

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica**

Grazielle Lopes

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**BIOMONITORAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS  
FRAÇÕES GLICOALCALÓIDAIAS DE SEIS ESPÉCIES DO  
GÊNERO *Solanum*, FRENTE À *Artemia Salina* E AO CARAMUJO  
*Biomphalaria glabrata* E REAÇÕES COM O ALCALÓIDE  
*SOLASODINA* DE *solanum crinitum***

**Grazielle Lopes**

*Sob orientação da Professora*  
**Dra. Áurea Echevarria Aznar N. Lima**  
*Sob co - orientação da Professora*  
**Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Magister Scientiae** em Química, Área  
de concentração Química Orgânica.

Seropédica  
Maio de 2005

Lopes, Grazielle

Biomonitoramento dos extratos brutos e das frações glicoalcaloidais de seis espécies do gênero *Solanum* frente à *Artemia salina* e ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. E as reações com o alcalóide solasodina de *Solanum crinitum*. / Dissertação. Seropédica. Rio de Janeiro. UFRuralRJ. ICE-DeQuim. 2005.

Orientador: Aurea Echevarria Aznar de Lima

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

Grazielle Lopes

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de concentração em Síntese Orgânica, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em Química Orgânica.

Aprovada em:...../...../.....

---

Profª. Dra. Áurea Echevarria Aznar N. Lima (Orientadora)  
DEQUIM, ICE – UFRRJ

---

Profª. Dra. Luciana Vignólio Alves  
Química Orgânica – Vota Redonda  
Departamento de Biologia – Maria Teresa

---

Profª. Dra. Helena Regina Pinto Lima  
Instituto de Biologia - Departamento de Botânica

---

Profª. Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira (Suplente)  
DEQUIM ICE – UFRRJ.

“Agradeço e dedico esse trabalho a minha mãe, Vera Lucia Pedrosa Lopes, que sempre se mostrou amiga, companheira e presença certa em todos os momentos, apesar da distância geográfica. Que sempre demonstrou a força de uma guerreira sem perder a doçura e o respeito pelas pessoas”.

“Ao meu pai, Amauri Lopes, que possibilitou a minha formação e me ensinou a encarar sem medo todas as situações. E que do seu jeito, eu sei que me ama muito, também te amo por isso agradeço e reconheço o que fez por mim”.

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Pessoa

## Agradecimentos

A Deus que sempre esteve comigo e me permitiu encerrar mais esta etapa e me anima para as próximas;

A minha família, pela compreensão das ausências e o incessante incentivo;

A Dra Tânia Maria Sarmiento da Silva, pela co-orientação e por todo aprendizado que me proporcionou, além de ter me recebido em sua casa;

A Universidade Federal da Paraíba por ter me acolhido e proporcionado um grande crescimento profissional;

A prof<sup>a</sup> Dra Maria de Fátima Agra, pela identificação das espécie de Solanum;

Aos queridos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – LTF-UFPB;

A UFRJ e ao aluno de doutorado Flávio por permitir a utilização do RMN;

Aos amigos Cláudio, Myrtes, Alice, Andressa, Kenia, Ari e Silavana que tanto me ajudaram e me ensinaram durante este tempo;

A mais nova amiga Amanda, por quem eu tenho uma grande admiração;

Os estagiários Dílson, Camila, Ana Paula Amorim, Ana Paula e Marcio que sempre colaboraram como podiam;

As amigas Andréa Rosane da Silva (Rose) e Tatiana Santana Ribeiro (Taty), por toda a nossa história que já vem lá da graduação, e que continuará por muitos anos;

As queridas amigas Regina Lucia Pelachin Lianda (Rrê) e Ana Paula Rosa Lopes (Aninha) por todos os nossos cafés da manhã, jantares e agradáveis conversas (sempre muito construtivas);

A todos os amigos da pós-graduação, Janaína, Cristina, Marli, Juliana, Cássia, Virgínia, Luciano, Mario Sergio, Ildomar, Luiz (Pilha), Cleber, Bauer, pela excelente convivência;

Ao Professor Mario Geraldo de Carvalho, pelas inúmeras ajudas;

A Professora Rosane Nora Castro pela ajuda com o CG-EM;

Aos amigos da V.L.S. A, Matheus, Thiago, Luís e Yuri pelos maravilhosos momentos de descontração;



Aos amigos, Mery, Alessandra, Rodrigo e Marcio pelo incentivo e carinho;

Aos funcionários, Áurea (*in memorian*), Eli, Frances, Fábio, Maurício, Aldir, André (Choque), Eugênio, Rui, Carlos, Renato, Conceição e Neli, pela atenção dispensada comigo e pela convivência cordial;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por todos estes incríveis anos que dela tenho feita minha casa;

Ao corpo docente do PPGQO, por sua valiosa contribuição em minha formação;

À CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

E a Mario Limeira de Andrade, meu namorado, amigo e companheiro, por toda a sua compreensão e amor, te Amo.

À Professora Áurea Echevarria, pela  
amizade, carinho e é claro pela  
competência indiscutível e a ética.  
Muito Obrigada!!

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	xiv
Índice de Figuras.....	xvi
Índice de Tabelas.....	xvii
Resumo.....	xix
Abstract.....	xx
1.0 Introdução.....	1
1.1 Histórico e importância das plantas.....	1
1.2 Família Solanácea: Gênero <i>Solanum</i> .....	4
1.3 Atividade biológica do gênero <i>Solanum</i> .....	8
1.4 Os Esteróides.....	10
1.4.1 Importância econômica e farmacológica.....	10
2.0 Objetivos.....	16
3.0 Parte experimental.....	17
3.1 Equipamentos.....	17
3.2 Reagentes e solventes.....	18
3.3 Metodologia.....	19
3.3.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	19
3.3.1.a <i>Solanum crinitum</i> .....	19
3.3.1.b <i>Solanum capsicoide</i> .....	19
3.3.1.c <i>Solanum variable</i> .....	20
3.3.1.d <i>Solanum lycocarpum</i> .....	20
3.3.1.e <i>Solanum americanum</i> .....	21
3.3.1.f <i>Solanum seaforthianum</i> .....	21
3.4 Preparação dos extratos e obtenção das frações.....	22
3.4.1 Obtenção e purificação da solasodina.....	22
3.5 Detecção dos glicoalcalóides de <i>solanum crinitum</i> utilizando CLAE-EM.....	23
3.6 Reação de esterificação utilizando MW.....	24
3.6.1 Reação catalisada por imidazol.....	24
3.6.2 Reação catalisada por ZnCl <sub>2</sub> .....	24
3.6.3 Reação catalisada por gel de sílica.....	25
3.6.4 Reação catalisada por Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	25

3.7	Reação de esterificação com a solasodina.....	26
3.7.1	Reação com suporte de gel de sílica.....	26
3.7.2	Reação com suporte de gel de sílica e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	26
3.7.3	Reação sólido-sólido.....	27
3.7.4	Reação da solasodina com catalisador imidazol.....	27
3.7.5	Reação da solasodina com cloreto de cinmoíla.....	28
3.7.5.a	Preparação do cloreto de cinamoíla.....	28
3.7.5.b	Reação de esterificação.....	28
3.7.6	Reação da solasodina com cloreto de benzoíla.....	29
3.7.7	Reação da solasodina com anidrido acético.....	29
3.8	Reações de oxidação da solasodina.....	30
3.8.1	Reação de oxidação utilizando MnO <sub>2</sub> .....	30
3.8.1.a	Preparação do MnO <sub>2</sub> .....	30
3.8.1.b	Reação de oxidação.....	30
3.8.2	Reação de oxidação utilizando PDC.....	31
3.8.2.a	Preparação do PDC.....	31
3.8.2.b	Reação de oxidação.....	31
3.8.3	Reação de oxidação utilizando PCC.....	32
3.8.3.a	Preparação do PCC.....	32
3.8.3.b	Reação de oxidação.....	32
3.9	Ensaio Biológicos.....	32
3.9.1	Ensaio de toxidez frente a <i>Artemia salina</i> .....	33
3.9.1.a	Procedimentos para o ensaio de toxidez.....	33
3.9.2	Ensaio moluscicida frente ao caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	37
3.9.2.a	Procedimentos para o ensaio moluscicida.....	37
4.0	Resultados e Discussão.....	39
4.1	Obtenção dos extratos, frações glicoalcaloidais e da solasodina de <i>Solanum crinitum</i> .....	39
4.2	Monitoramento dos glicoalcalóides de <i>Solanum crinitum</i> por CLAE-EM.....	44
4.3	Reações utilizando solasodina.....	47
4.3.1	Estudo da metodologia para as reações de esterificação.....	48
4.3.2	Reações de esterificação da solasodina.....	50
4.3.3	Reações de oxidação da solasodina.....	52

4.4 Atividade Biológica.....	56
4.4.1 Atividade frente a <i>Artemia salina</i> .....	56
4.4.2 Atividade moluscicida frente ao caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> ..	64
5.0 Conclusão .....	67
6.0 Resultados e Discussão.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOH – ácido acético

Ac<sub>2</sub>O – anidrido acético

°C – grau Celsius

CCD – cromatografia em camada delgada

CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

CLAE-EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

conc. – concentração

DL<sub>50</sub> – dose letal para 50%

DMSO – dimetilsulfóxido

dp – desvio padrão

EM – espectrometria de massas

EtOH – etanol

g – gramas

h - horas

Hex. - hexano

IV – infra-vermelho

JBP – Jardim Botânico da Paraíba

M<sup>+</sup> - pico de íon molecular

MeOH – metanol

MHz – mega hertz

Min. – minutos

mL – mililitros

MW – microondas

m/z – relação carga massa

n.t. – não testado

P.A – padrão analítico

P - probabilidade

PCC – pyridinum chlorochromate

PDC – pyridinum dichromate

R – coeficiente de correlação

RMN  $^{13}\text{C}$  – Ressonância Magnética de Carbono- 13

S – segundos

T AS – toxidez em *Artemia salina*

THF – tetrahydro furano

TMS – tetra metil silano

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética de Hidrogênio

$\mu\text{g}$  – microgramas

$\mu\text{L}$  – microlitros

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura da efedrina e da polícarpina.....	1
<b>Figura 3.</b> Estrutura da hiosciamina e da hioscina.....	4
<b>Figura 4.</b> Estrutura da nicotina.....	5
<b>Figura 5.</b> Estrutura do flavonóide tilirosídeo.....	5
<b>Figura 6.</b> Hormônios sexuais progesterona e testosterona.....	9
<b>Figura 7.</b> Estrutura da diosgenina.....	10
<b>Figura 8.</b> Estrutura da ecogenina.....	11
<b>Figura 9.</b> Estrutura do colesterol.....	13
<b>Figura 10.</b> Estrutura da tomatidina.....	14
<b>Figura 11.</b> Estrutura do glicoalcalóide solasonina.....	15
<b>Figura 12.</b> Estrutura da solasodina.....	23
<b>Figura 13.</b> Esquema para o ensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> .....	34
<b>Figura 14.</b> Esquema para o ensaio moluscicida frente ao caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	37
<b>Figura 15.</b> Estrutura da solasodina.....	40
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da solasodina.....	41
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para a solasodina.....	42
<b>Figura 18.</b> Espectro de massas da fração glicoalcaloidal.....	45
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas e espectros de massas das plantas coletadas no Rio de Janeiro e em João Pessoa.....	46
<b>Figura 20.</b> Equações das reações da solasodina com o ácido cinâmico.....	47
<b>Figura 21.</b> Estrutura do cinamato de ciclo pentila.....	49
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas do cinamato de ciclo pentila.....	49
<b>Figura 23.</b> Principais fragmentos para o éster cinamato de ciclo pentila.....	49
<b>Figura 24.</b> Fragmento do éster cinâmico da solasodina.....	51



<b>Figura 25.</b> Estrutura da solasodina acetilada.....	51
<b>Figura 26.</b> Espéctro de RMN <sup>13</sup> C da solasodina acetilada.....	52
<b>Figura 27.</b> Espectro de infra - vermelho e estrutura da solasodinona.....	53
<b>Figura 28.</b> Deslocamentos químicos para a cetona β,γ-insaturada e deslocamentos obtidos no trabalho.....	55
<b>Figura 29.</b> Rearranjo alílico para a solasodinona.....	55
<b>Figura 30.</b> Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log da dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal de <i>S. seaforthianum</i> .....	55
<b>Figura 31.</b> Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log da dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal <i>S. lincocarpum</i> .....	57
<b>Figura 32.</b> Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log da dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal <i>S. crinitum</i> .....	58
<b>Figura 33.</b> Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log da dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal <i>S. americanum</i> .....	59
<b>Figura 34.</b> Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log da dose ensaiada para o extrato bruto <i>S. capsicoides</i> .....	60
<b>Figura 35.</b> Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log da dose ensaiada para o e fração glicoalcaloidal <i>S.variable</i> .....	61
<b>Figura 36.</b> Gráfico comparativo dos valores de DL <sub>50</sub> para as espécies de Solanum frente à <i>Artemia salina</i> .....	62

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Gradiente de eluição da coluna no equipamento de CLAE-EM _____	23
<b>Tabela 2.</b> Espécies de <i>Solanum</i> utilizadas nos ensaios _____	33
<b>Tabela 3.</b> Dose da % de larvas mortas para <i>S. seaforthianum</i> _____	35
<b>Tabela 4.</b> Dose da % de larvas mortas para <i>S. lycocarpum</i> _____	35
<b>Tabela 5.</b> Dose da % de larvas mortas para <i>S. capsicoides</i> _____	35
<b>Tabela 6.</b> Dose da % de larvas mortas para <i>S. variable</i> _____	36
<b>Tabela 7.</b> Dose da % de larvas mortas para <i>S. crinitum</i> _____	36
<b>Tabela 8.</b> Dose da % de larvas mortas para <i>S. americanum</i> _____	36
<b>Tabela 9.</b> Peso dos frutos, extratos e frações glicoalcaloidais das espécies de <i>Solanum</i> e respectivos rendimentos _____	40
<b>Tabela 10.</b> Atribuições para os deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C para a solasodina _____	43
<b>Tabela 11.</b> Rendimento das reações do ciclohexanol com ácido benzóico com diferentes catalisadores _____	50
<b>Tabela 12.</b> Rendimento das reações de oxidação da solasodina _____	54
<b>Tabela 13.</b> Valores de DL <sub>50</sub> frente à <i>Artemia salina</i> para os extratos brutos e frações glicoalcaloidais das espécies de <i>Solanum</i> _____	63
<b>Tabela 14.</b> Triagem da ação moluscicida dos extratos brutos e frações glicoalcaloidais das seis espécies do gênero <i>Solanum</i> _____	65
<b>Tabela 15.</b> Valores de DL <sub>50</sub> para as frações glicoalcaloidais de <i>S. crinitum</i> e <i>S. seaforthianum</i> _____	66

## RESUMO

Este trabalho relata o estudo da atividade biológica dos extratos brutos e das frações glicoalcaloidais de seis espécies do gênero *Solanum*, *S. crinitum*, *S. seforthianum*, *S. capsicoides*, *S. variable*, *S. americanum*, *S. lycocarpum* frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

A fração glicoalcaloidal de *Solanum crinitum*, foi monitorada por CLAE-EM sendo verificada a presença de três diferentes glicoalcaloides, bem como foi realizada a comparação química das frações de plantas coletadas em João Pessoa-PB e Seropédica-RJ observando-se o mesmo perfil. Desta espécie, isolou-se o alcalóide esteroidal solasodina, com o qual foram realizadas reações de oxidação e esterificação, sendo que na segunda utilizou-se a metodologia clássica e também irradiação em forno de microondas, na presença de diferentes catalisadores.

As técnicas espectroscópicas de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e também CG-EM, foram utilizadas para identificar e caracterizar os produtos obtidos nas reações.

Os ensaios frente a *Artemia salina* mostraram que, tanto os extratos brutos como as frações glicoalcaloidais apresentaram toxidez significativa, sendo as frações de *S. seforthianum* e de *S. crinitum*, as mais tóxicas.

Diante do ensaio moluscicida, todos os extratos brutos e algumas das frações glicoalcaloidais não apresentaram atividade significativa. Porém, as frações de *S. seforthianum* e *S. crinitum*, mostraram bastante ativas, podendo este efeito ser correlacionado aos resultados do ensaio de toxidez geral.

## ABSTRACT

The biological activity of crude extracts and glycoalkaloidal fractions of six *Solanum* species, *S. crinitum*, *S. seaforthianum*, *S. variable*, *S. capsicoide*, *S. americanum* and *S. lycocarpum*, was related in this work against *Artemia salina* microcrustace and *Biomphalaria glabrata* snail.

The *S. crinitum* glycoalkaloidal fraction was HPLC-MS monitored and three different glycoalkaloids were verified. The *S. crinitum* collected plants, from João Pessoa (PB) and Seropédica (RJ), were compared and a similar chemical profile was observed.

The steroidal alkaloid solasodine was isolated from *S. crinitum* and utilized on oxidation and sterification reactions. In the last reactions the microwave irradiation was also utilized in the presence of several catalyts. The NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and IR spectroscopic techniques and the GC-MS were used to characterize the products.

The crude extracts and fractions of *Solanum* species were assayed against *Artemia salina* and the result had showed a significant toxicity. The *S. seaforthianum* and *S. crinitum* glycoalkaloidal fractions were the most actives.

All crude extracts of *Solanum* species and four glycoalkaloidal fractions haven't presented significant activity against *Biomphalaria glabrata* snails. However, the *S. seaforthianum* and the *S. crinitum* fractions showed effective moluscicidal activities and these results have led us a good correlation ship with *Artemia salina* assays.

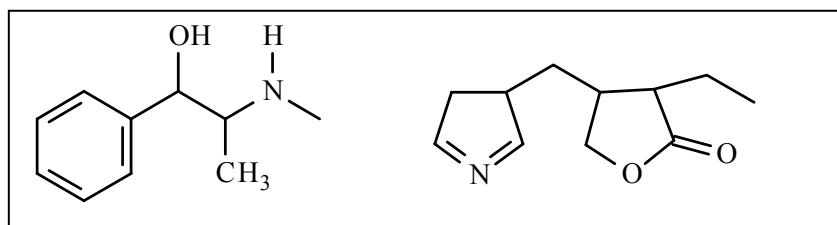
## ***INTRODUÇÃO***

# 1.0 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é uma das práticas mais antigas e universais da espécie humana. Não importa que cultura ou sociedade se considere, até hoje é possível encontrar plantas sendo usadas no tratamento de enfermidades.

Muitos medicamentos usados pela população até hoje têm sua origem nas plantas medicinais, cujos princípios ativos são usados como protótipo pela indústria farmacêutica, tais como a aspirina, efedrina, pilocarpina, apresentadas na **Figura 1** (BOTSARIS, 1997).



**Figura 1.** Estruturas da Efedrina e da Pilocarpina

Retornando a história, sabe-se que os egípcios usavam além das plantas aromáticas, muitas outras cujos efeitos bem conheciam, como por exemplo, a papoula (sonífera), a babosa e o óleo de rícino (cartático). Os assírios também incluíam, no seu receituário, nada menos que 250 plantas terapêuticas, entre elas: o açafrão, a assa-fétida, o cadamomo, a papoula, o tremoço, dentre outras. Na Grécia antiga, Hipócrates (460-361 a.C.) considerado o pai da medicina, empregava centenas de drogas de origem vegetal. Teofrastos (372- 285 a.C.), em História das Plantas, catalogou nada menos que 500 espécies. Crateús, que viveu no século I a.C. publicou a primeira obra de que se tem conhecimento na história – Orhizo Tomikom- sobre plantas medicinais com ilustrações (BOTSARIS, 1997).

A palavra fitoterapia foi criada para designar tradições populares de tratamento, nas quais as plantas medicinais são usadas. O uso terapêutico dessas espécies ficou restrito à abordagem leiga desde o salto tecnológico da indústria farmacêutica, ocorrido nas décadas de 50 e 60. A fitoterapia consiste em um tratamento das doenças e de

alterações orgânicas, por meio de espécies vegetais secas ou recém colhidas e seus extratos (GONÇALVES, 1994).

As espécies vegetais para uso medicinal têm recebido atenção especial, pelos diferentes significados que as plantas medicinais assumem em nossa sociedade como um recurso biológico e cultural, destacando-se seu potencial genético para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, as plantas medicinais representam possíveis fontes de recursos financeiras através de sua comercialização resgatando o fortalecimento da identidade cultural (SILVA, 2000).

As plantas medicinais representam a principal matéria médica utilizada pelas chamadas medicinas tradicionais, ou não ocidentais, em suas práticas terapêuticas, sendo a medicina popular a que utiliza o maior número de espécies diferentes.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam-se da medicina popular na atenção primária à saúde. Essas populações dependem, em grande parte, dos chamados profissionais tradicionais para a cura de seus problemas de saúde, seja pelas dificuldades impostas ao acesso à biomedicina, especialmente alopática, seja por questões de entendimento sobre a realidade social e aspectos culturais deste tipo de população, ou pela questão financeira (DA SILVA, 2000).

