

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming
(Annonaceae) e avaliações de bioatividades**

Maria Cleonice Bezerra Souza do Nascimento

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CONSTITUINTES BIOORGÂNICOS ISOLADOS DE *ANNONA CACANS*
WARMING (ANNONACEAE) E AVALIAÇÕES DE BIOATIVIDADES**

MARIA CLEONICE BEZERA SOUZA DO NASCIMENTO

Sob a Orientação do Professor
Raimundo Braz-Filho

e Co-orientação do professor
Ivo José Curcino Vieira

e professora
Rosane Nora Castro

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química. Área de Concentração, Química Orgânica - Química de Produtos Naturais.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

547
N244c
T

Nascimento, Maria Cleonice B. S. do, 1948-
Constituintes bioorgânicos isolados de
Annona cacans Warming (Annonaceae) e
avaliações de bioatividades/ Maria
Cleonice Bezerra Souza do Nascimento -
2008.
197f. : il.

Orientador: Raimundo Braz-Filho
Tese (Doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de
Ciências Exatas.
Bibliografia: f. 163-169.

1. Química vegetal - Teses. 2.
Fitoquímicos - Teses. 3. Annonaceae -
Teses. I. Braz-Filho, Raimundo, 1935- .
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Ciências Exatas.
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

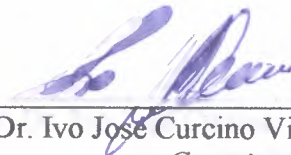
MARIA CLEONICE BEZERRA SOUZA DO NASCIMENTO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química. Área de Concentração, Química Orgânica. (Química dos Produtos Naturais).

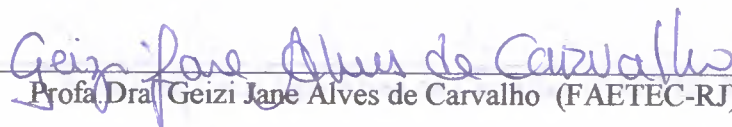
TESE APROVADA 25 / 02 / 2008



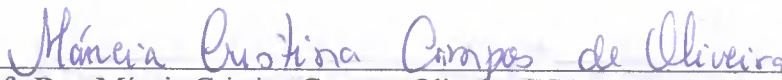
Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho (UFRRJ/ICE/DEQUIM)
Orientador/Presidente



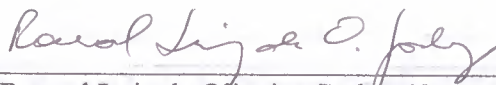
Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira (LCQ-CCT-UENF)
Co-orientador



Profa. Dra. Geizi Jane Alves de Carvalho (FAETEC-RJ)



Profa. Dra. Márcia Cristina Campos Oliveira (ICE-DEQUIM- UFRRJ)



Prof. Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (CTAA-EMBRAPA/RJ)



Profa. Dra. Naomi Kato Simas - NPPN-UFRJ

“Mas, a todos quanto o receberam, deu-lhes o poder de serem feitos filhos de Deus, a saber aos que crêm no seu nome” (Jo. 1:12a)

Dedico este trabalho aqueles á quem muito amo: Primeiro a Deus, ao meu esposo Eliseu as minhas filhas Alice e Regina e os meus netinhos e netinhas (os motivos de muita alegria), ao meu genro Gilson e ao meu filho querido e saudoso, Iran Magno Bezerra Alves (in memorian) e a Simone minha querida nora

AGRADECIMENTOS

-Primeiro ao meu Senhor Jesus Cristo que me deu vida, saúde e força para chegar à conclusão deste trabalho.

-Ao Professor Dr. Raimundo Braz-Filho, pela orientação, amizade, ensinamentos, compreensão e muito encorajamento nos momentos difíceis, atributos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

-Ao Professor Dr. Anselmo Alpandes de Moraes, pela orientação, concessão da planta e por me fazer acreditar na importância do estudo *A. cacans*, pelo grande amigo que foi (*in memoriam*).

-À professora Dra. Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ), pela orientação, correção de tese, amizade, ensinamentos conselhos e ajuda humana nos momentos difíceis o que foi muito importante para conclusão deste trabalho.

