



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

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Eupatorium macrocephalum Less (Asteraceae) e *Annona dioica* St.
HILL (Annonaceae):
UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS
NO PARAGUAY**

MARIA RAQUEL GARCIA VEGA

Sob orientação do professor
Raimundo Braz-Filho

e co-orientação do Professor
Mario Geraldo de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós - graduação em Química Orgânica. Área de concentração Produtos Naturais.

Seropédica, RJ
Março de 2007

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

MARIA RAQUEL GARCIA VEGA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-graduação em Química Orgânica, área de concentração em Produtos Naturais.

TESE APROVADA EM 19/03/2007

Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho (Orientador)

Prof. Dr. Mario G. de Carvalho (Co-Orientador-Presidente)

Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira (LCQ-CCT-UENF)

Prof. Profa. Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (NPPN-UFRJ)

Prof. Dr. Victor Marcos Rumjanek (DEQUIM-UFRRJ)

Profa. Dra. Heloísa de Mello (UFS-Itabaiana –Núcleo de Química)

FICHA CATALOGRAFICA

Vega, Maria Raquel Garcia.

Constituintes químicos de *Eupatorium macrocephalum* Less e *Annona dioica*:
Uma contribuição ao estudo de plantas medicinais no Paraguai.

Seropédica. Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. 2007.
Tese de Doutorado

Orientadores:

Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Instituição:

Universidade Federal do Rio de Janeiro (ICE-DQ)

Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza e, no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.....

J. J. Becher, Physica subterrânea (1667)

*Aos meus pais Beto e Agripina
exemplos de amor, desprendimento e perseverança
Todo meu tributo e reconhecimento*

*À luz que ilumina meus dias:
Ana Victória , Ernesto José e Luciano*

AGRADECIMENTOS

- Aos Professores Dr. Raimundo Braz-Filho e Dr. Mário G. de Carvalho, pela orientação amizade e ensinamentos fundamentais à minha formação.
- À Professora Dra. Áurea Echevarria, grande ser humano, pelo auxílio e incentivo constantes, pela valiosa amizade e também pela realização de testes biológicos junto com a Dra. Andressa Esteves.
- Ao Professor Marcor Eberlin (UNICAMP) pela obtenção de espectros de massas de alta resolução.
- Ao Professor Edilberto e o técnico Daniel (CENAUREMN – UFC) pela obtenção de espectros RMN 500 MHz.
- À Professora Claudia do Ó Pessoa (Laboratório de Oncologia Experimental - UFC) e sua equipe pela realização de testes biológicos.
- Aos Professores Ivo J. Curcino e Leda Mathias (UENF) pelo incentivo, amizade e pela acolhida no laboratório.
- À Professora Dra. Annelise Wilken do curso Farmácia (FMC) pelo incentivo e confiança.
- À todo o corpo docente da PPGQO da UFRRJ pelos ensinamentos e agradável convivência que muito acrescentaram na minha formação.
- A todos os técnicos do ICE-UFRRJ, Osmar, Renato, Francis, Eli, Carlão, Áurea Tatagiba (*in memoriam*), Conceição, Fábio, Rui, Rogéria, Mauricio e Aldir.
- Aos alunos de Iniciação científica Sandro Sant'Anna (UFRRJ) e Marcelo de Araújo (UENF) que me acompanharam durante a realização deste trabalho.
- Aos colegas de laboratório da Rural, Cássia, Bia, Patrícia, Lucinha e Tania
- Aos colegas do Laboratório da UENF, Marcelo, Vinicius, Lara, Ju, Priscila, Devora, Adriana pela amizade e agradável convivência.
- Aos amigos e alunos do curso de Farmácia, Inácio, Marquinhos, Rhamon e Anna Joyce pela amizade e confiança.
- Aos colegas e amigos pós - graduação da Rural, Heloísa, Marcinha, Edson, Miguel, Javier, Tânia, Rosane, André, Andressa e Geisi Jane.
- Aos amigos do alojamento da Ecologia a todos sem exceção.
- A Maronsi, Denise, Jamil e o Valdo que me fizeram sentir parte da família aliviando, confortando e dando forças para meu caminhar.
- Aos amigos Ricardinho e Claudia pelo auxílio no cuidado das crianças.

- Aos amigos da UENF, Carlos, Arnaldo e Ana, Fabinho, Cláudio e Lia, pelo carinho e estímulo sempre.
- E por fim a minha família, Beto, Agripina, Marilen, Alberto, Jorge, Karen, Jorgito, Fabrício, Anna Paula e Guadalupe, pelo apoio e compreensão que fizeram possível este trabalho.
- Ao meu companheiro Luciano, pelas sugestões e paciência durante a realização de todo o trabalho.
- A TODOS os que acreditaram, torceram, e colaboraram de alguma maneira para que este trabalho seja possível:

MUITO OBRIGADA....

MUCHAS GRACIAS...

AGUIJE..!!

SUMÁRIO**pág.**

INDICE GERAL	IX
INDICE DE ESQUEMAS FIGURAS E TABELAS	XI
ABREVIATURAS E SIMBOLOS	XVII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
SUBSTÂNCIAS NATURAIS ISOLADAS NESTE TRABALHO	XXI
DERIVADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO	XXIV

INDICE GERAL	Página
1. Introdução	1
1.1. A Diversidade biológica no Paraguai	3
1.2 Plantas medicinais no Paraguai	6
2. Objetivos	9
3. Plantas estudadas	10
3.1 <i>Eupatorium macrocephalum</i> Less	
3.1.1 Aspectos botânicos	10
3.1.2 A química do gênero <i>Eupatorium</i>	12
3.1.3 Constituintes químicos isolados	15
3.2 <i>Annona dioica</i>	
3.2.1 Aspectos botânicos	17
3.2.2 A química do gênero <i>Annona</i>	19
3.2.3 Constituintes químicos isolados	25
4. Parte experimental	
4.1 Equipamentos e reagentes	27
4.2 Acetilação com anidrido acético e piridina	28
4.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Eupatorium macrocephalum</i> Less – Coleta e obtenção de extratos	28
4.3.1 Parte aérea (caule+folhas)	29
4.3.2 Flores	30
4.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Annona dioica</i> St Hill – Coleta e obtenção de extratos	33
4.4.1 Folhas	33
4.4.2 Raiz	33
5. Resultados e Discussão – PARTE A	
5.1 Determinação estrutural dos constituintes de <i>Eupatorium macrocephalum</i> Less	
5.1.1 Triterpenos	39
5.1.2 Esteroides e Saponinas esteroidais	56
5.1.3 Diterpeno	67
5.1.4 Derivados do Ácido cinâmico	79
5.1.5 Flavonóide	95

5.2	Resultados e Discussão – PARTE B	
5.2.1	Determinação estrutural dos constituintes químicos de <i>Annona dioica</i> St. Hill	
	5.2.1 Flavonóides	102
	5.2.2 Acetogeninas	124
6.	Testes biológicos	
6.1	Avaliação de Citotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	148
6.2	Avaliação de Citotoxicidade frente ao carcinoma de Erhlich	150
6.3	Avaliação inibição da enzima humana DNA-Topoisomerase II	152
6.4	Triagem para avaliação da atividade antitumoral nas linhagens celulares [MDA-MB435 (mama), HL-60 (leucemia) e SF295 (cérebro)]	155
7.	Conclusões	157
8.	Referências	158

INDICE DE ESQUEMAS FIGURAS E TABELAS.	Pág.
ESQUEMAS e QUADROS	
Quadro 1	8
Esquema 1	32
Esquema 2	36
Esquema 3	37
 FIGURAS	
Figura 1: Mapa eco-regiões	5
Figura 2: Mapa área compreendida pela Mata atlântica	4
Figura 3: Utensílios usados na preparação do tereré	7
Figura 4: Distribuição do gênero <i>Eupatorium</i> no Paraguai	11
Figura 5: Distribuição do gênero <i>Annona</i> no Paraguai	19
Figura 6a: Espectro de IV da substância 16	42
Figura 6b: Espectro RMN ¹ H (200 MHz) da substância 16	43
Figura 6c: Espectro RMN ¹³ C (50 MHz) da substância 16	44
Figura 6d: Espectro de IV da substância 15	42
Figura 6e: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) da substância 15	45
Figura 6f: Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) da substância 15	45
Figura 7a: Espectro de IV da substância 17	47
Figura 7b: Espectro de IV da substância 18	47
Figura 7c: Espectro RMN ¹ H (200 MHz) da substância 17	48
Figura 7d: Espectro RMN ¹ H (200 MHz) da substância 18	48
Figura 7e: Espectro RMN ¹³ C (75 MHz) das substâncias 17 e 18	52
Figura 8a: CG da fração contendo as substâncias 16, 19 e 20	52
Figura 8b: Espectro de massas para a substância 19	52
Figura 8c: Espectro de massas para a substância 20	52
Figura 8d: RMN ¹ H (400 MHz) das substâncias 16, 19 e 20	52
Figura 8d: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) e expansão ¹³ C-APT para as substâncias 16, 19 e 20	53
Figura 9a: Espectro de IV da substância 9	61
Figura 9b: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 9	61
Figura 9c: Espectro de RMN ¹³ C(50 MHz, CDCl ₃) da substância 9	62

Figura 10a: Espectro de IV da mistura de 10 e 11	63
Figura 10b: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C da mistura de 10 e 11	63
Figura 11a: Espectro de IV para 12+14	64
Figura 11b: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para 12 + 14	64
Figura 11c: Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para 12+14	65
Figura 12a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para 13	66
Figura 12b: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para 13	66
Figura 14b: Espectro de RMN ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, MeOD) de 1	55
Figura 13a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 1	70
Figura 13b: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD+piridina) para 1	71
Figura 13c: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 1	72
Figura 13e: Expansão do espectro de RMN HMQC (400 MHz, MeOD) de 1 .	73
Figura 14a: Espectro de RMN HMBC (400 MHz, MeOD) de 1	75
Figura 15a: Modelos da literatura utilizados para a comparação de dados e atribuição dos δc para as substâncias 3,4 e 5	80
Figura 15b: Cromatograma obtido para a amostra contendo 3, 4 e 5	84
Figura 15c: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 3, 4 e 5	85
Figura 15d: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para as substâncias 3, 4 e 5	86
Figura 15e: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 3, 4 e 5 .	86
Figura 15f: Espectro de RMN ^{13}C para a amostra contendo 3, 4 e 5	87
Figura 16a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 6-8	88
Figura 16b: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 6-8	89
Figura 16c: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) para 6-8	89
Figura 16d: Espectro de RMN ^{13}C -APT para 6-8	90
Figura 16e: Espectro RMN HMQC para 6-8	91
Figura 16f: Espectro RMN HMBC para 6-8	92
Figura 16h: Espectro de RMN ^1H - ^1H -COSY e ^1H - ^1H -NOESY para as substância 6, 7 e 8	93

Figura 17 a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) para o flavonóide 22	97
Figura 17 b: Expansão da região de hidrogênios aromáticos no espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) para o flavonóide 22	98
Figura 17 c: Espectro de RMN ^1H - ^1H -NOESY (400 MHz, DMSO- d_6) na região dos sinais das metoxilas para o flavonóide 22	99
Figura 17d: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) para o 22 .	100
Figura 18a: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 21	106
Figura 18b: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 21	106
Figura 18c: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do flavonóide 21	107
Figura 19a: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 21	109
Figura 19b: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 21	109
Figura 19c: Expansões do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) para o flavonóide 22	110
Figura 19d: Expansão do espectro RMN de ^1H - ^1H NOESY (400 MHz, acetona- d_6) para o flavonóide 22	111
Figura 19e: Expansão do espectro RMN de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	112
Figura 19f: Expansão do espectro RMN de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	112
Figura 20a: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	113
Figura 20b: Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	113
Figura 20c: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear RMN ^1H - ^{13}C - HMBC (100 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	114
Figura 20d: Expansão do espectro bidimensional RMN ^1H - ^{13}C - HMBC (100 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	115
Figura 20e: Expansão do espectro bidimensional RMN ^1H - ^{13}C - HMQC (100 MHz, acetona- d_6) do flavonóide 22	115
Figura 21a: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 23	117
Figura 21b: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 23	117

Figura 21c: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 23	118
Figura 21d: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do flavonóide 23	118
Figura 22a: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 24	120
Figura 22b: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de 24	120
Figura 22c: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide 24	121
Figura 22d: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do flavonóide 24	121
Figura 22e: Expansão do espectro bidimensional de RMN $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ – HMBC (100 MHz, MeOD) do flavonóide 24	122
Figura 22f: Expansão do espectro bidimensional de RMN $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ - HMQC (100 MHz, MeOD) do flavonóide 24	123
Figura 23: Modelos usados na comparação de dados da literatura para determinação estrutural e configuração relativa dos Fragmentos A e B de acetogeninas	128
Figura 24: Proposta de estereoquímica relativa para as acetogeninas isoladas	129
Figura 25a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das acetogeninas 27 + 28 .	133
Figura 25b: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) das acetogeninas 27 + 28	133
Figura 25c: Expansões do espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (500 MHz, piridina- d_5) das acetogeninas 27 + 28	134
Figura 25d: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado acetilado das acetogeninas 27 + 28 .	135
Figura 26a: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) das acetogeninas 27 + 28	135
Figura 26b: Expansões do espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) das acetogeninas 27 + 28 na região correspondente ao Fragmento B.	136
Figura 26b: Expansões do espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) das acetogeninas 27 + 28 na região correspondente ao Fragmento A.	136
Figura 26c: Espectro de RMN ^{13}C total (125 MHz, piridina- d_5) das acetogeninas 27 + 28 e expansão para a região referente ao fragmento A.	137
Figura 27a: Espectro de massas obtido por inserção direta das acetogeninas 27+28	138
Figura 27b: Espectro de massas ES-EM das acetogeninas 27 e 28	138
Figura 27c: Proposta de fragmentação de massas para as acetogeninas 27 e 28	139

Figura 28a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da acetogenina 28	140
Figura 28b: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado acetilado 28Ac.	140
Figura 28c: Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 MHz, CDCl_3) da acetogenina 28	141
Figura 28d: Espectro de RMN ^{13}C –APT (100 MHz, CDCl_3) do derivado acetilado 28Ac.	141
Figura 28e: Espectro de RMN HMQC (400 MHz, CDCl_3) e expansão do espectro de RMN HMQC (400 MHz, CDCl_3) da acetogenina 28	142
Figura 30a: Espectro de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos esteroides 25 e 26	145
Figura 30b: Espectro de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do esteroide 29	145
Figura 30c: Espectro de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do esteroide 29	146
Figure 31. Atividade antiproliferativa dose-dependente dos flavonóides 21 , 22 e 23 na cultura de células do carcinoma de Ehrlich.	151
Figura 32: Atividade dos flavonóides sobre o DNA-topoisomerase -Topo I	153
Figura 33: Atividade dos flavonóides sobre DNA-topoisomerase - Topo II-a 2	154

TABELAS

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Annona</i> estudadas quimicamente e classe de compostos isolados	23
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) das substâncias 15 e 16 em CDCl_3	41
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) das substâncias 18 e 17 em CDCl_3	46
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) das substâncias 19 e 20 em CDCl_3	51
Tabela 5: Dados de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para as substâncias 9 , 10 e 11	57
Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para as saponinas esteroidais 12 , 13 e 14 .	60
Tabela 7: Dados de RMN uni e bidimensionais de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz, MeOD e MeOD+Piridina) do diterpeno 1	69
Tabela 8: Dados RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em MeOD para as substâncias 3 , 4 e 5	80
Tabela 9: Dados de RMN uni e bidimensionais ^1H (400MHz, MeOD) e	

	16
^{13}C (100 MHz) dos compostos 6 , 7 e 8	83
Tabela 10: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em DMSO- d_6 obtidos para o flavonóide 22 .	96
Tabela 11: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD e Acetona- d_6) dos Flavonóides 21 – 24	104
Tabela 12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD) para o flavonóide 21	105
Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, Acetona- d_6) para 22	108
Tabela 14: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD) para o flavonóide 23	116
Tabela 15: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD) para o flavonóide 24	119
Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125.75 MHz, CDCl_3) dos modelos utilizados para comparação dos valores de δ de acetogeninas.	128
Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) das acetogeninas 27 , 28	129
Tabela 18: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) das acetogeninas 27 e 28	130
Tabela 19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz, 125 MHz, piridina- d_5) das ACGs 27 +28	131
Tabela 20: Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das 28 e seu derivado acetilado 28ac	132
Tabela 21: dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do esteroide 29	144
Tabela 22: Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade com <i>Artemia salina</i> Leach	149
Tabela 23 : Valores de IC_{50} (μM and ng/mL) para os flavonóides 21-24 e a fração FF contra células do carcinoma de Erhlich.	151

ABREVIATURAS E SIMBOLOS

M^+	Pico do íon molecular
δ	Deslocamento químico (ppm)
Ac	Acetila
AcOEt	Acetato de etila
aq	aquoso
APT	Attached Próton Test
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia em camada fina
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada ao Espectrômetro de
Massas	
COLOC	Correlation spectroscopy Long-range Couplings
COSY	Correlated spectroscopy
d	duplete
dd	duplo duplete
dl	duplete largo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO _{d6}	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectroscopia de Massas
EMAR	Espectroscopia de Massas de Alta Resolução
HBBD	Hydrogen Broad Band Decouplet
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
Hz	Hz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento em Hertz
m	Multiplete
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
PND	Proton Noise Decoupling
q	quarteto
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	simpleto
sl	simpleto largo
t	triplete

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Título: CONSTITUINTES QUÍMICOS E A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Eupatorium macrocephalum* Less (Asteraceae) e *Annona dióica* St. HILL (Annonaceae): UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS NO PARAGUAY

Resumo

Eupatorium macrocephalum Less (Asteraceae) e *Annona dióica* (Annonaceae) são arbustos de grande dispersão na América do Sul e largamente usados na medicina popular no Paraguai. O presente trabalho relata o estudo químico de extratos de *Eupatorium macrocephalum* Less. (coletada no Dpto. Central Paraguay) que levou ao isolamento e identificação de vinte substâncias; seis triterpenos: acetato de lupeoila e lupeol (constituintes majoritários), taraxasterol e acetato de taraxasterila além de α - e β -amirina; seis esteróides: estigmasterol, sitosterol, epinasterol, 3-O- β -D-glicopiranosil estigmasterol, 3-O- β -D-glicopiranosil epinasterol e 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol; um diterpeno: (-) 9,15-diidroxicauran-19-ato de β -D-glicopiranosila; um flavonóide: 3',4',5-triidroxi-6,7-dimetoxiflavona e seis derivados do ácido cinâmico.

Estudo químico do extrato metanólico das folhas de um espécime de *Annona dióica* coletada no cerrado de Horqueta (Dpto. de Concepción, Paraguay) conduziu ao isolamento e à identificação de nove substâncias; quatro flavonóides: canferol, 3-O-[3'',6''-di-O-*p*-hidroxicinamoil]- β -galactopiranosil-canferol, 6''-O-*p*-hidroxicinamoil- β -D-galactopiranosil-canferol e 3-O- β -D-galactopiranosil-canferol; além da mistura de sitosterol + estigmasterol e do 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol. Do extrato em clorofórmio das raízes obteve-se duas acetogeninas sendo uma delas inédita na literatura. Todas as substâncias isoladas são descritas pela primeira vez para as respectivas espécies vegetais. As elucidações estruturais basearam-se na análise de dados espectrométricos, principalmente RMN ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, além de CG-EM, EMAR e comparação com dados da literatura. Foram realizados ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach com extratos das plantas em estudo. Os resultados mostraram atividade significativa apenas em extratos de *A. dióica*. As frações obtidas a partir destes extratos e os flavonóides isolados tiveram a atividade citotóxica avaliada utilizando-se células do carcinoma de Erhlich bem como avaliação da inibição da enzima humana DNA-Topoisomerase I e II. As frações obtidas do extrato metanólico das raízes foram submetidas a triagem de atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais humanas [MDA-MB435, HCT8, HL60 e SF295]. Os resultados mostraram atividade de todas as frações testadas em pelo menos uma das linhagens utilizadas na triagem.

Palavras chaves: Plantas medicinais, atividade biológica, *Eupatorium macrocephalum*, *Annona dióica*, terpenóides, flavonóides.

ABSTRACT

Eupatorium macrocephalum Less (Asteraceae) and *Annona dioica* (Annonaceae) are distributed throughout South America and have long been used as paraguayan folk medicine. The present work relates the chemical investigation of the extracts of *Eupatorium macrocephalum* Less (collected in Dpto. Central-Paraguay) which resulted in the isolation and identification of twenty compounds: six triterpenoids; lupeol and lupeol acetate (the main chemical components), taraxasterol and taraxasterol acetate together with α - and β -amiryn; six steroids; stigmasterol, sitosterol, epinasterol, 3-O- β -D-glicopyranosylstigmasterol, 3-O- β -D-glicopyranosylepinasterol and 3-O- β -D-glicopyranosylsitosterol; one diterpenoid, -9,15-diidroxi-6,7-dimetoxiflavone and six \acute{a} c. cinnamyc derivates.

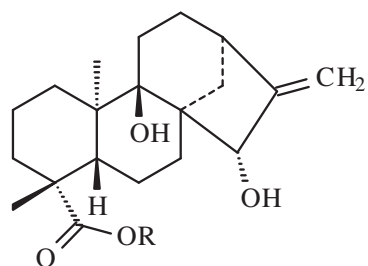
The methanolic extract from the leaves of *Annona dioica* specimens collected in the cerrado of Horqueta city (Dpto. Concepción-Paraguay) led to the isolation and identification of nine compounds: four flavonoids: kaempferol, 3-O-[3'',6''-di-O-*p*-hydroxycinnamoyl]- β -galactopyranosyl-kaempferol, 6''-O-*p*-hydroxycinnamoyl- β -galactopyranosyl-kaempferol and 3-O- β -galactopyranosyl-kaempferol. Three steroids, sitosterol, stigmasterol and 3-O- β -D-glicopyranosylsitosterol. The CHCl_3 extract from the root furnished two acetogenines, one known as "motrilin" and a new isomer *epi*-motrilin. The structures were established using IR, Mass and NMR spectral data, including 2D NMR experiments of natural substances or by the comparison of spectral and physical data with those described in the literature.

Biological tests using the brine shrimp lethality test in *Artemia salina* Leach for screening with all extract revealed good activity so for *A. dioica* extracts. The cytotoxic effects of the flavonoids and flavonoidic fractions (FF) were evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay against Ehrlich carcinoma cells. The inhibitory action on DNA-topoisomerase I and II of all the flavonoids was evaluated by relaxation assays on pBR322 plasmid DNA.

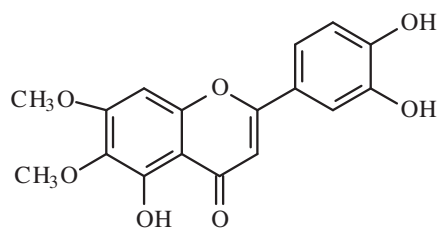
The obtained fractions of the methanolic extract of the roots were submitted the screening of activity antitumoral *in vitro* in lineages of cells human tumorais [MDA-MB435, HCT8, HL60 and SF295]. The results showed activity of all of the fractions tested in at least one of the lineages used in the screening.

SUBSTÂNCIAS NATURAIS IDENTIFICADAS NESTE TRABALHO

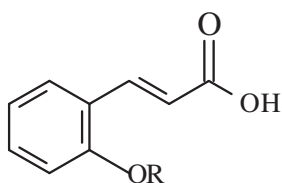
❖ De *Eupatorium macrocephalum* Less



1 R=Glic

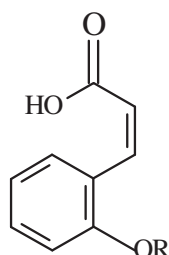


2



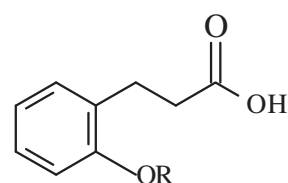
3 R=H

6 R=Glic.



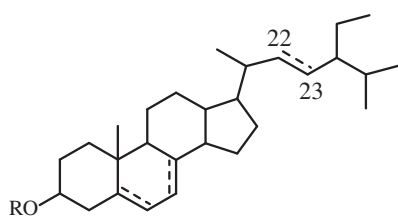
4 R=H

7 R= Glic



5 R= H

8 R=Glic.



9 R=H, $\Delta^{7/8, 22/23}$, 5/6 diidro

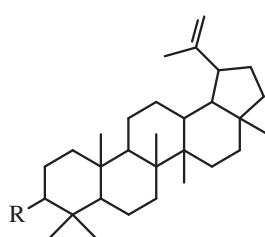
10 R=H, $\Delta^{5/6}$, 22/23 diidro

11 R=H, $\Delta^{5/6, 22/23}$

12 R=Glic., $\Delta^{7/8, 22/23}$, 5/6 diidro

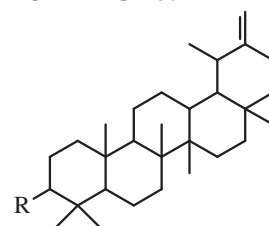
13 R=Glic., $\Delta^{5/6}$, 22/23 diidro

14 R=Glic., $\Delta^{5/6, 22/23}$



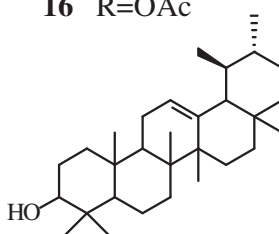
15 R= OH

16 R=OAc

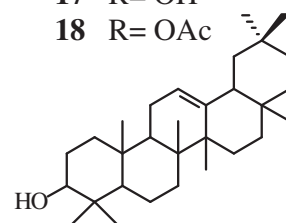


17 R= OH

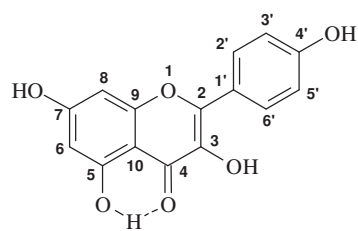
18 R= OAc



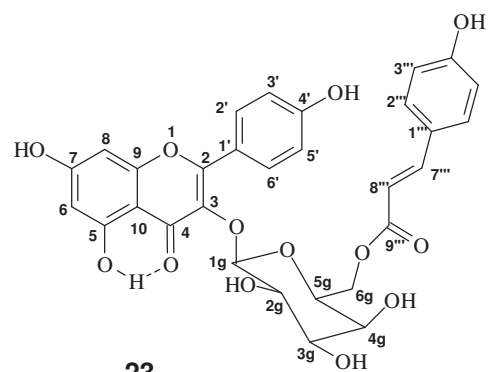
19



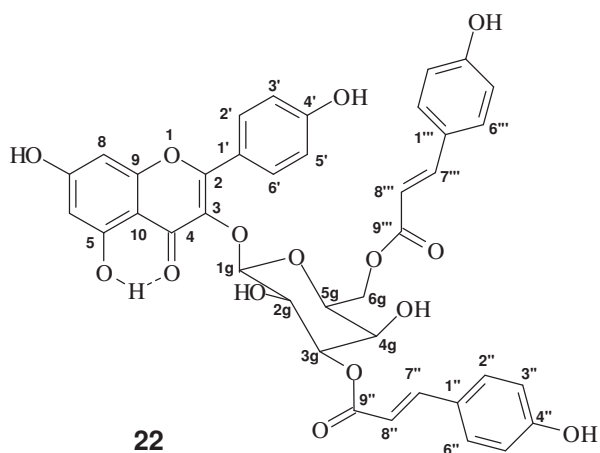
20

❖ *De Annona dioica* St Hill

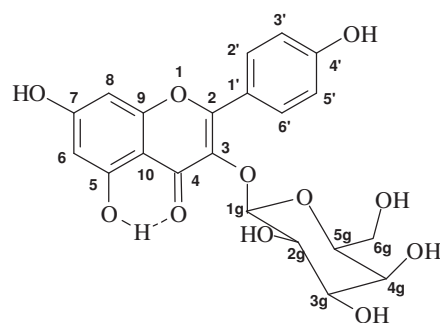
21



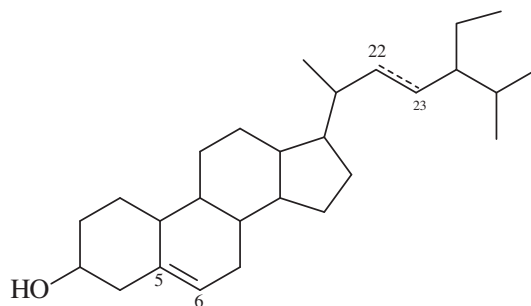
23

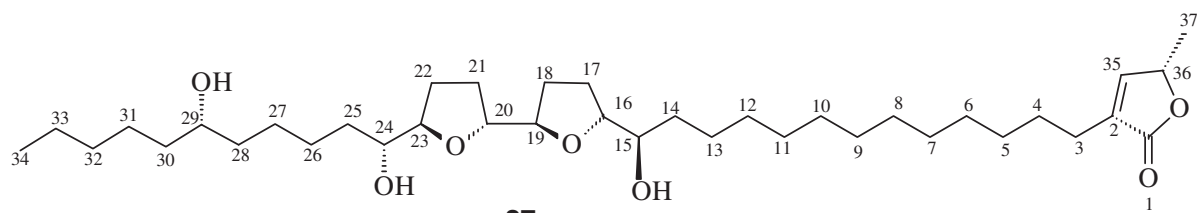


22

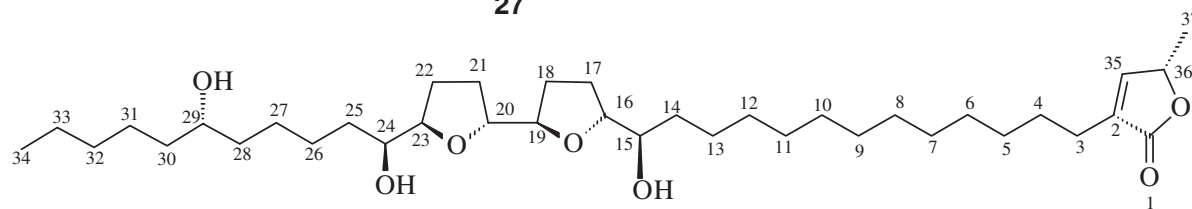


24

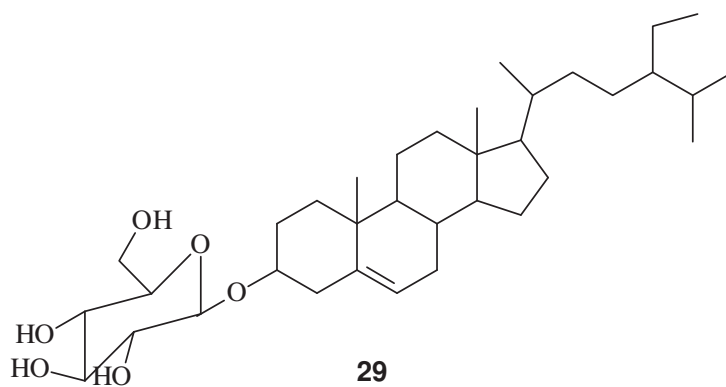
25 $\Delta^{5/6}$, 22-23 diidro26 $\Delta^{5/6, 22/23}$



27

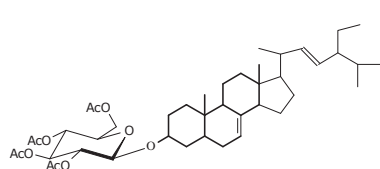
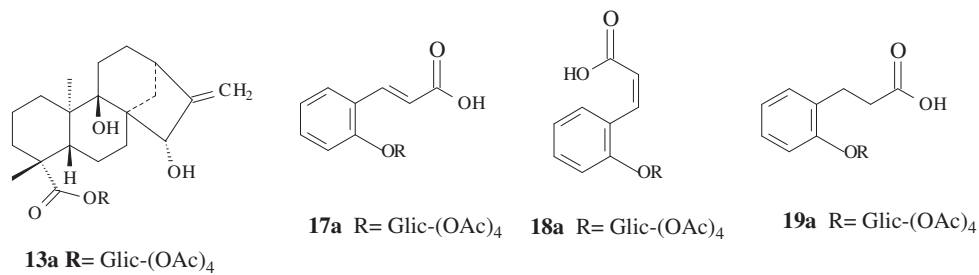


28

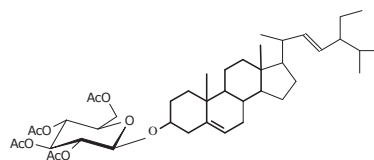


29

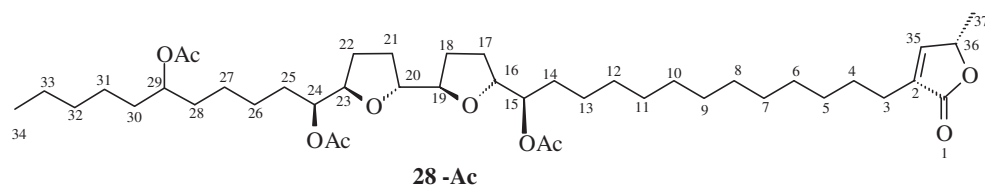
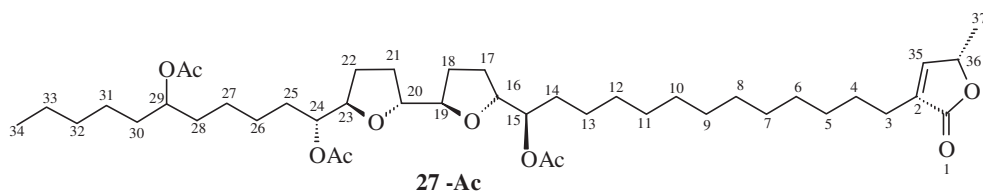
DERIVADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO

**10a**

Tetra-acetato de 3-O-β-D-glicopiranosil Epinasterol

**12a**

Tetra-acetato de 3-O-β-D-glicopiranosil Estigmasterol



1. Introdução

A abordagem etnofarmacológica é uma estratégia para investigação de plantas medicinais que consiste em combinar as informações das comunidades locais, usuárias da flora medicinal, com os estudos químicos e farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Segundo a Organização Mundial da Saúde, 80 % da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, representando entre 3,5 a 4 bilhões de pessoas no mundo que dependem das plantas como fonte de drogas (Simões, C.M.O. *et al*, 2000) , o que justifica plenamente este tipo de estudo. Fatores sócio-culturais e econômicos concorrem para a substituição de fármacos industrializados pelas plantas medicinais seja pelo alto custo das drogas sintéticas, ou por habitar longe dos centros urbanos. Com respeito aos fatores sócio-culturais relaciona-se a idéia equivocada de que a chamada “medicina alternativa” não apresente perigo ao usuário, ou seja, ausência de efeitos colaterais e toxides. Neste ponto cabe ressaltar a importância da orientação técnico - científica na padronização de mudas de plantas a serem utilizadas num canteiro de plantas medicinais bem como sobre a preparação, emprego e dosagem de fitoterápicos.

