

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DO GÊNERO *PILOCARPUS*:

PILOCARPUS TRACHYLLOPHUS HOLMES

PILOCARPUS SPICATUS SAINT HILAIRE

(Rutaceae)

MANOEL ANDRADE NETO

TESE DE MESTRADO

1990

Contribuição ao conhecimento químico do gênero *Pilocarpus*:

Pilocarpus trachyllophus Holmes

Pilocarpus spicatus Saint Hillaire

(Rutaceae)

Manoel Andrade Neto

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre

Universidade Federal do Ceará

Fortaleza-Ceará

1990



Este trabalho foi realizado sob a orientação do Professor
Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica
e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e, em cuja Biblioteca Central, encontra-se à disposição dos interessados.

Manoel Andrade Neto

TESE APROVADA EM
EXAMINADORES

Prof. Edilberto Rocha Silveira
Orientador

Prof. José Augusto Cabral
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Prof. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará

Prof. Francisco José de Abreu Matos
Universidade Federal do Ceará

A todos aqueles que permitiram a minha
passagem pelas suas vidas e me tocaram
com a magia da motivação, da compreensão
e do amor.

"No mundo,

há sempre aqueles que fazem de suas
vidas verdadeiras obras de arte.

Há sempre aqueles que não se limitam e
sempre vêem os obstáculos como
incentivos à vitória.

Estes são os verdadeiros artistas e
heróis."

Autor anônimo

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edilberto Rocha Silveira pela orientação e exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao professor Afrânio Gomes Fernandes pela prontidão em me dedicar parte do seu precioso tempo conversando e me ensinando sobre sistemática vegetal.

Ao professor Raimundo Braz Filho do Instituto de Química da UFRRJ, pela preciosa ajuda na interpretação dos espectros.

Ao professor Charles D. Hufford pela obtenção dos espectros das substâncias isoladas e apresentadas neste trabalho.

A indústria MERCK pela ajuda na obtenção de alguns cromatogramas no cromatógrafo (HPLC) do seu Laboratório de Pesquisa.

Ao amigo Dr. Paulo Henriques Mendes pela amizade, apoio e incentivo antes e durante este trabalho.

Ao Professor Francisco José de Abreu Matos pela transmissão dos conhecimentos de botânica aplicada à fitoquímica, o que foi bastante útil na minha formação acadêmica.

A todos os funcionários que sempre estiveram prontos a me ajudar na consecução deste trabalho.

Aos meus colegas alunos de Graduação, Pós-Graduação, professores, e os do convívio extra acadêmico que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento seja profissional ou pessoal.

RESUMO

Neste trabalho é relatado o histórico da evolução do jaborandi (espécies de *Pilocarpus*), como planta medicinal desde as primeiras experiências encontradas na literatura quando em sua utilização na medicina popular caseira, até o isolamento, industrialização e utilização médica do seu princípio ativo, a pilocarpina, na forma quimicamente pura.

Relata-se ainda sobre o isolamento anterior de alcalóides presentes nesta planta (espécies de *Pilocarpus*) nas diversas espécies estudadas.

No desenvolvimento deste trabalho foram isoladas, purificadas e determinadas as estruturas de sete substâncias, seis das quais são até então inéditas em *Pilocarpus*. Das cascas das raízes de *Pilocarpus trachyllophus* foram isoladas três cetonas alifáticas, uma lignana e uma isobutilamida 2,4 insaturada, além de uma mistura de pilocarpina e seu enantiômero. Das folhas de *Pilocarpus spicatus* isolou-se dois triterpenos tipo damarano possuindo trinta e três átomos de carbonos.

Realizou-se ainda a extração e identificação dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de várias espécies de *Pilocarpus* encontradas no Nordeste brasileiro.

As determinações estruturais foram realizadas utilizando-se métodos espectrométricos de IV, EM, RMN ¹H e ¹³C inclusive as técnicas mais modernas como APT, HETCOR, COSY e conectividade carbono-carbono através da técnica INADEQUATE.

ABSTRACT

In this work we report the historical evolution of Jaborandi (*Pilocarpus* species) as a medicinal plant, from its first report in the literature as folk remedy to the isolation, industrialization and medical utilization of its active principle, pilocarpine, in its chemically pure form. We also report the earlier works on the isolation of various alkaloids present in several species of these plants.

Throughout this work we report the isolation, purification and structure determination of seven substances. From them six are described for the first time for the *Pilocarpus* genus.

From roots barks of *P. trachyllophus* three alifatic ketones, a lignan and a 2,4-unsaturated isobutyl amide were isolated besides a mixture of pilocarpine and its enantiomer.

From leaves of *P. spicatus* two triterpines belonging to the damarane class were isolated, each one presenting a thirty three carbons skeleton.

Essential oil from leaves of several species of *Pilocarpus* native to the northeast region of Brasil were analised and its chemical constitution have been determined.

Structure determination was accomplished by means of spectrometric methods as IR, MS, ^1H and ^{13}C NMR including new techniques such as APT, HETCOR, COSY and carbon-carbon conectivity through two dimentional INADEQUATE.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Nº Página
1 - Cromatograma de PT(RC)H e espectros de massa..... de seus constituintes.....	29
2 - Espectro de RMN ^{13}C (PND e APT) de PT(RC)H-D2.....	31
3 - Espectro no I.V. de PT(RC)H-D2.....	32
4 - Espectro de RMN ^1H de PT(RC)H-D2.....	33
5 - Espectro de RMN ^{13}C (PND e APT) de PT(RC)H-D4.....	35
6 - Espectro de RMN ^1H de PT(RC)H-D4.....	36
7 - Espectro de I.V. de PT(RC)H-D4.....	37
8 - Espectro de massa de RD1-FA.....	39
9 - Espectro no I.V. de RD1-FA.....	40
10 - Espectro de RMN ^{13}C de RD1-FA.....	41
11 - Espectro de RMN ^1H de RD1-FA.....	42
12 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) de RD1-FA.....	43
13 - Espectro de massa de RD1-FC.....	49
14 - Espectro de RMN ^{13}C (PND e APT) de RD1-FC.....	50
15 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) de RD1-FC.....	51
16 - Espectro de RMN ^1H de RD1-FC.....	52
17 - Espectro no I.V. de RD1-FC.....	53
18 - Espectro de Correlação Homonuclear de RD1-FC.....	54
19 - Espectro de Correlação Heteronuclear de RD1-FC....	55
20 - Espectro de Massa de RD1-FD.....	62
21 - Espectro de RMN ^{13}C (PND e APT) de RD1-FD.....	63
22 - Espectro no I.V. de RD1-FD.....	64
23 - Espectro de RMN ^1H de RD1-FD.....	65

24 - Espéctro de Conectividade carbono-carbono de RD1-FD	66
25 - Cromatograma(CLAÉ) de PT(RC)E-BN.....	68
26 - Espéctro de RMN ^{13}C de PT(RC)E-BN.....	69
27 - Espéctro de RMN 13 de Cloridrato de pilocarpina...	70
28 - Espéctro no I.V. de PSFE-NA.....	74
29 - Espectro no I.V. de PSFE-NB1.....	75
30 - Espectro de I.V. de PSFE-NB2.....	76
31 - Espéctro de massa(HPLC/EM) de PSFE-NB1.....	82
32 - Espéctro de massa de PSFE-NB1.....	83
33 - Espectro de RMN ^1H de PSFE-NB1.....	84
34 - Espéctro de RMN ^{13}C (PND e APT) de PSFE-NB1.....	85
35 - Espéctro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NB1.....	86
36 - Espéctro de RMN ^1H de PSFE-NA.....	91
37 - Espéctro de RMN ^{13}C (PND) de PSFE-NA.....	92
38 - Espéctro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NA.....	93
39 - Espéctro de correlação heteronuclear de PSFE-NA...	94
40 - Espéctro de correlação heteronuclear de PSFE-NA(expandido).....	95
41 - Espéctro de massa de PSFE-NA.....	96
42 - Espéctro de RMN ^1H de PSFE-NB2.....	100
43 - Espectro de RMN ^{13}C (PND) de PSFE-NB2.....	101
44 - Espéctro de RMN ^1H de PSFE-NB2Oxi.....	102
45 - Espéctro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NB2.....	103
46 - Espéctro de RMN ^1H de PSFE-NAHid/Acet.....	104
47 - Espéctro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NAHID/Acet.....	105
48 - Espéctro de RMN ^{13}C de PSFE-NAHid/Acet.....	106

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 - Quantidade de pilocarpina exportada nos anos de 1986 e 1987, por países de destino e respectivos valores em \$US.....	15
2 - Local de coleta e nome das espécies de <i>Pilocarpus</i> cujos óleos essenciais foram estudados.	26
3 - Composição química do óleo essencial das espécies estudadas.....	27
4 - Pontos de fusão e rotação específica de RD1-FD e episesamim.....	47
5 - Dados comparativos dos espectros de RMN ^1H de episesamim e RD1-FC.....	47
6 - Comparação dos dados dos espectros de RMN ^{13}C de RD1-FC e episesamim.....	48
7 - Comparação dos dados de espectros de RMN ^1H e ^{13}C de XI1 e RD1-FD.....	59
8 - Dados do espectro de conectividade carbono-carbono de RD1-FD.....	60
9 - Dados espectrométricos de RMN ^{13}C comparativos de PSFE-NA, PSFE-NB1 e PSFE-NB2 com as substâncias XI1X, XX e XX1 encontradas na literatura.....	99

LISTA DE QUADROS

QUADROS	Página
1. Possíveis caminhos de fragmentação para RD1-FD no espectrômetro de massa.....	61
2. Possíveis caminhos de fragmentação PSFE-NB1 no espectrômetro de massa(HPLC).....	80
3. Possíveis caminhos de fragmentação PSFE-NB1 no espectrômetro de massa(EM).....	81
4. Possíveis caminhos de fragmentação para PSFE-NA no espectrômetro de massa.....	90

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMAS

1. Esquema de isolamento das substâncias isoladas de <i>Pilocarpus trachyllophus</i>	71
2. Esquema de isolamento das substâncias isoladas de <i>Pilocarpus spicatus</i>	107

LISTA PARCIAL DE ABREVIATURAS

APT	=	Attached Proton Test
PND	=	Proton Noise Decoupling
DEPT	=	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	=	Correlated Spectroscopy
HETCOR	=	Heteronuclear Correlation
CCD	=	Cromatografia em Camada Delgada
RMN ^1H	=	Ressonância Magnética Nuclear Protônica
RMN ^{13}C	=	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
IV	=	Infravermelho
CG/EM	=	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
HPLC/EM	=	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa
PSFE-N	=	Extrato etanólico desalcaloidificado das folhas de <i>Pilocarpus spicatus</i>
PT(RC)H	=	Extrato hexânico da casca das raízes de <i>Pilocarpus trachyllophus</i>
PT(RC)E	=	Extrato etanólico da casca das raízes de <i>Pilocarpus trachyllophus</i>

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1.0 - INTRODUÇÃO	
1.1 - Histórico do jaborandi.....	1
1.2 - Importância farmacoterapêutica do jaborandi.....	10
1.3 - Importância econômica do jaborandi.....	14
1.4 - A química do jaborandi.....	16
2. - ESTUDO QUÍMICO DO OLEO ESSENCIAL DE	
<i>PILOCARPUS</i> <i>ssp</i>	23
3. - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS	
ISOLADAS DE <i>PILOCARPUS TRACHYLLOPHUS</i>	
Considerações sobre PT(RC)H-D2, PT(RC)H-D4 e RD1-FA.....	28
Determinação estrutural de PT(RC)H-D2.....	30
Determinação estrutural de PT(RC)H-D4.....	34
Determinação estrutural de RD1-FA.....	38
Determinação estrutural de RD1-FC.....	44
Determinação estrutural de RD1-FD.....	56
Considerações sobre PT(RC)E-BN.....	67

4. - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

ISOLADAS DE *PILOCARPUS SPICATUS*.

Considerações sobre PSFE-NA e PSFE-NB1.....	72
Determinação estrutural de PSFE-NB1.....	77
Determinação estrutural de PSFE-NA.....	87
Determinação estrutural de PSFE-NB2.....	97
5. - CONCLUSÃO.....	108
6. - PARTE EXPERIMENTAL	
6.1 - Coleta de material.....	109
6.2 - Métodos cromatográficos.....	109
6.3 - Métodos espectrométricos.....	110
6.4 - Outras determinações.....	111
6.5 - Estudo dos componentes voláteis de <i>Pilocarpus spp.</i>	112
6.6 - Estudo dos componentes das raízes de <i>Pilocarpus trachyllophus</i> Obtenção dos extratos.....	112
Destilação fracionada de PT(RC)H.....	113
Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD.....	114
Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD1(19-39).....	115
Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD1(19-39)(13-52).....	115
Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD1(106-139).....	116
Extração das bases alcalóidicas de PT(RC)E..	117
Obtenção da mistura de alcalóides de PT(RC)E-B.....	117

6.7 - Estudo dos componentes fixos das folhas

de *Philocarpus spicatus*

Obtenção dos extratos.....	118
Elaboração de PSFE-N.....	119
Tratamento cromatográfico de PSFE-NH.....	119
Tratamento cromatográfico de PSFE-NH ₆	120

6.8 - Obtenção dos derivados

Hidrólise de PSFE-NA.....	121
Acetilação de PSFE-NAH _{1d}	122
Hidrólise de PSFE-NH ₆	122
Oxidação de PSFE-B ₂	123

CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DOS

CONSTITUINTES ISOLADOS E SEUS DERIVADOS.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - HISTÓRICO DO JABORANDI

Etimologia do termo Jaborandi

É grande a confusão que encontramos quando nos detemos no estudo da origem do nome jaborandi. Muitos estudiosos que se esmeraram no esforço de encontrar o sentido original desta palavra esbarraram em uma miscelânea de idéias a respeito do assunto. Bo Holmstedt¹ escreveu um completo trabalho sobre a origem do nome jaborandi e sobre o histórico das espécies de *Pilocarpus* conhecidas com este nome, o qual procuramos resumir a seguir. Segundo Holmstedt, Sampaio em 1918 sugeriu uma explicação para a origem da palavra. Referindo-se a *Pilocarpus microphyllus* Stapf., um do jaborandis, explica ele que o nome deriva de ya-mbo-r-endi significando "que faz babar". Também Pio Correia se refere a *ia-mbor-endi*, como jaborandi legítimo, sem dar-lhe no entanto a tradução para o português. Além de Pio Correia, outros autores também concordaram com a proposição de Sampaio. Há ainda a tentativa de explicar a palavra jaborandi como *ia-guar-endy* (baba de jaguar). No entanto, de acordo com Afrânio do Amaral, que por muitos anos esteve em contato com os índios que falam a língua *Nheegatú*, o fitônimo *iaborandy* não deve ser confundido com o zoônimo *iaguarundy/jaguarundi*. Antenor

Nascentes mostra que o termo jaguarun-dy para gato selvagem vem do Tupy *yawar* para o cão e *udi* para pintado de preto. O professor Afrânio do Amaral explica detalhadamente o significado do termo *ja* (*ja* ou *ia*) como uma partícula pronomial indicando o sujeito *-bu/bu(mbo)*, como um prefixo verbal indicando transitividade *-r* como letra eufônica e *andi(andy)*, significando salvação. Em resumo "que faz babar" ou "que faz salivar" o que muito bem traduz esta propriedade característica da planta.

Primeiros relatos sobre jaborandi

Ainda segundo Homstedt, as primeiras referências na literatura a respeito do Jaborandi datam dos séculos XVI e XVII. No século XVI estão as citações do português Gabriel Soares de Sousa e no século XVII, as do médico holandês Guilherme Pison e do alemão George Marcgrave.

Soares de Sousa, um colonizador português enviado ao Brasil na segunda metade do século XVI como senhor de engenho na Bahia, onde permaneceu 17 anos, e enviou um manuscrito a Dom Cristovam de Moura, um dos favoritos de Felipe II, que o remeteu para publicação. Neste manuscrito Soares de Sousa reporta o valor do jaborandi na cura de úlcera da boca.

Guilherme Pison, veio ao Brasil por volta de 1637, como atendente médico residente do governador. Aqui permaneceu oito anos e escreveu um trabalho intitulado "Do Jaborandi suas Propriedades e Usos". Nesse trabalho descreve duas espécies

vegetais que eram conhecidas pelos nativos como iaborandi. Pison descreve como um índio foi curado de envenenamento por meio da transpiração e micção induzidos pela ingestão de uma bebida preparada de raízes frescas e maceradas de jaborandi. Além disso, muitas vezes menciona o jaborandi no tratamento de oftalmites, espasmos, doenças catarrais e envenenamento.

Marcgrave é citado como outro estudioso ligado à história do jaborandi. Tendo estudado medicina em Leiden por dois anos, foi convidado a juntar-se à expedição científica holandesa no Brasil em 1648. Passou seis anos estudando especialmente, a região costeira compreendida entre Rio Grande do Norte e Pernambuco.

Marcgrave anotou os nomes vernaculares de plantas e animais, quase todos em tupi, em seus desenhos que foram mantidos em Berlin e, que segundo Fonseca Filho, foram de fundamental importância para o conhecimento da flora e fauna brasileiras.

Algumas espécies de jaborandi estão ilustradas no trabalho de Marcgrave que registra em termos gerais, o uso das raízes de jaborandi maceradas em água para a cura de gonorréia e cálculos urinários.

Introdução do jaborandi na terapêutica

O professor Oswaldo de Almeida Costa² desenvolveu extenso trabalho no sentido de dirimir dúvidas quanto à introdução do jaborandi (*Pilocarpus sp.*) na terapêutica médica ocidental, o que procuramos resumir a seguir. Refere-se ele a dois nomes que são apresentados como possíveis introdutores desta planta, o major João Martins da Silva Coutinho e o Dr. Symphrônio Olímpio Cesar Coutinho. O major Coutinho, embora não tenha se graduado em medicina, exercia atividades científicas paramédicas e estudou plantas medicinais brasileiras, tendo em 1861 escrito acerca das epidemias no vale do Amazonas. Este trabalho foi publicado nos Anais Brasilienses de Medicina em 1862-63. Participou ainda de algumas comissões durante a sua vida de militar, e como membro de uma comissão científica fez explorações em alguns estados do Nordeste do Brasil.

Segundo o Prof. Pedro A. Pinto, citado por Oswaldo Costa, o major Coutinho nasceu em São João da Barra, Estado do Rio de Janeiro, no ano de 1830, retirou-se do Exército em 1865 e morreu em Paris no dia 11 de Outubro de 1889.

Na página 359 de suas "Lições de Farmacologia" o Prof. Pedro A. Pinto diz que João Martins da Silva Coutinho um engenheiro do exército brasileiro foi o introdutor do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius*) e seus extratos na terapêutica, tendo levado as folhas desta planta de Pernambuco para Paris, lá chamando a atenção para o valor dessa espécie.

O Prof. Osvaldo de Almeida Costa, entretanto, lança dúvida a respeito de ter sido o major Coutinho o verdadeiro responsável pela introdução do jaborandi na Europa. Dentre outros detalhes discutidos levou em consideração o fato de que na biografia do referido major, publicada por Charles Pontes na Revista Brasileira de Geografia, não se fazia nenhuma referência a seus possíveis estudos sobre a citada planta.

Várias circunstâncias contribuíram para a confusão, diz o Professor Osvaldo Costa, dentre outras, o fato de que ambos, Silva Coutinho e Symphrônio Coutinho assinavam seus nomes como S. Coutinho. Outro fato não menos importante, continua Osvaldo Costa, é que o major Coutinho morreu em Paris e estava lá no tempo em que Symphrônio levou o jaborandi para fazer suas análises e experiências. Fato também curioso é que referências bibliográficas de trabalhos do major Coutinho são fáceis de encontrar, o mesmo não acontecendo com os de Symphrônio Coutinho.

Para distinguir mais precisamente os dois coutinhos deve-se dizer que Symphrônio Coutinho, era filho de Antonio Aureliano Lopes Coutinho e Antonia Florentina Cezar Coutinho. Foi batizado em outubro de 1832 na capela de Nossa Senhora da Conceição de Nazaré, em Olinda, estado de Pernambuco, com a idade de seis meses. Seus padrinhos foram Amaro José Lopes Coutinho e Joaquina Cezar Paes Barreto.

No dia 21 de fevereiro de 1848, registrou-se no primeiro ano da Escola de Medicina na Bahia (nesta mesma data Silva Coutinho entrava para o exército) e em 17 de dezembro de

1853 graduou-se em medicina. Em 1880 defendeu uma tese perante a Escola Médica de Paris sob o título "Le evacuation de fragments calculeux après em lithotritie".

Ainda Para o professor Oswaldo Costa o caso se esclarece no artigo "Sudoríficos brasileiros e sua ação na terapia" do Dr. Cursino de Moura e no trabalho de Caminhoá acerca do jaborandi, publicado na Revista Médica (Brasileira) em 1874. Esses documentos são importantes porque os autores são contemporâneos e amigos do Dr. Symphrônio Coutinho. Caminhoá diz nos seus escritos: "Com a viagem para a Europa que meu amigo Coutinho fez, a ciência e especialmente a farmacologia brasileira muito ganhou, porque ele fez conhecer ao mundo científico a grande vantagem do uso das propriedades de plantas brasileiras na terapia".

Cursino de Moura em sua tese de Doutor, apresentada a Faculdade de Medicina do Estado do Rio de Janeiro, em 12 de Outubro de 1884, escreveu: "Muitas pessoas acreditam que Symphrônio Coutinho não foi o real introdutor do jaborandi na Europa em 1873, o que não é correto". Explica ainda que o famoso médico de Pernambuco, usou a planta repetidas vezes em sua clínica antes de fazê-la conhecida e, por isso, conhecia suas propriedades terapêuticas e fisiológicas principais". "Enquanto viajava em sua província ouvia o povo falar a respeito de uma planta à qual eles davam o nome de nhaguarandi ou iaguarandi, e que era muito conhecida entre a população como um sudorífico, sendo porém pouco usada porque acreditavam que continha uma certa quantidade de veneno". "Depois de fazer largo uso do ja-

borandi especialmente em moléstias a *frigore* partiu para a Europa levando grande quantidade da planta. Em Paris entregou ao Dr. Rabuteau, médico, uma porção da planta, que lhe deu aparentemente pouca importância, mostrando-se cético quanto a afirmação do Dr. Coutinho. Posteriormente o Dr. Coutinho dirigiu-se ao Monsenhor Gluber, Professor de terapêutica na Escola de Medicina de Paris e autoridade médica no Hospital Biajon, o qual, a princípio exitou em aceitar as declarações do Dr. Coutinho acerca do jaborandi, embora finalmente tenha concordado com uma demonstração para provar a possível ação da planta. Uma das primeiras experiências foi com um dos alunos do Prof. Gluber, de nome Nouet. Por ocasião da visita ao Prof. Gluber e na presença de seus alunos, Nouet bebeu cerca de uma xícara cheia da infusão de folha de jaborandi, e dez minutos após, com uma risada disse ao Dr. Coutinho que nada sentia. Pouco depois, porém, todos ficaram impressionados com a quantidade de suor que corria da face de Nouet. Todo seu corpo também transpirava tremendamente apesar da temperatura ambiente ser baixa. Como a infusão foi tomada moderadamente fria o fato surpreendeu ao Prof. Gluber e a todos os presentes".

O Prof. Gluber publicou, então, uma comunicação na qual é mencionado o nome de Symphrônio Coutinho como o descobridor desta importante planta medicinal, o jaborandi.

"Depois de repetir as experiências diversas vezes no Hospital Biajon com excelentes resultados, o Dr. Coutinho publicou um pequeno artigo sobre o jaborandi e as observações que haviam sido feitas sobre a planta".

Tentativa de preservação do jaborandi, na Europa

Este aspecto do estudo do jaborandi foi desenvolvido por Imbesi³ de cujo trabalho foram resumidos os seguintes dados:

Pilocarpus pennatifolius Lem. já era cultivado na estufa do Museu de Paris no jardim botânico de Kew, e ainda em outros hortos botânicos da Europa, antes da chegada de Simphrônio Coutinho. Há mais de vinte anos exemplares desta espécie haviam sido introduzidos em estufa nos hortos botânicos das Universidades de Friburgo e Strasburgo, onde alcançaram mais de três metros de altura. Dois belos exemplares desta planta existiam ainda no horto botânico da Universidade de Palermo que, no final do século passado, tendo alcançado uma altura de dois metros.

Na mesma época existia uns poucos espécimes no horto botânico da Universidade Real de Nápoles donde haviam sido doadas duas destas pequenas plantas ao horto botânico da Universidade de Messina. Uma das plantinhas introduzidas em Messina vegetou bem ao ar livre e alcançou uma altura de mais de seis metros onde florescia e frutificava o ano todo.

Referindo-se a esse exemplar de *Pilocarpus pennatifolius* plantado em Messina, Dr. Imbesi diz: "A planta em nosso clima floresce e frutifica em todos os períodos do ano parecendo por assim dizer ter perdido a sensação do tempo, e quanto ao conteúdo, de alcalóides totais e de pilocarpina, verifi-

cou-se ser sempre muito inferior ao de mais baixo teor que se encontra usualmente na droga proveniente da planta em ocorrência no lugar de origem. As experiências biológicas confirmam plenamente os resultados de dosagens químicas, pondo em evidência o fato de que suas folhas são dotadas de escassas atividades biológicas".

"A possibilidade de se obter por síntese o princípio ativo que se pudesse ter proveito, não favorece a difusão desta planta senão com escopo experimental", conclui Dr. Imbesi.

Até hoje entretanto não foi possível obter-se industrialmente a pilocarpina quimicamente pura por síntese. Por isso muito anos depois desta afirmação do Dr. Imbesi, a Empresa MERCK em sua fazenda experimental, frente à escassez do jaborandi nativo, concentra esforços na pesquisa, para obter grandes plantações de *Pilocarpus microphyllus*, afim de que, pelo menos parte da matéria prima necessária à extração de pilocarpina ou seja, as folhas de jaborandi, seja produzida por ela própria.

1.2 - IMPORTÂNCIA FARMACOTERAPÊUTICA

Propriedades Farmacológicas

O grande interesse em torno do jaborandi após sua introdução na Europa pelo Dr. Coutinho em 1873 resultou na publicação, entre os anos de 1874 e 1900 de mais de 55 artigos, 30 dos quais apareceram nos quatro primeiros meses do ano de 1875 ⁵. O fato causou intenso interesse no meio médico e farmacêutico em virtude da ação biodinâmica de seu princípio ativo, um alcalóide posteriormente isolado e denominado de pilocarpina.

A pilocarpina logo atraiu o interesse de muitos pesquisadores que, com base nas suas ações farmacológicas realizaram muitos trabalhos para estabelecer sua aplicação na terapêutica. Ela foi assim classificada farmacologicamente como um parasimpatomimético dotada de propriedades gerais como hipotensor, depressor do coração e miótico. provoca as secreções glandulares atuando especialmente como sialagogo, galactagogo e sudorífico.⁶

Dentre as ações mais importantes da pilocarpina destacam-se aquelas sobre a musculatura lisa, glândulas exócrinas, sistema cardiovascular e sistema nervoso central.

Quando aplicada localmente age sobre a musculatura lisa do globo ocular provocando constrição pupilar, parada da acomodação e uma elevação transitória da pressão interna do

olho seguida por uma queda persistente, o que justifica o seu emprego no controle do glaucoma. Estimula também a musculatura do trato intestinal, uretères, bexiga, vesícula biliar e dutos biliares aumentando seu tônus e motilidade. Sobre a musculatura brônquica sua ação é também estimulante. Os pacientes asmáticos, por isso, respondem à pilocarpina com uma redução da capacidade vital podendo precipitar-se uma crise asmática típica.

A ação da pilocarpina sobre as glândulas salivares, lacrimais, gástricas, pancreáticas e intestinais é estimulante sabendo-se que uma dose de 10 a 15mg por via subcutânea provoca uma acentuada diaforese no homem, com aumento da eliminação de uréia pelo suor, podendo ser secretados de dois a três litros de suor em curto período.

Com referência ao sistema cardiovascular a pilocarpina age de forma complexa aumentando ou diminuindo a pressão arterial dependendo das condições em que for usada. Quando administrada numa dose de 0,1mg/kg, provoca uma queda na pressão arterial, no entanto, se precedida por uma dose apropriada de um bloqueador nicotínico verifica-se uma acentuada elevação da pressão.

A ação da pilocarpina sobre o sistema nervoso central verificada em gatos evoca uma resposta excitatória do córtex após administração endovenosa de doses consideravelmente pequenas. Essa ação é reduzida ou bloqueada pela atropina e outros agentes relacionados.⁶

Usos terapêuticos

A principal utilidade da pilocarpina esta no controle da pressão intraocular no tratamento de glaucoma, quando geralmente é empregada em solução aquosa de 0,5 a 4% na forma de colírio. Seu uso pode ser extremamente útil nos casos de intoxicação por alcalóides tropânicos como os que ocorrem pelo uso abusivo de drogas alucinógenas, como zabumba, saia branca ou a trombeta (*Datura spp.*), ricas em hiosciamina e escopolamina. A pilocarpina ou extrato de jaborandi, administrados adequadamente revertem os efeitos da intoxicação

A pilocarpina também pode ser utilizada na terapêutica como sudorífico, nas nefrites com uremia, na hidropsia, e como sialagoga. Pode ser ainda utilizada nas congestões do ouvido médio e interno, e segundo muitos fabricantes de cosméticos, em dermatologia como modificador da pele e ainda para evitar queda de cabelo(Sic).

Muito embora a pilocarpina apresente interessantes propriedades terapêuticas, seus efeitos colaterais limitam seu emprego, daí seu uso clínico atual está principalmente restrito como agente miótico e em veterinária no caso de parada do aparelho digestivo por sua ação estimulante do aparelho gástrico intestinal e das secreções digestivas.

Efeitos tóxicos

Os efeitos tóxicos da pilocarpina, são caracterizados principalmente por sua forte ação parasimpatomimética (lembrando aqueles produzidos pela ingestão de cogumelos de gênero *Inocybe*). Assim em doses altas provoca diarreia, bradicardia e edema pulmonar dentre outras consequências. O tratamento consiste na administração parenteral de atropina e medidas adequadas para manter a respiração e a circulação⁶.

1.3 - IMPORTANCIA ECONÔMICA

A importância econômica do jaborandi como planta medicinal produtora de pilocarpina, é realmente grande. O Brasil é o único produtor deste alcalóide, exportando para muitos países do mundo principalmente para sua utilização em medicamentos contra glaucoma.

A multinacional MERCK Darmstadt encontrou jaborandi em abundância no Nordeste. Possuindo a tecnologia e conhecendo o mercado, instalou uma unidade industrial inicialmente em São Luis-MA. Hoje existem duas empresas ambas em Parnaíba-PI extraíndo este alcalóide do jaborandi: A Produtos Vegetais do Piauí(PVP), uma empresa brasileira e a VEGETEX do grupo E.MERCK.

Os dados oficiais de exportação fornecidos pela CACEX registram para pilocarpina no ano de 1986, e para o período de janeiro a setembro de 1987, US\$ 7.826.512,00(US\$ 877,11/kg) e US\$ 8.399.063,00(US\$ 1.099,06/kg) respectivamente. Os dados quantitativos em dolares(US FOB) bem como os países de destino e o peso em quilogramas referentes a estas exportações, estão na TABELA 1.(fonte:CACEX)

A pilocarpina quimicamente pura é atualmente comercializada por US\$ 1.500,00 o quilograma. Sendo por isso muito importante para a nossa balança comercial.

Tabela 1 - Quantidades de pilocarpina exportadas nos anos de 1986 e 1987 por países de destino e respectivos valores em US\$ FOB.

TABELA 1

1986 (JANEIRO - DEZEMBRO)

PAIS	PESO em KG	US\$ FOB
Alemanha ocidental	3406	2.708,604
Bélgica	690	640,574
Canadá	187	195,942
Estados Unidos	2220	1.944,962
Japão	255	240,969
Países Baixos	245	226,055
Porto Rico	250	232,102
Reino Unido	320	260,428
U.R.S.S.	1350	1.246,876
TOTAL	8923	7.826,512

1987 (JANEIRO - SETEMBRO)

PAIS	PESO em KG	US\$ FOB
Alemanha ocidental	3098	3.202,291
Bélgica	985	1.092,814
Canadá	126	165,103
Chile	30	44,586
Colômbia	5	8,125
Estados Unidos	2023	2.254,003
Índia	30	48,753
Japão	235	293,523
México	40	49,027
Países Baixos	200	240,922
Reino Unido	170	176,197
U.R.S.S.	700	823,119
TOTAL	7642	8.399,063

Fonte: CACEX

1.4 - A QUÍMICA DO JABORANDI

Considerações gerais

A maioria das espécies de *Pilocarpus* até agora estudadas tem apresentado alcalóides do tipo imidazólico, assim chamados por apresentarem o núcleo do imidazol em sua estrutura, núcleo este proveniente biosinteticamente do aminoácido histidina⁷. Além do núcleo imidazólico os alcalóides das espécies de *Pilocarpus* apresentam também um anel lactônico de cinco membros. Dentre estes alcalóides já conhecidos está a pilocarpina(1) que é o alcalóide mais importante do ponto de vista terapêutico tendo, por isso despertado grande interesse entre químicos e farmacologistas.

Em sua molécula a pilocarpina apresenta dois centros assimétricos sendo por isso possível a existência de quatro isômeros com a mesma estrutura plana. No entanto até o momento são conhecidos apenas dois, a pilocarpina e a isopilocarpina(11).

Foram encontrados também em plantas deste gênero os alcalóides pilosina(111), isopilosina(1V) e epiisopilosina(v) que se diferenciam entre si apenas na configuração relativa de seus centros assimétricos. Suas moléculas apresentam três centros assimétricos sendo assim possível com a mesma estrutura molecular, a existência de oito isômeros. Até o presente momento apenas os três citados acima são conhecidos.

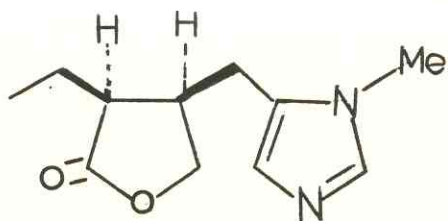
Outro alcalóide isolado posteriormente de *Pilocarpus*, foi a epiisopiloturina(VI) que se distingue da epiisopilosina apenas pela posição do grupo N-metil tendo ambos a mesma estereoquímica⁸.

Foram isolados também a nor-pilocarpina conhecida também como pilocarpidina(VII)⁹ e O-metil-bufotenina(VIII)¹⁰ o único alcalóide conhecido de *Pilocarpus* que não contém o núcleo imidazólico.

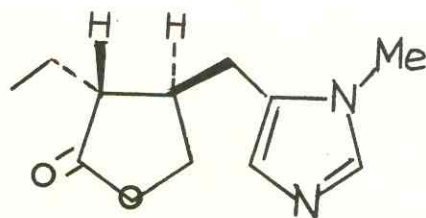
Isolamento da pilocarpina

O estudo químico de algumas espécies de *Pilocarpus* ainda no século passado, que resultou no isolamento da pilocarpina e é relatado num trabalho publicado pelo Dr. Imbesi¹¹ é resumido a seguir.