-Ao Professor Dr. Ivo José Curcino Vieira (CCT-UENF), pela amizade, orientação e correção de tese que foi de muita ajuda neste trabalho.

-À professora Dra. Leda Mathias pela amizade durante os trabalhos de laboratório realizados na UENF.

-À professora Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, pela amizade, compreensão, ensinamentos e valiosa acolhida no laboratório da UFMG para realização de experimento com CLAE.

-Ao Professor Dr. Mario Geraldo de Carvalho (ICE-UFRRJ) a quem muito estimo por suas boas palavras nos momentos oportunos e por sua disposição de sempre ajudar.

-Às Professoras Dras. Marilene de Menezes Silva Conde e Ines Machile Oliveira da Silva (Departamento de Botânica da UFRRJ-RJ) pela identificação e preservação de exsicata de *Annona cacans* Warming.

- Ao Professor Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, pela concessão de bolsa, pela amizade e pelos bons conselhos que sua experiência exemplifica.

-À Professora Dra. Lúcia Maria Conserva, pela colaboração e acolhimento junto ao laboratório de pesquisa da UFAL para realização de alguns ensaios.

-Ao grupo de Cristalografia da Universidade Federal de Alagoas, Prof. Dr. Mariano Alves Pereira, Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone e Profa. Dra. Valeria R. S. Malta., pela amizade valiosa e realização da análise por cristalografia de Raios-X.

-Ao Professor Dr. Antonio Euzébio G. Sant'Ana e Dra. Aldenir Feitosa dos Santos (UFAL), pela realização de testes de atividades biológicas.

-Ao Professor Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja e Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos, pela realização dos testes de atividade inseticida (UFRRJ).

-Ao Professor Dr. Carlos Roberto R. Matos (CCT-UENF), pela amizade, ajuda e acolhimento junto ao laboratório de síntese e na realização de espectros de massas.

-Ao Prof. Dr. Jan Schripsema (CCT-UENF), pela amizade e disposição de sempre ajudar e pela obtenção dos espectros de RMN.

-À professora Dra. Claudia Rezende e Prof. Dr. Ângelo Pinto (IQ-UFRJ), por disponibilizar o laboratório para realização de espectros de massas de alta resolução com eletron spray.

-Ao Sr. Roberto (CCT-UENF) pela obtenção de espectros de RMN e outros experimentos.

-À Carolina (IQ-UFRJ) pela realização de espectros de massas de alta resolução com eletron spray.

-À minhas irmãs em Cristo e amigas Cida e Dorinha pelo carinho, cuidados e muita dedicação nos momentos decisivos de conclusão deste trabalho.

-Às minhas irmãs Eunice e Francisca, pelas orações pelo carinho e grande amor para comigo em todos os momentos.

-À minha filha Regina pela ajuda, paciências carinho amor na hora de muita dor e muito encorajamento nos momentos em que tudo parecia não ter fim.

-À minha filha Alice pela valiosa ajuda amor e carinho em todos os momentos, principalmente os mais difíceis.

-À minha nora Simone pela valiosa ajuda amor e carinho que sempre me dispensou que foi de grande valia para a finalização deste trabalho.

-Ao meu esposo Eliseu por toda a ajuda, paciência e dedicação dispensadas a minha pessoa e por viver junto comigo todos os momentos da execução deste trabalho.

-Ao meu genro Gilson pela amizade e carinho e pela ajuda indispensável e preciosa no transporte de amostras até Fortaleza para realização de espectros de RMN na UFC.

-Aos meus netinhos, Ícaro, Isaac e Kaiky e netinha Elisa pela alegria que sempre me proporcionaram nos momentos em que a tristeza queria dominar.

-A todos os colegas e professores da UENF, UFRRJ, UFRJ, UFMG e UFAL que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

-Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelos auxílios e bolsas concedidas.