O conhecimento tradicional pode despertar interesse para a ciência visto que, trata-se de relatos verbais da observação sistemática de fenômenos biológicos feito por pessoas, quiçá freqüentemente iletrados, mas seguramente algumas tão perspicazes como o são alguns cientistas. A ausência de educação e cultura formais não significa ausência de conhecimento; de fato, somos todos ignorantes em relação às culturas que desconhecemos.

Os produtos naturais são de extrema significância na descoberta de novas drogas e desenvolvimento de novos processos. No tratamento de doenças humanas é particularmente notória sua influência na terapia de doenças infecciosas e câncer nas quais entre 75 % e 65 % das drogas usadas, respectivamente, teve origem em produtos naturais. Em drogas usadas como antihipertensivos 48 das 74 drogas sintéticas do mercado tiveram origem nos produtos naturais (Newman, J.D.; Gordon, M.G. e Snader, K.M., 2003). Grande parte dessas descobertas tem como ponto de partida a informação obtida de comunidades tradicionais que incorporam produtos naturais em suas práticas de sobrevivência e manejo do meio ambiente.

O respeito ao meio ambiente, bem como ao estilo tradicional de vida das comunidades tradicionais são essenciais ao desenvolvimento sustentável e manutenção da biodiversidade do planeta (Cordell, A.G., 2002).

E. O. Wilson, um dos responsáveis pela popularização do termo biodiversidade, estabeleceu um plano de cinco pontos relacionados a sua preservação: 1) caracterização dos componentes da biodiversidade; 2) geração da riqueza a partir destes componentes; 3) promoção do desenvolvimento sustentado; 4) conservação da biodiversidade remanescente; 5) restauração da biodiversidade em áreas degradadas (Wilson, E.O.; Organizador., 1997). É fundamental a conscientização de que embora a biodiversidade seja aceita como uma herança da humanidade, os países devem ter direitos e obrigações em relação a mesma. Não se pode entender, respeitar ou saber usar aquilo que se desconhece.

O Professor Otto R. Gottlieb observou que, uma redução na biodiversidade pode alterar o desempenho de um ecossistema, daí a importância transcendental do mapeamento da diversidade. Estudos sobre as interações e influências recíprocas entre o homem e a natureza permitem à humanidade, por meio do aprendizado da *linguagem da natureza*, entender, participar e interferir em seu funcionamento. Sem dúvidas, esta linguagem é, essencialmente, química (Gottlieb, O.; Kaplan, M.A.C.; Borin, M.R., 1996). Neste ponto, a fitoquímica ainda tem muito a desvendar visto que, das 350 a 500 mil espécies estimadas de plantas existentes, apenas entre 5 e 8 % foram estudadas quimicamente; considerando que a produção de substâncias do metabolismo secundário ou especializado das plantas é influenciada por vários fatores como, tipo de solo, irradiação, microrganismos e outros e, ainda, que uma mesma espécie pode variar sua composição química dependendo da época da coleta, a percentagem acima referida pode-se reduzir ainda mais.

A escolha das plantas para este trabalho baseou-se em critérios etnofarmacológicos. Foi realizado o estudo fitoquímico de duas espécies vegetais utilizadas na medicina popular no Paraguai, bem como ensaios biológicos preliminares realizados com os extratos obtidos e com os flavonóides isolados de uma delas.

O Paraguai têm uma cultura fortemente influenciada pelos Guaranis e, ainda hoje, bastante preservada pela população em comparação com outras

culturas indígenas sul americanas. O país possui 45,8 % de população rural, a taxa mais alta de América do Sul o que também favorece a preservação dessa memória cultural.

1.1 A diversidade biológica no Paraguai

A diversidade biológica ou biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes dos organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Ela pode ser entendida como uma associação de vários componentes hierárquicos: ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida (ENPAB, Secretaria del Ambiente, 2003). Uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativa desigual dos seus componentes no espaço geográfico, ou seja, a abundância de espécies é variável num determinado ambiente com a existência de gradientes geográficos da biodiversidade.

Do ponto de vista químico isto também pode ser observado visto que constituintes químicos de vegetações de florestas e savanas, por exemplo, são bem diferenciados. Considerando que macro e micromoléculas vegetais sejam biossinteticamente inter-relacionadas é possível esperar que a variação química seja menor em áreas de florestas do que em áreas de campinas em função do maior estresse oxidativo, origem universal da biodiversificação (Gottlieb, O.; Borin, M.R, Kaplan, M.A.C.; 1995). Sem dúvida, no entanto, o resultado mais dramático refere-se à interrupção de todos os gradientes micromoleculares ao longo da interface floresta/cerrado, uma turbulência química deve ter lugar em tais ecótonos bióticos.

O estudo da flora e da fauna no Paraguai teve seu início na época da Colônia. Apesar dos muitos esforços isolados para aumentar o conhecimento sobre a diversidade biológica do país, até o presente não existem catálogos completos de ecossistemas, de espécies de flora e de fauna que permitam conhecer e valorizar estas riquezas. Do ponto de vista ecogeográfico o Paraguai é considerado como uma área de transição ou ecotono, apresentando um mosaico dos mais diversos tipos de ecossistemas e, inclusive, uma área conservada de Mata Atlântica (Figura 1). Adaptando estudos generalizados feitos por Dinerstein e colaboradores para América Latina (Figura 2), podemos

reconhecer, em nível regional, que o Paraguai apresenta as seguintes eco-regiões (Dinerstein *et al.*,1995):

- a) Mata Atlântica do Alto Paraná
- b) Chaco
- c) Pantanal
- d) Cerrado



Figura 1: Mapa área compreendida pela Mata atlântica (Fonte: ONG WHO)

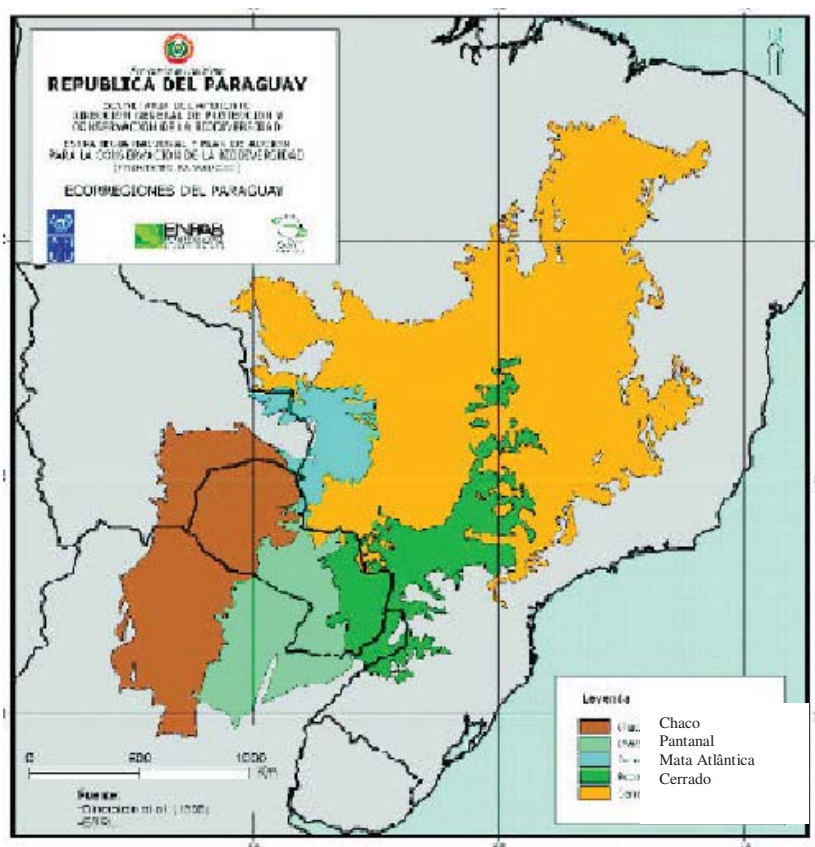


Figura 2: Mapa ecorregiões Paraguay

Nas décadas de 1970 -1980 a pesquisa da flora no Paraguai toma novo rumo, e são realizadas listagens de espécies vegetais principalmente pelo Departamento de Botânica da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Asunción (FAQ – UNA) e outros órgãos do governo (Mereles, F.,1990). Segundo relatório do Ministério de Agricultura estima-se que o número de espécies vegetais é de aproximadamente 13 000, embora outros estudos sugerem que este número pode chegar a 20 000. O projeto “Flora Del Paraguay”, de acordo com a coleção do herbário de Genebra, sugere que as famílias melhor representadas quanto ao número de gêneros são: Asteraceae: 95; Fabaceae: 94; Poaceae: 86; Rubiaceae: 37 e Orchidaceae: 35 (Ministério de Agricultura e Ganaderia, 1995).

A capacidade do país de levar a cabo pesquisas sobre a diversidade biológica é restrita, a maior parte desta capacidade se limita ao estudo taxonômico. O país conta com três locais de coleta e estudo taxonômicos reconhecidos internacionalmente:

- O Herbário (PY) do Museu Nacional de Historia Natural da Secretaria do Ambiente.
- Herbário do Departamento de Botânica da Facultad de Ciências Químicas da Universidad Nacional de Asunción (FAQ – UNA)
- Herbário Histórico da Prefeitura de Asunción.

A partir do ano 2000, com a criação de um convênio destas três instituições com o Missouri Botanical Garden dos Estados Unidos são iniciadas a sistematização da fauna e flora com a realização de um inventário baseado em amostras-testemunha localizadas em museus e herbários nacionais e estrangeiros.

A “Política Nacional de Ciência e Tecnologia”, aprovada por decreto do poder executivo nº. 19.000/2002, estabelece: “A proteção da biodiversidade como uma das áreas prioritárias e, para tanto serão promovidos a pesquisa e desenvolvimento a ela relacionados”.

1.2 Plantas medicinais no Paraguai

O Paraguai, situado no centro do continente sul-americano é, portanto, um país mediterrâneo, pluricultural e bilíngüe no qual 95 % da população é mestiça e os 5 % restantes são indígenas e imigrantes de várias origens. No Paraguai vivem atualmente 19 povos indígenas pertencentes a cinco famílias lingüísticas, todos eles têm legado um pouco de seus conhecimentos para o grande acervo de plantas medicinais utilizadas pela população. Esse conhecimento foi transmitido de geração para geração e persiste atualmente.

As plantas medicinais são consumidas diariamente pela grande maioria da população no “tereré” (Figura 3). A planta é macerada e colocada em água gelada e logo transferida para um recipiente (“guampa”) contendo erva mate (*Ilex paraguariensis*) e depois bebida com ajuda de uma “bonbilha” ou no “mate” no qual é feita a decoção da planta e colocada em um recipiente contendo a erva mate e servida quente. Estes costumes são uma clara influência dos Guaranis, que dividiam as plantas medicinais em:

- Pohã ro'ysã (remédios refrescantes): diuréticos febrífugos ou hepatoprotetores, plantas geralmente utilizadas no tereré.

- Pohã rakú (remédios quentes): utilizados para doenças do sistema respiratório geralmente consumido no mate ou na forma de infusão, chá ou cataplasma.
- Pohã pochy (remédios bravos) que devem ser utilizados com cuidado como os repelentes, antídotos etc.

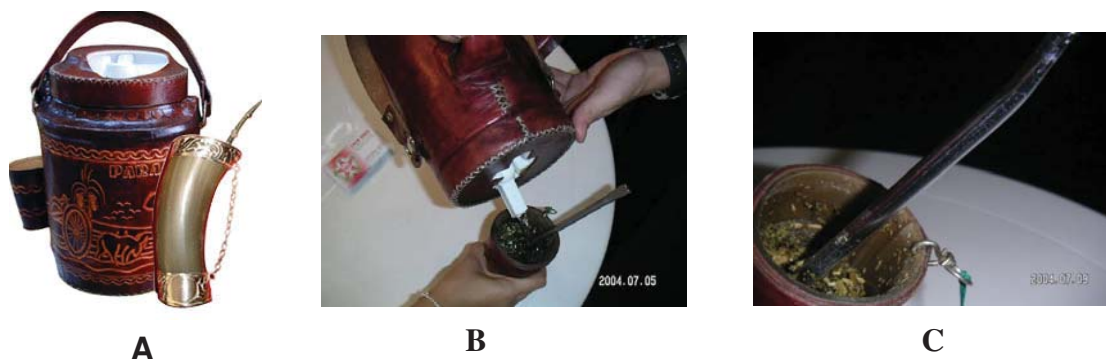


Figura 3: **A:** recipiente térmico onde a planta macerada é colocada em água gelada e guampa com bombilla; **B:** a água contendo o sumo da planta medicinal é colocada na guampa contendo erva mate, **C:** guampa com erva e bombilla prontas para o consumo.

Os Guaranis possuem uma surpreendente precisão científica e descritiva da classificação da flora e conhecimento de suas propriedades, alguns confirmados mais tarde pela ciência. São encontrados registros de 1100 gêneros botânicos e mais de 40 famílias botânicas Guaranis (González, T.D., 1992). Atualmente, as plantas medicinais do Paraguai são, praticamente, desconhecidas pela comunidade científica, assim como o estado geral da flora do país (Basualdo, I. et al, 1995). Na literatura é possível observar estudos de plantas usadas na medicina tradicional do Paraguai, na maioria dos casos estudos farmacológicos de extratos brutos (Li, Y. *et al*, 2004; Velásquez, E., 2003; Portillo *et al.*, 2001).

A importância econômica do conhecimento da biodiversidade e da tecnologia a ela relacionada é ilustrada no quadro abaixo onde são encontradas algumas espécies endêmicas de alto valor comercial. O número de espécies da flora nativa usada como medicinais pode chegar a 1500, muitas delas extraídas de forma extensiva o que coloca em risco a sobrevivência das espécies sendo, portanto, prioritário o estudo das mesmas.



Ilex paraguariensis, Ka'a
(extração das folhas)



Stevia rebaudiana, Ka'a he'e
(folha, adoçante)



Citrus aurantium, Apepú
(extração de óleo essencial)



Lippia citriodora, Cedron paraguay.
(exportação da planta seca e extração de óleo essencial)

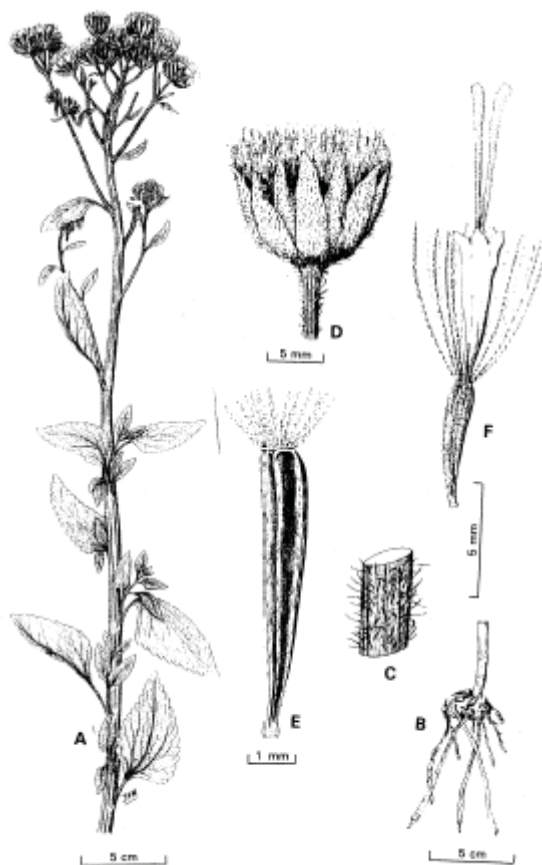
Quadro 1: Espécies nativas do Paraguay de elevada importância econômica

2. OBJETIVOS

- ❖ Contribuir para o conhecimento químico de espécies utilizadas na medicina tradicional do Paraguai, isolar e identificar os principais metabólitos especiais de *Eupatorium macrocephalum* Less; isolar e identificar os principais metabólitos especiais de *Annona dioica* St. Hill.
- ❖ Avaliar atividades biológicas através de ensaios de citotoxicidade frente a *Artemia salina* Leach, carcinoma de Erhlich e inibição da enzima topoisomerase I e II de extratos e/ou substâncias naturais isoladas.

3. Plantas estudadas:

3.1 *Eupatorium macrocephalum* Less.



3.1.1 Aspectos botânicos

Familia: Asteraceae

Tribo: Eupatorieae

Subtribo: Eupatoriinae

Gênero: *Eupatorium*

Espécie: *Eupatorium macrocephalum* Less

A família Asteraceae compreende cerca de 1100 gêneros com aproximadamente 25000 espécies (Barroso, G.M., *et al*, 1991a). A subtribo Eupariinae inclui quatro gêneros *Eupatorium*, *Austroeupatorium*, *Stomatanches* e *Hatschbiella*, segundo a classificação de King e Robinson (King, R.M., Robinson, H., 1970). Durante as décadas de 70 e 80 o gênero *Eupatorium* sofreu várias fragmentações feitas por estes autores. O gênero *Eupatorium* é amplamente distribuído na América do Norte e América do Sul e no Leste da Ásia. No Paraguai (Figura 4) este gênero é representado por 74 espécies aproximadamente (Spichiger, R., 1983a). *Eupatorium macrocephalum* Less. é uma espécie Sul Americana distribuída no sul do Brasil, Paraguai e norte e centro da Argentina, é conhecida popularmente no Paraguai como “Teju Ka’a” (erva de lagarto) e é utilizada pela população como antiinflamatório, sedativo, em afecções cardíacas e no tratamento de hipertensão (Cataldo. J.,1969) .

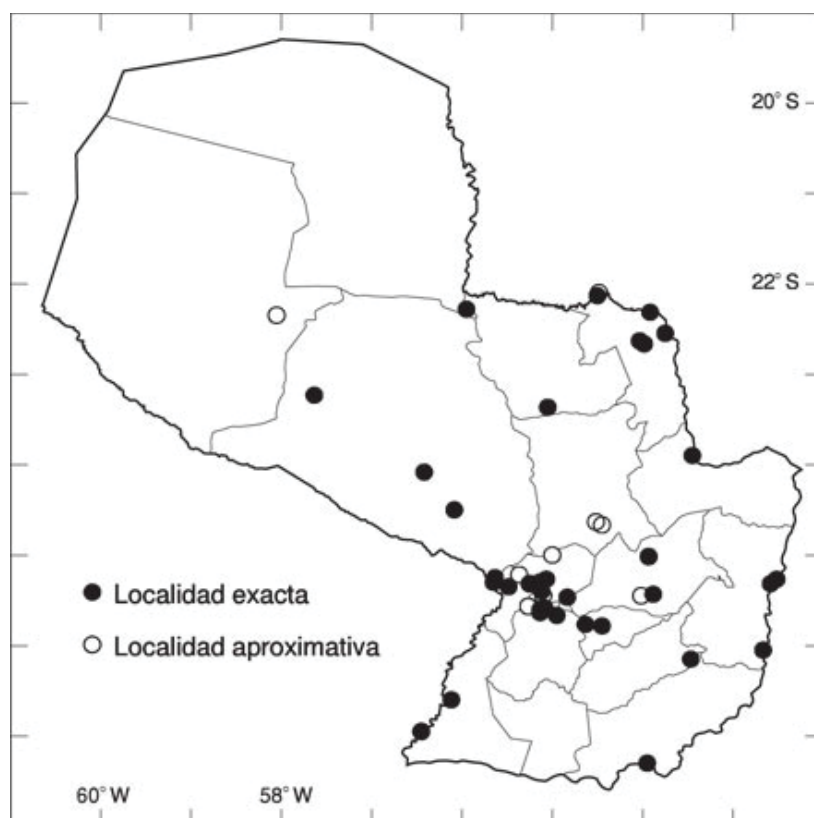


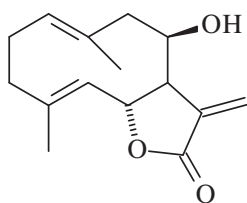
Figura 4: Distribuição do gênero *Eupatorium* no Paraguai

3.1.2 O gênero *Eupatorium*

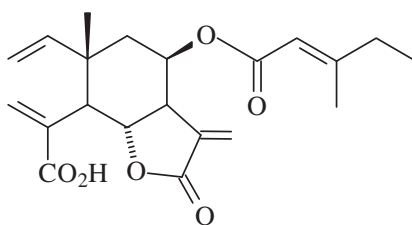
Outras espécies deste gênero também são usadas na medicina popular como *E. purpureum*, utilizada como anti-reumático, e *E. salvia* utilizada no Chile como antisséptico; desta última foi comprovada, através de ensaios biológicos, a atividade antimicrobiana do extrato diclorometânico e da resina desta planta. O estudo fitoquímico levou ao isolamento de dois diterpenos caracterizados como componentes majoritários e como princípio ativo desta planta (Habtemariam, S., 1998; Urzua, A. *et al*, 1998). Plantas do Nordeste do Brasil que são incluídas neste gênero, tais como: *E. ballotaefolium* H. B. K. (picão-roxo), *E. betonicaeforme* Baker e *E. pauciflorum* Kunth (cambara, botão azul) foram estudadas fitoquimicamente levando ao isolamento de sesquiterpenos lactônicos, diterpenos, triterpenos, esteróides e flavonóides (Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L, 2001).

Estudos fitoquímicos de espécies deste gênero conduziram ao isolamento de uma variedade de tipos estruturais como descrito a seguir:

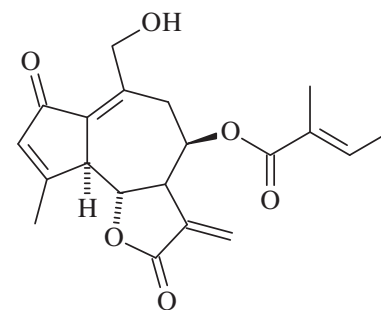
- ❖ **Lactonas sesquiterpênicas:** esta classe de compostos é amplamente encontrada no gênero *Eupatorium* como, por exemplo, (Herz, W., 2001; Zdero, C., Bohlmann, F., 1987; Jakupovic, J. *et al*, 1987) as seguintes substâncias:



E. cannabinum

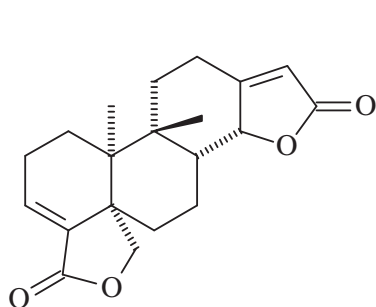
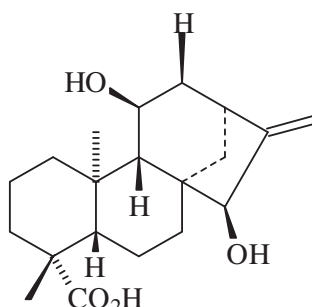
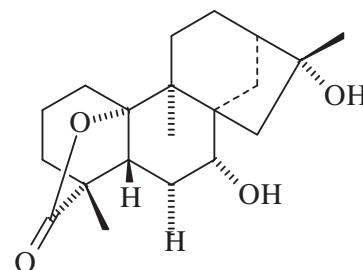


Elemadienolide
isolada de *E. serotinum*

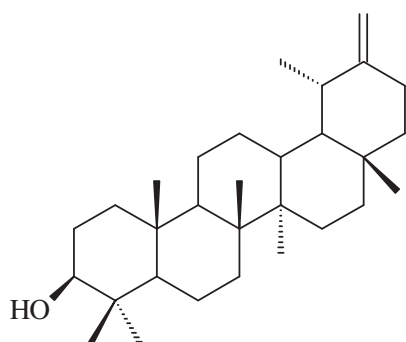
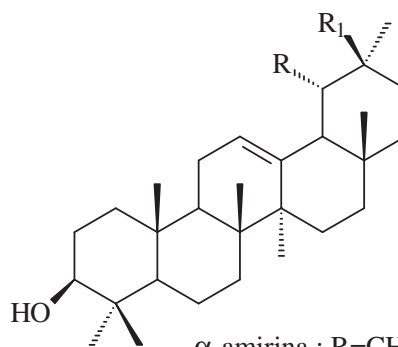


E. altissimum

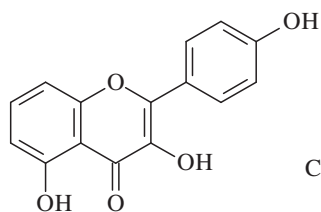
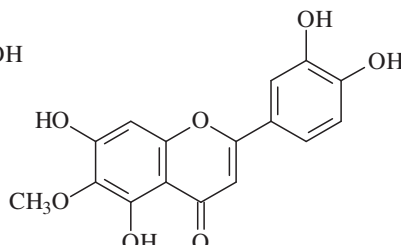
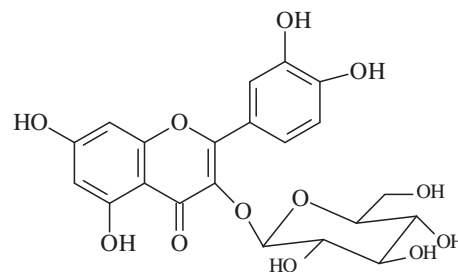
- ❖ **Diterpenos:** foram isolados diterpenos dos tipos labdanos, clerodanos e kaurenicos (Herz, W.,2001; Herz, W. *et al* 1979 e 1976).

*E. cannabinum**E. petaloideum**E. album*

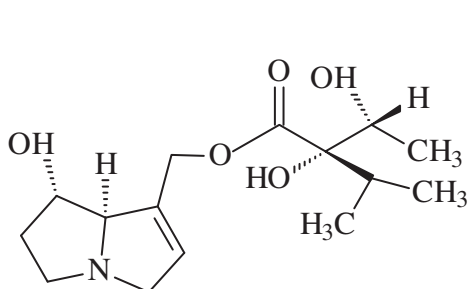
- ❖ **Triterpenos:** são também muito comuns principalmente como constituintes químicos das flores de plantas deste gênero (Militão, G.C.G., *et al*, 2004; Albuquerque, M.R.J.*et al*,2006).

Taraxasterol
isolada de *E. ballataefolim* α -amirina : R=CH₃; R₁= H
 β -amirina : R=H; R₁=CH₃*E. betonicaeforme*

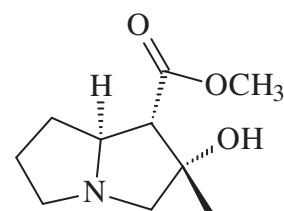
- ❖ **Flavonóides** (Albuquerque, M.R.J., *et al*, 2006; Oliveira, B.H., *et al* 2001).

Camferol
E. betonicaeformeEupafolin
E. littoraleQuercetina glicosilada
E. ballotaefolium

❖ **Alcalóides pirrolizidínicos** (Liu, K. *et al*, 1992; Lang, G., 2001)

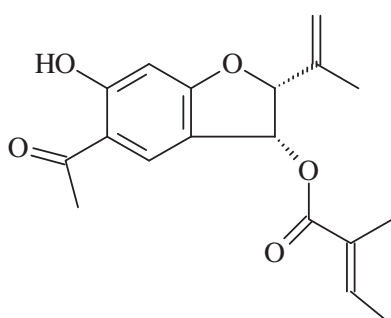


Rinderine
E. fortunei

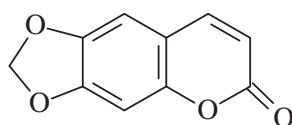


Tussilagin
E. semialatum

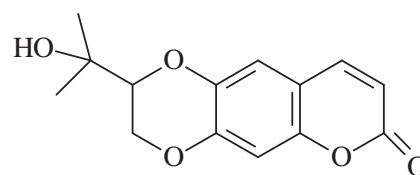
❖ **Benzofuranos, diidrobzenofuranos, cumarinas e cromonas**
(Habtemarian, S., 1998; Liu, K. *et al* 1992; Herz, W. *et al* 1981).



E. purpureum



E. fortunei

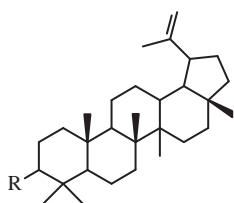


E. lancifolium

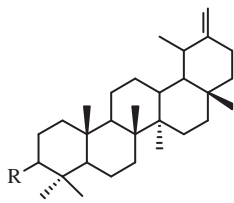
3.1.3 Constituintes químicos isolados de *Eupatorium macrocephalum* Less

Do estudo químico de extratos de *Eupatorium macrocephalum* Less. (coletada no Dpto. Central, Paraguai) foram isolados e identificados seis triterpenos: acetato de lupeoíla (1) e lupeol (2) (constituintes majoritários) taraxasterol (3) e acetato de taraxasterila (4) além de α - e β - amirina (5 e 6); três esteróides: estigmasterol (9), sitosterol (8), epinasterol (7), três saponinas esteroidais: acetato de 3-O- β -D-glicopiranosil estigmasterol (12), acetato de 3-O- β -D-glicopiranosil epinasterol (10) e acetato de 3-O- β -D-glicopiranosil

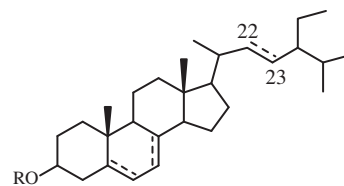
Constituintes químicos aislados de *E. macrocephalum* Less



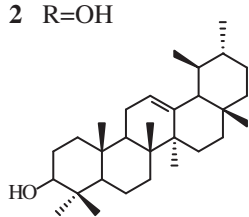
- 1 R= OAc
2 R=OH



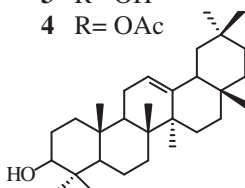
- 3 R= OH
4 R= OAc



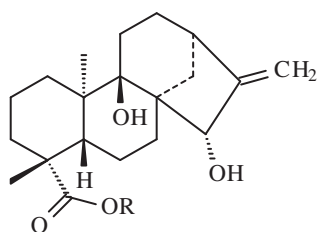
- 7 R=H, $\Delta^{7/8, 22/23}$, 5/6 diidro
8 R=H, $\Delta^{5/6}$, 22/23 diidro
9 R=H, $\Delta^{5/6, 22/23}$
10 R=Glic., $\Delta^{7/8, 22/23}$, 5/6 diidro
11 R=Glic., $\Delta^{5/6}$, 22/23 diidro
12 R=Glic., $\Delta^{5/6, 22/23}$



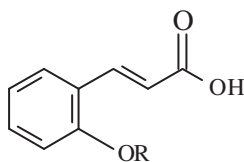
5



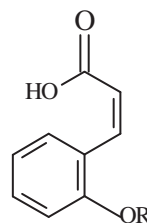
6



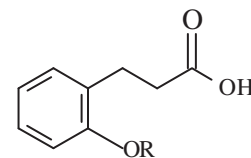
13 R=Glic



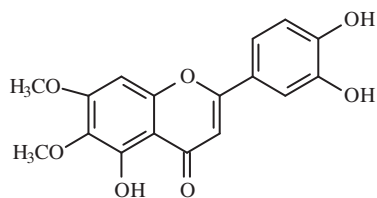
- 14 R= H
17 R= Glic.



