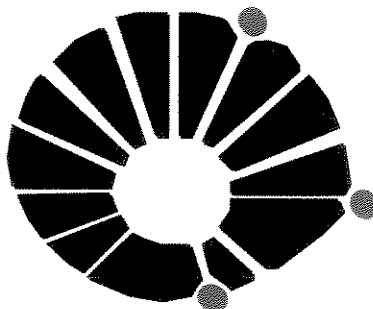




Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Instituto de Química – IQ

Departamento de Química Orgânica - DQO

**Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão:
Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica.**

Mary Ângela Fávaro Perez

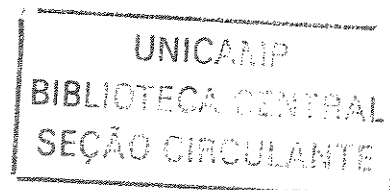
**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Química.**

Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães

Orientadora

25 de Fevereiro de 2005

Campinas, São Paulo – Brasil



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	P415d
V	EX
TOMBO BC/	65148
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11 00
DATA	03/08/05
Nº CPD	

Bib. id. 361081

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

P415d Perez, Mary Ângela Fávaro.
Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão:
Isolamento, determinação estrutural e atividade
biológica. / Mary Ângela Fávaro Perez. -- Campinas,
SP: [s.n], 2005.

Orientadora: Eva Gonçalves Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Leguminosae. 2. Sophoreae. 3. Myrocarpus.
4. Diterpenos. I. Magalhães, Eva Gonçalves.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

A Deus pela vida

Aos meus queridos pais Antônio e Josepina

As minha queridas irmãs e amigas Maria José, Doralice e Toninha

pelo amor, dedicação e ensinamentos sábios.

Meu eterno reconhecimento. Amo muito vocês!

**“Tudo na vida pode mudar de uma hora para outra.
O fundamental é nunca desistir de buscar a felicidade.”
(Autor desconhecido)**

**“...só se vê bem com o coração.
O essencial é invisível aos olhos.”
“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”
(Antoine de Saint-Exupéry)**

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Nacional e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães pela dedicação nos ensinamentos e na orientação deste trabalho e principalmente pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra. Ana Maria G. A. Tozzi pela atenção e carinho dispensados neste trabalho.

À Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli e sua doutoranda Sra. Suzan Pantaroto pela assistência técnica na realização dos testes de bioautografia e CIM.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e sua aluna Sra. Carina Denny pela colaboração na realização dos ensaios de atividade antiproliferativa.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial as técnicas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Paula Pilli, Sônia Crisóstomo e Sônia Fanelli, e à D. Maria Lopez pelo excelente trabalho técnico.

Às amigas Ana Lúcia, Celira, Lourdes, Maria del Pilar, Miriam e Valéria que acompanharam e incentivaram este trabalho.

A todo o pessoal do laboratório André, Adriana Flach, Adriana, Armando, Diego, Eduardo, Isis, Julia, Letícia, Lu Chen, Lucimar, Luiz Antônio, Mariza, Milena, Mirele, Sergio e Suzan pela agradável convivência.

Em especial aos amigos André Sardão, Fabiana, Fernando, José Roberto, Josiane, Naufal, Nina e Sílvia pelo constante carinho, apoio e amizade.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

Curriculum Vitae

1. Graduação:

Curso de Bacharelado em Química pela Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (1998-07/2002).

Curso de Licenciatura em Química pela Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (1998-2003).

2. Pós-Graduação:

Mestrado em Química Orgânica pela Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (08/2002-02/2005).

3. Trabalhos em Congressos:

3.1 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez**. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Diterpenos Naturais Inéditos de *Myrocarpus frondosus*", 30/05-02/06/2004, Salvador-BA. Livro de Resumos, PN074.

3.2 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez**. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Bioautografia dos extratos e substâncias isoladas de *Myrocarpus frondosus*", 30/05-02/06/2004, Salvador-BA. Livro de Resumos, PN073.

3.3 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez**. In: XXV RESEM - Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares, "Novos Diterpenos de *Myrocarpus frondosus*", 16-18/10/2003, Campos do Jordão-SP. CD de Resumos.

3.4 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Antoniana U. Kretti, Eva G. Magalhães, Lourdes C. S. Neta, **Mary A. F. Perez**, Miriam Sannomiya and Valter F. A. Neto. In: XII Congresso Ítalo-Americano de Etnomedicina, "Atividade In Vitro Contra *Plasmodium falciparum* Dos Extratos e Substâncias Das Raízes de Duas Leguminosae: *Deguelia longeracemosa* Beth Az-Tozzi e *Lonchocarpus montanus*", 08-12/09/2003, Rio de Janeiro-RJ. Livro de Resumos.

3.5 Aderbal F. Magalhães, Carlos A. Firmino, Cleverson F. Garcia, Eva G. Magalhães, Glaucius Oliva, João B. Fernandes, Lourdes C. S. Neta, Maria de F. G. F. da Silva, Maria del P. C. Soriano, Marisa A. Nogueira, **Mary A. F. Perez**, Miriam Sannomiya, Paulo C. Vieira e Valéria R. S. Moraes. In: 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Flavonóides de Rutaceae e Leguminosae e suas Atividades Inibitórias Frente a Enzima Glicolítica GAPDH de *Trypanosoma cruzi*", 26-29/05/2003, Poços de Caldas-MG. Livro de Resumos, QB031.

3.6 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez**. In: 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Primeiros Diterpenos Naturais Isolados do Gênero *Myrocarpus*", 26-29/05/2003, Poços de Caldas-MG. Livro de Resumos, PN003.

- 3.7 Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez**. In: X Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, "Primeiro Diterpeno Natural Isolado do Gênero *Myrocarpus*", 25-26/09/2002, Campinas-SP. Caderno de Resumos, p. E270.
- 3.8 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Claudia Picoli, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez**, Miriam Sannomiya e Selma Giorgio. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Atividade Leishmanicida do Extrato Éter de Petróleo das Raízes de *Lonchocarpus montanus* e do Aunol Derriobtusona A", 20-23/05/2002, Poços de Caldas-MG. Livro de Resumos, PN006.
- 3.9 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez** e Miriam Sannomiya. In: XXIII RESEM - Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares, "Correlações Quimiotaxonômicas dos Constituintes de *Platymiscium floribundum* var. *latifolium*", 22-24/10/2001, São Paulo-SP. Livro de Resumos, P023, p. 71.
3. 10 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez** e Miriam Sannomiya. In: XXIII RESEM - Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares, "Flavonóides em *Lonchocarpus montanus* (Leguminosae)", 22-24/10/2001, São Paulo-SP. Livro de Resumos, P24, p. 72.
- 3.11 Eva G. Magalhães e **Mary A. F. Perez**, In: IX Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. "Purificação dos Flavonóides Isolados de *Lonchocarpus montanus*", 27-28/09/2001, Campinas-SP. Caderno de Resumos, p. 90.
- 3.12 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez** e Miriam Sannomiya. In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Novos Metabólitos Isolados das Raízes de *Lonchocarpus montanus* (Leguminosae)", 28-31/05/2001, Poços de Caldas-MG. Livro de Resumos, PN090.
- 3.13 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez** e Miriam Sannomiya. In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, "Avaliação da Atividade Biológica dos Flavonóides de *Lonchocarpus montanus* (Leguminosae)", 28-31/05/2001, Poços de Caldas-MG. Livro de Resumos, PN009.
- 3.14 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez** e Miriam Sannomiya. In: 3rd Congress of Pharmaceutical Sciences, "Coumarin and Isoflavone Isolated of *Platymiscium floribundum* var. *latifolium*", 08-11/04/2001, Águas de Lindóia-SP. European Journal of Pharmaceutical Sciences, vol.13, Suppl. 1, p.S111, P.13.46, 2001.
- 3.15 Aderbal F. Magalhães, Ana M. G. A. Tozzi, Eva G. Magalhães, **Mary A. F. Perez** e Miriam Sannomiya. In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, "*Platymiscium floribundum* Vog. – Constituintes Fenólicos e Atividade Biológica", 17-20/10/2000, Recife-PE. Livro de Resumos, QU093, p. 151.

Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica.

Resumo

O estudo fitoquímico dos extratos hexânico e diclorometânico das cascas das raízes de *Myrocarpus frondosus* resultou no isolamento de sete diterpenos (18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24) cujas estruturas foram determinadas pela análise dos respectivos espectros de IV, UV, RMN e EM com ênfase na análise detalhada dos espectros de massas (baixa e alta resolução e experimentos de EM/EM), RMN-1D (^1H , ^{13}C , DEPT e NOESY 1D) e RMN-2D (gCOSY, HSQC/HETCOR e HMBC/COLOC). Após levantamento bibliográfico no *Chemical Abstract* (1907-2004), constatou-se que as substâncias 19, 20, 21 e 22 são inéditas na literatura. Os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das cascas das raízes quando submetidos ao ensaio de letalidade com *Artemia salina* mostraram-se ativos. Os extratos e as substâncias 18, 19 e 21 foram submetidos ao ensaio de bioautografia, sendo o extrato hexânico o único que apresentou atividade antimicrobiana, mas somente frente aos fungos *Rhizopus oryzae* (CCT 4964) e *Alternaria alternata* (CCT 1250), enquanto que 19 mostrou-se ativa somente contra as bactérias *Bacillus subtilis* (CCT 0089) e *Staphylococcus aureus* (CCT 4295), que foi confirmado no ensaio de concentração inibitória mínima (CIM = $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos hexânico e diclorometânico foram submetidos ao teste de atividade antiproliferativa com linhagens de células tumorais e apresentaram efeito citostático e citocida, já o extrato metanólico apresentou apenas efeito citostático. A substância 21 mostrou atividade frente às linhagens OVCAR (ovário) e PCO.3 (próstata), sendo cerca de 1000 vezes e 60 vezes respectivamente mais ativa que a doxorubicina (controle positivo), enquanto que para a linhagem NCI.460 (pulmão), a atividade mostrou-se equivalente ao controle positivo.

Diterpenes from *Myrocarpus frondosus* Allemão: Isolation, Structural Determination and Biological Activities.

Abstract

The phytochemical study of hexane and dichloromethane extracts from the roots of *Myrocarpus frondosus* resulted in the isolation of seven diterpenes (18, 19, 20, 21, 22, 23 and 24) whose structures were determined by the analysis of mass spectra (low and high resolution and EM/EM experiments), 1D-NMR (^1H , ^{13}C , DEPT e NOESY 1D) and 2D-NMR (gCOSY, HSQC/HETCOR e HMBC/COLOC). A bibliographic research on *Chemical Abstract* (1907-2004) showed that 19, 20, 21 and 22 are new compounds. The hexane, dichloromethane and methanol extracts from the roots were active when submitted to bioassay *Artemia salina* lethality. The extracts and compounds 18, 19 and 21 were submitted to bioautography assay, when the hexane extract showed antimicrobial activity against *Rhizopus oryzae* (CCT 4964) and *Alternaria alternata* (CCT 1250), while 19 it was active against *Bacillus subtilis* (CCT 0089) and *Staphylococcus aureus* (CCT 4295), both giving MIC = 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The hexane and dichloromethane extracts were submitted to the test of antiproliferative activity against lineages of tumoral cells from humans and showed citostatic and citocidi effect, while the methanol extract showed only citostatic effect. The compound 21 showed activity against OVCAR (ovarian) and PCO.3 (prostate) lineages, being about 1000 and 60 times more active than doxorubicin (positive control) respectively, while the activity against NCI.460 (lung) lineage was equivalent to that of the positive control (doxorubicin).

Índice Geral

	Página
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
Lista de Espectro.....	xxv
Lista de Fluxogramas.....	xxxi
Lista de Quadros.....	xxxiii
 Capítulo I - Diterpenos de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão.....	 01
1 Introdução.....	03
2 Objetivos.....	10
3 Parte Experimental.....	11
3.1 Materiais e Métodos.....	11
3.1.1 Análises Cromatográficas por CCDC e CCDP.....	11
3.1.2 Reveladores.....	11
3.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	11
3.1.4 Espectrometria de Massas.....	12
3.1.5 Espectroscopia no Ultravioleta.....	12
3.1.6 Espectroscopia no IV.....	12
3.1.7 Rotação Óptica.....	12
3.1.8 Ponto de Fusão.....	13
3.2 Estudo Fitoquímico.....	13
3.2.1 Coleta do material vegetal.....	13
3.2.2 Obtenção dos extratos.....	13
3.2.3 Estudo do Extrato Hexânico.....	14
3.2.4 Estudo do Extrato Diclorometânico.....	21
4 Resultados e Discussão.....	24
4.1 Determinação estrutural do diterpeno 18	25

4.2 Determinação estrutural do diterpeno <u>19</u>	29
4.3 Determinação estrutural do diterpeno <u>20</u>	34
4.4 Determinação estrutural do diterpeno <u>21</u>	41
4.5 Determinação estrutural do diterpeno <u>22</u>	47
4.6 Determinação estrutural do diterpeno <u>23</u>	52
4.7 Determinação estrutural do diterpeno <u>24</u>	56
 Capítulo I – Anexo A.....	 61
 Capítulo II - Atividade Biológica.....	 111
1 Introdução.....	113
2 Materiais e Métodos.....	115
2.1 Letalidade com <i>Artemia salina</i>	115
2.2 Bioautografia.....	116
2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	117
2.4 Atividade Antiproliferativa.....	118
3 Resultados e Discussão.....	120
3.1 Letalidade com <i>Artemia salina</i>	120
3.2 Bioautografia.....	120
3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	121
3.4 Atividade Antiproliferativa.....	122
 Considerações Finais.....	 128

Lista de abreviaturas

AcOEt Acetato de Etila

Co Carbono não hidrogenado

CCDC Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl₃ Clorofórmio deuterado

CI₅₀ Concentração inibitória

CL₅₀ Concentração letal

COLOC Correlated Spectroscopy via Long Range Coupling

d duplete

dd duplo dublete

ddd duplo duplo dublete

DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

dq duplo quinteto

dt duplo tripleto

E Espectro

ED Extrato Diclorometânico

EE Éter Etilico

EH Extrato Hexânico

EM Extrato Metanólico

EM/EM Experimento de Espectro de Massas de Espectro de Massas

EMAR Espectro de Massas de Alta Resolução

eV elétron volts

gCOSY Correlated Spectroscopy

HETCOR Heteronuclear Correlation Spectroscopy

Hex Hexano

HMBC Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz Hertz

IE Impacto Eletrônico

IV Infravermelho

J constante de acoplamento

M⁺ íon molecular

m multipeto

md multipeto de dubeto

ms multipeto de singeto

mt multipeto de tripeto

m/z relação massa/carga

nOe Nuclear Overhauser Effect

NOESY 1D Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

qt quarteto triplo

RDA Retro Diels-Alder

RMN¹H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN¹³C Ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN-2D Ressonância magnética nuclear bidimensional

s singeto

sl singeto largo

t tripeto

td triplo dubeto

t_R tempo de retenção

UV Ultravioleta

δ deslocamento químico

λ comprimento de onda

Lista de Tabelas

	Página
Capítulo I - Diterpenos de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	
Tabela 1: Compostos isolados anteriormente das espécies do gênero <i>Myrocarpus</i>	09
Tabela 2: Relação entre Grupo de frações / Substâncias isoladas do extrato hexânico de <i>M. frondosus</i>	15
Tabela 3: Relação entre Grupo de frações / Substâncias isoladas do extrato diclorometânico de <i>M. frondosus</i>	21
Tabela 4: Correlações observadas nos espectros gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125 MHz, CDCl ₃) para 18 , bem como os dados de RMN ¹ H e ¹³ C da literatura (100MHz, C 25MHz, CDCl ₃) para o <i>ent</i> -5,15-rosadieno.....	27
Tabela 5: Correlações observadas nos espectros gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl ₃) para 19	31
Tabela 6: Correlações observadas nos espectros gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl ₃) para 20	36
Tabela 7: Correlações observadas nos espectros de gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl ₃) para 21	43
Tabela 8: Correlações observadas nos espectros de RMN-2D gCOSY (H-H, J^n), HETCOR (C-H, J^1) e COLOC (C-H, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl ₃) para 22	49
Tabela 9: Correlações observadas nos espectros de RMN-2D gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl ₃) para 23	54

Tabela 10: Correlações observadas nos espectros de RMN-2D gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl ₃) para <u>24</u>	57
Capítulo II – Atividade Biológica	
Tabela 1: Linhagens de células tumorais humanas utilizadas no ensaio de atividade antiproliferativa.....	118
Tabela 2: Resultados obtidos no teste de bioautografia dos extratos e algumas substâncias frente aos microrganismos analisados.....	121
Tabela 3: Valores de Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹) obtidos para os extratos de <i>M. frondosus</i> , substância <u>21</u> e doxorubicina frente às linhagens de células tumorais humanas.....	126

Lista de Figuras

	Página
Capítulo I - Diterpenos de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	
Figura 1: Mapa contendo a distribuição geográfica das espécies de <i>Myrocarpus</i> Allemão que foram detectadas.....	06
Figura 2: Ilustração das estruturas de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão.	07
Figura 3: Grupos de frações obtidas do fracionamento do extrato hexânico, desenvolvida em CH ₂ Cl ₂ (1X).....	15
Figura 4: Grupos de frações obtidas do fracionamento do extrato diclorometânico, desenvolvida em CH ₂ Cl ₂ (1X).....	22
Figura 5: Correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J ⁿ) da substância <u>18</u>	26
Figura 6: Correlações observados para os carbonos quaternários do anel C no espectro de HMBC (H, C, J ⁿ) da substância <u>19</u>	32
Figura 7: Incrementos observados no experimento de nOe para <u>19</u>	32
Figura 8: Correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J ⁿ) da substância <u>20</u>	35
Figura 9: Incrementos observados no experimento de nOe para <u>20</u>	37
Figura 10: Algumas correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J ⁿ) da substância <u>21</u>	42
Figura 11: Incrementos observados no experimento de nOe para <u>21</u> ...	44
Figura 12: Correlações observados no espectro de COLOC (C, H, J ⁿ) da substância <u>22</u>	48
Figura 13: Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de nOe para <u>22</u>	50
Figura 14: Correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J ⁿ) da substância <u>23</u>	53

Figura 15: Correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J^n) da substância <u>24</u>	58
Figura 16: Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de nOe para <u>24</u>	58
Capítulo II - Atividade Biológica	
Figura 1: Atividade do extrato hexânico de <i>M. frondosus</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.....	123
Figura 2: Atividade do extrato diclorometânico de <i>M. frondosus</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.....	123
Figura 3: Atividade do extrato metanólico de <i>M. frondosus</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.....	124
Figura 4: Atividade da substância <u>21</u> sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.....	125

Lista de Espectros

	Página
Capítulo I - Anexo A	
E1: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 18	63
E2: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 18	63
E3: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl_3) da substância 18 ..	64
E4: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 18	64
E5: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 18	65
E6: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 18	65
E7: Espectro de massas (IE, 70eV) da substância 18	66
E8: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 19	66
E9: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 19	67
E10: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl_3) da substância 19	67
E11: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19	68
E12: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19	68
E13 Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19	69
E14: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19	69
E15: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19	70
E16: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 19	70

E17: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância <u>19</u>	71
E18: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância <u>19</u>	71
E19: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl_3 , δ 4.80) da substância <u>19</u>	72
E20: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância <u>19</u>	72
E21: Espectros de massas do experimento EM/EM (IE, 70eV) da substância <u>19</u> com seleção dos íons m/z 298 (a), 280 (b), 283 (c) e 265 (d).....	73
E22: Espectro de UV da substância <u>19</u>	73
E23: Espectro de IV da substância <u>19</u>	74
E24: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	74
E25: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	75
E26: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	75
E27: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	76
E28: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	76
E29: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	77
E30: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	77
E31: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	78
E32: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 00Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	78
E33: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância <u>20</u>	79

E34: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ , δ 4.64) da substância <u>20</u>	79
E35: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância <u>20</u>	80
E36: Espectros de massas do experimento EM/EM (IE, 70eV) da substância <u>20</u> com seleção dos íons <i>m/z</i> 314 (a), 296 (b), 281 (c), 253 (d) e 211 (e).....	81
E37: Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	82
E38: Espectro de RMN ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	82
E39: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	83
E40: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	83
E41: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	84
E42: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	84
E43: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	85
E44: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	85
E45: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	86
E46: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	86
E47: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>21</u>	87
E48: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ , δ 0.88) da substância <u>21</u>	87

E49: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ , δ 1.33) da substância <u>21</u>	88
E50: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ , δ 3.77) da substância <u>21</u>	88
E51: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância <u>21</u>	89
E52: Espectros de massas do experimento EM/EM (IE, 70eV) da substância <u>21</u> com seleção dos íons <i>m/z</i> 318 (a), 285 (b), 163 (c) e 135 (d).....	90
E53: Espectro de UV da substância <u>21</u>	91
E54: Espectro de IV da substância <u>21</u>	91
E55: Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	92
E56: Espectro de RMN ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	92
E57: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	93
E58: Mapa de contorno de RMN-2D (¹³ C, ¹ H-HETCOR) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	93
E59: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹³ C, ¹ H-HETCOR) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	94
E60: Mapa de contorno de RMN-2D (¹³ C, ¹ H-COLOC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	94
E61: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹³ C, ¹ H-COLOC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	95
E62: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹³ C, ¹ H-COLOC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	95
E63: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	96
E64: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>22</u>	96
E65: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ , δ 1.03) da substância <u>22</u>	97

E66: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ , δ 3.93) da substância <u>22</u>	97
E67: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância <u>22</u>	98
E68: Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	98
E69: Espectro de RMN ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	99
E70: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	99
E71: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	100
E72: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	100
E73: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹ H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	101
E74: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	101
E75: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	102
E76: Mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	102
E77: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹ H, ¹³ C-HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl ₃) da substância <u>23</u>	103
E78: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância <u>23</u>	103
E79: Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) da substância <u>24</u>	104
E80: Espectro de RMN ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>24</u>	104
E81: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl ₃) da substância <u>24</u>	105

E82: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância <u>24</u>	105
E83: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância <u>24</u>	106
E84: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>24</u>	106
E85: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>24</u>	107
E86: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>24</u>	107
E87: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância <u>24</u>	108
E88: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl_3 , δ 0.98) da substância <u>24</u>	108
E89: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância <u>24</u>	109

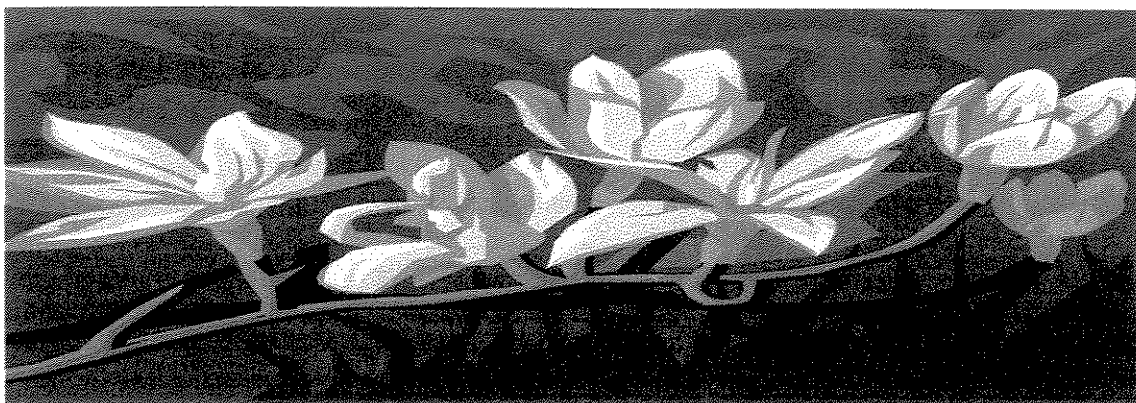
Lista de Fluxogramas

	Página
Capítulo I - Diterpenos de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	
Fluxograma 1: Fluxograma de extração por Soxhlet das cascas das raízes de <i>M. frondosus</i>	14
Fluxograma 2: Isolamento da substância <u>18</u>	16
Fluxograma 3: Isolamento da substância <u>19</u>	17
Fluxograma 4: Isolamento da substância <u>20</u>	18
Fluxograma 5: Isolamento da substância <u>21</u>	19
Fluxograma 6: Isolamento da substância <u>22</u>	20
Fluxograma 7: Isolamento das substâncias <u>23</u> e <u>24</u>	22

Lista de Quadros

	Página
Capítulo I - Diterpenos de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	
Quadro 1: Compostos isolados anteriormente das espécies do gênero <i>Myrocarpus</i>	09
Quadro 2: Substâncias isoladas dos extratos hexânico (<u>18</u> , <u>19</u> , <u>20</u> , <u>21</u> e <u>22</u>) e diclorometânico (<u>23</u> e <u>24</u>) das raízes de <i>M. frondosus</i>	24
Quadro 3: Proposta de fragmentação para a substância <u>18</u>	28
Quadro 4: Proposta de fragmentação para a substância <u>19</u>	33
Quadro 5: Proposta de fragmentação para a substância <u>20</u>	38
Quadro 6: Proposta de fragmentação para a substância <u>20</u>	38
Quadro 7: Proposta de fragmentação para a substância <u>20</u>	39
Quadro 8: Proposta de fragmentação para a substância <u>20</u>	39
Quadro 9: Proposta de fragmentação para a substância <u>20</u>	40
Quadro 10: Proposta de fragmentação para a substância <u>21</u>	45
Quadro 11: Proposta de fragmentação para a substância <u>21</u>	46
Quadro 12: Proposta de fragmentação para a substância <u>22</u>	51
Quadro 13: Proposta de fragmentação para a substância <u>23</u>	55
Quadro 14: Proposta de fragmentação para a substância <u>24</u>	60

Capítulo I – Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão



1 Introdução

A família Leguminosae é uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 730 gêneros e 19.400 espécies mundialmente distribuídas¹. Esta família está subdivida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, as quais são consideradas famílias independentes por alguns taxonomistas, dentre eles Hutchinson².

A subfamília Papilionoideae é a maior e mais amplamente distribuída das três subfamílias de Leguminosae e é facilmente reconhecida das outras subfamílias pelos caracteres vegetativos, florais e frutíferos, incluindo o desenvolvimento floral. Nas últimas décadas, esta subfamília tem sido objeto de intensa pesquisa taxonômica, principalmente no que se refere aos gêneros pertencentes às tribos basais tais como Sophoreae e Swartzieae³.

O nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo fitoquímico de várias espécies brasileiras pertencentes à subfamília Papilionoideae com o objetivo de averiguar quais as relações quimiotaxonômicas que podem ser observadas entre as espécies dentro de um gênero, entre gêneros numa mesma tribo ou ainda entre gêneros de tribos próximas que já foram classificados com base em morfologia e filogenia. Para tanto trabalhamos em colaboração com a Profa. Dra. Ana Maria G. A. Tozzi, do Depto. de Botânica (IB-UNICAMP) que é especialista em taxonomia de Leguminosae.

¹Lewis GP. 55º Congresso Nacional de Botânica, 26º Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES Sociedade Brasileira de Botânica (SBB), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. CD-Rom: *Simpósios, Palestras e mesas redondas*, 18-23/07/2004.

²Hutchinson J. *The genera of flowering plants*. London: Oxford Univ., p. 221, 1967.

³Wojciechowski MF. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective In: B. B. Klitgaard and A Bruneau (editors). *Advances in Legume Systematic*, Part 10, Higher Level Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 5-35, 2003.

Os resultados obtidos com várias espécies dos gêneros *Lonchocarpus*^{4, 5, 6, 7, 8, 9, 10} e *Deguelia*^{11, 12, 13}, ambos da tribo Milletieae nos permitiram propor correlações quimiotaxonômicas muito interessantes.

Por outro lado, estudos recentes sobre filogenia das espécies pertencentes à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae resultaram na construção de um cladograma onde algumas espécies das tribos Swartzieae, Sophoreae e Dipterygeae encontram-se próximas e derivam de uma mesma chave³. As tribos Swartzieae, Sophoreae, Dipterygeae e Dalbergieae são consideradas como as tribos mais basais da subfamília Papilionoideae. Na tribo Sophoreae o gênero

⁴Magalhães AF, Tozzi AMGA, Sales BHLN, Magalhães EG. Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. *Phytochemistry* 42, 1459-1471, 1996.

⁵Magalhães AF, Tozzi AMA, Magalhães EG, Blanco IS, Nogueira MA. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry* 46, 1029-1033, 1997.

⁶Firmino CA. *Estudo Fitoquímico das raízes de Lonchocarpus campetris-Tozzi*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1998.

⁷Magalhães AF, Ruiz ALTG, Tozzi AMGA, Magalhães EG. Dihydroflavonols and flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* roots. *Phytochemistry* 52, 1681-1685, 1999.

⁸Magalhães AF, Tozzi AMA, Magalhães EG, Nogueira MA, Queiroz SCN. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. *Phytochemistry* 55, 787-792, 2000.

⁹Sannomiya M. *Análise Fitoquímica de Platymiscium floribundum var. latifolium e Lonchocarpus montanus: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2001.

¹⁰Magalhães AF, Tozzi AMGA, Magalhães EG, Blanco IS, Soriano MDPC. Flavonoids from *Lonchocarpus muehlbergianus*. *An Acad Bras Cienc* 76, 651-661, 2004.

¹¹Magalhães AF, Tozzi AMGA, Magalhães EG, Moraes VRD. Prenylated flavonoids from *Deguelia hatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*. *Phytochemistry* 57, 77-89, 2001.

¹²Magalhães AF, Tozzi AMGA, Magalhães EG, Moraes VRD. New spectral data of some flavonoids from *Deguelia hatschbachii* A.M.G. Azevedo. *J Braz Chem Soc* 14, 133-137, 2003.

¹³Neta LCS. *Estudo Fitoquímico de Deguelia longeracemosa (Benth.) A. M. G Azevedo, Isolamento, Determinação Estrutural, Reações de Transformação da Escandenina e Testes Biológicos (Leguminosae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003.

Myrocarpus compõe a tríade dos “Myros” ao lado dos gêneros *Myrospermum* e *Myroxylon*¹⁴.

Myrocarpus é um gênero exclusivamente sul-americano que pertence à subfamília Papilionoideae, tribo Sophoreae e compreende cinco espécies de árvores, entre elas *Myrocarpus frondosus* Allemão, que apresenta sinonímias: *Leptolobium punctatum* Benth., *Myrocarpus paraguariensis* Hallier f. e *Myrocarpus frondosus* f. *paraguariensis* Hassler¹⁵. Sartori, na mais recente revisão taxonômica do gênero *Myrocarpus* Allemão detectou a ocorrência de cinco espécies: *M. emarginatus*, *M. fastigiatus*, *M. frondosus*, *M. leprosus* e *M. venezuelensis* (Figura 1)¹⁶.

A espécie *Myrocarpus frondosus* Allemão (Figura 2) é popularmente conhecida no Brasil como sapuvão, cabreúva, óleo-pardo, recoleta, brahuma, brahuma-parda, cabore e caboretinga. O nome *Myrocarpus* é derivado do prefixo grego *Myron* que significa óleo perfumado¹⁶. A espécie *M. frondosus* consiste numa importante fonte de nerolidol, um sesquiterpeno apreciado pela indústria de perfumaria que ocorre em várias partes da planta sendo o responsável pela fragrância moderada das flores¹⁷.

¹⁴Pennington RT, Lavin M, Ireland H, Klitgaard B, Preston J, Hu J-M. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast *trnL* Intron. *Syst Bot* 26, 537-556, 2001.

¹⁵Sartori ALB, Tozzi AMGA. Revisão Taxonômica de *Myrocarpus* Allemão (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae). *Acta Bot Bras* 18, 521-535, 2004.

¹⁶Sartori ALB. *Revisão Taxonômica e Estudos Morfológicos de Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L. f. e *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae Papilionoideae Sophoreae). Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP, 2000.

¹⁷Schubert V, Dietrich A, Ulrich T, Mosandl A. The stereoisomers of nerolidol: separation, analysis and olfactoric properties. *Z Naturforsch C* 47, 304-307, 1992.

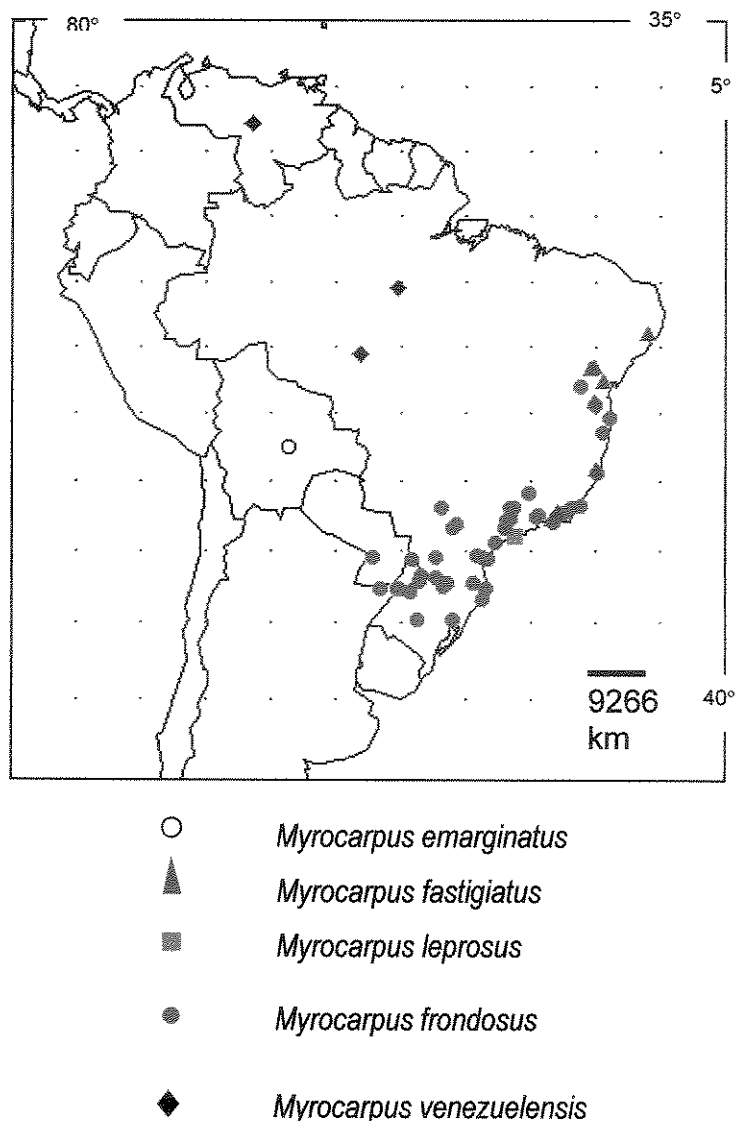


Figura 1: Mapa contendo a distribuição geográfica das espécies de *Myrocarpus* Alemão que foram detectadas.

A madeira de *M. frondosus* é muito utilizada na construção civil em vigas, caibros, ripas, mourões, dormentes, assim também como na fabricação de móveis, assoalhos e carrocerias entre outros¹⁸. A árvore de *M. frondosus* também é utilizada como ornamentação de parques e grandes jardins devido ao seu longo

¹⁸Lorenzi H. *Árvores brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Ed. Plantarum, p. 219, 1992.

período de floração que dura de fevereiro até dezembro^{16, 18}. Na região da Mata Atlântica, o macerado da casca da planta em aguardente é usado como cicatrizante e antiinflamatório. A casca e a resina são excelentes para tratar feridas e contusões, sendo ainda expectorante peitoral, indicadas nas lesões do sistema respiratório, os mesmos efeitos são atribuídos às raízes, enquanto os frutos são excitantes e antidiarréicos¹⁹.



Figura 2: Ilustração das estruturas de *Myrocarpus frondosus* Allemão.

¹⁹Stasi LCD, Hiruma-Lima CA. *Plantas medicinais na amazônia e na mata atlântica*. Editora Unesp, 2ª edição rev. e amp., p. 303, 2002.

Uma ampla pesquisa no *Chemical Abstracts* (1907-2004) e no *Web of Science* (1945-2005), usando como palavras-chave *Cabreuva*, *Myrocarpus*, *Myrocarpus frondosus*, *Myrocarpus paraguariensis* e *Leptolobium punctatum* mostrou que os estudos realizados anteriormente com a espécie *Myrocarpus frondosus* tratam da composição dos óleos essenciais da madeira^{20, 21, 22, 23} e das sementes²⁴ e dos taninos contidos no extrato aquoso da madeira^{25, 26}. Durante a pesquisa, foram encontrados trabalhos sobre estudos realizados com a espécie *M. fastigiatus*, envolvendo a análise dos óleos essenciais^{20, 21, 22, 23, 27} e do extrato benzênico da madeira^{28, 29} (Quadro 1, Tabela 1).

²⁰Naves YR. Etudes sur les matières végétales volatiles. XLIII). Présence de nérolidol dans des huiles essentielles de papilionacées. *Helv Chim Acta* 30, 275-277, 1947.

²¹Naves YR. Etudes sur les matières végétales volatiles LVII). Cétones des huiles essentielles de cabreuva (*Myrocarpus frondosus* et *M. fastigiatus* Allem.) et de bois de rose (*Aniba rosaedora* Ducke). *Helv Chim Acta* 31, 44-49, 1948.

²²Naves YR. Etudes sur les matières végétales volatiles. LXI). Présence de nérolidol dans des huiles essentielles de papilionacées. *Helv Chim Acta* 31, 408-417, 1948.

²³Zipei G, Duyi Y, Zhixi H. Synthesis of (+)-1-methyl-4-acetyl-1-cyclohexene from isoprene and methyl acrylate. *Dev Food Sci* 18, 841-6, 1988.

²⁴Naves YR. Essential of seeds of *Myrocarpus frondosus* (Brazilian oleo pardo). *Perfumery Essent. Oil Record* 46, 183-184, 1955.

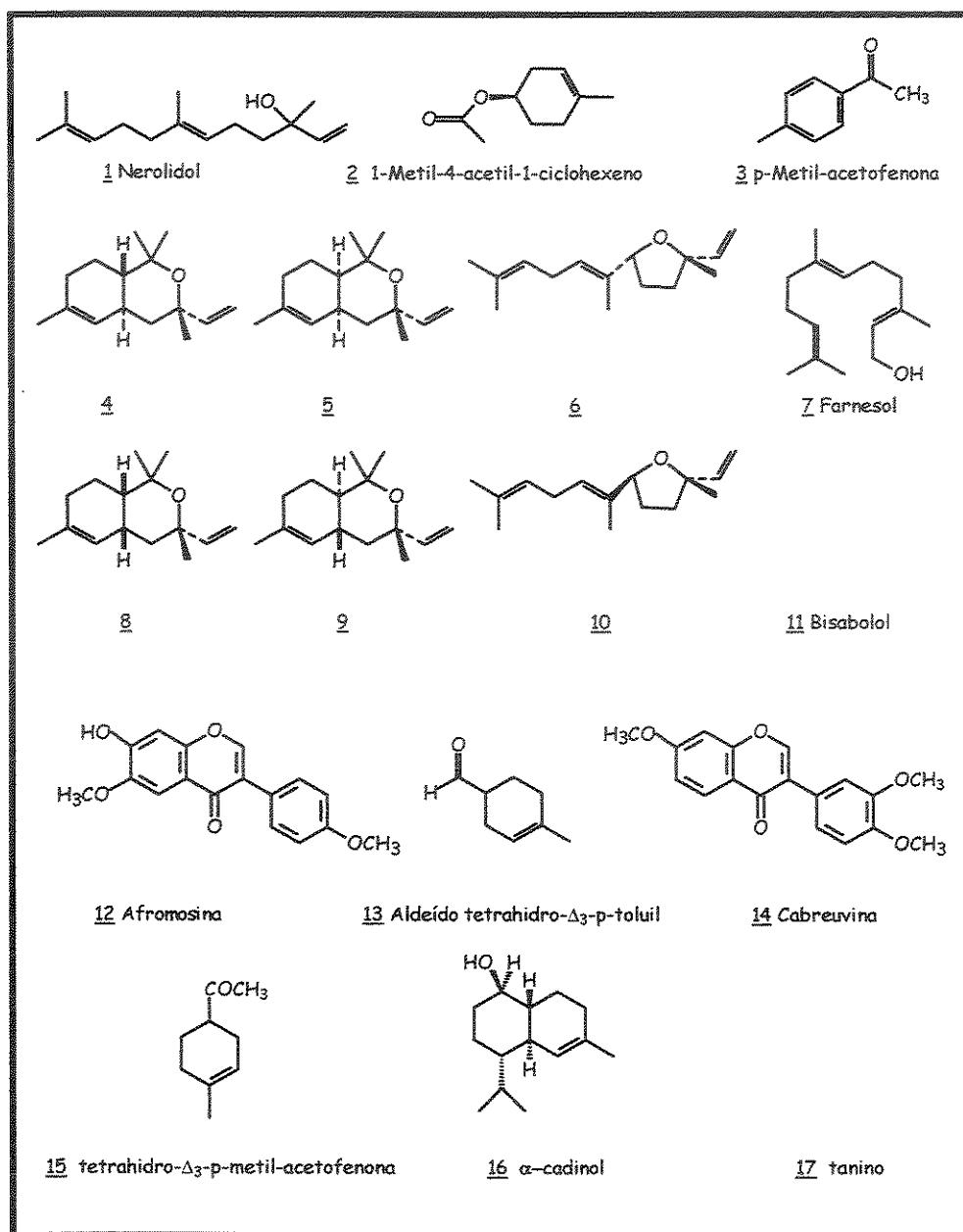
²⁵Dominguez JA. Analytical investigation of various indigenous woods and kinos. *An Soc Quim Argent* 5, 113-118, 1917. Chemical Abstracts 12: 1067¹.

²⁶Prado LL, Ricci E. Systematic study of the tannin content of various indigenous species. *An Admin Nacl Bosques, Rep Arg* 7-17, 1956. Chemical Abstracts 51:9803e.

²⁷Mauer B, Hauser A, Ohloff G. New Sesquiterpenoids from Cabreuva Oil. *Helv Chim Acta* 69, 2026-2037, 1986.

²⁸Harbone JB, Gottlieb OR, Magalhães MT. Occurrence of Isoflavone Afromosin in Cabreuva Wood. *J Org Chem* 28, 881-882, 1963.

²⁹Gottlieb OR, Magalhães MT. Isolation of 3',4',7'-trimethoxyisoflavone (cabreuvin) from *Myroxylon balsamum* and *Myrocarpus fastigiatus*. *An Assoc Bras Quim* 18, 89-97, 1959.



Quadro 1: Compostos isolados anteriormente das espécies do gênero *Myrocarpus*.

Tabela 1: Compostos isolados anteriormente das espécies do gênero *Myrocarpus*.

Espécie	Compostos ^{literatura}
<i>Myrocarpus frondosus</i>	1 ²⁰ , 2 ²³ , 3 ²¹ , 7 ²⁰ , 11 ²² , 13 ²¹ , 15 ²¹ , 16 ^{22, 24} , 17 ^{25, 26}
<i>Myrocarpus fastigiatus</i>	1 ²⁰ , 2 ²³ , 3 ²¹ , 4-6 ²⁷ , 7 ²⁰ , 8-10 ²⁷ , 11 ²² , 12 ²⁸ , 13 ²¹ , 14 ²⁹ , 15 ²¹ , 16 ²²

2 Objetivos

- ❖ Realizar o estudo fitoquímico dos extratos das raízes de *Myrocarpus frondosus*, visando o isolamento e a caracterização estrutural dos metabólitos secundários através da aplicação de cromatografia de adsorção (CC, CCDC, CCDP) e da análise dos respectivos espectros de IV, UV, RMN e EM com ênfase na análise detalhada dos espectros de massas (alta e baixa resolução e experimentos de EM/EM) e de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT e NOESY 1D) incluindo RMN-2D (gCOSY, HSQC/HETCOR e HMBC/COLOC).
- ❖ Averiguar possíveis correlações quimiossistemáticas com espécies das tribos vizinhas Swartzieae e Dipterygeae.
- ❖ Avaliar a atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas através dos ensaios de letalidade com *Artemia salina* (citotoxicidade), bioautografia (atividade antimicrobiana), concentração inibitória mínima (CIM) e atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais humanas.

3 Parte Experimental

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Análises cromatográficas por CCDC e CCDP

As placas de CCDP e CCDA sobre vidro foram preparadas no laboratório com sílica gel 60PF₂₅₄ (Merck), assim como as cromatoplasacas de alumínio recobertas com sílica gel GF₂₅₄ 0,2 mm (Art 1.05554 Merck) também foram utilizadas.

3.1.2 Reveladores

Os reveladores utilizados foram: irradiação com luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm e 365 nm) e nebulização com solução de anisaldeído modificada³⁰ (etanol/anisaldeído/ácido sulfúrico/ácido acético 90:5:5:1) seguido de aquecimento das placas cromatográficas.

3.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN¹H, RMN¹³C (totalmente desacoplado e DEPT), RMN-2D (gCOSY, HSQC/HETCOR e HMBC/COLOC) e NOESY 1D foram registrados no espectrômetro INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 tesla. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores de δ , utilizando CDCl₃ como referência externa ($\delta_H=7,27$ e $\delta_C=77,0$). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

³⁰Merck. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E Merck, Darmstadt, p. 118, 1971.

3.1.4 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução e experimentos de espectro de massas de espectro de massas (EM/EM) foram obtidos em um espectrômetro VG-Autospec através da técnica de impacto eletrônico (70 eV).

O espectro de massas de baixa resolução foi realizado em um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso modelo HP 5973 com coluna capilar HP-5MS. As condições de análise para a substância 18 foram: temperatura do injetor (250 °C), temperatura do detector (280 °C), coluna (120 °C, 4 °C/min até 250 °C, mais 5 min a 250 °C).

3.1.5 Espectroscopia no Ultravioleta

Os espectros de absorção no ultravioleta foram obtidos em um espectrofotômetro com arranjo de diodos Agilent, modelo HP 8453. O solvente utilizado no preparo das amostras foi metanol (grau HPLC).

3.1.6 Espectroscopia no IV

Os espectros no infravermelho foram adquiridos em um equipamento Bomem MB-Series, modelo B-100 com transformada de Fourier em pastilha de KBr ou filme.

3.1.7 Rotação Óptica

Os valores de rotação óptica específica foram obtidos no polarímetro Perkin-Elmer, modelo 341 com lâmpada de Sódio (589 nm), à temperatura de 20 °C, sendo as amostras dissolvidas em metanol grau HPLC. Os valores de rotação óptica específica foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \times 100}{l \times c}$$

onde:

$[\alpha]_D^{20}$ = valor de rotação óptica específica

α = valor de rotação óptica observada

c = concentração em g/100 mL da substância

l = caminho óptico da cela (0,1 dm)

3.1.8 Ponto de Fusão

As medidas de ponto de fusão foram realizadas empregando-se o aparelho de ponto de fusão da Microquímica, modelo MQAPF-301.

3.2 Estudo Fitoquímico

3.2.1 Coleta do material vegetal

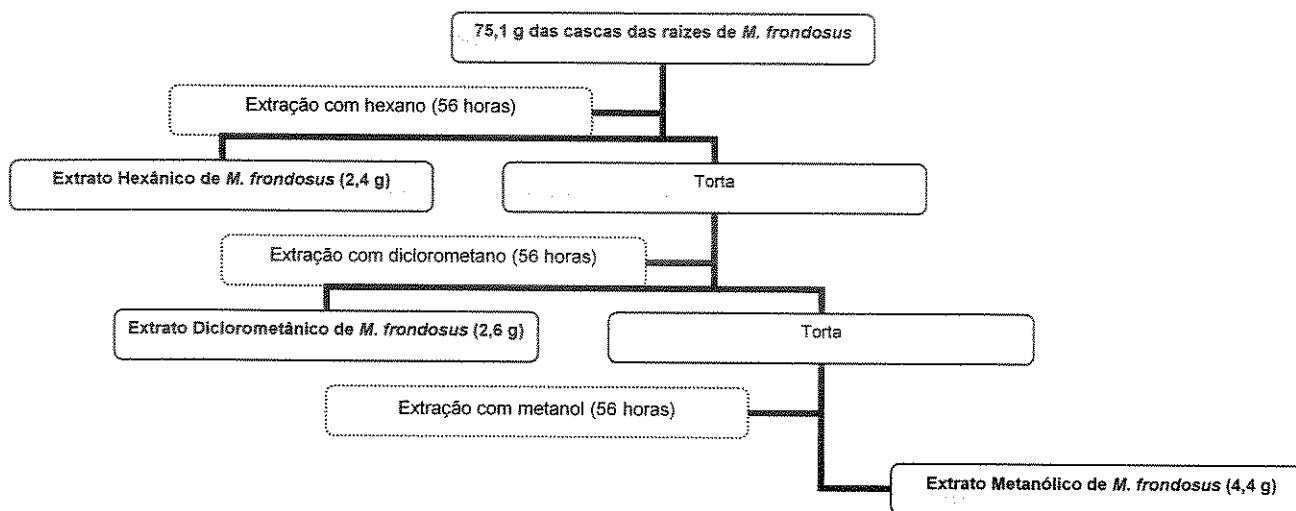
As raízes de *Myrocarpus frondosus* foram coletadas no Jardim Botânico da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e identificadas pela Dra. Ana Maria de Azevedo Tozzi. Uma amostra do espécime encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, UNICAMP (UEC nº 135622).

3.2.2 Obtenção dos extratos

Após secagem em estufa a 40 °C e trituração em moinho de facas as cascas (85,7 g) e o cerne (262,8 g) das raízes de *M. frondosus* foram armazenados por cerca de três anos e oito meses sem perder as características originais, isto é: odor e cor. Uma pequena amostra de cada uma das partes foi extraída por maceração com hexano, diclorometano e metanol para a realização de uma análise preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos das cascas e do cerne das raízes de *M. frondosus*, constatando-se a presença de substâncias que absorviam no ultravioleta e revelavam em

anisaldeído (revelador universal), observando-se ainda que os extratos das cascas eram mais ricos que os do cerne.

Assim, neste estudo as cascas (75,1 g) foram sucessivamente extraídas em Soxhlet com hexano, diclorometano e metanol durante um período de 56 horas com cada solvente conforme o Fluxograma 1.



Fluxograma 1: Fluxograma de extração por Soxhlet das cascas das raízes de *M. frondosus*.

3.2.3 Estudo do Extrato Hexânico

Uma parte do extrato hexânico (1,60 g) das cascas das raízes de *M. frondosus*, foi fracionada em coluna cromatográfica (17,2 cm x 4,0 cm de diâmetro interno), empacotada com sílica gel (230-400 mesh), sendo eluída inicialmente com hexano/diclorometano 1:1 (v:v), aumentando gradativamente a polaridade do eluente pela adição de CH_2Cl_2 seguida da adição de metanol até 100%. Obtiveram-se 234 frações (15 mL), as quais foram reunidas em 24 grupos após o monitoramento por CCDC (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2: Relação entre Grupo de frações / Substâncias isoladas do extrato hexânico de *M. frondosus*.

Grupo de Frações (G)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1	11,8		
2	2-3	65,0	<u>18</u>	10,0
3	4	18,1		
4	5-6	15,6		
5	7-8	8,3		
6	9	3,3		
7	10-11	8,4		
8	12-15	12,0		
9	16-17	8,3		
10	18-21	20,4	<u>19</u>	4,3
11	22-39	102,5		
12	40-49	29,1		
13	50-72	32,5		
14	73-81	26,1		
15	82-87	29,2		
16	88-93	35,7	<u>20</u>	1,1
17	94-112	156,2	<u>21</u>	9,2
			<u>22</u>	1,0
18	113-168	103,2		
19	169-177	14,8		
20	178	24,3		
21	179-181	385,9		
22	182-186	192,9		
23	187-211	77,8		
24	212-234	130,2		

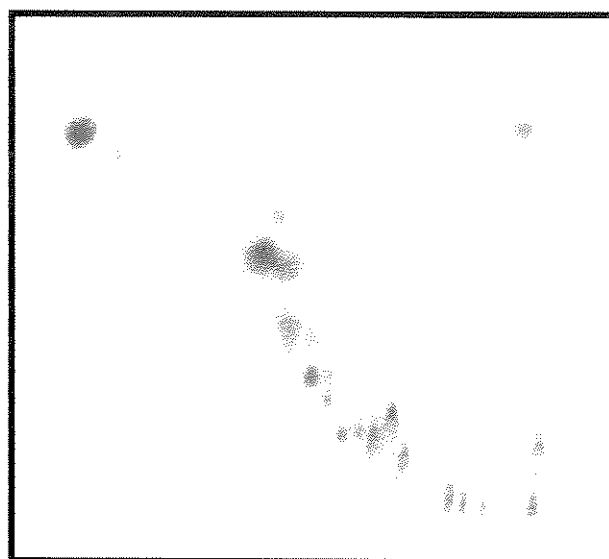
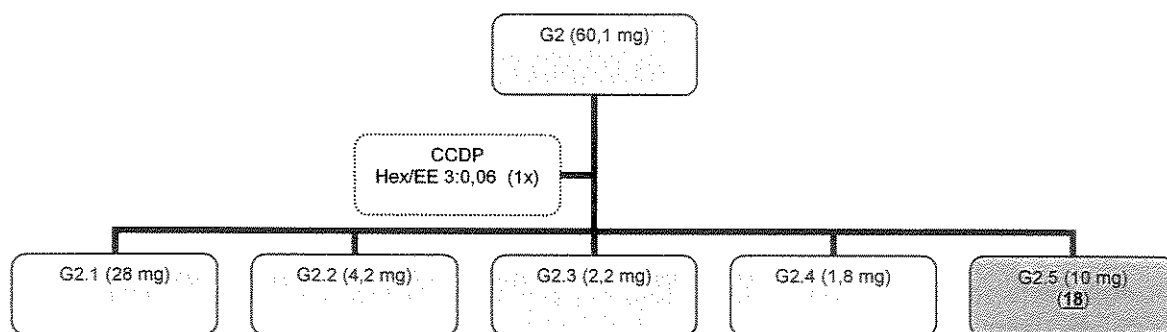
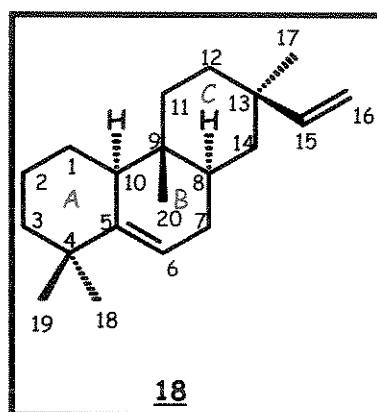


Figura 3: Grupos de frações obtidas do fracionamento do extrato hexânico, desenvolvida em CH_2Cl_2 (1X).

A sequência de fluxogramas abaixo corresponde as purificações por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) que resultaram no isolamento das substâncias 18 (Fluxograma 2), 19 (Fluxograma 3), 20 (Fluxograma 4), 21 (Fluxograma 5) e 22 (Fluxograma 6) cujos dados espectroscópicos são relatados em seguida.



Fluxograma 2: Isolamento da substância 18.

