UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

TERPENOS DE *Guarea guidonia* (Meliaceae) e FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS BIOMONITORADO POR LINHAGENS MUTANTES DE Saccharomyces cerevisiae

CLÁUDIA BARBOSA BROCHINI

Tese de Doutorado

Prof^a. Dr^a.Nidia Franca Roque Orientadora

SÃO PAULO -1997"Terpenos de *Guarea guidonia* (Meliaceae) e Fracionamento de Extratos Vegetais Biomonitorado por Linhagens Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*"

CLÁUDIA BARBOSA BROCHINI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica

Aprovado por:

Profa. Dra.NIDIA FRANCA ROQUE IQ - USP (Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. HELENA MARIA CARVALHO FERRAZ IQ - USP

Profa. Dra. VANDERLAN DA SILVA BOLZANI IQ - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARIA DE F. DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA UFSCar

> Prof. Dr. IVAN PÉRSIO DE ARRUDA CAMPOS UNIP

> > SÃO PAULO 21 DE AGOSTO DE 1997

esta tese é dedicada

Aos meus pais José Carlos e Darli

Aos meus irmãos e irmã Antonio Carlos, José Augusto e Fernanda

,

À memória da minha avó Liuba Moscaliuc Barbosa

O meu muito obrigada

À orientadora e amiga Nidia Franca Roque

Ao Dr. David G.I. Kingston

Aos professores Massayoshi Yoshida e Massuo Jorge Kato

À professora Vanderlan da Silva Bolzani

Ao Dr. Leslie Gunatilaka

Aos amigos: Ana Luisa, Alberto, Alexander, Beto, Cecilia, Clara, Dulce, Ernani, Fernanda, Isabel, Kennia, Leandro, Luciana, Lucianinha, Mariana, Mônica Vitória, Paulo Brandão e Sérgio

À amiga Nina Jo Baj

Aos amigos: Willian, Maria Helena, Lidia, Leandro, Cezar e Dina

À Beth, Doriana, Milvia e Patricia

À Helena Khouri

Ao Walmir, Fernanda e Cláudia Young, por coletarem os materiais vegetais

Aos funcionários da Central Analítica, em especial ao Roque

Ao Gilberto, pelos cálculos de energia molecular

Ao CNPq, pelas bolsas de estudo concedidas

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	111
ÍNDICE DE ESQUEMAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ESPECTROS	VIII
ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
APRESENTAÇÃO DA TESE	XVI
OBJETIVOS	XVII
TERPENOS DE Guarea guidonia	
INTRODUÇÃO	1
A família Meliacea A. Juss.	1
<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	8
EXPERIMENTAL	11
Procedimentos experimentais utilizados	11
Preparação de placas cromatográficas preparativas de sílica	
impregnada com AgNO₃	11
Adsorção de AgNO $_3$ à sílica para cromatografia em coluna	1 1
Cromatografia a gás	12
Especificações do material e instrumentos utilizados	12
Coleta e identificação do material vegetal	14
Estudo do extrato metanólico das folhas de Guarea guidonia	15
Obtenção e partição do extrato	15
Isolamento dos constituintes químicos	15
Fracionamento do extrato hexânico	15
Fracionamento cromatográfico de a-1	17

Fracionamento cromatográfico de a-9	21
Dados físicos para os diterpenos D-3 e D-4	24
Outras frações da Coluna a	25
Análise do óleo essencial das folhas de Guarea guidonia	26
Obtenção e fracionamento do óleo essencial	26
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	35
DITERPENOS	35
Identificação estrutural de D-2	39
Identificação estrutural de D-1	44
Determinação estrutural de D-3 e D-4	47
Análise dos espectros de RMN bidimensionais para D-3	49
Análise dos espectros de RMN bidimensionais para D-4	53
Considerações sobre as estruturas de D-2, D-3 e D-4	58
Identificação do sitosterol	61
SESQUITERPENOS	62
O óleo essencial bruto	63
Determinação do esqueleto carbônico dos sesquiterpenos	63
Elucidação estrutural dos sesquiterpenos de esqueleto	
eudesmânico (S-1 a S-8)	71
Elucidação estrutural do sesquiterpeno de esqueleto guaiânico	
(S-9)	81
FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS BIOMONITORADO	
POR LINHAGENS MUTANTES DE Saccharomyces cerevisiae	
INTRODUÇÃO	85
Estratégias empregadas para o descobrimento de novas drogas	
anticancerígenas	86
Bioensaios guiados pela doença	86
Bioensaios baseados no mecanismo de ação de drogas	88
O bioensaio do fungo Saccharomyces cerevisiae	91

П

O uso do bioensaio do fungo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no	
fracionamento biomonitorado de extratos naturais	91
Principio do bioensaio com o fungo Saccharomyces cerevisiae	93
Metodologia e análise dos resultados	94
EXPERIMENTAL	97
Especificação do material utilizado	97
Extratos e frações de extratos testados	98
Estudo fitoquímico biomonitorado de um extrato	119
Fracionamento biomonitorado da fração AcOEt	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
CURRICULUM VITAE	137
ESPECTROS	139

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação morfológica da família Meliaceae	2
Tabela 2- Diterpenos presentes em espécies de Meliaceae	3
Tabela 3- Sesquiterpenos presentes em espécies de Meliaceae	6
Tabela 4- Partes estudadas, locais de coleta etipos de substâncias	
isoladas de Guarea guidonia	10
Tabela 5- Fracionamento cromatográfico da fração metanólica do extrato	
hexânico (Coluna a)	17
Tabela 6- Fracionamento cromatográfico de a-1 (Coluna b)	18
Tabela 7- Fracionamento cromatográfico de b-9 (Coluna c)	19
Tabela 8- Fracionamento cromatográfico de b-1 (Coluna d)	19
Tabela 9- Fracionamento cromatográfico de d-3 (Coluna e)	20
Tabela 10- Fracionamento cromatográfico de a-9 (Coluna f)	21

Ш

Tabela 11- Fracionamento cromatográfico de g-17/g-23 (Coluna h)	22
Tabela 12- Constituintes presentes no óleo essencial da folhas de G.	
guidonia em proporção maior que 1%	26
Tabela 13- Fracionamento cromatográfico do óleo essencial das folhas	
de <i>G. guidonia</i> (Coluna i)	28
Tabela 14- Fracionamento cromatográfico de I-2 e I-3 (Coluna j)	31
Tabela 15- Dados de RMN de ¹³ C para os diterpenos isolados de <i>G</i> .	
guidonia e para as substâncias modelos	36
Tabela 16- Dados de RMN de ¹ H para os diterpenos D-2, D-3 e D-4	
isolados de G. guidonia e para as substâncias modelos	37
Tabela 17- Dados de RMN para o diterpeno D-1 isolados de <i>G. guidonia</i>	
e para biciclogermacren-13-al	38
Tabela 18- Dados de RMN para D-2	41
Tabela 19- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-2	42
Tabela 20- Dados de RMN para D-1	45
Tabela 21- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-1	46
Tabela 22- Fragmentos observados no espectro de massas de D-3 e	
D-4, obtido pela técnica de ionização química	48
Tabela 23- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-3	50
Tabela 24- Dados de RMN para D-3	50
Tabela 25- Correlações ¹³ C- ¹ H a longa distância observadas no espectro	
HMBC de D-3	51
Tabela 26- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-3	52
Tabela 27- Dados de RMN para D-4	54
Tabeia 28- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-3	55
Tabela 29- Correlações ¹³ C- ¹ H a longa distância observadas no espectro	
HMBC de D-4	55
Tabela 30- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-4	57
	50

Tabela 32- Dados de RMN para o sitosterol	61
Tabela 33- Valores dos tempos de retenção dos sesquiterpenos	
detectados nas folhas de <i>G. guidonia</i>	66
Tabela 34- Principais fragmentos observados nos espectros de massas	
dos sesquiterpenos detectados nas folhas de G. guidonia	67
Tabela 35- Dados de RMN de ¹³ C dos sesquiterpenos detectados nas	
folhas de <i>G. guidonia</i>	69
Tabela 36- Dados de RMN de ¹ H dos sesquiterpenos detectados nas	
folhas de <i>G. guidonia</i>	70
Tabela 37- Dados de RMN de ¹³ C para as substâncias modelos e S-1	72
Tabela 38- Dados de RMN para S-3	74
Tabela 39- Dados de RMN para S-5	76
Tabela 40- Acopiamentos observados no espectro HOMOCOSY de S-5	76
Tabela 41- Acoplamentos observados no espectro HOMOCOSY de S-6	79
Tabela 42- Dados de RMN de ¹³ C para alismol e S-9	84
Tabela 43- Correlações observadas no espectro HMQC de S-9	84
Tabela 44- Controles utilizados para cada linhagem de S. cerevisiae	95
Tabela 45- Determinação das concentrações para o estudo da	
dose/resposta de uma amostra considerada ativa	95
Tabela 46- Extratos e frações de extratos testados	98
Tabela 47- Resultado do ensaio preliminar para os extratos descritos na	
Tabela 46	102
Tabela 48- Dose/resposta para o extrato CH ₂ Cl ₂ :MeOH das folhas de	
Rapanea guyanensis (Extrato #25)	103
Tabela 49- Dose/resposta para o extrato AcOEt das raizes de Piper	
<i>regnellii</i> (Extrato #37)	103
Tabela 50- Dose/resposta para o extrato AcOEt das folhas de Piper	
<i>regnellii</i> (Extrato #39)	104

V

Tabela 51- Dose/resposta para o extrato CHCl₃ das folhas de <i>Piper</i>	
<i>umbelatum</i> (Extrato #44)	105
Tabela 52- Dose/resposta para o extrato CH ₂ Cl ₂ das sementes de <i>Virola</i>	
oleifera (Extrato #74)	105
Tabela 53- Dose/resposta para o extrato CHCl ₃ dos frutos de <i>Iryanthera</i>	
<i>juruensis</i> (Extrato #82)	106
Tabela 54- Dose/resposta para o extrato CHCl ₃ dos pecíolos de	
<i>Iryanthera juruensis</i> (Extrato #83)	107
Tabela 55- Dose/resposta para o extrato das partes aéreas de	
Acanthospermum australe (Extrato #101)	107
Tabela 56- Dose/resposta para o extrato #37 (segundo bioensaio)	108
Tabela 57- Dose/resposta para o extrato #39 (segundo bioensaio)	109
Tabela 58- Dose/resposta para o extrato #101 (segundo bioensaio)	109
Tabela 59- Misturas e substâncias puras testadas	110
Tabela 60- Resultado do bioensaio preliminar das misturas e	115
substâncias puras descritas na Tabela 59	
Tabela 61- Dose/resposta para a mistura #102	116
Tabela 62- Dose/resposta para a mistura #103	116
Tabela 63- Dose/resposta para a mistura #104	117
Tabela 64- Dose/resposta para a substância #106	117
Tabela 65- Dose/resposta para a mistura #110	118
Tabela 66- Dose/resposta para a substância #116	118
Tabela 67- Procedência do material testado	119
Tabela 68- Coluna da fração AcOEt em Sephadex LH-20 (Coluna k)	122
Tabela 69- Estudo da dose/resposta para as frações provenientes da	
Coluna k	123
Tabela 70- Coluna em Sephadex LH-20 das frações reunidas k-3/k-5	
(Coluna I)	123
Tabela 71- Bioensaios das frações da Coluna l	124

Tabela 72- Bioensaio das frações provenientes da CCDP de I-2/I-3	125
Tabela 73- Bioensaio das frações provenientes da CCDP de I-2/I-3	
(segundo bioensaio)	126

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1- Obtenção dos extratos das folhas de Guarea guidonia	16
Esquema 2- Fracionamento cromatográfico da fração metanólica do	
extrato hexânico	23
Esquema 3- Fracionamento cromatográfico do óleo essencial das	
folhas de <i>Guarea guidonia</i>	34
Esquema 4- Partição do extrato bioativo e resultados dos bioensaios	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas dos diterpenos presentes em Meliaceae	4
Figura 2- Estruturas dos sesquiterpenos presentes em Meliaceae	7
Figura 3- Árvore adulta e folhas de <i>Guarea guidonia</i>	9
Figura 4- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial bruto das	
folhas de <i>G. guidonia</i>	27
Figura 5- Correlações ¹³ C- ¹ H a longa distância observadas no espectro	
HMBC de D-3	51
Figura 6- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-3	53
Figura 7- Correlacões ¹³ C- ¹ H a longa distância observadas no espectro	
HMBC de D-4	56
Figura 8- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-4	57

VIII

Figura 9- Proposta biogenética para os diterpenos isolados de G.	60
guidonia	
Figura 10- Esqueletos sesquiterpênicos	65
Figura 11- Esqueletos guaiano e cadinano	82
Figura 12- Exemplos de substâncias antineoplásicas	90
Figura 13- Estruturas das substâncias puras e componentes das	
misturas testadas	111

LISTA DE ESPECTROS

ESPECTRO 1- RMN de ¹ H da fração precipitada da fração hexânica do extrato
metanólico das folhas de <i>G. Guidonia</i> (200 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 2- RMN de ¹³ C (PND) de D-2 (50 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 3- RMN de ¹³ C (DEPT 135 ^o) de D-2 (50 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 4- RMN de ¹³ C (DEPT 90 [°]) de D-2 (50 MHz, CDCI ₃)
ESPECTRO 5- RMN de ¹ H de D-2 (200 MHz, CDCI ₃)
ESPECTRO 6- RMN HOMOCOSY de D-2 (200 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 7- expansão do espectro de RMN HOMOCOSY de D-2 (espectro 6)
ESPECTRO 8- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹ H - ¹³ C) de D-2
(200 e 50 MHz, CDCI ₃)
ESPECTRO 9- RMN de ¹³ C (PND) de D-1 (50 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 10- RMN de ¹³ C (DEPT 135 ⁰) de D-1 (50 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 11- RMN de 13 C (DEPT 90 [°]) de D-1 (50 MHz, CDCI ₃)
ESPECTRO 12- RMN de ¹ H de D-1 (200 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 13- RMN HETCOR (¹ H - ¹³ C) de D-1 (200 e 50 MHz, CDCl ₃)
ESPECTRO 14- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹ H - ¹³ C) de D-1
(espectro 13)

ESPECTRO 15- RMN HOMOCOSY de D-1 (200 MHz, CDCl₃)

- ESPECTRO 16- RMN de 13 C (PND) de D-3 (100 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 17- RMN de ¹³C (DEPT 135^o) de D-3 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 18- RMN de ¹³C (DEPT 90^{\circ}) de D-3 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 19- RMN de ¹H de D-3 (400 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 20- expansão do espectro de RMN de ¹H de D-3 (espectro 19)
- ESPECTRO 21- RMN HETCOR (¹H ¹³C) de D-3 (200 e 50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 22- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹H ¹³C) de D-3 (espectro 21)
- ESPECTRO 23- RMN HOMOCOSY de D-3 (400 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 24- expansão do espectro de RMN HOMOCOSY de D-3 (espectro 23)
- ESPECTRO 25- expansão do espectro de RMN HMBC de D-3 (400 e 100 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 26- expansão do espectro de RMN HMBC de D-3 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 27- expansão do espectro de RMN HMBC de D-3 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 28- expansão do espectro de RMN HMBC de D-3 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 29- expansão do espectro de RMN HMBC de D-3 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 30- RMN NOESY de D-3 (400 MHz, CDCl₃)

ESPECTRO 31- expansão do espectro de RMN NOESY de D-3 (espectro 30)

- ESPECTRO 32- RMN de 13 C (PND) de D-4 (100 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 33- RMN de ¹³C (DEPT 135^{\circ}) de D-4 (50 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 34- RMN de ¹H de D-4 (400 MHz, CDCl₃)
- **ESPECTRO 35-** RMN HETCOR (1 H 13 C) de **D-4** (200 e 50 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 36- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹H ¹³C) de D-4 (espectro 35)

- Х
- ESPECTRO 37- RMN HOMOCOSY de D-4 (400 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 38- expansão do espectro de RMN HOMOCOSY de D-4 (espectro 37)
- ESPECTRO 39- expansão do espectro de RMN HMBC de D-4 (400 e 100 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 40- expansão do espectro de RMN HMBC de D-4 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 41- expansão do espectro de RMN HMBC de D-4 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 42- expansão do espectro de RMN HMBC de D-4 (400 e 100 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 43- expansão do espectro de RMN HMBC de D-4 (400 e 100 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 44- RMN NOESY de D-4 (400 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 45- expansão do espectro de RMN NOESY de D-4 (espectro 44)
- ESPECTRO 46- RMN de ¹H do sitosterol (200 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 47- RMN de ¹³C (PND) do sitosterol (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 48- RMN de ¹H do óleo essencial bruto das folhas de *Guarea* guidonia (200 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 49- RMN de 13 C (PND) de S-1 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 50- RMN de ¹³C (DEPT 135[°]) de S-1 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 51- RMN de ¹³C (PND) de fração I-2 [S-1 como constituinte principal (50 MHz, CDCl₃)]
- ESPECTRO 52- RMN de ¹H de S-1 (200 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 53- RMN de ¹³C (PND) de S-2 [em mistura com S-3 (50 MHz, CDCl₃)]
- ESPECTRO 54- expansão do espectro de RMN de ¹³C (PND) de S-2 (espectro 53)
- ESPECTRO 55- RMN de ¹³C (DEPT 135°) de S-2 [em mistura com S-3 (50 MHz, CDCl₃)]

- ESPECTRO 56- expansão do espectro de RMN de ¹³C (DEPT 135^o) de S-2 (espectro 55)
- ESPECTRO 57- RMN de ¹H de S-2 [em mistura com S-3 (200 MHz, CDCl₃)]
- ESPECTRO 58- RMN de ¹³C (PND) de S-3 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 59- RMN de ¹³C (DEPT 135^O) de S-3 (50 MHz, CDCl₃)
- **ESPECTRO 60-** RMN de ¹H de S-3 (200 MHz, $CDCI_3$)
- ESPECTRO 61- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹H ¹³C) de S-3 (200 e 50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 62- RMN HOMOCOSY de S-3 (200 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 63- RMN de ¹³C (PND) de S-4 [em mistura com S-1 e S-3 (50 MHz, CDCl₃)]
- ESPECTRO 64- RMN de ¹³C (DEPT 135°) de S-4 [em mistura com S-1 e S-3 (50 MHz, CDCl₃)]
- ESPECTRO 65- RMN de ¹H de S-4 [em mistura com S-1 e S-3 (200 MHz, CDCl₃)]
- ESPECTRO 66- RMN de ¹³C (PND) de S-5 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 67- RMN de 13 C (DEPT 135[°]) de S-5 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 68- RMN de ¹H de S-5 (200 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 69- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹H ¹³C) de S-5 (200 e 50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 70- RMN HOMOCOSY de S-5 (200 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 71- expansão do espectro de RMN HOMOCOSY de S-5 (espectro 70)
- ESPECTRO 72- RMN de 13 C (PND) de S-6 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 73- RMN de ¹³C (DEPT 135^o) de S-6 [fração I-11 (50 MHz, CDCl₃)]
- **ESPECTRO 74-** RMN de ¹H de S-6 (200 MHz, $CDCI_3$)
- ESPECTRO 75- RMN HOMOCOSY de S-6 (200 MHz, CDCI₃)
- ESPECTRO 76- RMN de ¹³C (PND) de S-7 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 77- expansão do espectro de RMN de ¹³C (PND) de S-7

(espectro 76)

- ESPECTRO 78- RMN de ¹³C (DEPT 135°) de S-6 e S-7 em mistura (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 79- expansão do espectro de RMN de ¹³C (DEPT 135^o) de S-6 e S-7 em mistura (espectro 78)

ESPECTRO 80- RMN de ¹H de S-7 (200 MHz, CDCl₃)

- ESPECTRO 81- experimento de dupla irradiação para S-7 (RMN de ¹H, 200 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 82- expansão do espectro de RMN de ¹H de S-7 (espectro 80)

ESPECTRO 83- expansão do espectro do experimento de dupla irradiação para S-7 (espectro 81)

- ESPECTRO 84- RMN de ¹³C (PND) de S-8 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 85- RMN de ¹H de S-8 (200 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 86- RMN de ¹³C (PND) de S-9 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 87- RMN de ¹³C (DEPT 135^o) de S-9 (50 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 88- RMN de ¹H de S-9 (500 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 89- RMN HMQC de S-9 (500 e 125 MHz, CDCl₃)
- ESPECTRO 90- RMN HOMOCOSY de S-9 (500 MHz, CDCl₃)

ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	acetato de etíla
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CG	cromatografia gasosa
CI	concentração de inibição
DNA	desoxyribonucleic acid
d	dubleto
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
DC	dicroismo circular
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DOR	dispersão ótica rotatória
DMSO	dimetil sulfóxido
HETCOR	Heteronuclear Correlated spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectroscopy
HOMOCOSY	Homonuclear Correlated spectroscopy
I.V.	infra-vermelho
J	constante de acoplamento
M ⁺ •	pico do íon-molecular
m/z	relação massa carga
MeOH	metanol
n-BuOH	álcool n-butílico
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectoscopy
PND	Proton Noise Decoupling
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
t _R	tempo de retenção

RESUMO

Da fração hexânica do extrato metanólico das folhas de *Guarea guidonia* (Meliaceae), foram isolados os diterpenos: $[11S-(1\alpha,2E,6E,10\alpha)]$ -3,7,11-trimetil-11-(4-metil-pent-3-en-1-il)biciclo[8.1.0]undeca-2,6-dieno e [1S- $(1a\beta,4a\alpha,7a\beta,7b\beta)]$ -decaidro-1,7-dimetil-1-(4-metil-pent-3-en-1-il)-4-metilen-1Hcicloprop[e]azulen-7-ol, já descritos na literatura, além de dois novos isômeros de [1S-(1a\beta,4a\alpha,7a\beta,7b\beta)]-decaidro-1,7-dimetil-1-(2-hidroxi-4-metil-pent-3-en-1-il)-4metilen-1H-cicloprop[e]azulen-7-ol.

No óleo essencial obtido das folhas do mesmo espécimen foram identificados, através da análise dos dados espectroscópicos (RMN ¹³C, RMN ¹H e EM), os sesquiterpenos: eudesma-5,7-dieno, 5α , 6α -epoxi-eudesm-7-eno, eudesma-5,7-dien-2 α -ol, 5α , 6α -epoxi-eudesm-7-en-9-ol e guaia-6-en-10-ol, ainda não descritos na literatura, além de eudesma-4(15),11(13)-dieno, eudesm-6-en-4 α -ol, eudesma-4,11-dieno e 5α , 6α , 7α , 8α -diepoxieudesmano.

Diversos extratos vegetais assim como substâncias puras e misturas de composições conhecidas foram testadas com a finalidade de se detectarem substâncias com atividade anticancerígena. Para tal, empregou-se o bioensaio com linhagens mutantes do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizados pelo grupo do Prof. Dr. David Kingston, do Virginia Tech Institute. Também foi realizado um estudo químico biomonitorado por aquele bioensaio.

ABSTRACT

From the hexanic extract of the dry leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae) two new isomers of decahydro-1,7-dimethyl-1-(2-hydroxy-4-methyl-pent-3-en-1-yl)-4-methylen-1H-cycloprop[e]azulen-7-ol were isolated together with the known [11S-(1α,2E,6E,10α)]-3,7,11-trimethyl-11-(4-methyl-pent-3-en-1diterpenes $[1S-(1a\beta,4a\alpha,7a\beta,7b\beta)]$ -decahydro-1,7yl)bicyclo[8.1.0]undeca-2,6-dien and dimethyl-1-(4-methyl-pent-3-en-1-yl)-4-methylen-1H-cycloprop[e]azulen-7-ol. The essential oil from the leaves of the same plant afforded the sesquiterpenes eudesma-5,7-diene, 5α , 6α -epoxy-eudesm-7-ene, eudesma-5,7-dien- 2α -ol, 5α , 6α epoxy-eudesm-7-en-9-ol and guaia-6-en-10-ol not previouly described, besides eudesma-4(15),11(13)-diene, eudesm-6-en-4 α -ol, eudesma-4,11-diene and 5α , 6α , 7α , 8α -bisiepoxy-eudesmane. All of these compounds were identified through ¹³C and ¹H NMR spectroscopy as well as MS.

Several plant extracts and pure compounds were tested in the search for potential anticancer agents, through the mechanism-based yeast bioassay, utilizing mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The screening of those plant materials and a bioassay-guided fractionation of an active extract were both carryed out in the laboratories of Professor David G.I. Kingston at Virginia Tech Institute.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A pesquisa fitoquímica biomonitorada por ensaios que direcionem fracionamento cromatográfico visando ao isolamento de substâncias bioativas é no momento, uma tendência mundial.

Assim sendo, além desta tese conter uma parte dedicada ao estud fitoquímico da espécie *Guarea guidonia* (L.) Sleumer, contém uma segunda parte relativa à procura de substâncias bioativas, utilizando-se para tal o bioensaio con fungos *Saccharomyces cerevisiae*. Esta parte do trabalho é resultante do estágio realizado durante um ano nos laboratórios do Prof. Dr. David G.I. Kingston, no Departamento de Química do Virginia Polytechnic Institute and State University em Blacksburg, Virginia, USA.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o de analisar quimicamente as folhas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer coletadas em Campo Grande (MS). Esta Meliaceae foi escolhida já que alguns estudos químicos com espécimens de regiões diferentes haviam sido realizados. Tais estudos evidenciaram constituições químicas diferentes em cada caso. Assim, o estudo visou a uma comparação dos constituintes químicos de plantas oriundas de regiões climáticas diferentes, a fim de que a produção de limonóides e de outros terpenóides pudesse ser avaliada.

