UFSM

"ESTUDO FITOQUÍMICO DA RAIZ DA ESPÉCIE *Melochia chamaedrys* St. Hil."

TESE DE DOUTORADO

Gilvan de Oliveira Costa Dias

Santa Maria, RS - Brasil

2005

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

ESTUDO FITOQUÍMICO DA RAIZ DA ESPÉCIE *Melochia chamaedrys* St. Hil

por

GILVAN DE OLIVEIRA COSTA DIAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQ

Santa Maria, RS – BRASIL
2005

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
a comissão examinadora, abaixo assinado, aprova a tese

ESTUDO FITOQUÍMICO DA RAIZ DA ESPÉCIE *Melochia chamaedrys* St. Hil.

elaborada por
GILVAN DE OLIVEIRA COSTA DIAS

como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em química

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____
Prof. Dr. Ademir Farias Morel – Orientador – UFSM

_____
Profª. Drª. Alana Neto Zoch - UPF

_____
Profª. Drª. Ionara Irion Dalcol – UFSM

_____
Prof. Dr. Nilo Zanatta – UFSM

_____
Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura – UNICAMP

Santa Maria, 04 de novembro de 2005

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Aos meus pais Raimundo Pereira Dias e Maria de Oliveira Costa Dias, pelo apoio, carinho e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos e suas famílias, por tudo.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu especial agradecimento pela orientação e confiança no decorrer deste trabalho.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

“Se não morre aquele que planta uma árvore
E não morre aquele escreve um livro,
Com mais razão não deve morrer o educador,
Pois ele semeia nas almas e escreve nos Espíritos”.

Berthold Brecht

À professora Emília Carolina *in memorian*

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo;

A Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino público, gratuito e de qualidade;

Ao Projeto Prata da Casa da Universidade Federal do Maranhão, coordenado pelo prof. Dr. Erasmo Campello de Melo;

Aos órgãos fomentadores deste trabalho: CNPq, CAPES e FAPERGS;

Aos Professores da UNICAMP: Dr. Paulo Mitsuo Imamura e Drª. Anita Massaiolli, pela obtenção de dados de rotação óptica e espectrometria de massas;

À Profª. Drª. Ionara Irion Dalcol, pela amizade e coorientação deste trabalho;

À Profª. Maria Benedita de Assunção, pelo incentivo, amizade e iniciação à pesquisa em fitoquímica;

Ao Prof. Dr. Robert Burow, pela contribuição nas análises de difração de raios-X;

aos amigos de São Mateus-MA, em especial, Adelmo Boueres, Francisco Garreto e Maria de Oliveira Barros “Meire”;

A Jacilda Porto Noleto, pelo carinho e amizade;

Aos colegas Juliano Rios e Veridiana Silva, pela amizade e ajuda na formatação deste trabalho;

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação em Química: Ademir Sartori e Valéria Velasquez, pela prestatividade;

Aos colegas de laboratório: Adriana Zago, Anderson, Andréia, Caroline Stüker, Carolina Oliveira, Cláudia, Elaine, Euclésio, Graciane, Graciela, Irene, Luciana, Marcelo, Sandro Giacomelli, Susiane, Vinicus Ilha e Vinícius Londeiro, pela agradável convivência e amizade durante essa jornada;

Aos colegas dos laboratórios de sínteses: Carla, Guilherme Bortolotto, Helena, Leonardo, Liana, Luciana, Martin, Marcelo Gindri;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, meu muito obrigado.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

RESUMO

TÍTULO: “ESTUDO FITOQUÍMICO DA RAIZ DA ESPÉCIE *Melochia chamaedrys* St. Hil.

AUTOR: Gilvan de Olivera Costa Dias

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Melochia chamaedrys St. Hil. é uma planta conhecida localmente como “douradinha”; é encontrada na América do Sul, mais precisamente, no sul do Brasil, Argentina e Uruguai. No Estado do Rio Grande do Sul a espécie *M. chamaedrys* é usada pela população local no tratamento de várias doenças, inclusive, câncer e como anti-hipertensiva.

O presente trabalho descreve especialmente a extração, o isolamento e caracterização de dois novos compostos: chamaedrona (20) e chamaedrina (28) bem como a identificação de mais 8 (oito) compostos conhecidos: ácido parasórbico (25), adoutina-X (29), antidesmona (19), (-)-epicatequina (31), propacina (26), scutianina B (9) e C (30) e waltheriona A (18) da raiz de *Melochia chamaedrys.* Suas estruturas foram identificadas principalmente através de métodos espectroscópicos incluindo a espectroscopia de RMN de 1D e 2D. Além disso, foram realizados os ensaios microbiológicos por bioautografia com as novas substâncias e com antisdemona e seus derivados. Chamaedrona e os derivados de antidesmona foram fortemente ativos frente a bactérias e fungos enquanto que antidesmona e chamaedrina foram inativas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado em Química
Santa Maria, 4 de novembro de 2005.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

ABSTRACT

TITLE: “PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE ROOTS OF THE SPECIES *Melochia chamaedrys* St. Hil.

AUTHOR: Gilvan de Oliveira Costa Dias

ACADEMIC ADVISOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Melochia chamaedrys St.Hil. is a plant that is locally known as “douradinha”, it is found in South America, more exactly in the south of Brazil, Argentina, and Uruguay. In the state of “Rio Grande do Sul”, the species *M. chamaedrys* is used by the local people in the treatment of many diseases, including cancer and hypertension.

The present research describes especially the extraction, isolation and characterization of two new compounds: chamaedrona (20) and chamaedrine (28) as well as the identification of 8 (eight) compounds that are already known: parasorbic acid (25), adoutine-X (29), atidesmone (19), (-)-epicatechin (31), propacine (26), scutianine B (9) and C (30) and waltherione A (18) of the roots of *Melochia chamaedrys.* Its structures were identified by spectroscopy methods including 1D and 2D NMR spectroscopy. Besides that, bioautography microbiological tests were made with these compounds and with antidesmone and its derivatives. Chamaedrone and antidesmone derivatives showed a strong activity against bacteria and fungus, while antidesmone and chamaedrine did not show any activity.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
POSTGRADUATE COURSE IN CHEMISTRY

Doctoral Thesis in Chemistry.

Santa Maria, November 4th, 2005.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS vii
RESUMO viii
ABSTRACT ix
LISTA DE FIGURAS xiii
LISTA DE TABELAS xvi
LISTA DE ESQUEMAS xvii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS xviii
1 . INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 1
2. REVISÃO DA LITERATURA 3
2.1. STERCULIACEAE 3
2.1.1. MELOCHIA 4
2.1.1.1. *Melochia chamaedrys* St. Hil. 5
2.2. Estudos químicos realizados com o gênero *Melochia* e similares 5
3. PARTE EXPERIMENTAL 9
3.1 Instrumentos Utilizados 9
3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 9
3.1.2. Ponto de Fusão 9
3.1.3. Cromatografia Gasosa 9
3.1.4. Espectrometria de Massas de Alta Resolução 9
3.1.5. Espectrometria de Massas de Baixa Resolução 10
3.1.6. Espectroscopia de Infravermelho 10
3.1.7. Polarímetro 10
3.2. Materiais e Métodos 10
3.2.1. Cromatografia, solventes e reveladores 10
3.2.2 Determinação de toxicidade “in vivo” através do Teste de Letalidade por *Artemia salina* (TLAS) 11
3.2.3. Método de Bioautografia 12
3.2.3.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana “in vitro” 13
3.2.4. Método de Horeau 13
3.2.4.1. Príncipio do Método 13
3.2.4.2. Regra de Horeau 14
3.2.5. *Melochia chamaedrys* 15

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.2.5.1. Coleta e identificação Botânica 15
3.2.5.2. Preparação dos Extratos e Fracionamentos..... 15
3.2.5.3. Bioensaio..... 17
3.2.5.4. Análise da Fração Hexânica..... 17
3.2.5.5. Análise da Fração Clorofórmica 18
3.2.5.6. Análise da Fração Acetato de Etila..... 19
3.2.5.7. Dados sobre os Metabólitos Isolados das Frações Hexânica, Clorofórmica e Acetato de Etila de *Melochia chamaedrys*. 20
3.2.5.7.1. Antidesmona (19)..... 20
3.2.5.7.2. Chamaedrona (20)..... 20
3.2.5.7.3. Ácido Parasórbico (25)..... 20
3.2.5.7.4. Propacina (26) 21
3.2.5.7.5. Scutianina B (27) 21
3.2.5.7.6. Chamaedrina (27) 21
3.2.5.7.7. Adoutina X (29) 22
3.2.5.7.8. Scutianina C (30) 22
3.2.5.7.9. Waltheriona A (18) 22
3.2.5.7.10. (-)- Epicatequina (31) 23
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 24
4.1. BIOENSAIO 24
4.2. Estudo Fitoquímico da Raiz de *Melochia chamaedrys* 24
4.2.1 Caracterização dos compostos GO2 e GO3 obtidos na fração hexânica de *M. chamaedrys*. 28
4.2.1.1. GO2..... 28
4.2.1.1.1. Espectro de Massas..... 28
4.2.1.1.2. Espectro de RMN ^{1}H..... 29
4.2.1.1.3. Espectro de RMN do Tipo COSY ^{1}H-^{1}H..... 30
4.2.1.1.4. Espectro de RMN ^{13}C 32
4.2.1.1.5. Espectro de RMN do tipo HMQC e HMBC..... 36
4.2.1.2. G03..... 41
4.2.1.2.1. Espectro de Massas..... 41
4.2.1.2.2. Espectro de RMN de^{1}H..... 42
4.2.1.2.3. Espectro de RMN do Tipo COSY ^{1}H-^{1}H..... 44
4.2.1.2.4. Espectro de RMN do Tipo NOESY ^{1}H-^{1}H 45

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4.2.1.2.5. Espectro de RMN de ^{13}C de GO3 47
4.2.1.2.6. Espectro de RMN do Tipo HMQC e HMBC 51
4.2.1.3. Definição da configuração relativa dos centros quirais (C-5, C-8) de GOH através do estudo de raios-X 60
4.2.1.3.1. Determinação da Estereoquímica do Centro Quiral C-8 de GOH 61
4.2.1.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Biautografia de GO3 e Derivados de GO2. 64
4.2.2. Caracterização dos Compostos Obtidos na Fração Clorofórmica de *Melochia chamaedrys*. 66
4.2.2.1. G-9 66
4.2.2.2. G-28 71
4.2.2.2.1. Espectro de Massas 71
4.2.2.2.2. Espectro de RMN de ^{1}H DE G-28 73
4.2.2.2.3. Espectro de RMN 2D COSY de G28 75
4.2.2.2.4. Espectro de RMN 2D do Tipo NOESY 76
4.2.2.2.5. Espectro de RMN de ^{13}C de G-28 78
4.2.2.2.6. Espectros de RMN HMQC e HMBC 80
4.2.2.3. G-63 85
4.2.2.4. G-65 92
4.2.2.5. G-70 106
4.2.2.6. G-77 e G-90 114
4.3. Caracterização do composto GA-1, obtido da fração acetato de etila de *M. chamaedrys* 115
4.3.1. GA-1 115
5. CONCLUSÕES 122
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 123

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Espectro de massas de GO2. 29
FIGURA 2. Principais fragmentações de GO2. 29
FIGURA 3. Espectro de RMN de ^{1}H de GO2 em $CDCl_3$, 400 MHz. 30
FIGURA 4. Espectro de RMN de 2D, COSY ^{1}H–^{1}H de GO2 em $CDCl_3$, 400 MHz. .. 31
FIGURA 5. Espectro expandido de RMN de 2D, COSY ^{1}H–^{1}H, região δ 0,89 a 3,25 de GO2 em $CDCl_3$, 400 MHz. 32
FIGURA 6. Espectro de RMN de ^{13}C de GO2 em $CDCl_3$, 100 MHz. 33
FIGURA 7. Espectro expandido de RMN de ^{13}C de GO2 em $CDCl_3$, 100 MHz. 34
FIGURA 8. Espectro de RMN de DEPT 135° de GO2 em $CDCl_3$, a 100 MHz. 35
FIGURA 9. Expansão do espectro de RMN de DEPT 135°de GO2 em $CDCl_3$, a 100 MHz. 35
FIGURA 10. Espectro 2D, heteronuclear $^{1}J_{H-C}$, HMQC de GO2 em $CDCl_3$, a 400 MHz. 36
FIGURA 11. Espectro 2D, heteronuclear, HMBC de GO2 em $CDCl_3$, a 400 MHz. ... 38
FIGURA 12. – Espectro expandido 2D, heteronuclear, HMBC de GO2 em $CDCl_3$, a 400 MHz. 39
FIGURA 13. Espectro de Massas de GO3 42
FIGURA 14. Fragmentação de GO3 42
FIGURA 15. Espectro de RMN de ^{1}H de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz. 43
FIGURA 15a. Espectro de RMN de ^{1}H de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz expandido entre δ 0,85 e 4,28. 44
FIGURA 17. Espectro de RMN de 2D, NOESY de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz. 47
FIGURA 18. Espectro de RMN de ^{13}C de GO3 em $CDCl_3$, 100 MHz. 48
FIGURA 18a. Espectro de RMN de ^{13}C de GO3 em $CDCl_3$, 100 MHz expandido entre δ 14,00 e 32,43. 49
FIGURA 19. Espectro de RMN de DEPT 135° de GO3 em $CDCl_3$, 100 MHz. 50
FIGURA 20. Espectro de RMN de DEPT 135° de GO3 em $CDCl_3$ a 100 MHz expandido entre δ 14,32 e 75,40. 51
FIGURA 21. Espectro de RMN de 2D, HMQC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz. 52
FIGURA 22. Espectro de RMN de 2D, HMBC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz. 53
FIGURA 22a. Expansão do espectro de RMN de 2D, HMBC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz. 54

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

FIGURA 22b. Expansão do espectro de RMN de 2D, HMBC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz. 55
FIGURA 23. Estrutura dos álcoois (GOH e GOH') de estereoquímica indefinida 57
FIGURA 24. Espectros de RMN ^{1}H de GOH e GOH' 58
FIGURA 25. Espectro de RMN ^{13}C de GOH 58
FIGURA 26. Perfil cromatográfico de GO2, GO3, GOMe e GOMe' em $CHCl_3$ e MeOH (96:4) revelado com Dragendorff. 59
FIGURA 27. Cromatogramas das substâncias naturais e modificadas: (A = GO2+GOMe'+GOMe+GO3; B = GO2+GO3; C = GOMe'; D =GOMe) 60
FIGURA 28. Estrutura obtida através da difração de raios-X de GOH. 61
FIGURA 29. Cromatograma dos ácidos 2-fenilbutíricos metil ésteres obtidos na reação do álcool com anidrido 2-fenilbutírico racêmico. 62
FIGURA 30. Atribuição do volume dos grupos ligados ao carbono 8. 63
FIGURA 31. Estrutura de GOH com estereoquímica absoluta definida (*8 R*). 63
FIGURA 32. Estruturas configuracionais dos compostos semi-sintéticos e naturais GO2 e GO3. 64
FIGURA 33. Demonstração do resultado do ensaio de bioautografia realizado com os compostos GO2 e GO3 frente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25792. 66
FIGURA 34. Espectro de RMN de ^{1}H de G-9, em $CDCl_3$, a 400 MHz. 67
FIGURA 35. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-9, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 68
FIGURA 36. Espectro de RMN de ^{13}C de G-9, em $CDCl_3$, a 100 MHz. 69
FIGURA 37. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°de G-9, em $CDCl_3$, a 100 MHz. .. 70
FIGURA 38. Espectro de massas de G-28 72
FIGURA 39. Fragmentos iônicos de G-28. 72
FIGURA 40. Espectro de RMN de ^{1}H de G-28 em $CDCl_3$ a 400 MHz. 73
FIGURA 41. Espectro de RMN de ^{1}H expandido na região entre δ 1,20 e 4,66 de G-28. 74
FIGURA 42. Espectro de RMN de ^{1}H expandido na região entre δ 5,70 e 7,61 de G-28. 75
FIGURA 43. Espectro de RMN de 2D, COSY de G28, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 76
FIGURA 44. Espectro de RMN de 2D, NOESY de G-28 em $CDCl_3$, 500 MHz. 78
FIGURA 45. Espectro de RMN de ^{13}C de G-28 a 100 MHz. 79
FIGURA 46. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°de G-28 a 100 MHz 80

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

FIGURA 47. Espectro de RMN 2D, HMQC de G-28 em $CDCl_3$ a 400,13 MHz. 81
FIGURA 48. Espectro de RMN 2D, HMBC de G-28 em $CDCl_3$ a 400,13 MHz. 82
FIGURA 49. Espectros expandidos de RMN 2D, HMBC de G-28 em $CDCl_3$ a 400,13 MHz. 83
FIGURA 50. Espectro de RMN de 1H de G-63 em $CDCl_3$ a 400 MHz 88
FIGURA 51. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-63, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 89
FIGURA 52. Espectro de RMN de ^{13}C de G-63 a 100 MHz 90
FIGURA 53. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°de G-63 a 100,32 MHz 91
FIGURA 54. Espectro de absorção de Infravermelho de G-65. 92
FIGURA 57. Espectro de RMN de ^{1}H de G-65 em $CDCl_3$ a 400 MHz.....96
FIGURA 58. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-65, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 99
FIGURA 60. Sistema de spins de G-65.....101
FIGURA 61. Espectro de RMN de ^{13}C de G-65 a 100 MHz 103
FIGURA 62. Espectros de RMN de ^{13}C DEPT 135° e 90° de G-65 a 100 MHz 104
FIGURA 63. Espectro de RMN de ^{1}H de G-70 em $CDCl_3$ a 400 MHz.....107
FIGURA 64. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-70, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 109
FIGURA 64a. Expansão do espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-70, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 110
FIGURA 64b. Expansão do espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-70, em $CDCl_3$ a 400 MHz. 112
FIGURA 65. Espectro de RMN de ^{13}C de G-70 a 100 MHz 113
FIGURA 65a. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de G-70 a 100 MHz.....114
FIGURA 66. Espectro de RMN de ^{1}H, GA-1, em Acetona-d_6, a 400 MHz. 117
FIGURA 67. Espectro de RMN de 2D, COSY de GA-1 em Acetona-d_6 a 400 MHz. 118
FIGURA 68. Espectro de RMN ^{13}C de GA-1 em Acetona-d_6 a 100.32 MHz. 119
FIGURA 69. Espectro de RMN DEPT 135° de GA-1 em Acetona-d_6 a 100 MHz. ..120
FIGURA 70. Espectro de RMN HMQC de GA-1 em Acetona-d_6 a 400 MHz. 121

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais sistemas de solventes utilizados nas técnicas cromatográficas. 11

TABELA 2. Cepas utilizadas nos ensaios de bioautografia..... 13

TABELA 3. Rendimento de resíduo obtido de cada fração. 16

TABELA 4. Proporções de solventes utilizados e rendimento em cada fração..... 19

TABELA 5. Concentração das amostras requerida para atingir 50% de letalidade frente a *Artemia salina.* 24

TABELA 6. Estruturas dos metabólitos isolados e modificados de *Melochia chamaedrys*..... 26

TABELA 7. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C e correlações dos experimentos COSY e HMBC para GO2, em $CDCl_3$..... 40

TABELA 8. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C e correlações dos experimentos COSY e HMBC para GO3, em $CDCl_3$..... 56

TABELA 9. Determinação da quantidade inibitória mínima de GO3 e derivados de GO2..... 65

TABELA 10. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C e correlações dos experimentos COSY e HMBC para G-28, em $CDCl_3$. 84

TABELA 11. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C para G-65, em $CDCl_3$. 105

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Estrutural geral de representação de alcalóides ciclopeptídicos 4

ESQUEMA 2. Esquema geral da reação de um álcool secundário e um derivado do ácido 2-fenilbutírico 14

ESQUEMA 3. Regra de Horeau 15

ESQUEMA 4. Fracionamento do Extrato Bruto 16

ESQUEMA 5. Refracionamento da fração hexânica e isolamento dos metabólitos GO2 e GO3. 18

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
µg	Micrograma
ATCC	American Type Culture Collection
BB	Espectro de carbono totalmente desacoplado
Phe	Fenilalanina
°C	Grau Celcius
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
EI	Ionização eletrônica
EM	Espectrometria de massas
Ev	Elétron-volt
FAB	Fast atom bombardment
FDA	Food and Drug Administration
IV	Infravermelho
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
Hz	Hertz
Ileu	Isoleucina
Leu	Leusina
m	Multipleto
mg	Miligrama
$M + H^+$	Íon molecular mais um próton
m/z	Relação massa/carga
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
Pro	Prolina
P.	Página
Ppm	Parte por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
t	Tripleto
TLAS	Teste de Letalidade com *Artemia salina*
TMS	Tetrametilsilano
TSA	Trypticase Soy Agar
Trp	Triptofano
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
URI	Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai
UI	Unidade Internacional

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

UV	Ultravioleta
v	Volume

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

1 . INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O estudo de *Melochia chamaedrys* faz parte do projeto sobre o estudo químico de plantas medicinais do Rio Grande do Sul, desenvolvido no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Esse estudo visa à obtenção de substâncias com potencial terapêutico que possam ser futuramente usadas como protótipos para sínteses de moléculas de interesse medicinal.

Selecionou-se a raiz de *M. chamaedrys* para um estudo inicial devido ser esta a parte mais usada na medicina popular e também, devido à inexistência de investigação fitoquímica, não somente da raiz, mas também de todas partes da espécie. Um outro fato interessante que despertou o nosso interesse por esse estudo e que está dentro desse contexto é que em algumas circunstâncias, esta espécie é usada em substituição à espécie *Waltheria douradinha*, Sterculiaceae, a qual já vem sendo estudada pelo nosso grupo há pelo menos uns dez anos, o que nos leva, ao mesmo tempo, a fazer um estudo comparativo entre as duas espécies.

O presente trabalho descreve a extração, o isolamento, a caracterização de dois novos compostos (chamaedrona e chamaedrina) e a identificação de mais oito compostos conhecidos (ácido parasórbico, adoutina X, antidesmona, (-)-epicatequina, propacina, scutianina B e C, waltheriona A) da raiz de *Melochia chamaedrys.* Além disso, serão discutidos os resultados dos ensaios microbiológicos realizados com algumas dessas substâncias.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo fitoquímico da raiz da espécie *Melochia chamaedrys* St. Hil. e como objetivos específicos à realização:

a) Da extração, separação e purificação de constituintes químicos da raiz da planta selecionada;

b) Da determinação estrutural dos metabólitos isolados, utilizando-se de técnicas de análises, tais como: espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C unidimensional e bidimensionais (NOESY, COSY ^{1}H-^{1}H, HMQC e HMQC), além de comparação com dados da literatura;

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

c) Da determinação da estereoquímica dos centros quirais da estrutura dos alcalóides do tipo quinolinonas, através do estudo de difração de raios-X e reação de Horeau;

d) Da determinação de toxicidade das frações de *Melochia chamaedrys* através do teste de letalidade por *Artemia salina;*

e) Dos ensaios para determinar a atividade antimicrobiana, através da técnica de bioautografia dos extratos, frações e de algumas substâncias isoladas em suas formas puras.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. STERCULIACEAE

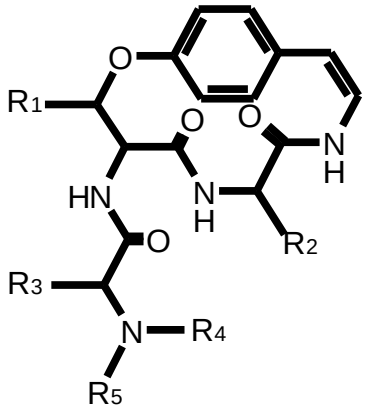
A família Sterculiaceae está incluída na ordem Malvales, e compreende cerca de 70 gêneros de distribuição pantropical, especialmente. São plantas herbáceas, arbustivas ou arbóreas, com folhas dispostas alternadamente, com estípulas. No Brasil são exemplos freqüentes as espécies do gênero Waltheria, planta baixa dos campos e dos cerrados; Helicteres, o popular sacarolha dos cerrados com seus frutos muitos característicos. Theobroma, valioso cacaueiro, cacau, extensamente cultivado no sul da Bahia; outra espécie, deste gênero produz na região amazônica o popular cupuaçu, fruto utilizado em sorvetes, bem como o conhecido cupuaí. Byttneria, com suas folhas sagitadas é comum nos cerrados. Sterculia, chichá do Nordeste, cultivado por seus frutos característicos vermelhos com carpelos bem afastados; a este mesmo gênero pertence o conhecido tacacazeiro da Amazônia; desta mesma região e do Nordeste é a árvore chamada mutamba (Guazuma). Brachychiton, originário da Austrália, é cultivado entre nós com o nome de perna-de-moça. Dombeya, pequena árvore, cultivada nos parques e jardins, introduzida entre nós, tem características inflorescências brancas ou rosadas, de forma globóide, pêndulas. Cola é um gênero de espécies africanas com propriedades medicinais. Das representantes brasileiras as mais significativas, do ponto de vista medicinal, são as espécies *Waltheria communis* e *W. douradinha*, que são conhecidas popularmente como douradinha e douradinha do campo. Estas plantas têm sido utilizadas no tratamento de infecções e como analgésico.[1]

Desse gênero, existem poucas espécies, sendo que o estudo químico é bastante restrito; podendo-se citar apenas os alcalóides ciclopeptídicos do tipo quinolinonas isolados de *Waltheria americana*[2] e *W. douradinha*.[3,4]

Espécies pertencentes às famílias Sterculiaceae e Rhamnaceae têm despertado o interesse de pesquisadores, em várias partes do mundo, não só pela utilização de suas espécies na medicina popular, mas também por apresentarem como constituintes principais, alcalóides ciclopeptídicos.[5] Esses compostos são bases mono ou di-metiladas, constituídas por unidades de aminoácidos unidos entre si, através de ligações amídicas. Em geral, contém uma unidade não aminoácida

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

formada por um grupo estirilamina ou um derivado como está representado no esquema 1.



R_1 = Leu; Phe; Pro
R_2 , R_3 = Leu; Ile; Pro; Phe; Trp
R_4 , R_5 = H; Me

Esquema 1. Estrutural geral de representação de alcalóides ciclopeptídicos

Devido às diferentes ações farmacológicas associadas a muitos desses alcalóides, incluindo atividades hipotensivas, antidiarréicas e antidesintérias[5], antifúngicas e antibióticas,[6] tais resultados têm incentivado o crescente número de investigações acerca desses compostos, como isolamentos, determinação estrutural e síntese.[5,7] Alguns exemplos desta classe de compostos encontram-se presentes no gênero Melochia e espécies de gênero similares apresentado em seguida.

Uma outra classe de alcalóides de grande importância medicinal encontrada na família Sterculiaceae é a das quinolinonas. As quinolinonas, hoje comercializadas, são todas de origem sintéticas.[8] São agentes antibacterianos de grande interesse na indústria farmacêutica devido à indicação no trato urinário.[8] As quinolinonas naturais foram obtidas, pela primeira vez, a partir de microrganismo, mas durante as últimas décadas, quinolinonas contendo uma cadeia alquila na posição 2 com C_7-C_{15} foram isoladas de numerosas espécies de Rutaceas. [9]

2.1.1. MELOCHIA

Melochia é um gênero pantropical com 65 espécies, predominante nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina.[10] As plantas deste gênero são usadas para tratar inflamações na bexiga,[11] são tumorogênicas[12] e usadas para curar inchaço abdominal, disenteria[8] e mordidas de cobra.[9]

Do ponto de vista químico, as espécies *Melochia corcorifolia*[15,16] e *Melochia tomentosa*[17-21] são as mais estudadas, sendo estas consideradas ricas em

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

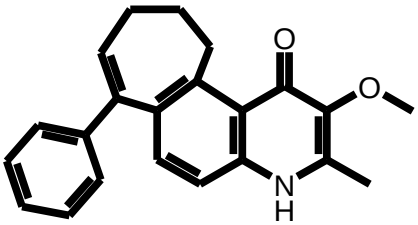
alcalóides, particularmente, ciclopeptídicos, quinolinonas e isatinas.[10-16] Neste trabalho daremos mais ênfase às classes de alcalóides ciclopeptídicos e quinolinonas, por estas se apresentarem com maior freqüência na espécie estudada.

2.1.1.1. *Melochia chamaedrys* St. Hil.

Melochia chamaedrys St. Hil. é uma planta conhecida localmente como "douradinha", é encontrada na América do sul, mais precisamente, no sul do Brasil, Argentina e Uruguai. No Estado do Rio Grande do Sul esta espécie é usada pela população local no tratamento de várias doenças, inclusive, nos casos de infecção urinária, câncer e hipertensão. Do ponto de vista botânico, esta espécie apresenta subarbusto; caules de raízes numerosas, prostrados, cilíndricos, tênues, pubérelos, meio hirsutos, vilosos superiormente; com folhas pecioladas, orbiculadas ou largo ovadas, obtusas, com base subcordada, com margens crenado-serradas, em cima hirsutas, em baixo pilosas, ciliadas; inflorescência axilar, umbela, penduculada; cálice campanulado amplo, com lacínios lanceolados, hirsutos, ciliados; pétalas obovadas, levemente abrupto ungüiculado; tubo estamenalde forma longistila, indivisa, duas vezes mais curta que as pétalas; pistilo um terço mais curto que as pétalas.[1]

2.2. Estudos químicos realizados com o gênero *Melochia* e similares

Em 1975, Kapadia e colaboradores descreveram o isolamento do alcalóide melochinona (1) a partir do extrato benzênico da raiz de *Melochia tomentosa*, planta esta, usada pelos povos nativos de Curaçao, Venezuela no tratamento de câncer de esôfago.[15]

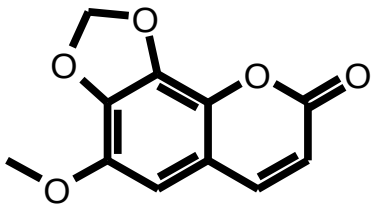


1

Também da raiz desta mesma espécie, Shukla e colaboradores em 1978 isolaram o composto 6-metoxi-7,8-metilenodioxicumarina (2). Segundo eles, esta

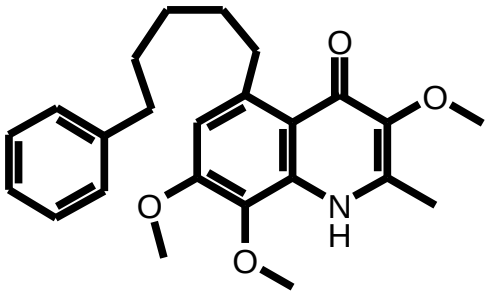
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

publicação constitui a comunicação do primeiro relato de ocorrência de cumarina na família Sterculiaceae.[14]



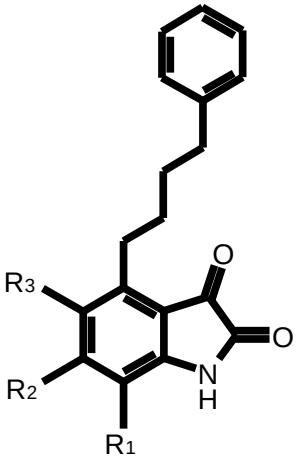
2

Neste mesmo ano, Kapadia, Shukla e Basak isolaram de *M. tomentosa* o alcalóide melovinona (3), um composto de cadeia aberta análogo a melochinona (1).[16]



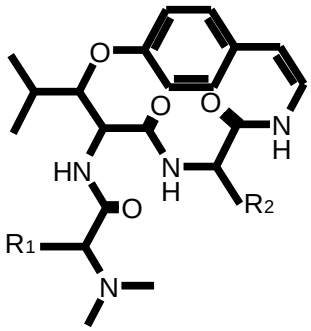
3

Em 1980, esse mesmo grupo de pesquisadores juntamente com o grupo de Sokoloski e Fales detalha o isolamento e caracterização das isatinas, melosatinas A, B e C (4, 5 e 6 respectivamente). Neste mesmo artigo são citados os alcalóides ciclopeptídicos melonovinas A (7) e B (8) e scutianina B (9) isolados em trabalhos anteriores da mesma planta.[13]



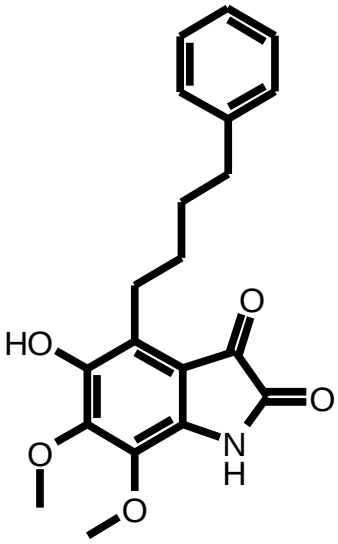
	R_1	R_2	R_3
4	OMe	OMe	H
5	H	H	H
6	OMe	H	H

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



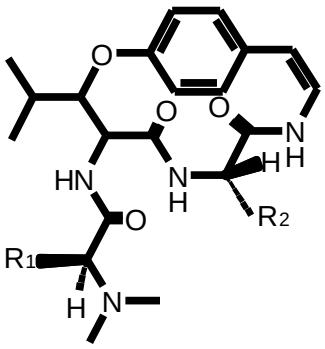
	R_1	R_2
7	$CH(CH_3)_2$	$CH_2CH(CH_3)_2$
8	$CH(CH_3)_2$	$CH_2C_6H_4OH$
9	$CH_2C_6H_5$	$CH_2C_6H_5$

Posteriormente a melosatina D (10) foi isolada por Kapadia e Shukla da raiz de *M. tomentosa.*[17]

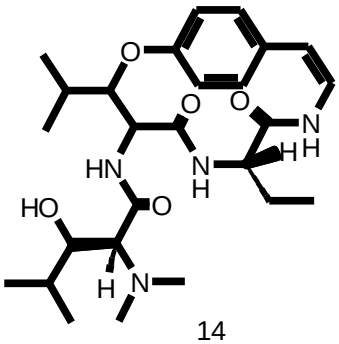


10

Bhakuni e colaboradores, em 1987, isolaram das partes aéreas de *Melochia chorcorifolia* quatro alcalóides ciclopeptídicos: franganina (11), frangufolina (12), adoutinaY' (13) e melofolina (14). Sendo os três primeiros isolados em trabalhos anteriores.[12]



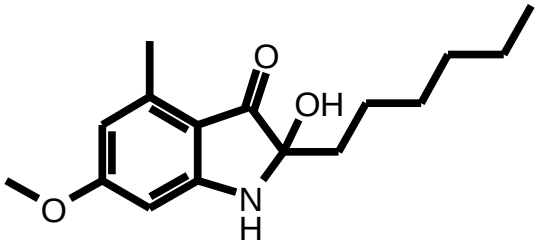
	R_1	R_2
11	$CH_2CH(CH_3)_2$	$CH_2CH(CH_3)_2$
12	$CH_2CH(CH_3)_2$	$CH_2C_6H_5$
13	$CH(Me)CH_2CH_3$	$CH_2C_6H_5$



14

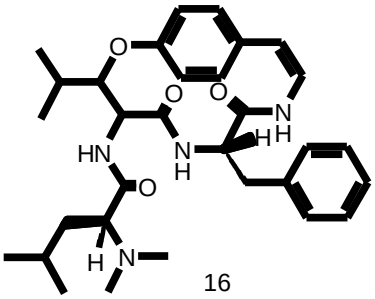
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Em contínuo estudo com a espécie *M. chorcorifolia,* Bhakuni e colaboradores, em 1991, isolam o Alcalóide pseudooxindólico, melochicorina (15). O tratamento deste metabólito com anidrido acético e piridina não resultou na formação do acetato, confirmando, desta forma, a presença natural do grupo hidroxila terciário nesta molécula.[11]

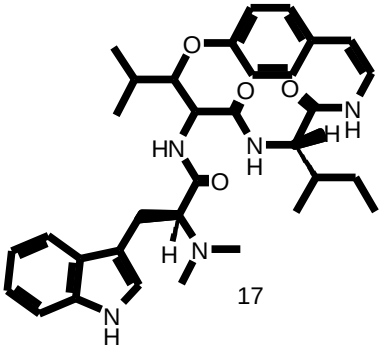


15

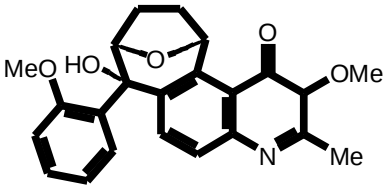
Há dez anos, o grupo de pesquisas do Laboratório de Produtos Naturais da UFSM conduzido por Morel e colaboradores vem estudando a espécie *Waltheria douradinha* (Sterculiaceae), da qual foi possível realizar o isolamento dos seguintes alcalóides ciclopeptídicos: adoutina Y' (13), scutianina B (9), waltherina A (16) e B (17).[3] Recentemente, um novo alcalóide do tipo quinolinona, waltheriona A (18) foi isolado desta espécie.[4] O nosso interesse em colocar esta espécie nesta revisão deve-se ao fato de que a espécie *Melochia chamaedrys,* em certas localidades do Rio Grande do Sul, é usada em sua substituição; pois segundo as pessoas que a utilizam, particularmente aquelas do setor rural, afirmam que ambas têm os mesmos efeitos, do ponto de vista medicinal.



16



17



18

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentos Utilizados

3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN uni -[1D: ^{1}H, ^{13}C] e os experimentos de efeito nuclear Overhauser (NOESY), (^{1}H x ^{1}H-COSY), DEPT 135°, heteronuclear de carbono e hidrogênio (HMQC) e (HMBC) foram obtidos em aparelho Bruker DPX 400, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria, operando a 400,13 MHz para ^{1}H e a 100 MHz para ^{13}C, usando clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) e acetona-d_6, como solventes e TMS como padrão interno.

Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm), em relação ao TMS como padrão interno (δ = 0,00).

3.1.2. Ponto de Fusão

O ponto de fusão de cada substância isolada, foi determinado em aparelho MQAPF-301 digital da Microquímica, com termômetro não aferido.

3.1.3. Cromatografia Gasosa

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafos a gás Variam 3800 e CP 3800 equipados com detector de ionização de chama (FID), injetor "SPLIT-SPLITLESS', operando com as temperaturas do injetor e do detector a 220 °C e 280 °C respectivamente. O gás de arraste utilizado foi H_2 a 50 Kpa de pressão (1mL/min.). Foram empregadas colunas capilares de sílica fundida (CCSF) com· 5 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro, com fases estacionárias quirais ·2,6-Me-3-Pe-··CD 50% e Lipodex-E 50%".

3.1.4. Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para obtenção dos espectros de massa de alta resolução, foi utilizado o aparelho Bruker BioApex 70 eV Spectromether, do Institut of Biochemistry, Halle-Saale, Alemanha.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.1.5. Espectrometria de Massas de Baixa Resolução

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás marca HP, modelo 6890, do Instituto de Química da UNICAMP.

3.1.6. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de I.V foi registrado em partilhas de KBr num espectrômetro Perkin-Elmer, modelo LR649122 do Departamento de Química da URI.

3.1.7. Polarímetro

A rotação óptica realizada com as amostras obtidas neste trabalho foi analisada em Polarímetro Perkin Elmer 341, número em série 9016, dos Institutos de Química da UNICAMP e UFRGS.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Cromatografia, solventes e reveladores

Nas separações cromatográficas em colunas (CC) usou-se sílica gel 60 da Merck, com granulação equivalente a 70 – 230 mesh. Cromatografias em placas preparativas foram realizadas usando-se sílica gel 60 GF_{254} (Merck).

As pré-análises cromatográficas foram efetuadas em placas de cromatofolhas A1 de sílica gel 60 GF_{254}.

As placas cromatográficas foram reveladas com luz UV (λ_{max} 254 e 366 nm) (Spectroline), reativo de Dragendorff, solução de ácido sulfúrico e álcool etílico (10:90) seguido de aquecimento e por reagente de Erlich específico por grupos indólicos.

Os solventes e reagentes utilizados foram produtos analiticamente puros Merck, Vetec e Reagem. Em certos casos, aplicou-se técnica específica de purificação de solventes, obtendo-se, dessa forma, produtos com maior grau de pureza.[22]

A relação a seguir, apresenta os principais sistemas de solventes utilizados nas técnicas cromatográficas.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Tabela 1. Principais sistemas de solventes utilizados nas técnicas cromatográficas.

1.Clorofórmio (100%)	9. $CHCl_3$, MeOH (93 : 7,0)	17. $CHCl_3$, MeOH (50 : 50)
2. $CHCl_3$, MeOH (99,5 : 0,5)	10. $CHCl_3$, MeOH (92 : 8,0)	18. Tolueno, AcOEt (95 :5,0)
3. $CHCl_3$, MeOH (99 : 1,0)	11. $CHCl_3$, MeOH (91 : 9,0)	19. Tolueno, AcOEt (90 :10)
4. $CHCl_3$, MeOH (98 : 2,0)	12. $CHCl_3$, MeOH (90 : 10)	20. Tolueno, AcOEt (85 :15)
5. $CHCl_3$, MeOH (97 : 3,0)	13. $CHCl_3$, MeOH (85 : 15)	23. Tolueno, AcOEt (80 :20)
6. $CHCl_3$, MeOH (96 : 4,0)	14. $CHCl_3$, MeOH (80 : 20)	24. Tolueno, AcOEt (70 :30)
7. $CHCl_3$, MeOH (95 : 5,0)	15. $CHCl_3$, MeOH (70 : 30)	25. Tolueno, AcOEt (50 :50)
8. $CHCl_3$, MeOH (94 : 6,0)	16. $CHCl_3$, MeOH (60 : 40)	26. Hexano, AcOEt (20:80)

3.2.2 Determinação de toxicidade "in vivo" através do Teste de Letalidade por *Artemia salina* (TLAS)

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* (TLAS) foi inicialmente proposto por Michael[23] e desenvolvido por Vanhaecke[24] e Meyer[25]. Tem como base, a habilidade de uma substância em matar larvas de *Artemia salina* criada em laboratório. Este método é considerado uma ferramenta bastante eficiente, rápida, simples e de baixo custo de avaliação preliminar de atividade farmacológica[26]. Também é muito usado na avaliação da toxicidade de substâncias puras[27] e de extratos de plantas, na detecção de toxinas fúngicas, metais pesados e pesticidas[28], além de "screening" teratológicos e ecotoxicológicos[29]. Uma boa correlação tem sido feita com TLAS na detecção de compostos antitumorais[25], anti-Tripanossoma [28] e antimalárico.[30]

O teste é realizado pela eclosão dos ovos da *Artemia salina* em solução salina. Após a eclosão, as larvas são submetidas a uma série de diluições da

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

amostra por um período de 24 h. Determina-se a CL_{50}, concentração letal capaz de matar 50% da população total de animais, pelo método de Probitos[31] ou por métodos de regressão linear. As amostras são consideradas ativas quando o teste de letalidade com *Artemia salina,* TLAS <1000 μg/mL.

Na tabela 5, encontra-se uma média dos resultados da CL_{50}, correspondentes ao ensaio de TLAS realizado em triplicatas com as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila de *Melochia chamaedrys*. O padrão de toxidez utilizado neste ensaio foi o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) que é um agente citotóxico, sal de metal pesado usado para monitorar o desempenho do teste.

3.2.3. Método de Bioautografia

A bioautografia é um método quantitativo aplicado à detecção de compostos antimicrobianos em misturas de composição variada e mesmo desconhecida. A amostra a ser testada é aplicada em placa de sílica gel, alumina, papel ou qualquer outro suporte adequado à cromatografia em camada delgada (CCD). A separação dos componentes da amostra aplicada com uma fase móvel de escolha pode ser realizada se o interesse for à verificação dos princípios ativos dentro de uma mistura complexa. O suporte contendo a amostra é então depositado em uma placa de petri e sobre esta é aplicado uma fina camada de meio de cultura, proporcionando o cultivo de um microrganismo sobre os componentes da amostra. A presença de um composto antimicrobiano é visualizada pela formação de zonas de inibição no crescimento do microrganismo cultivado. Esta visualização só é possível com a presença de reveladores químicos. Esses reveladores são corantes indicadores de microrganismos vivos. Os sais de tetrazólio como TTC (cloreto de 2, 3, 5-trifenil-1H-tetrazólio) e MTT (brometo de 4,5-dimetil-2H-tetrazólio) são amplamente utilizados para este fim, pois formam espécies altamente coloridas, conhecidas como formazanas, ao serem reduzidos por componentes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria,[32] tornando fácil à leitura dos resultados.

Os ensaios de determinação de atividade antimicrobiana pelo método de Bioautografia foram realizados de acordo com Hamburguer e Hostettmann[33,34].

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.2.3.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana "in vitro"

Os ensaios antimicrobianos do extrato metanólico, das frações e substâncias isoladas de *Melochia chamaedrys* foram realizados, utilizando cepas padrão (tabela 3) de ATCC (American Type Culture Colletion) e uma cepa isolada de pacientes (SM-26), cedida pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Farmácia da UFSM. Como referência, foram utilizados os antibióticos cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos nas concentrações de 0,5 a 0,7 µg para cloranfenicol e 2,3 a 4,0 µg para nistatina, como mostra a tabela 2, página 13.

Tabela 2. Cepas utilizadas nos ensaios de bioautografia

MICRORGANISMOS		ANTIBIÓTICOS
Bactérias Gram Positivas		Cloranfenicol (µg)
Staphylococcus aureus	ATCC 6538p	0,7
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	0,7
Bacillus subtillis	ATCC 6633	0,7
Bactérias Gram negativas		Cloranfenicol (µg)
Salmonella setubal	ATCC 19796	0,7
Escherichia coli	ATCC 25792	0,5
Klebsiella pneumoniae	ATCC 10031	0,5
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	0,6
Fungos (Leveduras)		Nistatina (µg)
Candida albicans	ATCC 10231	2,3
Sacharomyces cerevisae	ATCC 2601	3,3
Candida dubliniensis	SM-26	4,0
Cryptococcus neoformans	ATCC 28952	2,4

3.2.4. Método de Horeau

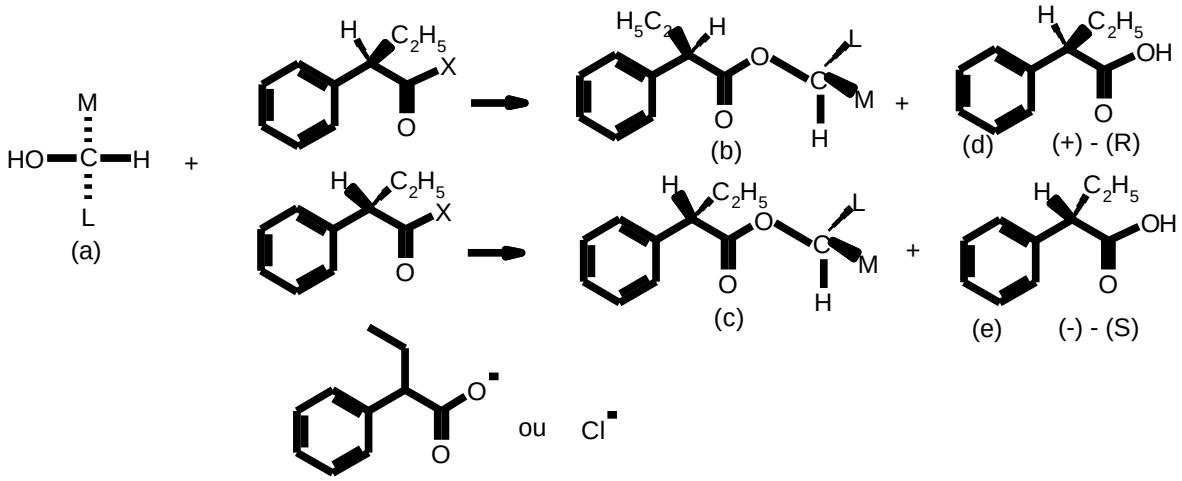
3.2.4.1. Príncipio do Método

Em 1961, Horeau[35] enunciou um método indireto de determinação de estereoquímica de álcoois secundários. Este método se baseia na reação de um álcool secundário opticamente ativo com um excesso de anidrido ou cloreto de ácido

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

2-fenilbutírico racêmico, em piridina. Esta reação se procede através de resolução cinética parcial formando ésteres diastereoisoméricos em diferentes proporções. De acordo com Horeau, a configuração do álcool pode ser determinada através da medida da rotação óptica do ácido 2-fenilbutírico em excesso na mistura reacional. Para isso, faz-se necessária à remoção completa das impurezas.

No esquema 2, pode-se observar a reação de um álcool secundário genérico puro e de estereoquímica desconhecida (a), cujos substituintes são L (substituinte com maior volume) e M (substituinte de volume médio) que foi submetido a uma reação com um anidrido ou cloreto de ácido 2-fenilbutírico racêmico formando dois ésteres diastereoisoméricos (b e c) e os dois ácidos enantioméricos (d e e), dos ácidos carboxílicos residuais.



Esquema 2. Esquema geral da reação de um álcool secundário e um derivado do ácido 2-fenilbutírico.

