INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Recebido em 07/06/00
Ferreira

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

25453
12/18242

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE
Dracontium lorentense Krause

Ingrit Elida Collantes Díaz
TESE DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Massayoshi Yoshida

São Paulo
Data do Depósito do trabalho na SPG: 15 / 02 / 2002

☆ 20.000
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004607

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Collantes Díaz, Ingrid Elida
C697a Alguns constituintes químicos de *Dracontium lorentense*
Krause / Ingrid Elida Collantes Díaz. -- São Paulo, 2002.
57p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Yoshida, Massayoshi

1. Produtos naturais : Química orgânica 2. Fitoquímica :
Araceae I. T. II. Yoshida, Massayoshi, orientador.

547.7 CDD

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

*“Alguns Constituintes Químicos de
Dracontium loretense Krause”*

INGRIT ELIDA COLLANTES DÍAZ

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em
Química – Área: Química Orgânica*

Aprovada por:

Prof. Dr. MASSAYOSHI YOSHIDA
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. VICENTE DE PAULO EMERENCIANO
IQ - USP

Profa. Dra. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
IQ-UNESP-Araraquara

SÃO PAULO
21 DE MARÇO 2002.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais Nestor e Neri, pelo amor e apoio incondicionais

Aos meus irmãos: Alexis, Jessica, Manuel e Armando

Agradecimentos

Ao Professor Massayoshi Yoshida, pelos ensinamentos, amizade, paciência e confiança.

Aos Professores Paulo H. Moreno e Massuo J. Kato, pela colaboração e amizade.

À Professora. Maria Cristina dos Santos da Universidade do Amazonas, pelos testes biológicos.

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, pelo convívio agradável.

À CAPES, pela bolsa concedida.

CONTEÚDO

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ESQUEMAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Plantas contra veneno de cobra.....	1
1.2. Família Araceae.....	5
1.3. <i>Dracontium loretense</i> Krase.....	7
1.3.1 Uso popular.....	9
1.4. Objetivo.....	9
1.5. Estudos prévios de <i>Dracontium loretense</i> Krause	10

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGIA.....	11
2.1. Materiais e métodos.....	11
2.2. Coleta e identificação do material vegetal.....	13
2.3. Estudo fitoquímico.....	14
2.3.1. Obtenção do extrato bruto.....	14
2.3.2. Partição do extrato hexânico.....	16
2.3.2.1.Esterificação dos ácidos graxos.....	17
2.3.3. Partição do extrato etanólica.....	17

2.3.3.1. Estudo de resíduo hexânico.....	18
2.3.3.2. Estudo de resíduo clorofórmico.....	19
2.3.3.3. Estudo de resíduos de acetato de etila e álcool- água.....	19
2.4. Testes biológicos.....	22
2.4.1. Testes de neutralização da atividade edematogênica do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	22

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1. Discussão sobre as estruturas das substâncias isoladas.....	24
3.1.1. Triglicerídeos.....	24
3.1.2. Ácidos graxos.....	26
3.1.3. Sitosterol e Estigmasterol (1 e 2).....	30
3.1.4. 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-eno (3).....	34
3.1.5. 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-en-7-ona (4).....	40
3.1.6. Ácido p-hidroxibenzóico (5).....	43
3.1.7. 2,3,4,6-Tetra-acetil-O-etil-glicosídeo (6).....	47
3.2. Testes biológicos.....	51

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSÃO.....	52
-------------------	----

CAPÍTULO 5

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
-------------------------------------	----

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AG	Mistura de esteroides acilglicosilados
A <i>p</i> -Hb	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectrometria de massas
δ	Deslocamento químico
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
Ext.	Extrato
Hex	Hexano
<i>J</i>	Constante de acoplamento
M	Mistura de compostos
MC	Mistura de carboidratos
m	Multiplete
ppm	Partes por milhão
Py	Piridina
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
SS	Mistura de Sitosterol e estigmasterol
s	Singleto
T_{amb}	Temperatura ambiente
T	Triglicerídeos
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
t_{R}	Tempo de retenção

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção de extratos brutos.....	15
Esquema 2. Partição do extrato hexânico.....	16
Esquema 3. Partição do extrato etanólico.....	17
Esquema 4. Fracionamento do resíduo hexânico.....	18
Esquema 5. Fracionamento do resíduo clorofórmico.....	19
Esquema 6. Fluxograma de acetilação dos resíduos de acetato de etila e álcool-água.....	20
Esquema 7. Fracionamento do resíduo de acetato de etila acetilado.....	21
Esquema 8. Fracionamento do resíduo de álcool-água acetilado	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Compostos com atividade antiofídica.....	3
Figura 2.	Foto de <i>Dracontium loretense</i> Krause.....	8
Figura 3.	Foto do rizoma de <i>Dracontium loretense</i> Krause.....	9
Figura 4.	Estrutura geral de um triglicerídeo.....	24
Figura 5.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CDCl_3) de um triglicerídeo.....	25
Figura 6.	Cromatograma do extrato hexânico bruto metilado.....	26
Figura 7.	Espectro de massas de Palmitato de metila.....	27
Figura 8.	Espectro de massas de 2-Metil-hexadecanoato de metila.....	27
Figura 9.	Espectro de massas de 14-Metil-hexadecanoato de metila.....	28
Figura 10.	Espectro de massas de Heptadecanoato de etila.....	28
Figura 11.	Espectro de massas de Elaidato de metila.....	28
Figura 12.	Espectro de massas de Iso-estearato de metila.....	29
Figura 13.	Espectro de massas de Oleato de etila.....	29
Figura 14.	Espectro de massas de 2-Metil-octadecanoato de metila.....	29
Figura 15.	Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da mistura das substâncias 1 e 2.....	32
Figura 16.	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, δ ppm, CDCl_3) da mistura das substâncias 1 e 2.....	33
Figura 17.	Cromatograma do éster metílico do ácido graxo, obtido após a hidrólise e metilação do sitosterol acil-glicosilado.....	34
Figura 18.	Espectro de massas de Pentadecanoato de metila.....	35
Figura 19.	Espectro de massas de Palmitato de metila.....	35
Figura 20.	Espectro de massas de 14-Metil-hexadecanoato de metila.....	36
Figura 21.	Espectro de massas de Elaidato de metila.....	36
Figura 22.	Espectro de massas de Iso-estearato de metila.....	36

Figura 23.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 3.....	39
Figura 24.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 4.....	42
Figura 25.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CD_3OD) da substância 5.....	45
Figura 26.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CD_3OD) da substância 5.....	46
Figura 27.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 6.....	49
Figura 28.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 6.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) das substâncias 1 e 2	31
Tabela 2.	Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 3	38
Tabela 3.	Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 4	41
Tabela 4.	Dados de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 5	43
Tabela 5.	Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 5	44
Tabela 6.	Dados de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 6	47
Tabela 7.	Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 6	48

RESUMO

Alguns Constituintes Químicos de *Dracontium loretense* Krause (Araceae)

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de *Dracontium loretense* Krause, que ocorre na Amazônia, e, a planta é popularmente usada no tratamento de picada de cobra e de algumas moléstias.