RESUMO

NASCIMENTO, Maria Cleonice Bezerra Souza do. **Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades** - 2008. 197 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Este trabalho de investigação fitoquímica dos extratos em hexano e etanol da madeira e folhas e extrato em acetato de etila dos frutos de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) foi realizado através de técnicas cromatográficas rotineiras de laboratório, inclusive análise por CLAE. Tal procedimento experimental permitiu o isolamento e a identificação de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído, *p*-hidroxibenzoato de etila; *p*-hidroxicinamato de bornila; quatro fitoesteróides: β -sitosterol, estigmasterol, 3-*O*- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol e 3-*O*- β -D-glicopiranosilestigmasterol; quatro diterpenos caurânicos: o ácido *ent*-caur-16-en-19-óico - do qual se preparou o derivado metílico, o *ent*-caur-16-en-19-ato de metila que foi usado também para a obtenção do *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (éster metílico dihidroxilado) -, ácido *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-óico, *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-ato de metila, ácido *ent*-cauran-17-formil-19-óico - que forneceu os dois derivados caurânicos hemiacetálicos - ácido *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico e o ácido *ent*-(16*R*,17*S*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico-; cinco alcalóides aporfínicos: liriodenina (1,2-metilenodioxido-7-oxoaporfina), oxolaurelina (10-metóxi-1,2-metilenodioxido-7-oxoaporfina), lanuginosina (9-metóxi-1,2-metilenodioxido-7-oxoaporfina), lisicamina e *O*-metilmoscatolina; e quatro acetogeninas monotetraidrofurânicas (inclusive três inéditas): *cis*-Rbrazilinona-A e *trans*-Rbrazilinona-B - das quais se obteve os derivados acetilados *cis*-Rbrazilinona-A1 e *trans*-Rbrazilinona-B1 -, cacansin-9-ona e a conhecida annoreticuín-9-ona já descrita na literatura. As estruturas foram elucidadas com base na análise dos dados fornecidos por espectros IV e principalmente RMN¹H e ¹³C (1D e 2D) e EM de baixa e alta resolução das substâncias naturais e derivados, incluindo-se comparação com dados registrados na literatura. Os testes biológicos de atividade inseticida foram realizados com os extratos etanólico da madeira e das folhas e acetato de etila dos frutos. Ensaio preliminar da atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphararia glabrata* foi realizado com o extrato em acetato de etila e fração metanólica dos frutos, extrato etanólico e frações hexânica e clorofórmica da madeira e extratos em hexano e etanol das folhas. A avaliação da citotoxicidade sobre *Artemia salina* foi realizada com os extratos em acetato de etila dos frutos, hexano e etanólico das folhas, hexano e etanólico da madeira, fração clorofórmica da madeira e metanólica dos frutos.

Palavras-chave: *Annona cacans*, Annonaceae, Atividades biológicas, Estudo fitoquímico.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Maria Cleonice Bezerra Souza do. **Bioorganic constituents isolated of *Annona cacans* Warming (Annonaceae) and evaluation of bioactivities.** 2008. 197 p. Thesis (Doctor Science in Organic Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

