

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**



**UNICAMP**



1150051010



**IQ**

**T/UNICAMP M663i**

**TESE DE DOUTORADO**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E TESTES ANTI-  
CÂNCER DE VITANOLÍDEOS DAS FOLHAS DE  
*Acnistus arborescens*.**

**SANDRO MINGUZZI**

**ORIENTADOR:  
PROF. Dr LAURO E. S. BARATA**

**Maio 2002**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL**

UNIDADE IQ  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
M663i  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 51010  
PROC 16.837/02  
C \_\_\_\_\_ DX \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 26/09/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

OK Verina

CM00173408-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP**

BIBID 260358

M663i

Minguzzi, Sandro  
Isolamento, identificação e testes anti-câncer em vitanolídeos das folhas de *acnistus arborescens* / Sandro Minguzzi. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Lauro E. S. Barata.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Vitanolídeos. 2. *Acnistus arborescens*.
3. Anti-câncer. I. Barata, Lauro E. S. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

**Aos meus filhos Bruno e Giulia, e a minha esposa Bete.**

**Agradecimento especial: Aos meus pais pelos exemplos de dedicação no trabalho e com a família, que me auxiliaram a continuar com determinação esta pesquisa, e que servirão de base para toda a vida.**

## **AGRADECIMENTOS:**

**Ao professor Dr. Lauro E. S. Barata pela oportunidade de aperfeiçoamento em Química Orgânica na área de produtos naturais.**

**Ao professor Dr. Geoffrey Cordell, da Universidade de Illinois, pela valiosa contribuição neste trabalho.**

**Ao Instituto de Química da Unicamp, pelas facilidades concedidas.**

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) pelo auxílio e bolsa concedidos.**

**À FAPESP pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.**

**Ao amigo Mário pela força, companheirismo e boa convivência desde os tempos de graduação.**

**Aos funcionários do setor de Biblioteca do IQ, sempre gentis e nos auxiliando em nossas pesquisas.**

**Ao pessoal do RMN, pela grande colaboração neste trabalho.**

**Aos Professores Keith Brown e Jorge Tamashiro do IB-Unicamp, pelo auxílio na área Botânica.**

**Ao Sr Gentil Godoy Junior e Sr Rosendo do IAC, pelo auxílio na obtenção de *Acnistus arborescens*.**

**Aos Professores do IQ-Unicamp: Dra Anita, Dr. Pedro Volpe e Dr. Marcos Eberlin, pelas orientações em diversas áreas da Química.**

**Aos colegas e funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho.**

## RESUMO

Este trabalho permitiu o isolamento e identificação de cinco vitanolídeos das folhas de *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht, o vitanolídeo 1 (conhecido) e os inéditos 2, 3, 4 e 5. As substâncias isoladas apresentaram atividade citotóxica em câncer, e foram identificadas através de estudos de IV, RMN 1D e 2D, e Espectrometria de Massas.

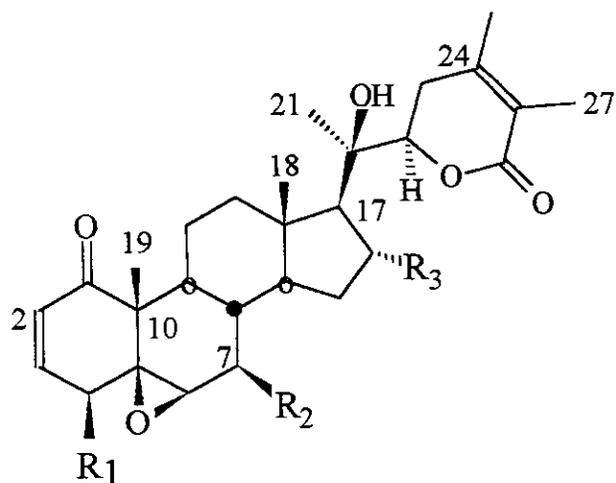
Estudos de de-replicação<sup>1</sup> permitiram avaliar a atividade anti-câncer. O extrato etéreo das folhas de *A. arborescens* e vitanolídeos purificados (1, 2, 3, 4 e 5) foram avaliados em: câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer de próstata e carcinoma oral epidermóide (Tabela 14). Outra parte do trabalho foi a obtenção de seis derivados sintéticos dos vitanolídeos 1 e 2 (Quadro 1), permitindo testar os mesmos nos sistemas de células cancerosas já referidos. Estes estudos **mostraram que a substância natural com maior atividade é 1**, em câncer de cólon ( $ED_{50} = 0,03 \mu\text{g/mL}$ ).

A alteração mais significativa na atividade biológica, com a mudança estrutural, ocorreu em 1b, onde houve um decréscimo na atividade biológica. Esta transformação mostrou que o **sistema conjugado 2-en-1-ona é fundamental na atividade dos vitanolídeos**. O derivado 1d representou uma melhora de 2 vezes na **atividade contra câncer de pulmão, embora a atividade tenha diminuído em outras de células**. O derivado 1c não apresentou nenhum aumento na atividade, entretanto percebemos uma certa seletividade na atividade de determinadas células. O teste biológico da atividade quimiopreventiva (Quinona Redutase), mostrou que **1, 2 e 3 são eficientes como indutores monofuncionais de quinona redutase, uma enzima relacionada à quimioprevenção em câncer**.

---

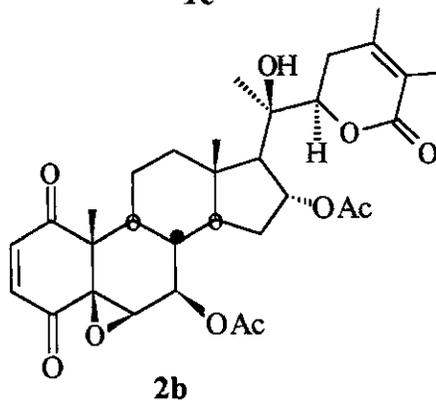
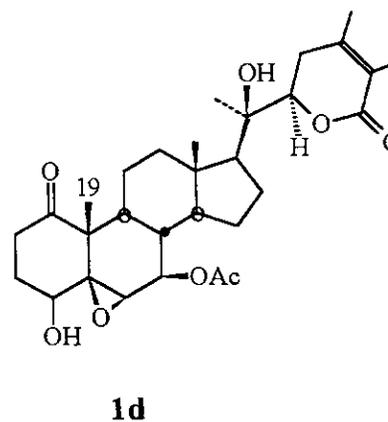
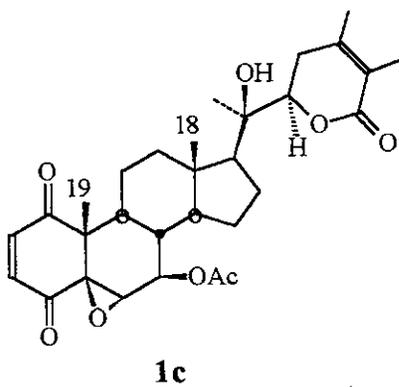
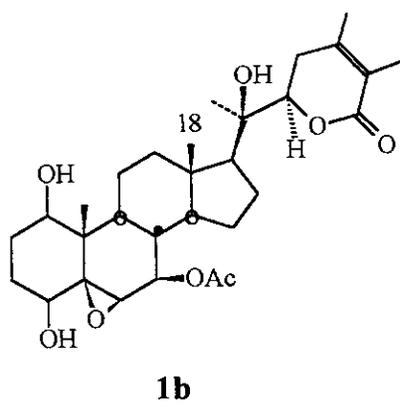
<sup>1</sup> De-replicação está descrita na página 16, podendo ser definida como uma técnica de análise de compostos orgânicos em produtos naturais, que utiliza um sistema HPLC-MS em conjunto com a realização de testes biológicos e consulta a uma base de dados de produtos naturais.

Quadro 1: Estruturas dos vitanolídeos isolados e sintéticos.



| Vitanolídeos isolados |    |     |     |
|-----------------------|----|-----|-----|
|                       | R1 | R2  | R3  |
| <b>1</b>              | OH | OAc | H   |
| <b>2</b>              | OH | OAc | OAc |
| <b>3</b>              | H  | OAc | OAc |
| <b>4</b>              | OH | EtO | H   |
| <b>5</b>              | OH | OAc | EtO |

| Derivados |                         |     |     |
|-----------|-------------------------|-----|-----|
| <b>1a</b> | OAc                     | OAc | H   |
| <b>2a</b> | OAc                     | OAc | OAc |
| <b>1b</b> | Vide estruturas abaixo. |     |     |
| <b>1c</b> |                         |     |     |
| <b>1d</b> |                         |     |     |
| <b>2b</b> |                         |     |     |

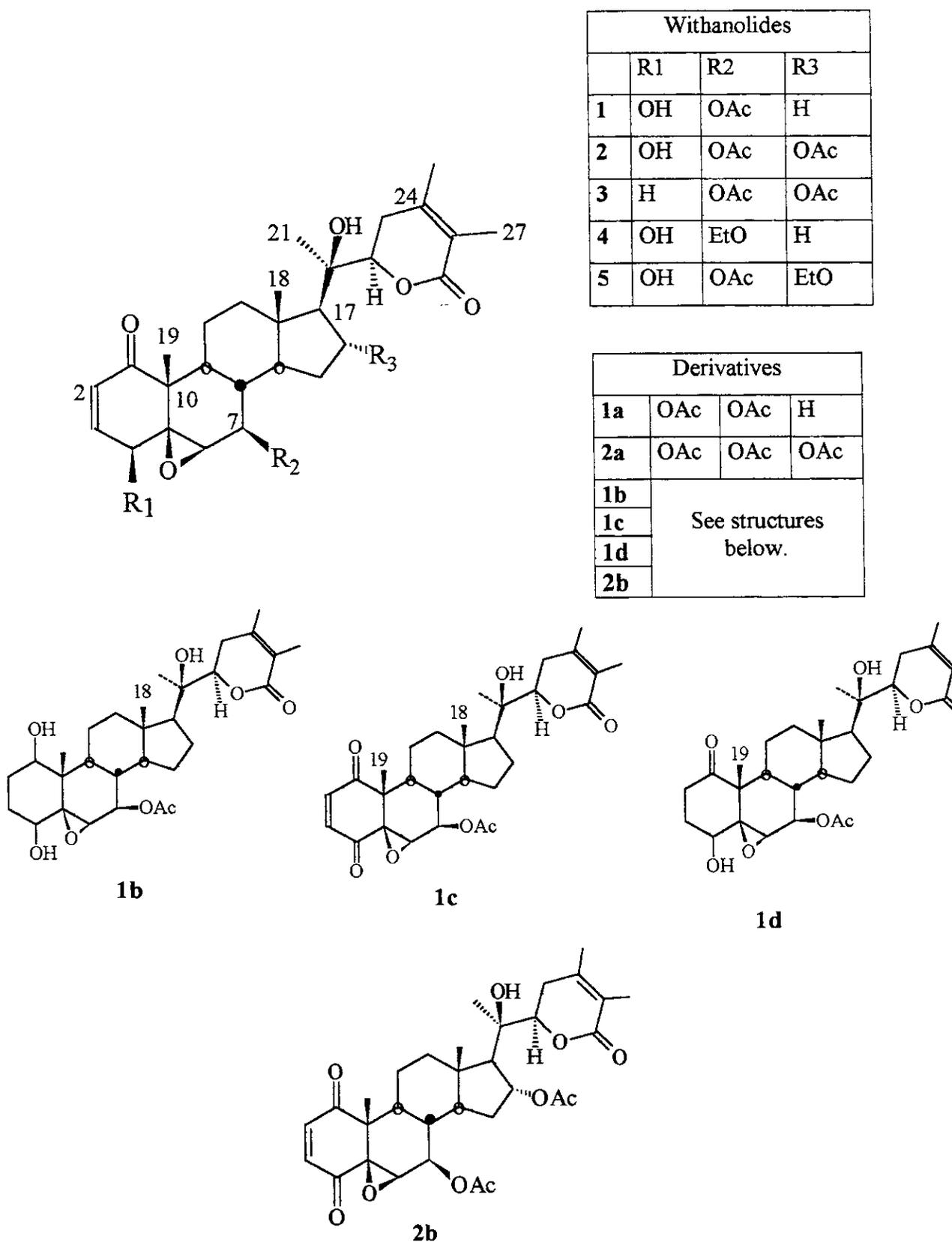


## ABSTRACT

Five cytotoxic withanolides (**1**, **2**, **3**, **4** and **5**), four with new structures (**2-5**), were isolated from the leaves of *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht. Their structures were determined by a combination of IR, 1D and 2D-NMR and mass spectral studies. Dereplication analysis of the ethyl ether extract was useful for evaluating the components showing significant cytotoxic activity.

The ether extract of the leaves of *A. arborescens* and the purified withanolides (**1**, **2**, **3**, **4** e **5**) were evaluated according to standard procedures against human cancers: breast, lung, colon, oral epidermoid carcinoma and prostate cancer cell lines (Table 14). Six derivatives of **1** and **2** were obtained and tested against the same cell lines (Figure 1). These data show that **1** exhibited the best activity in colon cancer ( $ED_{50}=0,03\mu\text{g/mL}$ ). The most significant structural change in the biological activity, occurred in **1b**, where there was a decrease in biological activity. This change showed that the conjugated 2-en-one system is fundamental for withanolides activities. **The 1c and 1d derivatives showed interesting results, 1d improved twice the activity against lung cancer, although the activities decrease for other cells. The 1c derivative does not improved the activity, despite of certain selectivity for some cells. The Quimiopreventive activity (Quinone Reductase), showed that 1, 2 and 3 are efficient as monofunctional inductors of Quinone reductase, an enzyme related with Quimioprevention in cancer.**

Figure 1: Withanolide structures of isolated and derivatives.



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|                  |  |
|------------------|--|
| AcOEt            | acetato de etila   |
| CC               | cromatografia em coluna  |
| CCD              | cromatografia em camada delgada  |
| CCDP             | cromatografia em camada delgada preparativa  |
| CI               | índice de quimioprevenção  |
| COLOC            | espectro bidimensional de correlação heteronuclear (CxH) a três ligações                                 |
| COSY             | espectro bidimensional de correlação homonuclear (HxH) a três ligações                                   |
| DEPT             | espectro de RMN <sup>13</sup> C utilizando transferência de polarização                                  |
| d                | dublete  |
| dd               | duplo dublete  |
| ddd              | duplo duplo dublete  |
| dt               | duplo triplete   |
| ED <sub>50</sub> | dose efetiva que mata 50% das células cancerosas   |
| EM               | espectro de massas   |
| EtO              | grupo etoxila  |
| HETCOR           | espectro bidimensional de correlação heteronuclear (CxH) a uma ligação.                                  |
| HSQC             | espectro bidimensional de correlação heteronuclear (“ <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> ”) |
| HMBC             | espectro bidimensional de correlação (CxH) a múltiplas ligações.   |
| HPLC/MS          | cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas                                   |
| HR-EIMS          | Espectrometria de massas de alta resolução   |
| Hz               | hertz  |
| IC <sub>50</sub> | concentração que inibe em 50% o crescimento de células cancerosas  |
| IV               | infravermelho  |
| IAC              | Instituto Agronômico Campinas  |
| KB               | células de câncer de pele, utilizadas em testes biológicos   |
| J                | constante de acoplamento   |
| m/z              | relação massa carga  |
| M <sup>+</sup>   | íon molecular  |
| m                | multiplete   |
| MM               | Massa molecular do composto  |
| Ms <sub>t</sub>  | tempo de retenção dos composto no espectro de massas   |
| NCI              | <i>National Cancer Institute</i>   |
| nOe              | efeito nuclear Overhauser  |
| NOESY            | Espectro bidimensional de correlação homonuclear (HxH) dos efeitos nOe                                   |
| ppm              | partes por milhão  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| p.f.                | ponto de fusão                              |
| q                   | quarteto                                    |
| QR                  | atividade de indução de quinona redutase    |
| Rf                  | fator de retenção, utilizado em CCD         |
| RMN <sup>1</sup> H  | ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| RMN <sup>13</sup> C | ressonância magnética nuclear de carbono-13 |
| t.a.                | temperatura ambiente                        |
| t                   | triplete                                    |
| δ                   | deslocamento químico em partes por milhão   |

## ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>1- INTRODUÇÃO</b>  |               |
| <b>OBJETIVOS DO TRABALHO</b>  |               |
| <b>1.2 - ÁREA DE ESTUDO</b>   | <b>1</b>      |
| 1.3 - Descrição da planta.  |               |
| 1.4 - Vitanolídeos  | 2             |
| 1.4.1 - Química e farmacologia de vitanolídeos.                               | 4             |
| 1.4.1.1 - Vitanolídeos com atividade anti-inflamatória.                       | 5             |
| 1.4.1.2 - Vitanolídeos com atividade anti-alimentar.                          | 6             |
| 1.4.1.3 - Vitanolídeos com atividade bactericida.                             | 7             |
| 1.4.1.4 - Vitanolídeos com atividade anti-câncer.                             | 8             |
| 1.4.1.5 - Vitanolídeos na quimio-prevenção de câncer.                         | 9             |
| 1.5 - Uma breve introdução sobre câncer e seu tratamento                      | 10            |
| 1.5.1 - Quimioterapia.  | 11            |
| 1.5.2 - Produtos Naturais anti-câncer derivados de plantas.                   | 12            |
| 1.6 - Estratégias na busca de novos agentes anti-câncer e ensaios biológicos. | 13            |
| 1.6.1 - De-replicação de produtos naturais.                                   |               |
| 1.6.1.1- De-replicação Química.   | 16            |
| 1.6.2 - De-replicação biológica.  | 18            |
| 1.6.3 - De-replicação combinando abordagem química e biológica                | 19            |
| 1.6.4 - Bases de dados da Química de Produtos Naturais.                       | 20            |
| <b>2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.</b>  |               |
| 2.1 - Extração.   |               |
| 2.2 - Identificação.  | 22            |
| 2.2.1 - Estudos de RMN dos vitanolídeos isolados.                             | 23            |
| 2.2.2 - Espectrometria de Massas  | 42            |
|   |               |
| <b>3 - Obtenção de derivados.</b>   |               |
| 3.1 - Reações de acetilação de 1 e 2.   | 45            |
| 3.2 - Reação de redução da carbonila em 1.                                    | 47            |

## ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 3.3 - Oxidação de 1 e 2 .   | 48            |
| 3.4 – Hidrogenação catalítica de 1.                                   | 49            |
|   |               |
| 4 - DE-REPLICAÇÃO em <i>A. arborescens</i> .                          |               |
| 4.1 - Detecção e testes biológicos <i>in vitro</i> .                  | 50            |
|   |               |
| 5- TESTES BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> DOS VITANOLÍDEOS.                |               |
| 5.1 - Citotoxicidade em células cancerosas.                           | 53            |
| <b>5.1.1 - Relação Estrutura-Atividade de vitanolídeos em Câncer.</b> | <b>54</b>     |
| 5.2- Atividade quimiopreventiva ( teste de quinona redutase).         | 58            |
|   |               |
| 6 - PARTE EXPERIMENTAL.   |               |
| 6.1- Material   |               |
| 6.2- Metodologia  |               |
| 6.2.1 - Obtenção de solventes tratados.                               | 59            |
| 6.2.2 – Obtenção de vitanolídeos.                                     | 60            |
| 6.2.3 – Análise dos compostos isolados                                |               |
| 6.2.3.1 – Geral   | 64            |
| 6.2.3.2 – Análise por HPLC-MS.  |               |
| 6.2.3.3 – Parâmetros Cromatográficos (HPLC).                          | 65            |
| 6.2.3.4 – Dados físicos dos vitanolídeos.                             | 66            |
| 6.2.4- Obtenção dos derivados e dados físicos.                        | 68            |
| 6.3 - TESTES BIOLÓGICOS.  | 73            |
| 6.3.1 – Avaliação da atividade citotóxica                             |               |
| 6.3.1 – Avaliação da atividade quimiopreventiva                       |               |
| 7 - CONCLUSÕES.   | 73            |
| 8 - BIBLIOGRAFIA.   | 74            |
| APÊNDICE  | 78            |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figuras   |    |
| Figura 1 - Esqueleto típico dos vitanolídeos  | 3  |
| Figura 2 - Estruturas de alguns vitanolídeos  | 4  |
| Figura 3 - Alguns exemplos de vitanolídeos com atividade anti-câncer. (Hill et. al.)  | 6  |
| Figura 4- Vitanolídeos com atividade biológica.   | 7  |
| Figura 5 - Vitanolídeos com atividade bactericida.  | 8  |
| Figura 6 - Vitanolídeos com atividade quimio-preventiva em câncer.  | 10 |
| Figura 7 - Técnica de de-replicação de produtos naturais.   | 20 |
| Figura 8 - Principais sinais em RMN 1H e fragmentos de massa de 1 e 2.  | 28 |
| Figura 8a - Interações dos próton por Noesy em 2.   | 29 |
| Figura 9 - Estrutura dos vitanolídeos isolados e deslocamentos químicos de 1 e 2.   | 31 |
| Figura 10- Interações dos prótons por Noesy em 3.   | 34 |
| Figura 10a - Deslocamentos químicos em RMN <sup>13</sup> C de 3.  | 34 |
| Figura 11 - Deslocamentos químicos em RMN 13C de 4.   | 37 |
| Figura 12 - Deslocamentos químicos em RMN 13C de 5.   | 40 |
| Figura 13 - Fragmentação dos vitanolídeos 1 e 2.  | 42 |
| Figura 14- Fragmentação do vitanolídeo 3.   | 43 |
| Figura 14a - Estruturas de 1a e 2a com seus respectivos deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C.  | 46 |
| Figura 15 - Cromatograma UV da injeção do extrato etéreo de <i>A arborescens</i> . por HPLC.  | 52 |
| Figura 16 - Cromatograma de íons reconstruídos para m/z 469, 527, 569 e 585 (A), perfil de atividade citotóxica <i>in vitro</i> contra células de carcinoma KB (B). | 52 |
| Figura 17- Estrutura dos vitanolídeos isolados e derivados, testados em câncer  | 57 |

## ÍNDICE DE TABELAS

| TABELAS  | Página |
|--|--------|
| Tabela 1 – Bases de dados utilizadas na pesquisa de produtos naturais.   | 21     |
| Tabela 2 - Sinais relevantes nos espectros de RMN <sup>1</sup> H de vitanolídeos de <i>A. arborescens</i> .  | 24     |
| Tabela 3- Correlações observadas no espectro COSY ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H)  | 24     |
| Tabela 4. Vitanolídeos 1, 2, e 3: Deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H e correlações 1J obtidas por experimento HSQC.                           | 26     |
| Tabela 5. Correlação direta <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C (1J) e correlações <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a longa distância (2J and 3J) através da técnica COLOC em 2.  | 29     |
| Tabela 6 - Correlações observadas no espectro COSY ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) de 2 (δ ppm).   | 30     |
| Tabela 7- Correlações observadas no espectro COSY ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) de 3 (δ ppm).  | 32     |
| Tabela 8- Correlações observadas no espectro COSY ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) de 4.  | 37     |
| Tabela 9. Correlação direta <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C (1J) e correlações <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a longa distância (2J and 3J) através da técnica HMBC, em 4.  | 38     |
| Tabela 10- Correlações observadas no espectro COSY ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) de 5  | 39     |
| Tabela 11. Correlação direta <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C (1J) e correlações <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a longa distância (2J and 3J) através da técnica HMBC, em 5. | 40     |
| Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H para 4 e 5.  | 41     |
| Tabela 13 – Massas moleculares e tempos de retenção dos compostos ativos no extrato etéreo de <i>Acnistus arborescens</i> , observados por de-replicação.                    | 51     |
| Tabela 14- Citotoxicidade em relação a células cancerosas.   | 54     |
| Tabela 15 – Atividade de indução de QR para os vitanolídeos (1-3) de <i>A. arborescens</i> e 4'-bromoflavona.  | 58     |
| Tabela 16 – Frações obtidas por Cromatografia líquida do extrato etéreo.   | 61     |
| Tabela 17 – Frações obtidas por Cromatografia líquida do extrato etanólico.  | 64     |
| Tabela 18- Correlações observadas no espectro COSY ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) de 1b.  | 69     |
| Tabela 19 – Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C e RMN <sup>1</sup> H para os derivados 1b, 1 <sup>a</sup> e 2a.  | 71     |
| Tabela 20- Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C e RMN <sup>1</sup> H para 1c e 1d.  | 72     |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

| Esquemas   | Página |
|--|--------|
| Esquema 1- Proposta de fragmentação para os fragmentos principais de 1.          | 44     |
| Esquema 2- Extração sucessiva em SOXHLET   | 61     |
| Esquema 3- Processo geral de eliminação de clorofila e obtenção de vitanolídeos. | 63     |

## ÍNDICE DE ESPECTROS

| ESPECTROS   | Página |
|---|--------|
| E-1- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 1.                 | 79     |
| E-1a - Espectro de Noesy do vitanolídeo 1.                          | 80     |
| E-2- Espectro de Cosy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do vitanolídeo 1. | 81     |
| E-3- Espectro DEPT do vitanolídeo 1.                                | 82     |
| E-4- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 1.              | 83     |
| E-5- Espectro HSQC do vitanolídeo 1.                                | 84     |
| E-6- Espectro de IV do vitanolídeo 1.                               | 85     |
| E-7- Espectro de massas do vitanolídeo 1.                           | 86     |
| E-8- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 2.                 | 87     |
| E-9- Espectro de Cosy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do vitanolídeo 2. | 88     |
| E-9a- Espectro de Noesy do vitanolídeo 2.                           | 89     |
| E-10- Espectro DEPT do vitanolídeo 2.                               | 90     |
| E-11- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 2.             | 91     |
| E-12- Espectro HSQC do vitanolídeo 2.                               | 92     |
| E-13- Espectro COLOC do vitanolídeo 2.                              | 93     |
| E-14- Espectro de nOe diff de 2.                                    | 96     |
| E-15- Espectro de massas do vitanolídeo 2.                          | 97     |
| E-16- Espectro de IV do vitanolídeo 2.                              | 98     |

|  |     |
|--|-----|
| E-17- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 3.                 | 99  |
| E-18- Espectro de Cosy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do vitanolídeo 3. | 100 |
| E-19- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 3.              | 101 |
| E-20- Espectro DEPT do vitanolídeo 3.                                | 102 |
| E-21- Espectro HSQC do vitanolídeo 3.                                | 103 |
| E22- Espectro nOe diff do vitanolídeo 3.                             | 105 |
| E-23- Espectro de IV do vitanolídeo 3.                               | 107 |
| E-24- Espectro de massas do vitanolídeo 3.                           | 108 |
| E-25- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 4.                 | 109 |
| E-26- Espectro de Cosy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do vitanolídeo 4. | 110 |
| E-27- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 4.              | 111 |
| E-28- Espectro DEPT do vitanolídeo 4.                                | 112 |
| E-29- Espectro COLOC do vitanolídeo 4.                               | 113 |
| E-30- Espectro HETCOR do vitanolídeo 4.                              | 117 |
| E-31- Espectro de IV do vitanolídeo 4.                               | 118 |
| E-32- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 5.                 | 119 |
| E-33- Espectro de Cosy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do vitanolídeo 5. | 120 |
| E-34- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 5.              | 121 |
| E-35- Espectro DEPT do vitanolídeo 5.                                | 122 |
| E-36- Espectro HETCOR do vitanolídeo 5.                              | 123 |
| E-37- Espectro COLOC do vitanolídeo 5.                               | 126 |
| E-38- Espectro de IV Do vitanolídeo 5.                               | 127 |
| E-39- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 1a.                | 128 |
| E-40- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 1a.             | 129 |
| E-41- Espectro DEPT do vitanolídeo 1a.                               | 130 |
| E-42- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 1b.                | 131 |
| E-43- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 1b.             | 132 |
| E-44- Espectro DEPT do vitanolídeo 1b.                               | 133 |

|  |     |
|--|-----|
| E-45- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 1c. | 134 |
| E-45a - Espectro DEPT do vitanolídeo 1c.                 | 135 |
| E-46- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 1c.    | 136 |
| E-47- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 1d.    | 137 |
| E-48- Espectro DEPT do vitanolídeo 1d.                   | 138 |
| E-49- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 1d. | 139 |
| E-50- Espectro DEPT do vitanolídeo 1d.                   | 140 |
| E-51- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do vitanolídeo 2a. | 141 |
| E-52- Espectro RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 2a.       | 142 |
| E-53- Espectro de RMN $^1\text{H}$ do vitanolídeo 2b.    | 143 |

## 1. DADOS PESSOAIS

Nome: Sandro Minguzzi

Nome em citações bibliográficas: Minguzzi, S  
Brasileiro, casado, nascido em 20/06/1965

Endereço Residencial: Rua Tatuí, 23 Jardim da Cidade  
CEP:13323-083 Salto- SP -Brasil

E-mail: [beguzi@uol.com.br](mailto:beguzi@uol.com.br)

## 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

PÓS-GRADUAÇÃO :

Doutor em Química Orgânica (UNICAMP 2002)

Mestre em Química Orgânica (UNICAMP/1997)

GRADUAÇÃO:

Bacharel em Química Tecnológica (UNICAMP/1992)

## 3. IDIOMA:

Inglês: Bom nível de conversação, leitura e escrita.

## 4. QUALIFICAÇÕES:

- Profissional da área Química com ênfase em ensino & pesquisa.
- Análises Orgânicas em Petróleo e Produtos Naturais com atividade farmacológica.
- Experiência em laboratórios de Química Orgânica, utilizando técnicas diversas de cromatografia e síntese, visando a análise de petróleo e plantas medicinais.
- Equipamentos e técnicas utilizadas: HPLC, Cromatografia à gás (CG ), Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS), Ressonância Magnética Nuclear (  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  )
- Conhecimentos de informática como usuário: Windows, Powerpoint, Word e Excel.

## 5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA/ TECNOLÓGICA

- Artigo Publicado em Revista Internacional: “ Citotoxic Withanolides from *Acnistus arborescens* , *Phytochemistry* **2002**, 59 , 635-641
- 20<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, 1997. Estudo geoquímico dos óleos dos campos de Furado, Tabuleiro dos Martins e Pilar da Bacia Sergipe-Alagoas por Cromatografia Gasosa de alta resolução acoplada à Espectrometria de Massas.
- 21<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, 1998. Um novo vitanolídeo das folhas de *A. arborescens*.
- 23<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, 2000. Vitanolídeos anti-câncer de *Acnistus arborescens*.
- XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, 1998. Citotoxicidade de vitanolídeos de *Acnistus arborescens* em células cancerosas.
- XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife, 2000. Uso da técnica de de-replicação na análise de Produtos Naturais: Vitanolídeos com ação anti-câncer.

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo da tese foi o estudo fitoquímico das folhas de *Acnistus arborescens* visando o isolamento, a identificação e a atividade anti-câncer de vitanolídeos. Na obtenção de novas substâncias potencialmente ativas em câncer, faz parte também a síntese de derivados a partir dos vitanolídeos isolados. O uso de técnicas de de-replicação, ensaios anti-câncer e quinona redutase (QR) *in vitro* de extratos, vitanolídeos puros e derivados também está presente neste trabalho.

### 1.2 – ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo faz parte da filosofia de trabalho e prioridades do nosso grupo de pesquisa que propõe a aplicação prática de estudos acadêmicos.

Duas áreas do conhecimento abrangem nossos estudos: a Química de Produtos Naturais (Fitoquímica) e a Farmacologia (Farmacognosia), e é parte de uma tendência atual na interdisciplinaridade.

O estudo químico de vitanolídeos em plantas teve início na década de 70 com Lavie, que iniciou os testes em câncer para estes compostos. No Brasil, Barata et al. (1970 (6)) estudaram *A. arborescens*, identificando um vitanolídeo não usual com grupo acetato. Neste mesmo trabalho foram feitos testes para este vitanolídeo contra câncer *in vivo* em ratos.

O aprimoramento das técnicas de ensaio e detecção de compostos anti-câncer com realização de testes anti-câncer *in vitro*, através da técnica de de-replicação, levou-nos a reestudar as folhas de *A. arborescens* em colaboração com a Universidade de Illinois em Chicago e o *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos, que vem testando extratos de plantas de várias partes do mundo (Santos e Elisabetsky, 1999). Além destes fatores existe também a importância da química de produtos naturais em identificar novos compostos orgânicos.

### 1.3 – DESCRIÇÃO DA PLANTA.

A planta *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht é classificada da seguinte forma:

Família: *Solanaceae*

Gênero: *Acnistus*

Espécie: *arborescens*

*Solanácea* da mata pluvial da encosta Atlântica em Minas, São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina, as folhas da planta em estudo foram coletadas no Rio de Janeiro e São Paulo, identificadas pelo Professor Jorge Tamashiro do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp. As amostras botânicas da planta se encontram depositadas no herbário do IB, nº das excicatas 125.150 e 125.151. A descrição botânica de *Acnistus arborescens* se encontra em Barata (1970 (5)).

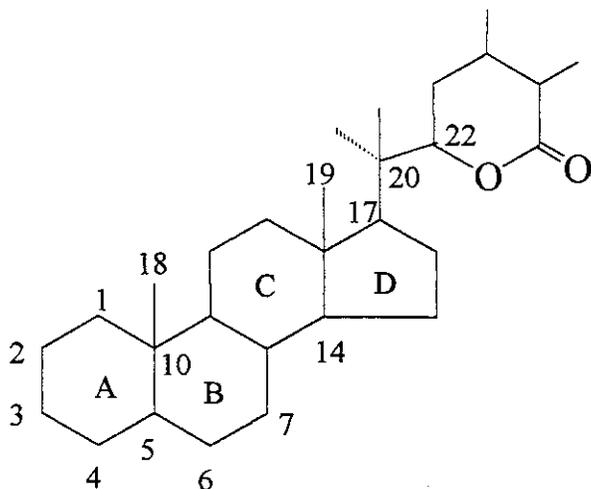
### 1.4 – VITANOLÍDEOS.

Vitanolídeos são um grupo de compostos naturais que podem ser definidos como lactonas esteroidais substituídas ( Glotter, 1991).

O esqueleto básico de um vitanolídeo apresenta um anel do tipo ergostano, no qual os C-22 e C-26 são apropriadamente oxidados para formar uma  $\delta$ -lactona.

Um aspecto comum dos vitanolídeos conhecidos é a oxidação em C-1, C-4, C-22 e C-26. Nos vitanolídeos já isolados, observa-se que 90 % apresentam uma carbonila em C-1 quase sempre  $\alpha,\beta$  insaturada. Em adição aos processos de oxidação nos três centros mencionados anteriormente, um dos aspectos intrigantes das plantas que sintetizam vitanolídeos é extraordinária facilidade em produzir funções oxigenadas (p.e: hidroxila, epóxido e acetoxi) em quase todas as posições da cadeia. O esqueleto básico dos vitanolídeos é mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Esqueleto típico dos vitanolídeos.



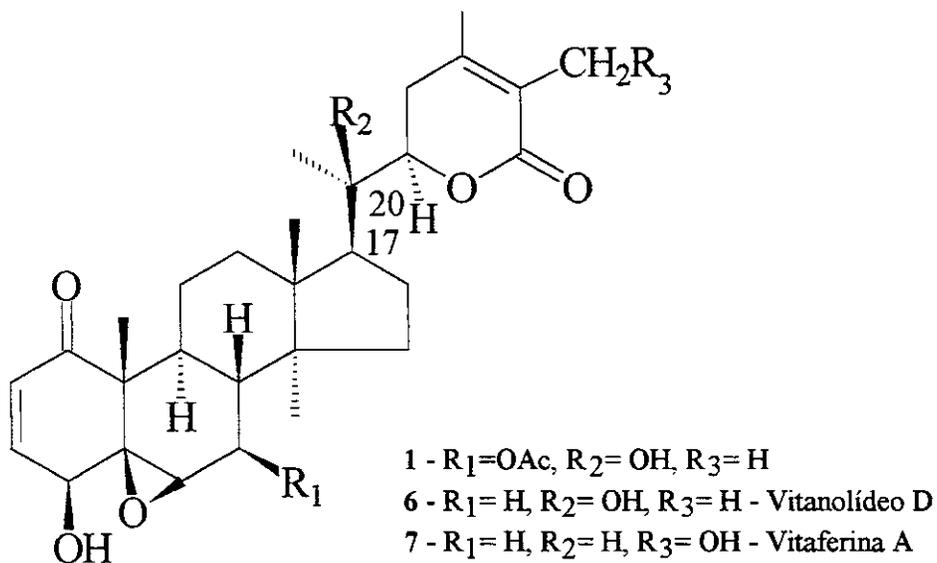
Os vitanolídeos foram primeiramente citados na literatura por Lavie e Yarden (1962), mas sua elucidação estrutural só aconteceu em 1966 com Lavie et al., que descreveram a estereoquímica da vitaferina A (7) (Figura 2) isolada das folhas de *Withania somnifera* ( nome comum: Ashwagandha), uma *Solanacea* muito popular na Índia pelas suas propriedades medicinais. Três anos depois do trabalho de Lavie (1966), os pesquisadores Kupchan *et al.* (1969), isolaram vários vitanolídeos das folhas de *Acnistus arborescens* da Costa Rica, e dentre estes destacava-se a vitaferina (7), que apresentou atividade citotóxica.

Um aspecto bastante interessante no estudo dos vitanonídeos é a presença de quimiotipos, ou seja a presença de diferentes componentes químicos, em plantas botânica e morfológicamente similares. As primeiras investigações sobre quimiotipos foram feitas na espécie *Withania somnifera* de Israel, onde três quimiotipos foram identificados, destacando-se I e II, por estes terem sido encontrados em *Acnistus arborescens*. O quimiotipo I apresenta como principal componente a substância 7, e como principais características a formação de um sistema 4 $\beta$ -OH-5 $\beta$ ,6 $\beta$  epoxi, assim como a ausência de hidroxila no C-20.

O quimiotipo II contém apenas 20-hidroxi-vitanolídeos, sendo o vitanolídeo D (6) seu principal componente, onde de novo se apresenta um sistema 4 $\beta$ -OH-5 $\beta$ ,6 $\beta$  epoxi. Barata et al. (1970 (5) e (6)) relatam o isolamento de um novo tipo de vitanolídeo (1) em *Acnistus arborescens* do Brasil, com a presença de um grupo acetato em C-7 (Figura 2), pertencendo ao quimiotipo II.

Glatter, E. (1991) apresentou uma revisão onde são descritos 177 vitanolídeos e suas atividades farmacológicas. Acreditamos que até a data atual tenham sido isolados mais de 200 vitanolídeos, e muitos outros ainda podem vir a ser isolados devido às inúmeras possibilidades estruturais.

Figura 2 - Estruturas de alguns vitanolídeos ( 1, 6 e 7)



#### 1.4.1 - Química e farmacologia de vitanolídeos.

As propriedades farmacológicas como anti-tumoral, bactericida, antiestimulante-alimentar, anti-inflamatória e quimiopreventiva em câncer apresentadas por vitanolídeos já estudados, tornam de grande interesse o estudo e isolamento destes compostos (Rahman *et al*, 1998, Kennelly. *et al.*, 1997).

#### 1.4.1.1 –Vitanolídeos com atividade anti-câncer

Um dos primeiros trabalhos sobre a atividade farmacológica de vitanolídeos foi feito por Kupchan *et al.* (1970), durante suas pesquisas sobre inibidores de tumores provenientes de plantas. Utilizando-se do extrato alcoólico de folhas de *Acnistus arborescens*, observou significativa atividade biológica *in vitro* (cultura de tecido) contra células de carcinoma humano da nasofaringe e *in vivo* contra sarcoma 180 em ratos. Kupchan teve sua planta coletada na Costa Rica, dela conseguindo isolar, por métodos cromatográficos convencionais, o vitanolídeo responsável por aquela ação farmacológica, a lactona esteroidal **7**.

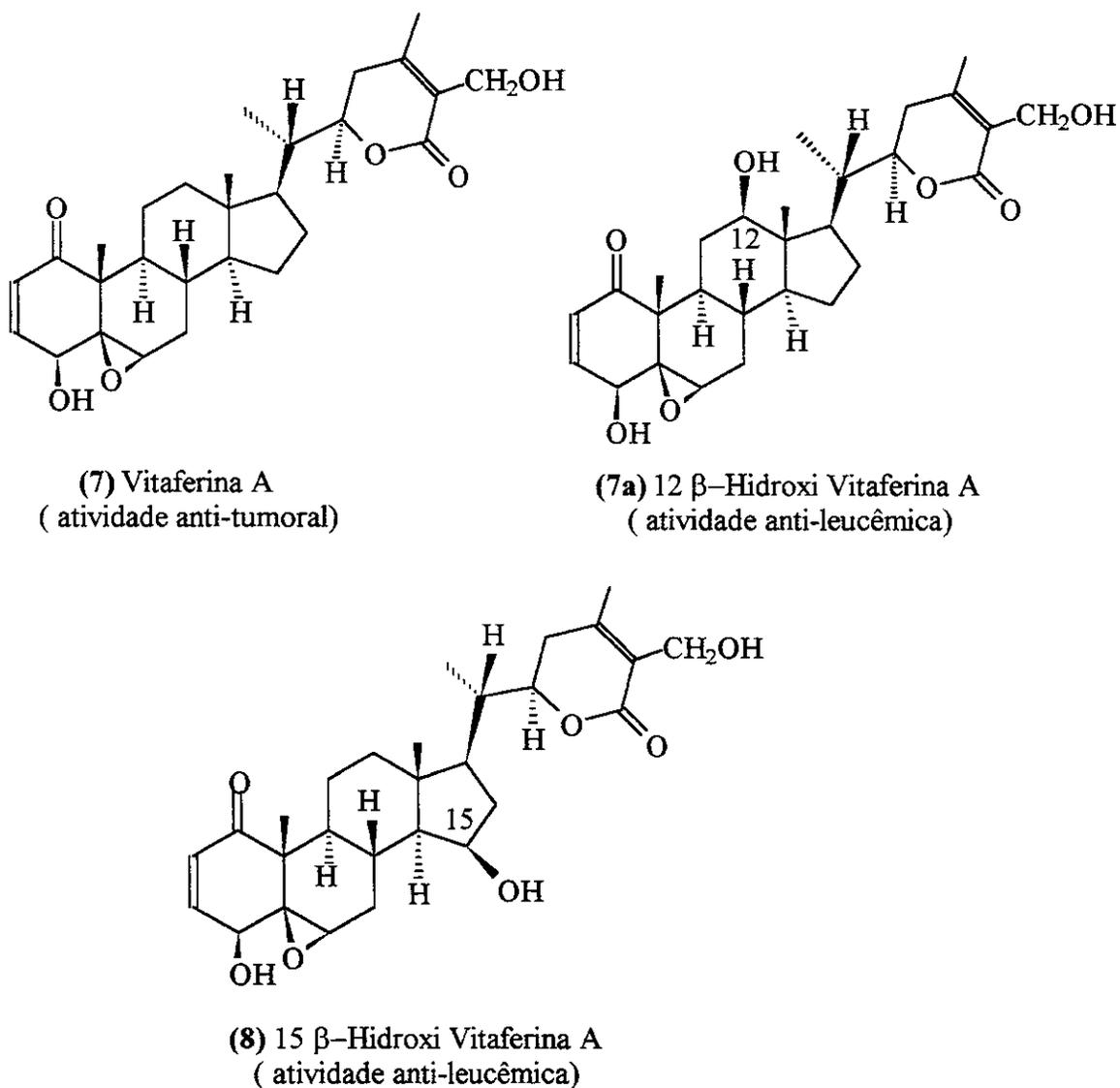
Devi *et al.* (1992) relatam o efeito de *Withania somnifera* (Ashwagandha), da família *Solanaceae*, rica em vitanolídeos, contra sarcoma 180, um tipo de tumor transplantado em ratos. Num trabalho posterior, Devi (1996) isolou o componente ativo **7**, o mesmo isolado por Kupchan.

Barata (1970 (5)) relata o efeito de redução de tumores em ratos de *A. arborescens*, e o isolamento de um novo tipo de vitanolídeo (**1**), com a presença de um grupo acetato conforme observado na Figura 2.

Hill *et al.* relatam uma série de compostos com atividade anti-câncer, obtidos a partir das folhas de *Withania somnifera*, dentre os quais destacamos **7**, **7a** e **8** (Figura 3).

Os compostos **7** e 4 $\beta$ -hidroxivitanolídeo E (**9**) (Figuras 3 e 4) foram ativos contra células de leucemia L5178Y de ratos (Yoshida *et al.*, 1979). O Vitanolídeo E (**10**) e (**9**) (Figura 4) obtidos por Kirson, Lavie e Glotter foram testados pré-clinicamente pelo NCI em leucemia L-1210 e melanoma B-16; entretanto a atividade de ambos foi menor do que o necessário para investigações clínicas futuras (Glotter, 1991).

Figura 3 - Vitanolídeos com atividade anti-câncer (Hill *et. al.*).



A presença de um epóxido- 5 $\beta$ , 6 $\beta$  parece ter importância na atividade antitumoral de vitanolídeos. Um exemplo de composto inativo em câncer é o vitanolídeo S (12) (Figura 4), um composto no qual o epóxido- 5 $\beta$ , 6 $\beta$  foi convertido em 5 $\alpha$ , 6 $\beta$  diol (Glotter, 1991).

#### 1.4.1.2 - Vitanolídeos com atividade anti-inflamatória.

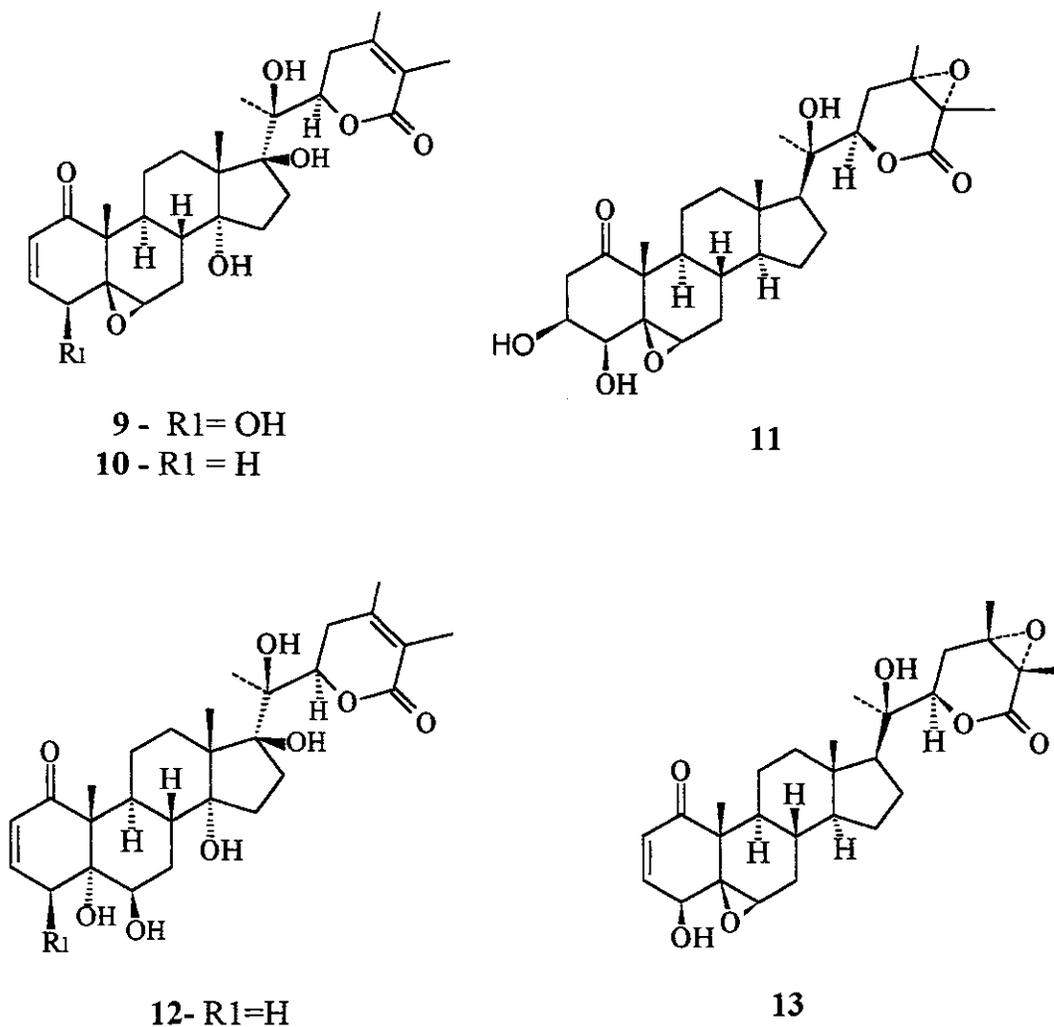
O Epoxivitanolídeo D (13) e fisangulídeo (11), isolados de *Physalis angulata*, (Figura 4) apresentaram efeito anti-inflamatório quando administrados intra-

peritonealmente em ratos (10 mg/kg) em inflamações induzidas. Os resultados foram comparáveis aos obtidos com hidrocortisona (Syrov *et al.*, 1989).

#### 1.4.1.3 –Vitanolídeos com atividade anti-alimentar.

Muitos vitanolídeos são antiestimulantes alimentares de insetos, como por exemplo **10** que possui potente atividade na larva de *Spodoptera littoralis*, e o 4β-hidroxi vitanolídeo (**9**) ( Figura 4) que é 10 vezes menos ativo que o vitanolídeo anterior (Ascher *et al.*, 1980). Ambos foram isolados de *Withania somnifera*.

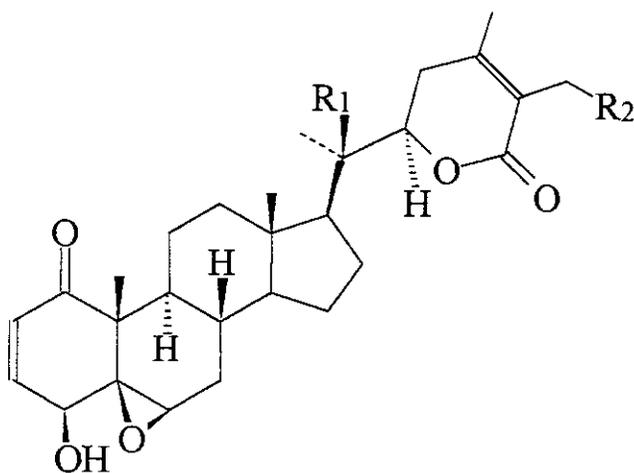
Figura 4 - Vitanolídeos com atividade biológica.



#### 1.4.1.4 –Vitanolídeos com atividade bactericida.

Investigações em vitaferina A (7) (Figura 5), antes de sua elucidação estrutural, levaram a conclusão de que este composto possuía propriedades antibacterianas, principalmente contra microorganismos gram-positivos (Ben-Efraim, S. e Yardem, A., 1962). Numa pesquisa posterior (Chatterjee e Chakraborti, 1980) ficou comprovado que 27-deoxivitaferina A (14) (Figura 5) é mais ativa do que outros compostos relacionados, mesmo quando comparado com a própria vitaferina A (7), vitanolídeo D (6), 2,3 diH- diidrodeoxivitaferina A (15) e 2,3 diH-diidrovidaferina A (16) (Figura 5).

Figura 5 – Vitanolídeos com atividade bactericida.



7 -  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$

6 -  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$

14-  $R_1 = R_2 = H$

15 - 2,3 diH,  $R_1 = R_2 = H$

16 - 2,3 diH,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$

#### 1.4.1.5 - Vitanolídeos na quimioprevenção do câncer.

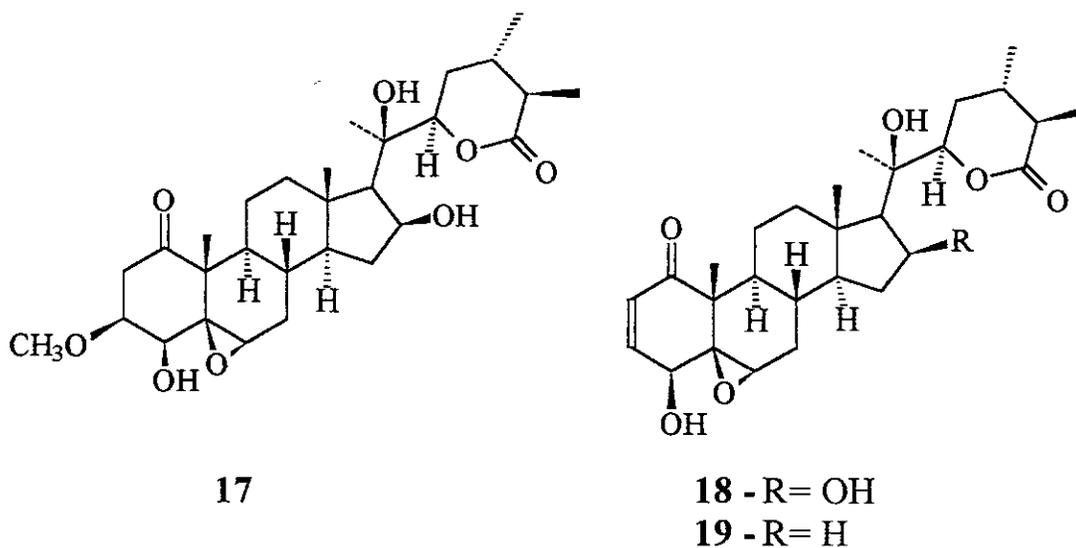
A quimioprevenção de câncer é definida como o uso de compostos químicos, ou compostos que fazem parte da dieta humana, para bloquear, inibir ou reverter o desenvolvimento de câncer (Gerhäuser *et al.*, 1997).

A indução de enzimas, como por exemplo a Quinona Redutase (QR), por agentes químicos, é considerado o mais importante mecanismo de proteção contra o estresse químico e iniciação da carcinogênese. Uma abordagem na determinação de novos agentes quimiopreventivos em câncer, é o teste de extratos de plantas ou compostos puros como indicadores de QR (Gerhäuser *et al.*, 1997).

Estudos epidemiológicos mostram que pessoas que consomem uma alta proporção de vegetais verdes ou amarelos em suas dietas, apresentam um decréscimo no risco de desenvolver alguns tipos de câncer (Colditz *et al.*, 1985). Um trabalho subsequente, levou ao isolamento de vários compostos de frutas e vegetais que reduzem a incidência de carcinogênese induzida em laboratório, entre eles podemos citar sulforafano de brócoli e outros vegetais crucíferos (Zhang *et al.*, 1992),  $\beta$ -caroteno de uma variedade de vegetais e frutas, e os mono-terpenos limoneno e D-carvona de várias espécies cítricas (Wattenberg *et al.*, 1989).

Kenelly *et al.* (1997) descrevem um estudo dos frutos de *Physalis philadelphica*, comumente utilizados na culinária da América Latina no preparo de temperos e molhos, mostrando que os mesmos induzem a atividade de QR em cultura de células Hepa 1cc7. O estudo fitoquímico destes frutos levou ao isolamento de vitanolídeos 17, 18 e 19, Figura 6. Destes vitanolídeos 17 é apontado pelo autor como um possível artefato, obtido durante o processo de extração, onde foi utilizado metanol, este reagiria com a dupla C2-C3 pré existente em 18. Os resultados de indução de QR com estes vitanolídeos, segundo o artigo, foram bastante satisfatórios.

Figura 6 - Vitanolídeos com atividade quimio-preventiva em câncer.



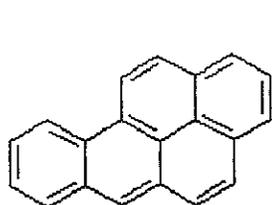
### 1.5 - Uma breve introdução sobre Câncer e seu tratamento<sup>2</sup>.

Cerca de 1,5 milhão de casos de câncer são diagnosticados anualmente nos EUA. Embora nenhum medicamento ou tratamento definitivo contra o câncer tenha sido encontrado, muito progresso está sendo feito na compreensão das causas do câncer, e no desenvolvimento de tratamentos efetivos e novas drogas. Câncer é o termo genérico para descrever uma coleção de cerca de 150 doenças diferentes, caracterizadas por uma rápida e anormal divisão celular do tecido, e pela migração de células para partes do corpo distantes da origem. Com a rápida e desnecessária divisão celular, logo se forma um excesso de tecido, conhecido como tumor, que pode ser benigno (inofensivo) ou maligno (tem a habilidade de se espalhar pelo corpo e formar outros tumores). Alguns tipos de câncer não envolvem tumores, tais como a leucemia, mas, tal como em outros cânceres, há uma reprodução incontrolada e indesejada de células (leucócitos ou eritrócitos, no caso da leucemia); as causas não são, ainda, completamente conhecidas e algumas foram identificadas.

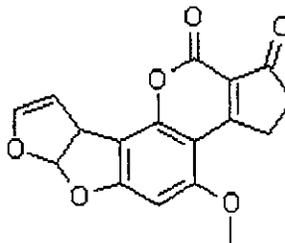
Em alguns casos a modificação do DNA parece ser a responsável pela alteração do crescimento normal da célula. Muitos compostos químicos, também,

<sup>2</sup> Referências na Internet (vide bibliografia)

podem induzir a formação de tumores cancerígenos e, dentre estes, destacam-se a aflatoxina B1(21) (presente no mofo do amendoim) e o benzopireno (20) (presente no alcatrão dos cigarros).



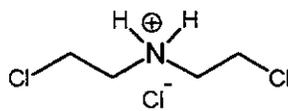
20



21

### 1.5.1 – Quimioterapia.

Os agentes químicos para o tratamento de câncer são chamados de antineoplásicos, são baseados no fato de que as células cancerígenas crescem mais rápido de que as células normais. Algumas células, porém, também crescem rapidamente: os folículos capilares, o epitélio intestinal, células do sistema imunológico. Os antineoplásicos possuem efeitos colaterais sobre todas as células do organismo que apresentam crescimento acelerado. Um dos primeiros antineoplásicos utilizados foi o Mecloroetamina (22), utilizado como arma química na primeira guerra mundial. Os principais danos causados por esta droga nos soldados afetados foram sobre as células de rápido crescimento, tal como epitélio intestinal e tecido linfático. Esta descoberta levou os cientistas a utilizar 22 no tratamento do câncer e, hoje, no mínimo 10 cânceres podem ser tratados com esta substância, tal como doença de Hodgkin e linfossarcoma.