O material para a análise fitoquímica foi coletado na selva baixa situada nos arredores de Pucallpa, no Departamento de Ucayali, no Perú. Os rizomas secos e moídos forneceu, após extração com hexano, etanol e etanol aquoso, os respectivos extratos. Estes, submetidos a partição com solventes orgânicos e fracionamentos cromatográficos dos resíduos das fases resultantes, permitiram o isolamento de constituintes apolares ou semi-polares como sitosterol, estigmasterol, ácido *p*-hidróxi-benzóico, sitosterol acil-glicosilado, 7-oxo-sitosterol acil-glicosilado e uma mistura de compostos acil-glicosilados. As frações polares foram acetiladas antes do fracionamento, possibilitando o isolamento de uma mistura de carboidratos com predominância de etil-glicosídeo acetilado.

A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi baseada em métodos espectrométricos: EM, RMN de ^1H e de ^{13}C . Os compostos acilados foram hidrolizados e os ácidos graxos resultantes metilados antes de serem submetidos a análise no sistema CG-EM.

Os testes biológicos foram realizados com as frações apolares e polares dos extratos para avaliar a atividade anti-edematogênica. Estes ensaios empregam o veneno de *Bothrops atrox* (jararaca). Os testes mostraram que ambas as frações inibiam o edema, entretanto com a diferença que a resposta é mais acentuada nas frações polares.

ABSTRACT

Some Chemical Constituents from *Dracontium loretense* Krause (Araceae)

This work describes phytochemical analysis of an araceous species *Dracontium loretense*, which occurs in Amazon Region and is popularly used the against snakebite and treatment of some diseases.

The plant material was collected in the lowland situated around Pucallpa, Ucayali State, Peru. The dried and milled rhizomes were sucessively extracted at room temperature with hexane, alcohol and diluted alcohol, yielding respective extracts after solvent distillation. The solvent partitions and chromatographic separations of extracts afforded sitosterol, stigmasterol, *p*-hydroxybenzoic acid, sitosterol- and 7-oxo-sitosterol acyl-glucosylated and a mixture of acyl-glucosylated compounds. The polar fractions were acetylated before the purification and the isolation through cromatographic techniques yielded a mixture of peracetylated carbohydrates and the 2,3,4,6-tetra-acetyl-1-ethyl glucoside.

Structure determination of isolated compounds was based on usual spectrometric techniques as Mass Spectrometry and ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. The natural acylated compounds were submitted to hydrolysis and the resulting fat acids were methylated, before submissuion foranalysis on Gas Chromatograph-Mass spectrometer system.

Evaluation of anti-edematogenic activity using *Bothrops atrox* venom was carried out with polar and apolar fractions. It was observed that polar fractions showed higher edema inhibition property.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas contra veneno de cobra

A vegetação amazônica tem despertado interesse de químicos e farmacólogos pela sua diversidade e o acúmulo de inúmeros metabólitos de diferentes classes de compostos, e, em consequência, a possibilidade de múltipla bioatividade dos mesmos. Particularizando para uma atividade específica, plantas utilizadas contra os venenos de cobras, encontram-se descritas na literatura informações etnobotânicas oriundas de diferentes povos.

Na América do Sul, os registros de plantas da Amazônia brasileira, podem ser encontrados nos relatos de Mors (1995), que incluem, além de espécies vegetais, alguns compostos químicos isolados. Estas espécies pertencem às famílias como Cyperaceae (*Cyperus corymbosus*, "pripioca"), Araceae (*Dracontium asperum*, "batata de cobra, jararaca, milho de cobra, tajá de cobra"), Moraceae (*Dorstenia asaroides*, "caapiá, carapiá"), Aristolochiaceae (*Aristolochia trilobata*, "jarrinha, papo de peru, urubucaa"), Capparaceae (*Crataeva benthami*, "catrauari, catore"), Icacinaceae (*Humirianthera duckei*, "mairá, surucucuina"), Loganiaceae (*Potalia amara*, "erva de cobra, pau de cobra"), Verbenaceae (*Aegiphila salutaris*, "contra cobra"), Schrophulariaceae (*Stemodia viscosa*, "boia-caá, paracari") e Astëraceae (*Eupatorium triplinerve*, "erva de cobra, japana").

Uma relação mais completa de plantas utilizadas contra as picadas de cobra, encontra-se registrada em outra referência e inclui plantas utilizadas pelos índios do Brasil, pelos índios da Amazônia peruana, como por exemplo os índios Conibos, pelos índios da Amazônia equatoriana e da Colômbia [Crespo, 1997]. Os compostos responsáveis pela atividade antiofídica em plantas tem sido atribuída ao sitosterol, ácido aristolóquico, daidzeina, quercetina [Mors, 1995], cabenegrina A-I e A-II, wedelolactona e

schumanniofosideo [Selvanayagam *et al.*, 1994], ehretianona [Selvanayagam *et al.*, 1996] e ar-turmerona [Ferreira *et al.*, 1992]. Estes compostos não atuam necessariamente contra o veneno, mas em uma das consequências resultante da picada por cobra.

Entre as espécies utilizadas contra o veneno de cobra, as do gênero *Dracontium*, encontram-se mencionadas com grande frequência. Consulta bibliográfica sobre espécies de *Dracontium* em bases de dados mais especializados observam-se registros de usos etnobotânicos da planta e de testes farmacológicos realizados com seus extratos.

As espécies de *Dracontium* utilizadas para tratar pessoas picadas por cobra incluem *D. asperum*, *D. costarricense*, *D. dubium*, *D. longipes*, *D. pittieri*, *D. polyphyllum*, *Dracontium* spp. [Selvanayagam *et al.*, 1996], *Dracontium* sp. [Desmarcheilier *et al.*, 1996a; Desmarcheilier *et al.*, 1996b] e *D. loretense* [Ducke & Vasquez, 1994; Desmarcheilier *et al.*, 1997].

Outras espécies de *Dracontium* são utilizadas como emenagoga, purgativa e em tratamento de asma, como a *D. polyphyllum* [Dragendorff, 1898; Saha *et al.*, 1961; Moreno, 1975; Chopra, 1993] e *D. asperum* [Dragendorff, 1898]. A espécie *D. trianae* é utilizada contra diarreia [Schultes, 1980].

