

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTRUTURAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE NEOLIGNANAS ARILTETRALÔNICAS E
DERIVADOS DE *Virola sebifera* (Aubl.)

KÊNIA ROCHA REZENDE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MASSUO JORGE KATO
ORIENTADOR

SÃO PAULO
1998

"Estrutura e Atividade Biológica de Lignan Ariltetralônicas e Derivados de **Viola** **Sebifera**".

KENNIA ROCHA REZENDE

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 Ciências - Área: Química Orgânica.

Aprovado por:

Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. NIDIA FRANCA ROQUE
IQ - USP

Prof. Dr. MARIA CLAUDIA MARX YOUNG
IB - SP

SÃO PAULO
30 DE JANEIRO DE 1998

*Aos meus pais
Arnaldo e Maria Luiza
e aos meus irmãos André e Kélia,
bússolas num mar sem tamanho.*

Meus sinceros agradecimentos

Ao orientador Massuo Jorge Kato pela oportunidade em desenvolver este trabalho;

Ao Paulo pela adorável colaboração neste trabalho;

A Araraquara por ter me proporcionado conhecer amigáveis tão maravilhosas como a do meu amigo FER e Cláudia Fegadolli !

À Fran e à Cris pela amizade;

Ao professor Massayoshi Yoshida pelo brilho dispensado;

À positividade na pessoa da professora Helena Ferraz;

À professora Nídia pela pessoa maravilhosa que é!

Aos colegas do bloco 11T pelo aprendizado em química e afins, em especial às meninas: Cláudia, Cecília, Dulce, Isabel, Clara e Ana Luísa;

A todos os colegas do bloco 11S pela convivência sempre amigável e pelo constante apoio durante o trabalho, em especial ao Rodrigo e ao Gilson;

Ao Guilherme pela excitação da espécie de *Virola sebifera*;

Ao Roque pelos excelentes espectros e pelas ótimas conversas;

Ao Chico minha admiração, e meu muito obrigada pelo xerox;

À professora Toshie Kawano e colegas do Instituto Butantan pela auxílio na realização do ensaio moluscicida;

À professora Sílvia e seu grupo pela estreita colaboração e execução do ensaio antioxidante;

À Cláudia do Instituto de Botânica pelo interesse na realização do ensaio antifúngico;

As colegas do Equilíbrio: Adriana, Paula e Cylene pela animada torcida!

À central analítica pelos espectros realizados,

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho, meu muito obrigada!!!!

ORAÇÃO DO TEMPO

*És um senhor tão bonito
quanto a cara do meu filho
Tempo tempo tempo*

*vou te fazer um pedido
Tempo tempo tempo*

*Compositor de destinos,
tambor de todos os ritmos
Tempo tempo tempo*

*entro num acordo contigo:
Tempo tempo tempo*

*Por seres tão inventivo
e pareceres contínuo,
Tempo tempo tempo*

*és um dos deuses mais lindos.
Tempo tempo tempo*

*que sejas ainda mais vivo
no som do meu estribilho
Tempo tempo tempo*

*ouve bem o que te digo:
Tempo tempo tempo*

*Peço-te o prazer legítimo
e um movimento preciso,
Tempo tempo tempo*

*quando o tempo for propício!
Tempo tempo tempo*

*de modo que o meu espírito
ganhe um brilho definido
Tempo tempo tempo*

*e eu espalhe benefícios.
Tempo tempo tempo*

*O que usaremos pra isso
fica guardado em sigilo
Tempo tempo tempo*

*apenas conte comigo!
Tempo tempo tempo*

*E quando eu tiver saído
para fora do teu círculo
Tempo tempo tempo*

*não serei, nem terás sido
Tempo tempo tempo*

*ainda assim acredito
podermos reunirmo-nos
Tempo tempo tempo*

*num outro nível de vínculo
Tempo tempo tempo*

*Portanto peço-te aquilo
e te ofereço elogios
Tempo tempo tempo*

*nas rimas do meu estilo
Tempo tempo tempo!*

Caetano Veloso

RESUMO

Os extratos das sementes de *Virola sebifera* foi fracionado através de técnicas cromatográficas conduzindo ao isolamento de quatro neolignanas ariltetralônicas (7'R,8'S,8S)-7-hidroxi-3,4,3',4'-dimetilenodioxo-7-oxo-2,7'-8,8'-neolignana (**1a**); (7'R,8'S,8S)-3,4,3',4'-dimetilenodioxo-7-oxo-2,7',8,8'-neolignana (**1b**); (8R,7'S,8'R)-4,5-dimetoxi-3',4'-metilenodioxo-7-oxo-2,7',8,8'-neolignana (**2a**) e (8R,7'S,8'R)-7'-hidroxi-4,5-dimetoxi-3',4'-metilenodioxo-7-oxo-2,7',8,8'-neolignana (**2b**) e uma neolignana diarilbutânica (8S,7'S,8'S)-7-acetoxi-3,4-dimetoxi-3',4'-metilenodioxo-7.1-seco-6,7',8,8'-neolignana (**4**), previamente descritas na literatura. São descritos ainda dois novos produtos naturais com esqueleto ariltetralônico e secotetralínico, respectivamente: (7'R,8'S,8S)-2'-hidroxi-3,4,4',5'-dimetilenodioxo-7-oxo-2,7'-8,8'-neolignana (**1c**) e (8R,8'R)-3,4,3',4',7,7'-dioxo,8,8'-neolignana (**3**). As neolignanas isoladas em quantidade foram derivatizadas e avaliadas quanto ao seu potencial biológico. No ensaio antitumoral com leveduras mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, as neolignanas e os derivados testados foram inativos. No ensaio antifúngico com *Cladosporium cladosporioides* apenas **1b** e **1c** demonstraram discreta atividade. No ensaio com desovas de *Biomphalaria glabrata*, a CL₅₀ para **1b** e **1c** foi 11,7 e 8,5 µg/mL, respectivamente. No ensaio antioxidante, as neolignanas mais ativas apresentaram hidroxilas fenólicas livres **1c**, **Cat-1a**, **Cat-2a** demonstrando atividade, em média, quarenta vezes maior que o α - tocoferol.

ABSTRACT

Ethyl acetate extract of *Viola sebifera* seeds was fractionated by chromatographic techniques yielding four aryltetralonic neolignans previously described: (7'R,8'S,8S)-7-hydroxy-3,4,3',4'-dimethylenedioxy-7-oxo-2,7',8,8'-neolignan (**1a**); (7'R,8'S,8S)-3,4,3',4'-dimethylenedioxy-7-oxo-2,7',8,8'-neolignan (**1b**); (8R,7'S,8'R)-4,5-dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-oxo-2,7',8,8'-neolignan (**2a**) e (7'S,8'R)-7'-hydroxy-4,5-dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-oxo-2,7',8,8'-neolignan (**2b**) and one diarylbutanic neolignan (8S,7'S,8'S)-7-acetoxy-3,4-dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7.1-seco-6,7',8,8'-neolignan (**4**). Furthermore, a new aryltetralonic and a diarylbutanic neolignans were described: (7'R,8'S,8S)-2'-hydroxy-3,4,4'5'-dimethoxy-7-oxo-2,7'-8,8'-neolignan-(**1c**) and (8R,8'R)-3,4,3',4',7,7'-dioxo,8,8'-neolignan (**3**). None of the isolated or derivatized neolignans showed antitumoral activity based on the low growth inhibition effect on mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The antifungal assay using *Cladosporium cladosporioides* showed slight activity for **1b** and **1c**. The molluscicidal assay on *Biomphalaria glabrata* indicated high activity for **1b** and **1c** with LC₅₀ of 11,7 and 8,5 µg/mL, respectively. As expected, the deprotection of **1a** and **2a** neolignans, yielding the corresponding catechols, increased forty times the antioxidant activity as compared to α-tocopherol. Similar activity was observed to the new neolignan bearing one free hydroxyl group (**1c**).

SUMÁRIO

Símbolos e abreviaturas.....	III
Índice de figuras.....	V
Índice de tabelas.....	VI
Índice de esquemas.....	VIII
Índice de espectros.....	VIII

I. INTRODUÇÃO

I.1- Atividades biológicas de metabólitos secundários.....	2
I.2- Lignóides: Definições e atividades biológicas.....	4
I.3- A espécie <i>Virola sebifera</i>	9
I.3.1- Metabólitos secundários isolados de <i>Virola sebifera</i>	11
I.4- Ensaio biológicos.....	14
I.4.1- Ensaio antifúngico	15
I.4.2- Ensaio antitumoral.....	18
I.4.3- Ensaio moluscicida	20
I.4.4- Ensaio de avaliação antioxidante.....	23
I.5- Objetivos.....	26

II- MATERIAIS E MÉTODOS

II.1- ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO ESTRUTURAL

II.1.1- Materiais e Instrumentos utilizados.....	28
II.1.1.1- Etapa fitoquímica.....	28
II.1.1.2- Ensaio com desovas de <i>Biomphalaria glabrata</i>	29
II.1.3- Sementes de <i>Virola sebifera</i>	30
II.1.4- Isolamento das neolignanas do extrato bruto de sementes de <i>Virola sebifera</i>	31
II.1.5- Derivatizações.....	40
II.1.5.1- Desmetilenação das neolignanas 1a e 2a	40
II.1.5.2- Acetilação da neolignana 1c	42
II.1.6- Dados físicos das neolignanas isoladas.....	43
II.1.6.1- Neolignanas ariltetralônicas.....	43
II.1.6.2- Neolignanas secotetralínicas.....	45

II.1.6.3- Dados espectroscópicos dos derivados.....	46
II.2- METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	
II.2.1- Ensaio antifúngico bioautográfico com <i>C. cladosporioides</i>	47
III.2.2- Ensaio antitumoral com variedades mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
III.2.3- Ensaio preliminar moluscicida com desovas de <i>Biomphalaria</i> <i>glabrata</i>	49
III.2.4- Ensaio de avaliação antioxidante pela medida pela medida do malonildialdeído e quimioluminescência.....	52
III- RESULTADOS E DISCUSSÕES	
III.1-Determinação estrutural.....	55
III.1.1- Neolignanas ariltetralônicas.....	57
III.1.1.1- Neolignana 1c	67
III.1.2- Neolignanas diarilbutânicas.....	72
III.1.2.1- Neolignana 3	73
III.1.2.2- Neolignana 4	77
III.2- Avaliação dos resultados biológicos.....	81
III.3- Considerações finais.....	89
IV- ESPECTROS	90

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ - Deslocamento químico

μ - Unidade de massa

J- Constante de acoplamento

α - Rotação específica

p.f.- Ponto de fusão

f- tripleto

d- dubleto

s- singleto

m- multiplete

dq- duplo quadruplete

PI- piperonila (3,4-metilenodioxifenila)

Ve- veratril (3,4-dimetoxifenila)

Abs- Absorbância

IV- Infravermelho

EM- Espectro de massas

NOE- Nuclear Overhauser effect

DEPT- Distortionless enhancement by polarizatizan transfer

m/z (int.rel.)- Relação massa carga (intensidade relativa)

RMN ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RMN ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono treze

COSY- Espectroscopia de correlação homonuclear

HETCOR- Espectroscopia de correlação heteronuclear

Pptação- Precipitação

Pptado- Precipitado

I-prOH- Isopropanol

Hex- Hexano

DMSO- Dimetilsulfóxido

DCM- Diclorometano

EtSH- Etanotiol

CG- Cromatografia a gás

C.C- Cromatografia em coluna

CPC- Cromatografia planar comparativa

CPP- Cromatografia planar preparativa

CRP- Cromatografia radial preparativa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Diversidade estrutural de lignanas e neolignanas.....	5
Figura 2- Podofilotoxina e derivados; neolignanas de <i>Phyllanthus niruri</i>	6
Figura 3- Lignóides com atividade biológica comprovada.....	8
Figura 4- Ramos floridos e detalhes das inflorescências de <i>V. sebifera</i>	9
Figura 5- Metabólitos secundários das cascas e folhas de <i>V. sebifera</i>	12
Figura 6- Metabólitos secundários dos tegumentos de <i>V. sebifera</i>	12
Figura 7- Metabólitos secundários dos arilos e sementes de <i>V. sebifera</i>	12
Figura 8- Metabólitos secundários de sementes de <i>V. sebifera</i>	13
Figura 9- Metabólitos secundários de plântulas de <i>V. sebifera</i>	13
Figura 10- Metabólitos secundários de frutos galhados de <i>V. sebifera</i>	13
Figura 11: Quimioterápicos intercalantes e antimitóticos.....	19
Figura 12- Ciclo epidemiológico da esquistossomose.....	20
Figura 13- Reação colorimétrica com malonildialdeído.....	24
Figura 14- Fruto de <i>V. sebifera</i> (Aubl) com pericarpo, arilo, tegumento e amêndoa.	30
Figura 15- Cromatograma das neolignanas isoladas.....	39
Figura 16: Estádios de desenvolvimento embrionário de <i>B. glabrata</i>	51
Figura 17: Resumo dos procedimento experimental utilizado no ensaio antioxidante.....	52
Figura 18: Neolignanas ariltetralônicas isoladas das sementes de <i>Virola sebifera</i>	56
Figura 19: Neolignanas diarilbutânicas isoladas das sementes de <i>Virola sebifera</i>	56
Figura 20: Esqueleto básico de neolignanas ariltetralônicas.....	57
Figura 21: Região entre 2,3 – 0,9 do espectro de RMN de ¹ H de 1a , com dupla irradiação.....	60
Figura 22: Confôrmeros propostos para neolignana 1c-Acet	70
Figura 23: Experimentos de RMN de ¹ H de 1c-Acet , sob temperatura variada.....	71
Figura 24: Projeções de Newman para os isômeros I e II, de 3	75
Figura 25: Região do espectro RMN de ¹ H de 4 , duplamente irradiado.....	78
Figura 26: Projeções de Newman de 4	78
Figura 27: Foto do halo de inibição da neolignana 1c (Inst. Bot. São Paulo).....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Fármacos de origem vegetal.....	3
Tabela 2- Lignanas e neolignanas com atividades biológicas comprovadas.....	7
Tabela 3- Modelos químicos e bioquímicos para detecção de radicais oxidantes.....	25
Tabela 4- Quantificação das neolignanas isoladas das amêndoas de <i>V. sebifera</i>	39
Tabela 5- Cromatograma das neolignanas isoladas.....	39
Tabela 6- Dados observados nos espectros de RMN- ¹ H para as neolignanas ariltetralônicas.....	61
Tabela 7- Dados observados nos espectros de RMN- ¹³ C para as neolignanas ariltetralônicas.....	62
Tabela 8- Dados observados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C para 1c e 1c-Acet	69
Tabela 9- Dados comparativos de espectros de RMN de ¹ H à T _{amb} e - 60° C para neolignana 1c- acet	72
Tabela 10- Dados observados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C para neolignana 3	75
Tabela 11- Dados observados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C para neolignana 4	81
Tabela 12- Diâmetro do halo de inibição do crescimento de variedades mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> das amostras avaliadas a 2000 µg/mL no Instituto Politécnico da Virgínia.....	84
Tabela 13- Diâmetro do halo de inibição do crescimento de variedades mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> das amostras avaliadas no Instituto Botânico de São Paulo.....	85
Tabela 14- Valores das CL ₅₀ e CL ₉₀ em embriões de desovas de <i>B. glabrata</i>	86
Tabela 15- Valores de Q _{1/2} em µg/ml obtidos nos ensaios de produção de MDA e emissão de Q.L.....	87

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1- Fracionamento do extrato bruto das amêndoas de <i>Virola sebifera</i>	31
Esquema 2- Fracionamento cromatográfico do grupo II.....	32
Esquema 3- Fracionamento cromatográfico do grupo III.....	34
Esquema 4- Fracionamento cromatográfico do grupo IV.....	36
Esquema 5- Fracionamento cromatográfico do grupo V.....	38
Esquema 6- Principais fragmentos observados no EM de 1a	63
Esquema 7- Principais fragmentos observados no EM de 1b	64
Esquema 8- Principais fragmentos observados no EM de 2a	65
Esquema 9- Principais fragmentos observados no EM de 2b	66
Esquema 10- Principais fragmentos observados no EM de 3	75
Esquema 11- Principais fragmentos observados no EM de 4	80

LISTA DE ESPECTROS

ESPECTRO 1- RMN de ^1H da neolignana 1a (200 MHz, CDCl_3).....	91
ESPECTRO 2- RMN de ^{13}C da neolignana 1a (50 MHz, CDCl_3).....	92
ESPECTRO 3- RMN de ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 1a (50 MHz, CDCl_3).....	93
ESPECTRO 4- RMN de ^1H do derivado Cat 1a (200 MHz, CDCl_3).....	94
ESPECTRO 5- RMN de ^{13}C do derivado Cat 1a (50 MHz, CDCl_3).....	95
ESPECTRO 6- RMN de ^1H da neolignana 1b (200 MHz, CDCl_3).....	96
ESPECTRO 7- RMN de ^{13}C da neolignana 1b (50 MHz, CDCl_3).....	97
ESPECTRO 8- RMN de ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 1b (50 MHz, CDCl_3).....	98
ESPECTRO 9- RMN -2D COSY da neolignana 1b (200 MHz, CDCl_3).....	99
ESPECTRO 10- Ampliação dos sinais da região aromática da neolignana 1b (COSY, 100 MHz, CDCl_3).....	100
ESPECTRO 11- RMN de ^1H da neolignana 1c (200 MHz, CDCl_3).....	101
ESPECTRO 12- RMN de ^1H da neolignana 1c (300 MHz, CDCl_3).....	102
ESPECTRO 13- RMN de ^1H da neolignana 1c (200 MHz, CD_3COCD_3).....	103
ESPECTRO 14- RMN de ^{13}C da neolignana 1c (50 MHz, CDCl_3).....	104
ESPECTRO 15- RMN de ^{13}C da neolignana 1c (50 MHz, CD_3COCD_3).....	105
ESPECTRO 16- RMN de ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 1c (50 MHz, CD_3COCD_3).....	106
ESPECTRO 17- RMN -2D HETCOR da neolignana 1b (200 MHz, CDCl_3).....	107
ESPECTRO 18- RMN de ^1H do derivado 1c-Acet (200 MHz, CDCl_3).....	108
ESPECTRO 19- Ampliação dos prótons metilenodioxifenílicos do RMN de ^1H de 1c-Acet (300 MHz, CD_3COCD_3).....	109
ESPECTRO 20- RMN de ^1H da neolignana 1c-Acet à $-60\text{ }^\circ\text{C}$ (500 MHz, CDCl_3).....	110
ESPECTRO 21- RMN de ^{13}C da neolignana 1c-Acet (50 MHz, CDCl_3).....	111
ESPECTRO 22- RMN de ^1H da neolignana 2a (200 MHz, CDCl_3).....	112
ESPECTRO 23- RMN de ^{13}C da neolignana 2a (50 MHz, CDCl_3).....	113
ESPECTRO 24- RMN de ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 2a (50 MHz, CDCl_3).....	114
ESPECTRO 25- RMN-2D HETCOR da neolignana 2a (75 MHz, CDCl_3).....	115
ESPECTRO 26- RMN ^1H do derivado Cat-2a (200 MHz, CDCl_3).....	116
ESPECTRO 27- RMN ^{13}C do derivado Cat-2a (50 MHz, CDCl_3).....	117

ESPECTRO 28- RMN ^1H da neolignana 2b (200 MHz, CDCl_3).....	118
ESPECTRO 29- RMN de ^{13}C da neolignana 2b (50 MHz, CDCl_3).....	119
ESPECTRO 30- RMN de ^1H da neolignana 3 (200 MHz, CDCl_3).....	120
ESPECTRO 31- RMN de ^{13}C da neolignana 3 (50 MHz, CDCl_3).....	121
ESPECTRO 32- RMN de ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 3 (50 MHz, CDCl_3).....	122
ESPECTRO 33- RMN-2D HETCOR da neolignana 3 (200 MHz, CDCl_3).....	123
ESPECTRO 34- RMN de ^1H da neolignana 4 (300 MHz, CDCl_3).....	124
ESPECTRO 35- Ampliação da região dos sinais de hidrogênios alifáticos do RMN ^1H da neolignana 4 (75 MHz, CDCl_3)	125
ESPECTRO 36- RMN ^{13}C da neolignana 4 (75 MHz, CDCl_3).....	126
ESPECTRO 37- RMN-2D HETCOR da neolignana 4 (75 MHz, CDCl_3).....	127
ESPECTRO 38- Ampliação da região dos sinais de hidrogênios aromáticos da neolignana 4 (HETCOR, 75 MHz, CDCl_3)	128
ESPECTRO 39- RMN-2D COSY da lignana 4 (300 MHz, CDCl_3).....	129

INTRODUÇÃO

I.1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.

A busca de substâncias biologicamente ativas em extratos vegetais tem se intensificado nos últimos anos, através do uso de ensaios biológicos paralelamente à fitoquímica. Estes trabalhos de isolamento biomonitorados têm sido desenvolvidos através do uso de ensaios preliminares e/ou específicos ao longo dos processos de fracionamentos cromatográficos^{1,2}.

Para os constituintes bioativos de plantas importantes correlações com funções ecológicas, fisiológicas e farmacológicas têm sido realizadas. As aplicações mais tradicionais são encontradas na medicina popular entre os povos chineses e indianos. Drogas como o ópio, ébano, mandrágora e ginseng estão entre as mais antigas usadas na terapêutica humana e datam de aproximadamente seis mil anos

Atualmente são utilizados cerca de 120 fármacos obtidos por extração direta do vegetal, sendo em sua maioria antibióticos, vitaminas, hormônios e substâncias ativas no sistema nervoso central ou anticancerígenas³.

As indicações de potenciais utilizações medicinais de plantas podem ser obtidas a partir de dados etnofarmacológicos comuns ou comparativos⁴. Existem inúmeros casos de drogas comerciais oriundas de tais informações⁵. Somente na terapêutica do câncer temos os alcalóides vinblastina e vincristina de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), utilizadas na doença de Hodgkin e leucemia linfocitária; as lignanas obtidas da mandrágora americana (*Podophyllum peltatum* - Berberidaceae) utilizadas no câncer da próstata e pulmão; os derivados da colchicina de *Colchicum autumnale* (Liliaceae); o taxol e outros derivados de *Taxus brevifolia* em triagem clínica, com promissor uso no câncer ovariano, e ainda inúmeros outros antitumorais com utilidade restrita à patologias específicas (Tabela 1, p. 3).

¹ Bastos, J.K. (1991) - Tese de Doutorado - Instituto de Química (USP) - *Zanthoxylum naranjilo*, Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica

² Brochini, C. B. (1997) - Tese de Doutorado - Instituto de Química (USP) - *Terpenos de Guarea guidonia* e Fracionamento Fitoquímico Biomonitorado com Linhagens Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

³ Korolkovas, A., Burchkhalter, J. H. (1988) *Química Farmacêutica*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

⁴ Gottlieb, O. R. & Stefanello, M. E. A (1991) *Ann. Acad. bras. Ci.* **63**, (1)

Entre os medicamentos com usos diversos, oriundos de plantas e amplamente difundidos, podemos citar vários exemplos (Tabela 1).

Tabela 1: Fármacos de origem vegetal⁶

Utilidade	Princípios ativos
tratamento da hipertensão	digitoxina e digoxina, cardenolídeos de <i>Digitalis lanata</i> (Scrophulariaceae)
ação antimalárica	artemisinina, lactona sesquiterpênica oriunda da <i>Artemisia annua</i> (Compositae)
usos oftálmicos na midríase	atropina de <i>Atropa belladonna</i> (Solanaceae)
atividade antipirética	ácido salicílico e derivados de <i>Salix sp</i> (Saliciliaceae)
anticoagulante	dicumarol, um artefato de <i>Melilotus officinalis</i> (Leguminosae)
tratamento do glaucoma	diterpenos de <i>Coleus barbatatus</i> (Labiatae)

O reino vegetal continua representando um enorme reservatório de novas moléculas a serem descobertas. Embora existam controvérsias a respeito do número, estima-se que existam cerca de 500 a 700 mil espécies de plantas⁷ e apenas 250 mil espécies conhecidas. Destas, uma pequena porcentagem foi investigada fitoquimicamente, e uma parcela ainda menor (cerca de 5000 espécies) foi submetida a seleção biológica e farmacológica. No Brasil, observa-se uma situação semelhante, pois existem cerca de 120 mil espécies de plantas, genuinamente nacionais e destas, apenas 470 (0,4 %) foram avaliadas quanto a seus constituintes químicos, sendo que sobre as demais nada se sabe.

⁵ Hamburguer & Hostettman *et al* (1991) *Phytochemistry*. **30**, 3864

⁶ Hostettmann, K.; Wolfender, J-L.; Rodriguez, S. (1997) *Planta Medica* **63**, 2.

⁷ Gottlieb, O. R. & Mors, W. (1980) *J Agric. Food Chem.* **28**, 196.

I.2- LIGNÓIDES: Definições e atividades biológicas.

O termo lignóide engloba importantes classes de metabólitos secundários de plantas. A nomenclatura utilizada para os esqueletos lignanoídicos foi introduzida por Haworth⁸, revisada por Gottlieb (1972)⁹, e adotada pela IUPAC. Nesta definição considera-se que lignanas são formadas por unidades fenilpropanoídicas ligadas através dos carbonos β - β' (C8/C8') e neolignanas são dímeros ligados por outras posições.

Posteriormente, Gottlieb (1978)¹⁰ redefiniu esta nomenclatura segundo a origem biogenética das substâncias, estabelecendo que lignanas são dímeros derivados da condensação por acoplamento oxidativo, cujo carbono γ (C3) da cadeia lateral encontra-se oxidado. As neolignanas, ao contrário são isentas de oxidação neste carbono. Portanto, lignanas seriam dímeros de ácidos cinâmicos e/ou álcoois cinâmicos e neolignanas os dímeros de propenilfenóis e/ou alilfenóis¹¹. Nesta dissertação adota-se esta última definição.

Na biossíntese de lignóides, os substratos utilizados são os produtos finais provenientes do metabolismo do chiquimato, ou seja, ácidos cinâmicos, álcoois cinâmicos, propenil e alilfenóis. O mecanismo biogênico, atualmente aceito foi proposto por Erdtmann¹¹ e respaldado em várias sínteses biomiméticas atuais^{12,13}. Tal mecanismo envolve acoplamentos oxidativos monoelétrônicos e bielettrônicos de precursores como fenóis orto ou para substituídos, com hidroxila fenólica livre na posição *para* das unidades fenilpropanoídicas, levando à formação de quinonametídeos. Estes, por interação com o carbânion, oriundo da unidade precursora não oxidada, resulta na maioria dos tipos de esqueletos encontrados (Figura 1 p. 5). Para as metoxilações ou metilenações, postula-se que estas ocorram em etapa posterior *via* ataque aos grupamentos hidroxílicos e preferencialmente nas posições 3 e 5 dos anéis aromáticos.

⁸ Haworth, R. D. (1942) *J. Chem. Soc.*, 448.

⁹ Gottlieb, O. R. (1972) *Phytochemistry* **11**, 1537.

¹⁰ Gottlieb, O. R. (1978) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **35**, 1.

¹¹ Erdtmann, H. (1933) *Liebigs. Ann. Chem* **503**, 283

¹² Pelter, A.; Ward, R. S. & Watson, D. J. (1986) *Rec. Adv. Phytochem.* **20**, 201

¹³ Ward, R. S. (1996) *Natural Product Reports* **13**, 43.

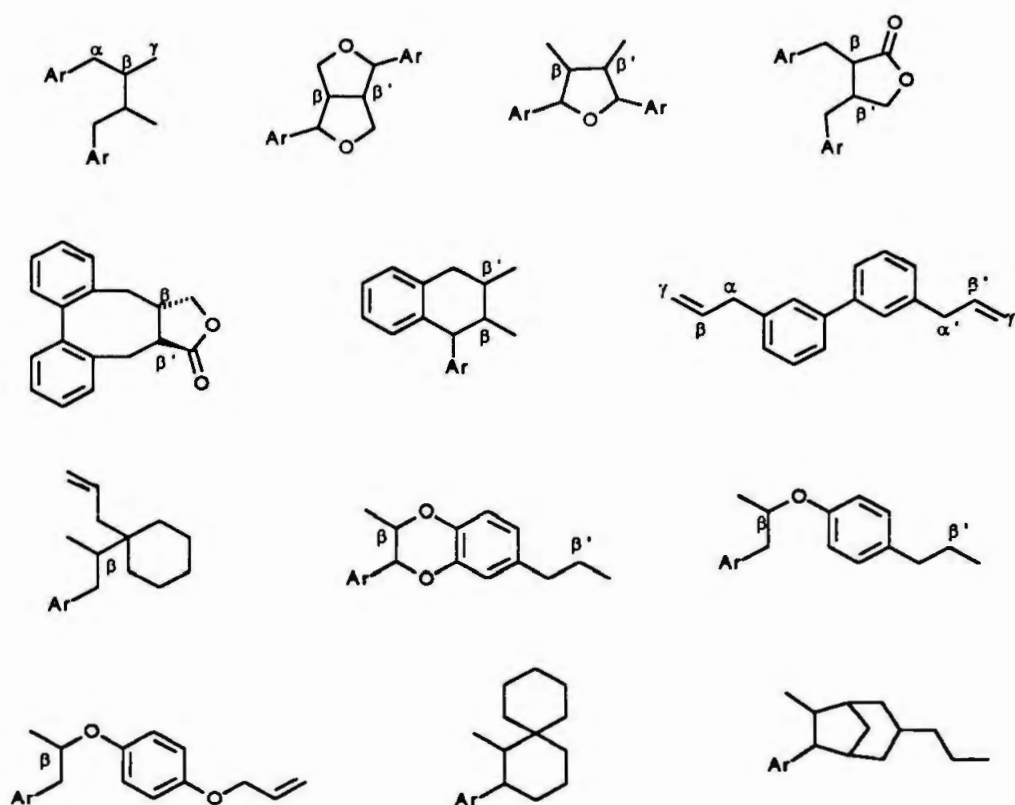


Figura 1: Diversidade estrutural de lignanas e neolignanas.

Dentre as classes de metabólitos secundários, os alcalóides, terpenóides e flavonóides apresentam propriedades terapêuticas que são frequentemente descritas. De importância semelhante podemos descrever os lignóides, aos quais têm sido atribuídos importante papel na evolução¹⁴ e adaptação das plantas no ambiente terrestre. Como exemplo do desenvolvimento de mecanismos de defesa produzidos, podemos citar as lignanas da madeira e folhas, oriundas de desvio da biossíntese normal, em resposta a ferimentos mecânicos, ou ataque por fungos e bactérias¹⁵. Esta injúria eleva a produção de ligninas e lignanas, as quais atuam como defesa do vegetal.

Comercialmente, a importância dos lignóides está bem representada pelos medicamentos obtidos a partir da podofilotoxina de *Podophyllum peltatum* L. e *P. emodii* Wallich. e utilizados no tratamento do câncer. Seus derivados o teniposideo

¹⁴ Gottlieb, O. R. (1992) *Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - An Essay into a Novel Botanical Discipline*. Springer-Verlag, Heidelberg.

¹⁵ Maxemiuc- Naccache, V. (1983) Tese de Doutorado: Alterações Bioquímicas em folhas de *Coffea arabica* resistentes e suscetíveis à infecção por *Hemileia vastatrix*.

(2) e o etoposídeo (3) são β -D-glicopiranosídeos da 4'-desmetil-epipodofilotoxina comercializados pela Sandoz para utilização na terapêutica clínica¹⁶. Outro derivado oriundo da mesma planta é denominado vepesídeo, o qual é utilizado no tratamento do câncer de pulmão e próstata e comercializado pela Mead Johnson por 145,83 libras/grama. Outras lignanas como a α - e β -peltatina (4, 5)¹⁷ foram utilizadas por mais de 40 anos na América do Norte no tratamento de verrugas venéreas. A ação diurética e/ou antilítica do quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) em seres humanos, tem sido relacionada à presença de neolignanas (6 -11) nesta espécie¹⁸, reforçando a importância farmacológica desta classe de metabólitos secundários.

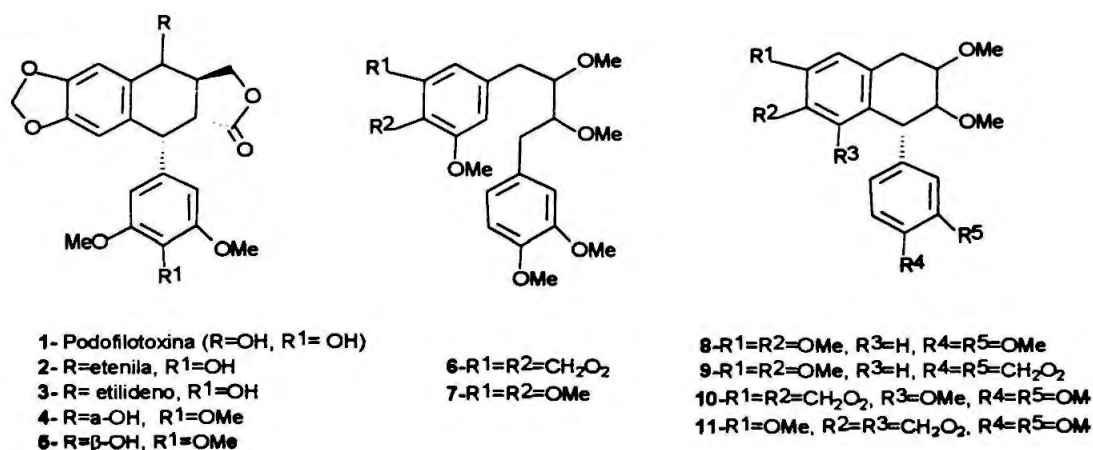


Figura 2: Derivados da podofilotoxina (2-5) e neolignanas de *Phyllanthus niruri* (6-11).

Outras atividades preliminares comprovadas são descritas para os lignóides¹⁹ e dentre estas podemos citar as atividades antiviral, antifúngica, antimitótica, piscicida e inseticida. Observa-se também, ação sobre o sistema nervoso central, atividade antialérgica, cardiovascular, hipotensora, inibidora de germinação, antifertilidade, além de exercer influência sobre ácidos nucleicos, atividades enzimáticas, proteção hepática e contra o estresse.

Para as espécies de Myristicaceae, os lignóides representam a mais importante classe de metabólitos secundários com inúmeras atividades biológicas descritas e propriedades farmacológicas consagradas (Tabela 2 p. 7, Figura 3, p. 8).

¹⁶ Loike, J. D.; Horwitz, S. B. (1976) *Biochemistry* **15**, 5435.

¹⁷ Hartwell, J. L.; Sherecker, A. W. (1958) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **15**, 83.

¹⁸ Cordell, G. A (1979) *Progress in Phytochemistry* **5**, 273.

¹⁹ McRae, W. D. & Towers, G. H. N. (1984) *Phytochemistry* **23**, 1207.

Tabela 2: Lignanas e neolignanas com atividades biológicas comprovadas*.

LIGNÓIDES	ATIVIDADES
Justicidina-A e B (1)	ictiotóxica
esteganacina, esteganagina, esteganona (2)	antileucêmica, anticarcinoma de nasofaringe de células P.S e K.B.
sesamina ^a (3) cobusina ^b	sinergista de inseticidas ^a inibidora de crescimento de <i>Bombyx morbi</i> ^b
cubebina (4)	anti-séptico urinário
hordatina (5)	antifúngica
ácido diidroguaiarético ^{a,b} , ácido nordidroguaiarético ^c (6)	anti-sifilítica ^a , antimicrobiana ^b ; antioxidante ^{c1} , inibidor de oxidases ^{c2} , antitumoral ^{c3} , antifúngica ^{c4} , anti-HIV^{c5}
norisoguaiacina (7)	antimicrobiana ^{6b}
otobaína (8)	antifúngica
esquizandrina, esquizandrol (9)	psicotrópicas
gomisina A e J ^a cadsurina/cadsurarina ^(6b) (10)	antipiréticas ^a estimulantes do SNC ^(6b)
licarina A (11)	citotóxica
megafona (12)	
surinamensina (13)	cercaricida
konokiol ^a , magnolol ^b (14)	relaxante muscular ^a , sedativo ^b
nanassantina A (15)	neuroléptica
4-hidroxi-1-tetralona (16)	ativa na leishmaniose cutânea

* O número entre parênteses indica a referência e a estrutura correspondente (Figura 3, p. 8).

(1) Munakata, K., Marumo, S., Ohta, K., Chen, L.-H. (1965) *Tetrahedron Lett.*, 4167.

(2) Kupchan, S. M.; Britton, R. W.; Ziegler, M. F.; Gilmore, C. J.; Restivo, R. J.; Bryan, R.F.; (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 1335.

(3) ^aCooper, R.; Gottlieb, H. E.; Lavie, D.; Levy, E. C. (1979) *Tetrahedron* **15**, 861.

^bKamikado, T.; Chang, C.-F.; Murakoshi, S.; Sakurai, A.; Tamura, S. (1975) *Agric. Biol. Chem. (Jpn)* **39**, 833.

(4) The Merck Index (1976) 9^a Ed., p. 340

(5) Stoessel, A. *Tetrahedron Lett.* (1966) 2287.

(6) ^aKing, F.E.; Wilson, J.G (1964) *J. Chem. Soc.* 4011.

^b Gisvold, O., Thaker, E. (1979) *J. Pharm. Sci.* **63**, 1905.

^{c1}Mabry, T. J.; Ulubelen, A. (1980) *J. Agric. Food. Chem.* **28**, 188.

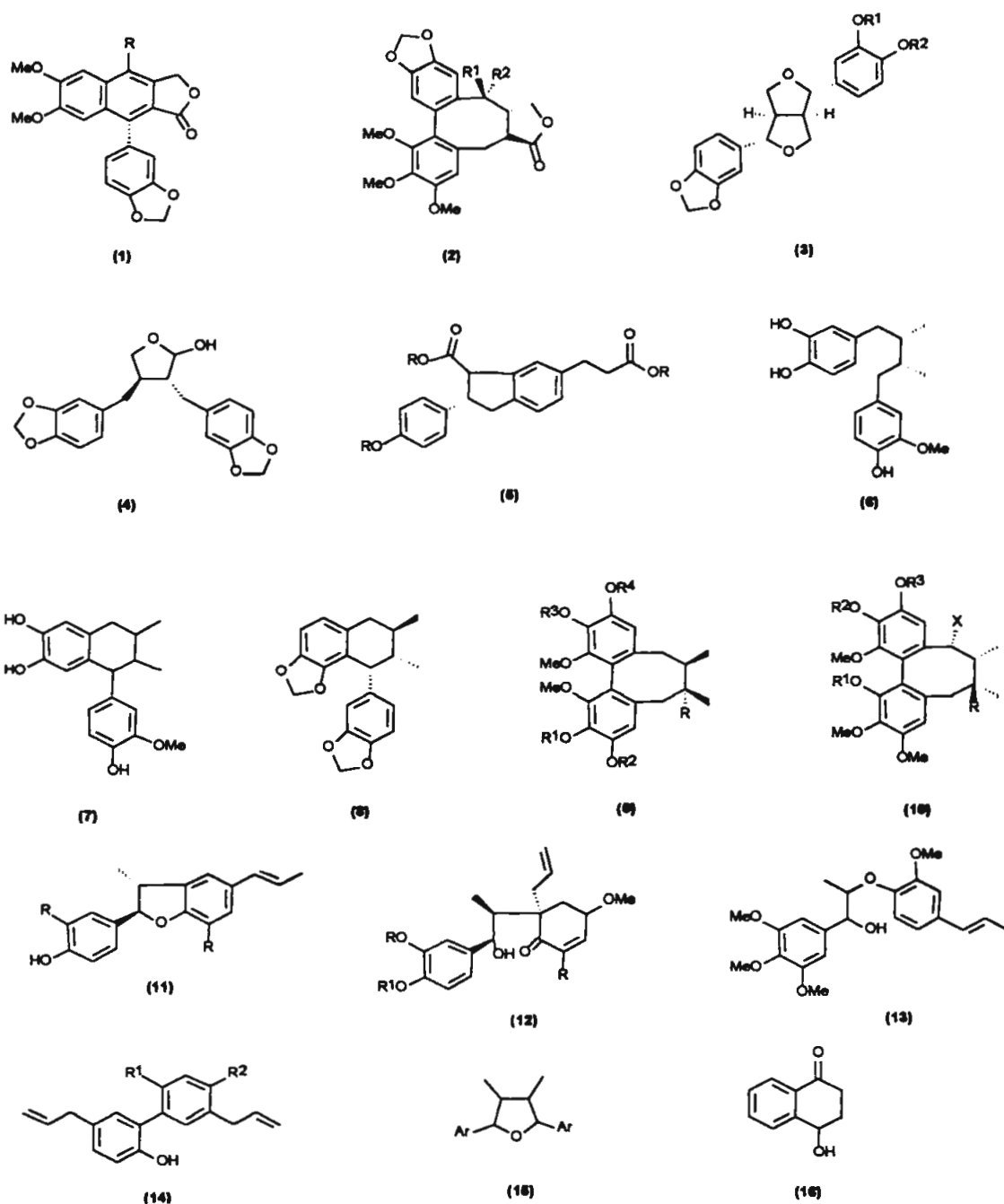
^{c2}Buvanavaren, C.; Dakshinamurti (1972) *Biochemistry* **11**, 85.

^{c3}Burk, D.; Woods, M. (1963) *Radiat. Res. Suppl.* **3**, 212.

^{c4}Fernandez, S.; Hurtado, L. M.; Hernandez, F. (1979) *Advances in Pesticide Science*, part2, Pergamon Press, Oxford

^{c5}Gnabre, J.; Huang, R. C.C.; Bates, R. B.; Burns, J. J.; Caldera, S.; Malcomsom, M. E.; McClure, K. J. (1995) *Tetrahedron* **51**, 12203.

Figura 3: Lignóides com atividades biológicas comprovadas.



(8) Adjangba, M. S. (1963) *Bull. Soc. Chim. France*, 2344.

(9) Cnipolhliev, T.; Ilieva, St. (1967) *Farmatsiya*, 17, 56.

Volicer, L.; Sramka, M.; Janku, I.; Capek, R.; Smetana, R.; Ditteova, V. (1966) *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* 163, 249.

10)^{a,b} Cnipolhliev, T.; Ilieva, St. (1967) *Farmatsiya*, 17, 56

(11) Le Quesne, P.W.; Larrahondo, J. E.; Raffauf, R. F. (1980) *Lloydia* 43, 353.

(12) Kupchan, S. M.; Stevens, K.L.; Rohlfing, E. A.; Sickles, B. R.; Sneden, A. T. Miller, R. W., Bryan, R. F. (1978) *J. Org. Chem.* 43, 586.

(13) Barata, L. E. S. Baker, P. M., Gottlieb, O. R., Rúveda, E. A. (1978) *Phytochemistry* 17, 783.

(14) Watanabe, K.; Goto, Y.; Yoshitomi, K. (1973) *Chem. Pharm. Bull.* 21, 1700.

(15) Oliveto, E. P. (1977) *Chem. Ind.*, 677.

(15) Rao, K. V.; Alvarez, F. M.; (1983) *Tetrahedron Lett.* 24, 4947.

(16) Fournet, A.; Barrios, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A (1994) *Planta Medica* 60, 8.

I.3- A ESPÉCIE *Virola sebifera* ²⁰

A espécie *Virola sebifera* pertence à ordem Magnoliales, à classe Angiosperma, à família Myristicaceae e ao gênero *Virola*.



VIROLA *Schultesii* A.C.Sm.

Figura 4: Ramos floridos e detalhes das inflorescências de *Virola schultesii*, similar a *V. sebifera* (Reprodução de Schultes & Holmsted, 1971)²¹.

Do ponto de vista filogenético, a família Myristicaceae é considerada pelos sistematas²² como sendo uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas vivas. Segundo Hegnauer²³, é composta por 15 gêneros e cerca de 300 espécies, distribuídos em três blocos continentais principais:

²⁰ Rodrigues, W.A (1980) *Acta Amazônica* (10), 1-123

²¹ Schultes, R. E. & Holmstedt, B. (1971) *Lloydia* 34, 61.

²² Smith, A. C., Wodehauser, R. P. (1937) *Brittonia* 2 (05), 313.

²³ Hegnauer, R. (1969) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band V Birkhauser-Verlag, Basel, p. 144-153.

- *Gymnacrantera*, *Horsfieldia*, *Knema* e *Myristica*, no continente asiático
- *Brochoneura*, *Cephalosphaera*, *Coelocaryon*, *Pycnanthus*, *Scyphocephalium* e *Staudtia*, na África e Madagascar;
- *Componeura*, *Dialyanthera*, *Iryanthera*, *Osteophloeum* e *Virola* nas Américas.

Quanto ao número de espécies dos gêneros americanos, Willis²⁴ aponta a existência de sessenta espécies de *Virola*, trinta de *Iryanthera*, onze de *Componeura*, nove de *Dilyyanthera* e uma de *Osteophloeum*.

O gênero *Virola* apresenta distribuição geográfica ampla, ocorrendo em quase toda a América tropical, desde a Nicarágua até o Peru e Bolívia. No Brasil, está presente em todos os Estados, principalmente na bacia amazônica com o número de espécies diminuindo abruptamente em direção ao extremo meridional do país.

No gênero *Virola*, nome adotado por Aublet em 1775 em referência a uma espécie utilizada pelos índios Sinemari da Guiana Francesa, encontram-se desde árvores muito pequenas até elevadas, mas raramente arbustos.

Para esta espécie, o habitat preferencial são matas de terra firme, campos cerrados, geralmente em baixas altitudes, mas pode ocorrer em elevações de até 1300 m, como na Serra dos Pirineus, em Goiás.

Sua floração acontece durante todos os meses do ano, mas destaca-se os meses entre fevereiro e maio; já a frutificação ocorre entre os meses de maio e outubro.

Dependendo da região, pode ser identificada pelos nomes populares de "árvore da cera", "bicuíba vermelha", "ucuúba-da-terra-firme" ou "ucuúba-da-folha-larga" na região amazônica, e como "pindaíba-roxa" em Goiás, entre outros.

Outra importante característica para reconhecimento da espécie é a presença de uma resina vermelha que exsuda da casca após a incisão, onde as triptaminas estão presentes em concentrações de até 11%²⁵.

A principal aplicação comercial desta espécie encontra-se na indústria madeireira para produção de tábuas de embalagem e construção civil e na indústria cosmética.

²⁴ Willis, J. C. (1973) *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns*. Cambridge University Press, Cambridge, p.771.

²⁵ Agurell, S.; Holmstedt, B.; Lindgren, J-E.; Schultes, R. E. (1969) *Acta Chem. Scand.* **23**, 903.

1.3.1- METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DE *Virola sebifera*

A "ucuúba" ou "árvore de gordura", assim denominada pelos indígenas da amazônia, apresenta em suas sementes ésteres de ácidos graxos saturados como laúrico, mirístico, palmítico e esteárico, e insaturados como o oleico e o linoleico e ainda metabólitos do tipo acilfloroglucinóis²⁶, tidos como inibidores da oxidação destes ácidos graxos insaturados. Observa-se ainda, a presença abundante de neolignanas ariltetralínicas (Fig. 7, p.12), as quais têm sido atribuídos efeito antifúngico²⁷. Os usos populares das Myristicaceae²⁸ apontam para eficácia do tratamento de afecções reumáticas, tumores artríticos, cólicas, erisipelas e feridas.

Os dados etnofarmacológicos apontam as cascas e folhas²⁹ (Figura 5 p.12) desta espécie como alucinogênica, devido a presença de alcalóides triptamínicos³⁰ e β -carbolínicos³¹, como a *N,N*-dimetil-triptamina (**1c**) e 2-metiltetrahydro- β -carbolina (**2c**)³². Nas cascas, observa-se ainda a presença de alguns terpenóides³³. As folhas adultas de *V. sebifera* apresentam neolignanas diarilbutânicas e lignanas dibenzilbutirolactônicas como seus metabólitos mais abundantes, cujos teores são dependentes de variações sazonais³⁴. Já as folhas de plântulas (Figura 9, p. 13) apresentam neolignanas ariltetralônicas e policetídeos como seus componentes principais.³⁵ Os frutos galhados, geralmente oriundos do ataque por *Agrobacterium tumefaciens*, também apresentam neolignanas ariltetralínicas em elevada concentração (Figura 10, p. 13).

Do tronco de *Virola sebifera* exsuda uma resina, cuja cor vermelha deve-se a presença de biflavonóides³⁶, flavonóides, flavanas e 1,3-diarilpropanóides³⁷, utilizados contra aftas, anginas e erisipelas na forma de gargarejos ou loções.

²⁶ Kato, M. J., Lopes, L. M. X. Paulino F^o, H. F.; Yoshida, M. & Gottlieb, O. R. (1985) *Phytochemistry* **24**, 533.