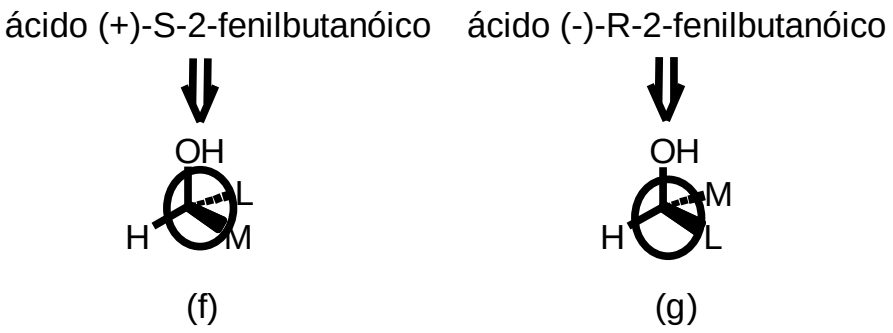
3.2.4.2. Regra de Horeau

Tanto os ésteres diastereoisomérico quanto os enantioméricos do ácido residual se formam em proporções distintas devido ao efeito estérico dos grupos volumosos do álcool e do cloreto ou anidrido (±)-2-fenilbutírico, proporcionando diferentes estados de transições para a reação. Por este motivo, pode-se usar esta reação para se determinar a estereoquímica do álcool, sendo que para isso, compara-se o valor da rotação óptica de um enantiômero puro com o da mistura de enantiômeros (e.e).

Com estes dados, Horeau determinou a estereoquímica de álcoois secundários, aplicando a seguinte regra: se o excesso enantiomérico for de ácido

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

(+)-(S)-2-fenilbutírico, o álcool terá a estrutura (f), e se o excesso for de ácido (-)-(R)-2-fenilbutírico apresentará a estrutura (g), conforme mostra o esquema 3.



Esquema 3. Regra de Horeau

A medida do excesso enantiomérico pode ser feita através de rotação óptica, cromatografia líquida ou gasosa[36]. Podendo ser ainda utilizada a espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons[37] com os ésteres diastereoisoméricos resultantes da reação do álcool ou amina secundária com os derivados dos ácidos 2-fenilbutíricos puros. A comparação entre os espectros destes ésteres permite a determinação da estereoquímica.

3.2.5. *Melochia chamaedrys*

3.2.5.1. Coleta e identificação Botânica

A espécie *Melochia chamaedrys* foi coletada no município de Santana do Livramento – RS em fevereiro e março de 2001. Sua identificação foi realizada pela professora Thaís S. C. Dorow , do Departamento de biologia da UFSM. Uma exsicata correspondente à espécie encontra-se depositada no Herbário Botânico da Universidade Federal de Santa Maria (SMDB) sob o número 9262.

O material vegetal foi selecionado e as raízes, foram secas em estufa de ar circulante com temperatura controlada a 40 °C durante cinco dias. Após a secagem as raízes foram trituradas a fino grão em moinho Wiley.

3.2.5.2. Preparação dos Extratos e Fracionamentos

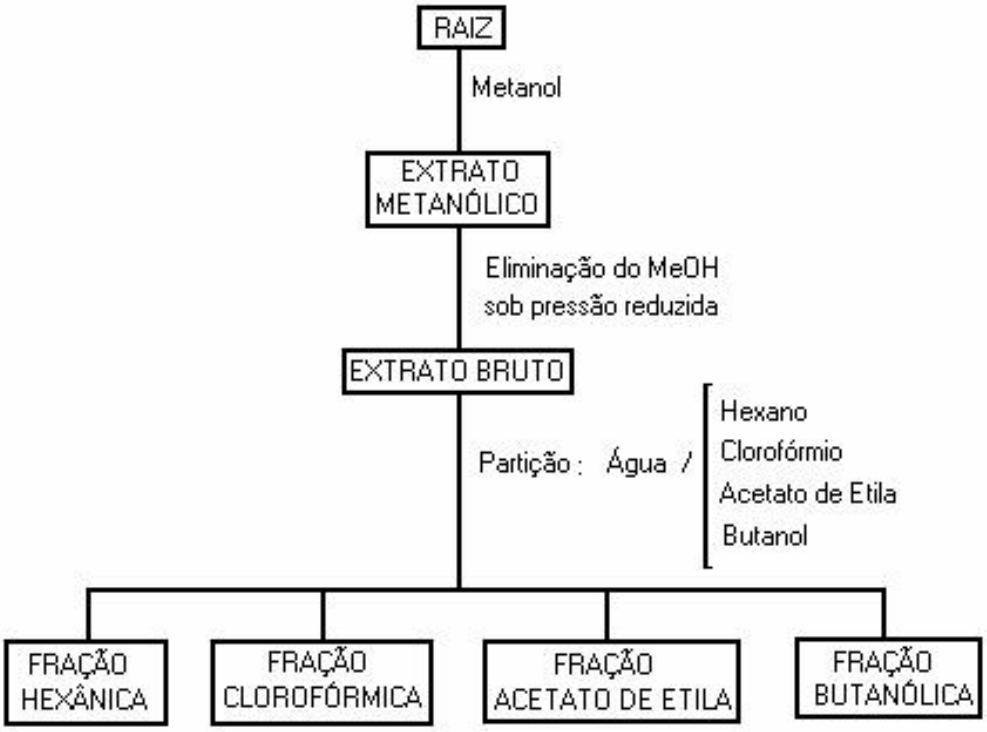
O pó das raízes de *Melochia chamaedrys* (780 g) foi extraído exaustivamente com metanol a quente em aparelho de Soxhlet. O solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo assim, um líquido viscoso de cor

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

avermelhado, denominado extrato bruto (200g), atingindo 25,6% de rendimento em relação ao material seco. Este foi solubilizado em água e extraído sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Após a evaporação dos solventes cada extrato originou respectivamente 10; 4,5; 11 e 35 g de resíduo, conforme mostra a tabela 3. O esquema 4 página 16, mostra o fracionamento ao qual o extrato bruto foi submetido.

Tabela 3. Rendimento de resíduo obtido de cada fração.

FRAÇÃO	PESO (g)	% Relativo ao material seco
HEXÂNICA	10,0	1,28
CLOROFÓRMICA	4,5	0,58
ACETATO DE ETILA	11,0	1,41
BUTANÓLICA	35,0	4,48



Esquema 4. Fracionamento do Extrato Bruto

Antes de se efetuar o estudo químico do extrato bruto metanólico e suas frações: hexânica, clorofórmica e acetato de etila, fez-se os ensaios preliminares de toxicidade sobre *Artemia salina* e microbiológico por bioautografia com o extrato bruto e as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, com a finalidade de detectar em qual das frações pudesse existir compostos com atividade citotóxico e

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

antimicrobiana. Vale ressaltar que, a fração butanólica não foi trabalhada neste aspecto e nem tampouco quanto ao aspecto químico.

3.2.5.3. Bioensaio

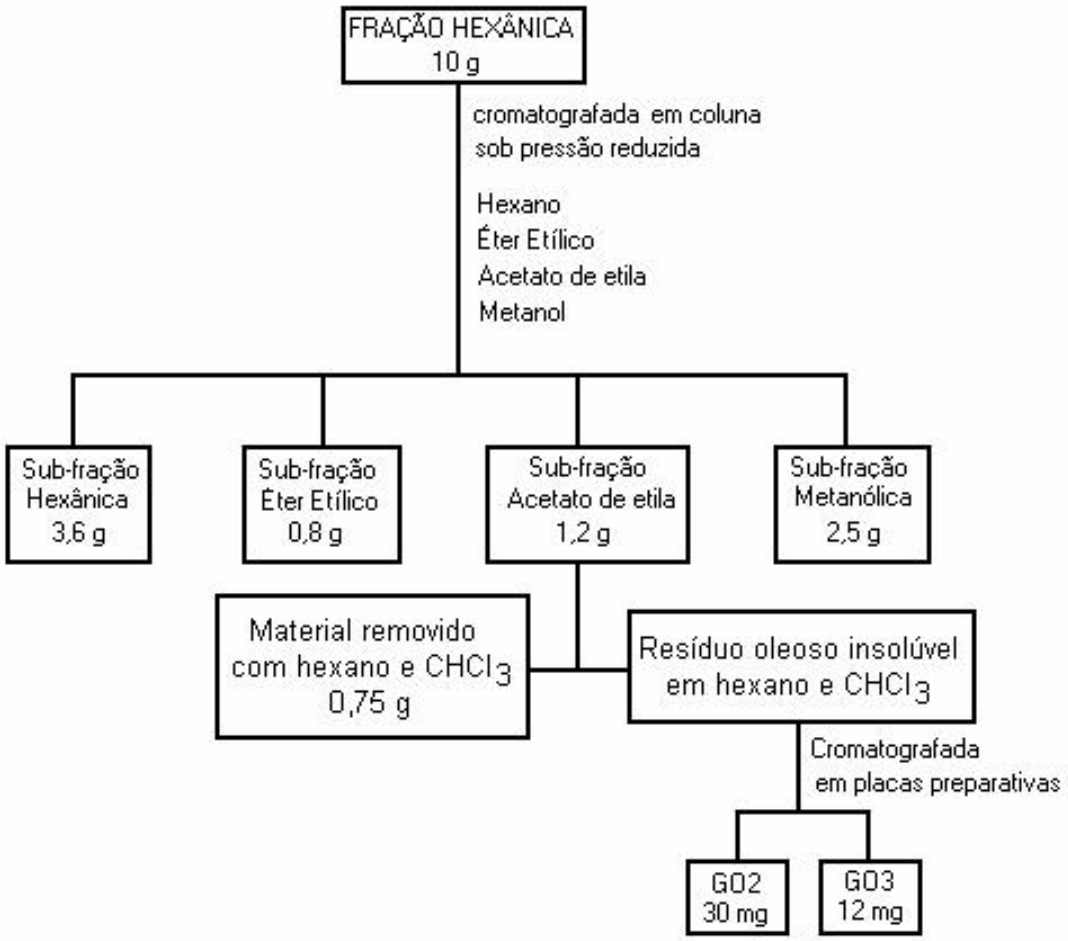
O ensaio de TLAS foi realizado com as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila de *Melochia chamaedrys,* nas concentrações de 10, 100 e 1000 μg/mL. Este foi executado de acordo com a metodologia proposta por Meyer[3], cujos valores correspondentes a CL_{50} encontram-se na tabela 5 página 20.

3.2.5.4. Análise da Fração Hexânica

O resíduo hexânico (10 g) foi fracionado a pressão reduzida em coluna de sílica gel. Neste fracionamento foram obtidos quatro subfrações a partir dos seguintes solventes adicionados em ordem crescente de polaridade: hexano; éter etílico; AcOEt e CH_3OH.

A subfração acetato de etila (1,2 g) foi previamente analisada por cromatografia de camada delgada (CCD), lâmpadas de U_{254nm} e $U_{365nm,}$ reagente de Dragendorff e solução de etanol e ácido sulfúrico (95:05). Detectou-se nesta pré-análise várias manchas, dentre elas, apenas duas mostraram-se positivas perante o reagente de Dragendorff, reagente específico para alcalóides. Esta subfração foi lavada sucessivas vezes com uma mistura de hexano vezes com uma mistura de hexano e clorofórmio (8:2) até a obtenção de um resíduo viscoso. Este resíduo foi cromatografado em placas preparativas utilizando-se como eluente clorofórmio e metanol (95:5). Deste modo foi possível realizar o isolamento dos metabólitos codificados como GO2 (30 mg) e GO3 (12 mg). O esquema 5 página 18, mostra o refracionamento desta fração e obtenção dos dois metabólitos mencionados.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



Esquema 5. Refracionamento da fração hexânica e isolamento dos metabólitos GO2 e GO3.

3.2.5.5. Análise da Fração Clorofórmica

O resíduo clorofórmico (4,5 g) foi fracionado em coluna cromatográfica (c = 80 cm, d = 4 cm), utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh) como suporte sólido e um gradiente de clorofórmio e metanol como sistema eluente.

As frações, de 50 mL, foram coletadas em frascos de vidro e analisadas individualmente em CCD, sendo reunidas conforme suas semelhanças em Rfs, resultando em 10 frações (Tabela 4).

Todas as frações obtidas apresentaram impurezas, sendo estas submetidas a novos processos de purificação, por meio de placas preparativas e recristalizações. Os sistemas de solventes mais utilizados em CCD e placas preparativas foram os mesmos utilizados na cromatografia em coluna. Desta forma foi possível realizar o

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

isolamento de sete substâncias, que foram codificadas pelas seguintes siglas: G-9, G-28, G-63, G-65, G-70, G-77 e G-90.

Tabela 4. Proporções de solventes utilizados e rendimento em cada fração.

FRAÇÕES	SISTEMA ELUENTE	COMPOSTO ISOLADO	PESO (mg)
1	$CHCl_3$	Mistura de compostos	220
2	$CHCl_3$: MeOH (99,5:0,5)	G-9	210
3	$CHCl_3$: MeOH (99,5:0,5)	G-28	35
4	$CHCl_3$: MeOH (99:1)	G-63, G-65	60
5	$CHCl_3$: MeOH (98:2)	G-70, G-77, G-90	160
6	$CHCl_3$: MeOH (95:5)	Mistura de compostos	130
7	$CHCl_3$: MeOH (94:6)	Mistura de compostos	180
8	$CHCl_3$: MeOH (80:20)	Mistura de compostos	350
9	$CHCl_3$: MeOH (70:30)	Mistura de compostos	300
10	$CHCl_3$: MeOH (50:50)	Mistura de compostos	800

3.2.5.6. Análise da Fração Acetato de Etila

Da fração acetato de etila de *Melochia chamaedrys* foi isolado um composto codificado como GA1. Uma parte desta fração (3 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel, com sistema eluente acetato de etila e tolueno em diferentes proporções. As frações obtidas de 20 mL cada, na proporção 75:25 entre as frações 8 e 14 possuíam, predominantemente, a substância GA1. Estas foram reunidas conforme seus Rfs e em seguida concentradas. O resíduo obtido contendo GA1 foi lavado sucessivas vezes com uma mistura de acetato de etila e hexano (90:10). Desta forma esse composto foi obtido na sua forma pura, na quantidade de 78 mg.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.2.5.7. Dados sobre os Metabólitos Isolados das Frações Hexânica, Clorofórmica e Acetato de Etila de *Melochia chamaedrys*.

3.2.5.7.1. Antidesmona (19)

Este alcalóide (30 mg) foi obtido do refracionamento em coluna cromatográfica da fração hexânica e apresentou-se como um óleo viscoso amarelo. Sua estrutura foi caracterizada por análises de RMN ^{1}H e ^{13}C, raios-X e espectrometria de massas.

Rf: 0,46 ($CHCl_3$ – MeOH, 96 : 4)

$[\alpha]_D^{25}$ +27° (*c* 1,5, $CHCl_3$); +24° (*c* 1,5, $CHCl_3$, Lit.[39,40])

HRESIME $[M+H]^+$ a *m/z* 320.22268 EIMS:*m/z* = 319 $[M]^+$, 207 {$[M]^+$- C_8H_{16}}.

Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Tabela 7, p. 37)

3.2.5.7.2. Chamaedrona (20)

Este novo alcalóide (12 mg) foi obtido do refracionamento em coluna cromatográfica da fração hexânica e apresentou-se como um óleo viscoso amarelo, foi caracterizado por análises de RMN ^{1}H e ^{13}C, raios-X e espectrometria de massas.

Rf: 0,28 ($CHCl_3$ – MeOH 96 : 4); $[\alpha]_D^{25}$ - 3.8 (*c* 1,2, $CHCl_3$).

HRESIME ($[M+H]^+$ a 336. 25474 EIMS: m/z =335 $[M]^+$, 223 {$[M]^+$- C_8H_{16}}.

Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Tabela 8, p. 54)

3.2.5.7.3. Ácido Parasórbico (25)

Esta substância (210 mg) de aspecto oleoso foi isolada da fração clorofórmica, sua estrutura foi confirmada através de análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C e de dados da literatura.[42]

Rf.: 0,55 ($CHCl_3$ – MeOH 99,5 : 0,5); $[\alpha]_D^{25}$ +170° *c* 5 em $CHCl_3$; +197° (*c* 6,3 em $CHCl_3$, Lit.[42])

RMN ^{1}H : δ 6,67 (1H, *ddd*, *J* = 10, 5, 3 Hz), 5,69 (1H,*dt*, *J* =10 e 1,5 Hz), 4,29 (1H, *dq*, *J* =9 e 6 Hz), (2 superposição 1H, *ddd*, *J* = 9, 3, - 14 e *J* = 6, 5, -14 Hz), 1,15 (3H, *d*, *J* = 6 Hz), RMN ^{13}C : δ 20,20 (6), 30,44 (4), 74,09 (5), 120 (2), 145,07 (3), 164 (1).

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.2.5.7.4. Propacina (26)

Esta substância (35 mg) foi isolada da fração clorofórmica e apresentou-se como um sólido branco amorfo, sua estrutura foi confirmada através de análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C e de dados da literatura.[46,47]

Rf: 0,44 ($CHCl_3$ – MeOH 98 : 2)

P.f.: 246 – 248°C (Lit.[46,47] 226 – 228, 238-241°C)

EIMS: m/z =369,1 $[M]^+$, 205,9 (100%); 164 {$[M]^+$- $C_{10}H_6O_5$}.

Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Tabela 10, p. 86)

3.2.5.7.5. Scutianina B (27)

Este alcalóide (35 mg) foi obtido da fração clorofórmica e apresentou-se como um sólido branco cristalino. Teve sua estrutura confirmada por análise de RMN de ^{1}H e ^{13}C, comparação em CCD com amostra autêntica e de dados da literatura.[53]

Rf: 0,5 ($CHCl_3$ – MeOH 98 : 1)

P.f.: 248 – 250°C (Lit.[50] 247 – 249 °C; $[\alpha]_D$ = -296° em $CHCl_3$).

RMN ^{1}H : δ 0,94 (3H, d, CH_3-18); 1,23 (3H, d, CH_3-19); 2,15 (6H, s, $N(CH_3)_2$); 2,73-3,31 (2H, m, H-30); (1H, m, H-7); 4,4 (1H, dd, H-4); 4,9 (1H, dd, H-3); 6,9-7,3 (14 H, aromático).

RMN ^{13}C: δ 155,9; 81,5; 54,8; 172,6; 53,9; 166,6; 125,5; 116,3; 132,2; 131,6; 123,1; 122,6;130,1; 29,1; 20,3; 15,1; 171,5; 69,1; 30,8; 140,1; 126,2; 129,0; 127,9, 126,7; 41,7; 29,6; 131,7; 128,5; 126,7; 128,3.

3.2.5.7.6. Chamaedrina (27)

Este novo alcalóide (30 mg) foi isolado da fração clorofórmica após várias separações em CCD preparativa. Apresentou-se como um sólido branco amorfo e teve as seguintes características físicas:

P.f.: 222-223 °C; Rf: 0,45 ($CHCl_3$ – MeOH 98 : 1); $[\alpha]_D$ = -122,5° c, 1,2; $CHCl_3$), HRESIME ($[M+H]^+$ a: m/z = 608,3231313 (calc. para $C_{36}H_{41}N_5O_4$} EIMS m/z 148 (100%), 130 (C_9H_8N), 159 ($C_{10}H_{11}N_2$), 347 ($C_{20}H_{17}N_3O_3$); IR v_{max} cm^{-1} 3437 – 3272 (NH), 1640 – 1545 (C=O). Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Tabela 10, p. 86)

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.2.5.7.7. Adoutina X (29)

Este composto (120 mg) apresentou-se como um sólido branco amorfo de Pf.: 283 - 284 °C (Lit.[56-58] Pf.: 277- 279, 279 – 280,5 °C; $[\alpha]_D$ = -316° e –370° em $CHCl_3$) e Rf.: 0,5 ($CHCl_3$ – MeOH, 98 : 2).

RMN de ^{13}C δ 156,18 (1); 81,79 (3); 59,36 (4); 172,11 (5); 55,37 (7); 167,07 (8); 125,80 (10); 116,63 (11); 131,98 (12); 130,12 (13); 122,66 (14); 123,09 (15); 131,79 (16); 19,04 (17); 15,14 (18); 11,70 (19); 173,87 (21); 29,70 (22); 34,88 (23); 26,25 (24); 21,83 (25/33); 23,05 (26); 41,94 (28/29); 35,29 (30); 15,94 (31); 20,36 (32).

3.2.5.7.8. Scutianina C (30)

Este metabólito (12 mg) de Pf.: 272 – 273 °C foi isolado da fração clorofórmica em forma de um sólido branco após cromatografia em placa preparativa.. Sua identificação foi possibilitada por meio de comparação em CCD com amostras autênticas e dados da literatura[60] (Pf.: 267 °C).

3.2.5.7.9. Waltheriona A (18)

Esta substância (10 mg) foi obtida da fração clorofórmica na forma de um sólido branco após várias separações em CCD preparativa. Forneceu Pf.: 207 – 208 e Rf.: 0,4 (CHCl3 e MeOH, 98:2). Sua estrutura foi confirmada por comparação em CCD com amostra autêntica e dados da literatura[4] descritos abaixo.

P.f.: 206,0 – 207,5°C

$[\alpha]_D$ = -25,5° c, 0,04 em $CHCl_3$; IR v_{max} cm^{-1} 3400 – 3200 (NH), 1685 – 1635 (C=O); HRESIME: *m/z* = 393,15777 (calc. para $C_{23}H_{23}NO_3$ 393,15762).

RMN ^1H δ 11,27 (1), 7,48 *d J* = 8,2 (7), 7,41 *d*, *J* = 8,2 Hz (8), 4,61 *dd*, *J* = 8,0 e 1,7 Hz (10), 1,90/2,13 *m* (11), 1,82/1,*92 m* (12), 6,87 *dd J* = 8,0 e 15 Hz (13), 6,94 d *J* = 8,0 e 1,2 Hz (3'), 7,20 *ddd J* = 8,0; 7,3 e 15 Hz (4'), 6,70 *ddd J* = 7,6; 7,3 e 1,5 Hz (5'), 6,29 *dd J* = 7,6 e 1,5 (6'), 2,41 *s* (2C-CH_3), 3,97 s (3C-OMe), 3,77 *s* (2'C-OMe).

RMN ^{13}C δ 141,6 (2); 139,3 (3); 174,4 (4); 119,8 (4a); 141,7 (5); 130,5 (6); 131,8 (7); 117,4 (8); 141,8 (8a); 77,2 (9); 80,16 (10); 21,6 (11); 33,7 (12); 75,6 (13); 134,7 (1'); 156,4 (2'); 110,8 (3'); 128,5 (4'); 120,6 (5'); 131,1 (6'); 14,3 (2C-CH_3); 55,4 (3C-OMe); 59,2 (2'C-OMe).

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

3.2.5.7.10. (-)- Epicatequina (31)

Sólido obtido da fração acetato de etila de; P.f = 235 –236 °C; forma-se em cristais branco-avermelhado em acetona, quando esta é evaporada; na presença de solução de cloreto férrico, apresenta mancha de coloração azul escuro. Os dados obtidos para esta substância neste trabalho, descritos abaixo; foram confirmados com os dados da literatura.[61]

$[\alpha]_D^{25}$ - 66° (c, 0,075; CH_3COCH_3); Rf = 0,55 (tolueno e AcOET, 70 : 30).

RMN ^{1}H δ 2,73 (1H, *J* = 3,2 e *J* = 16 Hz); 2,86 (1H, *J* = 4,4 e *J* = 16 Hz); 4,20 (1H, *s*); 6,77 (1H, *d*, $J_{5',6'}$ = 8,4 Hz); 6,83 (1H, *d*, $J_{6',5'}$ = 8,4 Hz e $J_{6',2'}$ = 1,2 Hz); 7,00 (1H, $J_{2',6',}$ = 1,2 Hz).

RMN ^{13}C δ 79,32 (2); 60,53 (3); 20,89 (4); 99,76 (4a); 157,06 (5); 95,68 (6); 157,44 (7); 157,49 (8), 171,00 (8a); 132,17 (1'); 115,19 (2'); 145,17 (3'); 145,19 (4'); 115,46 (5'); 119,32 (6').

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste item serão discutidos os mecanismos de caracterização dos metabólitos isolados de *Melochia chamaedrys*, e serão apresentados os resultados referentes as suas respectivas atividades biológicas.

4.1. BIOENSAIO

Observa-se na tabela 5 que todas as frações testadas apresentam uma média toxicidade, visto que, amostras ativas de alta toxicidade são aquelas que apresentam $CL_{50} < 50$ µg mL^{-1}, média toxicidade de $CL_{50} < 500$ µg mL^{-1} e de baixa toxicidade
$CL_{50} < 1000$ µg mL^{-1}.

Tabela 5. Concentração das amostras requerida para atingir 50% de letalidade frente a *Artemia salina.*

AMOSTRAS	CL_{50} (µg mL^{-1})
Fração Hexânica	260
Fração Clorofórmica	164,3
Fração Acetato de Etila	162,3
$K_2Cr_2O_7$	19,4

4.2. Estudo Fitoquímico da Raiz de *Melochia chamaedrys*

O estudo fitoquímico, realizado com o extrato metanólico da raiz de *Melochia chamaedrys*, permitiu o isolamento e a determinação estrutural de dois alcalóides inéditos: um do tipo quinolona e um ciclopeptídico, os quais foram denominados de chamaedrona (20) e chamaedrina (28). Além dessas substâncias, foram isolados o ácido parasórbico (25), adoutina X (29), antidesmona (19), (-)-epicatequina (31), scutianina B (9) e C (30) e waltheriona A (18) ; substâncias isoladas anteriormente em outras espécies vegetais com registros na literatura [4,39,40,37-41,44,45,46,50,52,53,57,58].

Na tabela 6 a seguir, encontram-se listadas todas essas substâncias na ordem de obtenção e apresentação.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

A elucidação estrutural dessas substâncias foi efetuada através de métodos físicos usuais como, EM, RMN de ^{1}H e ^{13}C e experimentos uni- e bidimensionais como COSY, NOESY, DEPT 135°, HMQC e HMBC, além de métodos químicos como, modificação estrutural. Este último, com a finalidade de confirmar ou tirar algumas dúvidas em relação à conectividade de alguns substituintes na estrutura. Também, com algumas dessas substâncias, realizou-se ensaios de frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos por meio da técnica de bioautografia.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Tabela 6. Estruturas dos metabólitos isolados e modificados de *Melochia chamaedrys*.

Compostos	Código	Fórmula Molecular	$[\alpha]_D$	Ponto de Fusão	Literatura
Antidesmona 19	GO2	$C_{19}H_{29}NO_3$	*+27,17° +24	óleo	35
Chamaedrona 20	GO3	$C_{20}H_{33}NO_3$	*-3,75°	óleo	
21	GOH	$C_{19}H_{31}NO_3$	*+41°	61º	
22	GOH'	$C_{19}H_{31}NO_3$		óleo	
23	GOMe	$C_{20}H_{33}NO_3$		óleo	
24	GOMe'	$C_{20}H_{33}NO_3$		óleo	
Ácido Parasórbico 25	G-9	$C_6H_8O_2$	+181° *+170°	óleo	42
Propacina 26	G-28	$C_{20}H_{18}O_7$		226-228 °C 238-241 °C *246-248 °C	46 47

*Valores encontrados neste trabalho.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Continuação da Tabela 6.

Compostos	Código	Fórmula Molecular	$[\alpha]_D$	Ponto de Fusão	Literatura
Acetato da Propacina 27	G-28Ac	$C_{22}H_{20}O_8$		202-205 °C 203-204 °C *199-201 °C	46 47
Scutianina B 9	G-63	$C_{34}H_{40}N_4O_4$	-296°	248-250 °C *247-249 °C	4 13 53
Chamaedrina 28	G-65	$C_{36}H_{41}N_5O_4$	-122,5°	222-223 °C	
Adoutina X 29	G-70	$C_{28}H_{44}N_4O_4$	-316° -370°	277-279 °C 279-280,5 °C *283-284 °C	56 57 58
Scutianina C 30	G-77	$C_{31}H_{42}N_4O_4$	-231°	267 °C *272-273 °C	60
18	G-90	$C_{24}H_{25}NO_6$	-25,5°	206-207 °C *207-208 °C	4
(-) - Epicatequina 31	GA-1	$C_{15}H_{14}O_6$	-12° -54° *- 66°	240 °C *235-236 °C	61 62

*Valores encontrados neste trabalho.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

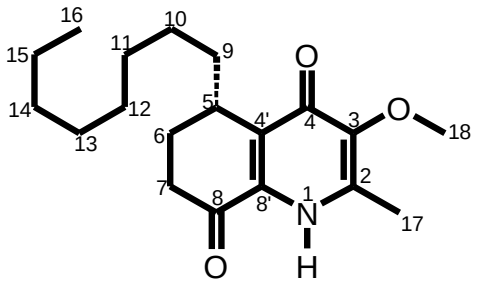
4.2.1 Caracterização dos compostos GO2 e GO3 obtidos na fração hexânica de *M. chamaedrys*.

4.2.1.1. GO2

Este composto foi isolado da fração hexânica (Esquema 5, p. 18), apresentando-se, depois de purificado, como um óleo de coloração amarela, que reagiu positivamente frente ao reagente de Dragendorff, sugerindo a presença de nitrogênio básico na sua estrutura molecular.

A análise de rotação ótica deste metabólito apresentou um $[\alpha]_D$ = +27,17° (c = 1,5, $CHCl_3$), mostrando tratar-se de uma molécula quiral.

A aplicação de métodos físicos de análises como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e experimentos uni-e bidimensionais, homo e heteronucleares, assim como a comparação de dados espectrais de outros alcalóides do tipo quinolonas 6,7 contribuiu nas atribuições dos sinais e na sugestão da possível estrutura 19 para este metabólito.



19

4.2.1.1.1. Espectro de Massas

O espectro de massas de baixa resolução (EIMS) de GO2 apresentou um pico à m/z 319 (M^+), referente ao íon molecular, ao passo que o espectro de massas de alta resolução (HRESIME) apresentou um íon "*quase molecular*" $[M+H]^+$ = 320,22270. A partir desses dados, juntamente com a análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C, foi sugerida a fórmula molecular $C_{19}H_{29}NO_3$ para GO2.

No espectro de massas de baixa resolução, mostrado na Figura 1, é possível ver as principais fragmentações que evidenciam a estrutura proposta. O pico base, por exemplo, a *m/z* 207 corresponde a uma quebra da cadeia lateral ($M-C_8H_{15}$) da

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

estrutura, e ainda pode ser observada na figura 2 a sucessiva fragmentação desta cadeia pelos respectivos íons, a *m/z* 220 (M-C_7H_{15}); 234 (M-C_6H_{13}); 248 (M-C_5H_{11}); 263 (M-C_4H9); 276 (M-C_3H_7); 291 (M-C_2H_5) e 304 (M-CH_2). Estas fragmentações são decorrentes do mecanismo de clivagem denominado clivagem α. Este tipo de clivagem leva a formação de um carbocátion e um radical livre. A abundância relativa desses fragmentos no espectro de massa está associada à capacidade dos fragmentos formados estabilizarem o radical livre ou a carga positiva formada. [38]

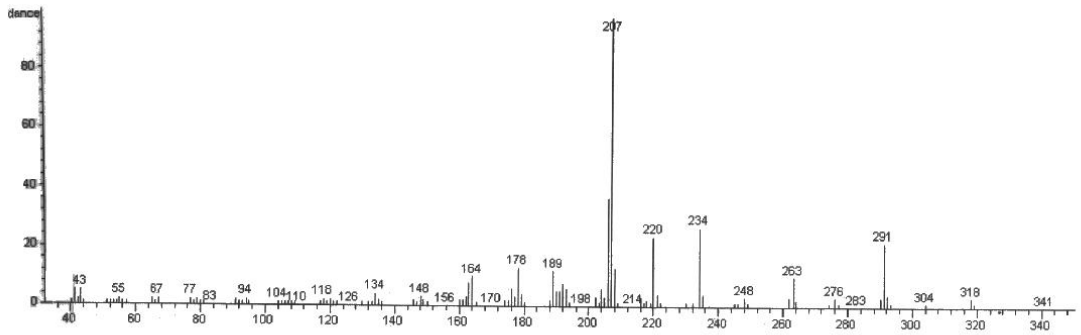


Figura 1. Espectro de massas de GO2.

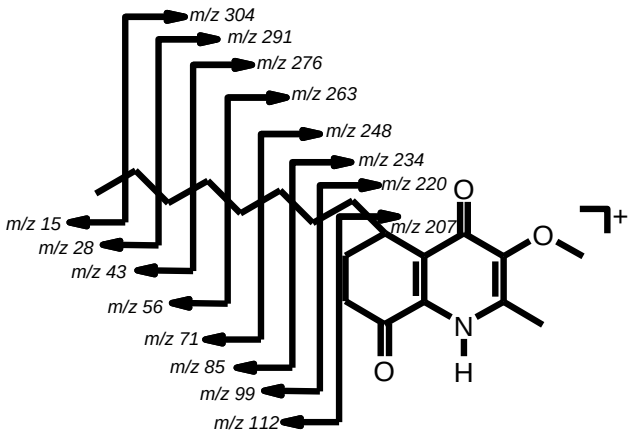


Figura 2. Principais fragmentações de GO2.

4.2.1.1.2. Espectro de RMN ^{1}H

O espectro de RMN ^{1}H de GO2 (Figura 3) revela a presença de 18 hidrogênios metilênicos entre δ 1,25 e 2,75, sendo a maioria sobrepostos, de difícil

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

atribuição. Entre estes sinais observa-se um singleto intenso em δ 2,35 (3H), atribuído aos hidrogênios de um grupamento metila, unido a um sistema aromático. Outro sinal que aparece em δ 3,93 (3H, *s*) foi atribuído aos hidrogênios de uma metoxila, também ligada a esse sistema aromático. Observa-se, também, um sinal ligeiramente deslocado para campo baixo, em δ 8,75, sugerindo que o hidrogênio esteja ligado a um heteroátomo. Além desses sinais, é de se notar em campo alto um tripleto em δ 0,89, referente a metila terminal e em δ 3,25 um sinal alargado correspondente ao único hidrogênio metínico da estrutura.

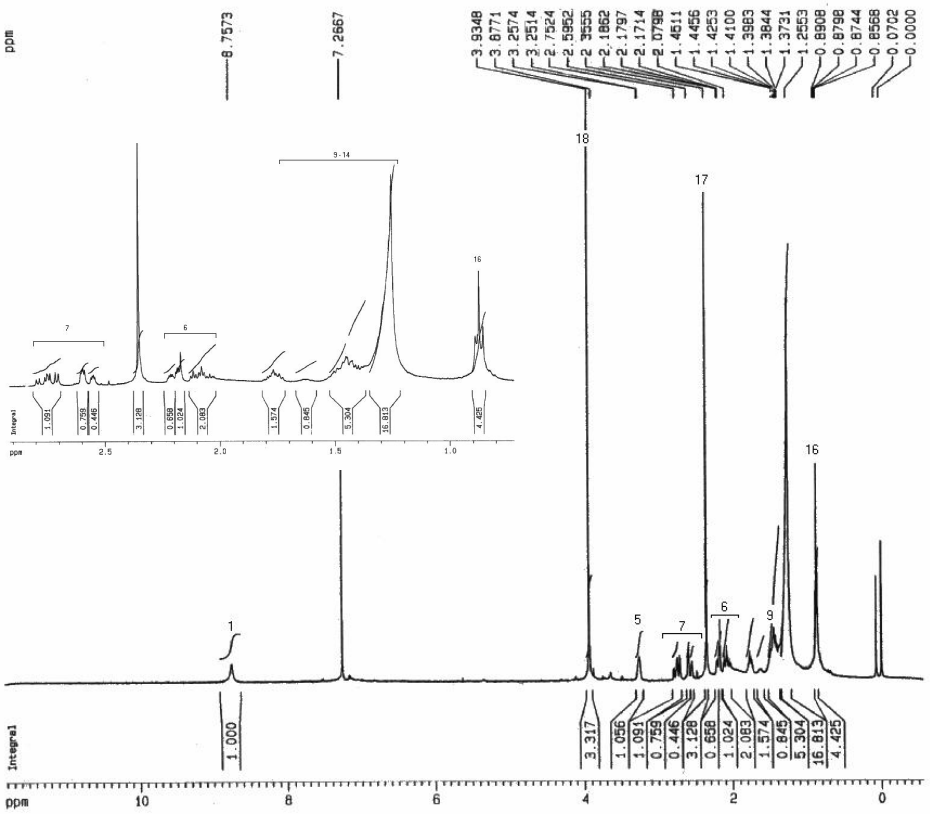


Figura 3. Espectro de RMN de ^{1}H de GO2 em $CDCl_3$, 400 MHz.

4.2.1.1.3. Espectro de RMN do Tipo COSY ^{1}H-^{1}H

O espectro de RMN de 2D, COSY ^{1}H-^{1}H (Figuras 4 e 5) revela a presença de um único sistema de spin na molécula. Nesse sistema, é possível observar as correlações entre o hidrogênio metínico H-5 (δ 3,25) com os pares de hidrogênios dos grupos metilênicos endocíclicos não equivalentes (H_a-6; H_b-6) e (H_a-9; H_b-9)

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

entre δ 1,37 e 2,07 e a correlação entre os pares hidrogênios (H_a-6; H_b-6) e (H_a-7; H_b-7) entre δ 2,07 e 2,58, além de estabelecer uma seqüência de correlações entre H-5 até 16-Me (δ 0,89) da cadeia lateral.

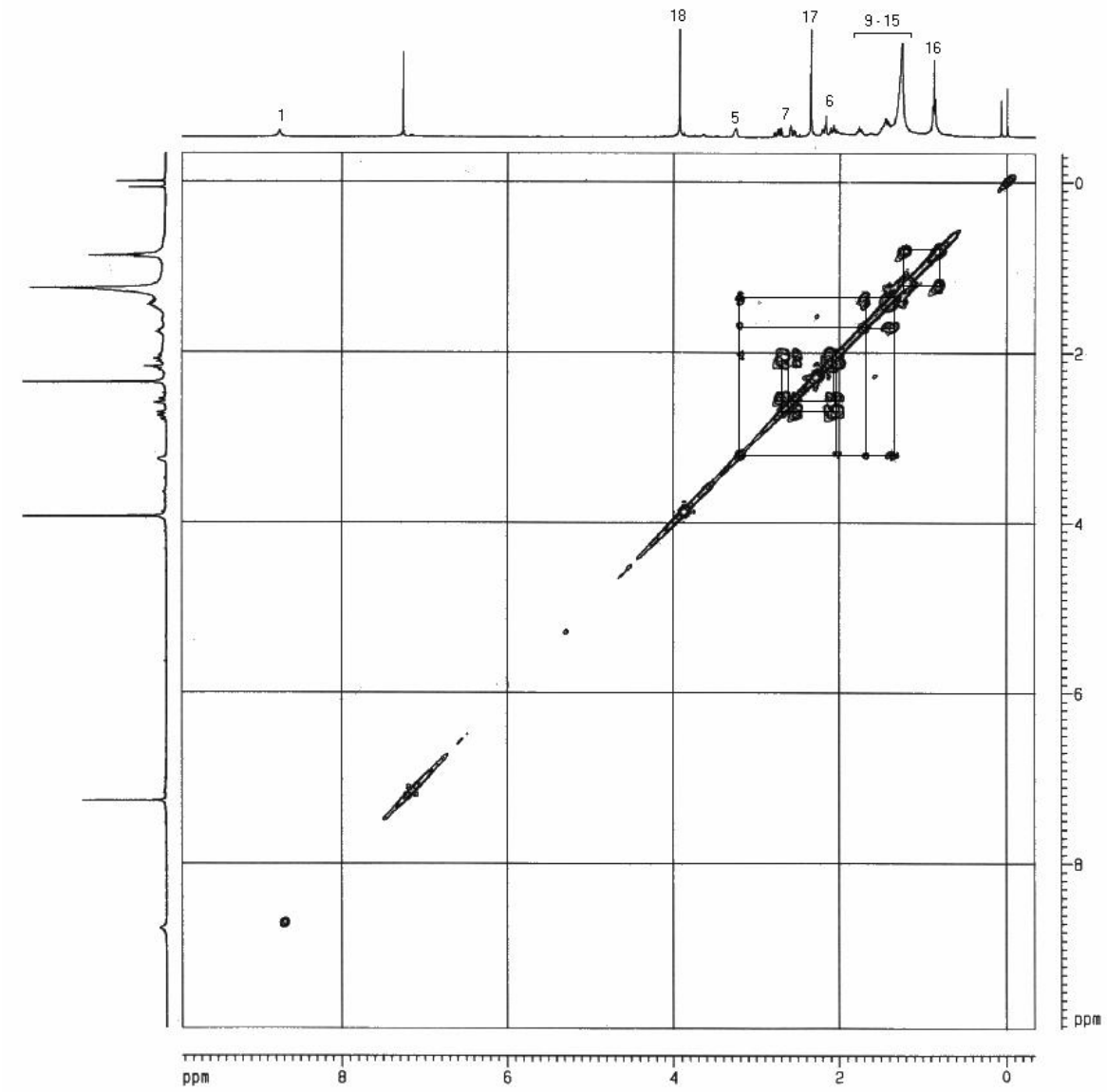


Figura 4. Espectro de RMN de 2D, COSY ^1H–^1H de GO2 em $CDCl_3$, 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

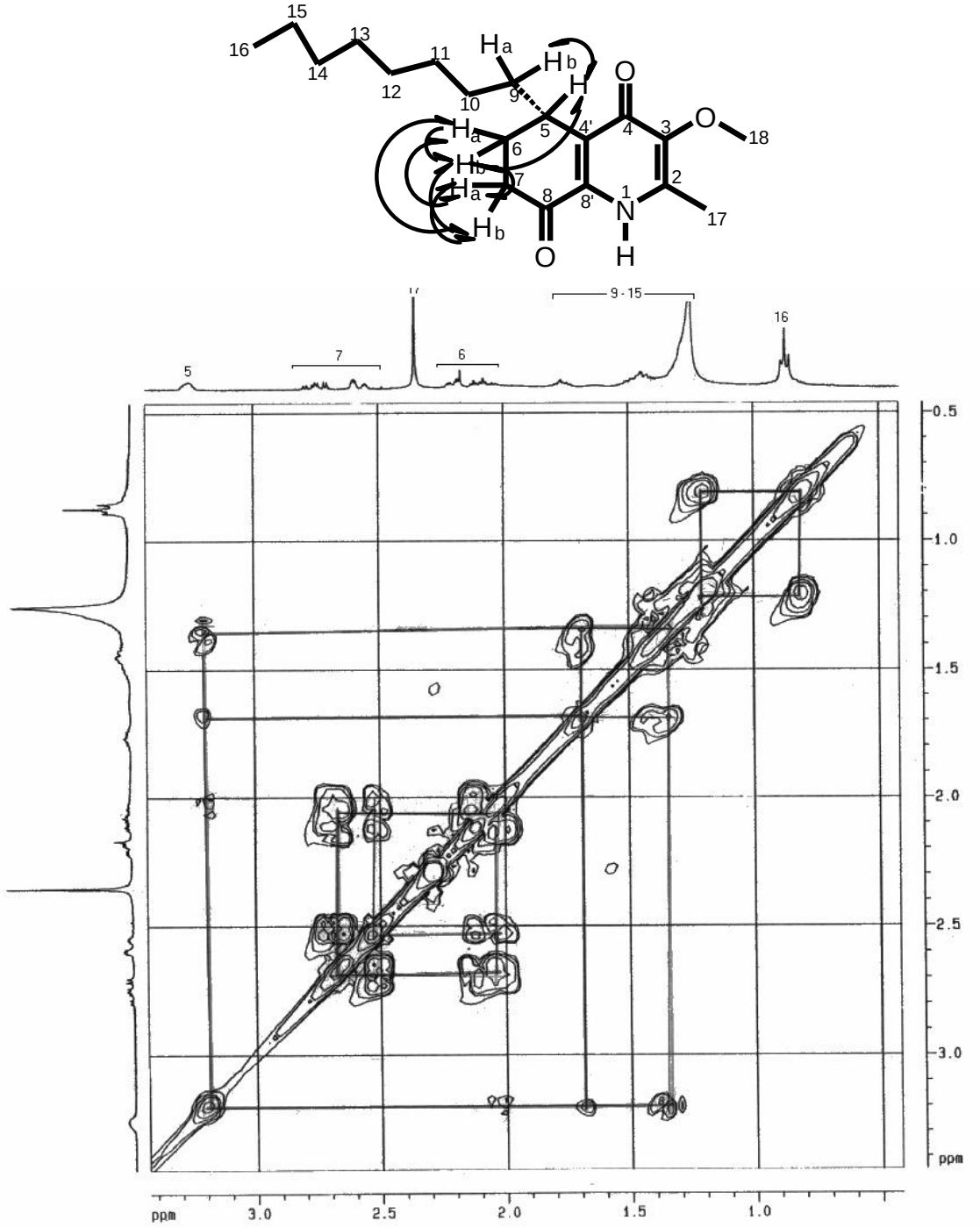


Figura 5. Espectro expandido de RMN de 2D, COSY $^{1}H–^{1}H$, região δ 0,89 a 3,25 de GO2 em $CDCl_3$, 400 MHz.

4.2.1.1.4. Espectro de RMN ^{13}C

A combinação do espectro de carbono ^{13}C (Figuras 6 e 7) e experimentos DEPT 135° permitiram a identificação de 19 sinais distribuídos numa região

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

espectral entre δ 14,06 e 194,91, revelando a existência de um carbono metínico, nove metilênicos, três metílicos e seis carbonos não-hidrogenados.

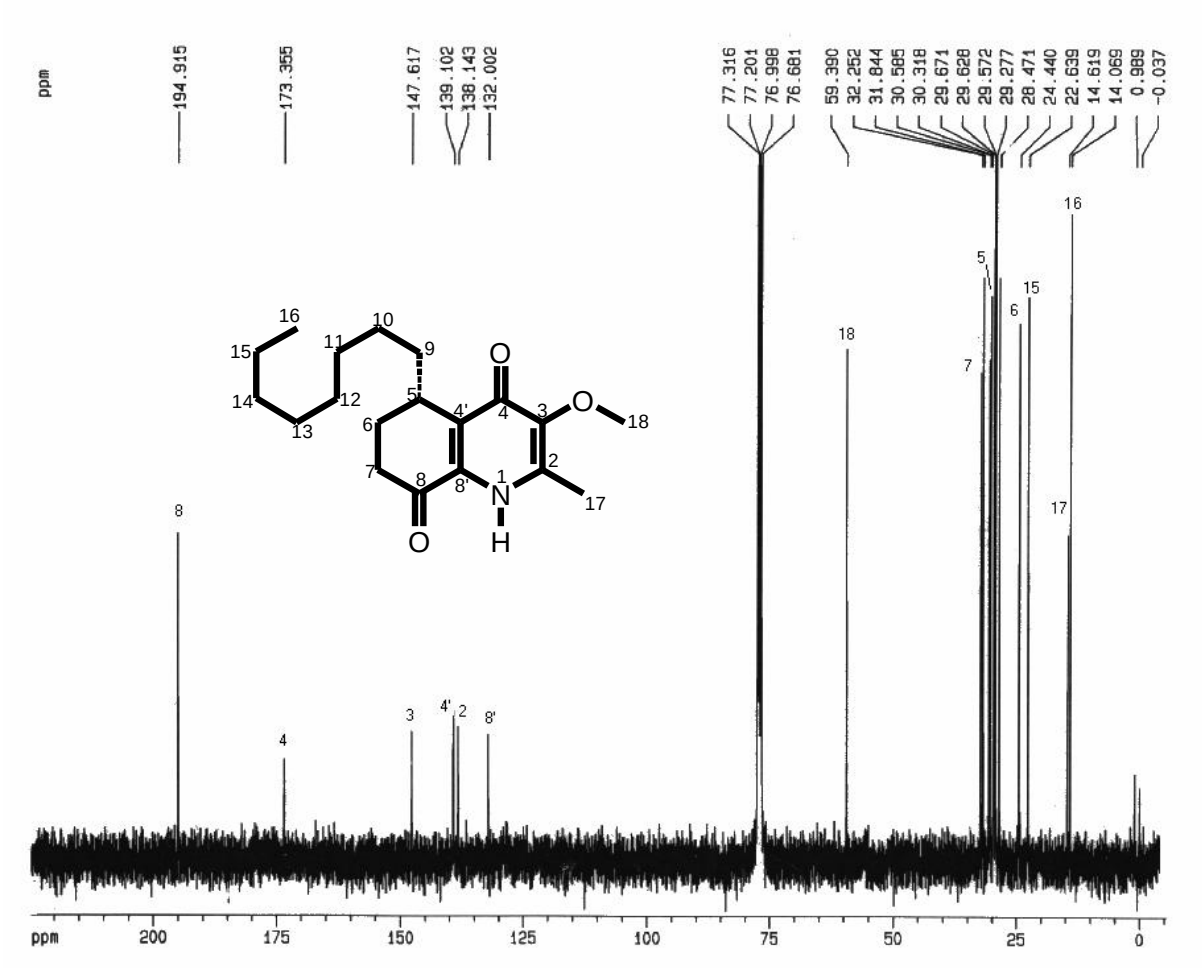


Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C de GO2 em $CDCl_3$, 100 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

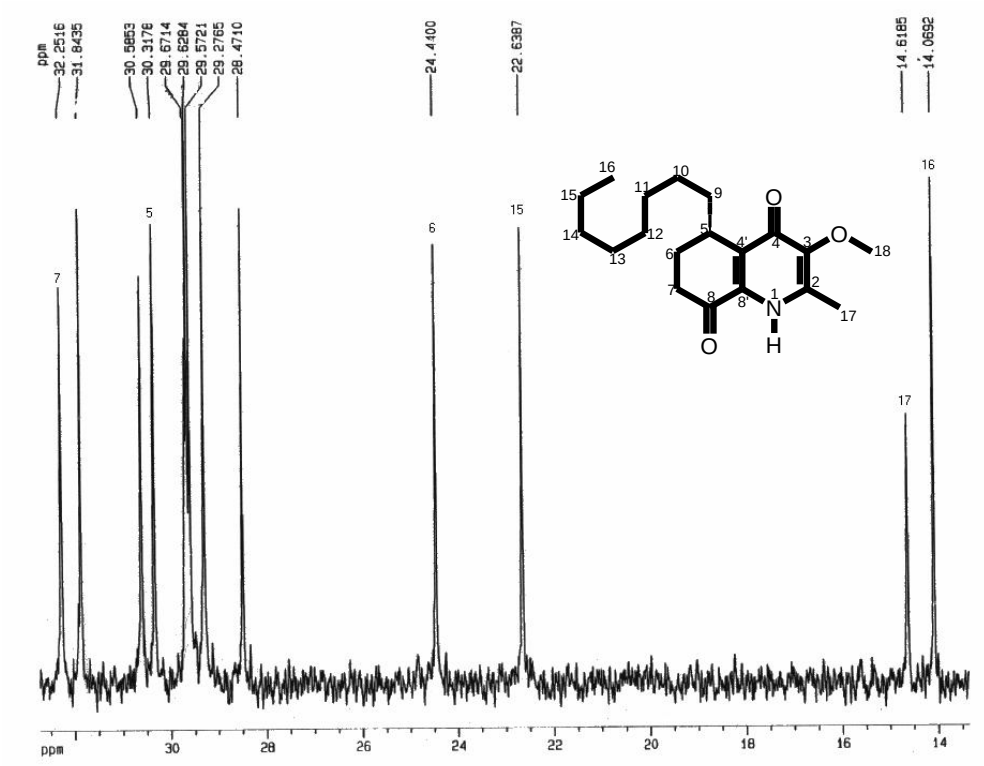


Figura 7. Espectro expandido de RMN de ^{13}C de GO2 em $CDCl_3$, 100 MHz.