Figura 1: Compostos com atividade anti-ofídica (cont.)

Figura 1: Continuação de compostos com atividade anti-ófídica

1.2. Família Araceae

A família Araceae compreende cerca de 115 gêneros com 1800 espécies. Estas encontram-se concentradas nas regiões tropicais da América, Sudeste da Ásia e no arquipélago Malaio [Mayo *et al.*, 1997].

O gênero *Dracontium* se encontra dentro das Araceae e foi morfológicamente estudado por Guanghai Zhu no Missouri Botanical Garden (MBG) e pela University of Missouri - St. Louis, sob a orientação do Dr. Thomas B. Croat do MBG.

O gênero *Dracontium* é originário da América Tropical e é constituído de 19 espécies relacionadas a seguir.

- 1 *Dracontium aricuaisanum* Bunt. (Venezuela)
- 2 *Dracontium asperum* Koch (Brasil, Venezuela, Suriname)
- 3 *Dracontium carderi* Hook (Colômbia)
- 4 *Dracontium changuango* Bunting (Venezuela)
- 5 *Dracontium costaricense* Engl. (Costa Rica, Panamá)
- 6 *Dracontium dubium* Kunth (Guiana)
- 7 *Dracontium foecundum* Hoor (Trinidad, Guiana, Suriname)
- 8 *Dracontium gigas* (Seem) Engl. (Nicarágua, Costa Rica)
- 9 *Dracontium longipes* Engl. (Brasil, Perú ?)
- 10 *Dracontium lorentense* Krause (Brasil, Equador, Perú)
- 11 *Dracontium margaretæ* Bogner (Bolívia, Brasil , Venezuela)
- 12 *Dracontium ornatum* Krause (Equador)
- 13 *Dracontium pittieri* Engl. (Costa Rica)
- 14 *Dracontium polyphyllum* L. (Brasil, Guiana, Suriname, Venezuela)
- 15 *Dracontium purdieanum* (Schott.) Hook (Colômbia)
- 16 *Dracontium regelianum* (Engl.) Bogner (Venezuela)
- 17 *Dracontium soconuscum* Matuda (México, Panamá)
- 18 *Dracontium trianae* Engl. (Colômbia)
- 19 *Dracontium ulei* Krause (Bolívia, Brasil)

1.3. *Dracontium lorentense* Krause

D. lorentense Krause (Fig. 2) é uma planta herbácea, terrestre, tuberosa, com a folha solitária, pecíolo largo, grosso, erguido, na base envainador, as vezes verrucoso ou manchado, com limbo tripartido ou multipartido, pedúnculos em momento da floração mais bem curtos, depois crescentes, espata oblonga ou lanceolada, na base convoluta, aberta, acuminada ou com ápice cuculado, espádice brevemente estipitado, cilíndrico, muito mais curto que espata, flores hermafroditas com perianto de 4 até 8 segmentos, estames 4 até 6 em dois verticílios ou também 9 até 12 em 3 até 4 verticílios, ovário ovóide de 2-5 lóculos incompletos, um rudimentário seminal anátropo ou subcampilótropo por lóculo, estilo bem mais largo, estigma pequeno de 2-5 lóbulos; fruto pequeno com restos do perianto e coronada com resíduos do estilo, com 2-5 lóculos monospermos.

Figura 2: Foto de *Dracontium loretense* Krause

1.3.1. Uso popular

Popularmente, os rizomas de *D. loretense* Krause (Fig. 3) é empregado para tratamento de diversos sintomas e doenças como tremor de mãos, epilepsia, diarreia, herpes, SIDA, hérnia, câncer e asma. Foram observadas propriedades anti-inflamatórias, antivirais e contra veneno da serpente *Bhotrops atrox* [Arevalo, 1994]

1.4. Objetivo

Realizar um estudo fitoquímico do rizoma de *D. loretense* Krause, popularmente conhecido no Perú como “jergón sachá”, “hierva del jergón”, “ronon rao” (grupo étnico, Shipibo-Conibo), “du nu yubi” (vocabulo dos Cashinaguas). Em adição, efetuar testes biológicos, que permitam buscar frações ou metabólitos ativos contra veneno de jararaca.

Figura 3: Foto do rizoma de *Dracontium loretense* Krause

1.5. Estudos prévios de *Dracontium loretense* Krause

Tem-se como precedente a este trabalho duas teses, sendo uma sobre estudo farmacológico da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico 70% [Serrano L., 1990]. A segunda, relata um estudo comparativo por cromatografia de camada delgada com os alcalóides presentes em *Cichorium intybus* (Asteraceae) [Jurado T., 1993]; e, a parte de estudo farmacológico realizada, relata a reduzida atividade anti-histamínica. Um estudo mais recente, relata a ausência de atividade citotóxica em células KB, P-388, L51784 e L1210 [Desmarcheiller *et al.*, 1996].

2. METODOLOGIA

2.1. Material e métodos.

- a) Todos os solventes utilizados nas extrações e nas eluições de colunas cromatográficas foram devidamente tratados e destilados, segundo os procedimentos usuais [Assumpção & Morita, 1968]. Utilizaram-se solventes deuterados (CDCl_3 e CD_3OD) contendo TMS como padrão interno, da Merck, para a obtenção de espectros de RMN.
- b) As soluções foram concentradas em evaporador rotatório da Buchler sob pressão reduzida.
- c) A cromatografia em camada delgada analítica foi realizada em cromatoplasas de sílica sobre suporte de alumínio da Merck. As placas preparativas utilizadas foram preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (5 - 40 μm) da Merck. Estas placas foram preparadas dispersando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro de 20 x 20 cm, utilizando-se o espalhador da "Quickfit". As espessuras das placas de sílica gel foram de 1,00 mm. Para as colunas cromatográficas foi utilizado como suporte sílica gel 60 (63 -200 μm) da Merck.
- d) As revelações dos cromatogramas analíticos foram efetuadas com vapor de iodo, irradiação no ultravioleta (254 e 356 nm) e nebulização com solução de ácido sulfúrico 25 %, seguido de aquecimento.

