INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

19.804

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo Fitoquímico Guiado por Bioensaios em Algumas Espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica

TESE DE DOUTORADO DE
PAULO JOSÉ COELHO BENEVIDES

ORIENTAÇÃO
Prof. Dra. VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004153

Ficha Catalográfica

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

Benevides, Paulo José Coelho

B465es Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica / Paulo José Coelho Benevides. -- São Paulo, 2001.
209p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Bolzani, Vanderlan da Silva

1. Produtos naturais : Química orgânica 2. Fitoquímica : Amazônia I. T. II. Bolzani, Vanderlan da Silva, orientador.

547.7 CDD

“Estudo Fitoquímico Guiado por Bioensaios em Algumas Espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica”

PAULO JOSÉ COELHO BENEVIDES

*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. VANDERLAN DA SILVA BOLZANI
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. LILIANA MARZORATI
IQ – USP

Profa. Dra. DAISY DE BRITO REZENDE
IQ – USP

Profa. Dra. LUCE MARIA BRANDÃO TORRES
UNIFESP

Profa. Dra. MARCIA REGINA BRAGA
IBL – SP

SÃO PAULO
26 DE OUTUBRO 2001.

"Bem aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento... Mais preciosa é do que os rubis; e tudo que podes desejar não se pode comparar a ela ... É árvore da vida para os que a seguram, e bem-aventurados são todos os que a retêm."

Salomão Rei de Israel (Pv. 3:13-18)

*Este Trabalho é Dedicado a Minha Família,
pelo Amor e Presença constantes*

Agradecimentos

"Um verdadeiro amigo é aquele que desculpa nossas falhas e tolera nosso sucesso"
Doug Larson

À Prof. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani pela orientação e confiança depositada em mim para realizar este estudo. Obrigado pela amizade e apoio durante estes quatro anos de trabalho.

Aos Profs. Drs. Nídia Franca Roque, Paulo Roberto H. Moreno, Massuo Jorge Kato e Massayoshi Yoshida pelo incentivo e dicas durante os trabalhos de isolamento e determinação estrutural.

Ao Prof. Dr. Antônio Jorge do NPPN-UFRJ pelo auxílio nas análises dos óleos essenciais por cromatografia a gás.

À Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, por me disponibilizar os materiais e os equipamentos para execução dos ensaios biológicos realizados neste trabalho de pesquisa.

À equipe de profissionais que formam a Central Analítica do IQ-USP.

Aos meus amigos e colegas do grupo de Produtos Naturais do IQ-USP, Leandro Latorre, Ana Paula Danelute, Patricia Sartoreli, Isabel Moreira, Roberto Martins, Ana Paula Santos, Claudia Brochini, Cecília Núñez, Mara, João, Melânia e Sergio Galdino; pela amizade e por transformarem a rotina do trabalho em um convívio descontraído e agradável.

À minha família, pela formação moral e intelectual, pelo amor, força e apoio em todos os momentos, sem os quais não teria chegado até aqui.

À FAPESP pela bolsa de doutoramento e suporte financeiro.

Índice de Conteúdo

Parte I

Resumo	iii
Abstract	iv
Símbolos e Abreviaturas	v
Figuras	vii
Tabelas	x
Substâncias Isoladas e Identificadas neste	
Trabalho	xii

CAPÍTULO 1

Fitoquímica, Ferramenta Útil na Busca de Moléculas Bioativas	1
Porque Fazer Fitoquímica Guiada por Bioensaio?	4
Técnicas Gerais de Bioensaio	6
Bioensaio Aplicados neste Estudo	7

CAPÍTULO 2

Equipamentos e Métodos	12
Cromatografia e Instrumentação	12
Espectroscopia	13
Obtenção dos Extratos Brutos	14
Bioensaio com Culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Ensaio de Bioautografia com Fungos	19
Procedimento de Metilação dos Ácidos	
Triperpênicos	20
Determinação do Índice de Kováts	21

CAPÍTULO 3

Estudos com a Espécie <i>Petiveria allancea</i> L.	24
A Família Phytolaccaceae	24
A Espécie <i>Petiveria allancea</i> L.	26
Preparação dos Extratos e Triagem Biológica	29
Fracionamento Guiado por Bioensaio	33
Identificação e Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas	41

Atividade Biológica das Substâncias Isoladas	52
Proposta Biossintética p/ as Substâncias Isoladas	56
Estudo do Óleo Essencial de <i>Petiveria allancea</i> L.	59

CAPÍTULO 4

Estudos com a Espécie <i>Psychotria spectabilis</i> S.	62
A Família Rubiaceae	62
A Espécie <i>Psychotria spectabilis</i> S.	64
Preparação dos Extratos e Triagem Biológica	66
Fracionamento Guiado por Bioensaio	68
Identificação das Substâncias Isoladas	72
Atividade Biológica das Substâncias Isoladas	82
Proposta Biossintética p/ as Substâncias Isoladas	86
Estudo do Óleo Essencial <i>Psychotria spectabilis</i> S.	90

CAPÍTULO 5

Estudos com a Espécie <i>Bathysa meridionalis</i> L.	93
A Espécie <i>Bathysa meridionalis</i> L.	93
Preparação dos Extratos e Triagem Biológica	95
Fracionamento Guiado por Bioensaio	97
Identificação das Substâncias Isoladas	101
Atividade Biológica das Substâncias Isoladas	107
Proposta Biossintética p/ as Substâncias Isoladas	108
Estudo do Óleo Essencial <i>Bathysa meridionalis</i> L.	110

CAPÍTULO 6

Considerações Finais	113
----------------------	-----

Parte II

Espectros	116
Referências Bibliográficas	200
Curriculum Vitae	207

PARTIE I

Resumo

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isto mas o que ele se torna com isso."
John Ruskin

Neste trabalho o estudo fitoquímico foi guiado por dois bioensaios visando o fracionamento e o isolamento de substâncias com atividades antitumoral e antifúngica potenciais. Os bioensaios utilizados são específicos e foram realizados com três cepas modificadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e com duas espécies de fungos: *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

O fracionamento guiado por estes bioensaios foi desenvolvido com duas espécies da Mata Atlântica: *Petiveria alliacea* L. e *Bathysa meridionalis* L.; e uma espécie da Floresta Amazônica: *Psychotria spectabilis* S. Este trabalho resultou no isolamento de vinte e duas substâncias. Da espécie *P. alliacea* foram isolados dois sulfetos, dois dissulfetos, três polissulfetos e um esteróide. A espécie *P. spectabilis* forneceu três cumarinas, dois diterpenos e dois flavonóides. Da espécie *B. meridionalis* foram isolados sete triterpenos. Além do estudo químico guiado por bioensaios, os óleos essenciais obtidos das espécies estudadas foram analisados por cromatografia gasosa e trinta substâncias foram identificadas como polissulfetos, mono, sesqui e diterpenos.

As substâncias **1, 3, 4, 5, 13 e 22** apresentaram forte atividade antifúngica. As substâncias **1, 4, 6, 9, 13, 22** e a mistura **20-21** foram capazes de inibir seletivamente o crescimento dos mutantes de *S. cerevisiae* indicando que a atividade citotóxica destas substâncias está relacionada com as vias de reparo do DNA celular.

O sulfeto **3**, o dissulfeto **4** e os polissulfetos **6 e 8** até então não haviam sido descritos na literatura como substâncias de origem natural.

ABSTRACT

Abstract

"The largest reward for the man's work is not what he wins with this but the one that he becomes with that".
John Ruskin

In this work the phytochemical guided-fractionation, using two bioassays was performed aiming the fractionation and the isolation of potential antifungal and antitumoral compounds. The bioassays used are specific and were performed with three mutants strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and with two species of fungi: *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium sphaerospermum*.

The bioassays guided-fractionation were done using two plant species: *Petiveria alliacea* L. and *Bathysa meridionalis* L. from Atlantic forest: and *Psychotria spectabilis* S. from Amazon forest: This study resulted in the isolation of 22 substances. From *P. alliacea* were isolated 2 sulfydes, 2 disulfydes, 3 polissulfydes and 1 steroid. From *P. spectabilis* supplied 3 cumarins, 2 diterpens and 2 flavonoids. From *B. meridionallis* were isolated 7 triterpens. Besides the chemical guided-fractionation study, the essential oils obtained of these species were also analyzed by gaseous chromatography and 30 compounds were identified as polisulfydes, mono, sesqui and diterpens.

The substances **1, 3, 4, 5, 13** and **22**, showed strong antifungal activity. The substances **1, 4, 6, 9, 13, 22** and the mixture **20-21** showed DNA-damaging activity, which was evidenced by selective inhibition of the growth of the mutants of *S. cerevisiae*.

The sulfyde **3**, the disulfyde **4** and the polisulfydes **6** and **8** have been described as natural derivatives for the time in this work.

Símbolos e Abreviaturas

[α]_D	desvio rotatório óptico	DMSO	dimetil sulfóxido
[M]⁺	íon molecular	dq	duplo quarteto
AcOEt	acetato de etila	dt	duplo tripleto
Aq.	aquosa	ε	absortividade molar
CC	Cromatografia em coluna (à pressão atmosférica)	EM	espectrometria de massas
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa	Ext.	extrato
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa	h	horas
CG	cromatografia a gás	Hex	hexano
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	Hz	Hertz
CHCl₃	clorofórmio	int. rel.	intensidade relativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência	IV	infravermelho
d	dubleto	J	constante de acoplamento
δ	deslocamento químico	λ	comprimento de onda
DCM	diclorometano	Lit.	literatura
dd	duplo dubleto	m	multiplete
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer	m/z	relação massa/carga
dl	dubleto largo	max.	máximo
		Me	metila
		MeOH	metanol
		min	minutos
		mL	mililitros
		p.	página

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

PND	Proton Noise Decoupled
q	quarteto
ref.	referência
RMN ¹³C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN ¹H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	singleto
Si	sílica

sl	singleto largo
Sol.	solúvel
t	triplete
Temp.	temperatura
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta
vol.	volume

FIGURAS

Figuras

Figura i Substâncias isoladas de <i>Petiveria alliacea</i> L.	xi
Figura ii Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Petiveria alliacea</i> L.	xi
Figura iii Substâncias isoladas de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	xii
Figura iv Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	xii
Figura v Substâncias isoladas de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	xiii
Figura vi Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	xiii
Figura 1.1 Exemplos de substâncias de origem vegetal com atividade biológica comprovada e uso popular.	2
Figura 1.2 Micromoléculas isoladas de fontes naturais X atividade biológica descrita (Fuller, G. <i>et al</i> 1995).	5
Figura 1.3 Dados da Organização Mundial de Saúde sobre maiores índices percentuais de causas da mortalidade humana (OMS-Relatory, 1998).	8
Figura 1.4 Alguns carcinógenos químicos de origem natural.	9
Figura 1.5 Substâncias de origem natural utilizadas no tratamento do câncer.	10
Figura 1.6 Abordagem para descoberta de novas drogas vegetais.	11
Figura 2.1 Esquema geral de obtenção dos extratos brutos.	15
Figura 2.2 Esquema ilustrativo das mutações sofridas pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> para serem utilizadas no bioensaio.	17
Figura 2.3 Diagrama ilustrativo do bioensaio com linhagens mutantes de <i>S. cerevisiae</i> .	18
Figura 2.4 Diagrama ilustrativo da bioautografia com esporos de fungos <i>Cladosporium</i> .	20
Figura 2.5 Cromatograma resultante da análise qualitativa por cromatografia gasosa das parafina utilizadas como padrão para determinação do índice de Kováts.	23
Figura 3.1 Exemplos de Micromoléculas Representativas em Phytolaccaceae.	25

FIGURAS

Figura 3.2 Exemplos de micromoléculas isoladas de <i>Petiveria alliacea</i> L.	28
Figura 3.3 A espécie <i>Petiveria alliacea</i> L.	28
Figura 3.4 Obtenção dos extratos brutos e partição do extrato DCM:MeOH (2:1 v/v) de raízes de <i>Petiveria alliacea</i> L.	33
Figura 3.5 Fracionamento biomonitorado da fase hexânica do extrato de raízes de <i>Petiveria alliacea</i> L.	36
Figura 3.6 Fracionamento biomonitorado das fases reunidas CHCl ₃ e AcOEt do extrato de raízes de <i>Petiveria alliacea</i> L.	37
Figura 3.7 Fracionamento do extrato em DCM (2a Coleta) de raízes e caules de <i>Petiveria alliacea</i> L.	39
Figura 3.8 Substâncias isoladas dos extratos bioativos de <i>Petiveria alliacea</i> L.	40
Figura 3.9 Proposta de fragmentação para 1.	43
Figura 3.10 Proposta de fragmentação para a substância 3.	47
Figura 3.11 Ensaio com as substâncias isoladas de <i>Petiveria alliacea</i> L. com esporos dos fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> .	54
Figura 3.12 Halos de inibição das substâncias 4 e 5 com mutante Rad 52Y.	54
Figura 3.13 Alguns polissulfetos com atividade biológica descrita.	55
Figura 3.14 Intermediários chave e relação entre metabolismo primário e metabólitos secundários.	57
Figura 3.15 Cromatograma resultante da análise por cromatografia gasosa do óleo essencial de <i>Petiveria alliacea</i> L.	61
Figura 4.1 Exemplo de substâncias isoladas de algumas espécies de Rubiaceae.	63
Figura 4.2 Exemplo de alcalóides isolados de espécies de <i>Psychotria</i> .	65
Figura 4.3 Folhas e inflorescência da espécie <i>Psychotria spectabilis</i> S.	65
Figura 4.4 Diagrama esquemático de obtenção dos extratos brutos e partições de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	69
Figura 4.5 Esquema de fracionamento das frações de polaridade média e hidroalcolólica obtidas da partição do extrato bruto de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	70
Figura 4.6 Substâncias isoladas de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	71

FIGURAS

Figura 4.7 Esqueleto diterpênico tipo labdânico.	73
Figura 4.8 Proposta de fragmentação de massas para a substância 9.	74
Figura 4.9 Bioautografia com o fungo <i>C. cladosporioides</i> das substâncias 9, 12 e 13.	84
Figura 4.10 Exemplo de cumarinas bioativas.	86
Figura 4.11 Proposta biossintética para as substâncias 9 e 10.	87
Figura 4.12 Proposta biossintética para as cumarinas isoladas em <i>Psychotria spectabilis</i> S.	88
Figura 4.13 Proposta biossintética para os flavonóides de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	89
Figura 4.14 Cromatograma resultante da análise por cromatografia gasosa do óleo essencial de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	92
Figura 5.1 Arbustos da espécie <i>Bathysa meridionalis</i> L.	94
Figura 5.2 Folhas de um espécime adulto de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	94
Figura 5.3 Estrutura do Paeonol isolado anteriormente de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	95
Figura 4.4 Partições dos extratos brutos de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	98
Figura 5.5 Fracionamento dos extratos ativos de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	99
Figura 5.6 Substâncias isoladas das frações ativas de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	100
Figura 5.7 Esqueletos ursano e oleano de triterpenos.	103
Figura 5.8 Fragmentos de massa característicos para triterpenos de esqueleto oleano e ursano.	105
Figura 5.9 Proposta biossintética para as substâncias isoladas de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	109
Figura 5.10 Cromatograma resultante da análise por cromatografia gasosa do óleo essencial de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	112

TABELAS

Tabelas

Tabela 2.1 tR' das parafinas utilizadas na determinação do Índice de Kováts.	22
Tabela 3.1 Rendimento dos extratos secos de <i>Petiveria alliacea</i> L.	29
Tabela 3.2 Ensaio de bioautografia dos extratos brutos de <i>Petiveria alliacea</i> L.	30
Tabela 3.3 Ensaio com leveduras mutantes dos extratos brutos de <i>Petiveria alliacea</i> L.	31
Tabela 3.4 Determinação do valor de CI ₁₂ dos extratos brutos de <i>Petiveria alliacea</i> L.	32
Tabela 3.5 Ensaio de bioautografia das partições do extrato de raízes de <i>Petiveria alliacea</i> L.	34
Tabela 3.6 Ensaio com linhagens mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Tabela 3.7 Dados de RMN ¹ H de 1	41
Tabela 3.8 Dados de RMN ¹³ C de 1	42
Tabela 3.9 Dados de RMN ¹ H de 2	44
Tabela 3.10 Dados de RMN ¹³ C de 2	44
Tabela 3.11 Dados de RMN ¹ H das substâncias 3, 4, 5 e 6	48
Tabela 3.12 Dados de RMN ¹³ C das substâncias 3, 4, 5 e 6	48
Tabela 3.13 Dados de RMN ¹ H de 7	49
Tabela 3.14 Dados de RMN ¹³ C de 7	50
Tabela 3.15 Dados de RMN ¹ H de 8	51
Tabela 3.16 Dados de RMN ¹³ C de 8	51
Tabela 3.17 Dados de bioatividade das substâncias isoladas de <i>Petiveria alliacea</i> L.	53
Tabela 3.18 Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Petiveria alliacea</i> L.	59

TABELAS

Tabela 4.1 Rendimento dos extratos brutos de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	66
Tabela 4.2 Resultado do ensaio de bioautografia dos extratos brutos de <i>P. spectabilis</i> S.	67
Tabela 4.3 Resultado do ensaio com mutantes de <i>S. cerevisiae</i> dos extratos brutos de <i>P. spectabilis</i> S.	67
Tabela 4.4 Dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias 9 e 10 .	75
Tabela 4.5 Dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias 11 , 12 e 13 .	78
Tabela 4.6 Dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias 14 e 15 .	81
Tabela 4.7 Dados de bioatividade das substâncias isoladas de <i>Psychotria spectabilis</i> S.	83
Tabela 4.8 Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Psychotria spectabilis</i> S..	91
Tabela 5.1 Massas de extratos secos de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	95
Tabela 5.2 Resultado do ensaio de bioautografia com extratos brutos de <i>B. meridionalis</i> L.	96
Tabela 5.3 Resultado do ensaio com mutantes de <i>S. cerevisiae</i> dos extratos brutos de <i>B. meridionalis</i> L.	96
Tabela 5.4 Dados de RMN ^{13}C dos triterpenos isolados (δ , CDCl_3).	106
Tabela 5.5 Dados de bioatividade das substâncias isoladas de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	107
Tabela 5.6 Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Bathysa meridionalis</i> L.	111

Substâncias Isoladas e identificadas neste Trabalho

***Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)**

Figura 1 Substâncias isoladas de *Petiveria alliacea* L.

Figura ii Substâncias identificadas no óleo essencial de *Petiveria alliacea* L.

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS

***Psychotria spectabilis* S. (Rubiaceae)**

Figura iii Substâncias isoladas de *Psychotria spectabilis* S.

Figura iv Substâncias identificadas no óleo essencial de *Psychotria spectabilis* S.

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS

Bathysa meridionalis L. (Rubiaceae)

Figura v Substâncias isoladas de *Bathysa meridionalis* L.

Figura vi Substâncias identificadas no óleo essencial de *Bathysa meridionalis* L.

Fitoquímica, Ferramenta Útil para a Busca de Moléculas Bioativas

Há milênios, substâncias de origem vegetal vêm sendo utilizadas pela humanidade na cura ou alívio de doenças; as plantas, até pouco tempo, eram a maior fonte de medicamentos. Ainda hoje, o uso popular de medicamentos ou fórmulas medicamentosas que usam extratos totais ou parcialmente purificados, infusões ou destilados representam parcela significativa no tratamento de doenças desde micoses até o câncer, principalmente em países subdesenvolvidos onde reside 80% da população mundial. (Farnsworth, *et al.* 1985; Balandrin, *et al.* 1985; Tyler, *et al.* 1988).

A importância das micromoléculas isoladas a partir de plantas é crescente no desenvolvimento de muitas áreas da química, terapêutica, agricultura e ecologia. Substâncias como quinina, atropina, estricnina, cafeína, morfina e cocaína, dentre outras, até hoje desempenham um papel relevante em saúde pública (Wheelwrigth, 1974; Balandrin, *et al.* 1985). Além de sua atividade biológica intrínseca tais substâncias apresentam grande importância como padrões para o planejamento e síntese de novas drogas servindo, também, como fonte de material para semi-síntese de medicamentos (Farnsworth, *et al.* 1991; Balandrin, *et al.* 1993; Bruheton, 1995). A **Figura 1.1** apresenta alguns exemplos de substâncias encontradas em plantas utilizadas na medicina popular e que apresentam atividades biológicas comprovadas.

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Figura 1.1 Exemplos de substâncias de origem vegetal com atividade biológica comprovada e uso popular.

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Substâncias orgânicas originadas de plantas podem ser divididas em metabólitos primários e secundários, sendo os metabólitos primários moléculas essenciais e constitutivas oriundas das principais rotas do metabolismo celular e os metabólitos secundários moléculas oriundas de rotas biossintéticas especiais de ocorrência restrita e/ou característica de determinados taxa. Estes últimos estão envolvidos em interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores, patógenos, atração de polinizadores, inibição de espécies competitivas etc. (Balandrin, *et al.* 1993 e 1985). Muitos metabólitos secundários de plantas têm importância e usos variados como produtos farmacêuticos, agroquímicos ou industriais (Nigg, *et al.* 1992; Kinghorn, *et al.* 1995).

Graças ao desenvolvimento de técnicas analíticas mais precisas para isolamento, purificação e elucidação estrutural, nas últimas três décadas, conhecem-se hoje cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas. No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se atualmente que, cerca de 400.000 espécies ocupem todo o planeta, sendo que mais de 50% (250.000) são constituídas pelas angiospermas (Brito, 1986). Analisando-se as plantas neste contexto evolutivo, as angiospermas são consideradas o grupo mais desenvolvido, e sem dúvida, desempenham papel fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas, dada a ocorrência de grupos de micromoléculas distintos e de estruturas complexas com inúmeras finalidades alelopáticas e biológicas (Rosenthal, *et al.* 1979). Assim, podemos considerar as plantas como uma enorme “biblioteca” viva de moléculas e modelos moleculares bioativos, fruto de milhões de anos de adaptação e evolução.

