## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Instituto de Química

# TRITERPENOS DE Alibertia edulis A. RICH (RUBIACEAE)

Cláudia Barbosa Brochini Dissertação de Mestrado

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nidia Franca Roque orientadora

São Paulo -1993-

#### TRITERPENOS DE <u>ALIBERTIA</u> EDULIS A. RICH (RUBIACERE)

CLAUDIA BARBOSA BROCHINI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos Requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Cièncias - Area: Química Orgânica.

Aprovada por:

Profa. Dra. Nidia Franca Roque IQ-U5P (Drientadora e Presidenta)

Profa. Dra. Liliana Marzorati IQ-USP

Profa. Dra. Ligia Maria Vettorato Trevisan IQ-UNESP-Araraquara

> SAO PAULO SP 10 DE MAID DE 1993

O presente trabalho foi realizado sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nidia Franca Roque

.

Aos meus pais José Carlos e Darli

Aos meus irmãos Antonio Carlos, José Augusto e Fernanda

.

## Agradecimentos

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nidia Franca Roque, pela confiança, paciência e amizade.

Aos professores do grupo de Produtos Naturais, Zenaide M. G. S. Ferreira, Massayoshi Yoshida, Marden A. Alvarenga, Vicente de P. Emerenciano, Massuo J. Kato, Mário Motidome e Otto R. Gottlieb, pelo auxílio e cooperação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanderlan da Silva Bolzani, pela valiosa colaboração e amizade.

Ao Walmir, pela coleta do material vegetal.

Ao Dirceu, pelas valiosas sugestões dadas no decorrer deste trabalho.

Ao Sergio e Gilberto, pelo companheirismo e grande auxilio na confecção desta se.

tese.

Ao Alberto, pela ajuda no uso do HPLC.

Às amigas Ana Luísa, Dulce Helena, Maria Cristina, Mariana e Clara, pelo apoio e amizade.

À D. Marina, Sr. Zé, Eva e Walter, pela assistência.

À todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais, pelo convívio agradável e companheirismo.

Aos funcionários da Central Analítica, pela obtenção de todos os espectros. Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

# Índice geral

	р.
Índice de tabelas	
Índice de espectros	III
Abreviaturas	IV
Resumo	V
Abstract	VI
Introdução	
A família Rubiaceae	1
Materiais e métodos	
Especificação do material e instrumentos utilizados	4
Figura 1- Estruturas das substâncias isoladas de Alibertia edulis	6
Experimental	9
Obtenção dos extratos	9
Esquema 1- Obtenção dos extratos	10
Partição do extrato bruto etanólico	11
Isolamento dos contituintes químicos	
Fracionamento dos extratos hexânicos	12
Fracionamento dos extratos clorofórmico e etérico	15
Fracionamento cromatográfico da fração C-6	16
Fracionamento cromatográfico da fração C-8	17
Fracionamento cromatográfico da fração C-11	18
Elucidação estrutural	20
Identificação dos constituintes das misturas	21
Identificação dos constituintes da mistura MB	24
Identificação dos constituintes da mistura MC	26
Identificação dos constituintes da mistura MD	
Identificação dos constituintes da mistura ME	
Determinação estrutural do éster metílico do ácido	
3β,19α,23,24-tetraidroxiolean-12-en-28-óico	
Esquema 2- Proposta de fragmentação de massas para 10a	
Identificação dos constituintes da mistura MA	
Dados fisicos para <u>9a</u> e <u>10a</u>	40
Discussão final	41
Referências bibliográficas	71

## Índice de tabelas

	p.
Tabela 1- Substâncias encontradas nos gêneros de Gardeniinae	2
Tabela 2- Fracionamento cromatográfico dos extraros hexânicos	12
Tabela 3- Fracionamento cromatográfico da fração A-9	13
Tabela 4- Fracionamento dos extratos clorofórmico e etérico	15
Tabela 5- Fracionamento cromatográfico da fração C-6	16
Tabela 6- Fracionamento cromatográfico da fração C-8	17
Tabela 7- Fracionamento cromatográfico da fração C-11	18
Tabela 8- Constituintes das misturas	20
Tabela 9- Valores característicos de RMN de <sup>13</sup> C de carbonos sp <sup>2</sup> em triterpenos.	22
Tabela 10- Dados de RMN de <sup>13</sup> C dos átomos de carbonos na função oxigenada.	23
Tabela 11- Dados de RMN de <sup>13</sup> C para <u>3</u> e <u>4</u> : mistura MB	25
Tabela 12- Dados de RMN de <sup>13</sup> C para <u>5</u> e <u>6</u> : mistura MC	27
Tabela 13- Dados de RMN de <sup>13</sup> C para <u>7</u> e <u>8</u> : mistura MD	29
Tabela 14- Dados de RMN para <u>9a</u>	32
Tabela 15- Dados de RMN para <u>10a</u>	35
Tabela 16- Dados de RMN de <sup>13</sup> C para <u>1</u> e <u>2</u> :mistura MA	38
Tabela 17- Dados de RMN de <sup>13</sup> C para <u>11</u> : mistura MA	39

# Índice de espectros

	р
Espectro 1- RMN de <sup>1</sup> H de MB	
Espectro 2- RMN de <sup>13</sup> C de MB	
Espectro 3- DEPT 135º de MB	44
Espectro 4- RMN de <sup>1</sup> H de MC	
Espectro 5- RMN de <sup>13</sup> C de MC	46
Espectro 6- DEPT 135° de MC	47
Espectro 7- RMN de <sup>1</sup> H de MD	
Espectro 8- RMN de <sup>13</sup> C de MD	49
Espectro 9- DEPT 135° de MD	
Espectro 10- RMN de <sup>1</sup> H de ME (metilada)	51
Espectro 11- RMN de <sup>13</sup> C de ME (metilada)	
Espectro 12- DEPT 135° de ME (metilada)	
Espectro 13- RMN de <sup>1</sup> H de ME (metilada e acetilada)	54
Espectro 14- RMN de <sup>13</sup> C de ME (metilada e acetilada)	55
Espectro 15- RMN de <sup>13</sup> C de <u>9a</u>	56
Espectro 16- DEPT 135º de <u>9a</u>	57
Espectro 17- RMN de <sup>1</sup> H de <u>9a</u>	
Espectro 18- espectro de massas de <u>9a</u>	59
Espectro 19- espectro I.V. de <u>9a</u>	60
Espectro 20- RMN de <sup>1</sup> H de <u>10a</u>	61
Espectro 21- ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <u>10a</u>	62
Espectro 22- RMN bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (COSY) de <u>10a</u>	63
Espectro 23- RMN de <sup>13</sup> C de <u>10a</u>	64
Espectro 24- DEPT 135º de <u>10a</u>	65
Espectro 25- espectro de massas de <u>10a</u>	66
Espectro 26- espectro de I.V. de <u>10a</u>	67
Espectro 27- RMN de <sup>1</sup> H de MA	68
Espectro 28- RMN de <sup>13</sup> C de MA	68
Espectro 29- DEPT 135° de MA	70

## **Abreviaturas**

CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência RDA: retro Diels-Alder EtOH: etanol DCM: diclorometano MeOH: metanol AcOEt: acetato de etila AcOH: ácido acético AcO<sup>-</sup>: acetato I.V.: infravermelho

## Resumo

A família Rubiaceae se caracteriza por produzir uma grande variedade de metabólitos secundários. Alcalóides, triterpenos iridóides e antraquinonas destacam-se entre os produtos naturais de maior ocorrência nas rubiaceas. Espécies desta família ocorrem com frequência no cerrado brasileiro, sendo que o gênero <u>Alibertia</u>, não havia sido estudado até recentemente.

O presente trabalho, que é o primeiro com a espécie <u>Alibertia edulis</u> A. Rich, descreve o isolamento, identificação e determinação estrutural de triterpenos presentes nas folhas de um espécimen coletado nas proximidades de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

O estudo da fração clorofórmica do extrato etanólico mostrou a ocorrência predominante de triterpenos. Foram isolados através dos métodos cromatográficos usuais (coluna e placa preparativa), os pares oleanano-ursano urs-12-en-3 $\beta$ ,28-diol e olean-12-en-3 $\beta$ ,28-diol; 3 $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-óico e 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-óico; 3 $\beta$ ,23-diidroxiurs-12-en-28-óico e 3 $\beta$ ,23-diidroxiolean-12-en-28-óico, que foram identificados através dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H. A mistura dos ésteres metílicos dos ácidos 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-tetraidroxiolean-12-en-28-óico e 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-tetraidroxiolean-12-en-28-óico e 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-tetraidroxiolean-12-en-28-óico seus componentes. Destes, o triterpeno com esqueleto tipo ursano foi identificado pelos seus espectros de RMN de <sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H. Como não foi encontrado registro na literatura do triterpeno com esqueleto oleanano, a determinação estrutural deste foi feita por comparação com os dados de RMN do éster metílico do ácido 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-tetraidroxiur-12-en-28-óico, associado a uma análise do espectro bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY).

Do extrato hexânico de <u>A</u>. edulis também foi isolada uma mistura, constituída por  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, além de fitol.

## Abstract

The Rubiaceae family affords as secondary metabolites, mainly alkaloids, triterpenes and iridoids. Species of this family are spread in the region of Brazilian "cerrado". The genus <u>Alibertia</u> has not been studied until recently.

This work, the first one with the specie <u>Alibertia</u>. <u>edulis</u> A. Rich, reports the isolation, identification and structural determination of the triterpenes that occurred in the leaves of a specimen colleted in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

The chloroform fraction of the ethanolic extract shows the predominance of triterpene compounds. From this fraction, we isolate, by means of chromatographic procedures, the ursane-oleanane pairs:  $3\beta$ ,28-dihydroxy-urs-12-en and  $3\beta$ ,28-dihydrohy-olean-12-en;  $3\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oic and  $3\beta$ -hydroxyolean-12-en-28-oic;  $3\beta$ ,23-dihydroxyurs-12-en-28-oic and  $3\beta$ ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic;  $3\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-tetrahydroxyolean-12-en-28-oic. The last compound is a new natural product and its structure was determined based on methyl-triacetylated derivative.