- 15 R= H
18 R= Glic.

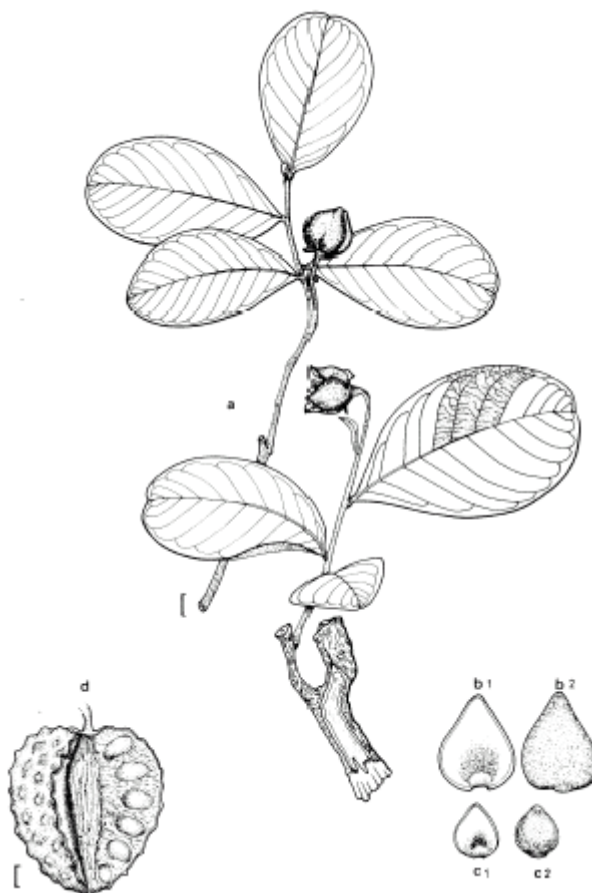


- 16 R= H
19 R= Glic.



20

3.2 *Annona dioica* St. Hill



3.2.1 Aspectos botânicos

Familia: ANNONACEAE

Subfamília: Annonoideae

Tribo: Unoneae

Gênero: *Annona*

Espécie: *Annona dioica* St. Hill.

A família Annonaceae compreende cerca de 130 gêneros com aproximadamente 2300 espécies. Esta família é de apreciável importância econômica como fonte de frutos comestíveis, aminoácidos e proteínas. O gênero *Annona* possui 120 espécies catalogadas no mundo (Barroso, G.M., et al., 2002). No Paraguai esta família é representada por cinco gêneros incluindo 16 espécies nativas das quais 11 pertencentes ao gênero *Annona* além de cinco espécies introduzidas (Spichiger, R. et al, 1983b) (Figura 5).

Annona dioica, é um arbusto de vasta dispersão na América do Sul estendendo-se da Bolívia ao Paraguai e no Brasil principalmente no Pantanal considerada planta do cerrado e conhecida popularmente como “Aratikú-ñu” (fruto do céu do campo) (Pavetti, C. et al, 1983). Esta planta é largamente usada pela população na medicina tradicional, no Brasil os frutos e folhas são utilizados contra reumatismo e as sementes contra diarreia (Pott & Pott; 1994) já no Paraguai os frutos, além de comestíveis, lhe são atribuídas propriedades sedativas e as sementes maceradas são usadas como inseticidas ou em aplicações locais para a limpeza de parasitas da pele (sarna e piolho) e as folhas são utilizadas na forma de chá ou como gargarejo como anticatarral (Basualdo, I.; Soria, N.; 1996). Na literatura encontra-se descrito o estudo do extrato etanólico da madeira de um espécime de *Annona dioica* coletada na Serra da Moeda (MG, Brasil) registrando o isolamento de seis alcalóides (Dos Santos, P. et al., 2003).

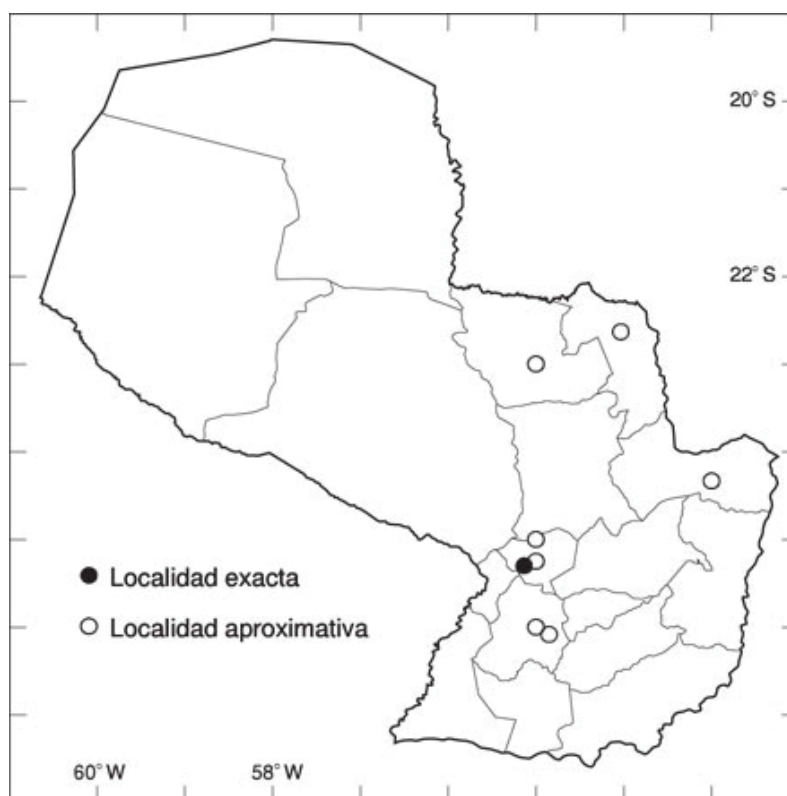
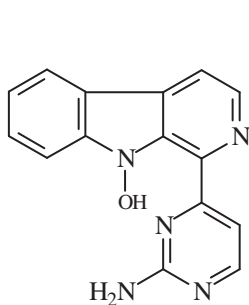


Figura 5: Distribuição do Gênero *Annona* no Paraguai

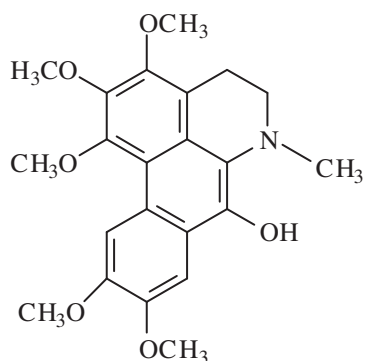
3.2.2 O gênero *Annona*

A família Annonaceae é caracterizada pela presença de alcalóides e mais recentemente acetogeninas, flavonóides foliares também são considerados como marcadores quimiotaxonomicos desta família (Santos, D.Y.C.; Salatino, M.L.F., 2000). O gênero *Annona* é nativo da América tropical e subtropical, possui 120 espécies catalogadas sendo estudadas até hoje quimicamente e/ou farmacologicamente aproximadamente 33 espécies (Tabela 1) das quais foram isoladas as mais diversas classes estruturais e com amplo espectro de atividades biológicas comprovadas sendo este gênero, portanto, uma importante fonte de moléculas bioativas. A seguir são mostrados alguns exemplos de produtos naturais isolados de plantas do gênero *Annona*

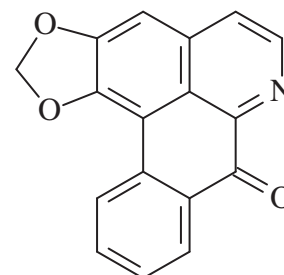
- ❖ **Alcalóides** (Leboeuf, M. *et al.*, 1982; Chang, F. *et al.*, 1998; Chang, F., *et al.*, 2000a):



A. foetida
Atividade antileishmania

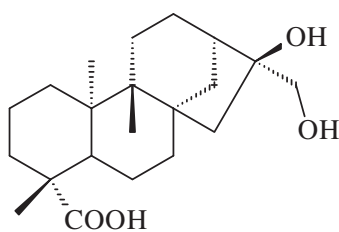


A. purpurea
Atividade sobre PAF

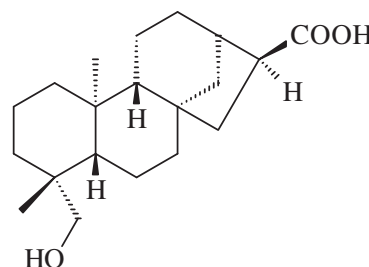


A. hipoglauca

- ❖ **Diterpenos** (Leboeuf, M. *et al.*, 1982; Wu, Y., *et al.* 1996; Chen, C., *et al.*, 2004)

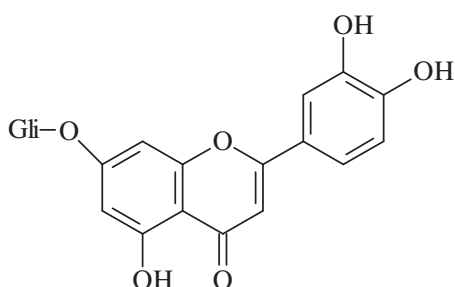


A. squamosa
Atividade Anti - HIV

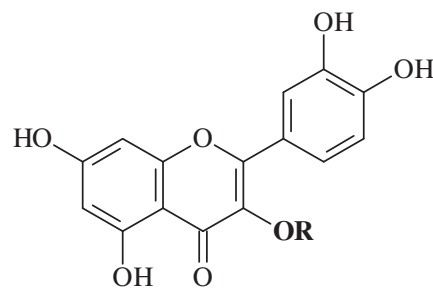


A. glabra

- ❖ **Flavonóides** (Santos, D. Y. A.C., *et al.*, 2000; Kotkar, H., *et al.*, 2002)



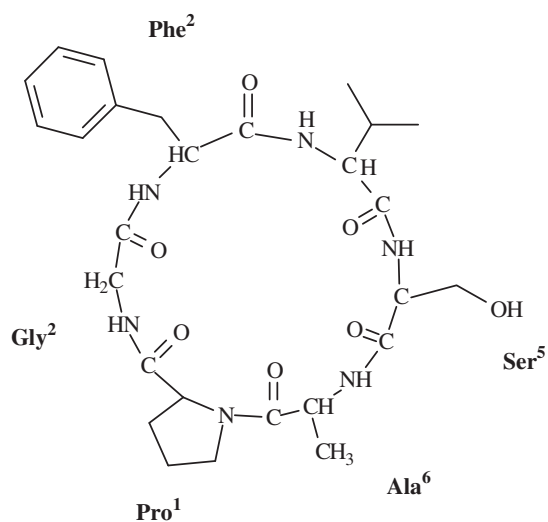
A. tormentosa



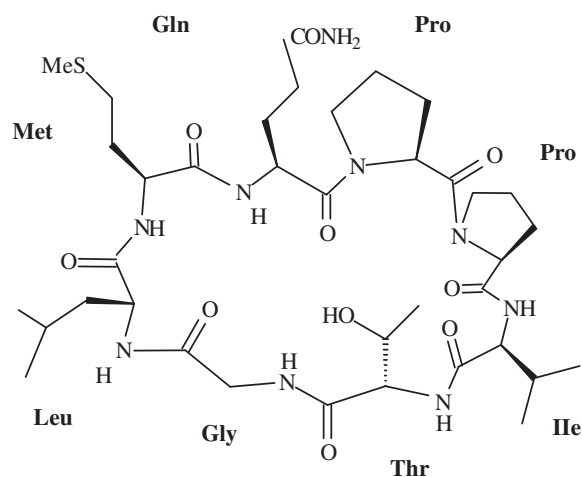
A. crassiflora
R= arabinose

A. warmingiana
R= rarnose

- ❖ **Peptídeos** (Wélé, A. *et al.*, 2004; Morita, H. *et al.*, 2006)

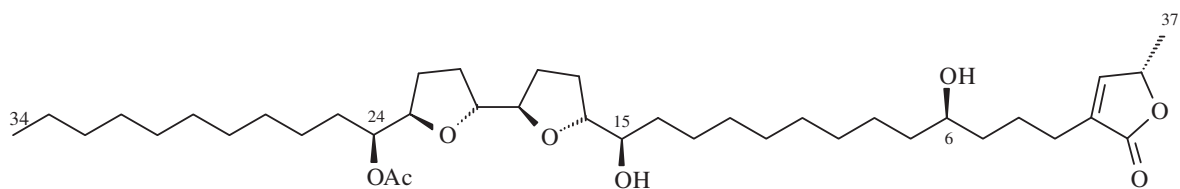


Annonuricatin C
(isolado das sementes de *A. muricata*)



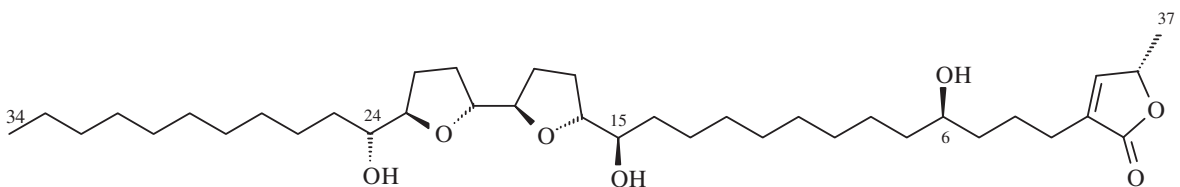
Cyclosquamosin B
(isolado das sementes de *A. squamosa*
Atividade vasorelaxante)

❖ **Acetogeninas:** são considerados importantes produtos naturais encontrados exclusivamente na família Annonaceae, vêm sendo intensamente estudada nos últimos anos e apresentam uma ampla gama de propriedades biológicas, tais como: citotóxica, antitumoral, antiparasitária, pesticida, antimicrobial e atividade imunossupressora (Alali, F.Q., *et al.*, 1999) O gênero *Annona* se apresenta como uma importante fonte desta classe de compostos considerando que dos 417 compostos conhecidos até 2004, 289 foram isolados a partir de 20 espécies de *Annona* (Bermejo, A., *et al.*, 2005) destacando as espécies: *Annona muricata* para a qual foram isoladas 81 acetogeninas (38 das sementes, 20 da raiz, 18 das folhas e 5 do caule) e *Annona squamosa* na qual foram descritas 32 acetogeninas (8 das cascas e 24 das sementes). A seguir alguns exemplos de acetogeninas encontradas em plantas do gênero *Annona*:



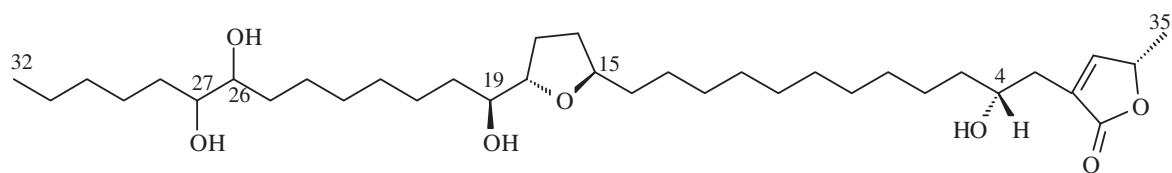
Uvaria acuminata

Uvaricin primeira acetogenina isolada de Annonaceas
Atividade antitumoral para células de leucemia linfocítica em ratos



A. squamosa

Atividade citotóxica para seis linhagens de células tumorais humanas



A. muricata

Atividade citotóxica seletiva duas linhagens de células tumorais humanas

Tabela 1: Espécies de *Annona* estudadas quimicamente, parte estudada entre parêntesis e as classes de produtos naturais descritos para cada espécime.

<i>Espécie</i>	Compostos isolados	Referência
<i>A. acuminata</i>	Alcalóides	BORUPGROCHTMANN, I., <i>et al.</i> , 1982
<i>A. aff. spraguei</i> (sementes)	Acetogeninas	CHAHBOUNE, N., <i>et al.</i> , 2006
<i>A. atemoya</i> (raiz e sementes)	Acetogeninas Alcalóides	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 WU, Y., <i>et al.</i> , 2005
<i>A. ambotay</i>	Alcalóides	DE OLIVEIRA, A.B., <i>et al.</i> , 1987
<i>A. bullata</i> (casca)	Acetogeninas	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005
<i>A. cherimolia</i> (caule, raiz e sementes)	Acetogeninas, Alcalóides, Peptídeos, Esteroides, Lignanas, Diterpenos, Proteínas, Ác. Graxos e Amidas	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 CHEN, C., <i>et al.</i> , 1997 / 1998 / 1999 / 2001a-b WELE, A., <i>et al.</i> , 2005a
<i>A. coriacea</i> (raiz)	Acetogeninas, Diterpenos Clicoproteínas	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 COELHO, M.B., <i>et al.</i> , 2006 FERRARI, M., <i>et al.</i> , 1971
<i>A. cornifolia</i> (sementes)	Acetogeninas	DOS SANTOS, L.A.R., <i>et al.</i> , 2006
<i>A. crassiflora</i> (sementes)	Acetogeninas, Flavonóides.	SANTOS, D.Y.A.C.; <i>et al.</i> , 2000 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005
<i>A. cristalensis</i>	Alcalóides	FAUST, J., <i>et al.</i> , 1981
<i>A. densicoma</i> (caule, sementes)	Acetogeninas	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005
<i>A. dioica</i> (galhos)	Alcalóides	DOS SANTOS, P., <i>et al.</i> , 2003
<i>A. diversifolia</i> (sementes)	Ác. Graxos, Flavonóides.	PEREZ AMADOR, M.C. <i>et al.</i> , 1997
<i>A. elliptica</i>	Alcalóides	SANDOVAL, D., <i>et al.</i> , 1985
<i>A. foetida</i>	Alcalóides	COSTA, E., <i>et al.</i> , 2006
<i>A. hayesii</i>	Alcalóides	RASAMIZAFY, S. <i>et al.</i> , 1987
<i>A. glabra</i> (folhas e sementes)	Acetogeninas, Alcalóides, Flavonóides, Amidas, Esteroides, Antraquinona, Di-, Sesqui- e Mono-terpeno	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 CHEN, C., <i>et al.</i> , 2000 / 2004 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 SANTOS, A.S., <i>et al.</i> , 1998 CHANG, F.R., <i>et al.</i> , 2000b HSIEH, T.J., <i>et al.</i> , 2004 CHAO-MING, I., <i>et al.</i> , 1998b XIAO-XI, L., <i>et al.</i> , 1999
<i>A. glauca</i> (raiz e sementes)	Acetogeninas Ciclopeptídeos	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 WELE, A., <i>et al.</i> , 2005b
<i>A. itcrassiflora</i>	Acetogeninas	SANTOS, L. P., <i>et al.</i> , 1996

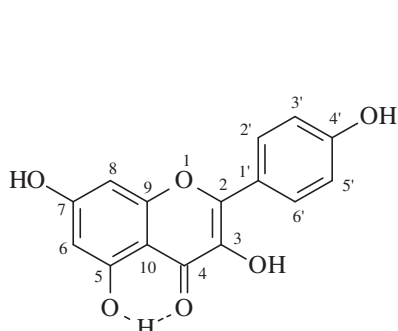
<i>A. jahnii</i> (galhos)	Acetogeninas	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005
<i>A. lutescens</i>	Ac. Graxos e Flavonóides	PEREZ AMADOR, M.C. <i>et al.</i> , 1997
<i>A. montana</i> (folhas, frutos e sementes)	Acetogeninas Alcalóides	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 WU, Y.C., <i>et al.</i> , 1993
<i>A. monticola</i>	Flavonóides	SANTOS, D.Y.A.C.; <i>et al.</i> , 2000
<i>A. muricata</i> (caule, folhas, raiz e sementes)	Acetogeninas, alcalóides, Ciclopeptideos	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 WELE, A., <i>et al.</i> , 2004 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 CHAO-MING, L., <i>et al.</i> , 1998a HASRAT, J.A., <i>et al.</i> , 1997a-b
<i>A. nutans</i> (raiz)	Acetogeninas	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005
<i>A. purpurea</i> (folhas e sementes)	Acetogeninas, Alcalóides; Amidas, Esteroides, Ác. Graxos e Flavonóides	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 CHANG, F.R., <i>et al.</i> 1998 / 2000a BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 CHAHBOUNE, N., <i>et al.</i> , 2006
<i>A. reticulata</i> (casca, folhas e sementes)	Acetogeninas	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 MAEDA, U., <i>et al.</i> , 1993
<i>A. salzmanii</i> (raiz)	Acetogeninas Alcalóides	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 QUEIROZ, E., <i>et al.</i> , 2003 PAULO, M.D., <i>et al.</i> , 1992
<i>A. senegalensis</i> (sementes)	Acetogeninas, Alcalóides, Flavonóides, Ciclopeptideos Diterpenos	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 ESHET, I.T.U., <i>et al.</i> , 1971 YOU, M., <i>et al.</i> , 1995 WELE, A., <i>et al.</i> , 2002
<i>A. spinescens</i> (sementes)	Acetogeninas Alcalóides	BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 QUEIROZ, E., <i>et al.</i> , 1996
<i>A. squamosa</i> (casca e sementes)	Acetogeninas, Alcalóides, Lignanas, Ciclopeptideos, Esteroides, Diterpenos Flavonóides	LEBOEUF, M., <i>et al.</i> , 1982 WU, Y.C., <i>et al.</i> , 1996 KOTKAR, H.M., <i>et al.</i> , 2002 MORITA, H., <i>et al.</i> , 2006 BERMEJO, A., <i>et al.</i> , 2005 RAHMAN, M.M., <i>et al.</i> , 2005 YEH, S.H., <i>et al.</i> , 2005 YANG, Y.L., <i>et al.</i> , 2004a / 2005 MORITA, H., <i>et al.</i> , 1999
<i>A. tormentosa</i>	Flavonóides	SANTOS, D.Y.A.C.; <i>et al.</i> , 2000
<i>A. warmingiana</i>	Flavonóides	SANTOS, D.Y.A.C.; <i>et al.</i> , 2000

3.2.3 Constituintes químicos isolados de *Annona dioica* St. Hill

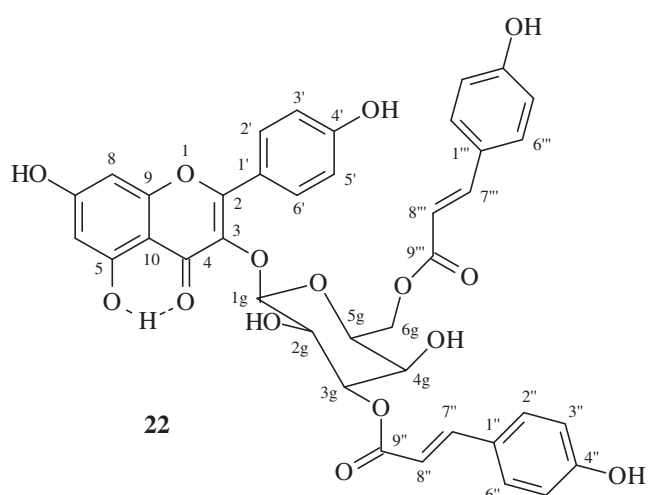
Hill

O presente trabalho relata o estudo do extrato metanólico das folhas de um espécime de *Annona dioica* coletada no cerrado de Horqueta (Dpto. de Concepción, Paraguai) que conduziu ao isolamento e identificação de quatro flavonóides **21-24** além da mistura de sitosterol + estigmasterol (**25 e 26**). Do extrato em clorofórmio das raízes obtiveram-se duas acetogeninas **27- 28** além do esteróide glicosilado: 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol (**29**).

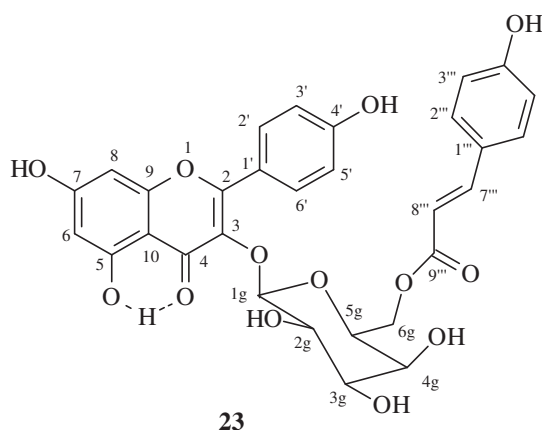
Constituintes químicos isolados de *Annona dioica* St. Hill



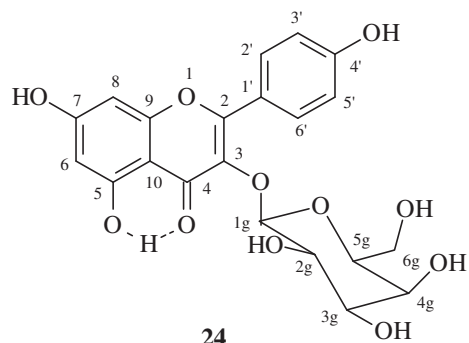
21



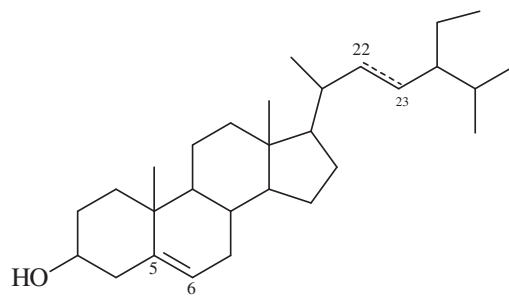
22



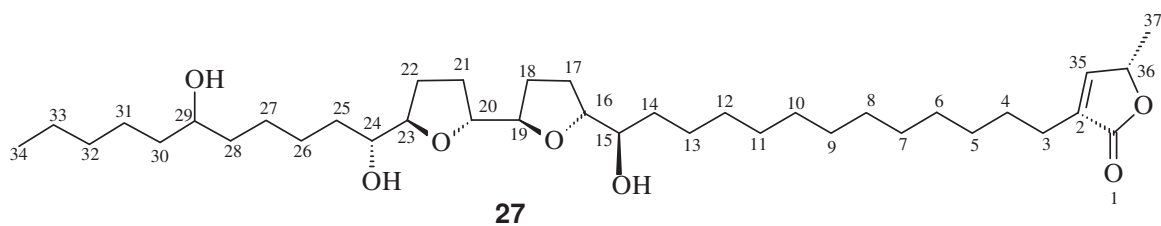
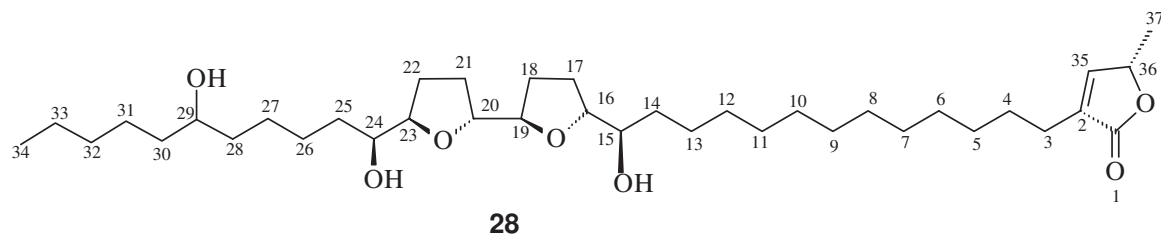
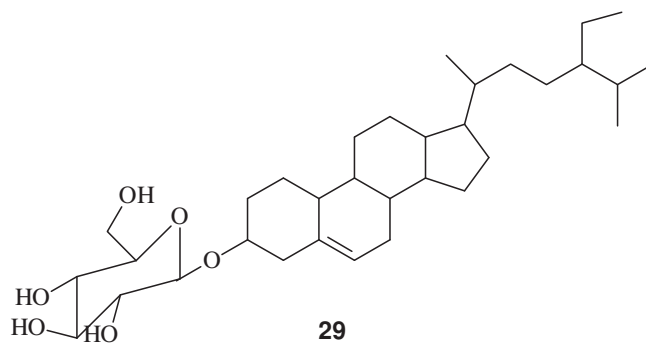
23



24



25 $\Delta^{5/6}$, 22-23 diidro
26 $\Delta^{5/6}$, 22/23

**27****28****29**

4. Parte experimental

4.1 Equipamentos e reagentes

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho digital MQAPF – 301 e os valores obtidos não foram corrigidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos em Perkin-Elmer 1605 FT-IR; os espectros foram registrados em filme sobre cristal de NaCl (amostras não sólidas) ou incorporadas em pastilhas de KBr (amostras sólidas). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros: Bruker DRX-500, 500 e 125 MHz para ^1H e ^{13}C respectivamente; Bruker ACX-200 (200 e 50 MHz) e JEOL Eclipse (400 e 100 MHz). Como referencia interna foi usado Tetrametilsilano. Os espectros de massas de alta resolução EM-ESAR em aparelho Varian VG Autospec Autospectrometer, operando com íon no modo positivo (UNICAMP). Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos por impacto de elétrons (70 eV) foram registrados em CG-EM Shimatzu modelo QP-5050 (UENF).

As cromatografias foram realizadas em coluna de vidro de diversos diâmetros e eluidas a pressão atmosférica, tendo como suportes: sílica gel (230-400 e 70-230 mesh); RP-C₁₈ e para cromatografia por exclusão foi utilizado gel de sephadex LH-20. A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi realizada em placas de sílica gel 60 PF₂₅₄, sobre suporte de vidro e espessura de 1mm. A análise comparativa das frações obtidas foi realizada por cromatografia em camada fina (CCF) observadas por irradiação UV (254 e 366 nm) e utilizando reveladores como vapores de iodo, vanilina e/ou reagente de Draggendorff.

4.2 Acetilação com anidrido acético e piridina

As substâncias acetiladas foram dissolvidas em anidrido acético e piridina (1:1) e a solução deixada em repouso por 48 horas. Após este tempo foi lavada com água destilada gelada e colocada em funil de separação para extração da fase orgânica com clorofórmio. A fase orgânica assim obtida foi seca com sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente obtiveram-se as substâncias acetiladas.

4.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *E. macrocephalum* Less.

A coleta e a classificação do material vegetal foram realizadas no Paraguai (Cidade de Luque - Departamento Central) em fevereiro de 1999, com a colaboração das professoras Rosa Degen e Nélide Soria do Departamento de Botânica da Univesidad Nacional de Asunción (UNA).

O material botânico partes aéreas (1,1 Kg) e flores (220,0 g) após seco e moído foi submetido à extração com solventes orgânicos (hexano e metanol) através de maceração exaustiva a temperatura ambiente. Após destilação a pressão reduzida obtiveram-se as quantidades relacionadas a seguir:

	Hexano	Metanol
Parte aérea (caule+ folhas)	26,5 g	38,7 g
Flores	9,7 g	15,2 g

4.3.1 Tratamento cromatográfico do extratos hexânico e metanólico da Parte aérea (caule + folhas)

O extrato em hexano da parte aérea foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna com gel de sílica, usando-se como eluentes hexano, clorofórmio e metanol e misturas binárias dos mesmos em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 65 frações que, após evaporação dos solventes a pressão reduzida, foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica e reunidas em grupos de acordo com a semelhança de perfil observado.

As frações reunidas 15 - 22 foram purificadas por cromatografia em coluna *flash* e cromatografia em camada delgada preparativa fornecendo as substâncias **2** (147,9 mg; Pf: 140-145 °C) e **1** (1,320 g ; Pf: 160-165 °C). A purificação das frações 37- 38 por cristalização em hexano e acetona forneceu as substâncias **8** e **9** em mistura (47,5 mg, Pf: 144-146 °C). Da reunião das frações 59-65 obteve-se substância a **7** (31,2 mg; Pf; 148-149 °C) por cromatografia em camada delgada preparativa utilizando hexano e acetato de etila como solventes.

