

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *VERNONIA
TWEEDIEANA* BAKER**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ricardo Basso Zanon

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *VERNONIA*
TWEEDIEANA BAKER**

por

Ricardo Basso Zanon

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *VERNONIA TWEEDIEANA*
BAKER**

elaborada por

Ricardo Basso Zanon

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Margareth Linde Athayde, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Solange Cristina da Silva Hoelzel, Dr^a (UNIFRA)

Marco Aurélio Mostardeiro, Dr. (UNIJUI)

Santa Maria, 07 de abril de 2006.

Têm coisas que tem seu valor
Avaliado em quilates,
Em cifras e fins
E outras não têm o apreço
Nem pagam o preço
Que valem pra mim...

Gujo Teixeira

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde, meus sinceros agradecimentos pela orientação, dedicação, amizade, estímulo e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e pessoa, que contribuíram para a minha formação científica e pessoal.

Ao Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, na pessoa do Prof. Dr. Sérgio L. Dalmora, pela disponibilização de suas infra-estruturas e especialmente para a realização do teste de toxicidade aguda e auxílio na interpretação dos resultados.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e atenção, pelo saber compartilhado, sendo que, não mediram esforços para que pudéssemos concluir esta jornada;

Ao Prof. Dr. Geraldo Ceni Coelho, pelo auxílio na coleta e identificação do material vegetal e pelas contribuições no desenvolvimento do trabalho;

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através de uma bolsa de estudos;

À Elaide Minatto, pela atenção, paciência, apoio e amizade;

À Ticiane Boschetti e Mariane dos Santos, minhas bolsistas de Iniciação Científica, pela amizade e empenho na busca às substâncias isoladas;

Aos colegas de laboratório, Chana M. Silva, Danielle F. Pereira, Francisco Maikon C. Barros, Leandro Francescato, Francisco Zanin, Tarcísio de Camargo, Alexandre Schubert, Aline Bolzan, Glória, Janine, Anelise, Tiago Schwanz, Tiane e Graciela que, pelo convívio diário, de uma forma ou outra participaram da pesquisa;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial Chana M. Silva, Gabriela C. Schmitt, Danielle F. Pereira e Leandro Francescato pela convivência amigável, alegre, estimuladora e pelos momentos de descontração;

À Maria Angélica da Silveira Lima (setor de Ressonância Magnética do Depto. de Química da UFSM) pela atenção e colaboração na obtenção dos espectros de RMN;

Aos professores Rodrigo Freddo e Raquel D. Petry (Unijuí) pelo incentivo e contribuição no meu crescimento profissional;

À Cláudia Farias pelo companheirismo, coragem, paciência, inteligência e por ter-me aberto os olhos para o mundo;

À minha família: meus irmãos Renato e Regina e meus pais Edeimar e Lenir pelo incentivo, estabilidade, amizade e amor. Afinal, “vieram os ventos mas não houve queda porque estava solidificado sobre a rocha”. Obrigado por sempre estarem ao meu lado, acompanhando e torcendo pelas minhas conquistas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1. Descrição da Planta.....	26
3.1.1. Descrição da Família Asteraceae (Compositae).....	26
3.1.2. Descrição do Gênero <i>Vernonia</i>	26
3.1.3. Descrição da Espécie <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	27
3.2. Metabólitos Secundários.....	29
3.2.1. Definição.....	29
3.2.2. Função e Importância.....	29
3.2.3. Metabolismo Vegetal Secundário.....	30
3.3. Aspectos Farmacológicos do Gênero <i>Vernonia</i>	32
3.4. Gênero <i>Vernonia</i> : Uso Popular.....	37
3.5. Metabólitos Secundários no Gênero <i>Vernonia</i>	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1. Material para Análise Química.....	52
4.2. Material Vegetal.....	54
4.3. Preparação do Material Vegetal	54
4.4. Preparação dos Extratos.....	54

4.5. Fracionamento do Extrato Hidro-etanólico Bruto.....	55
4.6. Análise Cromatográfica das Frações.....	55
4.7. Isolamento e Purificação.....	55
4.7.1. Procedimentos Cromatográficos Preliminares.....	55
4.7.2. Fração Diclorometânica (F-CH ₂ Cl ₂).....	56
4.7.3. Fração Acetato de Etila (F-AcOEt).....	56
4.8. Avaliação da Atividade Antioxidante das Frações das Folhas de <i>Vernonia tweedieana</i>	61
4.9. Avaliação da Toxicidade Aguda de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	61
4.9.1. Animais.....	61
4.9.2. Estudo de Toxicidade Aguda.....	62
5. RESULTADOS.....	63
5.1. Rendimento dos Extratos.....	64
5.2. Elucidação Estrutural dos Compostos Isolados.....	64
5.2.1. Elucidação Estrutural de V1.....	66
5.2.2. Elucidação Estrutural de V2.....	79
5.2.3. Elucidação Estrutural de V3.....	98
5.2.4. Elucidação Estrutural de V4.....	110
5.2.5. Elucidação Estrutural de V5.....	128
5.3. Avaliação da Atividade Antioxidante das Frações Obtidas das Folhas de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	135
5.4. Avaliação da Toxicidade Aguda da Planta <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	138
6. DISCUSSÃO.....	139
7. CONCLUSÕES.....	160
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Vernonia tweedieana</i> Baker – aspecto geral da planta.....	28
Figura 2:	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	31
Figura 3:	Rota biossintética de esteróides e triterpenos.....	32
Figura 4:	Flavonóides identificados em <i>Vernonia galamensis</i> ssp. <i>Nairobiensis</i>	39
Figura 5:	Compostos isolados de <i>Vernonia diffusa</i>	40
Figura 6:	Glaucolídeos isolados de <i>V. galamensis</i>	40
Figura 7:	Triterpenos isolados da espécie <i>Vernonia cinerea</i> Less.....	41
Figura 8:	Compostos lactônicos isolados de <i>V. cinerea</i>	41
Figura 9:	Saponinas isoladas de <i>Vernonia amygdalina</i> Del.....	42
Figura 10:	Esteróides isolados de <i>Vernonia amygdalina</i>	43
Figura 11:	Lactonas sesquiterpênicas isoladas de <i>Vernonia amygdalina</i>	43
Figura 12:	Estrutura de vernoniosídeos esteroidais presentes no extrato de <i>Vernonia kotschyana</i>	44
Figura 13:	Esteróides isolados de <i>Vernonia guinensis</i>	44
Figura 14:	Compostos isolados de <i>Vernonia fruticulosa</i>	45
Figura 15:	Compostos isolados de <i>Vernonia juralis</i>	45
Figura 16:	Compostos isolados de <i>V. poskeana</i>	46
Figura 17:	Lactona das folhas de <i>Vernonia arborea</i>	47
Figura 18:	Compostos isolados em espécies de <i>Vernonia</i>	48
Figura 19:	Compostos flavonoídicos isolados de <i>V. anthelmintica</i>	48
Figura 20:	Compostos isolados de espécies de <i>Vernonia</i>	49
Figura 21:	Compostos isolados de espécies de <i>Vernonia</i>	50
Figura 22:	Esquema de isolamento e purificação dos triterpenos da fração diclorometânica das folhas de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	58

Figura 23: Esquema de isolamento e purificação dos esteróides da fração diclorometânica das folhas de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	59
Figura 24: Esquema de isolamento e purificação do flavonóide da fração acetato de etila das folhas de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	60
Figura 25: Esquema de isolamento e purificação dos triterpenos da fração diclorometânica das folhas de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	65
Figura 26: Espectro IV de V1.....	67
Figura 27: Espectro de ¹ H-RMN ampliado de V1.....	69
Figura 28: Esquema de fragmentação do composto V1.....	71
Figura 29: Estrutura química do lupeol (V1).....	72
Figura 30: Espectro ¹ H-RMN de V1.....	74
Figura 31: Espectro de ¹ H-RMN de V1 ampliado.....	75
Figura 32: Espectro ¹ H-RMN de V1 ampliado na região de campo alto.....	76
Figura 33: Espectro de ¹³ C-RMN de V1.....	77
Figura 34: Espectro de massas de V1.....	78
Figura 35: Diferenças de substituintes β e γ sobre o deslocamento de C-18 de α e β-amirina.....	80
Figura 36: Espectro ¹ H-RMN de V2, mostrando os tripletes observados para H-12.....	81
Figura 37: Espectro de IV de V2.....	85
Figura 38: Proposta de fragmentação para α e β-amirina.....	87
Figura 39: Espectros de massas de V2.1 e V2.2.....	91
Figura 40: Espectro de ¹³ C-RMN de V2.....	92
Figura 41: Espectro de ¹³ C-RMN ampliado de V2.....	93
Figura 42: Espectro de ¹ H-RMN de V2.....	94
Figura 43: Espectro ¹ H-RMN ampliado de V2, região de campo alto.....	95
Figura 44: Espectro ¹ H-RMN ampliado de V2.....	96
Figura 45: Esquema de isolamento e purificação dos esteróides da fração diclorometânica das folhas de <i>Vernonia tweedieana</i> Baker.....	97
Figura 46: O espectro de ¹ H-RMN ampliado de V3, mostrando o <i>ddd</i> observado para H-3.....	99

Figura 47: Espectro ampliado de ^1H -RMN do composto V3, mostrando os sinais verificados para os hidrogênios olefínicos.....	100
Figura 48: Espectro ampliado de ^1H -RMN do composto V3, mostrando os sinais verificados para os hidrogênios metilênicos.....	101
Figura 49: Diferença estrutural entre os isômeros estereoquímicos espinasterol e condilasterol.....	102
Figura 50: Espectro de massas de V3.....	103
Figura 51: Espectro de ^{13}C -RMN ampliado de V3.....	107
Figura 52: Espectro ^1H -RMN de V3.....	108
Figura 53: Espectro de IV de V3.....	109
Figura 54: Cromatografia bidimensional com a amostra V4 utilizando como padrão β -sitosterol.....	110
Figura 55: Fórmulas estruturais de estigmasterol e sitosterol.....	111
Figura 56: Espectro ^1H -RMN ampliado de V4.....	113
Figura 57: Esquema de fragmentação de V4.1 (β -sitosterol).....	116
Figura 58: Esquema de fragmentação de esteróides possuínates de duas insaturações, sendo uma na cadeia lateral (CL) entre C-22 e C-23, como é o caso de V3 (Espinasterol) e V4.2 (estigmasterol)...	117
Figura 59: Espectro de ^{13}C -RMN de V4.....	122
Figura 60: Espectro ^1H -RMN de V4.....	123
Figura 61: Espectro ^1H -RMN ampliado de V4.....	124
Figura 62: Espectro IV de V4.....	125
Figura 63: Espectro de Massas de V4.1.....	126
Figura 64: Espectro de massas de V4.2.....	126
Figura 65: Esquema de isolamento do composto V5.....	127
Figura 66: Estruturas referentes aos compostos mostrados na tabela 16.....	130
Figura 67: Estruturas referentes aos compostos mostrados na tabela 17.....	131
Figura 68: Espectro ^1H -RMN de V5.....	132
Figura 69: Espectro de ^{13}C -RMN de V5.....	133
Figura 70: Espectro de ^{13}C -RMN - DEPT 135° de V5.....	134

Figura 71: Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão), do extrato bruto e das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, BuOH das folhas de <i>V. tweediana</i>	137
Figura 72: IC ₅₀ das amostras no teste de atividade antioxidante (DPPH), determinadas a partir da equação da reta.....	154
Figura 73: Estabilização dos radicais livres pelos compostos fenólicos.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Valores de deslocamentos de ^1H -RMN de V1 e dos compostos 1-7 utilizados como referências (δ_{H}).....	72
Tabela 2:	Valores de deslocamento de ^{13}C -RMN de V1 e dos compostos 1-6 utilizados como referências (δ_{C}).....	73
Tabela 3:	Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN de V2 (mistura) e do composto referência (δ_{C}), de campo baixo para campo alto, ambos em CDCl_3	88
Tabela 4:	Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN de V2 atribuídos à α -amirina e dos compostos 1-6 utilizados como referências	89
Tabela 5:	Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN de V2 atribuídos à β -amirina e dos compostos 1-6 utilizados como referências	90
Tabela 6:	Valores espectroscópicos de ^1H -RMN de H-3 e H-12 de V2 e dos compostos 1 e 2 utilizados como referências (δ_{H}).....	91
Tabela 7:	Diferenças nos δ_{C} que caracterizam os isômeros espinasterol e condrilasterol.....	102
Tabela 8:	Diferenças nos δ_{H} que caracterizam os isômeros 24α (espinasterol) e 24β (condrilasterol).....	102
Tabela 9:	Valores de deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN de V3 e dos compostos 1-5 utilizados como referências.....	105
Tabela 10:	Valores de deslocamentos químicos de ^1H -RMN de V3 e dos compostos 1-6 utilizados como referências.....	106
Tabela 11:	Principais sinais observados no espectro de ^1H -RMN de V4 e dos compostos 1-3 utilizados como referências para estigmasterol ($\delta = \text{ppm}$).....	118
Tabela 12:	Principais sinais observados no espectro de ^1H -RMN de V4 e dos compostos 1-3 utilizados como referências para β -sitosterol ($\delta_{\text{H}} = \text{ppm}$).....	118

Tabela 13:	Sinais observados no espectro de ^1H -RMN de V4 e do composto tido como referências para estigmasterol.....	119
Tabela 14:	Sinais observados no espectro de ^{13}C -RMN de V4 e dos compostos 1 e 2 utilizados como referências (δ_{C} = ppm): de campo mais baixo para campo mais alto.....	120
Tabela 15:	Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN atribuídos a estigmasterol e β -sitosterol de V4 e dos compostos 1-6 utilizados como referências.....	121
Tabela 16:	Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN – DEPT 135° de V5 e das referências (δ).....	130
Tabela 17:	Valores espectroscópicos de ^1H -RMN de V5 e das referências.....	131
Tabela 18:	Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e das frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol de <i>Vernonia tweedieana</i>	136
Tabela 19:	Distribuição dos compostos isolados de <i>V. Tweedieana</i> Baker no gênero <i>Vernonia</i>	150
Tabela 20:	Atividade antioxidante do ácido ascórbico e das frações testadas.....	153
Tabela 21:	Equações da reta e coeficientes de correlações verificados para as amostras no teste do DPPH.....	154

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt – acetato de etila
AgNO₃ – nitrato de prata
BRUTO – extrato bruto
CC – cromatografia em coluna
CCD – cromatografia em camada delgada
CCMP – cromatografia em coluna de média pressão
CDCl₃ – clorofórmio deuterado
CD₃OD – metanol deuterado
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CH₂Cl₂ – diclorometano
CL - cadeia lateral
CLAE – cromatografia líquida de alto desempenho
¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
CoA – coenzima A
d – dublete
dd – dublete de dublete
ddd – duplo dublete de dublete
DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO *d6* - dimetilsulfóxido
DPPH - 1,1-difenil, 2-picrilidrazila
EM – espectrometria de massas
EM-IE - espectrometria de massas por impacto eletrônico
EtOH – etanol
eV – elétron-Volts
GI – grau de insaturação
¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
IPP – isopentenil difosfato
IV – Infravermelho

J – constante de acoplamento

m – multiplete

m/z – massa sobre carga

n-BuOH – n-butanol

OECD/OCDE – Organisation for Economic Co-operation and Development

s – singlete

t – triplete

UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

u.m.a – unidade de massa atômica

UV – ultravioleta

δ - deslocamento químico

λ - comprimento de ondas

γ - gama

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *VERNONIA TWEEDIEANA* BAKER

AUTOR: Ricardo Basso Zanon
ORIENTADORA: Margareth Linde Athayde
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de abril de 2006.

O uso de plantas medicinais sempre teve uma importância vital no cotidiano da humanidade. No entanto, apenas uma pequena parte destas já foram estudadas e tiveram suas ações farmacológicas comprovadas cientificamente. Um exemplo de planta ainda desconhecida quimicamente é *Vernonia tweedieana* Baker (Asteraceae), vulgarmente conhecida como assa-peixe. É uma planta característica da região Sul do Brasil que é usada popularmente para o tratamento de doenças respiratórias, principalmente pelas suas propriedades expectorantes. Este trabalho descreve o isolamento e identificação de seis constituintes químicos presentes no extrato CH_2Cl_2 e de um no extrato AcOEt das folhas de *Vernonia Tweedieana* Baker. As folhas foram coletadas em março de 2004, no município de Ijuí-RS. A espécie foi localizada e identificada pelo Prof. Dr. Geraldo C. Coelho (DeBQ-UNIJUÍ). Material testemunha encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM sob o registro nº SMDB 9536. O material vegetal seco e moído (1.900 g) foi macerado utilizando como solvente etanol:água (65:35, v/v). Após sete dias o extrato foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida para remover o etanol. Fez-se fracionamento desse extrato bruto com solventes orgânicos de polaridades crescentes (CH_2Cl_2 , AcOEt, *n*-BuOH). Da fração CH_2Cl_2 caracterizou-se os triterpenos α e β -amirinas e lupeol, ainda os esteróides β -sitosterol, estigmasterol e espinasterol; e da fração AcOEt o flavonóide eriodictiol. Os compostos isolados foram analisados por CG-EM-IE, IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura. Ainda, na avaliação da toxicidade aguda foi verificado que nenhum dos extratos apresentou toxicidade em doses até 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Também, pelo método do DPPH, foi constatada atividade antioxidante para as frações AcOEt e *n*-BuOH da planta, apresentando IC_{50} de 22,52 e 17, 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Palavras-chaves: *Vernonia tweedieana* Baker, triterpenos, esteróides, α e β -amirina, lupeol, β -sitosterol, estigmasterol, espinasterol, eriodictiol.

ABSTRACT

SECONDARY METABOLIC OF *VERNONIA TWEEDIEANA* BAKER

Author: Ricardo Basso Zanon

Advisor: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

The species *Vernonia tweedieana* Baker is an herbaceous plant widely distributed in the plains of Paraguai, Argentina and south of Brazil and popularly known as “assa-peixe”. This plant is used in traditional medicine as an expectorant medicament. So far, this plant was not studied on the phytochemical and biological point of view. This work is a contribution to the phytochemical study of the Asteraceae. The leaves of *V. tweedieana* Baker were collected in march of 2004, in Ijuí – Rio Grande do Sul, Brazil, and identified by Dr. Geraldo C. Coelho (UNIJUI). The respective voucher specimen was deposited in the herbarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM)-RS (code SMDB 9536). The leaves (1.900 g) were dried in an air circulating stove at 40 °C, pulverized in mill and extracted by maceration with 65% EtOH at room temperature for seven days. The ethanolic extract was filtered and the ethanol was removed. Finally, the extract was retake in water and partitioned using organics solvents with increased polarity: CH₂Cl₂, AcOEt and *n*-BuOH. We report the isolation and identification of six constituents of the CH₂Cl₂ fraction: the triterpenes α -amyrin, β -amyrin and lupeol and the steroids β -sitosterol, stigmasterol and spinasterol. The flavanone eriodictyol was isolated from the AcOEt fraction. The constituents were identified through spectral data of the infra-red, GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and DEPT. No deaths and other signs of toxicity and adverse effect were observed in the evaluation of acute toxicity with doses up to 5.000 mg/kg, that is the maximum dose for acute oral toxicity test for extract of plants. Also, through DPPH method, AcOEt and *n*-BuOH fractions of the plant showed good antioxidant activity with IC₅₀ 22.52 and 17.44 μ g/mL, respectively.

Key works – *Vernonia tweedieana* Baker; triterpenes; steroids; α -amyrin; β -amyrin; lupeol; β -sitosterol; stigmasterol; spinasterol; eriodictyol; acute toxicity; antioxidant activity.

1-INTRODUÇÃO

O uso de plantas com finalidade terapêutica sempre teve importância vital no cotidiano da humanidade. Houve um extenso período em que os povos utilizaram e desenvolveram a fitoterapia visando encontrar alternativas que solucionassem os males instaurados nas sociedades.

O resultado dessa “evolução cultural” no uso de plantas medicinais tornou a sociedade atual habituada ao uso destas com finalidades terapêuticas. Nota-se uma busca pelo “naturalismo”, e como consequência, a retomada do interesse da população ao uso da medicina natural, seja ela de uma forma mais trabalhada (industrializada) ou mesmo bruta.

É comum entre os adeptos da fitoterapia o pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas e assim seriam remédios eficazes e seguros, naturalmente balanceados, sem os efeitos colaterais comuns aos produtos sintéticos.

No entanto, deve-se ter em mente que uma planta medicinal é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo. Como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até prova em contrário. Portanto, o uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Neste sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização, ou a autorização oficial de seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (Lapa et al., 1999).

A vasta gama de informações sobre o uso de plantas como ‘remédios’ em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Como a maior parte da flora é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico (Elisabetsky, 1999).

Dessa forma, a fitoquímica torna-se importante no descobrimento de novos princípios ativos, tendo em vista que alguns compostos originados de plantas não podem ou nunca foram quimicamente sintetizados (França, 1999). Um exemplo desses fármacos sintéticos são os hormônios e anticoncepcionais obtidos a partir de sapogeninas extraídas de matérias primas vegetais (Matos, 1998). Embora muitos compostos derivados de vegetais possam ser sintetizados em laboratório, tal síntese é freqüentemente tão complexa que os rendimentos são baixos e a produção economicamente inviável.

No entanto, a importância dos estudos fitoquímicos não fica somente no desenvolvimento de fármacos. Por parte do setor empresarial, a indústria farmacêutica movimenta importante volume de capital, na ordem de bilhões de dólares, e a busca de fármacos-protótipos envolve milhões de dólares de investimento em ciência e tecnologia. Ao se considerar valores econômicos, é necessário lembrar que o valor econômico representa todos os benefícios sociais de um certo produto (empregos, impostos, etc.) e não apenas o valor de mercado. Salienta-se, ainda, os óbvios benefícios ambientais pela preservação do ecossistema (Elisabetsky, 1999).

É neste contexto social que as plantas medicinais e os fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados (Lapa et al., 1999). Assim, a química de produtos naturais tem por objetivo o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, principalmente no campo da fitoquímica, através do seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (Matos, 1998).

Salienta-se que apesar dessa importância da fitoterapia na vida do homem e da grande variedade de plantas utilizadas, apenas 15 a 17% da flora mundial foi estudada cientificamente quanto ao potencial medicinal (Ferreira, 1998).

Geralmente, os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas estão relacionados a um grupo de metabólitos diferenciados, os quais são denominados metabólitos secundários. Estes possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacêutico.

Esta dissertação tem como objeto de estudo etnofarmacológico a espécie *Vernonia tweedieana* Baker, popularmente conhecida como “assa-peixe”, planta característica da região Sul do Brasil, Paraguai e Argentina.

O gênero *Vernonia*, no qual esta planta está inserida, abrange uma grande diversidade de espécies, possuindo representantes no mundo inteiro. As espécies compreendidas neste gênero são usadas na medicina popular de seus países, em grande parte, para fins terapêuticos em doenças respiratórias e distúrbios gastrintestinais.

Com base nos dados referidos, esta dissertação faz um levantamento bibliográfico a respeito de constituintes químicos já detectados ou isolados em espécies do gênero *Vernonia*. Ainda, descreve os testes de toxicidade aguda e avaliação da atividade antioxidante (DPPH) de frações extrativas da planta, assim como os processos realizados para a obtenção e caracterização dos compostos isolados da planta *Vernonia tweedieana* Baker.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal desta monografia consiste em estudar fitoquimicamente a espécie *Vernonia tweedieana* Baker.

2.2. Objetivos específicos

- à Isolar metabólitos secundários presentes em folhas do vegetal;
- à Identificar quimicamente o(s) composto(s) isolado(s) através do uso de técnicas espectroscópicas;
- à Realizar ensaios biológicos com o extrato e com frações desta planta.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Descrição da Planta

3.1.1. Descrição da Família Asteraceae (Compositae)

A família Asteraceae (Compositae) compreende muitos gêneros de plantas, e por conseguinte, inúmeras espécies vegetais. Devido à sua grande abrangência, esta é a maior família das angiospermas; são 920 gêneros com aproximadamente 19.000 espécies (Joly, 1998).

A maior parte das espécies desta família é composta por plantas de pequeno porte, ou seja, ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente, árvores (Joly, 1998).

De acordo com Joly (1998), as espécies vegetais que compreendem a família Asteraceae apresentam folhas muito variadas, inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta. Flores sempre reunidas em inflorescência característica, o capítulo. As flores são de simetria radial ou zigomorfas até bilabiadas, hermafroditas ou de sexo separado, pentâmeras, com cálice profundamente modificado. O papilo pode ser piloso ou às vezes espinhoso. Corola pentâmera com 5 lobos iguais. Androceu formado por cinco estames férteis com filetes livres e anteras introrsas, soldadas em um tubo que é atravessado pelo estilete.

3.1.2. Descrição do Gênero *Vernonia*

Este gênero de plantas recebeu esta denominação em homenagem a Will Vernon, pesquisador botânico que viajou na América do Norte (Cabrera & Klein, 1980).

De acordo com estes autores, as características morfológicas comuns entre as plantas pertencentes ao gênero *Vernonia* são: involúcro cilíndrico, campanulado ou hemisférico, com brácteas imbricadas em poucas ou muitas séries, as exteriores gradualmente mais curtas. Receptáculo plano ou

semiconvexo. Flores isomorfas, hermafroditas, de quatro a muitas. Corola actinomorfa, tubulosa, com limbo profundamente pentapartido. Anteras auriculadas ou curtamente sagitadas na base. Estilete com ramos lineares, agudos, densamente pilosos debaixo do ponto de bifurcação; pelos coletores agudos, unicelulares.

No gênero *Vernonia*, os capítulos podem conter só flores tubulosas iguais e hermafroditas (Joly, 1998).

As espécies do gênero *Vernonia* são ervas perenes, arbustos até árvores altas, com folhas geralmente alternas e capítulos dispostos em cincínios, panículas definidas de cima ou solitárias, ora nas axilas das folhas, ora terminais. Flores brancas, rosadas, violáceas ou purpúreas (Cabrera & Klein, 1980). As espécies do gênero *Vernonia* são bastante notáveis em campos cerrados (Joly, 1998).

3.1.3. Descrição da Espécie *Vernonia tweediana* Baker

A *Vernonia tweediana* Baker (Figura 1), recebeu este nome como uma homenagem ao botânico e explorador James Tweedie (1775 – 1862). Popularmente, é conhecida como assa-peixe, língua-de-vaca, chamarrita, erva-de-mula, orelha-de-mula, mata-pasto, laguneira (Cabrera & Klein, 1980).

É uma planta comum na região sul do Brasil, Paraguai e nas províncias de Misiones, Formosa e Corrientes, na Argentina (Cabrera & Klein, 1980).

Dados fenológicos, extraídos de Cabrera & Klein, (1980), indicam que a *Vernonia tweediana* floresce no verão, durante os meses de Fevereiro, Março e Abril, sendo Março a época predominante.

Cabrera & Klein (1980), descrevem *Vernonia tweediana* como sendo um arbusto com cerca de 2 metros de altura, ramoso, com ramos mais ou menos densamente griseo-pubescentes. Folhas alternas, curtamente pecioladas, lanceoladas, agudas no ápice e atenuadas na base, serradas nos bordos, glabras na face ventral e com pubescência grisácea densa na face dorsal, medem de 7 – 12 cm de comprimento por 1,5 – 2,5 cm de largura, as inferiores maiores.

Ela representa umas das principais plantas invasoras e daninhas das pastagens artificiais, implantadas ao longo de toda a costa atlântica (Cabrera & Klein, 1980).

Ainda, de acordo estes autores, *Vernonia tweedieana* possui capítulos muito numerosos, longamente pedicelados, dispostos em números de 2-3, formando cincínios curtos que se agrupam em uma densa panícula definida corimbiforme. Invólucro campanulado, de 5-6 mm de altura por 5 mm de diâmetro; filárias dispostas em 4-5 séries, as exteriores lineares, as internas lanceoladas, agudas, glabras. Flores brancas ou roxas.



Figura 1: *Vernonia tweedieana* Baker – aspecto geral da planta.

3.2. Metabólitos secundários

3.2.1. Definição

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações que continuamente estão ocorrendo em cada célula. Portanto, os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados são chamados metabólitos.

Segundo Santos (1999) todos os seres vivos derivam de um precursor comum. Isso explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), que vem a ser os constituintes químicos celulares, são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal, quer num animal. Por serem considerados processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário. Ou seja, o metabolismo primário compreende as várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes em unidades constitutivas essenciais da célula.

Vegetais, microorganismos e, em menor escala animais, entretanto, apresentam um metabolismo diferenciado (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. A todo este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, em seu ecossistema (Santos,1999).

3.2.2. Função e Importância

Durante muito tempo os metabólitos secundários foram considerados produtos de excreção dos vegetais. No entanto, atualmente já se sabe que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação

do produtor ao meio. Diversas funções são atribuídas à esta classe de metabólitos como: defesa contra herbívoros; proteção contra raios UV; atração de polinizadores e de animais dispersores de semente, entre outras (Santos, 1999).

É característica dos vegetais a elevada capacidade biossintética desses metabólitos secundários, tanto em relação ao número como a diversidade em uma mesma espécie. Este fato é explicado por Harborne (1988, apud Santos, 1999) segundo a lógica de que como os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar, eles não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais.

Assim, por serem fatores de interação entre organismos, os metabólitos secundários, freqüentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica, da perfumaria, entre outras. Pelo elevado número e grande diversidade destes metabólitos vegetais eles têm despertado interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que vêem neles uma promissora fonte de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (Santos, 1999).

3.2.3. Metabolismo Vegetal Secundário

Como pode ser visualizada na Figura 2, a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

O mevalonato é formado da condensação de uma unidade de acetoacetil-Coa com uma molécula de acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzido a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato, ou *isopreno ativo*, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato origina moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu isômero dimetilalil-pirofosfato formam o *trans*-geranil-pirofosfato, a partir do qual formam-se os demais terpenos. Novas ligações cabeça-cauda entre *trans*-geranil-pirofosfato e isopentenil-

pirofosfato resultarão em sesqui (C15) e diterpenos (C20). Já a ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (C15) origina o esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides (Santos, 1999). A rota biossintética de esteróides e triterpenos é apresentada na Figura 3.

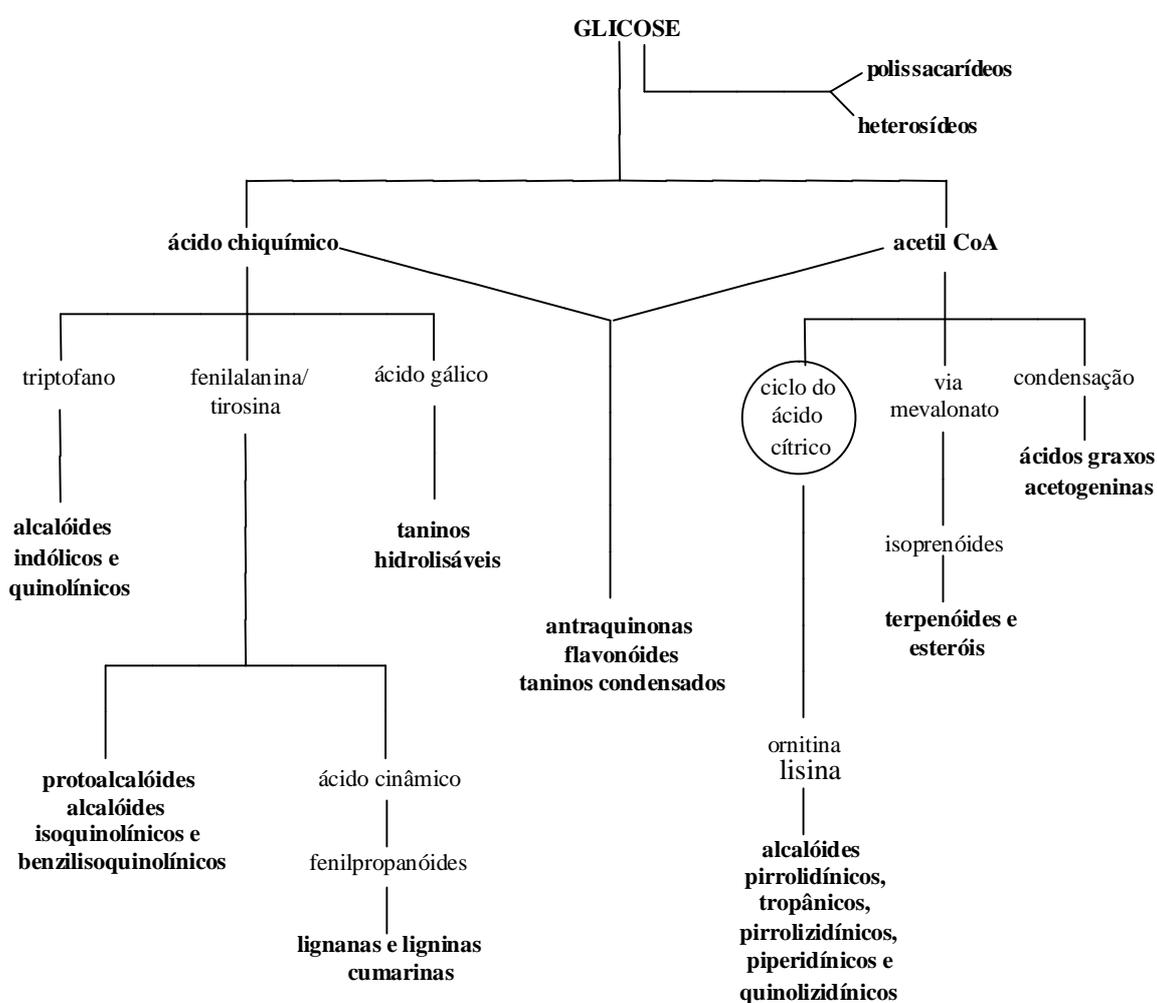
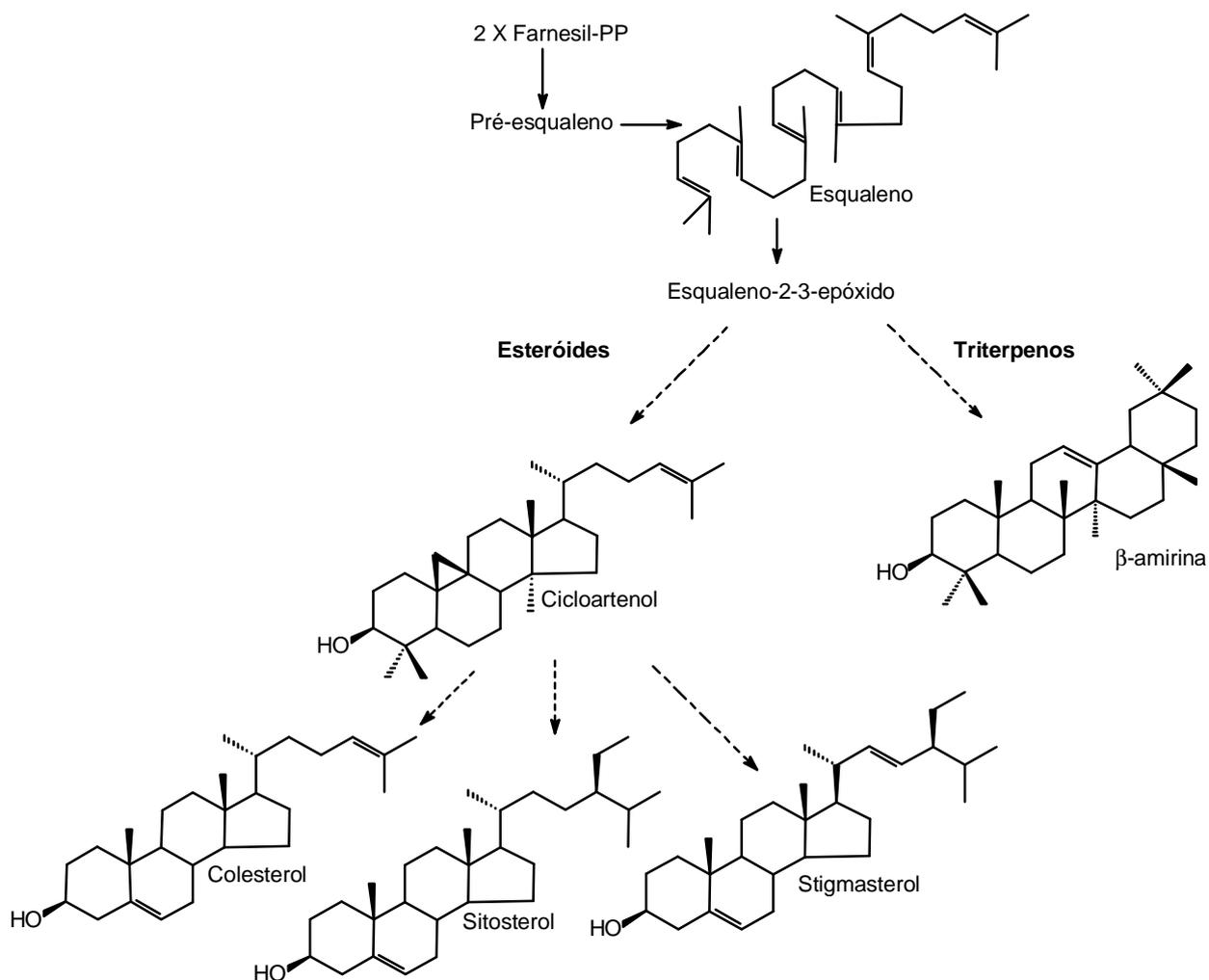


Figura 2: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (adaptado de Santos, 1999).



**Figura 3: Rota biossintética de esteróides e triterpenos.
 (Adaptado de Wagner, 1993)**

3.3. Aspectos Farmacológicos do Gênero *Vernonia*

Pesquisas realizadas em espécies do gênero *Vernonia* revelaram algumas atividades farmacológicas dessas plantas. Com base nesses estudos pode-se ter uma projeção de atividades e possíveis princípios ativos que poderão ser evidenciados na planta estudada nesta dissertação.

Espécies do gênero *Vernonia* têm sido estudadas quanto ao seu potencial anti-helmíntico, antiparasitário, antimicrobiano, anti-ulcerogênico, analgésico, antipirético e antiinflamatório entre outras atividades.

Extratos aquosos de *Vernonia amygdalina* foram testados contra ovos de *Haemonchus contortus*. Para simular o seu uso tradicional na África, a extração foi feita sob infusão aquosa das folhas em autoclave a 122,6 °C. A relação entre material vegetal seco e solvente utilizada foi de 11,2 mg/mL. Várias concentrações do extrato foram testadas contra a eclosão dos ovos, mas nenhuma se apresentou eficaz na inibição da eclosão. Esta planta já havia mostrado apreciável atividade contra *Trypanosoma brucei* e *Leishmania donovani* (Alawa et al., 2003). Ainda, Tona e colaboradores (2004) verificaram atividade *in vitro* antiplasmódica (*Plasmodium falciparum*) principalmente para os extratos etéreos e isoamílicos ($IC_{50} = 2,5 \pm 0,7$ e $2,7 \pm 0,6$ µg/mL, respectivamente). Referente a esta mesma espécie, Akinpelu e colaboradores, (1999) demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico. Esta atividade foi testada através do método de difusão em ágar e revelou que as bactérias *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteria* e *Staphylococcus aureus* foram sensíveis ao extrato das folhas desta espécie vegetal em uma concentração de 25 mg/mL. Já as bactérias *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* e a levedura *Candida albicans* foram resistentes à ação do extrato testado. Camundongos tratados via oral com extrato metanólico da planta apresentaram significativa promoção da motilidade intestinal e do esvaziamento gástrico, sugerindo um efeito purgante (Awe et al., 1999; Awe et al., 1998). Os mesmos autores demonstraram que a administração de 100 e 200 mg/kg do extrato metanólico de *V. amygdalina* protegeu em 40 e 50% contra trombose provocada e isto pode estar relacionado à habilidade de inibir a agregação plaquetária, como já foi demonstrado para algumas lactonas sesquiterpênicas da planta. O extrato metanólico quando administrado à ratas prenhas demonstrou efeito abortivo (Ojukwu, 1982; apud Awe et al, 1999).

Extrato das folhas de *Vernonia brachycalyx* Hoffm. apresentaram, *in vitro*, atividade contra *Plasmodium falciparum* e formas promastigotas de *Leishmania major* (Oketch-Rabah et al., 1998).

Ross e colaboradores (1998), evidenciaram que na espécie *Vernonia fastigata*, a fração acetato de etila obtida após a extração com éter de petróleo apresentou forte atividade antibacteriana.

Kelmanson e colaboradores (2000) constataram a atividade dos extratos metanólico e acetato de etila das folhas, caule e raízes de *V. colorata* na concentração de 1,0 mg/mL contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Pesquisas mostraram que as alterações físicas, histopatológicas e bioquímicas em animais com artrite foram reduzidas com administração oral do extrato hidroetanólico (80%) de flores de *Vernonia cinerea* Less, evidenciando-se assim, sua atividade antiinflamatória (Latha et al., 1998). Nesta espécie, experiências com ratos tratados com extratos da planta revelaram que o extrato clorofórmico induziu diurese, enquanto que os extratos metanólicos e aquosos apresentaram atividade contrária (anti-diurética) sugerindo que estes extratos possam ser utilizados como um tratamento alternativo de incontinência urinária (Adeboye et al., 1997). *Vernonia cinera* Less foi estudada por outro grupo de pesquisadores. Das folhas frescas coletadas na Nigéria foi realizada extração por Soxhlet com solventes de polaridade crescente (éter de petróleo, clorofórmio e metanol). Estes extratos foram administrados em ratos para testes de analgesia, efeito antipirético e antiinflamatório. Todos os extratos apresentaram ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética. Como resultado, os autores relatam como promissor o uso desta planta para o tratamento da Malária, que requer antiinflamatórios, antipiréticos e analgésicos (Iwalewa et al., 2003).

Gupta e colaboradores (2003) em testes de atividade antimicrobiana de vários extratos de *V. cinerea* Less contra os microorganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi* e *Shingella dysenteriae*, verificaram que o extrato benzênico apresentou atividade em todas as concentrações testadas (a partir de 50 µg/mL), mas os demais extratos testados não tiveram a mesma potência (éter de petróleo, clorofórmico e metanólico). Para esta mesma planta, estudos revelaram a presença de inibidores efetivos do início da

oxidação da atividade polimorfonuclear dos leucócitos, sendo que este efeito pode estar relacionado com a atividade antiinflamatória relatada para a espécie pela medicina tradicional (Abeysekera et al., 1999). Ainda, a planta apresenta outras propriedades medicinais e é usada como tônico, anti-helmíntico, diurético e para o tratamento de asma e bronquite (Misra et al., 1993).

A atividade anti-helmíntica da espécie *Vernonia anthelmintica* (L.) foi testada contra *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformes*. O teste foi realizado induzindo contaminação em carneiros, que após 30 dias receberam doses diárias do extrato da planta. A contagem dos ovos dos parasitas nas fezes foi realizada por um período de 20 dias. Apesar de haverem relatos anteriores a respeito da atividade anti-helmíntica desta *Vernonia*, o extrato hidroetanólico não apresentou atividade contra os vermes testados (Hördegen et al., 2003). Rabe e colaboradores (2002) identificaram lactonas sesquiterpênicas e verificaram que elas foram muito ativas contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e contra as Gram-positivas *S. aureus* e *Bacillus subtilis*.

Em testes realizados em camundongos albinos infectados com *Trypanosoma cruzi*, as espécies *Vernonia crotonoides* (DC) Sch. Bip. e *Vernonia pedunculata* DC exterminaram 100% das formas tripomastigotas de *T. cruzi* do tipo Y na concentração de 12,0 mg/mL. Porém, na concentração de 6,0 mg/mL apenas *Vernonia pedunculata* foi ativa contra este tipo de *T. cruzi*. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* do tipo CL também foram testadas. Na concentração de 23,0 mg/mL, ambas espécies foram efetivas, porém na concentração de 4,5 mg/mL, novamente apenas *Vernonia pedunculata* apresentou efeito. As espécies *V. condensata* Baker, *V. linearis* Spreng., *V. polyanthes* (Spreng.) Less., *V. varroniaefoliade* DC, *V. ferrugineae* Less. e *V. herbaceae* (Vell.) Rusby não apresentaram atividade tripanomicida (Chiari et al., 1996).

Estudos na espécie *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. revelaram que do extrato aquoso das raízes, a fração butanólica apresentou atividade gastroprotetora em doses a partir de 0,5 g/kg, inibindo o desenvolvimento de úlceras induzidas experimentalmente, tendo sido este efeito relacionado às saponinas presentes no extrato. Ainda, foi constatado que o extrato aquoso não apresentou efeitos significantes sobre o comportamento de ratos em doses até 4 g/kg, subentendendo-se que seja

inativo sobre o Sistema Nervoso Central. O mesmo extrato não apresentou toxicidade no teste de *Artemia salina* ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$) (Sanogo et al., 1996). Toure (1989) apud Nergard e colaboradores (2004) verificaram que de 16 pacientes portadores de úlceras gástricas, 50% tiveram os sintomas reduzidos e seis ficaram curados após trinta dias de ingestão de 6g de pó de raízes de *V. kotschyana*.

Em estudos realizados com extratos da planta *Vernonia condensata* Baker foram verificados os efeitos analgésico, anti-ulcerogênico e sedativo. Os testes foram conduzidos com o extrato aquoso bruto, uma fração polar e outra menos polar desse extrato (fração clorofórmica). O extrato bruto aquoso apresentou significativa redução do número de contrações abdominais induzidas por ácido acético, sendo esta relação dose-dependente, constatando-se assim efeito analgésico. Além disso, esse extrato e a fração menos polar apresentaram efeito sedativo. No entanto, a fração menos polar não apresentou efeito analgésico. Já a fração polar apresentou efeito analgésico e ainda significativa redução do número de úlceras, mas não alterou o tempo de dormência (Frutuoso et al., 1994).

A espécie *Vernonia brasiliiana* apresentou atividade inseticida inibindo *Triatoma infestans* e atividade mutagênica em seus extratos de raízes, folhas e flores (Arias et al., 1995). O extrato hexânico da mesma planta apresentou atividade antimalárica. Dos compostos isolados, somente o lupeol apresentou atividade *in vitro*, reduzindo a parasitemia em 45% na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, no teste *in vivo* realizado em ratos, esta substância não foi ativa, enquanto que o extrato hexânico bruto baixou em 45% a parasitemia na concentração de 1.000 mg/kg (Alves et al., 1997).

Leite e colaboradores (2002) testaram a atividade cicatrizante de *Vernonia scorpioides*. O extrato obtido por maceração alcoólica das folhas frescas (15% p/v) foi reduzido a 50% do volume inicial. Cinquenta gramas desse extrato foram solubilizados em 50g de hidrogel de carbopol a 2%. Dois grupos de seis animais (três machos e três fêmeas) foram utilizados. O grupo controle foi tratado com 50g do gel puro adicionado de 30g de etanol. O tempo de cicatrização foi comparado entre os grupos e o resultado não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Estudos anteriores identificaram e isolaram lactonas sesquiterpênicas nesta planta.

3.4. Gênero *Vernonia*: Uso popular

As plantas do gênero *Vernonia* são utilizadas em varias partes do mundo para o tratamento de inúmeras enfermidades. Grande parte das informações é proveniente do continente africano.

Na região do Quênia, a infusão das folhas da espécie *Vernonia brachycalyx* é usada para tratamento de malária (Oketch-Rabha et al., 1998) e a decocção das folhas da espécie *Vernonia galamensis* é utilizada na medicina tradicional com finalidade gastroprotetora (Miserez et al., 1996). Ainda, outra espécie usada na medicina popular daquela região é a *Vernonia galamensis* ssp *nairobiensis*, cuja decocção das folhas é usada na medicina tradicional contra dores de estômago (Miserez et al., 1996).

Em Camarões, a planta *Vernonia guinensis* é utilizada como anti-helmíntica, afrodisíaca, como antídoto para venenos e no tratamento da Malária e icterícia (Tchinda et al., 2002). A decocção das folhas de *V. colorata* é usada para diversas aplicações na medicina tradicional africana, especialmente para o tratamento de febre, tosse, diarreia e como tônico geral (Rabe et al., 2002).

A planta *Vernonia kotschyana* Sch. Bip é uma erva usada na medicina popular africana como remédio contra insuficiência digestiva, cólica, dermatose, tuberculose e dor de cabeça. Esta planta também faz parte da lista nacional de drogas essenciais de Mali onde é utilizada para o tratamento de malária, asma, dor de cabeça, deficiência sexual em homens, enjôo na gravidez, esquistossomose, anti-hipertensivo e como digestivo (Nergard et al., 2004). Ainda, as raízes trituradas são usadas para o tratamento de gastrite e úlceras gastroduodenais (Sanogo et al., 1998).

Na medicina tradicional da Nigéria a espécie *Vernonia cinerea* Less é utilizada no tratamento da Malária, em infecções, inflamações, dores, como diurético, anticarcinogênico, abortivo, contra desordens gastrointestinais, dentre outras atividades (Iwalewa et al., 2003). Ainda, apresenta propriedades medicinais e é usada como tônico, digestivo, antipirético, adstringente, diurético, e mostrou-se útil nos tratamentos de tuberculose, asma, tosse, bronquite, conjuntivite, reumatismo e doenças do fígado (Misra et al., 1993; Latha et al., 1998; Abeysekera et al., 1999; Gupta et al., 2003).

A espécie *Vernonia amygdalina* faz parte da farmacopéia natural da Nigéria, onde é usada como anti-helmíntica em humanos e em animais de criação (Alawa et al., 2003). Neste mesmo país esta espécie de *Vernonia* é utilizada tradicionalmente para distúrbios estomacais e gastrintestinais. A decocção das folhas é usada no tratamento da Malária (Akinpelu et al., 1999), como abortivo (Awe et al., 1999) e na redução da pressão sangüínea (Awe et al., 1998). Segundo Igilie e colaboradores (1995) extratos aquosos ou alcoólicos são muito usados na terapêutica, incluindo aplicações antimaláricas, anti-helmínticas, anti-anoréxicas e ginecológicas.

Na medicina tradicional do Paquistão, Filipinas e Índia a espécie *Vernonia anthelmíntica* (L.) é utilizada como anti-helmíntica (Hordeger et al., 2003). Ainda, na China é usada para o tratamento de vitiligo e mostrou ser uma alternativa para o tratamento do câncer de mama (Wu, 1991 apud Tian et al., 2004).

No Brasil, o macerado de folhas *Vernonia condensata* Baker é usado na medicina tradicional como analgésico, anti-ulcerogênico, além de prevenir distúrbios no estômago e no fígado (Frutuoso et al., 1994); o chá das raízes dessa *Vernonia* é utilizado como expectorante e é a terceira planta medicinal mais utilizada em Goiânia-GO (Rizzo et al., 1990). A espécie *Vernonia polyanthes* Less é usada devido às suas propriedades “expectorantes, béquicas e hemostáticas” (Wendling et al., 1996), além de diurética (Gavilanes et al., 1990). A espécie *Vernonia ferruginea* Less é utilizada como diurética e depurativa, a *Vernonia scabra* Pers como antisséptica, aromática e tônica, e ainda *Vernonia scorpioides* (Lam) como anti-séptica (Gavilanes et al., 1990).

3.5. Metabólitos Secundários no Gênero *Vernonia*

Os principais constituintes químicos presentes no gênero *Vernônia* são triterpenos, esteróides, e lignanas, mas os mais freqüentes são lactonas sesquiterpênicas e flavonóides, tanto que estes compostos são usados como marcadores taxonômicos para o gênero *Vernonia* (Carvalho et al., 1999).

A análise fitoquímica do extrato metanólico 60% das folhas da planta *Vernonia amygdalina* revelou taninos e flavonóides. Desta planta já foram isolados saponinas, flavonóides e alcalóides (Akinpelu et al., 1999). O extrato metanólico de folhas secas de *Vernonia amygdalina* foi submetido a testes verificando-se a presença de saponinas,

glicosídeos, taninos e flavonóides. Estes componentes são conhecidos por apresentarem atividade purgativa, adstringente e emulsificante de superfícies (Awe et al., 1999).

Wagner e colaboradores (1972), identificaram os flavonóides 3-O-metil-quercetina; quercetina; luteolina e campferol em *Vernonia patens*.

Na planta *Vernonia galamensis* ssp. *nairobiensis* já foram detectadas lactonas sesquiterpênicas, ácidos graxos e esteróides. Do extrato metanólico desta planta foram isolados os flavonóides quercetina 3-galactosídeo; quercetina 3-apiosil(1 à 2)galactosídeo; quercetina 3-ramnosil(1 à 6)galactosídeo e isorhamnetina 3-O-β-D-apio-D-furanosil(1 à 2)-β-D-galactopiranosídeo (Figura 4) (Miserez et al., 1996).