O estudo do óleo essencial das folhas foi realizado com o objetivo de aplicar-se uma metodologia desenvolvida para análise de misturas de sesquiterpenos, uma vez que já haviam sido detectados tais metabólitos no óleo essencial da casca do tronco. Tal metodologia possibilita a elucidação estrutural de sesquiterpenos não só através de espectrometria de massas, mas principalmente por meio de RMN de ¹³C, proporcionando assim tais dados à literatura. A grande maioria dos trabalhos com óleos essenciais, existentes na literatura, descreve a identificação de sesquiterpenos apenas através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas associada ao cálculo do índice de Kovatz.

Com o objetivo de aprender as técnicas cromatográficas empregadas para a separação de extratos bioativos, assim como a manipulação, preparação e utilização do bioensaio propriamente dito, planejou-se um estágio nos laboratórios do Prof. Dr. David G.I.Kingston.

TERPENOS DE *Guarea guidonia* (Meliaceae)

INTRODUÇÃO

A família Meliaceae A. Juss.

A família vegetal Meliaceae A. Juss. é constituída por cinqüenta e um gêneros e aproximadamente quinhentos e cinqüenta espécies que vivem nas regiões tropical e subtropical do planeta. Tais plantas possuem porte que varia de arbusto até árvore e, segundo a classificação morfológica de Pennington [1], são distribuídas em quatro sub-famílias e dez tribos, conforme mostra a Tabela 1, p. 2.

Quimicamente, tal família se caracteriza pela produção de meliacinas, também conhecidas por limonóides, que são tetranortriterpenos altamente oxidados. Além de Meliaceae, apenas os membros das famílias Rutaceae, Cneoracea e Simaroubaceae (gênero Harrisonia) produzem tais metabólitos [2].

Devido às diversas atividades farmacológicas apresentadas pelos limonóides, muitas meliaceas têm sido investigadas quimicamente. O uso comercial do inseticida azadiractina, extraído da espécie indiana *Azadirachta indica*, é o exemplo mais notório da importância econômica e ecológica desta família [3]. Assim sendo, a maioria dos trabalhos fitoquímicos com diversas espécies de Meliaceae é dirigida para o isolamento daquelas substâncias. No entanto, existem referências a outros terpenóides, tais como sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos [4, 46] e esteróides [5] e a outros tipos de metabólitos secundários com alcalóides [6], flavonóides [7], cumarinas [8] e acetogeninas [9].

As Tabelas 2, p. 3 e 3, p. 6 correlacionam, respectivamente, os diterpenos e sequiterpenos a plantas da família Meliaceae e as Figuras 1, p. 4 e 2, p. 7 mostram as estruturas dessas substâncias.

sub-famílias	tribos	gêneros
Swietenioideae	Cedreleae	Cedrela, Toona
	Swietenieae	Chukrasia, Entandrophragma,
		Khaya, Lovoa, Neobeguea,
		Pseudocedrela, Schmardaea,
		Soymida, Swietenia
Melioideae	Xylocarpeae	Carapa, Xylocarpus
	Turraeeae	Calodecaryia, Humbertioturraea,
		Munronia, Naregamia, Nymania,
		Turraea
	Melieae	Azadirachta, Melia
	Vavaeeae	Vavaea
	Trichilieae	Astrotrichilia, Cipadessa,
		Ekerbegia, Lepidotrichilia,
		Malleastrum, Owenia,
		Pseudobersama, Pterorhachis,
		Trichilia, Walsura
	Aglaieae	Aglaia, Aphanamixis, Lansium,
		Reinwardtiodendron,
		Sphaerosacme
	Guareeae	Anthocarapa, Cabralea,
		Chisocheton, Dysoxylum, Guarea,
		Hecheldora, Megaphyllaea,
		Pseudocarapa, Ruagea, Synoum,
		Turreanthus
Quivisianthoideae	Sandoriceae	Quivisianthe, Sandoricum
Capuronianthoideae		Capuronianthus

Tabela 1- Classificação morfológica da família Meliaceae [1]

espécie	diterpeno	#	ref.
Azadirachta indica	8,11,13-abietatrien-11,14-diol	<u>1</u>	10
	8,11,13-abietatrien-3,7-diona	<u>2</u>	11
	12,16-diidroxi-8,11-13-abietatrien-3,7-diona	<u>3</u>	11
	3β , 12-diidroxi-8, 11, 13-abietatrien-7-ona	<u>4</u>	11
	12-hidroxi-8,11,13-abietatrien-3,7-diona	<u>5</u>	12
	5,12-diidroxi-8,11,13-abietatrien-7-ona	<u>6</u>	13
	nimbilicina	<u>7</u>	10
	12,13-diidroxi-8,11,13-totaratrien-7-ona	<u>8</u>	14
	13-acetil-12-metoxi-8,11,13-podocarpatrieno	<u>9</u>	12
	12-metoxi-13-metil-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>10</u>	12
	13-acetil-12-hidroxi-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>11</u>	15
	12,13-diidroxi-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>12</u>	16
	13-hidroxi-12-metoxi-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>13</u>	14
Melia azadirachta	12-hidroxi-13-metil-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>14</u>	17
Azadirachta indica	13-carboxi-12-metil-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>15</u>	18
	3β , 12, 13-triidroxi-8, 11, 13-podocarpatrien-7-ona	<u>16</u>	15
	3,12-diidroxi-13-metil-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>17</u>	15
	3β , 12-diidroxi-13-metoxi-8, 11, 13-podocarpatrien-7-ona	<u>18</u>	19
	12,13-dimetoxi-8,11,13-podocarpatrien-3,7-diona	<u>19</u>	12
	13-hidroxi-12-metil-8,11,13-podocarpatrien-3,7-diona	<u>20</u>	20
	12-hidroxi-13-metil-8,11,13-podocarpatrien-3,7-diona	<u>21</u>	20
	12-carboxi-13-metil-8,11,13-podocarpatrien-3,7-diona	<u>22</u>	18
	13-carboxi-12-metil-8,11,13-podocarpatrien-3,7-diona	<u>23</u>	18
	12-hidroxi-13-metoxi-8,11,13-podocarpatrien-3,7-diona	<u>24</u>	19
	12-etil-13-metoxi-8,11,13-podocarpatrien-3-ona	<u>25</u>	21
	12-etil-13-metoxi-8,11,13-podocarpatrien-7-ona	<u>26</u>	21

Tabela 2- Diterpenos presentes em espécies de Meliaceae

espécie	diterpeno	#	ref.
Aphanamixis	13Z-labden-8,15-diol	<u>27</u>	22
polystacha			
Cipadessa fruticosa	13E-labden-8,15-diol	28	23
Turreanthus	12,15-epoxi-8(17),12,14-labdatrien-16-ol	<u>29</u>	24
africanus			
Guarea trichilioides	3β-hidroxilabd-8(17),12Z,14-trieno	<u>30</u>	25
	3α -hidroxilabd-8(17),12Z,14-trieno	<u>31</u>	25
	3-oxolabd-8(17),12Z,14-trieno	<u>32</u>	25
	(-)-2-oxo-13-hidroxi-3,14-clerodandieno	<u>33</u>	25
	13-hidroxi-3,14-clerodandieno	<u>34</u>	25
	19-hidroximanoiloxido	<u>35</u>	25
Cipadessa fruticosa	15,16-dihidroxi-ent-cleroda-3,14-dieno	<u>36</u>	26
	12,16-dihidroxi-ent-cleroda-3,14-dieno	<u>37</u>	26

Figura 1- Estruturas dos diterpenos presentes em Meliaceae



 $\begin{array}{l} \underline{1}: R_1 = H, H; R_2 = H, H; R_3 = OH; R_4 = H; R_5 = OH; R_6 = CH3\\ \underline{2}: R_1 = O; R_2 = O; R_3 = H; R_4 = H; R_5 = H; R_6 = CH3\\ \underline{3}: R_1 = O; R_2 = O; R_3 = H; R_4 = OH; R_5 = H; R_6 = CH_2OH\\ \underline{4}: R_1 = \beta OH; \alpha H; R_2 = O; R_3 = H; R_4 = OH; R_5 = H; R_6 = CH_3\\ \underline{5}: R_1 = O; R_2 = O; R_3 = H; R_4 = OH; R_5 = H; R_6 = CH_3\\ \underline{6}: R_1 = H, H; R_2 = O; R_3 = H; R_4 = OH; R_5 = H; R_6 = CH_3\\ \end{array}$





 $\begin{array}{l} \underline{10}; \ R_1 = OCH_3 \ ; \ R_2 = CH_3 \\ \underline{11}; \ R_1 = OH \ ; \ R_2 = COCH_3 \\ \underline{12}; \ R_1 = OH \ ; \ R_2 = OH \\ \underline{13}; \ R_1 = OMe \ ; \ R_2 = OH \\ \underline{14}; \ R_1 = OH \ ; \ R_2 = CH_3 \\ \underline{15}; \ R_1 = CH_3 \ ; \ R_2 = CO_2H \end{array}$



 $\begin{array}{l} \underline{16}: \ R_1 = \ OH \ ; \ R_2 = \ OH \\ \underline{17}: \ R_1 = \ OH \ ; \ R_2 = \ CH_3 \\ \underline{18}: \ R_1 = OH \ ; \ R_2 = \ OCH_3 \end{array}$



 $\begin{array}{l} \underline{19}: \ R_1 = OCH_3 \ ; \ R_2 = OCH_3 \\ \underline{20}: \ R_1 = CH_3 \ ; \ R_2 = OH \\ \underline{21}: \ R_1 = OH \ ; \ R_2 = CH_3 \\ \underline{22}: \ R_1 = CO_2H \ ; \ R_2 = CH_3 \\ \underline{23}: \ R_1 = CH_3 \ ; \ R_2 = CO_2H \\ \underline{24}: \ R_1 = OH \ ; \ R_2 = OCH_3 \end{array}$



<u>25</u>: R₁= O ; R₂= H,H <u>26</u>: R₁= H,H ; R₂= O







<u>33</u>



<u>30</u>: R= βOH ; αH <u>31</u>: R= αOH ; βH <u>32</u>: R= O





<u>36</u>: R_1 = H,H ; R_2 = CH₂OH <u>37</u>: R_1 = OH ; R_2 = CH₃

espécie	sesquiterpeno	#	ref.
Aphanamixis grandifolia	14-hidroxi-6-isodaucen-10-ona		27
	10-oxo-6-isodaucen-14-al	<u>39</u>	27
Lansium annamalayanum	1(10),11-guaiadieno	<u>40</u>	28
Lansium domesticum	1(10),4(15),5-germacratrieno	<u>41</u>	29
Dysoxylum fraseranum	1,3,6-elematriene (δ -elemeno)	<u>42</u>	30
	1,5,7(11)-elematrieno	<u>43</u>	31
Dysoxylum spectabile	2,3-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)-	<u>44</u>	32
	2-norbornanol		
Lepidotrichilia volensi	4(15)-eudesmen-1,6-diacetato	<u>45</u>	33
Entandrophragma cylindricum	copa-2-en-4-ol	<u>46</u>	34
	copa-3-en-2 α -ol	<u>47</u>	34
	mustacona	<u>48</u>	34
	calamenene-10β-ol	<u>49</u>	34
	T-cadinol	<u>50</u>	34
	ledol	<u>51</u>	34
Cabralea sp	cariofilanos, cadinanos e germa-		35
	cranos: principais constituintes		
	do óleo essencial		
Guarea cedrata	CG/MS do óleo essencial		36
Cedrela toona	copaeno	<u>52</u>	37
	calameneno	<u>53</u>	37
	1(10),4-cadinadieno	<u>54</u>	37/
			38

 Tabela 3- Sesquiterpenos presentes em espécies de Meliaceae





Guarea guidonia (L.) Sleumer

Segundo Pio Correa, a Meliacea Guarea guidonia (L.) Sleumer - sinonímia botânica: G. trichilioides L., G. aubleti Juss., G. multijuga Juss., G. guara Wilson, G. pauciflora Sessé & Moc., G. purgans Juss., G. sinuata Roem., G. surinamensis Mig. [39] - é uma espécie arbórea (Figura 3, p. 9) que atinge até vinte metros de altura e cingüenta centímetros de diâmetro, sendo encontrada no Brasil desde o Amazonas até o Paraná. Possui ramos de tom avermelhado-escuro, folhas que chegam até guarenta centímetros (Figura 3, p. 9) e sementes vermelhas. Sua madeira é castanho-avermelhada com estrias mais claras e manchas escuras, dura, com fibras longas e retas, aromática, muito resistente quando em contato com o solo e, devido à presença de uma resina que lhe enche os vasos, inatacável pelos insetos, própria para a construção civil e naval. A casca do caule, desprovida de epiderme, é amarela, resinosa, produzindo suco amargo, adstringente, purgativo, vermífugo, antipirético, abortivo por ação direta sobre o útero e, conforme a dose, veneno violento. O cozimento da casca das raízes é considerado útil contra a hidropisia, a gota, e em banhos, contra tumores artríticos. É árvore ornamental e de sombra, muito apreciada sobretudo nos pastos, para abrigo do gado. Parece que bois e cavalos aceitam as folhas, o mesmo fazendo os porcos quanto aos frutos; entretanto a infusão das folhas é purgativa e emética. Os seus nomes populares são: Açafroa, Bilreiro, Camboatá, Cangerana miúda, Cedrão, Cedro branco, Cedroana, Gatna-uba, Gitó ou Jitó, Jataúba, Jatuába branca, Macaqueiro, Marinheiro, Pau bala, Pau de sabão, Taúva, Yaguá ratai. Também é conhecida como Carrapeta verdadeira, mas outros gêneros e outras espécies desta família também são conhecidos por este nome [40].

Alguns estudos fitoquímicos com folhas desta espécie, assim como com outras partes da planta, já foram desenvolvidos anteriormente. Somente um destes estudos registrou a ocorrência de diterpenos [25] na espécie.



Figura 3- Árvore adulta e folhas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer fotos retiradas do livro Árvores Brasileiras [39] A Tabela 4 relaciona os estudos fitoquímicos realizados com *Guarea* guidonia.

Tabela 4- Partes estudadas,	locais de	coleta	e tipos	de	substâncias	isoladas	de
Guarea guidonia							

parte estudada	local de coleta	substâncias isoladas	ref.	
sementes	Rio de Janeiro	limonóide	41	
casca e madeira	Rio de Janeiro	esteróide	41	
casca da raiz	?	limonóides	42	
frutos	?	limonóide	43	
madeira	Amazônia	esteróides,	44	
		sesquiterpenos e		
		ác. graxos		
sementes	?	triterpenos	45	
folhas	Amazônia	triterpenos e	46 e	
		limonóide	46a	
folhas	Araraquara (SP)	triterpenos	47	
folhas	Rio de Janeiro	diterpenos	25	
óleo essecial da	Campo Grande	sesquiterpenos	48	
casca do tronco	(MS)			
casca do tronco	Campo Grande	limonóides,	49	
	(MS)	cumarina e		
	· · ·	sesquiterpenos		

EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais utilizados

Preparação de placas cromatográficas preparativas de sílica impregnada com AgNO₃ [50]

A uma solução aquosa de AgNO₃ 5% foi adicionada, lentamente e sob agitação, a sílica 60 para cromatografia preparativa. A proporção de AgNO₃/sílica deve ser de 15%.

As placas cromatográficas preparadas com esta sílica devem ser guardadas no escuro até que estejam secas. Só então deverão ser ativadas por 2 horas e meia, em estufa a 105 °C, antes de serem utilizadas.

É importante ressaltar que tanto o procedimento de preparação como o de utilização das placas devem ser realizados na ausência de luz.

Adsorção de AgNO₃ à sílica para cromatografia em coluna [50]

A uma solução de AgNO₃ (3 g) em H₂O (3 mL) e etanol absoluto (47 mL), foram adicionadas gradualmente e sob agitação 20 g de sílica gel (63 - 210 μ m), mantendose a agitação por 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este período, a mistura foi filtrada em funil de sucção e o excesso de solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A sílica impregnada com AgNO₃ foi mantida em dessecador sob vácuo até o momento de ser utilizada. Todo o procedimento de impregnação deve ser realizado no escuro, assim como o de empacotamento e de eluição da coluna. Obs. A coluna aberta com fase estacionária de sílica impregnada com AgNO₃ é empacotada por via úmida, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as colunas abertas de sílica.

Cromatografia a gás

As cromatografias a gás foram realizadas em aparelho Hewlett Packard 5890 Series II com injetor automático HP 7673 e integrador HP 3396A.

Utilizou-se coluna capilar de 30 m com fase estacionária de 5% de fenil em 95% de metil silicone, H₂ como gás de arraste e detector por ionização de chama. A razão de divisão utilizada foi de 1/50.

As condições de análise foram: 2 min a 100 $^{\circ}$ C, rampa de 5 $^{\circ}$ C/min, 2 min a 180 $^{\circ}$ C, rampa de 50 $^{\circ}$ C/min e 5 min a 250 $^{\circ}$ C. A temperatura do injetor foi fixada em 180 $^{\circ}$ C e a do detector em 220 $^{\circ}$ C.

Especificação do material e instrumentos utilizados

As folhas de Guarea guidonia foram moídas em moinho de facas.

Para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas foram utilizados solventes de grau P.A. (Merck, Grupo Química ou Vetec) ou grau técnico (B. Herzog) submetido a destilação fracionada.

Nas colunas cromatográficas foram utilizadas, como adsorvente, sílica gel 60 (63-200 μ m) e sílica gel 60 para cromatografia rápida (40-63 μ m) da Merck, assim como Sephadex LH-20 (25-100 μ m) da Sigma.

As placas de CCDC e CCDP foram feitas utilizando-se, respectivamente, sílica gel 60G e/ou $60GF_{254}$ (5-40 μ m) ambas da Merck. As placas cromatográficas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro, utilizando-se o espalhador "Quickfit". As espessuras das camadas de sílica gel foram de 0,25 mm para CCDC e 1,00 mm para CCDP.

As revelações dos cromatogramas em placas de camada delgada comparativa foram feitas com vapores de iodo, solução a 2% de sulfato cérico em H_2SO_4 2N e/ou irradiação no UV (254 e 356 nm) e, em placas preparativas, foi utilizado irradiação no UV (254 e 356 nm).

A concentração das soluções contendo substâncias e/ou extratos foi efetuada destilando-se o solvente à pressão reduzida por trompa d'água em evaporador rotatório, tipo Buchler.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker AC200, operando a 200 e 50 MHz (IQ-USP), Varian Unity-400 operando a 400 e 100 MHz (Departamento de Química do Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia, USA) e Bruker DRX-500 operando a 500 e 125 MHz (IQ-USP). Os espectros foram obtidos em deuteroclorofórmio como solvente e padrão de referência interna.

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro INCOS 50 Finnigan-Mat (quadrupolo) operando com impacto eletrônico (IE) a 70 eV, usado nas análises por CG/EM, acoplado ao cromatógrafo 3400 Varian (coluna: crosslinked methyl silicone gum, 25 m, 0.2 mm, 0.33 film thickness). Os espectros obtidos por ionização química foram registrados em espectrômetro HP 5988A.

Os espectros de infravermelho foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT 1750. As amostras foram preparadas sob a forma de filmes, utilizando-se janelas de NaCl. O padrão de referência empregado foi a absorção da água em 1638 cm⁻¹.

As rotações específicas dos sesquiterpenos foram medidas em polarímetro digital JASCO DIP-370, com filtro de Na. Para os diterpenos utilizou-se polarímetro Perkin - Elmer modelo 241, com filtro de Na.

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer utilizadas no presente trabalho, foram coletadas em Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, pelo Prof. Dr. Walmir da Silva Garcez, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Em fevereiro de 1994 foi coletado o material do qual foi obtido o extrato metanólico. Do mesmo espécimen, coletaram-se em 24 de novembro de 1996, aproximadamente às 10 horas, as folhas das quais foi extraído o óleo essencial.

O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Humberto Barreiros, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A exsicata número 1870 está depositada no Herbáreo da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Estudo do extrato metanólico das folhas de Guarea guidonia

Obtenção e partição do extrato

As folhas frescas de *Guarea guidonia* (3000 g) foram secas em estufa a 60 °C, com ventilação, resultando em 1100 g de material seco. Após moagem, o material vegetal foi extraído exaustivamente em MeOH a frio e filtrado. A solução resultante foi parcialmente concentrada sob pressão reduzida, fornecendo o extrato metanólico bruto.

A seguir, foram adicionados 400 mL de solução MeOH/H₂O (9:1) aos 300 mL do extrato metanólico bruto e a solução resultante foi submetida sucessivamente a partição em hexano, AcOEt e n-BuOH. Para a partição em AcOEt e n-BuOH foi adicionado um volume extra de H₂O. Desta forma foram obtidos 47 g de extrato hexânico, 14 g de extrato AcOEt e 11 g de extrato n-butanólico.

O Esquema 1, p. 16, mostra o processo de obtenção dos extratos.

Isolamento dos constituintes químicos

Fracionamento do extrato hexânico

Com a finalidade de limpar o extrato hexânico do material graxo presente, este extrato foi submetido a uma precipitação com MeOH. Para tal, o extrato foi dissolvido em MeOH a quente e mantido em refrigerador por uma noite. Após este tempo, o material graxo precipitou e pôde ser separado por filtração da parte solúvel em MeOH. Desta forma, foram obtidos 25 g de fração metanólica e 21 g de material graxo (Espectro 1). O Esquema 1, p. 16 mostra este procedimento.

Esquema 1- Obtenção dos extratos das folhas de Guarea guidonia



A fração metanólica do extrato hexânico (25 g) foi submetida a cromatografia em coluna (Coluna a), utilizando-se para tal 310 g de sílica 60. O sistema foi eluido com misturas de hexano/AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 43 frações de aproximadamente 120 mL cada, reagrupadas de acordo com a Tabela 5, após análise por CCDC.

(Colur	na a)		
		 	 =

Tabela 5- Fracionamento cromatográfico da fração metanólica do extrato hexânico

frações reunidas	massa (g)
a-1 (1 a 5)	1,4
a-2 (6 a 11)	0,2
a-3 (12 a 14)	1,3
a-4 (15 a 17)	2,3
a -5 (18 a 20)	4,8
a-6 (21)	0,8
a-7 (22)	0,8
a-8 (23 e 24)	1,3
a-9 (25 a 34)	2,6
a-10 (35 a 43)	2,0

Fracionamento cromatográfico de a-1

A fração a-1 (1,4 g) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica 60 (50 g), eluida com misturas de hexano/CH₂Cl₂, em gradiente crescente de polaridade (Coluna b). Foram recolhidas 32 frações de aproximadamente 30 mL cada, reagrupadas de acordo com a Tabela 6, após análise por CCDC.

frações reunidas	massa (mg)
b-1 (1)	691,0
b-2 (2)	17,6
b-3 (3)	4,8
b-4 (4 a 6)	36,3
b-5 (7 a 20)	desprezadas
b-6 (21)	5,75
b-7 (22)	16,0
b-8 (23)	16,4
b-9 (24 a 30)	128,0
b-10 (31)	desprezadas
b-11 (32)	450,0

Tabela 6- Fracionamento cromatográfico de a-1 (Coluna b)

desprezadas = massa muito pequena

A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C - técnicas PND, DEPT 135^o e 90^o, HOMOCOSY e HETCOR - assim como o espectro de massas, mostraram que a fração b-7 é constituída por **D-2**.

O espectro de RMN de ¹H de b-2 mostrou que esta poderia ser constituida por uma mistura de caráter terpenoídico. Porém o material sofreu decomposição, o que impossibilitou a análise dos espectros de RMN de ¹³C para que a estrutura molecular desta substância pudesse ser determinada.

A fração b-9 (128,0 mg) foi submetida a cromatografia rápida em coluna de sílica, utilizando-se como fase móvel uma mistura de hexano/éter etílico (7:3) e éter etílico 100%. Foram coletadas 27 frações de 5 mL cada que, após análise em CCDC, foram reagrupadas de acordo com a Tabela 7.

frações reunidas	massa (mg)
c-1 (1 a 5)	6,7
c-2 (6 e 7)	8,2
c-3 (8 a 10)	6,7
c-4 (11 a 23)	18,5
c-5 (24 a 27)	7,5

Tabela 7- Fracionamento cromatográfico de b-9 (Coluna c)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C mostraram que a fração c-2 também é constituída por D-2.

A análise da placa cromatográfica comparativa de b-1 (691,0 mg) indicou que esta fração deveria ser submetida a cromatografia rápida em coluna de sílica (Coluna d), eluida isocraticamente com hexano. Desta forma foram recolhidas 80 frações de 5 mL cada, reunidas conforme a Tabela 8, após análise em CCDC.

 Tabela 8- Fracionamento cromatográfico de b-1 (Coluna d)

frações reunidas	massa (mg)
d-1 (1 a 5)	
d-2 (6 e 7)	46,0
d-3 (8 a 13)	455,4
d-4 (14 e 15)	11,7
d-5 (16 a 76)	
d-6 (77)	10,2
d-7 (78 a 80)	

Através da análise dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C verificou-se que a fração d-2 contém uma mistura de sesquiterpenos.

O espectro de RMN de ¹H de d-4 mostrou que esta fração contém o mesmo material encontrado na fração b-2, já na sua forma degradada.

Após a análise da placa cromatográfica comparativa da fração d-3 (455,4 mg), concluiu-se que este material deveria ser submetido a cromatografia rápida em coluna de sílica (Coluna e), utilizando-se como eluente n-pentano. Assim, foram obtidas 30 frações de 3 mL cada, reagrupadas após análise em CCDC, conforme mostra a Tabela 9.

frações reunidas	massa (mg)
e-1 (1 a 8)	
e-2 (9 a 11)	41,2
e-3 (12 e 13)	111,5
e-4 (14 e 15)	78,5
e-5 (16)	14,1
e-6 (17 a 21)	57,2
e-7 (22 a 30)	0,8

Tabela 9- Fracionamento cromatográfico de d-3 (Coluna e)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C - técnicas PND, DEPT 135^o e DEPT 90^omostraram que a fração e-6 é constituida por **D-1**.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C mostraram que a fração e-2 contém a mesma mistura de sesquiterpenos encontrada na fração d-2, porém com proporção diferente dos constituintes. Uma análise mais detalhada dos espectros de RMN de ¹³C (PND e DEPT 135^o) de e-2 proporcionou a identificação do sesquiterpeno β -selineno (S-3, p. 62). Assim, foi possível identificar também na fração d-2 este mesmo sesquiterpeno.