No espectro de RMN DEPT 135° (Figuras 8 e 9) verificou-se a presença de nove sinais com amplitude negativa referentes aos carbonos metilênicos (C-6, C-7, C-9 a C-15) e quatro sinais com amplitude positiva correspondentes aos carbonos metílicos, (C-16, C-17, C18) e metínico (C-5).

Considerando que no espectro DEPT 135° desaparecem os sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados, seis carbonos (C-2, C-3, C-4, C-4', C-8, C-8') foram distinguidos dos demais através da comparação com o espectro de carbono desacoplado. Na tabela 7 encontram-se os valores dos deslocamentos correspondentes a cada átomo de carbono.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

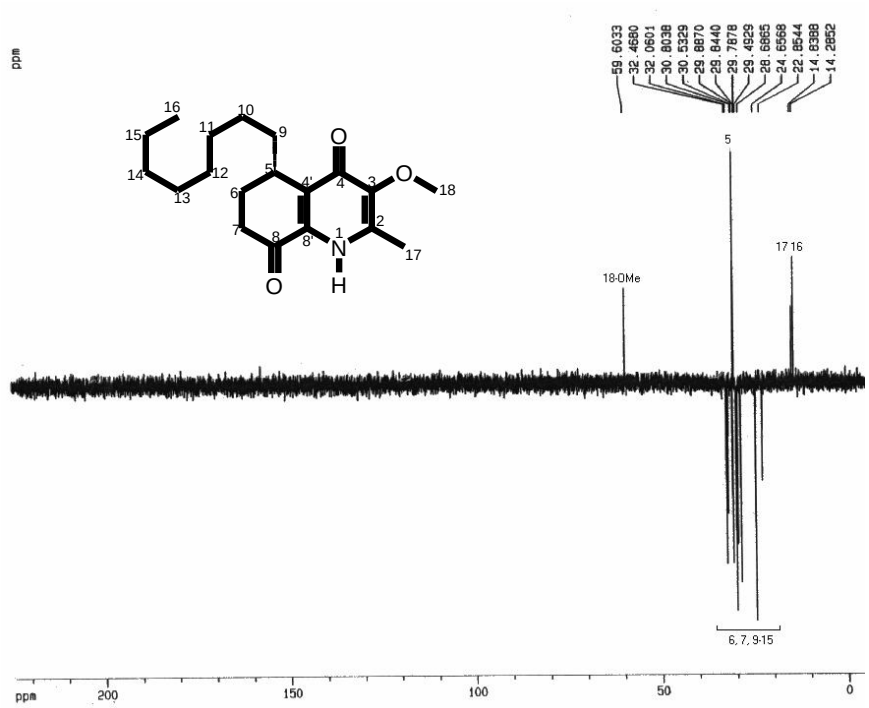


Figura 8. Espectro de RMN de DEPT 135° de GO2 em $CDCl_3$, a 100 MHz.

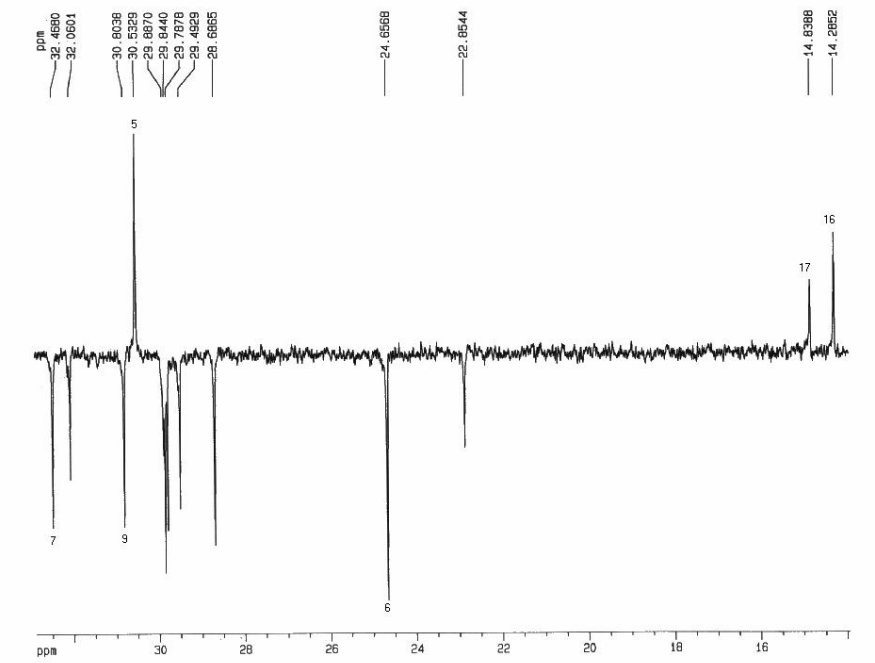


Figura 9. Expansão do espectro de RMN de DEPT 135°de GO2 em $CDCl_3$, a 100 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4.2.1.1.5. Espectro de RMN do tipo HMQC e HMBC

O espectro bidimensional heteronuclear HMQC (Figura 10) permitiu confirmar os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados presentes em GO2, através da correlação de cada um dos hidrogênios com seus respectivos carbonos.

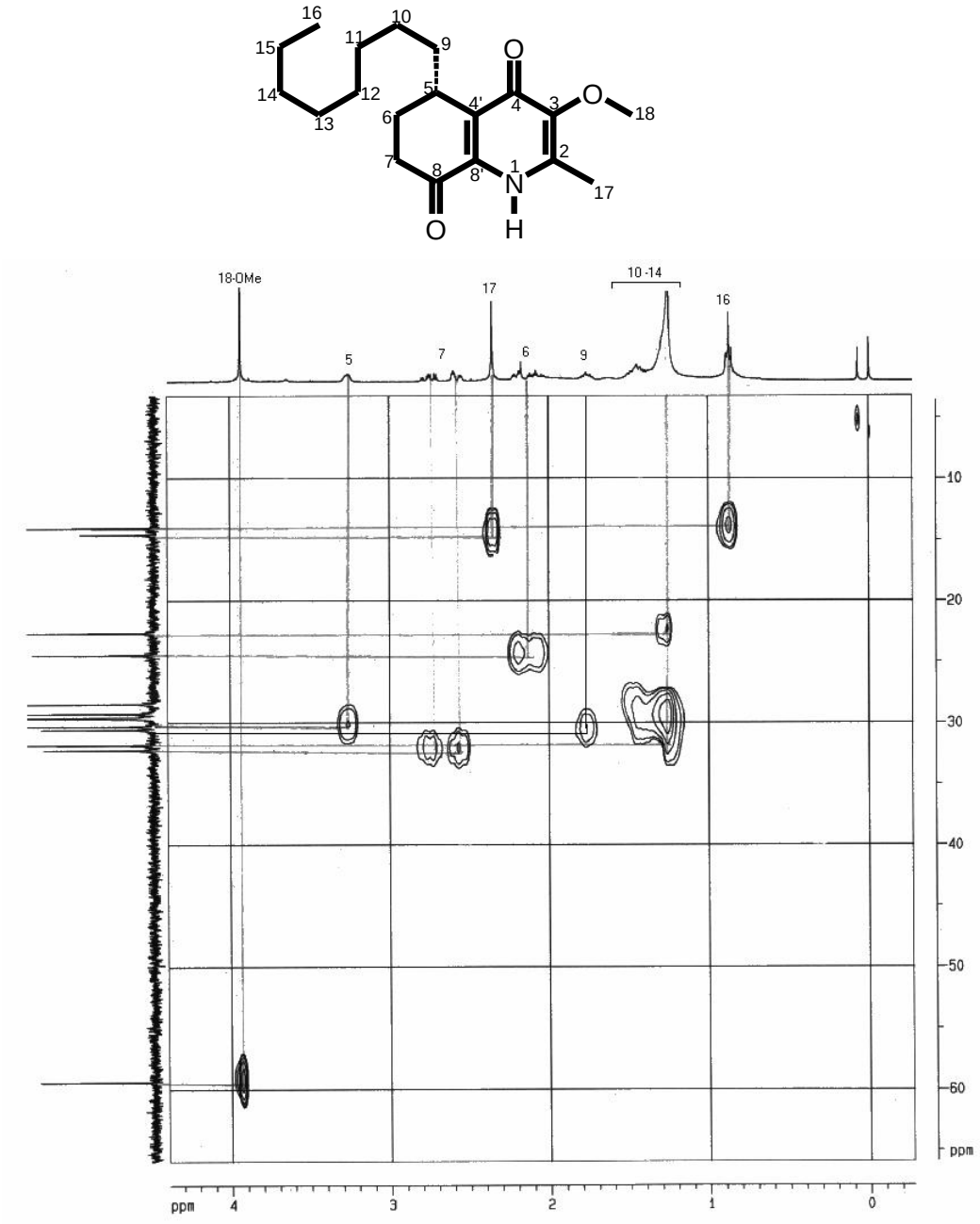


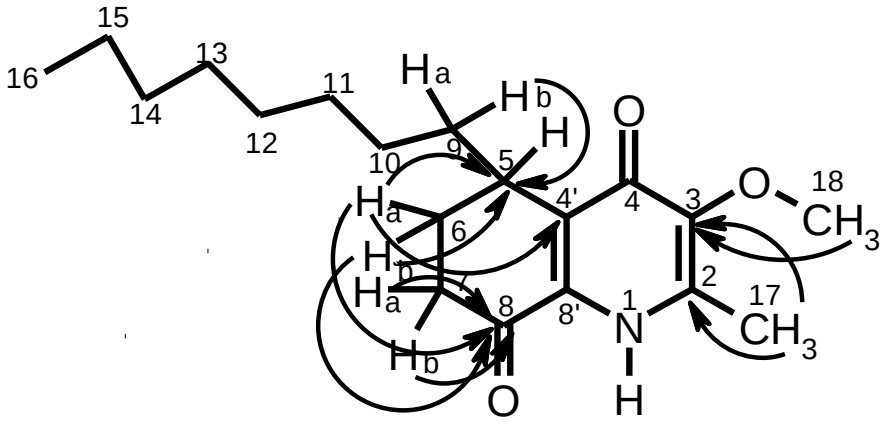
Figura 10. Espectro 2D, heteronuclear $^{1}J_{H-C}$, HMQC de GO2 em $CDCl_3$, a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

A análise do experimento HMBC (Figuras 11 e 12) permitiu esclarecer algumas dúvidas com relação à localização de certos grupos e substituintes na molécula, por exemplo, as localizações do grupo carbonílico (δ 194,91) e do substituinte n-alquila.

A afirmativa de que o grupo carbonílico se encontrava na posição C-8 foi definida neste experimento pelo sinal de cruzamento entre os hidrogênios metilênicos não equivalentes $H_{a,b}$-6, $H_{a,b}$-7 e o carbono C-8 (δ 194,91). Outra informação importante observada que reforça essa afirmativa e que, ao mesmo tempo, define a localização do substituinte n-alquila, é a correlação do carbono metínico C-5 (δ 30,31) com os hidrogênios ($H_{a,b}$-6 e $H_{a,b}$-7) e com um dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos da cadeia lateral (H_a ou H_b-9) em δ 1,38. Desta maneira, conclui-se que o substituinte n-alquil se encontra conectado ao carbono C-5. Pode-se observar ainda no anel aromático que os hidrogênios da metila (3H-17), que absorvem em δ 2,35, se-correlacionam com o carbono não-hidrogenado C-2 (δ 138,14), enquanto que os hidrogênios da metoxila (3H-18), que absorvem em δ 3,93, se correlacionam com o carbono não-hidrogenado C-3 (δ 147,61), sendo que os hidrogênios da metila (C-2) também se correlacionam com este carbono, sugerindo que os dois substituintes se encontram em carbonos vicinais. Essas atribuições assim como a localização do grupo carbonílico (δ 173,35) na posição C-4 foram confirmadas pela comparação de dados obtidos de outros alcalóides do tipo quinolinonas.[15,16]

Essas e outras importantes correlações observadas no espectro HMBC estão presentes na Tabela 7 e visualizadas na estrutura abaixo:



AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

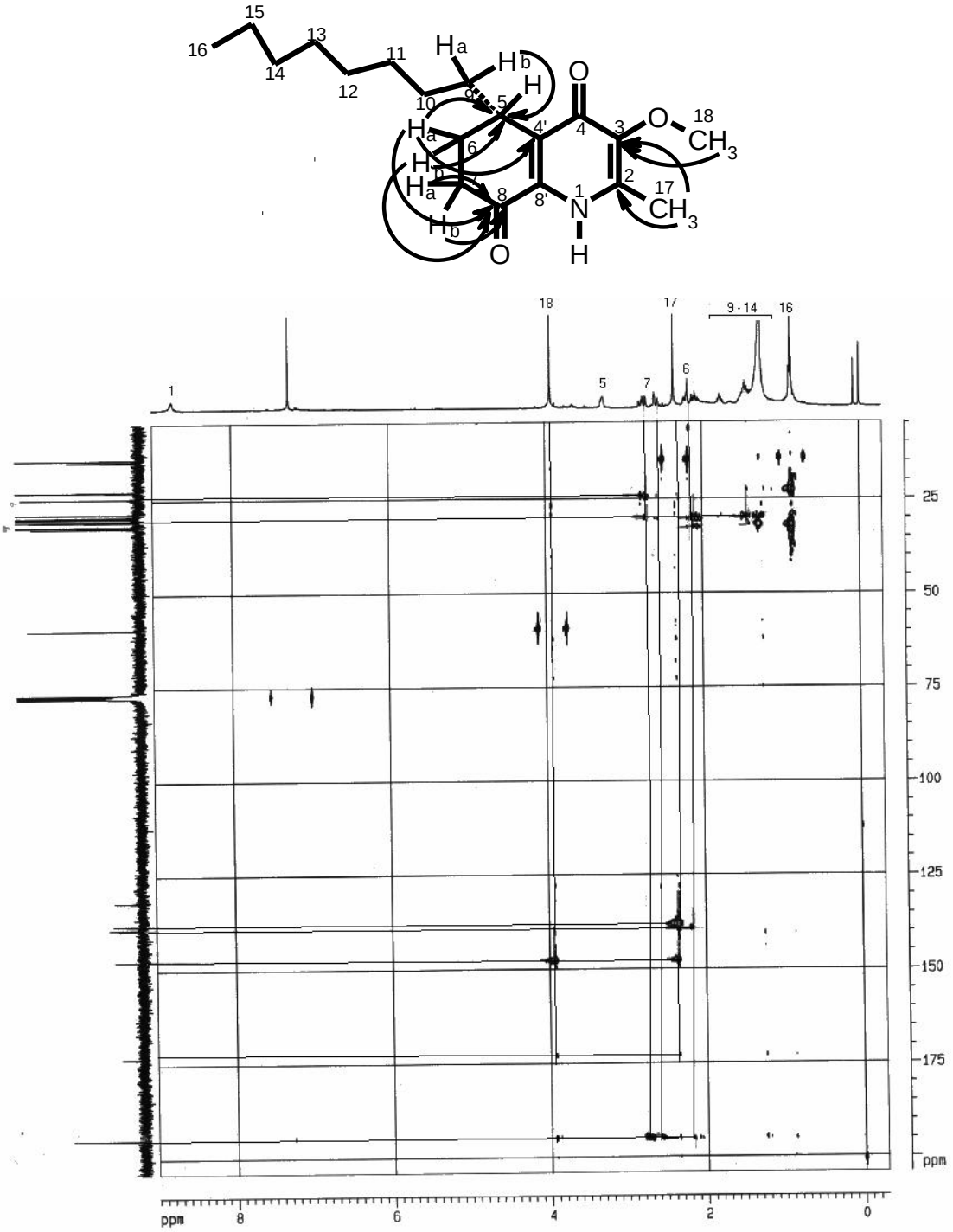


Figura 11. Espectro 2D, heteronuclear, HMBC de GO2 em $CDCl_3$, a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

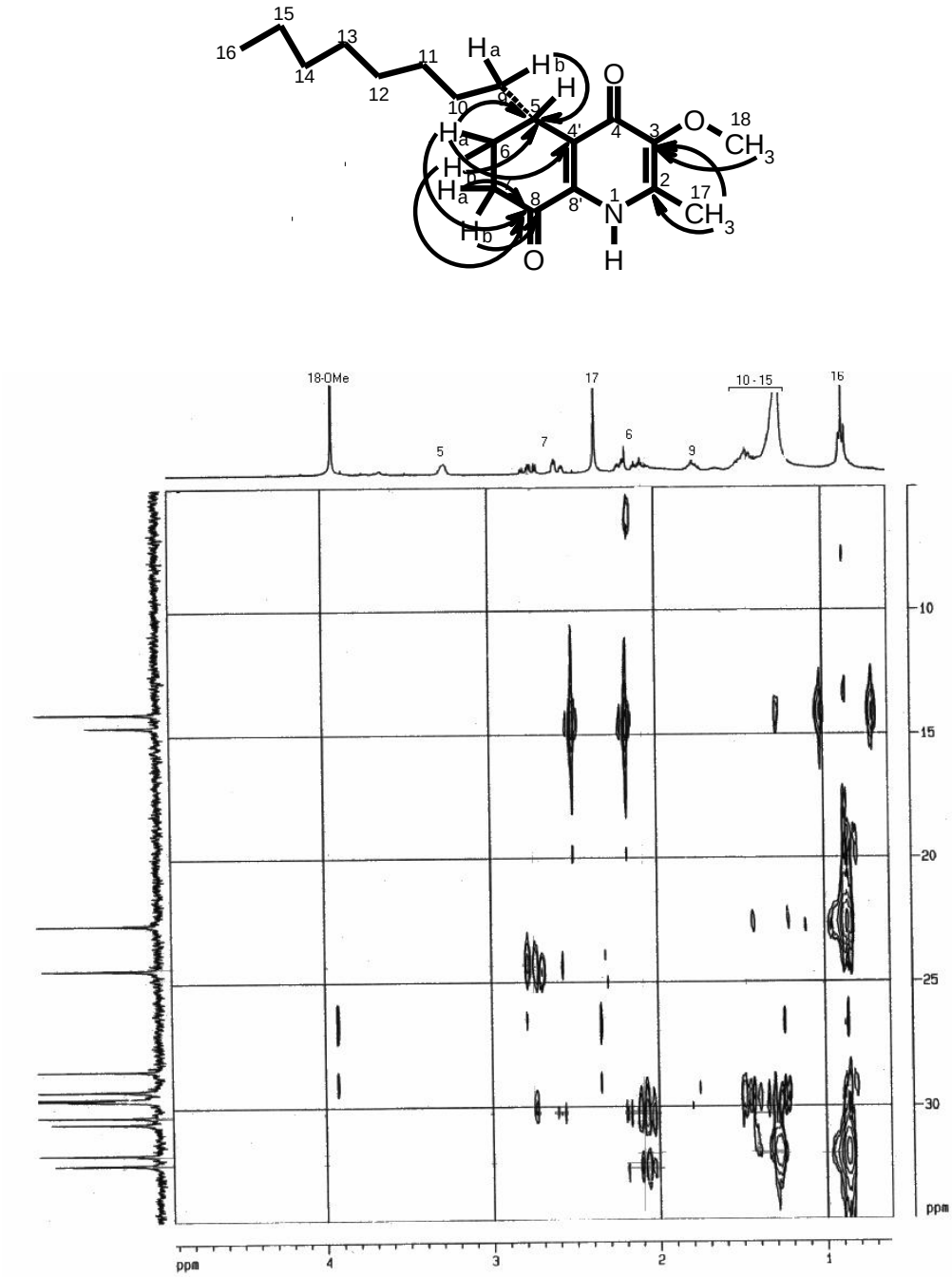


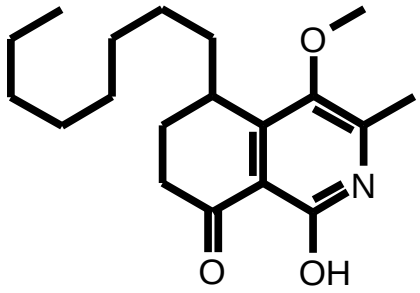
Figura 12. – Espectro expandido 2D, heteronuclear, HMBC de GO2 em $CDCl_3$, a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C e correlações dos experimentos COSY e HMBC para GO2, em $CDCl_3$.

POSIÇÃO	δ ^{13}C	δ ^{1}H	COSY ^{1}H-^{1}H	HMBC ^{1}H-^{13}C
1	-	8,75		
2	138,14			3; 17-Me
3	147,61			2; 18-OMe
4	173,35			
4’	139,10			6
5	30,31	3,25 (1H; *)	6; 9	6; 7; 9
6	24,44	2,07(2H,; m)	5; 7	5; 8; 4’
7	32,25	2,59 (2H; m)	6	6; 8
8	194,91			6; 7
8’	132,00			
9	30,58	1,38 (2H; m)	5; 10	5; 10
10 - 15	22 - 31			
16	14,06	0,85 (3H; t)	15	
17-Me	14,61	2,35 (3H; s)		2; 3
18-OMe	59,39	3,93 (3H; s)		3

Após a caracterização da estrutura de GO2, constatamos que a mesma havia sido isolada, em 1999, da espécie *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae) por Buske[39] e colaboladores, os quais a denominaram de antidesmona, correspondente a um alcalóide isoquinolínico 19a.



19a

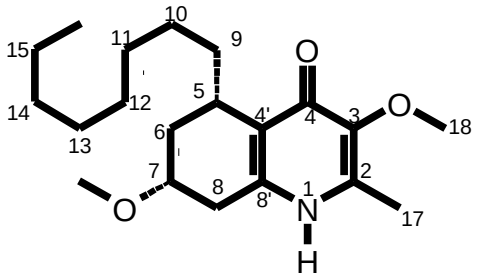
Um ano depois (2000), esse mesmo grupo de pesquisadores publicou um artigo retificando a estrutura desse alcalóide (antidesmona) de estereoquímica absoluta *S*.[40] Configuração esta, também obtida por nós e discutida posteriormente.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Este alcalóide encontra-se patenteado por esse mesmo grupo, pelo fato de o mesmo exibir uma potente atividade anti-tripanossômica contra o *Tripanossoma cruzi*, agente patogênico causador da doença de Chagas[41]. Vale ainda ressaltar que nos ensaios por bioautografia, realizados por nós, este alcalóide até uma quantidade inibitória mínima (QIM) de 100 μg não apresentou atividade para os microrganismos listados na tabela 3.

4.2.1.2. G03

O composto GO3 também foi obtido da fração hexânica (Esquema 3) na forma de óleo viscoso de cor amarela. Este composto reagiu positivamente frente ao reagente de Dragendorff, sugerindo a presença de nitrogênio básico na sua estrutura molecular. Sua estrutura (20) foi cuidadosamente estabelecida pela comparação dos sinais espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C de GO2 e pelas análises espectroscópicas detalhadas de RMN 2D, incluindo a aplicação dos experimentos COSY, NOESY, HMQC e HMBC. As análises de espectrometria de massas também foram fundamentais na elucidação desta estrutura.



20

4.2.1.2.1. Espectro de Massas

Os dados obtidos dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C de GO3 (Tabela 8), além do íon molecular registrado em *m/z* 335 no espectro EIMS (Figura 13) e íon "quase molecular" $[M+H]^{+}$ a 336,25474 HRESIMS, conferem ao composto GO3 a fórmula molecular $C_{20}H_{33}NO_3$. É importante notar que a fórmula molecular $C_{19}H_{29}NO_3$ de GO2, deduzida anteriormente, revelou uma diferença de quatro átomos de hidrogênios e mais um átomo de carbono quando comparada com a de GO3 ($C_{20}H_{33}NO_3$). O pico base em *m/z* 193 exibido no espectro EIMS corresponde à

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

clivagem da cadeia lateral (n-alquila), juntamente com um grupo metoxila (-OMe) fornecendo, assim, o fragmento principal (100%) (figura 14).

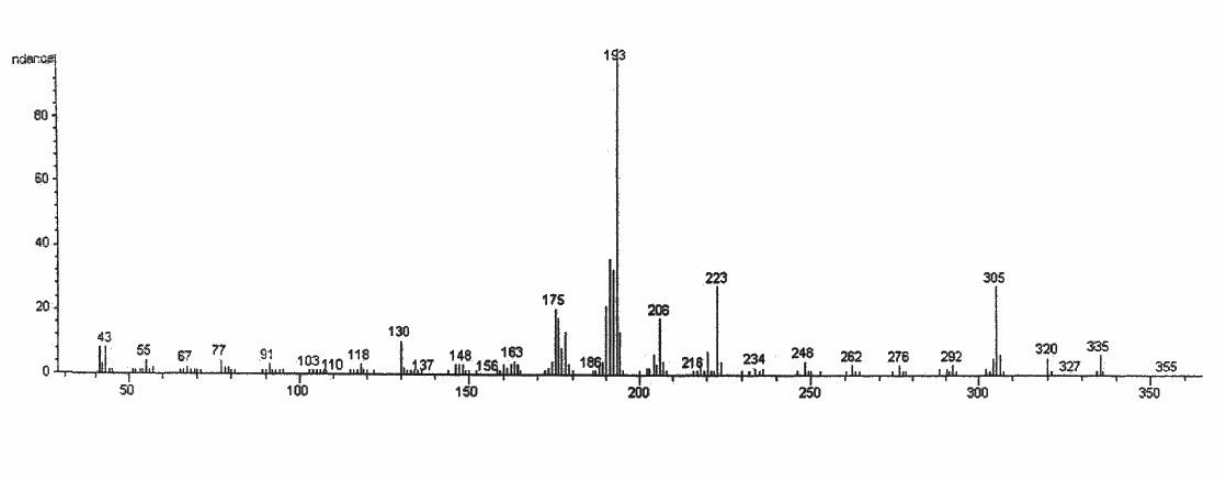


Figura 13. Espectro de Massas de GO3

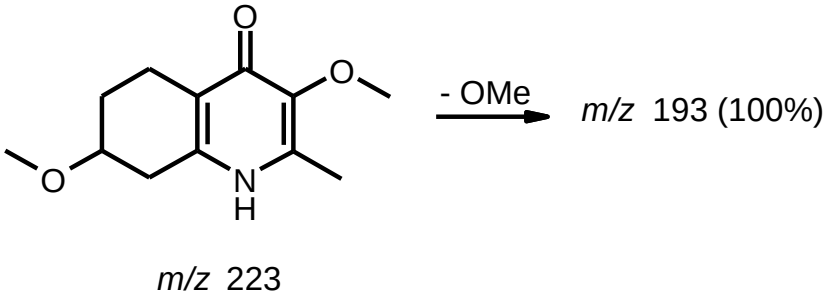


Figura 14. Fragmentação de GO3

4.2.1.2.2. Espectro de RMN de ^{1}H

O espectro de RMN ^{1}H (Figura 15) de GO3 é aproximadamente semelhante ao composto GO2. A exceção está relacionada à adição de um singleto em δ 3,46, referente a um grupo metoxila, um multipleto em δ 4,20, *J* = 6 e *J* = 10 Hz referente a um hidrogênio metínico na mesma posição do grupo metoxila e as diferenças significativas, correspondentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos endocíclicos diastereotópicos, ($H_{a,b}$-6 e $H_{a,b}$-8) que absorvem entre δ 1,61 e 2,14.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

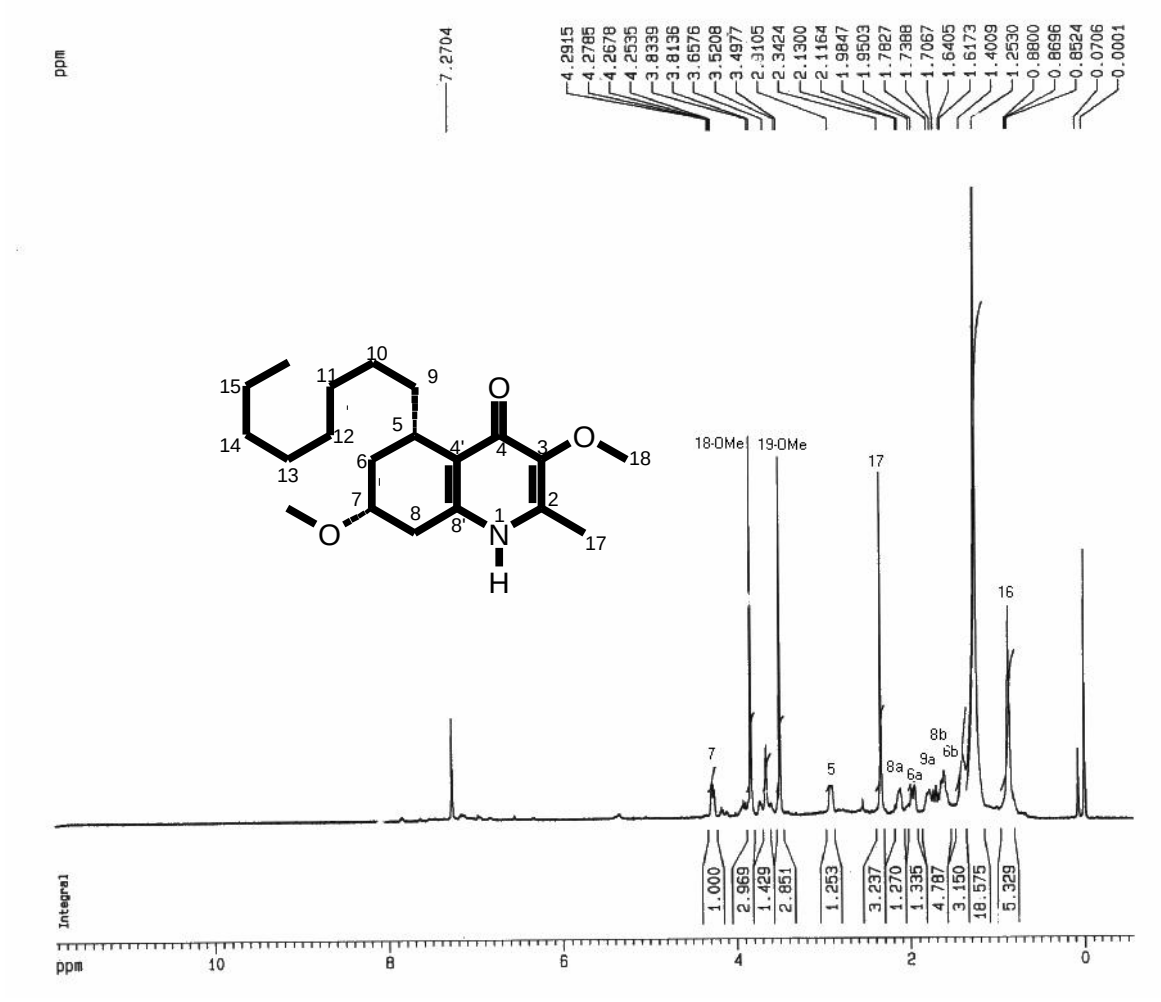


Figura 15. Espectro de RMN de ^{1}H de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

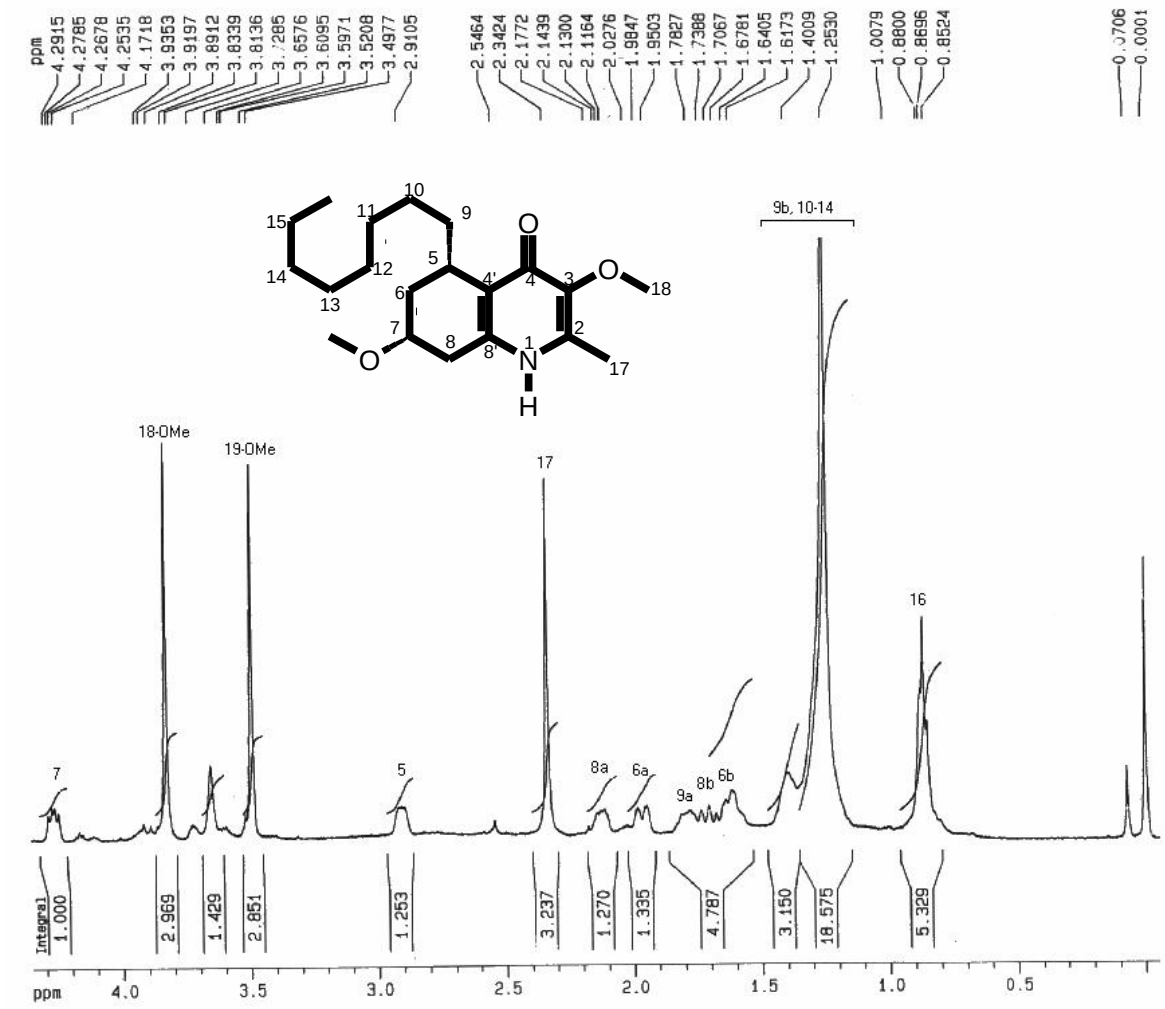


Figura 15a. Espectro de RMN de ^{1}H de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz expandido entre δ 0,85 e 4,28.

4.2.1.2.3. Espectro de RMN do Tipo COSY ^{1}H-^{1}H

A conectividade do grupo metoxila ao carbono C-7 observada neste espectro (Figura16) é muito sugestiva, já que a correlação do hidrogênio metínico H-7 (δ 4,28) ocorre apenas com o par de hidrogênios metilênicos endocíclicos não equivalentes (H_a-8, H_b-8). Por outro lado, percebe-se que esses hidrogênios metilênicos se correlacionam muito pouco com o outro par de hidrogênios metilênicos não equivalente (H_a-6, H_b-6). É importante notar neste espectro a correlação entre o hidrogênio metínico H-5 (δ 2,91) com um dos hidrogênios de cada par metilênico do anel (H_b-6) e da cadeia lateral, (H_a ou H_b-9), permitindo, desta forma, tornar evidente a conectividade da cadeia alifática ao carbono C-5 da

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

estrutura. Essas e outras correlações encontram-se na tabela 8 (p. 54) e poderão ser visualizadas na figura abaixo.

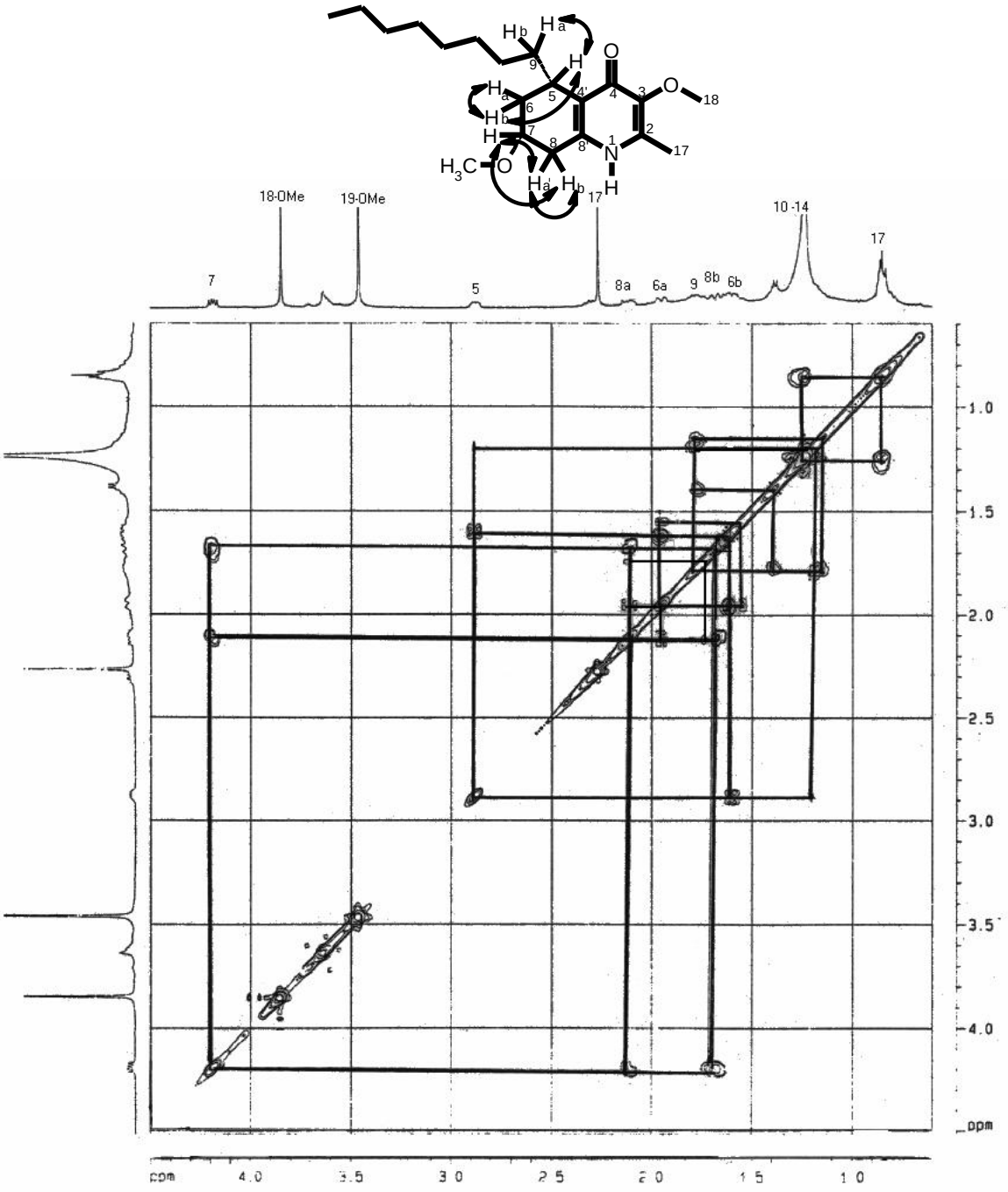


Figura 16. Espectro de RMN de 2D, COSY $^{1}H–^{1}H$ de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

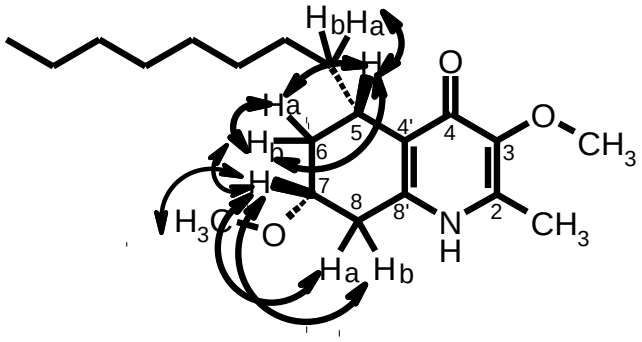
4.2.1.2.4. Espectro de RMN do Tipo NOESY ^{1}H-^{1}H

No espectro NOESY (Figura 17) de GO3 observou-se algumas correlações espaciais importantes que forneceram informações quanto à geometria da molécula.

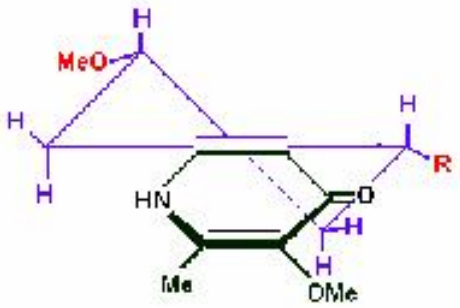
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Por exemplo, neste espectro observou-se à interação do hidrogênio metínico H-7, com um hidrogênio de cada par metilênico do anel (H_b-6 e H_a-8) e com os hidrogênios do grupo metoxila H_3-19. Estes, por sua vez, interagem com os hidrogênios H_a-8 e H_b-8. Observa-se, também, neste espectro, que o hidrogênio H_b-6 mostra uma forte interação com os hidrogênios H-5 e H_a-6 e uma fraca interação com o hidrogênio H-7. Já o hidrogênio H_a-6 não interage com H-7 e tem pouquíssima interação com H-5, logo, sugere-se que, os hidrogênios H-5, H_b-6 e H-7 estejam do mesmo lado, e que o hidrogênio H-5 esteja em posição *cis* em relação ao hidrogênio H-7.

Essas informações, juntamente com os dados presentes na tabela 8, levou-nos a sugerir a estrutura configuracional I, pelo fato de a mesma apresentar uma conformação termodinamicamente mais estável (I-a).



I



AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

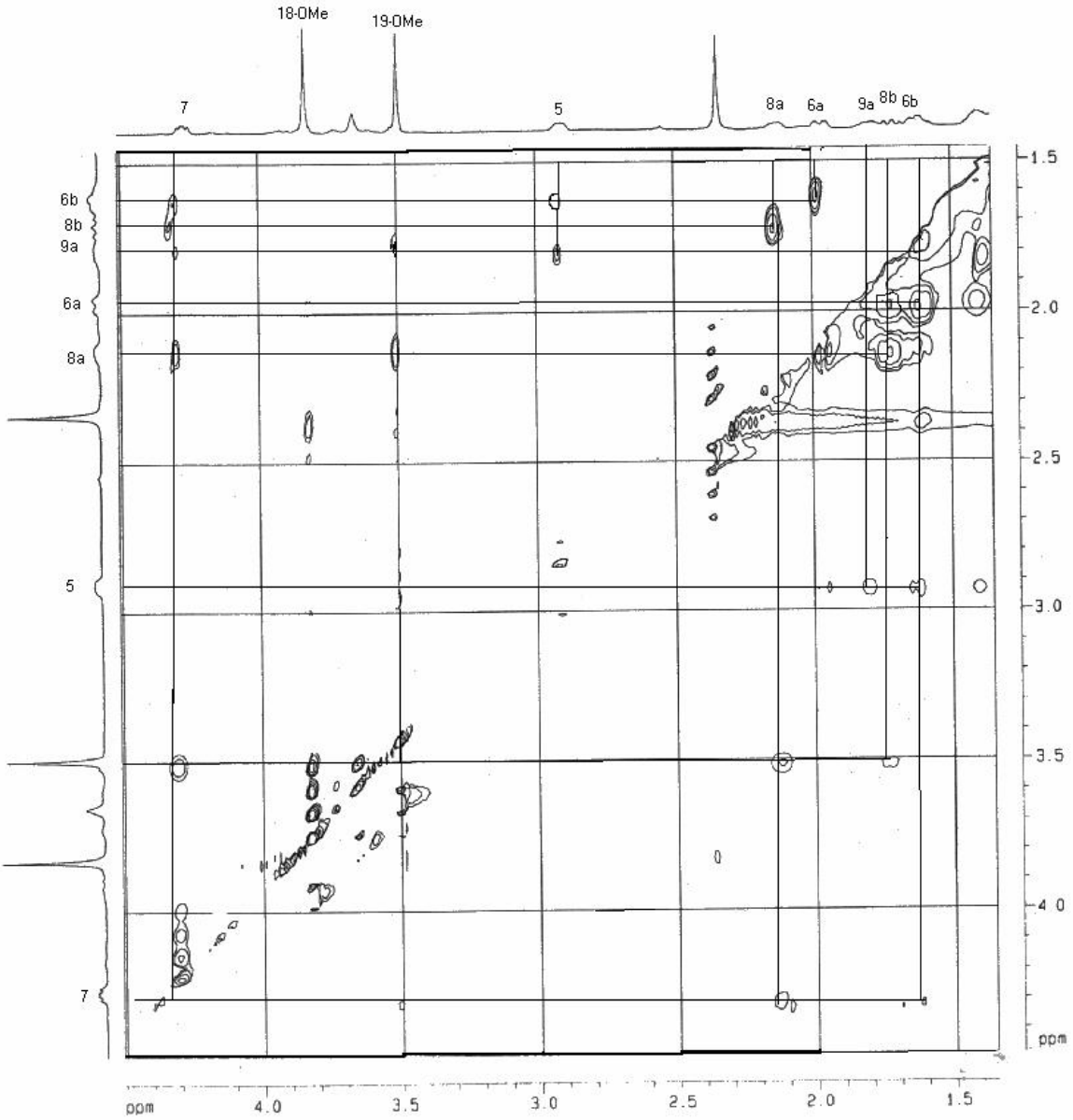


Figura 17. Espectro de RMN de 2D, NOESY de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

4.2.1.2.5. Espectro de RMN de ^{13}C de GO3

As atribuições de sinais dos átomos de carbono, pertencentes ao composto GO3, foram realizadas através de RMN ^{13}C, utilizando-se os espectros de carbono totalmente desacoplado (BB) e DEPT 135°, comparando-os com os dados de deslocamentos de RMN ^{13}C relatados para antidesmona.

O espectro de carbono (BB), (Figuras 18 e 18a), permitiu a identificação de vinte sinais distribuídos numa região espectral, entre δ 14,09 e 171,75, indicando a

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

presença de carbonos metínicos, metilênicos, metílicos e os não hidrogenados. A Tabela 8 apresenta os deslocamentos de RMN ^{13}C obtidos para GO3.