- e) Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetro Varian DPX-300, operando, respectivamente a 300 e 75 MHz. Os espectros foram obtidos em deuteroclorofórmio ou metanol deuterado como solventes e TMS como padrão interno.
- f) As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafo da Hewlett Packard mod. 5890 series II com injetor automático HP 7673 e integrador HP 3396A. Utilizou-se coluna capilar (0,25 mm) de 30 m, contendo fenil-silicone (5%) e metil-silicone (95%) como fase estacionária. As condições empregadas nos experimentos foram: bloco injetor: 220°C, detector de ionização de chama: 280°C, gás de arraste: He; vazão: 6 mL / min (30°C); temperaturas da coluna: 120°C durante 2 min com gradiente de 10°C / min até 280°C e mantido por 15 min nesta temperatura final.
- g) Os espectros de massas foram registrados em sistema CG - EM da Shimadzu constituído de cromatógrafo modelo CG - 17A e espectrômetro MS - QP 5050A, com temperatura do injetor 150 °C, temperatura do forno 60 °C por 2 min, com incremento 10 °C/min até 250 °C, permanecendo por 10 min em 250 °C.
- h) A amostra de veneno de *Bothrops atrox* utilizada para os experimentos foi extraída de uma fêmea adulta procedente do município de Presidente Figueiredo (AM). O veneno foi liofilizado e fornecido pelo Núcleo de Animais Peçonhentos da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Foram utilizados neste experimento camundongos não-isogênicos fêmeas, pesando entre 18 a 22 gramas, procedentes do biotério do Departamento de Ciências

Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Fundação
Universidade do Amazonas.

2.2. Coleta e identificação do material vegetal

O *D. loretense* Krause "Jergón sacha" foi coletado na cidade de Pucallpa, Perú, no mês de dezembro do 2000.

A espécie *Dracontium loretense* Krause (Fig. 2) foi identificada pela botânica Irma Fernandez V. da Universidad Peruana Cayetano Heredia, segundo o sistema de Engler & Prantl modificado por Melchior em 1964, e, a excicata encontra-se depositada no herbário da Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Division XVII:	Angiospermae
Classe:	Monocotyledonea
Ordem:	Spatiflorae
Família:	Araceae
Tribo:	Lasieae
Gênero:	<i>Dracontium</i>
Espécie:	<i>Dracontium loretense</i> Krause
Nome comum:	"Jergon sacha", "Ronon rao" (Shipibo-conibo), "Hierba del jergon", "Shano yora", "Du nu yubi" (cashinahua), "Jararaca", "Hierba de santamaria" "Taja de cobra", "Fer de lance"

2.3. Estudo fitoquímico

2.3.1. Obtenção do extrato bruto

Os rizomas frescos (2,9 Kg) foram secados a 40 °C, em estufa, obtendo-se 835,7 g de material seco, que foi moído.

O pó foi inicialmente macerado com hexano, subseqüentemente com etanol e finalmente com etanol-água (Esquema 1).

Os filtrados hexânico, etanólico e hidro-alcoólico foram concentrados em evaporador rotatório à pressão reduzida, obtendo-se os extratos hexânico, etanólico e etanol/água.

O extrato etanólico não foi totalmente evaporado. Deixando em repouso a temperatura ambiente durante vários dias, houve a precipitação de cristais incolores, que foram separados, reunidos, pesados (4,9 g), e analisados, separadamente do extrato etanólico.

Esquema 1: Obtenção de extratos brutos

2.3.2. Partição do extrato hexânico

O extrato hexânico foi ressuspendido em metanol 90% e, então, extraiu-se 3 vezes com hexano. As fases hexânicas e hidroalcoólicas resultantes foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se os respectivos resíduos (Esquema 2).

Esquema 2: Partição do extrato hexânico

Fez-se cromatografia comparativa em camada delgada (CCDC) com todos os extratos obtidos, com o objetivo de se fazer uma análise preliminar para uma escolha adequada da fração a ser fracionada.

Com a finalidade de identificar quais ácidos graxos ocorrem no extrato hexânico, metilou-se 25 mg de extrato bruto, para submeter o éster metílico resultante à análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

2.3.2.1. Esterificação dos ácidos graxos

Parte do extrato hexânico (25 mg) foi misturado com 3 mL de n-hexano, 15 ml de solução de ácido sulfúrico a 2% em metanol. Aqueceu-se a mistura em refluxo, durante uma hora e depois, a mistura foi resfriada. Adicionou-se 40 ml de solução saturada de cloreto de sódio até a fase hexânica atingir um nível pré-estabelecido em um balão volumétrico. Os ésteres metílicos formados se dispersam na fase hexânica.

2.3.3. Partição do extrato etanólico

O extrato etanólico foi ressuspendido em metanol 90% e, então, extraiu-se sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila, 3 vezes com cada solvente. As fases resultantes foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se os respectivos resíduos (Esquema 3).

Fez-se cromatografia comparativa em camada delgada (CCDC) com todos os extratos obtidos, com o objetivo de se fazer uma análise preliminar para uma escolha apropriada da fração a ser trabalhada.

Esquema 3: Partição do extrato etanólico

2.3.3.1. Estudo do resíduo hexânico

1 g do resíduo hexânico foi submetido a fracionamento em coluna, com sílica-gel, usando como gradiente hexano / acetato de etila e acetato de etila / metanol, obtendo-se 95 frações (Esquema 4). As frações semelhantes foram reunidas e submetidas a análise por RMN de ^1H e verificou-se a presença de triglicerídeos nas primeiras frações, nas frações intermediárias, uma mistura de sitosterol e estigmasterol e nas frações finais uma mistura de esteroides-acilglicosilados.

Como os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C não forneciam informações sobre o número de átomos de carbonos do ácido graxo ligado ao açúcar, a mistura de esteroide-acilglicosilados foi transesterificada com metanol em meio ácido. O éster metílico do ácido graxo obtido foi submetido a análise por CG-EM, ver item (2.3.2.1).

Esquema 4: Fracionamento do resíduo hexânico

2.3.3.2. Estudo do resíduo clorofórmico

1 g do resíduo clorofórmico foi submetido a fracionamento em coluna, com sílica-gel, usando como gradiente hexano / acetato de etila e acetato de etila / metanol, obtendo-se 174 frações (Esquema 5). As frações similares foram reunidas e submetidas à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e verificou-se a presença da mistura de sitosterol e estigmasterol nas frações de 9 até 15. O ácido *p*-hidróxi-benzóico estava presente nas frações de 54 até 80. As frações 81-86 eram constituídas de 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-eno e 87-174 constituídas de mistura complexa

Esquema 5: Fracionamento do resíduo clorofórmico

2.3.3.3. Estudo de resíduos de acetato de etila e de álcool-água

Os resíduos de acetato de etila e metanol-água foram submetidos à CCDC para encontrar um sistema de solventes que permitisse uma separação adequada de seus constituintes. Optou-se, pela dificuldade de encontrar um sistema e pela polaridade dos constituintes, acetilar estes resíduos. Utilizou-se 1 g de cada resíduo, adicionando-se para cada 10 mg de resíduo 2 ml da mistura 1:1 de anidrido acético: piridina, deixando reagir por 24 horas. Após a reação, para eliminar o excesso de reagente, as

misturas relacionais foram diluídas em água gelada, e as soluções resultantes foram extraídas 3 vezes com clorofórmio. As fases clorofórmicas foram reunidas, lavadas com ácido clorídrico 10% até pH 7, 3 vezes com água destilada e posteriormente secados com Na_2SO_4 (Esquema 6). Concentrou-se as fases clorofórmicas a pressão reduzida, obtendo-se os respectivos resíduos acetilados.