A fim de confirmar a presença do β -selineno e de identificar os outros componentes sesquiterpênicos em d-2, submeteu-se tal fração (46,0 mg) a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se sílica impregnada com AgNO₃. O sistema foi eluido com uma mistura de benzeno/acetona (95:5) e foram obtidas 2 subfrações: d-2a e d-2b. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C mostraram que a fração d-2a é constituida pelo β -selineno. Já a análise dos espectros de RMN de d-2b indicou que esta subfração é uma mistura muito complexa de sesquiterpenos. Posteriormente, após a análise do óleo essencial das folhas de *Guarea guidonia*, foi possível identificar o sesquiterpeno **S-1**, também encontrado naquele óleo, como constituinte das frações d-2 e e-2.

A fração a-9 (2,6 g) foi submetida a cromatografia rápida em coluna de sílica (Coluna f), eluida com misturas de hexano/isopropanol, nas proporções de 95:5, 8:2 e 1:1. Foram recolhidas 82 frações de aproximadamente 10 mL cada, reagrupadas de acordo com a Tabela 10, após análise por CCDC.

fração reunida	massa (mg)
f-1 (1 e 2)	
f-2- (3 a 5)	68,9
f-3- (6 a 12)	528,2
f-4- (13 a 18)	825,0
f-5 (19 a 22)	494,0
f-6- (23 a 27)	219,8
f-7 (28 a 34)	123,3
f-8 (35 a 37)	39,7
f-9 (38 a 40)	32,8
f-10 (41 a 47)	35,9
f-11 (48 a 54)	18,2
f-12 (55 e 56)	4,0
f-13 (57 a 59)	50,6
f-14 (60 a 71)	
f-15 (72 a 82)	247,1

Tabela 10- Fracionamento cromatográfico de a-9 (Coluna f)

A fração f-3 foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (Coluna g), eluida com as misturas hexano: CH_2Cl_2 (1:4), CH_2Cl_2 : $(CH_3)_2CO$ (3:2) e CH_2Cl_2 : $(CH_3)_2CO$ (1:4) [51]. Foram recolhidas 30 frações de aproximadamente 10 mL cada. A análise por CCDC mostrou que quase todo o material ficou concentrado nas frações g-17 a g-23, que foram eluidas da coluna com a primeira mistura de solvente utilizada. Estas frações foram então reunidas (517,9 mg) e submetidas a cromatografia rápida em coluna de sílica (Coluna h) eluida com 20% da mistura hexano:isopropanol (9:1) em hexano. Foram recolhidas 36 frações de

aproximadamente 8 mL cada, reagrupadas de acordo com a Tabela 11, após análise por CCDC.

fração reunida	massa (mg)
h-1 (1 a 9)	
h-2 (10 a 15)	26,3
h-3 (16)	1,9
h-4 (17 e 18)	4,5
h-5 (19 a 21)	14,2
h-6 (22 a 25)	15,9
h-7 (26 a 28)	11,2
h-8 (29 a 32)	17,4
h-9 (33 a 36)	

Tabela 11- Fracionamento cromatográfico de g-17/g-23 (Coluna h)

A comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C atribuídos previamente a D-2, juntamente com a análise dos espectros de RMN de ¹H (200 MHz, técnicas mono e bidimensionais) e de ¹³C (50 MHz, técnicas HETCOR e DEPT 135°) assim como dos espectros de RMN de ¹H (400 MHz, técnicas HOMOCOSY, NOESY e HMBC), mostraram que as frações h-2 e h-8 estão puras e que elas são constituidas respectivamente por D-3 e D-4.

Todo o processo de fracionamento da fração metanólica do extrato hexânico é mostrado no Esquema 2, p. 23.





24

Dados físicos para os diterpenos D-3 e D-4

D-3

 $\label{eq:alpha} [1S-(1a\beta,4a\alpha,7a\beta,7b\beta)]-decaidro-1,7-dimetil-1-(2-hidroxi-4-metil-pent-3-en-1-il)-4-metilen-1H-cicloprop[e]azulen-7-ol$

 $[\alpha]_{D}^{25}$ = - 22, c = 2,8 em CHCl₃ I.V. _{Vmax}. cm⁻¹: 3343, 3083, 2967, 2924, 2862, 1633, 1451, 1379, 1149, 1121, 1051. EM (ionização química): Tabela 22, p. 48. RMN de ¹H (100 MHz) Tabela 16, p. 37. RMN de ¹³C (400 MHz): Tabela 15, p. 36.

D-4

 $[1S-(1a\beta,4a\alpha,7a\beta,7b\beta)]-decaidro-1,7-dimetil-1-(2-hidroxi-4-metil-pent-3-en-1-il)-4-metilen-1H-cicloprop[e]azulen-7-ol$

I.V. _{Vmax}. cm⁻¹: 3371, 3082, 2924, 2866, 1635, 1447, 1379, 1150, 1032. EM (ionização química): Tabela 22, p. 48. RMN de ¹H (100 MHz) Tabela 16, p. 37. RMN de 13C (400 MHz): Tabela 15, p. 36.

Outras frações da Coluna a

Os espectros de RMN de ¹H das frações intermediárias da Coluna a mostraram que elas são constituidas principalmente por material graxo. Algumas dessas frações (a-3 e a-5), foram submetidas a processos de fracionamento cromatográfico tanto em sílica (coluna e CCDP) como em Sephadex LH-20 [51]. A análise dos espectros de RMN de ¹H indicou que o material graxo ainda predominava em todas as frações assim obtidas e portanto não se deu continuidade ao processo de purificação.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C mostrou que a fração a-6 é constituída por uma mistura de **sitosterol** e material graxo.

Análise do óleo essencial das folhas de Guarea guidonia

Como descrito anteriormente, o sesquiterpeno β -selineno (S-3) foi isolado da fração hexânica do extrato metanólico das folhas de *G. guidonia*. Assim, decidiu-se analisar o óleo essencial das folhas a fim de se identificar alguns de seus constituintes.

Obtenção e fracionamento do óleo essencial

O óleo essencial das folhas de *Guarea guidonia* (600 g) foi extraído submetendo-se o material vegetal a arraste a vapor d'água, em aparelho tipo Clevenger.

A análise do cromatograma deste óleo (Figura 4, p. 27), obtido por CG, mostrou que ele possui diversos constituintes, sendo que alguns deles são predominantes. A Tabela 12 relaciona os tempos de retenção (t_R) relativos aos compostos presentes no óleo em proporção maior a 1%.

-	
t _R (min)	(%)
6,910	19,16
8,207	3,02
8,312	6,11
8,443	5,85
8,510	1,56
9,145	1,04
9,788	1,61
11,199	21,01
11,360	13,63
11,477	1,58
11,970	1,94
12,716	1,25

Tabela 12 -	Constituintes	presentes	no	óleo	essencial	das	folhas	de	G.	guidonia	em
	proporção ma	aior que 1%	, 0.								



Com o objetivo de identificar os constituintes sesquiterpênicos através de dados obtidos por espectros de RMN de ¹³C e de ¹H assim como do espectro de massas, o óleo essencial foi submetido a cromatografia rápida em coluna de sílica (Coluna i), eluida isocraticamente com CH₂Cl₂. Foram recolhidas 55 frações de aproximadamente 6 mL cada, reunidas após análise dos cromatogramas obtidos por CG de cada uma das frações. A Tabela 13 relaciona os t_R das substâncias presentes em proporção acima ou igual a 1%, para cada uma das frações reunidas.

Tabela 13 - Fracionamento cromatográfico do óleo essencial das folhas de G. guidonia (Coluna i). Constituintes presentes em proporção acima ou igual a 1%.

fração	t _R (min) %	
reunida		
i-1	6,925	65,0
i-2	6,402	1,1
	6,968	38,7
	7,346	1,2
	7,443	2,1
	8,070	1,0
	8,147	1,0
	8,236	5,3
	8,353	13,9
	8,482	12,1
	8,542	2,9
	8,675	1,4
	8,807	1,5
	9,004	1,2
	9,165	2,1
	8,804	1,1
	10,243	1,1
	18,894	1,2
i-3	6,932	26,1
	8,333	16,0
	8,464	12,9
	8,528	3,6
	9,159	2,9
	9,999	6,7

fração	t _R (min)	%
reunida		
i-4	6,925	14,6
	8,328	5,3
	8,400	4,5
	8,460	4,0
	9,801	28,9
	11,225	4,0
i-5	-	-
i-6	11,194	67,0
i-7	11,205	69,0
	11,356	22,5
i-8	11,192	27,4
	11,360	67,4
i- 9	11,188	4,7
	11,242	11,0
	11,355	63,1
	11,812	5,4
	11,915	3,5
	11,980	8,1
	14,605	3,6
i-10	11,239	19,2
	11,351	11,8
	11,606	22,1
	11,815	2,1
	11,915	26,9
	11,982	7,3
	14,606	12,9
i-11	11,609	43,9
	14,606	56,1
i-12	12,905	
	14,608	

Como é mostrado na Tabela 13, as frações i-1 e i-6 são constituídas majoritariamente por substâncias cujos valores de t_R são 6,925' e 11,194' respectivamente. A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de cada uma dessas frações mostrou que i-1 contém o sesquiterpeno **S-1** e i-6 contém **S-5**.

A fração i-4 é uma mistura com dois constituintes principais. Comparando-se os valores de t_R desta mistura com o da fração i-1, concluiu-se que **S-1** (t_R = 6,925') está presente em aproximadamente 14,6% na mistura analisada. Os espectros de **RMN** de

de ¹H e de ¹³C confirmaram a presença de S-1 e proporcionaram a identificação do outro constituinte principal da mistura como sendo S-4, de t_R = 9,801'.

A fração i-5 não foi analisada devido a pequena quantidade de material e por tratar-se de uma mistura bastante complexa.

As frações i-7 e i-8 possuem os mesmos dois constituintes porém em proporções diferentes. Em i-7 há 69% do sesquiterpeno S-5 (t_R = 11,205'), já encontrado em i-6, e 25% de outro componente de t_R = 11,356'. Em i-8 estas proporções estão invertidas. O composto de t_R = 11,356' também está presente em i-9. Assim, esta fração foi submetida a CCDP em sílica. O sistema foi eluido em CH₂Cl₂ e desta forma foi possível obtér S-9.

A fração i-10 foi submetida a CCDP em sílica, utilizando-se como eluente a mistura $CH_2Cl_2/MeOH$ (99:1), o que proporcionou o isolamento dos sesquiterpenos S-6, S-8 e S-9.

A comparação dos valores de t_R dos constituintes da fração i-11 com os dos sesquiterpenos **S-6** e **S-8** mostrou que tais substâncias estão presentes em i-11. Esta proposta foi confirmada através da comparação dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de i-11 com os daqueles sesquiterpenos.

A mistura i-12 também foi submetida a CCDP em sílica, utilizando-se $CH_2CI_2/MeOH$ (99:1) como eluente. Este procedimento originou uma mistura formada pelos sesquiterpenos S-7 e S-8, conforme mostraram os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

Os cromatogramas das frações i-2 e i-3 mostraram que elas são misturas complexas. A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C sugeriu que tais frações poderiam ser reunidas (252 mg) e submetidas a cromatografia em coluna de sílica impregnada com AgNO₃ (Coluna j). O sistema foi eluido isocraticamente com CH₂Cl₂ e foram reunidas 20 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas após análise dos cromatogramas obtidos por CG de cada uma das frações. A Tabela 14 relaciona os valores de t_R das substâncias presentes em porcentagem maior ou igual a 1%, em cada uma das frações reunidas.

Fração reunida	t _R (min)	%
j-1	10,226	100
j-2	5,992	1,1
	6,935	41,3
	7,144	1,2
	7,443	3,2
	8,227	5,1
	8,466	11,0
	8,530	3,4
	8,665	2,1
	8,778	1,4
	9,008	3,3
	9,165	3,2
	9,805	1,4
	10,005	1,4
	10,246	4,4
	10,297	2,3
	11,230	1,0
	14,440	1,1
: ว	10,015	1,2
J-3	0,931	9,0
	7,349	22
	7,445	2,2
	8 071	15
	8 148	10.0
	8,228	2.4
	8,410	5.2
	8,497	14.3
	8,950	8,4
	10,245	3,0
	10,409	5,3
	10,814	1,3
	11,167	1,6
	12,366	2,6
	12,916	6,0
	13,327	2,3
	13,586	2,7
	14,430	3,1
<u></u>	14,771	2,7

Tabela 14 - Fracionamento cromatográfico de i-2 e i-3 (Coluna j). Constituintespresentes em porcentagem igual ou maior a 1% nas frações reunidas.

Fração reunida	t _R (min)	%
	17,200	2,1
j-4	8,289	36,1
	8,410	11,3
	12,920	25,9
	13,084	11,3
	14,772	15,3
j-5	8,290	41,2
	8,336	52,5
	18,443	6,3
j-6	7,555	11,6
	8,335	86,4
j-7	8,335	100,0

A fração j-1 não pôde ser analisada devido à pequena quantidade de material.

Os espectros de RMN de ¹³C e de ¹H de j-2, j-3 e j-4 mostraram que tais frações são misturas complexas de sesquiterpenos, o que já havia sido constatado através dos cromatogramas respectivos a cada fração. Assim, foi impossível identificar os constituintes de cada uma dessas misturas.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de j-5 mostrou que o constituinte presente em maior quantidade nesta fração é o β -selineno (S-3), de t_R= 8,336', e aquele presente em 41,2% (t_R= 8,290') é o sesquiterpeno S-2.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de j-7 mostraram que ela contém S-3 (β -selineno). Este sesquiterpeno também é o principal constituinte da fração j-6, fato constatado tanto através da comparação dos valores de t_R quanto pelos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

O Esquema 3, p. 34 mostra todo o processo de fracionamento do óleo essencial.

As Tabelas 33, p. 66; 34, p. 67; 35, p. 69 e 36, p. 70 mostram, respectivamente, os valores de t_R e os dados de espectrometria de massas, RMN de ¹³C e RMN de ¹H para os sesquiterpenos 4,11-eudesmadieno (S-2), 5α , 6α -epoxi-7-eudesmeno (S-4) e 5α , 6α -epoxi-7-eudesmen-9-ol (S-7), identificados em misturas, assim como para 5,7-eudesmadieno (S-1), 4(15),11(13)-eudesmadieno (S-3), 6-eudesmen-4 α -ol (S-5), 5,7-

eudesmadien- 2α -ol (S-6), 5α , 6α , 7α , 8α -diepoxieudesmano (S-8) e guaia-6-en-10-ol (S-9), identificados em frações puras.

A seguir são descritos os dados de I.V. e de $[\alpha]_{D}^{25}$ para S-1, S-6, S-8 e S-9:

5,7-eudesmadieno (S-1)

I.V. v_{max}. cm-¹: 3020, 2401, 2255, 1603, 1523, 1219, 904, 771, 670, 651.

5,7-eudesmadien-2α-ol (S-6)

I.V. v_{max} . cm-¹: 3406, 2964, 1712, 1665, 1258, 1167, 1038, 967. $[\alpha]_{D}^{25} = +6$, c = 0,25 em CHCl₃

$5\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 8\alpha$ -diepoxieudesmano (S-8)

I.V. v_{max} . cm-¹: 2961, 2930, 1706, 1462, 1285, 1255, 952, 906, 834, 748, 724. $[\alpha]_{D}^{25} = +42$, c = 0,15 em CHCl₃

guaia-6-en-10-ol (S-9)

I.V. v_{max} . cm⁻¹: 3403, 2959, 2928, 2862, 1710, 1460, 1378, 1191, 1121, 1090. $[\alpha]_{D}^{25} = +13$, c = 0,19 em CHCl₃





ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

DITERPENOS ISOLADOS DE Guarea guidonia



D-3eD-4

Obs: A numeração utilizada na determinação estrutural dos diterpenos é decorrente da biossíntese. Porém, a nomenclatura utilizada para **D-2**, **D-3** e **D-4** emprega a numeração do esqueleto azuleno, a qual já havia sido utilizada por Trautmann e col. [53]. Para **D-1** também foi utilizada a nomenclatura empregada por aqueles pesquisadores.



Tabela 15- Dados de RMN de ¹³C para os diterpenos D-2, D-3 e D-4 isolados de *Guarea guidonia* e para as substâncias modelos (^{*}50 MHz; ^b100 MHz, δ, CDCl₃)

					aromaden-	aloaroma-
¹³ C	espatu-	D-2*	D-3 ^b	D -4 [▶]	dreno	dendreno
	lenoi [52]				(<i>trans</i>) [54]	(<i>cis</i>) [54]
1	54,3	52,9	48,3	51,4	53,8	50,8
2	26,7	26,3	24,0*	25,6	29,5	28,3
3	41,7	41,6	39,5	41,0	35,2	31,3
4	81,0	81,0	80,0	80,6	35,4	7,9
5	53,4	53,8	53,0	53,3	44,0	42,2
6	29,9	29,1	25,0**	26,5	29,3	23,6
7	27,5	26,8	25,2**	27,4	27,7	24,9
8	24,8	24,8	25,3	24,8	24,9	22,2
9	38,8	38,9	39,0	38,8	39,2	35,8
10	153,4	153,5	154,5	153,5	154,0	152,3
11	20,2	24,3	20,7	21,7	19,9	17,2
12	28,6	43,2	49,7	49,8	28,7	28,6
13	16,3	13,6	13,2	14,6	15,7	15,9
14	26,1	25,7*	23,3	25,1	17,1	16,4
15	106,2	106,2	106,5	106,5	105,7	109,8
16	-	25,2	66,5	67,2	-	-
17	-	124,8	128,2	128,4	-	-
18	-	131,1	134,5	134,8	-	-
19	-	17,6	18,2	18,1	-	-
20	-	25,9*	25,7	25,8	-	-

*, **: os deslocamentos podem estar invertidos nas colunas

Obs: Os valores de deslocamentos químicos para C-2 e C-8, C-6 e C-7 do espatulenol foram reatribuídos

Tabela 16- Dados de RMN de ¹H para os diterpenos D-2, D-3 e D-4 isolados de *Guarea guidonia* e para as substâncias modelos (*200 MHz; ^b400 MHz, δ, CDCl₃)

					aromaden-	aloaroma-
1H	espatu-	D-2*	D-3 ^b	D-4 ^b	dreno	dendreno
	lenol [52]				(trans) [54]	(cis) [54]
1		2,19	2,25	2,23	2,24	2,65
2a			1,65	1,65		
2b			1,95	1,90		
3a			1,70	1,65		
Зb				1,80		
5		1,32	1,30	1,30	1,39	1,86
6	0,4 - 0,6	0,48	0,73	0,54	0,62	0,24
7	0,4 - 0,6	0,71	0,65	0,85	0,70	0,55
8a		0,90	0,93	0,99		
8b		2,01	2,00			
9 a		2,40	2,05	2,05		
9b			2,42	2,40		
1 2a	1,04	1,03	0,90	1,30		
12b		1,37	1,70	1,48		
13	1,05	1,02	1,04	1,08		
14	1,29	1,28	1,25	1,28		
15 a	4,66	4,65	4,69	4,66		
15b		4,68	4,71	4,69		
16		2,09	4,65	4,58		
17		5,10	5,10	5,17		
19		1,59	1,66	1,67		
20		1,66	1,67	1,69		

	bicicloger-	D-1	bicicloger	 D-1
posicão	macren-13-al	¹³ C	macren-13-al	¹ H
[3	¹³ C [55]	_	¹ H [55]	
1	125,8	124,8	4,96	4,74
2a	26,0	26,0	1,98	2,00
2b			2,10	
3a	40,9	41,2	1,96	1,79
Зb			2,26	2,12
4	131,3	127,9	-	-
5	122,2	126,4	4,96	4,28
6	35,2	26,5	2,13	1,20
7	36,9	29,4	1,43	0,54
8a	25,8	26,9	1,94	1,15
8b			2,05	1,76
9a	37,0	37,2	1,75	1,67
9b			2,52	2,23
10	139,8	140,8	-	-
11	35,7	23,8	-	-
12	20,1	43,6	1,27	1,20
13	203,5	12,8	9,60	0,94
14	16,2	17,6	1,69	1,53
15	20,8	20,8	1,50	1, 40
16	-	25,0	-	1,93
17	-	124,8	-	5,03
18	-	130,9	-	-
19	-	16,5	-	1,60
20	-	25,7	-	1,60

Tabela 17- Dados de RMN para os diterpeno D-1, isolado de *Guarea guidonia*, e para biciclogermacren-13-al (50 MHz e 200 MHz, δ, CDCl₃)

Identificação estrutural de D-2



Os espectros de RMN de ¹³C - técnicas PND, DEPT 135^o e 90^o (Espectros 2, 3 e 4)- de D-2 acusaram a presença de vinte átomos de carbono na molécula, sendo quatro grupos metílicos, sete grupos metilênicos, cinco grupos metínicos e quatro átomos de carbono quaternários. Os valores de deslocamentos químicos mostraram a presença de um carbono

carbinólico (81,0 δ), de duas ligações duplas na molécula, sendo que uma delas é exocíclica (106,2 e 153,5 δ) e de um carbono quaternário muito protegido (24,3 δ).



O espectro de RMN de ¹H (Espectro 5) mostrou sinais em 0,48 δ (dd) e 0,71 δ (ddd), característicos de anel ciclopropânico, assim como sinais de átomos de hidrogênio olefínicos em 4,70 δ . Estas informações levaram a comparação dos dados de ressonância, tanto de ¹³C quanto de ¹H, do composto isolado com

espatulenol os do sesquiterpeno espatulenol [52]. Este último possui átomo de carbono quaternário em 81,0 δ (C-4) e outro, característico de anel ciclopropânico, em 20,0 δ (C-11), além de átomos de hidrogênio olefínicos em 4,7 δ e ciclopropânicos em 0,4 - 0,6 δ (Tabela 16, p. 37). Estes valores são muito próximos aos observados nos espectros de RMN da substância isolada. Os demais valores de deslocamentos químicos dos átomos de carbono do espatulenol também são bastante próximos daqueles observados para o composto isolado. As exceções são os valores referentes a C-11 e C-13 do sesquiterpeno assim como o sinal em 28,6 δ , atribuído ao grupo metílico 12, que não foi observado no espectro da substância isolada (Tabela 15, p. 36).

Após a comparação dos dados de RMN de ¹³C restaram ainda seis sinais sem atribuição no espectro da substância isolada, sendo que dois deles estão na região

de carbonos olefínicos, dois na região de grupos metílicos e outros dois são referentes a átomos de carbono metilênicos.

Outra característica importante da estrutura molecular da substância isolada é a presença de dois grupos metílicos ligados a átomo de carbono sp² (1,59 e 1,66 δ), como mostrou o espectro de RMN de ¹H (Espectro 5).

O espectro de massas mostrou o pico do íon-molecular em m/z = 288. Assim, a fórmula molecular do composto foi estabelecida como $C_{20}H_{32}O$ e a molécula tem portanto cinco deficiências de hidrogênio: duas ligações duplas e três anéis, sendo que um deles é o ciclopropano.

Concluiu-se então que a estrutura cíclica do composto isolado é a mesma do espatulenol. Porém agora a molécula possui uma cadeia isoprênica lateral, ligada a posição 12 do sesquiterpeno, formando portanto um diterpeno. Isto confirma os efeitos de desproteção em C-11 e C-12 e de proteção em C-13, observados através dos valores dos deslocamentos químicos da substância isolada, em relação ao sesquiterpeno. Através da construção de modelos moleculares, verificou-se que a presença do grupo isoprenila em C-12 é favorecida estericamente. Tal observação foi confirmada pelo espectro de RMN de ¹³C uma vez que este não mostrou sinal referente a grupo metílico em torno de 28 δ .

A análise dos espectros HOMOCOSY e HETCOR (Espectro 6, expansão 7 e Espectro 8) confirmou a proposta estrutural para **D-2**, além de proporcionar a reatribuição dos valores de deslocamentos químicos de C-6 e C-7 assim como de C-2 e C-8 do espatulenol [52], uma vez que estes átomos de carbono possuem deslocamentos químicos equivalentes nas duas moléculas.

No espectro HETCOR de D-2 foram observados os acoplamentos entre C-15 $(106,2 \delta)$ e os sinais em torno de 4,7 δ assim como entre C-17 $(124,8 \delta)$ e H-17 $(5,10 \delta)$. Os outros dois átomos de carbono olefínicos não acoplam com átomos de hidrogênio, sendo portanto carbonos quaternários de ligações duplas, o que confirmou a informação obtida pelos espectros unidimensionais.

40

Também foram observadas as correlações entre os átomos de carbono dos grupos metílicos com os seus respectivos átomos de hidrogênio assim como outras correlações, conforme mostra a Tabela 18.

posição	¹³ C	¹ H (J em Hz)
1	53,8	2,19
2	26,3	
3	41,6	
4	81,0	
5	52,9	1,32
6	29,1	0,48 (11,0 e 9,4)
7	26,8	0,71 (11,0; 9,4 e 5,5)
8a	24,8	0,90
8b		2,01
9	38,9	2,40
10	153,5	-
11	24,3	-
12a	43,2	1,03
12b		1,37
13	13,6	1,01
14	25,7*	1,28
15 a	106,2	4,65
15b		4,68
16	25,2	2,09
17	124,8	5,10 (7,2; 7,2; 1,4 e 1,4)
18	131,1	-
19	17,6	1,59 (1,4)
20	25,9*	1,66 (1,4)

Tabela 18- Dados de RMN para D-2 (50 e 200 MHz, δ, CDCl₃).