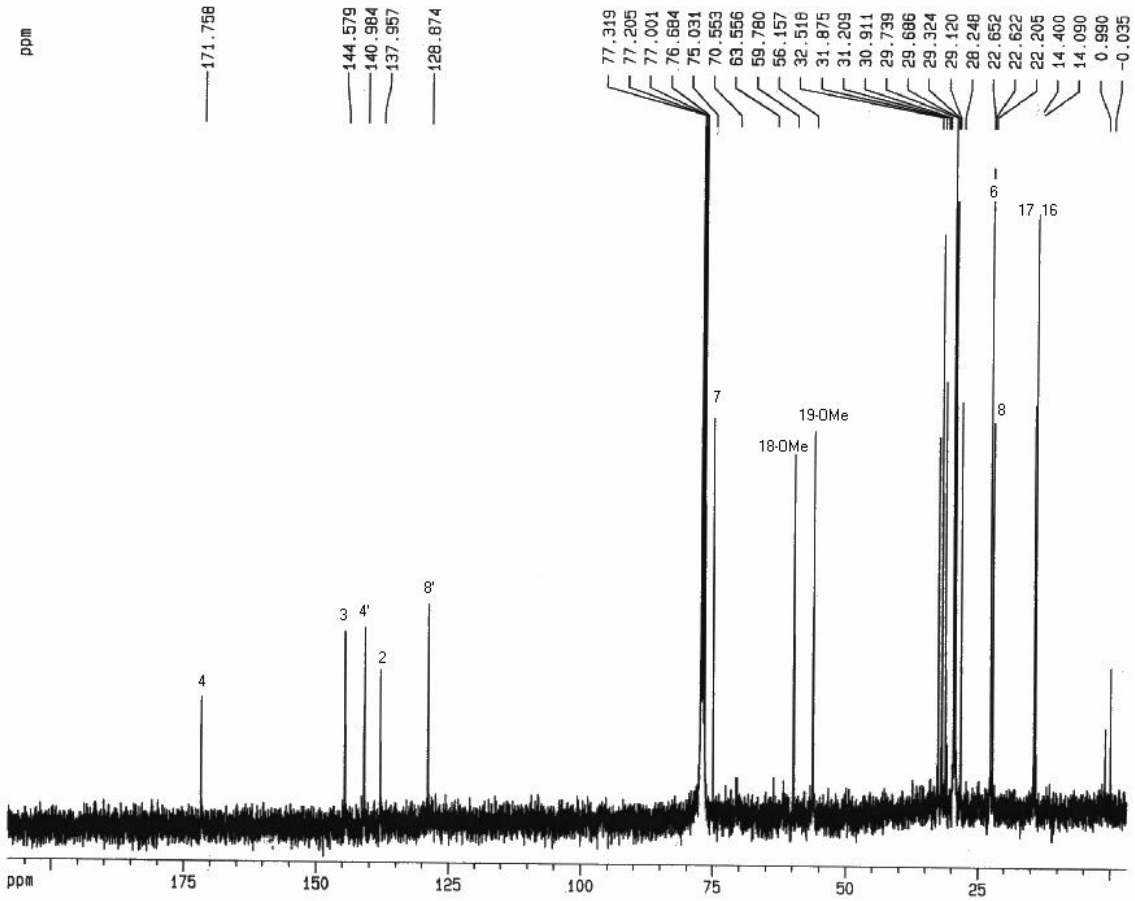


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C de GO3 em $CDCl_3$, 100 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

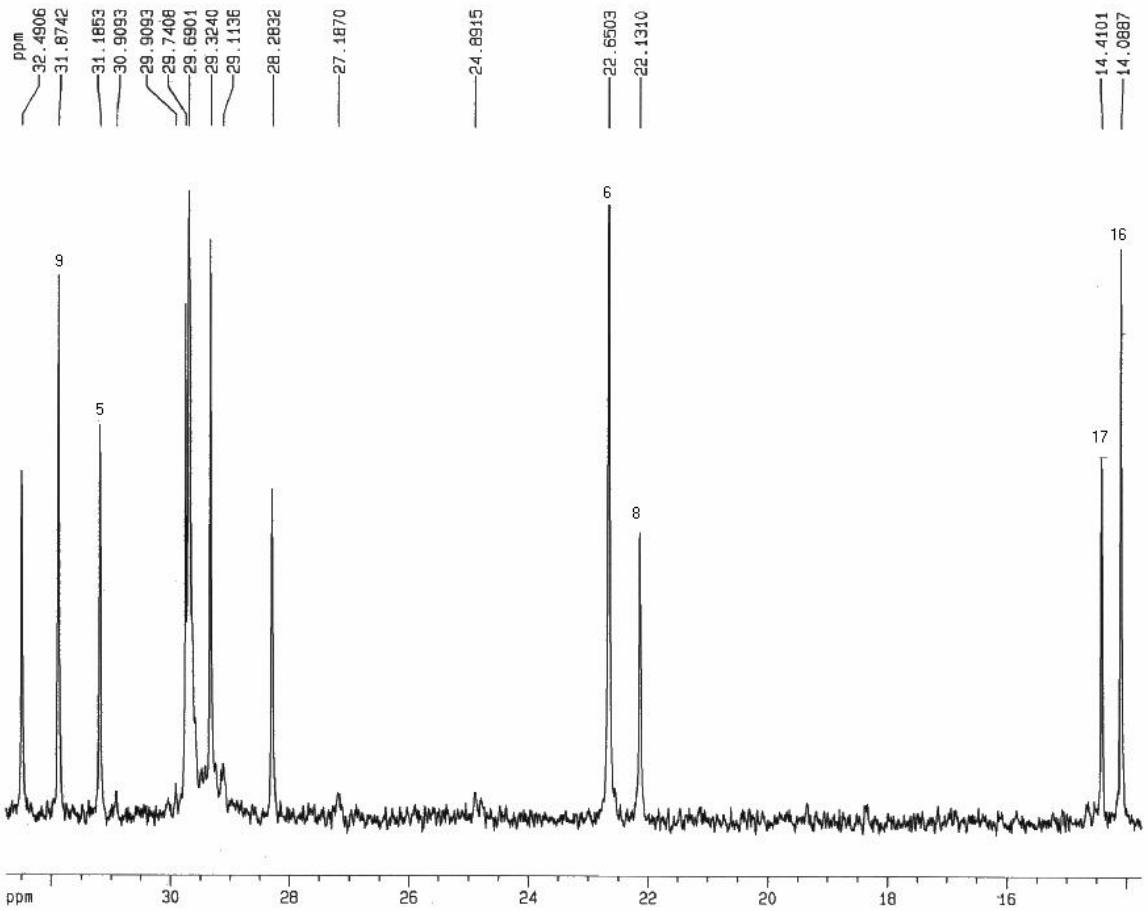


Figura 18a. Espectro de RMN de ^{13}C de GO3 em $CDCl_3$, 100 MHz expandido entre δ 14,00 e 32,43.

No espectro DEPT 135° (Figuras 19 e 20) verificou-se a presença de seis sinais com amplitude positiva, quatro referentes aos carbonos metílicos C-16 (δ 14,09), C-17 (δ 14,40), 18-OMe (δ 59,78), 19-OMe (δ 56,15) e dois referentes aos carbonos metínicos C-5 (δ 30,91) e C-7 (δ 75,03) e nove sinais com amplitude negativa correspondentes aos carbonos metilênicos C-6, C-8, C-9 a C-15 (δ 22,20 a 32,51).

Considerando que no espectro DEPT 135°, desaparecem os sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados, seis carbonos foram distinguidos dos demais através da comparação com o espectro de carbono desacoplado. Desta forma, uma grande parte dos sinais foi atribuído aos carbonos da molécula proposta. Na tabela 8, encontram-se listados os valores correspondentes aos deslocamentos químicos desses carbonos.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

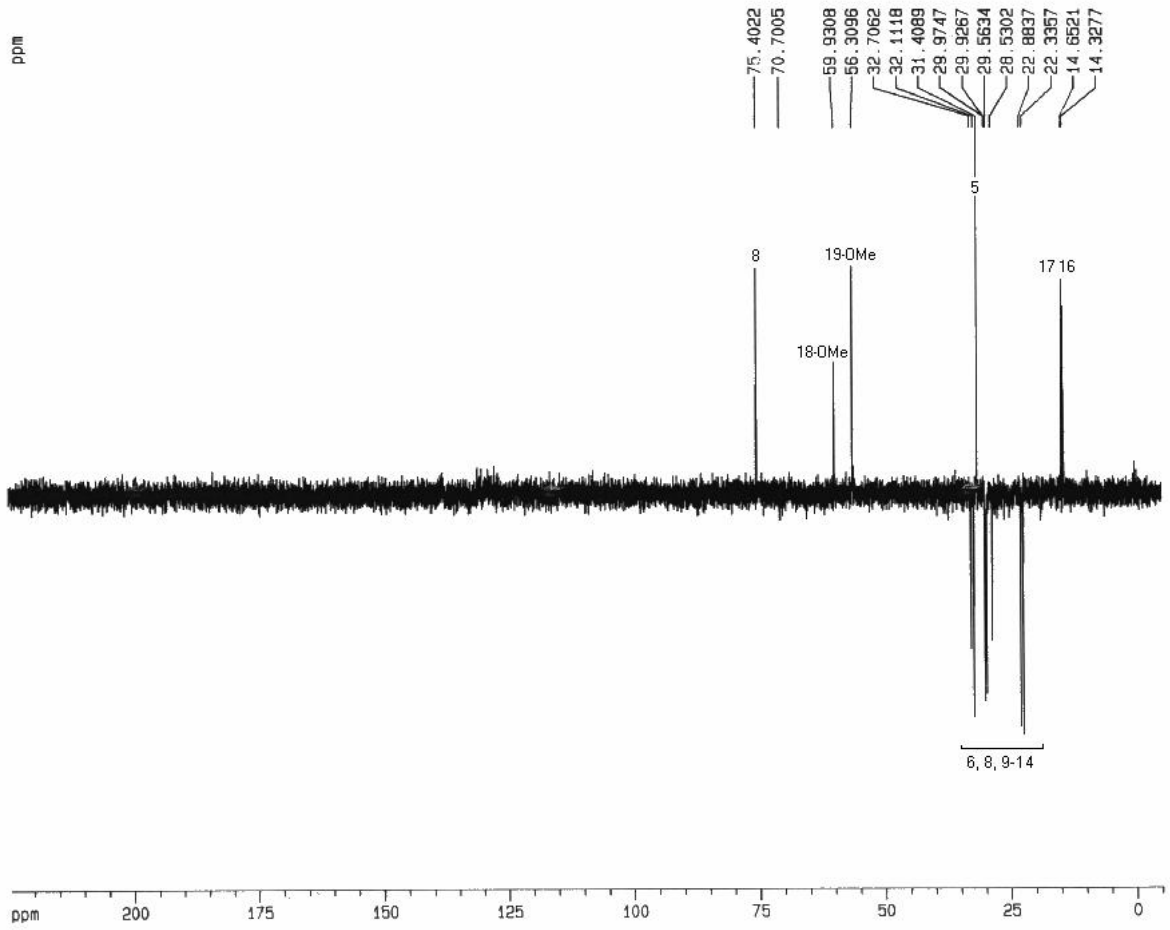


Figura 19. Espectro de RMN de DEPT 135° de GO3 em $CDCl_3$, 100 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

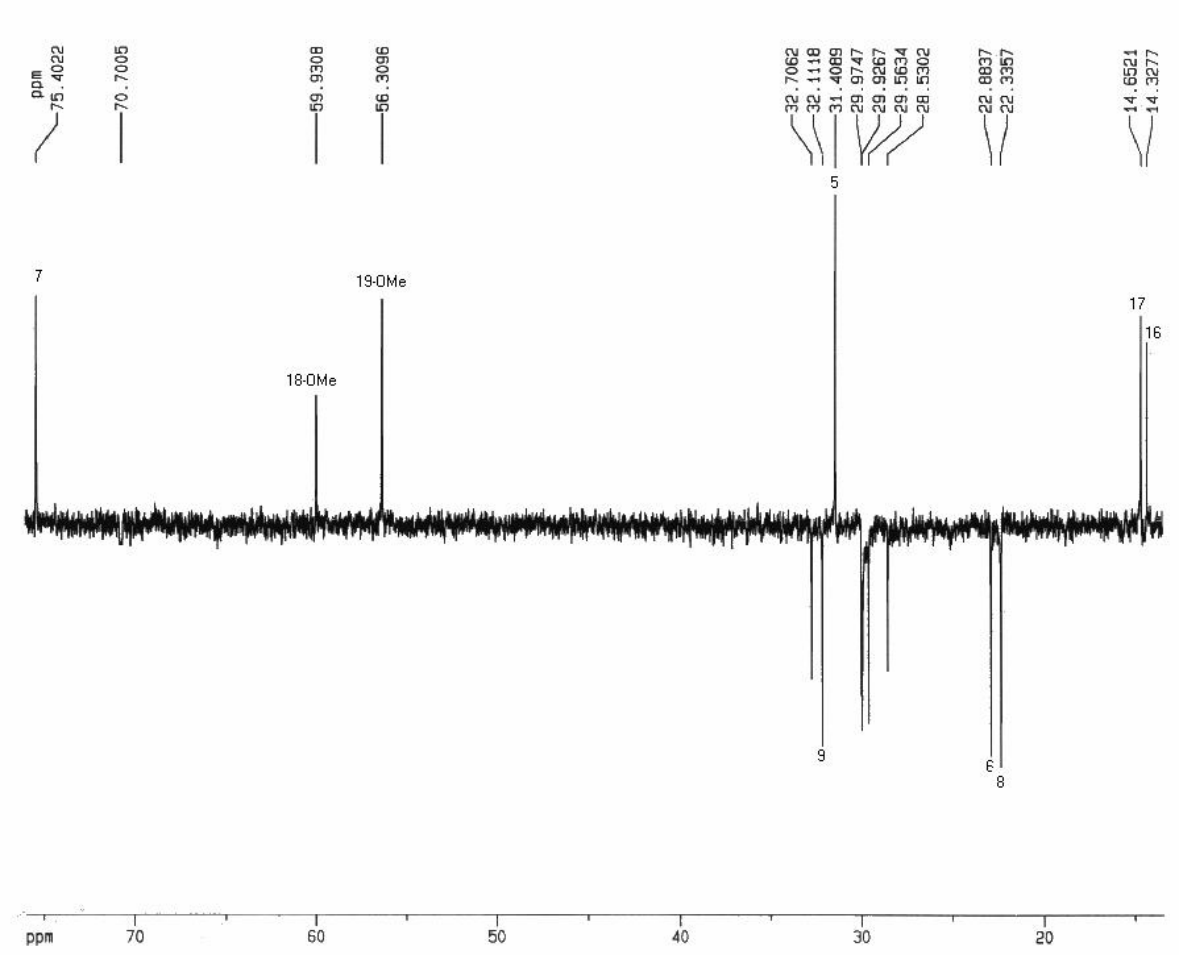


Figura 20. Espectro de RMN de DEPT 135° de GO3 em $CDCl_3$ a 100 MHz expandido entre δ 14,32 e 75,40.

4.2.1.2.6. Espectro de RMN do Tipo HMQC e HMBC

O espectro bidimensional heteronuclear HMQC, (Figura 21), permitiu confirmar os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados, presentes em GO3, através da correlação de cada um dos hidrogênios com seus respectivos carbonos já assinalados anteriormente através da análise do espectro unidimensional de RMN ^{1}H e dos experimentos bidimensionais COSY ^{1}H-^{1}H e NOESY.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

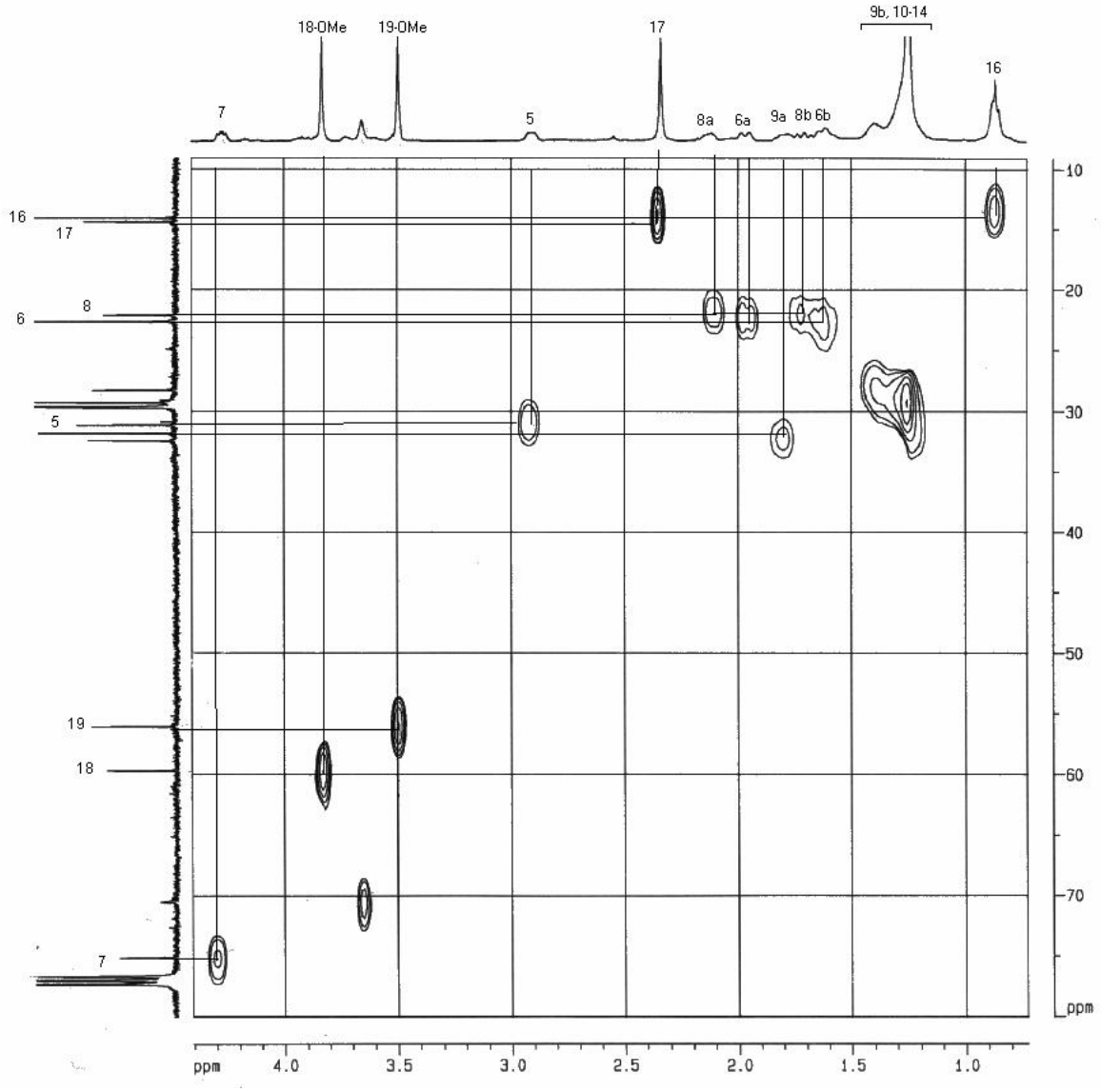


Figura 21. Espectro de RMN de 2D, HMQC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

As correlações a longa distância via ^2J e ^3J, observadas no espectro HMBC (Figuras 22, 22a, 23b) foram fundamentais, principalmente, na possível localização da conectividade do grupo metoxila e cadeia lateral (n-alquila) presente na molécula proposta para GO3. Neste espectro é possível ver com clareza as correlações do hidrogênio metínico H-7 (δ 4,28) com o carbono do grupo metoxila (19-OMe) em δ 56,15 e com os dois carbonos não hidrogenados C-4' (δ 128,87) e C-8' (δ 140,94) ppm, sugerindo desta forma a conectividade do grupo metoxila ao carbono C-7. Com relação à conectividade do substituinte n-alquila ao carbono C-5, apenas uma correlação foi observada, a correlação de um dos hidrogênios metilênicos endocíclicos H_a-6 (δ 1,96) com o carbono metínico C-5 (δ 31,18). As demais

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

correlações que permitiram a atribuição dos sinais aos carbonos da estrutura de GO3, são encontrados na tabela 8 e representados na figura abaixo.

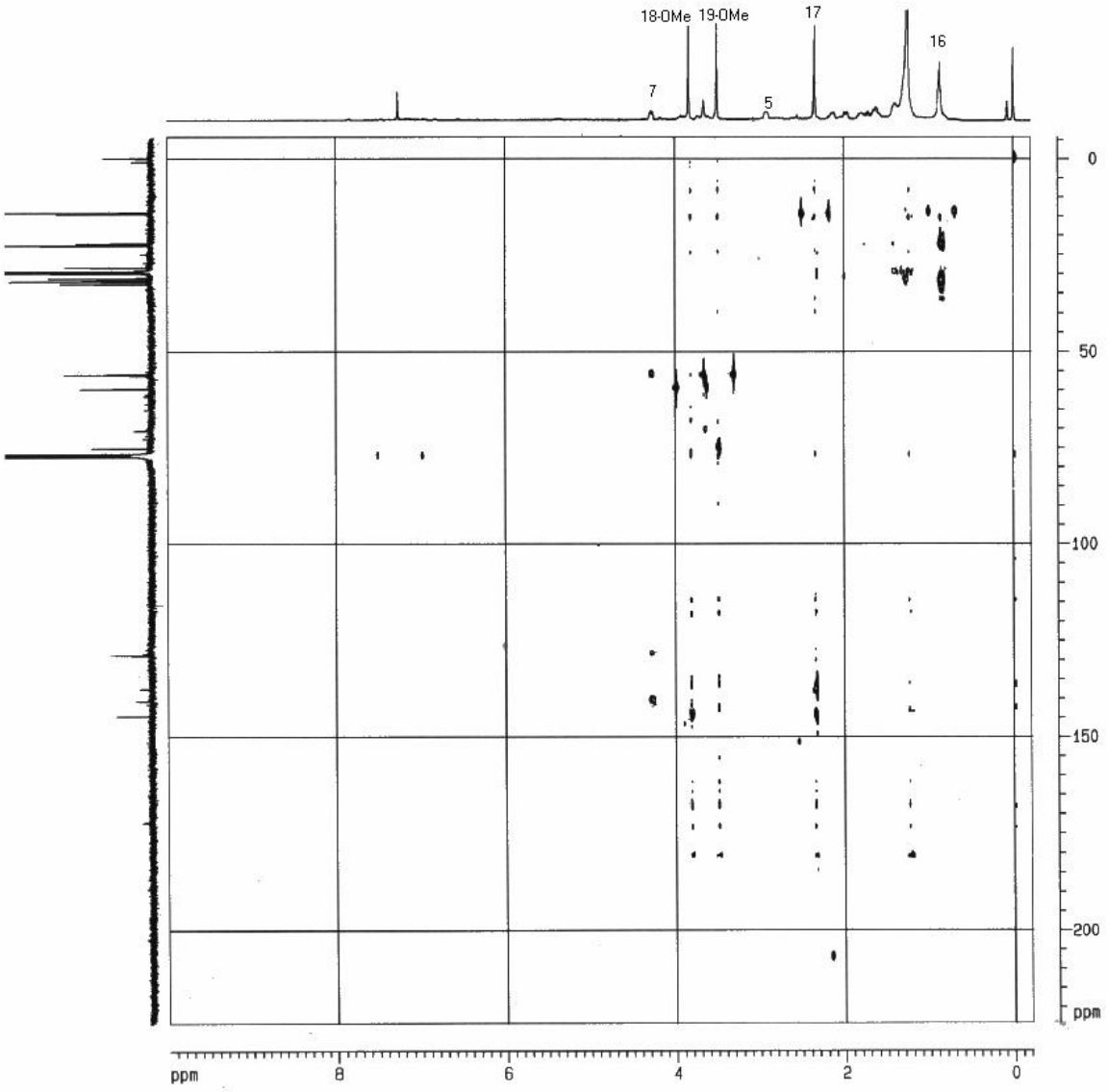


Figura 22. Espectro de RMN de 2D, HMBC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

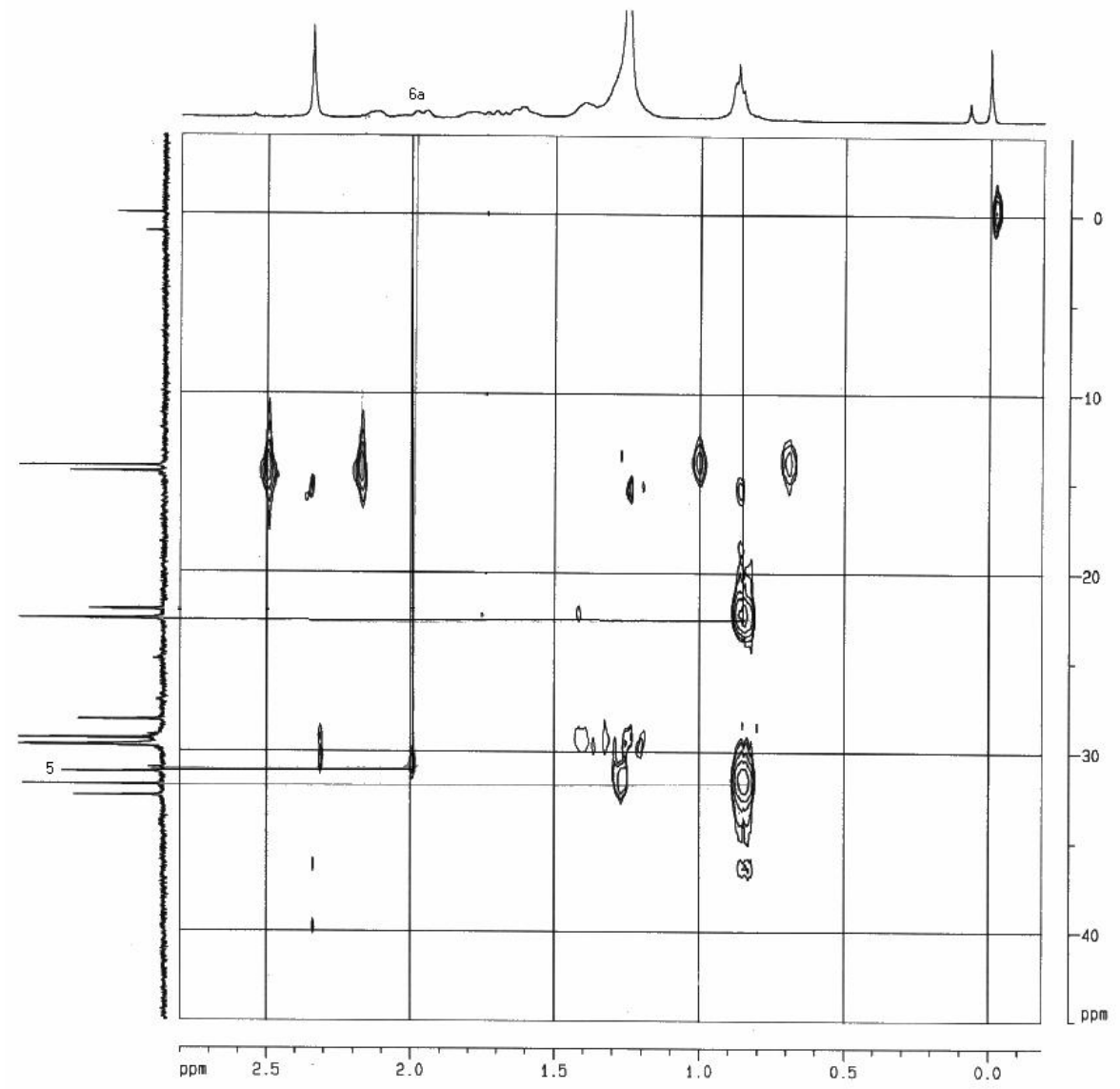


Figura 22a. Expansão do espectro de RMN de 2D, HMBC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

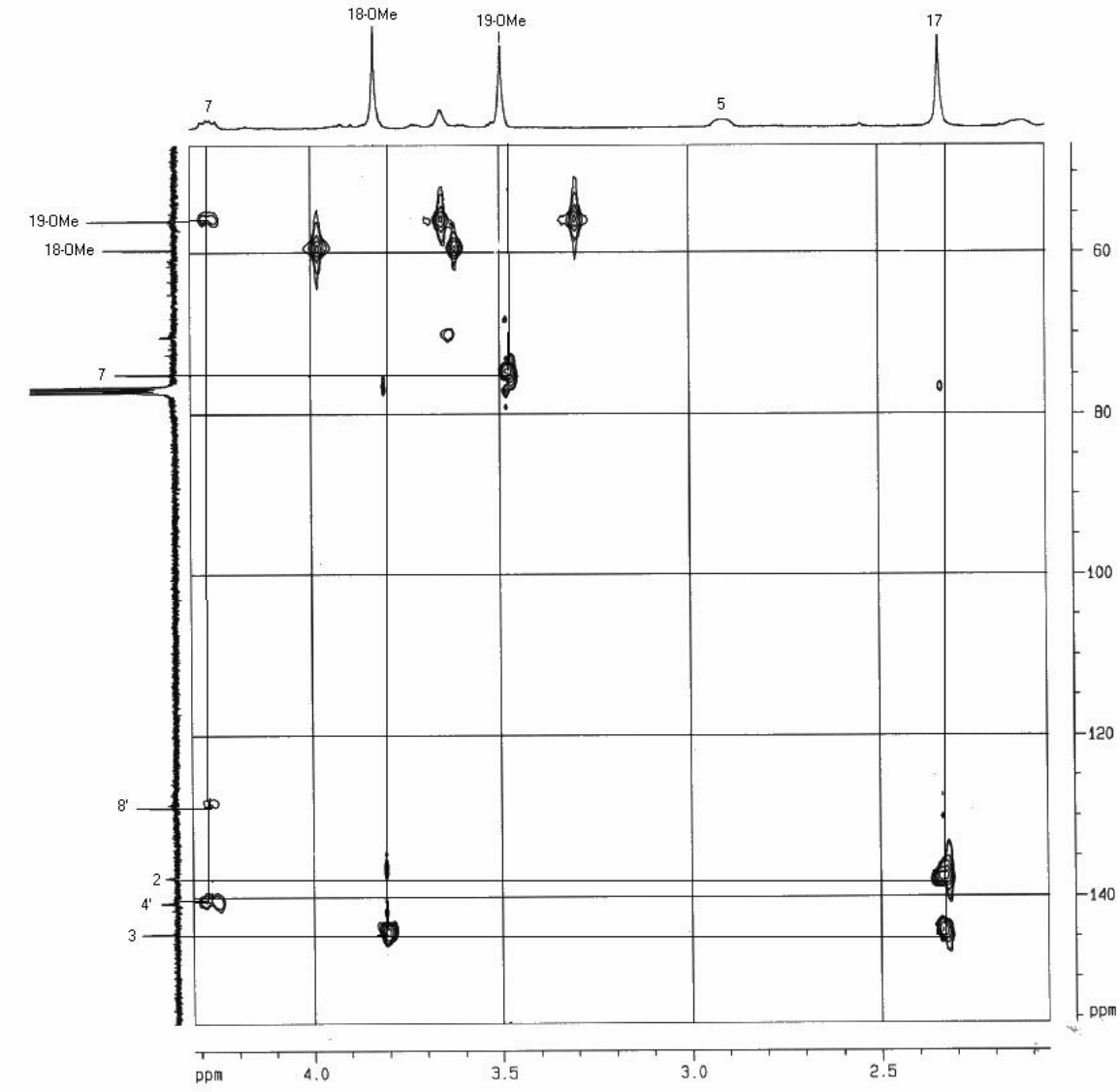


Figura 22b. Expansão do espectro de RMN de 2D, HMBC de GO3 em $CDCl_3$, 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C e correlações dos experimentos COSY e HMBC para GO3, em $CDCl_3$.

POSIÇÃO	δ ^{13}C	δ ^{1}H	COSY	HMBC	NOESY
1	-				
2	137,95			3; 17	
3	144,57			2; 18	
4	171,75				
4’	128,87			6	
5	31,87	2,91 (1H)	6a; 7; 8; 10	6a; 7; 9	6a; 6b; 9a
6	22,65	Ha=1,96 Hb=1,62	5	5; 7; 8; 4’	5 5; 6a; 9a
7	75,03	4,27(1H)		4’; 8’; 19	7; 8b; 19; 8a; 19
8	22,15	Ha=2,14 Hb=1,69		6; 7	6b; 8a; 19
8’	140,98				
9	30,58		5; 10	5; 10	5
10 - 15	22,20 – 32,51				
16	14,09	0,86 (3H; t)	15		
17	14,40	2,34 (3H; s)		2; 3	
18-OMe	59,78	3,93 (3H; s)		3	
19-OMe	56,15	3.49 (3H; s)			7; 8a; 8b

Apesar do crescente avanço em técnicas espectroscópicas e espectrométricas, nem sempre é possível determinar a configuração absoluta de um produto natural inédito. Neste contexto GO3 é um exemplo. A princípio achou-se que esse composto poderia ser um derivado de GO2, neste caso a localização do substituinte estaria na posição C-8, isto é, a metilação ocorreria a partir da redução da carbonila nesta posição, contrariando, desta forma, a elucidação estrutural proposta através das análises espectrais.

Com a finalidade de esclarecer tais dúvidas persistentes, desenvolveu-se a seguinte estratégia:

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

A partir do composto GO2 realizou-se a seguinte semi-síntese: GO2 (15 mg) foi dissolvido em MeOH (2 mL) e $NaBH_4$ (2 mg) a uma temperatura de 10°C. Após completar a adição, a mistura foi agitada durante um período de 1 hora. No final da reação adicionou-se H_2O para destruição do $NaBH_4$ restante; em seguida a mistura reacional foi extraída com $CHCl_3$. Finalizada a extração, o solvente foi removido e obteve-se uma mistura de dois álcoois que foram codificados de GOH e GOH' (Figura 23).

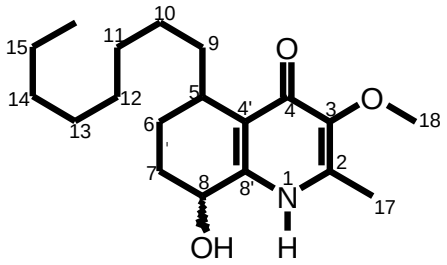


Figura 23. Estrutura dos álcoois (GOH e GOH') de estereoquímica indefinida

Esses dois álcoois foram separados em placas de cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP), cujos rendimentos foram respectivamente 66,6% e 13,3% para GOH e GOH'. Após a confirmação da redução do composto GO2, através de CCD e análises espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C (Figuras 24 e 25), fez-se a metilação dos dois álcoois com diazometano em meio etéreo, obtendo-se, assim, os compostos GOMe e GOMe'.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

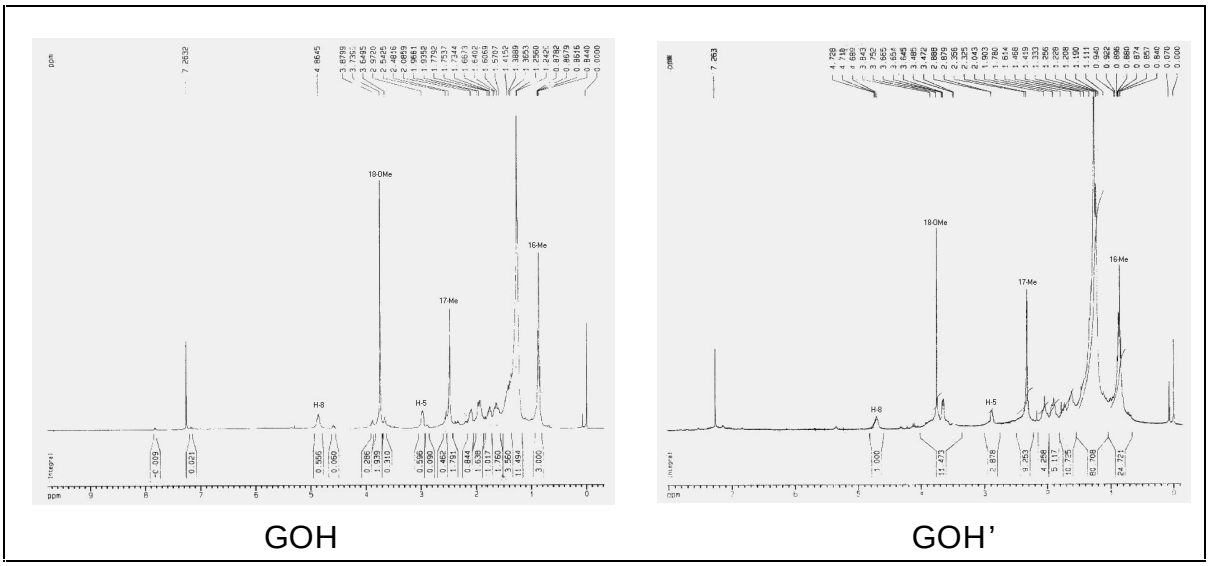


Figura 24. Espectros de RMN ^{1}H de GOH e GOH'

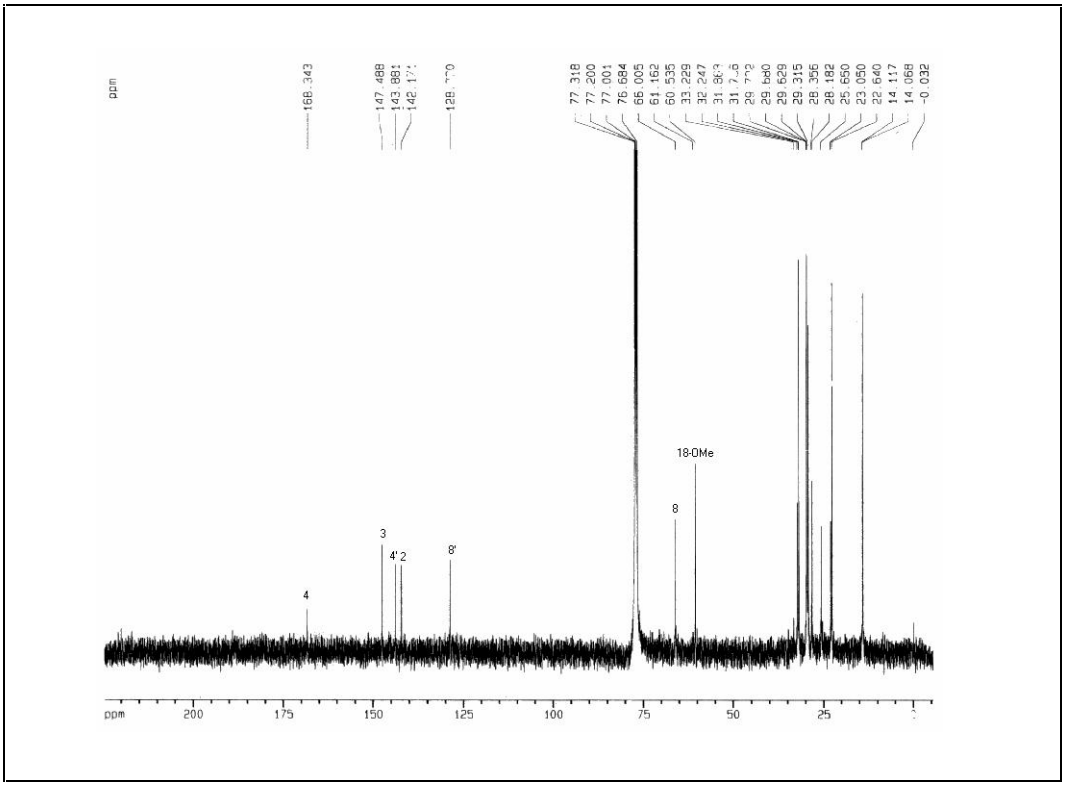
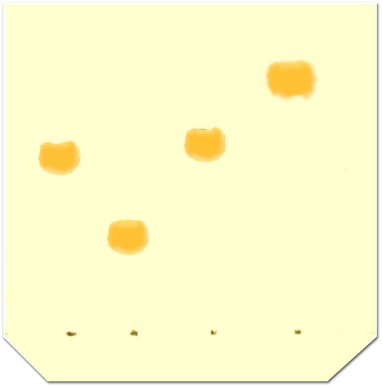


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C de GOH

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

GOMe e GOMe' foram comparados com GO3 através de análises em CCD (Figura 26). Verificou-se nesta análise que os Rfs dos dois compostos modificados apresentaram valores diferentes em relação ao composto natural (GO3), quando testados em diferentes sistemas de solventes.

A = GO2, Rf = 0.46
B = GO3, Rf = 0,28
C = GOMe, Rf = 0,50
D = GOMe', Rf = 0.68



A B C D

Figura 26. Perfil cromatográfico de GO2, GO3, GOMe e GOMe' em $CHCl_3$ e MeOH (96 : 4) revelado com Dragendorff.

A diferença entre GO3 e os compostos modificados (GOMe, GOMe') também foi detectada pela injeção em cromatógrafo gasoso (CG), ambos apresentaram tempos de retenção diferentes com relação ao GO3 (GO3 = 24,0 min., GOMe = 23,19 min. e GOMe' = 21,71 min.) (Figura 27). Essas análises comparativas permitiram distinguir GO3 dos dois compostos semi-sintéticos, podendo, desta forma, concluir que GO3 não é um derivado de GO2. Uma análise de raios-X de GO3 seria necessário para comprovar a conectividade.

Esta nova substância (GO3) de nomenclatura *3,7-dimetoxi-2-metil-5-octil-1,4,5,6,7,8-hexaidro-4-quinolinona*, foi denominada de chamaedrona. Esta denominação surgiu da derivação do radical da palavra chamaedrys (chamaedr) com o sufixo da palavra quinolinona (ona): classe de alcalóides a qual pertence esse composto.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

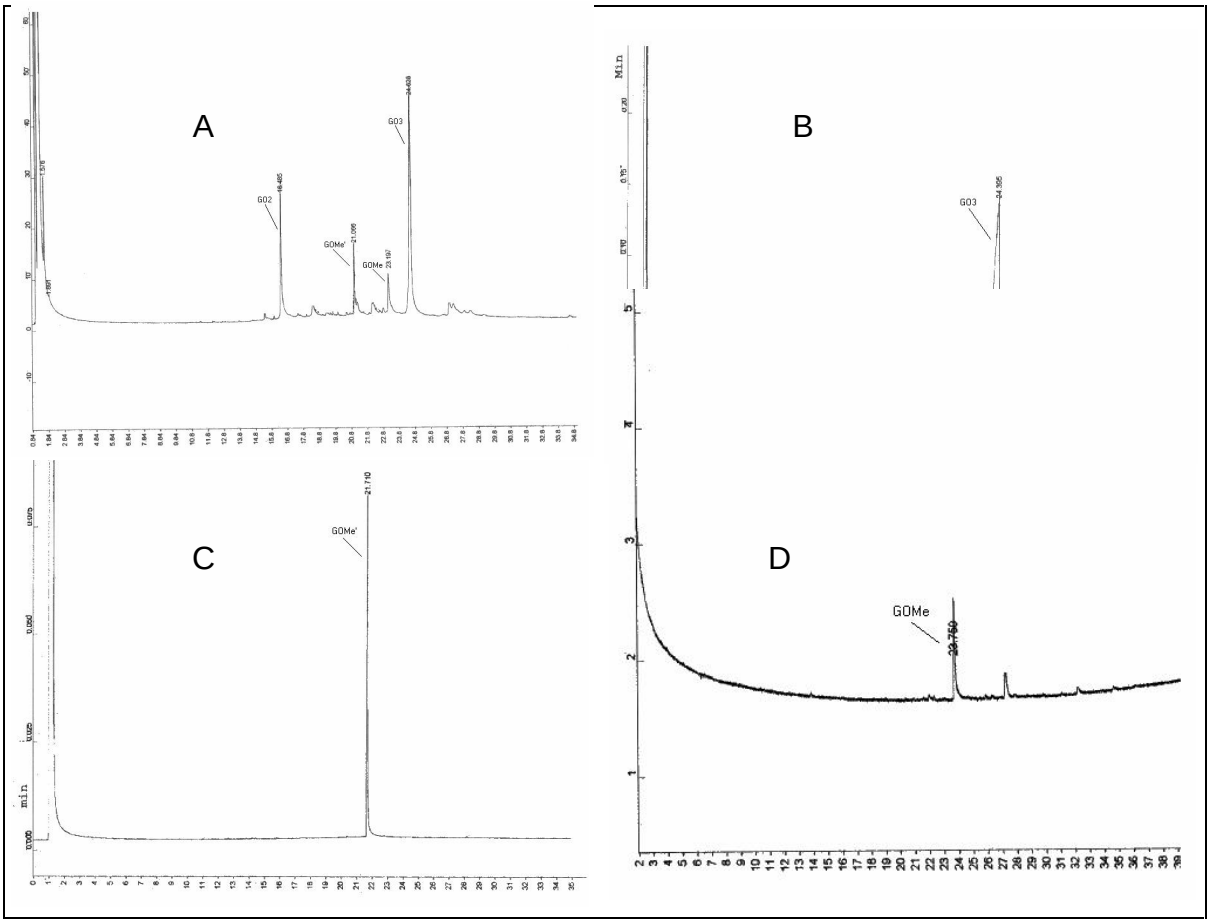


Figura 27. Cromatogramas das substâncias naturais e modificadas: (A = GO2+GOMe'+GOMe+GO3; B = GO2+GO3; C = GOMe'; D =GOMe)

4.2.1.3. Definição da configuração relativa dos centros quirais (C-5, C-8) de GOH através do estudo de raios-X.

Para determinação da difração de raios-X, foi necessário tornar o composto GOH, de aspecto viscoso, em cristais. Para isso, GOH foi diluído em acetona e deixado em repouso até a evaporação do solvente, o qual originou cristais possíveis de serem analisados por este método. A análise do estudo de raios-X deste cristal pôde confirmar a configuração relativa dos carbonos 5 e 8. A Figura 28 mostra, com clareza, a geometria *cis* entre os substituintes n-alquila e hidroxila conectados, respectivamente a esses carbonos. Embora nesta figura do cristal, os substituintes apareçam em posição α em relação ao plano, fica claro que não é possível definir a configuração absoluta nas posições C-5 e C-8 neste experimento com relação ao plano. Podendo esta também ser demonstrada na posição β, já que se trata de um

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

método relativo. Para a confirmação definitiva desta posição, seria necessário determinar a estereoquímica absoluta de um dos dois centros quirais presentes na molécula. Para este fim, utilizou-se a técnica de Horeau descrita a seguir:

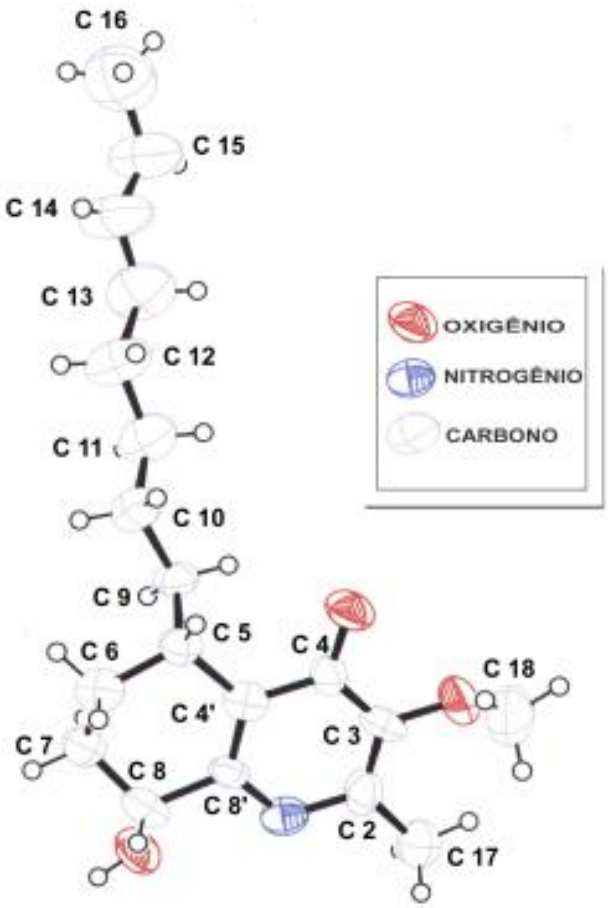


Figura 28. Estrutura obtida através da difração de raios-X de GOH.

4.2.1.3.1. Determinação da Estereoquímica do Centro Quiral C-8 de GOH

O método de Horeau foi empregado a fim de se determinar a estereoquímica do carbono 8, dos compostos semi-sintéticos. Para isto, GOH foi submetido a uma reação com o anidrido 2-fenilbutírico racêmico, obtendo-se, desta forma, dois ésteres diastereoisoméricos, que foram descartados, e uma mistura de ácidos (+) e (-)-2-fenilbutíricos em proporções diferentes, conforme mostra o esquema 2 página

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

14. A medida do excesso enantiomérico destes ácidos, após a metilação, foi utilizada para determinação da estereoquímica.

A mistura destes ácidos foi derivatizada utilizando-se diazometano e analisada por cromatografia gasosa enantiosseletiva (Figura 29).