O extrato metanólico foi submetido à partição com solventes acetato de etila e metanol:água (9:1), fornecendo as frações em acetato de etila (11,09 g) e hidroalcoólica (26,5 g). A porção solúvel em acetato de etila forneceu um precipitado insolúvel em solventes orgânicos e foi acetilado com piridina e ácido acético (como descrito na seção 4.3), extraído com clorofórmio e purificado por cristalização em acetona e forneceu dois derivados de esteróides glicosilados **10** e **12** (28.4 mg); o restante da fração em acetato de etila foi cromatografado em sílica gel usando-se clorofórmio e metanol como solventes e obtendo-se 35 frações que foram analisadas por CCDA e reunidas em grupos. A reunião das frações 17- 24 foi submetida à cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 utilizando metanol como solvente e resultando no flavonóide **20** (3,8 mg) e três derivados do ácido cinâmico: **14**, **15** e **16** em mistura (12,2 mg) e um do diterpeno glicosilado **13** (8,9 mg; Pf: 218-220 °C).

A fração metanólica foi submetida à cromatografia por exclusão em gel de Sephadex LH-20 fornecendo o diterpeno glicosilado **13** (27,0 mg). As demais frações foram analisadas por CCDA e combinadas em grupos e separadas por cromatografia em coluna usando sílica RP-18 e eluidas com metanol:água (2:1) fornecendo os derivados glicosilados **17**, **18** e **19** (27,6 mg)

A purificação destas frações e os resultados obtidos encontram-se resumidos no Esquema **1**.

4.3.2 Fracionamento cromatográfico dos extratos hexânico e metanólico das Flores.

O extrato hexânico das flores foi submetido a fracionamento por cromatografia de adsorção em coluna aberta, utilizando como adsorvente sílica gel e como eluentes diclorometano, acetato de etila e metanol e misturas destes solventes em ordem crescente de polaridade. Coletaram-se 31 frações que, após destilação dos solventes sob pressão reduzida, foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica e reunidas em 4 grupos. O grupo 1 forneceu uma mistura de ácidos graxos não identificados. O grupo 2 foi submetido à CC de sílica gel utilizando mistura de hexano:diclorometano como eluentes em ordem crescente de polaridade. A reunião das frações 10-15 após recristalização forneceu o triterpeno **4** (147,1 mg; Pf: 152-155 °C). O grupo 3 foi submetido a CCDP utilizando como eluentes hexano:clorofórmio (1:1) e forneceu a substância **3** (28,4 mg ; Pf.: 149-153 °C). O grupo 4 foi submetido à CC de sílica gel utilizando como eluentes diclorometano : acetato de etila (8 : 2) fornecendo as substâncias **1** (23,5 mg) e **2** (73,5 mg) e três esteróides **8** e **9** em mistura (25,4 mg) e **11** (44,3 mg).

O extrato metanólico das flores foi submetido à cromatografia por exclusão em gel de Sephadex LH-20 usando como eluentes clorofórmio: metanol (50:50 até 0:100). Obtiveram-se 23 frações que foram analisadas por CCDA e reunidas em grupos. As frações obtidas foram analisadas por CG-MS e RMN ¹H e ¹³C verificando a presença dos compostos **2**, **5** e **6**. A

purificação destas frações e os resultados obtidos estão resumidos no Esquema 1.

As elucidações estruturais foram baseadas em dados físicos e espectrais e por comparação destes dados com os descritos na literatura.

Esquema 1: Marcha geral para o isolamento de substâncias dos extratos hexânico e metanólico das partes aéreas e das flores de *Eupatorium macrocephalum* Less.

4.4 Isolamento e identificação dos constituintes químicos de *Annona dioica* St. Hill

A coleta do material vegetal foi realizada no Paraguai no cerrado de Horqueta – Concepción (Folhas em fevereiro/1999 e Raiz em abril/2003). A classificação botânica da espécie foi realizada pelas professoras Rosa Degen e Nélide Sória do Dep. de Botânica da Universidad Nacional de Asunción (UNA).

O material botânico após seco e moído foi submetido à extração com solventes orgânicos mediante maceração exaustiva a temperatura ambiente. Após destilação do solvente a pressão reduzida obteve-se as quantidades relacionadas abaixo:

	Hexano	Metanol
Folhas	12,4 g ^{**} .	25,7 g.
Raiz	-	120,0g [*]

* Extrato hidroalcoólico (MeOH + 10% H₂O)

** Extrato trabalhado pelo aluno de IC UFRRJ Sandro Sant' Anna (PIBIC/CNPq 1999-2000)

4.4.1 Fracionamento cromatográfico dos extratos metanólicos das folhas e raiz de *Annona dioica* St. Hill.

O extrato metanólico foi submetido à partição utilizando como solventes MeOH:H₂O (9:1) e CHCl₃. A fração hidroalcoólica 18.4 g foi submetida à cromatografia em coluna filtrante utilizando como solventes CHCl₃, MeOH e MeOH:H₂O (9:1). A porção solúvel em metanol (12.3 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando gel de sílica e, como eluentes, clorofórmio, acetona e metanol e misturas destes solventes em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 72 frações que, após retirada do solvente usando destilação a pressão reduzida, foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas em grupos de acordo a semelhança de perfil observado. As placas foram reveladas com vanilina obtendo-se três grupos (G-1, G-2 e G-3).

O grupo G-1 foi novamente submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica usando sílica “flash” e como eluentes hexano, clorofórmio e metanol e misturas destes solventes em ordem crescente de polaridade fornecendo os esteróides **5+6** (14,1 mg) e **9** (25,4 mg, Pf.: 230-235 °C).

O grupo G-2 foi submetido á cromatografia em gel de sílica usando como eluentes CH_2Cl_2 :AcOEt:MeOH obtendo-se 25 frações. O grupo de frações 7-12 foi submetido à cromatografia em coluna *flash* utilizando como eluentes CH_2Cl_2 :acetona (1:1). A reunião das frações 1-3 desta coluna foi purificada por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando como eluentes Acetona : AcOEt (3:1) fornecendo o flavonóide **2** (16,1 mg, Pf: 181-183 °C).

O grupo G-3 foi submetido à cromatografia por exclusão em gel de Sephadex LH-20 com MeOH : H₂O (9:1) obtendo-se 29 frações analisadas por CCDA e reveladas com sulfato cérico e vanilina. A purificação da fração 13 desta coluna por cristalização em MeOH:CH₂Cl₂ forneceu o flavonóide **3** (29.1 mg, Pf: 269-271 °C). O grupo de frações 15-19 desta coluna foi purificado por CCDP utilizando-se como solventes CH₂Cl₂: AcOEt: acetona (1:1:1) e obtendo-se os flavonóides **4** (17,2 mg, Pf.: 230-232 °C) e **1** (6,1 mg, Pf.: 185-186 °C).

O extrato hidroalcoólico da raiz foi particionado com CHCl₃ e MeOH. A fração solúvel em clorofórmio (25,40 g) foi submetida à cromatografia de sílica gel utilizando como eluentes CH_2Cl_2 :MeOH e mistura destes em ordem crescente de polaridade. Obteve-se 48 frações que após evaporação dos solventes, foram analisadas por CCDA e reunidas em grupos de acordo com a semelhança de perfil observado. As placas foram reveladas com vanilina e reagente de Dragendoff indicando a presença de alcalóides e/ou acetogeninas nas amostras. As frações foram reunidas em 14 grupos¹.

O grupo G-4 obtida da reunião das frações 30-31 (541,4 mg) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica eluída com CH_2Cl_2 + 1% até 5% de MeOH. Obtendo-se 77 frações que, após análise por CCDA, foram reunidas em grupos. A purificação da reunião das frações 59-65 desta coluna, por CCDP (eluente Acetato de etila 100%) forneceu a acetogenina **8E** (46,5 mg, óleo amarelo). Ainda nesta coluna, a reunião das frações 66-70 foi submetida à cromatografia por exclusão em gel de Sephadex LH-20 e eluída com MeOH:CHCl₃ (9:1) obtendo-se as acetogeninas **7** e **8** em mistura (126,8 mg, óleo marrom).

¹ Frações reunidas em 13 grupos desta coluna foram enviadas para triagem de atividade antitumoral *in vitro* em 3 linhagens de células tumorais humanas. Estes ensaios foram realizados na UFC, ver seção TESTES BIOLÓGICOS.

O tratamento cromatográfico a purificação das frações e os resultados obtidos estão resumidos nos Esquemas **2** e **3**.

Esquema 2: Marcha geral para o isolamento de constituintes químicos das folhas
Annona dioica St. Hill

Esquema 3: Marcha geral para o isolamento de constituintes químicos da raiz *Annona dioica* St. Hill

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte A

5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos isolados de *Eupatorium macrocephalum* Less

5.1.1 TRITERPENOS

O espectro obtido no IV da substância **1** (Figura 6a) apresentou sinais de absorção em 2942 e 2850 cm^{-1} referentes à $\nu_{\text{C-C}}$ CH_3 e CH_2 , em 1735 cm^{-1} correspondente a $\nu_{\text{C=O}}$ e em 1642 cm^{-1} sinal de absorção $\nu_{\text{C=C}}$ característica de dupla ligação. O espectro de RMN ^1H (Figura 6b) mostra sinais correspondentes a metilas terciárias: δ_{H} : 0,76; 0,81; 0,83; 0,90; 0,98 e 1,03 sendo o sinal em δ_{H} : 1,65 (s) atribuído a frequência de metila ligada a carbono sp^2 além de dois simpletos largos em δ_{H} 4,52 e 4,65 referentes a hidrogênios vinílicos. Sinais em δ_{C} 150,89 e 109,33 bem como os dados fornecidos pelo experimento DEPT no espectro de RMN ^{13}C (Figura 6c) no qual pode ser observado o número de CH, CH_2 e CH_3 e permitiram propor a estrutura de um triterpeno da classe dos lupanos.

A presença de sinais em δ_{H} 2,01 (s) e δ_{C} 170,43 características de grupo acetoxila permitiu sugerir a estrutura do composto **1** como sendo o acetato de lupeoila. As comparações com dados da literatura confirmam esta proposta (Sobrinho, D.C., *et al.*, 1991). A substância **2** apresenta espectro na região do IV (Figura 6d) se apresenta muito semelhante podendo ser destacado a ausência do sinal correspondente a C=O; já no espectro de RMN ^1H observa-se apenas diferenças no maior deslocamento para a H-3 e a ausência do sinal em δ_{H} 2,01 CH_3COO no espectro de RMN ^1H e do sinal em 170,9 no espectro RMN ^{13}C (Figuras 6e e 6f). Isto permitiu sugerir a estrutura do Lupeol para **2** (Tabela 2). As comparações com dados da literatura confirmam esta proposta (Mahato, S., *et al.*, 1994).

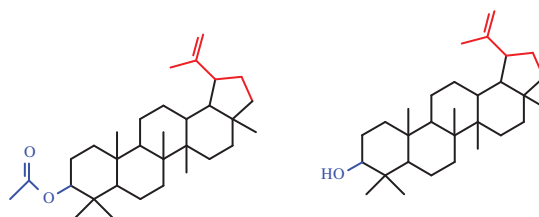
A análise dos espectros registrados na região de IV das substâncias **3** e **4** (Figuras 7a e 7b) revelou sinais de absorções características de estiramentos de CH de carbono sp^3 em 2857 e 2855 cm^{-1} e em 2946 e 2930 cm^{-1} ; sinais de absorção de estiramento de carbonila de éster (1739 cm^{-1}) para a substância **4**

e sinal de absorção correspondente ao estiramento O-H de álcool em 3388 cm^{-1} para a substância **3**; para ambas as substâncias foi possível observar a sinais de absorção característica de ligação dupla em 1642 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 7c e 7d) também apresentou-se semelhante, porém diferenciando-se no deslocamento químico $\delta_{\text{H-3}}$: 4,48 multiplete para **4** e $\delta_{\text{H-3}}$: 3,20 para a substância **3**. Um sinal simpleto intenso em δ_{H} : 2,04 correspondente ao grupo CH_3 do grupo acetoxila de **4** e que aparece no espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 80,8 no qual pode-se observar também o δ_{C} 170,8 correspondente ao carbono quaternário da carbonila (Tabela 3). O conjunto de dados e a comparação destes com valores descritos na literatura (Patra, A., *et al*, 1981), permitiram propor as estruturas do taraxasterol para **3** e acetato de taraxasterol para **4**.

Os triterpenos **5** e **6** foram identificados pela análise de dados obtidos por CG-EM (Figura 8 a-c) em combinação com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 8 d-e, Tabela 4). A comparação dos δ_{C} observados com os valores descritos na literatura (Olea, R.S., Roque, N.F.; 1990), confirmam a proposta estrutural de acetato de α -amirina para a substância **5** e de acetato de β -amirina para a substância **6**.

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) das substâncias **1** e **2** em CDCl_3



Acetato de Lupeol

Lupeol

Tipo lupanos

C	2		1	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	38,3	38,6	Axial:0,91 (t), Equatorial:1,65 (d)	
2	21,3	27,3	Axial:1,57 (d), Equatorial:1,54 (q)	
3	80,9	78,8	3,1 (dd)	
4	37,7	38,7		
5	55,2	55,2	0,67 (d)	
6	17,9	18,2	Axial:1,40 (m), Equatorial:1,54 (d)	
7	34,1	34,2	1,4 (m)	
8	39,9	40,7		
9	50,2	50,3	1,2 (d)	
10	37,0	37,0		
11	20,8	20,8	Axial:1,25 (q), Equatorial:1,49 (d)	
12	25,0	25,0	Axial:1,1 (q), Equatorial:1,63 (d)	
13	37,9	37,9	1,5 (t)	
14	42,7	42,7		
15	27,3	27,3	Axial:1,04 (d), Equatorial:1,65 (t)	
16	35,5	35,5	1,38 (dt)	
17	42,9	42,9		
18	48,2	48,2	1,3 (t)	
19	47,9	47,9	2,3(m)	
20	150,8	150,8		
21	29,7	29,7	Axial:1,32 (m), Equatorial:1,87 (m)	
22	39,9	39,9	Axial:1,22 (m), Equatorial:1,44 (m)	
23	28,0	27,9	0,97 (s)	
24	15,9	15,3	0,73 (s)	
25	16,1	16,0	0,84 (s)	
26	16,4	15,9	1,07 (s)	
27	14,4	14,5	0,94 (s)	
28	17,4	17,9	0,76 (s)	
29	109,3	109,3	Axial:4,53 (d), Equatorial:4,66 (d)	
30	19,2	19,2	1,60 (s)	
OCOCH ₃	170,9	-		
	21,2	-		



Figura 6a: Espectro de IV da substância 2

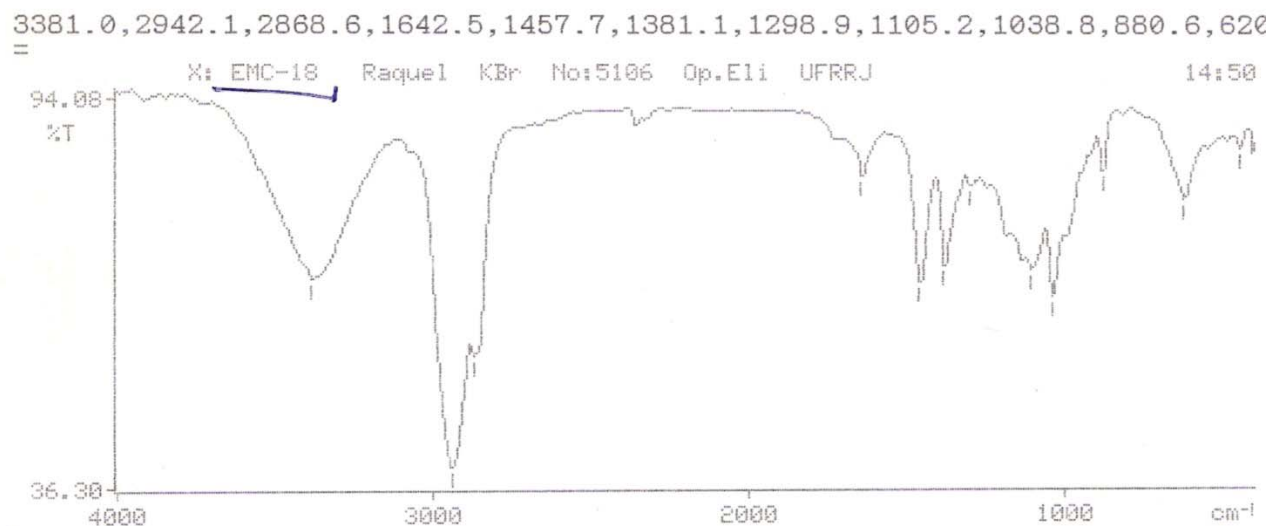


Figura 6d: Espectro de IV da substância 1

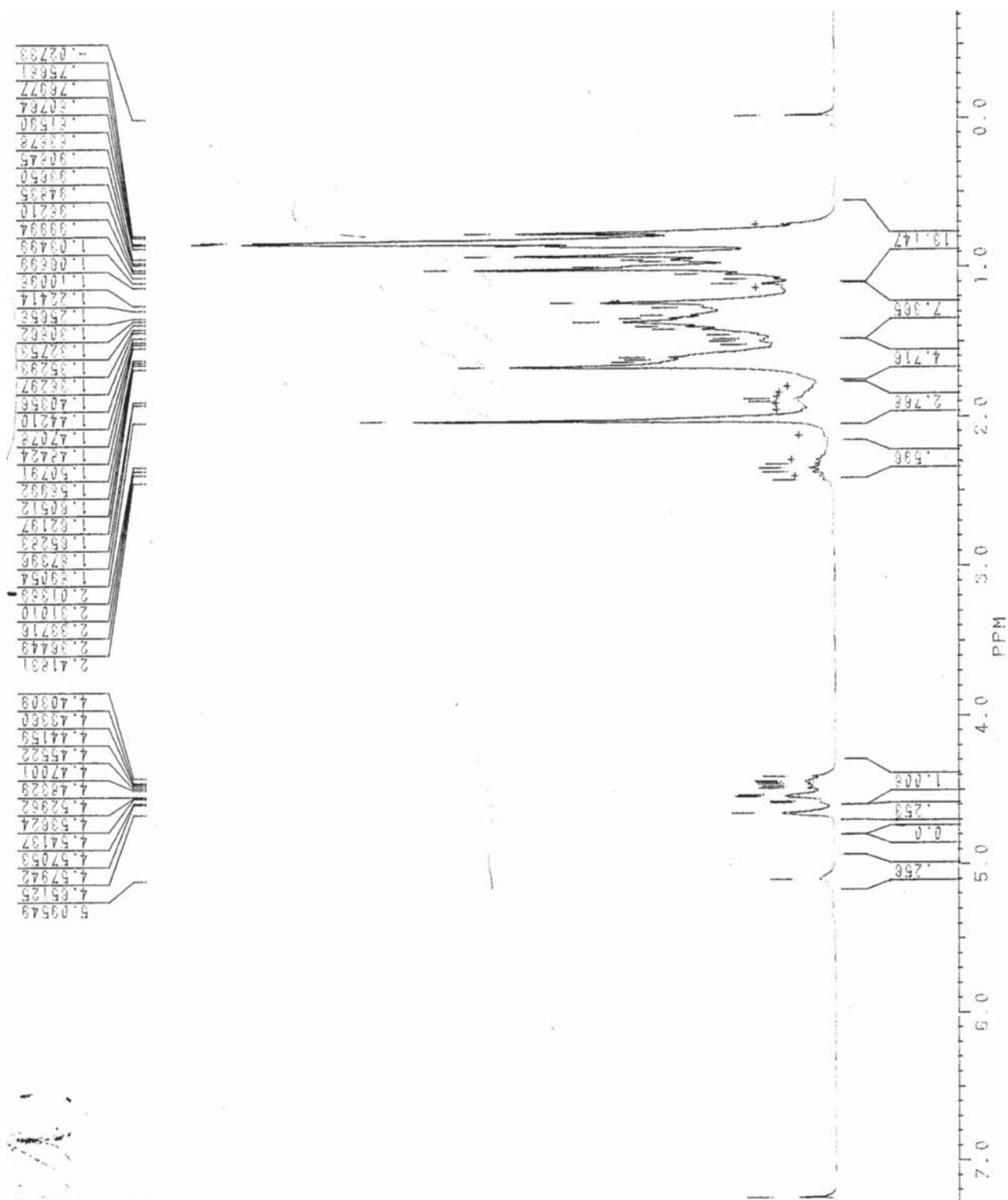


Figura 6b : Espectro RMN ^1H (200 MHz) da substância 2

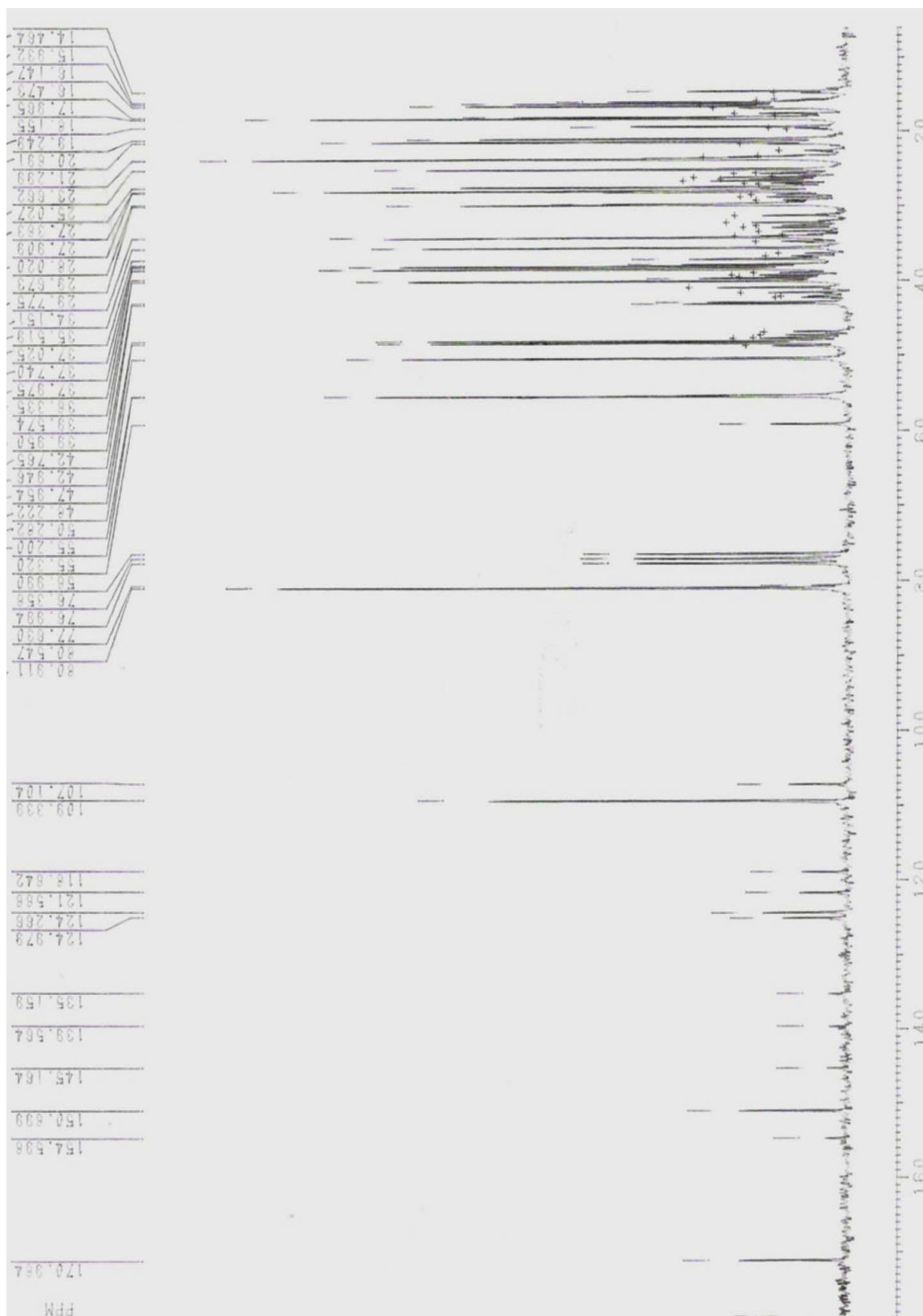


Figura 6c : Espectro RMN ^{13}C (50 MHz) da substância 2

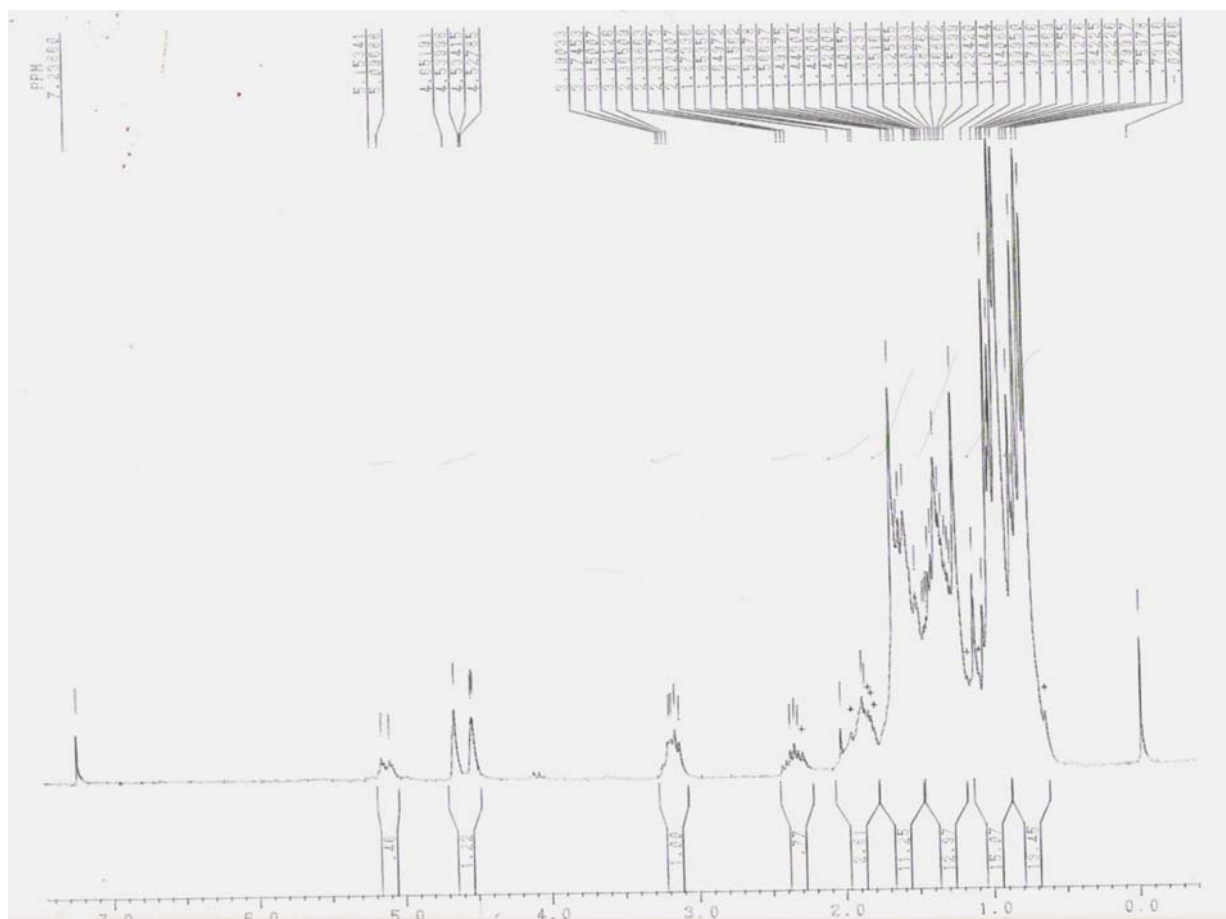


Figura 6e: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 1

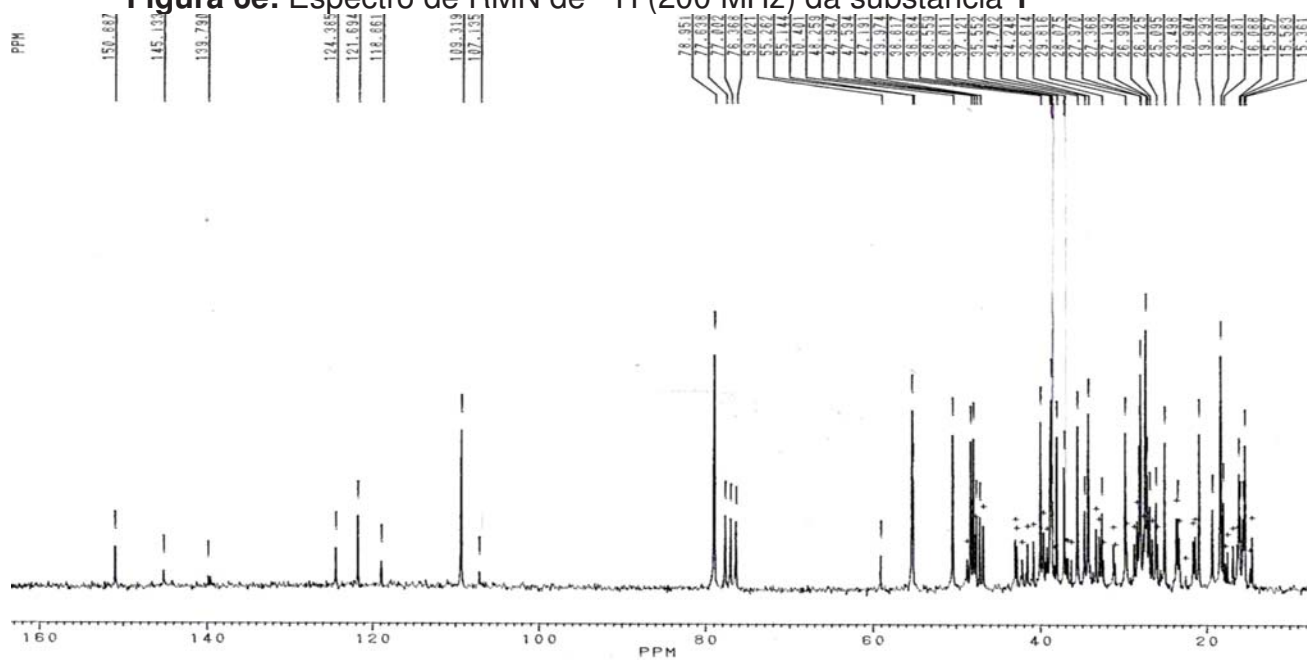
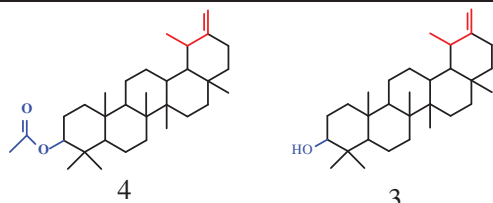


Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) das substâncias **3** e **4** em CDCl_3 .