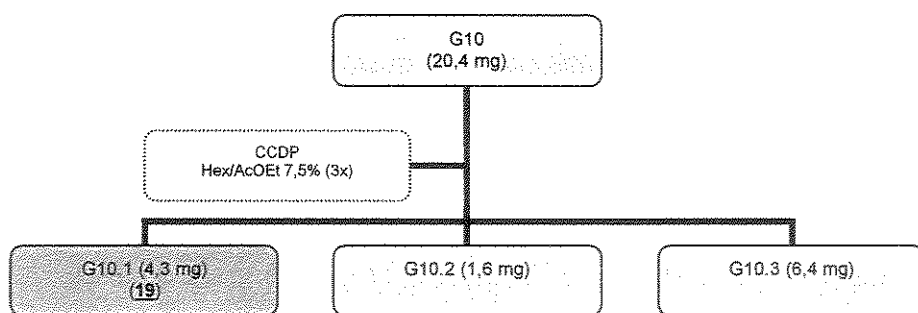


Aspecto Físico: óleo amarelo

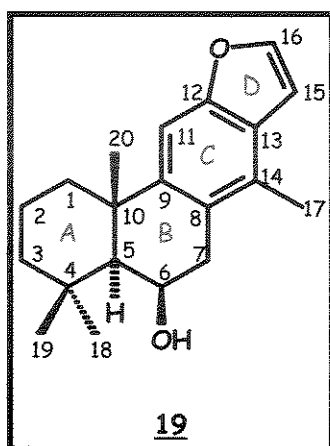
RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ: E1, Tabela 4

RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ: E2, Tabela 4

CG/EM: t_R 19,39 min, m/z (%) 272 (M⁺, 20%), 257(100%), 136 (10%), 121 (12%), 80 (14%), E7



Fluxograma 3: Isolamento da substância 19.



Aspecto Físico: sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D^{20} = +20^\circ$ (CH₃Cl; c 0,45)

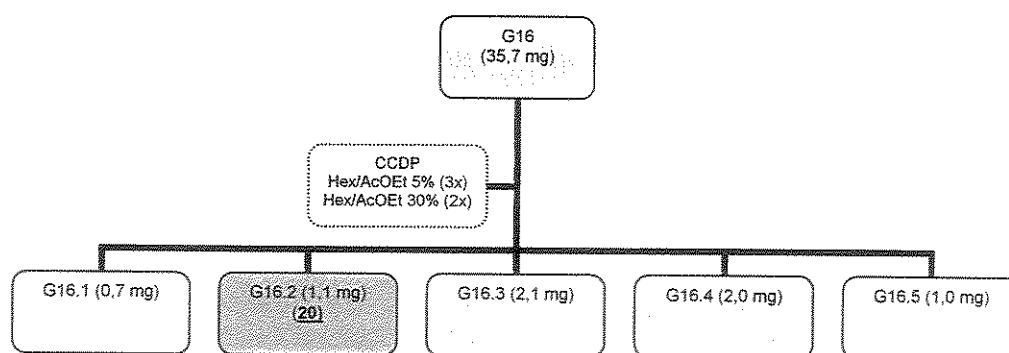
UV λ_{max} nm (log ϵ): 252 (4,11); 259 (4,02); 281 (3,47); 291 (3,48); (CH₃OH; c 5×10^{-5} mol L⁻¹), E22

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3494, 2928, 1462, E23

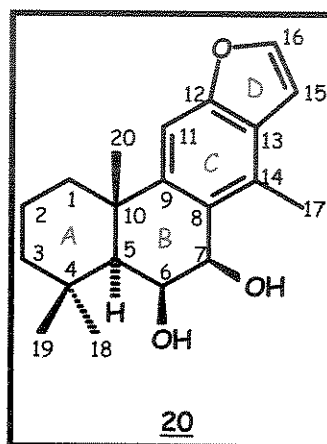
RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ : E8, Tabela 5

RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ : E9, Tabela 5

EMAR m/z : observado 298,1903 [M⁺] (C₂₀H₂₆O₂ calculada 298,1933), E20



Fluxograma 4: Isolamento da substância 20.

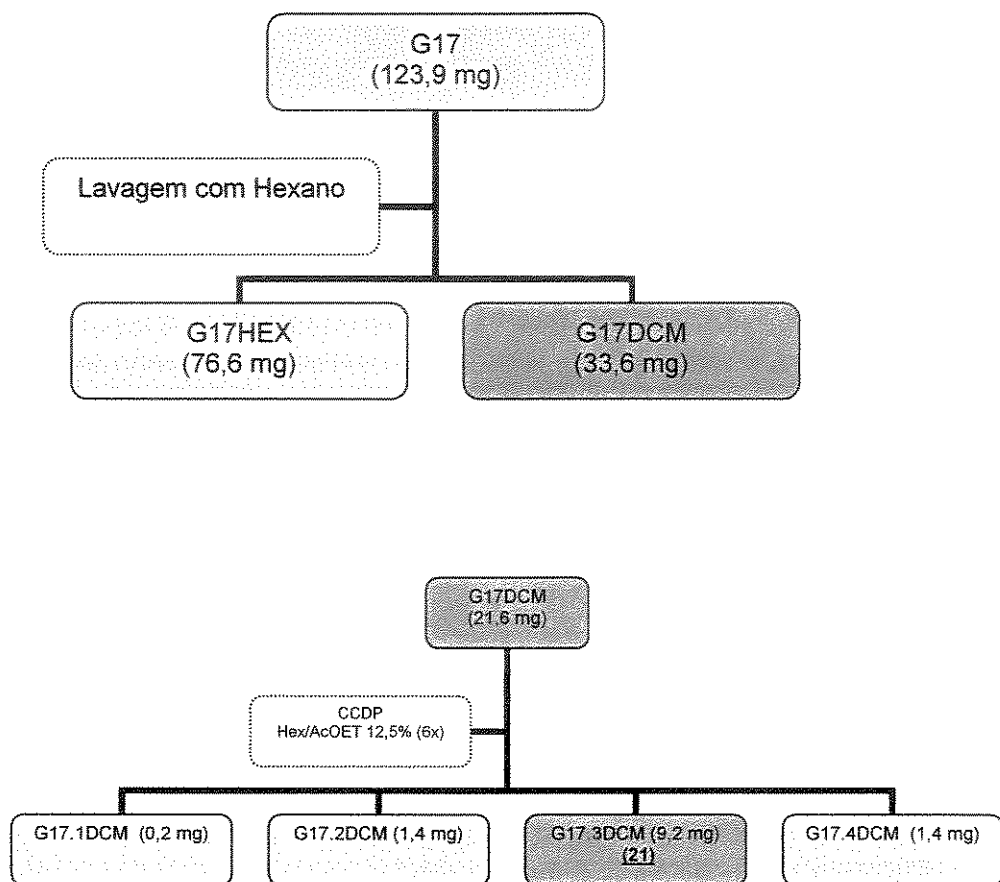


Aspecto Físico: sólido amorfo amarelo

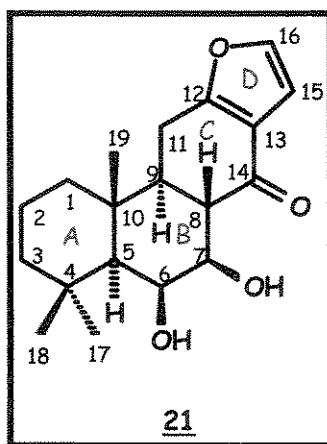
RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ: E24, Tabela 6

RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ: E25, Tabela 6

EMAR *m/z*: observado 314,1901 [M⁺] (C₂₀H₂₆O₃ calculada 314,1882), E35



Fluxograma 5: Isolamento da substância **21**.



Aspecto Físico: agulhas brancas

Ponto de fusão: 173,4-173,9°C

$[\alpha]_D^{20} = +74^\circ$ (CH₃Cl; c 0,81)

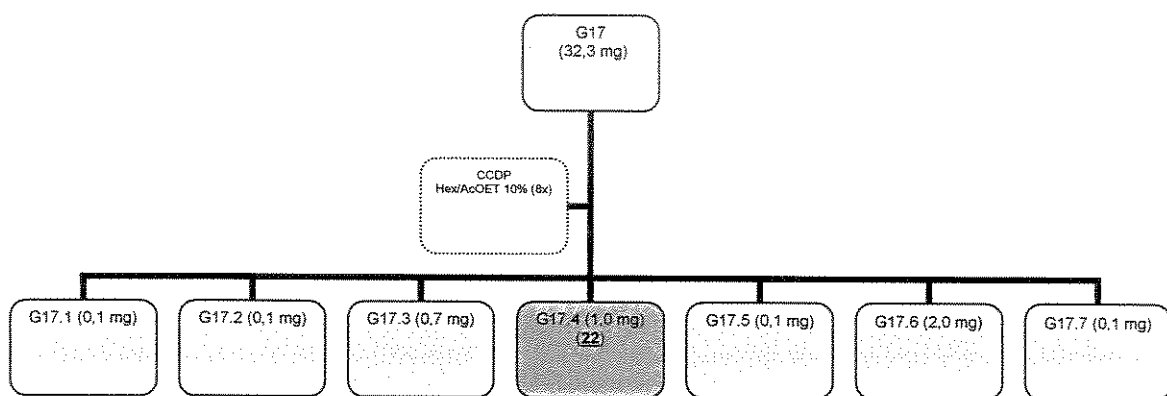
UV λ_{max} nm (log ϵ): 260 (3,69); 265 (3,72); 269 (3,70); (CH₃OH; c 5×10^{-5} mol L⁻¹), E53

IV $\nu_{\text{máx}}$ (pastilha de KBr, cm⁻¹): 3548, 3464, 2928, 1656, 1453, 1124, E54

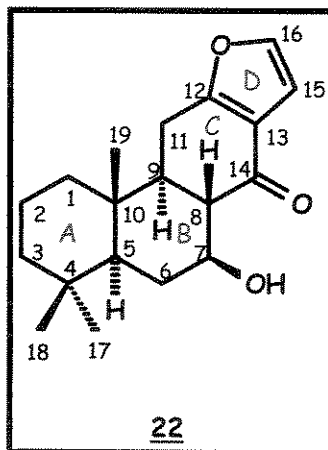
RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ : E37, Tabela 7

RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ : E38, Tabela 7

EMAR m/z : observado 318,1832 [M⁺] (C₁₉H₂₆O₄ calculada 318,1831), E51



Fluxograma 6: Isolamento da substância **22**.



Aspecto Físico: sólido amorfo amarelo

RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ : E55, Tabela 8

RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ : E56, Tabela 8

EMAR *m/z*: observado 302,1906 [M⁺] (C₁₉H₂₆O₃ calculada 302,1882), E67

3.2.4 Estudo do Extrato Diclorometânico

Uma parte do extrato diclorometânico (2,30 g) das cascas das raízes de *M. frondosus*, foi fracionada em coluna cromatográfica (16,0 cm x 3,8 cm de diâmetro interno), empacotada com sílica gel (230-400 mesh), sendo eluída inicialmente com hexano/diclorometano 1:1 (v:v), aumentando gradativamente a polaridade do eluente pela adição de CH₂Cl₂ seguida da adição de metanol até 100%. Obtiveram-se 386 frações (15 mL), as quais foram reunidas em 21 grupos após o monitoramento por CCDC (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3: Relação entre Grupo de frações / Substâncias isoladas do extrato diclorometânico de *M. frondosus*.

Grupo de Frações (G)	Frações	Massa (mg)	Substâncias Isoladas	Quantidade (mg)
1	1-2	29,2	<u>23</u> <u>24</u>	3,4 2,0
2	3-5	18,9		
3	6-8	29,6	<u>19</u>	4,9
4	9-15	31,4		
5	16-19	10,5		
6	20-22	9,1		
7	23-29	16		
8	30-31	5,1		
9	32-35	13,8		
10	36-40	18,5		
11	41-45	14,6		
12	46-47	6,2		
13	48-58	38,3	<u>21</u>	12,6
14	59-84	57,2	<u>21</u>	15,9
15	85-156	41,6		
16	157-166	632,7		
17	167-197	325,1		
18	198-293	205,1		
19	294-335	142,8		
20	336-354	112,8		
21	355-386	409,6		

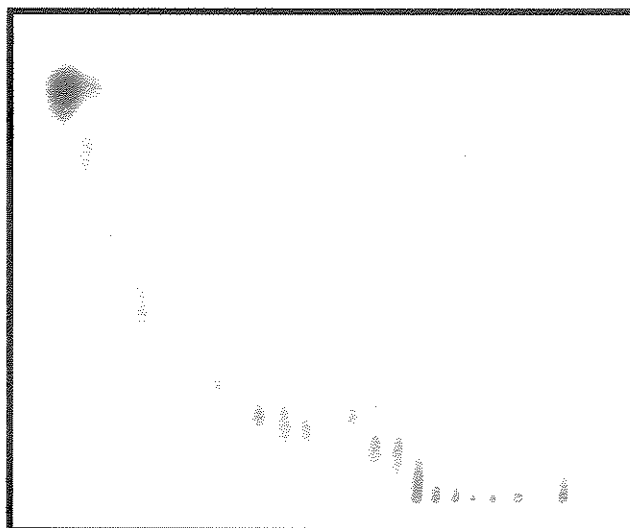
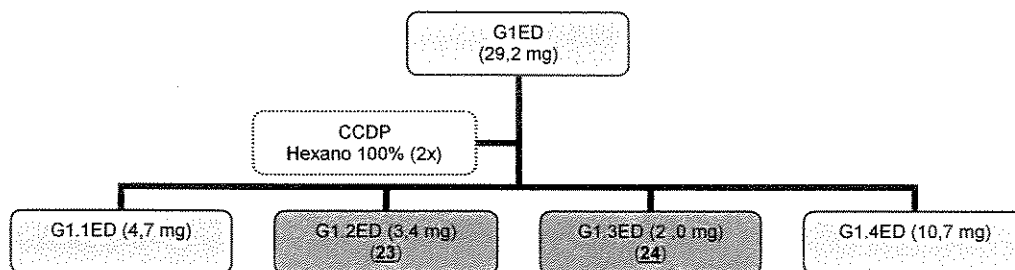
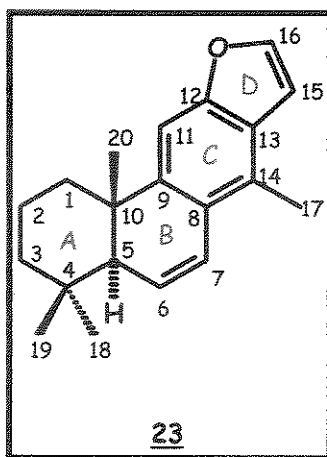


Figura 4: Grupos de frações obtidas do fracionamento do extrato diclorometânico, desenvolvida em CH_2Cl_2 (1X).

A seqüência de fluxograma abaixo corresponde a purificação por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) que resultaram no isolamento das substâncias **23** e **24** (Fluxograma 7), cujos dados espectroscópicos são relatados em seguida. O estudo do extrato diclorometânico também forneceu as substâncias **19** e **21**.



Fluxograma 7: Isolamento das substâncias **23** e **24**.

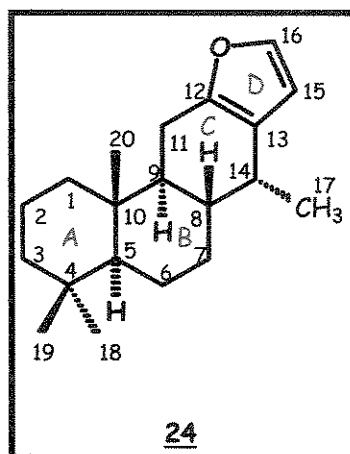


Aspecto Físico: óleo amarelo

RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ: E68, Tabela 9

RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ: E69, Tabela 9

EMAR *m/z*: observado 280,1838 [M^+] ($C_{20}H_{24}O$ calculada 280,1837), E78



Aspecto Físico: óleo amarelo

RMN¹H (500MHz, CDCl₃) δ: E79, Tabela 10

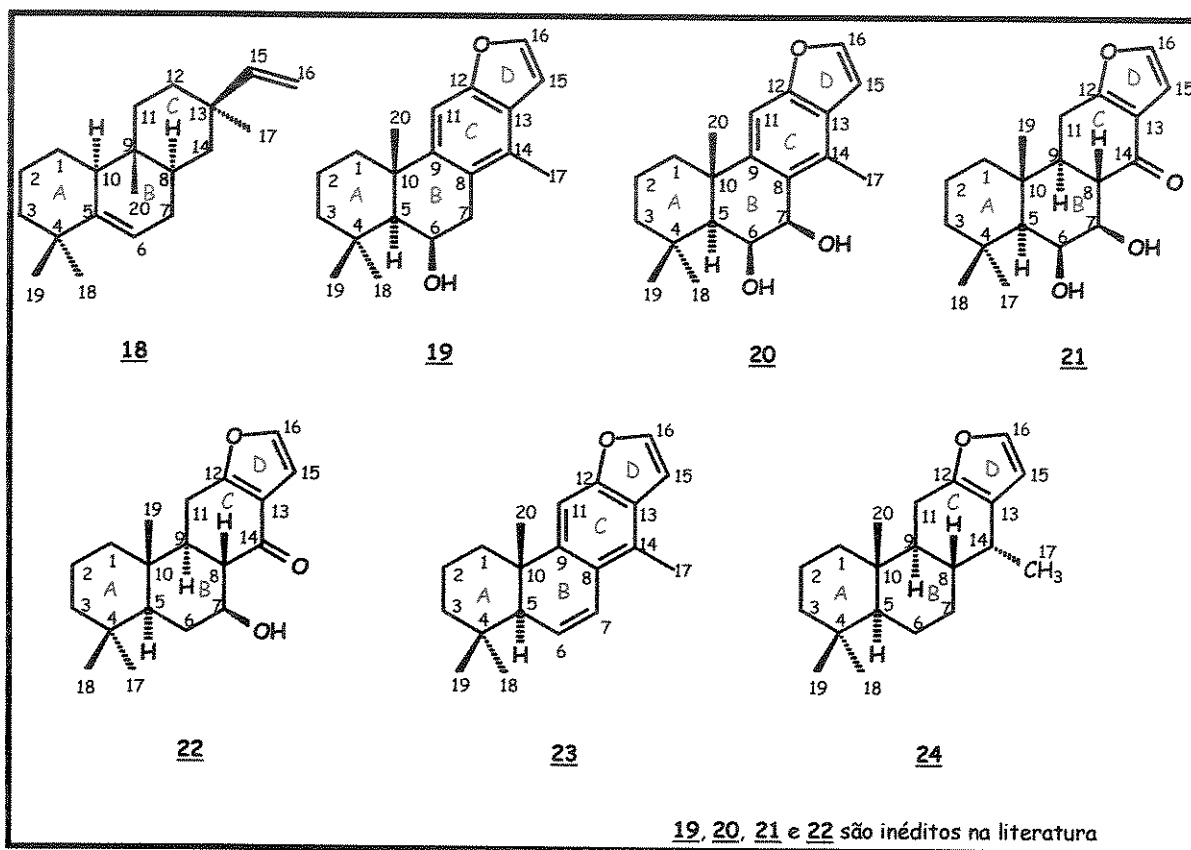
RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) δ: E80, Tabela 10

EMAR *m/z*: observado 286,2294 [M^+] ($C_{20}H_{30}O$ calculada 286,2297), E89

4 Resultados e Discussão

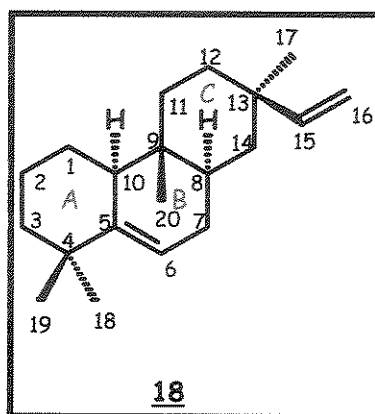
O estudo fitoquímico dos extratos hexânico e diclorometânico das cascas das raízes de *M. frondosus* resultou no isolamento e determinação estrutural de 7 diterpenos (Quadro 2), dos quais constatou-se que **19**, **20**, **21** e **22** são inéditos na literatura, após ampla busca bibliográfica no *Chemical Abstracts* (1907-2004).

As estruturas moleculares das substâncias isoladas foram caracterizadas através da análise dos respectivos dados espectroscópicos conforme descrito a seguir para cada substância.



Quadro 2: Substâncias isoladas dos extratos hexânico (**18**, **19**, **20**, **21** e **22**) e diclorometânico (**23** e **24**) das raízes de *M. frondosus*.

4.1 Determinação estrutural do diterpeno 18



O espectro de RMN¹H (Anexo A - E1, Tabela 4) da substância 18 apresentou quatro sinais em δ 0.67 (s; 3H), 1.02 (s; 6H) e 1.07 (s; 3H) referentes a metilas em carbonos quaternários. Observou-se também os sinais de quatro prótons olefínicos, dos quais três pertencem a uma ligação dupla terminal [δ 5.83 (dd; J = 17Hz e 11Hz; 1H), δ 4.93 (dd; J = 17Hz e 1Hz; 1H) e δ 4.85 (dd; J = 11Hz e 1Hz; 1H)] e o quarto próton absorve em δ 5.49 (m; 1H)].

Os espectros de RMN¹³C e DEPT (Anexo A - E2 e E3, Tabela 4), mostraram os sinais de 20 carbonos, sendo 4 CH₃, 8 CH₂, 4 CH (dois alifáticos e dois olefínicos) e 4 C_O (três alifáticos e um olefínico).

Essa substância foi identificada como tendo a mesma constituição do 5,15-rosadieno (Tabela 4) através da comparação dos respectivos dados de RMN ¹³C obtidos experimentalmente para o *ent*-5,15-rosadieno³¹, que foi primeiramente obtido a partir de reações de transformação em 1981³¹ e que há apenas dois

³¹García-Alvarez MC, Rodríguez B, Valverde S, Fraga BM, González AG. Carbon-13 NMR spectra of some *ent*-rosane diterpenoids. *Phytochemistry* 20, 167-169, 1981.

relatos de ocorrência natural do mesmo, nas espécies *Dacrydium intermedium*³² e *Cryptomeria fortunei*³³.

As correlações observadas nos espectros de RMN-2D homonuclear gCOSY (Anexo A - E4) e heteronuclear HSQC (Anexo A - E5) e HMBC (Anexo A - E6, Figura 5) encontram-se na Tabela 4.

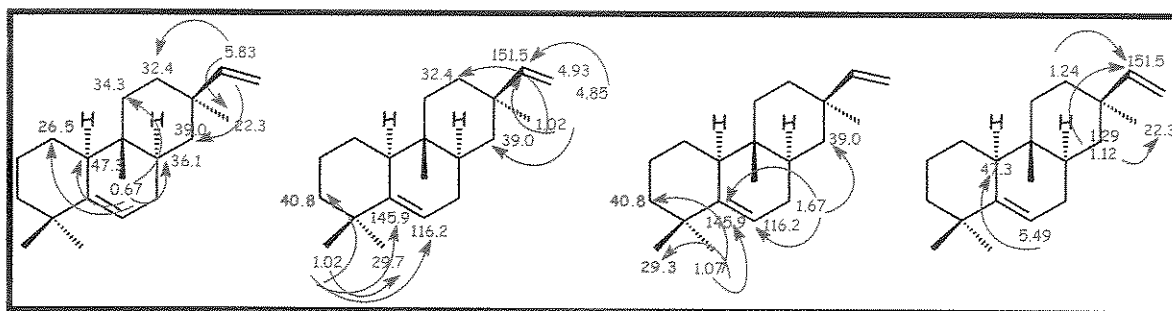


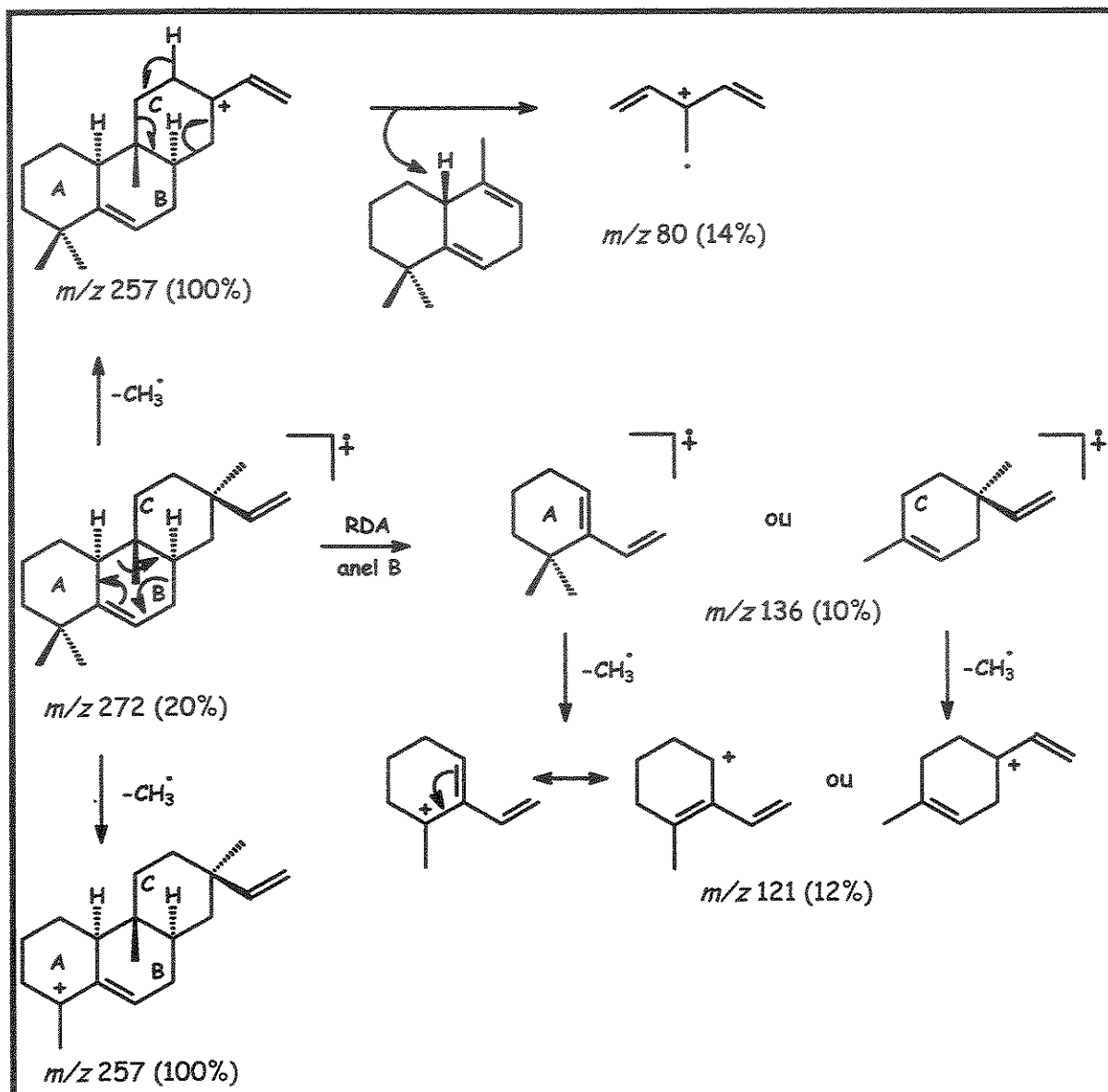
Figura 5: Correlações observados no espectro de HMBC (^1H , ^{13}C , J^n) da substância **18**.

O espectro de massas de baixa resolução (Anexo A - E7) mostrou o pico do íon molecular [$\text{M}^+ = 272$ (20%)]. A fragmentação proposta encontra-se no Quadro 3.

Os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da substância **18** apresentaram sinais adicionais relativos à presença de impurezas que não prejudicaram a determinação de sua constituição, mas iriam interferir na medida de rotação óptica específica que não foi feita e por isso não é possível afirmar se a substância **18** é o rosadieno ou o *ent*-5,15-rosadieno.

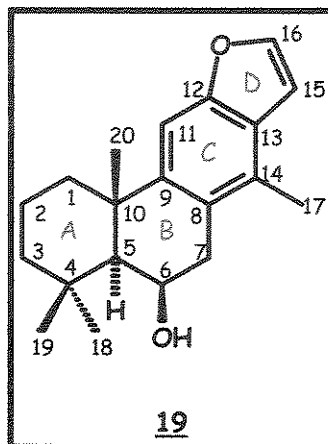
³²Perry NN, Weavers RT. Foliage diterpenes of *Dacrydium intermedium*: identification, variation and biosynthesis. *Phytochemistry* 24, 2899-2904, 1985.

³³Nagahama S, Tazaki M, Nishimura K, Tajima M. *Ent*-rosa-5,15-diene, a diterpene hydrocarbon in *Cryptomeria* Leaf oil. *Phytochemistry* 36, 77-78, 1994.



Quadro 3: Proposta de fragmentação para a substância 18.

4.2 Determinação estrutural do diterpeno 19



O espectro de RMN¹H (Anexo A - E8, Tabela 5) da substância 19 apresentou três sinais em δ 1.08 (s; 3H), 1.32 (s; 3H) e 1.64 (s; 3H), os quais sugerem a presença de um sistema 4,4,10-trimetil *trans* decalina, onde pelo menos duas das metilas podem estar sob o efeito da interação 1,3-diaxial com um grupo oxigenado cuja presença se confirma pelo sinal de um próton carbinólico [δ 4.80 (s; 1H)]. Observou-se também os sinais referentes a um próton aromático [δ 7.38 (s; 1H)], um anel furano [δ 6.70 (dd; J = 2Hz e 1Hz; 1H) e δ 7.52 (d; J = 2Hz; 1H)], uma metila aromática [δ 2.37 (s; 3H)] e de prótons metilênicos diastereotópicos [δ 3.05 (dd; J = 17Hz e 5Hz; 1H) e δ 2.97 (d; J = 17Hz; 1H)].

Na expansão do espectro de RMN¹H (Anexo A - E8) vale ressaltar a presença de um aparente quarteto triplo em δ 1.89 (J = 14 e 4 Hz, 1H), referente ao hidrogênio axial ($H_{2\beta}$), o qual apresenta acoplamento geminal com $H_{2\alpha}$ e vicinal com dois hidrogênios axiais ($H_{1\alpha}$ e $H_{3\alpha}$), e dois hidrogênios equatoriais ($H_{1\beta}$ e $H_{3\beta}$). Ao interpretar as multiplicidades e os valores das constantes resultantes destes acoplamentos onde em geral $J_{\text{gem}} > J_{\text{trans-diaxial}} > J_{\text{axial-equatorial}}$ seria esperado observar uma multiplicidade mais complexa. O aparente quarteto na realidade deve-se ao entrelaçamento dos dois tripletos resultantes do acoplamento *trans*-diaxial, sugerindo que neste caso a referida constante de acoplamento deve ser

da mesma ordem de grandeza do J_{geminal} permitindo a observação diferenciada apenas das constantes de acoplamento $J_{\text{trans-diaxial}}$ e $J_{\text{axial-equatorial}}$.

Os espectros de RMN¹³C e DEPT (Anexo A - E9 e E10, Tabela 5), mostraram os sinais de 20 carbonos, sendo 4 CH₃, 4 CH₂, 5 CH (dois alifáticos e três aromáticos) e 7 C_O (cinco aromáticos e dois alifáticos) de acordo com o esperado para um diterpeno da classe dos abieta-8,11,13-trieno³⁴, contendo um anel furano ligado ao anel aromático.

A comparação dos dados de RMN (¹H e ¹³C) com os dados da literatura para vários derivados de abieta-8, 11, 13-trienos levaram à conclusão de que a função oxigenada (um grupo hidroxila) encontra-se no anel B em C-6β, onde a interação do tipo 1,3-diaxial com as metilas C-19 e C-20, justifica os respectivos deslocamentos químicos (δ_{H} 1.32 CH₃-19 e 1.64 CH₃-20, δ_{C} = 23.9 CH₃-19 e 27.7 CH₃-20) em relação aos observados para o ferruginol^{34, 35} (δ_{H} 1.22 CH₃-19 e 0.96 CH₃-20, δ_{C} 21.4 CH₃-19 e 24.6 CH₃-20), logo os prótons metilênicos diastereotópicos acima mencionados encontram-se ligados ao C-7.

Os deslocamentos químicos de todos os prótons e carbonos da molécula foram confirmados por RMN-2D através das correlações observadas nos espectros HSQC (Anexo A - E11) e HMBC (Anexo A - E12, E13, E14 e E15, Figura 6), enquanto a análise do espectro gCOSY (Anexo A - E16, E17 e E18) confirmou os acoplamentos propostos com base na análise do espectro de RMN¹H (Tabela 5).

³⁴Corral JMMDeI, Gordaliza M. ¹³C NMR Data for Abieta- 8, 11, 13 -triene Diterpenoids. *Magn Reson Chem* 32, 774-781, 1994.

³⁵Yamagushi K. *Spectral data of natural products*. Vol. 1, Elsevier Publishing Company, p. 287, 1970.

Tabela 5: Correlações observadas nos espectros gCOSY (H-H, J^H), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^H) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl_3) para **19**.

posição	^{13}C		^1H		^1H		^{13}C	
	(δ, J^1)	δ	Multiplicidade	J (Hz)	(δ, J^H)	(δ, J^H)	(δ, J^H)	(δ, J^H)
1 α	43.3	1.46	<i>m</i>		2.26, 1.89, 1.66		43.1 (J^3), 38.2 (J^2), 27.7 (J^3), 39.0 (J^5), 146.5 (J^3), 34.2 (J^4)	
1 β		2.26	<i>md</i>	12	1.89, 1.66, 1.46			
2 α	19.8	1.66	<i>m</i>		2.26, 1.25		43.1 (J^2), 43.3 (J^2), 38.2 (J^3), 52.8 (J^4), 146.5 (J^4)	
2 β		1.89	<i>qt</i>	14 e 4	2.26, 1.46, 1.25			
3 α	43.1	1.25	<i>m</i>		1.89, 1.66, 1.46			
3 β		1.46	<i>m</i>		1.89, 1.66, 1.25		38.2 (J^4), 34.2 (J^2), 23.9 (J^3), 39.0 (J^5)	
4	34.2							
5	52.8	1.46	<i>m</i>		4.80, 2.97		34.2 (J^2), 38.2 (J^2), 23.9 (J^3), 27.7 (J^3), 39.0 (J^3), 43.1 (J^3), 146.5 (J^3), 43.3 (J^3)	
6	65.8	4.80	<i>sl</i>		2.97, 3.05, 1.32, 1.46			
7 α	39.0	2.97	<i>d</i>	17	4.80, 1.46		65.8 (J^3), 128.6 (J^2), 52.8 (J^3), 124.1 (J^3), 146.5 (J^3)	
7 β		3.05	<i>dd</i>	17 e 5	4.80, 2.37		65.8 (J^3), 128.6 (J^2), 124.1 (J^3), 146.5 (J^3)	
8	128.6							
9	146.5							
10	38.2							
11	105.3	7.38	<i>s</i>		7.52, 2.37		153.9 (J^2), 38.2 (J^3), 125.6 (J^3), 128.6 (J^3), 124.1 (J^4)	
12	153.9							
13	125.6							
14	124.1							
15	104.9	6.70	<i>dd</i>	2 e 1	7.52		125.6 (J^2), 144.2 (J^2), 153.9 (J^3)	
16	144.2	7.52	<i>d</i>	2	6.70, 7.38		104.9 (J^2), 125.6 (J^3), 125.6 (J^3), 153.9 (J^3)	
17	16.0	2.37	<i>s</i>		7.38		124.1 (J^2), 125.6 (J^3), 128.6 (J^3), 146.5 (J^4), 104.9 (J^4), 105.3 (J^5)	
18	33.7	1.08	<i>s</i>		1.32		34.2 (J^2), 23.9 (J^3), 43.3 (J^5), 52.8 (J^3), 43.1 (J^3)	
19	23.9	1.32	<i>s</i>		4.80, 1.08		34.2 (J^2), 43.3 (J^5), 52.8 (J^3), 33.7 (J^3), 43.1 (J^3)	
20	27.7	1.64	<i>s</i>				38.2 (J^2), 146.5 (J^3), 43.1 (J^5), 52.8 (J^3), 39.0 (J^5), 43.3 (J^3)	

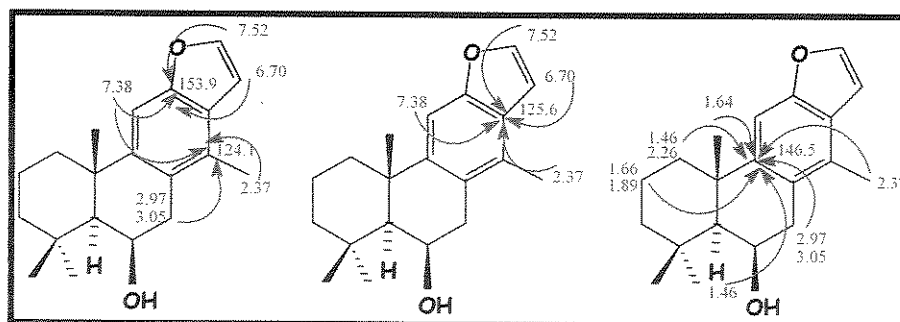


Figura 6: Correlações observados para os carbonos quaternários do anel C no espectro de HMBC (^1H , ^{13}C , J^n) da substância **19**.

No experimento de diferença de nOe (Anexo A - E19, Figura 7) a irradiação do próton carbinólico (δ 4.80, s) causou incremento dos sinais das metilas [CH_3 -18 (δ_{H} 1.08, 3.94%) e CH_3 -19 (δ_{H} 1.32, 0.59%)], de H-5 (δ_{H} 1.46, 1.24%) e de H-7 $_{\alpha\beta}$ (δ_{H} 2.97 e 3.05, 3.19%). Esses resultados reforçam a sugestão de que o grupo –OH encontra-se na posição 6 β .

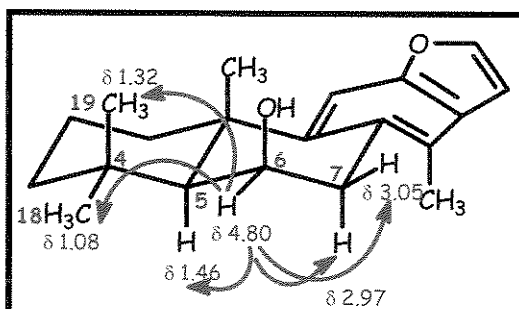
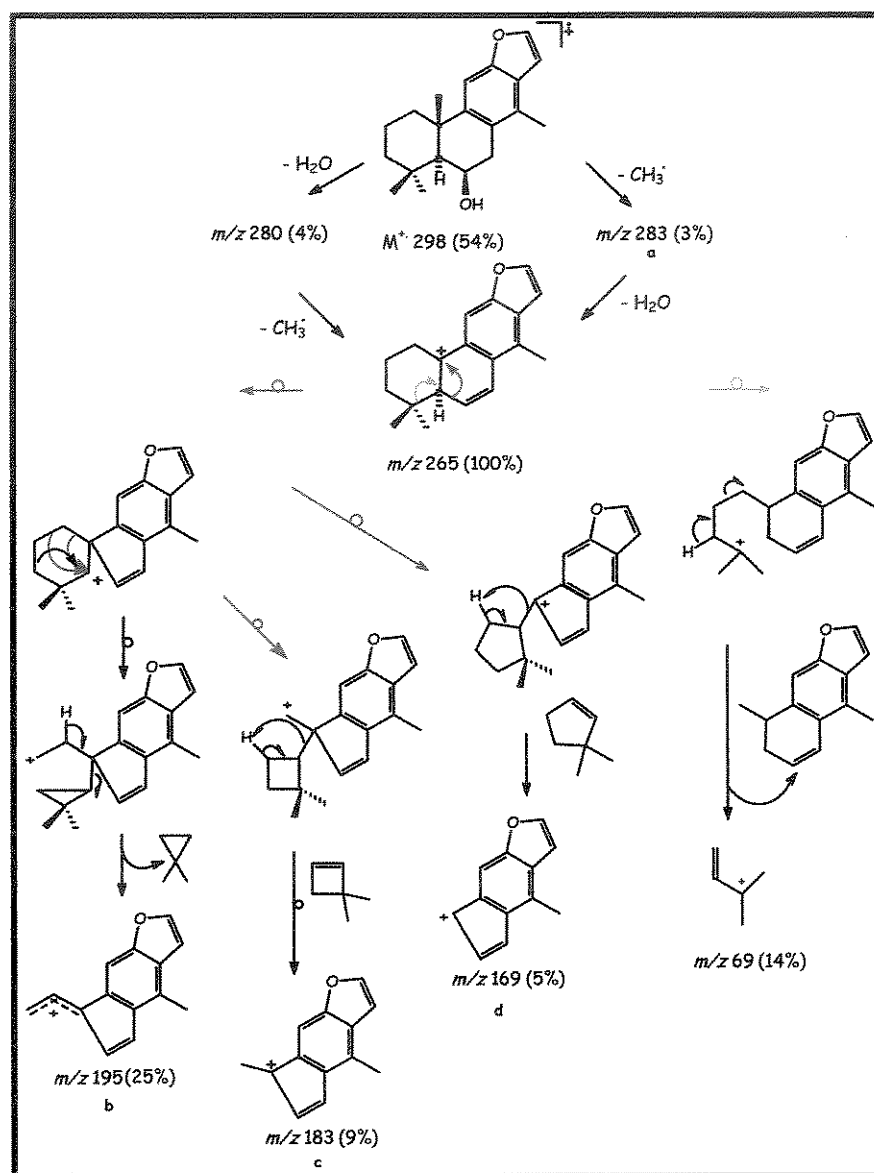


Figura 7: Incrementos observados no experimento de nOe para **19**.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A - E20) mostrou o pico do íon molecular [$\text{M}^+ = 298,1903$ (54%)], de acordo com a fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$ (Calc. 298,1933). A origem do pico base com m/z 265 (100%) pode ser racionalizada pela perda de uma molécula de água ($\text{M}^+ - 18$), seguida da perda de um radical metila ($\text{M}^+ - 18 - 15$) ou vice-versa. Por analogia aos caminhos de fragmentação

observados com vários derivados do ferruginol³⁶ foi possível racionalizar a origem dos fragmentos **a**, **b**, **c** e **d** correspondentes aos picos com m/z 283 (3%), 195 (25%), 183 (9%), 169 (5%) (Quadro 4). O Anexo A - E21 mostra os dados do experimento EM/EM, que estão de acordo com a proposta de fragmentação apresentada no Quadro 4.

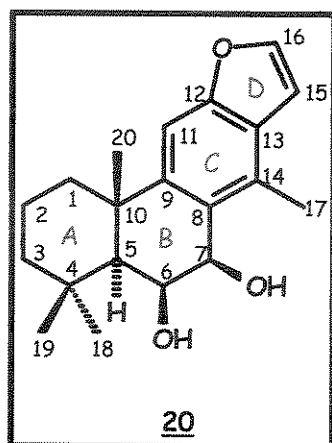


Quadro 4: Proposta de fragmentação para a substância **19**.

³⁶Enzell CR, Wahlberg I. Mass Spectrometric Studies of Diterpenes. *Acta Chem Scand* 23, 871-891, 1969.

Após ampla revisão bibliográfica, verificou-se que a substância **19** é um diterpeno da série dos abieta-8, 11, 13-trienos inédito na literatura. O isômero 5 α -OH foi isolado de *Caesalpinia pulcherrima*³⁷, uma espécie Leguminosae usada na medicina popular pelas suas propriedades abortíferas.

4.3 Determinação estrutural do diterpeno **20**



O espectro de RMN¹H (Anexo A - E24, Tabela 6) da substância **20** mostrou-se muito semelhante ao do diterpeno **19** com os sinais característicos das absorções dos hidrogênios referentes às metilas de um sistema 4,4,10-trimetil *trans* decalina, à metila aromática, ao próton aromático e a um anel furano, onde os deslocamentos químicos das metilas CH₃-19 e CH₃-20 também indicam o efeito da interação 1,3-diaxial causado pela presença de um grupo OH ligado ao carbono C-6 β . Entretanto, o sinal em δ 4.64 (*d*; *J* = 6Hz; 1H) foi atribuído à presença de mais um hidrogênio carbinólico na molécula.

Os espectros de RMN¹³C e DEPT (Anexo A - E25 e E26, Tabela 6) também se mostraram muito semelhantes aos do diterpeno **19**, com os sinais correspondentes a 20 carbonos, sendo 4 CH₃, 3 CH₂, 6 CH e 7 C_O. É interessante observar que em relação ao diterpeno **19** tem-se a mesma da quantidade de CH₃

³⁷McPherson DD, Che C, Cordell GA, Soejarto DD, Pezzuto, JM, Fong HHS. Diterpenoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry* 25, 167-170, 1986.

e C_O, diferindo apenas na presença de um CH₂ a menos e de um CH carbinólico a mais na molécula.

A comparação dos espectros de RMN¹³C dos compostos **19** e **20** mostrou uma grande semelhança entre os deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis A, C e D, sugerindo que a diferença estrutural entre os dois compostos encontra-se no anel B, o que junto à análise do espectro de RMN¹H mostrada acima levou à conclusão que **20** possui mais uma hidroxila que deve estar ligada na posição β do carbono C-7, pois a multiplicidade do sinal referente a H-7 [δ 4.64 (*d*; *J* = 6Hz; 1H)] é coerente com o esperado para a ocorrência de acoplamento axial (H-7_α) com equatorial (H-6_α).

Os deslocamentos químicos de todos os prótons e carbonos da molécula foram confirmados por RMN-2D através das correlações observadas nos espectros HSQC (Anexo A - E27 e E28) e HMBC (Anexo A - E29, E30 e E31, Figura 8), enquanto a análise do espectro gCOSY (Anexo A - E32 e E33) confirmou os acoplamentos propostos com base na análise do espectro de RMN¹H (Tabela 6).

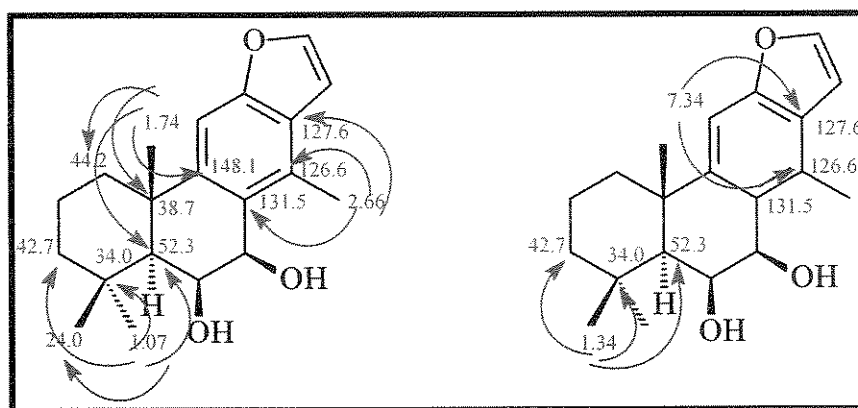


Figura 8: Correlações observados no espectro de HMBC (H, C, *J*ⁿ) da substância **20**.

Tabela 6: Correlações observadas nos espectros gCOSY (H-H, J^H), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^H) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl₃) para 20.

posição	¹³ C (δ , J^1)	¹ H		¹ H (δ , J^H)	¹³ C (δ , J^H)
		δ	Multiplicidade		
1 α	44.2	1.29	<i>m</i>	2.18	
1 β		2.18	<i>md</i>	1.29	
2 α	19.6	1.62	<i>m</i>	1.90	
2 β		1.90	<i>qt</i>	1.23, 1.62	
3 α	42.7	1.23	<i>m</i>	1.51, 1.90	
3 β		1.51	<i>m</i>	1.23	
4	34.0				
5	52.3	1.37	<i>d</i>	1	
6	70.0	4.99	<i>mt</i>	2.58	
7	65.5	4.64	<i>d</i>	6	
8	131.5				
9	148.1				
10	38.7				
11	105.1*	7.34	<i>s</i>		126.6 (J^4), 127.6 (J^3)
12	154.2				
13	127.6				
14	126.6				
15	105.2*				
16	144.5	6.77	<i>dd</i>	2 e 1	
17	17.7	7.55	<i>d</i>	2	
18	33.5	2.66	<i>s</i>		131.5 (J^3), 126.6 (J^2), 127.6 (J^3)
19	24.0	1.07	<i>s</i>		52.3 (J^3), 34.0 (J^2), 42.7 (J^3), 24.0 (J^3)
20	27.8	1.34	<i>s</i>		52.3 (J^3), 34.0 (J^2), 42.7 (J^3)
		1.74	<i>s</i>		38.7 (J^2), 148.1 (J^3), 44.2 (J^3), 52.3 (J^3)
OH-6		2.58	<i>s/</i>	4.99	
OH-7		2.54	<i>s/</i>		

*sinais intercambiáveis

No experimento de diferença de nOe (Anexo A - E34, Figura 9) a irradiação do próton carbinólico [δ 4.64 (*d*; J = 6Hz; 1H)] causou incremento dos sinais da metila CH₃-18 (δ _H 1.07, 4.16%), de H-6 (δ _H 4.99, 2.66%) e de H-5 (δ _H 1.37, 1.96%). Tais resultados reforçam a sugestão de que o grupo –OH encontra-se na posição 7 β .

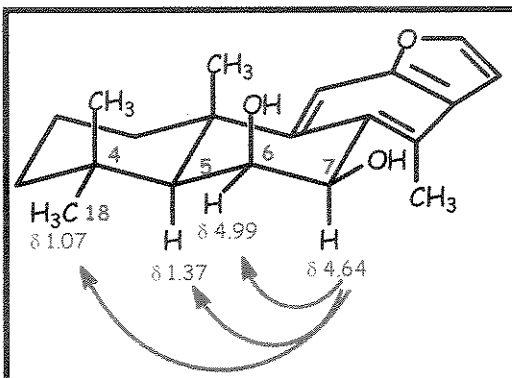
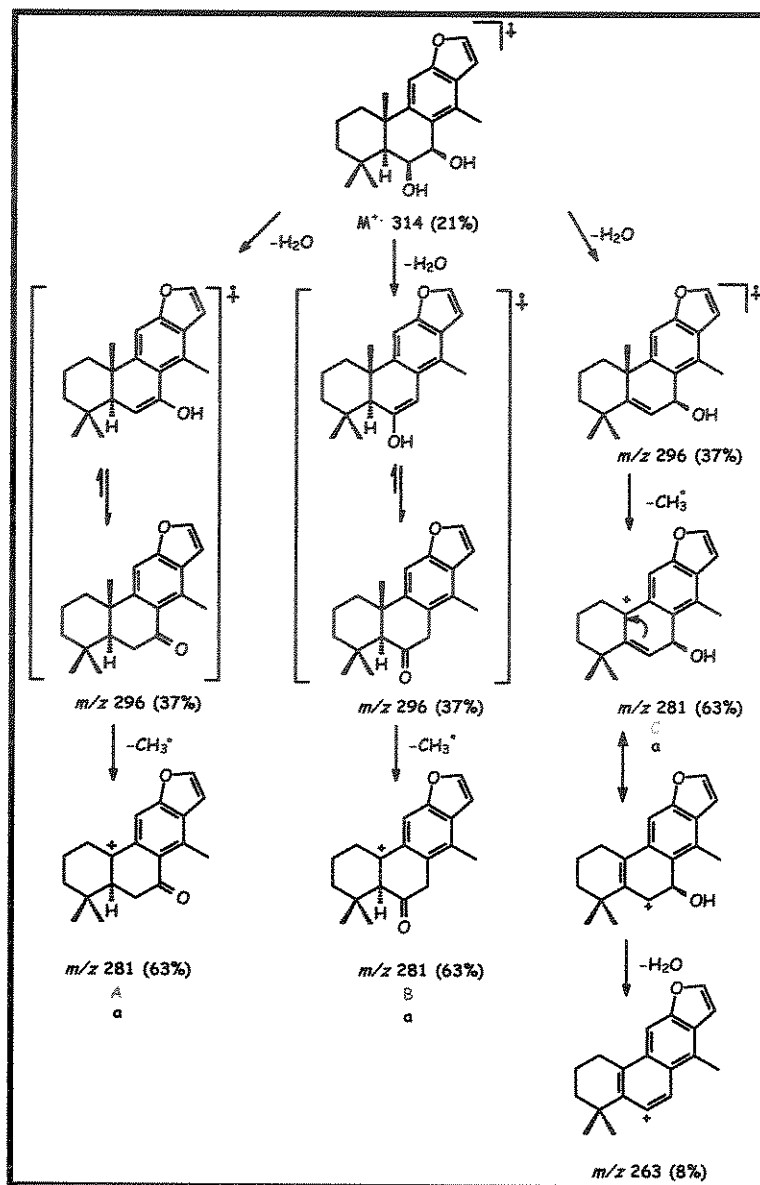
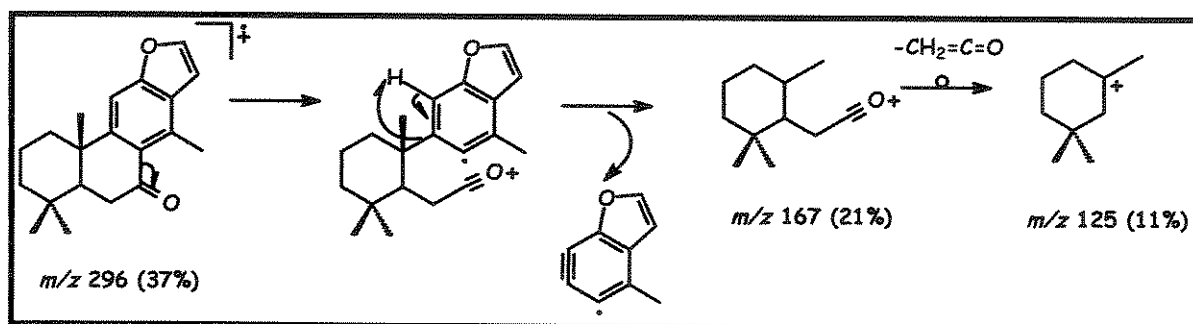


Figura 9: Incrementos observados no experimento de nOe para 20.

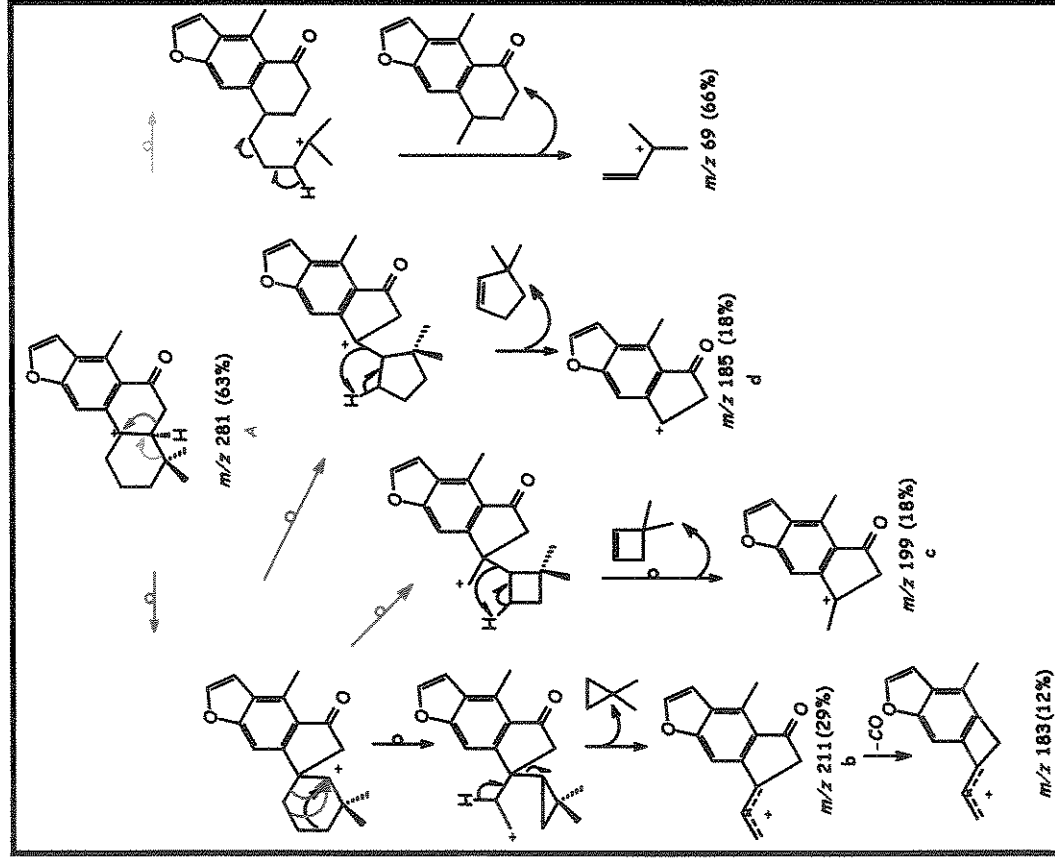
O espectro de massas de alta resolução (Anexo A - E35) mostrou o pico do íon molecular [M^+ = 314,1901 (21%)], de acordo com a fórmula C₂₀H₂₆O₃ (Calc. 314,1882). Os experimentos EM/EM (Anexo A - E36) comprovam que os caminhos de fragmentação são análogos aos observados para a substância 19 (Quadros 5, 6, 7, 8 e 9).