1.1 Porque Fazer Fitoquímica Guiada por Bioensaios?

Não obstante o desenvolvimento de produtos químicos sintéticos pela indústria farmacêutica, nestas últimas décadas, o investimento na busca de princípios medicamentosos a partir de espécies vegetais vem crescendo a passos largos (Rouhi, 1997). Apenas uma pequena porção, provavelmente cerca de 10-15% das 250.000 ou mais espécies de angiospermas, foram investigadas de forma sistemática quanto à química e à atividade biológica de seus metabólitos secundários (Farnsworth, *et al.* 1991; Kinghorn, *et al.* 1993). Isto é especialmente verdadeiro quando se refere a plantas do ecossistema brasileiro como o cerrado e as florestas equatoriais e tropicais onde se encontra metade de toda biodiversidade de plantas superiores (aproximadamente 125.000 espécies). Estima-se que apenas um oitavo (cerca de 375) das substâncias potencialmente ativas foram descobertas (Mendelsohn, *et al.* 1995; Kinghorn, 1996) e que as plantas de ambientes tropicais constituem um mercado bastante valioso.

A **Figura 1.2** apresenta dados que ilustram a discrepância entre a descoberta de novas moléculas e estudos de bioatividade destas. A prospeção para a descoberta de novos agentes antimicrobianos a partir de plantas vem atraindo a atenção de laboratórios ligados a universidades e a indústrias (anônimo, 1994; Adelson, 1990). Este interesse crescente deve-se a vários fatores, dentre os mais significantes: a indiscutível eficácia de derivados de plantas, a diversidade de mecanismos de ação biológica destas substâncias, a descoberta de novos bioensaios eficientes e rápidos e os métodos cada vez mais sensíveis de elucidação estrutural.

O cenário científico brasileiro na área de química de produtos naturais tem mostrado, nos últimos dois anos, sinais positivos de investimentos, tanto por parte do governo quanto da iniciativa privada; o projeto BIOTA-FAPESP, a BIOAMAZÔNIA e o Complexo POLO-BIORIO com a

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

EXTRACTA são exemplos expressivos. Entretanto, o número de estudos químicos e biológicos com espécies nativas está muito aquém do desejado, sendo a continuidade e diversificação de iniciativas e investimentos na bioprospeção da biodiversidade nacional, indispensáveis para o desenvolvimento e utilização sustentável destes ecossistemas.

Figura 1.2 Micromoléculas isoladas de fontes naturais X atividade biológica descrita
(Fuller, *et al.* 1995)

Os estudos fitoquímicos tradicionais com espécies brasileiras conduziram, até o momento, ao isolamento de grande variedade de micromoléculas. A grande maioria delas continuam sem qualquer aplicação devido à falta de programas de bioensaios preliminares para serem triadas e selecionadas para estudos farmacológicos posteriores. O trabalho fitoquímico guiado por bioensaios é uma alternativa para o estudo de espécies nativas, visando princípios bioativos. Assim, o fracionamento e a purificação guiados por bioensaios simples, seletivos e eficientes são uma maneira moderna de se fazer fitoquímica e de selecionar um grande número de substâncias naturais bioativas.

1.2 Técnicas Gerais de Bioensaios

O estudo fitoquímico biomonitorado exige a escolha de um bioensaio simples, seletivo, eficaz e passível de ser incorporado como metodologia de rotina para o monitoramento das etapas do trabalho fitoquímico. As técnicas biológicas rápidas de triagem podem ser classificadas em três grupos (Rios, *et al.* 1988):

Técnicas de difusão: Este tipo de técnica não requer dispersão homogênea dos extratos ou substâncias em água, o que facilita o trabalho com substâncias e/ou extratos menos polares. Constitui-se em aplicar sobre um meio de cultura sólido (geralmente em placas de Petri) os organismos-alvo (fungos, leveduras ou bactérias) e colocar as substâncias a serem testadas em contato com este meio, através de um disco de papel impregnado, ou diretamente em uma cavidade cilíndrica escavada no próprio meio. Após período de incubação, é medido o halo de inibição, cujo tamanho do diâmetro pode ser relacionado com a atividade da substância ou extrato testado.

Técnicas de diluição: Estas técnicas requerem dispersão homogênea em água das substâncias a serem testadas. São usadas para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Neste tipo de ensaio pode ser necessário o uso de agentes dispersores como polissorbatos do tipo Tween 20 ou 80. A turbidez do meio líquido, após incubação, (maior ou menor desenvolvimento de colônias de leveduras ou bactérias-alvo) é o parâmetro utilizado para se determinar a atividade da substância ou extrato testado. Aparelhos como leitor de placas tipo ELISA facilitam bastante o trabalho, reduzindo a quantidade de amostra a ser ensaiada e possibilitando a leitura rápida de inúmeras amostras.

Técnicas de bioautografia: Alguns autores consideram as técnicas de bioautografia as mais importantes técnicas de detecção de substâncias antimicrobianas novas (Betina, 1973). Em um

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

procedimento de bioautografia direta, extratos ou frações contendo as substâncias a serem testadas são cromatografados em CCD e, após a remoção completa do solvente de eluição e marcação das substâncias por exposição à luz UV, uma "solução reveladora" (que pode conter esporos de um fungo revelador, ou uma substância facilmente oxidável, ou algum antígeno fluorescente, etc) é borrifada sobre a placa. Desta forma pode-se observar a presença de regiões "marcadas" ou zonas de inibição onde encontram-se as substâncias ativas.

Um grande número de fatores pode influenciar os resultados: o método de extração, volume de inóculo, composição do meio de cultura, pH e temperatura de incubação (Bauer, *et al.* 1966; Leven, *et al.* 1979; Emeruwa, 1982; Nadir, *et al.* 1986). Janssen *et al.* (1987) e Rios *et al.* (1988) revisaram os métodos empregados no estudo de atividade antimicrobiana avaliando a importâncias de diversos destes fatores. Não existe, entretanto, método padrão para expressar os resultados de uma triagem antimicrobiana em extratos vegetais.

1.3 Bioensaios Aplicados Neste Estudo

Neste projeto empregaram-se duas estratégias para o monitoramento biológico do trabalho fitoquímico. Na primeira, utilizaram-se cepas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de revelar agentes anticancerígenos potenciais. Na segunda, utilizando a bioautografia com algumas espécies de fungos fitopatogênicos e/ou patológicos (como os do gênero *Cladosporium*), pretendia-se a seleção de agentes antifúngicos (Homans & Fuchs, 1970).

De acordo com dados recentes da Organização Mundial de Saúde (**Figura 1.3**), o câncer humano, é uma das principais causas da mortalidade. Em países desenvolvidos e nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, o câncer é a segunda causa mais freqüente de morte, depois das moléstias cardiovasculares (Noltenius, 1974). O tratamento das neoplasias malignas inclui cirurgia, a

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

radioterapia e a quimioterapia. Embora a cirurgia e a radioterapia sejam, ainda, as principais estratégias para determinados tipos de neoplasias, têm apenas ação loco-regional, não influenciando nas células neoplásicas circulantes e nas metástases à distância. A quimioterapia é, pois, o único tratamento para um câncer disseminado (Buccheri, 1991). A prática médica quimioterápica tem-se notabilizado e se revelado tratamento eficiente devido aos medicamentos antitumorais de origem natural e seus derivados.

Figura 1.3 Dados da Organização Mundial de Saúde sobre maiores índices percentuais de causas da mortalidade humana (OMS-Relatory, 1998)

A avaliação criteriosa da atividade biológica de uma substância utilizando métodos de triagem específicos é fundamental, mesmo sendo esta de origem natural, pois sabe-se que inúmeros carcinógenos químicos são de origem natural (**Figura 1.4**). O Câncer é uma doença genética que se desenvolve em múltiplos estágios, todos, entretanto, ligados a fatores gênicos. Fatores externos como viroses, radiação ou agentes químicos provocam alterações em regiões do DNA de células sadias do organismo, levando a lesões que podem provocar a ativação de proto-oncogenes e/ou desativação de genes supressores de tumor. Estes eventos ativam, desbloqueiam e superexpressam os chamados oncogenes, responsáveis por tornar a célula anormal.

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Figura 1.4 Alguns carcinógenos químicos de origem natural

Atualmente, um número substancial de neoplasias pode ser tratado com medicamentos de origem vegetal como podofilotoxina, vimblastina, vincristina, taxol e mitramicina (**Figura 1.5**) com uma boa expectativa de cura. Elas incluem, entre outras: leucemia infantil, doença de Hodgkin, coriocarcinoma e tumores de mama. Apesar destes avanços, muitas formas de câncer mais prevalentes ainda resistem a uma quimioterapia eficaz (Calabresi, *et al.* 1990). Há, portanto, necessidade urgente da descoberta de novas drogas que possam agir nas formas mais resistentes de câncer.

Tendo em vista a eficácia dos medicamentos de origem natural hoje em uso clínico, e a dificuldade de serem produzidos por síntese, é grande o interesse pela busca de novos agentes antitumorais a partir de fontes naturais, especialmente de plantas. Nesta última década, as triagens preliminares baseadas em mecanismos de atuação em sistemas específicos (receptores, enzimas, DNA etc) estão sendo utilizadas para esta finalidade como uma alternativa vantajosa, devido à especificidade, seletividade, rapidez e reprodutibilidade dos ensaios utilizados para triagens

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

primárias. Uma destas triagens foi desenvolvida para detectar deficiências nas vias de reparação e/ou recombinação do DNA (Johnson, *et al.* 1986). Um bioensaio com este mecanismo específico é o teste com linhagens modificadas de *S. cerevisiae* e foi utilizado neste trabalho.

O segundo bioensaio utilizado neste trabalho de pesquisa foi a bioautografia com os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. A pesquisa por novos compostos antifúngicos de plantas superiores têm sido estimulada devido ao aumento da ocorrência de micoses oportunistas e sistêmicas. A resistência à ação de antibióticos em uso adquirida por variações genéticas de diversos fungos e bactérias torna urgente a descoberta de novos agentes antifúngicos (Hufford, A. *et al.* 1988; Mitscher, L. A. *et al.* 1987; Rahalison, L. *et al.* 1993).

A descoberta de novas drogas a partir de recursos naturais é um processo complexo e pode ser sintetizado no diagrama apresentado na **Figura 1.6**. A Fase de descoberta é uma abordagem multidisciplinar envolvendo profissionais de química, farmácia, botânica, medicina, técnicos em automação e técnicas analíticas.

Figura 1.5 Substâncias de origem natural utilizadas no tratamento do câncer.

FITOQUÍMICA, FERRAMENTA ÚTIL PARA A BUSCA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Figura 1.6 Abordagem para descoberta de novas substâncias bioativas.

Equipamentos e Métodos

2.1 Cromatografia e Instrumentação

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para extrações, CC, CCDC e CCDP, utilizaram-se solventes de grau P.A. Merck, Grupo Química e Vetec submetidos previamente a destilação fracionada. Para separações em CLAE e medidas nas regiões do UV e do IV utilizaram-se solventes desaerados, grau espectroscópico Merck.

A fase estacionária utilizada para cromatografia em coluna foi Si-60 Merck, partículas de 63-210 μm .

Para cromatografia em coluna tipo "flash" sob pressão utilizou-se Si-60, partículas de 40-63 μm , e Si-60H partículas de 5 - 45 μm , ambas Merck.

A cromatografia planar em camada delgada preparativa foi feita em placas de vidro recobertas com sílica 60 F₂₅₄ Merck de espessura 1,0mm. Para cromatografia analítica utilizou-se placas de sílica F₂₅₄ comerciais suportadas em alumínio. A revelação das cromatoplasas foi feita com solução de sulfato de cério (IV), vapores de iodo e/ou irradiação no UV (254 e 356 nm).

EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

Cromatógrafo à gás HP 5890 Series II, munido de coluna capilar HP-5, 30m X 0,32 μ m X 0,25 μ m, detetor de ionização de chama e injetor automático.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados os seguintes recursos:

Cromatógrafo líquido Perkin-Elmer Series 3, equipado com bomba binária, detetor espectrofotométrico de comprimento de onda variável.

Cromatógrafo líquido analítico/semipreparativo Hewlett-Packard mod. 1050, equipado com bomba quaternária e detetor espectrofotométrico do tipo multicanal na região do UV, munido de injetor automático Shimadzu SIL-9A; colunas para CLAE analíticas, semipreparativas e preparativas de fase normal (Si 60, 10 mm) e de fase reversa (C-18, 10 mm).

Cromatógrafo líquido analítico/semipreparativo Hewlett-Packard mod. 1150, equipado com bomba quaternária e detetor espectrofotométrico do tipo multicanal na região do UV.

2.2 Espectroscopia.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-300 operando a 300 e 75 MHz, utilizando como solventes CDCl_3 , Metanol e DMSO deuterados Merck ou Aldrich. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em relação ao TMS ($\delta=0$). As constantes de acoplamentos J , em Hz.

Os espectros de infravermelho foram registrados em aparelhos FT-IR 1750 Perkin Elmer e FT-IR Nicolet, na forma de filmes utilizando janelas de NaCl. Os dados foram expressos em números de onda ν (cm^{-1}).

Os espectros de UV foram obtidos em um espectrofotômetro UV/VIS Hitachi U-3000, utilizando-se cubetas de quartzo de 1cm, em MeOH grau espectroscópico. O comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da banda está apresentado em nm (λ_{max}).

EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetros HP5988A Hewlett Packard (quadrupolo), Mat 90 Finnigan (duplo foco geometria reversa) e Shimadzu CGMS - QR5050A (quadrupolo), injeção direta e impacto eletrônico (EI) a 70 eV. Este último foi usado também nas análises por CG-EM acoplado a cromatógrafo 3400 Varian coluna DB-5, 30m X 0,32 μ m X 0,25 μ m. Os dados foram expressos como relação massa/carga (m/z) dos fragmentos correspondentes.

Os dados de análise elementar foram obtidos em aparelho CHNS/O SeriesII 2400 Perkin Elmer

2.3 Obtenção dos Extratos Brutos

O material vegetal seco a 40 °C em estufa por 42 h foi moído e extraído por maceração com DCM/MeOH (2:1 v/v) (3X) e MeOH até exaustão (5X). As soluções obtidas foram concentradas sob pressão reduzida fornecendo os extratos diclorometano-metanólico (2:1, v/v) e metanólico, respectivamente.

Todos os extratos obtidos foram submetidos a triagem biológica visando selecionar os extratos bioativos.

Estes extratos foram suspensos em MeOH:H₂O (8:2, v/v) e particionados sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila, e *n*-butanol. O resíduo foi concentrado a vácuo e liofilizado resultando no extrato aquoso conforme descrito no esquema apresentado na **Figura 2.1**.

Figura 2.1 Esquema geral de obtenção dos extratos brutos.

2.4 Bioensaio com Cultura de *Saccharomyces cerevisiae*

A triagem biológica foi feita com três tipos de linhagens modificadas de *Saccharomyces Cerevisiae* (Rad⁺, RS 321 e Rad 52Y). As linhagens mutantes de *S. cerevisiae* foram obtidas por engenharia genética nos laboratórios da Smithkline and Beecham Pharmaceutical Co.

Uma característica importante das células normais é sua capacidade de reparar erros nas fitas de seu DNA. As células de tecidos degenerados não têm esta capacidade e sem este mecanismo estas células acumulam falhas e erros no DNA que podem levá-las à apoptose ou a se tornarem células tumorais. Agentes com toxicidade seletiva contra células deficientes no reparo do DNA podem ser agentes anticancerígenos potenciais. Um forte indicativo de que isto é verdade é que leveduras mutantes com esta deficiência apresentam hipersensibilidade aos agentes antitumorais mais conhecidos (Eng, *et al.* 1988). A interpretação dos resultados deste bioensaio está fundamentada na resposta diferencial entre uma levedura com células normais, que são capazes de fazer reparos no DNA (Rad⁺), e células que não são capazes de reconstruir a sequência do DNA (Rad 52Y ou RS 321), frente uma determinada amostra (extrato bruto e/ou substância pura).

A linhagem Rad⁺ é definida como o tipo selvagem enquanto Rad 52Y e RS 321 são linhagens mutantes produzidas a partir de Rad⁺, apresentando deficiências relacionadas com as duas maiores vias de reparação do DNA em leveduras. Rad 52Y está associada à reparação recombinacional do DNA, ou seja, apresenta deficiência na recombinação mitótica (na conversão e "crossing over") e deficiência na recombinação meiótica. A linhagem RS 321 está associada com a enzima Topoisomerase I. As linhagens também possuem membrana celular diferenciada, com permeabilidade muito maior do que aquelas de leveduras normais.

EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

Figura 2.2 Esquema ilustrativo das mutações sofridas pelas linhagens de *S. cerevisiae* para serem utilizadas no bioensaio.

A **Figura 2.3** apresenta um esquema explicativo do fundamento básico do bioensaio com *S. cerevisiae*. Neste ensaio o resultado é dado pela medida do halo de inibição da cultura e os resultados são expressos em uma curva (log conc. da amostra em $\mu\text{g/mL}$ X diâmetro da zona de inibição em mm). A partir da equação obtida por regressão linear determina-se a concentração necessária para produzir uma inibição de 12mm (IC_{12}). São utilizados como substâncias padrão para comparação os antibióticos camptotecina e a estreptonigrina

Figura 2.3 Diagrama ilustrativo do bioensaio com linhagens mutantes de *S. cerevisiae*

Uma substância é considerada ativa quando a CI₁₂ obtida com as leveduras mutantes é menor que 2000 µg/mL e três vezes menor que a CI₁₂ obtida para a levedura normal (Rad+).

$$CI_{12} (\text{Rad}+) > CI_{12} (\text{RS } 321, \text{RS } 52Y) < 2000$$

2.5 Ensaio de Bioautografia com Fungos

A bioautografia é um teste simples e fundamenta-se na ação inibitória de extratos/substâncias antifúngicas potenciais sobre esporos de fungos utilizados para a revelação das cromatoplasas.

Foram utilizados, neste trabalho os fungos *Cladosporium cladosporoides* e *Cladosporium sphaerospermum* como reveladores; o primeiro, é um fungo saprófito e o segundo um fungo fitopatogênico. Estas duas espécies foram escolhidas por não serem patogênicas ao homem, produzirem uma grande quantidade de esporos e apresentarem um crescimento uniforme em condições de cultura *in vitro*.

As amostras foram aplicadas em placas de sílica prontas suportadas em alumínio F₂₅₄ Merck, eluídas ou não com solventes adequados e, após evaporação completa do solvente, uma solução de glicose e sais contendo esporos do fungo revelador foi nebulizada sobre as placas. As placas foram incubadas à temperatura de 25 °C em câmara úmida, durante 48h no escuro.

Decorrido o tempo de incubação, pode-se observar o crescimento do fungo sobre toda a placa exceto nas áreas onde se encontram as substâncias fungitóxicas. Pode-se calcular a dose limite de detecção variando-se a concentração e volumes de amostra aplicados na placa, comparando estes resultados com antibióticos-padrão. Neste trabalho foi utilizado como antibiótico-padrão a nistatina. A **Figura 2.4** apresenta o esquema do bioensaio (Homans & Fuchs, 1970).

Figura 2.4 Diagrama ilustrativo da bioautografia com esporos de fungos *Cladosporium*.

2.6 Procedimento de Metilação dos Ácidos Triterpênicos

Em balão de fundo redondo de 500mL, resfriado em banho de gelo e equipado com condensador de Liebig, foram colocados 21,5g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenossulfonamida (DIAZALD) e 240 mL de éter etílico e à solução obtida foi adicionada uma solução de KOH (5g) em água (7mL). A mistura foi então destilada a 65°C, recolhendo-se o destilado em erlenmayer mantido em banho de gelo. A solução contendo cerca de 3g de diazometano foi vertida sobre a mistura dos ácidos, contida em frasco de 50mL, até persistência da cor do diazometano (amarelo-alaranjado), evaporando-se a seguir o solvente.

2.7 Determinação do índice de Kováts

O índice de retenção de Kováts é utilizado como critério para identificação de substâncias presentes em óleos essenciais desde 1950. Kováts estabeleceu que o índice de retenção de uma substância com determinado número de carbonos situar-se-ia entre os índices de retenção de duas parafinas de uma série homóloga que possuísem números semelhantes de carbonos. Desta forma ele estabeleceu que o tempo de retenção da amostra guardaria uma relação logarítmica com os tempos de retenção das parafinas (Kováts, E., 1958), segundo a equação:

$$IK = \left(\frac{\log t_{R' \text{ subst}} - \log t_{R' n}}{\log t_{R' n+1} - \log t_{R' n}} + 100 \right) \times n$$

Sendo que $t_{R' n} < t_{R' \text{ subst}} < t_{R' n+1}$, onde: IK = Índice de Kováts sob condições isotérmicas; $t_{R' \text{ subst}}$ = Tempo de Retenção ajustado da amostra desconhecida; $t_{R' n}$ e $t_{R' n+1}$ = Tempos de retenção ajustados dos padrões anterior e posterior no cromatograma da série homóloga; n = número de carbonos do padrão anterior.

Para ajuste dos tempos de retenção foi utilizado o tempo de retenção do gás butano na coluna. Este tempo é descontado do tempo de retenção da amostra no cromatograma. Logo:

$$t_{R'} = t_R - t_B$$

onde $t_{R'}$ = Tempo de retenção ajustado; t_B = Tempo de retenção do gás butano na coluna

Utilizou-se um cromatógrafo gasoso modelo HP-5890 Série II, com injetor de divisão de fluxo (Split), detetor por ionização de chama (FID) e integrador HP-3396. Foi utilizada uma coluna de polaridade média HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) de 30m X 0,2mm X 0,33µm.

EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

Os hidrocarbonetos da série homóloga de C9 a C26 Aldrich, foram injetados sob forma de uma mistura homogênea. Esta série foi utilizada para cálculo dos índices de retenção. O óleo essencial e os padrões foram analisados por cromatografia a gás nas seguintes condições: temp. inicial: 40°C / 1min; temp. final: 200°C / 32 min; programação: 4°C/min; temp. injetor : 280°C; temp. detetor: 300°C; vol de injeção: 1µL; vazão do gás de arraste (H₂): 1mL/min; splitter 1:100.

A **Tabela 2.1** apresenta os valores de tempo de retenção corrigido das parafinas utilizadas como padrão. A **Figura 2.5** apresenta o cromatograma das parafinas-padrão. Os índices de retenção de Kováts obtidos por este método foram comparados com tabelas de IK da literatura para mono e sequiterpenos nas mesmas condições (Davies, 1990).

Tabela 2.1 tR' das parafinas utilizadas na determinação do Índice de Kováts

Numero de carbonos (n)	tR' min	Δ	Erro %	Numero de carbonos (n)	tR' min	Δ	Erro %
9	4,92	0,020	0,06	18	41,85	0,023	0,11
10	8,00	0,098	1,21	19	45,43	0,015	0,07
11	10,10	0,018	0,08	20	48,87	0,012	0,05
12	16,60	0,061	0,67	21	52,14	0,021	0,09
13	21,29	0,057	0,77	22	55,31	0,020	0,08
14	25,71	0,020	0,07	23	58,30	0,029	0,16
15	30,60	0,018	0,08	24	61,28	0,021	0,09
16	34,16	0,025	0,09	25	64,86	0,024	0,10
17	38,12	0,013	0,13	26	69,44	0,028	0,15

* Os cálculos do desvio padrão (Δ) e do erro % foram feitos a partir de três corridas idênticas pelas seguintes equações:

$$tR' = \frac{\sum tR'_i}{N} \quad \Delta = \sqrt{\frac{\sum (tR'_i - tR')^2}{N}} \quad \text{erro \%} = \frac{\Delta \times 100}{tR'}$$

Figura 2.5 Cromatograma resultante da análise qualitativa por cromatografia a gás das parafinas utilizadas como padrão para determinação do índice de Kováts.

Estudos com a Espécie *Petiveria alliacea* L.

3.1 A Família Phytolaccaceae

A família Phytolaccaceae pertence à ordem Caryophyllales e superordem Caryophylliflorae segundo o sistema de classificação e sinonímia de Dahlgren (Dahlgren, 1980). Trata-se de uma família não muito grande, contendo cerca de 14 gêneros e 106 espécies (Woo, 1977) onde encontram-se ervas e arbustos de pequeno porte de ocorrência pantropical distribuídas na América Central, Floresta Amazônica e Mata Atlântica.

Diversas espécies da família são utilizadas popularmente destacando-se a espécie *Phytolacca dodecandra*, que acumula saponinas com atividade espermicida *in vitro*, moluscicida, fungicida e larvicida potente, além da atividade cercaricida. A saponina que apresentou maior atividade foi a lematoxina, um trissacarídeo do ácido oleanólico (Stolzenberg, *et al.* 1974). Outra espécie que merece destaque por seu uso popular difundido, tanto por nativos indígenas, quanto pela população em geral, é a espécie *Petiveria alliacea* L., um dos objetos deste trabalho.

As classes de metabólitos descritos para a família ainda não são bem definidas do ponto de vista quimiotaxonômico, sendo encontrados registros de espécies que acumulam alcalóides, em especial betalaínas e triterpenos como principais metabólitos secundários (Woo, 1974; Razdan, *et al.* 1983; Germano, 1995). Também é descrita a ocorrência de taninos, cumarinas e antraquinonas (Germano, 1993). A **Figura 3.1** apresenta alguns exemplos de substâncias isoladas de Phytolaccaceae.

Figura 3.1 Exemplos de Micromoléculas Representativas em Phytolaccaceae (Woo, 1974; Razdan, *et al.* 1983; Germano, 1995).

3.2 A Espécie *Petiveria alliacea* L.

A espécie *Petiveria alliacea* L. é uma planta herbácea oriunda da África e da América tropical. É popularmente conhecida no Brasil por “amansa-senhor”, “erva-alho”, “guiné”, “pipi” etc. (Silva, 1935). As raízes de *Petiveria alliacea* L são usadas popularmente no Brasil como diurético, emenagogo, febrífugo, anti-reumático, sedativo, antiespasmódico, em doenças venéreas e no tratamento de tumores e feridas (Hoehne, 1939; Pio Correa, 1969; Morton, 1977).

O arbusto inteiro e, principalmente, suas raízes são usados também como abortivo, entretanto há indicações de que o uso prolongado da infusão das raízes pode provocar demência (De Sousa, *et al.* 1990). Delaveau *et al.* (1980) observaram que os constituintes não-saponificáveis da fração lipofílica dos extratos de *P. alliacea* eram capazes de proteger ratos da injeção letal de *Escherichia coli*. Esta proteção foi atribuída à capacidade do extrato em estimular a fagocitose da bactéria pelo sistema retículo endotelial. Em 1997, Williams *et al.*, confirmaram a atividade imuno-modulatória dos extratos apolares (em hexano) e de polaridade média (em ciclohexano/metanol) de *P. alliacea* observando o aumento no índice de fagocitose de granulócitos humanos comparável à substância imuno-estimuladora *N*-formil-metionil-fenil-alanina.

Outra atividade biológica descrita para a espécie é a atividade anti-inflamatória, bem caracterizada por Germano *et al.* (1993 e 1995). A administração de extratos alcoólicos secos de raízes da planta em ratos, por via oral, mostrou efeito anti-inflamatório tópico significativo em dois diferentes modelos de ensaio, inibindo a formação de edemas induzidos por nistatina e carragenina. A concentração do extrato em doses suficientes para que se observassem estes efeitos não apresentou qualquer irritação cutânea ou subcutânea à mucosa gástrica.

A atividade tripanocida dos extratos de *P. alliacea* L. foi descrita por Cáceres *et al.* (1998). A doença de Chagas, é uma infecção comum em áreas rurais do Brasil e América Latina causada pelo *Trypanosoma cruzi* que é transmitido a humanos pelo vetor *Rhodnius prolixus* (conhecido como

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

mosquito "barbeiro"). Algumas pessoas infectadas podem viver sem qualquer manifestação da doença; outras, entretanto apresentam, sérios sintomas, muitas vezes fatais. Existem apenas duas drogas para o tratamento desta doença: o nifurtímox e o benznidazol. Ambos apresentam sérios efeitos colaterais que levam a maior parte dos infectados a abandonarem o tratamento. O uso de extratos de plantas nativas no tratamento é especialmente interessante, já que não existe interesse algum das indústrias farmacêuticas transnacionais no desenvolvimento e pesquisa de medicamentos para esta doença. Os extratos de raízes de *P. alliacea* mostraram um efeito significativo contra os estágios epimastigoto e trypomastigoto *in vitro* e *in vivo* (Cáceres, *et al.* 1998; Berger, *et al.* 1998).

O alto conteúdo de nitratos encontrados em extratos mais polares produziu metahemoglobinemia em ensaios *in vivo* realizados com coelhos (Trheebilcock, 1974). Este e outros efeitos têm sido reportados como possíveis fatores de risco para humanos (De Sousa, 1987).

A espécie *P. alliacea* tem sido objeto de estudo químico de diversos grupos de pesquisa, tendo sido isolados cumarinas (Rocha, 1970); trissulfeto de benzil hidroxietila (Von Szczepanski, *et al.* 1975); *cis*-3,5-difenil-1,2,4-tritriolano, *trans*-estilbeno, benzaldeído, ácido benzoico e enxofre elementar (Adesogan, 1974). Foi descrita também a presença de *trans*-*N*-metil-metoxiprolina e do trissulfeto de dibenzila (De Sousa, *et al.* 1990). As **Figuras 3.2 e 3.3** mostram a planta e alguns de seus constituintes químicos descritos na literatura.

Figura 3.2 Exemplos de micromoléculas isoladas de *Petiveria alliacea* L.

Figura 3.3 A espécie *Petiveria alliacea* L.

3.3 Preparação dos Extratos e Triagem Biológica

A espécie *Petiveria alliacea* L. foi coletada em setembro e em outubro de 1997 na mata do Instituto Butantã em São Paulo; os arbustos foram coletados íntegros, folhas, caule e raiz. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da USP-SP sob o código Benevides S/n. SPF112.6.84.

Os espécimens de *Petiveria alliacea* L. foram separados em raiz, caule e folhas. O material vegetal foi seco em estufa a 40°C por dois dias, moído e extraído com DCM:MeOH (2:1 v/v) por três vezes e MeOH por cinco vezes, obtendo-se extratos secos cujos rendimentos em massa estão descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Massa dos extratos secos de *Petiveria alliacea* L.

	Massa de Extrato Seco (g)		
	Raízes	Caule	Folha
Material Vegetal Seco	283	548	238
Extrato DCM:MeOH (2:1 v/v)	7 (2,47%)	8 (1,46%)	15 (6,30%)
Extrato MeOH	11 (3,88%)	6 (1,09%)	32 (13,44%)

Os extratos em DCM:MeOH (2:1 v/v) e em MeOH de cada uma das partes da planta foram submetidos aos ensaios biológicos. Para o ensaio de bioautografia com fungos foram aplicados em placa cromatográfica analítica de sílica 100µg de cada extrato, as placas foram eluídas com

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Hex:DCM (7:3) (para o extrato em DCM:MeOH) e com DCM:MeOH (8:2) (para o extrato em MeOH). Avaliou-se a ocorrência ou não de inibição do crescimento dos fungos após 42h de incubação, a 25 °C, no escuro.

Os dois extratos obtidos de raízes apresentaram inibição total dos esporos dos fungos das espécies *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* utilizados para averiguação da ação fungitóxica (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2 Ensaio de bioautografia dos extratos brutos de *Petiveria alliacea* L.

Extrato ²	Parte da Planta					
	Raiz		Caule		Folha	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
DCM:MeOH (2:1 v/v) 100µg	Total ¹	total	ausente	parcial	ausente	ausente
MeOH 100µg	total	total	ausente	ausente	ausente	ausente

¹ A inibição é considerada total quando os halos observados são bastante definidos e nenhum esporo conseguiu crescer dentro do mesmo, a inibição é considerada parcial se quando observa claramente um halo de inibição porém alguns esporos ainda conseguem crescer dentro do mesmo.

² Foram aplicados na placa 100 µl de uma solução 1mg/mL de cada extrato que corresponde a 100 µg de extrato seco. Utilizou-se como padrão a Nistatina (10µl de uma solução 0,1mg/mL).

Para avaliar a atividade citotóxica seletiva para células com deficiências no reparo do DNA utilizaram-se linhagens modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* (Rad⁺, Rad 52Y e RS 321). Foram aplicados 100µL de uma solução de 4000µg/mL de cada extrato e utilizados como substâncias de referência os antibióticos:. A **Tabela 3.3** apresenta os resultados da inibição (em mm) de cada

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

extrato para cada uma das linhagens mutantes e a **Tabela 3.4** apresenta os resultados da concentração inibitória mínima de cada extrato necessária para se provocar uma inibição de 12mm (CI₁₂).

Tabela 3.3 Ensaio com leveduras mutantes dos extratos brutos de *Petiveria alliacea* L.

Halos de Inibição com diâmetro medido em mm			
Linhagens	Rad ⁺	RS 321	Rad 52Y
Padrões¹	15 (Camptotecina)	20 (Streptonigrina)	18 (Camptotecina)
DGM-MeOH (Raiz) 4000 µg/mL	8	12	10
(Caule)	Não ativo	10	12
(Folha)	Não ativo	Não ativo	Não ativo
MeOH (Raiz) 4000 µg/mL	Não ativo	Não ativo	Não ativo
(Caule)	Não ativo	Não ativo	Não ativo
(Folha)	Não ativo	Não ativo	Não ativo

¹Camptotecina (200 µg/mL para Rad⁺ e 5 µg/mL para Rad 52Y) e streptonigrina (4 µg/mL para RS 321)

Tabela 3.4 Determinação do valor de CI_{12} dos extratos brutos de *Petiveria alliacea* L.

Linhagens	Conc. em $\mu\text{g/mL}$ amostra	Halos de Inibição em mm		
		Rad ⁺	RS 321	Rad 52Y
Padrões ¹		21 (Camptotecina)	17 (Streptonigrina)	21 (Camptotecina)
DCM:MeOH (Raiz)	4000	16	22	19
	2000	11	15	9
	1000	Não ativo	10	Não ativo
CI_{12}		1989	922	1782
DCM:MeOH (Caule)	4000	Não ativo	12	10
	2000	Não ativo	10	Não ativo
	1000	Não ativo	9	Não ativo
CI_{12}		Não ativo	1121	Não ativo

¹Camptotecina (200 $\mu\text{g/mL}$ para Rad⁺ e 5 $\mu\text{g/mL}$ para Rad 52Y) e streptonigrina (4 $\mu\text{g/mL}$ para RS 321)

Novamente o extrato em DCM:MeOH (2:1 v/v) de raízes apresentou atividade mais significativa principalmente contra o mutante RS 321. Partiu-se então para o fracionamento biomonitorado deste extrato.

3.4 Fracionamento Guiado por Bioensaios

O extrato DCM:MeOH (2:1 v/v) das raízes de *P. alliacea* foi suspenso em MeOH:H₂O (8:2 v/v) e particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila, e *n*-butanol. O resíduo foi concentrado a vácuo e liofilizado resultando nas massas de extratos conforme descrito na **Figura 3.4**.

As frações obtidas das partições foram submetidas aos bioensaios mencionados para avaliação das atividades antifúngica e antineoplásica. As frações das partições que apresentaram maior atividade foram Hexânica., CHCl₃ e AcOEt de raízes de *P. alliacea*. As frações *n*-BuOH e aquosa apresentaram fraca atividade antifúngica e nenhuma atividade antineoplásica. As **Tabelas 3.5 e 3.6** apresentam os resultados das triagens biológicas das diversas partições do extrato DCM:MeOH (2:1 v/v) de raízes de *P. alliacea*.

Figura 3.4 Obtenção dos extratos brutos e partição do extrato DCM:MeOH (2:1 v/v) de raízes de *Petiveria alliacea* L.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Para o ensaio de atividade antifúngica foram aplicados em placa cromatográfica analítica de sílica 100µg de material seco de cada fase suspensos em CHCl₃ ou MeOH. As placas foram eluídas com Hex:DCM (7:3 v/v) e após evaporação do solvente de eluição, pulverizadas com suspensão dos esporos dos fungos em meio de cultura enriquecido.

Tabela 3.5 Ensaio de bioautografia das partições do extrato de raízes de *Petiveria alliacea* L.

Partição ¹	Tipo de Inibição	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
Fase Hexânica 100µg	total	total
Fase CHCl ₃ 100µg	total	total
Fase AcOEt 100µg	total	total
Fase n-BuOH 100µg	parcial	ausente
Fase Aquosa 100µg	ausente	ausente

¹ Foram aplicados na placa 100 µl de uma solução 1mg/mL de cada fase que corresponde a 100 µg de extrato seco. Utilizou-se como padrão a Nistatina (10µl de uma solução 0,1mg/mL).

No ensaio com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* foram aplicados 100µL de uma solução 4000µg/mL de material seco de cada fase.

Tabela 3.6 Ensaio com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Linhagens	Halos de Inibição em mm		
	Rad ⁺	RS321	Rad52Y
Padrões ¹	15 (Camptotecina)	20 (Streptonigrina)	18 (Camptotecina)
Fase Hex. 4000µg/mL	13	13	12
Fase CHCl ₃ 4000µg/mL	15	26	19
Fase AcOEt 4000µg/mL	12	22	15
Fase n-BuOH 4000µg/mL	Não ativo	Não ativo	Não ativo
Fase Aquosa 4000µg/mL	Não ativo	Não ativo	Não ativo

¹Camptotecina (200 µg/mL para Rad⁺ e 5 µg/mL para Rad 52Y) e streptonigrina (4 µg/mL para RS 321)

3.4.1 Fracionamento Biomonitorado das Fases Hexânica, CHCl₃ e AcOEt do Extrato em DCM:MeOH de Raízes de *Petiveria alliacea L.*

A fase hexânica foi fracionada por cromatografia em coluna de sílica-60 (42 frações agrupadas por CCDC em 15 frações). Duas frações apresentaram atividade (2-4 e 11-13). As substâncias **1** e **2** (**Figura 3.8**) foram isoladas por CCDP-Si a partir da fração 2-4. A fração 11-13 apresentou uma mistura de di e trissulfetos que foi fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência fornecendo o sulfeto **7** e o polissulfeto **8**. A **Figura 3.5** descreve o procedimento de fracionamento da fase hexânica.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Figura 3.5 Fracionamento biomonitorado da fase hexânica do extrato de raízes de *Petiveria alliacea* L.

As fases CHCl_3 e AcOEt foram reunidas por apresentarem forte similaridade de composição em análises por CCDC e CG. As fases reunidas foram fracionadas em coluna de sephadex LH-20, em gradiente de polaridade (10 frações). As frações 2 a 5 retiveram a atividade fungitóxica e antineoplásica. Estas frações foram reunidas e fracionadas em coluna aberta de sílica 60 (72 frações agrupadas por CCD em 19 frações), três (7-8, 20-22 e 43-48) apresentaram forte atividade citotóxica contra mutantes de *S. cerevisiae*. A fração 3 forneceu o sulfeto **7**, a fração 7 forneceu o sulfeto **3**; a fração 43-48 apresentou uma mistura de substâncias biotivas de difícil separação devido à massa da fração (7mg) e ao número de constituintes presentes na mistura. Análise por RMN ^1H indicou tratar-se de uma mistura complexa de polissulfetos. A **Figura 3.6** descreve o procedimento de fracionamento.

Figura 3.6 Fracionamento biomonitorado das fases reunidas CHCl_3 e AcOEt do extrato de raízes de *Petiveria alliacea* L.

A fração 43-48 não forneceu substâncias puras em quantidade suficiente para permitir uma determinação estrutural definitiva, mas pelos dados de RMN ^1H ficou claro tratarem-se de polissulfetos.

O rendimento de extração dos polissulfetos de *P. alliacea* é muito baixo (aproximadamente 0,04% em relação à massa de extrato bruto inicial). Procedeu-se então, a nova coleta de *P. alliacea*. Desta nova coleta foram utilizados raízes e caules que foram secados, reduzidos a pó e extraídos até exaustão com DCM. Os extratos foram concentrados a vácuo originando 32g de extrato bruto seco.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Foram fracionados 28g deste extrato em coluna aberta de sílica, obtendo-se 122 frações reunidas, por similaridade em CCDC, originando 24 frações.

O sulfeto **7** e o polissulfeto **8** não foram reisolados, o polissulfeto **1** foi reisolado da fração 2 por CCDC-Si. O polissulfeto **6** foi reisolado da fração 8 por CLAE-C18 juntamente com mais três polissulfetos de benzila que ainda não haviam sido isolados.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C bem como os dados de espectrometria de massas e análise elementar de (**6**) e dos polissulfetos novos levaram à definição estrutural da série de polissulfetos benzílicos isolados por CLAE. A **Figura 3.7** mostra o procedimento de fracionamento do extrato novo em DCM de *Petiveria alliacea* L.. A **Figura 3.8** apresenta as substâncias isoladas dos extratos bioativos.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Figura 3.7 Fracionamento do extrato em DCM (2a Coleta) de raízes e caules de *Petiveria alliacea* L.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Figura 3.8 Substâncias isoladas dos extratos bioativos de *Petiveria alliacea* L.

3.5 Identificação e Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas

3.5.1 Identificação da Substância 1

Dissulfeto de dipropila. Óleo incolor, volátil, odor acentuado lembrando alho. $C_6H_{14}S_2$ teórico 47,95% C, 9,39% H, 42,66% S; obtido 47,76% C, 9,03% H, 43,00% S. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) and RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (**Tabelas 3.7 e 3.8**) (**Espectros 1 e 3** p.120 e 122). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 720, 1450, 1375, 2872 (**Espectro 4** p.123). MS m/z (int. rel.): 150(38) $[M]^+$; 73(37), 74(12), 108(36), 149(100) (**Espectro 5** p.124).

O espectro de RMN 1H de 1 apresenta três sinais, que integram 1,5: 1: 1. O tripleto centrado em δ 2,68 indica a presença de hidrogênios metilênicos desprotegidos vizinhos a um átomo eletronegativo como O ou S (**Tabela 3.7**). Os sinais de RMN ^{13}C (**Tabela 3.8**) mostram a presença de três tipos de carbono. A análise elementar da substância forneceu o seguinte resultado: Carbono- 47,76%; Hidrogênio- 9,03%, Nitrogênio- 0%; Enxofre- 43,00%; não existe oxigênio na molécula e estes dados forneceram uma fórmula mínima $(C_3H_7S)_x$. A análise por espectrometria de massas forneceu um íon molecular $m/z = 150$ e as fragmentações concordam com a estrutura proposta para 1 como sendo o dissulfeto de dipropila, a **Figura 3.9** apresenta uma proposta de fragmentação para 1.

Tabela 3.7 Dados de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de 1

^1H	δ multiplicidade (j, Hz)
H-1 e H-1'	0,99 t (15)
H-2 e H-2'	1,70 dq (15 e 7)
H-3 e H-3'	2,66 t (7)

Tabela 3.8 Dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de 1

^{13}C	δ
C-1 e C-1'	13,01
C-2 e C-2'	22,42
C-3 e C-3'	41,08

Figura 3.9 Proposta de fragmentação para 1

3.5.2 Identificação da Substância 2

β -Sitosterol. $C_{29}H_{48}O$ Isolado como um sólido branco amorfo. O espectro de RMN 1H de 2 (Tabela 3.9) (Espectro 6 p.125) mostrou sinais característicos de esteróides; por exemplo, o sinal em δ 5,3 correspondente a um hidrogênio olefínico;

o multiplete centrado em δ 3,5 correspondente a um hidrogênio hidroximetínico e um acúmulo de sinais entre δ 0,7 e 2,3 demonstrando o caráter de hidrocarboneto saturado com os sinais mais intensos correspondendo aos grupos metílicos. O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 3.10)

(Espectro 7 p.126). mostrou 6 sinais correspondentes a carbonos metílicos, um sinal para carbono hidroximetínico (δ 71,8) e dois sinais para carbonos olefínicos em δ 140,7 e 121,7. O total de 29 sinais confirmou tratar-se do esteróide β -sitosterol, por comparação com amostra-padrão e com os dados da literatura (Lordello, 1992).