					
		4		3	
C	δ_{C}	Literatura δ_{C}	δ_{C}	Literatura δ_{C}	
1	38,3	38,4	38,7	37,7	
2	23,6	23,6	27,3	27,3	
3	80,8	80,8	79,0	78,9	
4	37,7	37,7	38,8	38,7	
5	55,3	55,4	55,3	55,3	
6	18,1	18,1	18,2	18,2	
7	33,9	33,9	34,0	34,0	
8	40,8	40,8	39,3	40,8	
9	50,3	50,3	50,4	50,4	
10	36,9	37,0	37,1	37,0	
11	21,4	21,4	21,4	21,3	
12	25,5	25,5	25,5	25,5	
13	38,7	38,8	38,7	38,7	
14	41,9	41,9	42,0	41,9	
15	26,5	26,6	26,6	26,6	
16	39,0	39,1	39,1	39,1	
17	34,4	34,4	34,2	34,4	
18	48,5	48,6	48,6	48,5	
19	38,3	38,3	38,3	38,2	
20	154,3	154,4	154,5	154,4	
21	25,4	25,5	25,5	25,4	
22	39,3	39,3	39,1	39,2	
23	27,8	27,8	27,9	27,9	
24	16,4	16,4	15,3	15,2	
25	15,8	15,8	16,2	15,8	
26	16,2	16,2	16,2	16,1	
27	14,6	14,6	15,0	14,6	
28	26,0	26,1	26,1	26,1	
29	19,4	19,4	19,4	19,3	
30	107,1	107,0	107,1	107,0	
OCOCH ₃	170,8 21,2	170,8 21,1	- -	-	

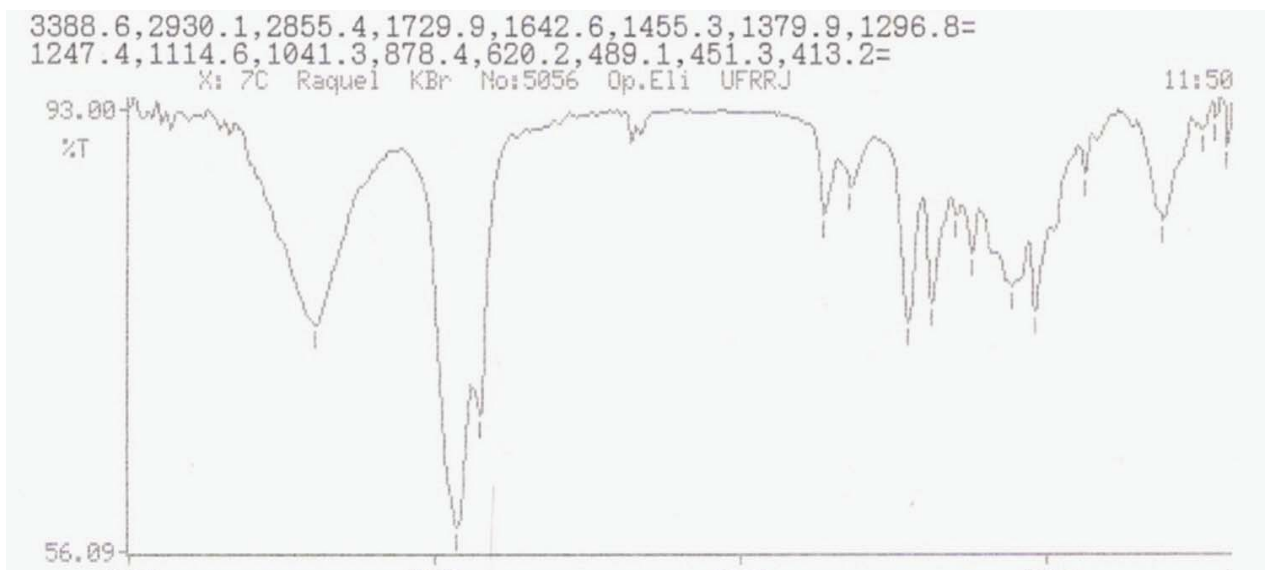


Figura 7a : Espectro de IV da substância 3

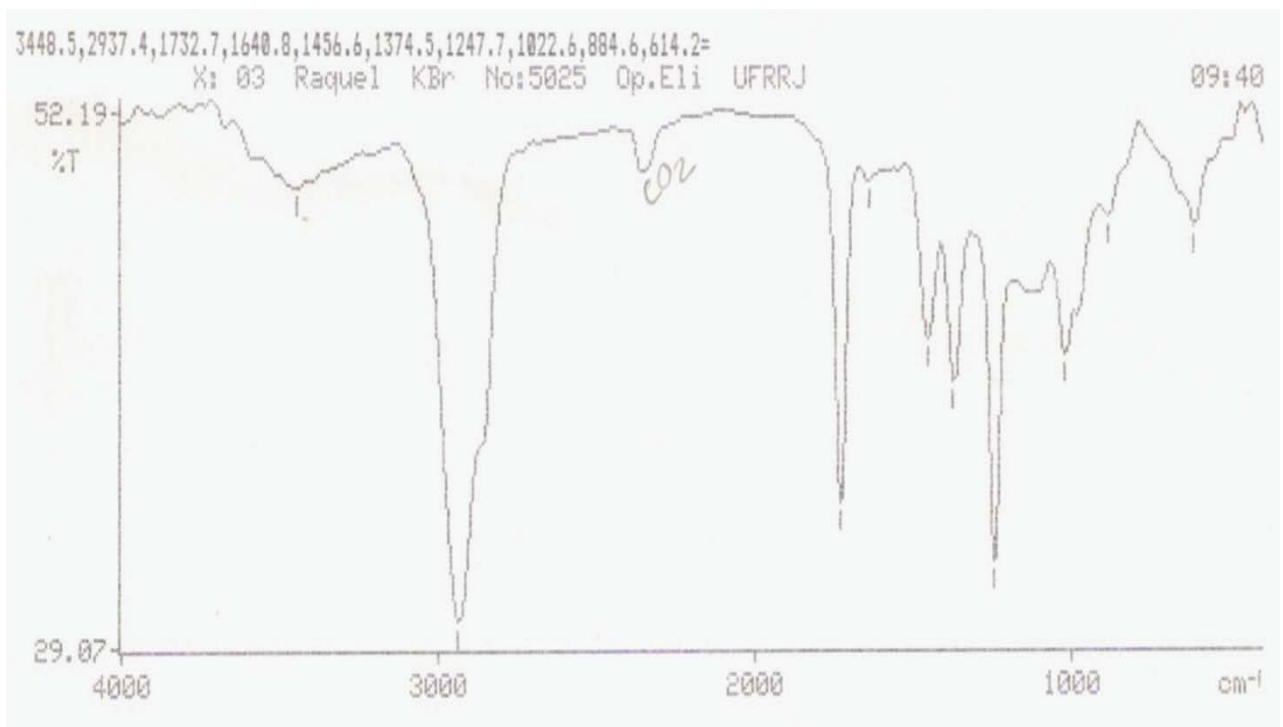


Figura 7b: Espectro de IV da substância 4

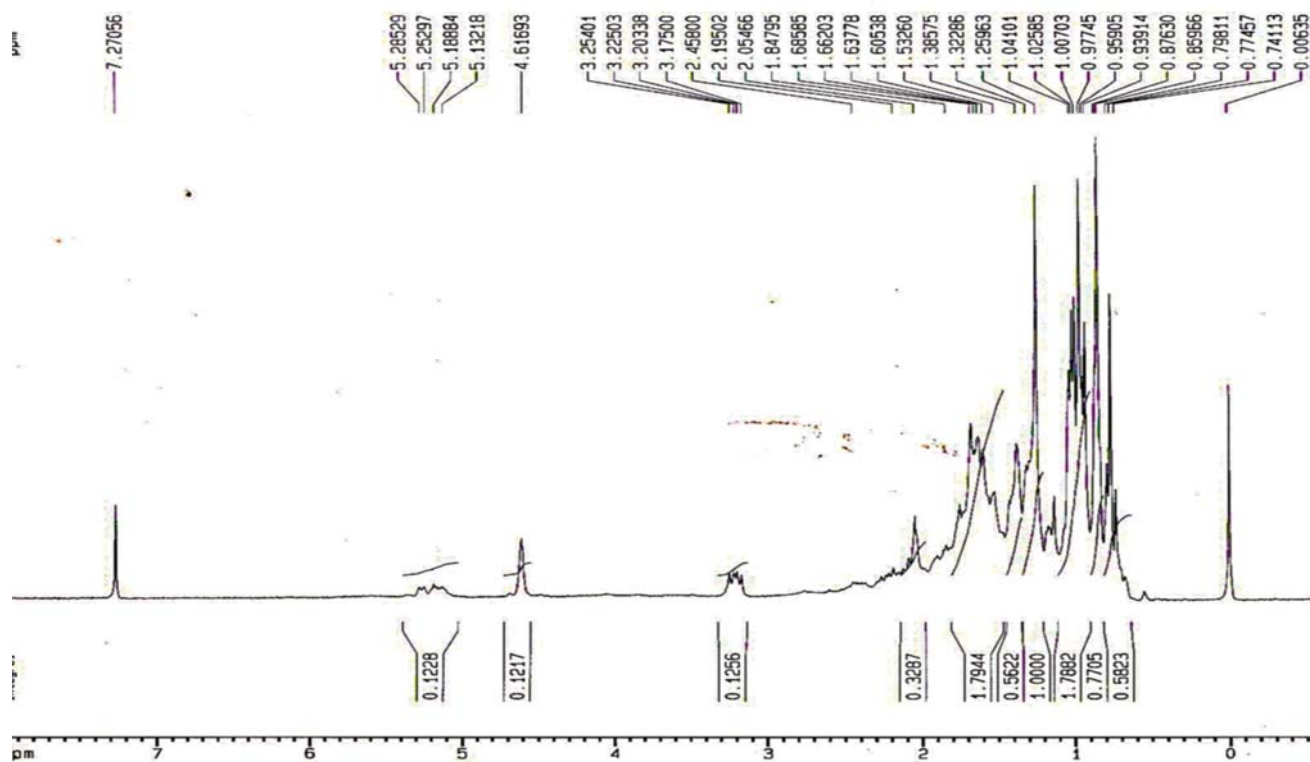


Figura 7c: Espectro RMN ^1H (200 MHz) da substância 3

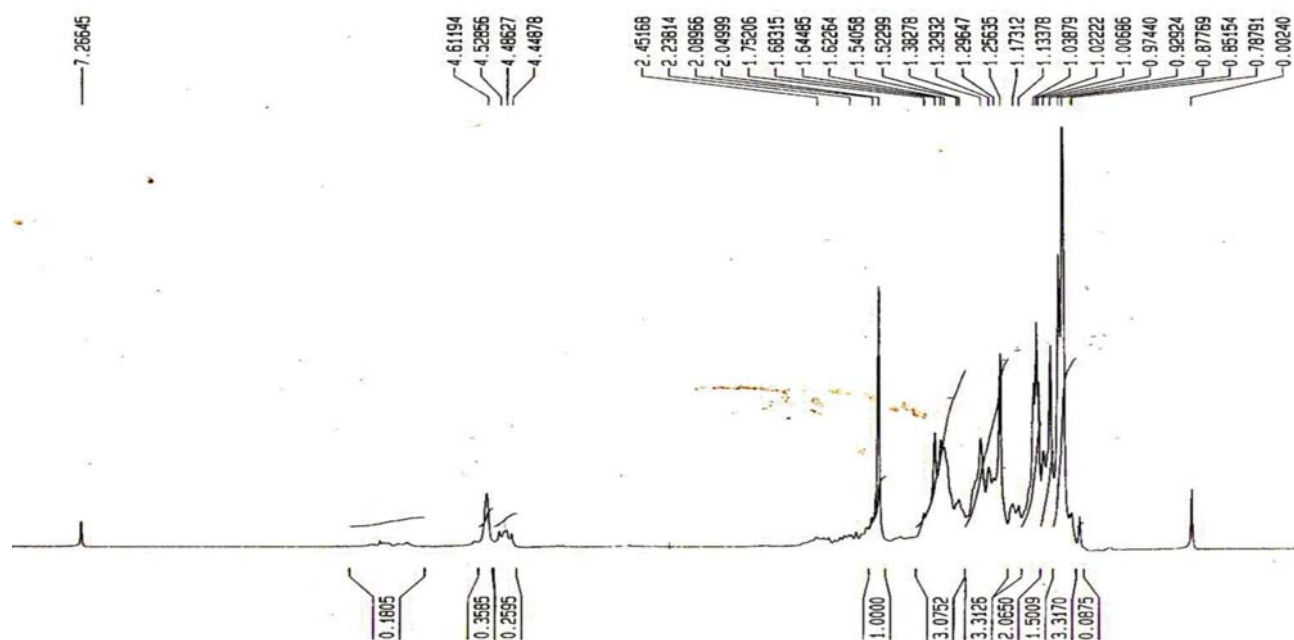


Figura 7d: Espectro RMN ^1H (200 MHz) da substância 4

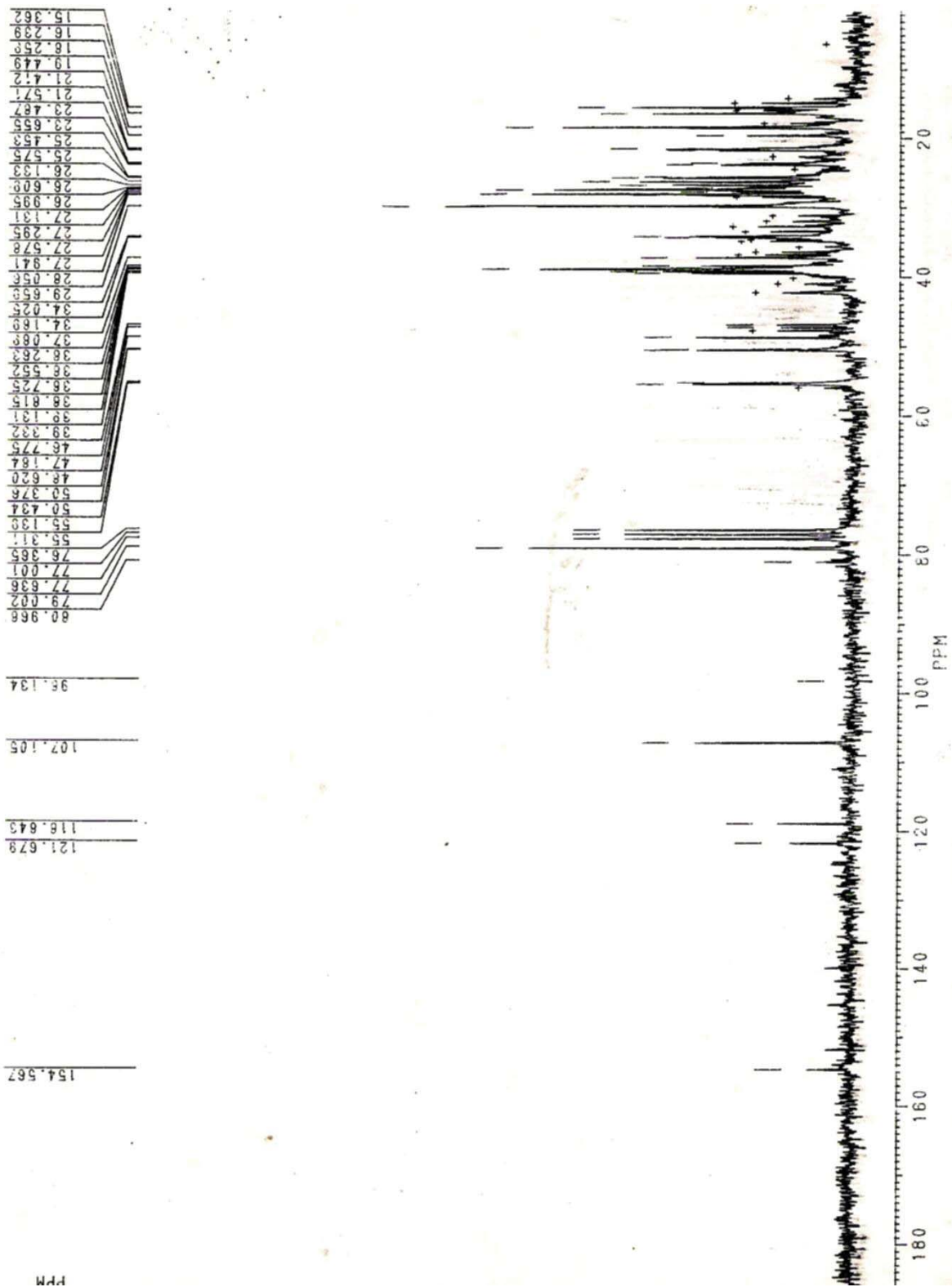


Figura 7e: Espectro RMN ^{13}C (75 MHz) das substâncias 3

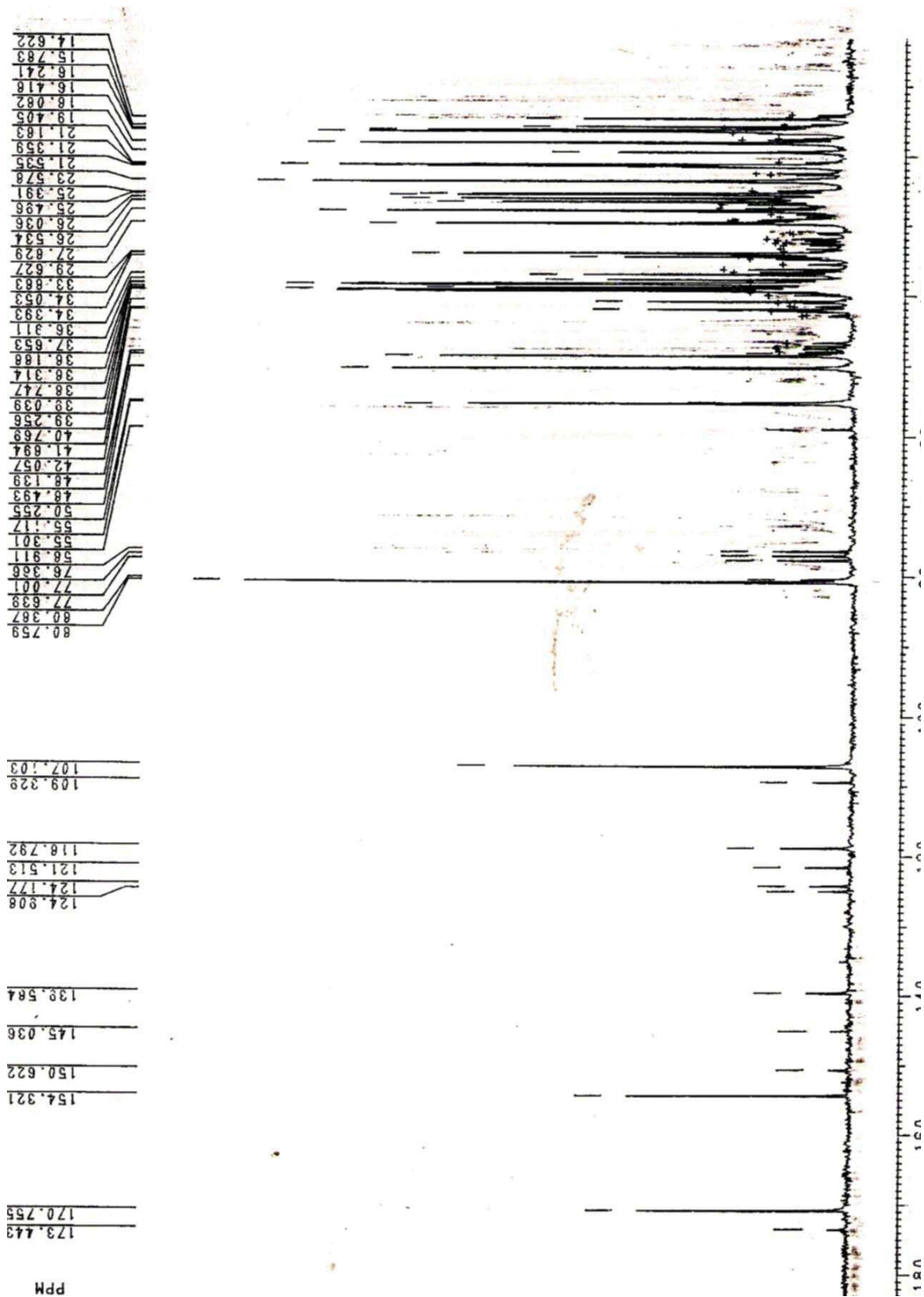
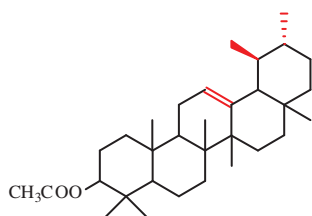


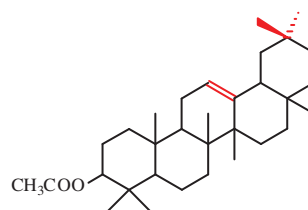
Figura 7f: Espectro RMN ^{13}C (75 MHz) das substâncias 4

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) das substâncias **5** e **6** em CDCl_3 em comparação com dados da literatura (Handbook of Natural Products Data, 1994)



acetato de α - amirina

Tipo ursano



acetato de β - amirina

Tipo oleanólico

C	5	6	α - amirina	β -amirina
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	38,34	38,25	38,27	38,27
2	26,60	26,10	26,78	26,49
3	80,86	80,86	78,54	78,54
4	37,64	37,64	38,11	38,14
5	55,20	55,39	54,70	54,75
6	17,46	18,15	17,86	17,96
7	32,81	31,20	32,17	30,78
8	39,10	39,74	39,17	39,34
9	47,94	47,58	47,23	47,28
10	36,65	36,73	36,44	36,46
11	23,18	23,32	22,89	23,04
12	124,25	121,58	123,95	121,26
13	139,55	145,11	139,10	144,68
14	42,12	41,63	41,26	41,62
15	27,95	27,90	27,68	27,64
16	26,55	26,10	26,49	26,16
17	33,68	31,02	33,26	31,99
18	59,00	47,49	58,63	47,18
19	39,55	46,72	39,15	46,37
20	39,55	31,02	39,15	30,57
21	31,20	33,29	31,82	33,26
22	41,49	36,78	41,05	36,68
23	27,89	27,89	27,89	27,89
24	15,50	15,68	15,17	15,12
25	15,50	15,68	15,17	15,12
26	16,75	16,82	16,39	16,34
27	23,32	25,89	23,20	25,56
28	28,02	27,55	28,15	27,64
29	16,29	32,53	16,39	32,83
30	21,36	22,49	20,89	22,78
CH_3COO	170,85	170,85		
	21,42	21,42		

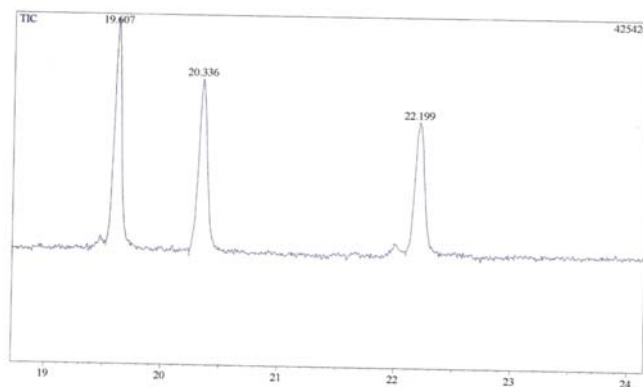


Figura 8a: CG da fração contendo as substâncias 2, 5 e 6

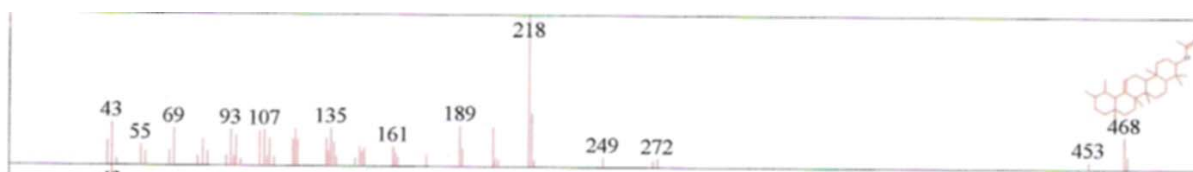


Figura 8b: Espectro de massas para a substância 5

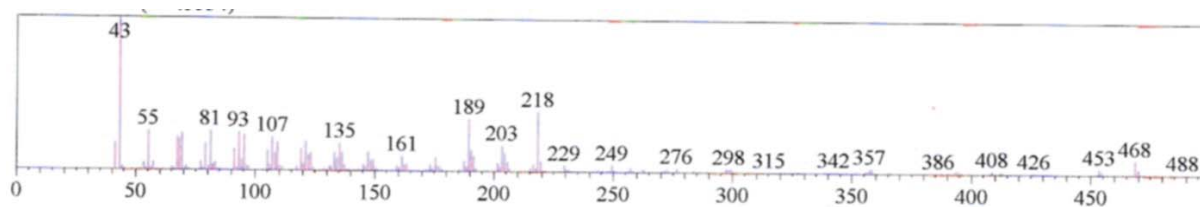


Figura 8c: Espectro de massas para a substância 6

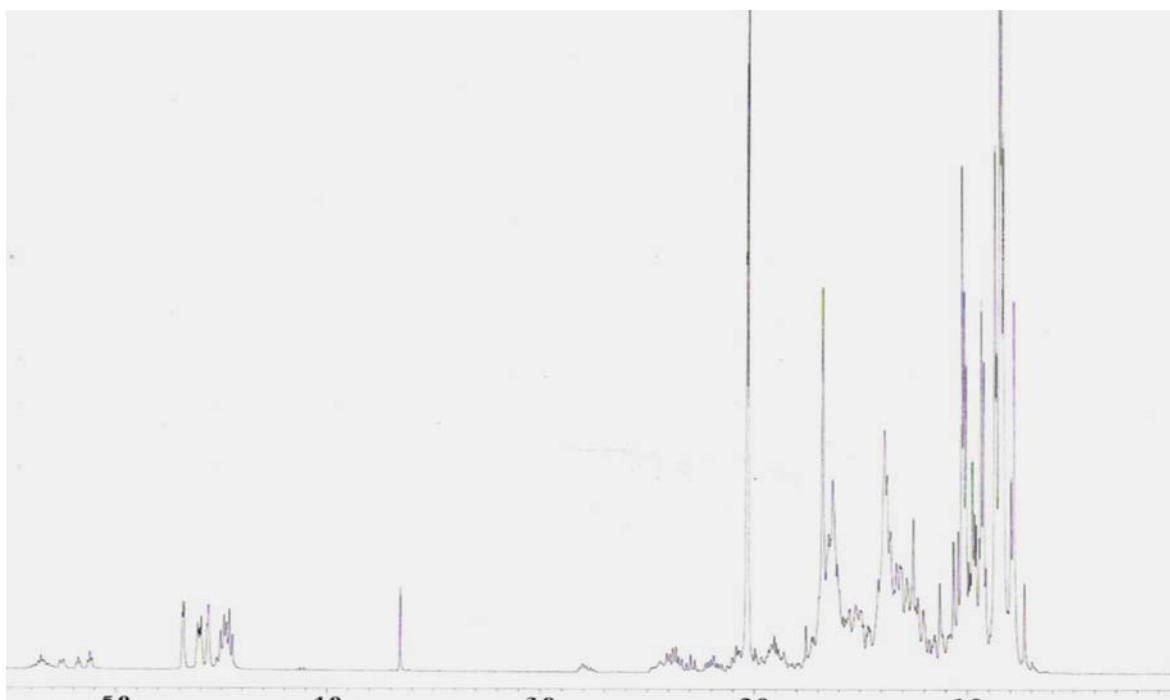


Figura 8d: RMN ^1H (400 MHz) da fração contendo as substâncias 2, 5 e 6

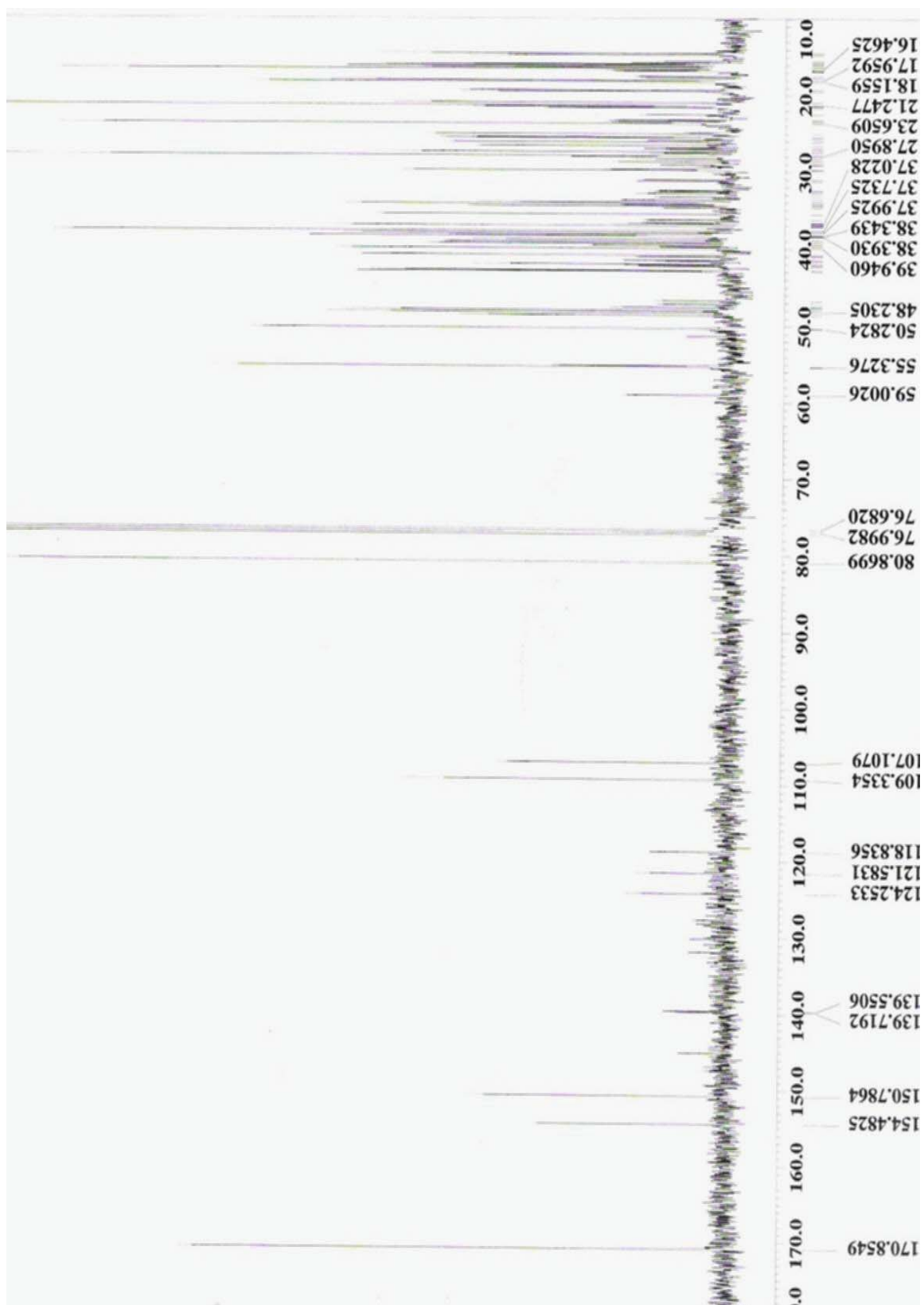


Figura 8d: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) para a amostra contendo as substâncias **2**, **5** e **6**