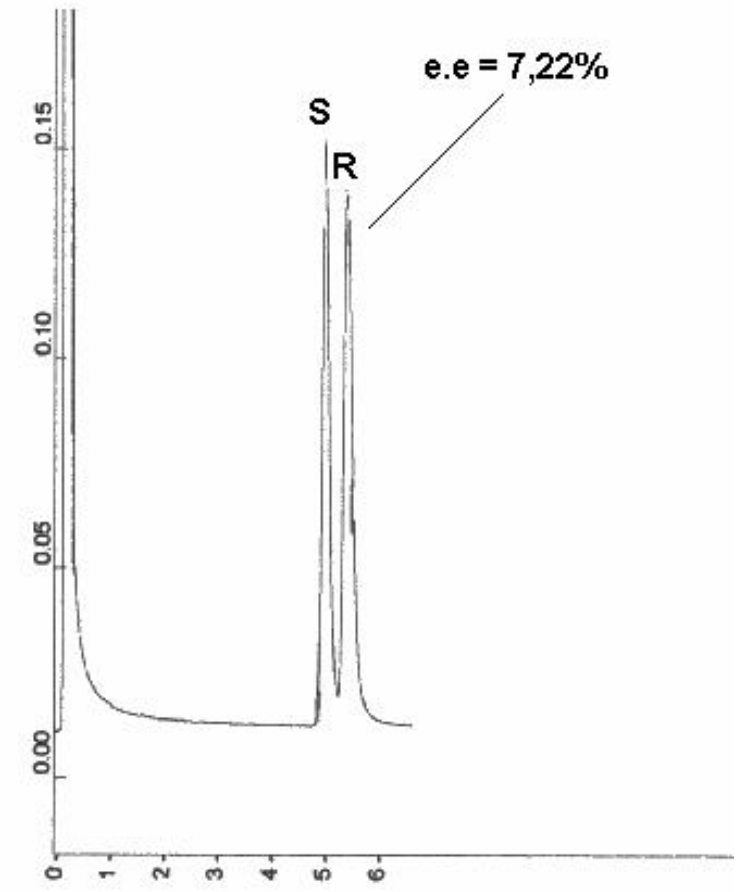


Figura 29. Cromatograma dos ácidos 2-fenilbutíricos metil ésteres obtidos na reação do álcool com anidrido 2-fenilbutírico racêmico.

Obteve-se um excesso enantiomérico (7,22%) do ácido (-)-(*R*)-2-fenilbutírico. A regra de Horeau determina que, quando o excesso corresponder ao enantiômero (-)-(R), como neste caso, a estereoquímica do álcool será aquela em que o substituinte maior (L) ficará próximo ao observador, enquanto que o médio (M) ficará mais distante, sendo o contrário quando o excesso for do enantiômero (+)-(S). Os

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

ligantes OH e H nos dois casos ficarão no plano, conforme podem ser observados no esquema 3 página 14.

Identificados os grupos L (maior volume) e M (volume médio) para GOH (Figura 30) e aplicando-se a regra Cahn, Ingold e Prelog (CIP), foi possível determinar a estereoquímica absoluta para este centro quiral como (*R*) (Figura 31), já que se obteve um excesso do ácido residual (*R*), e o grupo M é o de maior prioridade que L.

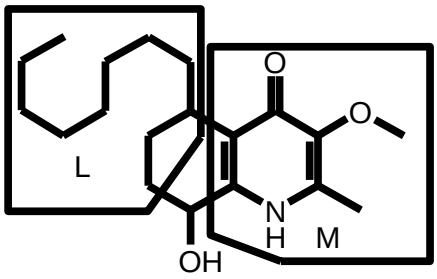


Figura 30. Atribuição do volume dos grupos ligados ao carbono 8.

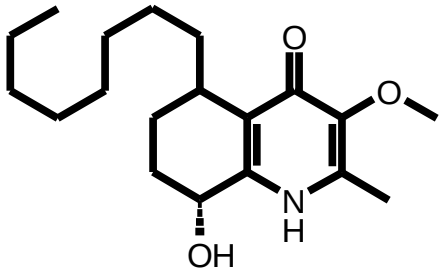


Figura 31. Estrutura de GOH com estereoquímica absoluta definida (*8 R*).

Com a determinação da estereoquímica absoluta do carbono 8 pelo método de Horeau, foi possível ratificar a estrutura do cristal (α em relação ao plano) presente na Figura 28 e conseqüentemente definir a estereoquímica do carbono 5 (Figura 32, p. 62) como (*S*). Essas duas técnicas foram essenciais na determinação da estereoquímica de GO2 e de outros três derivados (GOH', GOMe, GOMe'), como também, pôde tirar a dúvida a respeito da conectividade da metoxila no anel não aromático do composto natural GO3 (chamaedrona).

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

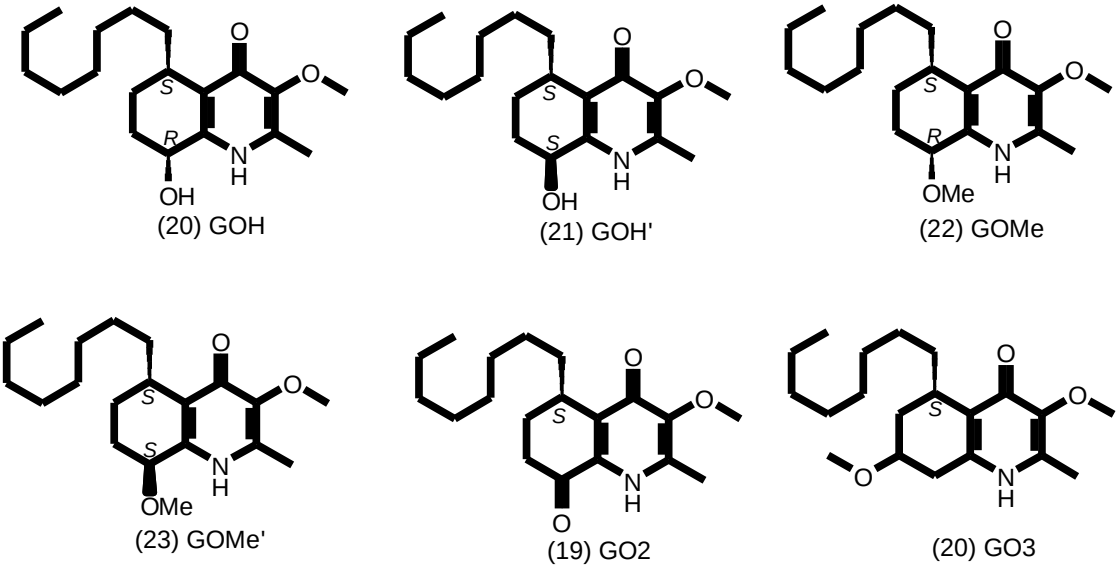


Figura 32. Estruturas configuracionais dos compostos semi-sintéticos e naturais GO2 e GO3.

4.2.1.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Biautografia de GO3 e Derivados de GO2.

Os resultados dos ensaios biológicos, para avaliação da atividade antimicrobiana do composto GO3, assim como de compostos derivados de GO2, (GOH, GOH', GOMe, GOMe') foram bastante expressivos, quando comparados com seus padrões; Cloranfenicol para bactérias (0,5 a 0,7µg) e Nistatina para fungos (2,5 a 4,0 µg). Na tabela 9, encontram-se os valores correspondentes à quantidade inibitória mínima (QIM) das cinco substâncias mencionadas. A substância GO3, por exemplo, mostrou-se fortemente ativa frente aos microrganismos *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* (QIM = 1,56 µg) e *S. epidermidis* (QIM = 3,12µg) e uma atividade significativa frente aos demais microrganismos testados (QIM = 6,25 a 50 µg). A menor quantidade inibitória para os dois álcoois obtidos (GOH e GOH') ocorreu frente aos microrganismos *E. coli* (QIM = 1,56µg) para GOH e *B.subtilis* (QIM = 3,12µg) para GOH', para os demais microrganismos testados apresentou uma atividade moderada (QIM = 6,25 a 50µg).

A metilação de GOH, isto é, a transformação para GOMe promoveu uma notável ampliação do espectro bacteriano. Esta substância foi fortemente ativa para

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

todas as bactérias gram positiva e gram negativa testadas (QIM = 1,56µg). Por outro lado, é de se notar que a atividade frente aos dois tipos de fungos testados (*S. cerevisae, C.albicans*) ocorreu o contrário. Para o microrganismo *S. cerevisae* a atividade foi reduzida 50 vezes, enquanto para *C. Abicans* foi totalmente perdida. A atividade do composto metilado (GOMe') foi ampliada apenas 50% frente aos microrganismos
S. aureus, *K. pneumoniae* e *B. subtilis* e permanecendo constante para os demais microrganismos testados. A figura 33 expõe um exemplo do resultado de um desses ensaios de bioautografia realizado com os compostos naturais GO2 e GO3.

Tabela 9. Determinação da quantidade inibitória mínima de GO3 e derivados de GO2.

Microrganismos	GO2 (µg)	GO3 (µg)	GOH (µg)	GOH' (µg)	GOMe (µg)	GOMe' (µg)	Padrões[1] (µg)
Staphylococcus aureus ATCC 6538p	NA	25,0	6,25	6,25	1,56	3,12	0,7
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	NA	3,12	6,25	12,5	1,56	12,5	0,7
Bacillus subtillus ATCC 6633	NA	50,0	NA	3,12	1,56	1,56	0,7
Salmonella setubal ATCC 19796	NA	6,25	12,5	6,25	1,56	6,25	0,7
Escherichia coli ATCC 25792	NA	1,56	1,56	12,5	1,56	12,5	0,5
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	NA	6,25	50,0	25,0	1,56	12,5	0,5
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	NA	25,0	25,0	12,5	1,56	12,5	0,6
Candida albicans ATCC 10231	NA	1,56	1,56	NA	NA	NA	2,3
Sacharomyces cerevisae ATCC 2601	NA	1,56	1,56	25,0	50,0	25,0	3,3
Candida dubliniensis SM-26	NA	NT	NT	NT	12,5	12,5	4,0
Cryptococcus neoformans ATCC 28952	NA	NT	NT	NT	NA	NA	2,4

[1]Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos; NA: não Ativo; NT: não testado.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

É provável que a presença de mais um carbono de hibridização sp^2 no anel não aromático do composto 19, seja o responsável pela sua não atividade microbiológica. Isso é percebível pela forte atividade dos compostos modificados (21 a 24) e chamaedrona (20), que apresentam apenas dois carbonos de hibridização sp^2 e quatro sp^3 no anel não aromático.

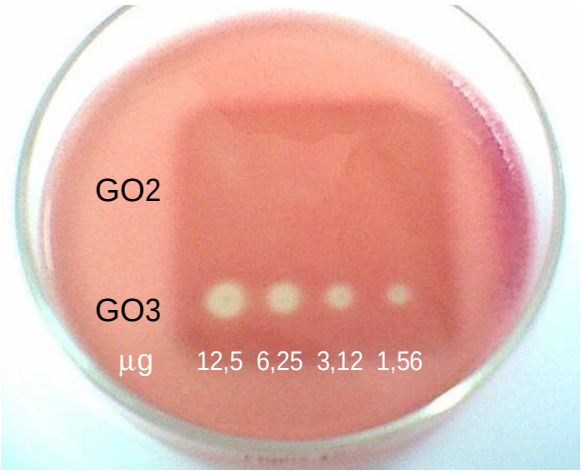


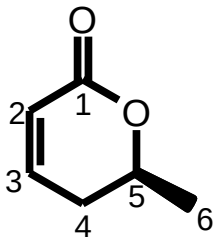
Figura 33. Demonstração do resultado do ensaio de bioautografia realizado com os compostos GO2 e GO3 frente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25792.

4.2.2. Caracterização dos Compostos Obtidos na Fração Clorofórmica de *Melochia chamaedrys*.

4.2.2.1. G-9

O composto G-9 (25) (125 mg) foi isolado da fração clorofórmica e apresentou-se como óleo de cor castanho-claro. A análise de rotação ótica deste metabólito apresentou um $[\alpha]_D$ = +170 (c = 5; $CHCl_3$), mostrando tratar-se de uma molécula quiral. Sua identificação foi possível graças às técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H, ^{13}C, e experimento bidimensional de COSY, além de dados obtidos na literatura.[39-41]

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



25

O espectro de RMN ^{1}H aliado ao espectro de RMN ^{13}C sugeriu a presença de um grupo metila, de um metileno alílico, de um carbono metínico vizinho a um heteroátomo e de dois hidrogênios olefínicos.

Na região espectral entre δ 1,52 e 6,66 do espectro de RMN ^{1}H mostrado na figura 34, é possível observar cinco sinais referentes a oito hidrogênios, sendo 3 hidrogênios pertencentes ao grupo metila (6-Me) em δ 1,52, um hidrogênio metínico (H-5) em δ 4,30, dois hidrogênios alílicos (H_2-4) em δ 2,10 e de dois hidrogênios olefínicos (H-2 e H-3) em δ 5,69 e δ 6,66, respectivamente.

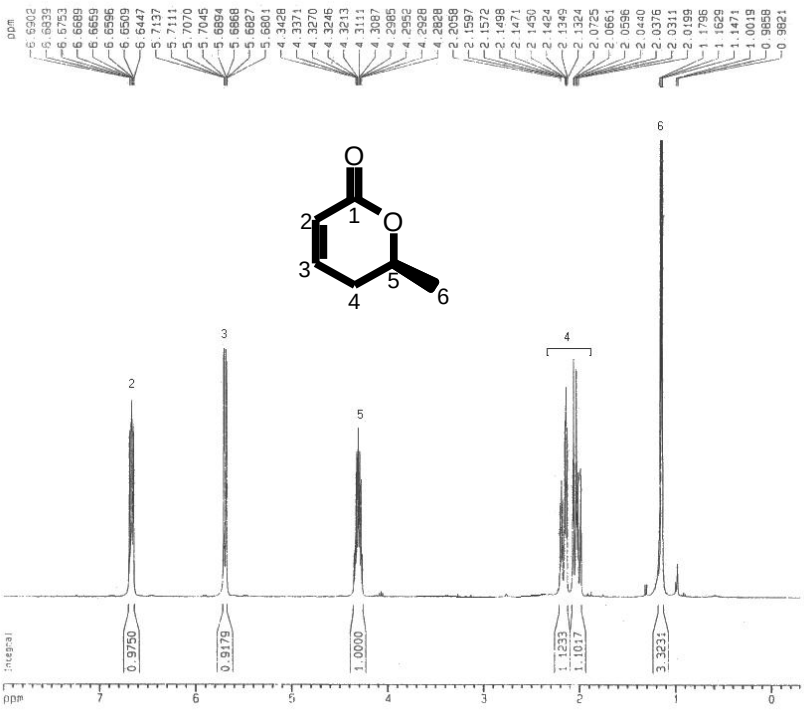


Figura 34. Espectro de RMN de ^{1}H de G-9, em $CDCl_3$, a 400 MHz.

Na base do espectro ^{1}H – ^{1}H COSY (Figura 35) os sinais do intervalo 6,66 – 1,52 foram atribuídos a um sistema de spin. Os sinais em δ 6,66 e 5,69

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

referentes aos hidrogênios olefínicos H-2 e H-3 estão correlacionados aos multipletos a δ 2,10 e δ 4,32 atribuídos aos hidrogênios alílicos H_{2-4} e hidrogênio metínico H-5, por sua vez correlacionado ao dubleto da metila em δ 1,52.

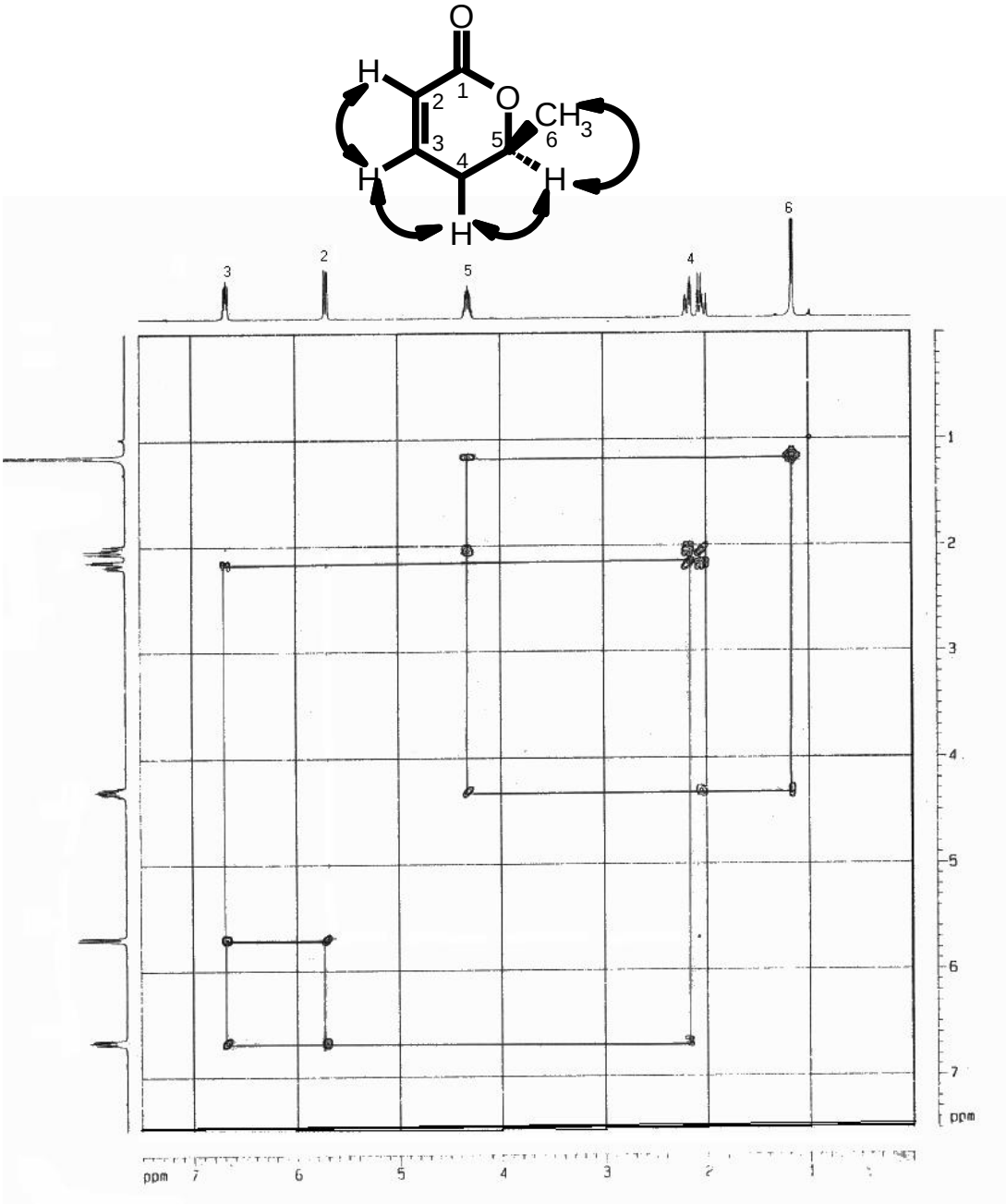


Figura 35. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-9, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 36) é bastante informativo para uma lactona, porque confirma a presença da metila C-6, em δ 20,20, do carbono metileno alílico C-4 em δ 30,44, do carbono metínico em δ 74,04, dos respectivos carbonos olefínicos em δ 120,45 e δ 145,07 e mais a presença de um sinal em δ 164,04, referente a carbonila de lactona.

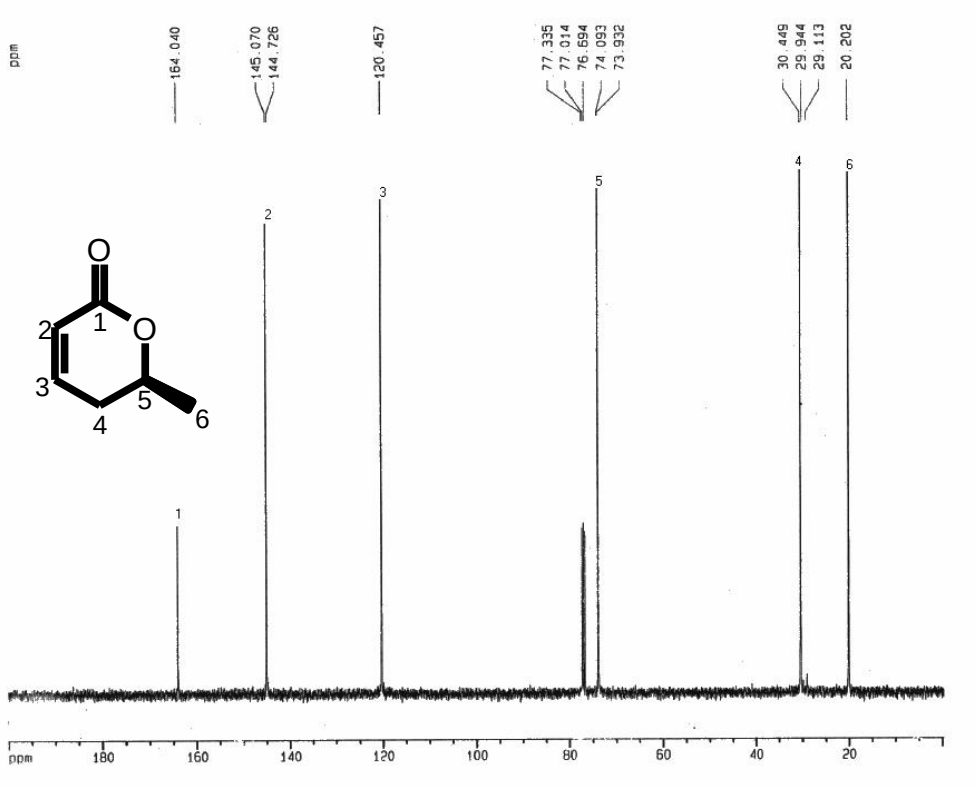


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C de G-9, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

Os sinais no espectro de DEPT 135° (Figura 37) para o composto G-9 foram ainda mais precisos, pois foi possível notar o desaparecimento do sinal da carbonila (C-1), a presença de quatro sinais com amplitude positiva referentes aos carbonos metínicos (C-2, C-3 e C-5) e metílico (C-6) e um único sinal com amplitude negativa referente ao carbono metilênico (C-4).

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

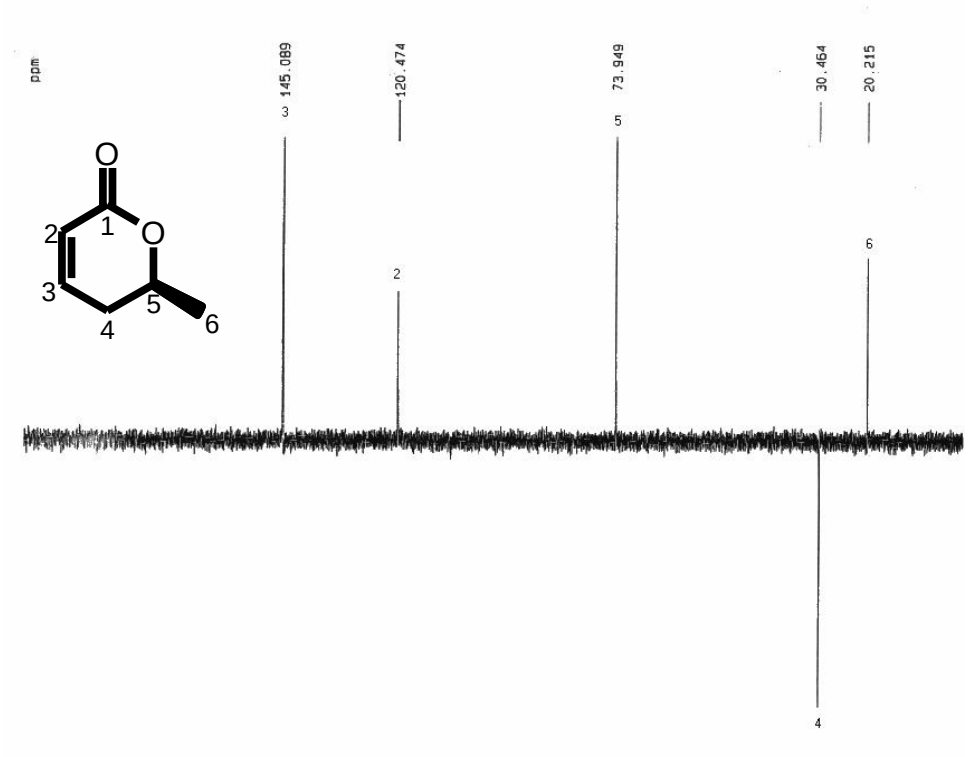


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°de G-9, em $CDCl_3$, a 100 MHz.

A estrutura 25 determinada através das análises espectroscópicas neste trabalho e confirmada com dados bibliográficos, corresponde a lactona *5,6-diidro-6(S)-metil-2H-piran-2-ona*, conhecida como ácido parasórbico, substância já descrita na literatura, porém a sua ocorrência no gênero Melochia está sendo originalmente descrita neste trabalho.

Esta substância foi isolada, pela primeira vez, do fruto de *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) por Hofmann há mais de cem anos[42]. Cardellina II e Meinvald também isolaram esta lactona de *Vaccinium macrocarpan*. Esses autores relatam ainda em seu trabalho, a eficiência desta substância em inibir o crescimento de fungo e a germinação de sementes[40].

Horton et al[42] e Lichtenthaler *et al*[43] sintetizaram esta substância. Segundo eles, esta lactona apresenta uma grande vantagem, pois se trata de uma molécula simples, fácil de ser sintetizada e de caráter pró-sintético, devido às funções alqueno e éster presentes na sua estrutura.

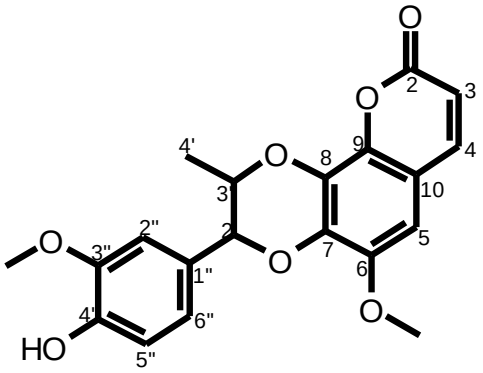
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4.2.2.2. G-28

Esse composto foi isolado da fração clorofórmica de *Melochia chamaedrys*. Apresentou-se em forma de um sólido branco amorfo, tornando-se finos cristais incolores em presença da mistura de acetato de etila e éter de petróleo de ponto de fusão 246 - 248 °C. A eluição desta substância em $CHCl_3$ e MeOH (98:2) originou um

Rf = 0,44.

Através da aplicação de métodos físicos, como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C e experimentos uni-e bidimensionais, como DEPT 135°, COSY, HMQC, HMBC e NOESY, foi possível propor a estrutura 26 a este composto.



26

4.2.2.2.1. Espectro de Massas

O espectro de massas (EIMS) (Figura 38) foi uma das ferramentas de grande importância na elucidação de 26. A partir dele foi possível deduzir parcialmente os principais fragmentos e permitir a construção do esqueleto molecular, típico de uma cumarinalignóide, que posteriormente foi confirmado pelo estudo exaustivo de espectroscopia de RMN de ^{1}H e ^{13}C.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

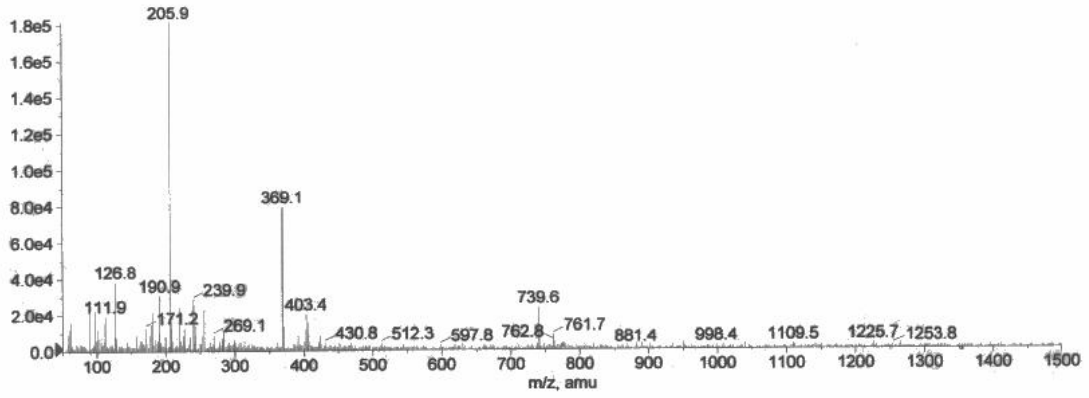
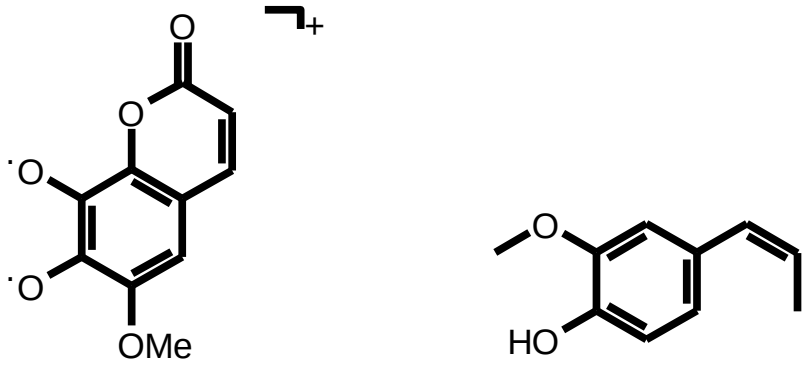


Figura 38. Espectro de massas de G-28

No espectro de massas (EIMS) foi observado um íon molecular de m/z = 369,1. Este valor associado aos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C, levou-nos a sugerir a fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_7$ para a substância em estudo. O pico base à m/z 205,9 (100%) sugeriu a presença da unidade cumarínica (a), por outro lado, a eliminação deste íon m/z M–205,9, deixa claro a existência do sistema $(OCH_3)(OH)C_6H_3$-CH-CH-CH_3 (b), característico de lignanas.

Essas informações adquiridas nesta análise reforçam a idéia de que os fragmentos iônicos a e b (Figura 39) constituam a estrutura mencionada para este composto.



a, *m/z* =205,9 (100%) b, *m/z* = 164

Figura 39. Fragmentos iônicos de G-28.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4.2.2.2.2. Espectro de RMN de ^{1}H DE G-28

O espectro de RMN ^{1}H de G-28 (Figuras 40 a 42) permitiu identificar a presença de sinais correspondente a 17 hidrogênios, distribuídos numa região espectral que compreende deslocamentos entre δ 1,28 a 7,61. Esses sinais correspondem a hidrogênios metílicos, metínicos, olefínicos e aromáticos, caracterizando assim a estrutura proposta.

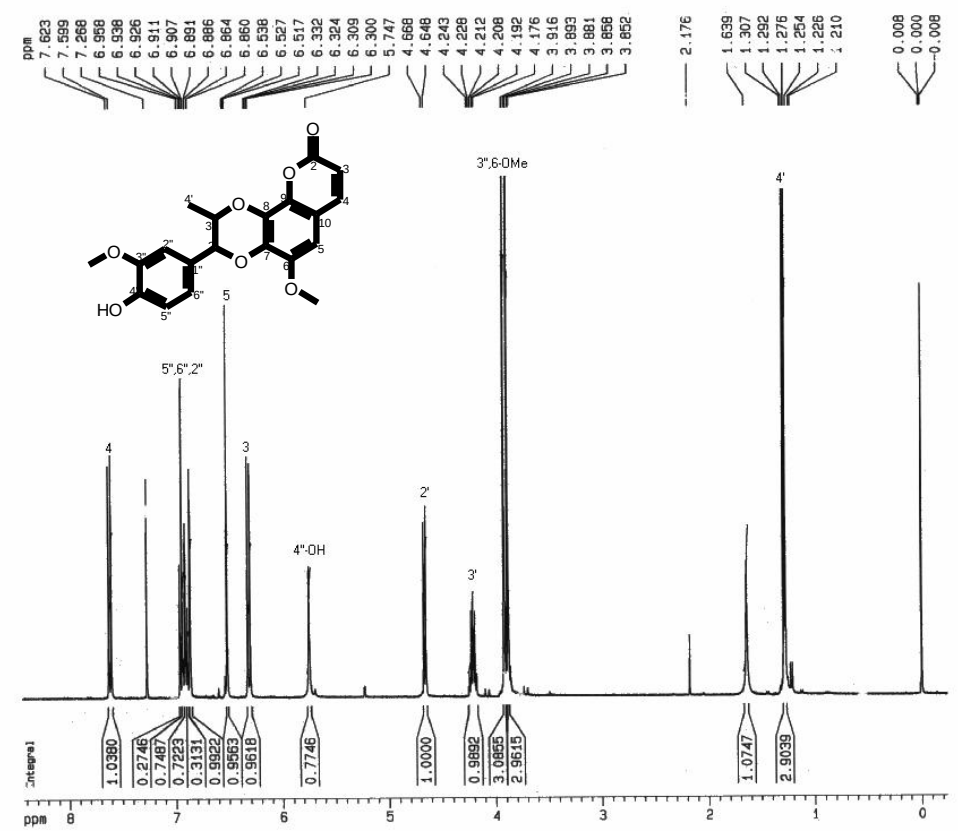


Figura 40. Espectro de RMN de ^{1}H de G-28 em $CDCl_3$ a 400 MHz.

Os hidrogênios metílicos são confirmados pela presença de um dubleto a δ 1,28 referente ao grupo metila 4' sinal resultante do acoplamento com o hidrogênio H-3' e a dois singletos a δ 3,88 e δ 3,92, correspondentes aos hidrogênios dos grupos metoxilas nas posições 6 e 3'' respectivamente.

O hidrogênio metínico H-2', apresenta-se como um dubleto a δ 4,66, acopla-se com o hidrogênio H–3' (δ 4,21) e este por sua vez, acopla-se com o grupo metila 4' (δ 1,28), apresentando-se como um multipleto.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

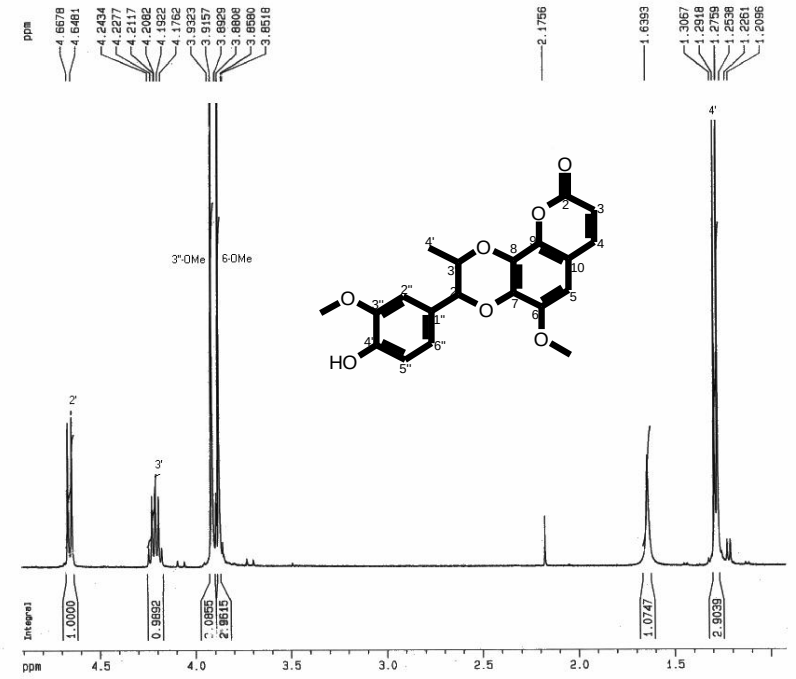


Figura 41. Espectro de RMN de ^{1}H expandido na região entre δ 1,20 e 4,66 de G-28.

Na região espectral compreendida entre δ 5,70 a 7,61 (Figura 43), encontram-se os sinais que correspondem aos hidrogênios olefínicos H–3 e H-4 e os hidrogênios aromáticos H–5, H–2', H-5' e H-6'. Também inclui nessa região o sinal relativo à hidroxila HO-4'.

Os hidrogênios olefínicos H–3 e H–4 com constante de acoplamento *J* = 9,5 Hz, apresentam-se como dubletos e possuem deslocamentos químicos à δ 6,31 e δ 7,61 respectivamente. Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento mencionados para esses hidrogênios são típicos de sistemas cumarínicos[45], o que torna mais evidente a estrutura sugerida.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

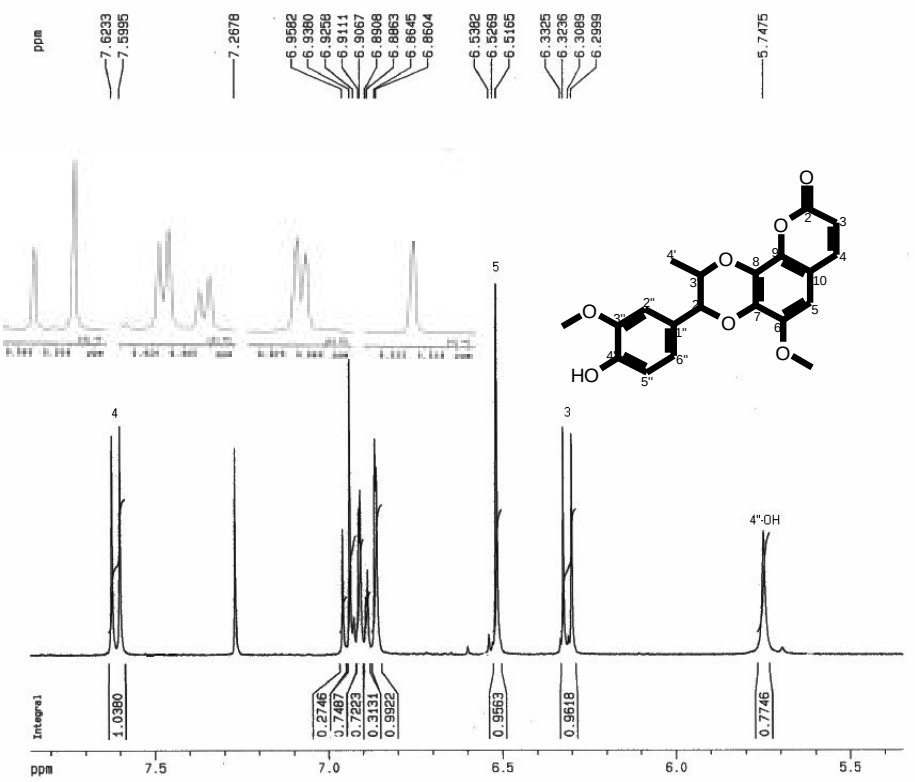


Figura 42. Espectro de RMN de ^{1}H expandido na região entre δ 5,70 e 7,61 de G-28.

Nesta região, observou-se ainda um singleto em δ 5,70 atribuído à hidroxila HO-4'' e outro em δ 6,51 atribuído ao hidrogênio aromático H-5. Observou-se também a presença de dois dubletos em δ 6,86 e δ 6,95 ppm, atribuídos, respectivamente aos hidrogênios H-2'' e H-5'' (*J* = 1,9 e *J* = 8,1 Hz), ambos acoplados com o hidrogênio H-6''. Para o hidrogênio H-6''pode ser observado um duplo dubleto com deslocamento químico δ 6,90 e constantes de acoplamento *J* = 1,9 e *J* = 8,7 Hz.

4.2.2.2.3. Espectro de RMN 2D COSY de G28

Este experimento revelou a interação spin-spin entre os núcleos de hidrogênios, tornando-se eficiente na atribuição definitiva dos sinais de hidrogênios na molécula proposta. É possível notar neste espectro (Figura 43) a presença de dois sistemas de spins. O sistema de spin que aparece em campo mais baixo (δ 6,31 e δ 7,61) neste espectro, refere-se à correlação entre os hidrogênios H-3 e H-4, que aparecem na forma de dubletos (*J* = 9,5 Hz). Esta correlação torna mais evidente a

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

presença do sistema cumarínico na molécula proposta. O outro sistema de spins que aparece em campo alto, refere-se, as correlações dos hidrogênios do grupo metila H_3-4' e H-2' com o hidrogênio H-3'.

Principais correlações observadas no espectro COSY de G-28

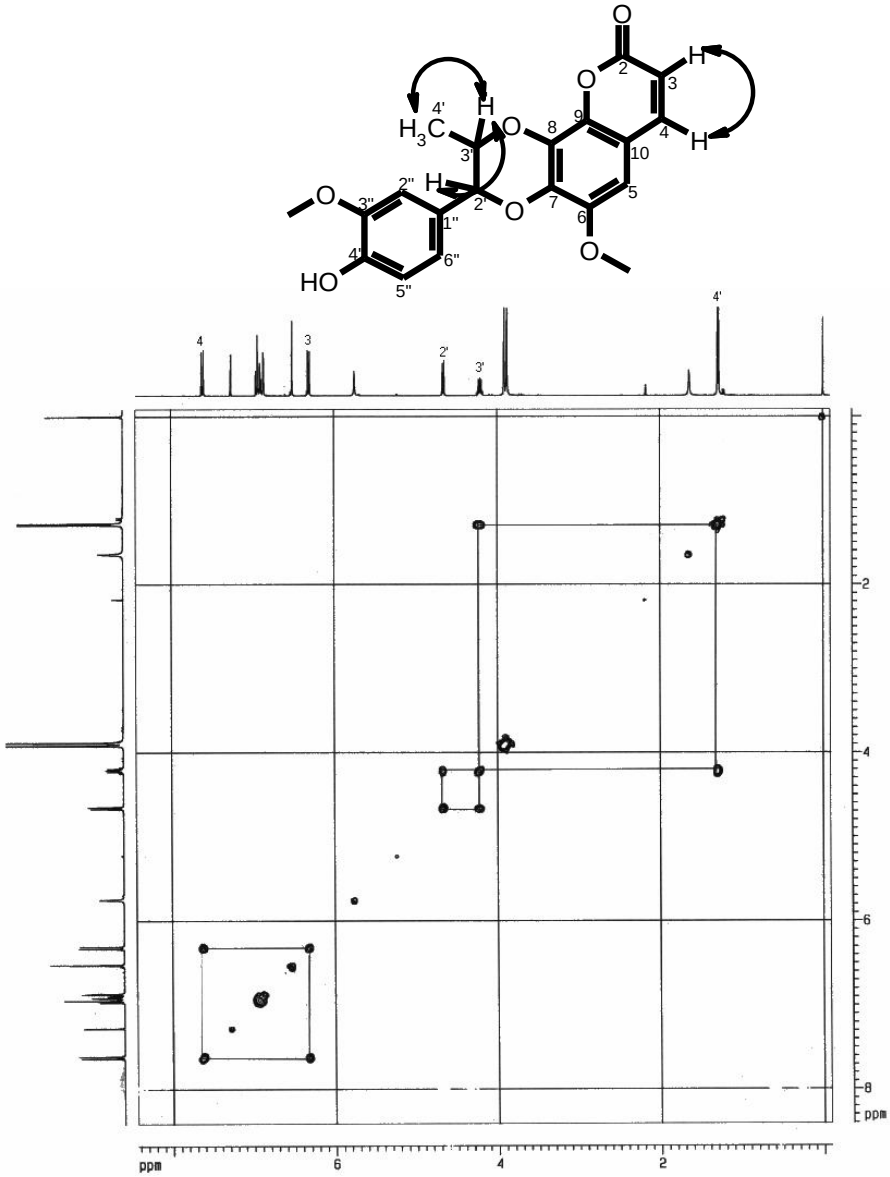


Figura 43. Espectro de RMN de 2D, COSY de G28, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

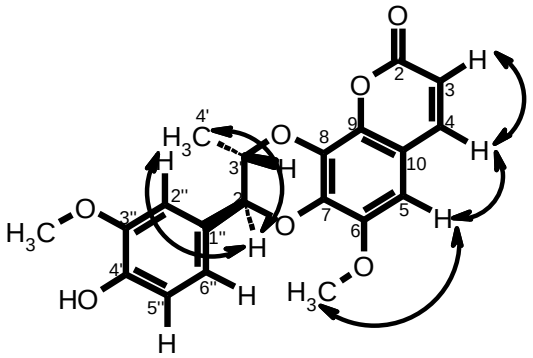
4.2.2.2.4. Espectro de RMN 2D do Tipo NOESY

Para análise deste espectro (Figura 44) foi utilizado como ponto de partida o sinal que absorve em δ 4,66; relativo ao hidrogênio metínico H-2'. Este apresentou interação espacial com o hidrogênio da metila (H_3-4') em δ 1,28 e com H-3', o que

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

não ajudou a garantir que se tratava de uma geometria *cis* ou *anti* entre H-2’ e H-3’. Por outro lado, sabe-se que H-2’ apresenta constante de acoplamento, *J* = 7,9 Hz que conduz a uma interação axial – equatorial, permitido, desta forma, uma geometria *trans* entre esses hidrogênios (H-2’ e H-3’). Também a interação espacial de H-2’ com o hidrogênio aromático, H-2’’ (δ 6,86) do substituinte ligado ao carbono C-2’ foi bem visível.

Outras interações espaciais observadas no espectro NOESY de G-28 estão listadas na tabela 10 (p. 76) e podem ser visualizadas na estrutura abaixo.



Principais correlações observadas no espectro NOESY de G-28

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

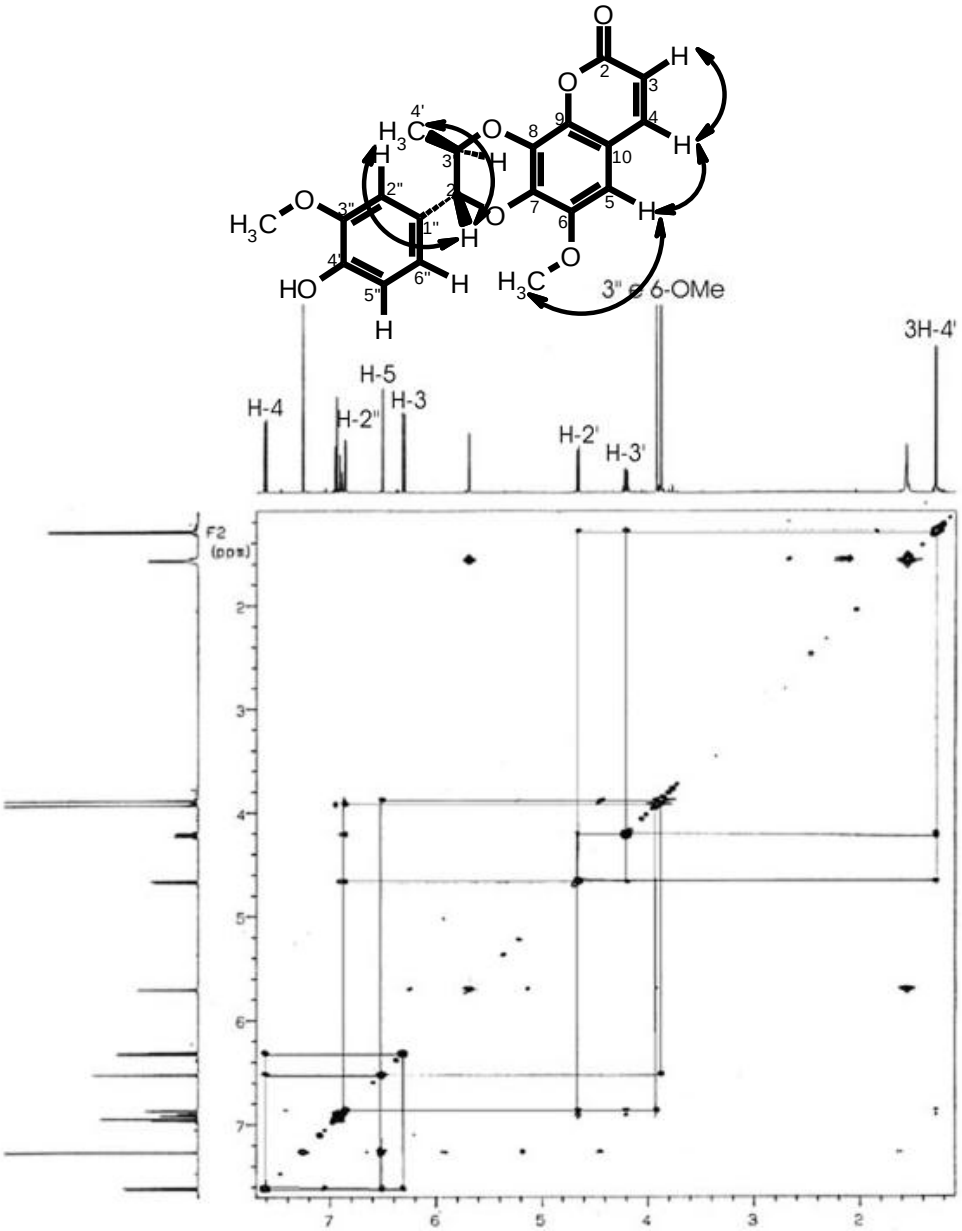


Figura 44. Espectro de RMN de 2D, NOESY de G-28 em $CDCl_3$, 500 MHz.