O conhecimento das propriedades medicinais das plantas, dos minerais e de certos produtos de origem animal é uma das maiores riquezas da cultura indígena, uma sabedoria tradicional que passa de geração em geração. Vivendo em permanente contato com a natureza, os índios e outros povos da floresta estão habituados a estabelecer relações de semelhança entre as características de certas substâncias naturais e seu próprio corpo (GONÇALVES, 1994).

É impossível estabelecer precisamente quantas das 250.000-300.000 espécies de plantas do mundo são utilizadas medicinalmente, mas sabe-se que pelo menos de 10-20% de todas as espécies de uma determinada região tem seu uso na medicina tradicional. Entretanto, menos que 1000 são amplamente utilizadas, sendo estas também de importância comercial.

No Brasil, o uso de plantas medicinais pela população é bastante difundido, até mesmo por ser muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades (MACIEL *et al.*, 2002). Nesse contexto inserem-se várias comunidades da região do norte e nordeste brasileiro. Apesar de considerada um centro mundial de biodiversidade, os indicadores de desenvolvimento sustentável destas regiões, elaborados mostram que em relação à equidade, saúde e educação, elas apresentam-se com menores índices do país em todos os indicadores analisados. Portanto, essa riqueza de biodiversidade não têm sido traduzida como qualidade de vida para a sua população, apesar de apresentar comunidades detentoras do saber tradicional sobre o ambiente natural e que têm um papel fundamental na manutenção de espécies e variedades nativas e seus sistemas de manejo (SILVA, 2000).

Estima-se que pelo menos a metade das espécies nativas do Brasil possui alguma propriedade medicinal, entretanto nem 1% foi estudada adequadamente. Na região Amazônica foram catalogadas em duas comunidades que vivem as margens da Baía de Marajó-PA, 260 plantas entre nativas e cultivadas; 1200 são comercializadas no mercado Ver-o-Peso, em Belém-PA; outras 242 espécies são cultivadas em quintais residenciais, também em Belém. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem ainda seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et al.*, 2002).

Os altos custos de produção dos medicamentos sintéticos, a existência de estudos científicos para alguns produtos fitoterápicos comprovam sua eficácia clínica e segurança, e a grande porcentagem da população mundial que não tem acesso aos medicamentos resultantes de síntese estão dentre as razões do crescente interesse por terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas (SILVA, 2000).

Estes fatores somados ao limitado efeito dos medicamentos sintéticos em doenças crônicas têm estimulado à pesquisa de plantas medicinais como alternativa terapêutica, com resultados bastante satisfatórios (HIRUMA-LIMA, 1999).



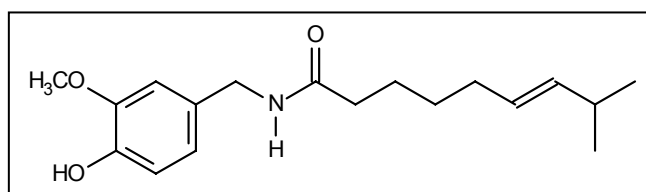
Dados recentes na literatura demonstram a grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam atividade farmacológica. Isto pode levar à descoberta de novos compostos úteis para o desenvolvimento de novos fármacos, e a preços mais acessíveis para a maioria da população (DA SILVA, 2000).

## 1.2 FAMÍLIA SOLANACEAE: O GÊNERO *SOLANUM* L.

A família Solanaceae descrita por Antoine Laurent de Jussieu compreende 94 gêneros, com 2.950 espécies subcosmopolitas, sendo 56 gêneros espontâneos na América do Sul, dos quais 25 são endêmicos. Entre estes, encontram-se árvores, arbustos, lianas e ervas, muitos desses com grande ocorrência no Brasil (MABBERLEY, 1997). Os principais gêneros estão distribuídos em duas subfamílias:

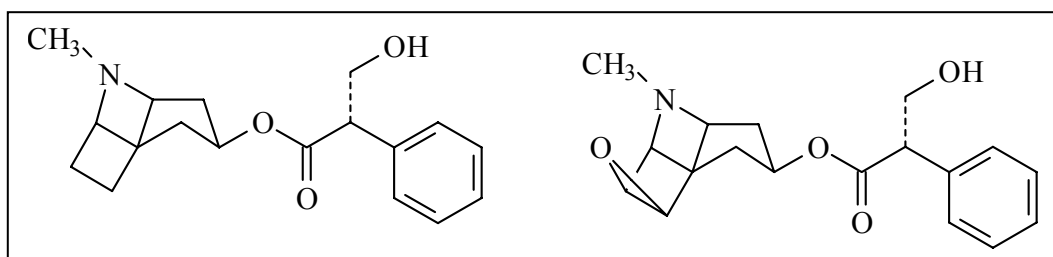
a) Solanoideae, na qual se encontram os gêneros:

- *Capsicum*, uma das inúmeras pimentas vermelhas e amarelas usadas como condimento, de onde se isolou, entre outros diversos compostos, a capsaicina, apresentada na **Figura 2**.



**Figura 2.** Estrutura da Capsaicina

- *Datura*, como a *Datura stramonium*, e outras relevantes espécies de importância farmacológica pela presença de inúmeros alcalóides como a hiosciamina e hioscina que são mostradas na **Figura 3** (DI STASI *et al*, 2002).



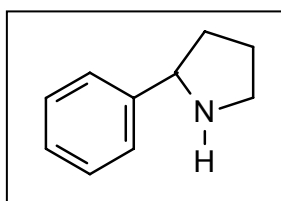
**Figura 3.** Estruturas da hiosciamina e da hioscina

- *Solanum*, com inúmeros representantes no Brasil, como o juá-bravo, fumo-bravo, cuvitinga e outras espécies, amplamente usadas como alimento e que possuem

elevado valor econômico, como é o caso da batata-doce e das mais variadas batatas; *Lycopersicum*, do famoso tomate.

b) Cestroideae, na qual se destacam os gêneros:

- *Nicotiana*, da famosa espécie *Nicotiana tabacum*, fonte de nicotina, usada como ferramenta farmacológica e, ainda do ponto de vista comercial e social, uma importante espécie cuja indústria do fumo movimentava milhões de dólares anualmente, mas que causa problemas de saúde extremamente sérios e graves. A **Figura 4** apresenta a estrutura da nicotina. (DI STASI *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Estrutura da Nicotina

Estes dados mostram a enorme importância dessa família botânica tanto do ponto de vista farmacológico, visto que inclui inúmeras espécies fontes de compostos químicos de grande relevância na farmacologia e na medicina moderna, como por compreender espécies vegetais de amplo valor econômico e de grande utilização na alimentação humana. Em estudos realizados muitas das espécies da família Solanaceae foram referidas como medicinais, sendo algumas delas:

- *Brunfelsia grandiflora* D. Don – Conhecida popularmente na região amazônica como maliaca. E, em outras regiões, pelos nomes de manacá-da-serra, managá-caa, gambá, manacá-açu e jerataca.

Na região amazônica, a infusão das folhas é considerada excelente para diminuir a febre. Mabberley (1997) refere que as folhas e cascas da espécie são usadas na Amazônia como alucinógenas.

- *Physalis angulata* L. – Chamada, na região amazônica, de camapu. Em outras regiões também é conhecida como bucho-de-rã, joá, juá-de-capote, mata-fome, tomate silvestre e cereja-de-inverno.

Na região amazônica, o chá de sua raiz é utilizada para o tratamento de problemas do fígado e contra malária. O chá preparado com raiz de camapu misturada com raiz de açaí, jurubeba e pega-pinto é utilizada contra doença nervosa. A seiva dessa espécie é calmante e depurativa, útil contra reumatismo; os frutos são desobstruintes, diuréticos e resolutivos (CORRÊA, 1984); em Minas Gerais, são utilizados para os mesmos fins (GAVILLANES *et al.*, 1982); no Pará, o chá da raiz é considerado útil contra problemas do fígado, contra inflamações, tosse e dores no corpo (AMOROZO & GÉLY, 1988); na Paraíba, o uso interno da planta toda é tido como útil contra problemas renais (AGRA, 1980).

- *Solanum tuberosum* L. – Na região do Vale do Ribeira, a espécie é conhecida como batata e comumente denominada batata-inglesa ou batatinha. Na mata atlântica, a infusão das folhas é usada contra distúrbios do estômago (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

O gênero *Solanum* é considerado um dos maiores e mais complexos entre as angiospermas. Este é compreendido por 1000 espécies (Darcy, 1991) e aproximadamente 3000 variedades são descritas na literatura (NEE, 1991). O gênero é bem representado no Brasil e está amplamente distribuído no norte e sul e em diversas regiões fitogeográficas, sendo muitas das espécies endêmicas destas regiões (AGRA, 1999).

No nordeste do Brasil, muitas espécies de *Solanum* são usadas na medicina popular e são comumente chamadas de jurubeba, sendo esta palavra originária do tupi-guarani, *yu`beba*, que se refere à presença de espinhos em algumas delas (AGRA, 1999).

As primeiras descrições para o gênero foram realizadas por Linnaeus, no *Species Plantarum* (1753), onde foram descritas 23 espécies, entre Europa e África sendo algumas exóticas e outras cultivadas. Em 1813, Michel-Felix Dunal's descreveu 235 espécies, e em 1816 em uma 2ª edição, foram incluídas 321 espécies (KNAPP, 2002).

George Don (1837) enumerou e descreveu 406 espécies de *Solanum*, sendo que G.G. Walpers (1844) seguiu o sistema de Don's e listou 435 espécies e mais 72 das quais se tinham informações incompletas. A maior descrição para o gênero *Solanum* foi feita por Dunal em 1852, onde foram listadas 900 espécies.

Desde 1852 muitas novas espécies têm sido descobertas e descritas, elevando o número de nomes entre 3000 e 5000, tornando a classificação do gênero um pouco problemática, e fazendo com que o tratamento taxonômico seja feito distribuindo o gênero em pequenos grupos.

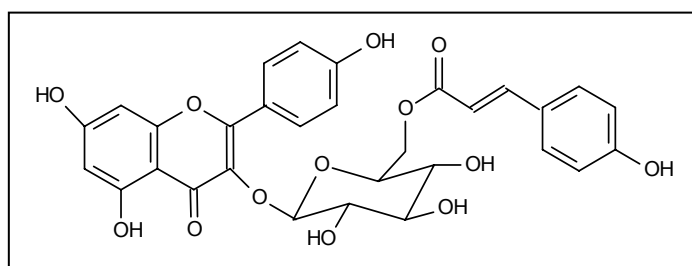
Linneaus (1753) dividiu o gênero em dois grupos o *Inermia*, ou espécie desarmada, e *Spinosa*, ou espécie armada. Dunal (1813,1816) dividiu o gênero similarmente. Suas categorias foram *Inermia*, ou *Solanums* desarmada, e *Aculeata*, ou *Solanums* armada. No *Prodromus* (1852) ele dividiu o gênero *Solanum* dentro de duas seções (“sectio”) que foram basicamente as mesmas. Ele nomeou *Pachystemonum*, espécies fortes com espinhos cilíndricos e que não furam, e *Leptostemonum*, espécies com espinhos atenuados, tricomas e que freqüentemente furam. Novos tratamentos para a taxonomia e classificação do gênero *Solanum*, desde o trabalho de Dunal em 1852, tem sido relativamente poucos e limitados (KNAPP, 2002).

### **1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO GÊNERO *SOLANUM* L.**

O gênero *Solanum* apresenta grande importância econômica. Espécies de *Solanum* produzem uma grande variedade de saponinas esteroidais e alcalóides responsáveis pela resistência contra alguns agentes patogênicos. Cerca de 200 alcalóides com bases esteroidais diferentes (esqueletos colestano com 27 átomos de carbono divididos em 5 tipos de estruturas) já foram isolados e se apresentam na planta na forma livre e como glicoalcalóide (ATTA-UR-RAHMAN & CHOUDHARY, 1998).

Dos muitos compostos que compõem o perfil dos metabólitos especiais das plantas, os glicoalcalóides estão entre os mais interessantes não somente por razões químicas e biológicas, mas também por exercerem uma importante influência em vários aspectos da atividade e comportamento humano. Cerca de 75 estruturas do tipo aglicona que ocorrem naturalmente (alcaminas) são conhecidas e apresentam esqueleto colestano C<sub>27</sub> com um anel adicional contendo nitrogênio ou grupos que dão basicidade e algumas das atividades biológicas.

Esteroides alcaloidais e outros glicosídeos ocorrem em numerosas espécies do gênero *Solanum* que demonstram possuir diversas atividades biológicas, incluindo antifúngica, antiviral, moluscicida, teratogênica e embriotóxica. Preparações contendo o glicosídeo solasodina são atualmente utilizadas para certos tipos de câncer (CHAM *et al*, 1980). Espécies deste gênero também possuem flavonóides, como o tilirosídeo (representado na **Figura 5**) extraído dos tricomas de *Solanum crinitum* Lam, (ESTEVESSOUZA *et al*, 2002) e são muito interessantes devido às suas atividades farmacológicas como antimicrobiana e antivirais (ESTEVESSOUZA, 2003). Em adição, uma porção significativa das atividades biológicas dos glicoalcaloides originam-se da porção oligo sacarídica, incluindo cinco unidades monossacarídicas e usualmente ligadas no carbono 3 (SILVA, 2002).



**Figura 5.** Estrutura do flavonóide Tilirosídeo

Embora sejam chamados glicoalcalóides, alguns destes compostos também apresentam características de saponinas. Muitos glicoalcaloides exibem dois principais tipos de atividades biológicas que refletem a natureza química “dual”: Atividade antiacetilcolinesterase remanescente de alguns alcalóides e a propriedade de lise da membrana, similar as saponinas (DA SILVA, 2000).

Os glicoalcalóides causam efeitos tóxicos, como por exemplo, em microorganismos e plantas, a toxidez é geralmente manifestada prejudicando o crescimento, desenvolvimento, permeabilidade ou metabolismo. Em animais inferiores a atividade alimentar, crescimento, desenvolvimento e mortalidade são os parâmetros mais comumente quantificados enquanto que, em mamíferos de laboratório uma grande variedade de parâmetros fisiológicos/farmacológicos são registrados os quais variam em natureza e intensidade. Informações de toxidez em humanos aparecem principalmente como casos de envenenamento acidental (somente poucos casos experimentais foram registrados).

Embora uma variedade de efeitos seja produzida pelos glicoalcaloides, muitos resultam de um limitado número de ações bioquímicas. Um dos mais conhecidos destes é a capacidade para romper a membrana celular e causar a perda dos solutos vitais, os glicoalcaloides podem também inibir a ação da enzima acetilcolinesterase, um efeito que é obviamente limitado a animais em que o sistema nervoso central é bem desenvolvido. Em organismos mais complexos é difícil saber o exato modo da toxidez devido a variedade de células diferentes e tipos de organismo que podem ser afetados, tais como a presença de sistemas de transportes, absorção diferente, metabolismo, características excretoras, etc (RODDICK, 1996).

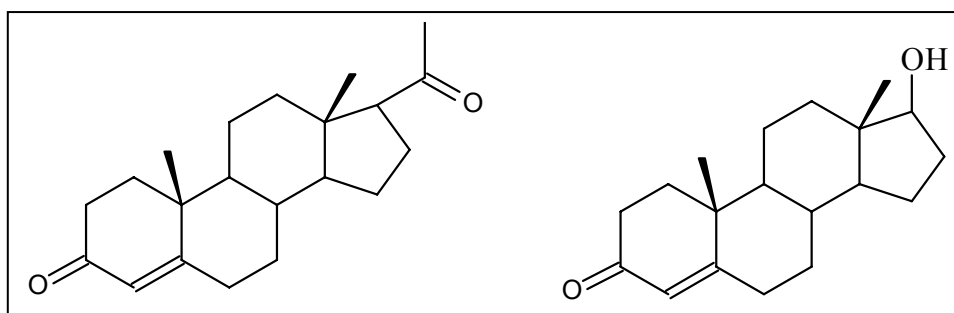
Sobre o rompimento das membranas, a primeira opinião favorece as propriedades surfactantes dos glicosídeos anfipáticos como a base de atividades. Porém, a demonstração de que o glicoalcaloide do tomate,  $\alpha$ -tomatidina, forma *in vitro* um complexo molecular estável 1:1 com  $3\beta$ -hidroxi esteroides, como o colesterol, veio contribuir para resolver esta questão. Os esteroides livres ajudam a estabilizar a camada de lipídeos de membranas eucarióticas, mas acredita-se que a ligação com os glicoalcaloides comprometa este papel levando a perda de permeabilidade (RODDICK, 1996).

## 1.4 OS ESTERÓIDES

### 1.4.1 Importância Econômica e Farmacológica

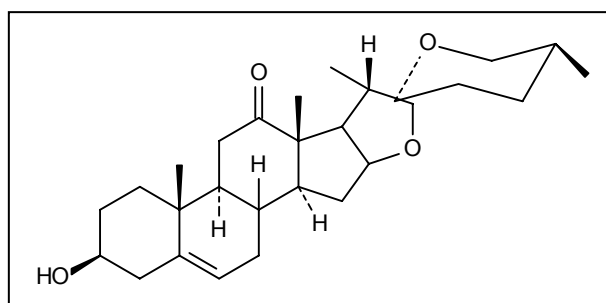
Os esteróides produzidos no mundo podem ser agrupados convenientemente do seguinte modo: andrógenos (hormônios sexuais masculinos), estrógenos e progesteronas (hormônios sexuais femininos) e corticosteróides. Drogas esteroidais possuem uma vasta gama de aplicações e são usadas como antiinflamatórios e agentes anticancerígenos, tratamento de desordens por deficiência hormonal, como contraceptivos orais e agentes anabólicos. A indústria de hormônios esteroidais empregou no passado substâncias de origem animal como o colesterol e os ácidos biliares, como material de partida para a síntese de hormônios sexuais (progesterona e testosterona, representados pela **Figura 6**, etc). e adrenocorticais (cortisona, aldosterona, etc). A premente busca por fontes alternativas de matéria-prima para a síntese de hormônios esteroidais resultou, no final da década de 40, no desenvolvimento

das sapogeninas esteroidais obtidas de plantas com possibilidades inusitadas (OASHI, 1999).



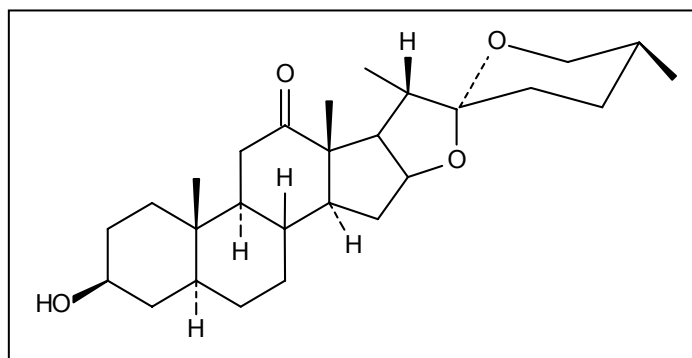
**Figura 6.** Hormônios sexuais Progesterona e Testosterona.

As sapogeninas esteroidais são de considerável importância econômica como precursoras de muitos esteróides farmacologicamente ativos, inclusive anticoncepcionais de via oral, de corticosteróides e de hormônios sexuais. A sapogenina de maior importância econômica é a diosgenina, cuja extração é feita quase que inteiramente das espécies dioscóreas. Entretanto, a indústria baseia-se na coleta de plantas, que estão se tornando raras em algumas áreas e a cada dia torna-se mais difícil e mais dispendioso explorar as fontes selvagens inexploradas anteriormente.



**Figura 7.** Estrutura da Diosgenina

Outra sapogenina esteroidal obtida comercialmente é a hecogenina, a qual é extraída do suco do sisal, o produto descartado durante o processo de desfibramento das folhas da *Agave sisalana* Perrine. Devido ao grupo cetônico no C-12 a hecogenina não é apropriada para a manufatura de anticoncepcionais de uso oral, mas é ideal para a síntese de corticosteróides. O consumo mundial de esteróides assume na época atual grandes proporções. O movimento mundial de venda de hormônios sexuais, drogas antiinflamatórias, anovulatórios e outros medicamentos de natureza esteroidal é da ordem de bilhões de dólares por ano (OASHI, 1999).



**Figura 8.** Estrutura da Hecogenina

Por volta de 1940, com o trabalho pioneiro de Marker, surgiu o primeiro processo industrial para a síntese de hormônios esteroidais, a partir da diosgenina isolada de tubérculos do gênero *Dioscorea* (espécie de inhame), notadamente *D. composita* e *D. floribunda*, espécies selvagens encontradas no México. Apesar da crescente demanda por diosgenina ocorrida nos anos seguintes, um impasse começou a surgir: o extrativismo predatório da produção mexicana fez com que o país não acompanhasse o crescimento da demanda mundial de hormônios e isso concorreu para que a produção de diosgenina perdesse seu lugar de destaque na economia mexicana (OASHI, 1999).