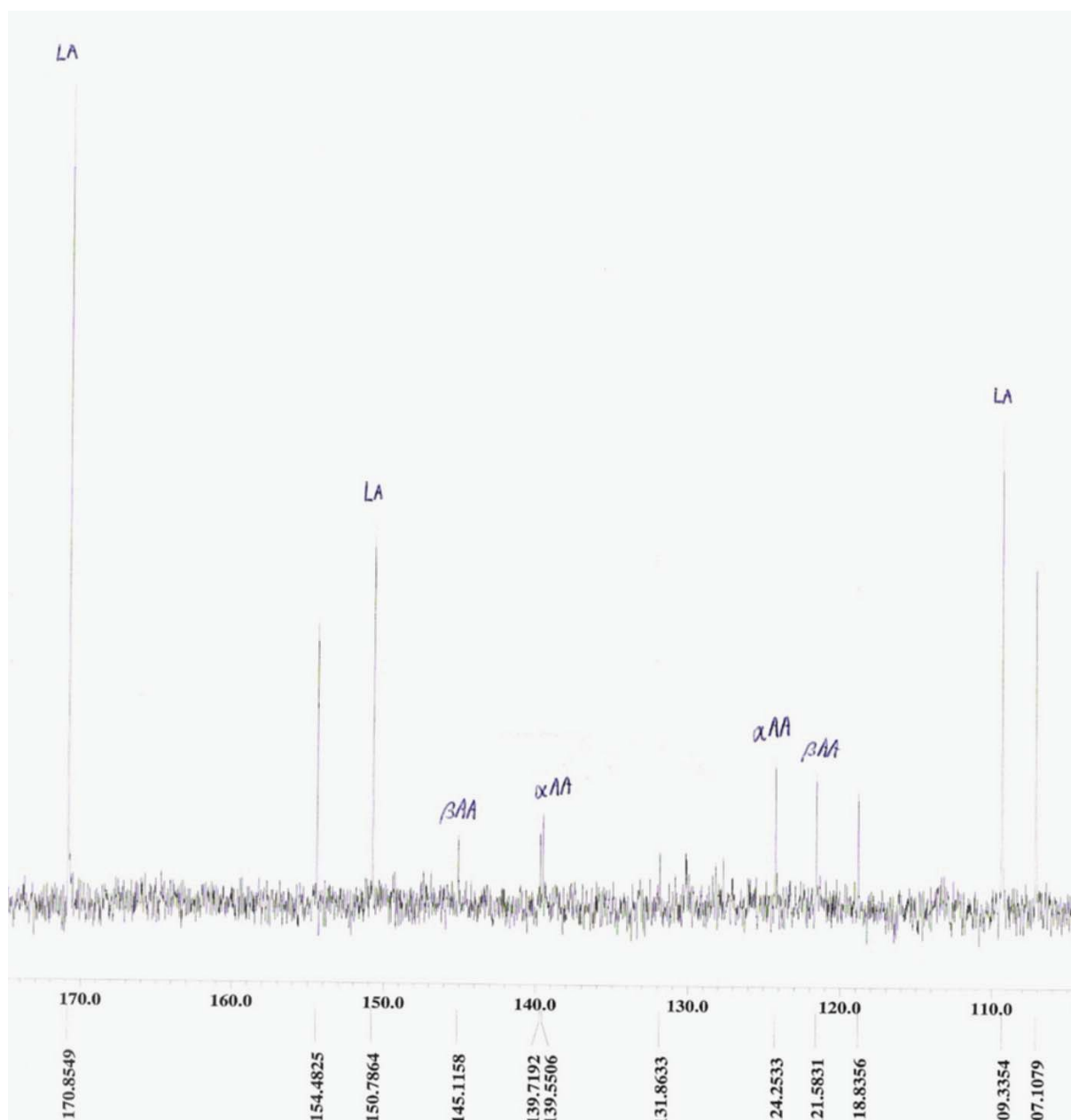


Figura 8e: Expansão no espectro de RMN ^{13}C da fração contendo as substâncias **2**, **5** e **6**

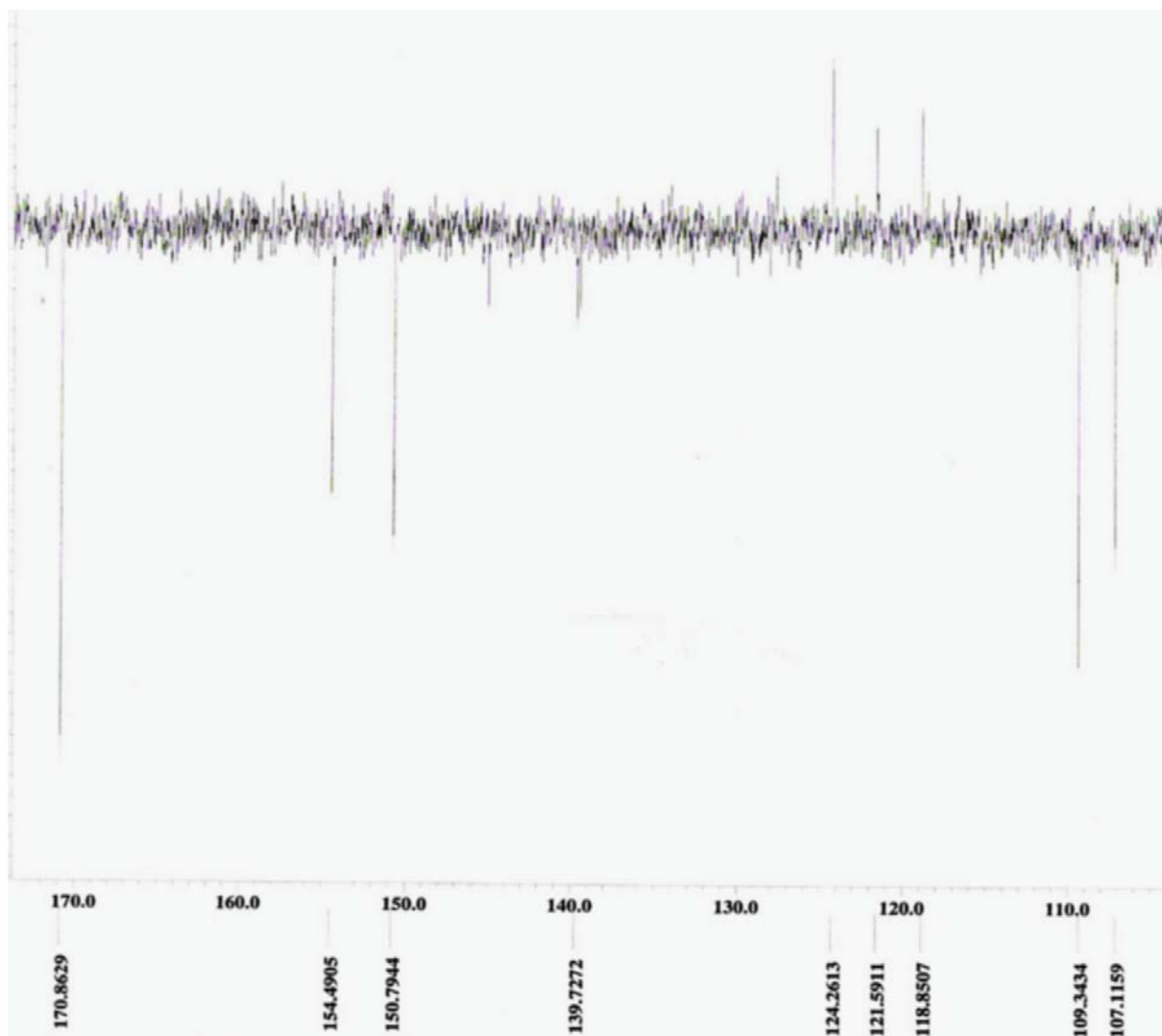


Figura 8f: Expansão para a mesma região no espectro de ^{13}C -APT da fração contendo as substâncias **2**, **5** e **6**

5.1.2 ESTERÓIDES e SAPOPININAS ESTEROIDAIIS

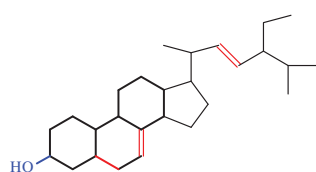
O espectro de IV (Figura 9a) da substância **7** apresenta um sinal de absorção em 3352 cm^{-1} (ν_{OH}), sinais de absorção intensas em 2930 e 2856 cm^{-1} correspondentes a estiramentos C-H de CH_3 e CH_2 respectivamente e sinais de absorção características de $\nu_{\text{C=C}}$ em 1650 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H (Figura 9b) revelou feição característica de esqueleto esteroidal com vários sinais entre 0,8 e 2,0 ppm. Esses sinais podem ser atribuídos a grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esteróide; o um multiplete em δ_{H} 3,5 foi atribuída ao H-3 ligado ao carbono que sustenta o grupo hidroxila. Os sinais dos hidrogênios olefínicos aparecem em δ_{H} 5,1 (sl) e em δ_{H} 4,8 (m) que justifica a atribuição aos hidrogênios H-22/H-23. Espectro de RMN ^{13}C (Figura 9c) apresenta, sinais de carbonos sp^2 envolvidos nas ligações duplas que aparecem em 129,3 (CH) correspondentes aos C-22 e C-23. Os valores em δ_{C} 117,3 (CH) e 139,7 (C) e em 138,1 (CH) são compatíveis com duplas nos carbonos 7/8 ou 9/11, comparação desses valores com modelos da literatura (Braz-Filho, R., *et al.*, 1986) permitiram localizar a dupla em 7/8 e propor a estrutura do Epinasterol para **7** (Tabela 5).

O espectro no IV (Figura 10a) da mistura de **8** e **9** revelou um sinal de absorção em 3400 cm^{-1} correspondente a ν_{OH} , sinais de absorção em 2936, 2866 e 1461 cm^{-1} referentes à presença de $\nu_{\text{C-H}}$ de CH, CH_2 e CH_3 e em 1127 cm^{-1} correspondente a estiramento C-O. A parte esteroidal definida pelo espectro de RMN ^1H (Figura 10b) apresenta sinais entre δ_{H} 0,65 e 2,2 ppm além dos sinais típicos de fitoesteróides observados em δ_{H} 3,5 (m) correspondente ao H-3, o multiplete em δ_{H} 5,05 correspondente H-22/H-23 e o duplete largo em δ_{H} 5,30 referente ao H-6. Estes dados em conjunto com os fornecidos pelo espectro de RMN ^{13}C (Tabela 5) permitiram a identificação destes esteroides como sendo o sitosterol **8** e o estigmasterol **9**.

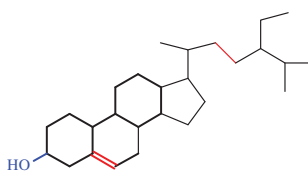
As comparações dos dados obtidos com valores descritos na literatura (Kojima, H. *et al.*, 1990) confirmam esta proposta.

Tabela 5 : Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) para as substâncias **7**, **8** e **9** em CDCl_3



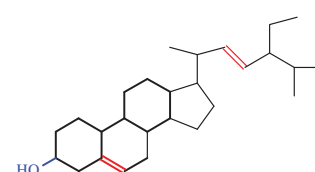
7

Epinasterol



8

Sitosterol



9

Estigmasterol

	7	8	9
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,0	37,2	37,2
2	28,4	31,6	31,6
3	70,8	71,8	71,8
4	34,1	42,3	42,3
5	40,1	140,7	140,7
6	29,6	121,6	121,6
7	117,3	31,9	31,6
8	139,4	31,9	31,9
9	49,3	50,1	50,1
10	34,1	36,5	36,5
11	21,4	21,1	21,1
12	39,4	39,6	39,7
13	43,1	42,3	42,3
14	55,7	56,8	56,8
15	22,9	24,3	24,3
16	28,8	28,2	28,9
17	55,7	56,7	55,9
18	12,1	11,8	12,0
19	12,9	19,4	19,4
20	40,7	36,1	40,5
21	21,2	18,8	21,2
22	138,1	33,9	138,3
23	129,3	26,0	129,2
24	51,1	45,8	51,2
25	31,8	28,9	39,1
26	21,4	19,3	21,1
27	18,9	19,8	21,1
28	25,3	23,0	25,4
29	12,1	12,2	12,2

O precipitado obtido da Fração AcEOT, foi tratado com anidrido acético e piridina (como descrito na seção 4.3) e forneceu o produto natural solúvel em clorofórmio. O espectro de IV deste produto apresentou absorções fortes em 3400 cm^{-1} (ν_{OH}), $1160\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$). Os sinais de absorção em 2850 e 2950 cm^{-1} são compatíveis com o esqueleto esteroidal do material (Figura 11a). A parte aglicona foi definida com padrão esteroidal pelo espectro de RMN de

^1H (Figura 11b) que apresentou sinais entre δ_{H} 0,50 e 1,92 ppm correspondentes aos grupos metílicos característicos de esteróides e em δ_{H} 1,97 e 2,19 ppm são observados os sinais correspondentes aos grupamentos acetoxila.

A diferença na intensidade dos sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C (Figura 11c) e a presença de sinais correspondentes a seis carbonos sp^2 sendo quatro deles mais intensos levaram a deduzir a presença de uma mistura de esteróides glicosilados.

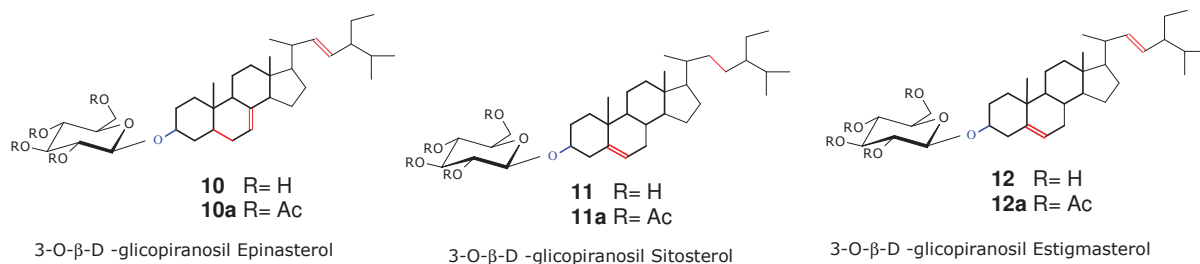
A localização das ligações duplas nos carbonos C-7/C-8 [δ 117,2 e 139,5 (CH=C)]; e C-22/C-23 [δ 138,2 e 129,4 (CH=CH)] para a saponina esteroidal **10a** e nos carbonos C-5/C6 [δ 122,1 e 140,3 (CH=C)]; e C-22/C-23 [δ 138,2 e 129,2 (CH=CH)] para a saponina esteroidal **12a** decorreu, principalmente, da análise dos deslocamentos químicos e das feições dos sinais correspondentes aos átomos de carbono sp^2 . Esta proposta foi confirmada pela comparação com dados de substâncias modelo descritas na literatura (Agrawal, P.K., *et al.*, 1985; Akihisa, T., *et al.*, 1988). Ainda para a parte aglicona, os carbonos sp^2 de maior intensidade envolvidas em duas ligações duplas foram atribuídas ao estigmasterol para **12a**, identificado como componente majoritário na mistura. Os sinais de intensidade menor foram atribuídos ao epinasterol **10a**.

A caracterização da unidade glicosil foi feita pela análise dos dados no espectro de RMN de ^{13}C . O sinal intenso em δ 99,66 de HC-1', carbono anomérico, e sinais correspondentes a outros quatro CH em δ_{C} 71,6 (CH-2'); 71,5 (CH-3'); 68,4 (CH-4') e 72,8 (CH-5') além do sinal em 62,0 (CH₂-6'); ainda pode-se observar no espectro de RMN ^{13}C sinais referentes a quatro carbonos quaternários, característicos de carbonila do grupo acetoxila, além dos sinais das metilas correspondentes a estes grupos em 19,3; 20,5; 21,0 e 21,3 respectivamente (Tabela 6). Estes dados permitiram propor para **12a** e **10a** a mistura de tetra-O-acetil-3-O- β -D-glicopiransil estigmasterol e tetra-O-acetil-3-O- β -D-glicopiransil epinasterol. Isso permitiu concluir que o precipitado obtido na fração analisada e a mistura de 3-O- β -D-glicopiransil estigmasterol (**12**) e 3-O- β -D-glicopiransil epinasterol (**10**)

A substância **11** foi identificada através da análise dos espectros do seu derivado acetilado (**11a**). O espectro de RMN de ^1H (Figura 12a) apresentou

sinais característicos de esteroide com sinais entre δ_H 0,68 e 1,23 ppm de metilas terciárias, secundárias e primárias e sinais simples em 1,85 e 2,05 ppm correspondentes as metilas dos grupos acetoxila, foi possível observar, também, multipletos em δ_H 3,64 (H-3), 4,13 e 5,04 referentes aos hidrogênios da unidade glicopiranosídica; já no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12b) foram observados os sinais referentes a quatro carbonos de C=O em δ_C 169,27 (sinal intenso atribuído a duas carbonilas); 169,37; 170,31. O sinal em δ_C 99,60 referênte ao carbono anomérico e os sinais correspondentes aos carbonos olefínicos aparecem em δ_C 140,32 e 122,12 ppm (C-5/C-6). A análise dos dados em conjunto com a comparação com dados da literatura permitiram propor a estrutura de **11a** como tetra-O-acetil-3-O- β -D glicopiranosilsterol (Pessoa, O.D., et al., 1995), e portanto, a substância natural contida nessa fração é o 3-O- β -D glicopiranosilsterol (**11**). Os dados foram resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para as saponinas esteroidais **10**, **11** e **12**.



C	10a	11a	12a	β -D-glicopiranosideo	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	C	δ_{C}
1	36,6	37,16	37,0	1'	99,6
2	28,4	29,12	31,9	2'	71,6
3	80,0	80,04	79,5	3'	71,5
4	34,4	38,88	39,5	4'	68,4
5	40,1	140,32	140,3	5'	72,8
6	29,6	122,12	122,1	6'	62,0
7	117,2	29,67	29,6	C=O	170,7; 170,4 169,4; 169,3
8	139,5	32,00	31,8	CH ₃	19,3
9	49,3	50,14	50,1		20,5
10	34,4	36,09	36,6		21,0
11	21,4	21,01	21,1		21,3
12	39,4	39,71	40,1		
13	43,0	42,18	42,0		
14	55,8	56,02	56,7		
15	22,9	24,00	24,3		
16	28,4	28,20	28,8		
17	55,8	56,72	56,7		
18	12,2	11,81	11,9		
19	12,9	18,74	19,3		
20	40,8	36,69	40,4		
21	21,0	18,94	21,3		
22	138,2	33,91	138,2		
23	129,4	25,40	129,2		
24	51,1	45,81	51,1		
25	31,8	29,41	31,8		
26	21,4	19,77	21,1		
27	18,9	19,00	20,7		
28	25,4	26,04	25,4		
29	12,2	11,94	12,2		



Figura 9a: Espectro de IV da substância 7

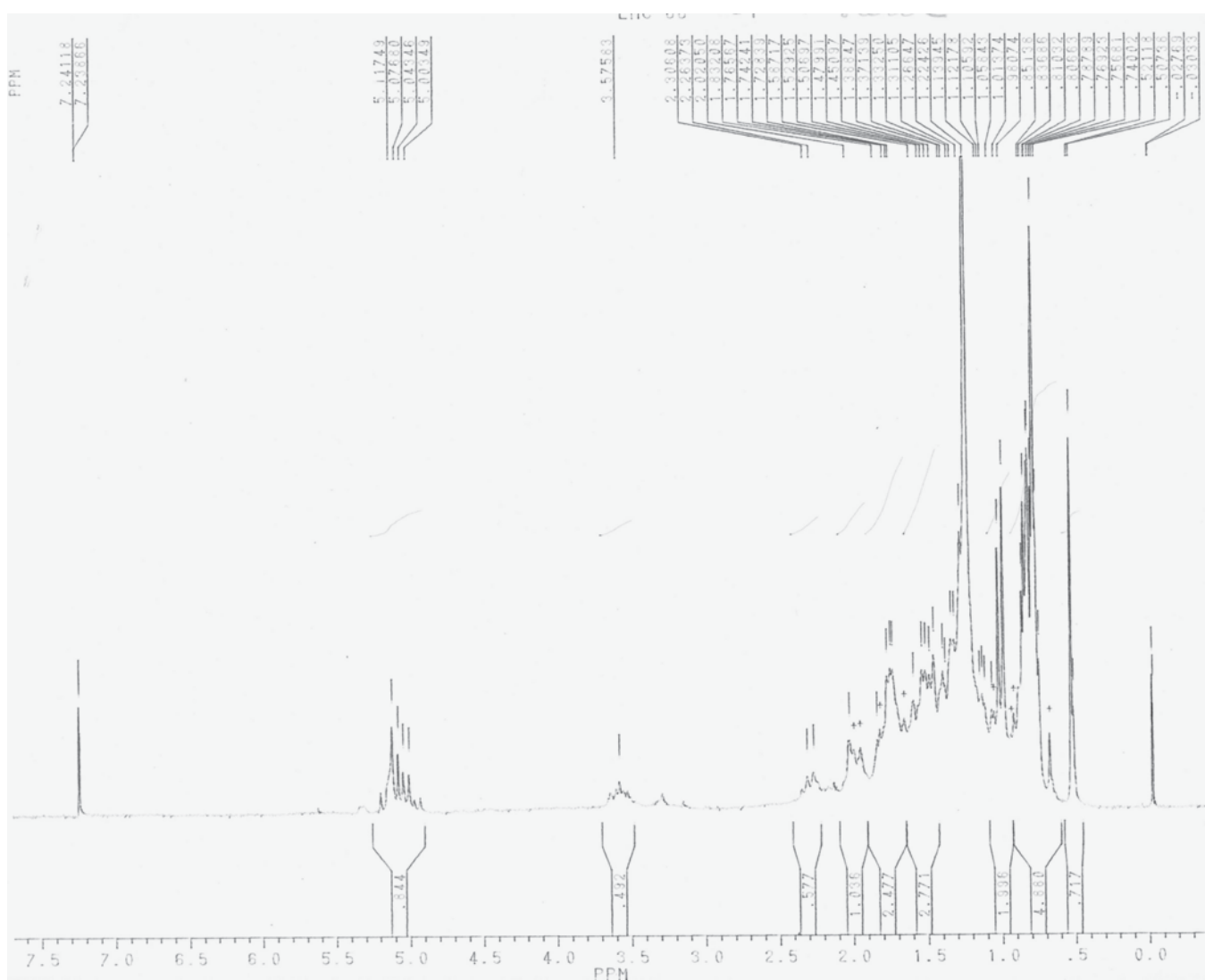


Figura 9b: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância 7

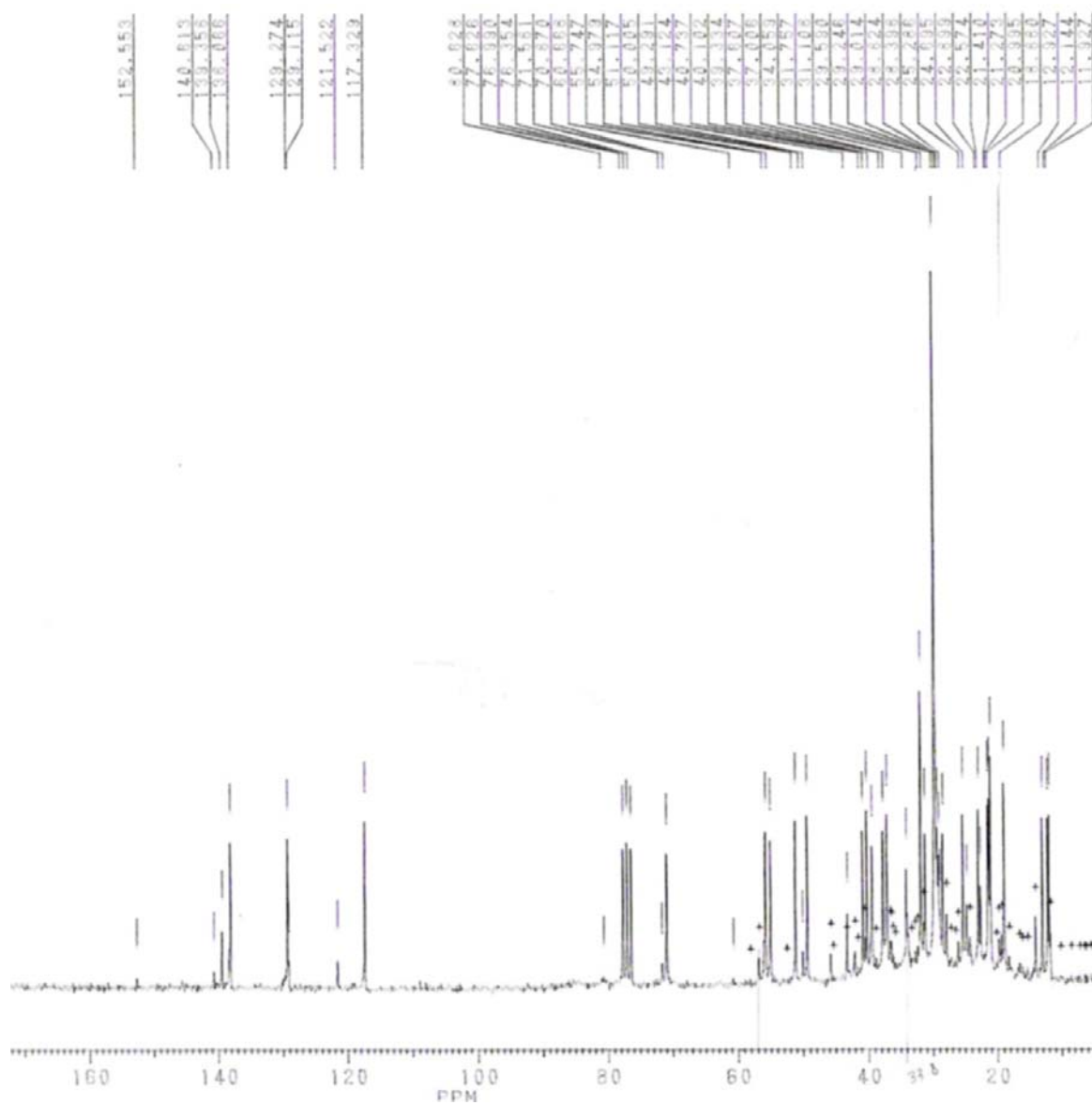


Figura 9c: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 7



Figura 10a: Espectro de IV da mistura de 8 e 9

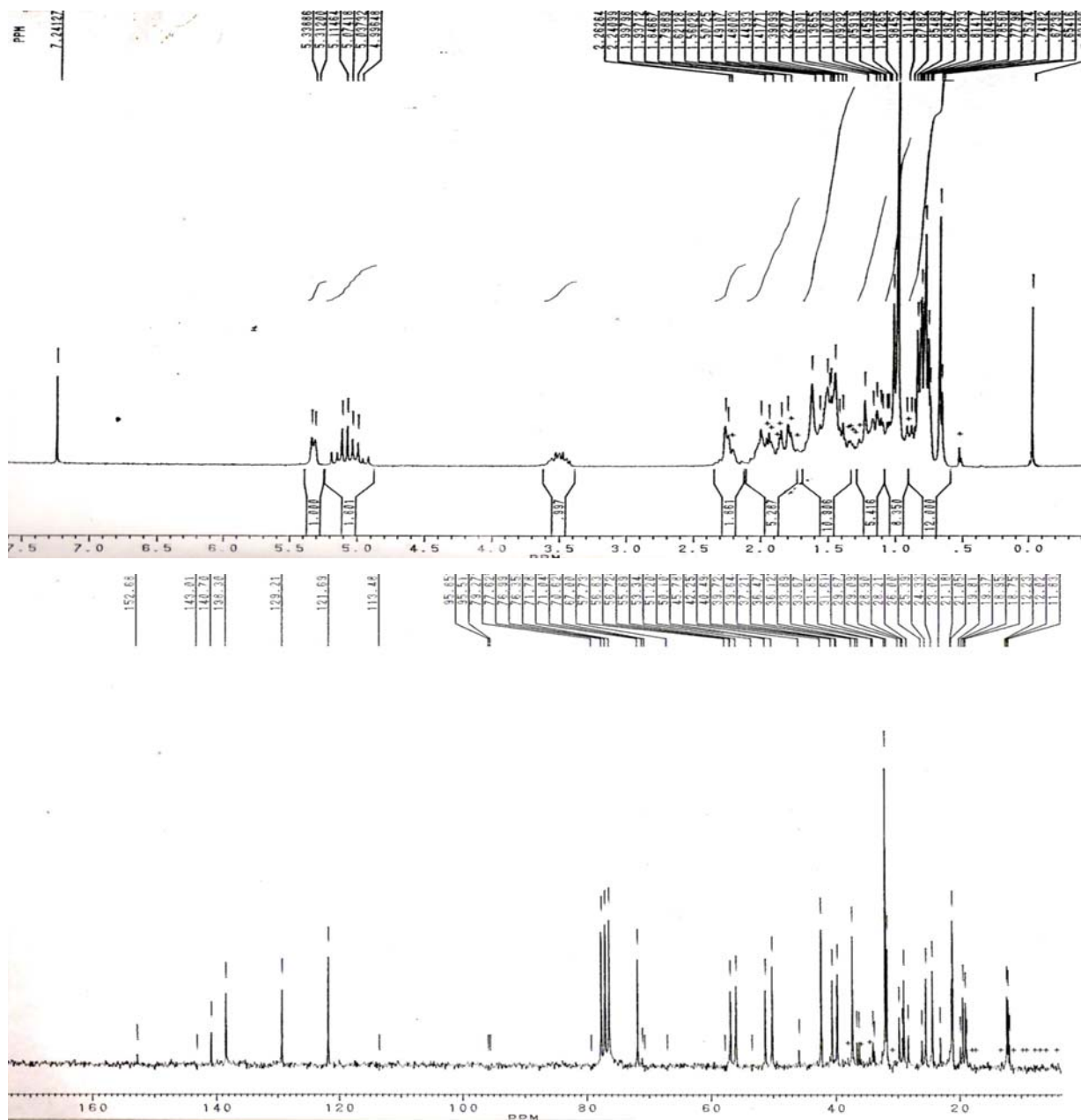


Figura 10b: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, CDCl_3) da mistura de 8 e 9