Tabela 3.9 Dados de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de 2

^1H	δ multiplicidade (j, Hz)
H-6	5,3 d(6)
H-3	3,7 m

Tabela 3.10 Dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de 2

^{13}C	δ	^{13}C	δ
1	37,2	16	39,7
2	29,6	17	56,0
3	71,7	18	11,9
4	42,2	19	19,4
5	140,7	20	36,1
6	121,7	21	18,7
7	31,9	22	33,9
8	31,6	23	26,0

9	50,1	24	45,8
10	36,4	25	29,1
11	21,0	26	19,8
12	28,2	27	19,0
13	42,3	28	23,0
14	56,7	29	11,8
15	24,3		

3.5.3 Identificação e Elucidação estrutural das Substâncias 3, 4, 5 e 6

Sulfeto de dibenzila. Óleo amarelo. $C_{14}H_{14}S$ teórico 78,46% C, 6,58% H, 14,96% S; obtido 78,28% C, 6,56% H, 15,01% S. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Tabelas 3.11 e 3.12) (Espectros 9 e 10 p.128 e 129). R_t = 7.42 min em HPLC (Coluna Econosil C-18, 5 μm , 250x4 mm, com gradiente MeOH- H_2O 7:3 (7 min) mudando para 90:10 (15 min) e 100% MeOH em 20 min; fluxo 1 ml min^{-1} , detecção a 280 nm). UV λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ): 220 (8400), 265 (450). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 3085, 3060, 3030, 2930, 1600, 1495, 1455, 712. MS m/z (int. rel.): 214(2,6) $[M]^+$; 213 (4,5), 137(2,2), 124(19,8), 91(100), 78(17,9), 77(11,3), 65(20,1) (Espectro 12 p.131).

Dissulfeto de dibenzila. Óleo amarelo. $C_{14}H_{14}S_2$ teórico 68,25% C; 5,73% H; 26,02% S; obtido 68,30% C; 5,61% H; 25,89% S. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (**Tabelas 3.11 e 3.12**) (**Espectros 13 e**

14 p.132 e 133). $R_t = 9,72$ min em HPLC (Coluna Econosil C-18, 5 μm , 250x4 mm, com gradiente de MeOH:H₂O 7:3 (7 min) mudando para 90:10 (15 min) e 100%MeOH em 20 min; fluxo 1 ml min⁻¹, detecção a 280 nm). UV λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ): 239 (9200), 279 (340). IR ν_{max}^{film} cm⁻¹: 3080, 3060, 3019, 3008, 1604, 1503, 1460, 700. MS m/z (rel. int.): 246(4,9) [M]⁺; 245 (14,4), 170(2,3), 156(3,2), 124(3,9), 91(100), 78(3,9), 77(11), 65(19,9) (**Espectro 16** p.135).

Trissulfeto de dibenzila. Sólido amarelo amorfo. $C_{14}H_{14}S_3$ teórico 60,39% C; 5,07% H; 34,54% S; obtido 60,29% C; 4,94% H; 34,40% S. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (**Tabela 3.11 e**

3.12) (**Espectros 17 e 18** vol. II p.136 e 137). $R_t = 11,24$ min em HPLC (Coluna Econosil C-18, 5 μm , 250x4 mm, com gradiente de MeOH-H₂O 7:3 (7 min) mudando para 90:10 (15 min) e 100%MeOH a 20 min; fluxo 1 ml min⁻¹, detecção a 280 nm). UV λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ): 215 (9800), 260(320). IR ν_{max}^{film} cm⁻¹: 3076, 3025, 2988, 1598, 1489, 1456, 722. MS m/z (rel. int.): 278(2) [M]⁺; 277(3,5), 245 (9,3), 202(5,6), 188(2,7), 124(4,5), 91(100), 78(4,2), 77(11,8), 65(19,3) (**Espectro 20** p.139).

Tetrassulfeto de dibenzila. Sólido amorfo alaranjado. $C_{14}H_{14}S_4$ teórico 54,16% C; 4,54% H; 41,30% S; obtido 53,98% C; 4,53% H; 41,2% S.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (**Tabelas 3.11 e 3.12**) (**Espectros 21 e 22** p.140 e 141). $R_t = 13,52$ min em HPLC (Coluna Econosil C-18, 5 μm , 250x4 mm, com

gradiente de MeOH-H₂O 7:3 (7 min) mudando para 90:10 (15 min) e 100% MeOH a 20 min; fluxo 1 ml min⁻¹, detecção a 280 nm). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 235 (11.100), 256 (530). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm⁻¹: 3076, 3029, 2930, 1610, 1504, 1458, 719. MS m/z (rel. int.): 310(2,5) [M]⁺; 278 93,4), 246 (9,7), 234(1,2), 220(4,6), 188(1,5), 156(2,9), 124(1,9), 91(100), 78(1,58), 77(8), 65(21,1) (**Espectro 24** p143).

Os compostos **3**, **4**, **5** e **6** exibiram algumas características comuns nos espectros de massas, RMN ¹H e RMN ¹³C (**Tabelas 3.11** e **3.12**). Os espectros de massas apresentaram um íon significativo a m/z 91, característico de unidades benzílicas, em todas as estruturas. A análise elementar atribuiu para estas substâncias a presença de um, dois, três e quatro enxofres respectivamente. Os espectros de RMN ¹H de **3**, **4**, **5** e **6** apresentaram sinais compatíveis com a presença de anel aromático ArH - (7,25) e hidrogênios benzílicos onde C-benzílico encontra-se unido ao enxofre ArCH₂-S (3,60) a (4,19). Dados da literatura demonstram que o efeito de desproteção pela cadeia de enxofre aumenta com o aumento da mesma (de Sousa, 1990). O espectro de massas de **6** apresentou um íon molecular M⁺ de massa 310; logo deduziu-se tratar do tetrassulfeto de dibenzila. Com base nos dados da espectrometria massas e da análise elementar, puderam ser definidas as estruturas de **3**, **4** e **5** como sendo o monossulfeto de dibenzila, dissulfeto de dibenzila e trissulfeto de dibenzila. O espectro de RMN ¹H do composto **5** mostrou sinais compatíveis com os relatados para o trissulfeto de dibenzila isolado anteriormente desta espécie (Von Szcepaniski, 1972). A **Figura 3.10** apresenta uma proposta de fragmentação para a substância **3**. O mesmo esquema de fragmentação pode ser estendido às substâncias **4**, **5** e **6**.

Figura 3.10 Proposta de fragmentação para a substância **3**.

Tabela 3.11 Dados de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) das substâncias 3, 4, 5 e 6

δ multiplicidade				
Posição ^1H	3	4	5	6
H2 - H6, H2' - H6'	7,30 m	7,32 m	7,33 m	7,33 m
H7, H7'	3,59 s	4,02 s	4,15 s	4,19 s

Tabela 3.12 Dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) das substâncias 3, 4, 5 e 6

δ (PND)				
Posição ^{13}C	3	4	5	6
C2, C6 e C2', C6'	127,93	127,57	127,58	127,82
C3, C5 e C3', C5'	128,49	128,60	128,62	128,65
C4 e C4'	129,41	129,42	129,42	129,53
C1, C1'	137,43	136,52	136,26	136,74
C7, C7'	43,01	43,15	43,76	44,27

3.5.4 Elucidação Estrutural da Substância 7

Sulfeto de benzil hidroximetila. Óleo Incolor. $C_8H_{10}OS$. Teórico 62.33% C, 6.49% H, 10.39% O, 20.77% S; obtido 63.12% C, 6.30% H, 10.12% O, 19.89% S. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) and RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Tabela 3.13 e 3.14) (Espectros 25 e 26 p.144 e 145). MS m/z (rel. int.): 177(55) $[M]^+$; 156(9), 137(37), 124(12), 91(100), 71(55), 65(15), 56(21) (Espectro 27 vol. II p.146).

Os dados de espectroscopia de massas da substância 7 mostraram um íon molecular de massa a $m/z = 154$ que junto com os dados de RMN ^{13}C e a análise elementar permite determinar a fórmula molecular $C_8H_{10}SO$. O espectro de RMN 1H apresenta três singletos que integram respectivamente 2:2:5 em δ 3,60, 5,03 e 7,30. O espectro de RMN ^{13}C apresenta além dos seis carbonos característicos de anel aromático mono-substituído, um carbono metilênico em δ 43,31 (metileno ligado ao anel e ao S) e um carbono metilênico em δ 76,50 indicando que em 7 existe um grupamento hidroximetilênico ligado ao "S".

Tabela 3.13 Dados de RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) de 7

1H	δ multiplicidade
H2 - H6	7,30 s
H7	3,60 s
H1'	5,03 s

Tabela 3.14 Dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de **7**

^{13}C	δ
C2, C6	127,42
C3, C5	128,48
C4	129,56
C1	136,00
C7	43,31
C1''	76,50

3.5.4 Elucidação Estrutural da Substância **8**

Di(benziltrítio) Metano. Sólido amorfo Alaranjado. $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{S}_6$ Teórico 46,36% C; 4,15% H; 49,49% S; obtido 47,2 % C; 4,0 % H; 48,9 % S. RMN ^1H (300 MHz,

CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Tabela 3.15 e 3.16) (Espectros **28** e **29** p.147 e 148). MS m/z (int. rel.): 388(1) $[\text{M}]^+$; 290(1), 202(21), 188(1), 124(3), 91(100), 78(35), 77(26), 65(15) (Espectro **30** p.149).

O polissulfeto **8** pode ser analisado em comparação com o polissulfeto **5**, os espectros de RMN ^1H de ambos apresentam sinais semelhantes, diferindo apenas no valor do deslocamento químico dos hidrogênios benzílicos, que em **8** ressonaram em δ 4,02 ($\delta_{\text{C}}=43,19$) e a presença de um singlete adicional em δ 5,30 atribuído a hidrogênios metilênicos pelos dados do experimento

DEPT. O espectro de RMN ^{13}C mostra um carbono metilênico benzílico (δ 43,19) e um segundo, extremamente desblindado, a δ 106,32. Este deslocamento pode ser explicado por efeitos eletrônicos de muitos átomos de enxofre ligados a este grupo. Os dados de análise elementar junto com a espectrometria de massas estabeleceram uma fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{S}_6$ e confirmaram a estrutura de **8** como o di(benziltrítio)metano.

Tabela 3.15 Dados de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de **8**

^1H	δ multiplicidade
H2 - H6, H2' - H6'	7,33 s
H7, H7'	4,02 s
H1'	5,30 s

Tabela 3.16 Dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de **8**

^{13}C	δ
C2, C6 e C2', C6'	127,57
C3, C5 e C3', C5'	128,62
C4 e C4'	129,44
C1, C1'	136,55
C7, C7'	43,19
C1''	106,32

3.6 Atividade Biológica das Substâncias Isoladas

As substâncias isoladas das frações e extratos de *Petiveria alliacea* L. que apresentaram atividade biológica de foram submetidas a bioensaios para determinar sua ação destas como agentes antifúngicos e/ou antineoplásicos potenciais.

O ensaio para atividade antifúngica foi realizado a partir de 5 soluções de cada uma das substâncias isoladas e de nistatina em CHCl_3 , nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 mg/mL, e aplicados 10 μL de cada solução em uma placa de CCDC-Si suportada em alumínio. Após a evaporação do solvente aspergiu-se sobre a placa uma solução contendo esporos do fungo revelador. As placas foram incubadas em câmara úmida a 25 °C no escuro por 42h.

A atividade antitumoral potencial destas substâncias foi avaliada pelo ensaio com linhagens mutantes de *S. cerevisiae*. Foram preparadas soluções contendo 500, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada substância e aplicados 100 μL destas soluções em orifícios abertos no gel de agar colocado em placas de Petri semeadas com a levedura-alvo. A incubação foi feita em estufa a 30 °C no escuro por 48 a 72h. Após este tempo, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição em mm; estes valores foram tratados por regressão linear ($\log$ da concentração da dose X diâmetro do halo) e a partir do valor do coeficiente da reta obtida calculou-se a concentração necessária para proporcionar um halo de inibição de 12mm (CI_{12}).

A **Tabela 3.17** apresenta os resultados obtidos nos ensaios biológicos para as substâncias isoladas de *Petiveria alliacea* L. Os resultados são expressos como CI_{12} (Rad⁺; RS321 e Rad52Y) ($\mu\text{g/mL}$) ou $\text{DR}_{\min}$ (*C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*) (μg).

Tabela 3.17 Dados de bioatividade* das substâncias isoladas de *Petiveria alliacea* L.

Substâncias	Microorganismos				
	Cl ₁₂ (µg/mL)			DR _{min} (µg)	
	Rad ⁺	RS 321	Rad 52Y	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
1	389	68	11	0,1	1,0
3	402	381	412	1,0	1,0
4	332	66	16	0,1	1,0
5	73	64	62	1,0	1,0
6	328	53	104	10,0	10,0
7	67	58	76	>25	>25
8	76	58	67	5,0	5,0
Camptotecina	20	-	0,6	-	-
Streptonigrina	-	0,2	-	-	-
Nistatina	-	-	-	0,1	1,0

A **Figura 3.11** apresenta os resultados dos ensaios de bioautografia realizados com esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* para o sulfeto **3**, o dissulfeto **4** e os polissulfetos **5**, **6** e **8**. As substâncias **6** e **8** apresentaram uma dose resposta mínima de 10µg e 5µg, respectivamente. Já o sulfetos **3** e o polissulfeto **5** apresentaram uma dose resposta de 1µg e

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

os polissulfetos **4** e **1**, assim como o antibiótico comercial utilizado como padrão (Nistatina), mostraram a maior atividade fungitóxica, com dose resposta mínima de 0,1µg. O sulfeto **7** foi testado até uma dose de 25µg e não apresentou atividade inibitória.

Figura 3.11 Ensaio com as substâncias isoladas de *Petiveria alliacea* L. com esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Figura 3.12 Halos de inibição das substâncias **4** e **5** com mutante Rad 52Y.

A **Figura 3.12** apresenta uma das placas utilizadas nos ensaios contra mutantes de *S. cerevisiae* com as substâncias **4** e **5**. Os códigos A1, A2 e A3 referem-se , respectivamente, às concentrações de

500, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de **4**; os códigos B1, B2 e B3 referem-se às concentrações de 500, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de **1**; o código P refere-se ao padrão utilizado para checar a integridade e estabilidade da levedura mutante, neste caso foi utilizada uma solução 5 $\mu\text{g/mL}$ de camptotecina e a levedura testada foi a Rad 52Y.

Alguns sulfetos e polissulfetos foram descritos na literatura como fortes agentes antimicrobianos. Exemplos já consagrados são os di e trissulfetos de dialila presentes no alho (*Allium sativum*, Liliaceae) e na cebola (*Allium cepa*) (McElnay, 1991); substâncias como o ajoeno (**Figura 3.13**) e 2-vinil-1,3-ditiina são fortes inibidores de agregação de plaquetas e apresentam atividade antitrombótica potente (Lawson, 1993).

Figura 3.13 Exemplo de alguns polissulfetos com atividade biológica conhecida.

Os polissulfetos de *Petiveria alliacea* L. apresentaram um efeito que podemos considerar moderado no ensaio com os mutantes de *S. cerevisiae*. Pode-se observar ação seletiva no caso de **1** e **4** para RS 321 e, principalmente, para Rad 52Y; a substância **6** também mostrou seletividade para a linhagem RS 321. Os outros polissulfetos apresentaram citotoxicidade geral (não seletiva). É importante ressaltar que o fato do valor do CI₁₂ das substâncias **1** e **4** para o mutante Rad 52Y ser mais de três vezes menor que o valor para RS 321 é um indicativo forte de que estas substâncias possuem um mecanismo de citotoxicidade ligado ao DNA através enzima topoisomerase II; por outro lado, substâncias que apresentam valores expressivos de CI₁₂ para RS 321 parecem ter sua ação

citotóxica ligada a presença da enzima topoisomerase I, como é o caso da substância **6** (Eng, *et al* 1998; Gunatilaka, *et al* 1994).

Os ensaios de bioautografia com os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* demonstrou que as substâncias isoladas eram as responsáveis pela atividade antifúngica detectada nos extratos brutos da espécie. As substâncias **1, 3, 4 e 5** mostraram forte inibição, comparável à da nistatina, enquanto as substâncias **6, 7 e 8** apresentaram atividade marginal ou não apresentaram atividade expressiva. Analisando-se a estrutura molecular das substâncias isoladas e comparando-se as atividades observadas poder-se-ia inferir que o tamanho da cadeia polissulfídica parece ser um fator importante para a atividade.

3.7 Proposta biossintética para as substâncias isoladas

Todos os metabólitos secundários são derivados de um número relativamente pequeno de intermediários-chave, possivelmente originados das vias metabólicas primárias compartilhadas pela maioria dos seres vivos (metabolismo dos açúcares, proteínas e ácidos nucleicos). A **Figura 3.14** apresenta, de forma geral, os principais vínculos entre o metabolismo primário e secundário em plantas.

O metabolismo do enxofre em plantas é bastante conhecido. O enxofre elementar possui uma solubilidade em água bastante reduzida e é absorvido pelas plantas na forma de sulfato, produzido a partir de reações oriundas da simbiose de plantas com as bactérias presentes no solo e nos rizomas. O sulfato resultante deste mecanismo metabólico é reduzido a sulfito pela enzima sulfito oxidase e este a sulfeto, pela enzima sulfito redutase (ferredoxina). Na forma de sulfeto, reage com o aminoácido serina para formar cisteína. A cisteína é o precursor-chave da síntese de polissulfetos orgânicos, além de estar envolvida na biossíntese de diversos metabólitos como a cistationina, metionina e taurina. Aminoácidos derivados da cisteína como S-alil-cisteína, S-propil-cisteína e S-propenil cisteína foram identificados em diversas espécies do gênero *Allium* como precursores dos sulfóxidos que, sob a mediação da enzima alliinase, dimerizam formando tiosulfinais (Lawson, *et al* 1991). Estes compostos são

Figura 3.14 Intermediários-chave ■ e relação entre metabolismo primário ■ e metabólitos secundários ■ (Mann, 1994).

formados quando certos tecidos de algumas plantas de Angiospermae e Gimnospermae são danificados expondo os sulfóxidos de cisteína à enzima alliinase, que cliva o aminoácido liberando o respectivo ácido sulfênico que dimeriza rapidamente formando os tiossulfatos que dão origem aos polissulfetos reduzidos. A **Figura 3.15** apresenta uma proposta de biossíntese para os polissulfetos de *Petiveria alliacea* L., com base nesta abordagem biossintética.

Figura 3.15 Biossíntese dos polissulfetos de *Petiveria alliacea* L.

3.8 Estudo do Óleo Essencial de *Petiveria alliacea* L.

A espécie *Petiveria alliacea* L. possui um forte odor que lembra o alho, devido provavelmente, à presença de sulfetos e polissulfetos voláteis. Este estudo mostrou que a atividade biológica observada nos extratos de *P. alliacea* está ligada ao acúmulo de sulfetos e polissulfetos. Com a finalidade de avaliar a composição do óleo volátil, folhas e raízes frescas (700 g) de *Petiveria alliacea* L foram submetidas a arraste por vapor d'água em aparelho tipo Clevenger modificado por Wasicky (Wasicky, 1963). Obtiveram-se 600 mg de óleo essencial (0,085% de rendimento). O óleo essencial foi analisado por cromatografia a gás em coluna capilar (HP-5) de 30m, nas condições descritas no item 2.7 do capítulo 2 (página 22).

Para a identificação das substâncias presentes no óleo essencial foram utilizadas técnicas de coinjeção com padrões, CG-MS e índice de retenção de Kováts. A **Tabela 3.18** apresenta as substâncias identificadas no óleo essencial de *P. alliacea*. Foi utilizada para a identificação por CG-MS a espectroteca NIST em sua versão mais atualizada, disponível no Núcleo de Produtos Naturais da UFRJ (NPPN). A **Figura 3.15** apresenta o cromatograma a gás do óleo essencial de *P. alliacea* com os sinais identificados para as substâncias correspondentes.

Tabela 3.18 Substâncias identificadas no óleo essencial de *Petiveria alliacea* L.

Substância	IK	%	Identificação
Sulfeto de dimetila	752	24,20	MS, P
Sulfeto de dietila	909	16,40	MS, P
Mirceno	984	0,85	P, IK, MS
Linalol	1092	3,98	P, IK, MS

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PETIVERIA ALLIACEA* L.

β-citronelol		1215	0,87	IK, MS
Trissulfeto dimetila	de	1226	6,01	MS, P
Dissulfeto dipropila	de	1283	9,67	MS, P, isolado
Cariofileno		1428	5,45	IK, MS
Trissulfeto dipropila	de	1523	18,81	P
Nerolidol		1553	11,76	IK, P, MS
Epoxi-cariofileno		1676	0,45	P

IK = Índice de Kováts; MS = espectrometria de massas e espectroteca; isol. = substância isolada e estrutura determinada por RMN¹H e ¹³C; P = coinjeção com padrões.