22

Um agente quimioterápico ideal mataria as células cancerígenas e seria inofensivo às células saudáveis. Nenhum agente quimioterápico, por enquanto, atende a estes critérios, e os mais efetivos são também os mais tóxicos para os humanos e, portanto, precisam ser cuidadosamente controlados quando ministrados aos pacientes. Existem três fontes principais de agentes quimioterápicos: substâncias químicas sintéticas, produtos produzidos por micro-organismos, organismos marinhos e plantas. Os quimioterápicos são agentes capazes de perturbar ou inibir a divisão (crescimento) das células.

#### 1.5.2 - Produtos Naturais anti-câncer derivados de plantas.

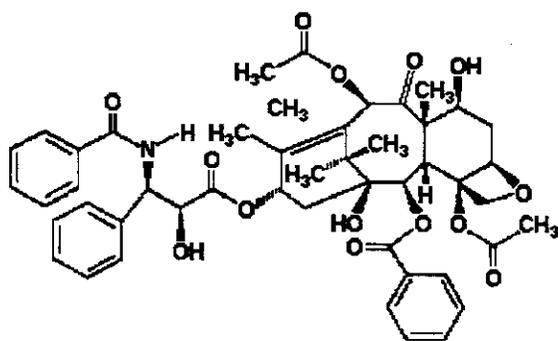
A química dos produtos naturais, estava até recentemente, muito mais preocupada com o isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários (Quimiosistemática), do que propriamente com a atividade biológica destes. A tendência atual é da pesquisa multidisciplinar onde químicos, botânicos, biólogos, físicos devem interagir, e como consequência a separação entre diversas disciplinas está se tornando menos distinta. Os químicos de produtos naturais estão realizando a detecção, o isolamento e a identificação de produtos ativos biologicamente, numa etapa que requer ainda muitos outros passos, para que se possa chegar a um composto com potencial farmacológico.

Muitos avanços tem sido feitos no tratamento de algumas formas de câncer através da quimioterapia, utilizada sozinha ou em conjunto com outras formas de tratamento. Infelizmente, porém, o número de drogas utilizadas comercialmente não é suficiente frente ao grande número de tipos de câncer detectados, e em alguns casos as drogas utilizadas não são suficientemente ativas contra determinados tipos de câncer. Podemos citar como exemplo os Estados Unidos, no qual existem 50 drogas clinicamente aprovadas, que conseguem curar completamente apenas 12% dos vários tipos de câncer, como por exemplo a leucemia linfocita e a doença de Hodgkin (Boyd, 1992).

Com relação ao estudo de produtos naturais, e mais especificamente no estudo de plantas com alguma atividade medicinal, muito pouco foi estudado até o

presente momento. O número de plantas superiores (com flores) no planeta segundo estimativas é de aproximadamente 250.000, entretanto um pequeno número de espécies destas plantas tem sido estudadas com relação aos seus potenciais medicinal e biológico. O Brasil possui 55.000 espécies de plantas superiores, mas sequer 1% destas espécies foram estudadas química e/ou farmacologicamente (Barata et al., 1998), adicionalmente as pesquisas realizadas se esgotam na publicação de um artigo científico.

O número de produtos farmacêuticos isolados de plantas utilizados terapêuticamente é de aproximadamente 120, destes apenas 12 são utilizados no tratamento do câncer (Cordell *et al.*, 1991). Das drogas anti-câncer utilizadas clinicamente e derivadas de plantas, as mais conhecidas são a vinblastina e vincristina, isoladas de *Catharanthus roseus*. Mais recentemente novos agentes foram descobertos, destacando-se o paclitaxel ou taxol (23), utilizado como tratamento de câncer de ovário, e obtido semi-sinteticamente de uma fonte renovável, *Taxus baccata* (Cordell *et al.*, 1997).



23

1.6 – Estratégias na busca de novos agentes anti-câncer e ensaios biológicos (Kinghorn *et al.*, 1995)

Embora possam ser feitas modificações nas estruturas já conhecidas com objetivo de aumentar a eficácia e biodisponibilidade e/ou reduzir a toxicidade, é fundamental procurar na grande diversidade de estruturas químicas da natureza novas moléculas, que possam ser otimizadas do ponto de vista farmacológico.

Existem muitas abordagens para facilitar a descoberta de novas drogas provenientes de produtos naturais. As abordagens na descoberta de metabólitos secundários de plantas com atividade biológica que vem sendo utilizadas são: abordagem etnofarmacológica, quimiotaxonômica, a pesquisa dirigida e a pesquisa aleatória.

A abordagem etnofarmacológica leva em conta o conhecimento popular, indígena ou de especialistas tradicionais no uso de determinadas espécies de plantas: seus usos, modo de preparação e o tipo de doença tratada. As plantas com potencial medicinal são coletadas e testadas para determinadas doenças através de ensaios biológicos. Segundo estimativas, aproximadamente 75% da população mundial faz uso da medicina popular, utilizando-se de plantas medicinais, para o tratamento de uma série de enfermidades. Um caso de observação científica na descoberta de droga anti-câncer é a vinblastina, que começou com a sua utilização inicial como agente anti-hiperglicêmico.

A abordagem quimiotaxonômica, leva em conta a premissa de que uma determinada família de plantas produz metabólitos secundários similares. Esta abordagem é de utilidade variada dependendo da necessidade de pesquisa. Se o propósito da descoberta de drogas provenientes de produtos naturais é obter novos compostos biologicamente ativos, este método pode prover compostos muito similares em estrutura, mas com diferentes atividades biológicas. Portanto, neste caso a variabilidade química pode contribuir com informações importantes relativas a estrutura-atividade dos compostos como eficácia e toxicidade.

A abordagem baseada em estudos dirigidos de plantas é baseada na aquisição de uma lista selecionada de plantas que *i)* tenham informações etnomédicas relacionada a um doença específica, *ii)* tenha demonstrada atividade *in vitro*, *in vivo* ou possua outra atividade biológica relevante para esta doença, *iii)* contenha produtos naturais conhecidos que possuam atividade biológica em um ou mais ensaios relevantes. Plantas que tenham um relato de uso etnomédico, atividade *in vitro*, *in vivo*, ou em outro estudo biologicamente relevante, e não tenham sido

previamente isolados os compostos responsáveis por esta atividade também são selecionados para análises subsequentes.

A abordagem aleatória é aquela na qual uma série de plantas, de uma determinada área geográfica, é coletada e avaliada em um amplo espectro de atividades biológicas. Um exemplo desta abordagem é o programa do *National Cancer Institute* (NCI) que possui sessenta tipos de células cancerosas, nas quais extratos de plantas são testados com relação a citotoxicidade e HIV. Muitas empresas farmacêuticas estão utilizando esta abordagem para criar bancos de dados da diversidade química, para uso atual ou futuro. A empresa americana Eli Lilly Co., na busca por espécies utilizadas em medicina tradicional para qualquer fim, conseguiu detectar de 400 espécies de plantas, 3 substâncias ativas em ensaios para atividade antitumoral. No programa de busca aleatória do NCI, de um total de 20.525 espécies coletadas 10,4% foram ativas em pelo menos um tipo de tumor animal (Cordell *et al.*, 1997).

Em nosso trabalho selecionamos a planta *Acnistus arborescens* do Brasil, baseado em estudos da literatura que indicavam:

- a) a presença de pelo menos um vitanolídeo (Barata 1970 (5))
- b) a presença nesta planta de compostos com atividade anti-câncer.

Além destas evidências, a abordagem quimiotaxonômica, mostra que a família *Solanacea* é bastante citada na literatura como possuidora de vitanolídeos (lactonas esteroidais), compostos de interesse em nossa pesquisa.

Seguindo a escolha da planta para estudo, o ponto de partida na pesquisa de qualquer droga proveniente de produtos naturais é a análise química dos componentes ('*screening químico*') para posteriores testes biológicos.

Existe ainda alguma confusão com relação no uso dos termos antineoplásico e citotoxicidade na literatura. O *NCI* definiu estes termos precisamente: citotoxicidade se refere a toxicidade em células cancerosas *in vitro*, enquanto atividade antineoplásica ou antitumoral se referem a toxicidade em células

cancerosas *in vivo*. A maior parte dos ensaios realizados para análise destas atividades foi desenvolvido pelo NCI, com programas extensivos sendo conduzidos na busca de agentes anti-câncer. Até 1981 haviam sido analisadas 35.000 espécies de plantas representando 1551 gêneros e 114.000 extratos tinham sido analisados para citotoxicidade *in vitro e in vivo* contra vários sistemas tumorais. Embora muitos compostos com atividades anti-tumorais tenham sido detectados através destas análises, poucos destes se mostraram clinicamente efetivos contra tumores sólidos de crescimento lento. Isto é consequência de se utilizar nos ensaios, por motivos práticos, tumores de rápida divisão celular. Por outro lado, ensaios *in vivo* não são práticos devido ao longo período de tempo e alto custo.

#### 1.6.1 - De-replicação de produtos naturais.

De-replicação é uma estratégia de análise na procura de novas drogas, onde o foco é a identificação rápida de novas substâncias, ativas biologicamente, a partir de fontes naturais. O desenvolvimento da técnica começou com a necessidade de se priorizar amostras com atividade biológica, uma vez que o trabalho de isolamento e identificação de compostos ativos, pode ser muitas vezes dispendioso e não raramente levar a compostos já conhecidos.

A de-replicação pode ser dividida em duas estratégias de análise: a química e a biológica.

##### 1.6.1.1 – De-replicação Química

A de-replicação química consta de várias técnicas dentre as quais a cromatografia em camada delgada (CCD) e o '*screening químico*', embora estas duas técnicas sejam bastante familiares aos pesquisadores brasileiros, não se utiliza o termo de-replicação para estas técnicas.

Muitas publicações foram feitas a respeito da técnica de de-replicação química nas últimas décadas. A aceitação deste '*screening químico*' começou com o desenvolvimento de técnicas cromatográficas, usando por exemplo CCD. A segunda

fase de desenvolvimento de estratégias na identificação de compostos químicos se deu no início da década de setenta, com o advento dos computadores que podiam processar uma grande quantidade de dados.

O início das técnicas de '*screening químico*' foi feito por pesquisadores no final do século dezenove e no começo do século recém passado. O estudo chamado de '*screening fitoquímico de plantas*' é o processo onde a informação das classes de compostos em extratos de plantas é obtido, através de reações específicas que dão cores características para cada classe de compostos, algumas classes de compostos que podem ser analisadas por esta técnica incluem: alcalóides, polifenóis, glicosídeos, saponinas e flavonóides.

Os problemas desta técnica são: a não seletividade das reações para uma determinada classe de compostos, levando a falsos positivos e falsos negativos, ou muitas vezes a quantidade de determinado composto não ser suficiente para a detecção através do teste. Algumas revisões da literatura com relação aos tipos de reagentes utilizados para identificação de diferentes classes de compostos foram publicadas (Farnsworth, 1966 ; Marini-Bettòlo *et al.*, 1981 e Fong, 1973).

O advento de técnicas cromatográficas em papel, e mais notadamente em camada delgada, proporcionou aos pesquisadores técnicas de rápida visualização para a separação e identificação de classes de compostos em produtos naturais.

A identificação de classes de produtos naturais em extratos de plantas antes do isolamento em si e identificação, é uma prática comum quando se tem como objetivo a obtenção de determinada classe de compostos. Entretanto, esta prática é limitada, quando se tem por objetivo a obtenção de novas classes de compostos.

Muitas técnicas de CCD e esquemas de extração vem sendo utilizados ultimamente no '*screening*' fitoquímico. O sistema de extração consiste normalmente em se obter os princípios ativos das plantas através do uso de solventes em ordem crescente de polaridade, ou então da extração com um solvente pouco seletivo como etanol, e em seguida o particionamento das frações através de cromatografia em coluna. Os extratos são então submetidos a vários sistemas de

solvente em CCD, utilizando também sistemas variados de adsorventes como por exemplo sílica gel ou celulose. As placas são então secas e submetidas a um *spray* com uma variedade de reveladores, muitos deles específicos para determinada classe de compostos (Marini-Bettòlo, 1981 e Stahl, 1969). Um método recente de “screening” químico utiliza placas cromatográficas empacotadas com diferentes fases sólidas, visando obter um perfil cromatográfico do extrato. Esta estratégia vem sendo utilizada para priorizar extratos, com atividade inibidora em HIV, a partir de invertebrados marinhos, cianobactérias, líquens e plantas terrestres. A fase inicial de screening mostrou que extratos aquosos de muitos organismos marinhos continham atividade anti-HIV. A análise química destes extratos mostrou que estes possuíam taninos e polissacarídeos, os quais eram responsáveis pela alta e não usual ocorrência de inibição viral. Os pesquisadores no intuito de encontrar novos agentes anti-virais, removiam dos extratos os polissacarídeos e taninos (compostos de reconhecida atividade biológica). O extrato somente seria submetido ao screening se após a etapa anterior, que removeu polissacarídeos e taninos, houvesse atividade anti-HIV. O screening químico consiste de três sistemas de placas. Dois deles (o C<sub>4</sub> e C<sub>18</sub>) fornecem informações sobre a polaridade dos constituintes, e a placa Sephadex G-25 fornece informação sobre a massa molecular relativa dos compostos. Este procedimento rapidamente elimina compostos já conhecidos e um perfil de eluição é estabelecido, porém poucas informações estruturais dos compostos são obtidas por este método (Cordell et al., 1997).

#### 1.6.2 - De-replicação biológica.

O segundo tipo fundamental de estratégia de de-replicação é baseada nas atividades biológicas de um determinado composto.

O programa de análise do NCI dos Estados Unidos é um exemplo de estratégia de de-replicação biológica. A premissa utilizada é a de que novos agentes anti-câncer devem possuir atividade biológica diferencial nas 60 culturas de células cancerosas que compõem o programa do NCI. Neste programa extratos e compostos isolados são testados nas culturas de células obtendo-se valores de ED<sub>50</sub>, que são

comparados com uma base de dados de compostos e extratos já analisados (Cordell et al., 1997).

### 1.6.3 - De-replicação combinando abordagem química e biológica

As técnicas de de-replicação tem levado a algumas limitações. O screening químico de extratos não leva em conta informações biológicas e fornece apenas informações dos grupos funcionais ou de classes de compostos na amostra. A de-replicação através de técnicas cromatográficas pode focalizar determinadas classes de compostos de interesse, e em condições ótimas associar uma resposta biológica com uma classe de compostos, por exemplo a bioautografia<sup>3</sup>, entretanto este tipo de abordagem não permite uma decisão crítica se o composto ativo é inédito. Um grande número de sistemas em CCD em conjunto com reveladores tem sido utilizados no campo da pesquisa microbial desde 1960, e estas técnicas vem sendo extensivamente empregadas na análise de novos agentes microbiais ( Aszalos et al, 1975).

O advento da técnica de HPLC/MS, em conjunto com um sistema *electrospray*, permitiu que um grande número de informações pudesse ser coletado a partir da análise de um extrato de plantas. Ao mesmo tempo existem muitas aplicações para esta técnica, sendo aqui apresentado seu uso na de-replicação química/biológica de extratos de plantas (Figura 7). A técnica de de-replicação representa uma fusão entre a instrumentação do HPLC-MS, e a informação processada através de um banco de dados contendo informações sobre produtos naturais (Cordell e Shin, 1999 ).

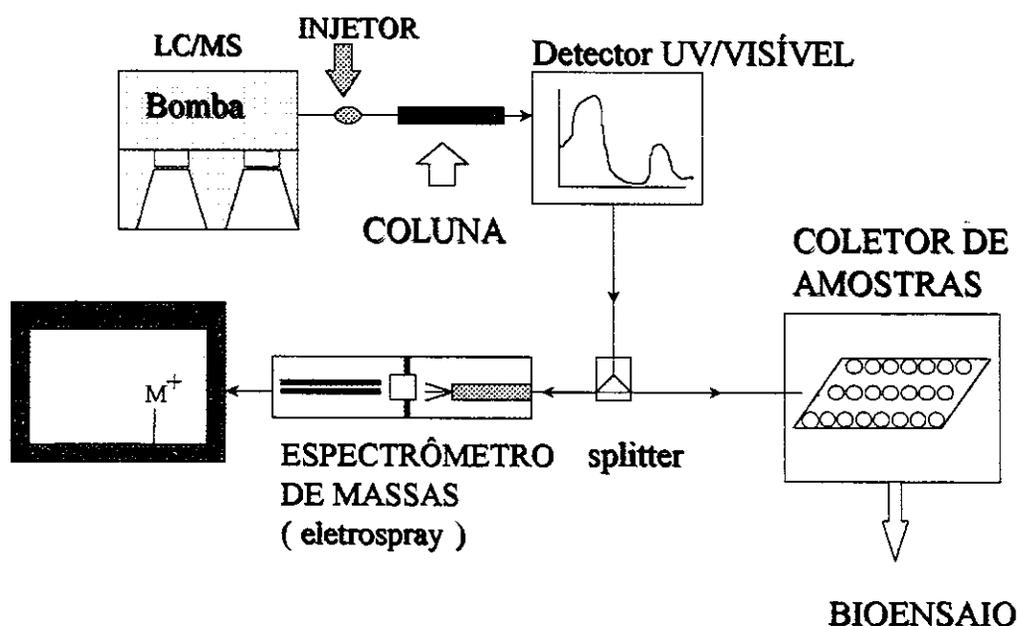
O equipamento de HPLC/MS utilizado para a técnica de de-replicação consiste de um sistema *electrospray* e um espectrômetro contendo um detector quadrupolar. O processo de de-replicação consiste de duas fases distintas. A primeira etapa consiste na separação e coleta de dados, a segunda fase consiste na

---

<sup>3</sup> Bioautografia – técnica que une a cromatografia em camada delgada com realização de testes biológicos (p.ex atividade bactericida), e muito utilizada na detecção de possíveis compostos com atividade biológica em extratos de plantas.

análise dos dados. As variáveis da primeira etapa incluem parâmetros cromatográficos, manipulação da amostra e testes biológicos. A segunda etapa envolve estratégias para análise dos dados espectroscópicos e atividade biológica. A análise dos dados espectroscópicos pode ser auxiliada pelo uso de bases de dados como veremos a seguir. O uso da técnica de de-replicação nos mostra uma linha de pesquisa muito promissora, bastando lembrar a riqueza de nossa flora, para se ter uma idéia da abrangência que pode ser alcançada nos estudos de extratos de plantas e em curto espaço de tempo (Cordell e Shin, 1999 ).

Figura 7 – Técnica de de-replicação de produtos naturais.



#### 1.6.4 – Bases de dados da Química de Produtos Naturais.

Um dos grandes avanços na análise de produtos naturais foi o desenvolvimento de processos de análise com computador. Com o advento de computadores menores e mais potentes, as informações passaram a se tornar mais facilmente disponíveis, sendo possível hoje em dia localizar informações como parâmetros químicos, taxonômicos ou farmacológicos. Com o advento de sistemas de bases de dados, as informações relativas a diversos produtos naturais que se

encontravam normalmente em uma variedade de livros, jornais e resumos de conferências, podem agora ser encontradas num pequeno número de bases de dados.

O sistema '*Scientific and Technical Network*' (STN) de base de dados pode ser separado em dois tipos: um na qual a informação bibliográfica pode ser armazenada (por exemplo o resumo de um artigo) ou então pode-se obter informação estrutural da molécula (Tabela 1).

As bases de dados referentes a produtos naturais que compõem o (STN) são: MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, BEILSTEIN, SPECINFO, JICST-E, *Chemical Abstracts Registry*, *Chapman and Hall's Dictionary of Natural Products*, DEREK, MARINLIT, *The Marine Natural Products Database*, e NAPRALERT da University of Illinois em Chicago. As similaridades e diferenças de cada um dos bancos de dados são comentadas nos parágrafos seguintes:

Tabela 1 – Bases de dados utilizadas na pesquisa de produtos naturais.

| <b>Base de dados</b> | <b>Referência</b>              | <b>Atualização</b> | <b>tipo de dados</b>             |
|----------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| BIELSTEIN            | química orgânica               | Periódica          | estruturais                      |
| BIOSIS               | biossíntese                    | Semanal            | bibliográficos                   |
| CA (1967- )          | química e engenharia química   | Quinzenal          | bibliografia                     |
| EMBASE               | biomédicas e farmácia          | Semanal            | bibliográficos                   |
| JICST (1985- )       | Jornais japoneses              | Quinzenal          | bibliográficos                   |
| MEDLINE              | medicina                       | Quinzenal          | bibliográficos                   |
| NAPRALERT            | produtos naturais              | Mensal             | bibliográficos                   |
| SPECINFO             | infravermelho                  | Trimestral         | estruturais/<br>dados espectrais |
| REGISTRY (1957-      | índice de substâncias químicas | Semanal            | estruturais                      |

A Universidade de Illinois, com a qual parte deste trabalho foi feito em colaboração, tem se dedicado aos testes de avaliação destes compostos. O estudo farmacológico tem sido feito pelo grupo de pesquisa do Professor Geoffrey Cordell que faz parte dos Colaboradores deste projeto.

## 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 - Métodos de extração

Na primeira etapa do nosso trabalho usamos apenas 92,2 g de folhas de *A. arborescens*, coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Estas folhas foram submetidas a um sistema de extração em Soxhlet, com solventes em ordem crescente de polaridade (n-hexano, éter etílico e etanol). Este método mostrou-se muito eficiente para extração das pequenas quantidades de folhas. Assim, foi possível o isolamento de dois vitanolídeos 1 e 2, que totalizaram apenas 28,3 mg (tabela 16, parte experimental).

A necessidade de isolar maior quantidade de vitanolídeos, nos levou a procura de uma fonte maior de *A. arborescens*, o que foi conseguido após consulta do Prof. Jorge Tamashiro (Departamento de Botânica –Unicamp), Prof. Keith Brown (Departamento de Zoologia- Unicamp) e do Sr. Gentil Godoy (Diretor Estação Experimental do IAC em Ubatuba), onde a planta pôde ser encontrada em seu habitat natural. Pode-se então coletar 3 kg de folhas verdes de *A. arborescens*, que foram secas ao sol totalizando 1,3 kg. Esta quantidade de folhas permitiu o isolamento de cinco vitanolídeos em quantidades apreciáveis (> 100 mg) e levar até o fim este trabalho.

A metodologia para extração das substâncias teve de ser adaptada em função da grande quantidade de folhas. O método utilizado foi o da extração sucessiva a frio com etanol (solvente pouco seletivo) que permitiu extrair grande quantidade de compostos. A partir desta etapa seguimos os tratamentos de partição e separação cromatográfica clássicos (Tabela 17, pág. 64).

## 2.2 – Identificação dos vitanolídeos

O reestudo de *A. arborescens* permitiu-nos isolar do extrato etéreo três compostos com características dos vitanolídeos, os quais chamamos de 1, 2 e 3 (Figura 9). O vitanolídeo 1 já havia sido isolado por Barata et.al (1970). Do extrato etanólico isolamos os vitanolídeos 4 e 5 (Figura 9).

A identificação dos vitanolídeos foi feita através técnicas de IV, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMBC, COLOC, HSQC, COSY, NOESY, nOe diff e DEPT 135 °.

Os espectros de IV dos vitanolídeos (E-6, E-16, E-23, E-31 e E-38, apêndice) indicaram a presença de carbonila  $\alpha,\beta$  insaturada em torno de  $1686\text{ cm}^{-1}$  (1, 2, 3 e 4), carbonila conjugada de lactona em torno de  $1705\text{ cm}^{-1}$  (1 e 2), e a presença de banda de OH entre  $3400$  e  $3500\text{ cm}^{-1}$  (1-5). A identificação dos vitanolídeos foi feita também pela análise dos seus espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, comparando-se com vitanolídeos de estrutura conhecida (Kupchan et. al, Pelletier et. al, Nittala et. al, Nittala e Lavie, e Habtemariam, S). Na tabela 2 são apresentados os principais deslocamentos químicos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de 1-5.

### 2.2.1 – Estudos de RMN dos vitanolídeos isolados.

#### Vitanolídeo 1

A análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 1 (E-1) apresentou os deslocamentos característicos descritos na tabela 2 e Figura 8, e outros sinais mostrados nas tabelas 2 e 4. A análise das constantes de acoplamento permitiram-nos localizar os hidrogênios 2, 3, 4, 6 e 7, assim como os hidrogênios 2 e 3 estão de acordo com um sistema com cetona  $\alpha,\beta$  insaturada, conforme já havíamos observado no espectro de IV (E-6). O H-4 a 3,8 ppm apresentou-se como um dubleto com  $J = 5,9\text{ Hz}$ , o que nos leva a posicioná-lo próximo ao epóxido na junção dos anéis A e B. O sinal a  $\delta 4,8$ , referente a H-7, aparece como um duplo dublete ( $J = 1,8$  e  $9,3$ ) e foi correlacionado como um próton debaixo de grupo acetato que é vizinho ao hidrogênio do epóxido. Os dados obtidos pelo espectro de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (tabela 3, E2), nos auxiliaram na confirmação dos dados anteriores para localização dos hidrogênios da molécula.

Tabela 2- Sinais relevantes de RMN<sup>1</sup>H de vitanolídeos de *A. arborescens*.

| Composto                | $\delta^1\text{H}$ (J em Hertz) |                          |                                      |                                   |                        |                       |                        |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                         | H-2                             | H-3                      | H-4                                  | H-6                               | H-7                    | H-16                  | H-22                   |
| 1                       | 6,20 d (10)                     | 6,96 dd<br>(5,9, 10)     | 3,80 d<br>(5,9)                      | 3,34 d<br>(1,8)                   | 4,84 dd<br>(1,8 ; 9,3) | 1,25                  | 4,18 dd<br>(3,4, 13,4) |
| 2                       | 6,0 d (9,9)                     | 6,96 dd<br>(5,9, 9,9)    | 3,80 dd<br>(5,8, 1,1)                | 3,40 d<br>(1,8)                   | 4,80 dd<br>(1,8 ; 9,5) | 5,40 t<br>(7,7)       | 4,20 dd<br>(3,7, 13,2) |
| 3                       | 6,05 dd<br>(10, 2,7)            | 6,85 ddd<br>(2,7, 10, 6) | 3,00 dt<br>(19,2, 2,7)<br>H4 $\beta$ | 3,40 d<br>(1,2)                   | 4,81 dd,<br>(9,5, 1,2) | 5,35 t<br>(7,7)       | 4,30 dd<br>(3,4, 13,2) |
| 4                       | 6,20 d<br>(10)                  | 6,95 dd<br>(5,9, 10)     | 3,75 d (5,9)                         | 3,28 d<br>(0,8)                   | 3,50 dd<br>(9,0, 0,8)  | 1,25                  | 4,18 dd<br>(3,4, 13,4) |
| 5                       | 6,20 d                          | 6,95 dd<br>(5,9, 9,9)    | 3,75 d<br>(5,8)                      | 3,35 d<br>(1,0)                   | 4,85 dd<br>(1,0, 9,5)  | 4,55 dd<br>(7,7, 7,4) | 4,40 dd<br>(3,7, 13,2) |
| Grupos metila e etileno |                                 |                          |                                      |                                   |                        |                       |                        |
| Composto                | 18                              | 19                       | 21                                   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 7-OCOCH <sub>3</sub>   | 16-OCOCH <sub>3</sub> |                        |
| 1                       | 0,88                            | 1,44                     | 1,27                                 |                                   | 2,12                   |                       |                        |
| 2                       | 0,88                            | 1,44                     | 1,29                                 |                                   | 2,10                   |                       | 1,94                   |
| 3                       | 0,93                            | 1,29                     | 1,31                                 |                                   | 2,10                   |                       | 1,96                   |
| 4                       | 0,80                            | 1,38                     | 1,32                                 | 4,10 q                            |                        |                       |                        |
| 5                       | 0,82                            | 1,40                     | 1,33                                 | 4,12 q                            | 2,10                   |                       | 2,00                   |

Tabela 3- Correlações observadas no espectro COSY de 1.

| Hidrogênio ( $\delta$ ) | Hidrogênio correlacionado ( $\delta$ ) |
|-------------------------|--|
| H-3 (6,93)              | H-2 (6,20)                             |
| H-3 (6,93)              | H-4 (3,80)                             |
| H-7 (4,80)              | H-8 (1,82)                             |
| H-7 (4,80)              | H-6 (3,25)                             |
| H-22 (4,20)             | H-23ax, H-23 eq                        |
| H-14 (1,10)             | H-15 (1,45)                            |

A atribuição completa da molécula 1 pôde ser feita pela análise de outras técnicas. Na análise do espectro de DEPT (E-3) observamos a presença de 5 grupos CH<sub>2</sub>, 6 grupos metila e 10 grupos CH, estando dois destes grupos na região característica de CH insaturados ( $\delta$ 132,3 e 141,5). Em complementação, observamos

no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (E-4, Figura 9, Tabela 4), a presença de três carbonilas ( $\delta_{\text{C}}$  201,9; 172,5 e 165,9); dois carbonos insaturados ( $\delta_{\text{C}}$  148,8 e 122,2) e quatro carbonos  $\text{C}_0$  (C-5, C-10, C-13 e C-20), dois deles carbinólicos, um em C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  67,0) e outro em C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  75,0).

A atribuição dos carbonos 14 e 17 foi feita através da análise, em conjunto, dos espectros HSQC (E-5) e COSY (E-2). Através do espectro HSQC ficaram estabelecidas as correspondências entre os prótons e carbonos como  $\delta_{\text{H}}$  1,10/  $\delta_{\text{C}}$  55,52 e  $\delta_{\text{H}}$  1,39/  $\delta_{\text{C}}$  5382. A distinção, entre os dois sinais (C-14 ou C-17), foi feita através da observação da correlação do sinal a  $\delta_{\text{H}}$  1,10 com o grupo metileno ( $\text{H}_2$ -15) a  $\delta_{\text{H}}$  1,45.

A análise da estereoquímica de **1** foi feita em conjunto com os dados da literatura, interpretação dos espectros de NOESY (E-1a) e RMN  $^1\text{H}$ . A posição de H-7 pôde ser definida pelo valor de  $J$  de 9,3 Hz entre os prótons H-7 e H-8, o valor desta constante sugere que estes dois hidrogênios estejam em posição trans. Além disso, observamos o efeito nOe entre o H-7 com H-9 $\alpha$  e H-14- $\alpha$  (de estereoquímica já conhecida (Glatter, 1991)). Consequentemente o substituinte acetoxi tem configuração  $\beta$ . A estereoquímica de C-4 foi avaliada pelo experimento NOESY, onde observamos efeito nOe entre H-4 e H-6 $\alpha$ , levando-nos a concluir que H-4 é  $\alpha$ . Glatter (1991) estabelece para os vitanolídeos que “todos possuem a configuração 22R”. Consequentemente, a atribuição desta estereoquímica é raramente determinada sem ambiguidade e usualmente é ignorada. As constantes de acoplamento com  $\text{H}_2$ -23, calculadas teoricamente através de um programa (Cache 4.4 for Windows, 2001) são bem distintas para os dois isômeros H-22 (0,5- 4 Hz e 9-13,8 Hz para H-22 $\alpha$ , e 2,5- 7 Hz e 2- 5 Hz para H-22 $\beta$ ). Desse modo, a constante de acoplamento observada ( $J= 3,4, 13,4$  Hz) define H-22 como  $\alpha$  e o centro como R.

O próton H-22 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  4,18) mostrou correlações nOe com os prótons  $\text{H}_2$ -23 a  $\delta_{\text{H}}$  2,06 e 2,41.

Tabela 4. Vitanolídeos 1, 2, e 3: Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e correlações  $^1J$  obtidas por experimento HSQC.

| C          | Vitanolídeo 1            |                                     | Vitanolídeo 2                         |                                     | Vitanolídeo 3                        |                                     |
|------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
|            | $\delta_{\text{C}}$      | $\delta_{\text{H}}$<br>(J em Hertz) | $\delta_{\text{C}}$                   | $\delta_{\text{H}}$<br>(J em Hertz) | $\delta_{\text{C}}$                  | $\delta_{\text{H}}$<br>(J em Hertz) |
| 1          | 201,13                   |                                     | 201,56                                |                                     | 202,4                                |                                     |
| 2          | 132,33                   | 6,20 d (10,0)                       | 132,33                                | 6,0 d (9,9)                         | 129,3                                | 6,05 dd (2,7 ; 10)                  |
| 3          | 141,57                   | 6,96 dd (5,9 ; 10,0)                | 142,00                                | 6,96 dd (5,9 ; 9,9)                 | 144,2                                | 6,85 ddd (2,7 ; 10 ; 6,0)           |
| 4 $\alpha$ | 69,30                    | 3,80 d (5,9)                        | 69,18                                 | 3,80 dd (5,8 ; 1,1)                 | 32,5                                 | 1,95 (19,2 ; 6)                     |
| 4 $\beta$  |                          |                                     |                                       |                                     |                                      | 3,00 dt (19,2 ; 2,7)                |
| 5          | 67,02                    |                                     | 66,86                                 |                                     | 64,9                                 |                                     |
| 6          | 62,41                    | 3,34 d (1,8)                        | 62,34                                 | 3,40 d (1,8)                        | 63,8                                 | 3,40 d (1,2)                        |
| 7          | 74,56                    | 4,84 dd (9,3 ; 1,8)                 | 74,32                                 | 4,80 dd (1,8 ; 9,5)                 | 74,6                                 | 4,81 dd (9,5 ; 1,2)                 |
| 8          | 34,06                    | 1,82 (9,3)                          | 33,34                                 | 1,83 (9,5)                          | 33,8                                 | 1,91 (9,5)                          |
| 9          | 43,32                    | 1,21                                | 42,89                                 | 1,29                                | 43,5                                 | 1,42                                |
| 10         | 46,87                    |                                     | 46,64                                 |                                     | 47,8                                 |                                     |
| 11         | 22,12                    | 1,48 ; 1,86                         | 21,75                                 | 1,51 ; 1,94                         | 23,7                                 | 2,2 ; 1,9                           |
| 12         | 39,47                    | 1,98 ; 1,20                         | 39,45                                 | 1,36, 1,95                          | 40,2                                 | 1,39 ; 2,02                         |
| 13         | 43,52                    |                                     | 44,13                                 |                                     | 43,5                                 |                                     |
| 14         | 55,52                    | 1,10                                | 52,56                                 | 1,37 (2,0)                          | 52,7                                 | 1,4 (2,0)                           |
| 15         | 25,55                    | 1,45                                | 35,89                                 | 1,34 ; 2,06                         | 35,9                                 | 1,32 ; 2,06                         |
| 16         | 29,69                    | 1,25                                | 75,57                                 | 5,4 t (7,7)                         | 75,8                                 | 5,35 t (7,7)                        |
| 17         | 53,82                    | 1,39                                | 59,1                                  | 1,75                                | 59,3                                 | 1,81                                |
| 18         | 13,45                    | 0,89                                | 14,28                                 | 0,91                                | 14,7                                 | 0,93                                |
| 19         | 17,18                    | 1,44                                | 17,14                                 | 1,45                                | 15,4                                 | 1,29                                |
| 20         | 74,96                    |                                     | 74,49                                 |                                     | 74,7                                 |                                     |
| 21         | 20,80                    | 1,27                                | 20,27                                 | 1,29                                | 20,6                                 | 1,31                                |
| 22         | 80,82                    | 4,18 dd (3,4 ; 13,4)                | 80,62                                 | 4,20 dd (3,7 ; 13,2)                | 80,8                                 | 4,30 dd (3,4 ; 13,2)                |
| 23         | 31,48                    | 2,06 ; 2,41                         | 31,03                                 | 2,26 ; 2,40                         | 31,4                                 | 2,27 ; 2,41                         |
| 24         | 148,82                   |                                     | 148,93                                |                                     | 148,8                                |                                     |
| 25         | 121,99                   |                                     | 122,37                                |                                     | 122,3                                |                                     |
| 26         | 165,96                   |                                     | 166,07                                |                                     | 166,0                                |                                     |
| 27         | 12,46                    | 1,88                                | 12,23                                 | 1,89                                | 12,7                                 | 1,90                                |
| 28         | 20,55                    | 1,94                                | 20,56                                 | 1,29                                | 20,9                                 | 1,42                                |
| 7-OAc      | 172,5 (C=O)              |                                     | 170,5 (C=O)                           |                                     | 170,3 (C=O)                          |                                     |
| 7-OAc      | 21,52 (CH <sub>3</sub> ) | 2,11                                | 21,14 (CH <sub>3</sub> )              | 2,10                                | 21,5 (CH <sub>3</sub> )              | 2,10                                |
| 16-OAc     |                          |                                     | 171,7 <sup>a</sup> (C=O)              |                                     | 171,6 <sup>a</sup> (C=O)             |                                     |
| 16-OAc     |                          |                                     | 21,21 <sup>b</sup> (CH <sub>3</sub> ) | 1,96                                | 21,7 <sup>b</sup> (CH <sub>3</sub> ) | 1,95                                |

Observação: a, b – Estas atribuições podem ser intercambiadas.

## Vitanolídeo 2

A análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  do inédito vitanolídeo 2 (E-8) apresentou deslocamentos característicos:  $\delta 6,20$  (d,  $J = 10$  Hz, H-2),  $\delta 6,96$  (dd,  $J = 6 ; 10$  Hz, H-3),  $\delta 3,80$  (d,  $J = 6$  Hz, H-4) (Figura 8) e outros sinais mostrados nas Tabelas 2 e 4.

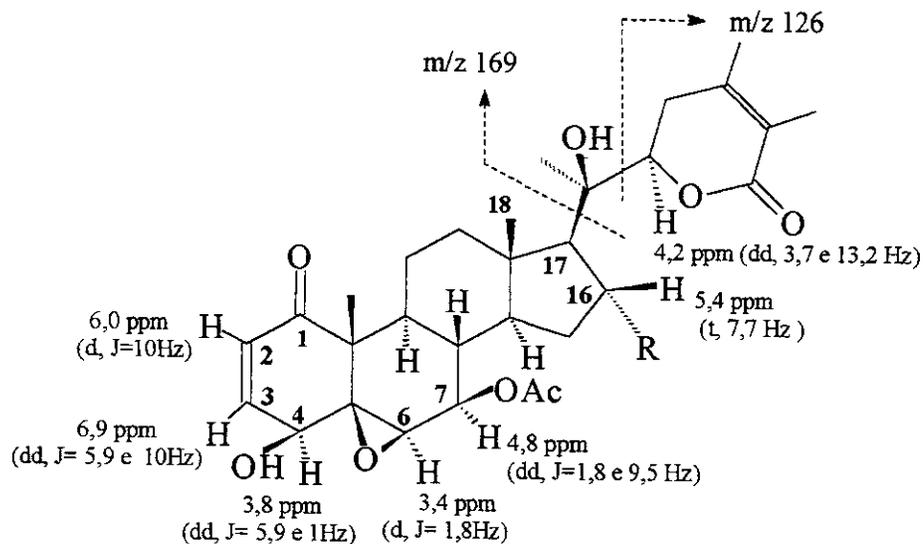
Além destes, o o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2 apresentou um tripleto a  $\delta 5,4$  correspondente a um hidrogênio vizinho ao grupo acetato adicional em relação a 1, apresentando uma mudança significativa em relação a 1, que mostra para H<sub>2</sub>-16 um multipletto a  $\delta 1,25$ . No espectro de  $^{13}\text{C}$ , para o C-16 uma mudança de  $\delta 29,69$  em 1, para  $\delta 75,57$  em 2. A posição deste segundo grupo acetato em 2, poderia ser atribuída tanto às posições 12, 15 como 16.

Com o intuito de localizar inequivocamente a posição deste grupo, foram utilizadas as técnicas: HSQC (tabela 4, E-12), COLOC (tabela 5, E-13, E-13a-b), COSY (tabela 6, E-9) e nOe diff (E-14) que permitiram posicionar o grupo acetato em C-16 e com a estereoquímica  $\alpha$ . Observou-se por COSY (tabela 6, E-9) que o H-16, junto ao grupo acetato, apresenta duas correlações: uma com o próton a  $\delta 2,06$  e outra com próton a  $\delta 1,75$ . O próton a  $\delta 1,75$  se correlaciona com o carbono a  $\delta 59,1$  (HSQC, E-12), correspondendo ao carbono C-17. A atribuição de C-17 em  $\delta 59,1$  foi confirmada pelas correlações a longa distância (COLOC, E13, E13a-b): os 3H do grupo metila em C-18 tem uma correlação  $^2J$  com o C-13 e duas correlações  $^3J$  com C-14 e C-17, já os 3H do grupo metila em C-21 tem correlação  $^3J$  com C-17 (tabela 5). Através da análise do espectro de NOESY e nOe diff (E-9a e E-14) pudemos obter informações complementares sobre a estereoquímica de 2, como por exemplo definir a estereoquímica do H-16. A atribuição da estereoquímica do C-16, merece uma discussão particular: um número razoável de vitanolídeos substituídos em C-16 tem sido isolados recentemente de Solanáceas. Três derivados  $16\alpha$ -substituídos foram isolados de *Exodeconus maritimus* (Gil et al, 1997), dois derivados  $16\beta$ -substituídos foram obtidos de tomatillos (*Physalis philadephica*) (Kennely et al., 1997), três compostos  $16\alpha$ -substituídos de *Discopodium penninervum*

(Habtemariam et al, 1993), e um isômero 16 $\alpha$  de *Lochoma coccineum* (Alfonso et al.,1991), *Hyoscyamus niger* (Ma et al.,1999), e *Salpichroa organifolia* (Tettamanzi et al., 2001). Nestes casos, a estereoquímica do grupo hidroxí em C-16 foi deduzida através de observação do efeito nOe entre H-14 $\alpha$  e H-16 $\alpha$  (Kennely et al., 1997), por cristalografia de raios-X (Alfonso et al., 1991; Ma et al., 1999), e pelo efeito nOe entre H<sub>3</sub>-18 $\beta$  e H-16 $\beta$  (Habtemariam et al., 1993; Gil et al, 1997; Tettamanzi et al., 2001). No caso do vitanolídeo 2, foram observados para o H-16 ( $\delta$ 5,4) efeitos nOe com os prótons a  $\delta$  0,91; 1,32; 1,72; 2,06; e 4,08, correspondendo, respectivamente a H<sub>3</sub>-18 $\beta$ , H-15, H-17 $\alpha$ , H-15, e H-22 $\alpha$  (E-9a, figura 8a). A irradiação do H-16, através da técnica nOe diff, mostrou os mesmos resultados. Para se definir a estereoquímica de H-16, foram importantes os incrementos nos sinais de H<sub>3</sub>-18 $\beta$  e H-22 $\alpha$ . A livre rotação da ligação C-17 e C-20 faz com que o H-22 $\alpha$  tenha uma proximidade espacial com H-16, seja ele  $\alpha$  ou  $\beta$ .

No caso do efeito nOe entre H-16 e H<sub>3</sub>-18 $\beta$  há a interação entre H-16 com uma metila ligada a estrutura rígida do esteróide, o que nos leva a atribuir a estereoquímica  $\beta$  para H-16. Portanto a estereoquímica do grupo acetato é  $\alpha$ .

Figura 8 – Principais sinais em RMN <sup>1</sup>H e fragmentos de massa de 1 e 2.



- 1 - R = H  
 2 - R = OAc

OBS: Os deslocamentos dos hidrogênios são muito semelhantes para 1 e 2, com exceção do H16 a 5.4 ppm em 2, que passa para  $\delta$ 1.25 em 1.

Figura 8a- Interações dos prótons por NOESY em 2.

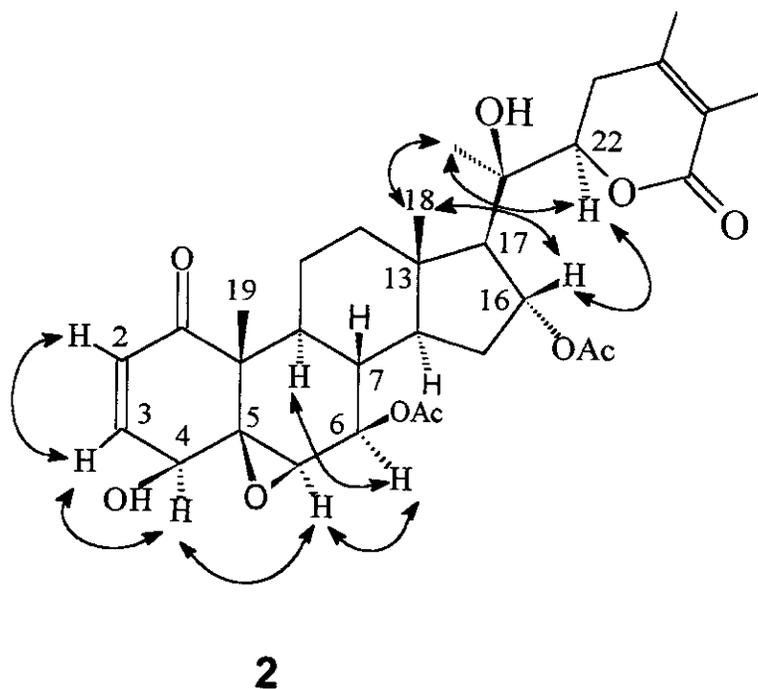


Tabela 5. Correlação direta  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^1J$ ) e correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a longa distância ( $^2J$  e  $^3J$ ) através das técnicas COLOC e HSQC em 2.

| Hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) | $\delta_{\text{C}}$ (nº do C) |              |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------------|
|                                    | $^1J$                         | $^2J$        | $^3J$                               |
| H-2 (6,0)                          | 132,33                        |              | 69,18 (C4)                          |
| H <sub>3</sub> -18 (0,91)          | 14,28                         | 44,13 (C13)  | 52,56 (C14) ; 59,1 (C17)            |
| H <sub>3</sub> -19 (1,45)          | 17,14                         | 46,64(C10);  | 42,89 (C9); 66,86 (C5); 201,56 (C1) |
| H <sub>3</sub> -21 (1,29)          | 20,27                         | 74,49 (C20)  | 59,1 (C17) ; 80,62 (C22)            |
| H <sub>3</sub> -28 (1,89)          | 12,23                         | 122,37 (C25) | 148,93 (C24) ; 166,07 (C26)         |
| 7-OCOCH <sub>3</sub> (2,1)         | 21,14                         | 170,5        |                                     |
| 16-OCOCH <sub>3</sub> (1,96)       | 21,21                         | 171,7        |                                     |

Tabela 6 - Correlações observadas no espectro COSY de 2.

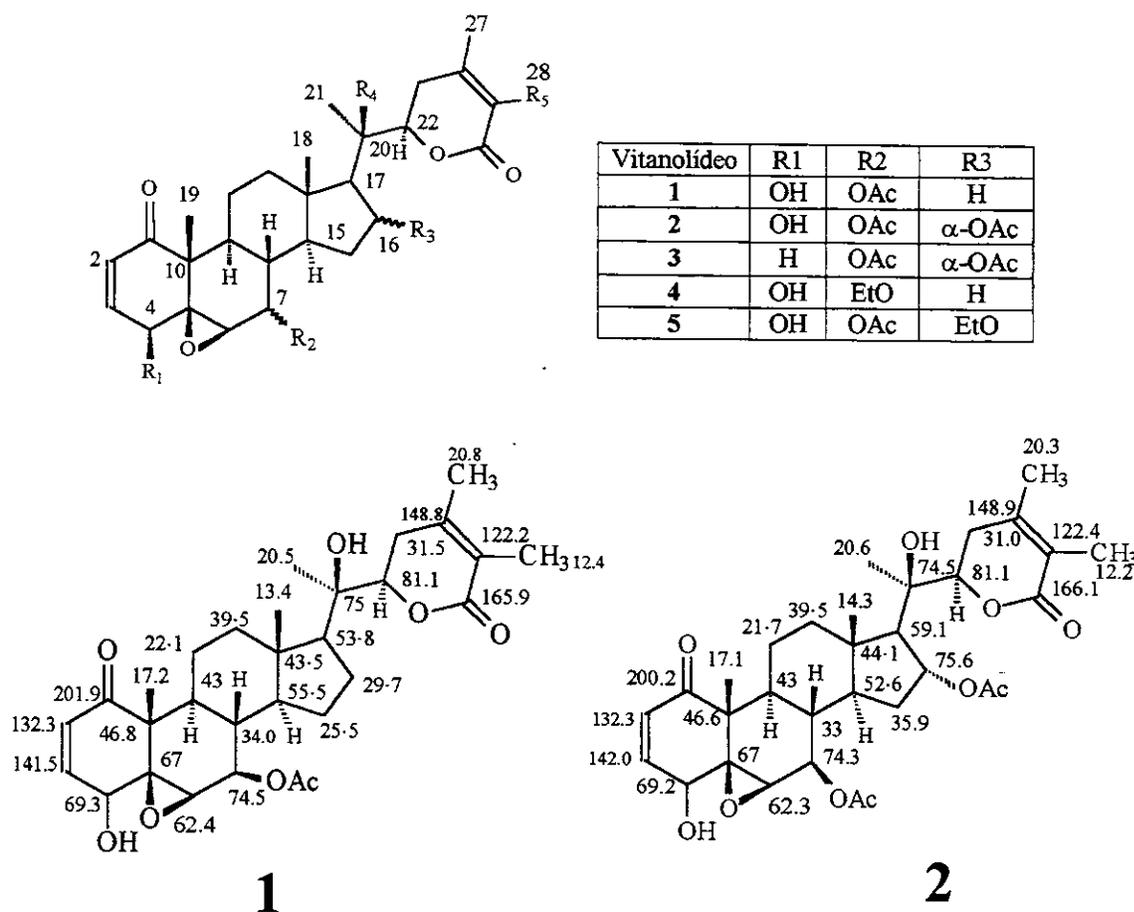
| Hidrogênio ( $\delta$ ) | Hidrogênio correlacionado ( $\delta$ ) |
|-------------------------|--|
| H-3 (6,96)              | H-2 (6,0)                              |
| H-3 (6,96)              | H-4 (3,80)                             |
| H-16 (5,40)             | H-17 (1,75), H-15 (2,06)               |
| H-7 (4,80)              | H-8 (1,83)                             |
| H-7 (4,80)              | H-6 (3,40)                             |
| H-22 (4,20)             | H-23axial , H-23 equatorial            |

Pela análise do espectro DEPT (E-10) de 2, observamos a presença de 11 grupos CH, estando dois destes grupos na região característica de CH insaturados ( $\delta$ 132,3 e 142,0); 4 grupos CH<sub>2</sub>, e 7 grupos metila. Em complementação, observamos no espectro de RMN <sup>13</sup>C (E-11, Figura 9): a presença de quatro carbonilas ( $\delta$  201,6; 170,5; 171,7 e 166,1) ; dois carbonos C<sub>0</sub> insaturados ( $\delta$ 148,9 e 122,4) e quatro carbonos C<sub>0</sub> saturados, dois deles carbinólicos, sendo um no carbono C5 em  $\delta$ 66,86 e outro no carbono 20 em  $\delta$ 74,49.

Através das técnicas COLOC (E-13, E13a-b, apêndice) e HSQC (E-12) obtivemos dados que permitiram localizar inequivocamente alguns átomos, como por exemplo a localização de C17 em  $\delta$ 54,0. Os 3H do grupo metila em C21 e C13 apresentam correlações <sup>3</sup>J com o C-17 em  $\delta$ 54. As principais correlações <sup>13</sup>C- <sup>1</sup>H são apresentadas na Tabela 5 (pág. 29).

Estes dados estão coerentes com a estrutura proposta para 2 (Figura 9).

Figura 9 – Estrutura dos vitanolídeos isolados e deslocamentos químicos em RMN  $^{13}\text{C}$  de 1 e 2.



### Vitanolídeo 3

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (E-17) do inédito vitanolídeo 3, além dos sinais característicos semelhantes aos dos vitanolídeos já isolados (1 e 2) (Tabelas 2 e 4), apresentou como diferenças em relação a estes: um duplo dubleto em  $\delta 6,05$  referente ao H-2, um duplo duplo dubleto em  $\delta 6,85$  referente ao H-3 e, dois hidrogênios não equivalentes ligados em C4. O hidrogênio  $\beta$  mostra um duplo tripleto em  $\delta 3,00$ , e o H $\alpha$  apresenta deslocamento em  $\delta 1,95$ , conforme pudemos detectar por COSY (Tabela 7, E-18). O acoplamento geminal de 19,2 Hz entre os dois hidrogênios H-4, é considerado muito alto. A explicação para este

comportamento foi analisado por Zelnik *et al.*(1979) e Vande Velde *et al.* (1981), e seria a presença de um sistema de orbital do tipo 2-en-1-ona, em conjunto com a orientação do substituinte eletronegativo em C-5. O efeito máximo é obtido quando o ângulo formado pelos orbitais  $p$  e o plano ( $p$ ) que bisecciona o grupo  $H\alpha$ - C(4)- $H\beta$  é  $90^\circ$ . Também um efeito considerável é observado quando o ângulo existente entre a ligação C(5)-O e o plano ( $p$ ) é  $90^\circ$ . No vitanolídeo **3** a constante de acoplamento vicinal entre o 3-H e os prótons geminais em C-4 é de 2,7 Hz para o H-  $4\beta$ - axial, e 6 Hz para o H-  $4\alpha$  equatorial (dados observados por RMN  $^1H$  e COSY (Tabela 7)).

Tabela 7- Correlações observadas no espectro COSY de **3**.

| Hidrogênio ( $\delta$ ) | Hidrogênio correlacionado ( $\delta$ ) |
|-------------------------|--|
| H-3 (6,85)              | H-2 (6,05)                             |
| H-3 (6,85)              | H- $4\alpha$ (1,95)                    |
| H-3 (6,85)              | H- $4\beta$ (3,0)                      |
| H-2 (6,05)              | H- $4\beta$ (3,0)                      |
| H-7 (4,81)              | H-8 (1,91)                             |
| H-7 (4,81)              | H-6 (3,40)                             |
| H-22 (4,30)             | H-23axial , H-23 equatorial            |
| H-16 (5,35)             | H-17 (1,81), H-15 (2,06)               |

A análise dos espectros de RMN  $^{13}C$  (tabela 4, E-19, Figura 10a) e DEPT (E-20) de **3**, permitiu detectar claramente a ausência do grupo OH no C4, onde desaparece o grupo CH na faixa de 68-69 ppm e aparece um grupo  $CH_2$  em  $\delta$ 32,5.

Pela análise dos espectros de RMN  $^{13}C$  e DEPT ( E-19 e E-20) de **3**, observamos a presença de 10 CH, estando dois destes grupos na região característica de CH insaturados ( $\delta$ 129,3 e 144,2) mostrando um efeito de proteção de 3 ppm no

C-2, em relação a 1; 5 CH<sub>2</sub>, onde destaca-se o grupo metilênico de C-4 em δ32,5, resultado da ausência de hidroxila em C-4 ( mudança de δ69,3 para δ32,5, de 2 para 3 ) e, finalmente, 7 grupos metila.

Em complementação, observamos no espectro de RMN <sup>13</sup>C (E-19): a presença de quatro carbonilas (δ202,4 e 170,3; 171,6 166,0), dois carbonos insaturados (δ148,8 e 122,3) e quatro carbonos C<sub>0</sub> saturados (dois deles carbinólicos, um no carbono C5 em δ64,9 ( proteção de 2 ppm em relação a 2) e outro no carbono 20 em δ74,7). Comparando-se os deslocamentos químicos do espectro de <sup>13</sup>C de 3 com 1 percebemos além da mudança em C4, a proteção em C19 (17,2 em 2 para 15,4) como efeito do desaparecimento do grupo OH. Estes dados são coerentes com a estrutura proposta para o vitanolídeo 3.

As correlações à uma ligação <sup>1</sup>H- <sup>13</sup>C em 3 foram determinadas num experimento HSQC (tabela 4, E-21, E-21a).

O vitanolídeo 3 apresentou, da mesma maneira que 2, um grupo acetato adicional, este posicionamento foi confirmado através do estudo por NOESY 2D (E-22a, Figura 10), onde se observaram correlações semelhantes as de 2, o que nos levou a atribuir a estereoquímica β para H-16. No estudo dos 2 H não equivalentes em C-4, pudemos diferenciar através de estudos dos espectros de NOESY 1D e 2D, os hidrogênios α e β. Primeiramente, no estudo de NOESY 1D (E-22) foi feita a irradiação do H-4 a 3,0 ppm, onde foram observados incrementos nos H-4 (1,95) e em 3-H-19 da metila (que sabemos ter estereoquímica β) levando-nos a propor a estereoquímica β para este hidrogênio a 3,0 ppm. O estudo de NOESY 2D (E-22a) permitiu-nos observar as mesmas interações para o H-β, assim como os sinais do H-4α que geraram incrementos nos sinais de H-2 e H-6α.

Os compostos 2 e 3 são os primeiros relatos de vitanolídeos oxigenados em C-7 e C-16 respectivamente, conforme pudemos atestar analisando a literatura (Glotter, 1991).

Figura 10– Interações dos prótons por NOESY em 3.

