolation and characterization of (5R, 6S, 5''R, 8'R) – and (5R, 6S, 5''R, 8'R) – Luteochrome from Brazilian Sweet Potatoes (*Ipomoea Batatas*). **Helv. Chim. Acta**, v.69, n.7, p. 1554-8, 1986.

CAMPOS, J. M. & Col. **Plantas que ajudam o homem**. São Paulo: Cultrix: Pensamento, 1991.

COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.44-78.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S. **Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica**; Ed. Vozes, 3ª edição, Petrópolis, Rio de Janeiro, 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**; Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, Brasil, 1984. .

DEVAL, M. S.; THIEN, L. B.; PLATT, W. J. The ecology of *Ipomoea pes-caprae*, a pantropical strand plant. Proceedings of the Symposium on Coastal Sand Dunes, September 13-14, 1990.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, Ed. Unesp, 2.ed., São Paulo, 2002.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.

FITOTERAPIA. A cura através das plantas. Disponível em <http://www.geocities.com/HotSprings/2477/cursos.htm>. Acesso em 28 de abril de 2003.

- GORZALCZANY, S. Search for anti-inflammatory activity in Argentine medicinal plants. **Phytomedicine**, v.3, n.2, p.181-4, 1996.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., 2001.
- IKHIRI, K.; KOULODO, D., Nouveaux alcaloides indolizínicos isolés de *Ipomoea alba*. **J. Nat. Prod.**, v.50, n.2, p.152-6, 1987.
- KATARIA, H. C., GUPTA, S. S. Synthesis of some antileptotic drugs from some indigenous flora. **Asian J. Chem.**, v.8, n.4, p.787-91, 1996.
- LIMA, O. G.; MARINE-BETTOLO, G. B.; MONACHE, F. D. Antimicrobial compounds from higher plants. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, v.10, n.1, dez 1970.
- LIU, K. Pyrolizidine alkaloids from eupatorium fortunei. **Phytochemistry**, v.31, n.7, p. 2573-4, 1992.
- MABBERLEY, D. J. **The plant book**. A portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge University Press, 1997, 859p.
- MANN, P.; TOFERN, B. Flavanoid sulfates from the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v.50, n.2, p.267-71, 1999.
- MATOS, F. J. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Edições UFC, 1988, 128p.
- MILES, D. H.; MEDIEROS, J.; CHEN. A search for agrochemicals from Peruvian plants. **ACS Symp. Ser.** p. 449, 339-406, 1991.
- MONTANARI, A. C., Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacologia. **Química Nova**, 18, n.1, p. 56-64, 1995.
- PÁSKA, C. INNOCENTI, G.; Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. **Phytochemistry**, v.52, n.5, p.879-83, 1999.
- POLUNIN, M.; ROBBINS, C. **A farmácia natural**. Guia de medicamentos naturais Enciclopédia Ilustrada/Tradução e revisão técnica Dalila Espírito Santo. Livraria Civilização Editora, Alemanha, 143p., 1993.

PONGPRAYOON, U., BAECKSTROM P., Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from ipomoea-pes-caprae. **Planta Médica**, v.57, n.6, p.515-518, 1991.

REYNOLDS, W. F., YU, M., Isolation and characterization of citotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from Ipomoea stans. **J. Nat. Prod.**, v.58, n.11, p. 1730-4, 1995.

SILVA, G. C. Estudo fitoquímico do Extrato hexânico de *Vellozia aff. Caranculares*. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 1999.

SPECTOR, W. G. The mediation of alteres capillary permeability in acute inflammation. **J. Pathol. Bacter**, v.72, p. 367-380, 1956.

WILLS, R. B. H., RANGGA, A. Determination of carotenoids in Chinese vegetables. **Food Chem.**, v.56, n.4, p. 451-5, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)