Os óleos essenciais são produtos vegetais constituídos de terpenóides, lignóides e outras substâncias voláteis como os sulfetos. Independente de sua constituição química, os óleos essenciais estão depositados em estruturas anatômicas que evoluíram de células oleíferas, cavidades e canais secretores a pelos glandulares. Na divisão vegetal, os óleos essenciais são considerados características primitivas que foram substituídas por outros sistemas defensivos com a evolução. O caráter alelopático de defesa ou atração de polinizadores dos óleos essenciais é extensamente abordado na literatura (Gottlieb, *et al* 1987). Tendo em vista tais considerações, resolveu-se testar a atividade fungitóxica do óleo extraído de *Petiveria alliacea* L. no ensaio de bioautografia com os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. O óleo essencial de *Petiveria alliacea* L. apresentou forte inibição dos esporos dos dois fungos ensaiados. Os valores de dose-resposta mínima foram de 0,1µg no fungo *C. cladosporioides* e de 1µg no fungo *C. sphaerospermum*; estes valores são comparáveis ao do antibiótico comercial nistatina utilizado como padrão.

Figura 3.15 Cromatograma resultante da análise por cromatografia a gás do óleo essencial de *Petiveria alliacea* L.

Estudo com a Espécie: *Psychotria spectabilis* S.

4.1 A Família Rubiaceae

A família Rubiaceae encontra-se no grupo das seis maiores famílias de Angiospermas, contando com mais de 40 tribos, 637 gêneros e cerca de 10.700 espécies. A maioria dos autores inclui Rubiaceae na ordem Gentianales. Este grupo taxonômico, segundo Cronquist, forma um elo entre Gentianales e Dipsacales, mas se comportaria como um grupo estranho dentro de qualquer uma destas ordens. A família caracteriza-se por ser essencialmente tropical; mais de três quartos de suas tribos são predominantemente lenhosas, e apenas a tribo Rubiaceae estão localizadas em regiões temperadas (Robbrecht, 1991).

No Brasil, a família Rubiaceae inclui representantes pertencentes a 125 gêneros e, no Estado de São Paulo há cerca de 204 espécies registradas, envolvendo árvores lenhosas, arbustos e até mesmo ervas, que ocorrem na Floresta ou Cerrado (Bolzani, 1991).

Pesquisas bibliográficas sobre os constituintes químicos biossintetizados na família revelam a presença de alcalóides tipo indólicos, quinolínicos e isoquinolínicos; porém só os alcalóides

indólicos foram analisados e, devido à grande diversidade química e larga ocorrência, se constitui em um marcador quimiotaxonômico bastante representativo para avaliação em nível de subfamília. Alguns artigos descrevem a ocorrência de iridóides glicosilados, no entanto, as diferentes sub-famílias analisadas apresentam uma significativa variação quanto aos tipos de iridóides encontrados (Robbrecht, E. 1991; Olea, R. S. G. 1995). A **Figura 4.1** apresenta exemplos de substâncias representativas isoladas de espécies de Rubiaceae.

Figura 4.1 Exemplo de substâncias isoladas de algumas espécies de Rubiaceae (Heralth, *et al* 1978; Nishihama, *et al* 1981; Bolzani, 1982; Iavorone, *et al* 1983; Vesato, *et al* 1984)

4.2 A Espécie *Psychotria spectabilis* S.

A tribo Psychotrieae família Rubiaceae é bastante representada nas zonas tropicais com ocorrência de cerca de 800 espécies, cujos dados taxonômicos registrados ainda não são suficientes para uma classificação precisa (Engler, 1964). Existem dúvidas quanto aos gêneros pertencentes a esta tribo, porém três deles (*Psychotria*, *Calycodendron* e *Calycosia*), considerados os principais gêneros desta tribo, sem dúvida apresentam semelhanças morfológicas, fisiológicas e filogenéticas (Libot, *et al* 1987).

As espécies do gênero *Psychotria* (que deriva do grego: psyche = alma e trophos = alimento) vem despertando grande interesse etnobotânico, tendo em vista serem espécies produtoras de substâncias com ação no sistema nervoso central. Um exemplo é *P. viridis* (Pinedo & Carmen, 1994), utilizada no preparo da bebida alucinógena denominada ayahuasca, caapi, yagê ou daime, para fins religiosos ou medicinais. As atividades biológicas das espécies deste gênero estão relacionadas com a presença de alcalóides; espécies como *P. beccarioides*, *P. forsteriana* e *P. oleoides* são fontes de alcalóides poliindolínicos, uma classe com potencial farmacológico (Lajis *et al.* 1993; Roth *et al.* 1985; Libot *et al.* 1987). Alcalóides poliindolínicos se mostraram altamente citotóxicos em diferentes linhagens tumorais (Roth *et al.* 1986; Adjibadé *et al.* 1989). A **Figura 4.2** apresenta exemplos de alcalóides isolados de espécies de *Psychotria spectabilis* S.

A espécie *Psychotria spectabilis* S. (**Figura 4.3**) é um arbusto semi-lenhoso de grande porte que possui folhas ovaladas recoberta de pêlos e flores amarelas bastante grandes (cerca de 10 cm de diâmetro), incomuns ao gênero, o que suscitou certa dúvida inicialmente quanto à classificação da espécie. Folhas da espécie foram coletadas de um espécimen adulto (7m), na mata próximo a Barragem Dormente, no estado do Amapá, em Outubro de 1996. A identificação botânica foi feita pelo Dra. Marina Thereza Vieira de Amaral Campos, na Seção de Curadoria do Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, uma exsicata encontra-se depositada no herbário daquela instituição sob o código Lopes-26.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *PSYCHOTRIA SPECTABILIS* S.

Figura 4.2 Exemplos de alcalóides isolados de espécies de *Psychotria* (Verotta, L. *et al* 1999)

Figura 4.3 Folhas e inflorescência da espécie *Psychotria spectabilis* S.

4.3 Preparação dos Extratos e Triagem Biológica

As Folhas coletadas foram secas em estufa a 40 °C por dois dias, moídas e extraídas com DCM:MeOH (2:1 v/v) e com MeOH a exaustão, obtendo-se os de extratos secos, cujos rendimentos encontram-se descritos na **Tabela 4.1**

Tabela 4.1 Massa dos extratos brutos obtidos de *Psychotria spectabilis* S.

	Massa de Extrato Seco (g)
Material vegetal (folhas) seco	215
Extrato DCM:MeOH (2:1 v/v)	8 (3,72%)
Extrato MeOH	19 (8,83%)

Os extratos em DCM:MeOH e em MeOH foram submetidos aos ensaios biológicos de bioautografia com os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e ao ensaio para atividade citotóxica seletiva contra mutantes de *S. cerevisiae*. Para o ensaio de bioautografia, foram aplicados em placa cromatográfica analítica de sílica 100µg de cada extrato, as placas foram eluídas com Hex:DCM (7:3 v/v) (para os extratos em DCM:MeOH) e com DCM:MeOH (8:2 v/v) (para os extratos em MeOH). Avaliou-se a ocorrência (ou não) de inibição do crescimento dos fungos após 42h de incubação a 25°C no escuro. Os resultados da avaliação dos potenciais antineoplásico e antifúngico encontram-se descritos na **Tabela 4.2**. Ambos os extratos apresentaram resposta positiva ao ensaio, apresentando uma inibição parcial para o fungo *C. sphaerospermum*, ou seja, alguns esporos do fungo conseguiam crescer na placa mesmo nas áreas onde observava-se zonas de inibição, já com o fungo *C. cladosporioides* a inibição foi total.

Tabela 4.2 Resultado do ensaio de bioautografia dos extratos brutos de *P. spectabilis*

Extrato	Tipo de inibição	
	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>C. cladosporioides</i>
DCM:MeOH (2:1 v/v) 100µg	Parcial	Total
MeOH 100µg	Parcial	Total

Para o ensaio com linhagens mutantes de *S. cerevisiae*, foram utilizados 4000µg de cada extrato. As substâncias de referência foram os antibióticos: camptotecina (200 µg para Rad⁺ e 5 µg para Rad 52Y) e streptonigrina (4 µg para RS 321). Ambos os extratos demonstraram resposta inibitória fraca conforme os valores dos dados de inibição indicados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 Resultado do ensaio com mutantes de *S. cerevisiae* dos extratos brutos de *P. spectabilis*

Linhagens	Halos de Inibição em mm (para 4mg/mL de extrato testado)		
	Rad ⁺	RS 321	Rad 52Y
Padrões	15	20	18
DCM:MeOH 4000µg	10	10	13
MeOH 4000µg	Não ativo	9	12

4.4 Fracionamento Guiado por Bioensaio

O extrato em DCM:MeOH foi suspenso em MeOH:H₂O (8:2 v/v) e particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e o resíduo hidroalcólico conforme descrito na **Figura 4.4**. Como a atividade biológica distribuiu-se entre as fases de polaridade média e hidroalcólica, decidiu-se reunir a fase CCl₃ com a fase EtOAc e o resíduo hidroalcólico ao extrato metanólico respectivamente, e em seguida, fazer o fracionamento destas duas fases separadamente.

A fase hidroalcólica reunida ao extrato metanólico bruto de *P. spectabilis* foi fracionada em coluna de sephadex LH-20 em MeOH, obtendo-se 15 frações agrupadas por CCDC-Si em 15 frações. As frações 10 a 15 retiveram a atividade biológica e foram fracionadas por CC-Si e CCDP, fornecendo as cumarinas **12**, **13** e o flavonol **15** como sólidos amorfos, sendo que **12** e **13** foram recristalizadas de MeOH/éter fornecendo seus respectivos cristais.

As fases de polaridade média (CHCl₃ e EtOAc) foram fracionadas de acordo com o esquema mostrado na **Figura 4.5**. Deste procedimento experimental foram purificados o esteróide sitosterol (já descrito no capítulo anterior, também isolado de *Petiveria alliacea* L.), os diterpenos **9**, **10** e as cumarinas **11** e **13**. A fração 34 apresentou uma coloração amarelo-alaranjado intensa de onde precipitou um sólido também de coloração laranja que apresentou resposta positiva ao teste para detecção de flavonóides⁴. Apesar desta fração não apresentar atividade biológica nos bioensaiois utilizados decidiu-se purificar a fração de onde foi isolado o flavonóide **14**. A **Figura 4.5** apresenta o esquema de fracionamento utilizado. A **Figura 4.6** apresenta as substâncias isoladas dos extratos bioativos de *Psychotria spectabilis* S.

⁴ A uma solução em metanol da fração foram adicionados alguns mg de fita de magnésio e a solução foi acidificada com HCl conc.; após um breve tempo de reação pôde-se observar o aparecimento de coloração vermelha intensa, indicativa da presença de flavonóides, flavonas ou xantonas.

Figura 4.4 Diagrama esquemático de obtenção dos extratos brutos e das partições de *Psychotria spectabilis* S.

Figura 4.5 Esquema de fracionamento das frações de polaridade média e hidroalcóolica obtidas da partição do extrato bruto de *Psychotria spectabilis* S.

Figura 4.6 Substâncias isoladas de *Psychotria spectabilis* S..

4.5 Identificação das Substâncias Isoladas

4.5.1 Identificação das Substâncias 9 e 10

9 α -hidróxi-15, 16-epóxi-labdan-7, 13, 14-trieno (Solidagenona). Sólido levemente amarelado. C₂₀H₂₈O₃ teórico 75,91% C, 8,92% H, 15,17% O; obtido 75,08% C, 8,56% H, 15,01% O. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (**Tabela 4.4**) (**Espectros 31 e 32** p.150 e 151). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 225 (4,03). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm⁻¹: 3443, 2938, 2870, 1718, 1666, 1460, 1380, 1234, 1069, 1068, 980, 874, 757 (**Espectro 34** p.153). MS m/z (int. rel.): 316(3) [M]⁺; 303(1), 298(1), 192(5), 192(10), 124(1), 123(6,1),

111(20,1), 83(11), 82(100), 81(33), 43(15), 41(11) (**Espectro 35** p.154). [α]⁵⁸⁹ = -20,2 (CHCl₃, c = 1,00).

15, 16-epoxi-labdan-7, 13, 14-trieno (Desoxissolidagenona). Sólido amorfo branco. C₂₀H₂₈O₂ teórico 79,96% C; 9,39% H; 10,65% O; obtido 78,12% C; 8,96% H; 12,42% O. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (**Tabela 4.4**) (**Espectros 36 e 37** p.155 e 156). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 215 (3,8), 240 (4,03). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm⁻¹: 2990, 2920, 2902, 1676, 1506, 1462, 1450, 1383, 1168, 874, 778 (**Espectro 38** p.157). MS m/z (int. rel.): 301(0,5), 300(1) [M]⁺;

285(1), 220(1), 219(4,2), 205(2), 176(6,1), 149(20,1), 135(11), 109(20), 95(17), 83(11), 82(100), 81(25), 41(11), 40(1) (**Espectro 39** p.158). [α]⁵⁸⁹ = -18,3 (CHCl₃, c= 1,00).

As substâncias **9** e **10** pertencem ao grupo de diterpenos com esqueleto do tipo labdânico (**Figura 4.7**). As duas substâncias possuem espectros de RMN ^1H bastante similares: três sinais múltiplos com integração para um hidrogênio em δ 6,30; 7,27 e 7,37 compatíveis com a presença de um anel furânico β -substituído nas estruturas de ambos.

Figura 4.7 Esqueleto diterpênico tipo labdânico

O anel B é caracterizado em **9** pelo dubleto em δ 2,02 ($J = 1,5$ Hz) atribuído aos hidrogênios metílicos H-17, pelo sinal largo em δ 5,71 atribuído ao hidrogênio vinílico H-7, o singlete em δ 2,75 referente ao hidrogênio metínico H-5. O tripleto centrado em δ 2,66 ($J = 9$ Hz) refere-se aos hidrogênios metilênicos H-11 e H-12. Aos hidrogênios metílicos H-20, H-19 e H-18 foram atribuídos os singletos em δ 1,00; 1,14 e 1,18 respectivamente. No espectro de RMN ^1H de **10** observa-se um singlete em δ 2,71 atribuído ao hidrogênio metínico H-9. Além disso, observa-se que os singletos atribuídos aos hidrogênios metílicos H-20 (δ 0,97), H-19 (δ 1,10) e H-18 (δ 1,17) estão ligeiramente deslocados para campo mais alto, quando comparados aos sinais respectivos aos hidrogênios de **9**; estas variações confirmam a desfuncionalização do carbono C-9.

Os dados de RMN ^{13}C de **9** e **10** são compatíveis com os dados descritos na literatura para os diterpenos labdânicos solidagenona e desóxisolidagenona (Torres, *et al.* 1983; Sierra, *et al.* 1984; Torres, 1985). Como esperado, a ausência da hidroxila em C-9 na substância **10** altera os valores dos deslocamentos dos carbonos próximos em relação aos respectivos carbonos em **9**.

Os espectros na região do IV de **9** e **10** apresentam bandas características de anel furânico β -substituído (1500 , 870 e 760 cm^{-1}). Uma banda clara de deformação axial de carbonila enólica (1670 cm^{-1}) e a presença de uma da banda larga em 3500 cm^{-1} , referente à deformação axial da hidroxila observada para a estrutura de **9**, que mostrou ser diferente de **10** pela falta da banda correspondente à deformação axial da hidroxila.

Os espectros de massas de ambas são semelhantes. Os dois espectros apresentam como pico base o fragmento de massa m/z 82, que é característico da fragmentação de diterpenos com anel furânico β -substituído (Bohlmann, F. *et al.* 1973). A **Figura 4.8** apresenta uma proposta de fragmentação para a substância **9**, que pode ser estendida para a substância **10**.

Figura 4.8 Proposta de fragmentação de massas para a substância **9**.

Tabela 4.4 Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) das substâncias **9** e **10**.

Posição	9		10	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	2,00 m	31,60	2,00 m	38,40
2	2,00 m	17,80	2,00 m	17,80
3	1,50 m	42,61	1,50 m	42,61
4	-	32,22	-	31,62
5	2,75 s	55,80	2,75 s	55,8
6	-	200,44	-	200,0
7	5,72 sl	129,25	5,72sl	128,2
8	-	155,92	-	157,9
9	-	76,61	2,71 s	63,1
10	-	46,50	-	42,80
11	2,66 t; $J=9$ Hz	33,34	2,63 t; $J=6$ Hz	26,54
12	2,66 t; $J=9$ Hz	21,21	2,63 t; $J=6$ Hz	27,31
13	-	125,12	-	124,02
14	6,30 sl	110,70	6,33 sl	110,70
15	7,37 sl	143,10	7,37 sl	143,20
16	7,27 sl	138,61	7,27 sl	138,61
17	2,04 d; $J=1,5$ Hz	20,11	1,92 d ($J=1,0$)	21,7
18	1,18 s	33,83	1,10s	33,8
19	1,14 s	21,72	1,03s	21,8
20	1,00 s	18,30	0,97s	14,3

4.5.2 Identificação das Substâncias 11, 12 e 13

2H-1-benzopirran-2-ona (Cumarina). Sólido branco cristalino. $C_9H_6O_2$ PF ($^{\circ}C$) = 70. RMN 1H (300 MHz, metanol) e RMN ^{13}C (75 MHz, metanol) (**Tabela 4.5**) (**Espectros 40 e 42** p.159 e 161). UV λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ): 311 (5710), 273 (11000). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 1927, 1822, 1747, 1388, 1257, 1225, 1173, 1111, 953, 925, 887, 823, 754, 602, 518, 490 (**Espectro 44** p.163). MS m/z (int. rel.): 146(81) $[M]^+$; 118(100), 90(42), 89(40), 64(8), 63(27), 61(5), 50(8), 42(3), 37(5) (**Espectro 45** p.164).

7-hidroxi-2H-1-benzopirran-2-ona (Umbelliferona). Sólido branco cristalizado por sublimação. $C_9H_6O_3$ PF ($^{\circ}C$) = 230. RMN 1H (300 MHz, metanol) e RMN ^{13}C (75 MHz, metanol) (**Tabela 4.5**) (**Espectros 46 e 48** p.165 e 167). UV λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ): 324 (14610), 254 (2030), 216 (10000). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 3176, 1710, 1689, 1614, 1572, 1406, 1323, 1236, 1136, 638, 758, 487 (**Espectro 49** p.168). MS m/z (int. rel.): 162(93) $[M]^+$; 134(100), 106(10), 105(23), 78(31), 63(13), 50(14), 42(26) (**Espectro 50** p.169).

6,7-furan-2H-1-benzopirran-2-ona (Psoraleno). Sólido branco amorfo. $C_{11}H_6O_3$ PF ($^{\circ}C$) = 98 - 101. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (**Tabela 4.5**) (**Espectros 51 e 53** p.170 e 172). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 1723, 1629, 1574, 1452, 1284, 1130, 1098, 1019, 756, 540 (**Espectro 55** p.174). MS m/z (int. rel.): 186(100) $[M]^+$; 158(86), 130(34), 102(48), 83(11), 69(16), 51(24) (**Espectros 56** p.175).

Os dados de RMN ^1H de **11**, **12** e **13** são compatíveis com a estrutura de cumarinas. Análise detalhada de cada espectro permitiu distingui-los. Em **11**, dois dubletos com constantes de acoplamento (9,6 Hz), típica da relação *orto* entre os hidrogênios, e deslocamentos em δ 7,9 e 6,3 são característicos dos sinais esperados para hidrogênios 3 e 4 do sistema α e β carbonílico das cumarinas. O dubleto em δ 7,28 (H-5) (J = 8,0 Hz) referente aos sinais de hidrogênios com relação *orto*, o duplodubleto em δ 7,31 (J = 1,5; 8,0 Hz) (H-8) e o multiplete em δ 7,56 (H-6 e H-7) indicam que o anel aromático não é substituído.

Os dados de RMN ^1H de **12** mostram claramente a substituição no carbono C-7 revelando sinais característicos de hidrogênios com relação *orto* e *para* de aromáticos. Os dubletos com J = 9,6 Hz centrados em δ 6,17 e 7,83 referem-se aos hidrogênios 3 e 4 do sistema α e β carbonílico de um benzopirano, os sinais referentes aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8 acoplam entre si originando um dubleto em δ 7,43 (J = 8,4 Hz), um duplo dubleto em δ 6,63 (J =2,3 e 8,4 Hz) e um dubleto em δ 6,69 (J = 2,3 Hz) respectivamente.

No espectro de RMN ^1H de **13** os singletos em δ 7,68 e 7,44 referente aos hidrogênios H-5 e H-8 indicam a dupla substituição do anel aromático na posição C-6 e C-7, os dubletos em δ 6,83 e 7,71 (J = 3Hz) confirmam a presença de um anel furânico ligado nesta posição.

As cumarinas isoladas são bastante comuns em plantas (Nathan, *et al.* 1984) apesar de não haver, até o momento, descrição desta classe de substâncias em espécies de *Psychotria* e serem de ocorrência bastante rara em Rubiaceae. Os dados de RMN ^{13}C e espectrometria de massas para estas cumarinas encontram-se publicados na literatura (Austin, *et al.* 1973; Chan, *et al.* 1977; Hayakawa, *et al.* 1984) e, confrontados com os nossos, confirmaram as estruturas propostas

Tabela 4.5 Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) das substâncias **11**, **12** e **13**.

Posição	11 (metanol- D_3)		12 (metanol- D_3)		13 (CDCl_3)	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	-	-	-	-	-
2	-	160,51	-	160,35	-	160,35
3	6,38 d; $J=9,6$ Hz	116,42	6,17 d; $J=9,6$ Hz	113,20	6,36 d; $J=9,4$ Hz	113,82
4	7,94 d; $J=9,6$ Hz	143,53	7,83 d; $J=9,6$ Hz	143,50	7,79 d; $J=9,4$ Hz	143,74
5	7,28 d; $J=8,0$ Hz	127,00	7,43 d ; $J=8,4$ Hz	127,76	7,68 s	118,45
6	7,56 m	124,40	6,63 dd; $J=2,3;8,4$	119,96	-	125,02
7	7,56 m	128,00	-	156,18	-	157,41
8	7,31 dd $J=1,5;8,0$	115,12	6,69 d; $J=2,3$ Hz	106,26	7,44 s	94,99
9	-	153,90	-	153,36	-	152,56
10	-	118,81	-	114,26	-	113,67
11					6,83 d; $J=3,0$ Hz	106,30
12					7,71 d; $J=3,0$ Hz	144,85

4.5.3 Identificação das Substâncias 14 e 15

2 - (3, 4-di-hidróxi-fenil) - 3, 5, 7 - tri-hidróxi - 4H - 1 - benzopiran - 4 - ona (Quercetina). Sólido amarelo alaranjado amorfo . $C_{15}H_{10}O_7$ RMN 1H (300 MHz, metanol) e RMN ^{13}C (75 MHz, metanol) (**Tabela 4.6**) (**Espectros 57 e 59** p.176 e 178).. IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 3411, 1665, 1611, 1522, 1383, 1320, 1169, 1014, 824, 602 (**Espectro 61** p.180). MS m/z (int. rel.): 302(100) $[M]^+$;

301(36), 273(12), 229(8), 153(11), 137(14), 128(24), 69(19) (**Espectro 62** p.181).