From the hexanic extract we isolated  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin and phytol.

## Introdução

## A família Rubiaceae

As rubiaceas constituem uma família essencialmente tropical, composta por 637 gêneros, sendo que mais de 75% destes apresentam forma arbórea.

De acordo com as características biológicas, anatômicas, morfológicas e evolutivas, a família Rubiaceae é dividida em quatro sub-famílias (1):

Cinchonoideae	1
Ixoroideae	2
Antirheoideae	3
Rubioideae	4

Considera-se a sub-família Cinchonoideae como sendo a menos evoluída. Já a sub-família Rubioideae, que é a única característica das regiões temperadas, é considerada como a mais evoluída (1).

No Brasil, onde são registrados 125 gêneros de Rubiaceae, a importância econômica e terapêutica de algumas espécies é bem conhecida. Só na região do estado de São Paulo existem cerca de 204 espécies registradas. Estas apresentam tanto a forma de arbustos como de árvores e crescem principalmente na região do cerrado (2).

O gênero <u>Alibertia</u>, que até recentemente não havia sido estudado (4), está incluído na sub-família Ixoroideae, tribo Gardenieae A. Rich e sub-tribo Gardeniinae. Dentro desta sub-tribo estão classificados 67 gêneros, incluindo <u>Alibertia</u>.

Através de um levantamento bibliográfico cobrindo o período de 1962 a 1992, foi construída a tabela 1, p.2, que mostra as classes de substâncias encontradas nos gêneros estudados de Gardeniinae.

	-									
Gênero	A	В	D	G	G	0	P	R	R	S
(número	L	R	I	Α	E	x	0	A	0	C
de	Ι	E	D	R	N	Y	S	N	Т	Н
espécies	В	N	Y	D	I	A	0	D	н	U
estudadas)	E	A	M	E	P	N	Q	Ι	Μ	Μ
	R	N	0	N	A	Т	U	Α	Α	Α
	Т	I	S	I	(1)	Н	E	(9)	N	N
	I	A	Α	A		U	R		N	N
	A	(1)	L	(19)		S	I		Ι	Ι
	(1)		Р			(2)	A		Α	0
			Ι				(1)		(1)	Р
			N							Н
			X							Y
			(1)							Т
										0
										Ν
										(2)
Saponinas		X		X				X		
Triterpenos	X			X				X		
Iridóides	X			X	X		X	X	X	
Diterpenos			x							
Monoterpenos				X	X					
Esteróides				X		X		X		
Alcalóides										X
Cumarinas				X				X		X
Ác. Graxos				X				X		
Flavonóides				X						
Óleos				X						
Essenciais										
Fenil	X			X						
Propanóides										
Referências	4,5	6	7	8-	56,	58	59	60-	77	78-
				55	57			76		84

Tabela 1- Substâncias encontradas nos gêneros de Gardeniinae

Como pode ser observado pela tabela 1, as plantas da sub-tribo Gardeniinae produzem com destaque saponinas, triterpenos e iridóides. Estas substâncias pertencem à classe dos terpenóides, estando portanto dentro da esfera de interesse do grupo. Além disto, saponinas, triterpenos e iridóides vêm ultimamente despertando grande interesse, não só do ponto de vista estrutural como também farmacológico (3).

Assim, escolheu-se a <u>Alibertia edulis</u> como representante desta sub-tribo, para um estudo fitoquímico, com a finalidade de verificar a constituição química das folhas de um espécimen coletado em Campo Grande (MS).

## Materiais e Métodos

#### Especificação do material e instrumentos utilizados

a. Nas colunas cromatográficas foi utilizada como adsorvente sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) da Merck.

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

c. As revelações foram feitas com vapores de iodo e as irradiações com lâmpadas de ultravioleta chromat UVE, modelo C-3 (254 e 366 nm).

d. As extrações das substâncias após CCDP foram feitas com clorofórmio, acetato de etíla, acetona e metanol como solventes.

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

f. O critério de pureza adotado foi a observação de uma única mancha em CCDC, variando-se o sistema de solvente.

g. Os solventes utilizados foram das marcas Merck, Reagen e B. Herzog, todos grau P.A., com exceção os utilizados em CLAE, que são grau Lichrosolv.

h. Os espectros de infravermelho foram obtidos com o espectrofotômetro Nicolet modelo 510 com transformada de Fourier. Os espectros foram registrados com amostra em pastilha de KBr. O padrão de referência foi a absorção da água em 1638 cm<sup>-1</sup>.

i. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram registrados em espectrômetro Bruker AC200, operando a 200 MHz. Os espectros foram obtidos em deuteroclorofórmio ou deuteropiridina como solvente e padrão de referência interna.

j. Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetro Bruker AC200 operando a 50 MHz. Os espectros foram obtidos utilizando-se deuteroclorofórmio ou deuteropiridina como solvente e padrão de referência interna.

 Os espectros de massas foram registrados em espectrômetros Hewlett-Packard, modelo 5988-A, de baixa resolução. Os espectros foram obtidos através de ionização por impacto de elétrons (EI). m. Os cromatogramas foram efetuados em cromatógrafo líquido Perkin-Elmer Series 3B, com integrador Hewlett-Packard HP 3396A, coluna RP-8 (10 µm; 250x22 mm) da Perkin-Elmer, com solvente metanol, grau Lichrosolv, e água milli-Q, em 210 nm. O fluxo foi ajustado em 10 ml/min.

n. A determinação do poder rotatório específico  $[\alpha]_D$  foi obtida em polarímetro Polamac A, Carl Zediss. As leituras foram feitas em dois comprimentos de onda (546 e 578 nm) e interpoladas para a rotação na raia D do sódio.

o. O ponto de fusão da substância cristalina foi determinado utilizando-se Electrothermal 9100.

7





<u>1</u>-  $\alpha$ -amirina



<u>3</u>- uvaol



5- éster metílico do ácido ursólico



HO

1. ....

<u>2</u>-β-amirina

4- eritrodiol







<u>7</u>-



9- éster metilico do ácido clétrico



8- hederagenina



<u>10</u>-



![](_page_17_Figure_10.jpeg)

.

<u>9a</u>-

<u>10a</u>-

![](_page_18_Figure_0.jpeg)

<u>11</u>- fitol

•

## Experimental

O material botânico de <u>Alibertia edulis</u> A. Rich utilizado no presente trabalho, foi coletado no mês de agosto de 1990, nas proximidades de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul. A exsicata (número 10) desta espécie, encontra-se depositada no herbáreo do Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

## Obtenção dos extratos

As folhas de <u>Alibertia edulis</u> foram secas em estufa e pesadas, resultando em 1600 g. Primeiramente o material foi apenas partido com as mãos e extraído em hexano a frio. Após concentração do solvente sob pressão reduzida, foram obtídos 13 g de extrato hexânico bruto (E.H.I). Após nova secagem das folhas, estas foram moídas e pesadas, resultando em 1500 g. Este material foi então submetido a extrações a frio em hexano e etanol, sucessivamente. As soluções resultantes foram filtradas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Desta maneira, foram obtidos 18,5 g de extrato hexânico bruto (E.H.II) e 274 g de extrato etanólico bruto.

O esquema 1, p. 10, mostra o processo de obtenção dos extratos.

![](_page_20_Figure_0.jpeg)

![](_page_20_Figure_1.jpeg)

#### Partição do extrato etanólico bruto

Foram dissolvidos 57 g de extrato etanólico bruto em EtOH/H<sub>2</sub>O (85:15). Esta solução foi submetida à partição em hexano e clorofórmio, sucessivamente, obtendo-se assim, 3,3 g de extrato hexânico e 9 g de extrato clorofórmico.

Uma segunda partição foi feita utilizando-se 60 g do extrato etanólico bruto, dissolvidos em EtOH/H<sub>2</sub>O (9:1). Desta vez, utilizou-se hexano, éter etílico e n-butanol, sucessivamente, como solventes. Foram obtidos 8 g de extrato hexânico, 8,5 g de extrato etérico e 16,5 g de extrato butanólico.

Após análise em CCDC, os extratos hexânicos E.H.I e E.H.II foram reunidos com as frações hexânicas do extrato etanólico, formando 42,8 g. Também foram reunidos os extratos clorofórmico e etérico, resultando em 17,5 g.

## Isolamento dos constituintes químicos

## Fracionamento dos extratos hexânicos

Os extratos hexânicos brutos resultantes das extrações das folhas não trituradas (E.H.I), trituradas (E.H.II) e da partição com hexano do extrato etanólico bruto, foram reunidos após análise em CCDC. Cerca de 35 g deste material foram cromatografados em coluna de sílica (350 g), eluída com misturas de hexano/AcOEt em gradiente crescente de polaridade, sendo recolhidas 142 frações de aproximadamente 100 ml cada, reagrupadas após análise em CCDC, conforme a tabela 2, p. 12.

Frações reunidas	Massa (g)
A-01 (01-07)	
A-02 (08-16)	0,8
A-03 (17-39)	2,0
A-04 (40-44)	4,6
A-05 (45-48)	2,3
A-06 (49-53)	0,5
A-07 (54-58)	1,9
A-08 (59-68)	2,1
A-09 (69-73)	1,8
A-10 (74-79)	1,0
A-11 (80-85)	3,5
A-12 (86-90)	0,9
A-13 (91-96)	2,0
A-14 (97-105)	1,5
A-15 (106-114)	1,1
A-16 (115-123)	0,8
A-17 (124-138)	0,6
A-18 (139-142)	0,5

Tabela 2- Fracionamento cromatográfico dos extratos hexânicos

Com a finalidade de identificar os triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, foram feitas comparações entre as frações provenientes desta coluna e padrões dos triterpenos procurados. Através desta análise, foram selecionadas as frações A-3, A-4, A-5, A-8, A-9, A-10, A-11, A-12 e A-14, das quais foram registrados espectros de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz). Assim, concluiu-se que a fração A-9 provavelmente conteria as amirinas como constituintes.