* os deslocamentos podem estar invertidos

.

No espectro de RMN de ¹H de D-2, existe um duplo dubleto em 0,48 δ (J= 11,0 e 9,4 Hz) e um duplo duplo dubleto em 0,71 δ (J= 11,0; 9,4 e 5,5 Hz). O sinal em 0,48 δ deve ser atribuído a H-6, uma vez que este hidrogênio acopla com H-5 e com H-7. Já o sinal em 0,71 δ , devido a sua multiplicidade, é referente a H-7, pois este acopla tanto com com H-6 como com os dois átomos de hidrogênio H-8. A Tabela 18 mostra as correlações entre os átomos de carbono e de hidrogênio das posições 6 e 7.

No espectro HOMOCOSY observou-se a relação entre H-6 e H-7 assim como de H-6 com outro hidrogênio cujo sinal está em 1,32 δ , que é, portanto, H-5. Também observou-se o acoplamento de H-7 com o sinal em 0,90 δ , que é relativo a H-8a. Os acoplamentos de H-17 com H-19, H-20 e H-16 também foram observados neste espectro o que proporcionou o valor de deslocamento químico de H-16. Os acoplamentos observados no espectro HOMOCOSY estão descritos na Tabela 19.

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-1 (2,19)	H-5 (1,32)
H-5 (1,32)	H-6 (0,48)
H-6 (0,48)	H-7 (0,71)
H-7 (0,71)	H-8a (0,90)
H-8a (0,90)	H-8b (2,01)
H-8b (2,01)	H-9 (2,40)
H-16 (2,09)	H-17 (5,10)
H-17 (5,10)	H-19 (1,59)
H-17 (5,10)	H-20 (1,66)

Tabela 19- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-2 (200 MHz, CDCl₃) Assim, através do espectro HETCOR foi possível atribuir a C-8 o deslocamento químico de 24,8 δ . Nos dados de RMN publicados para o espatulenol [52], este valor foi erroneamente atribuído a C-2. A C-8 foi dado o valor de 26,7 δ . As Tabelas 15, p. 35 e 16, p. 36 mostram os deslocamentos químicos para o espatulenol já reatribuídos.





A comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C indicou que a substância isolada de *Guarea guidonia* é idêntica a isolada de *Cneorum tricoccon* por Trautmann e colaboradores [53], a qual foi denominada

Х

{[1S-($1a\beta$, $4a\alpha$, $7a\beta$, $7b\beta$)]-

aromadendreno

aloaromadendreno

decaidro-1,7-dimetil-1-(4-metil-pent-3-en-1-il)-4-metilen-1H-cicloprop[e]azulen-7-ol}. No entanto, a estereoquímica *cis* da junção do ciclopentano e cicloeptano proposta pelos autores, que basearam-se na análise de produtos de modificações estruturais assim como em curvas de DOR e DC, deve ser retificada para *trans*, já que os valores de RMN de ¹³C atribuidos a D-2 são bastante próximos aos valores do aromadendreno, no qual a estereoquímica da junção dos anéis é *trans*, e diferentes dos valores do aloaromadendrano, que possui junção *cis* [54, (Tabela 15, p. 36)]. A semelhança dos valores de deslocamentos químicos de D-2 e do aromadendreno é especialmente notada quando os valores para C-1, C-6, C-7 C-8, C-9, C-10 e C-15 são comparados.

cneorubina

A Tabelas 15, p. 36 e 16, p. 37 mostram, respectivamente, os dados de RMN de ¹³C e de ¹H atribuídos para **D-2**.

Identificação estrutural de D-1



A análise dos dados de RMN de ¹³C - técnicas PND e DEPT 135° e DEPT 90° - de D-1 (Espectros 9 10 e 11) acusou a presença de dezenove sinais relativos a átomos de carbono, sendo cinco grupos metílicos, seis grupos metilênicos, quatro grupos metínicos e quatro átomos de carbono quaternários. O espectro de massas mostrou o pico do íon-molecular em m/z = 272 e

portanto, como não foram observados valores de deslocamentos químicos característicos de carbono carbinólico, a fórmula molecular da substância é $C_{20}H_{32}$. Assim, concluiu-se que o sinal intenso em 124,8 δ deve ser relativo a dois átomos de carbono e a molécula tem portanto cinco deficiências de hidrogênio, sendo três ligações duplas e dois anéis.

No espectro de RMN de ¹H (Espectro 10), observou-se um sinal em torno de 0,7 δ (ddd) e no espectro de RMN de ¹³C um sinal em 23,8 δ relativo a carbono quaternário, ambos característicos de anel ciclopropânico. Desta forma, ficou estabelecida a presença deste tipo de anel na molécula, restando apenas mais uma insaturação que deve corresponder a um ciclo de dez átomos de carbono.



biciclogermacren-13-al

Comparando-se os dados de RMN de ¹³C da substância isolada (D-1) com os do sesquiterpeno biciclogermacren-13-al [55], concluiu-se que as estruturas moleculares são bastante semelhantes. Assim como D-2, D-1 também possui um grupo isoprenila ligado a C-12 do sesquiterpeno, sendo portanto um diterpeno.

Através do espectro HETCOR (Espectro 13, expansão 14), foi possível correlacionar os átomos de carbono aos seus respectivos átomos de hidrogênio, conforme mostra a Tabela 20.

posição	¹³ C	¹ H
1	124,8	4,74
2	26,0	2,00
3a	41,2	1,79
3b		2,12
4	127,9	-
5	126,4	4,28
6	26,5	1,20
7	29,4	0,54
8a	26,9	1,15
8b		1,76
9a	37,2	1,67
9b		2,23
10	140,8	-
11	23,8	-
12	43,6	1,20
13	12,8	0,94
14	17,6	1,53
15	20,8	1,40
16	25,0	1,93
17	124,8	5,03
18	130,9	-
19	16,5	1,60
20	25,7	1,60

Tabela 20- Dados de RMN para D-1 (50 e 200 MHz, δ CDCl₃)

Para a atribuição dos deslocamentos químicos dos grupos metílicos foram utilizados os valores atribuídos aos átomos de hidrogênio e de carbono de tais grupos em D-2 e na substância modelo biciclogermacren-13-al [55]. Assim, CH₃-15 é aquele cujo sinal está em 1,40 δ (d, 1,3 Hz) e 20,8 δ nos espectro de RMN de ¹H e de ¹³C respectivamente. Os hidrogênios de CH₃-19 e CH₃-20 aparecem como dois dubletos em torno de 1,60 δ e o espectro HETCOR mostrou que eles acoplam com os sinais relativos aos átomos de carbono em 16,5 e 25,7 δ . Portanto, CH₃-14 aparece em 1,53 e 17,6 δ nos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C e CH₃-13 em 0,94 e 12,8 δ .

O espectro HETCOR confirmou que o sinal em 124,8 δ é relativo a dois átomos de carbono já que foram observados os acoplamentos dos átomos de carbono relativos àquele sinal e os multipletos em 4,74 e 5,03 δ , os quais foram respectivamente atribuídos a H-1 e H-17.

O espectro HOMOCOSY (Espectro 15) mostrou diversas correlações entre os átomos de hidrogênio, que estão coerentes com a estrutura proposta para D-1, conforme mostra a Tabela 21.

Tabela 21- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-1

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-1 (4,74)	H-2 (2,00)
H-1 (4,74)	H-15 (1,40)
H-5 (4,28)	H-6 (1,20)
H-5 (4,28)	H-14 (1,53)
H-6 (1,20)	H-7 (0,54)
H-7 (0,54)	H-8a (1,15)
H-7 (0,54)	H-8b (1,76)
H-17 (5,03)	H-16 (1,93)
H-17 (5,03)	H-19/20 (1,60)

(200 MHz, CDCl₃)

Os deslocamentos químicos para os demais átomos de carbono da molécula foram determinados com base nos dados de D-2 e do biciclogermacren-13-al [55 (Tabela 17, p. 38)].

A comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C indicou que a substância isolada de Guarea guidonia é idêntica a isolada por Trautmann e colaboradores [53], a qual foi denominada de cneorubina y {[11S-(1 α ,2E,6E,10 α)]-3,7,11-trimetil-11-(4metil-pent-3-en-1-il)biciclo[8.1.0]undeca-2,6-dieno}.

46

Determinação estrutural de D-3 e D-4



Assim como para D-1, os respectivos espectros de RMN de ¹³C - técnicas PND, DEPT 135^o e DEPT 90^o - de D-3 (Espectros 16, 17 e 18) e D-4 (Espectros 32 e 33), acusaram a presença de vinte átomos de carbono, sendo quatro grupos metílicos, seis grupos metilênicos,

D-3 e D-4 seis grupos metínicos e quatro carbonos quaternários em cada molécula. A comparação dos valores de deslocamentos químicos fornecidos por aqueles espectros com os valores atribuídos a D-2 mostrou que as estruturas moleculares das três substâncias são bastante semelhantes sendo que tanto D-3 como D-4 possuem outro grupo hidroxílico nas suas respectivas moléculas, uma vez que os seus espectros mostraram sinal relativo a grupo metínico em 66,5 e 67,2 δ respectivamente.

A análise dos espectros de RMN de ¹H de D-3 e D-4 (Espectros 19 e 34) também indicou que as estruturas moleculares das duas substâncias são bastante semelhantes. Ambos os espectros mostraram dubletos em 5,1 e 4,7 δ além de um multipleto em 4,6 δ . Os sinais relativos aos hidrogênios metílicos também são coincidentes nos espectros: dois singletos em torno de 1,0 δ e outro em 1,2 δ e dois dubletos em 1,7 δ . Por outro lado, estes espectros mostraram-se bastante diferentes quando as regiões entre 0,5 e 2,0 δ foram comparadas.

A avaliação dos valores de deslocamentos químicos dos átomos de carbono de D-3 e D-4, em comparação com os de D-2 (Tabela 15, p. 36), sugeriu que as respectivas moléculas daquelas substâncias possuem uma hidroxila em C-16 além daquela em C-4. A localização da segunda hidroxila em C-16 justifica a desproteção de 6,5 δ para C-12 e de 4 δ para C-17, devido a efeito β provocado por aquele grupo. Já C-11, embora quaternário, sofreu proteção de aproximadamente 3,7 δ em D-3 e de 2,6 δ em D-4 pois tal carbono tem relação γ com a hidroxila. Ao comparar-se os valores de deslocamentos químicos para os demais átomos de carbono notou-se que D-4 e D-2 possuem valores mais semelhantes entre si do que D-3 e D-2.

Os espectros de massas de D-3 e D-4 foram obtidos através da técnica de ionização química, o que levou a observação dos ions quasi-moleculares em m/z = 305 e m/z = 303, os quais possuem respectivamente uma unidade de massa atómica a mais e a menos do que M⁺⁺. Dessa forma, foi possível caracterizar a fórmula molecular para ambas as substâncias como C₂₀H₃₂O₂. A Tabela 22 mostra alguns dos fragmentos observados nos espectros de D-3 e D-4.

Tabela 22- Fragmentos observados no espectro de massas de D-3 e D-4, obtidos pela técnica de ionização química.

	D-3	D-4
	m/z (%)	m/z (%)
[M + H] ⁺	305 (1,2)	-
[M - H] ⁺	303 (2,2)	303 (1,9)
304 - 15	289 (5,9)	289 (15,6)
[M - H] ⁺ - 15	288 (13,9)	288 (11,9)
[M + H] ⁺ - 18	287 (64,9)	287 (56,0)
[M + H] ⁺ - 36 (2H₂O)	269 (100)	269 (100)
[M - H] [⁺] - 72 (C₄H ₈ O)	231 (14,2)	231 (23,4)
231 - 18	213 (5,7)	213 (11,0)
287 - 85 (C₅H ₉ O)	202 (13,0)	202 (13,0)

Análise dos espectros de RMN bidimensionais para D-3

Através do espectro HETCOR de D-3 (Espectro 21 e expansão 22), foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio da molécula, restando dúvidas quanto aos valores relativos a H-2 e H-3, além de um dos hidrogênios em 8. Este espectro também mostrou que ambos os átomos de hidrogênio ciclopropânicos (H-6 e H-7) possuem deslocamentos químicos em torno de 0,7 δ .

O espectro HOMOCOSY, obtido a 400 MHz (Espectro 23 e expansão 24), permitiu a constatação de que H-6 é ligeiramente mais desprotegido do que H-7, já que observou-se o acoplamento entre o sinal relativo a H-5 e aquele em 0,7 δ , o que corresponde ao acoplamento de H-6 com H-5. Também observou-se uma correlação entre os sinais em 0,7 δ e 0,93 δ , que corresponde ao acoplamento de H-7 com H-8a assim como a correlação deste último com o sinal em torno de 2,0 δ (H-8b e H-9a). Foram observados também, os acoplamentos entre H-5 e H-1 e deste último com H-2a e H-2b. Porém, não se observou o acoplamento entre H-6 e H-7 uma vez que eles possuem praticamente o mesmo deslocamento químico. Outro acoplamento observado foi o existente entre H-17 e H-16, o que comprovou que a hidroxila está ligada a C-16. Também foi possível observar o acoplamento de H-16 com H-12a e H-12b. As Tabelas 23 e 24, p. 50 mostram os acoplamentos observados no espectro HOMOCOSY e HETCOR respectivamente.

O espectro de RMN de ¹H monodimensional a 400 MHz (expansão 20) também mostrou que o sinal relativo a H-9b é um duplo dubleto em 2,42 δ , de constantes de acoplamento 6,4 e 13,2 Hz, que correspondem aos acoplamentos deste hidrogênio com H-8b e com H-9a. Estes acoplamentos também foram observados no espectro HOMOCOSY.

As correlações carbono-hidrogênio a três ligações observadas no espectro HMBC (ampliações 25, 26, 27, 28 e 29) confirmam algumas atribuições de deslocamentos químicos, conforme mostram a Tabela 25 e a Figura 5, p. 51.

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-1 (2,25)	H-2a (1,65)
	H-2b (1,95)
	H-5 (1,30)
H- 5 (1,30)	H-6 (0,73)
H-7 (0,65)	H-8a (0,93)
	H-8b (2,00)
H-9b (2,42)	H-8b/H-9a
H-16 (4,65)	H-12a (0,90)
	H-12b (1,70)
	H-17 (5,10)

Tabela 23- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-3 (400 MHz, CDCl₃)

Tabela 24- Dados de RMN para D-3 (100 e 400 MHz, δ , CDCl₃)

posição	¹³ C	¹ H (J em Hz)
1	48,3	2,25
2a	24,0*	1,65
2b		1,95
3	39,5	1,70
4	80,0	-
5	53,0	1,30
6	25,0**	0,73
7	25,2**	0,65
8a	25,3	0,93
8b		2,00
9 a	39,0	2,05
9b		2,42
10	154,5	-
11	20,7	-
12a	49,7	0,90
1 2b		1,70
13	13,2	1,04
14	23,3	1,25
15a	106,5	4,69
15b		4,71
16	66,5	4,65 (8,7; 8,7 e 4,7)
17	128,2	5,10 (d largo; 8,7)
18	134,5	-
19	18,2	1,66
20	25,7	1,67
¹³ C (δ)	¹ Η (δ)	
---------------------	--------------------	
C-1 (48,1)	H-9a (2,05)	
C-1 (48,1)	H-9b (2,42)	
C-1 (48,1)	H-15a (4,69)	
C-4 (80,0)	H-2b (1,95)	
C-7 (25,1)	H-9b (2,42)	
C-9 (39,0)	H-15b (4,71)	
C-19 (18,2)	H-17 (5,50)	
C-20 (25,7)	H-17 (5,50)	

Tabela 25- Correlações ¹³C-¹H a longa distância observadas no espectro HMBC de D-3 (100 e 400 MHz, CDCl₃)

Figura 5- Correlações ¹³C-¹H a longa distância observadas no espectro HMBC de



D-3

O espectro NOESY de **D-3** (Espectro 30, expansão 31), mostrou algumas relações espaciais indicando a estereoquímica relativa dos centros quirais C-1, C-4, C-5, C-6 e C-11. Tal espectro mostrou a interação entre os átomos de hidrogênio do grupo metílico em 14, que está em α em relação ao plano do anel, com H-1 e H-6,

confirmando a posição α também para estes átomos. A interação entre H-5 e os hidrogênios do grupo CH₃ em 13, que estão em posição β , também foi observada, o que confirmou que o grupo isoprenila está unido a C-12. As interações observadas entre H-15a e H-9b e entre H-15b e H-2b levaram à conclusão de que H-9b está em β assim como H-2b, pois somente em tal posição estas interações são possíveis. Também puderam ser observadas interações espaciais na porção isoprênica da molécula, porém a estereoquímica ao redor de C-16 não pode ser definida por esta técnica de RMN, uma vez que a conformação desta cadeia lateral não pode ser estabelecida pois existe rotação livre ao redor das ligações C-11/C-12 e C-12/C-16. Todas as evidencias espectrais indicam que a estereoquímica relativa da porção cíclica da molécula é a mesma de **D-2** e do **espatulenol**. A Tabela 26 assim como a Figura 6 mostram as relações espaciais entre os átomos de hidrogênio observadas no espectro NOESY.

Tabela 26- I	nterações	espaciais	observadas	no espec	tro NOESY	de	D-3
(400 MHz,	CDCl ₃)					

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-17 (5,10)	H-19 (1,66)
	H-12a (0,90)
	H-16 (4,65)
H-16 (4,65)	H-19 (1,66)
	H-20 (1,67)
	H-13 (1,04)
H-15a* (4,69)	H-9b* (2,42)
H-15b*	H-2b* (1,95)
H-14* (1,25)	H-1* (2,25)
	H-6* e/ou H-7 (0,70)
H-13* (1,04)	H-5* (1,30)
	H-12a (0,90)

52

Figura 6- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-3



Análise dos espectros bidimensionais de D-4

Como descrito anteriormente, as moléculas de **D-3** e **D-4** possuem a mesma estrutura plana, diferindo apenas em um ou mais centros quirais. Considerando que a análise detalhada dos dados obtidos por diversas técnicas de RMN indicou uma configuração relativa de **D-3** idêntica a **D-2**, e que os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de **D-4** mostraram-se muito semelhantes aos de **D-2**, a diferença entre **D-3** e **D-4** deve estar apenas na cadeia lateral, o que levaria as substâncias a serem epiméricas em C-16.

A análise do espectro HETCOR (Espectro 35 e expansão 36) proporcionou a atribuição dos valores de deslocametos químicos para todos os átomos de hidrogênio da molécula de **D-4**. Este espectro mostrou que, ao contrario de **D-3**, os átomos de hidrogênio ciclopropânicos (H-6 e H-7) possuem deslocamentos químicos distintos sendo que o sinal relativo a H-6 é um duplo dubleto em 0,54 δ (9,7 e 10,8 Hz) e para H-7 observou-se um duplo duplo dubleto em 0,85 δ (11,3; 9,7 e 6,0 Hz). A Tabela 27 mostra as correlações obtidas pelo espectro HETCOR.

posição	¹³ C	¹ H (J em Hz)
1	51,4	2,23
2a	25,6	1,65
2b		1,90
3a	41,0	1,65
3b		1,80
4	80,6	-
5	53,3	1,30
6	26,5	0,54 (10,8 e 9,7)
7	27,4	0,85 (11,3; 9,7 e 6,0)
8	24,8	0,99
9a	38,8	2,05
9b		2,40
10	153,5	-
11	21,7	-
12a	49,8	1,30
12b		1,48
13	14,6	1,08
14	25,1	1,28
15a	106,5	4,66
15b		4,69
16	67,2	4,58 (8,7; 8,7 e 4,3)
17	128,4	5,17 (8,7; 1,4 e 1,4)
18	134,8	_
19	18,1	1,67 (1,4)
20	25,8	1,69 (1,4)

Tabela 27- Dados de RMN para D-4 (50 e 200 MHz, δ, CDCl₃)

O espectro HOMOCOSY (Espectro 37 e expansão 38) confirmou a proposta estrutural uma vez que foram observados os acoplamentos entre H-17 e H-16 além de H-16 e os átomos de hidrogênio em C-12, o que confirmou que a hidroxila está em C-16. Outros acoplamentos observados estão descritos na Tabela 28.

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-1 (2,23)	H-5 (1,30)
H-5 (1,30)	H-6 (0,54)
H-6 (0,54)	H-7 (0,85)
H-7 (0,85)	H-8 (0,99)
H-8 (0,99)	H-9a (2,05)
H-9a (2,05)	H-9b (2,40)
H-17 (5,17)	H-16 (4,58)
H-16 (4,58)	H-12a (1,30)
	H-12b (1,40)
H-12a (1,30)	H-12b (1,40)

Tabela 28- Correlações observadas no espectro HOMOCOSY de D-4

(400 MHz, CDCl₃)

As correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC (ampliações 39, 40, 41, 42 e 43), confirmaram algumas atribuições. A Tabela 29 e a Figura 7 mostram as correlações a três ligações observadas em tal espectro.

Tabela 29- Correlações ¹³C-¹H a longa distância observadas no espectro HMBC de D-4 (400 e 100 MHz, CDCl₃)

⁻¹³ C (δ)	¹ Η (δ)
C-1 (51,4)	H-9b (2,40)
	H-15
C-9 (38,8)	H-15
C-17 (128,4)	H-19 (1,67)
	H-20 (1,69)
C-19 (18,1)	H-20 (1,69)
	H-17 (5,17)
C-20 (25,8)	H-17 (5,17)
	H-19 (1,67)

Figura 7- Correlações ¹³C-¹H a longa distância observadas no espectro HMBC de



O espectro de RMN técnica NOESY (Espectro 44, expansão 45) mostrou que as interações espaciais existentes entre os átomos de hidrogênios da molécula de **D-4** são as mesmas que as observadas no espectro de **D-3**, com exceção de que para **D-4** foi observada a interação entre H-6 e H-1, mas não observou-se a relação entre H-5 e CH₃-13 Estes dados reforçam a proposta de que **D-3** e **D-4** sejam apenas epiméricos em C-16. A Figura 8 assim como a Tabela 30 mostram as relações espaciais observadas.

D-4

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-1* (2,23)	H-14* (1,28)
H-1* (2,23)	H-6* (0,54)
H-14* (1,28)	H-6* (0,54)
H-15a* (4,66)	H-9b* (2,40)
	H-2b* (1,90)
H-16 (4,58)	H-12a (1,30)
	H-13 (1,08)
	H-19 (1,67)
H-17 (5,17)	H-19 (1,67)
	H-20 (1,69)

Tabela 30- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-4

(400 MHz, CDCl₃)

Figura 8- Interações espaciais observadas no espectro NOESY de D-4



Considerações sobre as estruturas de D-2, D-3 e D-4

Como descrito anteriormente, através da análise do espectro NOESY de D-3 e de D-4 concluiu-se a estereoquímica relativa da porção cíclica das moléculas, sendo que H-1, CH₃-14 e H-6 estão no plano α , e H-5 e CH₃-13 estão no plano β . Desta forma, a junção dos anéis de 5 e 7 membros ficou definida como sendo trans. A comparação dos dados de RMN de ¹³C destas moléculas com os dados dos sesquiterpenos aloaromadendreno e aromadendreno [54 (Tabela 15, p. 36)], também comprova tal estereoquímica, já que os valores de deslocamentos químicos de C-8, C-9, C-10 e C-15 das substâncias isoladas são bastante próximos aos dos de carbono equivalentes sesquiterpeno átomos do com juncão trans (aromadendreno). Assim sendo, não existe possibilidade para que a diferença entre D-3 e D-4 esteja na estereoquímica da junção dos anéis ou na configuração de qualquer outro centro quiral que não seja o C-16. Assim, estes diterpenos são descritos como epímeros em C-16 de decaidro-1,7-dimetil-1-(4-metil-3-penten-2-ol)-4-metilen-1H-cicloprop[e]azulen-7-ol, dos quais não foram encontrados registros na literatura.

Como descrito na parte experimental desta tese, as substâncias D-3 e D-4 foram isoladas a partir de uma mesma coluna de sílica, sendo que D-3 é menos polar do que D-4, já que foi eluida primeiramente. Assim, considerando que existe uma diferença de polaridade entre tais substâncias, propõem-se que elas sejam epiméricas em C-16 e que, provavelmente, em D-3 exista uma ligação de hidrogênio entre os 2 grupos hidroxílicos, favorecida pela configuração do carbono carbinólico C-16, o que justificaria a sua menor polaridade em relação a D-4. Isto ocasionaria uma mudança na conformação do penta-anel, proporcionando proteção em C-1, C-2 e C-6, devido ao aumento dos efeitos γ gauche, já que a posição de CH₃-14 seria α pseudo-axial.

Cáculos de energia molecular realizados pelo programa HyperChem através do método de mecânica molecular (MIM+), efetuados pelo Dr. Gilberto do Vale

Rodrigues, da UFMG, mostraram que os dois epímeros possuem praticamente a mesma estabilidade quando não é considerada a ligação de hidrogênio. Quando esta é introduzida, o epímero com configuração R ao redor de C-16 é bastante desestabilizado, mas aquele com configuração S sofre apenas uma pequena desestabilização. A Tabela 31 mostra os valores de energia calculados para os dois epímeros em C-16.

	sem lig. H	com lig. H
configuração	(kcal/mol)	(kcal/mol)
C-16 (R)	10,173	21,526
C-16 (S)	11,659	15,520

Tabela 31- Valores de energia para os epímeros em C-16

Assim, estes dados sugerem que a configuração ao redor de C-16 é S para D-3 e R em D-4. Porém, para que a estereoquímica deste centro quiral seja definitivamente estabelecida, é necessário que outros métodos mais precisos sejam empregados, como por exemplo o Método de Mosher [56].