²⁷ Adjangba, M. S. (1973) *Bull. Soc. Chim. France*, 2344

²⁸ Kistler, L. L. (1970) *Biology* **207**, 35.

²⁹ McKeena, D. J.; Towers, G. H. N.; Abbott, F. S. (1984) *J. Ethnopharm.* **12**, 179

³⁰ Kawanishi, K. & Hashimoto, Y. (1987) *Phytochemistry* **25**, 279.

³¹ Schultes, R. E. & Holmstedt, B. (1968) *Rhodora* **70**, 113.

³² Lindgren, comunicação pessoal a Schultes, R. E. & Holmstedt, B. (1968) *Rhodora* **70**, 113

³³ Corothie, E. & Nakano, T. (1969) *Planta Medica* **17**, 184

³⁴ Fraga, R. L. (1987) Dissertação de Mestrado - Departamento de Química do Centro de Tecnologia da Universidade de São Carlos.

³⁵ Danelutte, A. P. (1996) Tese de Mestrado - Departamento de Química da Universidade de São Paulo.

³⁶ Gottlieb, O. (1979) - *J. Ethnopharmacol.* **1**, 309

³⁷ Gottlieb, O. R.; Loureiro, A. A.; Carneiro, M. dos S., da Rocha, A. I. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1830.

Figura 5: Metabólitos secundários das cascas e folhas de *V. sebifera*

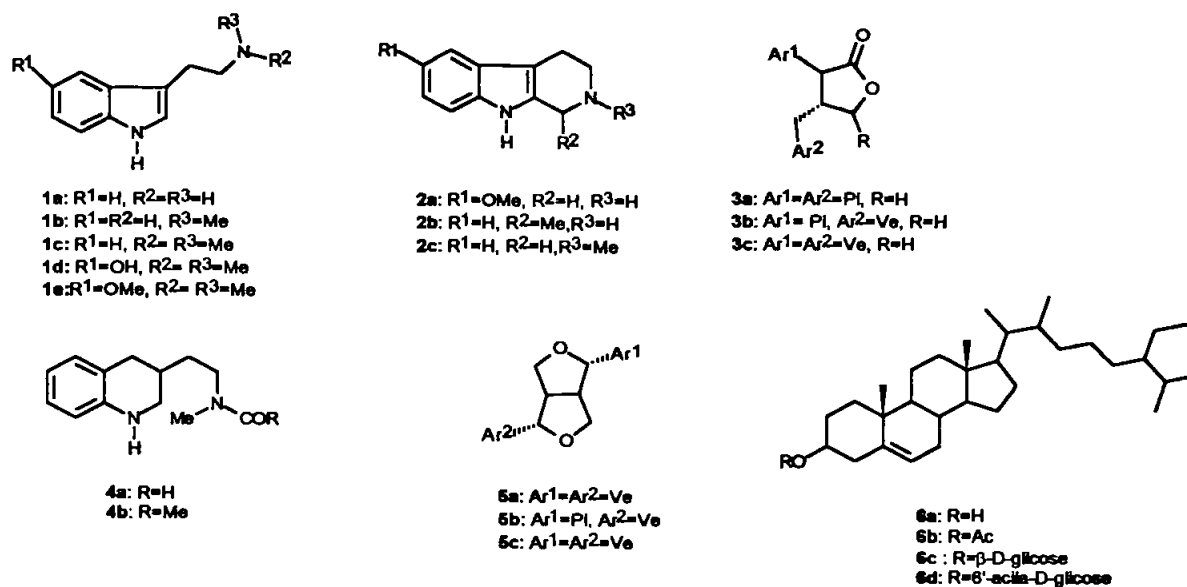


Figura 6: Metabólitos secundários dos tegumentos de *V. sebifera*.

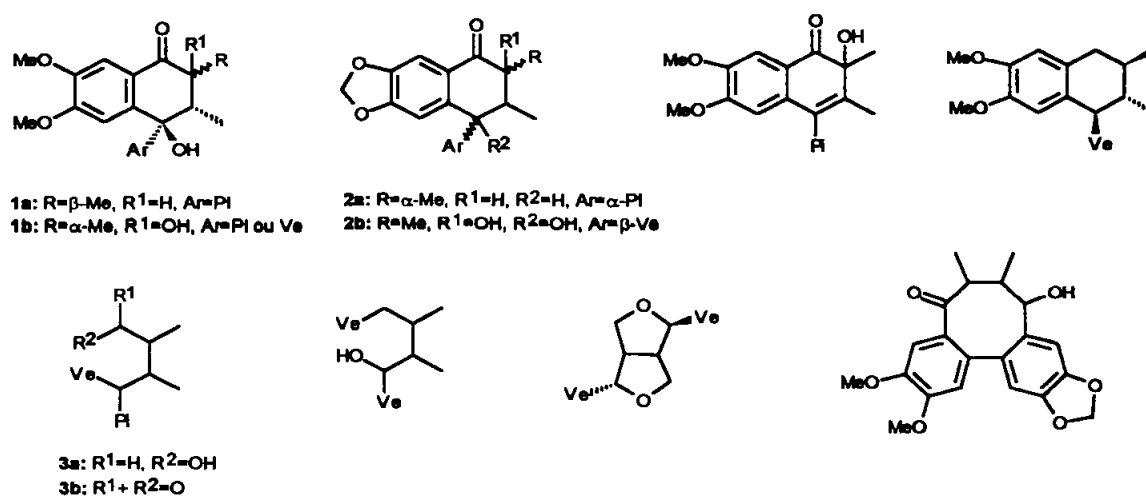


Figura 7: Metabólitos secundários dos arilos e amêndoas de *V. sebifera*.

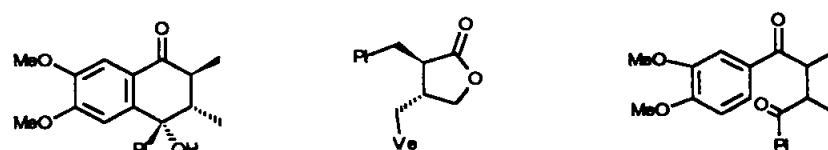


Figura 8: Metabólitos secundários de sementes de *V. sebifera*.

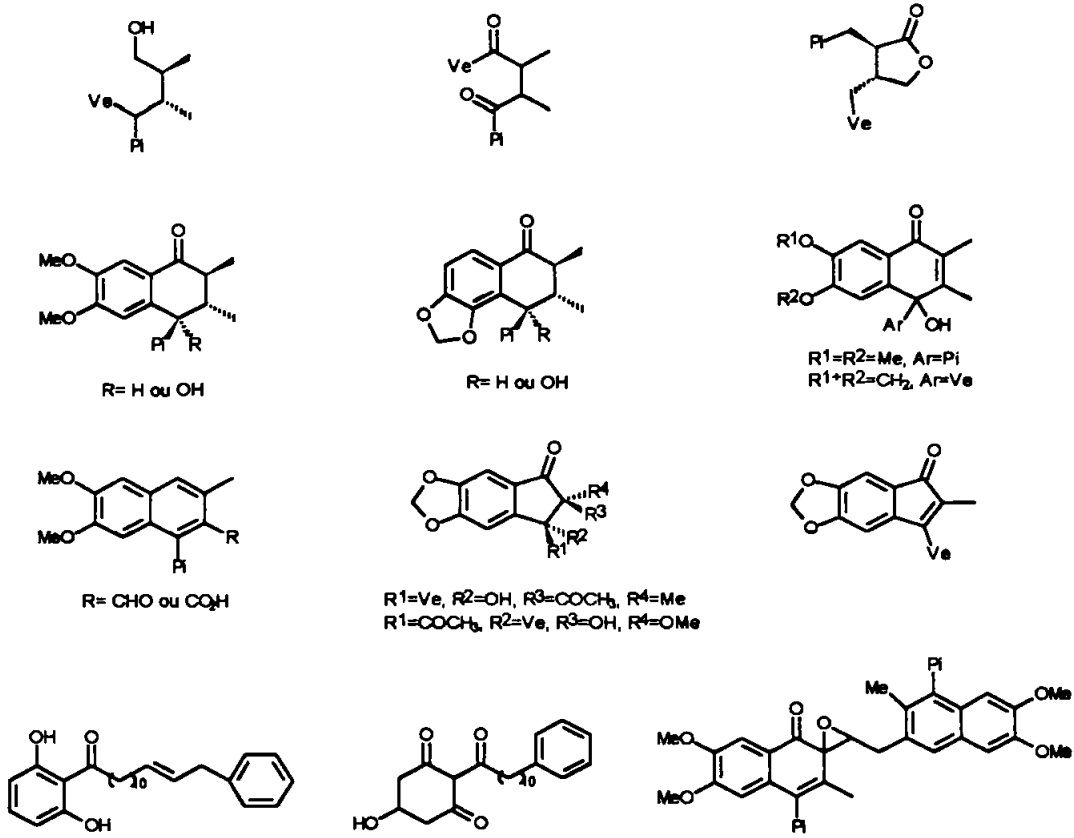


Figura 9: Metabólitos secundários de plântulas de *V. sebifera*

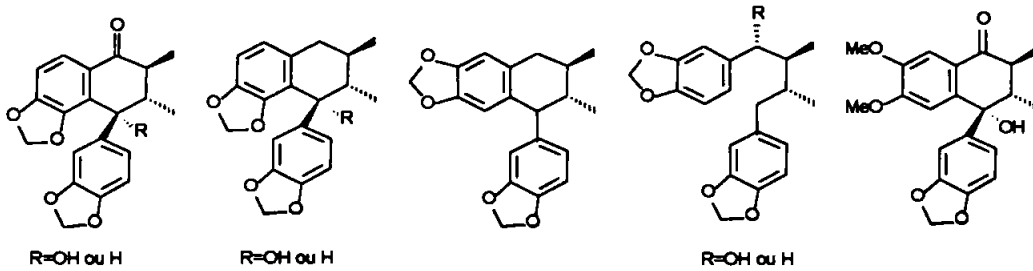
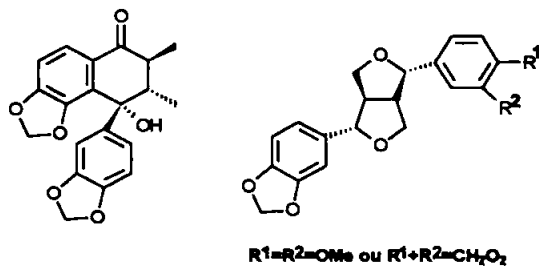


Figura 10: Metabólitos secundários dos frutos galhados de *V. sebifera*



I.4- ENSAIOS BIOLÓGICOS

Um dos aspectos mais fundamentais na descoberta e no desenvolvimento de fármacos, seja de origem natural ou sintética é a utilização de ensaios biológicos adequados e confiáveis. De acordo com a literatura³⁸, os alvos dos bioensaios podem ser do tipo pré-seletivos para simples detecção da atividade citotóxica, ou específicos na detecção de um alvo direto.

O primeiro tipo utiliza organismos inferiores como invertebrados, microorganismos, plantas e algas para bioensaios de bancada. O segundo é utilizado após a detecção de atividade prévia, sendo realizado através de bioensaios frente a bactérias e fungos, sistemas subcelulares isolados como enzimas, receptores ou organelas; células vegetais ou animais produzidas por cultura de tecidos, órgãos isolados de vertebrados, ou ainda através da utilização de animais superiores inteiros.

O inconveniente dos ensaios específicos está na necessidade de especialistas, na exigência de condições estéreis e no sacrifício de animais de laboratório. A quantidade de material vegetal purificado, a estabilidade química e a solubilidade da substância isolada são também outros fatores que muitas vezes dificultam a realização de tais testes.

Nos bioensaios de bancada, muitas dessas dificuldades são eliminadas, exceto pelo fator solubilidade do material a ser testado. Destacam-se importantes vantagens como a obtenção de resultados rápidos, com baixo índice de falsos negativos e positivos; baixo custo aliados a simplicidade, sensibilidade e elevada reprodutibilidade na detecção de compostos ativos. A importância de tais ensaios pré-seletivos eleva-se ainda mais, quando observa-se que estes apresentam excelentes correlações estatísticas para determinadas atividades específicas³⁹.

No presente trabalho são realizados ensaios de ambos os tipos. A justificativa para a escolha e a descrição de cada um destes, é abordada de maneira a situá-los dentro de um contexto global, através de um breve histórico e pela apresentação de métodos alternativos aqueles desenvolvidos neste trabalho.

³⁸ Hamburguer & Hostettman *et al* (1991) *Phytochemistry* **30**, 3864

³⁹ Anderson, J. E.; Goetz, C. M. Suffness, M. and McLaughlin, J. L. (1991) *Phyto. Anal.* **2**, 107.

1.4.1- Ensaio antifúngico

Agentes antifúngicos são utilizados tanto na clínica humana e veterinária, quanto para proteção de plantas, sementes, solos e pinturas. Podem ser protetores foliares, conservantes de produtos industriais e madeira. Para a avaliação desta atividade, realiza-se um ensaio para visualização do efeito inibitório da substância sobre o crescimento dos fungos. Optou-se pela utilização de um representante dos fungos superiores, Ordem Eumycota, pois estes são responsáveis por várias doenças de difícil tratamento, como a alergia causada pelo fungo *Trichophyton mentagrophytes* ("pé-de-atleta"), a paracoccidiodomicose, a blastomicose sul-americana causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* entre outras doenças, ainda sem tratamento.

Estes fungos apresentam micélio, esporos aéreos e ciclos de vida complexos, podendo desenvolver colônias do tipo leveduriformes, associadas às funções vegetativas / reprodutivas, ou filamentosas. Este dimorfismo presente nas colônias pode ser reproduzido em laboratório, variando-se o pH do meio de cultura (favorecido entre 5-7), a temperatura de incubação, a tensão de O₂ e à própria composição do meio de cultura. Os fungos apresentam crescimento mais lento que bactérias necessitando, geralmente de sete a quinze dias de incubação. Para inibir o desenvolvimento de bactérias que podem se sobrepor ao crescimento do fungo, é necessária incorporação de antibióticos de amplo espectro, como o cloranfenicol. Muitas espécies de fungos exigem luz para seu desenvolvimento, outras são inibidas ou indiferentes. Em geral, são sensíveis a incidência direta da luz, devido à ação fungicida da radiação ultravioleta.

O fungo *Cladosporium cladosporioides*, utilizado no ensaio desenvolvido nesta Dissertação, é patogênico para plantas, e um resultado positivo neste ensaio pode ser considerado um indicador para uma possível atividade contra fungos patogênicos humanos. Deve-se lembrar ainda, que outras espécies do gênero *Cladosporium* causam cromoblastocitose, uma micose crônica de pele e tecidos subcutâneos.

Pelas razões anteriormente citadas e devido à dificuldade no combate às micoses sistêmicas associadas a doenças imunodeficientes, tal como a AIDS, faz-se

necessária a busca de novos compostos de potencial atividade antifúngica com menos efeitos colaterais.

Para avaliação da propriedade antibiótica preliminar utiliza-se técnicas microbiológicas que envolvem basicamente três métodos distintos:

a) Método de difusão em ágar solidificado que mede a inibição do crescimento radial ao redor do reservatório da amostra, ou seja, cavidade em ágar solidificado ou disco de papel impregnado com amostra e adicionado sobre a superfície do meio de cultura do fungo.

b) Método de crescimento microbiano em meio de cultura líquido que utiliza diluições seriadas para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) através da medida da turbidimetria ou peso seco da colônia microbiana formada;

c) Método bioautográfico de detecção de compostos vegetais, o qual utiliza três técnicas básicas^{40, 41, 42}:

- **Bioautografia de contato** é baseada na difusão de compostos isolados por CPC ou cromatografia de papel, as quais são colocados sob superfície do ágar inoculado com microorganismos;

- **Bioautografia de imersão** onde o cromatograma obtido após eluição em CPC de sílica é coberto com ágar fundido, e após solidificação, inoculados com microorganismos e incubados.

- **Bioautografia direta** desenvolvida primeiramente por Weltzien⁴³, e modificada consecutivamente por Dekhuijzen⁴⁴ e Homans & Fuchs⁴⁵. Tal técnica consiste em borrifar o cromatograma com suspensão conidial do fungo, contendo nutrientes necessários para crescimento da colônia. Os fungos mais utilizados em bioautografia são:

Ascochyta pisi

Aspergillus niger

Botrytis cinerea

Colletotrichum lindemuthianum

Fusarium culmorum

Glomerula cingulata.

Penicillium expansum

Cladosporium cucumerinum

⁴⁰ Rios, J.L.; Recio, M. C.; Villar, A. (1988) *J. of Ethnopharmacol.* **23**, 127

⁴¹ Lund & Lion (1975) *J. of Chrom.* **110**, 193

⁴² Hamburguer & Cordell (1987) *J. of Nat. Products*, **50**, 19.

⁴³ Weltzien, H.C., (1958) *Naturwis.*, **45**, 288.

⁴⁴ Dekhuijzen, M. (1961) *Landbouwhogeschool Opzoekingsstaat. Staat Gent*, **26**, 1542.

⁴⁵ Homans, A.L. & Fuchs, A. (1970) *J. of Chrom.* **51**, 325.

Para leveduras patogênicas que não crescem diretamente sobre a superfície da sílica, Rahalison et al, 1991⁴⁶, desenvolveram ainda, um método para detecção de atividade antifúngica utilizando uma camada de ágar sobre placa cromatográfica.

Os ensaios citados anteriormente são frequentemente utilizados na etapa de seleção de compostos potencialmente ativos. Deve ser ressaltada a dificuldade de escolha de ensaios eficientes para uma ampla variedade de substâncias, sem que os dados obtidos estejam livres de "falsos-negativos". Atualmente existe uma forte tendência a realização de bioensaios fungicidas diretamente nos sistemas onde espera-se obter a ação. Entretanto, isto implica em manter extensas colônias de animais ou populações de plantas, o que muitas vezes inviabiliza o ensaio, sendo que atualmente o número de testes existentes são tão numerosos que aproximam-se do número de compostos testados.

Dentre importantes classes de metabólitos secundários de plantas⁴⁷ com potencial ação antifúngica, as fitoalexinas⁴⁸ representam substâncias químicas bastante promissoras pois, têm amplo espectro de atividade e apresentam baixa toxicidade às células humanas possuindo dose tóxica variando entre 10-100 µg/mL. Como exemplos podemos citar flavonóides como a faseolina, faseolinaisoflavona e kievitona⁴⁹ com mecanismos de ação idênticos, ou seja, atuam alterando a membrana celular fúngica, embora de forma diferenciada à dos antibióticos poliênicos como a nistatina e anfotericina B.

Outra importante atividade aleloquímica e antifúngica foi relatada contra fungos simbióticos de formigas cortadoras de folhas de *Virola sebifera*⁵⁰. O fato demonstra que o ataque destes as folhas de *Virola sebifera* é inibido pela presença de lignanas furofurânicas. Para a potencialização da ação contra o fungo *Leucocoprinus gongylophorus*, syn. *rozites gongylophora* Möller, destaca-se a importância da substituição por grupamentos metilenodioxílicos, em detrimento dos grupos metoxílicos na lignana mais ativa (sesamina, figura 3, p. 8).

⁴⁶ Rahalison, L.; Hamburger, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Hostettmann, K. (1991) *Phyto. Anal.* **2**, 199.

⁴⁷ Hostettmann, K., Marston, A. (1990) In: *Studies in Natural Products Chemistry*, (Atta-ur-Rahman, Ed), Elsevier, Amsterdam, Vol. 7, pp. 405-437.

⁴⁸ Bailey, J. A. and Mansfield, J. W. *Phytoalexins* Halsted Press, New York.

⁴⁹ Gordon, M. A.; Lapa, E. W.; Filter, M. S. and Lindsay, M. (1980) *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 120.

⁵⁰ Pagnocca, F. C.; Ribeiro, S. B.; Torkomian, V. L. V.; Hebling, M. J. A.; Bueno, O. C.; da Silva, O.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; da Silva, M. F. G. F.; Ferreira, G. (1996) *J. Chem. Ecol.* **22**, 1325.

1.4.2- Ensaio antitumoral

O câncer constitui-se na segunda maior causa de morte nos países industrializados. De cada cinco indivíduos acometidos, um chega ao óbito. Como o câncer é uma doença de etiologia múltipla, ou seja, vários mecanismos biológicos são atuantes, é imprescindível o entendimento dos diversos mecanismos existentes. Entretanto, a indústria farmacêutica investe apenas 3% de seus lucros em pesquisas na área novas drogas antitumorais⁵¹. Este fato reflete o desinteresse comercial na exploração de tais substâncias, e a importância do papel da pesquisa acadêmica.

Atualmente, os tratamentos disponíveis para o câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e imunoterapia. Embora esta última seja a mais indicada, as pesquisas nesta área são ainda muito incipientes, e portanto a quimioterapia continua sendo a mais aplicada.

Os agentes quimioterápicos são classificados de acordo com seus mecanismos de ação em:

- Agentes alquilantes de centros biológicos essenciais como ácidos nucleicos.
Ex: Ciclofosfamida.
- Agentes intercalantes de pares de bases de ácidos nucleicos. Ex: Elicpicina (1)
- Antimetabólitos de processos bioquímicos, por competição com metabólito natural. Ex: Metotrexato
- Antimitóticos, ou seja, inibidores da mitose celular seja através do inibição da formação do fuso mitótico (colchicina 2) ou enovelamento dos microtúbulos (taxol 3) ou qualquer outro evento que resulte no impedimento da divisão celular (Figura 11 p. 19). A enzima *topoisomerase II* é responsável pela isomerização da topoforma do DNA, através da formação de um intermediário (Enzima-dupla fita DNA). A inibição da enzima *topoisomerase II* impede a quebra da dupla-hélice e sua consequente replicação, enquanto que a enzima *topoisomerase I* está associada à reparação da excisão durante a recombinação mitótica. Drogas como o etoposídeo e teniposídeo estabilizam

⁵¹ Corrêa, A. C. (1995) *Química Nova* 18 (5), 460.

topoisomerase II resultando no aumento da quebra do DNA e falência na rejunção das partes (Fig. 2 p. 6).

O ensaio antitumoral descrito nesta Dissertação, utiliza leveduras mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* com deficiências nos mecanismos de recombinação e/ou reparação do DNA. As células tumorais apresentam as mesmas deficiências no reparo do DNA, ou seja, apresentam células incapazes de corrigir erros que ocorrem normalmente durante as recombinações cromossômicas das células normais.

Como estratégias de avaliação da atividade antitumoral utiliza-se explorar as diferenças morfológicas e metabólicas entre células cancerosas e normais através de estudos histológicos e bioquímicos comparativos.

Para a seleção de substâncias potencialmente úteis no tratamento do câncer, desenvolveu-se algumas variedades mutantes (Rad+, rad 321N, rad52Y, etc) com membrana citoplasmática mais permeável à passagem de metabólitos, como um artifício "amplificador" da ação antitumoral.

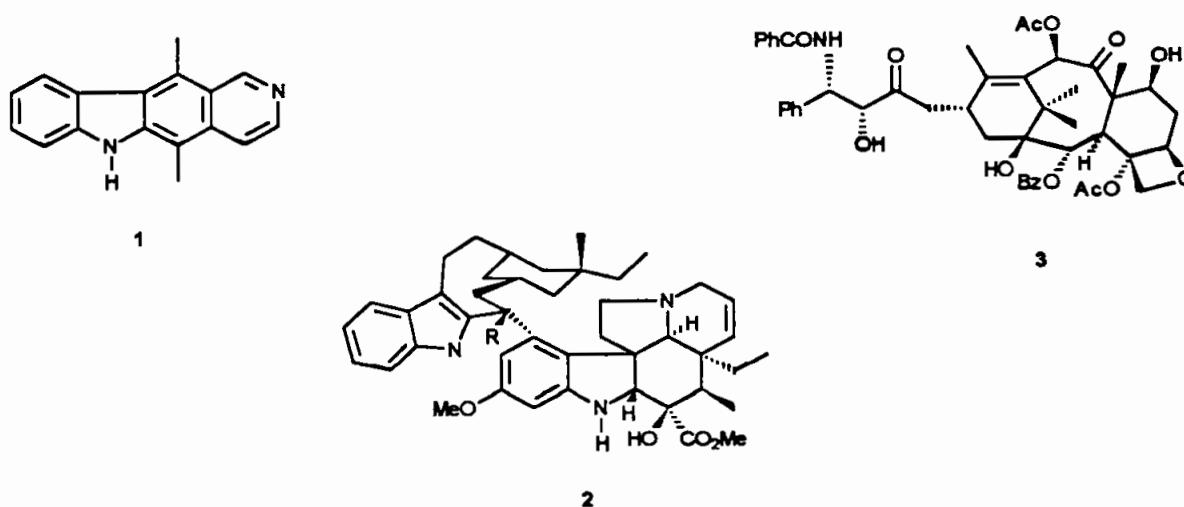


Figura 11: Quimioterápicos intercalantes (1) e antimitóticos (2-3).

I.4.3- Ensaio moluscicida com desovas de *Biomphalaria glabrata*

A esquistossomose é uma doença endêmica parasitária que infesta cerca de 200 milhões de pessoas em países da África, América do Sul, Antilhas e Oriente (WHO, 1983)⁵² e expõe mais de 500 milhões de pessoas desfavorecidas por saneamento básico (Mott, 1989)⁵³. O agente etiológico é um trematódeo digênico, do gênero *Schistosoma* (Weinland), representados por três espécies principais (*S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonica*), com ciclos de vida associados a períodos de vida parasitário. Os moluscos do gênero *Bulinus* e *Biomphalaria* representam os hospedeiros intermediários com vida livre em ambiente aquático, enquanto que mamíferos e aves constituem-se nos hospedeiros definitivos.

A infestação no ser humano ocorre com a penetração das cercárias através da pele, oriundas de ovos eliminados nas fezes ou urina, e depositadas na água (Figura 12). Estas penetram na pele humana utilizando-se de enzimas proteolíticas presentes na região da cabeça, estimuladas por ácidos graxos presentes na pele.

Na América do Sul, África e Antilhas a modalidade representativa é a esquistossomose mansônica ou intestinal em referência ao local de alojamento do parasita, ou seja, nas vênulas da parede do intestino grosso, sigmóide e reto.

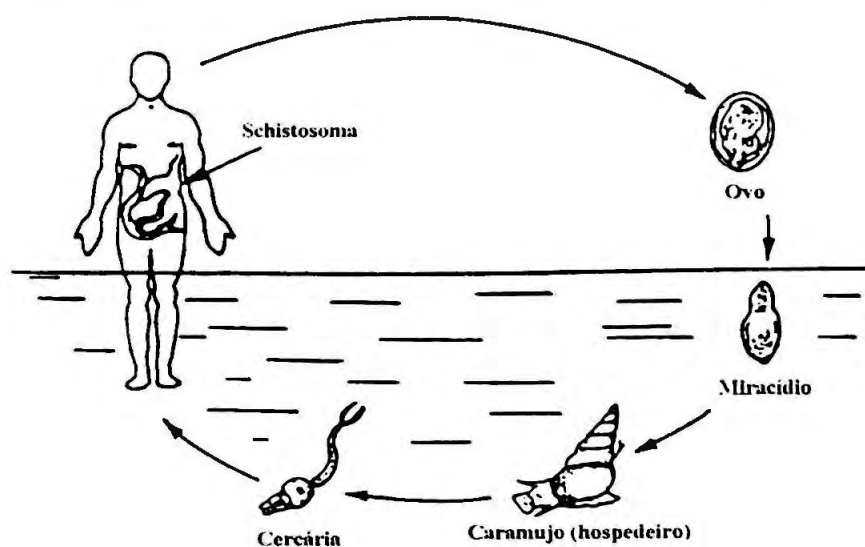


Figura 12: Ciclo epidemiológico da esquistossomose.

⁵² WHO (1983)– World Health Organization (Geneva) - Technical Report series 728: 1-113

A esquistossomose pode ser combatida através do extermínio do hospedeiro intermediário (caramujo) ou pelo tratamento do ser humano infectado. Para tanto, são utilizados fármacos sintéticos que possuem várias restrições de uso devido aos severos efeitos tóxicos aos usuários e/ou meio ambiente. Na Nigéria o reflorestamento de áreas infectadas com espécies vegetais ativas⁵⁴ tem sido aplicado com sucesso. Outros modos de combate à doença continuam sendo desenvolvidos e, dentre estes, o mais recente é a aplicação tópica de aerossóis fitoterápicos⁵⁵, previamente a entrada em águas estancadas.

No caso de vegetais, as famílias *Compositae*, *Euphorbiaceae*, *Leguminosae*, *Phytolacaceae*, *Polygonaceae*, *Rubiaceae* e *Rutaceae*⁵⁶, concentram várias espécies cujos extratos possuem elevada atividade moluscicida.

As classes de compostos químicos naturais mais comumente relacionadas^{57,58,59} a atividade moluscicida são as saponinas monodesmosídicas com apenas uma unidade glicosídica. Tais compostos são ativos em doses inferiores a 1,5 µg/mL, sendo equivalente ao atual moluscicida utilizado comercialmente (Bayluscide = niclosamida). São também conhecidos muitos sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas potentes como warburganal e ambrosina (2,0 µg/mL); algumas naftoquinonas ativas como a plumbagina; fenóis simples como o derivado do ácido salicílico (0,35 µg/mL) e cumarinas.

Devido a falta de informação acerca da bioquímica, fisiologia e metabolismo de substâncias dos moluscos, com exceção aos inseticidas⁶⁰, os mecanismos de ação são pouco conhecidos. Alguns atuam na osmoregulação, inibindo a atividade neurosecretora, como as organotinas e sulfato de cobre. Outros afetam os sistemas enzimáticos da cadeia respiratória⁶¹, como a niclosamina, pentaclorofenato e sulfato de cobre. Alguns autores ainda descrevem

⁵³ Mott, K. E. (1984) *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz Supl.* (1): 1-19, Rio de Janeiro.

⁵⁴ Adewunmi, C. O (1984) *International Journal of Crude Drug Research* 22, 161.

⁵⁵ Perrett, S.; W

hitfield, P. J.; Sanderson, L.; Bartlett, A. (1995) *Journal of Ethnopharmacology* 47, 49.

⁵⁶ Duncan, J. In: Mott, K.E., (1987) *Plant Molluscicides*, Ed John Willey, Chicester, p. 45-108.

⁵⁷ Marston, A. & Hosttetmann, K. (1993) *Journal of Ethnopharmacology* 38 (2-3), 215.

⁵⁸ Marston, A.; Dudan, G.; Gupta, M. P.; Solis, P. N.; Hosttetmann, K.; (1996) *Inter. J. of Pharmacog.* 34 (1), 15

⁵⁹ Kloos, H.; McCollough, F. S (1982) *Planta Medica* 46, 195.

⁶⁰ Sullivan, J. T. & Cheng, T. C. (1975) Heavy Metal Toxicity to *B. glabrata* *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 266: 437

⁶¹ Villers & Mackenzie (1963) *Bullettin of World Health Organization* 29 (1), 424.

possíveis efeitos generalizados de algumas substâncias oriundas de vegetais⁶², sobre diversos sistemas enzimáticos⁶³.

Para a avaliação da atividade moluscicida de produtos naturais purificados, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a realização de três estágios de avaliação em desovas de *B. glabrata*⁵². O primeiro visa o ensaio preliminar onde detecta-se a presença de atividade até o limiar de 100 µg/mL. A seguir, realiza-se o estudo definitivo, para estabelecimento da CL₅₀ e CL₉₀. Numa última etapa realiza-se o estudo específico da potencial droga como, por exemplo, seu mecanismo de ação e estabilidade química. Neste caso, a porcentagem de mortalidade é estabelecida ao final de sete dias do início do ensaio.

Outro mecanismo para avaliação de atividade moluscicida, descrito por Hostettman⁶⁴ visa o estabelecimento da toxicidade aguda em desovas de *Biomphalaria glabrata* após 24 h. Portanto, trata-se de um ensaio pré-seletivo durante os fracionamentos cromatográficos de extratos/frações vegetais.

Esta última abordagem têm sido utilizada em substituição ao ensaio proposto pela OMS, quando há grande número de amostras a serem testadas e deseja-se apenas uma pré-seleção, pois é menos trabalhosa e os resultados são obtidos mais rapidamente.

⁶²Mc Cullough, F. S.; Gayral, P.; Duncan, J.; Christie, J. D. (1980) *Bulletin of World Health Organization* **58** (5), 681.

⁶³Duncan, J. In: Mott, K.E., (1987) *Plant Molluscicides*, Ed John Willey, Chicester, p. 251.

⁶⁴Hostettmann, K. (1989) Plant-derived molluscicides of current importance, in *Economic and Medicinal Plant Research* Vol.3, Edited by Wagner H. and Farnsworth N. R., pp. 73-102, Academic Press, London.

I.4.4- Ensaio de avaliação da atividade antioxidante

O estudo da capacidade antioxidante de vegetais, ervas e temperos tem sido bastante difundido nas últimas décadas, com vistas a sua aplicação na indústria alimentícia⁶⁵, na prevenção da rancificação e na indústria cosmética como agente antienvhecimento. De maneira geral, os antioxidantes têm sido aplicados na prevenção de danos gerados ao corpo humano por espécies reativas de oxigênio.

O termo antioxidante engloba não apenas inibidores da peroxidação lipídica como o α -tocoferol, mas refere-se ainda a inibidores de danos oxidativos causados em proteínas, DNA e outras pequenas moléculas. Portanto, o agente antioxidante representa qualquer substância que, quando presente em pequenas concentrações, em relação ao substrato oxidável, protege-o da ação degradativa⁶⁶.

Para avaliação da atividade antioxidante são conhecidas várias metodologias com distintas finalidades (Tabela 3 p. 25).

Sabendo-se que os aldeídos presentes em muitos sistemas biológicos são produtos do metabolismo de hidroperóxidos lipídicos, e o principal produto da peroxidação lipídica é o malonildialdeído (MDA), a quantificação deste representa um índice indireto da injúria oxidativa. O princípio deste método baseia-se na detecção de produtos de lipoperoxidação, resultantes da oxidação espontânea de lipídios (principalmente MDA) presentes nas células cerebrais. Estes radicais peróxidos formados podem ser detectados pela medida da quimioluminescência (QL) devido à emissão dos fótons ou reação de produtos colorimétricos com ácido tiobarbitúrico (TBA)⁶⁷, detectáveis em 535 nm (Figura 13 p. 24).

Dentre as duas medidas, a primeira é a mais sensível.

⁶⁵ Löliger, J. (1991) The use of antioxidants in food. In *Free Radicals in Food Additives*. Ed. Aruoma, O. I. and Halliwell, B., pp.121-150. Taylor and Francis, London.

⁶⁶ Halliwell, B. (1990) *Free Rad. Res. Comm.* **9**, 1-32.

⁶⁷ Stocks, J.; Gutteridge, J.M.C.; Sharp, R.J.; Dormandy, T.L (1974) *Cli. Sci. Mol. Med.*, **47**: 215

A medida da capacidade antioxidante através do MDA, é aplicada geralmente a sistemas de membranas definidas, como microssomas e lipossomas, não sendo aplicada para fluidos corporais e extratos de tecidos, pois a reação com ácido tiobarbitúrico não é específica para aldeídos, ocorrendo também reações paralelas com carboidratos, pirimidinas e hemoglobinas, gerando substâncias coloridas que absorvem em região sobreponível aos produtos colorimétricos do malonildialdeído (MDA).

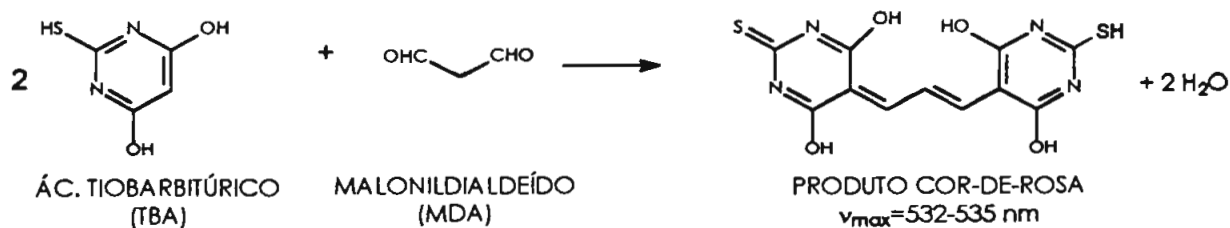


Figura 13: Reação colorimétrica com malonildialdeído.

Tabela 3: Modelos químicos e bioquímicos para detecção de radicais oxidantes ⁶⁸.

MODELOS QUÍMICOS		APLICAÇÕES
Ressonância de spin eletrônico	<ul style="list-style-type: none"> •detecção direta de radicais livres através de técnicas de "freeze-quench", condições de estado estacionário, fluxo rápido, detecção <i>in situ</i> e amostragem rápida. •detecção indireta por "spin-trapping" 	
Espectrometria de RMN sob campo magnético elevado	<ul style="list-style-type: none"> •determinação de α-cetoácidos •Exame dos produtos de lipoperoxidação lipídica •γ- radiólise de fluidos humanos 	
Radiólise de pulso	<ul style="list-style-type: none"> •detecção de radicais de oxigênio •detecção de íons radicalares carotenóides 	
MODELOS BIOQUÍMICOS		
Quimioluminescência	<ul style="list-style-type: none"> •mede emissão intrínseca de luz U.V. de células vivas em órgãos inteiros, homogenatos de tecidos e plasma sanguíneo 	
Microfluorografia	<ul style="list-style-type: none"> •técnica semi-quantitativa através da informação de sinais de fluorescência em fluoroprobes. 	

⁶⁸ PUNCHARD, N. A. ; KELLY, F.J. (1996) In *Free Radicals, a Practical Approach*. Ed. Oxford University Press

1.5- OBJETIVOS

A diversidade estrutural de lignanas e neolignanas descritas na literatura tem aumentado gradativamente nos últimos anos, sendo que o Laboratório de Química de Produtos Naturais da USP contribui bastante através do estudo destas espécies vegetais brasileiras. No entanto, devido em parte a dificuldade na obtenção de quantidades de substâncias suficientes para serem analisadas e também devido à baixa disponibilidade de ensaios adequados, este trabalho teve como objetivos:

- Isolar as principais neolignanas ariltetralônicas do extrato de sementes de *V. sebifera*, e avaliar suas propriedades antifúngica, antioxidante, moluscicida e antitumoral através da realização de bioensaios preliminares.
- Obter alguns derivados visando estabelecer a relação estrutura –atividade e um aproveitamento do potencial biológico destas.

Tal interesse em relação às investigações farmacológicas destas neolignanas deve-se a semelhança estrutural com importantes lignanas antitumorais e agentes citotóxicos, os quais apresentam ligação β - β' como a otobaina, o ácido nordiidroguaiarético e a esquizandrina, amplamente conhecidas por seu potencial farmacológico.

Materiais e Métodos

II.1- ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

II.1.1- Materiais e instrumentos utilizados

II.1.1.1- Etapa fitoquímica

1. O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para a preparação do extrato e execução das cromatografias em coluna (CC), utilizou-se solventes submetidos a destilação fracionada. Para extração das substâncias adsorvidas à sílica, nas etapas de purificação por cromatografia em camada delgada, utilizou-se somente solventes de grau P.A., Merck.

2. A fase estacionária empregada para cromatografia em coluna filtrante sob vácuo ou pressão de N₂ foi sílica gel 60 com partículas de 63 - 210 µm. Para cromatografias em coluna, tipo "flash", sob pressão utilizou-se Si-60 com partículas de 40 - 63 µm, todas da Merck.

3. Para as cromatografias em camada planar comparativa (CPC) e cromatografia planar preparativa (CPP) utilizou-se, como fase estacionária, sílica - gel 60 PF₂₅₄, da Merck, com tamanho de partícula de 4 - 45 µm e espessuras de 0,50 mm e 1,00 mm, respectivamente.

4. Outras separações em escala preparativa foram executadas por cromatografia radial (CRP) em Cromatotron (mod. 7924 T Harrison Research) com sílica gel 60 PF₂₅₄ com gesso e partículas de 5 - 45 µm, sob placa de vidro de 2 mm de espessura (Artigo 7749, Merck)

5. A revelação dos cromatogramas foi efetuada com irradiações na região do UV (254 e 366 nm), borrifação de solução de vanilina / ác. fosfórico e / ou sulfato cérico seguido de aquecimento a 70° C / 15min.

6. O critério de pureza adotado foi de 96-100% aferido através da análise dos cromatogramas em:

- Cromatógrafo a gás, mod. HP- 5890 series II, com coluna capilar HP-5 de silicone derivatizada com 5% de fenil em metilsilicone medindo 30 m x 0,32 mm x 0,25 mm utilizando N₂ como gás de arraste e detector FID.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Mod. HP Series 1050 com detector UV, integrador HP 3395 e injetor automático Shimadzu SIL-9A em coluna analítica TAXSIL (250x4,6 mm) com detecção a 254 nm e fluxo de 0,6 mL / min.

Os espectros de RMN - ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker mod. AC-200, 300 e 500 MHz utilizando como solvente CDCl₃ (Aldrich). As exceções são adequadamente especificadas no texto. A referência interna utilizada foi o sinal de TMS (0 δ) ou CDCl₃ (7,25 δ). Os dados são expressos em deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J em Hz.

Os espectros no infravermelho foram registrados em aparelhos FT-IR 1750 Perkin-Elmer e FT-IR 510 Nicolet, utilizando pastilhas de KBr. Os dados são expressos em números de onda ν (cm⁻¹).

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro HP 5988 A Hewlett Packard (CG / EM), Mat 90 Finnigan e INCOS 50 Finnigan-Mat (injeção direta), acoplados a cromatógrafo Varian 3400, com ionização por impacto eletrônico a 70 eV.

As medidas de rotação específica [α]_D foram realizadas em polarímetro digital JASCO DIP-370 com lâmpada de Na em λ = 589 nm.

1.1.1.2- Ensaio com desovas de *Biomphalaria glabrata*

As diluições das amostras teste foram preparadas utilizando-se micropipetas da marca Gilson modelo P100 e P1000 e balança analítica Sartorius modelo BP110S. As desovas foram adicionadas às soluções preparadas em placas de polietileno de alta densidade com doze orifícios, marca "Costar" (12), com volume final de 3 mL ou 10 mL. A temperatura de exposição dos organismos teste foi controlada em estufa e incubadora BOD modelo 347 F (Fanem). A observação dos organismos teste foi realizada em lupa Olympus modelo BH2.

II.1.3- SEMENTES DE *Virola sebifera*

As sementes de *Virola sebifera* foram coletadas no Km 79 da rodovia Araraquara - Bauru, interior do estado de São Paulo, durante o mês de Agosto de 1994.



Figura 14- Fruto de *Virola sebifera* (Aubl.) com pericarpo, arilo, tegumento e amêndoa.

As sementes foram secas (212,0 g) em estufa à 40° C, trituradas e maceradas em solvente orgânico (AcOEt) à frio, com auxílio de ultra-som, por 5x de 15 min. A solução obtida foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, obtendo-se assim, o extrato bruto das sementes (111,8 g).

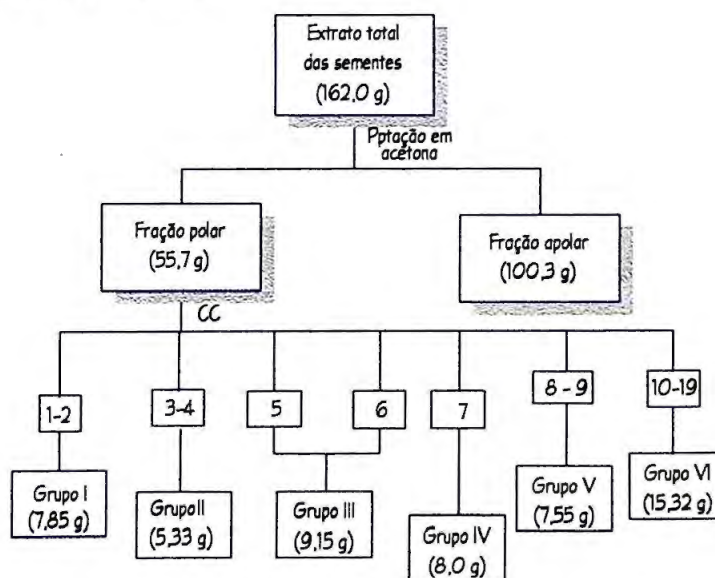
Após análise em CPC de sílica reuniu-se o extrato AcOEt das sementes (111,8 g; 53 % rendimento), aos extratos clorofórmico (19,77 g) e hexânico (30,43 g) de coleta anterior, obtendo-se 162,0 g de extrato total.

II.1.4 – ISOLAMENTO DAS NEOLIGNANAS DO EXTRATO BRUTO DE SEMENTES DE *Viola sebifera*

Ao extrato total (162,0 g) adicionou-se acetona à quente, seguido de refrigeração. O precipitado resultante foi lavado com acetona, resfriada sob gelo seco. A fração solúvel resultante foi concentrada em rotaevaporador. Este procedimento foi seguido até cessar a precipitação do material graxo, obtendo-se assim, uma fração polar (55,7 g) e outra apolar (100,3 g).

A análise preliminar destas por cromatografia à gás, comparativamente aos padrões disponíveis no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química-USP (Kato, 1990)⁶⁹, mostrou a presença predominante de neolignanas ariltetralínicas na fração polar, objetivo de estudo deste trabalho.

A fração polar (55,7 g) foi submetida a cromatografia em coluna filtrante 18,5 cm (d) x 6,5 cm (h) sob vácuo. O gradiente eluotrópico iniciou-se com Hex/AcOEt 20% indo até 100% de acetato de etila. As frações coletadas (19) foram de aproximadamente, 800 ml cada.



Esquema 1 - Fracionamento do extrato total das sementes de *Viola sebifera*.

⁶⁹ Kato, M. J. Yoshida, M. & Gottlieb, O. R. (1990) *Phytochemistry* 29 (6), 1799.

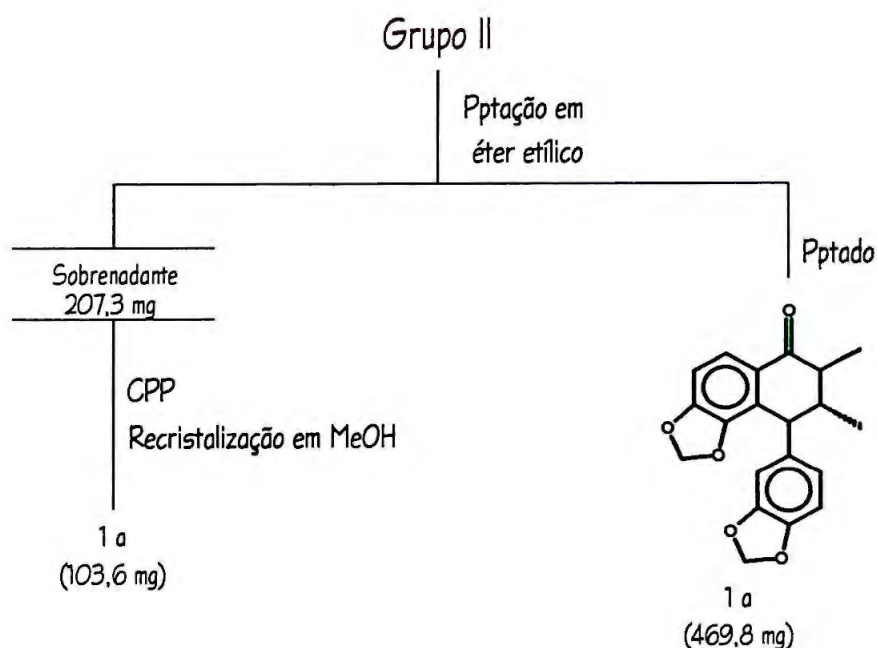
Grupo I

Material denso e de cor branca amarelada, cuja análise por RMN-¹H evidenciou a presença apenas de derivados de ácidos graxos.

Grupo II

As frações 3 e 4 apresentaram-se como óleo denso e de cor amarelada, tendo sido solubilizadas em éter etílico à quente e resfriadas até precipitação de sólido branco amorfo, identificado como a neolignana ariltetralônica **1a** (469,8 g).

O sobrenadante (207,3 mg) resultante foi purificado em duas etapas por CPP. O primeiro eluente foi Hex/AcOEt 5% (eluída 10 X) seguido pelo sistema Hex/A (20/80) (A=DCM:Me₂CO 99,5:0,5) e recristalização em metanol (**1a**; 103,6 mg).



Esquema 2- Fracionamento cromatográfico do Grupo II*

* A cor representada nas estruturas químicas surgem quando borra-se o cromatograma (CPC) com solução de sulfato cérico, e subsequente aquecimento à 70°C.