Nesse sentido, a dificuldade no cultivo intensivo das dioscórias selvagens e as restrições do México à exportação dos tubérculos e de diosgenina pura levaram os grandes laboratórios a procurar novas fontes de matérias-primas. A Companhia Syntex, de origem mexicana, foi a primeira indústria de hormônios esteroidais. Com a redução de exploração das dioscóreas pelo México, os laboratórios começaram a partir para a busca de outras matérias-primas que pudessem oferecer esteróides, tanto a partir de processos biotecnológicos (oxidações biológicas em posições estratégicas da molécula de partida), como através do uso de outras fontes renováveis e abundantes (OASHI, 1999)..

A Glaxo, de origem britânica, partiu para explorar a sua tecnologia química de síntese parcial de hormônios esteroidais a partir de substâncias isoladas do suco do sisal. Foi assim que se deu início a utilização de sapogeninas encontradas nas plantas, como uma matéria-prima para a fabricação de fármacos tão importantes (OASHI, 1999).

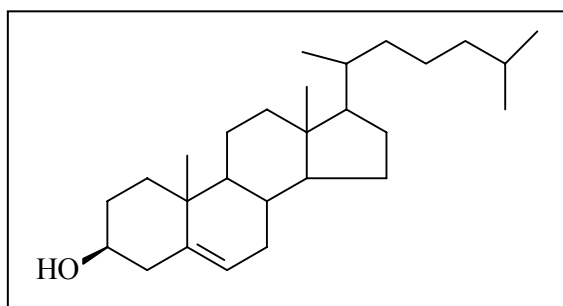


Entre as sapogeninas, a hecogenina é a mais importante para a síntese de corticóides. Ela é matéria-prima na produção de hormônios corticais, como cortisona, cortisol, prednisolone, dexametasona, betametasona e outros (OASHI, 1999).

O aproveitamento da hecogenina a partir do sisal como alternativa de diversificação do setor agrícola brasileiro foi feito pelo professor Carl Djerassi, da Universidade de Stanford, em 1966. A partir daí, nasceu a primeira tentativa nacional de uma indústria de hormônios esteroidais.

Os trabalhos sobre as sapogeninas existentes em plantas da família das Liliáceas, Amarilidáceas e Discoriáceas proporcionaram a descoberta de novas substâncias mais abundantes e mais adequadas para a síntese de hormônios esteroidais.

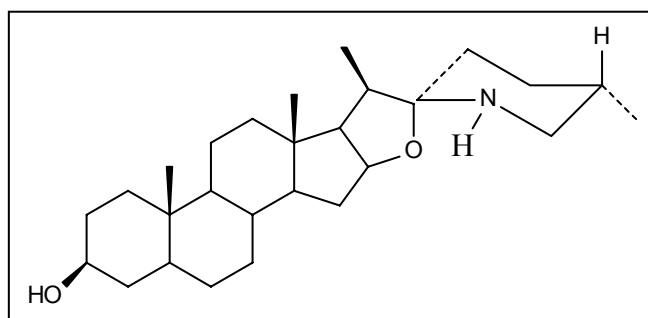
Os hormônios hoje consumidos são produtos de transformação de síntese parcial cuja matéria-prima é de origem vegetal ou animal. A matéria-prima que até recentemente predominava no panorama mundial era a diosgenina (**Figura 7**), o estigmasterol e o colesterol (representado na **Figura 9**). A hecogenina ainda não ocupa um lugar relevante como matéria-prima para a síntese de esteróides, pois, como ponto de partida, apresenta o inconveniente de ter sua molécula totalmente saturada. Esta característica obriga a incluir diversas etapas de transformações químicas que levam aos hormônios (OASHI, 1999).



**Figura 9.** Estrutura do Colesterol

Dentre as substâncias naturais, já isoladas, destacam-se os glicoalcalóides esteroidais e as saponinas esteroidais encontradas na maioria das plantas do gênero *Solanum*. Estes são compostos de grande interesse na medicina tradicional, pois são matérias-primas para a produção de vários fármacos com diferentes aplicações (BENTO).

Muitas das plantas da família Solanaceae acumulam alcalóides esteroidais com esqueleto básico colestânico ( $C_{27}$ ), como encontrado na solasodina (**Figura 12**) e na tomatidina (**Figura 10**), epímeros no átomo de carbono ( $C_{22}$ ). Estes alcalóides são essencialmente análogos nitrogenados das saponinas esteroidais, e estão presentes como glicosídeos (SIMÕES *et al*, 1986).



**Figura 10.** Estrutura da Tomatidina

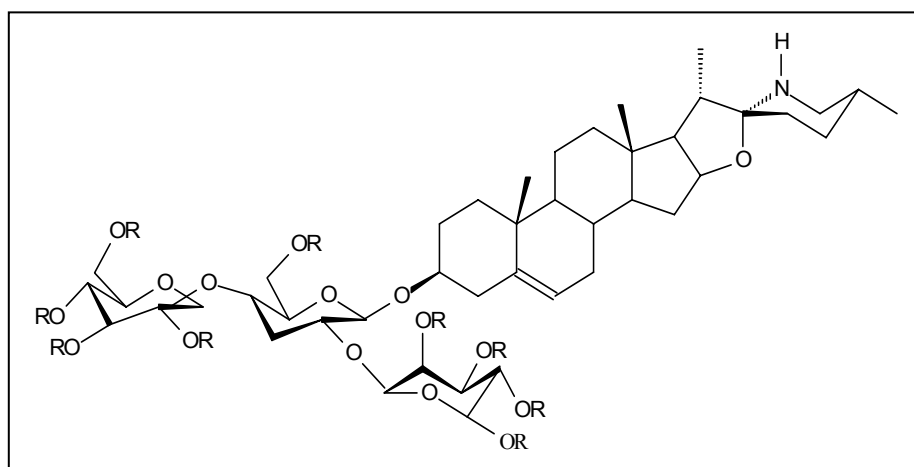
Os alcalóides esteroidais são uma importante classe de metabólitos secundários que ocorrem em plantas e também em certos animais superiores e invertebrados marinhos. Diferentemente de muitas outras classes de alcalóides, as bases esteroidais não são derivadas de aminoácidos. Biogeneticamente, eles são freqüentemente chamados de “aminas esteroidais” ao invés de alcalóides propriamente.

Devido à similaridade estrutural com anabolizantes, hormônios esteroidais e corticosteróides, os alcalóides esteroidais têm sido alvo de investigações farmacológicas. O interesse recente deve-se a demanda mundial de busca de material de partida como os esteróides, devido à escassez de diosgenina. Muitos alcalóides esteroidais podem ser convertidos em valiosos hormônios bioativos por reações químicas e microbianas. Muitos corticosteróides utilizados para o tratamento de doenças de pele podem ser obtidos por conversão química de alcalóides esteroidais estruturalmente parecidos (ATTA-UR-RAHMAN & CHOUDHARY, 1998).

Os alcalóides esteroidais são principalmente encontrados nas famílias Apocynaceae, Bruceaceae, Liliaceae e Solanaceae. A maioria dos alcalóides são tóxicos para mamíferos quando na forma glicosilada. Alguns glicoalcalóides encontrados no gênero *Solanum*, freqüentemente presentes em quantidades relativamente pequenas, podem provocar intoxicações alimentares quando em concentrações maiores na dieta humana normal, provocando problemas gastrointestinais e neurológicos. Esta toxidez

permitiu sugerir que os alcalóides participam do processo defensivo dos vegetais. Várias atividades biológicas são atribuídas a tais produtos naturais.

São conhecidos aproximadamente 1400 alcalóides esteroidais, que geralmente ocorrem nas partes aéreas de muitas espécies do gênero *Solanum*. Os tipos mais comuns são os espirolosanos, solanidanos, sendo que em muitos casos estes alcalóides são glicosilados, como a solasonina, apresentada na **Figura 11** (ATTA-UR-RAHMAN & CHOUDHARY, 1996).



**Figura 11.** Estrutura do glicoalcaloide Solasonina

Nosso interesse no estudo de plantas medicinais na busca de novos princípios ativos, particularmente da família Solanaceae, levou-nos a investigar as atividades biológicas de diferentes espécies do gênero *Solanum*, bem como de suas frações ricas em glicoalcalóides.

## 2.0 OBJETIVOS

Este trabalho tem como principais objetivos específicos:

- Coletar e enviar para identificação diversas espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae), visando às extrações das frações ricas em glicoalcalóides de seus frutos verdes.
- Isolar e caracterizar a presença de solasodina da espécie com maior rendimento de fração glicoalcaloidal.
- Monitorar a fração glicoalcaloidal de *Solanum crinitum* Lam proveniente do Rio de Janeiro e Paraíba utilizando a técnica de CLAE-EM.
- Realizar reações de esterificação e oxidação com a solasodina
- Analisar a toxidez frente *Artemia salina* dos extratos brutos e frações glicoalcaloidais das diferentes espécies de *Solanum*.
- Avaliar a ação moluscicida frente ao *Biomphalaria glabrata*.

## 3.0 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 EQUIPAMENTOS

- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlações Homonuclear e foram realizados em espectrômetro Bruker modelo AC 200 (200 MHz,  $^1\text{H}$  e 50,3 MHz,  $^{13}\text{C}$ ). Como referência interna foi usado tetrametilsilano (TMS) e o solvente utilizado em todos os espectros foi  $\text{CDCl}_3$ ;
- Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 1605, série FTIR-1600, os valores das bandas de absorção foram medidos em número de números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ );
- Os espectros de massas (EM) acoplados aos correspondentes cromatogramas foram obtidos através (CG-EM), aparelhos Hewlett-Packard, modelo HP-5890 e HP-6890, operados a 70 eV (impacto de elétrons);
- Na cromatografia em camada fina (CCD) utilizou-se placas de alumínio com sílica Kieselgel 60 F 254, com 0,2 mm de espessura, com indicador de fluorescência (Merck), reveladas com lâmpada ultravioleta de comprimento de onda 254 nm. Na cromatografia em coluna utilizou-se como adsorvente sílica gel 60, com partículas de 35-70 mesh (Merck);
- A remoção dos solventes foi feita em evaporador rotatório, marca BÜCHI;
- Os pontos de fusão foram determinados utilizando-se aparelho Quimis Q-340s e não foram corrigidos;
- Utilizou-se balança de precisão com quatro casas decimais da OHAUS para a pesagem do material;
- Foi utilizado aparelho de microondas Cònsul com 4500wats de potência.
- Para as análises de por CLAE, utilizou-se um Cromatógrafo da Shimadzu, Coluna Slim-pack CLC-ODS (250 x 4.6 mm d.i.; tamanho de partícula  $5\mu\text{m}$ ), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro LC (Micromass, Manchester, UK).

### 3.2 REAGENTES E SOLVENTES

Os solventes usados nas sínteses, recristalizações, extrações, preparação de extratos, cromatografia em coluna e camada fina, foram todos de grau P.A. da Vetec, Aldrich e Merck, sendo eles:

- Etanol
- Metanol
- Clorofórmio
- Diclorometano
- Éter etílico
- THF
- Piridina
- Acetonitrila
- DMSO
- Hexano

Os reagentes utilizados nas sínteses foram das marcas Vetec e Aldrich:

- Ácido acético
- Ácido cinâmico
- Ácido sulfúrico
- Anidrido acético
- Ácido clorídrico
- Celite
- Cloreto de benzoíla
- Carbonato de sódio
- Ciclo pentanol
- Cloreto de sulforila
- Cloreto de zinco
- Dióxido de manganês
- Hidróxido de amônio
- Hidróxido de sódio
- Imidazol
- Óxido de Crômio (VI)
- Permanganato de potássio
- Solasodina
- Sulfato de manganês
- Trietilamina

Os solventes e as outras substâncias utilizadas para os ensaios biológicos estão descritas abaixo:

- Água destilada
- Água mineral
- Cloreto de sódio
- Cloreto de cálcio
- Brometo de Potássio
- Gel de Sílica
- Cloreto de magnésio
- Tween 80
- Cloreto de potássio
- Sulfato de sódio
- Carbonato de sódio

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

##### 3.3.1.a *Solanum crinitum* Lam



O extrato foi preparado a partir dos frutos verdes coletados no dia 31 de julho de 2003 em Seropédica, RJ. Depois de triturados obteve-se uma massa igual a 1,310Kg.

A planta foi identificada por comparação com escicata depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ.

##### 3.3.1.b *Solanum capsicóide*



Os frutos foram coletados no dia 17 de maio de 2004 em Caieiras, SP. Depois de triturados obteve-se uma massa igual a 86,59g utilizada na preparação do extrato.

A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF-Setor de Botânica da UFPB, e a escicata depositada no Herbário Prof<sup>or</sup> Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.

##### 3.3.1.c *Solanum variable*



Os frutos foram coletados no dia 17 de junho de 2004 em Seropédica, RJ. Depois de triturados obteve-se uma massa igual a 35,27g que foi utilizada na preparação do extrato.

A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF-Setor de botânica da UFPB, e a excicata depositada no Herbário Prof<sup>or</sup> Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.

#### 3.3.1.d *Solanum lincocarpum* ·



Os frutos foram coletados no dia 17 de junho de 2004 em Seropédica, RJ. Depois de triturados obteve-se uma massa igual a 4,55g que foi utilizada na preparação do extrato.

A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF-Setor de Botânica da UFPB, e a excicata depositada no Herbário Prof<sup>or</sup> Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.

#### 3.3.1.e *Solanum americanum*



Os frutos foram coletados no dia 12 de fevereiro de 2004 em Seropédica, RJ. Depois de triturados obteve-se uma massa igual a 341,29g que foi utilizada na preparação do extrato.



A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF-Setor de Botânica da UFPB, e a escicata depositada no Herbário Prof<sup>or</sup> Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.

### 3.3.1.f *Solanum seaforthianum*



Os frutos foram coletados no dia 07 de Julho de 2004 na UFRRJ - Seropédica, RJ. Depois de triturados obteve-se uma massa igual a 154,29g que foi utilizadas para preparação do extrato.

A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF-Setor de botânica da UFPB, e a excicata depositada no Herbário Prof<sup>or</sup> Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.

### 3.4 Preparação dos Extratos e Obtenção das Frações Glicoalcaloidais

Os frutos verdes foram triturados e adicionou-se EtOH (90%) contendo 2% de AcOH, sendo a mistura mantida em repouso por no mínimo dois dias. Após este período o extrato foi filtrado e concentrado em rota-evaporador. Este procedimento foi realizado 3 vezes para exaustão do extrato.

Ao extrato bruto, já concentrado, foi adicionado o mesmo volume de AcOH 10% e deixou-se pernoitar em resfriamento. Filtrou-se em celite a vácuo, e à solução foi adicionado NH<sub>4</sub>OH (em banho de gelo) em quantidade suficiente para obter pH 10. Após pernoitar, filtrou-se a vácuo, sendo o filtrado descartado e o precipitado já constituía a fração rica em glicoalcaloides. O procedimento acima descrito foi o mesmo para a preparação de todos os outros extratos e obtenção de suas respectivas frações glicoalcaloidais.

Foi efetuado um teste simples, em bancada, para confirmar a presença de glicoalcalóides nas frações. Este teste consistia em solubilizar uma pequena quantidade

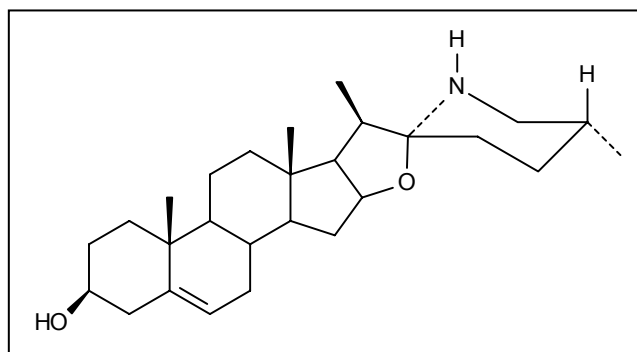
da fração em ácido acético e logo após adicionar 2 gotas de reagente de Dragendorff, sendo para o resultado positivo observado a formação de precipitado.

Para verificar a presença de solasonina nas frações, foram realizadas CCD, comparando as frações glicoalcaloidais das outras plantas, com a fração glicoalcaloidal da *Solanum crinitum*.

### 3.4.1 Obtenção e Purificação de Solasodina

Apenas a fração contendo o glicoalcalóide solasonina da *S. crinitum* foi hidrolisada para obtenção do alcalóide esteroidal. A fração foi solubilizada em EtOH / HCl<sub>(conc.)</sub> (8:2) e mantida em refluxo por 2 horas, logo após filtrou-se, e deixou-se em repouso por uma noite. No dia seguinte filtrou-se, e com o filtrado preparou-se uma suspensão em água ao qual se adicionou NH<sub>4</sub>OH (conc.) e mantendo-se em banho-maria por 30 minutos, após resfriamento, obteve-se o extrato bruto da solasodina.

A solasodina foi solubilizada em MeOH a quente sendo adicionado posteriormente carvão ativo. Aqueceu-se novamente e filtrou-se a vácuo utilizando terra de infusória. A solasodina (**Figura 12**) foi recristalizada em MeOH.



**Figura 12.** Estrutura da Solasodina

### 3.5 Detecção dos Glicoalcalóides de *Solanum crinitum* utilizando CLAE-EM

A separação dos glicoalcalóides presentes na fração glicoalcaloidal de *S. crinitum* foi realizada utilizando-se uma coluna Slim-pack CLC-ODS (250 x 4.6 mm d.i. tamanho de partícula 5µm).

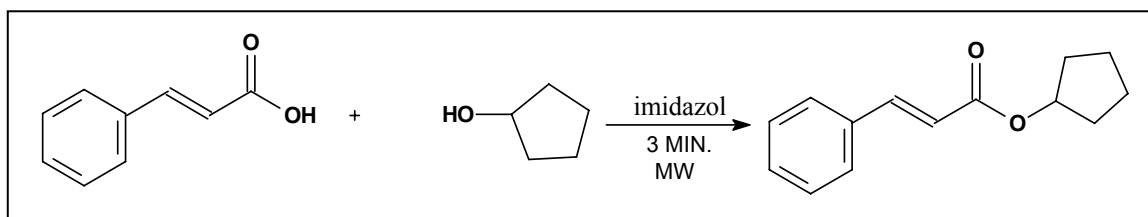
Como fase móvel foi utilizada a mistura H<sub>2</sub>O: acetonitrila segundo o gradiente mostrado na Tabela 1, com fluxo de 1,0 mL/min.

**TABELA 1** – Gradiente de eluição da coluna no equipamento de CLAE-EM

Tempo (min.)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	80	20
20	10	90
21	80	20
25	80	20

### 3.6 Reações de Esterificação Utilizando MW

#### 3.6.1 Reação Catalisada por Imidazol

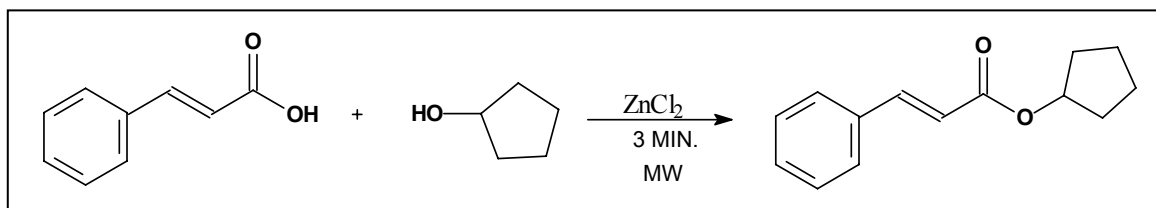


Pesaram-se 100 mg de imidazol e 635 mg de ácido cinâmico, sendo posteriormente homogeneizados em almofariz. Transferiu-se para uma placa de Petri e adicionou-se 0,133 mL de ciclopentanol.

A reação foi exposta a irradiação em forno de microondas por 3 minutos divididos em 6 exposições de 30 s, com intervalos de mesmo valor entre cada uma. Posteriormente extraiu-se com éter etílico, adicionou-se a solução sulfato de magnésio, filtrou-se e deixou-se evaporar o solvente. (HIROSE *et al*, 2002).

O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

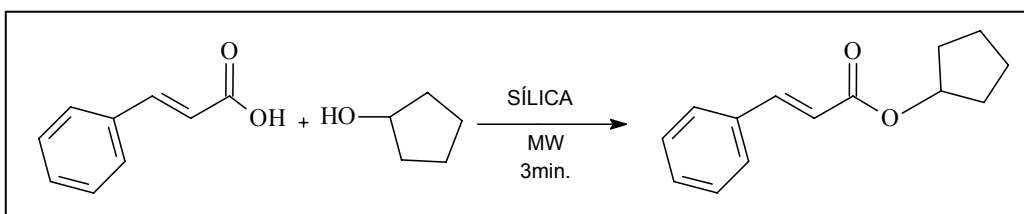
#### 3.6.2 Reação Catalisada por ZnCl<sub>2</sub>



Pesaram-se 50 mg de ácido cinâmico e 35,8 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bem misturados e transferiu-se para uma placa de Petri e adicionando-se 0,214 mL de ciclopentanol. O meio reacional foi levado ao aquecimento de maneira similar ao item 3.6.1 (LIAO *et al*, 2003).