A Figura 9, p. 60 mostra a proposta biogenética para os diterpenos isolados de *Guarea guidonia*.





D-1





D-3 e D-4

Identificação do sitosterol

O esteróide sitosterol foi identificado, através da comparação com os dados fornecidos pela literatura [57] na fração A-6, proveniente do fracionamento cromatográfico da fração metanólica do extrato hexânico das folhas de *G. guidonia.* A Tabela 32 mostra os dados de RMN de ¹³C para esta substância. Os Espectros 46 e 47 do volume II são respectivamente os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C para esta substância.

Tabela 32- Dados de RMN de ¹³C para o sitosterol (50 MHz, CDCl₃)

	¹³ C	
	1	
	2	
	3	
	4	
21	5	
	6	
19 20 22 27	7	
	8	
9 14 16 24 26	9	
28 26	10	
6 29	11	
	12	
sitosterol	13	
	14	
	15	
	16	
	17	
	18	
	19	
	20	
	21	
	22	
	23	
	24	
	25	
	26	
	27	
	28	

29

δ 37,2 31,6 71,7 42,2 140,7 121,7 31,9 31,6 50,1 36,5 21,0 39,7 42,2 56,7 24,3 28,2 56,0 11,9 19,8 36,1 19.4 34,1 26,0 45,8 29,6 21,0 19,4 23,0

11,9

SESQUITERPENOS DETECTADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE Guarea guidonia













S-4



S-6



S-7







O óleo essencial bruto

A análise do cromatograma obtido por CG (Figura 4, p. 27) do óleo essencial bruto das folhas de *Guarea guidonia* mostrou que os tempos de retenção dos constituintes (condições: ver experimental, p. 12) estão principalmente entre 7 e 14 minutos (entre 120° e 160° C), que corresponde à faixa relativa a hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos mono-oxigenados e eventualmente di-oxigenados [58]. Os valores dos tempos de retenção dos componentes do óleo essencial bruto em proporção maior ou igual a 1% estão listados na Tabela 12, p. 26.

O espectro de RMN de ¹H (Espectro 48), confirmou o caráter predominantemente terpênico do óleo, já que não apresenta sinais na região de prótons aromáticos, que caracterizariam aril propanóides, substâncias que frequentemente compõem óleos essenciais.

Determinação do esqueleto carbônico dos sesquiterpenos

A elucidação estrutural dos sesquiterpenos obtidos puros ou em misturas foi baseada principalmente nos dados de RMN de ¹³C, técnicas PND e DEPT 135^o, além do espectro de massas que indicou a massa molecular dos mesmos.

Para a análise dos espectros das misturas sesquiterpênicas seguiu-se a metodologia descrita para misturas de triterpenos [59, 60]. Este método sugere que sinais de intensidade semelhantes, relativos a átomos de carbono de mesma multiplicidade, devam pertencer à mesma molécula. Desta forma é possível separar os sinais relativos a cada constituinte da mistura desde que eles não estejam presentes na mesma proporção. A intensidade relativa entre os constituintes é dada pelo cromatograma da mistura obtido por CG.

A determinação do tipo de esqueleto carbônico da molécula é um passo importante no processo de elucidação estrutural, uma vez que os sesquiterpenos possuem uma gama muito grande de possibilidades estruturais e, por serem moléculas pequenas, qualquer alteração na estrutura ocasiona variações consideráveis nos valores de deslocamentos químicos dos átomos de carbono de toda a molécula, o que torna difícil a associação desses valores a um tipo único de esqueleto carbônico.

A fórmula molecular do composto, assim como o número de deficiência de hidrogênios da estrutura de cada sesquiterpeno, são deduzidos a partir do espectro de massas associado ao t_R e ao espectro de RMN de ¹³C. Embora o pico correspondente ao íon-molecular possa ser suficiente para a determinação da fórmula molecular, ele nem sempre está presente nos espectros de massas dos sesquiterpenos. Nestes casos, o valor de t_R é usado para definir a presença de oxigênio na molécula. O espectro de RMN de ¹³C acusa o número de ligações duplas da molécula através dos sinais relativos a átomos de carbono sp² e então é possível concluir o número de anéis da estrutura. Este dado, juntamente com o número de grupos metílicos, metilênicos, metínicos e de átomos de carbono quaternários, também obtidos pelos espectros de RMN de ¹³C - técnicas PND e DEPT 135^o - indica as possibilidades estruturais do esqueleto sesquiterpênico. A seguir os espectros de RMN de ¹³C e de ¹H bem como o espectro de massas devem ser avaliados mais detalhadamente.

Usando-se esta metodologia foi possível concluir que as estruturas moleculares dos sesquiterpenos aqui analisados possuem um grupo isopropílico, já que o fragmento em m/z = 161, correspondente à perda de tal grupo, é observado nos espectros de massas. Outras indicações da presença deste grupo são os dubletos próximos a 1,0 δ observados nos espectros de RMN de ¹H, relativos a átomos de hidrogênio metílicos, além de dois ou mais sinais aproximandamente em 21 δ , relativos aos carbonos metílicos, observados nos espectros de RMN de ¹³C. Outra característica importante apontada pelo espectro de RMN de ¹H é a existência de um grupo metílico ligado a carbono quaternário, pois tais espectros mostram singletos em 1,0 δ ou em 1,2 δ , quando este está ligado a carbono oxigenado (ver determinação estrutural de **S-9**). Quando

possível, a existência do carbono quaternário foi constatada pelo espectro de RMN de ¹³C.

Considerando-se todas essas características, foi possível selecionar alguns esqueletos sesquiterpênicos através de um levantamento feito no Dictionary of Terpenes [61]. Tais esqueletos são mostrados na Figura 10.

Figura 10- Esqueletos sesquiterpênicos

daucano

(carotano)



isodaucano



pseudoguaiano





nardosinano

gorgonano

eremofilano

eudesmano

Sesquiterpenos com esqueletos nardosinano são encontrados apenas em organismos marinhos [61]. Como o β -selineno (S-3) já havia sido isolado da fração metanólica do extrato hexânico das folhas de *G. guidonia* (Esquema 2, p. 23), considerou-se a possibilidade de sesquiterpenos com esqueleto eudesmânico estarem presentes no óleo essencial. De fato, isto foi confirmando para todas as substâncias, com exceção daquela presente nas frações I-7, I-8 e I-9, onde foi encontrado S-9, cujo esqueleto, que não apresenta as características do grupo da Figura 10, é do tipo guaiânico.

A seguir são descritas as determinações estruturais para os sesquiterpenos encontrados no óleo essencial das folhas de *Guarea guidonia*.

Tabela 33-	Valores	dos tempos	de rete	enção dos	s sesquiterpenos	detectados	nas
	folhas d	e Guarea gi	uidonia				

sesquiterpenos	t _R (min)
	6,925
S-2	8,290
S-3	8,335
S-4	9,801
S-5	11,194
S-9	11,357
S-6	11,481
S-7	12,765
S-8	14,466

66

 Tabela 34- Principais fragmentos observados nos espectros de massas dos sesquiterpenos detectados nas folhas de

 Guarea guidonia

	S-9		(M ⁺•) on	ои	ои	ои	36	ou	28	4	ou	9	ou	100	22	5
	S-8	no (M ^{+•})	ou	ou	43	13	7	ო	4	ო	12	15	Q	10	28	80
	S-7	5 (M ^{+•})	ou	ou	ои	7	ou	ou	ou	ou	ou	20	7	7	16	4
	S-6			33 (M⁺•)	ო	ои	ი	51		26	0	~	4	100	12	58
%	S-5		6 (M ⁺)	ou	ou	ои	63	0	40	ou	ou	ო	ო	71	18	4
	S-4			19 (M ^{*•})	ои	ou	оп	ou	ou	25	27	ou	66	ou	12	20
	S-3						45 (M ^{+•})	ou	44	-	~	22	4	47	42	4
	S-2						53 (M⁺•)	9	54	9	~	26	5	58	47	9
	S-1						39 (M ⁺ •)	ou	41	5	ои	18	9	45	38	თ
	fórmula	$C_{15}H_{24}O_2$	$C_{15}H_{26}O$	C ₁₅ H ₂₄ O	$C_{15}H_{23}O$	$C_{15}H_{22}O$	$C_{15}H_{24}$	$C_{15}H_{22}$	$C_{14}H_{21}$	$C_{14}H_{19}$	$C_{13}H_{21}$	$C_{13}H_{19}$	$C_{12}H_{19}$	$C_{12}H_{17}$	$C_{11}H_{15}$	C ₁₁ H ₁₃
	m/z	236	222	220	219	218	204	202	189	187	177	175	163	161	147	145

						%				
m/z	fórmula	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	8-9
139	C ₁₀ H ₁₉	ou	ou	ou	ou	-	9	40	7	ou
137	$C_{10}H_{17}$	ou	~	~ -	50	35	7	15	26	4
135	$C_{10}H_{15}$	22	27	25	20	38	ω	9	14	15
133	$C_{10}H_{13}$	42	53	50	ou	21	19	10	43	24
121	C_9H_{13}	56	65	56	62	49	G	11	65	63
109	C_8H_{13}	22	23	22	72	23	13	66	46	42
107	C_8H_{13}	83	06	93	41	18	13	28	81	42
105	C_8H_9	66	100	98	24	56	43	16	ou	84
97	C_7H_{13}	თ	7	7	10	10	ю	100	19	თ
95	C_7H_{11}	43	41	43	45	32	16	44	51	64
93	C7H₅	98	88	100	41	51	11	29	32	62
81	C ₆ H ₉	ou	57	68	44	100	14	68	59	68
62	C_6H_7	100	62	86	38	28	11	32	35	64
67	C_5H_7	71	53	66	100	23	12	49	62	41
55	C4H7	57	34	49	61	24	17	77	100	48
53	C₄H₅	51	32	40	26	10	13	30	48	21
no: não ob:	servado									

I

I

Tabela 35- Dados de RMN de ¹³C (50 MHz, δ, CDCl₃) dos sesquiterpenos detectados nas folhas de

Guarea guidonia

υ	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	8-S	S-9
-	41,7*	36,7	41,2	38,1*	40,7	50,2	30,3	38,1	51,2
2	17,6	18,9	23,5	17,5	20,4	64,4	16,8	17,0	23,9**
S	31,6	32,9	36,9	29,4	43,2	40,8	29,2	29,9	33,1
4	32,9	ou	150,8	33,3	72,3	32,9	33,3	32,1	37,2
5	149,6	ou	49,9	ou	54,4	147,2	ou	53,2	43,8
9	114,5	28,4	29,5	57,6	117,2	114,3	58,3	56,1	124,0
7	141,4	41,1	45,8	141,1	143,8	ou	ou	ou	148,2
ω	120,9	24,0	26,8	120,3	23,4	121,3	124,6	51,2	25,1**
6	41,4*	39,9	41,9	38,1*	39,5	41,5	74,4	38,5	42,6
10	34,2	ou	36,0	32,9	33,8	ou	ou	34,6	76,0
11	35,6	ou	151,0	37,5	35,0	36,2	38,0	37,4	37,6
12	21,4	24,8*	21,0	18,4	21,8*	21,3*	21,0*	18,1*¶	21,2*
13	21,8	110,3	108,1	21,4**	21,6*	21,7*	21,1*	22,2*	21,3*
14	23,6**	ou	16,3	21,4**	17,6	24,3**	21,2*	17,5¶	21,4
15	24,5**	23,1*	105,3	21,3**	22,3	25,0**	17,8	18,0¶	15,2
no: não obs	ervado * **;	I: os deslocan	ientos podem	estar invertido	s nas colunas				

69

3) dos sesquiterpenos detectados nas folhas de	
CDC	
ΛHz , δ,	
H (200 N	
RNN de ¹	idonia
os de f	rea gu
- Dad	Gua
la 36	
Tabe	

1,41 / 1,76 1,60 / 1,76 1,60 / 1,33 1,90 / 2,15 2,15 2,15 5,46 0,93* 2,15 0,94* 1,18 1,90 0,84 6-S 2,93 2,80 8-S 5,80 3,01 3,23 S-7 5,59 2,69 0,95* 5,23 1,80 2,24 0,92* 0,96 1,13 1,18 1,44 4,03 ο-S 1,12 / 1,25 1,25 / 1,71 1,90 5,46 2,10 0,96* 0,92* · 0,73 1,91 1,50 1,03 ı 1,25 S -S 5,42 2,98 **S**4 2,66/2,73 1,45/1,55 1,05 4,34 / 4,64 *: os deslocamentos podem estar invertidos nas colunas 1,90 0,65 1,75 1,45 4,64 1,38 2,23 1,68 1,40 1,55 S-3 , 1 4,74 / 4,76 1,60 1,73 S-2 0,89* 0,96* 0,92* 5,54 1,08 5,25 <u>^-</u> 15 14 12 13 I

70

Elucidação estrutural dos sesquiterpenos de esqueleto eudesmânico (S-1 a S-8)

Os respectivos espectros de RMN de ¹³C de S-1, S-2 e S-3 não mostraram sinal na região relativa a átomos de carbono oxigenados. A ausência de átomos de oxigênio nas moléculas daqueles sesquiterpenos foi confirmada pelos respectivos valores de t_R (Tabela 33, p. 66).



O espectro de RMN de ¹³C de S-1, obtido da fração I-1, juntamente com os dados fornecidos pelo DEPT 135^o (Espectros 49 e 50), acusou a presença de dois grupos metínicos na região do espectro característica de átomos de carbono sp². Os sinais relativos aos átomos de carbono quaternários sp² não foram registrados neste espectro, mas

seus valores puderam ser observados no espectro da fração I-2 (Espectro 51), que é uma mistura onde S-1 é o constituinte principal. A comparação dos dados de RMN de ¹³C obtidos para S-1 com os das substâncias eudesm-5-en-11-ol [62] e eudesma-5,7-dien-11-ol [63], proporcionou a determinação estrutural para S-1, que foi definido como eudesma-5,7-dieno, do qual não foi encontrado registro na literatura. A Tabela 37 mostra os dados de RMN de ¹³C para as substâncias modelos em comparação com a atribuição proposta para S-1.



eudesm-5-en-11-ol

eudesma-5,7-dien-11-ol

S-1

12

Tabela 37- Dados de RMN de ¹³C para as substâncias modelos e S-1 (^a 50 MHz, δ, CDCl₃)

¹³ C	eudesm-5-en-11-ol [62]	eudesma-5,7-dien -11-ol [63]	S-1*
1	39,6	42,8	41,7*
2	17,7	22,7	17,6
3	33,6	35,7	31,6
4	38,8	33,2	32,9
5	133,2	149,6	149,6
6	121,0	115,5	114,5
7	45,4	142,8	141,4
8	20,3	114,1	120,9
9	41,3	41,0	41,4*
10	34,4	34,9	34,2
11	73,5	71,4	35,6
12	27,2*	29,5*	21,4
13	27,4*	29,3*	21,8
14	22,4	22,4	23,6**
15	27,8	18,7	24,5**

*, **,: os deslocamentos químicos podem estar invertidos nas colunas

Ao comparar-se os deslocamentos químicos dos átomos de carbono mostrados na Tabela 37, observa-se que os valores de C-5, C-6 e C-7 de S-1 são muito próximos aos de eudesma-5,7-dien-11-ol, mas C-8 é mais desprotegido em S-1, já que tal átomo perdeu um efeito γ de proteção, causado pelo grupo hidroxílico em C-11. As posições das ligações duplas em S-1 também estão coerentes com a feição dos sinais relativos aos átomos de hidrogênio observados

no espectro de RMN de ¹H (Espectro 52; Tabela 36, p. 70), que mostra H-6 como um singleto em 5,54 δ e H-8 como um duplo dubleto em 5,25 δ (J= 1,4 e 5,1 Hz).

É importante ressaltar que em S-1 os grupos metílicos 14 e 15 estão no mesmo plano molecular, assim como em eudesm-5-en-11-ol, já que o espectro de RMN de ¹³C de S-1 mostrou um sinal em 17,6 δ , relativo a grupo metilênico, que deve ser atribuido àquele grupo da posição 2 da molécula. Esse valor de deslocamento químico é devido ao maior número de interações γ gauche entre os átomos de hidrogênio do grupo CH₂-2 e os grupos CH₃-14 e CH₃-15 quando ambos estão em posição axial. Os valores atribuidos a S-1 sugerem também que a atribuição de C-1 e C-9 para eudesm-5-en-11-ol está invertida, já que C-1 deve ter valores de deslocamento químico semelhantes tanto naquela substância modelo como em S-1.



S-3

A comparação dos valores de RMN de ¹³C - técnicas PND e DEPT 135° (Espectros 58 e 59), assim como de ¹H (Espectro 60) com os dados fornecidos pela literatura [64], levou à conclusão de que S-3 é o sesquiterpeno eudesma-4(15),11(13)dieno (β -selineno), isolado das frações J-6, J-7 e J-5. Este já

havia sido detectado na fração metanólica do extrato hexânico das folhas de *G. Guidonia*. A análise do espectro HETCOR (Espectro expandido 61) proporcionou a atribuição dos deslocamentos químicos para os átomos de hidrogênio (Tabela 38), enquanto que o espectro HOMOCOSY (Espectro 62) mostrou o acoplamento entre H-15a e H-15b assim como entre CH₂-13 e CH₃-12.

posição	¹³ C	¹ H
1	41,2	1,40
2	23,5	1,55
3	36,9	2,23
4	150,8	-
5	49,9	1,75
6	29,5	1,55 e 1,45
7	45,8	1,90
8	26,8	1,45
9	41,9	1,38
10	36,0	-
11	151,0	-
12	21,0	1,68
13	108,1	4,64
14	16,3	0,65
15	105,3	4,34 e 4,64

Tabela 38- Dados de RMN para S-3 (50 e 200 MHz, δ, CDCl₃)



O espectro de RMN de ¹³C - técnicas PND e DEPT 135° (Espectro 53, expansão 54 e Espectro 55, expansão 56) da fração J-5 mostrou que esta contém, além de S-3 (β -selineno), outro sesquiterpeno (S-2) também não oxigenado e, assim

S-2 como S-3, com uma ligação dupla exocíclica na cadeia lateral da molécula, já que o espectro registrou um sinal relativo a átomo de carbono sp² metilênico em 110,3 δ , valor característico de grupo CH₂ da posição 13 de sesquiterpenos de esqueleto eudesmânico [65].

O espectro de RMN de ¹H (Espectro 57) mostrou um sinal em torno de 4,7 δ , de feição espectral semelhante a do sinal relativo ao grupo CH₂-13 de S-3, e um duplo tripleto em 2,69 δ . Este mesmo espectro registrou valores de deslocamentos químicos de 1,07; 1,60 e 1,73 δ para os grupos CH₃, o que sugeriu que, em S-2, dois destes grupos estão ligados a átomos de carbono sp². Assim sendo, a molécula de S-2 deve conter, além da ligação dupla na cadeia lateral, outra que é totalmente substituida, sendo que a única posição possível para ela é entre C-4 e C-5.

A comparação dos dados de RMN de ¹H obtidos para a mistura J-5 com aqueles publicados por Maures e Grieder [66], confirmou a proposta estrutural para S-2 como sendo eudesma-4,11-dieno, já que os deslocamentos químicos são coincidentes.

A atribuição dos valores de deslocamentos químicos para os átomos de carbono foi feita com base nos valores de S-3 e S-1 (Tabela 35, p. 69).



S-5

Assim como o espectro de massas (tabela 34, p. 67) e o valor de t_R (tabela 33, p. 66), o espectro de RMN de ¹³C de **S-5** - técnicas PND e DEPT 135° - (espectros 66 e 67), encontrado na fração I-6, confirmou que este sesquiterpeno é oxigenado, pois foi observado um sinal relativo a carbono quaternário em 72,2 δ . Através da comparação dos dados de RMN de ¹³C e de

¹H (Espectro 68) registrados para **S-5** (Tabelas 35, p.69 e 36, p. 70) com os valores fornecidos pela literatura [67], concluiu-se que a substância isolada é o sesquiterpeno eudesm-6-en-4 α -ol.

A análise do espectro HETCOR de S-5 (Espectro expandido 69) proporcionou a atribuição dos átomos de hidrogênio da molécula (Tabela 39).

O espectro HOMOCOSY (Espectro 70 e expansão 71), confirmou a proposta estrutural uma vez que foram observados os acoplamentos mostrados na tabela 40.

posição	¹³ C	¹ H
1	40,7	1,25
2	20,4	1,50
. 3a	43,2	1,25
3b		1,71
4	72,3	-
5	54,4	1,91
6	117,2	5,46
7	143,8	-
8	23,4	1,90
9a	39,5	1,12
9b		1,25
10	33,8	-
11	35,0	2,10
12	21,8*	0,96*
13	21,6*	0,92*
14	17,6	0,73
15	22,3	1,03

Tabela 39- Dados de RMN para S-5 (50 e 200 MHz, δ, CDCl₃)

* os deslocamentos podem estar invertidos

Tabela 40- Acoplamentos observados no espectro HOMOCOSY de S-5 (200 MHz, CDCl₃)

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-1 (1,25)	H-2 (1,50)
H-2 (1,50)	H-3a (1,25)
	H-3b (1,71)
H-3a (1,25)	H-3b (1,71)
	H-5 (1,91)
H-9a (1,25)	H-9b (1,12)

 $2 \underbrace{)}_{16} \underbrace{)}_{16} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{16} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{12} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{12} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{12} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{12} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{14} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{14} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{14} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{14} \underbrace{)}_{13} \underbrace{)}_{14} \underbrace{$

S-4

O espectro de RMN de ¹³C da fração I-4 mostrou que esta é constituida por uma mistura de sesquiterpenos. Os valores de tempos de retenção, obtidos por cromatografia gasosa, mostraram que os sesquiterpenos S-1 e S-3 são constituintes desta mistura e que o componente principal é uma substância (S-4), de t_R = 9,801', valor que sugeriu a presença

de oxigênio em tal molécula. Foi possível também identificar no espectro de RMN de ¹³C - ténicas PND e DEPT 135[°] (Espectros 63 e 64) - os sinais relativos a S-1 e S-3.

No espectro de RMN de ¹H (Espectro 65) foi observado um dubleto em 2,98 δ (J = 2,3 Hz), que sugeriu a presença de um epóxido na molécula.

A comparação dos dados de RMN de ¹³C de S-1 e S-4 mostrou que os valores de deslocamentos químicos dos átomos de carbono sp² de S-4 são idênticos aos valores relativos a C-7 e C-8 em S-1 (Tabela 35, p. 69). Assim sendo, concluiu-se que em S-4 existe um anel epóxido em C-5 e C-6 e desta forma ele foi definido como $5\alpha,6\alpha$ -epoxi-eudesm-7-eno, do qual não foi encontrado registro na literatura.

Esta proposta está coerente com o espectro de RMN de ¹H, já que o dubleto em 2,98 δ é atribuível a H-6, pois este sofre acoplamento alílico com H-8. O sinal em 5,42 δ (ddd, J = 2,3; 3,6 e 7,4 Hz) é atribuível a H-8 (Tabela 36, p. 70).

A posição α para o anel epóxido foi proposta com base nos valores de deslocamentos químicos de C-3 e C-9 observados para este sesquiterpeno em comparação com aqueles observados para S-1. Em S-4, C-3 e C-9 são mais protegidos devido a efeitos γ gauche proporcionados pelo anel epóxido. Além disso, a posição α é menos impedida estericamente, o que facilita a entrada do grupo epóxido.



O espectro de RMN de ¹³C (Espectro 72) de S-6, isolado da fração I-10, mostrou que este sesquiterpeno possui um carbono carbinólico em sua estrutura, já que foi observado um sinal relativo a grupo metínico em 64,4 δ . Este dado esta coerente com o valor de t_R = 11,481' desta substância, dado pelo cromatograma obtido por CG.

As multiplicidades dos átomos de carbono para S-6 foram obtidas a partir do espectro DEPT 135° da mistura I-11, que contém S-6 e S-8 (Espectro 73).

O espectro de RMN de ¹H (Espectro 74), mostrou que os sinais relativos aos átomos de hidrogênio olefínicos possuem feições espectrais e deslocamentos químicos muito semelhantes aos de **S-1** (Tabela 36, p. 70).

Através da comparação dos dados de RMN de ¹³C de S-1 com os obtidos para S-6 (Tabela 35, p. 69), verificou-se que os valores de deslocamentos químicos destes dois sesquiterpenos são bastante semelhantes, sendo que para S-6 não foi observado nenhum sinal de grupo metilênico próximo a 17 δ , valor relativo ao grupo <u>CH</u>₂-2 de S-1. Além disto, verificou-se uma alteração nos deslocamentos químicos de C-1 e C-3 devido a efeitos β de desproteção causados pelo grupo hidroxílico. Assim sendo, S-6 foi definido como eudesma-5,7-dien-2 α -ol, do qual não foi encontrado registro na literatura. A estereoquímica da hidroxila foi definida como sendo α devido a ausência de efeito γ gauche em C-4.

A análise do espectro HOMOCOSY (Espectro 75) mostrou diversas correlações que confirmaram a proposta estrutural para S-6, inclusive os acoplamentos alílicos entre H-8 e H-6 assim como entre H-8 e H-11. A Tabela 41 mostra os acoplamentos observados neste espectro.

¹ Η (δ)	¹ Η (δ)
H-2 (4,03)	H -1 (1,18)
	H-3 (1,44)
H-4 (2,69)	H-3 (1,44)
	H-15 (1,13)
H-8 (5,23)	H-6 (5,59)
	H-9 (1,80)
	H-11 (2,24)

Tabela 41- Acopiamentos observados no espectro HOMOCOSY de S-6 (200 MHz, CDCl₃)



S-8

O espectro de RMN de ¹H (espectro 85) de S-8, detectado nas frações I-10, I-11 e I-12, não mostrou sinais na região de átomos de hidrogênio olefínicos, mas acusou um singleto em 2,93 δ e um duplo dubleto em 2,80 δ (J = 3,2 e 9,0 Hz), região característica de átomos de hidrogênio de anel epóxido. O t_R = 14,446', dado pelo cromatograma obtido por

CG, também indicou a presença de átomos de oxigênio na estrutura de S-8.