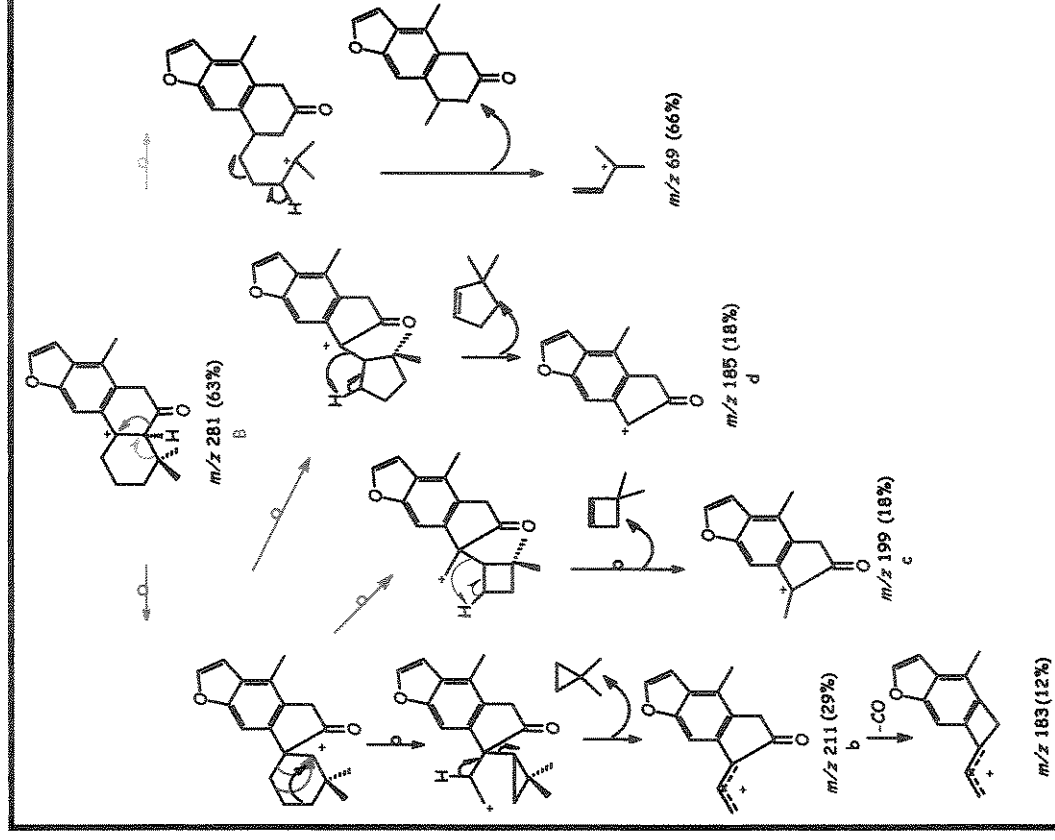
Quadro 5: Proposta de fragmentação para a substância 20.



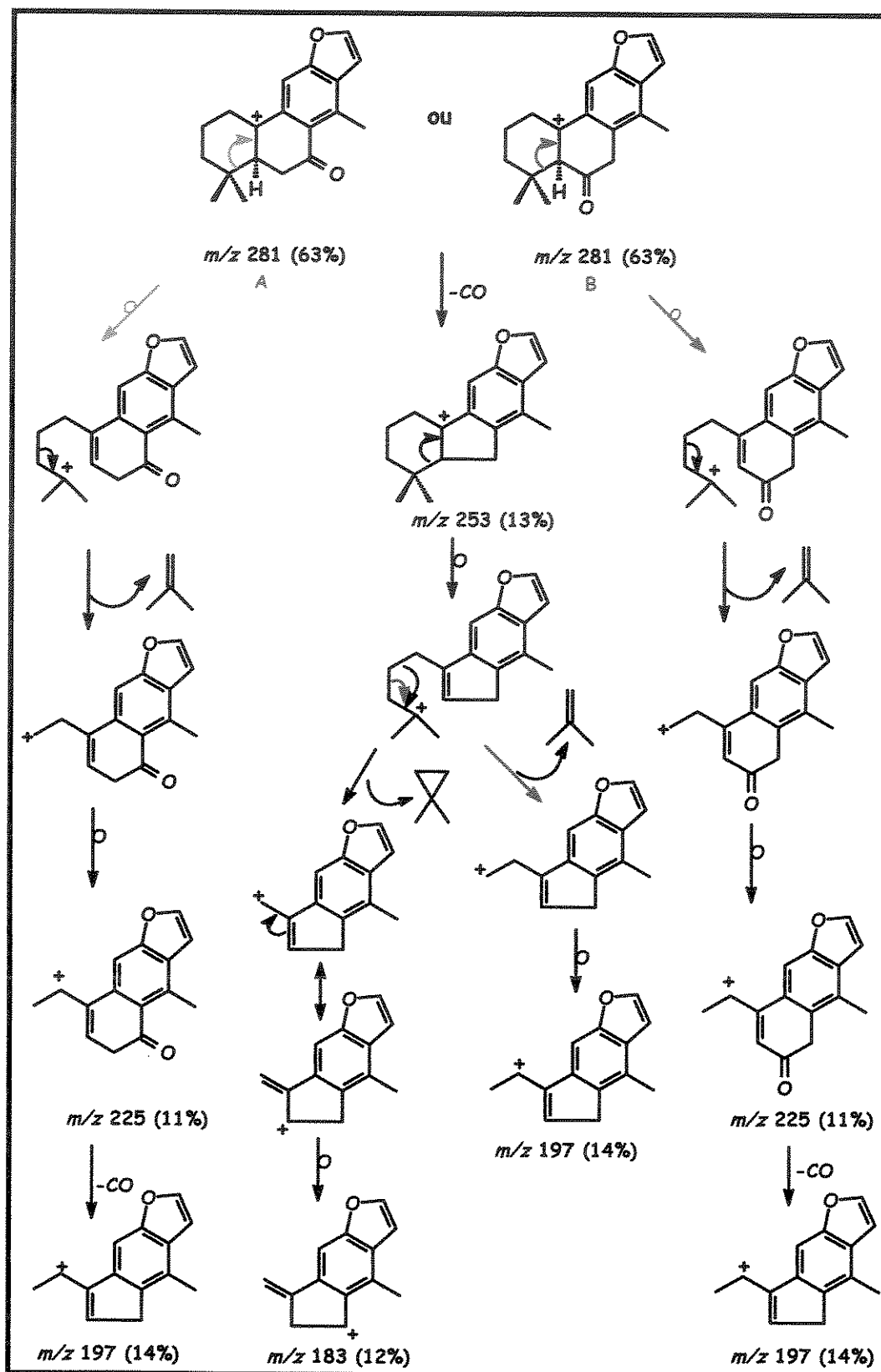
Quadro 6: Proposta de fragmentação para a substância 20.



Quadro 7: Proposta de fragmentação para a substância 20.



Quadro 8: Proposta de fragmentação para a substância 20.

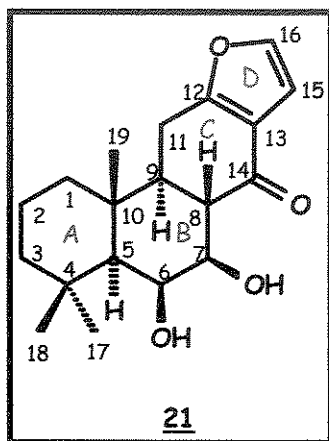


Quadro 9: Proposta de fragmentação para a substância **20**.

Tanto o espectro de massas como os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da substância **20** apresentaram sinais adicionais menos intensos relativos à presença de impurezas que não prejudicaram a determinação de sua estrutura molecular, mas iriam interferir na medida de rotação óptica específica que por isto não foi feita.

Após ampla revisão bibliográfica, verificou-se que a substância **20** é um diterpeno di-hidroxilado nas posições 6β e 7β pertencente à série dos abieta-8, 11, 13-trieno inédito na literatura.

4.4 Determinação estrutural do diterpeno **21**



O espectro de RMN ^1H (Anexo A - E37, Tabela 7) da substância **21**, revelou a presença três sinais em δ 1.01 (s; 3H), 1.30 (s; 3H) e 1.33 (s; 3H) que sugerem a presença de um sistema 4,4,10-trimetil *trans* decalina, bem como a presença de um anel furano [δ 6.65 (d; J = 2Hz; 1H) e δ 7.34 (d; J = 2Hz; 1H)] e dois prótons carbinólicos [δ 3.77 (dd; J = 10Hz e 3Hz; 1H) e δ 4.31 (sl, 1H)]. Os deslocamentos químicos de duas metilas indicam que ambas estão sofrendo o efeito de interação 1,3-diaxial com um dos grupos hidroxila.

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT (Anexo A - E38 e 39, Tabela 7) mostraram sinais correspondentes a 19 carbonos, sendo 3 CH_3 , 4 CH_2 , 7 CH e 5 Co. Ao comparar estes dados com os da substância **20**, observa-se a ausência dos sinais da metila aromática e do anel aromático (anel C), indicando que em **21**

o anel C encontra-se saturado. Por outro lado, observa-se uma grande semelhança entre os anéis A de **20** e **21** e ambas possuem um anel furano. Essas evidências mostraram que as mudanças estruturais principais ocorreram entre os anéis B e C. Finalmente, o sinal em δ_c 200.1, indica a presença de uma carbonila.

Conforme mencionado anteriormente, o espectro de RMN¹H mostrou a presença de dois prótons carbinólicos, os quais foram alocados na posição 6 e 7, devido as constantes de acoplamentos e multiplicidade dos sinais, uma vez que H-6 α (δ 4.31) apresenta-se como um *singleto largo* e H-7 α (δ 3.77) como um *duplo dubleto* (J = 10Hz e 3Hz), pois H-7 α acopla com H-6 α (J = 3Hz, acoplamento axial-equatorial) e com H-8 β (J = 10Hz, acoplamento axial-axial) sugerindo assim que H-7 possui configuração relativa trans-diaxial em relação ao H-8. Mais uma vez, a multiplicidade do sinal e a constante de acoplamento do hidrogênio em δ 2.71 referente ao H-8 β (*dd*; J = 12Hz e 10Hz; 1H) revela que o mesmo apresenta configuração relativa trans-diaxial em relação ao H-9 α [δ 1.81 (*td*; J = 12Hz e 5Hz; 1H)]. Há ainda a presença de sinais referentes a prótons metilênicos diastereotópicos [δ 2.93 (*dd*; J = 17Hz e 5Hz; 1H; H-11 α) e 2.77 (*dd*; J = 17Hz e 12Hz; 1H; H-11 β)].

Os deslocamentos químicos de todos os prótons e carbonos da molécula foram confirmados por RMN-2D através das correlações observadas nos espectros HSQC (Anexo A - E40 e E41) e HMBC (Anexo A - E42, E43 e E44, Figura 10), enquanto a análise do espectro gCOSY (Anexo A - E45, E46 e E47) confirmou os acoplamentos propostos com base na análise do espectro de RMN¹H (Tabela 7).

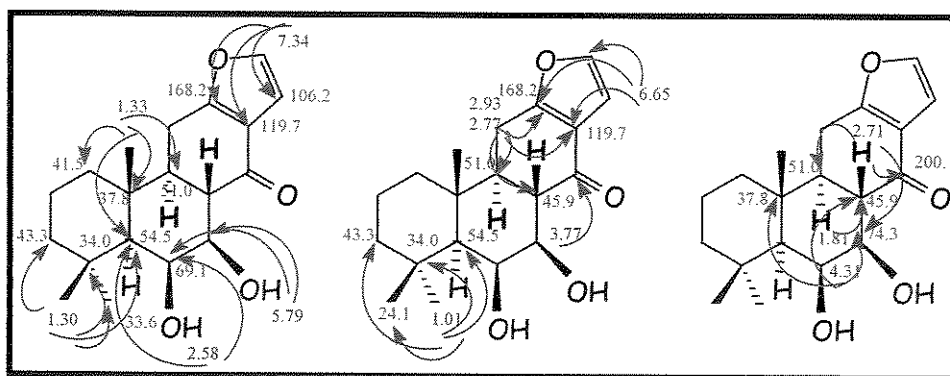


Figura 10: Algumas correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J^n) da substância **21**.

Tabela 7: Correlações observadas nos espectros de gCOSY (H-H, J^n), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n)
(H 500MHz, C 125MHz, CDCl₃) para **21**.

posição	¹³ C		¹ H		¹ H	¹³ C
	(δ , J^1)	δ	Multiplicidade	J (Hz)	(δ , J^n)	(δ , J^n)
1 α	41.5	0.98	<i>dd</i>	13 e 3	1.52, 1.68, 1.73	
1 β		1.68	<i>m</i>		1.52, 0.98	54.5 (J^3), 43.3 (J^3)
2 α	18.8	1.52	<i>dquint</i>	12 e 4	0.98, 1.18, 1.68	
2 β		1.73	<i>dt</i>	14 e 3	0.98, 1.18	
3 α	43.3	1.18	<i>td</i>	14 e 4	1.44, 1.52, 1.73	24.1 (J^3), 18.8 (J^2)
3 β		1.44	<i>m</i>		1.18	24.1 (J^3), 18.8 (J^2)
4	34.0					
5	54.5	0.88	<i>sl</i>		4.31, 2.58	37.8 (J^2), 34.0 (J^2), 33.6 (J^3), 24.1 (J^3), 18.8 (J^4), 17.7 (J^3)
6	69.1	4.31	<i>sl</i>		3.77, 0.88	37.8 (J^3), 74.3 (J^2), 45.9 (J^3)
7	74.3	3.77	<i>dd</i>	10 e 3	4.31, 2.71	200.1 (J^3)
8	45.9	2.71	<i>dd</i>	12 e 10	3.77, 1.81	200.1 (J^2), 74.3 (J^2), 51.0 (J^2)
9	51.0	1.81	<i>td</i>	12 e 5	2.77, 2.93, 2.71	45.9 (J^2)
10	37.8					
11 α	22.6	2.93	<i>dd</i>	17 e 5	1.81, 2.77	119.7 (J^3), 168.2 (J^2), 51.0 (J^2), 45.9 (J^3),
11 β		2.77	<i>dd</i>	17 e 12	1.81, 2.93	119.7 (J^3), 168.2 (J^2), 51.0 (J^2)
12	168.2					
13	119.7					
14	200.1					
15	106.2	6.65	<i>d</i>	2	7.34	119.7 (J^2), 168.2 (J^3), 143.3 (J^2)
16	143.3	7.34	<i>d</i>	2	6.65	168.2 (J^3), 119.7 (J^3), 106.2 (J^2)
17	33.6	1.01	<i>s</i>			34.0 (J^2), 43.3 (J^3), 33.6 (J^1), 24.1 (J^3), 54.5 (J^3)
18	24.1	1.30	<i>s</i>			34.0 (J^2), 54.5 (J^3), 43.3 (J^3), 33.6 (J^3)
19	17.7	1.33	<i>s</i>			37.8 (J^2), 54.5 (J^3), 51.0 (J^3), 41.5 (J^3)
OH-6 β		2.58	<i>sl</i>		0.88	69.1 (J^2), 54.5 (J^3)
OH-7 β		5.79	<i>sl</i>			74.3 (J^2), 69.1 (J^3)

Nos experimentos de diferença de nOe (Anexo A - E48, E49 e E50, Figura 11), observou-se que a irradiação da metila (CH_3 -19) (δ_{H} 1.33, s) causou incremento dos sinais (CH_3 -18) (δ_{H} 1.30, 0.64%), H-2 β (δ_{H} 1.73, 1.31%), OH-6 β (δ_{H} 2.58, 0.15%), H-8 β (δ_{H} 2.71, 1.91%) e H-11 β (δ_{H} 2.77, 1.91%), do próton carbinólico H-7 α (δ_{H} 3.77, dd) causou incrementos nos sinais H-5 α (δ_{H} 0.88, 2.27%), H-6 α (δ_{H} 4.31, 2.80%), H-9 α (δ_{H} 1.81, 1.93%) e OH-7 β (δ_{H} 5.79, 2.40%) e do próton H-5 α (δ_{H} 0.88, s) causou incremento nos sinais de H-1 α (δ_{H} 0.98, 0.70%), H-3 α (δ_{H} 1.18, 1.61%), H-6 α (δ_{H} 4.31, 1.53%), H-7 α (δ_{H} 3.77, 1.92%), H-9 α (δ_{H} 1.81, 3.36%) e CH_3 -17 (δ_{H} 1.01, 2.58%). Esses resultados reforçam a sugestão de que as hidroxilas encontram-se nas posições 6 β e 7 β , bem como a fusão trans entre os anéis B e C.

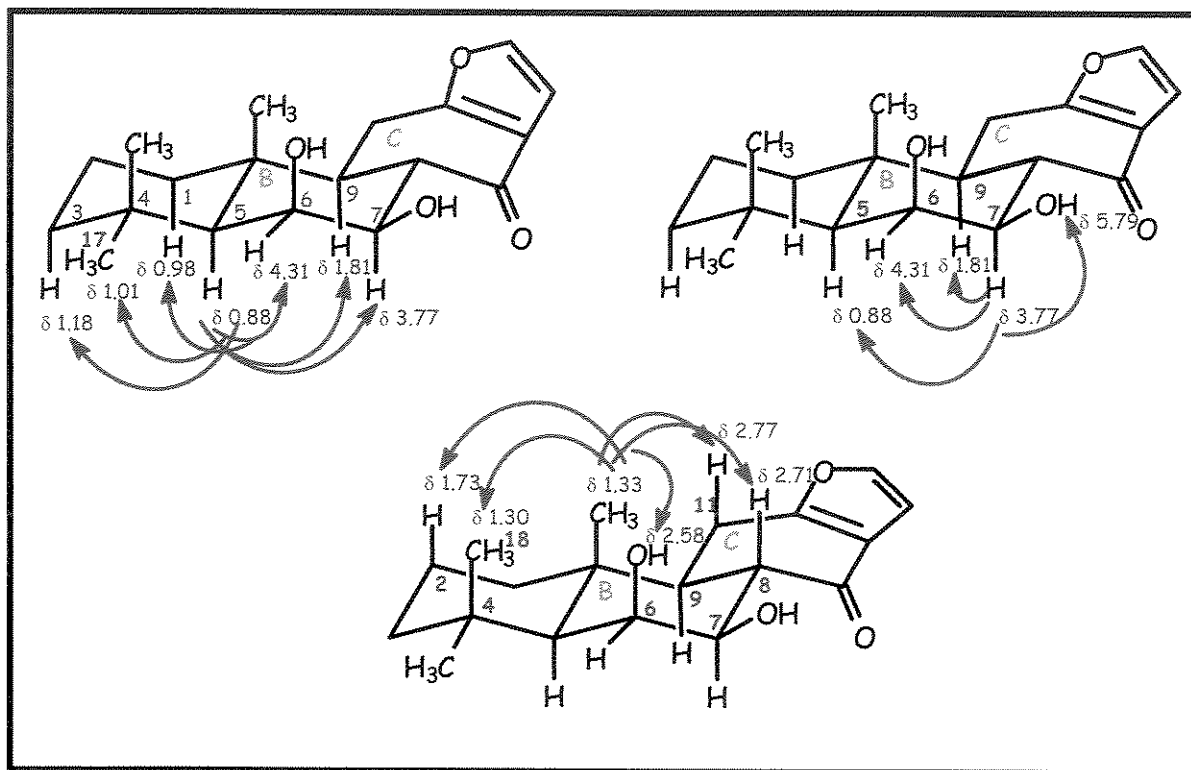
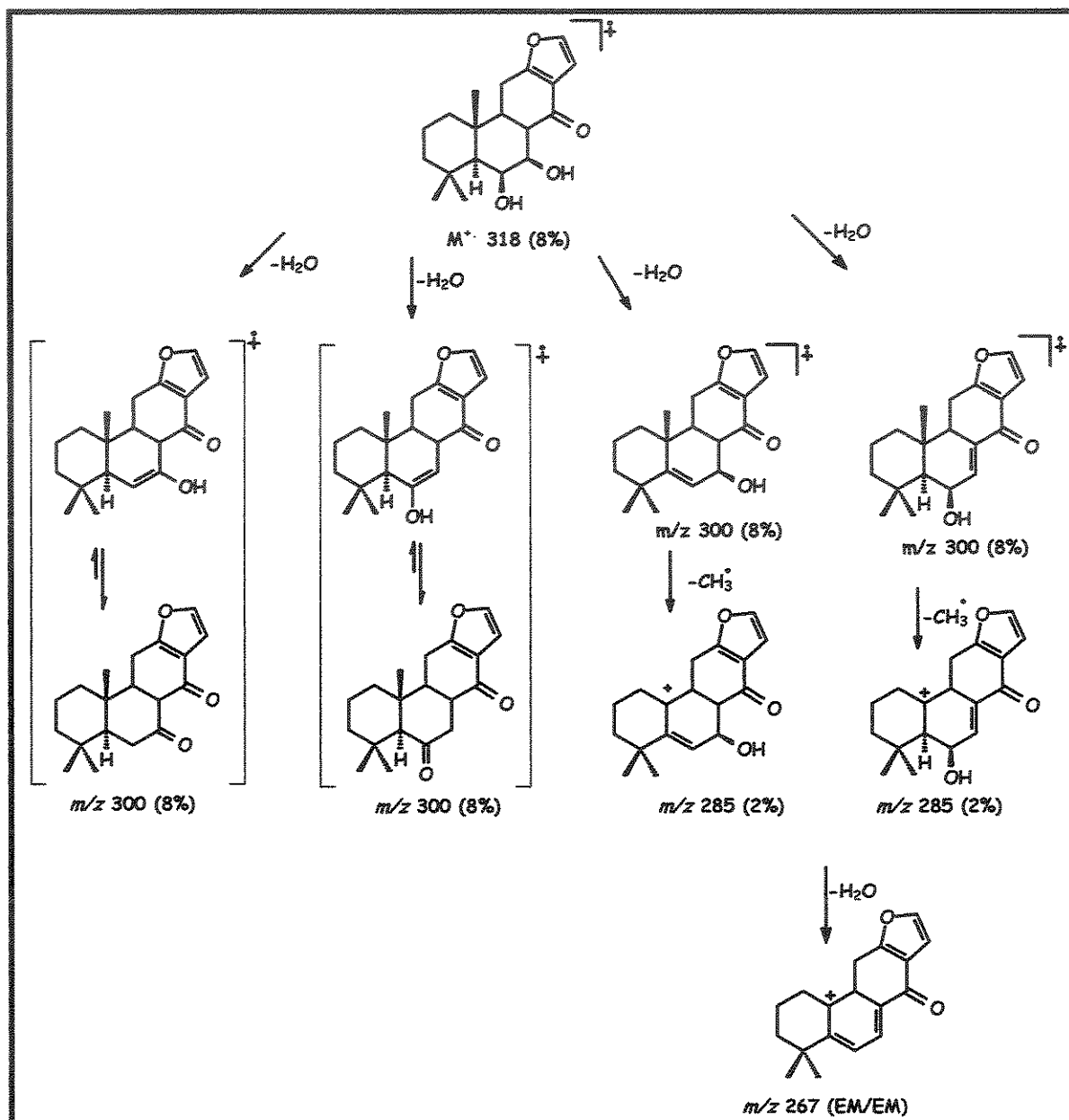


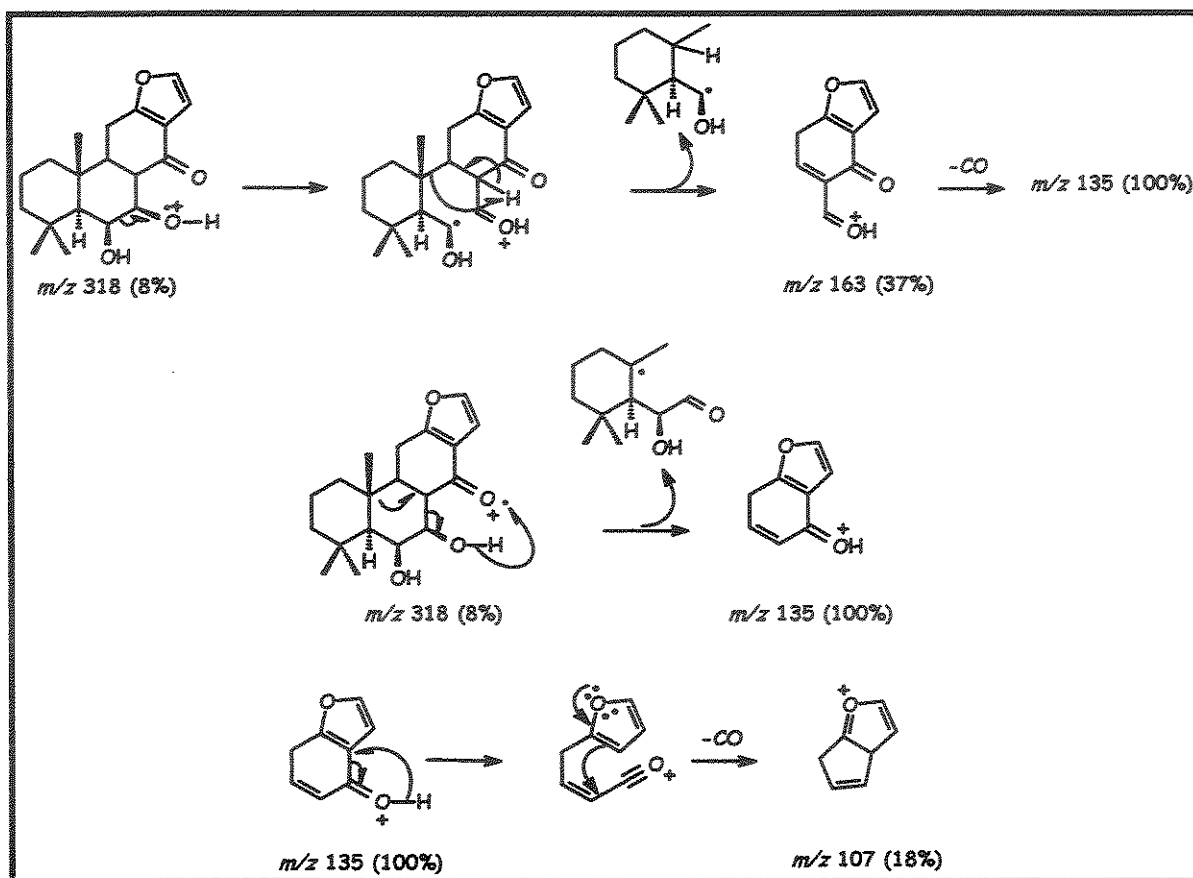
Figura 11: Incrementos observados no experimento de nOe para **21**.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A - E51) mostrou o pico do íon molecular [$\text{M}^+ = 318,18318$ (8%)], de acordo com a fórmula $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_4$ (Calc.

318,18311). A racionalização dos caminhos de fragmentação foi coerente com os experimentos EM/EM (Anexo A - E52, Quadros 10 e 11).



Quadro 10: Proposta de fragmentação para a substância 21.



Quadro 11: Proposta de fragmentação para a substância **21**.

Após ampla revisão bibliográfica, verificou-se que **21** é um diterpeno inédito na literatura, muito semelhante aos diterpenos isolados de espécies do gênero *Pterodon*^{38, 39, 40, 41} e derivados^{42, 43, 44}.

³⁸Arriaga AMC, Castro MAB, Silveira ER, Braz-Filho R. Further Diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. *J Braz Chem Soc* 11, 187-190, 2000.

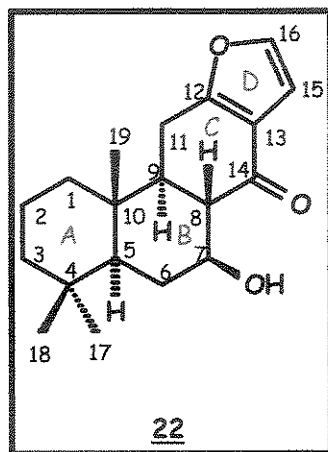
³⁹Campos, AM, Silveira ER, Braz-Filho R, Teixeira T. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Phytochemistry* 36, 403-406, 1994.

⁴⁰Fascio M, Mors WB, Gilbert B, Mahajan JR, Monteiro MB, Filho DSF, Vichnewski W. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry* 15, 201-203, 1976.

⁴¹Mahajan JR, Monteiro MB. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. *J Chem Soc Perk T* 1, 5, 520-525, 1973.

⁴²Rubinger MMM, Castelo-Branco PA, Guilardi S, Souza EMR, Gambardella MTP, Borges EEL, Ferreira-Alves DL, Piló-Veloso D. Preparation, X-ray structural studies and plant growth regulatory activity of methyl 6 α ,7 β -thiocarbonyldioxyvouacapan-17 β -oate. *J Braz Chem Soc* 15, 219-223, 2004.

4.5 Determinação estrutural do diterpeno 22



O espectro de RMN¹H (Anexo A - E55, Tabela 8) da substância 22 mostrou a presença dos três sinais em δ 0.90 (s; 3H), 0.92 (s; 3H) e 1.03 (s; 3H), característicos das absorções dos hidrogênios das metilas do sistema 4,4,10-trimetil *trans* decalina, de um anel furano [δ 6.65 (d; J = 2Hz; 1H) e δ 7.33 (d; J = 2Hz; 1H)], de um próton carbinólico [δ 3.93 (ddd; J = 11Hz, 9Hz e 5Hz)], de um próton de hidroxila [δ 5.08 (s; 1H)] e de prótons metilênicos diastereotópicos [δ 2.02 (ddd; J = 13Hz, 5Hz e 2Hz, 1H) e δ 1.47 (m)]. A comparação dos deslocamentos químicos das metilas do sistema *trans* decalina com os observados em 19, 20 e 21 concluiu-se que na substância 22 não ocorre interação do tipo 1,3-diaxial das referidas metilas com um grupo oxigenado.

⁴³Belinelo V, Reis GT, Stefani GM, Ferreira-Alves DL, Piló-Veloso D. Synthesis of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid derivatives. Part IV: Mannich base derivatives and its activities on the eletrically stimulated guinea-pig ileum preparation. *J Braz Chem Soc* 13, 830-837, 2002.

⁴⁴Maltha CRA, Stefani GM, Piló-Veloso D. The synthesis of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid derivatives. Part II: Carbamate and amine derivatives. *J Braz Chem Soc* 6, 357-360, 1995.

Os espectros de RMN¹³C e DEPT (Anexo A - E56 e E57, Tabela 8) mostraram-se muito semelhantes ao do diterpeno **21**, com sinais correspondentes a 19 carbonos, dos quais 3 CH₃, 5 CH₂, 6 CH e 5 Co (dois aromáticos, dois alifáticos e uma carbonila). Ao comparar os deslocamentos químicos dos carbonos dessa substância com **21** concluiu-se que a diferença encontra-se no anel B.

Retornando-se ao espectro de RMN¹H, os valores das constantes de acoplamentos juntamente com a multiplicidade do sinal do próton carbinólico [δ 3.93 (*ddd*; J = 11Hz, 9Hz e 5Hz; 1H)] sugerem que H-7 encontra-se na posição axial, e portanto acopla com H-8 β ($J_{\text{trans-diaxial}}$ = 9Hz), com H-6 β ($J_{\text{trans-diaxial}}$ = 11Hz) e com H-6 α ($J_{\text{equatorial-axial}}$ = 5Hz). Por sua vez, o hidrogênio H-6 α [δ 2.02 (*ddd*; J = 13Hz, 5Hz e 2Hz; 1H)] acopla com H-6 β (J_{geminal} = 13Hz), com H-7 α ($J_{\text{equatorial-axial}}$ = 5Hz) e com H-5 ($J_{\text{equatorial-axial}}$ = 2Hz). Finalmente, os sinais em δ 1.47 (*m*; 1H) e δ 0.97 (*d*; J = 10Hz; 1H) foram atribuídos aos prótons H-6 β e H-5.

Os deslocamentos químicos de todos os prótons e carbonos da molécula foram confirmados por RMN-2D através das correlações observadas nos espectros HETCOR (Anexo A - E58 e E59) e COLOC (Anexo A - E60, E61 e E62, Figura 12), enquanto a análise do espectro gCOSY (Anexo A - E63 e E64) confirmou os acoplamentos propostos com base na análise do espectro de RMN¹H (Tabela 8).

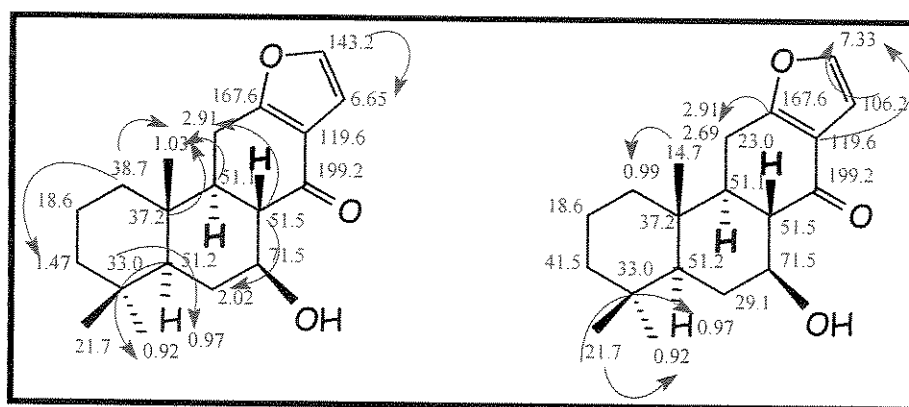


Tabela 8: Correlações observadas nos espectros de RMN-2D gCOSY (H-H, J^H), HETCOR (C-H, J^1) e COLOC (C-H, J^H) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl₃) para **22**.

posição	¹³ C (δ , J^1)	¹ H		¹ H (δ , J^H)	¹ H (δ , J^H)
		δ	Multiplicidade		
				J (Hz)	
1 α	38.7	0.99	d	10	1.03 (J^3), 1.47 (J^3)
1 β		1.71	m		1.71
2 α	18.6	1.57	m		0.99
2 β					0.99, 1.17
3 α	41.5	1.17	m		1.47
3 β		1.47	m		1.17
4	33.0				0.97 (J^2) 0.92 (J^3)
5	51.2	0.97	d	10	
6 α	29.1	2.02	ddd	13, 5 e 2	1.47
6 β		1.47	m		2.02
7	71.5	3.93	ddd	11, 9 e 5	1.47, 2.02, 2.37
8	51.5	2.37	dd	12 e 9	1.81
9	51.1	1.81	td	12 e 5	2.69, 2.91, 2.37
10	37.2				1.03 (J^2)
11 α	23.0	2.91	dd	17 e 5	1.81, 2.69
11 β		2.69	dd	17 e 12	1.81, 2.91
12	167.6				2.91 (J^2), 2.69 (J^2) 7.33 (J^3)
13	119.6				
14	199.2				
15	106.2	6.65	d	2	7.33 (J^2)
16	143.2	7.33	d	2	6.65 (J^2)
17	33.3	0.92	s		
18	21.7	0.90	s		0.92 (J^3), 0.97 (J^3)
19	14.7	1.03	s		0.99 (J^3)
OH-7 β		5.08	s/		

No experimento de diferença de nOe (Anexo A - E65 e E66, Figura 13) a irradiação do próton carbinólico (δ 3.93, *ddd*) causou incremento dos sinais de H-5 α (δ_H 0.97, 2.06%), H-6 α (δ_H 2.02, 2.33%), OH-7 β (δ_H 5.08, 0.43%) e H-9 α (δ_H 1.81, 1.30%), já a irradiação da metila CH₃-19 (δ 1.03, *s*) causou incremento dos sinais de H-1 β , H-2 β , H-3 β , H-6 β (δ_H 1.71, 1.57, 1.47, 1.47, 2.84%), H-8 β (δ_H 2.37, 0.94%), H-11 β (δ_H 2.69, 1.01%) e CH₃-18 (δ_H 0.90, 0.74%). Esses resultados reforçam a sugestão de que a hidroxila encontra-se na posição 7 β .

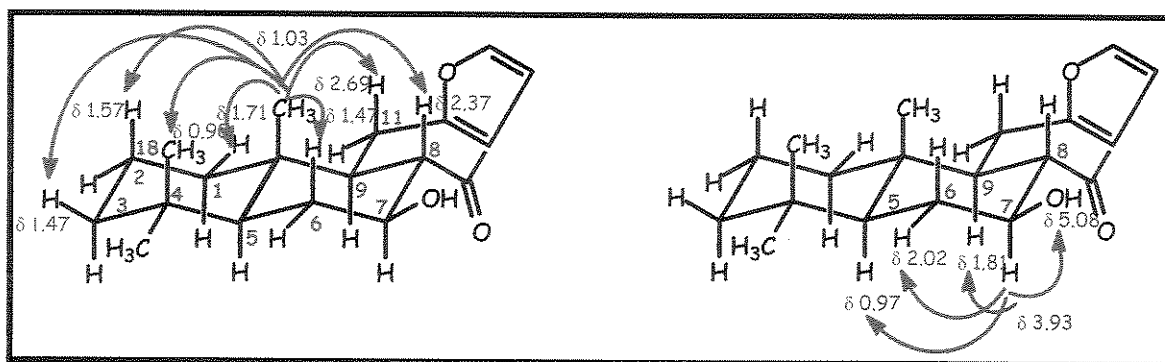
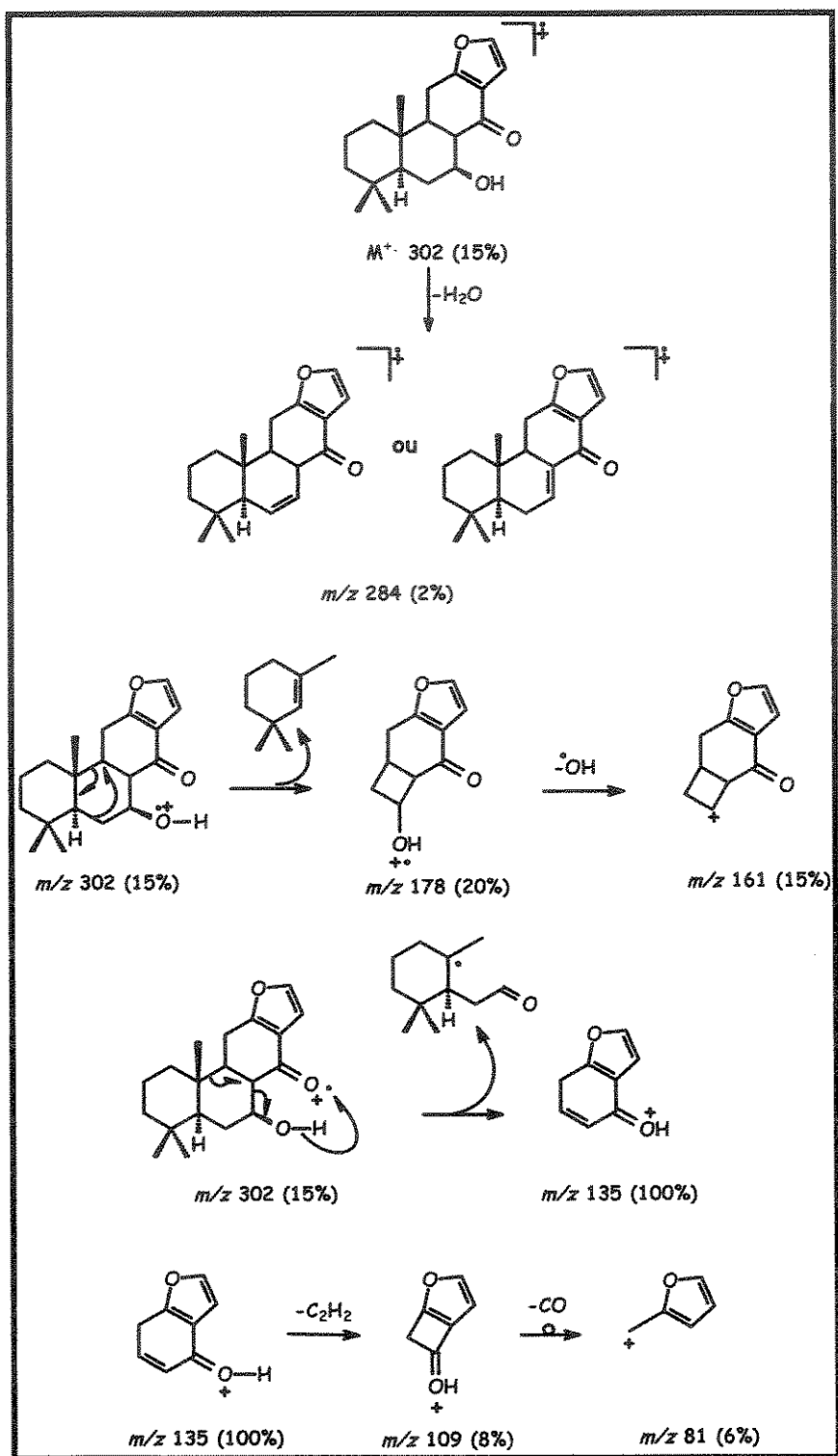


Figura 13: Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de nOe para **22**.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A - E67) mostrou o pico do íon molecular [$M^+ = 302,1906$ (15%)], de acordo com a fórmula C₁₉H₂₆O₃ (Calc. 302,1882). Os caminhos de fragmentação foram propostos por analogia aos dados obtidos pelos espectros de EM/EM de **21**.

É interessante observar que na estrutura proposta para o cátion correspondente ao pico base *m/z* 135 (100%) a carga positiva encontra-se bastante deslocalizada (Quadro 12).

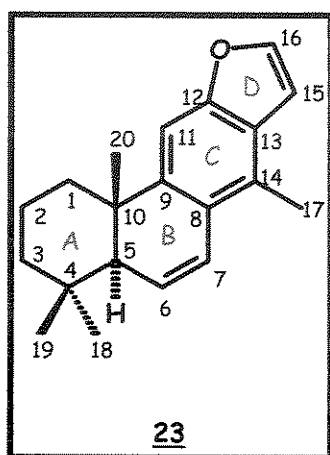


Quadro 12: Proposta de fragmentação para a substância 22.

O espectro de RMN¹³C da substância **22** apresentou sinais adicionais de baixa intensidade relativos à presença de impurezas que não prejudicaram a determinação de sua estrutura molecular, mas iriam interferir na medida de rotação óptica específica que por isto não foi feita.

Após ampla revisão bibliográfica, verificou-se que o diterpeno é inédito na literatura.

4.6 Determinação estrutural do diterpeno **23**



O espectro de RMN¹H (Anexo A - E68, Tabela 9) da substância **23** apresentou grande similaridade com o do diterpeno **19**, com sinais característicos das absorções das metilas do um sistema 4,4,10-trimetil *trans* decalina em δ 0.99 (s; 3H) e 1.08 (s; 6H), bem como os sinais de uma metila aromática [δ 2.50 (s; 3H)], um próton aromático [δ 7.22 (s; 1H)] e dois prótons de anel furano [δ 6.75 (dd; J = 2Hz e 1Hz; 1H) e δ 7.54 (d; J = 2Hz; 1H)]. A diferença consistiu basicamente na ausência do próton carbinólico e na presença de dois sinais em δ 6.04 (dd; J = 10Hz e 3Hz; 1H) e δ 6.87 (dd; J = 10Hz e 3Hz; 1H) que foram atribuídos à presença de prótons olefínicos na molécula.

Os espectros de RMN¹³C e DEPT (Anexo A - E69 e E70, Tabela 9) também se mostraram muito semelhantes aos do diterpeno **19**, com os sinais correspondentes a 20 carbonos, sendo 4 CH₃, 3 CH₂, 6 CH e 7 Co. É interessante

observar que entre os sinais de CH, dois são típicos de carbonos olefinicos (δ 128.8 e 124.2) e que se encontram respectivamente correlacionados pelo HSQC (H-C, J^1) com os prótons em δ 6.04 e 6.87. Quando se comparou os deslocamentos químicos dos carbonos das substâncias **23** e **19** notou-se que a diferença encontrava-se no anel B, que em **23** apresenta uma ligação dupla entre os carbonos C-6 e C-7.

As correlações observadas nos espectros de RMN-2D homonuclear gCOSY (Anexo A - E71, E72 e E73) e heteronuclear HSQC (Anexo A - E74 e E75) e HMBC (Anexo A - E76 e E77, Figura 14) encontram-se na Tabela 9.

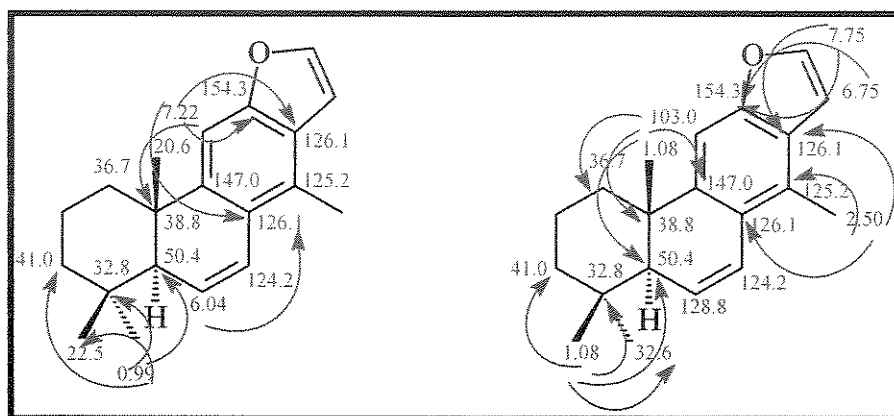
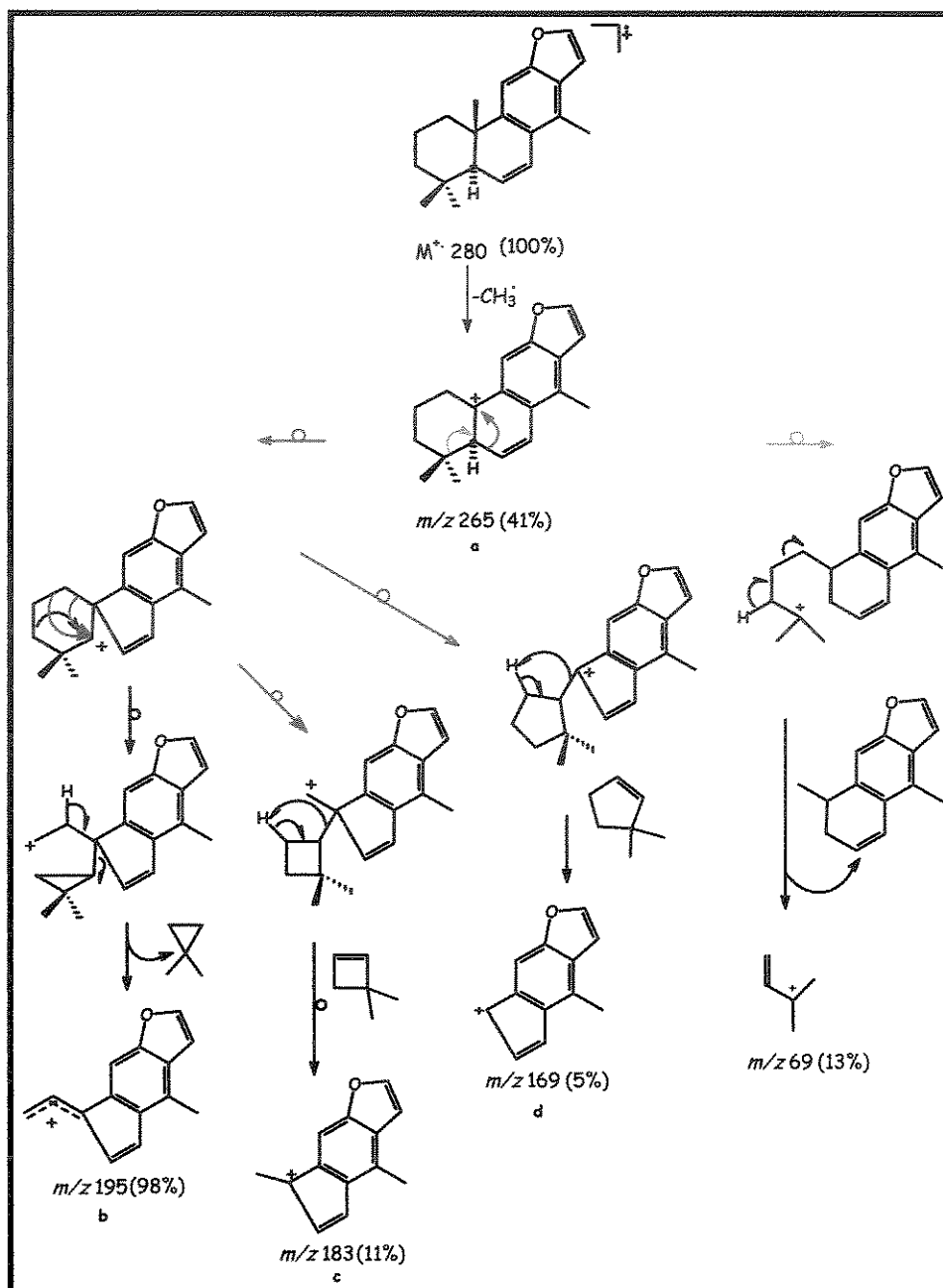


Figura 14: Correlações observados no espectro de HMBC (H, C, J^n) da substância **23**.

O espectro de massas de alta resolução (Anexo A - E78), mostrou o pico do íon molecular [M^+ = 280.1838 (100%)], de acordo com a fórmula $C_{20}H_{24}O$ (Calc. 280.1837). Quando comparado ao espectro de massas da substância **19**, observou-se que ambos possuem os mesmos fragmentos a, b, c, e d. No caso da substância **23** o fragmento a (m/z 265) é originado diretamente do íon molecular pela perda de um radical metila levando aos demais fragmentos tal com ilustrado no Quadro 13.

Tabela 9: Correlações observadas nos espectros de RMN-2D gCOSY (H-H, J^H), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^n) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl₃) para **23**.

posição	¹³ C (δ , J^1)	¹ H		¹³ C (δ , J^n)
		δ	Multiplicidade J (Hz)	
1 α	36.7	1.68	m	
1 β		2.22	md	
2 α	19.1	1.74	m	
2 β		1.80	m	
3 α	41.0	1.26	m	
3 β		1.58	m	
4	32.8			
5	50.4	2.11	t	
6	128.8	6.04	dd	126.1 (J^3)
7	124.2	6.87	dd	
8	126.1			
9	147.0			
10	38.8			
11	103.0	7.22	s	126.1(J^3), 126.1(J^3), 38.8 (J^3), 154.3 (J^2)
12	154.3			
13	126.1			
14	125.2			
15	105.4	6.75	dd	
16	144.1	7.54	d	154.3 (J^3), 126.1 (J^3)
17	15.4	2.50	s	126.1 (J^3), 126.1 (J^3), 125.2 (J^2)
18	32.6	0.99	s	50.4 (J^3), 41.0 (J^3), 32.8 (J^2), 22.5 (J^3)
19	22.5	1.08	s	41.0 (J^3), 32.8 (J^2), 50.4 (J^3), 32.6 (J^3)
20	20.6	1.08	s	147.0 (J^3), 50.4 (J^3), 38.8 (J^2), 36.7 (J^3)

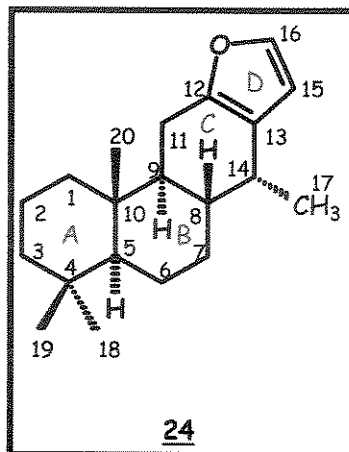


Quadro 13: Proposta de fragmentação para a substância 23.

Desta forma a substância 23 foi caracterizada como sendo mais um diterpeno da série dos abieta-8, 11, 13-trieno que após uma ampla revisão bibliográfica foi identificado como um produto obtido através de reações de transformação dos diterpenos isolados de *Pterodon emarginatus* Vog⁴¹ e cujos dados físicos limitaram-se a obtenção dos espectros de IV e RMN¹H (60MHz). Agora portanto a ocorrência natural de 23 está sendo relatada pela primeira.

Tanto o espectro de massas como os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da substância **23** apresentaram sinais adicionais relativos à presença de impurezas que não prejudicaram a determinação de sua estrutura molecular, mas iriam interferir na medida de rotação óptica específica que por isto não foi feita.

4.7 Determinação estrutural do diterpeno **24**



O espectro de RMN ^1H (Anexo A - E79, Tabela 10) da substância **24** mostrou a presença dos sinais em δ 0.87 (ms; 3H) e 0.90 (s; 6H), característicos das absorções dos hidrogênios das metilas do sistema 4,4,10-trimetil *trans* decalina, bem como os sinais de uma metila terciária [δ 0.98 (*md*; J = 7Hz)], de um próton metínico [δ 2.61 (*d*; J = 7Hz)], de um anel furano [δ 6.18 (*d*; J = 2Hz; 1H) e δ 7.22 (*t*; J = 1Hz; 1H)] e de prótons metilênicos diastereotópicos [δ 2.36 (*dd*; J = 17Hz e 10Hz; 1H) e δ 2.56 (*dd*; J = 17Hz e 7Hz; 1H)].

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT (Anexo A - E80 e E81, Tabela 10) mostraram os sinais de 20 carbonos, dos quais 4 CH_3 , 6 CH_2 , 6 CH e 4 Co (dois aromáticos e dois alifáticos). Os dados de RMN ^1H juntamente com os de ^{13}C permitiram identificar esse diterpeno como sendo o vouacapano.