Grupo III

A adição de éter etílico às frações 5 e 6 resultou na precipitação de um sólido amorfo branco-amarelado (985,0 mg) que submetido a cromatografia radial preparativa (CRP) com Hex/Me₂CO/i-PrOH (80/20/1) como eluente, originou 20 frações/30 mL. Este procedimento resultou no isolamento da neolignana secotetralônica **3** (881,5 mg) e, em menor proporção, da neolignana ariltetralônica **1b** (87,0 mg).

O sobrenadante foi concentrado (8,0g) e fracionado em CC filtrante, sob pressão reduzida.

Dimensões da coluna (dXh): 4,0 cm X 32,5 cm

O gradiente eluotrópico utilizado foi

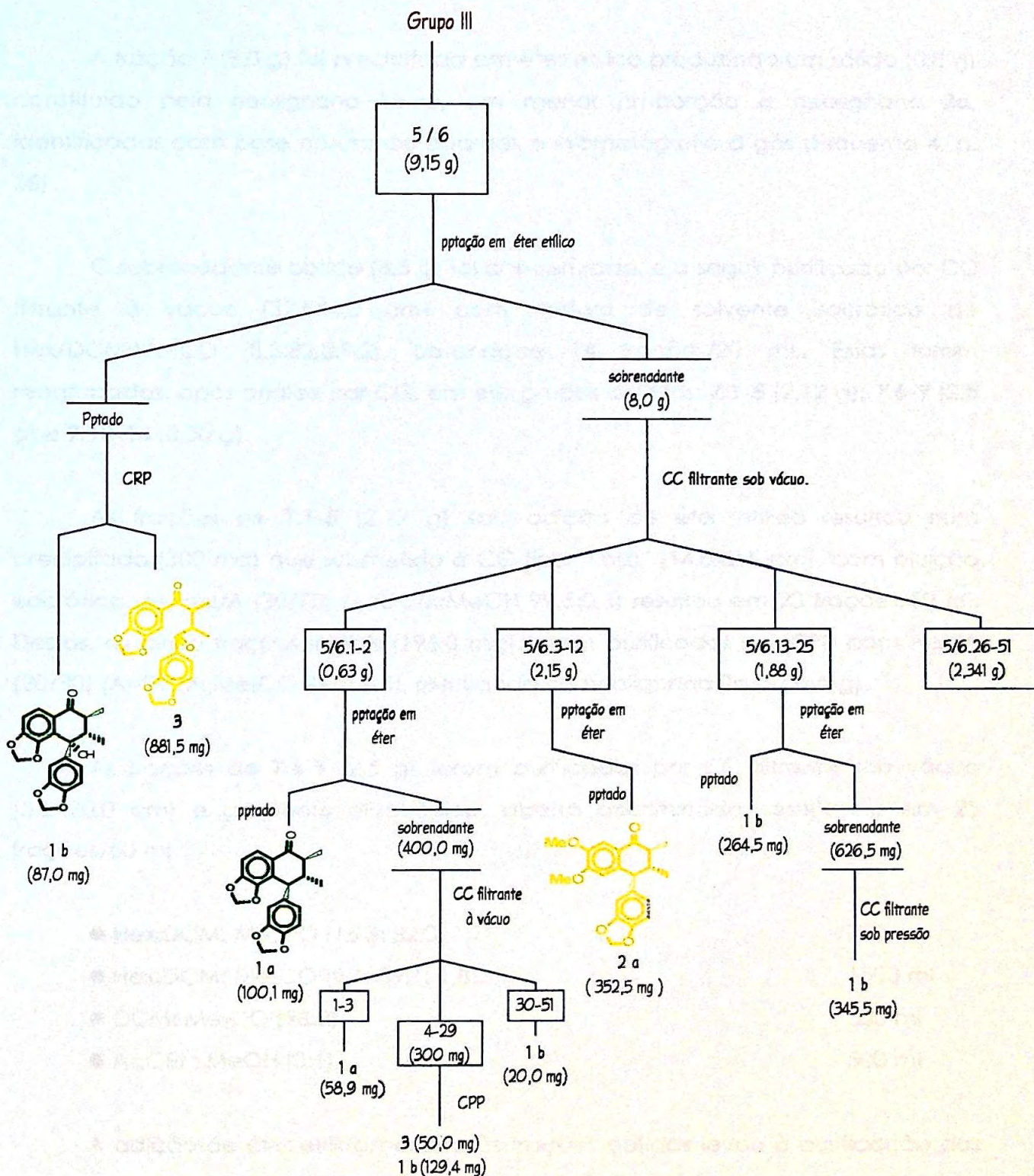
- | | |
|---|---------|
| • Hex:DCM: Me ₂ CO (17,4: 81,3: 1,3) | 800 mL |
| • Hex:DCM: Me ₂ CO (10,0: 88,6: 1,4) | 800 mL |
| • DCM : Me ₂ CO (97,5 : 1,5) | 400 mL |
| • CDCl ₃ :AcOet:i-PrOH (80: 20: 1) | 1000 mL |

Número de frações: 51 frações reunidas após análise por C.G. em 4 grupos (1-2; 3-12; 13-25; 26-51) (Esquema 3, p. 34).

As neolignanas **1a** (100,1 mg), **2a** (352,5 mg) e **1b** (264,5 mg) foram isoladas por precipitação direta, após adição de éter etílico às frações 5/6.1-2; 5/6.3-12; 5/6.13-25, respectivamente (Esquema 3, p. 34)

O sobrenadante obtido (400 mg) da fração 5/6.1-2 após concentrado, foi analisado por CC filtrante à vácuo, de dimensões 5,0 X 20,0 cm; eluente isocrático de Hex/AcOEt/i-PrOH (75/15/1) resultando em 51 frações/20 mL, e na purificação direta das neolignanas **1a** (58,9 mg) e **1b** (20,0 mg). As frações intermediárias (4-29) foram isoladas por CPC utilizando-se Hex/A (30/70) (A= DCM:Me₂CO 97,5:1,5) como fase móvel, obtendo-se as neolignanas **3** (50,0 mg) e **1b** (129,4 mg).

Grupo IV



Esquema 3- Fracionamento cromatográfico do Grupo III*

* A cor representada nas estruturas químicas surgem quando borrifá-se o cromatograma (CPC) com solução de sulfato cérico, e subsequente aquecimento à 70°C.

Grupo IV

A fração 7 (8,0 g) foi precipitada em éter etílico produzindo um sólido (0,8 g) constituído pela neolignana **1b** e, em menor proporção a neolignana **2a**, identificadas com base no uso de padrões e cromatografia à gás (Esquema 4, p. 36)

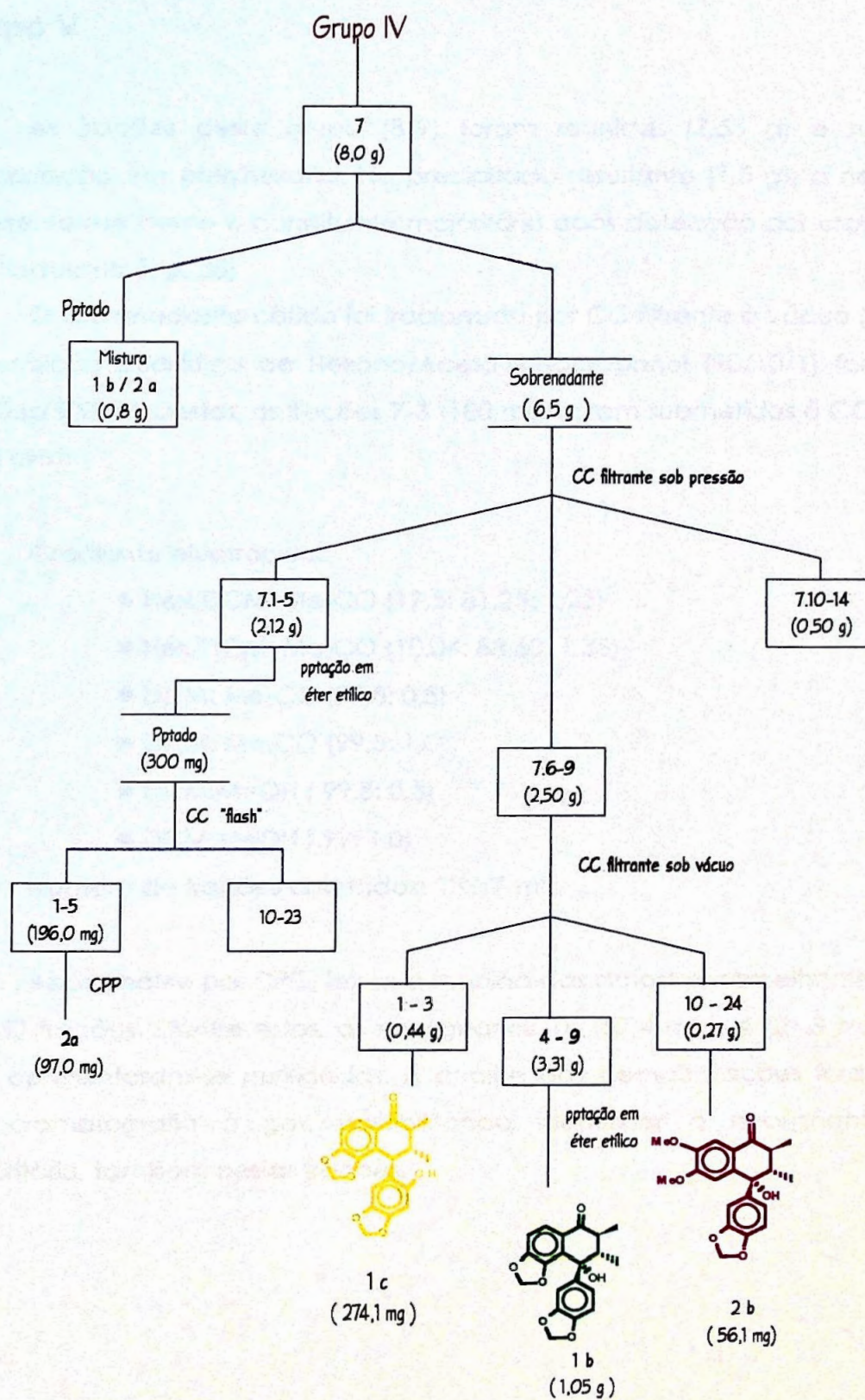
O sobrenadante obtido (6,5 g) foi concentrado, e a seguir purificado por CC filtrante à vácuo (32,5X4,0 cm) com mistura de solvente isocrática de Hex/DCM:Me₂CO (8,3:82,5:9,2), obtendo-se 14 frações/20 mL. Estas foram reagrupadas, após análise por CG, em três grupos distintos: **7.1-5** (2,12 g); **7.6-9** (2,5 g) e **7.10-14** (0,50 g).

As frações de **7.1-5** (2,12 g) sob adição de éter etílico resultou num precipitado (300 mg) que submetido à CC tipo "flash" (14,0X2,5 cm), com eluição isocrática de Hex/A (30/70) (A=DCM:MeOH 99,5:0,5) resultou em 23 frações/50 ml. Destas, as cinco frações iniciais (196,0 mg) foram purificadas por CPP com Hex/A (20/80) (A=DCM: Me₂CO 99,5: 0,5), resultando na neolignana **2a** (97,0 mg).

As frações de **7.6-9** (2,5 g) foram purificadas por CC filtrante sob vácuo (5,5X20,0 cm) e gradiente eluotrópico, abaixo discriminado, resultando em 25 frações/50 ml.

- | | |
|--|---------|
| ● Hex:DCM: Me ₂ CO (16,3: 82,0: 1,7). | 750 ml |
| ● Hex:DCM: Me ₂ CO (9,1: 89,1: 1,8). | 1500 ml |
| ● DCM: Me ₂ CO (98:2). | 500 ml |
| ● AcOEt : MeOH (3:1) | 500 ml |

A adição de éter etílico/hexano às frações obtidas levou à purificação das neolignanas **1c** (274,1 mg), **1b** (1,05 g) e **2b** (56,1 mg).



Esquema 4- Fracionamento cromatográfico do Grupo IV*

* A cor representada nas estruturas químicas surgem quando borrifa-se o cromatograma (CPC) com solução de sulfato cérico, e subsequente aquecimento à 70°C.

Grupo V

As frações deste grupo (8/9) foram reunidas (7,55 g) e submetidas a precipitação em éter/hexano. No precipitado resultante (1,5 g), a neolignana **2b** apresentou-se como o constituinte majoritário após detecção por cromatografia à gás (Esquema 5, p. 38)

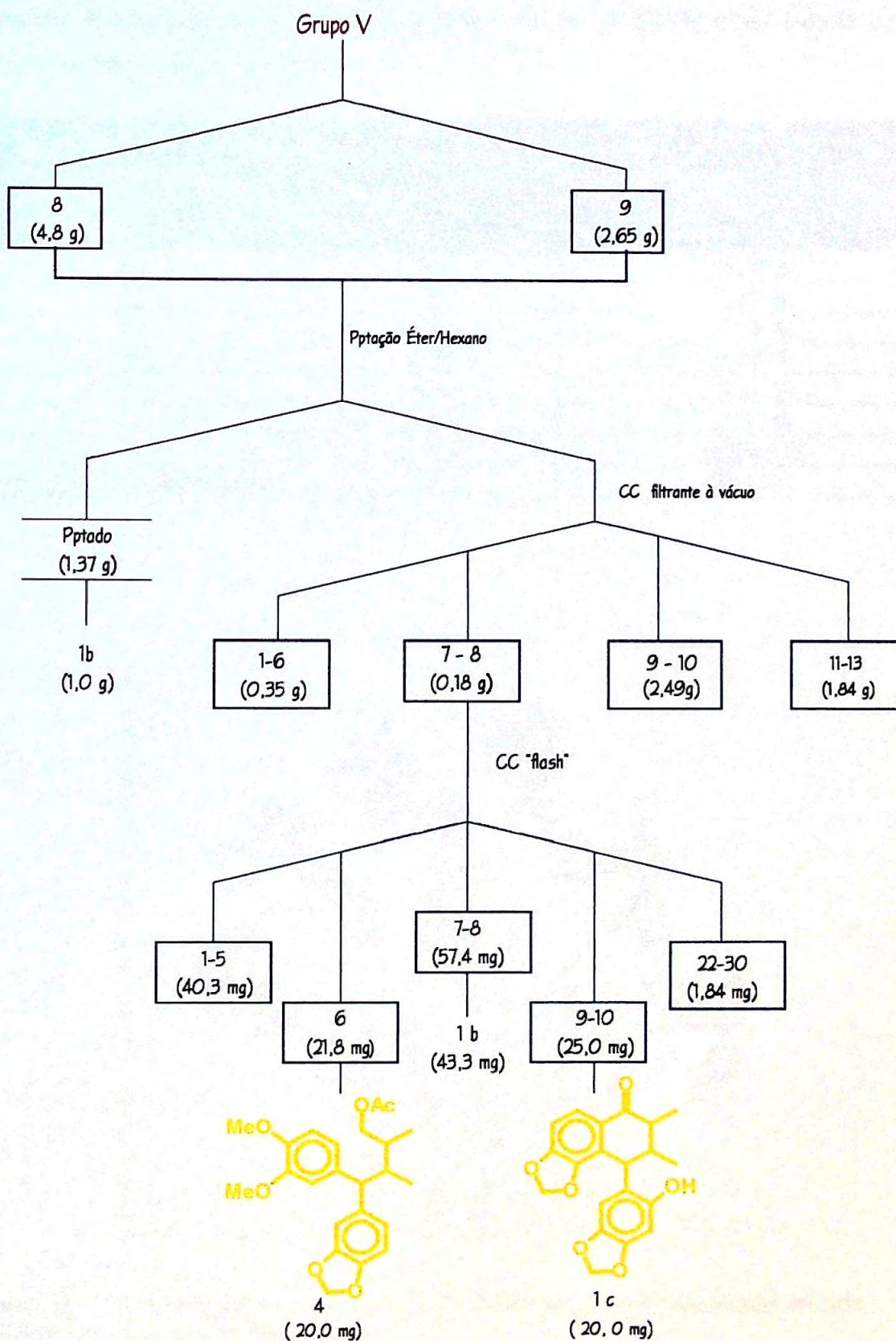
O sobrenadante obtido foi fracionado por CC filtrante à vácuo (22,5X6,5 cm) e condição isocrática de Hexano/Acetato/Isopropanol (90/10/1) fornecendo 13 frações/500 ml. Destas, as frações **7-8** (180 mg) foram submetidas à CC "flash" (14,0 X 2,8 cm).

Gradiente eluotrópico:

● Hex/DCM: Me ₂ CO (17,5: 81,25: 1,25)	600 ml
● Hex/DCM: Me ₂ CO (10,04: 88,60: 1,36)	100 ml
● DCM: Me ₂ CO (99,5: 0,5)	100 ml
● DCM: Me ₂ CO (99,5: 1,0)	100 ml
● DCM:MeOH (99,5: 0,5)	100 ml
● DCM:MeOH (99: 1,0)	200 ml

Número de frações coletadas: 132/7 ml.

Após análise por CPC, fez-se a reunião das amostras semelhantes, resultando em 30 frações. Dentre estas, as neolignanas **1b** (57,4 mg), **4** (21,8 mg) e **1c** (20,0 mg) apresentaram-se purificadas. A análise das demais frações foram realizadas por cromatografia à gás, possibilitando identificar a neolignana **2b** como majoritária, também nestas frações.



Esquema 5- Fracionamento cromatográfico do Grupo V*

* A cor representada nas estruturas químicas surgem quando borrfia-se o cromatograma (CPC) com solução de sulfato cérico, e subseqente aquecimento à 70°C.

Tabela 4: Proporções relativas de neolignanas isoladas das frações trabalhadas do extrato reunido de *V. sebifera*.

Neolignana	Peso total (g)	% relativa
		nas sementes secas (212,0 g)
1a	0,51	0,24 %
1b	1,30	0,62 %
1c	0,20	0,09 %
2a	0,31	0,15 %
2b	0,74	0,34 %
3	0,65	0,30 %
4	0,012	0,0065 %
Ác. graxos e derivados	69,2	30,95 %

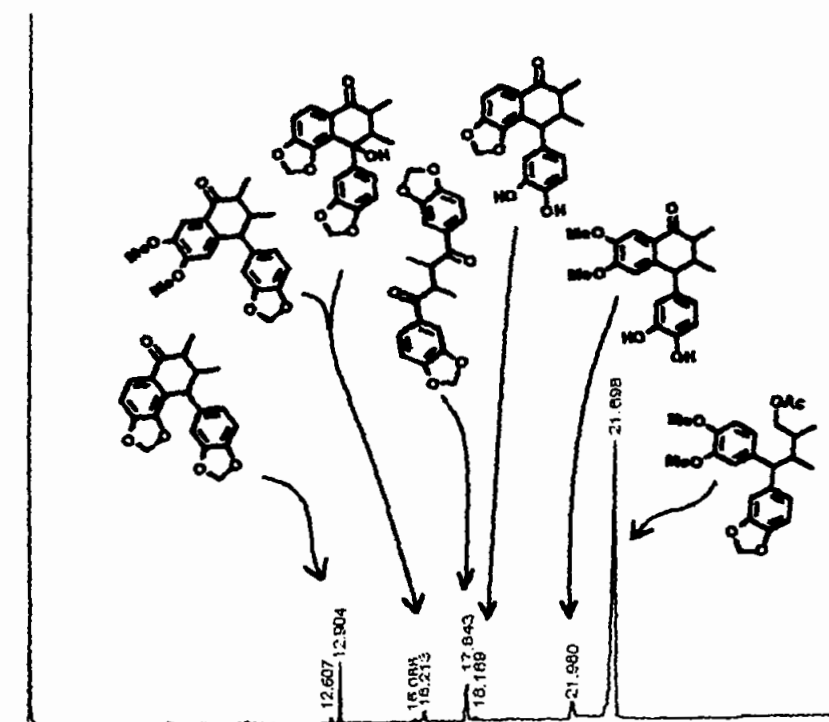


Figura 15: Cromatograma à gás obtido a partir da mistura de padrões das neolignanas isoladas e derivados.

II.1.5- DERIVATIZAÇÕES

II.1.5.1- Desmetilenação das neolignanas 1a e 2a.

Visando a avaliação da importância do grupamento metilenodioxifenílico frente às diferentes atividades biológicas, foram realizadas reações de desproteção nas neolignanas **1a** e **2a**, levando à formação dos catecóis correspondentes. Dentre as várias metodologias conhecidas utilizou-se a desmetilenação proposta por Node *et. Al.*^{70,71} com sistema reagente tiol- AlX_3 , devido à preferência para desmetilações ocorrer com velocidade decrescente, na seguinte ordem: $\text{RCH}_2\text{OMe} > \text{R}_2\text{CHOMe} \gg \text{Ph-OMe}$.

As neolignanas **1a** e **2a** foram dissolvidas em solução seca de DCM/EtSH a 5% e vertida em AlCl_3 à 0° C, sob atmosfera inerte de N_2 . A reação foi monitorada por CPC durante cerca de 1h e, finalizada com HCl 1%.

Fez-se a extração da fase orgânica com éter etílico, para eliminação do tiol presente. Esta foi tratada de maneira usual, ou seja, adicionou-se solução salina saturada para auxiliar na separação das fases e Na_2SO_4 como secante.

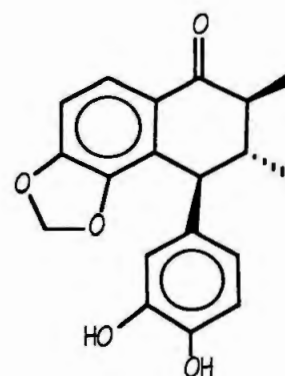
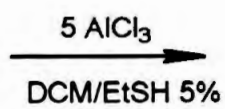
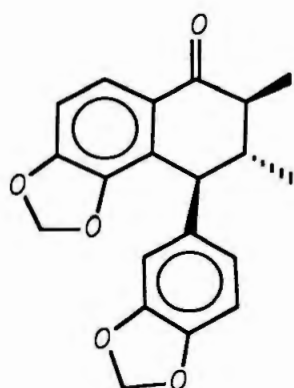
A purificação dos produtos da reação foram executados por C.C filtrante sob pressão, seguido de CPC em sílica. Os eluentes foram, respectivamente, DCM/MeOH (99/1) e DCM/MeOH (98/2), para os produtos da neolignana **1a** e DCM/MeOH (98/2) e DCM/MeOH (96/4) na reação com a neolignana **2a**.

Como principais produtos das reações obtiveram-se os catecóis correspondentes **Cat-1a** e **Cat-2a**, caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C .

⁷⁰ Node, M.; Hatori, H.; Fujika, E. (1976) *J .C. S. Perkin I*, 2237

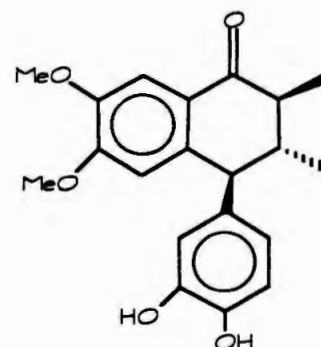
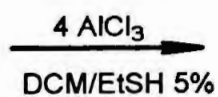
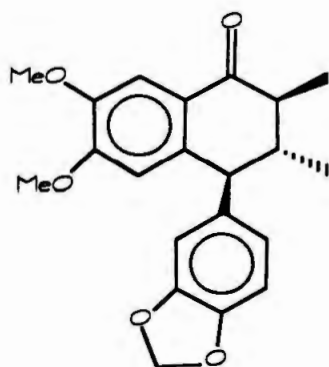
⁷¹ Node, M., Nishide, K., Sai, M., Fuji, K.Fujita, E. (1979) *Chemistry Letters*, 97.

As proporções utilizadas e os rendimentos obtidos são resumidos abaixo:



1a (C₂₀H₁₈O₅)
(103,6 mg/0,31 mmol)

Cat-1a (C₁₉H₁₇O₅)
(44 mg/0,13 mmol **42%**)



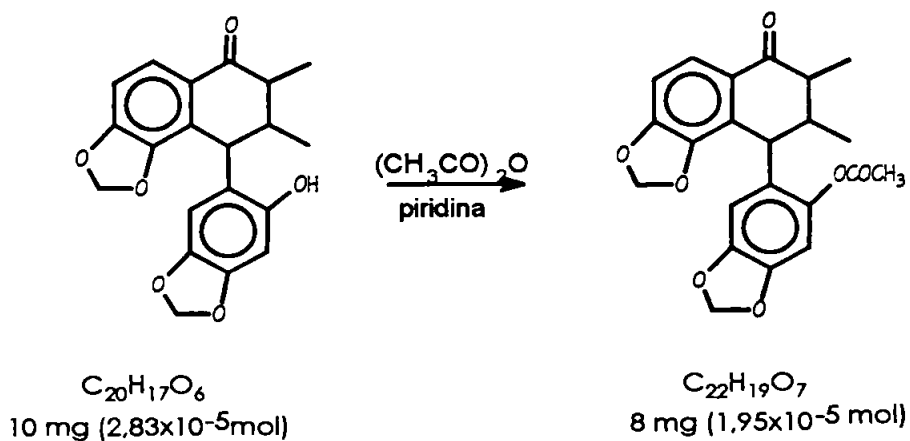
2a (C₂₁H₂₂O₅)
(143 mg/0,41 mmol)

Cat-2a (C₂₀H₂₀O₅)
(100 mg/0,29 mmol = **70%**)

II.1.5.2- Acetilação da neolignana 1c

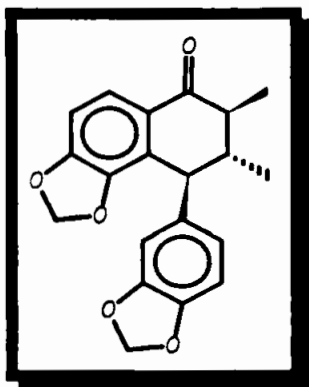
Visando confirmar a estrutura proposta para a neolignana **1c**, conduziu-se a reação de acetilação desta neolignana com anidrido acético e piridina, durante 24 h. A seguir, verteu-se água gelada ao meio reacional seguido da adição de CHCl_3 para extração da fase orgânica. A esta fase adicionou-se solução de HCl 1% para eliminação da piridina do meio. A fase clorofórmica foi seca com Na_2SO_4 evaporada e, posteriormente purificada em CPP com Hex:DCM: AcOH:i-PrOH (23,1:75,4:0,8:0,8).

O rendimento obtido para esta reação foi de 69 %.



II.1.6- DADOS FÍSICOS DAS NEOLIGNANAS ISOLADAS

II.1.6.1- Neolignanas ariltetralônicas



(7'R,8'S,8S)-7-hidroxi-3,4,3',4'-dimetilenodioxi-7-oxo-2,7'-8,8'-neolignana (**1a**)

$C_{20}H_{18}O_5$

pf=173-174 °C

$[\alpha]_D - 41,0^\circ$ (MeOH; c 0,1)

RMN- 1H e ^{13}C - Tabelas 6 e 7 pp. 61-62, Espectros 1-3, pp. 91-93.

I.V.: CO (1674), Ar(C=C) 1617, 1584, 1508; CH₂O₂ (937).

EM 70 eV, m/z (int.rel.): 338(M⁺, 57), 309(6), 328(8), 295(3), **282(100)**, 281(20), 283(18), 251(2), 252(18), 253(8), 223(4), 224(38), 225(13), 196(29), 149(7), 139(25), 138(22), 96(23).

(7'R,8'S,8S)-3,4,3',4'-dimetilenodioxi-7-oxo-2,7',8,8'-neolignana (**1b**)

$C_{20}H_{18}O_6$

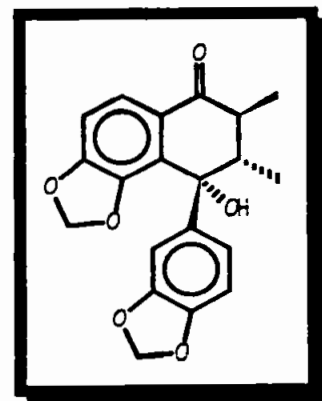
p.f=112-115°

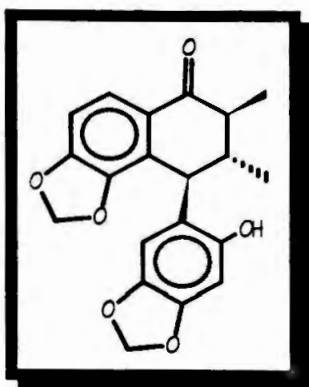
$[\alpha]_D - 18,0^\circ$ (MeOH; c 0,1)

RMN- 1H e ^{13}C : Tabelas 6 e 7 pp. 61-62; Espectros 6-10, pp. 96-100.

IV: OH(3457); CO(1668), Ar(C=C) 1615, 1587,1505; CH₂O₂ (938).

EM 70 eV, m/z (int.rel.): 354(M⁺, 21), 336(2), **298(100)**, 269(16), 270(5), 240(16), 241(5), 189(4), 149(35), 121(11), 120(10), 63(10).





(7'R,8'S,8S)-2'-hidroxi-3,4,4',5'-dimetilenodioxi-7-oxo-2,7'-8,8'-neolignana (**1c**)

$C_{20}H_{18}O_4$

pf=167-168°

$[\alpha]_D - 29,5^\circ$ (MeOH; c 0,1)

RMN- 1H e ^{13}C - Tabela 9, pág. 72, Espectros 11-17, pp. 101-107.

I.V.: OH (3393), CO(1670), Ar (C=C) 1619,1586,1503; CH_2O_2 (937).

EM 70 eV, m/z (int.rel.): 354(M^+ ,100), 337(9), 307(15), 298(15), 297(41), 279(9), 271(71), 165(13), 149(20).

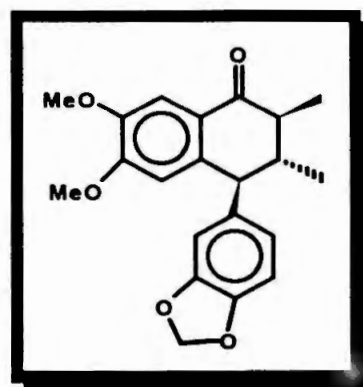
(8R,7'S,8'R)-4,5-dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-7-oxo-2,7',8,8'-neolignana (**2a**)

$C_{22}H_{22}O_6$

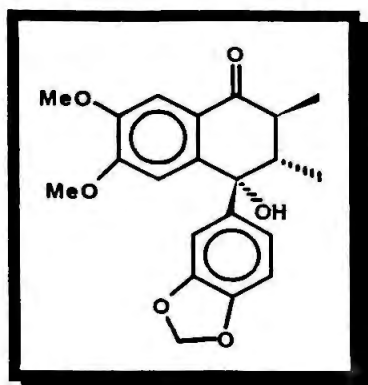
$[\alpha]_D + 12,0^\circ$ (MeOH; c 0,1)

RMN- 1H e ^{13}C : Tabelas 6 e 7, pp. 61-62; Espectros 22-25, pp. 112-115.

I.V.: CO (1673), Ar(C=C) 1619, 1586, 1503, 1487, 1454, 1439; CH_2O_2 (936).



EM 70 eV, m/z (int.rel.): 354(M^+ ,73), 339(12), 311(6), 298(100), 283(17), 267(20), 268(10), 255(33), 254(7), 240(9), 225(9), 197(17), 169(15), 165(6), 149(10), 139(14), 126(18), 115(10), 106(19), 77(10), 62(12).



(8*R*,7'*S*,8'*R*)-7'-hidroxi-4,5-dimetoxi-3',4'-metilenodioxo-7-oxo-2,7',8.8'-neolignana (**2b**)

$C_{22}H_{22}O_5$

p.f=132-134°

$[\alpha]_D + 23,5$ (MeOH, c, 0,1)

RMN- 1H e- ^{13}C : Tabelas 6 e 7, pp. 61-62; Espectros 28-29, pp 118-119.

I.V.: OH(3358), CO(1651), Ar(C=C) 1599, 1516, 1505; CH₂O₂(936)

E.M., 70eV, m/z (int.rel.) : 370(M⁺), 352(9), 314(100), 299(6), 284(7), 283(20), 271(8), 256(8), 255(18), 241(4), 217(10), 165(14), 149(18), 121(11), 114(8), 65(10)

III.6.2- Neolignanas diarilbutânicas

(8*R*,8'*R*)-3,4,3',4',dimetilenodioxo-7.7'-dioxo,8.8'-neolignana (**3**)

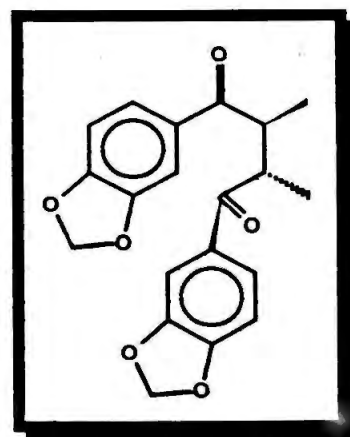
$C_{20}H_{18}O_4$

p.f= 210-212°

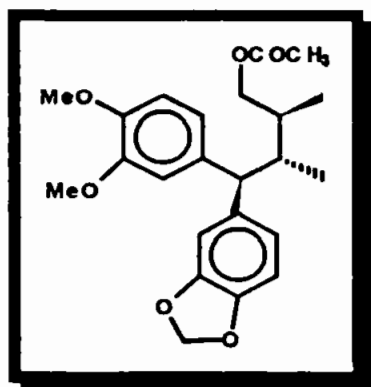
$[\alpha]_D - 125,5^\circ$ (MeOH; c 0,1)

RMN- 1H e ^{13}C - Tabela 10, p. 75; Espectros 30-33, pp. 120-123

I.V.: CO(1670); Ar(C=C) 1611,1504,1463,1440; CH₂O₂(931).



EM 30 eV, m/z (int.rel.): 354 (M⁺), 336(12), 207(27), 205(5), 149(100), 122(2), 91(2).



(8*S*,7'*S*,8'*S*)-7-acetoxi-3,4-dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-7.1-seco-6.7',8.8'-neolignana(4)

$C_{23}H_{28}O_6$

RMN- 1H e ^{13}C - Tabela 11, p. 81; Espectros 34-39, pp. 124-129.

I.V.: CO(1737), Ar(C=C) 1511, 1487, 1463, 1444, 1420; CH₂O₂(934).

EM 70 eV, m/z (Int.rel.): 400(M⁺), 272(18), 271(100), 240(2), 227(3), 226(2), 225(2), 197(2), 152(2), 139(2), 135(2), 127(2), 91(1).

II.1.6.3- Dados espectroscópicos dos derivados

Cat-1a

RMN 1H (Espectro 4, 200 MHz): H₉-1,12 (d, 6,7); H_{9'}-0,93 (d, 6,5); H₈'-3,62 (d, 9,7); H₇-7,58 (d, 8,2); H_{7'}- 6,54 (dd, 8,1; 1,8); H₆-6,71 (d, 8,2); H_{6'}-6,54 (dd, 8,1; 1,8); H₅'-6,72 (d,8,2); H₂'-6,50 (d, 1,8); 2CH₂O₂- 5,63 e 5,72 (2d, 1,0).

RMN ^{13}C (Espectro 5, 50 MHz) : C₉-12,5; C_{9'}-17,6; C₈-47,0; C_{8'}-43,4; C₇-199,3; C_{7'}-49,1; C₆-122,0; C_{6'}-122,7; C₅-107,6; C_{5'}-107,8; C₄- 151,7; C_{4'}-146,0; C₃-145,0; C_{3'}-147,4; C₂-127,7; C_{2'}-108,7; C₁-126,8; C_{1'}- 137,6, CH₂O₂-100,9/ 101,6.

Cat-2a

RMN 1H (Espectro 26, 200 MHz): H₉-1,25 (d, 6,6); H_{9'}-0,91 (d, 6,4); H₈-2,33 (dq, 6,4; 12,0); H_{8'}-1,93 (ddq, 6,6; 10,4; 12,0); H₇'-3,61 (d, 10,4); H₆-7,45 (s); H_{6'}-6,62 (dd, 2,0; 8,0); H₅'-6,88 (d, 8,0); H₃-6,19 (s); H₂'-6,54 (d, 2,0); 3-OMe-3,60 (s); 4-OMe-3,83 (s)

RMN ^{13}C (Espectro 27, 50 MHz): C₉-12,5; C_{9'}-17,9; C₈-48,4; C_{8'}-43,8; C₇-199,9; C_{7'}-52,9; C₆-111,2; C_{6'}-122,3; C₅-147,8; C_{5'}-115,1, C₄-153,3; C_{4'}-143,0; C₃-107,9; C_{3'}-144,2; C₂-142,3; C_{2'}-115,4; C₁-125,1; C_{1'}-135,9; 3-OMe-55,8; 4-OMe-55,9.

II.2- METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

II.2.1- Ensaio antifúngico bioautográfico com *Cladosporium cladosporioides*

A técnica empregada neste experimento foi a bioautografia direta desenvolvida por Homans & Fucks⁷² e executada pela Dr^a Maria Cláudia Marx Young do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica.

A detecção de substâncias fungitóxicas é realizada após a eluição dos constituintes químicos⁷³ em CPC de sílica gel. Após a evaporação do solvente, o cromatograma é borrifado com suspensão conidial de fungo contendo nutrientes necessários para crescimento da colônia. A solução contendo os nutrientes é previamente autoclavada a 120°C por 20 min. Adiciona-se ainda 10 mL de uma solução de glicose para cada 60 mL da suspensão de esporos. Numa etapa seguinte faz-se a incubação da placa em atmosfera úmida por 2-3 dias a 25°C. Após este período verifica-se se há zona de inibição que comprove a presença de substâncias fungitóxicas.

As zonas de inibição são visualizadas como manchas brancas contra um fundo cinza-escuro

⁷² Homans, A.L. & Fucks, A. (1970) *J. of Chrom.* **51**, 325.

⁷³ Hostettmann & Marston (1990) In "*Studies in Natural Products Chemistry*", Vol 7, ed. Attaur - Rhaman, Elsevier, Amsterdam, pp 405-437.

II.2.2- Ensaio antitumoral com variedades mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Este ensaio foi realizado em duas instituições: Departamento de Química do Instituto Politécnico da Virgínia - EUA (V.P.I.), na ocasião pela aluna de doutorado Cláudia B. Brochini⁷⁴, e no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, sob coordenação das Dr^a Maria Cláudia Marx Young e pela Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani.

As variedades de fungos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* com deficiências nos mecanismos de recombinação e / ou reparação do DNA utilizados neste ensaio foram:

- *rad6* que está associada à rota de reparo do DNA ("error-prone");
- *rad52* associada à rota da recombinação que efetua a quebra da dupla-hélice e a recombinação meiótica, atuando sobre a enzima topoisomerase II.

O ensaio antitumoral com fungos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*⁷⁵ é conduzido medindo-se a inibição do crescimento destas cepas de leveduras quando adiciona-se ao meio de cultura do fungo, um potencial agente antitumoral. Esta droga deve apresentar toxicidade seletiva para as células deficientes e inibir o crescimento destas cepas mutantes especificamente.

O mecanismo bioquímico é avaliado pelas rotas *rad52* e *rad6*, comparativamente aos resultados obtidos com o crescimento da levedura tipo selvagem (*rad+*). É importante salientar, que qualquer tipo mutante de levedura DNA - deficiente será mais sensível que a variedade selvagem.

A avaliação dos resultados (Tabelas 12-13 p. 84-85) é descrita na forma de Cl_{12} , que representa a concentração (em $\mu\text{g/mL}$) necessária para produzir uma zona de inibição de 12 mm de diâmetro, ao redor de uma cavidade de 10 μL no meio de cultura da levedura em questão.

⁷⁴ Brochini, C.B. (1997) - Tese de Doutouramento - Instituto de Química (USP).

⁷⁵ Gunatilaka, L. A., Kingston, D. G. I., Johnson, R. K. (1994) *Pure and Appl. Chem*, **66** (10-11), 2219.

II.2.3- Ensaio preliminar moluscicida com desovas de *Biomphalaria glabrata*

O experimento realizado no Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan, sob a orientação da Dr^a Toshie Kawano utiliza o molusco corresponde à espécie *Biomphalaria glabrata* (SAY,1818) (Mollusca, Gastropoda), tipo selvagem, oriundo de Belo Horizonte (MG), mantidos pelo Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan, em aquários de polietileno com capacidade para 20 litros, à temperatura ambiente, aeração artificial e sob dieta de alface.

As desovas de *B. glabrata* são depositadas sobre folhas de polietileno, colocadas na superfície da água dos aquários. Para cada desova, observa-se um número variado de ovos envolvidos por uma cápsula resistente e transparente que as mantêm unidos e aderidos ao substrato⁷⁶.

As desovas selecionadas apresentavam a membrana externa protetora dos ovos intacta pois, uma vez seccionada, há acentuação do efeito tóxico da droga.

Para a identificação do estadio de desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*, Kawano *et al*⁷⁷ estabeleceram o tempo inicial (t_0) da primeira clivagem, pelo aparecimento de um sulco de segmentação no pólo animal do ovo em 50% dos ovos da mesma desova (Figura 13, p. 51). Este estadio finda com a formação de dois blastômeros arredondados. A segunda clivagem inicia-se 80 minutos após a primeira, resultando na formação de quatro blastômeros. A terceira clivagem ocorre após decorrer 160 minutos da primeira, com formação de quatro micrômeros e quatro macrômeros. O estadio de blástula é visualizado entre 12 a 15h após a primeira clivagem, apresentando de 45 a 65 células. Quando não intoxicados, há o desenvolvimento normal dos ovos passando pelos estádios de gástrula, trocófora e veliger (larva), levando à eclosão dos indivíduos jovens após sete dias. A eclosão dos caramujos é considerada à partir da saída da cápsula do ovo, mesmo que este permaneça na desova⁷.

⁷⁶ Ré, L. (1990) - Tese de Mestrado pelo I.B-USP - *Estudo da Atividade Moluscicida de Extratos Vegetais em B. Glabrata (Say, 1818)*

⁷⁷Kawano (Camey), T.; Okazaki, K. & Ré, L.(1992) *Malacologia* **34(1-2)**, 25.

A seleção das desovas em estágio de blástula foi feita com o auxílio de microscópio estereoscópico. O tipo de clivagem em espiral, característica de moluscos em geral, exceto os cefalópodes, facilita na identificação de cada blastômero, desde o início do desenvolvimento embrionário. A opção por tal estágio explica-se pela relativa facilidade de obtenção, quando comparada aos estágios iniciais.

Neste estudo as amostras foram dissolvidas em H₂O:DMSO observando a concentração máxima permitida de 3% de DMSO, na solução padrão de concentração 100 µg/mL (100 ppm). A partir desta, foram realizadas sucessivas diluições em série, até obtenção dos intervalos de concentração necessários para estabelecer as concentrações letais para 50% e 90% dos indivíduos (CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente).

Inicialmente, as amostras são avaliadas a 10, 50 e 100 µg/mL, na presença de dois tipos de controles, um contendo o solvente na diluição utilizada, e outro contendo apenas água, para volume final de 25 mL.

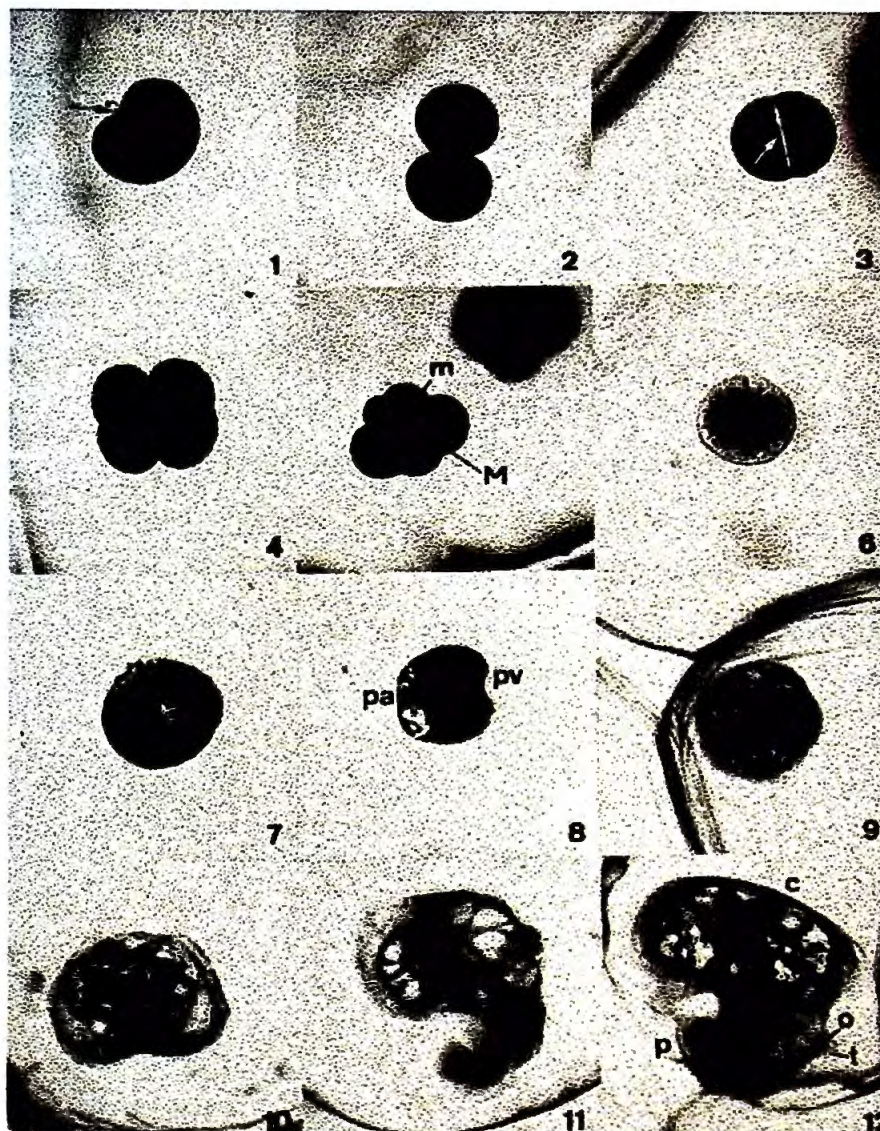
A exposição à solução teste é feita durante 24 h com temperatura entre 24-25 °C. Após este período verte-se água filtrada (3X) sobre as desovas, mantendo-as imersas e livres do toxicante .

A leitura da taxa de mortalidade é determinada após sete dias, através da visualização em microscópio estereoscópico. São considerados mortos os embriões com blastômeros dissociados, com mudança de coloração, mudança de consistência e falta de movimentação larvária. São considerados malformados os embriões em exogástrula, hidropia, malformações cefálica, da concha e inespecífica^{78,79}. Não são considerados malformados aqueles com redução de tamanho ou atraso no desenvolvimento normal.

Os dados obtidos são avaliados pelo programa Excel 5.0 de análise estatística para ambiente WINDOWS, o qual estima-se a CL₅₀ com intervalos de confiança de 95%.

⁷⁸Raven, CHR. P. (1949) *Archs. Néer. Zool.* **8** (3), 1-30.

⁷⁹Geilenkinchen (1966) *J. Embryol. Exp. Morph.* **16** (2), 321



Reprodução autorizada

Figura 16: Estádios de desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*.

- 1) Início da primeira clivagem (t), mostrando sulco de clivagem no pólo animal ovo
- 2) Estádio de 1ª clivagem, com dois blastômeros 3) Estádio de 1ª clivagem, com blastômeros afastados apontando a cavidade de clivagem entre estes 4) Estádio de 2ª clivagem 5) Estádio de 3ª clivagem (m= micromêros e M= Macrômeros) . Todos com aumento de 125X. 6) **Blástula** (100x) 7) gástrula 8) perfil da gástrula (PA=pólo animal e PV= pólo vegetativo) 9) trocófora jovem 10) trocófora 11) veliger jovem (7 a 11= 90 x) 12) veliger (c=concha, o=olho, t=tentáculo, 60x)

II.2.4- Ensaio de avaliação da atividade antioxidante pela medida do malonildialdeído e quimioluminescência

Este ensaio foi realizado, na ocasião, pela pós-doutoranda Solange C. Davino do Departamento de Toxicologia da FCF-USP, segundo o método de detecção de produtos de lipoperoxidação resultantes da oxidação espontânea de lipídios presentes nas células cerebrais⁸⁰. Estes peróxidos formados podem ser detectados tanto pela medida da quimioluminescência (QL) originada pela emissão de fótons, quanto por reação colorimétrica, detectável em 535 nm, proveniente da reação do malonildialdeído (MDA)⁸¹ com ác. tiobarbitúrico (Figura 13, p. 24). Dentre as duas medidas, a primeira é a mais sensível.