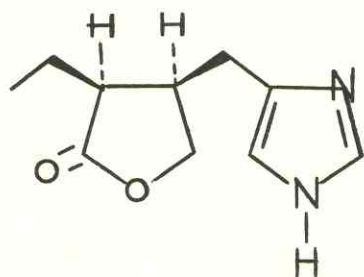
Um dos primeiros registros dão a Rabuteau a responsabilidade da primeira análise das folhas do jaborandi, que não se refere a ocorrência de nenhum alcalóide mas apenas de pequena quantidade de óleo etéreo. Pode-se supor, por isso tratar-se de outra planta também conhecida pelo nome de jaborandi(*Piper sp*). Posteriormente Byasson extraiu de *Pilocarpus pennatifolius* um alcalóide que denominou de jaborandina. A jaborandina é descrita pelo autor como um líquido aromático, viscoso, dotado de um sabor acre e amargo, solúvel em clorofórmio, éter, etanol absoluto e soluções aquosa ácidas. Estas soluções ácidas respondem positivamente aos testes para alcalóides e, quando inje-



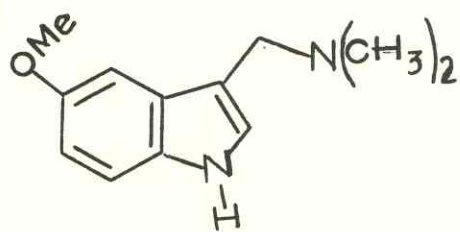
(I)



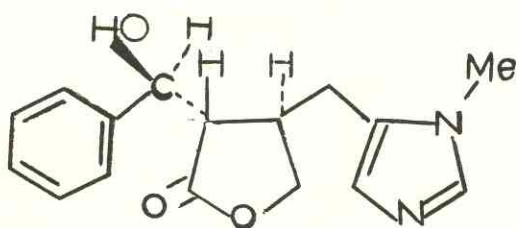
(II)



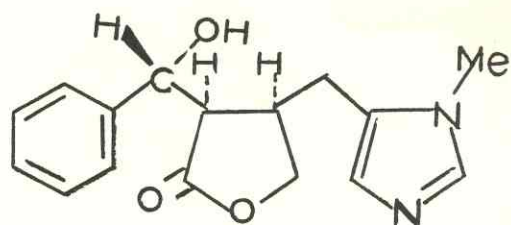
(VII)



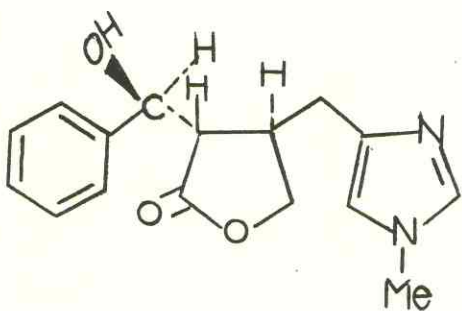
(VIII)



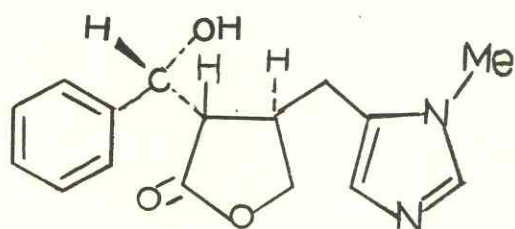
(V)



(III)



(VI)



(IV)

tada na veia de um cão provocam salivação abundante.

Logo depois do isolamento da jaborandina foi isolada uma outra substância a partir de outro jaborandi, identificado como uma espécie de *Piper* que recebeu também o nome de jaborandina.

Posteriormente Hardy(1875) isolou das folhas de um jaborandi do gênero *Pilocarpus*, uma nova substância que se combinava com ácido clorídrico para dar um cloridrato cristalino, solúvel em água em álcool absoluto e em éter, que denominou de pilocarpina. Pelas propriedades descritas pôde-se supor que a pilocarpina de Hardy corresponde à jaborandina isolada por Byasson.

Quase na mesma época M.W.Gerrard(1875), trabalhando separadamente isolou a pilocarpina porém na forma de nitrato que se apresentava na forma de cristais incolores cujas soluções exerciam ação sobre o olho análoga às preparações de jaborandi.

O alcalóide foi obtido a partir das folhas esmagadas que foram extraídas com álcool 84% ao qual se juntou 1% de amônia concentrada. O extrato obtido foi, em seguida neutralizada com ácido tartárico sendo o álcool destilado e o resíduo da destilação retomado com álcool etílico amoniacal. A solução foi filtrada, privada de álcool e a pilocarpina extraída com clorofórmio. Após a evaporação do clorofórmio a base residual foi neutralizada com ácido nítrico e transformada em nitrato e purificada por repetidas recristalizações em etanol absoluto à quente.

Por um processo análogo ao de Gerrard, outro químico, Merck, também preparou nitrato de pilocarpina recristalizado.

Dois outros pesquisadores, E.Harnack e H.Meyer, obtiveram a pilocarpina do extrato do jaborandi preparando primeiro os sais duplos de platina que se dissolvem em água quente e são decompostos pelo ácido sulfídrico. Após a filtração do sulfeto de platina, o filtrado é super saturado com soda cáustica e agitado com éter, que extrai completamente um segundo alcaloide o qual foi chamado de jaborina e que parece ser um possível produto de decomposição da pilocarpina. Acidificada novamente, a solução é precipitada com ácido fosfowolfrâmico sendo o precipitado decomposto com água de barita para a obtenção de pilocarpina. Nesta solução também foi encontrado isopilocarpina e pilocarpidina.

Espécies estudadas quimicamente

O gênero *Pilocarpus* compreende treze espécies que são: *Pilocarpus microphyllus*, *Pilocarpus jaborandi*, *Pilocarpus pennatifolius*, *Pilocarpus spicatus*, *Pilocarpus pauciflorus*, *Pilocarpus trachylophus*, *Pilocarpus racemosus*, *Pilocarpus giganteus*, *Pilocarpus grandiflorus*, *Pilocarpus goudotianus*, *Pilocarpus peruvianus*, *Pilocarpus riedelianus* e *P. demerarae*⁵.

No entanto nem todas estas espécies até então conhecidas, foram estudadas quimicamente. Apenas algumas delas

foram submetidas a investigação química e, mesmo assim, de forma não exaustiva. A literatura registra as informações listadas a seguir.⁵

Pilocarpus giganteus Engler: é mencionado por Draggendorff(1898) e segundo ele não há certeza da presença de pilocarpina.

Pilocarpus jaborandi Holmes(Jaborandi de Pernambuco): foi estudado por Tedeschi e colaboradores(1973) que registraram o isolamento de pilosina, isopilosina e epiisopilosina de suas folhas. Esta espécie é portadora de pilocarpina.¹¹

Pilocarpus microphyllus Stapf.(Jaborandi do Maranhão): foi exportado para Liverpool em 1893. Além de pilocarpina e isopilosina dele foi isolado inicialmente em 1912 por Pyman a pilosina¹² que Voigtlander chamou de isopilosina¹³. Lowe e Pook além de isolarem isopilosina e epiisopilosina ainda mostraram que a pilosina descrita por Voigtlander era uma mistura de 1:1 de pilosina e isopilosina¹⁴. hoje esta espécie é a mais utilizada na indústria por sua abundância e alto teor de pilocarpina.

Pilocarpus pennatifolius Lem.(Jaborandi do Paraguai): quem primeiro exportou esta espécie para a Europa foi Balansa que, juntamente com o botânico paraguaio Parodi, viram a utilização médica desta espécie no Paraguai⁵. Esta planta foi cultivada na Sicília e nela foi encontrada a pilocarpina, porém em baixo teor.³

Pilocarpus racemosus Vahl.(Jaborandi do Guadalupe):
Rocher em 1898 isolou 0,6% de pilocarpina das folhas desta planta.⁵

Pilocarpus spicatus Saint Hillaire, subespécie *aracatensis*(Jaborandi do Aracati): foi exportado para Inglaterra em 1895, e segundo Paul e Cownley(1896) suas folhas continham 0.16% de alcalóides amorfos. Não foi reportado nesta espécie o isolamento de pilocarpina.

Pilocarpus trachyllophus Holmes(Jaborandi do Ceará): esta espécie apareceu na Europa em fevereiro de 1894. Dela Paul e Cownley isolaram 0.02% de nitrato cristalino. Petit obteve também 0.1% de nitrato cristalino. Não se soube entretanto se a base era pilocarpina.

Pilocarpus organensis Rizzini: esta espécie foi descrita em 1974. Kaastra afirma ser a mesma espécie descrita anteriormente como *Pilocarpus pauciflorus* Saint Hillaire. Deste material foi isolado um alcalóide diferente estruturalmente dos outros até então conhecidos em *Pilocarpus*. Este alcalóide tem núcleo indólico ao invés de imidazólico e foi denominado de O-metil-bufotenina¹⁰(Vill).

Nenhuma referência foi encontrada em relação ao isolamento de qualquer outra substância das outras espécie de *Pilocarpus*.

2 - ESTUDO QUÍMICO DO OLEO ESSENCIAL DE *PILOCARPUS* ssp

Óleos essenciais são definidos como produtos vegetais que podem ser extraídos por arraste à vapor d'água. São armazenados nas plantas em órgãos especiais de excreção como, sejam compartimentos, glândulas, canais ou pelos glandulares, distribuídos especialmente nas folhas e até mesmo nas raízes das plantas produtoras.

Nas espécies da família Rutaceae estes óleos estão depositados em glândulas esquizógenas (originadas por separação ou desdobramento do tecido celular) distribuídas nas folhas podendo ser observadas como pontos translúcidos com o auxílio de uma lupa.

Nas espécies de *Pilocarpus* estudadas, o óleo essencial está presente basicamente nas folhas, no entanto alguns constituintes do óleo podem ser encontrados também nas raízes, como é o caso das metilcetonas citadas neste trabalho. Quimicamente estes óleos estão constituídos em maior percentagem por metilcetonas de onze e treze átomos de carbonos ocorrendo também a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e mais raramente diterpenos.

Os primeiros estudos sobre o óleo essencial de *Pilocarpus* datam do início do século, na Europa. Gildermeister e Hoffmann extraíram o óleo essencial de *Pilocarpus jaborandi* por destilação à vapor que deu um rendimento de 0,2 a 1,1% dependendo das condições de umidade das folhas¹⁶. Os mesmos

autores registraram as propriedades de dois óleos analisados por Schimmel e Cia(1895). Um dos óleos extraídos, provavelmente de *Pilocarpus pennatifolius* oriundo do Paraguai, conhecido localmente como Yvira-tai apresentou odor semelhante ao de arruda(*Ruta graveolens*) e continha 83% de metil nonil cetona(IX). O outro extraído das folhas do jaborandi comercial constituído principalmente, segundo os autores, de *Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus spicatus*, continha apenas 20,6 de metil nonil cetona e apresentava um odor balsâmico que mascarava o odor semelhante ao de arruda¹⁵.

Na TABELA 2 são apresentadas todas as espécies nordestinas que até agora foram estudadas com relação à composição química dos seus óleos essenciais(especies de 7 a 15) incluindo aquelas cujas análises foram publicadas anteriormente por Craveiro e colaboradores(especies de 1 a 6)¹⁶

A TABELA 3 apresenta os constituintes químicos das espécies discriminadas na TABELA 2

Da análise da TABELA 3 pode-se inferir que as metil cetonas estão sempre presentes no óleo essencial das espécies estudadas, exceto na amostra de número cinco, sugerindo a necessidade de uma nova análise da respectiva amostra. O fato não foi possível até o momento em virtude do sistema CG/EM não se encontrar em funcionamento.

Também é observado na TABELA 3 que os monoterpenos delta-car-3-eno e alfa terpinoleno só são encontrados em *P. spicatus* dentre as espécies de *Pilocarpus* analisadas.

Os resultados apresentados permitem concluir que as metil cetonas de onze e treze átomos de carbonos se apresentam como possíveis marcadores quimiotaxonômicos para *Pilocarpus*, bem como sugere uma proximidade filogenética com *Ruta* (Rutaceae), já que estas substâncias estão presentes nas espécies analisadas de ambos os gêneros. A presença de delta-car-3-eno e alfa-terpinoleno, confinados à espécie *P. spicatus* também sugere serem estes componentes possíveis marcadores quimiotaxonômico para esta espécie entre suas congêneres.

Para elucidar o assunto, faz-se necessário ainda a análise detalhada de outras espécies de *Pilocarpus*, assim como de outras espécies distribuídas nos diversos gêneros de Rutaceae.

TABELA 2

Tabela 2 - Local de coleta e nome das espécies de *Pilocarpus* cujos óleos essenciais foram estudados

Número da amostra	Espécie	Local de coleta	Número do arquivo
01	<i>P. microphyllus</i> Stapf	Santa Quitéria-MA	F 191
02	<i>P. jaborandi</i> Holmes	Meruoca-CE	F 137
03	<i>P. affinis pauciflorus</i>	Crato-CE	F 213
04	<i>Pilocarpus</i> sp.	Viçosa-CE	F 192
05	<i>Pilocarpus</i> sp.	Bodocó-PE	F 212
06	<i>P. microphyllus</i> Stapf	Parnaíba-PI	F 112
07	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Maranguape-CE	F 973
08	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Maranguape-CE	F 989
09	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Maranguape-CE	F 974
10	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Maranguape-CE	F 990
11	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Pacatuba-CE	F 1001
12	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Pacatuba-CE	F 1002
13	<i>P. jaborandi</i> Holmes	Tianguá-CE	F 979
14	<i>P. trachyllophus</i> Holmes	Macaúbas-BA	F 1088
15	<i>P. spicatus</i> St.Hil.	Cocalzinho-CE	F 972

Fonte: Arquivo do Laboratório de Produtos Naturais(UFC)

TABELA 3

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial das espécies estudadas

Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alfa-cubebeno							+							+	
Delta-cadineno		+			+	+	+	+			+				+
Gama-cadineno					+			+				+			+
Beta-cariofileno		+		+	+	+	+	+	+	+		+			+
Alfa-copaeno		+				+	+	+			+				+
Delta-car-3-eno							+	+	+	+	+	+			+
Beta-elemeno							+	+				+		+	
Gama-elemeno					+		+	+	+		+	+			+
Delta-elemeno							+	+	+		+	+			+
Germacreno							+							+	+
Alfa-humuleno		+			+			+	+					+	+
Limoneno	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+		+
Linalol							+	+			+				
Mirceno	+		+		+		+	+	+	+	+	+	+		+
Gama-muuruleno							+	+	+					+	+
Trans-ocimeno							+	+	+	+	+	+			
Cis-ocimeno		+						+	+	+		+	+		+
Alfa-pineno	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
sabineno			+	+	+	+	+	+	+	+		+			+
sandaracopimaradieno	+									+			+		
Gama-terpineno					+		+	+	+						+
Alfa-terpineno			+		+										
Alfa-terpinoleno							+	+	+	+	+	+			+
2-undecanona	+		+	+			+	+	+	+	+	+	+		+
2-tridecanona		+				+		+	+	+	+	+	+	+	+

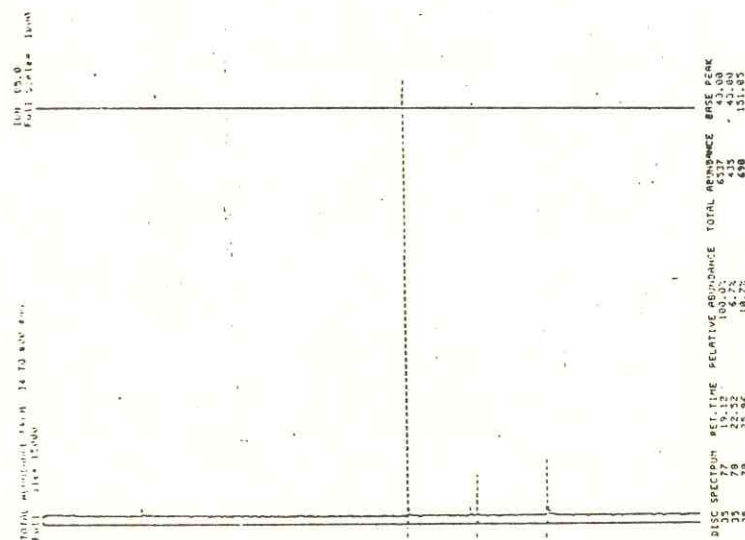
3.0 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *PILOCARPUS TRACHYLLOPHUS*

Considerações sobre PT(RC)H-D2, PT(RC)H-D4 E RD1-FA

Extração exaustiva da casca das raízes de *Pilocarpus trachyllophus* com hexano a frio forneceu, depois da evaporação do solvente sob pressão reduzida, 185ml de um óleo amarelado designado pela sigla PT(RC)H. Análise de PT(RC)H através de cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa revelou a presença de três constituintes principais (fig. 1).

As duas substâncias de menor polaridade, mostraram nos seus espectros de massa, uma fragmentação característica de compostos alifáticos. O íon molecular da substância com menor tempo de retenção (fig. 1) $m/z=198$ Daltons, é indicativo de uma fórmula molecular $C_{13}H_{26}O$, enquanto que para a outra, mesmo sem se observar o íon molecular, pode-se inferir um peso molecular mais elevado em virtude do seu índice de Kovat maior.

A destilação fracionada de PT(RC)H forneceu duas frações homogêneas em CCD denominadas PT(RC)H-D2(2ml) e PT(RC)H-D4(1ml) e um resíduo denominado PT(RC)H-RD(63g) do qual foi isolado um sólido branco homogêneo em CCD, que apresentou ponto de fusão de 55-58°C e foi designado pela sigla RD1-FA.



LIBRARY SEARCH PROGRAM (Rev. 10/24/79)
 SEARCH OF LIBRARY 4
 0.77.035 Total Abundance 6537 Ret. Time 17.12 Sample 4 0 B.P. Abundance 1720



0.78.035 Total Abundance 435 Ret. Time 22.52 Sample 4 0 B.P. Abundance 183



0.79.035 Total Abundance 633 Ret. Time 25.95 Sample 4 0 B.P. Abundance 72

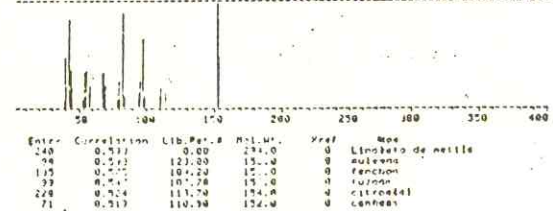
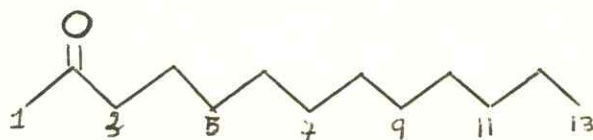


Figura 1 - Cromatograma de PT(RC)H e espectros de massa dos seus constituintes.

Determinação estrutural de PT(RC)H-D2

PT(RC)H-D2 apresentou onze sinais no espectro de RMN de carbono-13 completamente desacoplado (PND, fig 2), com o pico em 29.19 muito mais intenso que todos os sinais, indicando a possibilidade de superposição de três absorções. Aplicação da teoria de deslocamento químico e análise do espectro de ^{13}C utilizando a técnica APT (fig. 2) para determinação da multiplicidade revelou a existência de um carbono carbonílico de cetona (208.67), dois grupos metilas (13.84 e 29.48) e uma série de grupos metilênicos, sugerindo uma estrutura aberta de acordo com uma única lacuna de insaturação sugerida pela fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}$. O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou uma absorção em 1730cm^{-1} característica de cetona alifática. (fig.3). Análise do espectro de RMN ^1H (fig.4) mostra um triplete em 2.29 (2H), um singlete em 1.99 (3H) característico de acetila $\text{CH}_3\text{-C=O}$, e um quinteto em 1.44 (2H), um singlete largo em 1.14 (16H) e um triplete em 0.76 (3H). Correlação dos dados acima discutidos permite então sugerir a estrutura da metil-undecil-cetona (IX) para PT(RC)H-D2.



IX

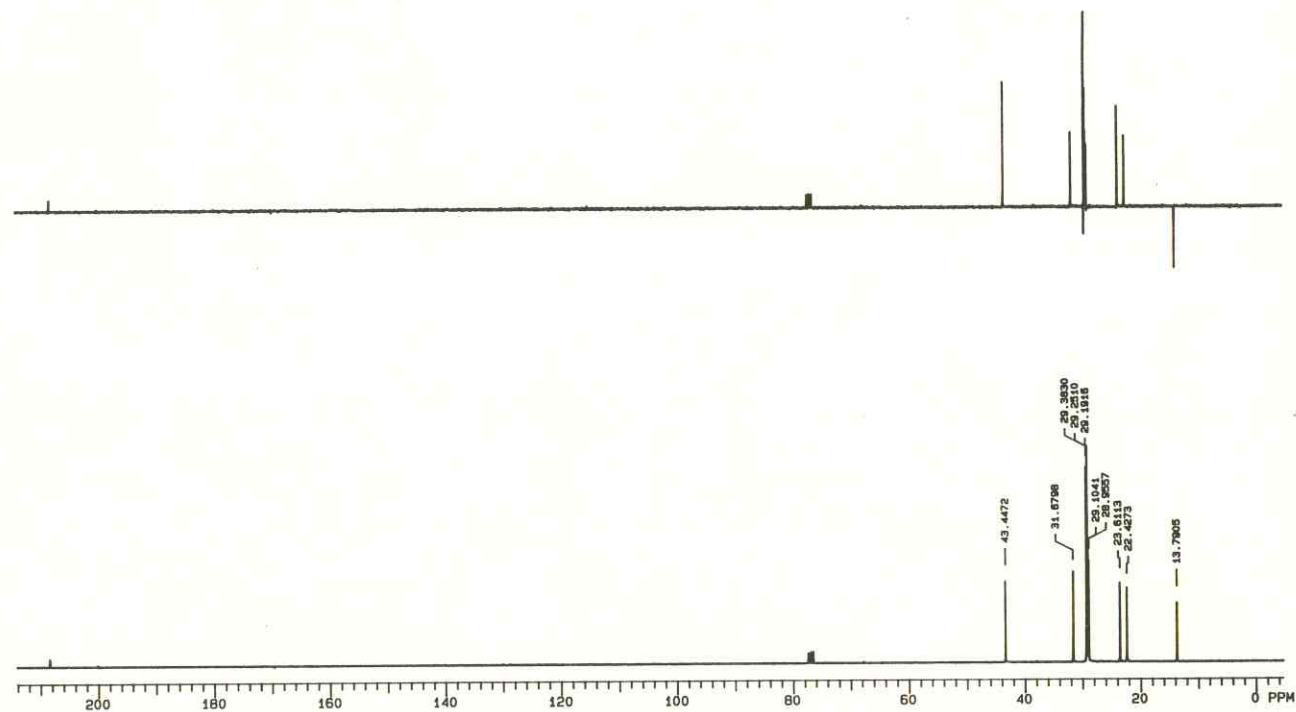


Figura 2 - Espectro de RMN ^{13}C (PND e APT) de PT(RC)H-D2

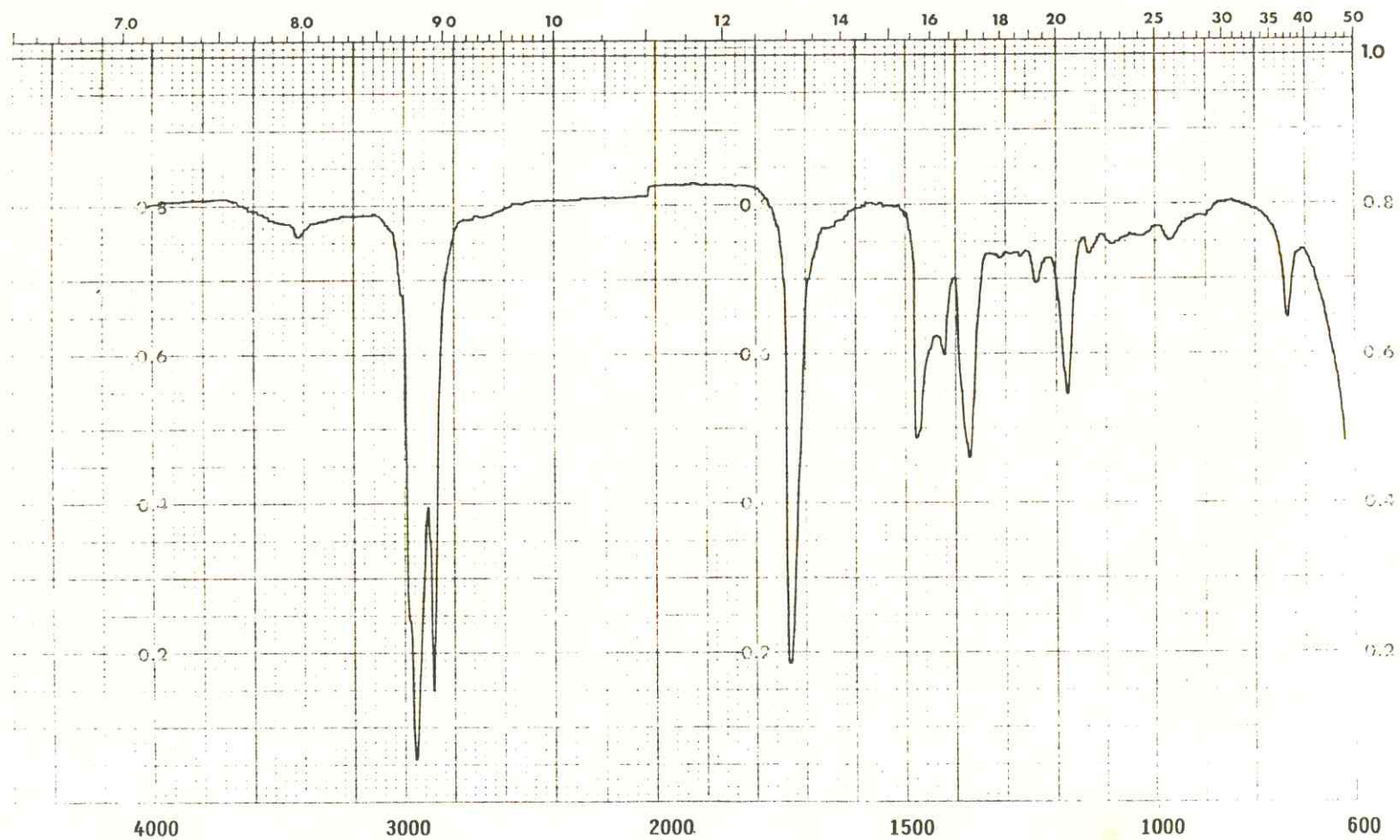


Figura 3 - Espectro no I.V. de PT(RC)H-D2

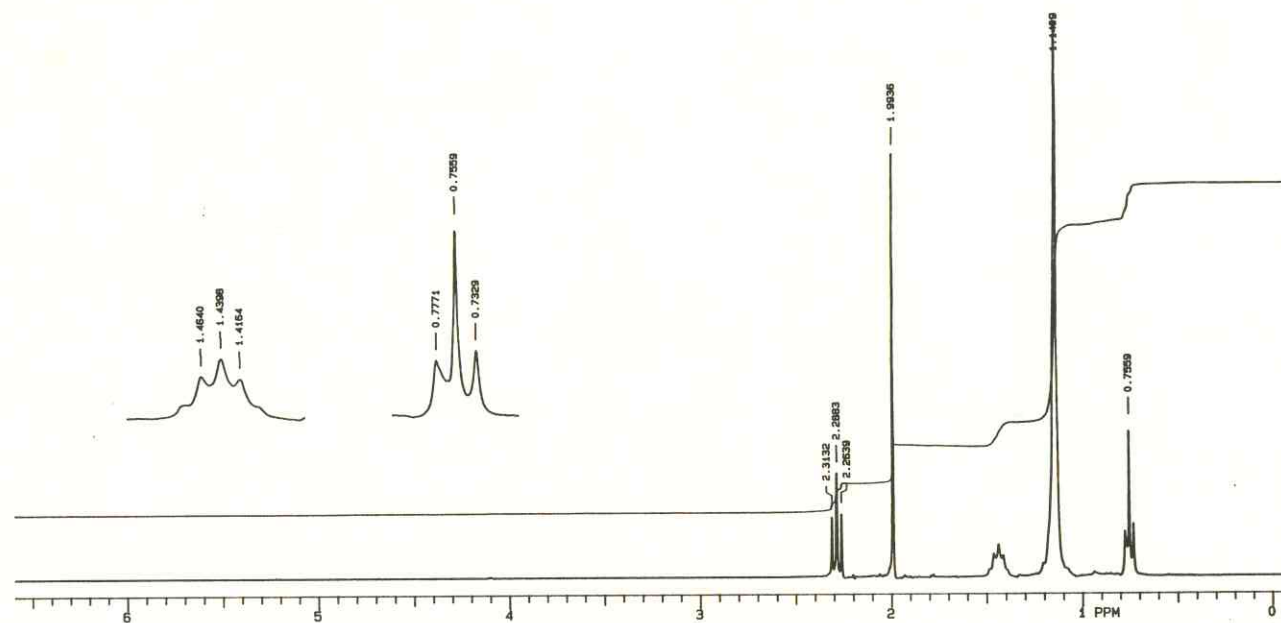
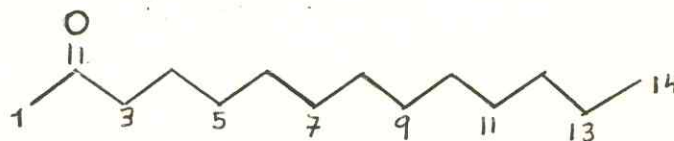


Figura 4 - Espectro de RMN ^1H de PT(RC)H-D2

Determinação estrutural de PT(RC)H-D4

PT(RC)H-D4 apresentou espectros muito semelhantes a PT(RC)H-D2, com exceção do aparecimento de mais um CH₂ no espectro de Carbono-13(fig.5) em torno de 29.42δ e a integração do singlete largo em 1.16δ, para dezoito prótons no espectro de RMN ¹H(fig.6). O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou também uma absorção em 1720cm⁻¹(fig.7) característica de cetona alifática. Assim sugerimos a estrutura da metil-dodecil-cetona(X) para PT(RC)H-D4. Esta proposição está de acordo com o comportamento de compostos homólogos em cromatografia gás-líquido, ou seja um índice de Kovat mais alto para PT(RC)H-D4 em relação a PT(RC)-D2.(fig 1).



X

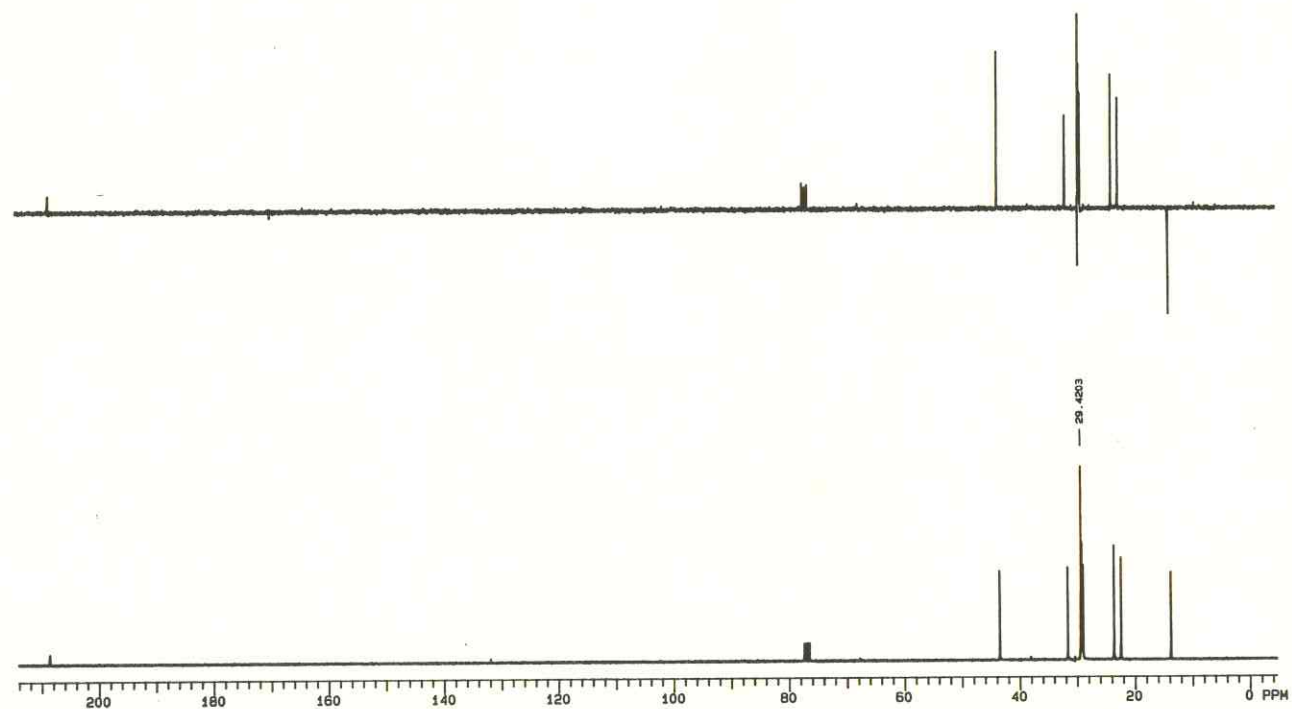


Figura 5 - Espectro de RMN ^{13}C (PND e APT) de PT(RC)H-D4

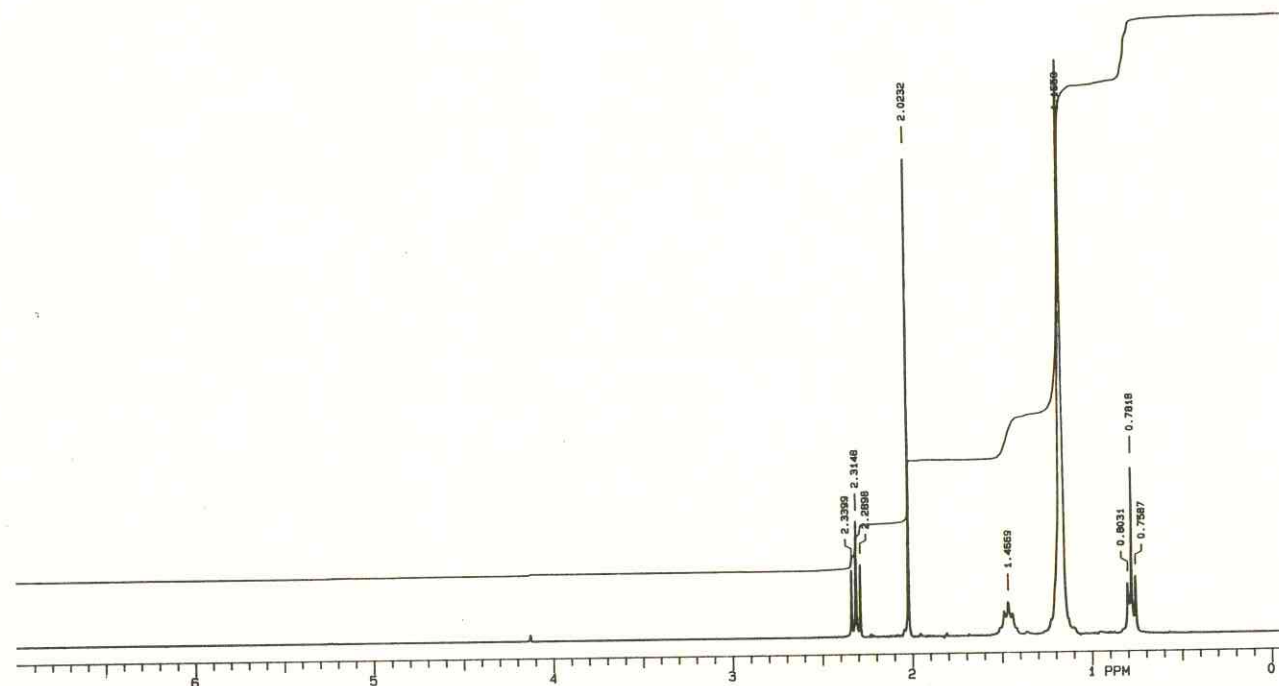


Figura 6 - Espectros de RMN ^1H de PT(RC)H-D4:

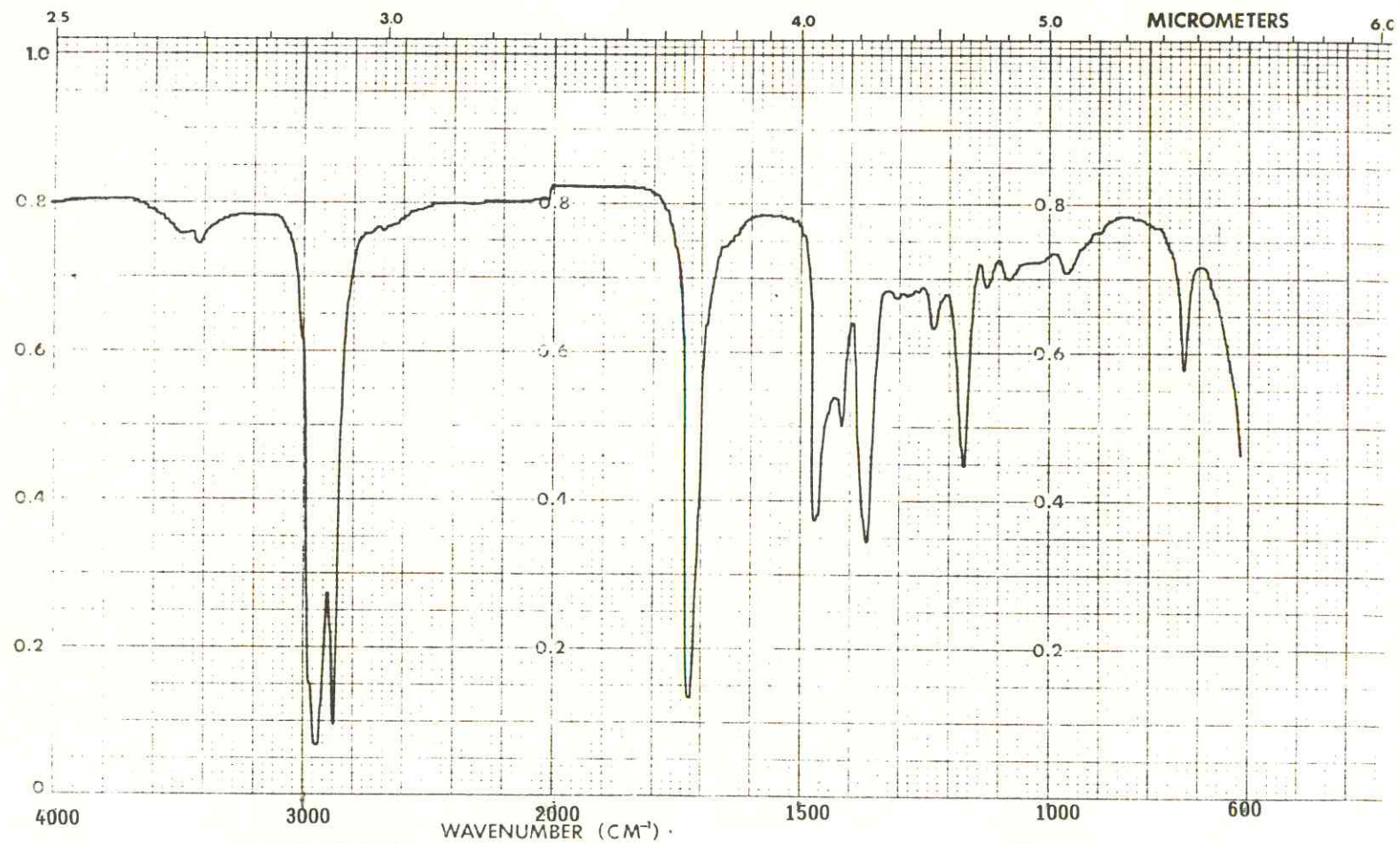


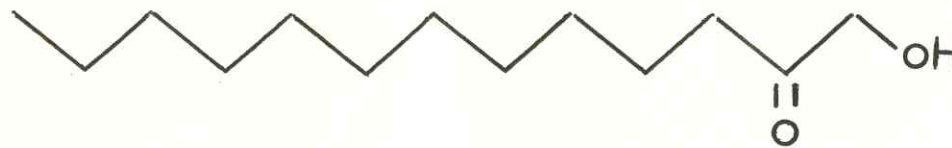
Figura 7 - Espectro no I.V. de PT(RC)H-D4

Determinação estrutural de RD1-FA

O espectro de massa de RD1-FA apresenta o pico do íon molecular $m/z=214$ Daltons (fig.8) sugerindo uma fórmula molecular $C_{13}H_{26}O_2$. O espectro de absorção na região do infravermelho revelou em comparação com PT(RC)H-D2, a presença de hidroxila (fig.9). O espectro de RMN de carbono-13 (fig.10) revelou o aparecimento de um grupo metilênico carbinólico (68.0) em RD1-FA e desaparecimento do metila em 29.4 δ em PT(RC)H-D2 (fig.2). Isto é plenamente confirmado pelo RMN 1H (fig.11) onde o desaparecimento do metila em 1.99 δ e o aparecimento do sigleto em 4.22 δ (2H) são compatíveis com a hidroxilação do grupo metila "alfa" em PT(RC)H-D2. Portanto a estrutura de RD1-FA é a 1-hidroxi-tridecanona-2. (X1).