As correlações observadas nos espectros de RMN-2D homonuclear gCOSY (Anexo A - E82 e E83) e heteronuclear HSQC (Anexo A - E84 e E85) e HMBC (Anexo A - E86 e E87, Figura 15) encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Correlações observadas nos espectros de RMN-2D gCOSY (H-H, J^H), HSQC (H-C, J^1) e HMBC (H-C, J^H) (H 500MHz, C 125MHz, CDCl₃) para **24**.

posição	¹³ C (δ , J^1)	¹ H		¹ H (δ , J^H)	¹³ C (δ , J^H)
		δ	Multiplicidade		
1 α	39.6	0.98	md	1.69	
1 β		1.69	m	0.98	
2 α	18.7	1.47	m		
2 β					
3 α	41.9	1.18	m	1.40	
3 β		1.40	m	1.18	
4	33.1				
5	55.1	0.87	ms		41.9 (J^3), 39.6 (J^3), 33.6 (J^3), 33.1 (J^2)
6	31.2	1.69	m		
7	21.5	1.64	m		
8	35.7	1.78	m	2.61	
9	45.5	1.43	m	2.56, 2.36	
10	37.3				
11 α	22.2	2.56	dd	17 e 10	149.8 (J^2)
11 β		2.36	dd	17 e 7	149.8 (J^2), 122.4 (J^3), 35.7 (J^3)
12	149.8				
13	122.4				
14	31.5	2.61	d	0.98, 1.78	
15	109.5	6.18	d	7.22	
16	140.2	7.22	t	6.18	
17	17.5	0.98	md		122.4 (J^3), 35.7 (J^3), 31.5 (J^2)
18	33.6	0.90	s		55.1 (J^3), 41.9 (J^3), 33.6 (J^1), 33.1 (J^2), 31.2 (J^4), 22.2 (J^3)
19	22.2	0.87	ms		55.1 (J^3), 41.9 (J^3), 33.6 (J^3), 33.1 (J^2)
20	14.4	0.90	s		55.1 (J^3), 45.5 (J^3), 39.6 (J^3), 37.3 (J^2), 31.2 (J^4), 22.2 (J^4)

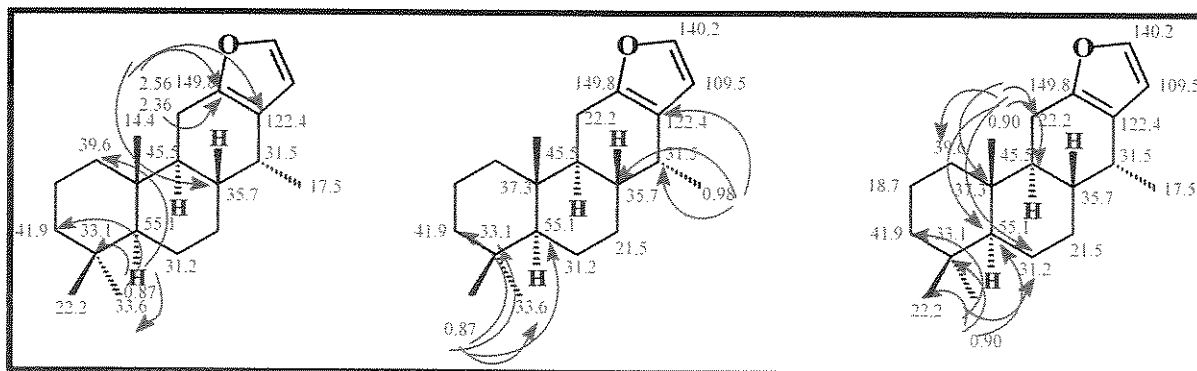


Figura 15: Correlações observados no espectro de HMBC (^1H , ^{13}C , J^n) da substância 24.

No experimento de diferença de nOe (Anexo A - E88, Figura 16) a irradiação do próton da metila (CH_3 -17) (δ 0.98, *md*) causou incremento do sinal de $\text{H-9}\alpha$ (δ_{H} 1.43, 2.11%). Como o sinal do próton de $\text{H-1}\alpha$ encontra-se com o mesmo deslocamento químico anteriormente mencionado, observou-se também incremento dos sinais de $\text{H-1}\beta$ e H-2 (δ_{H} 1.69, 1.47, 2.63%). Já a irradiação do próton da metila (CH_3 -20) (δ 0.90, *s*) não causou incremento de sinal. Esses resultados reforçam a sugestão de que a metila (CH_3 -17) encontra-se na posição 14α .

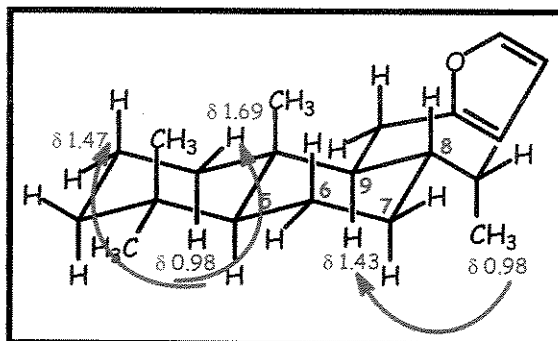


Figura 16: Atribuições dos incrementos observados no espectro de diferença de nOe para 24.

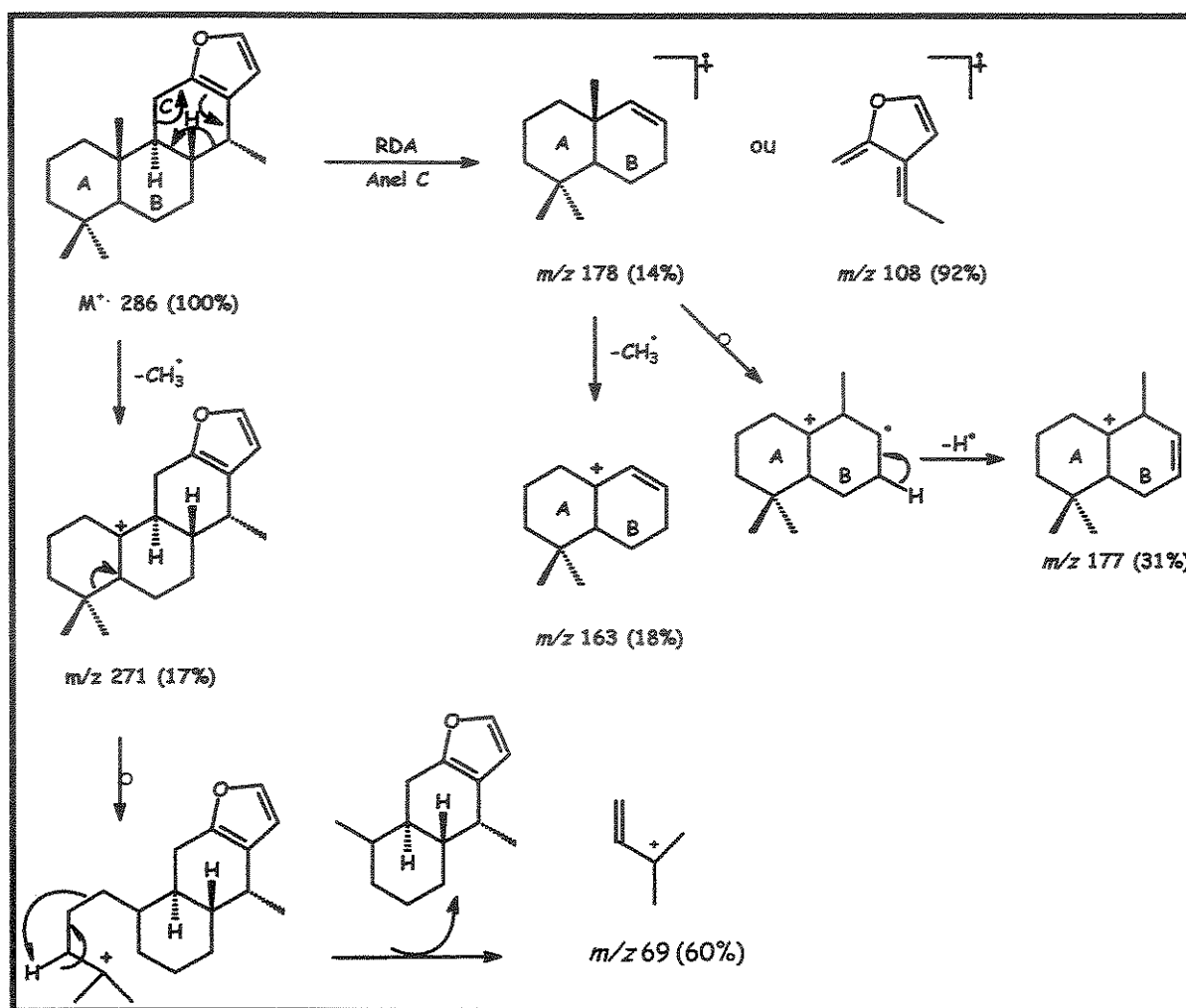
O espectro de massas de alta resolução (Anexo A - E89) mostrou o pico do íon molecular [M^+ = 286.2294 (100%)], de acordo com a fórmula $C_{20}H_{30}O$ (Calc. 286.2297). Os caminhos de fragmentação encontram-se no Quadro 14.

O espectro de massas da substância 24 apresentou sinais adicionais relativos à presença de impurezas que não prejudicaram a determinação de sua estrutura molecular, mas iriam interferir na medida de rotação óptica específica que por isto não foi feita.

Após revisão bibliográfica, constatou-se que 24 já havia sido preparada através de reações de transformação a partir de diterpenos naturais isolados de *Voucapoua americana e macropetala*⁴⁵, *Pterodon emarginatus* Vog⁴¹ e *Dipterix odorata*⁴⁶, sendo que dessa última espécie a substância 24 também foi identificada como componente minoritário da casca das sementes. Há na literatura somente os dados de IV e rotação óptica específica.

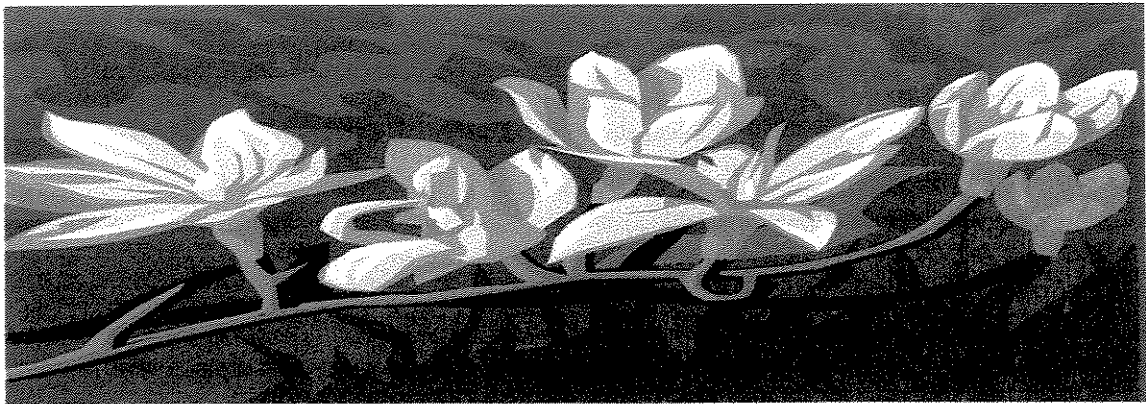
⁴⁵King FE, Godson DH, King TJ. The chemistry of extractives from hardwoods. Part XXII. The structure of diterpenes from *Vouacapoua* species. *J Chem Soc* 1117-1125, 1955.

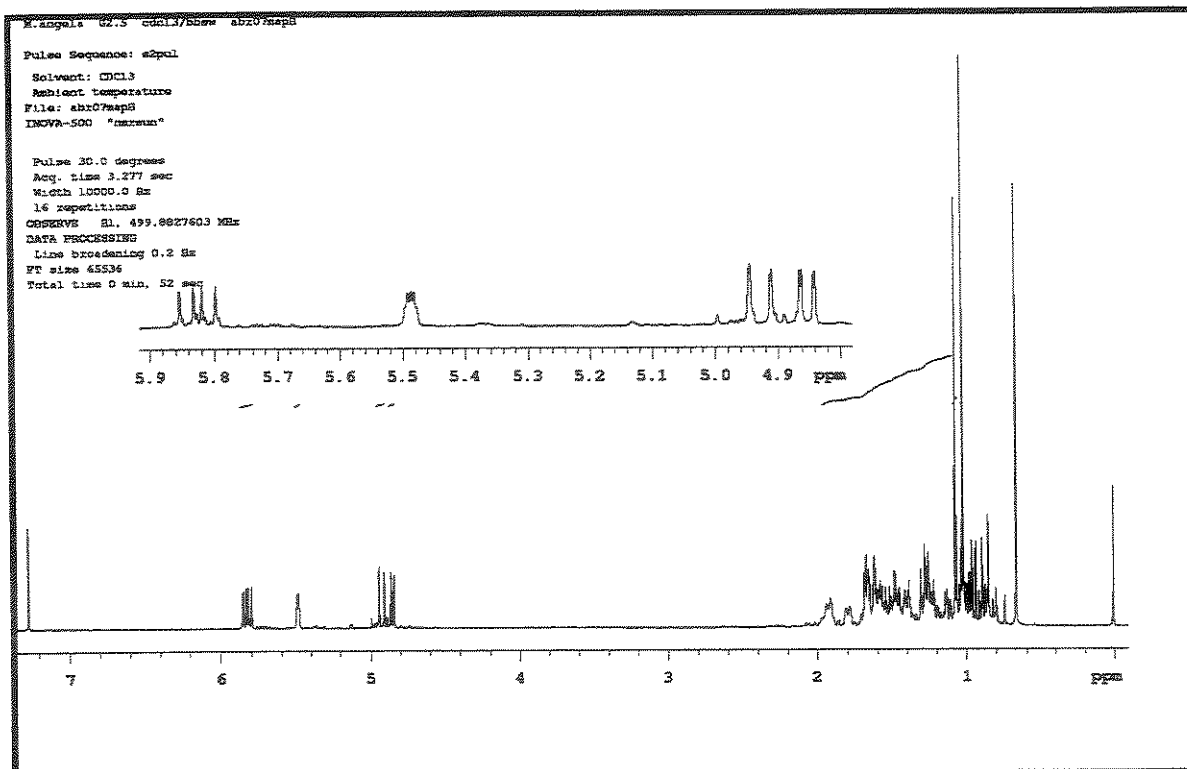
⁴⁶Godoy RLO, Lima PDDB, Pinto AC, Neto FRA. Diterpenoids from *Dypterix odorata*. *Phytochemistry* 28, 642-644, 1989.



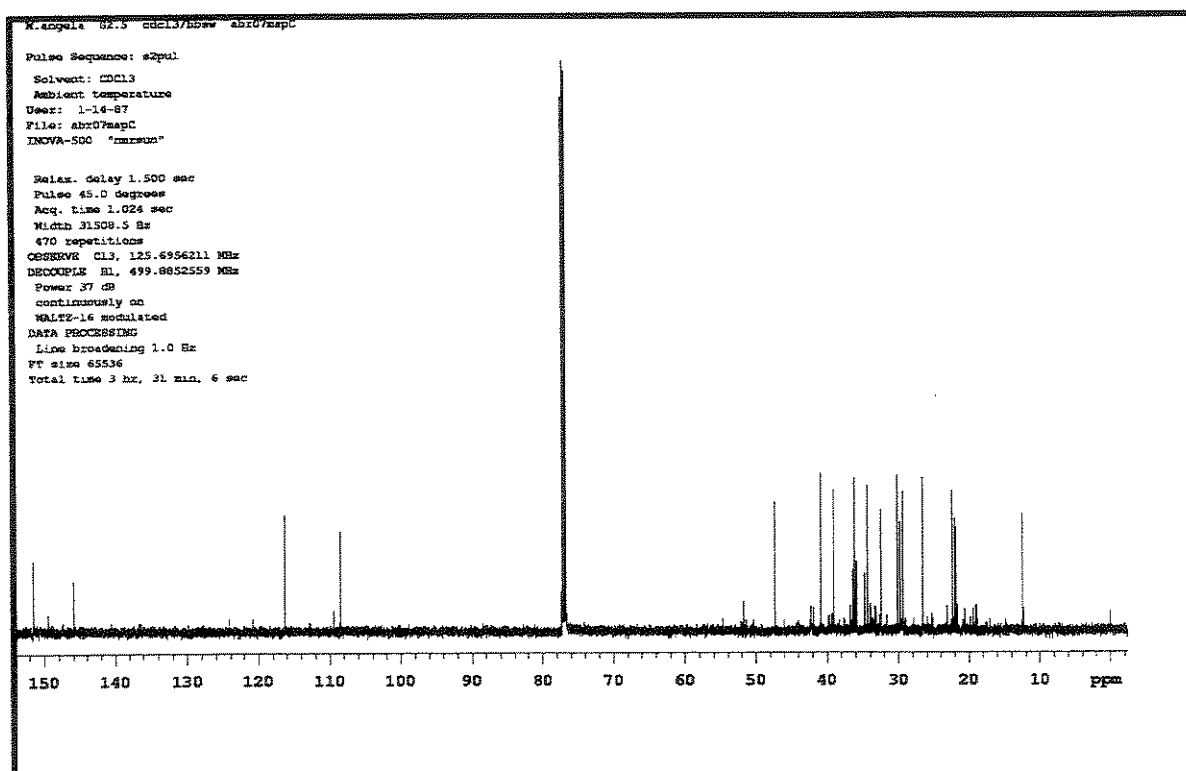
Quadro 14: Proposta de fragmentação para a substância 24.

Capítulo I – Anexo A

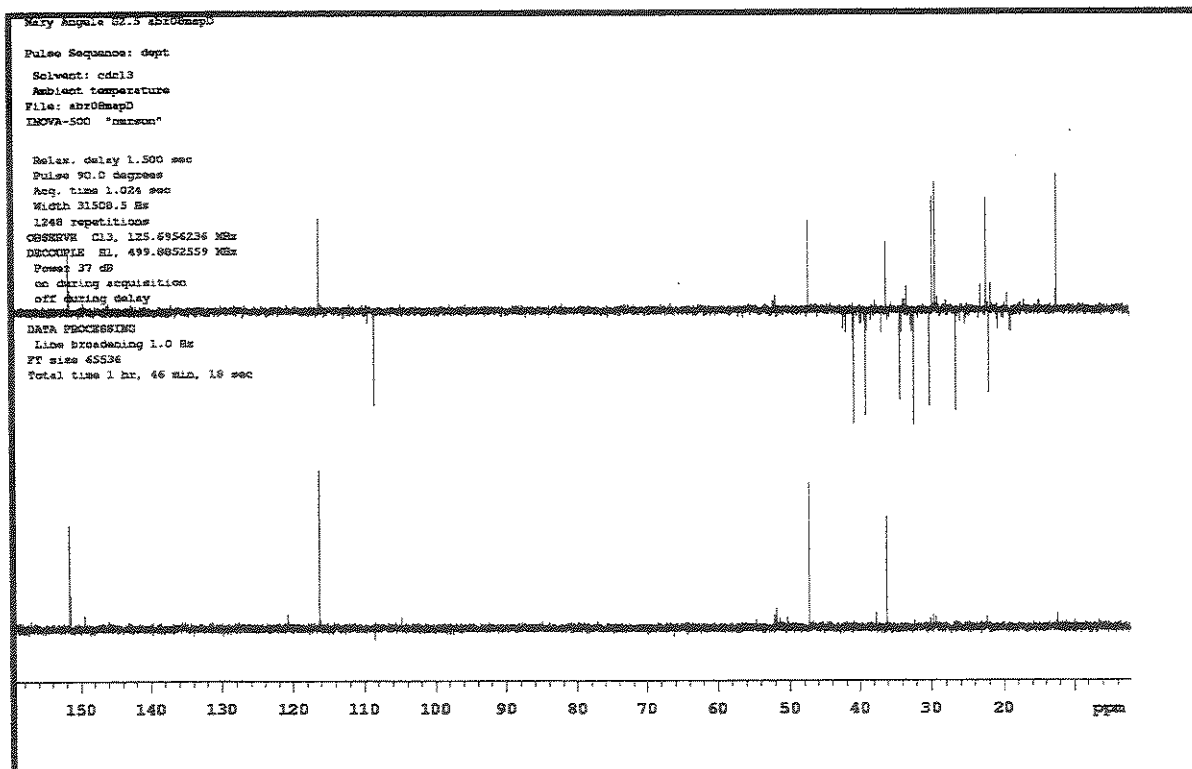




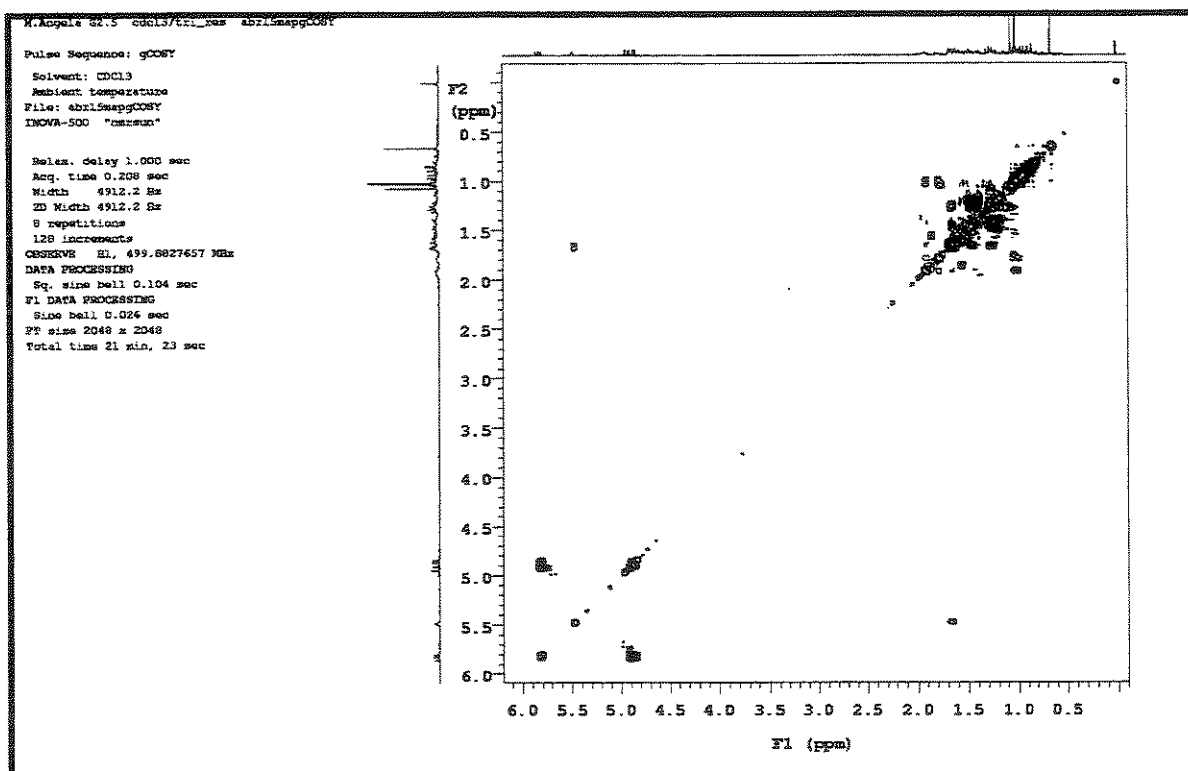
E1: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 18.



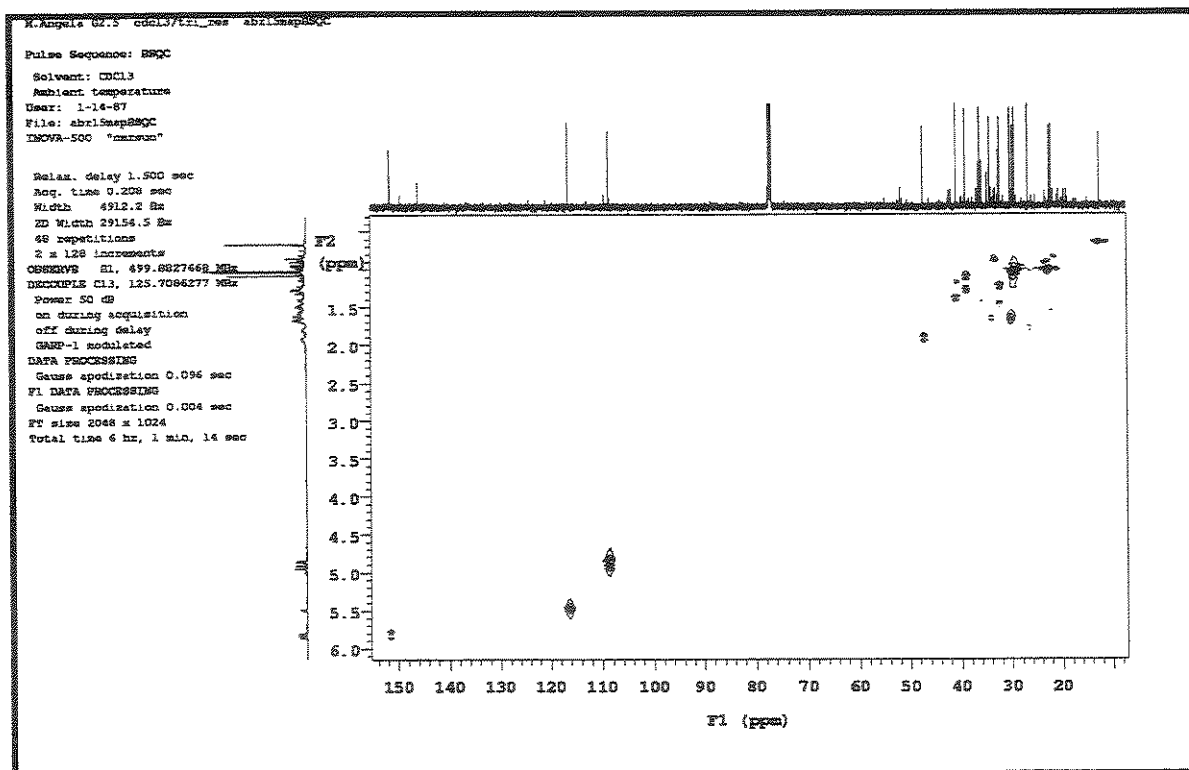
E2: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 18.



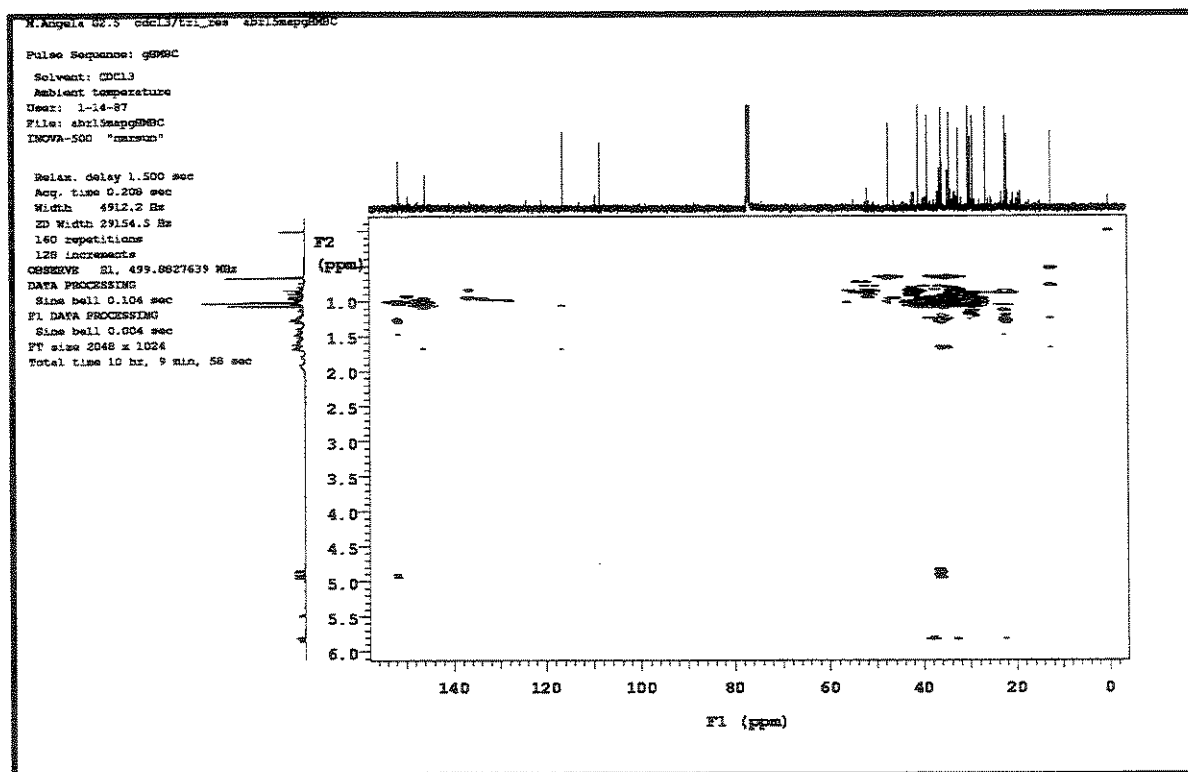
E3: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl₃) da substância 18.



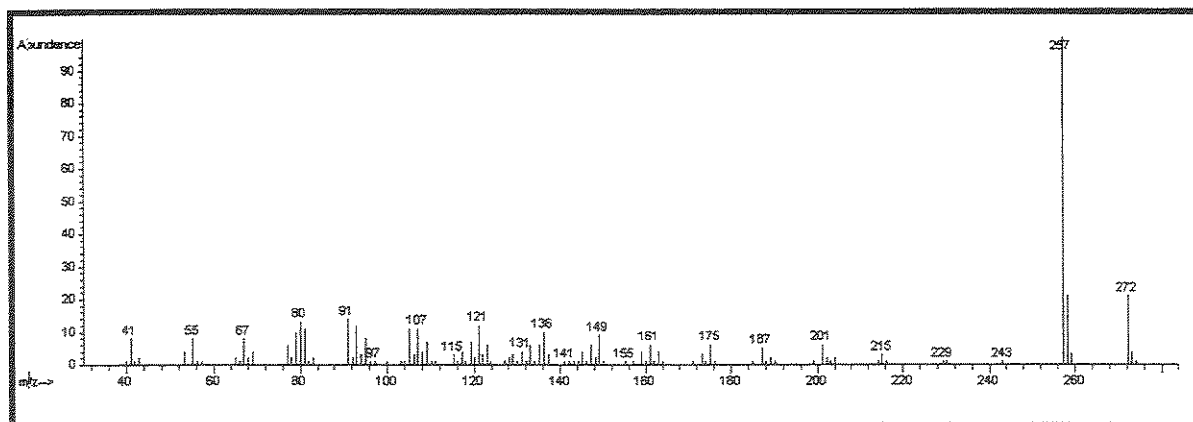
E4: Mapa de contorno de RMN-2D (¹H, ¹H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl₃) da substância 18.



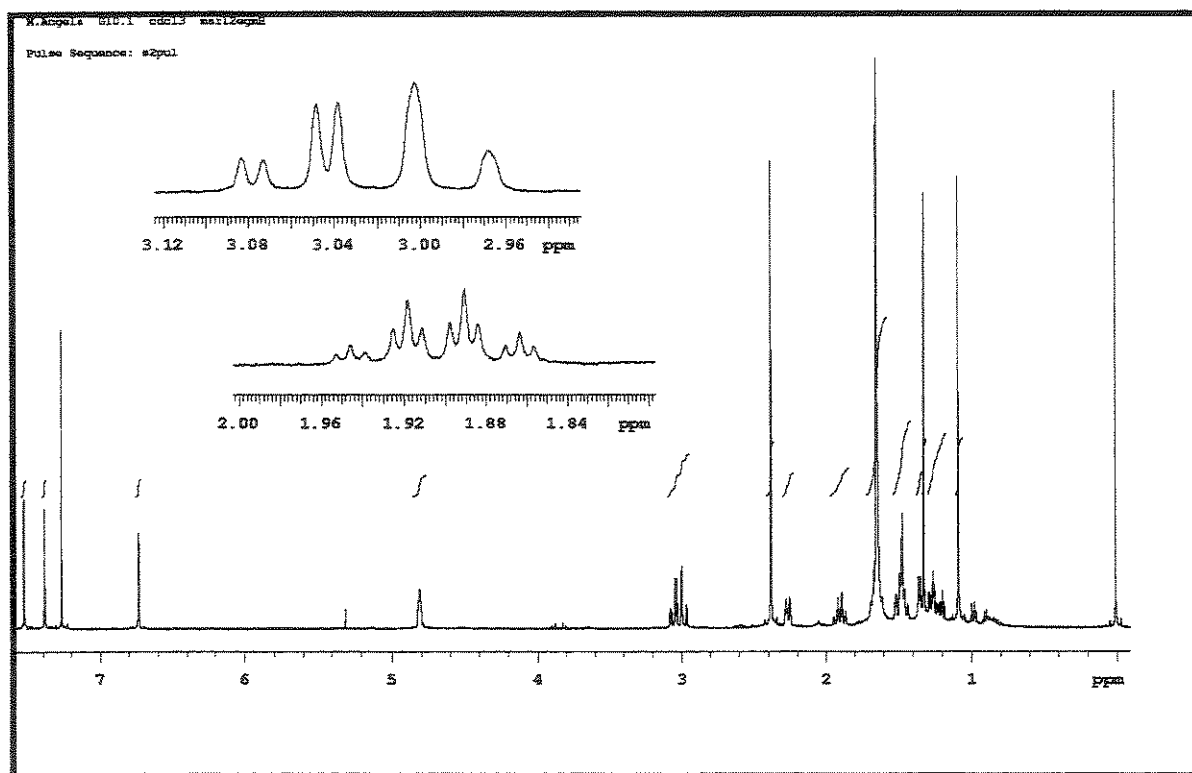
E5: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 18.



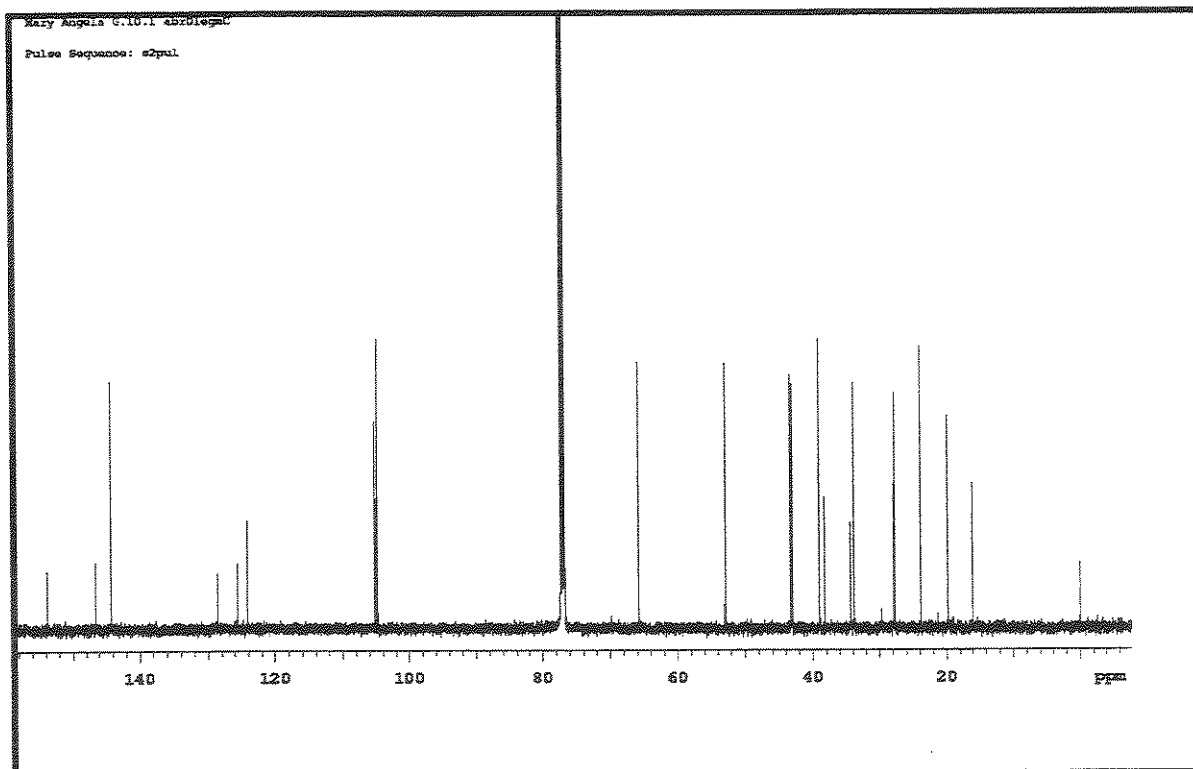
E6: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 18.



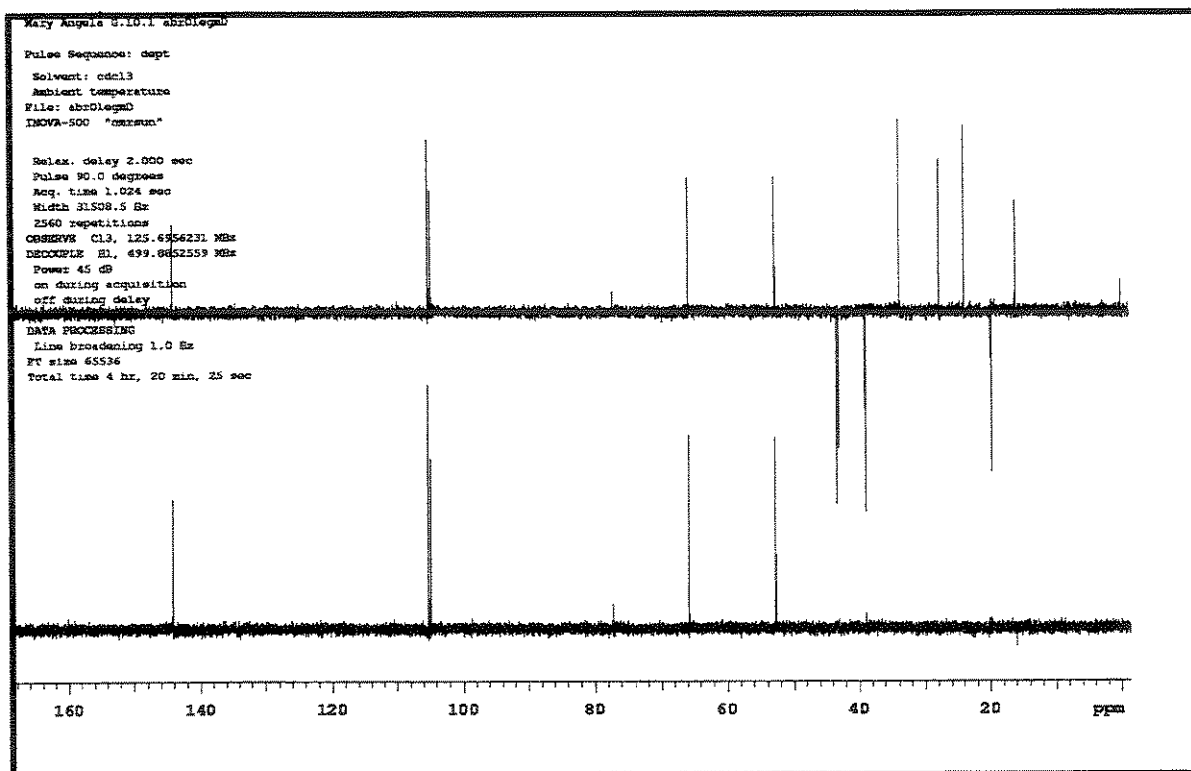
E7: Espectro de massas (IE, 70eV) da substância **18**.



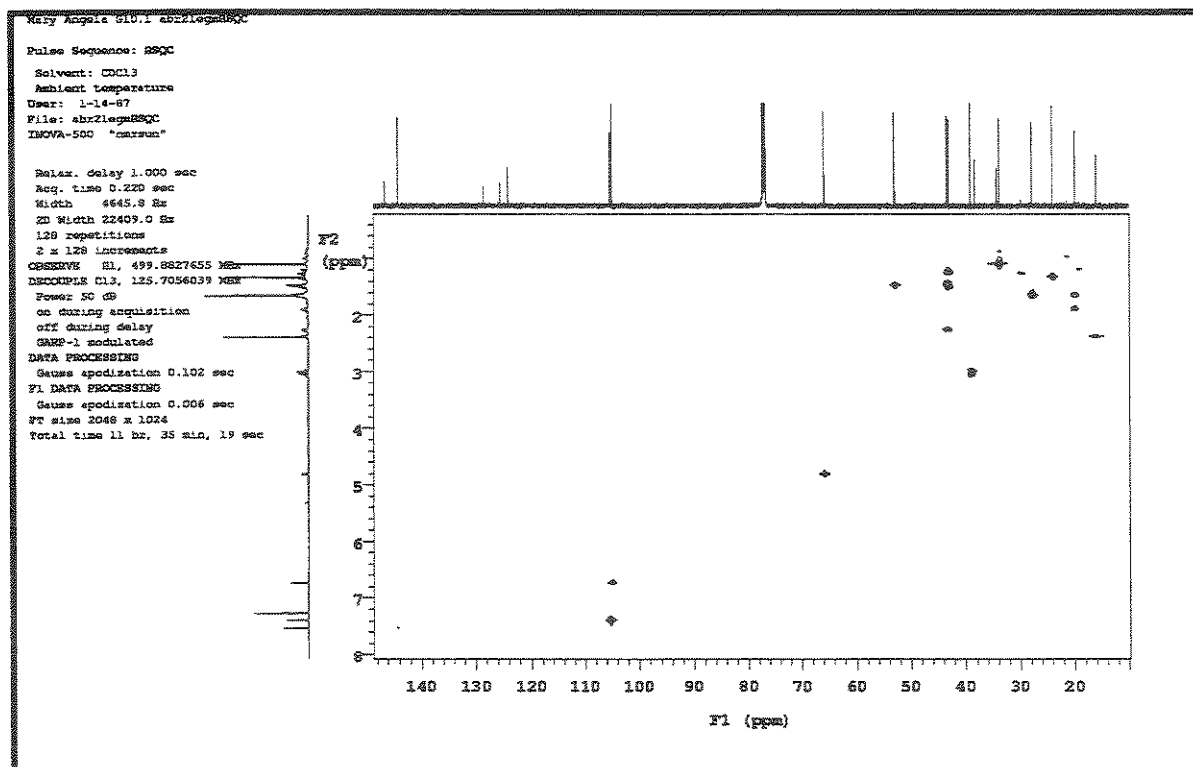
E8: Espectro de RMN ¹H (500MHz, CDCl₃) da substância **19**.



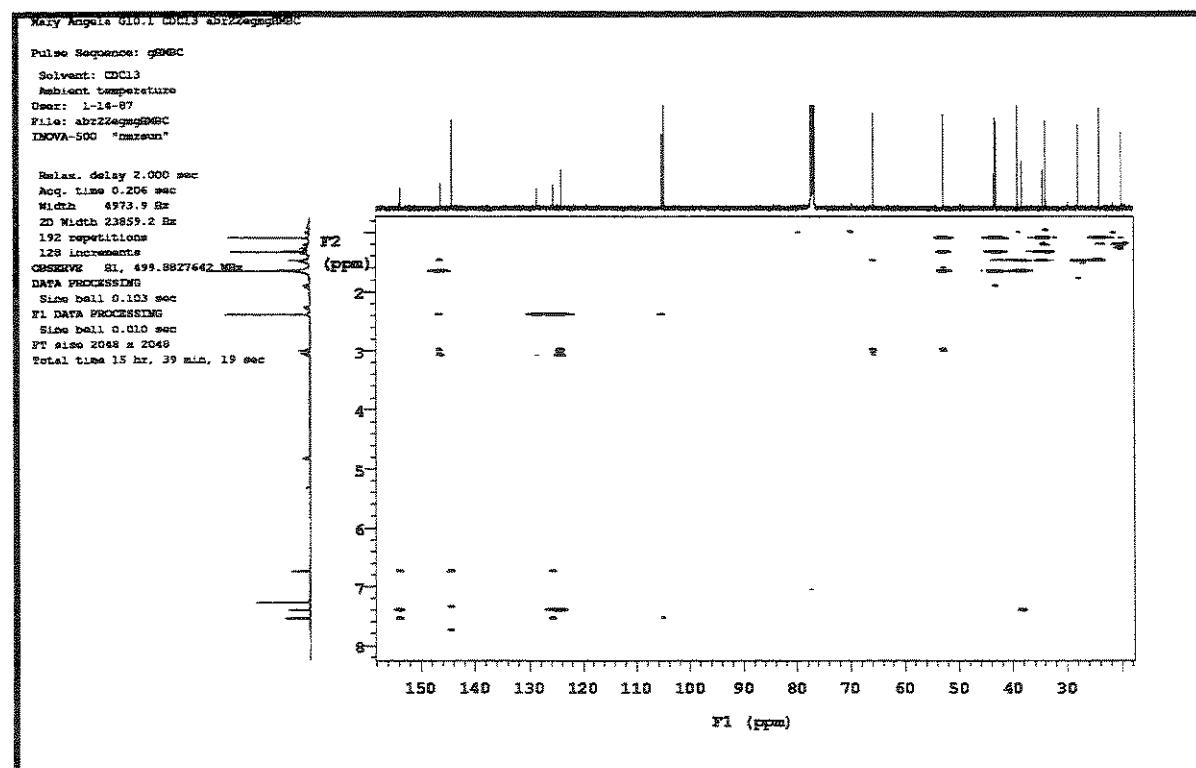
E9: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 19.



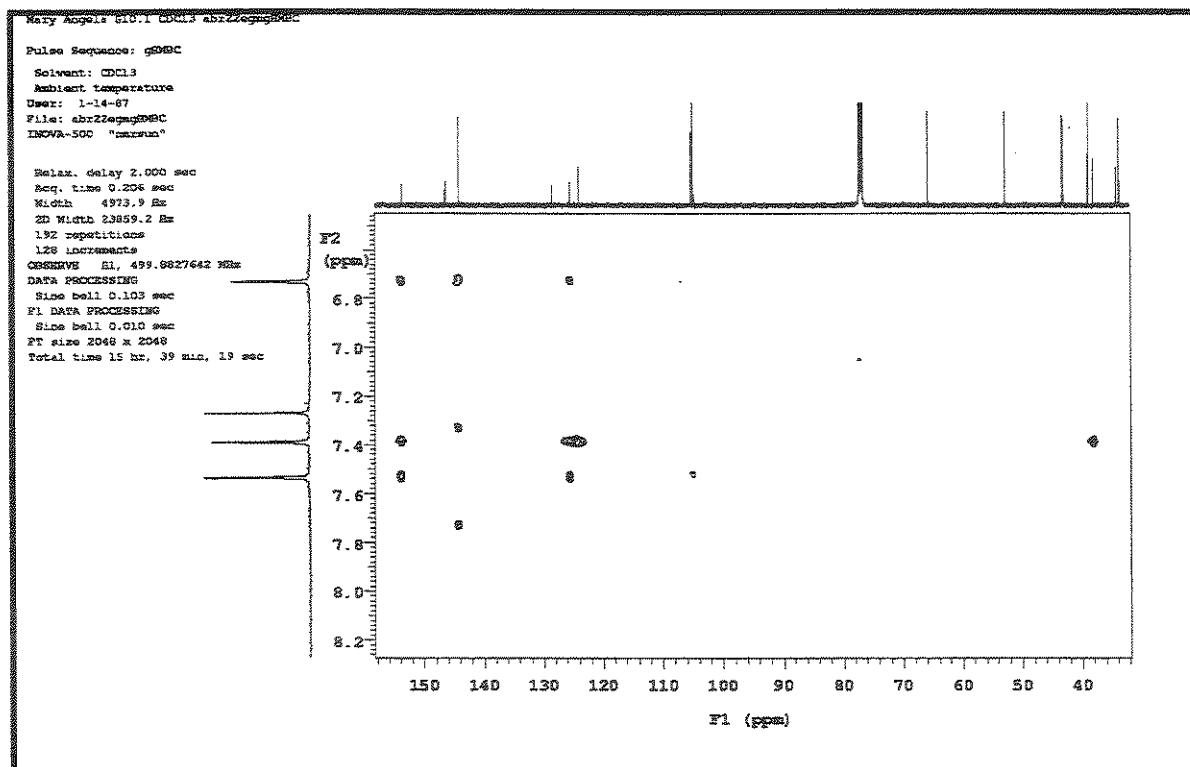
E10: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl_3) da substância 19.



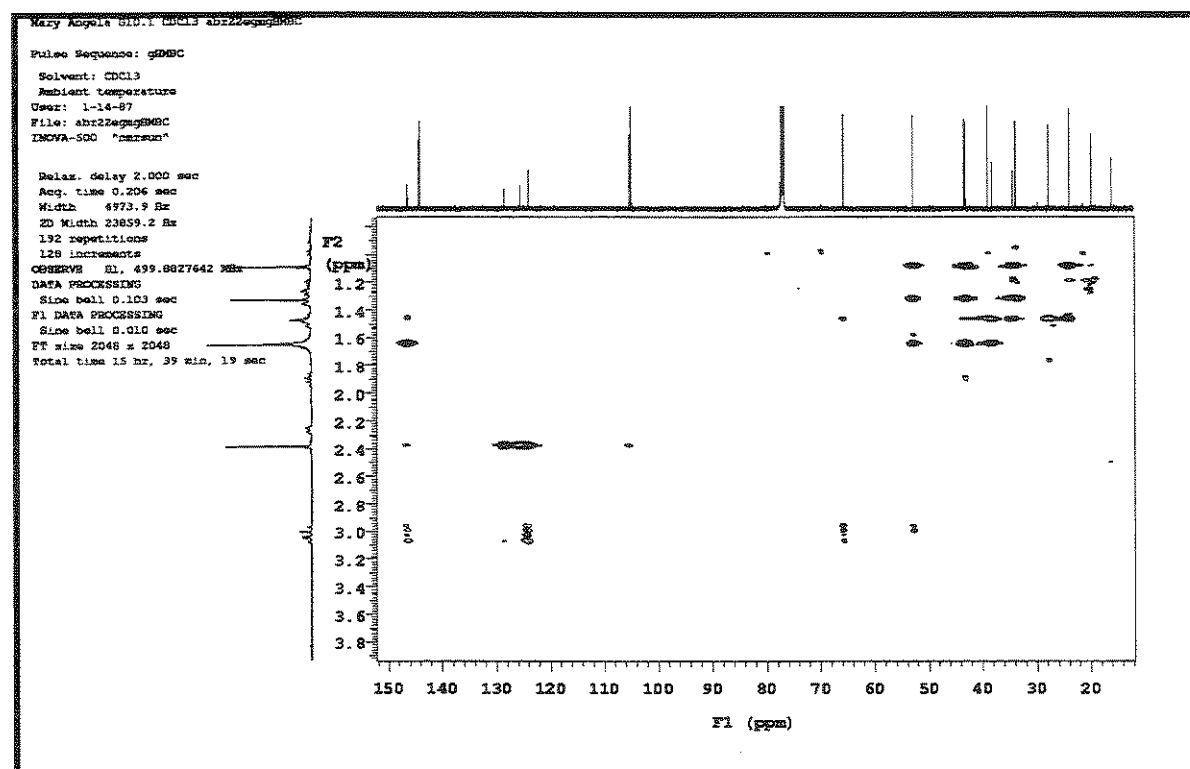
E11: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19.



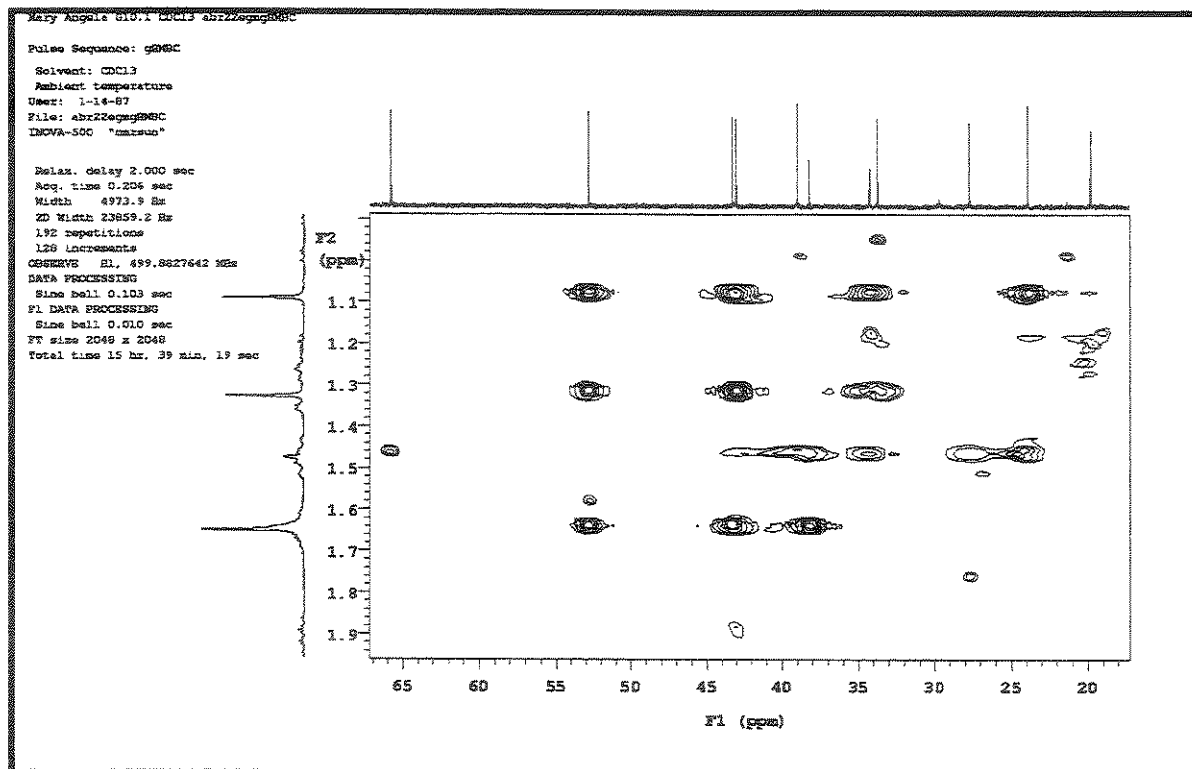
E12: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19.



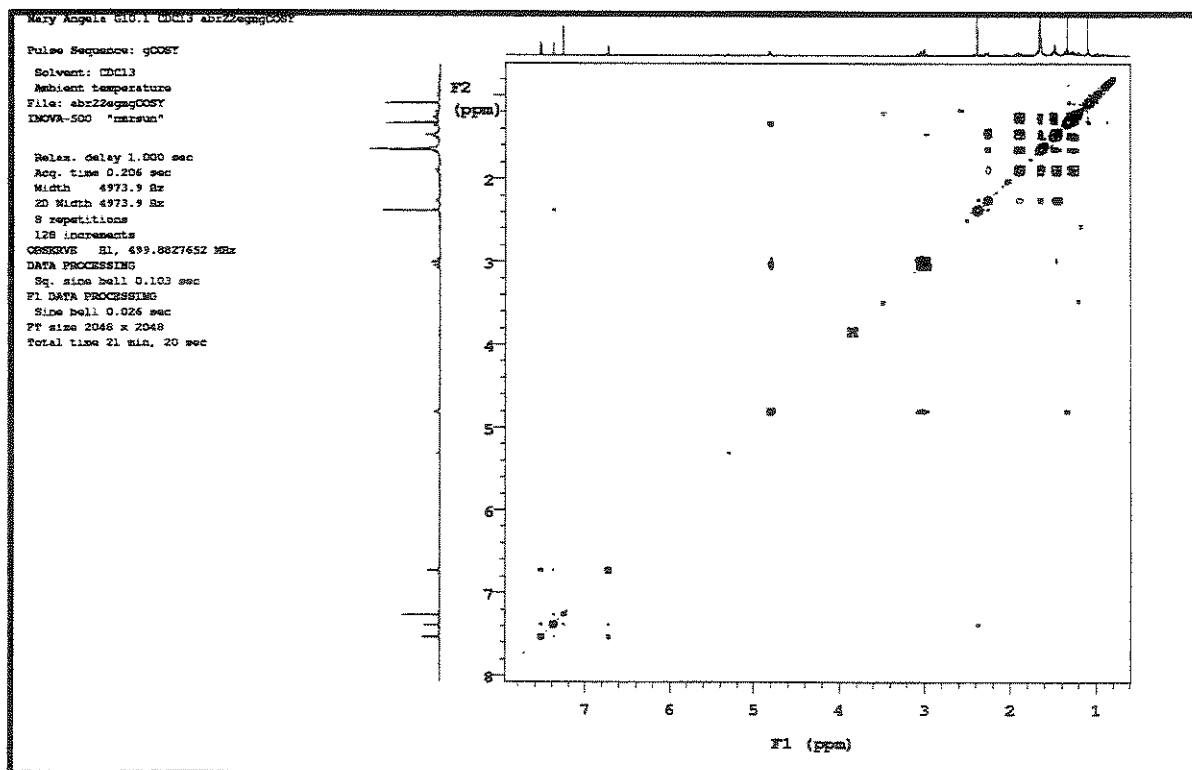
E13: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19.