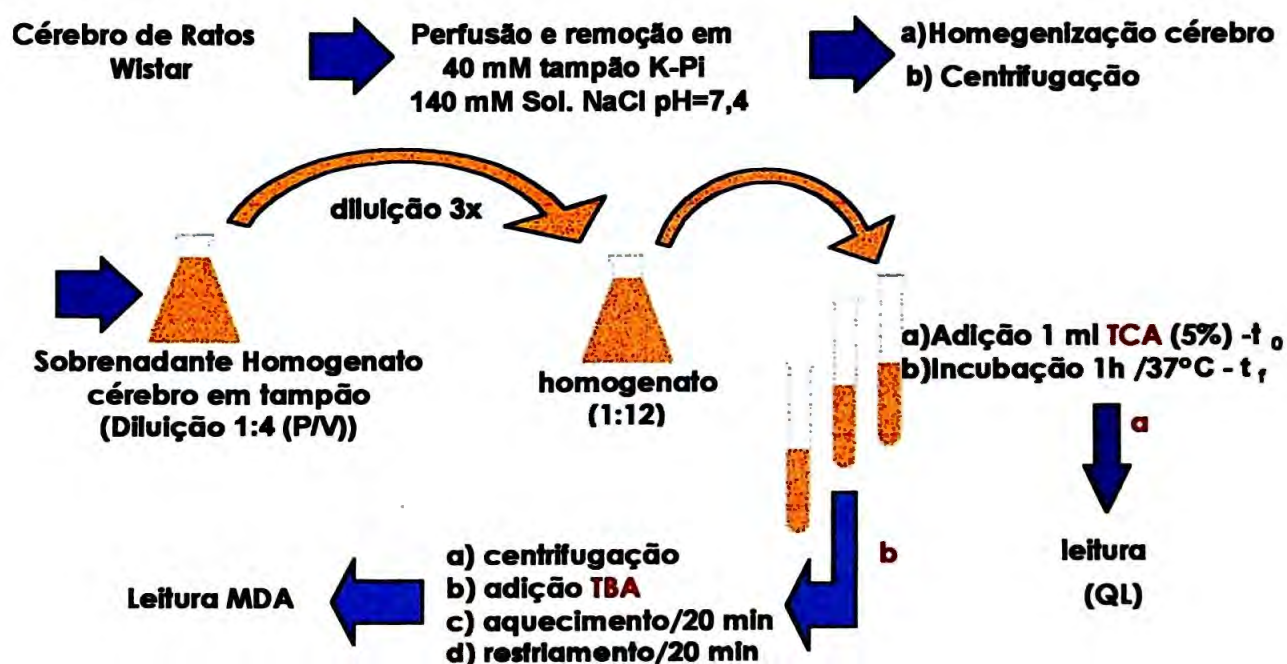


Figura 16: Resumo do procedimento experimental utilizado no ensaio antioxidante

Nestes ensaios as amostras foram dissolvidas em etanol 96° GL, ou em soluções de DMSO/EtOH 1:1, ou DMSO/óleo, conforme conveniente.

⁸⁰ Haleiwell, Barry - 2nd Ed -Free Radical in Medicine , Cap.8 (lipoperoxidation)

⁸¹ Stocks, J.; Gutteridge, J.M.C.; Sharp, R.J.; Dormandy, T.L (1974) *Cli. Sci. Mol. Med.*, **47**: 215

Quando na presença de substâncias antioxidantes há inibição dos produtos da lipoperoxidação, e a diferença obtida entre o tempo final (t_f) da reação com ácido tiobarbitúrico e o tempo inicial (t_0) representa a capacidade antioxidante (CAOX) da substância. O cálculo é efetuado através da fórmula abaixo:

$$\text{CAOX} = \left[\frac{(\text{Abs } t_f - \text{Abs } t_0)_{\text{amostra}}}{(\text{Abs } t_f - \text{Abs } t_0)_{\text{controle}}} - 1 \right] \times 100$$

Na produção de malonildialdeídos (MDA) ou emissão de quimioluminescência (QL), utiliza-se expressar a ação antioxidante em função da concentração necessária para inibir 50% da autoxidação ($Q_{1/2}$). Este dado é obtido através da representação gráfica de $1/\text{MDA}$ ou $1/\text{QL}$ versus $1/\text{concentração amostra teste}$.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.1- Determinação estrutural

Visando a obtenção de neolignanas ariltetraínicas de *Virola sebifera* para avaliação de algumas atividades biológicas, suas sementes foram submetidas a extração em AcOEt. O extrato resultante foi submetido a diversas etapas de fracionamento que possibilitaram o isolamento de neolignanas com esqueletos **ariltetraínicos** e **diarilbutânicos**, sendo o primeiro tipo de ocorrência restrita a *Virola elongata*, *V. sebifera*, *V. oleifera*, *V. calophylla* e *Myristica simarium* (Mac. Rae & Towers, 1984)⁸².

A identificação de diversas neolignanas conhecidas foi realizada mediante obtenção dos dados de RMN ¹H a 200, 300 e 500 MHz e RMN ¹³C à 50, 75 e 100 MHz, e comparados com dados publicados (Kato, 1986; Lopes, 1984⁸³). O estudo espectrométrico das neolignanas de *Virola sebifera* foi realizado através de equipamentos mais potentes e técnicas mais modernas, como as espectroscopias bidimensionais COSY e HETCOR. A técnica de dupla irradiação foi utilizada para obtenção das constantes de acoplamentos e identificação dos sistemas acoplados nos espectros de RMN - ¹H.

Para a determinação estrutural das neolignanas inéditas (**1c** e **3**) utilizou-se as técnicas citadas anteriormente, e no caso de **1c**, realizou-se a reação de acetilação com estudo conformacional do derivado acetilado por espectrometria de RMN de ¹H a temperaturas variadas.

⁸² McRae, W. G. & Towers, G. H. N. (1984) *Phytochemistry* **23**, 1207.

⁸³ Kato, M.J.; Yoshida, M. & Gottlieb, O. (1990) *Phytochemistry* **29**, 1799.

Lopes, L.M.X.; Yoshida, M. & Gottlieb, O. (1984) *Phytochemistry* **23**, 2021

Figura 18: Neolignanas ariltetralônicas isoladas das sementes de *Virola sebifera*.

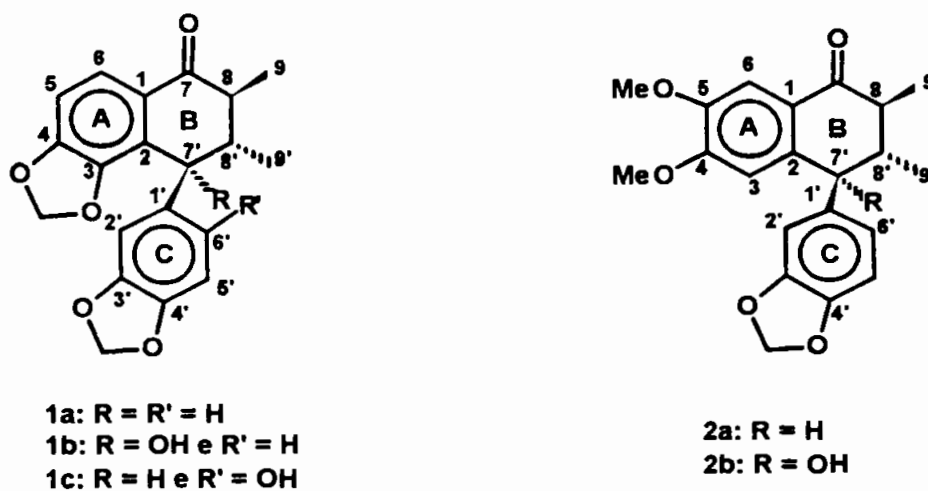
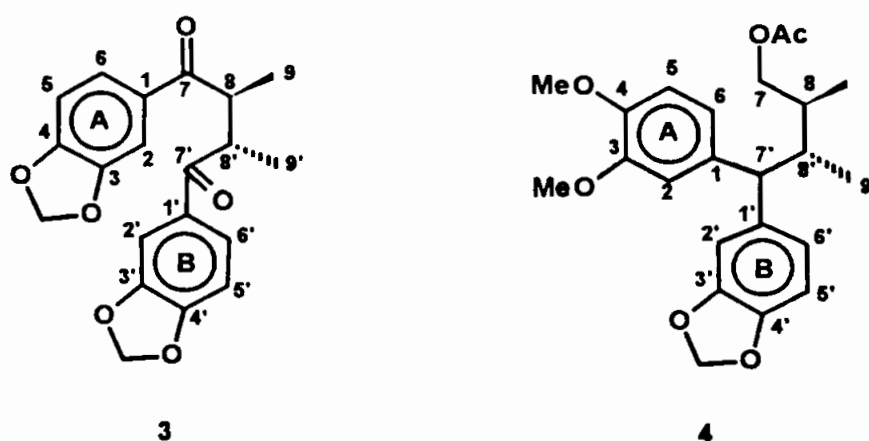


Figura 19: Neolignanas diarilbutânicas isoladas das sementes de *Virola sebifera*.



III.1.1- Neolignanas Ariltetralônicas

As neolignanas com esqueleto ariltetralínico representam os metabólitos secundários mais abundantes nas sementes de *Virola sebifera* chegando a representar 12,5% dos constituintes totais das sementes, sendo superado apenas pelos ésteres graxos que compõem 77, 6% do extrato CDCl_3 seco (Lopes et al 1984)⁸⁴.

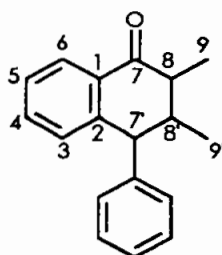


Figura 20: Esqueleto básico de neolignanas ariltetralônicas.

As neolignanas ariltetralônicas (**1a/1b e 2a/2b**) tiveram os dados de I.V., RMN ^1H e ^{13}C comparados aos pares e pôde-se observar a equivalência para a maioria dos sinais de absorções (Tabelas 6, 7 pp. 61-62; Espectros 1-11 e 27-34)

A diferenciação dos esqueletos ariltetralônico e ariltetralínico é feita mediante detecção de carbono carbonílico, evidenciado no espectro de I.V (Dados físicos, pp 43-45) pela banda de estiramento de carbonila conjugada em $1662 \pm 11 \text{ cm}^{-1}$. Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C tal grupamento é inferido pela presença de um sinal referente a um hidrogênio desprotegido orto ao carbono que sustenta a carbonila (H6) em δ 7,58 ($\pm 0,09$) e comprovado por deslocamento químico de RMN- ^{13}C referente ao C7 em δ 198,8 ($\pm 0,6$).

As absorções na região do infravermelho referentes à presença de anel aromático é inferido através de bandas de estiramento C=C de anel aromático, compreendida entre $1617 \pm 2 - 1460 \pm 10$ (Dados físicos, p. 43-45), e ainda pela presença de sinais correspondentes a 5H aromáticos entre δ 6,2-7,7, no espectro de RMN de ^1H (Tabela 6, p. 61).

A natureza dos carbonos aromáticos é avaliada no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 7, p. 62; Espectros 2, 7, 29 e 36), pela observação de sinais de absorção

⁸⁴ Lopes, L. M. X., Yoshida, M. & Gottlieb, O. R. (1984) *Phytochemistry* **23**, 2021.

referentes a ^{12}C , divididos em três grupos distintos: carbonos oxigenados entre δ 153,5 - 141,0, carbonos quaternários aromáticos entre δ 140,0 - 125,0 e carbonos aromáticos não substituídos entre δ 123,0-106,0.

Os substituintes dos anéis aromáticos são evidenciados através dos deslocamentos químicos referentes aos prótons metoxílicos em δ 3,66 ($\pm 0,03$) e δ 3,90 ($\pm 0,04$) e/ou metilenodioxílicos em δ 5,83 ($\pm 0,20$).

Para as neolignanas **2a/2b** os sinais referentes aos grupos metoxílicos (Tabela 7 p. 62,) são observados como dois singletos nos espectros de RMN ^1H (Espectros 22 e 28, pp. 112 e 118) e, como dois sinais pouco diferenciados em δ 56,0 ($\pm 0,1$) nos espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 23 e 29, pp. 113 e 119). Nestas neolignanas observa-se um efeito de proteção para os prótons metoxifenílicos em C4, em relação a C5 (+0,26 δ), listado nas tabelas 6 e 7, pp. 61 e 62.

Para as neolignanas **1a/1b** (Espectros 1 e 6, pp. 91 e 96) os hidrogênios metilenodioxílicos mostram diferentes multiplicidades no espectro de RMN- ^1H . O grupamento ligado ao anel A desdobra-se em dois singletos, pois possuem prótons diastereotópicos, enquanto aquele ligado ao anel C, com rotação livre, aparece como um singleto. Nas neolignanas **1a/1b**, observa-se o efeito de proteção anisotrópica do anel aromático C sobre os prótons metilenodioxílicos do anel A, causando nestes uma diferença de deslocamento químico, evidenciada pelo aparecimento de $2d$ (5,7 e 5,8 δ ; $J=1,2$ Hz). A presença deste pode ser confirmada nos espectro de RMN- ^{13}C pelo sinal em 101,0 ($\pm 0,1$) e pela banda no I.V. em 937 cm^{-1} que caracteriza grupamentos metilenodioxifenílicos.

A definição do padrão de substituição dos anéis aromáticos realizou-se mediante análise das multiplicidades e das integrais dos picos no espectro de RMN ^1H :

- Para as neolignanas **1a/1b** (Tabela 6, p. 61, Espectros 1 e 6, pp. 91 e 96), o dubleto desprotegido, em δ 7,64 \pm 0,02 ($J_{\text{orto}}=8,2$ Hz) apresenta integral para 1H, sugerindo desproteção orto ao carbono que sustenta a carbonila. A mesma multiplicidade e constante de acoplamento são observadas para o hidrogênio H5 em δ 6,76 \pm 0,04, indicando que há apenas dois hidrogênios vizinhos (C5 e C6) no anel A.
- Nas neolignanas **2a/2b** (Tabela 6, p. 61, Espectros 22 e 28, pp. 112 e 118), os deslocamentos químicos referentes ao anel aromático do sistema tetrahidronaftalênico são observados como singletos com H6 em δ 7,52 \pm 0,02 e H3 em δ 6,24 \pm 0,08, indicando que o próton orto ao carbono que sustenta a carbonila,

não possui hidrogênios vizinhos, nem mesmo em posição *meta*. Portanto, o anel aromático deste sistema é tetrassubstituído, com as posições C3/C6 livres nas neolignanas **2a/2b**.

Pela análise dos demais sinais relativos aos prótons aromáticos, pôde-se definir o padrão de substituição do segundo anel aromático. Este apresentou multiplicidade e constantes de acoplamentos (*J*) típicos de sistema ABC (*d*, δ 6,74 \pm 0,09; J_{orto} = 8,00 \pm 0,10 Hz); (*d*, δ 6,69 \pm 0,20; J_{meta} = 1,65 \pm 0,15 Hz) e (*dd*, δ 6,72 \pm 0,09; $J_{orto, meta}$), característicos de anéis aromáticos trissubstituídos com oxigenações nas posições C3' e C4'.

Para as neolignanas **1a** e **2a** (Tabela 6, p. 61, Espectros 1 e 22, pp. 91 e 112) a presença de um dubleto em δ 3,65 (J =9,7 e 11,5 Hz, respectivamente), evidencia a presença de prótons dibenzílicos. A correlação do próton dibenzílico com o carbono C7' em δ 49,1 para **1a** e δ 53,2 para **2a**, foi realizada através do espectro de HETCOR (Espectro 25, p. 115). Para as neolignanas **1b** e **2b** não detectou-se a presença de prótons dibenzílicos. Entretanto, no espectro no IV observou-se bandas de absorções em 3457 e 3358 cm^{-1} , características de estiramento de hidroxilas. A posição destas foi confirmada nos espectros de RMN ^{13}C pelos sinais em δ 74,8 e 76,9, respectivamente (Tabela 7 p. 62, Espectros 8 e 28).

Os espectros de RMN ^1H das neolignanas **1a/1b** e **2a/2b** (Espectros 1, 6, 22 e 28, pp. 91, 96, 112 e 118) apresentaram sinais referentes aos hidrogênios metílicos entre 2,9-2,3 δ (H8) e 2,4-1,9 δ (H8'), observados como dois multipletos.

Na região de absorção de prótons metílicos (H9' e H9) observa-se a presença de dois dubletos (3H, δ 0,93 \pm 0,03; δ 1,17 \pm 0,07, J =6,4 \pm 0,2 Hz), indicando o acoplamento de prótons metílicos a grupamentos metílicos. Estes encontram-se presentes como substituintes do anel B, do sistema tetralínico.

A confirmação do sistema dimetiltetralínico foi realizada através da análise dos espectros HETCOR das neolignanas ariltetralônicas (Espectros 17 e 25, pp. 107 e 115). Ao dubleto mais desprotegido (H8, δ 1,24 \pm 0,07) correlaciona-se o grupo CH₃ (H9, δ 12,3 \pm 0,2) ligado diretamente ao carbono carbonílico (C7).

A atribuição dos sinais, a multiplicidade e as constantes de acoplamento referentes aos prótons metínicos e metílicos do anel B foi comprovada mediante experimentos de dupla irradiação (Figura 21).

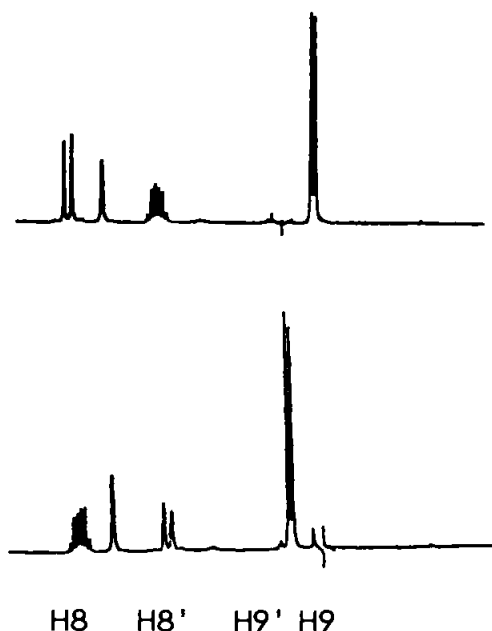


Figura 21: Região entre 2,9-0,9 δ do espectro RMN- ^1H de **1b**, duplamente irradiado.

Quando a irradiação foi realizada na frequência referente aos sinais dos hidrogênios metílicos (H9 -1,17 δ e $\text{H9}'$ -0,92 δ), verifica-se a simplificação do duplo quadruplete (dq), atribuído aos hidrogênios metínicos (H8 -2,84 e $\text{H8}'$ -2,14 δ) para um dubleto com constante de acoplamento 11,8 Hz, típica de acoplamento vicinal *trans*-diaxial entre hidrogênios.

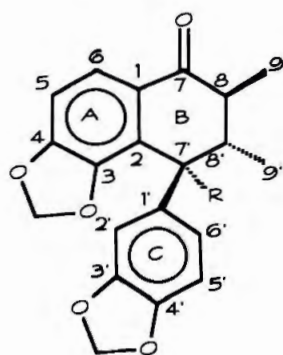
Para as neolignanas **1a** e **2a** o hidrogênio $\text{H8}'$ apresenta constante de acoplamento ($J_{\text{H7}'/\text{H8}'}$) de 9,7 e 11,5 Hz, respectivamente, características para a configuração relativa *trans-trans* diaxial.

A constante de acoplamento entre $\text{H7}'/\text{H8}'$ em **1a** de 9,7 Hz é ligeiramente inferior, devido à presença do grupamento metilenodioxílico nos $\text{C3}/\text{C4}$ do anel A, que gera uma estrutura mais tensionada, do que aquela causada pelas metoxilas em $\text{C4}/\text{C5}$ de **2a**, diminuindo o ângulo diédrico entre $\text{H7}'$ e $\text{H8}'$. Na neolignana **2a**, o ângulo diédrico formado corresponde à interação spin-spin máxima (180° ou $\text{H}_{\text{ax}}/\text{H}_{\text{ax}}$), ao qual infere-se uma relação *trans* entre os hidrogênios $\text{H7}'$ e $\text{H8}'$.

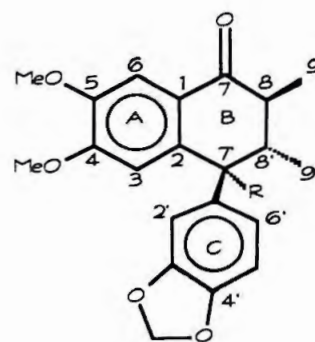
Da análise dos dados de EM (Dados físicos, pp. 43-44) obteve-se o pico do íon relativo ao íon molecular e um padrão de fragmentação⁸⁵ que confirma as estruturas propostas para as neolignanas isoladas. Para os íons M^+ em 338, 354, 382 e 366 associou-se as fórmulas moleculares $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$, $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$, $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5$, $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_6$ às neolignanas **1a**, **1b**, **2a** e **2b**, respectivamente (Esquemas 6-9 pp. 63-66).

⁸⁵ Kato, M. J. (1989) - Tese de Doutorado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Tabela 6: Dados observados nos espectros de RMN de ^1H para as neolignan ariltetralônicas (200 MHz).



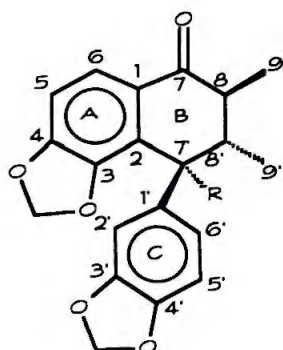
1a: R = H
1b: R = OH



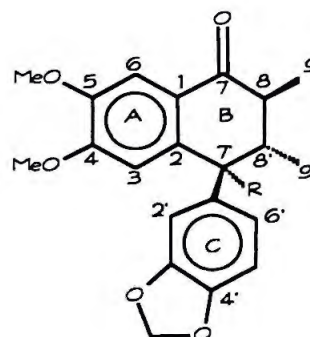
2a: R = H
2b: R = OH

H	1a (J=Hz)	1b (J=Hz)	2a (J=Hz)	2b (J=Hz)
9	1,21 (d; 6,5; 3H)	1,17 (d, 6,8; 3H)	1,26 (d, 6,6; 3H)	1,31 (d, 6,7; 3H)
9'	0,94 (d; 6,7; 3H)	0,92 (d, 6,8; 3H)	0,90 (d, 6,4; 3H)	0,93 (d, 6,7; 3H)
8	2,32 (dq; 6,5, 11,8; 1H)	2,84 (dq, 6,8; 11,8; 1H)	2,30 (dq, 6,6; 12; 1H)	2,88 (dq, 6,7; 11,7; 1H)
8'	1,88 (ddq; 9,7; 6,7; 11,8)	2,14 (dq, 6,8; 11,8; 1H)	1,99 (ddq, 6,4; 11,5; 12,0; 1H)	2,33 (dq, 6,7; 11,7; 1H)
7'	3,65 (d; 9,7; 1H)	---	3,65 (d, 11,5; 1H)	---
6	7,62 (d; 8,2; 1H)	7,66 (d, 8,2; 1H)	7,49 (s; 1H)	7,53 (s; 1H)
6'	6,55 (dd, 7,9; 1,7; 1H)	6,74 (d, 8,1 e 1,8; 1H)	6,63 (dd, 7,8; 1,7; 1H)	6,93 (dd, 8,0 e 1,5; 1H)
5	6,72 (d; 8,2; 1H)	6,79 (d, 8,2; 1H)	---	---
5'	6,65 (dd, 7,9; 1H)	6,78 (d, 8,1; 1H)	6,76 (d, 7,8; 1H)	6,83 (d, 8,0; 1H)
3	---	---	6,16 (s; 1H)	6,32 (s; 1H)
2	---	---	---	---
2'	6,49 (d, 1,7; 1H)	6,67 (d, 1,8; 1H)	6,61 (d, 1,7; 1H)	6,88 (d, 1,5)
CH ₂ O ₂	5,63 (d; 1,3; 1H) 5,72 (d; 1,3; 1H) 5,86 (s; 2H)	5,79 (d, 1,2; 1H) 5,82 (d, 1,2; 1H) 5,94 (s; 2H)	5,93 (s, 2H)	6,02 (s; 2H)
4-OMe	---	---	3,62 (s, 3H)	3,69 (s; 3H)
5-OMe	---	---	3,88 (s; 3H)	3,95 (s; 3H)

Tabela 7: Dados observados nos espectros de RMN de ^{13}C para as neolignanariltetralônicas (50 MHz).

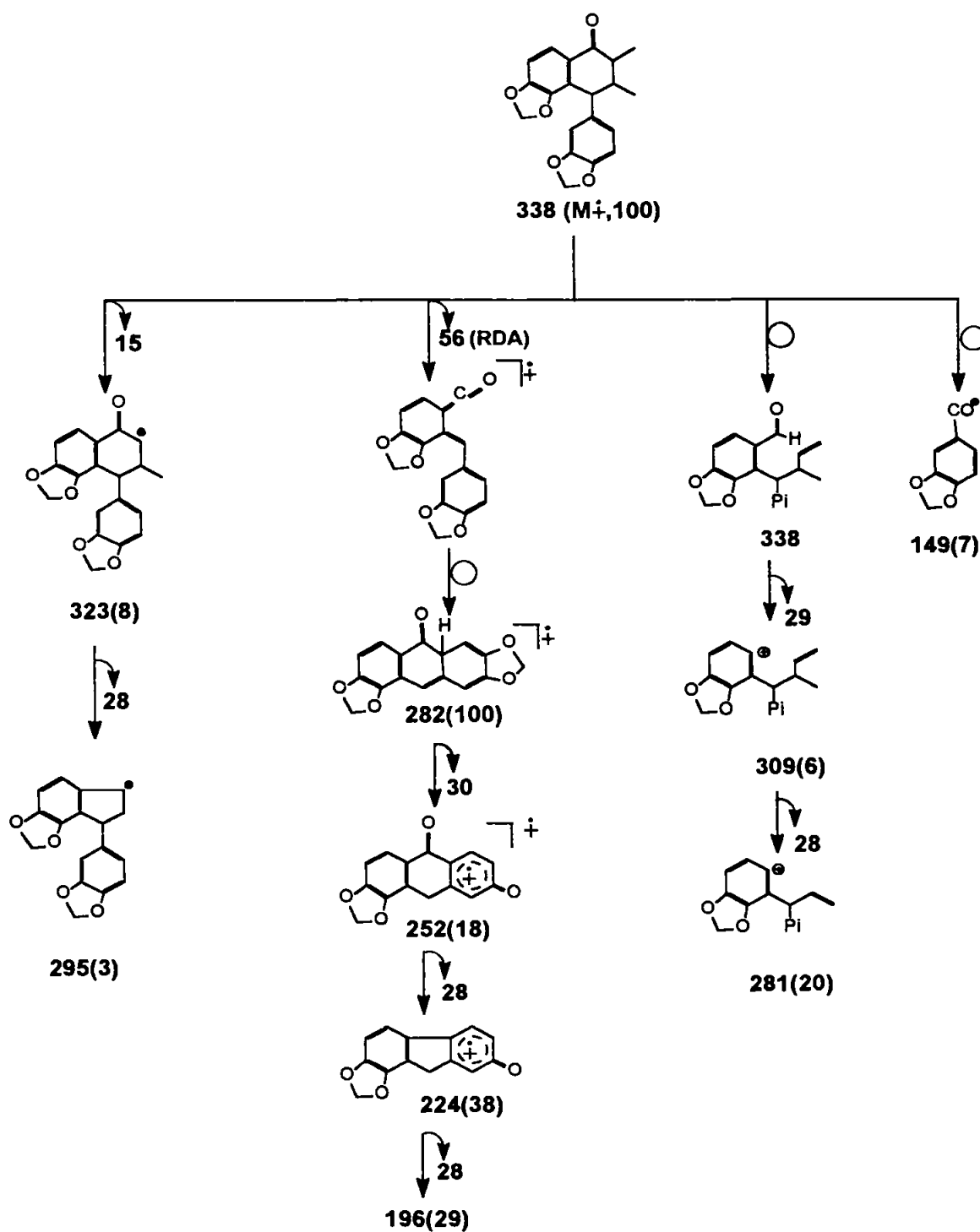


1a: R = H
1b: R = OH

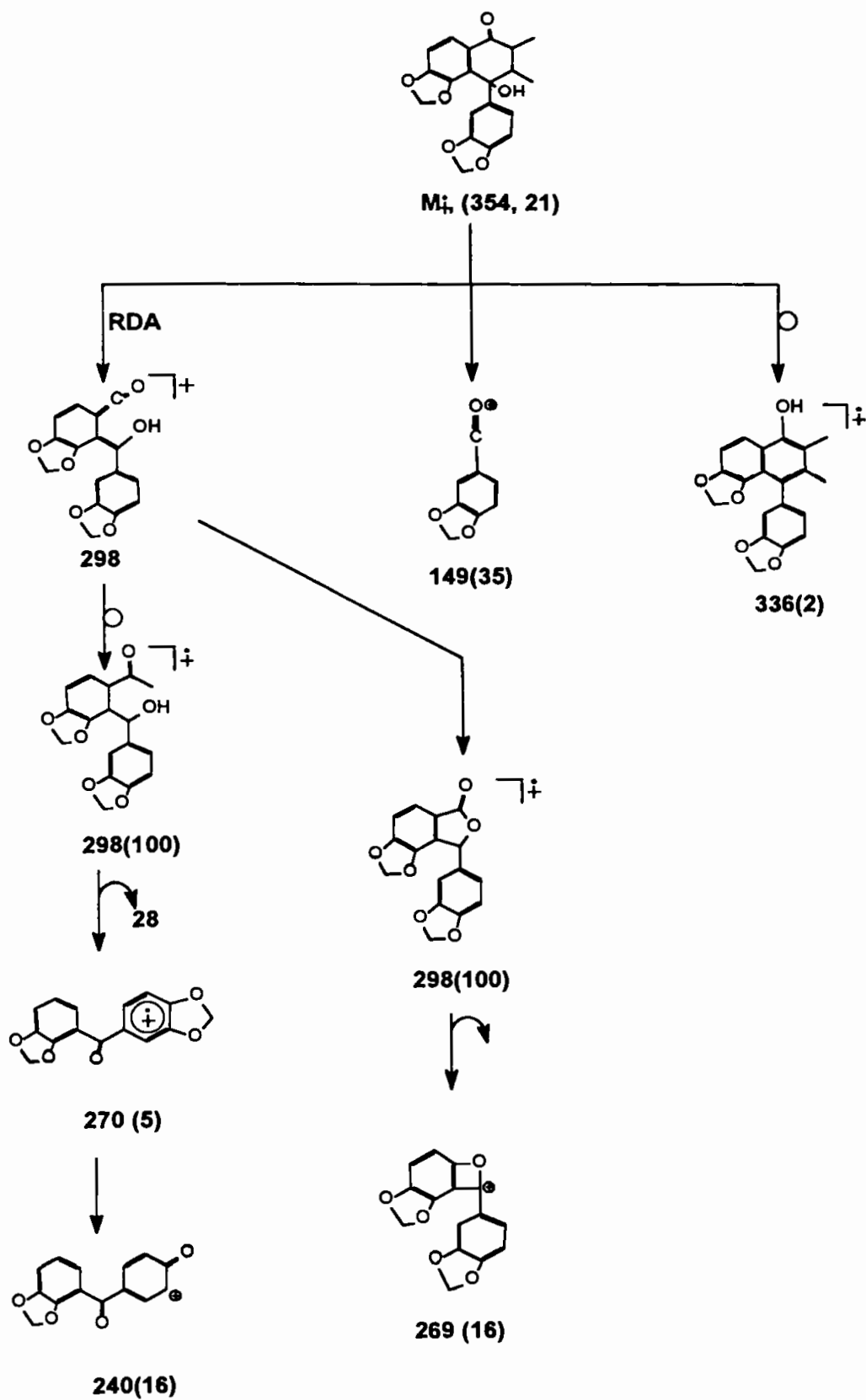


2a: R = H
2b: R = OH

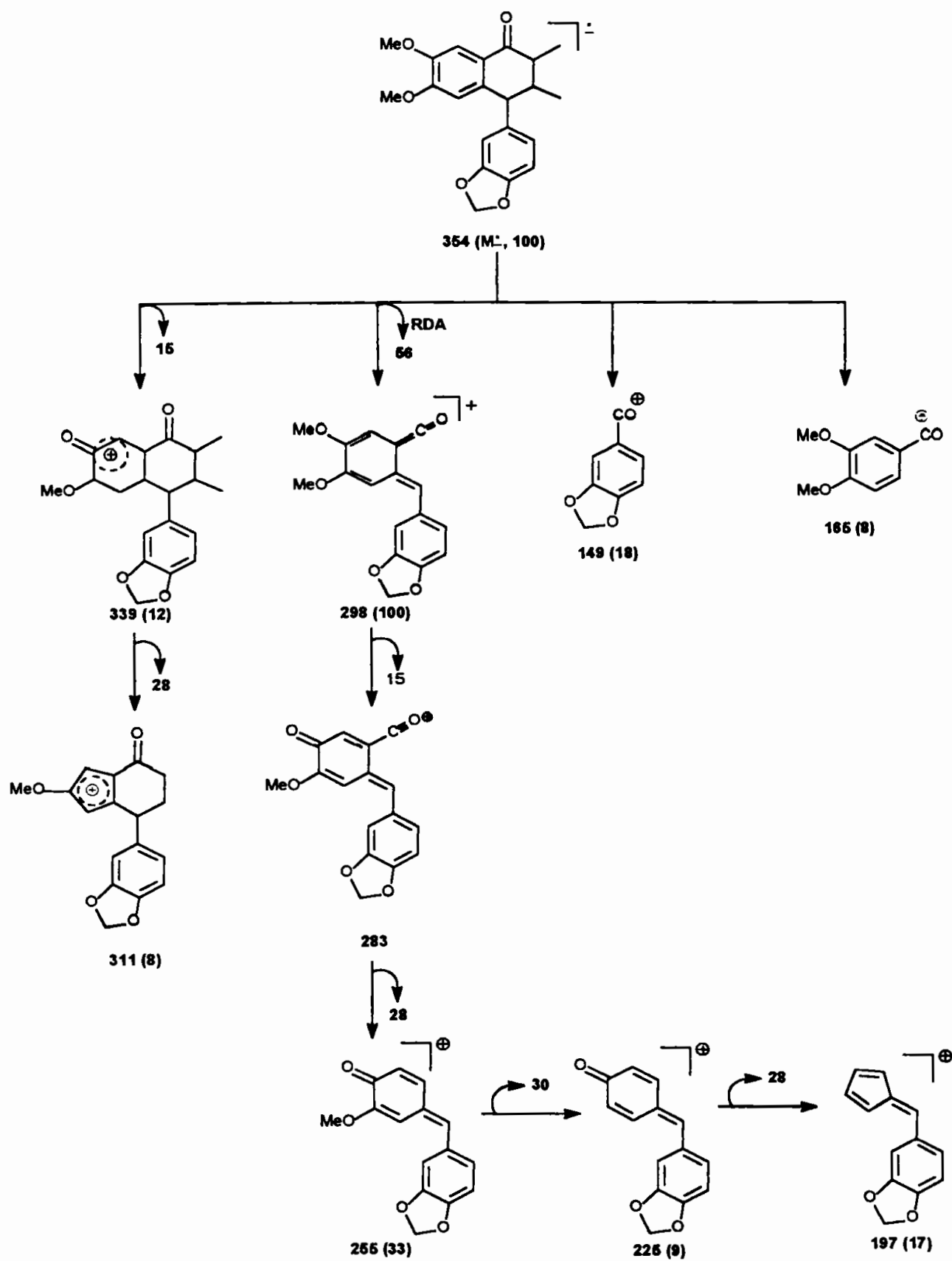
H	1a	1b	2a	2b
9	12,5	12,1	12,4	12,4
9'	17,6	12,0	17,8	12,9
8	47,0	43,3	48,3	43,3
8'	43,4	46,7	43,6	46,8
7	199,3	198,2	198,7	198,8
7'	49,1	74,8	53,2	76,9
6	122,0	122,8	111,0	110,6
6'	122,7	118,9	122,9	119,9
5	107,6	108,8	147,8	149,1
5'	107,8	107,4	109,0	108,2
4	151,7	152,5	153,1	153,4
4'	146,0	147,3	146,3	146,5
3	145,0	144,6	107,8	107,5
3'	147,4	147,3	147,9	147,4
2	127,7	128,4	141,2	141,8
2'	108,7	106,6	108,0	107,4
1	126,8	126,6	125,2	125,2
1'	137,6	140,4	137,4	140,0
CH ₂ O ₂	100,9/ 101,6	101,0 / 102,0	100,9	101,1
4 OMe	---	---	55,7	55,9
5 OMe	---	---	55,9	56,0



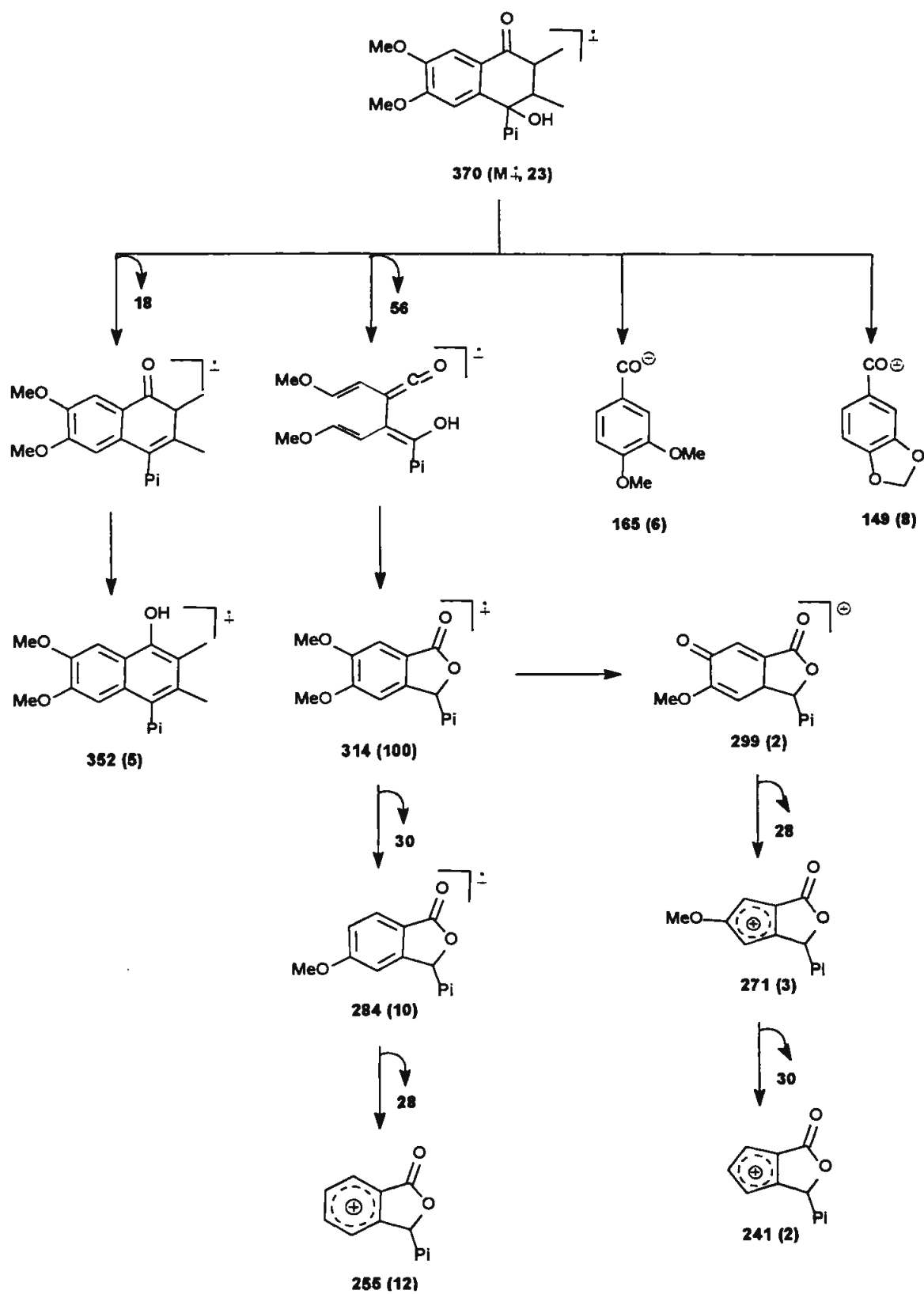
Esquema 6: Principais íons fragmentários observados no EM de **1a**.



Esquema 7: Principais íons fragmentários observados no EM de **1b**.



Esquema 8: Principais íons fragmentários observados no EM de 2a.



Esquema 9: Principais íons fragmentários observados no EM de **2b**.

III.1.1- Neolignana 1c

Estrutura planar

Entre os dados obtidos para **1c** de EM o pico do íon molecular em m/z 354, foi associado aos números relativos de C e H, à partir dos espectros de RMN, possibilitou a proposição da fórmula ($C_{20}H_{18}O_6$). A observação do espectro na região do IV., evidenciou a presença de grupo hidroxílico através de bandas de absorção em 3393 cm^{-1} e do grupo C=O em 1670 cm^{-1} . Evidenciou ainda bandas de absorção de estiramento C=C em $1619,1586,1503.\text{ cm}^{-1}$, referentes a anel aromático.

A comparação do espectro de RMN ^1H desta neolignana (Espectros 11-13, pp. 101-103) com aquele obtido para a neolignana **1a** (Espectro 1, p. 91) evidenciou grande semelhança estrutural, devido à equivalência de alguns deslocamentos químicos e à multiplicidade dos sinais relativos aos prótons dos anéis A e B. As diferenças concentram-se nas regiões relativas aos prótons aromáticos e metilenodioxílicos do anel C. Observou-se ainda multiplicidades variáveis dependentes do solvente deuterado e da temperatura de obtenção do espectros de RMN de ^1H (Espectros 11-13, pp. 101-103).

O espectro obtido a 200 MHz em acetona- d_6 (Espectro 13, p. 103) mostrou dois singletos referentes aos hidrogênios aromáticos do anel C em 6,29 e 6,17 δ , integrando para 1H cada, e ainda dois singletos na região referentes aos hidrogênios metilenodioxílicos, em 5,67 δ e 5,59 δ com intensidades que correspondem a 3H e 1H, respectivamente.

No espectro à 200 MHz em CDCl_3 , registrado à temperatura ambiente (Espectro 11, Tabela 8 p. 7), verifica-se grande semelhança para os deslocamentos químicos dos singletos referentes aos hidrogênios aromáticos do anel C. Entretanto, para os deslocamentos químicos dos prótons metilenodioxílicos observou-se melhor resolução. Para um destes grupamentos, observa-se a presença de $2d$ (5,67 e 5,77 δ ; $J=1,3\text{ Hz}$) que integram para 1H cada e para o outro, um singleto largo referente a 2H. Aos dois dubletos com constante de acoplamento de 1,3 Hz atribui-se o grupamento $-\text{CH}_2\text{O}_2-$ ligado ao anel rígido A, com prótons diastereotópicos. Ao singleto largo em δ 5,77 atribui-se o grupamento $-\text{CH}_2\text{O}_2-$ ligado ao anel C. Este alargamento do pico sugeriu a existência de confômeros com rotação

parcialmente restrita no anel C, resultando em pequena diferenciação dos prótons metilenodioxílicos. Esses prótons são denominados *isocrônicos*⁸⁶ e, devido à rotação do anel, absorvem em frequências idênticas ou muito próximas, mas não diferenciadas neste campo magnético. No espectro de RMN de ¹H obtido, em CDCl₃, a 300 MHz (Espectro 12, p. 102), observa-se para esses prótons, agora diastereotópicos, dois singletos em δ 5,81 e δ 5,82, além dos dois dubletos em δ 5,67 e 5,77 ($J=1,3$ Hz), referentes aos prótons metilenodioxílicos do anel A.

Acetilação de 1c e Estudo Conformacional

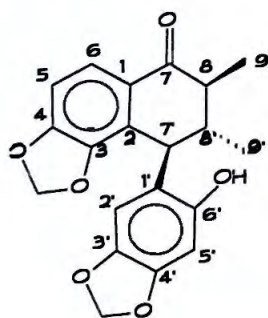
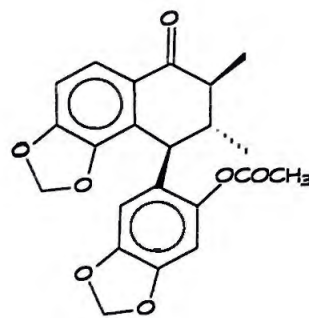
A reação de acetilação da hidroxila fenólica de **1c** foi realizada para comprovação da estrutura desta neolignana (Materiais e Métodos, p. 42), cujo espectro na região do IV. apresentou absorção de grupo carbonila de éster em 1760 cm⁻¹ e o desaparecimento da banda de estiramento de OH. Os dados de espectrometria de massas confirmam a estrutura do derivado acetilado através da observação do pico do íon molecular em M⁺ 396. O espectro de RMN de ¹H (Espectro 18, Tabela 8 p. 69) mostrou um singleto largo em δ 1,85 com integração para 3H, enquanto o espectro de RMN de ¹³C (Espectro 21, p.111), confirmou a presença do grupamento acetoxílico através dos sinais em δ 169,2 (CO) e δ 20,6 (CH₃).

No espectro de RMN de ¹H, observou-se a desproteção dos sinais atribuídos aos hidrogênios H2' e H5' (+ 0,20 e 0,19 δ) do anel C, e a equivalência dos prótons metilenodioxílicos do anel C (s, 2H), acompanhada de uma pequena desproteção (+ 0,10 δ). Entretanto, a ampliação da região entre δ 5,6-7,8 do espectro de RMN ¹H do derivado acetilado (Espectro 19, p. 109; acetona-d₆, 300 MHz) exibe quatro dubletos referentes aos prótons de dois grupos metilenodioxílicos, completamente diferenciados em δ 6,01 e 6,02 (0,95 Hz) e δ 5,67 e δ 5,87 ($J=1,4$ Hz).

Este dado indicou que a rotação do anel C tornou-se restrita. Assim, realizou-se o estudo do derivado acetilado à temperaturas variadas registrando espectros de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), à 47°C, T_{amb}, 0°C, - 20°C, -40°C, -50°C e -60°C (Figura 23, p. 71).

⁸⁶Friedbolin, H.(1993) - *Basic One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*, VCR Publishers, New York (USA)

Tabela 8: Dados observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para neolignana **1c** e **1c-Acet**.

**1c****1c-Acet**

1c		1c - ACet	
^1H (CDCl_3)	^{13}C (acetona- d_6)	^1H (CDCl_3)	^{13}C (acetona- d_6)
9	1,17 (d; 6,5 Hz)	13,1	12,5
9'	0,96 (d; 6,5 Hz)	17,9	14,3
8	2,30 - 2,41 (m)	48,3	48,1
8'	1,92 - 2,06 (m)	43,2	42,4
7	-----	198,5	198,6
7'	4,12 (d; 9,8 Hz)	42,6	42,4
6	7,62 (d; 8,2 Hz)	123,1	123,0
6'	-----	150,8	145,9
5	6,73 (d; 8,2 Hz)	107,7	107,8
5'	6,32 (s)	98,1	105,3
4	-----	152,5	152,7
4'	-----	145,9	145,8
3	-----	147,8	143,9
3'	-----	141,5	147,1
2	-----	129,0	128,7
2'	6,30 (s)	109,0	113,2
1	-----	129,0	128,2
1'	-----	122,7	127,1
CH_2O_2	5,82 (d; 1,0 Hz)	101,7	102,6
CH_2O_2	5,67 (d; 0,8 Hz) 5,77 (d; 0,8 Hz)	101,0	102,7
COO	-----	-----	169,2
CH_3 - Acet	-----	-----	20,5

Com base nas medidas das integrações das absorções e na análise de modelos moleculares, foi possível propor a presença de dois confômeros predominantes (atropoisômeros), resultantes de impedimento à livre rotação do anel aromático C (Figura 22) (Tabela 9 p. 72). Sendo assim, considera-se que o grupamento acetoxílico presente neste anel poderia assumir a posição acima ou abaixo do plano do sistema tetralínico, com o anel aromático C ortogonal a este plano (Figura 22).