This work reports the phytochemical investigation of wood and leaves (hexane and ethanol) and fruits (ethyl acetate) of *Annona cacans* Warming (Annonaceae). The research was carried out with usual chromatographic techniques including High Performance Liquid Chromatography. This investigation led to the isolation and identification of 4-hydroxy-3-5-methoxybenzaldehyde; ethyl *p*-hydroxybenzoate; bornyl *p*-hydroxycinnamate; four steroids: β -sitosterol, stigmasterol, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol and 3-*O*- β -D-glucopyranosylstigmasterol; four kauranoid diterpenes: *ent*-kaur-16-en-19-oic acid – that was used to obtain methyl *ent*-kaur-16-en-19-ate and this derivative used to preparation of methyl *ent*-16 α ,17-dihydroxykauran-19-ate, *ent*-16 β ,17-dihydroxykauran-19-oic acid, methyl *ent*-16 β ,17-dihydroxykauran-19-ate, *ent*-17-formylkauran-19-oic acid – which afforded the two derivatives *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hydroxy-17-methoxykauran-19-oic acid and *ent*-(16*R*,17*S*)-17-hydroxy-17-methoxykauran-19-oic acid; five aporphine alkaloids liriodenine (1,2-methylenedioxy-7-oxoaporphine), oxolaureline (10-methoxy-1,2-methylenedioxy-7-oxoaporphine), lanuginosine (9-methoxy-1,2-methylenedioxy-7-oxoaporphine), lisicamine and *O*-methylmoscatoline; and four monotetrahydrofuranic: acetogenins *cis*-Rbrazilinone-A, *trans*-Rbrazilinone-B – that were also used to obtain the acetyl derivatives *cis*-Rbrazilinone-A1 and *trans*-Rbrazilinone-B1, respectively-, cacansin-9-one and annoreticuin-9-one. The structures were elucidated on the basis of their spectral data obtained of IR and mainly ^1H and ^{13}C (1 and 2D) NMR and high and low resolution EIMS spectra and comparison with literature values. The biological tests for insecticide activity were run with the ethanolic extracts of wood and leaves and with the ethyl acetate extract of fruits. A preliminary investigation of the moluscicide activity against *Biomphararia glabrata* was carried out with the ethyl acetate extract and methanol fractionation of fruits and also with the ethanol, hexane and chloroform extracts of leaves. Cytotoxicity against *Artemia salina* was investigated with the ethyl acetate extract of fruits, hexane and ethanol extracts of leaves, hexane and ethanol extracts of wood, methanol extract of fruits and chloroform extract of wood.

Keywords: *Annona cacans*, Annonaceae, biological activities; phytochemical investigation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Annona cacans</i> Warming (LORENZI, 2002).	3
Figura 2. Substâncias isoladas de <i>A. cacans</i> Warm. em trabalho anterior a este.	4
Figura 3. Substâncias consideradas típicas da família Annonaceae.	6
Figura 4. Características estruturais comuns em acetogeninas de Annonaceae.	11
Figura 5. Classificação de anéis γ -lactônicos em acetogeninas de Annonaceae.	13
Figura 6. Classificação dos néis THF e/ou THP e anéis epóxidos em acetogeninas de Annonaceae.	14
Figura 7. Propostas mecanísticas para translactonização de acetogeninas do tipo L-B para o tipo L-C ₁ .	15
Figura 8. Hipótese para a biossíntese de anéis tetraidrofurânicos em acetogeninas de Annonaceae.	16
Figura 9. Cromatograma de íons totais obtido por CG/EM para a mistura AcF-2911.	28
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura AcF-2911, em CDCl ₃ .	32
Figura 11. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura AcF-2911, em CDCl ₃ .	33
Figura 12. Mapa de correlações HMQC da mistura AcF-2911, em CDCl ₃ .	34
Figura 13. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF 2911A.	35
Figura 14. Mapa de correlações COSY da mistura AcF-2911, em CDCl ₃ .	36
Figura 15. Mapa de correlações NOESY da mistura AcF-2911, em CDCl ₃ .	37
Figura 16. Mapa de correlações HMBC da mistura AcF-2911, em CDCl ₃ .	38
Figura 17. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF-2911B.	39
Figura 18. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF-2911C.	40
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura de esteróides AcF-267 em CDCl ₃ .	42
Figura 20. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura de esteróides AcF-267 na região de δ_H 3,3 a 5,4, em CDCl ₃ .	43
Figura 21. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura de esteróides AcF-267, em CDCl ₃ .	43
Figura 22. Espectro de RMN ¹ : (400 MHz) da mistura de esteróides glicosilados AcF-09A e AcF-09A em MeOD/CDCl ₃ .	45
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura de esteróides glicosilados AcF-09A e AcF-09B, em MeOD/CDCl ₃ .	45
Figura 24. Mapa de correlações HMQC da mistura AcF-09A e AcF-09B, em MeOD/CDCl ₃ .	46
Figura 25. Expansão do mapa de correlações HMQC da mistura de AcF-09A e AcF-09B, em MeOD/CDCl ₃ .	46
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura AcF-1822, obtido em CDCl ₃ .	49
Figura 27. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura AcF-1822 na região de δ_H 6,3-9,2, em CDCl ₃ .	50
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura AcF-1822, em CDCl ₃ .	50
Figura 29. Espectro de massas (EM-IE) da mistura AcF-1822.	51
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de AcF-2245, obtido em CDCl ₃ .	53
Figura 31. Mapa de correlações NOESY (400 MHz) da AcF-2245, em CDCl ₃ .	55