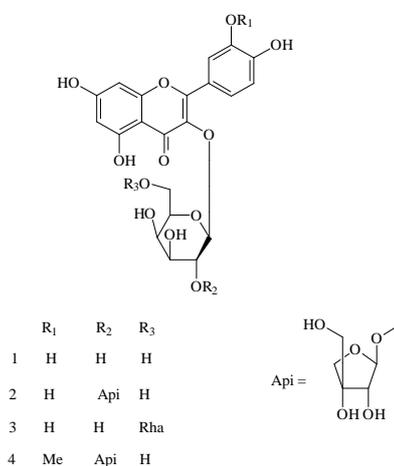
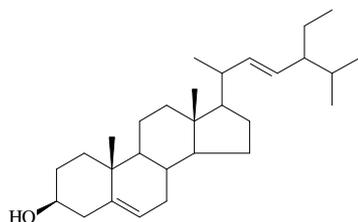
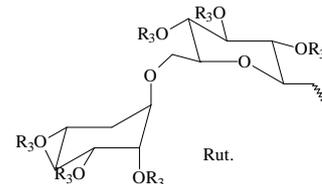
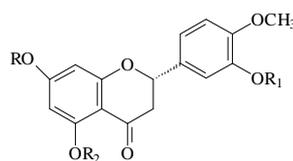


Figura 4: Flavonóides identificados em *Vernonia galamensis* ssp. *Nairobiensis*.

No trabalho realizado por Carvalho e colaboradores (1999), do extrato diclorometânico foi identificada a mistura de sitosterol (1) e estigmasterol (2). Do extrato metanólico da madeira de *Vernonia diffusa* foram isoladas as flavanonas hesperidina (3), 3'-metil-hesperetina (homoesperetina) (4); esperitina (5) foi identificada como a aglicona obtida da hidrólise do novo glicosídeo natural 7-rutinosil-homoesperetina (6) (Figura 5). Segundo este autor, já havia sido identificada outra flavanona no gênero *Vernonia*, o eriodictiol (*Vernonia hindei* e *V. syringifolia*).

(1) 22,23-Diidro ; (2) $\Delta^{22,23}$ 

(3) R=Rut, R1=R2=R3=H (hesperidina)

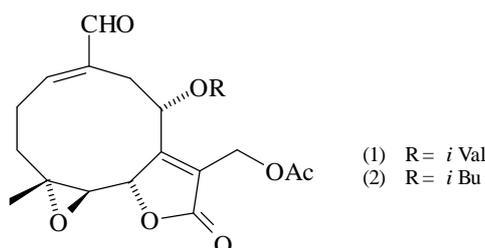
(4) R=R2=H, R1=Me (homoesperitina)

(5) R=R1=R2=H (hesperitina)

(6) R=Rut., R2=R3=H, R1=Me

Figura 5: Compostos isolados de *Vernonia diffusa*.

Conforme Zdero e colaboradores (1990), várias espécies de *Vernonia* contêm glaucólídeos, como *V. galamensis*, *V. praemorsa*, *V. sutherlandi* e *V. fastigata*. Exemplos são os compostos glaucogalamenólídeo isovalerato (1) e glaucogalamenólídeo isobutirato (2), isolados de *V. galamensis* (Figura 6).

(1) R = *i* Val(2) R = *i* Bu**Figura 6: Glaucólídeos isolados de *V. galamensis*.**

Extratos de folhas de *Vernonia cinerea* Less coletadas na Nigéria foram analisados por Iwalewa e colaboradores (2003), utilizando extração em Soxhlet com três solventes de polaridade crescente: éter de petróleo, clorofórmio e metanol. A análise fitoquímica dos constituintes das frações revelou a presença de esteróides, alcalóides e saponinas no extratos etéreo e clorofórmico, e flavonóides e terpenos no metanólico. Sabe-se que os flavonóides e terpenos são os constituintes majoritários desta planta. Ainda, Latha e colaboradores (1998) detectaram carboidratos, proteínas, e principalmente compostos fenólicos como os flavonóides luteolina, luteolina 7-O-

glucosídeo, luteolina 4'-O-glucosídeo, derivados dos ácidos clorogênicos e caféicos e taninos. Wagner e colaboradores (1972), identificaram o flavonóide luteolina 7-mono- β -D-glucopiranosídeo.

Dessa mesma espécie foram isolados triterpenóides, esteróides, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides por Abeysekera e colaboradores (1999). Das raízes foi isolado um triterpeno com forma molecular $C_{32}H_{52}O_2$, caracterizado como 3 β -acetoxiursan-19-eno, além do acetato de lupeol (1) (Misra et al., 1993). Ainda, os triterpenos lupeol (2), β -amirina (3) (Figura 7) e germanicol (Alves et al., 1997) e os esteróides estigmastan-5,17(20)-dieno-3- β -ol, estigmasterol e β -sitosterol (Misra et al., 1984). Da mesma planta também foram detectados no extrato de flores alcalóides, flavonóides, saponinas, carboidratos, proteínas, esteróides, taninos e compostos fenólicos (Latha et al., 1998).

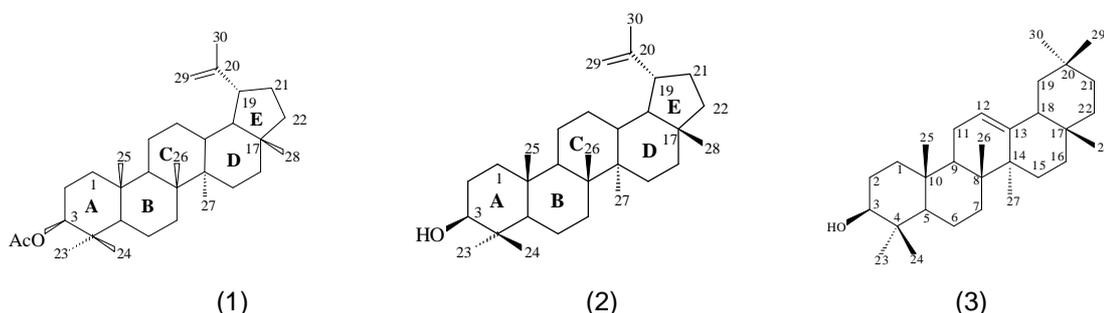


Figura 7: Triterpenos isolados da espécie *Vernonia cinerea* Less.

Ainda na espécie *V. cinerea*, Jakupovic e colaboradores (1986), identificaram os compostos 1-8 que são mostrados na figura 8.

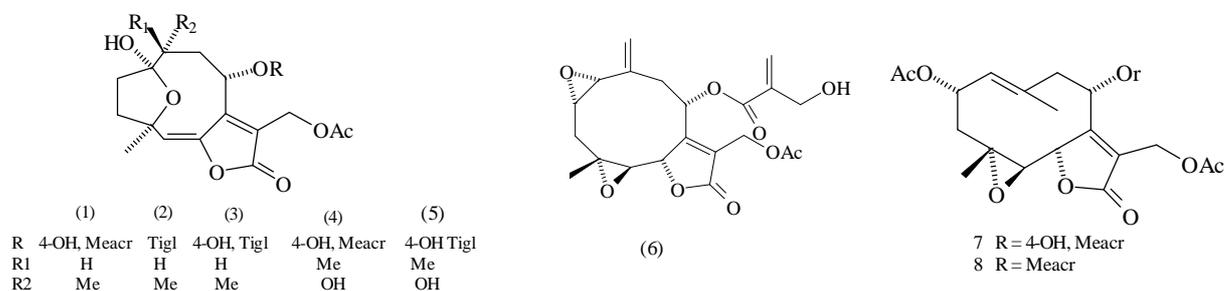


Figura 8: Compostos lactônicos isolados de *V. cinerea*.

A análise fitoquímica do extrato metanólico das folhas da planta *Vernonia amygdalina* indicou a presença de saponinas, flavonóides, alcalóides, glicosídeos e taninos (Awe et al., 1999; Akinpelu et al., 1999). As saponinas apresentaram ações hipocolesterolemiantes, diuréticas, laxativas e redutoras de peso em cobaias tratadas com o extrato da planta. Este extrato após análises espectroscópicas revelou a presença de duas saponinas esteroidais cíclicas com núcleo estigmastano (a aglicona possui vinte e nove carbonos). Estas saponinas tiveram suas estruturas elucidadas, conforme mostra a Figura 9 (Igilie et al., 1995).

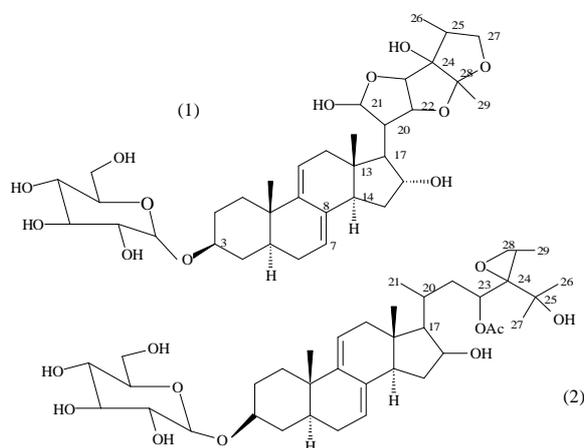


Figura 9: Saponinas isoladas de *Vernonia amygdalina* Del. (1) - Vernoniosídeo D; (2) - Vernoniosídeo E.

Ainda com relação a *Vernonia amygdalina*, sabe-se que ela é utilizada por chimpanzés africanos. O estudo fitoquímico realizado por Jisaka e colaboradores (1993), revelou a presença de constituintes bioativos, principalmente esteróides de sabor amargo. Do extrato metanólico das folhas foram isolados os vernoniosídeos mostrados na Figura 10.

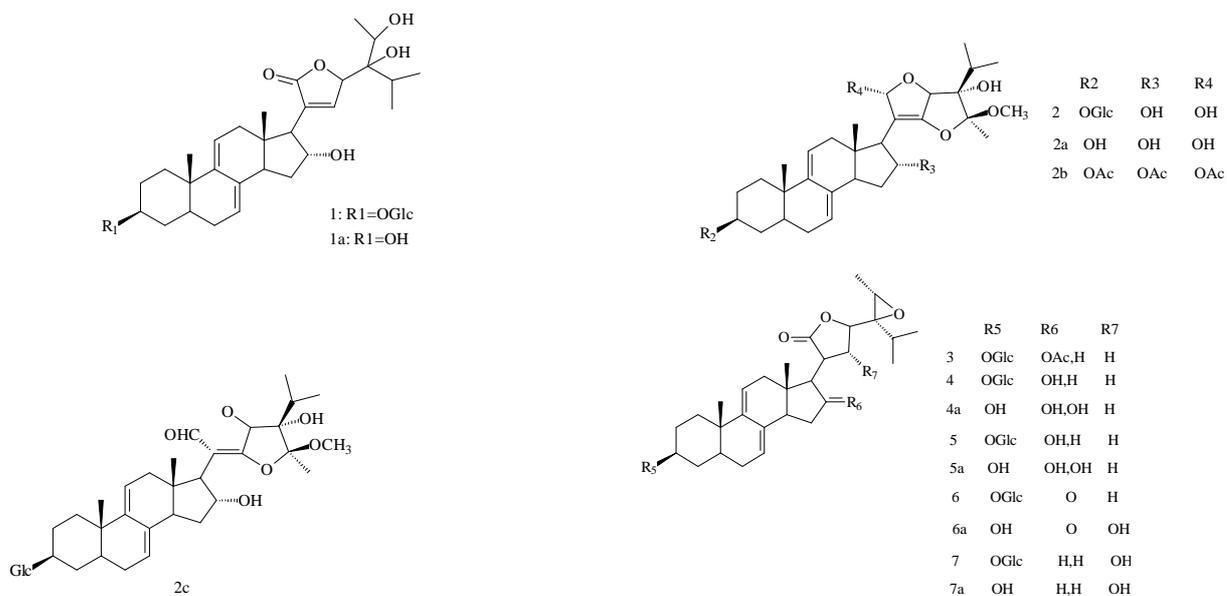


Figura 10: Esteróides isolados de *Vernonia amygdalina*.

Para esta mesma espécie Ganjian e colaboradores (1983) identificaram três lactonas sesquiterpênicas como sendo Vernodalina (1), Vernodalol (2) e 11,3-diidro-vernodalina (3) mostrados na Figura 11; sendo que o composto 3 apresentou atividade inibitória/repelente de insetos e, junto com (1), *in vitro*, citotoxicidade.

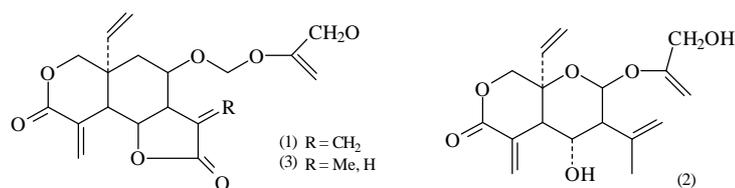


Figura 11: Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Vernonia amygdalina*.

Do extrato das folhas de *Vernonia brasiliiana* foram isoladas três substâncias triterpênicas pentacíclicas: lupeol, β -amirina e germanicol (Alves et al., 1997).

O extrato butanólico de *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. revelou a presença de vernoniosídeos esteroidais contendo núcleo esteroidal damarano e saponinas esteroidais, sendo atribuídos a estas o efeito gastroprotetor da planta (Figura 12) (Sanogo et al., 1996; Sanogo et al., 1998).

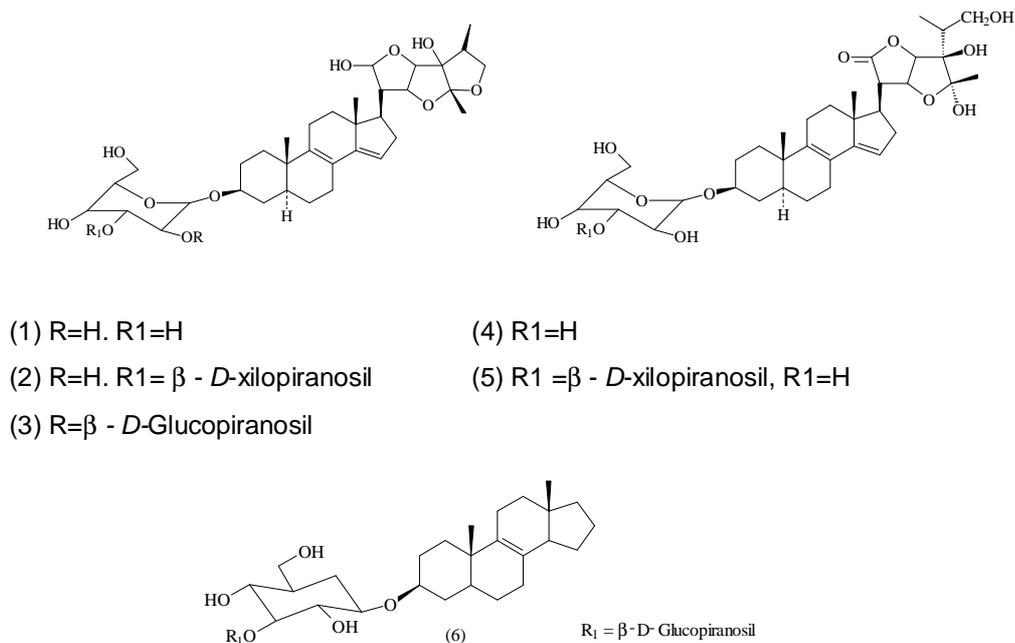


Figura 12: Estrutura de vernoniosídeos esteroidais presentes no extrato de *Vernonia kotschyana*.

Da casca da planta *Vernonia guinensis* foram isolados compostos com núcleo esteroidal estigmastano 1-4 e 5 e 6 (Tchinda et al., 2002; Tchinda et al., 2003). As estruturas identificadas são mostradas a seguir na Figura 13.

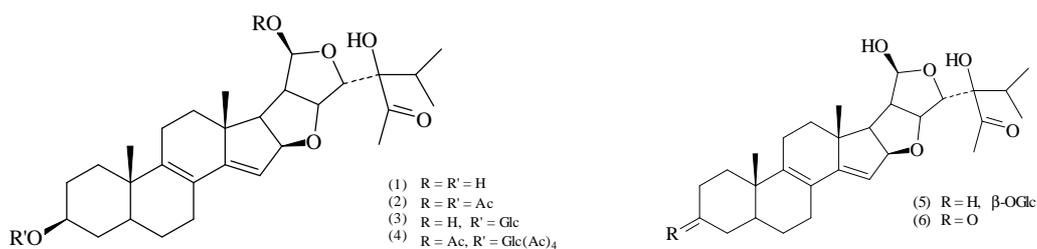


Figura 13: Esteróides isolados de *Vernonia guinensis*.

Nas partes aéreas de *Vernonia fruticulosa* foram identificados três compostos. O glicosídeo (1) foi isolado do extrato hexano-acetato de etila. Do extrato etanólico foram isolados três cadinolídeos (2a - c), além dos flavonóides isorhamnetina, acacetina e tamarixetina. Os cadinolídeos 2a e 2b já haviam sido relatados para *Vernonia jalcana*. Estas estruturas são mostradas na Figura 14 (Bazon et al., 1997).

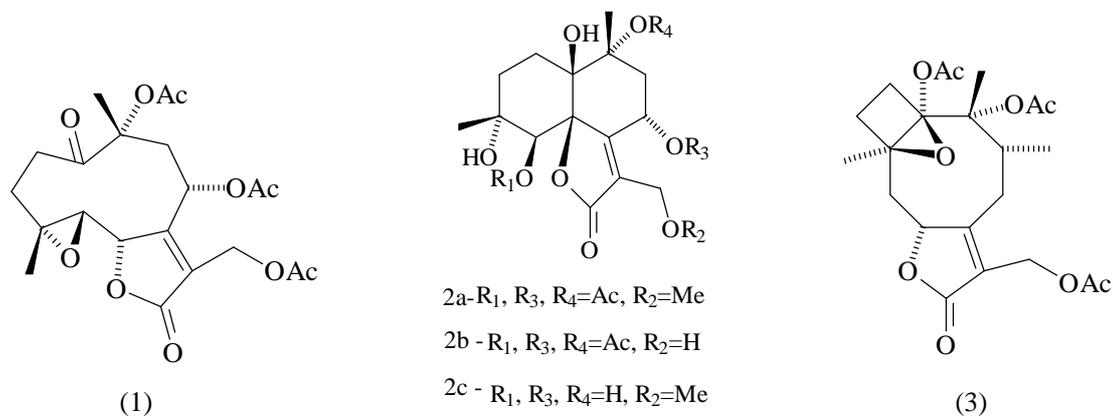


Figura 14: Compostos isolados de *Vernonia fruticulosa*.

Tsichritzis e colaboradores (1991) identificaram no extrato das partes aéreas da planta *Vernonia juralis* três novas lactonas sesquiterpênicas (1-3) e um derivado (4), além dos compostos 5, 6 e 7 (Figura 15). As estruturas de 1-3 foram muito similares às de lactonas sesquiterpênicas já isoladas de *Vernonia poskeana*.

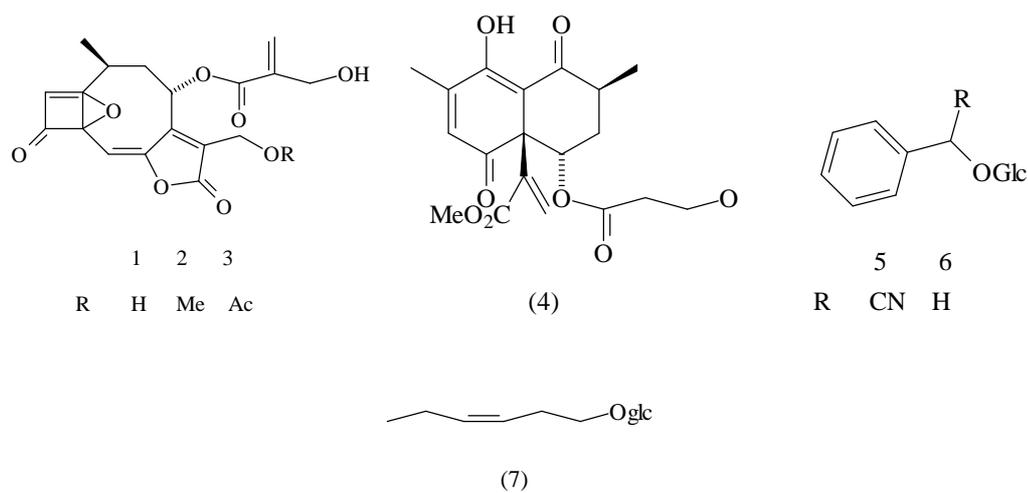


Figura 15: Compostos isolados de *Vernonia juralis*.

Para esta mesma espécie (*V. poskeana*) Jakupovic e colaboradores (1986), identificaram os compostos 1-7 mostrados na Figura 16.

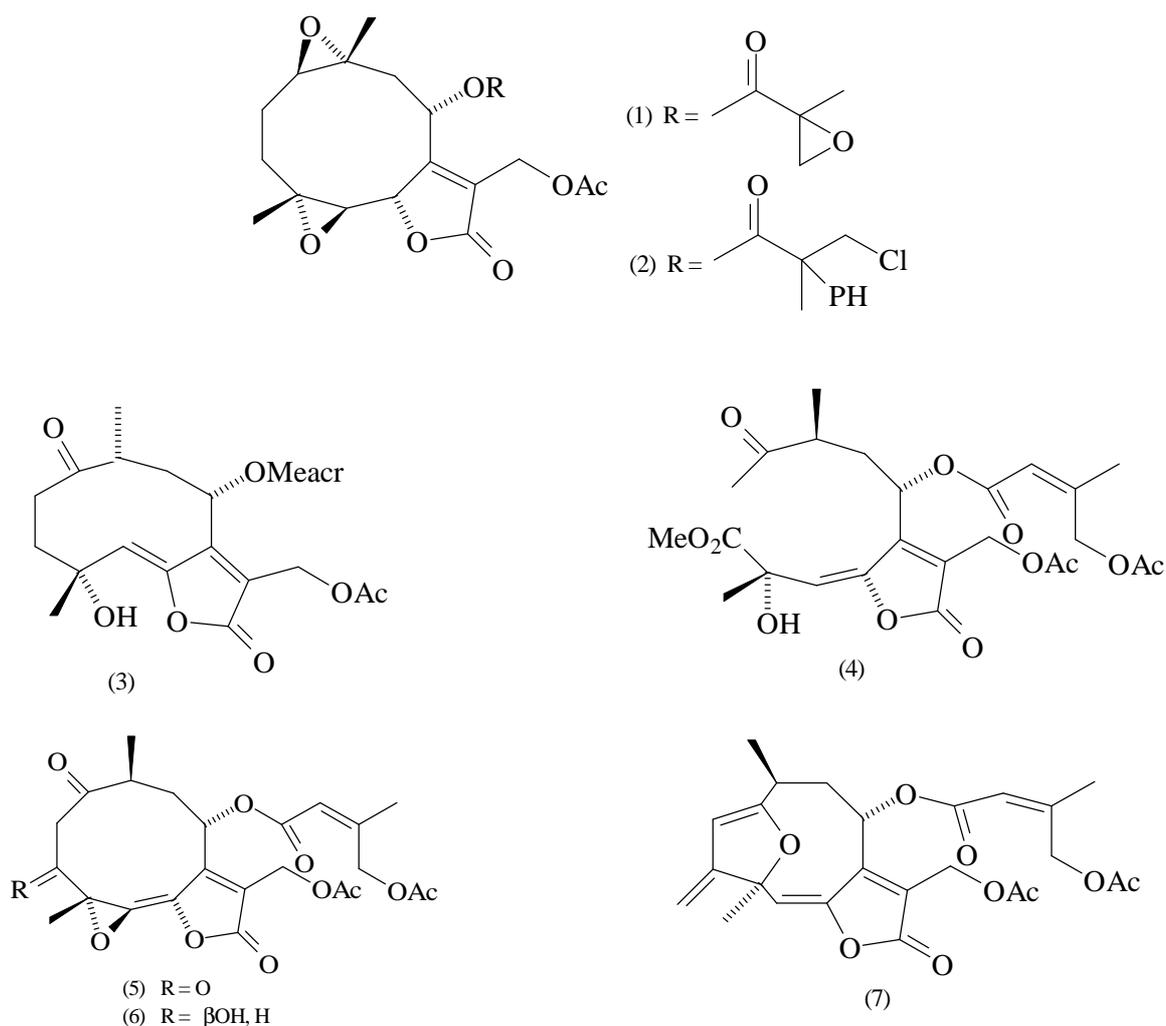


Figura 16: Compostos isolados de *V. poskeana*.

Neste mesmo estudo, Kumari e colaboradores (2003) isolaram e identificaram uma lactona sesquiterpênica das folhas de *Vernonia arborea* (Figura 17). A substância identificada como zulazanin D, foi testada como antifúngica por saber-se que este grupo de metabólitos secundários são utilizados como repelentes de insetos, citotóxico, anti-tumoral e antifúngico. A zulazanin D apresentou 100% de inibição sobre o crescimento micelial do fungo *Rhizoctonia solani*. Ainda, na concentração de 200 ppm, apresentou

inibição de 75% para *Curvalaria lunata* e *Botrytis cinerea*. Nesta mesma concentração, apresentou 60% de inibição para *Colletotrichum lindemuthiaum*, *Fusarium equisetii*, *F. oxysporum*. Em concentrações inferiores a 200 ppm, o composto apresenta somente atividade fungistática, dose-dependente.

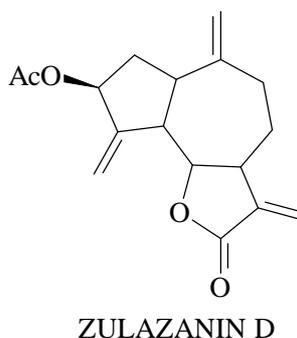


Figura 17: Lactona das folhas de *Vernonia arborea*.

Em pesquisa com plantas do gênero *Vernonia*, Zdero e colaboradores (1991) identificaram em *Vernonia steetziana* os já conhecidos germacreno-D, α -humuleno, cariofilenoepoxido, ácidos graxos e seus metil-ésteres, além dos glaucolídeos 1 e 2 e os hirsutinolídeos 3-5. Lactonas similares foram também encontradas em *Vernonia poskeana* Vatke et Hild. Nas partes aéreas de *Vernonia natalensis* foram identificados: germacreno-D, acetato de lupeil e os glaucolídeos 7, 8 e 10. De *Vernonia syringifolia*, os glaucolídeos 6, 7, 9, bem com o hirsutinolídeo 11, além da flavanona eriodictiol, germacreno-D e acetato de lupeil. Das partes aéreas de *Vernonia hindei* foram isolados ácidos graxos, eriodictiol metil éster, isorhamnetina e vernodalina (12) em altas concentrações. A Figura 18 apresenta as estruturas dos compostos isolados em espécies de *Vernonia*.

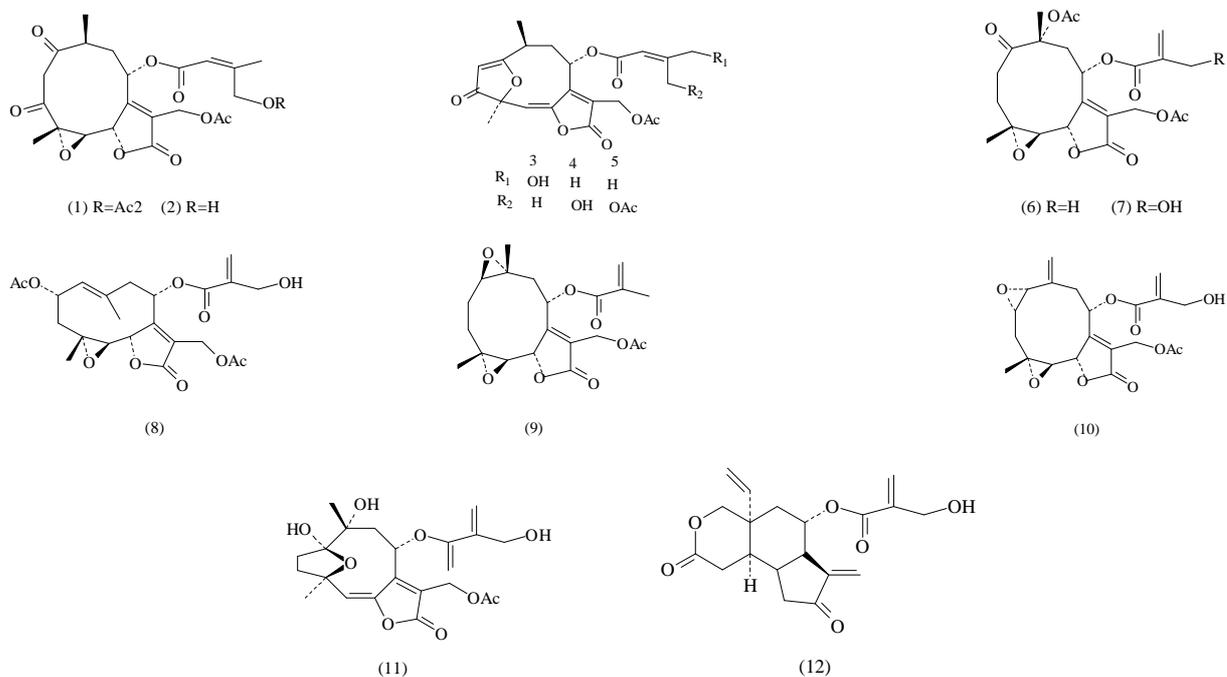


Figura 18: Compostos isolados em espécies de *Vernonia*.

Do extrato etanólico (60% em água, v/v) das sementes de *V. anthelmintica* foram isolados os compostos flavonoídicos 1-3 e todos mostraram atividade anti-vitiligo, especialmente butina (3) (Figura 19) (Tian et al., 2004).

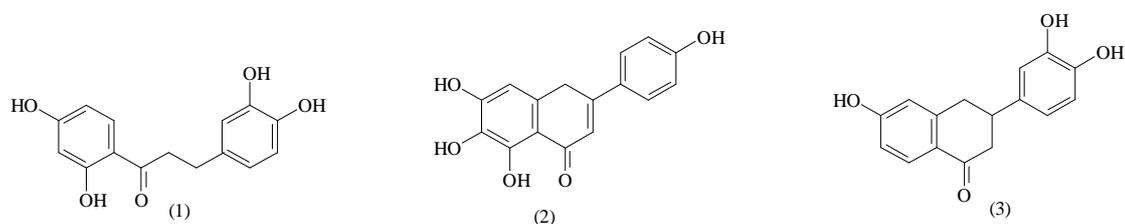


Figura 19: Compostos flavonoídicos isolados de *V. anthelmintica*.

No trabalho publicado por Bohlmann & Zdero (1982) foram estudadas quatro espécies de *Vernonia* e foram isolados do extrato etéreo derivados glaucolídeos, eudesmanos, deucadienos e cumarinas. Da espécie *V. galpini* foram isolados os compostos tridecapentadieno; trideca-3,5,7,9-tetraeno-1,11-dieno; α -bergamoteno; β -bergamoteno; bisabolano; germacreno-D; biciclo-germacreno; acetato de lupeil e os compostos 1, 2, 5 e 6. Neste mesmo trabalho, da espécie *V. cinarens* os compostos tridecapentaineno; α -humuleno; lupeol; acetato de lupeil e seu isômero Δ^{12} ; lactonas sesquiterpênicas e os compostos 3 e 4. Da planta *V. natalensis* foram isolados germacreno-D; biciclo-germacreno; lupeol; acetato de lupeil e seu isômero Δ^{12} ; acetato de β -amirina; lupenona; estigmasterol; espatulenol e os compostos 7-10. Da espécie *V. stipulaceae* os compostos tridecapentaineno; ácido linoléico; α -humuleno; lupeol; estigmasterol; cariofileno; acetato de lupeil e seu isômero Δ^{12} ; ácido linoléico e os compostos 11-16. As estruturas destes compostos estão mostradas na Figura 20.

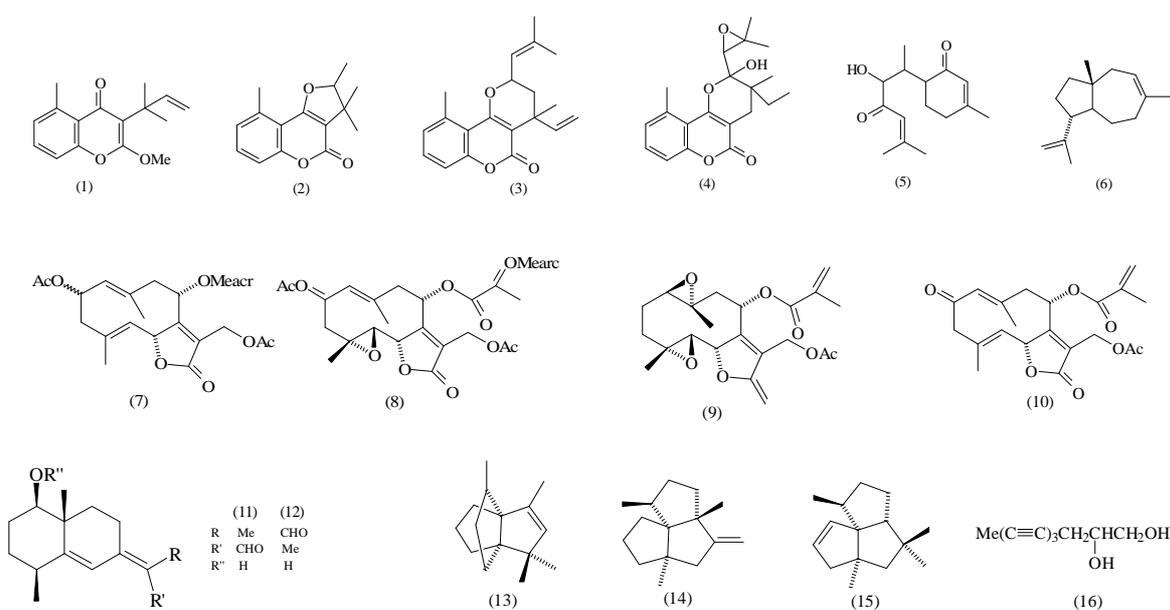


Figura 20: Compostos isolados de espécies de espécies de *Vernonia*.

Bohlmann e colaboradores (1981) estudaram espécies de *Vernonia* e constataram a presença de diversos constituintes químicos. Para *V. lilacina* foram identificados acetato de lupeil; estigmasterol; germacreno-D; α -humuleno, cariofileno e

os compostos lactônicos 13, 14, 15 e 17. Para *V. arkansana*, tridecapentaineno; germacreno-A; cariofileno; sitosterol; acetato de lupeil e os compostos lactônicos 2, 3, 7-11 e a mistura de 16a e 16b. Para *V. lanuginosa* acetato de lupeil; germacreno-D; α -humuleno; cariofileno; lupeol e os compostos 12. Para *V. polyanthes* os compostos germacreno-D; α -humuleno; acetato de lupeil; tridecapentaineno; biciclo-germacreno; cariofileno; estigmasterol e ainda 1, 5, 6 e 11. Para *V. fagifolia* Gardn acetato de lupeil; lupeol; estigmasterol; germacreno-D; cariofileno; cadinina e os compostos 2 e 6. Para *V. chinensis* Less. sitosterol; acetato de lupeil; lupeol e os compostos 1, 2, 3, 8 e 10. Para *V. alvinii* os compostos lupeol; acetato de lupeil; germacreno-D; cariofileno e ainda 4. As estruturas destes compostos estão mostradas na figura 21.

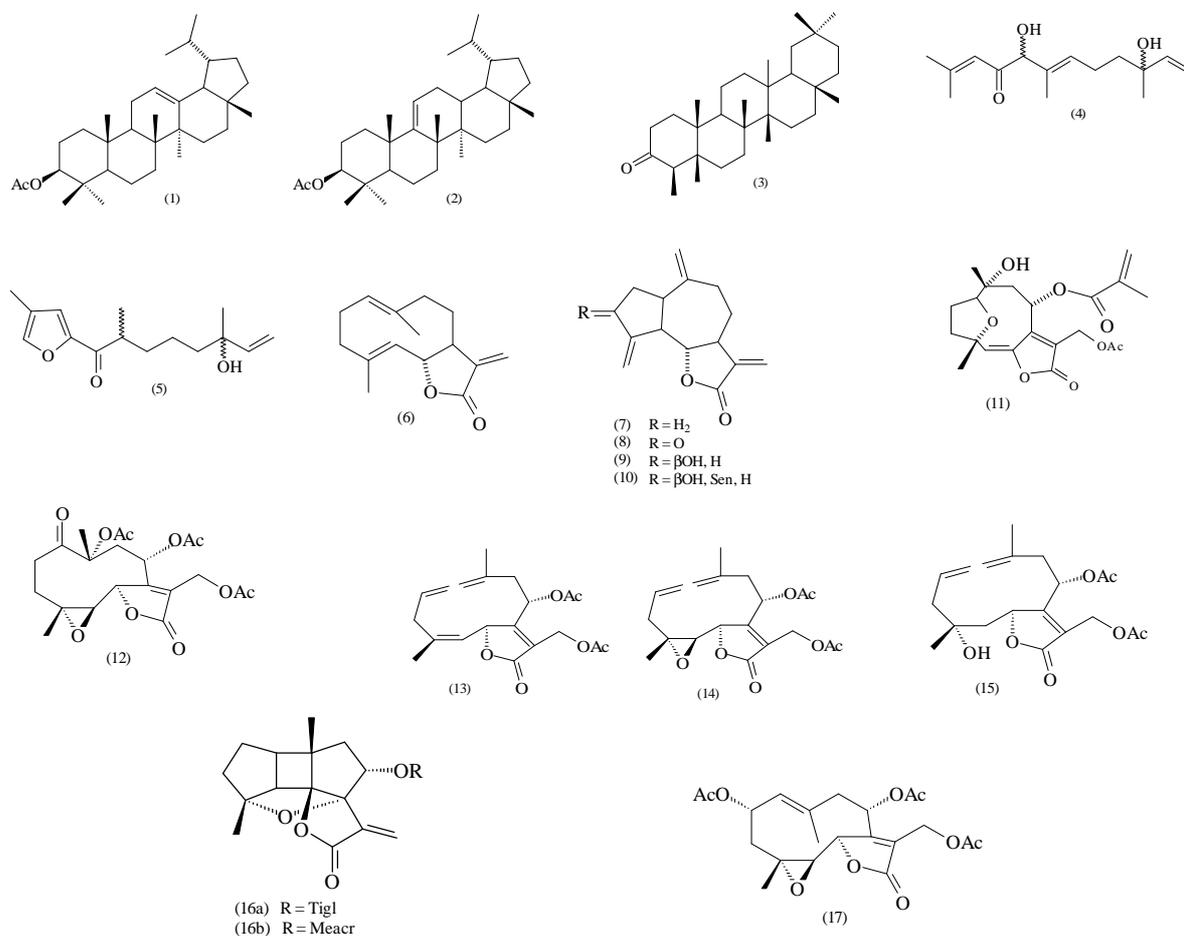


Figura 21: Compostos isolados de espécies de *Vernonia*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Para Análise Química

Os solventes e reagentes empregados foram de procedência Merck e/ou Quimex, especificação pró-análise ou então purificados por destilação. O etanol utilizado no processo extrativo foi de grau comercial. As misturas de solventes utilizados nas cromatografias em camada delgada, nas cromatografias preparativas em placas e nas cromatografias em coluna estão indicados na proporção volume/volume (v/v), sendo que variações são indicadas nos textos correspondentes. A água utilizada em todos os procedimentos foi destilada no próprio laboratório.

A concentração dos extratos e frações foi realizada em evaporador rotatório Büchi, sob pressão reduzida, em temperaturas inferiores a 40°C. Para as cromatografias em camada delgada preparativas, foram utilizadas placas de vidro (20 cm x 20 cm) recobertas com o adsorvente gel de sílica GF₂₅₄ nm (Merck) em espessura de 0,5mm, confeccionadas no próprio laboratório. Cromatofolhas de gel de sílica GF₂₅₄ nm (Merck) redimensionadas foram também utilizadas.

Para a análise dos constituintes químicos foram utilizadas placas não ativadas, em câmara saturada. Para as cromatografias em coluna, foi utilizado gel de sílica 60 Merck, com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 mesh-ASTM). Quando não especificado no texto correspondente, a quantidade de substância a cromatografar sobre coluna foi de 1% em relação ao adsorvente.

Utilizou-se de sílica impregnada com nitrato de prata (AgNO₃) para coluna e para CCD, sendo estas preparadas no próprio laboratório. Para tanto, foi preparada uma solução de nitrato de prata a 10% em água. A quantidade de sílica a ser impregnada foi posta em um balão e recoberta com esta solução. A água foi removida em evaporador rotatório a temperatura de 70 °C e em seguida a sílica foi ativada por uma hora a 100 °C em estufa (Stahl, 1969). Para as placas (CCD), migrou-se a solução de AgNO₃ 10% até o ápice da placa e ativou-se a 100 °C também por uma hora. Todos os processos foram realizados ao abrigo da luz.

Os sistemas eluentes utilizados para as cromatografias em camada delgada, preparativa e em coluna são descritos nos textos correspondentes.

Para a detecção das substâncias, foi utilizado o reagente cromogênico anisaldeído-sulfúrico, cuja composição está descrita abaixo:

anisaldeído.....0,5 mL
ácido sulfúrico concentrado.....1,0 mL
ácido acético glacial.....25,0 mL
etanol.....25,0 mL

Após a aspersão do reagente, as placas foram aquecidas à 100°C, por cerca de 10 minutos. A visualização das substâncias foi efetuada sob luz visível e luz ultravioleta, utilizando-se para esta última, lâmpadas de quartzo com comprimento de onda 254 e 365 nm.

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizadas as seguintes técnicas espectrais: ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio (¹³C-RMN e ¹H-RMN), infravermelho (IV) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM).

No desenvolvimento do trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica OHAUS Voyager;
- Balança semi-analítica MARTE AS5500C;
- Banho de ultrassom THORNTON Unique;
- Bomba de vácuo PRIMAR;
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Hewlett-Packard (HP) 6890 Series *Plus* +, equipado com injetor automático split-splitless modelo HP 6890 Series GC AutoSampler Controller e detector seletivo de massas modelo HP 5973 MSD. Parâmetros da CG: injeção da amostra no modo split, com razão de 20:1; coluna capilar cromatográfica de sílica fundida HP-5 MS (30m x 0,32mm i.d e espessura do filme 0,25 µm) com 5% fenil e 95% de metilsiloxano. O gás de arraste: hélio; fluxo: 2 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; programação do forno: 12 °C/min até 280 °C; energia de ionização: 70 eV.
- Espectrômetro de IV NICOLET MAGNA 550, com Acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (HATR), Acessório de Refletância Difusa com Transformada de Fourier (DRIFTS), para amostras sólidas em pastilhas de KBr.

- Espectrômetro de RMN BRUCKER DPX. Para a obtenção dos espectros de RMN (^1H -RMN \rightarrow 400 MHz e ^{13}C -RMN \rightarrow 100 MHz), as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou metanol deuterado (CD_3OD);
- Estufa BIOMATIC;
- Evaporador rotatório BÜCHI R – 114, acoplado a um banho de água BÜCHI Waterbath B – 480 e a uma trompa d'água;
- Lâmpada de UV CHROMATOVUE;
- Lâmpada de UV BOITTON.

4.2. Material Vegetal

O material vegetal utilizado nos experimentos constituiu-se de folhas de *Vernonia tweedieana* Baker que foram coletadas no dia 09 de abril de 2004, em Ijuí-RS. Esta planta foi identificada pelo botânico Dr. Geraldo Ceni Coelho do Departamento de Biologia e Química (DeBQ/UNIJUÍ). O material testemunho (exsicata) está depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob o número de registro SMDB 9536.

4.3. Preparação do Material Vegetal

Logo após a coleta, o material vegetal foi seco à temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar direta, por sete dias.

4.4. Preparação dos Extratos

Após a secagem, o material vegetal foi moído em moinho de facas resultando em 1.900 g. Esta amostra foi submetida à maceração hidro-etanólica (35:65, v/v) na proporção de 15g/100 ml da mistura de solvente, por sete dias.

O extrato assim obtido foi filtrado em funil de vidro sinterizado e concentrado para redução de volume, retirando-se parte do solvente por evaporação em pressão reduzida com auxílio de evaporador rotatório.

4.5. Fracionamento do Extrato Hidro-etanólico Bruto

O extrato hidro-etanólico reduzido foi retomado em água e transferido para uma ampola de separação para o fracionamento por partição seqüencial utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e n-butanol (4 x 200 mL cada). Foi adicionada pequena quantidade de cloreto de sódio para evitar emulsão entre as fases. Foram obtidas três frações orgânicas e uma fração aquosa remanescente que foram concentradas à secura em evaporador rotatório. O rendimento de cada fração foi determinado em relação à massa de folhas secas maceradas.

4.6. Análise Cromatográfica das Frações

Para uma avaliação prévia dos componentes extraídos, foram efetuadas cromatografias analíticas das frações diclorometânica (F-CH₂Cl₂), acetato de etila (F-AcOEt) e butanólica (F-BuOH) obtidas a partir do extrato bruto hidro-etanólico. Estas cromatografias foram realizadas empregando-se como fase estacionária o gel de sílica GF₂₅₄, tendo como eluente para a análise da fração F-CH₂Cl₂ a mistura de diclorometano:etanol (96:4 v/v); para a fração F-AcOEt, a mistura de diclorometano:acetato de etila:etanol (8:2:0,5 v/v) e para a fração F-BuOH, clorofórmio:etanol:água, na proporção de 20:8:1 (v/v/v).

Após eluição do solvente, os cromatogramas foram avaliados mediante revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 100°C, sendo estas placas cromatográficas visualizadas sob luz natural e UV antes e após a aspensão do revelador.

4.7. Isolamento e Purificação

4.7.1. Procedimentos Cromatográficos Preliminares

Sucessivas cromatografias em coluna de sílica com as frações F-CH₂Cl₂ e F-AcOEt levaram ao isolamento de sete compostos. Da fração diclorometânica foram

caracterizados seis, sendo três com característica de triterpenos (codificados como V1, V2.1 e V2.2) e três com características de compostos esteroidais (codificados como V3, V4.1 e V4.2). Ainda, da fração acetato de etila foi isolado o composto flavonoídico codificado como V5.

4.7.2. Fração Diclorometânica (F-CH₂Cl₂)

No caso de F-CH₂Cl₂, o processo de isolamento das substâncias empregando sílica convencional como fase estacionária não foi suficiente. Foram obtidos com esta metodologia dois compostos considerados puros quando analisados por CCD frente a vários sistemas eluentes. No entanto, análises espectrais, principalmente de ¹³C-RMN, mostraram que as amostras não se encontravam puras em função do número de sinais observados. Para resolver estas misturas utilizou-se de sílica impregnada com AgNO₃ 10%, preparada no laboratório.

Os esquemas mostrados nas Figuras 22 e 23 (páginas 58 e 59) mostram que tanto para os triterpenos como para os esteróides foram necessários procedimentos cromatográficos em coluna, sendo o penúltimo determinante nas separações, quando foi empregada sílica impregnada com AgNO₃ 10%. Os detalhes referentes aos solventes utilizados estão expostos nas figuras.

O esteróide V4.1 foi caracterizado, além dos dados espectrais, mediante cromatografia bidimensional em camada delgada de gel de sílica (placa 15x15cm), utilizando amostra autêntica de β-sitosterol. O sistema eluente da migração na primeira direção foi hexano:AcOEt (1:1, v/v) e da migração na segunda direção CH₂Cl₂:AcOEt (7:3, v/v).

4.7.3. Fração Acetato de Etila (F-AcOEt)

No isolamento do flavonóide V5 da fração F-AcOEt o método por cromatografia em coluna não foi eficiente para a obtenção da substância pura. Optou-se por outra metodologia: a cromatografia em placa preparativa. As placas foram produzidas no próprio laboratório utilizando sílica GF₂₅₄ - Merck e como solvente água e etanol (60:15;

v/v), na proporção de 28,0 g de sílica para 60 ml do solvente. Esta mistura foi espalhada sobre placas de vidro com auxílio de aparelhagem específica. As placas foram secas a temperatura ambiente por um mínimo de 24 horas e ativadas a 100 °C por 1 hora antes da aplicação da amostra.

As amostras foram solubilizadas em metanol e aplicadas em linha com auxílio de tubo capilar nas placas preparativas. Após a eluição do solvente, as placas foram parcialmente reveladas com reagente anisaldeído sulfúrico para identificar em que R_f se encontrava a substância de interesse. Localizada, as porções correspondentes à substância foram coletadas por raspagem com auxílio de espátula, solubilizadas em solução de etanol: metanol (1:1; v/v) e mantidas sob agitação em agitador magnético por 20 minutos para a remoção do flavonóide. Após filtração, a solução resultante contendo a substância foi concentrada em evaporador rotatório, quantificada e recromatografada.

A Figura 24 mostra os dados referentes à metodologia utilizada para o isolamento de V5. Para o isolamento foram necessárias placas preparativas seqüenciais utilizando-se como eluentes clorofórmio: acetato de etila: etanol (4:1:0,5; v/v/v); clorofórmio: acetato de etila (1:1; v/v); clorofórmio: acetato de etila: éter de petróleo (4:1:0,5; v/v/v) e clorofórmio: acetato de etila: etanol: éter de petróleo (4:1:0,5:0,5; v/v/v/v).

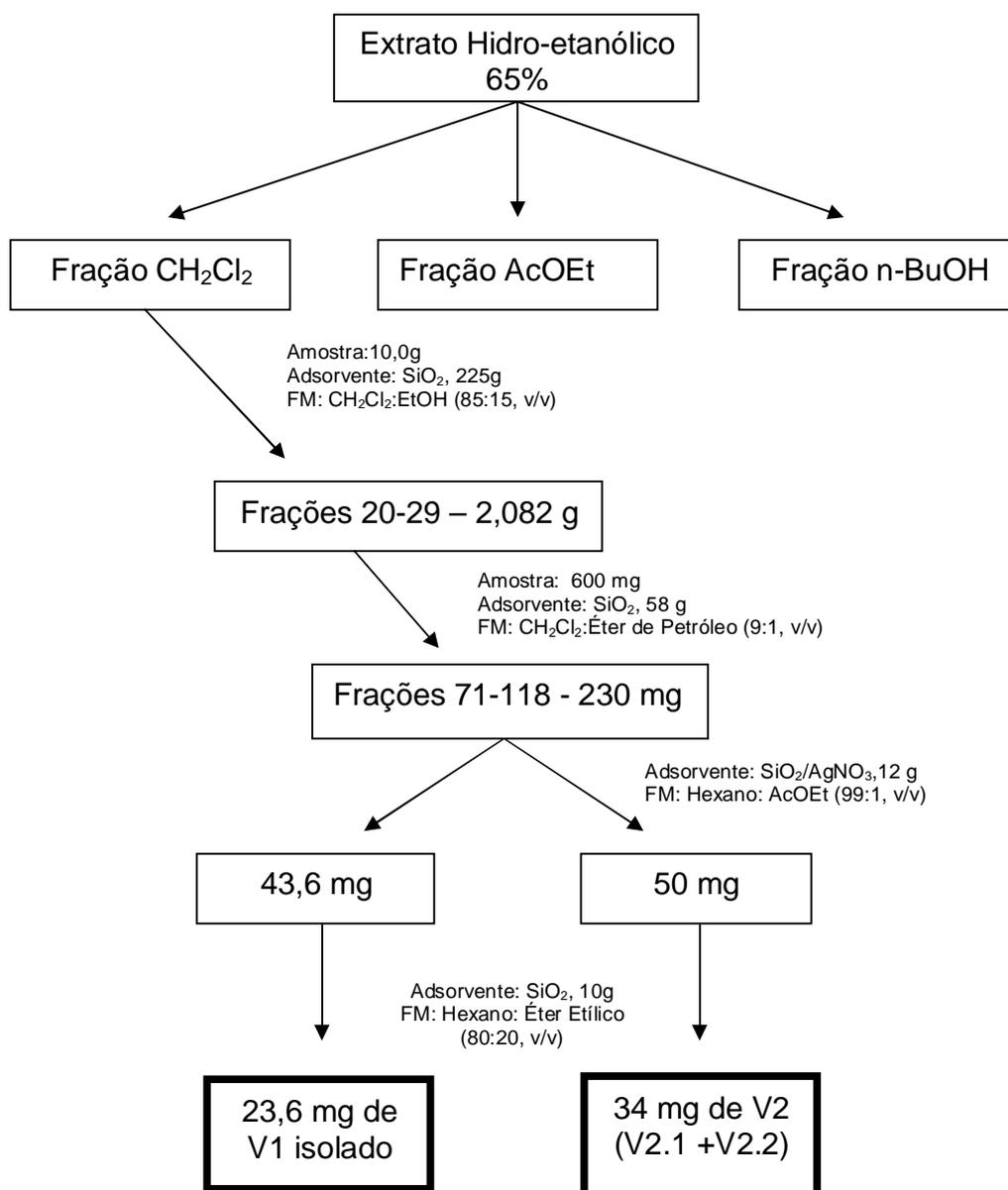


Figura 22: Esquema de isolamento e purificação dos triterpenos da fração diclorometânica das folhas de *Vernonia tweedieana* Baker.