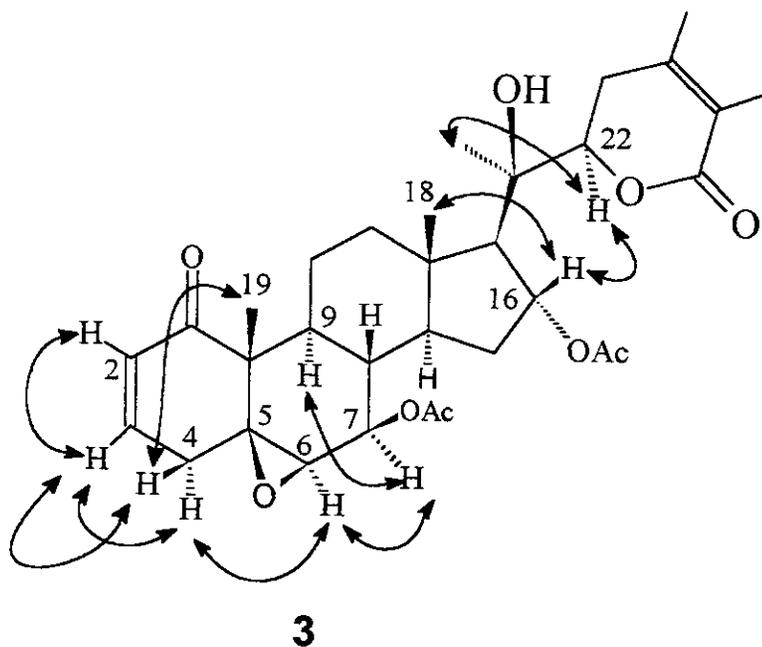
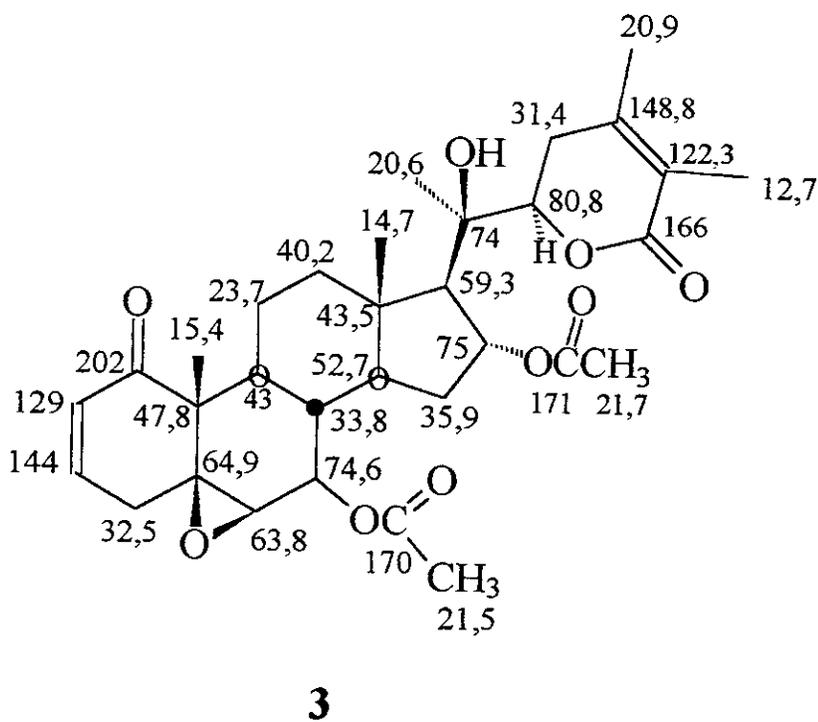


Figura 10a – Deslocamentos químicos em RMN <sup>13</sup>C de 3.

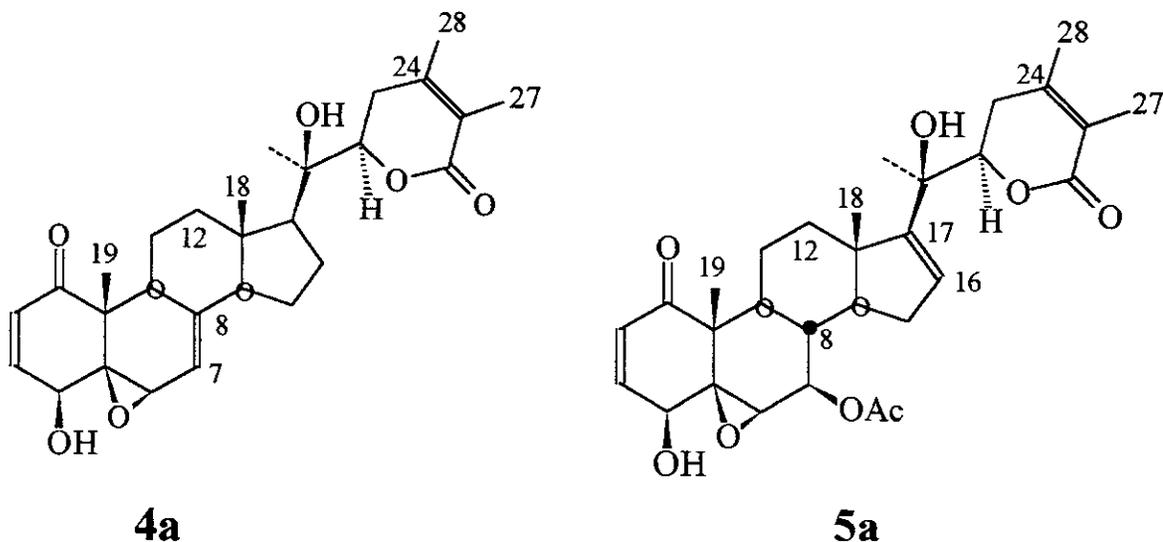


### Vitanolídeos 4 e 5.

No estudo fitoquímico do extrato etanólico, obtido conforme item 6.2.2 da parte experimental (página 62), identificamos os vitanolídeos 4 e 5, que apresentaram como diferença em relação a 1 e 2 um grupo etoxila na posição 7 em vez do grupo acetila. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  destes compostos (E-25 e E-32), a diferença principal apresentada é um quarteto correspondente a dois prótons em  $\delta$  4,2 ligados a um grupo metila (Figura 6, estruturas de 4 e 5).

Estes compostos são, provavelmente, artefatos obtidos no processo de extração com etanol, o que introduziria o grupo etoxila, embora tenhamos neutralizado o mesmo conforme descrito na parte experimental. Em nossa pesquisa na literatura encontramos relato de vitanolídeos etoxilado, por Kupchan (1969) que fez o isolamento de 3-etoxi-2,3-diidro-vitanolídeos quando utilizou EtOH para extração.

No entanto, Kupchan não apresentou dados espectrais destas substâncias, Barata (1970) já relatou a obtenção de artefatos com o grupo metoxila na posição 3 devido à extração com MeOH, isto costuma ocorrer devido à presença de traços de  $\text{H}^+$  que catalisa a reação. O relato de 7-etoxi (4) e 16-etoxi (5) vitanolídeos parece ser o primeiro na literatura. Aparentemente uma dupla ligação deveria existir entre C7,8 e C16,17, em 4 e 5 respectivamente. Assim, mesmo não tendo sido isolados pode-se prever que existam os vitanolídeos 4a e 5a.



Pela análise do espectro de DEPT de 4 ( E-28 ) observamos a presença de 10 grupos CH, estando dois destes grupos na região característica de CH insaturados ( $\delta$  132,0 e 142,0); 6 grupos CH<sub>2</sub>, onde destaca-se o grupo metilênico ( $\delta_c$  60,5) presente na etoxila e, finalmente 6 grupos metila.

Em complementação, observamos no espectro de RMN <sup>13</sup>C (E-27, Figura 11) a presença de duas carbonilas ( $\delta$ 202,1 e 167,0); dois carbonos C<sub>o</sub> insaturados ( $\delta$ 148,0 e 122,0) e quatro carbonos C<sub>o</sub> saturados. Dois deles carbinólicos, um no carbono C5 ( $\delta$ 69,0) e outro no carbono C20 ( $\delta$ 75,0). Estes dados são coerentes com a estrutura proposta para o vitanolídeo 4.

Através das técnicas COLOC (E-29, E-29a-c) e Hetcor (E-30) obtivemos dados que permitiram localizar inequivocamente alguns átomos, como por exemplo a localização de C17 em  $\delta$ 54,0. Os 3H do grupo metila em C21 e C13 apresentam correlações <sup>3</sup>J com C17 em  $\delta$ 54. As principais correlações <sup>13</sup>C- <sup>1</sup>H são apresentadas na Tabelas 9 e 12.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de 4 (E-25) apresenta além dos sinais característicos dos vitanolídeos já apresentados, como por exemplo os hidrogênios vinílicos à  $\delta$ 6,2 e 6,95 que fazem parte de um sistema conjugado do tipo 2-en-3-ona, um quarteto correspondendo a dois hidrogênios em  $\delta$ 4,1 que mostra a presença de um grupo metilênico de etoxila. O posicionamento da etoxila pôde ser confirmado pelas correlações <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H através da técnica COSY (E-26): o H6 em  $\delta$ 3,28 apresenta correlação <sup>1</sup>J com H7 em  $\delta$ 3,5, o H7 apresenta também uma correlação <sup>1</sup>J com H8 em  $\delta$ 1,45. Este posicionamento do grupo etoxila também pode ser confirmado pelas correlações <sup>1</sup>J <sup>13</sup>C- <sup>1</sup>H por Hetcor (E-30) onde se observa que o próton em  $\delta$ 3,3 tem correlação com o carbono em  $\delta$ 65, e o C7 em  $\delta$ 73 tem correlação <sup>1</sup>J com o próton em  $\delta$ 3,5, confirmando a posição da etoxila. Pela análise do COSY de 4 (E-26) também observa-se a correlação <sup>1</sup>J entre os hidrogênios metilênicos da etoxila em  $\delta$ 4,1 com a metila em  $\delta_H$  1,38. As principais correlações <sup>1</sup>H- <sup>1</sup>H observadas por COSY são mostradas a seguir:

Tabela 8- Correlações observadas no espectro COSY de 4.

| Hidrogênio ( $\delta$ )                | Hidrogênio correlacionado ( $\delta$ ) |
|--|--|
| H-3 (6,95)                             | H-4 (3,75)                             |
| H-3 (6,95)                             | H-2 (6,20)                             |
| H-22 (4,17)                            | H-23 ax, H-23 eq                       |
| H-7 (3,5)                              | H-8 (1,45)                             |
| H-7 (3,5)                              | H6 (3,28)                              |
| 4,1 (CH <sub>2</sub> do grupo etoxila) | CH <sub>3</sub> (1,4)                  |

Figura 11 – Deslocamentos químicos em RMN <sup>13</sup>C de 4.

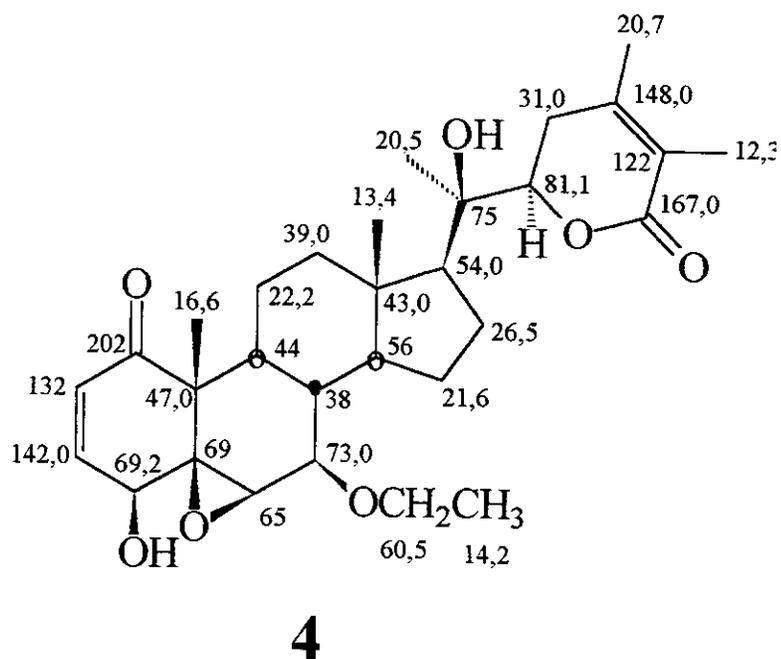


Tabela 9. Correlação direta  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  ( $^1J$ ) e correlações  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  a longa distância ( $^2J$  e  $^3J$ ) através das técnicas Hetcor e COLOC, em **4**.

| Hidrogênio                       | $\delta_{\text{C}}$ (nº do C) |       |                           |
|----------------------------------|-------------------------------|-------|---------------------------|
|                                  | $^1J$                         | $^2J$ | $^3J$                     |
| H-2                              | 132,0                         |       |                           |
| Me-18                            | 13,4                          |       | 56,0 (C14) ; 54,0 (C17)   |
| Me-21                            | 20,7                          |       | 54,0 (C17); 81,0 (C22)    |
| H-28                             | 12,3                          | 122,0 | 148,0 (C24) ; 167,0 (C26) |
| H-27                             | 20,5                          | 148,0 |                           |
| OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 14,2                          |       |                           |

A análise dos espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **5** (E-32) mostrou como diferença principal, um quarteto em  $\delta 4,2$ , correspondente a dois prótons ligados a um grupo metila.

Pela análise do espectro de DEPT de **5** (E-35) observamos a presença de 11 CH, estando dois destes carbonos na região característica de CH insaturados ( $\delta$  132,0 e 142,0); 5 CH<sub>2</sub>, destacando-se o CH<sub>2</sub> a 60,5 ppm presente no grupamento etoxila e finalmente 7 grupos metila. Além destes carbonos observamos em complementação no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (E-34, Figura 12) a presença de três carbonilas ( $\delta$  202,0, 172,0 e 167,0): dois carbonos C<sub>0</sub> insaturados ( $\delta$  148,0 e 122,2) e quatro carbonos C<sub>0</sub> (dois deles carbinólicos, um no carbono C5 a  $\delta$  68,0 e outro no carbono C20 em  $\delta$  75,0). Estes dados foram coerentes com a estrutura proposta para o vitanolídeo **5**.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (E-32) mostrou uma diferença de 0,9 ppm do H-16 em **5** quando comparado com o mesmo H-16 em **2**, esta proteção se deve ao fato de agora termos ligado ao C16 um grupo etoxila, e não mais o grupo acetato ligado em C-16.

As correlações  $^1J$  ( $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ) na técnica Hetcor (E-36, E-36a-b)) permitiram diferenciar o carbonos em  $\delta 62,5$  e  $\delta 62,0$ . O primeiro apresenta correlação  $J1$  com o H em 1,6 ppm, coerente com C-17; já o carbono em  $\delta 62$  apresenta correlação  $J1$

com um H em  $\delta$ 3,4, o que condiz com um hidrogênio vizinho a carbono ligado a oxigênio, ou seja C6. Estes fatos também puderam ser comparados por correlações a longa distância  $^3J$ ,  $^2J$  e  $^4J$  na técnica COLOC ( E-37).

A posição do grupo etoxila foi confirmada inequivocamente através de análises por COSY, Hetcor e COLOC (E-33, E-36 e E-37). O C-17 em  $\delta$ 62,5 tem correlação com o H-17 em  $\delta$ 1,6. Este hidrogênio, por COSY, apresentam correlação  $^2J$  com H-16 em  $\delta$ 4,5, que tem como vizinho o H-15 em  $\delta$ 1,84, e finalmente por Hetcor nota-se que o H-15 se correlaciona com o C-15 em  $\delta$ 38,2. Os principais resultados observados por COSY para **5** são mostrados a seguir:

Tabela 10- Correlações observadas no espectro COSY de **5**.

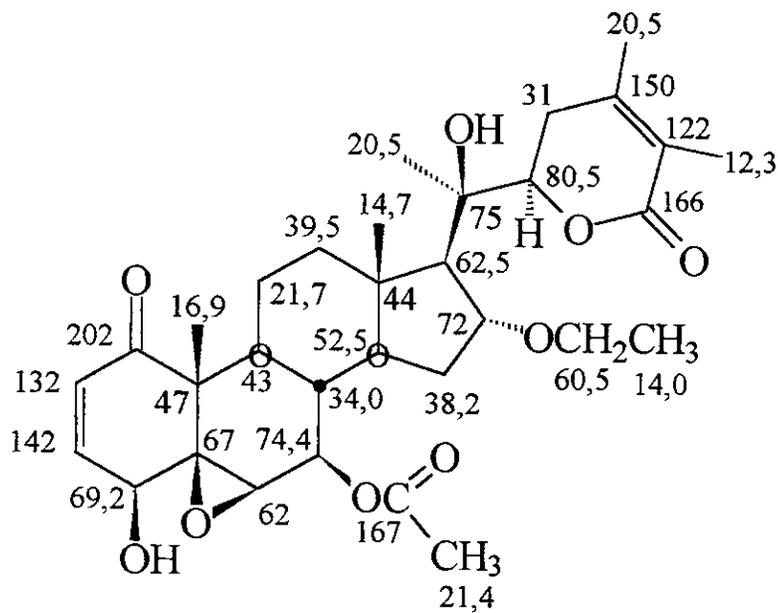
| Hidrogênio ( $\delta$ )                 | Hidrogênio correlacionado ( $\delta$ ) |
|---|--|
| H-3 (6,95)                              | H-4 (3,75)                             |
| H-3 (6,95)                              | H-2 (6,20)                             |
| H-22 (4,4)                              | H-23 ax, H-23 eq                       |
| H-7 (4,85)                              | H-8 (1,72)                             |
| H-7 (4,85)                              | H6 (3,4)                               |
| 4,1 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) | CH <sub>3</sub> (1,4)                  |

A posição do C-17 foi confirmada na análise do espectro COLOC (E-37): o C17 tem correlação  $^3J$  com os 3 H da metila C21 ( $\delta_H$  1,25), e o carbono em  $\delta$ 74,5 tem uma correlação  $^4J$  com esta mesma metila. Estes dados permitiram a proposição da estrutura de **5**.

Tabela 11. Correlação direta  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  ( $^1J$ ) e correlações  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  a longa distância ( $^2J$  e  $^3J$ ) através das técnicas Hetcor e COLOC, em **5**.

| H                            | $\delta^{13}\text{C}$ |             |                                   |
|------------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------------------|
|                              | $^1J$                 | $^2J$       | $^3J$                             |
| H-2                          | 132,3                 |             |                                   |
| Me-18                        | 14,7                  | 44,2 (C13)  | 52,5 (C14) ; 62,5 (C17)           |
| Me-19                        | 16,9                  | 46,9 (C10); | 43,0 (C9) ; 67,0(C5) ; 202,0 (C1) |
| Me-21                        | 20,5                  |             | 150,0 (C24) 62,5 (C17)            |
| H-28                         | 12,3                  | 122,0 (C25) | 166,0 (C26)                       |
| -OCOCH <sub>3</sub> (em C-7) | 21,4                  | 167,4       |                                   |

Figura 12 – Deslocamentos químicos em RMN  $^{13}\text{C}$  de **5**.



**5**

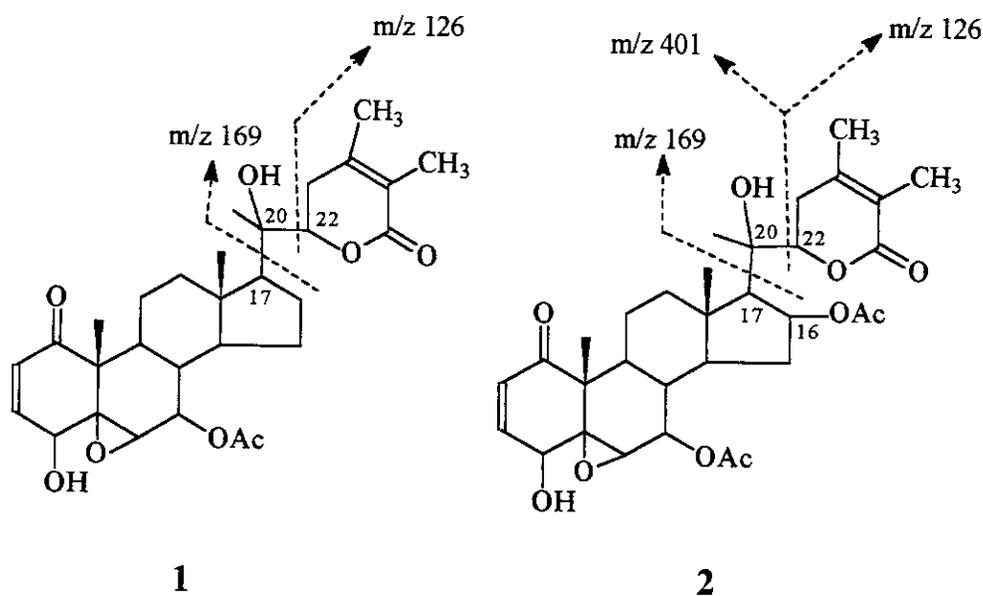
Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para 4 e 5.

| C                             | Vitanolídeo 4         |                                    | Vitanolídeo 5         |                                    |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|                               | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$<br>(J em Hertz) | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$<br>(J em Hertz) |
| 1                             | 202,1                 |                                    | 202,0                 |                                    |
| 2                             | 132,0                 | 6,20 d (10,0)                      | 132,0                 | 6,20 d (9,9)                       |
| 3                             | 142,0                 | 6,95 dd (5,9 ; 10,0)               | 142,0                 | 6,95 dd (5,9 ; 9,9)                |
| 4                             | 69,2                  | 3,75 d (5,9)                       | 69,2                  | 3,75 d (5,8)                       |
| 5                             | 69,0                  |                                    | 67,0                  |                                    |
| 6                             | 65,0                  | 3,28 d (0,8)                       | 61,7                  | 3,35 d (1,0)                       |
| 7                             | 73,0                  | 3,5 dd (9,0 ; 0,8)                 | 74,4                  | 4,85 dd (1,0 ; 9,5)                |
| 8                             | 38,0                  | 1,45                               | 34,0                  | 1,72                               |
| 9                             | 44,0                  | 1,21                               | 43,1                  | 1,2                                |
| 10                            | 47,0                  |                                    | 46,9                  |                                    |
| 11                            | 22,2                  | 1,49                               | 21,7                  |                                    |
| 12                            | 39,0                  | 1,98, 1,20                         | 39,5                  | 1,36, 1,95                         |
| 13                            | 43,0                  |                                    | 44,2                  |                                    |
| 14                            | 56,0                  | 1,10                               | 52,5                  | 1,5 (2,0)                          |
| 15                            | 21,6                  | 1,45                               | 38,2                  | 1,84                               |
| 16                            | 26,5                  | 1,25                               | 72,0                  | 4,5 dd (7,7; 7,4)                  |
| 17                            | 54,0                  | 1,39                               | 62,5                  | 1,6                                |
| 18                            | 13,4                  | 0,80                               | 14,7                  | 0,82                               |
| 19                            | 16,6                  | 1,38                               | 16,9                  | 1,40                               |
| 20                            | 75,0                  |                                    | 75,1                  |                                    |
| 21                            | 20,5                  | 1,92                               | 20,5                  | 1,84                               |
| 22                            | 81,1                  | 4.18 dd (3,4; 13,4)                | 80,5                  | 4,4 dd (3,7; 13,2)                 |
| 23                            | 31,0                  | 2,06, ,41                          | 30,8                  | 2,22 ; 2,40                        |
| 24                            | 148,0                 |                                    | 150,0                 |                                    |
| 25                            | 122,0                 |                                    | 122,0                 |                                    |
| 26                            | 167,0                 |                                    | 166,0                 |                                    |
| 27                            | 20,7                  | 1,94                               | 20,8                  | 1,92                               |
| 28                            | 12,3                  | 1,88                               | 12,3                  | 1,82                               |
| 7- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  | 60,5                  | 4,1 q                              |                       |                                    |
| 7- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  | 14,2                  | 1,4                                |                       |                                    |
| 7- $\text{OCOCH}_3$           |                       |                                    | 167,4                 |                                    |
| 7- $\text{OCOCH}_3$           |                       |                                    | 21,4                  | 2,11                               |
| 16- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ |                       |                                    | 60,5                  | 4,12                               |
| 16- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ |                       |                                    | 14,0                  | 1,4                                |

### 2.2.2 – Espectrometria de Massas

O espectro de massas de **1** (E-7) apresentou um pico base em  $m/z$  126 correspondente a formação do íon  $C_7H_{10}O_2$ , do íon intenso em  $m/z$  169 correspondente ao rompimento da ligação C-17 - C-20 (Figura 13 e Esquema 1), e do íon molecular em  $m/z$  528. O espectro de massas de **2** (E-15) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  586, tendo como pico base o íon  $m/z$  126 (correspondendo ao íon que contém a lactona mais H ( $C_7H_{10}O_2$ )), um pico intenso à  $m/z$  401 ( $M-125$ )<sup>+</sup> e outro a  $m/z$  169, formado pela quebra da ligação C17-C20 (Figura 13).

Figura 13 - Fragmentação dos vitanolídeos **1** e **2**

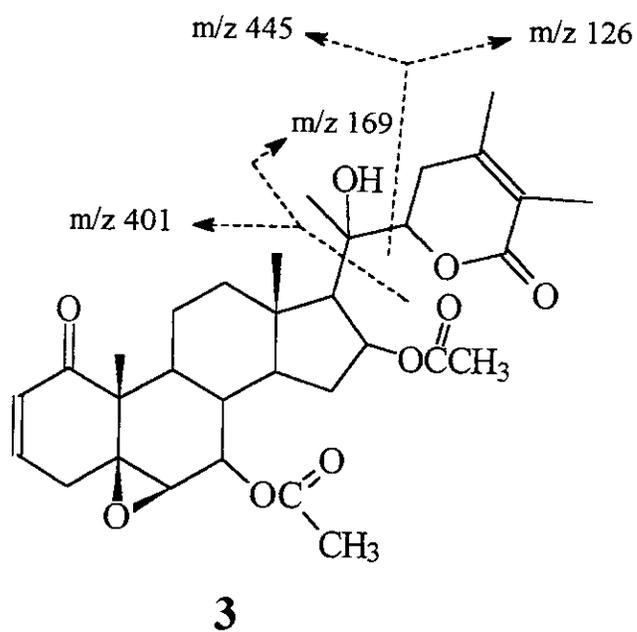


O espectro de massas de **3** (E-24, Figura 14) apresentou o pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  570, apresentando em relação a **2**, 16 unidades a menos, o que foi atribuído a substância **3** possuir um grupo OH a menos, o íon principal é o íon  $m/z$  385 (100). Outros picos importantes para **3** são:  $m/z$  385 (65),  $m/z$  126 (75),  $m/z$  169 (44),  $m/z$  445(17),  $m/z$  325 (68).

O pico do íon molecular ( $M^+$ ) observado nos vitanolídeos a 70 ev, aparece com uma unidade a menos na técnica que utiliza o sistema 'eletrospray', utilizada na

técnica de de-replicação. É que nesta técnica é feito um pré-tratamento com solução de trietanolamina que retira um próton dos vitanolídeos, que podem então ser analisados por espectrometria de massas na forma de íons negativos. Os espectros de massas de 4 e 5 não puderam ser realizados, porque os compostos não foram suficientemente voláteis para permitir a obtenção de seus espectros.

Figura 14- Fragmentação do vitanolídeo 3.

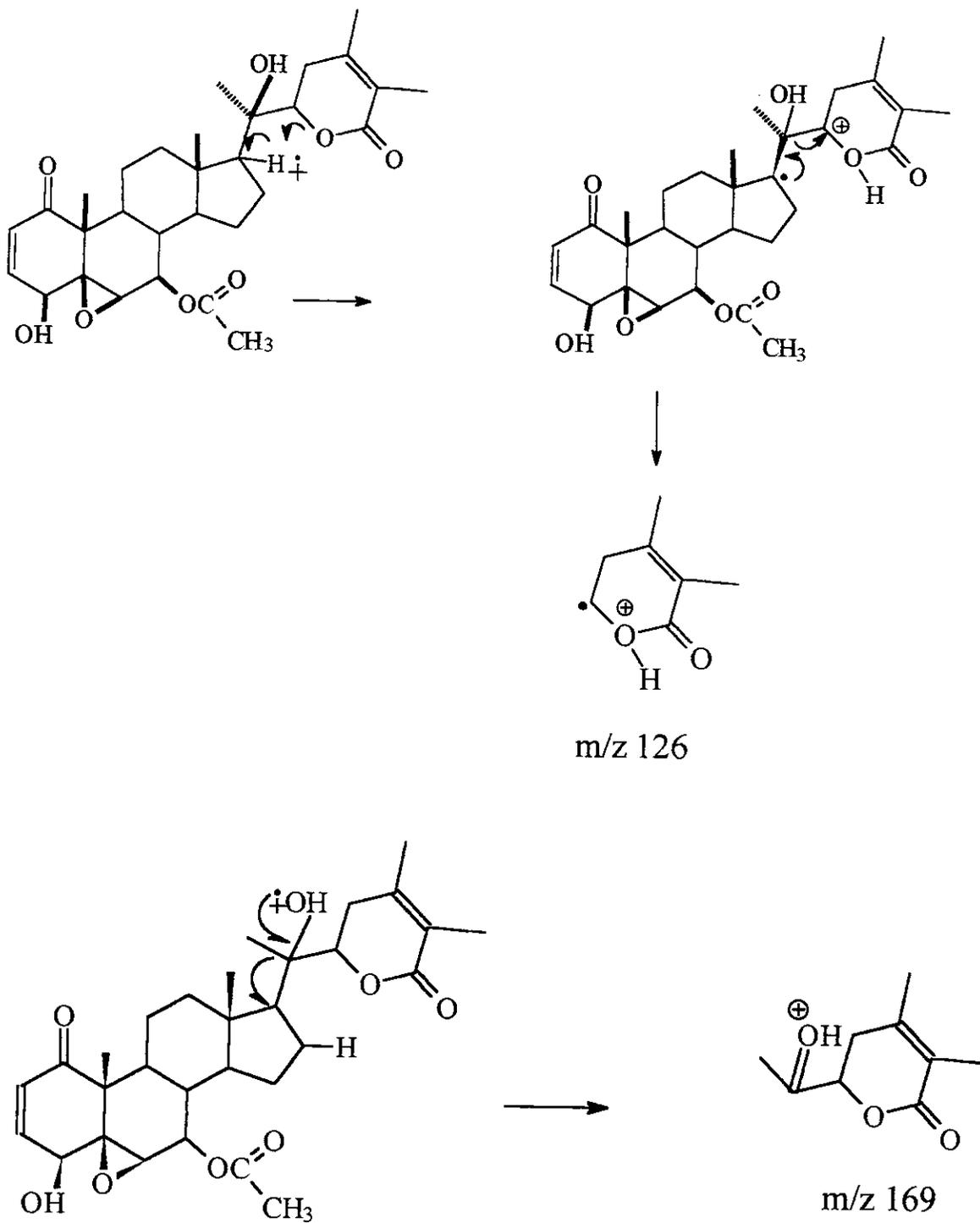


outros fragmentos:

$$m/z\ 385 = m/z\ 445 - (OAc + H)$$

$$m/z\ 325 = m/z\ 385 - (OAc + H)$$

ESQUEMA 1- Proposta de fragmentação para os fragmentos principais de 1



### 3 – OBTENÇÃO DE DERIVADOS

Os derivados químicos dos vitanolídeos, foram sintetizados com o objetivo de obter compostos com atividade biológica anti-câncer melhorada em relação aos seus precursores. A diminuição da atividade biológica, pode ser um indicativo da importância de determinada porção da molécula, orientando transformações posteriores. Devido à pequena quantidade do produto natural e à complexidade das estruturas, as reações de transformação envolveram não mais do que duas etapas. Os derivados obtidos envolveram reações de redução de carbonila em 1, oxidação da hidroxila-4 em 1 e 2, acetilação de 1 e 2, totalizando cinco derivados que já foram enviados para os testes biológicos na Universidade de Illinois nos Estados Unidos.

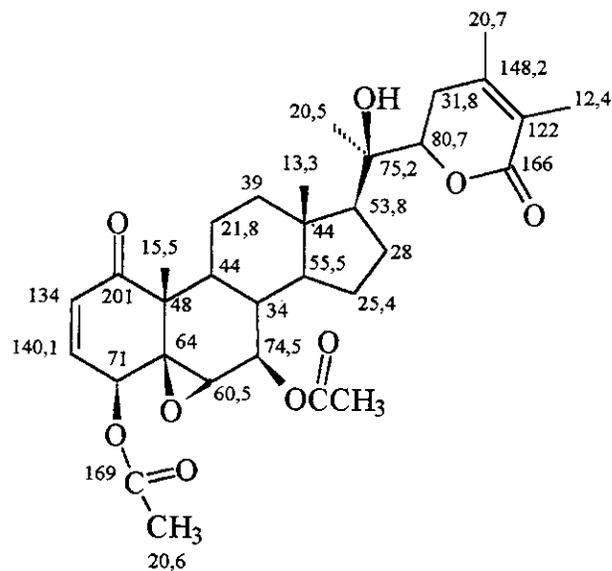
#### 3.1 - Reações de acetilação de 1 e 2

As reações de acetilação de 1 e 2 foram feitas utilizando-se anidrido acético e piridina a temperatura ambiente levando aos derivados 1a e 2a. As reações foram acompanhadas por CCD observando-se a formação dos produtos após 3hs de reação.

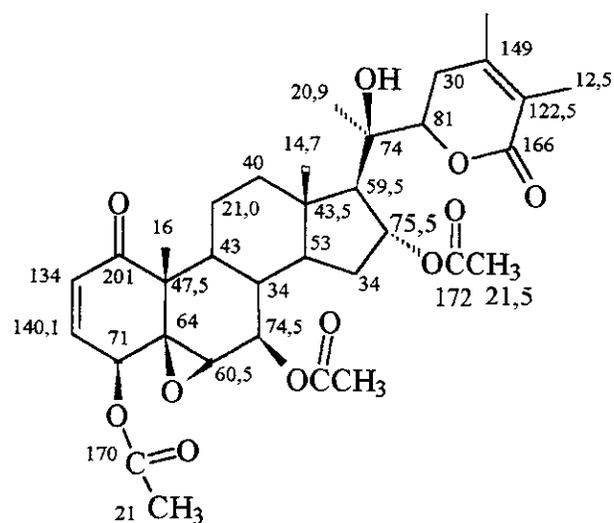
Os compostos obtidos foram analisados por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (E-39-E-41, E-50-E-52). Através de RMN  $^{13}\text{C}$  (E-40, Figura 14a), foram observados os seguintes aspectos em 1a: o grupo C-4 acetoxi causa um efeito de proteção de 1,6 ppm no grupo metila em C-19, quando comparado seu espectro com o de 1. Esta proteção pode ser explicada pela interação 1,3 diaxial entre C-4 acetoxi e o grupo metila em C-19. O deslocamento químico em  $\delta$  69,3 do C-4 ( grupo hidroxila) em 1 está mais protegido (1,7 ppm), quando comparado com o carbono correspondente no derivado di-acetilado 1a. Devido à mudança da função de hidroxila para acetoxila, este grupo CH a 71 ppm pode ser observado no DEPT de 1a (E-41). Aspectos semelhantes foram observados em 2a (E-51, Figura 14a). Tanto em 1a como em 2a observou-se por RMN  $^{13}\text{C}$  a adição de dois carbonos referentes a carbonila ( $\delta$ 169 e 170) e metila ( $\delta$ 20,6 e 21) respectivamente. No DEPT (E-41 e E-50) observou-se uma metila adicional. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  de 1a e 2a (E-39 e E-52) apresentaram como principal alteração, em relação a 1 e 2 (E-1 e E-8), uma

desproteção de 0,9 ppm para o H-4 que passa de  $\delta$ 3,80 para  $\delta$ 4,70 em 1a e 2a, alteração esta devida a mudança de hidroxila para acetato em C-4.

Figura 14a - Estruturas de 1a e 2a com seus respectivos deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$ .



1a



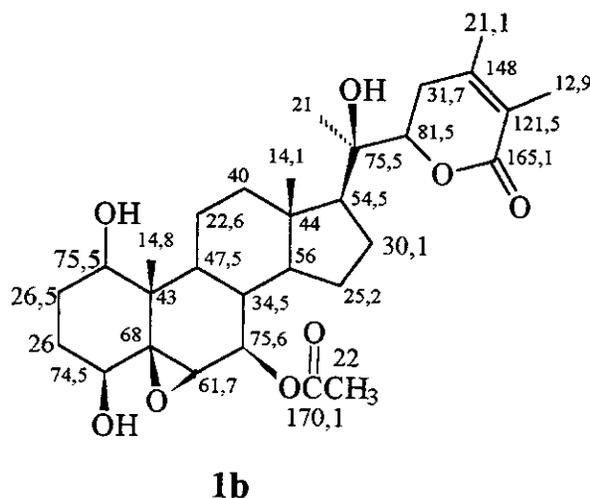
2a

### 3.2 - Reação de redução da carbonila em 1

Em síntese orgânica é usual reduzir um grupo funcional de uma molécula, sem afetar outros grupos passíveis de redução. O vitanolídeo 1 apresenta como grupos funcionais passíveis de redução: carbonila, acetato, epóxido e lactona. O derivado desejado envolve a redução de carbonila e da dupla ligação do vitanolídeo 1. O reagente mais apropriado neste caso seria  $\text{NaBH}_4$  (March, 1977). A reação de 1, dissolvido em acetona e com  $\text{NaBH}_4$ , foi feita com agitação e aquecimento, acompanhando-se a reação por CCD (acetato/tolueno/ácido acético (8:2:0,1)).

Após um período de 30 min notamos a presença de apenas um composto. O composto obtido, após purificação por CCDP, que denominamos 1b, foi analisado por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT (E-42, E-43 e E-44). A análise do seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (E-42) mostra claramente a ausência de H vinílicos entre 6,2 e 6,8 ppm. A identificação deste composto foi feita por RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (E-43 e E-44), comparando-se o seu espectro com o de 1 onde nota-se a ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3, e conseqüentemente as alterações nos deslocamentos químicos de 1b. O deslocamento químico da carbonila em C-1 em 1 ( $\delta 201,9$ ) passa para um deslocamento CH ligado a grupo hidroxila ( $\delta 75,5$ ).

O carbono C-4, contendo grupo hidroxila, é deslocado para campo baixo ( $\delta 74,5$ ) conforme esperado, pois não tem mais o efeito de proteção da ligação dupla.

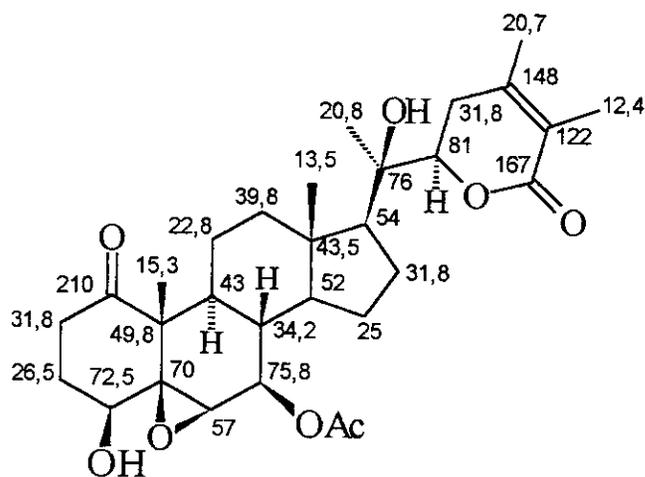




desaparecimento do sinal correspondente grupo CH em 69 ppm presente no seu precursor 1, e que foi oxidado em 1c. Estes dados estão coerentes as estruturas propostas para estes dois derivados.

#### 3.4 – Hidrogenação catalítica de 1.

O vitanolídeo 1d foi obtido através de reação de hidrogenação, tendo como catalisador de reação Pd/C. As análises para identificação de 1d, foram feitas através de técnicas de RMN. Inicialmente, a análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1d (E-47) mostrou como diferenças principais em relação ao espectro de 1: o desaparecimento de dois sinais de H-vinílicos a 6,2 e 6,8 ppm, o H-4 que em 1 aparecia como um duplete a 3,8 ppm, apareceu como um duplo duplete a 3,5ppm, uma vez que nesta molécula temos um hidrogênio vizinho a um grupo metilênico. No DEPT de 1d (E-48) percebeu-se claramente o desaparecimento dos carbonos vinílicos a 132,0 e 142,0 ppm. Comparando-se o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 1d (E-49) com 1 (E-4) notamos a presença de cinco sinais na região entre 122 e 210 ppm, e não sete como em 1; devido ao desaparecimento de dois grupos CH vinílicos após a redução da dupla ligação C2-C3. Os deslocamentos químicos de 1d em RMN  $^{13}\text{C}$  são mostrados a seguir:



**1d**

#### 4 - De-replicação usando extrato e substâncias isoladas de *A. arborescens*.

##### 4.1 Detecção e testes biológicos *in vitro*

O extrato etéreo de *Acnistus arborescens* foi analisado através da técnica de de-replicação, que consiste em dissolver a amostra em solvente apropriado e injetá-la num sistema HPLC-eletrospray/MS, que permite ao mesmo tempo coletar as frações e realizar os testes biológicos em câncer. Os componentes do extrato em questão, separados por HPLC (Figura 15), foram testados em células KB (câncer de pele), detectando-se as regiões de atividade biológica deste extrato ( injeção de 5µL) como a) 9,6 - 9,9 min b) 10,6-12,0 min e c) 12,7-13,0 min, respectivamente (tabela 13), os picos mostrados na Figura 16 se referem a detecção em massa (MS) dos íons negativos ionizados por *eletrospray*, sendo os tempos de retenção ( $MS_t$ ) ligeiramente diferentes dos tempos observados no perfil cromatográfico por HPLC ( da ordem de 0,4 min).

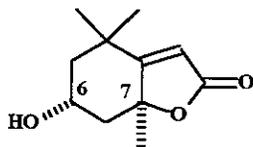
Os íons negativos detectados por massa na região de atividade biológica foram:  $m/z$  469, 485, 527, 569 e 585 (Figura 16 (A)) que correspondem respectivamente as massas moleculares (MM): 470, 486, 528, 570 e 586. Esses dados de massa molecular foram confrontados com uma biblioteca de produtos naturais ( p.ex *Dictionary of Natural Products*, que possui mais de 70.000 compostos naturais catalogados), detectando-se Vitaferina A (MM= 470) em torno de 11,5 min e hidroxí-Vitaferina em torno de 9,6 min, como as substâncias de maior probabilidade para os picos  $m/z$  470 e 486. Os demais compostos seriam provavelmente os vitanolídeos 1, 2 e 3, com as massas 528, 586 e 570, isolados neste trabalho. Também foram detectados os compostos Loliolídeo (MM= 196) e Vitacnistina (MM= 558), mas estes não estavam na região de atividade biológica.

Tabela 13 - Massas moleculares e tempos de retenção dos compostos ativos no extrato etéreo de *Acnistus arborescens* contra células KB de câncer de pele, observados por de-replicação.

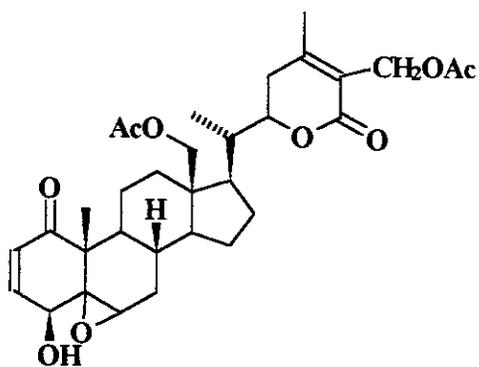
| MS <sub>t</sub> (min) | Massas moleculares dos compostos ativos em câncer | Consulta em biblioteca de produtos naturais* |
|-----------------------|---|--|
| 9,6 - 9,9             | 486   | Hidroxi-vitaferina (Figura 3)                |
| 10,6- 12,0            | 470, 510, <u>528</u> , <u>586</u>                 | 470 (Vitaferina A) (Figura 3)                |
| 12,7 - 13,0           | <u>570</u>  | ausente                                      |

OBS: MS<sub>t</sub> = tempo de retenção \* - *Dictionary of Natural Products*

Outros compostos identificados mas que não estavam na região de atividade biológica são:



Loliolídeo



Vitacnistina

Figura 15 - Cromatograma UV ( $\lambda=254$  nm) da injeção de 5  $\mu$ L do extrato etéreo de *A. arborescens*, por HPLC.

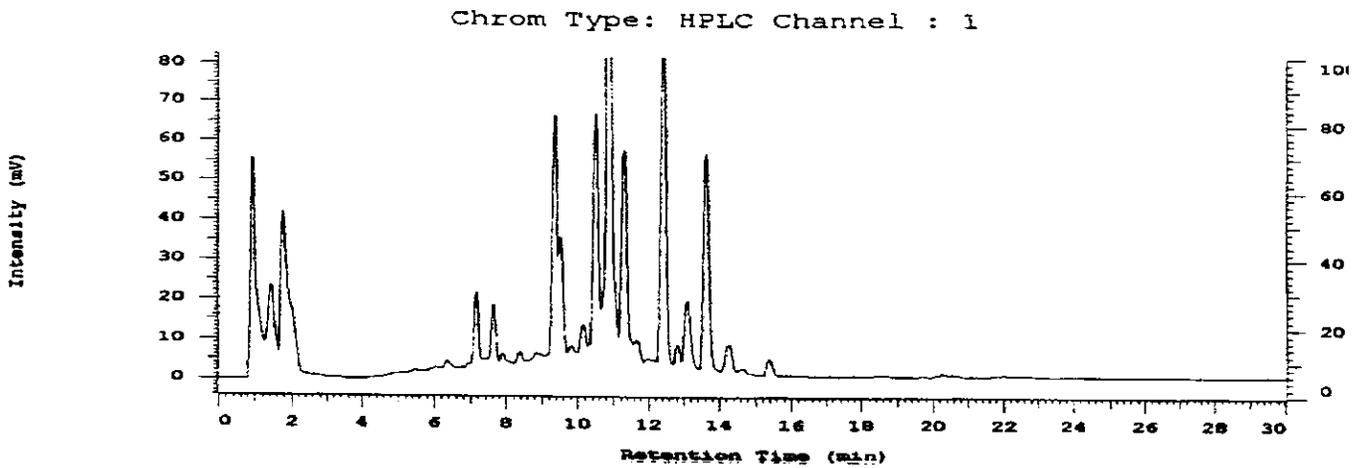
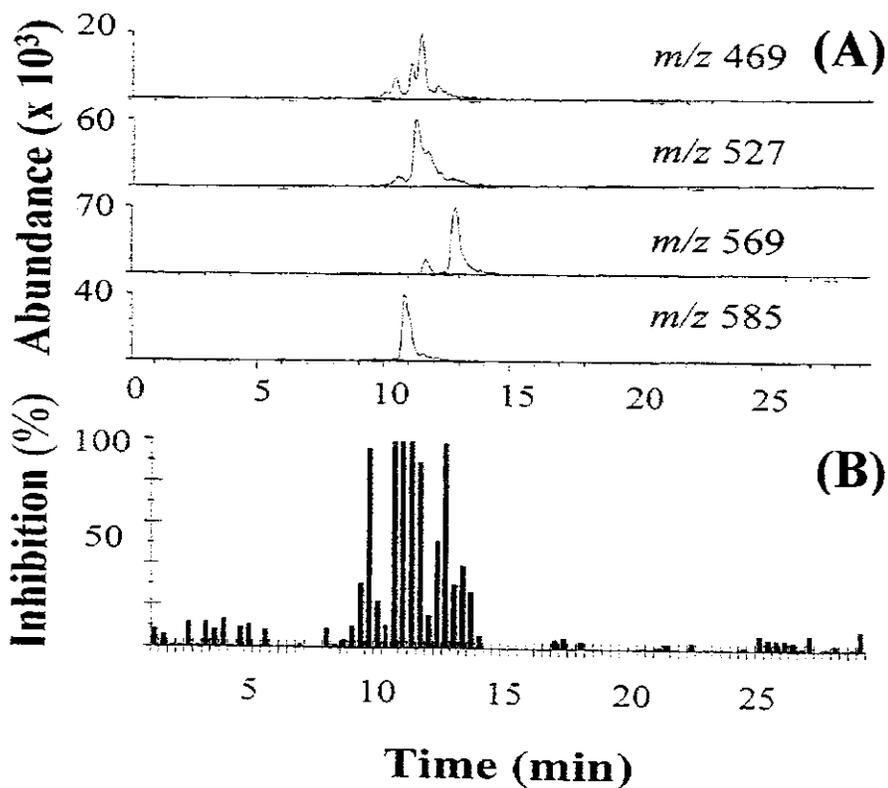


Figura 16 – Cromatograma de íons reconstruídos para  $m/z$  469, 527, 569 e 585 (A), perfil de atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma KB (B).



5 - Testes biológicos *in vitro* dos vitanolídeos isolados e derivados.

#### 5.1 – Citotoxicidade em células cancerosas

Os compostos 1, 2, 3, 4 e 5 e os extratos etéreo e etanólico foram submetidos a testes biológicos em diversos tipos de células cancerosas na Universidade de Illinois (EUA), sendo os resultados apresentados na Tabela 14.

O extrato etéreo apresentou um valor de ED<sub>50</sub> de 0,25 µg/ml contra células KB (câncer de pele), o que significa um resultado bastante significativo, uma vez que o valor de ED<sub>50</sub> representa a concentração do composto que elimina 50% das células cancerosas. Conforme podemos observar uma pequena concentração do extrato foi muito ativa contra células de câncer. Segundo os padrões do "*National Cancer Institute*" (NCI) dos Estados Unidos, um composto apresenta citotoxicidade quando o valor de ED<sub>50</sub> é menor que 10 µg/ml, o que nos leva a concluir que todas amostras analisadas foram ativas em câncer, com destaque para 1 e 2 contra células de câncer de cólon, que apresentaram os menores valores de ED<sub>50</sub>, e **consequentemente as maiores atividades.**

Tabela 14- Citotoxicidade em relação a células cancerosas \*

| Substância/ extrato   | tipo de célula cancerosa (ED <sub>50</sub> µg/ml ) |        |       |      |          |
|---|--|--------|-------|------|----------|
|   | mama   | pulmão | cólon | pele | próstata |
| 1   | 0,2  | 1,3    | 0,03  | 0,4  | 0,2      |
| 2   | 0,4  | 2,1    | 0,08  | 0,5  | 0,2      |
| 3   | 0,5  | 0,3    | 0,5   | 0,1  |          |
| 4   | 1,3  | 0,77   | 0,3   |      |          |
| 5   | 4,2  | 3,8    | 2,6   |      |          |
| 1a  | 1,1  | 0,19   | 0,2   |      |          |
| 2a  | 3,0  | 0,25   | 0,3   |      |          |
| 1b  | >20  | >20    | >20   | >20  | >20      |
| 1c  |  | 7,9    | 1,1   | 0,8  | 1,9      |
| 1d  |  | 0,63   | 3,7   | 10,6 | 13,1     |
| Extrato etéreo folhas de <i>A. arborescens</i> .              |  |        |       | 0,25 |          |
| Extrato etanólico das folhas de <i>Acnistus arborescens</i> . | 2,6  | 1,0    | 0,8   |      |          |
| Extrato etanólico das raízes de <i>Acnistus arborescens</i> . | >20  | >20    | >20   | >20  | >20      |

### 5.1.1 - Relação Estrutura-Atividade de vitanolídeos em Câncer.

Comparando-se a atividade biológica de 1 com o derivado 1a acetilado no C-4 (tabela 14, Figura 17), percebe-se que a atividade diminuiu nos cânceres de mama e cólon (5x e 7x), mas aumentou muito (7x) nas células de câncer de pulmão; comportamento semelhante foi observado na atividade de 2.

O sistema conjugado 2-en-1-ona mostrou-se importante na atividade dos vitanolídeos, pois quando realizamos a redução da carbonila (C1) e dupla ligação em 1, obtendo-se o derivado 1b, percebemos uma diminuição significativa nos valores de atividade biológica em todos os tipos de células cancerosas.

Considerando este fato obtivemos os derivados 1c e 1d. Os resultados apresentados na tabela 14 mostram que a 1d, melhorou em 2 vezes a atividade para câncer de pulmão, mas a atividade caiu nos outros tipos de células. O derivado 1c que poderia representar uma melhora na atividade, pela incorporação de uma carbonila, não apresentou nenhum aumento na atividade nas células testadas, entretanto percebemos uma certa seletividade na atividade de determinadas células (tabela 14).

Comparando-se a estrutura de 1 com 4 percebe-se como diferença na estrutura a mudança de um grupo acetoxila para etoxila, este fato faz com a atividade seja diminuída no vitanolídeo 4, nas células cancerosas de mama e cólon, e melhorada nas células de câncer de pulmão. Estes fatos nos levam a concluir que o grupo acetoxila no C-7 é muito importante na atividade biológica de 1, nos cânceres de cólon e mama, com atividades seis e dez vezes maiores do que em 4 (Tabela 14).

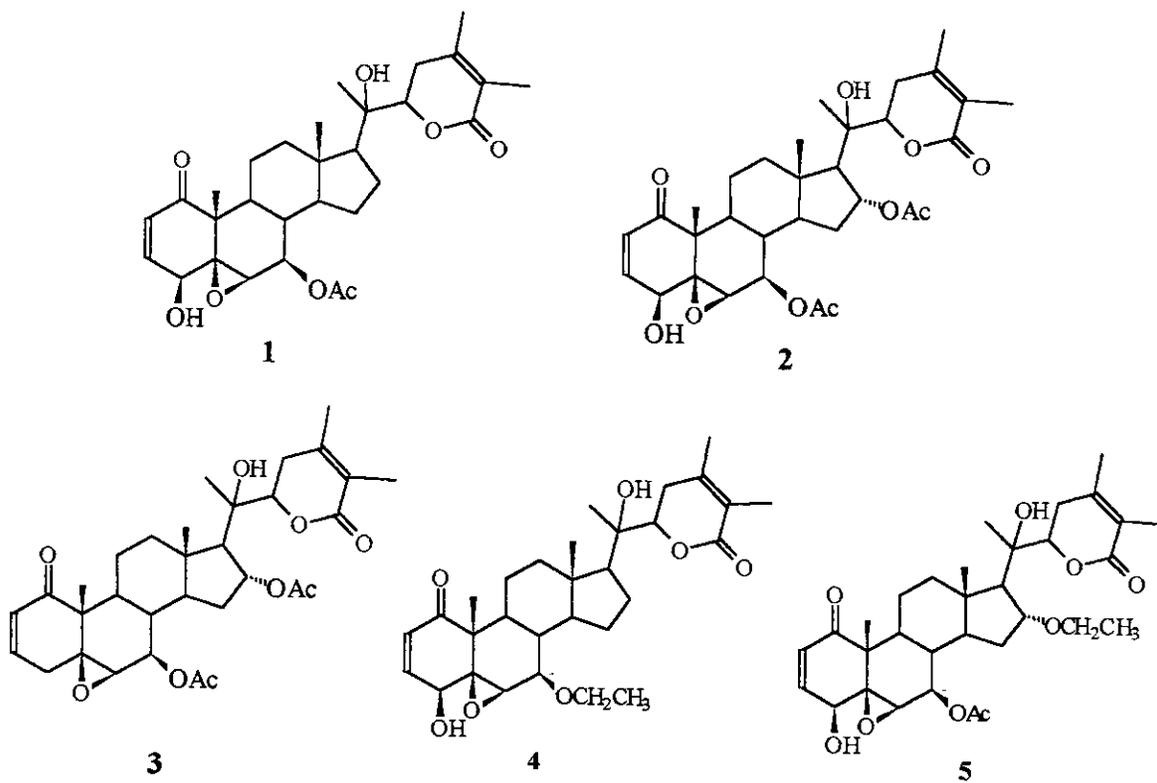
Comparando-se a estrutura de 2 com 5 (Figura 17) percebe-se como diferença na estrutura a mudança de um grupo acetoxila para etoxila no C16, este fato faz com a atividade seja diminuída para a substância 5 nos cânceres de mama, cólon e pulmão (10x, 3x e 2x, respectivamente). Estes resultados mostram que uma pequena modificação estrutural causa profundas mudanças na atividade biológica. Quando comparamos 5 com os demais vitanolídeos observa-se que este é 21 vezes menos ativo que 1 em câncer de mama, 13 vezes menos ativo que 3 em câncer de

pulmão, 87 vezes menos ativo que 1 em câncer de cólon, ou ainda 10 vezes menos ativo que 2 em câncer de mama. Estruturalmente em relação a 2, a diferença é apenas a mudança do grupo acetato em C16 por um grupo etoxila (Figura 17).

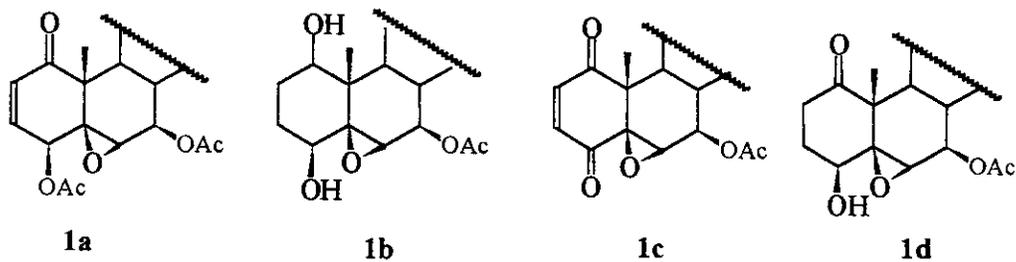
Os resultados da tabela 14 mostram claramente que quando acetilamos os vitanolídeos 1 e 2 no OH-C-4, a atividade biológica anti-câncer cai drasticamente em relação a 1 (5,5x) ou 2 (7,5x). Mas 1a se torna muito mais ativo em câncer de pulmão (7x).

O extrato etanólico das raízes mostrou-se muito pouco ativo em câncer ( $ED_{50} > 20$  em todos os testes). Provavelmente o fato se deve a não terem sido detectados vitanolídeos neste extrato em testes de CCD, em comparação com padrões de 1 e 2, que influenciam a atividade anti-câncer. Os extratos etanólico e etéreo das folhas de *A. arborescens* mostraram atividades muito elevadas nas células testadas, destacando-se aqui o extrato etéreo com atividade até superior a dos vitanolídeos 1 e 2 (puros).