A confirmação da proposta estrutural para os dois constituintes do extrato hexânico da casca da raiz, caracterizados como metil-undecil-cetona e metil-dodecil-cetona, será inequivocamente realizada quando na obtenção dos espectros de massa de cada substância isoladamente. Infelizmente até o momento não nos foi possível obter estes dados.

A presença em pequena quantidade, da metil undecil-cetona já havia sido detectada no óleo essencial de *P. trachyllophus* e outros *Pilocarpus*. No entanto a presença da 1-hidroxi-tridecanona-2 está sendo registrada pela primeira vez para plantas deste gênero.



(XI)

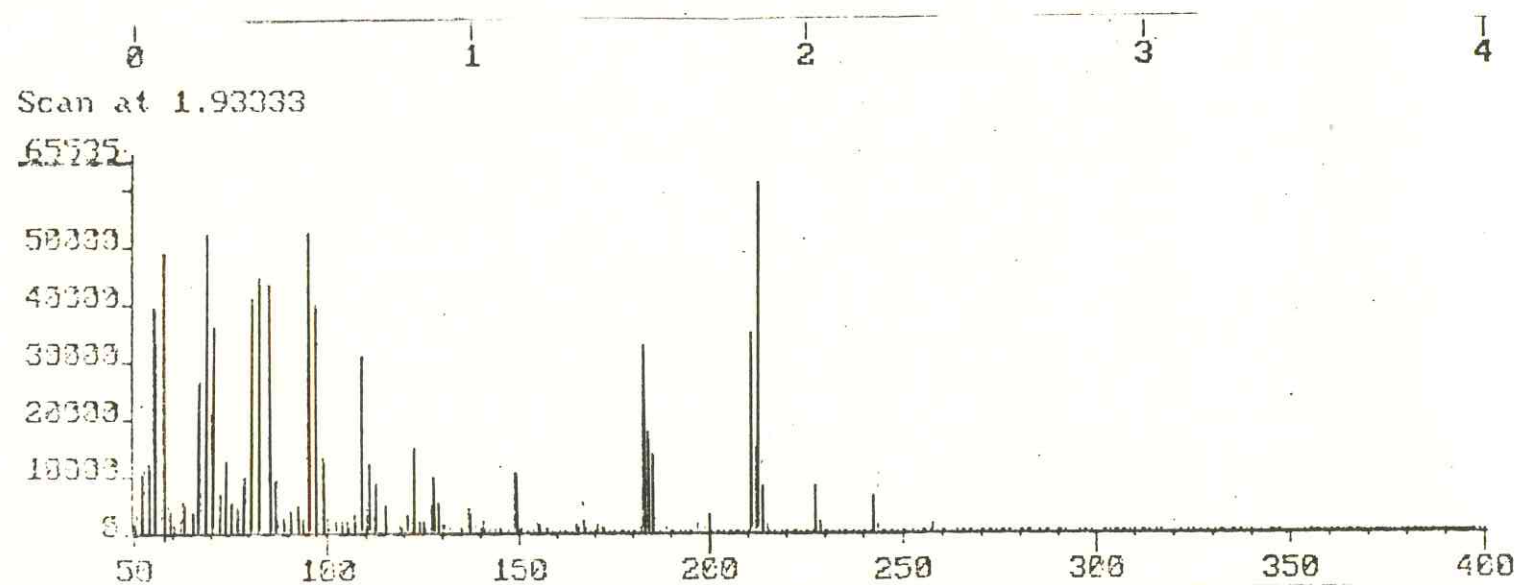


Figura 8 - Espectro de Massa de RD1-FA

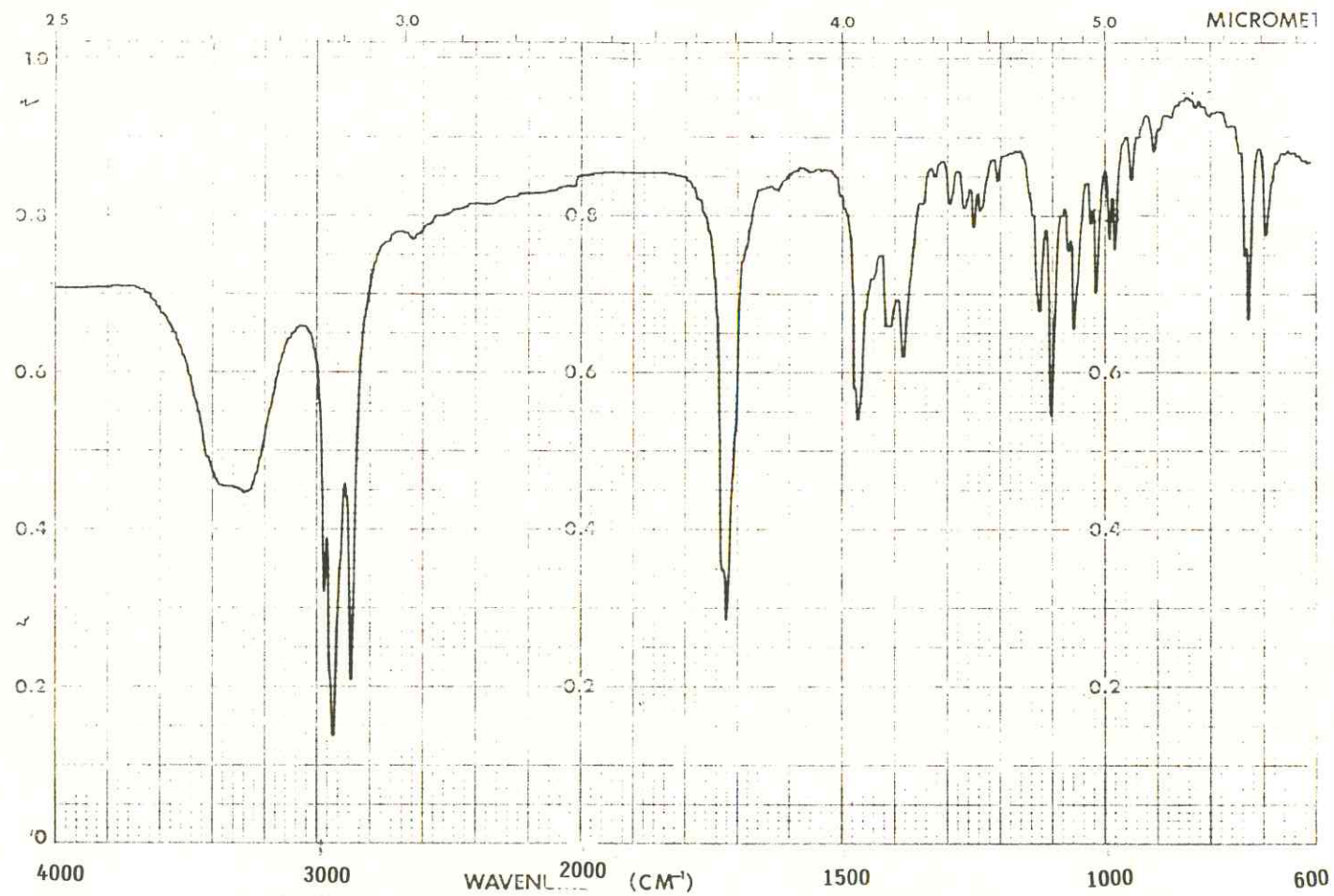


Figura 9 - Espectro no I.V. de RD1-FA

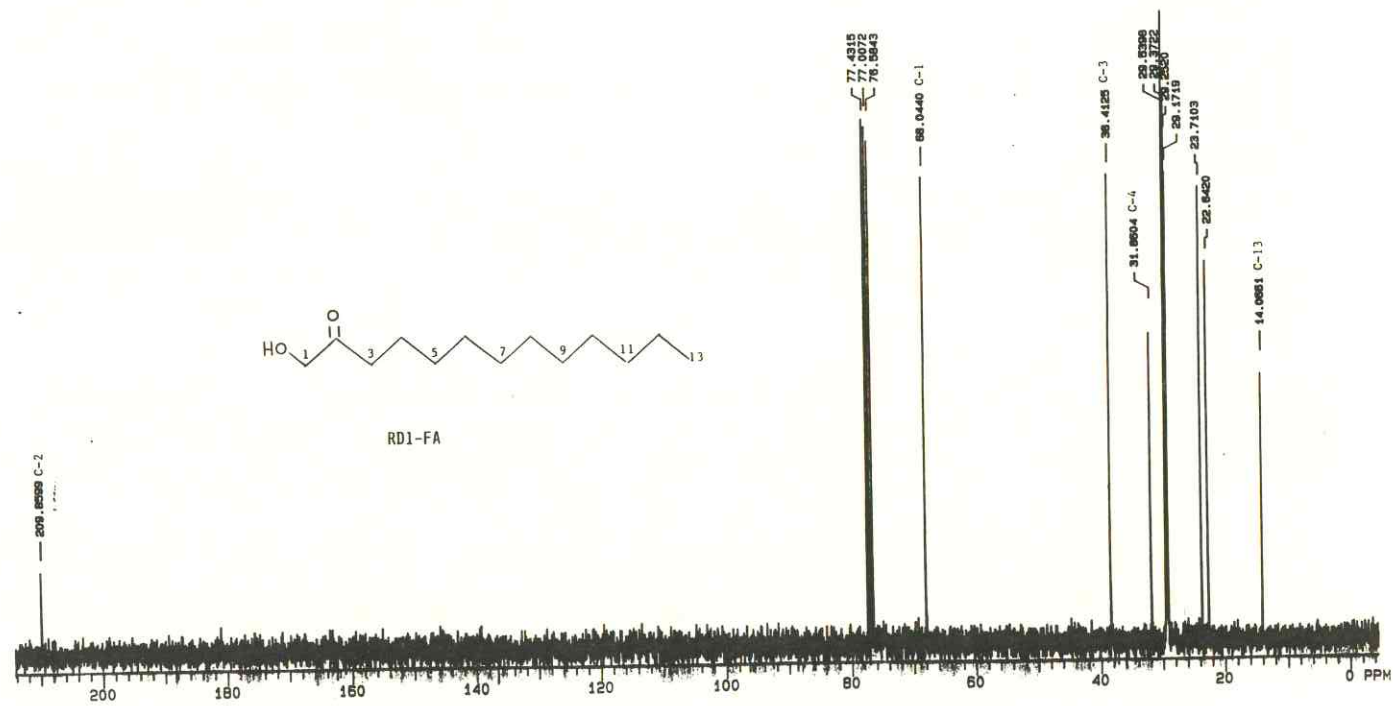


Figura 10 - Espectro de RMN¹³C de RD1-FA

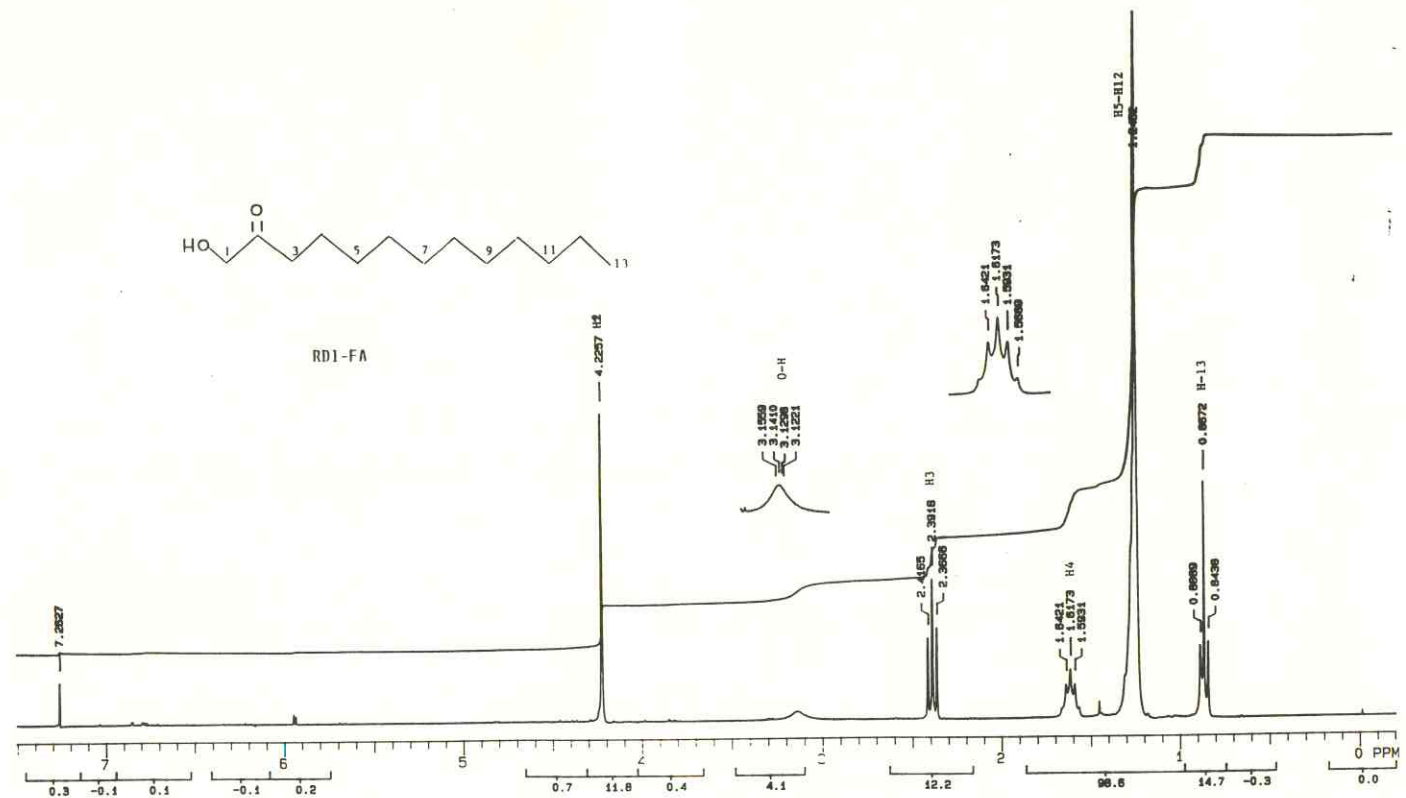


Figura 11 - Espectro de RMN¹H de RD1-FA

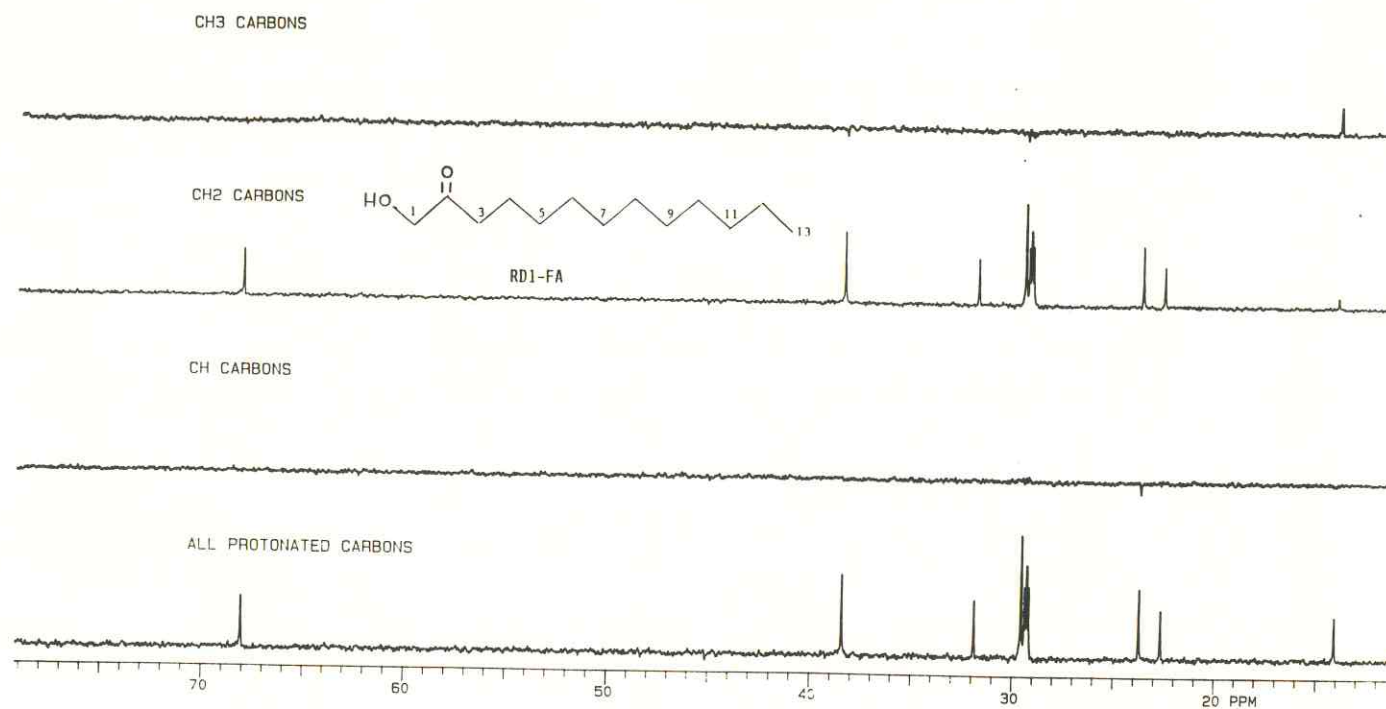


Figura 12 - Espectro de RMN¹³C (DEPT) de RD1-FA

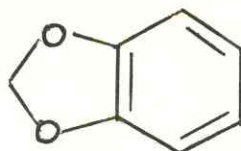
Determinação estrutural de RD1-FC

O resíduo da destilação fracionada do extrato oleoso obtido por extração com hexano a partir da casca das raízes de *Pilocarpus trachyllophus*, após ser cromatografado em coluna sobre gel de sílica forneceu um sólido denominado RD1-FC que se mostrou homogêneo em CCD, apresentou ponto de fusão de 117-119°C e rotação específica $[\alpha]_D = -110 (C 6.8; CHCl_3)$.

O espectro de massa desta substância forneceu o pico do íon molecular com $M/z=354$ daltons (fig.13) compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_6$. O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (PND, fig.14), apresentou dezenove sinais sendo o sinal em 108.05 δ , em virtude de sua intensidade, provavelmente correspondente a dois átomos de carbonos. Pela análise do espectro de RMN ^{13}C utilizando a técnica DEPT, (fig.15) foi confirmado o número de hidrogênios da fórmula molecular proposta e notada a ausência de seis sinais presentes no espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (132.19 δ , 135.06 δ , 146.48 δ , 147.48 δ , 147.55 δ , 147.87 δ). Estes sinais correspondem a carbonos não protonados pertencentes possivelmente a um anel aromático sendo oxigenados os quatro mais desprotegidos.

Devido ao fato do espectro ainda conter mais seis sinais correspondentes a carbonos monoprotonados também na região de prótons aromáticos, concluiu-se que RD1-FC contém dois anéis aromáticos trissubstituídos.

A presença dos dois sinais em 100.89 δ e 100.96 δ correspondentes a dois CH₂ nos induz a acreditar que a molécula em estudo contém dois grupos metilenodióxidos ligados a anel aromático. (estrutura parcial 1)



ESTRUTURA PARCIAL I

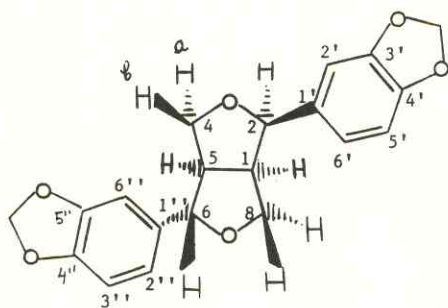
A presença dos grupos metilenodióxido é confirmada no espectro de RMN ¹H (fig.16) pela presença de dois singletos em 5.95 δ e 5.93 δ com integração para dois prótons cada. E também pela forte banda em 1245 cm⁻¹ no espectro de absorção na região do infravermelho (fig.17).

O número de insaturações para a molécula, deduzido pela fórmula molecular proposta, é doze. Aceitando-se a evidência de que a molécula contém dois grupos fenilmetilenodióxido, restariam apenas duas insaturações. Como não há evidência nos espectros analisados da presença de carbonilas nem de duplas ligações não aromáticas, sugere-se que as duas insaturações sejam devido a dois anéis. Os anéis seriam formados por dois átomos de oxigênios e seis átomos de carbonos. Nenhuma banda de absorção característica de hidroxila foi observada no espectro de absorção na região do

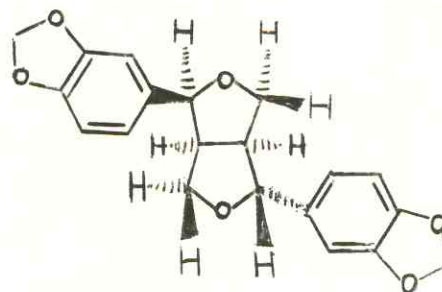
infravermelho e nem a presença de qualquer metila no espectro de RMN ^{13}C , quando se utilizou a técnica DEPT. A presença de dois CH não oxigenados (50.07 δ e 54.06 δ), dois CH e dois CH_2 ambos oxigenados (69.57 δ , 70.83 δ) e (81.93 δ , 87.55 δ) sugeriu que a molécula deveria conter um sistema de dois anéis tetrahidrofurânicos condensados, do tipo 3,7-dioxabiccliclo[3.3.0]octano ligados aos dois grupos fenilmetilenodióxidos muito comuns na química de lignanas.

Comparações dos dados físicos e espectrais de RD1-FC com os dados de outras lignanas existentes na literatura¹⁷ revelou a semelhança de todos os dados de RD1-FC(XII) com os de Episesamim(XIII), exceto o sinal da rotação específica (ver tabelas 4, 5 e 6)

A análise dos espectros de RMN bidimensional utilizando as técnicas COSY (fig.18) e HETCOR (fig.19) estão de acordo com a proposição estrutural requerida para RD1-FC como (-)episesamim comum nos gênero *Zantoxylum* e pela primeira vez registrada na química do gênero *Pilocarpus*.



XII



XIII

TABELA 4

Tabela 4 - Ponto de fusão e rotação
específica de RD1-FC e Episesamim

Substância	Pf °C	$[\alpha]_D^{25}$
RD1-FC	115-119	-110
Episesamim	121-122	+120

TABELA 5

Tabela 5 - Dados comparativos dos espectros
de RMN ^1H de RD1-FC e Episesamim¹⁷

Nº do próton	Episesamim	RD1-FC
H1	3.32	3.29
H2	4.76 (J=5Hz)	4.82(5.4Hz)
H4a	4.09 (J=10 e 1Hz)	4.09(9.3Hz)
H4b	3.80 (J=10 e 6Hz)	3.82
H5	2.87	2.85
H6	4.36 (J=7Hz)	4.40(7.2Hz)
H8a	3.29	3.29
H8b	3.80	3.80

TABELA 6

Tabela 6 - Comparação dos dados dos espectros de
RMN ^{13}C de Episesamim e RD1-FC

Nº do carbono	Episesamim	RD1-FC
5	54.76	54.56
1	50.26	50.07
4	71.04	70.83
8	69.70	69.57
6	87.71	87.55
2	82.11	81.93
1'	135.63	135.06
1''	132.65	139.19
3'	146.84	146.48
3''	147.44	147.12
4'	147.94	147.55
4''	148.24	147.87
2'	106.61	106.32
2''	106.71	106.47
5'	108.26	108.05
5''	108.26	108.05
6'	118.89	118.60
6''	119.65	119.49
-OCH ₂ O-	101.14	100.89
-OCH ₂ O-	101.14	100.96