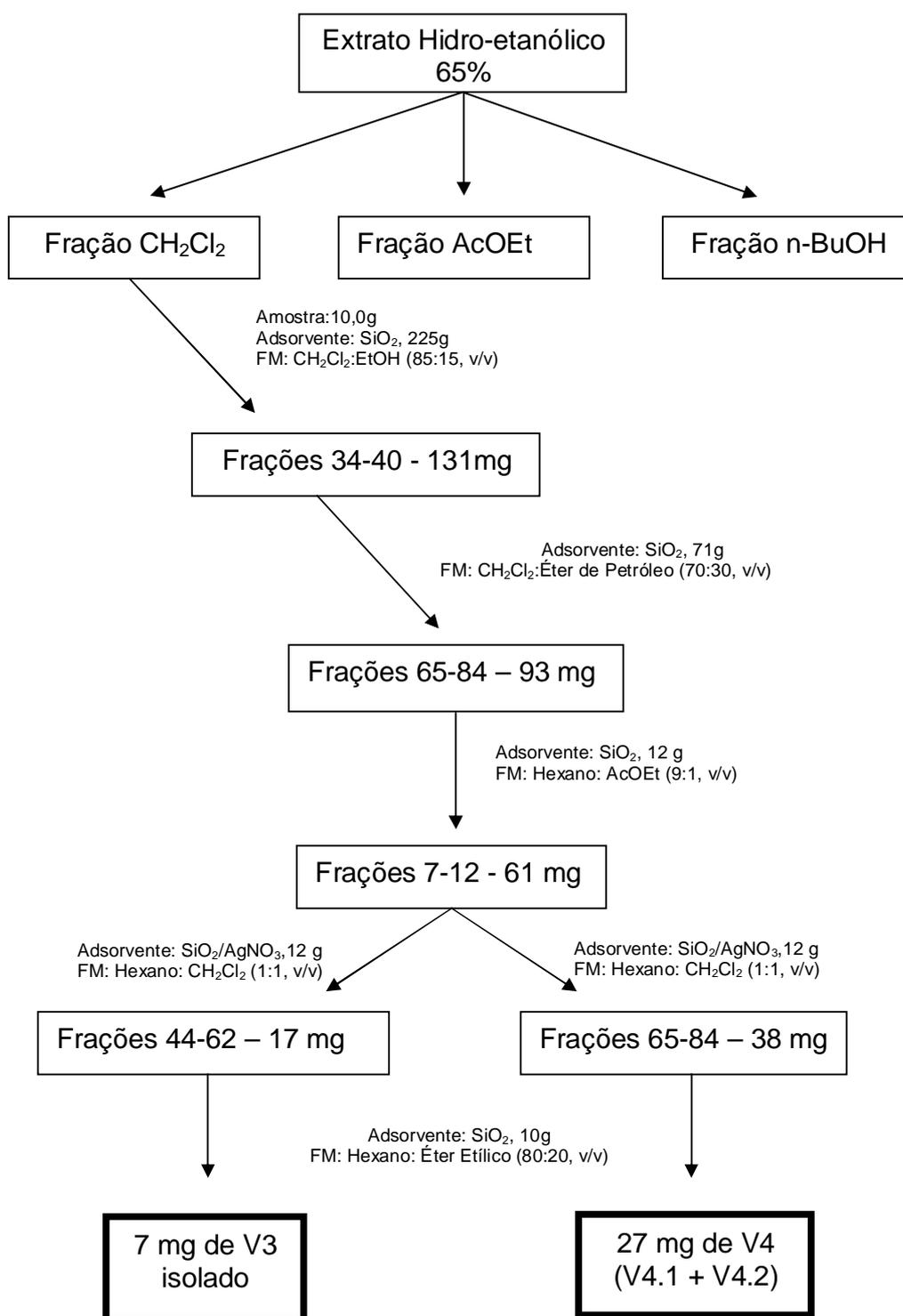


Figura 23: Esquema de isolamento e purificação dos esteróides da fração diclorometânica das folhas de *Vernonia tweediana* Baker.

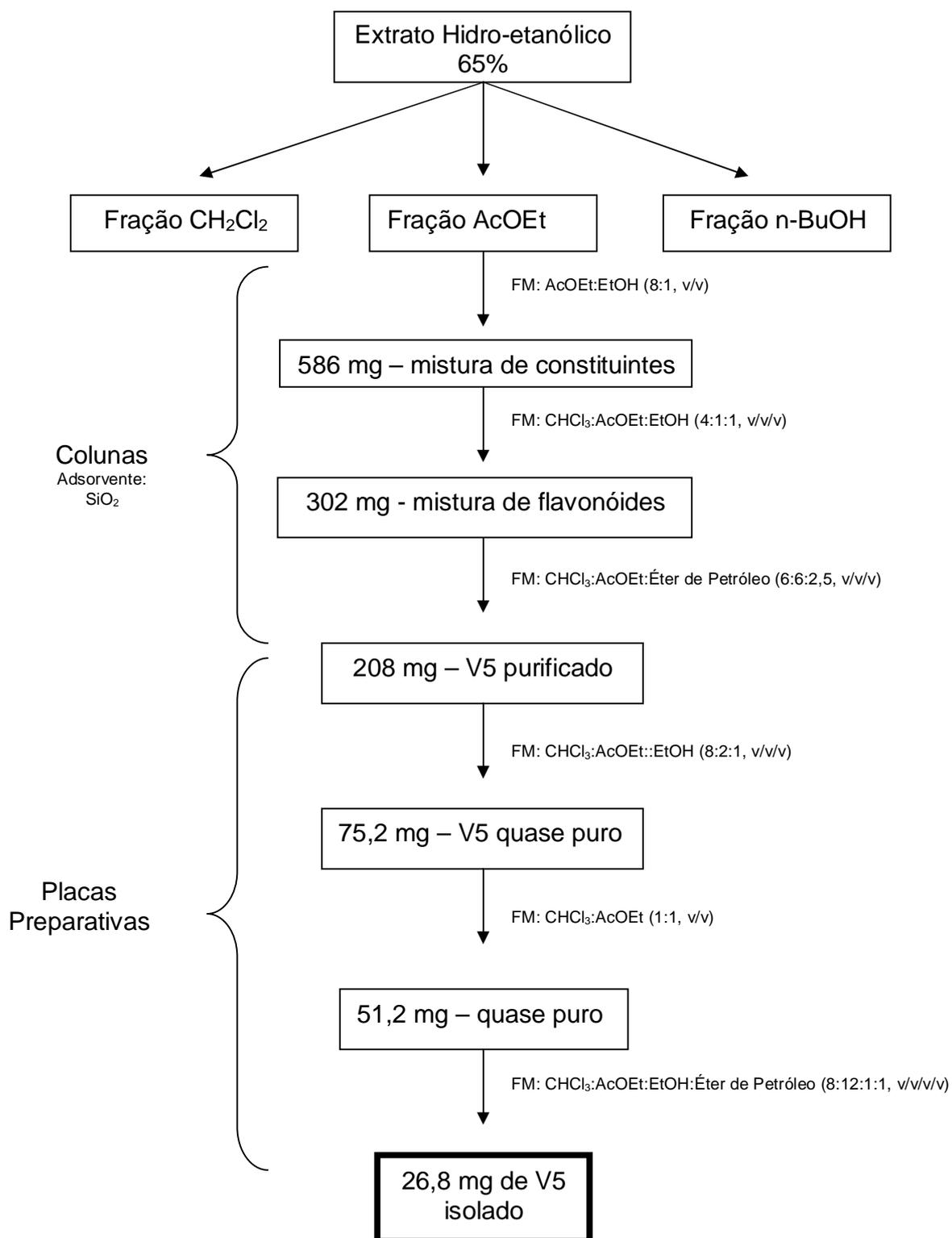


Figura 24: Esquema de isolamento e purificação do flavonóide da fração acetato de etila das folhas de *Vernonia tweediana* Baker.

4.8. Avaliação da Atividade Antioxidante das Frações Obtidas das Folhas de *Vernonia tweedieana*

A preparação do material vegetal se deu conforme o item 4.5. Foram avaliadas as frações diclorometânica (F-CH₂Cl₂), acetato de etila (F-AcOEt), butanólica (F-BuOH) e o extrato bruto das folhas da planta *V. tweedieana*. Para a avaliação da atividade antioxidante foi usado o método fotocolorimétrico do DPPH (1,1-difenil, 2-picrilidrazila) utilizando o método de Choi e colaboradores (2002). Para o ensaio foram preparadas soluções de 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8 µg/mL de cada amostra em etanol. À 2,5 mL das amostras, adicionou-se 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM em etanol. Após 30 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 518 nm, onde o radical DPPH apresenta máximo de absorção. Uma solução de DPPH (1 mL, 0,3 mM) em etanol (2,5 mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico foi utilizada como padrão (controle positivo) nas mesmas concentrações das frações. Etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro (Shimadzu,UV-1021), tendo como brancos as soluções testes de cada fração (sem a adição do DPPH). As determinações foram efetuadas em triplicata, sendo determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação percentual (CV%) para cada uma das determinações.

4.9. Avaliação da Toxicidade Aguda de *Vernonia tweedieana* Baker (OECD/OCDE, 2001)

No estudo de toxicidade aguda foram avaliados o extrato hidro-etanólico bruto e suas frações acetato de etila e butanólica, obtidos conforme item 3.5. A fração diclorometânica não foi testada devido à sua baixa solubilidade no veículo utilizado.

4.9.1. Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C jovens, machos e fêmeas, pesando 20,0 ± 2g. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada de 22 ± 3 °C,

recebendo ciclo 12 horas-luz diária com alimentação (pellets) e água *ad libitum*, durante o período de experimentação.

4.9.2. Estudo de Toxicidade Aguda

Foram preparadas soluções dos extratos secos. Os camundongos foram randomicamente divididos em grupos ($n=6$) e administrados oralmente com 0,5 mL de solução do extrato hidro-alcoólico bruto e suas frações acetato de etila e butanólica. Um grupo serviu como controle e recebeu igual volume do veículo utilizado (água destilada). Os extratos testes foram administrados em uma única dose por gavagem através de sonda gástrica. Os animais foram alimentados, mas não receberam água três horas antes da administração dos extratos. Após a administração, o alimento foi detido por duas horas.

As doses foram aumentadas progressivamente (2.000-5.000 mg/kg) para a determinação da dose letal (DL_{50}). Os animais foram observados por sete dias após serem tratados. O número de camundongos que tiveram óbito durante o período do estudo foi verificado para cada grupo visando a determinação da DL_{50} .

5. RESULTADOS

5.1. Rendimento dos Extratos

A partir do extrato hidro-etanólico do material vegetal seco e moído (1900 g) foram obtidos 30,0 g da fração diclorometânica (rendimento de 1,58 %); 25,62 g da fração acetato de etila (rendimento de 1,35 %) e 55,85 g da fração butanólica (rendimento de 2,94 %).

5.2. Elucidação Estrutural dos Compostos Isolados

Os procedimentos descritos em material e métodos conduziram ao isolamento de sete substâncias. Da fração diclorometânica foram obtidos seis compostos, codificados como V1, V2.1, V2.2, V3, V4.1 e V4.2. Da fração acetato de etila (F-AcOEt) foi isolado o composto codificado como V5.

Os compostos codificados como V1, V3 e V5 foram obtidos de forma pura, enquanto os compostos V2.1 e V2.2 e V4.1 e V4.2 foram obtidos na forma de misturas binárias, respectivamente. A mistura de V2.1 + V2.2 recebeu o código de V2, enquanto que a mistura de V4.1+ V4.2 foi codificada como V4. Todas as substâncias tiveram suas estruturas elucidadas através do uso de técnicas espectroscópicas.

O esquema mostrado na Figura 25 apresenta o isolamento e purificação das substâncias triterpenóides V1 e V2.1 + V2.2, evidenciando as substâncias obtidas nos cromatogramas. A elucidação estrutural das três substâncias é discutida na seqüência.

O esquema mostrado na Figura 45 (página 98) descreve o isolamento e purificação das substâncias esteroidais V3 e V4.1+V4.2, evidenciando as substâncias obtidas no cromatograma. A elucidação estrutural desses esteróides é discutida na seqüência.

A Figura 65 (página 127) apresenta o esquema geral de isolamento de V5. A elucidação estrutural de V5 é apresentada na seqüência.

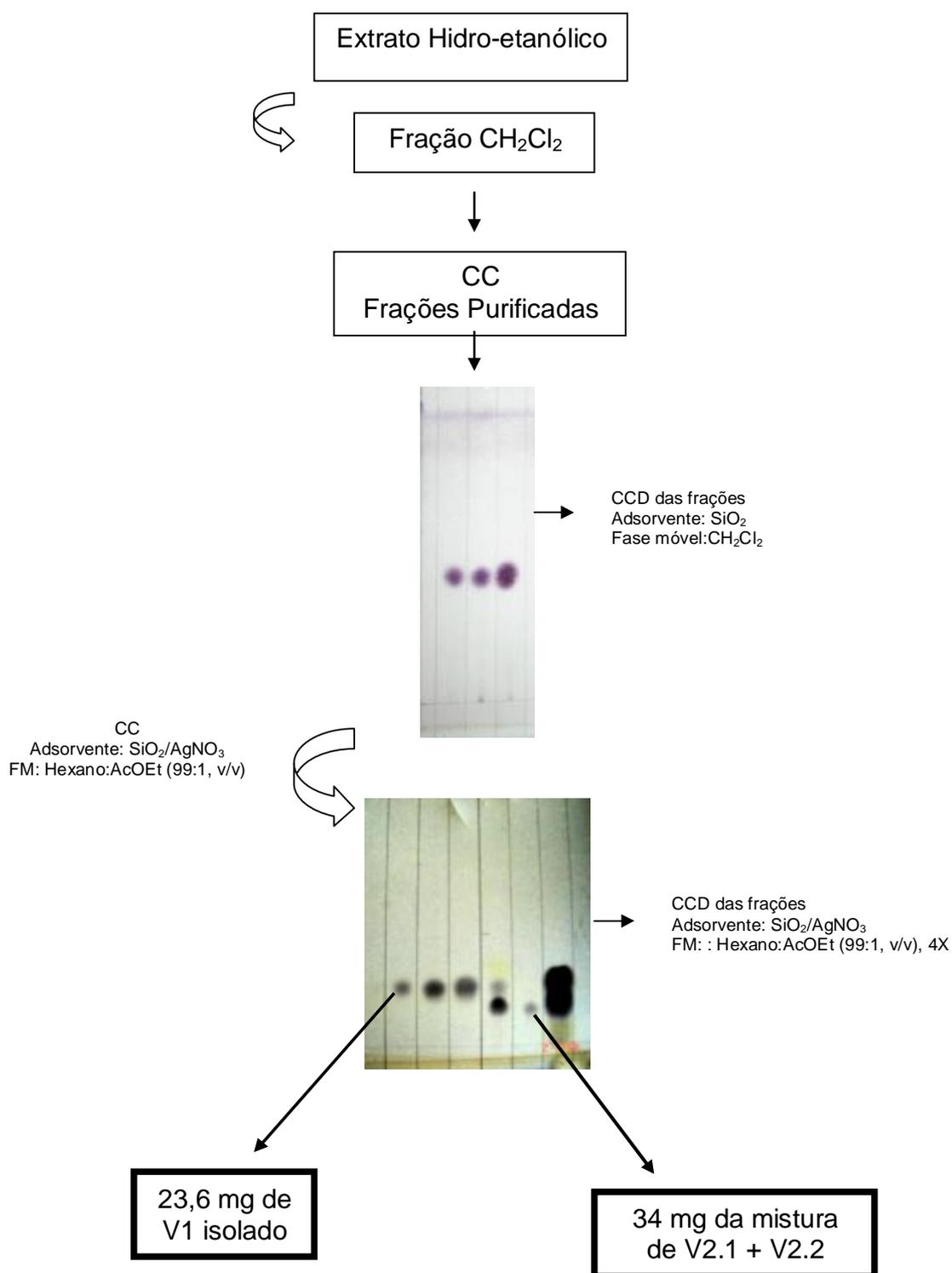


Figura 25: Esquema de isolamento e purificação dos triterpenos da fração diclorometânica das folhas de *Vernonia tweedieana* Baker.

5.2.1. Elucidação Estrutural de V1

Da fração diclorometânica do extrato hidro-etanólico das folhas da planta foram isolados 23,6 mg de um composto cristalino branco codificado como V1. O comportamento cromatográfico de V1, apresentando-se como uma mancha única, de coloração violácea após revelação com anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C, indicou tratar-se de uma substância com característica triterpenóide. Esta amostra foi submetida a espectrometria de massa (CG/EM), infravermelho (IV), ¹H-RMN e ¹³C-RMN.

O espectro de infravermelho (Figura 26) forneceu importantes informações acerca dos grupos funcionais presentes na estrutura do composto analisado. O espectro apresentou uma banda de intensidade forte em 2950 cm⁻¹, característico de deformações axiais de C-H sp³, bastante comum em compostos orgânicos. Outra absorção destacável ocorreu em 3300 cm⁻¹. Esta absorção aparece como um pico largo característico da deformação axial de O-H associado (ligação hidrogênio de álcoois). Ainda, o pico mais intenso do espectro ocorreu em 1050 cm⁻¹, exatamente a região onde absorve a função C-O de álcoois. O espectro apresentou ainda, sinais na faixa de 1700 a 700 cm⁻¹, decorrentes de deformações angulares e axiais de alcanos (C-C e C-H). Destacam-se também a banda de baixa intensidade, em 1650 cm⁻¹, característica de deformação axial de C=C; e ainda as bandas em 1465 cm⁻¹ e 1375 cm⁻¹ que são deformações angulares de CH₂ e CH₃, respectivamente.

Através dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN (Figuras 30-33, páginas 74-77) atribuíram-se os deslocamentos químicos e caracterizaram-se os átomos de hidrogênio e carbono que compõem a estrutura do composto. O espectro de ¹³C-RMN totalmente desacoplado indicou a presença de trinta átomos de carbono na estrutura de V1. Desses sinais, dois bem desblindados são característicos de uma dupla ligação em compostos com esqueletos derivados do lupano (δ_c 109,31 e 150,9 ppm), que apresentam um grupamento isopropenil com deslocamentos químicos específicos de 19,31; 150,9, e 109,31 ppm para os carbonos C-30, C-20 e C-29, respectivamente (Bhattacharya & Barros, 1986; Mebe et al., 1998; Almeida et al., 2003; Chaturvedula et al., 2004; Aguiar et al., 2005). O espectro apresentou apenas um sinal característico de

carbono portador de oxigênio, em δ_C 79,01 ppm. Este deslocamento é compatível com a presença de hidroxila livre, que, por razões de ordem biossintética, foi atribuída ao C-3 (Wagner, 1993; Hartmann, 1998; Hansel, 1999).

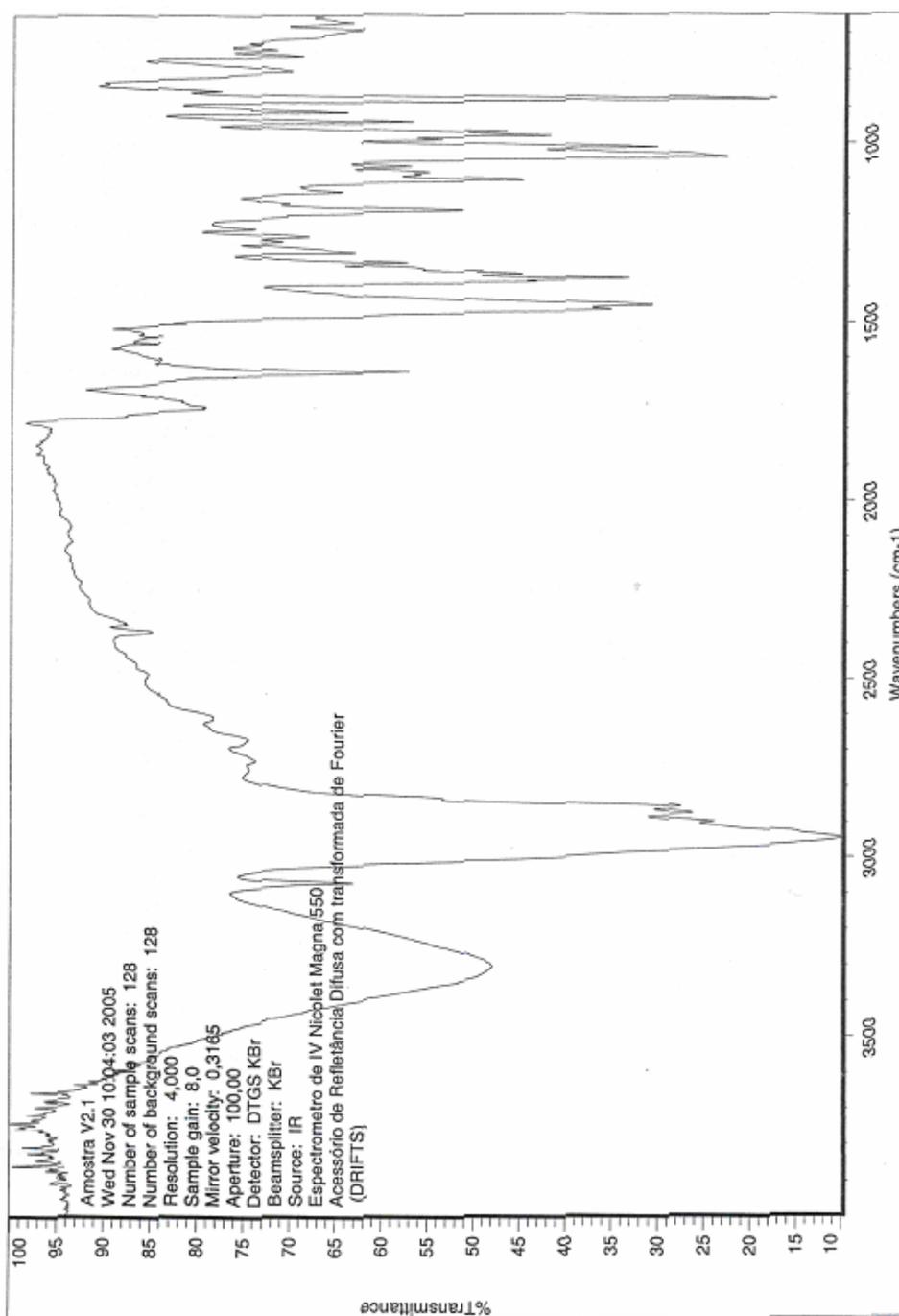


Figura 26: Espectro de IV de V1, em pastilhas de KBr.

A comparação com os valores registrados na literatura para lupeol e derivados deste triterpeno permitiu determinar a conformação da hidroxila em C-3. Observou-se que quando a hidroxila está em posição 3- α o deslocamento de C-3 ocorre em torno de 75 ppm (Souza et al., 2001; Carvalho et al., 1998; Olea & Roque, 1990) valor este não observado no espectro. No entanto, o deslocamento observado foi de δ_C 79,05 ppm, que é compatível com a função OH em conformação β (Jiang et al., 1995; Mebe et al., 1998; Chaturvedula et al., 2004; Olea & Roque, 1990). Os deslocamentos dos prótons e carbonos vizinhos a esta hidroxila comprovam esta informação. Os valores de deslocamento para C-1 (38,8 ppm) e C-5 (55,3 ppm) indicam que a hidroxila está em mesmo plano e assim interage com esses carbonos deslocando-os para campo mais baixo. Caso estivessem em posições estereoquímicas opostas, os deslocamentos seriam de 34,0 ppm para C-1 e 49,5 ppm para C-5, por não sofrerem efeito de desblindagem do oxigênio (Carvalho et al., 1998). Os dados de literatura de ^1H -RMN também contribuem para a determinação da conformação de H-3, e conseqüentemente, de OH-3. Quando H-3 está em β , seu deslocamento ocorre em 3,40 ppm. Como o valor observado no espectro de V1, ocorreu em 3,20 ppm, e é característico de H-3 em α (Souza et al., 2001), concluiu-se que em V1 a hidroxila aparece em β e o H-3 em α . O hidrogênio em C-3 acopla com os dois hidrogênios H-2 (H-2a e H-2b). Como a hidroxila está mais próxima de um dos prótons, este sofre um pequeno deslocamento para campo mais baixo (3,20 ppm, *d*) enquanto que o outro não sofre tanto este efeito adicional de desblindagem e aparece como dubleto em δ_H 3,17 ppm. Assim, se comportam como hidrogênios diferentes e por este motivo o sinal de H-3 aparece como duplo dubleto (*dd*) e não como um tripleto (Figura 27).

Os espectros de hidrogênio (Figura 31 e 32, páginas 75 e 76) mostraram ainda, sete metilas na forma de singletes de alta intensidade. Atribuíram-se os valores de deslocamento químico através de comparação com dados encontrados na literatura (Tabela 1, página 72). Os deslocamentos para essas metilas foram: δ_H 0,76 (H-28, 3H), 0,78 (H-25, 3H), 0,83 (H-24, 3H), 0,94 (H-23, 3H), 0,96 (H-27, 3H), 1,03 (H-26, 3H) e 1,67 ppm (H-30, 3H).

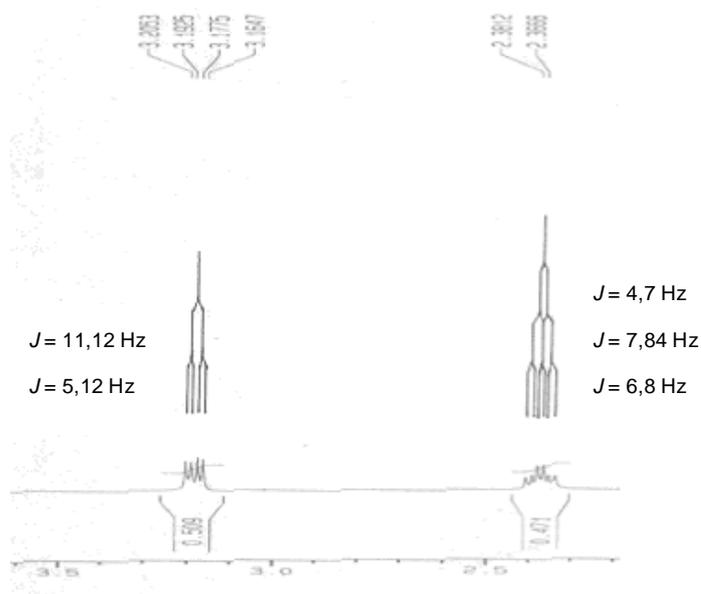


Figura 27: Espectro de ^1H -RMN ampliado de V1, região de δ_{H} 2,2-3,5 ppm.

Os sinais que aparecem como singletes em δ_{H} 4,56 e 4,68 ppm representam os dois prótons geminais olefínicos (H-29a e H-29b). Aparecem em campo baixo pois estão ligados ao carbono que faz dupla ligação e assim sofrem forte efeito de desblindagem. Estes hidrogênios como não fazem acoplamento, aparecem como dois singletes de integral 0,5 (Souza et al., 2001). Estes sinais somados ao deslocamento do sinal de metila em δ_{H} 1,67 ppm, são característicos de prótons pertencentes a um grupamento isopropenil, sugerindo que o composto se trata de um triterpeno pentacíclico do tipo lupeno (Jiang et al., 1995; Carvalho et al., 1998; Aguiar et al., 2005).

Um sinal importante no espectro de V1 e que caracteriza um dos hidrogênios H-21 é um multiplete em δ_{H} 1,91 ppm. Este hidrogênio aparece em campo mais baixo por estar próximo da dupla ligação e assim sofrer efeito de desblindagem. O sinal referente ao outro hidrogênio H-21 encontra-se encoberto pelos sinais relativos aos metilenos da molécula. Deslocamentos semelhantes, referentes aos dois prótons H-21 são descritos como multipletes por Jiang et al., (1995) em 2,00 e 1,42 ppm e Junges et al., (1999) em δ_{H} 1,98 e 1,40 ppm.

O mesmo efeito de desblindagem ocorre sobre o próton H-19, que acopla com os 2H-21 e H-18 (Junges et al, 1999) e aparece no espectro em δ_H 2,37 ppm na forma de um multiplete.

Os demais sinais no espectro de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN apareceram em campo alto e foram atribuídos aos carbonos e hidrogênios por comparação com dados da literatura, sendo os valores determinados para V1 sobreponíveis aos valores de compostos derivados do lupeol, contribuindo para a sua identificação na planta em estudo (Tabelas 1 e 2, páginas 72 e 73, respectivamente).

Na análise por CG foi possível observar no cromatograma um pico principal com tempo de retenção de 26,08 minutos. O espectro de massa por impacto eletrônico (Figura 34, página 78) do composto mostrou pico em m/z 426 u.m.a, que corresponde ao pico do íon molecular do composto V1 (lupeol). Outros picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder (RDA) do anel C são típicos de triterpenos pentacíclicos, principalmente os de maiores intensidades como os m/z 218; 207; 203 e 189 u.m.a (Mendes et al., 1999; Ogunkoya et al., 1981). Destes, os mais intensos foram m/z 189 e 207 u.m.a., que são característicos de fragmentações de compostos do tipo lupeno (Ogunkoya et al., 1981; Mebe et al., 1998; Kotowicz et al., 2005). O esquema de fragmentação de V1 está mostrado na Figura 28.

Com base nos dados espectrais é possível propor para o composto V1 a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. Para essa fórmula molecular tem-se um grau de insaturação (índice de deficiência de hidrogênio) igual a seis. Uma vez que os espectros de RMN indicaram a presença de somente uma insaturação, conclui-se que o composto apresenta cinco ciclos. Portanto, estes dados nos permitem afirmar que V1, isolado do extrato diclorometânico, é um triterpeno álcool pentacíclico portador de uma insaturação: lupeol (3 β -hidroxi-lupa-20(29)-eno), figura 29.

Substância V1: Cristal branco. $R_f=0,34$ (gel de sílica F_{254} ; CH_2Cl_2 :Hexano 95:5; visualização após nebulização com anisaldeído sulfúrico – mancha roxa). IV (KBr) ν_{max} 3300, 3050, 2950, 1730, 1620, 1450, 1370, 1150, 1040, 850 cm^{-1} . EM/IE 70 eV, m/z 426 [M^+] (22), 411 (10), 393 (5), 229 (15), 218 (100), 207 (62), 189 (62), 175 (28), 161 (28), 135 (46), 109 (77), 81 (91), 55 (65) calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ 426 g (Figura 34). Para ^{13}C -

RMN (100 MHz, CDCl_3) e ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) ver Tabelas 1 e 2, páginas 72 e 73, respectivamente.

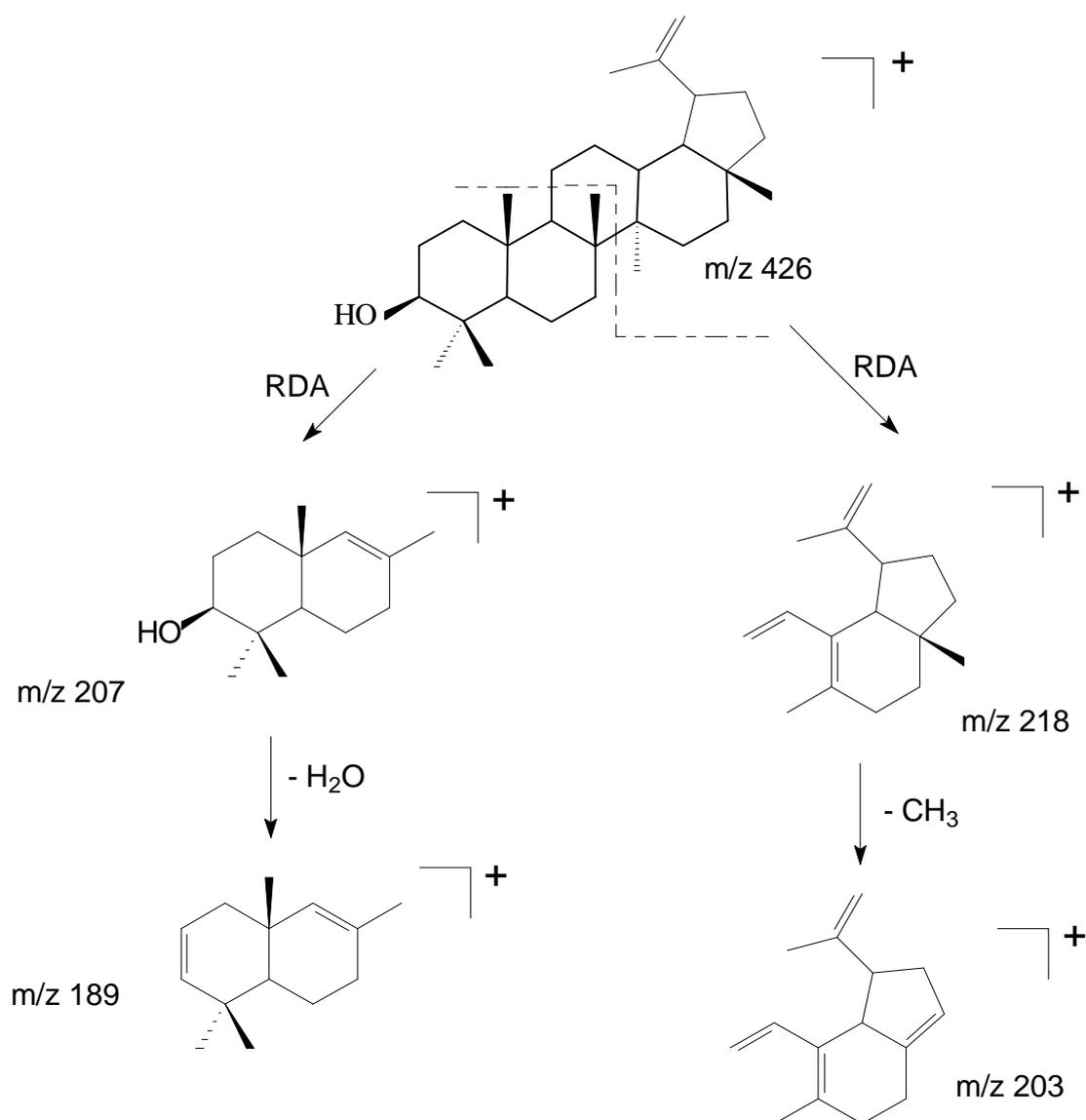


Figura 28: Esquema de fragmentação do composto V1, adaptado de Mebe et al., 1998.

Tabela 1: Valores de deslocamentos de $^1\text{H-RMN}$ de V1 e dos compostos 1-7 utilizados como referências (d_{H}):

H	1 CDCl ₃	2 CDCl ₃	3 CDCl ₃	V1 CDCl ₃	4 CDCl ₃	5 CDCl ₃	6 CDCl ₃	7 CDCl ₃
3	3,20 <i>m</i>	3,40 <i>m</i>	4,47 <i>dd</i>	3,20 <i>dd</i>	3,18 <i>dd</i>	3,22 <i>dd</i>	3,21 <i>dd</i>	4,5-4,60 <i>m</i>
19	2,38 <i>m</i>	2,38 <i>m</i>	2,37 <i>m</i>	2,38 <i>m</i>	2,39 <i>m</i>	-	2,60 <i>ddd</i>	2,30 <i>m</i>
21a	-	-	-	1,91 <i>m</i>	1,93 <i>m</i>	-	2,06 <i>m</i>	-
21b	-	-	-	*	1,33 <i>m</i>	-	-	-
23	-	-	0,84-0,86	0,94 <i>s</i>	0,98 <i>s</i>	0,99 <i>s</i>	-	0,76 <i>s</i>
24	-	-	0,84-0,86	0,78 <i>s</i>	0,77 <i>s</i>	0,77 <i>s</i>	0,79 <i>s</i>	0,87 <i>s</i>
25	-	-	0,84-0,86	0,83 <i>s</i>	0,84 <i>s</i>	0,86 <i>s</i>	0,85 <i>s</i>	0,86 <i>s</i>
26	1,03 <i>s</i>	1,03 <i>s</i>	0,94 <i>s</i>	1,03 <i>s</i>	1,04 <i>s</i>	1,06 <i>s</i>	1,04 <i>s</i>	0,89 <i>s</i>
27	-	-	1,02 <i>s</i>	0,96 <i>s</i>	0,97 <i>s</i>	0,94 <i>s</i>	0,99 <i>s</i>	0,93 <i>s</i>
28	0,79 <i>s</i>	0,79 <i>s</i>	0,79 <i>s</i>	0,76 <i>s</i>	0,79 <i>s</i>	0,79 <i>s</i>	0,78 <i>s</i>	1,02 <i>s</i>
29	4,57 <i>s</i> , 4,69 <i>s</i>	4,57 <i>s</i> , 4,69 <i>s</i>	4,57 <i>s</i> , 4,68 <i>s</i>	4,56 <i>s</i>, 4,68 <i>s</i>	4,56 <i>m</i> , 4,69 <i>m</i>	-	-	4,58 <i>s</i> , 4,70 <i>s</i>
30	1,68 <i>s</i>	1,68 <i>s</i>	1,68 <i>s</i>	1,67 <i>s</i>	1,69	1,17 <i>d</i>	2,16 <i>s</i>	1,66 <i>s</i>

- 1) Citado 3 β -hidroxi-lupeol (Souza et al., 2001).
 - 2) Citado 3 α -hidroxi-lupeol (Souza et al., 2001).
 - 3) Citado lup-20(29)-eno-3 β -O-hexanoato (Brum et al., 1998).
 - 4) Citado 3 β -OH-lupeol (lupeol) (Reynolds et al., 1986).
 - 5) Citado ácido 3 β -hidroxi-lupan-29-óico (Kotowicz et al., 2005).
 - 6) Citado 29-Nor-20-oxolupeol (Kotowicz et al., 2005).
 - 7) Citado 3 β -(5-hidroxiferuloil)lup-20(29)-eno (Mebe et al., 1998).
- (-) dados não fornecidos.
 (*) sinal encoberto no espectro.

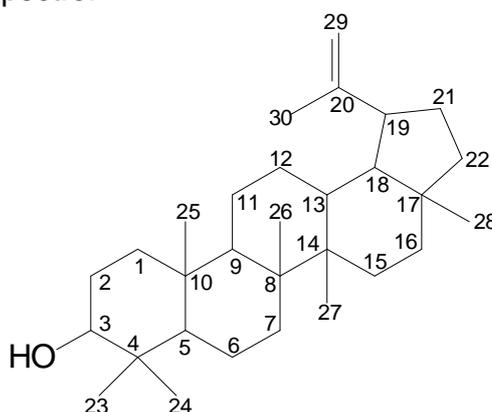


Figura 29: Estrutura química do lupeol (V1).

Tabela 2: Valores de deslocamento de ^{13}C -RMN de V1 e dos compostos 1-6 utilizados como referências (d_c):

C	1	2	3	4	V1	5	6	7	8
	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	Piridina	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3
1	38,4	38,1	38,65	41,6	38,86	38,7	32,5	38,5	38,67
2	23,6	23,7	27,31	28,6	25,18	27,4	25,3	23,8	27,35
3	80,9	80,6	78,92	78,6	79,01	78,9	76,4	81,5	78,94
4	37,6	37,8	38,85	40,4	38,73	38,8	37,6	37,9	38,81
5	55,3	55,3	55,24	55,4	55,35	55,3	48,2	55,5	55,25
6	18,0	18,2	18,28	73,1	18,33	18,3	18,4	18,3	18,28
7	34,3	34,2	34,18	74,3	34,31	34,2	34,4	34,3	34,23
8	40,9	40,8	40,71	46,6	40,86	40,8	41,1	41,0	40,78
9	50,3	50,3	50,25	51,5	50,47	50,4	50,5	50,4	50,38
10	37,1	37,1	37,16	37,4	37,19	37,1	37,3	37,2	37,11
11	20,9	20,9	20,89	21,4	20,95	20,9	21,2	21,0	20,89
12	25,0	25,1	27,17	26,1	27,43	25,1	25,3	25,2	25,08
13	38,0	38,0	-	38,4	38,08	38,0	38,0	38,2	38,00
14	42,9	42,8	43,05	44,7	42,84	42,8	43,0	43,0	42,78
15	27,5	27,4	27,31	31,6	27,46	27,4	27,6	27,6	27,41
16	35,5	35,5	34,96	36,5	35,60	35,5	35,8	35,7	35,54
17	43,0	43,0	42,66	43,1	43,00	43,0	43,2	43,1	42,95
18	48,2	48,3	49,67	48,8	48,33	48,2	48,2	48,4	48,24
19	48,0	48,0	52,25	48,5	47,98	47,9	48,2	48,1	47,94
20	150,9	151,0	-	151,3	150,9	150,9	151,2	151,0	150,88
21	29,8	29,8	27,64	30,3	29,87	29,8	29,9	29,8	29,80
22	40,0	40,0	39,84	40,4	40,01	40,0	40,2	40,1	39,96
23	28,0	27,9	27,98	28,1	27,99	28,0	28,2	28,0	27,95
24	16,5	16,6	15,36	18,24	16,11	15,4	22,4	16,6	15,35
25	16,1	16,2	16,07	17,9	15,99	16,1	16,4	16,1	16,09
26	16,0	15,9	15,90	11,1	15,36	15,9	16,2	16,2	15,94
27	14,4	14,5	14,46	15,5	14,56	14,5	14,7	14,6	14,51
28	18,1	18,0	17,28	18,19	18,00	18,0	18,2	18,1	17,97
29	109,3	109,3	-	109,8	109,31	109,3	109,6	109,5	109,31
30	19,2	19,3	29,15	19,6	19,31	19,3	19,5	19,4	19,28

- 1) Citado acetato de lupeol (Perfeito et al., 2005).
 - 2) Citado lup-20(29)-eno-3 β -O-hexanoato (Brum et al., 1998).
 - 3) Citado 29-Nor-20-oxolupeol (Kotowicz et al., 2005).
 - 4) Citado 3 β ,6 β ,7 β -trihidroxi-20(29)lupeno (Jiang et al., 1995).
 - 5) Citado 3 β -OH-lupeol (lupeol) (Souza et al., 2001).
 - 6) Citado 3 α -OH-lupeol (epilupeol) (Souza et al., 2001).
 - 7) Citado 3 β -(3*R*-acetoxihexadecanoiloxi)-lup-20(29)-eno (Chaturvedula et al., 2004).
 - 8) Citado 3 β -OH-lupeol (lupeol) (Reynolds et al., 1986).
- (-) dados não fornecidos.

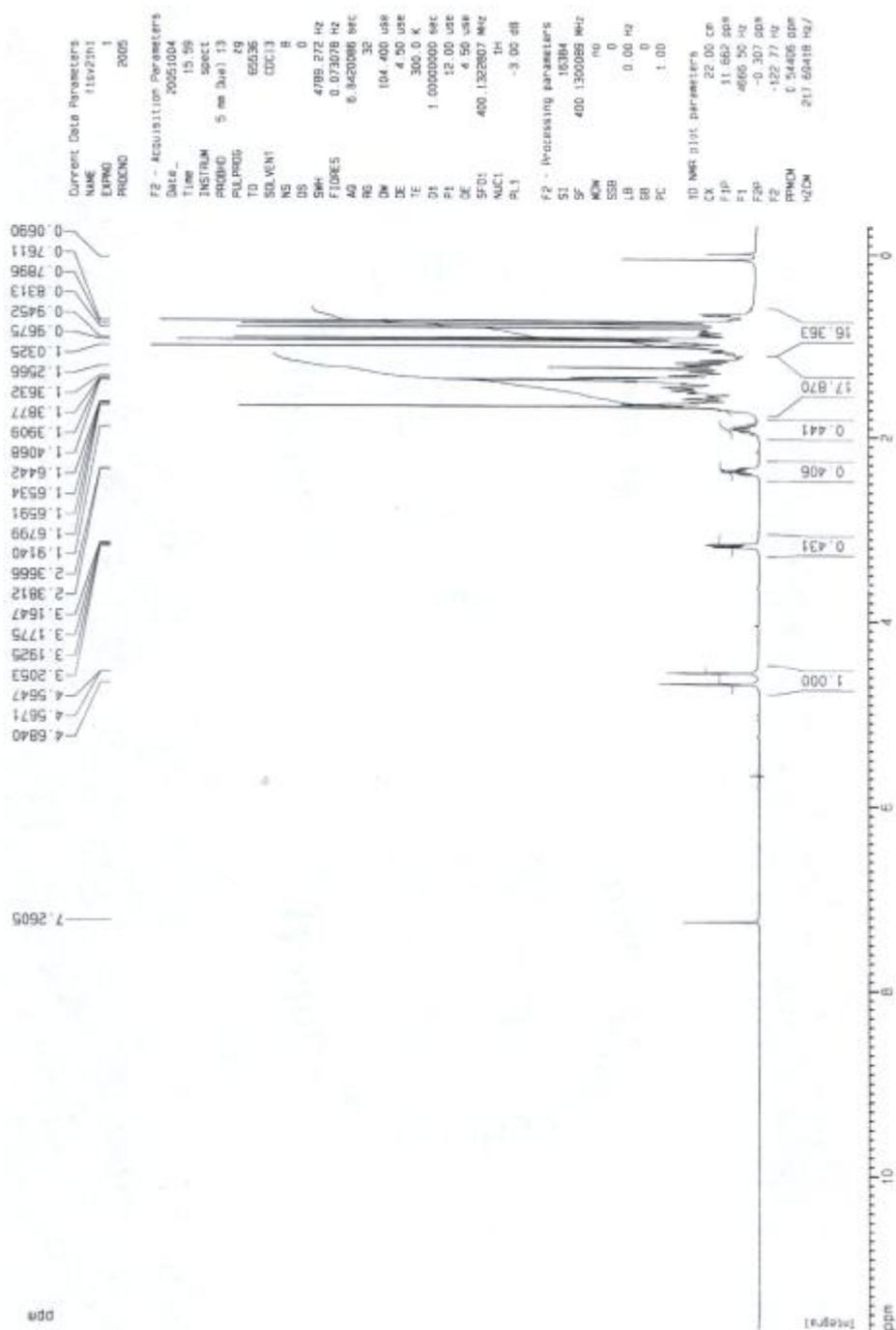


Figura 30: Espectro de ^1H -RMN de V1 em CDCl_3 .

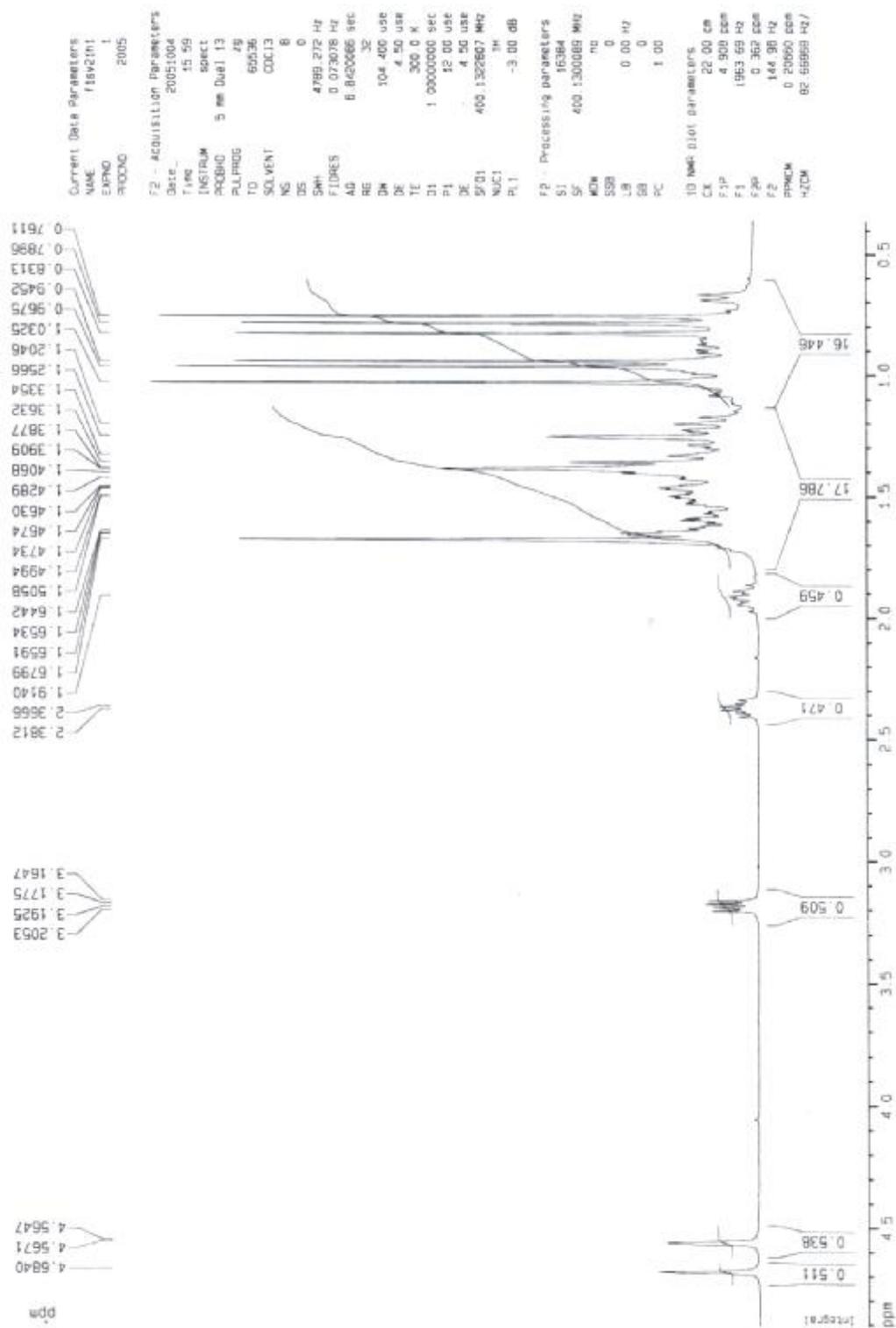


Figura 31: Espectro ^1H -RMN de V1 ampliado, em CDCl_3 .

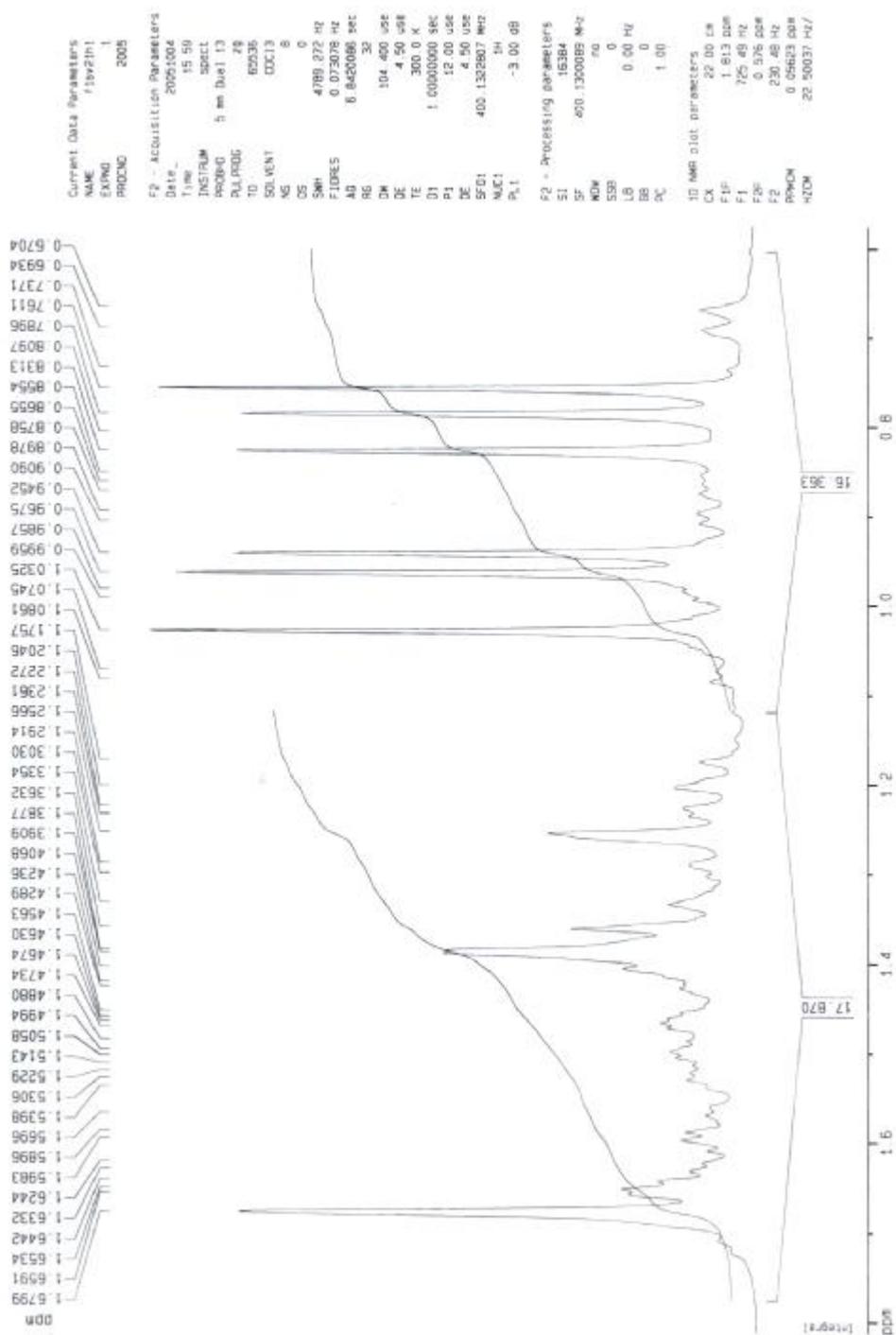


Figura 32: Espectro ^1H -RMN de V1 ampliado na região de campo alto (d_{H} 0,5-2,0 ppm), em CDCl_3 .