Figura 11a: Espectro de IV para 10a+12a

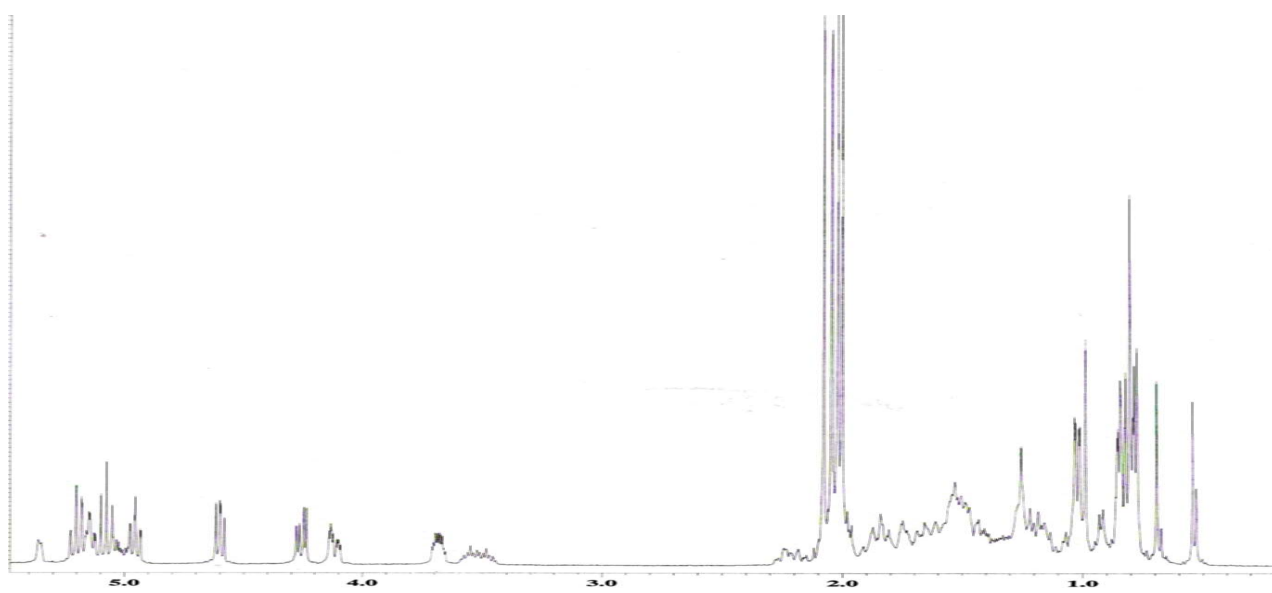


Figura 11b: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) para 10a + 12a

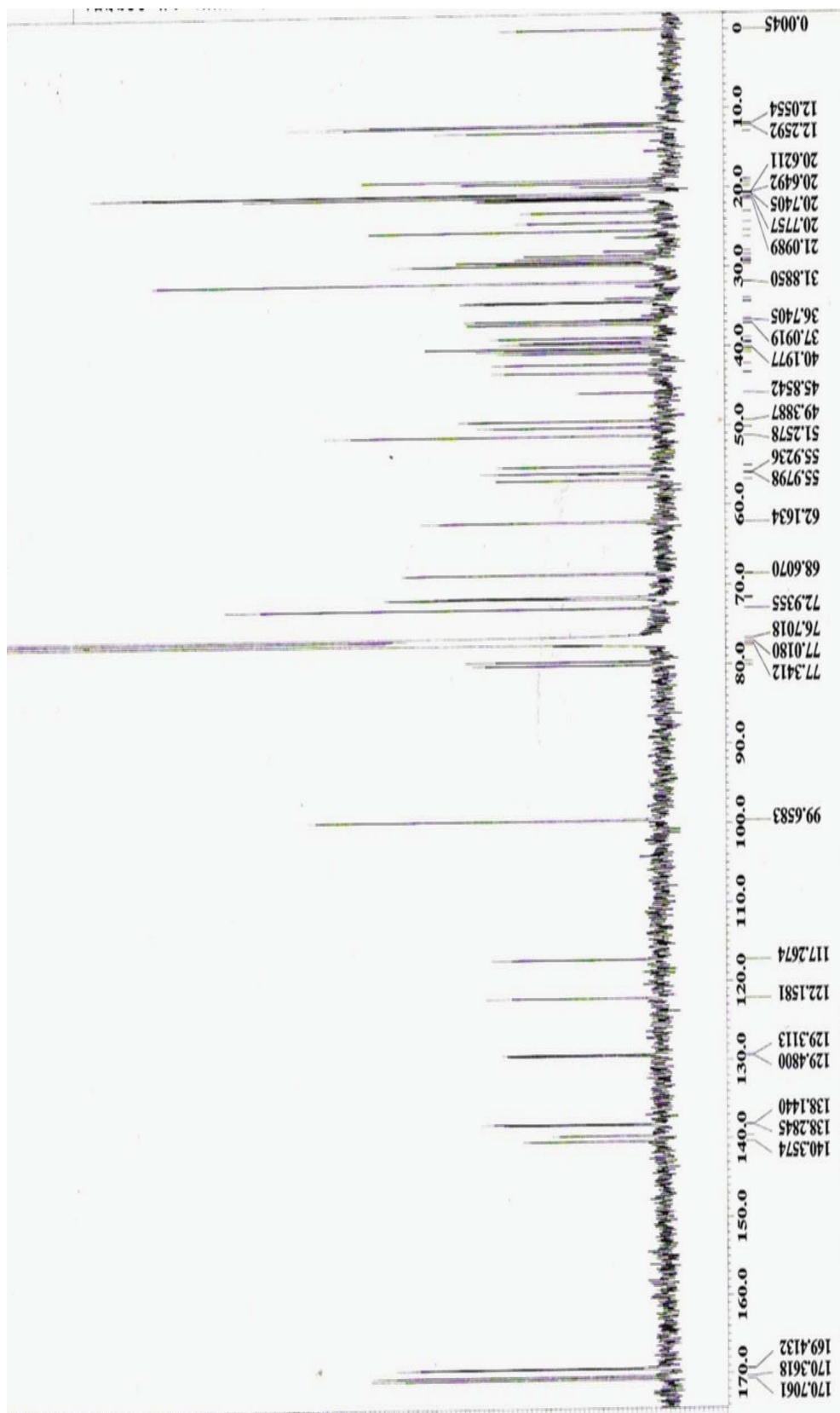


Figura 11c: Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para 10a+12a

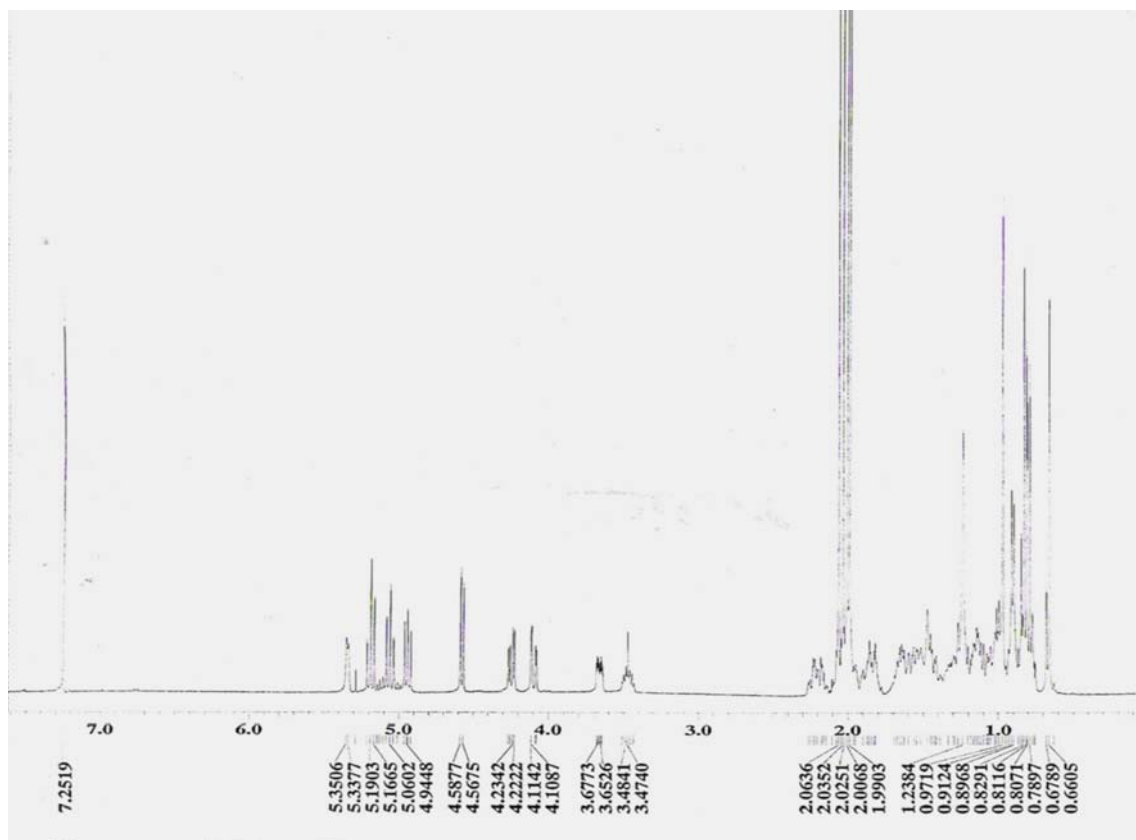


Figura 12a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para **11a**

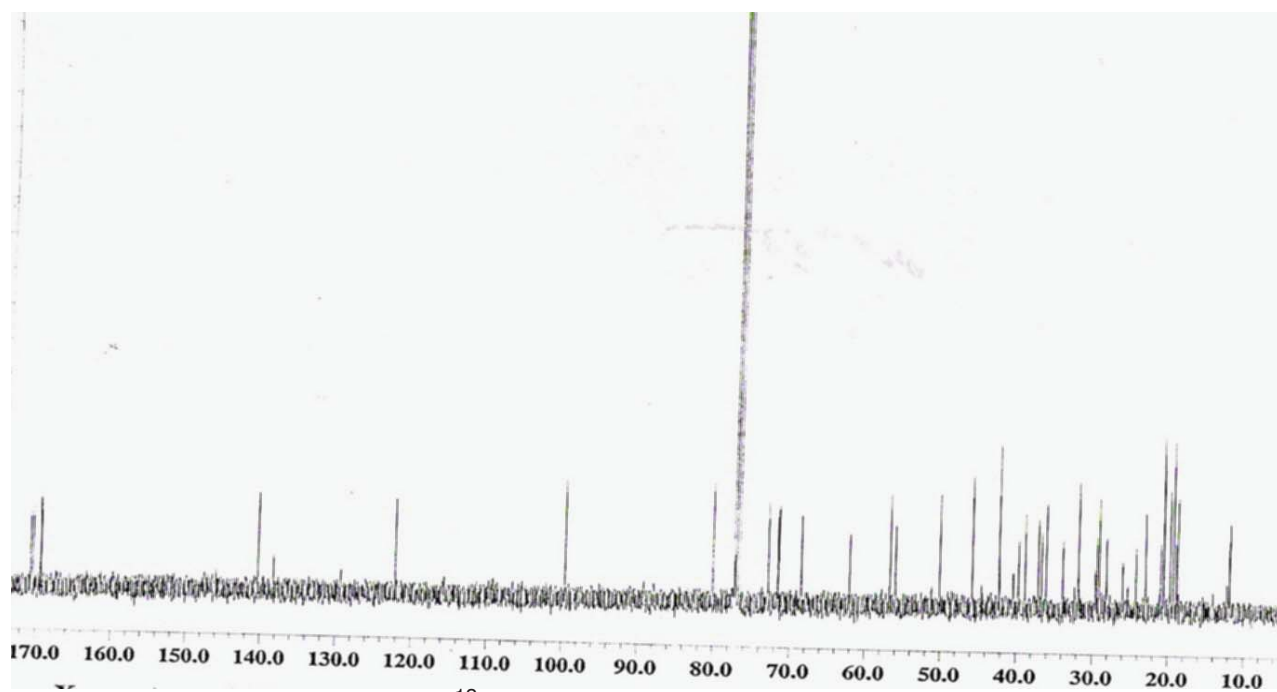


Figura 12b: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para **11a**

5.2.3 DITERPENO

A determinação estrutural da substância **13** foi feita pelas análises dos espectros de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D (RMN ^1H , ^{13}C -HBBD, ^{13}C -APT) e 2D [^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) e ^1H - ^1H -NOESY], (Figuras 13a -13i) alteração do solvente utilizado para obtenção de espectros de melhorou a resolução dos sinais observados principalmente para RMN ^1H (Tabela 7).

A feição e valores de frequência dos sinais no espectro RMN ^1H indica a presença de um composto de natureza glicosídica reconhecida pelos sinais entre δ_{H} 3,35 – 3,37 ppm (H-2' – H-5') e o sinal duplete em δ_{H} 5,41 (d, J= 7.8) que no espectro HMQC correlaciona com o sinal em δ_{C} 95,49 de carbono anomérico correspondente ao CH-1' confirmando a presença de uma unidade de açúcar. O sinal observado no espectro de ^{13}C -APT como um CH₂ em δ_{C} 62,42 e que mostra interação no espectro HMQC com os hidrogênios em δ_{H} 3,82 (dl,11.8,) e 3,58 (dd, 11,8, 4,0) foram atribuídos ao CH₂-6' da unidade glicopiranosídica.

Análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado e ^{13}C -APT permitiu propor a fórmula parcial C₆(CH)₈(CH₂)₁₀(CH₃)₂ totalizando 26 carbonos sendo seis deles da unidade açúcar e os 20 restantes correspondentes a um esqueleto diterpênico. Os sinais referentes aos grupos metil observados em δ_{C} 29,16 e 18,39 apresentam correlação no espectro de HMQC com os simpletos em δ_{H} 1,23 e 1,09 e foram atribuídos as metilas CH₃-18 e CH₃-20 respectivamente. Os grupos carbonila e vinila foram caracterizados pelos δ_{C} 178,66 (C=O -19), 160,8(=C -16) e 108,69 (=CH₂-17) e pelos sinais para dois hidrogênios metilênicos de carbonos sp² em δ_{H} 5,14 (s) e 5,05 (s) presentes no espectro RMN ^1H . A confirmação pode ser observada pelas interações no espectro HMQC entre estes hidrogênios e o C-17.

A interação dos hidrogênios H-17 foram observadas no espectro HMBC a três ligações com os carbonos em δ_{C} 42,44 e 78,73 atribuídos aos carbonos C-13 e C-15 caracterizando a estrutura de um diterpeno caurênico com oxigenação na posição C-15 mostrando interação no espectro HMQC com o hidrogênio em δ_{H} 4,50 (s, CH-15) que apresenta correlação observada no

espectro HMBC a duas ligações com o carbono C-16 e a três ligações com 2H-17. Os valores atribuídos e as correlações observadas estão resumidos na Tabela 7.

As correlações observadas no espectro ^1H - ^1H -COSY [Figura 13i(1)] e as interações espaciais observadas no espectro ^1H - ^1H -NOESY permitiram propor a estereoquímica relativa. A medida obtida de rotação óptica $[\alpha]_{25}^{\text{D}} = -87$ (em MeOH) e comparação com dados descritos na literatura para o diterpeno **13** permitiu deduzir a estrutura do (-) - $4R,5S,10R,9R,8R,13R,15R$ - 9,15-diidroxicauran-16 em-19-ato de β -D-glicopiranosila (Torrenegra, R.; *et al.*, 1999).

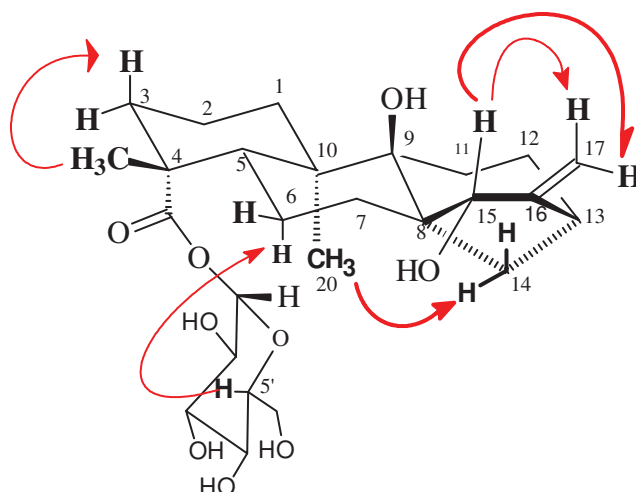
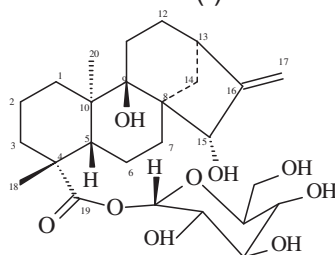


Figura 13i(1): Correlações observadas no espectro ^1H - ^1H -COSY e as interações espaciais observadas no espectro ^1H - ^1H -NOESY

Tabela 7: Dados de RMN uni e bidimensionais de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4 e MeOD- d_4 +piridina- d_5) do diterpeno **13**, multiplicidade e constante de acoplamento J em Hz em ().



13
13a =Derivado acetiladc

C	13 (MeOD)		HMBC		13 (MeOD+Py)	
	δ_c	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_c	δ_H
4	45,26	-	3H-18		45,17	-
8	54,14	-	H-15		54,13	-
9	78,05	-		3H-20	77,82	-
10	45,73	-	3H-20		48,35	-
16	160,80	-	H-15; 2 H-17		160,92	-
19	178,66	-		H-1', 3H-18	178,44	-
CH						
5	51,48	1,69		3H-18, 3H-20	51,39	1,83 (m)
13	42,44	2,64 (sl)		2H-17	42,39	2,63 (sl)
15	78,73	4,50 (s)		2H-17	78,89	4,64 (s)
1'	95,59	5,41 (d; 7,8)			95,67	5,58 (d; 7,8)
2'	74,08				74,14	3,53 (m)
3'	78,73				78,89	3,49 (m)
4'	71,12				71,18	3,55 (m)
5'	78,35				78,28	3,58 (m)
CH₂						
1	33,30	1,46 (ddl)		3H-20	33,00	1,21 (dl)
2	20,12	1,67			20,14	1,75 (m)
3	38,85	1,94		3H-18	39,00	2,18
6	22,14	1,89 (s)			22,17	1,79 (m)
7	31,17	1,27 (s)			32,00	1,96 (s)
11	30,76				30,00	1,93 (m)
12	34,88				35,00	1,79 (m)
14	37,71	2,16		H-15	37,50	2,19 (m)
17	108,69	5,14 (s) 5,05 (s)			108,59	5,20 (s) 5,16 (s)
6'	62,42	3,82 (dl; 11,8) 3,58 (dd; 11,8; 4,0)			62,42	3,94 (dd, 2.2) 3,80 (dd, 4.8)
CH₃						
18	29,16	1,23 (s)			29,19	1,14 (s)
20	18,39	1,09 (s)			18,44	1,30 (s)

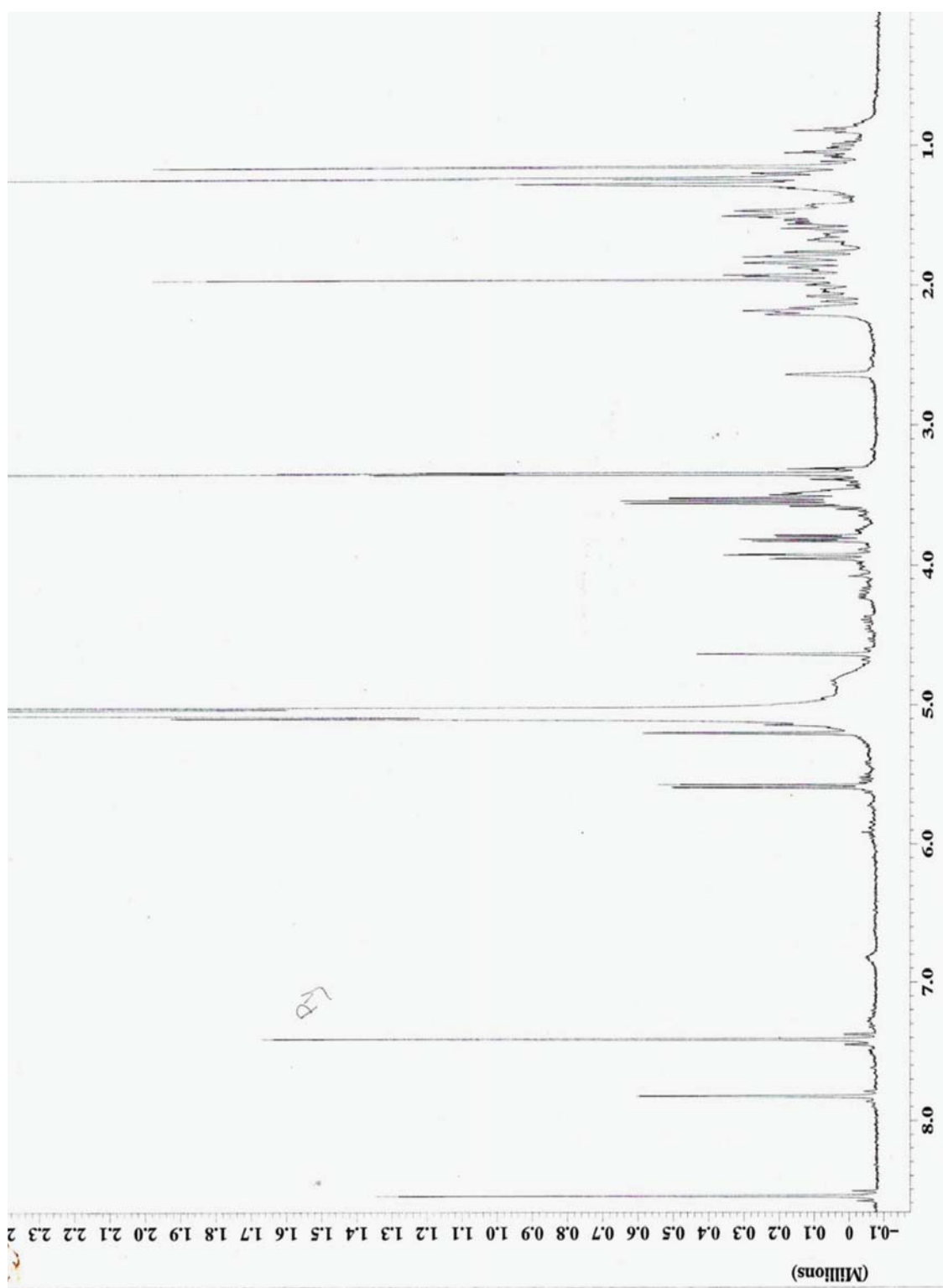


Figura 13a: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$ +piridina- d_5) para **13**

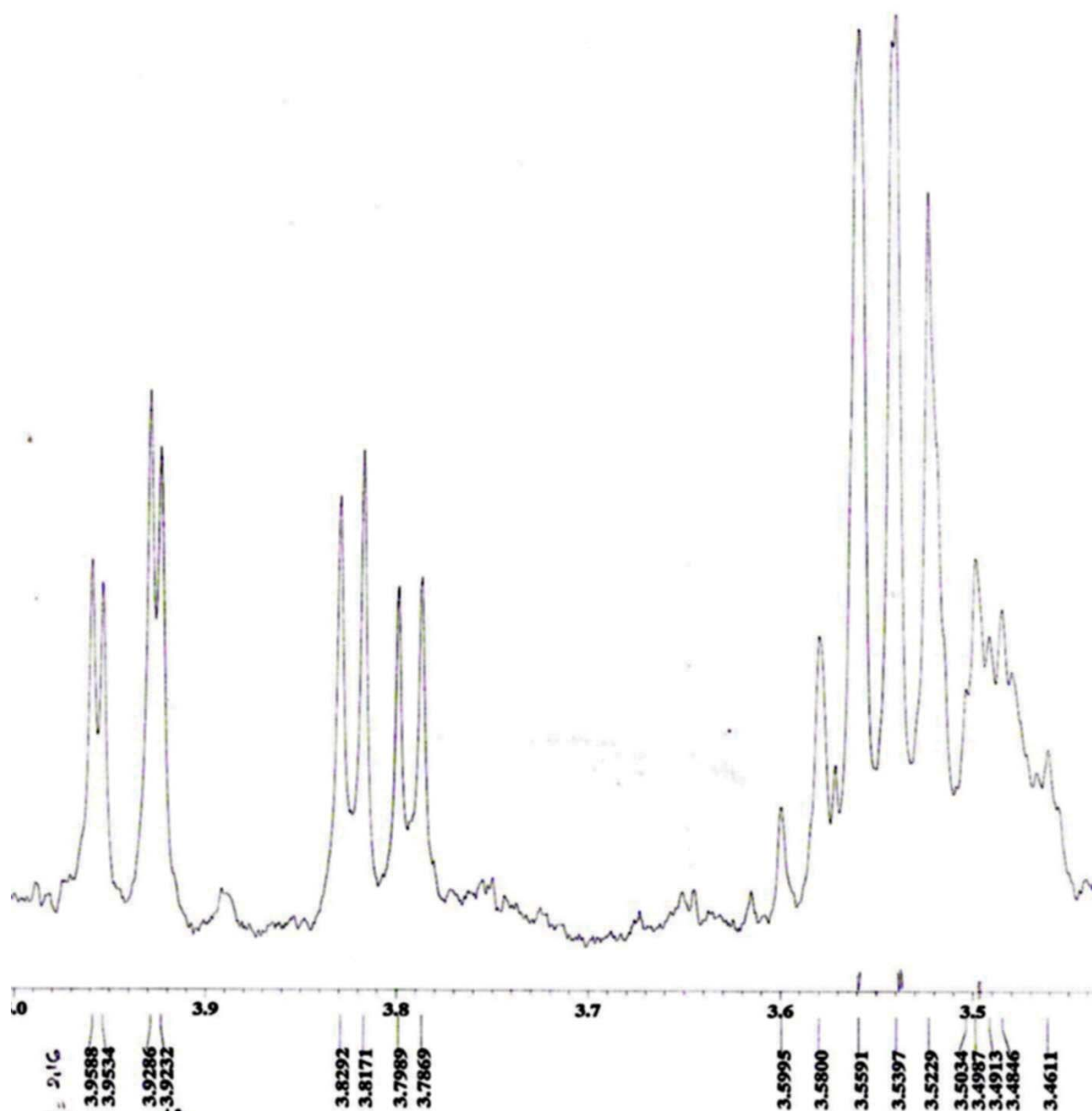


Figura 13b: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$ +piridina- d_5) para **13**

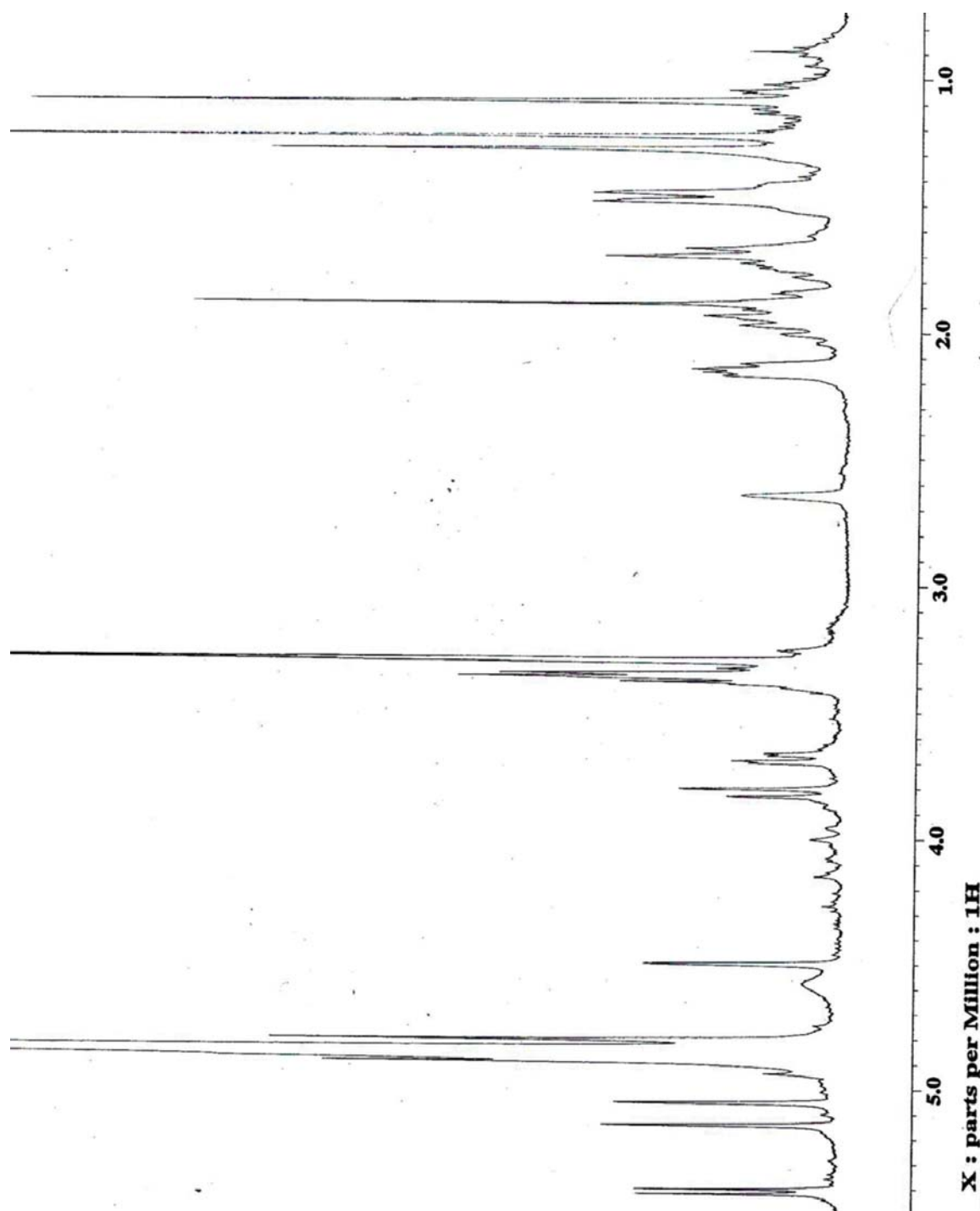


Figura 13c: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) para o composto 13

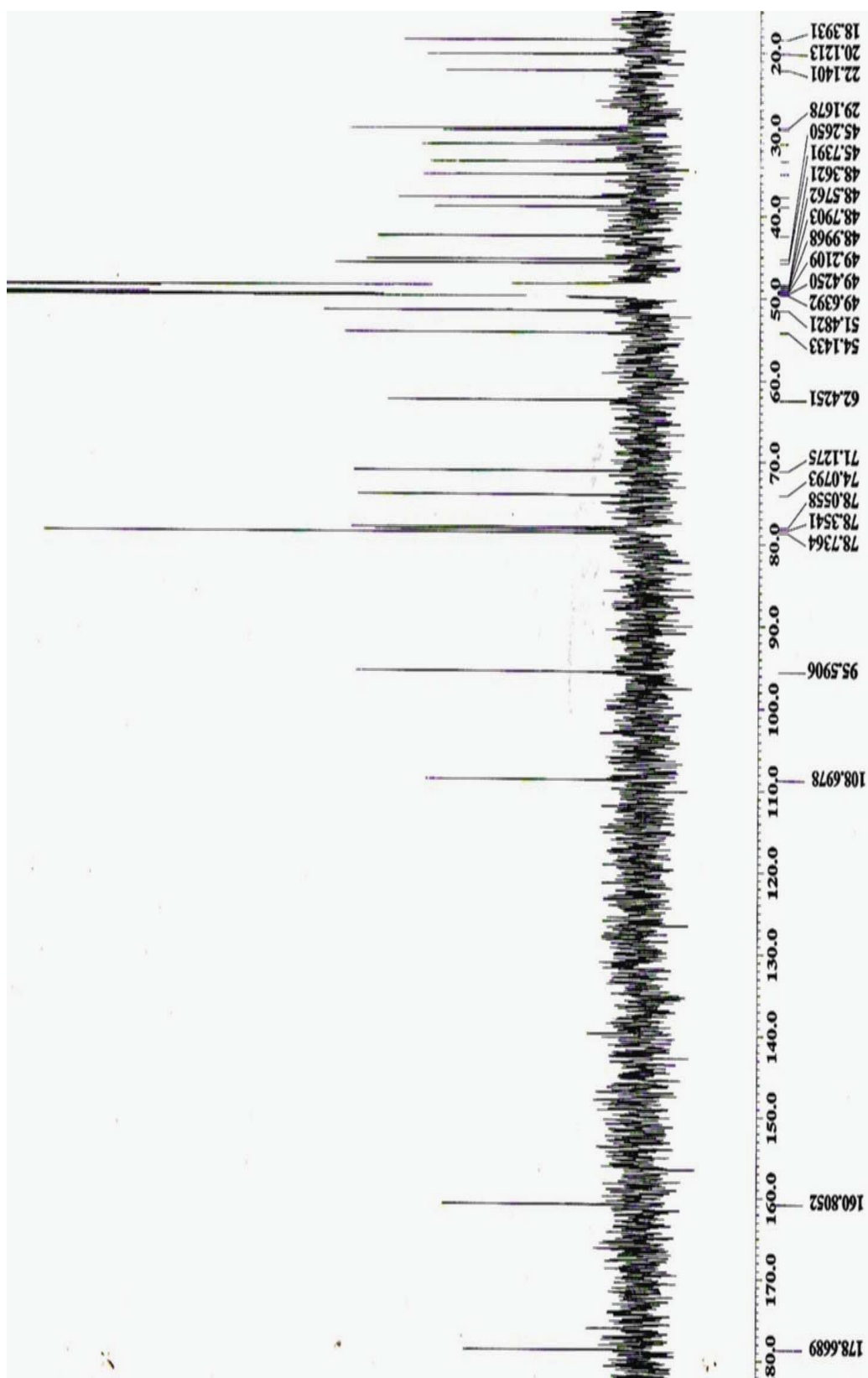


Figura 13d: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) para o diterpeno 13

Figura 13e: Expansão do espectro de RMN HMQC (400 MHz, MeOD- d_4) de **13**.

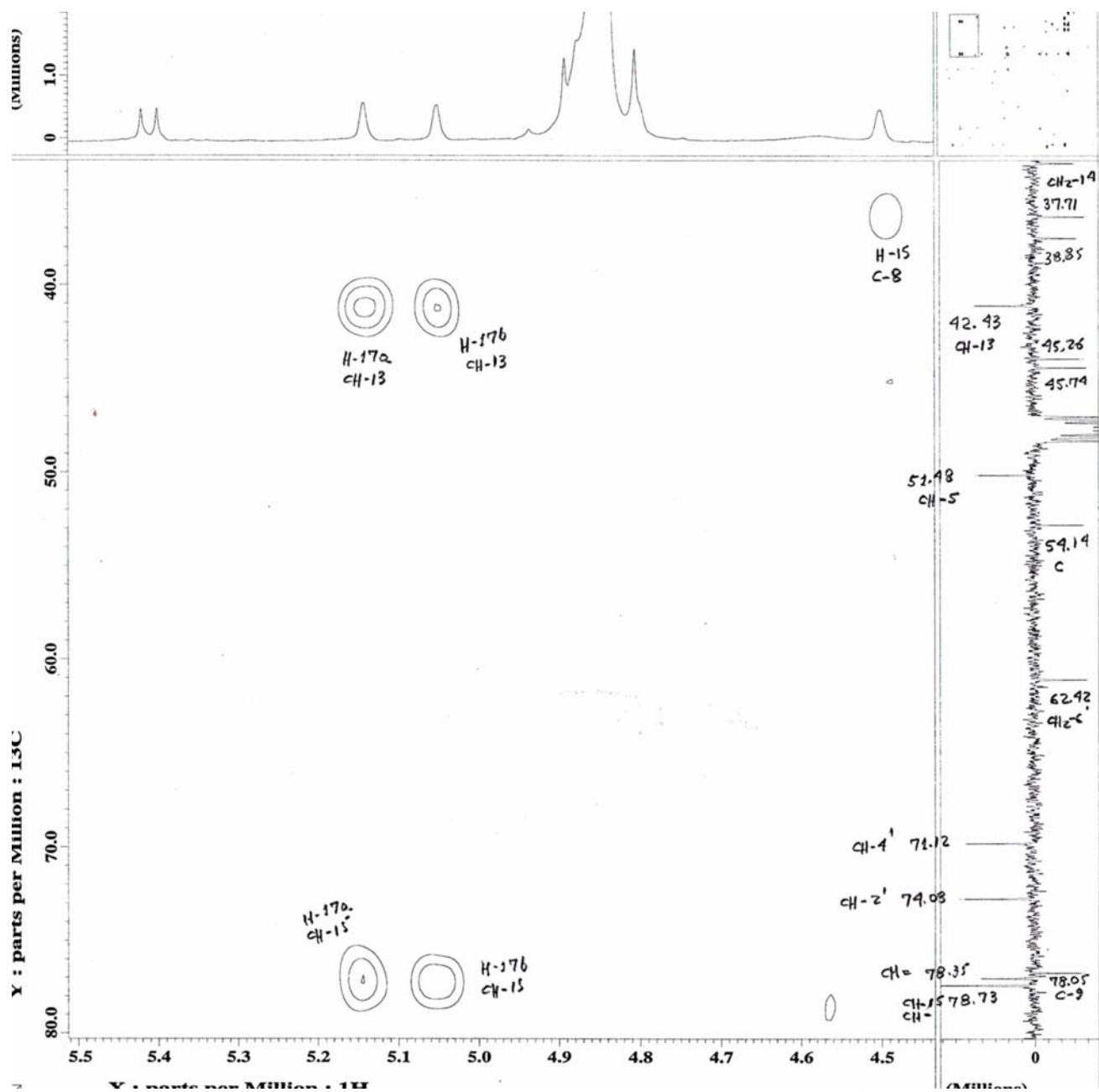


Figura 13f: Expansão do espectro de RMN HMBC (400 MHz, MeOD- d_4) de 13.