Esquema 6: Fluxograma de acetilação dos resíduos de acetato de etila e álcool-água.

Os resíduos acetilados foram separadamente cromatografados numa coluna contendo sílica-gel usando como gradiente hexano/acetato de etila, obtendo-se 120 frações (Esquema 7). As frações similares em CCDC foram reunidas e submetidas à análise por RMN de ^1H , e verificou-se a presença nas primeiras frações, de mistura de esteroides-acilglicosilados e nas frações posteriores, de mistura de carboidratos com predominância de etil-glicosídeo.

Esquema 7: Fracionamento do resíduo de acetato de etila acetilado.

O resíduo de etanol-água acetilado foi cromatografado numa coluna com sílica-gel usando como gradiente hexano/acetato de etila, obtendo-se 85 frações (Esquema 8). As frações similares reunidas foram submetidas a análises por RMN de ^1H e mostrou ser constituída de uma mistura de carboidratos com predominância de etil-glicosídeo.

Esquema 8: Fracionamento do resíduo álcool-água acetilado

2.4. Testes biológicos

2.4.1. Teste de neutralização da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*

Este teste foi realizado, com as frações da partição do extrato etanólico bruto, pela Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos da Universidade do Amazonas, com o intuito de verificar se estas frações neutralizavam atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*.

Os camundongos utilizados no teste foram divididos em três grupos com seis animais cada. As amostras (fração polar e apolar) foram diluídas em 100µL de tween 80 e 900µL de solução salina em uma concentração final de 50 µg/mL. A amostra de veneno foi diluída em solução salina a uma concentração final de 72 µg/mL (3 vezes a dose mínima edematogênica do veneno utilizado).

O grupo controle recebeu 50µL de solução de veneno no coxim plantar da pata teste, 50µL de solução salina na pata contralateral e 100 µL

de solução salina contendo tween 80 a 10% intraperitonalmente. Os grupos experimentais receberam 50 μ L de solução de veneno no coxim plantar da pata teste, 50 μ L de solução salina na pata contralateral e 100 μ L da frações (polar ou apolar) em solução salina com tween 80 a 10% intraperitonalmente.

As patas foram medidas com auxílio de um paquímetro nos tempos 2, 4 e 6 horas após as injeções. O edema foi expresso pela diferença entre as espessuras do coxim da pata experimental e da pata controle (contralateral) , dividido pela espessura da pata controle multiplicado por 100.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Discussão sobre as estruturas das substâncias isoladas

3.1.1. Triglicerídeos

A análise do extrato hexânico bruto mostrou a presença de triglicerídeos através do espectro de RMN de ^1H (Fig. 5) sinais característicos de 1 H em 5,25 ppm (CHOCOR) e dois duplo dubletos referentes a 4 H, entre 4,12 e 4,28 ppm (CH_2OCOR).

Figura 4: Estrutura geral de um triglicerídeo, onde R, R' e R'' podem ser cadeias carbônicas com ou sem insaturação, e também, diferentes entre si

A maior reserva de lipídeos são os triglicerídeos, que é o glicerol completamente acilado. Usualmente, encontra-se o glicerol acilado por dois diferentes ácidos graxos. Assim, a hidrólise ácida ou básica de um triglicerídeo resulta em uma mistura de ácidos graxos.

Figura 5: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CDCl_3) de um triglicerídeo

3.1.2. Ácidos graxos

Para a determinação dos ácidos graxos, o extrato hexânico bruto, foi metilado e os ésteres resultantes, analisados por CG-EM.

Figura 6: Cromatograma do extrato hexânico bruto metilado

O espectro de massas de ésteres metílicos de ácidos graxos saturados mostra a presença do íon acílio ($M-31$). Normalmente o pico do íon molecular se apresenta pouco intenso ou até inexistente. O pico base do espectro é m/z 74, que se forma por um rearranjo de Mc Lafferty. Os íons da série aritmética $59+14n$, por exemplo m/z 87 (intensidade alta), 101, 115, 129, 143, 157, etc. (sinais de intensidades discretas) são observados, distinguindo-se dos outros pela intensidade baixa [Landone *et al.*, 1976]. Os íons de m/z 69, 83 e 97 de intensidade baixa são formados por simples clivagens e rearranjos da cadeia carbônica.

O espectro de massas de um éster metílico de ácido graxo insaturado, apresenta o pico do íon m/z 55 (C_4H_7)⁺ com intensidade alta. Observa-se também íons resultantes pela perda de um radical metoxílico ($M-31$) e pela eliminação da molécula de metanol ($M-32$).

A presença de m/z M-74 e M-56 são característicos do referidos ésteres [Linskens *et al.*, 1986].

Os espectros de massas de principais componentes observados no cromatograma (Fig. 6) foram registrados nas figuras 7 a 14.

Figura 7: Espectro de massas do palmitato de metila, com íon molecular em m/z 270.

Figura 8: Espectro de massas de 2-metil-hexadecanoato de metila com íon molecular em m/z 284.

Figura 9: Espectro de massas de 14-metil-hexadecanoato de metila com íon molecular em m/z 284.

Figura 10: Espectro de massas de heptadecanoato de etila com íon molecular em m/z 298.

Figura 11: Espectro de massas de elaidato de metila com íon molecular em m/z 296.

Figura 12: Espectro de massas do iso-estearato de metila com íon molecular em m/z 298.

Figura 13: Espectro de massas de oleato de etila com íon molecular em m/z 310.

Figura 14: Espectro de massas de 2-Metil-octadecanoato de metila com íon molecular em m/z 312.

A identificação dos ácidos graxos foram baseadas na comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles registrados na literatura [Mc Lafferty *et al.*, 1989] para compostos modelo. Assim foram identificados os ácidos graxos como sendo, ácido palmítico, ácido 2-metil-hexadecanóico, ácido 14-metil-hexadecanóico, ácido heptadecanóico, ácido elaídico, ácido iso-esteárico, ácido oléico e ácido 2-metil-octadecanóico.