2 - (3, 4-di-hidróxi-fenil) - 3, 5, 7 - tri-hidróxi-4H - 1 - benzopiran - 4 - ona - 3O - ramnose (Quercetrina). Sólido amarelo amorfo. $C_{21}H_{20}O_{11}$ RMN 1H (200 MHz, DMSO/ $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO/ $CDCl_3$) (**Tabela 4.6**) (**Espectros 63 e 64** p.182 e 183)..

O espectro de RMN 1H de **14** apresentou dois dubletos em δ 6,38 ($J= 2,1$ Hz) e δ 6,07 ($J= 2,1$ Hz) referente aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A indicando que este encontra-se bifuncionalizado nos carbonos C-5 e C-7; um duplo dubleto e um dubleto em 7,63 δ ($J= 8,5$ e 2,2 Hz) e δ 6,88 ($J= 8,5$ Hz) referentes aos hidrogênios H-5' e H-6' do anel B indicam que este se encontra 1, 3, 4-trissubstituído. Este dado analisado com o dubleto em δ 7,72 ($J= 2,2$) atribuído ao hidrogênio H-2' do anel B definem de maneira insofismável a substituição no anel B. O singlete

largo em δ 12,64 indica que o hidrogênio hidroxílico em C-5 está em ponte com a carbonila em C-4. Os dados de RMN ^{13}C mostram 10 sinais relativos a carbonos quaternários e 5 relativos a carbonos metínicos. Análise dos deslocamentos químicos desses carbonos e comparação com dados publicados para flavonóides análogos confirma que a estrutura de **14** deve ser de um flavonol tetrasubstituído (Markham, *et al.* 1978) identificado como Quercetina. Os dados de espectrometria de massas e IV obtidos para **14** também corroboram esta conclusão.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **15** são bastante semelhantes aos de **14**. O espectro de RMN ^1H apresenta sinais em δ 6,19 (d, $J=1,7$ Hz), δ 6,32 (d, $J=1,7$ Hz), δ 6,88 (d, $J=8,4$ Hz), δ 7,23 (dd, $J=1,7$ e $8,4$ Hz) e δ 7,36 (d, $J=1,7$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios H-6, H-8, H-5', H-6' e H-2' respectivamente; o multipeto largo em δ 3,4 correspondentes a hidrogênios hidroximetínicos. O dubleto em δ 0,79 (correspondente a um grupo metílico) e o singleto em δ 5,38 indicativo de um hidrogênio anomérico, sugeriram tratar-se de uma unidade de açúcar na estrutura de **15**. Estes dados analisados em consonância com aqueles descritos na literatura confirma a estrutura de um flavonóide glicosilado para **15**. O espectro de RMN ^{13}C apresenta 10 sinais para carbono quaternário, 10 sinais para carbono metínico e um sinal para carbono metílico; com base nos sinais em δ 101,5; 71,4; 70,5; 70,3; 70,0 e 17,3, concluiu-se que a parte glicosídica é a ramnose. A substância **15** foi identificada como sendo a (Markham, *et al.* 1978).

Tabela 4.6 Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) das substâncias **14** e **15**.

Posição	14 (metanol)		15 (DMSO/ CDCl_3)	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	-	148,26	-	157,0
3	-	137,19	-	134,0
4	-	177,31	-	177,5
5	-	162,48	-	161,3
6	6,38 d; $J=2,1$ Hz	99,34	6,32 d; $J=1,7$ Hz	99,1
7	-	165,82	-	165,7
8	6,07 d; $J=2,1$ Hz	94,49	6,19 d; $J=1,7$ Hz	93,7
9	-	158,0	-	156,6
10	-	104,46	-	103,6
1'	-	121,68	-	120,9
2'	7,72 d; $J=2,2$ Hz	116,00	7,36 d; $J=1,7$ Hz	115,3
3'	-	146,22	-	145,2
4'	-	148,77	-	148,8
5'	6,88 d; $J=8,5$ Hz	116,14	6,88 d; $J=8,4$ Hz	115,6
6'	7,63 dd; $J=8,5$ e 2,2 Hz	124,16	7,23 dd; $J=8,4$ e $J=1,7$ Hz	120,4
1''	-		5,52 s	101,5
2''	-		-	70,3
3''	-		-	70,5
4''	-		-	71,4
5''	-		-	70,0
6''	-		0,79 ($J=6$ Hz)	17,5

4.6 Atividade Biológica das Substâncias Isoladas

As substâncias isoladas das frações e extratos de *Psychotria spectabilis* S. que apresentaram atividade biológica de foram submetidas aos bioensaios para determinar o potencial destas como agentes antifúngicos e/ou antineoplásicos potenciais.

O ensaio para atividade antifúngica foi realizado a partir de 5 soluções de cada uma das substâncias isoladas e de nistatina em CHCl_3 , nas concentrações de 1,0; 0,05; 0,025 e 0,0025 mg/ml, foram aplicados 10 μ l de cada solução em uma placa de CCDC-Si suportada em alumínio. Após a evaporação completa do solvente aspergiu-se sobre a placa uma solução contendo esporos do fungo revelador. As placas foram incubadas em câmara úmida a 25°C no escuro por 42h.

A atividade antitumoral potencial destas substâncias foi avaliada pelo ensaio com linhagens mutantes de *S. cerevisiae*. Foram preparadas soluções contendo 500, 100 e 10 μ g/mL de cada substância e aplicados 100 μ L destas soluções em orifícios abertos no gel de agar colocado em placas de Petri semeadas com a levedura alvo. A incubação foi feita em estufa a 30°C no escuro por 48 a 72h. Após este tempo foram medidos os diâmetros dos halos de inibição em mm; estes valores foram tratados por regressão linear e a partir do valor do coeficiente da reta obtida calcula-se a concentração necessária para proporcionar um halo de inibição de 12mm (CI₁₂).

A **Tabela 4.7** apresenta os resultados obtidos nos ensaios biológicos para as substâncias isoladas de *Psychotria spectabilis* S. Os resultados são expressos como CI₁₂ (Rad⁺; RS321 e Rad 52Y) (μ g/mL) ou DR_{min} (*C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*) (μ g).

Tabela 4.7 Dados de bioatividade (IC₁₂ e DR_{min}) das substâncias isoladas de *Psychotria spectabilis* S.

Substâncias	Microorganismos				
	IC ₁₂ (µg/mL)			DR _{min} (µg)	
	Rad ⁺	RS321	Rad52Y	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
9	634	552	89	0,25	0,5
10	> 2000	> 2000	> 2000	10	10
11	Não ativo	Não ativo	Não ativo	10	10
12	Não ativo	Não ativo	Não ativo	2,5	2,5
13	360	298	119	0,25	0,25
14	Não ativo	Não ativo	Não ativo	ausente	ausente
15	Não ativo	Não ativo	Não ativo	ausente	ausente
Camptotecina	20	-	0,6	-	-
Streptonigrina	-	0,2	-	-	-
Nistatina	-	-	-	0,1	1,0

A **Figura 4.9** apresenta os resultados dos ensaios de bioautografia realizados com esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* para as substâncias **9**, **12**, **13** e a nistatina (controle positivo). Pode-se observar forte inibição do crescimento dos esporos em todas as doses testadas. As substâncias **13** e **9** foram as que apresentaram maior potencial fungitóxico e também, a melhor resposta seletiva ao ensaio com mutantes de *S. cerevisiae*.

Figura 4.9 Foto ilustrativa de uma placa de bioautografia mostrando as zonas de inibição do fungo *C. cladosporioides* produzido pelas substâncias **9**, **12** e **13**.

As cumarinas são encontradas em inúmeras espécies de plantas, em especial nas famílias Umbelliferae e Rutaceae, em Rubiaceae são muito raras. A cumarina propriamente dita é encontrada, por exemplo, no cravo-da-índia e contribui para o seu sabor doce. Dímeros de cumarina como, por exemplo o dicumarol (**Figura 4.10**) são relatados como fortes agentes anticoagulantes podendo levar à morte por hemorragia interna (Kanne, *et al.* 1982). Sua ação está ligada à formação de complexos com a vitamina K, diminuindo as reações de coagulação no sangue. A warfarina (**Figura 4.10**) é um derivado de cumarina utilizado como raticida e possui atividade similar. As cumarinas e furanocumarinas são freqüentemente produzidas como resposta alelopática de plantas como o aipo (*Apium graveolens*, Umbelliferae) a parasitas e fungos (Kornhauser, *et al.* 1982). O psoraleno, isolado de *Psychotria spectabilis* S., tem sido usado topicamente como promotor de pigmentação da pele em cremes e loções de bronzamento, por ser um cromóforo que absorve no UV intensamente e é capaz de estimular a formação de melanina. O metoxisaleno (**Figura 4.10**), constituinte dos frutos de *Amiml majus* (Umbelliferae) é utilizado clinicamente para o tratamento de certas lesões de pele como a psoríase, caracterizada

pela produção exacerbada de células epiteliais. O medicamento é ingerido e doses de radiação são aplicadas localmente (Parsons, 1980). A estrutura planar destas moléculas facilita sua intercalação com a molécula do DNA celular formando complexos com bases pirimidínicas, estimulados pela radiação, inibindo a proliferação celular (**Figura 4.10**). Os resultados dos ensaios de bioautografia e antineoplásico mostraram diferenças significativas entre a atividade do psoraleno (**13**) e das cumarinas **11** e **12**, o que reforça a idéia de que tal atividade esteja ligada a mecanismos de interação com o DNA.

A *trans*-desidrocrotonina (**Figura 4.10**), um diterpeno de esqueleto labdânico, isolado de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae) revelou atividade anti-inflamatória e efeito hipoglicêmico significativo em cobaias com diabetes induzida, além de diminuir o índice de lesões gástricas nestas cobaias (Macial, *et al.* 2000). Diterpenos de esqueleto labdânico como os isolados de *Psychotria spectabilis* S. não foram relatados como substâncias que apresentem atividade biológica significativa, até este trabalho. Entretanto, neste trabalho, observou-se uma atividade citotóxica seletiva para a substância **9** sugerindo que uma investigação mais profunda desta classe de substâncias deve ser pertinente. A hidroxilação do carbono C-9 poderia estar associada com a atividade detectada para **9**, considerando-se que a substância **10** não apresentou atividade.

Embora os flavonóides isolados não terem apresentado atividade nos ensaios utilizados neste trabalho, sabe-se que flavonóides são descritos como substâncias que possuem atividades antioxidantes, e são hoje amplamente utilizados na prevenção de doenças cardiovasculares e do câncer (Bennini, *et al.* 1992).

Figura 4.10 Exemplo de cumarinas e diterpeno com atividades farmacológica comprovada

4.7 Proposta biossintética para as substâncias isoladas

Os diterpenos são derivados da condensação do farnesil pirofosfato com o isopentenil pirofosfato (IPP) ambos derivados da acetil coenzima A; e as enzimas envolvidas neste processo estão bem caracterizadas. O geranylgeranyl pirofosfato formado nesta condensação é o precursor de todos os diterpenos, o tipo de esqueleto é determinado pelo tipo de ciclização deste precursor. Oxidações e rearranjos determinam o tipo de substituintes da molécula.

O esqueleto labdânico é formado por uma ciclização eletrofílica e uma posterior oxidação. Uma proposta biossintética para as substâncias **9** e **10**, baseada neste mecanismo é apresentada na Figura 4.11.

Figura 4.11 Biogênese para as substâncias **9** e **10**

As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico que sofre uma hidroxilação na posição *orto* para formar o precursor ácido 2- hidróxi-cumárico. A mudança de configuração *trans* para a configuração menos estável *cis* da cadeia lateral é o segundo passo para tornar possível o fechamento do anel lactônico, este processo é catalisado enzimaticamente. O ácido 4- hidróxi cumárico pode ser sugerido como precursor da cumarina **12** segundo o mesmo mecanismo. O anel aromático de **12** é ativado nas posições *orto* em relação ao grupo hidroxila e pode ser alquilado por uma série de agentes alquilantes, neste caso o dimetilalila difosfato (Hayakawa, *et al.* 1984). A ciclização do grupamento dimetilalil com a hidroxila fenólica origina a marmesina, etapa mediada por uma enzima citocromo-P-450-dependente e requer cofatores como o NADPH. Uma segunda enzima, também P-450 dependente, é responsável pela clivagem do fragmento hidroxiiisopropílico gerando o psoraleno (**14**). A **Figura 10.12** apresenta esta proposta biossintética para as cumarinas isoladas.

Figura 4.12 Biogênese apresentada para as cumarinas isoladas em *Psychotria spectabilis* S.

Os flavonóides são metabólitos de biossíntese mista, pois parte da molécula origina-se do ácido cinâmico (via do chiquimato) e parte pela condensação de esteres de coenzima A (via do acetato-mevalonato). A **Figura 4.13** apresenta uma proposta de biossíntese para os flavonóides **14** e **15**. A enzima chave neste processo é a chalcona sintase que acopla uma unidade de 4-hidroxicinamoil-CoA com 3 unidades de malonil-CoA formando a naringenina (uma flavanona) que, por oxidações consecutivas, origina aos flavonóides.

Figura 4.13 Biogênese apresentada para os flavonóides de *Psychotria spectabilis* S.

4.8 Estudo do Óleo Essencial de *Psychotria spectabilis* S.

Com a finalidade de avaliar a composição do óleo volátil, folhas secas de *Psychotria spectabilis* S. (34g) foram submetidas a arraste por vapor d'água em aparelho tipo Clevenger modificado por Wasicky (Wasicky, 1963), obtendo-se 0,45% de rendimento (0,16 ml). O óleo essencial obtido foi submetido a análise por cromatografia gasosa em coluna capilar (HP-5) de 30m, nas condições descritas no item 2.7 do capítulo 2 (página 22). Foram identificados oito substâncias pelo índice de Kováts (Kováts, 1958; Davies, 1990) e por coinjeção com padrões: seis sesquiterpenos e dois diterpenos (isolados anteriormente dos extratos ativos de *P. spectabilis*). A falta de padrões de sesquiterpenos e a impossibilidade de se efetuar análise por CG-MS impediu a identificação de mais componentes, inclusive da substância majoritária no óleo. A **Tabela 4.8** apresenta as substâncias identificadas no óleo essencial. A **Figura 4.14** mostra o cromatograma a gás do óleo essencial de *P. spectabilis*.

Tabela 4.8 Substâncias identificadas no óleo essencial de *Psychotria spectabilis* S..

Substância	IK	%	Identificação
cariofilano	1424	5,3	IK, P
cariofileno	1428	4,0	IK, P
humuleno	1438	4,9	P, IK,
copaeno	1445	3,1	IK
cedreno	1446	9,8	IK
bisabolano	1449	2,5	P, IK
bisabolol	1668	6,8	P, IK
farnesol	1747	2,5	P, IK
10	2089	1,8	P, isolado
9	2269	3,4	P, isolado

IK = Índice de Kováts; isol. = substância isolada e estrutura determinada por RMN ^1H e ^{13}C ; P = coinjeção com padrões.

Figura 4.14 Cromatograma resultante da análise por cromatografia a gás do óleo essencial de *Psychotria spectabilis* S.

Capítulo

Estudos com a Espécie *Bathysa meridionalis* L.

5.1 A Espécie *Bathysa meridionalis* L.

A espécie *Bathysa meridionalis* L. pertence à família Rubiaceae. São escassas as referências a trabalhos fitoquímicos ou de bioatividade com espécies do gênero *Bathysa*. A espécie estudada é uma árvore chegando a 5m de altura com folhas medindo 1m de comprimento por 0,5m de largura (**Figuras 5.1 e 5.2**). Folhas da espécie *Bathysa meridionalis* L. foram coletada em abril de 1997 na Floresta do Estado (Reserva Estadual das Nascentes do Ipiranga), próximo ao Instituto Botânico situado no Jardim Botânico da cidade de São Paulo. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto Botânico sob código JBSP13.8.34.

Estudo fitoquímico anterior com esta espécie revelou a presença nos extratos alcóolicos da 2-hidróxi-4-metóxi acetofenona (Paeonol) (Arnold, *et al.* 1977). O Paeonol é descrito como um indutor potente da carcinogênese química causada por arilaminas em humanos (Chung, 1999). As arilaminas são uma das classes de carcinógenos químicos documentados como indutores de tumores de colo em humanos, pela formação adutos com o DNA. Este processo é acelerado na

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *BATHYSA MERIDIONALIS* L.

presença de Paeonol (Parker, *et al.* 1984). A **Figura 5.3** apresenta a estrutura do Paeonol, único constituinte químico descrito para a espécie *Bathysa meridionalis* L.

Figura 5.1 Arbustos da espécie *Bathysa meridionalis* L.

Figura 5.2 Folha de um espécime adulto de *Bathysa meridionalis* L.

Figura 5.3 Estrutura do Paeonol isolado anteriormente de *Bathysa meridionalis* L.

5.2 Preparação dos Extratos e Triagem Biológica preliminar

As Folhas de *Bathysa meridionalis* L. foram secas em estufa a 40°C por dois dias, moídas e extraídas com DCM:MeOH 2:1 (v/v), obtendo-se as massas de extratos secos descritos na **Tabela 5.1**

Tabela 5.1 Massas de extratos secos de *Bathysa meridionalis* L.

	Massa de Extrato Seco (g)
Material Partida Seco	1000
Extrato DCM:MeOH 2:1	183 (18,3%)
Extrato MeOH	114 (11,4%)

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *BATHYSA MERIDIONALIS* L.

Os extratos em DCM:MeOH (2:1 v/v) e em MeOH de cada uma das partes da planta foram submetidos aos ensaios biológicos de bioautografia com o fungo *Cladosporium cladosporioides* e com leveduras mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Somente o extrato em DCM:MeOH apresentou atividade em ambos os bioensaios. As **Tabelas 5.2** e **5.3** apresentam os resultados destes bioensaios.

Tabela 5.2 Resultado do ensaio de bioautografia com extratos brutos de *B. meridionalis* L.

Extrato	Parte da Planta
	Folha
	<i>C. cladosporioides</i>
DCM:MeOH (2:1 v/v) 100µg	positivo
MeOH 100µg	ausente

Tabela 5.3 Resultado do ensaio com mutantes de *S. cerevisiae* dos extratos brutos de *B. meridionalis* L.

Linhas	Halos de Inibição em mm		
	Rad ⁺	RS321	Rad52Y
Padrões	15	20	18
DCM:MeOH 4000µg/ml	9	15	11
MeOH 4000µg/ml	Não ativo	Não ativo	Não ativo

5.3 Fracionamento Guiado por Bioensaios

O Extrato em DCM: MeOH seco foi suspenso em MeOH:H₂O 8:2 (v/v) e particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila, e *n*-butanol, o resíduo foi concentrado a vácuo e liofilizado resultando no extrato aquoso conforme descrito na **Figura 5.4**.

O biomonitoramento destas fases revelou atividade antifúngica fraca e potencial antineoplásico significativo no extrato bruto em DCM:MeOH e na fase AcOEt do mesmo. O protocolo apresentado na **Figura 5.5** traz, em vermelho as fases que mostraram resposta positiva à triagem biológica com *S. cerevisiae* e com o fungo *C. cladosporioides*.

A fase em AcOEt foi a única que reteve a atividade antineoplásica e antifúngica. Assim, partiu-se para o fracionamento da mesma em coluna de sílica gel, em gradiente de polaridade, fornecendo quarenta e cinco frações que foram reunidas por CCDC e também ensaiadas da mesma forma. As frações 11-13 e 14-15 retiveram a atividade e foram fracionadas em coluna de sílica separadamente conforme descrito na **Figura 5.5**. A mistura de triterpenos obtida no fracionamento da fração 11-13 foi metilada com diazometano, separando-a por CCDP-Si em DCM:MeOH 95:5 em duas misturas binárias de triterpenos (**16** e **17**; **18** e **19**). A fração 14-15 forneceu o triterpeno **22** e a mistura binária dos triterpenos **20** e **21**.

Figura 4.4 Obtenção dos extratos brutos e partições de *Bathysa meridionalis* L.

ESTUDOS COM A ESPÉCIE *BATHYSA MERIDIONALIS* L.

Figura 5.5 Fracionamento dos extratos ativos de *Bathysa meridionalis* L.

Figura 5.6 Substâncias isoladas das frações ativas de *Bathysa meridionalis* L.

5.4 Identificação das Substâncias Isoladas

Ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico) e Ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-óico (ácido oleanólico). A mistura apresenta-se como um sólido branco. $C_{30}H_{48}O_3$. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Tabela 5.4) (Espectros 65 e 66 p.184 e 185). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 3434, 2927, 2858, 1692, 1630, 1462, 1383, 1276, 1181, 1034, 670 (Espectro 68 p.187). MS m/z (int. rel.): 456(1) $[M]^+$; 438(2), 410(1), 248(100), 219(10), 207(20), 203(68), 189(15), 133(34), 83(81), 69(33), 55(40) (Espectro 69 p.188).

3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila e 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato de metila. A mistura apresenta-se como um sólido branco. $C_{31}H_{50}O_3$. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Tabela 5.4) (Espectros 70 e 71

p.189 e 190). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 3435, 2929, 2870, 1725, 1471, 1462, 1386, 1261, 1199, 1167, 1033, 758 (Espectro 73 p.192). MS m/z (int. rel.): 470(4) $[M]^+$; 455(2), 410(6), 262(83), 248(34), 207(32), 203(100), 189(25), 133(44), 83(31), 69(35), 55(40) (Espectro 74 p.193).