Esta fração (1,8 g) foi então cromatografada em coluna, utilizando-se 55 g de sílica e misturas de hexano/AcOEt em gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram recolhidas 35 frações de aproximadamente 100 ml cada, reagrupadas de acordo com a tabela 3, p. 13.

Hexano/AcOEt	Frações
100:00	<b>B-01/B-02</b>
99:01	B-03/B-08
98:02	<b>B-09/B-</b> 10
97:03	<b>B-11/B-</b> 14
95:05	B-15/B-24
09:01	B-25/B-27
85:15	<b>B-28/B-3</b> 0
08:02	B-31
07:03	B-32
06:04	B-33
01:01	B-34
00:100	B-35

Tabela 3 - Fracionamento cromatográfico da fração A-9

As frações provenientes desta coluna foram comparadas por meio de CCDC com os padrões dos triterpenos procurados. Desta forma, a fração B-16 (260 mg), foi selecionada para ser submetida à CCDP em sílica, a fim de separar os seus constituintes.

Parte deste material foi aplicada nas placas cromatográficas, eluídas em hexano/AcOEt (8:2). Chegou-se assim a uma subfração, cujos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (200 e 50 MHz) mostraram tratar-se de uma mistura (MA) de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e fitol (<u>1</u>, <u>2</u> e <u>11</u> respectivamente).

Além da fração B-16, provavelmente as frações B-14, B-15, B-17 e B-18 também apresentam como constituintes a  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, já que através da análise por CCDC, elas apresentam manchas cujos Rf são os mesmos dos padrões destas substâncias.

#### Fracionamento do extratos clorofórmico e etérico

Os extratos clorofórmico e etérico provenientes das partições do extrato bruto etanólico, foram reunidos (17,5 g) e cromatografados em coluna, utilizando-se para tal 170 g de sílica. O sistema foi eluído com misturas de DCM/MeOH em gradiente crescente de polaridade, sendo coletadas 70 frações de aproximadamente 125 ml cada, reagrupadas conforme a tabela 4, p. 15, após análise em CCDC.

Frações reunidas	Massa (g)
C-01 (01-05)	0,1
C-02 (06-08)	0,1
C-03 (09-12)	0,1
C-04 (13-16)	0,1
C-05 (17-18)	1,0
C-06 (19-21)	2,0
C-07 (22-23)	0,6
C-08 (24-25)	1,0
C-09 (26)	0,1
C-10 (27)	0,1
C-11 (28)	0,4
C-12 (29-30)	0,5
C-13 (31-37)	1,5
C-14 (38)	0,3
C-15 (39)	0,7
C-16 (40-44)	4,0
C-17 (45-48)	1,0
C-18 (49-54)	1,6
C-19 (55)	0,1
C-20 (56-61)	1,2
C-21 (62-70)	3,6

Tabela 4- Fracionamento dos extratos clorofórmico e etérico

#### Fracionamento cromatográfico da fração C-6

A fração C-6 (2,0 g), foi metilada com diazometano e cromatografada em coluna, utilizando-se 70 g de sílica. Foram utilizadas misturas de DCM/AcOEt em gradiente crescente de polaridade como eluente, sendo coletadas 25 frações de aproximadamente 125 ml cada, reagrupadas em 11 frações, conforme a tabela 5, p. 16, após análise em CCDC.

Frações reunidas	Massa (mg)
D-01 (01)	37,8
D-02 (02)	2,6
D-03 (03)	3,5
D-04 (04)	4,5
D-05 (05-07)	149,6
D-06 (08-10)	107,9
D-07 (11-13)	32,2
D-08 (14)	98,2
D-09 (15-17)	518,5
D-10 (18-21)	551,0
D-11 (22-25)	177,4

Tabela 5- Fracionamento cromatográfico da fração C-6

A fração D-5 foi submetida à CCDP em sílica, utilizando-se como eluente DCM/AcOEt (9:1), o que originou 5 faixas. Destas, apenas uma pôde ter suas estruturas identificadas, pois as demais não apresentaram quantidades suficientes. Após a análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (200 e 50 MHz), concluiu-se que esta é uma mistura de triterpenos (MC), constituída pelas substâncias 5 e 6 (ésteres metílicos dos ácidos ursólico e oleanólico, respectivamente).

Com base nas placas cromatográficas comparativas, a fração D-6 também foi submetida à CCDP em sílica, utilizando-se DCM/AcOEt (85:15) como fase móvel. As placas foram eluídas duas vezes consecutivas e desta forma ocorreu a separação em 2 faixas distintas, sendo que uma destas faixas continha uma única mancha e a outra, diversas. A primeira destas faixas mostrou tratar-se de uma mistura triterpênica complexa e, portanto, não foi possível identificar os seus constituintes. A outra faixa, após ser extraída da sílica, foi submetida novamente à CCDP, no mesmo sistema de solvente utilizado anteriormente. Desta vez foram recolhidas 5 faixas, das quais somente uma apresentou quantidade suficiente para ser submetida às espectroscopias necessárias para a verificação de suas estruturas. Após análise dos espectros de RMN de  $^{1}$ H e de  $^{13}$ C (200 e 50 MHz), concluiu-se que esta subfração é uma mistura dos triterpenos (MB) <u>3</u> (uvaol) e <u>4</u> (eritrodiol).

#### Fracionamento cromatográfico da fração C-8

A fração C-8 (1,0 g) foi cromatografada em coluna de sílica (38 g), com a finalidade de separar as suas substâncias constituintes. O sistema foi eluido com misturas de CHCl<sub>3</sub>/MeOH em gradiente crescente de polaridade, sendo recolhidas 49 frações de aproximadamente 13 ml cada, reagrupadas de acordo com a tabela 6, p. 17, após análise em CCDC.

Frações reunidas	Massa (mg)
E-1 (01-08)	19,8
E-2 (09)	4,6
E-3 (10-16)	233,8
E-4 (17)	22,4
E-5 (18-22)	290,3
E-6 (23-27)	107,9
E-7 (28-33)	27,1
E-8 (34-49)	20,6

Tabela 6- Fracionamento cromatográfico da fração C-8

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (200 e 50 MHz), da fração E-3, mostraram que esta é constituida pelo triterpeno 5 na sua forma ácida (ácido ursólico).

A fim de identificar os componentes da fração E-5, esta foi submetida à CCDP em sílica, sendo utilizado como eluente o sistema CHCl<sub>3</sub>/MeOH (92:8). As placas foram eluídas duas vezes consecutivas, originando desta forma 5 faixas, das quais três não puderam ser trabalhadas devido as suas pequenas quantidades. As outras duas foram analisadas através de seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (200 e 50 MHz), sendo concluído que ambas são constituidas por uma mistura (MD) de 2 triterpenos: <u>7</u> e <u>8</u> (hederagenina).

#### Fracionamento cromatográfico da fração C-11

A fração C-11 foi cromatografada em coluna de sílica (25 g), eluída em gradiente crescente de polaridade com misturas de CHCl<sub>3</sub>/MeOH. Foram coletadas 63 frações, das quais as primeiras 46 continham aproximadamente 13 ml cada uma e as demais, 60 ml cada.

Após análise em CCDC, estas frações foram reagrupadas conforme a tabela 7, p. 18.

Frações reunidas	Massa (mg)
F-1 (01-18)	6,7
F-2 (19-38)	11,0
F-3 (39-46)	8,3
F-4 (47-49)	152,3
F-5 (50)	58,8
F-6 (51-55)	43,3
F-7 (56-59)	15,2
F-8 (60-63)	11,3

Tabela 7- Fracionamento cromatográfico da fração C-11

Após ser metilada com diazometano, a fração F-4 foi submetida à CCDP em sílica, utilizando-se como fase móvel a mistura CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5) + 0,5 ml de H<sub>2</sub>O. Desta maneira, chegou-se a uma fração cujos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (200 e 50 MHz), mostraram que esta era constituída principalmente por <u>9</u>, além de poder conter também o triterpeno <u>10</u> (ME). Como não foi encontrado registro de <u>10</u> na literatura, esta fração foi acetilada com anidrido acético e piridina, e submetida à separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2). Desta maneira foi possível separar <u>9a</u> de <u>10a</u>.

## Elucidação Estrutural

Conforme descrito na parte experimental deste trabalho, as substâncias extraídas da espécie <u>Alibertia edulis</u> foram obtidas em misturas, tendo como constituintes principais dois triterpenos: um de esqueleto ursano e o seu equivalente no esqueleto oleanano (figura 1, p. 6 e 7). A única exceção ocorreu com o ácido ursólico (<u>5</u>), que além de ter sido encontrado em mistura com o ácido oleanólico (<u>6</u>), ambos na forma de metil-éster, também foi encontrado sem a presença deste último na fração E-3, na sua forma ácida.

Mistura	Constituintes
MA	1 + 2 + 11
MB	3 + 4
MC	5+6
MD	7 + 8
ME	9 + 10

Tabela 8- Constituintes das Misturas

## Identificação dos constituintes das misturas

A identificação dos constituintes de cada uma das misturas foi feita através da metodologia desenvolvida por Roberto S. Gallegos Olea e Nidia F. Roque, para a análise de misturas de triterpenos (85).

Seguindo esta metodologia, foram feitos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz), das frações que apresentaram uma única mancha em CCDC, em diversos sistemas de solventes. Através destes espectros, constatou-se que cada uma das misturas era constituída apenas por triterpenos e que estes apresentavam as mesmas funções orgânicas. Estas caracteristicas são fundamentais para a análise da mistura.