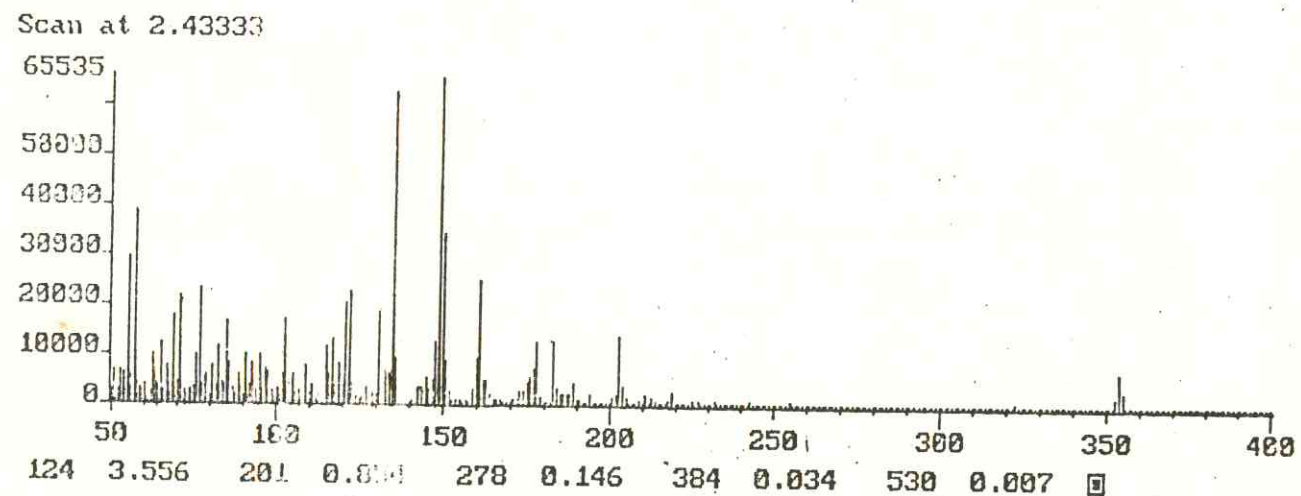


Figura 13 - Espectro de Massa de RD1-FC

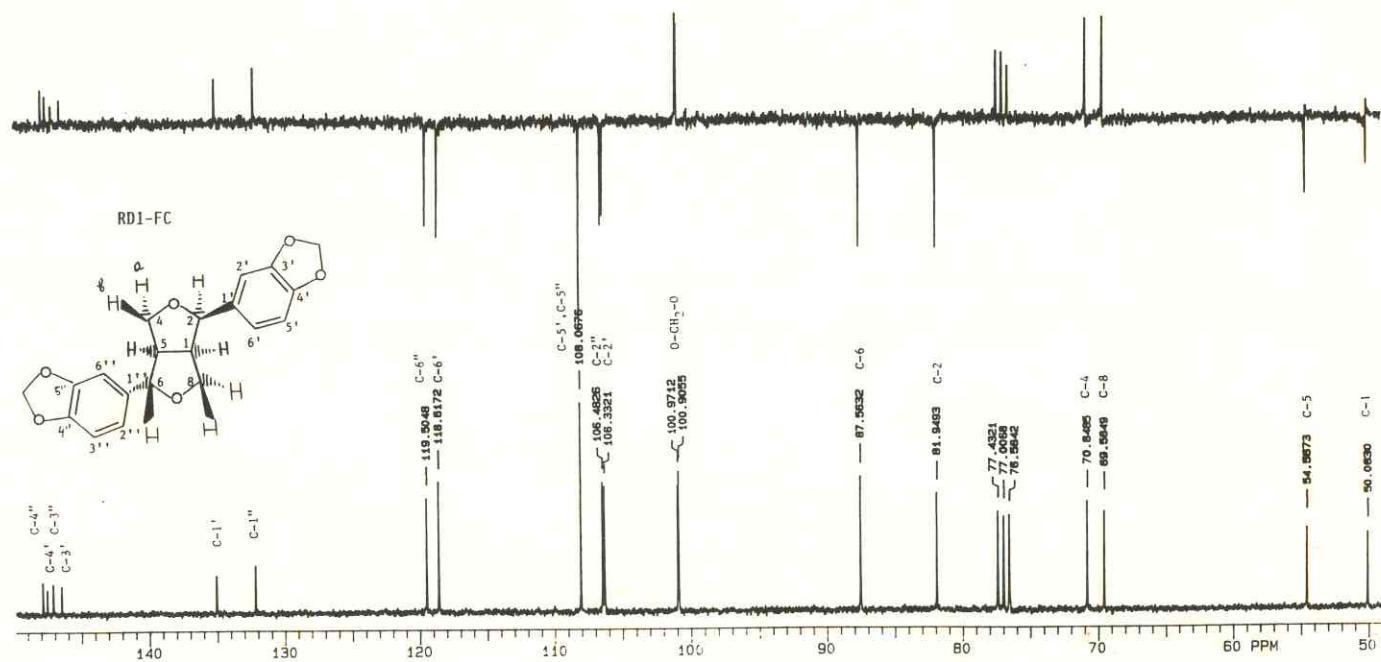


Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C (PND-APT) de RD1-FC

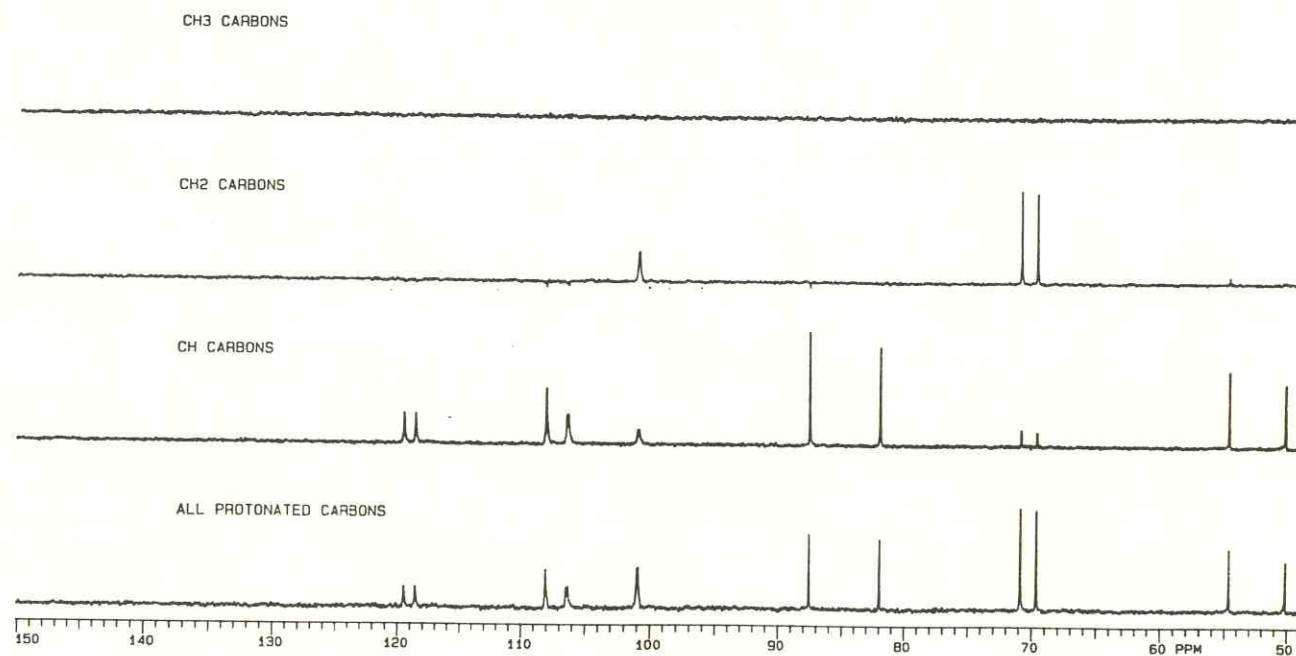


Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) de RD1-FC

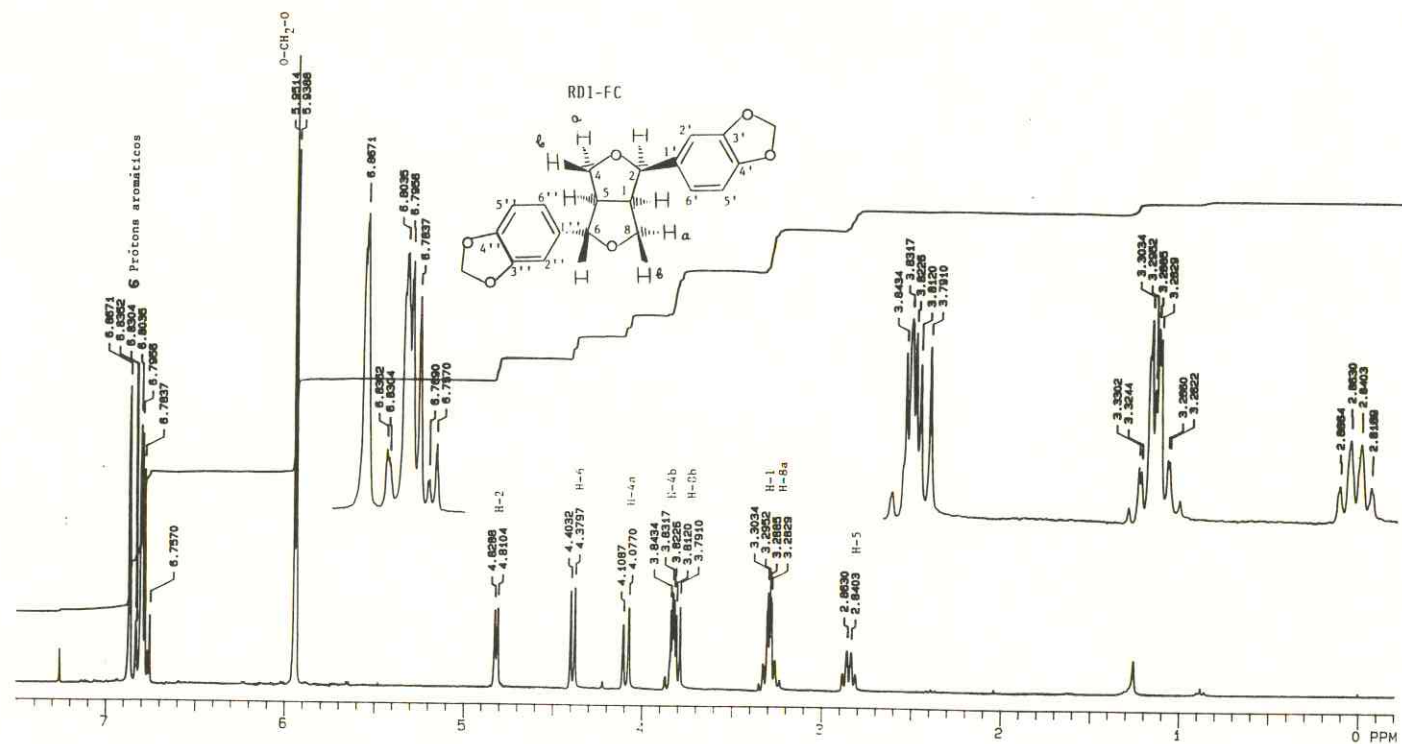


Figura 16 - Espectro de RMN¹H de RD1-FC

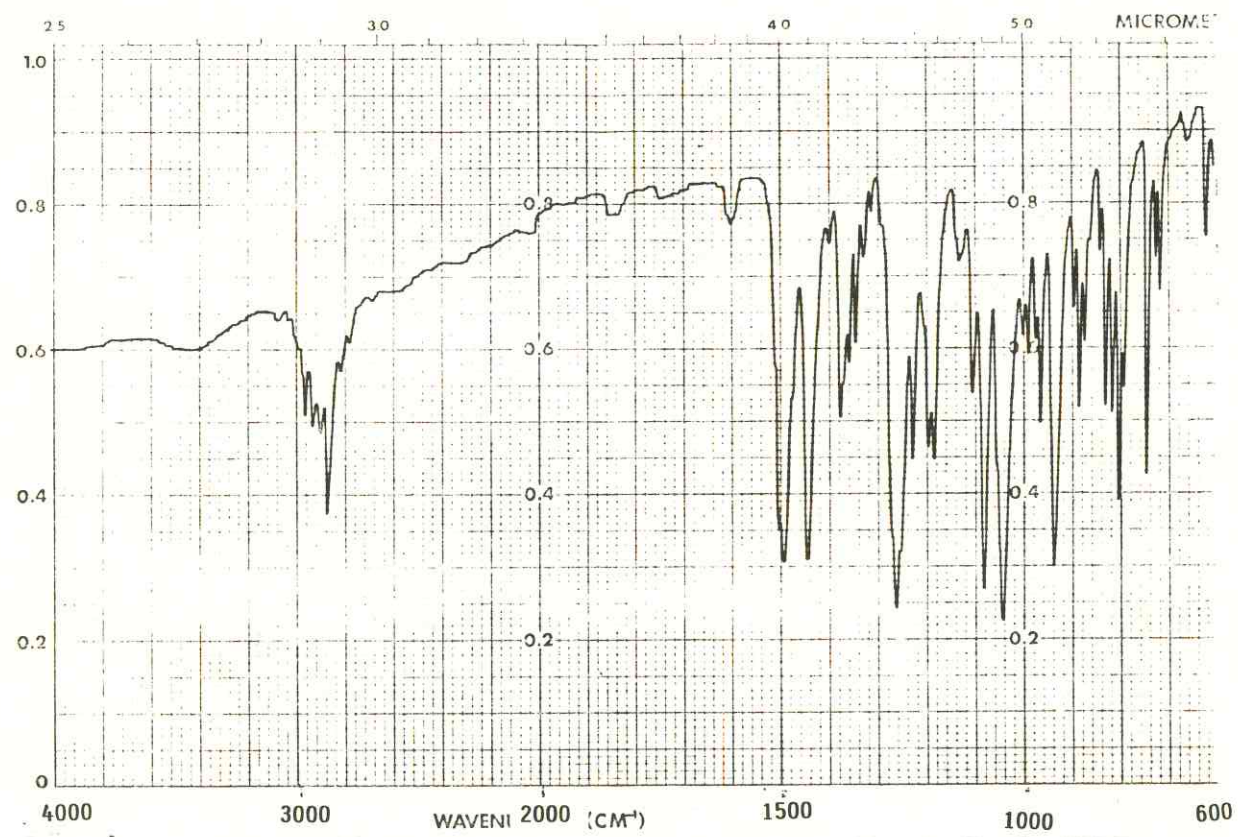


Figura 17 - Espectro no I.V. de RD1-FC

RD1-FC
 EXP4 PULSE SEQUENCE: COSY
 DATE 01-30-89
 SOLVENT CDCL3
 FILE COSY

COSY PULSE SEQUENCE
 OBSERVE PROTON
 FREQUENCY 299.943 MHz
 1D SPECTRAL WIDTH (F2) 1776.8 HZ
 2D SPECTRAL WIDTH (F1) 1776.8 HZ
 ACQ. TIME 0.289 SEC
 RELAXATION DELAY 1.0 SEC
 PULSE WIDTH 90 DEGREES
 FIRST PULSE 90 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 4
 NO. INCREMENTS 256
 DATA PROCESSING
 PSEUDO-ECHO SHAPED
 FT SIZE 1K X 1K
 TOTAL TIME 34.8 MINUTE

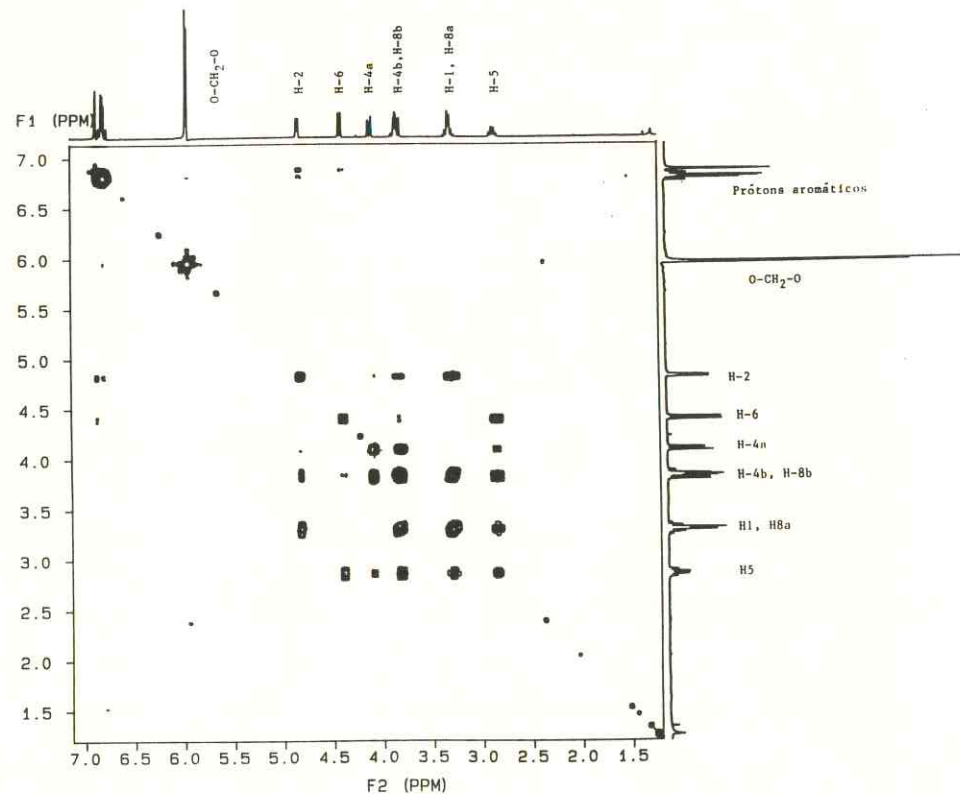
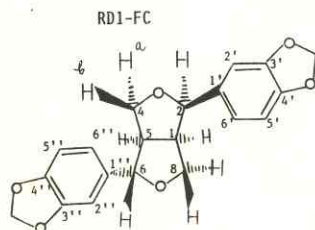


Figura 18 - Espectro de Correlação Homonuclear de RD1-FC

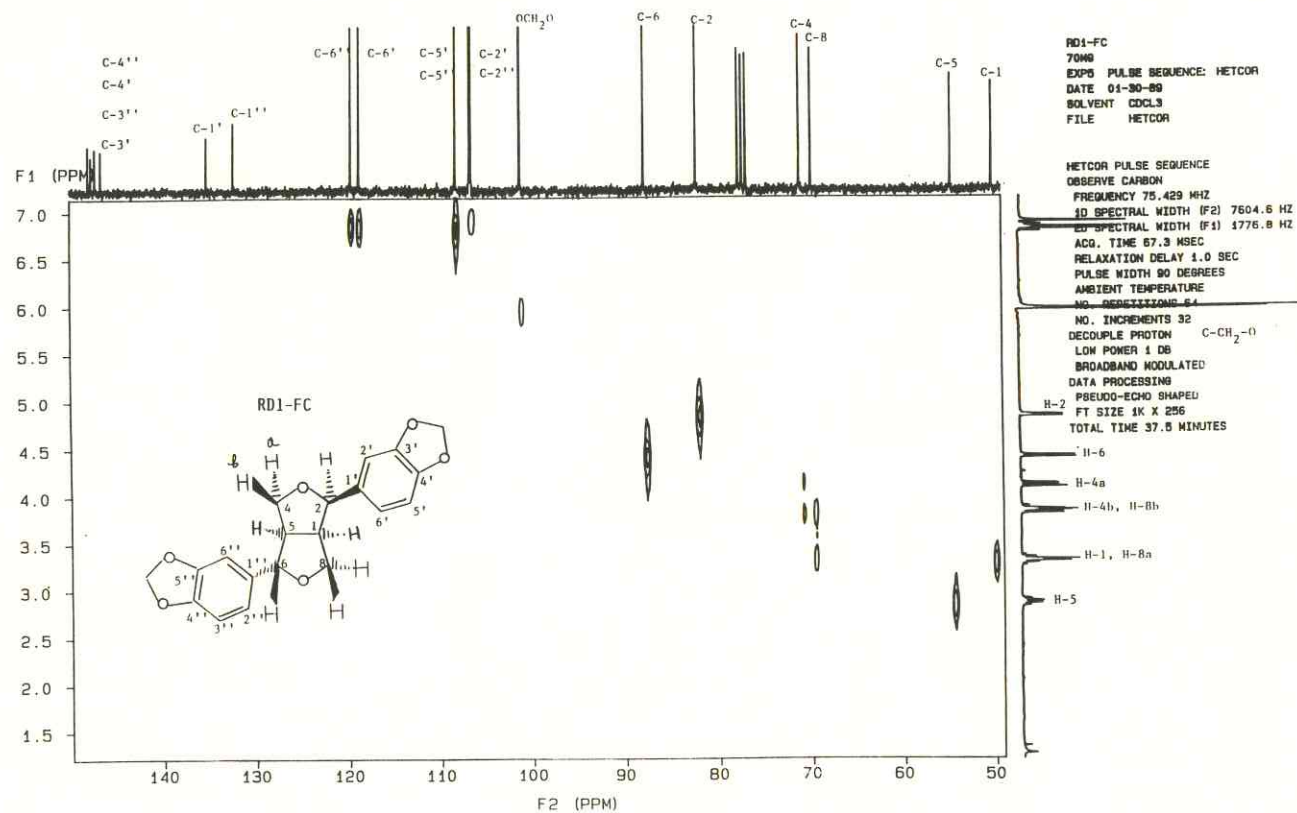
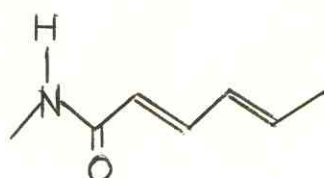


Figura 19 - Espectro de Correlação Heteronuclear de RD1-FC

Determinação estrutural de RD1-FD

A substância RD1-FD, $P_f=82-86^\circ\text{C}$, apresentou-se como cristais aciculares incolores e homogêneo em CCD. O espectro de massa forneceu o pico do íon molecular com $m/z=223$ daltons, (fig.20) sugerindo a presença do nitrogênio na sua composição. O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (PND, fig.21) apresentou treze sinais, sendo o sinal em 28.58δ , em virtude da sua intensidade, possivelmente correspondente a dois carbonos sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}$ concordante com o espectro de massa. O espectro de RMN ^{13}C utilizando a técnica APT (fig.21) apresenta: sete linhas de amplitude negativa correspondente a três metilas (20.08δ , 20.08δ , 13.94δ), um metino (28.58δ) e quatro C-H insaturados (121.81δ , 143.02δ , 128.19δ e 141.13δ); apresenta também seis linhas de amplitude positiva correspondente a cinco grupos metilênicos (46.90δ , 28.44δ , 32.85δ , 28.58δ , 22.41δ) e há apenas um carbono não hidrogenado relacionado com a presença de uma carbonila de amida insaturada, evidenciada pela absorção intensa no espectro da região do infravermelho (fig.22) em 1630cm^{-1} e pelas absorções mais fracas em 1660 e 1550cm^{-1} correspondentes ao estiramento $\text{C}=\text{C}$. Verificou-se a presença de vinte cinco prótons na molécula, através da integração dos picos registrados no espectros de RMN ^1H (fig.23) onde se observa um pico largo em 5.74δ provavelmente correspondente a um próton N-H de amida. A presença de um dubleto em 5.22δ (15Hz) e um duplo dubleto em 7.17δ (9.8 e 15Hz), ambos referentes a um próton cada, mais um

multiplete na região de 5.92-6.16 δ , referente a dois prótons sugeriu um sistema de duas duplas ligações trans substituídas em conjugação com uma carbonila (estrutura parcial II) o que foi confirmado pelos sinais nos espectros de RMN ^{13}C (PND fig.21) em 121.81 δ , 143.02 δ , 128.19 δ e 141.13 δ referentes a carbonos insaturados pertencentes às duplas ligações dissustituídas.



- ESTRUTURA PARCIAL II

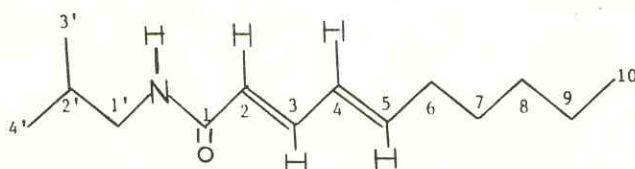
O dublete em 0.90 δ com integração para seis prótons indicou a presença na molécula de um grupamento isopropila, assim como um noneto em 1.78 δ (1H) correspondente ao próton que acopla com os dois metilas do isopropila. Um grupo metileno em 3,14 δ absorve como um triplete devido ao acoplamento simultâneo com o próton do grupo isopropila e o próton ligado ao nitrogênio, com o mesmo valor da constante de acoplamento. Isto já havia sido observado para outras isobutilamidas registradas na literatura¹⁸.

No espectro de massa, o pico base (fragmento V) apresenta uma relação de massa sobre carga $m/z=151$ (100%) o que corresponde à perda de um radical isobutilamínico e um outro (fragmento III), com $M/z=166$ (9%) referente a perda de um radical N-butila. O quadro 1 resume o padrão de fragmentação de RD1-FD no espectrômetro de massa. Correlação dos dados

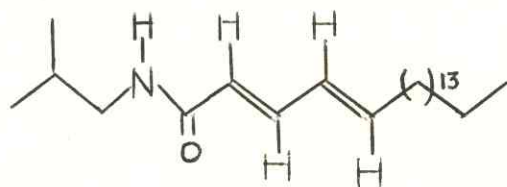
espectrais até aqui discutidos permite sugerir que a substância em análise, contém em sua molécula: um grupamento isobutilamínico, um sistema trans-trans de duas duplas ligações conjugadas com uma carbonila e um grupamento n-pentila.

Comparações dos dados espectrais com uma outra isobutilamida(XIV) encontrada na literatura¹⁸ possibilitou concluir que RD1-FD é a N-isobutil-(2-trans-4-trans)-decadienamida(XV).(ver Tabela 7).

Desde que a presença do grupo isobutil ligado ao nitrogênio é inequívoca, a comprovação da estrutura final para RD1-FD foi realizada através do experimento INADEQUATE bidimensional(fig.24) para determinação da conectividade carbono-carbono da parte saturada da cadeia principal(Tabela 8)



XV



XIV

TABELA 7

Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN ^1H de RD1-FD e X1118

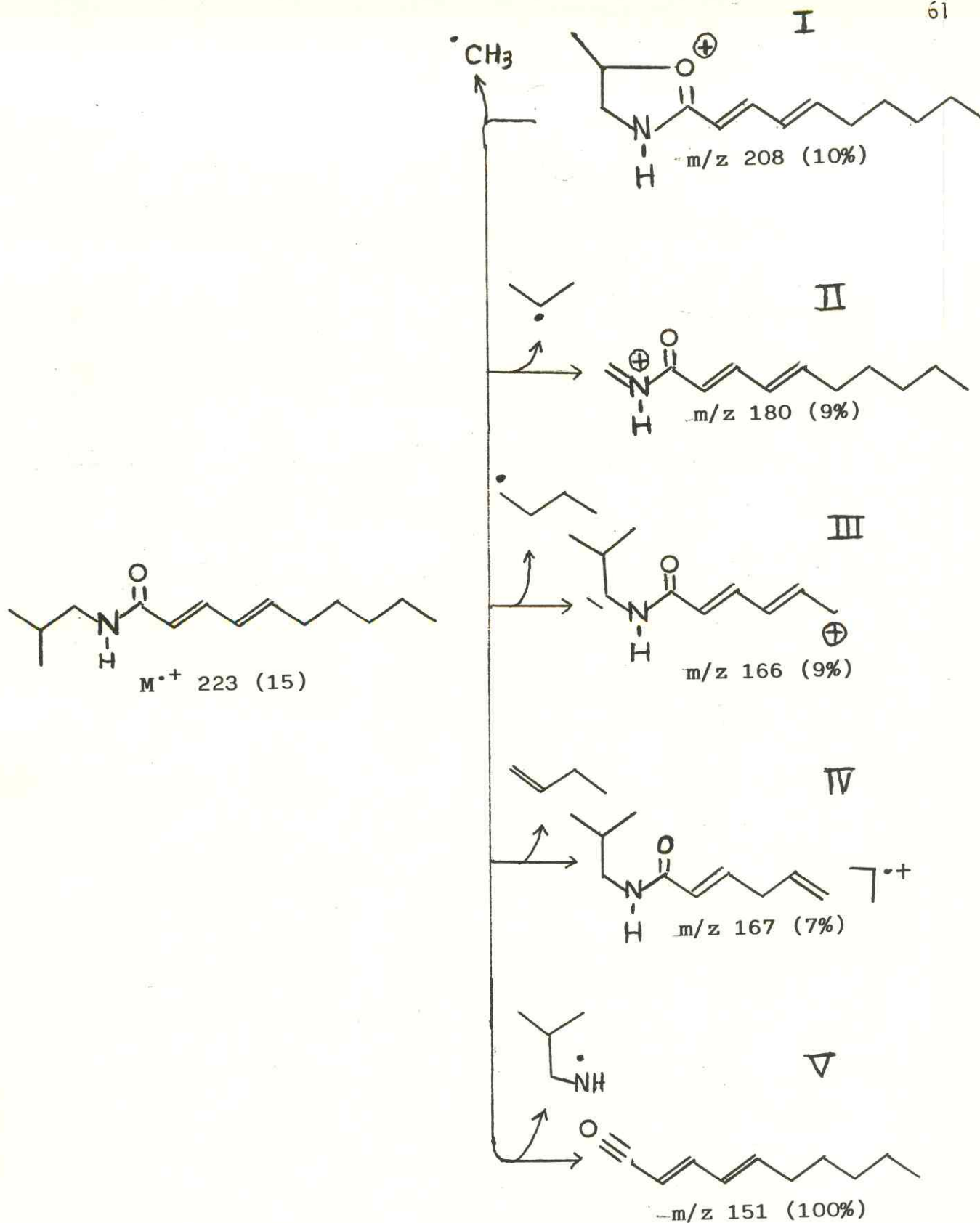
Número do próton	RD1-FD	X11
2	5.77(d)	5.69-6.20(m)
3	7.17(dd)	7.02-7.32(m)
4	6.6-5.92(m)	"
5	"	"
6	2.12(d)	
7	1.40(qui)	
8	1.30-1.24(m)	
10	0.87(t)	0.87(t)
1'	3.14(t)	3.12(t)
2'	1.78(m)	1.54(m)
3'	0.9(d)	0.93(d)
4'	0.9(d)	0.93(d)

TABELA 8

Tabela 8 - Dados do espectro de conectividade carbono-carbono da parte alifática de RD1-FD(fig.24)

Nº do carbono	RMN 13C (DEPT)	conect.carbono-carbono
1	166.41(OH)	
3	143.02(1H)	
5	141.13(1H)	
4	128.19(1H)	
2	121.81(1H)	
1'	46.90(2H)	2'
6	32.85(2H)	7 e 5 não observado
8	31.31(2H)	7 e 9
2'	28.58(2H)	1',3' e 4'
7	28.44(2H)	6 e 8
9	22.41(2H)	8 e 10
3'	20.08(3H)	2'
4'	20.08(3H)	2'
10	13.94(3H)	9

Levantamento bibliográfico revelou a inexistência de compostos desta natureza em plantas do gênero *Pilocarpus*. Apesar de muito comum para o gênero *Piper*, este é o primeiro relato da presença desta substância na química do gênero *Pilocarpus* e, portanto, na espécie estudada.



Quadro 1 - Possíveis caminhos de fragmentação para RD1-FD no espectrômetro de massa.

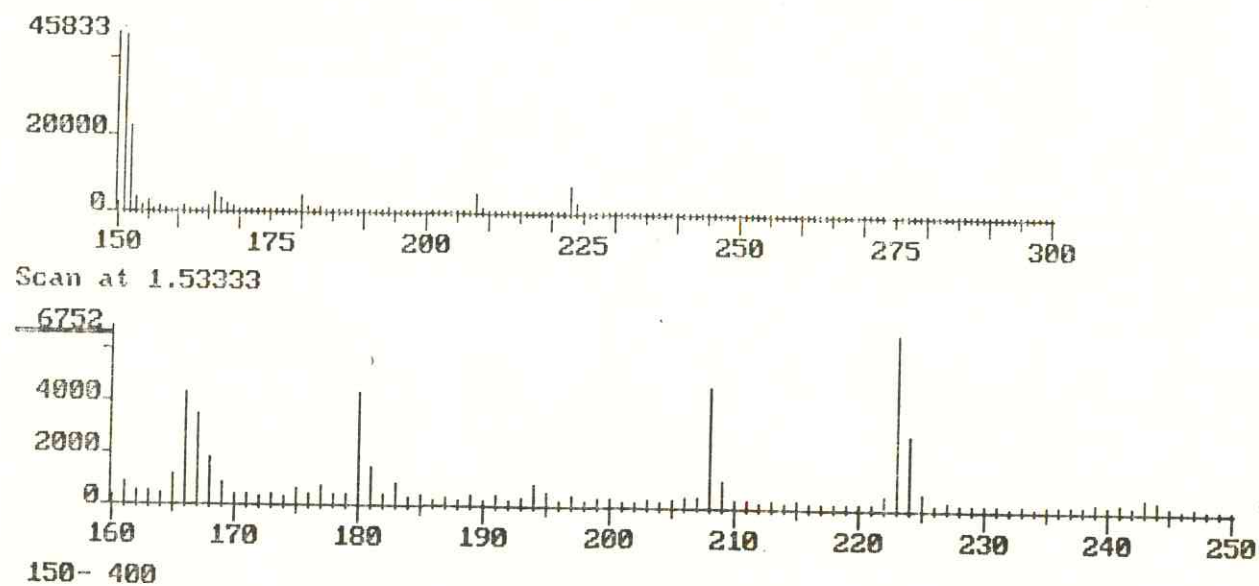


Figura 20 - Espectro de massa RD1-FD

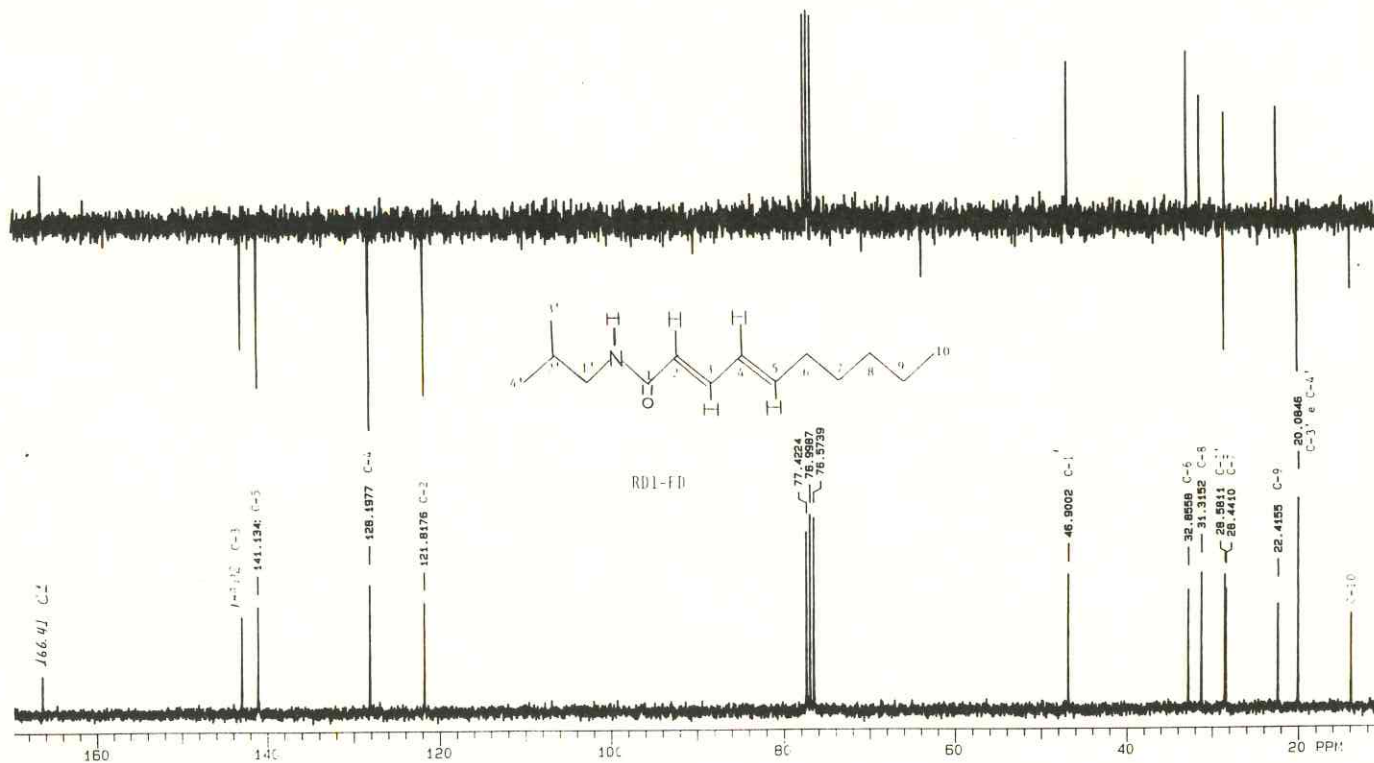


Figura 21 - Espectro de RMN¹³C (PND-APT) de RD1-FD

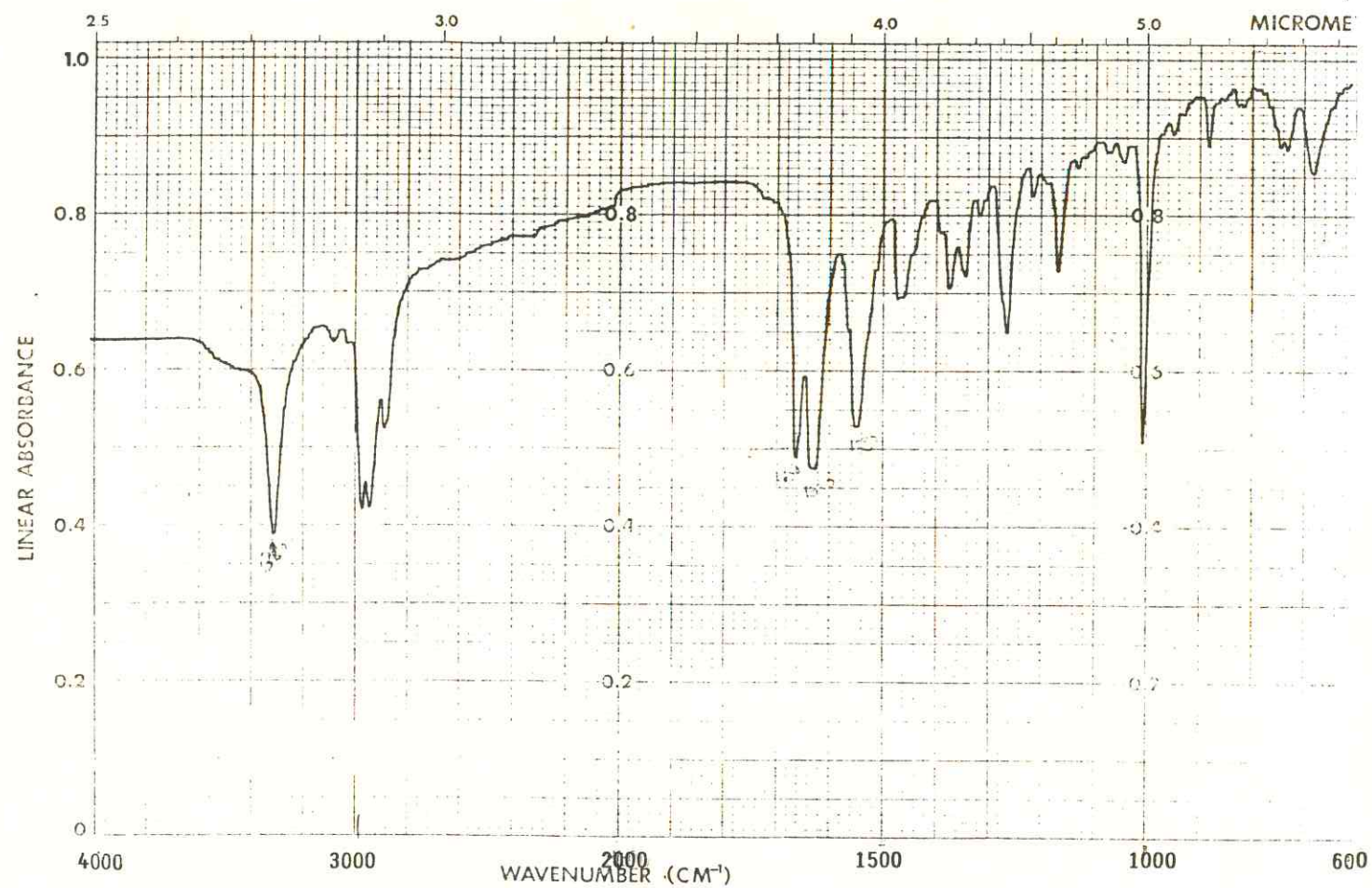


Figura 22 - Espectro no I.V. de RD1-FD

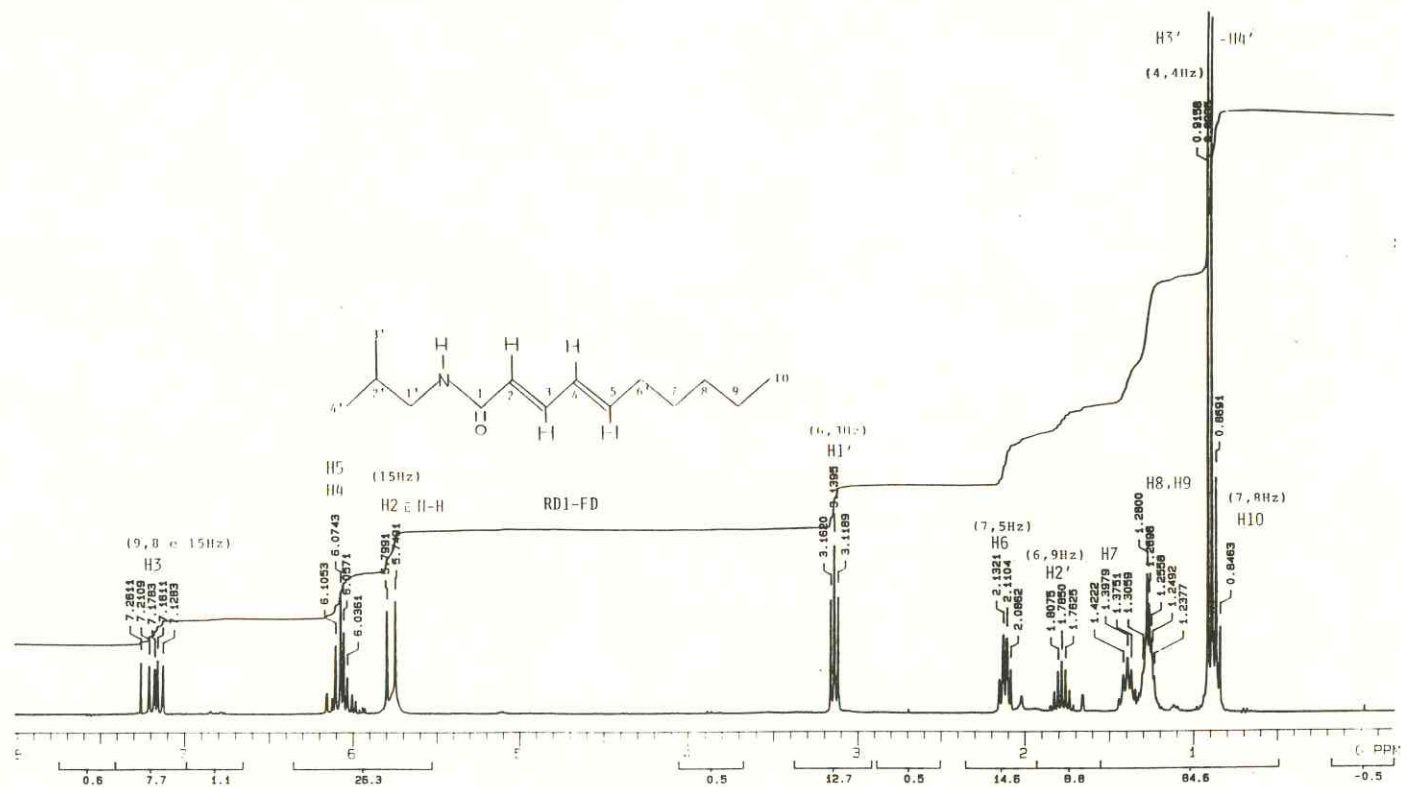


Figura 23 - Espectro de RMN¹H de RD1-FD

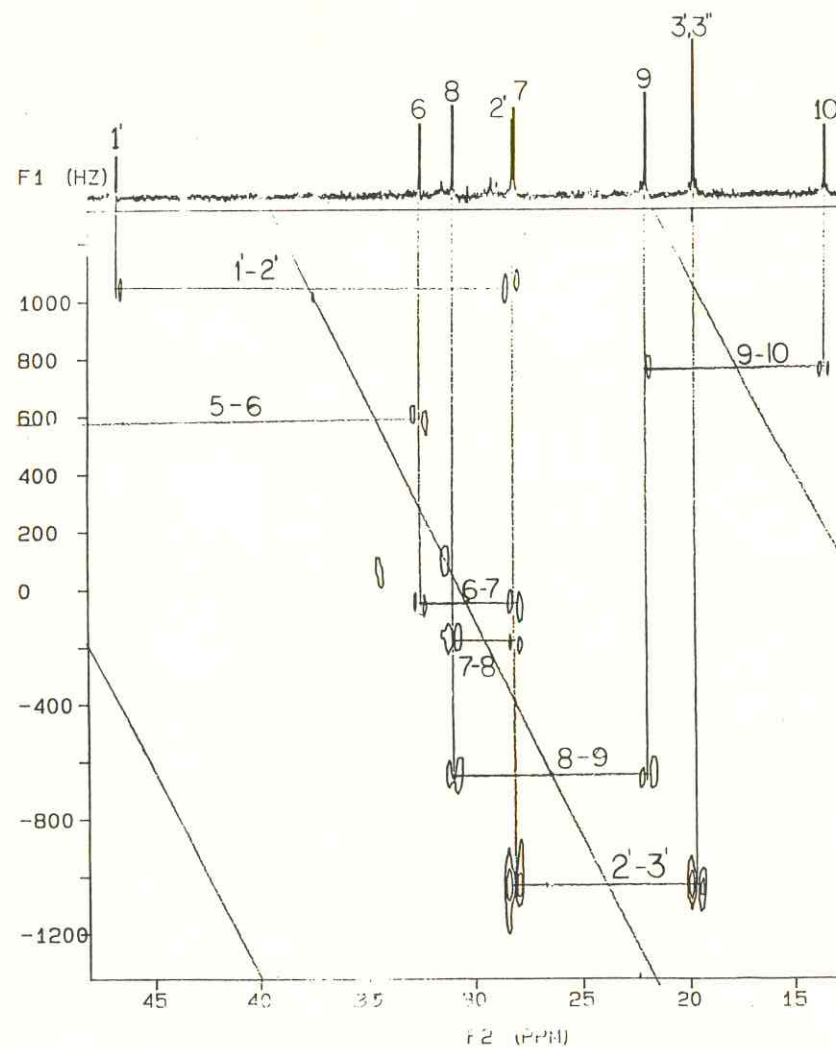


Figura 24 - Espectro de Conectividade Carbono-
Carbono de RD1-FD

Considerações sobre PT(RC)E-BN

Do extrato etanólico das cascas das raízes de *Pilocarpus trachyllophus*, foram extraídas por marcha química as bases totais que receberam a denominação de PT(RC)E-B. Destas bases alcalóidicas após dissolução em etanol e adição de ácido nítrico concentrado foi obtida uma mistura de sais de nitratos de alcalóides denominada PT(RC)E-BN que após recristalização apresentou ponto de fusão entre 159 e 161°C. Devido a pequena diferença entre a temperatura inicial e final da amostra e sua homogeneidade quando analisada em CCD pensou-se tratar-se de uma substância homogênea. No entanto a análise dessa amostra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) coinjetando padrões de pilocarpina e de outros alcalóides já isolados de *Pilocarpus* esclareceu que se tratava de uma mistura de pilocarpina e uma outra substância, diferente de todos os padrões utilizados pela comparação dos tempos de retenção expostos no cromatograma (fig.25).