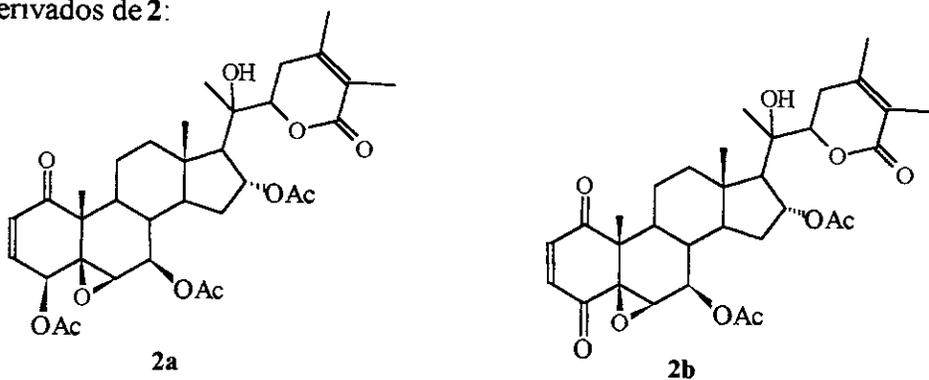
Figura 17 - Vitanolídeos isolados e seus derivados, testados em câncer.



Derivados de 1:



Derivados de 2:



## 5.2 - Atividade quimiopreventiva ( teste de quinona redutase)

Os vitanolídeos foram avaliados na Universidade de Illinois, quanto a sua atividade quimiopreventiva como indutores de fase II de detoxificação de enzimas, usando um sistema em células de murine hepatoma 1c1c7 (Song et al., 1999). Os resultados são apresentados na tabela 15. Estudos prévios (Kennelly et al., 1997) mostraram que alguns vitanolídeos de *Physalis philadelphica* foram muito ativos neste ensaio, apresentando baixos níveis de seletividade. Os vitanolídeos de *A. arborescens* foram muito potentes como indutores monofuncionais de quinona redutase (valor de CD), entretanto não houve seletividade na atividade dos compostos (valor de CI iguais, Tabela 15).

Tabela 15 – Atividade de indução de Quinona redutase (QR) para os vitanolídeos (1-3) de *A. arborescens* e 4'-bromoflavona<sup>a</sup> (Minguzzi et al., 2002).

| Amostra                     | CD (mcg/mL) | IC50 (mcg/mL) | CI     |
|-----------------------------|-------------|---------------|--------|
| Vitanolídeo 1               | 0,21        | 0,45          | 2,1    |
| Vitanolídeo 2               | 0,21        | 0,45          | 2,1    |
| Vitanolídeo 3               | 0,3         | 0,62          | 2,1    |
| 4'-bromoflavona<br>(padrão) | 0,003       | >20           | >6.667 |

<sup>a</sup> Atividade de Quinona redutase (QR) foi determinada com células Hepa 1c1c7 hepatoma murine. CD é a concentração requerida para dobrar a atividade QR; IC<sub>50</sub>, concentração que inibe o crescimento celular em 50%; CI, índice de quimioprevenção (IC<sub>50</sub>/CD).

## 6 – PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 Material

As folhas de *Acnistus arborescens* foram coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro pelo Prof. Lauro E. S. Barata e Sra. Silvana Holanda. Folhas e raízes foram coletadas na estação experimental do IAC em Ubatuba por Sandro Minguzzi e Mário Aveniente.

As folhas de *Acnistus arborescens* nas duas coletas ( Rio e São Paulo), foram identificadas pelo Botânico Jorge Tamashiro do Instituto de Biologia- Unicamp. As amostras das espécies coletadas se encontram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Unicamp.

As duas amostras de folhas secas coletadas do Jardim Botânico em julho e dezembro de 1997 foram juntadas num só lote totalizando 92,2 g . As folhas foram submetidas a um processo de extração que chamamos método A (Esquema 2). A quantidade de folhas para isolamento de vitanolídeos foi pequena permitindo com dificuldade o isolamento de diminuta quantidade de dois vitanolídeos (1 e 2). Uma maior quantidade de folhas de *A. arborescens* foi encontrada em seu habitat natural na Estação Experimental de Ubatuba, onde foram coletadas 3 kg de folhas verdes que foram secas ao sol totalizando 1,3 kg de folhas. esta quantidade permitiu o isolamento de 5 vitanolídeos.

A metodologia para estudo de grande quantidade de folhas seguiu os procedimentos do método B (Esquema 3).

### 6.2- Metodologia

#### 6.2.1 – Obtenção de solventes tratados .

Os solventes utilizados nas análises foram o n-hexano, acetato de etila, éter etílico, tolueno, metanol e etanol. Estes foram submetidos a tratamento prévio para que houvesse menor interferência nos resultados finais. Os tratamentos seguiram procedimentos usuais de destilação, e no caso do etanol adicionou-se hidróxido de sódio na proporção de 5% de massa do solvente, para remoção de impurezas ácidas

que poderiam no processo de extração reagir com os compostos de interesse, o frasco foi agitado por 60 minutos com NaOH, deixado em repouso por 1h e a seguir filtrado. O solvente foi então destilado e utilizado.

#### 6.2.2 - Obtenção de vitanolídeos

Depois de secas, as folhas de *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht. foram moídas e submetidas a dois tipos de tratamentos:

##### **Método A: Extração em Soxhlet**

92,2g de folhas coletadas no Jardim Botânico (RJ) foram extraídas em Soxhlet com capacidade de 500 mL, utilizando-se como solventes: hexano, éter etílico e etanol (Esquema 2). O extrato hexânico (2 g) contendo pigmentos e ácidos graxos foi descartado, após a verificação em CCD, em diferentes solventes, mostrar que não existiam vitanolídeos. O extrato etéreo foi evaporado totalizando 1,24g e então submetido à separação cromatográfica em sílica gel, com solventes em ordem crescente de polaridade, onde separou-se 60 frações de 15 mL cada (Tabela 16). As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas. As frações hexano-acetato de etila (40 %) resultaram em um sólido esverdeado, que foi cromatografado em CCD preparativa, eluindo-se três vezes com uma mistura de hexano / acetato de etila (50%), fornecendo após recristalização dois vitanolídeos (1 e 2) com Rf próximos. O Vitanolídeo 1 já havia sido isolado por Barata et. al (1970), já o composto 2 foi inédito.

## Esquema 2- Extração sucessiva em Soxhlet

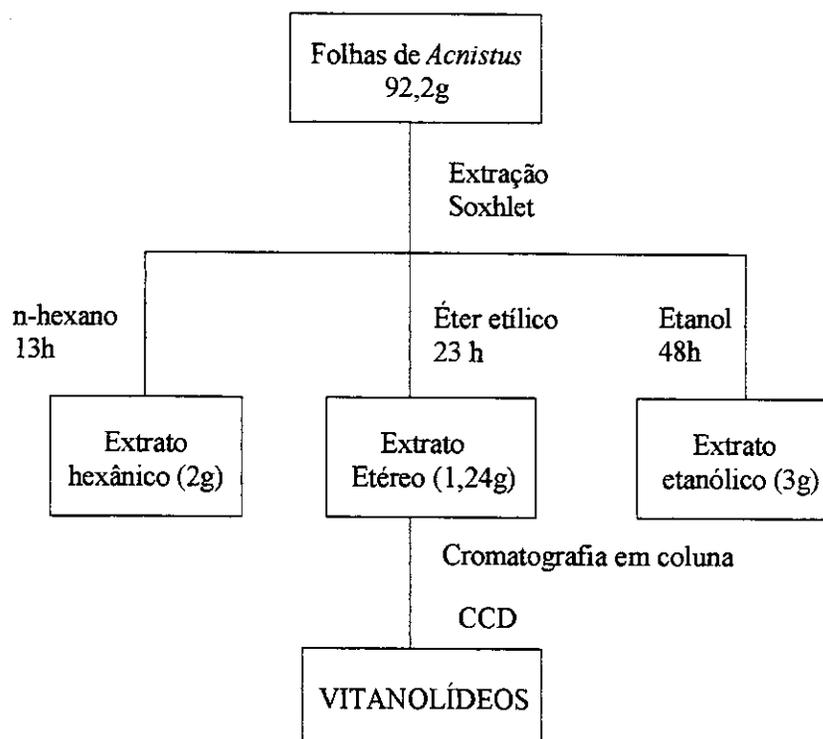


Tabela 16 – Frações obtidas por Cromatografia líquida do extrato etéreo.

| Frações | solvente                | % solv. | Massa (mg) |
|---------|-------------------------|---------|------------|
| 1       | hexano                  |         | 5          |
| 2-5     | hexano/ AcOEt           | 5       |            |
| 6-10    | “                       | 10      |            |
| 11-15   | “                       | 20      | 10         |
| 16-20   | “                       | 30      |            |
| 21-22   | “                       | “       | 17,6       |
| 23-24   | “                       | 40      | 40,2       |
| 25-26   | “                       | 50      | 37,6       |
| 27      | “                       | 70      | 13,9       |
| 28-29   | “                       | “       | 31,5       |
| 30-32   | AcOEt                   | 100     | 13,9       |
| 33-37   | “                       | “       | 19         |
| 38-41   | “                       | “       | 14         |
| 42-47   | CHCl <sub>3</sub> /MeOH | 10      | 35,9       |
| 48-51   | “                       | 20      | 5          |
| 52-60   | “                       | 30      | 10         |
| TOTAL   |                         |         | 246,6      |

### PREPARATIVA

Frações 23 –24:  
3 manchas em CCD  
Compostos:  
Vitanolídeo 1 (11,6 mg)  
Vitanolídeo 2 (3,0 mg)  
Pigmento (3,0 mg)

Frações 27-29:  
2 manchas em CCD:  
Vitanolídeo 1 (3,6 mg)  
Vitanolídeo 2 (10,1 mg)

### **Método B: Extração sucessiva à frio.**

A um garrafão de vidro de 20 L foram adicionados 1,3 kg de folhas secas de *A. arborescens* e 5L de etanol previamente tratado. Seguiu-se então a extração sucessiva com etanol, onde após um período de extração de três dias o solvente era retirado e evaporado com posterior tratamento para eliminação de clorofila (Esquema 3), esta etapa foi repetida três vezes. A segunda etapa foi a eliminação de clorofila e pigmentos das folhas de *Acnistus*. Ajustou-se o volume do extrato etanólico obtido na primeira etapa para 600 mL adicionando-se 400 ml de água. Após leve agitação deixou-se a mistura em repouso por 30 min, para que houvesse a precipitação de clorofila e pigmentos, que foram separados da solução etanol-água através de filtração em celite. Esta etapa do método foi adaptada da literatura (Fernandes *et al.*, 1997). Como após esta etapa ainda persistia uma grande quantidade de pigmentos verdes, submeteu-se a amostra a uma purificação clássica utilizando-se acetato de chumbo, cujo método é o seguinte: na solução etanólica proveniente da etapa anterior, adicionou-se 10 mL de solução aquosa contendo 1g de acetato de chumbo, após agitação da mistura adicionou-se, mantendo-se agitação, 5 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10 %). A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos para que houvesse a precipitação da clorofila e flavonóides. A mistura foi então filtrada em outro tipo de adsorvente (argila), extraída com acetato de etila e então adicionado água para a formação de duas fases. As duas fases foram separadas em funil de separação de 1L, prosseguindo-se o trabalho com a fração de acetato de etila.

O solvente foi então evaporado e submetido aos mesmos tratamentos cromatográficos do método A, obtendo-se os vitanolídeos 1, 2, 3, 4 e 5. A fração hexano-acetato (70 %) também resultou em um sólido esverdeado que foi cromatografado em (CCDP), a eluição desta fração com uma mistura hexano/acetato 40%, resultou no vitanolídeo 3 inédito.

Esquema 3 - Processo geral de eliminação de clorofila e obtenção de vitanolídeos.

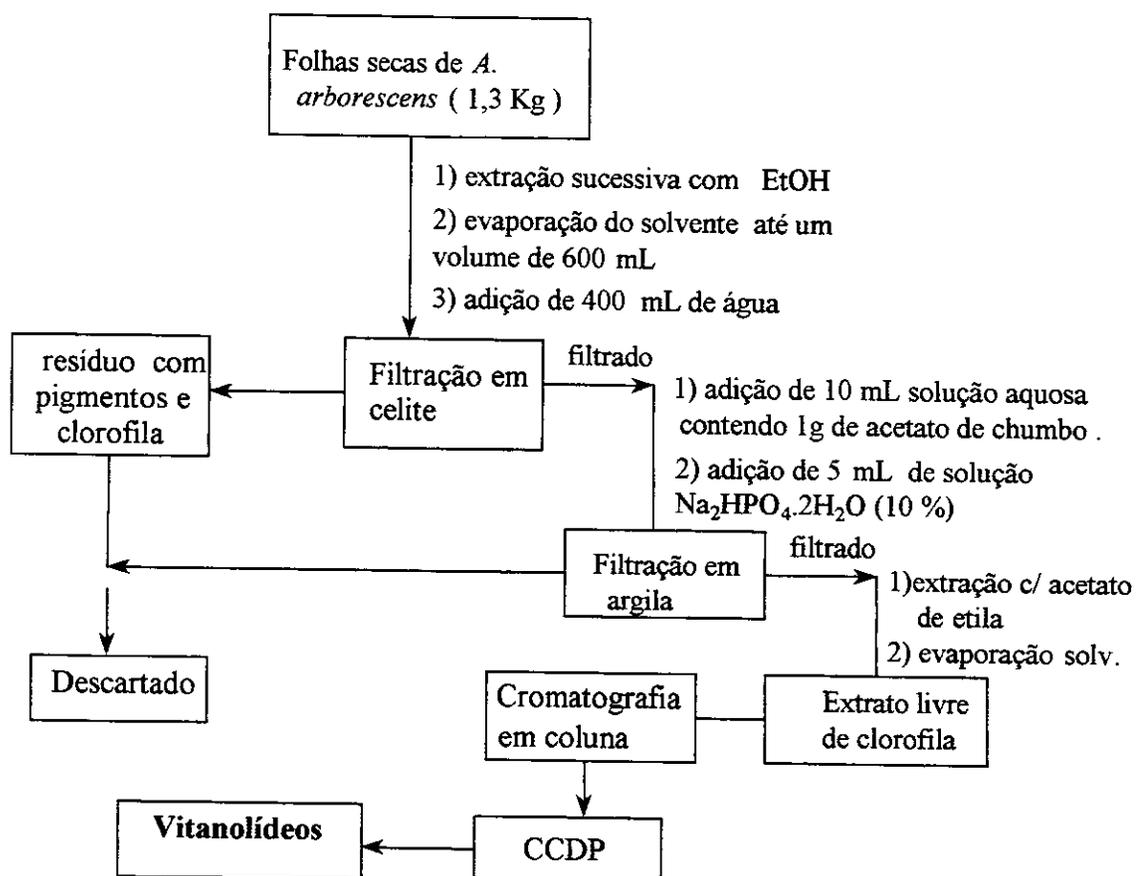


Tabela 17 – Frações obtidas por Cromatografia líquida do extrato etanólico

| Frações | solvente      | % solv. | Massa (mg) |
|---------|---------------|---------|------------|
| 1       | hexano        |         | 100        |
| 2-8     | hexano        |         | 200        |
| 10-14   | hexano/ AcOEt | 5       | 100        |
| 14-16   | “             | 10      | 100        |
| 16-18   | “             | 20      | 50         |
| 20-22   | “             | 30      | 45         |
| 22-30   | “             | 40      | 1100       |
| 30-36   | “             | 50      | 200        |
| 36-40   | “             | 70      | 100        |
| 40-55   | “             | 70      | 70         |
| 55-58   | AcOEt         | 100     | 67         |
| 58-60   | “             | “       | 54         |
| 61-63   | “             | “       | 47         |
| 63-65   | AcOEt/ MeOH   | 10      | 39         |
| 66-68   | “             | 20      | 20         |
| 69-74   | “             | 30      | 10         |

Cromatografia em coluna das frações  
 Frações 20 - 22  
 2 manchas em CCD  
 Compostos:  
 Vitanolídeo 3 (30 mg)  
 Pigmento

Frações 22-40:  
 2 manchas principais em CCD:  
 Vitanolídeo 1 (1,0 g)  
 Vitanolídeo 2 (300 mg)  
 e mais pigmentos verdes

Frações 40-55:  
 2 manchas principais em CCD:  
 Vitanolídeo 4 (12 mg)  
 Vitanolídeo 5 (15 mg)

### 6.2.3 - Análise dos compostos isolados

#### 6.2.3.1. Geral

Os espectros no IV foram obtidos num espectrofotômetro Perkin Elmer 1600 (FTIR Series). Cromatogramas e espectros de de-replicação HPLC-electrospray/MS foram obtidos em um espectrômetro de massa acoplado com uma interface electrospray 59987A e um sistema Hitachi HPLC L-7100 Hewlett Packard 5989B.

Os espectros de massas EI foram obtidos num equipamento VG Autospec High Resolution Mass Spectrometer (Micromass Company). Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ - foram obtidos num equipamento Bruker operando em 500 e 300 MHz. Cromatografia em coluna foi feita utilizando-se sílica gel, 230-400 mesh da Merck. Cromatografia em camada delgada foi feita em placas cromatográficas pré-fabricadas contendo sílica gel GF-254 (20 × 20 cm, 0,2 mm de espessura da Merck.

A visualização das placas foram feitas em UV a 254 e 366 nm, tendo como revelador MeOH/ácido sulfúrico (1:1) na detecção dos vitanolídeos.

Os compostos isolados tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas de RMN  $^1\text{H}$  (300 e/ou 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (75 e/ou 125 MHz) , DEPT, COSY, HSQC, HMBC nos equipamentos Varian Gemini 300 BB e/ou Varian Inova 500 do IQ-Unicamp. Em conjunto com as análises por Espectrometria de Massas (inserção direta de sólidos), HPLC-MS ( técnica eletrospray) e IV.

#### 6.2.3.2 - Análise por HPLC-MS

A técnica de de-replicação, foi realizada pelo Dr. Young Geun Shin e Prof. Dr. Geoffrey A. Cordell da University of Illinois, utilizando um sistema HPLC-"eletrospray"-MS que consiste de um espectrômetro de massas HP 5989B, uma interface eletrospray 59987A, um sistema HPLC Hitachi com um detector de UV L-7400, um "splitter" numa vazão 1:50, e um coletor de frações (Figura 2 ). A temperatura do quadrupolo do espectrômetro de massas foi fixada em 120 °C e os espectros foram adquiridos com íon negativos. A temperatura do  $\text{N}_2$ , como agente

secante foi de 350 °C, e o fluxo de N<sub>2</sub> nebulizado na razão de 40 mL/min com a pressão na câmara de íons mantida em 80 psi (Cordell e Shin, 1999).

#### 6.2.3.3 - Parâmetros Cromatográficos (HPLC)

A separação cromatográfica do extrato etéreo foi feita, em duplicata, com uma coluna de fase reversa Kromasil C-18 (250 x 3,2mm). A fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B) e o gradiente foram os seguintes: de 0-1 min 95% A, seguindo-se um gradiente linear de 1 a 8 min com 50% de A/ 50% de B, um novo gradiente linear de 8 a 20 min com 100% de B, e então mantida esta concentração por 10 min até o final. O detector UV foi fixado em 254 nm. A vazão foi dividida na razão de 1:50 após o detector de UV. O extrato etéreo injetado duas vezes, teve frações coletadas da corrente de maior vazão em duas microplacas de 96 depósitos, as frações de menor vazão geraram dois conjuntos de dados espectroscópicos. Os volumes de injeção foram relativos ao ED<sub>50</sub> do extrato. Portanto, a primeira injeção foi de 25µL com concentração de 4mg/mL, o qual é pelo menos 5 vezes a dose efetiva (ED<sub>50</sub>) obtida preliminarmente para o extrato. Esta primeira injeção foi posteriormente tratada com solução 0,2% de trietanolamina em solução aquosa de metanol (80%) e o espectrômetro de massas ajustado para observar íons negativos.

A segunda injeção foi uma injeção de 5µL com concentração de 4mg/mL da amostra, o qual é equivalente da dose efetiva. Esta última injeção serve para detectar as regiões de maior atividade no extrato (Figura 15). Os testes de atividade citotóxica realizados nas frações coletadas dos 96 depósitos são descritos a seguir:

#### 6.2.3.4 – Dados físicos dos vitanolídeos

##### Vitanolídeo (1):

7β-acetoxi-4β,20R-diidroxi-5β,6β-epoxi-1-oxo-vita-2,24-dienolídeo.

Sólido incolor de p.f. 151-153°C (AcOEt); UV λ<sub>max</sub> 217 nm (ε 15.000) ; IV ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3421, 1712, 1686; EIMS m/z (int. rel.): 528 [M<sup>+</sup>], 468 [M-HOAc]<sup>+</sup> (2), 403 [M-125]<sup>+</sup> (15), 385 [M-125-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (12), 343 [M-125-HOAc]<sup>+</sup> (30), 325 [M-125-

HOAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (25), 169 (25), 126 (100); HR-EIMS *m/z* 325.18065 (Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>: 325,18037) ; dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, ver Tabela 4.

Principais sinais em RMN <sup>1</sup>H ( CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):

δ 6,96 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 10 Hz ; <sup>3</sup>*J* = 6,0 Hz , H3)

δ 6,20 ( d, <sup>3</sup>*J* = 10 Hz ; H2)

δ 4,83 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 9,7 Hz ; <sup>3</sup>*J* = 1,8 Hz , H7)

δ 4,18 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 3,6 Hz ; <sup>3</sup>*J* = 13,0 Hz , H22)

δ 3,8 ( d, <sup>3</sup>*J* = 6,0 Hz, H4)

δ 3,25 ( d, <sup>3</sup>*J* = 1,8 Hz , H6)

Vitanolídeo (2):

7β,16α-diacetoxi-4β,20*R*-dihidroxi-5β,6β-epoxi-1-oxo-vita-2,24-dienolídeo.

Sólido incolor de p.f 163-166°C (AcOEt); IV *v*<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3440, 1707, 1680; EIMS *m/z* (int. rel.): 586 [M<sup>+</sup>], 461 [M-125]<sup>+</sup> (20), 401 [M-125-HOAc]<sup>+</sup> (100), 341 [M-125-2HOAc]<sup>+</sup> (28), 323 (19), 281 (20), 169 (50), 126 (100); HR-EIMS *m/z* 461,21749 (Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>O<sub>8</sub>: 461,21754); RMN <sup>1</sup>H dados espectrais, ver Tabela 1; RMN <sup>13</sup>C dados espectrais, ver Tabela 1, correlações HMQC <sup>1</sup>H- <sup>13</sup>C, ver Tabela 2.

Principais sinais em RMN <sup>1</sup>H de 2 ( CDCl<sub>3</sub> , 500 MHz):

δ 6,96 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 10 Hz ; <sup>3</sup>*J* = 5,9 Hz , H3);

δ 6,20 ( d, <sup>3</sup>*J* = 10 Hz ; H2) ;

δ 5,40 ( t., *J* = 7,7 Hz ≅ *J* = 7,7 Hz , H16β) ;

δ 4,80 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 9,5 Hz ; <sup>3</sup>*J* = 1,8 Hz , H7)

δ 4,20 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 4,03 Hz ; <sup>3</sup>*J* = 12,8 Hz , H22)

δ 3,80 ( dd, <sup>3</sup>*J* = 6,0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1,8 Hz, H4)

δ 3,40 ( d, <sup>3</sup>*J* = 1,8 Hz, H6)

### Vitanolídeo 3:

7 $\beta$ , 16 $\alpha$ -diacetoxi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-20*R*-hidroxi-1-oxo-vita-2,24-dienolídeo.

Sólido incolor de p.f. 132-137°C (AcOEt); IV  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3490, 1731, 1707, 1680; EIMS  $m/z$  (int. rel.): 570 [M<sup>+</sup>], 263 (95), 385 (65), 325(32), 126(40), e 169(15); HR-EIMS  $m/z$  445,22238 (Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>O<sub>7</sub>: 445,22263); RMN <sup>1</sup>H, ver Tabela 1; RMN <sup>13</sup>C, ver Tabela 1.

Principais sinais em RMN <sup>1</sup>H de 3 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  
 $\delta$  6,85 (ddd, <sup>3</sup>J = 10 Hz; <sup>3</sup>J = 2,7 Hz, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, H3)  
 $\delta$  6,05 (dd, <sup>3</sup>J = 10 Hz; <sup>4</sup>J = 2,7 Hz, H2)  
 $\delta$  5,35 (t., <sup>2</sup>J = 7,7 Hz  $\cong$  <sup>2</sup>J = 7,7 Hz, H16 $\beta$ )  
 $\delta$  4,81 (dd, <sup>3</sup>J = 9,5 Hz; <sup>3</sup>J = 1,2 Hz, H7)  
 $\delta$  4,30 (dd, <sup>3</sup>J = 3,4 Hz; <sup>3</sup>J = 12 Hz, H22)  
 $\delta$  3,40 (d, <sup>3</sup>J = 1,2 Hz, H6)  
 $\delta$  3,00 (dt, <sup>2</sup>J = 19,2 Hz; <sup>4</sup>J = 2,7 Hz; H4 $\beta$ )  
 $\delta$  1,95 (dd, <sup>2</sup>J = 19,2 Hz; <sup>3</sup>J = 6 Hz; H4 $\alpha$ )

### Vitanolídeo (4):

7 $\beta$  etoxi- 5 $\beta$ ,6 $\beta$ - epoxi-20*R*- hidroxi-1-oxo-vita-2,24- dienolídeo.

Dados físicos: Óleo a temperatura ambiente, IV  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3425, 1687; RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C ver Tabela 12, página 41.

### Vitanolídeo (5):

7 $\beta$ -acetoxi, 16 $\alpha$ - etoxi -5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-20*R*-hidroxi-1-oxo-vita-2,24-dienolídeo.

Dados físicos: Óleo a temperatura ambiente, IV  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3408, 1682; RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, ver Tabela 12.

#### 6.2.4- Obtenção dos derivados e dados físicos.

Compostos 1a e 2a (Acetilação de 1 e 2).

O vitanolídeo 1 (20 mg) foi adicionado a um balão de 50 mL e então dissolvido em 2 mL de acetato de etila. A seguir adicionou-se 1mL de anidrido acético- piridina (1:1), iniciando-se agitação e deixando reagir por 5h. A reação foi

acompanhada por CCD até a reação de todo material. O mesmo procedimento foi adotado para o vitanolídeo 2. Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  : Tabela 19.

Composto 1b – (Redução de 1).

Inicialmente verificou-se se o agente redutor (borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ )) estava ativo, adicionando-se o mesmo em pequena quantidade de metanol e aquecendo levemente. A solução liberou pequenas bolhas mostrando que o  $\text{NaBH}_4$  estava ativo. O composto 1 (20 mg) foi dissolvido em metanol e mantido em agitação, a seguir adicionou-se uma pequena porção (5mg) de  $\text{NaBH}_4$  observando-se a liberação de gás. A mistura foi então aquecida em banho-maria até ebulição por dois minutos. Após o término da reação procedeu-se o trabalho de purificação de 1b, utilizando-se CCDP, eluindo-se três vezes uma mistura de acetato/ tolueno/ácido acético (8:2:0,1), e obtendo-se 10 mg de 1b. Dados físicos: Pf: óleo a temperatura ambiente. RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 19) : RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) sinais principais:  $\delta$ :4,85 (dd,  $J=9,0$  Hz, 2,0 Hz, H7), 4,2 (dd,  $J=3,4$  Hz, 12,5 Hz, H22), 3,7 m (H4), 3,1 (d,  $J=2$  Hz, H6), 3,2 (dd, H1). COSY observar tabela 18.

Tabela 18- Correlações observadas no espectro COSY de 1b.

| Hidrogênio ( $\delta$ ) | Hidrogênio correlacionado ( $\delta$ ) |
|-------------------------|--|
| H-4 (3,7)               | H-3 (2,0)                              |
| H-22 (4,2)              | H-23 (2,4), H-23 (2,2)                 |
| H-7 (4,8)               | H-8 (1,8)                              |
| H-7 (4,8)               | H6 (3,2)                               |

Composto 1c ( oxidação de 1).

Inicialmente foi necessário a obtenção de óxido de manganês ( $\text{MnO}_2$ ) ativado, uma vez que o óxido de manganês comercial não é adequado para síntese. Prepara-se uma solução contendo 5g  $\text{KMnO}_4$  em 10 mL de água, esta é adicionada a uma solução contendo 5g de  $\text{MnSO}_4$  em 20 mL de água, numa temperatura de  $90^\circ\text{C}$ . A mistura é mantida em agitação por 20 min, seguindo-se então a filtração do

óxido de manganês em papel de filtro (composto de cor marron avermelhada). O precipitado é lavado com 90 mL de água e em seguida com 90 mL de acetona. O sólido obtido é então seco em estufa a 100 °C por 2hs. O MnO<sub>2</sub> agora ativado deve ser utilizado prontamente, pois a sua atividade diminui com o passar do tempo.

Segundo a literatura (Counsell *et al.*, 1962) este óxido de mangânes preparado por este método é ativado por até um mês desde que guardado em frasco bem vedado e em dessecador.

Oxidação de 1 : 200 mg de MnO<sub>2</sub> obtido conforme descrito anteriormente foram adicionados numa solução contendo 50 mg de 1 em 20 mL de acetona, a mistura foi adicionada a um balão de 50 mL e então mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24h. Após filtração e recristalização com metanol, obtivemos (20 mg) de 1c. Dados físicos Pf: 137-140 °C RMN <sup>1</sup>H(CDCl<sub>3</sub>): sinais principais: δ:7,6 (s, H2 e H3), 5,2 (dd, *J*= 9,0 Hz, 2,0 Hz, H7), 4,5 (dd, *J*= 3,0 Hz, 12,0 Hz, H22), 3,8 (d, *J*= 2 Hz, H6). RMN <sup>13</sup>C observar tabela 20.

Oxidação de 2 : A partir de 20 mg de 2 e seguindo-se o mesmo procedimento anterior, obteve-se 7 mg de 2b . Dados físicos Pf: 140-143 °C. Sinais principais RMN <sup>1</sup>H: δ:6,9 (s, H2 e H3), 5,4 (t, *J*= 7 Hz, H16β), 4,2 (dd, *J*= 3,0 Hz, 12,0 Hz, H22), 3,6 (d, *J*=2 Hz, H6).

#### Composto 1d (Hidrogenação de 1).

O composto 1 (50 mg) foi hidrogenado sobre Pd/C (10%) utilizando-se como solvente acetato de etila. O processo consiste em passar uma corrente de H<sub>2</sub> (g) gerado através de reação de Alumínio metálico com solução aquosa de NaOH a 5% , na mistura contendo o vitanolídeo 1 e o catalisador Pd/C em acetato de etila a temperatura ambiente. Após 90 min de reação procedeu-se o trabalho de purificação de 1d, utilizando-se CCDP, eluindo-se três vezes uma mistura de acetato de etila/ tolueno (8:2), e obtendo-se 30 mg de 1d. Dados físicos: RMN <sup>13</sup>C : Tabela 20.

Sinais principais RMN <sup>1</sup>H : δ 4,9 (dd), δ 4,2 dd, δ 3,5 (m) e δ 3,3ppm (d).

Tabela 19 - Deslocamentos químicos de RMN  $C^{13}$  e RMN  $H^1$  para os derivados 1b, 1a e 2a.

| C      | 1b             | 1a             | 2a             |                 |                        |
|--------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------------|
|        | $\delta^{13}C$ | $\delta^{13}C$ | $\delta^{13}C$ | carbono         | $\delta H^1$ (J in Hz) |
| 1      | 75,5           | 201,0          | 201,0          | C=O             |                        |
| 2      | 26,5           | 134,0          | 134,0          | CH              | 6.20 d ( 10,1)         |
| 3      | 26,0           | 140,0          | 140,1          | CH              | 6.96 dd ( 5.7 ; 10.1)  |
| 4      | 74,5           | 71,0           | 71,0           | CH              | 3.80 d ( 5.7)          |
| 5      | 68,0           | 64,0           | 64,0           | C               |                        |
| 6      | 61,7           | 60,5           | 60,8           | CH              | 3.40 d ( 1.8)          |
| 7      | 75,6           | 74,5           | 74,5           | CH              | 4.80 dd ( 1.8; 9.3)    |
| 8      | 34,5           | 34,0           | 33,5           | CH              | 1.87                   |
| 9      | 47,5           | 44,0           | 43,0           | CH              | 1.28                   |
| 10     | 43,0           | 48,0           | 47,5           | C               |                        |
| 11     | 22,6           | 21,8           | 21,0           | CH <sub>2</sub> | 1.94                   |
| 12     | 40,1           | 39,0           | 40,0           | CH <sub>2</sub> | 1.38                   |
| 13     | 44,0           | 44,0           | 43,5           | C               |                        |
| 14     | 56,0           | 55,5           | 53,0           | CH              | 1.75                   |
| 15     | 25,2           | 25,4           | 34,0           | CH <sub>2</sub> | 5.4                    |
| 16     | 30,0           | 28,0           | 75,5           | CH              | 1.36                   |
| 17     | 54,5           | 53,8           | 59,5           | CH              | 1.40                   |
| 18     | 14,8           | 13,3           | 14,7           | CH <sub>3</sub> | 0.88                   |
| 19     | 14,1           | 15,5           | 16,0           | CH <sub>3</sub> | 1.44                   |
| 20     | 75,5           | 75,2           | 75,6           | C               |                        |
| 21     | 21,0           | 20,5           | 20,9           | CH <sub>3</sub> | 1.90                   |
| 22     | 81,5           | 80,7           | 81,0           | CH              | 4.2 dd ( 3.6; 13.0)    |
| 23     | 31,7           | 31,8           | 30,5           | CH <sub>2</sub> | 2.4; 2.05              |
| 24     | 148,0          | 148,2          | 149,0          | C               |                        |
| 25     | 121,5          | 122,0          | 122,5          | C               |                        |
| 26     | 165,0          | 166,0          | 166,0          | C=O             |                        |
| 27     | 12,4           | 12,4           | 12,5           | CH <sub>3</sub> | 1.88                   |
| 28     | 21,1           | 20,7           | 20,7           | CH <sub>3</sub> | 1.30                   |
| 4- OAc |                | 169,0          | 170,0          | C=O             |                        |
| 4- OAc |                | 20,6           | 21,0           | CH <sub>3</sub> | 2,00                   |
| 7- OAc | 170,0          | 171,0          | 170,5          | C               |                        |
| 7- OAc | 22,0           | 21,3           | 21,6           | CH <sub>3</sub> | 2.10                   |
| 16-OAc |                |                |                |                 | 1,96                   |

Tabela 20- Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  para 1c e 1d.

| C     | 1c                    |                 | 1d                    |
|-------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
|       | $\delta^{13}\text{C}$ | Tipo de C.      | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 1     | 202,0                 | C=O             | 210,0                 |
| 2     | 139,0                 | CH              | 31,8                  |
| 3     | 142,0                 | CH              | 26,5                  |
| 4     | 193                   | C=O             | 72,5                  |
| 5     | 65,5                  | C Quat.         | 70,0                  |
| 6     | 63,8                  | CH              | 57,0                  |
| 7     | 74,0                  | CH              | 75,8                  |
| 8     | 33,5                  | CH              | 34,2                  |
| 9     | 43,3                  | CH              | 43,0                  |
| 10    | 48,8                  | C Quat.         | 49,8                  |
| 11    | 22,3                  | CH <sub>2</sub> | 22,8                  |
| 12    | 39,8                  | CH <sub>2</sub> | 39,8                  |
| 13    | 42,8                  | C Quat.         | 43,5                  |
| 14    | 55,5                  | CH              | 52,0                  |
| 15    | 24,0                  | CH <sub>2</sub> | 25,0                  |
| 16    | 27,0                  | CH <sub>2</sub> | 31,8                  |
| 17    | 53,9                  | CH              | 54,0                  |
| 18    | 13,5                  | CH <sub>3</sub> | 13,5                  |
| 19    | 19,2                  | CH <sub>3</sub> | 15,3                  |
| 20    | 75,0                  | C               | 76,0                  |
| 21    | 20,6                  | CH <sub>3</sub> | 20,8                  |
| 22    | 81,1                  | CH              | 81,0                  |
| 23    | 31,5                  | CH <sub>2</sub> | 31,8                  |
| 24    | 148,0                 | C Quat.         | 148,0                 |
| 25    | 122,5                 | C Quat.         | 122,0                 |
| 26    | 167,0                 | C=O             | 167,0                 |
| 27    | 12,5                  | CH <sub>3</sub> | 12,4                  |
| 28    | 21,0                  | CH <sub>3</sub> | 20,7                  |
| 4-OAc |                       |                 | 171,5                 |
| 4-OAc |                       |                 | 22,0                  |
| 7-OAc | 172,1                 | C=O             | 171,0                 |
| 7-OAc | 21,5                  | CH <sub>3</sub> | 21,3                  |

### 6.3 - TESTES BIOLÓGICOS (Realizados na Universidade de Illinois)

#### 6.3.1 – Avaliação da atividade citotóxica ( Likhitwitayawuid, 1993)

Foram realizados testes de atividade anti-câncer, no extrato etéreo, vitanolídeos isolados e derivados, de acordo com procedimentos padrões contra os seguintes tipos de câncer: mama, pulmão, cólon, próstata e pele.

#### 6.3.2 – Avaliação da atividade Quimiopreventiva

Os vitanolídeos 1, 2 e 3 foram avaliados através do teste de quinona redutase (Kennelly et. al. 1997, Song et. al.1999) como indutores da enzima Quinona redutase, utilizando-se células hepatoma de ratos Hepa 1c1c7.

## 7 - CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das folhas de *A. arborescens* permitiu o isolamento de cinco vitanolídeos, quatro deles inéditos. A análise da literatura mostrou 2 e 3 como sendo os primeiros vitanolídeos registrados contendo grupos acetoxi em C-7 e C-16.

Os compostos 4 e 5, isolados no extrato etanólico, embora inéditos parecem ser artefatos obtidos no processo de extração com etanol. O estudo de de-replicação do extrato etéreo mostrou a presença de seis substâncias ativas contra câncer nesta fração, destas isolamos 1, 2 e 3 (tabela 13). Estas mesmas substâncias, mais os vitanolídeos 4 e 5 (isolados no extrato etanólico), foram testados em câncer contra vários tipos de células cancerosas. Os resultados nos permitiram concluir que os vitanolídeos 1 e 2 são os mais ativos componentes em câncer, com destaque para 1 em câncer de cólon. Através do teste de indução de quinona redutase em 1 e 2, pudemos observar que os vitanolídeos não só inibem o desenvolvimento do câncer como também previnem a sua formação. Derivados sintéticos de 1 e 2, foram obtidos visando acentuar a atividade anti-câncer dos vitanolídeos. O derivado 1a (acetilado no C-4) teve a sua atividade reduzida de cinco e quinze vezes, nos cânceres de mama e cólon, mas aumentou sua atividade dez vezes nas células de câncer de pulmão. Comportamento semelhante se observou na atividade de 2a. O

sistema conjugado 2-en-1-ona mostrou-se importante na atividade dos vitanolídeos, pois quando realizamos a redução da carbonila (C1) e dupla ligação em 1, obtendo-se o derivado 1b, percebemos uma diminuição significativa nos valores de atividade biológica em todos os tipos de células cancerosas.

No derivado 1d, observamos melhora de duas vezes na atividade contra câncer de pulmão, mas a atividade caiu nos outros tipos de células. O derivado 1c que poderia representar uma melhora na atividade, pela incorporação de uma carbonila, não apresentou nenhum aumento na atividade nas células testadas, entretanto percebemos uma certa seletividade na atividade de determinadas células.

## 8 - BIBLIOGRAFIA

Referências na Internet:

1 - <http://www.quimica.matrix.com.br/exemplar10.html>

2 - <http://www.cancerbacup.org.uk/info/index.htm>

Referências em periódicos e livros:

- 1- Alfonso, D., Kapetanidis, I., Bernardinelli, G. *J. Nat. Prod.* 1991, 54, 1576-1582.
- 2- Ascher, K. R. S.; Nemny, N. E.; Eliyahu, M, Kirson, I.; Abraham, A. e Glotter, E., *Experientia*, 1980, 36, 998.
- 3- Aszalos, A. ; Frost, D. , *Methods in Enzymology: Antibiotics* . Vol 43, Academic Press, New York, 1975, pp 172-209
- 4- Ballini, R.; Barboni, L. e Filippone, P., *Chemistry Lett.* 1997, 5, 475.
- 5- Barata, L. E. S, Tese de mestrado: Um novo vitanolídeo obtido das folhas de *Acnistus arborescens*, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ (CPPN), 1970.
- 6- Barata, L. E. S.; Mors, W. B.; Kirson, I. e Lavie, D. *An. Acad. Brasil. de Cienc.* 1970, 42, 401.

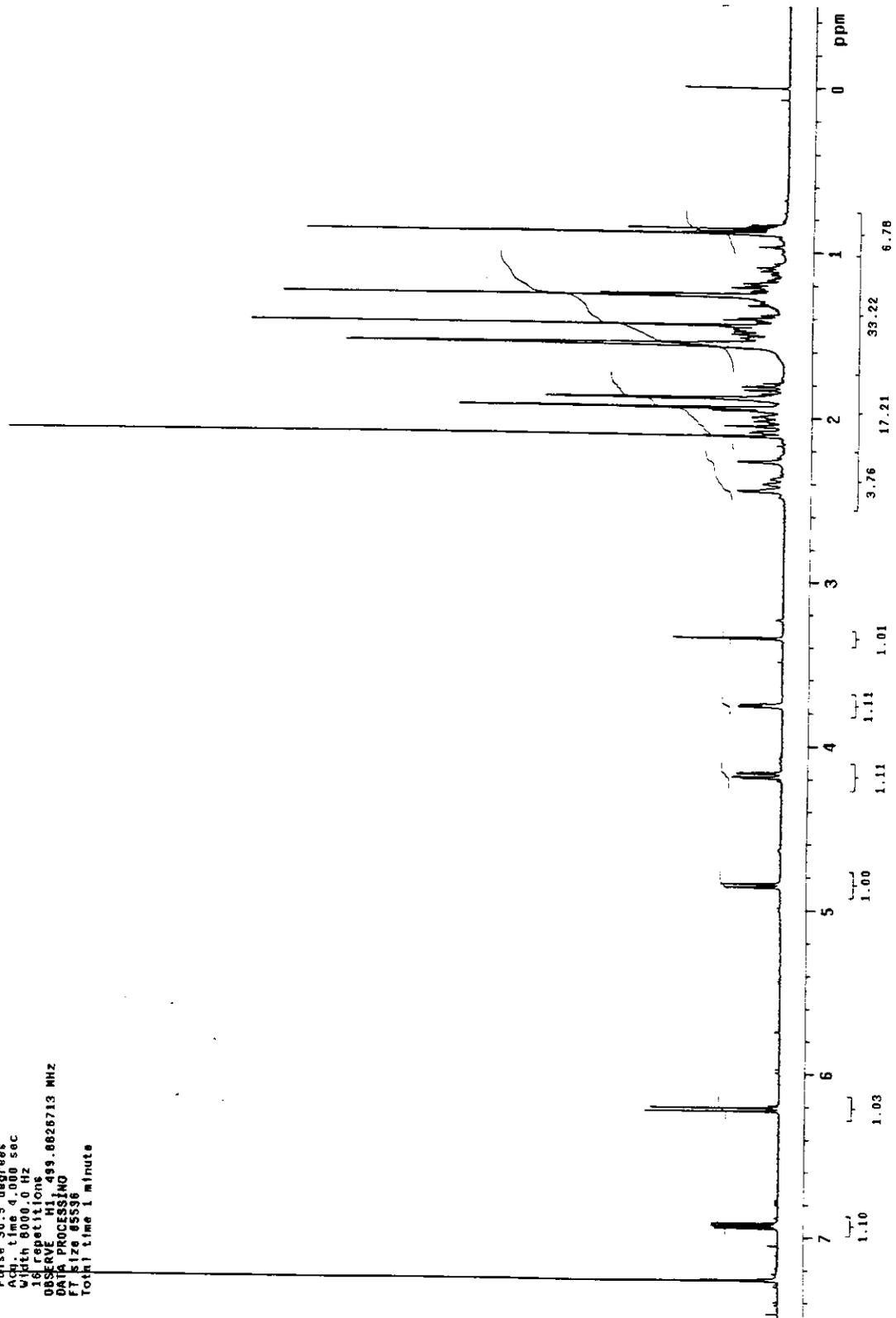
- 7- Barata, L. E. S.; Queiroz, S.; Sales, S. e Ferreira, S. H. "Medicamentos a partir de Plantas Medicinais do Brasil", *Academia Brasileira de Ciências* **1998**.
- 8- Ben-Efraim, S. e Yardem, A., *Antibiot. Chemother.* **1962**, 12, 575.
- 9- Boyd, M.R. *Current Therapy in Oncology* **1992**, 11.
- 10- Chatterjee, S e Chakraborti, S. K., *Antonie van Leeuwenhoek* **1980**, 46, 59.
- 11- Colditz, G. A.; Branch, L. G.; Lipnick, R. J.; Willet, W. C.; Rosner, B. ; Posner, B. M.; Hennekens, C. H., *Am. J. Clin. Nutr.* **1985**, 41, 32-36.
- 12- Cordell, G. A. e Shin, Y. G., *Pure and Applied Chemistry* **1999**, 71, 1089.
- 13- Cordell, G.A.; Beecher, C.W.W.; Pezzuto, J.M., *J. Ethnopharmacol* **1991**, 32, 117.
- 14- Cordell, G.A.; Beecher, C. W.W.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J. M.; Contant, H. L.; Fang, L.; Seo, E. K.; Long, L.; Cui, B.L. e Barrilos, S. *In Studies in Natural Products Chemistry* **1997**, p.749. Atta-ur-Rahman, ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- 15- Counsell, R. E.; Klimstra, P. D. e Colton, F. B., *J. Org. Chem.* **1962**, 27,248.
- 16- Devi, P.U.; Sharada, A.C.; Solomon, F.E. e Kamath, M., *Indian J. Exper. Biol.* **1992**, 30, 169.
- 17- Devi, P.U., *Indian J. Exper. Biol.* **1996**, 34, 927.
- 18- Farnsworth, N.R., *J. Pharm. Sci* **1966**, 55, 225.
- 19- Fernandes, A. M. A.; Prado, A. L.; Barata, L. E. S.; Paulo, M. Q.; Azevedo, N. R. e Ferri, P. H., *Phytochemical Analysis* **1997**, 8, 18-21.
- 20- Fong, H.H.S.; Malone, M.H. e McLauhlin (Eds), *Experiments in the Pharmaceutical Biological Sciences* **1973**, 43.
- 21- Gerhäuser, C.; You, M.; Liu, J.; Mariarty, R.M.; Hawthorne, M.; Mehhta, R. G.; Moon, R. C. e Pezzuto, J. M. *Cancer Res.* **1997**, 57, 272.
- 22- Gil, R.R., Misico, R. I. , Sotes, I.R., Oberti, J.C., Veleiro, A.S., Burton, G. J. *Nat. Prod.* **1997**, 60, 568-572.

- 23- Glotter, E., *Natural Products Reports* **1991**, 8, 415.
- 24- Grosourdy, R. *El Médico Botánico Criollo* **1914**, 52, 260-275 .
- 25- Habtemaraiaam, S. *Phytochemistry* **1993**, 34, 807-811.
- 26- Hill, R.A.; Kirk, D.N.; Makin, H.L.J. and Murphy, G.M. *Dictionary of Steroids-Chemical Data, Structures and Bibliographies* **1991**. Hill, R. A, ed. Chapman & Hall, 1<sup>st</sup> edition, Univ of Glasgow, UK.
- 27- Kennelly, E. J. ; Gerhäuser, C.; Song, L. L., Graham, J. G.; Beecher, C. W. W.; Pezzuto, J. M. e Kinghorn, D. *J. Agric. Food Chem* **1997**, 45, 3771.
- 28- Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R.; Beecher, C.W.W., Soejarto, D. D.; Cordell, G.A.; Pezzuto, J. M.; Wall. M. E.; Wani, M. C.; Brown, D. M.; O'Neill, M. J.; Lewis, J. A. Lewis e Besterman, J. M. *Int. J. Pharmacogn.* **1995**, 33, 48.
- 29- Kupchan, S . M.; Anderson, W. K.; Bollinger, P.; Doskotch, R. W.; Smith, R. M.; Renauld, J. A. S.; Schnoes, H.K.; Burlingame, A.L. e Smith, D. H. *J. Am. Chem. Soc* **1965**, 87, 5805.
- 30- Lavie, D. e Yarden, A. *J. Chem. Soc* **1962**, 2925.
- 31- Lavie, D. ; Greenfield, S. e Glotter, E., *J. Chem. Soc.* **1966**, 1753.
- 32- Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Cordell, G. A. e Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 30.
- 33- March, J. *Advanced Organic Chemistry* **1977**, 1127. *Reactions Mechanisms, and Structure.*
- 34- Ma, C.Y., Williams, I.D., Che, C.T. *J.Nat. Prod.* **1999**, 62, 1445-1447.
- 35- Marini-Bettòlo, G.B.; Nicoletti, M. ; Patamia, M.; Galeffi, C., Messina, I; *J. Chromatogr* **1981**, 213, 113.
- 35- Minguzzi, S; Barata, L.E.S; Shin, G. S.; Chai, H. B.; Park, E. J.; Pezzuto, J. M. e Cordell, G. A. *Phytochemistry* **2002**, 59, 635-641.
- 36- Nittala, S.S.N e Lavie, D. *Phytochemistry* **1981**, 20, 2735.
- 37- Nittala, S.S.; Velde ,V.V.; Frolow, F. e Lavie, D. *Phytochemistry* **1981**, 20, 2547.

- 38- Peckold, T. *Ber.Deut. pharm. Ges.* **1908**, 19, 31.
- 39- Pelletier, S. W.; Mody, N. V.; Nowacki, J. e Bhattacharyya, J., *J. Nat. Prod.* **1979**, 42, 512.
- 40- Rahman, A.; Yousaf, M.; Gul, Qureshi, S.; Choudhary, M. I.; Voelter, W.; Hoff, A. e Naz, A. *Heterocycles* **1998**, 48, 1801.
- 41- Santos, M. A. C. dos e Elisabetsky, E. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **1999**, 2, 7.
- 42- Sendtner , *in Flora Brasiliensis*, XXV, **1817**, 151.
- 43- Sharada, A.C.; Solomon, F. E.; Devi, P. U.; Udupa, N. e Srinivasan, K. K. *Acta Oncologica* **1996**, 35 , 95.
- 44- Song, L. L., Kosmeder II, J.W., Lee, S.K., Gerhäuser, C., Lantvit, D., Moonm R.C., Moriarty, R.M., Pezzuto, J.M., *J. Nat. Prod.* **1999**, 59, 578-585.
- 45- Stahl, E. ; *Thin Layer Chromatography . A Laboratory Handbook.* 2<sup>nd</sup> Edition. Springer, New York, **1969**.
- 46- Syrov, V. N.; Khushbaktova, Z. A. e Vasina, O. E. *Khim. Pharm Zh.* **1989**, 23, 610.
- 47- Vande Velde, V.; Lavie, D. *Phytochemistry* **1981**, 20, 1359.
- 48- Veleiro, A.S.; Burton,G. e Gros, E.G. *Phytochemistry* **1985**, 24, 1799.
- 49- Wattenberg, L. W.; Sparnins, V. L.; Barany, G., *Cancer Res.* **1989**, 49, 2689-2692.
- 50- Yoshida, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K. e Ishiguro, M. *J. Pharm, Dyn.* **1979**, 2, 92.
- 51- Zhang, Y.; Talalay, P.; Cho, C. G.; Posner, G.H.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 2399-2403.
- 52- Zelnik, R., Gottlieb, H. E., Lavie, D. *Tetrahedron* **1981**, 35, 2693.

# APÊNDICE

Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "Inova500"  
 PULSE SEQUENCE  
 Pulse 30.5 degrees  
 Acq. time 4.000 sec  
 Width 6000.0 Hz  
 16 repetitions  
 OBSERVE HI 499.8626713 MHz  
 DATA PROCESSING  
 File size 85536  
 Total time 1 minute



E-1- Espectro de RMN <sup>1</sup>H do vitanolídeo 1.