Com estes requisitos garantidos, foram registrados então dois espectros de RMN de  $^{13}$ C (50 MHz), para cada uma das misturas, sendo um com desacoplamento total dos prótons (NOISE) e um DEPT 135º O espectro totalmente desacoplado forneceu as seguintes informações:

- funções orgânicas presentes nos triterpenos: esta informação é obtida através dos deslocamentos químicos característicos dos átomos de carbono referentes às funções orgânicas oxigenadas;

- número aproximado de triterpenos: pode-se ter o número aproximado de constituintes da mistura em análise, através do número de sinais registrados, que é sempre menor do que o número de átomos de carbono total, e também do número de carbonos sp<sup>2</sup>, considerando que os triterpenos pentacíclicos, salvo algumas exceções, possuem uma ligação dupla e os tetracíclicos duas ligações duplas;

- abundância dos triterpenos presentes na mistura: este dado é obtido a partir do espectro NOISE, comparando-se a intensidade de sinais referentes a carbonos com a mesma multiplicidade.

O espectro DEPT 135º informa a multiplicidade de cada carbono, sendo que os deslocamentos químicos são obtidos pelo espectro totalmente desacoplado.

Com estes dados, iniciou-se a identificação dos constituintes das misturas, comparando-se os deslocamentos dos carbonos  $sp^2$  com os existentes na literatura, o que forneceu o tipo de esqueleto triterpênico. A tabela 9, p. 22, dá os valores característicos de RMN de <sup>13</sup>C de carbonos  $sp^2$  em triterpenos (85).

Dados observados (ppm)	Triterpenos	Ref.
157,9(s); 117,0(d)	D-friedoolean-14-eno	86
154,3(s); 107,0(t)	Urs-20(30)-eno	87
151,5(s); 115,9(d)	D:C-friedo-B':A'	88
	neogamacer-9(11)-eno	
150,5(s); 109,3(t)	Lup-20(29)-eno	<b>8</b> 9
148,7(s); 114,8(d)	Lanosta-9(11),24-dieno	90
130,9(s); 125,2(d)		
146,0(s); 117,7(d)	Lanosta-7,24-dieno	91
130,8(s); 125,1(d)	(13α, 14β)	
142,7(s); 120,1(d)	Lanosta-7,9(11)-dieno	92
145,9(s); 116,3(d)		
145,4(s); 116,4(d)	D:C-friedours-7-eno	93
145,3(s); 117,3(d)	Lanost-7-eno	91
145,1(s); 121,7(d)	Olean-12-eno	94
142,6(s); 129,8(d)	Olean-18-eno	95
141,9(s); 131,0(s)	B':A'-neogamacer	96
	13(18)eno	
140,4(s); 122,7(s)	A'-neogamacer-21-eno	88
140,0(s); 136,0(s)	A'-neogamacer	88
	17(21)-eno	
139,6(s); 118,8(d)	Urs-20-eno	97
139,4(s); 124,1(d)	Urs-12-eno 9	
134,6(s); 134,2(s)	D:C-friedours-8-eno 93	
134,4(s); 134,2(s)	Lanost-8-eno 99	
134,1(s); 133,6(s)	Lanost-8-eno	92
	(13α, 14β)	
134,1(s); 133,3(s)	Lanosta-8,24-dieno	99
130,0(s); 125,2(d)	(13α,,14β)	
130,8(s); 125,4(d)	9,19-ciclolanost-24-eno 100	
sem ligação dupla, 6,8(q)	D:A-friedooleanan-3-ona	101
sem ligação dupla, 20,0(s)	(s) 9,19-ciclolanostano 102	

**Tabela 9-** Valores característicos de RMN de  $^{13}$ C de carbonos sp<sup>2</sup> em triterpenos (85)

Na etapa subsequente, verificou-se quais seriam as funções oxigenadas presentes nos triterpenos. Isto pode ser feito através de comparação dos dados obtidos com os dados fornecidos pela tabela 10, p. 23 (103), onde aparecem os deslocamentos químicos dos átomos de carbono oxigenados, de triterpenos naturais mais frequentes.

Com a proposta do esqueleto triterpênico e com o tipo de oxigenação que este apresenta, procura-se na literatura dados de RMN de <sup>13</sup>C de triterpenos, cujos carbonos apresentem deslocamentos químicos compatíveis com aqueles observados. Para facilitar este trabalho, pode-se construir uma tabela onde se correlacionam os deslocamentos químicos observados no espectro NOISE, a multiplicidade e a intensidade relativa de cada sinal. Comparando-se estes valores com os dados da literatura, iniciando pelos carbonos metínicos, já que estes existem em menor número que os metilênicos ou metílicos, esperase observar todos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos de cada triterpeno presente na mistura, exceto talvez, de algum carbono quaternário de um dos constituintes que estiver em menor quantidade. Muitas vezes pode ocorrer uma coincidência de deslocamento químico para mais de um carbono de uma mesma substância ou de substâncias diferentes, o que obviamente levará a uma quantidade menor de sinais no espectro NOISE, do que a somatória de todos os carbonos dos triterpenos presentes na mistura.

Carbono tipo	δ (ppm)
C(3)-OH(α)	76,1+/-0,5
С(3)-ОН(β)	78,6+/-0,5
C(3)-OAc(β)	80,6+/-0,4
<u>C(3)-OCH<sub>3</sub>(β)</u>	88,7+/-0,1
$C(3)-O\underline{C}H_3(\beta)$	57,5+/-0,1
C(3)-O <u>2C</u> CH <sub>3</sub> (β)	170,6+/-0,3
C(3)-O <sub>2</sub> C <u>C</u> H <sub>3</sub> (β)	21,2+/-0,2
C(3)=O	216,8+/-1,2
C(28)O <sub>2</sub> H	181,1+/-2,3
<u>C(28)O2CH3</u>	177,3+/-0,8
C(28)O <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	51,4+/-0,2

Tabela 10- Dados de RMN de <sup>13</sup>C (ppm, CDCl<sub>3</sub>) dos átomos de carbono na funçãooxigenada (103)

#### Identificação dos constituintes da mistura MB

A mistura MB é constituída pelos triterpenos urs-12-en-3 $\beta$ ,28 diol (uvaol, <u>3</u>) (104) e olean-12-en-3 $\beta$ ,28 diol (eritrodiol, <u>4</u>) (105).

Para a identificação destas substâncias, usou-se a metodologia já descrita para análise de mistura de triterpenos.

Ao ser submetida à CCDC em DCM:AcOEt em diversas proporções, (85:15), (9:1), (8:2); a fração analisada apresentou somente uma mancha.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 1, p. 42) apresentou uma feição espectral característica de triterpenos, com diversas absorções entre 0,6 e 1,9 ppm, correspondentes aos prótons metílicos e metilênicos, um multipleto em 3,2 ppm atribuível a próton oximetínico, um tripleto em 5,1 ppm característico de próton olefinico, e um dubleto em 3,5 e 3,6 ppm, de dois prótons oximetilênicos.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (espectro 2, p. 43), revelou ao todo 49 sinais, o que indicou que na mistura poderiam estar contidas duas substâncias. Foram observados sinais em 69,5 e 69,8 ppm, indicando que estas substâncias apresentavam a mesma função oxigenada, no caso, uma hidroxila, além daquela em C-3, presente em todos os triterpenos (106), cujo deslocamento do carbono ao qual ela se liga é 79,0 ppm. Absorções em 122,6 ; 125,3 ; 139,1 e 144,6 ppm referentes a carbonos sp<sup>2</sup>, também indicaram que a mistura teria, em principio, dois triterpenos pentacíclicos, já que cada um deles possui apenas uma ligação dupla.

Ao confrontar estes valores com aqueles apresentados pela tabela 9, p. 22 (85), observa-se que eles estão muito próximos dos deslocamentos dos carbonos sp<sup>2</sup> dos esqueletos olean-12-eno ( $\beta$ -amirina) e urs-12-eno ( $\alpha$ -amirina).

Com a construção da tabela correlacionando os deslocamentos químicos de cada carbono, a multiplicidade dada pelo DEPT 135º (espectro 3, p. 44) e intensidades relativas, foi possível atribuir os deslocamentos químicos para todos os 30 carbonos dos triterpenos, comparando-se estes valores com os fornecidos pela literatura (104, 105). Também foi possível concluir, principalmente através das intensidades dos quatro sinais relativos aos carbonos sp<sup>2</sup>, que o uvaol (<u>3</u>) está em maior quantidade que o eritrodiol (<u>4</u>), na mistura analisada.. A tabela 11, p. 25 apresenta os dados de RMN de <sup>13</sup>C para os dois triterpenos. Como pode ser observado por esta tabela, muitos carbonos possuem deslocamentos químicos idênticos, o que era previsto já que o espectro NOISE apresentou somente 49 sinais.

	<u>3</u>	<u>4</u>
C-01	38,5	38,3
C-02	26,8	26,8
C-03	79,0	79,0
C-04	39,0	38,5
C-05	55,0	55,0
C-06	17,9	17,9
C-07	32,5	32,2
C-08	39,7	39,5
C-09	47,4	47,3
C-10	36,5	36,6
C-11	23,2	23,2
C-12	125,3	122,6
C-13	139,1	144,6
C-14	41,7	41,7
C-15	25,6	25,1
C-16	23,0	21,6
C-17	37,7	36,6
C-18	53,8	42,0
C-19	39,5	46,2
<b>C-2</b> 0	39,7	30,7
C-21	30,3	33,7
C-22	34,8	30,7
C-23	27,7	27,7
C-24	15,2	15,2
C-25	15.2	15,2
C-26	16,9	16,9
C-27	23,1	25,6
C-28	69,8	69,5
C-29	16,9	32,9
C-30	20,9	23,1

![](_page_35_Figure_2.jpeg)

<u>3</u>- uvaol

![](_page_35_Figure_4.jpeg)

4- eritrodiol
### Identificação dos constituintes da mistura MC

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 4, p. 45) da mistura MC, apresentou diversas absorções entre 0,7 e 2,6 ppm, referentes aos prótons metílicos e metilênicos; um multipleto em 3,2 ppm, característico de próton carbinólico e um multipleto em 5,2 ppm atribuível a próton olefinico. Também observou-se em 3,6 ppm, dois singletos referentes à duas metoxílas, pois o material foi metilado com diazometano.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (espectro 5 ,p. 46), apresentou 52 sinais, acusando a presença de duas substâncias triterpênicas. Quanto ao tipo de oxidação, as absorções em 178,0 e 178,2 ppm sugeriram a presença de carboxílas e as duas absorções em 51,4 ppm, a presença de metilas do grupo éster (103).