Em virtude da falta de espectros de RMN ^1H e ^{13}C do nitrato de pilocarpina, não foi possível realizar-se a comparação dos dados espectrométricos. No entanto na comparação dos dados espectrométricos de cloridrato de pilocarpina observou-se uma analogia completa entre os dados de RMN ^{13}C das duas substâncias (figuras 26 e 27) que leva a suposição de que PT(RC)E-BN é uma mistura de pilocarpina e um de seus enantiômeros.

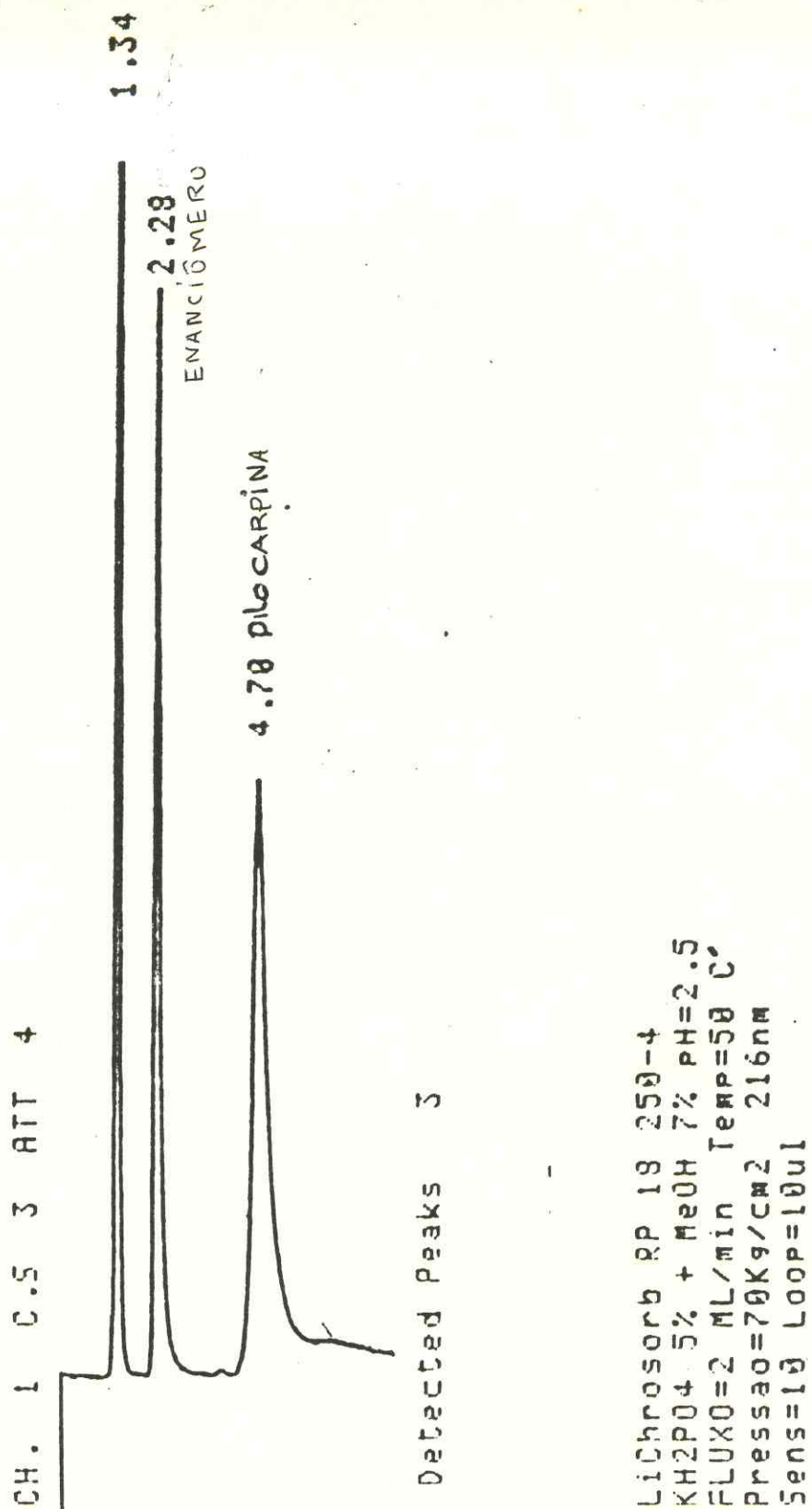


Figura 25- Cromatograma (CLAE) de PT(RC)E-BN

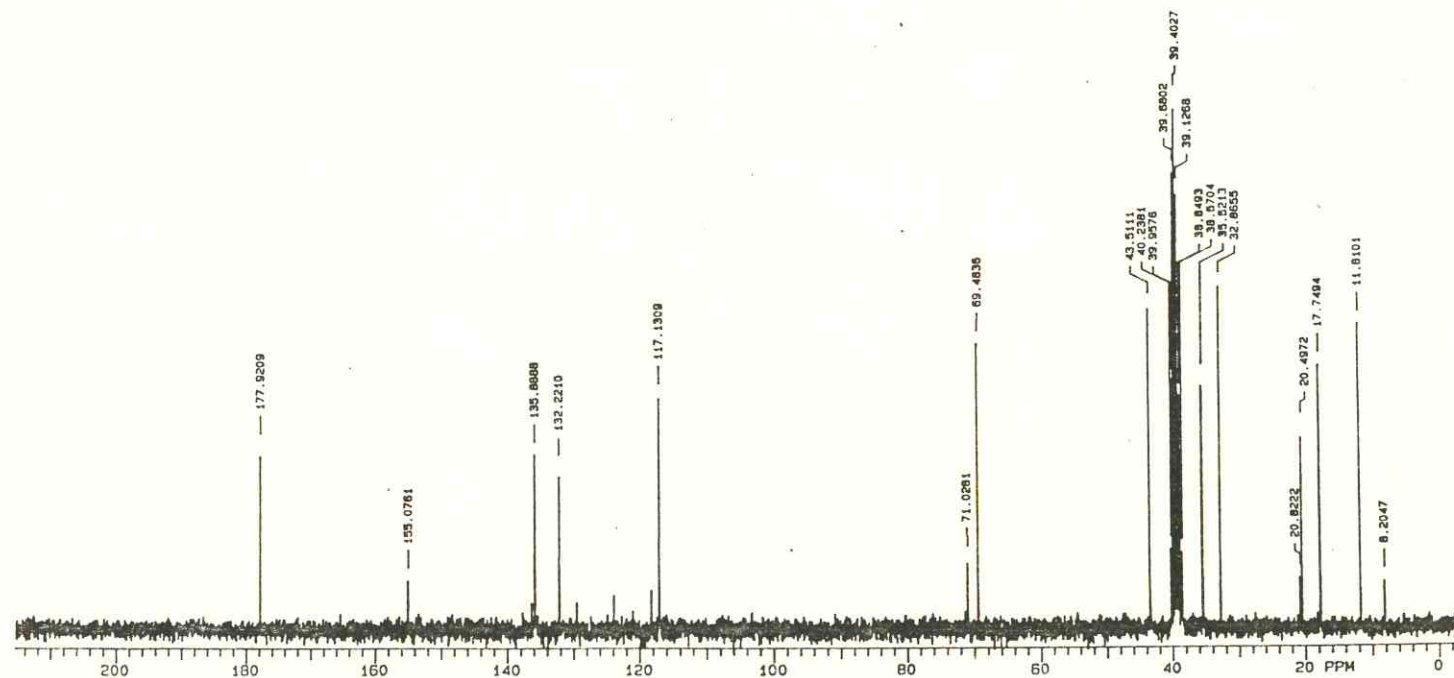


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C de PT(RC)E-BN

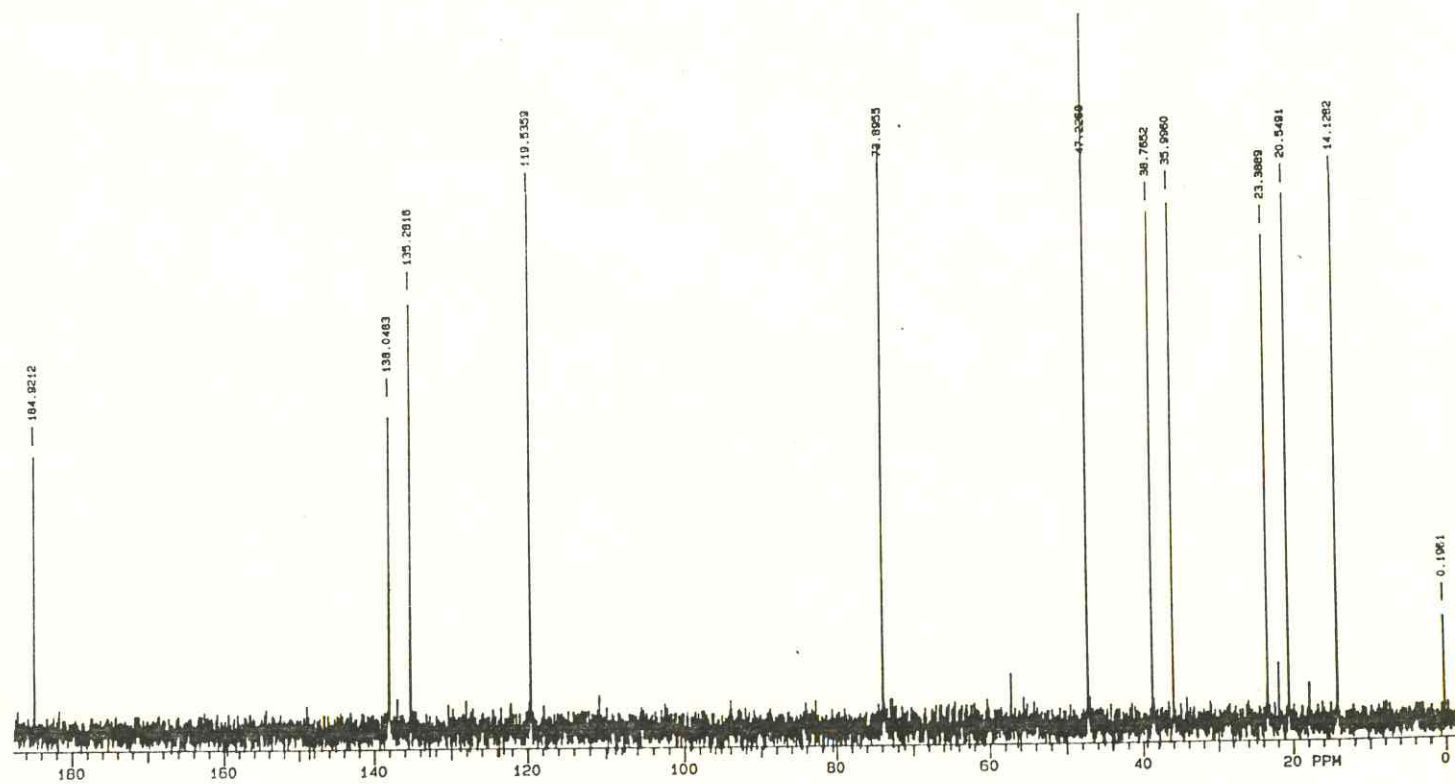
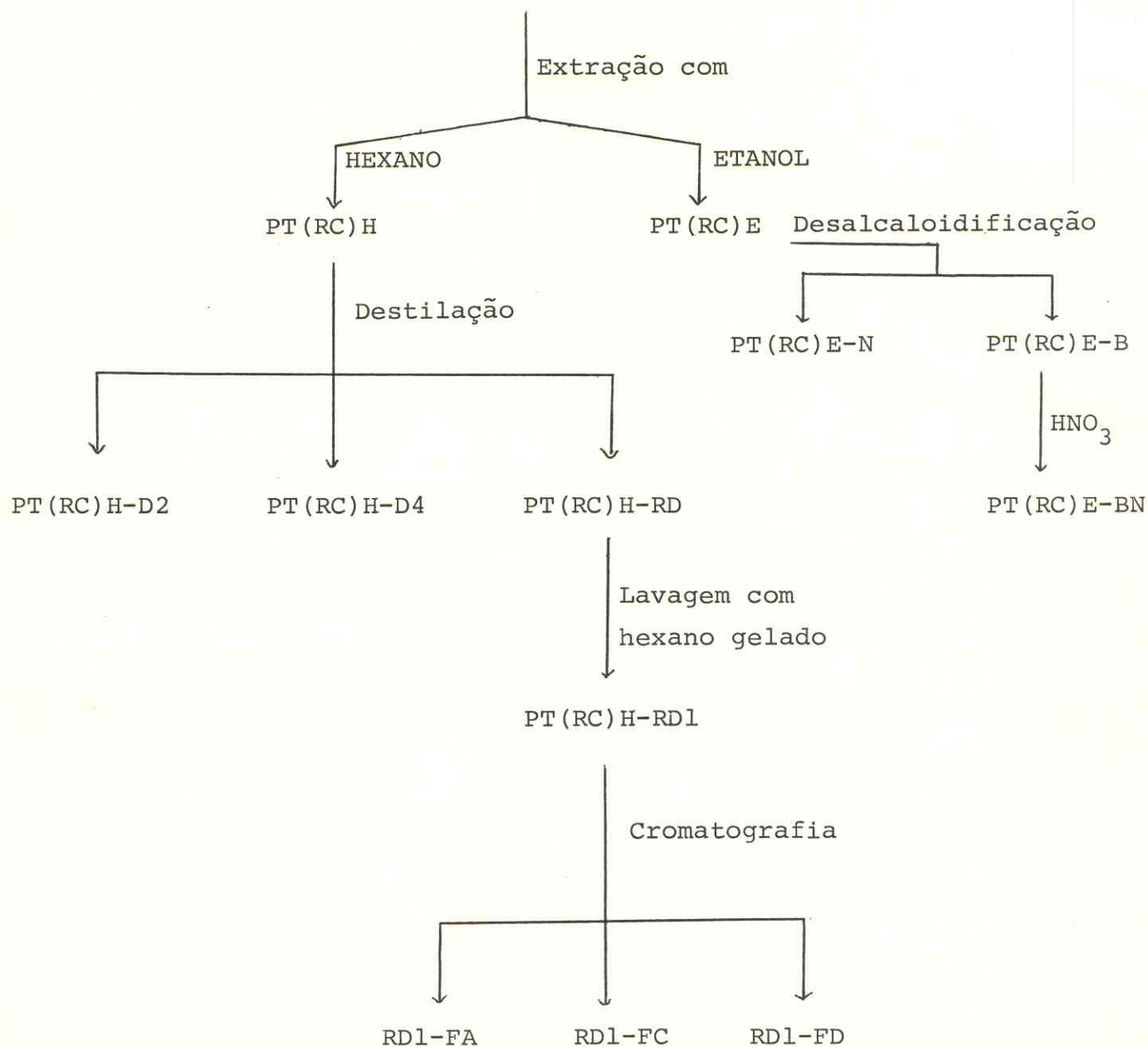


Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C de Cloridrato de Pilocarpina

PILOCARPUS TRACHYLLOPHUS

(CASCA DAS RAÍZES)

Esquema 2 - Esquema de isolamento das substâncias de P. Trachyllophus

4.0 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Pilocarpus spicatus*

Considerações sobre PSFE-NA e PSFE-NB1

O extrato etanólico das folhas de *Pilocarpus spicatus* foi desalcaloidificado e a parte neutra foi fracionada sobre gel de sílica eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Análise cromatográfica da fração hexânica forneceu dentre as frações menos polares um sólido denominado PSFE-NA que após filtração em Buchner e sucessivas lavagens com hexano gelado mostrou-se homogênea em CCD com ponto de fusão de 270.8-271.6°C apresentando absorções em 1735 e 1270cm⁻¹ no espectro de absorção na região do infravermelho(fig.28), características de grupo éster. Dentre as frações mais polares um outro sólido denominado PSFE-NH6 foi obtido. Em CCD PSFE-NH6 apresentou-se como uma mistura de duas substâncias de Rf muito semelhantes dos quais um apresentava Rf idêntico ao Rf de PSFE-NA.O espectro de absorção na região do infravermelho de PSFE-NH6 apresentava duas absorções características de carbonila em 1700 e 1735cm⁻¹, das quais a 1735cm⁻¹ deveria estar relacionada com PSFE-NA.

Devido a impossibilidade de separação destas substâncias, mesmo após varias tentativas por cromatografia em coluna,PSFE-NH6 foi submetida à hidrólise alcalina. Análise do material hidrolisado por CCD revelou que apenas uma das

substâncias, a de maior R_f e idêntica à PSFE-NA havia sido modificada. A grande diferença de R_f entre as duas substâncias após a hidrólise permitiu a análise da referida mistura em coluna de gel de sílica fornecendo duas frações uniformes em CCD. A fração menos polar denominada PSFE-NB1 apresentou $P_f=211-214\pm C$ e absorções no IV em 1700cm^{-1} características de cetona(fig.29). A fração mais polar denominada PSFE-NB2, $P_f=248-251\pm C$ apresentou uma absorção no espectro de I.V. (fig.30) em 3400cm^{-1} característica de hidroxilas alcoólicas.

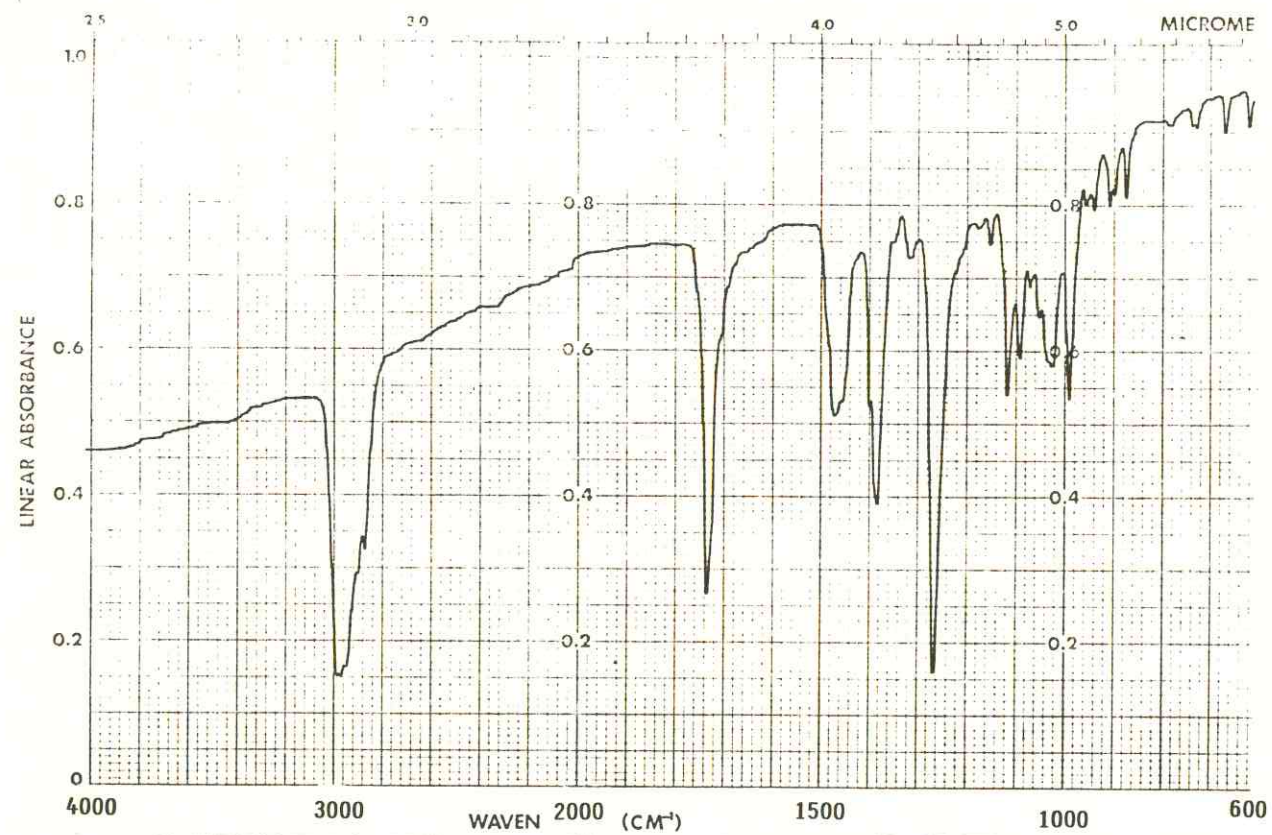


Figura 28 - Espectro no I.V de PSFE-NA

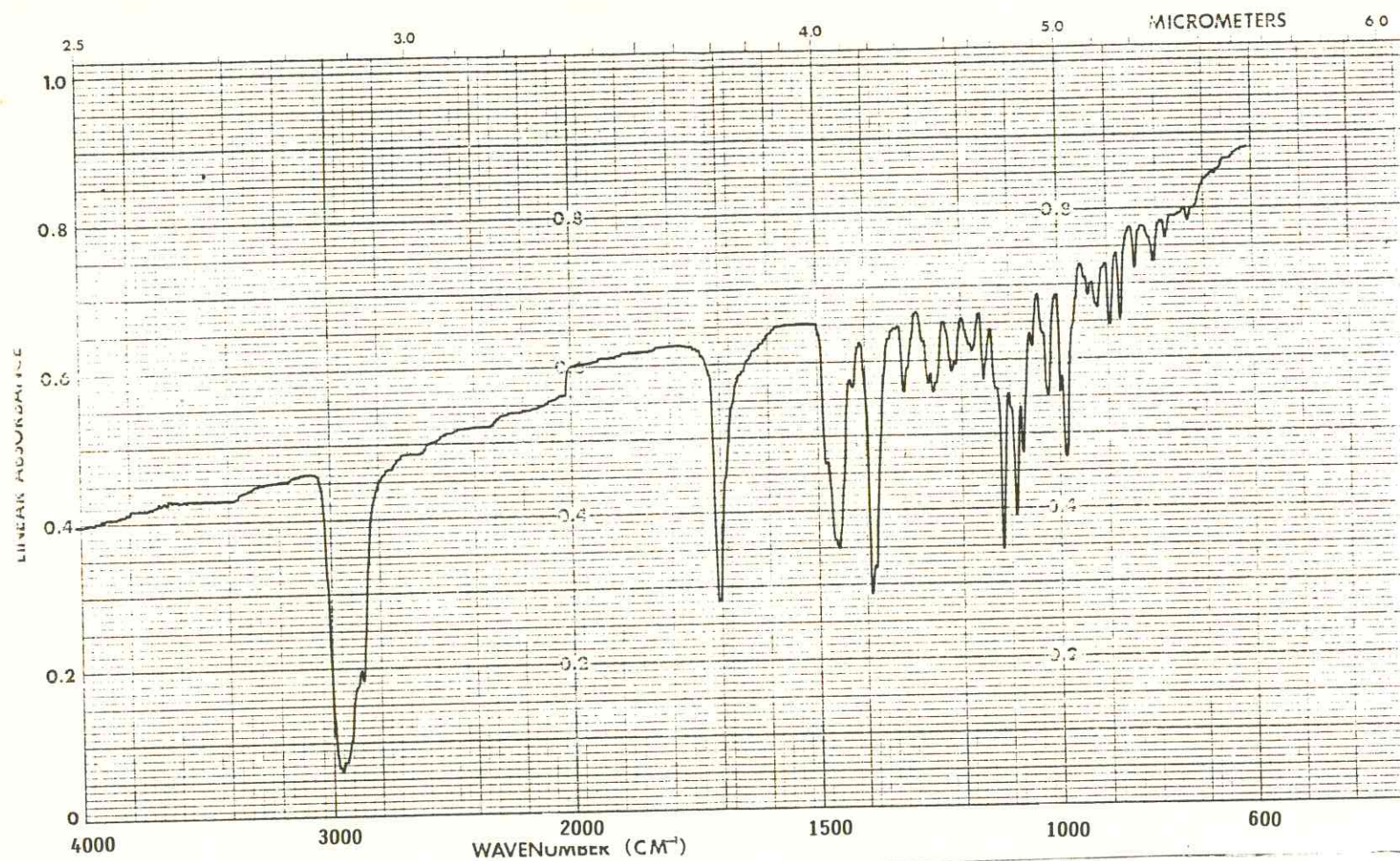


Figura 29 - Espectro no I.V. de PSFE-NB1

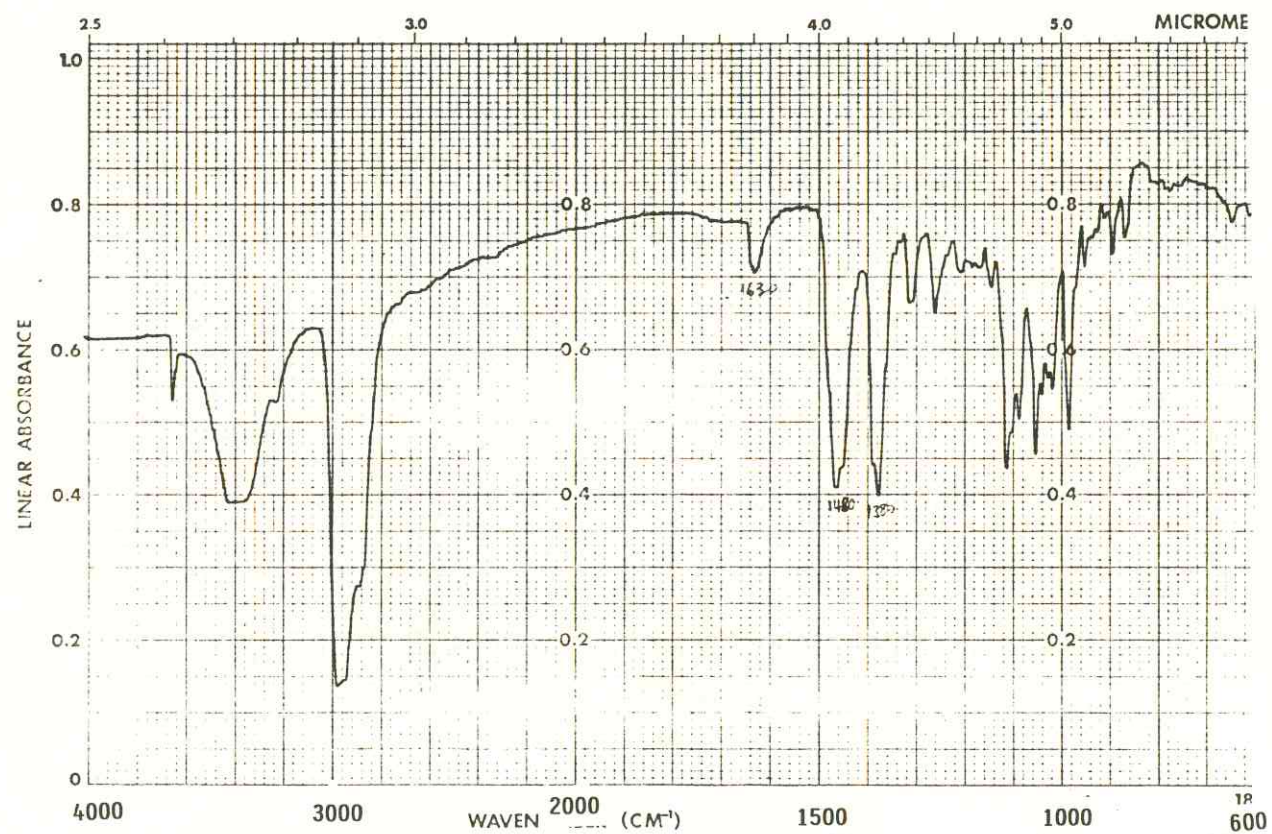


Figura 30 - Espectro no I.V. de PSFE-NB2

Determinação estrutural de PSFE-NB1

A substância denominada PSFE-NB1 forneceu o pico do íon molecular com razão massa sobre carga $m/z=484$ daltons(fig.31) sugerindo a fórmula molecular $C_{33}H_{56}O_2$ possuindo portanto seis lacunas de insaturação.

O espectro de RMN 1H de PSFE-NB1(fig.33) apresentou todas as absorções entre 0 e 2.5δ sugerindo um caráter alifático. Como foi dito anteriormente observou-se no espectro de I.V. a presença de uma absorção em $1700cm^{-1}$ provavelmente referente à um grupo carbonílico cetônico, o que nos leva a inferir a existência de cinco anéis na estrutura de PSFE-NB1. Ainda no espectro de RMN 1H pôde-se observar a existência de nove metilas ligados a carbonos não hidrogenados, através da presença de nove sinais simples em $0.76\delta, 0.78\delta, 0.82\delta, 0.85\delta, 0.93\delta, 0.99\delta, 1.03\delta, 1.12\delta$ e 1.13δ e provavelmente um metila em sistema A_2B_3 através do sinal triplo, parcialmente superposto, centrado em 0.78δ . Além disto somente as absorções em 2.41δ com integração para dois hidrogênios, dois multipletos com um próton cada em 2.0 e 1.85δ respectivamente, e um multipletto centrado em 1.70δ com integração para quatro prótons, podem ser distinguidos de uma série de picos entre 1.2 e 1.6δ .

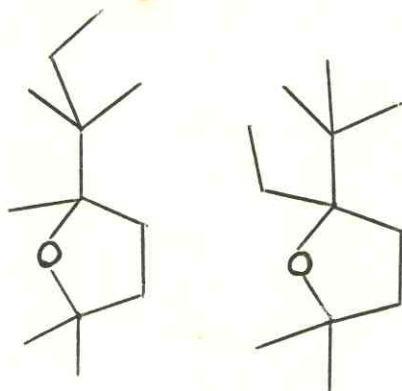
O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (fig.30) apresentou trinta e duas linhas sendo que a absorção em 26.6δ é muito mais intensa que as outras sugerindo a superposição das absorções de dois carbonos, o que está de acordo com o numero de carbonos propostos na formula molecular.

Análise do espectro de carbono-13 utilizando a técnica de DEPT para determinação do número de hidrogênio ligados a cada carbono(fig.35) revelou a existência de dez grupos CH₃, onze CH₂, quatro CH e portanto por exclusão oito carbonos não hidrogenados. Com base na teoria do deslocamento químico observou-se a presença de uma carbonila cetônica, em 218.12 δ , dois carbonos oxigenados em 85.02 δ e 87.37 δ e trinta carbonos sp³ não oxigenados entre 55.2 e 8.85 δ . O fato dos dois carbonos oxigenados não aparecerem no espectro DEPT, indicando a não hidrogenação dos mesmos e a ausência de qualquer banda correspondente a hidroxilas no infravermelho, e o alto grau de insaturação para um composto alifático permitem sugerir uma estrutura parcial etérea, cíclica para PSFE-NB1. Com base no número de grupos metilênicos e metínicos e nas quatro lacunas de insaturação restantes propôs-se um esqueleto triterpênico tipo damarano, ou seja tetracíclico com uma cadeia lateral ciclizada em forma de éter, acrescida de três átomos de carbonos.

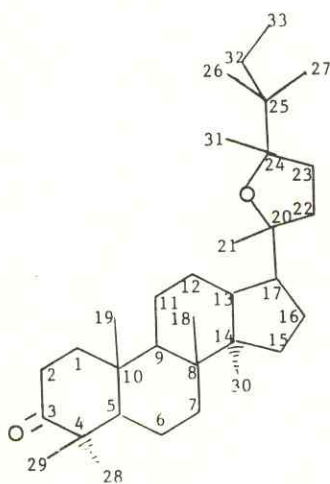
Baseado na razão massa sobre carga m/z=169, do pico base, indicativo da principal fragmentação de PSFE-NB1 no espectrômetro de massa(ver quadro 2) duas possibilidades como aquelas representadas pelas estruturas parciais:III, e IV poderiam ser aventadas.