Sandro NOVI IA cdc13 ago13samNOESY1

Pulse Sequence: NOESY

Solvent: CDC13

Temp. 25.0 C / 298.1 K

File: ago13samNOESY1

INNOVA-500 "amr'sun"

Relax. delay 1.500 sec

Mixing 0.200 sec

Acq. time 0.224 sec

Width 4568.8 Hz

20 Width 4568.8 Hz

80 repetitions

2 x 64 increments

OBSERVE H1, 499.8828220 MHz

DATA PROCESSING

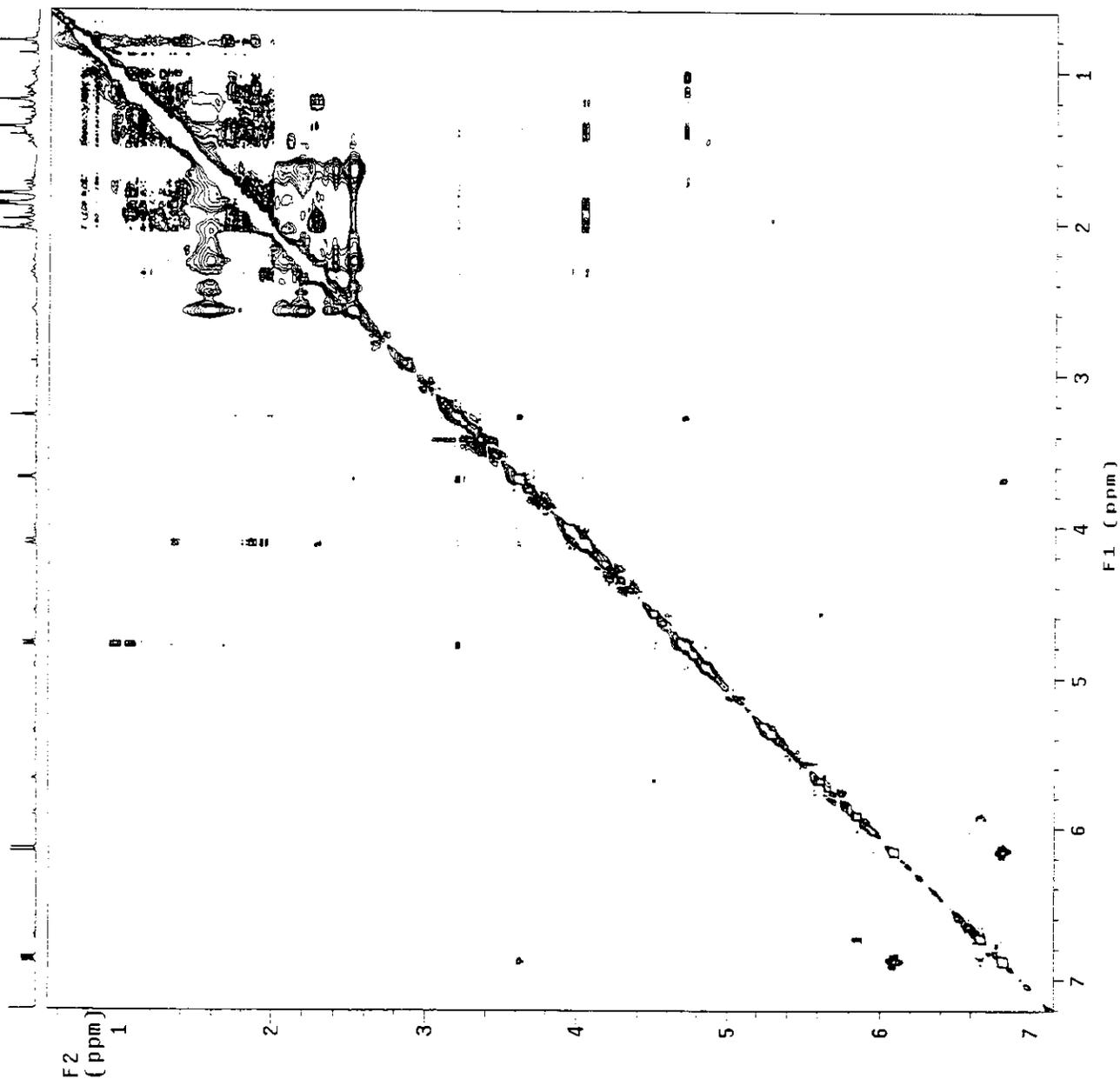
Gauss apodization 0.104 sec

F1 DATA PROCESSING

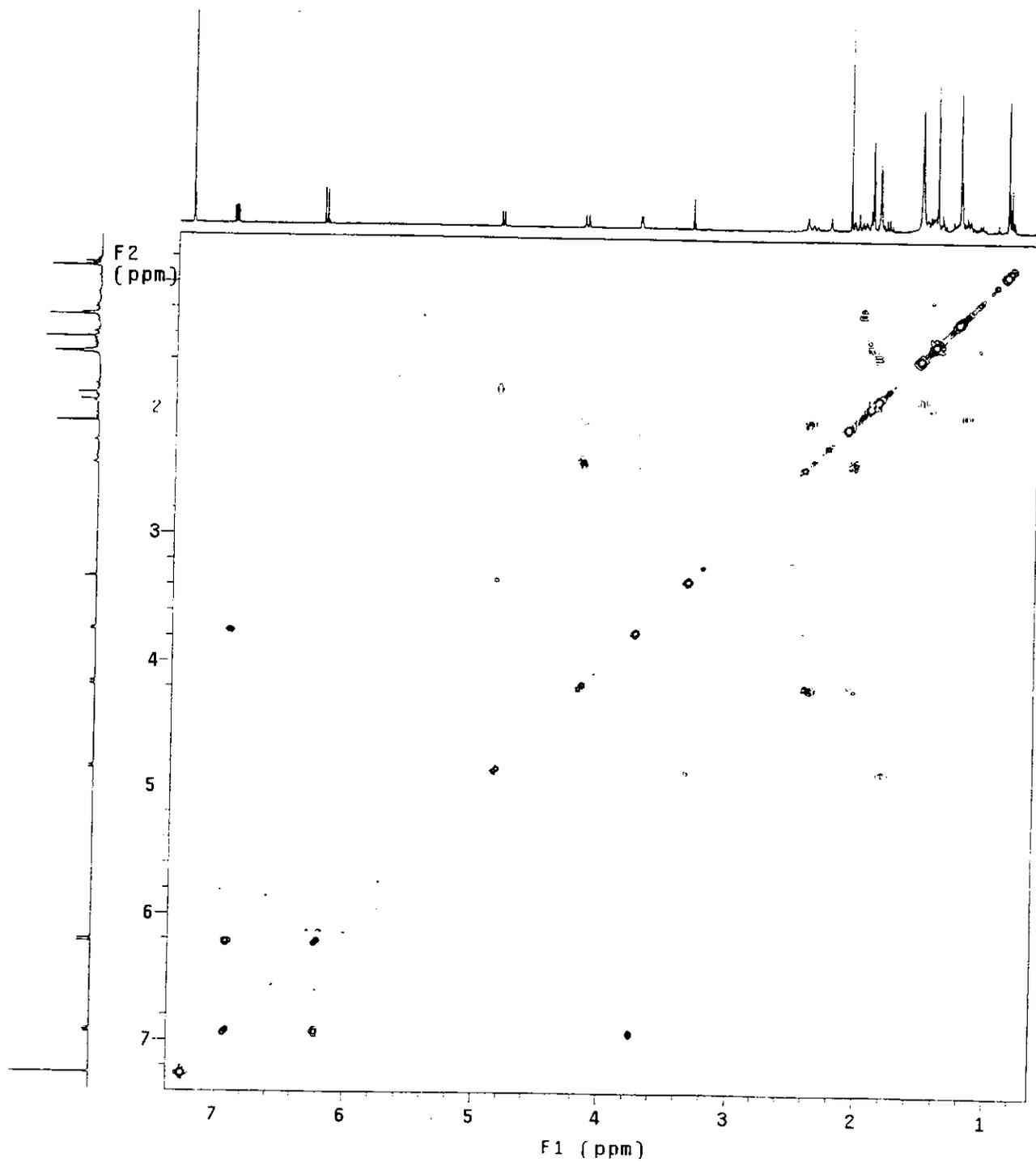
Gauss apodization 0.040 sec

FT size 2048 x 2048

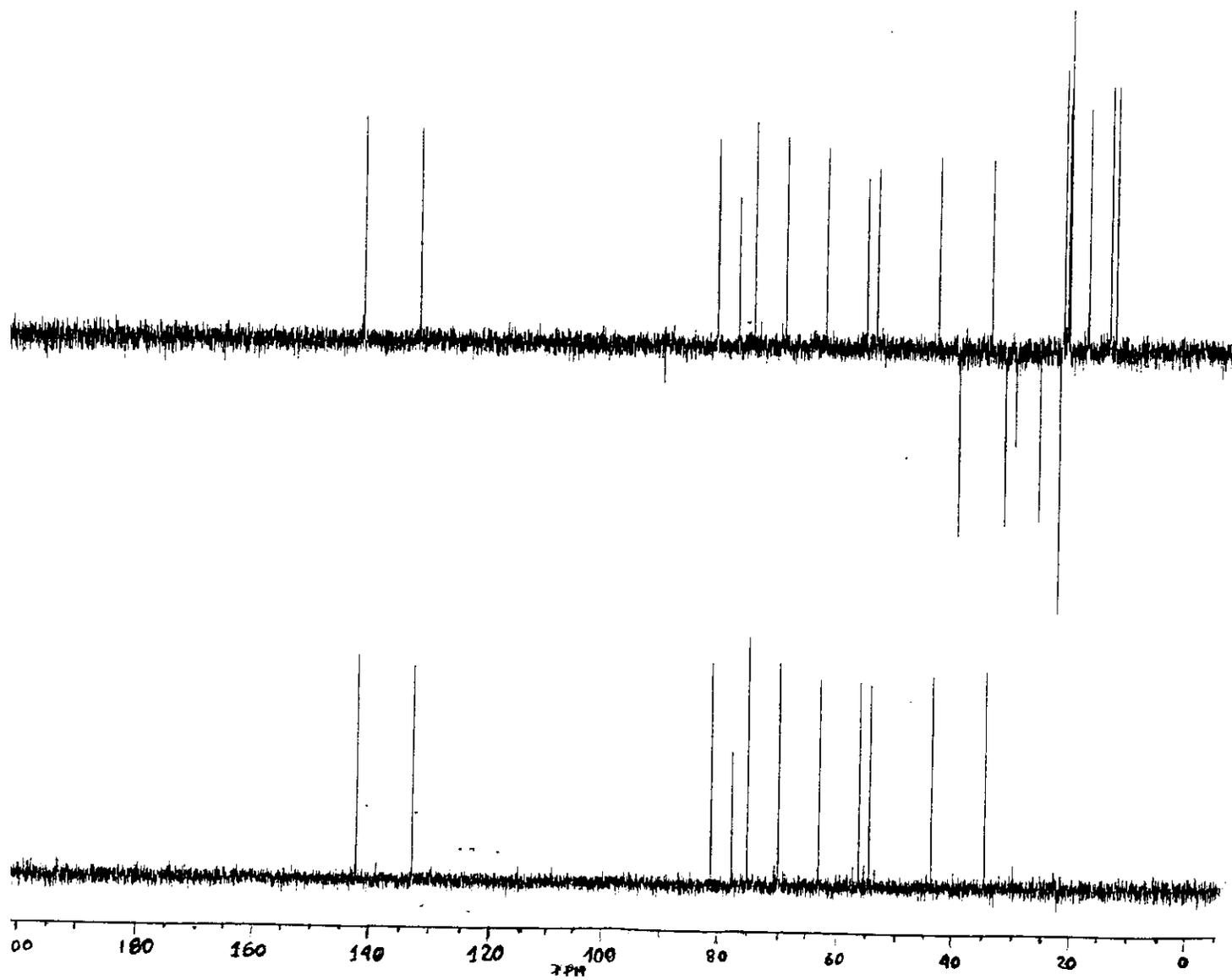
Total time 5 hr, 32 min, 56 sec.



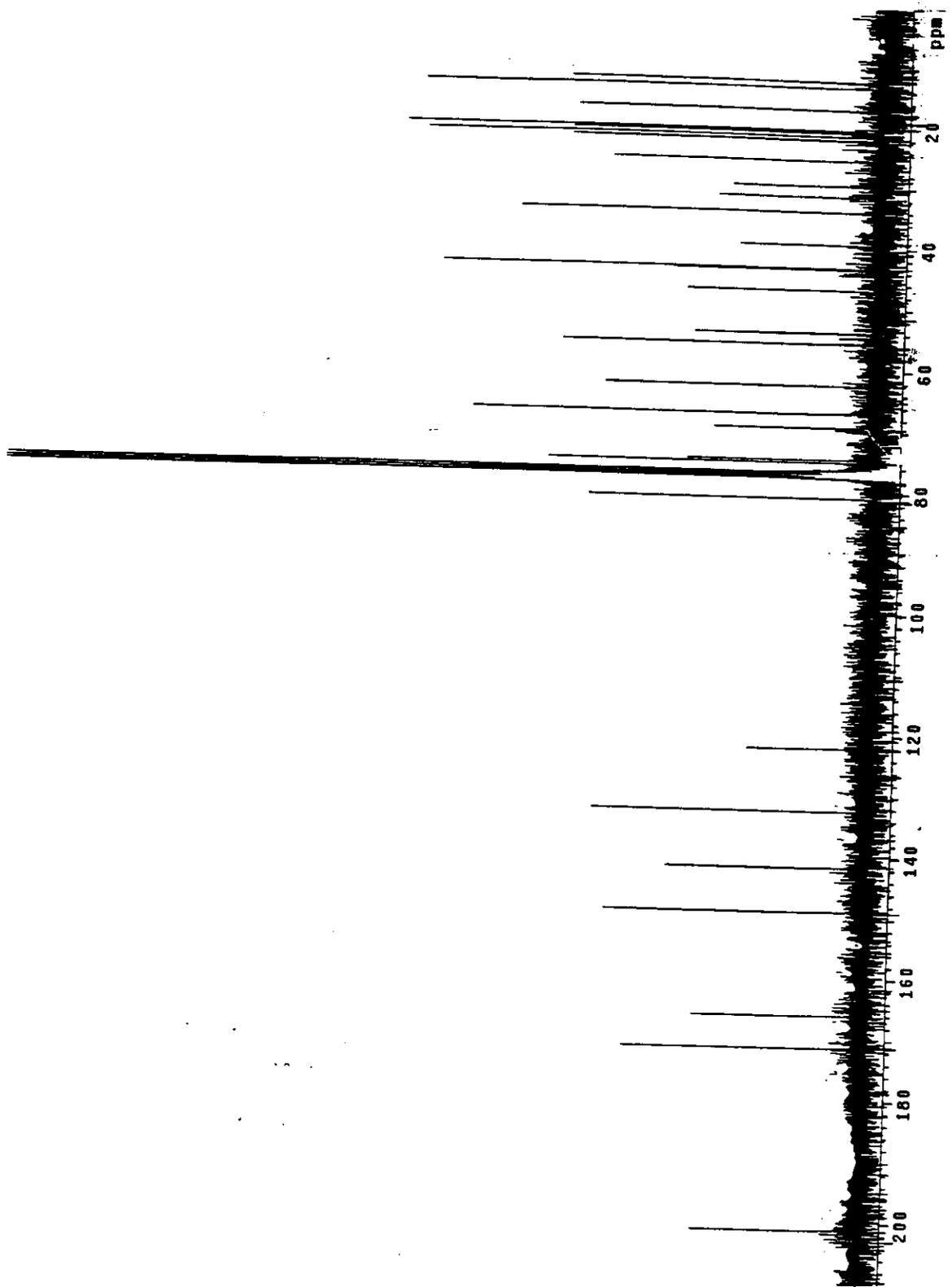
E-1a - Espectro de Noesy do vitanolideo 1.



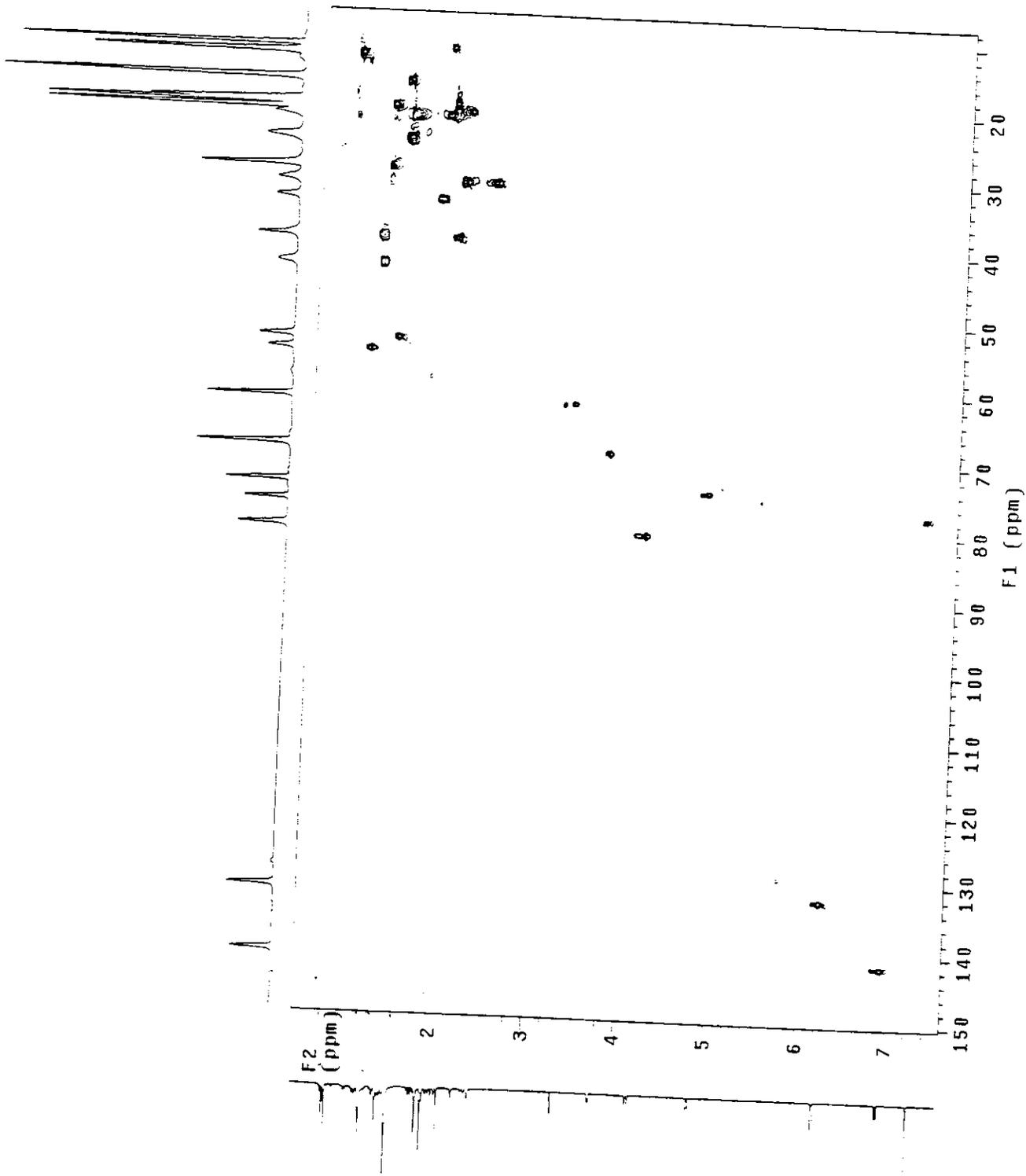
E-2- Espectro de Cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do vitanolideo 1.



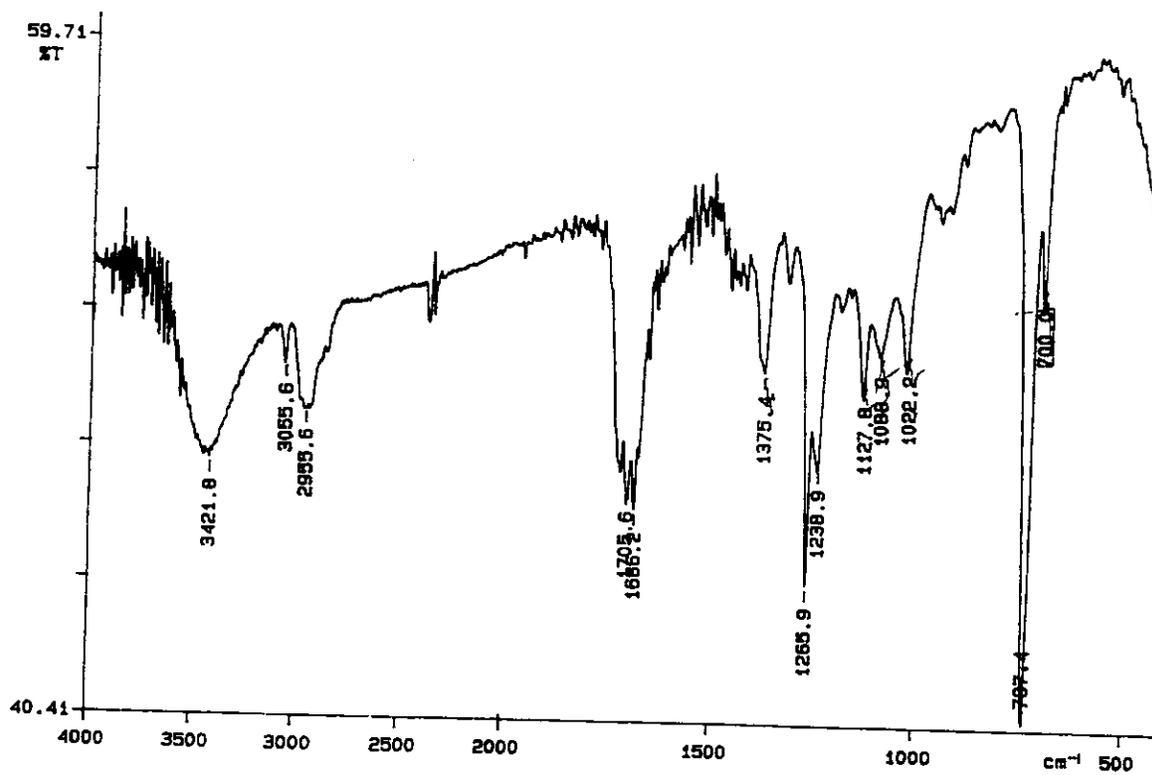
E-3- Espectro DEPT do vitanolideo 1.



E-4- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 1.



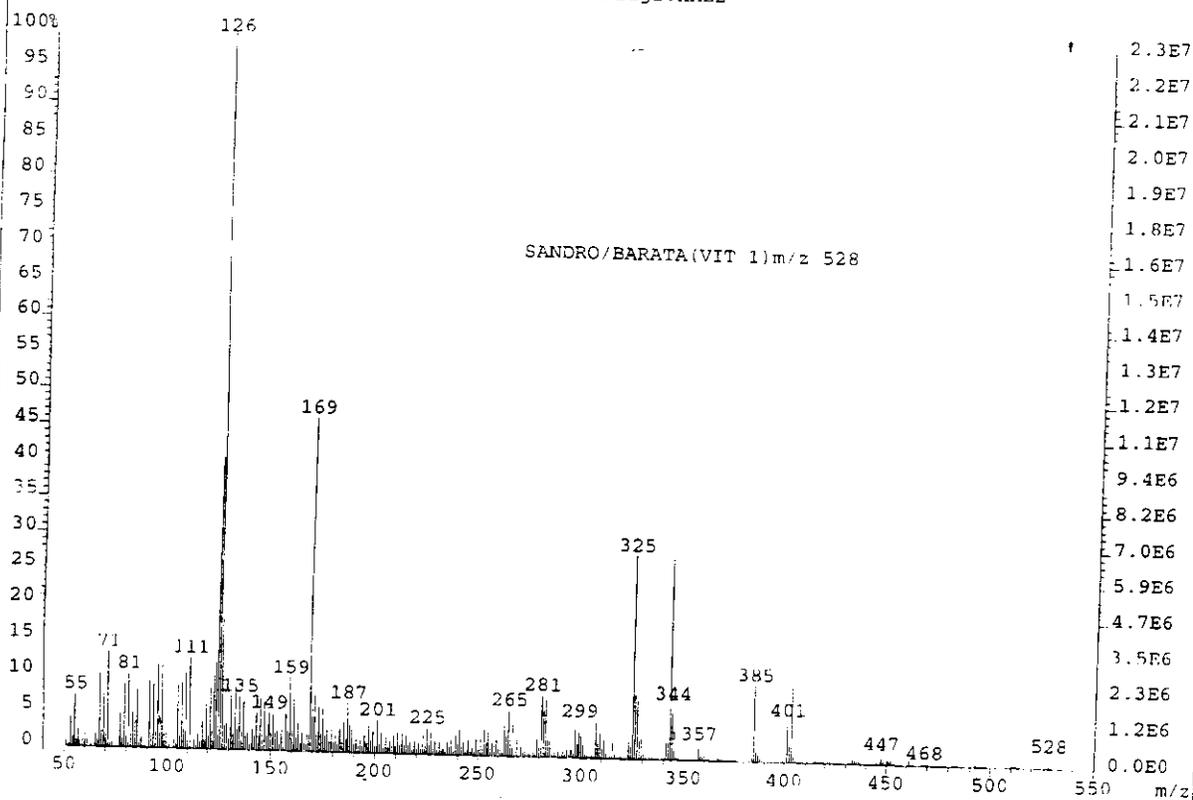
E-5- Espectro HSQC do vitanolídeo 1.



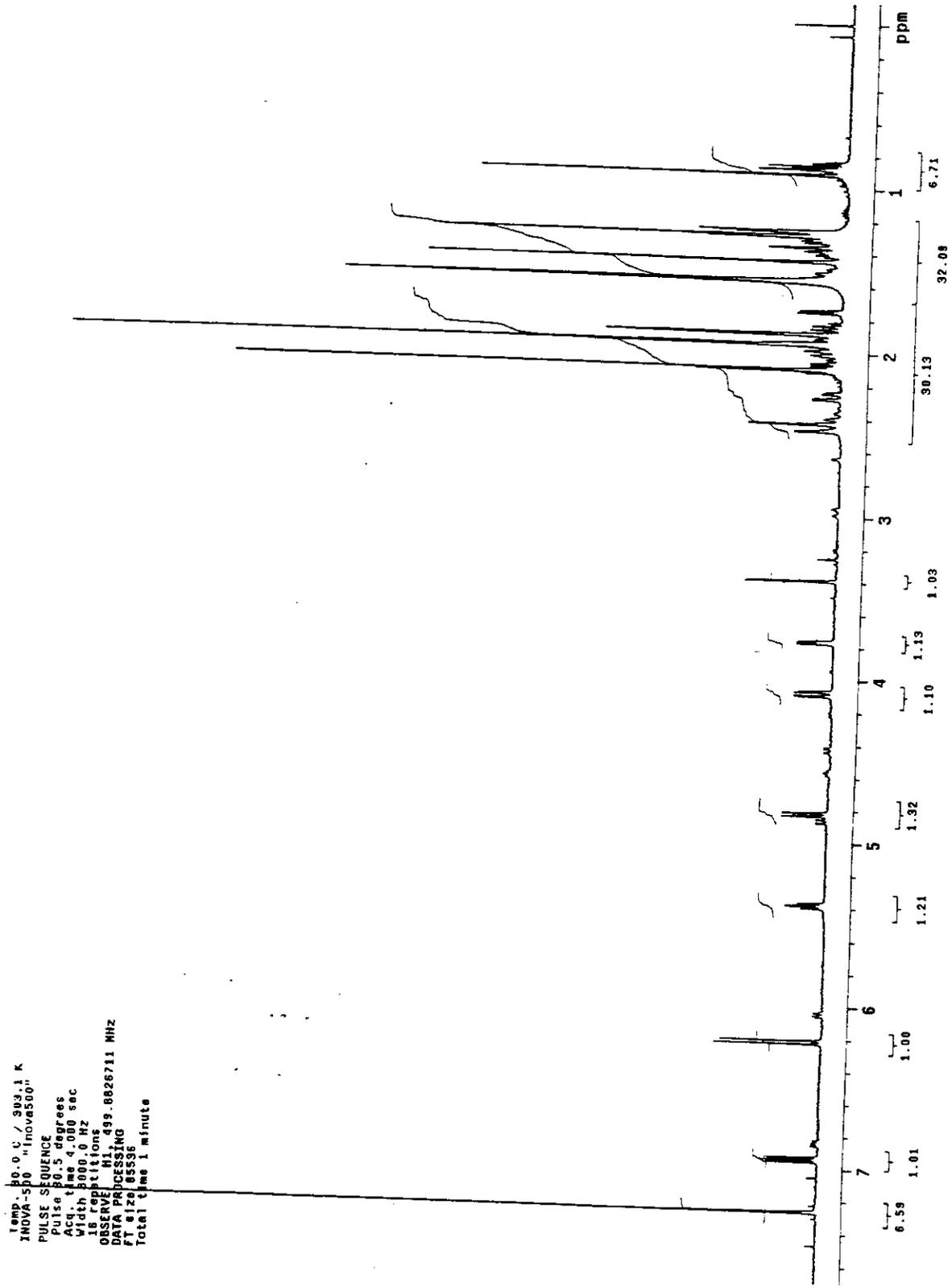
97/11/11 10:04  
X: 4 scans, 4.0cm<sup>-1</sup>. flat. smooth

E-6- Espectro de IV do vitanolídeo 1.

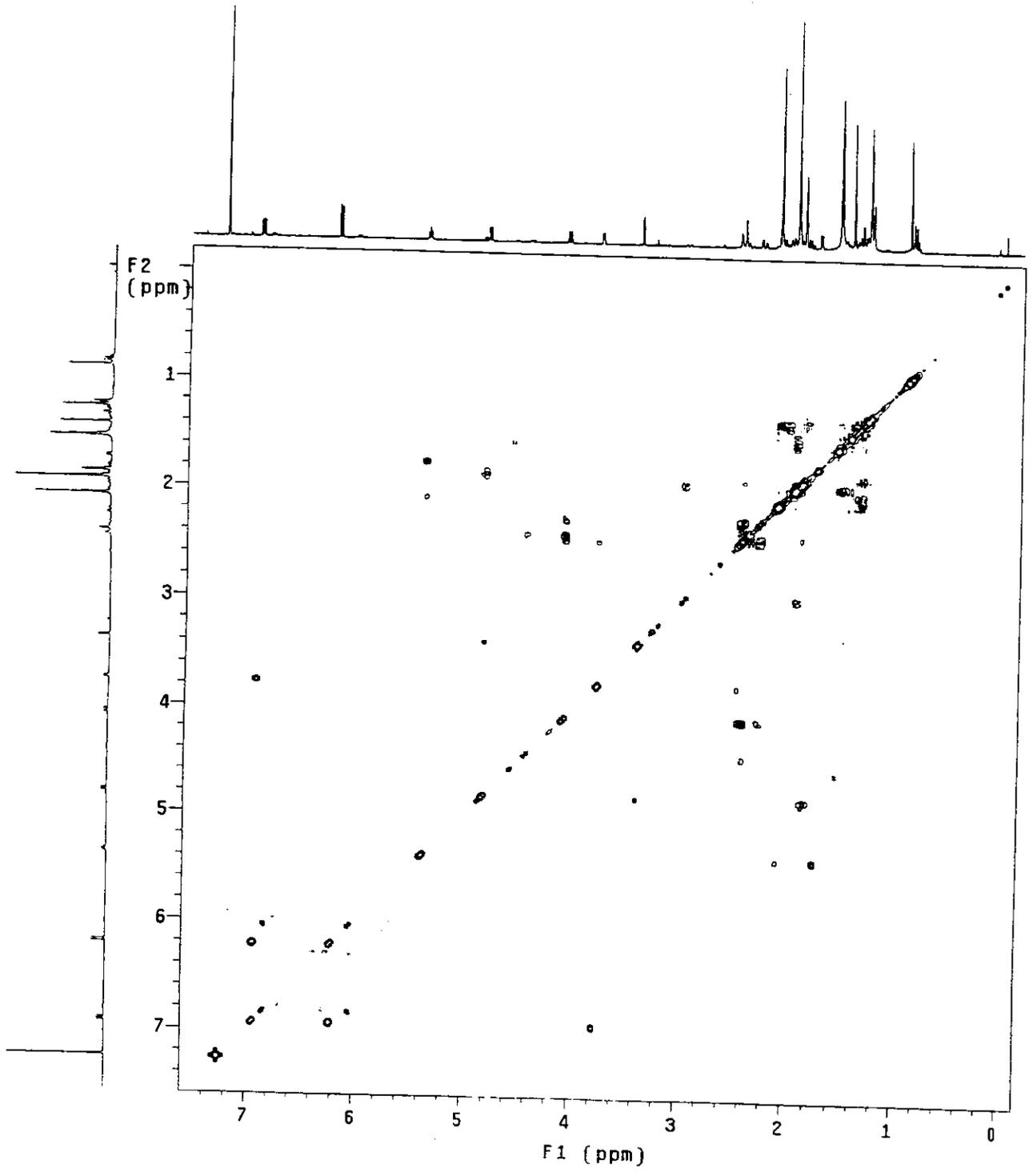
File:NOV2700A Ident:141 Acq:27-NOV-2000 10:10:13 +14:47 Cal:NOV2700  
AutoSpec EI+ Magnet BpI:23482608 TIC:270892000 Flags:HALL



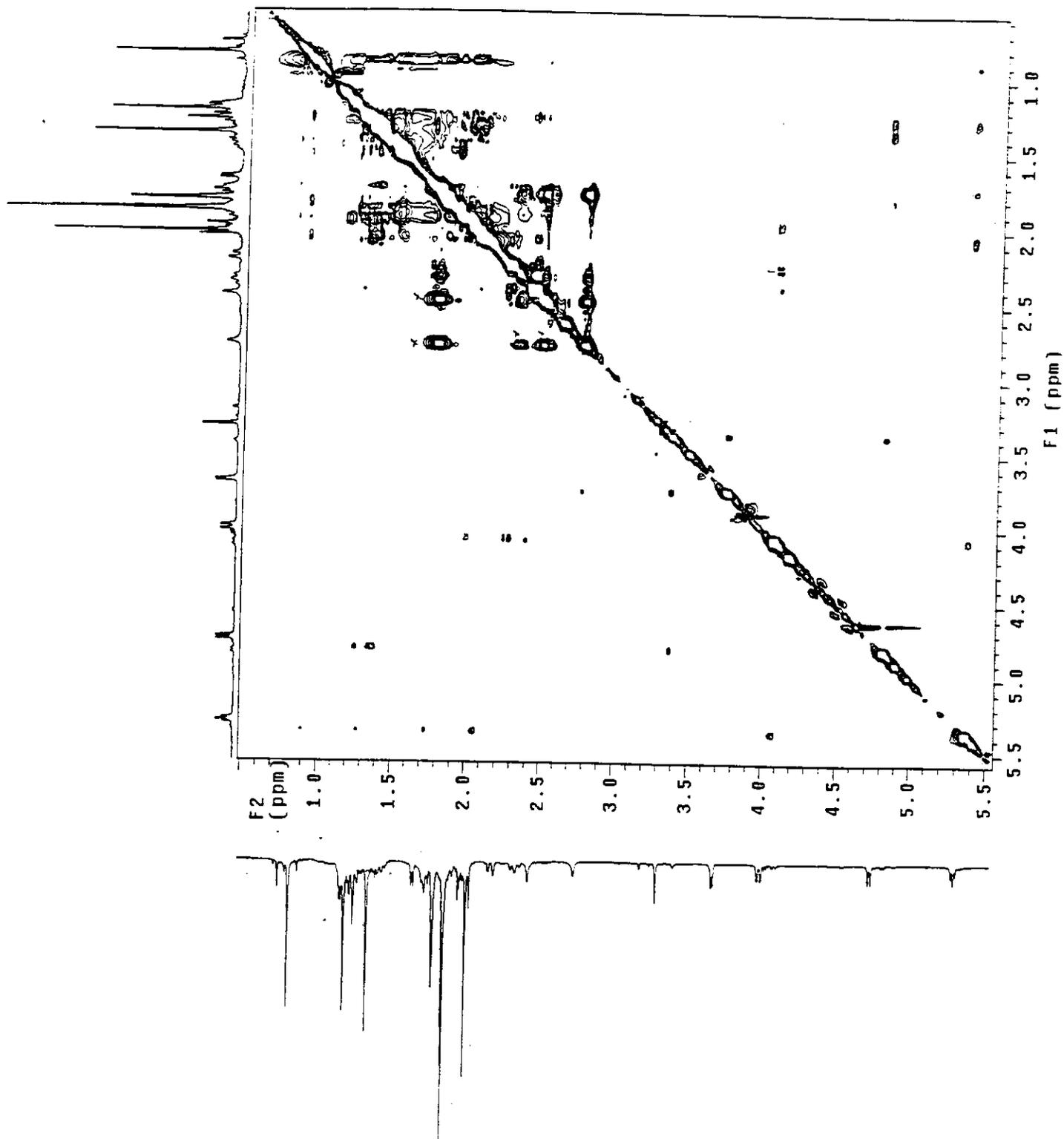
E-7- Espectro de massas do vitanolídeo 1.



E-8- Espectro de RMN <sup>1</sup>H do vitanolídeo 2.

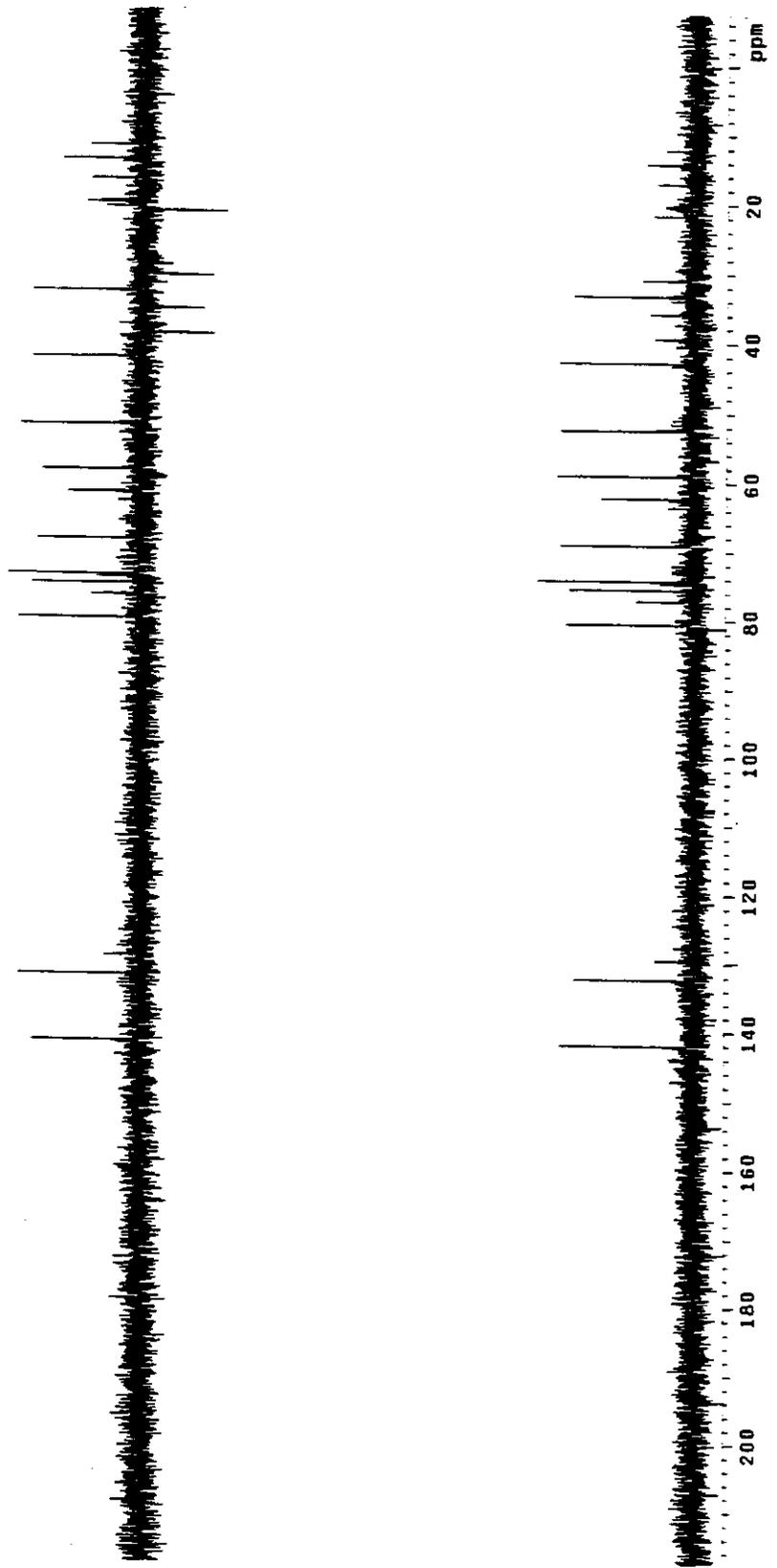


E-9- Espectro de Cosy  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 2.

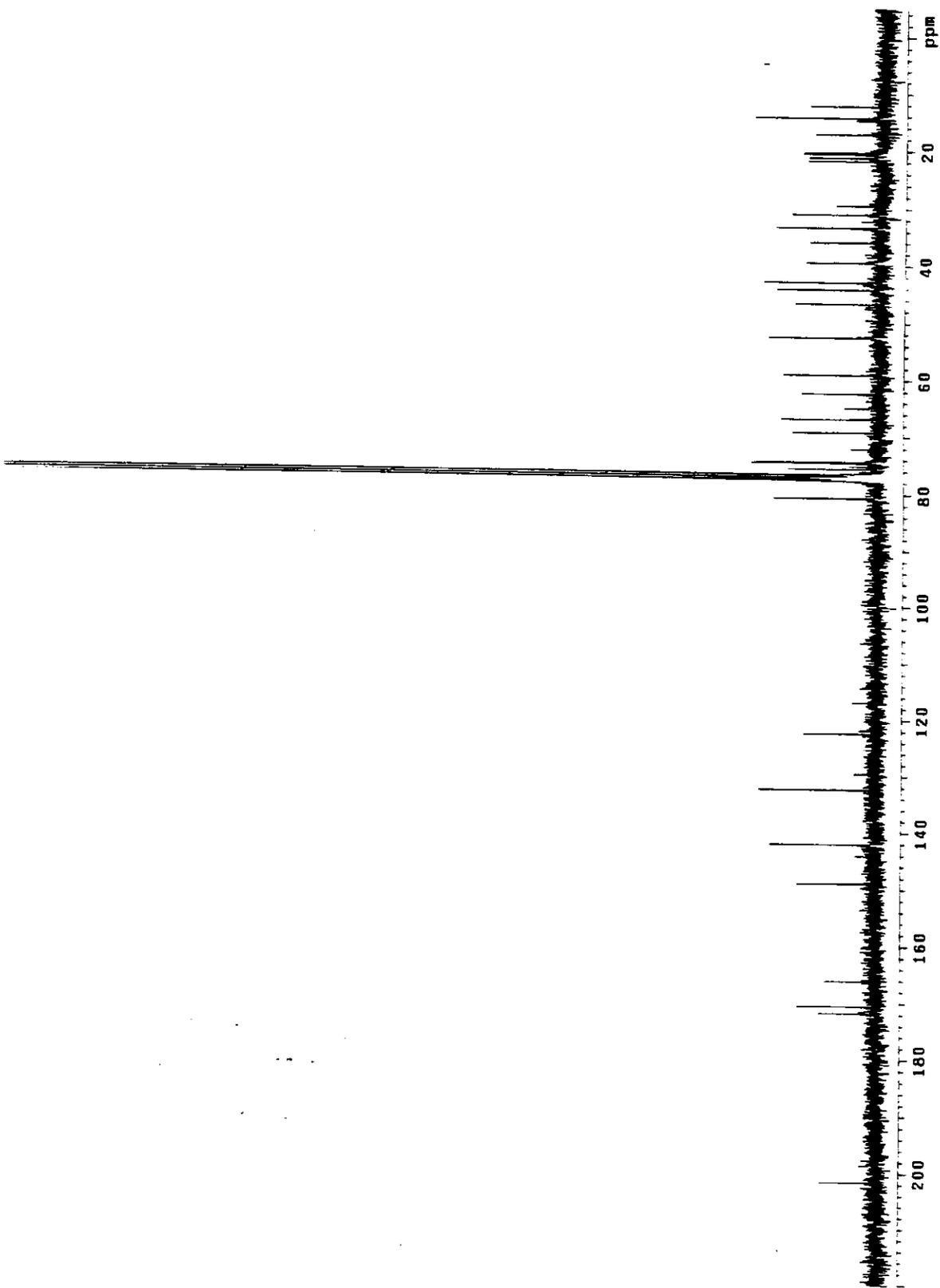


E-9a- Espectro de Noesy do vitanolídeo 2.

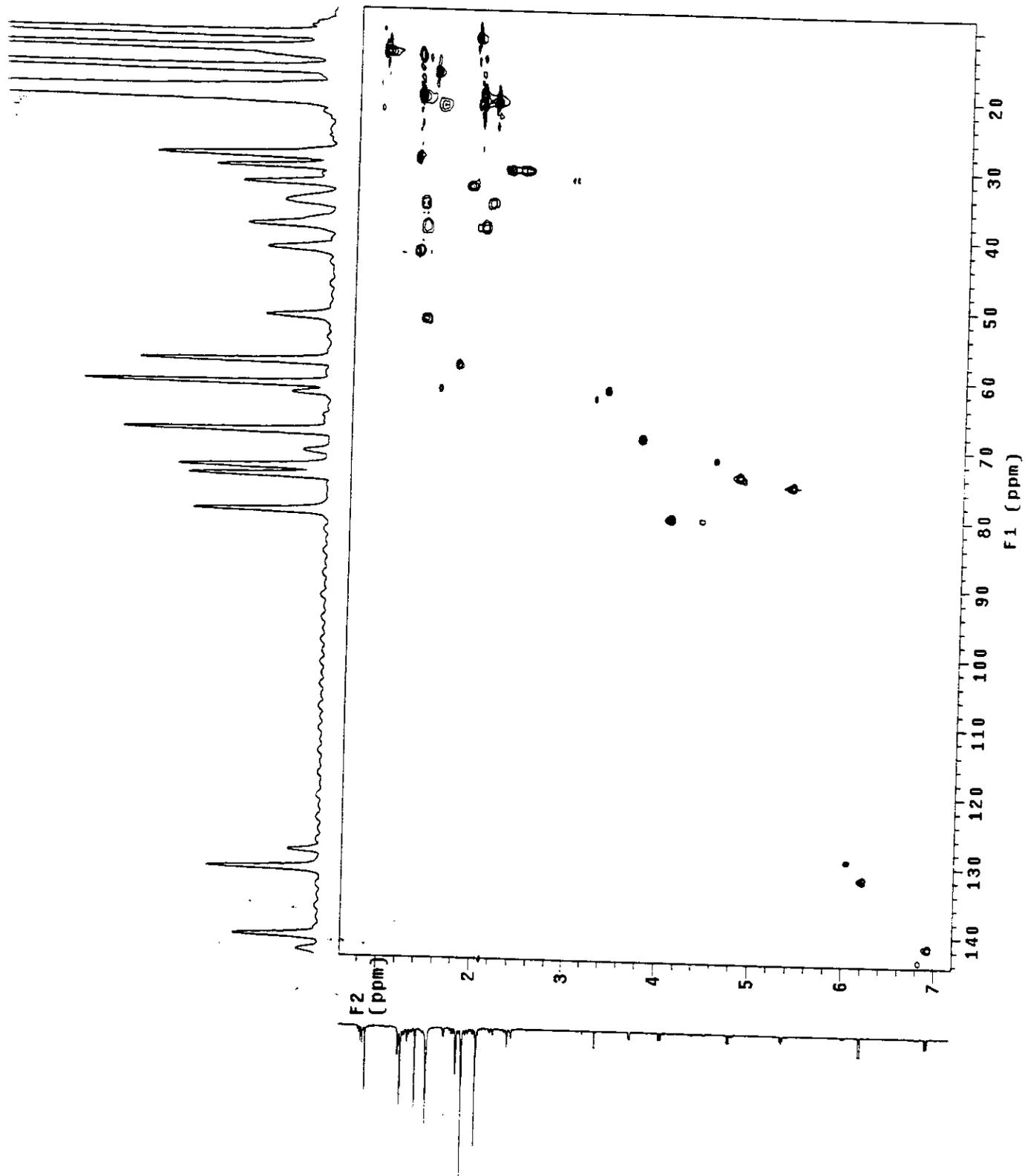
Ambient temperature  
DEMNI-300BB "gemin"  
PULSE SEQUENCE: dept  
Relax delay 1.000 sec  
Pulse prog 1500 sec  
Width 20000 Hz  
9600 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4519823 MHz  
DECOUPLE H1, 300.0664076 MHz  
power 37 dB  
on during acquisition  
off during delay  
VALT2-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 1.0 Hz  
FT size 8536  
Total time 14.0 hours



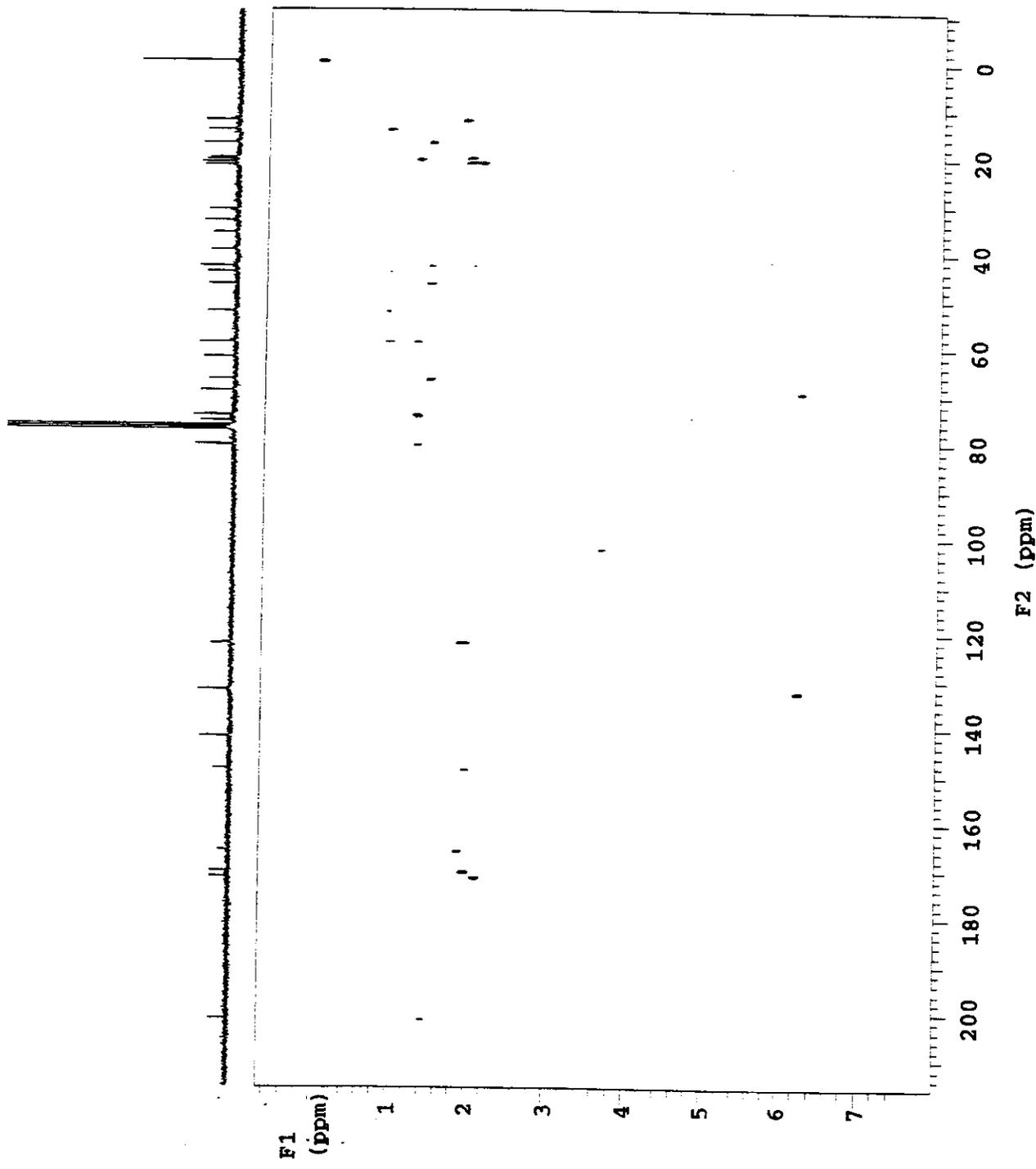
E-10- Espectro DEPT do vitanolídeo 2.



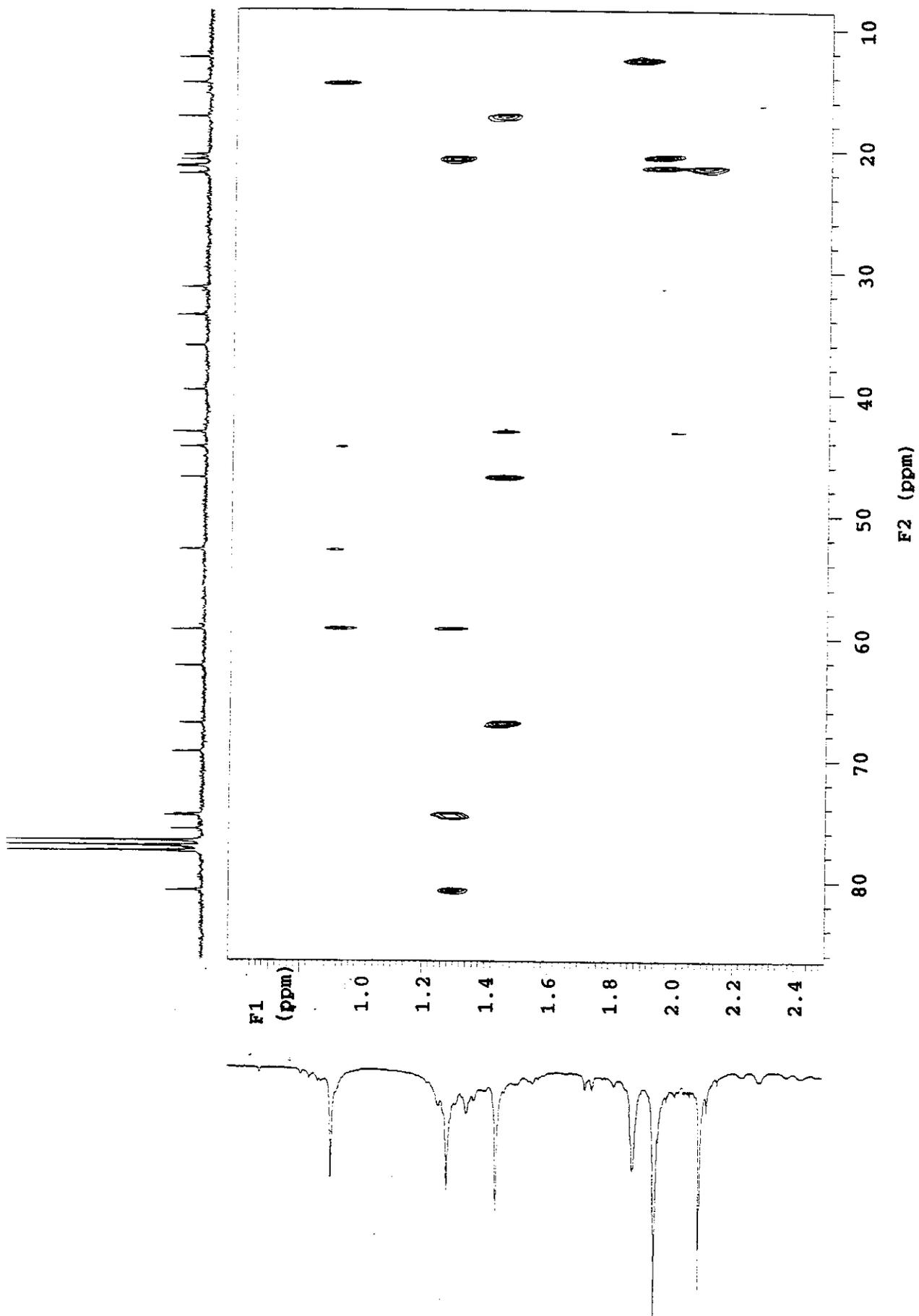
E-11- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 2.



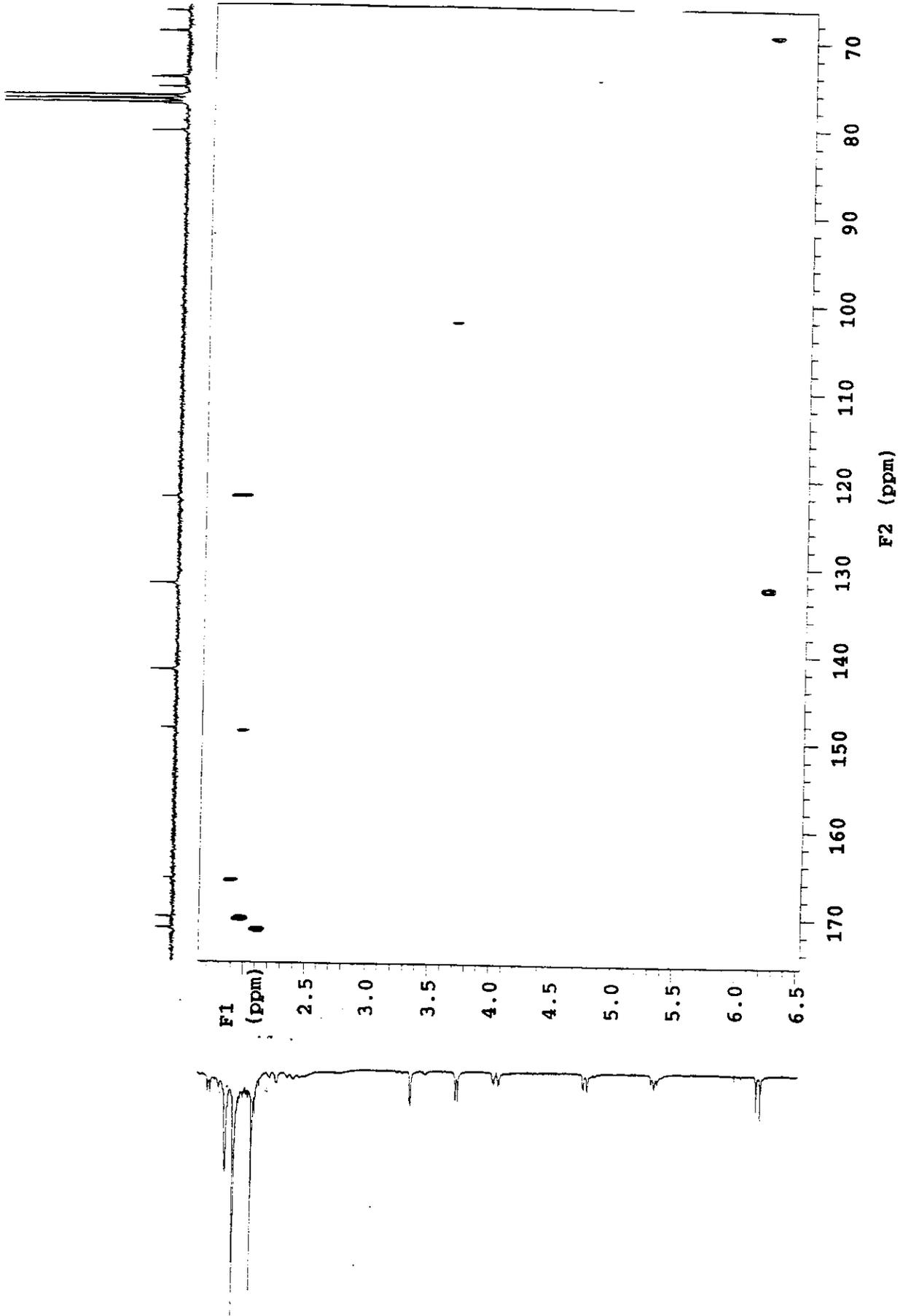
E-12- Espectro HSQC do vitanolideo 2.



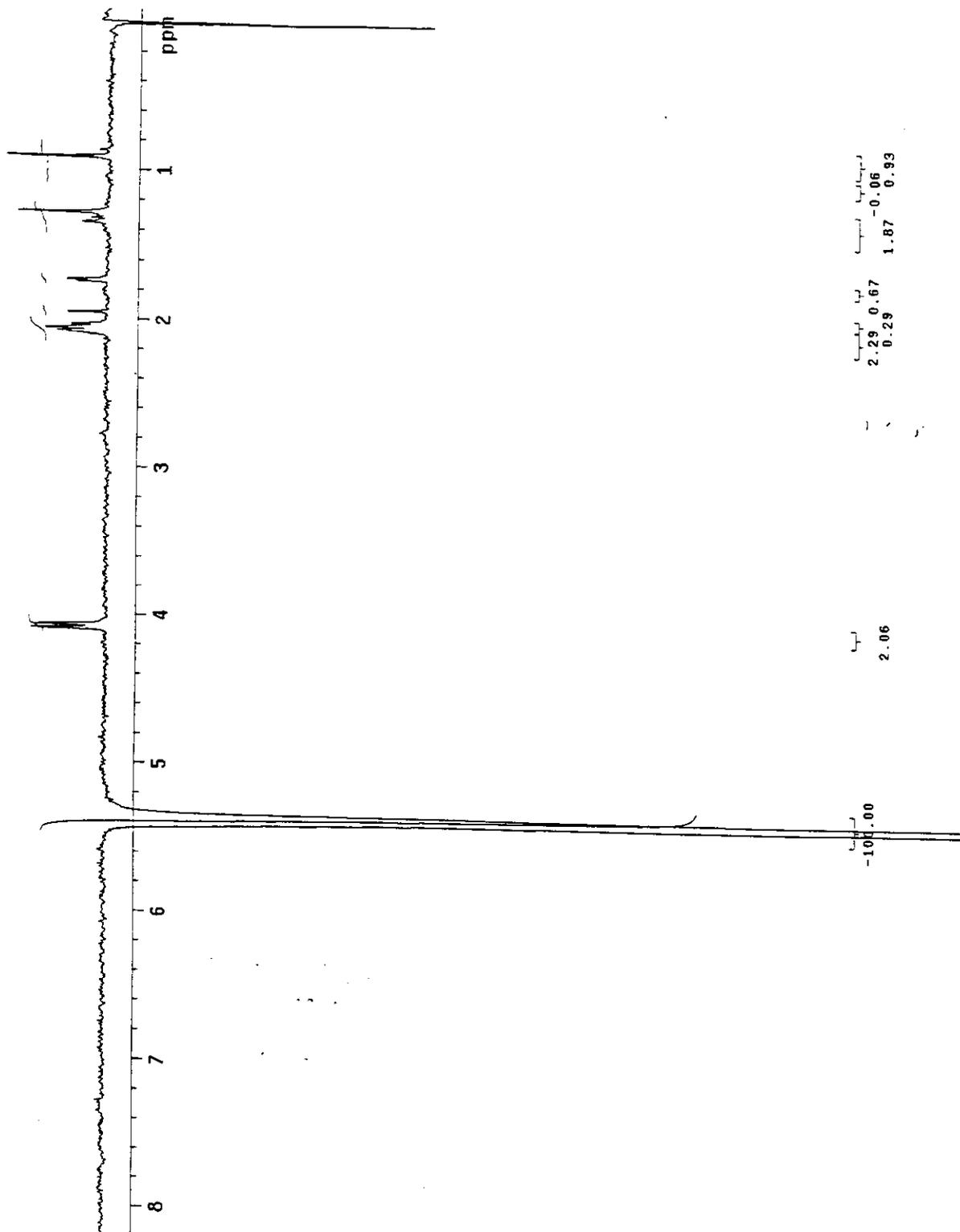
E-13- Espectro COLOC do vitanolideo 2.