A absorção em 78,9 ppm foi atribuída a um carbono carbinólico, e os sinais em 122,3 ; 125,5 ; 138,1 e 143,7 ppm ao serem confrontados com os dados da tabela 9, p. 22 (85), indicaram a presença de dois triterpenos: um com esqueleto tipo urs-12-eno ( $\alpha$ -amirina) e o outro tipo olean-12-eno ( $\beta$ -amirina).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 4, p. 45) confirmou esta proposta, através das absorções do H-18 em ambos os esqueletos (107). No esqueleto tipo  $\alpha$ -amirina, o próton em 18 está em  $\beta$ -axial e acopla com o próton em 19, que é  $\alpha$ -axial. Eles estão portanto, numa relação trans. O espectro mostra um dubleto em 2,1 ppm (J=11,2 Hz). Já no espectro de uma substância com esqueleto tipo  $\beta$ -amirina, o sinal deste próton aparece como um dubleto largo em 3,4 ppm, pois ele acopla com os dois prótons que se ligam ao carbono 19.

Estes dados levaram aos ésteres metílicos dos ácidos 3 $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-óico (éster metílico do ácido ursólico, <u>5</u>) e 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-óico (éster metílico do ácido oleanólico, <u>6</u>) e, ao correlacionar os deslocamentos químicos, multiplicidades, (DEPT 135°: espectro 6, p.47) e intensidades relativas, foi possível atribuir deslocamentos químicos compatíveis com os citados na literatura (108, 109), a todos os carbonos dessas duas substâncias, conforme pode ser verificado na tabela 12, p. 27.

Através das intensidades relativas dos sinais, principalmente das absorções dos carbonos sp<sup>2</sup>, concluiu-se que o éster metílico do ácido ursólico ( $\underline{5}$ ) é o principal constituinte da mistura.

	<u>5</u>	<u>6</u>
C-01	38,6	38,4
C-02	28,0	27,6
C-03	78,9	78,9
C-04	38,7	38,7
C-05	55,2	55,2
C-06	18,3	18,3
C-07	32,9	32,6
C-08	39,4	39,4
C-09	47,5	47,6
<b>C-</b> 10	36,9	36,9
C-11	23,2	23,0
C-12	125,5	122,3
C-13	138,1	143,7
C-14	41,9	41,9
C-15	28,0	27,6
C-16	24,2	23,3
C-17	48,0	46,6
C-18	52,8	41,2
C-19	39,0	45,8
<b>C-2</b> 0	38,8	30,6
C-21	30,6	33,8
C-22	36,6	32,3
C-23	28,1	28,1
C-24	15,6	15,6
C-25	15,6	15,2
C-26	16,8	17,0
C-27	23,5	25,9
C-28	178,2	177,9
C-29	17,0	33,0
C-30	21,1	23,6
$\rm CO_2 \underline{CH_3}$	51,4	51,4



5- éster metílico do ácido ursólico



6- éster metílico do ácido oleanólico

### Identificação dos constituintes da mistura MD

A fração da mistura MD apresentou uma única mancha ao ser submetida à CCDC em CHCl<sub>3</sub>:MeOH em diversas variações de concentração destes dois solventes: (95:5), (92:8), (9:1) e (85:5).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 7, p. 48), apresentou sinais de prótons metílicos e metilênicos entre 0,9 e 2,3 ppm, um multipleto em 3,7 ppm, atribuível a prótons oximetínicos e um sinal em aproximadamente 4,2 ppm, que após a identificação dos componentes da mistura, foi atribuído aos prótons do C-23 de ambos os triterpenos.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (espectro 8, p. 49), observou-se aproximadamente 57 sinais, o que sugeriu a presença de dois triterpenos. Os sinais em 67,8 e 73,9 ppm sugeriram a presença de dois átomos de carbonos oxigenados. Os sinais em 122,6 ; 125,7 ; 139,5 e 144,9 ppm correspondem às absorções dos carbonos sp<sup>2</sup> dos esqueletos olean-12 eno ( $\beta$ -amirina) e urs-12-eno ( $\alpha$ -amirina) (85).

Através da comparação destes dados com os apresentados na literatura (110, 111), chegou-se aos triterpenos ácido  $3\beta$ ,23-diidroxiurs-12-en-28-óico (7) e ácido  $3\beta$ ,23-diidroxiolean-12-en-28-óico (hederagenina, 8).

Ao correlacionar os deslocamentos químicos, as multiplicidades dadas pelo DEPT  $135^{\circ}$  (espectro 9, p. 50) e as intensidades relativas de cada sinal, foi possível atribuir deslocamentos químicos compatíveis com a literatura a todos os 30 carbonos de cada triterpeno proposto e, concluiu-se que a hederagenina (<u>8</u>) está em maior quantidade na mistura analisada.

A tabela 13, p. 29 mostra os deslocamentos químicos dos carbonos dos dois triterpenos contidos na mistura MD.

	<u>7</u>	<u>8</u>
C-01	38,9	38,8
C-02	28,3	28,3
C-03	73,3	73,3
C-04	42,5	42,9
C-05	48,5	48,5
C-06	18,6	18,6
C-07	33,0	33,0
C-08	40,0	39,7
C-09	48,1	48,1
C-10	37,1	37,2
<b>C-11</b>	23,8	23,7
C-12	125,7	122,6
C-13	139,5	144,9
C-14	42,2	42,2
C-15	27,6	28,7
C-16	24,8	23,7
C-17	48,1	46,7
C-18	53,6	42,0
C-19	39,4	46,5
C-20	39,4	31,0
<b>C-2</b> 1	31,1	34,2
C-22	37,4	33,2
C-23	67,8	67,8
C-24	13,1	13,1
C-25	16,1	16,0
C-26	17,5	17,5
C-27	23,9	26,2
C-28	180,8	180,8
C-29	23,9	33,3
C-30	21,4	23,8



<u>7</u>



8- hederagenina

## Identificação dos constituintes da mistura ME

Assim como as demais misturas analisadas, a fração da mistura ME apresentou uma única mancha ao ser submetida à CCDC.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 10, p. 51) desta fração, que já havia sido metilada com diazometano, mostrou diversos sinais entre 0,6 e 1,9 ppm, devidos aos prótons metílicos e metilênicos e também sinais entre 3,0 e 4,2 ppm, indicando a presença de vários carbonos oxigenados na molécula. Além destes, em 5,3 ppm pode ser observado um pico característico de próton olefinico.

O espectro de RMN de  $^{13}$ C totalmente desacoplado (espectro 11, p. 52) revelou 49 sinais. A absorção em 178,5 ppm indicou a presença de um grupo carboxíla e em 51,6 ppm a presença de uma metoxíla (103). Os sinais em 65,9 ; 66,9 ;70,1 e 73,0 ppm sugeriram a presença de quatro carbonos unidos a oxigênio, através de uma ligação simples.

As absorções em 124,9 ;128,9 ;138,0 e 142,6 ppm indicaram que poderiam estar contidos na mistura dois triterpenos pentacíclicos, sendo um com esqueleto urs-12-eno e o outro com esqueleto olean-12-eno. Como os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos sp<sup>2</sup> observados estavam alterados em relação aos esqueletos básicos (85), sendo observada uma proteção no C-13 e uma desproteção no C-12 de ambos os esqueletos, pensou-se na presença de uma hidroxila próxima à ligação dupla, de tal maneira que estes fenômenos pudessem ser explicados.

Para que pudessem ser formados os dois pares de deslocamentos químicos de carbonos de cada ligação dupla, foram consideradas as intensidades relativas dos quatro sinais destes carbonos, no espectro NOISE.

Comparando-se os dados obtidos pelos espectros de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado e do DEPT 135° (espectro 12, p. 53) com a literatura, chegou-se ao éster metílico do ácido  $3\beta$ ,  $19\alpha$ , 23, 24-tetraidroxiurs-12-en-28-óico (éster metílico do ácido clétrico, <u>9</u>) (112), que é o constituinte principal da mistura analisada.

Como não foi encontrado registro na literatura do equivalente de 9 no esqueleto olean-12-eno, optou-se por acetilar a mistura com anidrido acético e piridina, a fim de obter uma melhor separação das duas substâncias, caso o segundo constituinte fosse realmente o triterpeno esperado.

Esta melhor separação seria obtida porque esperava-se que a hidroxila ligada ao C-19 no triterpeno com esqueleto ursano (9), não fosse acetilada, já que ela está ligada a um carbono terciário. Porém, na substância com esqueleto oleanano, esta mesma hidroxíla seria acetilada, já que ela está em um carbono secundário. Com isto, criaria-se uma diferença de polaridade entre as duas substâncias , e elas poderiam ser separadas mais facilmente. As demais hidroxilas presentes são acetiladas em ambas as moléculas. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 13) e de <sup>13</sup>C (espectro 14) das páginas 54 e 55 respectivamente, são da mistura ME já acetilada.

A seguir, esta mistura foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. O cromatograma desta mistura, que é mostrado abaixo, apresentou dois picos principais, além de um terceiro com o menor tempo de retenção, relativo às impurezas. O pico com tempo de retenção intermediário (19.647 min) possui uma área menor do que o pico com o maior tempo de retenção (22.435 min), não correspondendo portanto, ao triterpeno com esqueleto ursano (9a), como era esperado, já que ele é o principal constituinte da mistura.