O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

### 3.6.3 Reação Catalisada por Gel de Sílica



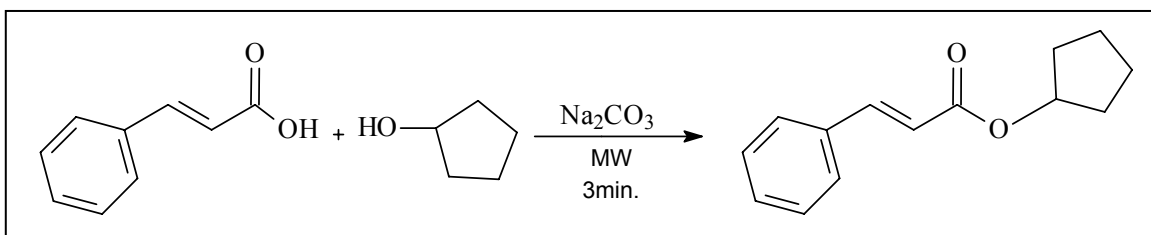
Pesou-se 50 mg de ácido cinâmico e misturou-se com uma pequena porção de sílica, previamente ativada, adicionando-se gotas de diclometano, para obter uma melhor homogeneização.

Após evaporar o solvente, a reação foi exposta à irradiação em forno de microondas realizando-se os procedimentos já citados anteriormente.

Tentando obter melhores rendimentos, repetiram-se as reações utilizando imidazol e  $\text{ZnCl}_2$ , aumentando a exposição à irradiação de microondas para 6 min. divididos em 12 tempos de 30s com intervalos de mesmo valor.

O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

### 3.6.4 Reação Utilizando $\text{Na}_2\text{CO}_3$

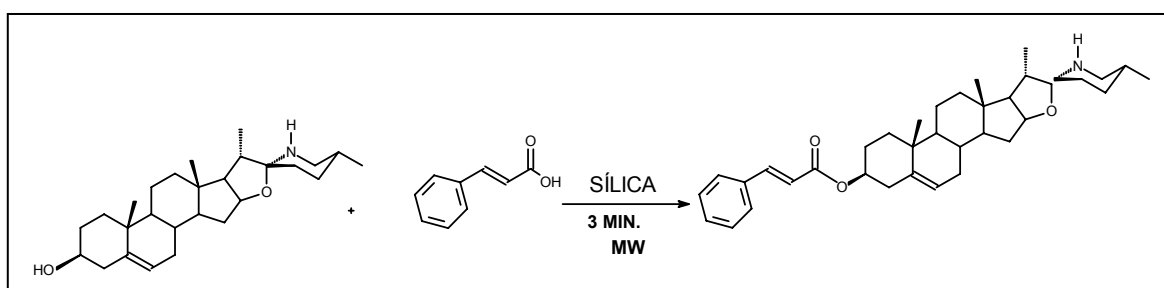


Pesaram-se 50 mg de ácido cinâmico e 35,8 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bem misturados, transferiu-se para uma placa de Petri e adicionou-se 0,214 mL de ciclopentanol. O meio reacional foi levado ao aquecimento de maneira similar ao item 3.6.1 (HIEH *et al*, 2002).

O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

### 3.7 Reações de Esterificação com a Solasodina

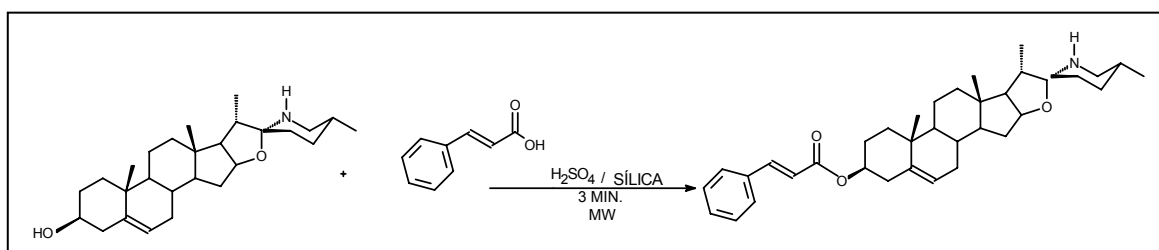
#### 3.7.1 Reação com Suporte de Gel de Sílica



Misturou-se 50 mg de solasodina com 21 mg de ácido cinâmico e uma pequena porção de gel de sílica, previamente seca em estufa a uma temperatura de  $150^\circ\text{C}$  por aproximadamente 2 horas. Adicionou-se gotas de diclorometano para melhor homogeneização dos reagentes. Após evaporar o solvente, transferiu-se os reagentes para uma placa de Petri que foi exposta a irradiação em forno de microondas por 3 min.

O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

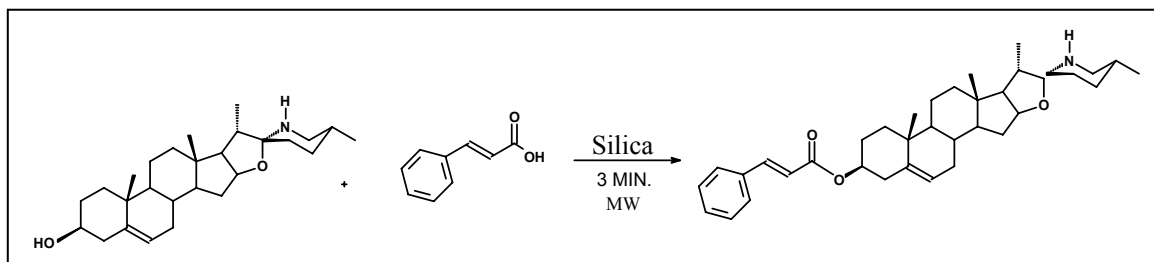
#### 3.7.2 Reação com Suporte de Gel de Sílica e $\text{H}_2\text{SO}_4$



Os procedimentos experimentais e estequiométricos foram similares aos já citados no item 3.7.1, a única diferença foi a adição de gotas de ácido sulfúrico concentrado ao meio reacional.

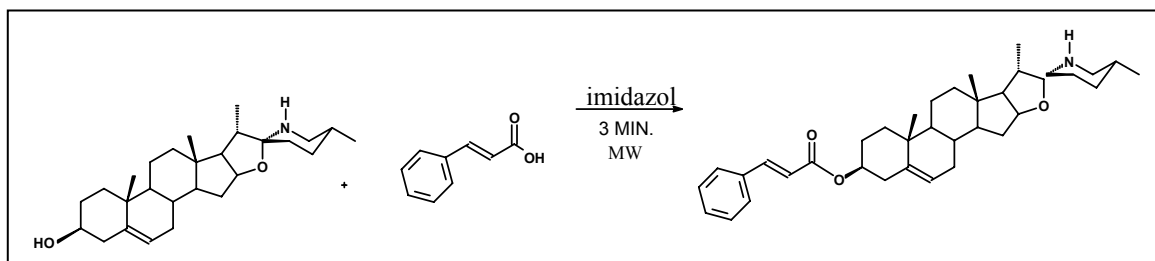
O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

### 3.7.3 Reação Sólido-Sólido



A reação foi realizada de forma similar as já citadas, porém não ocorreu a adição de catalisador ácido e não foi utilizado suporte de gel de sílica.

### 3.7.4 Reação da Solasodina com Imidazol como Catalisador

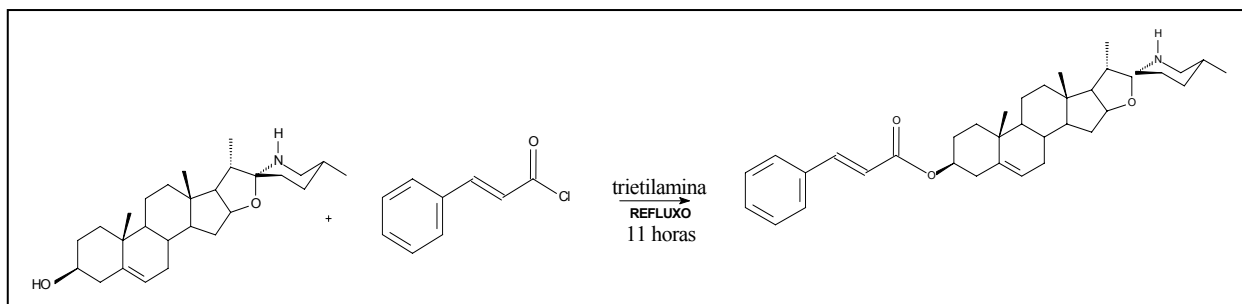


Misturaram-se 50 mg de solasodina, 55,3 mg de ácido cinâmico, 8,5mg de imidazol, e transferiu-se a mistura sólida para uma placa de Petri, onde foram adicionadas gotas de diclorometano para melhor homogeneizar o meio reacional.

A placa de Petri foi levada para a exposição à irradiação em forno de microondas por 3 min. Divididos em 6 tempos de 30 s, com intervalos de mesmo valor. Após o término deixou-se esfriar, lavou-se com éter etílico para extrair o produto, filtrou-se e deixou-se evaporar.

O produto da reação foi identificado, utilizando a técnica de CG – EM e o rendimento calculado em percentual de área relativa dos picos.

### 3.7.5 Reação da Solasodina com Cloreto de Cinamoíla



#### 3.7.5.a Preparação do Cloreto de Cinamoíla

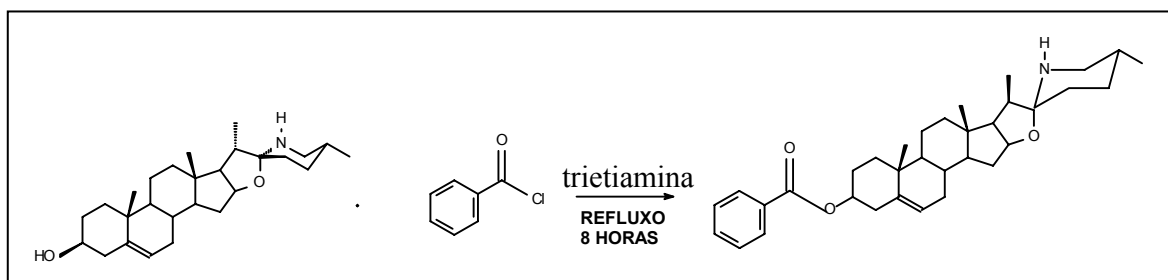
Pesou-se 300mg de ácido cinâmico, transferiu-se para um balão de 50mL onde foi adicionado 0,60mL de  $\text{SOCl}_2$ . A reação foi mantida em refluxo por 8 horas. Após, fez-se à destilação do meio reacional para a retirada do excesso de  $\text{SOCl}_2$ .

#### 3.7.5.b Reação de Esterificação

Pesaram-se 100mg de solasodina e 40mg de do cloreto de ácido recém preparado, transferiu-se para um balão de 50mL, adicionou-se 30mL  $\text{CHCl}_3$ , previamente seco, e trietilamina. A reação permaneceu em refluxo por 11 horas, havendo um acompanhamento por CCD.

Após esse período, deixou-se esfriar, evaporou-se o solvente e preparou-se uma coluna filtrante para purificar o produto. Utilizou-se como eluente, Hexano e  $\text{CHCl}_3$ , nos seguintes gradientes: Hexano puro, Hex./ $\text{CHCl}_3$  (9:1), Hex./ $\text{CHCl}_3$  (8:2), Hex./ $\text{CHCl}_3$  (7:3), Hex./ $\text{CHCl}_3$  (1:1).

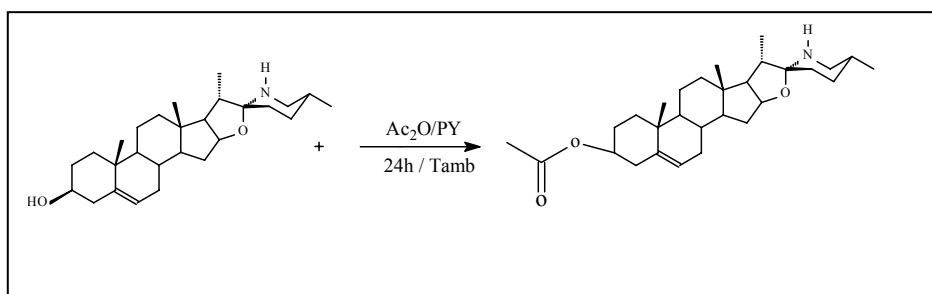
### 3.7.6 Reação da Solasodina com Cloreto de Benzoíla



Pesou-se 100mg de solasodina, transferiu-se para um balão de 50mL, onde foram adicionados 0,028mL de cloreto de benzoíla, 30mL de CHCl<sub>3</sub> e 5 gotas de trietilamina. A reação foi mantida em refluxo por 8 horas.

Para a purificação do produto da reação, preparou-se uma coluna filtrante utilizando como eluentes Hexano e CHCl<sub>3</sub>, nos seguintes gradientes: Hexano puro, Hex./CHCl<sub>3</sub> (8:2), Hex./ CHCl<sub>3</sub> (7:3), Hex./ CHCl<sub>3</sub> (1:1), Hex./ CHCl<sub>3</sub> (2:8).

### 3.7.7 Reação da Solasodina com Anidrido Acético

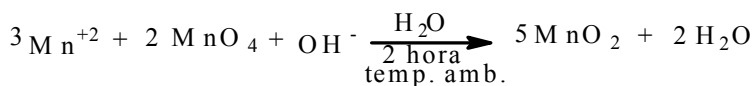


Foram adicionados em um balão de fundo redondo 230mg de solasodina, 2mL de piridina e 5mL de anidrido acético. Esta mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 24h. Após o tempo de reação, adicionou-se 10mL de água destilada, extraíndo-se o produto com CHCl<sub>3</sub>. O excesso de piridina foi eliminado pela adição de 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. O produto foi então novamente extraído com CHCl<sub>3</sub> e, a solução seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro (SHIRINER, 1979). A fase orgânica foi evaporada e o derivado acetilado foi obtido com 40% de rendimento (92mg). A obtenção do produto foi confirmada por RMN <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H.

## 3.8 REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DA SOLASODINA

### 3.8.1 Reação de Oxidação Utilizando MnO<sub>2</sub>

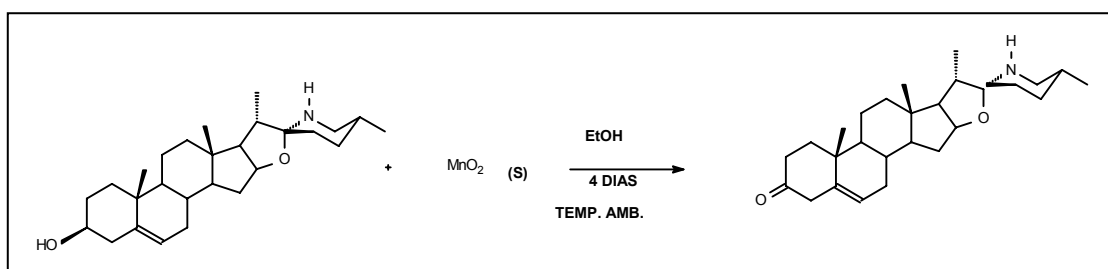
#### 3.8.1.a Preparação do MnO<sub>2</sub>





Adicionou-se simultaneamente, durante uma hora, uma solução de 2,8g de sulfato de manganês em 3mL de água e 2g de NaOH em 5mL de água em uma solução 40% (p/v) de  $\text{KMnO}_4$ , previamente aquecida. Este meio reacional ficou sob agitação por mais uma hora. O precipitado fino foi isolado por filtração a vácuo, sendo lavado várias vezes com água. O produto foi seco em estufa (100-200°) por duas horas antes de ser utilizado.

### 3.8.1.b Reação de Oxidação



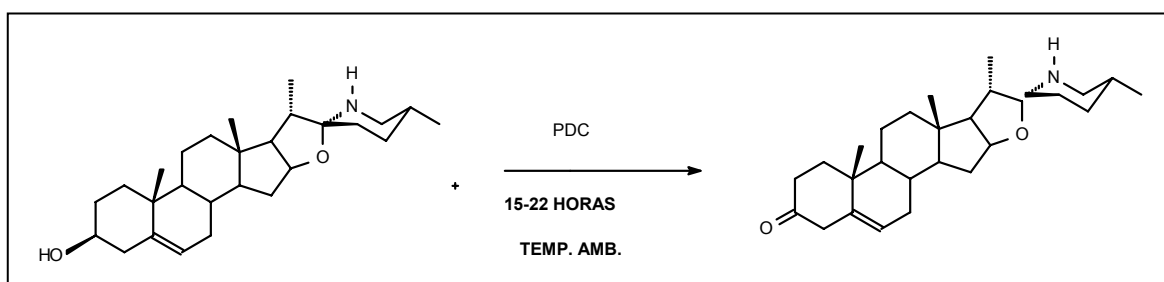
Em um balão de 50mL de capacidade, equipado com agitador magnético, e septo de borracha, foi preparada uma solução de solasodina 0,49g (0,0012mol) em 5mL de THF (seco) agitado sob atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ) e em seguida adicionou-se 103g (1,2 moles) de  $\text{MnO}_2$ . Após 3 horas sob agitação, fez-se análise por CCF. A reação foi mantida 4 dias, e o produto foi isolada por filtração, lavando com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

### 3.8.2 Reação de Oxidação Utilizando PDC

#### 3.8.2.a. Preparação do PDC

Primeiro preparou-se o complexo adicionando  $6,2 \times 10^{-2}$  moles de óxido de crômio (VI) em um balão de 100mL e em seguida 50mL de piridina anidra (previamente destilada). A solução foi mantida sob agitação vigorosa por um período de 10 a 15 minutos.

#### 3.8.2.b. Reação de Oxidação



No próprio meio reacional em que foi preparado o PDC, em seguida adicionou-se de uma só vez 0,3 mg (0,00073 moles) de solasodina diluída em 10mL de piridina anidra. A mistura foi mantida em agitação por aproximadamente 30 minutos, e esta permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 15-22 horas.

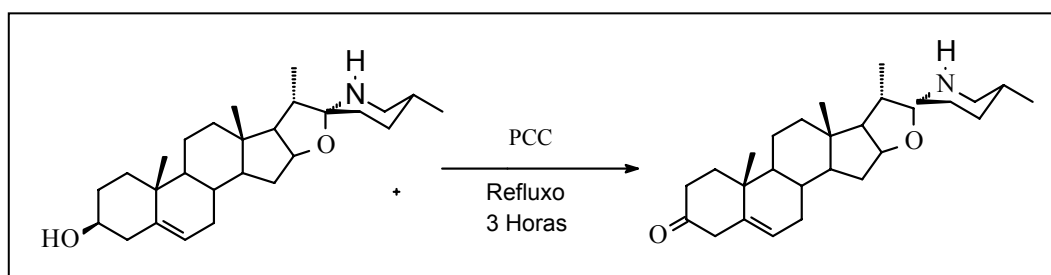
A mistura foi despejada em 300mL de água destilada e extraída com 250mL de éter divididos em três porções. A extração com éter foi lavada sucessivamente com ácido hidrocloreídrico 10% (em 3 partições) e 25mL de carbonato de sódio 10% e 25mL de água (HOLUM, 1961). Repetiu-se o mesmo procedimento, porém substituindo a extração com éter por  $\text{CHCl}_3$  na mesma quantidade.

### 3.8.3 Reação de Oxidação Utilizando PCC

#### 3.8.3.a Preparação do PCC

Em um Becher contendo 61mL de HCl 6N, foram rapidamente adicionados 33g de  $\text{CrO}_3$ , sob agitação intensa. Após 5 minutos, a solução homogênea foi resfriada a  $0^\circ\text{C}$  e foram cuidadosamente adicionados 26,4mL de piridina. Quando se resfriou a mistura a  $0^\circ\text{C}$ , obteve-se um sólido alaranjado (PCC) que foi filtrado e seco a vácuo durante 2 horas (CAREY, 1975).

#### 3.8.3.b Oxidação da Solasodina



Em um balão de fundo redondo de 250mL foram suspensos 40mg de PCC em 30 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro. Dissolveu-se 870mg de solasodina em 40mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e adicionou-se à solução de PCC com agitação magnética, e manteve-se em refluxo durante 3 horas.

### 3.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Foram avaliadas a toxidez frente a *Artemia salina* Leach e a atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, dos extratos etanólico e das frações glicoalcaloidais de 6 espécies do gênero *Solanum*, descritas na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Espécies de *Solanum* utilizadas nos ensaios biológicos

<i>Solanum variable</i>
<i>Solanum capsicoide</i>
<i>Solanum lycocarpum</i>
<i>Solanum crinitum</i>
<i>Solanum americanum</i>
<i>Solanum seaforthianum</i>

#### 3.9.1 Ensaio de Toxidez Frente a *Artemia salina* Leach

Para realizar o ensaio de toxidez, preparou-se uma solução salina artificial, composta por (48g de NaCl, 3g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,20g de KBr, 1,40g de KCL, 8g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4g de NaHCO<sub>3</sub> e 22g de MgCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O para 2L de solução), que foi utilizada como meio de cultura das ovas. Depois da solução pronta, colocou-se as ovas no criadouro e a solução até cobri-las totalmente. Tampou-se a parte contendo as ovas e direcionou-se a luz para a parte descoberta, onde após a eclosão, as larvas passam por fototropismo. As Artemias foram utilizadas após 48 horas da eclosão.