Ácido 3 β , 6 β - dihidroxiurs- 12 - en -28-oico e Ácido 3 β , 6 β - hidroxiolean- 12 - en -28-oico (ácido sumaresinólico) A mistura apresenta-se como um sólido branco. C₃₀H₄₈O₄. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (**Tabela 5.4**)

(**Espectros 75 e 77** p.194 e 196).

Ácido 3 β , 6 β , 19 α - trihidroxiurs- 12 - en -28-oico. Sólido branco. C₃₁H₅₀O₃. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (**Tabela 5.4**) (**Espectros 78 e 79** p.197 e 198).

A mistura contendo os ácidos triterpenênicos **16** e **17**, ao ser submetida á CCDC com eluentes de diferentes polaridades, apresentou somente uma mancha. O espectro de RMN ¹H apresentou diversos sinais entre δ 0,6 e 1,9, indicando a presença de diversos hidrogênios metílicos e metilênicos. A observação de dois dubletos em δ 3,2 atribuídos a hidrogênios oximetínicos, dois tripletos em δ 5,26 e 5,28 , característicos de hidrogênios olefinicos, e dois dubletos em δ 2,8 , sugeriu tratar-se de uma mistura de dois triterpenos. O espectro de absorção no IV mostrou a presença dos grupos hidroxílico e carboxílico nas moléculas (absorções em 3400, 29101 e 1690 cm⁻¹). O espectro de massas exibiu picos significativos a m/z 248, 203 e 207 correspondentes aos íons (a), (b) e (c) apresentados na **Figura 5.8**, sugerindo que as fragmentações correspondem às estruturas dos esqueletos urs-12-enos e olean-12enos (**Figura 5.7**) com um grupo carboxílico em C-17 e nenhum grupo hidroxila nos anéis B, C, D e E.

Figura 5.7 Esqueletos ursano e oleano de triterpenos

A bibliografia sobre triterpenos mostra um grande número destas substâncias de ocorrência vegetal com inúmeros tipos de esqueletos. Entretanto, observando-se algumas características reveladas pelos dados de RMN ^{13}C pode-se chegar à estrutura básica dos triterpenos da mistura. Triterpenos pentacíclicos com esqueleto oleano ou ursano, em geral, encontram-se oxidados no carbono C-3 que, quando em configuração α , apresenta um deslocamento a δ 76,1 e quando em β a δ 78,9 que é o caso dos triterpenos isolados neste trabalho (Olea, *et al.* 1990). A mistura de ácidos ursólico e oleanólico ficou evidente quando se observaram os deslocamentos dos quatro carbonos olefínicos δ 143,6; 122,7 (caracterizam o esqueleto olean-12-eno) e 137,9; 125,9 (caracterizam o esqueleto urs-12-eno) (Mahato, *et al.* 1994). Uma observação importante em estruturas de triterpenos de esqueleto olean-12 eno e urs-12-eno é a diferença nos deslocamentos dos carbonos C-12 e C-13 pelo efeito de diamagnético e paramagnético δ e γ da metila em 19β (equatorial) nos esqueletos urs-12-eno.

Com a construção da tabela correlacionando os deslocamentos químicos de cada carbono, a multiplicidade dada pelo DEPT 135° e as intensidades relativas, foi possível atribuir os deslocamentos químicos para todos os 30 carbonos dos dois ácidos triterpênicos componentes da mistura, comparando-os com os valores da literatura (Mahato, *et al.* 1994; Numata, *et al.* 1989; Shao, *et al.* 1989).

O espectro de RMN ^1H da mistura de **18** e **19** mostrou a mesma feição do espectro RMN ^1H da mistura **16** e **17**, apresentando porém dois singletos em δ 3,6 referentes a duas metoxilas. Estes dados indicam tratar-se dos ésteres metílicos dos ácidos **16** e **17**. Isto se confirmou observando-se o espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado que apresenta 52 sinais, acusando tratar-se de duas substâncias triterpênicas. O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado apresentou 52 sinais, acusando a presença de duas substâncias triterpênicas. Quanto ao tipo de oxidação, as absorções em δ 178,0 e 178,2 indicaram a presença de carboxilas, duas absorções em δ 51,4 a presença de metilas do grupo éster, o sinal em δ 78,9 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 com a hidroxila em β , e os sinais em δ 122,3; 125,5; 138,1 e 143,7 confirmaram tratar-se dos esqueletos urs-12-eno e olean-12-eno.

O ácido triterpênico **22** teve sua estrutura elucidada com base nos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os carbonos olefinicos em δ 129,6 e 137,1 e o carbono C-3 a δ 79,2 indicam tratar-se do esqueleto 3β -hidroxi-urs-12-eno. O espectro de RMN ^1H mostra sete sinais para hidrogênios metílicos, dentre os quais seis referentes aos H-23, H-24, H-25, H-26, H-27 e H-29 são singletos e um referente ao H-30 é um dubleto; este valor sugeriu uma hidroxila no carbono C-19. A presença de dois sinais de carbonos carbinólicos em δ 68,7 e 73,2, além daquele atribuído ao C-3, sugerem mais duas hidroxilas na molécula. Comparação com os dados de RMN ^{13}C de **16** e **17** e com modelos da literatura (Aimi, *et al.* 1989; Liang, *et al.* 1990) permitiram atribuir a estrutura do ácido 3β , 6β , 19α - trihidroxiurs- 12 - en -28-oico para o triterpeno **22**.

As estruturas dos triterpenos **20** e **21** também foram determinadas com base nos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da mistura, utilizando-se como modelos as substâncias **16**, **17** e **22**. A hidroxila em C-6 possui configuração β determinada pelo deslocamento do carbono C-6 no espectro RMN ^{13}C (δ 68,6) já que em estruturas semelhantes com configuração α o carbono C-6 apresenta-se a δ 65,3 (Liang, *et al.* 1990).

Os triterpenos isolados neste trabalho encontram-se descritos na literatura, isolados de diversas espécies (Aimi, *et al.* 1989; Mahato, *et al.* 1994; Numata, *et al.* 1989; Shao, *et al.* 1989; Liang, *et al.*

1990). A proposta de fragmentação de massas apresentada na **Figura 5.8** para o ácido ursólico (16). Pode ser estendida a todos os triterpenos isolados, já que ambos os esqueletos possuem o mesmo padrão de fragmentação.

Figura 5.8 Proposta de fragmentação de massas características para triterpenos de esqueleto oleano e ursano.

Tabela 5.4 Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) dos triterpenos isolados (δ)

	16	17	18	19	20	21	22
C-1	38,7	38,9	38,2	38,6	40,6	40,5	40,0
C-2	23,5	28,2	27,2	27,2	27,6	27,6	26,1
C-3	79,0	78,0	79,1	79,1	79,2	79,2	79,2
C-4	39,6	39,4	39,0	39,0	38,6	38,7	39,0
C-5	55,6	55,8	55,3	55,3	55,7	55,6	55,7
C-6	18,3	18,8	18,4	18,4	68,6	68,6	68,7
C-7	33,0	33,1	32,7	32,7	40,8	40,7	41,1
C-8	39,1	39,8	39,3	39,3	42,6	42,6	39,6
C-9	47,6	48,1	47,7	47,6	48,0	48,0	47,5
C-10	36,7	37,4	37,1	37,0	38,6	38,4	38,0
C-11	23,7	23,7	23,1	23,2	23,7	23,6	23,1
C-12	125,8	122,5	125,6	122,4	126,1	122,1	129,6
C-13	138,0	144,8	138,0	143,8	137,2	142,9	137,1
C-14	42,0	42,0	41,7	41,8	42,6	42,3	40,1
C-15	29,4	28,3	28,2	27,2	29,4	29,7	29,4
C-16	23,3	23,7	24,3	27,7	27,3	27,3	25,0
C-17	47,9	46,7	48,1	46,7	47,8	46,5	47,7
C-18	52,7	42,0	52,9	41,3	52,6	41,0	52,9
C-19	38,7	46,7	39,1	45,9	39,6	45,9	73,2
C-20	38,4	31,0	38,9	31,0	38,9	30,7	41,8
C-21	27,3	34,3	30,7	32,4	32,4	33,9	24,4
C-22	37,0	33,3	36,6	33,1	36,7	32,5	36,45
C-23	27,4	28,7	28,0	28,1	28,9	28,0	29,2
C-24	15,0	16,5	15,4	15,3	17,1	17,5	17,5
C-25	15,7	15,5	15,6	15,5	14,1	14,1	16,1
C-26	17,5	17,5	16,9	16,8	18,3	18,6	17,9
C-27	24,2	26,2	25,7	25,8	24,2	25,9	24,5
C-28	181,5	181,8	178,2	178,3	182,9	182,9	182,5
C-29	16,6	33,1	17,0	33,0	16,9	33,0	27,9
C-30	21,4	23,8	21,2	23,6	21,2	23,6	16,9
OCH ₃	-	-	51,5	51,4	-	-	-

5.5 Atividade Biológica das Substâncias Isoladas

Os triterpenos isolados das frações que apresentaram atividade foram submetidos aos bioensaios para determinar o potencial destes como agentes antifúngicos e/ou antineoplásicos potenciais, seguindo os procedimentos já descritos nos capítulos anteriores.

A **Tabela 5.5** apresenta os resultados obtidos nos ensaios biológicos para as substâncias isoladas de *Bathysa meridionalis* L. Os resultados são expressos como IC_{12} (Rad⁺; RS 321 e Rad 52Y) ($\mu\text{g/ml}$) ou $DR_{\min}$ (*C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*) (μg).

Tabela 5.5 Dados de bioatividade (IC_{12} e $DR_{\min}$) das substâncias isoladas de *Bathysa meridionalis* L.

Substâncias	Microorganismos			
	IC_{12} ($\mu\text{g/mL}$)			$DR_{\min}$ (μg)
	Rad ⁺	RS 321	Rad 52Y	<i>C. cladosporioides</i>
16-17	634	102	289	10
18-19	725	112	346	10
20-21	435	96	280	10
22	318	45	272	5
Camptotecina	20	-	0,6	-
Streptonigrina	-	0,2	-	-
Nistatina	-	-	-	1

Os triterpenos isolados apresentaram atividade fungitóxica moderada se comparados ao antibiótico comercial nistatina. A resposta seletiva no ensaio com leveduras mutantes de *S.*

cerevisiae, principalmente para os triterpenos **20**, **21** e **22**, com relação ao mutante RS 321 é um indicativo de que estas substâncias têm sua atividade ligada à enzima topoisomerase I.

Muitos triterpenos com atividades citotóxicas foram isolados de diversas espécies de plantas (Barnes, *et al.* 1979; Valisolalao, *et al.* 1978; Kupchan, *et al.* 1978). As sapelinas A e B apresentaram atividade contra células do linfoma humano P-388 e contra células de carcinoma epidermoide 9KB (Jolad, *et al.* 1977). A atividade antifúngica *in vitro* de triterpenos pentacíclicos como a hederagenina e o ácido oleanólico já havia sido demonstrada, utilizando-se como microorganismo alvo o fungo *Saccharomyces carlsbergensis*, apresentando alta atividade antifúngica (Anisimov, *et al.* 1979). Os triterpenos tetracíclicos encontrados em *Panax ginseng* (Araciaceae) da China, conhecidos como ginsenosídeos tem sido reputados como estimuladores do sistema nervoso central, hipoglicêmicos e hipotensivos (Takahashi, *et al.* 1980). O efeito do ácido ursólico e de seus derivados no metabolismo dos lipídios foi estudado, revelando considerável diminuição nos níveis de colesterol, β -lipoproteína e fosfolipídeos no sangue de coelhos com arteriosclerose induzida (Fernandez-Fernandez, J. M. *et al.* 1980). Os resultados deste trabalho vêm se somar a estes, indicando os ácidos triterpênicos pentacíclicos como potenciais agentes antifúngicos e antineoplásicos.

5.6 Proposta biossintética para as substâncias isoladas

Triterpenos são formados a partir da junção eletrofílica "cabeça-cabeça" de duas moléculas de farnesil pirofosfato dando origem ao hidrocarboneto esqualeno. A ciclização do esqualeno, via um intermediário esqualeno-2,3-óxido é catalisada por uma flavoproteína que requer como cofatores O_2 e NADPH. Os diversos esqueletos tetra e pentacíclicos derivam do cátion protosterila ou do cátion damarenila formados, e dos rearranjos destes cátions que pelo deslocamento de grupos alquila e metila formam os esqueletos oleano e ursano. A Figura 5.9 apresenta uma proposta biossintética, baseada nesta rota, para os triterpenos isolados de *Bathysa meridionalis* L.

Figura 5.9 Biogênese proposta para as substâncias isoladas de *Bathysa meridionalis* L.

5.7 Estudo do Óleo Essencial de *Bathysa meridionalis* L.

As folhas secas de *Bathysa meridionalis* L. (34 g) foram hidrodestiladas utilizando-se um aparato do tipo Clevenger, obtendo-se 0,65% de rendimento (0,23 ml). O óleo essencial obtido foi submetido a análise por CG, sendo seus componenetes, identificados pelo índice de Kováts (Davies, 1999; Kováts, 1958) e por coinjeção com padrões. Dez substâncias foram identificadas como componentes majoritários: três monoterpenos e sete sequiterpenos. As substâncias mais abundantes no óleo essencial são o monoterpeno α -pineno e os sequiterpenos β -elemeno, β -cariofileno, bisabolenos e nerolidol. A **Tabela 5.6** apresenta os índices de Kováts e percentuais das substâncias identificadas e a **Figura 5.10** apresenta o cromatograma obtido na análise por cromatografia a gás do óleo essencial de *Bathysa meridionalis* L.

Tabela 5.6 Substâncias identificadas no óleo essencial de *Bathysa meridionalis* L.

Substância	IK	%	Identificação
α -pineno	939,87	14,23	IK, P
Limoneno	1023,98	2,34	IK, P
Mentol	1168,75	3,68	P, IK,
Copaeno	1398,97	1,25	IK
β -elemeno	1403,18	19,12	IK
β -cariofileno	1432,40	17,11	P, IK
Cedrano	1465,08	4,16	IK
Bisaboleno	1496,45	13,67	P, IK
Nerolidol	1523,35	21,87	P, IK
Cadaleno	1643,96	1,34	IK

IK = Índice de Kováts; P = coinjeção com padrões.

Figura 5.10 Cromatograma resultante da análise por cromatografia a gás do óleo essencial de *Bathysa meridionalis* L.

Considerações Finais

"À nau capitânia trouxeram uns ouriços verdes de árvores, que na cor queriam parecer de castanheiros, senão quando eram e mais pequenos, e aqueles eram cheios de uns grãos vermelhos pequenos que esmagando-os entre os dedos fazia tintura muito vermelha, da que eles andavam tintos."
Pero Vaz Caminha: carta a El-Rei D. Manuel, 1500

Nossas matas vem sendo alvo da admiração e cobiça desde os tempos em que por aqui aportaram nossos compatriotas Portugueses, que levaram para a Europa e copiaram de nossos indígenas o uso de corantes, fragrâncias, estimulantes e remédios frutos da biodiversidade de nosso continente. Foi assim que a curiosidade de cientistas se voltou principalmente para aqueles mesmos vegetais. Apesar de todos os avanços da química, bioquímica e fitoquímica, o conhecimento, em sua totalidade, da diversidade química e principalmente da atividade biológica das substâncias de nossa flora ainda encontram-se tão distantes quanto *Caminha* de seu rei *D. Manuel*.

As plantas investigadas neste trabalho foram selecionadas levando-se em consideração alguns fatores fundamentais na busca de princípios ativos como: indicações do uso popular da planta, abundância e relevância da família e gênero quanto as substâncias com atividade biológica já

CONSIDERAÇÕES FINAIS

descritas. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram substâncias, algumas inéditas, com atividades biológicas significativas, como os polissulfetos de *P. alliacea* L. A presença de cumarinas e diterpenos em *Psychotria spectabilis* S., deixa claro que a química de Rubiaceae necessita ainda de estudos mais detalhados, já que cumarinas não haviam sido descritas na literatura como constituintes nem no gênero *Psychotria* nem na família Rubiaceae e diterpenos só haviam sido isolados no gênero *Coffea*, com esqueleto do tipo caurano. Os triterpenos isolados da espécie *Bathysa meridionalis* L., apesar de já descritos na literatura, não tinham sido relatados, com exceção dos ácidos ursólico e oleanólico, como substâncias bioativas. Nenhum dos óleos essenciais descritos no trabalho haviam sido estudados anteriormente. Como pode ser observado muitos resultados promissores quanto aos aspectos químicos e farmacológicos foram obtidos, alguns comparáveis a produtos terapêuticos comerciais.

Estes resultados só foram possíveis devido à colaboração de diversos grupos de pesquisa (NUBE, LQPN-USP, NPPN-UFRJ e Instituto Botânico). Esta abordagem inovadora de trabalho em pesquisa de produtos naturais *multi* ou *trans*-disciplinar, envolvendo diversos grupos de pesquisa, cada um com suas particularidades e competências, é outro ponto a se destacar deste trabalho. No Brasil, algumas questões no que tange à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico ainda são passíveis de discussão: quantos e quais projetos são relevantes? Os objetivos ainda continuarão sendo estabelecidos por força do mercado? A universidade continuará sendo a única vetora, ou a indústria nacional irá participar deste processo conjunta ou individualmente? Precisamos de uma mega-indústria ou pequenos e diversos centros trabalhando em colaboração poderão estabelecer e realizar as pesquisas de formas mais realistas?

Talvez os resultados positivos apresentados neste trabalho possam esclarecer algumas destas questões. Novos alvos celulares precisam ser estabelecidos e novos métodos de bioensaios para triagem de substâncias bioativas também. A falta de ensaios em batelada ainda é uma falha importante e graças a isso muitas substâncias continuam "engavetadas". No novo mundo "globalizado", países que fazem ciência de qualidade possuem o monopólio de patentes e substâncias medicamentosas. É urgente, portanto, a criação de novos institutos tecnológicos que,

CONSIDERAÇÕES FINAIS

junto com as universidades, façam a ponte entre pesquisadores e indústria. O Prohem e o novo CTA (Centro de Tecnologia da Amazônia) são, sem dúvida, um avanço neste sentido.

Espera-se que, no futuro, muitos núcleos de pesquisa no Brasil tenham atenção dos órgãos governamentais no sentido de que seja implantada uma política científica orientada para o desenvolvimento de fitofármacos novos e importantes, de origem essencialmente brasileira; e que as indústrias nacionais se manifestem, pois só assim poderemos impulsionar o desenvolvimento da fitoterapia no Brasil. Cabe aqui mencionar as palavras de Dom Helder Câmara, por ocasião do simpósio mundial ECO-RIO no Rio de Janeiro: *"Quando sonhamos sozinhos é só um sonho. Quando sonhamos juntos é o começo de uma nova realidade"*.