Comparação dos dados de carbono-13 com dados de modelos colhidos na literatura¹⁹, ver TABELA 9 , a presença do anel tetrahydrofurânico em PSFE-NB1, pode ser justificada. Tendo em vista a compatibilidade da correlação entre os dados e

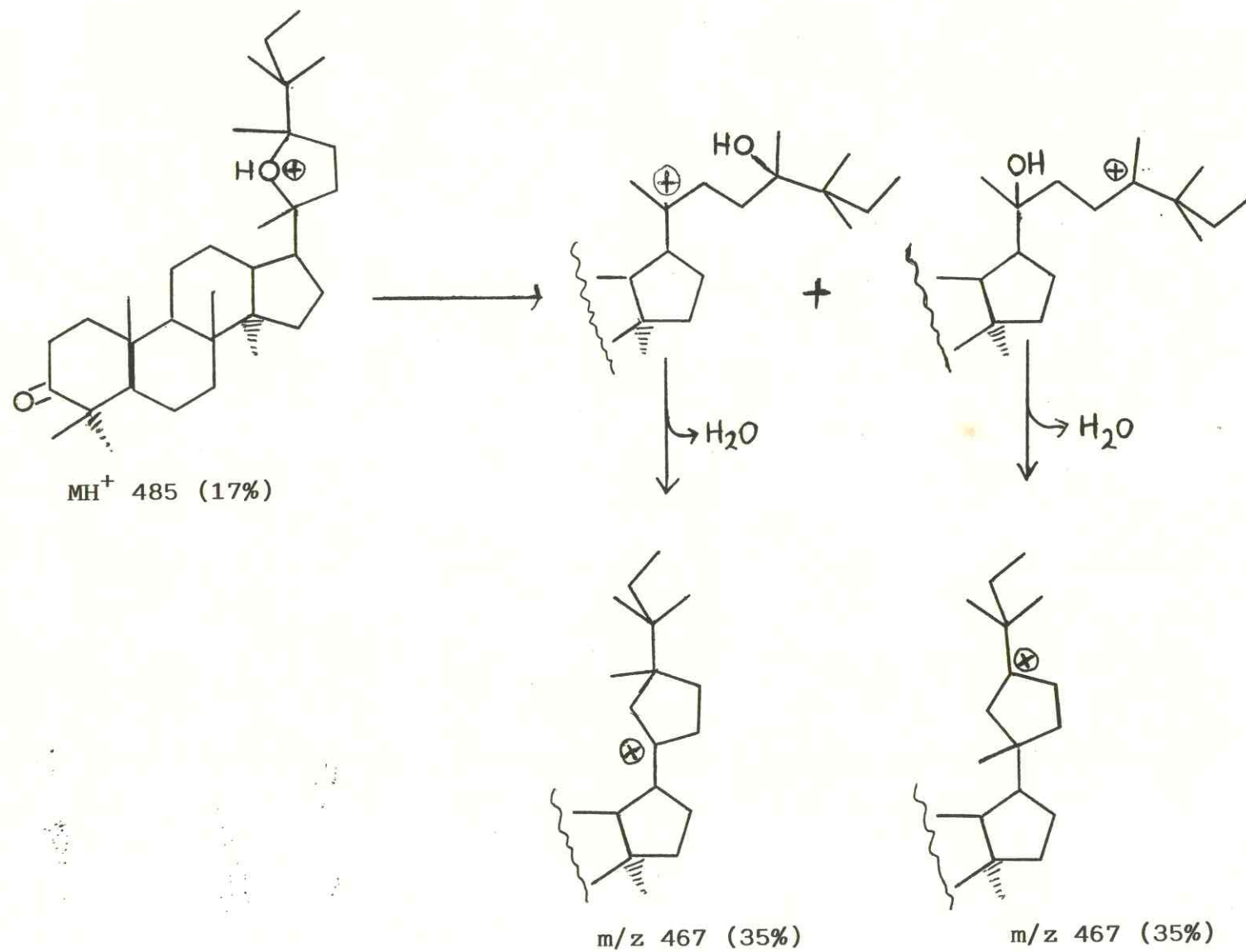
qualquer das estruturas III e IV, optou-se pela primeira em virtude do íon fragmento com $m/z=414$ correspondente à eliminação do grupo C_5H_{10} gerado apartir do íon molecular e $C_5H_{11}(m/z=413)$ correspondente à saída do radical isopentila terciário, ser possível somente para esta estrutura(ver quadro 3).Portanto, apesar das evidências experimentais suportarem a estrutura XVI como proposição estrutural final para PSFE-NB1, sabe-se que somente através da análise cristalográfica por Raios X, a estrutura final poderá ser determinada.



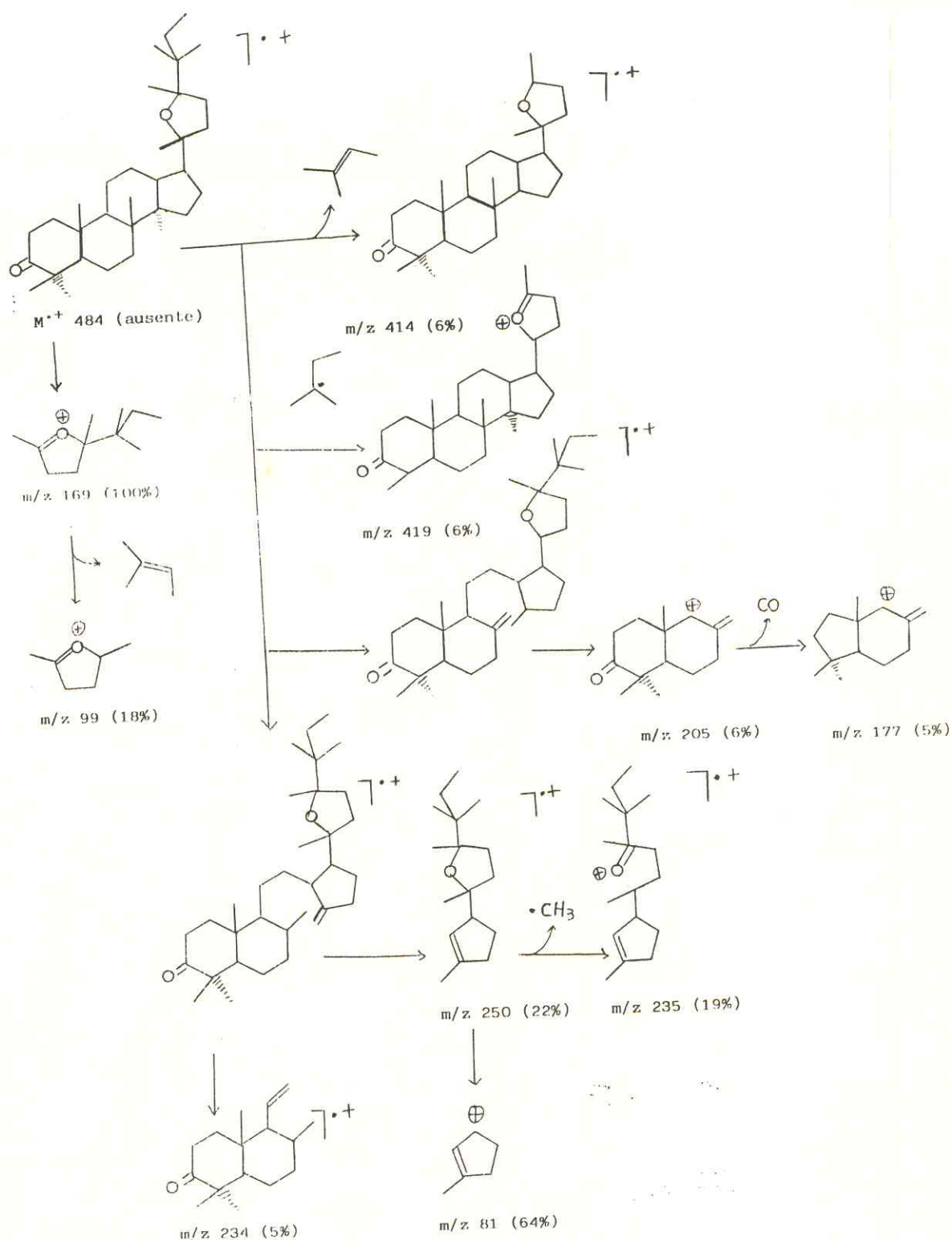
ESTRUTURA PARCIAL III IV



XVI



Quadro 2 - Possíveis caminhos de fragmentação para PSFE-NB1 no espectrômetro de massa. (HPLC)



Quadro 3 - Possíveis caminhos de fragmentação para PSFE-NB1 no espectrômetro de massa.

DAKER/PSFE
sample PSFE-NH6
direct injection
Scan time 7.2

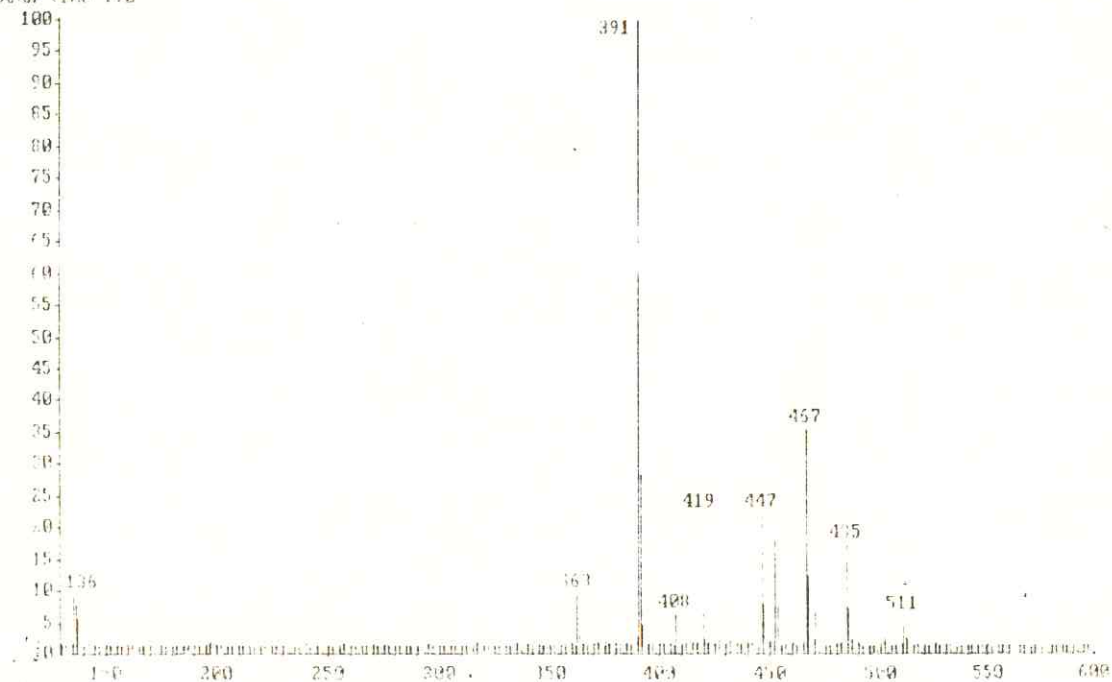
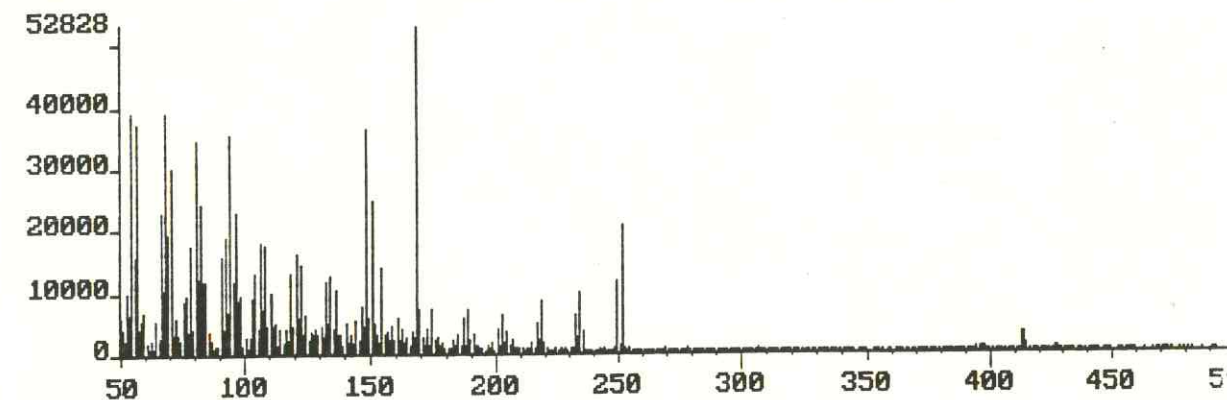


Figura 31 - Espectro de Massa (HPLC/EM) de PSFE-NB1

Display X axis from 50 to 500 on marked plot

Scan at 2.1



Scan at 2.1

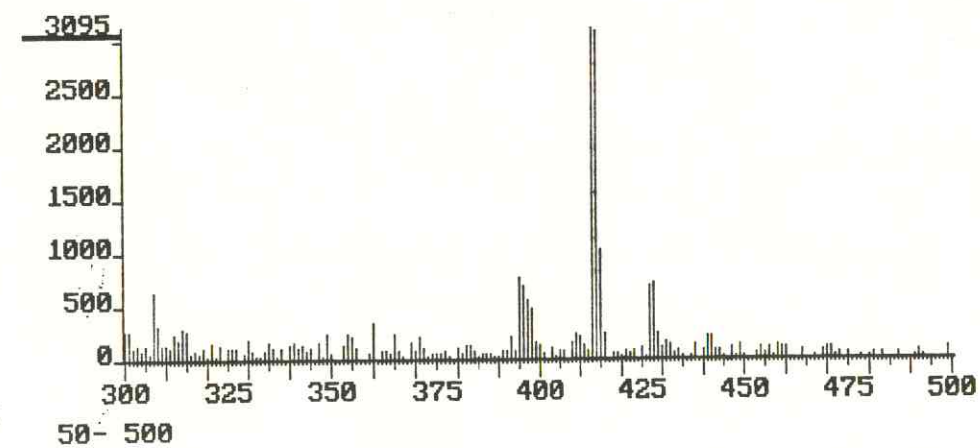


Figura 32 - Espectro de Massa de PSFE-NB1

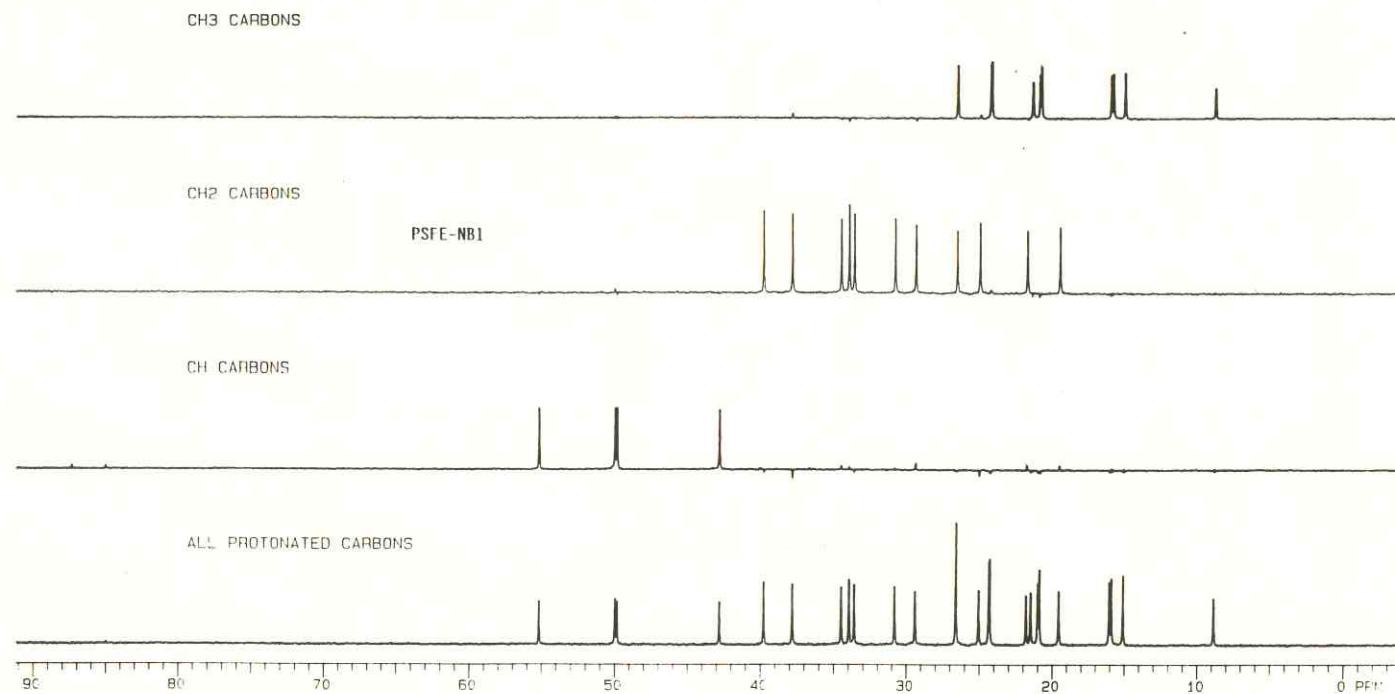


Figura 35 - Espectro de PMN^{13}C (DEPT) de PSFE-NB1

Determinação estrutural de PSFE-NA

A substância denominada PSFE-NA apresenta espectros de RMN ^1H e ^{13}C semelhantes aos de PSFE-NB1 sugerindo uma relação estrutural aproximada entre estas duas substâncias.

O espectro de RMN ^1H (fig.36) apresenta todas as absorções entre 0 e 2.0 δ exceto o duplo dubleto em 4.25 δ provavelmente devido a um próton carbinólico acetilado, sendo a existência do grupo acetila confirmada pela presença do singlete em 2.0 δ . Esta característica do espectro de PSFE-NA sugere o caráter alifático da substância. No espectro de absorção na região do infravermelho de PSFE-NA(fig.28) ao invés da presença da absorção referente à carbonila cetônica em 1700 cm^{-1} , observada para PSFE-NB1(fig.29), observou-se uma absorção em 1738 cm^{-1} provavelmente devido à C=O do grupo acetila. Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se a presença de uma absorção parcialmente superposta e centrada em 0.84 δ devido a um metila em sistema A_2B_3 anteriormente referido em PSFE-NB1.

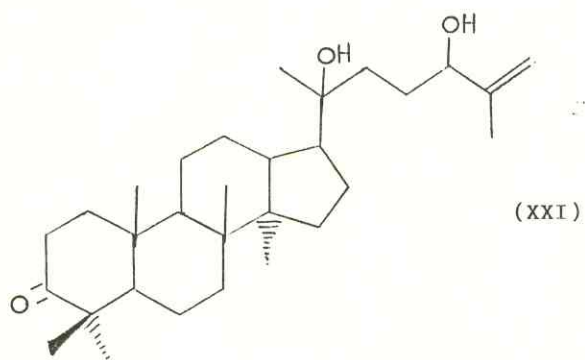
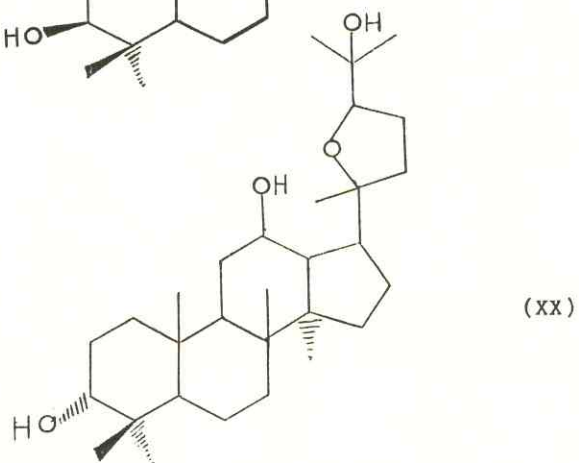
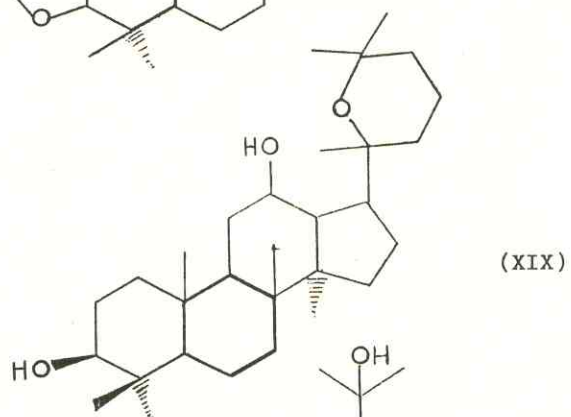
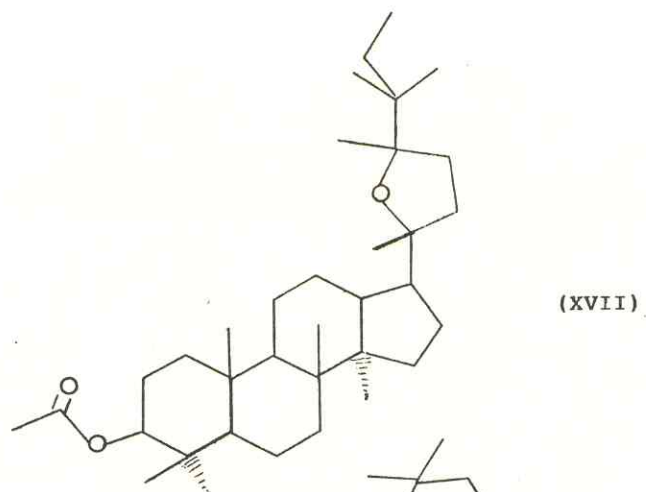
O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado(PND, fig.37) apresenta trinta e tres linhas sendo que as absorções em 25.74 e 16,46 δ , muito mais intensas que as outras sugerem a superposição de bandas de dois carbonos. A análise do espectro de carbono-13 utilizando a técnica DEPT(fig.38) a existência de onze grupos CH_3 , onze CH_2 , cinco CH e por exclusão oito carbonos não hidrogenados.

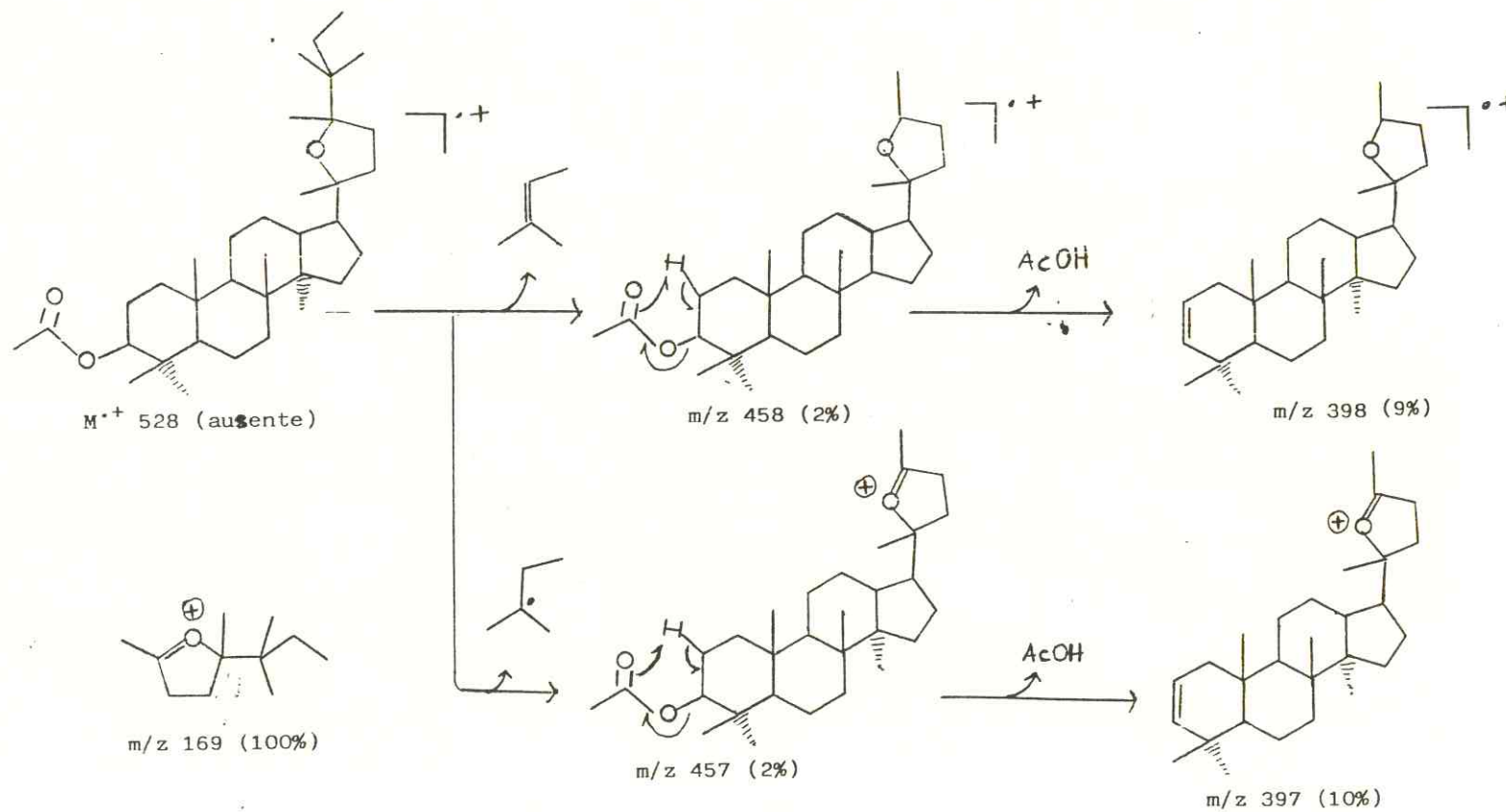
Comparação dos dados de RMN ^{13}C de PSFE-NA e PSFE-NB1(ver tabela 1X) revelou o desaparecimento da absorção de

carbonila em 218.12) e o aparecimento de um sinal em 170.89 δ , referente à carbonila do grupo acetoxila, o que é confirmado pelo aparecimento de uma absorção extra na região de 21.0 δ para PSFE-NA. Corroboração para a sugestão de redução da carbonila e acetilação da hidroxila é encontrada pela absorção do CH oxigenado em 80.88 δ . Análise do espectro RMN de correlação heteronuclear bidimensional (HETCOR, fig.39) além de concordar com as considerações estruturais acima descritas permitiu o assinalamento da correlação estrutura absorção, entre os quais o C-3 (80.88 δ) e o próton carbinólico H-3 (4.5 δ)

Análise da fragmentação no espectrômetro de massa de PSFE-NA (fig.41) está de acordo com uma estrutura triterpênica tipo damarano com cadeia lateral ciclizada em forma de éter, em virtude da presença do íon fragmento de razão massa sobre carga $M/z=169$ (100%), pico base. Apesar da não observação do pico do íon molecular esperado em 528 daltons, o íon fragmento com $M/z=458$ (2%) correspondente à perda de C_5H_{10} a partir do íon molecular foi observado. O quadro 4 resume as principais vias de fragmentação e PSFE-NA no espectrômetro de massa.

Desta forma caracterizou-se PSFE-NA como derivado natural reduzido e acetilado de PSFE-NB1 (XV11).





Quadro 4 - Possíveis caminhos de fragmentação para PSFE-NA no espectrômetro de massa.

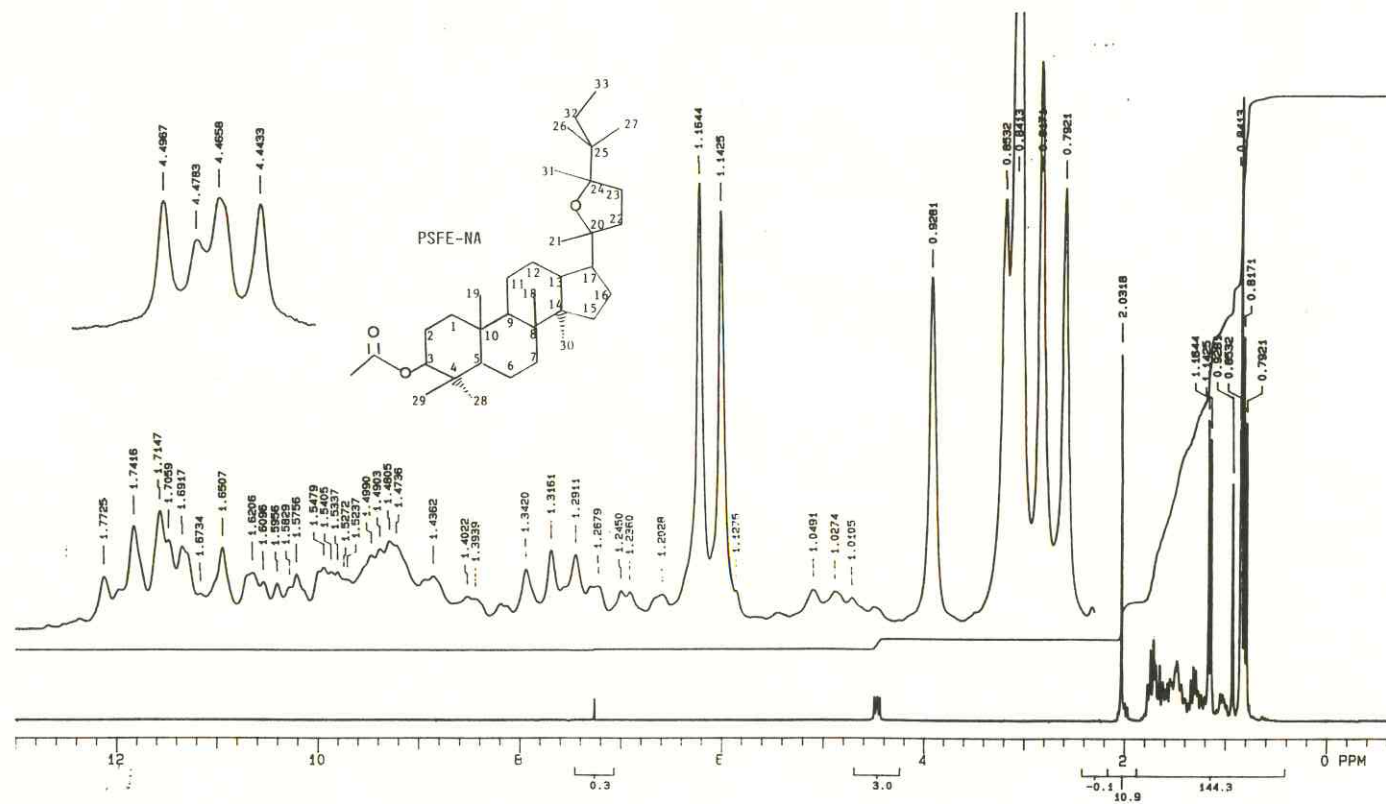


Figura 36 - Espectro de RMN¹H de PSFE-NA

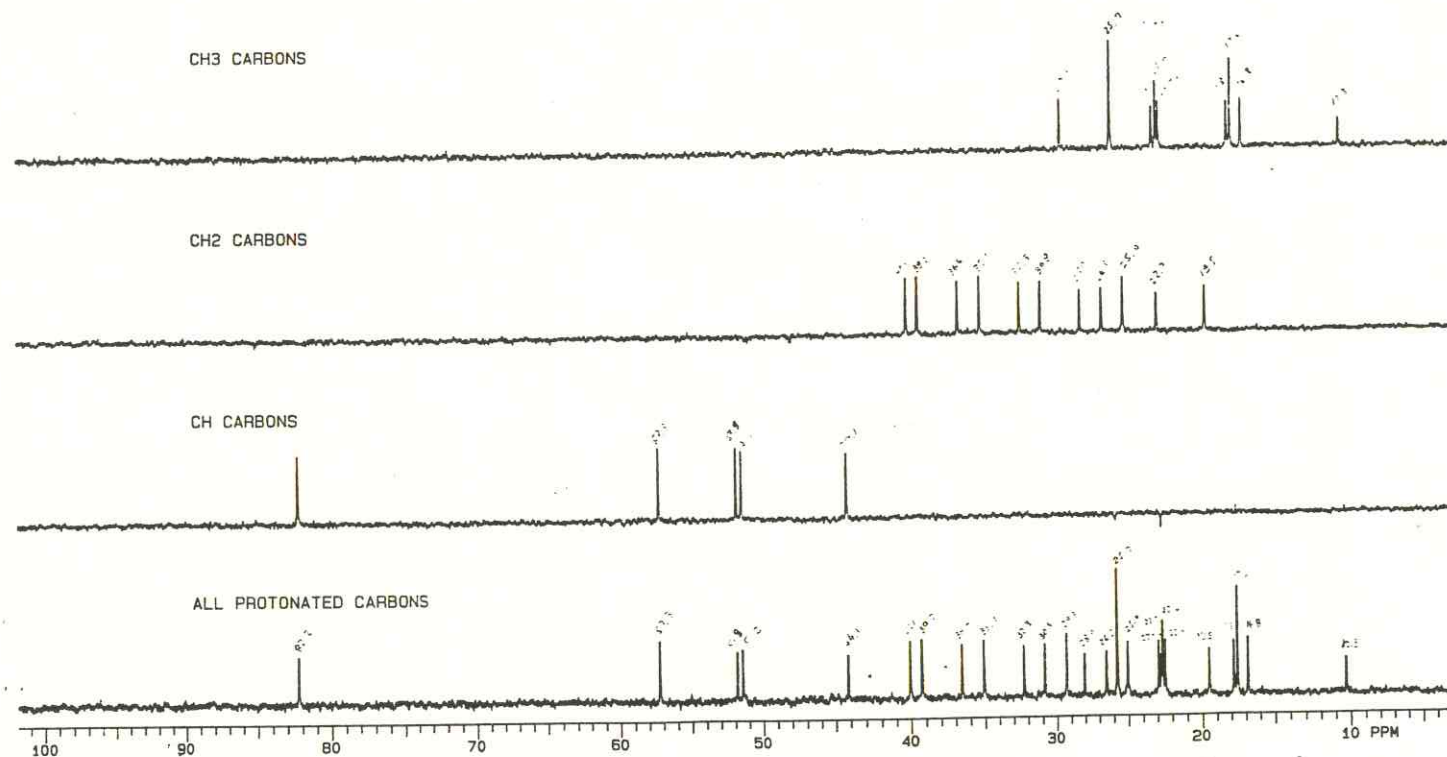


Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NA

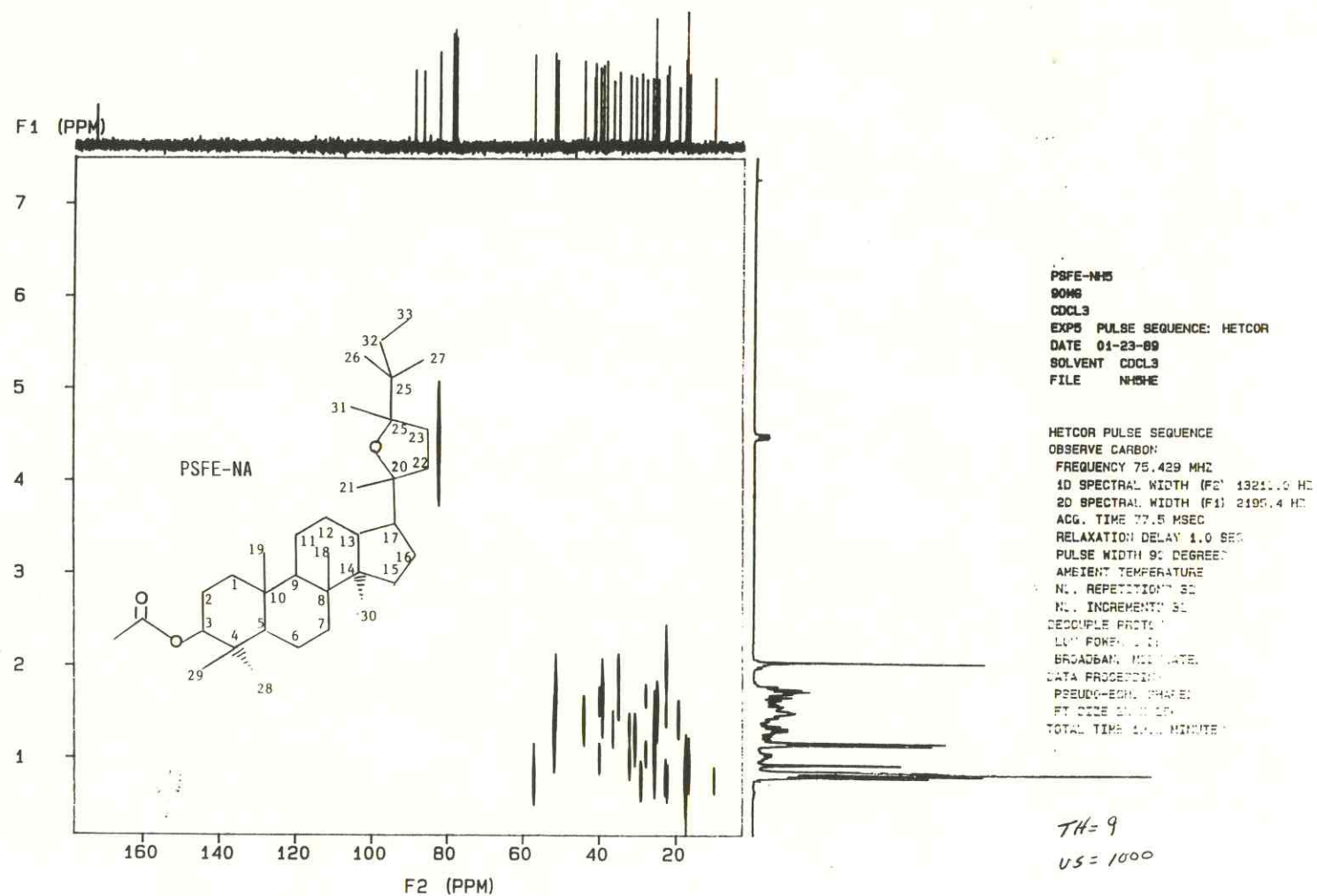


Figura 39 - Espectro de CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR de PSFE-NA