3.1.3. Sitosterol e estigmasterol (1 e 2)

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig.15) da fração intermediária apresenta diversos sinais de carbonos alifáticos entre 12 e 57 ppm e sinal de um carbono oxigenado em 72 ppm, sugerindo uma mistura de esteróides.

Os sinais que permitem uma proposição estrutural absorvem em 141, 138,5, 129,6 e 121,9 ppm, sendo que os sinais em 141 e 121,9 ppm são mais intensos que os sinais restantes. A busca na literatura [Holland *et al.*, 1978] e comparação dos dados observados no espectro permitem deduzir que a mistura é constituída de estigmasterol e de sitosterol, muito frequente em espécies vegetais.

O espectro de RMN de ^1H (Fig.16) de sitosterol e estigmasterol apresenta algumas absorções características como um duplo-duplo-duplo-dublete em 3,52 ppm ($1\text{H}-3$, $J = 9,5 \text{ Hz}$, $4,8 \text{ Hz}$, $11,2 \text{ Hz}$, e $4,6 \text{ Hz}$) e o tripleto largo em 5,3 ppm que indica a presença de um hidrogênio olefínico em C6.

Os sinais em 5,07 ppm e 5,16 ppm indicam a presença dos hidrogênios em C22 e C23.

Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C do sitosterol e do estigmasterol constam na Tabela 1, juntamente com dados da literatura para comparação.

Substâncias 1 e 2 : Estigmaterol e Sitosterol

Tabela 1: Comparação com os dados da literatura [Holland *et al.*, 1978] com os dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) das substâncias 1 e 2 .

Carbonos	Estigmaterol δ (ppm)	Sitosterol δ (ppm)	Subst. 1 δ (ppm)	Subst. 2 δ (ppm)
1	37,4	37,3	37,6	37,6
2	31,7	31,8	31,9	31,9
3	71,8	71,9	72,1	70,1
4	42,4	42,4	42,6	42,6
5	140,9	140,9	141,0	141,0
6	121,7	121,8	121,9	121,9
7	31,9	32,0	31,9	32,1
8	31,9	32,0	31,9	32,1
9	50,3	50,3	50,4	54,0
10	36,6	36,6	36,8	36,8
11	21,2	21,1	21,2	21,2
12	39,8	39,9	39,9	39,9
13	42,4	42,4	42,6	42,6
14	57,0	56,8	57,2	57,1
15	24,4	24,3	24,5	24,5
16	28,9	28,2	29,1	28,5
17	56,0	56,2	56,4	56,4
18	12,2	11,9	12,2	
19	19,4	19,4	19,3	19,3
20	40,5	36,2	40,6	36,4
21	21,1	19,1	21,2	19,2
22	138,4	34,0	138,5	34,3
23	129,4	29,3	129,6	29,5
24	51,3	50,3	51,3	
25	31,9	26,2	31,9	26,5
26	19,0	18,8	19,0	19,0
27	21,1	19,8	21,2	19,6
28	25,4	23,1	25,6	23,4
29	12,0	11,9	12,1

Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da mistura das substâncias **1** e **2**

Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CDCl_3) da mistura das substâncias **1** e **2**

3.1.4. 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-eno (3)

Os deslocamentos químicos observados e analisados no espectro de RMN de ^{13}C (Fig.23) da substância **3** (sitosterol acil-glicosilado) sugerem correlacionar aos sinais de um esteróide glicosilado (Tabela 2). Os sinais de carbono sp^2 em 122 ppm e 140 ppm são análogos aos carbonos 5 e 6 do sitosterol. As absorções em 79 ppm e de 101 ppm sugerem que o sitosterol esteja glicosilado, porque o valor de 101 ppm é característico de carbono anomérico. As absorções em 73,6 ppm, 76,1 ppm, 70,3 ppm, 73,6 ppm e 63,2 ppm, permitem estabelecer que o açúcar ligado ao esteróide é a glicose. Uma absorção adicional no espectro de RMN de ^{13}C em 174,4 ppm, característica de uma carbonila de éster, junto com a absorção de carbonos metilênicos em 29 ppm sugerem que a glicose se encontra esterificada por um ácido graxo. Com a intenção de determinar o número de átomos de carbono do ácido, que está ligado ao açúcar, hidrolisou-se o produto ver item (2.3.2.1.), e o ácido graxo, após metilação, foi analisado por CG-EM.

Figura 17: Cromatograma do éster metílico do ácido graxo, obtido após a hidrólise e metilação do sitosterol acil-glicosilado.

Observando o espectro do RMN de ^{13}C pode-se concluir que no esteroil acil-glicosilado, o ácido graxo ligado à glicose não apresenta insaturação.

Os espectros de massas dos principais constituintes observados no cromatograma (Fig.17) foram registrados e apresentados nas Figuras de 20 a 24.

Figura 18: Espectro de massas de pentadecanoato de metila com íon molecular em m/z 256.

Figura 19: Espectro de massas de palmitato de metila com íon molecular em m/z 270.

Figura 20: Espectro de massas de 14-metil-hexadecanoato de metila com íon molecular em m/z 284.

Figura 21: Espectro de massas de elaidato de metila com íon molecular em m/z 296.

Figura 22: Espectro de massas de iso-estearato de metila com íon molecular em m/z 298.

A análise dos espectros de massas dos constituintes do cromatograma de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos, por hidrólise, permitiu deduzir que um dos ácidos graxos que acila a glicose em maior proporção, é o ácido palmítico (Fig. 19).

As absorções descritas no artigo do Pei-wu *et al.* (1988) coincidem com as absorções observadas no espectro de RMN de ^{13}C da substância 3.

Substância 3

Tabela 2: Comparação de dados do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 3 com os dados da literatura [Holland *et al.*, 1978] [Pei-wu *et al.*, 1988]

Carbono	Sitosterol δ (ppm)	Sitosterol acilglic. δ (ppm)	Substância 3 δ (ppm)
1	37,3	39,1	37,2
2	31,8	32,0	31,9
3	71,9	79,9	79,8
4	42,4	42,4	42,2
5	140,9	140,5	140,3
6	121,8	122,1	122,1
7	32,0	32,0	31,9
8	32,0	32,0	31,9
9	50,3	50,3	50,3
10	36,6	36,8	36,1
11	21,1		21,1
12	39,9	39,7	39,7
13	42,4	42,4	42,2
14	56,8	56,7	56,9
15	24,3		24,3
16	28,2		28,2
17	56,2	56,3	56,2
18	11,9	12,0	12,0
19	19,4	19,4	19,3
20	36,2	36,8	36,1
21	19,1	19,1	18,9
22	34,0		34,2
23	29,3	29,3	29,2
24	50,3	50,3	50,3
25	26,2		26,1
26	18,8	18,9	18,8
27	19,8	19,9	19,8
28	23,1	23,2	23,1
29	11,9	11,9	11,9
1'		101,4	101,0
2'		73,4	73,6
3'		76,4	76,1
4'		70,6	70,3
5'		73,8	73,6
6'		63,8	63,2
1''		174,2	174,4
2''		32,1	31,9
3''		25,1	24,9
4''-13''		29,3/30,0	29,2/29,9
14''		32,0	32,0
15''		22,8	22,8
16''		14,2	14,2

Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 3

3.1.5. 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-en-7-ona (4)

Os deslocamentos químicos observados e analisados no espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 24) da substância **4** (7-oxo-sitosterol acil-glicosilado) sugerem correlacionar aos sinais de um esteróide glicosilado (Tabela 3). Os sinais de carbono sp^2 em 126,1 ppm, 165,5 ppm e 202,6 ppm são analogos aos carbonos 5,6 e 7 citados na literatura por Kovganko *et al.* (1999). As absorções em 78,5 ppm e 101,6 ppm sugerem que a substância **4** esteja glicosilada, porque o valor de 101,6 ppm é característico de carbono anomérico, as absorções em 73,4 ppm, 76,2 ppm, 70,7 ppm, 76,2 ppm e 63,7 ppm, permitem deduzir que o açúcar ligado ao esteroide é a glicose. Uma absorção adicional no espectro de RMN de ^{13}C em 174,3 ppm, característica de uma carbonila de éster, junto com a absorção de carbonos metilênicos em 29 ppm sugerem que a glicose se encontra esterificada por um ácido graxo.

Substância 4

BIBLIOTECA
UNIVERSITÁRIA

Tabela 3: Comparação de dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância **4** com os dados registrados na literatura [Kovganko *et al.*, 1999]

carbono	3-O-colest-5-en-7-ona δ (ppm)	substância 4 δ (ppm)
1	36,4	36,4
2	31,2	31,9
3	70,4	78,5
4	41,9	43,1
5	165,3	165,3
6	126,1	126,1
7	202,2	202,5
8	45,4	45,4
9	50,0	49,7
10	38,4	38,5
11	21,2	21,3
12	38,8	38,7
13	43,1	43,1
14	50,0	49,7
15	23,1	23,1
16	28,5	28,5
17	54,8	54,9
18	12,0	11,9
19	17,3	17,2
20	36,1	36,1
21	19,0	19,0
22	34,0	34,3
23	26,3	26,3
24	45,9	45,9
25	29,2	29,2
26	19,8	19,8
27	19,0	19,0
28	23,1	23,1
29	12,0	11,9
1'		101,6
2'		73,4
3'		76,4
4'		70,4
5'		73,4
6'		63,6
1''		174,2
2''		31,9
3''		24,9
4''-13''		29,2/29,7
14		32,0
15''		22,6
16''		14,0

Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância **4**

3.1.6. Ácido *p*-hidróxi-benzóico (5)

Os deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H (Fig. 25) na região de δ 6,8 - 7,9 ppm correspondem a sinais de 4 hidrogênios de um anel aromático dissustituído caracterizado por absorções em δ 6,81(2H, d, $J = 9$ Hz) e em δ 7,87 (2H, d, $J = 9$ Hz).

Substância 5: Ácido *p*-hidróxi-benzóico

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CD_3OD) da substância 5

Hidrogênio	δ (ppm), Multiplicidade, J (Hz)		
H-2 e H-6	7,87	(d)	$J = 9$
H-3 e H-5	6,81	(d)	$J = 9$
OH	---		
COOH	---		

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 26) da substância 5 apresenta sinais de carbonos quaternários em δ 170 ppm pertencente a um carbono carbonílico, em δ 122,7 ppm de um carbono *ipso* e em δ 163,4 ppm de um carbono ligado a uma hidroxila.

Tabela 5: Comparação dos dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CD_3OD) da substância **5** com os dados registrados na literatura [Scott, 1972]

Carbono	δ (ppm)	substância 5
C=O	169,0	170,1
1	121,9	122,7
2	132,7	133,0
3	115,8	116,0
4	162,5	163,3
5	115,8	116,0
6	132,7	133,0

Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CD_3OD) da substância **5**

Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CD_3OD) da substância **5**

3.1.7. 2,3,4,6-Tetra-acetil-O-etil-glicosídeo (6)

O espectro de RMN de ^1H (Fig. 27) apresenta sinal do hidrogênio anomérico em δ 4,4 ppm (Tabela 6). Os dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 28) permitem analisar os carbonos da molécula. O sinal em 100,4 ppm pertence ao carbono anomérico de tetraacetil-O-etil-glicosídeo. As demais atribuições encontram-se na Tabela 7.

Substância 6:

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (300MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 6

Hidrogênio	δ (ppm), Multiplicidade, J (Hz)		
H ₁	4,52	(d)	$J = 9$
H ₂	5,21	(t)	$J = 9$
H ₃	5,09	(t)	$J = 9$
H ₄	4,99	(t)	$J = 9$
H ₅	5,05	(dm)	
H ₆	3,64	(dd)	$J = 2,4$
H _{6'}	3,61	(dd)	$J = 2,4$
4 CH ₃ CO	2,01-2,09	(s)	
CH ₃ CHH	3,91	(dq)	$J = 2,7$
CH ₃ CHH'	3,59	(sq)	$J = 2,7$
CH ₃	1,21	(t)	$J = 6,9$

Tabela 7: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância 6

Carbono	Substância 5 δ (ppm)
1	100,4
2	71,2
3	71,6
4	68,4
5	72,8
6	61,9
CH_2	65,5
CH_3	14,0
CO	169,2 - 170,5
CH_3CO	20,4 - 20,5

Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância **6**

Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, δ ppm, CDCl_3) da substância **6**

3.2. Testes biológicos

As frações apolares e polares foram testadas, obtendo-se resposta positiva para ambas frações, com a diferença que a parte polar, onde se encontram os carboidratos, observados através de RMN de ^1H , a resposta é mais acentuada na neutralização edematogênica mediante veneno de *Bothrops atrox*.

4. CONCLUSÃO

As frações obtidas por partição de solventes do extrato alcoólico dos rizomas de *D. lorentense* Krause, apresentaram propriedades de inibir o edema causado pelo veneno de *B. atrox* (jararaca).