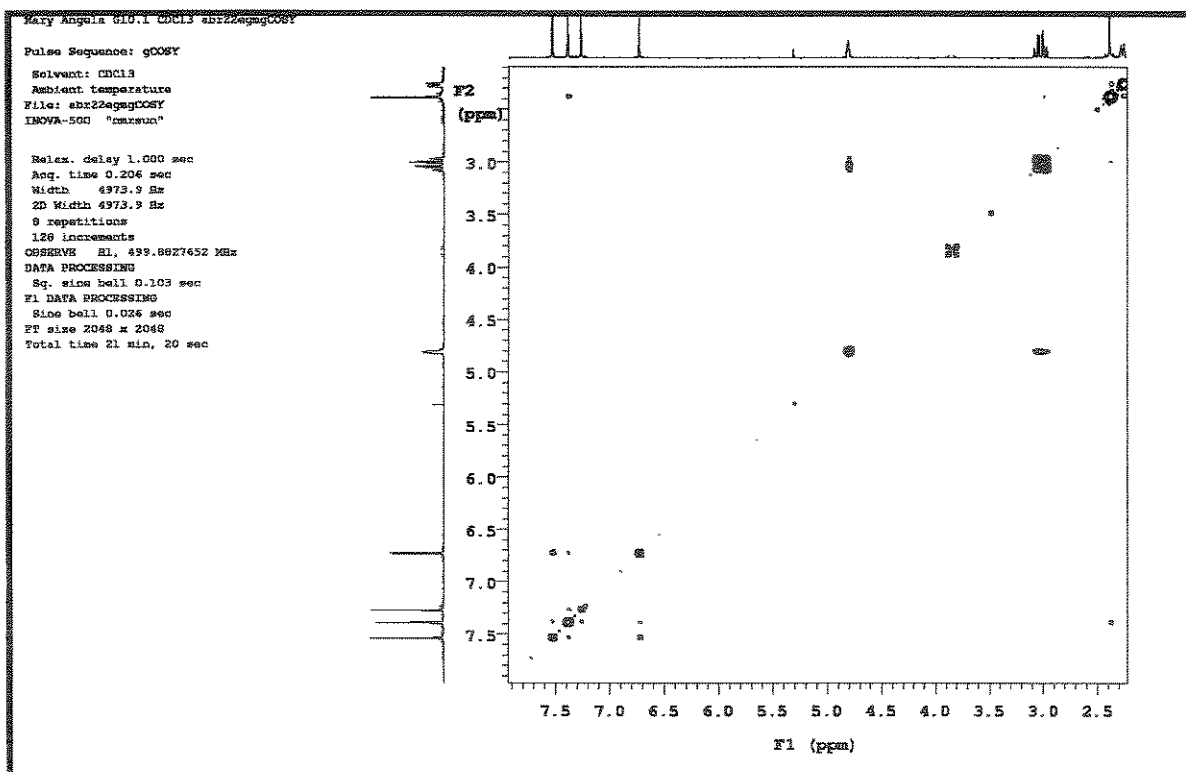
E14: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19.



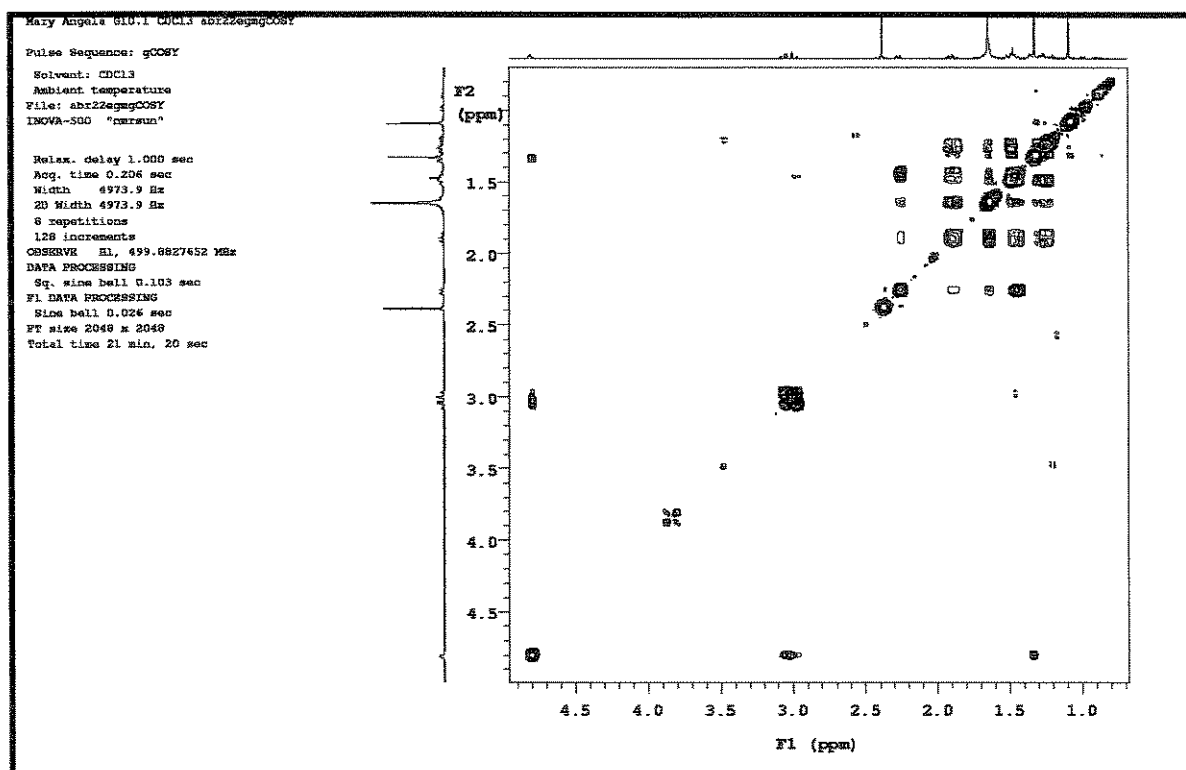
E15: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 19.



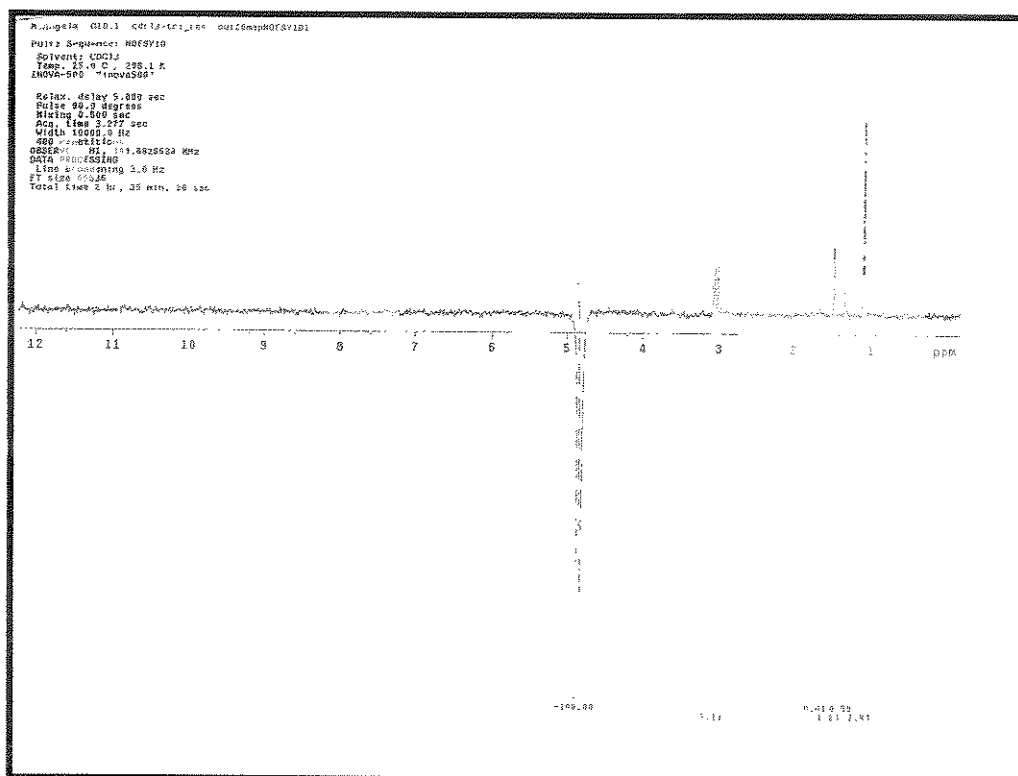
E16: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 19.



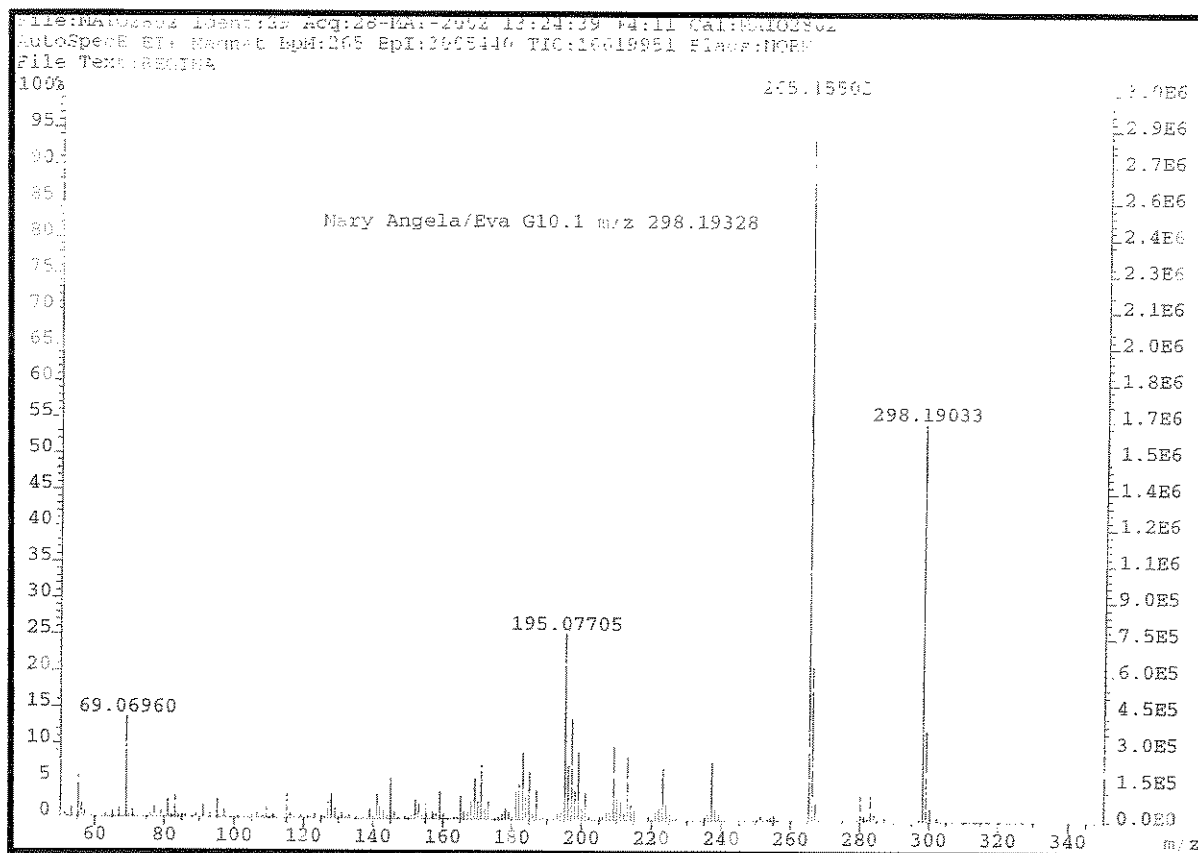
E17: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl₃) da substância 19.



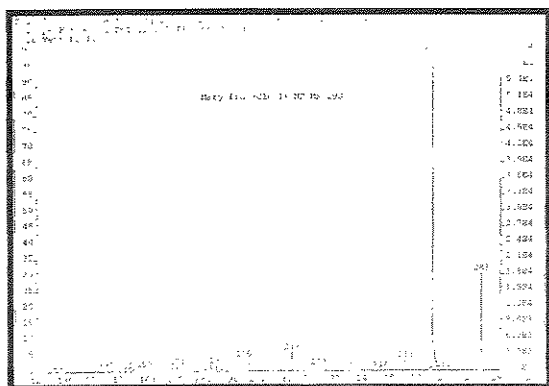
E18: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl₃) da substância 19.



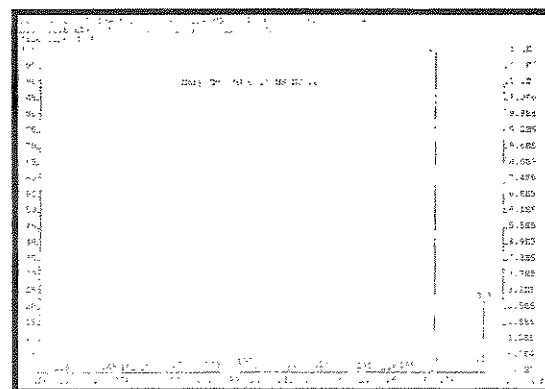
E19: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl₃, δ 4.80) da substância 19.



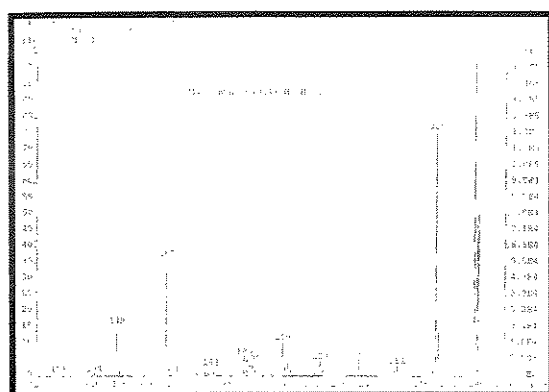
E20: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância 19.



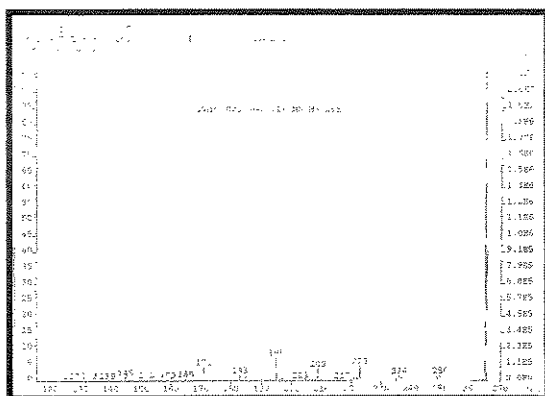
(a)



(b)

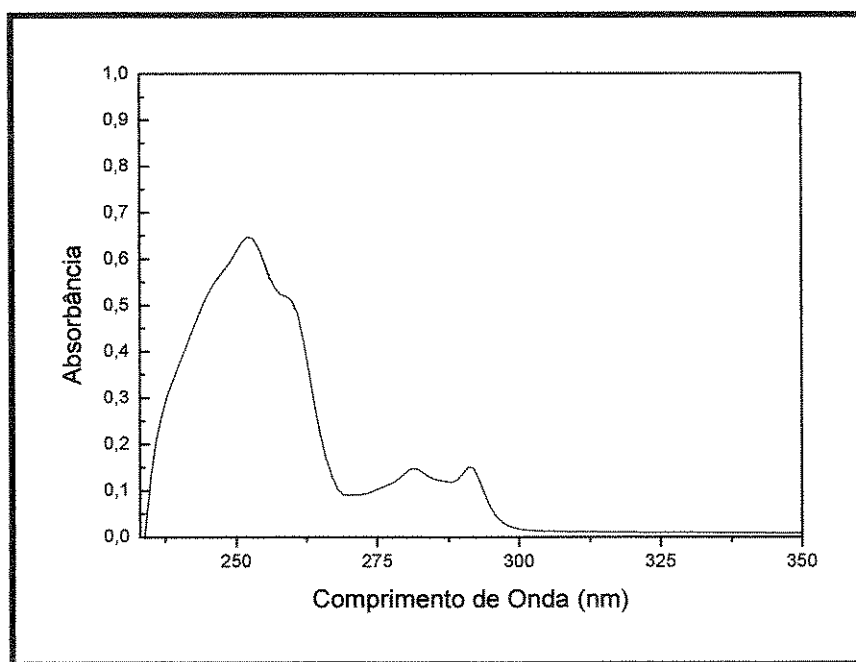


(c)

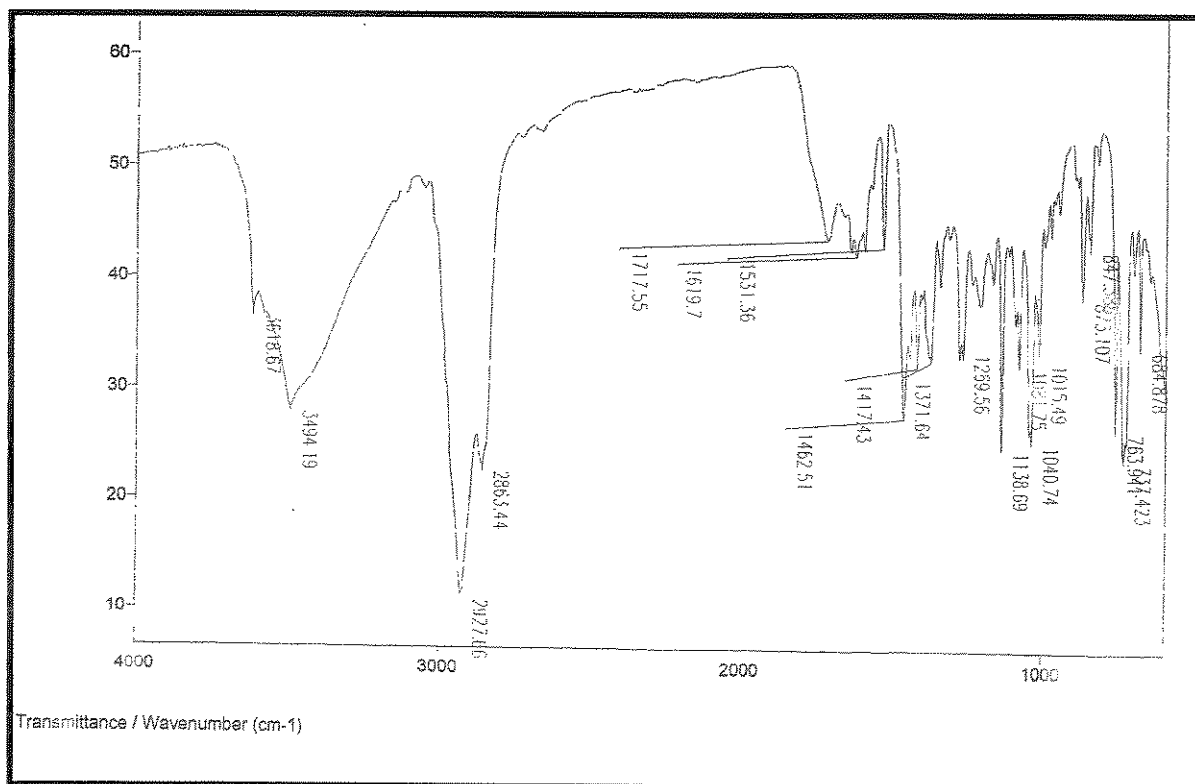


(d)

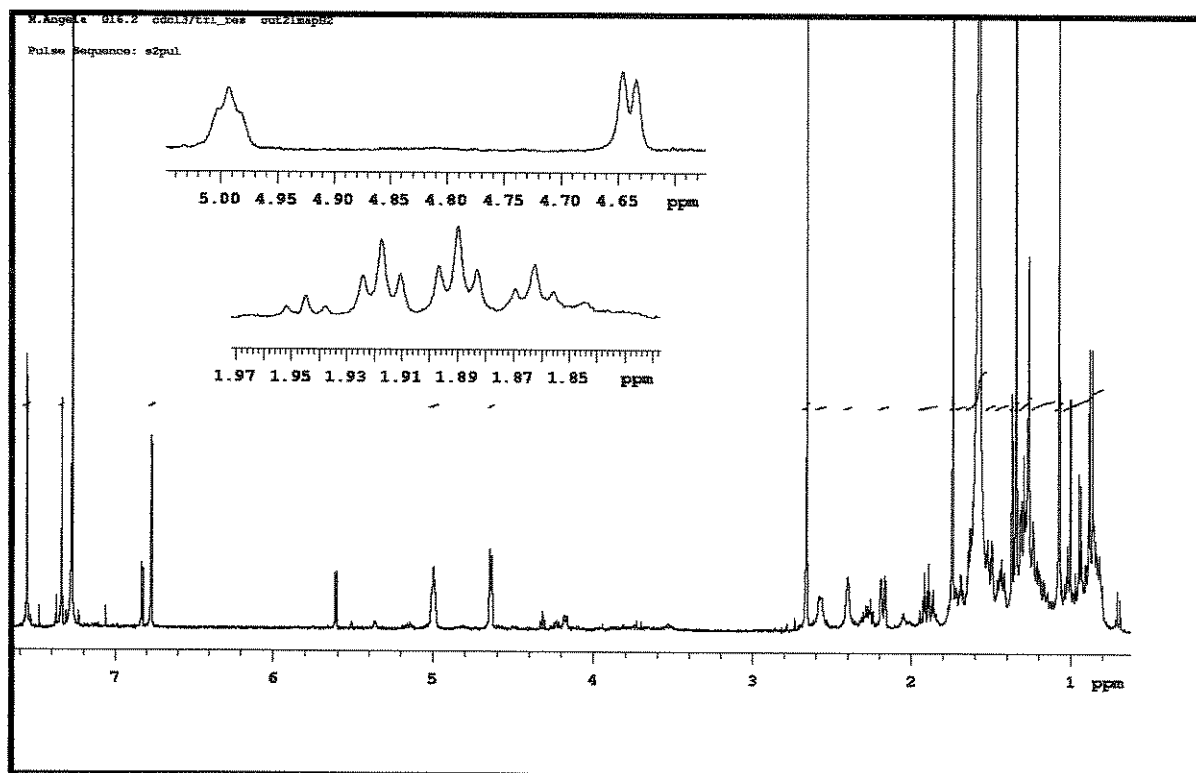
E21: Espectros de massas do experimento EM/EM (IE, 70eV) da substância 19 com seleção dos ions m/z 298 (a), 280 (b), 283 (c) e 265 (d).



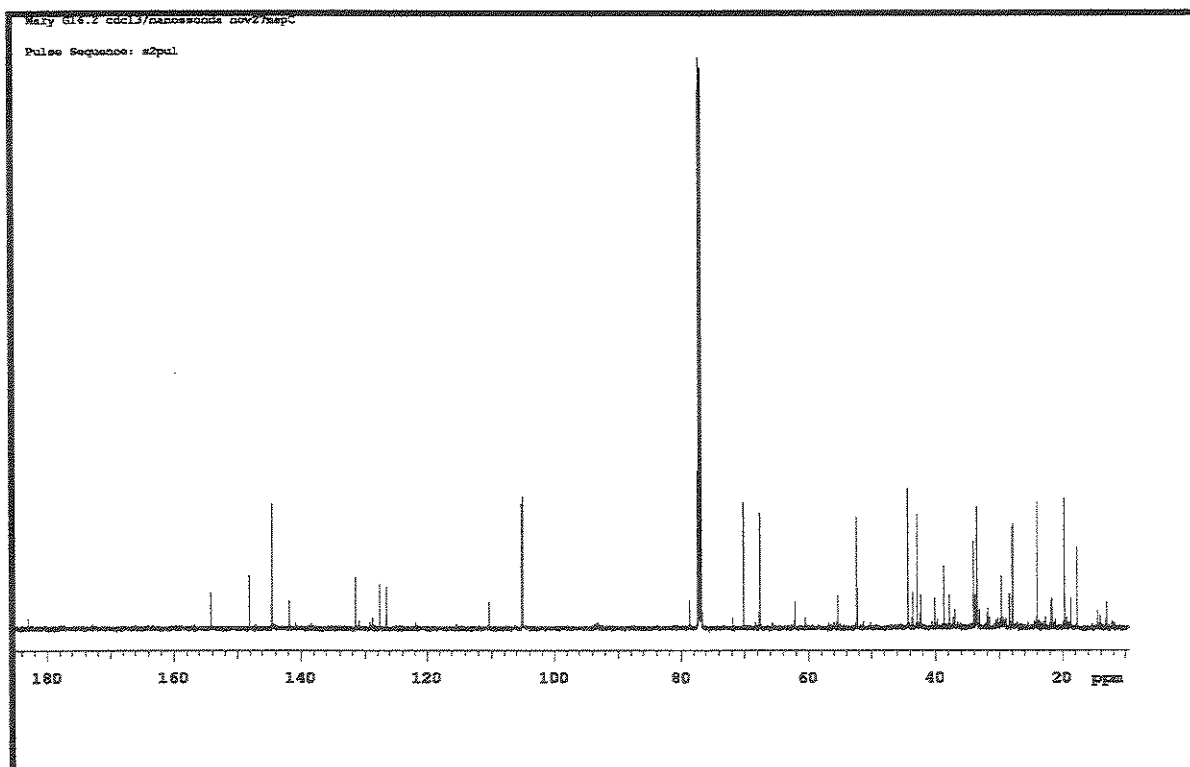
E22: Espectro de UV da substância 19.



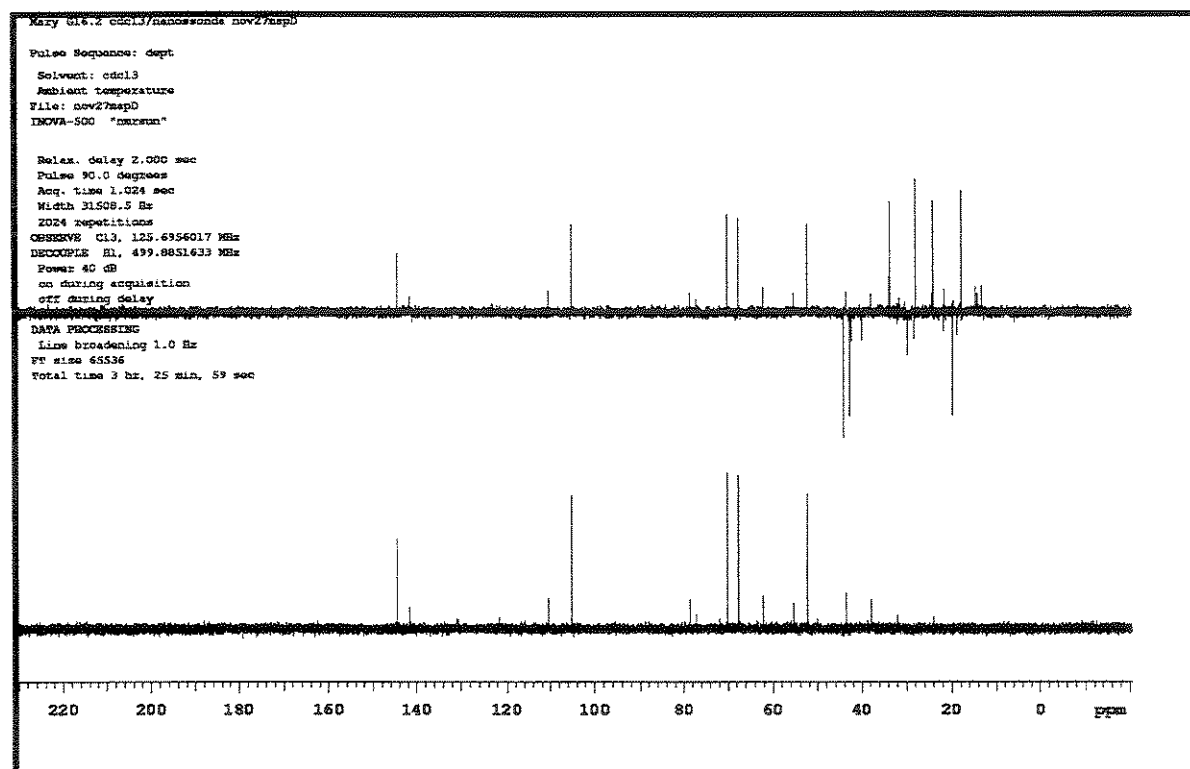
E23: Espectro de IV da substância 19.



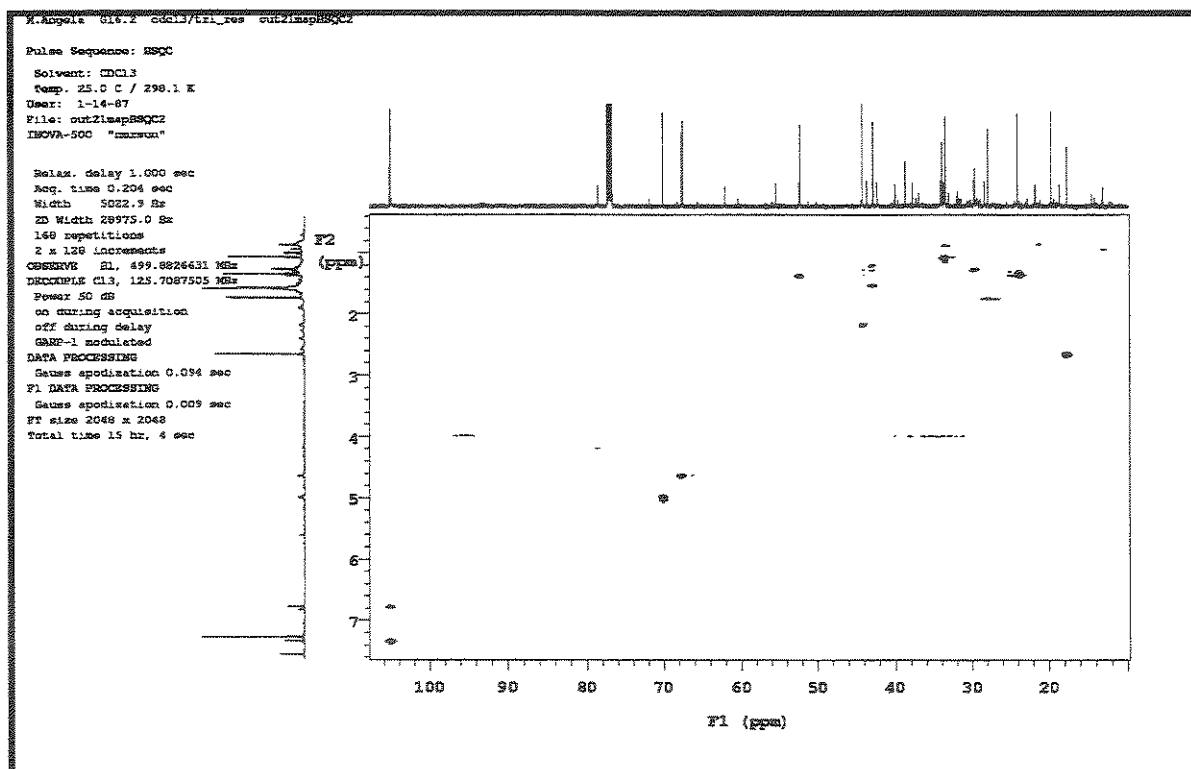
E24: Espectro de RMN ¹H (500MHz, CDCl₃) da substância 20.



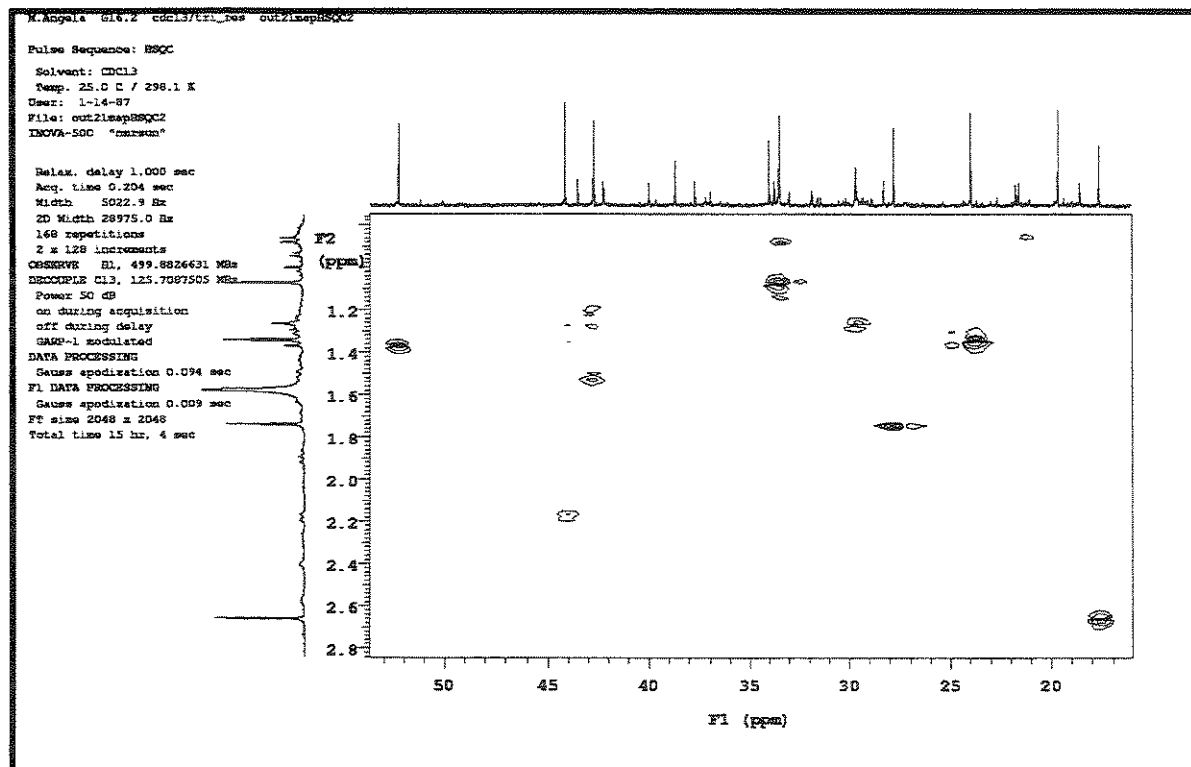
E25: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 20.



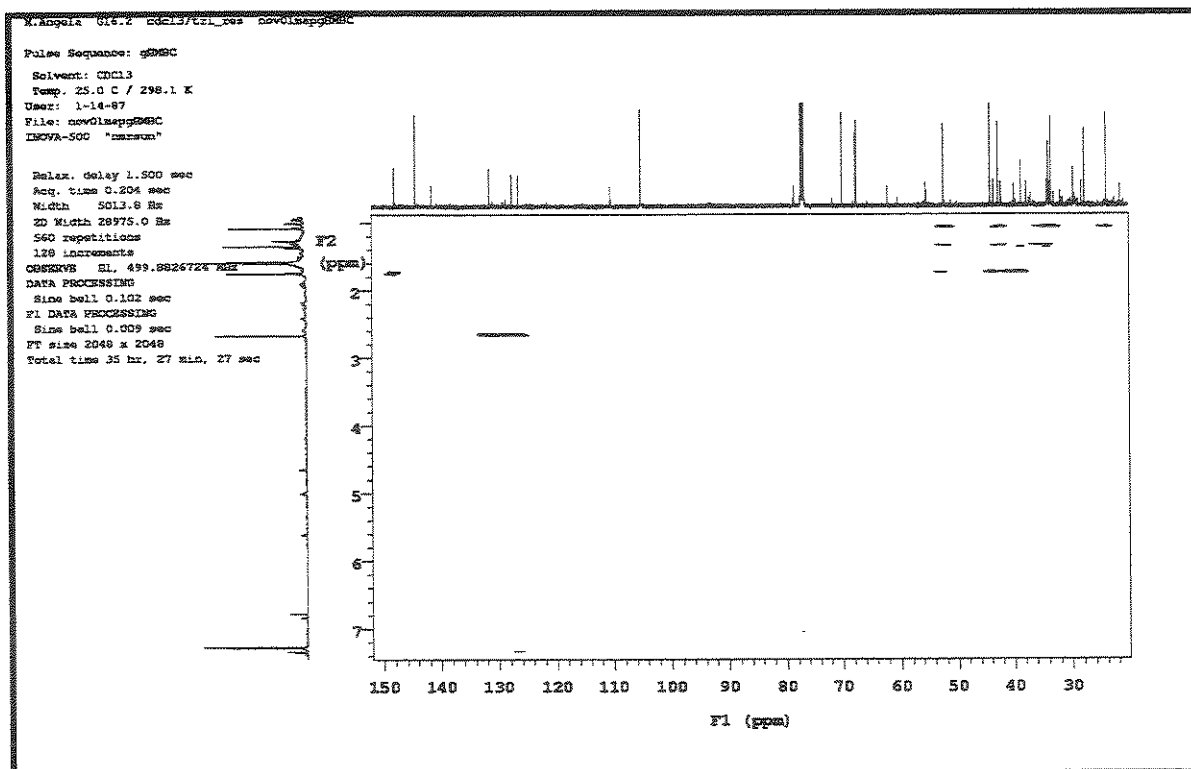
E26: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl_3) da substância 20.



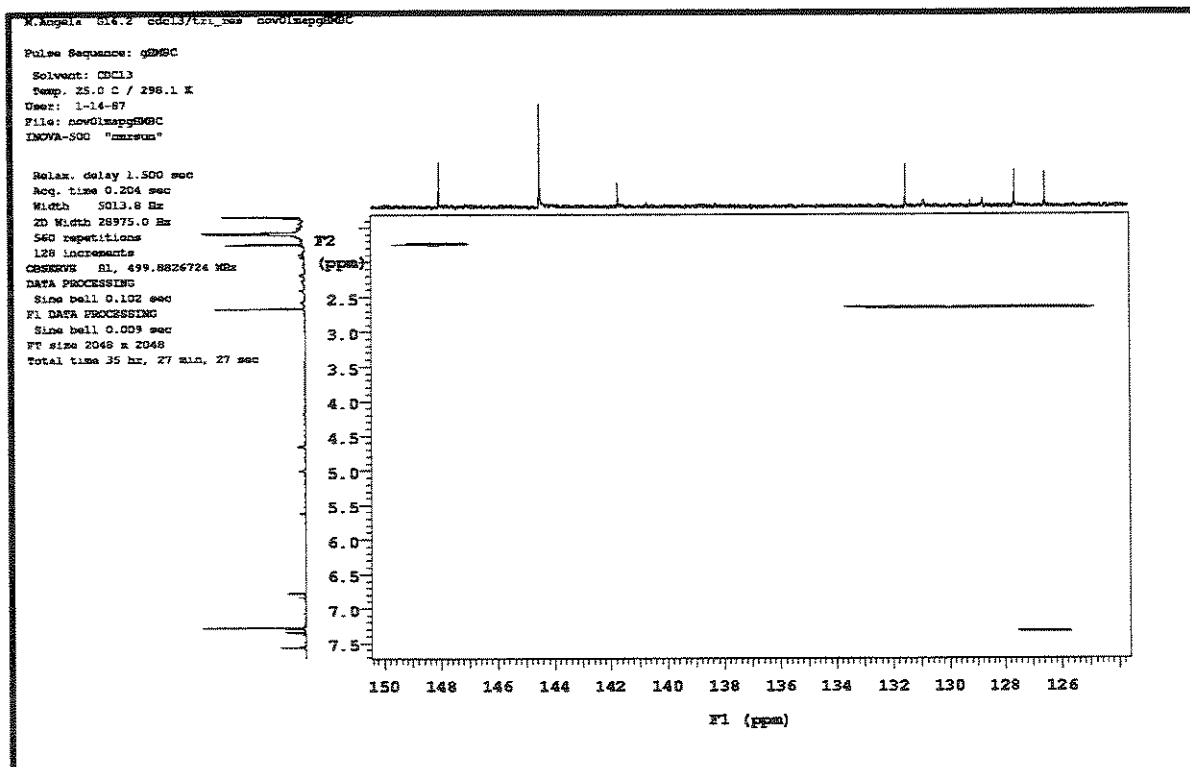
E27: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 20.



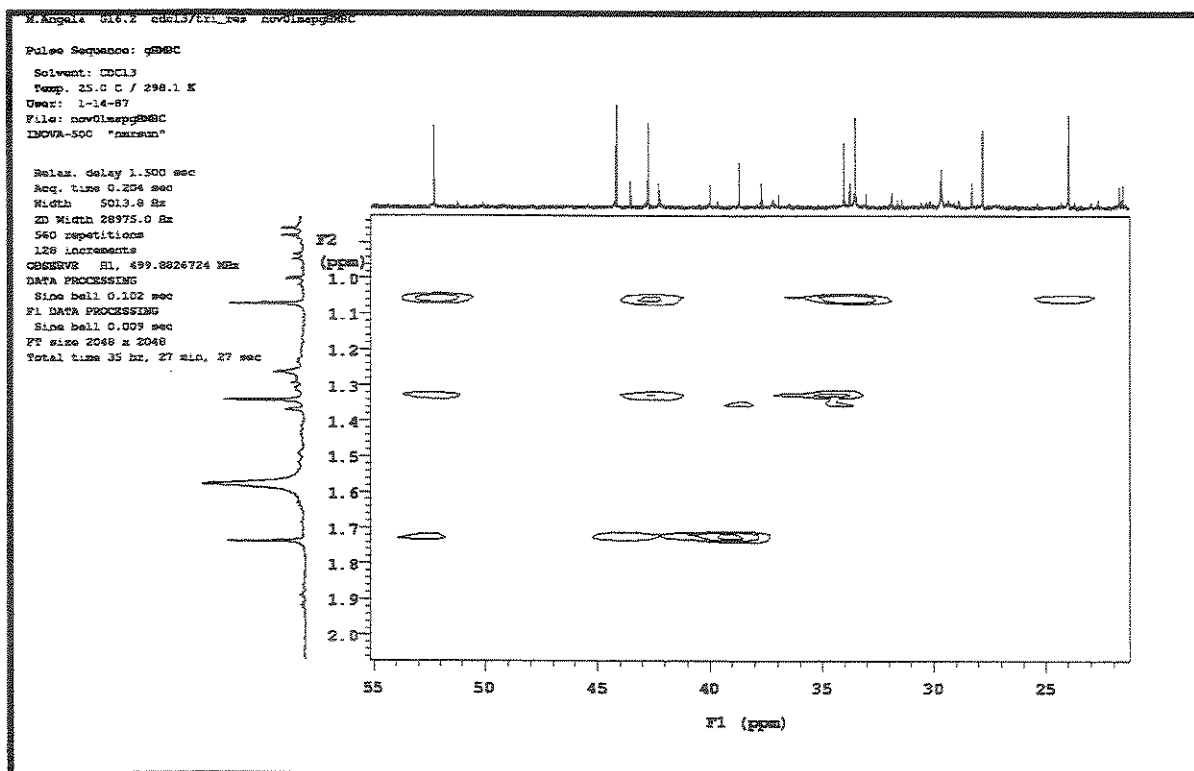
E28: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 20.



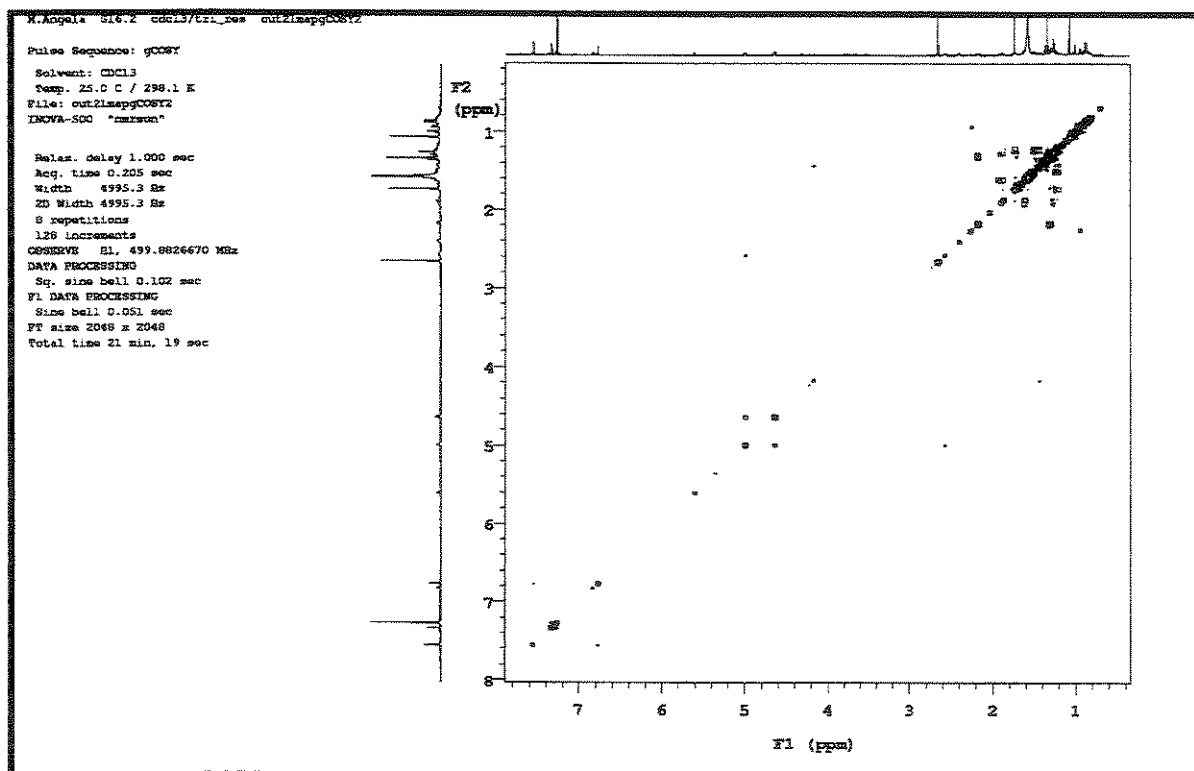
E29: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 20.



E30: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 20.

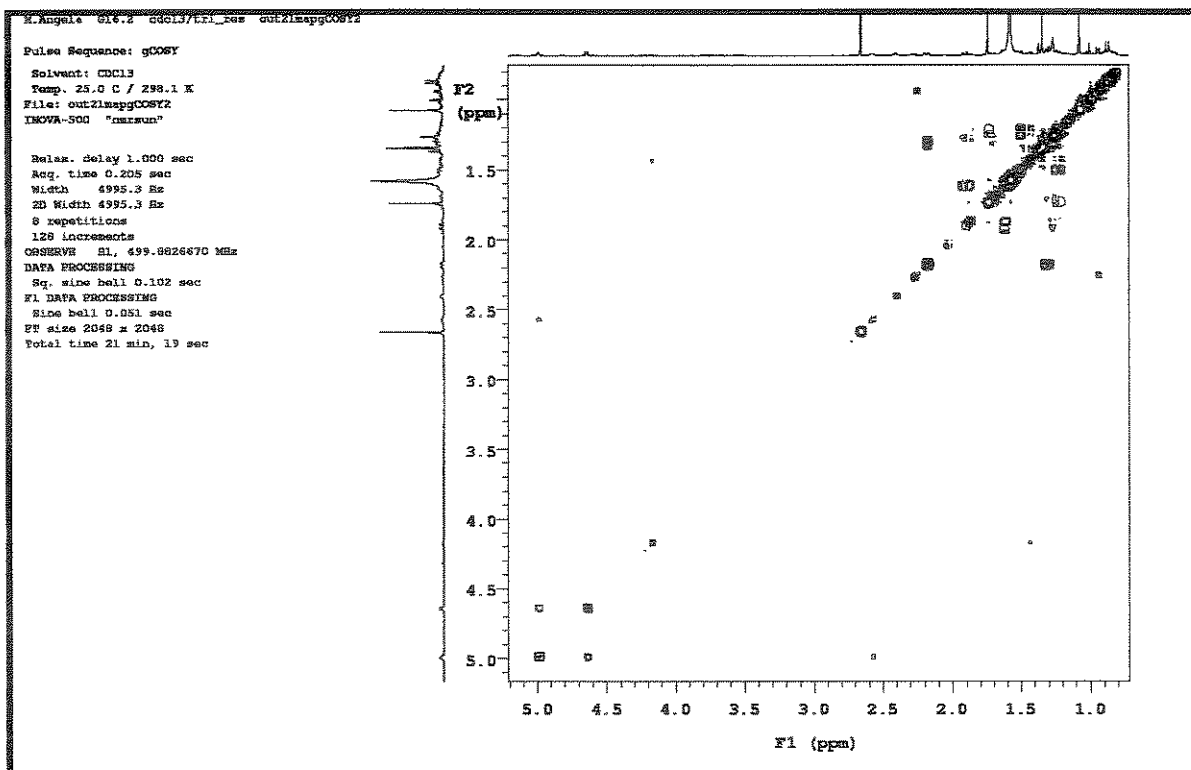


E31: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 20.

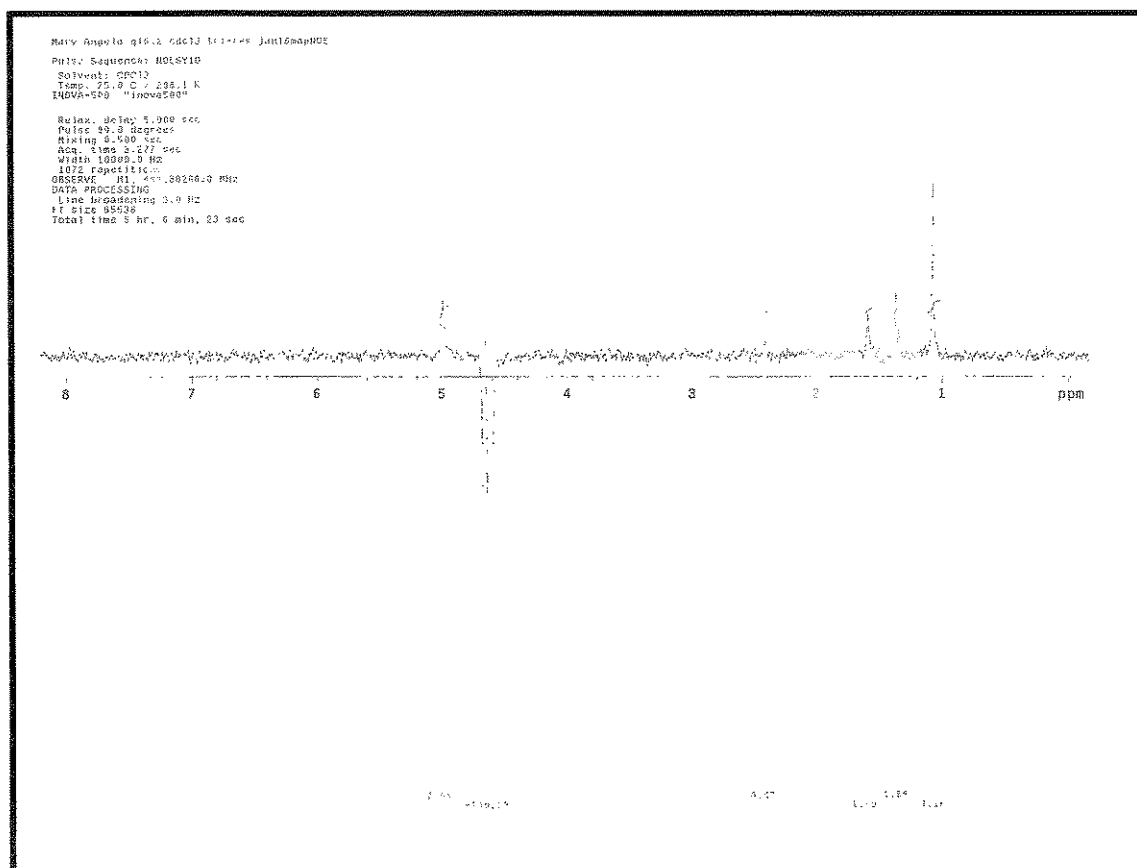


E32: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância

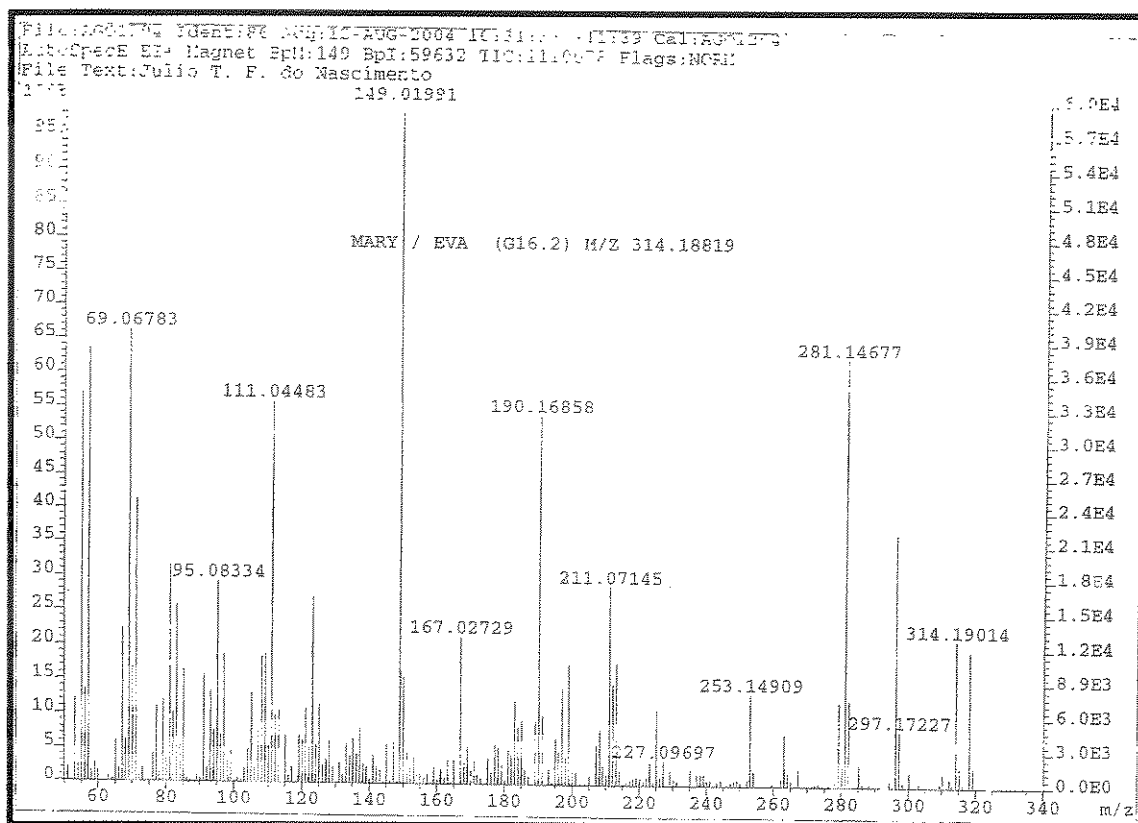
20.