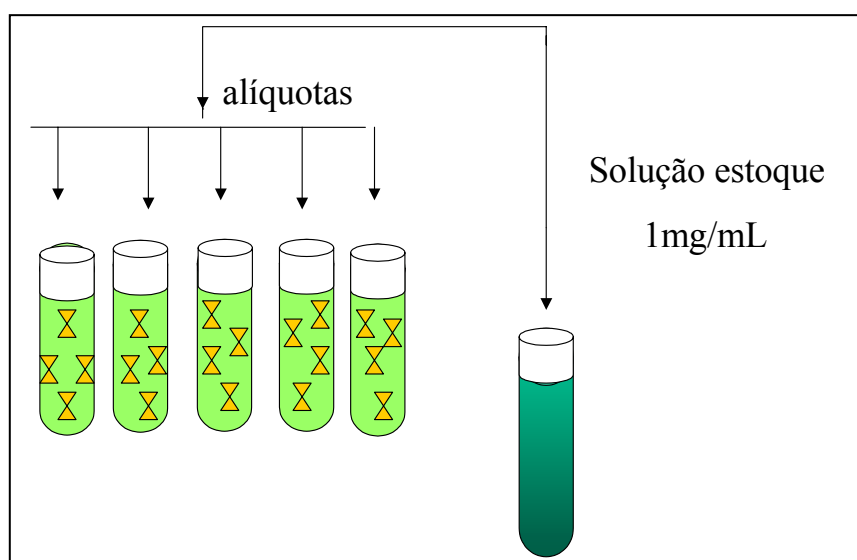
##### 3.9.1.a Procedimento para o Ensaio de Toxidez

Foram pesados 0,05g dos extratos e das frações glicoalcaloidais e solubilizados em 2ml de DMSO, transferiu-se para um balão de 5mL e completou-se o volume com 3mL de solução salina. Desta solução, chamada de solução mãe, retiraram-se 5

alíquotas de volumes diferentes que variaram de 38 $\mu$ L a 500 $\mu$ L. Transferiu-se à cinco tubos de ensaio, sendo que cada dose foi preparada em quadruplicata.

A cada tubo, com a suas devidas doses, foram adicionados 5mL de solução salina medidos em uma bureta. Para comparação dos resultados, utilizou-se uma solução controle, com os mesmos volumes que os ensaios com os extratos (500-38 $\mu$ L), a partir de uma solução estoque que continha 2mL de DMSO e 3mL de solução salina, também preparada em quadruplicata.

Utilizando-se uma pipeta Pasteur, pegou-se de 10-15 larvas que foram colocadas nos tubos de ensaio. Elas ficaram expostas às amostras e ao controle por 24 horas, e após este período realizou-se a contagem dos microcrustáceos vivos e mortos. A **Figura 13** ilustra o procedimento do ensaio.



**Figura 13.** Esquema para ensaio de toxidez geral frente à *Artemia salina*

Para o cálculo da dose letal que mata 50% das larvas ( $DL_{50}$ ), utilizou-se o log da concentração em função da percentagem de microcrustáceos mortos (método acumulativo) sendo obtidas curvas com perfil sigmoidal, fazendo-se necessário utilizar a técnica estatística de probitos (BIER, 1965).

As **Tabelas de 3-8** apresentam os valores dos log das doses e dos correspondentes probitos que foram utilizados para a confecção dos gráficos e posteriores cálculos das  $DL_{50}$ .

**Tabela 3.** Doses e porcentagens de larvas mortas para *S. seafortianum*

Extrato Bruto			Fração Glicoalcaloidal		
Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos	Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos
125	84,00	5,99	50	54,00	5,10
120	63,00	5,33	47	25,00	4,33
115	39,00	4,72	45	6,00	3,36
110	15,00	3,96	40	2,00	2,67
100	2,00	2,95	38	0	0

**Tabela 4.** Doses e porcentagens de larvas mortas para *S. lycocarpum*

Extrato Bruto			Fração Glicoalcaloidal		
Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos	Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos
500	100,00	7,33	500	81,00	5,88
300	91,00	6,34	300	34,00	4,59
200	70,00	5,52	200	11,00	3,77
100	45,00	4,87	100	3,00	3,12
50	9,00	3,66	50	2,00	2,95

**Tabela 5.** Doses e Porcentagens de larvas mortas para *S. capsicoide*

Extrato Bruto		
Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos
500	100	7,33
300	96	6,75
200	76	5,70
100	13	3,87
50	0	0

**Tabela 6.** Doses e porcentagem de larvas mortas para *S. variable*

Fração Glicoalcaloidal		
Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos
500	66	5,4
300	30	4,5
200	14	3,9
100	2	2,9
50	0	0

**Tabela 7.** Doses e porcentagem de larvas mortas para *S. crinitum*

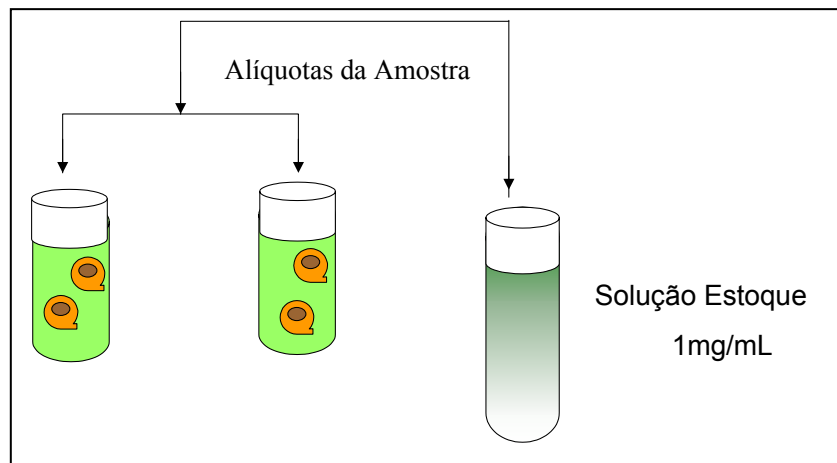
Extrato Bruto			Fração Glicoalcaloidal		
Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos	Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos
500	99	7,33	500	99	7,3
300	93	6,48	300	98	7,0
200	71	5,55	200	84	6,0
100	42	4,80	100	65	5,4
50	21	4,19	50	45	4,9

**Tabela 8.** Doses e porcentagem de larvas mortas para *S. americanum*

Extrato Bruto			Fração Glicoalcaloidal		
Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos	Dose ( $\mu$ l)	% de Mortos	Probitos
500	98	7,10	500	98	7,10
300	86	6,10	300	92	6,40
200	56	5,20	200	78	5,80
100	36	4,60	100	51	5,00
50	15	3,90	50	20	4,20

### 3.10 Ensaio Moluscicida Frente ao Caramujo *Biomphalaria glabrata*

Os ensaios para a avaliação moluscicida, consistiam basicamente na introdução do extrato da planta ou fração glicoalcaloidal em um recipiente contendo os caramujos. Após um determinado tempo, que para o ensaio preliminar foi de 24-48 horas, e para o definitivo 24-72 horas, realizou-se a observação do número de caramujos vivos e mortos.



**Figura 14.** Esquema para o ensaio moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*

#### 3.10.1 Materiais e Procedimentos para o Teste Moluscicida

- 1- Utilizaram-se caramujos entre 8-10 mm de diâmetro (adultos)
- 2- Água desclorada (mineral)
- 3- Provetas
- 4- Copos de 125mL e de 250mL para cinco concentrações, (n=5).
- 5- Tween 80 (detergente para ajudar na solubilização da amostra)
- 6- Cápsula de porcelana
- 7- Balões volumétricos

- 8- Solução estoque com concentração de 1mg/mL após pesar a amostra, eram adicionados 1-2 gotas de tween 80 e posteriormente água ate completar o volume para 125 mL.
- 9- Para o ensaio preliminar foi transferida uma alíquota da solução estoque (começando pelo volume referente a 100µg/mL) e completado o volume para 125mL, em seguida mergulhou-se 5 caramujos, (a relação é sempre de 25ml de solução por caramujo). Após 48 horas de exposição, foi verificado se a amostra apresentou atividade, quando ativo, foram realizado ensaios nas concentrações de 80µg/mL, 70µg/mL, 50µg/mL e 10µg/mL.
- 10- Para o ensaio definitivo as concentrações foram escolhidas de acordo com o resultado do ensaio preliminar. Alíquotas da solução estoque (também de 1mg/mL) foram completadas com água mineral para dois copos de 250mL, em seguida 10 caramujos foram mergulhados. Cada concentração foi avaliada em duplicata utilizando 20 caramujos por concentração.
- 11- Depois de 24 horas observou-se o comportamento dos caramujos, e após 48 horas os caramujos foram transferidos para um a placa de Petri e verificado se havia reação aos estímulos provocados com uma espátula. Para confirmação da mortandade, os caramujos foram transferidos para um copo limpo, contendo apenas água e alimento. Depois de 24 horas, foi realizado um novo exame.
- 12- O controle foi feito com uma gota de tween 80 e água, sendo os caramujos transferidos para copos com 125mL ou 250mL (n=2).
- 13- O cálculo da  $DL_{50}$  foi realizado utilizando o log da concentração em função da porcentagem de caramujos mortos, sendo obtidas curvas com perfil sigmoidal, fazendo-se necessário utilizar a técnica estatística de probitos (BIER,1965).



## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de diversas espécies da família Solanaceae foi motivado pela grande diversidade de atividades biológicas apresentadas pelo gênero *Solanum*. Assim, foram estudadas seis espécies do gênero *Solanum* sendo elas: *S. crinitum*, *S. variable*, *S. americanum*, *S. lycocarpum*, *S. capsicoides* e *S. seaforthianum*.

### 4.1 Obtenção dos Extratos, Frações Glicoalcaloidais, e da Solasodina de *Solanum crinitum* Lam

A partir dos frutos verdes moídos das seis espécies foram preparados os respectivos extratos em etanol e ácido acético (8:2). Posteriormente, reservou-se uma parte dos extratos brutos para a realização de ensaios biológicos, e a outra parte foi utilizada para a obtenção das frações glicoalcaloidais, utilizando uma metodologia específica já citada anteriormente na Parte Experimental.

A avaliação da presença de glicoalcalóides foi realizada utilizando ácido acético e o reagente de Dragendorff que mostrou resultado positivo quando houve aparecimento de precipitado, das seis espécies, a única que não apresentou resultado positivo foi a *S. capsicoides*. A presença de solasonina foi investigada nas frações glicoalcaloidais, por CCD em comparação com a fração de *Solanum crinitum*, cuja presença é majoritária.

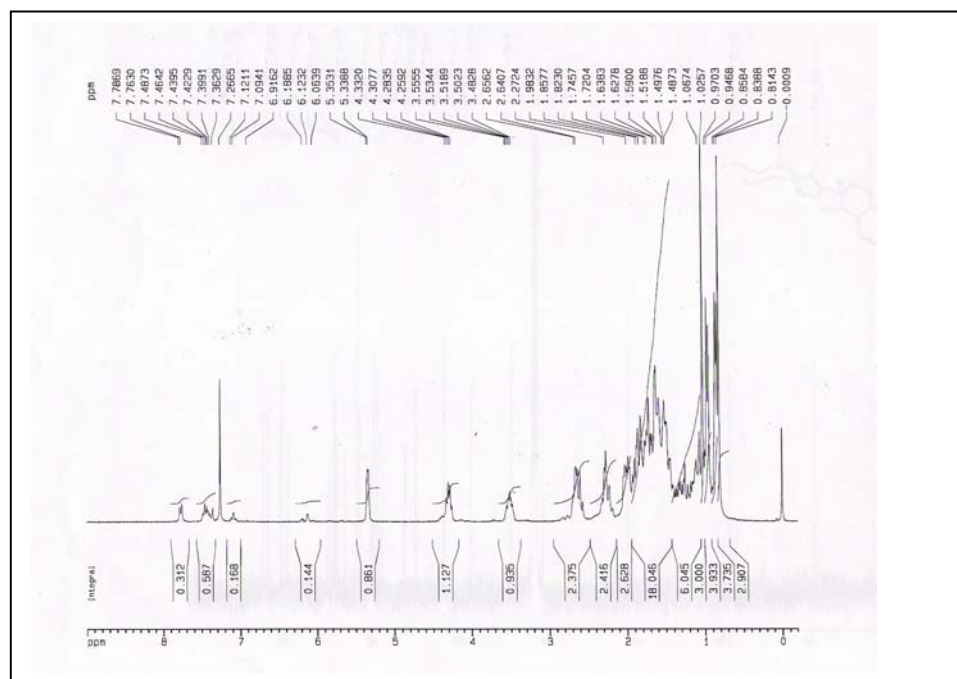
Os rendimentos dos extratos brutos foram calculados em relação ao peso dos frutos moídos, e os rendimentos das frações glicoalcaloidais em relação aos extratos brutos obtidos. Os respectivos valores de pesos e rendimentos estão descritos na **Tabela 3**, sendo que as espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* apresentaram-se mais ricas nas frações glicoalcaloidais.



A solasodina obtida foi comparada com amostra padrão por CCD e, apresentou ponto de fusão na faixa de 200-202°C (201-202°C, SIGMA, 2001). Além disso, sua estrutura foi confirmada por técnicas espectroscópicas.

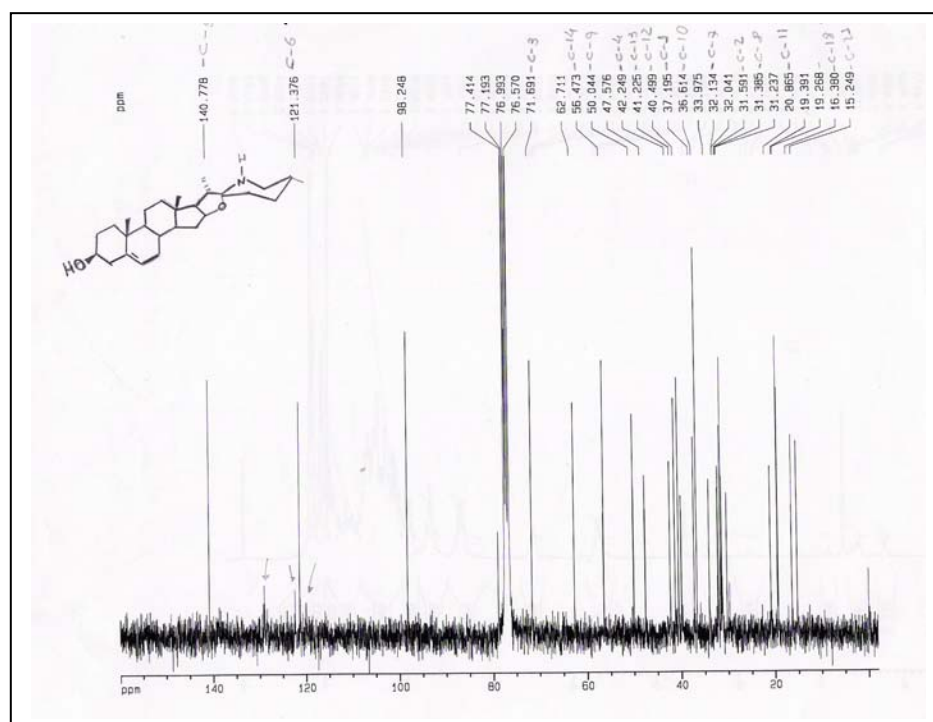
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu atribuir os seguintes sinais: dois dubletos correspondentes a duas metilas secundárias (H-21 e H-27) em  $\delta_{\text{H}}$  0,81 e 0,91, e dois singletos para duas metilas terciárias, H-19 e H-18, que apareceram em  $\delta_{\text{H}}$  0,99 e 0,78, respectivamente.

Os alcalóides do tipo espirosalanos têm dois anéis piperidínicos e tetra-hidrofurano peculiares ligados em espiro, fornecendo perfil característico ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . O multipletto com deslocamento químico em campo baixo, em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 corresponde ao hidrogênio metínico geminal (H-16) ao oxigênio do anel tetrafurânico. Os hidrogênios metilênicos geminais ao nitrogênio (H-26 e H-26') têm deslocamentos químicos em  $\delta$  2,61 (H- $\alpha$ ) e 2,56 (H- $\beta$ ). A **Figura 16** mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

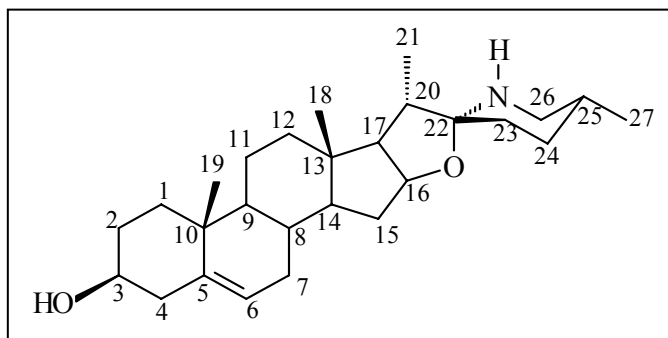


**Figura 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da solasodina

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi observado a presença do C-22, um carbono quaternário com deslocamento em  $\delta$  98,10 característico de todos os alcalóides do tipo espirosolano (RADEGLIA, 1977). A **Tabela 10** mostra os valores dos deslocamentos químicos encontrados na literatura em comparação com os valores obtidos para o produto isolado neste trabalho. A **Figura 17** mostra o espectro de  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 17.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da solasodina



**Tabela 10.** Atribuições para os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  para a solasodina (RADEGLIA, 1977)

C	Literatura ( $\delta$ )	Solasodina isolada ( $\delta$ )
1	37,3	37,4
2	31,5	31,5
3	71,7	71,8
4	42,3	42,4
5	140,9	140,9
6	121,3	121,5
7	32,1	32,3
8	31,5	32,2
9	50,2	50,2
10	36,7	36,8
11	20,9	19,5
12	40,0	40,0
13	40,5	40,6
14	56,6	56,7
15	32,1	32,2
16	79,0	78,9
17	62,9	62,5
18	16,4	16,5
19	19,3	19,5
20	41,3	42,4
21	15,2	15,4
22	98,4	98,4
23	34,1	34,2
24	30,3	30,4
25	31,5	31,8
26	47,7	47,8
27	19,3	19,4

## 4.2. Monitoramento dos Glicoalcalóides de *Solanum crinitum* por CLAE-EM

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) é uma poderosa técnica analítica para identificar e/ou monitorar a presença de metabólitos especiais de plantas. O trabalho de fracionamento de um extrato vegetal pode ser abreviado pela obtenção do perfil cromatográfico do respectivo extrato ou fração. Assim, através do tempo de retenção dos compostos eluídos no sistema cromatográfico, o qual é regido por parâmetros, tais como: polaridade e peso molecular, é possível identificar ou monitorar suas presenças.

Por outro lado, a obtenção dos espectros de massas dos picos presentes nos respectivos cromatogramas permitem inferir sobre os metabólitos presentes na espécie em estudo, e finalmente fazer a identificação dos mesmos (BRANCO e PIZZOLATTI, 2002).

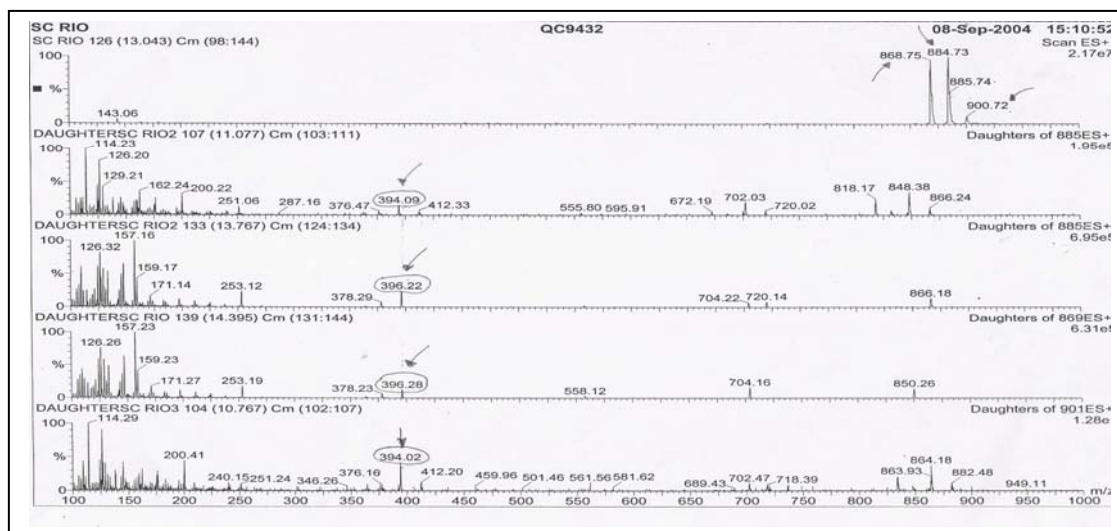
Diante disso, foram realizadas as análises por CLAE-EM da fração glicoalcaloidal de *Solanum crinitum*, que de acordo com as placas de CCD, apresentava três diferentes glicoalcaloides. Após a hidrólise da fração glicoalcaloidal observou-se apenas um alcalóide com estrutura esteroideal: a solasodina (aglicona), indicando a provável diferença apenas nas unidades de açúcar.