O espectro de RMN de ¹³C (Espectro 84) confirmou a ausência de átomos de carbono sp² na estrutura molecular de S-8, mas mostrou sinais em 51,2; 53,2 e 56,1 δ , os quais são característicos de átomos de carbono de anéis epóxidos. A comparação dos dados de RMN de ¹³C obtidos para S-8 com os dos sesquiterpenos S-4 e S-1 (Tabela 35, p. 69), mostrou que em S-8 as posições 5,6 e 7,8 foram epoxidadas. Assim, S-8 foi definido como 5 α ,6 α ,7 α ,8 α -diepoxieudesmano.

A comparação dos dados de RMN de ¹H obtidos para **S-8** (Tabela 36, p. 70) com os fornecidos pela literatura [68] confirmou a proposta estrutural.

A atribuição dos deslocamentos químicos para os átomos de carbono foi feita com base nos dados de S-1 e S-4. As multiplicidades dos sinais foram

obtidas através do espectro DEPT 135^o (Espectro 78) da mistura obtida da CCDP da fração I-12, que contém além de **S-8**, outro sesquiterpeno (**S-7**).



Dos espectros de RMN de ¹³C - técnicas PND e DEPT 135[°] (Espectro 76 e expansão 77; Espectro 78 e expansão 79) - da mistura que contém **S-8** e **S-7**, obtida da CCDP da fração I-12, foi possível identificar os sinais relativos a este último.

S-7 Os valores de deslocamentos químicos para os átomos de carbono mostraram que S-7 deve conter um grupo hidroxílico e um anel epóxido na sua estrutura, já que foram observados sinais em 74,4 e 58,8 δ relativos a grupos metínicos.

A análise do espectro de RMN de ¹H (Espectro 80) mostrou um sinal em 5,80 δ (dd, J = 2,2 e 8,0 Hz), atribuível a H-8, um dubleto em 3,01 δ (J = 2,2 Hz), relativo a H-6 e um sinal em 3,23 δ (dd, J = 8,0 e 18,2 Hz), relativo ao hidrogênio carbinólico (Tabela 36, p. 70). Estas atribuições foram feitas considerando que a ligação dupla está em C-7 e o epóxido em C-5, C-6.

O experimento de RMN de dupla irradiação (Espectro 81) confirmou as posições dos grupos funcionais dessa molécula. A irradiação na frequência de H-8 (hidrogênio olefínico; 5,80 δ = 116,0 Hz), transformou o dubleto relativo a H-6 em um singleto, confirmando o acoplamento alílico entre estes dois átomos. Também foi observado o desacoplamento de H-8 e H-9, já que o duplo dubleto relativo a H-9 foi transformado em um dubleto que corresponde ao acoplamento deste átomo com o hidrogênio hidroxílico. As expansões do espectro de RMN de ¹H (expansões 82 e 83 respectivamente) antes e depois da dupla irradiação mostram estes desacoplamentos. Assim, S-7 foi definido como 5 α ,6 α -epoxieudesm-7-en-9-ol, do qual não foi encontrado registro na literatura.

A atribuição dos valores de deslocamentos químicos para os átomos de carbono de S-7 foi feita com base nos dados de S-4 (Tabela 35, p. 69).

Determinação estrutural do sesquiterpeno de esqueleto guaiânico (S-9)



O cromatograma obtido por CG mostrou que o tempo de retenção de **S-9**, obtido das frações I-9 e I-10, é 11,357', valor que sugere a presença de átomo de oxigênio na molécula.

O espectro de massas (Tabela 34, p. 67) mostrou um fragmento em m/z = 161, indicando a presença de um grupo

S-9 isopropila. Os espectros de RMN tanto de ¹H (Espectro 88) como de ¹³C (Espectro 86) confirmaram esta proposta uma vez que mostraram respectivamente dubletos em 0,93 e 0,94 δ e sinais relativos a grupos metílicos ao redor de 21 δ .

Como o pico do íon-molecular não foi observado no espectro de massas (Tabela 34, p. 67), a fórmula molecular da substância foi determinada através da análise dos espectros de RMN de ¹³C - técnicas PND e DEPT 135^o (Espectros 86 e 87) - como sendo C15H26O. A estrutura molecular tem portanto três deficiências de hidrogênio, sendo dois anéis e uma ligação dupla, além de um grupo hidroxílico. Desta forma, o esqueleto sesquiterpênico possui quatro grupos metílicos, seis grupos metilênicos e cinco grupos metínicos. A ausência de átomos de carbono quaternário assim como a presença do grupo isopropílico levaram a dois esqueletos sesquiterpênicos, considerando-se apenas aqueles de ocorrência mais comum: guaiano e cadinano (Figura 11). Como não foi observado sinal relativo a átomo de carbono de grupo metínico em torno de 26 δ e sim próximo a 37 8, concluiu-se que o esqueleto é guaiano e não cadinano. Nos sesquiterpenos de esqueleto cadinano o carbono metínico do grupo isopropila possui deslocamento químico aproximadamente de 26 δ . Já nos sesquiterpenos de esqueleto guaiano, o deslocamento químico daquele átomo é em torno de 37 \delta [68]. A presença de sesquiterpenos de esqueleto cadinânicos no óleo essencial

das folhas de *G. guidonia* seria esperada uma vez que sesquiterpenos deste tipo foram encontrados no óleo essencial da casca do caule desta espécie [65].

Figura 11- Esqueletos guaiano e cadinano



guaiano

cadinano



Comparando-se os dados de RMN de ¹³C do composto isolado com os do alismol [70], concluiu-se que as estruturas moleculares de ambos os sesquiterpenos são bastante semelhantes, inclusive com respeito a posição da ligação dupla endocíclica. A ligação dupla exocíclica não existe na molécula da substância isolada. A posição da hidroxila em S-9 também foi determinada através da comparação daqueles

alismol

dados. No alismol o deslocamento químico de C-6, que é olefínico e sofre efeito γ de proteção do grupo hidroxílico em C-4, é de 121,3 δ enquanto que para a substância isolada foi observado um valor de 124,0 δ . Esta desproteção de 2,7 δ sugeriu que em S-9 a hidroxila não está em C-4 mas sim em C-10, já que o espectro de RMN de ¹H deste sesquiterpeno (Espectro 88) mostrou um singleto relativo a átomos de hidrogênio de grupo metílico em 1,18 δ , indicando que tal grupo está ligado a átomo de carbono quaternário oxigenado. O espectro DEPT 135^o (Espectro 87) confirmou esta proposta pois não acusou sinal relativo a átomo de carbono carbinólico (76,0 δ), o que provou que a hidroxila está ligada a

carbono quaternário. Além disso, caso a hidroxila estivesse em C-4, o deslocamento químico do carbono carbinólico seria de aproximandamente 80,0 δ e não de 76,0 δ. Com o estabelecimento das posições do grupo hidroxílico e da ligação dupla, foi possível atribuir os valores de deslocamentos químicos para os demais átomos de carbono da molécula, também através da comparação dos valores atribuidos ao alismol. Assim, S-9 foi definido como guaia-6-en-10-ol, do qual não foi encontrado registro na literatura. A Tabela 42 mostra os dados de RMN de ¹³C para estes dois sesquiterpenos. A comparação destes dados mostrou que C-9 em S-9 é mais desprotegido do que o seu equivalente no alismol uma vez que em S-9 tal carbono, apesar de deixar de ser alílico, ganhou o efeito de desproteção β causado pela hidroxila em C-10. Já C-1, C-3, C-5 e C-8 são mais protegidos em S-9 do que no alismol. Em S-9, C-8 sofre efeito γ de proteção causado pela hidroxila em C-10. No alismol, C-3 e C-5 estão sujeitos a efeito β de desproteção causado pela hidroxila em C-4. Em S-9 os átomos de carbono daquelas posições não sentem tal efeito de desproteção e C-5 ainda sofre efeito y de proteção causado pela hidroxila em C-10.

A análise do espectro HMQC (Espectro 89) possibilitou a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio da molécula (Tabela 43, p. 84) assim como a atribuição dos valores de deslocamentos químicos para os átomos de carbono dos grupos metílicos. O espectro HOMOCOSY (Espectro 90) confirmou a estrutura proposta para S-9 pois mostrou a existência de um acoplamento intenso entre H-6 (5,46 δ) e H-5, cujo deslocamento é de aproximadamente 2,15 δ . O deslocamento químico também de 2,15 δ para o átomo de H-11 está condizente com a proposta, já que a posição 11 é alílica e está na ramificação isopropílica da molécula. As estereoquímicas de C-4 e C-9 não foram estabelecidas.

С	alismol [70]	S-9ª
1	55,0	51,2
2	24,7	23,9**
3	40,2	33,1
4	80,7	37,2
5	47,3	43,8
6	121,3	124,0
7	149,8	148,2
8	30,0	25,1**
9	37,1	42,6
10	153,9	76,0
11	37,4	37,6
12	21,3	21,2*
13	21,5	21,3*
14	106,5	21,4
15	24,1	15,2

Tabela 42- Dados de RMN de ¹³C para alismol e S-9 (^a 50 MHz, δ , CDCl₃).

*, **: os deslocamentos podem estar invertidos

Tabela 43- Correlações observadas no espectro HMQC de S-9

(125 e 500 MHz, δ, CDCl₃)

posição	¹³ C	¹ H (J em Hz)
1	51,2	1,90
2	23,9**	1,60 e 1,76
3	33,1	1,60 e 1,33
4	37,2	2,15
5	43,8	2,15
6	124,0	5,46 (d, 3,25)
7	148,2	-
8	25,1**	1,90 e 2,15
9 -	42,6	1,41 e 1,76
10	76,0	-
11	37,6	2,15
12	21,2*	0,93**(d, 3,8)
. 13	21,3*	0,94**(d, 3,8)
14	21,4	1,18
15	15,2	0,84 (d, 7,5)

FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS BIOMONITORADO POR LINHAGENS MUTANTES DE Saccharomyces cerevisiae

INTRODUÇÃO

Hoje, no Brasil, só as doenças cardíacas e a violência (incluídos os acidentes), matam mais do que o câncer. Porém, estima-se que no ano 2000, o câncer será a enfermidade mais letal tanto no nosso pais como nos Estados Unidos, onde atualmente é a terceira maior *causa mortis*, ficando atrás somente das doenças cardíacas e as do aparelho circulatório [71].

Existem duas grandes dificuldades enfrentadas pelos cientistas que se dedicam ao estudo deste mal. A primeira é a existência de mais de cem tipos diferentes da doença, cada qual com a sua resposta característica a uma determinada droga. Esta variação no grau de sensibilidade em relação a diferentes drogas está relacionada com a localização do tumor, ao seu tamanho e também a diversos fatores bioquímicos.

A característica comum a todas as doenças que são classificadas como câncer é a multiplicação desordenada de genes anormais, produzidos a partir de genes normais que sofrem uma mutação ocasionada por agentes externos ou internos (hormônios, sistema imunológico e hereditariedade).

Trata-se de um risco inerente a todos os organismos multicelulares vivos. Cada vez que uma célula humana se divide, ela precisa replicar o seu DNA, que além de conter o código genético também é responsável pelo próprio processo da divisão celular. Os erros ocorridos durante o processo - inevitáveis - são reparados por proteínas. O câncer aparece quando este sistema falha e as células malignas se multiplicam sem que nenhuma proteína as detenha.

Assim, o tumor é um produto humano e não um produto causado por um inimigo externo, como as doenças ocasionadas por vírus ou bactérias. Portanto, não existem grandes diferenças entre as células sadias e as doentes e este é o segundo grande desafio enfretado pelos pesquisadores [71].
Estratégias empregadas para o descobrimento de novas drogas anticancerígenas

A fim de facilitar a descoberta de drogas antineoplásicas efetivas, foi essencial a adoção de novos testes mais específicos e racionais do que os testes antimicrobiais e citotóxicos, utilizados de forma empírica, que estavam levando somente à detecção de produtos citotóxicos gerais, com mínima ou nenhuma atividade em modelos tumorais *in vivo* [72].

Assim, durante a década de 80, duas estratégias alternativas de bioensaios foram desenvolvidas com o objetivo de detectar substâncias com atividade biológica desejável tanto em extratos vegetais e animais como para avaliar substâncias sintéticas: os bioensaios orientados pela doença e aqueles orientados pelo mecanismo de ação de agentes antitumorais [72, 75].

Bioensaios guiados pela doença

Os bioensaios guiados pela doença utilizam um objetivo (endpoint) biológico, como por exemplo a inibição do crescimento celular. Afim de eliminar produtos citotóxicos gerais e já detectados por antigos testes, é aconselhável introduzir um elemento adicional de seletividade nos estágios iniciais do bioensaio [72]. Isso se faz necessário uma vez que: (a) os compostos capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas em cultura de tecidos são muito comuns; (b) apenas uma pequena porção de compostos citotóxicos demonstram um certo grau de atividade *in vivo*, mesmo quando testados em modelos de tumores animais bastante quimiossensíveis e (c) somente alguns dos agentes antitumorais ativos *in vivo* demonstram atividade e seletividade adequadas em modelos tumorais sólidos o suficiente para que os testes clínicos sejam realizados. Vale lembrar que somente as drogas com um alto grau de eficácia contra modelos tumorais animais têm sido úteis no tratamento de câncer em

humanos. Como exemplo temos a ciclofosfamida, cisplatina, dexorubiacina, etopodideo e os alcalóides da Vinca [73].

Os bioensaios guiados pela doença são dos seguintes tipos [73]:

Ensaios de citotoxicidade: analisa a toxicidade de substâncias naturais ou sintéticas, *in vitro*, contra células de mamíferos. Porém, sabe-se que a citotoxicidade não é necessária e nem suficiente para uma atividade antitumoral. Em muitos casos, as substâncias isoladas e/ou testadas são simplesmente tóxicas.

Ensaios *in vivo*: devido a pequena relação entre citotoxicidade e atividade antitumoral, alguns programas de pesquisa utilizam modelos tumorais *in vivo* para o descobrimento de novas drogas. O uso de um "screening" *in vivo* para detectar possíveis substâncias antitumorais em extratos vegetais e animais é impraticável devido à alta complexidade de tais ensaios, ao alto custo e também à grande quantidade de tempo requerido.

Ensaios de citotoxicidade seletiva: devido às dificuldades de utilização dos ensaios *in vivo*, foram desenvolvidos ensaios *in vitro* que utilizam células derivadas de câncer humanos. Estes ensaios são realizados contra uma bateria de aproximadamente sessenta linhagens de células, obtidas a partir de oito sistemas de órgãos. O objetivo deste tipo de bioensaio é a descoberta de agentes com uma citotoxicidade específica contra uma linha celular derivada de um único tipo de tumor. Isto originaria uma droga útil no tratamento de um câncer em particular, já que o que diferencia os diversos tipos de câncer é a presença de receptores específicos.

Projeto de análogos: o projeto e síntese de análogos de drogas antitumorais já estabelecidas, como o taxol e a camptotecina, continua sendo uma área importante para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas.

Bioensaios baseados no mecanismo de ação de drogas

Outra estratégia para o desenvolvimento de novas drogas anticancerígenas consiste no estudo e descoberta do mecanismo de ação de agentes antitumorais já estabelecidos e na aplicação deste conhecimento visando encontrar novas substâncias que trabalhem através de um mecanismo similar, mas que possuam uma atividade maior e/ou menores efeitos colaterais [72, 74].

Desta forma, ensaios bioquímicos específicos foram desenvolvidos para detectar agentes anticancerígenos em potencial, tanto em fontes de produtos naturais quanto para direcionar sínteses. Como resultado, novos agentes estão sendo testados clinicamente, incluindo inibidores de topoisomerase I e II, agentes interativos com o DNA, inibidores da biossíntese e incorporação de nucleotídeos, agentes antimitóticos, inibidores da função receptora do fator de crescimento e/ou atividade da proteina tirosina quinase, agentes que interfiram na via de transdução do sinal e proteínas regulatórias nucleares [74]. Alguns exemplos de substâncias antineoplásicas (Figura 12), cujos mecanismos de ação já foram estabelecidos e que são usadas como modelos para o desenvolvimento de novos bioensaios são as seguintes [73, 74]:

Vinblastina (<u>1</u>) e Vincristina (<u>2</u>) (alcalóides da Vinca): São agentes antimitóticos que inibem a formação dos microtúbulos, bloqueando assim a divisão celular [78].

Taxol (3): Diterpeno que também é um agente antimitótico. Bloqueia a divisão celular promovendo a formação dos microtúbulos e inibindo a sua despolimerização [79].

Camptotecina (<u>4</u>): Alcalóide citotóxico com forte atividade antitumoral. Inibe a síntese tanto do DNA quanto do RNA através da inibição da topoisomerase I [77]. As enzimas topoisomerases I e II estão envolvidadas no processo de proliferação celular.

Clerocidina (<u>5</u>), terpentecina (<u>6</u>) e UCT4B (<u>7</u>): Terpenoides inibidores da topoisomerase II [74].

Saintopina (8): É um inibidor de ambas as enzimas topoisomerase [74].

É importante ressaltar que a utilização de bioensaios orientados pelos mecanismos de ação é uma maneira eficaz de detecção de substâncias anticancerígenas em potencial porém, para que a eficácia de tais substâncias seja confirmada, é indispensável uma avaliação subsequente através de testes mais avançados assim como de testes clínicos.



Figura 12- Exemplos de substâncias antineoplásicas

Vinblastina $1 R = CH_3$ Vincristina2 R = CHO









Terpentecina $\underline{6}$ R = H UCT4B $\underline{7}$ R = OH



но он он он

Saintopina <u>8</u>





O Bioensaio do fungo Saccharomyces cerevisiae

Dentro da nova filosofia de utilização de bioensaios baseados no mecanismo de ação de drogas, foi desenvolvido um teste que utiliza mutantes do fungo *Saccharomyces cerevisiae* deficientes no reparo ou na recombinação do DNA. [72, 75].

Os fungos são preferidos em relação as bactérias por serem genética e bioquimicamente semelhantes às células dos mamíferos. Além desta característica, eles são excelentes para o estudo dos mecanismos genéticos envolvidos nos processos do reparo do DNA, já que possuem uma genética bem estabelecida e bastante versátil, o que origina testes bastante específicos [72, 76].

O uso de bioensaio do fungo *Saccharomyces cerevisiae* no fracionamento biomonitorado de extratos naturais

O isolamento de novos produtos naturais é uma das estratégias mais importantes para o descobrimento de novas drogas antineoplásicas, uma vez que a natureza proporciona substâncias com estruturas bastante complexas que também podem servir de modelos para desenvolvimentos sintéticos.

O descobrimento de novas drogas a partir do estudo de produtos naturais é um longo caminho que engloba uma pesquisa interdisciplinar. Esta multidisciplinaridade envolve desde a seleção da planta, organismo marinho ou outra fonte natural que será analisada, até os bioensaios que guiarão o fracionamento do extrato levando ao isolamento da substância bioativa propriamente dita e a identificação ou determinação estrutural de tal substância. A partir dai, a bioatividade ainda deverá ser confirmada através de outros bioensaios e os estudos enfocando a relação estrutura/atividade também podem ser desenvolvidos. A exploração comercial como medicamento só será feita após a avaliação clínica da toxicidade de tal composto. Todo este processo poderá levar anos de trabalho e dedicação de muitos pesquisadores.

Assim, a escolha de uma estratégia de bioensaio através do qual seja possível tanto a seleção de fontes naturais a serem estudadas quanto o monitoramento do processo de fracionamento de tais fontes é um passo muito importante para o descobrimento de novas drogas. A utilização do bioensaio do fungo *S. cerevisiae* para detectar possíveis agentes anticancerígenos em extratos vegetais e animais apresenta diversas vantagens:

(a) E facilmente realizável, o que favorece a sua utilização por químicos de produtos naturais.

(b) É barato e rápido, quando comparado com ensaios que envolvem culturas celulares. Algumas vezes as zonas de inibição podem ser visualizadas em apenas 24 horas. Esta rapidez o torna bastante apropriado para o fracionamento biomonitorado.

(c) É altamente seletivo. A probabilidade de se encontrar um extrato ativo neste bioensaio é de aproximadamente 1% enquanto que em outros testes é de aproximadamente 5%.

(d) E altamente sensível o que possibilita a detecção de substâncias ativas presentes em pequeníssimas concentrações.

(e) Possibilita testar um grande número de amostras simultaneamente.

(f) A dissolução das amostras é feita em uma mistura de DMSO/MeOH, o que possibilita que substâncias de quase todas as polaridades sejam testadas.

Princípio do bioensaio com o fungo Saccharomyces cerevisiae

Uma importante característica de muitas células tumorais é que elas não conseguem reparar danos existentes no DNA. Isso sugere que agentes com seletiva toxicidade em relação àquelas células podem ser agentes anticancerígenos em potencial.

O bioensaio descrito aqui é baseado na resposta diferenciada das linhagens do fungo que são deficientes no reparo do DNA (rad 6, rad 52Y e RS 321N) e daquela que é proficiente neste reparo (rad +), em relação a amostra testada.

A linhagem rad + é o fungo comum, porém com uma maior permeabilidade de membrana. No teste, esta linhagem age como um modelo de células sadias, pois é capaz de refazer o seu DNA. Já as linhagens rad 6, rad 52Y e RS 321N além de possuirem membranas mais permeáveis, são incapazes de repararem por si próprias danos existentes no DNA de suas células o que as torna modelos de células cancerígenas.

É importante notar que essas linhagens foram geradas em laboratório através de mutações genéticas, levando-se em consideração os três caminhos principais de reparo de DNA existentes em células do fungo *S. cerevisiae* [71, 75]. Tais caminhos foram definidos como rad 3, rad 6 e rad 52. A via rad 3 está associada com o reparo por excissão, a via rad 6 é associada ao reparo da parte do DNA que esta propensa a se duplicar erradamente e a via rad 52 é o caminho da recombinação, ocorrendo a quebra da dupla-hélice e recombinação meiótica [72].

Estudos mostraram que o mutante rad 52 é hipersensível a camptotecina, um alcalóide inibidor da enzima topoisomerase I. Já um mutante rad 52 top 1, deficiente na produção da enzima, é totalmente resistente a droga. Concluiu-se então, que a enzima topoisomerase I é necessária para a bioatividade da camptotecina. Este estudo também mostrou que quando há quebra da produção da topoisomerase I, ocorre simultaneamente a superprodução da topoisomerase II e o mutante torna-se sensível a agentes inibidores de tal enzima [76]. A partir destes resultados, os mutantes do fungo *S. cerevisiae* passaram a ser usados em um bioensaio especíifico que detecta agentes anticancerígenos que interajam com o DNA através da inibição da topoisomerase I ou II.

Metodologia e análise dos resultados [80]

Todas as amostras são testadas inicialmente na concentração de 2000 µg/mL, em uma mistura de 50% de DMSO e 50% de MeOH. Concentrações de DMSO acima de 80% inibirão o crescimento do fungo. A utilização apenas de MeOH, apesar deste ser tolerado pelo microorganismo, fará com que toda a amostra se espalhe pela placa, pois a solução amostra/solvente não permanecerá no orifício onde é aplicada.

O objetivo do bioensaio é medir o quanto uma determinada amostra é capaz de inibir o crescimento das linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes no reparo do DNA (rad 6, rad 52Y e RS 321N), em comparação com a linhagem proficiente (rad +). Assim, o material é testado em rad +, rad 52Y, rad 6 e RS 321N. Para tal, 100 μ L da solução da amostra (C = 2000 μ g/mL) são aplicados na placa que contém uma das quatro linhagens do fungo.

Uma determinada amostra será considerada positiva se exibir, após o período de incubação de 48 horas a 30^oC, uma zona de inibição de crescimento do fungo ao redor do local onde a amostra foi aplicada. O diâmetro desta zona de inibição é medido em milímetros para cada um dos quatro mutantes do fungo.

Sempre deverão ser utilizadas substâncias controle em cada placa usada. A Tabela 44 correlaciona a droga utilizada como controle para cada linhagem do microorganismo e a média do halo de inibição observado.

droga	С	zon	a de inibição	(mm) obser	vada
controle	(µg/mL)	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
camptotecina	5,0		21 +/- 3		
camptotecina	200,0	16 +/- 3			
streptonigrina	4,0				20 +/- 4
streptonigrina	8,0			20 +/- 3	

Tabela 44- Contoles utilizados para cada linhagem de S. cerevisiae

Geralmente uma amostra é considerada ativa se induzir uma zona de inibição em rad 52Y, rad 6 ou RS 321N de 6 mm ou mais, maior do que em rad +.

Amostras que não induzem halos de inibição são consideradas inativas e aquelas que não mostram uma diferenciação nos tamanhos das zonas de inibição em favor de rad 52Y, rad 6 ou RS 321N são classificadas como citotóxicas.

A dose/resposta é medida para todas as amostras que foram classificadas como ativas no teste preliminar. Para tal, cada amostra é testada nas linhagens onde foram verificadas inibição de crescimento do fungo, em quatro ou cinco doses diferentes. Estas doses serão determinadas pelo tamanho da zona de inibição medida no teste preliminar (C = 2000 μg/mL). A Tabela 45 mostra a relação entre o tamanho do halo de inibição medido no teste preliminar e as doses a serem utilizadas no teste dose/resposta.

Tabela 45- Determinação das concentrações para o estudo da dose/resposta de uma amostra considerada ativa.