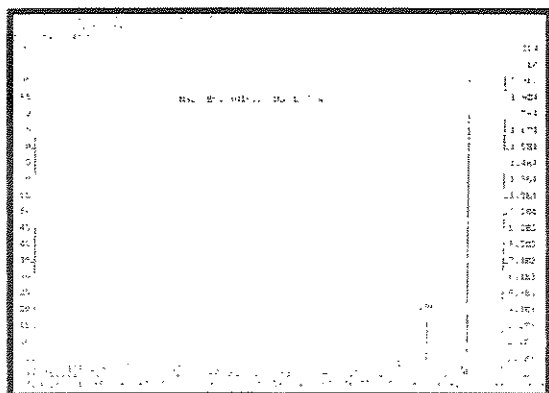
E33: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 20.



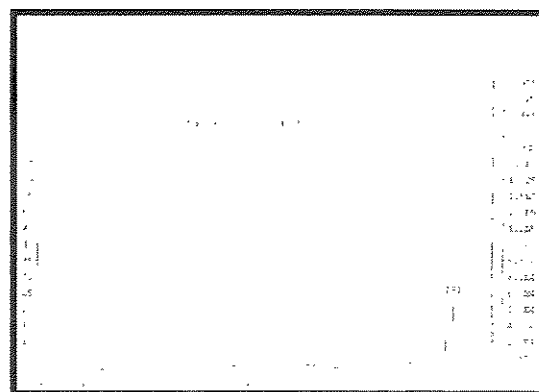
E34: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl_3 , δ 4.64) da substância 20.



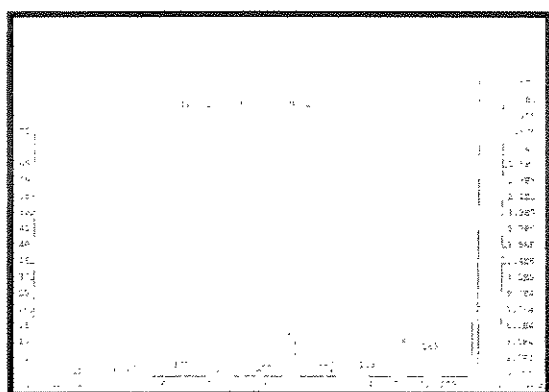
E35: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância 20.



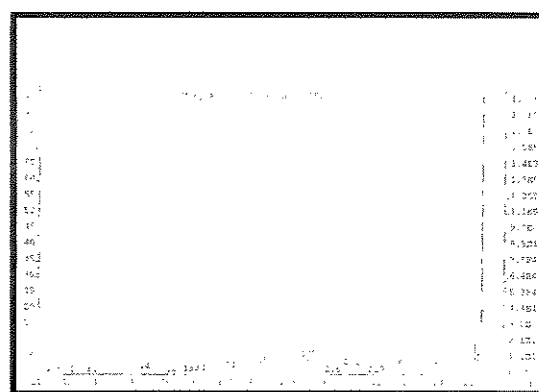
(a)



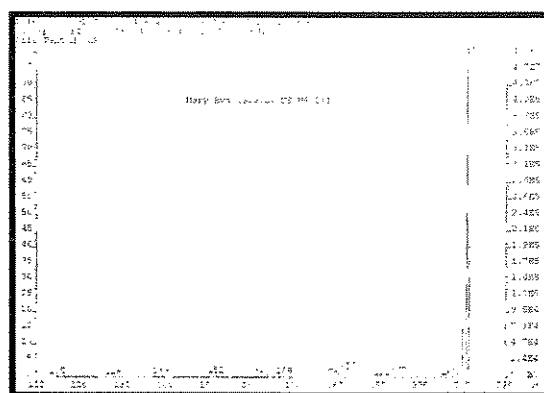
(b)



(c)

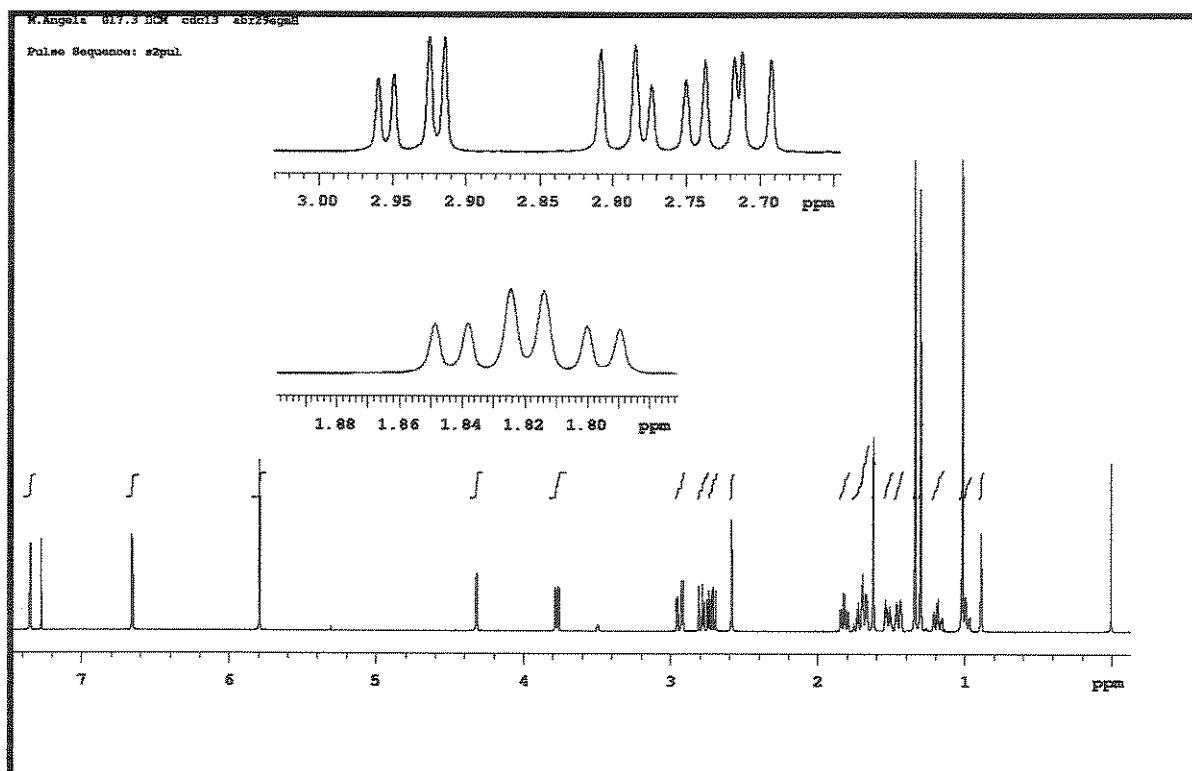


(d)

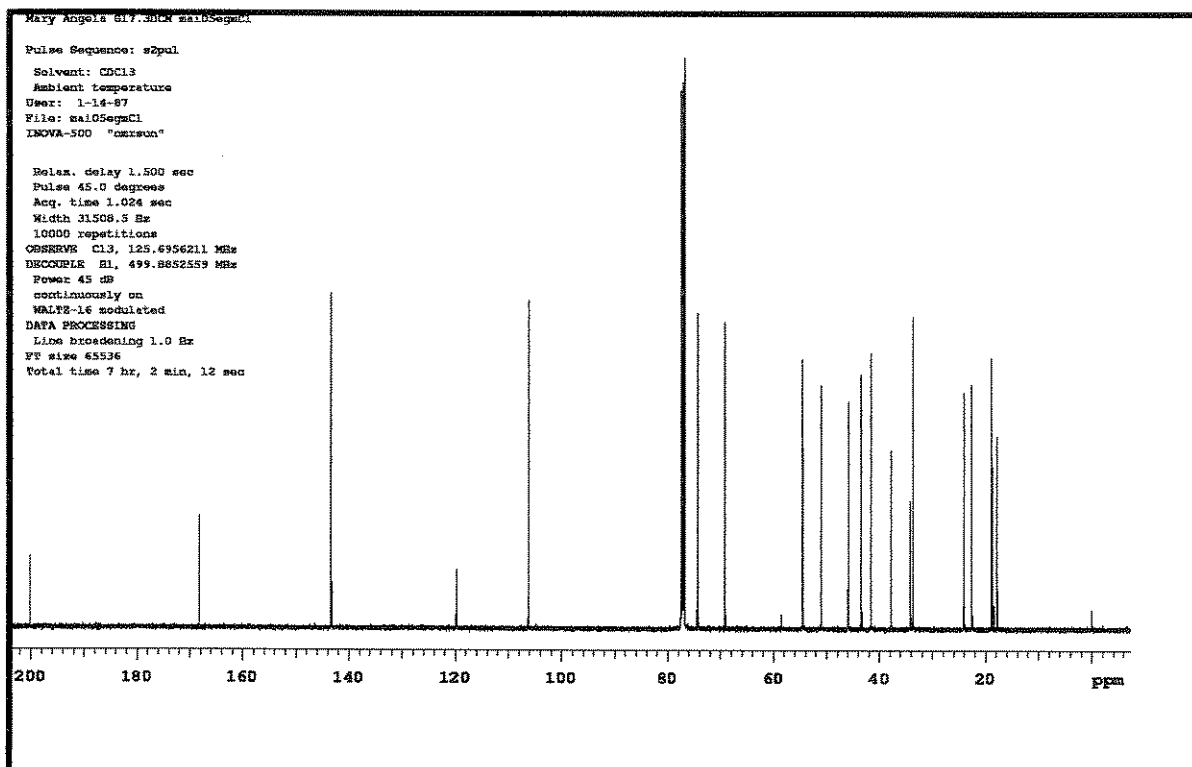


(e)

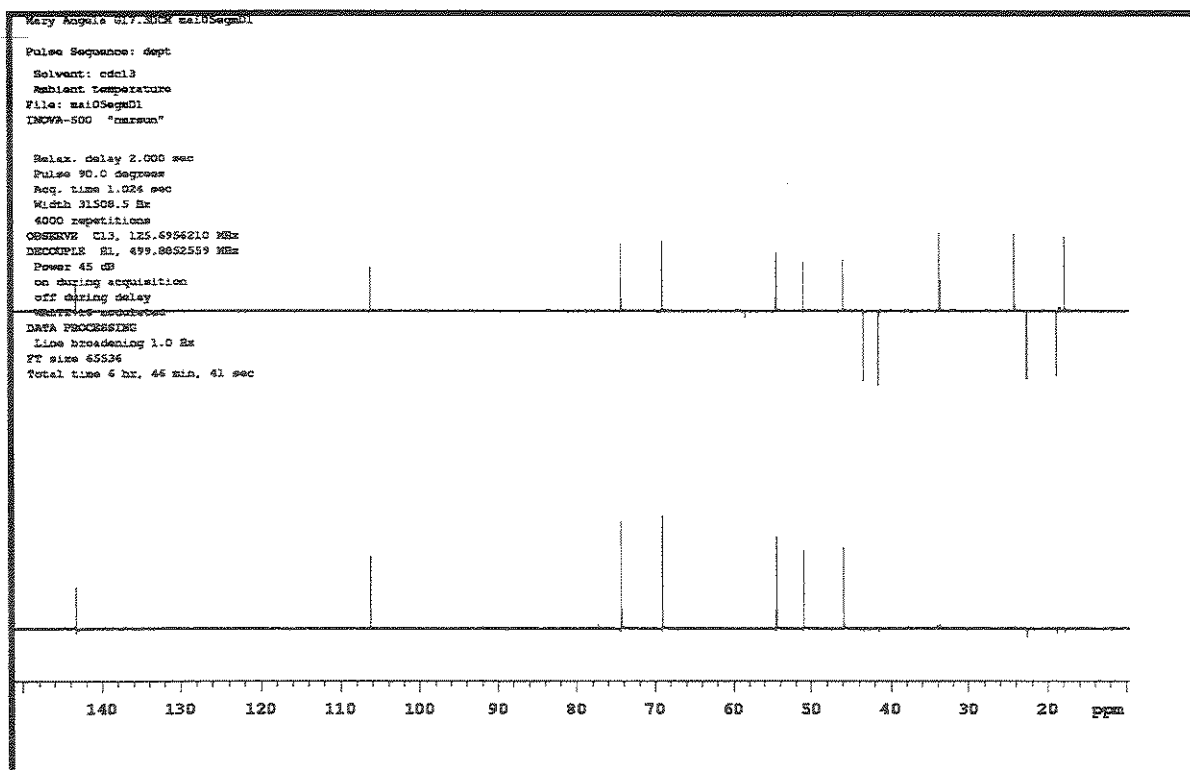
E36: Espectros de massas do experimento EM/EM (IE, 70eV) da substância 20 com seleção dos íons m/z 314 (a), 296 (b), 281 (c), 253 (d) e 211 (e).



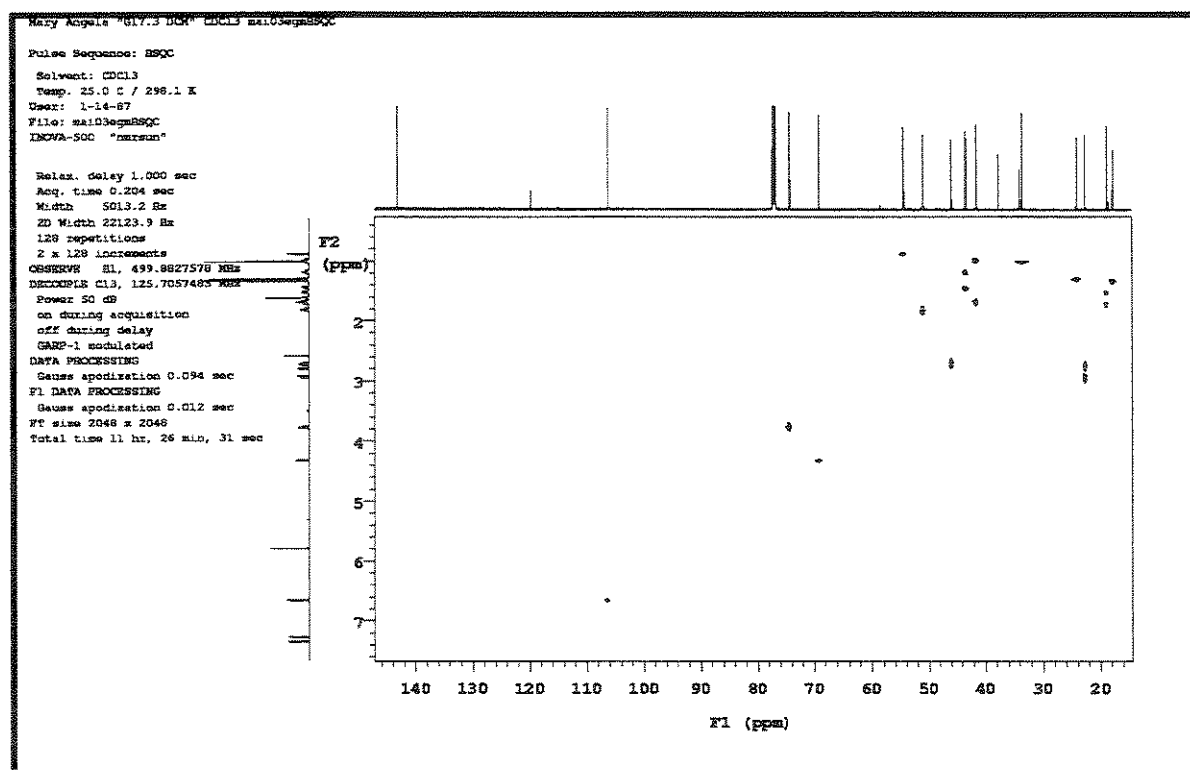
E37: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 21.



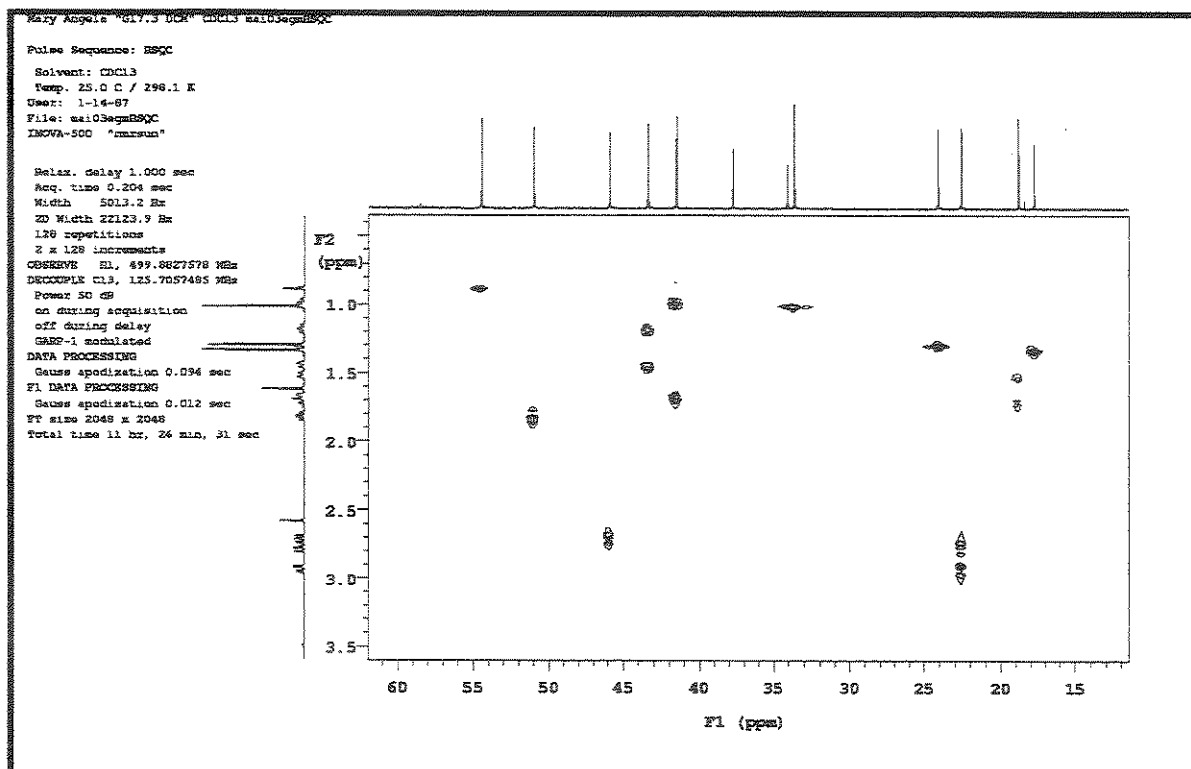
E38: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 21.



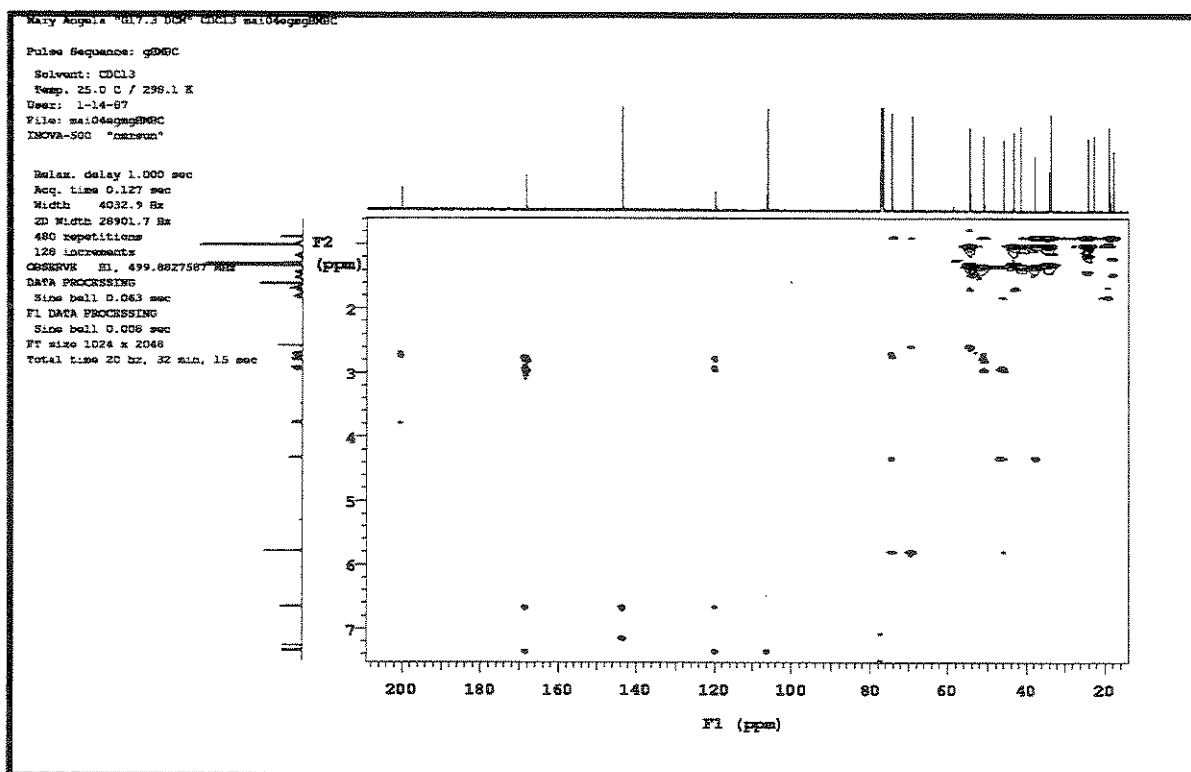
E39: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl₃) da substância 21.



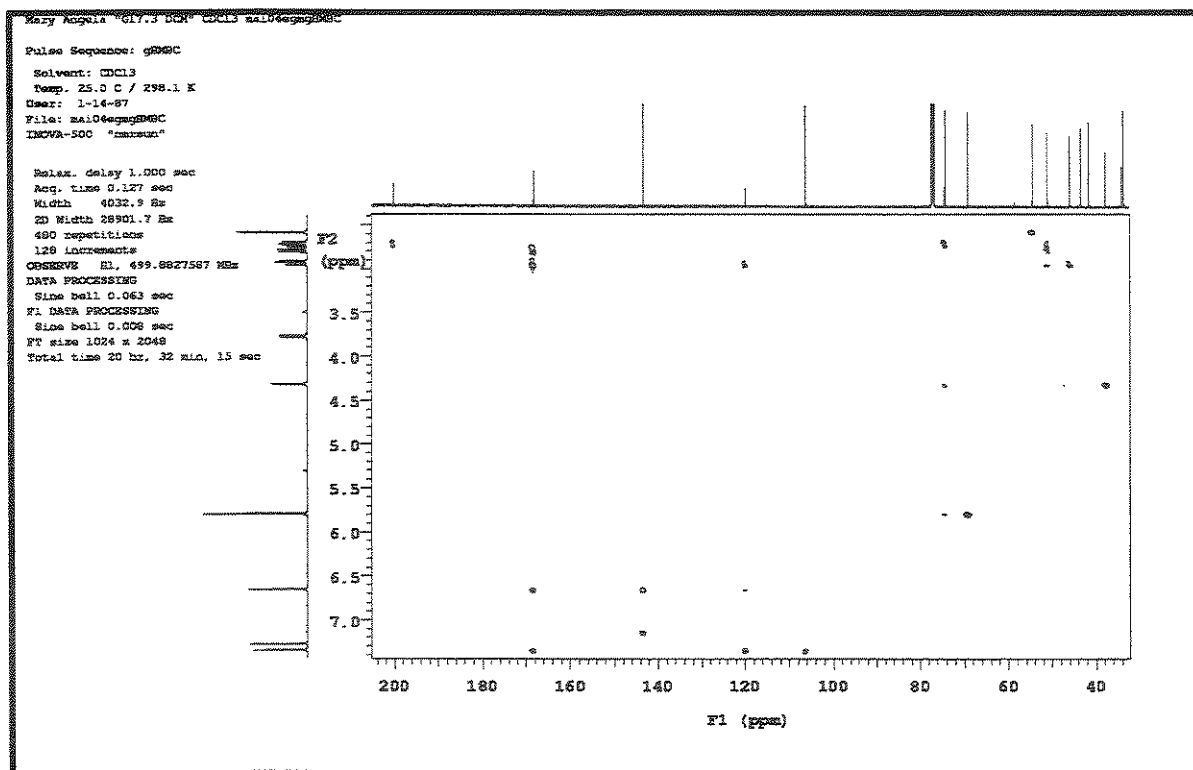
E40: Mapa de contorno de RMN-2D (¹H, ¹³C-HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 21.



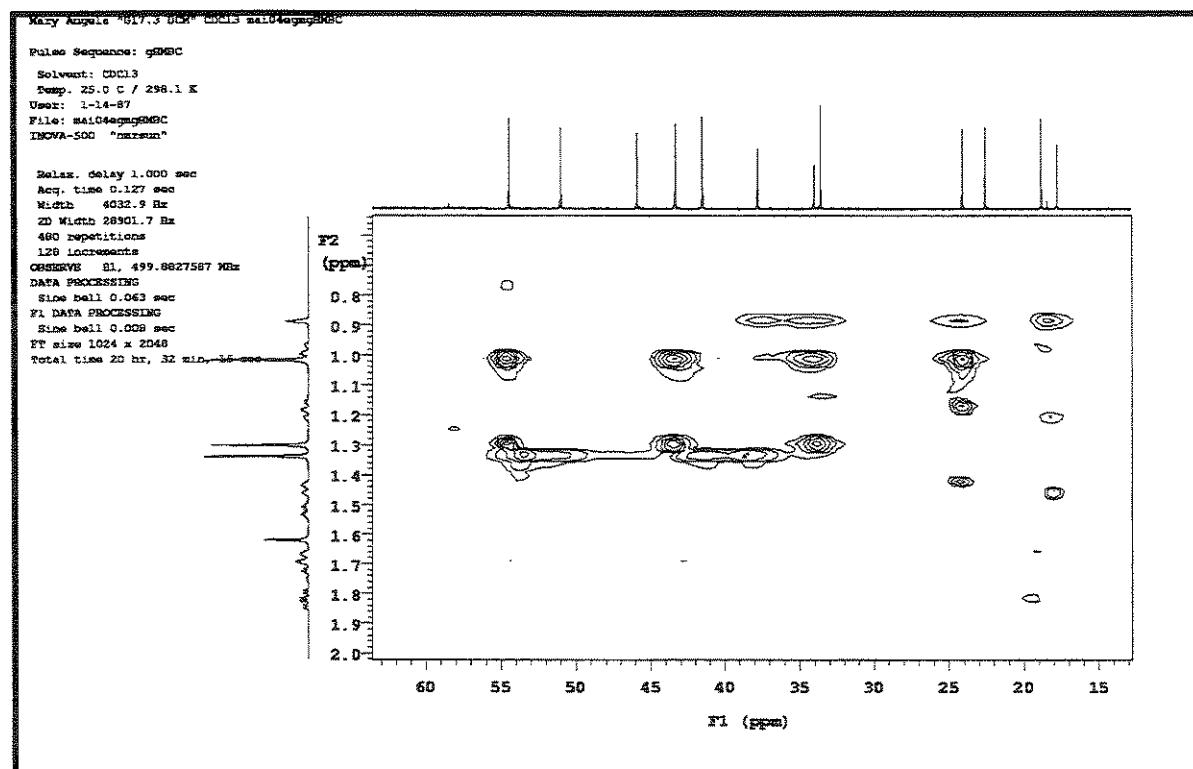
E41: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 21.



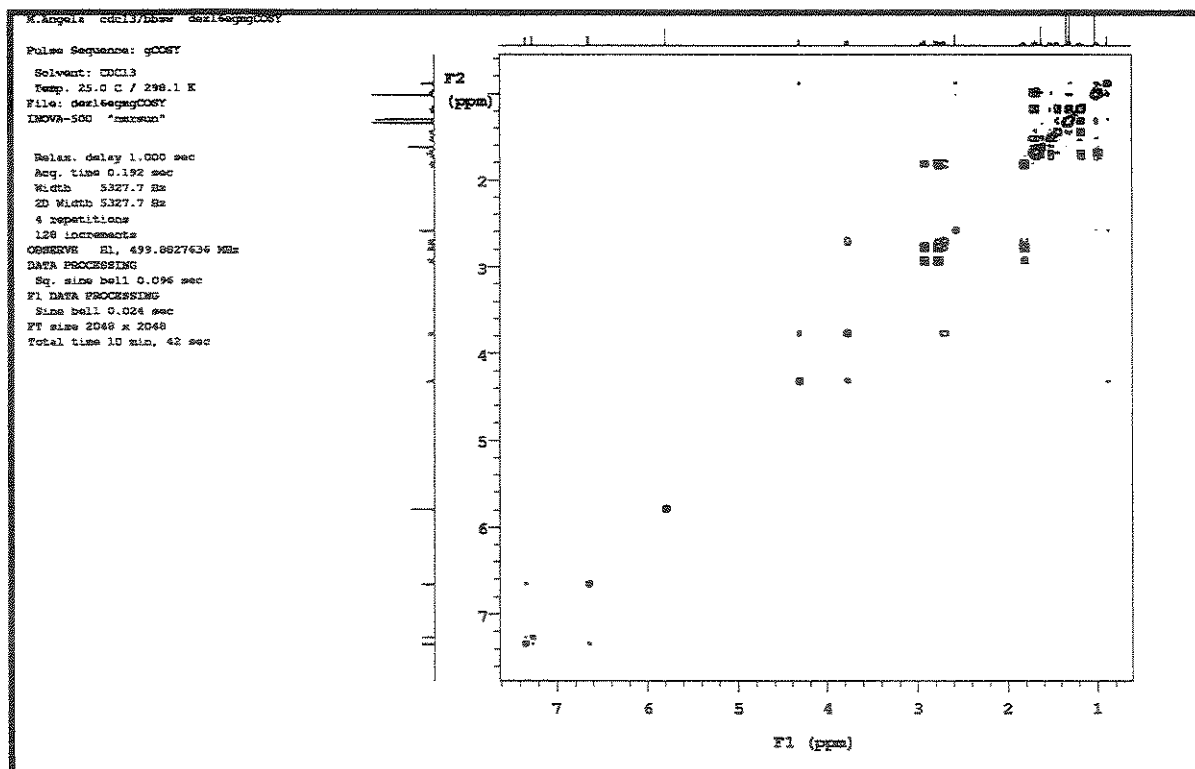
E42: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 21.



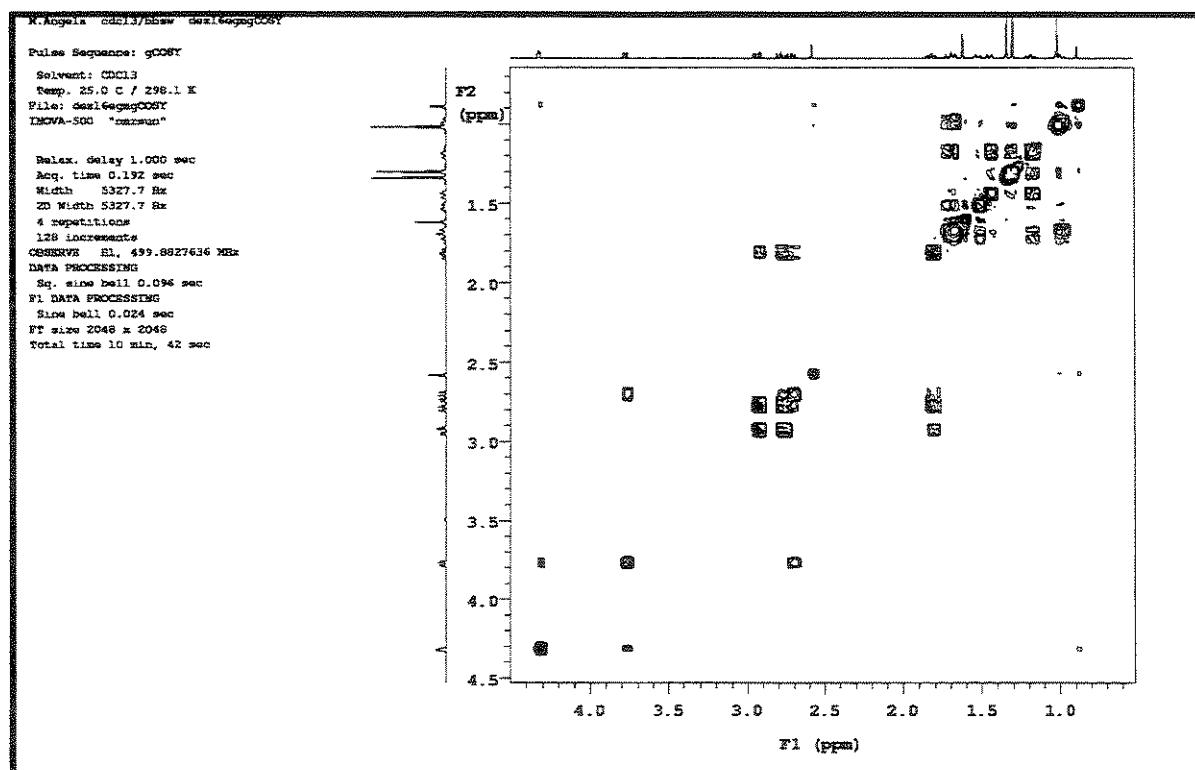
E43: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 21.



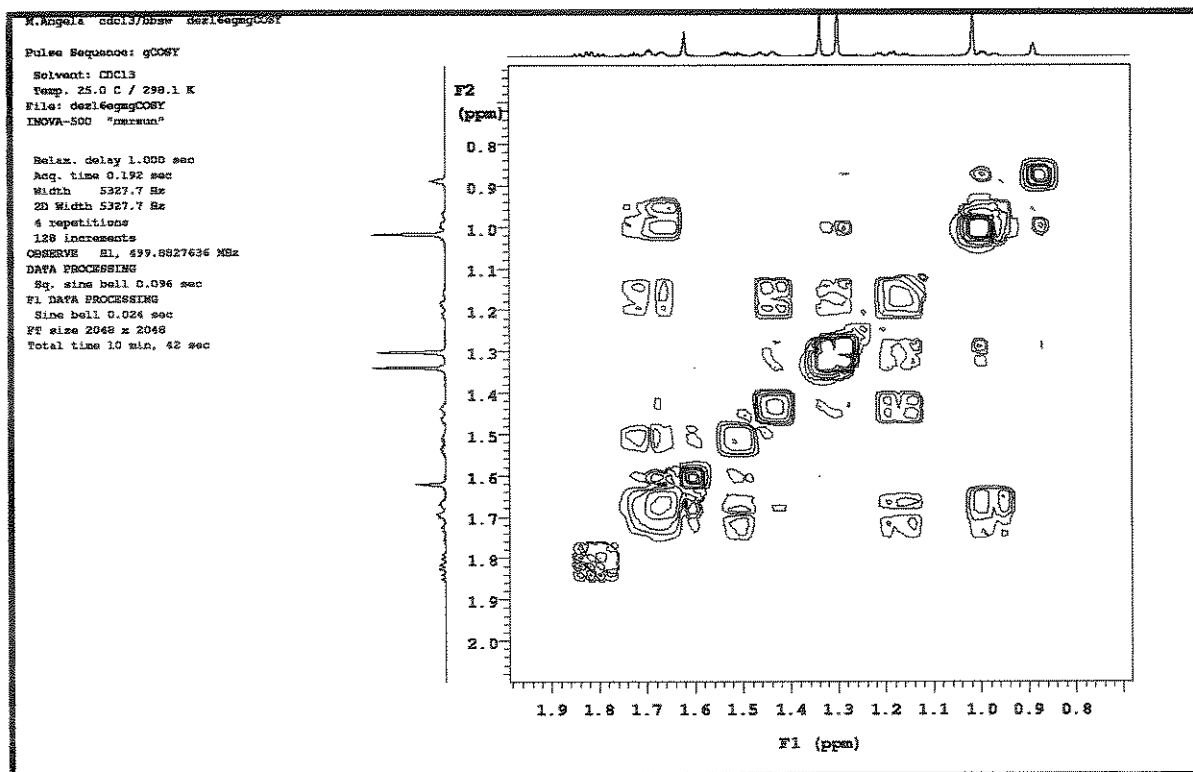
E44: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 21.



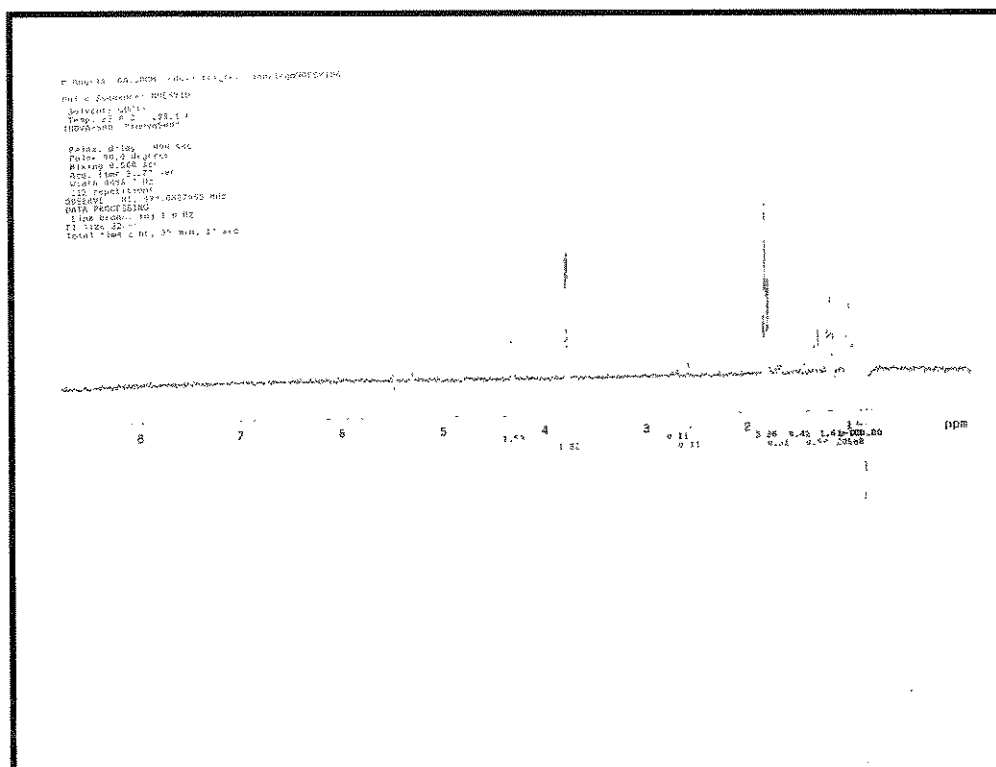
E45: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 21.



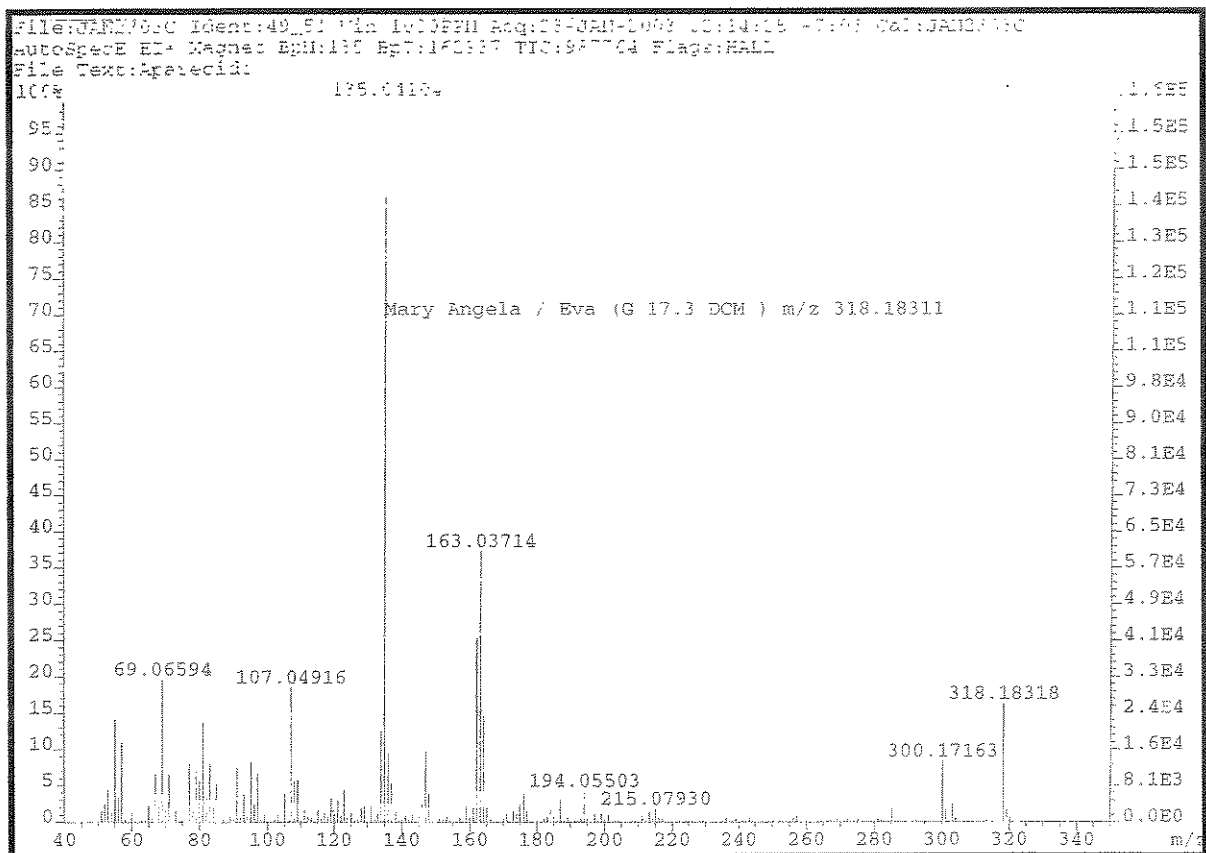
E46: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 21.



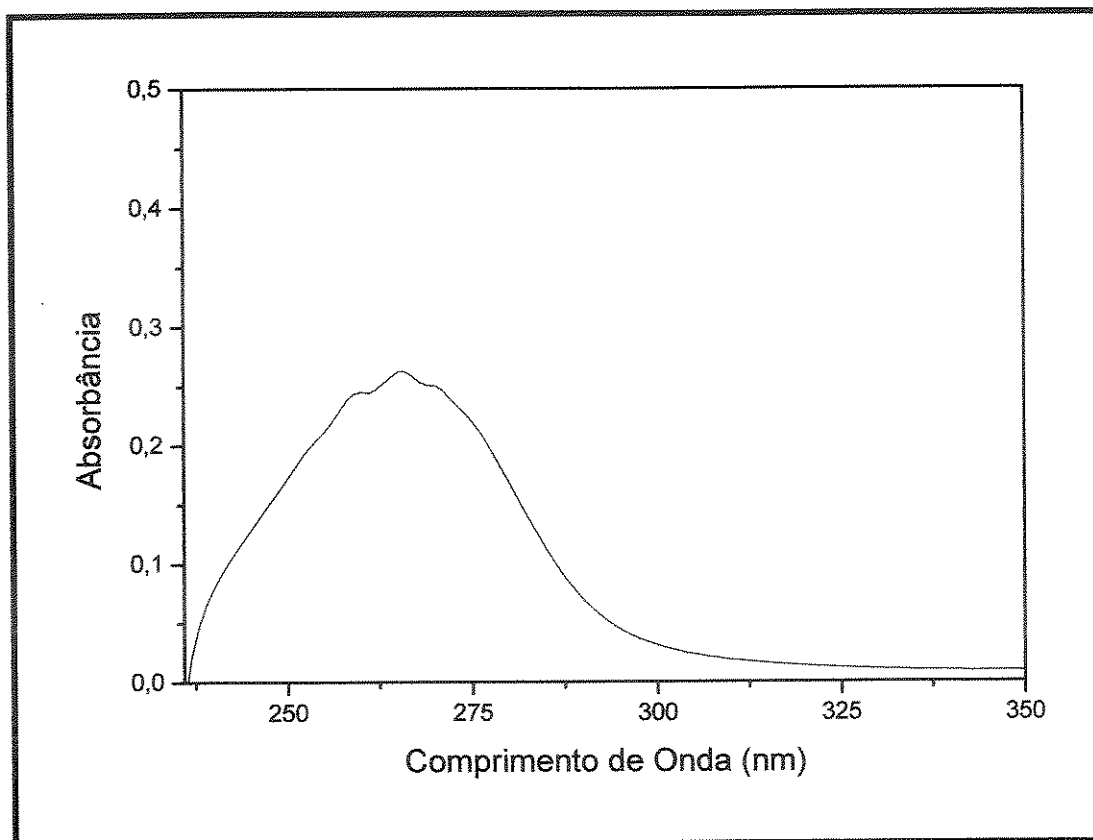
E47: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 21.



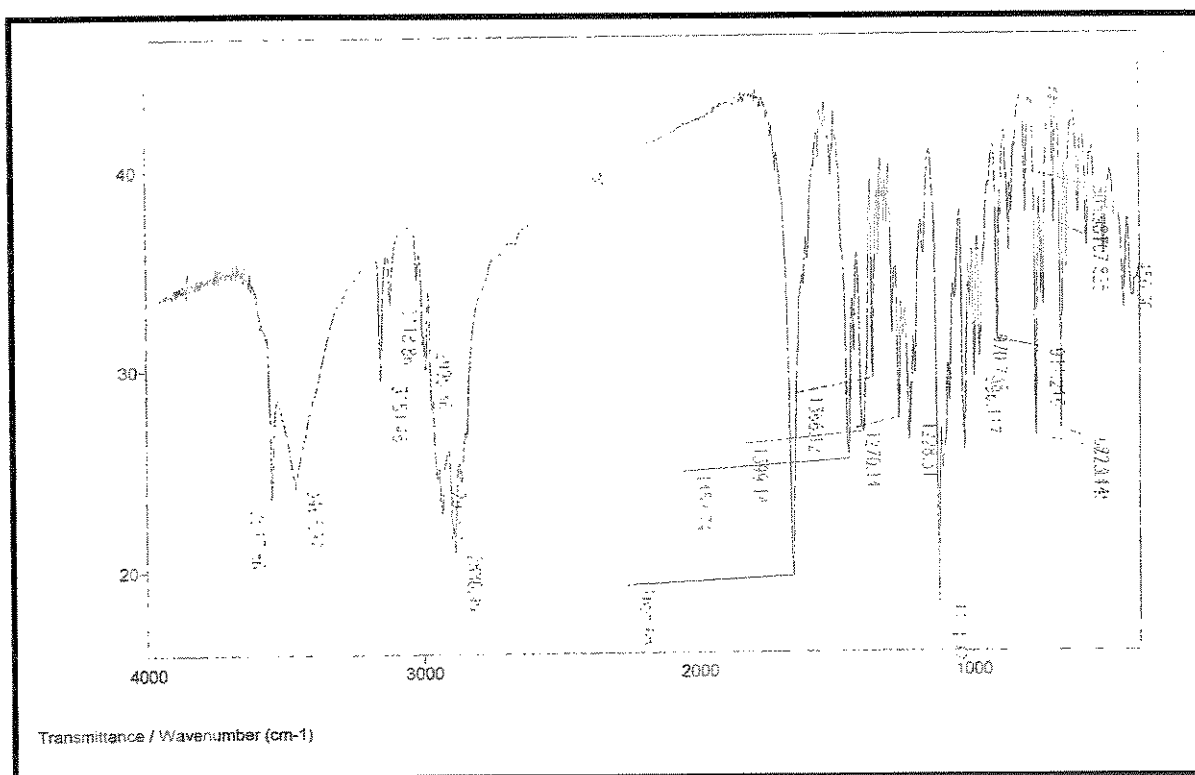
E48: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl_3 , δ 0.88) da substância 21.



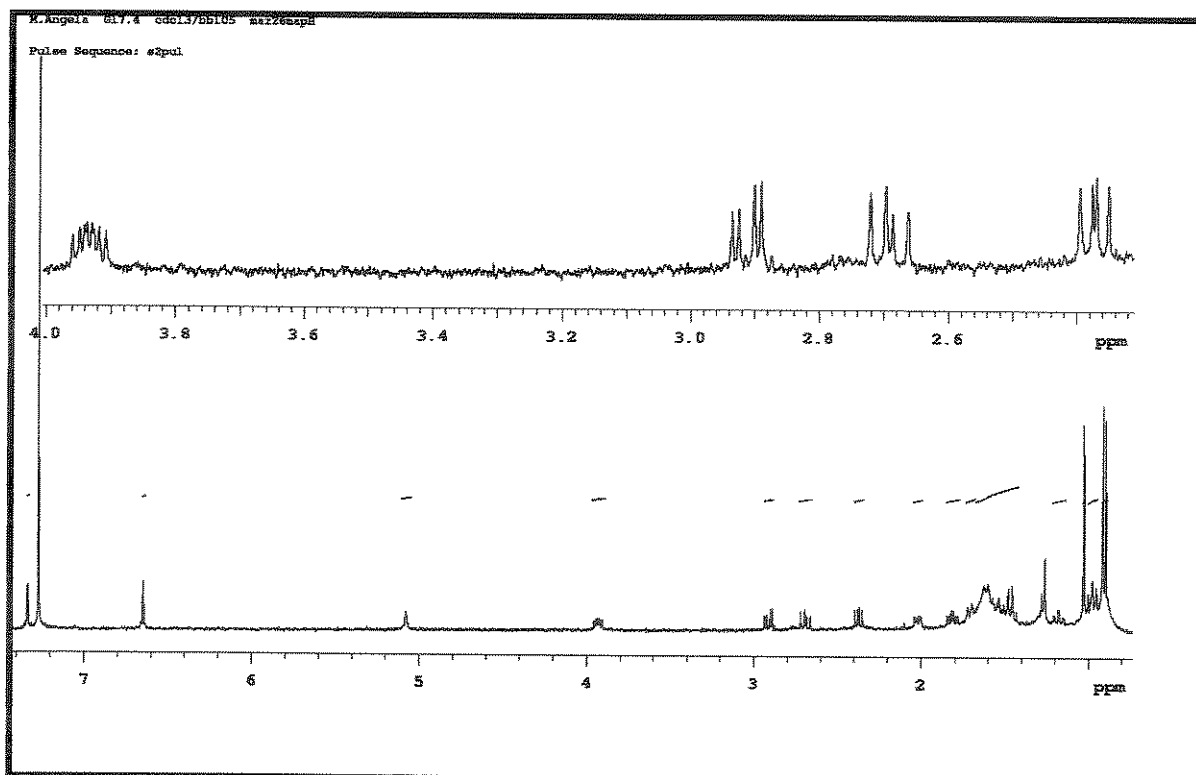
E51: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância 21.



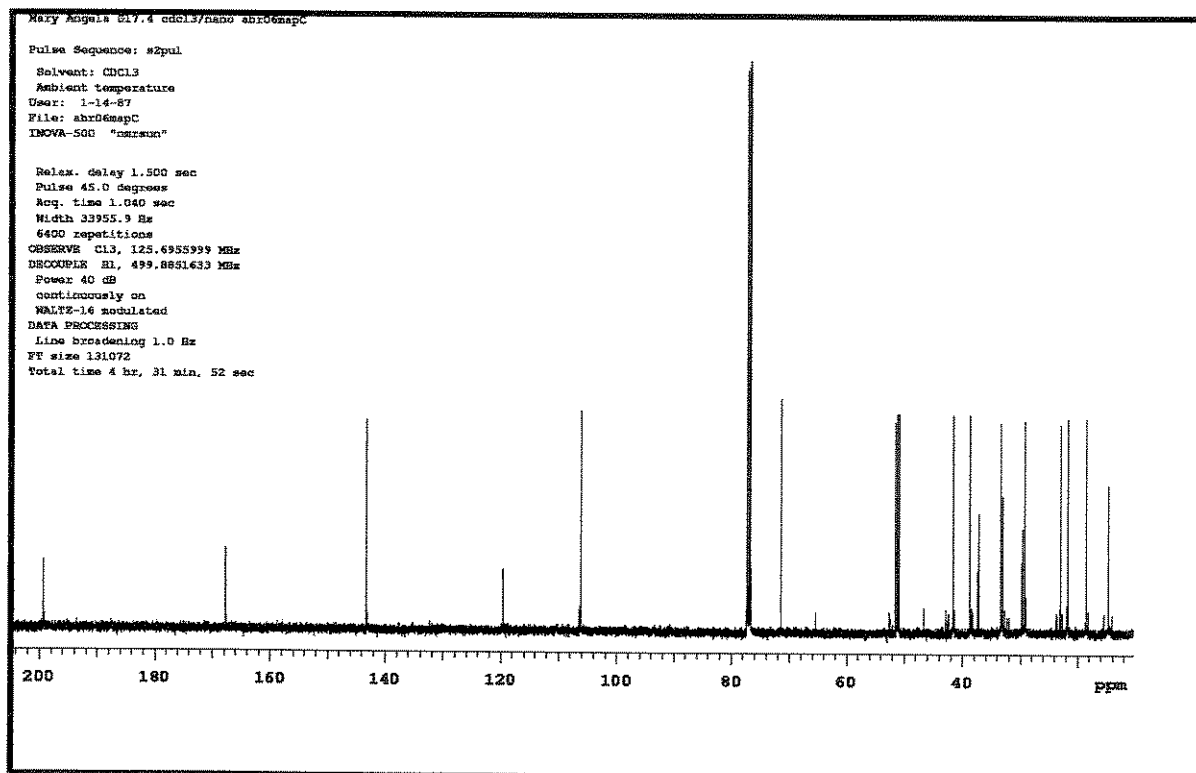
E53: Espectro de UV da substância 21.



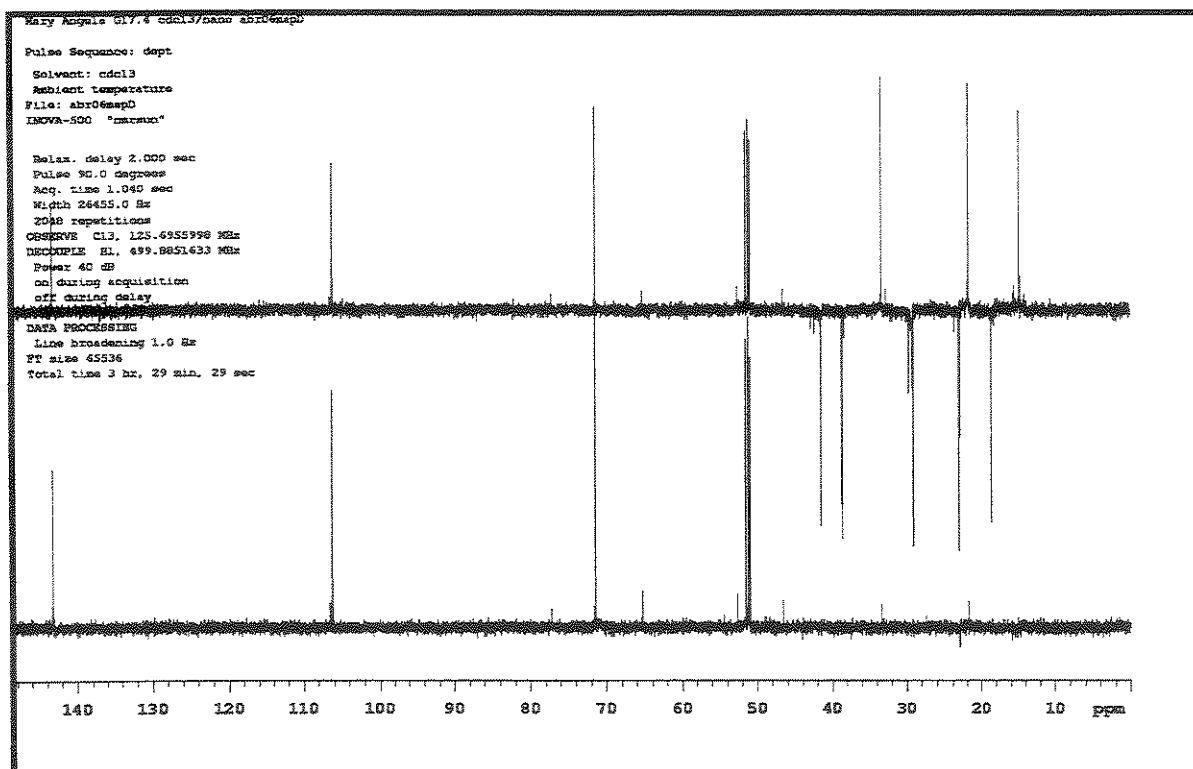
E54: Espectro de IV da substância 21.