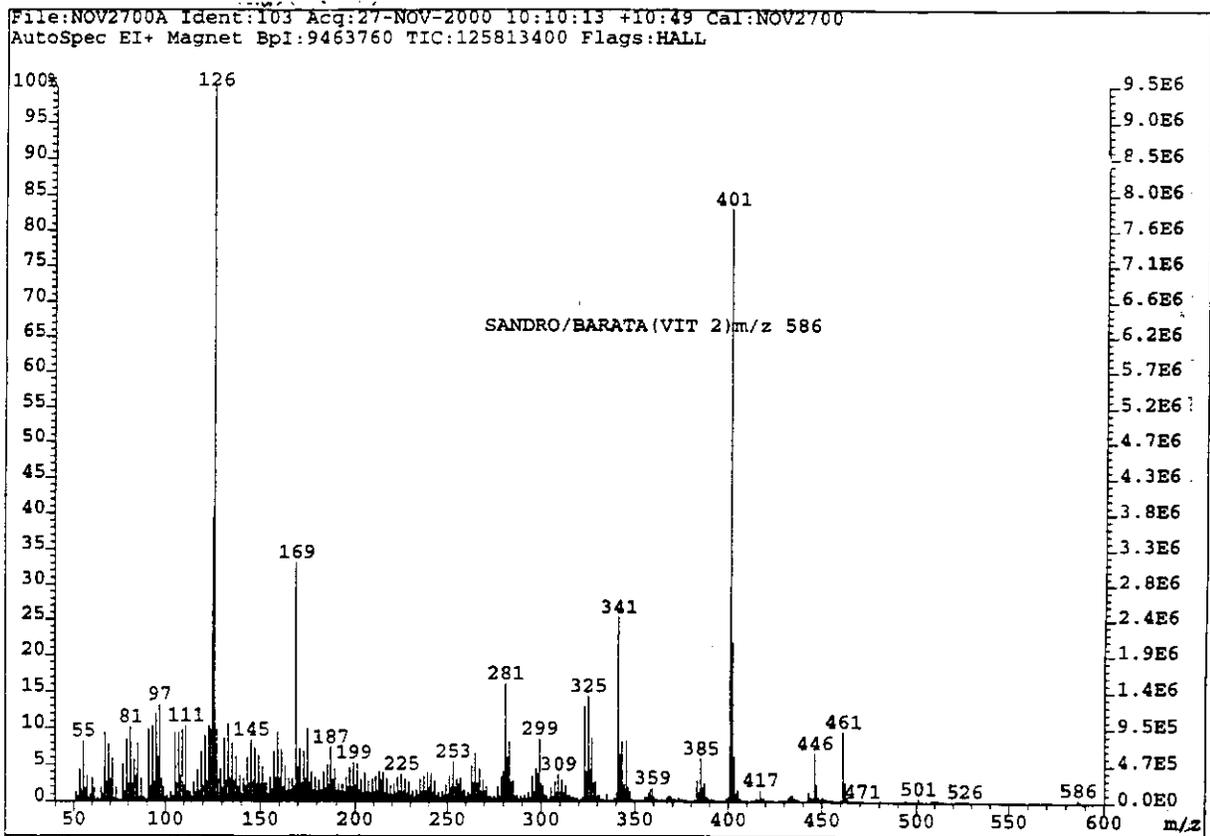
E-13a- Expansão do espectro COLOC de 2.



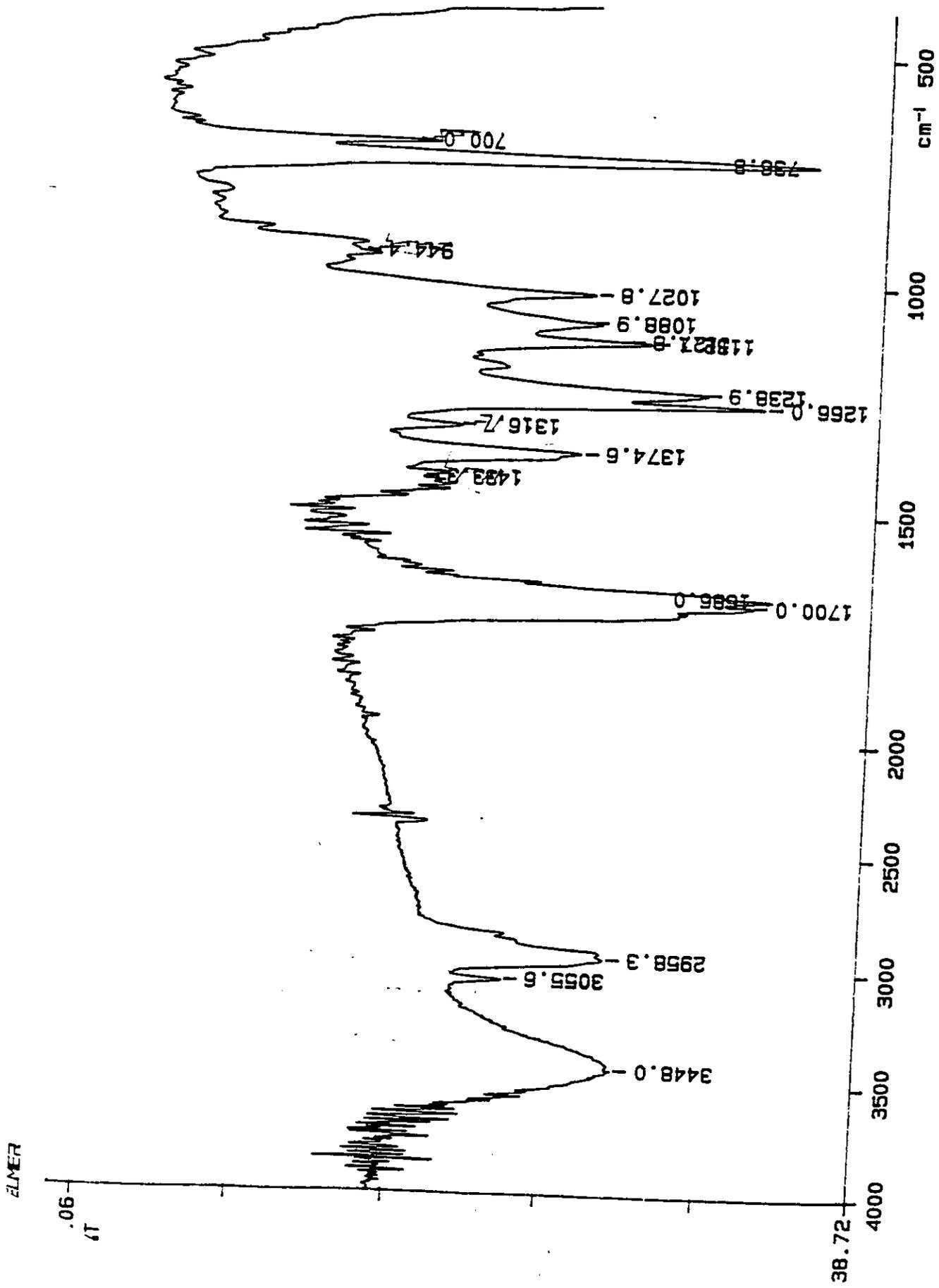
E-13b- Expansão do espectro COLOC de 2.



E-14- Espectro de nOe diff de 2.

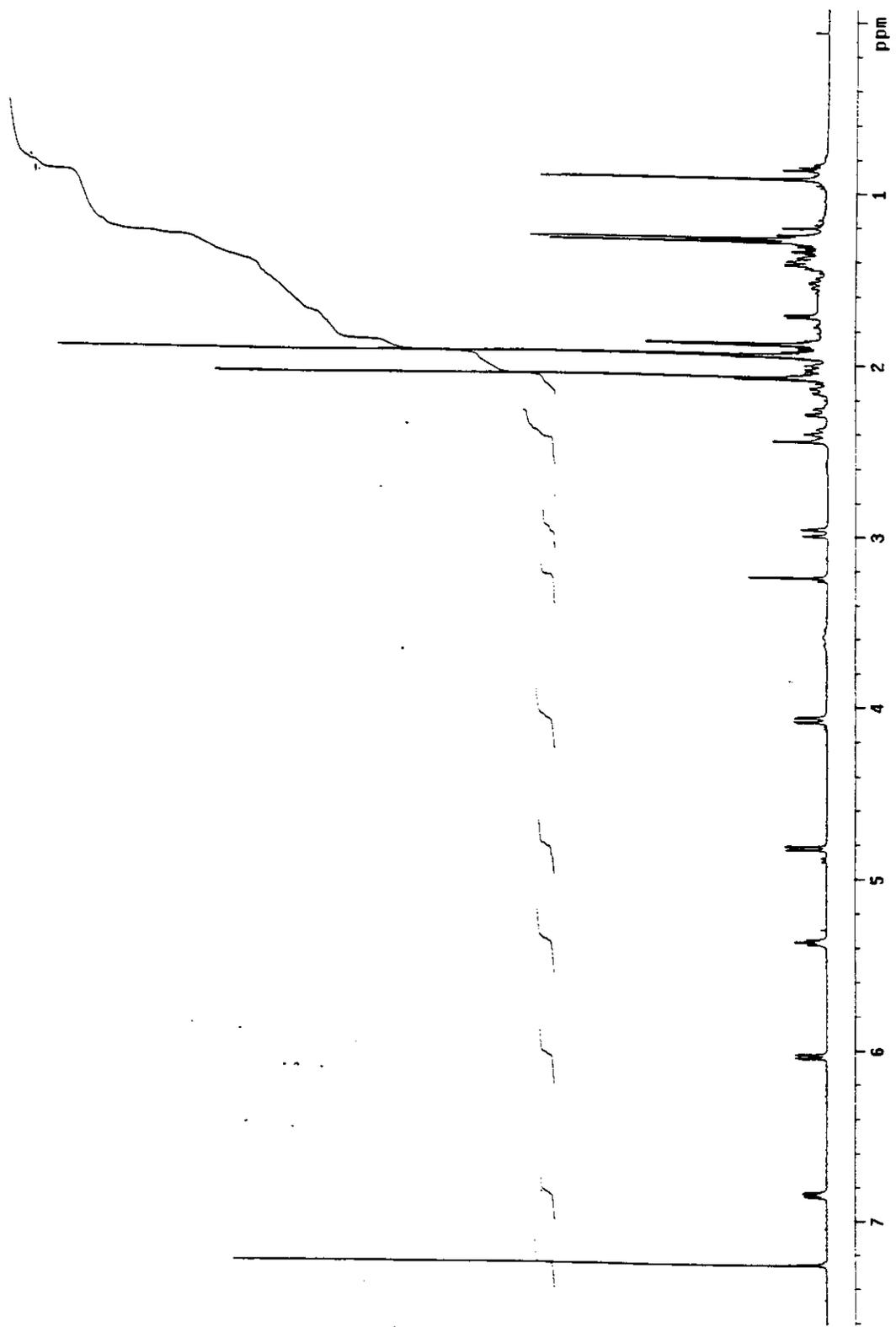


E-15- Espectro de massas do vitanolídeo 2.

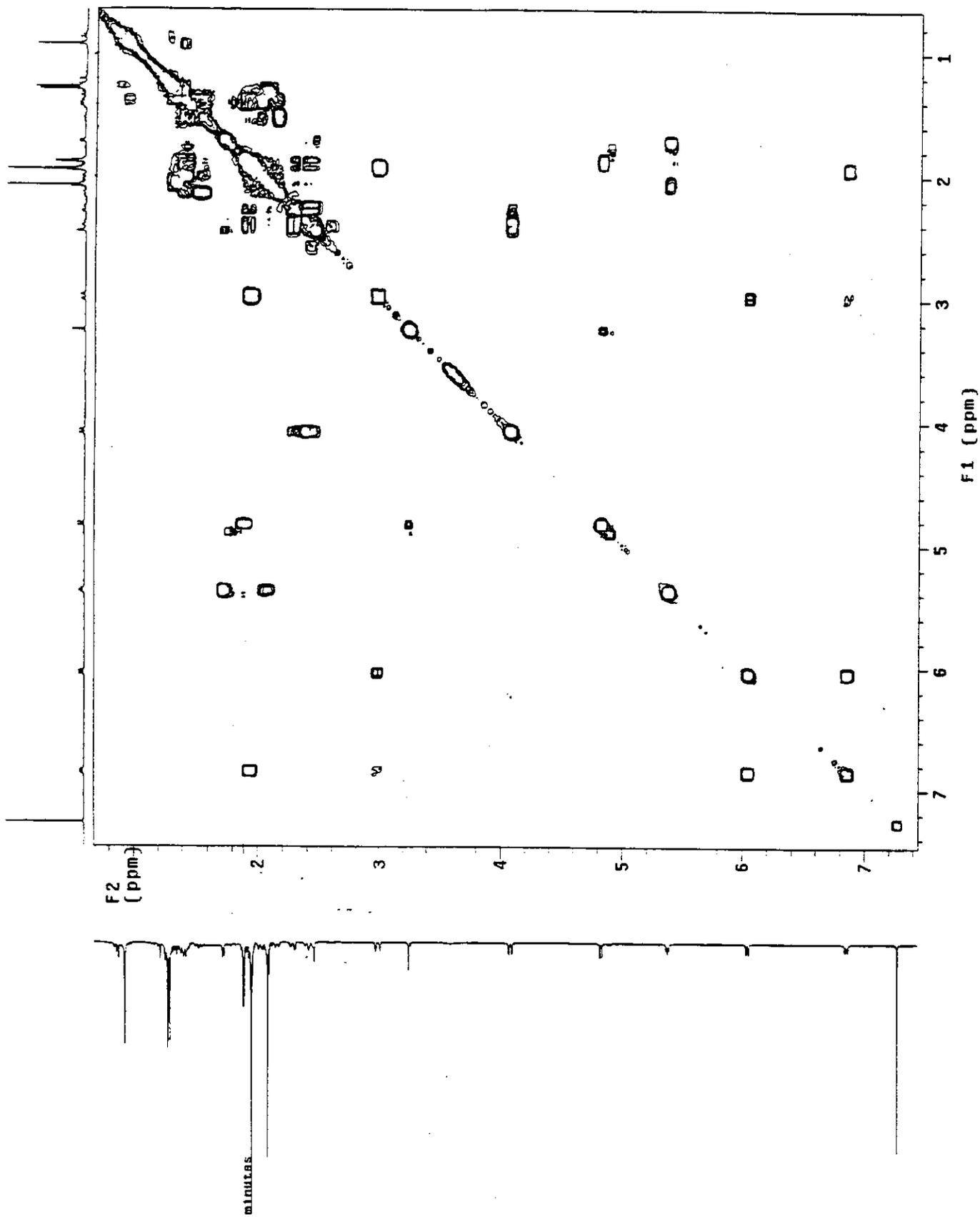


97/11/11 10:00  
 Z: 4 scans, 4.0cm-1, flat, smooth

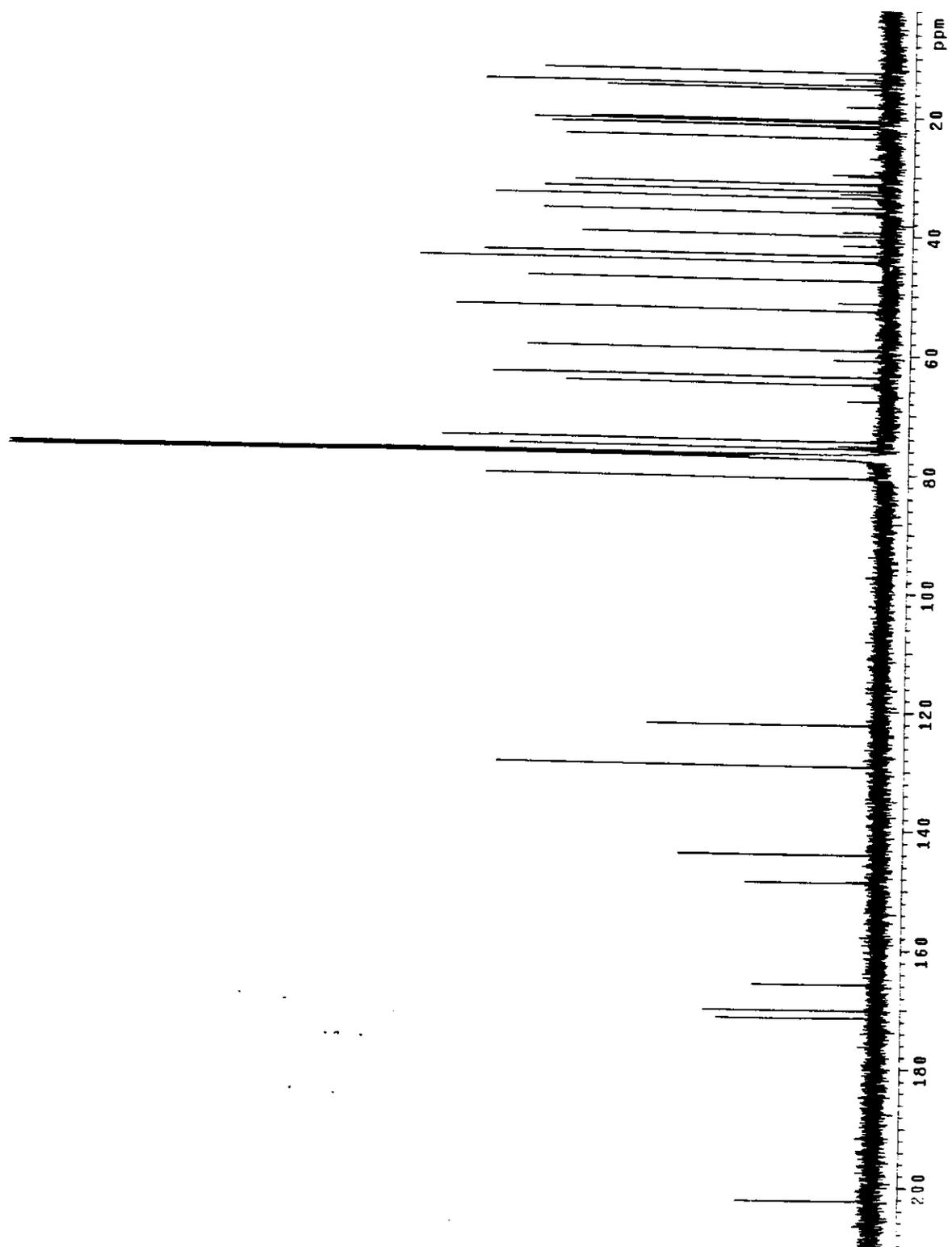
E-16- Espectro de IV do vitanolídeo 2.



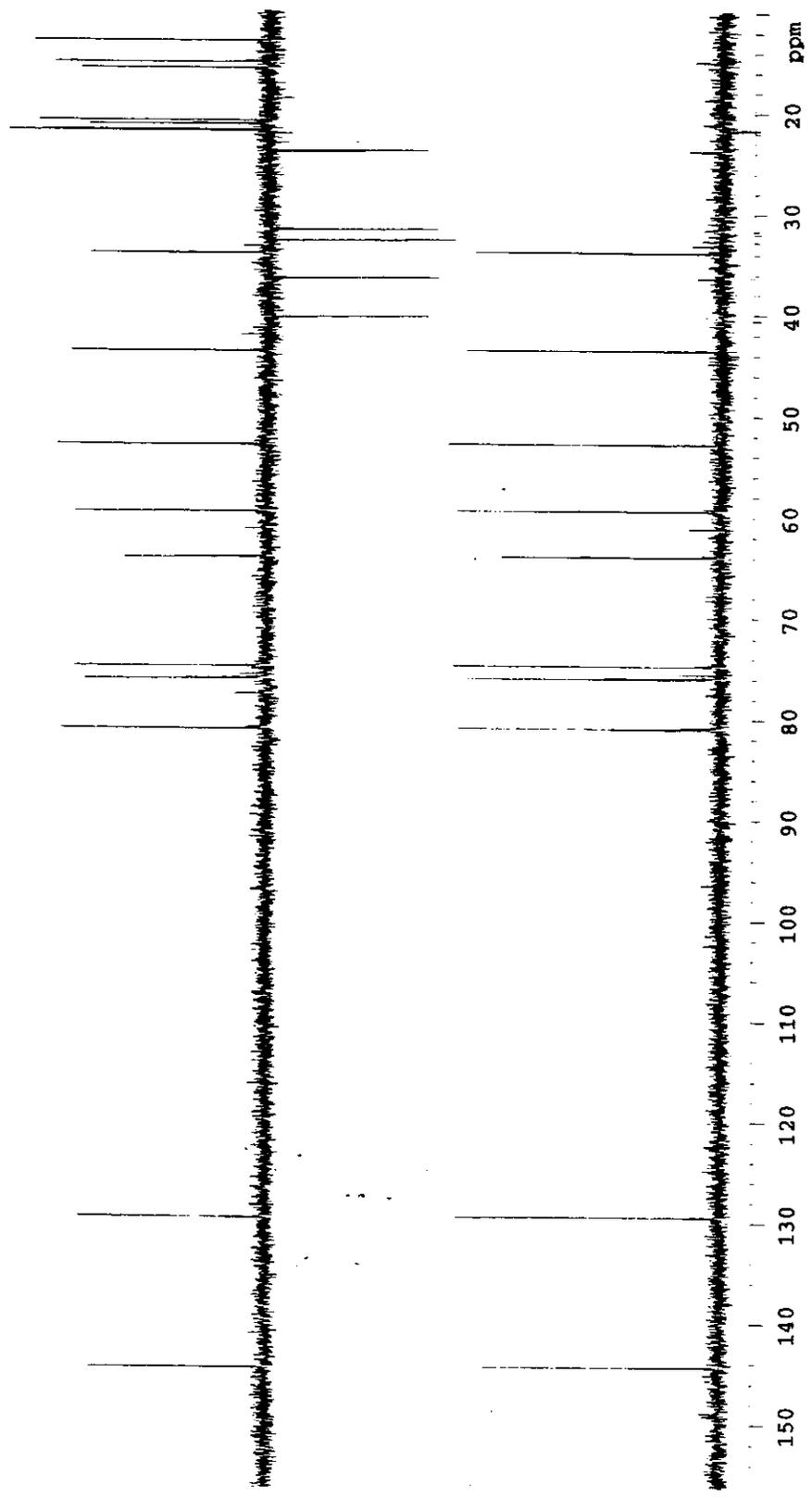
E-17- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolideo 3.



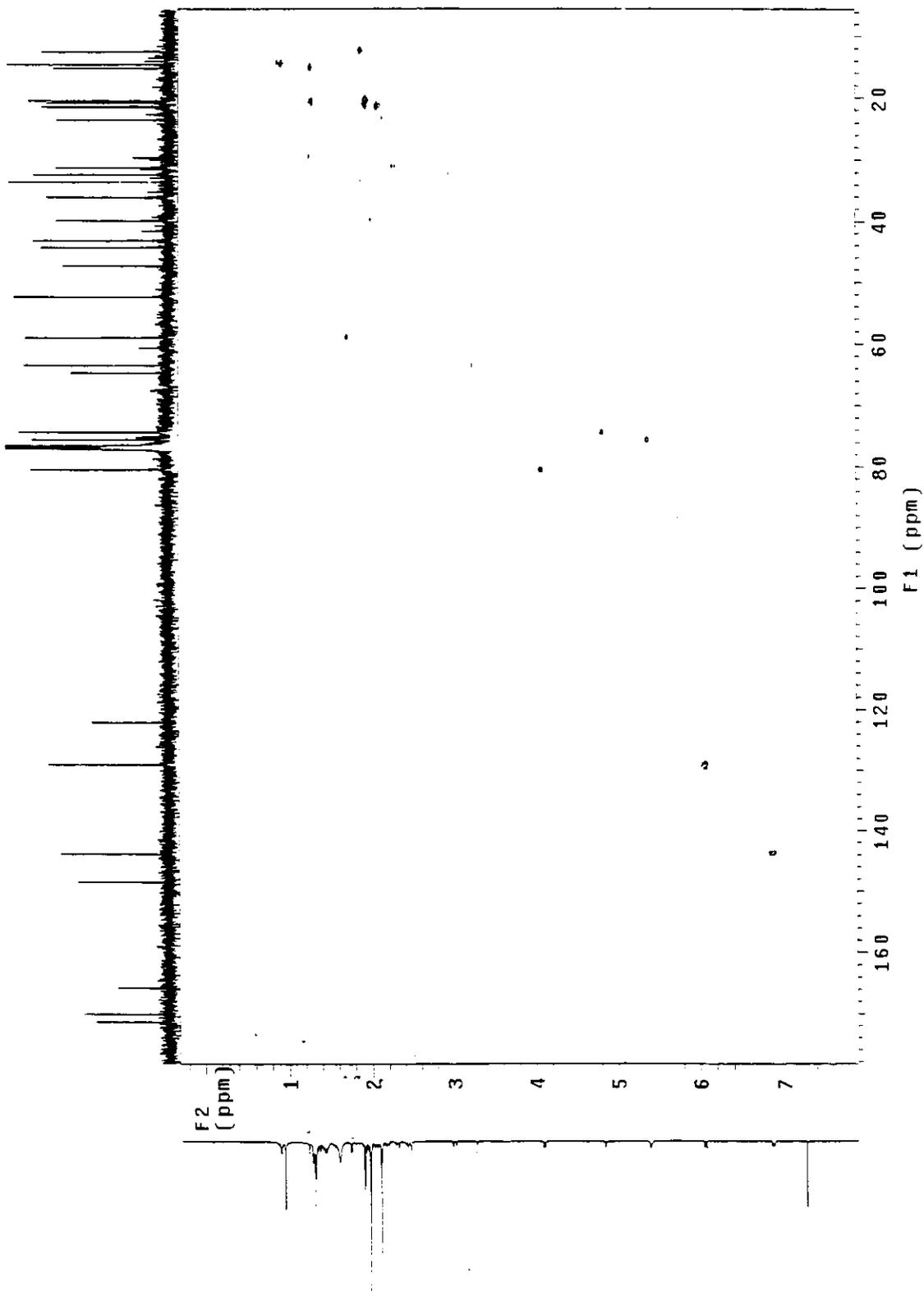
E-18- Espectro de Cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do vitanolideo 3.



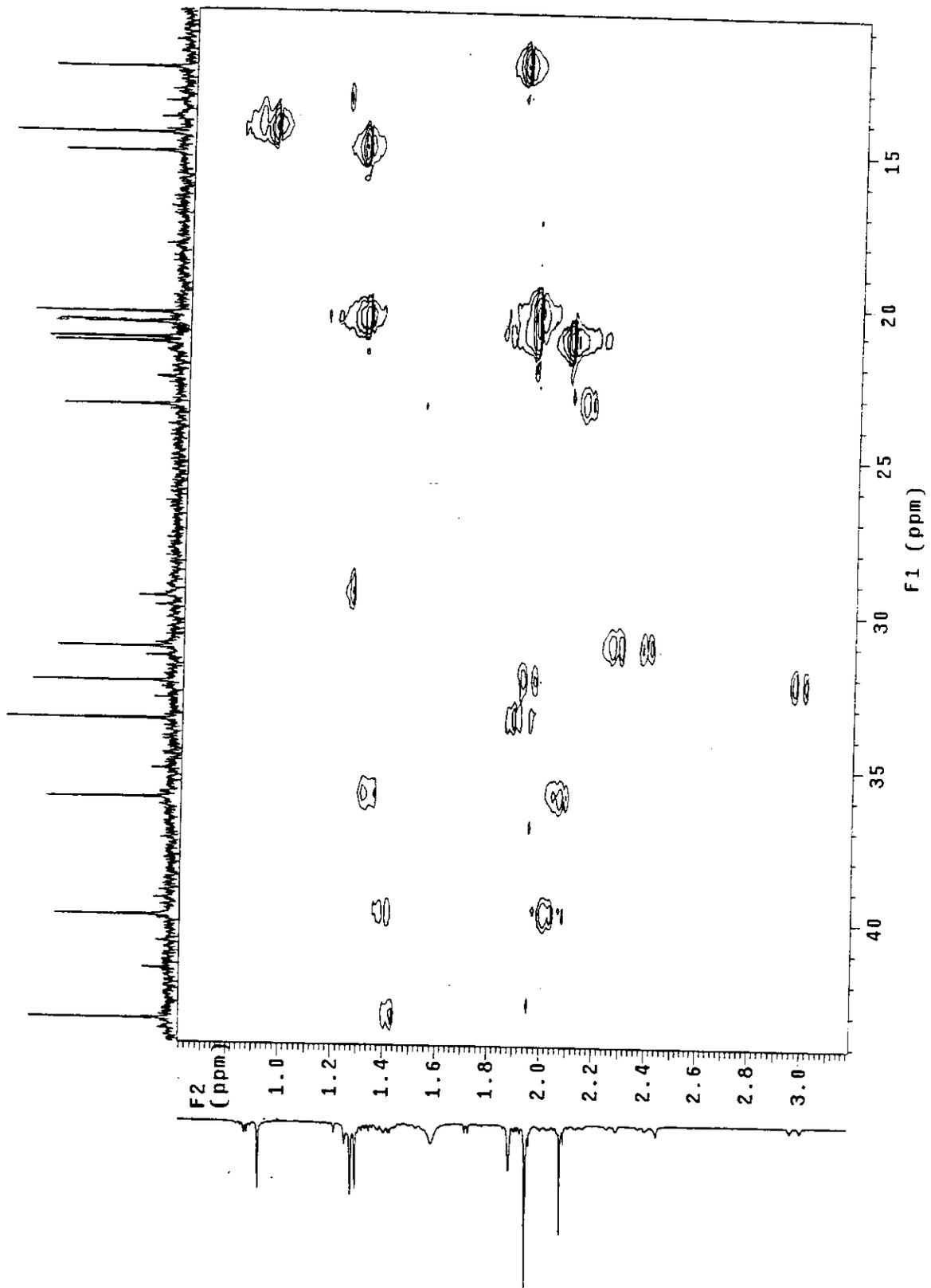
E19- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolideo 3.



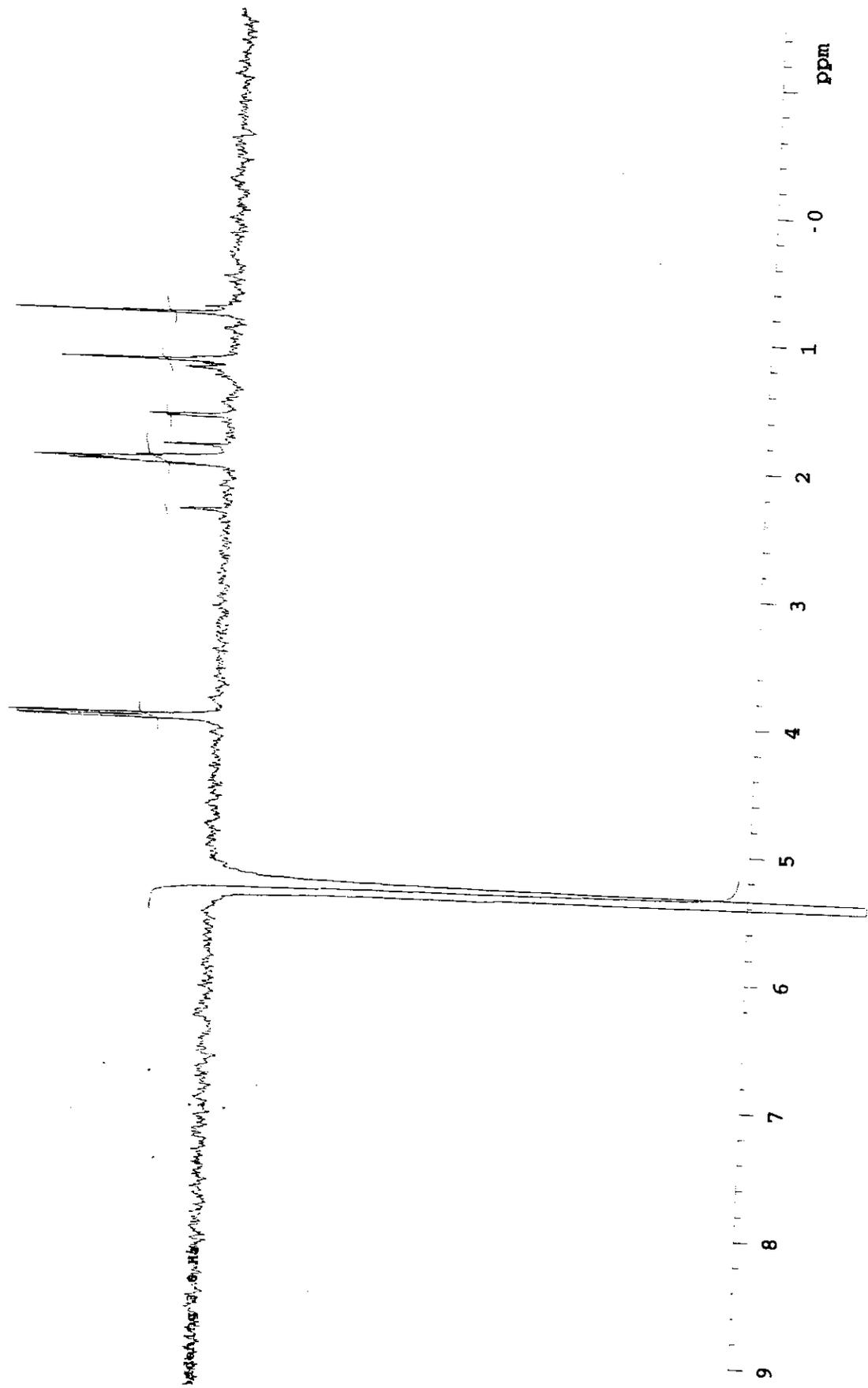
E20- Espectro DEPT do vitanolideo 3.



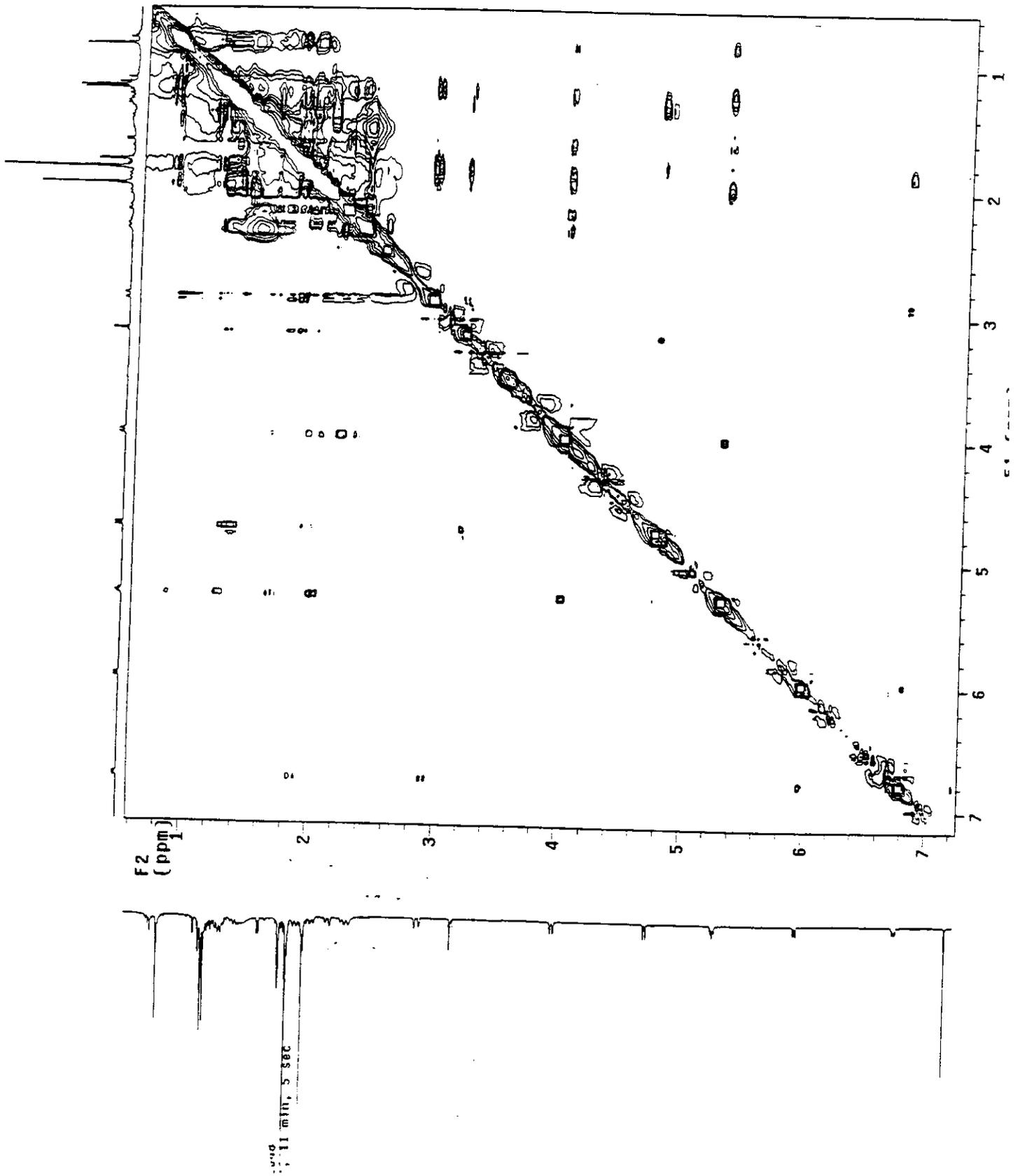
E21- Espectro HSQC do vitanolídeo 3.



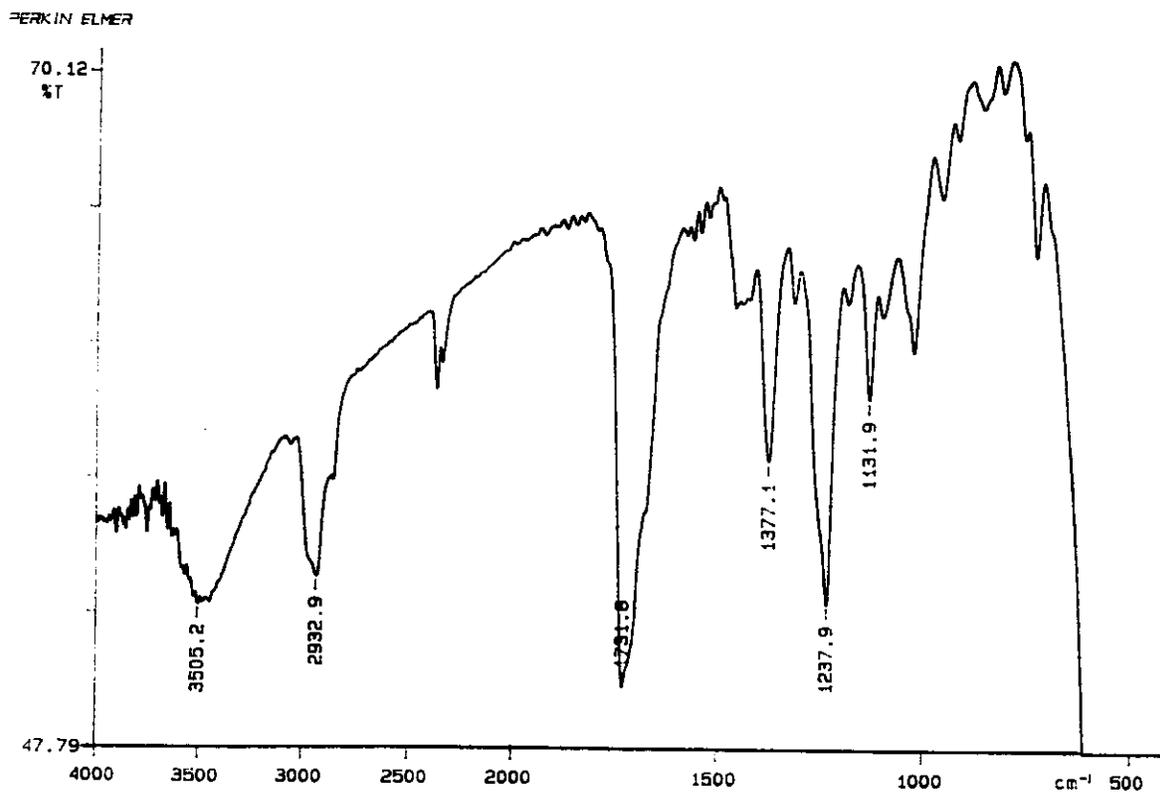
E-21a- Expansão do espectro HSQC de 3.



E-22- Espectro nOe diff do vitanolideo 3.



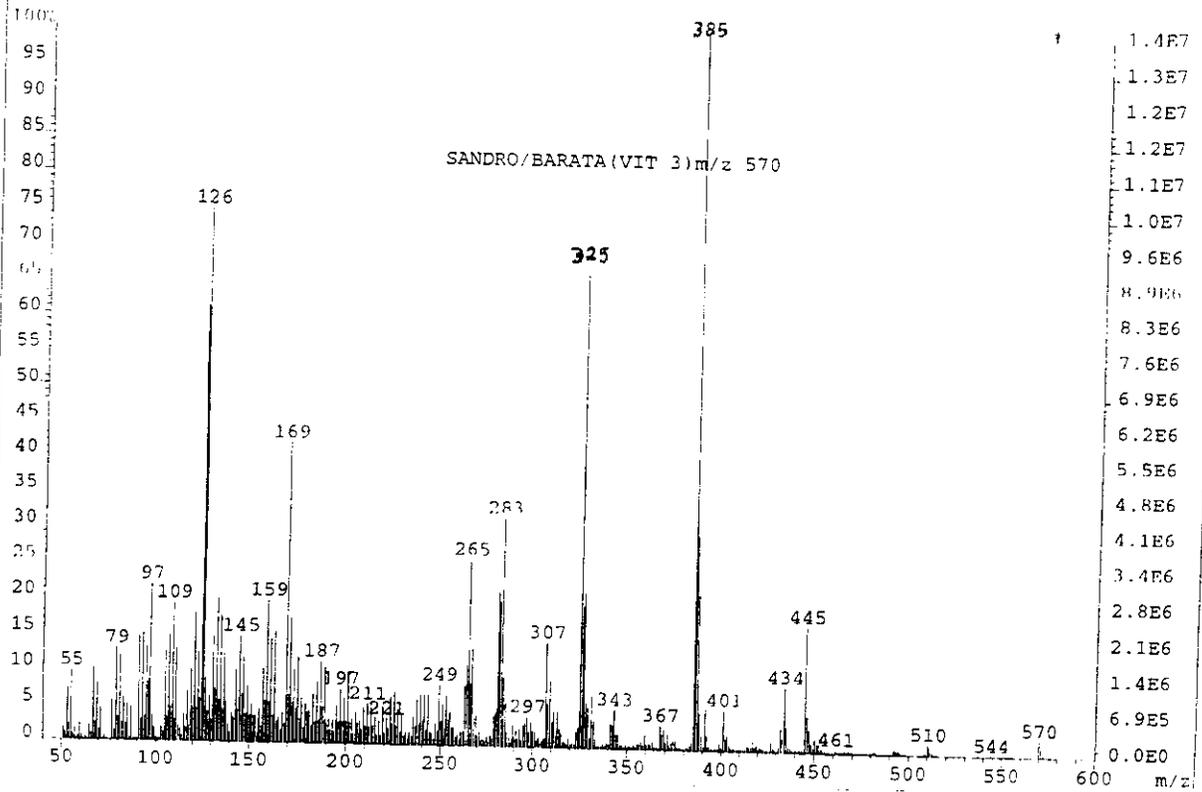
E22a- Espectro nOe 2D do vitanolídeo 3.



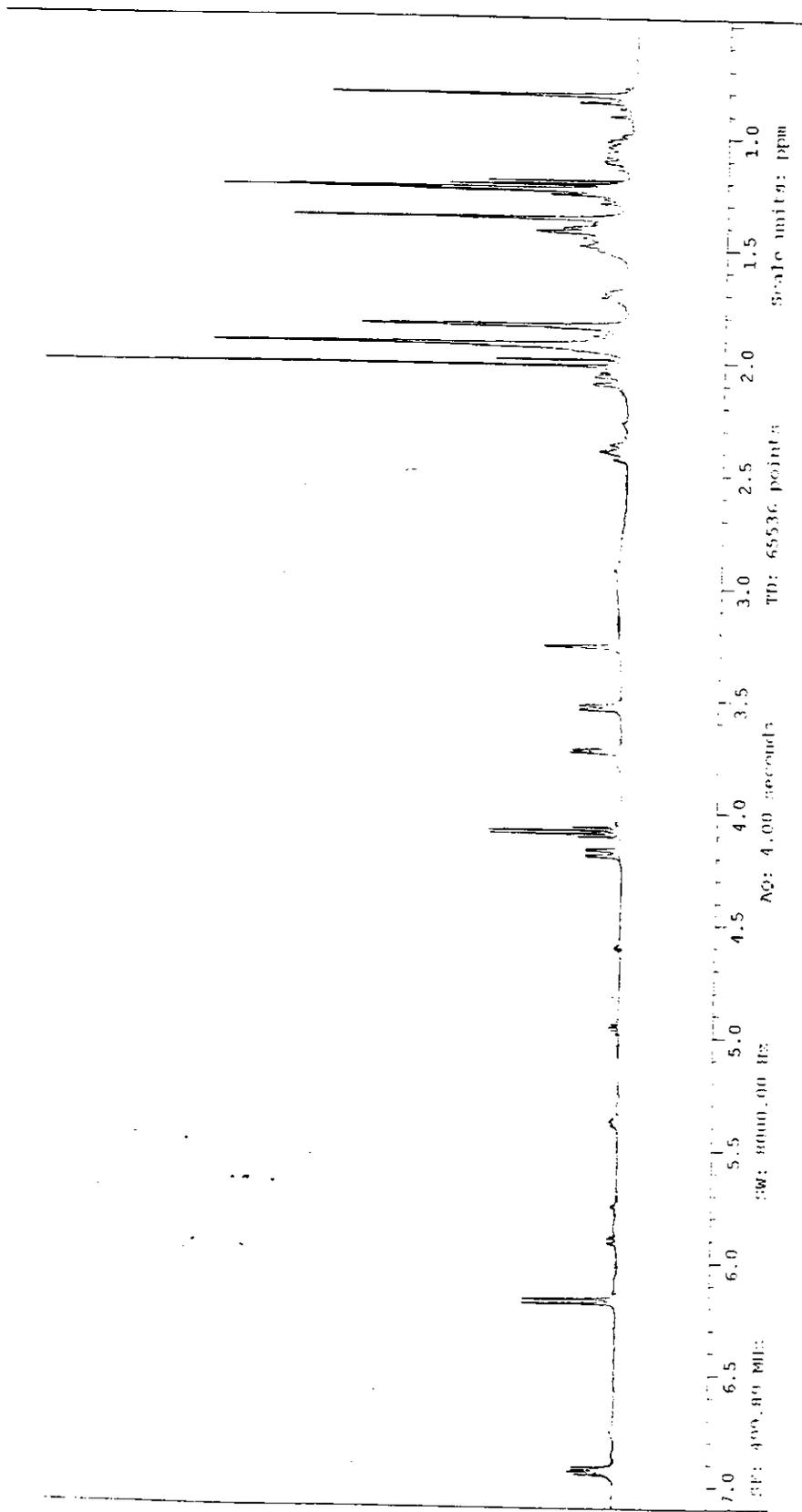
98/10/16 17:42  
X: 4 scans, 4.0cm<sup>-1</sup>, smooth

E-23- Espectro de IV do vitanolideo 3.

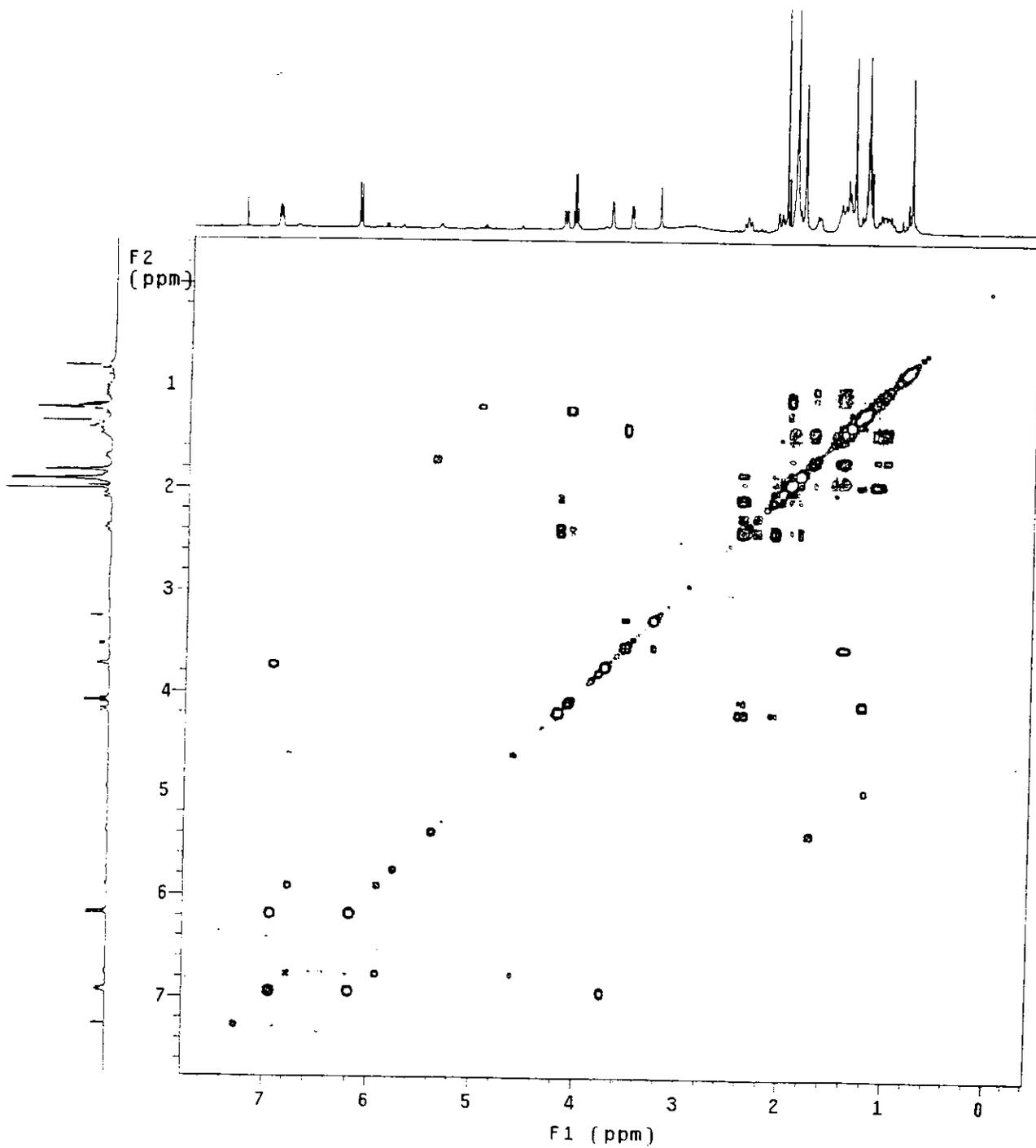
File:NOV2700A Ident:64\_66 Win 1000PPM Acq:27-NOV-2000 10:10:13 +6:50 Cal:NOV2700  
AutoSpec EI+ Magnet BpM:385 BpI:13761195 TIC:271582496 Flags:HALE



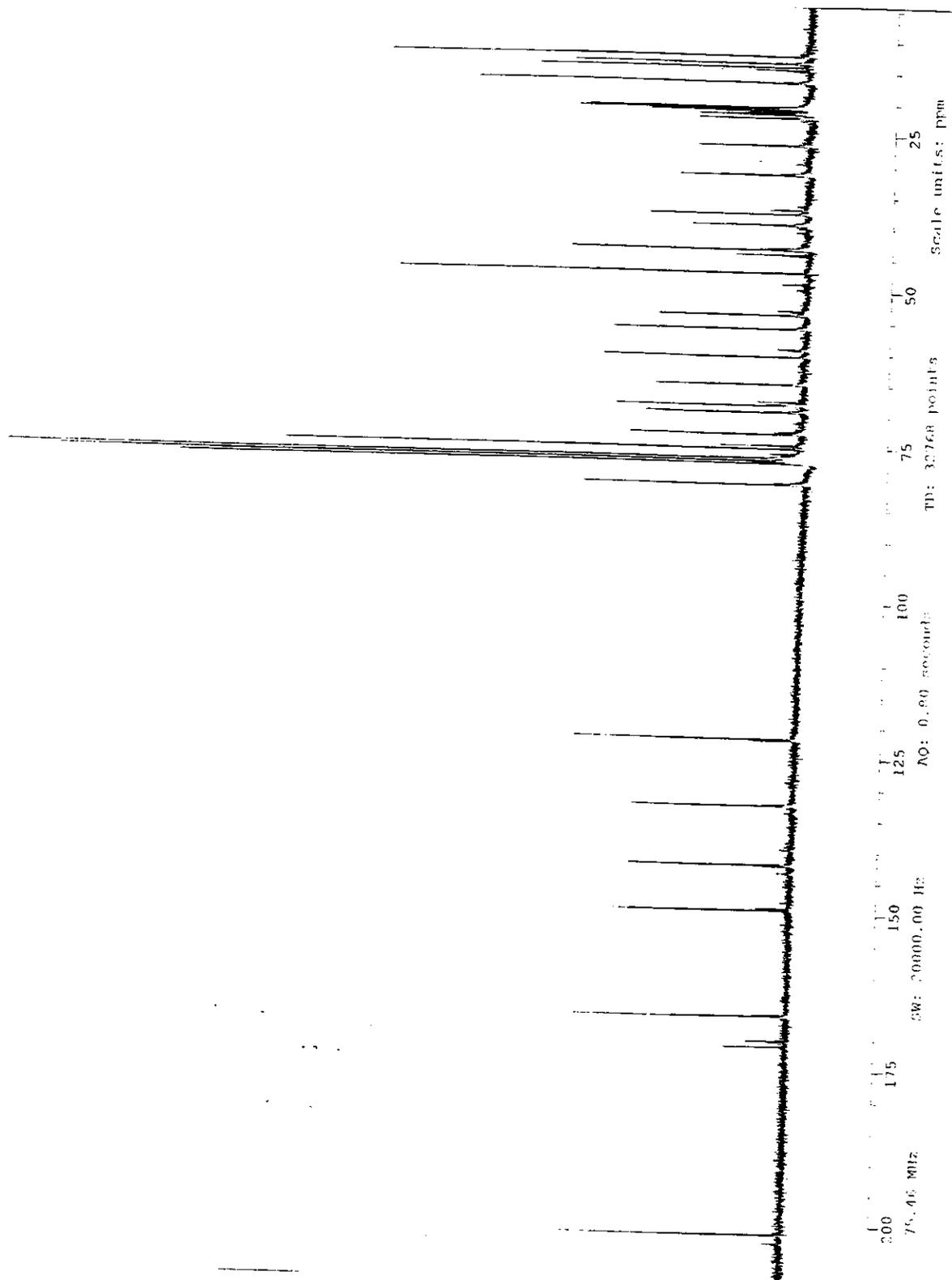
E-24- Espectro de massas do vitanolídeo 3.