4.2.2.2.5. Espectro de RMN de ^{13}C de G-28

A combinação do espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° facilitou a atribuição dos sinais de carbonos da estrutura de 26. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 45), foi observado a presença de vinte sinais de carbonos, numa região espectral compreendida entre δ 17,07 e 160,81. Dos oito carbonos metínicos, cinco aparecem na região espectral de aromáticos, entre δ 99,94 a 121,23. A unidade cumarínica α,β-insaturada foi evidenciada pelos sinais δ 160,81 (C-2), 74,29 (C-3) e 81,35 (C-4),

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

nestes espectros. A posição relacionada a cada carbono na estrutura, encontra-se listados na tabela 10.

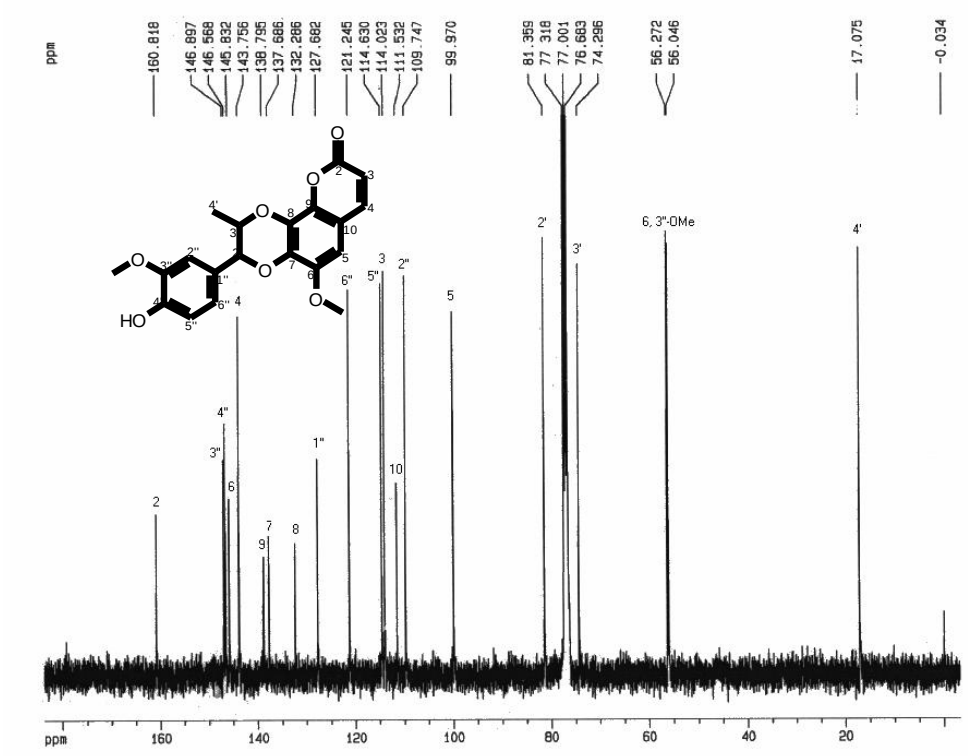


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C de G-28 a 100 MHz.

O espectro de DEPT 135° em concordância com o espectro de ^{13}C, confirma que a estrutura química de G-28, é composta por 20 carbonos, 9 não hidrogenados, 8 metínicos e 3 metílicos.

No espectro mostrado na figura 46, é possível notar com clareza a presença de 11 sinais com intensidade positiva, sendo que, oito deles correspondem aos carbonos metínicos (C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-2'', C-5'', C-6'') e três aos carbonos metílicos (C-4', 6-OMe, 3''-OMe). A ausência dos demais sinais neste espectro caracteriza este tipo de experimento, o qual exclui carbonos não hidrogenados. Deste modo, nove carbonos não hidrogenados são confirmados na estrutura de G-28, (C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C- 0, C-1'', C-3'', C-4'').

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

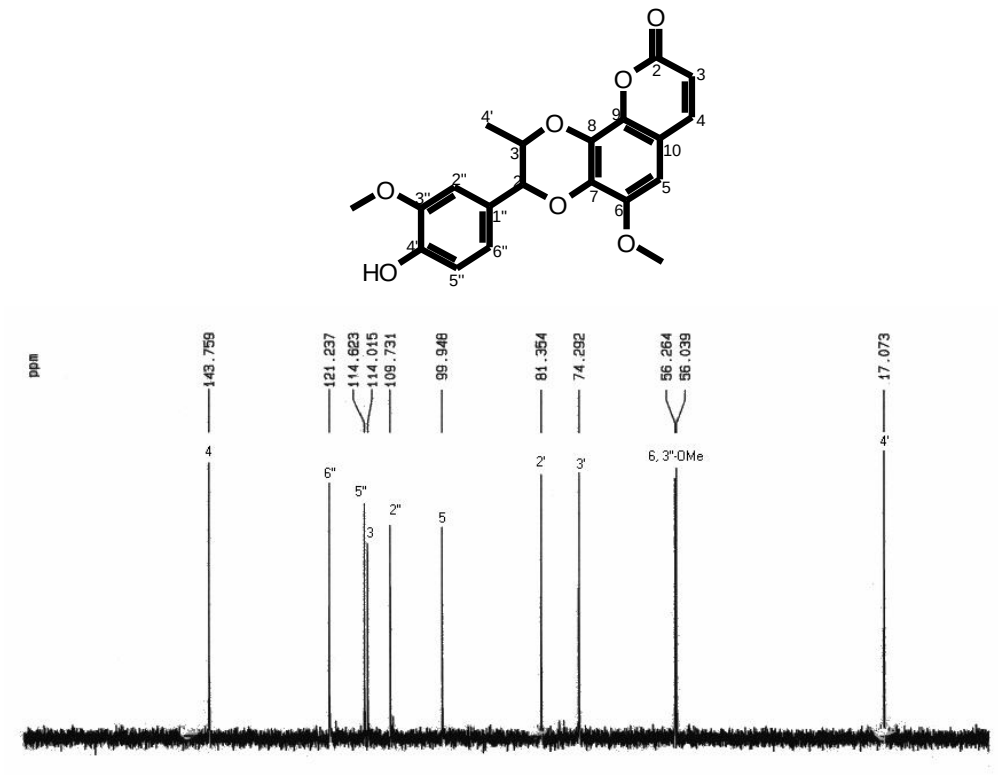


Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°de G-28 a 100 MHz

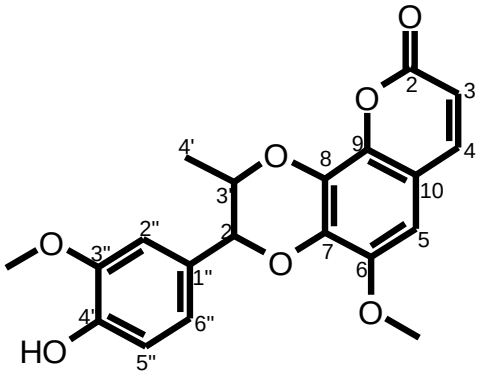
4.2.2.2.6. Espectros de RMN HMQC e HMBC

O espectro de RMN do tipo HMQC via $^{1}J_{H\text{-}C}$ (Figura 47) permitiu correlacionar o sinal de cada carbono hidrogenado com o sinal do seu respectivo hidrogênio.

No espectro de RMN do tipo HMBC (Figura 48) apresentando correlações hidrogênio-carbono via acoplamento à longa distância $^{3\text{-}4}J_{H\text{-}C}$, foi possível observar as seguintes correlações: O hidrogênio H-2' correlacionando-se com os carbonos não hidrogenados (aromáticos), C-1'', C-2'' e C-6'' que aparecem em δ 127,68; 109,74 e 121,24 respectivamente e com os carbonos metínicos C-3' em δ 74,29 e metílico C-4' em δ 17,07. Por outro lado H-3' correlacionando apenas com os carbonos C-2' e C-4', permitindo desta forma, a confirmação da sua posição e a do carbono C-2' com seu respectivo substituinte fenílico. Foi observado também as correlações dos hidrogênios H-4 e H-3. O hidrogênio H-4 correlaciona-se com os carbonos C-5, C-9 (δ 138,79) e carbonila C-2 em δ 160,81, já o hidrogênio H-3 em relação a H-4 é diferenciado pela sua correlação com o carbono C-10 (δ 111,53) e a não correlação com o carbono C-9. Outro dado importante observado foi à correlação do hidrogênio H-5 com os carbonos C-4, C-6 (δ 145,83), C-7 (δ 137,68) e

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

C-9. Essas informações podem ser mais bem visualizadas nos espectros expandidos (Figura 49) e na tabela 9.



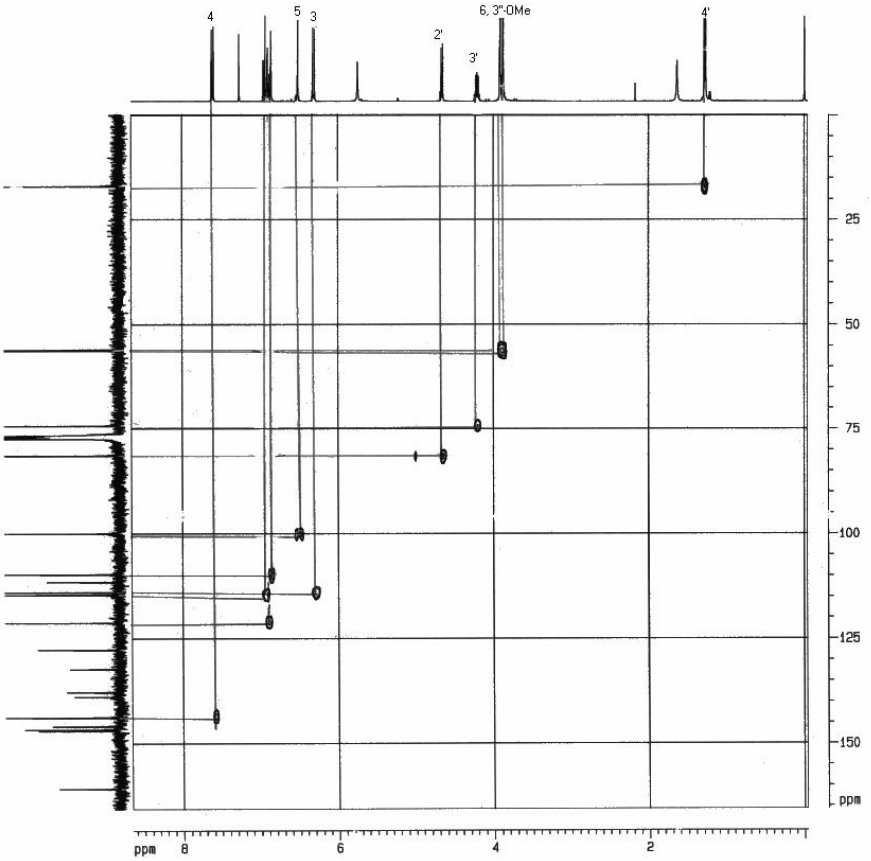


Figura 47. Espectro de RMN 2D, HMQC de G-28 em $CDCl_3$ a 400,13 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

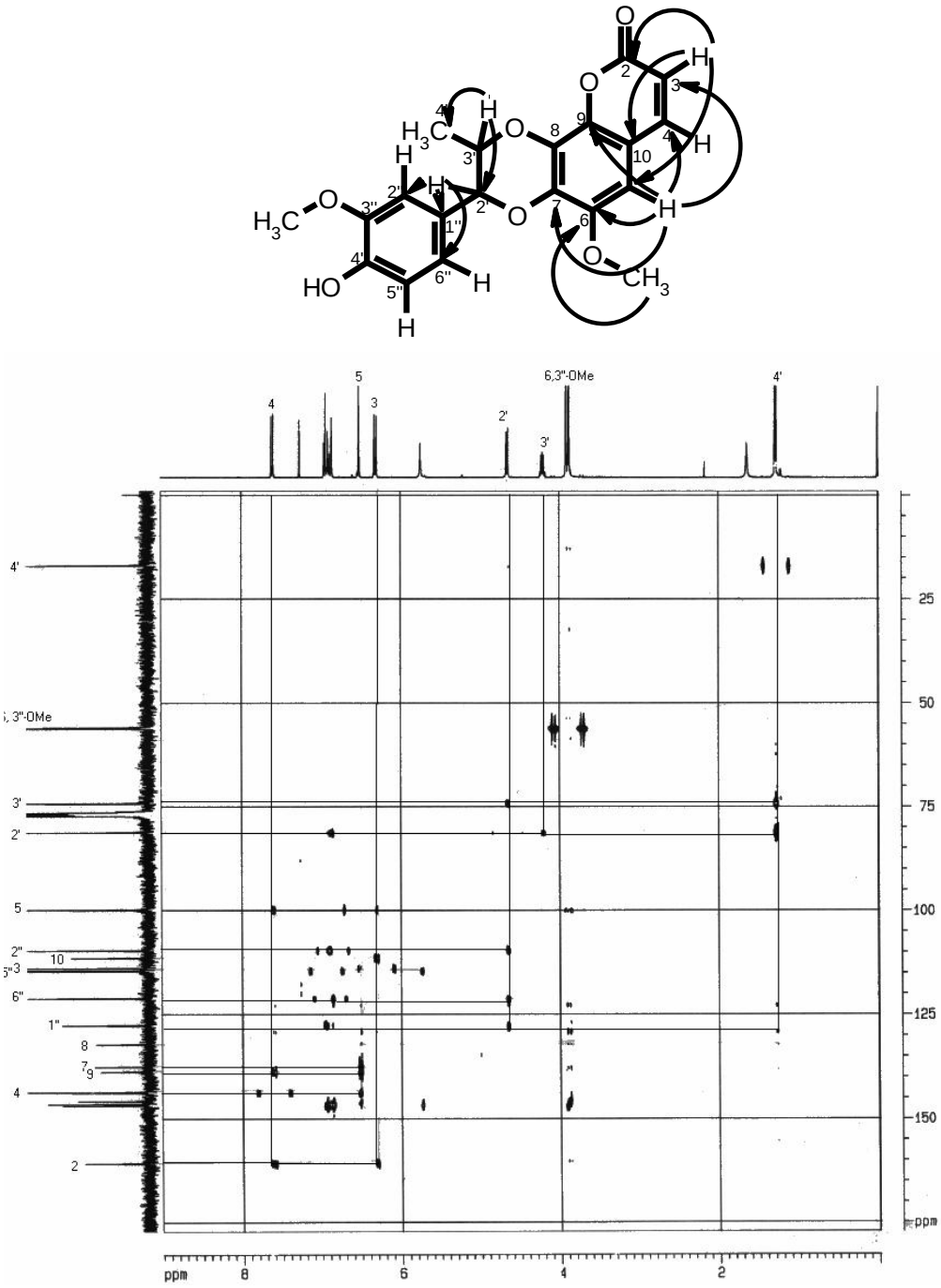


Figura 48. Espectro de RMN 2D, HMBC de G-28 em $CDCl_3$ a 400,13 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

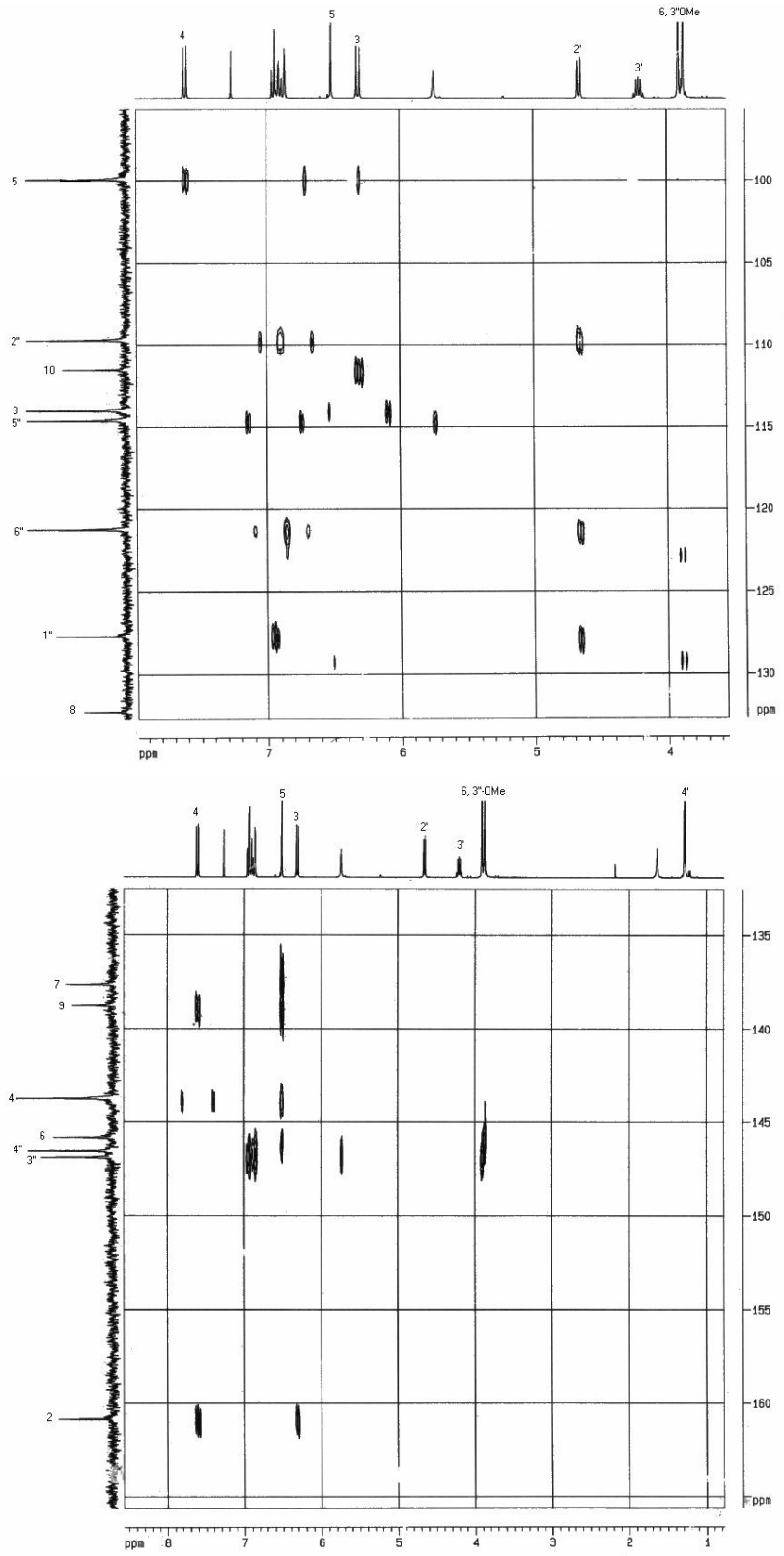


Figura 49. Espectros expandidos de RMN 2D, HMBC de G-28 em $CDCl_3$ a 400,13 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C e correlações dos experimentos COSY e HMBC para G-28, em $CDCl_3$.

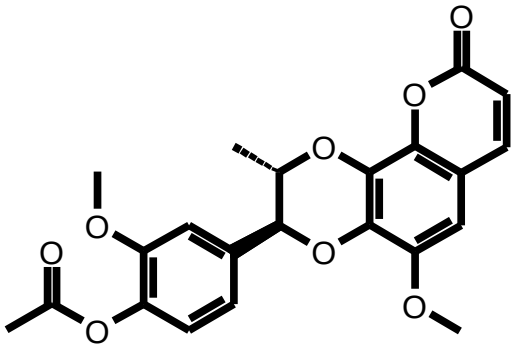
POSIÇÃO	δ ^{13}C	δ ^{1}H *J*	COSY ^{1}H-^{1}H	HMBC^{1}H-^{13}C
2	160,81			3; 4
3	114,02	6,31 *d* (1H, 9,5 Hz)	4	2; 5; 10
4	143,75	7,61 *d* (1H; 9,5 Hz)	3; 5	2; 5; 9
5	99,97	6,51 *s* (1H)	6-OMe; 4	3; 4; 6; 7; 9
6	145,83			5; 6-OMe
7	137,68			5; 6-OMe
8	132,28			5; 6-OMe;3'-Me
9	138,79			4; 5
10	111,53			3
2'	81,35	4,66 *d* (1H; 7,9 Hz)	3'; 4'-Me	1''; 2''; 6''
3'	74,29	4,21*dq* (1H; 7,9 e 6,4 Hz)	2'; 4'-Me	2'; 4'-Me
4'-Me	17,01	1,28 d(3H; 6,4 Hz)	3'; 2'	8; 2'; 3'
1''	127,68			2'; 2''; 5''
2''	109,74	6,86 *d* (1H; 1,9 Hz)		2'; 1''; ;3''; 4'
3''	146,89			5''; 2''; 3''-OMe
4'	146,36			5'';6'', 4''-OH
5''	114,63	6,95 *d* (1H; 8,1 Hz)	6''	4''-OH
6''	121,24	6,90 *dd* (1H; 8,1 e 1,9 Hz)	5''; 2''	2'; 2'';4''-OH
6-OMe	56,27	3,88 *s* (3H)		6
3''-OMe	56,04	3,92 *s* (3H)		3''
4''-OH	-	5,7 (*s*)		3''; 4''; 5''

Após a definição estrutural do composto G-28, com base na interpretação de dados espectrais, principalmente os fornecidos pelos os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H) e carbono – 13 (RMN ^{13}C) uni – (1D) e bidimensional (2D), verificou-se a existência de informações de RMN ^{1}H e ^{13}C e estereoquímica registradas na literatura para uma substância de estrutura análoga a de G-28. Essas informações permitiram identificar G-28 como sendo a substância conhecida como propacina. A certeza de que G-28 tratava-se da propacina também foi evidenciada quando esta substância foi tratada com anidrido acético e piridina

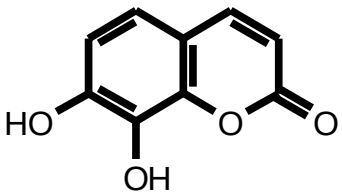
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

pelo processo convencional, para fornecer o derivado monoacetilado G-28Ac (27). Este derivado apresentou Pf = 199-201 °C, equivalente ao encontrado na literatura [46, 47], Pf.: 202-203 , 206-204 °C.

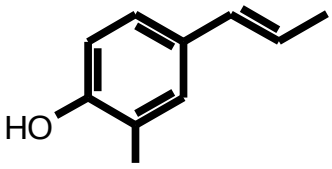
27



A propacina foi previamente isolada em *Protium opacum* (Burseraceae)[46] e identificada em várias espécies do gênero Jatropha (Euphorbiaceae)[45,48-50]. Recentemente na raiz da espécie *Mondia whitei* (Asclepidiaceae) esta substância também foi encontrada.[51] Devido a interessante atividade biológica desta classe de compostos, particularmente citotóxica Tanaka et. al.,[47] Lin e Cordell[52] sintetizaram a propacina e seus regioisômeros a partir da fraxetina (a) e isoeugenol (b). Vale ressaltar que na família Sterculiaceae o isolamento desta substância ocorre pela primeira vez.



a



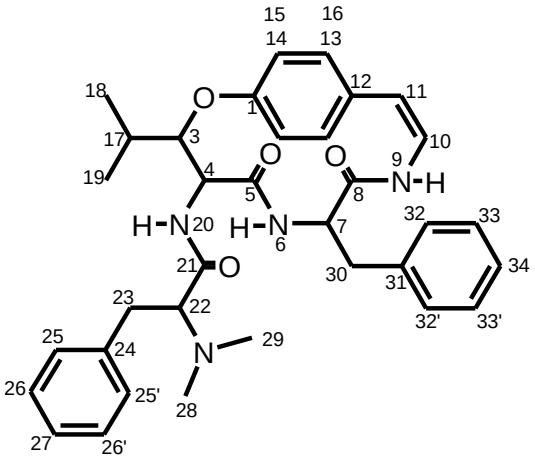
b

4.2.2.3. G-63

Este composto foi isolado da fração clorofórmica na forma de um sólido branco amorfo, o qual mostrou-se homogêneo em CCD em vários sistemas de solventes. Com o reagente de Dragendorff apresentou reação positiva, produzindo mancha de coloração alaranjada, sugerindo a presença de nitrogênio básico na estrutura molecular, característico de alcalóides.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

A comparação das análises dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de G-63 com dados da literatura, como também, a comparação em CCD com amostras autênticas levou a concluir que o composto G-63, tratava-se de um alcalóide ciclopeptídico, conhecido como Scutianina-B (9).



9

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 50) deste composto, permitiu identificar na região alifática a presença de dois sinais característicos de hidrogênios metílicos que absorvem à δ 0,88 e 1,18, os quais apresenta-se na forma de dubletos, correspondentes aos hidrogênios das duas metilas do grupo isopropil, da unidade β-hidroxileucina. Esses dubletos resultam do acoplamento com um hidrogênio metínico, neste caso, atribuído ao H-17 de uma unidade hidroxileucina participante da estrutura de um alcalóide ciclopeptídico. Os hidrogênios atribuídos a H-3 (β-carbonílico) e H-4 (α-carbonílico), apresentam deslocamentos químicos à δ 4,86 e 4,33, respectivamente. O hidrogênio H-4 apresenta-se como um duplo dubleto, resultante do acoplamento com H-3 (*J* = 7,2 Hz) e com o hidrogênio amídico NH-20 (*J* = 10 Hz). Observa-se também um sinal à δ 2,15 (6H), que corresponde as duas metilas atribuídas a H_3-28 e H_3-29, de um resíduo básico terminal N-N-dimetilado.

Os sinais com deslocamentos químicos entre δ 2,65 e 3,07, que se apresentam como multipletos, correspondem a hidrogênios metilênicos diastereotópicos β-carbonílico atribuídos a H-30a e H-30b, de uma unidade fenilalanina. Esta multiplicidade é resultante do acoplamento destes hidrogênios com um hidrogênio metínico atribuído ao H-7, o qual foi identificado por apresentar uma correlação com um hidrogênio amídico, o NH-6 (δ 5,97, *d*). Também os hidrogênios

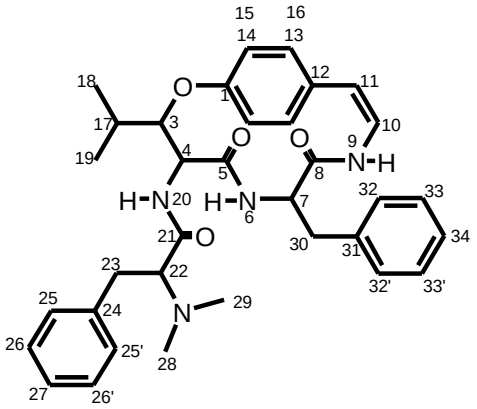
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

diastereotópicos H-23a e H-23b da unidade fenilalanina ligada ao macrociclo, encontra-se nesta região.

O sinal do hidrogênio metínico H-10 (δ 6,33) da unidade estirilamina foi identificado por apresentar uma correlação com um sinal pertencente ao hidrogênio amídico NH-9 (δ 6,54, d) e com o hidrogênio metínico H –11(δ 6,31). Desta forma a enamina da unidade estirilamina foi identificada.

O espectro de ^{1}H mostra ainda vários sinais de difícil atribuição, principalmente, devido à sobreposição dos hidrogênios aromáticos, com deslocamentos químicos que aparecem numa região entre δ 6,87 e 7,21. Estes hidrogênios são correspondentes as unidades fenilalaninas, que se trata do aminoácido terminal e do aminoácido participante do macrociclo. Estas correlações foram confirmadas através do espectro COSY (Figura 51) juntamente com os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figuras 52 e 53).

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



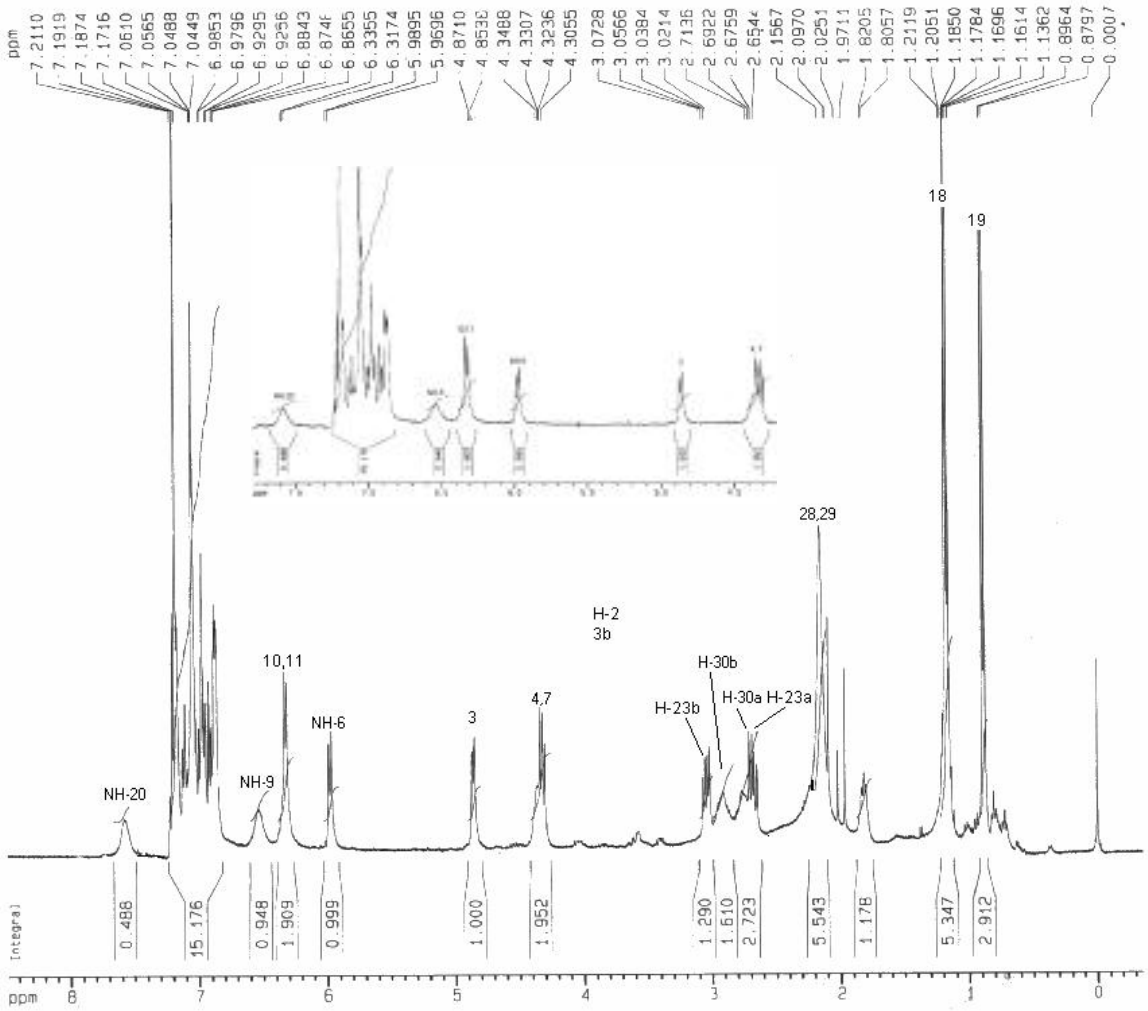
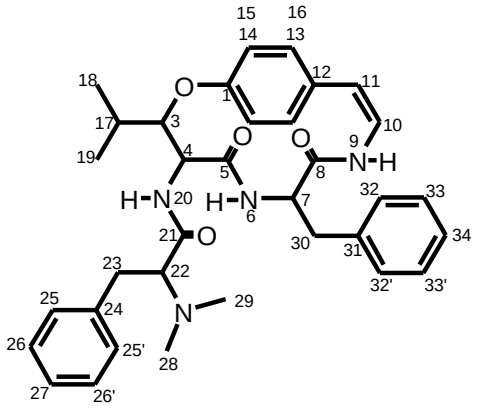


Figura 50. Espectro de RMN de 1H de G-63 em $CDCl_3$ a 400 MHz

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



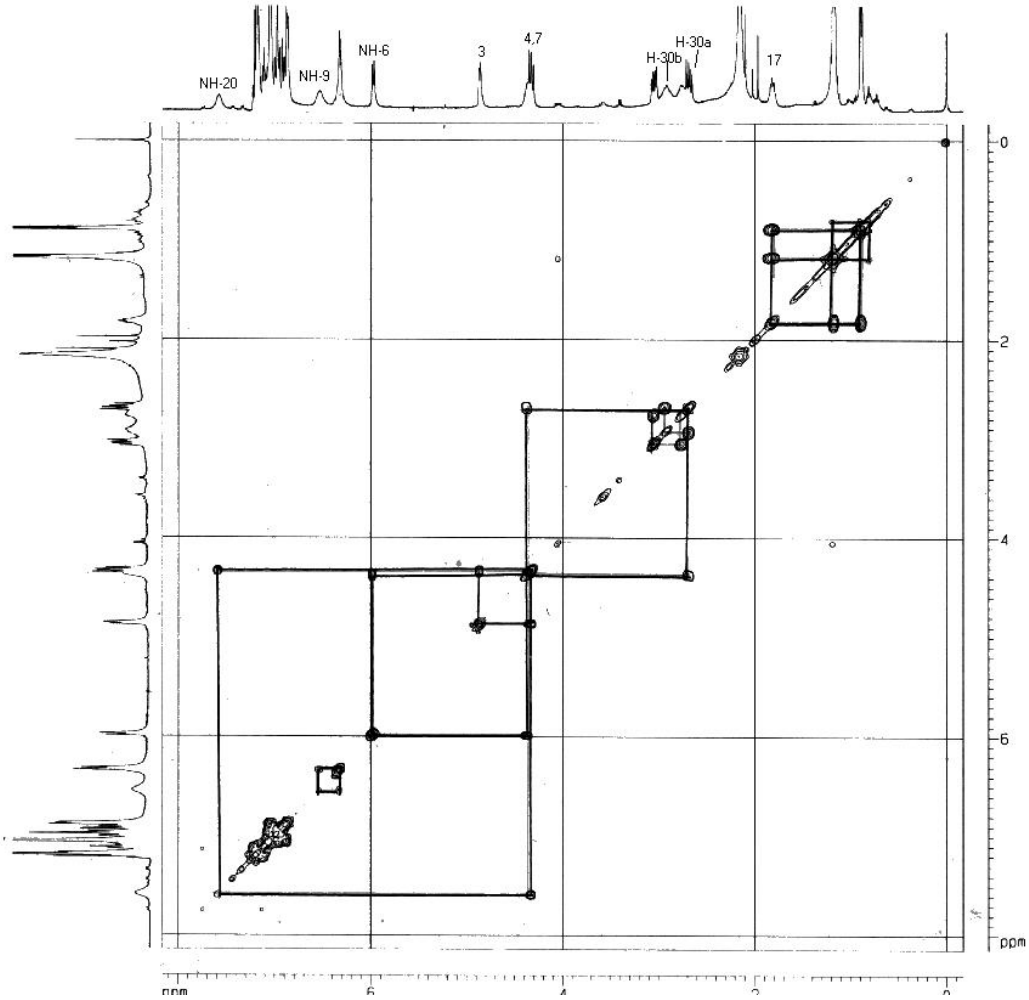
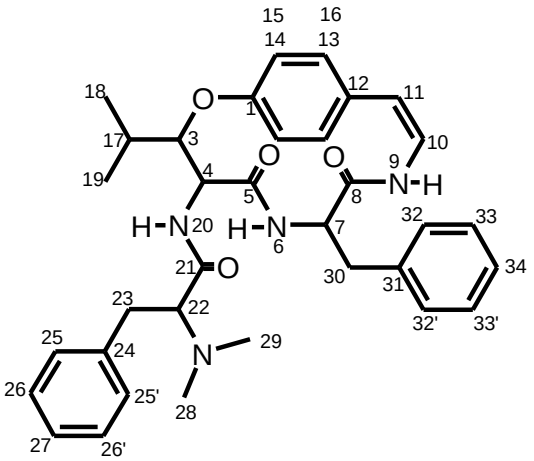


Figura 51. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-63, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



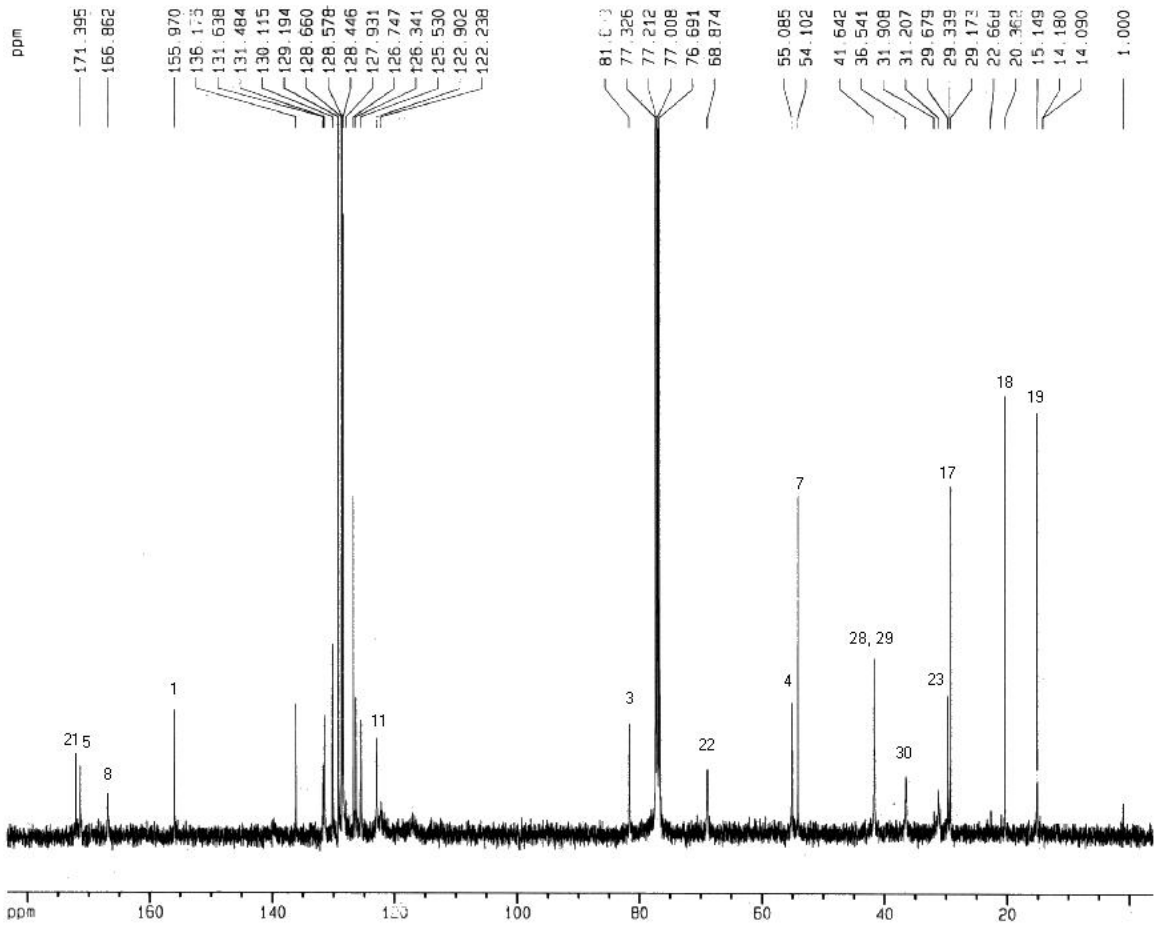


Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C de G-63 a 100 MHz

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

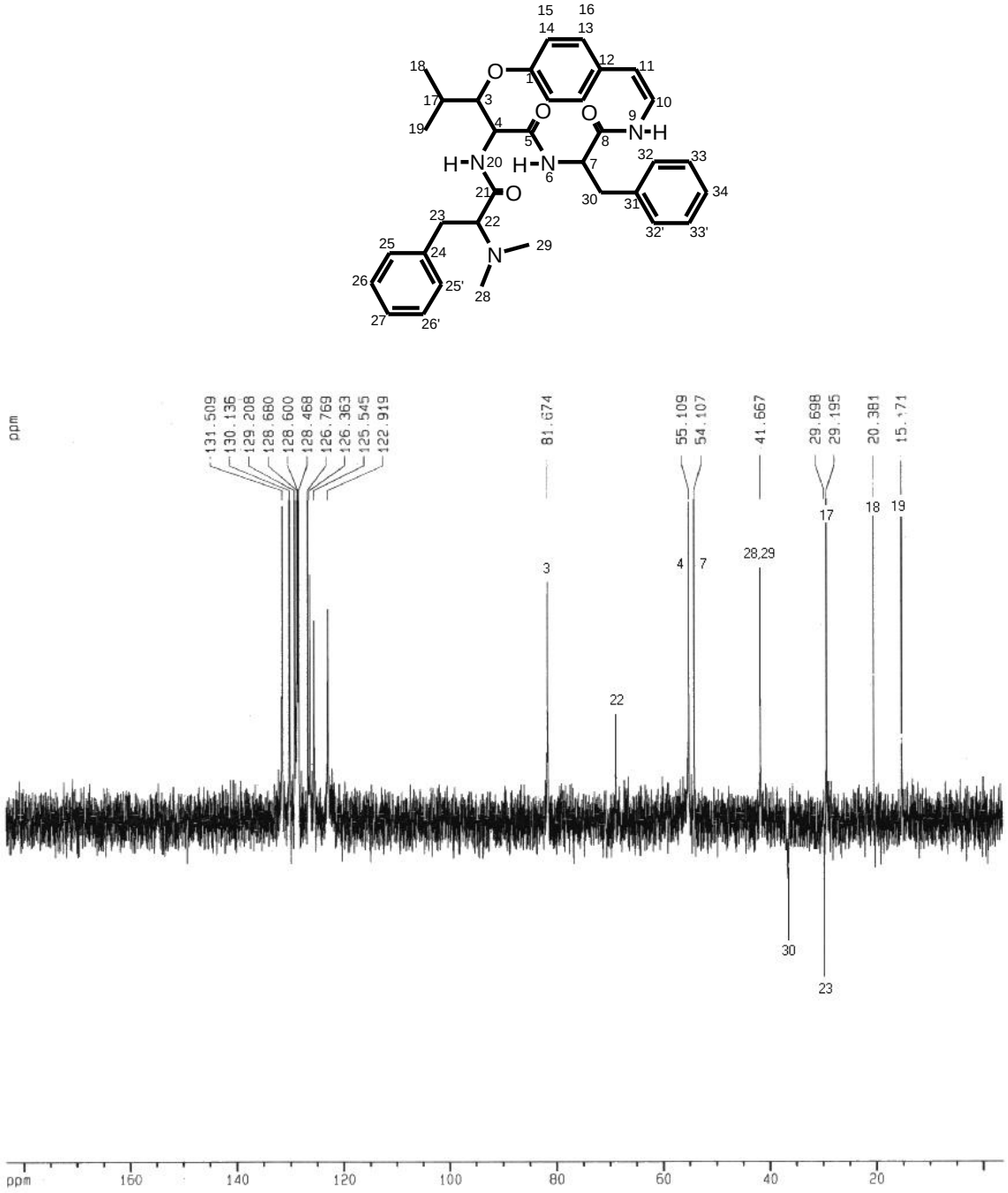


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°de G-63 a 100,32 MHz

Esta substância foi isolada pela primeira vez da espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae)[53], porém nas espécies *Melochia tomentosa*[13] e *Waltheria douradinha* (Sterculiaceae)[4] este alcalóide também foi isolado.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4.2.2.4. G-65

O composto G-65 foi também isolado da fração clorofórmica como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão de 222-223ºC. Na presença de reagente de Dragendorff reagiu positivamente, produzindo mancha de coloração alaranjada, sugerindo a presença de nitrogênio básico na estrutura molecular, característico de alcalóides. Seu espectro de infravermelho (Figura 54) sugere tratar-se de uma estrutura peptídica, pois o mesmo apresenta bandas em 3437 e 1640 cm^{-1} típicos de grupos NH e CO.

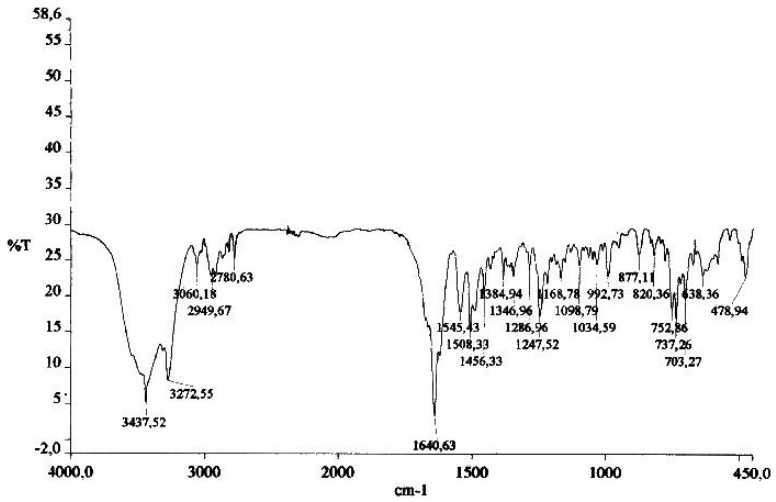


Figura 54. Espectro de absorção de Infravermelho de G-65.

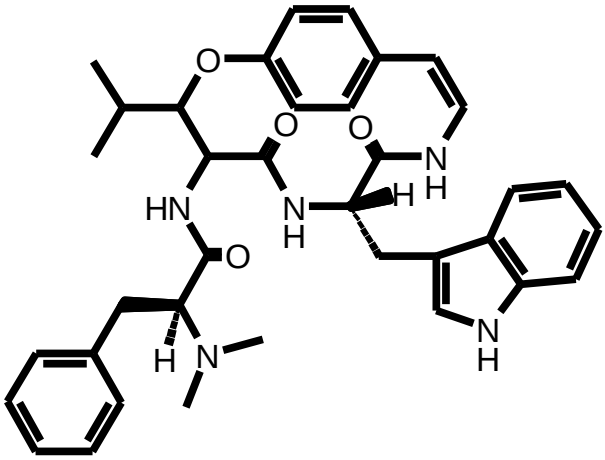
A estrutura 28 proposta para esse alcalóide foi parcialmente deduzida através das fragmentações obtidas da análise do espectro de massas, que foi posteriormente confirmada pelo estudo exaustivo de RMN de ^{1}H e ^{13}C.

O espectro de massas de baixa resolução (EIMS) (Figura 55 p. 94), de G-65 apresentou um pico à m/z 608 (M^{+}), referente ao íon molecular, enquanto que o espectro de massas de alta resolução (HRESIME) apresentou um íon "*quase molecular*" $[M+H]^{+}$ = 608,3231313, correspondente a fórmula molecular $C_{36}H_{41}N_5O_4$ para o composto.

Através da análise do espectro de massas EIMS foi possível identificar vários fragmentos (Figura 56, p. 96), que auxiliaram na determinação deste alcalóide, como por exemplo, o pico base, à m/z 148 (100%) sugerindo a presença da unidade N,N-dimetil fenilalanina em forma de resíduo básico terminal e os sinais de fragmentos de baixa intensidade a *m/z* 130 (C_9H_8N) e 159 ($C_{10}H_{11}N_2$), típico para peptídios

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

triptofânico.[55] Também a caracterização do sistema de catorze membros foi revelada pela presença do íon m/z 347 ($C_{20}H_{17}N_3O_3$).