O cromatograma referente a fração glicoalcaloidal de *Solanum crinitum*, apresentou 3 picos de abundâncias significativas com tempos de retenção em 13,04, 13,66 e 14,39 s, sendo obtido o espectro de massas que forneceu fragmentos correspondentes aos possíveis íons moleculares ( $M^+$ ) com  $m/z = 868,74$ ,  $884,73$  e  $900,72$ . Esses íons moleculares poderiam ser atribuídos a três diferentes estruturas glicosiladas, sendo o pico  $m/z = 884,73$  referente à solasonina (CHEN *et al*, 1994).

Comparando-se os valores dos possíveis íons moleculares  $868,74$  e  $900,72$  com a solasonina, pôde-se sugerir que as estruturas dos glicoalcaloides apresentavam diferenças apenas na natureza das unidades de açúcar. Complementando, os fragmentos  $m/z 394,09$  e  $396,28$  caracterizam a presença do esqueleto esteroideal para os três glicoalcaloides.

Assim, as estruturas sugeridas para os glicoalcalóides podem apresentar três unidades de glicose ( $M^+ = 868,74$ ), duas de glicose e uma ramnose (solasonina,  $M^+ = 884,73$ ) e o outro glicoalcalóide com uma glicose e duas raminoses ( $M^+ = 900,72$ ). As

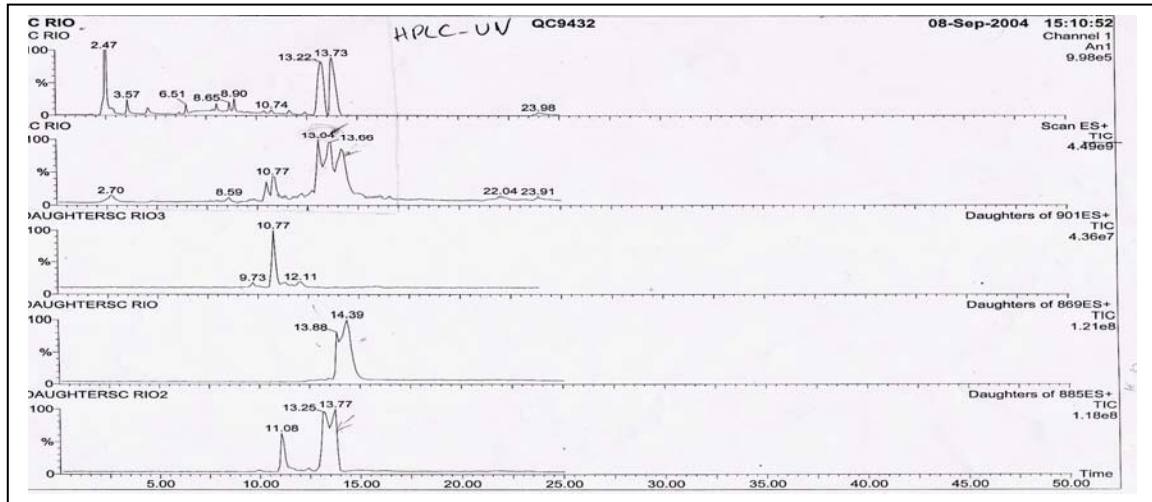
estruturas não foram propostas devido a dificuldade na separação dos glicoalcalóides e, em função da pequena quantidade da mistura não foi possível a obtenção de espectros de RMN para a provável elucidação. A **Figura 18** apresenta o espectro de massas da fração glicoalcaloidal.



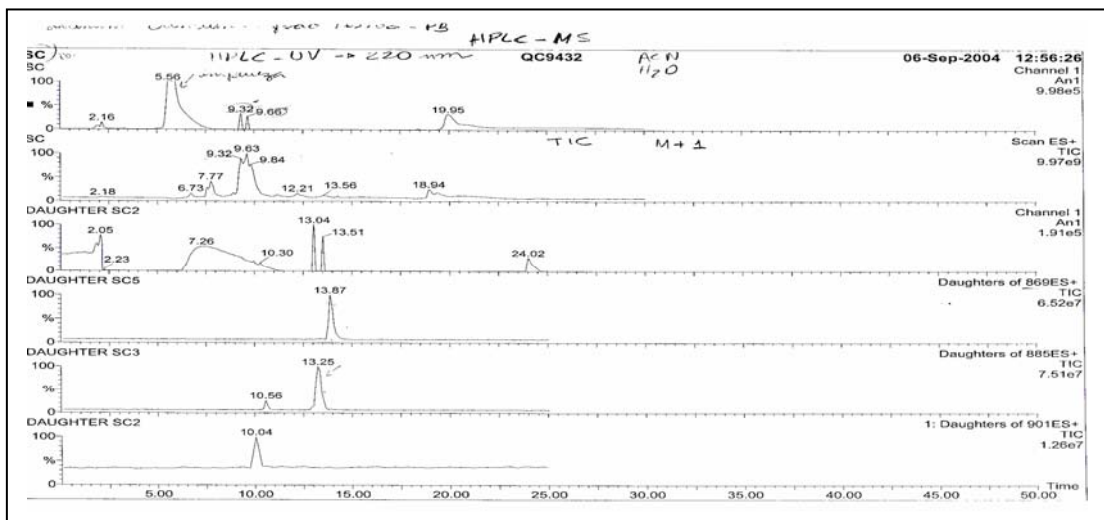
**Figura 18.** Espectro de massas da fração glicoalcaloidal de *Solanum crinitum*

Diante da possibilidade de coletar a espécie *S. crinitum* na cidade de João Pessoa (PB), tornou-se fato interessante realizar a comparação do perfil de metabólitos especiais com a coletada em Seropédica (RJ), devido às diferenças morfológicas observadas e também em função das variações de solo e clima. Através dos cromatogramas e dos espectros de massas obtidos para as frações glicoalcaloidais dos frutos das duas plantas foi possível verificar que estas apresentavam características químicas semelhantes, apesar das visíveis diferenças como a maior presença de espinhos e tricomas pela espécie do nordeste.

A comparação dos cromatogramas e espectros de massas (**Figura 19**) permitiu visualizar a semelhança dos metabólitos da classe dos glicoalcalóides.



Cromatograma de *Solanum crinitum* do Rio de Janeiro (RJ)



Cromatograma de *Solanum crinitum* de João Pessoa (Paraíba)

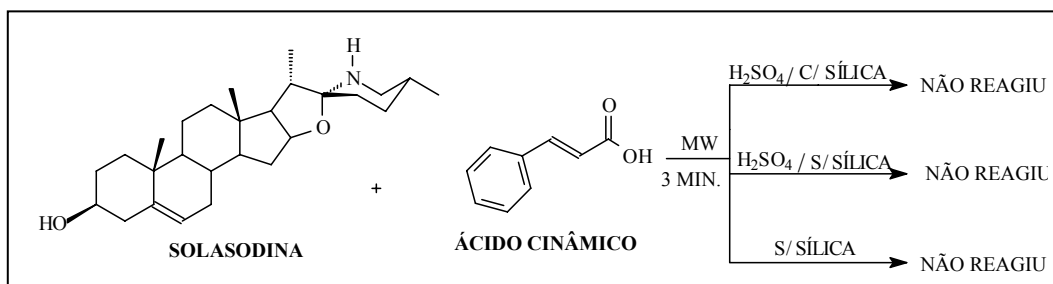
**Figura 19.** Cromatogramas e espectros de massas das plantas coletadas no Rio de Janeiro e em João Pessoa



### 4.3 Reações Utilizando a Solasodina

O interesse em realizar modificações estruturais na solasodina, deveu-se a estudos anteriores, onde se avaliou sua atividade citotóxica frente a células do carcinoma de Ehrlich e da leucemia humana K562. Os ensaios também foram realizados com o glicoalcalóide solasonina. Os resultados indicaram atividade citotóxica significativa para a solasonina, e baixa atividade para a solasodina, indicando assim, a importância da presença dos açúcares na estrutura do glicoalcalóide (ESTEVES-SOUZA, 2002), justificando assim, o interesse na busca de novos derivados da solasodina.

As reações de esterificação clássica, envolvendo a solasodina e o cloreto do ácido cinâmico não forneceram resultados positivos, como também, as reações entre a solasodina e o ácido cinâmico que foram realizadas com suporte sólido de gel de sílica, com ou sem catalisador ácido ( $H_2SO_4$ ) sob irradiação de microondas. Este fato foi confirmado por CCD, em que se comparou o produto da reação com o padrão de solasodina e ácido cinâmico, tendo como eluente  $CHCl_3:MeOH$  (9,5:0,5). O resultado negativo também foi verificado para a mesma reação sem suporte de gel de sílica (reação sólido-sólido). A **Figura 20** ilustra as equações para as reações realizadas.



**Figura 20.** Equações das reações da solasodina com ácido cinâmico

Esses resultados negativos motivaram-nos a buscar novas alternativas para a possível esterificação da solasodina sob irradiação em forno de microondas.

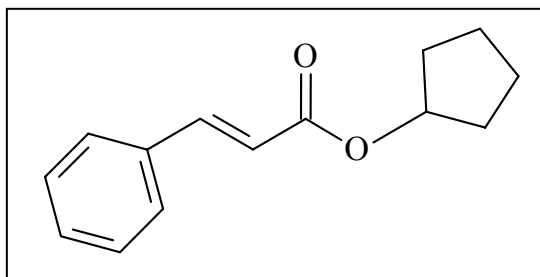
### 4.3.1 Estudo da Metodologia para as Reações de Esterificação

Inicialmente foram realizadas reações utilizando o sistema ciclopentanol e ácido benzóico com diversos catalisadores como  $ZnCl_2$ ; imidazol;  $Na_2CO_3$ ; gel de sílica e  $H_2SO_4$ , expostas à irradiação em forno de microondas, como modelo para posterior utilização com a solasodina.

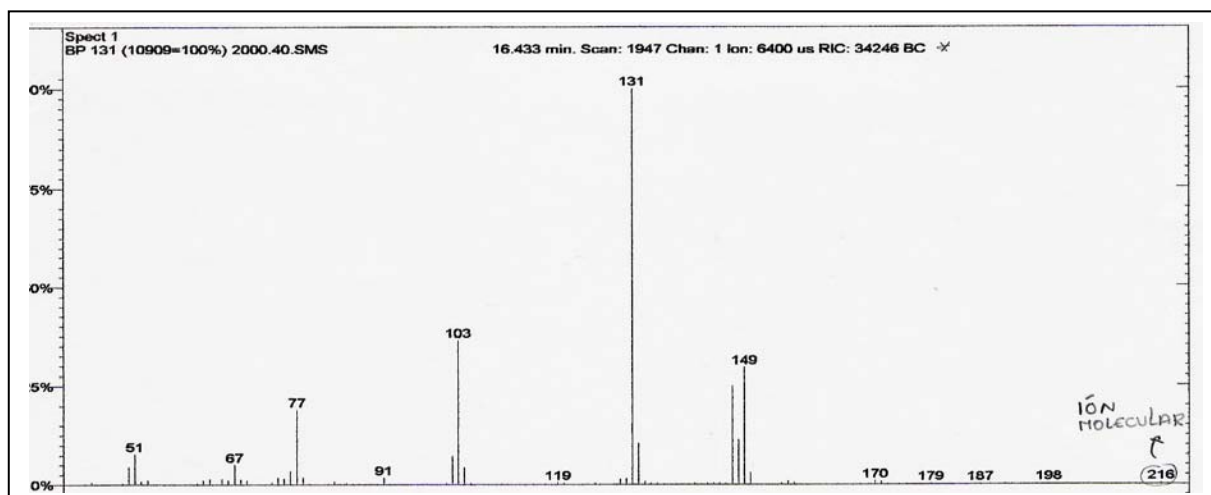
As aplicações do aquecimento de irradiação sob microondas tem sido utilizadas em pesquisas de diferentes áreas. Estas incluem a preparação de amostras para análise, tecnologia em polímeros, cerâmica e decomposição de alcanos. A técnica tem também uso estabelecido em processos de decomposição como na hidrólise de proteínas e peptídeos. Aplicações em sínteses inorgânicas e orgânicas, em estado sólido, têm sido também muito beneficiadas por esta tecnologia (CADDICK, 2001).

As reações com os cinco catalisadores ( $ZnCl_2$ , imidazol,  $Na_2CO_3$ , gel de sílica e  $H_2SO_4$ ), foram realizadas em forno de microondas doméstico, mantendo-se sempre a mesma potência e o tempo de exposição a irradiação. Dentre os cinco catalisadores testados as reações que forneceram resultados satisfatórios foram aquelas em que se utilizaram o  $ZnCl_2$ , imidazol ou o  $H_2SO_4$ .

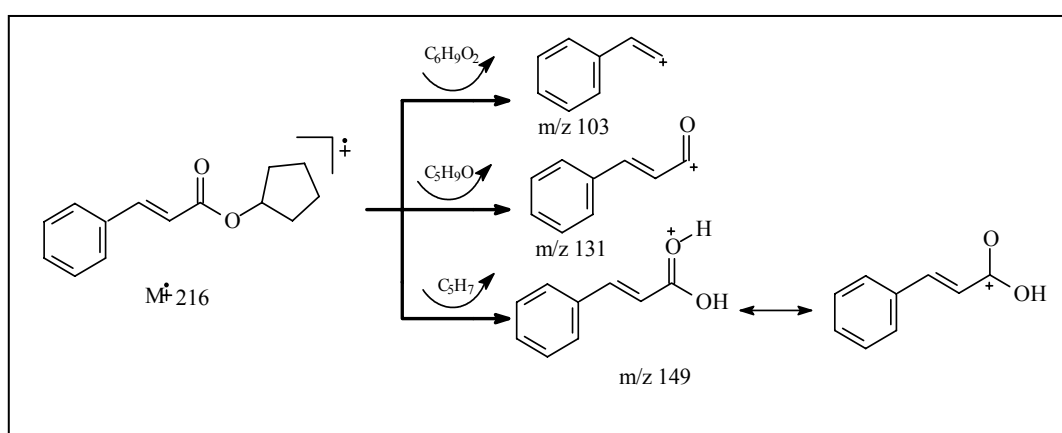
Estas reações foram monitoradas por cromatografia gasosa, e a formação dos produtos foi confirmada por espectrometria de massas (CG-MS). Pôde-se confirmar a formação do éster proveniente do ácido cinâmico e ciclopentanol, através da análise dos espectros de massas que apresentaram pico de íon molecular  $M^+$  216, e alguns sinais correspondendo aos fragmentos:  $m/z = 103, 131, 149$ , comuns nas reações utilizando-se os três catalisadores citados acima. A **Figura 21** apresenta a estrutura do éster do cinamato de ciclopentila e as **Figura 22 e 23** mostram o espectro de massas e os principais fragmentos sugeridos para o éster cinamato de ciclopentanila obtido na reação de esterificação utilizando o  $ZnCl_2$ , escolhido dentre os três catalisadores que apresentaram o mesmo perfil.



**Figura 21.** Estrutura do cinamato de ciclopentila



**Figura 22.** Espectro de massas do éster cinamato de ciclopentila



**Figura 23.** Principais fragmentos para o éster cinamato de ciclopentila

Os cálculos dos rendimentos dessas reações foram realizados através da área relativa percentual para o pico do produto, em relação a área do pico do reagente com estequiometria limitante, obtendo-se 77% para a reação catalisada por  $ZnCl_2$  em área relativa, 47% para a catalisada por imidazol e 62% para a reação com  $H_2SO_4$  como catalisador, sendo que todas foram realizadas em potência máxima do forno de microondas.

Tentando melhorar os rendimentos das reações utilizando o imidazol e o  $ZnCl_2$  como catalisadores estas foram repetidas mantendo-se os meios reacionais expostos as irradiações de microondas por mais tempo, porém diminuindo a potência do aparelho. Os resultados observados não foram satisfatórios, pois, não houve um aumento nos rendimentos, ocorrendo em alguns casos até uma diminuição da formação do produto.

Os rendimentos das reações do ciclopentanol e ácido benzóico frente aos diversos catalisadores estão descritos na **Tabela 11**.

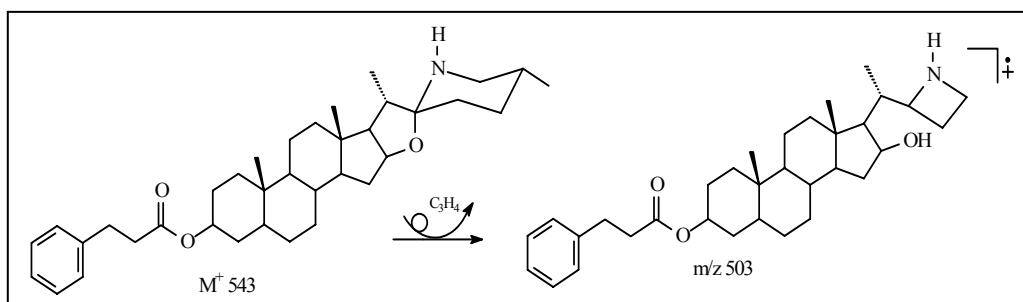
**Tabela 11.** Rendimentos das reações do ciclopentanol com ácido benzóico com diferentes catalisadores.

Catalisador	Tempo (min.)	Potência (W)	Rend. em área relativa (%)
$ZnCl_2$	3	10	77
$ZnCl_2$	6	10	36
$ZnCl_2$	6	5	35
Imidazol	3	10	47
Imidazol	6	10	17
Imidazol	6	5	0,5
$H_2SO_4$	6	5	62
$Na_2CO_3$	3	10	Não reagiu
Gel de Sílica	3	10	Não reagiu

#### 4.3.2. Reações de Esterificação da Solasodina

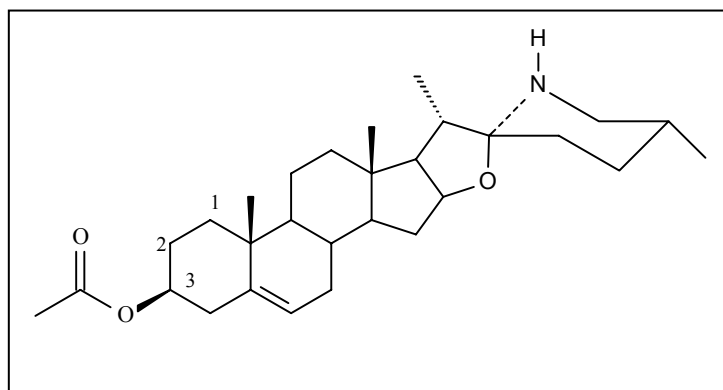
Assim, a reação da solasodina com o ácido cinâmico foi realizada sob irradiação de microondas utilizando os catalisadores que apresentaram melhores resultados, ou seja, na presença de imidazol e  $ZnCl_2$ . Os produtos foram isolados através da extração com  $CHCl_3$ , e foram analisados por CG-EM, sendo que puderam ser observados fragmentos importantes provenientes da fragmentação do éster formado entre a solasodina e o ácido cinâmico.

O íon molecular não pôde ser observado nos espectros de massas. A **Figura 24** mostra os principais fragmentos sugeridos para o éster cinâmico da solasodina.



**Figura 24.** Principais fragmentos para o Ester cinâmico da solasodina

A solasodina também foi submetida à reação de esterificação frente ao anidrido acético utilizando piridina como catalisador. A reação apresentou-se bem eficiente, após 48 horas de reação, foi possível extrair o produto com facilidade obtendo-se 92mg do acetato, o que correspondeu a um rendimento de 40%. A estrutura do produto obtido está representada pela **Figura 25**.