O efeito mais acentuado foi observado sobre o próton H7' do confômero B, cujo sinal em δ 3,54 está, aparentemente, protegido pela carbonila do acetato. A presença de uma ponte de hidrogênio é esperada quando ocorre a interconversão dos rotâmeros. Esta possibilidade é evidenciada no confômero A, onde o H-7' (δ 4,02) absorve em campo mais baixo ($-0,23 \delta$) quando comparado ao mesmo hidrogênio, no espectro obtido à temperatura ambiente. Neste confômero o grupamento metílico do acetato encontra-se protegido pelo efeito anisotrópico do anel A, e o ângulo diédrico entre H8'/H7' tendendo a *axial-axial* (180°). No confômero B, o grupo acetoxílico, acima do plano, poderia estar exercendo efeitos de proteção anisotrópica sobre H-8', fato não observado no rotâmero A.

Finalmente, observou-se o efeito de proteção sobre um dos hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, devido ao cone da carbonila do grupo acetoxílico no confômero B.

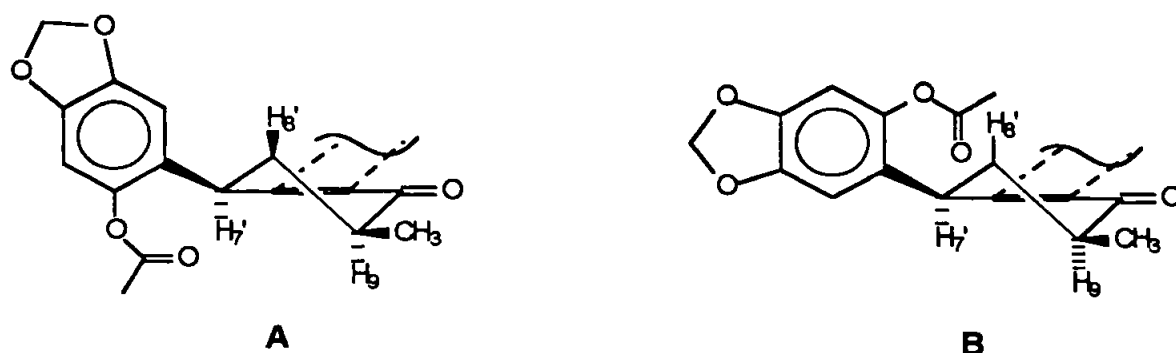


Figura 22: Confômeros propostos para a neolignana **1c-Acet**

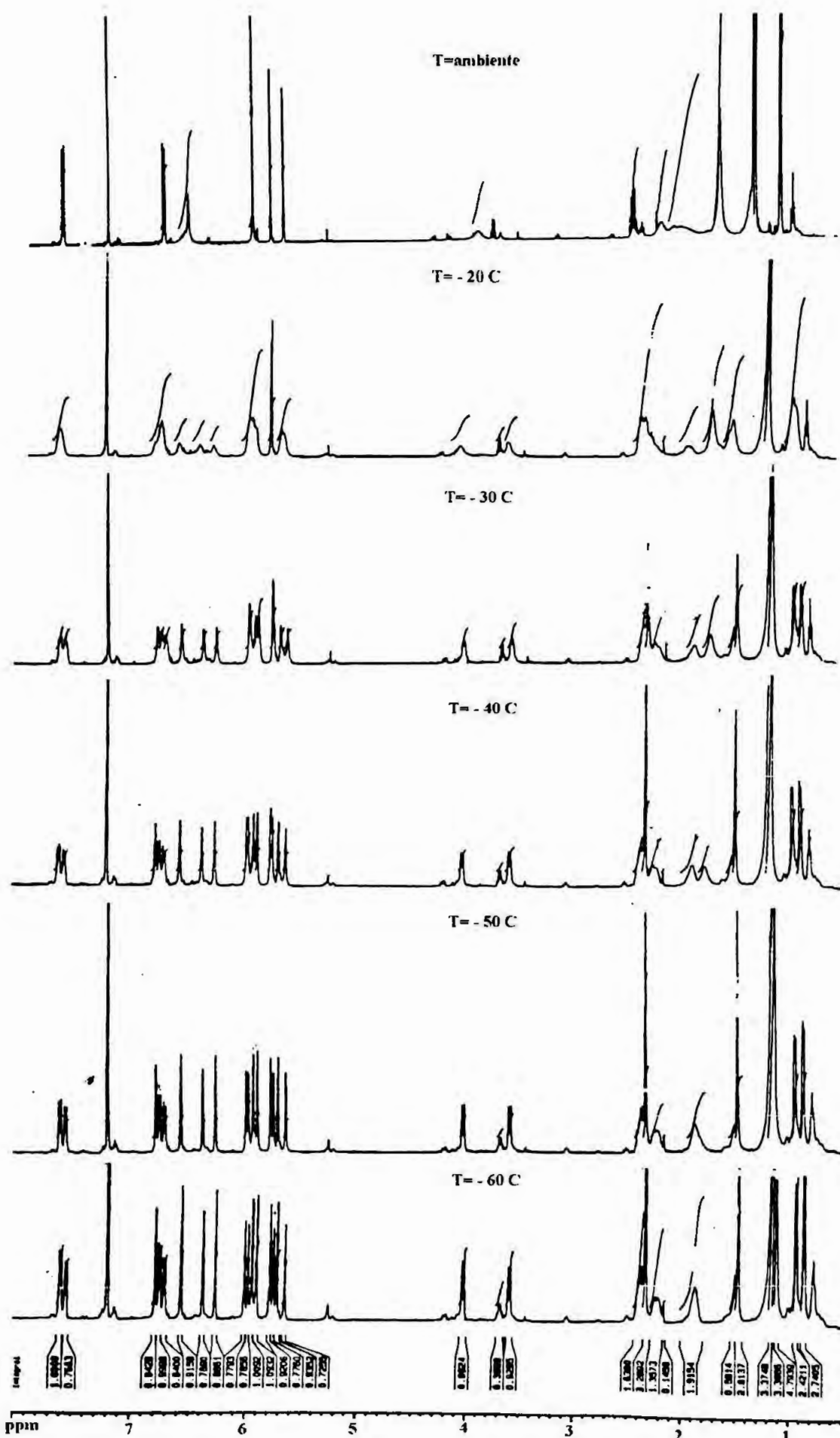


Figura 23: Experimentos em RMN (500 MHz, CDCl₃, para a neolignana 1c-Acet sob temperatura variada.

Tabela 9: Dados dos espectros de RMN de ^1H à T_{amb} e -60°C , (500 MHz, CDCl_3).

T_{amb}				$T = -60^\circ\text{C}$				
				A		B		
^1H	δ (Hz)	$\Delta\delta_{\text{A}}$	$\Delta\delta_{\text{B}}$	(δ_{A} , Hz)	Integral	(δ_{B} , Hz)	Integral	$\delta_{\text{A-B}}$
9	1,17 (d; 6,5)	-0,03		1,13-1,15 (sl)	6,76	n.d.*		
9'	0,93 (d; 6,7)	-0,08	0,00	0,85 (d, 5,4)	2,74	0,93 (d, 5,4)	2,42	+0,08
8	2,28 - 2,41 (m)	+0,07	-0,12	2,35-2,47 (m)	1,64	2,21 - 2,25 (m)	1,50	-0,12
8'	2,01 - 2,10 (m)	-0,19		1,87 (m)	1,92	n.d.		
7'	3,82 (sl)	+0,20	-0,23	4,02 (d, 10,0)	0,98	3,59 (d, 10,4)	0,93	-0,43
6	7,59 (d, 8,2)	+0,01	-0,04	7,60 (d, 8,2)	1,00	7,55 (d, 8,2)	0,77	-0,05
5	6,71 (d; 8,2)	+0,02	-0,02	6,73 (d, 8,2)	1,00	6,69 (d, 8,2)	0,84	-0,04
5'	6,49 (sl)	+0,08	-0,22	6,57 (s)	0,92	6,27 (s)	0,89	-0,30
2'		+0,29	-0,11	6,78 (s)	0,84	6,38 (s)	0,77	-0,40
CH ₂ O ₂ Anel C	5,91 (s)	+0,03	-0,13	5,94 (s)	1,10	5,78 (s)	0,92	-0,16
		-0,01	-0,19	5,90 (s)	1,10	5,72 (s)	0,94	-0,18
CH ₂ O ₂ anel A	5,63 (d; 1,2) 5,75 (d; 1,2)	+0,38	-0,13	6,01 (s)	0,78	5,76 (s)	0,78	-0,25
		+0,23	-0,10	5,98 (s)	0,79	5,65 (s)	0,73	-0,33
CH ₃ - Acet	1,50 (sl)	-0,03	+0,83	1,47 (sl)	3,64	2,33 (sl)	3,29	+0,86

$\Delta\delta_{\text{A}}$ e $\Delta\delta_{\text{B}}$ = Diferença entre os deslocamentos químicos à temperatura ambiente e os confômeros (A e B), presentes a -60°C .

$\delta_{\text{A-B}}$ = Diferença de deslocamentos químicos entre os confômeros A e B.

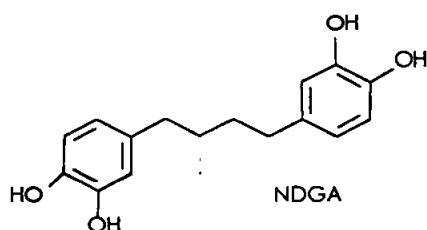
n.d. = não desdobrado

+ = desproteção

- = proteção

III.1.2- Neolignanas Diarilbutânicas

Esta classe de neolignanas de ocorrência natural tem sido relatada, principalmente nas famílias Myristicaceae, Zygophyllaceae, Combretaceae e Austrobaileyaceae. Tem como principal representante o ácido nor-diidroguaiarético (NDGA), que possui destacada atividade antioxidante ⁸⁶.



A determinação estrutural destas neolignanas foi feita mediante análise dos dados de espectrometria de RMN ¹H, ¹³C, DEPT₁₃₅ (Espectros 30-39, pp. 120-129), e espectrometria de massas e infravermelho. Da análise destes dados pôde-se observar sinais de grupamentos

característicos de lignóides, principalmente pelas absorções de doubletos referentes aos hidrogênios metílicos, além dos hidrogênios aromáticos.

O espectro no infravermelho detectou a presença de grupamento carbonílico em 1670 cm⁻¹ para **3** e, em 1737 cm⁻¹ para **4**. Apresentou ainda, bandas de estiramento C=C aromático na região compreendida entre 1611-1440 cm⁻¹ e 1511-1420 cm⁻¹ para **3** e **4**, respectivamente.

Embora estas neolignanas pertençam à mesma subclasse de metabólitos secundários, os espectros de RMN ¹H destas apresentaram muitas características diferentes, sendo apresentadas individualmente.

III.1.2.1- Neolignana 3

A proposição da fórmula molecular desta nova neolignana diarilbutânica foi baseada em espectrometria de massas sob impacto eletrônico a 30 eV. Nestas condições, obteve-se o sinal de M⁺ em 354 μ, e um pico base em m/z 149 (Esquema 10, p. 76). O íon molecular foi associado aos dados de análise elementar desta substância obtendo-se a fórmula molecular C₂₀H₁₈O₆.

Os dados de RMN de ¹H (Tabela 10, p. 75; Espectro 30, p.120) indicaram a presença de anel aromático trissubstituído, típico de sistema ABC, através da multiplicidade dos sinais aromáticos e das constantes de acoplamento obtidas,

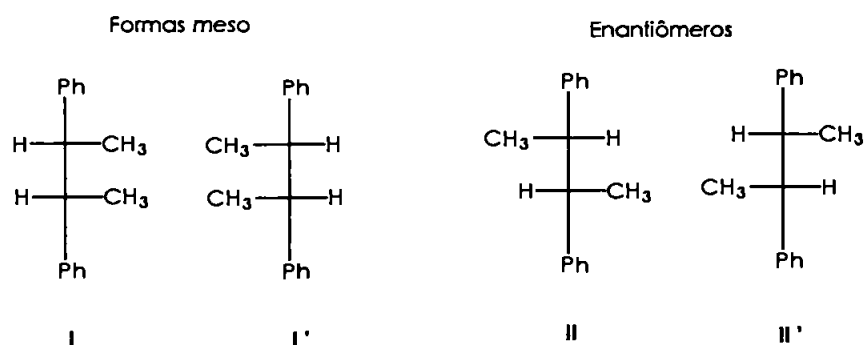
⁸⁶ Mabry, T. J.; Thaker, E. (1980) *J. Pharm. Sci.* **63**, 1905.

como descrito anteriormente para as neolignanas ariltetralônicas **1a/1b** e **2a/2b** (pp. 58-59).

As multiplicidades dos sinais, observadas no espectro de RMN ^1H , indicam uma simetria molecular que é corroborada através dos espectros de RMN ^{13}C (Espectro 31, p.121) e DEPT 135° (Espectro 32, p. 122) onde observou-se a presença de dez carbonos, sendo dois carbonos aromáticos oxigenados na região δ 151,6-148,1, um carbono quaternário em δ 130,7, três metínicos aromáticos compreendidos entre δ 124,0-107,0 e ainda, sinais característicos de grupamento carbonílico em δ 202,3 e metilenodioxílico em δ 101,7. Para os sinais em δ 43,4 e 15,8 atribui-se os carbonos alifáticos, ligados diretamente à carbonila(C8/C8') e ao grupo metílico (C9/C9'), respectivamente. Estes dados foram confirmados através do experimento HETCOR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (Espectro 33, p. 123).

Análise Conformacional

Considerando a presença de dois centros quirálicos na molécula, quatro isômeros são possíveis (I, I', II e II') podendo ser representados através das projeções de Fisher:



Através da análise do valor da rotação específica ($[\alpha]_D = -125,0^\circ$ $c = 0,1$; MeOH e 25°C) exclui-se a possibilidade da presença do isômero, uma vez que este não promoveria o desvio da luz polarizada. Portanto não seria possível a presença da conformação R/S=S/R, mas um dos dois enantiômeros: R, R ou S,S (Figura 24, p. 75)^{87,88}.

⁸⁷ Barbosa Filho, J. M. - Tese de Doutorado: Constituintes químicos dos gêneros *Aniba*, *Licaria* e *Nectandra* (Lauraceae) - I.Q. - USP, 1986.

⁸⁸ Perry, C. L.; Kalnins, M. V.; Deitcher, K. (1972) *J. Org. Chem.* **26**, 4371.

Para a definição da configuração absoluta nestes estereocentros, necessita-se da obtenção de um derivado cristalino para a obtenção de Raios-X ou de um produto de derivatização que pudesse ser diretamente comparado com dados existentes na literatura.

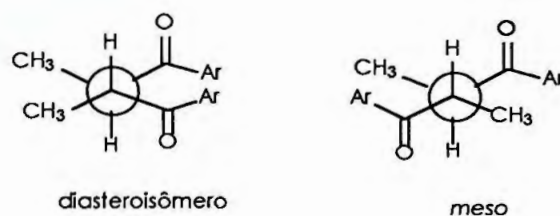
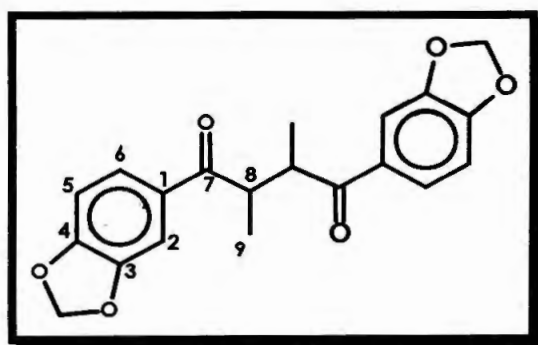
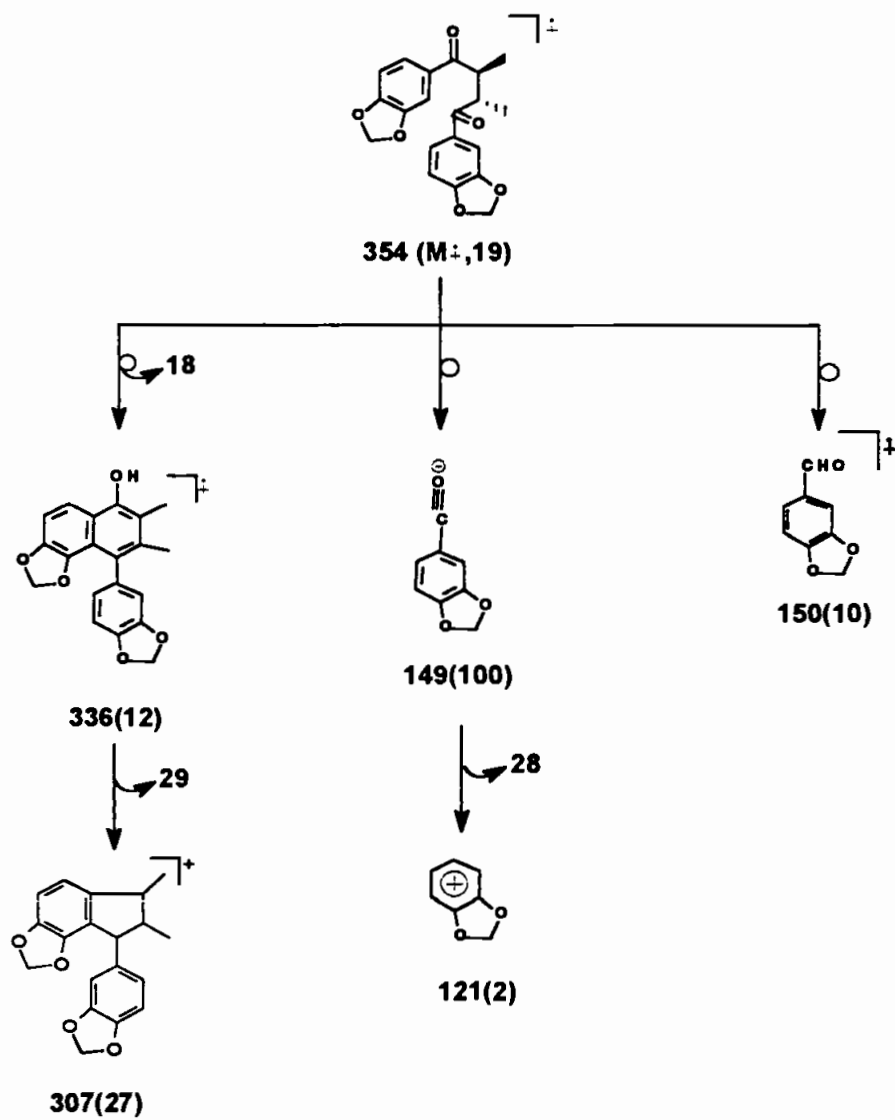


Figura 24: Projeções de Newman para os isômeros I e II de **3**

Tabela 10: Dados observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para neolignana **3** (CDCl_3 , 200 MHz):

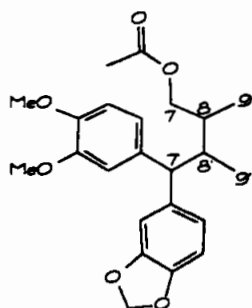


3	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1/1'	----	130,74
2/2'	7,35 (d; 1,7 Hz)	108,27
3/3'	----	148,06
4/4'	----	151,58
5/5'	6,79 (d; 8,2 Hz)	107,85
6/6'	7,56 (dd; 8,2 e 1,7 Hz)	124,58
7/7'	----	202,33
8/8'	3,77 (q; 2,5 Hz)	43,44
9/9'	1,19 (d; 2,3 Hz)	15,79
CH_2O_2	5,95 (s)	101,68



Esquema 10: Principais íons fragmentários observados no E.M para **3**.

III.1.2.2- Neolignana 4



O espectro de massas da neolignana **4** (Esquema 11, p. 80) apresentou M^+ em 400 μ compatível com a fórmula molecular $C_{23}H_{28}O_6$.

O espectro no I.V. apresentou banda de absorção característica de grupamento carbonílico de acetato em 1737 cm^{-1} . Evidências para a presença deste grupamento em **4**, foram obtidas no espectro de RMN 1H (Espectro 34, p. 124) através da presença de um singlete em δ 1,99 (3H). O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 36, p. 126) apresentou sinais relativos aos carbonos metílico e carbonílico em δ 20 e 171,0, respectivamente. Observa-se ainda, a desproteção provocada pelo grupo acetato sobre os prótons carbinólicos (H7, 2H, δ 3,87, 2dd) com relação ao espectro da substância não acetilada⁸⁹. A presença destes anéis aromáticos são também corroborados pelo EM, que apresentou como pico base o íon m/z 271 μ , relativo ao cátion dibenzílico.

A presença do substituinte metilenodioxifenílico foi detectada pela presença de 2d no espectro de RMN de 1H em δ 5,81 e δ 5,82 (2H, $J=1,4$ Hz) e em δ 100,80 no espectro de RMN de ^{13}C . O grupamento metoxifenílico foi identificado através da observação de sinais característicos em δ 58,0 e 58,2, cujo padrão de substituição foi equivalente às demais neolignanas ariltetralônicas descritas previamente (p. 57).

Observa-se ainda a ocorrência de dois dubletos referentes aos prótons metílicos (H9'/H9) em δ 0,63 ($J=6,8$ Hz) e em δ 0,72 ($J=7,0$ Hz), no espectro de RMN 1H (Espectro 34, p. 124).

Para verificação da multiplicidade e das constantes de acoplamento dos sinais referentes aos prótons carbinólicos (m ; δ 3,92-3,81) e metínicos (2 m ; δ 2,40-2,38; m ; δ 1,89-1,86) foram feitos experimentos de dupla irradiação (Figura 25 p.78).

⁸⁹ Kato, M.J. (1989) – Tese de Doutorado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

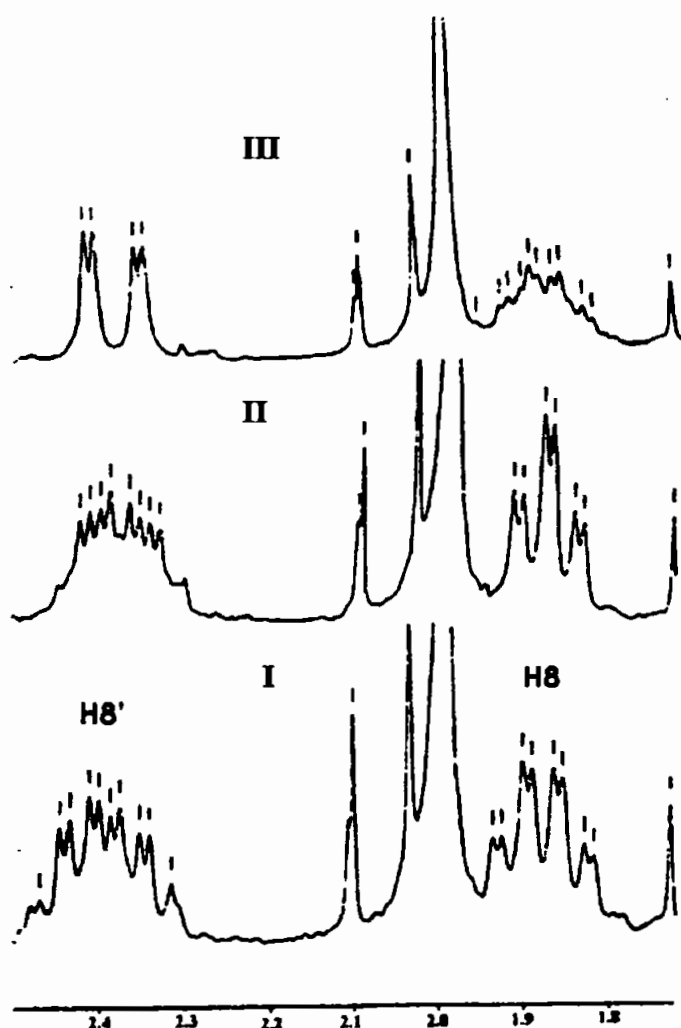


Figura 25: Região entre 2,4-1,8 δ do espectro RMN de ^1H de **4**, duplamente irradiado.

- Espectro não irradiado: Figura 25-I.

- A irradiação na frequência do hidrogênio H9 (d ; δ 0,71) resultou na simplificação do sinal referente ao hidrogênio H8 (dtq ; δ 1,88) a duplotripleto (dt), sendo possível observar as constantes de acoplamento entre H7/H8 e H8/H8' com 7,1 e 2,2 Hz, respectivamente (Figura 25, II)

- A irradiação na frequência do hidrogênio H9' (δ 0,63) resultou na simplificação do ddq (H8', δ 2,39) à dd , com constantes de acoplamento entre H8'/H8 e H7'/H8' de 2,2 Hz, e 11,8 Hz., respectivamente (Figura 25 -III)

Os demais sinais obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram atribuídos conforme listado na Tabela 11, p. 81.

Análise conformacional e configuracional

A magnitude das constantes de acoplamento de 11,8 Hz entre os hidrogênios H8'/H7' define uma disposição *antiperiplanar* entre esses sendo que duas configurações, dentre as oito possibilidades estão representadas na Figura 24.

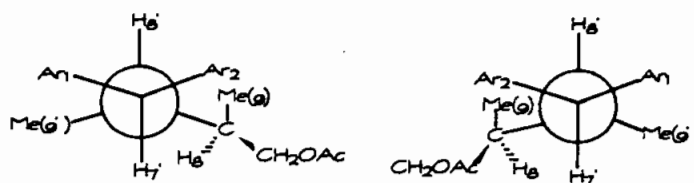
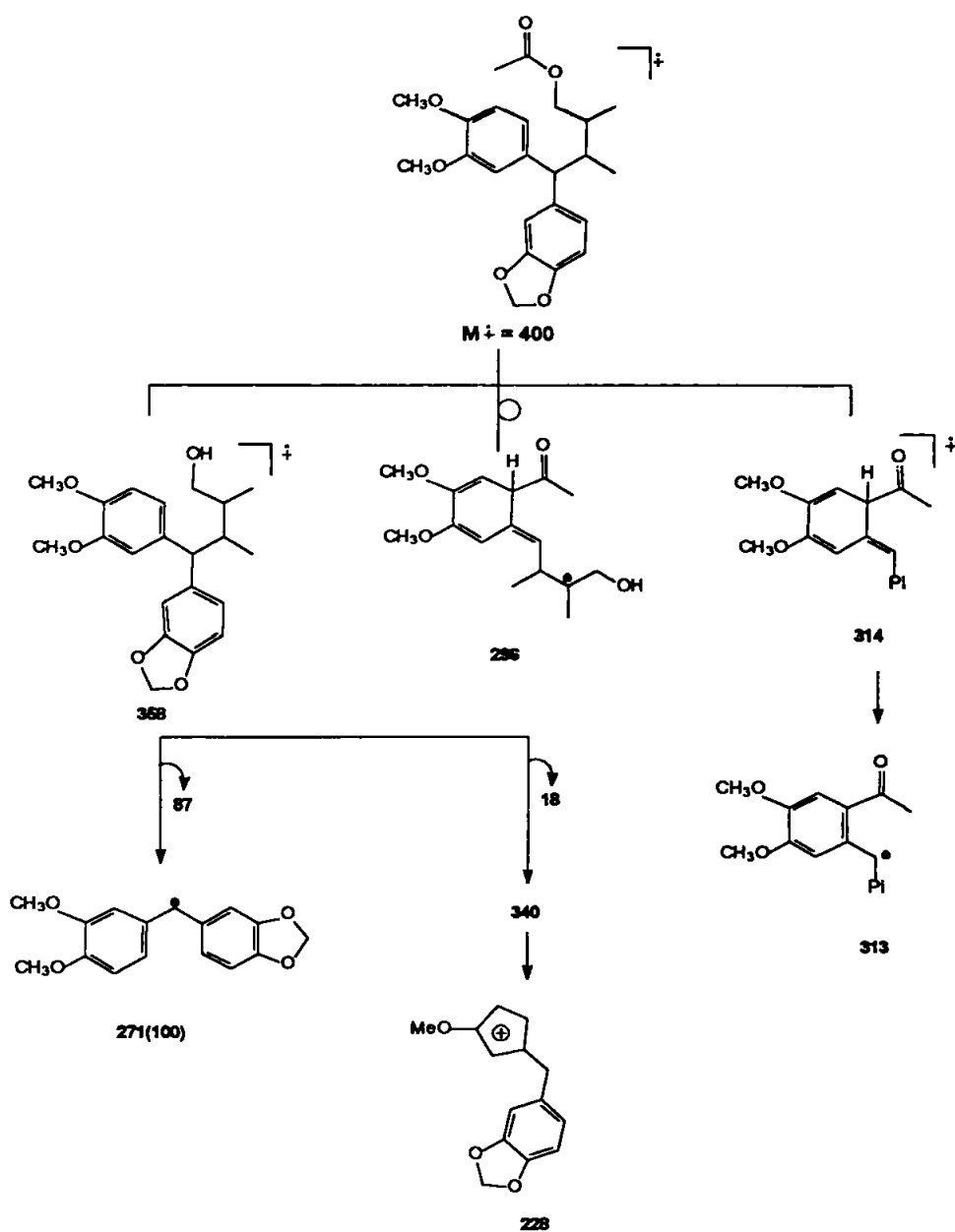


Figura 24: Projeções de Newman de **4**.

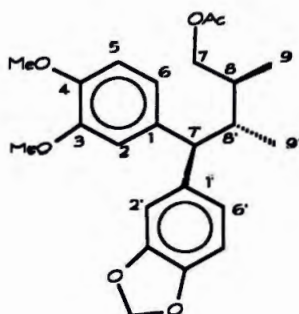
Em ambos os casos, os hidrogênios metílicos (9/9') encontram-se protegidos por anisotropia dos anéis aromáticos, e a definição das configurações não é possível. Para tanto, Kato *et al* 1990⁸⁹, oxidou a neolignana não acetilada com clorocromato de piridina (PCC) obtendo-se o aldeído. Esta na presença de ácido de Lewis, foi ciclizado a neolignana ariltetralônica **2a**. Neste caso, a configuração relativa foi estabelecida mediante dados de constante de acoplamento entre H7'/H8' e a configuração absoluta mediante dados de dicroísmo circular e $[\alpha]_D$.

No presente trabalho, a principal evidência para a estrutura proposta foi baseada nos dados obtidos de constantes de acoplamentos. Mediante comparação os dados descritos previamente na literatura, comparados com os demais espectros registrados, como COSY e HETCOR (Espectros 37-39, pp. 127-129) pôde-se atribuir a estrutura proposta anteriormente.



Esquema 11: Principais íons fragmentários observados no EM de **4**.

Tabela 11: Dados observados nos espectros de RMN-¹H e ¹³C para neolignana **4** (CDCl₃, 300 MHz)



4	¹ H	¹³ C
9	0,71(d; 6,8 Hz, 3H)	9,70
9'	0,63(d, 7,1 Hz, 3H)	11,84
8	1,88 (dtq, 7,1; 6,8; 2,2 Hz, 1H)	32,54
8'	2,39 (ddq, 11,8; 7,1; 2,2 Hz, 1H)	36,50
7	3,87 (2dd, 7,1 e Hz, 2H)	68,42
7'	3,44 (d, 11,8 Hz, 1H)	55,80
6	6,84-6,61(m, 1H)	119,56
6'	6,84-6,61(m, 1H)	120,84
5	6,84-6,61(m, 1H)	111,38
5'	6,84-6,61(m, 1H)	108,14
4	---	147,42
4'	---	145,73
3	---	148,98
3'	---	147,72
2	6,84-6,61(m, 1H)	111,08
2'	6,84-6,61(m, 1H)	107,78
1	---	136,54
1'	---	138,78
CH ₂ O ₂	5,82 (d, 1,4 Hz, 1H) / 5,81 (d, 1,4 Hz, 1H)	100,80
COCH ₃	1,99 (s, 3H)	20,99
<u>CO</u> CH ₃	---	171,00
2 OMe	3,76/3,80(2 s, 6H)	58,0/58,2

III.2- AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS BIOLÓGICOS

Ensaio antifúngico bioautográfico com *Cladosporium cladosporioides*

As neolignanas ariltetralônicas **1a-b** ensaiadas pelo método de bioautografia direta e aplicadas em placa cromatográfica de sílica, na dose de 10 µg não mostraram-se incapazes de gerar inibição do crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*. Dentre as neolignanas ariltetralônicas, apenas a neolignana **1a** apresentou fraca inibição nesta dose. Dos derivados semi-sintéticos (**Cat-1a e Cat-2a**), apenas o derivado **Cat-2a** apresentou diminuta atividade inibitória a 25 µg. A neolignana secotetralínica **3** também não demonstrou nenhuma atividade inibitória potencial contra o crescimento deste fungo.

Os resultados obtidos são apresentados de maneira qualitativa, pois neste ensaio prévio as substâncias testadas não demonstraram atividade potencial. Somente no caso de resultados positivos, utiliza-se realizar a determinação da concentração inibitória mínima necessária na inibição do crescimento da colônia (CIM), em meio de cultura líquido.

Ensaio antitumoral com variedades mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Os extratos, as substâncias purificadas e os derivados obtidos de sementes de *V. sebifera* foram enviados ao Departamento de Química do Instituto Politécnico da Virgínia - EUA (V.P.I.) na ocasião, à aluna de doutorado Claudia B. Brochini, para avaliação da atividade contra as variedades mutantes do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (*rad52Y*, *rad321N* e *rad6*)

A atividade das substâncias testadas na concentração de 2000 µg/mL (48h, 30°C) foram comparadas com os antibióticos padrões *camptotecina* e *estreptonigrina*. Estas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido/metanol (1/1), e adicionadas ao meio de cultura.

Os resultados são apresentados em valores (Cl_{12}), que representa a concentração necessária para produzir um halo de inibição, com diâmetro de 12 cm, no meio de cultura do fungo.

Para a amostra ser considerada ativa, o valor de Cl_{12} deve ser inferior a 2000 µg/mL, e a zona de inibição deve indicar toxicidade seletiva contra uma ou mais variedades de leveduras mutantes. A inibição seletiva é caracterizada quando a diferença entre valor obtido para o *rad+* e cada uma das variedades é inferior a 6 mm, no mínimo.

Portanto, para um potente agente antitumoral a ação será mais específica quanto menor o valor do halo de inibição para a variedade *rad+* (representam as células humanas saudas), e maior o halo de inibição para as demais variedades.

No caso de amostras tóxicas o halo de inibição não apresenta zona de inibição diferenciada para nenhuma das variedades do fungo. Quando inativas, não se observa nenhum halo de inibição .

Os valores obtidos para as amostras testadas encontram-se tabelados a seguir:

Tabela 12: Diâmetro do halo de inibição do crescimento de variedades mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* das amostras avaliadas a 2000 µg/mL no Instituto Politécnico da Virgínia.

Amostra	Rad+	Rad6	Rad52y	RS321N
1a	----*	inativa	inativa	inativa
1b	----	12,5 mm	8,5 mm	22 mm
1c	----	---	8,5 mm	22 mm
2a	----	inativa	inativa	inativa
3	inativa	inativa	inativa	inativa
Cat-2a	----	---	11 mm	12 mm
VSAmEtOH*	----	inativa	inativa	inativa
VSArCHCl₃*	----	inativa	inativa	inativa
VSArEtOH*	----	inativa	inativa	inativa

*Os dados obtidos para a variedade Rad+ e para os padrões (camptotensina e estrictonigrina) apresentaram dentro da faixa de valores padronizados para o ensaio⁹⁰.

Para a neolignana **1b** as variedades Rad6 e RS321N apresentaram $Cl_{12}=8000$ µg/mL e $Cl_{12}=2117$, respectivamente. Tais valores embora discrepantes daqueles observados no ensaio preliminar (tabela 12), resultam da regressão linear da curva dose-resposta nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL. Nestas concentrações os valores obtidos para Rad 6 e Rad 321N foram 0,0 e 7,0; 0,0 e 8,5; 7,0 e 10,0; 8,5 e 12,0, respectivamente às doses.

As demais amostras (**1c** e **Cat-2a**) não foram testadas devido à quantidade insuficiente de material enviado e, principalmente à inatividade das amostras.

Recentemente, o mesmo ensaio foi implantado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto Botânico de São Paulo, sob coordenação das Dr^{as} Maria Cláudia Marx Young e Prof^{as} Dr^{as} Vanderlan da Silva Bolzani (IQ-UNESP), ao qual foram submetidas as neolignanas isoladas **1b-c** e os derivados semisintéticos **Cat-1a** e **Cat-2a**. Os resultados obtidos são tabelados a seguir:

* VSAmEtOH e VSArEtOH = Extrato de amêndoas e arilos de *V. sebifera*, respectivamente. VSArEtOH= Extrato de arilos de *V. sebifera*.

Tabela 13: Diâmetros do halo de inibição do crescimento de variedades mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, das amostras avaliadas no Instituto Botânico de São Paulo.

Amostra (mg/1mL [*])	Rad + (mm)	Rad 6 (mm)	Rad 321 (mm)	Rad 52Y (mm)
1b (4,3)	26,0	12,0	16,5	11,0
1c (3,8)	15,0	11,0	14,0	13,0
Cat-1a (3,3)	18,0	19,0	21,0	19,0
Cat-2a (3,4)	13,0	10,0	15,5	14,5
Camptotecina (200 µg/mL)	23,0	---	---	---
Camptotecina (5,0 µg/mL)	---	---	---	17,0
Estreptonigrina (8,0 µg/mL)	---	25,0	---	---
Estreptonigrina (4,0 µg/mL)	---	---	18,0	---

---= Não é realizado teste para estas variedades.

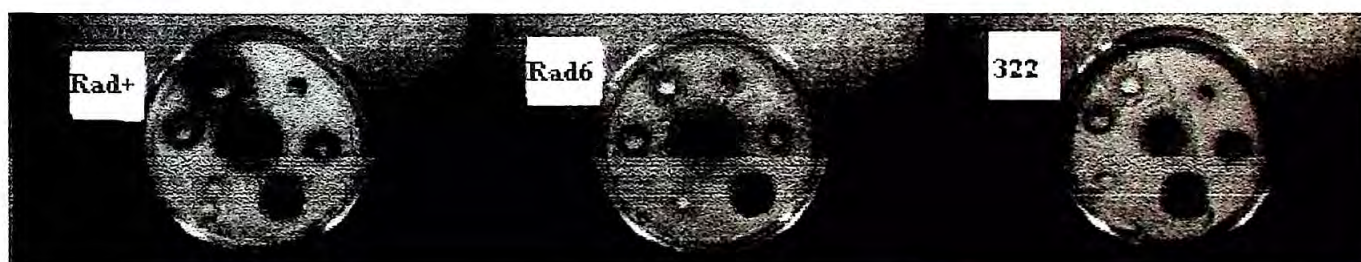


Figura 25: Foto evidenciando halo de inibição da neolignananas testadas
(Inst. Bot. São Paulo)

Como pôde ser evidenciado através dos valores obtidos, não houve nenhuma preferência ou inibição diferenciada para as variedades de fungos testados, demonstrando portanto, citotoxicidade às células normais e ausência de especificidade das substâncias às células cancerosas.

Ensaio preliminar moluscicida com desovas de *Biomphalaria glabrata*

Dentre as neolignanas isoladas das sementes de *V. sebifera* e os derivados obtidos, as neolignanas **1a**, **2a** e **3** mostraram-se inativas, mesmo em concentração superior a 100 ppm ($\mu\text{g/mL}$), tendo apresentado baixíssima solubilidade em $\text{H}_2\text{O/DMSO}$ a 3%.

A neolignana **1c** foi a mais ativa com CL_{50} e CL_{90} de 13,5 e 19,8 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 14) muito próximas refletindo elevada toxicidade. A CL_{50} para atividade ovicida da neolignana **1b** foi reduzida aproximadamente à metade, quando comparada à neolignana **1c**, evidenciando a importância da hidroxila fenólica desta última.

As neolignanas **Cat-1a** e **Cat-2a** apresentaram atividades semelhantes à neolignana **1b**.

Tabela 14: Valores das CL_{50} e CL_{90} ($\mu\text{g/mL}$) em embriões de desovas de *B. glabrata*.

	1b	1c	Cat-1a	Cat-2a	Niclosamida ⁹¹
CL₅₀	30,11	13,53	38,62	33,83	0,2 $\mu\text{g/mL}$
CL₉₀	72,93	19,81	55,88	73,19	2-4 $\mu\text{g/mL}$

Dentre as neolignanas ariltetralônicas, observou-se que no ensaio com desovas de caramujos, o grupamento metilenodioxílico no anel A e a presença de hidroxila livre, são essenciais para a atividade das neolignanas **1b** e **1c** (CL_{50} entre 13 - 30 $\mu\text{g/mL}$), embora a natureza fenólica não seja fundamental. Já a desproteção do grupo metilenodioxílico no anel C das neolignanas **1a** e **2a**, elevou substancialmente a atividade moluscicida, como nos catecóis **Cat-1a** e **Cat-2a** (CL_{50} entre 50-60 $\mu\text{g/mL}$).

⁹¹Mott, K. E. (1987) In *Plant Molluscicides* Ed. John Willey and Sons Ltda.

Ensaio da atividade antioxidante pela medida do malonildialdeído e quimioluminescência

Os valores obtidos na inibição de 50% da lipoperoxidação espontânea ($Q_{1/2}$) em homogenatos de cérebro de ratos medidos na produção de malonildialdeído (MDA) e na emissão de quimioluminescência (QL) com as neolignanas isoladas e derivados são tabelados a seguir.

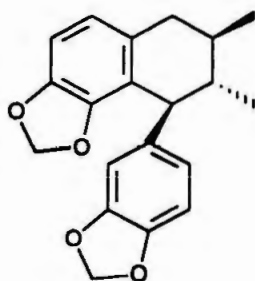
Tabela 15: Valores de $Q_{1/2}$ em $\mu\text{g/ml}$ obtidos nos ensaios de produção de MDA e emissão de QL.

Neolignanas	MDA ($\mu\text{g/ml}$)	QL ($\mu\text{g/ml}$)
1a	109,26	não realizado.
1b	>>>133,33	não realizado.
1c	0,89	0,10
2a	>>>133,33	não realizado.
2b	>>>133,33	não realizado.
Cat-1a	0,39	0,088
Cat-2a	0,63	0,23
α -tocoferol	12,10	4,64

Verificou-se um aumento da atividade antioxidante quando **1a** e **2a** foram transformadas nos catecóis correspondentes (de inativas a ativas entre 20-50 $\mu\text{g/ml}$), sugerindo que neste caso, a presença de hidroxilas fenólicas deve ser essencial para a atividade da substância. Outro fato é que o grupamento metilenodioxílico no anel A apresenta maior importância na atividade antioxidante, que a presença da hidroxila dibenzílica, como pode ser notado pela comparação entre as neolignanas **1a** e **1b**.

III.2.1 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de sementes de *Virola sebifera* (WARB) foi fracionado por técnicas cromatográficas resultando no isolamento de quatro neolignanas ariltetralônicas descritas na literatura: (-)otobanona e (-)hidroxi-otobanona (**1a** e **1b**), (+)oxoisogalcatina, (+)hidroxi-oxoisogalcatina (**2a** e **2b**) e duas neolignanas diarilbutânicas (**3** e **4**) sendo que **1c** e **3**, foram caracterizadas como novos produtos naturais.



As neolignanas ensaiadas contra o fungo *Cladosporium cladosporioides* apresentaram discreta atividade inibidora de crescimento, contrariando expectativas, pois havia sido relatada ação antifúngica para a otobaína (estrutura 8, Figura 3, p.8)⁹², cuja estrutura é bastante semelhante à otobanona (**1a**) e hidroxi-otobanona (**1b**). No entanto, a não especificação do

microorganismo utilizado dificulta a correlação entre estes resultados distintos, pois existem grandes diferenças devido à sensibilidade das espécies de fungos.

Diversas classes de produtos naturais de plantas⁹³ como terpenóides; alcalóides, além dos lignóides possuem atividade antitumoral. Dentre estes últimos destacam-se as lignanas com esqueleto arilnaftalênico como podofilotoxina e derivados, justicidina A, difilina⁹⁴, α e β -peltatina, fossonol⁹⁵; neolignanas diarilbutânicas como o ácido nordiidroguaiarético e benzofurânicas como a licarina A e obovatinal⁹⁶, além de neolignanas bicicloctânicas como a esteganacina (estruturas na Figura 3, p. 8). Para o esqueleto arilnaftalênico dispõe-se de estudos de relação estrutura-atividade antitumoral, os quais sugerem que a presença da unidade lactônica e a configuração *trans* entre os carbonos C8'/C8 são importantes nas substâncias com elevada atividade. As lactonas *cis*⁹⁷ possuem atividade antitumoral inferior às lactonas *trans*.

⁹² Adjangba, M. S. (1963) *Bull. Soc. Chim. France*, 2344.

⁹³ Cordell, G. A. (1978) *Progress in Phytochemistry* **5**, 273-316.

⁹⁴ Fukamiya, N.; Lee, Kuo-Hsiung (1986) *J. Nat. Prods* **49**, 348.

⁹⁵ Sun, Nan-Jun; Chang, Ching-Jer; Cassidy, J. M. (1987) *Phytochemistry* **26**, 3051.

⁹⁶ Tsai, Ian-Lih; Hsieh Chih-Feng; Duh, Chang-Yih, Chien, Ih-Sheng (1996) *Phytochemistry* **43**, 1261.

⁹⁷ Brewer, C.F.; Loike, J. D.; Horwovitz, S. B.; Sternlicht, H.; Gensler, W. J. (1979) *J. Med. Chem.* **22**, 215.

Ao esqueleto dibenzilbutirolactônico é correlacionada potente ação antiviral ao HIV^{98,99,100}, onde observa-se a importância tanto do anel lactônico, quanto do número e arranjo das hidroxilas fenólicas para potencial ação da substância.

Do extrato de sementes de *V. sebifera* foram isoladas neolignanas ariltetralônicas e diarilbutânicas e estas, quando avaliadas frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, não demonstraram nenhuma seletividade em sua ação citotóxica, pelo contrário, detectou-se elevada toxicidade a todas as células em divisão mitótica. Esta conclusão pôde ser inferida através à inespecificidade da inibição de crescimento das células normais (rad+) e deficientes do fungo *Saccharomyces cerevisiae* frente às neolignanas **1c**, **Cat-1a** e **Cat-2a**. A inatividade destas substâncias pode estar relacionada à ausência do anel lactônico no esqueleto tetralônico.

Para a ação moluscicida, Nabiih & Elwasimi,¹⁰¹ relatam que a relação estrutura-atividade de substâncias fenólicas depende da natureza dos substituintes no anel aromático. Nas substâncias onde a oxidação radicalar *in vivo*, via enzimas do tipo peroxidases, leva a produtos estáveis como quinonas e naftoquinonas, observa-se elevada atividade moluscicida, com várias substâncias avaliadas¹⁰². Brockson¹⁰³ correlaciona ainda a atividade moluscicida em neolignanas ariltetralínicas e diarilbutânicas à presença de hidroxilas fenólicas livres.

Para as neolignanas avaliadas nesta dissertação observou-se a atividade moluscicida para a substância **1c**, onde há substituição aromática com grupamento metilenodioxílico e uma hidroxila fenólica livre, sugerindo a ação sinergista do grupamento metilenodioxílico, ativo na inibição de oxidases de função mista¹⁰⁴.

Considerando que lignóides e flavonóides assemelham-se estruturalmente através da porção fenólica, relacionou-se os estudos de estrutura-atividade de esqueletos flavonoídicos^{105,106}, aos dados de atividade obtidos para as neolignanas avaliadas. Nestes, a característica principal é a presença de anel aromático orto-

⁹⁸ Gnabre, J.; Huang, R. C. H.; Bates, R. B.; Burns, J. J.; Caldera, S.; Malcomson, M.E., McClure, K.J. (1995) *Tetrahedron* **51**, 12203.

⁹⁹ Yang, Min-Li; Shwu-Juan, L.; Yang, Tsang-Hsiung; Lee, Kuo-Hsiung (1996) *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **6**, 941.

¹⁰⁰ Eich, E. pertz, H.; Kaloga, M. Schulz, J.; Fesen, M.R.; Mazunder, A.; Pommier, Y. (1996) *J. Med. Chem.* **39**, 86.

¹⁰¹ Nabih, I.; Elwasimi, T. M. (1963) *J. Pharm. Sci.* **57**, 1202.

¹⁰² Nabih, I.; Metri, J. (1973) *J. Pharm. Sci.* **62**, 323.

¹⁰³ Broksom, U. (1980) - Tese de Doutouramento - Instituto de Química da Universidade de São Paulo(USP).

¹⁰⁴ Casida, J. E. (1970) *J. Agr. Food Chem.* **18**, 753.