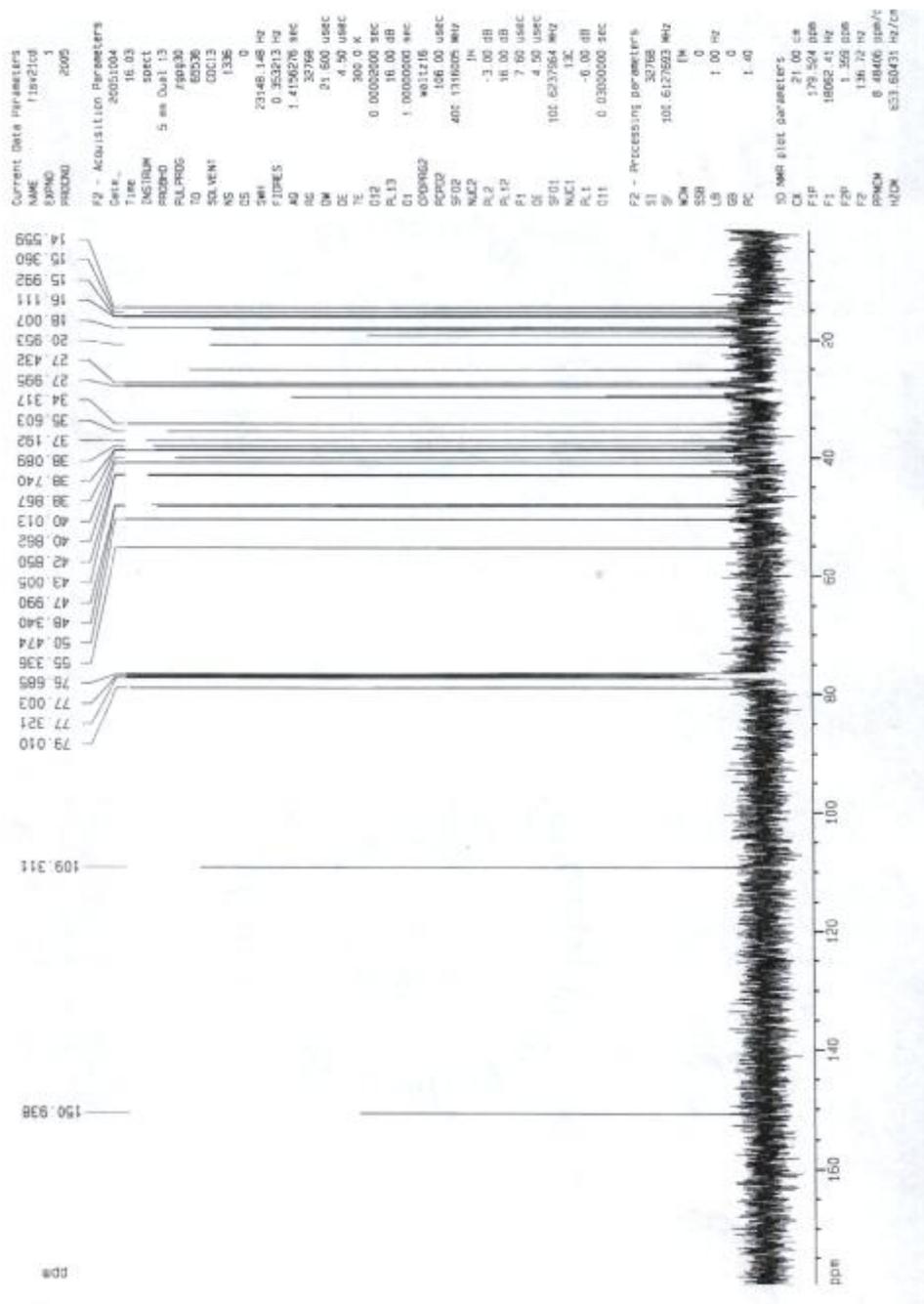


Figura 33: Espectro ^{13}C -RMN de V1, em CDCl_3 .

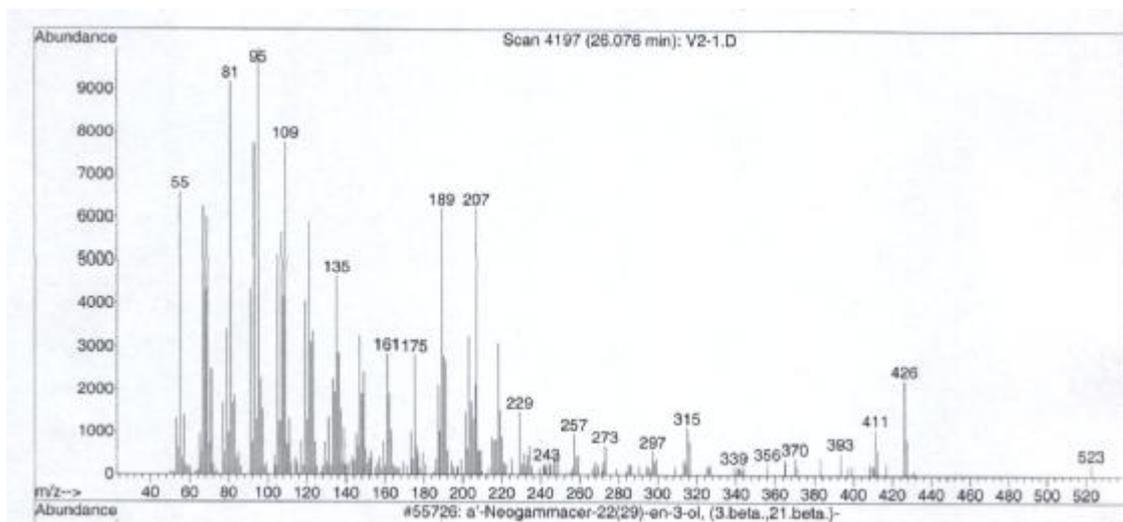


Figura 34: Espectro de massas de V1.

5.2.2. Elucidação estrutural de V2

Da fração diclorometânica do extrato hidro-etanólico das folhas da planta foram isolados, conforme esquematizado na Figura 25 (página 65), 34,0 mg de um composto cristalino branco codificado como V2, que apresentou-se como uma mancha única, de coloração roxa, após migração em CCD e revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento. Em sistema impregando com AgNO_3 a mancha aparece na coloração marrom. Esta amostra foi submetida a espectrometria de massa (CG/EM), infravermelho (IV), ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

Através dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (Figuras 40-44, páginas 92-96) atribuíram-se os deslocamentos químicos e caracterizaram-se os átomos de hidrogênio e carbono que compõem a estrutura do composto. O espectro de ^{13}C -RMN totalmente desacoplado indicou a presença de cinquenta e seis átomos de carbono, sugerindo uma mistura binária de triterpenos, uma vez que quatro desses sinais aparecem em alta intensidade e provavelmente tratam-se de carbonos com mesmos deslocamentos químicos (equivalentes) e ainda pelo fato dos sinais característicos de grupamentos metílicos e metilênicos (10-50 ppm) aparecerem geralmente duplicados, fato este que é característico de isomeria, onde os elementos estruturais são distribuídos de forma muito semelhante diferindo apenas em algumas posições e por isso a maioria dos sinais aparecem duplicados.

Desses sinais, quatro bem desblindados na região de carbonos sp^2 (δ_{C} 121,75; 124,44; 139,60 e 145,18 ppm) sugerem duas duplas ligações. Segundo metodologia descrita por Olea & Roque (1990) sinais nesta região, quando presentes, são altamente característicos de cada esqueleto, pelo menos no caso de triterpenos oxigenados apenas no C-3. Estes sinais são, portanto, muito importantes na elucidação estrutural de misturas de triterpenos. No espectro em questão (V2), a mistura apresentou estruturas pertencentes às séries urseno (δ_{C} 139,18 e 124,44 ppm) e oleaneno (δ_{C} 121,75 e 145,18 ppm) (Aragão et al., 1990; Mendes et al., 1999; Maia et al., 2000; Carvalho et al., 1998; Garai & Mahato 1997; Baykal et al., 1998; Berrondo et al., 2003; Olea & Roque, 1990). São núcleos triterpênicos isoméricos possuíntes de uma dupla ligação entre C-12 e C-13, diferindo somente na posição de uma metila (C-30) em C-19

ou C-20, respectivamente. Os valores de deslocamento confirmam a presença dos dois esqueletos. Para o tipo urso-12-eno em geral o carbono 12 é desblindado (cerca de 2 ppm), enquanto o carbono 13 é blindado (cerca de 5 ppm) em relação às séries olean-12-eno. A diferença entre os dois valores é determinada pela presença do grupamento 19- α -CH₃ (equatorial), que está bem próximo à dupla ligação (efeito γ e $\bar{\gamma}$ para C-13 e C12, respectivamente) nas séries ursan-12-eno, afetando estericamente os valores de deslocamentos destes carbonos (Athayde, 1993). A localização desta metila influencia também o deslocamento de C-18. Quando a posição é no C-19 (α -amirina) C-18 sofre um efeito β a mais (+9,4 ppm) e um efeito γ a menos (-2,5 ppm) em relação à localização da metila em C-20 (β -amirina) (Figura 35). Isto explica a diferença dos deslocamentos químicos observados para C-18 dos isômeros (aproximadamente 12 ppm), que foi de δ_C 59,10 ppm para α -amirina e 47,26 ppm para β -amirina.

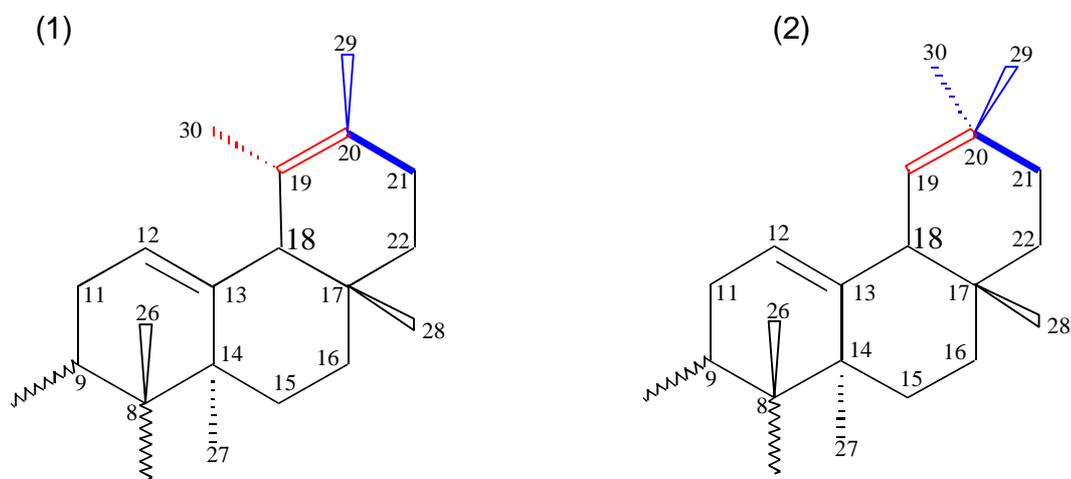


Figura 35: Diferenças de substituintes b e g sobre o deslocamento de C-18 de a-amirina (1) e b-amirina (2).

à efeito β ;

à efeito γ .

O espectro de ¹H-RMN também traz informações importantes para a classificação dos triterpenos presentes na mistura. Hidrogênios olefínicos possuem um deslocamento químico específico na faixa de 4,5 – 7,5 ppm devido ao efeito de desblindagem exercido pela nuvem eletrônica da dupla ligação. Nesta região do

espectro verificam-se dois tripletes em δ 5,19 ($J=3,2$ Hz) e 5,14 ($J=3,2$ Hz) ppm (Figura 36). Pelo fato de um dos carbonos envolvidos na dupla ligação ser quaternário (C-13) e portanto não possuir hidrogênios, conclui-se que os sinais verificados são pertencentes ao hidrogênio de C-12. Este próton acopla com os dois hidrogênios H-11, resultado em um triplete para α -amirina e um para β -amirina. Certifica-se quando se compara com dados da literatura onde estes δ são característicos dos hidrogênios H-12 em urseno (α -amirina) e oleaneno (β -amirina), respectivamente (Carvalho et al., 1998; Souza et al., 2001; Miyase et al., 1996; Aragão et al., 1990; Baykal et al., 1998; Susunaga et al., 2001). Esta diferença é explicada pela presença do grupamento 19- α -CH₃ (equatorial), que exerce efeito sobre H-12 nas séries ursan-12-eno, afetando estericamente o valor de deslocamento deste próton. Como em olean-12-eno esta metila encontra-se no C-20, H-12 não sofre este efeito.

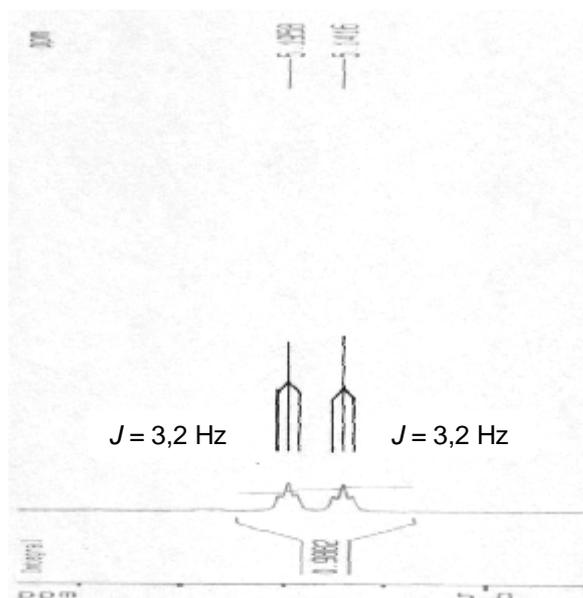


Figura 36: Espectro ¹H-RMN de V2 ampliado (d_H 4,9-5,4 ppm), mostrando os tripletes observados para H-12, em CDCl₃.

Outro sinal característico aparece em δ_C 79,05 ppm. Nesta região do espectro de ¹³C-RMN geralmente os sinais são decorrentes de efeito de desblindagem exercido por oxigênios álcoois. Por razões biossintéticas o C-3 aparece ligado a um oxigênio

(Hansel, 1999; Wagner, 1993; Hartmann, 1998) neste caso a uma hidroxila (OH). Sendo assim, determinou-se que as estruturas possuem um carbono hidroxilado com deslocamento químico em 79,05 ppm, característico de C3-OH (Brum et al., 1998; Jiang et al., 1995; Kotowicz et al., 2005; Olea & Roque, 1990). Este sinal, em relação aos demais, está em alta intensidade, e isto é um indício de que nas estruturas os carbonos oxigenados (C-3) são equivalentes, possuindo o mesmo deslocamento. Este efeito de desblindagem exercido pelo oxigênio afeta também o deslocamento de carbonos vizinhos ao carbono hidroxilado, deslocando-os para campo mais baixo. Esses dados podem contribuir para a determinação da estereoquímica da estrutura molecular do composto.

A comparação com os valores registrados na literatura para α -amirina e β -amirina e derivados destes triterpenos permitiu determinar a conformação da hidroxila em C-3. Observou-se que quando a hidroxila está em posição 3- α o deslocamento de C-3 ocorre em torno de 75 ppm (Souza et al., 2001; Carvalho et al., 1998; Olea & Roque, 1990) valor este não observado no espectro. No entanto, o deslocamento observado foi de δ_C 79,05 ppm, que é compatível com a função OH em conformação β (Jiang et al., 1995; Mebe et al., 1998; Chaturvedula et al., 2004; Olea & Roque, 1990). Os deslocamentos dos hidrogênios e carbonos vizinhos a esta hidroxila comprovam esta informação. Como os valores de δ_C para C-1 foram 38,78 e 38,8 ppm para α -amirina e β -amirina, respectivamente, e o sinal em δ_C 55,21 ppm (também duplicado) correspondente a C-5, estes dados indicam que a hidroxila está em mesmo plano e assim interage com esses carbonos deslocando-os para campo mais baixo. Caso estivessem em posições estereoquímicas opostas os deslocamentos seriam em torno de 34,0 (C-1) e 49,5 (C-5) por não sofrerem efeito de desblindagem do oxigênio (Carvalho et al., 1998) (Tabelas 4 e 5, páginas 89 e 90). Os dados de literatura de ^1H -RMN também contribuem para a determinação da conformação de H-3, e conseqüentemente de OH-3. Quando H-3 está na posição β , seu deslocamento ocorre em δ_H 3,40 (*m*). Como o deslocamento observado no espectro foi δ_H 3,23 ppm (*m*), e é característico de H-3 em α (Souza et al., 2001; Carvalho et al., 1998), conclui-se que a posição da hidroxila é β em ambos os isômeros, não exercendo, assim, efeito γ (gama)

de proteção (redução do deslocamento) sobre os carbonos C-1 e C-5 (Jiang et al., 1995; Carvalho et al., 1998; Aragão et al., 1990) e o H-3 em α .

Pelo fato de C-3 estar ligado à uma hidroxila, H-3 sofre efeito de desblindagem exercido pelo oxigênio (eletronegativo) apresentando um δ_H em torno de 3,23 ppm. Este hidrogênio faz acoplamento com os dois hidrogênios H-2 (H-2a e H-2b). Como a hidroxila estereoquimicamente está mais próxima de um dos prótons, este sofre um pequeno deslocamento para frequência mais alta (δ_H 3,24, *d*) enquanto que o outro não sofre tanto este efeito adicional de desblindagem e aparece como dubleto em δ_H 3,21 ppm (Aragão et al., 1990). Assim, se comportam como hidrogênios diferentes e por este motivo o sinal de H-3 aparece como duplo dubleto (*dd*) e não como um tripleto. Estes sinais para α -amirina e β -amirina foram equivalentes (sobreponíveis).

O espectro de $^1\text{H-RMN}$ mostrou doze sinais de metilas na forma de singletes de alta intensidade em campo alto (mais blindado). Desses, quatro aparecem com maior intensidade: δ_H 0,80; 0,88; 1,01 e 1,27 ppm, indicando que se tratam de prótons equivalentes entre as estruturas, resultando nas dezesseis metilas existentes na mistura (oito para cada isômero). Atribuíram-se os valores de deslocamento químico (δ) por comparação com dados encontrados na literatura (Tabela 6, página 91). Os δ para essas metilas foram δ_H 0,80 (30, 3H), 0,81 (H-29 β , 3H), 0,85 (H-29 α , 3H), 0,88 (H-26, 3H), 0,95 (H-28 β , 3H), 0,96 (H-28 α , 3H), 0,98 (H-27 β , 3H), 1,01 (C-24, 3H), 1,02 (C-27 α , 3H), 1,08 (H-26 β , 3H), 1,14 (H-26 α) e 1,27 ppm (H-23, 3H). Esta última, em 1,27 ppm (referente ao H-23) aparece mais desblindada por estar próxima a hidroxila, que exerce este tipo de efeito. H-24, apesar de estar também ligado ao C-4, não sofre tanto este efeito pois está em posição estereoquímica oposta à hidroxila deslocando-se em δ_H 1,01 ppm.

Tratando-se de uma mistura, os sinais nos espectros podem trazer informações acerca das proporções de cada componente. Tanto o espectro de carbono como o de hidrogênio mostram que não existem picos que aparecem em maiores intensidades. Devido ao espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ possuir muitos sinais, o $^1\text{H-RMN}$ pôde ser melhor explorado. Como foi discutido anteriormente, H-12 aparece com deslocamentos químicos diferentes para α -amirina (δ_H 5,19 ppm) e β -amirina (δ_H 5,14 ppm). Verificou-

se que as intensidades destes sinais são idênticas e isto possibilita afirmar que os compostos estão na proporção de 1:1 na mistura (Vieira et al., 2005). Este dado está de acordo com o obtido no cromatograma por CG, onde foi possível observar dois picos com tempos de retenção de 25,28 e 26,07 minutos, sendo que as proporções entre eles é muito semelhante 1:1 (verificadas pelas áreas dos picos).

Os demais sinais no espectro de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN apareceram em campo alto e foram atribuídos aos carbonos por comparação com dados da literatura, sendo os valores determinados para a mistura V2 sobreponíveis aos valores de compostos derivados de α -amirina e β -amirina, contribuindo para as suas detecções na planta em estudo (Tabelas 3-5, páginas 88-90).

O espectro de infravermelho (IV) forneceu importantes informações acerca dos grupos funcionais que compõem a estrutura do composto analisado. Uma banda forte ocorreu em 2950 cm^{-1} e é característico de deformação axial de C-H sp^3 , bastante comum em compostos orgânicos. Outra absorção destacável ocorreu em 3300 cm^{-1} . Esta absorção aparece como um pico largo característico da deformação axial de O-H associado (ligação hidrogênio de álcoois). Ainda, o pico mais intenso do espectro ocorreu em 1050 cm^{-1} , região onde absorve a função C-O de álcoois. Outros sinais na faixa de 1700 a 700 cm^{-1} são decorrentes de deformações angulares e axiais de alcanos (C-C e C-H). Destacam-se também, a banda de baixa intensidade em 1650 cm^{-1} que é característica de deformação axial de C=C; e ainda as bandas em 1465 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} que são deformações angulares de CH_2 e CH_3 , respectivamente (Figura 37).

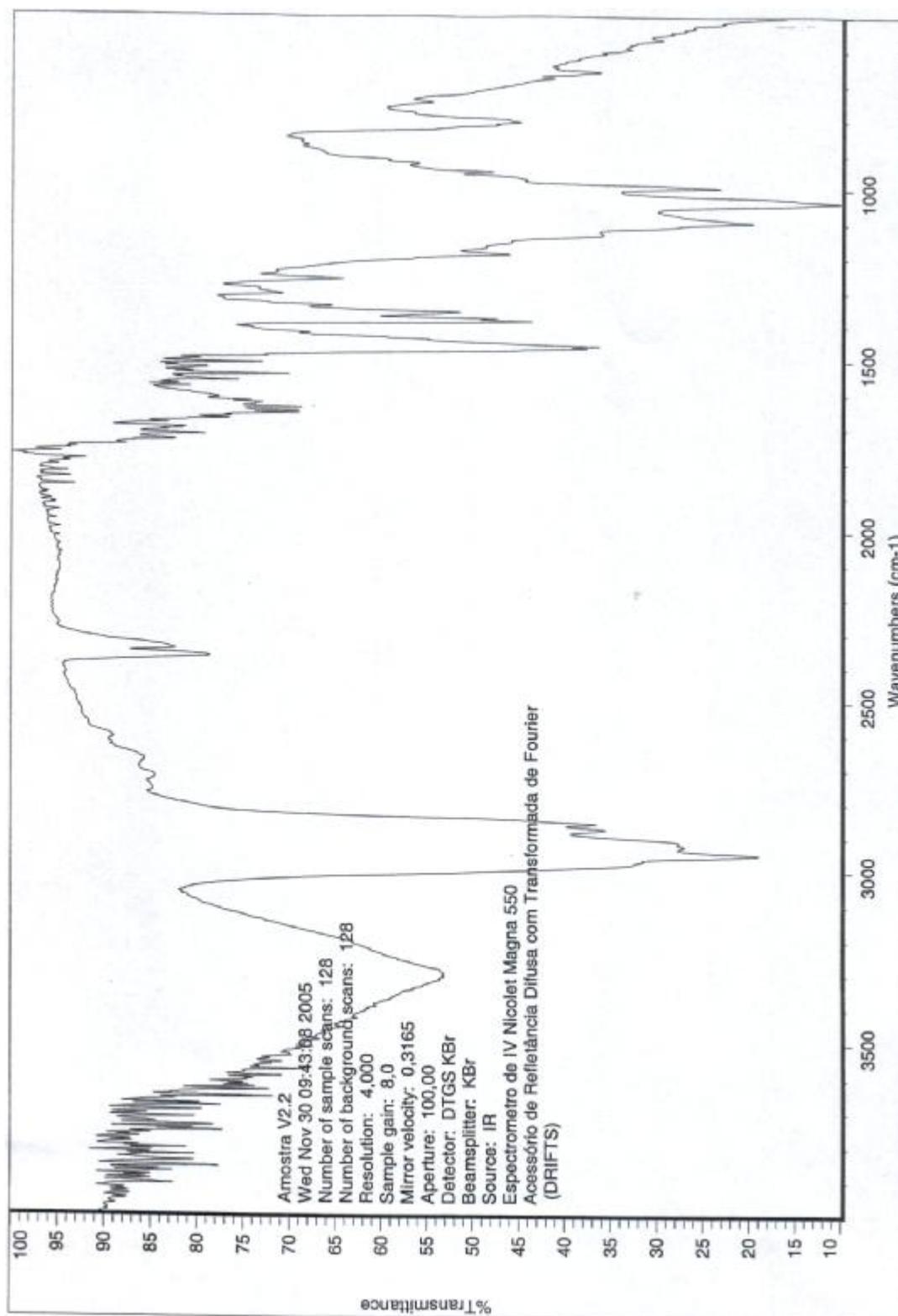


Figura 37: Espectro de IV de V2, em pastilhas de KBr.

Na análise por CG foi possível observar dois picos com tempos de retenção de 25,28 e 26,07 minutos. Os espectros de massas por impacto eletrônico (Figura 39, página 91) dos compostos foram muito semelhantes. Mostraram picos em m/z 426 u.m.a, que correspondem aos picos dos íons moleculares dos isômeros α e β -amirina. Outros picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder do anel C são típicos de olean-12-enos e ursan-12-enos, principalmente os de maiores intensidades como os m/z 218; 203 e 189 u.m.a (Mendes et al., 1999; Ogunkoia et al., 1981). Este tipo de fragmentação resulta na formação do íon pico base com m/z 218 u.m.a., que retém a carga por produzir um fragmento dieno, que tem a propriedade de estabilizar melhor a carga por mesomeria (Ogunkoia et al., 1981). O esquema de fragmentação de V2 está mostrado na figura 38.

Com base nos dados obtidos em todos os espectros é possível propor para a mistura V2 dois compostos com fórmulas moleculares $C_{30}H_{50}O$ (isômeros). Para essa fórmula molecular tem-se um grau de insaturação igual a seis. Uma vez que os espectros de RMN indicaram a presença de somente uma insaturação, conclui-se que os compostos apresentam cinco anéis. Portanto, estes dados nos permitem afirmar que a amostra V2 isolada do extrato diclorometânico é constituída de uma mistura de dois triterpênos álcoois pentacíclicos portadores de uma insaturação: α -amirina (V2.1 - V3 β -hidroxiurs-12-eno) e β -amirina (V2.2 - 3 β -hidroxiolean-12-eno).

Substância V2: Cristal branco. Rf=0,34 (gel de sílica F₂₅₄; CH₂Cl₂:Hexano 95:5; visualização após nebulização com anisaldeído sulfúrico – mancha roxa). IV (KBr) ν_{max} 3300, 2950, 2460, 1650, 1450, 1040, 800 cm⁻¹. EM/IE 70 eV, m/z 426 [M⁺] (10), 411 (7), 369 (8), 343 (12), 311 (7), 272 (7), 231 (6), 218 (100), 204 (8), 189 (15), 175 (19), 109 (31), calculado para $C_{30}H_{50}O$ 426 g (Figura 39, página 91). Para ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) e ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) ver tabelas 3-6.

Substância V2: Cristal branco. Rf=0,34 (gel de sílica F₂₅₄; CH₂Cl₂:Hexano 95:5; visualização após nebulização com anisaldeído sulfúrico – mancha roxa). IV (KBr) ν_{max} 3300, 2950, 2460, 1650, 1450, 1040, 800 cm⁻¹. EM/IE 70 eV, m/z 426 [M⁺] (3), 411 (1), 369 (2), 343 (2), 281 (7), 218 (100), 203 (44), 189 (15), 175 (7), 135 (10), 107 (19), 81 (21) calculado para $C_{30}H_{50}O$ 426 g (Figura 39, página 91). Para ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) e ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) ver tabelas 3-6.

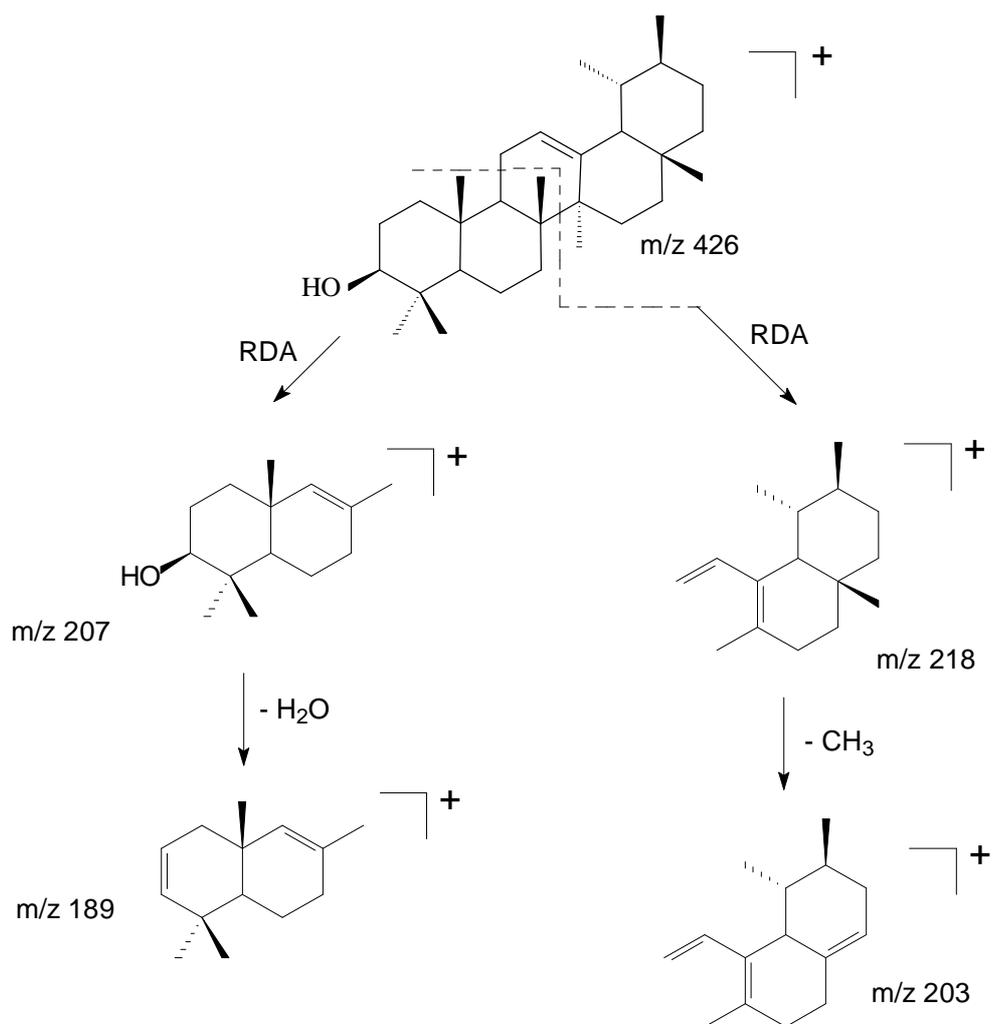


Figura 38: Proposta de fragmentação para a e b-amirina.

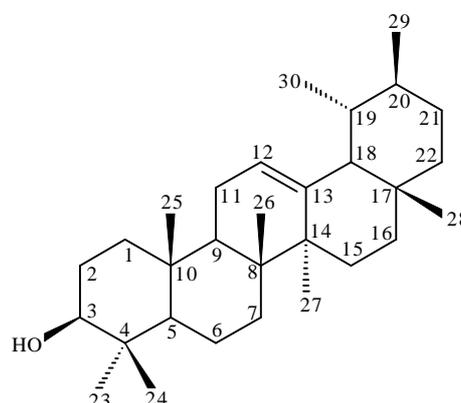
Tabela 3: Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN de V2 (mistura) e do composto referência (d_c), de campo baixo para campo alto, ambos em CDCl_3 :

N^oC	V2	REF	N^o	V2	REF
1	145,19	145,1	31	32,97	32,9
2	139,60	139,3	32	32,69	32,8
3	124,45	124,3	33	32,49	32,5
4	121,75	121,8	34	31,27	31,2
5	79,05	78,3	35	31,07	31,1
6	79,05	79,0	36	29,69	28,7
7	59,11	58,9	37	28,74	28,4
8	55,22	55,2	38	28,39	28,2
9	55,22	55,3	39	28,13	28,1
10	47,75	47,7	40	28,11	28,1
11	47,66	47,7	40	27,29	27,3
12	47,27	47,4	42	27,25	27,2
13	46,86	46,9	43	26,97	27,0
14	42,11	42,0	44	26,64	26,6
15	41,75	41,8	45	26,18	26,2
16	41,55	41,5	46	25,99	26,0
17	40,05	40,0	47	23,69	23,6
18	39,83	39,6	48	23,54	23,6
19	39,68	39,6	49	23,38	23,3
20	39,62	38,8	50	23,28	23,3
21	38,82	38,8	51	21,38	21,3
22	38,78	38,7	52	18,37	18,5
23	38,78	38,7	53	17,46	18,3
24	38,62	38,7	54	16,88	17,4
25	37,16	37,6	55	16,82	16,9
26	36,97	37,2	56	15,67	15,8
27	36,92	36,9	57	15,61	15,6
28	34,76	34,8	58	15,57	15,6
29	33,76	33,7	59	15,49	15,6
30	33,33	33,1	60	15,49	15,5

REF - Citado da mistura de α e β -amirina (Mendes et al., 1999).

Tabela 4: Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN de V2 atribuídos à α -AMIRINA e dos compostos 1-6 tidos como referências (d_c):

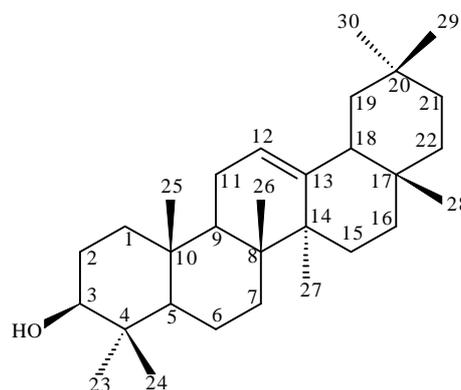
C	1	2	3	V2-a	4	5	6
1	38,7	38,5	38,27	38,78	38,7	39,6	38,8
2	27,2	27,7	26,78	27,25	27,2	34,0	27,3
3	78,2	80,9	78,57	79,05	78,3	216,7	78,8
4	38,8	42,0	38,11	38,62	38,7	47,2	38,8
5	55,2	55,8	54,70	55,21	55,2	55,4	55,4
6	18,3	18,6	17,86	17,46	18,3	19,8	18,4
7	33,0	33,1	32,17	32,96	32,9	32,5	33,0
8	39,5	40,0	39,19	39,82	40,0	40,1	39,6
9	47,5	47,7	47,23	47,66	47,7	48,2	47,5
10	36,9	36,6	36,44	36,92	36,9	36,7	37,0
11	17,1	23,6	22,89	23,37	23,3	23,5	23,3
12	125,2	124,2	123,95	124,4	124,3	124,3	125,5
13	138,3	139,6	139,10	139,6	139,3	139,8	138,0
14	42,0	42,7	41,26	41,74	42,0	42,3	42,0
15	28,2	28,0	27,68	28,13	28,7	28,2	28,2
16	24,2	26,6	26,49	26,44	26,6	26,5	24,3
17	47,5	33,7	33,26	33,75	33,7	-	48,1
18	52,7	59,0	58,63	59,10	58,9	59,3	52,8
19	39,1	39,5	39,15	39,62	39,6	39,8	39,1
20	38,8	39,6	39,15	39,68	39,6	39,8	38,8
21	30,7	31,2	31,82	32,49	31,2	31,1	30,7
22	36,7	41,5	41,05	41,54	41,5	41,6	36,7
23	28,0	22,4	27,89	28,74	28,1	26,6	28,2
24	15,7	64,5	15,17	15,57	15,6	21,5	15,5
25	15,4	16,2	15,17	15,61	15,6	15,5	15,7
26	17,0	16,7	16,39	16,82	16,8	16,9	16,9
27	23,5	23,2	23,20	23,69	23,3	23,3	23,6
28	179,9	28,7	28,25	29,68	28,1	28,8	177,7
29	23,2	17,5	16,39	16,88	17,4	17,5	16,9
30	21,2	21,4	20,89	21,37	21,3	21,5	21,2



- 1) Citado do ácido 3 β -hidroxiurs-12-eno-28-óico (Lin et al., 1987, CDCl_3).
 - 2) Citado do 3 β ,24-dihidroxiurs-12-eno (Susunaga et al., 2001, CDCl_3).
 - 3) Citado do 3 β -hidroxiurs-12-eno (Maia et al., 2000, CDCl_3).
 - 4) Citado do 3 β -hidroxiurs-12-eno (Wehrli et al., 1979 apud MENDES, 1999, CDCl_3).
 - 5) Citado α -amirenona (Olea & Roque, 1990, CDCl_3).
 - 6) Citado do ácido 3 β -hidroxiurs-12-eno-28-óico (Seo et al., 1975, CDCl_3).
- dados não fornecidos.

Tabela 5: Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN de V2 atribuídos à b-AMIRINA e dos compostos 1-6 tidos como referências (d_c):

C	1	2	3	V2- β	4	5	6
1	39,4	38,8	38,7	38,78	38,27	38,8	38,8
2	34,2	26,5	27,2	26,64	26,49	26,7	27,9
3	216,7	88,9	79,6	79,05	78,54	91,4	78,0
4	47,3	39,6	38,7	38,82	38,14	44,0	39,3
5	55,3	55,9	55,1	55,21	54,75	56,3	55,7
6	19,8	18,6	18,3	18,37	17,96	18,6	18,7
7	32,2	33,2	32,8	31,26	30,78	33,4	33,2
8	39,7	40,0	39,9	40,04	39,34	40,1	39,6
9	46,9	48,1	47,7	47,74	47,28	47,9	48,0
10	36,7	37,0	39,6	36,97	36,46	36,6	37,3
11	23,6	23,9	23,6	23,54	23,04	24,1	23,7
12	121,6	123,3	121,6	121,75	121,26	122,4	122,5
13	145,2	144,2	145,2	145,18	144,68	144,9	144,7
14	41,9	42,2	41,7	42,10	41,62	42,5	42,1
15	27,0	28,3	26,1	28,11	27,64	26,5	28,2
16	26,1	23,5	26,9	26,17	26,16	28,9	23,7
17	32,3	47,1	33,7	32,68	31,99	38,0	46,6
18	47,4	41,8	47,6	47,26	47,18	45,5	41,9
19	46,8	46,3	46,7	46,86	46,37	46,9	46,4
20	31,3	30,8	31,1	31,07	30,57	30,9	30,8
21	34,8	34,1	34,7	34,75	33,26	42,4	34,1
22	37,2	32,6	37,1	37,16	33,68	75,7	33,2
23	26,2	28,3	28,4	28,39	27,89	23,0	28,2
24	21,1	16,8	15,6	15,49	15,12	63,6	16,4
25	15,3	16,7	15,7	15,49	15,12	15,9	15,4
26	16,7	17,6	16,9	15,66	16,34	17,1	17,3
27	25,9	26,1	26,1	25,98	25,56	25,7	26,1
28	28,5	176,6	28,8	27,29	27,64	28,7	180,1
29	33,4	33,2	33,4	33,32	32,83	33,2	33,2
30	23,7	23,7	23,6	23,27	22,78	21,0	23,7



- 1) Citado do β -amirenona (Olea & Roque, 1990, CDCl_3).
- 2) Citado do 3-O-[β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil] ácido oleanólico-28-O-[β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil (Khalik et al., 2000, Piridina).
- 3) Citado do 3 β -hidroxiolean-12-eno (Carvalho et al., 1998, CDCl_3).
- 4) Citado do 3 β -hidroxiolean-12-eno (Maia et al., 2000, CDCl_3).
- 5) Citado do 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-24,22-dihidroxiolean-12-eno (Mohamed et al., 1995, Piridina).
- 6) Citado do ácido 3 β -hidroxiolean-12-eno-29-óico (Adesina et al., 1985, CDCl_3).

Tabela 6: Valores espectroscópicos de ^1H -RMN de H-3 e H-12 de V2 e dos compostos 1 e 2 tidos como referências (d_{H}):

H	1	V-2	2
H-3	3,23, <i>dd</i> , $J=6,3$ e 9 Hz	3,23, <i>m</i>	3,22, <i>dd</i>
H-12	5,19, <i>m</i> (α); 5,14, <i>m</i> (β)	5,19, <i>t</i> $J = 3,2\text{Hz}$ (a); 5,14, <i>t</i> $J = 3,2\text{Hz}$ (b)	5,20, <i>t</i> (α); 5,15, <i>t</i> (β)

- 1) Citado como mistura de α -amirina e β -amirina (Aragão et al., 1990, CDCl_3).
2) Citado como mistura de α -amirina e β -amirina (Vieira et al., 2005, CDCl_3).

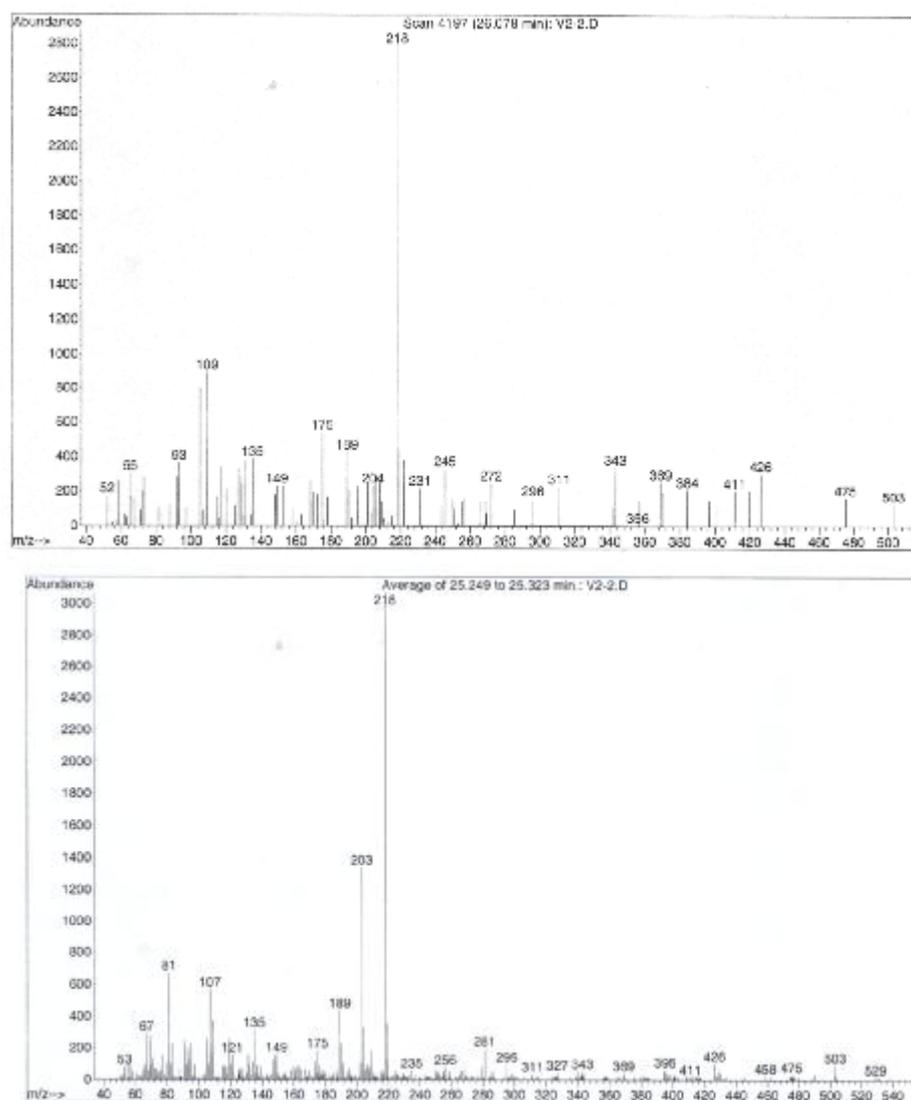


Figura 39: Espectros de massas de V2.1 e V2.2.

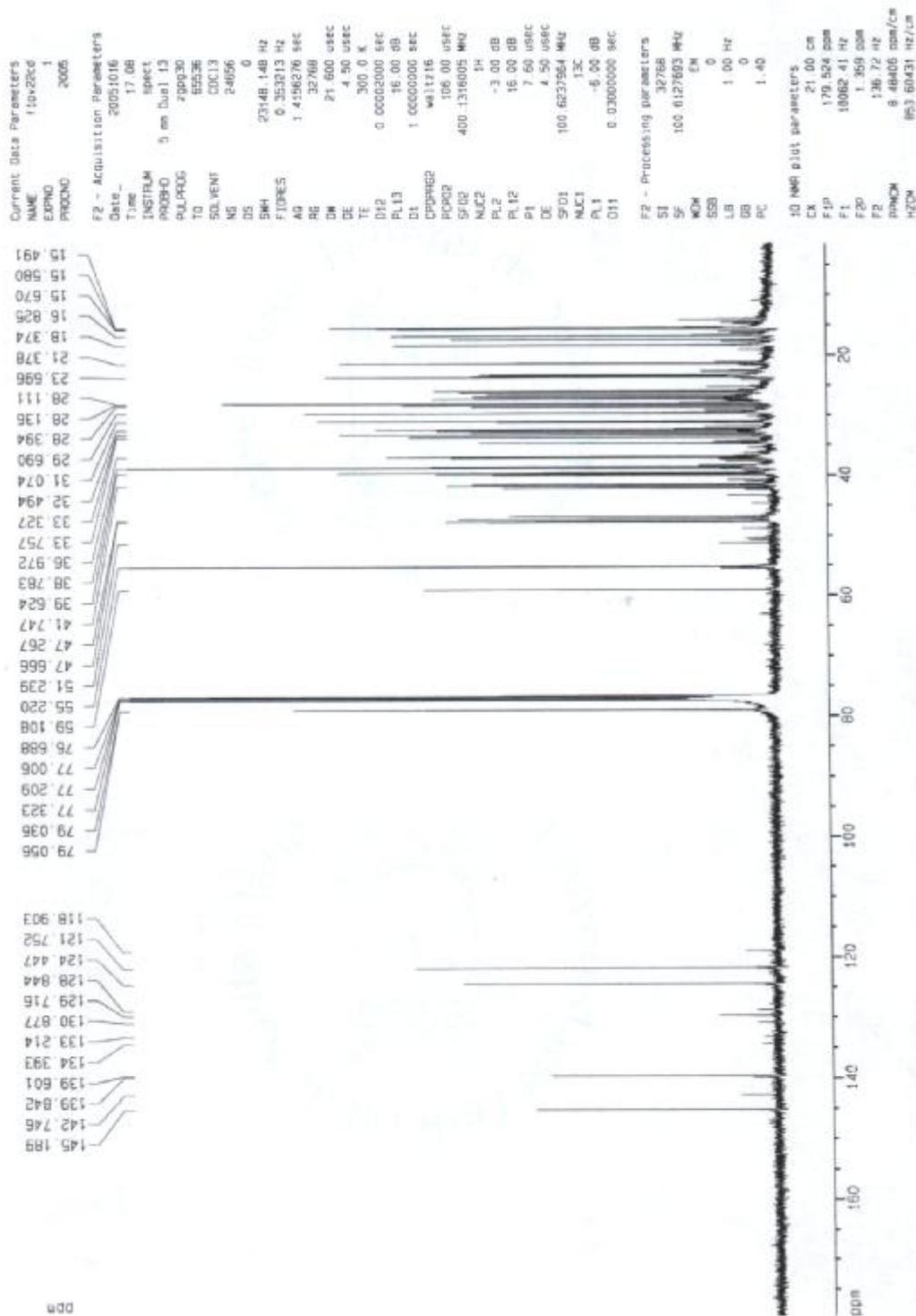


Figura 40: Espectro de ^{13}C -RMN de V2, em CDCl_3 .

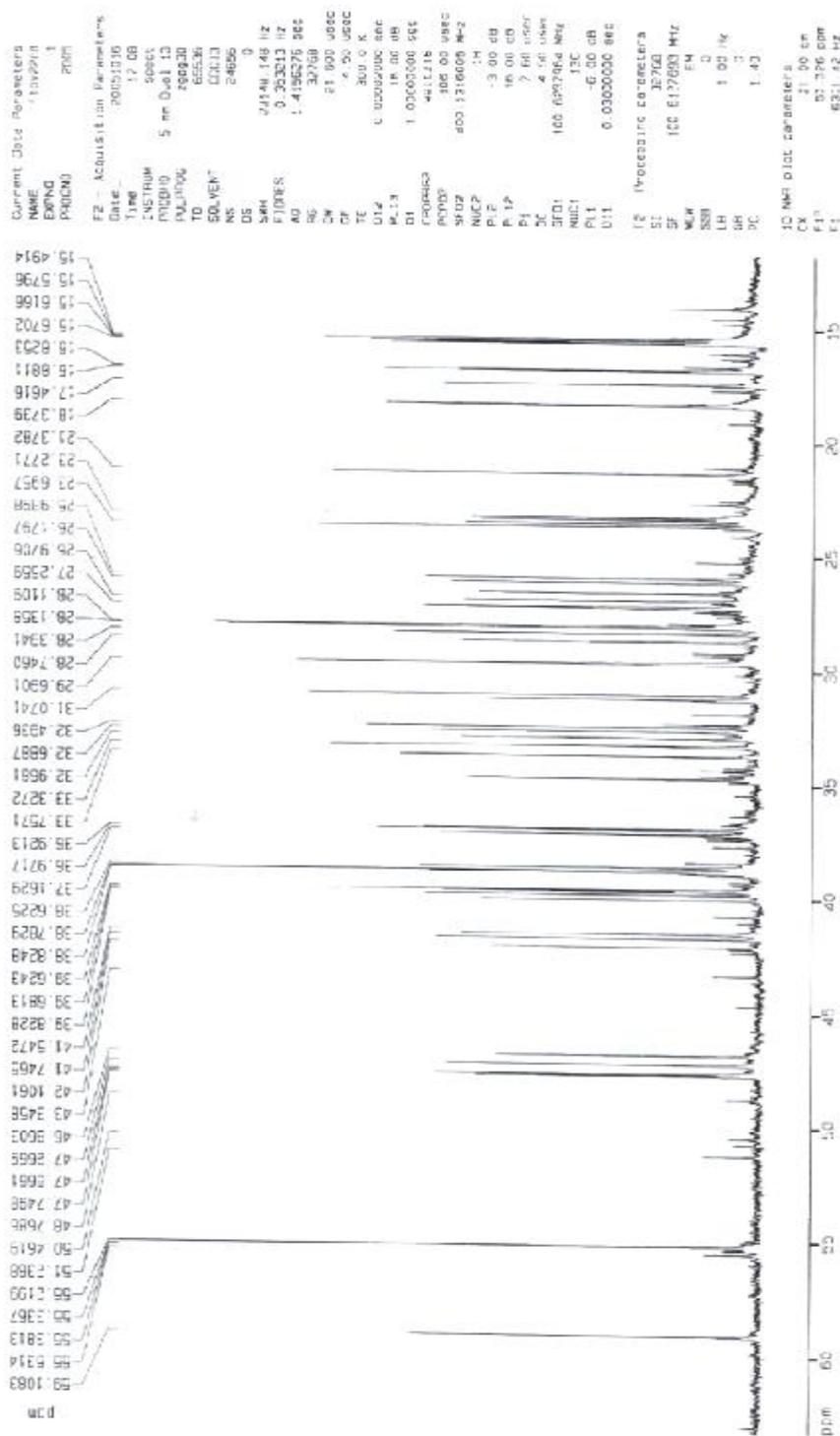


Figura 41: Espectro de ^{13}C -RMN ampliado de V2 (dc 10-65 ppm), em CDCl_3 .