28

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

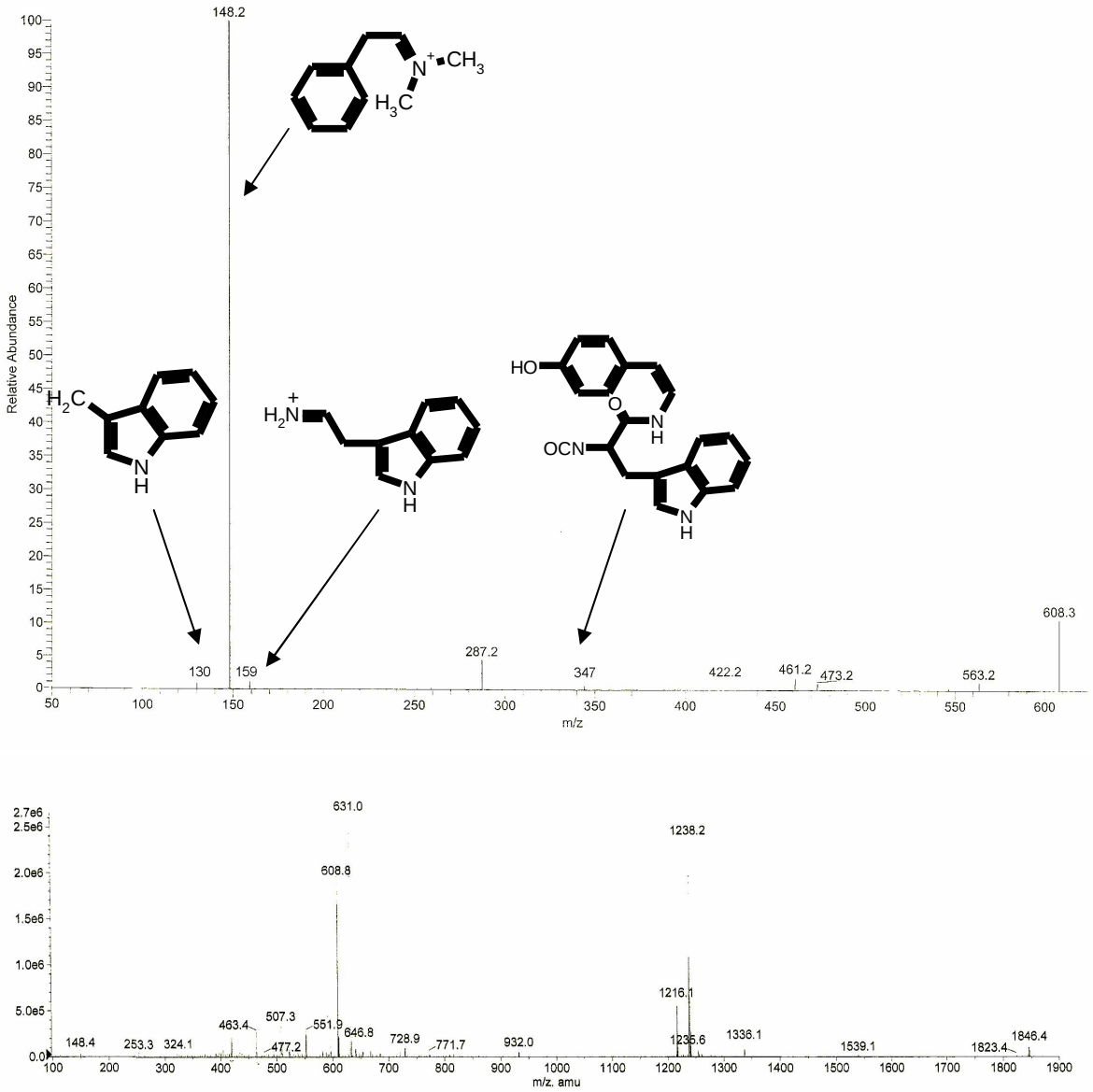


Figura 55. Espectros de massas EIMS de G-65

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

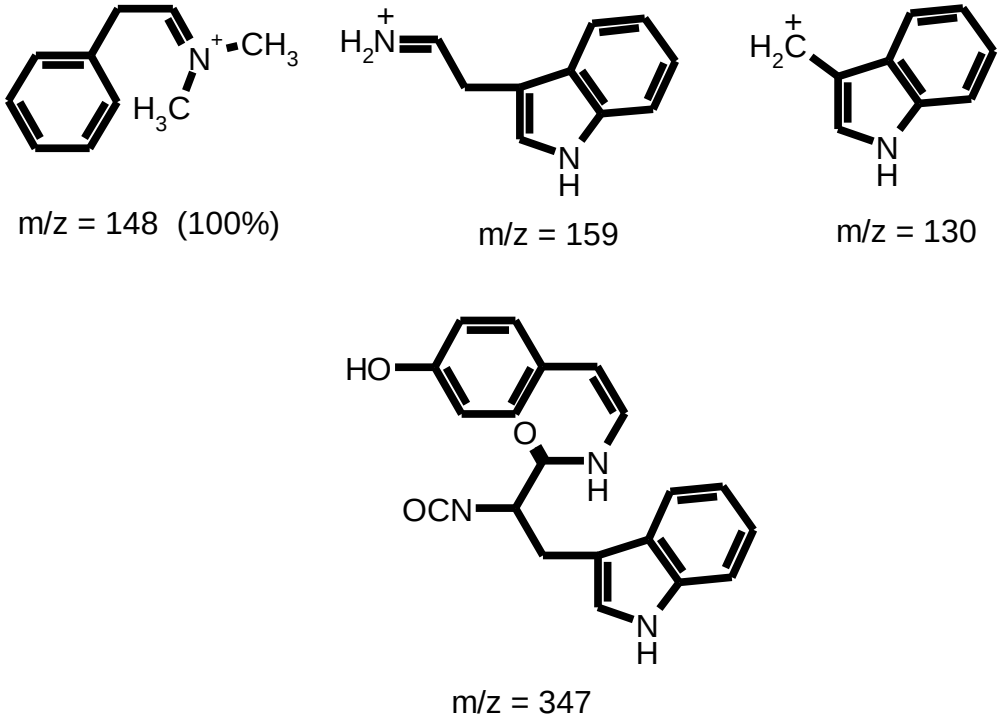


Figura 56. Interpretação dos principais fragmentos observados no espectro de massas de G-65.

Os dados espectrais de RMN do alcalóide discarina B[54] (estrutura 28-A) serviram de suporte para dedução dos espectros de RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT e COSY de G-65. No espectro de RMN ^{1}H de G-65 (Figura 57) foi possível identificar os sinais dos grupos metilas diastereotópicos do β-hidroxiaminoácido como dois dubletos à δ 0,87 (Me-19, *J* = 6,6 Hz) e δ 1,15 (Me-18, *J* = 6,6 Hz).

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

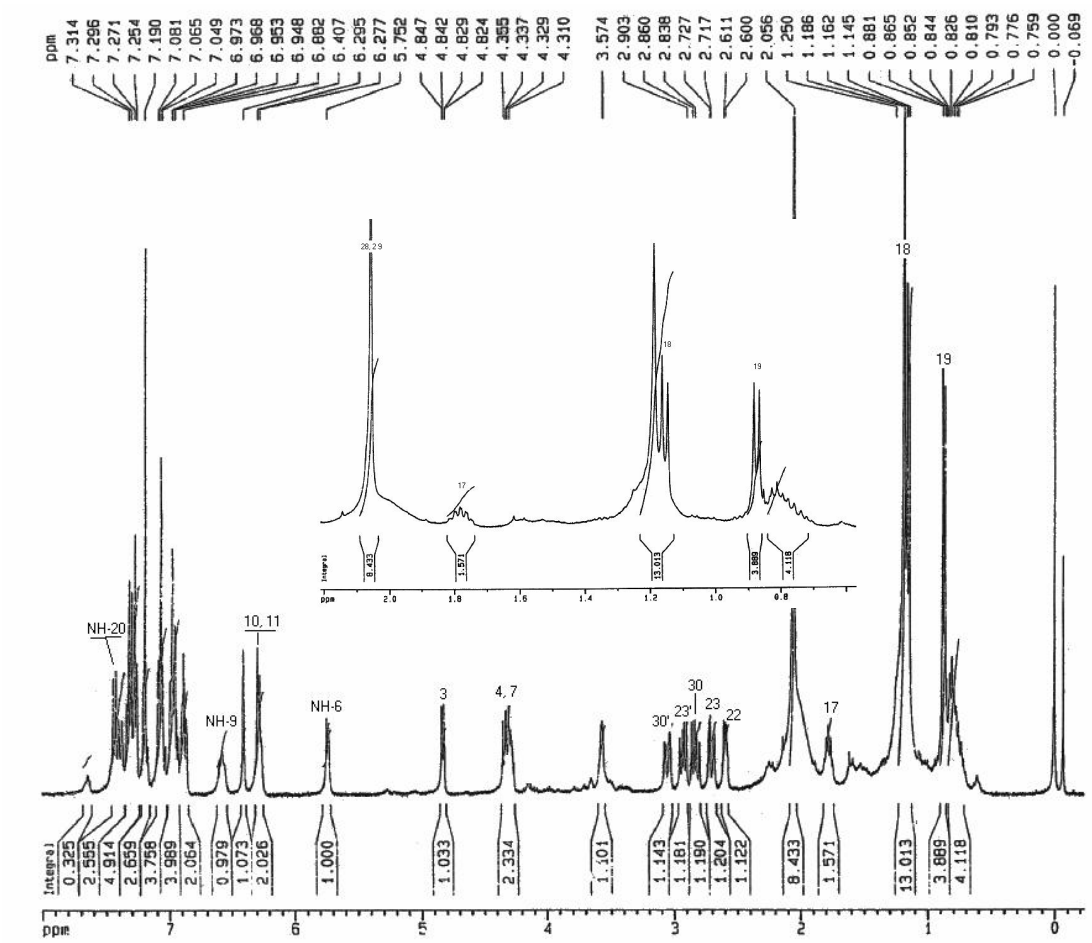
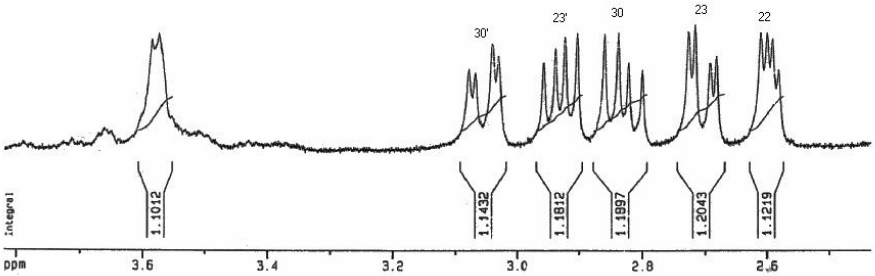


Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H de G-65 em $CDCl_3$ a 400 MHz.

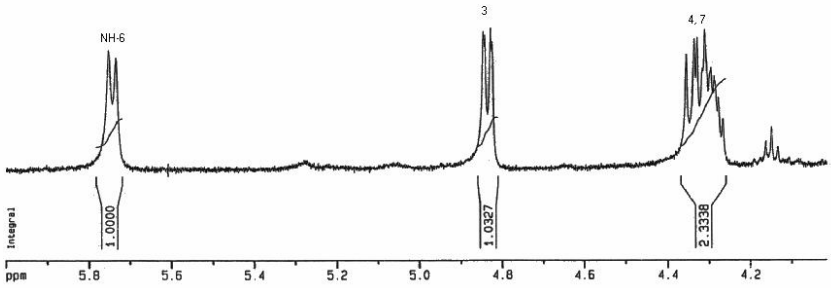
Na região expandida entre δ 2,60 e 2,90 (figura abaixo) é notável a presença de sinais múltiplos, correspondentes ao hidrogênio metínico H-22 e aos hidrogênios diastereotópicos (H-23, H-23') e (H-30 e H30').



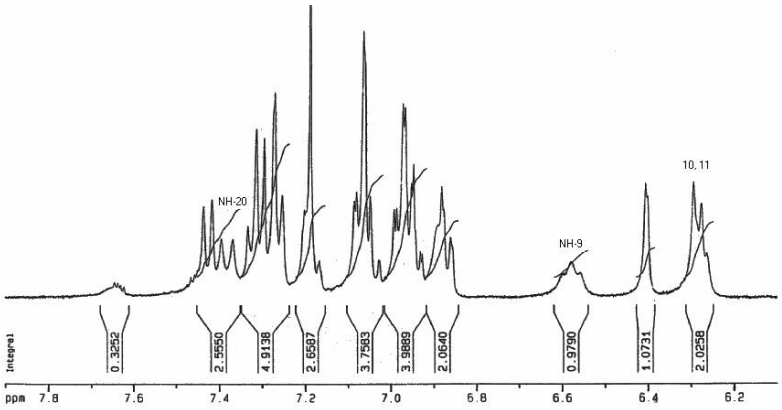
O hidrogênio H-3 (β-carbonílico) da unidade β-hidroxileucina apresentou um deslocamento químico à δ 4,84, constituindo-se um duplo dubleto, devido ao

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

acoplamento com H-17 (J = 2,0 Hz) e com H-4 (J = 7,2 Hz). O hidrogênio metínico H-4 (α-carbonílico) da mesma unidade apresenta um deslocamento químico à δ 4,33 ppm, na forma de um duplo dubleto, devido ao acoplamento com o hidrogênio metínico H-3 (J = 7,2 Hz) e com o hidrogênio amídico NH-20 (J = 10,5 Hz). Estes deslocamentos foram confirmados pela análise do espectro COSY, discutidos a seguir.

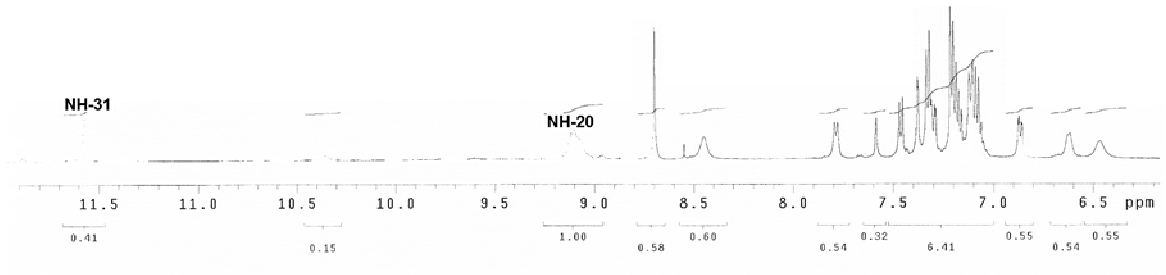


Os hidrogênios aromáticos das unidades p-hidroxi-estirilamina e β-fenilserina, encontram-se na região entre δ 6,86 e 7,46 em forma de sinais complexos, difíceis de serem atribuídos, devido à sobreposição de sinais. O sinal referente ao hidrogênio amídico NH-20 também se encontra localizado nesta região a δ 7,38 (d) $J_{20,4}$ = 10.



Na região entre δ 6,46 e 11,56 do espectro de hidrogênio de G-65, realizado em piridina (figura abaixo), encontra-se o sinal em δ 11,56, correspondente ao hidrogênio indólico NH-30, da unidade triptofano. Na expansão do espectro COSY figura 59 é possível observar a correlação deste hidrogênio com o hidrogênio metínico do resíduo triptofano.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



Através da análise do espectro de RMN de 2D, COSY correlação ^{1}H-^{1}H de G-65 (Figura 58), foi possível identificar acoplamentos através de correlações que definiram os seguintes sistemas de spins (Figura 60): (I) o sistema de spins envolvendo os hidrogênios da unidade β-hidroxileucina; (II) o resíduo terminal fenilalanina; (III) o grupo N, N-dimetil do resíduo básico terminal; (IV) o aminoácido triptofano participante do macrociclo; (V) o grupo enamina da unidade estirilamina.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

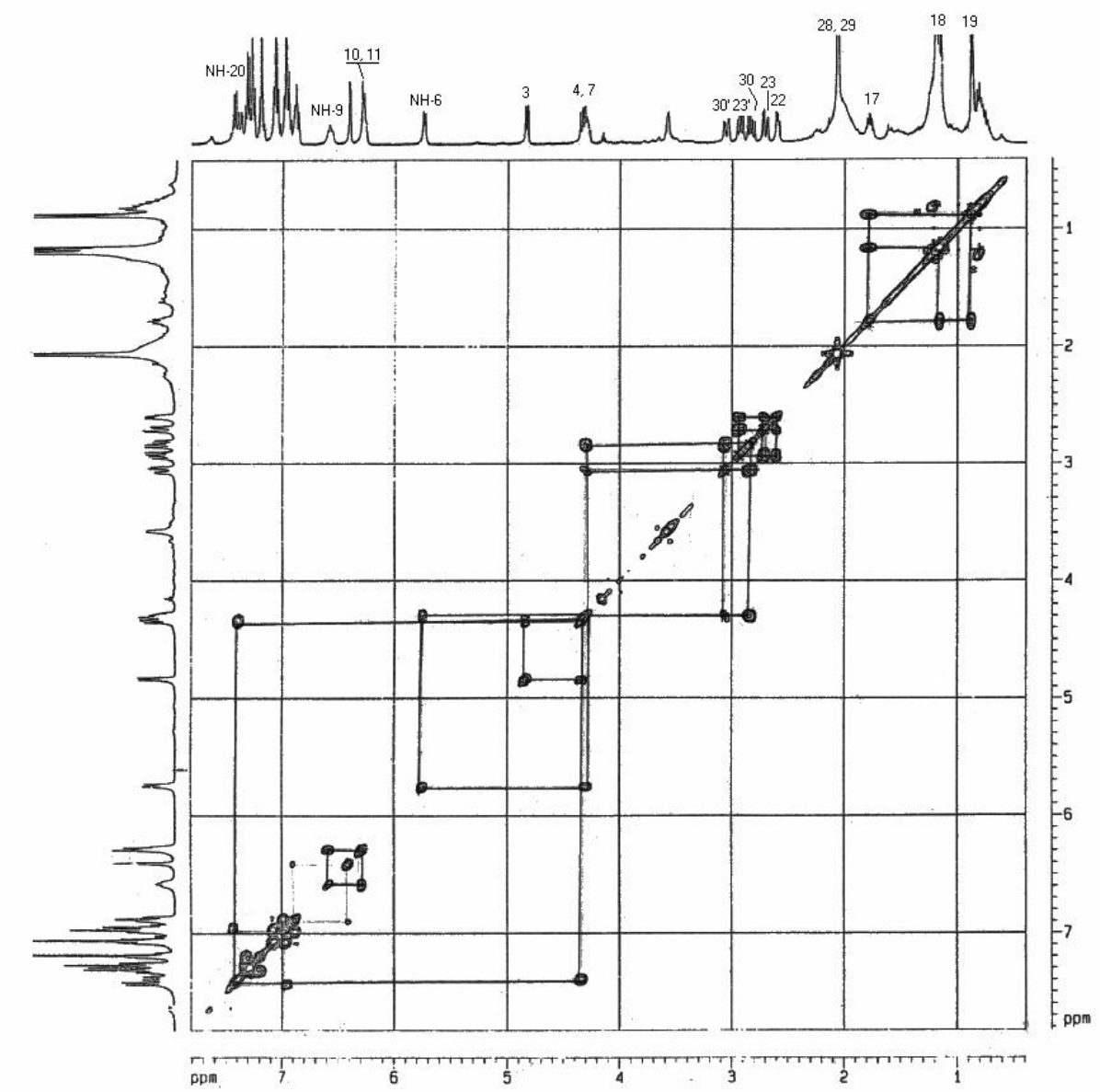


Figura 58. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-65, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

Para atribuição dos sinais da unidade β-hidroxileucina foi utilizado como ponto de partida o hidrogênio NH-20. O sinal deste hidrogênio apresenta correlação com o sinal do hidrogênio H-4 (α-carbonílico) que por sua vez, correlaciona-se com o hidrogênio metínico H-3. Não foi observados a correlação do hidrogênio H-3 com o hidrogênio

H-17. O H-17 apresentou correlação com os hidrogênios heterotópicos das duas metilas (Me-18 e Me-19), completando assim o sistema de spins da unidade β-

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

hidroxileucina. Observa-se também uma correlação do hidrogênio H-4 com H-20 e H-3.

Constata-se também neste espectro a unidade estirilamina em que o hidrogênio amídico NH-9 apresenta uma correlação com o hidrogênio metínico H-10. Este por sua vez, correlaciona-se com o sinal do hidrogênio metínico H-11, definindo assim a enamina da unidade estirilamina.

Não foi possível atribuir os sinais dos hidrogênios aromáticos das duas unidades fenilalanina (II) e triptofano (IV), devido à sobreposição dos sinais. Porém, os hidrogênios não aromáticos pertencentes a esses sistemas de spins (II, IV) foram atribuídos utilizando como ponto de partida o hidrogênio metínico H-22 para (II) e o hidrogênio amídico NH-6 (IV). Em (II) observa-se, a correlação do hidrogênio metínico H-22 com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-23 e H-23', estes por sua vez, correlacionam entre-si. No sistema (IV) fica claro a correlação do hidrogênio amídico NH-6 com o hidrogênio metínico H-7, o qual apresenta correlação com os hidrogênios diastereotópicos H-30 e H-30'.

O grupo N,N-dimetil constitui um sistema de spins isolado (III) não apresentando nenhuma correlação com os outros hidrogênios, portanto, as duas metilas, 28 e 29 desse grupo, são atribuídos ao típico singleto à δ 2,12.

A figura 60 mostra os principais sistemas de spins para o composto G-65.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

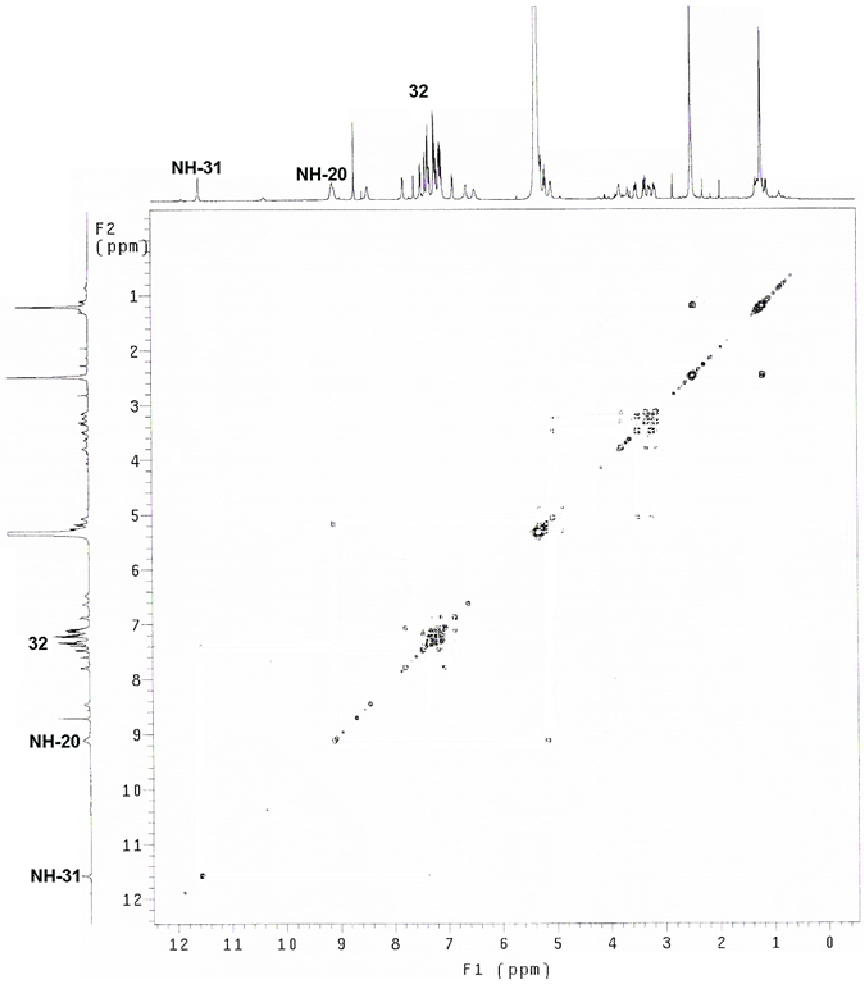


Figura 59. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-65, em piridina a 400 MHz.

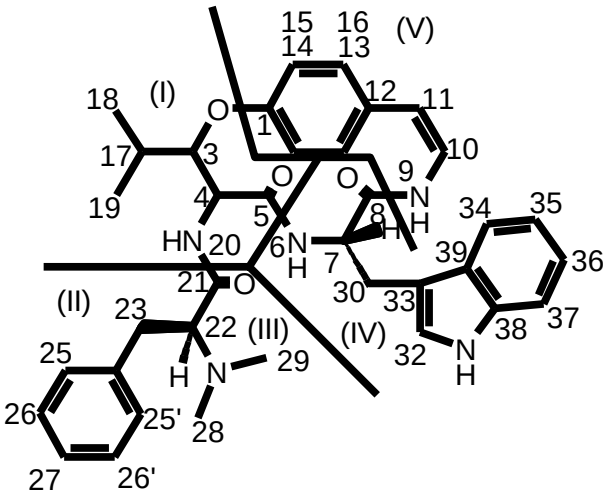


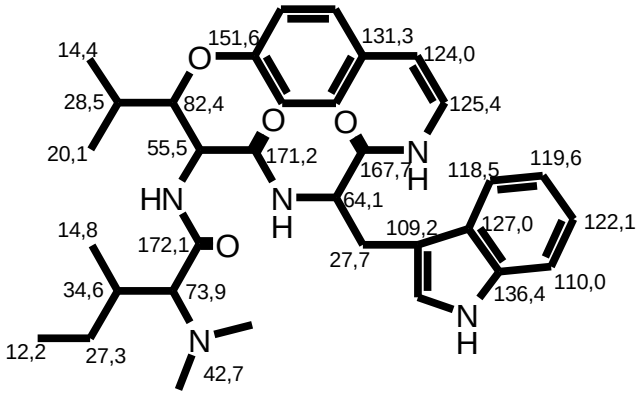
Figura 60. Sistema de spins de G-65.

A análise comparativa dos espectros de RMN de ^{13}C de G-65 (Figura 61) com o alcalóide discarina B (28-A) juntamente com os espectros DEPT 90° e 135°

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

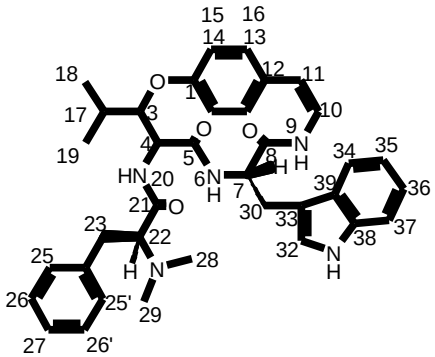
(Figura 62) permitiu reconhecer a presença de 36 sinais no espectro de RMN ^{13}C. Sendo observado a presença de 27 sinais ligados a hidrogênios nos espectros de RMN ^{13}C DEPT 135°: vinte e dois metínicos, dois metilênicos e quatro metílicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos através das duas técnicas (BB e DEPT) indicou a existência de nove sinais (36 - 27 = 9) correspondentes a átomo de carbonos não hidrogenados, sendo três carbonílicos (δ 167,24; 171,54; 172,38) e seis inseridos em anéis aromáticos (δ 116,36 – 156,09). Também no espectro DEPT 90° foi possível confirmar a existência dos 21 sinais correspondentes aos carbonos metínicos presente na estrutura. Os demais dados espectrométricos deste composto encontram-se presente na tabela 11.

Após estas análises, concluímos que o composto codificado como G-65 tratava de um alcalóide ciclopeptídico inédito e denominado neste trabalho de chamaedrina.



28-A

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



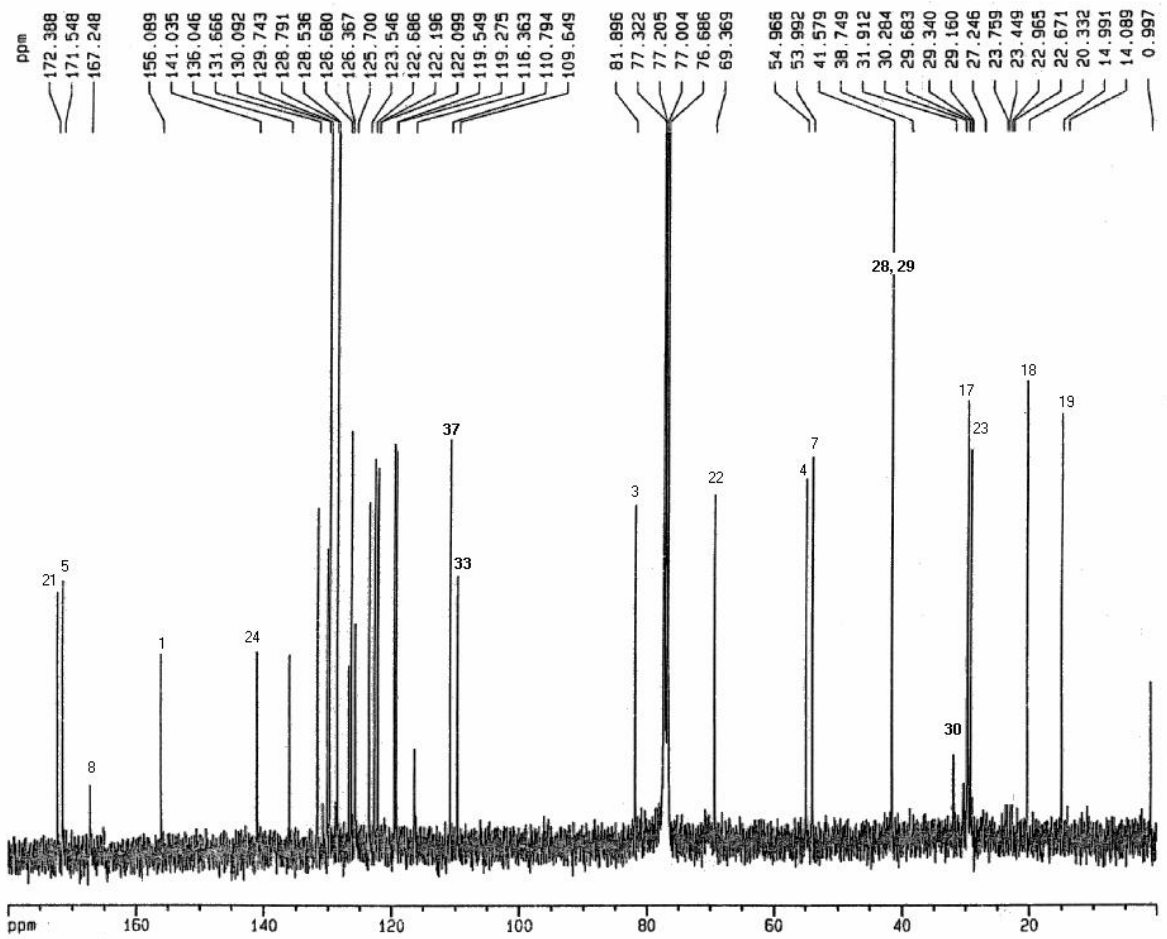
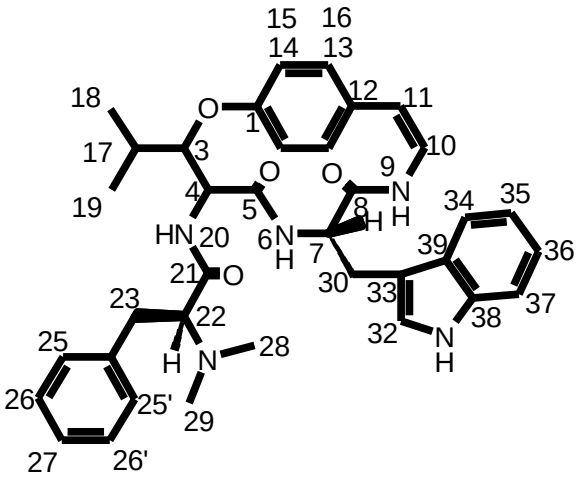


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C de G-65 a 100 MHz

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



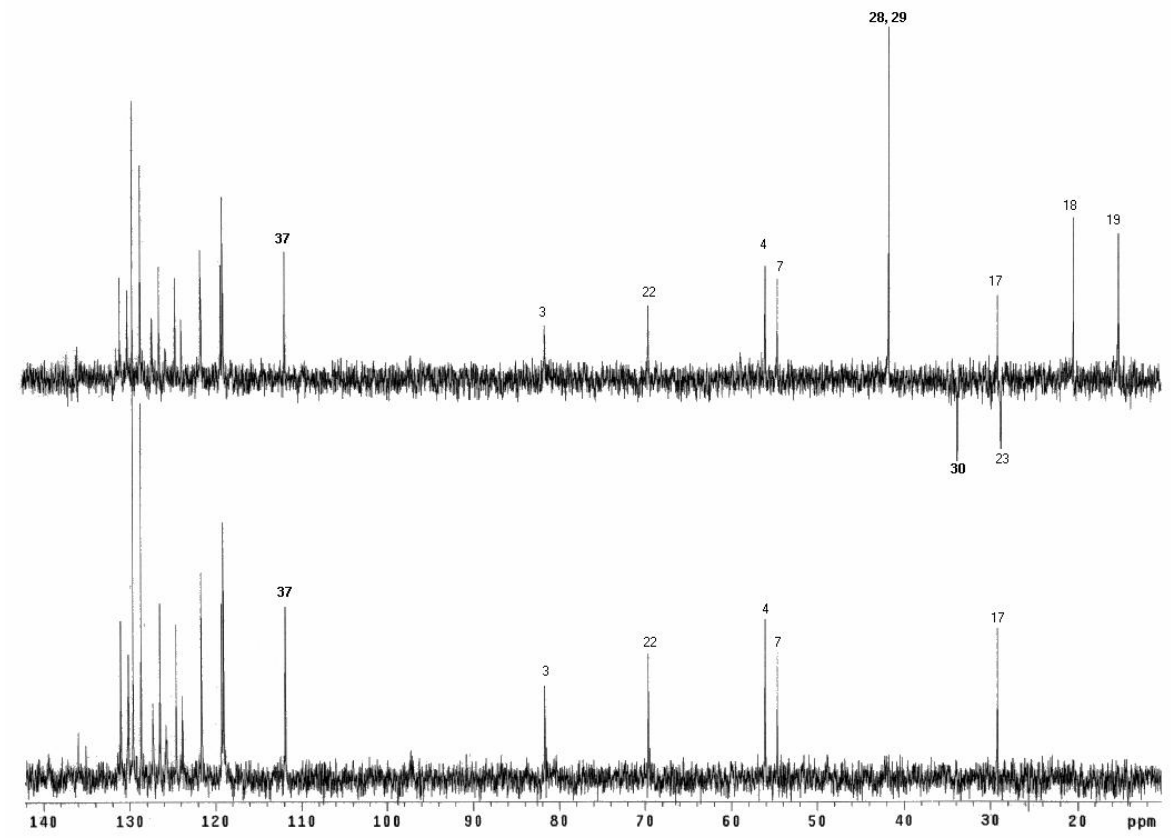


Figura 62. Espectros de RMN de ^{13}C DEPT 135° e 90° de G-65 a 100 MHz

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Tabela 11. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C para G-65, em $CDCl_3$.

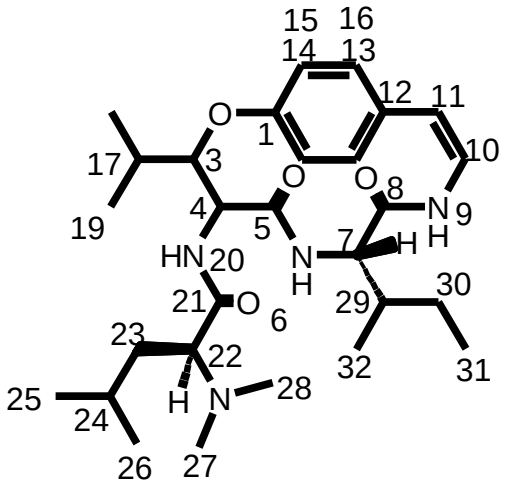
POSIÇÃO	δ ^{13}C	δ ^{1}H *J* (Hz)
1	160,81	
3	81,89	4,84 (dd) $J_{3,4}$ = 7,2; $J_{3,17}$ = 2
4	54,96	4,33 (dd) $J_{4,3}$ = 7,2; $J_{4,20}$ = 10,5
5	171,54	
6	-	5,72 (d) $J_{6,7}$ = 7,1
7	53,99	4,32 (m)
8	167,24	
9	-	6,40 (d) $J_{9,10}$ = 7,5
10-16	119,54-131,66	
17	29,16	1,85 (m)
18	14,08	1,15 (d) $J_{18,17}$ = 6,6
19	20,33	0,87 (d) $J_{19\text{-}17}$ = 6,6
20	-	7,38 (d) $J_{20,4}$ = 10
21	172,2	
22	69,36	2,59 (dd) $J_{22,23}$ = 7,8; $J_{22,23'}$ = 4,2
		2,70 (dd) $J_{23,22}$ = 7,8; $J_{23,23'}$ = 15
23,23’	29,34	2,81 (dd) $J_{23',22}$ = 7,8; $J_{22,23'}$ = 15
24	141,03	
25		
25’		
26	119,27-130,09	
26’		
27		
28-29	41,57	2,12 (s)
30,30’	31,91	2,83 (dd) $J_{30,7}$ = 7,8; $J_{30,30''}$ = 15,6
31	-	
32-39	109,64-136,04	

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

4.2.2.5. G-70

Este composto foi isolado da fração clorofórmica e apresentou-se como um sólido branco amorfo. Na presença de reagente de Dragendorff, reagiu positivamente, sugerindo ter na sua estrutura nitrogênio básico, característico de alcalóides.

Os dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico franganina[55] contribuíram para a dedução dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Figura 63) deste composto, sugerindo tratar-se de um outro alcalóide ciclopeptídico. Essas informações obtidas nesta análise e análise do espectro COSY de G-70, foram condizentes com os da literatura para o alcalóide ciclopeptídico adoutina X (29).



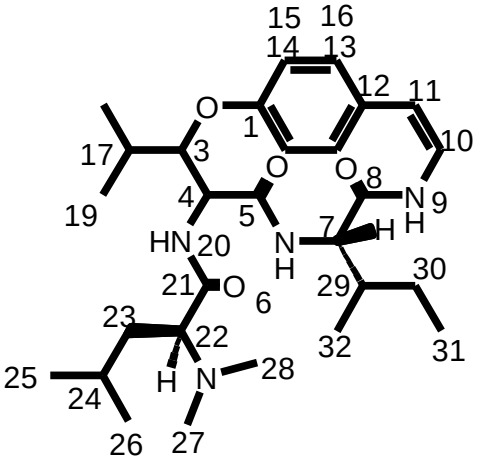
29

Este alcalóide foi isolado previamente da espécie *Waltheria americana* (Sterculiaceae)[56,57]. Estudos relatam ainda, o isolamento deste alcalóide na espécie *Ceanothus americanus* (Rhamnaceae)[58]. Na espécie em estudo este metabólito se apresenta em proporções superiores aos demais alcalóides.

Na análise do espectro de RMN de ^{1}H (Figura 61) deste composto, observou-se vários sinais na região espectral entre δ 0,70 e 1,01 correspondentes a seis grupos metilas, sendo dois pertencentes à unidade β-hidroxileucina (Me-18 e 19), dois de uma unidade *N,N*-dimetil-leucina (Me-25 e 26) e dois de uma unidade isoleucina (Me-31 e Me-32). Os multipletos, com deslocamentos químicos entre δ

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

1,15 e 1,94 são correspondentes aos hidrogênios metilênicos H-23 e H-30, e aos hidrogênios metínicos H-17 e H-24.



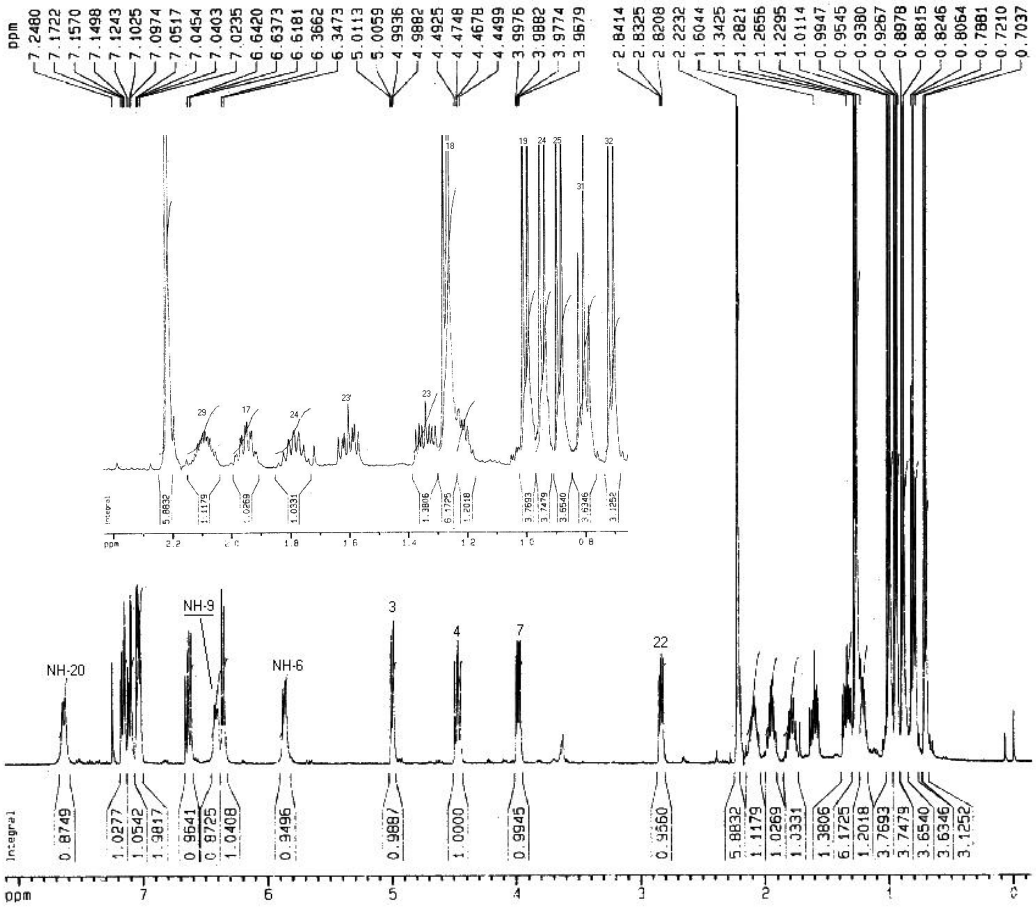
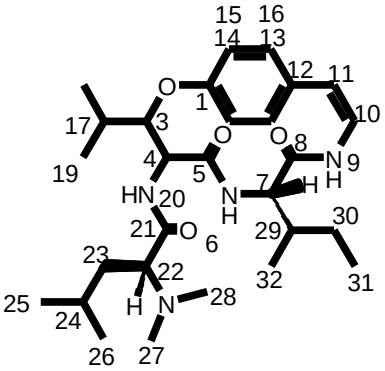


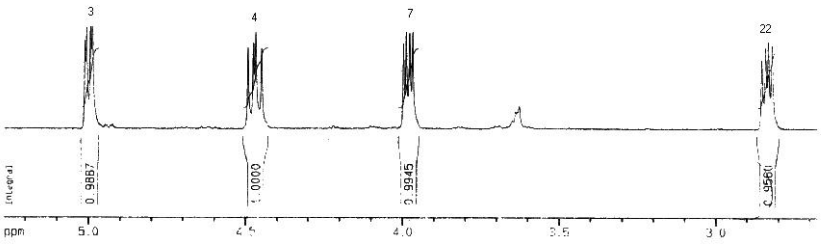
Figura 63. Espectro de RMN de ^{1}H de G-70 em $CDCl_3$ a 400 MHz.

Observou-se, também, um sinal intenso à δ 2,22(6H), correspondente aos hidrogênios metílicos de uma unidade N,N dimetil do aminoácido básico terminal.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

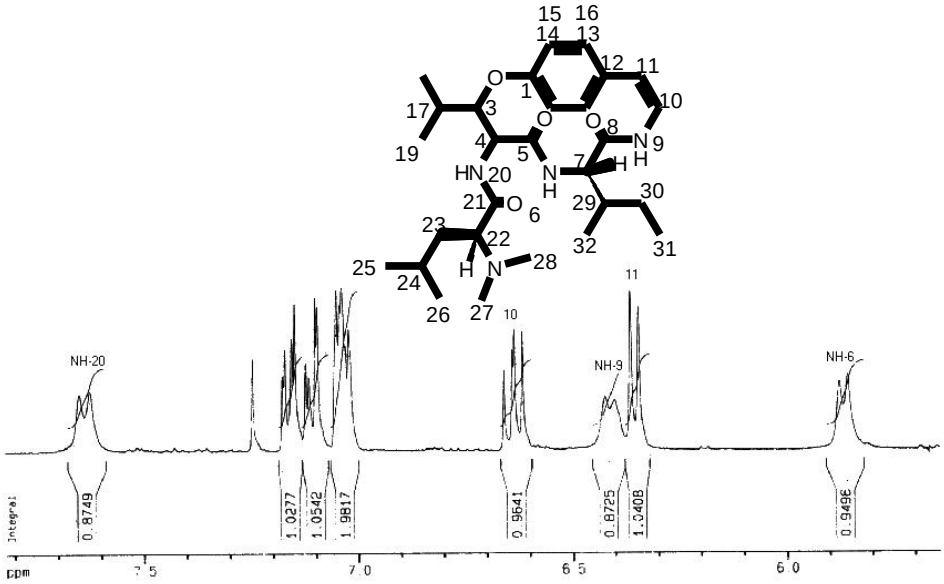
O hidrogênio H-3 (β-carbonílico) da unidade β-hidroxileucina apresentou deslocamento químico à δ 4,99 que aparece como um duplo dubleto, devido ao acoplamento com H-17 (*J* = 2,1 Hz) e com o hidrogênio metínico H-4 (α-carbonílico), que apresenta deslocamento químico à δ 4,47 e desdobra na forma de um duplo dubleto, devido ao acoplamento com o hidrogênio metínico H-3 (*J* = 7,0 Hz) e com o hidrogênio amídico NH-20, que acoplam com os hidrogênios α-carbonílicos H-7 e H-4, respectivamente. O hidrogênio amídico NH-9, da enamina, apresenta-se também em forma de dubleto com deslocamento químico à δ 6,41.





A região espectral que corresponde aos hidrogênios aromáticos deste composto foi facilmente atribuída, com deslocamentos químicos em δ 7,02 e 7,24. Os sinais de acoplamento de 7,8 Hz, relação orto, e *J* = 2,8 Hz, relação meta, em relação à função éter. Essas constantes de acoplamento são características para sistemas benzênicos 1,4 disubstituídos[59].

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



A análise do espectro de RMN de 2D, COSY ^{1}H-^{1}H (Figura 64) possibilitou identificar os sinais de hidrogênio que constituem as três unidades aminoácidas (leucina, isoleucina e β-hidroxileucina) presentes na molécula.

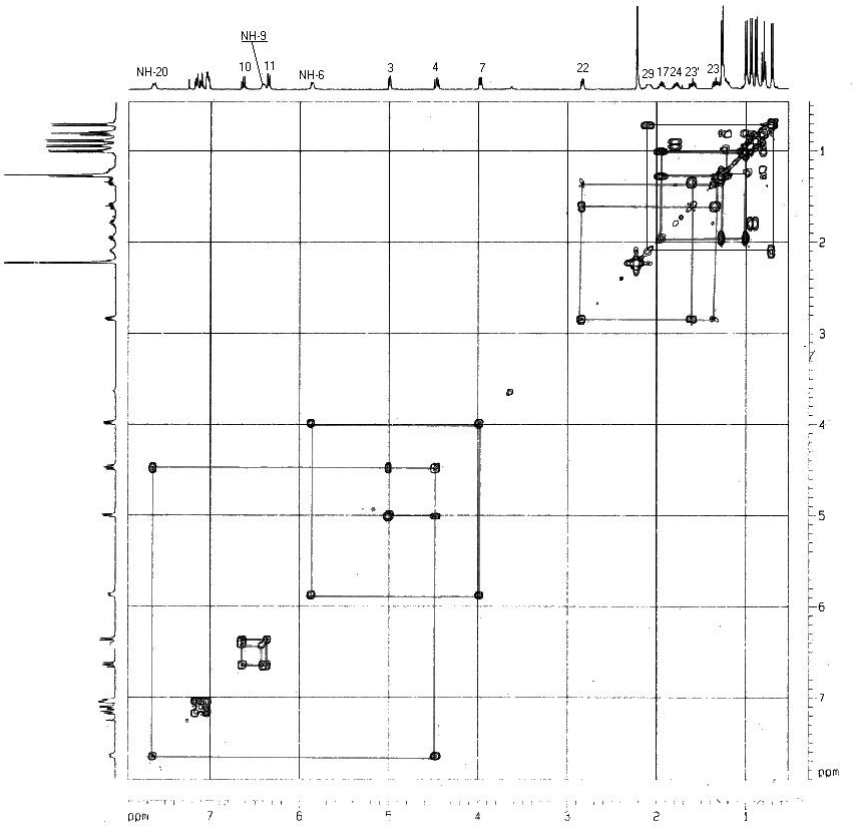


Figura 64. Espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-70, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Para atribuição dos sinais da unidade β-hidroxileucina, foi utilizado como ponto de partida o hidrogênio amídico NH-20 que absorve em δ 7,63, o qual correlaciona-se com o hidrogênio metínico H-4 em δ 4,77, este por sua vez, correlaciona-se com o hidrogênio metínico H-3 à δ 4,99. Neste espectro não foi observados a correlação do hidrogênio H-3 com H-17. O H-17 apresenta correlação com os hidrogênios heterotópicos das duas metilas (Me-18 e Me-19). Completando assim o sistema de spins da unidade β-hidroxileucina. Observa-se também uma correlação do hidrogênio H-4 com H-20 e H-3.