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (espectro 15, p. 56) juntamente com o DEPT 135° (espectro 16, p. 57) da substância com o maior tempo de retenção no cromatograma, confirmaram que esta é o triterpeno <u>9</u> na sua forma acetilada (<u>9a</u>), assim como o seu espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 17, p. 58) (112). Os espectros de massas (espectro 18, p. 59) e infravermelho (espectro 19, p. 60) também apresentam dados concordantes com a literatura.

A tabela 14, p. 32 mostra os dados de RMN para o triterpeno 9a.

Cromatograma de ME (metilada e acetilada)



С	Ca	Нр	
01	33,1		
02	22,3		
03	70,2	5,00 (m)	
04	42,9		
05	47,9		30
06	19,3		29
07	32,7		$\sim$
08	39,8		HO'''' <sup>19</sup>
09	47,2		
10	36,6		
11	23,6		
12	128,7	5,34 (m)	
13	138,0		
14	41,1		AcO /
15	28,1		$AcOCH_2$ $CH_2OAc$
16	25,4°		24 23 2
17	47,8		
18	53,1	2,59 (s)	0 n
19	73,1		<u>98</u>
20	41,1		
21	25,9°		
22	37,3		
23	67,1	4,06 (d 11 Hz)	
		4,16 (d 11 Hz)	
24	64,2	4,25 (d 11 Hz)	
		4,16 (d 11 Hz)	
25	15,1	$0,98^{e}(s)$	
26	16,4ª	0,67 (s)	
27	24,3	1,20 (s)	
28	178,3		
29	16,10	1,30 (s)	
30	27,4	$0,95^{e}(s)$	
O <u>CH</u> 3	51,6	3,60 (s)	
OCO <u>CH</u> 3	20,8		
	20,9		
	21,2		
OCOCH <sub>3</sub>	170,1	1,99 (s)	
	170,7	2,04 (s)	
	170,8	2,04 (s)	

Tabela 14- Dados de RMN para 9a (ppm, CDCl3)

a. 50 MHz b.200 MHz

c,d,e. os valores podem estar invertidos

 $CO_2Me$ 

## Determinação estrutural do éster metílico do ácido $3\beta$ , $19\alpha$ ,23,24-tetraidroxiolean-12-en-28-óico (<u>10</u>)

O triterpeno <u>10a</u> (<u>10</u> na sua forma acetilada), que correspondende ao pico com tempo de retenção intermediário no cromatograma (p. 31), apresentou um espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 20, p. 61) muito semelhante ao espectro de <u>9a</u> (espectro 17, p. 58): dois multipletos em 5,0 e 5,4 ppm devidos aos prótons H-3 e H-12 respectivamente, o sistema AB de dubletos dos prótons H-23 e H-24 em 4,1 ; 4,2 e 4,3 ppm (espectro ampliado 21, p. 62). Juntamente com estes sinais, no espectro de <u>10a</u> podem ser observados outros dois sinais em 3,3 e 3,1 ppm, os quais correspondem a dois prótons acoplados entre si, como mostra o espectro HOMOCOSY (espectro 22, p. 63). Destes dois prótons, o que aparece mais desprotegido acopla também com um outro próton, cujo sinal aparece em 1,6 ppm.

No ácido oleanólico, o H-18 possui um deslocamento químico em torno de 3,0 ppm. Então, o sinal em 3,1 ppm do espectro de <u>10a</u> foi atribuído a este próton, e aquele em 3,3 ppm atribuiu-se ao H-19.

A hidroxila em C-19 deve estar em posição axial, o que explica a pequena constante de acoplamento observada entre os prótons H-18 e H-19 (J=3 Hz), e também o acoplamento a longa distância (acoplamento em W) entre este último próton e o H-21 ( $\delta$ =1,6 Hz). Esta posição da hidroxila em C-19 justifica também a não acetilação deste grupo em 10a, já que ela sofre um grande impedimento estérico, o que impossibilita a entrada de um grupo volumoso como o acetato.

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (espectro 23, p. 64) e DEPT 135º (espectro 24, p. 65), também mostraram a semelhança entre <u>10a</u> e <u>9a</u>, quando os anéis A e B são analisados. Os deslocamentos químicos para os outros carbonos foram definidos quando comparados com os dados do éster metílico do ácido oleanólico (<u>6</u>) (26).

Através desta comparação, podem ser observados efeitos  $\beta$  de desproteção nos carbonos 18 e 20, ocasionados pela hidroxila em C-19. Os carbonos 12 e 16 também são desprotegidos pela mesma hidroxila, só que devido ao efeito  $\delta$ . Os carbonos 29, 21, 17 e 13 tem os seus deslocamentos em campo mais alto em <u>10a</u>, em função de um forte efeito  $\gamma$  de proteção.

A tabela 15 da p. 35 mostra os dados de RMN para 10a.

O espectro de massas deste triterpeno (espectro 25, p. 66), apresentou como ion molecular o ion  $M^+644$ , confirmando a fórmula molecular  $C_{37}H_{56}O_9$ . A fragmentação proposta é concordante com a descrita na literatura para moléculas semelhantes (esquema 2, p. 36).

O espectro de IV (espectro 26, p. 67), mostrou as bandas das carbonilas dos grupos ésteres e da hidroxila ainda restante na molécula acetilada.

С	Ca	Hp	
01	32,8 <sup>c</sup>		
02	22,1		
03	70,1	5,00 (m)	20
04	42,8		
05	48,0		HO,
06	19,2		19
07	32,3°		
08	39,3		
09	47,7		1 $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $28$
10	36,7		
11	23,6		3
12	124,6	5,45 (m)	AcO 7
13	142,6		AcOCH
14	41,0		24 $23$
15	27,8		
16	27,8		
17	45,2		10a
18	43,6	3,15 (m)	<u></u>
19	81,5	3,34 (m)	
20	34,5		
21	27,4		
22	32,3°		
23	67,0	4,06 (d 11 Hz)	
		4,17 (d 11 Hz)	
24	64,0	4,26 (d 11 Hz)	
		4,17 (d 11 Hz)	
25	14,8	0,95 <sup>d</sup> (s)	
26	16,6	0,67 (s)	
27	24,3	1,21 (s)	
28	178,3	1	
29	27,8	$0.97^{d}$ (s)	
30	24,8	0,98 <sup>d</sup> (s)	
OCH <sub>3</sub>	51,6	3,61 (s)	
ОСО <u>СН</u> 3	20,7		
	20,8		
	21,1		
О <u>С</u> ОСН <sub>3</sub>	169,9	2,00 (s)	
	170,6	2,05 (s)	
	170,7	2,05 (s)	

Tabela 15- Dados de RMN para 10a (ppm, CDCl<sub>3</sub>)

a. 50 MHz b. 200 MHz

c,d. os valores podem estar invertidos

.

.

## Esquema 2- Proposta de fragmentação de massas para 10a



185 (31,8)

#### Identificação dos constituintes da mistura MA

Como todos os triterpenos que foram isolados de <u>Alibertia edulis</u> apresentam os esqueletos urs-12-eno ( $\alpha$ -amirina) e olean-12-eno ( $\beta$ -amirina), pensou-se que as próprias  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina também pudessem estar presentes, possivelmente no extrato hexânico da planta. Usando-se padrões destas duas substâncias (em mistura), conforme descrito na parte experimental deste trabalho, chegou-se a uma fração que apresentou uma única mancha quando submetida à CCDC em diversos sistemas de solventes, e que possuia o mesmo Rf das amostras de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (espectro 27, p. 68), apresentou uma feição espectral característica de triterpenos, com uma grande concentração de sinais entre 0,7 e 2,4 ppm, um multipleto em 3,1 ppm atribuível ao próton carbinólico H-3 e um multipleto em 5,1 ppm de prótons olefinicos.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C totalmente desacoplado (espectro 28, p. 69), mostrou ao todo 97 sinais, o que sugeriu a presença de três triterpenos na mistura.

Ao comparar os deslocamentos químicos obtidos pelo espectro NOISE, considerando-se a multiplicidade de cada carbono, que é dada pelo espectro DEPT 135<sup>o</sup> (espectro 29, p. 70), com os dados da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina fornecidos pela literatura (98 e 94 respectivamente), constatou-se que estes dois triterpenos realmente estão presentes na mistura. Juntamente com eles, encontra-se o cis e trans-fitol (113).

Através das intensidades relativas dos sinais dos carbonos olefinicos no espectro NOISE, concluiu-se que destes constituintes da mistura, a  $\alpha$ -amirina está em maior quantidade e a  $\beta$ -amirina em menor quantidade, sendo que para esta última substância não são observados no espectro totalmente desacoplado os deslocamentos químicos de dois carbonos quaternários (C-13 e C-19), o que é previsto pela metodologia empregada, quando se trata do constituinte em menor quantidade na mistura.

As tabelas 16, p. 38 e 17, p. 39 mostram, respectivamente, os dados de RMN de  $^{13}$ C dos dois triterpenos contidos na mistura MA e do cis e trans-fitol.