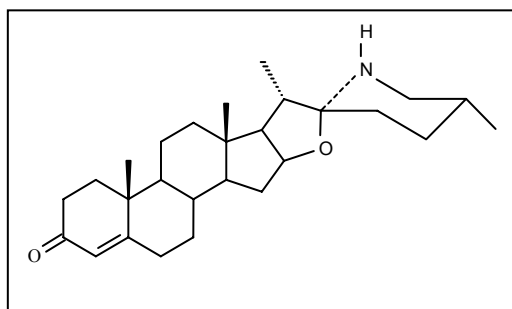
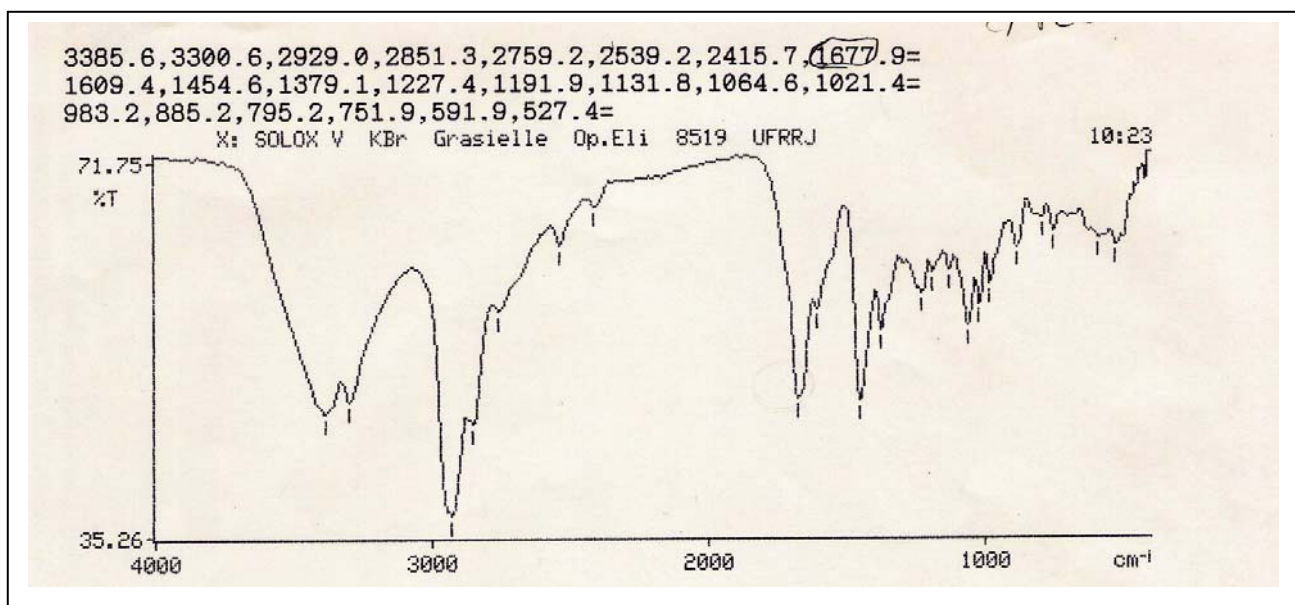
**Figura 25.** Estrutura da solasodina acetilada.

A solasodina acetilada foi caracterizada através dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou deslocamento químico para o C-3 em  $\delta$  70, 12, característico de álcool secundário acetilado em esqueleto esteroidal (BREITMAIER & VOELTER, 1987), enquanto que o C-3 da solasodina em  $\delta$  71,7 (RADEGLIA, 1977), além de absorções em  $\delta$  170,13 e 21, 7, referentes aos carbonos carbonílico e metílico do grupo acetila, respectivamente. A **Figura 26** mostra o espectro obtido.



A segunda técnica foi a oxidação utilizando  $\text{MnO}_2$  onde, através de CCD pôde-se verificar que esse oxidante não se apresentou muito eficiente devido a presença de muitas impurezas no produto formado, e da grande quantidade de solasodina que não havia reagido. Confirmou-se a formação do produto, através do espectro de infra-vermelho que apresentou uma pequena banda de absorção em  $1670\text{cm}^{-1}$ , confirmando a presença da carbonila.

A técnica em que se utilizou o PCC como agente oxidante foi a que forneceu melhores resultados, tanto no rendimento como na pureza do produto. A formação do produto foi confirmada por CCD, que apresentou uma mancha intensa atribuída a solasodinona. O espectro de infra-vermelho também foi obtido, e apresentou uma intensa banda de absorção em  $1677\text{cm}^{-1}$ , que confirmou a presença da carbonila. A **Figura 27** mostra o espectro de infra-vermelho e a estrutura da solasodinona.



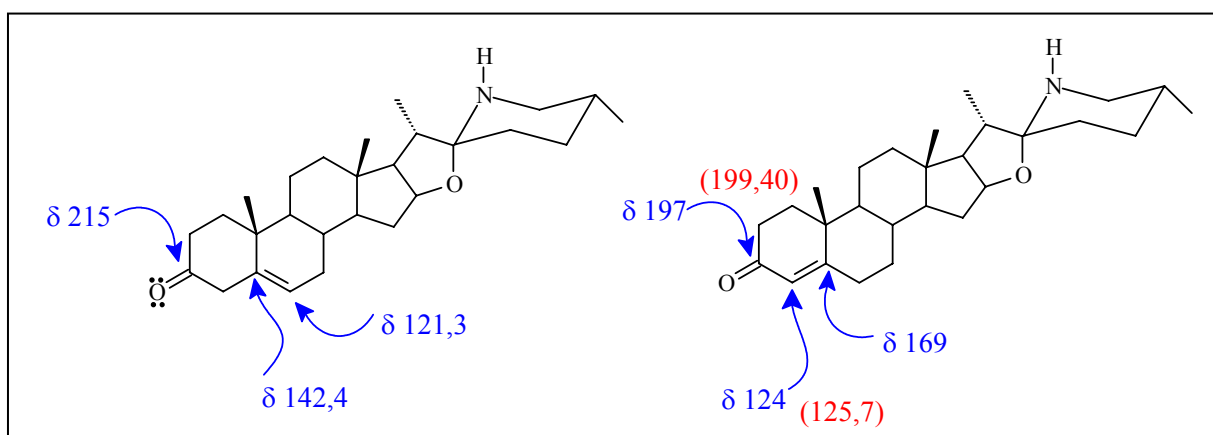
**Figura 27.** Espectro de infra-vermelho e estrutura da solasodinona.

Os valores dos rendimentos obtidos nas reações de oxidação da solasodina estão indicados na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Rendimento das reações de oxidação da solasodina.

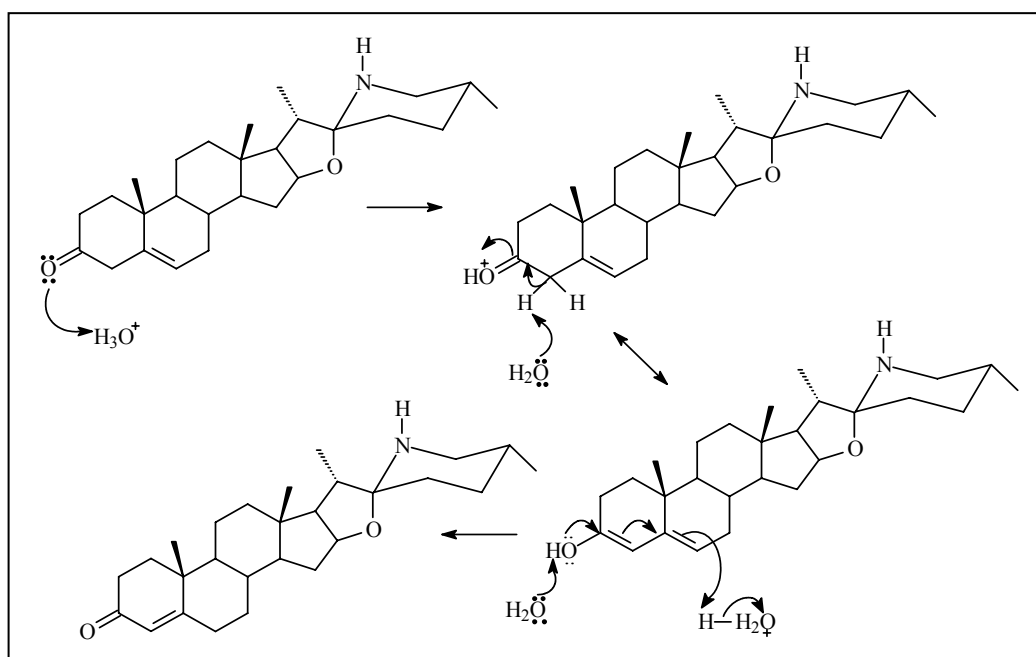
Oxidante	Rendimento (%)
PDC	7,5
MnO <sub>2</sub>	25
PCC	30

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram obtidos para a solasodinona, confirmando sua estrutura, através da comparação dos valores dos deslocamentos químicos com os correspondentes descritos na literatura (RADEGLIA, 1977). O deslocamento químico observado para o C-3 foi de  $\delta$  199,40, e 125,7 para o C-4, valores típicos de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (BREITMAIER & VOELTER, 1987), indicando a ocorrência do rearranjo alílico para o H em posição  $\gamma$  à carbonila. A **Figura 28** mostra os deslocamentos químicos da literatura para os carbonos envolvidos, e a **Figura 29** o rearranjo alílico



**Figura 28.** Deslocamentos químicos para a cetona  $\beta,\gamma$  (MAHATO & KUNDU, 1994) e cetona  $\alpha,\beta$ -insaturadas (BREITMAIER & VOELTER, 1987) e os valores, em vermelho e entre parênteses, obtidos neste trabalho.





**Figura 29.** Rearranjo alílico sugerido para a solasodinona

#### 4.4. Atividade Biológica

Foram realizados ensaios para a avaliação da toxidez geral frente a *Artemia salina* Leach e atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, dos extratos brutos e das frações glicoalcaloidais das seis espécies de plantas do gênero *Solanum* estudadas nesse trabalho.

##### 4.4.1. Atividade Frente a *Artemia salina* Leach

Os laboratórios de produtos naturais ou de síntese orgânica têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento ou monitoramento, diversos ensaios biológicos simples. Geralmente, esses ensaios são pouco viáveis em laboratórios de química, pois estes não estão devidamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais tecidos ou órgãos isolados, fazendo-se necessário realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos (CAVALCANTE *et al*, 2000).

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um

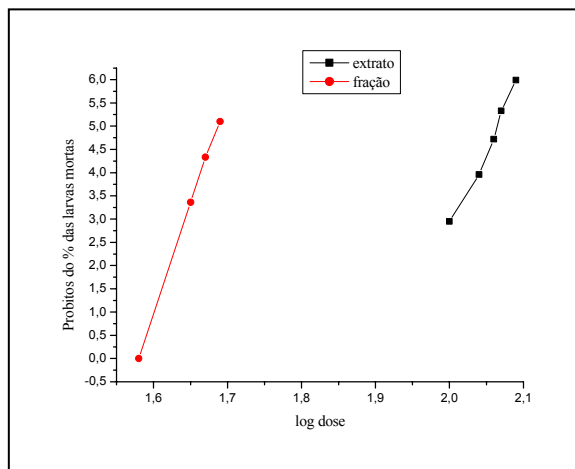
parâmetro envolvido: morte ou vida, e os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxidez geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (SIQUEIRA *et al*, 1998).

Dentre esses bioensaios, encontra-se a toxidez sobre *Artemia salina* Leach (TAS), que se caracteriza por ser de baixo custo e rápido. A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizada como alimento vivo para peixes. O primeiro trabalho relativo ao uso da TAS em bioensaios foi para avaliar resíduos de pesticidas. E a partir daí, inúmeros artigos têm sido publicados na literatura em estudos ambientais, utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas (SIQUEIRA *et al*, 1998).

Os extratos brutos e frações glicoalcaloidais dos frutos verdes de *S. crinitum*, *S. americanum*, *S. lincocarpum* e *S. seaforthianum*, como também o extrato bruto de *S. capsicoides*, e a fração de glicoalcalóides de *S. variable*, foram submetidos ao ensaio frente a *Artemia salina*.

Foram preparadas soluções-mãe de 40% (v/v) de DMSO e solução salina. Destas soluções foram retiradas alíquotas que variaram entre 500 – 38 µl que foram adicionadas aos tubos de ensaio para a realização dos testes. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada concentração. Os valores dos log das doses *versus* os percentuais de larvas mortas permitiram a obtenção de gráficos com perfil sigmoidal, que foram tratados estatisticamente pelo método dos Probitos (BIER, 1965) e posteriormente submetidos à regressão linear. As equações assim obtidas permitiram a obtenção dos valores da dose letal que mata 50% (DL<sub>50</sub>). As **Figuras 30 – 35** apresentam os gráficos dos probitos dos percentuais de larvas mortas *versus* log doses ensaiadas e as equações que permitiram a obtenção dos valores de DL<sub>50</sub>.

*S. seafortheanum*



**Figura 30.** Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal de *S. seafortheanum*.

Após a regressão linear foram obtidas as seguintes equações:

Extrato de *S. seafortheanum*

Probitos do % de larvas mortas =  $-65,43 (\pm 5,72) + 34,10 (\pm 2,79) \log \text{dose}$

$R = 0,9901$      $dp = 0,1908$      $p = 0,0012$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-65,43) / 34,10 = -2,07$      $\text{DL}_{50} = 23,6 \mu\text{g/mL}$

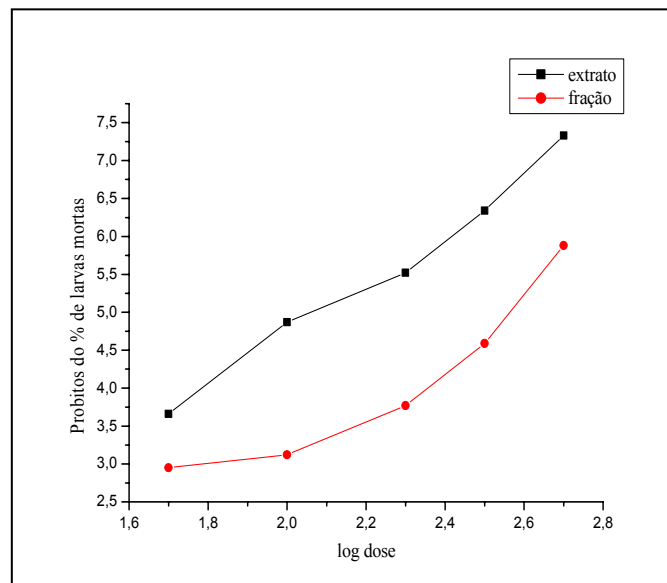
Fração de *S. seafortheanum*

Probitos do % de larvas mortas =  $-74,10 (\pm 1,85) + 46,92 (\pm 1,12) \log \text{dose}$

$R = 0,9994$      $dp = 0,0929$      $p = 5,69 \cdot 10^{-4}$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-74,10) / 46,92 = -1,69$      $\text{DL}_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$

*S. lycocarpum*



**Figura 31.** Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal de *S. lycocarpum*.

Após a regressão linear foram obtidas as seguintes equações:

Extrato de *S. lycocarpum*

Probitos do % de larvas mortas =  $-2,28 (\pm 1,47) + 2,84 (\pm 0,65)\log \text{ dose}$

$R = 0,9903$      $dp = 0,2193$      $p = 0,0012$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-2,28) / 2,84 = 2,60$

$\text{DL}_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$

Fração de *S. lycocarpum*

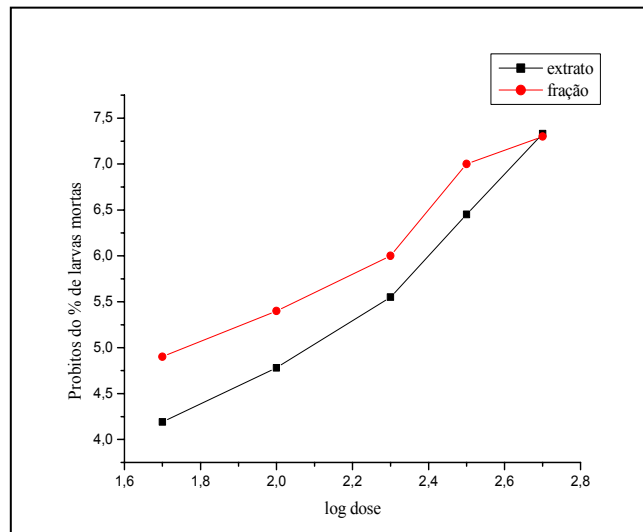
Probitos do % de larvas mortas =  $-2,42 (\pm 1,40) + 2,89 (\pm 0,62)\log \text{ dose}$

$R = 0,9296$      $dp = 0,5123$      $p = 0,0222$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-2,42) / 2,89 = 2,56$

$\text{DL}_{50} = 70 \mu\text{g/mL}$

*S. crinitum*



**Figura 32.** Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log dose ensaiada para o extrato bruto e fração glicoalcaloidal de *S. crinitum*.

Após a regressão linear foram obtidas as seguintes equações:

Extrato de *S. crinitum*

Probitos do % de larvas mortas =  $-1,21 (\pm 0,68) + 3,07 (\pm 0,30)\log \text{ dose}$

$R = 0,9861$      $dp = 0,2375$      $p = 0,0020$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-1,21) / 3,07 = 2,02$

$DL_{50} = 52,7 \mu\text{g/mL}$

Fração de *S. crinitum*

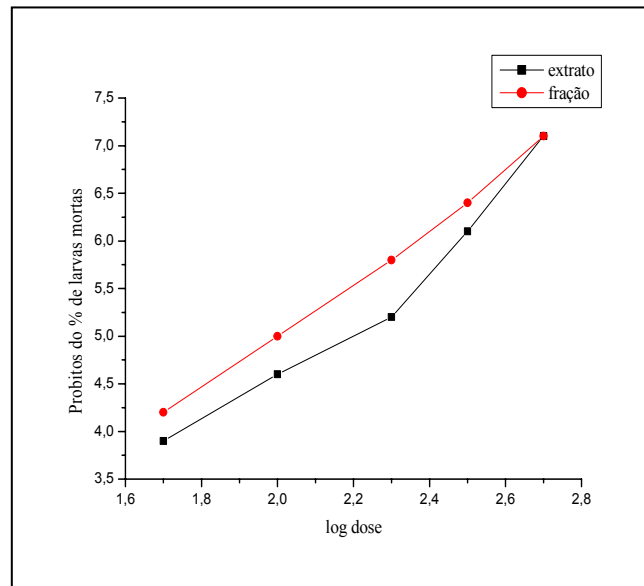
Probitos do % de larvas mortas =  $0,46 (\pm 0,65) + 2,53 (\pm 0,29)\log \text{ dose}$

$R = 0,9810$      $dp = 0,5123$      $p = 0,0030$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (0,46) / 2,53 = 1,80$

$DL_{50} = 13 \mu\text{g/mL}$

*S. americanum*



**Figura 33.** Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log dose ensaiada para o extarto bruto e fração glicoalcaloidal de *S. americanum*.

Após a regressão linear foram obtidas as seguintes equações:

Extrato de *S. americanum*

Probitos do % de larvas mortas =  $-1,55 (\pm 0,85) + 3,09 (\pm 0,38)\log \text{ dose}$

$R = 0,9786$      $dp = 0,2982$      $p = 0,0037$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-1,55) / 3,09 = 2,09$

**$DL_{50} = 25,20 \mu\text{g/mL}$**

Fração de *S. americanum*

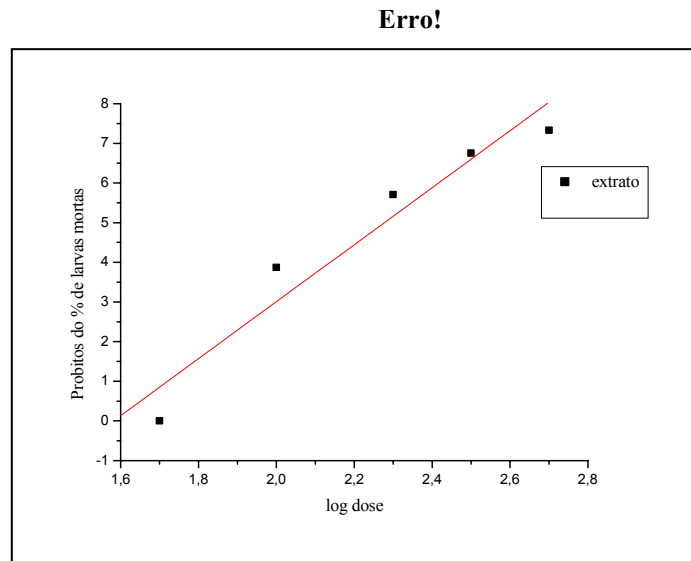
Probitos do % de larvas mortas =  $-0,72 (\pm 0,21) + 2,86 (\pm 0,09)\log \text{ dose}$

$R = 0,9984$      $dp = 0,0737$      $p < 0,0001$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (0,72) / 2,86 = 1,97$

**$DL_{50} = 18,70 \mu\text{g/mL}$**

*S. capsicoide*



**Figura 34.** Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log dose ensaiada para o extrato bruto de *S. capsicoide*.

Após a regressão linear foi obtida a seguinte equação:

Extrato de *S. capsicoide*

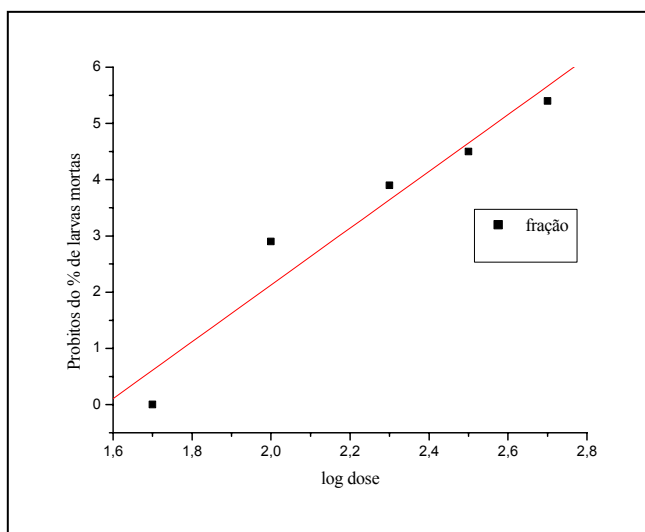
Probitos do % de larvas mortas =  $-11,49 (\pm 2,43) + 7,28 (\pm 1,08)\log \text{ dose}$

$R = 0,9686$      $dp = 0,8481$      $p = 0,0067$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-11,49) / 7,28 = -2,26$

**$\text{DL}_{50} = 40,00 \mu\text{g/mL}$**

*S. variable*



**Figura 35.** Gráfico do probitos do % de larvas mortas x log dose ensaiada para a fração glicoalcaloidal de *S.variable*.