¹⁰⁵ Rice-Evans, C., Nicholas, M. J., Paganda, G. (1996) *Free Radical and Biology & Medicine* **20(7)**, 933

diidroxissubstituído (**Cat-1a** e **Cat 2a**) que participa ativamente na deslocalização eletrônica do radical formado, conferindo-lhe grande estabilidade. O fato está geralmente associado à presença de grupamentos doadores de elétrons em *orto* e/ou *para* às hidroxilas, o que reforça a possibilidade destas substâncias estarem atuando como captadores de "espécies reativas de oxigênio", através de reações de óxido-redução, com o catecol agindo como agente redutor, embora seja possível que haja outros mecanismos de ação atuando quando os esqueletos carbônicos são modificados.

Atualmente sabe-se que mais de cinquenta doenças estão associadas à danos provocados por radicais livre¹⁰⁷, como câncer, aterosclerose, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce, declínio do sistema imunológico, disfunções cerebrais, dentre outras.

Isawaki *et al*, 1995¹⁰⁸ ainda associa a atividade antilipidêmica, ou seja, atividade contra aterosclerose, às neolignanas ariltetralínicas. São também disponíveis na literatura dados sobre neolignanas com esqueleto diarilbutânico e lignanas dibenzilbutirolactônicas, como a enterolactona e enterodiol, presentes na urina de animais e seres humanos, principalmente em indivíduos com dieta rica em fibras, embora não seja conhecida a finalidade para sua biossíntese endógena.

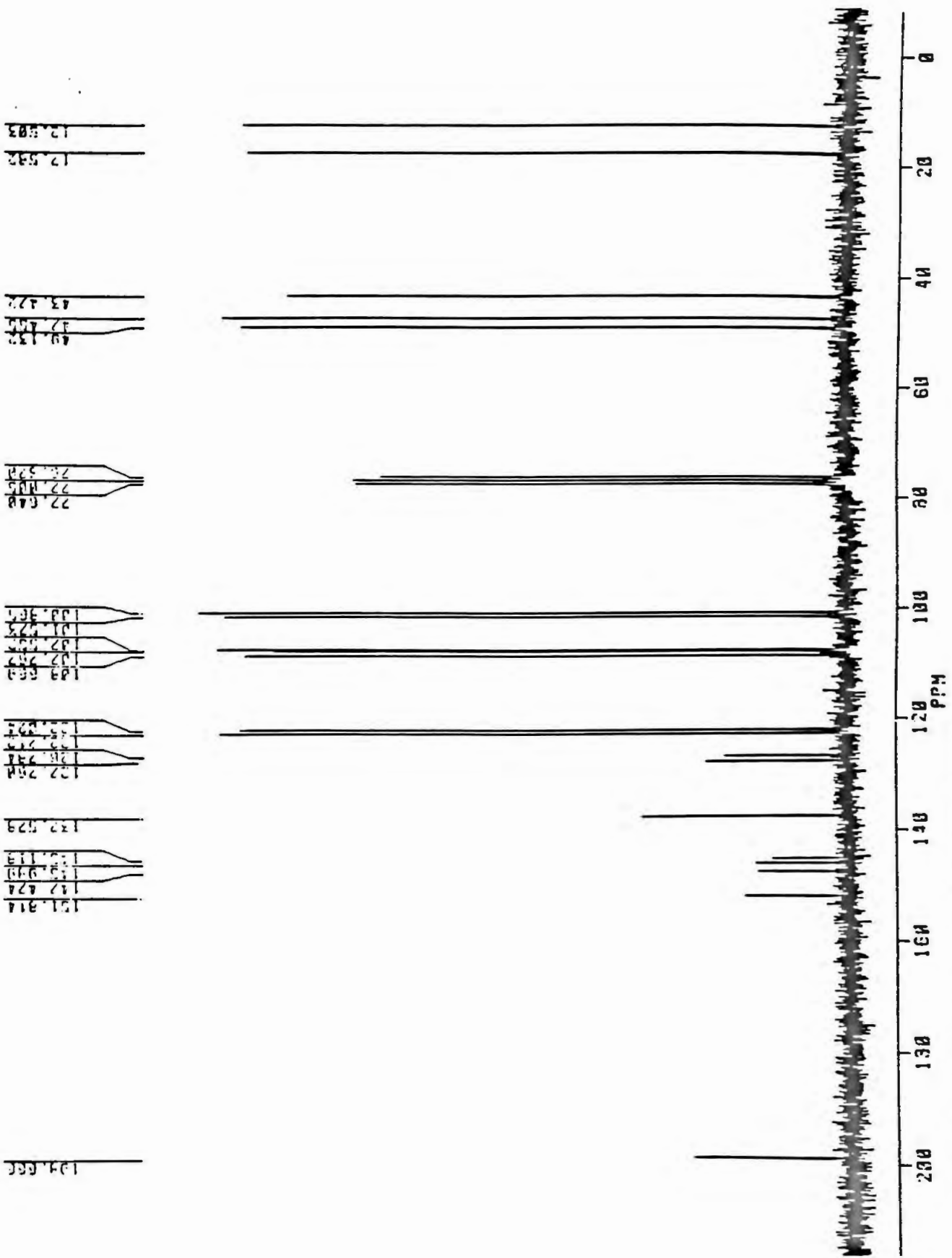
Através da associação dos dados descritos na literatura com resultados obtidos nos ensaios preliminares, pode dizer que, embora o número de estruturas avaliados não tenha sido amplo para estabelecer com segurança, a correlação estrutura-atividade, é possível afirmar que as substâncias **1**, **2**, **Cat-1a** e **Cat-2a**, com esqueleto ariltetralônico foram geralmente ativas, haja visto que a substância **3** (única com esqueleto diarilbutânico) mostrou-se inativa em todos os ensaios realizados. De maneira geral, podemos correlacionar ainda, a atividade destas neolignanas à elevada propriedade antioxidante comprovada nesta dissertação.

¹⁰⁶ Van Acker.; S. A. B. E.; van den Berg, D-J.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; van Bennekom, W. P.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. (1996) *Free Radical and Biology & Medicine* **20(3)**, 331.

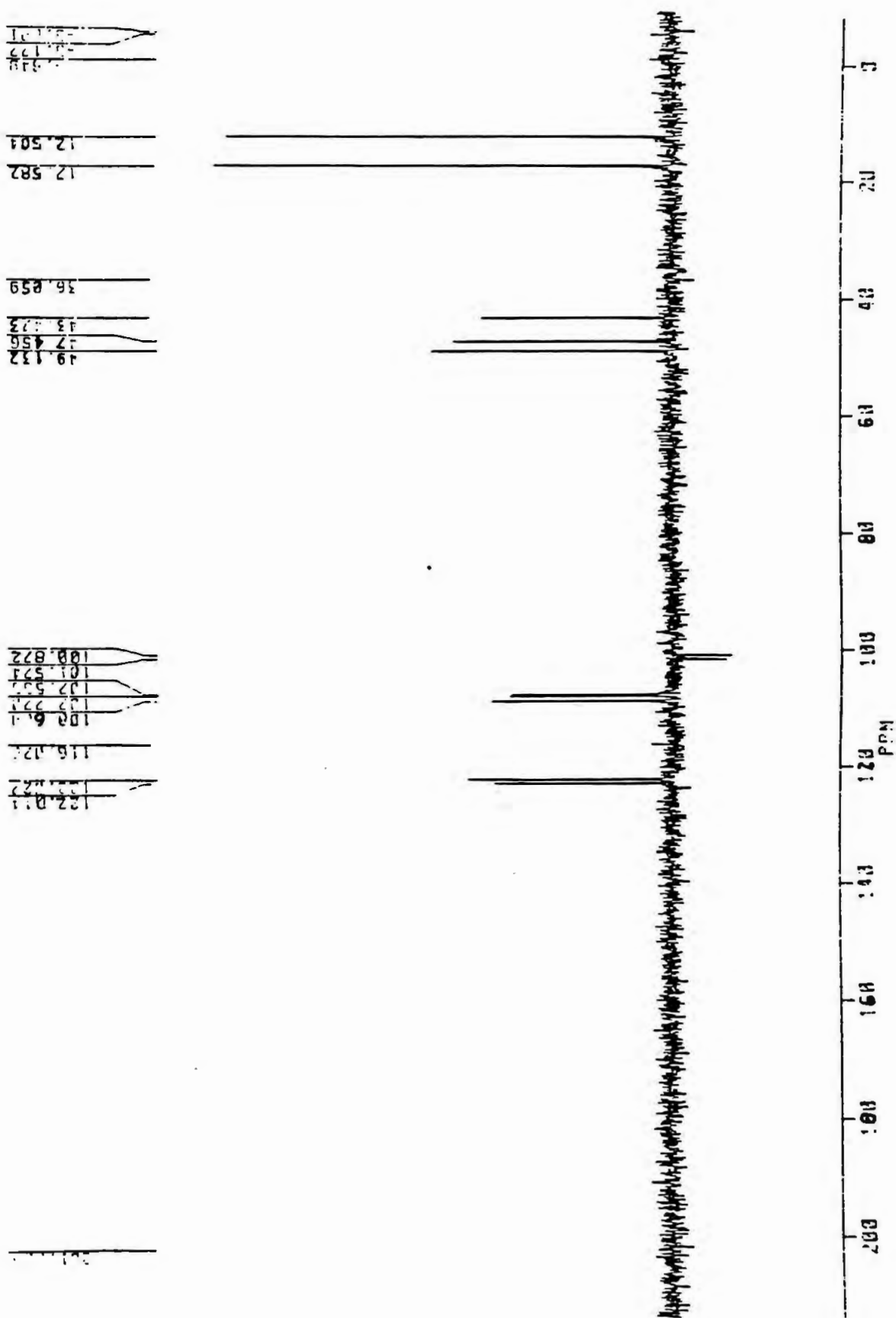
¹⁰⁷ Max, J. L. (1987) *Science* **235**, 529.

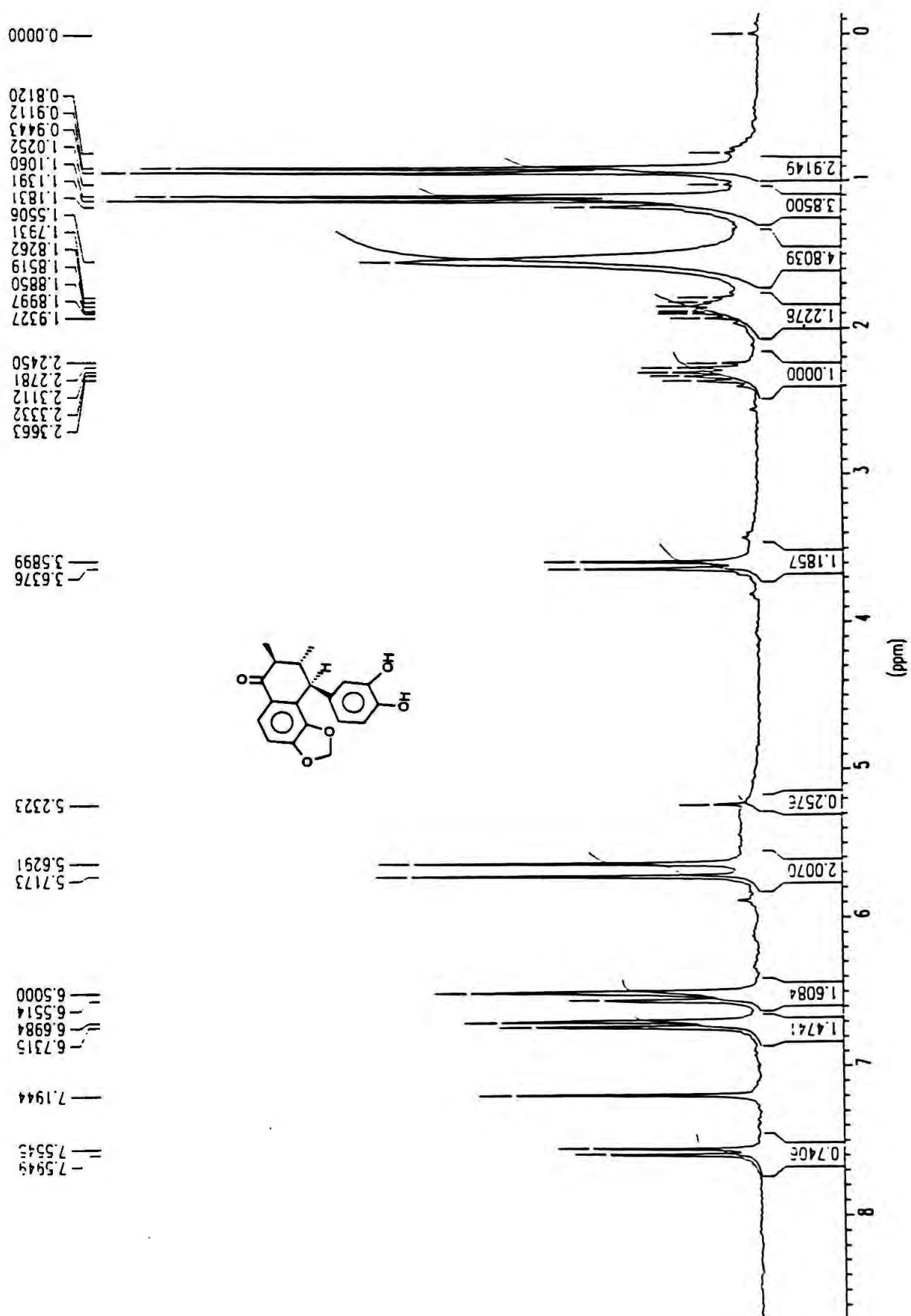
¹⁰⁸ Isawaki, T.; Kazuhiko, K.; Nishitani, T.; Kuroda, T.; Hirakoso, K.; Ohtani, A.; Takashima, K. (1995) *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 1701.

ESPECTROS

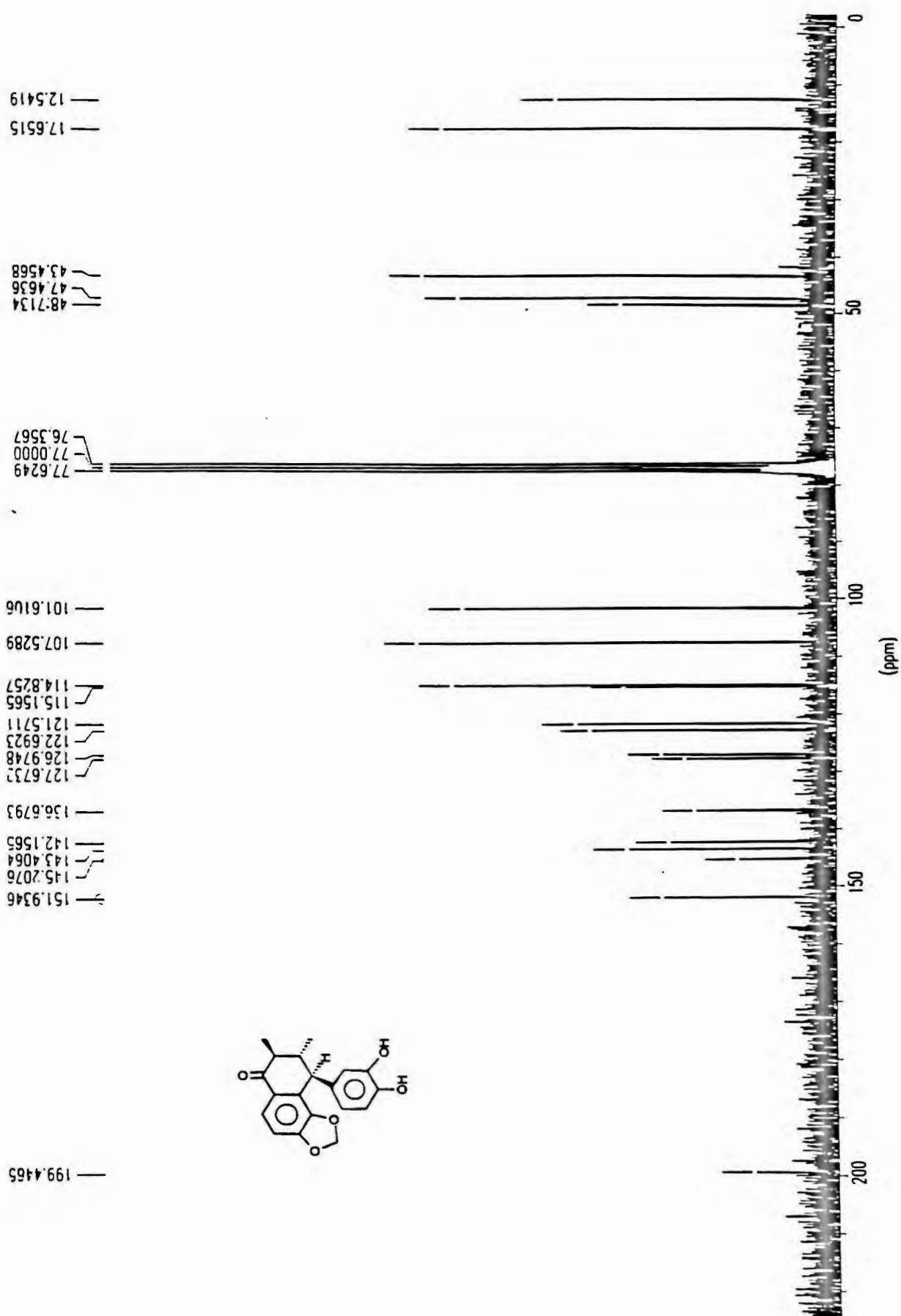


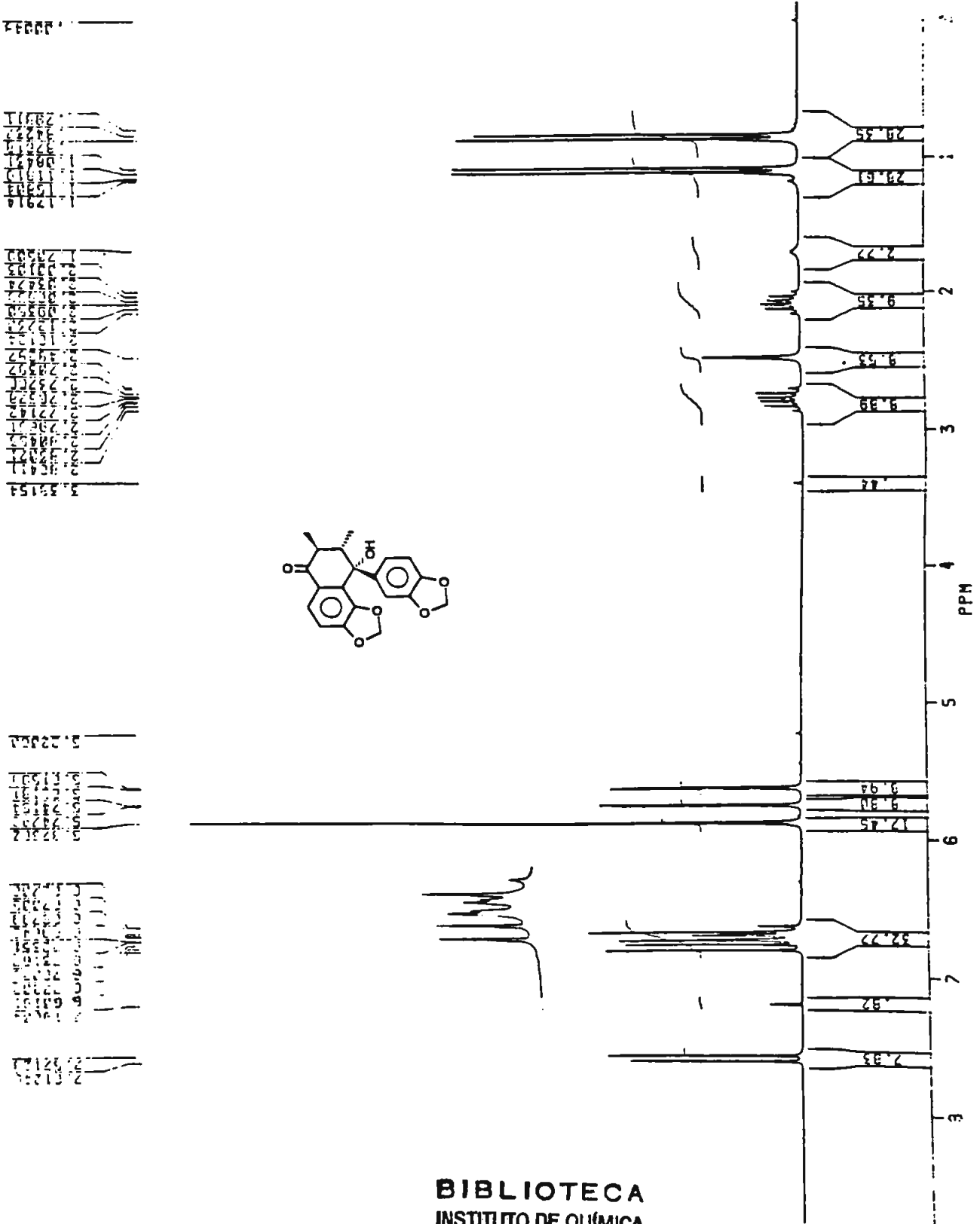
Espectro 2: RMN-13C da neolignana 1a (CDCl3, 50 MHz)

Espectro 3: RMN-¹³C DEPT 135 da neolignana 1a (CDCl₃, 50 MHz)

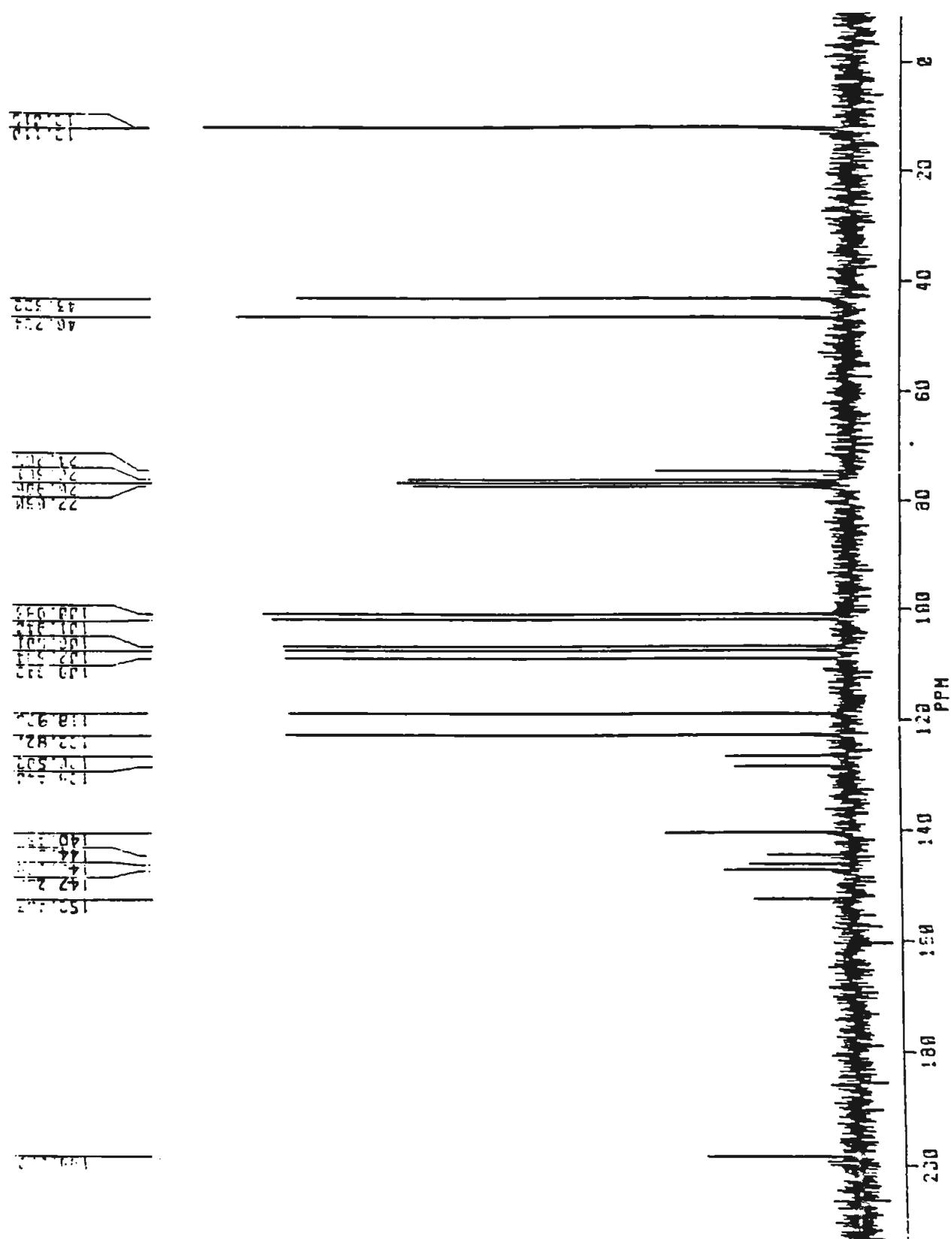


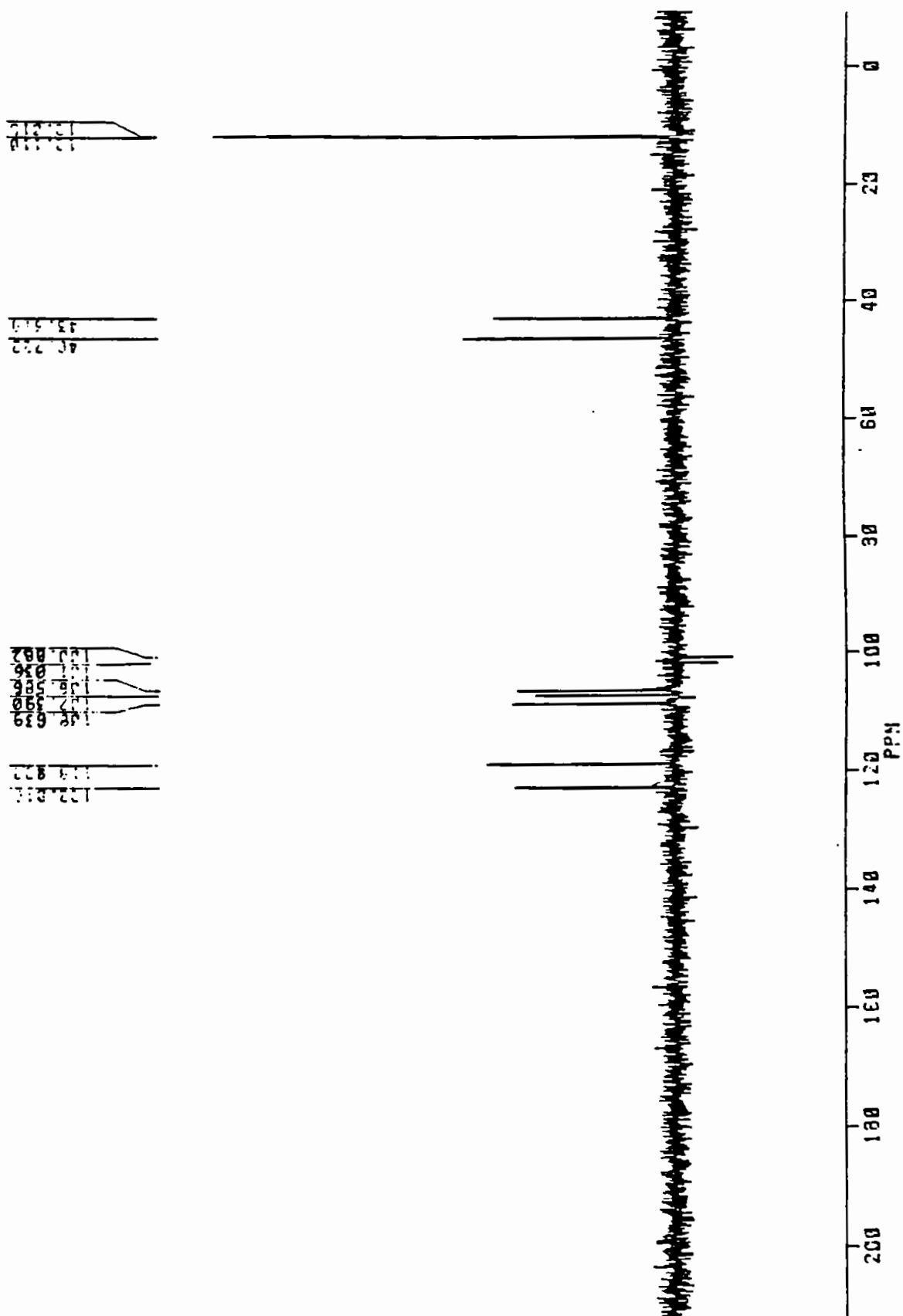
Espectro 4: RMN-1H do derivado Cat-1a (CDCl₃, 200 MHz)

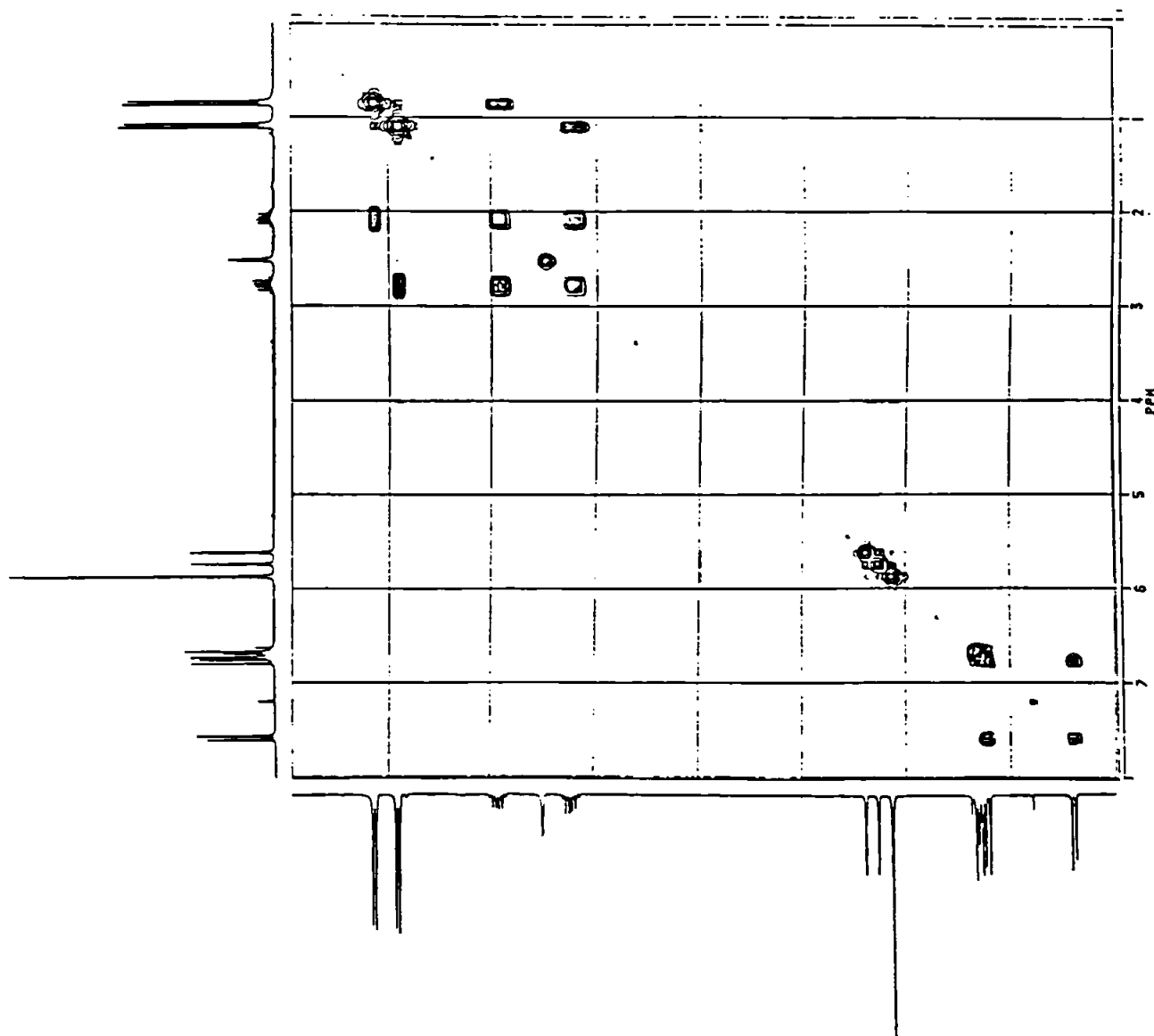
Espectro 5: RMN-¹³C do derivado Cat-1a (CDCl₃, 50 MHz)



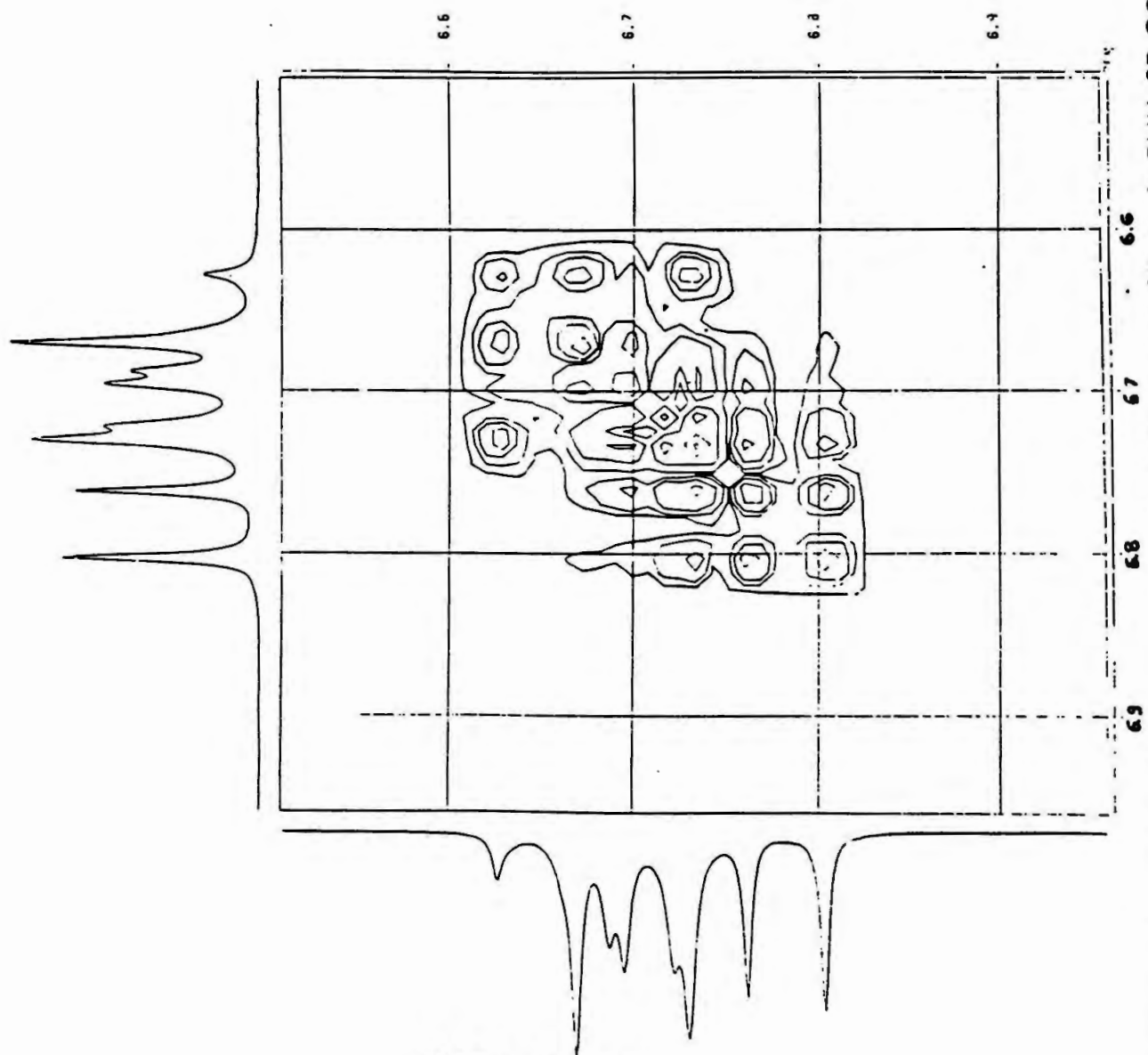
Espectro 6: RMN-1H da neolignana 1b (CDCl₃, 200 MHz)

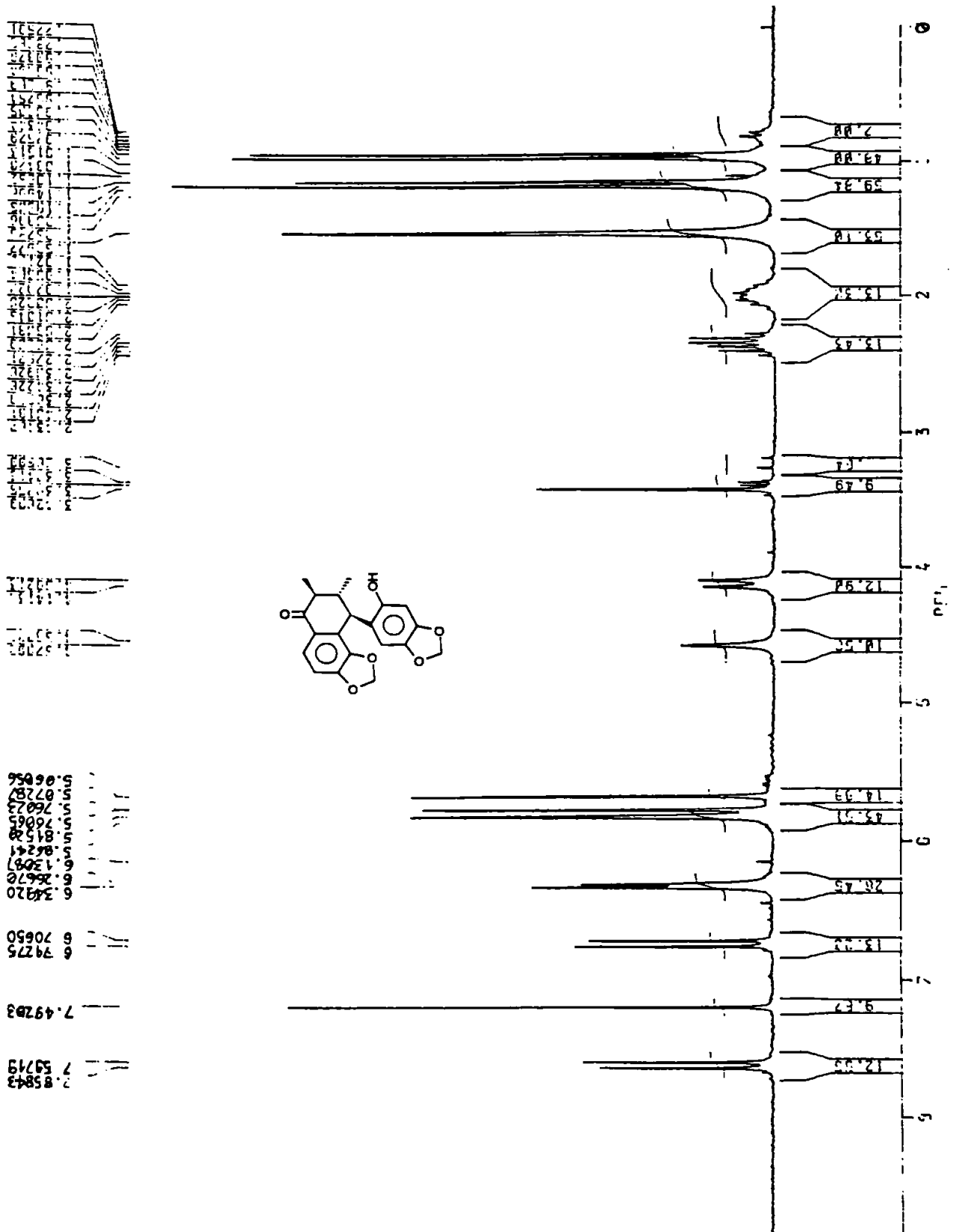
Espectro 7: RMN- ^{13}C da neolignana 1b (CDCl_3 , 50 MHz)

Espectro 8: RMN- ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 1b (CDCl_3 , 50 MHz)

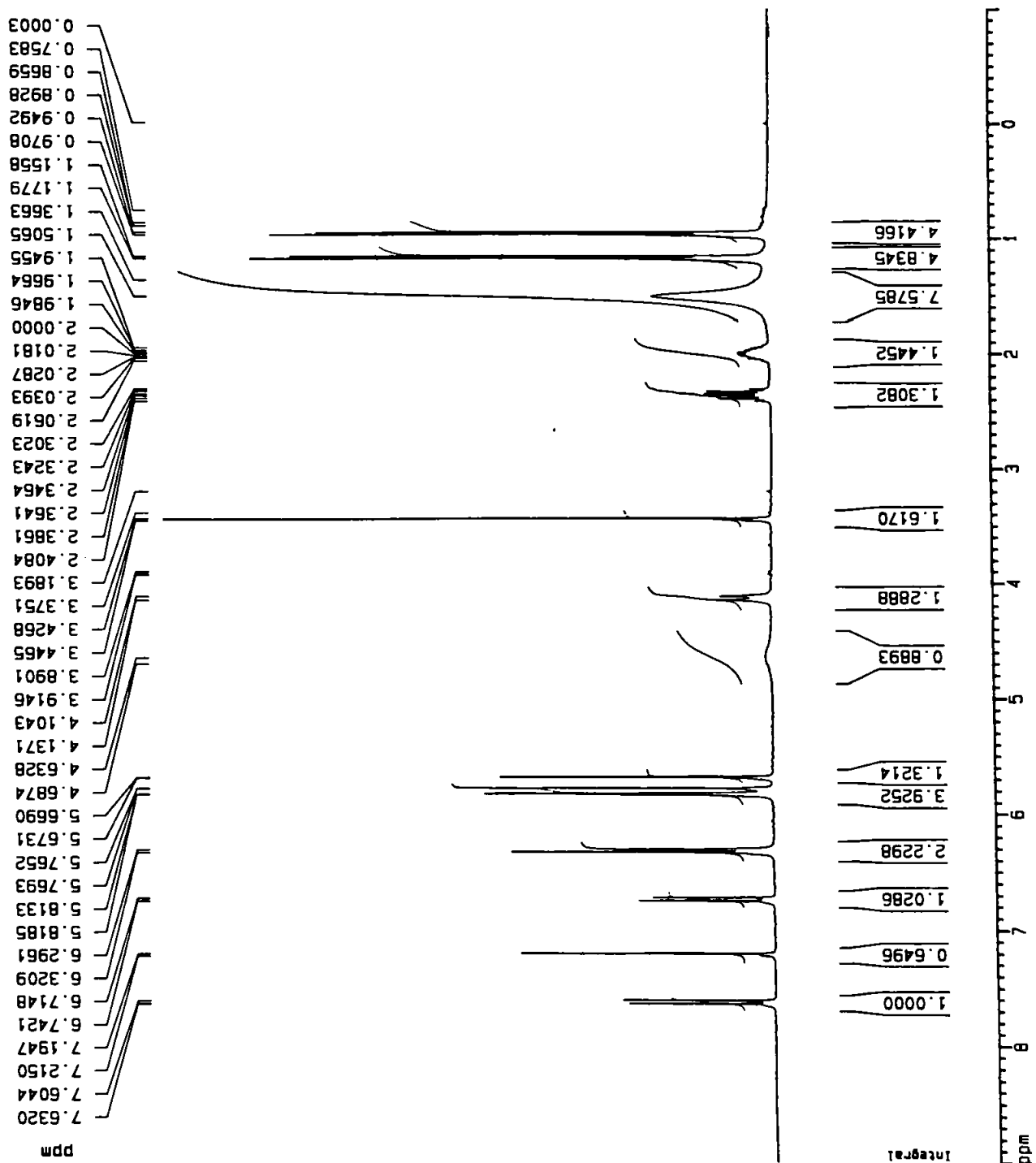


Espectro 9: RMN- 2D COSY da neolignana 1b (CDCl₃, 200 MHz)

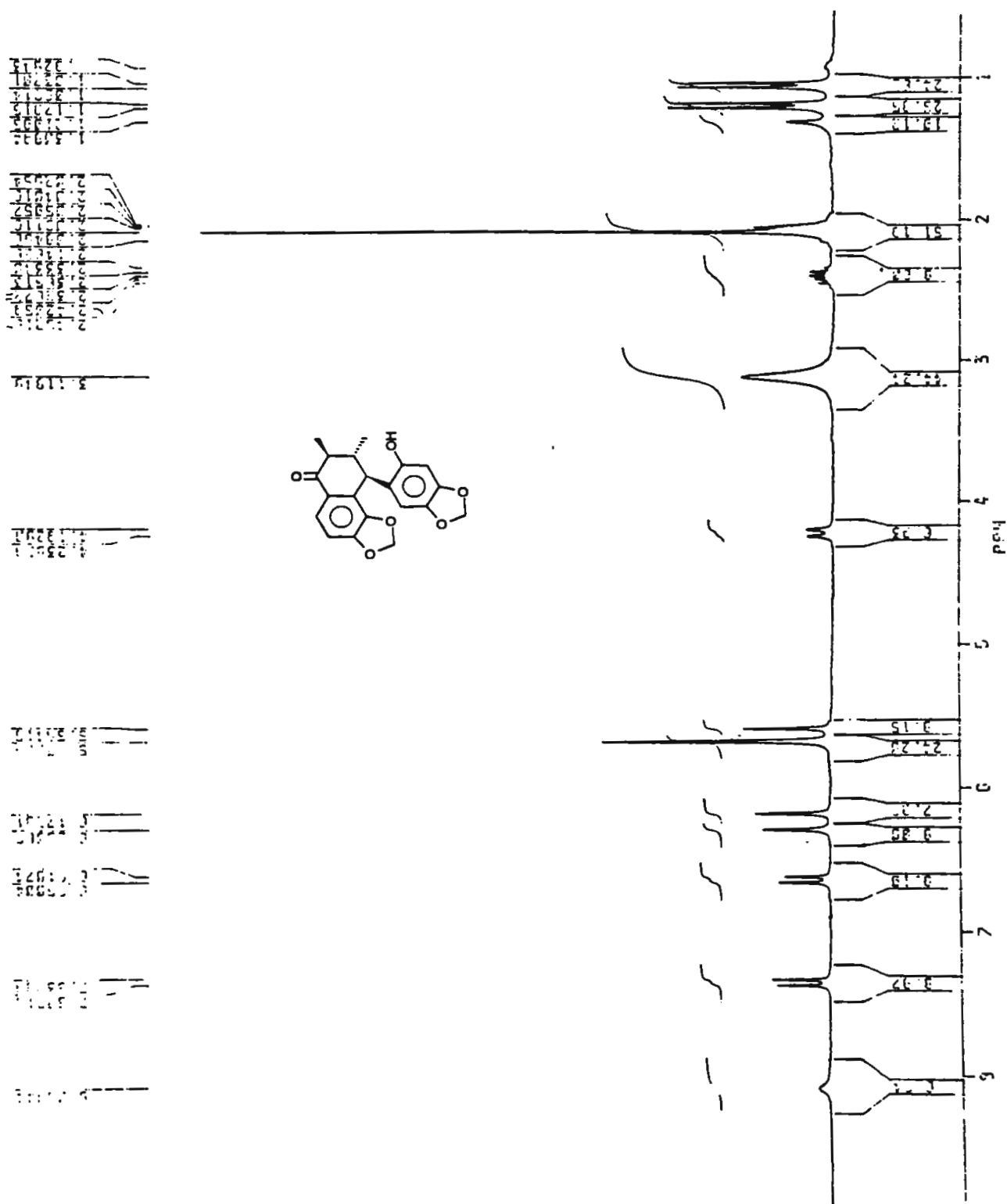


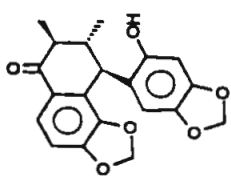
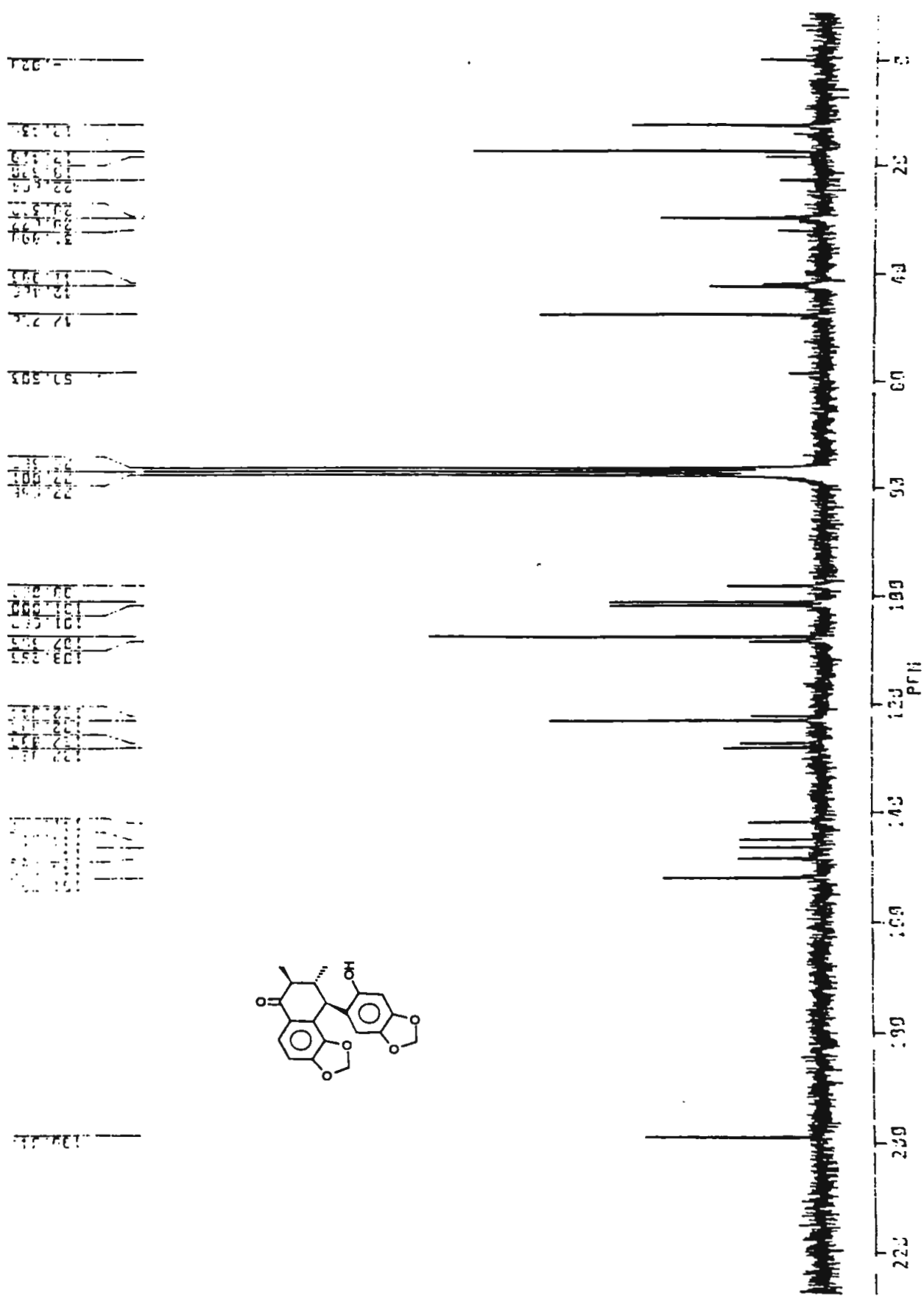