O fracionamento por diferentes técnicas cromatográficas das frações ou de seus resíduos forneceram os metabólitos a seguir sitosterol, estigmasterol, 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-eno, 3-O-[6'-O-palmitoil- β -D-glicosil]-colest-5-en-7-ona, ácido *p*-hidróxi-benzóico e 2,3,4,6-Tetra-acetil-O-etil-glicosídeo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arevalo, V.G. (1994), Las Plantas Medicinales y su Beneficio en la Salud Shipibo Conibo (Ediciones Asociación Interetnica de Desarrollo de la selva Peruana A . I.D.E.S.E.A . , p. 264

Assumpção, R.M.V. e Morita, T. (1968), Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo.

Chopra, R.N. (1993), Indigenous Drugs of India. Their Medical and Economic Aspects. The Art Press, Calcutta.

Crespo, A . (1997), Plantas Nativas Antiofídicas y Antivenenosas, Cap. IV in Etnomedicina - Progresos Italo-latinoamericanos (Eds. Naranjo, P. & Crespo, A .). Universidad Andina Simon Bolivar, Quito, p. 137-152.

Desmarcheilier, C. , Mongelli, E., Coussio, J. & Ciccía, G. (1996a), Studies on the Cytotoxicity, Antimicrobial and DNA-Binding Activities of plants Used by the ESEEJAS. *J. Ethnopharmacol.* 50: 91-96

Desmarheilier, C., Gurni, A.M. (1996b) Ritual and Medicinal Plants of the ESEEJAS of the Amazonian Rainforest (Madre de Dios, Perú). *J. Ethnopharmacol.* 52: 45 - 51

Desmarcheilier, C., Repetto, M., Coussio, J., Llesuy, S. & Ciccía, G. (1997), Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants Used in Southwest Amazonas (Bolivia and Perú). *Int. J Pharmacog.* 35: 288 - 296

Dragendorff, G. (1898), Die Heilpflanzen der Verschiedenen Volker und Zeiten. F. Enke, Stuttgart.

Ducke, J.A. & Vasquez, M.R. (1994), Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC, Boca Raton.

Ferreira, L.A., Henriques, O.B., Andreoni, A.A.S., Vital, G.R.F., Campos, M.M.C., Habermehl, G.G. & Moraes, V.L.G. (1992), Antivenom and Biological Effects of AR-Turmerone Isolated From *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon*, 30, 10, 1211-1218.

Holland, H.L., Diakow, P.R.P. & Taylor, G.J. (1978), ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some C-19-Hydroxy, C-5,6-epoxy, C-24-ethyl and C-19-norsteroids. *Can. J. Chem.*, 56, 3121-3127.

Jurado, T.B. (1993). Contribución al estudio farmacognóstico de *Dracontium lorentense* Krause (Jergón sachá), tesis para optar título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

Kovganko, N.V., Kashkan, Zh.N., Borisov, E.V. & Batura, E.V. (1999), ^{13}C NMR Spectra of β -Sitosterol Derivatives with Oxidized Rings A and B, *Chem. Nat. Comp.*, vol 35, No 6.

Landone, A., Cavalli, L., Cardini, G., Bareggi, E. & Gini, G. (1976), Gas Chromatography - Mass Spectrometry of Fatty Acids Present in Single Cell Proteins, *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*, vol II, pp. 567-580.

Linskens, H.F. & Jackson, J. F. (1986), Modern Methods of Plant Analysis New Series Volume 3 Gas Chromatography Mass Spectrometry. Springer-Verlag, Berlin, pp. 92-94

Martz, W. (1992), Plants with a reputation against snakebite, *Toxicon* 30 (10), 1131-1142.

Mayo, S.J., Bogner, J. & Boyce, P.C. (1997), The Genera of Araceae. Royal Botanical Gardens Kew, Firt published:

Mc Lafferty, F. W. & Stauffer, D. (1989), The Wiley/ NBS Registry of Mass Spectral Data. New York: John Wiley Sons

Moreno, A.R. (1975), Two Hundred Sixty Eight Medical Plants Used to Regulate Fertility in Some Countries of South America. Unpublished (stenciled), Review in Spanish.

Mors, W. B. (1995), Poisons and anti-poisons from the Amazon Forest, Chemistry of Amazon, Biodiversity, Natural Products and Environmental Issues. ACS SYMPOSIUM SERIES 588, American Chemical Society, Washington, DC.

Nakagawa, M. & Nakanishi, K. (1982), Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms, *Tetrahedron Lett.*, 23 (38), 3855-3858.

Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, (1985), São Paulo, 3º Ed. IMESP, IOE, V. I, 266.

Pei-Wu, G., Fukuyama, Y., Rei, W. & Nakagawa, K. (1998), An Acylated Sitosterol Glucoside From *Alisma Plantago-aquatica*, *Phytochemistry* 27 (6), 1895-1896.

Saha, J.C., Savini, E.C. & Kasinathan, S. (1961), Ecobolic Properties of Indian Medicinal Plants. Part 1. *Indian J. Med. Res.* 49, 130 -151.

Selvanayagam, Z.E., Gnanavendhan, S.G., Balakrishna, K. & Rao, R.B. (1994), Antisnake Venom Botanicals from Ethnomedicine. *J. Herb. Spices Med. Plants* 2, 45 -100

Selvanayagam, Z.E., Gnanavendhan, S.G., Chandrasekharan, P., Balakrishna, K. & Rao, R.B. (1994), Plants with Antisnake Venom Activity - A Review on Pharmacological and Clinical Studies. *Fitoterapia*, LXV, 2.

Selvanayagam, Z.E., Gnanavendhan, S.G., Balakrishna, K., Rao, R.B., Sivaraman, J., Subramanian, K., Puri, R. & Puri, R.K. (1996), Ehretianone, a Novel Quinonoid Xanthene from *Ehretia buxifolia* with Antisnake Venom Activity. *J. Nat. Prod.* 59, 664-667

Serrano, L.G. (1990), Pharmacognostic studies on plants used by the shipibo-conibo from the Peruvian Amazon, licenciante thesis, Uppsala University, Sweden.

Schultes, R.E. (1980), De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Tropicales Commentation. XXVI. Ethnopharmacological Notes on the Flora of Northwestern South America. *Bot. Mus. Leaflet. Harv. Univ.* 28, 1-45.

Scott, N.K. (1972), Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Biologically Important Aromatic Acids. I. Chemical Shifts of Benzoic Acid and Derivatives, *J. Amer. Chem. Soc.* 94 (24), 8564-8568.

Vignon, M.R. & Vottero, P.J.A. (1977), Influence du Groupe Trichloroacétyle Sur Les Déplacements Chimiques des Signaux des Atomes de Carbone du 1,2,3,4,6-Penta-*O*-Acétyl- β -D-Glucopyranose et du β -Gentiobiose octaacétate en R.M.N.- ^{13}C . *Carboh. Res.* 53, 197-207.