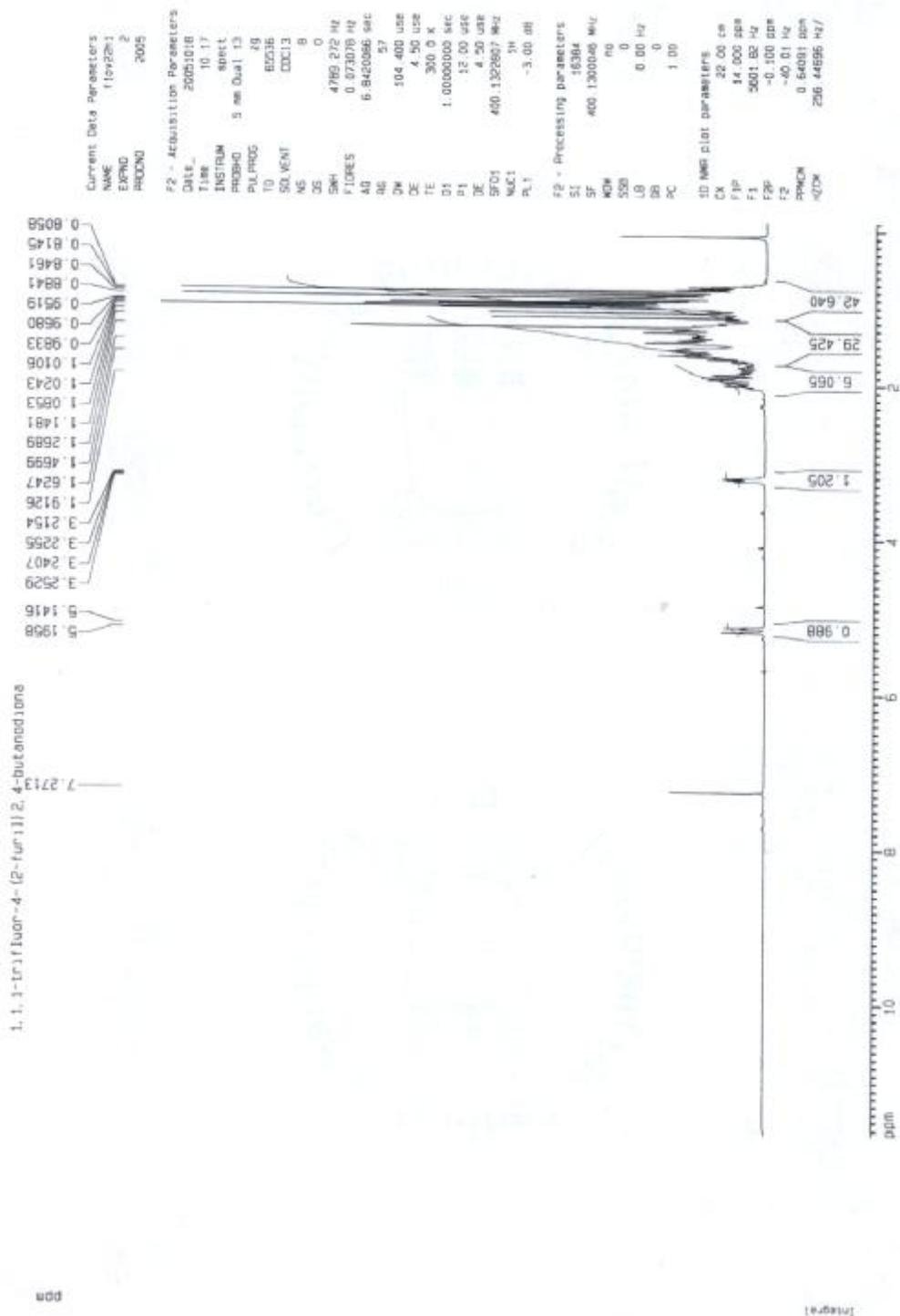


Figura 42: Espectro de ^1H -RMN de V2, em CDCl_3 .

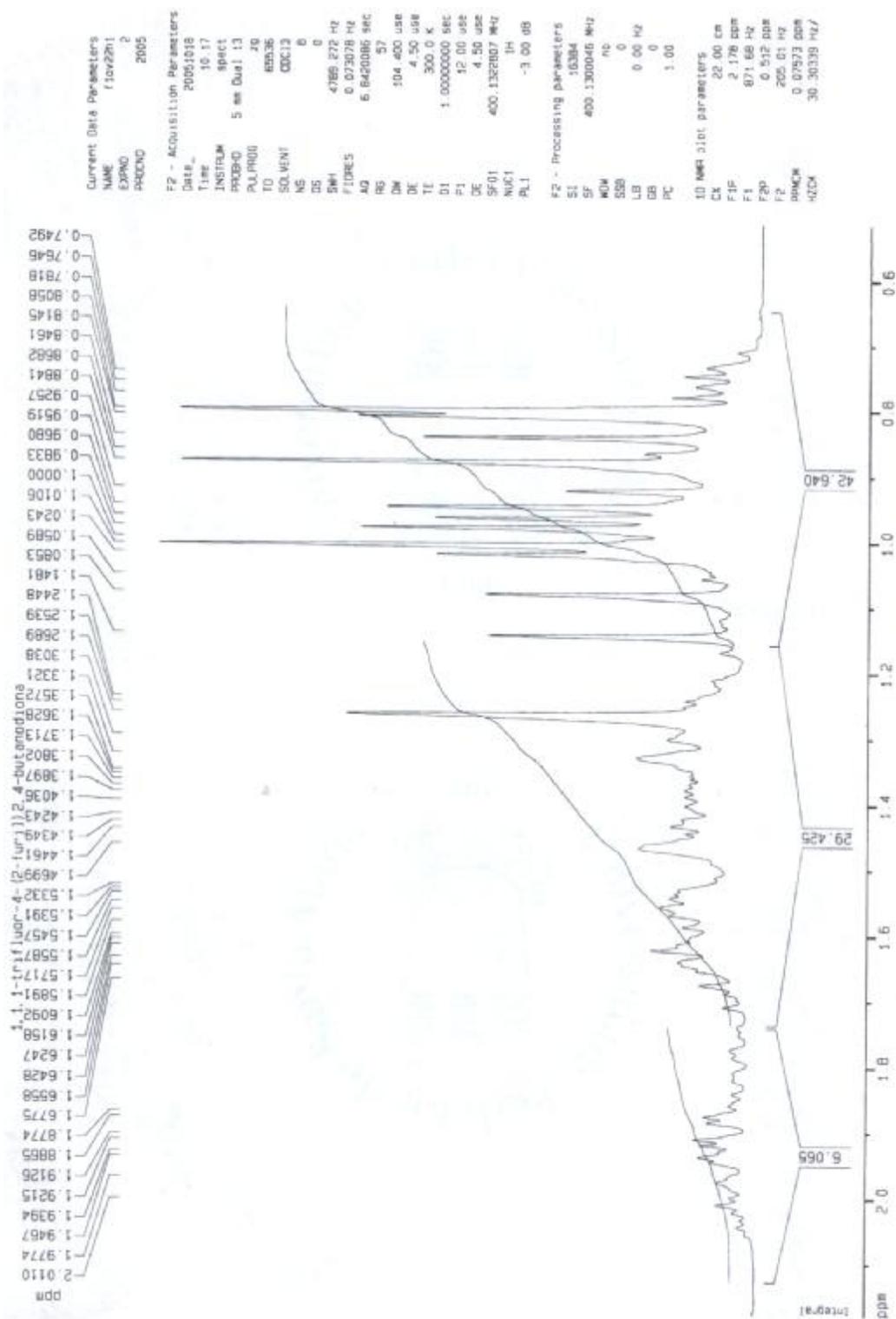


Figura 43: Espectro ^1H -RMN ampliado de V2 (d_H 0,5-2,1 ppm), em CDCl_3 .

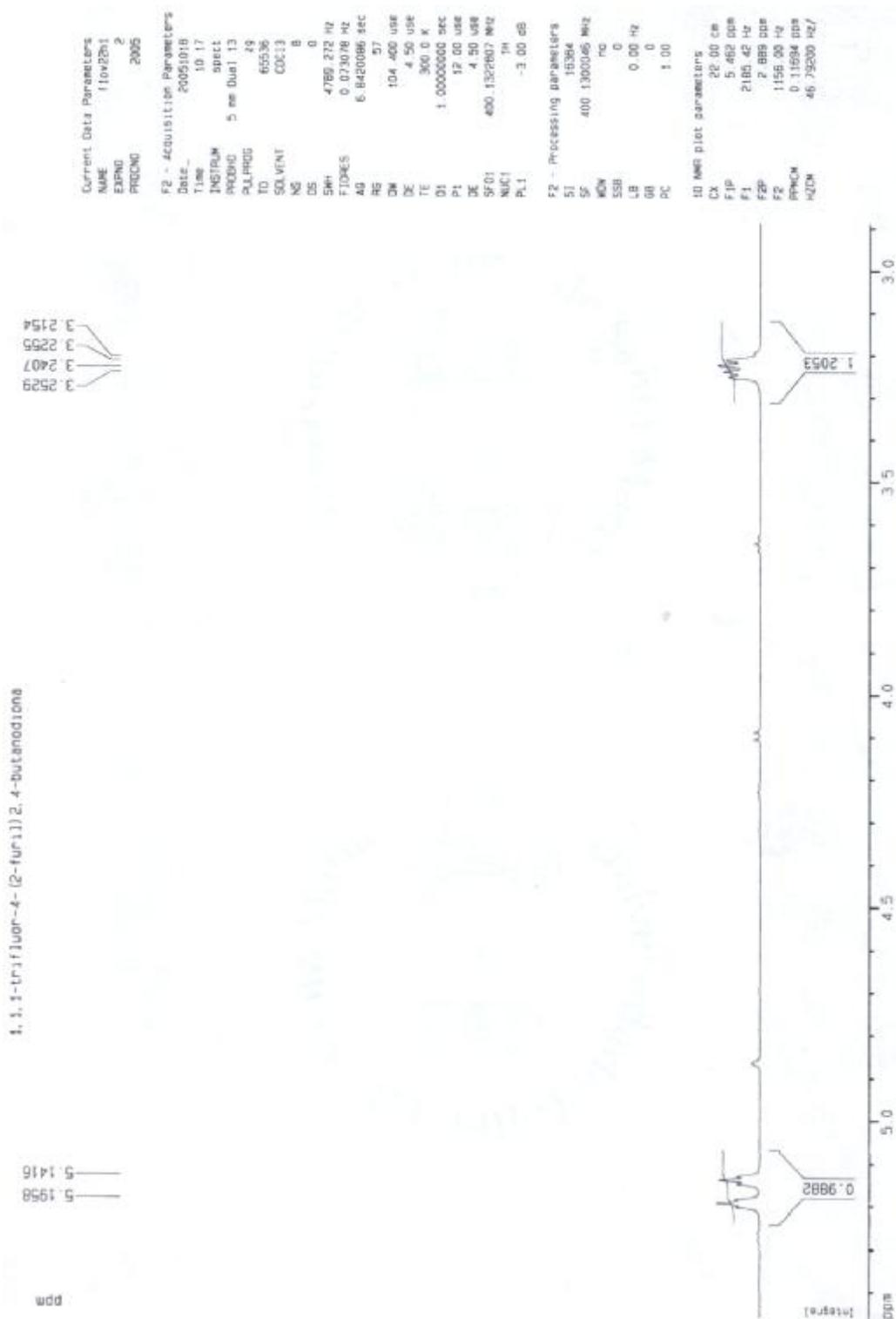


Figura 44: Espectro ^1H -RMN ampliado de V2 (d_H 3,0-5,4 ppm), em CDCl_3 .

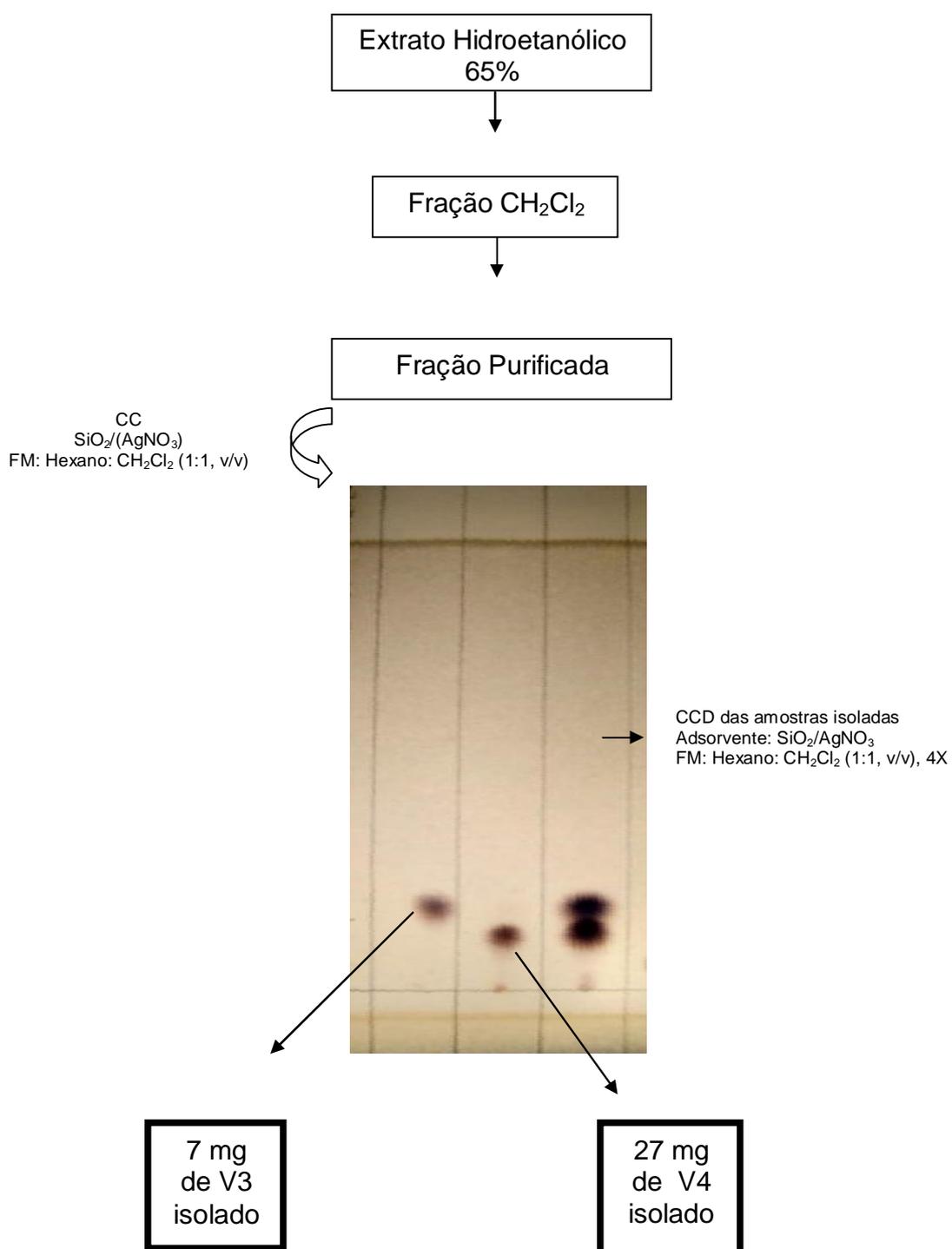


Figura 45: Esquema de isolamento e purificação dos esteróides da fração diclorometânica das folhas de *Vernonia tweediana* Baker.

5.2.3. Elucidação Estrutural de V3

Do fracionamento da fração diclorometânica do extrato hidro-etanólico das folhas da planta foram isolados 7 mg de um composto cristalino branco codificado como V3. Esta amostra foi submetida a espectrometria de massa (CG/EM), infravermelho (IV) ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

Através dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (Figuras 51 e 52, páginas 107 e 108) atribuiu-se os deslocamentos químicos e caracterizou-se os átomos de hidrogênio e carbono que compõem a estrutura do composto. O espectro de ^{13}C -RMN totalmente desacoplado indicou a presença de um componente majoritário, uma vez que 29 sinais apareceram em alta intensidade em relação a um interferente. Portanto, supõe-se que 29 átomos de carbonos compõem a estrutura de V3. Desses sinais, quatro bem desblindados na região de carbonos sp^2 (δ_{C} 117,46; 129,48; 138,15 e 140,78 ppm) sugerem a presença de duas duplas ligações. Segundo dados de literatura, estes sinais são característicos de compostos com esqueletos esteroidais ramificados, especificamente do tipo espinasterol, quando uma das insaturações está localizada entre C-7 e C-8 (δ_{C} 117,46 e 138,15 ppm) e a outra entre C-22 e C-23 (δ_{C} 129,48 e 140,78 ppm) (Itoh et al., 1981; Gomes & Alegrio, 1998; Souza et al., 2001). A comparação dos dados obtidos com os já publicados excluíram algumas hipóteses e permitiram propor a estrutura deste composto esteroideal (Tabelas 7-10, páginas 102-106).

O espectro de ^{13}C -RMN apresentou um sinal em δ_{C} 71,07 ppm, característico de carbono portador de oxigênio. Nesta região do espectro geralmente os sinais são decorrentes de efeito de desblindagem exercido por oxigênios álcoois sobre os carbonos α (acrécimo de 35-52 ppm). Um efeito importante observado em anéis rígidos de derivados do ciclohexano portadores de uma hidroxila é o deslocamento para campo mais baixo dos carbonos β (5-12 ppm) e para campo mais alto dos carbonos γ (0-6 ppm). Estes deslocamentos para a direita, observados em carbonos γ , resultam da compressão estérica de uma interação vici (*gauche*) que resulta em efeito de desblindagem de C- β e blindagem de C- γ (Silverstein, 2000).

Por ordem biogenética, na biossíntese de esteróides o C-3 aparece ligado a um oxigênio (Hansel, 1999; Wagner, 1993; Hartmann, 1998). O espectro de infravermelho (Figura 53, página 109) mostrou uma absorção em 3300 cm^{-1} na forma de uma banda larga, característica da deformação axial de O-H associado (ligação hidrogênio de álcoois). Como não foram verificados outros sinais característicos de ligações “C-O” além deste sinal de álcool nos espectros, concluiu-se que há apenas a hidroxila (OH) ligada ao C-3 (Tabela 9, página 105) sendo que este carbono tem um deslocamento químico em 71,07 ppm, característico de C-3-OH (Paulo et al., 2005; Kojima et al., 1990; De-Eknamkul & Potduang, 2003).

O espectro de ^1H -RMN também indica a presença desta hidroxila. Pelo fato de C-3 estar ligado a um oxigênio, H-3 sofre efeito de desblindagem exercido pelo oxigênio (eletro negativo), tendo deslocamento em torno de δ_{H} 3,5 ppm (Paulo et al., 2005; Garg & Nes, 1984; Garg & Nes b 1984; Sucrow et al., 1976; Kojima et al., 1990). Este próton faz acoplamento com os dois hidrogênios H-2 (H-2a e H-2b) e os H-4 (H-4a e H-4b). Como a hidroxila estereoquimicamente está mais próxima de um dos prótons de cada carbono, um fica mais desblindado enquanto que o outro não sofre tanto este efeito adicional de desblindagem. Assim, eles se comportam como hidrogênios diferentes e H-3 aparece como *ddd* ($J = 4,8; 11$ e $15,2\text{ Hz}$) em δ_{H} 3,526 ppm (Figura 46).

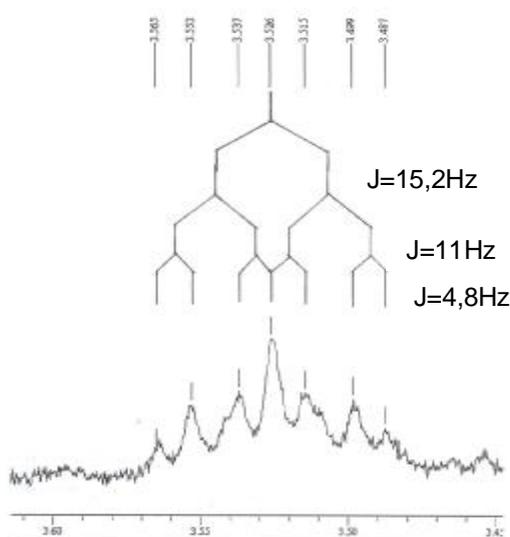


Figura 46: O espectro de ^1H -RMN ampliado de V3 (d_{H} 3,45-3,60 ppm), mostrando o *ddd* observado para H-3, em CDCl_3 .

Os sinais de prótons olefínicos apareceram em δ_H 4,96 ppm (1H, *dd*, $J=8,8$ e 15,2 Hz, H-22 ou 23) δ_H 5,094 ppm (1H, *dd*, $J=8,8$ e 15,2 Hz, H-22 ou 23) e também são similares aos do espinasterol e condriasterol (Garg e Nes, 1984). Estes sinais aparecem em campo baixo pois estão ligados a carbono que faz dupla ligação e assim sofrem forte efeito de desblindagem (Figura 47).

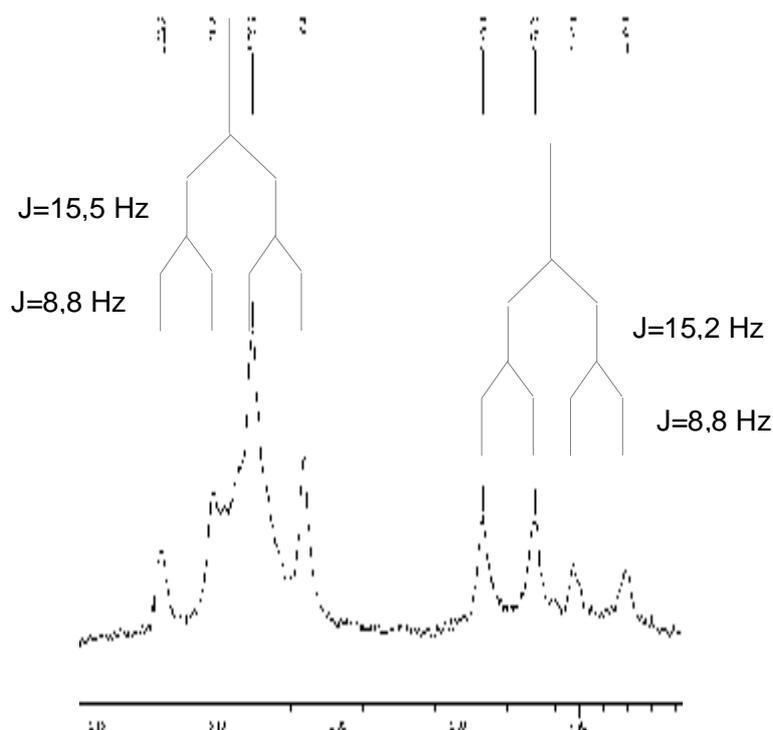


Figura 47: Espectro ampliado de ^1H -RMN do composto V3 (δ_H 4,9-5,15 ppm), mostrando os sinais verificados para os hidrogênios olefínicos, em CDCl_3 .

Os grupos metílicos aparecem entre δ_H 0,4 e 1,0 ppm, sendo alguns sinais sobrepostos. Os deslocamentos químicos observados foram: δ_H 0,483 ppm (3H, *s*, H-18), δ_H 0,732 ppm (3H, *s*, H-19). Os prótons H-29 (terminal) acoplam com os dois H-28 resultando em um triplete em δ_H 0,757 (3H, *t*, $J=6,4$ Hz). Os prótons H-26 e H-27 (terminais) acoplam com o H-25, por isso aparecem no espectro como dois dubletos em δ 0,735 (3H, *d*, $J=2,8$ Hz; H-26) e δ_H 0,783 ppm (3H, *d*, $J=6,4$ Hz; H-27). Ainda, os H-21

(terminais) acoplam com o H-20 resultado em um dubleto em δ_H 0,958 ppm (3H, *d*, $J=6,80$ Hz) (Figura 48).

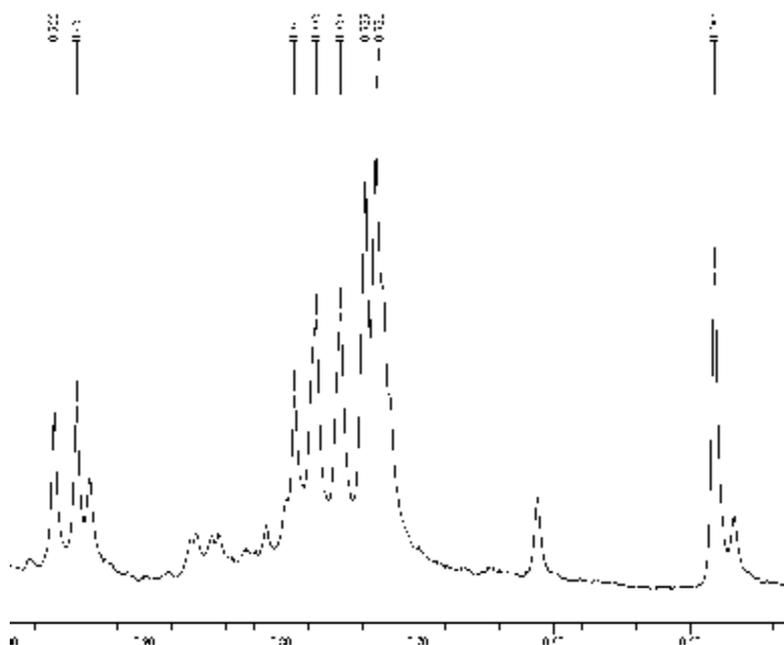


Figura 48: Espectro ampliado de ^1H -RMN do composto V3, mostrando os sinais verificados para os hidrogênios metilênicos.

O conjunto de dados espectroscópicos de V3 é compatível com os dados estruturais dos esteróides espinasterol e condriasterol. Estes isômeros estereoquímicos apresentam as insaturações nos mesmos locais, diferindo somente na configuração do grupamento etil em C-24, que em espinasterol aparece em α e em condriasterol em β (Figura 49, página 102). Por este motivo geralmente estas substâncias são confundidas. Como a rota biossintética destes é praticamente a mesma, normalmente estes compostos co-ocorrem nos vegetais. (Garg & Nes, 1984; Itoh et al., 1981). Alguns autores preferem, ainda, não esclarecer esta dúvida dizendo que detectaram um ou o outro (Gomes & Alegrio, 1998). Os valores de deslocamentos químicos dos dois isômeros (α e β) são muito parecidos, como pode-se analisar nas tabelas 9 e 10 (páginas 105 e 106). No entanto, segundo Itoh et al., (1981) e Garg & Nes (1984) é

possível caracterizá-los através de dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN e estabelecer qual/quais das substâncias foram isoladas. No espectro de ^{13}C -RMN as mudanças ocorrem, principalmente, nos sinais de C-16, C-21 e C-29.

Tabela 7: Diferenças nos d_c que caracterizam os isômeros espinasterol e condrilasterol segundo Itoh et al., 1981.

	d_c espinasterol	d_c condrilasterol	d_c V3
C-16	28,5	28,4	28,4
C-21	21,1	21,0	21,06
C-26	21,5	19,0	21,37
C-27	19,0	21,5	19,0
C-29	12,3	12,5	12,22

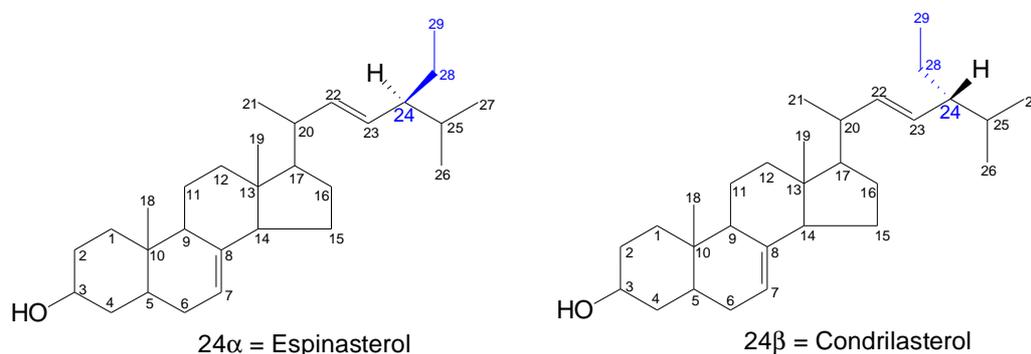


Figura 49: Diferença estrutural entre os isômeros estereoquímicos espinasterol e condrilasterol.

Tabela 8: Diferenças nos d_H que caracterizam os isômeros 24a (espinasterol) e 24b (condrilasterol) segundo Garg & Nes, 1984.

	δ_H Espinasterol	δ_H Condrilasterol	δ_H V3
H3	3,598 1H, <i>m</i>	3,597 1H, <i>m</i>	3,526 1H, <i>ddd</i> J= 4,8; 11,0 e 15,2 Hz
H7	5,172 1H, <i>br s</i>	5,172 1H, <i>br s</i>	5,086 1H, <i>br s</i>
H18	0,552 3H, <i>s</i>	0,550 3H <i>s</i>	0,484 <i>s</i>
H19	0,800 3H <i>s</i>	0,800 3H <i>s</i>	0,732 <i>s</i>
H21	1,027 3H, <i>d</i> J=6,5Hz	1,030 3H, <i>d</i> J=6,5Hz	0,958 <i>d</i> , J=6,8Hz
H22	5,027, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz	5,029, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz	4,96 <i>dd</i> , J=8,8 e 15,2 Hz
H23	5,162, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz	5,162, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz	5,094 <i>dd</i> , J=8,8 e 15,5 Hz
H26	0,800 3H, <i>d</i> J=6,2Hz	0,825 3H, <i>d</i> J=6,5Hz	0,735 <i>d</i> , J=2,8Hz
H27	0,851 3H, <i>d</i> J=6,1Hz	0,845 3H, <i>d</i> J=6,3Hz	0,783, <i>d</i> , J=6,4Hz
H29	0,757 3H, <i>t</i> J=6,4Hz	0,799, <i>t</i> , J=7,2Hz	0,757, <i>t</i> , J=6,4Hz

Apesar dos relatos quanto às diferenças dos deslocamentos de carbonos e hidrogênios entre espinasterol e condriasterol, principalmente referentes aos hidrogênios metílicos H-26, H-27 e H-29, não foi possível caracterizá-los por comparações com dados da literatura. Portanto, a elucidação de V3, em particular a configuração de C-24, não foi possível com as técnicas empregadas. Observou-se no espectro de ^1H -RMN um deslocamento de todos os valores para a direita, diferindo cerca de 0,07 ppm em todos os sinais das referências utilizadas. Os valores observados em V3 foram intermediários aos valores de δ_{H} espinasterol e condriasterol relatados na literatura e por isso não se pode afirmar qual dos compostos foi isolado (ver Tabela 8).

Na análise por CG foi possível observar no cromatograma um pico principal com tempo de retenção de 26,64 minutos. O espectro de massa por impacto eletrônico (Figura 50) do composto mostrou pico em m/z 412 u.m.a, que corresponde ao pico do íon molecular de V3 (espinasterol). Outros picos oriundos da fragmentação são característicos deste composto. O esquema de fragmentação é mostrado na Figura 58 (página 117). O espectro de massa da substância isolada foi coincidente com os relatados para espinasterol (Kojima et al., 1990).

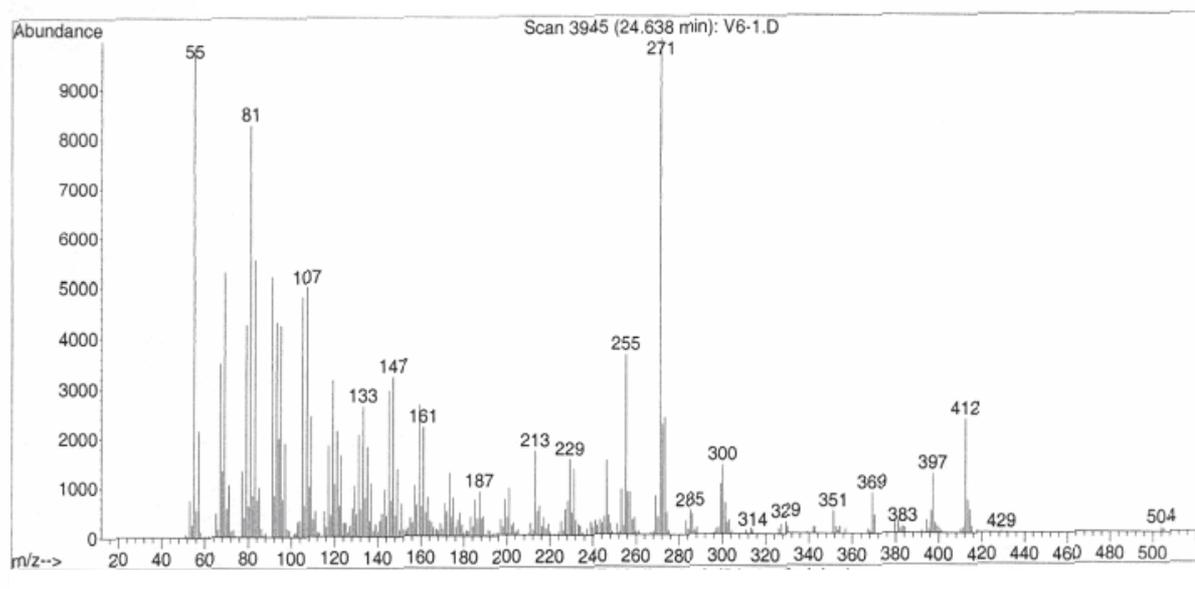


Figura 50: Espectro de massas de V3.

Com base nos dados espectrais é possível propor para o composto V3 a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$. Para essa fórmula molecular tem-se um grau de insaturação igual a seis. Uma vez que os espectros de RMN indicaram a presença de duas insaturações, conclui-se que o composto apresenta quatro anéis. Portanto, estes dados nos permitem afirmar que V3, isolado do extrato diclorometânico, é um esteróide álcool tetracíclico portador de duas insaturações: espinasterol (24-etilcolestano-7,22-dieno-3 β -ol).

Substância V3: Cristal branco. Rf=0,41 (gel de sílica F₂₅₄; CH₂Cl₂:AcOEt 9:1; visualização após nebulização com anisaldeído sulfúrico – mancha roxa). IV (KBr) ν_{max} 3450, 2950, 1700, 1620, 1480, 1370, 1040, 970 cm^{-1} . EM/IE 70 eV, m/z 412 [M⁺] (23), 397 (11), 383 (2), 369 (8), 351 (5), 329 (2), 300 (14), 285 (5), 271 (100), 255 (46), 229 (15), 213 (17), 147 (32), 107 (50), 81 (82), 55 (98) calculado para $C_{29}H_{48}O$ 412 g. Para ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) e ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) ver tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Valores de deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN de V3 e dos compostos 1-5 utilizados como referências:

	1	2	3	V3	4	5	6
C1	37,10	37,0	36,9	37,17	38,9	36,9	37,1
C2	29,03	29,5	27,5	28,49	38,2	27,5	31,4
C3	78,60	78,5	73,4	71,08	212,1	73,4	71,0
C4	34,70	34,1	33,8	34,24	44,3	33,8	38,0
C5	40,21	40,0	40,1	40,30	43,0	40,1	40,2
C6	29,41	29,2	29,5	31,51	30,1	29,5	29,6
C7	117,92	117,2	117,3	117,46	117,1	117,3	117,4
C8	139,62	139,4	139,4	139,57	139,6	139,4	139,5
C9	49,60	49,4	49,2	49,49	49,0	49,2	49,4
C10	34,50	34,2	34,2	31,87	34,5	34,2	34,2
C11	23,42	21,4	21,5	21,57	21,8	21,5	21,5
C12	39,62	39,3	39,3	39,49	39,4	39,3	39,4
C13	43,51	43,1	43,2	43,31	43,3	43,2	43,3
C14	55,32	54,9	55,1	55,14	55,1	55,1	55,1
C15	23,41	22,8	23,0	23,02	23,1	23,0	23,0
C16	29,00	28,3	28,5	29,70	28,6	28,4	28,5
C17	56,01	55,8	55,9	55,95	56,0	55,9	55,8
C18	12,60	11,9	12,1	12,05	12,2	12,1	12,0
C19	13,12	12,8	12,9	13,03	12,5	12,9	13,0
C20	41,21	40,7	40,8	40,79	40,9	40,8	40,8
C21	21,70	21,2	21,1	21,06	21,2	21,0	21,4
C22	138,71	138,0	138,1	138,15	138,1	138,1	138,7
C23	129,60	129,3	129,4	129,48	129,6	129,4	129,4
C24	51,53	51,1	51,2	51,26	51,3	51,2	51,2
C25	32,22	31,7	31,8	30,03	32,0	31,8	31,9
C26	21,40	20,9	21,5	21,37	21,5	19,0	21,1
C27	19,20	18,8	19,0	19,00	19,1	21,5	19,0
C28	-	25,2	25,4	25,38	25,5	25,4	25,4
C29	-	12,0	12,3	12,22	12,3	12,5	12,3

- 1) Citado de 3β -O- β -D-glucopiranosilspinasterol (Gomes & Alegrio, 1998, Piridina).
- 2) Citado de 24S-etil-5 α -colestan-7,22E-dieno-3 α -ol- β -galactopiranosil (Paulo et al., 2005, CDCl_3).
- 3) Citado de espinasterol (Itoh et al., 1981, CDCl_3).
- 4) Citado de 24S/ α -espirasterona (Souza et al., 2001, CDCl_3).
- 5) Citado de condilasterol (Itoh et al., 1981, CDCl_3).
- 6) Citado de espinasterol (Kojima et al., 1990, CDCl_3).

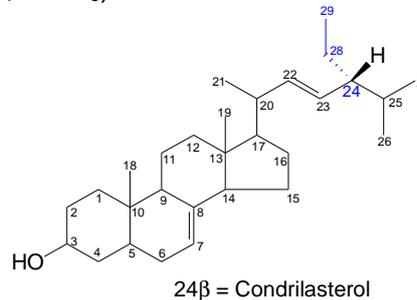
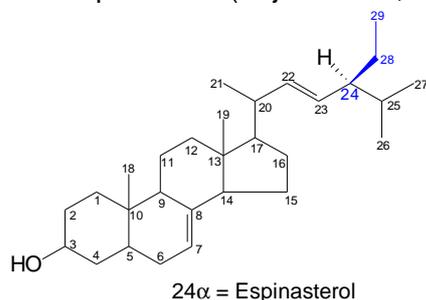
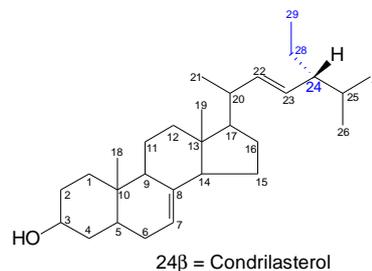
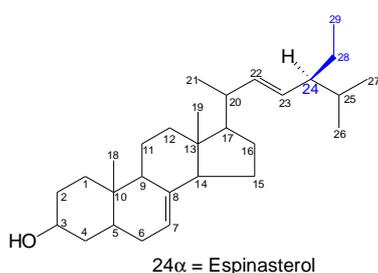


Tabela 10: Valores de deslocamentos químicos de ^1H -RMN de V3 e dos compostos 1-6 utilizados como referências:

	1	2	3	V3	4	5	6
H3		3,57 1H, <i>m</i>	3,598 1H, <i>m</i>	3,526 <i>ddd</i> , J = 4,8; 11,0 e 15,2 Hz	3,597 1H, <i>m</i>		3,59 <i>m</i>
H7	5,30 1H <i>s</i>	5,18 1H, <i>dd</i>	5,172 1H, <i>br s</i>	5,086 1H, <i>br s</i>	5,172 1H, <i>br s</i>		5,16 <i>m</i>
H18	0,66 3H, <i>s</i>	0,56 3H, <i>s</i>	0,552 3H, <i>s</i>	0,484 <i>s</i>	0,550 3H <i>s</i>	0,55, <i>s</i>	0,55 <i>s</i>
H19	0,79 3H, <i>s</i>	0,81 3H, <i>s</i>	0,800 3H <i>s</i>	0,732 <i>s</i>	0,800 3H <i>s</i>	0,81, <i>s</i>	0,80 <i>s</i>
H21	1,20 3H, <i>d</i> , J=6,6Hz	1,03 3H, <i>d</i> , J=6,8 Hz	1,027 3H, <i>d</i> J=6,5Hz	0,958 <i>d</i> , J=6,8Hz	1,030 3H, <i>d</i> J=6,5Hz	1,03, <i>d</i> J=6,6Hz	1,02 <i>d</i>
H22	5,01 1H, <i>dd</i> , J=13,2 e 6,6 Hz	5,17 1H	5,027, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz	4,96 <i>dd</i> , J=8,8 e 15,2Hz	5,029, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz		5,15 <i>dd</i> J=15,9
H23	5,18 1H <i>dd</i> J=9,9 e 5,5 Hz	5,03 1H, <i>dd</i> J=5,2 e 8,8 Hz	5,162, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz	5,094 <i>dd</i> , J=8,8 e 15,2Hz	5,162, 1H, <i>dd</i> , J=7,5Hz		5,02 <i>dd</i> J=15,9Hz
H24	0,88 1H, <i>d</i> , J=6,6 Hz	1,39 1H					
H26	0,83 3H, <i>d</i> , J=5,3 Hz	0,86 <i>d</i> , J=6,4 Hz	0,800 3H, <i>d</i> J=6,2Hz	0,735 <i>d</i> , J=2,8Hz	0,825 3H, <i>d</i> J=6,5Hz	0,80, <i>d</i> J=7Hz	0,85 <i>d</i>
H27	0,84 3H, <i>d</i> , J=6,2 Hz	0,81 3H, <i>d</i> , J=7,2 Hz	0,851 3H, <i>d</i> J=6,1Hz	0,783, <i>d</i> , J=6,4Hz	0,845 3H, <i>d</i> J=6,3Hz	0,85, <i>d</i> J=6,5Hz	0,80 <i>d</i>
H29	0,80 3H, <i>t</i> , J=6,7 Hz	0,83 3H, <i>t</i> , J=7,6 Hz	0,757 3H, <i>t</i> J=6,4Hz	0,757, <i>t</i> , J=6,4Hz	0,799, <i>t</i> , J=7,2Hz	0,81, <i>t</i> J=6,5Hz	0,80 <i>d</i>

- 1) Citado de 3β -O- β -D-glucopiranosilspinasterol (Gomes & Alegrio, 1998, Pirdina).
- 2) Citado de 24-S-etil-5 α -colestan-7,22E-dieno-3 α -ol- β -galactopiranosil (Paulo et al., 2005, CDCl₃).
- 3) Citado de espinasterol (Garg & Nes, 1984, CDCl₃).
- 4) Citado de condriasterol (Garg & Nes, 1984, CDCl₃).
- 5) Citado acetato de α -espinasteril (Sucrow et al., 1976, CDCl₃).
- 6) Citado de espinasterol (Kojima et al., 1990).



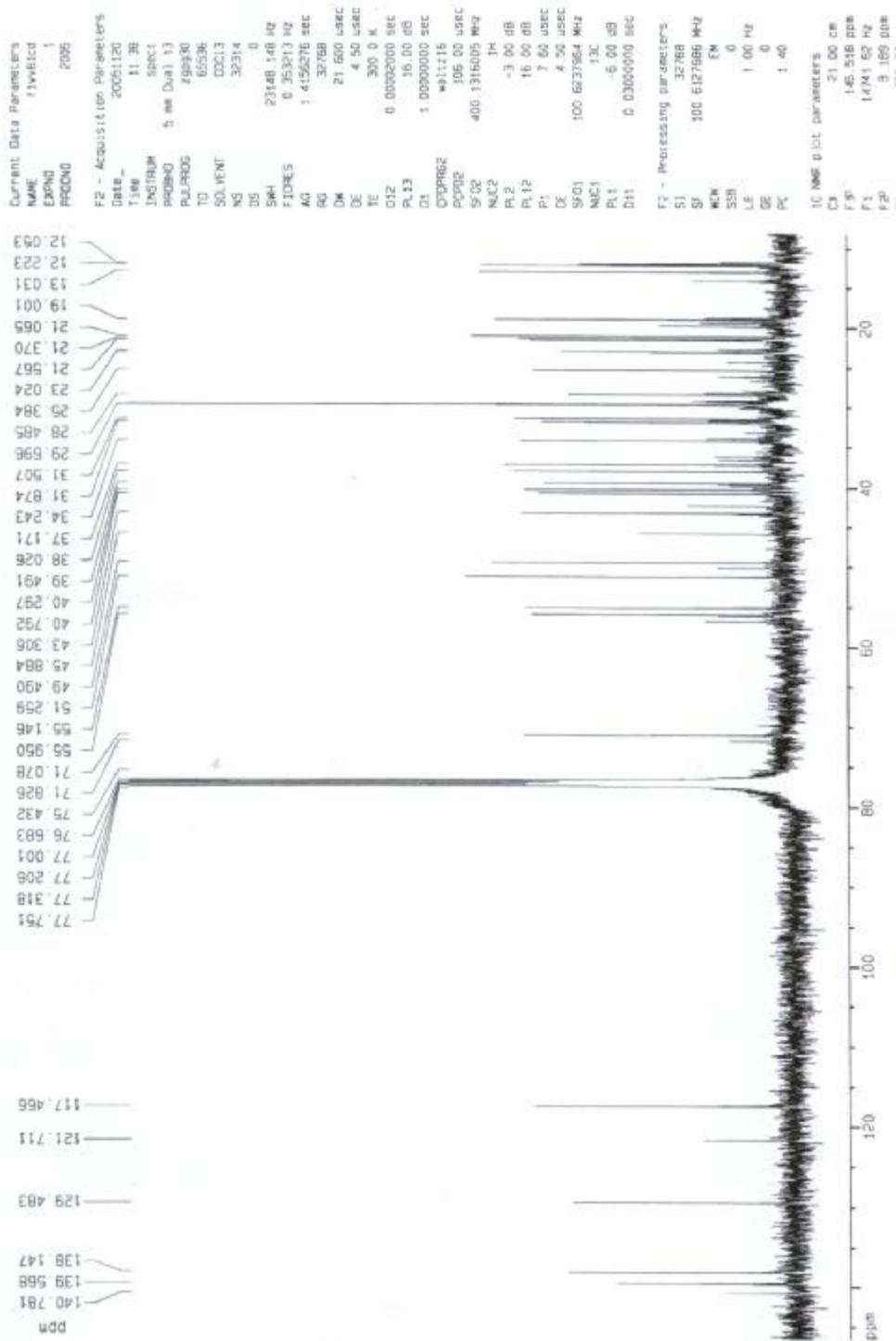


Figura 51: Espectro ^{13}C -RMN ampliado de V3, em CDCl_3 .

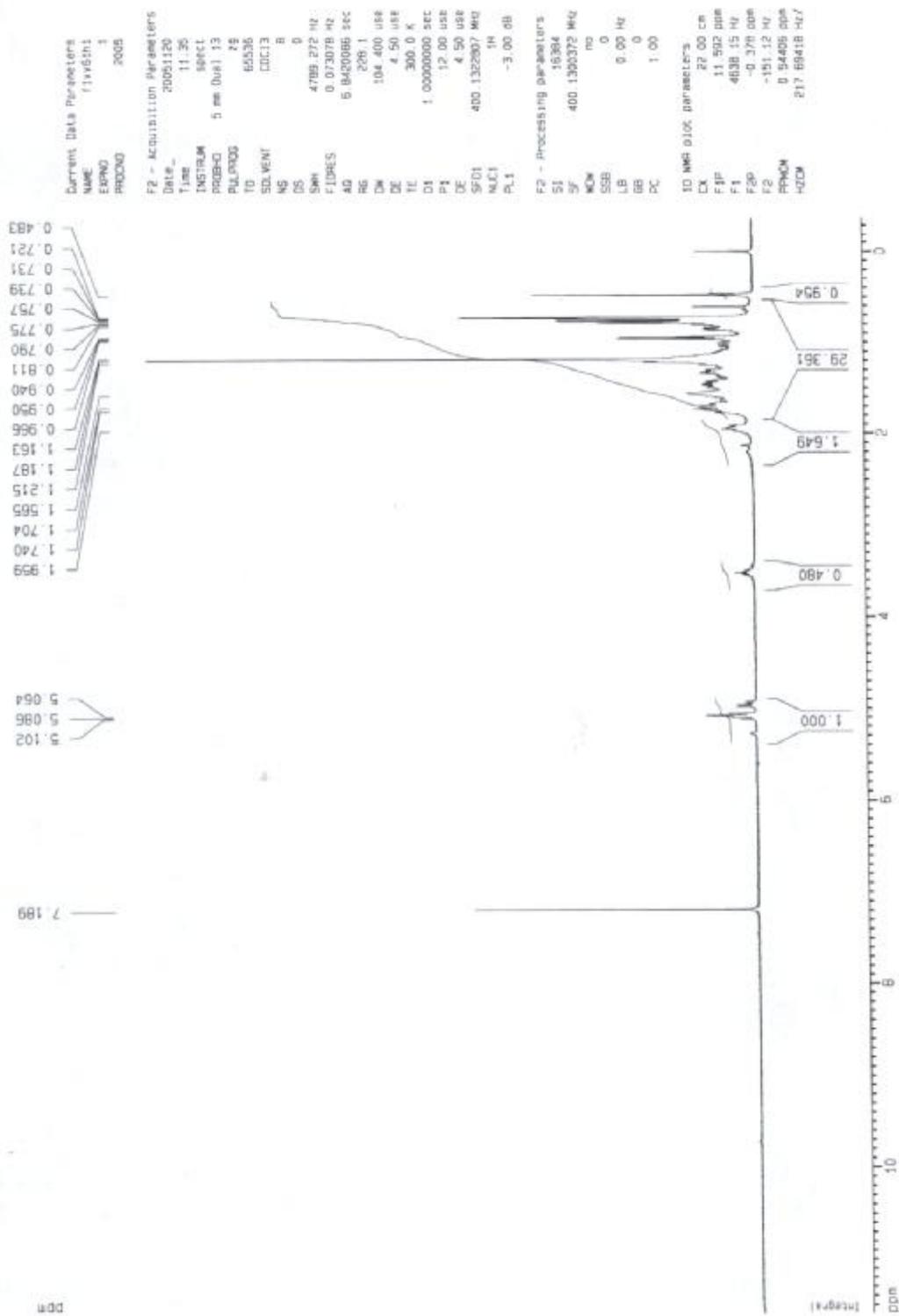


Figura 52: Espectro ^1H -RMN de V3, em CDCl_3 .