Espectro 11: RMN ¹H da neolignana 1c (CDCl₃, 200 MHz)

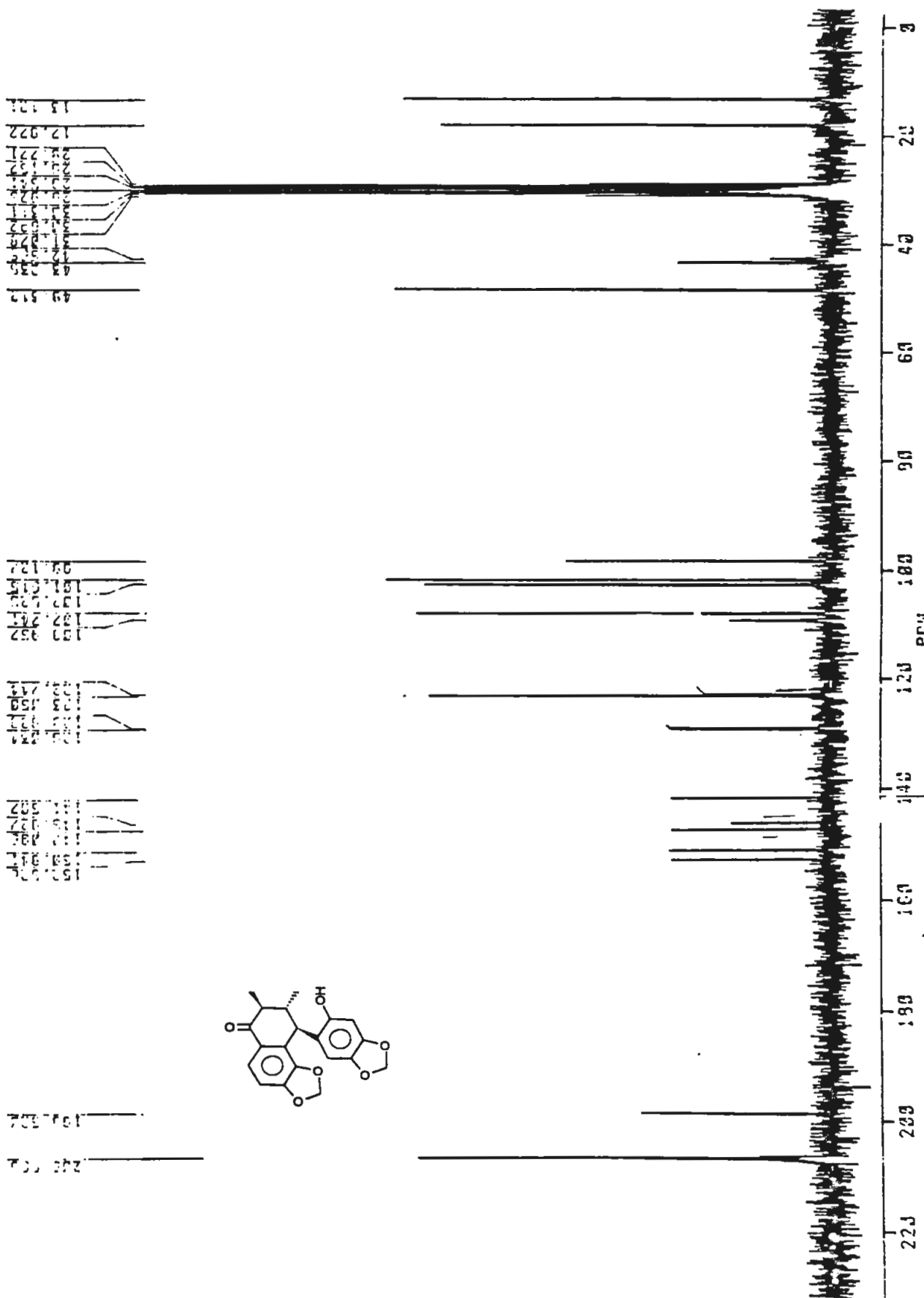


Espectro 12: RMN ¹H da neolignana 1c (CDCl₃, 300 MHz)

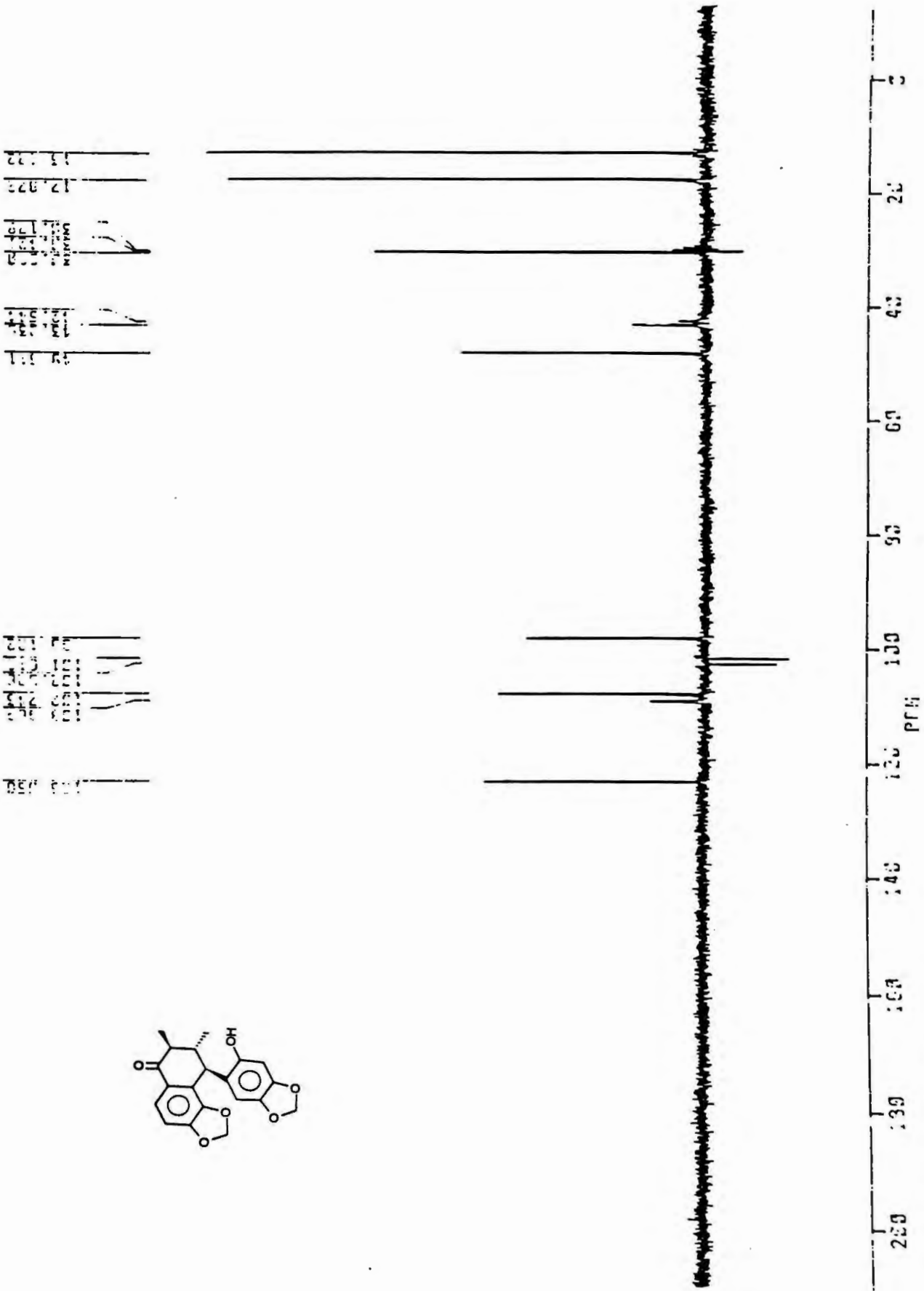
Espectro 13: RMN ^1H da neolignana 1c (CD_3COCD_3 , 200 MHz)



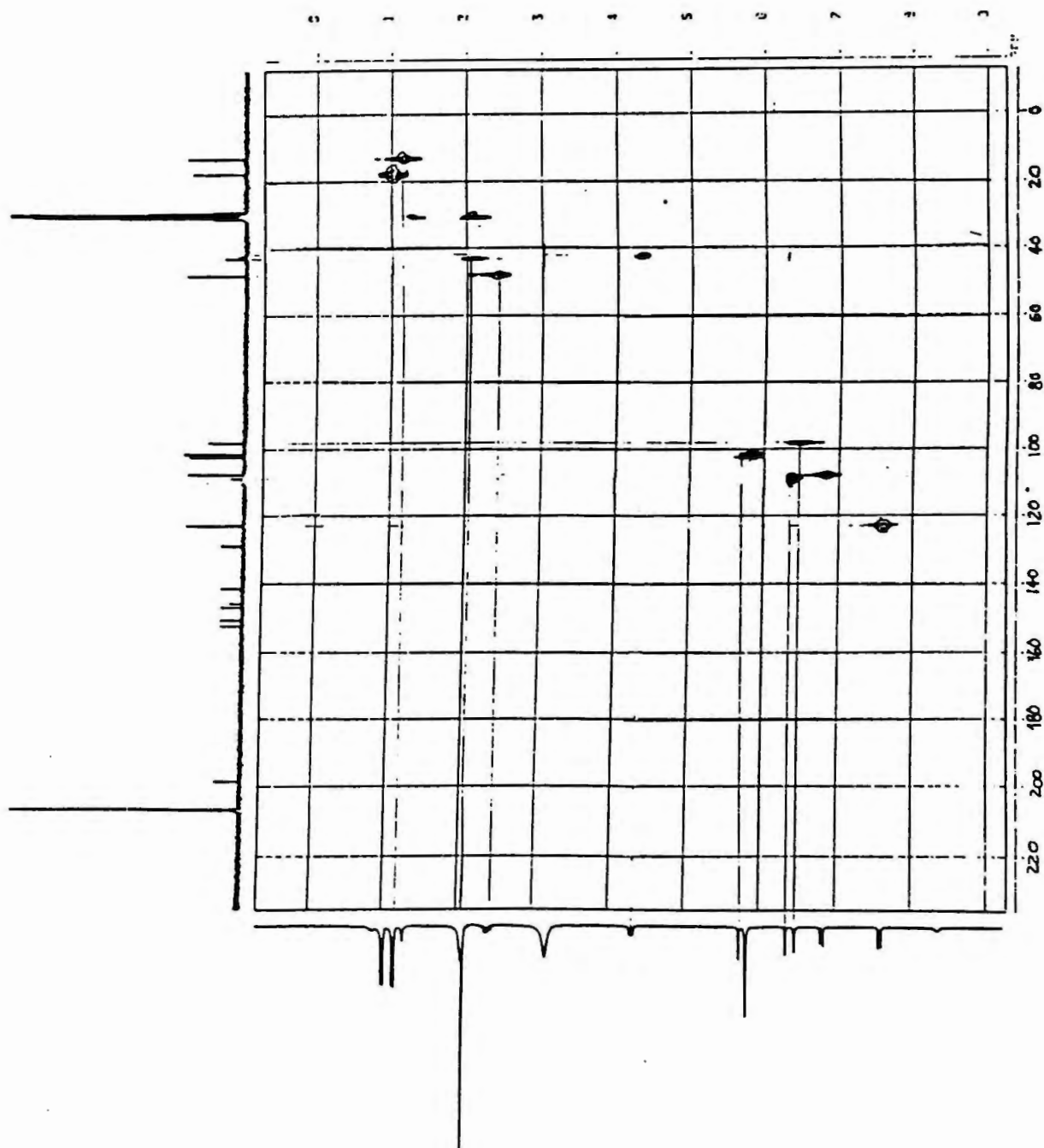
Espectro 14: RMN ¹³C da neolignana 1c (CDCl₃, 50 MHz)



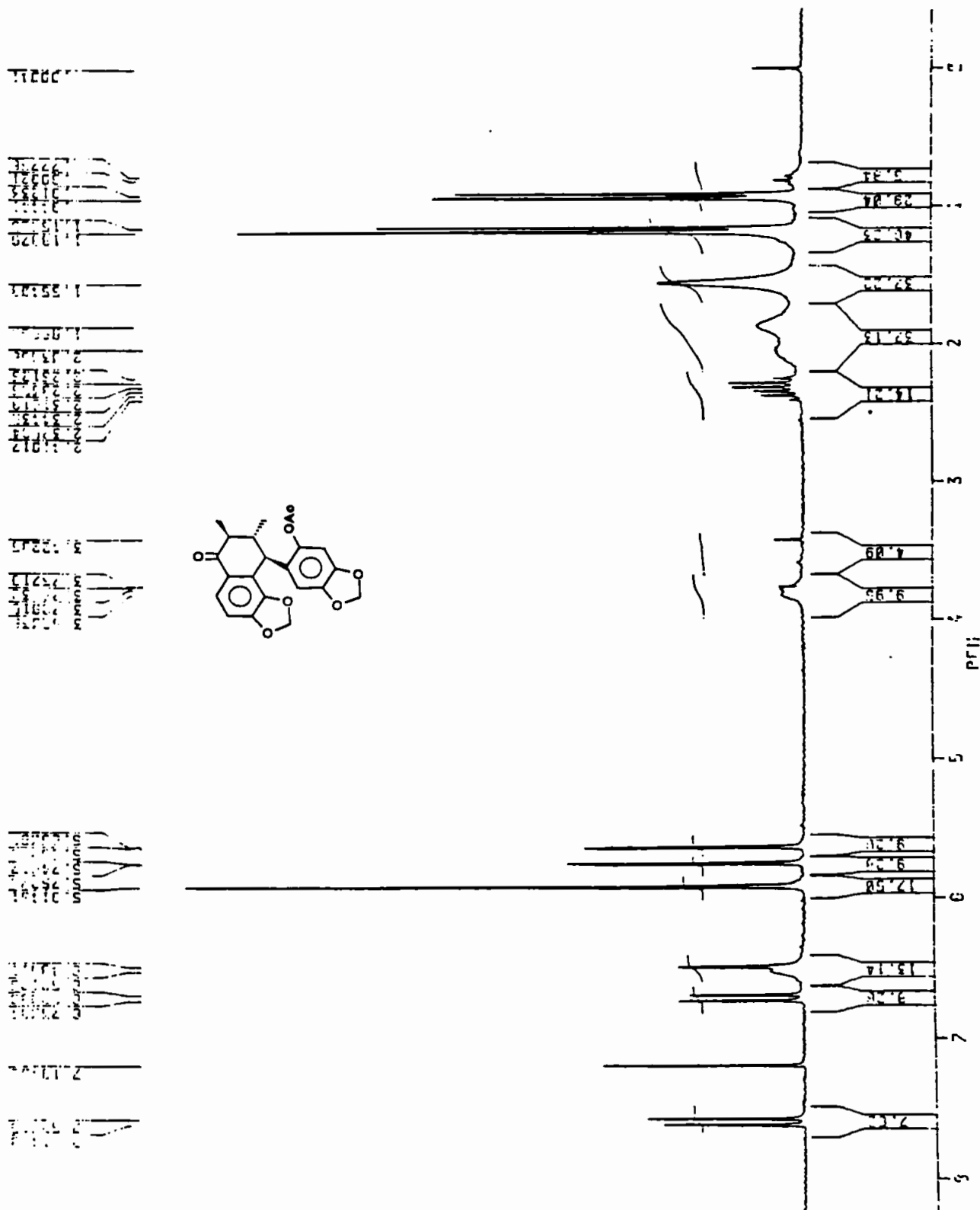
Espectro 15: RMN ¹³C da neolignana 1c (CD₃COCD₃, 50 MHz)



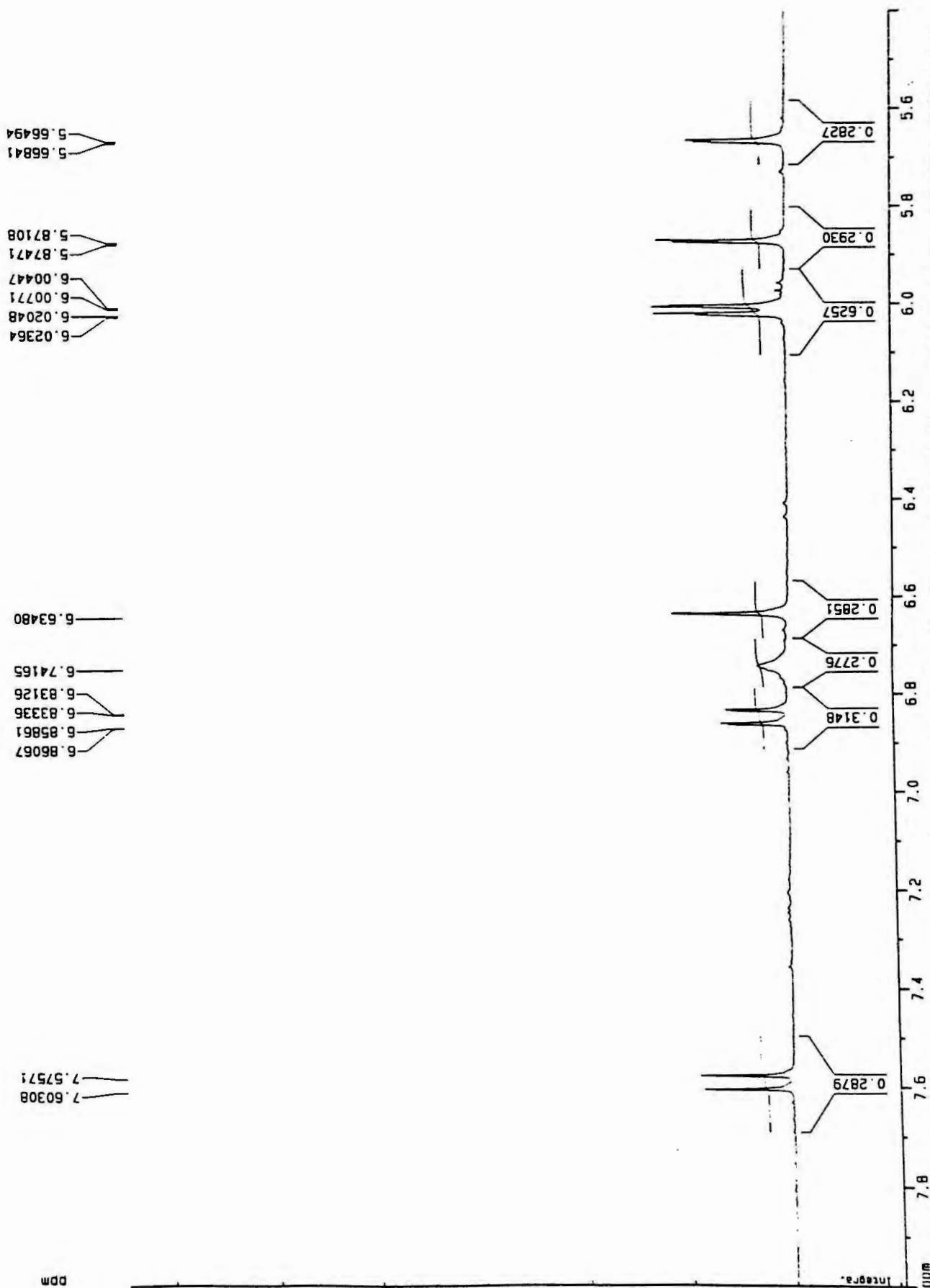
Espectro 16: RMN ¹³C (DEPT) da neolignana 1c (CD₃COCD₃, 50 MHz)



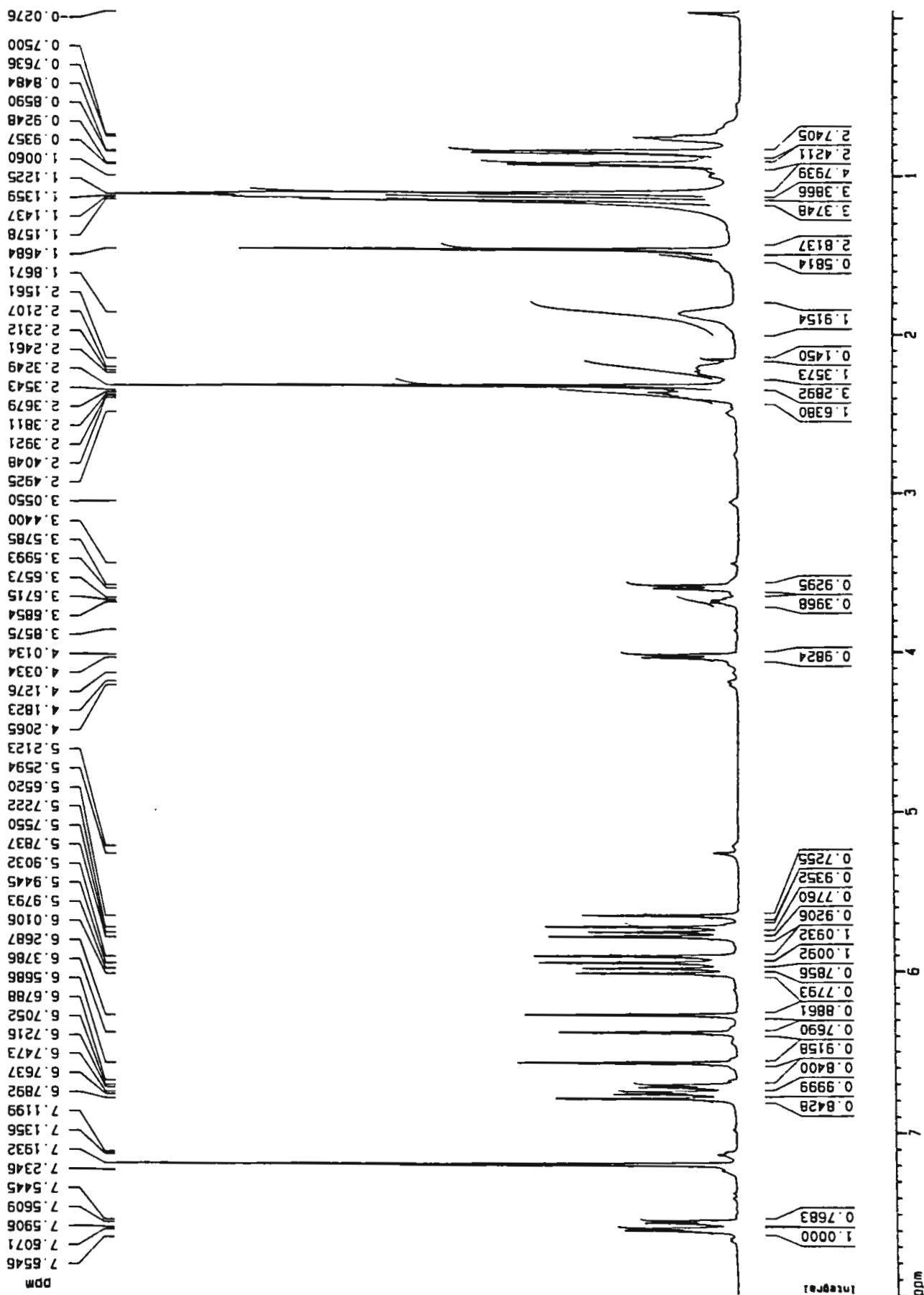
Espectro 17: RMN -2D HEICOR da neolignana 1C (CD₃COCD₃, 50 MHz)

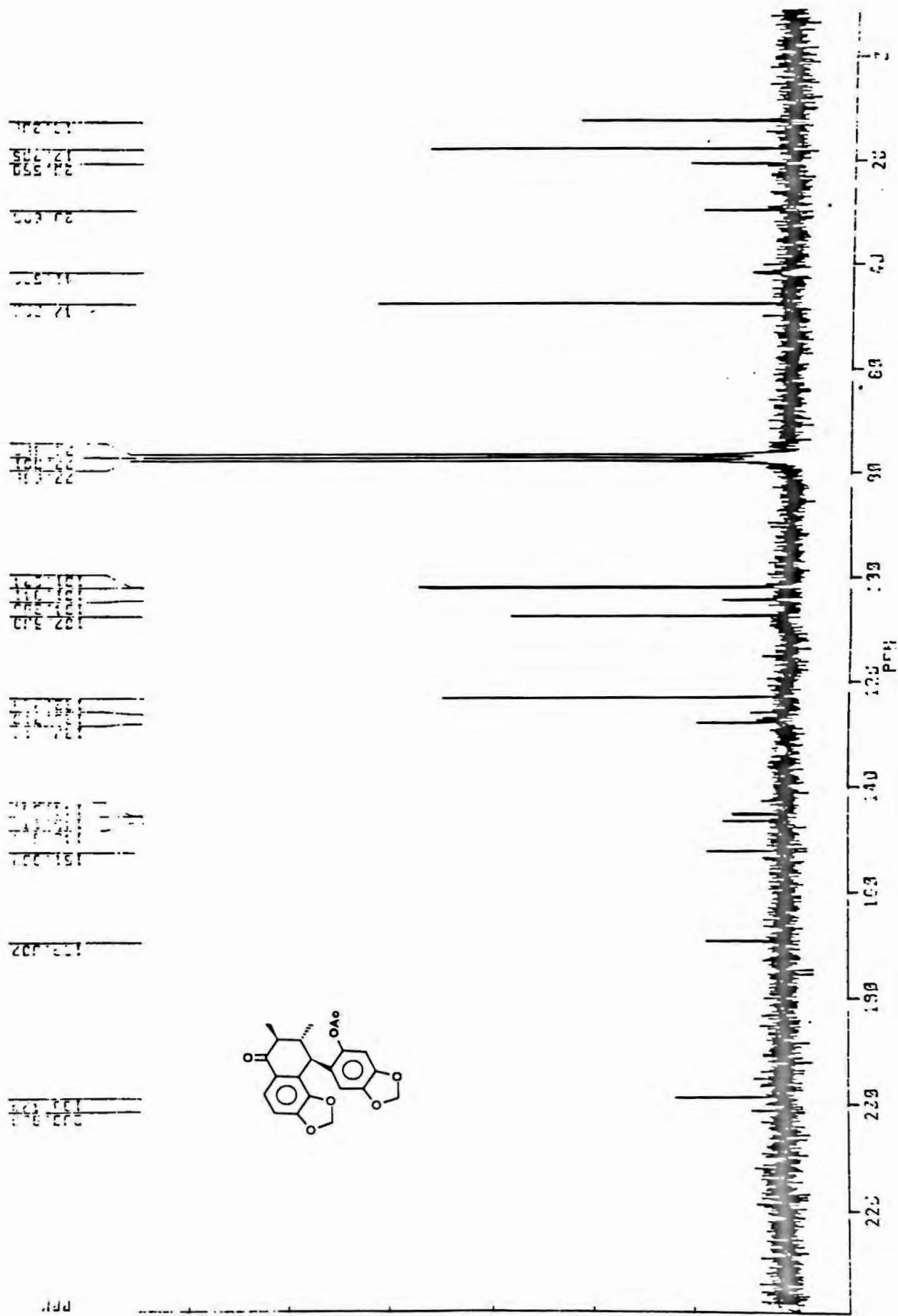


Espectro 18: RMN ¹H da neolignana 1C-Acet (CD Cl₃, 200 MHz)

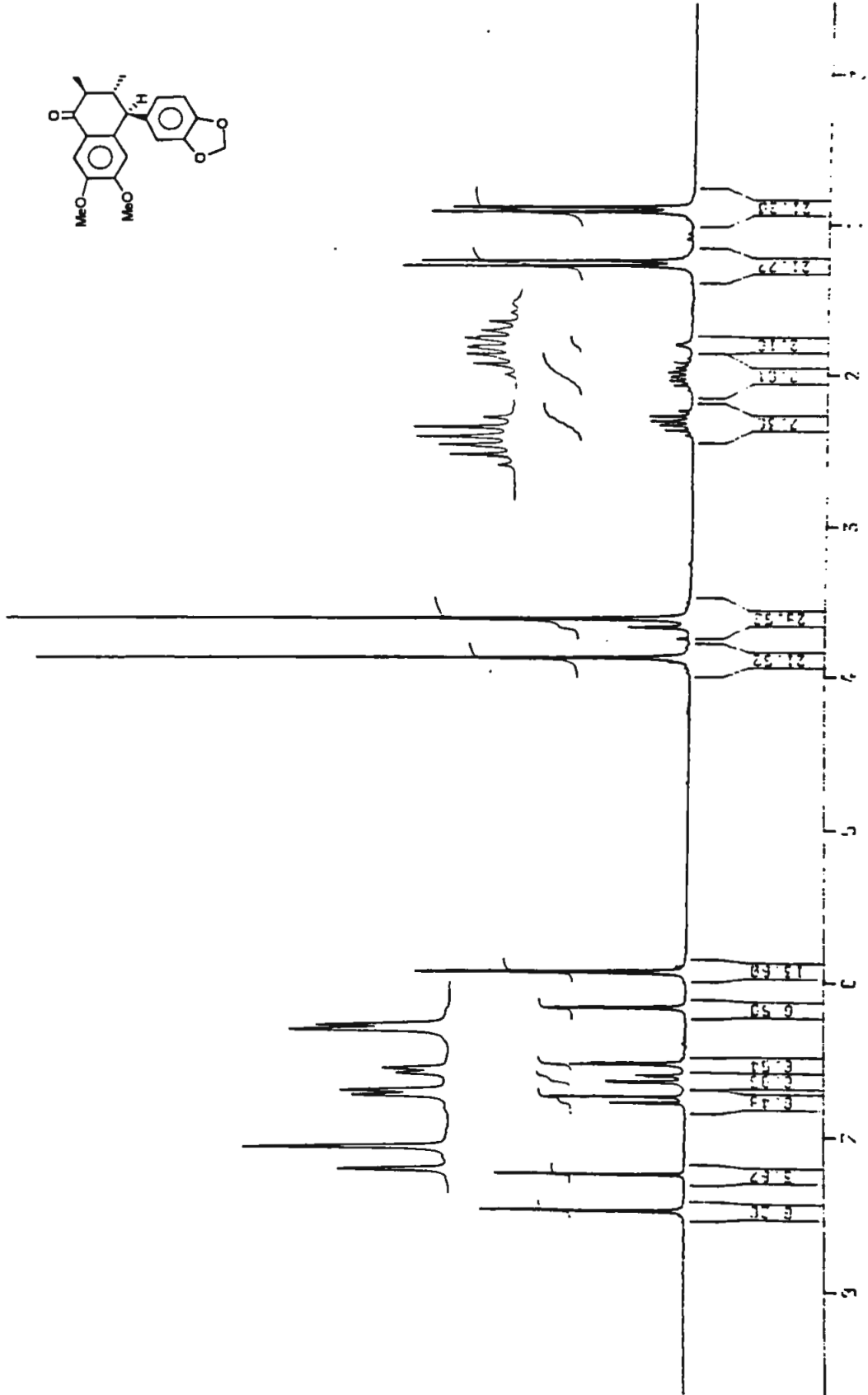
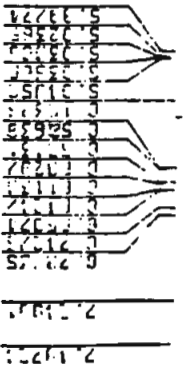
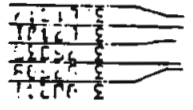
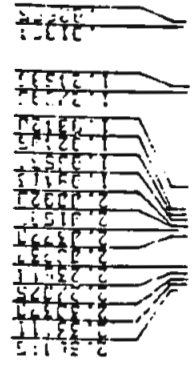
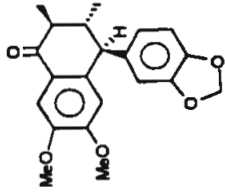


Espectro 19: Ampliação da região de prótons metileno-dioxifenílicos do RMN ¹H de 1C-Acet (CD₃COCD₃, 300 MHz)

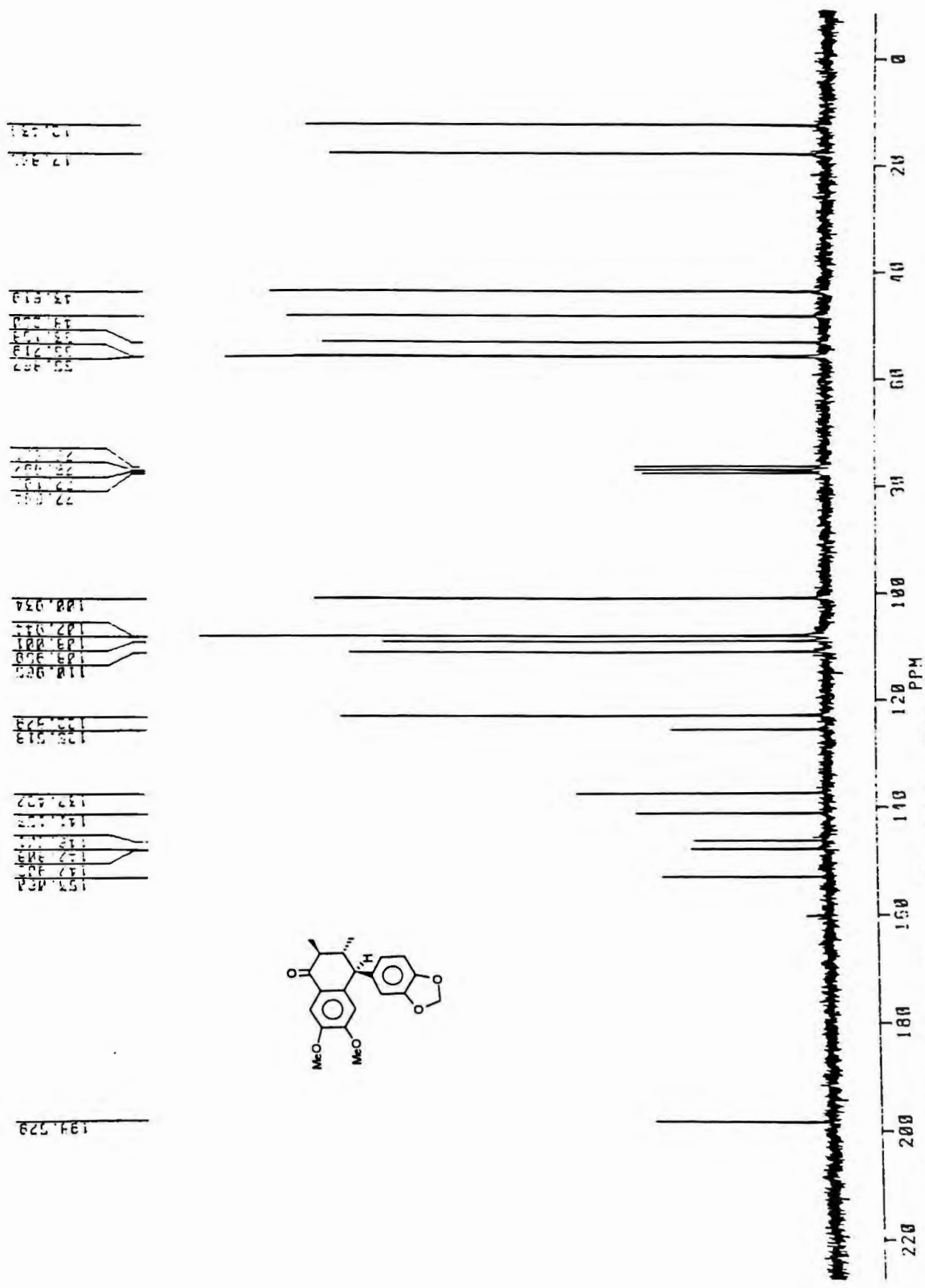




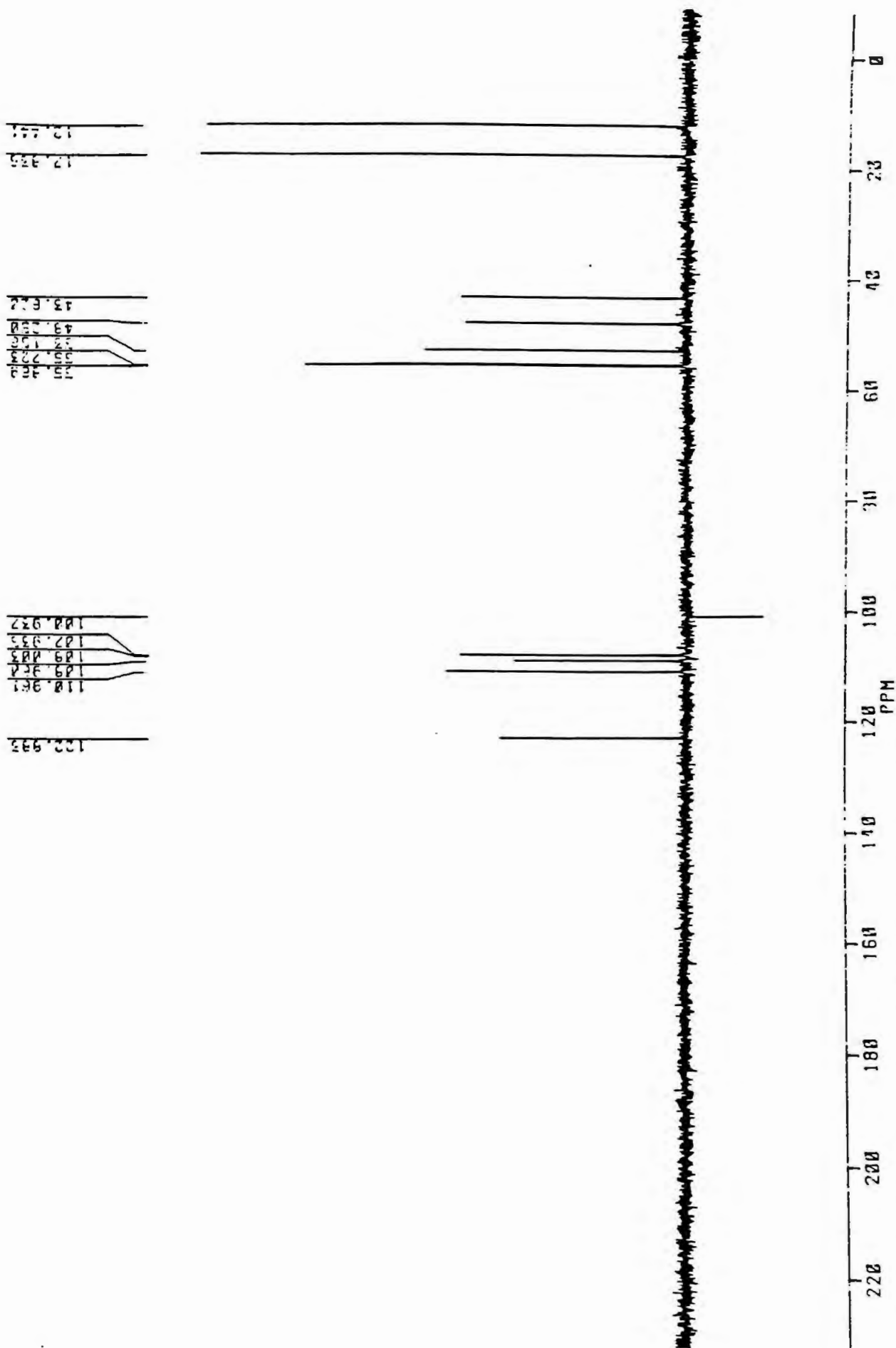
Espectro 21: RMN ¹³C da neolignana 1C-Acet (CD Cl₃, 50 MHz)



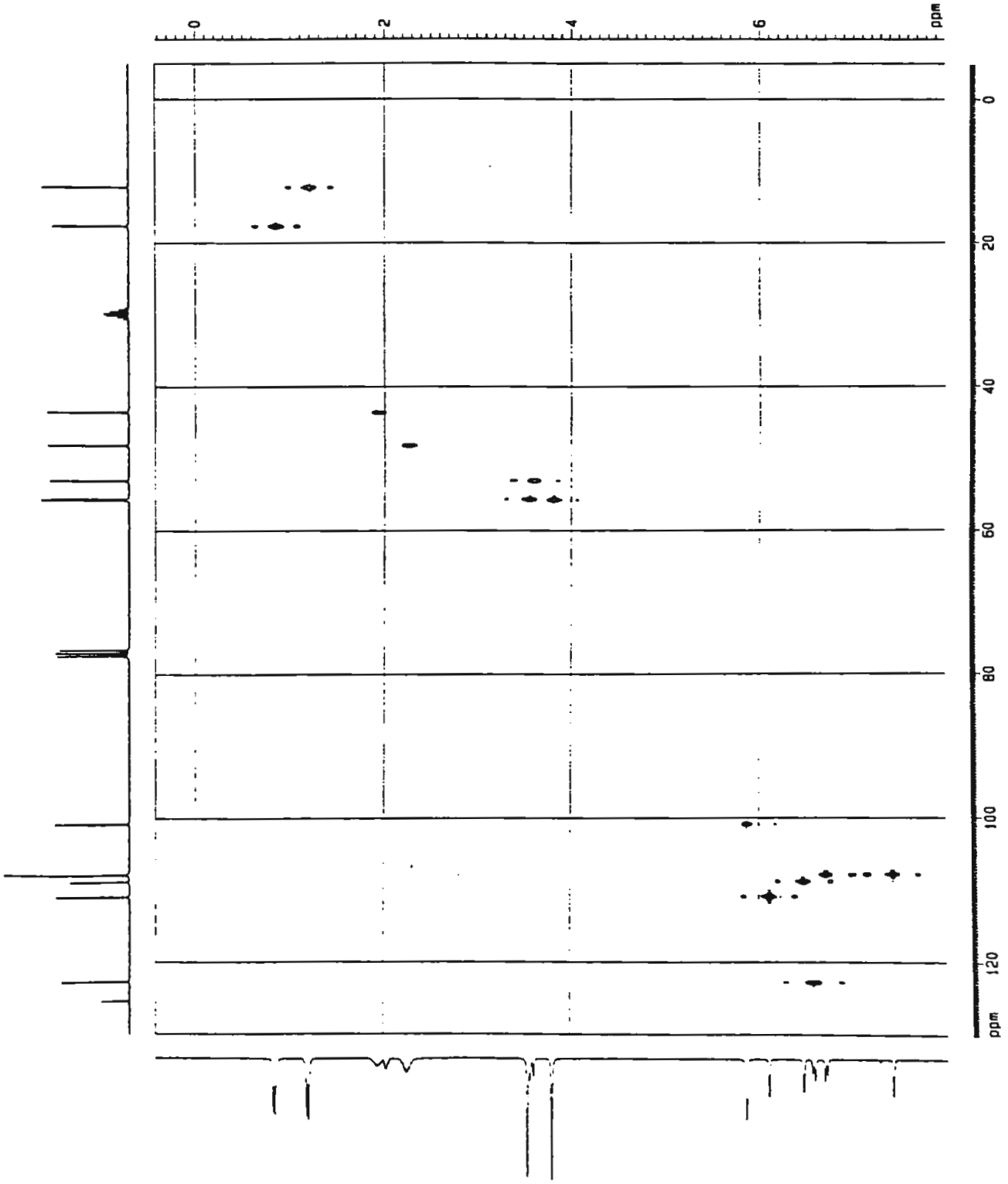
Espectro 22: RMN ¹H da neolignana 2a (CD Cl₃, 200 MHz)



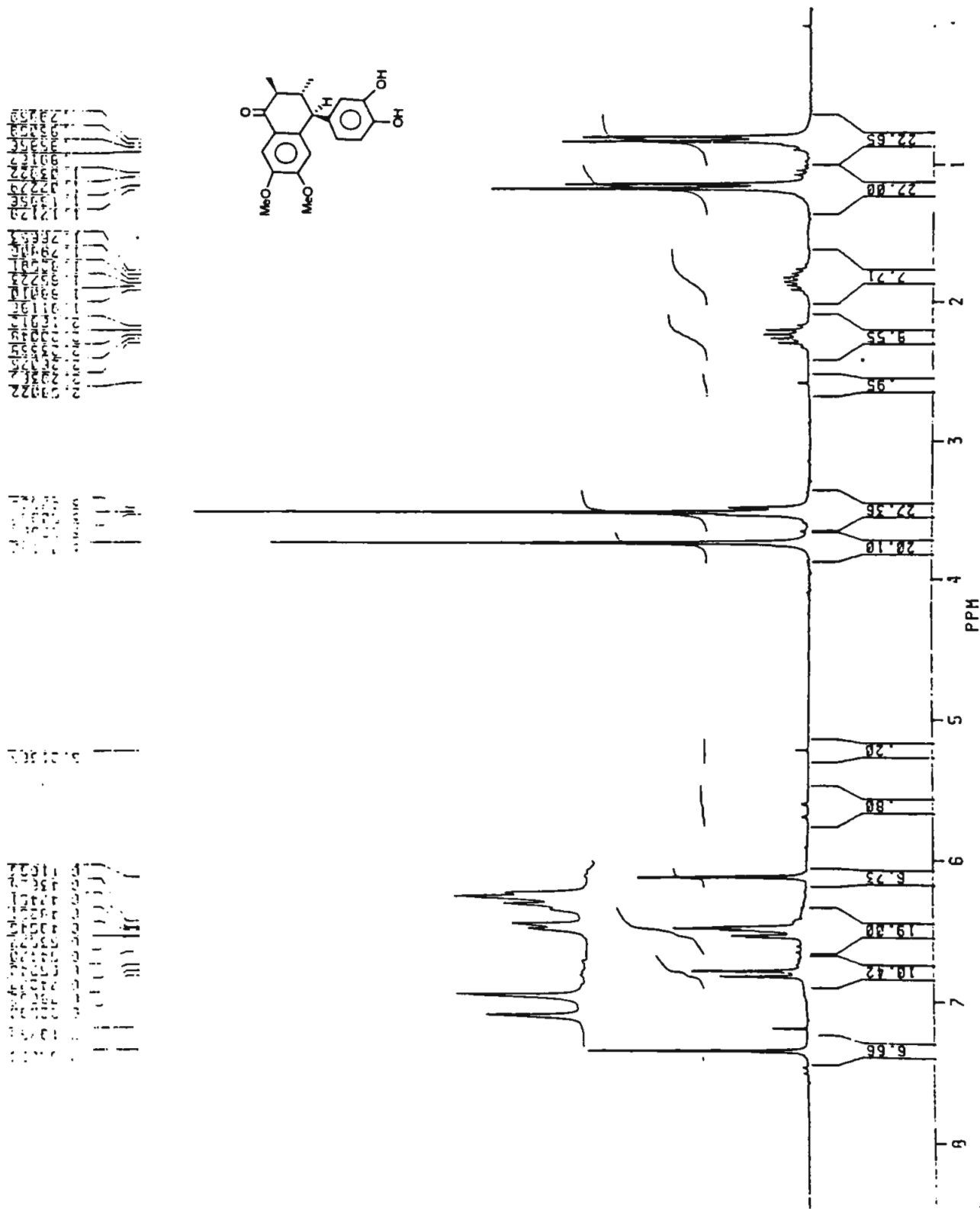
Espectro 23: RMN ¹³C da neolignana 2a (CD Cl₃, 50 MHz)