	<u>1</u>	<u>2</u>
<b>C-0</b> 1	38,7	38,6
C-02	27,2	26,9
C-03	79,0	79,0
C-04	38,6	38,6
C-05	55,2	55,1
C-06	18,3	18,3
C-07	32,9	32,6
C-08	39,7	39,7
C-09	47,7	47,7
<b>C-10</b>	36,9	37.0
<b>C-</b> 11	23,1	23,1
C-12	124,4	121,7
C-13	139,5	
C-14	42,0	42,0
C-15	27,3	27,3
C-16	26,6	26,1
C-17	33,7	32,5
C-18	59,0	47,7
C-19	39,6	
C-20	39,6	31,0
<b>C-2</b> 1	31,2	34,7
C-22	41,5	37,1
C-23	28,1	28,1
C-24	15.6	15,5
C-25	15,6	15,5
C-26	16,8	16,8
C-27	23,3	26,0
C-28	28,1	28,1
C-29	21,4	33,3
<b>C-3</b> 0	17,4	23,7





<u>2</u>- $\beta$ -amirina

# **Tabela 17-** Dados de RMN de <sup>13</sup>C para <u>11</u>(cis e trans-fitol:) Mistura MA (ppm, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

	cis-fitol	trans-fitol
<b>C-</b> 01	59,3	59,3
C-02	124,4	123,3
<b>C-03</b>	139,5	139,5
<b>C-04</b>	39,3	39,3
C-05	25,1	25,1
<b>C-</b> 06	36,6	36,6
<b>C-</b> 07	32,8	32,8
<b>C-08</b>	37,3	37,3
<b>C-</b> 09	24,4	24,4
<b>C-</b> 10	37,3	37,3
C-11	32,8	32,8
C-12	37,3	37,3
C-13	24,8	24,8
C-14	39,3	39,3
C-15	27,9	27,9
<b>C-</b> 16	22,7	22,7
C-17	22,7	22,7
C-18	19,7	19,7
C-19	19,7	19,7
<b>C-2</b> 0	22,7	16,2





# **Dados Físicos**

# <u>9a</u>

I.V. v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3500; 2932; 1743; 1650; 1452; 1368; 1235; 1035.

EM, 70 eV, m/z (int. rel.): 644, M<sup>+.</sup> (1,1); 584, M<sup>+.</sup>- AcOH (18,6); 365, M<sup>+.</sup>- $C_{17}H_{26}O_3$  (1,6); 305, 365-AcOH (3,3); 278, RDA (4,3); 260, 278- $H_2O$  (11,9); 246, 260- $CH_3$  (20,!); 245, 365-2AcOH (7,0); 219, 278-AcO (14,6); 218, 278-AcOH (14,0); 203, 218- $CH_3$  (8,8); 201, 219- $H_2O$  (30,5); 200, 218- $H_2O$  (16,9); 185, 365-3AcOH (22,6); 179,  $C_{11}H_{15}O_2$  (100)

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) e RMN <sup>13</sup>C (50 MHz): Tabela 14, p. 32

## <u>10a</u>

P.F.: 181-183°C (MeOH)

 $[\alpha]_D^{25} = -40,0 \text{ (CHCl}_3; 0,164\text{g}/100\text{ml})$ 

I.V.  $v_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3510; 2948; 1747; 1703; 1645; 1453; 1370; 1236; 1033.

EM 70eV: Esquema 2, p. 36

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) e RMN <sup>13</sup>C (50 MHz): Tabela 15, p. 35

## **Discussão Final**

O presente trabalho mostrou que, como constituinte de baixa polaridade, a espécie <u>Alibertia</u> edulis apresenta principalmente substâncias de caráter graxo. No extrato hexânico das folhas de <u>A</u>. edulis foram identificados apenas os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, além de fitol.

A maior variedade de substâncias são de polaridade intermediária e estão presentes na fração clorofórmica do extrato etanólico. O isolamento deste tipo de composto é relativamente dificil, o que impossibilitou um estudo completo da fração clorofórmica, assim como das demais frações do extrato etanólico.

A presença dos triterpenos urs-12-en-3 $\beta$ ,28-diol; olean-12-en-3 $\beta$ ,28-diol; 3 $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-óico; 3 $\beta$ ,23-diidroxiurs-12-en-28-óico; 3 $\beta$ ,23-diidroxiolean-12-en-28-óico; 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-tetraidroxiolean-12-en-28-óico as folhas de <u>A</u>. edulis está de acordo com a classificação botânica da planta dentro da sub-tribo Gardeniinae.





**Espectro 2-** RMN de  $^{13}$ C de MB (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Espectro 3-** DEPT 135° de MB (50 MHz,  $CDCl_3$ 









.









ų!





Espectro 11- RMN de <sup>13</sup>C de ME (metilada, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Espectro 12-** DEPT 135° de ME (metilada, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)







**Espectro 14-** RMN de <sup>13</sup>C de ME (metilada e acetilada, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Espectro 15-** RMN de  $^{13}$ C de  $\underline{9a}$  (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)









**Espectro 19**- espectro de I.V. de  $\underline{9a}$ 






.

























Espectro 29- DEPT 135° de MA (50 MHz,  $CDCl_3$ )

## Referências Bibliográficas

1. Robbrech, E. (1988) <u>Tropical Woody Rubiaceae</u>, Opera Bot. Belg. 1, Meise, National Plantintuen van Belgie.

2. Angeli, J. (1970) <u>Flora Analítica e Fitogeográfica do Estado de São Paulo</u>, 1<sup>a</sup> Ed., p.767. Phyton Ed., São Paulo.

3. Shukla, B.; Visen, P.K.S.; Patnaik, G.K.; Tripathi, S.C.; Srimal, R.C.; Dayal, R.; Dobhal, P.C. (1992) Phytotherapy Research <u>6</u> 74.

4. Bolzani, V. da S.; Trevisan, L.M.V.; Young, M.C.M. (1991) Phytochemistry 30. 2089.

5. Young, M.C.M.; Braga, M.R.; Dietrich, S.M.C.; Gottlieb, H.E.; Trevisan, L.M.V.; Bolzani, V. da S. (1992) Phytochemistry <u>31</u>, 3433.

6. Menu, P.; Bouquet, A.; Cave, A.; Pousset, J.L. (1976) Ann. Pharm. Fr. 34, 427.

7. Taylor, D.A.H. (1967) J. Chem. Soc., C 15, 1360.

8. Ahmed, E.M.; Bashir, A.K.; El Khier, Y.M. (1985) Fitoterapia 56, 354.

9. Myiagoshi, M.; Amagaya, S.; Ogihara, Y. (1986) J. Chromatography 357, 293.

10. Akada, Y.; Kanematsu, Y. (1986) Bunseki Kagaku 35, 215; C.A. 104:213342r.

11. Hayakawa, J.; Noda, N.; Yamada, S.; Mikani, E.; Uno, K. (1985) <u>Yakugaku Zasshi</u> 105, 996; C.A. 104:56498b

12. Besseri, J.M.; Pellecuer, J.; Allain, P. (1985) Fitoterapia 56, 62.

13. Hagiara, K.; Yamauchi, K.; Kuwano, S. (1981) <u>Mukogawa Joshi Daigaku Kiyo,</u> <u>Yakugaku Hen 29</u>, 9; C.A. 97:98425t.

14. Wang, C.; Zhao, C.; Zhao, B. (1981) Zhongcaoyao 12, 487; C.A. 97:20700j.

15. Gunatilaka, A.A. Leslie; Sirimane, S.R.; Sotheeswaran, S.; Sriyani, H.T.B. (1982) Phytochemistry <u>21</u>, 805.

16. Esvandzhiya, G.A. (1976) Dokl. TSKHA 224, 72; C.A. 87:19016c.

17. Chhabra, S.C.; Gupta, S.R.; Sharma, N.D. (1977) Phytochemistry 16, 399.

18. Reddy, G.C.S.; Rangaswami, S.; Sunder, R. (1977) Planta Medica 32, 206.

19. Gunatilaka, A.A. Leslie; Sirimane, S.R.; Sotheeswaran, S.; Nakanish, T. (1979) J. Chem. Res. Synop. 7, 216.

20. Kumari, D.; Gupta, S.R.; Sharma, N.D. (1979) Indian J. Chem. 17B, 181.

21. Takeda, Y.; Nishimura, H.; Kadota, O.; Inouye, H. (1976) <u>Chem. Pharm. Bull. 24</u>, 2644.

22. Tsumura Juntendo Co., Ltd. Jan. Kokai Tokkyo Koho 81 92, 211 (Cl. A61K31/35), 25 Jul. 1981, Appl. 79/168, 417, 26 Dec. 1979; C.A. 95:P209643t

23. Wang, D.J. (1979) K'o Hsueh Za Chan Yuesh K'an 7, 1036; C.A. 92:124929d.

24. Chhabra, S.C.; Gupta, S.R.; Sharma, C.S.; Sharma, N.D. (1977) Phytochemistry <u>16</u>, 1109.

25. Chhabra, S.C.; Gupta, S.R.; Sharma, C.S.; Sharma, N.D. (1977) Phytochemistry <u>16</u>, 399.

26. Chatterjee, Mrs. A.; Saha, S.K.; Bhattacharya, S. (1980) Indian J. Chem. 19B, 421.

27. Joshi, K.C.; Singh, P.; Pardasani, R.T. (1979) J. Indian Chem. Soc. 56, 327.

28. Mahmood, C.; Daulatabad, J.D.; Mulla, G.M.M.; Mirajkar, A.M.; Hosamani, K.M. (1991) Phytochemistry <u>30</u>, 2399.

29. Liang, H.; Zheng, H.; Chen, S. (1991) <u>Yunnan Zhiwu Yanjiu 13</u>, 95; C.A. 115:155031c.

30. Babady, B.; Tandu, K.R. (1988) Planta Medica 54, 86.

31. Wang, X.; Chen, J.; Zhang, G. (1986) <u>Zhongyao Tongbao 11</u>, 620; C.A. 106:188378p.

32. Ohash, H.; Tsurushima, T.; Ueno, T.; Fukami, H. (1986) Agric. Biol. Chem. 50, 2655.

33. Nishizawa, M.; Izuhara, R.; Kaneko, K.; Fujimoto, Y. (1987) <u>Chem. Pharm. Bull.</u> <u>35</u>, 2133.

34. Xu, R.; Qin, G.; Zhu, D.; Fan, Z.; Jiang, F.; Zhang, B.; Wang, J.; Wang, Y. (1987) <u>Huaxue Xuebao 45</u>, 301; C.A. 107: 83704t.