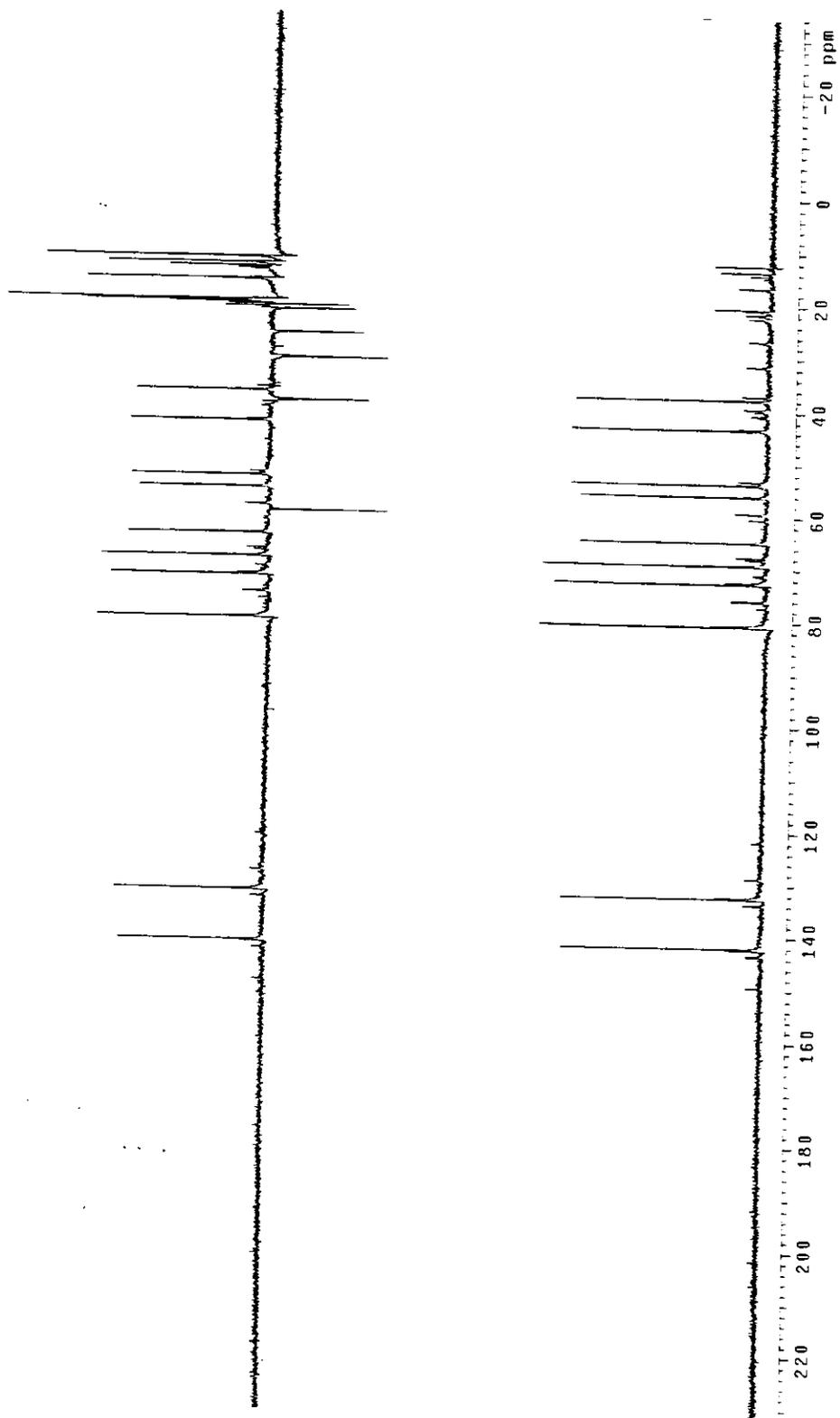
E-25- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 4.



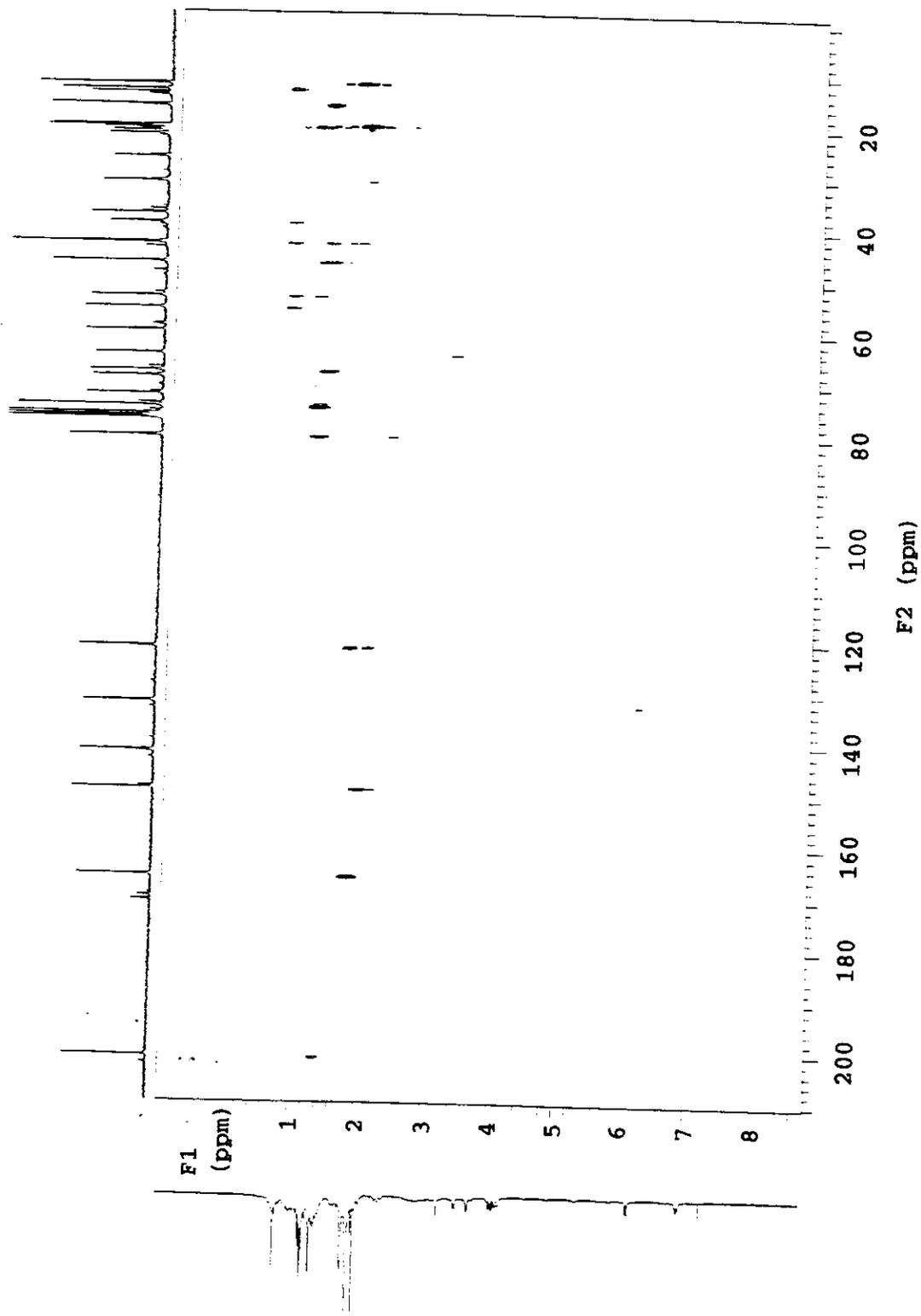
E-26- Espectro de Cosy  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 4.



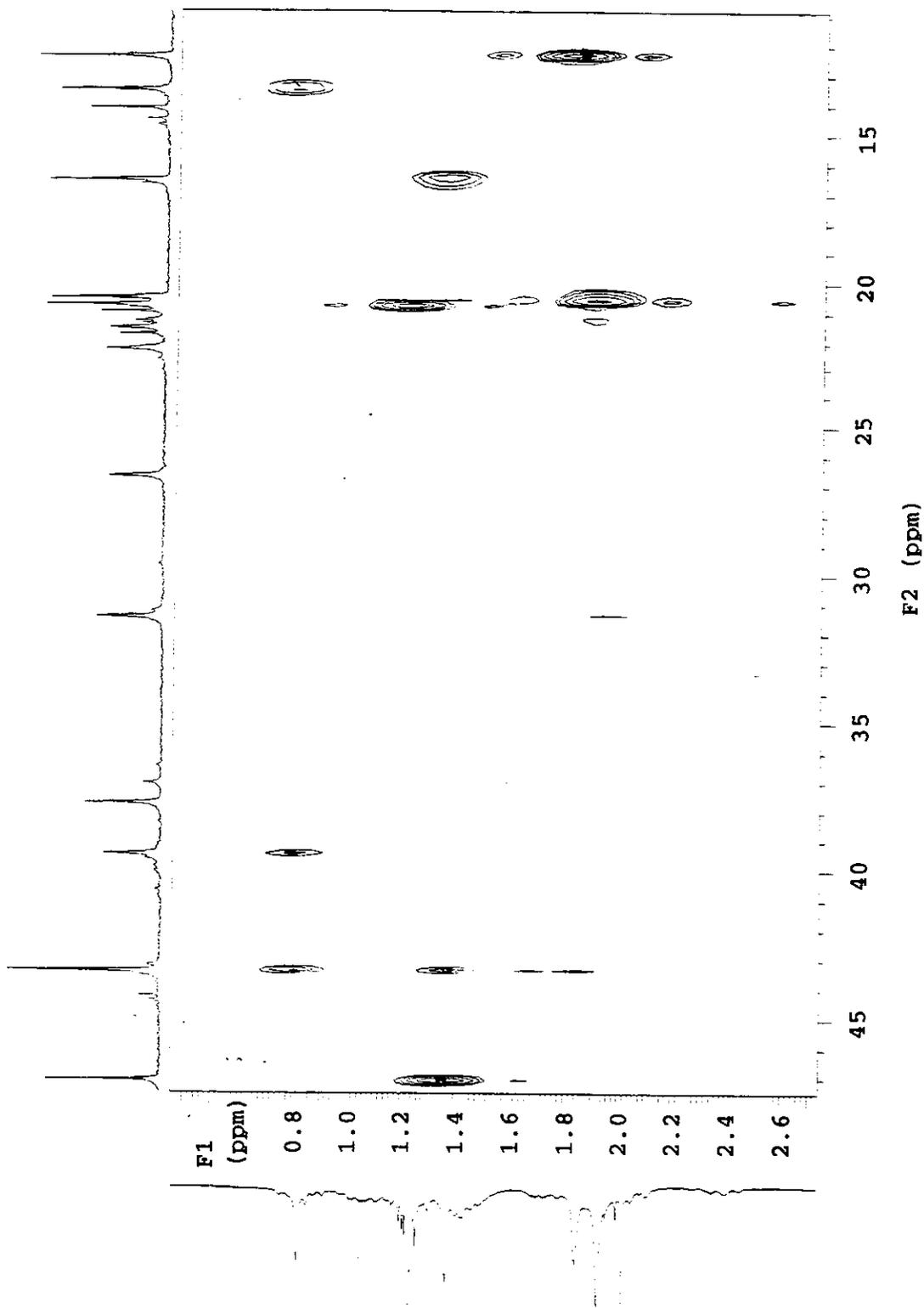
E-27- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 4.



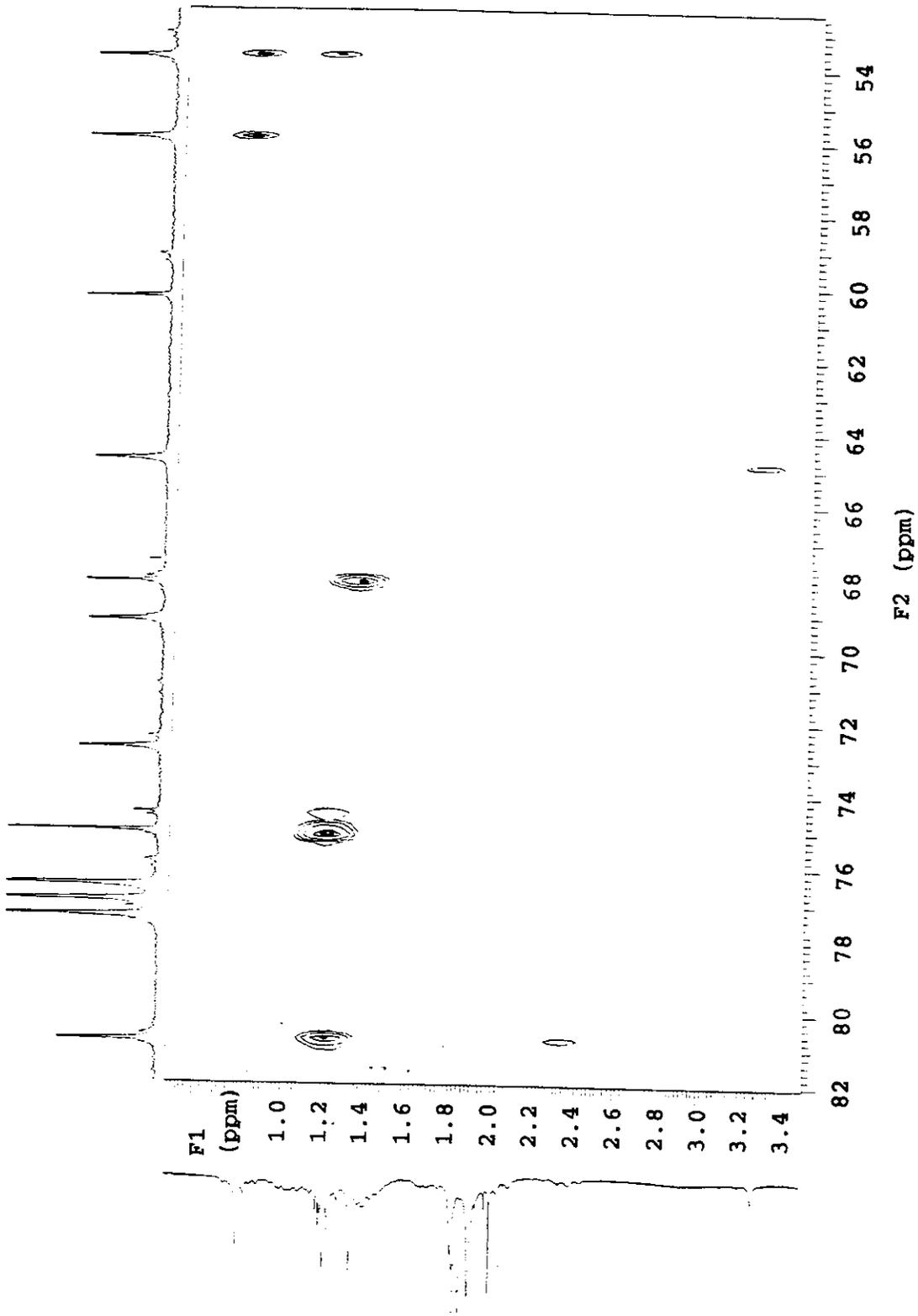
E-28- Espectro DEPT do vitanolídeo 4.



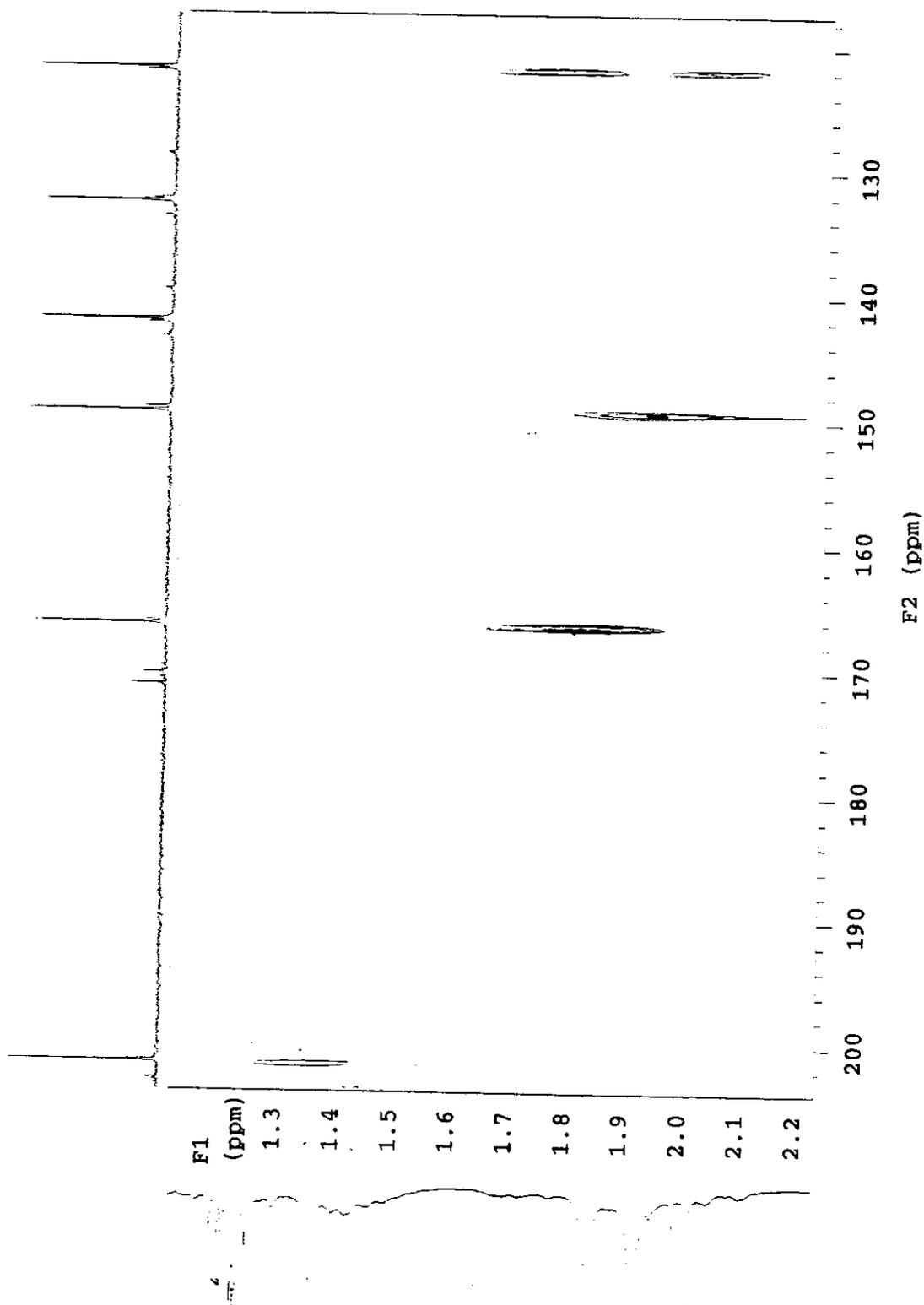
E-29- Espectro COLOC do vitanolídeo 4.



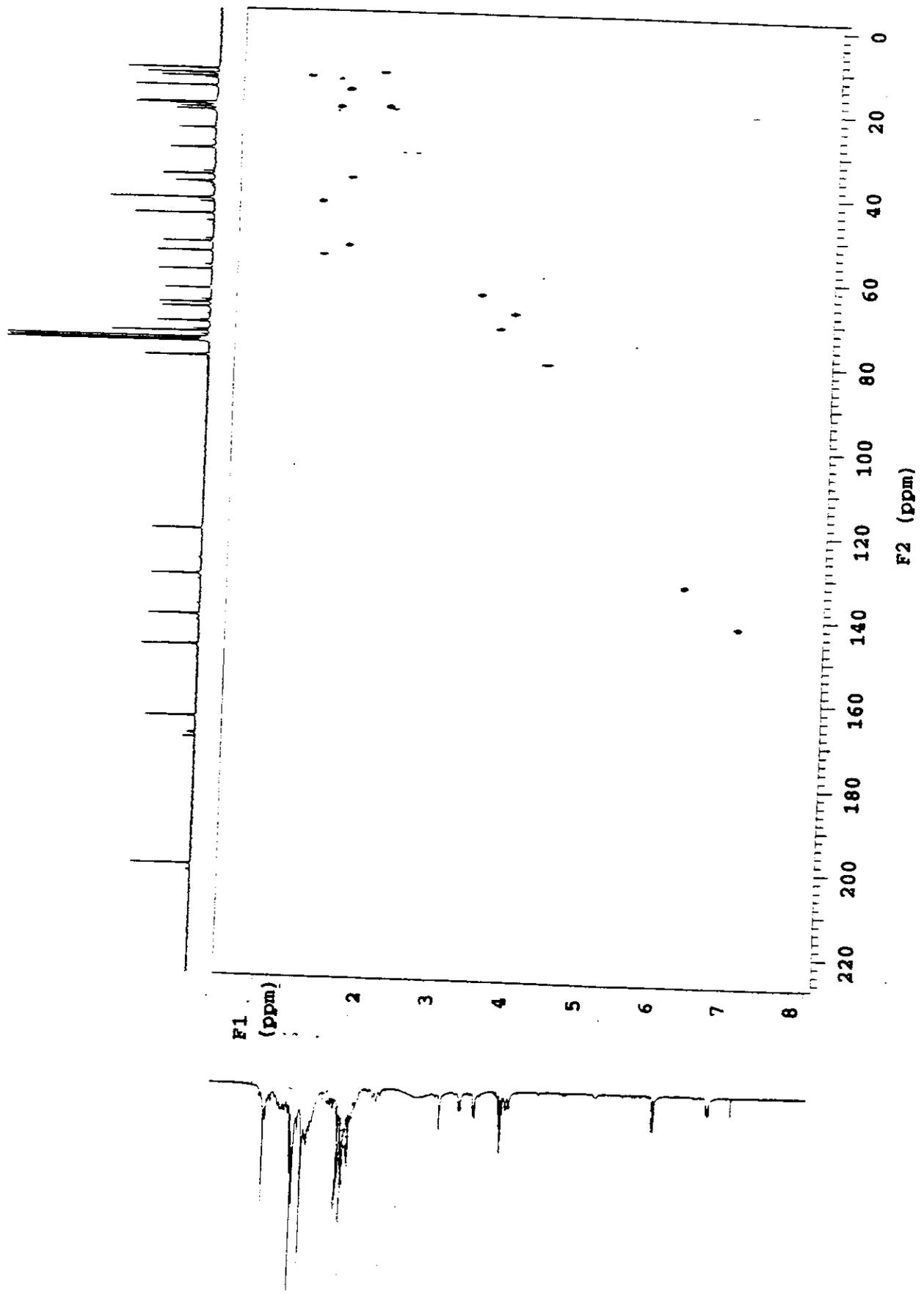
E-29a- Expansão do espectro COLOC de 4.



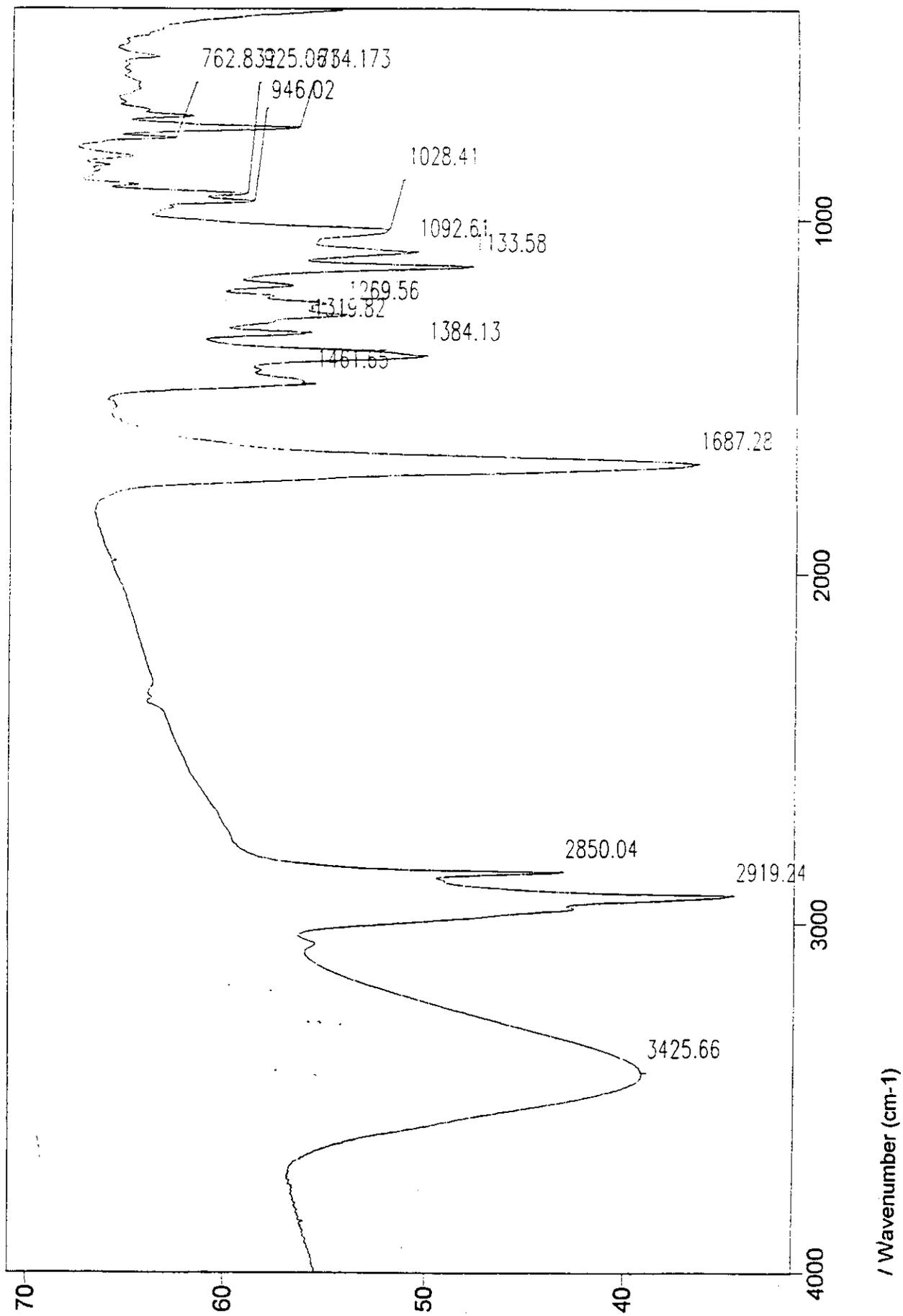
E-29b - Expansão do espectro COLOC de 4.



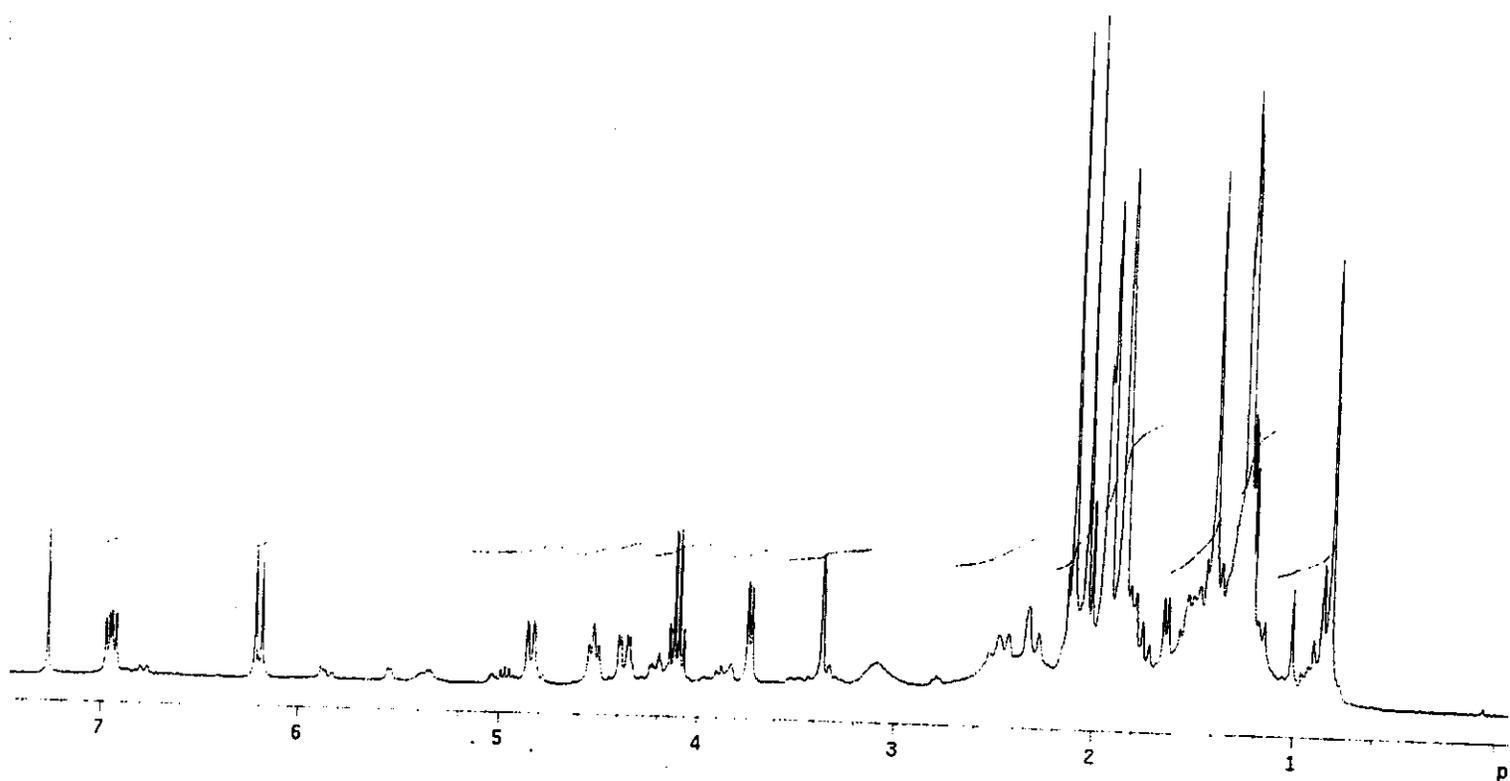
E-29c - Expansão do espectro COLOC de 4.



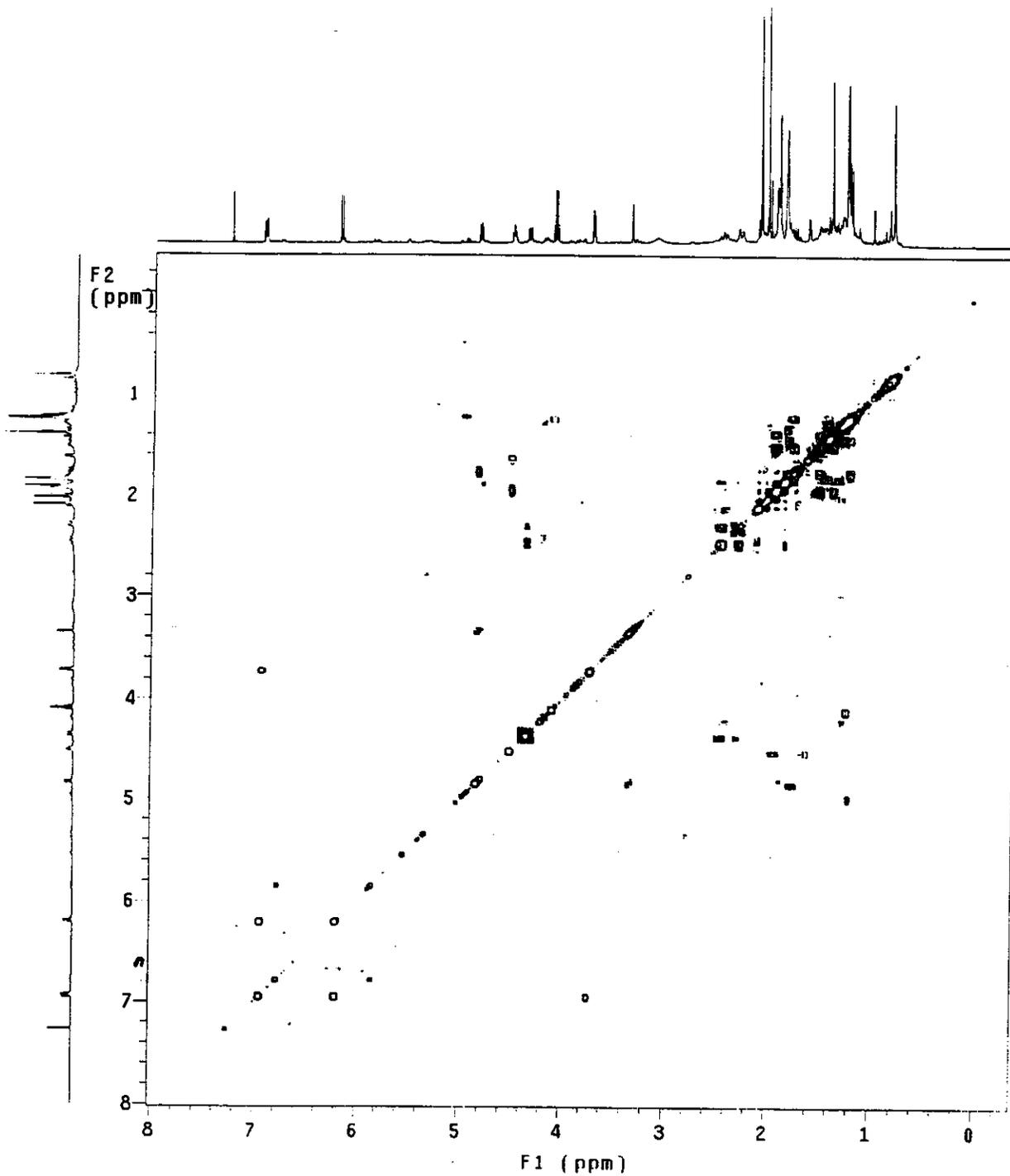
E30- Espectro HETCOR do vitanolídeo 4.



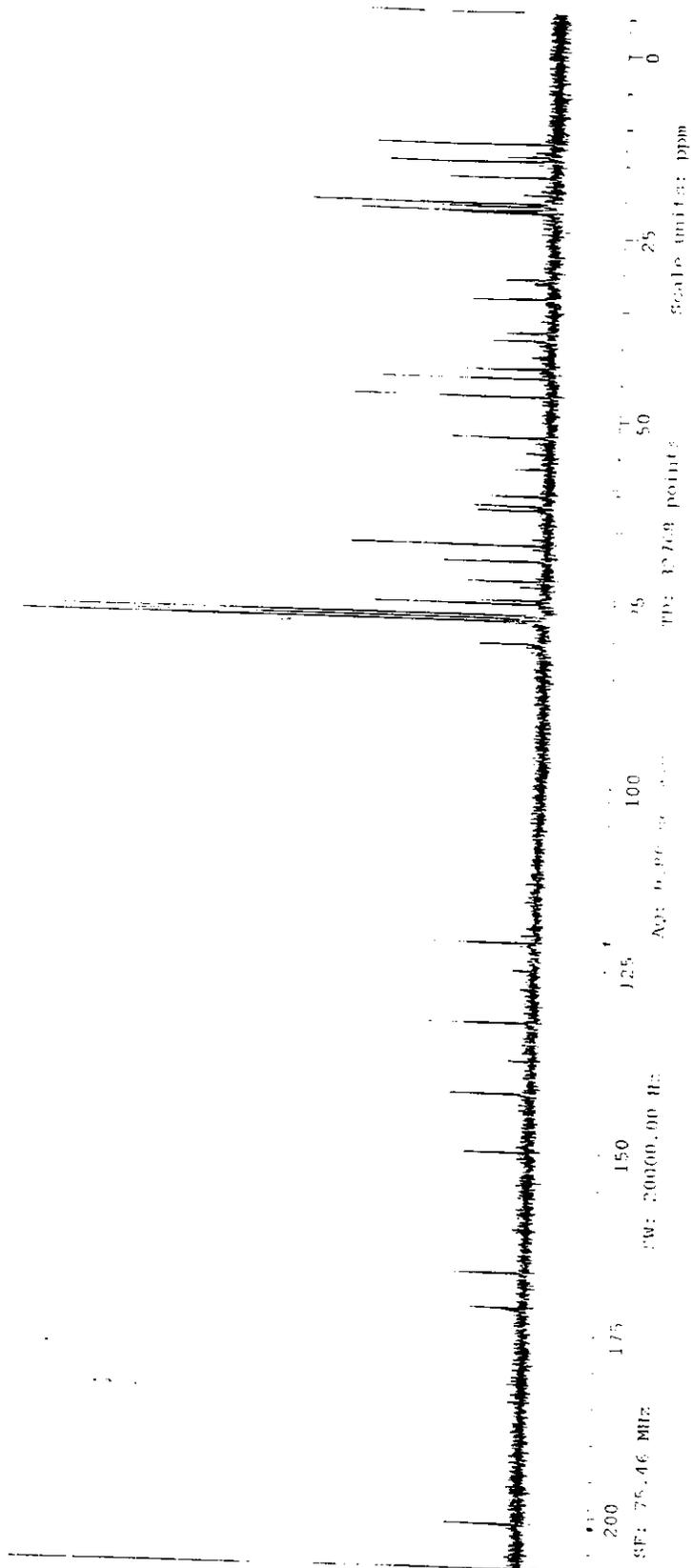
E-31- Espectro de IV do vitanolídeo 4.



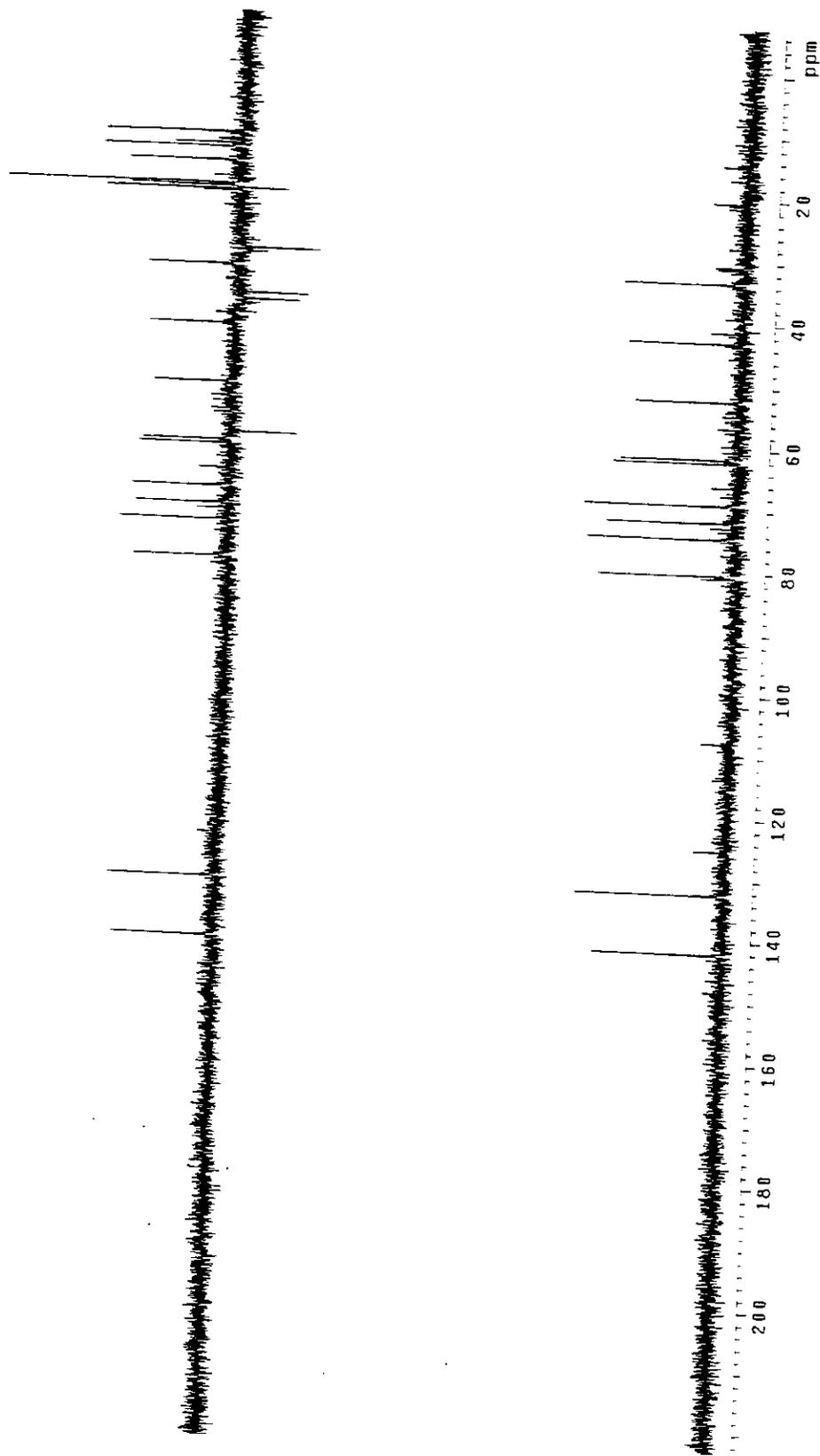
E-32- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 5.



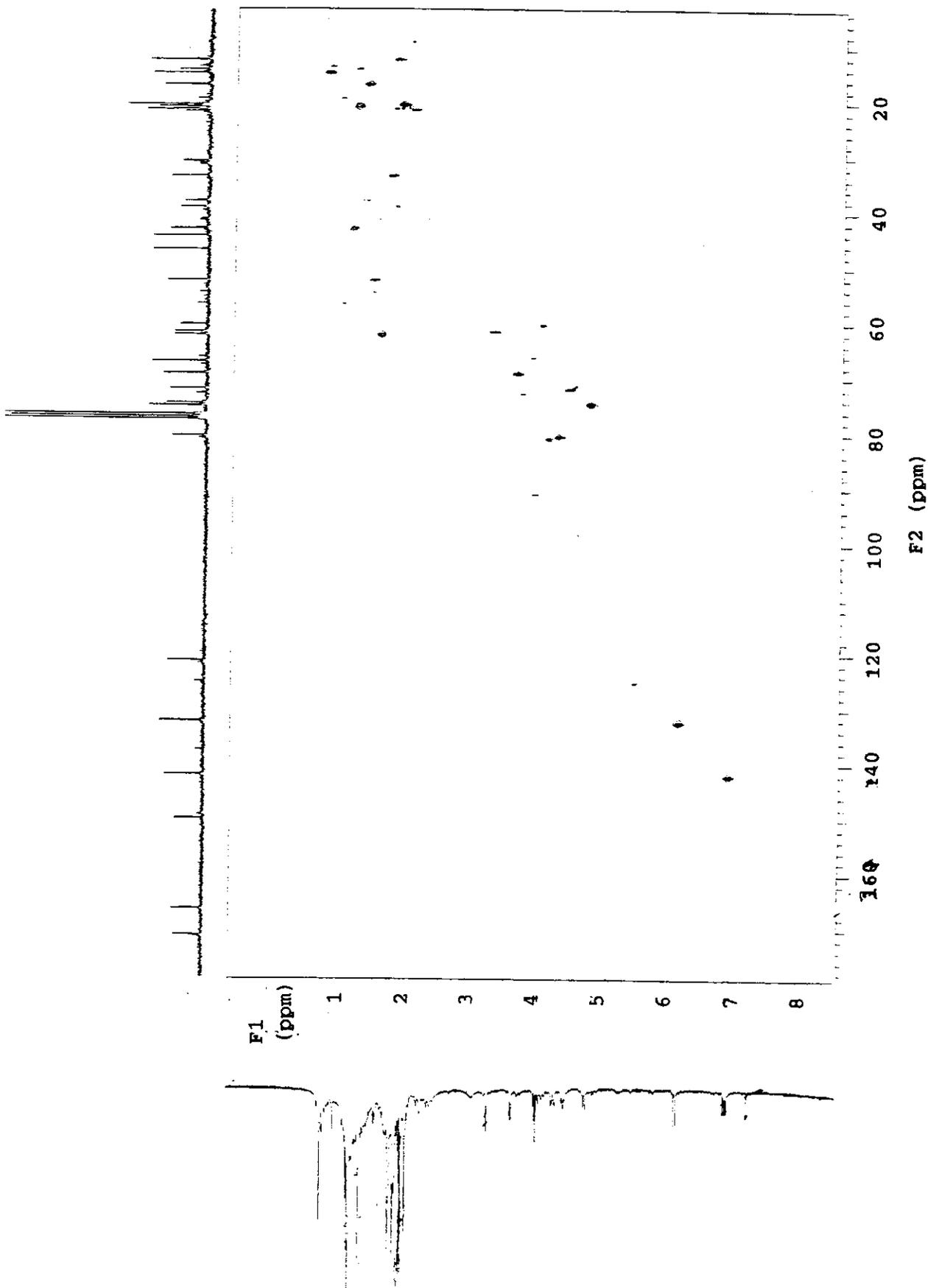
E-33- Espectro de Cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do vitanolídeo 5.



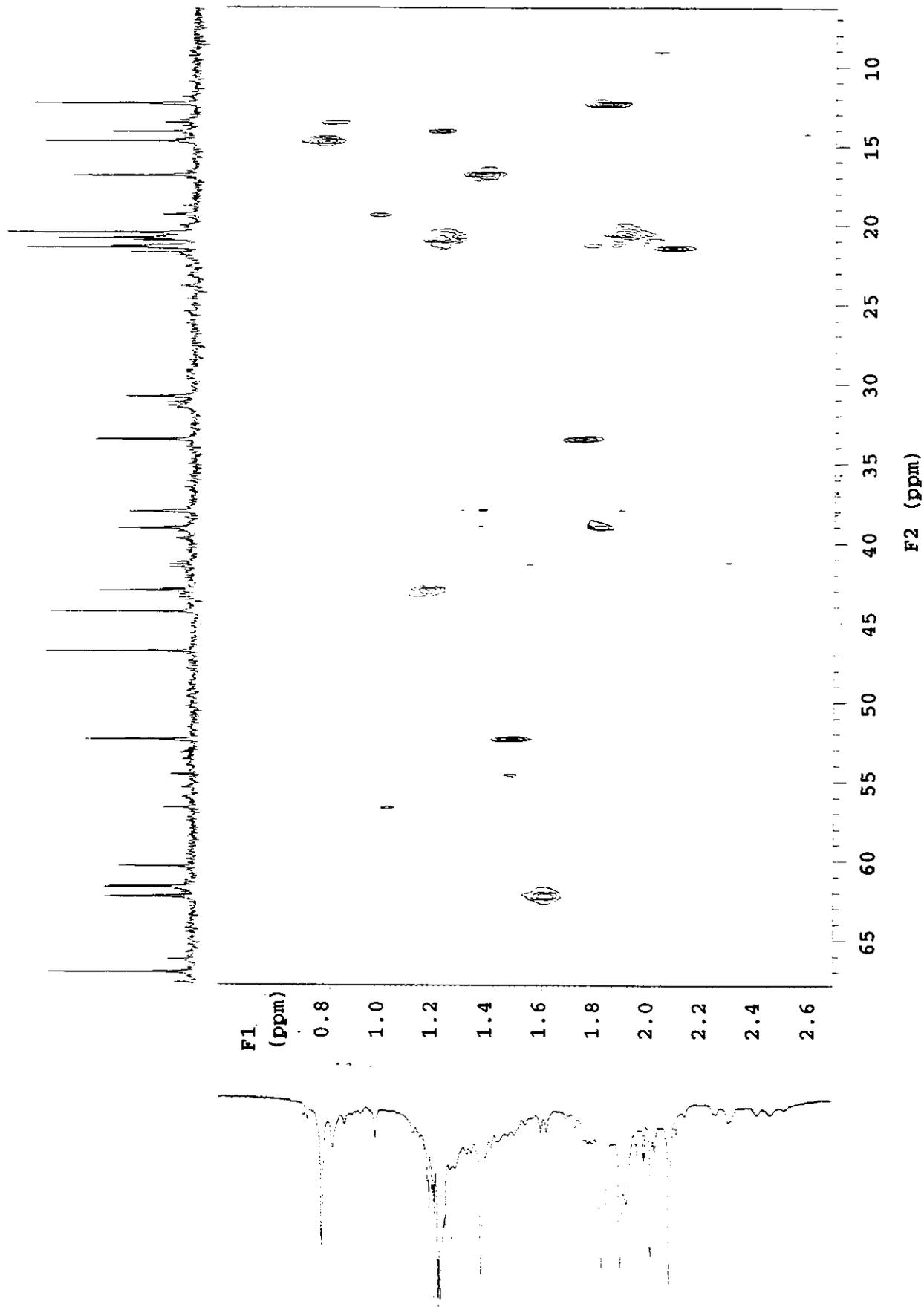
E34- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 5.



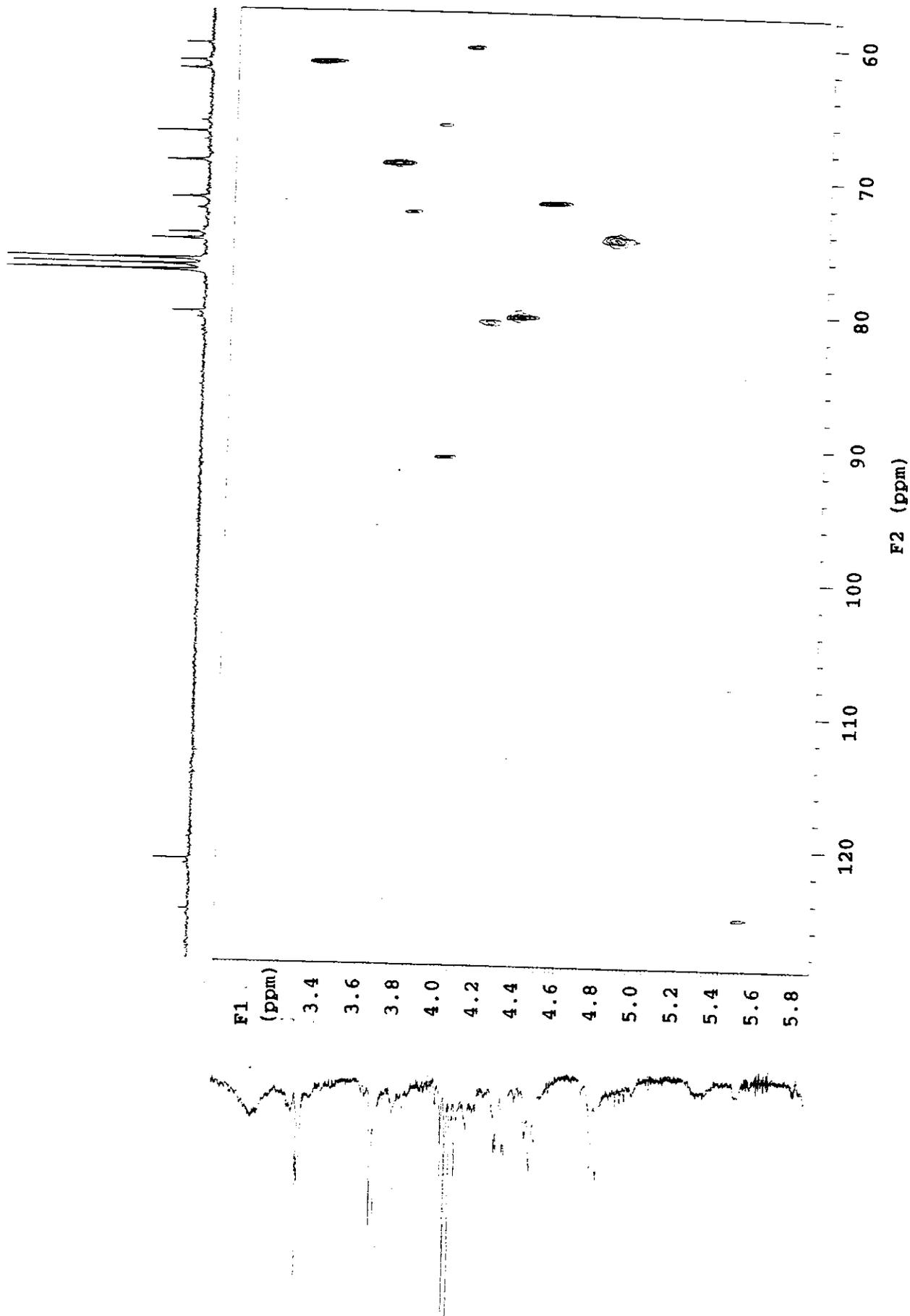
E-35- Espectro DEPT do vitanolídeo 5.



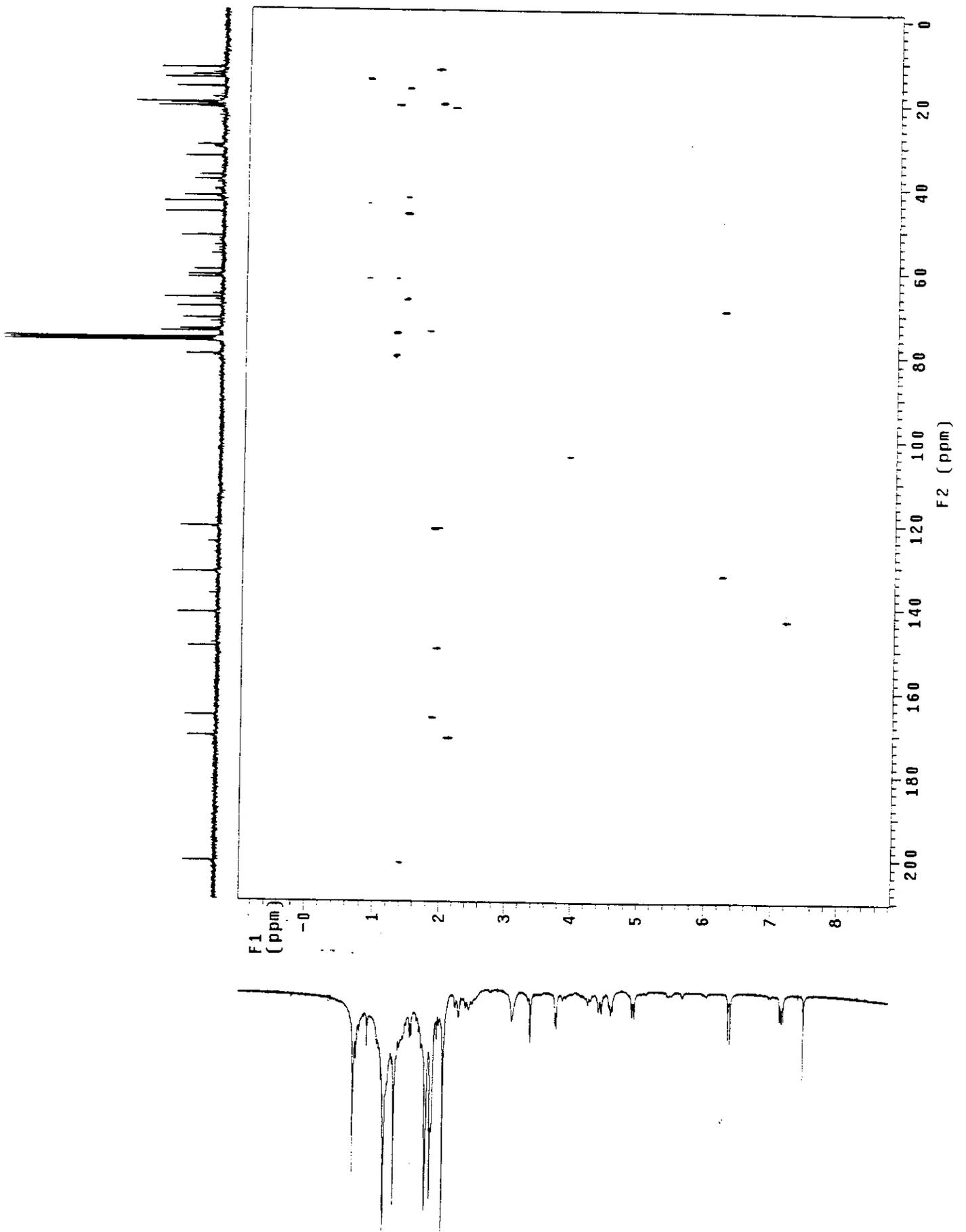
E-36- Espectro HETCOR do vitanolídeo 5.



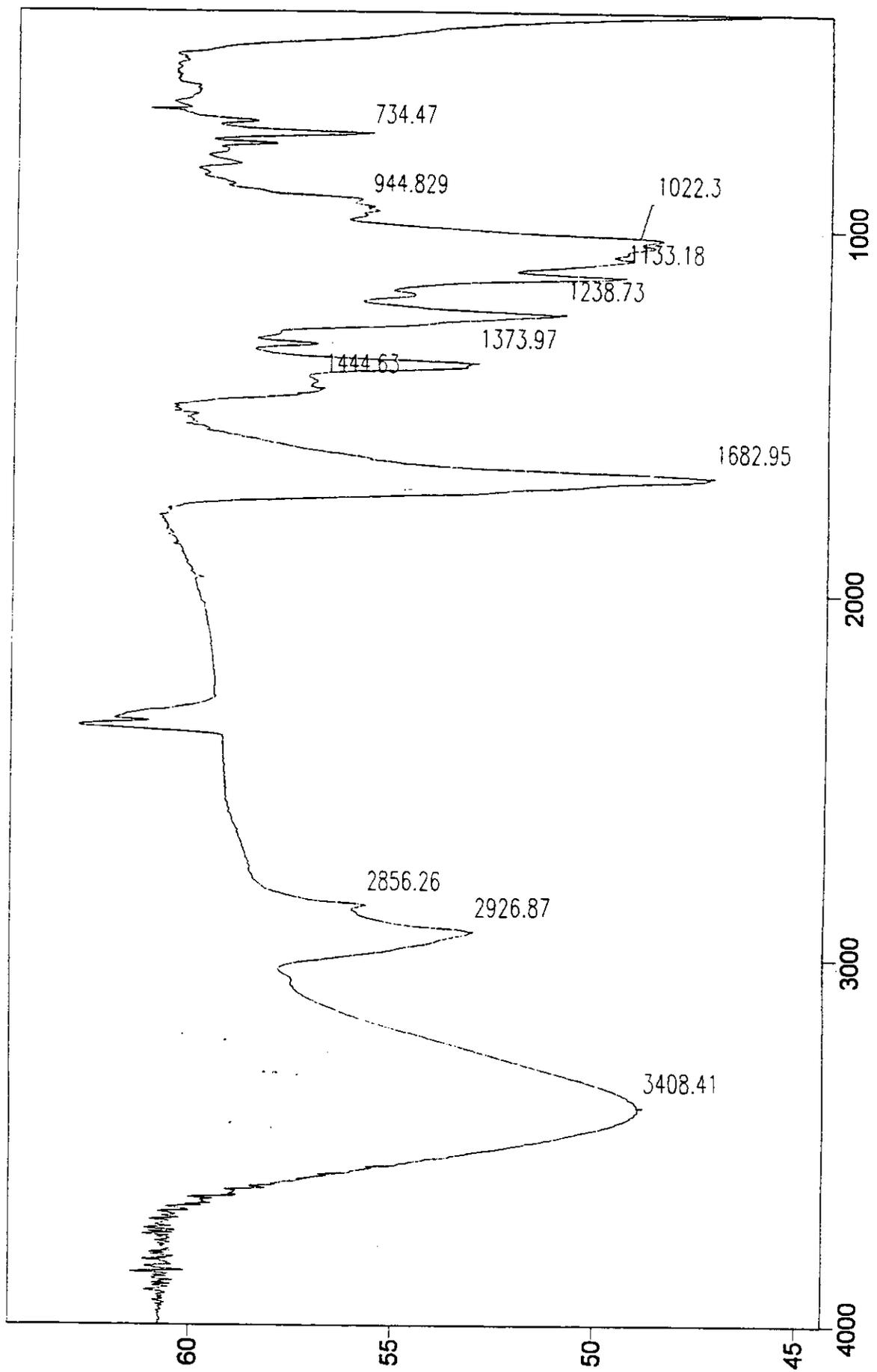
E-36a- Expansão do espectro HETCOR de 5.