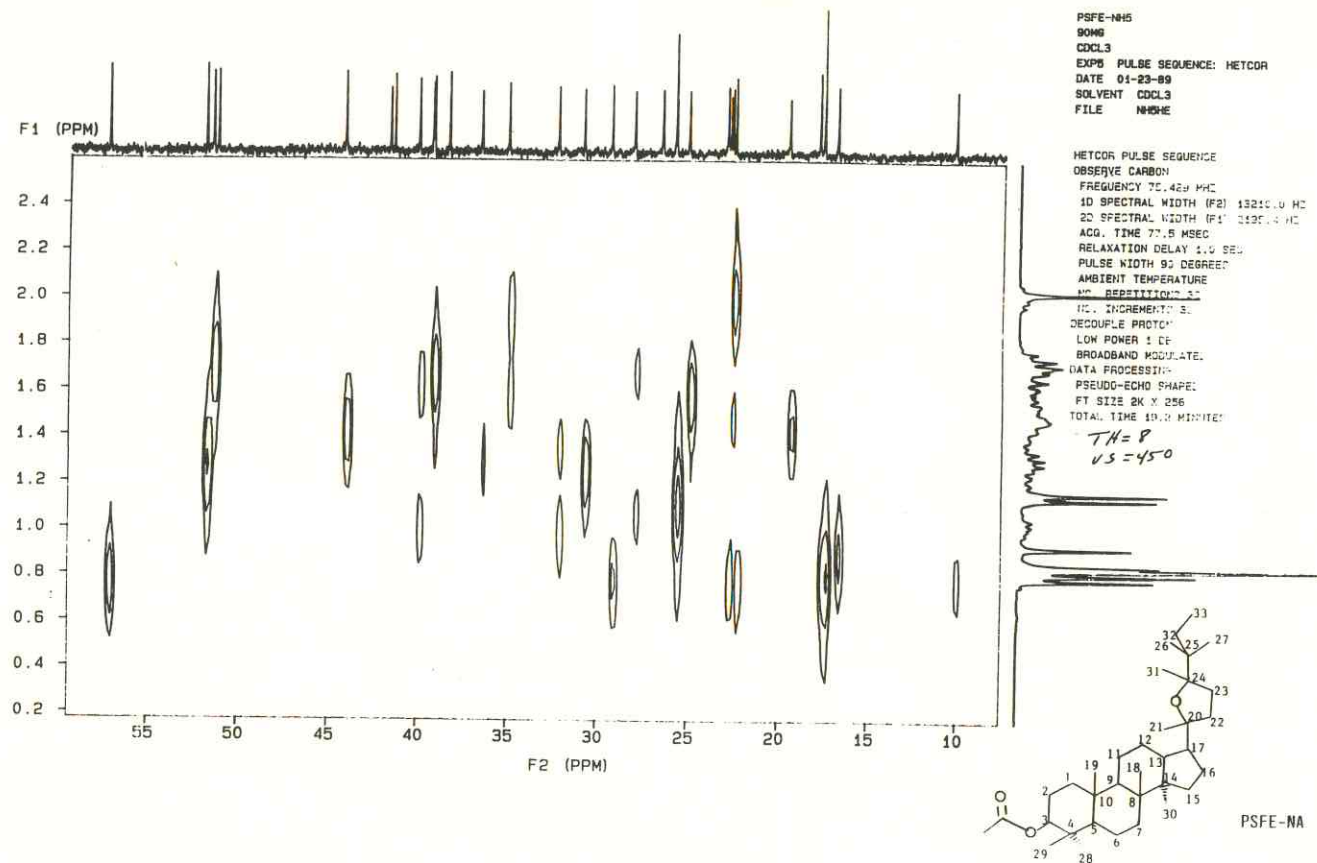


Figura 40 - Espectro de correlação HETERONUCLEAR de PSFE-NA

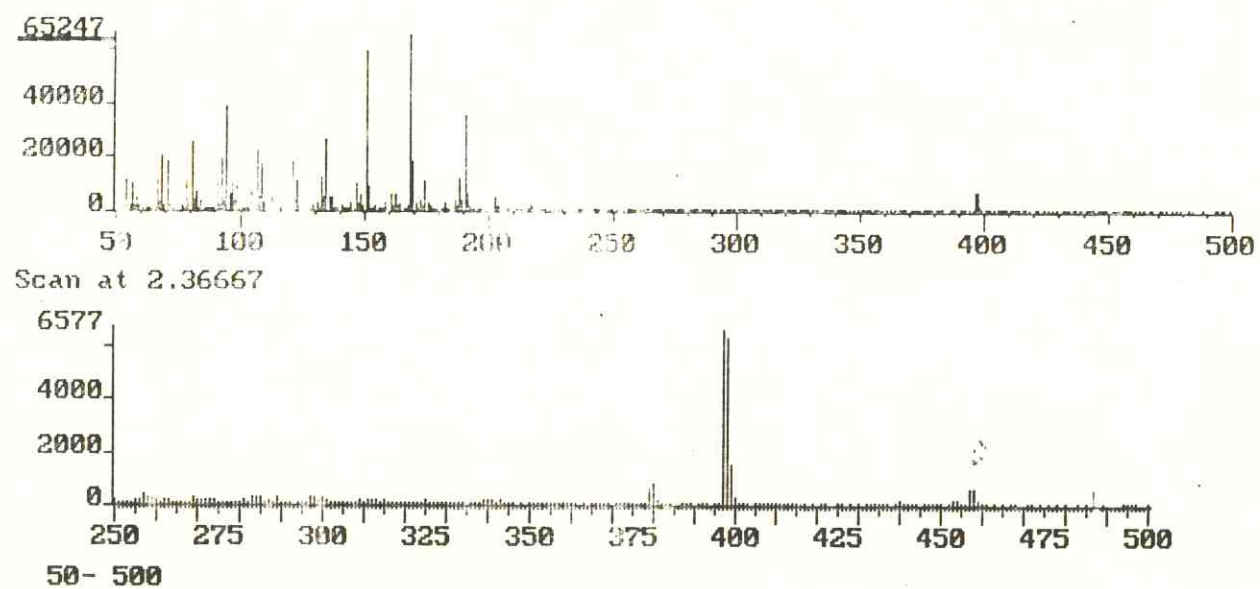


Figura 41 - Espectro de Massa de PSFE-NA

Determinação estrutural de PSFE-NB2

Análise espectrométrica da fração mais polar resultante da separação cromatográfica do produto de hidrólise de PSFE-NH6 permitiu a caracterização da mesma como sendo o derivado da hidrólise de PSFE-NA, da seguinte maneira.

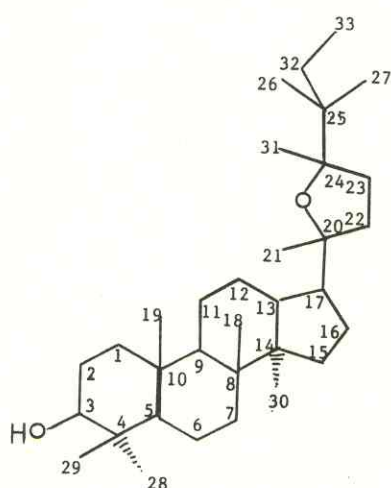
O espectro de RMN ^1H (fig.42) como PSFE-NA também apresentou todas as absorções entre 0 e 2.0 δ , exceto o duplo dubleto referente ao próton carbinólico que agora se encontra centrado em 3.4 δ . Ainda no espectro de RMN ^1H se verifica o desaparecimento da absorção correspondente ao metila do acetato.

No espectro de absorção na região do infravermelho (fig.30) verificou-se o desaparecimento das absorções em 1700 e 1270 cm^{-1} correspondente a C=O e C-O de acetoxila respectivamente presentes em PSFE-NA, assim como o aparecimento de uma banda larga em 3400 cm^{-1} referente à hidroxila alcoólica.

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (PND, fig.43) mostrou para PSFE-NB2 absorções correspondentes a trinta e três carbonos, donde se pôde confirmar o desaparecimento do grupo acetoxila. Foi observado também o deslocamento para campo alto do carbono carbinólico de 80.88 δ para 78.92 δ .

A oxidação de PSFE-NB2 com PCC forneceu uma substância com ponto de fusão semelhante ao de PSFE-NB1 (212-210 \pm C) e espectro de RMN ^1H superponível (fig.44).

O espectro de carbono-13 utilizando a técnica DEPT, (fig.45), apresentando dez CH₃, onze CH₂, cinco CH e por exclusão oito carbonos não hidrogenados, confirma o desaparecimento do grupo acetila e corrobora para a sugestão de que PSFE-NB2 é o PSFE-NA hidrolisado(XVIII).



XVIII

TABELA 9

TABELA 9 - Dados espectrométricos de RMN ^{13}C comparativos de PSFE-NA, PSFE-NB1 e PSFE-NB2 com as substâncias XIX, XX e XXI encontradas na literatura¹⁹.

Nº carbono	PSFE-NA	PSFE-NB1	PSFE-NB2	XIX	XX	XXI
1	38.69	40.08	39.02	38.9	33.7	40.2
2	23.65	24.02	27.38	27.5	25.5	34.3
3	80.88	218.12	78.92	78.8	76.1	218.6
4	37.9	47.38	38.94	38.9	37.6	47.6
5	55.89	55.28	55.81	55.9	49.6	55.7
6	18.14	19.63	18.27	18.4	18.3	19.9
7	35.19	34.57	35.28	34.9	34.8	34.8
8	40.06	40.19	40.30	39.8	40.1	40.6
9	50.50	50.05	50.59	49.9	50.2	50.5
10	37.01	36.79	37.10	37.1	37.4	37.1
11	21.38	21.88	21.38	31.2	31.6	22.3
12	25.14	25.15	25.18	70.0	70.7	27.7
13	42.78	41.89	42.79	49.2	48.9	42.8
14	50.11	49.84	49.88	51.2	52.4	50.4
15	30.90	30.89	30.93	33.5	31.7	31.4
16	26.65	26.69	26.71	25.2	28.6	25.0
17	49.85	49.92	50.12	54.7	49.0	50.5
18	16.20	15.98	16.14	16.1	16.2	16.1
19	15.47	15.17	15.48	15.7	15.5	15.3
20	86.52	85.16	85.23	76.7	87.2	75.1
21	21.56	21.54	21.58	19.4	28.9	25.0
22	35.06	33.69	33.70	35.8	32.3	37.0
23	37.87	37.87	37.87	16.3	25.2	29.4
24	87.46	87.51	87.50	36.5	87.5	76.4
25	40.06	39.86	40.09	73.1	70.1	147.8
26	24.35	24.44	33.01	27.7	110.9	110.9
27	24.38	24.40	24.40	27.2	24.4	17.6
28	27.92	26.69	27.98	28.1	28.4	26.9
29	16.20	21.09	15.35	15.4	22.1	21.1
30	16.46	16.12	16.24	17.1	18.0	16.5
31	21.09	20.98	21.10			
32	29.47	29.46	29.46			
33	8.90	8.90	8.91			
CH3	21.27					
O-C=O	170.89					

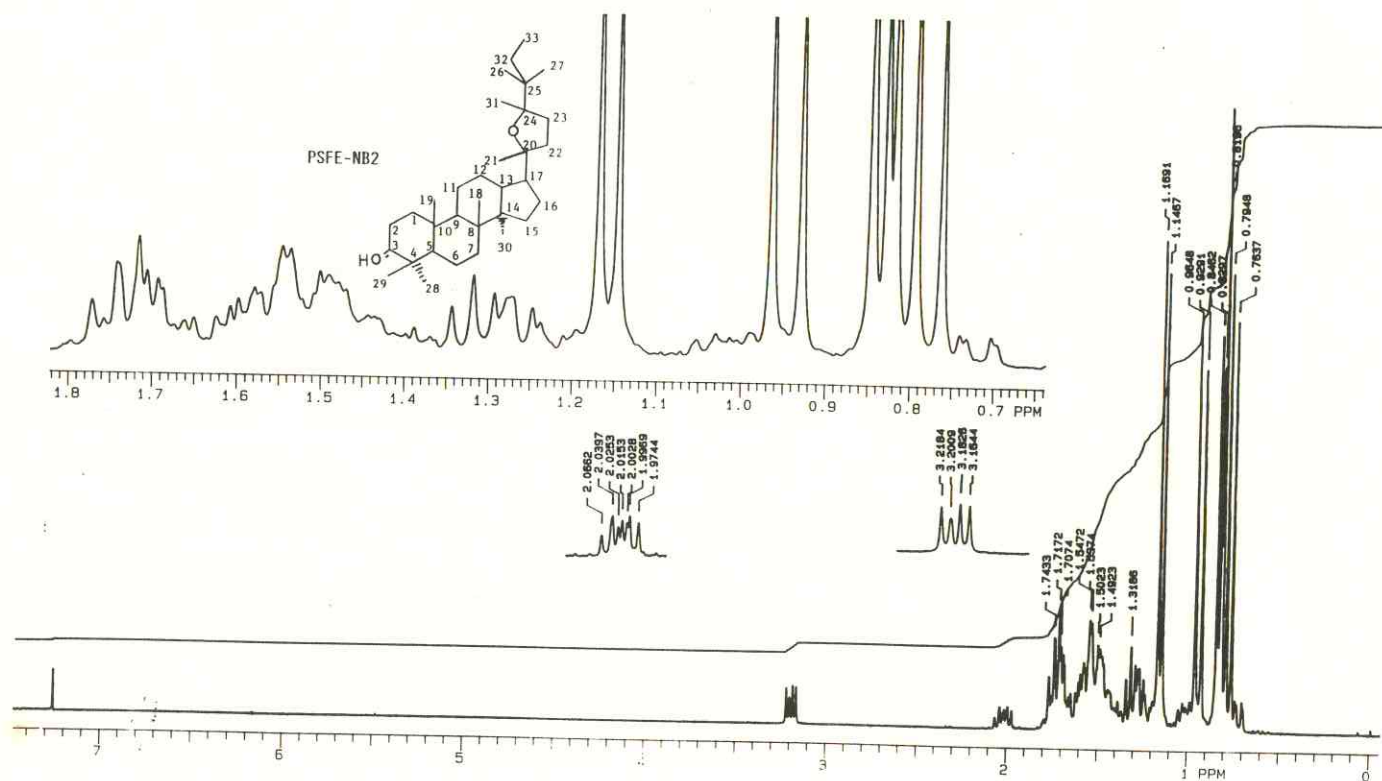


Figura 42 - Espectro de RMN'H dePSFE-NB2

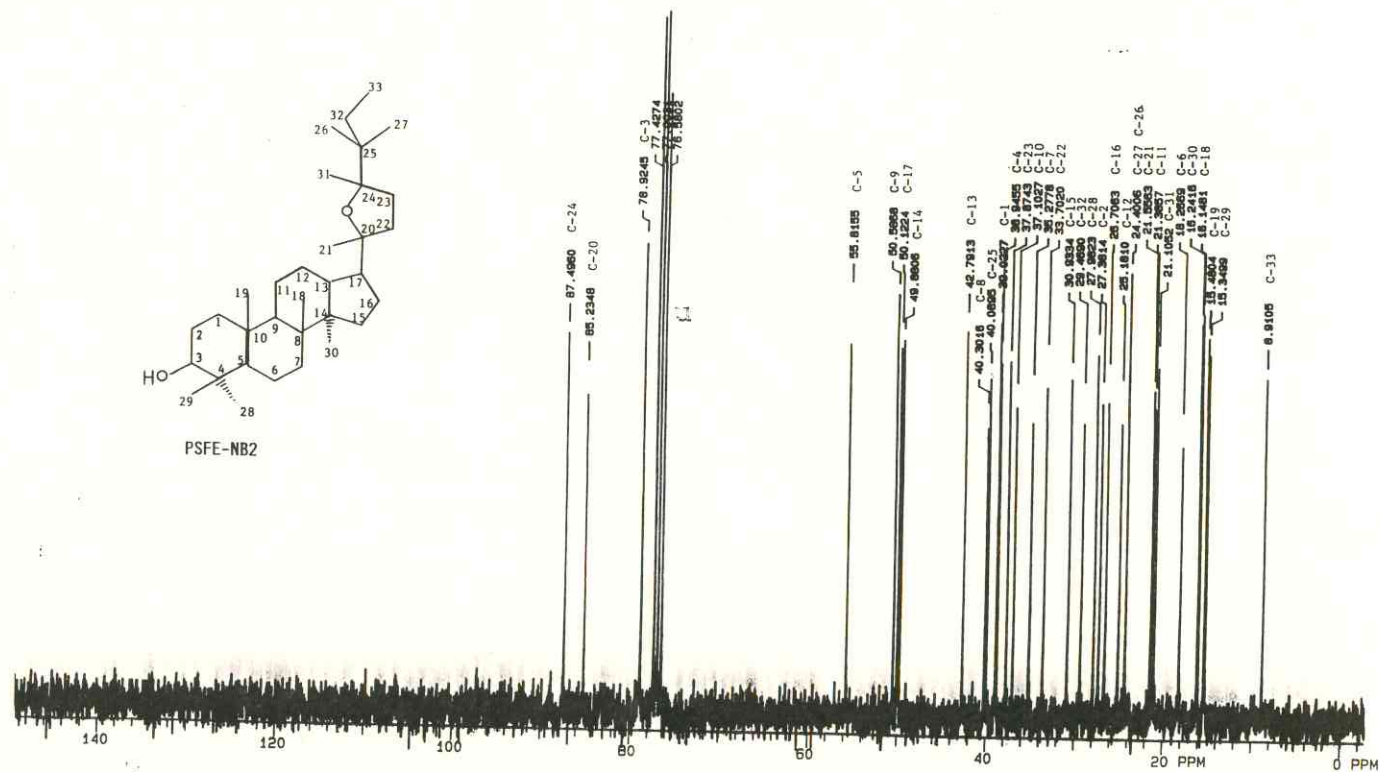


Figura 43 - Espectro de RMN^{13}C (PND) de PSFE-NB2

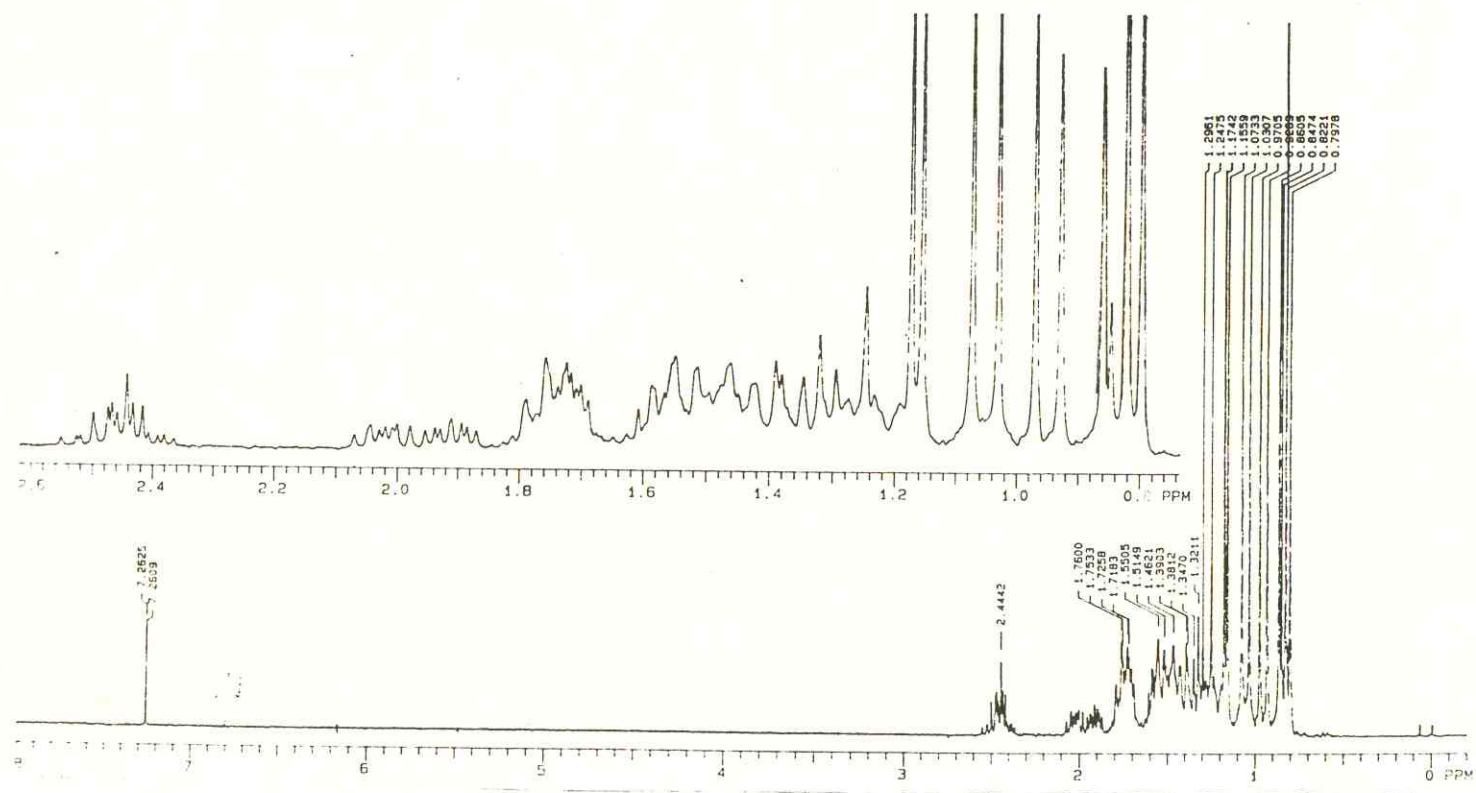


Figura 44 - Espectro de RMN ^1H de PSFE-NB₂Oxi

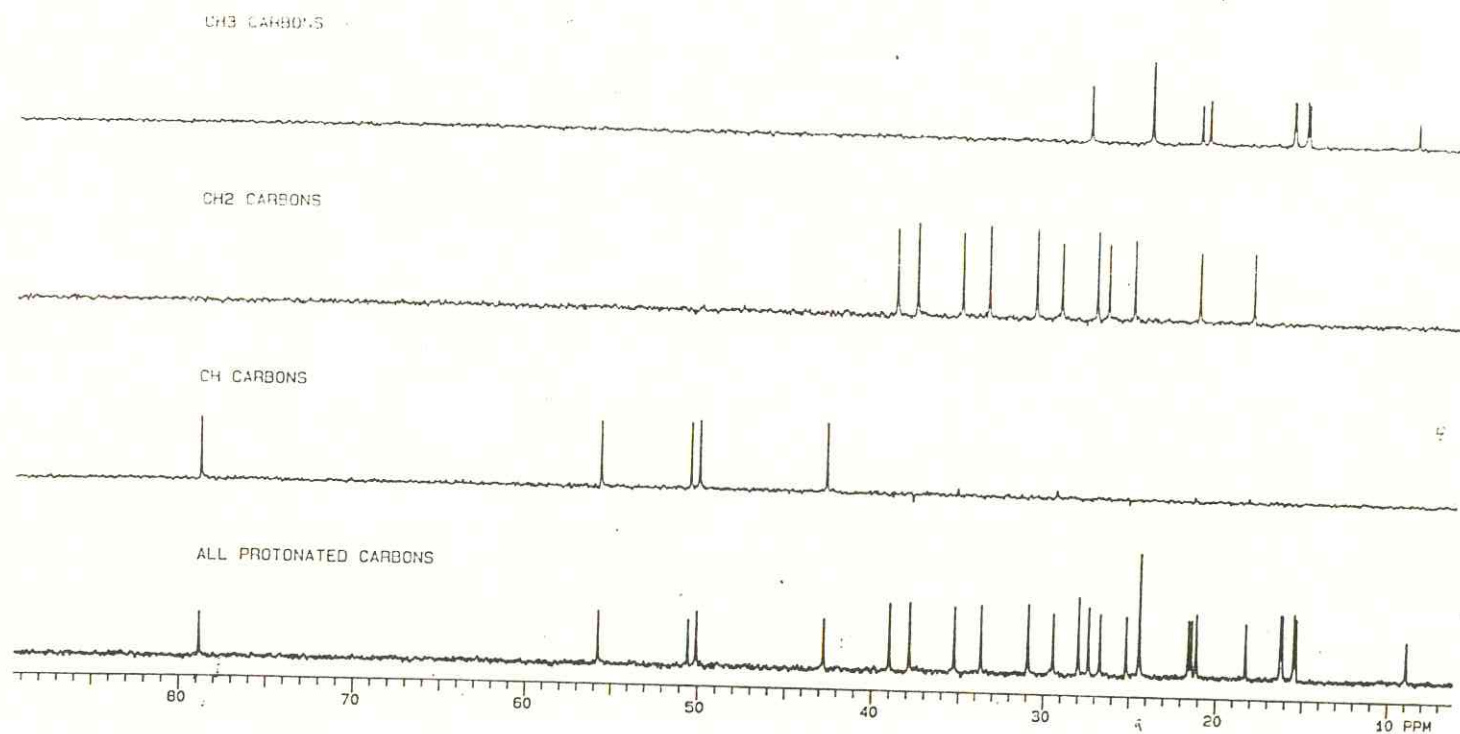


Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NB2

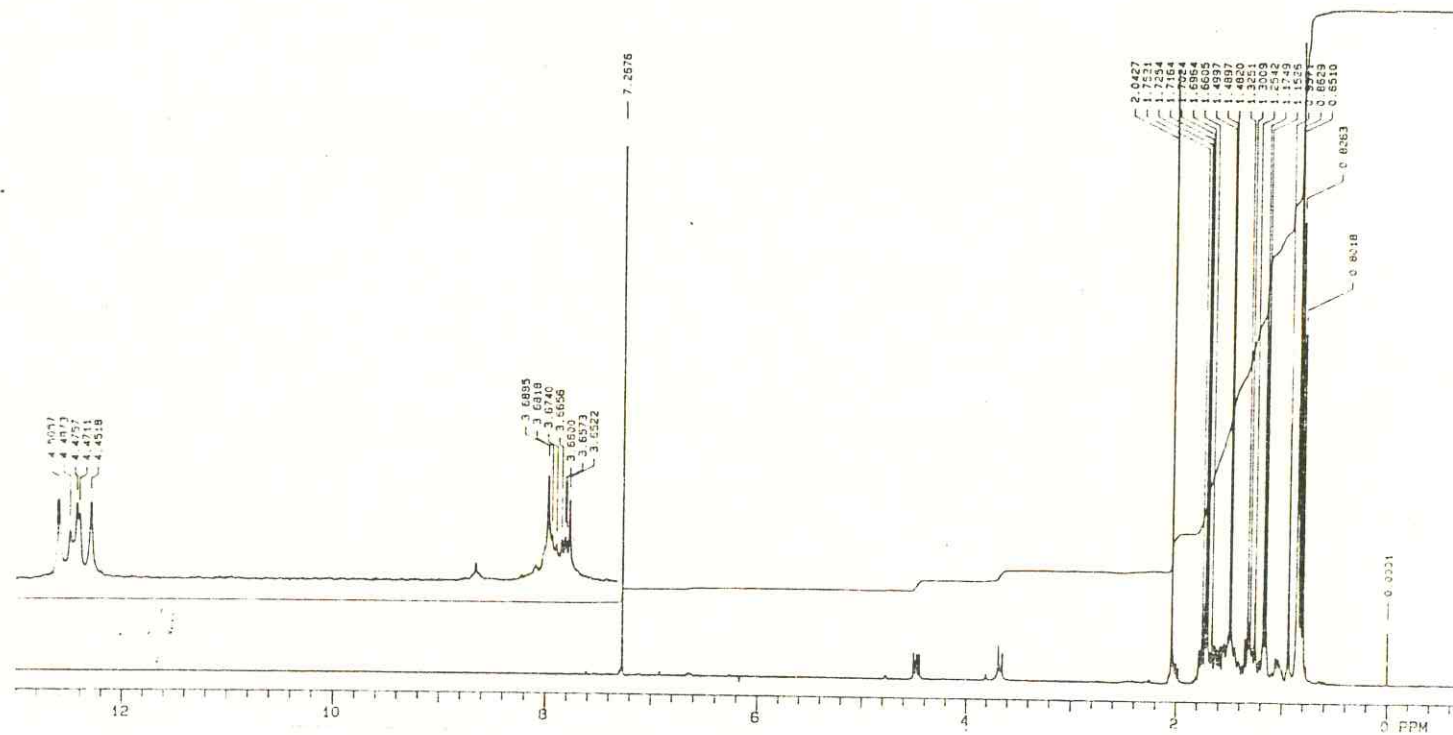


Figura 46 - Espectro de RMN ^1H de PSFE-NAHid/Acet.

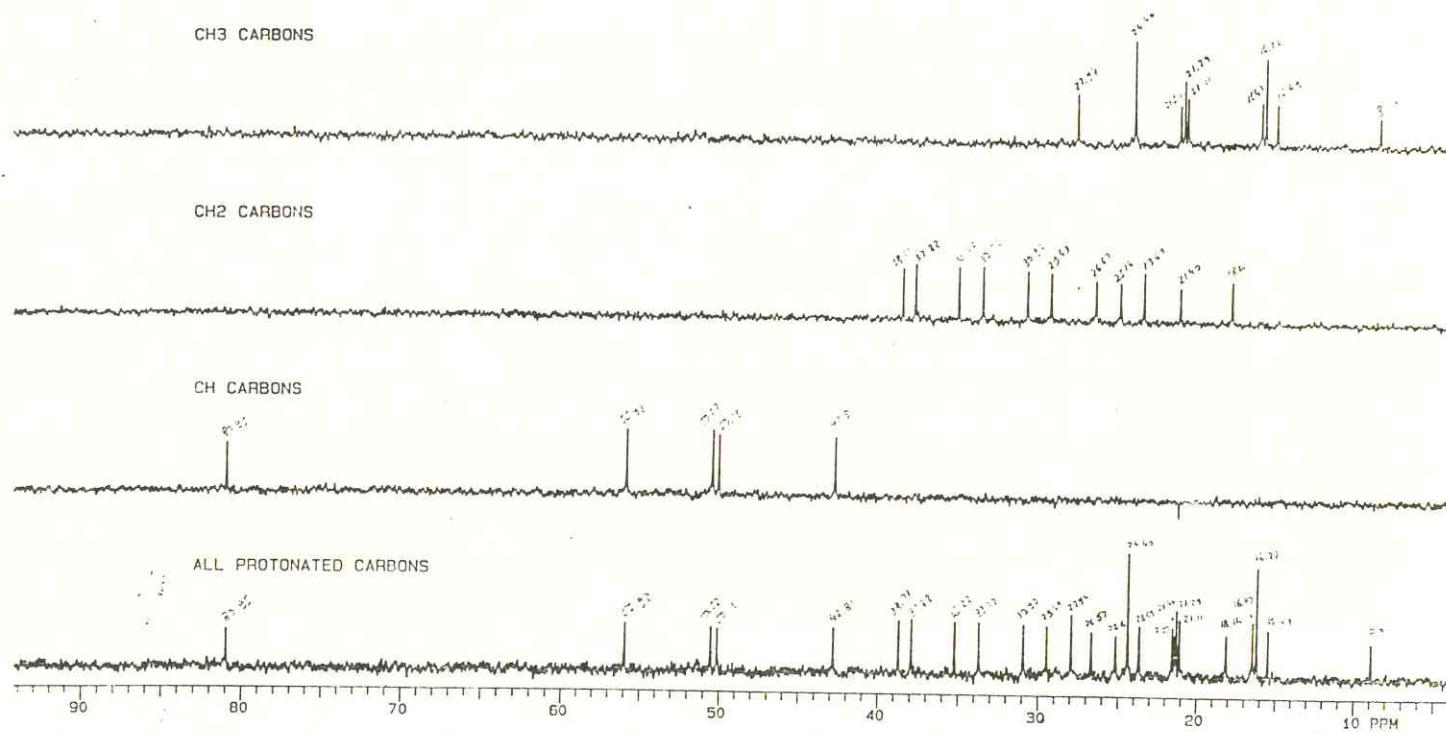


Figura 47 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) de PSFE-NAHid/Acet.

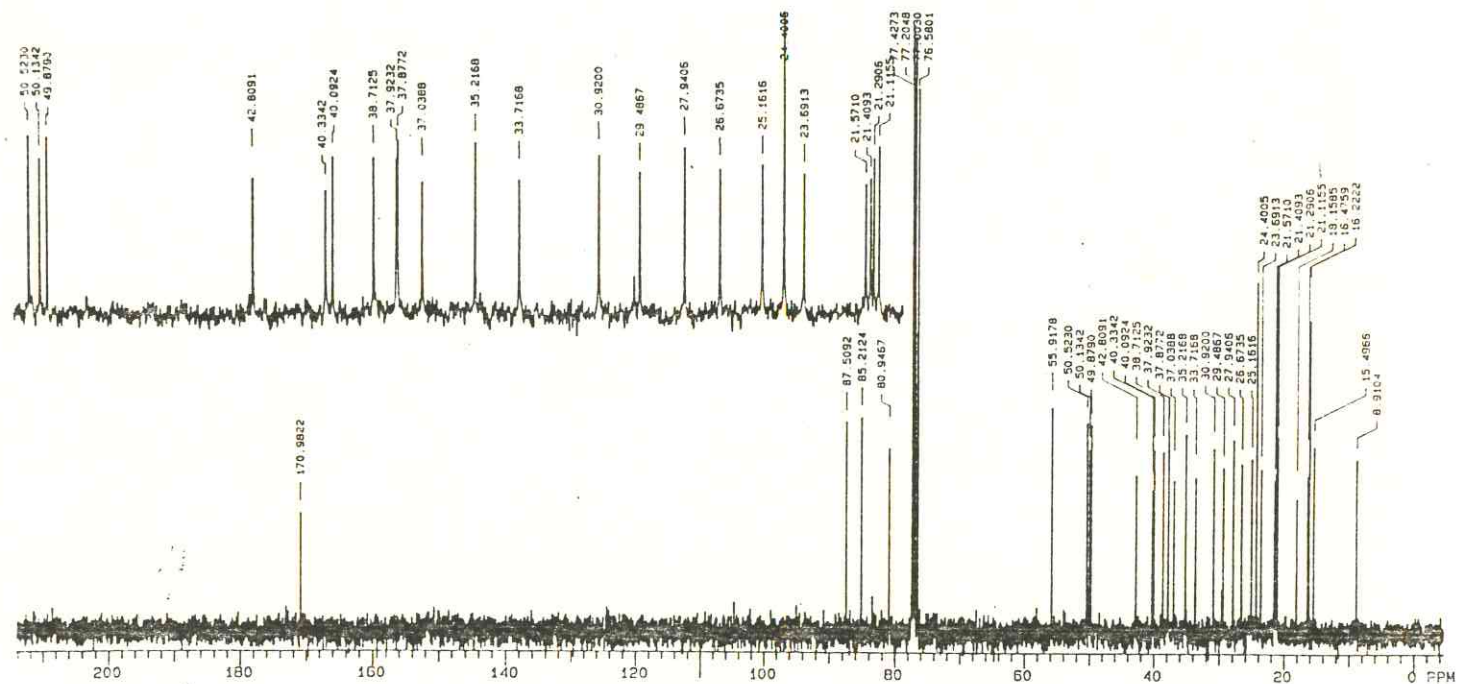
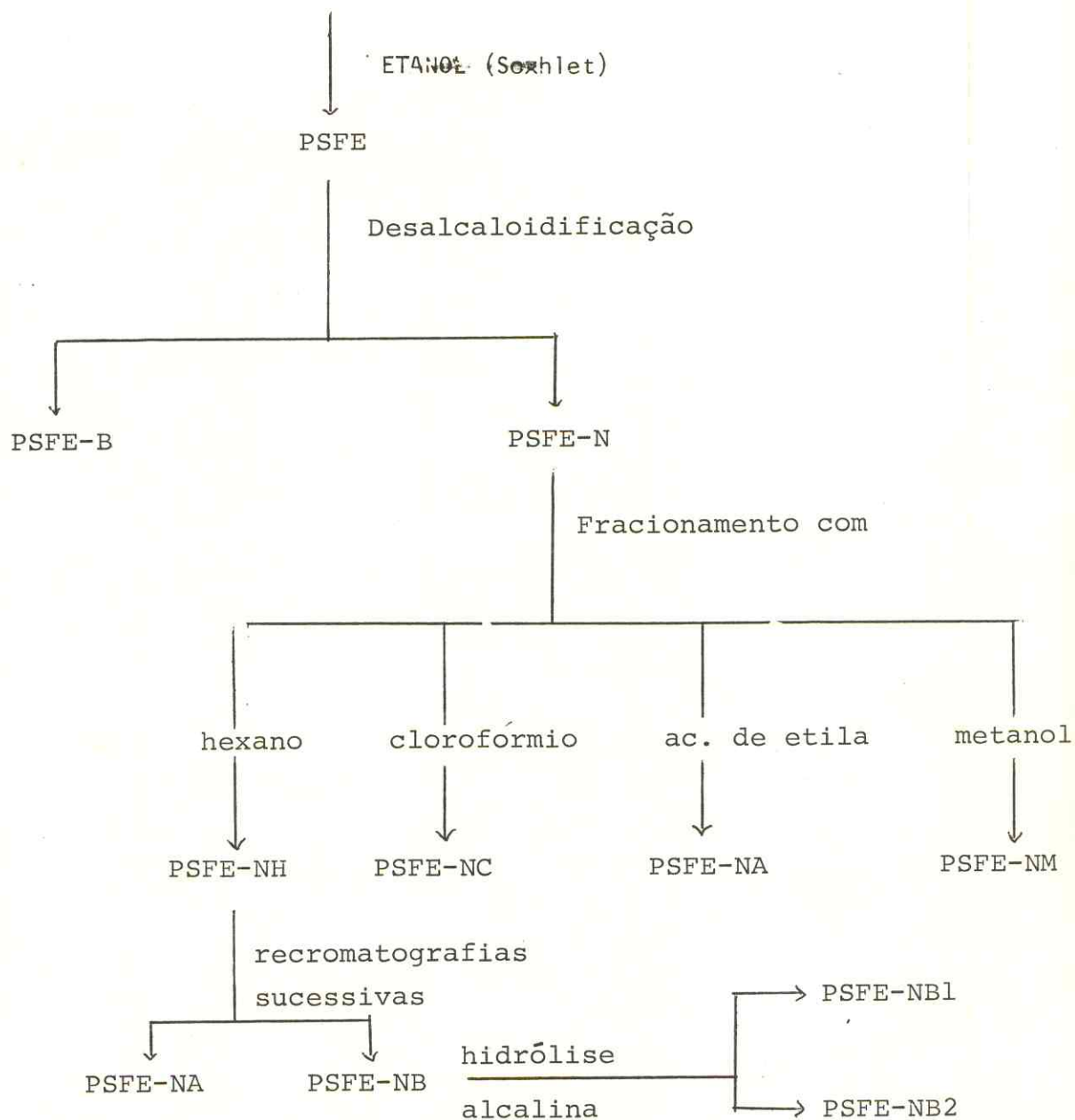


Figura 48 - Espectro de RMN ^{13}C de PSFE-NAHid/Acet.