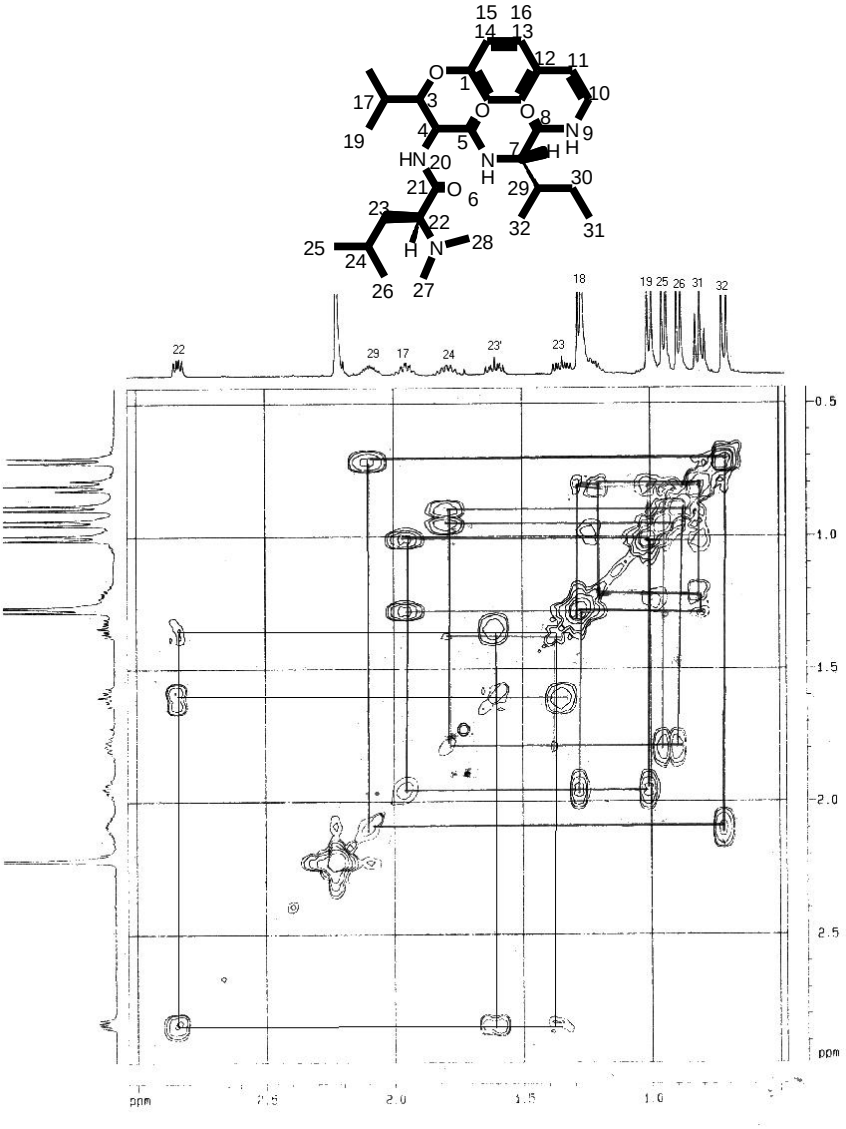


Figura 64a. Expansão do espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-70, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

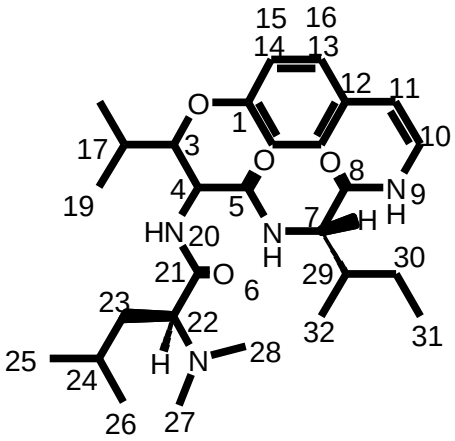
AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

Constata-se também no espectro COSY ^{1}H-^{1}H (Figura 64b) da unidade esterilamina em que o hidrogênio amídico NH-9 apresenta uma correlação com o hidrogênio metínico H-11, definindo assim a enamina da unidade esterilamina.

A atribuição para a unidade leucina do resíduo básico terminal iniciou pelo sinal correspondente ao hidrogênio H-22, o qual correlaciona-se com os hidrogênios metilênicos diasteriotópicos H-23 e H-23'. O hidrogênio H-23 também apresenta correlação com H-23' e com H-24, por sua vez, correlaciona-se com as duas metilas heterotópicas Me-25 e Me-26 completando o sistema de spins.

Para atribuição dos sinais da unidade isoleucina, foi utilizado como ponto de partida o hidrogênio amíidico NH-6 que absorve em δ 5,86, o qual se correlaciona com o hidrogênio metínico H-7 em δ3,98, este por sua vez, correlaciona-se com o hidrogênio H-29 a δ 2,09, que apresenta correlação com CH_3-32 que absorve a δ 0,71. O hidrogênio metílico CH_3-31 que absorve a δ 0,80 correlaciona-se com os hidrogênios diastereotópicos H-30, H-30' a δ 1,21 e 1,30 definido desta forma o sistema de spins para unidade isoleucina.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



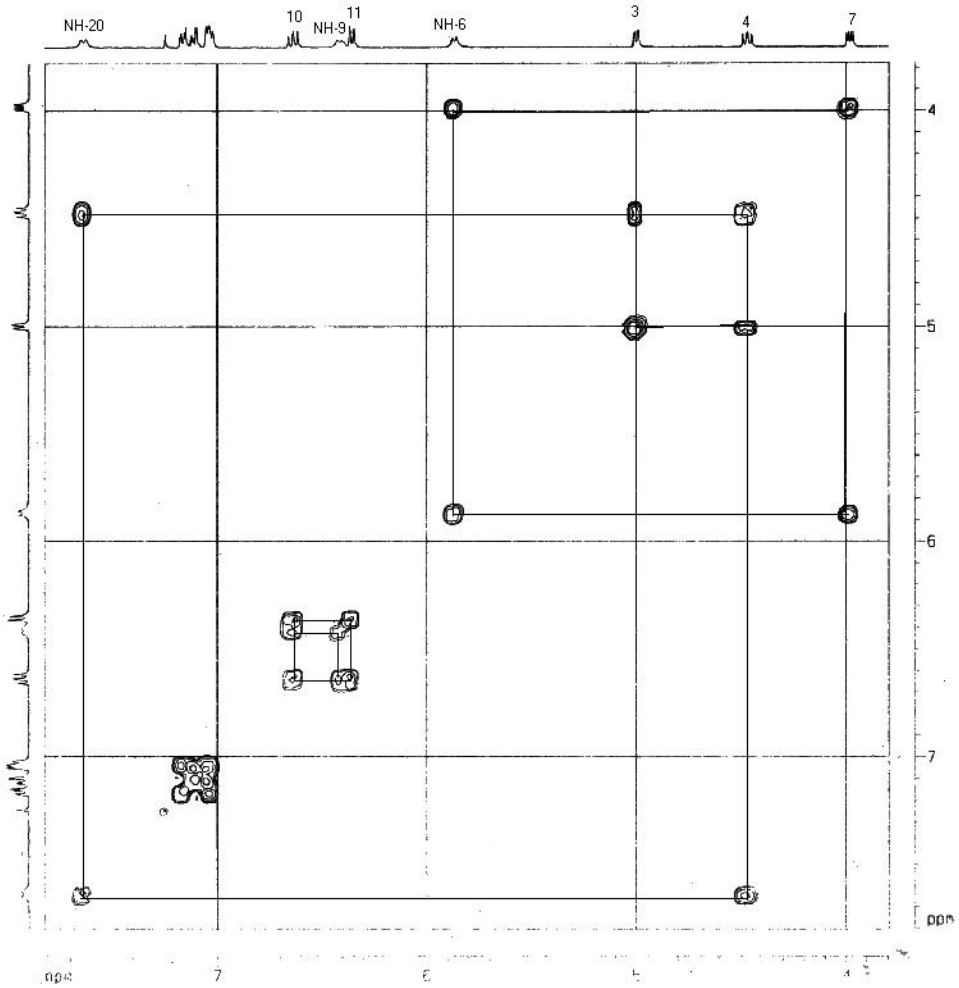
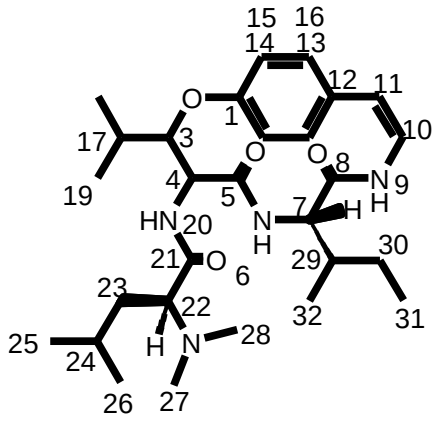


Figura 64b. Expansão do espectro de RMN de 2D, 1H-1H COSY, de G-70, em $CDCl_3$ a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



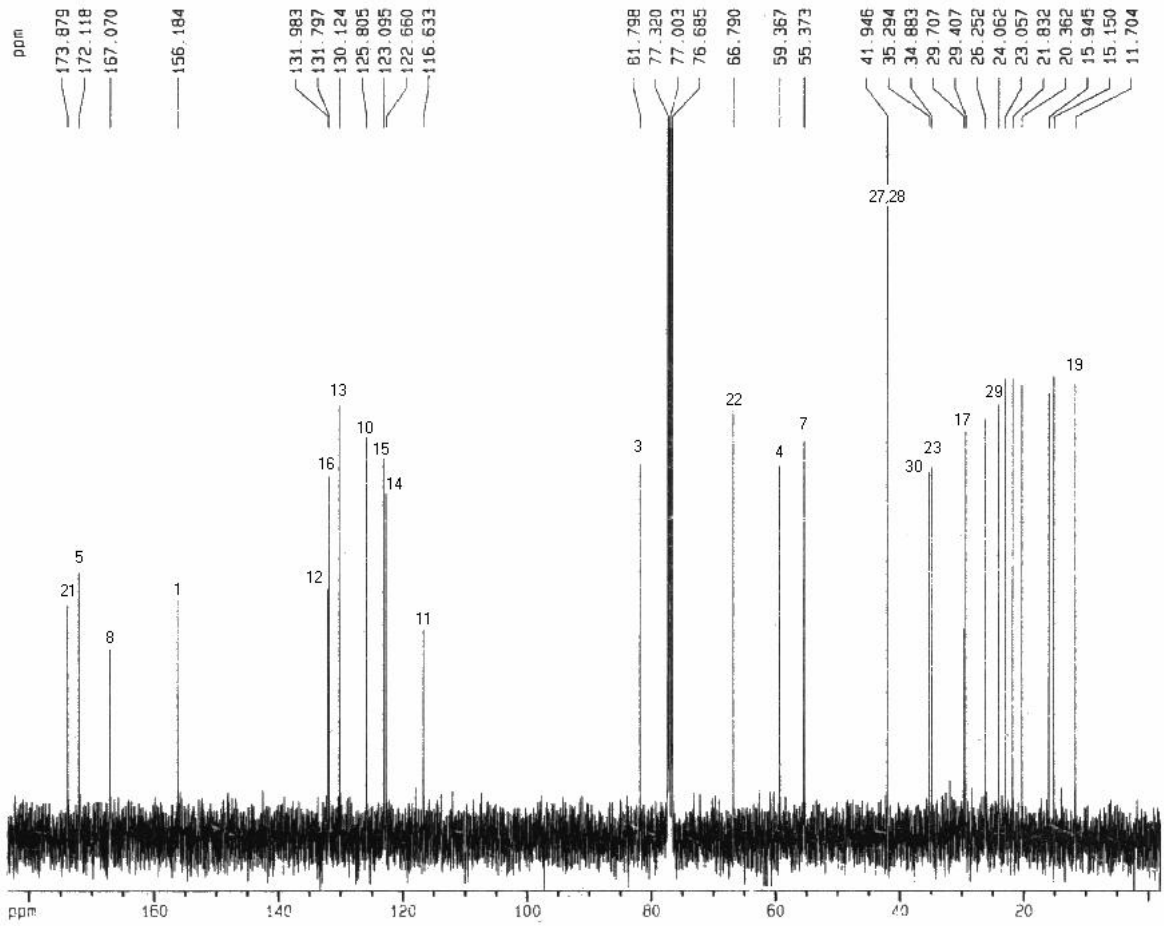
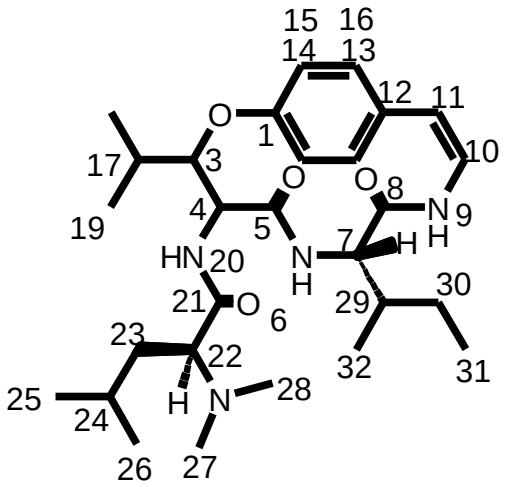


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C de G-70 a 100 MHz

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.



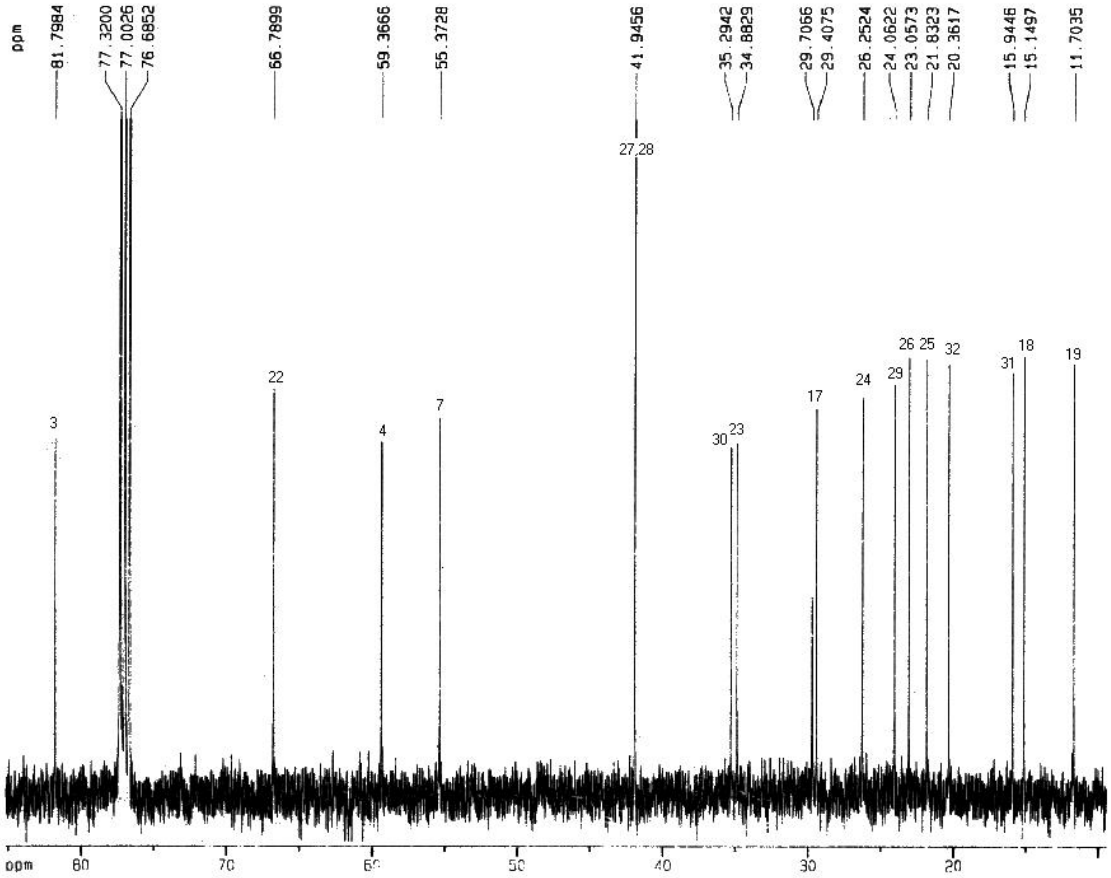


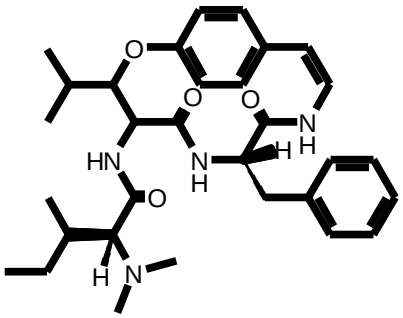
Figura 65a. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de G-70 a 100 MHz.

4.2.2.6. G-77 e G-90

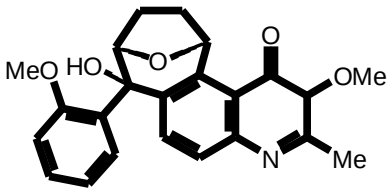
Os metabólitos G-77 (30) e G-90 (18) foram isolados da fração clorofórmica (tabela 3), apresentando-se em forma de sólido branco, após purificação em CCDP. Esses metabólitos foram identificados, respectivamente como scutianina C^{60} e

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

waltheriona A,[4] ambos pertencentes às classes de alcalóides ciclopeptídicos e alcalóides do tipo quinolonas. Essa confirmação foi gerada a partir da comparação em CCD destes alcalóides com amostras autênticas e seus respectivos ponto de fusão (ver tabela 6, p. 23).



30



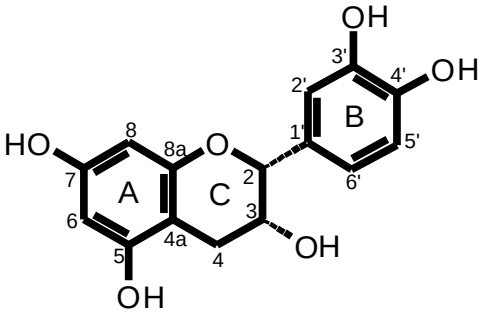
18

4.3. Caracterização do composto GA-1, obtido da fração acetato de etila de *M. chamaedrys*

4.3.1. GA-1

O extrato de acetato de etila após ser submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica, forneceu um sólido que foi codificado como GA-1 de p.f. = 235 – 236 °C. Este na presença de solução de cloreto férrico apresentou mancha de coloração azul-escuro, característico de compostos fenólicos. Houve também a formação de cristais de coloração branco-avermelhado em acetona para este composto, cujo $[\alpha]^{20}$ = -66° (c = 0,075; CH_3COCH_3).

Os dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H, ^{13}C, COSY, DEPT e HMQC do metabólito GA-1 foram compatíveis com os dados espectroscópicos de RMN encontrado na literatura para o flavonóide (-)-epicatequina (31).[61] Esta substância apresenta propriedade antiinflamatória e antioxidante.[62]



AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

31

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 66) em acetona-d_6 forneceu dados que possibilitaram atribuir os sinais correspondentes aos hidrogênios dos anéis A, B e C de 31.

O anel C foi caracterizado pelos sinais em δ 4,20 (1H, s) para H-3 e δ 4,87 (1H, *d, J* = 3) para H-2. Os duplos dubletos a 2,86 (1H, *J* = 4,4 e *J* = 16 Hz) e 2,73 (1H,
J = 3,2 e *J* = 16 Hz) referem-se aos hidrogênios diastereotópicos H_{4b} e H_{4a}, respectivamente. Estas correlações podem ser mais bem visualizadas no espectro de COSY (Figura 67). O anel A, com dois substituintes OH nas posições 5 e 7 é caracterizado pelos dois dubletos em δ 5,92 e 6,01 ($J_{6,8}$ = 2,4 Hz) referentes aos hidrogênios H-6 e H-8. Entretanto, os sinais observados na região entre δ 6,70 e 7,00 apresentam uma multiplicidade indicativa de duas substituições OH – 3', 4' conforme esperado para o anel B. Os hidrogênios H-6' e H-5', aparecem à δ 6,83 (1H, *d*, $J_{5',6'}$ = 8,0 Hz ($J_{6',2'}$ = 1,2 Hz) e δ 6,77 (1H, *d*, $J_{5',6'}$ = 8,4 Hz). O dubleto em δ 7,00, corresponde ao hidrogênio H-2', com $J_{2',6'}$ = 1,2 Hz, característico de acoplamento de hidrogênio *meta* e o sinal alargado que aparece em δ 8,00 corresponde as quatro hidroxilas ligadas aos anéis A e B.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

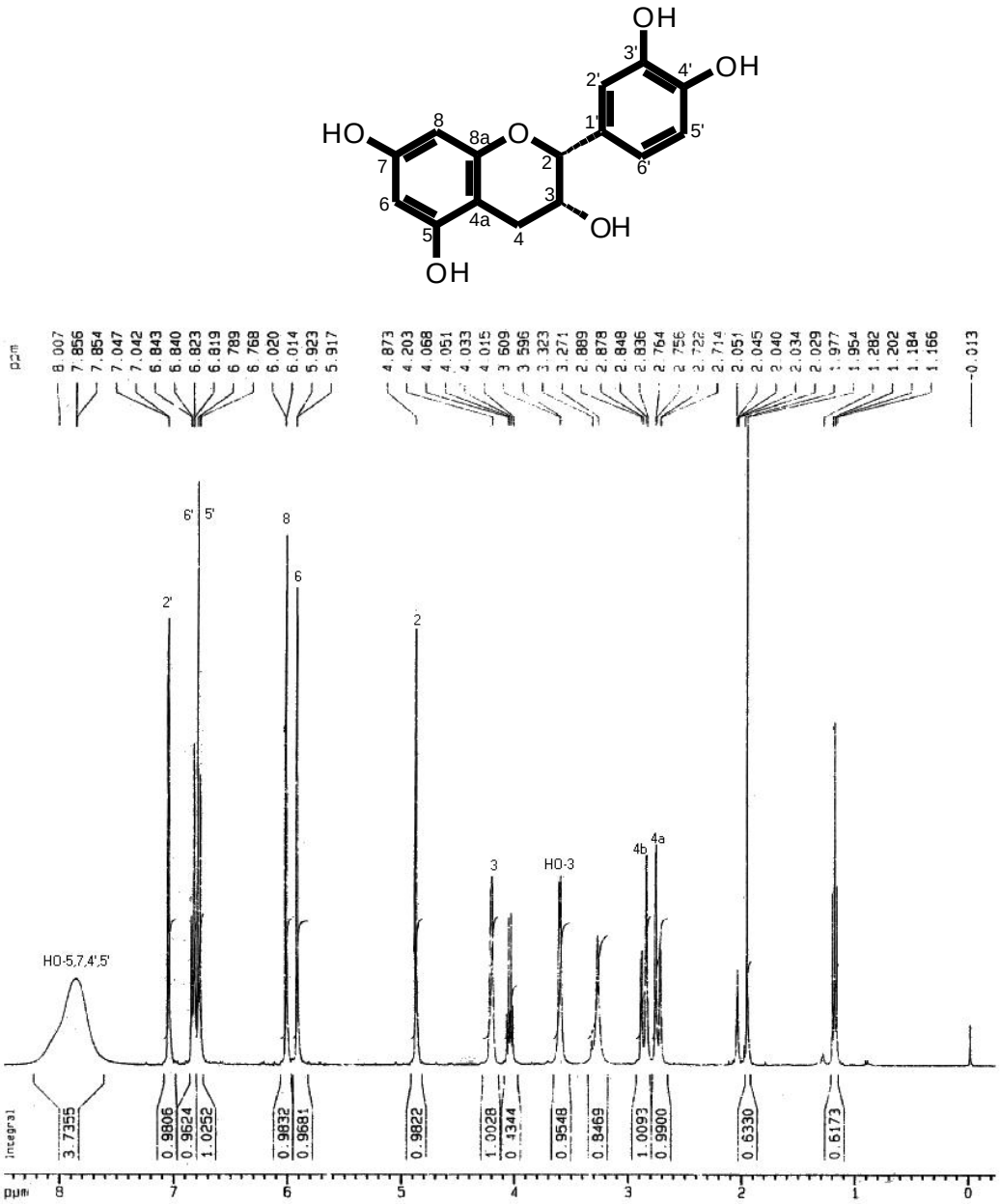


Figura 66. Espectro de RMN de ^{1}H, GA-1, em Acetona-d_6, a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

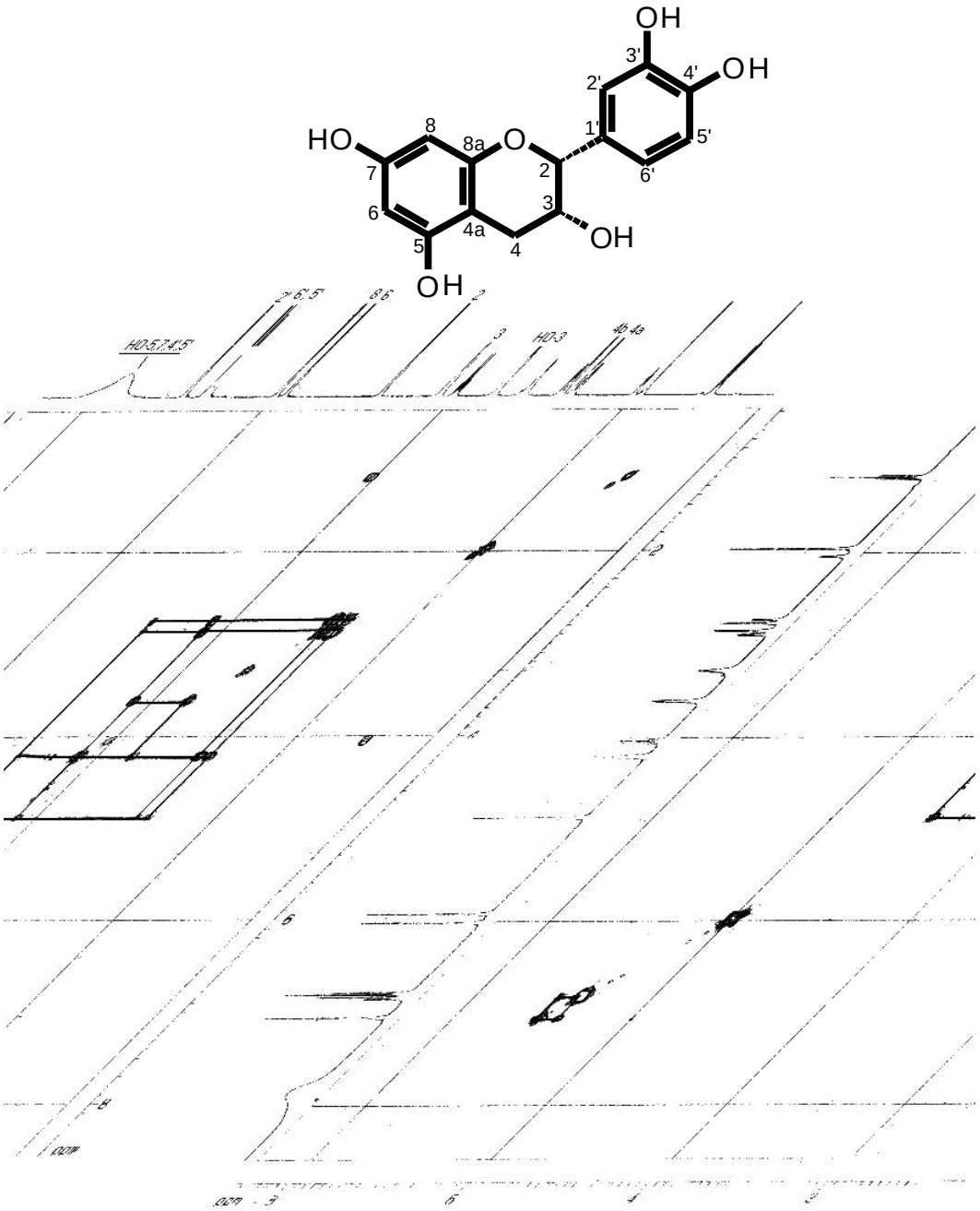


Figura 67. Espectro de RMN de 2D, COSY de GA-1 em Acetona-d_6 a 400 MHz.

O espectro de RMN de ^{13}C juntamente com os espectros de DEPT 135° e HMQC (Figuras 68, 69 e 70), de GA1 permitiram confirmar a estrutura 31 proposta, através da identificação dos três sistemas de anéis na molécula. Na região espectral relativa a carbono sp^3, caracterizou-se o anel C, através dos sinais a δ 28,89, referente ao carbono metilênico C-4, à δ 66,89 e 79,32 relativos aos carbonos metínicos C-2 e C-3, respectivamente. O anel A, que apresenta substituição 5,7 –

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

diidróxi, foi identificado através das ressonâncias em δ 157,06 para C-5 e δ 157,44, para C-7, com desblindagem típica para carbonos sp^2 contendo substituintes com efeito mesomérico (+M).

Em conseqüência, C-6 e C-8, corresponderam aos sinais em δ 95,08 e 94,37, demonstrando aumento de densidades eletrônicas para os carbonos em posição *orto* aos grupos fenólicos. Essa característica foi também observada para o anel B, que apresenta substituição 3',4'-diidróxi (Figura 65).

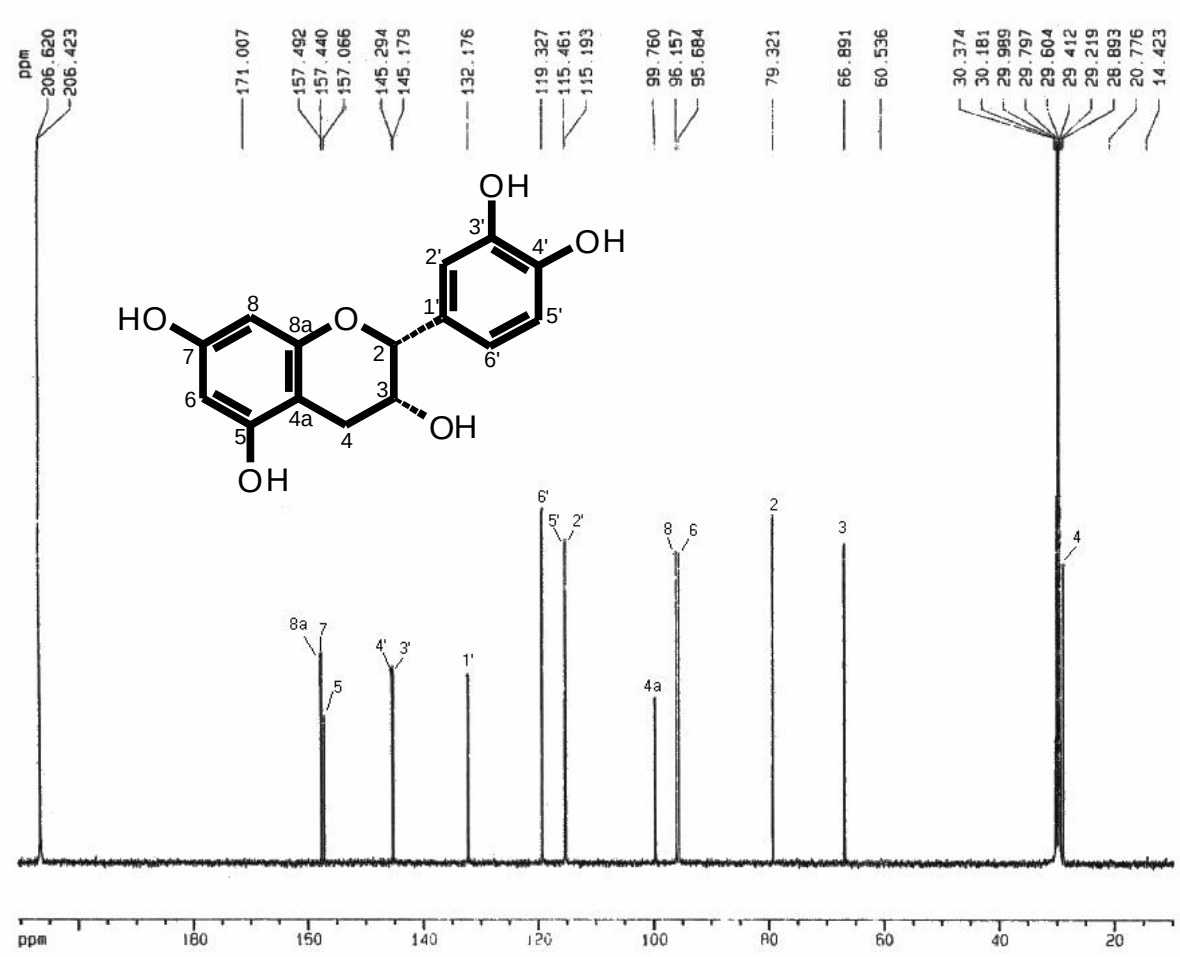
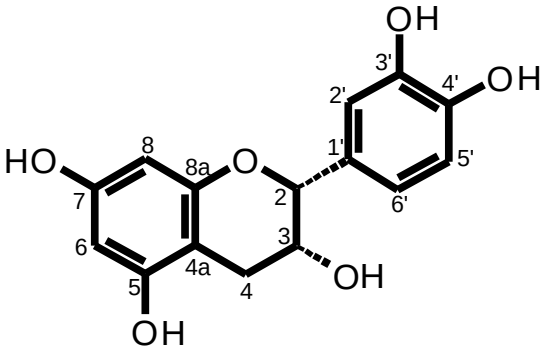


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C de GA-1 em Acetona-d_6 a 100.32 MHz.

No espectro de DEPT 135° (Figura 66) nota-se a presença de sete sinais com intensidade positiva correspondentes aos carbonos metínicos (C-2, C-3, C-6, C-8, C-2', C-5', C-6') e um único sinal com intensidade negativa referente ao carbono metilênico C-4. Os demais sinais vistos no espectro de ^{13}C e ausente neste

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

espectro, correspondem aos carbonos desidrogenados presentes na molécula de GA-1.



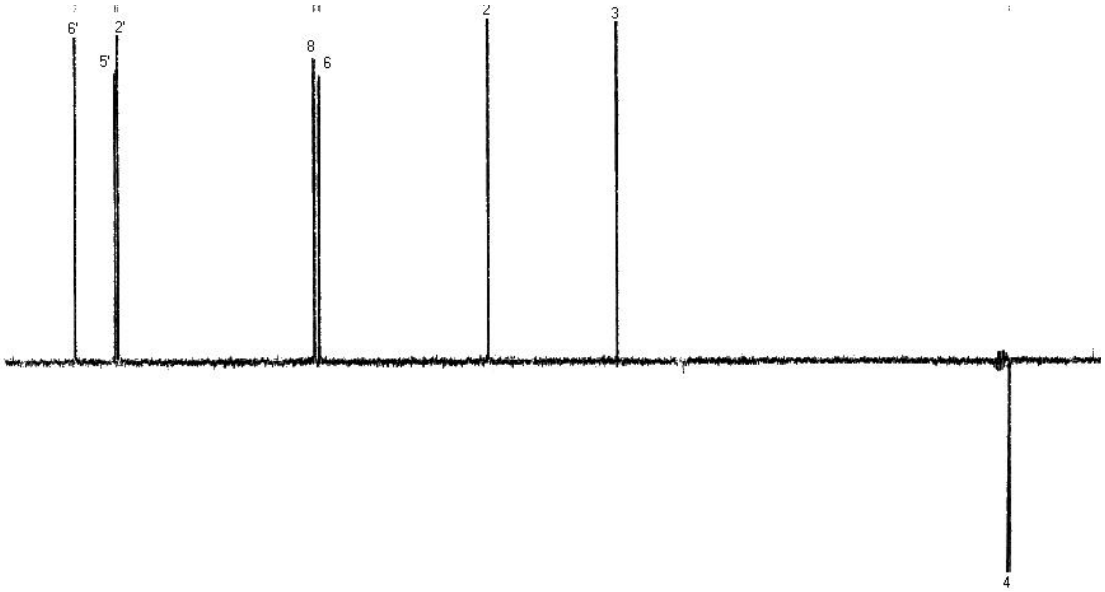
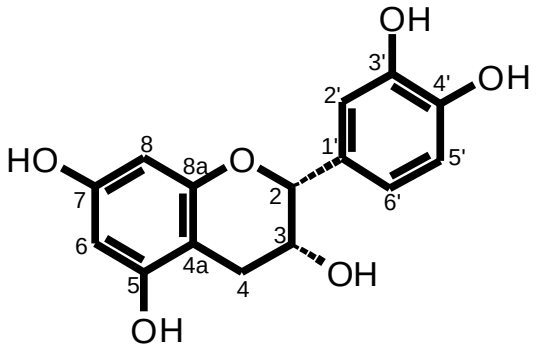


Figura 69. Espectro de RMN DEPT 135° de GA-1 em Acetona-d_6 a 100 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

A atribuição dos respectivos carbonos hidrogenados, presentes na estrutura proposta, foi também facilitada com a ajuda do espectro HMQC, presente na figura 67.



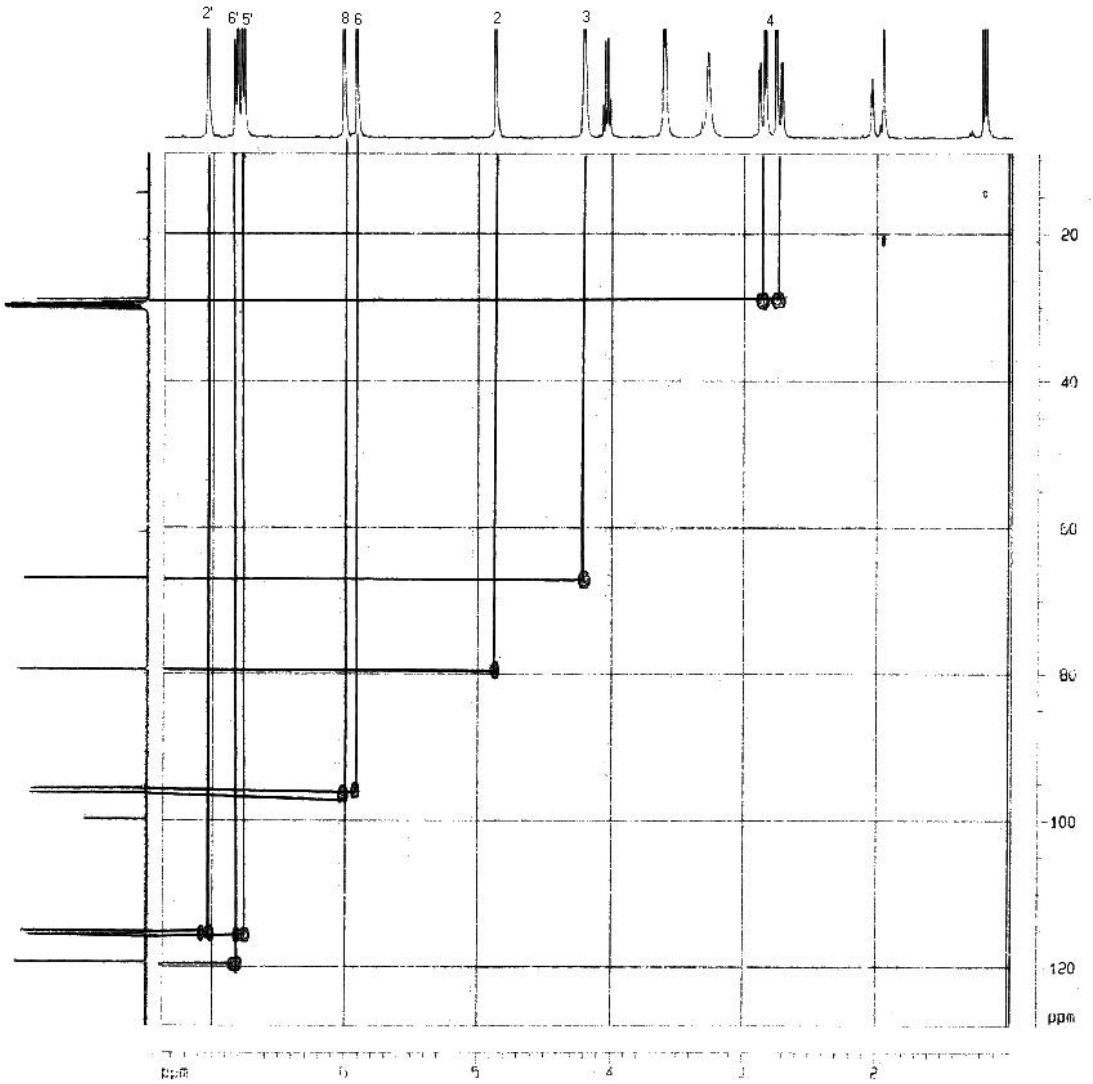


Figura 70. Espectro de RMN HMQC de GA-1 em Acetona-d_6 a 400 MHz.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

5. CONCLUSÕES

Da raiz de *Melochia chamaedrys* foram isoladas quatro classes de compostos naturais; alcalóides, cumarinalignóides, flavonóides e lactonas, tendo a classe dos alcalóides subdividida em dois grupos de compostos denominada de alcalóides ciclopeptídicos e alcalóides do tipo quinolinonas.

Através de métodos espetroscópicos e espectrométricos usuais, IV, EM, raios-X e RMN (1 e 2D) e, em alguns casos pela comparação direta com uma amostra autêntica, foi possível identificar os seguintes compostos: ácido parasórbico (25), adoutina X (29), (-)–epicatequina (31), propacina (26), walteriona A (18), scutianina B(9) e C (30), todos conhecidos, e dois alcalóides inéditos a chamaedrona (20) e chamaedrina (28). Outros quatro novos compostos semi-sintéticos foram também sintetizados a partir do alcalóide antidesmona, codificados pelas siglas GOH (21), GOH' (22), GOMe (23) e GOMe' (24).

Os alcalóides inéditos, como também o alcalóide 19 e seus derivados foram submetidos a ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana. Todos se mostraram ativos, com exceção dos alcalóides 19 e 28.

Os testes de letalidade contra *Artermia salina* revelaram que as frações (hexânica, clorofórmica e acetato de etila) de *Melochia chamaedrys*, apresentaram uma toxicidade moderada. A fração hexânica da qual foram isolados os compostos 19 e 20, apresentou uma CL_{50} maior que as demais frações, indicando esta possuir uma toxicidade inferior, em relação a essas frações.

Com relação à comparação da espécie *Melochia chamaedrys* com a espécie *Waltheria douradinha*, planta também estudada pelo nosso grupo de pesquisa, pode-se comprovar a existência de três compostos em comum, 9, 18 e 19, sendo o último recentemente isolado pelo grupo.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JOLY, A. B., *Botânica. Introdução à taxonomia vegetal*. 2.ed., p. 450-463, 1977.

2. PAÏS, M., MAINIL, J., GOUTAREL, R. *Ann. Pharm*. *Franc*., 21 (2), p.139, 1963.

3. MOREL, A. F., Gehrke, I. L. T. S., *et. al*. *Phytochemistry*, 51, p. 473-477, 1999.

4. HOELZEL, S. C. S. M., *et. al*. *Phytochemistry,* 66, p. 1663-1167, 2005.

5.TSCHESCHE, R., KAUSSAMAN, E. V., "*The Alkaloids*", v. 15, Manske (ed). Academic Press, New York, N. Y., p. 165, 1975.

6. MACHADO, E. C. S., ZANATTA, N., MOREL, A. F. *Química Nova.* 16, p. 397-402, 1993.

7. SCHIMIDT, U., *et. al*. J. *Org.Chem.,* 48, p. 2680, 1983.

8. MITSCHER, L. A., *Chem. Rev*. 305, p. 559-592, 2005.

9. GRUNDON, M. F., *The Alkaloid*. V. XVII, New York, Ac. Press, p. 105-198, 1975.

10. GOLDBERG, A., *Contr. U. S. Natl. Herb*., v.34, p.134-363, 1967.

11. BHAKUNI, R. S., SHUKLA, Y. N, THAKUR, R.S., *Phytochemistry*, 9, p. 3159-3160, 1991.

12. BHAKUNI, R. S., SHUKLA, Y. N, THAKUR, R.S., *Phytochemistry*, 26, p. 334-335, 1987.

13. KAPADIA, G. J., *et. al*., *Tetrahedron*, 36, p. 2441-2447, 1980.

14. SHUKLA, Y. N., *et. al*., *Phytochemistry*, 15, p. 1788. 1976.

15. KAPADIA, G. J., *et. al*., *J. Am. Chem. Soc.*, V. 97 (23), p. 6814-6819, 1975.

16. KAPADIA, G. J., SHUKLA, Y. N., BASAK, S. P., *Phytochemistry,* 17, p.1444-1445, 1978.

17. KAPADIA, G. J., SHUKLA, Y. N., *Planta Medica*, 59, p. 568-569, 1993.

18. MORTON, J. F., *Morris Arbor Bull*, 25, p. 24. 1974.

19. O'GARA, R.W., *et. al*., *J. Nat. Cancer inst.,* 52, p. 445, 1974.

20. *C.S.I.R*., New Delhi, V. 1, p. 334, 1962.

21. CHOPRA, N. R., NAYAR, S. L., CHOPA, I. C., *Glossary of Indian Medicinal Plants.* C.S.I.R. New Delhi, p. 164, 1956.

22. PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F. AND PERRIN, D. R. *Pergamon Press*, 2ª ed. 1980.

23. MICHAEL, A. S., THOMPSON C. G., ABRAMOVITZ, M., *Science,* v. 123, p. 464, 1956.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

24. VAN HAECKE, P., PERSUUNE, G., *Ecotoxicology. Environmental Safety*, v. 5 p. 352-387, 1981.

25. MEYER, B. N, *et al*. , *Planta Medica*, v. 45, p. 31-34, 1982.

26. COLEGATE, S. M., MOLYNEUX, R. J., *CRC Press*, EUA, p. 507, 1993

27. CADWELL, G. S., MATTHEW, G. B., PETER, J. W. , *Toxicon,* v. 12, p. 120-127, 2003.

28. CARBALLO, J. L. *et al*., *BMC Biotecnology*, v. 2, p. 17-20, 2002.

29. ALVES, T. M., *et al*. *Biological "screening" of Brazilian medicinal plants*. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

30. CHENG, S. S., *et al*., *Bioresource Technology*, v. 89, p. 99-102, 2003.

31. FINNEY, D. J., *University Press*, Cambridge, p. 55-80, 1974.

32. ATMAN, F. P., *Stuttgart*, Gustav Fischer Verlag, p. 56, 1976

33. HAMBURGUER, M. HOSTETTMANN, K., *Phytochemistry,* v. 30, p.3864, 1991.

34. HAMBURGUER, A. L., FUCHS, A., *J. Chromatography*, v. 51, p. 327-329, 1970.

35. HOREAU, A., *Tetrahedron Letters*, v. 15, p. 1527-1530, 1961.

36. CHRISTENSEN, S. B., *Journal of Organic Chemistry*, v. 48, p. 396-399, 1993.

37. HELMCHEN, G., *Tetrahedron Letters*, v. 16, p. 1527-1530, 1974.

38. FERREIRA, J. T. B., *et. al*., *Série de Textos da Escola de Verão em Química V,* Editora da UFScar, São Carlos-SP, p. 77, 2001.

39. BUSKE, A., *et. al*., *Tetrahedron,* 55, p. 1079-1086, 1999.

40. BRUGMANN, G., *et. al*. *Tetrahedron*, 56, p. 3691-3695, 2000.

41. BRUGMANN, G., *et. al*. *Pharmaceutical and Pharmacological letters* 11 (2), p. 47-48, 2001.

42. CARDELLINA II, J. H., MEINWALD, J., *Phytochemistry,* v. 19, p. 2199-2200, 1980.

43. HORTON, A. M., LEY, S. V., *J. Organometallic Chem.*, v. 285, p. 17-20, 1985.

44. LICHTENTHALER, F. W., KLINGER, F. D., JARGLIS, P., *Carbohydrate Research*, v. 132, p. 1-4, 1984.

45. PARTHASARATHY, M. R., SARADHI, K. P., *Phytochemistry*. V.23, n.4, p. 867-869, 1984.

46. ZOGHBI, M. G. B., ROQUET, N. F., GOTTLIEB, O. R., *Phytochemistry,* v.20, p. 180, 1981.

47. TANAKA, H., *et. al*., *Chem. Pharm. Bull*. 36 (5) p. 1738-1743, 1988.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.

48. DAS, B., VENKATAIAH, B., *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, p.213-214, 2001.

49. GOULART, M. O. F., *et. al*., *Química Nova*, 16 (2), p. 95-100, 1993.

50. MARQUES, M. O. M., YOSHIDA, M., *Química Nova*, 13 (4), p. 245-246, 1990.

51. PATNAM, R. *et. al*., *Phytochemistry*, i*n press* 2005.

52. LIN, L.-J., CORDELL, G. A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun*., p. 160-161. 1984.

53. MERKUSA, V. M., *et al*. *Phytochemistry,* 13, p. 1239, 1974.

54. MOREL, A. F., *Fakultät fürChemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universitätzu Tübingen* Dissertation,Tübingen – Deutschland, p.70 –91, 1985

55. MOREL, A. F., *et. al*., *Phytochemistry*, 47 (1), p. 125, 1998.

56. PAÏS, M., *et. al*., *Ann. Pharm. Franc*, 21(2), p. 139, 1963.

57. PAÏS, M., *et. al*., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, v. 3, p. 1145, 1968.

58. SERVIS, R. E., *et. al*. *J. Am. Chem. Soc.*, 91:20, 24(9), 1969.

59. RHAMAN, A., *Sping Verlag*, New York, 1986.

60. TSCHESCHE, R., AMMERMANN, R., *Ber*, 107, p. 274, 1974.

61. EL-SEEDI, H. R., *et. al*., *Phytochemistry*, 52, p. 1739-1744, 1999.

62. SHOJI, T., *et. al*., *Phytochemistry,* v. 59, p. 183-189, 2002.

AcroPDF - A Quality PDF Writer and PDF Converter to create PDF files. To remove the line, buy a license.