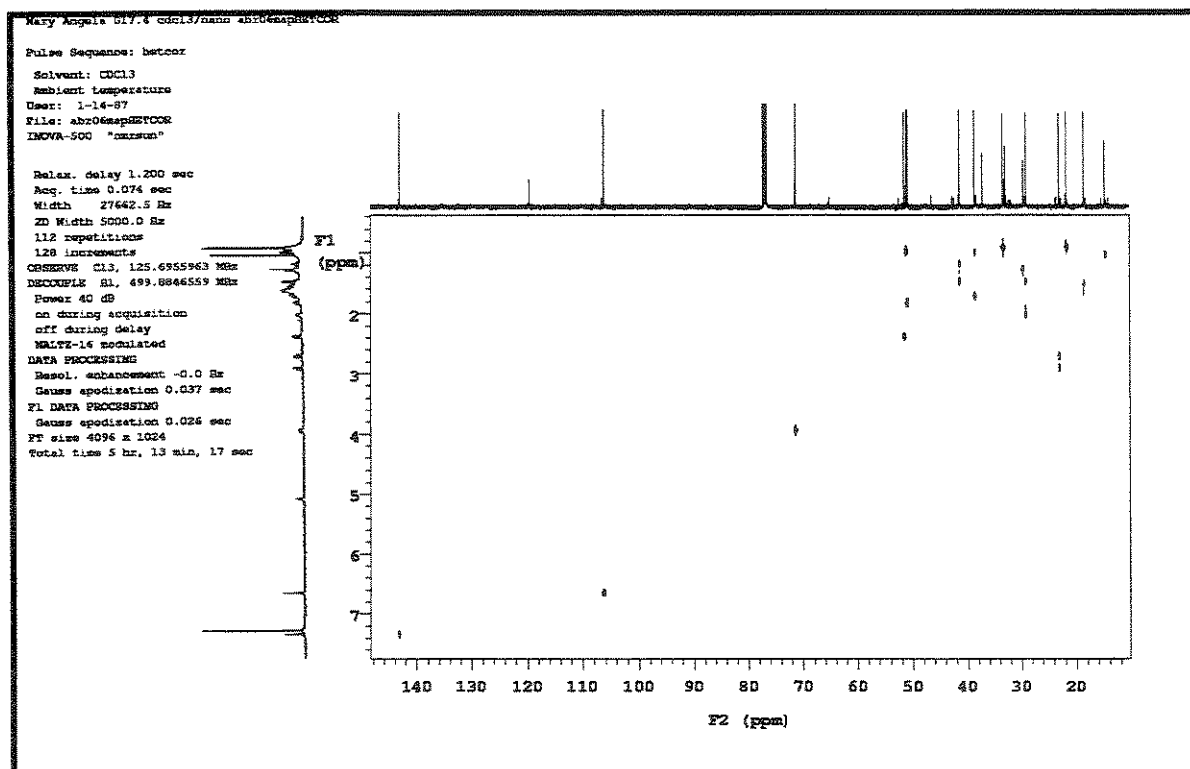
E55: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 22.



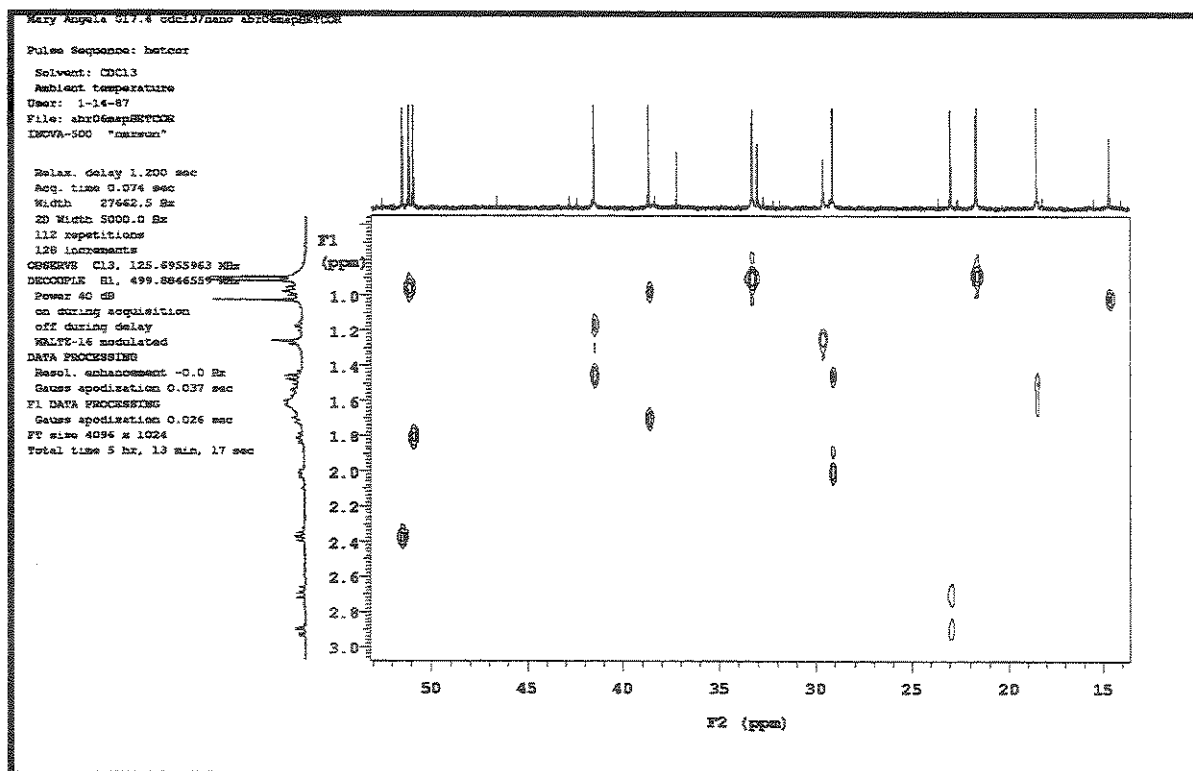
E56: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 22.



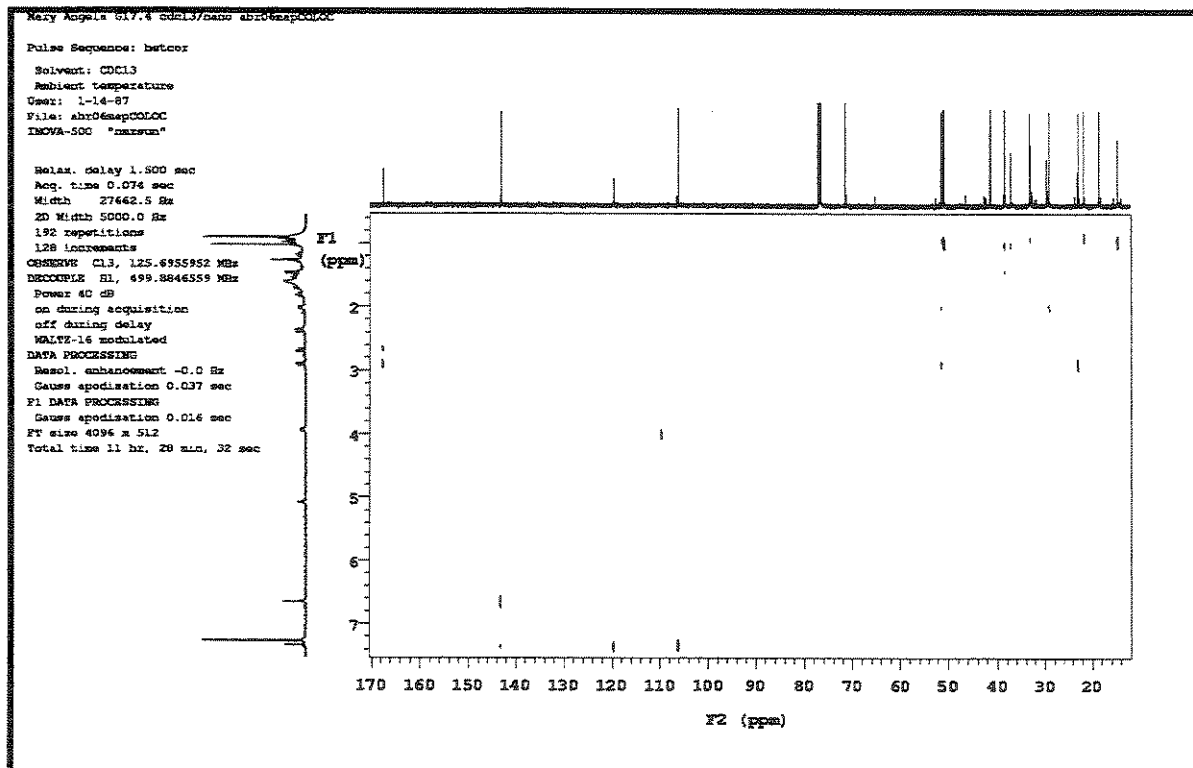
E57: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl₃) da substância 22.



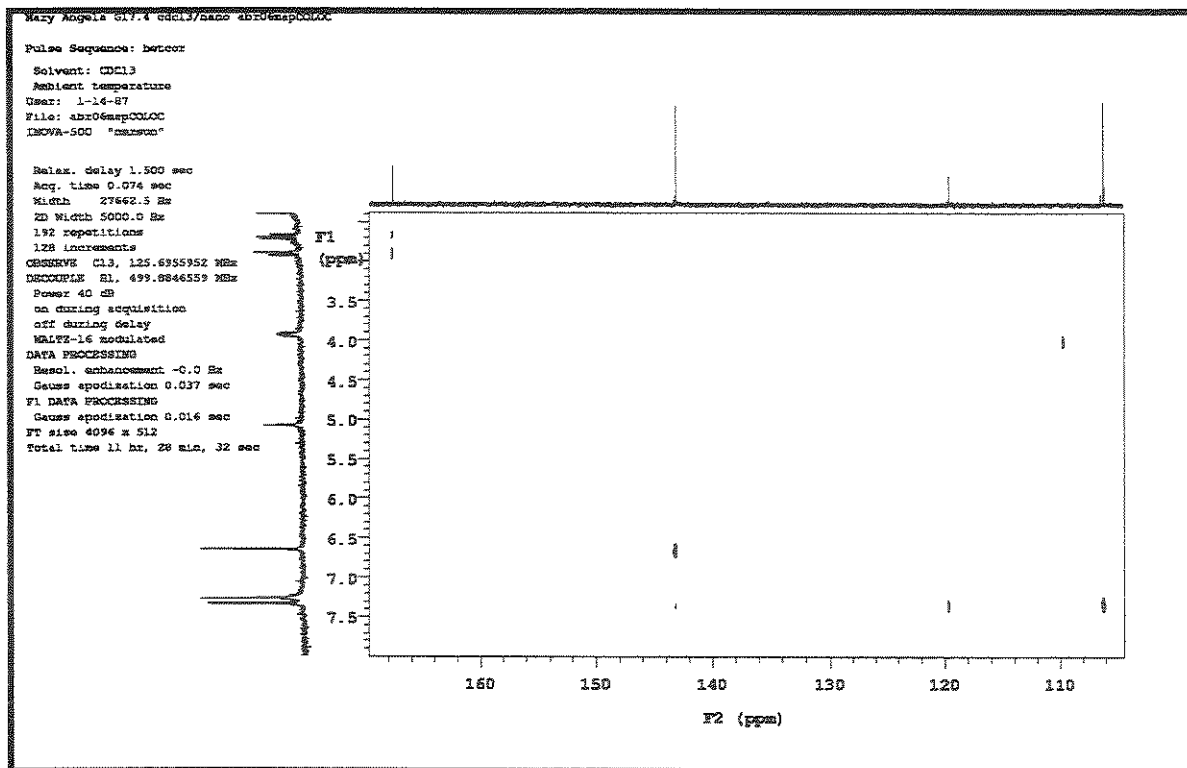
E58: Mapa de contorno de RMN-2D (¹³C, ¹H-HETCOR) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 22.



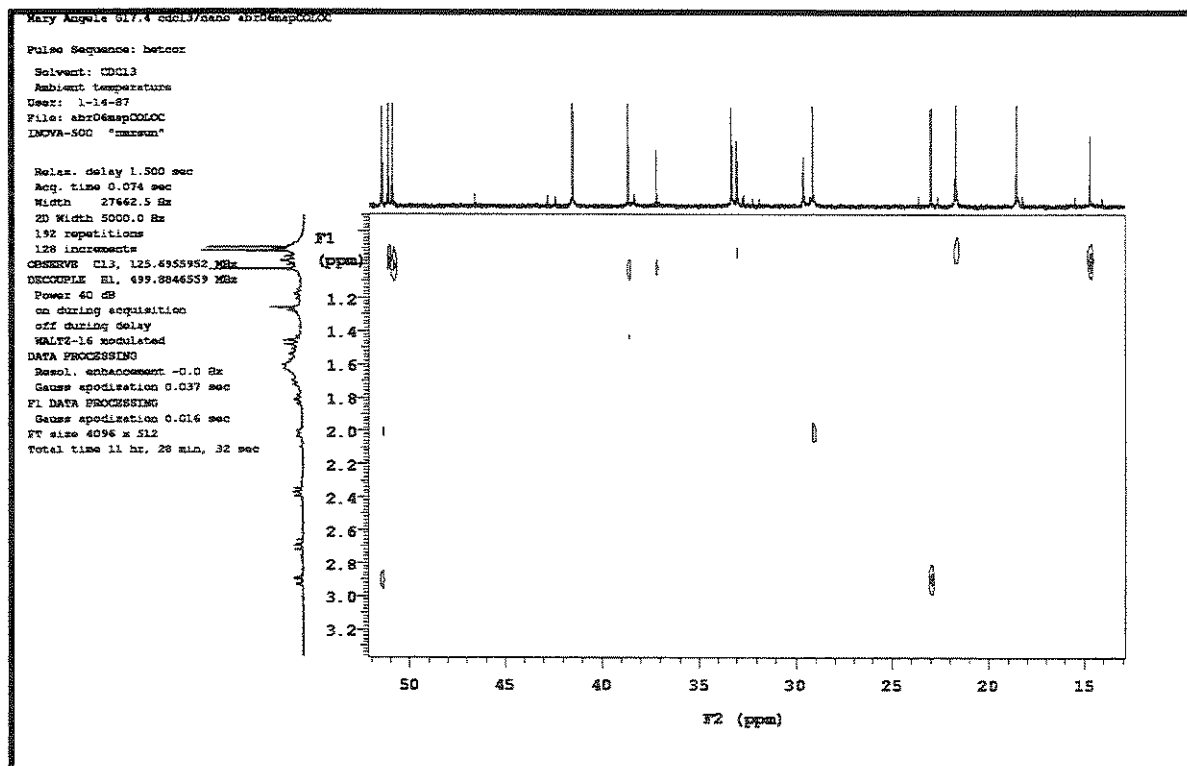
E59: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^{13}C , ^1H -HETCOR) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 22.



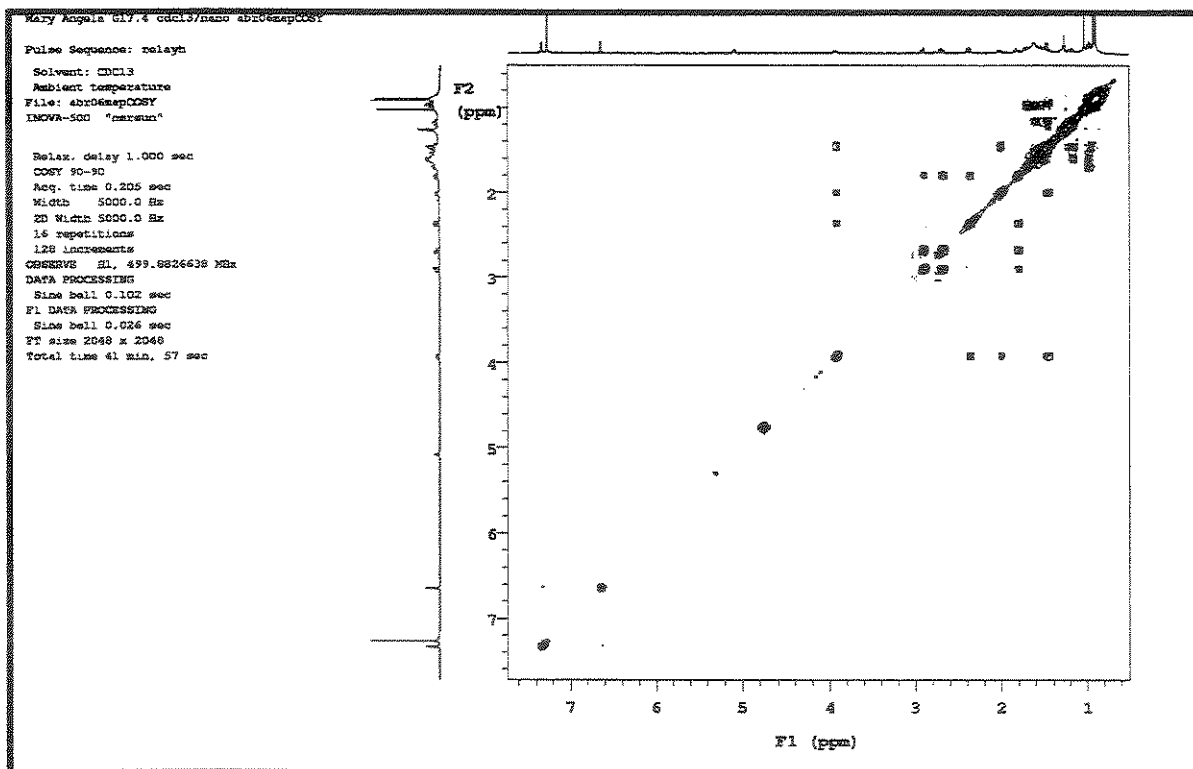
E60: Mapa de contorno de RMN-2D (^{13}C , ^1H -COLOC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 22.



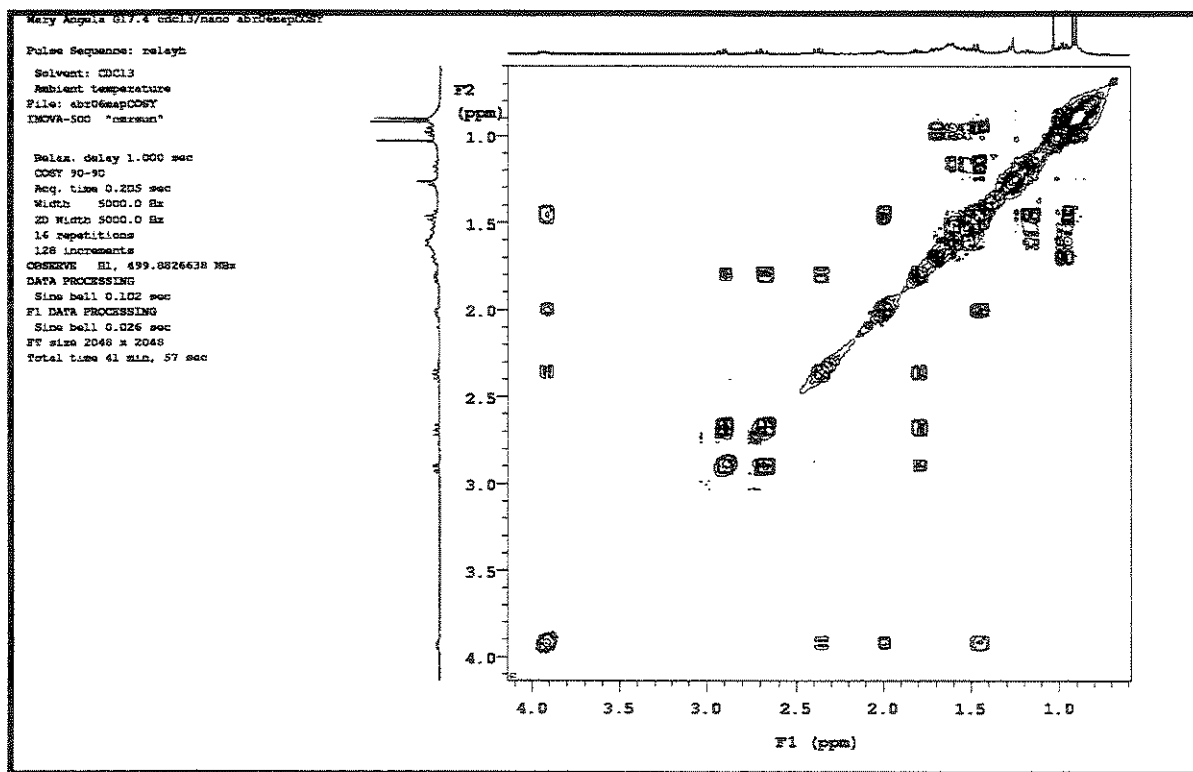
E61: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹³C, ¹H-COLOC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 22.



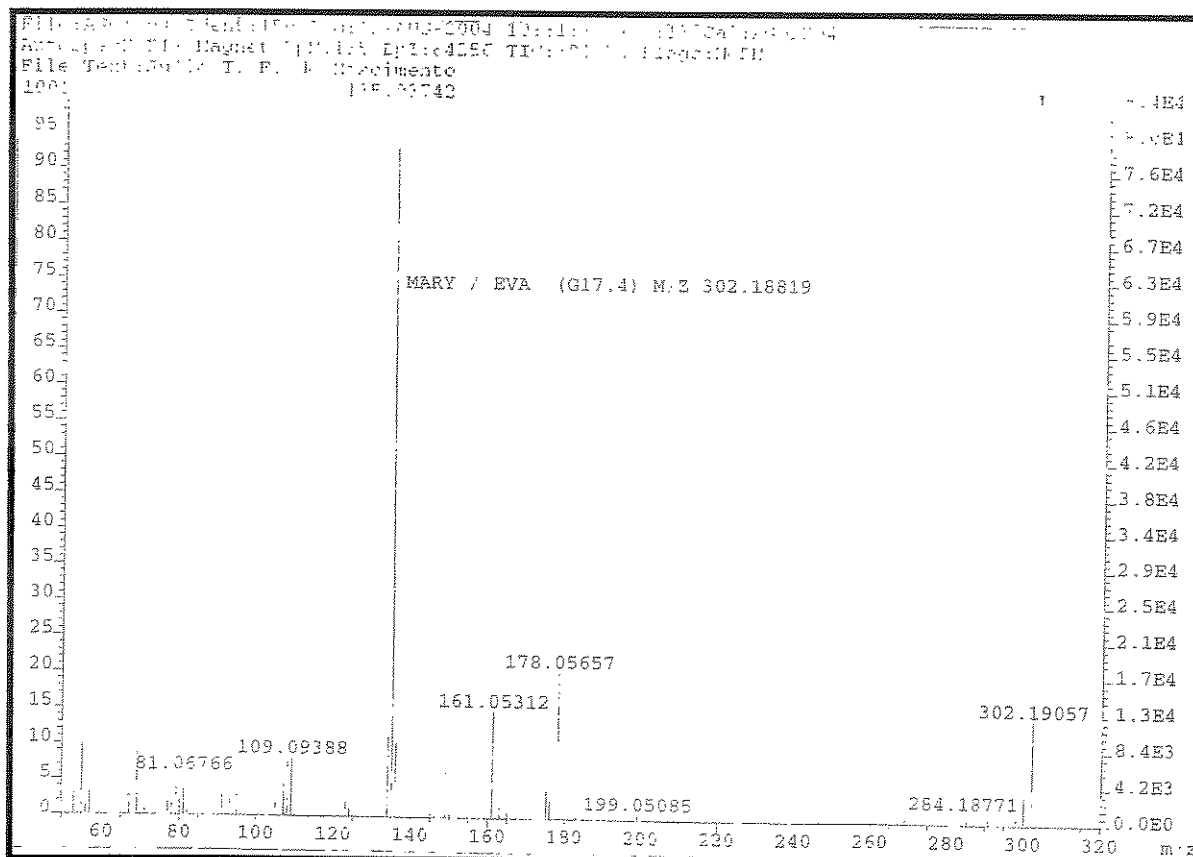
E62: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (¹³C, ¹H-COLOC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 22.



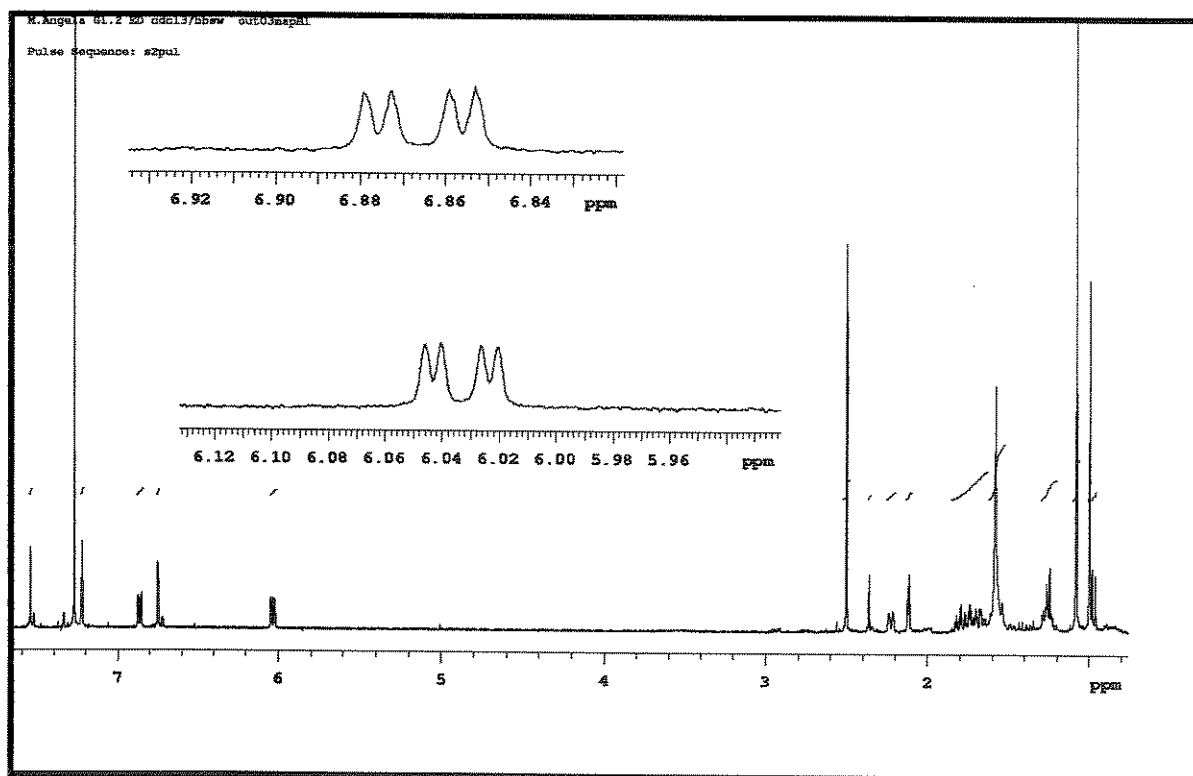
E63: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 22.



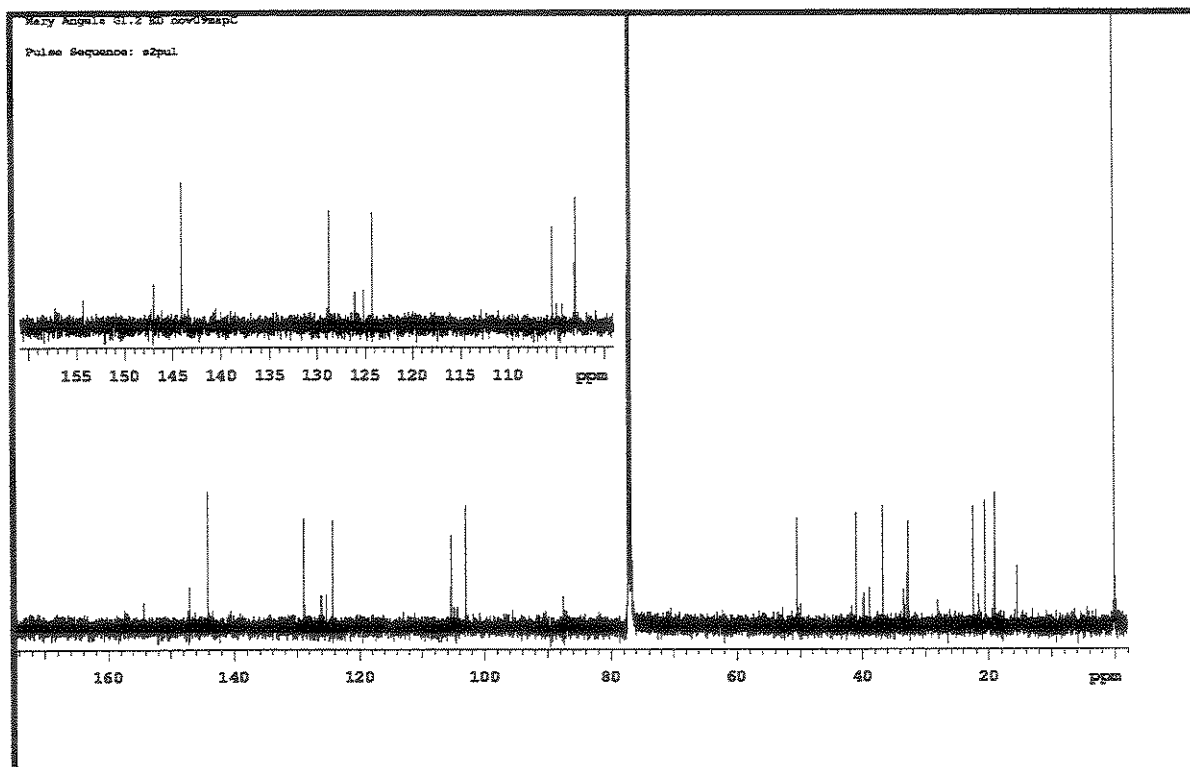
E64: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 22.



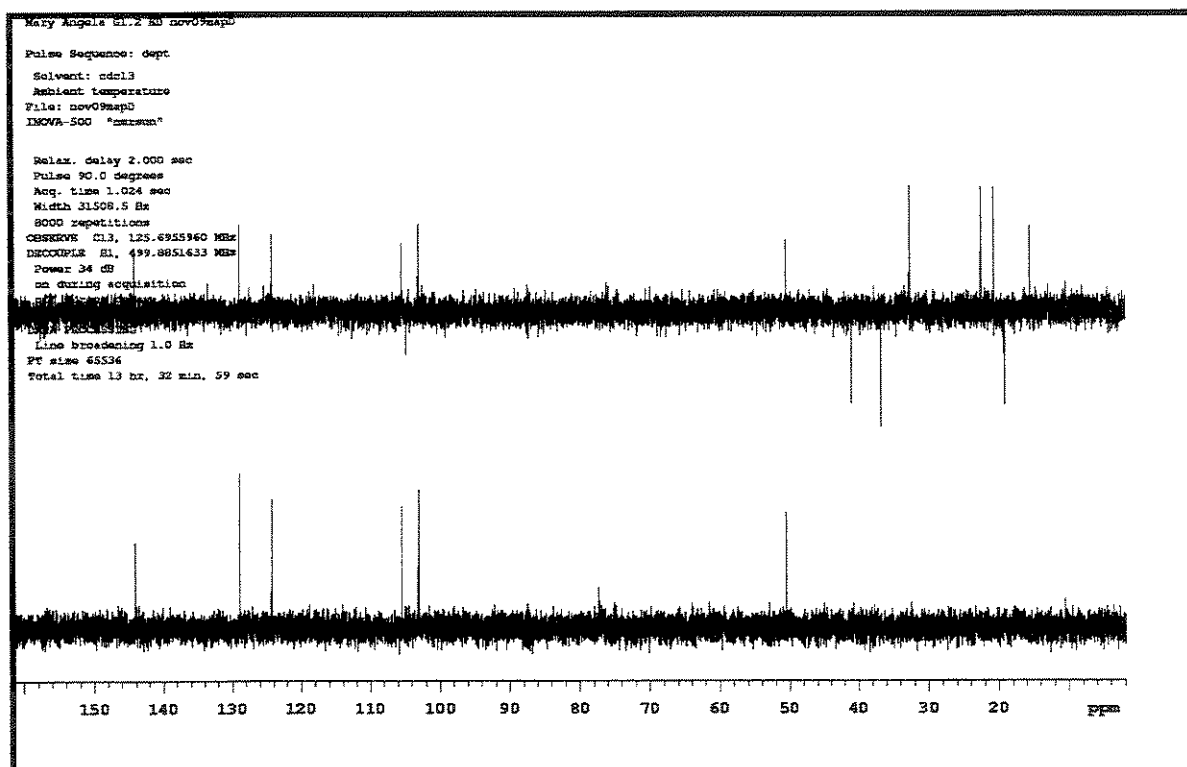
E67: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância 22.



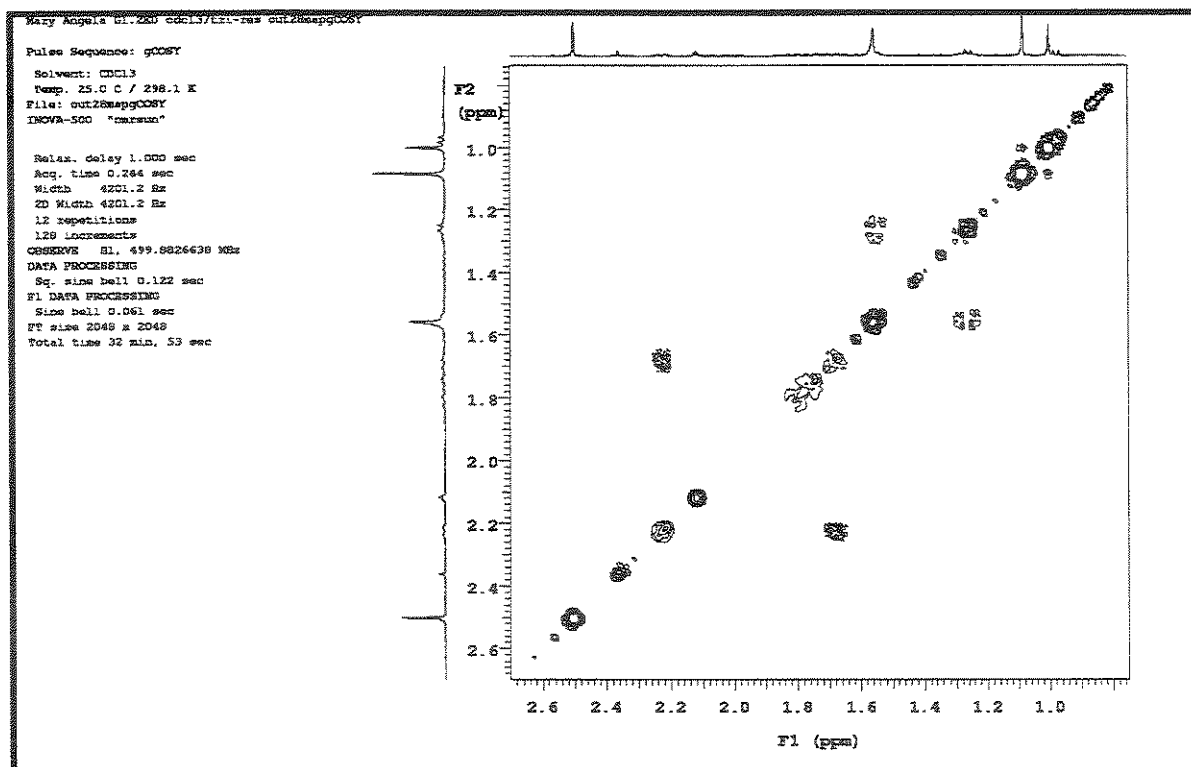
E68: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 23.



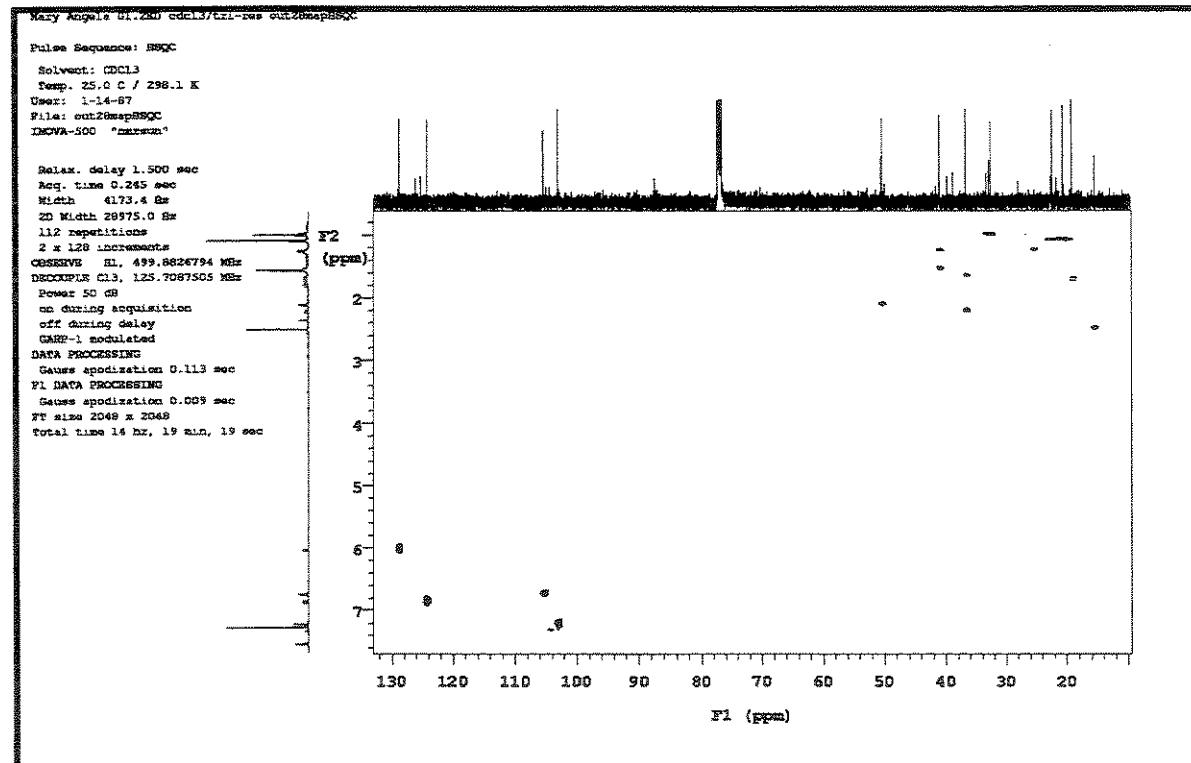
E69: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 23.



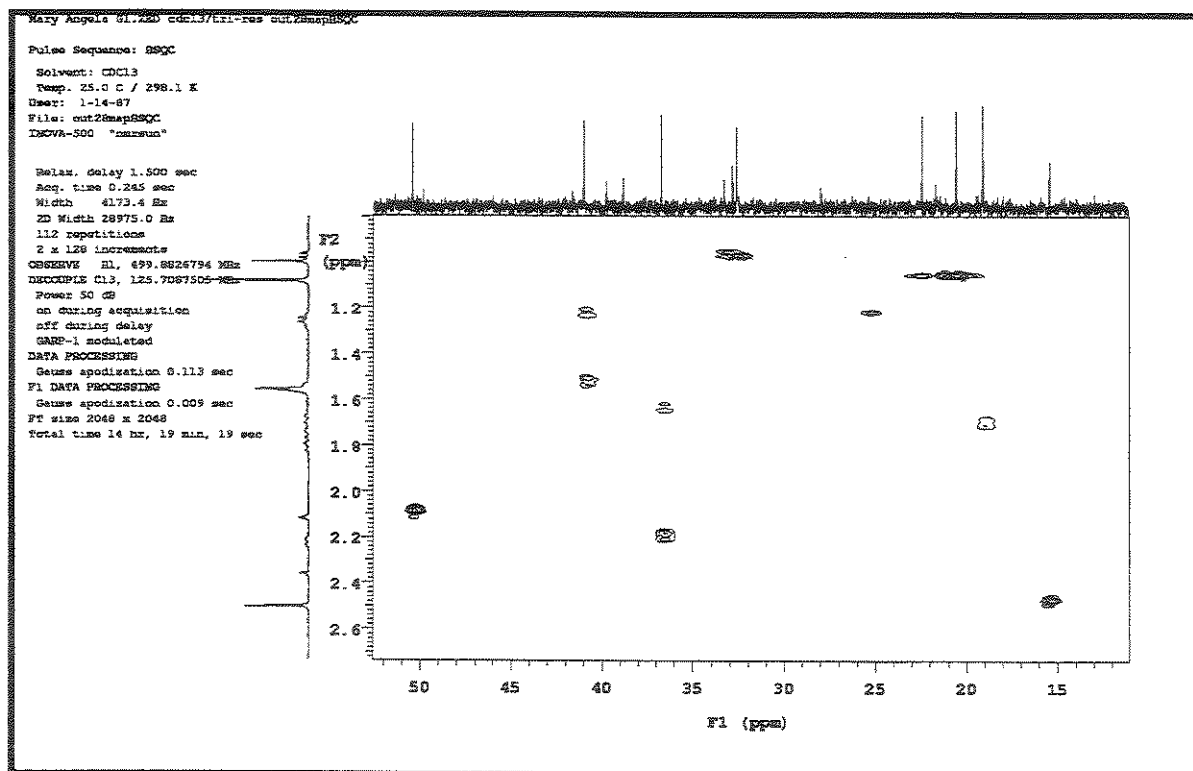
E70: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl_3) da substância 23.



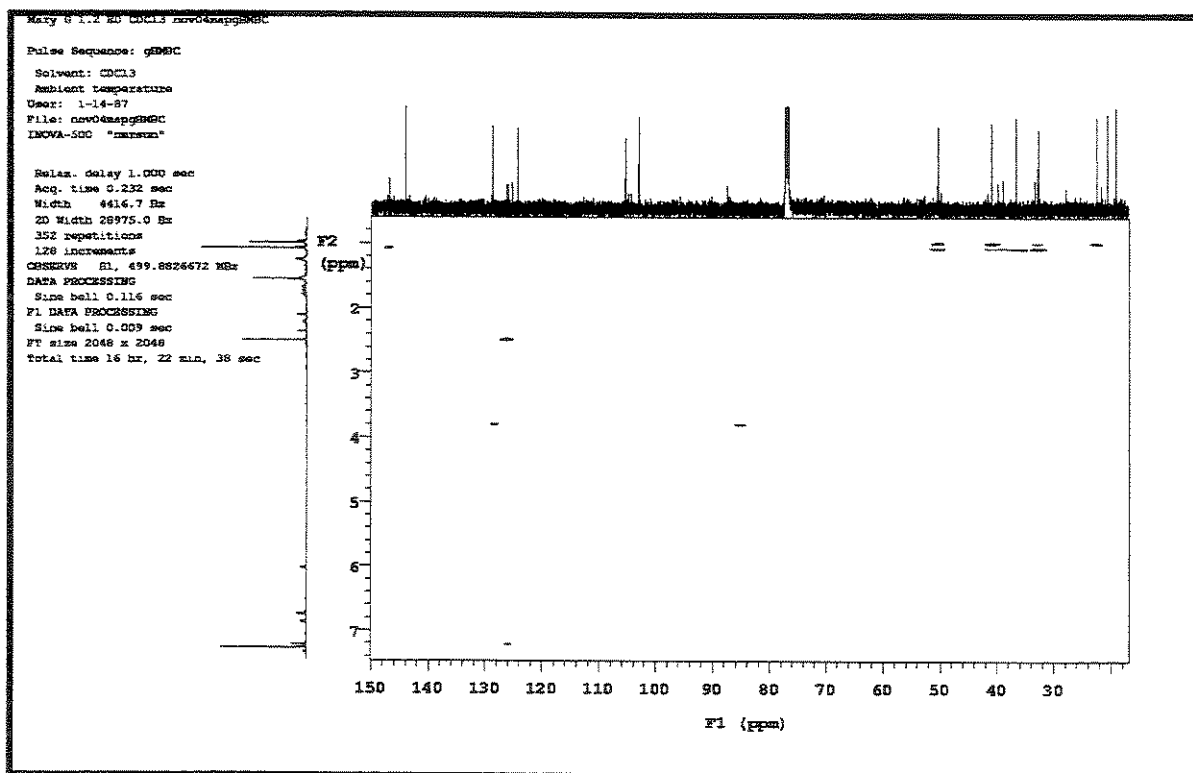
E73: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl₃) da substância 23.



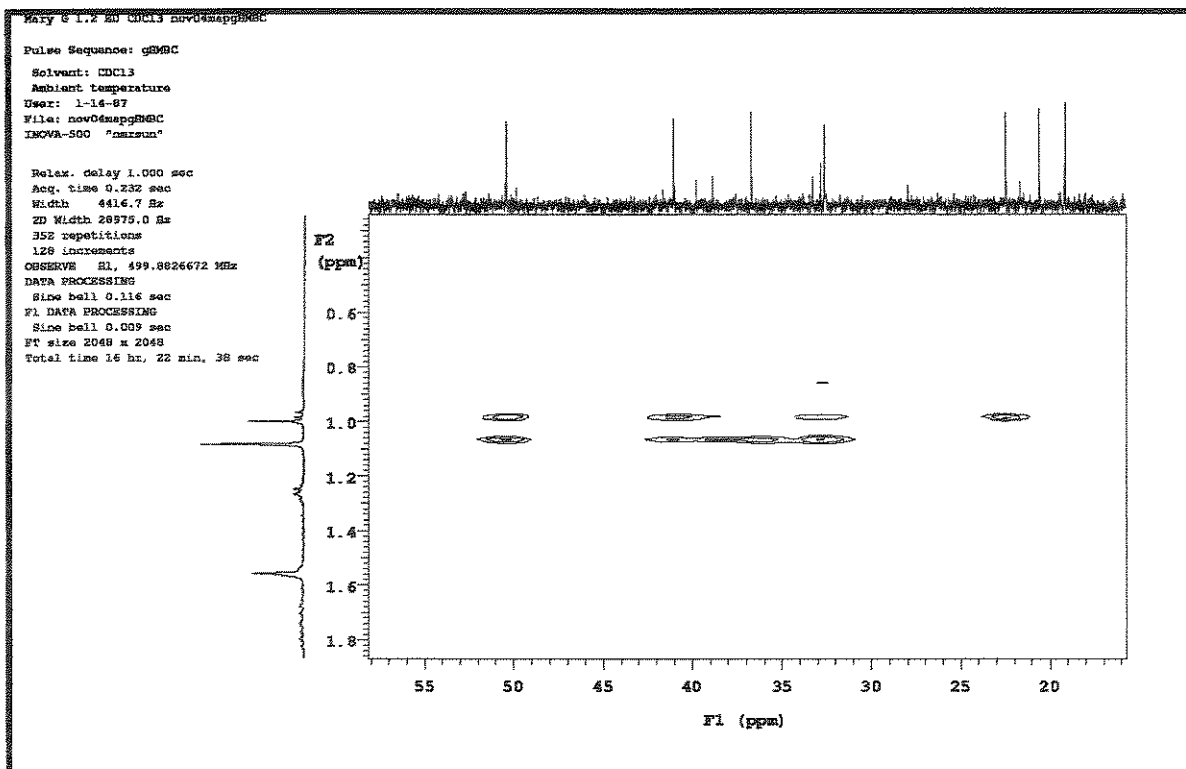
E74: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 23.



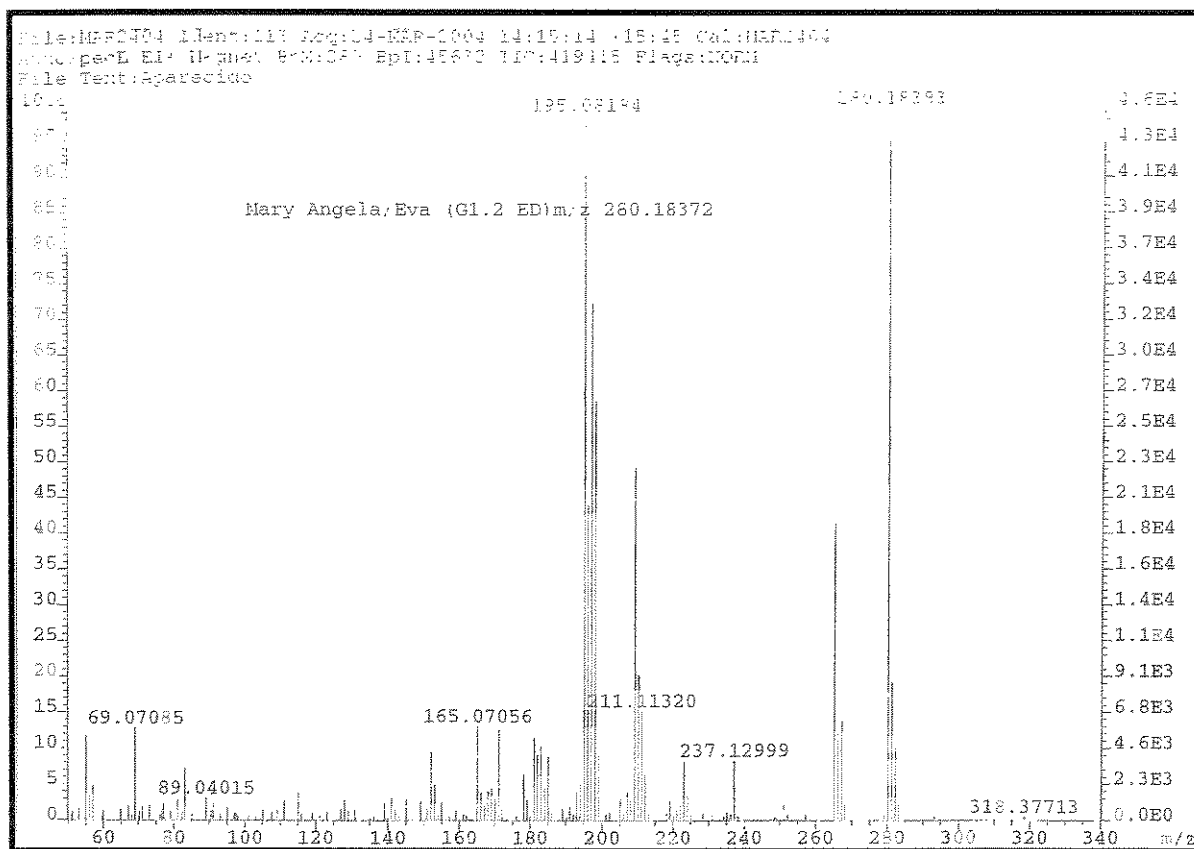
E75: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 23.



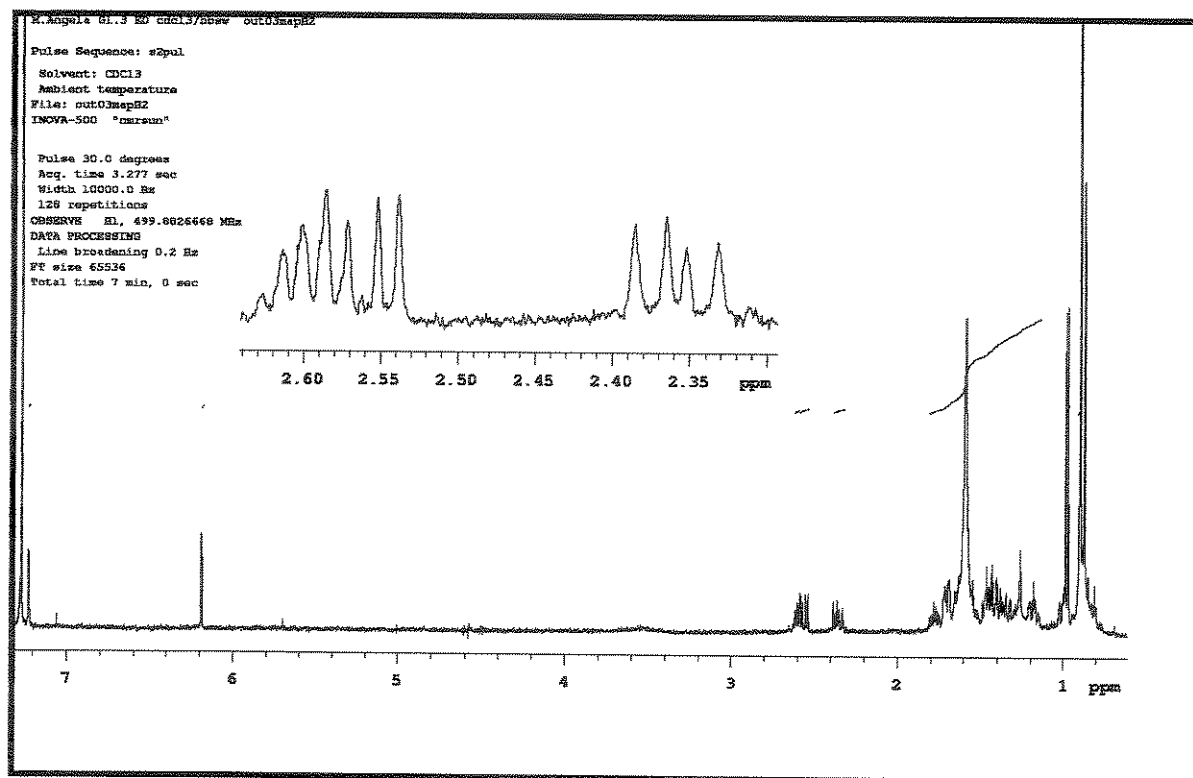
E76: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 23.