Após a regressão linear foi obtida a seguinte equação:

Fração de *S. variable*

Probitos do % de larvas mortas =  $-7,97 (\pm 1,75) + 5,09 (\pm 0,77)\log \text{ dose}$

$R = 0,9667$      $dp = 0,8473$      $p = 0,0073$

$\text{Log DL}_{50} = 5 - (-7,97) / 5,09 = -2,90$

**$\text{DL}_{50} = 160,00 \mu\text{g/mL}$**

Os valores de  $\text{DL}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos nos ensaios de toxidez frente a *Artemia salina* para os extratos brutos e frações glicoalcaloidais das diversas espécies de *Solanum* estudadas estão indicados na **Tabela 13**. Observou-se que todos os extratos mostraram atividade significativa, sendo o de *S. seafortheanum* o mais ativo ( $\text{DL}_{50} = 23,6 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que as frações alcaloidais foram mais ativas quando comparadas aos respectivos extratos brutos. A fração de glicoalcalóides mais ativa também foi de *S. seaforthianum* que apresentou  $\text{DL}_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$ , e a menos ativa foi a *S. variable* com  $\text{DL}_{50} = 160 \mu\text{g/mL}$ .

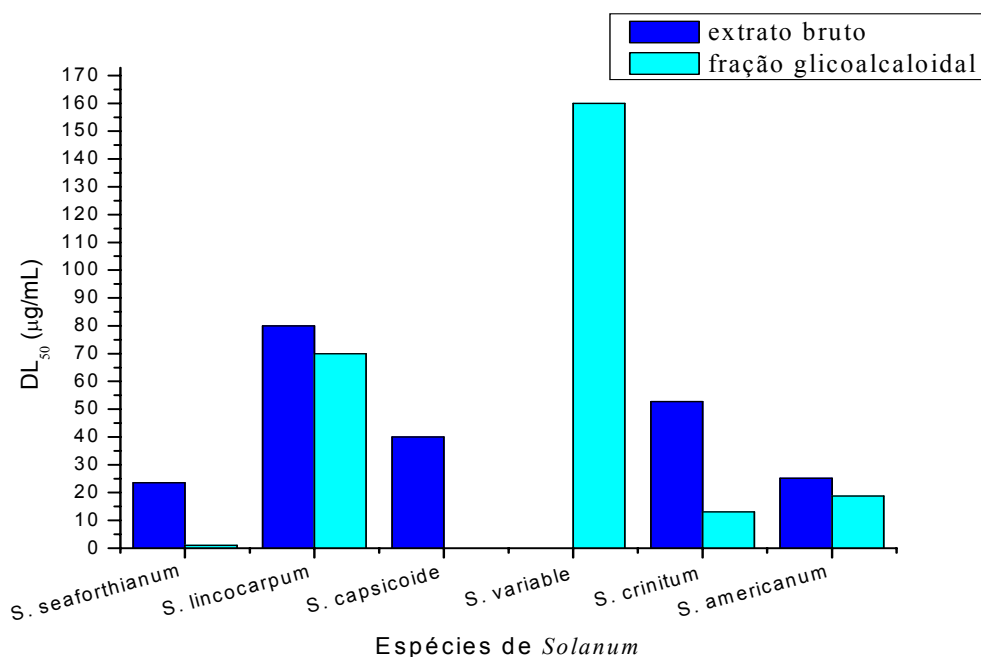


**Tabela 13.** Valores de DL<sub>50</sub> frente a *Artemia salina* para os extratos brutos e frações glicoalcaloidais das espécies de *Solanum*.

Espécie	Extrato DL <sub>50</sub> µg/mL	Fração DL <sub>50</sub> µg/mL	Atividade <sup>a</sup>
<i>S.seaforthianum</i>	23,60	1,00	Ativa
<i>S. lycocarpum</i>	80,00	70,00	Ativa
<i>S. capsicoide</i>	40,00	n.t. <sup>b</sup>	Ativa
<i>S. variable</i>	n.t.	160,00	Ativa
<i>S. crinitum</i>	57,70	13,00	Ativa
<i>S. americanum</i>	25,20	18,70	Ativa

<sup>a</sup>Considera-se ativa DL<sub>50</sub> < 1000 µg/mL; <sup>b</sup>n. t.: não testada.

A **Figura 36** mostra o gráfico comparativo dos valores de DL<sub>50</sub> para a toxidez frente a *Artemia salina* das espécies de *Solanum* avaliadas.



**Figura 36.** Gráfico comparativo dos valores de DL<sub>50</sub> para as espécies de *Solanum* frente a *Artemia salina*.

#### 4.4.2 Atividade Moluscicida Frente ao Caramujo *Biomphalaria Glabrata*

A doença parasitária esquistossomose é o maior problema de saúde em muitos países tropicais e mais de 300 milhões de pessoas estão infectadas. Os caramujos aquáticos são os hospedeiros intermediários para o parasita e por causa disto, a infecção é transmitida para os humanos através do contato com a água contaminada, principalmente em áreas rurais com o fornecimento precário de água para o consumo doméstico e pobres instalações sanitárias. A erradicação da doença é impossível com os recursos disponíveis, entretanto o objetivo imediato é o controle da mortalidade. Apesar do sucesso de alguns programas de controle, a prevalência da esquistossomose continua constante, devido principalmente ao crescimento da população e ao aumento de áreas de irrigação (WHO,1993).

No Brasil 8 milhões de pessoas são infectadas, com distribuição em vastas regiões, desde Belém do Pará até o Norte do Paraná, com dois focos isolados em Santa Catarina e um caso no Rio Grande do Sul ( CARVALHO *et al*, 1998).

É uma doença provocada pelo *Schistosoma mansoni*, caracteriza-se por uma fase aguda, muitas vezes despercebida, e uma crônica, na qual podem surgir formas graves, evidenciadas principalmente pela hipertensão porta ou pulmonar (PRATA, 1987).

Existe uma necessidade urgente de encontrar um moluscicida seletivo e eficiente para o controle dos caramujos, especialmente porque os compostos utilizados ou as formulações em geral são biocidas, afetando também muitos animais e plantas (ou ambos) onde estes habitam. Por esta razão, tem-se aumentado a procura por substâncias derivadas de plantas com atividade moluscicida, na esperança de que espécies disponíveis localmente possam ser usadas para o controle da doença em áreas endêmicas (KLOOS & MCCULLOUGH, 1982; MARSTON & HOSTETTMANN, 1985, MARSTON & HOSTETTMANN, 1991).

Os extratos dos frutos verdes e as frações glicoalcaloidais de *S. crinitum*, *S. americanum*, *S. lincocarpum* e *S. seaforthianum*, bem como o extrato bruto *S. capsicoides* e a fração glicoalcaloidal de *S. variable*, foram submetidos ao ensaio moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. Primeiramente foram realizados ensaios preliminares (triagem, conforme Parte Experimental) para verificar a existência ou não de atividade significativa. Os resultados dessa triagem estão apresentados na **Tabela 14**.

**Tabela 14.** Triagem da ação moluscicida dos extratos brutos e frações glicoalcaloidais das seis espécies do gênero *Solanum*

Espécies de <i>Solanum</i>	Amostras testadas	Diâmetro dos caramujos (mm)	Concentrações testadas (µg/ml)	Mortalidade (%)	Atividade
<i>S. seaforthianum</i>	Extrato	12-13	100 50	0 0	Inativo
<i>S. seaforthianum</i>	Fração	12-13	100 50	100 40	Ativo Ativo
<i>S. crinitum</i>	Extrato	11-12	100 50	100 0	Ativo Inativo
<i>S. crinitum</i>	Fração	11-12	100 80 70 50	100	Ativo
<i>S. lincocarpum</i>	Extrato	9-10	100	0	Inativo
<i>S. lincocarpum</i>	Fração	9-10	100	0	Inativo
<i>S. americanum</i>	Extrato	9-10	100	0	Inativo
<i>S. americanum</i>	Fração	9-10	100	0	Inativo
<i>S. variable</i>	Fração	9-10	100	0	Inativo
<i>S. capsicoides</i>	Extrato	9-10	100	0	Inativo

De acordo com os resultados observados na **Tabela 14**, verificou-se que apenas as frações glicoalcaloidais de *S. seaforthianum* e *S. crinitum*, apresentaram atividade moluscicida significativa, o que nos levou a realização dos ensaios definitivos com essas amostras.

Os ensaios definitivos foram realizados, segundo metodologia detalhada descrita na Parte Experimental, utilizando concentrações que variaram entre 40 a 1 µg/mL, em duplicata para cada dose, sendo cada experiência realizada com 20 caramujos. A contagem dos caramujos mortos e vivos foi realizada após 48 horas, mantendo-se os ensaios em observação por mais 24 horas. Os gráficos dos valores dos

log das doses *versus* os percentuais de caramujos mortos possibilitaram a obtenção dos valores de DL<sub>50</sub>, após o tratamento estatístico pelo método dos Probitos (BIER, 1965), sendo posteriormente submetidos à regressão linear. A **Tabela 15** mostra os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para as frações glicoalcaloidais de *S. crinitum* e *S. seaforthianum* frente aos caramujos.

**Tabela 15.** Valores de DL<sub>50</sub> para as frações glicoalcaloidais de *S. crinitum* e *S. seaforthianum* frente a *Biomphalaria glabrata*.

Espécie	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Coefficiente de correlação <sup>a</sup>
<i>S. crinitum</i>	34,70	0,9647
<i>S. seaforthianum</i>	4,90	0,9358

<sup>a</sup>Coefficiente de correlação obtido, após regressão linear, na equação para determinar o valor de DL<sub>50</sub>

As frações glicoalcaloidais das espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* apresentaram atividade moluscicida significativa que pôde ser correlacionada com a maior toxidez frente a *Artemia salina*, uma vez que estas também foram as mais ativas frente a esse microcrustáceo, indicando a importância do ensaio de toxidez geral.

## 5.0 CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos desse trabalho, pôde-se concluir que:

1 – Das seis espécies de plantas do gênero *Solanum* estudadas, apenas *Solanum capsicoides* não apresentou fração de glicoalcalóides e *Solanum crinitum* forneceu o maior rendimento da fração glicoalcaloidal.

2 - Através de CLAE-EM pôde-se verificar que a fração glicoalcaloidal de *S. crinitum* é constituída por três diferentes glicoalcalóides, que possuem o mesmo esqueleto esteroidal, variando apenas nas suas unidades de açúcar. Esta técnica também permitiu confirmar a semelhança química entre as frações de glicoalcalóides de *S. crinitum* coletada em Seropédica-RJ e em João Pessoa-PB, pois os cromatogramas apresentaram o mesmo perfil.

3 - Nas reações de esterificação da solasodina realizadas pela técnica tradicional não foi observado a formação do produto, o que nos levou a buscar novas metodologias. Das metodologias sintéticas testadas, as reações em que foram utilizados  $ZnCl_2$ , imidazol e  $H_2SO_4$  sob irradiação em forno de microondas, respectivamente, forneceram o éster cinâmico da solasodina, que foi confirmado através de CG-EM.

4 - Os ensaios frente à *Artemia salina* Leach mostraram que, tanto os extratos brutos como as frações glicoalcaloidais apresentaram toxidez significativa, sendo as frações de *S. seaforthianum* e de *S. crinitum*, as mais tóxicas.

5 - Diante do ensaio moluscicida frente à *Biomphalaria glabrata*, todos os extratos brutos e algumas das frações glicoalcaloidais não apresentaram atividade significativa. Porém, as frações de *S. seaforthianum* e *S. crinitum*, mostraram-se bastante ativas, podendo este efeito ser correlacionado aos resultados do ensaio de toxidez geral.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F. A New Espécies de *Solanum* Subgenus *Letostemonum* (Solanaceae) From Chapada da Diamantina, Bahia, Brasil. *Novon* 9, 292-295, **1999**.
- AGRA, M.F. *et al.* Contribuição ao Estudo de Plantas Medicinais da Paraíba. *VI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Resumo 64-66, **1980**.
- AMOROZO, M. C.; GÉLY, A. Bol. Mus. Par. Emílio Goeldi, série Botânica, V. 4, n. 1, p. 47-131, **1988**.
- ATTA- UR – RAHMAN, ALI, R. A.; ASHRAF, M.; CHOUDHARY, M.; SENER, B.; TURKOZ, S. STEROIDAL alkaloids from *Veratrum Album*, *Phytochemistry*, 43, 907-911, **1996**
- ATTA – UR- RAHMAN & CHOUDHARY, I. Chemistry and Biology of Steroidal Alkaloids. In: *The Alkaloids* (G.A. Cordell, ed.), 50, p. 61-107, Academic Press, San Diego, **1998**.
- BENTO, A. F.; DE AZEVEDO, M. S.; DOS SANTOS, A. R. S. Abordagem Fitoquímica e Avaliação Farmacológica de *Solanum acanthodes* e *Solanum jamaicense* Mill. [www.unir.br/pesquisa/pibic](http://www.unir.br/pesquisa/pibic), visitado em 05/01/2005.
- BIER, O., Bacteriologia e Imunologia. 12 ed. São Paulo: Edições Melhoramentos. P. 950-953, **1965**.
- BOTSARIS, A. S., As Fórmulas Mágicas das Plantas. 2 ed. Editora Nova Era. P. 14-15, **1997**.
- BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. C. CGAR e CGAR-EM na Análise dos Constituintes Químicos Isolados do Extrato Hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). *Química Nova* 25, 15-19, **2002**.
- BREITMAIER, E.; VOLTER, W., Carbon-13 NRM Spectrscopy Hight-Resolution methods and applications in Organic Chemistry and Biochemistry. Third, completely revised edition: VCM. P. 363-375, **1987**.
- CADDICK, S.; McCARROLL, A. J.; SANDHAM, D. A., A Convenient an Practical Method for the Selective Benzoylation of Primary Hydrxyl Groups Using Microwave Heating. *Tetrahedron*, 57, 6305-6310, **2001**.
- CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M.; CALDEIRAS, L. First Report of BIOMPHALARIA glabrata in the State of Rio Grande do Sul , Brazil, *Men Inst. Oswaldo Cruz*, 93, 39-40, **1998**

- CAVALCANTE, M.F.; DE OLIVEIRA, M.C.C; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A., Síntese de 1,3,5-triazinas Substituídas e Avaliação da Toxidez Frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, 23, 20-22, **2000**.
- CAREY, E. J.; VUGGS, J. W., *Tetrahedron Letters* 31, 2647-2650, **1975**.
- CHAM, B. E.; GERNS, E. H. J.; GERNS, H. H., Pharmaceutical Compositions Comprising Ateroid Alkaloids. *European Patent*, **1980**.
- CHEN, S.; DERRICK, M. S.; DOS SANTOS, A.R.S.; MELLON, F. A.; KEITH, R.P. Analysis of Glycoalcaloids from Potato Shoots and Tomatoesnby Four-Sector Tandem Mass Spectrometry With Scanning Array Detection: Comparason of Positive Ion and Negative Ion Methods. *Analitical Biochemistry* 218, 157-169, **1994**.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional. v. I a IV, **1984**.
- D'ARCY, W. G.The Solanaceae since 1976 with a Review of its Biography. In: J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee & N. Estrada-R. (eds.), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew. P. 257-266, **1991**.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2 ed. Editora UNESP São Paulo:, p. 397-404, **2002**.
- DA SILVA, M. S.; Uso a Avaliação Farmacológica de Plantas Mediciniais Utilizadas na Medicina Popular do Povoado Colônia Treze em Lagarto/ SE. FUNESA, **2000**. [www.amppas.org.br](http://www.amppas.org.br) - visitado em 11/01/05.
- DOS SANTOS, A. D. Estudo Plantas com Atividade Nematicida e/ou Moluscicida e Re-Exama da *Jatropha elliptica* Muell. Alagoas, **1997**. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Alagoas.
- ESTEVES-SOUZA, A.; DA SILVA, T. M. S.; ALVES, C. C. F.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; EVARRIA, A. Cytotoxic Activities Against Ehrlich Carcinoma and Human K562 Leukaemia of Alkaloids and Flavonoid from Two Solanum Species, *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 838-842, **2002**.
- ESTEVES-SOUZA, Avaliação Biológica de Substancias Sintética, Semi-Sintéticas, Naturais, Frações de *Cróton cajucara* Benth e *Solanum* sp. Síntese de Novas 1,3,5-Triazinas e Derivados da trans-Desidrocrotonina como Potenciais Agentes Anti-Carncer. Tese de Doutorado UFRRJ, **2003**
- GAVILLANES, M. L. *et al.* *Oréades*, v. 8, no 14/15, **1982**.
- GONÇALVES, K.C. *et al.* *Anais da XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, **1994**.

HIROSE, T.; KOPEK, B. G.; WANG, Z. H.; YUSA, R.; BALDWIN, B. W. Microwave Oven Synthesis of Esters Promoted by Imidazole. *Tetrahedron Letters*, 44, 45-48, **2002**.

HIRUMA-LIMA, C. A. *et al.* *Planta Medica*, 65, 325-330, **1999**.

HOLUM, J. R. Study of the Chromium (VI) Oxide-pyridine complex, 26, 4814-4816, **1961**.

KLOOS, H.; MC CULLOUGH, F. S., Plant Molluscicides, *Planta Medica*, 46, 195-209, **1982**.

KNAPP, S. Solanum Section Geminata (Solanaceae) published for Organization for Flora Neotropica, by the New York Botanical Gardens Bronx, New York, 345, **2002**.

MABBERLY, D. J. The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants. 2 ed. Cambridge University Press, p. 858, **1997**.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. J.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinasi: A Necessidade de Estudo Multidisciplinares, *Química Nova*, 25, 429-438, **2002**.

LIAO, X.; RAGHAVAN, G. S. V.; YAYLAYAH, V. A. A Novel Way to prepare n-butylparaben Under Microwave Irradiation, *Tetrahedron Lettes*, 44, 1831-1833, **2003**.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids- a Compilation and Some Salient Features, *Phytochemistry*, 37, 1517-1575, **1994**.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant Molluscids, *Phytochemistry*, 24, 639-652, **1985**.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Assays for Molluscicidal, Cercaricidal, Schistotomicidal and Piscicidal Actevities, In: Methods in Plant Biochemistry, (Dey, P.M and Harbone, J. B. eds.), 6 , Academic Press, London, p. 153-178, **1991**.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L., In human Medicine Agents from Plants. Kinghom, A. D. & Balandrin, M. f., eds., Symposium, American Chemical Society. 534, 112-137, **1993**.

MICHAES, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M., *Science*, 123: 464, **1956**.

NEE, M. SYNOPSIS OF Solanum Section Acanthophara: a group of interest for glycoalkaloids. In J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee & N. R. Estrada (eds.), solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Garden, Kew. P. 257-266, **1991**.

OASHI, M.C.G. Tese de Doutorado, **1999**. ([www.eps.ufsc.br](http://www.eps.ufsc.br) , visitado em 14/01/04)

PRATA, A. Esquistossomose Mansonias, Doenças Infecciosas e Parasitárias. 7 ed, Rio de Janeiro, Guanabara, p. 885-904, **1987**.



- RADEGLIA, R.; ADAM, G.; RIPPERGER, H. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of Solanum Steroid Alkaloids, *Tetrahedron Letters*, 11, 903-906, **1977**.
- RODDICK, J. G. Steroidal Glycoalkaloids: Nature and Consequences of Bioactivity. In: Saponins used in Traditional and Modern Medicine ( George R. Waller and Kazuo Yamasaki eds.), Plenum Press, New York, p. 277-295, **1996**.
- SHIEH, W. C.; DELL, S.; REPIC, O. Large Scale Microwave Accelerated Esterification of Carboxylic acids with Dimethyl Carbonate, *Tetrahedron Letters*, 43, 5607-5609, **2002**.
- SHIRINER, R. L. the Systematic Identification of Organic Compounds, 6<sup>th</sup> ed; John Wiley & sons, Singapore, p. 160, **1979**.
- SILVA, T. M. S. Estudos Químicos de Espécies de Solanum. Tese de Doutorado.UFRRJ, **2002**.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul. *Editora da UFRGS*, **1986**.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMN, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo Fitoquímico de Unonopsis lindmau- Annonaceae. *Química Nova*, 21, 557-559, **1998**.
- WHO. The Control of Schistosomiasis. World Health Organization, Technical Report Series, 83-86, **1993**.