Raio da zona de inibição (mm) medido no teste preliminar	Concentrações para o estudo da dose/resposta (µg/mL)
25 ou maior	1000 - 500 - 250 - 125 - 62.5
20 - 25	2000 - 1000 - 500 - 250 - 125
15 -20	4000 - 2000 - 1000 - 500 - 250
menor do que 15	8000 - 4000 - 2000 - 1000 - 500

Após o período de incubação (48 horas, 30°C), mede-se o diâmetro do halo de inibição induzido por cada uma das doses utilizadas. A Cl₁₂ (dose ou concentração mínima, em μg/mL, requerida para produzir uma zona de inibição de 12 mm), é calculada por análise da regressão linear do logarítmo da concentração versus o tamanho da zona de inibição. Um valor da Cl₁₂ para rad 52Y, rad 6 ou RS 321N que seja pelo menos três vezes menor do que para rad +, indica uma atividade positiva e tal amostra merecerá consideração.

Para extratos contendo múltiplos compostos, prefere-se um valor da CI_{12} menor do que 2000 µg/mL em rad 52Y, rad 6 ou RS 321N; ou que o valor da CI_{12} para rad + seja ao menos três vezes maior quando comparado a CI_{12} de uma das outras linhagens.

Para amostras puras, a Cl₁₂ deverá ser menor do que 100 μg/mL. Porém, outros resultados devem ser avaliados individualmente.

Os valores da CI_{12} para rad 52Y e para RS 321N também devem ser comparados para indicar a atividade da topoisomerase. Quando a CI_{12} em rad 52Y é três vezes maior do que a CI_{12} em RS 321N, a bioatividade ocorre através da inibição da DNA topoisomerase II. Se uma relação oposta é observada, isto é; a CI_{12} em RS 321N é três vezes maior do que em rad 52Y, constata-se a presença da DNA topoisomerase I.

EXPERIMENTAL

Especificação do material utilizado

Os materiais vegetais de *Annona dioca*, *Rapanea guyanensis*, *Dydimopanax sp* e Curraleiro foram secos, moídos em moinho de facas e extraídos exaustivamente a frio com solventes de grau P.A. da Merck. Os extratos vegetais foram obtidos após a evaporação do solvente sob pressão reduzida.

Para as partições e técnicas cromatográficas foram utilizados solventes grau HPLC EM Science.

Para a cromatografia em coluna utilizou-se Sephadex LH-20 (25 - 100 $\mu)$ da Sigma.

Para os bioensaios foram utilizadas linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* desenvolvidas por SmithKline Beecham Pharmaceuticals (rad +, rad 52Y, rad 6 e RS 321N) e por Bristol - Meyers (SC-7).

Para a cromatografia em camada delgada preparativa em fase reversa foram utilizadas placas Whatman PLKC₁₈F (1000 μm). A revelação foi feita com irradiação no U.V. (254 nm).

Extratos e frações de extratos testados

possíveis agentes anticancerígenos. A Tabela 46 relaciona todos os extratos testados. A Tabela 67, p. 119 mostra a Diversos extratos, partes de extratos e algumas substâncias puras foram testadas com o intuito de detectar procedência desses extratos.

#	Planta	Família	parte da planta	Extrato	fração do extrato (partição)
01	Annona dioca	Annonaceae	folhas	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
02			folhas	MeOH (100%)	
03			galhos	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
04			galhos	MeOH (100%)	
05	Xylopia emarginata	Annonaceae	folhas	hexano	hexano
90			folhas	hexano	MeOH/H ₂ O
07			folhas	hexano	
08			galhos	CH ₂ Cl ₂	
60	Xylopia aromatica	Annonaceae	casca dos galhos	EtOH	interfase
					(H ₂ O/ CHCl ₃)
10			casca dos galhos	EtoH	AcOEt
11			casca dos galhos	EtoH	n-BuOH
12			casca dos galhos	EtoH	
13			casca dos galhos	Etoh	hexano
14			folhas	hexano	
15	Xylopia aromatica	Annonaceae	folhas	CH ₂ CI ₂	ć

Tabela 46- Extratos e frações de extratos testados

16			folhas	CH ₂ Cl ₂	¢.
17			frutos	hexano	
18			frutos	CH ₂ Cl ₂	
19	Alibertia edulis	Rubiaceae	folhas	EtOH (100%)	
20			folhas	EtOH : H ₂ O	éter
21			folhas	EtOH : H ₂ O	AcOEt
22			folhas	EtOH : H ₂ O	n-BuOH
23	Cayaponia espelina	Curcubitaceae	folhas e ramos	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
24			folhas e ramos	MeOH (100%)	
25	Rapanea guyanensis	Myrsinaceae	folhas	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
26			folhas	MeOH (100%)	
27			galhos	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
28			galhos	MeOH (100%)	
29	Dydimopanax sp	Araliaceae	folhas	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
30			folhas	MeOH (100%)	
31			galhos	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
32			galhos	MeOH (100%)	
33	Curraleiro (?)		folhas	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
34			folhas	MeOH (100%)	
35			galhos	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1)	
36			galhos	MeOH (100%)	
37	Piper regnellii	Piperaceae	raizes	AcOEt	
38			caule	AcOEt	
39			folhas	AcOEt	
40			raizes	MeOH	
41			caule	MeOH	
42			folhas	MeOH	
43	Piper umbelatum	Piperaceae	folhas	hexano	
44			folhas	CHCI ₃	
45	Piper aduncum	Piperaceae	raizes	AcOEt	
46			raizes	MeOH	
47	Phylantus tenelos	Piperaceae	raizes	AcOEt	
48			caule	AcOEt	

49			folhas	AcOEt
50			raizes	MeOH
51			caule	MeOH
52			folhas	MeOH
53	Potomorfe umbelatum	Piperaceae	raizes	AcOEt
54			caule	AcOEt
55			folhas	AcOEt
56			raizes	MeOH
57			caule	MeOH
58			folhas	MeOH
59	Ocotea catarinensis	Lauraceae	embrião seco	MeOH
60			embrião fresco	MeOH
61			massa celular	MeOH
62	Ocotea catarinensis	Lauraceae	folhas	hexano
	(Florianópolis)			
63	Ocotea catarinensis		folhas	MeOH
	(Florianópolis)			
64	Ocotea catarinensis		folhas	MeOH
	(Sao Paulo)			
65	Virola sebifera	Myristicaceae	inflorescências	CH ₂ Cl ₂
99			arilos	(CH ₃) ₂ O
67			arilos	EtOH
68			arilos	CHCI ₃
69			amêndoas	EtOH
70	Virola oleifera	Myristicaceae	pericarpos	CH ₂ Cl ₂
71			arilos	CH ₂ Cl ₂
72			sementes	MeOH
73			folhas	MeOH
74			sementes	CH ₂ Cl ₂
75	Virola surinamensis	Myristicaceae	raizes de plântula	CH ₂ Cl ₂
76			talos de plântulas	CH ₂ Cl ₂
77			folhas de plântulas	CH ₂ Cl ₂
78			raizes	CH ₂ Cl ₂
62			madeira	CH ₂ Cl ₂
80	Virola michelii	Myristicaceae	folhas	AcOEt

.

81	Iryanthera juruensis	Myristicaceae	frutos	hexano	
82			frutos	CHCI ₃	
83			pecíolos	CHCI ₃	
84	Iryanthera sagotiana	Myristicaceae	inflorescências	EtOH	CHCI ₃
85			folhas	EtOH	
86	Guarea guidonia	Meliaceae	casca do caule	óleo essêncial	
87	Sargassum filipendula	Fucaceae		CH ₂ Cl ₂	
88	Sargassum filipendula			MeOH	
89	Sargassum furcatum				
06	Sargassum furcatum			MeOH	
91	Sargassum hystrix			CH ₂ Cl ₂	
	(Praia dos Padres)				
92	Sargassum hystrix			CH ₂ Cl ₂	
	(Parati)				
93	Sargassum ramifolium			MeOH	
94	Sargassum			MeOH	
	stephinodendrum				
95	Sargassum vulgare			CH ₂ Cl ₂	
96	Kielmeyna reticulata	¢		hexano	
97	Kielmeyna reticulata			MeOH	CH ₂ Cl ₂
98	Cecropia adenopus	Moraceae	folhas	EtOH	hexano
66	Cecropia adenopus		folhas	EtOH	MeOH
100	Acanthospermum	Asteraceae	raizes		
	australe				
101	Acanthospermum		partes aéreas		
	australe				

Como já foi descrito, todos os extratos foram testados primeiramente na concentração de 2000 µg/mL, utilizando-se DMSO:MeOH (1:1) para dissolvê-los. O resultado deste teste preliminar é mostrado na Tabela 47.

Extrato #		raio da zona de	inibição (mm)	
(C= 2000 μg/mL)	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
01	na	9,0	na	na
03	na	9,0	na	9,0
19	na	na	na	11,0
25	11,0	10,5	8,0	na
37	9,0	10,0	10,5	13,0
39	9,0	9,0	10,0	15,0
40	na	na	na	10,5
44	na	9,0	9,0	12,0
47	na	na	na	11,0
53	na	9,0	na	na
74	na	8,0	8,0	11,0
80	na	na	na	7,0
82	9,0	na	na	10,0
83	10,0	na	na	9,0
101	na	na	11,0	na

Tabela 47- Resultado do bioensaio preliminar para os extratos descritos naTabela 46.

na = não ativo

Os extratos que não mostraram zonas de inibição para nenhuma das quatro linhagens do fungo não constam na Tabela 47 e devem ser considerados totalmente inativos neste bioensaio.

Com base nos reultados mostrados na Tabela 47, também calculou-se a dose/resposta para os extratos 25, 37, 39, 44, 74, 82, 83 e 101. Os resultados obtidos são mostrados a seguir:

Tabela 48- Dose/resposta para o extrato CH2Cl2:MeOH das folhas de Rapaneaguyanensis (extrato #25)

	zona de	e inibição (mm) o	bservada nas l	inhagens
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	10,0	11,0	na	9,0
4000	-	9,0	na	9,0
2000	-	8,0	na	9,0
1000	-	-	na	T.M.

Valores calculados da Cl₁₂:

 $CI_{12}^{\text{rad 52Y}} > 8000 \ \mu g/mL$

 $Cl_{12}^{\text{RS 321N}} > 8000 \ \mu g/mL$

·唐尔公别任义皇帝

Tabela 49- Dose/resposta para o extrato AcOEt das raizes de Piper regnellii(extrato #37)

	zona de	e inibição (mm) ol	bservada nas l	inhagens
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	10,0	12,0	13,0	19,5
4000	na	11,0	12,0	19,0
2000	na	10,0	11,0	17,5
1000	na	9,0	10,0	16,0
controle	16,0	20,0	18,5	23,0

Valores calculados da Cl₁₂:

$$CI_{12}^{rad +} > 8000 \ \mu g/mL$$
 $CI_{12}^{rad 52Y} > 8000 \ \mu g/mL$

$$CI_{12}^{\text{rad }6} = 4000 \ \mu\text{g/mL}$$
 $CI_{12}^{\text{RS }321\text{N}} = 108 \ \mu\text{g/mL}$

Tabela 50- Dose/resposta para o extrato AcOEt das folhas de Piper regnellii(extrato #39)

	zona de	e inibição (mm) ol	bservada nas l	inhagens
C (µg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	10,0	11,5	13,0	18,5
4000	-	10,5	12,0	17,5
2000	-	10,0	11,0	17,5
1000	-	8,5	10,0	15,0
controle	16,0	22,0	18,5	22,0

Valores calculados da Cl₁₂:

Cl ^{rad +} > 8000 μg/mL	$CI_{12}^{rad 52Y} > 8000 \ \mu g/mL$
Cl ^{rad 6} = 4000 μg/mL	$CI_{12}^{RS 321N} = 175 \ \mu g/mL$

	zona de	e inibição (mm) o	bservada nas l	inhagens
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	9,0	10,5	11,0	14,0
4000	-	9,0	9,5	12,0
2000	-	9,0	9,0	10,5
1000	-	9,0	8,0	9,0
controle	16,0	21,0	19,0	22,0

Tabela 51- Dose/resposta para o extrato CHCl₃ das folhas de *Piper umbelatum* (extrato #44)

Valores calculados da CI₁₂:

$CI_{12}^{rad +} > 8000 \ \mu g/mL$	$CI_{12}^{\text{rad 52Y}} > 8000 \ \mu\text{g/mL}$
$CI_{12}^{\text{rad 6}} > 8000 \ \mu\text{g/mL}$	CI ^{RS 321N} = 3600 μg/mL

Tabela 52- Dose/resposta para o extrato CH2CI2 das sementes de Virola oleifera(extrato #74)

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000		10,5	8,0	12,5
4000		8,0	7,0	11,0
2000		7,0	-	9,0
1000		-	-	7,0
controle	16,0	22,0	18,5	22,0

Valores calculados da CI₁₂:

$$CI_{12}^{rad \, 52Y} > 8000 \ \mu g/mL \qquad \qquad CI_{12}^{rad \, 6} > 8000 \ \mu g/mL$$

Tabela 53- Dose/resposta para o extrato CHCl3 dos frutos de Iryantherajuruensis (extrato #82)

	zona de	e inibição (mm) o	bservada nas l	inhagens
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	11,0	12,0	na	11,0
4000	10,0	10,0	na	10,0
2000	9,0	8,0	na	8,0
1000	7,5	-	na	-

Valores calculados da Cl₁₂:

$$CI_{12}^{rad +} > 8000 \ \mu g/mL$$

 $CI_{12}^{\text{rad 52Y}} > 8000 \ \mu g/mL$

 $CI_{12}^{\text{RS 321N}} > 8000 \ \mu g/mL$

	zona de	e inibição (mm) ol	bservada nas l	inhagens
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	14,0	12,0	na	11,5
4000	13,0	10,0	na	9,0
2000	12,0	9,0	na	8,0
1000	11,0	-	na	7,0

Tabela 54- Dose/resposta para o extrato CHCl₃ dos pecíolos de *Iryanthera juruensis* (extrato #83)

Valores calculados da CI₁₂:

$$CI_{12}^{rad +} = 2000 \ \mu g/mL$$
 $CI_{12}^{rad 52Y} = 7400 \ \mu g/mL$

 $CI_{12}^{\text{RS 321N}} > 8000 \ \mu g/mL$

Tabela 55- Dose/resposta para o extrato das partes aéreas de Acanthospermumaustrale (extrato #101)

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens				
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N	
8000	na	na	16,0	na	
4000	na	na	12,0	na	
2000	na	na	8,5	na	
1000	na	na	-	na	

Valor calculado da CI₁₂:

 $CI_{12}^{rad 6} = 3700 \ \mu g/mL$

Com base nestes resultados, o ensaio dose/resposta para as amostras #37, #39 e #101 foi repetido a fim de se confirmar os valores da Cl₁₂ obtidos.

A Tabelas 56, 57 e 58 mostram os valores das zonas de inibição observadas nas diversas concentrações utilizadas, respectivamente para cada um dos extratos testados.

C (μg/mL) do extrato	zona de inibição (mm) observada nas linhagens				
	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N	
1000	8,0	10,0	15,0	15,0	
500	8,0	9,0	12,0	14,0	
250	7,0	7,5	10,5	11,5	
125	-	-	7,5	9,0	
62,5	-	-	-	-	
controle	15,0	22,0	21,0	28,5	

Tabela 56- Dose/resposta para o extrato #37 (segundo bioensaio).

Valores calculados da Cl₁₂:

Cl ₁₂ ^{rad +} > 8000 μg/mL	$CI_{12}^{rad 52Y} = 2800 \ \mu g/mL$
$CI_{12}^{rad 6} = 437 \ \mu g/mL$	$CI_{12}^{RS321N} = 312 \ \mu g/mL$

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens				
C (µg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N	
1000	7,5	9,5	10,0	15,0	
500	7,0	8,0	9,0	13,5	
250	7,0	8,0	8,0	10,0	
125	-	-	-	8,0	
62.5	-	-	-	-	
controle	15,0	25,0	21,0	26,0	

Tabela 57- Dose/resposta para o extrato #39 (segundo bioensaio).

Valores calculados da Cl₁₂:

CI ₁₂ ^{rad +} > 8000 μg/mL	$CI_{12}^{rad 52Y} = 5600 \ \mu g/mL$
CI ^{rad 6} = 4000 μg/mL	CI ^{RS 321N} = 392 µg/mL

Tabela 58- Dose/resposta para o extrato #101 (segundo bioensaio).

	zona de	e inibição (mm) o	bservada nas l	inhagens
C (μg/mL) do extrato	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	na	9,5	14,0	11,0
4000	na	8,0	11,0	9,0
2000	na	7,0	8,0	7,0
1000	na	-	-	

Valores calculados da CI₁₂:

 $CI_{12}^{\text{rad 52Y}} > 8000 \ \mu\text{g/mL}$

 $CI_{12}^{rad 6}$ = 5000 µg/mL

$$CI_{12}^{RS 321N} > 8000 \ \mu g/mL$$

As substâncias puras assim como as misturas descritas na Tabela 59 também foram testadas nas quatro linhagens disponíveis do fungo. A Tabela 60, p. 115 mostra o resultado do bioensaio preliminar, realizado na concentração de 2000 µg/mL, somente para aquelas misturas ou substâncias que apresentaram alguma zona de inibição em ao menos uma das linhagens do fungo.

A Tabela 67, p. 119 mostra a procedência do material testado e as estruturas de cada substância, assim como dos componentes das misturas, são mostradas na Figura 13, p. 111.

Tabela 59- Misturas e substâncias puras testadas.

#	mistura	substância	# das
		pura	estruturas
102	Х		1+2
103	Х		3 a 10
104	Х		3 a 10
105		Х	11
106		Х	12
107		Х	13
108		Х	14
109		Х	15
110	Х		16+17
111		Х	18
112		Х	19
113		Х	20
114		Х	21
115		Х	22
116		Х	23
117		Х	24
118		Х	25
119		Х	26
120		Х	27
121		Х	28
122		Х	29
123		Х	30

Figura 13- Estruturas das substâncias puras e componentes das misturas testadas



HO sitosterol

trans-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno



























~





Burchelina































amostra #	zona de inibição (mm) observada nas linhagens				
(C=2000mg/mL	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N	
)					
102	12,5	na	na	14,0	
103	10,0	11,5	14,5	20,0	
104	10,5	14,0	17,0	21,5	
105	na	na	9,0	7,5	
106	na	8,5	12,5	22,0	
110	na	na	9,0	13,0	
116	na	na	9,0	13,0	

Tabela 60- Resultado do bioensaio preliminar das misturas de substâncias e dassubstâncias puras descritas na Tabela 59.

Com base nos resultados mostrados na Tabela 60 as amostras #102, 103, 104 assim como #110 e 116 foram selecionadas para o bioensaio dose/resposta a fim de que a CI₁₂ pudesse ser calculada.

Esta dosagem (CI₁₂) foi medida também para a amostra #106, mas só para as linhagens rad 6 e RS 321N, já que a quantidade de material não era suficiente para os outros testes.

Os valores das zonas de inibição medidos nas diversas concentrações de cada amostra testada, estão descritos nas Tabelas que se seguem.

Tabela 61- Dose/ resposta para a mistura #102

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
C (µg/mL) da mistura	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	?	9,0	na	11,0
4000	9,5	8,5	na	9,5
2000	8,5	-	na	7,0
1000	_	-	na	

Valores calculados da CI₁₂:

$$CI_{12}^{rad +} > 8000 \ \mu g/mL$$

 $C I_{12}^{\text{rad 52Y}} > 8000 \ \mu g/mL$

 $Cl_{\rm 12}^{\text{RS 321N}} > 8000 \ \mu\text{g/mL}$

Tabela 62- Dose/resposta para a mistura #103

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
C (µg/mL) da mistura	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	9,5	10,0	12,0	17,0
4000	9,0	9,5	11,0	16,5
2000	9,0	9,0	10,0	16,0
1000	8,0	9,0	10,0	15,0

Valores calculados da CI₁₂:

$CI_{12}^{rad +} > 8000 \ \mu g/mL$	$CI_{12}^{rad 52Y} = 290 \ \mu g/mL$
$CI_{12}^{rad 6} > 8000 \ \mu g/mL$	CI ^{RS 321N} = 40 µg/mL

Tabela 63- Dose/resposta para a mistura #104

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
C (μg/mL) da mistura	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	?	11,0	13,0	20,0
4000	9,0	11,0	12,0	18,5
2000	9,0	10,0	12,0	17,0
1000	8,0	9,5	11,0	17,0

Valores calculados da Cl₁₂:

$$CI_{12}^{rad +} > 8000 \ \mu g/mL$$

 $CI_{12}^{\text{rad 52Y}} > 8000 \ \mu g/mL$

$$CI_{12}^{rad 6} = 2800 \mu g/mL$$
 $CI_{12}^{RS 321N} = 77 \mu g/mL$

Tabela 64- Dose/resposta para a substância #106

C (μg/mL) da mistura	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	na	na	8,5	12,0
4000	na	na	7,0	10,0
2000	na	na	-	8,5
1000	na	na	-	7,0

Valores calculados da Cl₁₂:

$$CI_{12}^{rad 6} > 8000 \mu g/mL$$

 $CI_{12}^{RS 321N} = 2100 \ \mu g/mL$

Tabela 65- Dose/resposta para a mistura #110

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
C (μg/mL) da mistura	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	na	na	9,0	15,0
4000	na	na	8,0	13,0
2000	na	na	-	11,0
1000	na	na	-	-

Valores calculados da Cl₁₂:

 $C\,I_{12}^{\text{rad }6}>8000\mu g/mL$

 $CI_{12}^{RS 321N} = 2800 \ \mu g/mL$

Tabela 66- Dose/resposta para a substância #116

	zona de inibição (mm) observada nas linhagens			
C (μg/mL) da mistura	rad +	rad 52Y	rad 6	RS 321N
8000	na	na	-	15,0
4000	na	na	-	13,0
2000	na	na	-	9,5
1000	na	na	-	-

Valores calculados da Cl₁₂:

 $CI_{12}^{RS 321N} = 3500 \ \mu g/mL$

extrato, mistura ou	Procedência
substância pura (#)	
1 a 4	extratos preparados especialmente para serem
23 a 36	testados
5 a 8	trabalho de Tese: Isabel Craveiro Moreira (IQ-USP)
9 a 18	fornecidas pelo Dr. Dirceu Martins
100, 101 e 123	(UFBA)
19 a 22	dissertação de Mestrado: Cláudia B. Brochini (IQ-USP, 1993)
37 a 42; 45 a 58	fornecidas pelo Prof. Dr. Massuo J. Kato (IQ-USP)
65 a 83	
110 a 122	
43 e 44	fornecidas pela Dr ^a . Ana Luisa L. Lordello (UFPR)
59 a 64	
84 e 85	Tese de Doutorado: Dulce H S. Silva (IQ-USP, 1997)
86	dissertação de Mestrado: Cecilia V. Núñez
	(IQ-USP, 1996)
87 a 95	trabalho de Tese: Luciana R. de Carvalho (IQ-USP)
96 e 97	fornecidas pelo Dr. Frederico G. Cruz (UFBA)
98 e 99	fornecidas pela Drª.Luce Brandão (UFMA)
102 a 105	trabalho de Mestrado: Paulo J. C. Benevides (IQ-USP)
106 a 109	trabalho de Mestrado: Kennia R. Rezende (IQ-USP)

Tabela 67- Procedência do material testado nas linhagens mutantes deSaccharomyces cerevisiae.

Estudo fitoquímico biomonitorado de um extrato

A metodologia empregada pelo grupo do Prof. Dr. David G. I. Kingston para o fracionamento de extratos bioativos começa com um processo de partição solvente-solvente [73]. É importante lembrar que é necessário o bioensaio de cada uma das partes obtidas nessa partição.

A seguir, a fase bioativa é cromatografada em coluna de Sephadex LH-20 utilizando-se gradiente de solvente para a eluição [51]. A avaliação do bioensaio das frações provenientes desta coluna indicará qual fração deverá ser estudada. A partir dai, poderão ser utilizadas colunas de fase-reversa, CCDP de fasereversa e CLAE também de fase reversa, sempre utilizando-se as bioplacas para o monitoramento de cada etapa de purificação.

Em certos casos poderão ser utilizadas colunas ou placas preparativas de sílica e/ou alumina. Entretanto, deve-se testar a estabilidade do metabólito bioativo em sílica utilizando-se para tal uma escala piloto.

Quando os compostos ativos são alcalóides, o fracionamento ácido-base convencional poderá ser empregado.

Assim, 79,3 g do extrato metanólico de folhas foram submetidos a partição entre n-BuOH e H₂O o que originou 51,3 g de fração n-butanólica e aproximadamente 27,0 g de fração aquosa. A análise da bioplaca mostrou que a fração n-butanólica era duas vezes mais ativa do que a fração aquosa. Para biomonitorar esse extrato foi utilizada a linhagem SC-7 do fungo *Saccharomyces cerevisiae*.

A fração mais ativa foi então solubilizada em MeOH:H₂O (8:2) e submetida a partição em hexano, o que originou 16,4 g de fração hexânica. O bioensaio mostrou que o material ativo estava totalmente contido na parte hidroalcoólica e não na hexânica e que portanto, deveria-se dar continuidade ao processo de partição. Para tal, a parte MeOH:H₂O (8:2) foi diluida a 40% de H₂O e submetida a partição com CHCl₃. O bioensaio que foi realizado a seguir mostrou que o material ativo continuou solubilizado na fração hidroalcoólica. Decidiu-se continuar a partição e então tal fração foi diluida à 50% de H₂O em MeOH e extraida com AcOEt, o que originou 14,2 g de fração AcOEt. O bioensaio desta e da fração hidroalcoólica mostrou que ambas eram ativas, sendo que a parte AcOEt possuia uma atividade maior do que a outra.