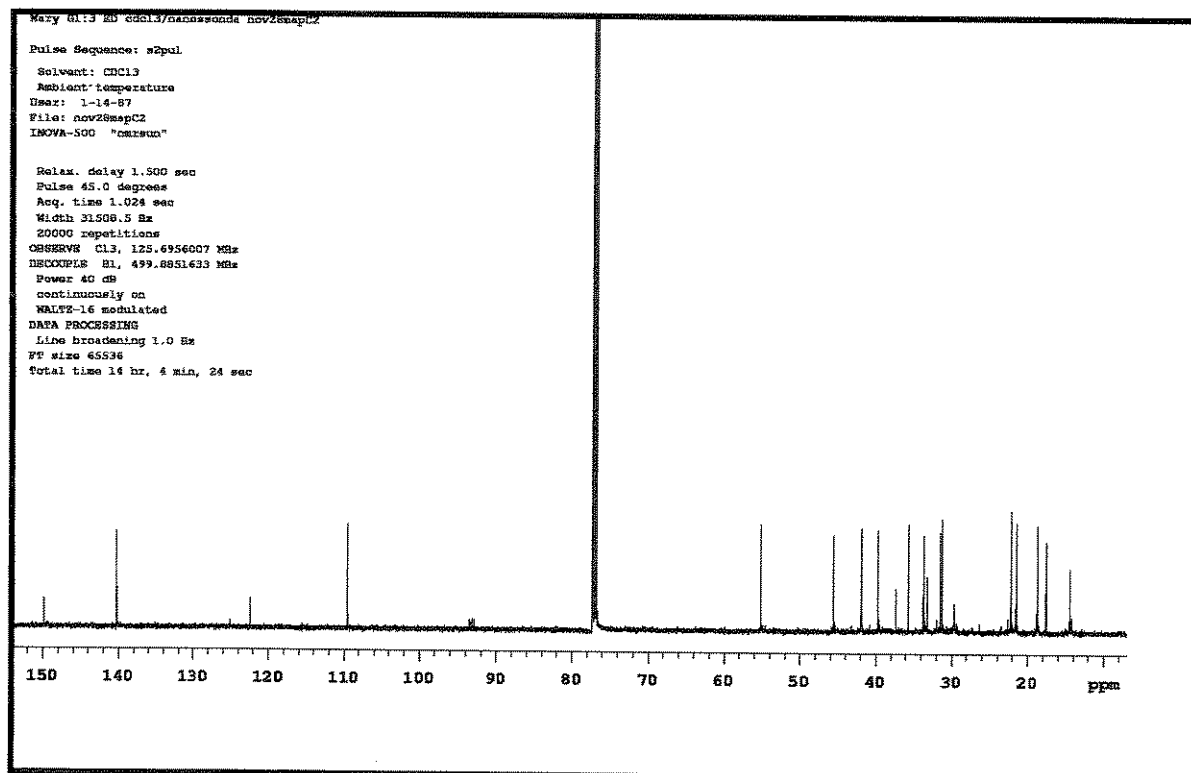
E77: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 23.



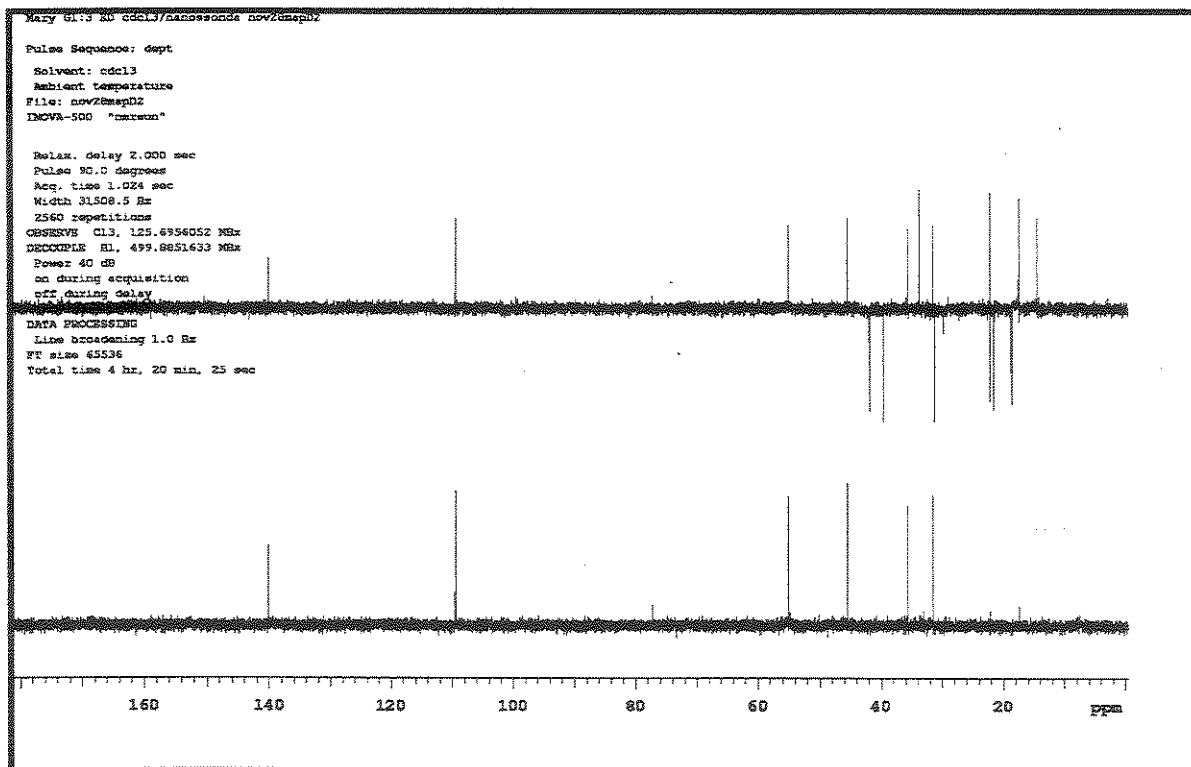
E78: Espectro de massas de alta resolução (IE, 70eV) da substância 23.



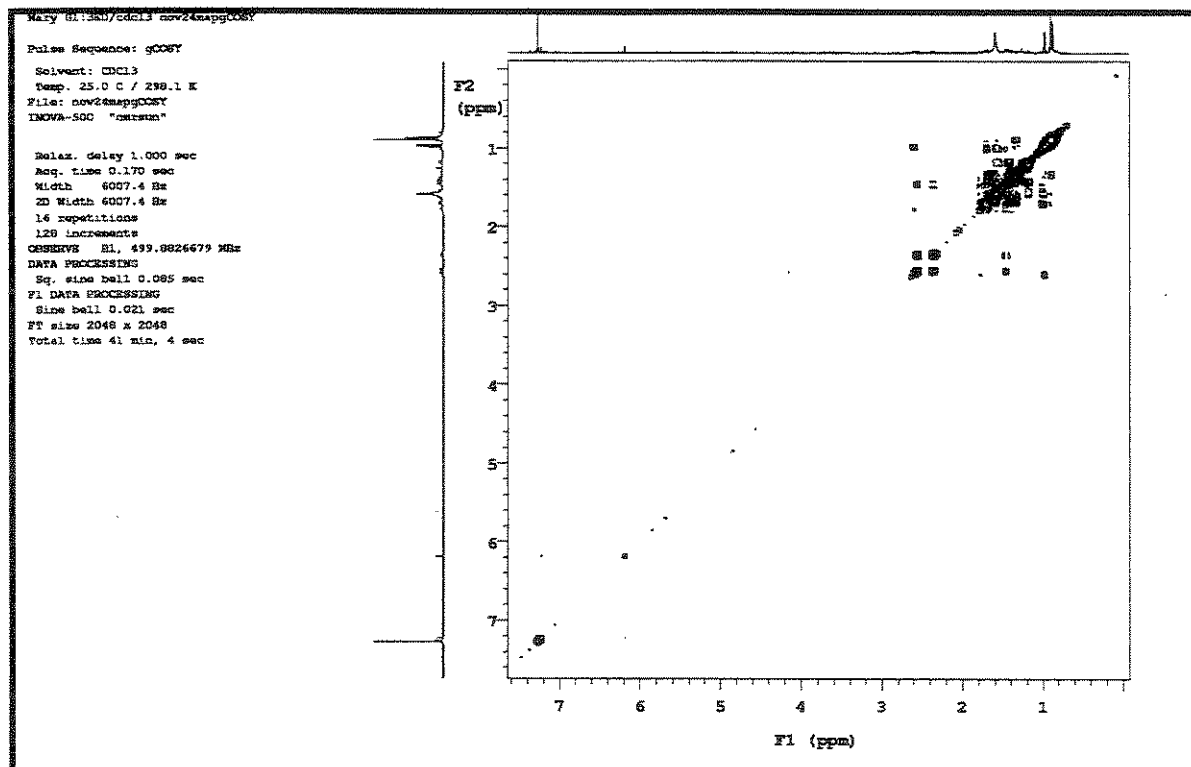
E79: Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) da substância 24.



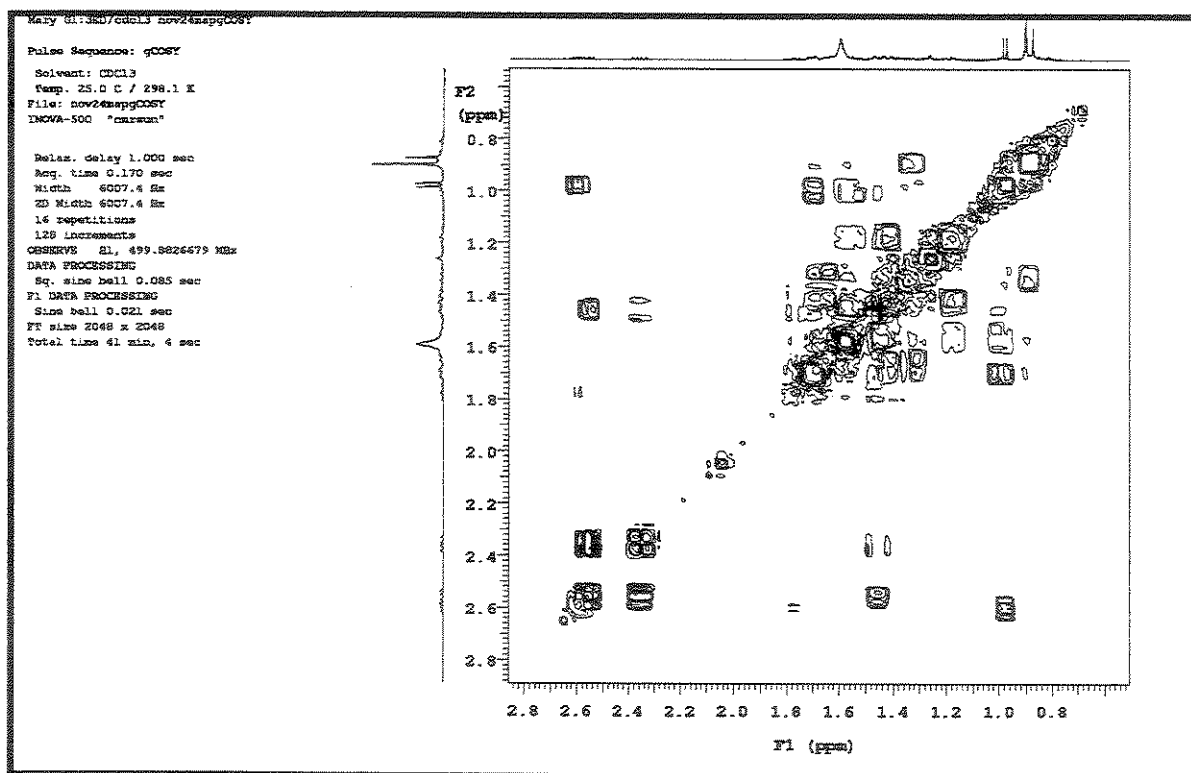
E80: Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da substância 24.



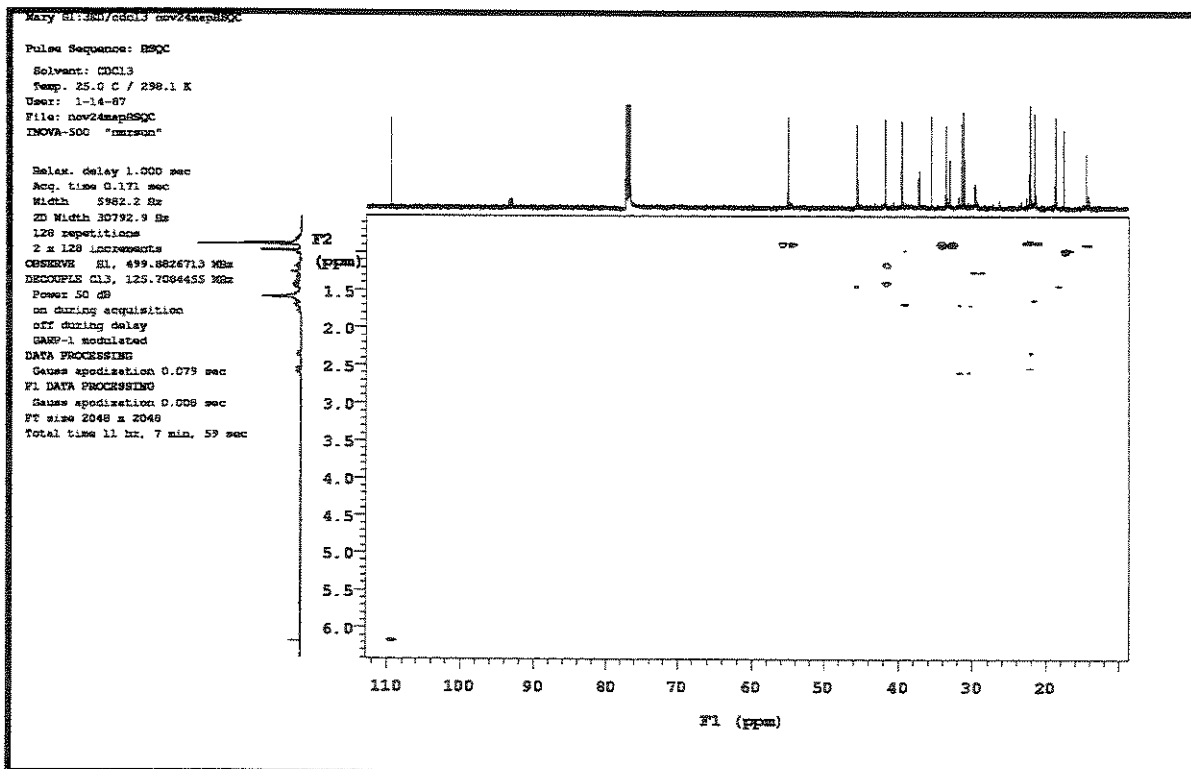
E81: Experimento DEPT 90° e 135° (125MHz, CDCl₃) da substância 24.



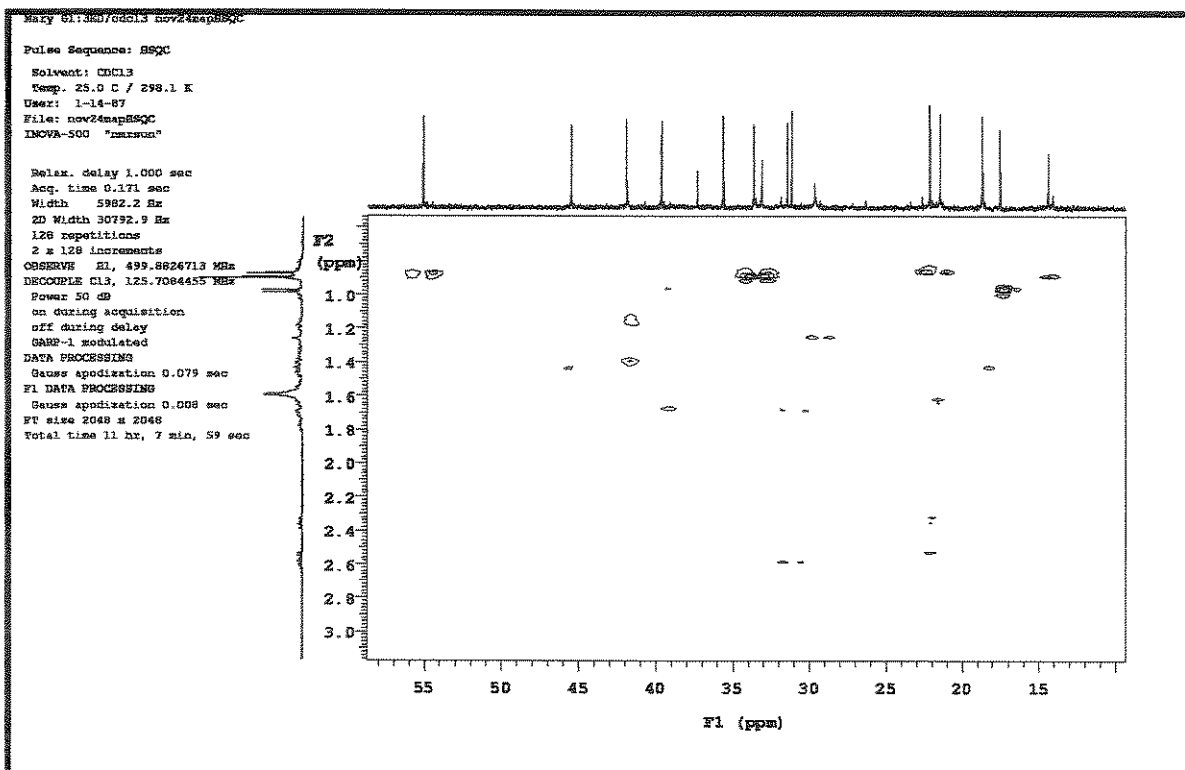
E82: Mapa de contorno de RMN-2D (¹H, ¹H-gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl₃) da substância 24.



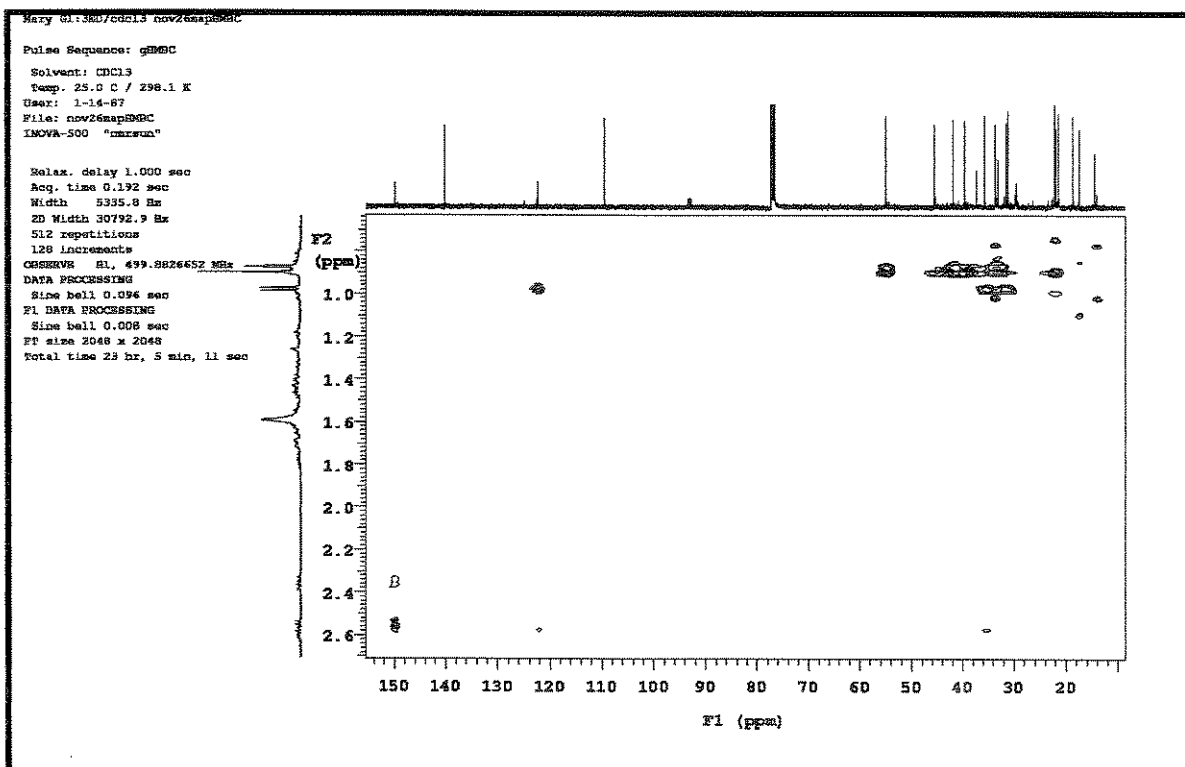
E83: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^1H -gCOSY) (H 500Mz, H 500Mz, CDCl_3) da substância 24.



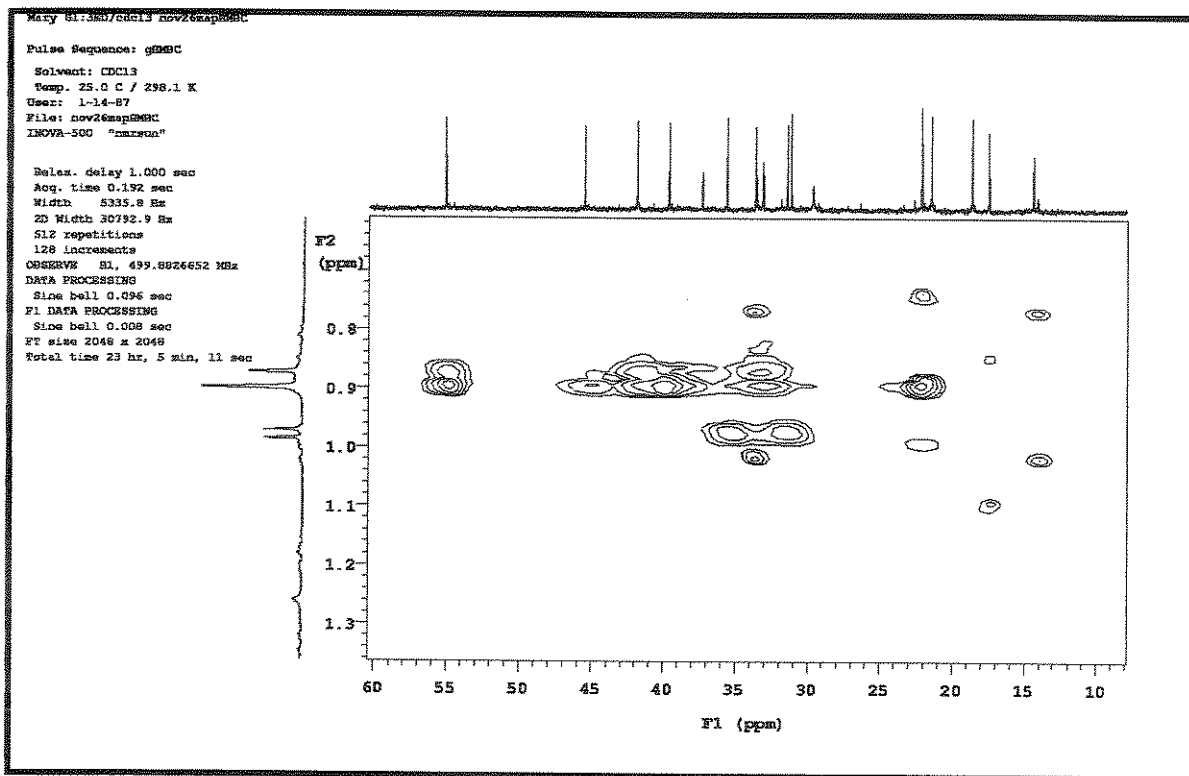
E84: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 24.



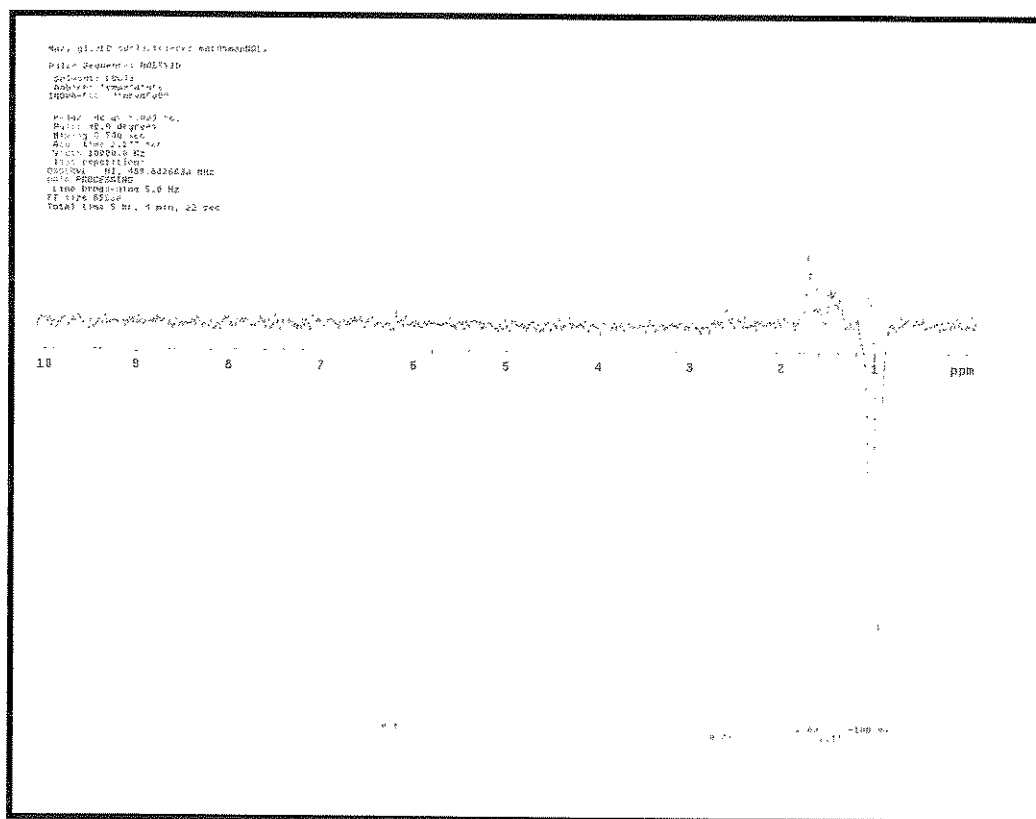
E85: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 24.



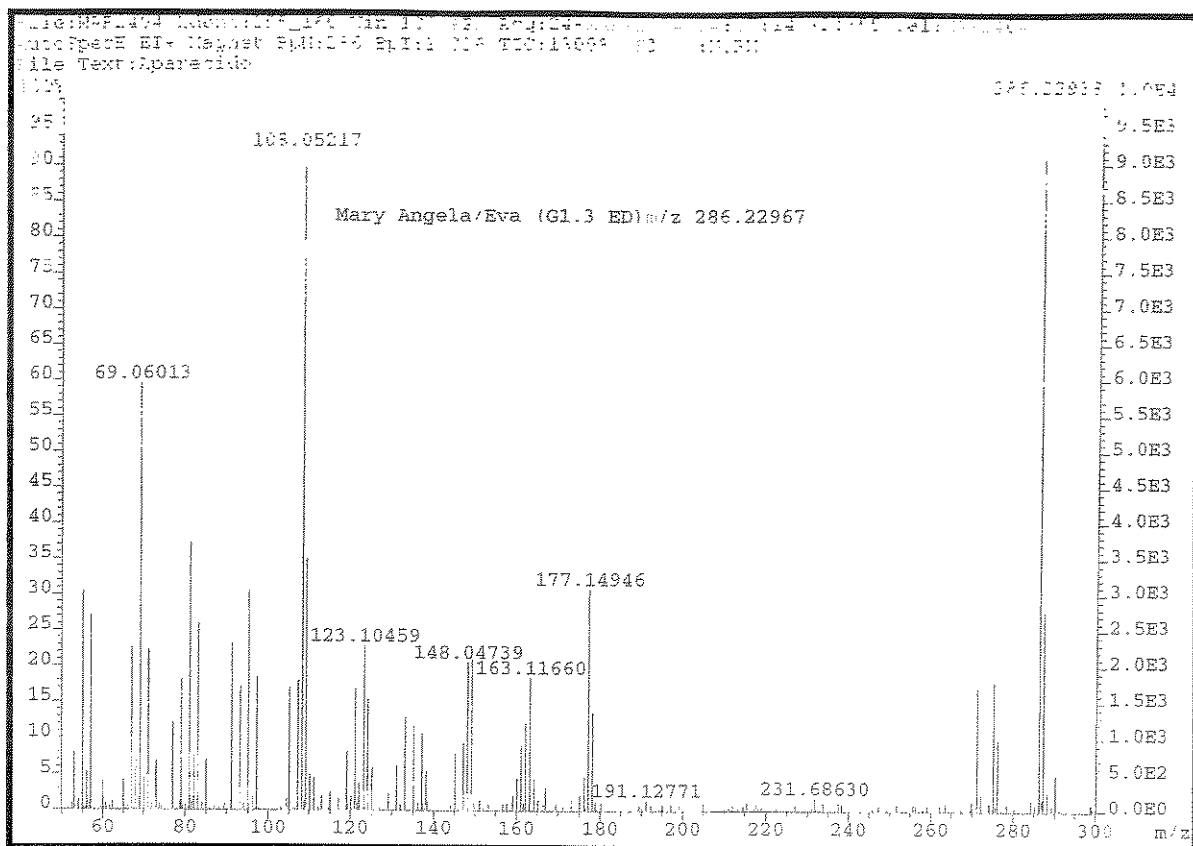
E86: Mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl₃) da substância 24.



E87: Expansão do mapa de contorno de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HMBC) (H 500Mz, C 125Mz, CDCl_3) da substância 24.



E88: Experimento de NOESY 1D (500MHz, CDCl_3 , δ 0.98) da substância 24.



Capítulo II – Atividade Biológica



1 Introdução

O potencial das plantas como fonte de novas drogas ainda oferece grande campo para investigação científica uma vez que das cerca de 250 000 a 500 000 espécies conhecidas, uma pequena porcentagem já foi investigada fitoquimicamente e apenas uma fração destas já foi avaliada quanto ao potencial farmacológico¹.

A descoberta de novas drogas para o tratamento do câncer representa uma grande necessidade da humanidade e as substâncias de origem vegetal constituem uma rica fonte para o desenvolvimento de novos princípios ativos mais eficientes no tratamento de neoplasias^{2, 3}. Como por exemplo, o isolamento do paclitaxel (taxol) da casca do teixo (*Taxus brevifolia*) em 1971, cujos estudos clínicos iniciais revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário resistentes à terapia tradicional; porém a introdução desta droga na terapêutica só foi possível quando estudos de quimiotaxonomia mostraram que as folhas de *Taxus baccata* eram ricas em 10-deacetil-baccatina III, um intermediário-chave para a semi-síntese do paclitaxel bem como do derivado docetaxel, permitindo assim a obtenção de quantidades suficientes para a aplicação terapêutica^{4, 5}.

¹Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613, 2001.

²Wu JH, Morris-Natschke SL, Lee KH. Progress in the recent discovery and development of promising anticancer and anti-HIV agents from natural products in the United States. *J Chin Chem Soc* 50, 11-22, 2003

³Ravelo AG, Estevez-Braun A, Chavez-Orellana H, Perez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem* 4, 214-265, 2004.

⁴Harborne JB. Arsenal for survival: secondary plant products. *Taxon* 49, 435-449, 2000.

⁵Barreiro EJ. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais In: Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna, Argos Editora Universitária, Cap. 6, p. 246, 2001.

Sabe-se que muitos derivados de diterpenos possuem propriedades biológicas como anti-inflamatórias e analgésicas⁶, reguladores de crescimento de plantas⁷, anticancerígenos^{8, 9, 10}, cardioativos¹¹, bactericidas¹¹, antivirais^{9, 12, 13}, antitripanomicidas¹⁴ entre outros. Assim, para avaliar a atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas realizou-se os ensaios de letalidade com *Artemia salina* (citotoxicidade), bioautografia (atividade antimicrobiana), concentração inibitória mínima (CIM) e atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais humanas.

⁶Rubinger MMM, Veloso DP, Stefani GMS. Synthesis of 6 α ,7 β -di-hydroxyvouacapan-17 β -oic acid derivatives. Parte I: Hydroxamic acid and amide derivatives. *J Braz Chem Soc* 2, 124-128, 1991.

⁷Demuner AJ, Barbosa LCA. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. *J Nat Prod* 59, 770-772, 1996.

⁸Patil AD, Freyer AJ, Webb RL, Zuber G, Reichwein R, Bean MF, Faucette L, Johnson RK. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. *Tetrahedron* 53, 1583-1592, 1997.

⁹Betancur-Galvis L, Zuluaga C, Arnó M, Gonzáles MA, Zaragoza R. Citotoxic effect (on tumor cells) and in vitro antiviral activity against herpes simplex virus of synthetic spongiane diterpenes. *J Nat Prod*, 65, 189-192, 2002.

¹⁰McPherson DD, Che C, Cordell GA, Soejarto DD, Pezzuto, JM, Fong HHS. Diterpenoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry* 25, 167-170, 1986.

¹¹Ulubelen A. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry* 64, 395-399, 2003.

¹²Jiang R-W, Ma S-C, But PP-H, Mak TCW. New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*. *J Nat Prod* 64, 1266-1272, 2001.

¹³Jiang R-W, But PP-H, Ma S-C, Ye W-C, Chan S-P, Mak TCW. Struture and antiviral properties of macroesalmim, a novel cassane furanoditerpenoid lactone from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. *Tetrahedron Lett* 43, 2415-2418, 2002.

¹⁴Mendoza DT, González LDU, Orterga-Barria E, Capson TL, Rios LC. Five new cassane diterpenes from *Myrospermum frutescens* with activity against *Trypanosoma cruzi*. *J Nat Prod* 66, 928-932, 2003.

2 Materiais e Métodos

2.1 Letalidade com *Artemia salina*

O ensaio de avaliação da toxicidade foi realizado segundo a metodologia descrita por McLaughlin e colaboradores¹⁵.

Neste ensaio, os ovos de *Artemia salina* foram colocados numa solução de sal marinho (38 g L⁻¹), protegidos da luz durante 48 horas para a eclosão dos mesmos em larvas do tipo *nauplii*.

As amostras utilizadas no ensaio de letalidade contra *Artemia salina* foram os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das cascas das raízes de *M. frondosus*. As amostras foram feitas em triplicatas em frascos de penicilina, dissolvidas em solventes apropriados nas concentrações de 1000, 100 e 10 µg mL⁻¹ para os extratos hexânico e metanólico e nas concentrações de 100, 50 e 25 µg mL⁻¹ para o extrato diclorometânico. A cafeína foi utilizada como controle positivo neste ensaio, sendo as concentrações utilizadas de 1000, 100 e 10 µg mL⁻¹ (306 µg mL⁻¹)¹⁶.

Após total evaporação dos solventes, cada um dos nove frascos recebeu uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), 3 mL de solução de sal marinho (38 g L⁻¹), 10 larvas de *Artemia salina* e o volume foi ajustado para 5 mL. Os frascos foram deixados em repouso e descobertos. Após 24 horas foi efetuada a contagem das larvas sobreviventes.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Probit¹⁷ e calculadas a CL₅₀ dos extratos.

¹⁵McLaughlin JL, Saizarbitoria TC, Anderson JE. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Rev Soc Venez Quim* 18, 13-18, 1995.

¹⁶Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med* 45, 31-34, 1982.

¹⁷Haddad ML, de Moraes RCB. Modelos bioestatísticos aplicados à entomologia - MOBAE – Análise de Probit. Aplicativo desenvolvido no Departamento de Entomologia – ESALQ/USP, 1996.

2.2 Bioautografia

Os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das cascas das raízes de *M. frondosus*, assim como as substâncias **18**, **19** e **21** foram submetidas ao ensaio de bioautografia segundo metodologia de Saxena¹⁸ com algumas modificações por Magalhães e colaboradores¹⁹.

O ensaio de bioautografia resumiu-se na preparação de duas placas de CCDA contendo quatro pontos, sendo um para o antibiótico padrão (10 µg de ciclopirox olamina para fungos e a mesma quantidade de cloranfenicol para bactérias) e os outros três para as amostras em análise (20 µg). Após, a aplicação das amostras e desenvolvimento da placa em fase móvel adequada, seguida de total evaporação do solvente aplicou-se o antibiótico padrão. A seguir, uma das placas foi colocada no fundo de uma placa de Petri, sobre a qual verteu-se o meio de cultura adequado e a outra ficou reservada como placa testemunha para posterior comparação. Após solidificação e resfriamento do meio de cultura, fez-se a inoculação do microorganismo (100µL, suspensão a 10⁶ NMP de células mL⁻¹) utilizando-se uma alça de Drigalski. Uma placa de Petri contendo apenas o meio de cultura e o microorganismo foi utilizada como controle. Depois do período de incubação adequado, verificou-se a formação de halos de inibição de crescimento e assim procedeu-se a revelação da placa de CCDA testemunha.

Os microorganismos foram fornecidos pela Coleção de Cultura Tropical (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”.

Dentre os microorganismos testados encontram-se seis bactérias (*Staphylococcus aureus* CCT 4295, *Escherichia coli* CCT 5050, *Bacillus subtilis* CCT 0089, *Salmonella tiphyrumium* CCT 0528, *Micrococcus luteus* CCT 2720, *Streptococcus mutans* CCT 3440), sete fungos do tipo filamentosos (*Cladosporium*

¹⁸Saxena G, Farmer S, Towers GHN, Hancock, REW. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochem Anal* 6, 125-129, 1995.

¹⁹Magalhães AF, Tozzi AMGA, Magalhães EG, Nogueira MA, Roncancio VJF. Ensayos biológicos con extractos obtenidos de raíces de *Lonchocarpus latifolius* (WILLD) D. C. Y. de un nuevo dibenzoilmetano aislado. *Rev Ceres* 45, 351-358, 1998.

cladosporioides CCT 5039, *Aspergillus niger* CCT 1435, *Penicillium funiculosum* CCT 0490, *Fusarium oxysporum* CCT 3244, *Alternaria alternata* CCT 1250, *Rhizopus oryzae* CCT 4964, *Aspergillus fumigatus* CCT 01277) e um fungo do tipo levedura (*Candida albicans* CCT 0776).

Os meios de cultura utilizados foram NA (Ágar Nutriente) para bactérias e MA (Malte Ágar) para fungos. O NA foi constituído de 5,0 g de peptona, 3,0 g de extrato de carne, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada, enquanto que MA foi constituído de 20,0 g de extrato de malte, 20,0 g de ágar e 1000 mL água destilada.

Os fungos foram incubados durante 2 a 3 dias, a 27 °C, exceto para *C. albicans* que exigiu 24 h a 37 °C, já as bactérias foram incubadas pelo período de 24 h a 37 °C.

2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado segundo adaptação da metodologia proposta por Bicalho e colaboradores²⁰.

As substâncias testadas (**19** e **21**) foram dissolvidas em 20% de DMSO e 80% de água destilada. Primeiramente a todos os poços da microplaca foram adicionados 100 µL do meio de cultura [Müller Hinton (DIFCOS) 21 g L⁻¹ para bactéria e Extrato Malte (OXOID) 20 g L⁻¹ para fungos]. Em seguida, 100 µL das soluções das substâncias foram adicionadas e diluídas em série (8 diluições), onde as concentrações das substâncias foram avaliadas de 7,81 µg mL⁻¹ a 1000 µg mL⁻¹. Após, acrescentou-se 100 µL da suspensão do microrganismo (10⁸ NMP de célula mL⁻¹) aos poços.

Nesta análise, o controle negativo foi preparado utilizando-se o meio de cultura, DMSO e o microrganismo, enquanto o controle positivo foi preparado com o meio de cultura, DMSO, microrganismo e cloranfenicol (bactéria) ou ciclopirox

²⁰Bicalho B, Gonçalves RA, Zibordi AP, Manfio GP, Marsaioli AJ. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* ssp. (Clusiaceae) pollinating bees. *Z Naturforsch C* 58, 746-751, 2003.

olamina (fungos). As microplacas foram incubadas pelo período adequado para o tipo de microrganismo utilizado conforme citado no teste de bioautografia. Os resultados foram observados através da adição de 50 µL do revelador [MTT (0,05%)] a todos os poços da microplaca.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Biocatálise (IQ – UNICAMP) pelas técnicas Juliana Rodriguez e Andréia Bucci sob a supervisão da Sra. Suzan Pantaroto, que é farmacêutica e está desenvolvendo o trabalho da tese de doutorado sob a orientação da Profa. Dra. Anita Marsaioli.

2.4 Atividade Antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa foi testada com os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das cascas das raízes de *M. frondosus* e com a substância **21**, utilizando o ensaio da sulfarrodamina B (SBR)²¹. As oito linhagens de células tumorais humanas utilizadas, com seus respectivos códigos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens de células tumorais humanas utilizadas no ensaio da atividade antiproliferativa.

Tipo celular	Código
Cólon	HT.29
Pulmão	NCI.460
Mama	MCF.7
Mama	NCI.ADR*
Rim	C786.0
Melanoma	UACC.62
Ovário	OVCAR
Próstata	PCO.3

* linhagem celular resistente a drogas padrões

²¹Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer I* 82, 1107-1112, 1990.

Estas linhagens foram cedidas pelo NCI (National Cancer Institute) e mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm³ (Nunc®), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Basicamente o ensaio de atividade antiproliferativa consistiu em inocular 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc®), de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3x10⁴ e 6,5x10⁴ células/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 50 µg mL⁻¹ de gentamicina (Schering Plus®). Após 24 h de incubação a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100 µL/compartimento do extrato ou substância testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹). Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina nas mesmas concentrações das amostras em teste.

Ao final de 48 h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido trifluoracético (TCA) a 50% e as placas foram incubadas por 1 h a 4 °C. Após esse período, quatro lavagens consecutivas com água destilada foram realizadas para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50 µL/compartimento com SRB 0,4% dissolvido em ácido acético 1% e mantidas por 30 minutos a 4 °C; em seguida, foram lavadas com ácido acético 1 % (4x) e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base [(Sigma®), 10 µM, pH 10,5] por 5 minutos em ultrasson. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada por leitor de elisa em $\lambda = 540$ nm no instrumento Labsystems Multiskan MCC/340.

Na análise dos resultados foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através da fórmula abaixo, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada. Os resultados obtidos foram analisados, considerando-se:

Se $T > C$, existiu estimulação do crescimento celular

Se $T \geq T_0$, mas $< C$, existiu uma atividade citostática e a fórmula utilizada será $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

Se $T < T_0$, existiu atividade citocida e a fórmula utilizada será $100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$

Onde, T é a média da absorbância da célula tratada, C é o controle de célula e T_0 é o controle das células no dia da adição. Finalmente, também é possível subtrair o resultado obtido de 100%, obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento (IC). As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente.

Este ensaio foi realizado no laboratório de pesquisa do Dr. João Ernesto de Carvalho, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA – Unicamp), pela sua aluna de doutoramento Carina Denny.

3 Resultados e Discussão

3.1 Letalidade com *Artemia salina*

O resultado positivo deste ensaio indica potencial atividade de compostos bioativos em extratos vegetais, sendo essa atividade correlacionada com atividade antitumoral e/ou inseticida^{15, 16}.

Após análise estatística dos dados, as concentrações letais (CL_{50}) dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das cascas das raízes de *M. frondosus* foram respectivamente $25,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $14,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $42,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses valores são considerados ativos, uma vez que encontram-se dentro da faixa de interesse ($CL_{50} \leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2 Bioautografia

O extrato hexânico foi o único extrato que apresentou atividade antimicrobiana, mas somente contra os fungos *Rhizopus oryzae* CCT 4964 e

Alternaria alternata CCT 1250, enquanto o diterpeno **19** mostrou-se ativo somente contra as bactérias *Bacillus subtilis* CCT 0089 e *Staphylococcus aureus* CCT 4295 (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados obtidos no teste de bioautografia dos extratos e algumas substâncias frente aos microrganismos analisados.

Microrganismos testados	EH	ED	EM	18	19	21
<i>Staphylococcus aureus</i> CCT 4295	-	-	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> CCT 5050	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CCT 0528	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2720	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> CCT 3440	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> CCT 5039	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium funiculosum</i> CCT 0490	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> CCT 3244	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> CCT 1250	+	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus orizae</i> CCT 4964	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> CCT 01277	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> CCT 0776	-	-	-	-	-	-

EH = Extrato Hexânico de *M. frondosus*

ED = Extrato Diclorometânico de *M. frondosus*

EM = Extrato Metanólico de *M. frondosus*

(+) presença de um halo de inibição

(-) ausência de um halo de inibição

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A substância **19** foi submetida ao ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando novamente as linhagens de bactéria (*Bacillus subtilis* CCT 0089 e *Staphylococcus aureus* CCT 4295), contra as quais apresentou um halo de inibição no teste de bioautografia.

Já a substância **21**, que corresponde ao diterpeno mais abundante no extrato foi submetida ao ensaio CIM com quatro microrganismos [*Escherichia coli* CCT 5050 (bactéria gram-negativa), *Staphylococcus aureus* CCT 4295 (bactéria gram-positiva), *Aspergillus niger* CCT 1435 (fungo do tipo filamentoso) e *Candida albicans* CCT 0776 (fungo do tipo levedura)]. Isto porque a ausência de halo de

inibição no ensaio de bioautografia pode ser decorrente da baixa difusibilidade da substância no ágar, assim procedeu-se o protocolo padrão de CIM para escolha dos microrganismos a serem testados.

As concentrações das substâncias **19** e **21** utilizadas na CIM foram: 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A substância **19** mostrou-se ativa frente aos dois microrganismos empregados (CIM = 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), já **21** foi inativa com os quatro microrganismos testados, confirmando o resultado obtido no ensaio de bioautografia. Neste teste, são consideradas ativas as substâncias com CIM $\leq$ 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4 Atividade Antiproliferativa

As Figuras 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente as curvas de concentração-resposta dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das cascas das raízes de *M. frondosus* e da substância **21** sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento das células e a concentração do extrato ou substância utilizada.

É importante mencionar que nos gráficos a seguir a atividade citostática é considerada onde se observa a porcentagem de crescimento entre 0 e 50 e a atividade citocida entre 0 e -100.

Pelo gráfico (Figura 1) verifica-se que o extrato hexânico apresentou atividade antiproliferativa, diretamente relacionada à concentração (concentração dependente) com efeito citostático e citocida para todas as linhagens, apresentando maior potência para as linhagens de OVCAR (ovário), UACC.62 (melanoma) e PCO.3 (próstata).

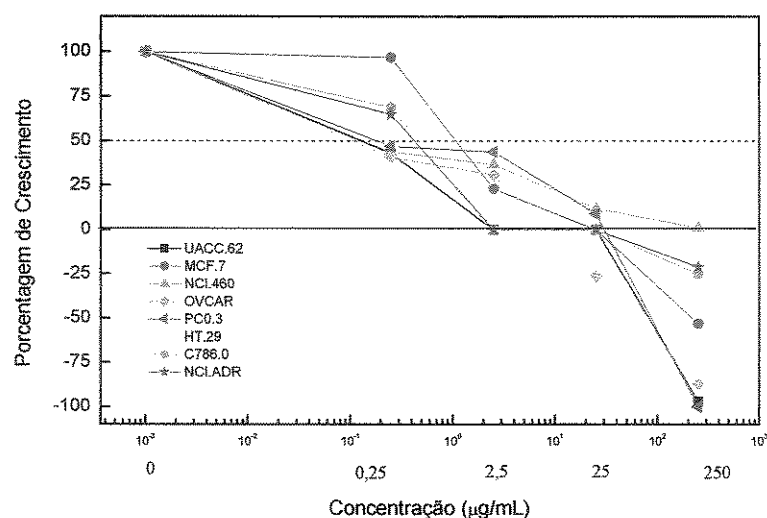


Figura 1: Atividade do extrato hexânico de *M. frondosus* sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

Analogamente, o extrato diclorometânico (Figura 2) demonstrou atividade antiproliferativa, diretamente relacionada à concentração (concentração dependente) com efeito citostático e citocida, apresentando maior potência para as linhagens OVCAR (ovário), PCO.3 (próstata), C786.0 (rim), NCI.460 (pulmão) e UACC.62 (melanoma).

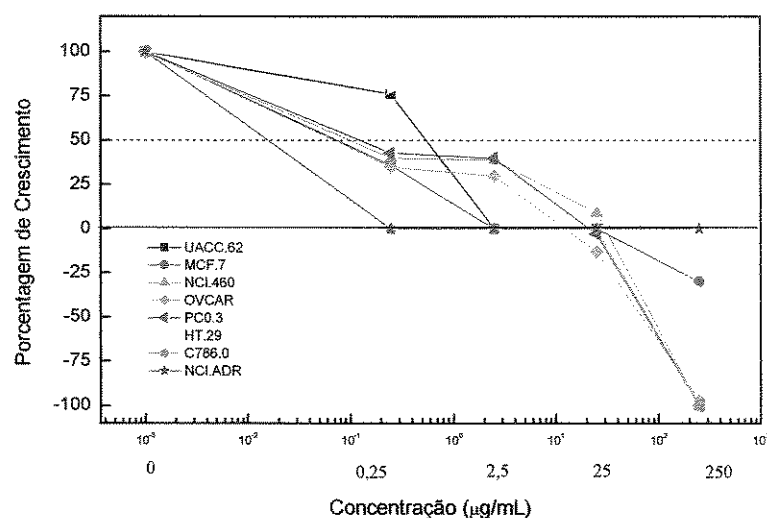


Figura 2: Atividade do extrato diclorometânico de *M. frondosus* sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

No gráfico do extrato metanólico (Figura 3) observa-se atividade antiproliferativa, com efeito citostático sobre todas as linhagens e efeito citocida somente para OVCA (ovário).

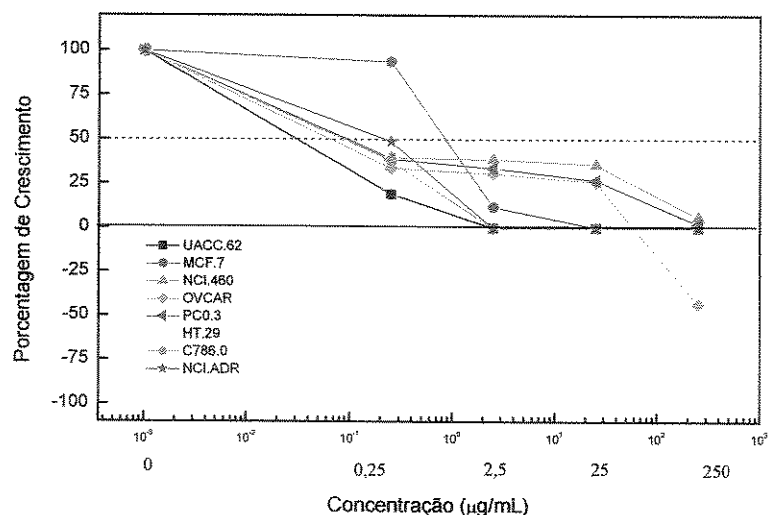


Figura 3: Atividade do extrato metanólico de *M. frondosus* sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

O gráfico da substância 21 (Figura 4) indica que a mesma apresentou atividade antiproliferativa com efeito citostático sobre todas as linhagens e citocida para a linhagem HT.29 (cólon).

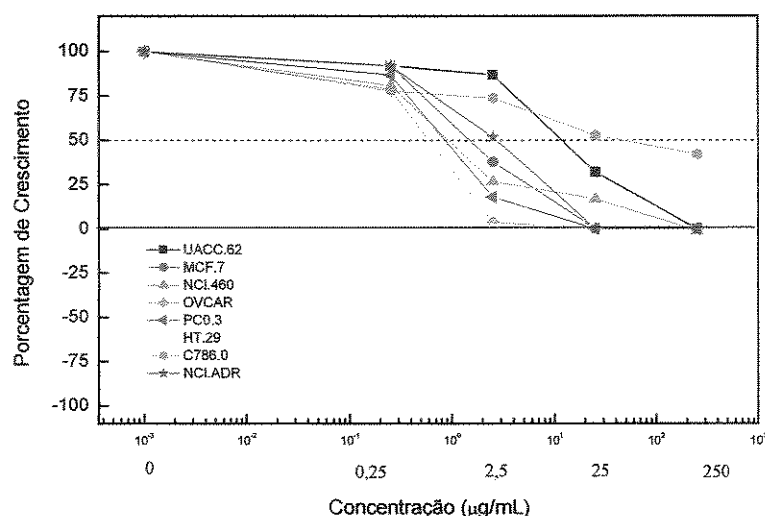


Figura 4: Atividade da substância **21** sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

A Tabela 3 contém os valores de CI_{50} que é a concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mínima necessária para inibir 50% do crescimento das células tumorais. Nela encontram-se os valores obtidos para os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico de *M. frondosus*, substância **21** e doxorrubicina (controle positivo) frente às linhagens de células tumorais humanas.

Comparando-se os valores de CI_{50} para as linhagens UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), C786.0 (rim) e NCI.ADR (mama resistente) verificou-se que o extrato metanólico é mais ativo que a doxorrubicina, enquanto que o extrato hexânico também se mostrou ativo frente à linhagem NCI.ADR (mama resistente).

A substância **21** mostrou atividade frente às linhagens OVCAR (ovário) e PCO.3 (próstata), sendo cerca de 1000 vezes e 60 vezes respectivamente mais ativa que a doxorrubicina, enquanto que para a linhagem NCI.460 (pulmão), a atividade mostrou-se equivalente ao controle positivo.

Tabela 3: CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) obtidos para os extratos de *M. frondosus*, substância 21 e doxorubicina frente às linhagens de células tumorais humanas.

Linhagens de células tumorais	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	EH	ED	EM	<u>21</u>	Doxorrubicina
UACC.62	NC	NC	0,001	16,5	1,5
MCF.7	2,0	1,2	0,1	1,4	0,3
NCI.460	10,3	151,1	1931	0,7	0,6
OVCAR	27,7	59,1	NC	0,001	1,1
PCO.3	113,6	73,8	86,3	0,4	24,3
HT.29	30,7	74,8	NC	12,8	2,7
C786.0	0,3	NC	0,001	13,4	0,002
NCI.ADR	0,2	NC	0,001	2,7	0,4

NC = são valores que não puderam ser determinados

EH = Extrato Hexânico de *M. frondosus*

ED = Extrato Diclorometânico de *M. frondosus*

EM = Extrato Metanólico de *M. frondosus*

Considerações Finais



Este trabalho consiste no primeiro relato da ocorrência de diterpenos no gênero *Myrocarpus*.

A semelhança estrutural dos diterpenos isolados da espécie *Myrocarpus frondosus* pertencentes à tribo Sophoreae e os das espécies da tribo Dipterygeae coincide com os dados de filogenia recentemente obtidos que levaram a elaboração de um cladograma, onde as duas tribos encontram-se muito próximas e derivam da mesma chave.

Segundo a literatura, vários diterpenos naturais pertencentes à classe dos abietanos e/ou cassanos possuem atividade biológica, tal como verificado para alguns dos diterpenos que foram isolados de *M. frondosus* ao longo do trabalho cujos resultados encontram-se descritos nesta tese.

As análises dos espectros de massas e alta resolução incluindo os experimentos de EM/EM mostraram que diterpenos com a mesma fórmula molecular possuem rotas de fragmentação diferentes, tal como do diterpeno **19**, cujo regioisômero com a hidroxila na posição 5α havia sido anteriormente isolado¹. Neste sentido, a análise dos espectros de **19** revelou que após a molécula perder um radical metila e uma molécula de água a fragmentação segue a proposta de Enzell² para os derivados do ferruginol observado-se os picos referentes aos íons **a**, **b**, **c** e **d**, enquanto o espectro do regioisômero contendo a hidroxila em 5α mostra apenas o pico referente ao íon **a**. Este dado ilustra a importância de se conhecer a rota de fragmentação de metabólitos secundários isoméricos em espectrometria de massas, já que mesmo na ausência de padrões é possível detectar qual isômero encontra-se presente na análise de uma mistura através de CLAE/EM ou CG/EM. A literatura recente entretanto não apresenta tais considerações.

¹McPherson DD, Che C, Cordell GA, Soejarto DD, Pezzuto, JM, Fong HHS. Diterpenoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry* 25, 167-170, 1986.

²Enzell CR, Wahlberg I. Mass Spectrometric Studies of Diterpenes. *Acta Chem Scand* 23, 871-891, 1969.