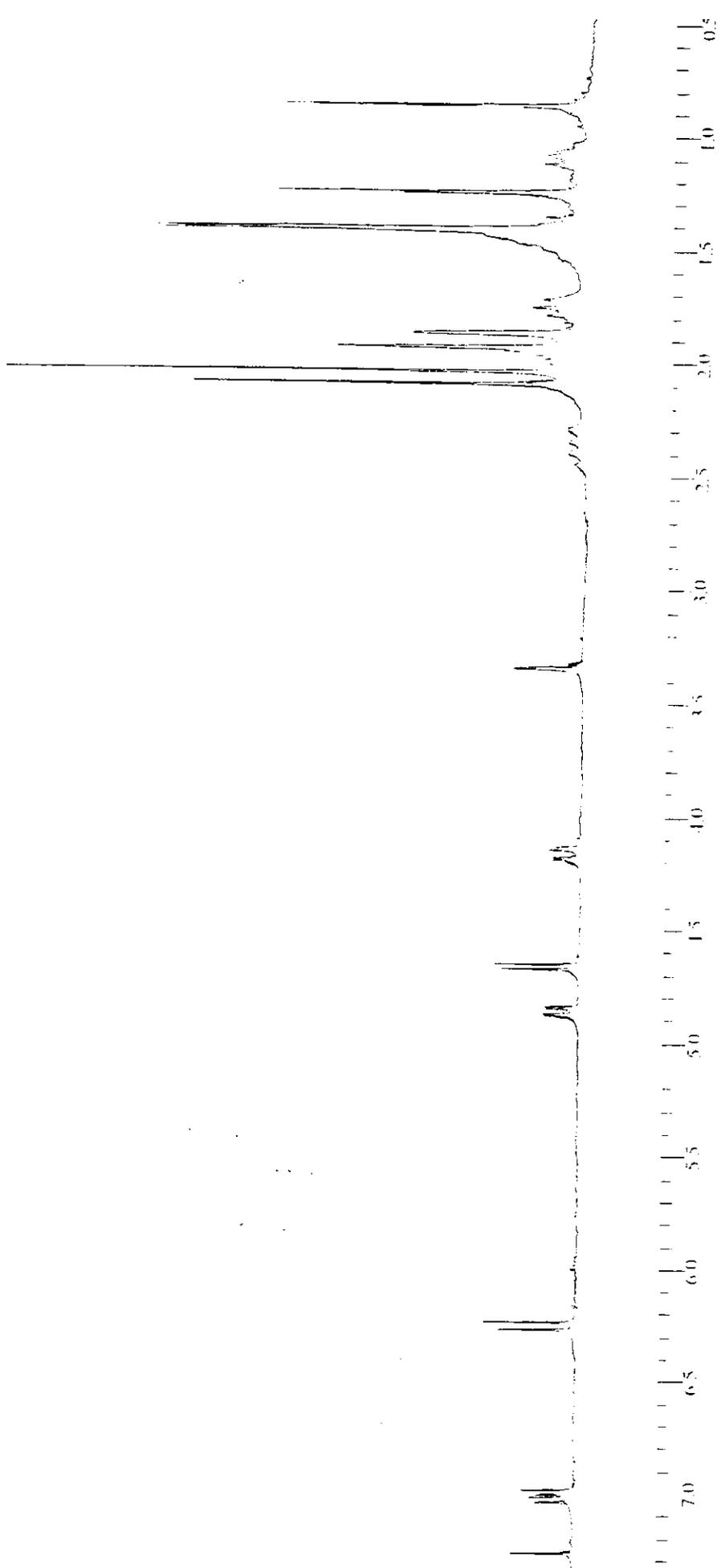
E-36b- Expansão do espectro HETCOR de 5.



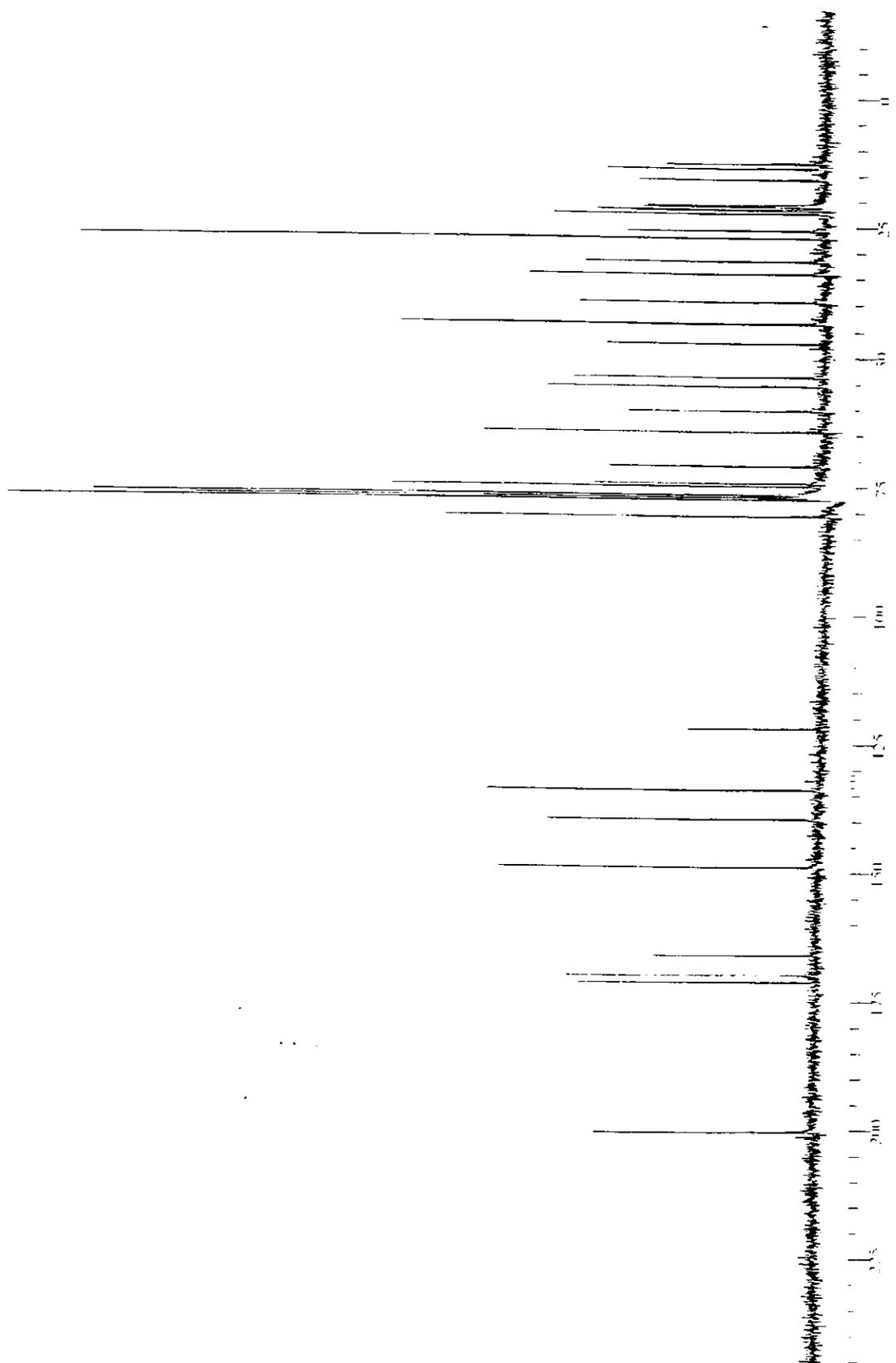
E-37- Espectro COLOC do vitanolídeo 5.



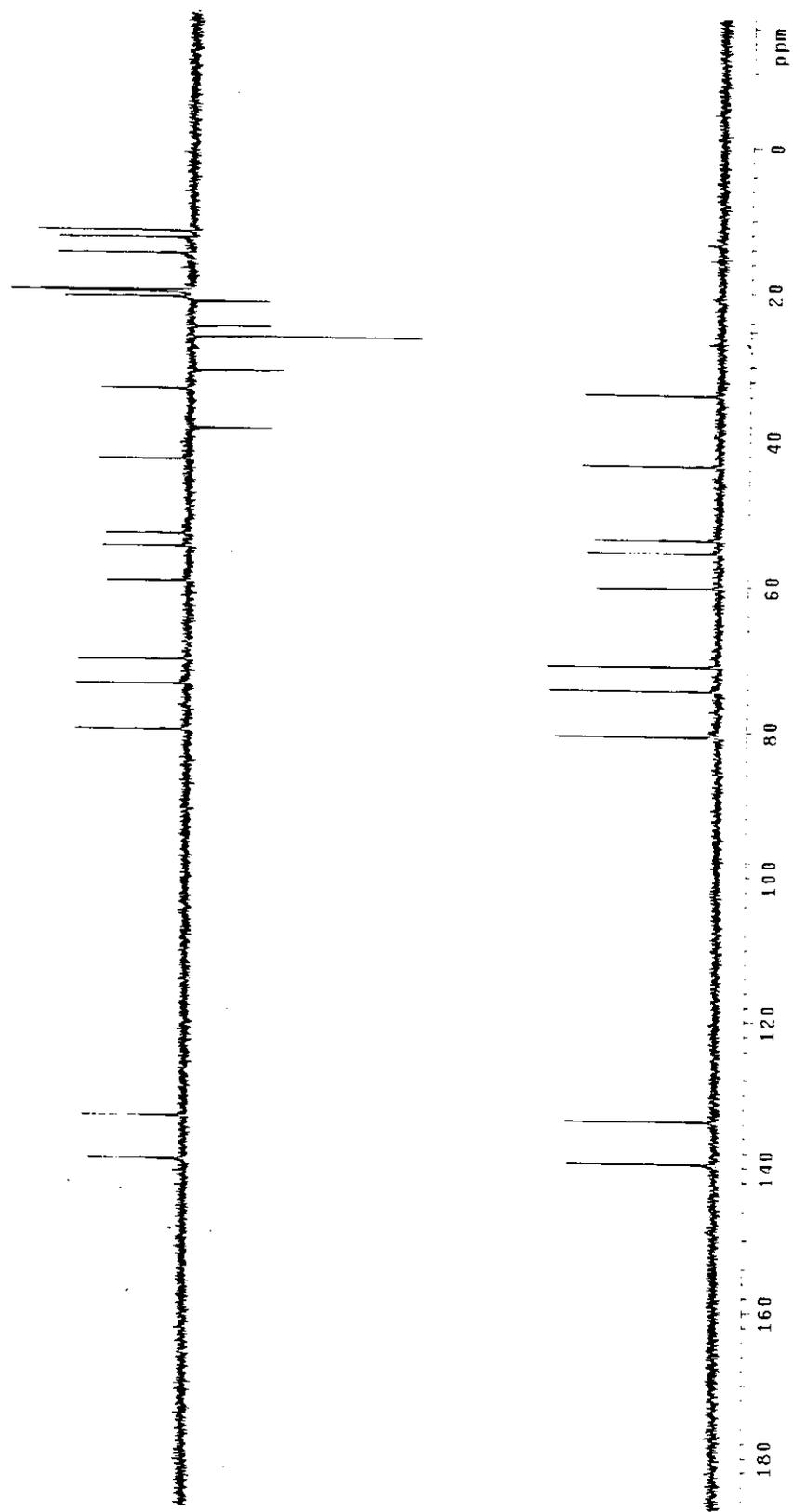
E-38- Espectro de IV Do vitanolídeo 5.



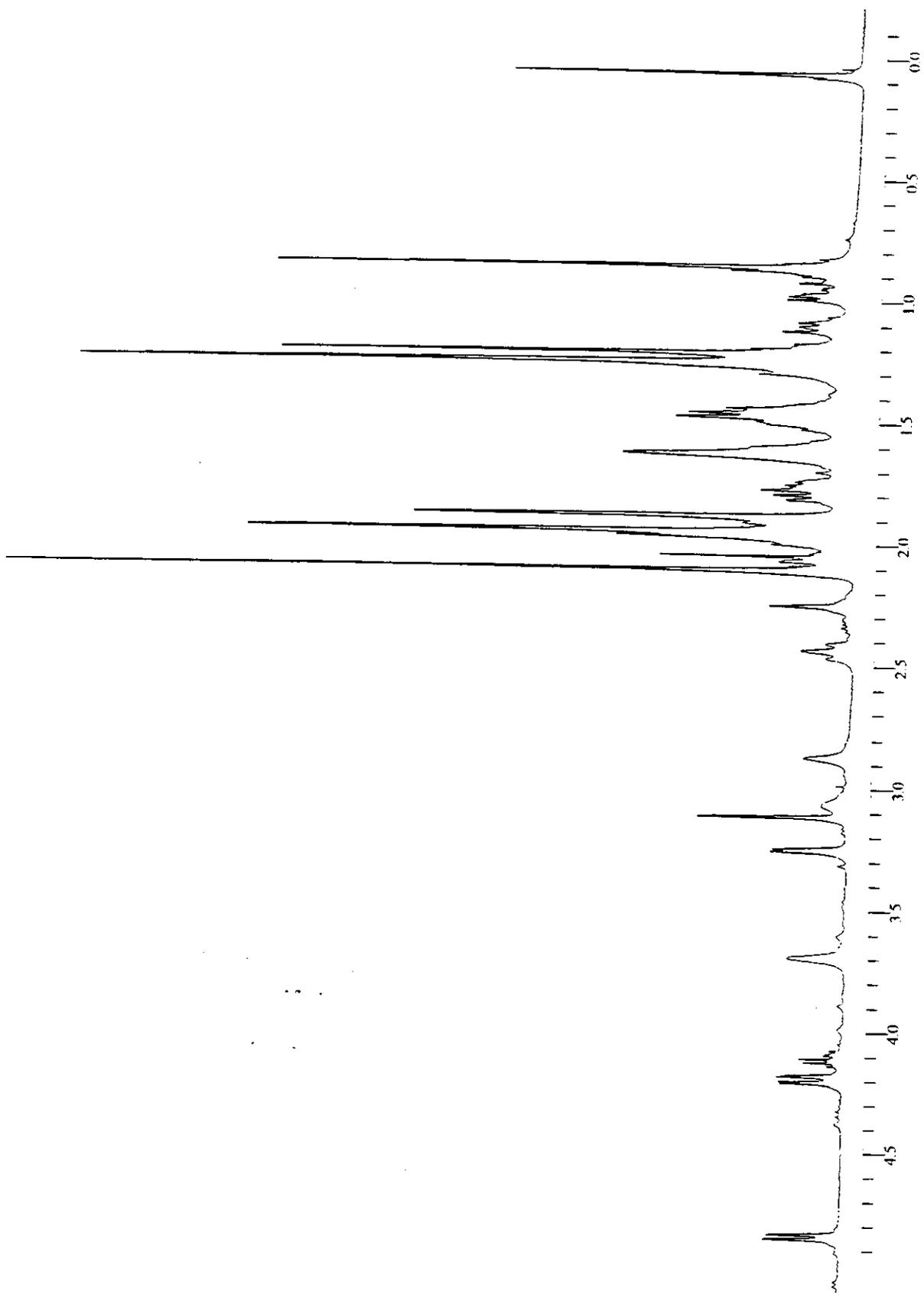
E-39- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo **1a**.



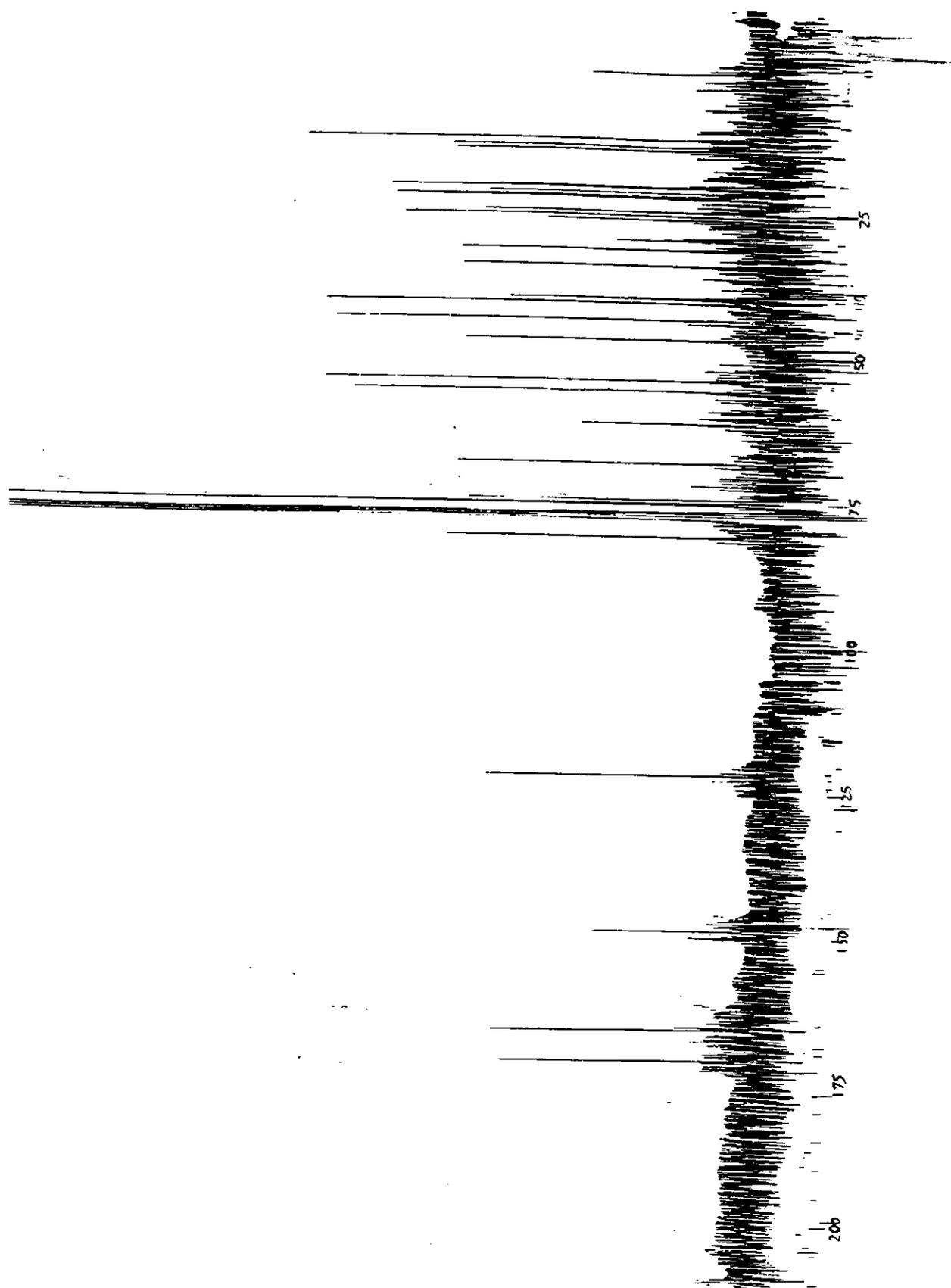
E-40- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo **1a**.



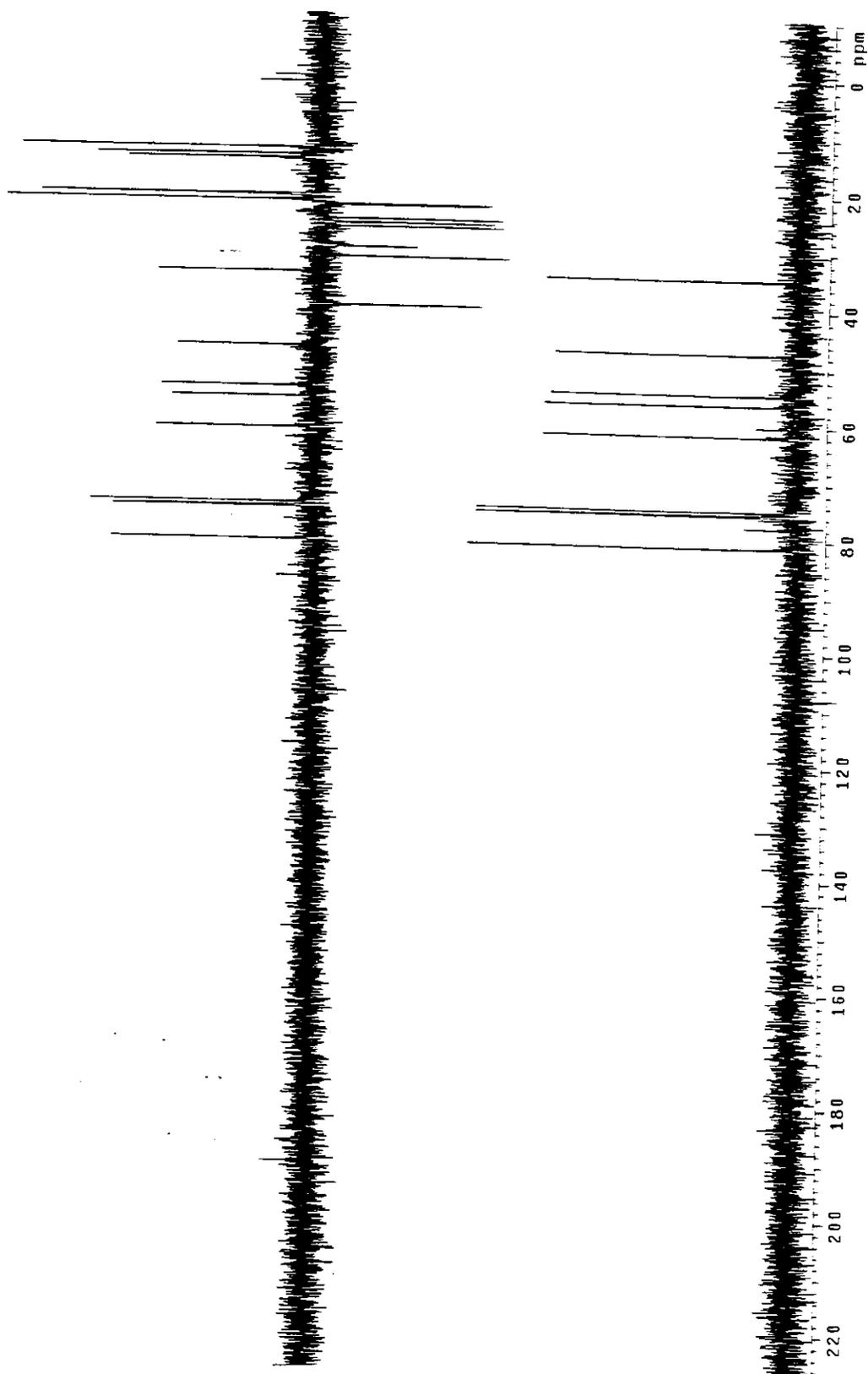
E-41- Espectro DEPT do vitanolídeo 1a.



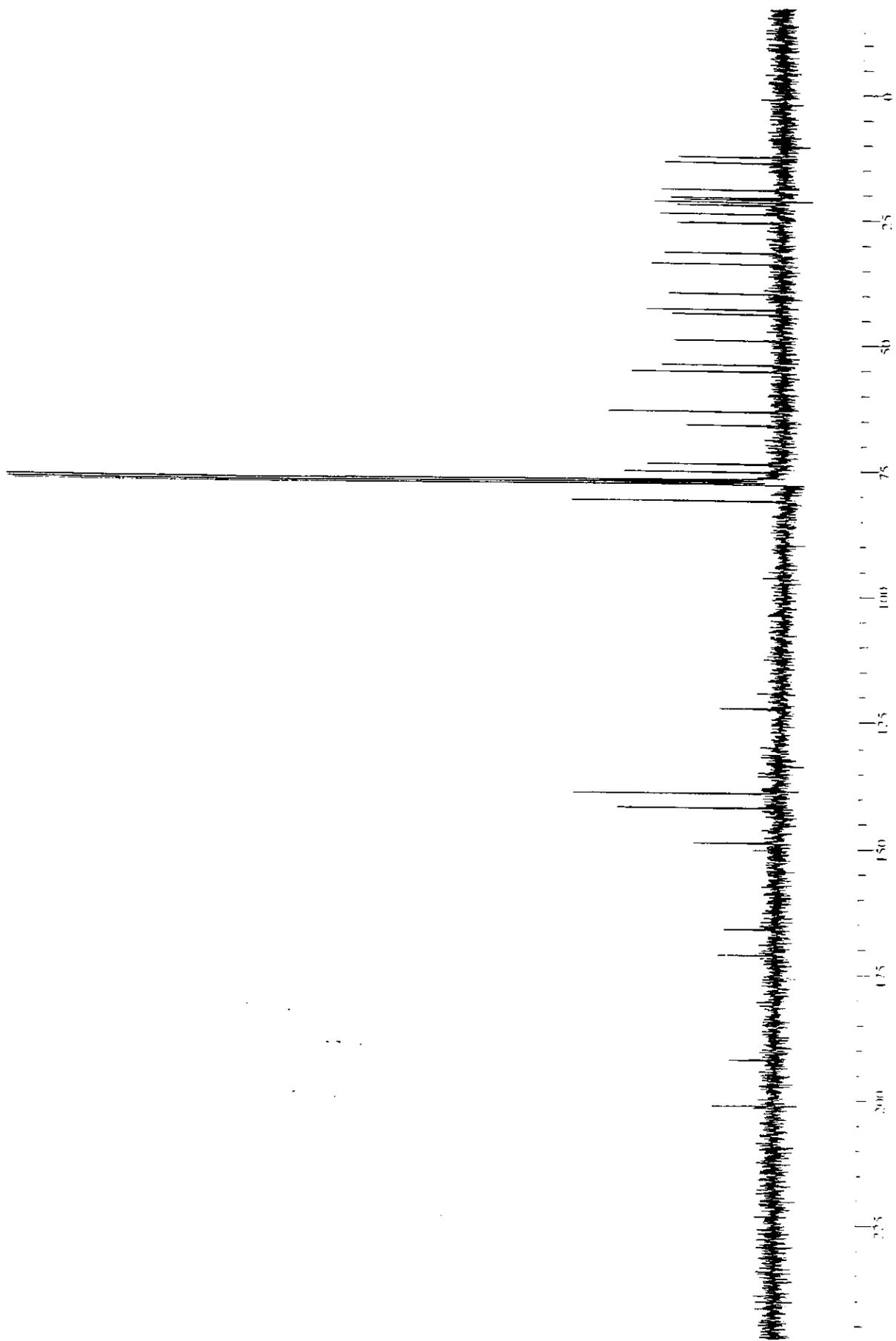
E-42- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo **1b**.



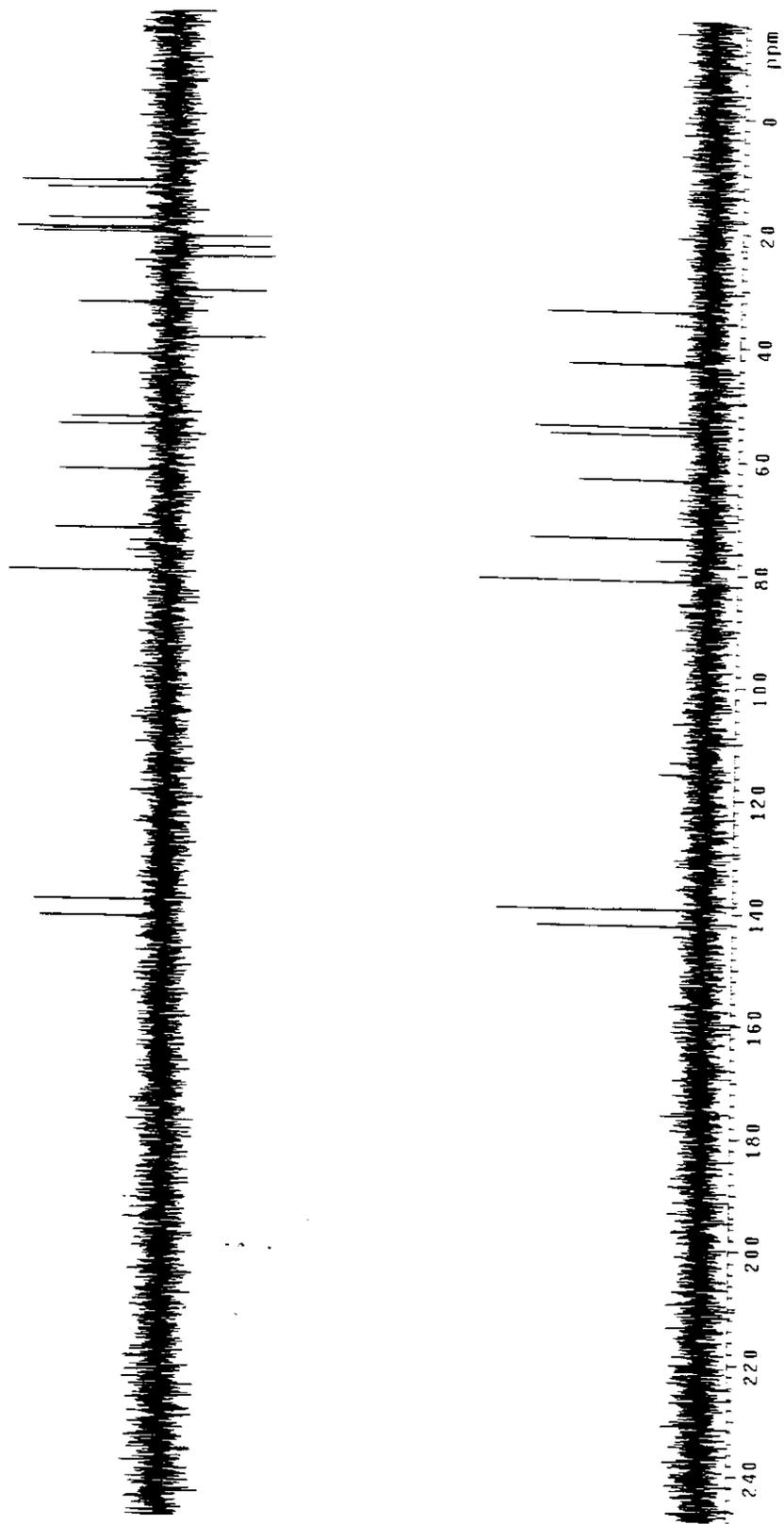
E-43- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolideo **1b**.



E-44- Espectro DEPT do vitanolídeo 1b.



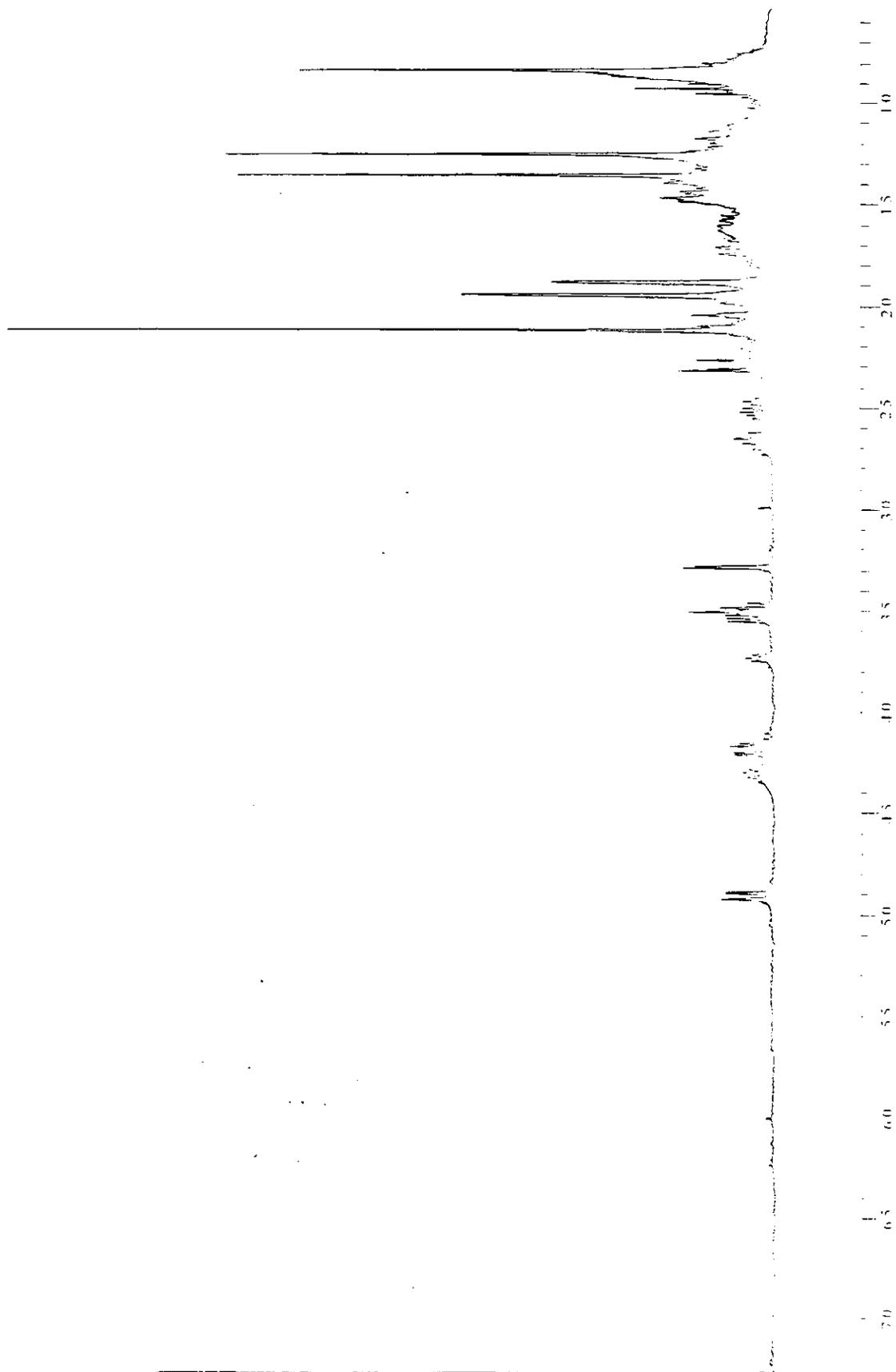
E-45- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 1c.



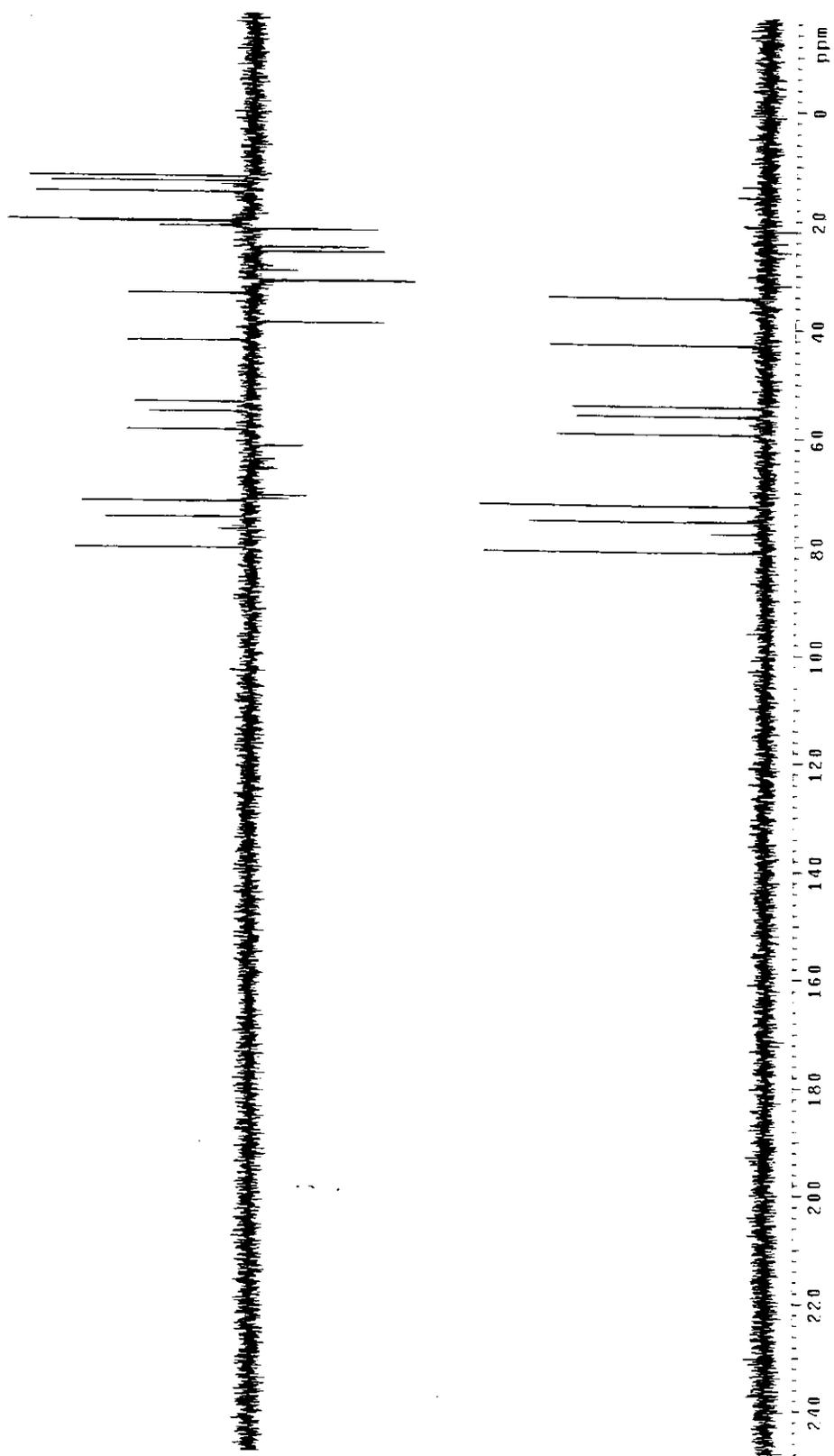
E-45a - Espectro DEPT do vitanolideo **1c**.



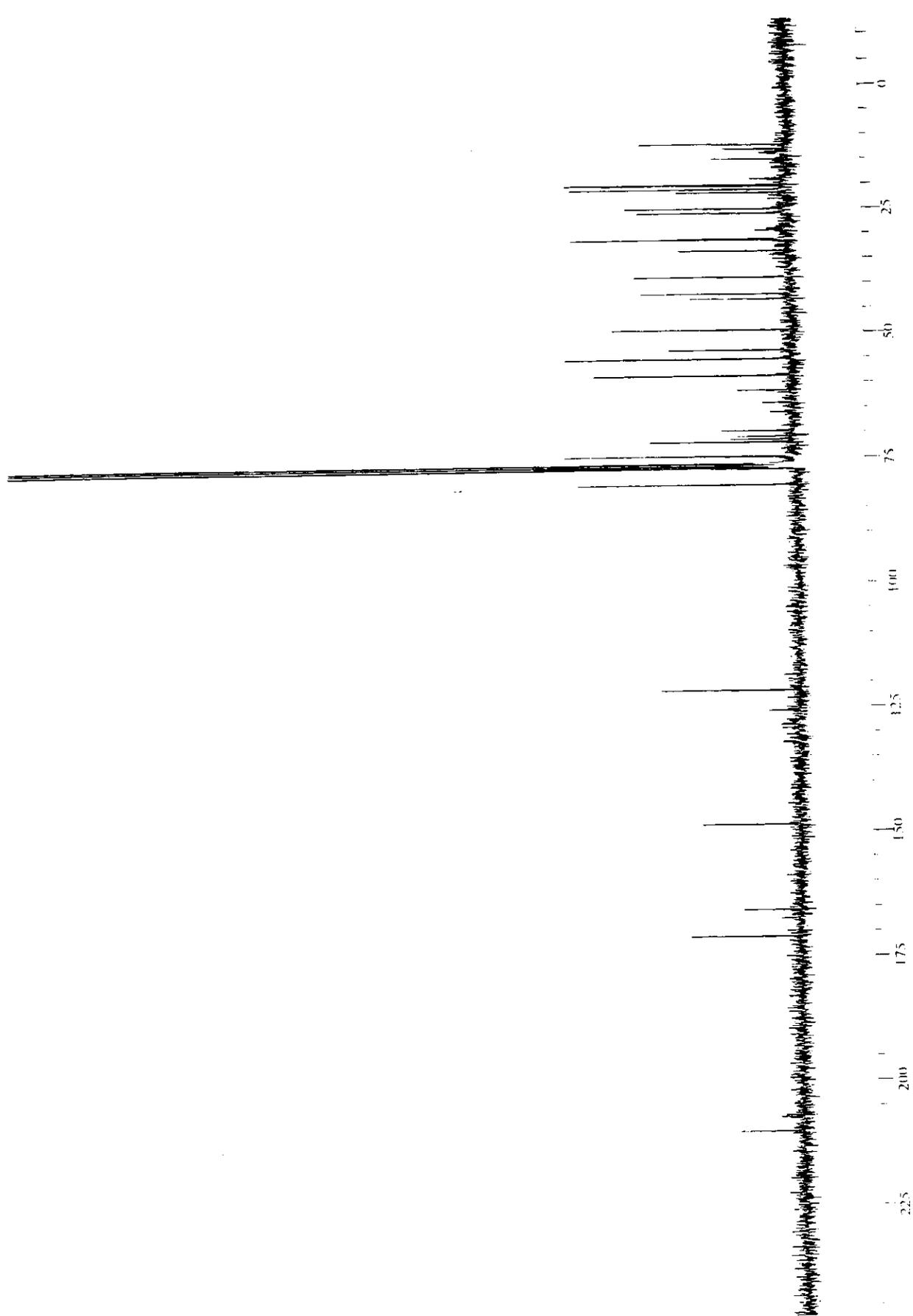
E-46- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo **1c**.



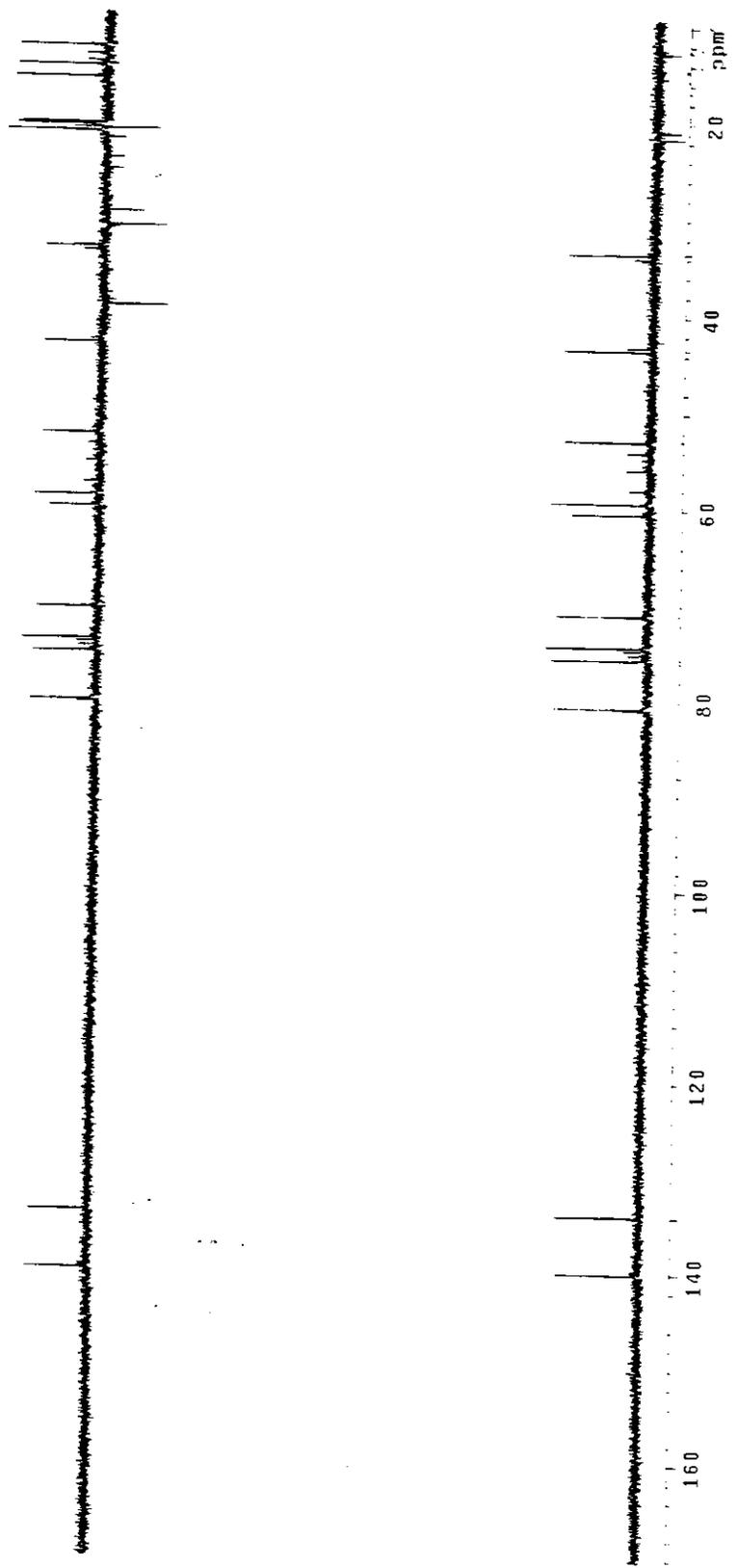
E-47- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo **1d**.



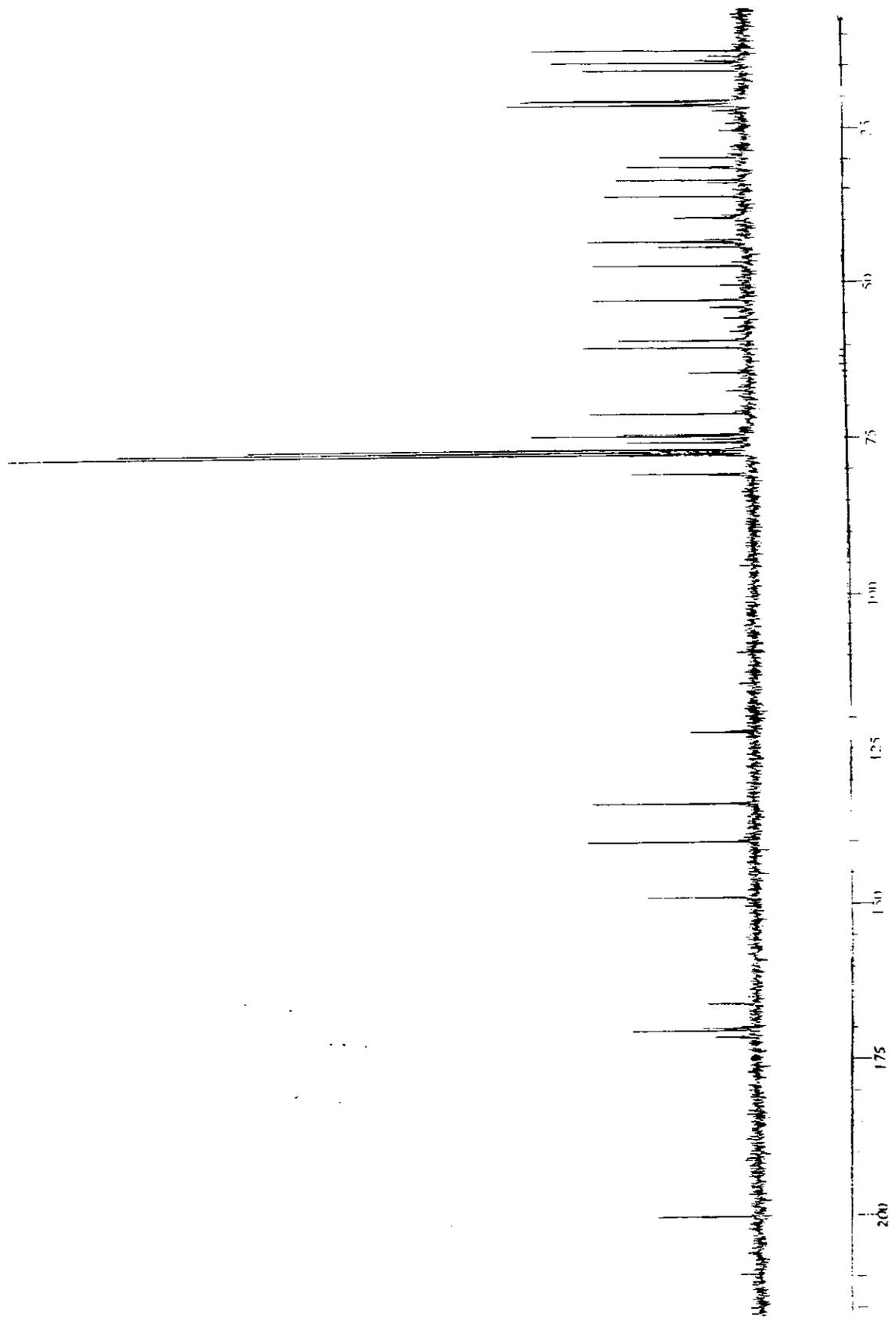
E-48- Espectro DEPT do vitanolideo 1d.



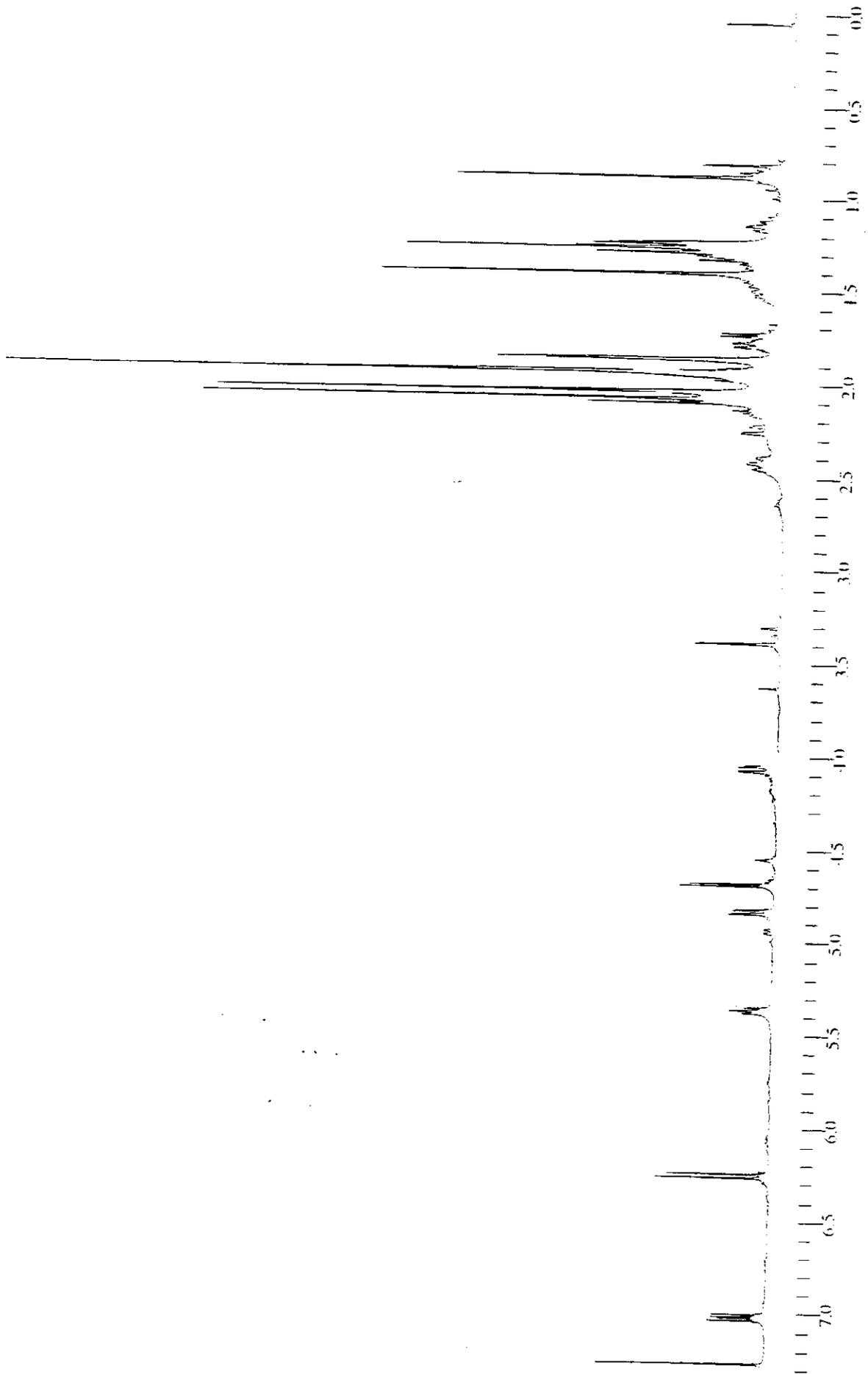
E-49- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 1d.



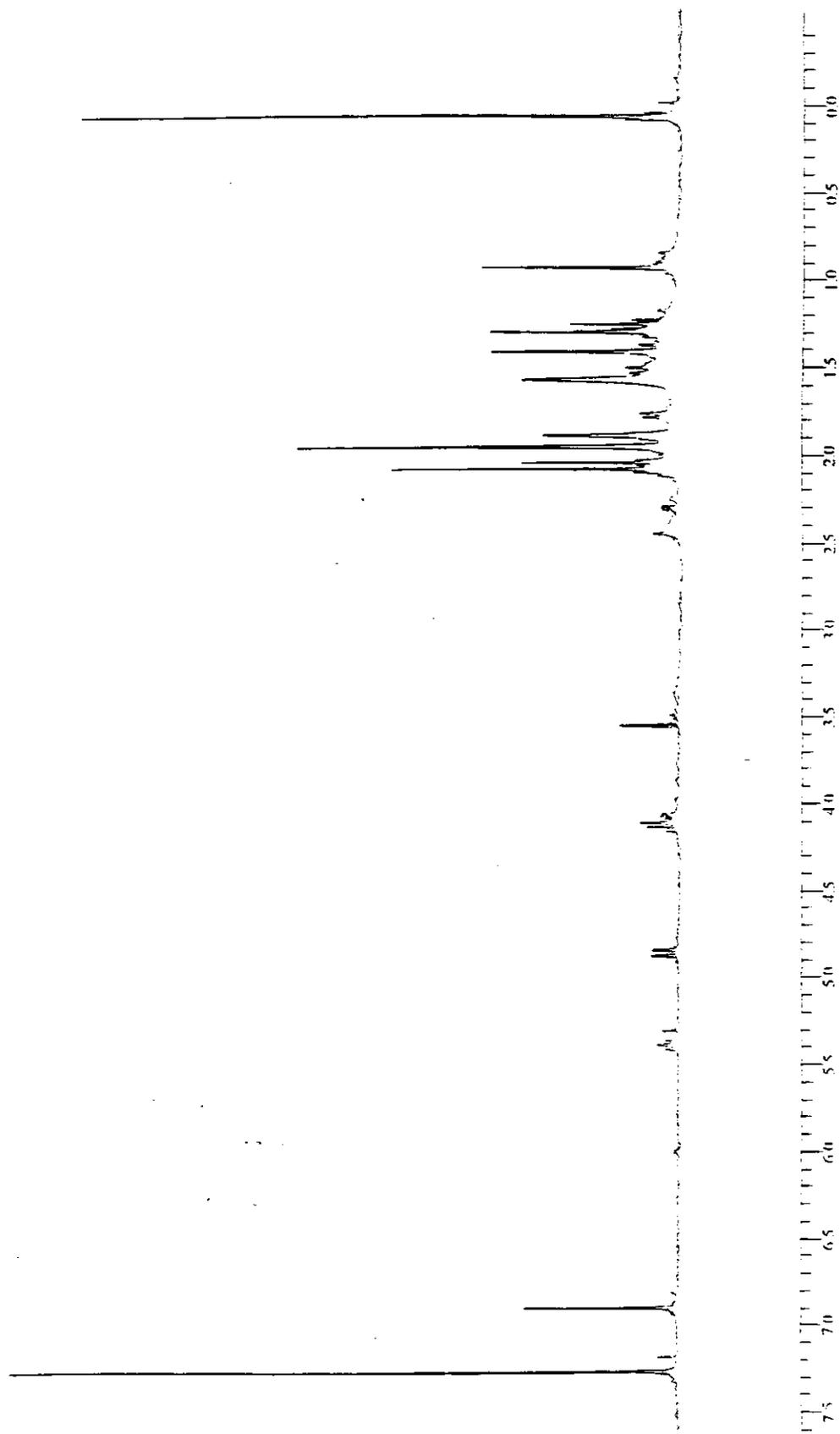
E-50- Espectro DEPT do vitanolídeo **2a**.



E-51- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do vitanolídeo 2a.



E-52- Espectro RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 2a.



E-53- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do vitanolídeo 2b.