PILOCARPUS SPICATUS

(FOLHAS)

Esquema 1 - Esquema de isolamento das substâncias de P. Spicatus

5.0 - CONCLUSÃO

As treze espécies pertencentes ao gênero *Pilocarpus* habitam na região compreendida entre os trópicos de Câncer e Capricórnio conhecida como Flora Neotrópica. Apenas nos foi possível estudar duas destas espécies, das quais isolamos sete substâncias sendo inclusive duas inéditas para o gênero e duas inéditas para a ciência.

Um dos objetivos do trabalho era estudar a composição química (fixos e voláteis) de diferentes espécies de *Pilocarpus* para assim contribuir com a sistemática do gênero.

A princípio foram estudados os componentes fixos das espécies *P. spicatus* e *P. trachyllophus* coletados respectivamente em Maranguape-Ce e Macaúbas-Ba. A comparação infelizmente não nos trouxe nenhuma informação nova talvez devido ao fato de por conveniência nossa terem sido estudados órgãos diferentes nas duas espécies (raiz de *P. trachyllophus* e folhas de *P. spicatus*). Com referência aos componentes voláteis pôde-se observar que as metil cetonas de onze e treze átomos de carbonos são comuns nas espécies estudadas. por outro lado os componentes delta-careno e alfa-terpinoleno, apresentam-se confinados a espécie *P. spicatus*.

O estudo das raízes de *P. spicatus* e as folhas de *P. trachyllophus* serão posteriormente estudadas para que se torne possível a comparação química entre as duas espécies.

6.0 - PARTE EXPERIMENTAL

6.1 - Coleta de material

As folhas de *Pilocarpus spicatus* e as raízes de *Pilocarpus trachyllophus* foram coletadas na serra de Maranguape, município de Maranguape-Ceará e no município de Macaúbas-Bahia, respectivamente. O material botânico das duas espécies estudadas foi identificado pelo professor Afranio Gomes Fernandes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra do mesmo Departamento, sob os números 15243 (Maranguape-CE) e 15229 (Macaúbas-BA).

6.2 - Métodos cromatográficos

As cromatografias de adsorção em coluna e em camada fina, foram realizadas utilizando-se Sílica Gel S(0,063 - 0,2mm) e Sílica Gel 60H(Merck), respectivamente. A dimensão das colunas variou de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes a serem utilizados. A revelação das substâncias nas placas analíticas de sílica, foi realizada utilizando-se para cada caso específico lâmpada de irradiação na faixa de ultravioleta, saturação em câmara de iodo e borrifação com solução de sulfato cérico ou reagente de

Draggendorff. Foram utilizados como eluentes os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias de acordo com a polaridade da substância a ser cromatografada.

Os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram corridos utilizando-se Cromatógrafo MERCK-HITACHI munido de duas bombas, estufa e microprocessador. A detecção foi realizada através de um detector na faixa do ultravioleta, operando no comprimento de onda de 216nm e sensibilidade de 0.04 AUFS

6.3 - Métodos espectrométricos

Os aparelhos utilizados para obtenção dos espectros das substâncias estudadas pertencem ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará ou ao Departamento de Farmacognosia da Universidade do Mississippi, EUA

O equipamento utilizado nas determinações das características físicas das substâncias isoladas foram os seguintes: os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em espectrômetro PERKIN-ELMER modelo 720, utilizando-se pastilhas de KBr para sólidos e filmes para substâncias líquidas. Os espectros de ressonância magnética nuclear protônica e ressonância magnética nuclear de carbono-13 foram registrados em espectrômetro VXR 300 VARIAN utilizando-se

a transformada de Fourier (FT) e operando a 300MHz na frequência do próton. Como solvente utilizou-se clorofórmio deuterado(CDCl_3) e tetrametilsilano(TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em parte por milhão (PPM) tanto para ressonância magnética nuclear protônica como para ressonância magnética nuclear de Carbono-13. Os desdobramento das bandas foi indicado segundo a convenção: s(singlete), d(dubleto), t(triplete), q(quarteto) e m(multiplete). Os espectros de massa foram registrados em espectrômetro de massa HEWLETT-PACKARD modelo HP-5995-A acoplado à cromatógrafo de gás(CGL-EM) provido de coluna capilar de sílica fundida(50m) com fase estacionária de metilsilicona SP 2100, usando-se programação de temperatura de 50 a 250°C a 4°C/min e temperatura do injetor a 250°C.

6.4 - Outras determinações

Os pontos de fusão foram determinados em aparelhos de microdeterminação METTLER com placa aquecedora modelo FP52 e unidade de controle FP5, e não foram corrigidos.

As medidas de rotação ótica foram efetuadas em polarímetro automático RUDOLPH RESEARCH modelo Auto-pol 11, usando-se soluções clorofórmicas em tubos de 1dm.

6.5 - Estudos dos componentes voláteis de

Pilocarpus ssp.

As folhas das plantas estudadas foram coletadas, secas ao sol e submetidas diretamente ao arraste com vapor d'água. O óleo foi separado da água, filtrado sobre sulfato de sódio anidro para a retirada da água residual e guardadas em ampôlas sob atmosfera de nitrogênio para posterior análise.

As análises dos constituintes dos óleos foram realizadas utilizando-se cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa em aparelho HP 5995 provido de coluna capilar de sílica fundida (50m) e fase estacionária de metilsilicona SP 2100, usando-se programação de temperatura de 50-250°C a 4°C/min e temperatura do injetor a 250°C.

As identificações das substâncias foram feitas por interpretações dos respectivos espectros de massa, combinada com a determinação dos índices de Kovat através de programa de microcomputador especialmente elaborado para esta finalidade.

6.6 - Estudo dos componentes das raízes de

Pilocarpus trachyllophus

Obtenção dos extratos

1.5kg da casca das raízes de *Pilocarpus trachyllophus* foram secas ao sol, devidamente moídas e extraídas exaustivamente à frio com hexano seguido de etanol.

Os respectivos extratos, depois de evaporados os solventes pesaram 165g(185ml) e 83g e receberam a denominação de PT(RC)H e PT(RC)E. O extrato PT(RC)H apresentou-se como um óleo levemente amarelado

Destilação fracionada de PT(RC)H

Análise de PT(RC)H por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa(CGL-EM) revelou a presença de basicamente três substâncias sendo portanto submetida a uma destilação fracionada.

15ml(13,5g) do material foram adicionados em um balão de fundo redondo(50ml), o qual foi adaptado com uma coluna de destilação do tipo Vigreux. A destilação foi realizada sob vácuo por agitação com agitador magnético e as frações foram coletadas em micro coletor tetratubulado fornecendo os resultados abaixo:

TEMP.DE DESTILAÇÃO	DENOMINAÇÃO	VOLUME DESTILADO(ml)
73-80°C	PT(RC)H-D1	2.0
80-81°C	PT(RC)H-D2	2.0
81-82°C	PT(RC)H-D3	3.7
82-84°C	PT(RC)H-D4	1.0

Dentre as frações obtidas, PT(RC)H-D2 e PT(RC)H-D4 apresentaram-se homogêneas em CCD. No resíduo da destilação(5.8g) foi verificada a formação de cristais em forma de agulhas.

A alíquota restante de PT(RC)H(170ml) foi submetida ao mesmo processo de destilação descrito acima e o resíduo

obtido(63g) foi reunido com os outros 5.8g e denominado PT(RC)H-RD(68.8g).

Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD

As 68.8g de PT(RC)H-RD foram filtradas à vácuo e o filtrado lavado várias vezes com hexano gelado fornecendo um material cristalino denominado PT(RC)H-RD1(2.4g). A análise cromatográfica por CCD dos cristais anteriormente obtidos revelou-nos tratar-se de uma mistura de quatro componentes. As 2.4g de PT(RC)H-RD1 foram adsorvidas em 2.4g de sílica, pulverizadas em gral de porcelana e em seguida cromatografadas em funil cilíndrico de 250ml sobre 132g de sílica de placa utilizando-se hexano como eluente. A cromatografia foi realizada sobre pressão com o auxílio de um microcompressor. As frações obtidas foram comparadas por CCD e aquelas que apresentaram comportamento semelhante foram reunidas. Os resultados são fornecidos abaixo:

ELUENTE	VOL.DO ELUATO(ml)	DENOMINAÇÃO	PESO(mg)
Clorofórmio	300	-	-
"	3 x (10)	PT(RC)H-RD1(16-18)	85
"	21 X (10)	(19-39)	900
"	25 X (10)	(40-65)	420
"	39 X (10)	(66-105)	130
"	33 X (10)	(106-139)	500
"	50	140	100
			2135

Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD1(19-39)

A análise da fração PT(RC)H-RD1(19-39) por CCD revelou tratar-se de uma mistura de dois componentes. 700mg de PT(RC)H-RD1(19-39) foram misturadas com 500mg de sílica, pulverizadas em gral de porcelana e acondicionadas sobre 45g de sílica de placa em um funil cilíndrico de 250ml. A eluição foi feita sob pressão com o auxílio de um microcompressor, e os resultados obtidos após comparação por CCD são fornecidos abaixo:

ELUENTE	VOL.ELUATO(ML)	DENOMINAÇÃO	PESO(mg)
Hex/HCCl ₃ (1:1)	400	PT(RC)H-RD1(19-39)(1-12)	80.1
"	39 x (10)	(13-52)	305.4
"	30 x (10)	(53-83)	200.2
"	29 x (10)	(84-113)	70.1
			655.8

Verificou-se que apenas PT(RC)H-RD1(19-39)(84-113) denominada RD-FC se mostrava homogênea em CCD apresentando ponto de fusão de 115-119°C

Tratamento cromatográfico de

PT(RC)H-RD1(19-39)(13-52)

300mg da PT(RC)H-RD1(19-39)(13-52) foram misturadas com 200mg de sílica, pulverizadas em gral de porcelana e acondicionadas sobre 45g de sílica de placa em um funil cilíndrico de 125ml. A eluição foi feita sob pressão com o

auxílio de microcompressor. Os resultados obtidos após comparação por CCD são fornecidos abaixo:

ELUENTE	VOLUME(ml)	DENOMINAÇÃO	PESO(mg)
Hex/HCCl ₃ (1:1)	5 X (10)	PT(RC)H-RD1(19-39)(13-52)(1-5)	2.5
"	3 X (10)	" (6-8)	40.4
"	5 X (10)	" (9-21)	220.0
			262.9

Após a análise das frações em CCD foi verificado que PT(RC)H-RD1(19-39)(13-52)(6-8) denominado RD1-FA era homogênea e apresentava ponto de fusão de 55-58°C.

Tratamento cromatográfico de PT(RC)H-RD1(106-139)

PT(RC)H-RD1(106-139) apresentou-se em CCD como uma mistura de duas substâncias. 500mg desta mistura foram cromatografadas em duas placas preparativas de Alumina(20cm X 20cm) com indicador de fluorescência, utilizando-se como eluente a mistura clorofórmio/hexano(95:5). As camadas de sílica referentes a cada uma das duas bandas foram retiradas das placas, reunidas e submetidas à extração com acetato de etila à quente. O acetato de etila foi evaporado fornecendo uma fração denominada RD1-FD(90mg) que por análise em CCD mostrou-se homogênea. RD1-FD apresentou um ponto de fusão de 82-86°C.

Extração das bases alcalóidicas de PT(RC)E

82g de PT(RC)E foram extraídas com dez alíquotas de 100ml de ácido sulfúrico (3%). O extrato ácido foi filtrado em diatomita e carvão ativo e depois alcalinizado com hidróxido de amônio (10%). A solução alcalina foi filtrada, e tanto o filtrado quanto o precipitado retido no filtro foram extraídos com clorofórmio até que se esgotasse pela extração todos os alcalóides neles presente (testes com reagente de Dragendorff). Os extratos obtidos pela evaporação do clorofórmio foram analisados em CCD e reunidos por tratar-se de mistura com semelhante composição química. A mistura reunida foi denominada PT(RC)E-B (3.26g). A parte de PT(RC)E insolúvel em ácido foi denominada PT(RC)E-N.

Obtenção da mistura de alcalóides de PT(RC)E-B

Os 3.26g de PT(RC)E-B foram dissolvidos em 10ml de etanol e acondicionados em um balão de fundo redondo (50ml) e colocados sob agitação. Ácido nítrico foi adicionado até pH=4 quando precipitou um sólido branco que mostrou-se homogêneo em CCD, mas quando analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se coluna RP-18, temperatura da coluna 50°C, metanol/água 93:7, KH₂PO₄ 5%, pH=2,5, verificou-se tratar-se de duas substâncias de diferentes tempos de retenção (2.28 e 2.70min). A mistura de alcalóides apresentou ponto de fusão de 159-161°C e foi denominada PT(RC)E-BN.

6.7 - Estudo dos componentes fixos das folhas de *Pilocarpus spicatus*

Obtenção dos extratos

7,5Kg de folhas de *Pilocarpus spicatus* depois de secas ao sol foram trituradas e posteriormente extraídas em aparelho de Soxhlet semiindustrial com 25l de etanol por seis horas. O etanol foi evaporado até um volume aproximado de dois litros e em seguida evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se 700g de extrato que foi denominado PSFE.

Uma alíquota de 300g de PSFE foi lavada cinco vezes com porções de 500ml de ácido sulfúrico 2,5%. O extrato ácido foi filtrado em funil de Buchner sob vácuo, alcalinizado até pH 9 com hidróxido de amônio a 10% e extraído com acetato de etila até que a solução aquosa não mais revelasse reação positiva para alcalóides com reagente de Draggendorff. As frações acetato de etila depois de reunidas foram lavadas com água, secas em sulfato de sódio anidro, e o solvente evaporado sob pressão reduzida, fornecendo dez gramas de bases alcaloídicas denominadas PSFE-B.

A parte original neutra, que não se solubilizou no ácido sulfúrico a 25%, foi lavada para retirar o excesso de ácido e evaporada sob pressão reduzida fornecendo 200g de um material muito viscoso, correspondente ao extrato etanólico desalcaloidificado e denominado de PSFE-N.

Elaboração de PSFE-N

Uma alíquota de 190g do extrato etanólico desalcaloidificado(PSFE-N) foi adsorvida a 242g de sílica e acondicionadas em um funil de separação de 2.000ml. Eluição com hexano seguida de clorofórmio, acetato de etila e finalmente metanol forneceu o seguinte resultado:

ELUENTE	VOL.DO ELUATO(ml)	DENOMINAÇÃO	PESO(mg)
Hexano	5000	PSFE-NH	65
Clorofórmio	4000	PSFE-NC	51
Ac.de etila	2500	PSFE-NA	24
Metanol	2000	PSFE-NM	40
			180

Tratamento cromatográfico de PSFE-NH

As 65g de PSFE-NH, anteriormente obtidas foram adsorvidas a 120g de sílica e pulverizadas em gral de porcelana. A mistura foi acondicionada em um funil de separação cilíndrico de 1000ml sobre uma camada de 100g de sílica. A eluição com solventes puros e misturas binárias forneceu os seguintes resultados:

ELUENTE	VOL.DO ELUATO(ml)	DENOMINAÇÃO	PESO(mg)
Hexano	200	PSFE-NH1	3100
"	400	PSFE-NH2	1700
"	600	PSFE-NH3	990
"	600	PSFE-NH4	500
Hex/HCCl ₃ -(4:1)	1000	PSFE-NH5	510
" (1:1)	1000	PSFE-NH6	2000
Clorofórmio	1000	PSFE-NH7	200
Ac.de etila	1500	PSFE-NH8	29250
Etanol	580	PSFE-NH9	25500
			63750

Na fração PSFE-NH5 precipitou um sólido que foi filtrado à vácuo em funil de placa porosa e lavado várias vezes com hexano gelado rendendo 304mg de uma substância branca apresentando ponto de fusão de 270.8-271.6°C e denominada de PSFE-NA.

Tratamento cromatográfico de PSFE-NH6

Também na fração PSFE-NH6 houve a formação de um precipitado que depois de filtrado sob vácuo em funil de placa porosa e lavado várias vezes com hexano gelado forneceu 1,53g de um sólido denominado PSFE-NH6 que após a análise por CCD revelou tratar-se de uma mistura de duas substâncias de Rf muito semelhantes, sendo que uma das substâncias apresentou o mesmo Rf de PSFE-NA.

Quando 1.0g de PSFE-NH6 foi submetida a hidrólise alcalina rendendo 844mg de material hidrolisado, denominado PSFE-NH6HID verificou-se por CCD que apenas um dos dois componentes havia de fato sido hidrolisado modificando completamente seu Rf, possibilitando assim a separação dos dois componentes por cromatografia em sílica.

As 844mg de PSFE-NH6HID foram adsorvidas em 5g de sílica e cromatografadas em funil cilíndrico de 250ml sobre 20g de sílica para CCD. A coluna foi eluída com o auxílio de um pequeno compressor para ajustar a vazão do eluente diminuindo o tempo de eluição. Os resultados após comparações das frações

por CCD são apresentados abaixo:

ELUENTE	VOL.DO ELUATO(ml)	DENOMINAÇÃO	PESO(mg)
Hexano	180	-	-
Hex/HCCl ₃ (95:5)	200	-	-
" (93:8)	50	PSFE-NH6HID(1-87)	391
" "	150	(88-110)	120
" "	100	(111-116)	36
" "	100	(117-141)	245
" "	100	(142)	50
			842

Análise cromatográfica por CCD das frações PSFE-NH6HID(1-87) e PSFE-NH6HID(117-141) revelou a homogeneidade das mesmas. A confirmação da pureza das referidas frações foi realizada através da obtenção do ponto de fusão 211-14°C para PSFE-NH6HID(1-87) e 248-51°C para PSFE-NH6HID(117-141) os quais foram denominadas de PSFE-NB1 E PSFE-NB2, respectivamente.

6.8 - Obtenção de derivados

Hidrólise de PSFE-NA

Em balão de fundo redondo(50ml), adicionou-se 100mg de PSFE-NA dissolvidos em 10ml de etanol. Em seguida foram adicionados 20ml de uma solução etanólica de KOH 2% e a mistura foi refluxada com agitação por 24 horas à temperatura ambiente quando então a reação se completou(o acompanhamento foi feito

por CCD). Adicionou-se 40ml de água à mistura reacional e extraíu-se quatro vezes com éter etílico(20ml). Evaporado o éter etílico obteve-se 74.23mg de uma substância sólida de ponto de fusão 245-252°C denominada PSFE-NAHID. A porção hidroalcoólica alcalina foi acidificada com ácido clorídrico 6% e extraída quatro vezes com éter etílico. Evaporação do éter etílico não forneceu qualquer material orgânico.

Acetilação de PSFE-NAHid

74.23mg de PSFE-NAHID foram adicionados em um balão de fundo redondo(50ml) juntamente com 1ml de piridina e 5ml de anidrido acético e colocados sob refluxo por seis horas. Após a análise da mistura reacional em CCD verificou-se que a reação havia sido completada. Adição de água(40ml) levou à formação de um precipitado que depois de filtrado e lavado várias vezes com ácido clorídrico 6% foi finalmente lavado com água até pH neutro e forneceu 50mg de um sólido, $P_f=270.8-271.6$ denominado PSFE-NAHID/ACET.

Hidrólise de PSFE-NH6

1g de PSFE-NH6 foi dissolvido em 50ml de etanol e adicionado em um balão de fundo redondo(250ml), juntamente com 100ml de solução alcoólica de KOH 2%. A mistura foi deixada sob refluxo até que o final da reação foi constatado através da análise por CCD. O precipitado formado depois de filtrado,

lavado água com e seco em dessecador pesou 944mg e foi denominado PSFE-NH6HID.

Oxidação do PSFE-NB2

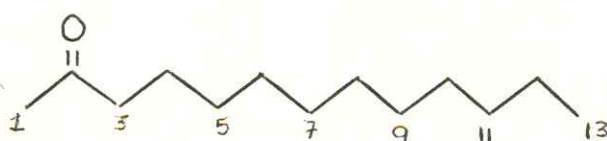
50mg de PSFE-NB2 foram dissolvidos em 10ml de diclorometano e adicionados em um balão de fundo redondo(50ml) juntamente com 100mg clorocromato de piridinium(PCC) dissolvidos em 10ml de diclorometano. O término da reação duas horas depois foi verificado através do acompanhamento por CCD. A mistura reacional foi filtrada em uma pequena camada de sílica em uma coluninha por eluição com diclorometano. O diclorometano foi evaporado fornecendo 36mg de uma substância denominada PSFE-NB2oxi. Pf=202-210°C

CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DOS CONSTITUINTES
ISOLADOS E SEUS DERIVADOS

PT(RC)H-D2

PM = 198

FM = C₁₃H₂₆O



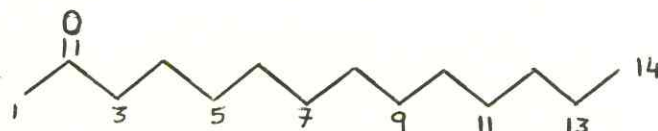
Espectrometria na região do infravermelho:filme(cm^{-1}):2960,2880
1730,1480,1370,1180.

Espectrometria de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): (integração,multipl-
cidade, constante de acoplamento e deslocamento químico em
 δ):0.75(3H,t,6.9Hz), 1.14(16H), 1.43(2H,qui,6.9Hz) 1.99(3H),
2.28(2H,t,7.5Hz).

Espectrometria de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3):deslocamento químico em
 δ :13.79, 22.42, 23.61, 28.95, 29.10, 29.19, 29.25, 29.38,
31.67, 43.44, 208.00.

PT(RC)H-D4

PM = 212

FM = C₁₄H₂₈O

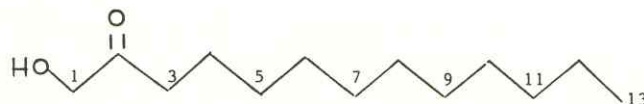
O Espectrometria na região do infravermelho:filme(cm^{-1}): 2960
2880, 1730, 1480, 1180.

Espectrometria de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): integração e multipli-
cidade, constante de acoplamento e deslocamento químico em
 δ): 0.78(3H,t,6.9Hz), 1.16(18H), 1.46(2H,quin,6.8Hz), 2.02(3H,
s),2.31(2H,t,7.4Hz).

Espectrometria de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3):deslocamento químico
em δ : 13.84, 22.47, 23.66, 28.99, 29.14, 29.22, 29.29, 29.42,
29.42, 29.42, 29.48, 31.71, 43.52, 208.67.

RD1-FA

PM = 214

FM = C₁₃H₂₆O₂

Espectrometria na região do infravermelho. KBr (cm⁻¹): 3300, 2960, 2940, 2880, 1720, 1470, 1410, 1380, 1100.

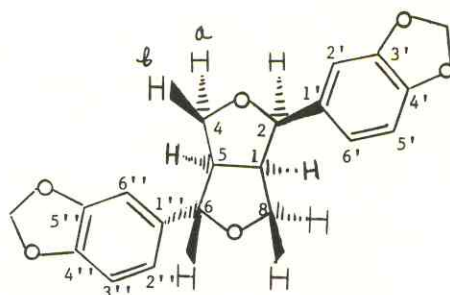
Espectrometria de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): (integração, multiplicidade, constante de acoplamento e deslocamento químico em δ): 0.86 (3H, t, 7.2 Hz), 1.24 (16H), 1.61 (2H, t, 7.2 Hz), 2.39 (2H, t, 7.5 Hz), 3.13 (1H, s), 4.22 (2H, s).

Espectrometria de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): deslocamento químico em δ: 14.06, 22.64, 23.71, 29.17, 29.25, 29.37, 29.53, 29.53, 29.53, 31.86, 38.41, 68.04, 209.85.

Espectrometria de massa: 54, 55, 57, 68, 82, 84, 86, 96, 98, 109, 184, 211, 212, 214.

RD1-FC

PM = 354

FM = C₂₀H₁₈O₆

Espectrometria na região do infravermelho. KBr (cm⁻¹) 960, 3880, 1500, 1440, 1380, 1260, 1230, 1200, 1180, 1080, 1040, 940, 800, 740.

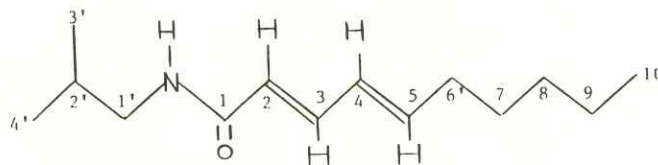
Espectrometria de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃): (integração multiplicidade e constante de acoplamento em δ): 2.85(1H, q, 6.9Hz), 3.29, (2H, m), 3.80(2H, m), 4.04(1H, d, 9.3Hz), 4.36(1H, d, 7.2Hz), 4.82(1H d, 5.4Hz), 5.93(2H, s), 5.95(2H, s), 6.8(6H, m).

Espectrometria de RMN ¹³C (75Mhz, CDCl₃). deslocamento químico em δ : 50.07, 54.56, 69.57, 70.83, 81.93, 87.55, 100.89, 100.96, 106.32, 106.47, 108.05, 108.05, 118.60, 119.49, 132.19, 135.06, 146.48, 147.12, 147.55, 147.87.

Espectrometria de massa: 55(10%), 65(27%), 77(33%), 91(18%), 115(28%), 121(41%), 122(43%), 148(29%), 149(90%), 150(65%), 203(18%), 354(9%).

RD1-FD

PM = 223

FM = C₁₄H₂₅NO

Espectrometria na região do infravermelho. KBr (cm⁻¹): 4380, 2960, 2940, 2880, 1660, 1550, 1000.

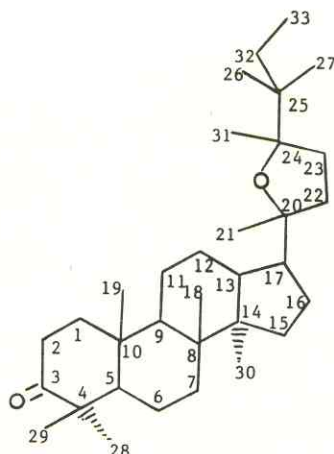
Espectrometria de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): (integração multiplicidade, constante de acoplamento e deslocamento químico em δ): 0.87 (2H, t, 7.8 Hz), 0.90 (6H, d, 4.4 Hz), 1.40 (2H, q), 1.78 (1H, n, 6.9 Hz), 2.12 (2H, q, 7.5 Hz), 3.14 (2H, t, 6.3 Hz), 5.77 (1H, d, 15 Hz), 6.16-5.92 (2H, m), 7.17 (1H, dd, 9.8 e 15 Hz).

Espectrometria de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) deslocamento químico em δ: 14.00, 20.08, 20.08, 22.41, 28.44, 28.58, 31.31, 32.85, 46.90, 121.81, 128.19, 141.13, 142.50, 166.15.

Espectrometria de massa: 223 (15%), 208 (10%), 180 (9%), 166 (9%), 167 (7%), 151 (100%).

PSFE-NB1

PM = 484

FM = C₃₃H₅₆O₂

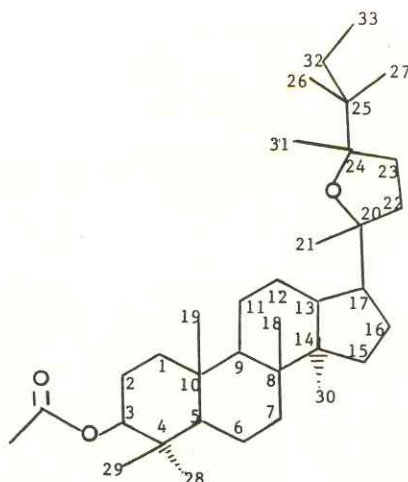
Espectrometria na região do infravermelho. KBr(cm^{-1}): 3960, 1700, 1460, 1380, 1080.

Espectrometria de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): (integração, multiplicidade, constante de acoplamento e deslocamento químico em δ): 2.4(2H), 1.2-1.6(m), 0.76(3H,s), 0.78(3H,s), 0.82(3H,s), 0.85(3H,s), 0.93(3H,s), 0.9(3h,s), 1.03(3H,s), 1.12(3H,s), 1.13(3H,s)

Espectrometria de RMN ^{13}C (75Mhz, CDCl_3). Deslocamento químico em δ : 8.91, 15.17, 15.98, 16.12, 19.63, 21.98, 21.09, 21.54, 21.88, 24.40, 24.36, 25.15, 26.92, 26.69, 29.46, 30.89, 33.69, 34.02, 34.57, 36.79, 37.87, 39.86, 40.08, 40.19, 42.89, 47.38, 49.84, 49.92, 50.05, 55.28, 85.16, 87.51, 218.12.

Espectrometria de massa. 485(17%), 467(35%), 468(12%), 453(18%), 414(6%), 413(6%), 205(6%), 177(5%), 206(2%), 250(22%), 235(19%), 169(100%), 99(18%), 234(5%), 233(11%), 219(15%), 191(5%), 99(18%), 81(64%).

PSFE-NA



PM = 528

FM = C35H60O3

Espectrometria na região do infravermelho. KBr (cm^{-1}): 2970, 1740, 1260, 1120, 1000.

Espectrometria de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): (integração, multiplicidade, constante de acoplamento e deslocamento químico em δ): 0.79(3H, s), 0.82(3H, s), 0.84(3H, s), 0.85(12H, s), 0.85(3H, t), 0.93(3H, s), 1.14(3H, s), 1.16(3H, s), 2.03(3H, s), 4.47(1H, dd, 5.52 e 9.88Hz).

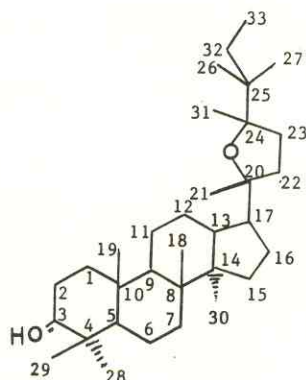
Espectrometria de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) deslocamento químico em δ : 8.96, 15.53, 16.26, 16.26, 16.52, 18.20, 21.15, 21.33, 21.44, 21.64, 23.74, 24.44, 24.44, 25.20, 26.71, 27.29, 29.53, 30.96, 33.75, 35.25, 37.07, 33.91, 37.96, 38.75, 40.12, 40.36, 42.84, 49.91, 50.17, 50.56, 55.95, 80.94, 85.22, 87.52, 170.95.

Espectrometria de massa: 458(2%), 457(2%), 398(9%), 397(10%), 169(100%).

PSFE-NB2

PM = 486

FM = C33H58O2



Espectrometria na região do infravermelho. KBr (cm^{-1}) 3400, 2960, 1480, 1380, 1110, 1060, 960.

Espectrometria de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): (integração, multiplicidade e deslocamento químico em δ): 0.76 (3H, s), 0.79 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.83 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.96 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.17 (3H, s), 2.0 (1H, s), 3.2 (1H, dd)

Espectrometria de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) deslocamento químico em δ : 8.91, 15.34, 15.48, 16.14, 16.24, 18.26, 21.10, 21.38, 21.55, 24.40, 24.40, 25.18, 26.70, 27.38, 27.98, 29.46, 30.93, 33.70, 35.27, 37.10, 37.87, 38.94, 39.02, 40.08, 40.30, 42.79, 49.88, 50.88, 50.58, 55.81, 78.92, 85.23, 87.49.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Bo Holmstedt, S. Henry Wassén (Jaborandi: an interdisciplinary appraisal). *Journal Ethnopharmacology*, 1(1979), 3-21.
- 2 - Costa O.A.,. The introduction of jaborandi in to therapeutics by Dr. Symphronio Coutinho. *Revista Brasileira de Farmácia*. 6(1968) 324-329.
- 3 - Imbesi A.O *Pilocarpus pennatifolius*. *Revista Brasileira de Farmacia*. 3(1944) 87-106.
- 4 - Imbesi A. O *Pilocarpus pennatifolius*. *Revista Brasileira de Farmácia*. 4(1944), 123-139.
- 5 - Kaastra R.C. *Pilocarpinae*. Monograph number 33. *Flora Neotropica*. Ed. by the New York Botanical Garden (1982)
- 6 - Penildon Silva. *Farmacologia*. 1980. Editora Guanabara Koogan SA. Rio de Janeiro.
- 7 - Manske M. The alkaloids. vol XXII (1983). 1983 Copyright by academic press inc.
- 8 - Voightlander W, G. Balsam. *Arch. Pharm. (Weinheim Ger)*. 311 (1978), 927
- 9 - Haase J. and Kussather E. *Z. Naturforsch. B: anorg. Chem; Org. Chem; Biochem., Biophysic., Bio.* 27B, 212 (1972).
- 10 - Balsam, Guenter; Voightlander, Hans W. (Fabriklab., E. Merck, Darmstadt, Ger). *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger)*, 12(1978), 311, 1016-18

- 11 - Tedeschi E. et al. The isolation of pure pilosine and epipilosine from leaves of *Pilocarpus jaborandi*. Isr. J. Chem. 11(1973)731-733.
- 12 - Pimann F.L. Pilosine. J. Chem. Soc. 101(1912)2260.
- 13 - Voigtlander H. and W. Rosenberg. Uber isopilosine und pilosine. Arch. Pharm. und Ber. deutsch Pharm. Ger. 292(2959)579-585.
- 14 - Lowe, W. and Pook. Pilosin und isopilosin. Sin. Justus Liebigs Ann. Chem. (1973)1476-1479.
- 15 - Guenter. The essential Oils, Vol 111, Pg 375, 5ª edição. Robert E. Krieger Publishing Co., inc. New York. 1972.
- 16 - Craveiro A.A., Matos F.J., Alencar J.W.. Essencial Oil from Brazilian Rutaceae. 1. Genus *Pilocarpus*. J. Nat. Products. 42(1979)669.
- 17 - Pelter A. Ward R.S., Revised structures for pluviatilol. Tetrahedron. 32(1976)2783.
- 18 - Ivan Adaae-Mensah, Frank G. torto. N-isobutil-trans-2-trans-4-eicosadieneamide of fruits of *Piper guianense*. Phytochemistry(1977)16, 483-85.
- 19 - Kaya, V.L; Novikov, V.A. Izv. Akad. Naur sssr, Ser Khim. 12(1983)2727-34