O Esquema 4, p. 121 mostra todo o processo de partição, os valores de CI₁₂ calculados ou o tamanho dos halos de inibição observados assim como as quantidades obtidas de cada fração.

Esquema 4- Partição do extrato bioativo e resultados dos bioensaios.



.
Fracionamento biomonitorado da fração AcOEt

Dando continuidade ao procedimento estabelecido para o fracionamento biomonitorado, aproximadamente 200 mg de fração AcOEt foram cromatografados em coluna de Sephadex LH-20 (5 g). A Tabela 68 correlaciona as frações coletadas com o sistema de solvente utilizado para eluição.

fração	sistema de solvente	massa (mg)
	hexano:CHCl ₃ (1:4)	2,1
k-2	CH ₂ Cl ₂ :(CH ₃) ₂ O (3:2)	5,5
k-3	CH ₂ Cl ₂ :(CH ₃) ₂ O (1:4)	9,2
k-4	(CH ₃) ₂ O (100%)	16,3
k-5	(CH ₃) ₂ O:MeOH (4:1)	119,9
k-6	(CH ₃) ₂ O:MeOH (1:1)	47,1

Tabela 68- Coluna da fração AcOEt em Sephadex LH-20 (Coluna k)

A seguir foi realizado o bioensaio de cada uma das frações da Coluna k, utilizando-se a linhagem SC-7 do fungo *S. cerevisiae*. A Tabela 69 mostra os valores das zonas de inibição medidas em cada uma das concentrações utilizadas.

C (μg/mL) das frações	zona de inibição (mm) observada linhagem SC-7					
	fração k-1	fração k-2	fração k-3	fração k-4	fração k-5	fração k-6
8000	nt	nt	17,0	24,0	23,0	19,0
4000	nt	nt	16,0	19,5	17,5	15,0
2000	nt	nt	12,0	13,0	11,5	11,5
1000	10,0	11,0	-	-	-	-
Cl₁₂ (μg/mL) calculada			1900	1870	2087	2450

Tabela 69- Estudo da dose/resposta para as frações provenientes da Coluna k

nt = não testado

Com base nestes resultados, as frações k-3, k-4 e k-5 foram reunidas (145 mg) e cromatografadas em coluna de Sephadex LH-20 (Coluna I, 5 g). A Tabela 70 correlaciona as frações eluidas desta coluna com o sistema de solvente utilizado.

Tabela 70- Coluna em Sephadex LH-20 das frações reunidas k-3/k-5 (Coluna I)

fração	sistema de solvente	massa (mg)
l-1	CH ₂ Cl ₂ :(CH ₃) ₂ O (1:4)	17,2
I-2	(CH ₃) ₂ O (100%)	26,5
I-3	(CH ₃) ₂ O:MeOH (95:5)	25,3
1-4	(CH ₃) ₂ O:MeOH (9:1)	22,7
I-5	(CH ₃) ₂ O:MeOH (85:15)	16,0
I-6	(CH ₃) ₂ O:MeOH (8:2)	8,1
I-7	(CH ₃) ₂ O:MeOH (1:1)	4,0

O resultado do bioensaio destas frações é mostrado na Tabela 71.

fração	C (μg/mL)	zona de inibição (mm) linhagem SC-7
l-1	1200	na
I-2	1000	12,0
I-3	1000	11,0
I-4	1000	na
I-5	1200	na
I-6	1100	na
-7	1000	9,0

Tabela 71- Bioensaio das frações da coluna L

na = não ativa

Com base nestes resultados assim como na análise por CCDC, as frações l-2 e l-3 foram reunidas (51,8 mg) e testadas novamente na linhagem SC-7 do fungo *S. cerevisiae.* Após o período de incubação de 72 horas a 30°C, foi possível observar um halo de inibição de 31 mm na concentração de 4000 μ g/mL.

Assim, 6 mg da fração reunida I-2/I-3 foram cromatografados em placa preparativa de fase reversa RP-18, eluída em MeOH:H₂O (4:6). Foram recolhidas cinco faixas desta placa e o resultado do bioensaio destas frações é descrito na Tabela 72. É importante notar que a fração reunida I-2/I-3 assim como a fração AcOEt bruta também foram testados na mesma placa que as frações provenientes da placa preparativa (frações #1, #2, #3, #4, #5) a fim de se comparar os tamanhos dos halos de inibição.

material (C=2000 μg/mL)	raio da zona de inibição (mm) linhagem SC-7
fração AcOEt	14,0
1-2/1-3	22,0
#1	10,0
#2	na
#3	na
#4	8,0
#5	na

Tabela 72- Bioensaio das frações provenientes da CCDP de I-2/I-3

na = não ativa

O resultado deste bioensaio mostrou que o material bioativo poderia estar se decompondo, uma vez que o halo de inibição induzido pelas frações provenientes da placa preparativa são menores do que o da fração AcOEt.

Decidiu-se então repetir o procedimento cromatográfico a fim de se confirmar se estaria ou não ocorrendo a degradação do material bioativo durante o processo cromatográfico.

Para tal, a fração I-2/I-3 foi mais uma vez submetida a CCDP de fase reversa (RP-18). Apenas 9 mg do material foram aplicados na placa e após a eluição em MeOH:H₂O (4:6) foram recolhidas cinco faixas. O bioensaio em SC-7 dessas frações foi realizado novamente e a Tabela 73 mostra os valores observados. A concentração utilizada agora foi de 4000 μg/mL.

material (C=4000 μg/mL)	raio da zona de inibição (mm) linhagem SC-7	
I-2/I-3	31,0	
#1	na	
#2	na	
#3	na	
#4	na	
#5	na	

Tabela 73- Bioensaio das frações provenientes da CCDP de I-2/I-3 (segundo bioensaio)

na = não ativa

É importante notar que simultaneamente com o procedimento cromatográfico, o bioensaio das três últimas frações obtidas na partição foi repetido diversas vezes. Os resultados destes testes indicaram que a bioatividade destas frações foi diminuindo com o passar do tempo.

Este importante dado, juntamente com o resultado do bioensaio das frações provenientes da placa preparativa, mostrou que o material bioativo sofreu degradação, o que impossibilitou o seu isolamento e consequente identificação ou determinação estrutural.

O Esquema 4, p. 121 mostra todos os valores de CI_{12} ou do halo de inibição das frações obtidas na partição. Nota-se que o primeiro resultado da CI_{12} para a fração 60% aquosa em MeOH é de 465 µg/mL. Quando repetiu-se o bioensaio desta fração, o valor da CI_{12} passou para 1200 µg/mL. Também ocorreu um aumento dos valores da CI_{12} para as frações AcOEt e MeOH:H₂O (1:1), respectivamente de 212 para 1530 µg/mL e de 968 para 2390 µg/mL.

Vale relembrar que a CI_{12} indica a concentração da amostra testada, em μ g/mL, necessária para produzir uma zona de inibição com 12 mm de diâmetro e que uma amostra é considerada ativa se o valor da CI_{12} é menor do que 2000 μ g/mL.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise química da fração hexânica do extrato metanólico das folhas de *Guarea guidonia*, coletadas em Campo Grande (MS), mostrou que, além de grande quantidade de material graxo, os constituintes principais de tal fração são diterpenos com esqueletos carbônicos prenilbiciclogermacrânico (D-1) e cneorubínico (D-2, D-3 e D-4). Diterpenos com tais esqueletos só haviam sido encontrados previamente em *Cneorum tricoccon* e/ou *Neochamaelea pulverulenta* [53]. Essa constatação confirmou a observação prévia de que folhas de *G. guidonia* coletadas em regiões diversas possuem diferentes constituintes principais. A diversidade dos metabólitos secundários de *G. guidonia* tem se mostrado surpreendente. Mesmo em se tratando de substâncias de mesma classe, como, por exemplo os diterpenos, estes apresentam esqueletos carbônicos completamente diferentes (Tabela 4, p. 10).

Uma grande diversidade foi também observada na constituição sesquiterpênica do óleo essencial da casca do tronco [48]. Nas folhas, no entanto, os sesquiterpenos predominantes são do tipo eudesmânico. A análise do óleo essencial das folhas, principalmente através de dados de RMN de ¹³C de constituintes puros ou de misturas, mostrou-se efetiva uma vez que foram identificados nove sesquiterpenos, sendo que cinco deles são inéditos.

Como os estratos polares não foram analisados, não foi possível analisar se o espécimem estudado produz meliacinas.

Os extratos e frações de extratos testados em busca de possíveis substâncias anticancerígenas não mostraram resultados satisfatórios para que o estudo químico biomonitorado fosse realizado. Este fato não é surpreendente uma vez que a possibilidade de se encontrar um extrato ativo no bioensaio utilizado é de 1%. Assim sendo, estudou-se um extrato ativo de outra procedência, o qual

perdeu a atividade durante o processo de fracionamento cromatográfico. Mesmo assim, o conjunto de atividades desenvolvidas durante o estágio proporcionou um excelente aprendizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Pennington, T.D., Styles, B.T. (1995) *A Generic monograph of the Meliaceae*, Blumea, **22**, 419-540.
- 2. Taylor, D.A.H. (1983) *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*, Academic Press, 353-375.
- 3. Ley, S.V., Denholm, A.A., Wood, A. (1993) *Natural Products Report* **10**, 109-155.
- 4. Shuengthong, D., Kokpel, U., Kartiang, P. (1997) Tetrahedron 30, 2211.
- 5. Tchouankeu, J.C., Nyasse, B., Tsamo, E., Sondengam, B.L., Morin, C. (1992) *Phytochemistry* **31**, 704.
- 6. Aladesanmi, A.J., Kelley, C.J., Leary, J.D. (1983) *Journal of Natural Products* **46**, 127.
- 7. Garg, H.S., Bhakumi, D.S. (1984) Phytochemistry 23, 2115.
- 8. Nagasampagi, B.A., Sriraman, M.C., Yankov, L., Dev, S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1673.
- 9. Tinto, W.F., Jagessar, P.K., Ketwaru, P., Reynolds, W.F., McLean, S. (1991) Journal of Natural of Products **54**, 972.

- 10. Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1989) *Z. Naturforsch., B. Chem. Sci* 44, 1279.
- 11. Ara, I., Siddigui, B.S., Faizi, S., Siddigui, S. (1990) Phytochemistry 29, 911.
- 12. Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1988) *Journal of Natural Products* **51**, 1054.
- Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1989) *Journal of Natural Products* 52, 1209.
- 14. Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1990) Planta Medica 56, 84.
- Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1990) *Journal of Natural Products* 53, 816.
- 16. Majunder, P.L., Maiti, D.C., Kraus, W., Bokel, M. (1987) *Phytochemistry* **26**, 3021.
- 17. Meyer, W.L., Clemans, G.B., Manning, R. A. (1975) *Journal of Organic Chemistry* **40**, 3686.
- 18. Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1989) *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1, 343.
- 19. Siddiqui, S., Ara, I., Faizi, S., Mahmood, T., Siddiqui, B.S. (1988) *Phytochemistry* 27, 3903.
- 20. Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1988) Phytochemistry 27, 1801.

- 21. Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1989) Phytochemistry 28, 1177.
- 22. Chandrasekharan, S., Chakrabortty, T. (1969) *Journal of Indian Chemical* Society **45**, 208.
- 23. Rojatkar, S.R., Chiplumkar, Y.G., Nagasampagi, B.A. (1994) *Phytochemistry* **37**, 1213.
- 24. Cambie, R.C., Moratti, S.C., Rutledge, P.S., Westron, R.J., Woodgate, P.D. (1990) *Australian Journal of Chemistry* **43**, 1151.
- 25. Furlan, M., Lopes, M.N., Fernandes, J.B., Pirani, J.R. (1996) *Phytochemistry* **41**, 1159.
- 26. Rojatkar, S.R., Nagasampagi, B.A. (1994) Phytochemistry 37, 505.
- 27. Nishizawa, M., Inoue, A., Hayashi, Y., Sastrapradja, S., Kosela, S., Iwashita, T. (1984) *The Journal of Organic Chemistry* **49**, 3661.
- 28. Somasekar, A.R., Dutt, K.B., Sukl, D., Guha, P.C. (1952) *Journal of Indian Chemical Society* **29**, 604.
- 29. Wong, K.C., Wong, S.W., Siew, S.S., Tie, D.Y. (1994) *Flavour and Fragance Journal* **9**, 319.
- 30. Gough, J.H., Sutherland, M.D. (1964) Australian Journal of Chemistry 17, 1270.
- 31. Paknikar, S.K., Bhattacharyya, S. (1962) Tetrahedron 18, 1509.

- 32. Russel, G.B., Hunt, M.B., Bowers, W.S., Blunt, J.W. (1994) *Phytochemistry* **35**, 1455.
- 33. Hoffmann, J., Cole, J.R., Arora, S.K., Bates, R.B., Kriek, G.R. (1978) *The Journal of Organic Chemistry* **43**, 1254.
- Daniewski, W.M., Anazwski, W., Gumulka, M., Danikiewicz, W., Jacobsson,
 U., Norin, T. (1996) *Phytochemistry* 43, 811.
- 35. Weyerstahl, P., Scneider, S., Marschall, H.(1996) *Flavour Fragrance Journal*, 11, 81.
- 36. Menut, C., Lamaty, G., Bessière, J.M., Seuleiman, A.M., Fendero, P., Maidou,
 E., Demamganai, J. (1995) *The Journal of Essential Oil Research* 7, 207.
- De Mayo, P., Willians, R.E., Buchi, G., Feairheller, S.H. (1965) Tetrahedron 21, 619.
- 38. Nagasampagi, B.A., Yakov, L., Dev S. (1968) Tetrahedron Letters 16, 1913.
- Lorenzi, H. (1992) Árvores Brasileiras, Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, Plantarum, São Paulo, 242.
- 40. Correa, M.P. (1926-1978) *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, II, 77.
- 41. Zelnik, R., Rosito, C. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1166.
- 42. Lukacova, V., Polonsky, J., Moretti, C., Pettit, G.R., Schimidt, J.M. (1982) Journal of Natural Products **45**, 288.

43. Lins, A.P. (1991) Livro de Resumos da 14ª Reunião Anual da SBQ, PN-43.

- 44. Wolter, E.L.A., Wolter Filho, W., da Rocha, A. I., Gadelha, T. De O., da Cunha, E.V.L., Barbosa Filho, J.M. (1991) *Livro de Resumos da 14^a Reunião Anual da SBQ*, PN-13.
- 45. Lins, A.P., Braggio, M.M.. Felicio, J.D., Giuriatti, A.M., Felicio, J.C. (1992) *Revista Latinoamericana de Química* **23**, 30.
- 46. Furlan, M., Wolter Filho, W., Roque, N.F. (1993) Phytochemistry 32, 1519.
- 46a. Furlan, M. (1990) *Tese de Doutoramento*, Instituto de Química da Universidade de São Paulo
- 47. Furlan, M., Lopes, M.N.(1993) *Eclética Química* 18, 113.
- 48. Núñez, C.V., Roque, N.F. (1996) *Livro de Resumos da 19ª Reunião Anual da SBQ*, PN-056.
- 49. Garcez, F.R., Núñez, C.V., Garcez, W.S., Almeida, R.M., Roque, N.F. (1997) *Planta Medica* **00**, 000.
- 50. Gupta, A.S., Dev, S. (1963) Journal of Chromatography 12, 189.
- 51. Cardellina II, J.H. (1983) Journal of Natural Products 46, 196.
- 52. lwabuchi, H., Yoshikura, M., Kamisako, W. (1989) *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 509.

- 53. Trautmann, D., Epe, B., Oelbermann, U., Mondon, A. (1980) *Chemische Berichte* **113**, 3848.
- 54. Faure, R., Ramanoelina, A.R.P., Rakotonirainy, O., Bianchini, J.P., Gaydou, E.M. (1991) *Magnetic Resonance in Chemistry* **29**, 969.
- 55. Toyota, M., Nagashima,Y., Fukuyama, Y., Honda, S., Asakawa, Y. (1988) *Phytochemistry* **27**, 3317.
- 56. Ohtani, I., Kusumi, T., Ishitsuka, M.O., Kakisawa, H. (1989) *Tetrahedron Letters* **30**, 3147.
- 57. Ahmad, V.U., Aliya, R., Perveern, S., Shameel, M. (1992) *Phytochemistry* 31, 1429.
- 58. Patitucci, M.L., Veiga Jr., V.F., Pinto, A.C., Zoghbi, M. das G.B., Silva, J.R. de A. (1995) *Química Nova* **18**, 262.
- 59. Gallegos Olea, R., Roque, N.F. (1990) Química Nova 13, 278.
- 60. Brochini, C.B., Martins, D., Roque, N.F., Bolzani, V. da S. (1993) *Phytochemistry* **36**, 1293.
- 61. Connolly, J.D., Hill, R.A. (1991) Dictionary of Terpenes, Chapman and Hall.
- 62. Southwell, I.A. (1977) Tetrahedron Letters 19, 873.
- Ambrosio, M.D., Guerreiro, A., Pietra, F. (1987) *Helvetica Chimica Acta* 70, 612.

- Ferreira, Z.M.G. (1979) Tese de Doutoramento, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- 65. Núñez, C.V. (1996) *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- 66. Maurer, B., Grieder, A. (1977) Helvetica Chimica Acta 60, 2177.
- 67. Fang, N., Yu, S., Mabry, T.J., Abboud, K.A., Simonsen, S.H. (1988) *Phytochemistry* **27**, 3187.
- 68. Bohlmann, F., Umemoto, K., Jakupovic, J., Kind, R.M., Robinson, H. (1984) *Phytochemistry* **23**, 1980.
- 69. Raman, Atta ur, Ahmad, V.U. ¹³C NMR of Natural Products, volume 1 (monoterpenes and sesquiterpenes), Plenum Press, New York.
- 70. Yoshikawa, M., Hatakeyma, S., Tanaka, N., Fukuda, Y., Murakami, N., Yamahara, J. (1992) *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 2582.
- 71. Sardenberg, I (1996) Revista Veja 1440, p. 76-82.
- 72. Johnson, R.K., Bartus, H.F., Hofmann, G.A., Bartus, J.O., Mong, S-M., Faucette, L.F., McCabe, F.L., Chan, A., Mirabelli, C.K. (1986) "In Vitro and In Vivo Models for Detection of New Antitumor Drugs". Ed. by L.J.Hanka, T. Kondo e R.J.White, Organizing Commitee of the 14th Internacional Congress of Chemotherapy, Kyoto, p 15-26.
- 73. Johnson, R.K., Hertzberg, R.P. (1990) *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **25**, 129.

- 74. Hertzberg, R.P., Johnson, R.K. (1993) *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **28**, 167.
- 75. Gunatilaka, A.A.L., Kingston, D.G.I., Johnson, R.K. (1994) *Pure and Appl. Chem.* **66**, 2219.
- 76. Game, J.C. (1983) Yeast Genetics, Fundamentals and Applied Aspects. Ed. by J.F.T. Spencer, D.M. Spencer and A.R.W. Smith, Springer-Verlag, New York p.109-137.
- 77. Eng, W-K, Faucette, L., Johnson, R.K., Sternglanz, R. (1988) *Molecular Pharmacology* 34, 755.
- Parness, J., Kingston, D.G.I., Powell, R.G., Hanacksingh, C., Horwitz, S. (1982) *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 105, 1082.
- 79. Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Lavelle, F., LeGoff, M-T, Mamgatal, L., Potier, P. (1991) *Journal of Medicinal Chemistry* **34**, 992.
- 80. Gunatilaka, A.A.L., Kingston, D.G.I., comunicação pessoal.

CURRICULUM VITAE

CLÁUDIA BARBOSA BROCHINI

Nascimento: 04 de março de 1965

Local: Osasco - São Paulo

Educação

COLÉGIO NOSSA SENHORA DA MISERICÓRDIA Osasco - SP de fevereiro de 1972 a dezembro de 1972

ESCOLA ESTADUAL DE 1^{\circ} E 2^{\circ} GRAUS "PROF. JOSÉ LIBERATTI" Osasco - SP de fevereiro de 1973 a dezembro de 1979

COLÉGIO RIO BRANCO São Paulo - SP de fevereiro de 1980 a dezembro de 1982

FACULDADES OSWALDO CRUZ Bacharelado em Ciências - Habilitação em Química Concluído em dezembro de 1986

FACULDADES OSWALDO CRUZ Licenciatura em Ciências Concluído em dezembro de 1987

INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Mestrado em Química Orgânica Orientadora: Profª. Drª. Nidia Franca Roque Título da Dissertação: Triterpenos de *Alibertia edulis* (A. Rich) Rubiaceae Defendida em 10 de maio de 1993

Atividades profissionais

Professora (2 ^º Grau)		
Escola Mutirão	Período:	03/04/92 a 15/12/92
Colégio Integrado Objetivo	Período:	01/09/89 a 12/02/90
Colégio Continental	Período:	01/10/86 a 01/06/88

Técnico de Laboratório de Química Empresa: Associação de Cimento Portland Período: 02/05/88 a 13/10/88

Bolsas recebidas

Bolsa de Mestrado - CNPq de 1990 a 1992

Bolsa de Doutoramento - CNPq de 1993 a 1997

Bolsa de Doutorado Sandwich no Exterior (CNPq) Estágio de 1 ano nos laboratórios do Prof. Dr. David G. I. Kingston Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg - Virginia - USA de 12 de agosto de 1995 a 11 de agosto de 1996

Publicação

An Oleanan Triterpene from *Alibertia edulis* Cláudia B. Brochini, Dirceu Martins, Nidia F. Roque e Vanderlan da S. Bolzani (1994) *Phytochemistry* **36**,1293.

۰.

138

ESPECTROS











ESPECTRO 4- RMN de ¹³C (DEPT 90^o) de **D-2** (50 MHz, CDCI₃)



ESPECTRO 5- RMN de ¹H de D-2 (200 MHz, CDCI₃)







ESPECTRO 8- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹H - ¹³C) de D-2 (200 e 50 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 9- RMN de 13 C (PND) de **D-1** (50 MHz, CDCI₃)









ESPECTRO 12- RMN de ¹H de **D-1** (200 MHz, CDCI₃)













ESPECTRO 16- RMN de ¹³C (PND) de D-3 (100 MHz, CDCl₃)


















ESPECTRO 21- RMN HETCOR (¹H - ¹³C) de **D-3** (200 e 50 MHz, CDCl₃)















ESPECTRO 25- expansão do espectro de RMN HMBC de D-3 (400 e 100 MHz, CDCl₃)

















ESPECTRO 30- RMN NOESY de D-3 (400 MHz, CDCI3)









ESPECTRO 32- RMN de ¹³C (PND) de D-4 (100 MHz, CDCl₃)







2 N ເກ دد ----Prw ¦ . į ê 1. こうろうちょうしてもち 4.8 モディーアイモーテー 69 والمتحمولة فترابعتهم والمراطع والمنافرة مناطرة والمتواصر ومترافعة فمعرا أمتناه والمرأد والمنافعة ومناريه والمراجعة والم 80 FFM 100 _ 120 6 140 Y m **WIW** ANT'

ESPECTRO 35- RMN HETCOR (¹H - ¹³C) de **D-4** (200 e 50 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 36- expansão do espectro de RMN HETCOR (¹H - ¹³C) de D-4 (espectro 35)





























ESPECTRO 46- RMN de ¹H do sitosterol (200 MHz, CDCI₃)







ESPECTRO 48- RMN de ¹H do óleo essencial bruto das folhas de *Guarea guidonia* (200 MHz, CDCl₃)





ESPECTRO 50- RMN de 13 C (DEPT 135^o) de **S-1** (50 MHz, CDCI₃)







ESPECTRO 53- RMN de ¹³C (PND) de S-2 [em mistura com S-3 (50 MHz, CDCl₃)]



ESPECTRO 54- expansão do espectro de RMN de ¹³C (PND) de S-2 (espectro 53)


ESPECTRO 55- RMN de ¹³C (DEPT 135^o) de S-2 [em mistura com S-3 (50 MHz, CDCI₃)]





ESPECTRO 57- RMN de ¹H de S-2 [em mistura com S-3 (200 MHz, CDCl₃)]



ESPECTRO 58- RMN de ¹³C (PND) de S-3 (50 MHz, CDCI₃)

























ESPECTRO 65- RMN de ¹H de S-4 [em mistura com S-1 e S-3 (200 MHz, CDCl₃)]



ESPECTRO 66- RMN de 13 C (PND) de S-5 (50 MHz, CDCl₃)







ESPECTRO 68- RMN de ¹H de S-5 (200 MHz, CDCI₃)









ESPECTRO 71- expansão do espectro de RMN HOMOCOSY de S-5 (espectro 70)









.





9: 9: 9: 9: 9: 9: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 9: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10: 10:	
53 53 53 23 53 73 73 23 23 53 23 23 23 23 53 23 23 23 23 53 23 23 23 23 53 23 23 23 23 53 23 23 23 23 53 24 25 23 23 53 24 25 23 23 54 26 15 25 52 26 15 25 54 26 26 15 54 26 26 15	
2552 2552 5987 59777 5977 5977 5977 5977 5977 5977 5977 5977 5977 5977	
235. <u>15</u>	
1220 35 SSEE	

ESPECTRO 77- expansão do espectro de RMN de ¹³C (PND) de S-7 (espectro 76)











ESPECTRO 80- RMN de ¹H de S-7 (200 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 81- experimento de dupla irradiação para S-7 (RMN de ¹H, 200 MHz, CDCl₃)







ESPECTRO 83- expansão do espectro do experimento de dupla irradiação para S-7 (espectro 81)







ESPECTRO 86- RMN de ¹³C (PND) de **S-9** (50 MHz, CDCI₃)









ESPECTRO 89- RMN HMQC de S-9 (500 e 125 MHz, CDCI₃)



ESPECTRO 90- RMN HOMOCOSY de S-9 (500 MHz, CDCI3)