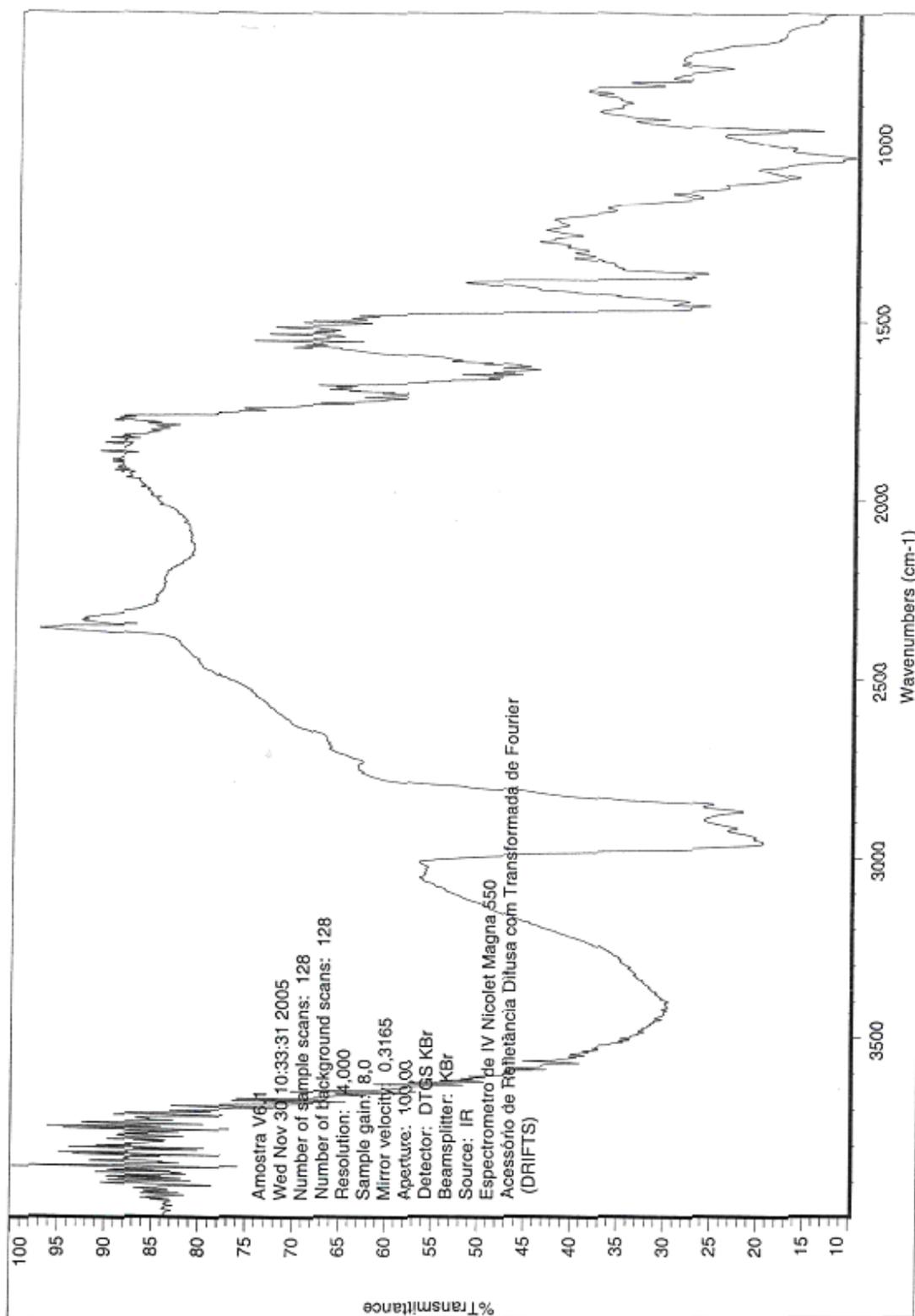


Figura 53: Espectro de IV de V3, em pastilhas de KBr.

5.2.4. Elucidação estrutural de V4

Da fração diclorometânica do extrato hidro-etanólico das folhas da planta foram isolados 27 mg de um composto cristalino branco codificado como V4. A substância apresentou-se como uma mancha única (CCD), de coloração roxa após revelação com o reagente anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100 °C. O comportamento cromatográfico e a comparação por cromatografia em camada delgada com amostra autêntica de β -sitosterol sugeriu a presença desse composto na mistura. A confirmação foi realizada através de cromatografia bidimensional, onde foi possível detectar este esteróide em V4, como mostra a figura 54.

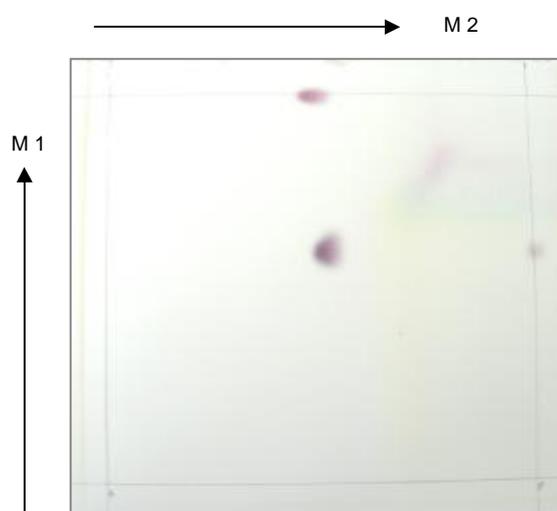


Figura 54: Cromatografia bidimensional com a amostra V4 utilizando como referência o β -sitosterol. Primeira migração (M1)(Hexano:AcOEt 1:1, v/v-RF=0,57); segunda migração (M2) (CH_2Cl_2 :AcOEt 7:3, v/v-RF=0,48).

Para confirmar a presença de β -sitosterol na planta esta amostra (V4) foi submetida a espectrometria de massa (CG/EM), infravermelho, ^1H -RMN e ^{13}C -RMN. Através dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (figuras 59-61, páginas 122 a 124) atribuíram-se os deslocamentos químicos e caracterizaram-se os átomos de hidrogênio e carbono que compõem a estrutura do composto. O espectro de ^{13}C -RMN totalmente desacoplado indicou a presença de quarenta e três sinais de átomos de carbonos,

sugerindo uma mistura binária, uma vez que vários desses sinais apareceram em alta intensidade, provavelmente se tratando de carbonos com mesmo deslocamento químico. O cromatograma resultante do CG/EM confirmou a existência de dois compostos através de dois picos que foram observados em tempos de retenções de 23,83 minutos e 24,70 minutos.

No espectro de ^{13}C -RMN, presença de quatro sinais na região dos carbonos sp^2 (δ_{C} 140,77, 138,28, 129,31 e 121,68 ppm) sugere a existência de duas duplas ligações. Segundo dados da literatura, sinais em δ_{C} 121,68 e 140,77 ppm são característicos de esteróides com uma dupla ligação entre C-5 e C-6 (Ahmad et al., 1992; Chaurasia & Wichtl, 1987; De-Eknamkul & Potduang, 2003; Goulart et al., 1993) e em δ_{C} 129,31 e 138,28 ppm são característicos de uma dupla ligação entre C-22 e C-23 na cadeia lateral de esteróides (De-Eknamkul & Potduang, 2003; Goulart et al., 1993). Estes sinais são, portanto, muito importantes na elucidação estrutural de compostos esteroidais. Na revisão da literatura verificou-se que estes deslocamentos químicos (δ_{C}) são específicos de β -sitosterol (24 α -etil-colestan-5-eno-3 β -ol) e estigmasterol (24 α -etil-colestan-5,22-dieno-3 β -ol). Também foi possível constatar que freqüentemente ocorre a identificação destes constituintes em misturas (Carvalho et al., 1998; De-Eknamkul & Potduang, 2003; Goulart et al., 1993, Conegero et al., 2003; Chaves et al., 2004). Estes compostos possuem uma mesma insaturação (Δ^5) e portanto os sinais nos espectros de ^{13}C -RMN irão coincidir e assim os sinais referentes a C-5 e C-6 estarão mais intensos quando comparados com os outros dois sinais referentes a insaturação em Δ^{22} , que está presente somente em estigmasterol (De-Eknamkul & Potduang, 2003) (Figura 55).

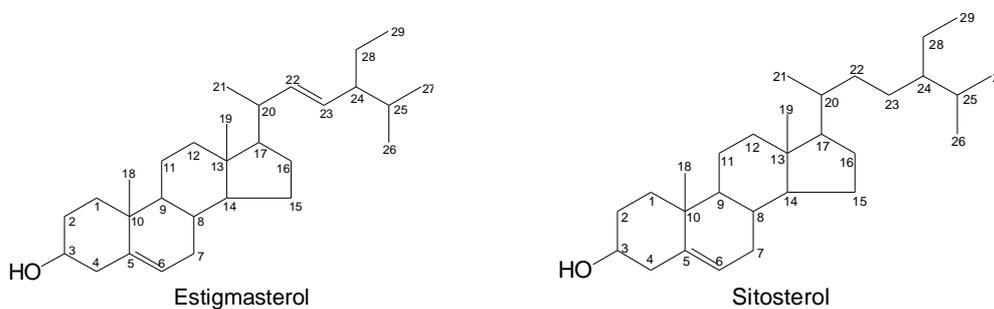


Figura 55: Fórmulas estruturais de estigmasterol e sitosterol.

Supondo-se que a mistura é composta por β -sitosterol e estigmasterol, e que portanto as porções cíclicas das estruturas são idênticas (β -sitosterol e estigmasterol diferem somente na cadeia lateral), presume-se que os deslocamentos químicos dos carbonos e dos hidrogênios desta unidade sejam coincidentes ou muito próximos.

No espectro de ^{13}C -RMN de V4 observa-se um sinal intenso em δ_{C} 71,80 ppm, característico de carbono portador de oxigênio. Analisando o espectro de infravermelho (Figura 62, página 125), percebe-se uma absorção destacável em $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$. Esta absorção aparece como uma banda larga característica da deformação axial de O-H associado (ligação hidrogênio de álcoois). Ainda, a banda mais intensa do espectro ocorre em 1050 cm^{-1} , exatamente a região onde absorve a função C-O de álcoois. Como não foram verificados outros sinais característicos de ligações "C-O" além dos sinais característicos de álcool nos espectros, conclui-se que os componentes da mistura possuem uma hidroxila livre em suas estruturas, sendo que a posição foi atribuída ao C-3, em conformidade com dados de literatura e origem biossintética dessa classe de compostos (Chaurasia & Wichtl, 1987; Harrison et al., 1990; Ahmad et al., 1992; Goulart et al., 1993; De-Eknamkul & Potduang, 2003).

A hidroxila posicionada em C-3 afeta o deslocamento de carbonos vizinhos ao carbono hidroxilado, deslocando para campo mais alto os carbonos β (5-12 ppm) e para campo mais baixo os carbonos γ (0-6 ppm). Este deslocamento para a direita observado em carbonos γ é resultado da compressão estérica de uma interação vici (*gauche*). Isto resulta em efeito de desblindagem de C- β e blindagem de C- γ (Silverstein, 2000).

A inspeção do espectro de ^1H -RMN contribuiu para a localização da hidroxila livre no carbono 3. Pelo fato deste carbono estar ligado a um oxigênio, H-3 sofre efeito de desblindagem exercido pelo oxigênio, deslocando-se para aproximadamente δ_{H} 3,6 ppm. Este hidrogênio faz acoplamento com os dois hidrogênios H-2 (H-2a e H-2b) e H-4 (H-4a e H-4b). Como a hidroxila está mais próxima de um dos hidrogênios de cada carbono, um fica mais desblindado enquanto que o outro não sofre tanto este efeito adicional de desblindagem. Assim, eles se comportam como hidrogênios "diferentes" e H-3, nas duas substâncias, aparece como multipletto em 3,52 ppm, e não como um quinteto.

Através de sinais característicos no espectro de ^1H -RMN também foi possível caracterizar a presença de mistura de β -sitosterol e estigmasterol. Como nos demais derivados quimicamente relacionados, a maioria dos sinais concentraram-se entre 0,5 e 2,0 ppm. Somente quatro sinais apareceram em campo mais baixo, sendo estes os dos hidrogênios olefínicos pertencentes ao esqueleto e à cadeia lateral, e ainda ao H-3 adjacente ao grupo hidroxila (Forgo & Kövér, 2004). Destacam-se o multiplete em δ_{H} 3,52 ppm (H-3) e o singlete largo em δ_{H} 5,36 ppm (H-6) que são hidrogênios com características comuns em ambos os compostos e portanto possuem o mesmo deslocamento químico. Ainda, como pode ser visualizado na figura 56, os duplo-dubletes em δ_{H} 5,02 (J=8,6 e 16 Hz, H-23) e 5,16 ppm (J=8,52 e 15,15 Hz, H-22), caracterizam os prótons olefínicos do estigmasterol (Carvalho et al., 1998; Kojima et al., 1990; De-Eknamkul & Potduang, 2003; Goulart et al., 1993; Forgo & Kövér, 2004).

O espectro de hidrogênio foi totalmente sobreponível ao espectro mostrado por Forgo e Kövér (2004) para estigmasterol. Como visto anteriormente, os sinais obtidos para o estigmasterol coincidem com os observados para o β -sitosterol, com a adição dos sinais de H-22 e H-23.

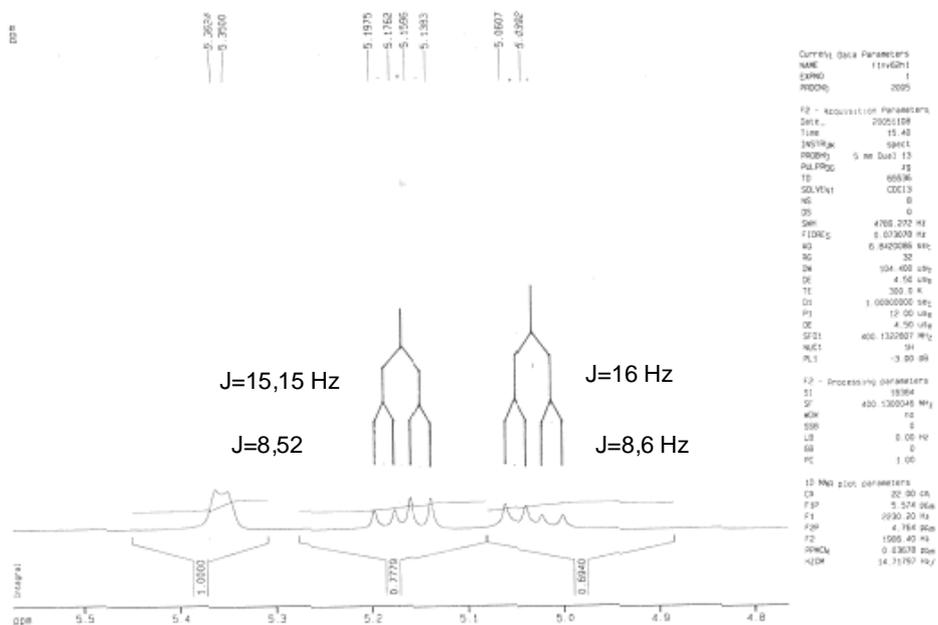


Figura 56: Espectro ^1H -RMN ampliado de V4 (d_{H} 4,8-5,5 ppm), em CDCl_3 .

Outras bandas observadas no espectro de infravermelho de V4 (Figura 62, página 125) incluem: um sinal intenso em 2950 cm^{-1} , característico de deformações axiais de C-H sp^3 ; absorções na faixa de 1700 a 700 cm^{-1} , decorrentes de deformações angulares e axiais de alcanos (C-C e C-H); uma banda de baixa intensidade em 1650 que é característica de deformação axial de C=C e ainda as bandas em 1465 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} que são deformações angulares de CH_2 e CH_3 , respectivamente.

As porcentagens aproximadas dos dois constituintes na mistura foram calculadas de acordo com o descrito por Goulart e colaboradores (1993), utilizando-se o espectro de ^1H -RMN (Figura 60, página 123), tendo como base na integração dos sinais correspondentes a H-6 (β -sitosterol + estigmasterol), de intensidade relativa 1,0 e os sinais de H-22 e H-23 pertencentes ao estigmasterol, de intensidade relativa 1,472 ($0,778 + 0,694$). A metade de 1,472 representou um hidrogênio da molécula do estigmasterol (0,736) e a subtração desse valor de 1,0 ($1,0 - 0,736 = 0,264$) representa o hidrogênio de β -sitosterol. As intensidades relativas 0,736 (1 H de estigmasterol) e 0,264 (1 H de β -sitosterol) permitiram deduzir que a mistura contém 26,4 % de β -sitosterol e 73,6 % de estigmasterol [$1,0 (0,264 + 0,736) = 100\%$].

O cromatograma resultante do CG/EM de V4 mostrou os dois picos referentes ao estigmasterol (TR=23,83 minutos) e ao β -sitosterol (TR=24,70 minutos). No entanto, segundo este cromatograma, as concentrações percentuais, com base nas áreas dos picos foram de 91:9 estigmasterol/ β -sitosterol. Nota-se que estes valores apesar de confirmarem a predominância do estigmasterol não concordam com os obtidos pelo cálculo de ^1H -RMN, tendo como base a integração dos sinais. Levando-se em conta a maior confiabilidade do cromatógrafo gasoso, optou-se por afirmar que a proporção de estigmasterol/ β -sitosterol na mistura é de 9:1.

Na análise do espectro de massa por impacto eletrônico dos compostos foi possível observar as suas fragmentações (Figuras 63 e 64, página 126). A primeira substância (TR=23,83 minutos) apresentou sinal do íon molecular em m/z 412 u.m.a.. Conhecendo-se a massa dos dois compostos existentes na mistura como estigmasterol (M^+ 412) e β -sitosterol (M^+ 414) deduz-se que este primeiro sinal no cromatograma corresponde ao estigmasterol. No espectro de massas, outros picos oriundos da fragmentação, são característicos deste composto. Com base no modelo de

fragmentação apresentado pela substância, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento (por semelhança de fragmentação) o composto estigmasterol (Figura 64, página 126). O esquema de fragmentação proposto para estigmasterol é apresentado na figura 58, página 117.

Já para o segundo pico do cromatograma (CG) observado em tempo de retenção de 24,70 minutos, o espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular em m/z 414 u.m.a. Esta massa corresponde ao β -sitosterol. O esquema de fragmentação deste composto é mostrado na figura 57 (página 116).

Os espectros de massas dos compostos isolados foram coincidentes com os relatados para estigmasterol (Gershengorn, 1968; Garg b, 1984; Jácome, 2004; Kojima et al., 1990) e para β -sitosterol (Gershengorn, 1968; Garg & Nes b, 1984; Kojima et al., 1990).

Com base nos dados espectrais é possível propor para um dos compostos V4 a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. Para essa fórmula molecular tem-se um grau de insaturação igual a cinco. Uma vez que os espectros de RMN indicaram a presença de somente uma insaturação, conclui-se que o composto apresenta quatro anéis. Portanto, estes dados nos permitem afirmar que esta substância (codificada separadamente como V4.1), isolado do extrato diclorometânico, é um esteróide álcool tetracíclico portador de uma insaturação: β -sitosterol (24-etilcolestano-5-eno-3 β -ol).

Para o composto V4.2 foi possível sugerir a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$. Para essa fórmula molecular tem-se um grau de insaturação igual a seis. Uma vez que os espectros de RMN indicaram a presença de duas insaturações, conclui-se que o composto apresenta quatro anéis. Portanto, estes dados nos permitem afirmar que V4.2, isolado do extrato diclorometânico, é um esteróide álcool tetracíclico portador de duas insaturações: estigmasterol (24-etilcolestano-5,22-dieno-3 β -ol).

Substância V4.1: Cristal branco. $R_f=0,57$ (gel de sílica F_{254} ; Hexano:AcOEt 1:1; visualização após nebulização com anisaldeído sulfúrico – mancha roxa). IV (KBr) ν_{max} 3350, 2950, 1650, 1450, 1370, 1060, 970, 800 cm^{-1} . EM/IE 70 eV, m/z 414 [M^+] (64), 396 (65), 381 (37), 329 (52,8), 303 (48), 273 (32), 255 (36), 213 (60), 191 (37), 161 (48), 145 (60), 109 (60), 81 (60), 55 (79) calculado para $C_{29}H_{50}O$ - 414 g. Para ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$) e 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) ver tabelas 12, 14 e 15.

Substância V4.2: Cristal branco. $R_f=0,57$ (gel de sílica F_{254} ; Hexano:AcOEt 1:1; visualização após nebulização com anisaldeído sulfúrico – mancha roxa). IV (KBr) ν_{max} 3350, 2950, 1650, 1450, 1370, 1060, 970, 800 cm^{-1} . EM/IE 70 eV, m/z 412 [M^+] (43), 369 (6), 351 (19), 329 (3), 300 (22), 271 (39), 255 (32), 229 (11), 207 (17), 153 (46), 81 (85) calculado para $C_{29}H_{48}O$ - 412 g. Para ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$) e 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) ver tabelas 11, 13, 14 e 15.

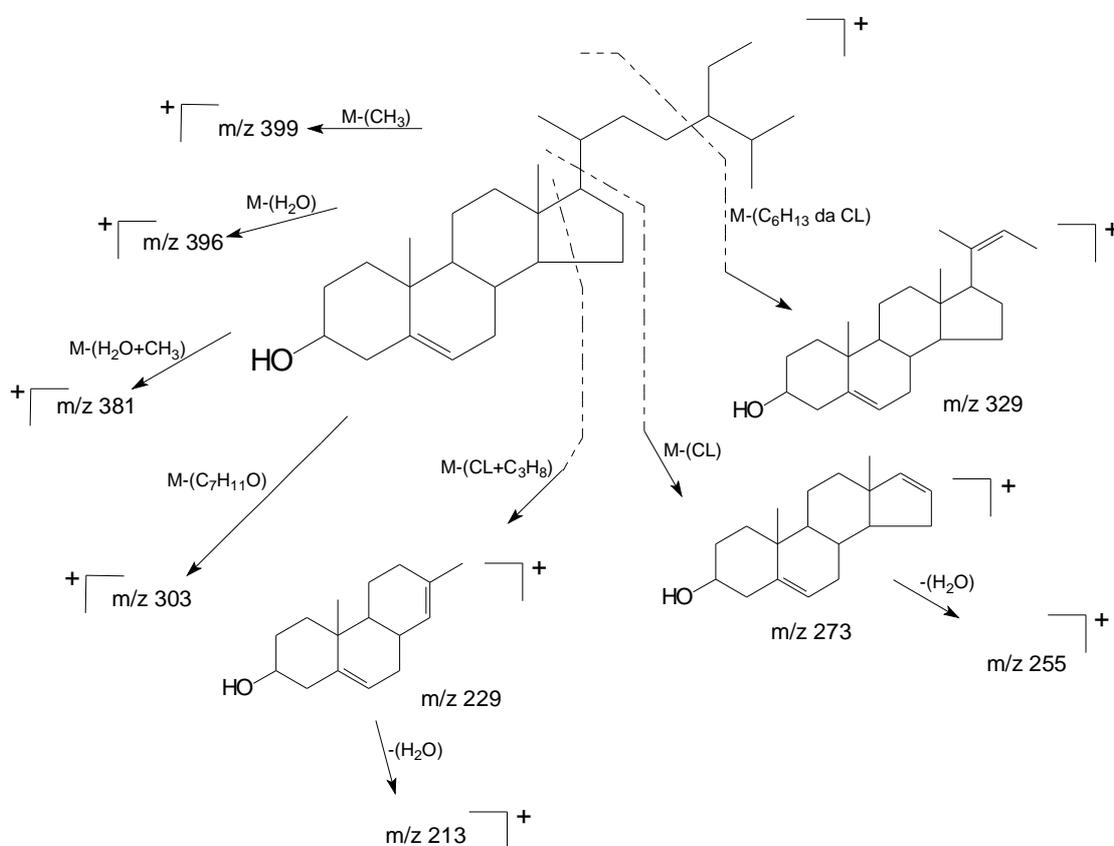


Figura 57: Esquema de fragmentação de V4.1 (β -sitosterol).

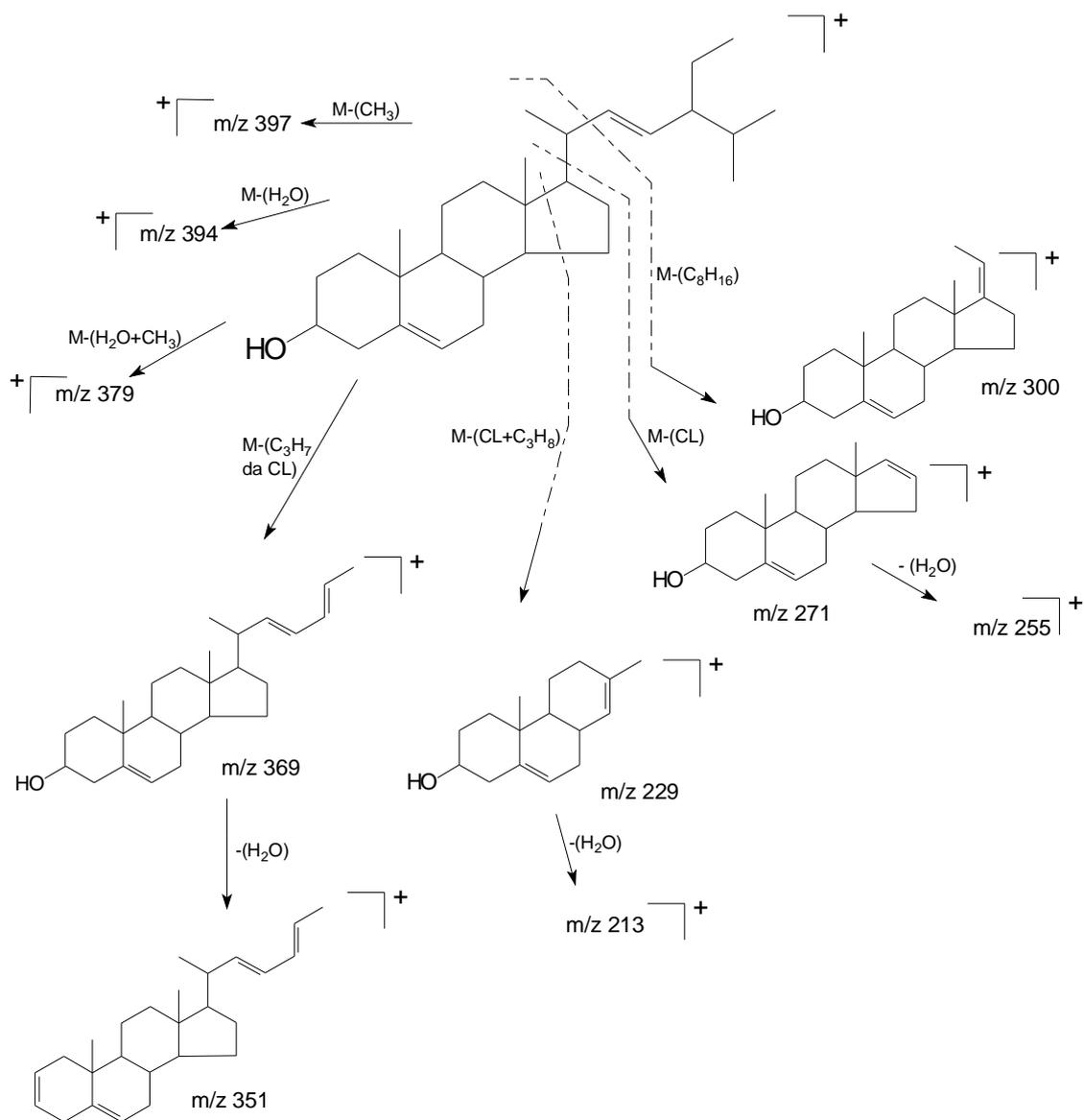


Figura 58: Esquema de fragmentação de esteróides possuíntes de duas insaturações, sendo uma na cadeia lateral (CL) entre C-22 e C-23, como é o caso de V3 (espinaesterol) e V4.2 (estigmaesterol).

Tabela 11: Principais sinais observados no espectro de ^1H -RMN de V4 e dos compostos 1-3 utilizados como referências para estigmasterol ($d = \text{ppm}$):

Hidrogênio	1	V4	2	3
H-3 (1H, <i>m</i>)	3,52 <i>m</i>	3,52	3,51	3,505
H-6 (1H)	5,35 <i>m</i>	5,356 <i>br s</i>	5,34 <i>m</i>	3,357
H-22 (1H, <i>dd</i>)	5,15 <i>dd</i>	5,168 (8,52 e 15,15 Hz)	5,17 (8,6 e 15,2 Hz)	5,159 (7,5Hz)
H-23 (1H, <i>dd</i>)	5,01 <i>dd</i>	5,02 (8,6 e 16 Hz)	5,04 (8,6 e 15,2 Hz)	5,015 (7,5Hz)

1 - Citado como estigmasterol (Kojima et al., 1990, CDCl_3).

2 - Citado do 5,22-estigmastadieno-3 β -ol (Forgo & Kövér, 2004, CDCl_3).

3 - Citado do 24 α -etilcolestan-5,22-dieno-3 β -ol (stigmasterol) (Garg & Nes b, 1984, CDCl_3).

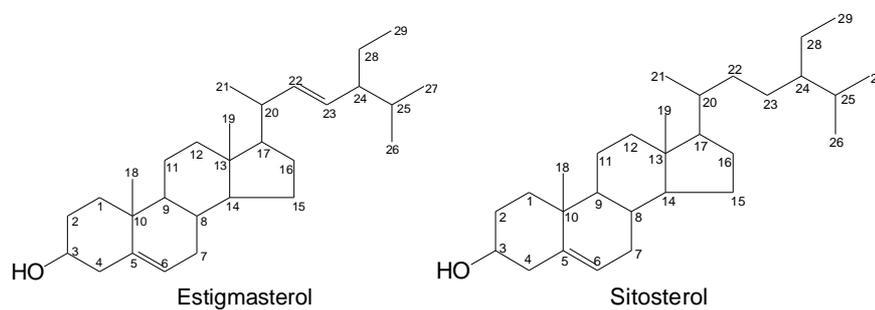


Tabela 12: Principais sinais observados no espectro de ^1H -RMN de V4 e dos compostos 1-3 utilizados como referências para β -sitosterol ($d_H = \text{ppm}$):

Hidrogênio	1	2	V4	3
H-18 (3H, <i>s</i>)	0,66	0,680	0,69	0,68
H-19 (3H, <i>s</i>)	0,97	1,010	1,02	1,01
H-21 (3H, <i>d</i>)	0,91 J=6,5Hz	0,921 6,5Hz	0,90	0,92
H-26 (3H, <i>d</i>)	0,80 J=6,8Hz	0,814 6,5Hz	0,79	0,83
H-27 (3H, <i>d</i>)	0,80 J=6,8Hz	0,833 6,5Hz	0,81	0,81
H-29 (3H, <i>t</i>)	0,83 J=6,5Hz	0,845 J= 7,3Hz	0,86	0,84
H-3 (1H, <i>m</i>)	3,43	3,502	3,52	3,52
H-6 (1H, <i>br s</i>)	5,33	5,358	5,356	5,35

1) Citado do 3-O- β -D-[6'-(3''-metilbutanoato) glucopiranosil]- β -sitosterol (Ali et al., 2002, CDCl_3).

2) Citado do 24 α -etil-colestan-5-eno-3 β -ol (Garg & Nes b, 1984, CDCl_3).

3) Citado como β -sitosterol (Kojima et al., 1990, CDCl_3).

Tabela 13: Sinais observados no espectro de ^1H -RMN de V4 e do composto tido como referências para estigmasterol (d_{H} = ppm):

H	REF*. () = acoplamentos	V4
1b	1,84, <i>m</i> 1H (1 β ,1 α ; 1 β ,2 α ; 1 β ,2 β)	1,86
1a	1,08, <i>m</i> 1H (1 α ,2 β ; 1 α ,2 α)	1,08
2a	1,83, <i>m</i> 1H (2 α ,2 β ; 2 α ,3 α)	1,84
2b	1,51, <i>m</i> 1H (2 β ,3 α)	1,51
3	3,51, <i>m</i> 1H (3 α ,4 α ; 3 α ,4 β)	3,52
4a	2,30, <i>m</i> 1H (4 α ,4 β ; 4 α ,2 α)	2,27
4b	2,23, <i>m</i> 1H (4 β ,6; 4 β ,7 β ; 4 β ,7 α)	2,30
6	5,34, <i>m</i> 1H (6,7 β ; 6,7 α)	5,36
7b	1,97, <i>m</i> 1H (7 β ,7 α ; 7 β ,8)	1,97
7a	1,50, <i>m</i> 1H (7 α ,8)	1,50
8	1,46, <i>m</i> 1H (8,9; 8,14)	1,46
9	0,94, <i>m</i> 1H (9,11 β ; 9,11 α)	0,90
11(ab)	1,50, <i>m</i> 2H (11 β ,12 α ; 11 β ,12 β)	1,50
12b	2,00, <i>m</i> 1H (12 β ,12 α ; 12 β ,11 α)	2,0
12a	1,18, <i>m</i> 1H (12 α ,11 α)	1,18
14	1,01, <i>m</i> 1H (14 α ,15 β)	1,00
15a	1,56, <i>m</i> 1H (14 α ,15 α)	1,55
15b	1,06, <i>m</i> 1H	1,08
16a	1,72, <i>m</i> 1H (16 α ,16 β ; 16 α ,17 α)	1,72
16b	1,28, <i>m</i> 1H (16 β ,17 α)	1,28
17	1,15, <i>m</i> 1H (17,20)	1,15
18	0,70, <i>s</i> 3H	0,71
19	1,01, <i>s</i> 3H	1,01
20	2,06, <i>m</i> 1H (20,21; 20,22)	2,04
21	1,03, <i>d</i> 3H	1,03
22	5,17, <i>dd</i> 1H (22,23)	5,17
23	5,04, <i>dd</i> 1H (23,24)	5,02
24	1,54, <i>m</i> 1H	1,60
25	1,55, <i>m</i> 1H (25,26; 25,27)	1,55
26	0,85, <i>d</i> 3H	0,89
27	0,80, <i>d</i> 3H	0,81
28	1,43, <i>m</i> 1H (28,28; 28,29; 28,24)	1,43
28	1,18, <i>m</i> 1H (28,29; 28,24)	1,18
29	0,81, <i>t</i> 3H	0,84

* Citado como estigmasterol (Forgo & Kövér, 2004, CDCl_3).

Tabela 14: Sinais observados no espectro de ^{13}C -RMN de V4 e dos compostos 1 e 2 utilizados como referências (d_c = ppm): de campo mais baixo para campo mais alto.

Sinal	1	V4	2	Sinal	1	V4	2
1	140,72	140,77	140,73	30	31,87	31,92	33,94
2	140,72	140,77	140,73	31	31,87	31,92	31,89
3	138,31	138,28	138,40	32	31,87	31,92	31,89
4	129,25	129,31	129,27	33	31,87	31,92	31,89
5	121,71	121,68	121,72	34	31,87	31,87	31,89
6	121,71	121,68	121,72	35	31,63	31,67	31,89
7	71,80	71,80	71,81	36	31,63	31,67	31,64
8	71,80	71,80	71,81	37	29,11	29,69	28,24
9	56,85	56,88	56,87	38	28,91	28,89	28,24
10	56,73	56,79	56,87	39	28,22	28,89	#
11	56,02	56,10	56,05	40	26,02	26,16	26,03
12	55,93	55,99	55,93	41	25,39	25,38	25,42
13	51,22	51,24	51,23	42	24,34	24,36	24,38
14	50,10	50,20	50,12	43	24,29	24,30	24,30
15	50,10	50,20	50,12	44	23,04	23,10	23,06
16	45,81	45,87	45,83	45	21,20	21,21	21,20
17	42,26	42,32	42,29	46	21,07	21,08	21,08
18	42,26	42,32	42,29	47	21,07	21,08	21,08
19	42,26	42,23	42,29	48	21,07	21,05	19,81
20	42,19	42,23	42,29	49	19,80	19,80	19,38
21	40,48	40,45	40,50	50	19,39	19,38	19,38
22	39,74	39,80	39,68	51	19,39	19,38	19,03
23	39,66	39,70	39,68	52	19,01	19,05	19,00
24	37,22	37,28	39,12	53	18,96	18,98	19,00
25	37,22	37,28	37,25	54	18,76	18,78	18,76
26	36,48	36,52	37,25	55	12,23	12,22	12,27
27	36,48	36,52	36,40	56	12,03	12,04	11,99
28	36,12	36,14	36,40	57	11,97	11,98	11,87
29	33,91	33,98	36,16	58	11,84	11,86	11,87

valor não relatado

- 1) Citado como mistura de β -sitosterol e estigmasterol (De-Eknamkul & Potduang, 2003, CDCl_3).
- 2) Citado como mistura de β -sitosterol e estigmasterol (Goulart et al., 1993, CDCl_3).

Tabela 15: Valores espectroscópicos de ^{13}C -RMN atribuídos a Estigmasterol (Estg) e β -sitosterol (β -sit) de V4 e dos compostos 1-6 tidos como referências (d = ppm):

Estg	1	V4	2	3	b-sit	4	V4	5	6
C1	37,22	33,52	37,25	37,2	1	37,22	33,52	37,25	37,2
C2	31,63	31,67	31,64	31,6	2	31,63	31,67	31,64	31,6
C3	70,81	71,80	71,81	71,8	3	71,80	71,80	71,81	71,8
C4	42,26	42,32	42,29	42,3	4	42,19	42,32	42,29	42,3
C5	140,72	140,77	140,73	140,7	5	140,72	140,77	140,73	140,7
C6	121,71	121,68	121,72	121,7	6	121,71	121,68	121,72	121,7
C7	31,87	31,92	31,89	31,9	7	31,87	31,92	31,89	31,9
C8	31,87	31,92	31,89	31,9	8	31,87	31,92	31,89	31,9
C9	50,10	50,19	50,12	50,1	9	50,10	50,19	50,12	50,1
C10	36,48	37,28	36,40	36,5	10	36,48	37,28	36,40	36,5
C11	21,07	21,08	21,08	21,1	11	21,07	21,08	21,08	21,1
C12	39,66	39,80	39,68	39,7	12	39,74	39,70	39,68	39,8
C13	42,26	42,23	42,29	42,2	13	42,26	42,23	42,29	42,3
C14	56,85	56,88	56,87	56,8	14	56,73	56,79	56,87	56,8
C15	24,34	24,36	24,38	24,4	15	24,29	24,30	24,30	24,3
C16	28,91	28,89	28,24	28,9	16	28,22	28,89	28,24	28,2
C17	55,93	55,99	55,93	55,9	17	56,02	56,09	56,05	56,0
C18	12,03	12,04	11,87	12,0	18	11,84	11,85	11,87	11,9
C19	19,39	18,38	19,38	19,4	19	19,39	19,38	19,38	19,4
C20	40,48	40,45	40,50	40,5	20	36,12	36,14	36,16	36,01
C21	21,07	21,05	21,20	21,2	21	18,76	18,78	19,03	18,8
C22	138,31	138,28	138,40	138,3	22	33,91	33,98	33,94	33,9
C23	129,25	129,31	129,27	129,2	23	26,02	26,16	33,12	26,0
C24	51,22	51,24	51,23	51,2	24	45,81	45,87	45,83	45,8
C25	31,87	31,87	31,89	31,9	25	29,11	29,69	26,03	29,1
C26	21,20	21,20	19,0	21,1	26	18,80	18,98	18,76	19,8
C27	18,96	19,79	19,0	19,0	27	19,01	19,05	19,81	19,0
C28	25,39	25,38	25,42	25,4	28	23,07	23,09	23,06	23,0
C29	12,23	12,21	12,27	12,3	29	11,97	11,98	11,99	12,0

1) Citado de estigmasterol (De-Eknamkul & Potduang, 2003, CDCl_3).

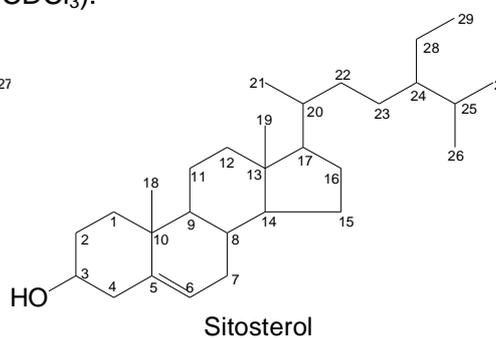
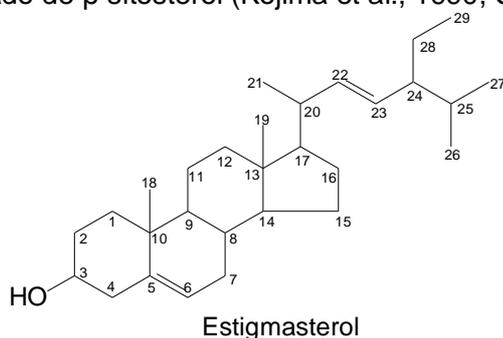
2) Citado de estigmasterol (Goulart et al., 1993, CDCl_3).

3) Citado de estigmasterol (Kojima et al., 1990, CDCl_3).

4) Citado de β -sitosterol (De-Eknamkul & Potduang, 2003, CDCl_3).

5) Citado de β -sitosterol (Goulart et al, 1993, CDCl_3).

6) Citado de β -sitosterol (Kojima et al., 1990, CDCl_3).



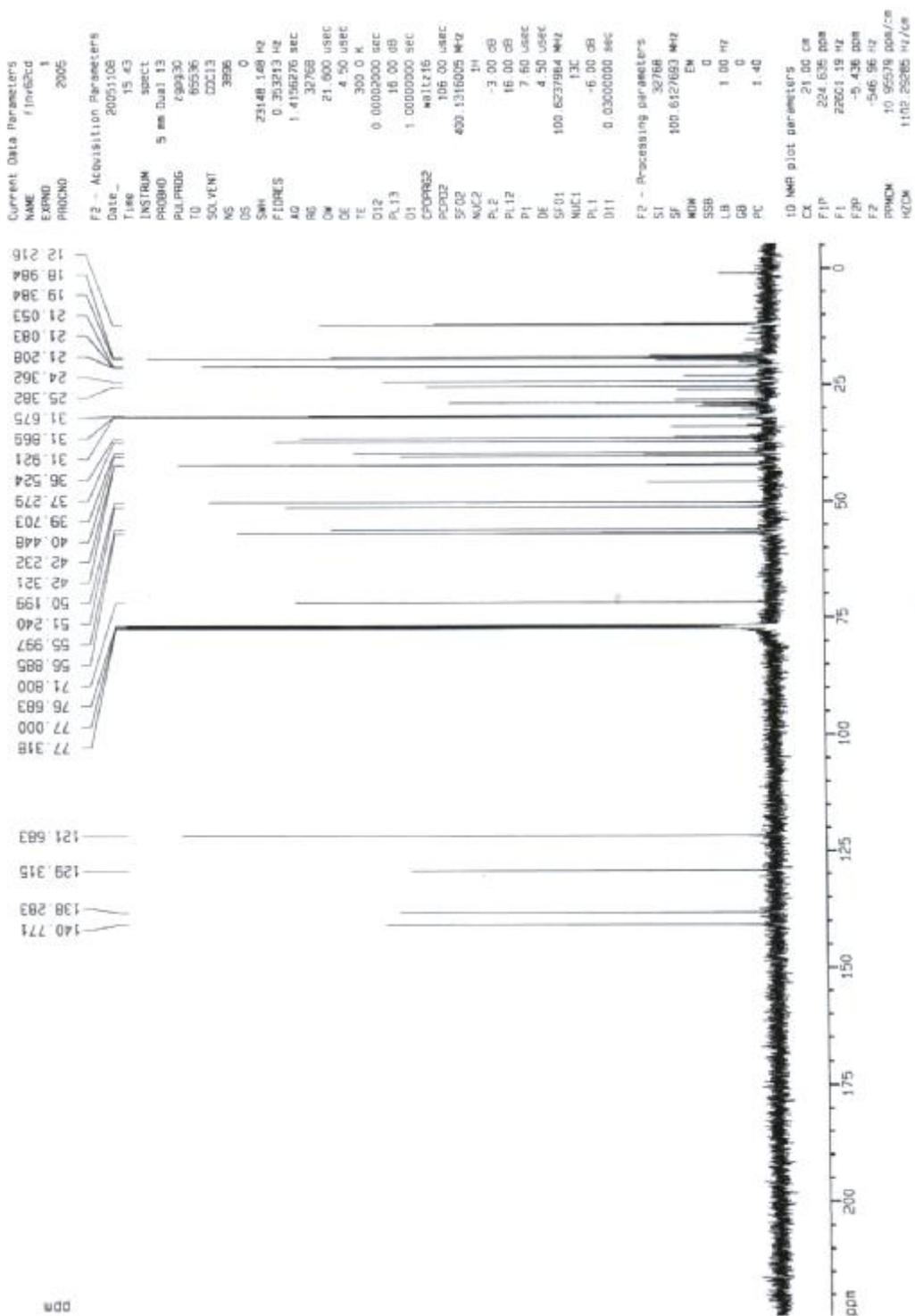


Figura 59: Espectro ^{13}C -RMN de V4, em CDCl_3 .

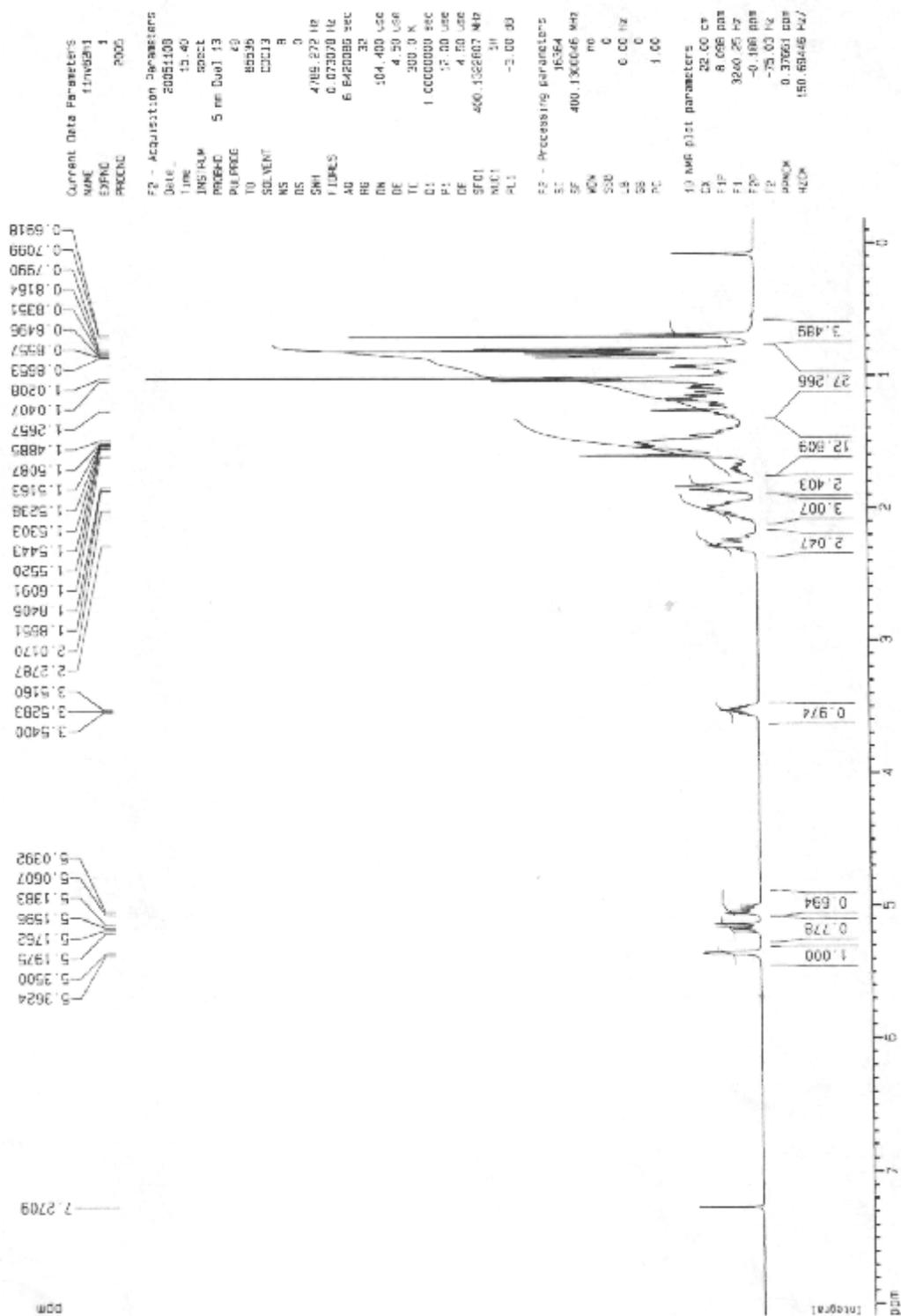


Figura 60: Espectro ^1H -RMN de V4, em CDCl_3 .

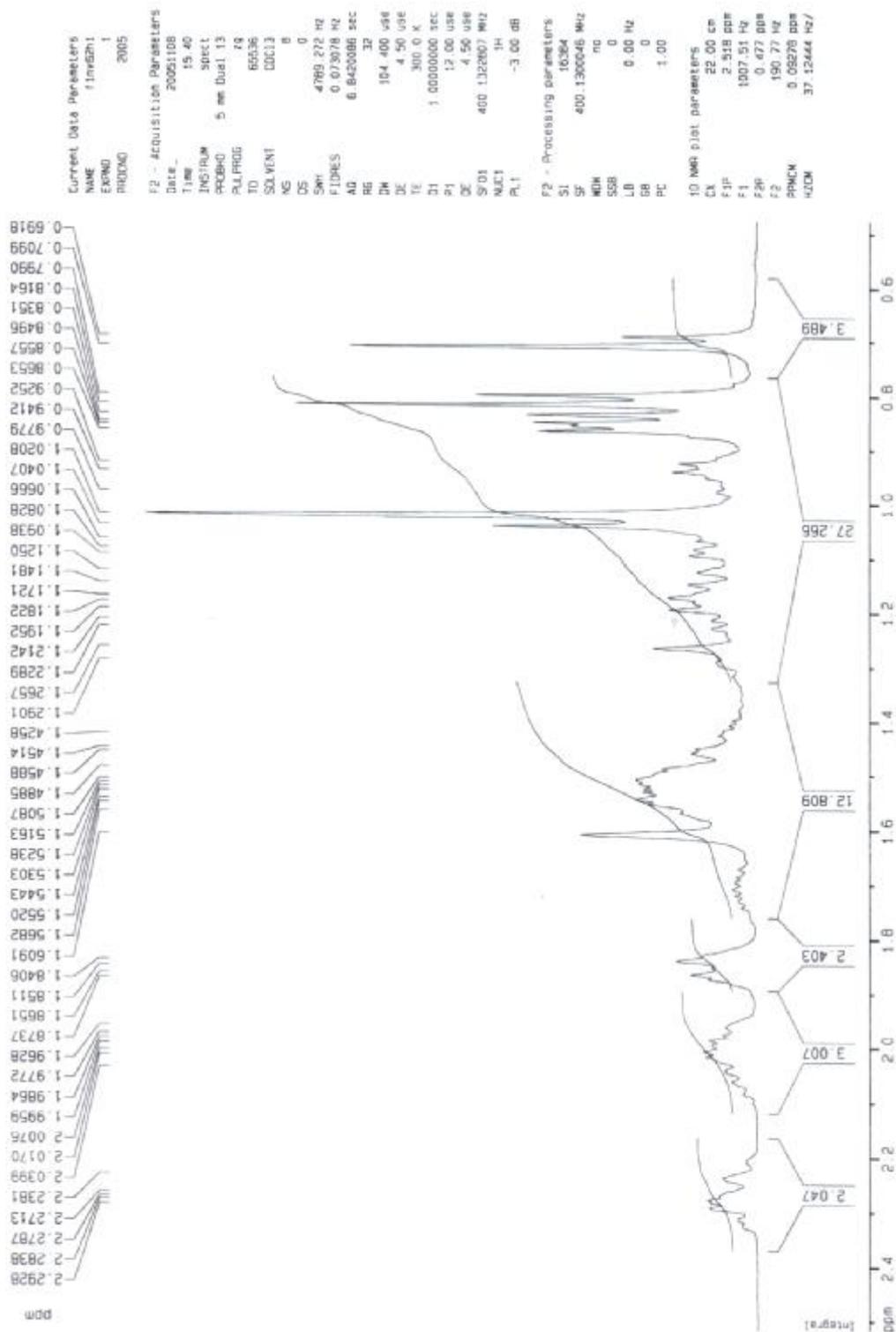


Figura 61: Espectro ^1H -RMN ampliado de V4(d_{H} 0,5-2,5 ppm), em CDCl_3 .