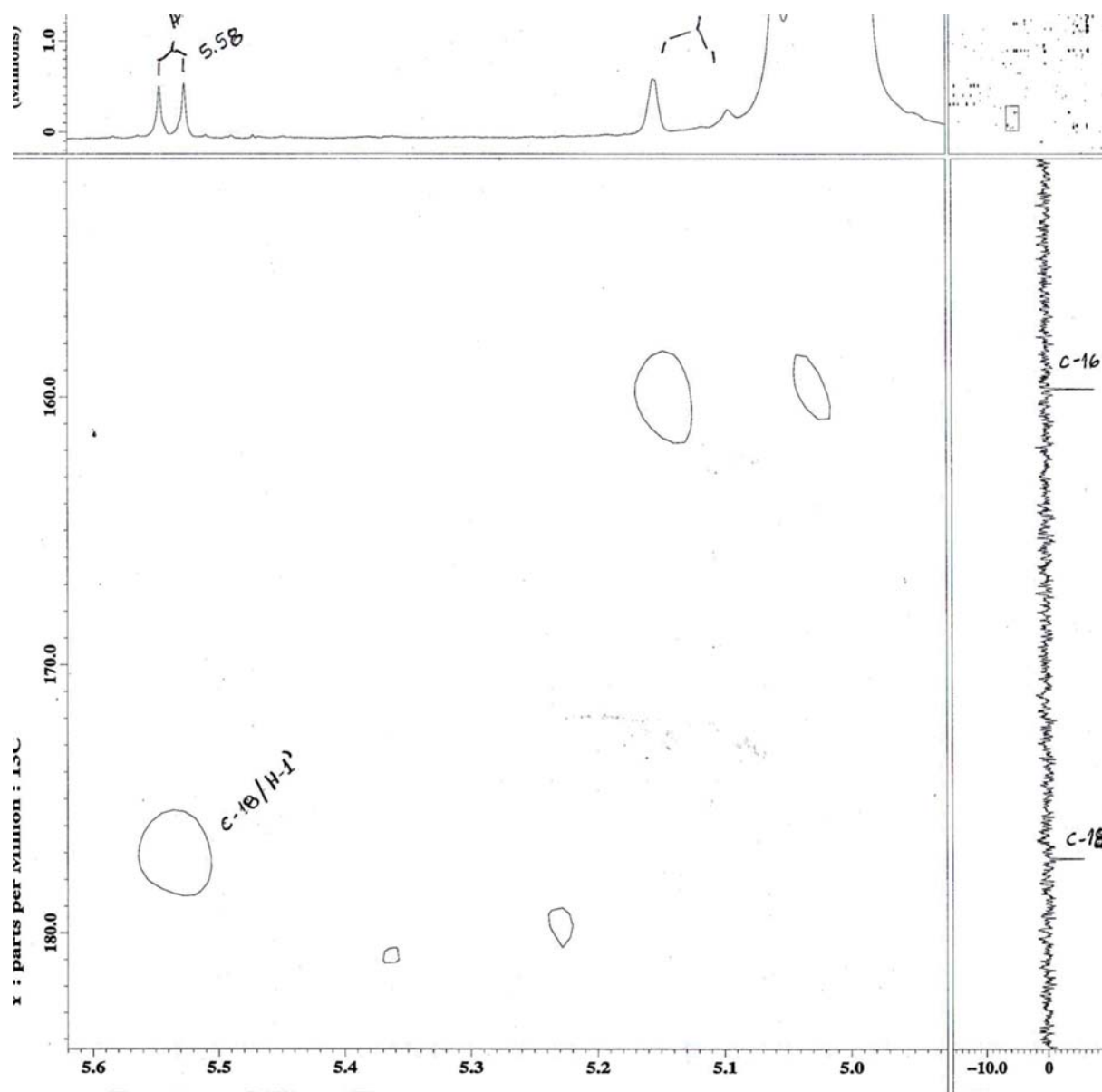


Figura 13g: Expansão do espectro de RMN HMBC (400 MHz, MeOD-*d*₄) de

13.

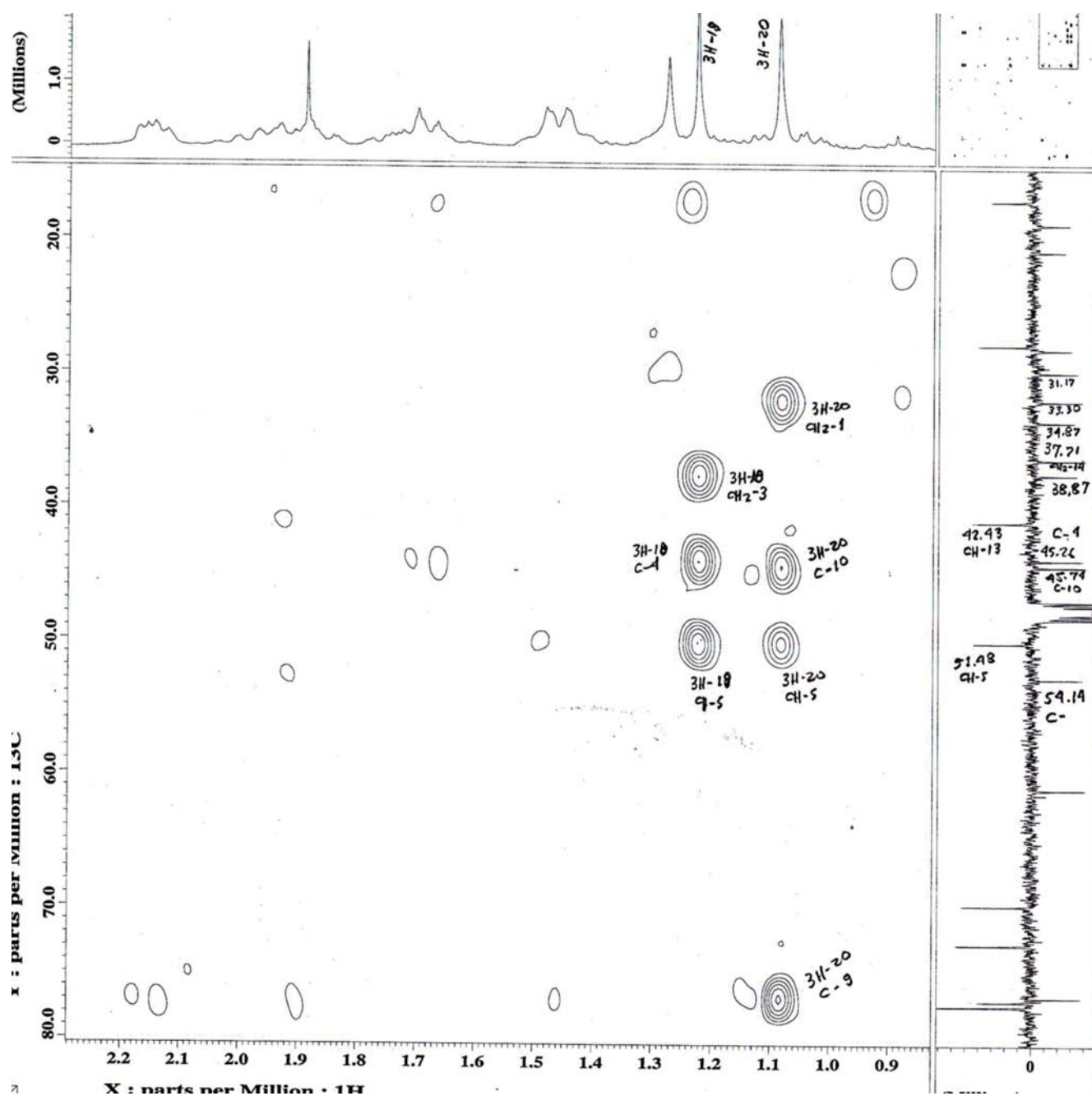


Figura 13h: Expansões do espectro de RMN HMBC (400 MHz, MeOD- d_4) de 13

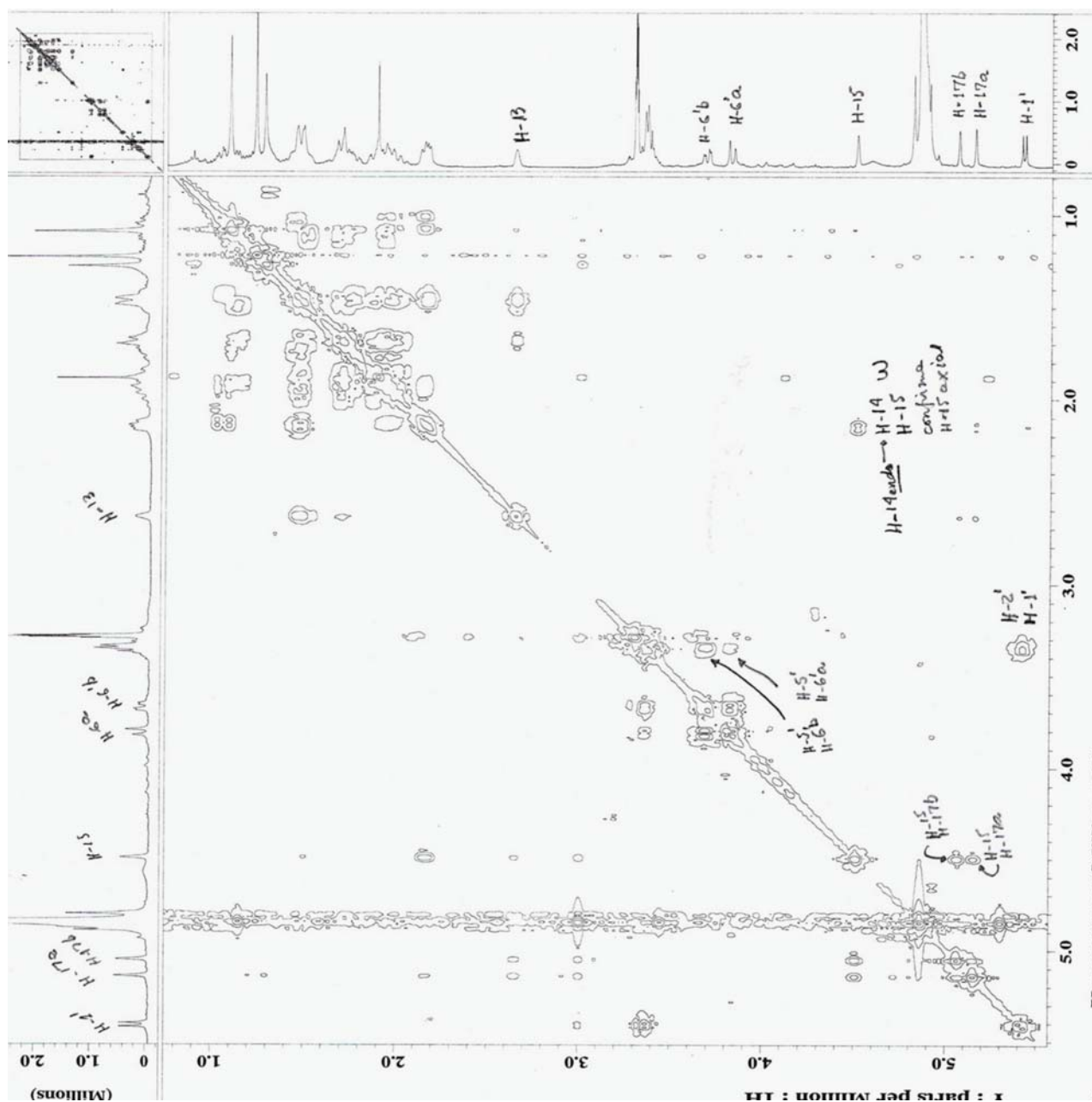


Figura 13i(2): Espectro de RMN ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, MeOD- d_4) de 13.

5.2.4 DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO

Os derivados do ácido cinâmico isolados neste trabalho são importantes intermediários para a biossíntese de cumarinas, xantonas e cromonas. A fotoisomerização da ligação dupla do ácido cinâmico $E \rightarrow Z$ leva a formação de cumarina por lactonização espontânea do isômero Z.

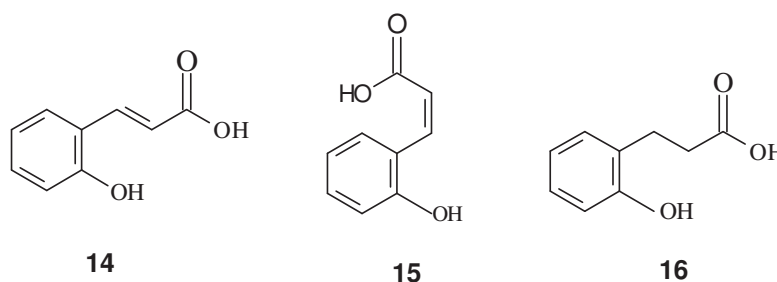
As substâncias **14**, **15** e **16** foram identificadas em mistura. A elucidação das estruturas para estes compostos foi possível através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figura 15c-f). O cromatograma (Figura 15b) obtido para a amostra contendo estas substâncias mostrou três picos sendo um deles majoritário na mistura. O espectro de RMN ^1H mostrou vários sinais duplicados na região de hidrogênios aromáticos com intensidades diferentes. A análise dos deslocamentos químicos, a multiplicidade e os valores das constantes de acoplamento (J) dos sinais em δ_{H} 6,97 (dl, 7,7; H-3E), 6,98 (dd, 7,7, 1,8, H-4E), 7,85 (tl, H-5E) e 7,37 (dd, 8,6, 2,9, H-6E); 6,81 (d, 7,0, H-3Z), 7,14 (dd, 7,0, 1,8, H-4Z), 7,16 (tl, 7,0, H-5Z) e 7,62 (dd, 8,8, 1,6, H-6Z) além dos sinais 6,78 (dl, H-3D), 7,05 (dd, 7,8, 1,6, H-4D), 6,76 (tl, H-5D) e 7,45 (dd, 7,8, 1,6, H-6D) permitiram reconhecer a presença de três anéis aromáticos *orto*-dissubstituídos atribuídos para os compostos **14**, **15** e **16**, respectivamente.

Sinais correspondentes a hidrogênios olefínicos conjugados observados em δ_{H} 7,86 (d, 16,1, H-7E), 6,55 (d, 16,1, H-8E) e 7,94 (d, 9,4, H-7Z), 6,42 (d, H-8Z) foram atribuídos para os isômeros *E* (**14**) e *Z* (**15**), respectivamente. Para a substância **16** (Diidro) os deslocamentos referentes aos hidrogênios H-7 e H-8 foram observados em 2,84 (t, 7,2, H-7D) e 2,51 (t, 7,2, H-8D). As intensidades dos sinais referentes aos hidrogênios H-7 e H-8 para as três moléculas permitiu deduzir que a substância **14** é o componente majoritário na mistura seguida de **16** e tendo a substância **15** como componente minoritário.

No espectro de RMN ^{13}C pode-se observar sinais referentes a presença de carbonila em δ_{C} 173,51 (C=O-9, **14** e **15**) e 162,50 (C=O-9, **16**). A comparação dos dados com os modelos descritos na literatura (POURCHERT, C.J.; *et al.*, 1993) serviram de referência para as atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C . Na Tabela 8 encontram-se os valores

atribuídos para δ de ^1H e ^{13}C para as substâncias **14**, **15** e **16** derivados do ácido cinâmico *orto*-hidroxilados.

Tabela 8: Dados RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD- d_4) para as substâncias **14**, **15** e **16**, multiplicidade e valores de constante de acoplamento em (°).



C	14 <i>E</i>		15 <i>Z</i>		16 Diidro	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	121,89	-	123,37	-	132,73	-
2	157,81	-	157,81	-	156,34	-
9	173,51	-	173,51	-	162,50	-
CH						
3	116,62	6,97 (dl, 7,7)	116,92	6,81 (d, 7,0)	115,74	6,78 (dl)
4	128,21	6,98 (dd, 7,7, 1,8)	129,51	7,14 (dd, 7,0, 1,8)	130,57	7,05 (dd, 7,8, 1,6)
5	120,66	7,85 (tl)	120,66	7,16 (tl, 7,0)	121,89	6,76 (tl)
6	129,51	7,37 (dd, 8,6, 2,9)	131,81	7,62 (dd, 8,8, 1,6)	131,13	7,45 (dd, 7,8, 1,6)
7	139,95	7,86 (d, 16,1)	139,95	7,94 (d, 9,4)	-	-
8	120,66	6,55 (d, 16,1)	116,92	6,42 (d, 9,4)	-	-
CH₂						
7	-				27,59	2,84 (t, 7,2)
8	-				37,56	2,51 (t, 7,2)

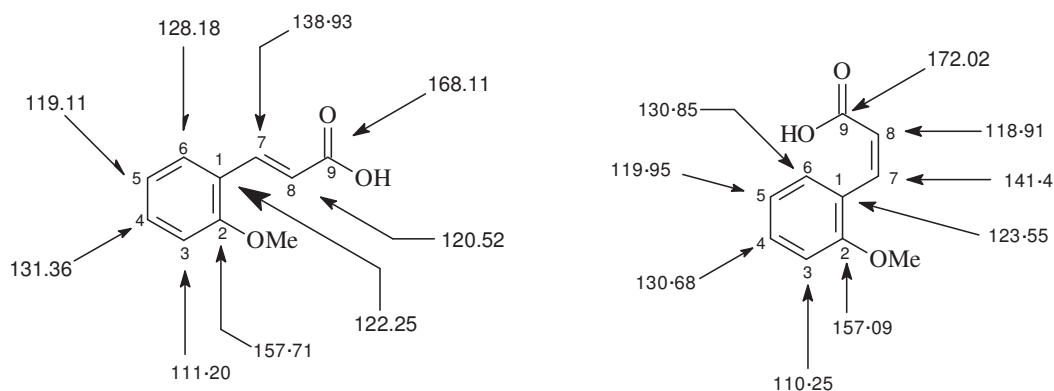


Figura 15a: Modelos utilizadas para a comparação de dados e atribuição dos δ_{C}

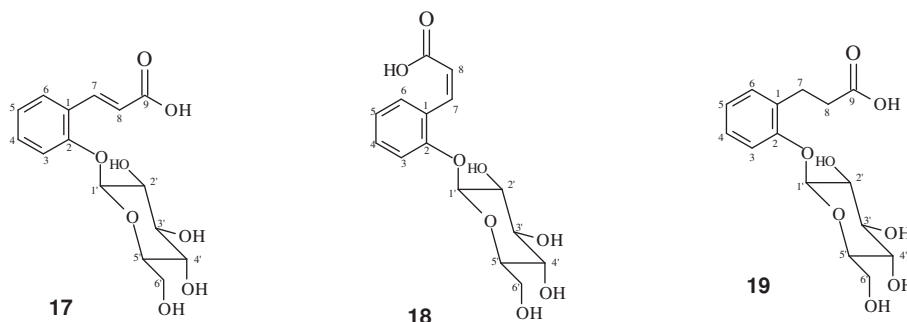
A elucidação estrutural das substâncias **17**, **18** e **19** baseou-se na análise de dados fornecidos por métodos espectrométricos, principalmente, RMN ^1H (400MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D (RMN RMN ^1H , ^{13}C -HBBDD, ^{13}C -APT) e 2D [^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) e ^1H - ^1H -NOESY], (Figuras 16 a-h). As substâncias **17-19** foram identificadas em mistura.

A feição do espectro RMN ^1H apresenta sinais entre 3,38 e 3,90 ppm sugerindo a presença de açúcar na molécula, o que pode ser confirmado pelos sinais referentes aos carbonos anoméricos em δ_{C} 102,43 e 102,58 este último com intensidade consistente para a sobreposição de dois carbonos CH-1' de unidades glicosídicas. Estes dados junto com os sinais observados em 62,55 e 62,48 (sinal forte) identificados no espectro de ^{13}C -APT como carbonos metilênicos e que mostram correlações a uma ligação no espectro HMQC com os hidrogênios em δ_{H} 3,91-3,84 e 3,72-3,65 confirmam a presença de três unidades glicopiranosídicas. Interações a três ligações observadas no espectro HMBC entre o H-1' [δ_{H} 4,97 (d, 7,7 para **17**), 4,92 (d, 7,7 para **18**) e 4,90 (d, 7,5 para **19**)] e os carbonos em δ_{C} 157,49, 156,53 e 157,00 atribuídos aos carbonos quaternários aromáticos C-2 para **17**, **18** e **19**, respectivamente, confirmam a posição do glicopiranosil no carbono -2.

Os espectros unidimensionais RMN ^1H (subtraindo-se os sinais referentes as unidades de açúcar) são semelhantes aos espectro RMN ^1H para as moléculas **14** – **16** observadas pelos sinais em δ_{H} 2,60 (t, 7.8) e 2,95 (m) correspondentes aos CH₂-7 D e CH₂-8 D que no espectro HMQC apresenta correlação com os carbonos em δ_{C} 27,07 e 35,63 identificados no espectro de ^{13}C -APT como carbonos metilênicos atribuídos aos C-7 e C-8 para o composto **19** derivado do ácido cinâmico hidrogenado. Sinais característicos para os isômeros *E* e *Z* foram observados no espectro RMN ^1H em δ_{H} 8,08 (d, 16,1), 6,52 (d, 16,1) e 7,22 (d, 12,5) 5,97 (d, 12,5) que apresentam correlação a uma ligação observadas no espectro HMQC com os carbonos em δ_{C} 140,72, 120,19 e 137,57, 122,43 respectivamente, estes sinais são identificados no espectro de ^{13}C -APT como carbonos metínicos atribuídos aos CH-7 e CH-8 respectivamente para os isômeros **17** e **18**, ainda neste espectro podem ser observados os sinais correspondentes a carbonos quaternários em δ_{C} 171,71, 171,33 e 177,93 referentes aos C=O – 9 para **17**, **18** e **19** respectivamente.

Na Tabela 9 estão resumidas as atribuições dos deslocamentos químicos observados para ^1H e ^{13}C e as correlações observadas nos espectros bidimensionais. Espectros de ^1H - ^1H - COSY e ^1H - ^1H -NOESY forneceram informações das interações dos hidrogênios que serviram para confirmar as atribuições dos δ_{H} para os compostos **17**, **18** e **19** (Figura 16h).

Tabela 9: Dados de RMN 1 e 2D ^1H (400MHz, MeOD) e ^{13}C (100 MHz) dos compostos **17**, **18** e **19** [multiplicidade e constantes de acoplamento J em Hz em ()].



C	17 <i>E</i>				18 <i>Z</i>				19 <i>Diidro</i>	
	HMQC		HMBC		HMQC		HMBC		HMQC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	125,55	-		H-5, H-8	126,97	-		H-8	131,51	-
2	157,49	-		H-1', H-4,H-6	156,53	-		H-1'	157,00	-
9	171,71	-		H-7	171,33	-		H-4, H-6	177,83	-
CH										
3	116,90	7,24 (dl, 8,0)	H-4	H-5	116,41	7,17 (dl, 7,7)			116,28	7,15 (d, 7,3)
4	132,64	7,35 (dl, 8,0, 1,8)		H-6	131,06	7,27 (dt, 7,7, 1,1)		H-6	128,70	7,27 (tl)
5	123,58	7,04 (tl, 8,0)		H-3	122,78	6,94 (tl, 7,7)		H-3	123,39	6,92 (dd)
6	128,25	7,61 (dd, 8,0, 1,8)		H-4,H-7	131,43	7,54 (dd, 7,7;1,1)		H-4	130,97	6,90
7	140,72	8,08 (d, 16,1)		H-6	137,57	7,22 (d, 12,5)		H-6	-	2,95 (m)
8	120,19	6,52 (d, 16,1)			122,43	5,97 (d, 12,5)			-	2,60 (t, 7,8)
1'	102,43	4,97 (d, 7,7)			102,58	4,92 (d, 7,7)			102,58	4,90 (d, 7,5)
2'	75,00	3,56 (dd, 7,7, 8,8)			74,89	3,50-3,43			74,86	3,56 (dd)
3'	78,12	3,50-3,43			78,08	3,00-3,43			78,16	3,00-3,43
4'	71,37	3,42-3,38			71,28	3,42-3,38			71,28	3,42-3,38
5'	78,25	3,42-3,38			78,14	3,42-3,38			78,20	3,42-3,38
CH₂										
6'	62,55	3,91-3,84 3,72-3,65			62,48	3,91-3,84 3,72-3,65			62,48	
7	-	-			-	-			27,07	2,95 (m)
8	-	-			-	-			35,63	2,60 (t,7,8)

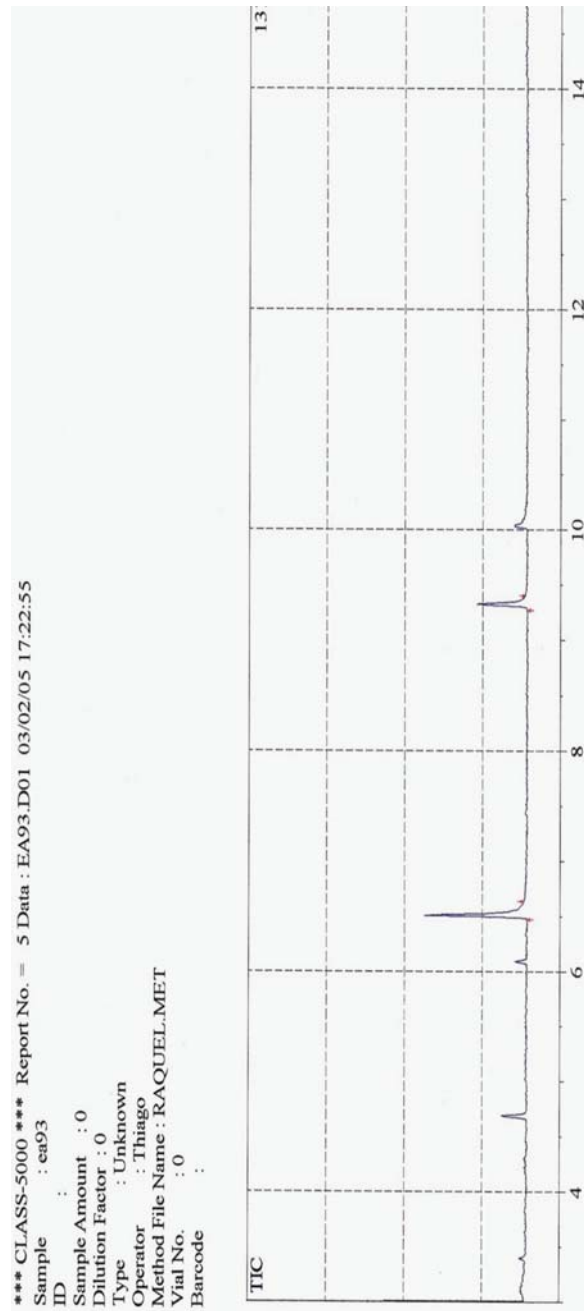


Figura 15b: Cromatograma obtido para a amostra contendo 14, 15 e 16

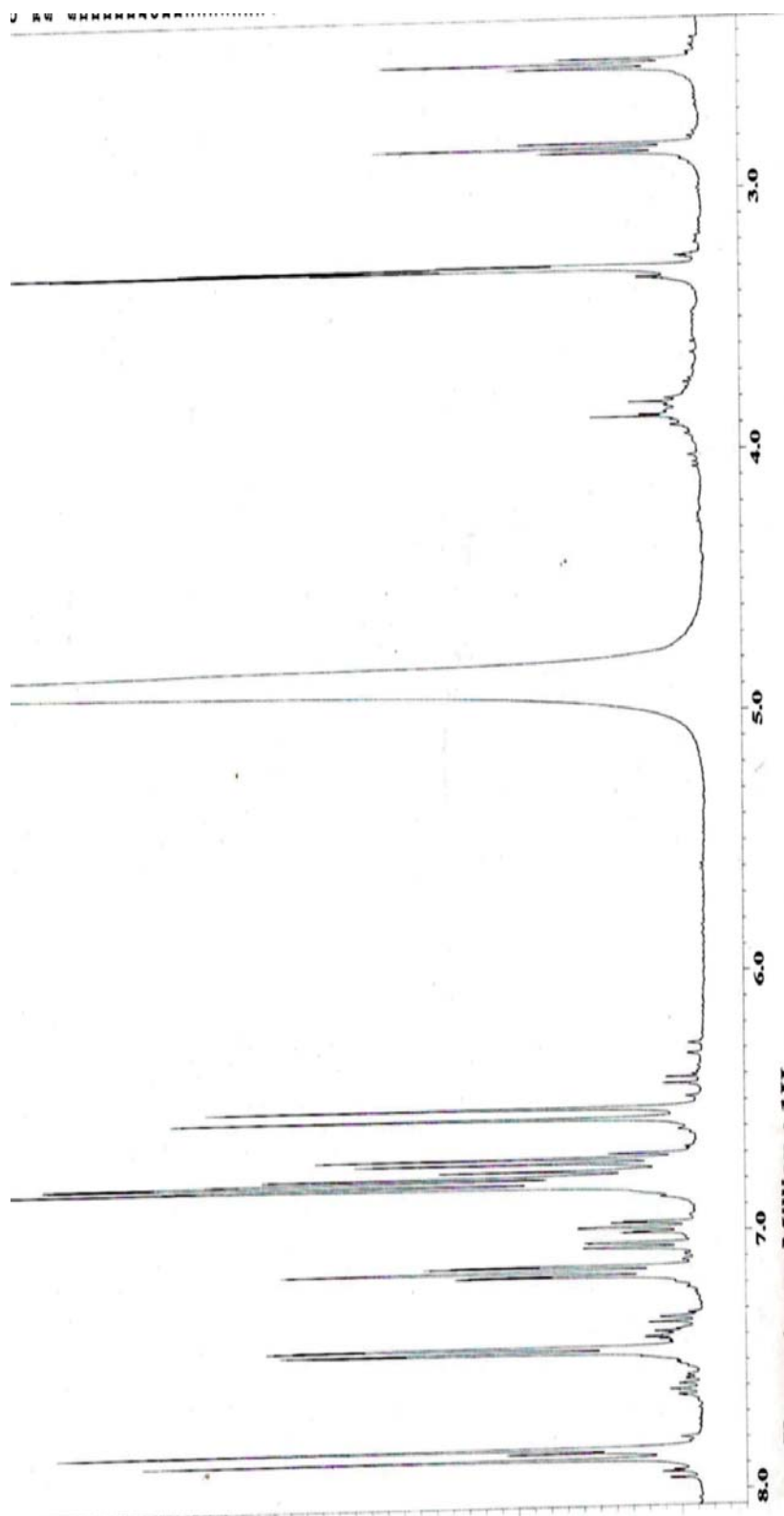


Figura 15c: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) obtido para 14, 15 e 16