35. Babady, B.; Tandu, K.R. (1987) Monatsh. Chem. 118, 1195.

36. Nishizawa, M.; Izuhara, R.; Kaneko, K.; Koshihara, Y.; Fujimoto, Y. (1988) Chem. Pharm. Bull. 36, 87.

37. Oshima, T.; Sagara, K.; Yoshida, T.; Tong, Y.Y.; Zhang, G.; Chem, Y.H. (1988) J. Chromatogr. <u>455</u>, 410.

38. Qin, G.; Fan, Z.; Xu, R.; Zhang, B. (1989) Youji Huaxue 9, 263.

39. Tong, Y.; Zhang, G.; Soraku, K.; Oshima, T. (1989) Zhongguo Zhongyao Zaghi <u>14</u>, 228.

40. Tewari, N.; Mukharya, D.R. (1988) Natl. Acad. Sci. Lett. (India) 11, 281.

41. Miller, J.M.; Naidu, R.; Sotheeswaran, S.; Bokel, M.; Kraus, W. (1989) Indian J. Chem. <u>28B</u>, 1093.

42. Kabra, A.J.; Krishna-murti, M.; Seshadri, T.R. (1973) Indian J. Chem. 11, 1092.

43. Endo, T.; Taguchi, H. (1973) Chem. Pharm. Bull. 21, 2684.

44. Inouye, H.; Takeda, Y.; Saito, S.; Nishimura, H.; Sakuragi, R. (1974) <u>Yakugaku</u> Zasshi <u>94</u>, 577; C.A. 81:49977k.

- 45. Inouye, H.; Takeda, Y.; Nishimura, H. (1974) Phytochemistry 13, 2219.
- 46. Reddy, G.C.S.; Ayengar, K.N.N.; Rangaswani, S. (1975) Phytochemistry 14, 307.
- 47. Reddy, G.C.S.; Ayengar, K.N.N.; Rangaswani, S. (1975) Indian J. Chem. 13, 749.
- 48. Reddy, G.C.S.; Ayengar, K.N.N.; Rangaswani, S. (1973) Phytochemistry 12, 1831.
- 49. Rao, A.V.R.; Venkataraman, K. (1968) Indian J. Chem. 6, 677.
- 50. Inouye, H.; Saito, S.; Taguchi, H.; Endo, T. (1969) Tetrahedron Lett. 28, 2347.
- 51. Endo, T.; Taguchi, H. (1970) Chem. Pharm. Bull. 18, 1066.
- 52. Inouye, H.; Saito, S.; Shingu, T. (1970) Tetrahedron Lett. 41, 3581.
- 53. Rao, A.V.R.; Venkataraman, K.; Chakrabarti, P.; Sanyal, A.K.; Bose, P.K. (1979) Indian J. Chem. 8, 398.
- 54. Krishinamurti, M.; Seshardi, T.R.; Sharma, N.D. (1971) Indian J. Chem. 9, 189.

55. Chin, Y.C. (1964) Yao Hsueh Pao 11, 342; C.A. 61:8130c.

- 56. Guarnaccia, R.; Madyastha, K.M.; Tegtmeyer, E.; Coscia, C.J. (1972) <u>Tetrahedron</u> Lett. <u>50</u>, 5125.
- 57. Tallent, W.H. (1964) Tetrahedron 20, 1781.
- 58. Gibbs, R.D.; Edward, J.T.; Ferland, J.M. (1967) Phytochemistry 6, 253.
- 59. Chao, P.D.L.; Svoboda, G.H. (1980) J. Nat. Prod. 43, 571.

- 60. Lapikanon, P.; Tovivich, P.; Woo, W.S.; Choi, J.S. (1983) Arch. Pharmacal Res. <u>6</u>, 29.
- 61. Sainty, D.; Delaveau, P.; Bailleul, F.; Moretti, C. (1982) J. Nat. Prod. 45, 676.
- 62. Bashir, A.K.; Ross, M.S.F.; Turner, T.D. (1981) Fitoterapia 52, 273.
- 63. Sainty, D.; Delaveau, P.; Bailleul, F.; Moretti, C. (1982) J. Nat. Prod. 45, 486.
- 64. Uesato, S.; Ali, E.; Nishimura, H.; Kawamura, I.; Inouye, H. (1982) Phytochemistry 21, 356.
- 65. Bashier, A.K.; Ross, M.S.F.; Turner, T.D. (1986) Fitoterapia 57, 190.
- 66. Ansari, A.; Khan, L.H.; (1983) J. Sci. Res. (Bhopal, India) 5, 91.
- 67. Varshney, I.P.; Pal, R.; Srivastava, H.C. (1978) J. Indian Chem. Soc. 55, 397.
- 68. Quershi, M.A.; Thakur, R.S. (1977) Planta Medica 32, 229.
- 69. Saharia, G.S.; Seshadri, V. (1980) Indian J. For. 3, 6.
- 70. Johi, K.C.; Singer, P.; Tanja, S. (1981) J. Indian Chem. Soc. 58, 825.
- 71. Ansari, A.; Khan, L.H. (1981) J. Sci. Res. (Bhopal, India) 3, 133.
- 72. Davioud, E.; Bailleul, J. (1988) Planta Medica 54, 87.
- 73. Talapatra, S.K.; Sarkar, A.C.; Chakrabarti, S.; Talapatra, B. (1989) J. Indian Chem. Soc. <u>66</u>, 694.
- 74. Vohora, S.B.; Khan, M.S.Y. (1974) Indian J. Pharm. 36, 77.
- 75. Tandon, J.S.; Agarwal, K.P.; Dhar, M.M. (1966) Indian J. Chem. 4, 483.
- 76. Jain, M.K. (1965) Current Sci. (India) 34, 505.

- 77. Jensen, J.R. (1983) Phytochemistry 22, 1761.
- 78. Houghton, P.J.; Yang, H. (1985) Planta Medica 1, 23.
- 79. Adeboye, J.O.; Okori. D.A. (1983) Planta Medica 42, 95.
- 80. Schilitteer, E.; Spitaler, U. (1978) Tetrahedron Lett. 32, 2911.
- 81. Akunyili, D.N.; Akubue, P.I. (1986) J. Ethnopharmacol. 18, 167.
- 82. Houghton, P.J. (1988) Planta Medica 54, 239.
- 83. Tane, P.; Oyafor, J.F.; Sondengan, B.L.; Connoly, J.D. (1990) Phytochemistry 29, 1004.
- 84. Houghton, P.J.; Hairon, Y. (1987) Planta Medica 53, 262.
- 85. Gallegos Ollea, R.S.; Roque, N.F. (1990) Química Nova 13, 278.
- 86. Sakurai. N.; Yaguchi, Y.; Inque, T. (1987) Phytochemistry 26, 217.
- 87. Patra, A.; Mukhopadhyay, A.K.; Mitra, A.K. (1981) Org. Magn. Reson. 17, 166.
- 88. Wilkins, A.L.; Bird, P.W.; Jager, P.M. (1987) Magn. Reson. Chem. 25, 503.
- 89. Wenkert, E.; Baddeley, G.V.; Burfitt, I.R.; Moreno, L.N. (1978) Org. Magn. Reson. <u>11</u>, 337.
- 90. Blunt, J.W.; Munro, H.G. (1980) Org. Magn. Reson. 13, 26.
- 91. Polonsky, J.; Varon, Z.; Rabanal, R.M. (1977) Israel J. Chem. 16, 16.
- 92. Kmight, S.A. (1974) Org. Magn. Reson. 6, 603.
- 93. Roque, N.F.; Haraguchi, M.; resultados não publicados.

94. Sao, S.; Tomita, Y.; Tori, K. (1975) <u>Tetrahedron Lett</u>. <u>1</u>7.

95. Gonzáles, A.G.; Fraga. B.M.; Gonzáles, P.; Hernández, M.G.; Ravelo, A.G. (1981) Phytochemistry 20, 1919.

96. Oyarzún, M.L.; Garbarino, J.A.; Gambaro, V.; Guilhem, J.; Pascard, C. (1981) Phytochemistry 26, 221.

97. Majumder, P.L.; Laha, S. (1982) J. Indian Chem. Soc. 59, 881.

98. Wehrli, F.W.; Nishida, T. (1976) Progress in the Chemistry of Organic Natural Products <u>36</u>, 1.

99. Harref, A.B.; Lavergne, J.-P. (1985) Bull. Soc. Chim. Fr. 5, 965.

100. Radics, L.; Kajtar-Paredy, M.; Corsano, S.; Standoli, L. (1975) <u>Tetrahedron Lett</u>. 4287.

101. Prakash, O.; Roy, R.; Garg, H.S.; Bhakuni, D.S. (1987) Magn. Reson. Chem. 25, 39.

102. Lakshminarayana, V.; Murty, Y.L.N.; Row, L.R. (1981) Org. Magn. Reson. 17, 77.

103. Gallegos Olea, R.S.; Dissertação de Mestrado (1990), IQ-USP.

104. Siddiqui, S.; Hafeez, F.; Begum, S.; Siddiqui, B.S. (1986) J. of Nat. Prod. 49, 1086.

105. Nes, W.D.; Benson, M.; Heftman, E. (1981) Phytochemistry 20, 2299.

106. Geissman, T.A.; Crout, D.H.G. (1969) Organic Chemistry of Secundary Plant Metabolism;p.317, Freeman, Cooper & Company.

107. Macari, P.A.T.; Dissertação de Mestrado (1989), IQ-USP.

108. Bhandari, S.P.S.; Garg, H.S.; Agraeval, P.K.; Bhakuni, D.S. (1990) Phytochemistry 29, 3956.

109. Carpenter, R.C.; Subramanian, S.; Sultanbawa, M.U.S. (1980) Org. Magn. Resson. 14, 462.

110. Souza, M.P.; Matos, M.E.O.; Machado, M.I.L.; Braz Filho, R.; Vencato, I.; Mascarenhas, Y.P. (1984) Phytochemistry 23, 2589.

111. Tori, K.; Seo, S.; Shimaoka, A.; Tomita, Y. (1974) Tetrahedron Lett. 48, 4227.

112. Takahashi, K.; Takani, M. (1978) Chem. Pharm. Bull. 26, 2689.

.

113. Sadtler Research Laboratories, Inc. (1978) 5009c.