PART II

Espectros

ESPECTRO 1: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 1 (300MHz, CDCl_3)	120
ESPECTRO 2: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 1 (EXPANSÃO) (300MHz, CDCl_3)	121
ESPECTRO 3: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 1 PND (75MHz, CDCl_3)	122
ESPECTRO 4: ESPECTRO DE IV DE 1 (FILME KBr)	123
ESPECTRO 5: ESPECTRO DE MASSAS DE 1 (70 eV)	124
ESPECTRO 6: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 2 (300MHz, CDCl_3)	125
ESPECTRO 7: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 2 PND (75MHz, CDCl_3)	126
ESPECTRO 8: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 2 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)	127
ESPECTRO 9: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 3 (300MHz, CDCl_3)	128
ESPECTRO 10: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 3 PND (75MHz, CDCl_3)	129
ESPECTRO 11: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 3 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)	130
ESPECTRO 12: ESPECTRO DE MASSAS DE 3 (70 eV)	131
ESPECTRO 13: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 4 (300MHz, CDCl_3)	132
ESPECTRO 14: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 4 PND (75MHz, CDCl_3)	133
ESPECTRO 15: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 4 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)	134
ESPECTRO 16: ESPECTRO DE MASSAS DE 4 (70 eV)	135
ESPECTRO 17: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 5 (300MHz, CDCl_3)	136
ESPECTRO 18: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 5 PND (75MHz, CDCl_3)	137
ESPECTRO 19: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 5 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)	138
ESPECTRO 20: ESPECTRO DE MASSAS DE 5 (70 eV)	139
ESPECTRO 21: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 6 (300MHz, CDCl_3)	140
ESPECTRO 22: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 6 PND (75MHz, CDCl_3)	141
ESPECTRO 23: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 6 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)	142
ESPECTRO 24: ESPECTRO DE MASSAS DE 6 (70 eV)	143
ESPECTRO 25: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 7 (300MHz, CDCl_3)	144
ESPECTRO 26: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 7 PND (75MHz, CDCl_3)	145

ESPECTROS

ESPECTRO 27: ESPECTRO DE MASSAS DE 7 (70 eV).....	146
ESPECTRO 28: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 8 (300MHz, CDCl_3)	147
ESPECTRO 29: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 8 PND (75MHz, CDCl_3)	148
ESPECTRO 30: ESPECTRO DE MASSAS DE 8 (70 eV).....	149
ESPECTRO 31: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 9 (300MHz, CDCl_3)	150
ESPECTRO 32: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 9 PND (75MHz, CDCl_3)	151
ESPECTRO 33: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 9 DEPT-135 $^\circ$ (75MHz, CDCl_3).....	152
ESPECTRO 34: ESPECTRO DE IV DE 9 (FILME KBr).....	153
ESPECTRO 35: ESPECTRO DE MASSAS DE 9 (70 eV).....	154
ESPECTRO 36: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 10 (300MHz, CDCl_3)	155
ESPECTRO 37: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 10 PND (75MHz, CDCl_3)	156
ESPECTRO 38: ESPECTRO DE IV DE 10 (FILME KBr).....	157
ESPECTRO 39: ESPECTRO DE MASSAS DE 10 (70 eV).....	158
ESPECTRO 40: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 11 (300MHz, METANOL).....	159
ESPECTRO 41: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 11 (EXPANSÃO) (300MHz, METANOL).....	160
ESPECTRO 42: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 11 PND (75MHz, METANOL).....	161
ESPECTRO 43: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 11 DEPT-135 $^\circ$ (75MHz, METANOL).....	162
ESPECTRO 44: ESPECTRO DE IV DE 11 (FILME KBr).....	163
ESPECTRO 45: ESPECTRO DE MASSAS DE 11 (70 eV).....	164
ESPECTRO 46: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 12 (300MHz, METANOL).....	165
ESPECTRO 47: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 12 (EXPANSÃO) (300MHz, METANOL).....	166
ESPECTRO 48: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 12 PND (75MHz, METANOL).....	167
ESPECTRO 49: ESPECTRO DE IV DE 12 (FILME KBr).....	168
ESPECTRO 50: ESPECTRO DE MASSAS DE 12 (70 eV).....	169
ESPECTRO 51: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 13 (300MHz, CDCl_3)	170
ESPECTRO 52: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 13 (EXPANSÃO) (300MHz, CDCl_3).....	171
ESPECTRO 53: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 13 PND (75MHz, CDCl_3)	172
ESPECTRO 54: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 13 DEPT-135 $^\circ$ (75MHz, CDCl_3).....	173
ESPECTRO 55: ESPECTRO DE IV DE 13 (FILME KBr).....	174
ESPECTRO 56: ESPECTRO DE MASSAS DE 13 (70 eV).....	175

ESPECTROS

ESPECTRO 57: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 14 (300MHz, METANOL).....	176
ESPECTRO 58: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 14 (EXPANSÃO) (300MHz, METANOL).....	177
ESPECTRO 59: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 14 PND (75MHz, METANOL).....	178
ESPECTRO 60: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 14 DEPT-135° (75MHz, METANOL).....	179
ESPECTRO 61: ESPECTRO DE IV DE 14 (FILME KBr).....	180
ESPECTRO 62: ESPECTRO DE MASSAS DE 14 (70 eV).....	181
ESPECTRO 63: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 15 (200MHz, DMSO/ CDCl_3).....	182
ESPECTRO 64: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 15 PND (50MHz, DMSO/ CDCl_3).....	183
ESPECTRO 65: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 16 + 17 (300MHz, CDCl_3)	184
ESPECTRO 66: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 16 + 17 PND (75MHz, CDCl_3)	185
ESPECTRO 67: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 16 + 17 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3).....	186
ESPECTRO 68: ESPECTRO DE IV DE 16 + 17 (FILME KBr).....	187
ESPECTRO 69: ESPECTRO DE MASSAS DE 16 + 17 (70 eV).....	188
ESPECTRO 70: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 18 + 19 (300MHz, CDCl_3)	189
ESPECTRO 71: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 18 + 19 PND (75MHz, CDCl_3)	190
ESPECTRO 72: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 18 + 19 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3).....	191
ESPECTRO 73: ESPECTRO DE IV DE 18 + 19 (FILME KBr).....	192
ESPECTRO 74: ESPECTRO DE MASSAS DE 18 + 19 (70 eV).....	193
ESPECTRO 75: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 20 + 21 (300MHz, CDCl_3).....	194
ESPECTRO 76: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 20 + 21 PND (75MHz, CDCl_3)	195
ESPECTRO 77: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 20 + 21 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3).....	196
ESPECTRO 78: ESPECTRO DE RMN ^1H DE 22 (300MHz, CDCl_3)	197
ESPECTRO 79: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 22 PND (75MHz, CDCl_3)	198
ESPECTRO 80: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE 22 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3).....	199

ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de RMN ^1H de **1** (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 2: Espectro de RMN ^1H de **1** (expansão) (300MHz, CDCl_3)

Espectro 3: Espectro de RMN ^{13}C de 1 PND (75MHz, CDCl_3)

Espectro 4: Espectro de IV de 1 (Filme KBr)

Espectro 5: Espectro de Massas de 1 (70 eV)

Espectro 6: Espectro de RMN ^1H de 2 (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 7: Espectro de RMN ^{13}C de 2 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 8: Espectro de RMN ^{13}C de 2 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 9: Espectro de RMN ^1H de 3 (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 10: Espectro de RMN ^{13}C de 3 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 11: Espectro de RMN ^{13}C de 3 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 12: Espectro de Massas de 3 (70 eV)

Espectro 13: Espectro de RMN ^1H de 4 (300MHz, CDCl_3)

Espectro 14: Espectro de RMN ^{13}C de 4 PND (75MHz, CDCl_3)

Espectro 15: Espectro de RMN ^{13}C de 4 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 16: Espectro de Massas de 4 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 17: Espectro de RMN ^1H de 5 (300MHz, CDCl_3)

Espectro 18: Espectro de RMN ^{13}C de 5 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 19: Espectro de RMN ^{13}C de 5 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 20: Espectro de Massas de 5 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 21: Espectro de RMN ^1H de 6 (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 22: Espectro de RMN ^{13}C de 6 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 23: Espectro de RMN ^{13}C de 6 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 24: Espectro de Massas de 6 (70 eV)

Espectro 25: Espectro de RMN ^1H de 7 (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 26: Espectro de RMN ^{13}C de 7 PND (75MHz, CDCl_3)

Espectro 27: Espectro de Massas de 7 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 28: Espectro de RMN ^1H de 8 (300MHz, CDCl_3)

Espectro 29: Espectro de RMN ^{13}C de 8 PND (75MHz, CDCl_3)

Espectro 30: Espectro de Massas de 8 (70 eV)

Espectro 31: Espectro de RMN ^1H de 9 (300MHz, CDCl_3)

Espectro 32: Espectro de RMN ^{13}C de 9 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 33: Espectro de RMN ^{13}C de 9 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 34: Espectro de IV de 9 (Filme KBr)

Espectro 35: Espectro de Massas de 9 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 36: Espectro de RMN ^1H de 10 (300MHz, CDCl_3)

Espectro 37: Espectro de RMN ^{13}C de 10 PND (75MHz, CDCl_3)

Espectro 38: Espectro de IV' de 10 (Filme KBr)

Espectro 39: Espectro de Massas de 10 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 40: Espectro de RMN ^1H de **11** (300MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 41: Espectro de RMN ^1H de **11** (expansão) (300MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 42: Espectro de RMN ^{13}C de **11** PND (75MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 43: Espectro de RMN ^{13}C de **11** DEPT-135° (75MHz, Metanol)

Espectro 44: Espectro de IV de 11 (Filme KBr)

Espectro 45: Espectro de Massas de 11 (70 eV)

Espectro 46: Espectro de RMN ^1H de 12 (300MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 47: Espectro de RMN ^1H de 12 (expansão) (300MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 48: Espectro de RMN ^{13}C de 12 PND (75MHz, Metanol)

Espectro 49: Espectro de IV de 12 (Filme KBr)

Espectro 50: Espectro de Massas de **12** (70 eV)

Espectro 51: Espectro de RMN ^1H de 13 (300MHz, CDCl_3)

Espectro 52: Espectro de RMN ^1H de **13** (expansão) (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 53: Espectro de RMN ^{13}C de **13** PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 54: Espectro de RMN ^{13}C de 13 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 55: Espectro de IV de 13 (Filme KBr)

Espectro 56: Espectro de Massas de 13 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 57: Espectro de RMN ^1H de **14** (300MHz, Metanol)

Espectro 58: Espectro de RMN ^1H de **14** (expansão) (300MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 59: Espectro de RMN ^{13}C de **14** PND (75MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 60: Espectro de RMN ^{13}C de **14** DEPT-135° (75MHz, Metanol)

ESPECTROS

Espectro 61: Espectro de IV de 14 (Filme KBr)

Espectro 62: Espectro de Massas de 14 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 63: Espectro de RMN ^1H de 15 (200MHz, DMSO/ CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 64: Espectro de RMN ^{13}C de 15 PND (50MHz, DMSO/ CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 65: Espectro de RMN ^1H de **16** + **17** (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 66: Espectro de RMN ^{13}C de **16 + 17** PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 67: Espectro de RMN ^{13}C de **16 + 17** DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 68: Espectro de IV de 16 +17 (Filme KBr)

Espectro 69: Espectro de Massas de 16 + 17 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 70: Espectro de RMN ^1H de 18 + 19 (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 71: Espectro de RMN ^{13}C de 18 + 19 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 72: Espectro de RMN ^{13}C de **18 + 19** DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 73: Espectro de IV de 18 +19 (Filme KBr)

Espectro 74: Espectro de Massas de 18 + 19 (70 eV)

ESPECTROS

Espectro 75: Espectro de RMN ^1H de **20 + 21** (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 76: Espectro de RMN ^{13}C de 20 + 21 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 77: Espectro de RMN ^{13}C de 20 + 21 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Espectro 78: Espectro de RMN ^1H de 22 (300MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 79: Espectro de RMN ^{13}C de 22 PND (75MHz, CDCl_3)

ESPECTROS

Espectro 80: Espectro de RMN ^{13}C de 22 DEPT-135° (75MHz, CDCl_3)

Referências bibliográficas

- Adelson, P. H. *Science*, **247**, (1990), 513.
- Adesogan, E. K. *J. Chem. Somm.* (1974), 906.
- Aimi, N.; Likhitwitauawuid, K.; Goto, J.; Ponglux, D.; Haginiwa, J. e Sakai, S. *Tetrahedron*, **45**(13), (1989), 4125.
- Anisimov, M. M.; ShCheglov, V. V.; Strigina, L. I.; Chetyrina, W. S.; Uvarova, N. I.; Oshitok, G. I.; Alad'ma, W. G.; Vecherko, L. P. e Zonia, A. D. *Izv. Akad. Nauk, SSSR Ser. Biol.*, (1979), 570.
- Anônimo, *Lancet*, **343**, (1994), 1513.
- Arnold, R. W.; Dobberstein, R.H. e Farnsworth, N.R. *Lloydia*, **40**(5), (1977), 515.
- Austin, D. J. e Brown, S. A. *Phytochemistry*, **12**, (1973), 1657.
- Balandrim, M. F., Klocke, J. A. e Bollinger, W. H., *Science*, **285**, (1985), 1154.
- Balandrin, M. F.; Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R., *American Chemical Society, Washington, Sym.Ser.* (1993), 534.
- Barnes, P. J.; Brassel, S. C.; Comet, P.; Eglinton, G.; McEvoy, J.; Maxwell, J. R.; Wardropper, A. M. K.; e Volkman, J. K. *Initial Report of the Deep Sea Drilling Project*, **48**, (1979), 965.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M., *The American Journal of Clinical Pathology*, **45**, (1966), 493.
- Bennini, B.; Chulia, A. J.; Kaouadji, M. e Thomasson, F. *Phytochemistry*, **31**(7), (1992), 2483.
- Berger, I.; Barrientos, A. C.; Cárceres, A.; Hernández, M.; Rastrelli, L.; Passreiter, C. M. e Kubelka, W. J. *Ethnopharmacology*, **62**, (1998), 107.
- Betina, V., *J. of Chromatography*, **78**, (1973), 41.
- Bohlmann, F. G. M. e Schwarz, H. *Chem. Ber.*, **106**, (1973), 2479.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolzani, V. da S., Gunatilaka, A. A. L. e Kingston, D. G. I., *J. Nat. Prod.*, **26** (1994), 654.
- Bolzani, V. da S., Gunatilaka, A. A. L. e Kingston, D. G. I., *Tetrahedron*, **54** (1994), 482.
- Bolzani, V., Trevisan, L. e Young, C. M. *Phytochemistry*, **30**, (1991), 2089.
- Brito, N. R. S. *Perfil Químico de Famílias de Angiospermas*, Tese de Doutorado, IQ-USP, (1986).
- Bruheton, J., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier publishing, Secaucus, NY, (1995).
- Buccheri, V. *Fármacos Antineoplásicos em Farmacologia Integrada*, Atheneu, **2**, (1991).
- Calabresi, P. e Parks Jr, R. E. *Quimioterapia de Doenças Neoplásicas em As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 7 ed., Guanabara Koogan, (1990), 813.
- Cárceres, A.; López, B.; González, S.; Berger, I.; Tada, I. e Maki, Jun J. *Ethnopharmacology*, **62**, (1998), 195.
- Chan, K. K.; Giannini, D. D.; Cain, A. H.; Roberts, J. D. e Prter, W. *Tetrahedron*, **33**, (1977), 899.
- Chung, J. G. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, (1999), 327
- Dahlgren, R. M. T., *Bot. J. Linn. Soc.*, **80**, (1980), 91.
- Davies, N. W. *Journal of Chromatography*, **503**, (1990), 1.
- de Sousa, J. R.; Demuner, A. J.; Pedersoli, J. L. e Afonso, A. M. M. *Ciência e Cultura*, **39**, (1987), 645.
- de Sousa, J. R.; Demuner, A. J.; Pinheiro, J. A.; Bretmair, E. e Cassels, B. K. *Phytochemistry*, **29**, (1990), 3653.
- Delaveau, P.; Lallouette, P. e Tessier, H. M. *Planta Medica*, **40**(1), (1980), 49.
- Downum, K. R., Romeo, J. T. e Stafford, H. A. *Recent Advance in Phytochemistry em: Phytochemical Potential of Tropical Plants*, **27**, (1993), 299.
- Emeruwa, A. C., *Lloydia*, **45**, (1982), 123.
- Eng, W. K. L.; Johnson, R. K. e Stenglantz, R. *Mol. Farmacol.*, **34**, (1988), 775.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Eng, W.-K., Faucette, L., Johnson, K. R. e Stenglanz, R., *Mol. Pharmacol.* **34**, (1988), 775.
- Engler, A. *Syllabus der Pflanzenfamilien*, **2**, (1964), 421.
- Farnsworth, N. R. e Sojarto, D. D. *Econ-Bot.*, **39**, (1995), 231.
- Farnsworth, N. R., *The Role of Medicinal Plants and Drugs Development in Natural Products and Drugs Development* Krogsgaard-Larsen, P., Christensen, S. B., Kopad, H. Eds. Balliere, Tindall and Cox, London, (1984).
- Farnsworth, N. R. e Soerjarto, D. D.; *The Conservation of Medicinal Plants*, Akerele, H. V. e Synge, H. eds., Cambridge University Press, Cambridge, (1991).
- Farnsworth, N. R.; Akerele, °; Bingel, A. S., Soejarto, D. D.; Guo, Z., *Bull. Who*, **63**, (1985), 965.
- Fernandez-Fernandez, J. M.; Vives, F. e Gomez-Capilla, J. A. *Horm. Metab. Res.*, **12**, (1980), 221.
- Germano, D. H. P.; Caldeira, T. T. O.; Mazella, J. A. A. e Bacchi, E. M., *Fitoterapia*, **64**(5), (1993), 459.
- Germano, D. H. P.; Sertié, J. A. A. e Bacchi, E. M., *Fitoterapia*, **64**(3), (1995), 195.
- Gottlieb, O. R. e Salatino, A. *Ciência e Cultura*, **39**(8), (1987), 707.
- Gunatilaka, A. A. L., Samaranayake, G. e Kingston, D. G.I., *J. Nat. Prod.*, **55**, (1992), 1648.
- Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I. e Johnson, R. K. *Pure & Appl. Chem.*, **66**(10), (1994), 2219.
- Harrigan, G. G., Gunatilaka, A. A. L. e Kingston, D. G. I., *J. Nat. Prod.*, **57**, (1994), 68.
- Hayakawa, K.; Yodo, M.; Ohsuki, S. e Kanematsu, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, (1984), 6735.
- Heltzel, C. E., Gunatilaka, A. A. L. e Kingston, D. G. I., *J. Nat. Prod.*, **57**, (1994), 620.
- Hoehne, F. C. *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais*. Depto. de Botânica do Estado, Graphicars, (1939).
- Homans, L. A., Fuchs, A., *J. of Chromatog.*, **51**, (1970), 327.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hufford, A. e Clark, A., *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, ed, Elsevier, Amsterdam, **2v**, (1988), 421.
- Janssen, M.; Scheffer, J. J. C. e Svendsen, A. B., *Planta Medica*, **40**, (1987), 143.
- Johnson, R. K., Bartus, H. F., Hofmam, G. A., Bartus, J. O. L., Mong, S.-M., Faucette, L. F., McCabe, J. A. C. e Mirabelli, C. K. *In vitro and in vivo Models for Detection of the New Antitumor Drugs*, Hanka, L. J., Kondo, T. e White, R. J., eds. Organizing Committee of the 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto, (1986), 15.
- Joland, S. D.; Wiedhopf, R.M. e Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.*, **66**, (1977), 889.
- Kanne, D.; Straub, K.; Hearst, J. E.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, (1982), 6754.
- Kinghorn, A. D. e Kennelly, E. J., *Journal of Chemical Education*, **72**, (1995), 676.
- Kinghorn, A. D. e Seo, E. K., *Agricultural Materials as Renewable Resources*, Fuller, G.; McKeon, T. A. e Bills, D. D. eds., American Chemical Society, Washington, **12v**, (1996), 179.
- Kornhauser, A.; Warner, W. G. e Giles, A. L. Jr. *Science*, **217**, (1982), 733.
- Kováts, E. *Helvetica Chimica Acta*, **7**(206), (1958), 1915.
- Kupchan, S. M.; Meshulan, H. e Sneden, A. T. *Phytochemistry*, **17**, (1978), 767.
- Lawsom, L. D.; Wang, Z. J. e Hughes, B. G. *Planta Medica*, **57**, (1991), 363.
- Lawson, L. D. *Human Medicinal Agents from Plants*, ACS Symposium Series, **534**, (1993), 306.
- Leven, M.; Van den berghe, D. A.; Mertens, F.; Vlietinck, A. e Lammens, E., *Planta Medica*, **36**, (1979), 311.
- Liang, Z. Z.; Aquino, R.; Feo, V. D.; Simone, F. D. e Pizza, E. *Planta Medica*, **56**, (1990), 330.
- Libot, F.; Miet, C.; Kunesch, N. e Poisson, J. E. *J. of Nat. Prod.*, **50**(3), (1987), 468.
- Maciel, M. A.; Pinto, A. C.; Arruda, A. C.; Pamplona, S. G. S. R.; Vanderlinde, F. A.; Lapa, A. J.; Echevarria, A.; Grynberg, N. F.; Côlus, I. M. S.; Farias, R. A. F.; Costa, A. M. L. e Rao, V. S. N. *Journal of Ethnopharmacology*, **70**, (2000), 41.
- Mahato, S. B. e Kundu, A. P. *Phytochemistry*, **37**(6), (1994), 1517.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mann, J. *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Davies, S.G. ed., Oxford Univ. Press, (1994).
- Markham, K. R.; Ternai, B.; Stanley, R.; Geiger, H. e Mabry, T. J. *Tetrahedron*, **34**, (1978), 1389.
- McElmay, J. C. e Li, W. P. A. *Pharm. J.*, **246**, (1991), 324.
- Mendelsohn, R.; Balick, M., *J. Econ. Bot.*, **49**, (1995), 223.
- Mitscher, L. A., Drake, S., Gollapudi, S. R. e Okwute, S. K., *J. Nat. Prod.*, **50**, (1987), 1025.
- Morton, J. F. *Quart. J. of Crude Drug Res.*, **15**, (1977), 165.
- Morton, J. F. *Quart. J. of Crude Drug Res.*, **15**, (1977), 165.
- Nadir, D. M. T., Abdval-Baqi, J.; Al-Sarraj, S. M. e Hussein, W. A., *Fitoterapia*, **57**, (1986), 359.
- Nathan, P. J.; Domínguez, M. e Ortega, D. A. *J. Heterocyclic Chem.*, **21**, (1984), 1141.
- Nigg, H. N. e Seigler, D., *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*, Plenum, New York, (1992), 444.
- Noltenius, H. *Biologie der Krankheiten em: Urban & Schwarzenberg*, Berlim, Wien, Munchen (1974).
- Numata, A.; Yang, P.; Takahashi, C.; Fujiki, R.; Nabae, M. e Fijita, E. *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **37**, (1989), 648.
- Olea, R. S. G. e Roque, N. F. *Química Nova*, **13**(4), (1990), 278.
- Olea, R. S. G. *Terpenoides e Flavonóides de Alibertia sessilis (Rubiaceae)*, Tese de Doutorado, IQ-USP, (1995).
- Parker, H. G. e Evans, A. E. Z. *Epidemiology of aromatic amine cancers em: Chemical Carcinogens*, Searle, C. E. ed., ACS, Washington, (1984)., 277.
- Parsons, B. J.; *Photochem. Photobiol.*, **32**, (1980), 813.
- Pio Correa, M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Ministério da Agricultura, (1969).
- Rahalison, L.; Hamburger, M.; Monod, M.; Frenk, E. e Hostettmann, K., *Planta Med.* **60**, (1993), 41.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chromatography*, **841**, (1999), 165.
- Ville, R. G. e Morris, A. G. *The Multiple Molecular Mechanisms of Cancer em: Intruduction to the Molecular Genetics of Cancer*, John & Sons Ltd, (1992).
- Von Szczepanski, Ch.; Zgorzelak, P. e Hoyer, G. A. *Arzneim. Forsch.*, **22**, (1972), 1975.
- Wasicky, R. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica USP*, **1**, (1963), 77.
- Wheelwrigh, E. G. *Medicinal Plants and their History*, Dover Publications, New York, (1974).
- Willians, L. A. D.; The, T. L.; Gardner, M.T.; Fletcher, C. K.; Naravane, A.; Gibbs, N. e Fleishhacker, R. *Phytotherapy research*, **11**, (1997), 251.
- Woo, W. S. e Wagner, H., *Phytochemistry*, **16**, (1977), 1845.
- Woo, W. S., *Phytochemistry*, **13**, (1974), 2887.