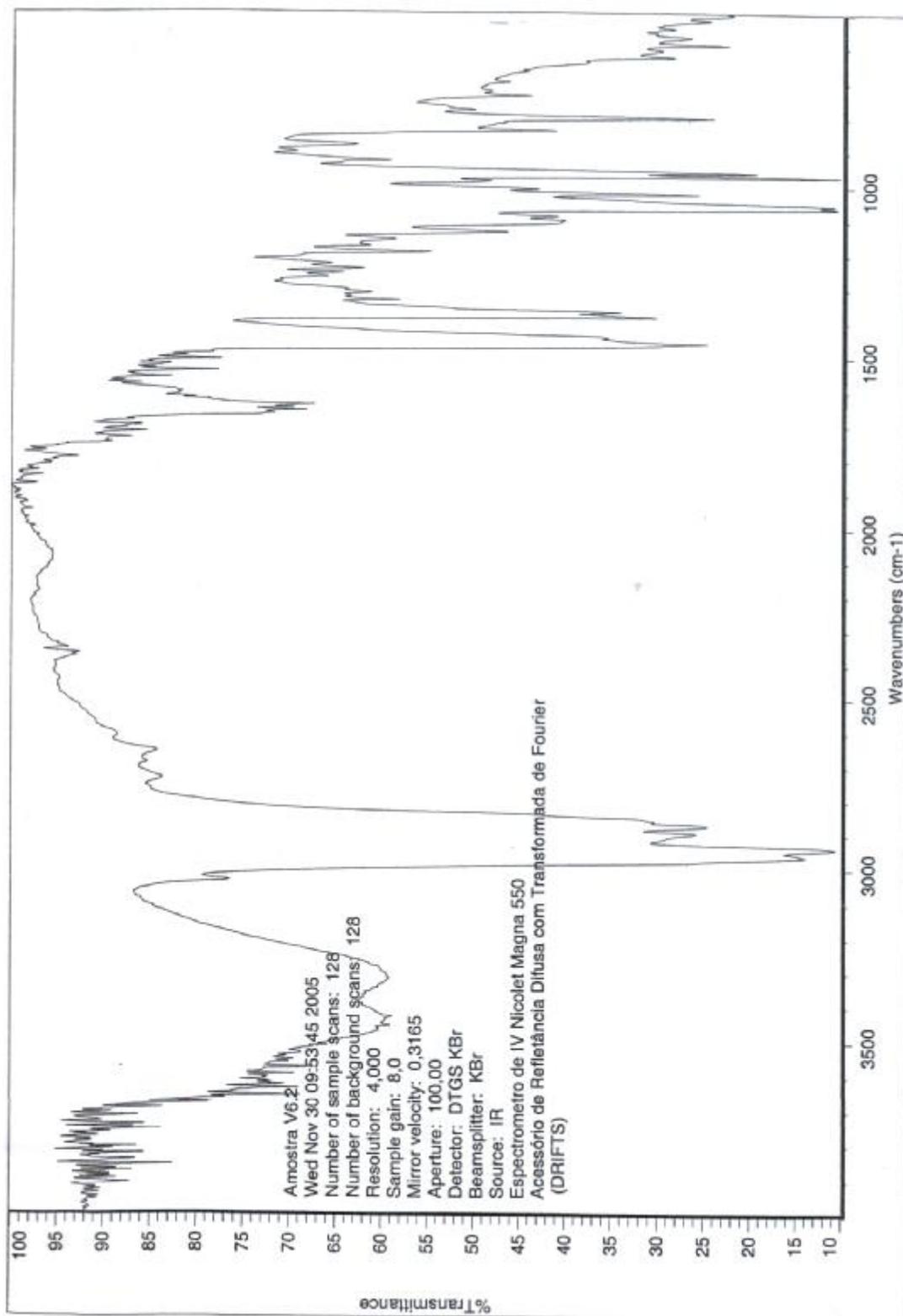


Figura 62: Espectro IV de V4, em pastilhas de KBr.

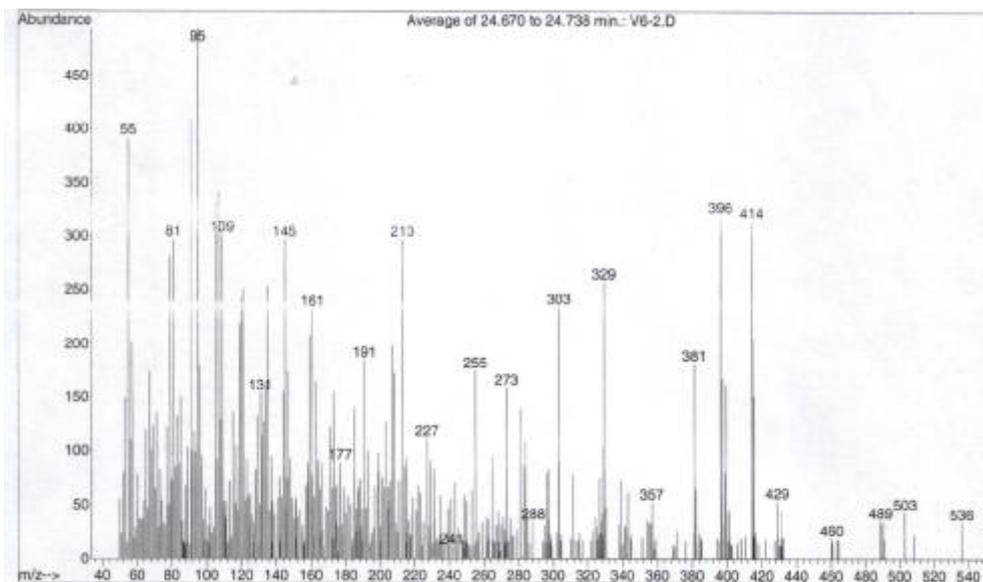


Figura 63: Espectro de Massas de V4.1.

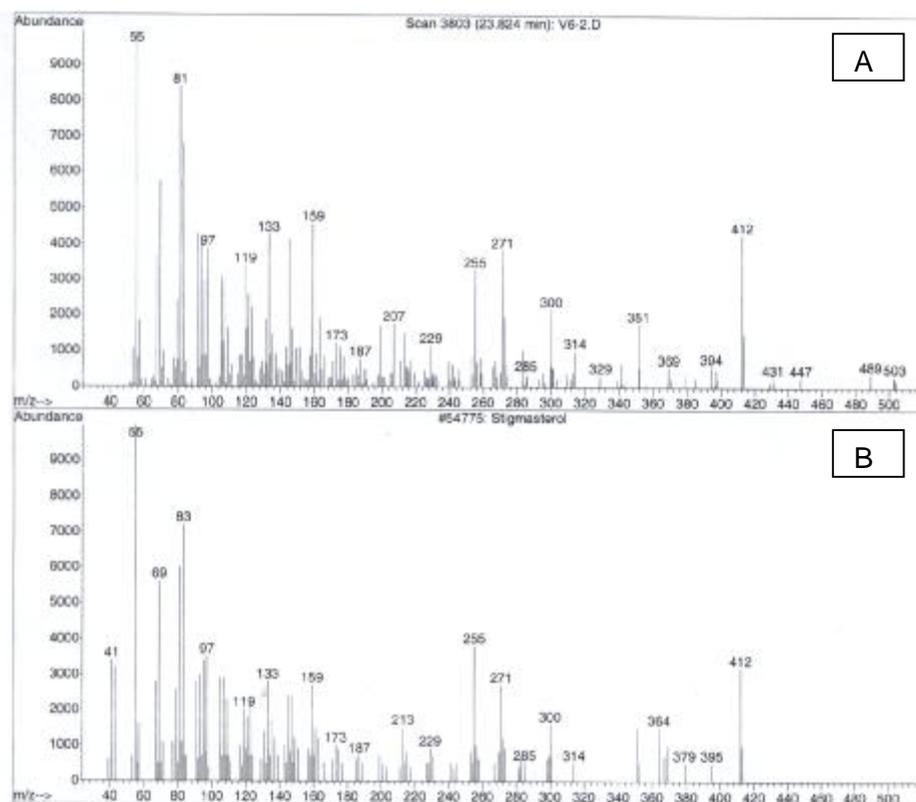


Figura 64: A - Espectro de massas de V4.2; B - Espectro de massas de estigmasterol sugerido pela biblioteca do aparelho.

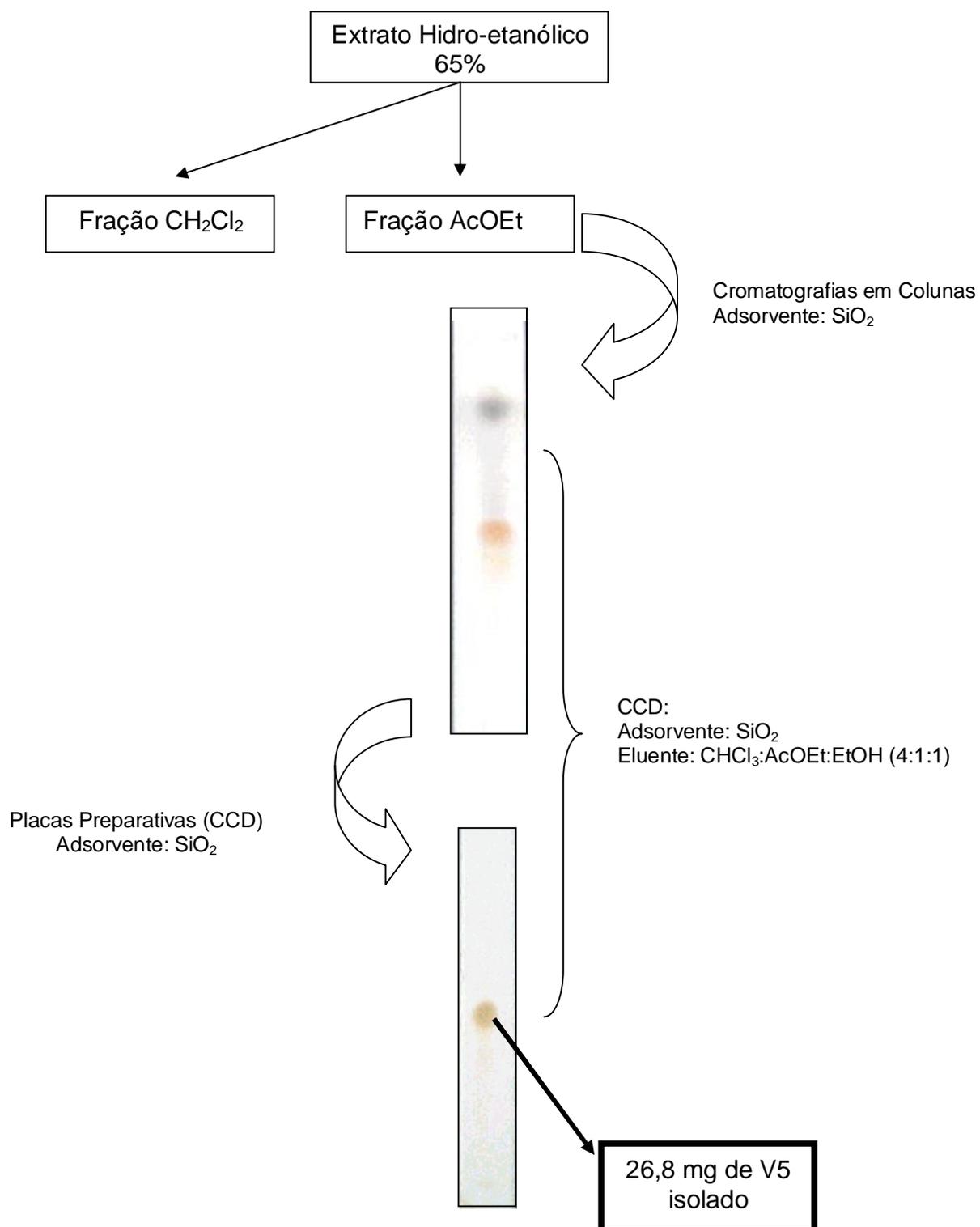


Figura 65: Esquema de isolamento do composto V5.

5.2.5. Elucidação estrutural de V5

A substância V5 foi isolada por cromatografia em coluna da fração acetato de etila (F-AcOEt) obtida a partir do extrato hidro-etanólico de *Vernonia tweedieana* Baker, seguida de cromatografia em placa preparativa, como esquematizado na Figura 65.

O composto foi obtido na forma de um sólido amorfo de coloração alaranjada. Na análise cromatográfica (CCD) com aspensão de anisaldeído sulfúrico e aquecimento, V5 é visualizado, sob luz visível, como uma mancha de cor laranja intensa. O solvente utilizado para as análises em RMN foi metanol deuterado (CD₃OD). Demais testes para a identificação do composto não foram realizados.

O espectro de ¹H-RMN (Figura 68, página 132) indica que o composto é uma flavanona pelo duplo dubleto do hidrogênio da posição C-2 em δ_H 5,25 ppm e pelos duplos dubletos dos hidrogênios ligados ao C-3 em torno de δ_H 3,0 ppm e 2,7 ppm. O espectro de carbono 13 (Figura 69, página 133) também confirma o caráter flavanona, pois o carbono da posição C-3 aparece em δ_C 44 ppm como sinal correspondente a um grupo metileno, como pode ser visualizado no espectro DEPT (Figura 70, página 134) (Falkenberg, 1991).

A presença de hidroxilas fenólicas no composto seria confirmada pelo espectro de ¹H-RMN por singletos acima de δ_H 9,0 ppm (Shen, et al., 1993). Entretanto, o solvente utilizado (CD₃OD) reage com essas hidroxilas e estes hidrogênios são removidos formando água. Isto justifica a ausência dos sinais referentes a estas hidroxilas e ainda a presença do sinal bastante intenso em δ_H 4,8 ppm, equivalente a água formada. Os hidrogênios ligados aos carbonos C-6 e C-8 aparecem como dois singletos em δ_H 5,86 ppm e em 5,88 ppm, indicando ligação de um hidrogênio a cada carbono (Liu et al., 1992).

A Tabela 16 apresenta os valores de deslocamento para carbono de compostos semelhantes a V5, retirados da literatura. Os dados apresentados referem-se a valores de deslocamentos medidos em DMSO *d*₆, para os compostos que foram utilizados como referência.

Já a Tabela 17 apresenta valores de deslocamento dos hidrogênios presentes nos carbonos das estruturas comparadas com V5 nestas características.

Os valores dos deslocamentos dos carbonos do composto V5 foram obtidos em CD₃OD. Observa-se que os dados obtidos nos dois diferentes solventes apresentaram uma diferença em torno de 2 ppm para campo mais baixo, sendo, no entanto, sobreponíveis aos valores das referências 1 e 2.

O espectro de ¹³C-RMN de V5 comparado com dados da literatura sugere hidroxilas no anel A em C-5 (δ_C 165,41 ppm) e em C-7 (δ_C 167,97 ppm). Também, mostra que os carbonos C-6 e C-8 não estão ligados a oxigênios, aparecendo C-6 e C-8 em δ_C 96,36 ppm. Eles possuem o mesmo deslocamento pois há uma simetria/equivalência entre estes dois carbonos e eles podem se deslocar no mesmo ponto (Silverstein et al., 2000). Estes dados se tornam ainda mais relevantes quando são comparados os espectros de V5 com outros de compostos oxigenados na posição C-6. Estes espectros revelam sinais em δ_C 129 ppm quando C-6 é oxidado. Dessa forma, certifica-se de que V5 se trata de uma flavanona com duas hidroxilas ligadas ao anel A, em C-5 e C-7.

O padrão de substituição do anel B é definido no espectro de ¹H-RMN pela presença de singleto em δ_H 6,909 ppm, característico de um hidrogênio em C-2', assim como um singleto com dois hidrogênios em δ_H 6,77 ppm característico de H5' e H6' (Liu et al., 1992). O espectro de ¹³C-RMN quando comparado com dados da literatura comprova que há duas hidroxilas neste anel B. Uma no C-3' em 146,49 ppm e outra em C4' em 146,86 ppm. Este mesmo espectro mostra o carbono C-1' aparece em 131,8 ppm; o C-2' em 114,709 ppm; C-5' em 116,27 ppm e C-6' em 119,24, todos ligados a um hidrogênio cada, exceto C-1' que é quaternário (ver tabela 16).

O conjunto de dados espectroscópicos de V5 é compatível com os dados espectroscópicos da flavanona eriodictiol (5,7,3',4'- tetrahidroxiflavanona), substância já isolada em *Eriodictyon californicum* (Liu et al., 1992), em *Rhus retinorrhoea* (Anacardiaceae) (Ahmed et al., 2001) e até de uma espécie de *Vernonia*, a *Vernonia syringifolia* (Zdero et al., 1991), entre outras plantas.

Tabela 16: Valores espectroscópicos de RMN ¹³C-DEPT de V5 e das referências (d):

C	DEPT 135 °	V5 CD ₃ OD	REF.1 DMSO d ₆	REF.2 DMSO d ₆	REF.3 DMSO d ₆	REF.4 DMSO d ₆	REF.5 DMSO d ₆	REF.6 DMSO d ₆	REF.7 DMSO d ₆
2	CH	80,452	78,3	80,0	79,0	79,0	*	78,6	79,7
3	CH ₂	44,076	42,0	43,4	43,2	43,1	42,0	*	43,5
4	C=O	197,598	196,0	197,7	196,0	195,9	195,9	197,3	197,5
5	Cq-O	165,412	163,4	164,8	164,1	164,1	163,4	158,4	159,9
6	C-H	97,217	95,6	95,3	95,1	96,7	95,8	129,6	109,8
7	C-OH	168,971	166,5	168,7	168,0	166,0	166,7	160,5	165,4
8	CH	96,364	94,9	94,5	94,2	95,7	95,0	91,9	106,1
9	Cq	164,807	162,8	164,1	162,8	163,1	162,8	153,8	160,7
10	Cq	103,213	101,7	103,6	103,1	102,6	101,7	102,4	102,8
1'	Cq	131,828	129,4	131,1	131,5	134,0	130,7	128,6	131,7
2'	CH	114,709	114,2	114,6	112,6	122,6	128,1	128,1	114,6
3'	C-OH	146,498	145,0	146,1	145,9	130,7	113,9	115,0	146,4
4'	C-OH	146,869	145,5	146,5	147,0	155,9	159,4	157,5	146,4
5'	CH	116,27	115,3	116,0	110,6	135,6	113,9	115,0	116,6
6'	CH	119,239	117,8	119,1	118,2	127,1	128,1	128,1	118,8

REF.1) Citado como eriodictiol, C₁₅O₁₂O₆ (Liu et al., 1992).

REF.2) Citado como eriodictiol-7-metil-eter (5,3'-dihidroxi – 7,4'- dimetoxiflavanona) (Vasconcelos *et al.*, 1998).

REF.3) Citado como eriodictiol-7,4'-dimetil éter (Vasconcelos et al., 1998).

REF.4) Citado como burtinona (Yenesew et al., 1998).

REF.5) Citado como naringenina 4'-metil-eter,- C₁₆H₁₄O₅ (Liu et al., 1992).

REF.6) Citado de 5,4dihidroxi – 6,7 – dimetoxiflavanona (C₁₇H₁₆O₆) (Liu et al., 1992).

REF.7) Citado de 6-prenil-8-(2-hidroxi-3metelbut-3enil)-5,7,3',5'-tetrahidroxiflavanona. (Ngadjui et al., 1999).

*. Dados não fornecidos.

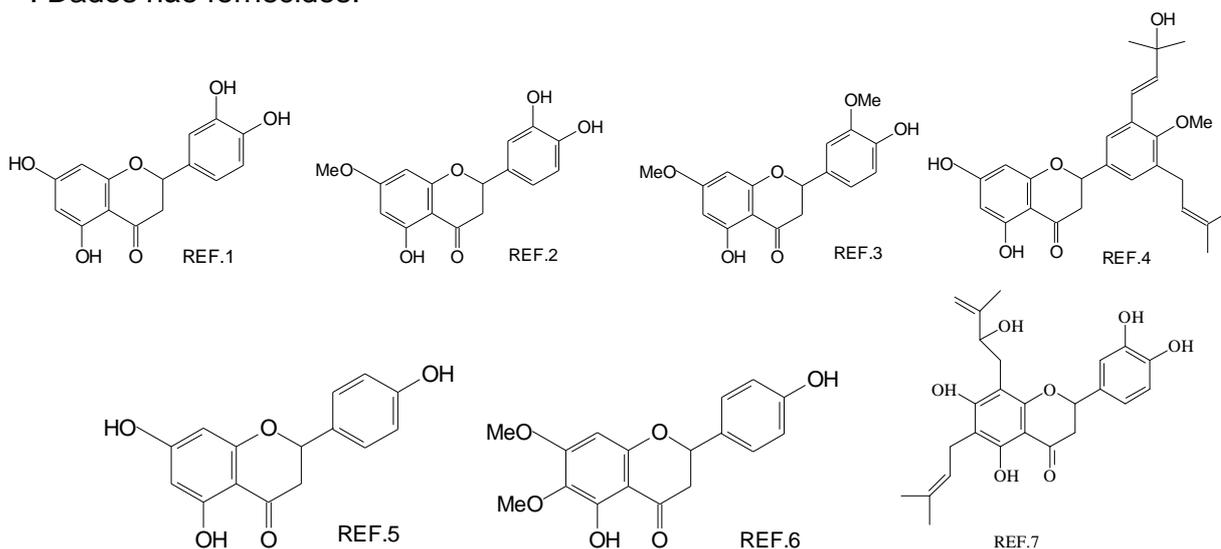


Figura 66: Estruturas referentes aos compostos mostrados na tabela 16.

Tabela 17: Valores espectroscópicos de ^1H RMN de V5 e das referências (d=ppm).

	V5 CD ₃ OD	Ref.1 CDCl ₃	Ref.2 DMSO d ₆	Ref.3 DMSO d ₆	Ref.4 DMSO d ₆	Ref.5 DMSO d ₆	Ref.6 DMSO d ₆
H2	5,26 <i>dd</i>	5,33 <i>dd</i>	5,28 <i>dd</i>	5,36 1H <i>dd</i>	5,43 1H <i>dd</i>	-	5,36 <i>dd</i>
H3 cis	2,69 <i>dd</i>	2,76 <i>dd</i>	2,71 <i>dd</i>	2,66 1H <i>dd</i>	2,73 1H <i>dd</i>	-	2,74 <i>dd</i>
H3 trans	3,05 <i>dd</i>	3,11 <i>dd</i>	3,04 <i>dd</i>	3,17 1H <i>dd</i>	3,21 1H <i>dd</i>	-	3,13 <i>dd</i>
H6	5,86 <i>s</i>	5,98 <i>s</i>	5,99 <i>s</i>	5,87 1H <i>s</i>	5,96 1H <i>s</i>	6,20 1H <i>d</i>	-
H8	5,88 <i>s</i>	5,98 <i>s</i>	5,99 <i>s</i>	5,86 1H <i>s</i>	5,96 1H <i>s</i>	6,41 1H <i>d</i>	-
H2'	6,909 <i>s</i>	7,09 <i>s</i>	7,37 <i>d</i>	6,86 1H <i>s</i>	7,18 1H <i>d</i>	7,53 1H <i>d</i>	7,10 <i>s</i>
H5'	6,782 <i>s</i>	-	-	6,73 1H <i>s</i>	6,88 1H <i>d</i>	6,98 1H <i>d</i>	6,83 <i>s</i>
H6'	6,7794 <i>s</i>	7,09 <i>s</i>	7,09 <i>d</i>	6,73 1H <i>s</i>	6,98 1H <i>dd</i>	7,91 1H <i>dd</i>	6,83 <i>s</i>

V1) Composto fenólico isolado nesta monografia.

Ref.1) Citado como abissinona V-4'-metil éter (Yanesew et al., 1998).

Ref.2) Citado como abissinona V (Yanesew et al., 1998).

Ref.3) Citado como eriodictiol – C₁₅H₁₂H₆ (Liu et al., 1992).

Ref.4) Citado como homoeriodictiol – C₁₆H₁₄O₆ (Liu et al., 1992).

Ref.5) Citado como isorhamnetina 3-O-β-D-apio-D-furanosil (1à6) -β-D-galactopiranosil (Miserez et al., 1996).

Ref.6) Citado como 6-prenil-8-(2-hidroxi-3metilbut-3-enil)-5,7,3',5'-tetrahidroxiflavanona (NGADJUI, B. T., et al., 1999).

(-): ausente.

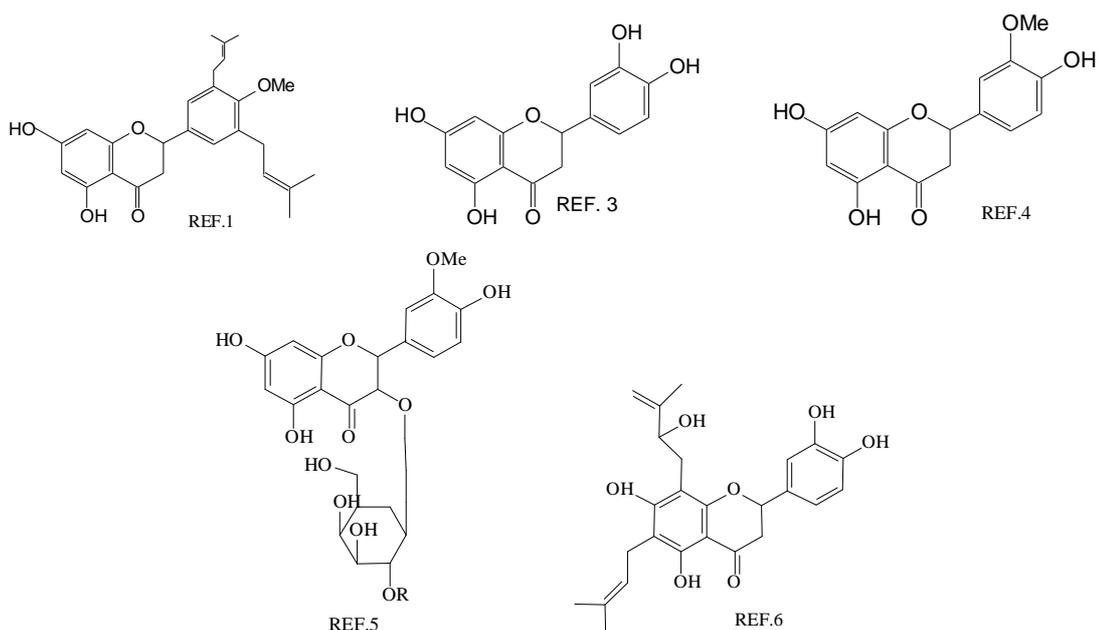


Figura 67: Estruturas referentes aos compostos mostrados na tabela 17.

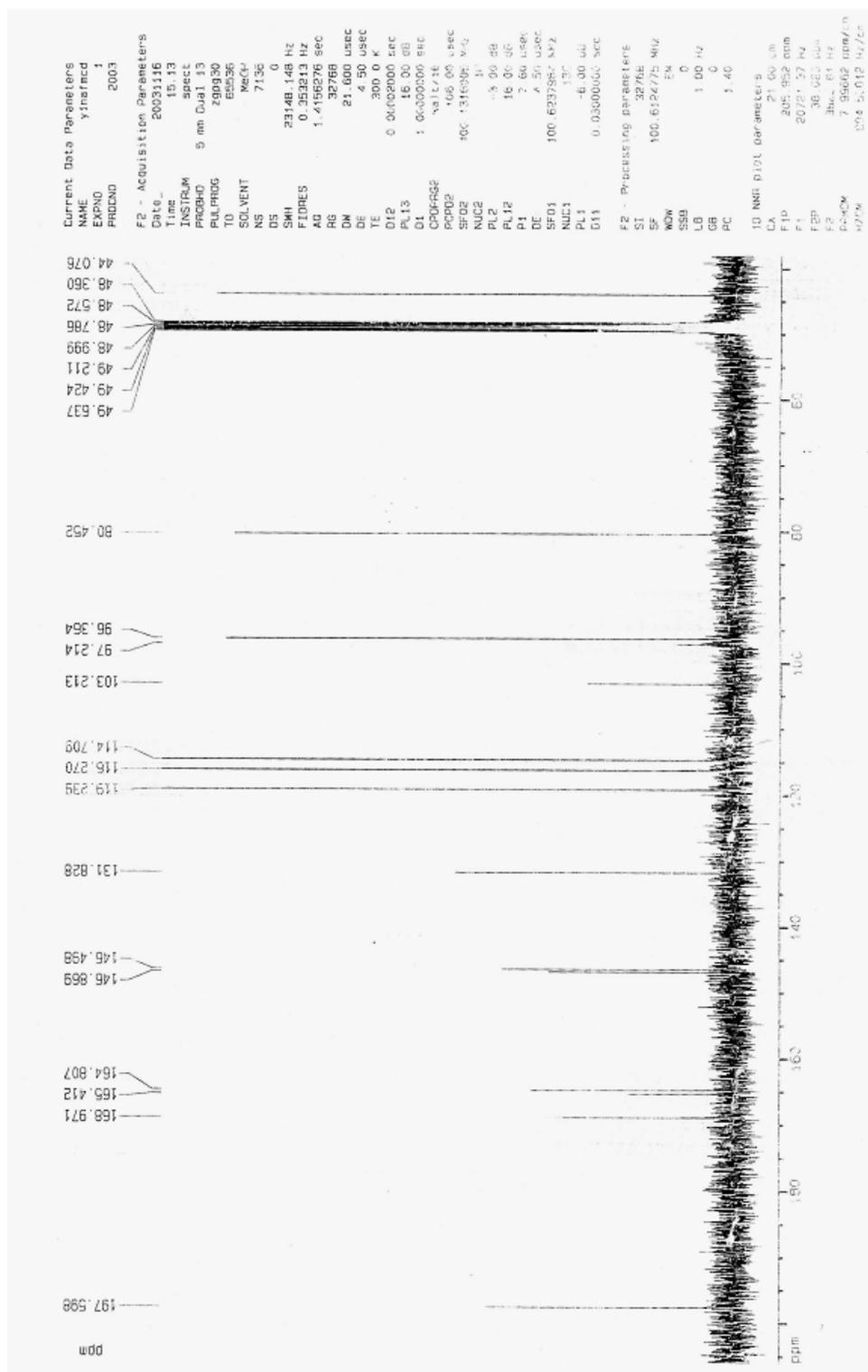


Figura 69: Espectro de ^{13}C -RMN de V5, em CD_3OD_3 .

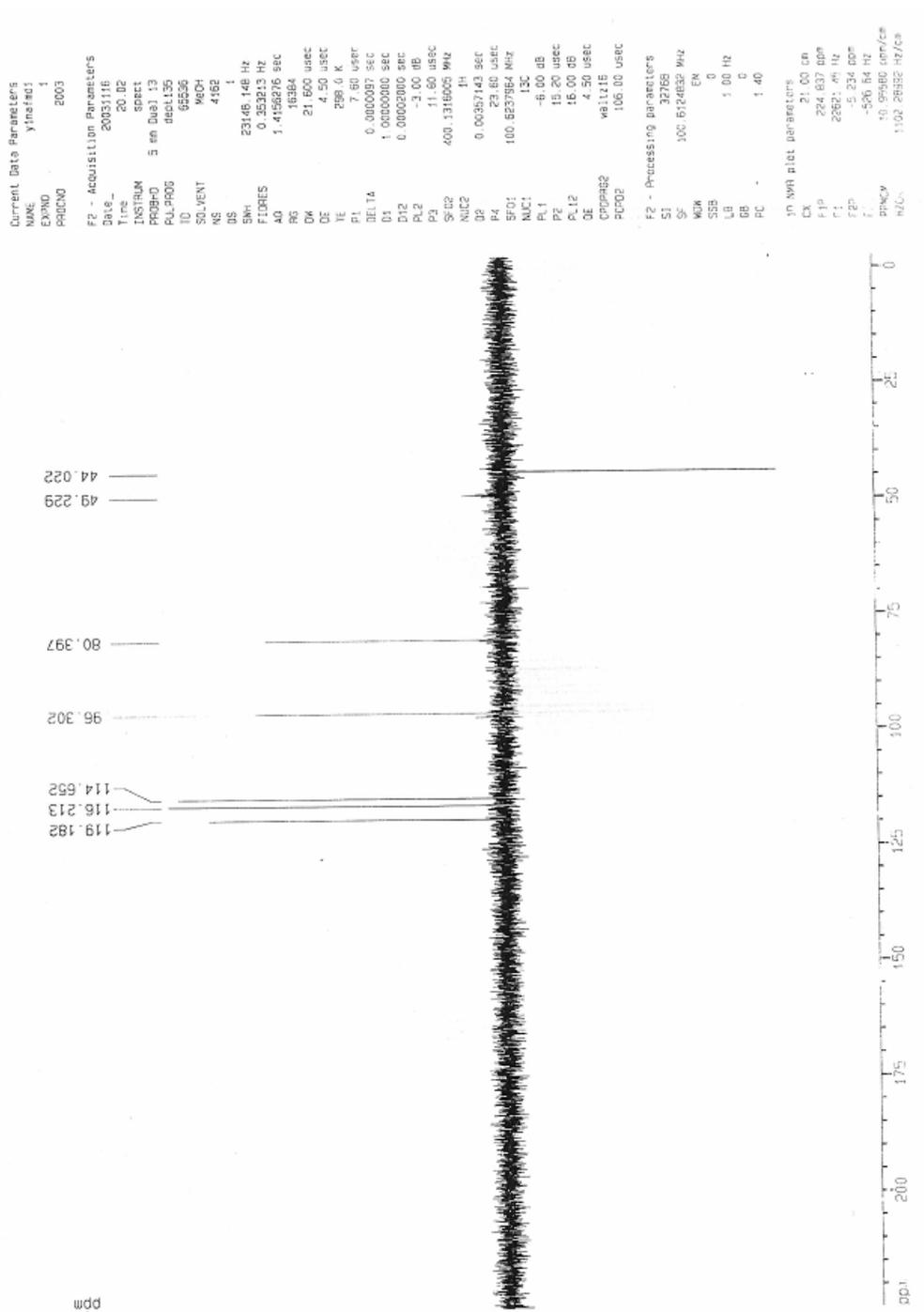


Figura 70: Espectro de ^{13}C -RMN – DEPT 135 $^{\circ}$ de V5, em CD_3OD_3 .

5.3. Avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de *Vernonia tweedieana* Baker

O método utilizado foi de Choi e colaboradores (2002), empregando-se como padrão o ácido ascórbico, já que este possui atividade antioxidante comprovada e, portanto, inibe a ação do DPPH. A porcentagem de inibição de cada fração analisada frente ao DPPH foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{(\text{Ab amostra} - \text{Ab branco})}{\text{Ab controle}} \times 100 \right]$$

Onde:

Ab amostra = absorbância da amostra;

Ab branco = absorbância do branco;

Ab controle = absorbância do controle.

O controle foi feito com 1,0 mL da solução de DPPH 0,3 mM mais 2,5 mL de etanol. O branco foi a própria solução em cada concentração a ser testada, visando minimizar a interferência de componentes dos extratos na leitura.

A tabela 18 mostra as médias das leituras (em absorbância) do DPPH, após trinta minutos de contato deste com o ácido ascórbico (padrão) e com os extratos testados. A partir dessas absorbâncias foi obtido o percentual de inibição, que corresponde à atividade antioxidante dos extratos. A análise de uniformidade dos dados foi efetuada através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação percentual (CV%).

Tabela 18: Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e das frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol de *Vernonia tweedieana*.

Concentração (mg/mL)	Média (Abs)	Desvio padrão	Coefficiente de variação	% Inibição
Ácido ascórbico				
7,8	0,463	0,0089	1,92	43,3
15,6	0,134	0,0023	1,72	83,66
31,25	0,018	0,001	5,55	97,81
62,5	0,014	0,001	7,14	98,26
125	0,014	0,001	7,14	98,3
CH₂Cl₂				
7,8	0,7733	0,0211	2,73	17,85
15,6	0,6903	0,0220	3,19	26,67
31,25	0,4443	0,0099	2,22	52,81
62,5	0,137	0,0035	2,53	78,62
125	0,1197	0,0015	1,28	87,35
AcOEt				
7,8	0,637	0,021	3,29	32,3
15,6	0,538	0,0046	0,85	42,82
31,25	0,3487	0,0603	1,73	63,01
62,5	0,091	0,001	1,99	90,32
125	0,1067	0,0081	7,58	88,73
BuOH				
7,8	0,6087	0,0040	0,66	35,38
15,6	0,420	0,0183	4,36	54,44
31,25	0,3347	0,0093	2,78	64,08
62,5	0,1347	0,0145	10,74	85,75
125	0,054	0,001	1,85	94,26
Bruto				
7,8	0,7893	0,0148	1,88	16,15
15,6	0,701	0,0201	2,86	25,5
31,25	0,5307	0,0119	2,25	43,67
62,5	0,2583	0,0080	3,10	72,58
125	0,0917	0,0055	6,00	90,32

A representação gráfica das concentrações de cada amostra em relação à sua atividade antioxidante está representada na figura 71.

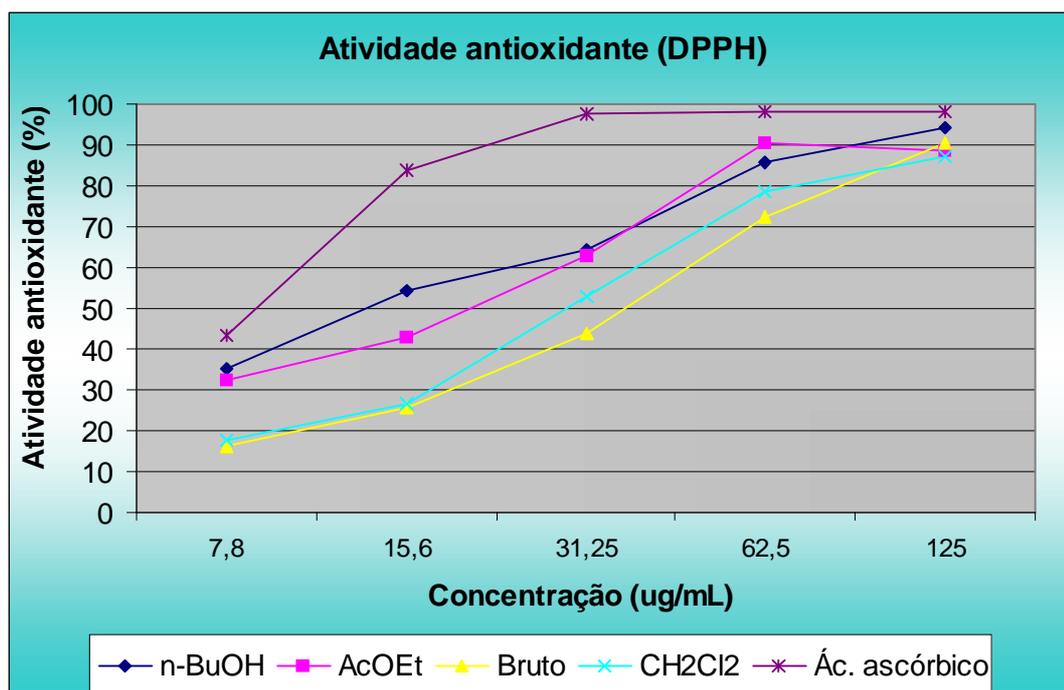


Figura 71: Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão), do extrato bruto e das frações CH₂Cl₂, AcOEt, *n*-BuOH das folhas de *V. tweediana*.

As atividades foram dose-dependentes, o que permitiu o cálculo do IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50 % da atividade do DPPH) para cada uma das frações analisadas. As médias das absorvâncias referentes a cada concentração foram utilizadas no cálculo da porcentagem de inibição do DPPH (conforme equação apresentada na página 136) e as porcentagem de inibição obtidas para cada fração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* % de inibição, calculando-se o coeficiente de regressão linear e equação da reta correspondente pelo método dos mínimos quadrados. O cálculo do IC₅₀ foi efetuado levando-se em consideração o intervalo de concentração que apresentou linearidade (tomando-se como referência a

faixa ascendente da reta). Este procedimento foi semelhante ao apresentado por Tsimogiannis & Oreopoulou (2005).

5.4. Avaliação da toxicidade aguda da planta *Vernonia tweedieana* Baker

Não foram verificados óbitos e tão pouco outros sinais de toxicidade e efeitos adversos para o extrato hidro-etanólico bruto e suas frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica de *V. tweedieana* Baker no teste de toxicidade aguda oral em camundongos. As doses testadas foram até 5.000 mg/kg, que é o máximo da dose a ser testada na toxicidade aguda para extratos de plantas (OECD/OCDE, 2001). Com isso, DL₅₀ não pôde ser determinada.

6. DISCUSSÃO

A história das civilizações mostra que o homem, como os demais seres vivos, soube explorar e assim adaptar-se em seu habitat conseguindo, ao decorrer de sua evolução, melhores relações com o meio ambiente e com isso melhores condições de sobrevivência. Nesta “evolução adaptativa” acumulou-se um conhecimento tradicional (popular) que ainda hoje continua sendo importante, tanto para as populações menos assistidas, como para o setor farmacêutico. Parece curioso nos tempos atuais, quando a pesquisa científica solidifica-se com os freqüentes ineditismos obtidos através de mecanismos totalmente informatizados, que haja uma constante busca e valorização pela retomada do conhecimento popular, e principalmente no uso desse conhecimento popular.

Segundo Elisabetsky (1999) este conhecimento popular a respeito do uso da flora medicinal pode contribuir com o desenvolvimento científico. Esta relação relato popular x ciências é denominada etnofarmacologia. O método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses quanto à(s) atividade(s) farmacológica(s) e à(s) substâncias ativas responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas pelas populações. A seleção de espécies vegetais para pesquisa e desenvolvimento baseia-se na alegação de um dado efeito terapêutico em humanos e pode se constituir em um valioso atalho para a descoberta de fármacos, já que seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos.

A vasta gama de informações sobre o uso de plantas como ‘remédios’ em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Como a maior parte da flora é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico (Elisabetsky, 1999).

Uma das principais aplicações destes estudos se encontra no âmbito das ciências farmacêuticas, responsáveis pela produção de novos medicamentos. Embora a importância dos medicamentos de origem vegetal seja freqüentemente subestimada, numerosas substâncias deste tipo fazem parte do arsenal terapêutico da medicina do século XX. Rutina, papaína, morfina e codeína são exemplos de princípios ativos amplamente utilizados na atualidade e que são de origem vegetal (Matos, 1998).

Salienta-se que apesar dessa importância da fitoterapia na vida do homem e da grande variedade de plantas utilizadas, apenas 15% destas foram estudadas e/ou tiveram suas propriedades químicas e farmacológicas verificadas cientificamente (Ferreira, 1998). Com isso, um amplo campo de pesquisa se abre na área de produtos naturais. Neste ímpeto, estudou-se a espécie *Vernonia tweedieana* Baker (Asteraceae), popularmente conhecida como assa-peixe. É uma planta característica da região sul do Brasil, Paraguai e Argentina onde é utilizada popularmente para o tratamento de doenças respiratórias, constituindo-se de uma alternativa eficaz em gripes, bronquites e tosses.

A ausência de estudos químicos sobre a espécie em questão, aliados ao fato da importância do registro químico de espécies endêmicas dos biomas brasileiros, principalmente as que são utilizadas para fins terapêuticos, motivaram o presente trabalho que descreve o estudo fitoquímico de *Vernonia tweedieana* Baker.

Fêz-se um macerado com folhas secas utilizando-se como líquido extrator etanol em água (65%, v/v). O extrato foi concentrado e particionado com solventes orgânicos de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol.

A análise cromatográfica (CCD) destes extratos com revelador anisaldeído sulfúrico e aquecimento mostrou que a fração diclorometânica deteve compostos com características apolares, possivelmente agliconas esteroidais e triterpênicas (manchas com coloração roxa) que já foram identificadas no gênero *Vernonia* (Jisaka et al., 1993; Perdue et al., 1993). Da fração acetato de etila destacaram-se as manchas laranjas e amarelas, possivelmente de flavonóides. Já a fração *n*-butanólica apresentou manchas azuladas com propriedades polares (retenção na sílica) indicando se tratar de saponinas.

A investigação fitoquímica de *V. tweedieana* resultou na caracterização, através de dados espectroscópicos como espectrometria de massa (MS), infravermelho (IV) ¹H-RMN e ¹³C-RMN de sete compostos. Da fração diclorometânica os triterpenos lupeol, e a mistura de α -amirina e β -amirina; os esteróides espinasterol e a mistura de β -sitosterol e estigmasterol. E da fração acetato de etila, o flavonóide eriodictiol.

O grande número de substâncias triterpênicas de ocorrência vegetal já é bem conhecido. Uma ampla diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização,

predominantemente oxigenada, leva a mais de mil estruturas. Dentro dessa variedade existem alguns que ocorrem com maior frequência. Estes apresentam apenas um grupo funcional no C-3 e são pentacíclicos ou tetracíclicos que contém no máximo uma e duas ligações duplas, respectivamente. Exemplos característicos são o lupeol, a α -amirina, a β -amirina, a friedelina e o lanostadieno (Olea & Roque, 1990).

Quando vários triterpenos do tipo mencionado estão presentes em um mesmo extrato vegetal, o fracionamento deste por técnicas cromatográficas convencionais dificilmente leva ao isolamento de substâncias puras. O que se obtém normalmente é uma mistura de triterpenos de difícil resolução. Estas situações podem ser enfrentadas de maneiras variadas dependendo do objetivo do estudo: se o interesse é isolar as substâncias, utilizando técnicas cromatográficas especiais (CLAE e CG de alta resolução, que envolvem custos, padrões e tempo), ou, se o objetivo é meramente identificá-las, recorrendo a outros procedimentos, geralmente métodos físicos de análise para identificar triterpenos em mistura (Olea & Roque, 1990; Maia et al., 2000)

Um levantamento e uma análise de dados de ^{13}C -RMN de triterpenos registrados na literatura mostram que os deslocamentos dos carbonos sp^2 , quando presentes, são altamente característicos de cada esqueleto, pelo menos no caso de triterpenos oxigenados no C-3. Foi observado que em nenhum dos casos analisados, uma variação do grupo funcional em C-3 provoca mudanças nos deslocamentos dos carbonos olefínicos. Isto permite que substâncias possam ser identificadas por dados de ^{13}C -RMN, mesmo em misturas (Olea & Roque, 1990; Bhattacharyya et al., 1986; Galotta et al., 2005).

Pelos dados de ^{13}C -RMN totalmente desacoplado pode-se ter as seguintes informações: a) função orgânica presente no triterpeno (álcool, acetato, éteres, cetonas,...), b) número aproximado de triterpenos na mistura (número de sinais registrados, que é sempre menor que o de carbonos totais) e c) abundância relativa dos triterpenos (intensidade relativa dos sinais) (Olea & Roque, 1990).

Os dados do espectro de ^{13}C -RMN caracterizam as séries urseno (139,18 e 124,44 ppm) e oleaneno (121,75 e 145,18 ppm) (Aragão et al., 1990; Mendes et al., 1999; Maia et al., 2000; Carvalho et al., 1998; Garai & Mahato, 1997; Baykal et al., 1998; Berrondo et al., 2003; Olea & Roque, 1990). São núcleos triterpênicos isoméricos

possuíntes de uma dupla ligação entre C-12 e C-13, diferindo somente na posição de uma metila (C-30) em C-19 ou C-20, respectivamente. Os valores de deslocamento confirmam a presença de um esqueleto do tipo ursan-12-eno, pois em geral, o carbono 12 é desblindado (cerca de 2 ppm), enquanto o carbono 13 é blindado (cerca de 5 ppm) nas séries ursan-12-eno em relação às séries olean-12-eno. A diferença entre os dois valores é determinada pela presença do grupamento 19- α -CH₃ (equatorial), que nas séries ursan-12-eno está bem próximo à dupla ligação (efeito γ e $\bar{\gamma}$ para C-13 e C-12, respectivamente), afetando estericamente os valores de deslocamentos destes carbonos (Athayde, 1993).

A localização desta metila (C-30) influencia também o deslocamento de C-18. Quando a posição é no C-19 (α -amirina) C-18 apresenta um efeito β a mais (+9,4 ppm) e um efeito γ a menos (-2,5 ppm) em relação à localização da metila em C-20 (β -amirina). Isto resulta em uma diferença de cerca de 12 ppm nos deslocamentos observados para C-18 que foram de 59,10 ppm para α -amirina e 47,26 ppm para β -amirina (ver elucidção estrutural de V2).

O espectro de ¹H-RMN desta mistura também fornece dados que caracterizam a mistura de α e β -amirinas, principalmente os tripletes em δ_H 5,19 e 5,14 ppm. Pelo fato de um dos carbonos envolvidos na dupla ligação ser quaternário (C-13) e portanto não possuir hidrogênios, conclui-se que os sinais verificados são pertencentes ao hidrogênio de C-12. Este hidrogênio acopla com os dois hidrogênios H-11, resultado em um triplete para α -amirina e um para β -amirina. Certifica-se quando se compara com dados da literatura onde estes δ são característicos dos hidrogênios H-12 em urseno (α -amirina) e oleaneno (β -amirina), respectivamente (Carvalho et al., 1998; Souza et al., 2001; Miyase et al., 1996; Aragão et al., 1990; Baykal et al., 1998; Susunaga et al., 2001). Esta diferença é explicada pela presença do grupamento 19- α -CH₃ (equatorial), que exerce efeito sobre H-12 nas séries ursan-12-eno, afetando estericamente o valor de deslocamento deste hidrogênio. Como em olean-12-eno esta metila encontra-se no C-20, H-12 não sofre este efeito.

Diversos trabalhos têm documentado a dificuldade do isolamento dos isômeros triterpênicos α -amirina e β -amirina, tais como Kasuyoshi et al., 1957; Susunaga et al., 2001; Carvalho et al., 1998; Souza et al., 2001; Maia et al., 2000; Aragão et al., 1990;

Berrondo et al., 2003; Mendes et al., 1999. Da mesma forma, a separação de misturas de glicosídeos com a mesma cadeia de açúcares e agliconas com esqueletos ursan-12-eno e olean-12-eno constitui uma dificuldade ainda não superada (Souza et al., 1984, Miana et al., 1987; Srivastava et al., 1989). Outro exemplo de insucesso no isolamento destes isômeros é a mistura de cinamato de α e β -amirina (Carvalho et al., 1998), assim como da mistura de α e β -amirenona (Carvalho et al., 1998; Olea & Roque, 1990). Ainda, a mistura dos isômeros 3,16-diidroxí de α e β -amirina (breína e maniladiol, respectivamente) não pôde ser separada (Maia et al., 2000). Entretanto, a elucidação estrutural de misturas é possível, principalmente pelos dados de RMN ^{13}C (Olea & Roque, 1990; Bhattacharyya et al., 1986).

Da mesma forma que a mistura de α e β -amirina, muitos trabalhos tratam da dificuldade na separação dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol, mas mostram que é possível caracterizá-los mesmo em mistura (Carvalho et al., 1998; Brum et al., 1998; Chaves et al., 2004; Conegero et al., 2003; Carvalho et al., 2001; Paula et al., 1996). Kojima e colaboradores (1990) encontraram dificuldades no isolamento e caracterizaram uma mistura de quatro esteróides através de dados de RMN.

No presente trabalho, dentre os sinais verificados no espectro de ^{13}C -RMN para V4, quatro bem desblindados na região de carbonos sp^2 (121,683; 129,315; 138,283 e 140,771 ppm) sugerem duas duplas ligações. Segundo dados da literatura, sinais nestes deslocamentos (121,68 e 140,77 ppm) são característicos de esteróides com uma dupla ligação entre C-5 e C-6 (Ahmad et al., 1992; Chaurasia et al., 1987; De-Eknamkul & Potduang, 2003; Goulart et al., 1993) e em 129,31 e 138,28 ppm são característicos de uma dupla ligação entre C-22 e C-23 na cadeia lateral de esteróides (De-Eknamkul & Potduang., 2003; Goulart et al., 1993). Estes sinais são, portanto, muito importantes na elucidação estrutural de esteróides. Com a revisão literária acerca de compostos possuítentes destas características, constatou-se que é comum ocorrer o isolamento da mistura de β -sitosterol (24 α -etil-colestan-5-eno-3 β -ol) e estigmasterol (24 α -etil-colestan-5,22-dieno-3 β -ol) (Carvalho et al., 1998; De-Eknamkul & Potduang, 2003; Goulart et al., 1993, Conegero et al., 2003; Chaves et al., 2004; Brum et al., 1998; Carvalho et al., 2001; Paula et al., 1996). Estes compostos possuem uma mesma insaturação (Δ^5) portanto os sinais nos espectros de ^{13}C -RMN irão coincidir e assim os

sinais para C-5 e C-6 estarão mais intensos quando comparados com os outros dois sinais referentes a insaturação em Δ^{22} (que está presente somente em estigmasterol) (De-Eknamkul & Potduang, 2003). Os compostos β -sitosterol e estigmasterol possuem as porções cíclicas idênticas, diferindo somente na cadeia lateral. Por este motivo, apesar da existência de uma ligação dupla a mais no estigmasterol (cadeia lateral) os compostos apresentam propriedades muito semelhantes a ponto de terem comportamentos cromatográficos idênticos mesmo em sílicas impregnadas com AgNO_3 , seja em CCD ou em cromatografia em coluna.

Portanto, a dificuldade de separação destas misturas muitas vezes não justifica os gastos de tempo e material na obtenção de substâncias puras, quando o objetivo for apenas registrar a composição química da mistura (Maia et al., 2000). Isto justifica e fornece subsídios para a identificação das misturas α e β -amirina, e β -sitosterol e estigmasterol em *Vernonia tweedieana* Baker no presente estudo.

Outro composto identificado foi o triterpeno lupeol, que foi caracterizado principalmente por dados espectrais de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN. O espectro de ^{13}C -RMN mostrou dois sinais bem desblindados que são característicos de uma dupla ligação de compostos com esqueletos derivados do lupeol (δ 109,31 e 150,9 ppm), que apresentam um grupamento isopropenil com deslocamentos químicos específicos de 19,31, 109,31 e 150,9, para os carbonos C-30, C-20 e C-29, respectivamente (Aguiar et al., 2005; Mebe et al., 1998; Chaturvedula et al., 2004; Bhattacharyya et al., 1986).