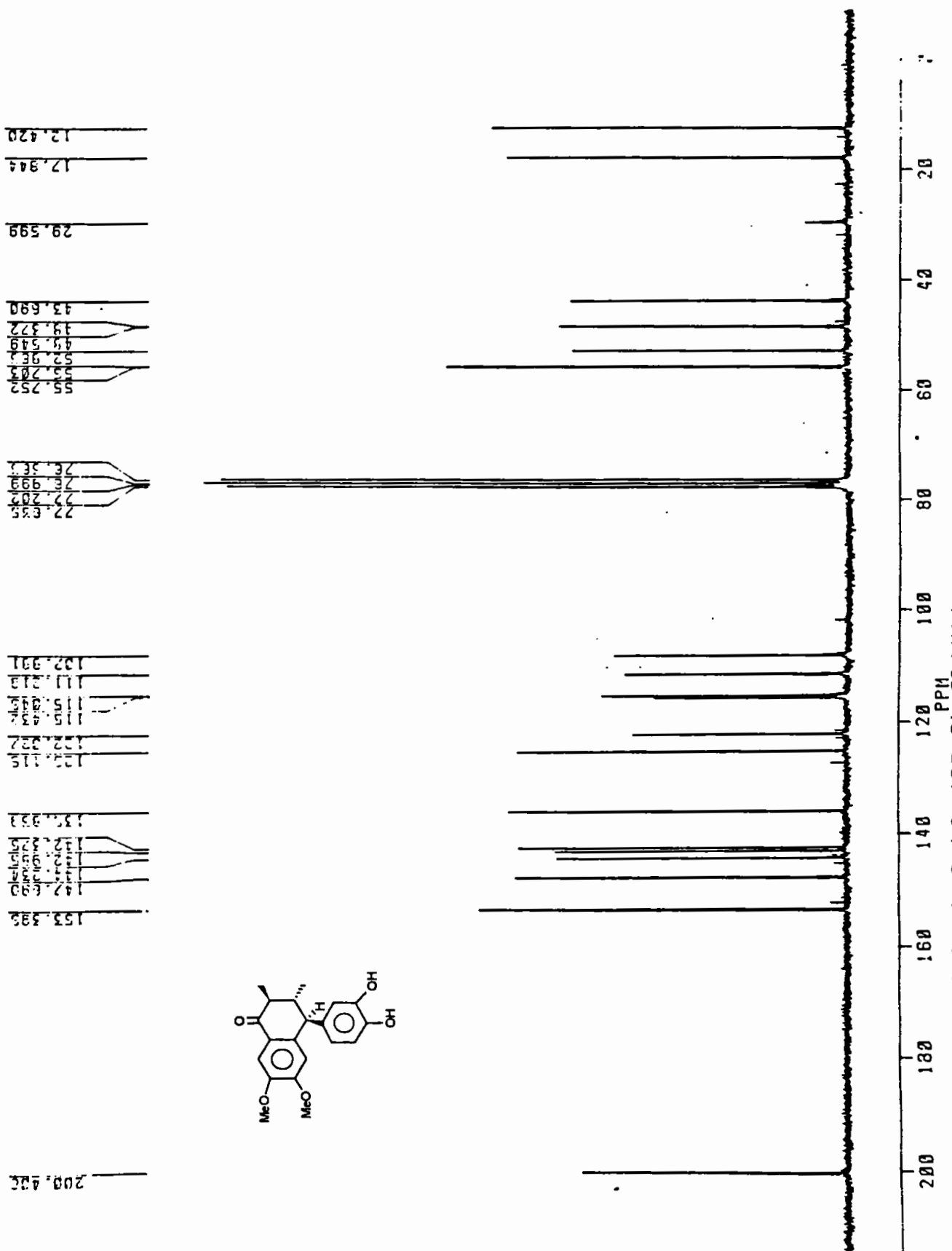
Espectro 24: RMN ¹³C (DEPT 135) da neolignana 2a (CDCl₃, 50 MHz)

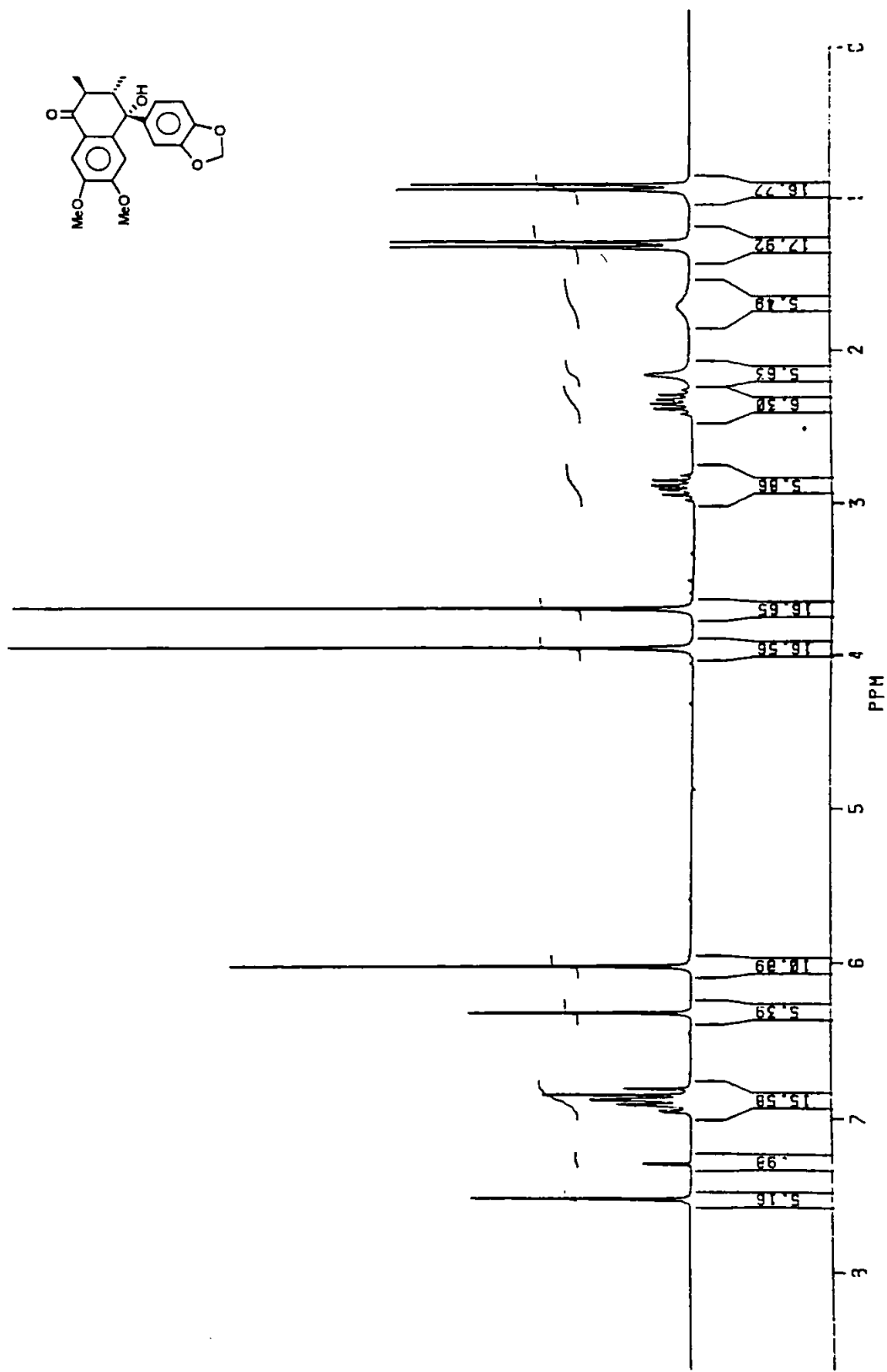


Espectro 25: RMN-2D HETCOR da neolignana 2a (CD Cl₃, 75 MHz)

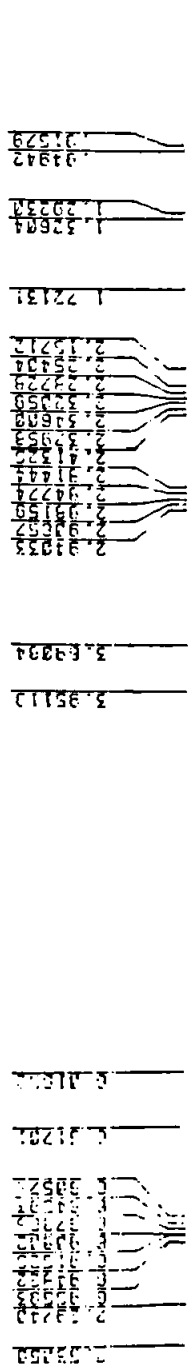


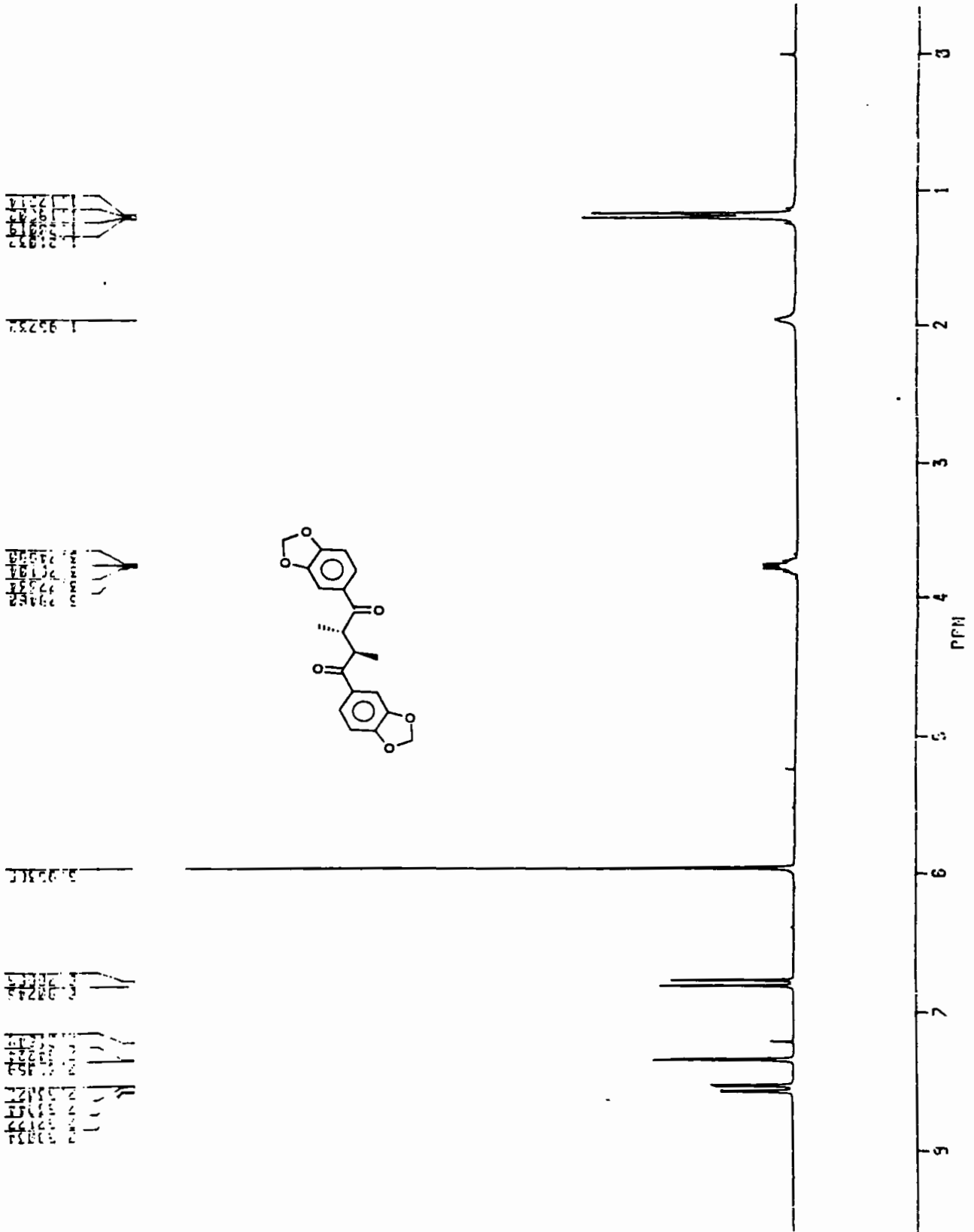
Espectro 26: RMN ¹H do derivado Cat-2a (CD Cl₃, 200 MHz)

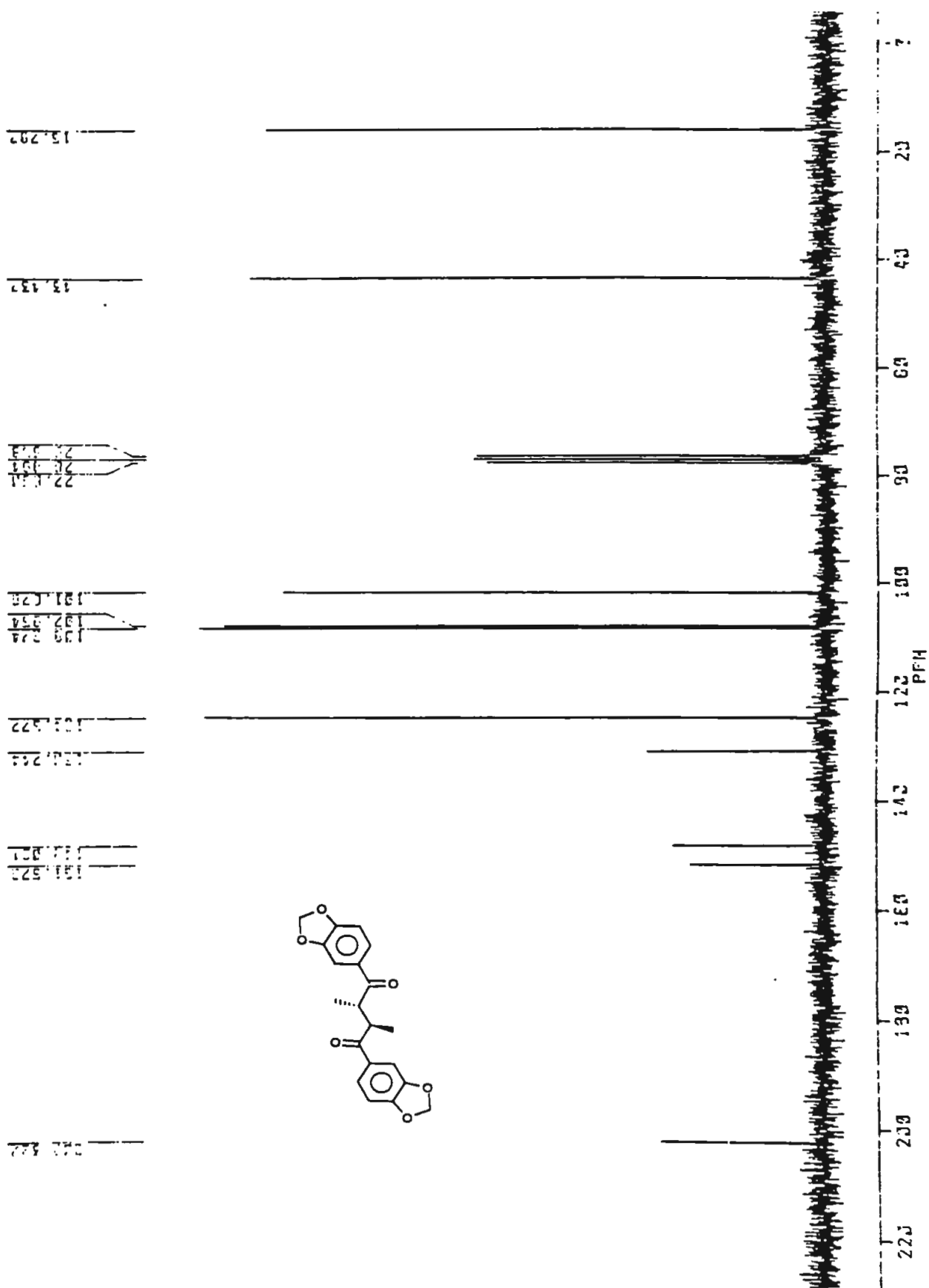
Espectro 27: RMN ^{13}C do derivado Cat-2a (CD Cl₃, 50 MHz)

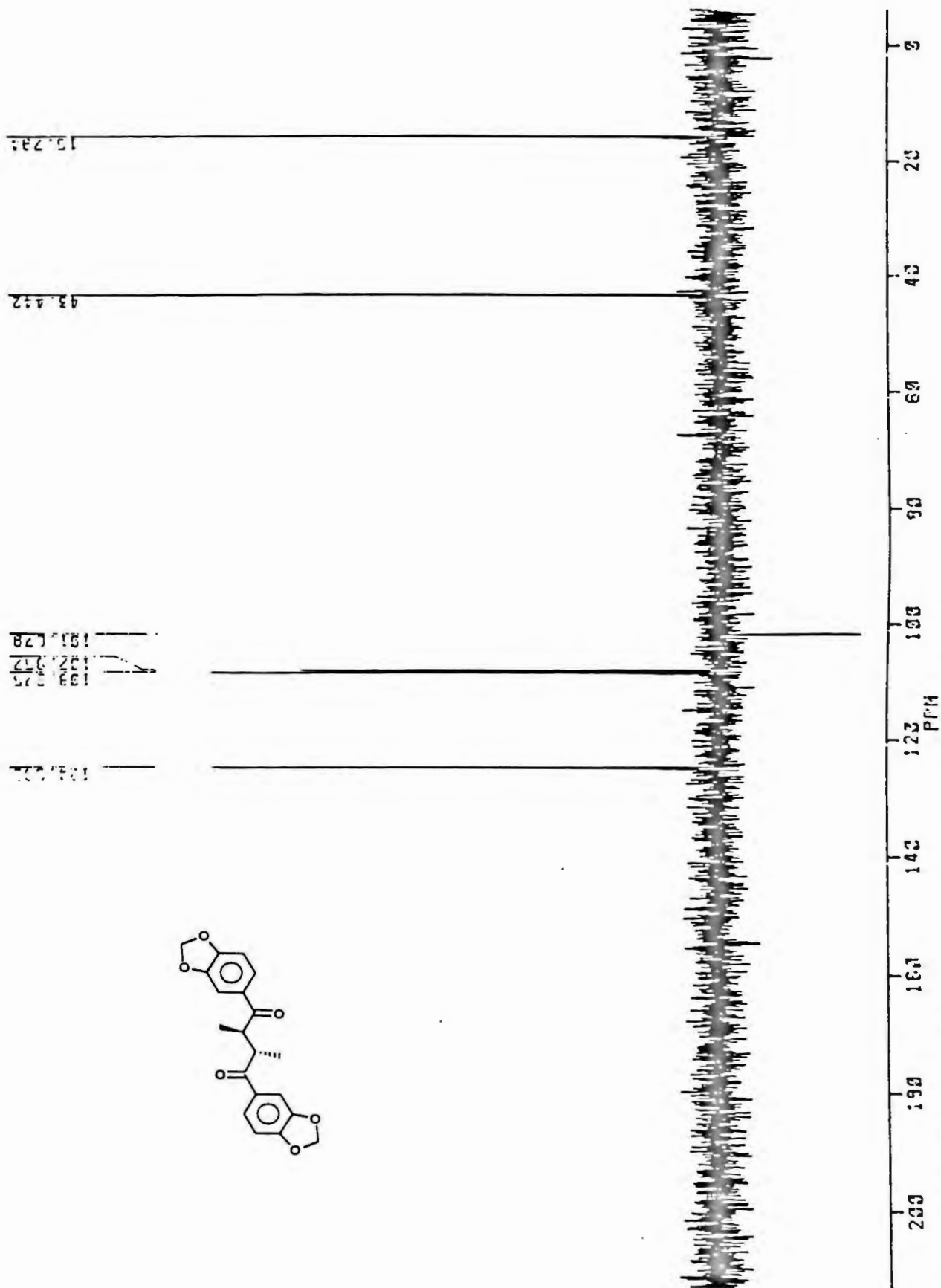


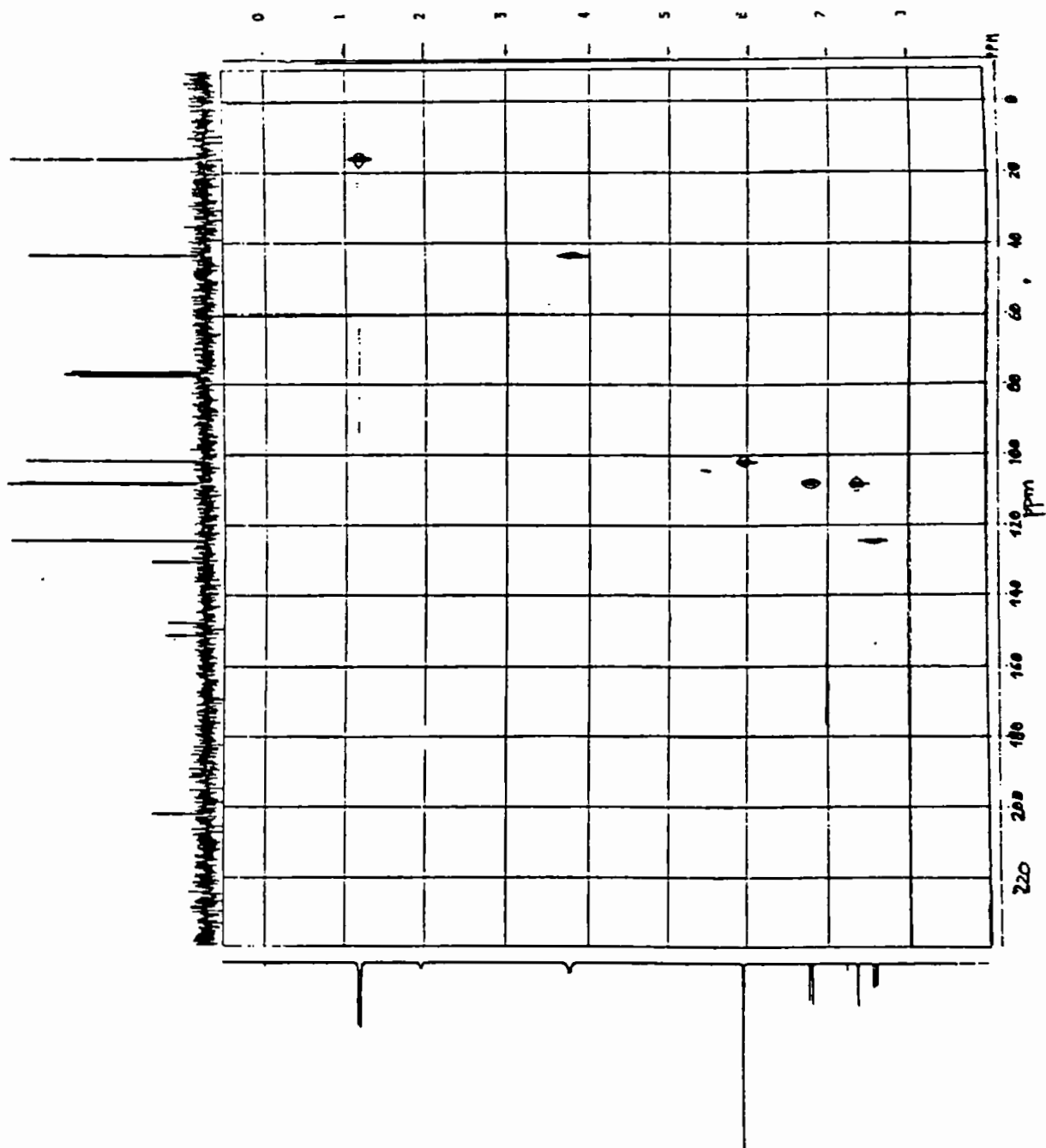
Espectro 28: RMN ¹H da neolignana 2b (CD Cl₃, 200 MHz)

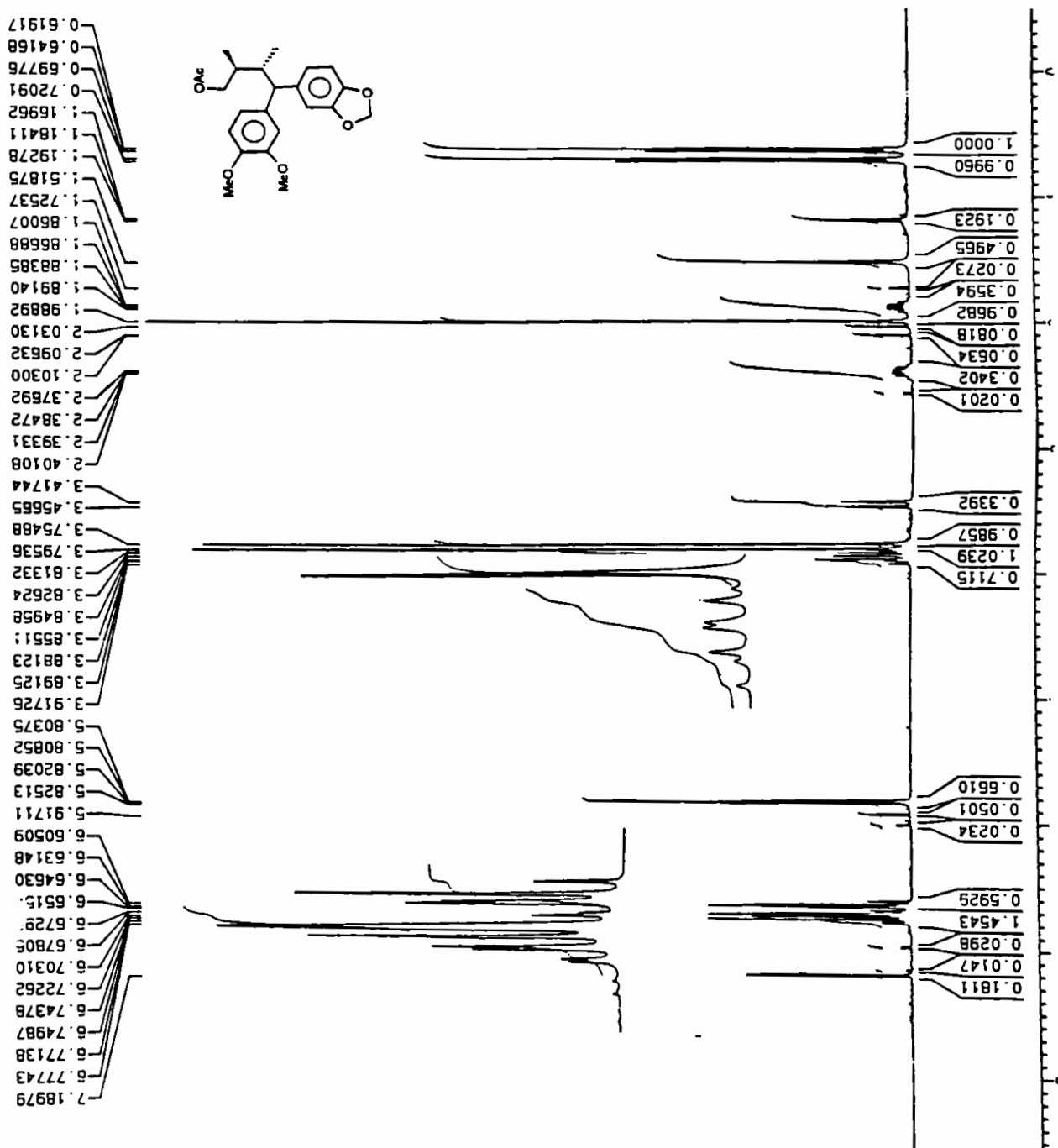


Espectro 30: RMN ¹H da neolignana 3 (CD Cl₃, 200 MHz)

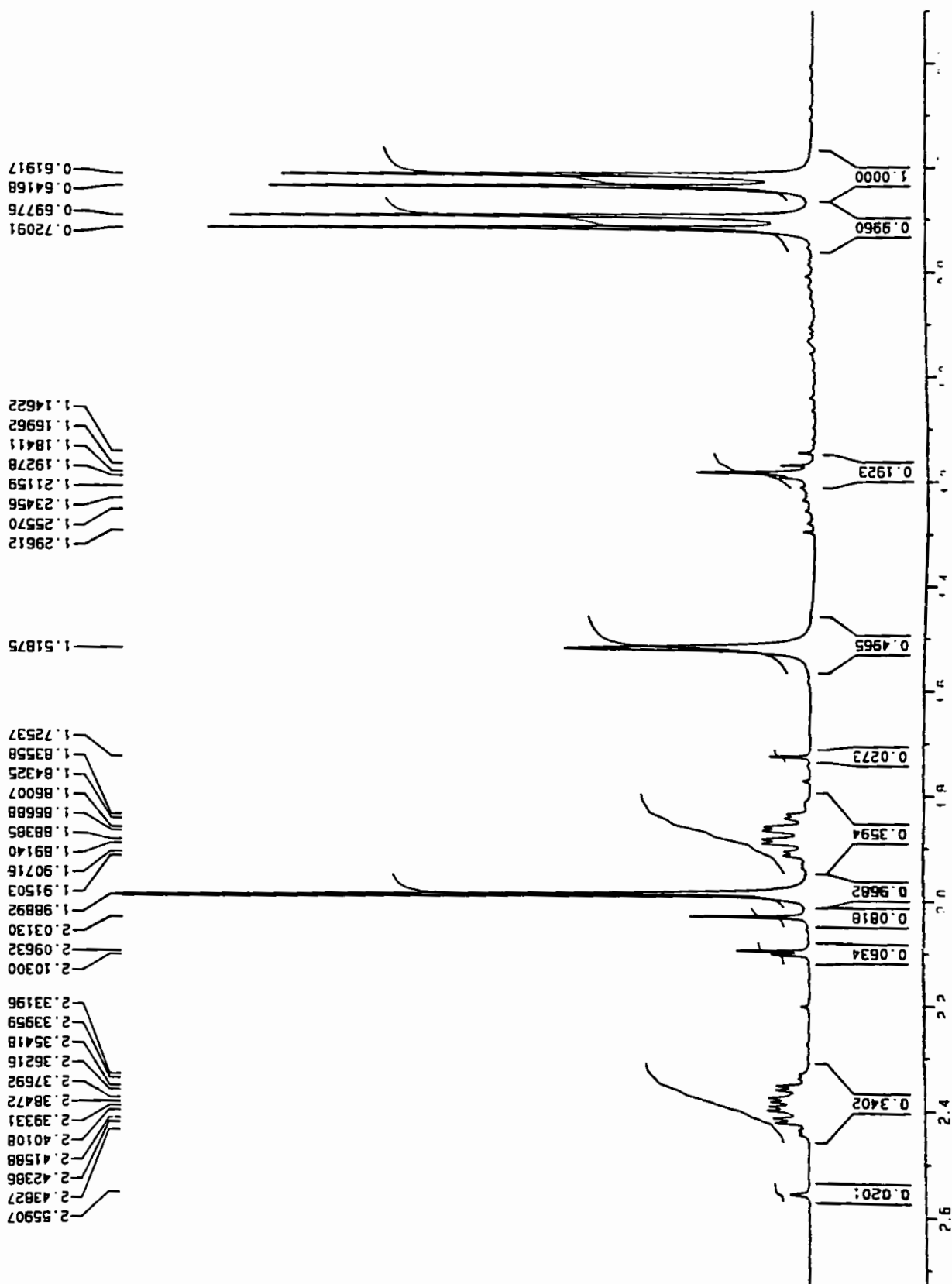


Espectro 32: RMN ^{13}C (DEPT 135) da neolignana 3 (CD Cl₃, 50 MHz)

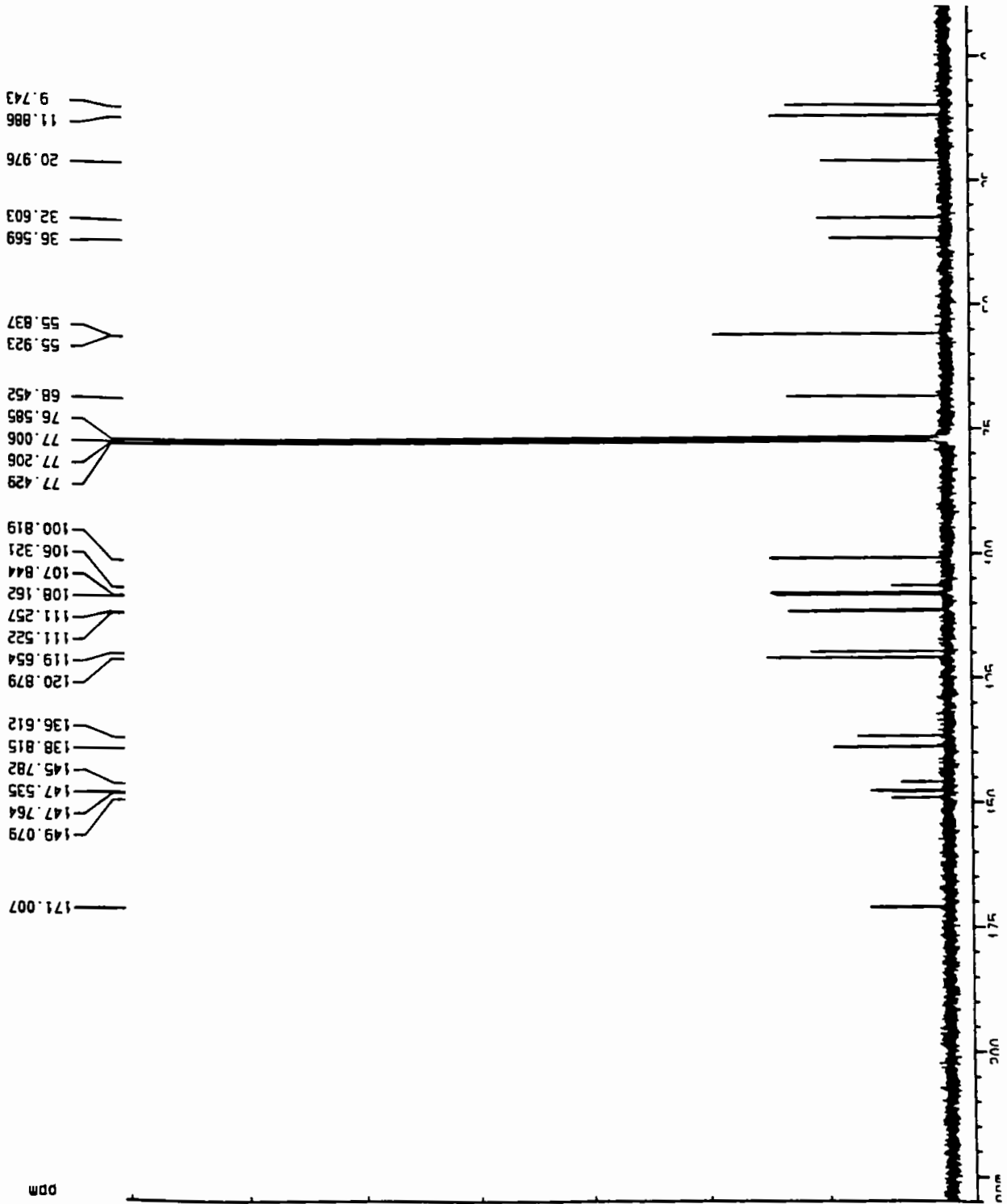
Espectro 33: RMN-2D HETCOR da neolignana 3 (CD Cl₃, 50 MHz)



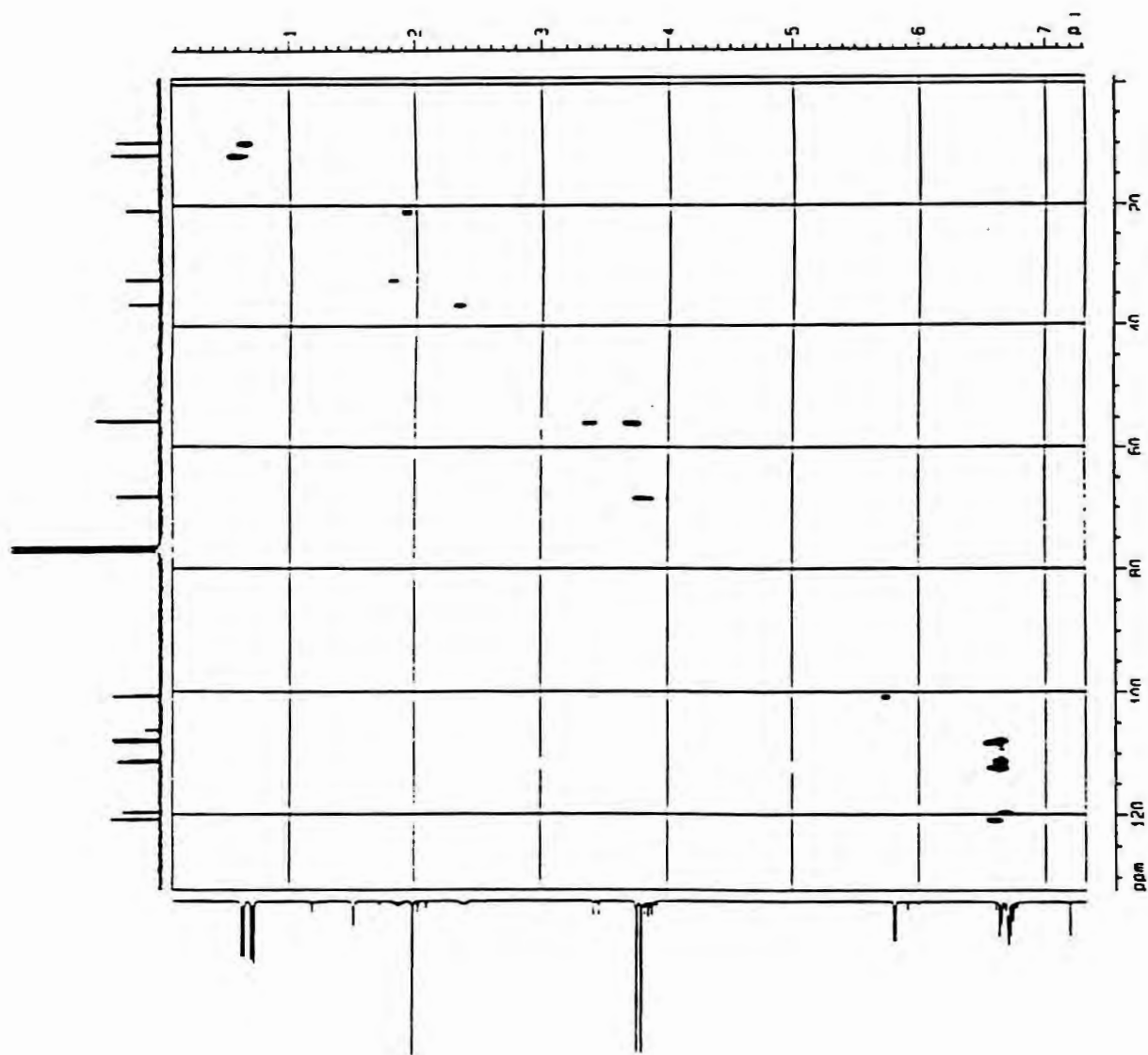
Espectro 34: RMN ¹H da neolignana 4 (CD Cl₃, 300 MHz)

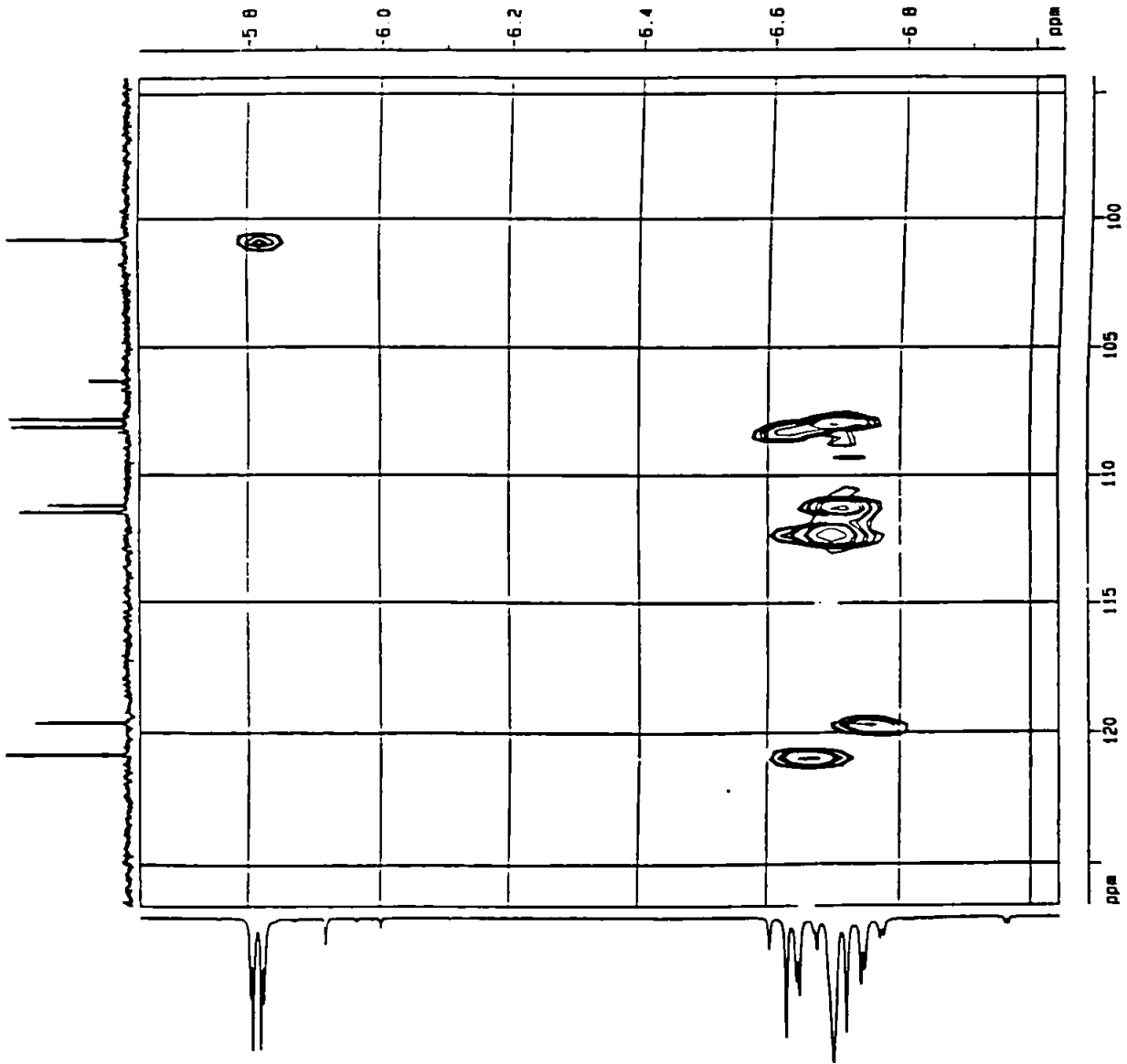


Espectro 35: Ampliação da região dos sinais de hidrogênios alifáticos da neolignana 4 (CD Cl₃, 300 MHz)

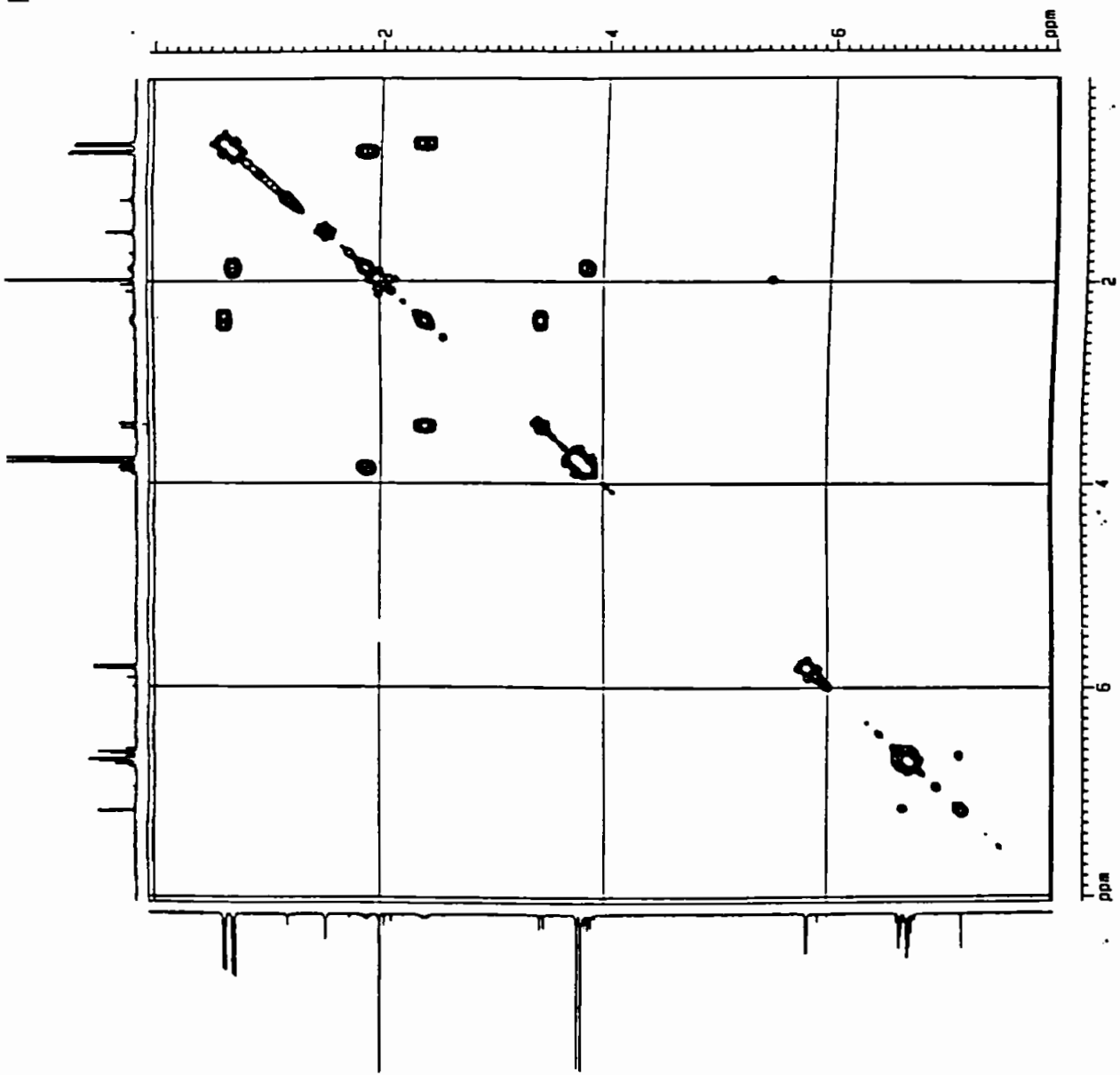


Espectro 36: RMN ¹³C da neolignana 4 (CD Cl₃, 75 MHz)





Espectro 38: Ampliação dos sinais de hidrogênios alifáticos do RMN-2D HETCOR da neolignana 4 (CD Cl₃, 300 MHz)



Espectro 39: RMN- 2D COSY da neolignana 4 (CDCl₃, 300 MHz)