No espectro de ^1H -RMN os sinais que caracterizaram lupeol foram os singletes em δ 4,56 e 4,68 ppm, que representam os dois hidrogênios geminais olefínicos (H-29a e H-29b). Aparecem em campo baixo pois estão ligados ao carbono que faz dupla ligação e assim sofrem forte efeito de desblindagem. Estes hidrogênios acoplam entre si formando dois singletes de integral um (Souza et al., 2001). Estes sinais somados ao δ_{H} do sinal de metila em 1,67 ppm, são característicos de hidrogênios pertencentes a um grupamento isopropenil, sugerindo que o composto se trata de um triterpeno pentacíclico do tipo lupeno (Jiang et al., 1995; Aguiar et al., 2005; Carvalho et al., 1998).

O esteróide espinasterol/condrilasterol, também isolado, foi caracterizado principalmente por dados espectrais de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN. Dos sinais verificados no ^{13}C -RMN, quatro bem desblindados na região de carbonos sp^2 (117,46; 129,48; 138,15

e 140,78 ppm) sugerem duas duplas ligações e são característicos de compostos com esqueletos esteroidais ramificados, especificamente do tipo espinasterol, quando as insaturações estão localizadas entre C-7 e C-8 (117,46 e 138,15 ppm) e entre C-22 e C-23 (129,48 e 140,78 ppm) (Itoh et al., 1981; Gomes & Alegrio, 1998; Souza et al., 2001).

Os sinais de hidrogênios olefínicos que apareceram em δ_H 5,03 (1H, *dd*, $J=8,8$ e 15,2 Hz, H-22 ou 23), δ 5,164 (1H, *dd*, $J=8,80$ e 15,2 Hz, H-22 ou 23) também são similares aos do espinasterol/condrilasterol (Itoh et al., 1981). Estes sinais aparecem em campo baixo pois os hidrogênios estão ligados a carbono que faz dupla ligação e assim sofrem forte efeito de desblindagem.

O conjunto de dados espectroscópicos de V3 é compatível com os dados estruturais dos esteróides espinasterol e condrilasterol. Estes isômeros estereoquímicos apresentam as insaturações nos mesmos locais, diferindo somente na configuração do grupamento etil em C-24, que em espinasterol aparece em α e em condrilasterol em β . Por este motivo geralmente estas substância são confundidas.

Apesar dos relatos quanto às diferenças dos deslocamentos de carbonos e hidrogênios entre espinasterol e condrilasterol (Itoh et al., 1981; Garg & Nes 1984), não foi possível caracterizá-los. Assim, a elucidação de V3, em particular a configuração de C-24, não pode ser estabelecida com as técnicas empregadas. Os valores observados em V3 foram intermediários aos valores de δ_H espinasterol e condrilasterol relatados na literatura e por isso não se pode afirmar qual dos compostos foi isolado.

Pelo fato destes esteróides serem compostos por 29 átomos de carbonos (espinasterol, β -sitosterol e estigmasterol) e ainda por possuírem duas duplas ligações, exceto β -sitosterol que possui uma, são isômeros e assim justifica-se a razão por aparecerem em misturas de difícil separação: pela semelhança de polaridade. Caso semelhante é verificado nos triterpenos (30 átomos de carbonos) lupeol, α e β -amirinas.

O flavonóide isolado da fração acetato de etila foi caracterizado por alguns sinais característicos nos espectros de 1H -RMN e ^{13}C -RMN. O espectro de hidrogênio indica que o composto é uma flavanona pelo duplo dubleto do hidrogênio da posição C2 em 5,25 ppm e pelos duplos dubletos dos hidrogênios da posição C3 em torno de 3,0 ppm e 2,7 ppm. O espectro de carbono 13 também confirma o caráter flavanona, pois o C-3

aparece em 44 ppm como sinal correspondente a um grupo metileno, como pode ser visualizado no DEPT 135^O. Os hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 8 aparecem como dois singletos em δ 5,86 ppm e 5,88 ppm, indicando ligação de um hidrogênio a cada carbono (Liu, et al., 1992).

O espectro de ¹³C-RMN de V5, comparado com dados da literatura, sugere hidroxilas no anel A em C5 (165,41 ppm) e em C7 (167,97 ppm). Também, mostra que os carbonos 6 e 8 não estão ligados a oxigênios, deslocando-se em 96,36 ppm.

O padrão de substituição do anel B é definido no espectro de hidrogênio pela presença de singlete em 6,909 ppm característico de um hidrogênio em C2', assim como um singlete com dois hidrogênios em 6,77 ppm característico de H5' e H6' (Liu et al., 1992). O espectro de ¹³C-RMN quando comparado com dados da literatura comprova que há duas hidroxilas neste anel B, uma no C3' em 146,49 ppm e outra em C4' em 146,86 ppm. Este mesmo espectro mostra que o carbono C1' aparece em 131,8 ppm; o C2' em 114,709 ppm; C5' em 116,27 ppm e C6' em 119,24, todos ligados a um hidrogênio cada, exceto C1' que é quaternário.

Dessa forma, as técnicas espectroscópicas foram ferramentas bastante úteis para a elucidação estrutural dos compostos isolados nessa dissertação, permitindo a identificação de 7 compostos em *Vernonia tweedieana*.

O homem primitivo, ao procurar plantas para o seu sustento, foi descobrindo plantas com ação tóxica ou medicinal, dando início a uma sistematização empírica dos seres vivos, de acordo com o uso que podia fazer deles. No entanto, a grande diversidade de formas vegetais tornou necessária uma sistematização com base em critérios de mais fácil utilização, agrupando aquelas formas com maior semelhança externa e interna (Poser & Mentz, 1999).

Em todo o globo estima-se em cerca de 300.000 o número de espécies de plantas. Estas são classificadas de acordo com diversos dados morfo-anatômicos (folhas, caule, carpelos, gineceu, pétalas, células,...) e outros, como por exemplo presença de metabólitos secundários.

A ocorrência de metabólitos secundários restrita a determinados grupos de plantas, abriu um amplo campo de estudos – a quimiotaxonomia. A presença de certos metabólitos secundários indica claramente que as espécies que os sintetizam possuem

uma rota biossintética específica e um gene ou conjunto de genes específicos controlando essa rota, estando os produtos presentes em baixa ou alta concentração. Com isso, a presença de certos compostos em determinados grupos de plantas é de grande importância nos estudos sobre evolução. A existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode prover evidências mais corretas de parentesco do que similaridades morfológicas, que podem tanto ser devidas a ancestrais comuns quanto à evolução convergente (Poser & Mentz, 1999).

Atualmente, os produtos do metabolismo secundário considerados mais apropriados aos estudos quimiotaxonômicos são alcalóides, aminoácidos não protéicos, poliacetilenos, iridóides e compostos fenólicos, especialmente flavonóides e taninos hidrolisáveis. Todos estes compostos são de ocorrência restrita sendo amplamente utilizado como marcadores quimiotaxonômicos (Poser & Mentz, 1999).

Nesta lógica, o isolamento de triterpenos, esteróides e de uma flavanona de *Vernonia tweedieana* Baker torna-se bastante relevante tendo em vista ser o primeiro estudo químico e biológico dessa espécie da família Astereaceae, conhecida como um grupo de plantas de ocorrência marcante no Brasil.

Apesar de as substâncias isoladas, descritas neste trabalho, serem todas já conhecidas, é preciso levar em conta que a espécie, apesar de utilizada na medicina popular, até então não havia sido estudada. Essas são novas informações, pois este é o primeiro relato da presença das substâncias na espécie.

A tabela 19 mostra a ocorrência no gênero *Vernonia* dos compostos isolados para a planta *Vernonia tweedieana* Baker neste trabalho. A presença destes constituintes, principalmente o eriodictiol (não muito freqüente como os demais), pode ser importante em aspectos quimiosistemáticos e bioquímicos para o reconhecimento da espécie, gênero e/ou da família Asteraceae.

Tabela 19: Distribuição dos compostos isolados de *V. Tweedieana* Baker no gênero *Vernonia*.

COMPOSTO	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
a-amirina	<i>V. galamensis</i> var. <i>ethiopica</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> var. <i>petitiana</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> ssp. <i>gibbosa</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
b-amirina	<i>V. galamensis</i> var. <i>ethiopica</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> var. <i>petitiana</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> ssp. <i>gibbosa</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. brasliana</i> (L) Druce	ALVES, 1997
	<i>V. cinerea</i> Less.	ALVES, 1997
Lupeol	<i>V. galamensis</i> var. <i>ethiopica</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> var. <i>petitiana</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> ssp. <i>gibbosa</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. brasliana</i> (L) Druce	ALVES, 1997
	<i>V. cinerea</i> Less.	ALVES, 1997
	<i>V. cinarens</i>	BOHLMANN, 1982
	<i>V. natalensis</i>	BOHLMANN, 1982
	<i>V. stipulaceae</i>	BOHLMANN, 1982
	<i>V. lanuginose</i>	BOHLMANN, 1981
	<i>V. chinensis</i> Less.	BOHLMANN, 1981
	<i>V. fagifolia</i>	BOHLMANN, 1981
	<i>V. alvinii</i>	BOHLMANN, 1981
Estigmasterol	<i>V. galamensis</i> var. <i>ethiopica</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> ssp. <i>gibbosa</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. diffusa</i>	CARVALHO, 1999
	<i>V. lilacina</i>	BOHLMANN, 1981
	<i>V. cinerea</i> Less.	MISRA, 1984
	<i>V. natalensis</i>	BOHLMANN, 1982
	<i>V. stipulaceae</i>	BOHLMANN, 1982
	<i>V. polyanthes</i>	BOHLMANN, 1981
	<i>V. fagifolia</i>	BOHLMANN, 1981
b-sitosterol	<i>V. galamensis</i> var. <i>ethiopica</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> ssp. <i>gibbosa</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. galamensis</i> ssp. <i>afromontana</i>	GILBERT, 1988, apud PERDUE, 1993.
	<i>V. diffusa</i>	CARVALHO, 1999
	<i>V. arcansana</i>	BOHLMANN, 1981
	<i>V. cinerea</i> Less.	MISRA, 1984
<i>V. chinensis</i> Less.	BOHLMANN, 1981	
Eriodictiol	<i>V. hindei</i> S. Moore	JACOB, 1986 apud CARVALHO, 1999.
	<i>V. syringifolia</i>	ZDEDO, 1991

Nos dados da tabela 19 percebe-se que ainda não havia sido registrada a ocorrência do esteróide espinasterol no gênero *Vernonia*, embora outros estudos verificaram a presença de outros esteróides derivados do estigmastano possuíntes de

insaturação em C-7 (característico do espinasterol). Segundo Sanogo e colaboradores (1998) e Tchinda e colaboradores (2003), o gênero *Vernonia* é conhecido por conter glicosídeos do tipo estigmastano possuidores de $\Delta^{7,9(11)}$ ou $\Delta^{8,14}$ em núcleos esteroidais de 29 carbonos. Ainda, Jisaka e colaboradores (1993) relata que estes esteróides geralmente possuem o C-16 oxigenado.

Por se tratar de compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, muitos trabalhos tem documentado o isolamento dos triterpenos e esteroides de uma mesma planta. Galotta & Boaventura (2005) identificaram no açai (*Euterpe precatória* Mart., Arecaceae) os triterpenos α e β -amirina (mistura) e lupeol, assim como os esteróides β -sitosterol e stigmasterol (mistura). Como pode ser visto na tabela 19, em espécies do gênero *Vernonia* também já foram relatados isolamentos destes constituintes químicos.

Pelo fato dos compostos caracterizados neste trabalho já serem conhecidos, já foram estudados quanto às atividades biológicas. Galotta & Boaventura (2005) testaram a atividade citotóxica com *Artemia salina* de alguns compostos isolados da planta *Euterpe precatória*. Os resultados, mostrados em DL_{50} , foram: β -sitosterol (inativo), α -amirina (200 $\mu\text{g/mL}$), β -amirina (23 $\mu\text{g/mL}$) e lupeol (300 $\mu\text{g/mL}$).

Mors e colaboradores (2000) testaram várias substâncias naturais de diferentes classes, com histórico de neutralizar efeitos dos venenos de cobra. O teste realizado foi do efeito antiletal sobre o veneno da *Bothrops jararaca*. Os autores observaram que substâncias amplamente difundidas no reino vegetal como o β -sitosterol e estigmasterol, dentre outras, apresentaram 70% de proteção contra o efeito letal deste veneno. A abundância destes esteróides em *Vernonia tweediana* poderia estimular estudos neste sentido. O triterpeno lupeol apresentou 20% de proteção. A atividade dos triterpenos α e β -amirina, assim como a do esteróide epilupeol não foram estudadas mas constatou-se a presença destes constituintes químicos em diversas plantas relatadas por terem atividade neutralizante de veneno de cobras. Segundo este mesmo autor, β -sitosterol e seu análogo estigmasterol já demonstraram atividade anti-inflamatória, redutora de colesterol plasmático e no controle de tumores prostáticos. Dentre as importâncias fisiológicas dos esteróides está a capacidade de formar complexos necessários para o organismo, como nos ácidos biliares e seus sais. Ainda, estes esteróides têm a capacidade de converter gorduras em ácidos graxos solúveis em

água ou emulsificar estes compostos facilitando sua absorção intestinal e suas hidrólises, como para vitaminas lipossolúveis (Hartmann, 1998).

Liu e colaboradores (1992), avaliaram a atividade quimio-preventiva de compostos flavonoídicos. Constatou-se que dentre os compostos que apresentaram atividade, o eriodictiol teve ação contra o agente carcinogênico B{a}P em concentrações a partir de 5 µg/mL.

Chaturvedula e colaboradores (2004), verificaram a habilidade de compostos naturais em inibir a atividade da enzima DNA polimerase β, que está envolvida na formação de tumores. Constatou-se que o triterpeno lupeol apresentou excelente inibição (IC₅₀ = 6,4 µM), enquanto que o esteróide estigmasterol teve IC₅₀ em 26,8 µM.

Akihisa e colaboradores (2005) testaram a atividade antitubercular de alguns triterpenos contra *Mycobacterium tuberculosis*. Determinou-se o MIC (Concentração Inibitória Mínima) para a β-amirina (64 µg/mL) α-amirina (32 µg/mL), lupeol (64 µg/mL) e epilupeol (4 µg/mL) que diferencia-se do lupeol somente na configuração da hidroxila em C-3, dentre outros, enquanto que a droga referência (rifampicina) teve MIC 0,25 µg/mL. Não foram verificadas relações entre a estrutura dos triterpenos (oleananos, ursanos, lupanos,...) com atividade antitubercular. No entanto, ficou claro que a conversão de estereoquímica da hidroxila em C-3 de β para α aumenta significativamente a atividade de compostos, principalmente lupânicos.

Alves e colaboradores (1997) verificaram forte atividade antiplasmódica para lupeol, 45% de inibição na concentração de 25 µg/mL *in vitro*. No entanto, no teste *in vivo* (ratos) esta substância não foi ativa. Na mesma concentração β-amirina apresentou somente 1% de inibição.

Estas atividades já atribuídas aos compostos podem servir de parâmetro para atribuir/idealizar possíveis ações biológicas destas substâncias e/ou de extratos da planta *Vernonia tweedieana* Baker, pelo fato de serem majoritárias na planta (dado verificado por CCD).

É sabido que o processo de envelhecimento e do surgimento de diversas doenças são decorrentes da ação de agentes oxidantes no organismo. Estes oxidantes são, geralmente, ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. As reações dos radicais resultam em danos celulares e teciduais que contribuem no

surgimento de patologias. Os radicais livres agem nos componentes celulares oxidando lipídeos, lisossomas e membranas mitocondriais. Ainda, proteínas são danificadas por substituição de aminoácidos no pareamento resultando em proteínas e enzimas inativas que modificam o DNA e moléculas vitais (Cho et al., 2003). Como muitas destas enzimas são responsáveis pelo equilíbrio dos constituintes endo e exocelular, ocorre um desequilíbrio eletrolítico resultando em danos celulares por diferentes mecanismos que procedem várias doenças como inflamações, reumatismo, doenças gastrintestinais, isquemia, cardiovasculares, desordens no sistema nervoso e processos neurodegenerativos (Ursini et al., 1994; Choi et al., 2002). Com isso, captadores radicalares surgem como uma promissora alternativa terapêutica para várias doenças (Cho et al., 2003).

Essas espécies reativas são produzidas em reações químicas no metabolismo de nosso organismo mas nossos mecanismos de defesa (enzima/proteínas) muitas vezes não conseguem eliminá-los totalmente. Sendo assim, torna-se importante a busca por compostos químicos que possam ser ingeridos e que sejam capazes de inibir estes processos de oxidação *in vivo* sem apresentar risco à saúde humana.

É atualmente bem documentado o papel desempenhado por polifenóis e flavonóides como protetores contra diversas doenças degenerativas (Tsuda et al., 1994; Rice-Evans et al., 1996, Zielinska et al., 2003) Os efeitos benéficos da ingestão de antioxidantes são evidenciados por vários estudos e dados epidemiológicos sugerem uma associação entre dietas ricas em vegetais, frutas, vinho tinto e o decréscimo de doenças degenerativas (Filip et al., 2000, Bixbi et al., 2005).

Pela ampla variedade de substâncias oriundas de fontes vegetais, há muito tempo os humanos vêm buscando os benefícios das plantas e de composto obtidos a partir delas. A atividade antioxidante de metabólitos secundários de plantas tem sido bastante investigada.

O primeiro passo estratégico para identificar uma droga candidata para o tratamento de patologias decorrentes da oxidação exercida pelos radicais livres é realizar uma avaliação quantitativa da capacidade antioxidante da amostra.

Um método simples e rápido de avaliar plantas promissoras quanto ao potencial antioxidante *in vitro* consiste no método fotolorimétrico do DPPH, um radical livre

relativamente estável que produz coloração violeta em etanol. Neste método os extratos ou compostos a serem testados são colocados em contato com o DPPH em uma solução etanólica, e a redução na concentração de DPPH é monitorada pelo decréscimo de sua absorvância em um comprimento de onda fixo durante a reação (518 nm). Na sua forma radicalar o DPPH absorve no comprimento de onda de 518 nm, mas havendo sua redução por um agente antioxidante ou outra espécie radicalar a absorção desaparece.

Neste trabalho foram testados o extrato bruto hidro-etanólico das folhas da planta *Vernonia tweedieana* e suas frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão, já que possui atividade antioxidante comprovada, podendo ser utilizado como parâmetro para a comparação das atividades testadas. Todas as amostras apresentaram capacidade de captura de radicais DPPH, ou seja, de doar hidrogênios para neutralizar o poder reativo do radical decorrente da presença de um elétron desemparelhado.

Entretanto, os resultados obtidos no experimento do DPPH evidenciaram frações com maior atividade antioxidante, como pode ser visualizado na Tabela 20.

Tabela 20: Atividade antioxidante do ácido ascórbico e das frações testadas.

Concentração	% Inibição				
	Ácido ascórbico	Bruto	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
7,8	43,3	16,15	17,85	32,3	35,38
15,6	83,66	25,5	26,67	42,82	54,44
31,25	97,81	43,67	52,81	63,01	64,08
62,5	98,26	72,58	78,62	90,32	85,75
125	98,3	90,32	87,35	88,73	94,26

As frações acetato de etila e butanólica, comparativamente, apresentaram as maiores atividades, alcançando 90,32% e 85,75% de inibição do DPPH na concentração de 62,5 µg/mL, respectivamente. As atividades foram dose-dependentes, o que permitiu o cálculo de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50 % da atividade do DPPH) para cada uma das frações analisadas. Este procedimento foi semelhante ao apresentado por Tsimogiannis & Oreopoulou (2005). O ácido ascórbico apresentou

97,81% de inibição na concentração de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, mantendo a mesma atividade nas concentrações superiores. Por este motivo, o cálculo de seu IC_{50} foi realizado utilizando-se uma curva de três pontos (apenas as concentrações onde houve resposta linear). A Figura 72 apresenta os valores de IC_{50} para as amostras testadas. As respectivas equações da reta e coeficientes de correlações são apresentados na tabela 21.

Tabela 21: Equações da reta e coeficientes de correlações verificados para as amostras no teste do DPPH.

Amostras	Equação	Coefficiente de correlação (R^2)
Ac. ascórbico	$Y = 2,1224x + 36,239$	$R^2 = 0,8021$
Bruto	$y = 1,0255x + 9,434$	$R^2 = 0,996$
Diclorometano	$y = 1,12x + 11,177$	$R^2 = 0,974$
Acetato de etila	$y = 1,05x + 26,353$	$R^2 = 0,9884$
<i>n</i> -butanol	$y = 0,8365x + 35,408$	$R^2 = 0,9326$

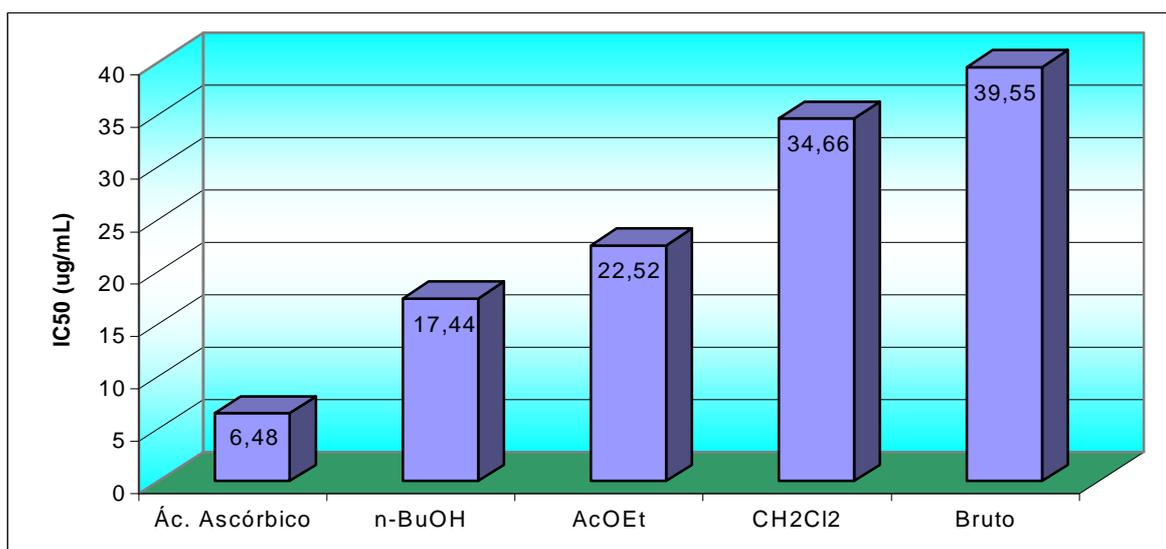


Figura 72: IC_{50} das amostras no teste de atividade antioxidante (DPPH), determinadas a partir da equação da reta.

Analisando os valores de IC_{50} obtidos através da equação da reta (Figura 72), é possível afirmar que das amostras testadas as frações butanólica e a acetato de etila apresentaram as melhores atividades antioxidantes. Estas duas frações tiveram comportamentos muito semelhantes, tanto que os IC_{50} foram próximos (17,44 e 22,52 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ já alcançaram cerca de 90% de inibição do DPPH. A fração butanólica apresentou uma atividade inicial mais forte/rápida decaindo com o decorrer do tempo, enquanto que a acetato de etila manteve uma resposta mais linear, equivalendo-se a atividade da butanólica na concentração 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e superando-a na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser visualizado no gráfico apresentado na figura 71 (página 137). Este comportamento pode ser entendido pela composição das amostras. Existem compostos que reagem rapidamente com o DPPH e outros que possuem um mecanismo de reação mais lento (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2004). Não há dúvidas de que na fração acetato de etila concentram-se mais flavonóides. No entanto, deve-se levar em conta que na fração butanólica existem muitos compostos com propriedades polares, como é o caso dos compostos fenólicos (dectados por CCD, dados não mostrados), que também possuem comprovada atividade antioxidante. Com isso, pode-se dizer que compostos dessa natureza foram os responsáveis por esta atividade na fração butanólica, enquanto que na acetato de etila predominaram compostos flavonoídicos e que, provavelmente por este motivo, os mecanismos de reações sejam diferentes.

Salienta-se ainda que a fração acetato de etila atingiu um máximo de atividade antioxidante na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e que a partir desta concentração sua atividade decaiu. Este fato provavelmente seja decorrente da alta concentração de compostos flavonoídicos, que nestas condições poderiam exercer atividade pró-oxidante (Rietjens et al., 2002).

Vários trabalhos têm mostrado a maior potência de extratos e frações butanólica e acetato de etila em testes de atividade antioxidante. Tseng e colaboradores (1997), fazendo uso do mesmo ensaio (DPPH) frente a extratos das flores de *Hibiscus sabdariffa* testaram extratos de diversas polaridades e foi constatado que a fração acetato de etila apresentava maior porcentagem no índice de inibição.

Em um screening quanto a atividade antioxidante de plantas brasileiras, Mensor e colaboradores (2001) verificaram pelo método do DPPH que, para as diferentes plantas, a fração que exibiu melhor atividade foi a acetato de etila.

Na fração acetato de etila normalmente são extraídos compostos flavonoídicos. Os flavonóides, uma ampla classe de produtos de ocorrência natural, são presentes em praticamente todas as plantas. São compostos que apresentam forte atividade antioxidante, e por este efeito está sendo visto como benéfico para a saúde, principalmente visando controlar o stress oxidativo que acarreta inúmeras situações pato-fisiológicas. Ao longo dos anos, muitos experimentos demonstraram as propriedades biológicas e farmacológicas dos flavonóides, principalmente suas atividades antiinflamatórias, antioxidantes e anti-tumor, que são associadas a capacidade de capturar radicais livres (Cho et al., 2003). Para muitos componentes dessa classe já foram descritas atividades antioxidantes. Ainda, apresentaram forte atividade antiinflamatória, antialérgica e antiviral, dentre outras (Ursini et al., 1994). Verificou-se que o efeito antioxidante apresentado por compostos era devido a presença de grupamentos hidroxilas na estrutura (Kulisic et al., 2004).

Como pode ser visualizado na figura 73, os radicais livres reagem com os polifenóis formando radicais estáveis (Cho et al., 2003). Como os flavonóides geralmente são hidroxilados, formam um grupo bastante interessante na busca por novos compostos que apresentem esta atividade antioxidante. Outros componentes fitoquímicos como aminoácidos, vitaminas e pigmentos podem contribuir sinergicamente fortalecendo a atividade antioxidante (Choi et al., 2002).

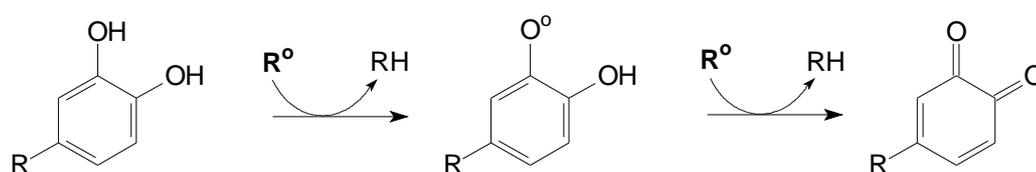


Figura 73: Estabilização dos radicais livres pelos compostos fenólicos.

Em nosso trabalho, as análises cromatográficas (CCD) das frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanólica de *Vernonia tweedieana* Baker

mostraram que a fração butanólica possui, dentre outros componentes, muitos compostos fenólicos, e que a acetato de etila possui compostos flavonoídicos e derivados fenólicos. Inclusive, isolou-se da fração acetato de etila a flavanona eriodictiol, que em trabalhos anteriores demonstrou ser um potente agente antioxidante (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2004). Por este motivo, o fato destas duas frações mais polares apresentarem capacidade de reação com o DPPH superior às demais amostras testadas não surpreendeu.

Heilmann et al., (1995) reportou que compostos flavonoídicos possuintes de substituintes 3',4'-dihidroxilas mostraram excelente atividade inibitória contra o radical DPPH. Ainda, Rice-Evans et al., (1997) e Zielinska et al., (2003) verificaram que a quercetina (flavonóide) é conhecida por ser um potente antioxidante e esta atividade é favorecida pela presença de grupos hidroxilas nas posições 3, 5, 7, 3', 4', que são crucias para esta atividade. Cho e colaboradores (2003) comprovaram que alterações desses grupos por glicosilação provocam um decréscimo da atividade antioxidante, e isto seria devido à redução do número de hidroxilas e ao impedimento estérico que o açúcar proporciona, dificultando a ligação do captador ao radical livre.

O flavonóide isolado (eriodictiol) possui quatro hidroxilas (5,7,3',4') e nenhuma glicosilação, sendo assim um composto que preenche os requisitos de um bom antioxidante. Por se tratar do constituinte majoritário da fração acetato de etila (verificado por CCD), possivelmente a forte atividade antioxidante verificada para esta fração seja devido à sua presença.

Estes resultados são bons indicativos de que a planta *Vernonia tweedieana* Baker possui constituintes químicos detentores de forte capacidade de capturar radicais livres e formar radicais estáveis. Portanto, pressupõe-se que esta planta possui compostos promissores na busca por fármacos antioxidantes e para doenças decorrentes de stress oxidativo como as degenerativas e inflamações. Ainda, pode ser importante para a indústria alimentícia. No entanto, o teste do DPPH não permite uma precisa definição dos efeitos antioxidantes por se tratar de uma metodologia *in vitro* (muitas moléculas são ativas na reação com o DPPH, mas inativas em testes mais específicos, como inibição enzimática) e não avaliar a formação de produtos da redução relativamente estáveis (Ursini et al., 1994). Tendo em vista que a atividade

antioxidante de extrativos de plantas não pode ser avaliada somente por um método (Choi et al., 2002), estes resultados devem encorajar para posteriores estudos *in vivo*, que irão determinar se esta planta medicinal pode ser aplicada industrialmente, principalmente em formulações farmacêuticas e cosméticas.

Há muito tempo as plantas vêm sendo utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias enfermidades. No entanto, somente agora se procurou ter o conhecimento científico das propriedades farmacológicas/terapêuticas e da possível toxicidade que os constituintes químicos destas plantas possam apresentar (Rebecca et al., 2002).

A planta *Vernonia tweedieana* Baker é utilizada na medicina tradicional do Brasil para o tratamento de doenças respiratórias como gripes, bronquites e tosses. No entanto, nenhum estudo que avalie suas propriedades terapêuticas e/ou tóxicas até então foi realizado.

Neste trabalho, na avaliação da toxicidade aguda da planta não foram verificados óbitos e/ou outros sinais de toxicidade e efeitos adversos nas doses testadas, até 5.000 mg/kg. Com isso, DL_{50} não pôde ser determinada. Embora estudos de toxicidade em experimentos animais não possam ser totalmente extrapolados para humanos, os resultados, mesmo necessitando de mais estudos, mostram que a planta em questão não é tóxica e isto é um indício de que o seu eventual uso como um fito-medicamento seja seguro.

Além desses resultados positivos quanto à atividade tóxica, com base nos demais resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que *Vernonia tweedieana* Baker é uma planta promissora do ponto de vista farmaco-biológico pelo fato das inúmeras atividades anteriormente já verificadas aos compostos isolados. Também, as atividades antioxidantes dos extratos, principalmente o acetato de etila e butanólico, são bons indicativos de que a planta possui constituintes químicos detentores de forte capacidade de capturar radicais livres, que são vistos, hoje, como um fator de causa de inúmeras doenças decorrentes de stress oxidativo, como as degenerativas e inflamações.

Sendo este o primeiro estudo realizado com a espécie, muito ainda se tem a explorar sobre *Vernonia tweedieana* Baker, seja relacionado à sua constituição química

ou mesmo quanto às atividades biológicas. Ainda, sabendo da ocorrência de outras espécies deste gênero na mesma região, como é o caso de *Vernonia cognata*, estudos comparativos abordando composição química (triterpenos, flavonóides e saponinas) poderão, juntamente com dados botânicos, definir mais claramente a importância destas substâncias na avaliação quimiotaxonômica.

7. CONCLUSÕES

- Da fração diclorometânica do extrato hidro-alcoólico das folhas da planta *Vernonia tweedieana* caracterizou-se seis compostos, três triterpenos e três esteróides;
- O composto codificado como V1 foi identificado como sendo o triterpeno 3 β -hidroxilup-20(29)-eno (lupeol);
- O composto codificado como V2 mostrou se tratar da mistura dos triterpenos α -amirina (3 β -hidroxieurs-12-eno) e β -amirina (3 β -hidroxiolean-12-eno);
- O composto codificado como V3 foi identificado como sendo o esteróide espinasterol (24-etilcolestan-7,22-dieno-3 β -ol);
- O composto codificado como V4 mostrou se tratar da mistura dos esteréoides estigmasterol (24-etilcolestan-5,22-dieno-3 β -ol) e β -sitosterol (24-etilcolestan-5-eno-3 β -ol);
- Da fração acetato de etila do extrato hidro-alcoólico das folhas da planta *Vernonia tweedieana* Baker foi isolado o flavonóide eriodictiol (5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavanona);
- No teste de toxicidade aguda de extratos da planta não foram verificados óbitos e/ou outros sinais de toxicidade e efeitos adversos nas doses testadas, até 5.000 mg/kg. Este é um dado importante pois mostra que a planta em questão não é tóxica e isto é um indício de que o seu eventual uso como um fito-medicamento seja seguro.
- As notáveis atividades antioxidantes dos extratos, principalmente das frações butanólica e acetato de etila, são bons indicativos de que a planta possui constituintes químicos detentores de forte capacidade de capturar radicais livres, como o flavonóide isolado (eriodictiol).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESEYKERA, A. M. et al. Inhibition of chemiluminescence generated by zimosan-activated polymorphonuclear leucocytes by phenolic constituents of *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia**, vol. 70, pp. 317-319, 1999.

ADEBOYE, J. O.; ASIJE, W.; AWE, S. O. Diuretic and antidiuretic activity of the leaf extracts of *Vernonia cinerea* (Less) (fam. *Compositae*). **Phytotherapy Research**, v. 11, p.454-456, 1997.

ADESINA, S. K.; REISCH, J. A triterpenoid glycoside from *Tetrapleura aptera* fruit. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p.3003-3006, 1985.

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphilla*. **Phytochemistry**, v. 66, p.2388-2392, 2005.

AHMAD, V. U. et al. A sterol glycoside from marine green alga *Codium iyengarii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1429-1431, 1992.

AHMED, M. S. et al. A weakly antimalarial biflavone from *Rhus retinorrhoea*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 599-602, 2001.

AKIHISA, T.; et al. Antitubercular activity of triterpenoids from asteraceae flowers. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, n. 1, p.158-160, 2005.

AKINPELU, D, A. Antimicrobial activity of *Vernonia amigdalina* leaves. **Fitoterapia**, n. 70, p.432-434, 1999.

ALAWA, C. B. I. et al. *In vitro* screening a two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Amvona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 113, pp. 73-81, 2003.

ALI, M. S. et al. A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). **Phytochemistry**, v. 59, p.889-895, 2002.

ALMEIDA, J.R.G.S. et al. Outros constituintes químicos de *Diplotropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p.44-46, 2003.

ALVES, T. M. A. et al. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*. **Planta Medica**, vol. 63, p.554-555, 1997.

ARAGÃO, P. C. A. et al. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Química Nova**, v. 13, n.4, p.254-259, 1990.

ARIAS, A. R. et al. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p.35-41, 1995.

ATHAYDE, M. L. **Saponinas e triterpenos em algumas espécies do gênero *Ilex*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, 1993, 183p.**

AWE, S. O.; MAKINDE, J. M.; OLAJIDE, O. A. Cathartic effect of the leaf extract of *Vernonia amygdalina*. **Fitoterapia**, v. 70, pp. 161-165, 1999.

AWE, S, O.; OLAJIDE, O. ; MAKINDE, J .M. Effects of *allium sativum* and *Vernonia amygdalina* on thrombosis in mice. **Phytotherapy Research**, v.12, p.57-58, 1998.

BARBERÁN, F. A . T. et al. Highly Methylated 6-Hydroxyflavones and Other Flavonoids from *Tuymus piperella*. **Planta Médica**, p. 452-454, 1985.

BAZON, J. N. et al. Cadinanolides and other constituents from *Vernonia fruticulosa* and *Vernonanthura discolor*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1535-1536, 1997.

BAYKAL, T. et al. Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p.867-873, 1998.

BHATTACHARYYA, J.; BARROS, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscopus urens*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p.274-276, 1986.

BERRONDO, L. F. et al. Dirhamnosyl flavonoid and other constituents from *Brillantaisia palisatii*. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 922-923, 2003.

BIXBI, M. et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitor of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, n. 3, 345-358, 2005.

BOHLMANN, F. et al. Allenic germacranolides, bourbonene derived lactones and other constituents from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 20, p.473-480, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Glaucolides and other constituents from south african *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p.2263-2267, 1982.

BRUM, R. L. et al. Acyl lupeols from *Cnidoscopus vitifolius*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p.1127-1128, 1998.

CABRERA, A. L & KLEIN, R. M. Fascículo Compostas. Tribo *Verniniae* in REITZ, R. Flora Ilustrada Catarinense. **As Plantas, Parte I**. Itajaí, p.324-326, 1980.

CARVALHO, L. H. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berhei*-infected mice in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz. J. Méd. Biol. Res**, v. 24, n. 11, p.1113-1123, 1991.

CARVALHO, L. H. & KRETTLI, A. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemical defined molecules. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86, Suppl. 2, p.181-184, 1991.

CARVALHO, M. G. et al. Triterpenos isolados de *Escheweilera longipes* miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v.21, n.6, p. 740-743, 1998.

CARVALHO, M. G.; COSTA, P. M.; ABREU, H. S. Flavones from *Vernonia diffusa*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 10, n. 2, p. 163-166, 1999.

CARVALHO, G. J et al. Diterpenos, triterpenos e Esteróides das folhas de *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, V. 24, n. 1, p. 24-26, 2001.

CHATURVEDULA, V. S. P. et al. New lupane triterpenoids from *Salidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β . **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12, p.6271-6275, 2004.

CHAURASIA, N. & WICHTL, M. Sterols and Steryl Glycosides from *Urtica dioica*. **Journal of Natural Products**, v.50, n.5, p.881-885, 1987.

CHAVES, M. H. et al. Caracterização química do óleo de amêndoa de *Sterculia striata* ST. HIL. ET NAUD. **Química Nova**, v. 27, n.3, p.404-408, 2004.

CHIARI, E. et al. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy research**, v. 10, p. 636-638, 1996.

CHO, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydralyl radical. **Phytomedicine**, v. 10, p.544-551, 2003.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 153, p.1161-1168, 2002.

CONEGERO, L. S. et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). **Química Nova**, v. 26, n. 6, p.825-827, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 11 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, 2v.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12 n. 4, p. 564-582, 1999.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v.62, p.389-398, 2003.

ELISABETSKY, E.. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas** in SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, p. 91-104, 1999.

FALKENBERG, M. B. **Flavonóides e terpenóides em *Heterothalamus alienus* (SPRENGEL) O. KUTZE (ASTERACEAE)**. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre: UFRGS, 1991.

FERREIRA, S. H. (Org). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1998.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p.1437-1446, 2000.

FORGO, P.; KÖVÉR, K. Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, p.43-50, 2004.

FRANÇA, S. C.. **Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas** in SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, p.105-124, 1999.

FRUTUOSO, V. S.; Gurjão, M. R.R.; Cordeiro, R. S. B.; Martins, M. A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Medica**, v. 60, n.1, p. 21-25. 1994.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do Açaí (*Euterpe precatória* MART., ARECACEAE). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p.610-613, 2005.

GANJIAN, I.; KUBO, I.; FLUDZINSKI, P. Insect antifeedant elemanolide lactones from *Vernonia amygdalina*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2525-2526, 1983.

GARAI, S.; MAHATO, S. B. Isolation and structure elucidation of three triterpenoid saponins fro *Acacia auriculiformis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p.137-140,1997.

GARG, V. K.; NES, W. R. –b. Codisterol and other Δ^5 -sterols in the seeds of *Cucurbita máxima*. **Phytochemistry**, v.23, n.12, p.2925-2929, 1984.

GARG, V. K.; NES, W. R. Studies on the C-24 configurations of Δ^7 -sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. **Phytochemistry**, v.23, n.12, p.2925-2929, 1984.

GAVILANES, M. L., et al. Plantas daninhas medicamentosas de uso popular, in **Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Botânica**. Brasília-DF, IBAMA. p. 653-676, 1990.

GERSHENGORN, M. C.; et al. The sterols of *Ochromonas danica* and *Ochromonas malhamensis*. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p.1698-1706, 1968.

GOMES, D. C. F.; ALEGRIO, L. V. Acyl steryl glycosides from *Pithecellobium cauliflorum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p.1365-1367, 1998.

GOULART, M. O. F. et al. Fitoconstituíntes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofilonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p.95-100, 1993.

GUPTA, M. et al. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia**, v. 74, p.148-150, 2003.

HÄNSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E. **Pharmakognosie – Phytopharmazie**. 6. Aufl. Berlin: Springer, 1403 p., 1999.

HARRISON, D.M. The Biosynthesis of Triterpenoids, Steroids, and Carotenoids. **Natural Product Reports**, p.459-484, 1990.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modess of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HARTMANN, M. A. Plant sterols and the membrane environment. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 5, p.170-175, 1998.

HORDEGEN, P. et al. The anthrlmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongyloids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 51-60, 2003.

IGILIE, G; OLESEK, W.; JURZYSTA, M. Vernoniosides D and E, two novel saponins from *Vernonia amygdalina*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1438-1443, 1995.

ITOH, T. et al. Co-occurrence of chondrillasterol and spinasterol in two cucurbitaceae seeds as shown by ^{13}C NMR. **Phytochemistry**, v.20, n.4, p.761-764, 1981.

IWALEWA, E. O., et al. Analgesic, antipiretic, anti-inflammatory effects of metanol, cloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* Less leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 229-234, 2003.

JÁCOME, R. L. R. P. et al. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira"). **Química Nova**. v. 27, n. 6, p.897-900, 2004.

JAKUPOVIC, J. et al. Poskeanolide, a seco-germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1359-1364, 1986.

JIANG, Z.; TANAKA, T.; KOUNO, I. A lupene triterpene and two triterpene caffeates from *Rhoiptelea chiliantha*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p.1223-1226, 1995.

JISAKA, M. et al. Steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, a possible Chipanze medicinal plant. **Phytochemistry**, v. 34, n. 2, p 409-413, 1993.

JOLY, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.628-636, 1998.

JUNGES, M.J. et al. The use of ^{13}C and ^1H -NMR in the structural elucidation of a new *nor*-lupane triterpene. **J. Braz. Chem. Soc**, v.10, n.4, p.317-320, 1999.

KELMANSON, J. E.; JÄGER, A.; STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p.241-246, 2000.

KHALIK, S. M. et al. Triterpenoid saponin from *Fagonia cretica*. **Phytochemistry**, v. 54, p.853-859, 2000.

KOJIMA, H. et al. Sterol Glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p.2351-2355, 1990.

KOJIMA, K. et al. Flavanones from *Iris tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 711-714, 1997.

KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; HUFFMAN, M. A.. Use of *Vernonia amygdalina* by wild Chimpanzee: Possible roles of its bitter and related constituents. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 6, p. 1209-1216, 1994.

KOTOWICZ, C. et al. Triterpenes and other constituents of *Nassaouvia axillaris*. **Biochemical systematics and ecology**, v.33, p. 737-742, 2005.

KULISIK, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p.633-640, 2004.

KUMARI, G. N. K. et al. Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from *Vernonia arborea*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 479-482, 2003.

LAPA, A. J. et al. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais** in SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, p. 183-198, 1999.

LASEKAN, O. O.; LASEKAN, W. O.; BABALOLA, J. O. Effect of *Vernonia amygdalina* (bitter leaf) extract on brewing qualities and amino acid profiles of stout drink from sorghum and barley malts. **Food Chemistry**, v. 64, p. 507-510, 1999.

LATHA, R. M.; GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Effect of *Vernonia cinera* Less flower extract in adjuvant-induced arthritis. **Gen Pharmac. USA**, v.31, n.4, p.601-606, 1998.

LEITE, S.N. et al. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, v. 74, p. 496-500, 2002.

LI, G. et al. Steroids from the soft coral *Dendronephthya* sp. **Steroids**, v. 70, p.13-18, 2005.

LIU, Y.; HO, D. K.; CASSADY, J. M.. Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 3, p. 357-363, 1992.

LOPES, J. L. Sesquiterpene lactones from *Vernonia*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86, Suppl. 2 : 227-230, 1991.

MAIA, R. M. et al. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p.623-626, 2000.

MARDER, M. Cirsilioland caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica*, are competitiva ligands for the central benzodiazepine receptors. **Phytomedicine**, v. 3, p. 29-31, 1996.

MARTINS, H. M. et al. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusion. **International Journal of Food Microbiology**. v. 68, p. 149-153, 2001.

MATOS, F. J. A. **Introdução á Fitoquímica Experimental**. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,1988.

MEBE, P. P.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from *Euclea divinorum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p.311-313, 1998.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpenicos isolados de *Byrsonima microphyla*. **Química Nova**, v.22, n.2, p.185-188, 1999.

MENSOR, L. L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p.127-130, 2001.

MIANA, A. G.; AL-HAZIMI, H. M. G. Assignment of the ^{13}C of quinivic acid. **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p.225-227, 1987.

MISEREZ, F. et al. Flavonol glicosides from *Vernonia galamensis ssp nairobiensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p.283-286, 1996.

MISRA, T. N. et al. A new triterpenoid from *Vernonia cinerea*. **Planta Medica**, v. 59, p. 458-460. 1993.

MISRA, T. N. et al. Isolation of natural sterol and an aliphatic acid from *Vernonia cinerea*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p.415-417, 1984.

MIYASE, T. et al. Araliasaponins I-XI, triterpene sapononis from the roots of aralia decaisneana. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p.1411-1418,1996.

MOHAMED, K. M. et al. Oleanane glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p.1237-1242, 1995.

MORS, W. D. et al. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p.627-642, 2000.

NCUBE, I. et al. Triacylglycerols of *Vernonia galamensis* seed oil. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p.723-727, 1998.

NCUBE, I.; REAL, S.. Evaluation of *Vernonia galamensis* lipase (acetone powder) for use in biotechnology. **Industrial Crops and Products**, 1995.

NERGARD, C. S. et al. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotshyana* Sch. Bip. Ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p.141-152, 2004.

NGADJUI, B. T. et al. Prenilated flavanones from the twings of *Dorstenia mannii*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1401-1406, 1999.

OBATOMI, D. K. et al. Metanolic and renal changes following the ingestion of African Mistletoe extract in rats. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 171-173, 1997.

OECD/OCDE - Guideline for testing of chemicals. **Organisation for economic co-operation and development**. 423, 2001.

OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, p.121-126, 1981.

OKETCH-RABAH, H. A. et al. Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalixolide from *Vernonia brachycalyx*. **Planta Medica**, n. 64, p. 559-562, 1998.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p.278-281, 1990.

OLESZEK, W. A. Cromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 147-162, 2002.

PAULA, V. F. et al. Constituintes químicos de *Ochroma lagopus* Swartz. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 225-229, 1996.

PAULO, A. et al. A new $\Delta^{7,22}$ sterol from the bulbs of *Autonoë madeirensis*. **Fitoterapia**, v. 76, p.765-767, 2005.

PERDUE, R. E.; TSICHRITZIS, F.; JAKUPOVIC, J. Prevernocistifolides from *Vernonia galamensis*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1075-1077, 1993.

PERFEITO, J. P. et al. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p.183-186, 2005.

PLANTAS que curam. São Paulo: Ed. Três, 1983, v.1, p.76.

POLLORA, G. C. et al. Elephantopus-type sesquiterpene lactones from a *Vernanthura* species, *Vernanthuranebularum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 397-405, 2002.

POSER, G. L. & MENTZ, L. A. **Diversidade Biológica a Sistemas de Classificação in** SIMÕES C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.333-364, 1999.

RABE, T.; MULLHOLLAND, D.; STADEN, J. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 91-94, 2002.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: Uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n. 2, pp. 57-69, 2001.

RAUTER, A. P. et al. Flavonoids From *Artemisia Campestris* Subsp. Marítima. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2173-2175, 1989.

REBECCA, M. A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstrinens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p.101-104, 2002.

REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S.; POPLAWSKI, J. Total Assignment of ^{13}C and ^1H Spectra of Three Isomeric Triterpenol Derivatives by 2D NMR: An Investigation of the Potential Utility of ^1H Chemical Shifts in Structural Investigation of Complex Natural Products. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p.3419-34-28, 1986.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIETJENS, I.M.C.M. et al. The pro-antioxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 321-333, 2002.

RIZZO, J. A. et al. Utilização de plantas medicinais em Goiás., in **Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Botânica**, p. 691-716, 1990.

RODRÍGUEZ, B. 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone from *Sideritis mugronensis*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 800-801, 1977.

ROSS, G. et al. New sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Vernonia fastigata*. **Planta Medica**, n. 64, p. 673-674, 1998.

SANOGO, R. et al. *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. : Tolerability and gastroprotective activity. **Phytotherapy Research**, v. 10, p.169-171, 1996.

SANOGO, R. et al., Vernosides and an androstane glycoside from *Vernonia kotschyana*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 73-78, 1998.

SANTOS, R.I. **Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários** in SIMÕES C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.333-364, 1999.

SEO, S.; TOMITA, Y. Biosynthesis of ursene-type triterpenes from sodium [1,2-¹³C] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara and re-assignments of ¹³C N.M.R. signals in urs-12-enes. **J. C. S. Chem. Comm.**, p.954-955, 1975.

SHEN, C.; CHANG, Y.; HO, L. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 843-845, 1993.

SILVESRTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6ª edição, Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SING, V. P. et al. Flavanone glycosides from *Alhagi pseudalhagi*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 587-590, 1999.

SOUZA, A. D. L. et al. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 4, p.439-442, 2001.

SOUZA, M. P. et al. Triterpenoids from *Guettarda angélica*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p.2589-2592, 1984.

SRIVASTAVA, S. K.; JAIN, D. C. Triterpenoid saponin from plants of *Araliaceae*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p.644-647, 1989.

SUCROW, W.; SLOPIANKA, M.; KIRCHER, W. The occurrence of C₂₉ sterols with different configurations at C-24 in *Cucúrbita pepo* as shown by 270 MHz NMR. **Phytochemistry**, v. 15, n. 10, p. 1533-1535, 1976.

SUSUNAGA, G. S. et al. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**, v. 72, p.709-711, 2001.

TCHINDA, A. T. et al. Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from *Verninia guineensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 63, p. 841-846, 2003.

TCHINDA, A. T. et al. Vernoguinsterol and vernoguinoside, trypanocidal stigmastane derivatives from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 59, p.371-374, 2002.

TIAN, G. et al. Separation of flavonoids from the seeds of *Vernonia anthelmintica* Willd by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1049, p.219-222, 2004.

TONA, L. et al. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p.27-32, 2004.

TSENG, T. H. et al. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 12, p.1159-1164, 1997.

TSICHRITZIS, F. et al. Sesquiterpene lactones from *Vernonia jugalis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3808-3809, 1991.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3'4'-hydroxy-substituted flavonoids. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p.523-528, 2004.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3'4'-hydroxy substituted members. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Article in press, 2005.

TSUDA, T. et al. Radical scavenger effect of *Boschniakia rossica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p.85-90, 1994.

URSINI, F. et al. A novel antioxidant flavonoid (ldb 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, n. 5, p.547-553, 1994.

VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S. S.; CAVALEIRO, J. A. S.. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* SUBSP. *Maritima*. **Phytochemistry**, v. 49., n. 5. p. 1421-1424, 1998.

VIEIRA, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p.183-187, 2005.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.536-539, 2004.

XAASAM, C. C. et al. 1980. Unusual Favones from *Ocimum canum*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2229-2230.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; MUNGAI, G. M. A glaucolide-type sesquiterpene lactone from *Vernonia galamensis* ssp. *Nairobiensis*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p.3668-3669, 1990.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; MUNGAI, G. M. Glaucolides and hirsutinolides from african *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2653-2654, 1991.

ZIELINSKA, M.; GÜLDEN, M.; SEIBERT, H.; Effects of quercetin and quercetin-3-O-glicosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p.47-53, 2003.

ZUIN, V. G.; VILEGAS, J. H. Y. Pesticide residues in medicinal plants and phytomedicines. **Phytoterapy Research**, v. 14, p. 73-88, 2000.

WAGNER, H. et al. Flavonoides in *Vernonia* Arten. **Phytochemistry**, v. 11, p.3086-3087, 1972.

WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie**. 5. Auflage, New York: Gustav Fischer Verlag, 522 p., 1993.

YAGISHITA, K. Isolation and identification of α - and β -Amyrin from the Bark of *Ilex latifolia* Thunberg. **Bull. Agr. Chem. Soc. Japan**. v.21, n.3, p.157-159, 1957.

YENESEW, A. et al. Two prenylated flavanones from stem bark of *Erithrina burttii*. **Phytochemistry**, v.48, n.8, p. 1439-1443,1998.