Figura 32. Expansão do mapa de correlações NOESY (400 MHz) de AcF-2245 na região de δ_H 4,0 a 9,3, em $CDCl_3$.	55
Figura 33. Espectro de massas da AcF-2245 obtido por CG/EM.	56
Figura 34. Espectro de RMN 1H (400 MHz) de AcF-2245a, obtido em $CDCl_3$.	57
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de AcF-2245a, obtido em $CDCl_3$.	57
Figura 36. Espectro IV de AcF-01, obtido em KBr.	65
Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-01, em $CDCl_3$.	65
Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-01, em $CDCl_3$.	66
Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-01 na região de δ_C 15,56-58,04, em $CDCl_3$.	66
Figura 40. Espectro de RMN 1H (400 MHz) de AcF-01, em $CDCl_3$.	68
Figura 41. Mapa de correlações HMQC da AcF-01, em $CDCl_3$.	68
Figura 42. Mapa de correlações HMBC da AcF-01, em $CDCl_3$.	69
Figura 43. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por impacto eletrônico de AcF-01.	69
Figura 44. Espectro de RMN 1H (400 MHz) da AcF-01a, em $CDCl_3$.	72
Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-01a, em $CDCl_3$.	72
Figura 46. Mapa de correlações HMQC da AcF-01a, em $CDCl_3$.	73
Figura 47. Espectro na região do infravermelho obtido em KBr, de AcF-01b.	74
Figura 48. Espectro de RMN 1H (400 MHz) de AcF-01b, em $CDCl_3$.	75
Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-01b, em $CDCl_3$.	76
Figura 50. Mapa de correlações HMQC da AcF-01b, em $CDCl_3$.	78
Figura 51. Mapa de correlação COSY da AcF-01b, em $CDCl_3$.	78
Figura 52. Mapa de correlação HMBC da AcF-01b, em $CDCl_3$.	79
Figura 53. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por impacto eletrônico de AcF-01b.	79
Figura 54. Espectro na região do infravermelho de AcF-195, obtido em pastilha de KBr.	81
Figura 55. Espectro de RMN 1H (400 MHz) de AcF-195, em $CDCl_3$.	83
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-195, em $CDCl_3$.	83
Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-195 na região de δ_C 50,0-80,0, em $CDCl_3$.	84
Figura 58. Mapa de correlações HMQC da AcF-195, em $CDCl_3$.	84
Figura 59. Mapa de correlações HMBC da AcF-195, em $CDCl_3$.	85
Figura 60. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF-195.	85
Figura 61. Espectro na região do infravermelho de AcF-1216, obtido em pastilha de KBr.	87
Figura 62. Espectro de RMN 1H (400 MHz) de AcF-1216, em piridina d_5 .	87
Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-1216, em piridina d_5 .	88
Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-1216, em piridina d_5 .	88
Figura 65. Mapa de correlação HMQC da AcF-1216, em piridina d_5 .	89
Figura 66. Espectro IV da AcF-158, registrado em pastilha de KBr.	91
Figura 67. Espectro de RMN 1H (500 MHz) de AcF-158, em $CDCl_3$.	93
Figura 68. Expansão do espectro de RMN 1H (500 MHz) de AcF-158 entre δ_H 0,87-2,64, em $CDCl_3$.	93
Figura 69. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-158, em $CDCl_3$.	95
Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-158 entre δ_C 15-60, em $CDCl_3$.	94

Figura 71. Mapa de correlações HMQC da AcF-158, em CDCl ₃ .	96
Figura 72. Expansão do mapa de correlações HMQC da AcF-158 entre δ_H 0,87-2,64 e entre 15-60, em CDCl ₃ .	96
Figura 73. Mapa de correlações COSY de AcF-158, em CDCl ₃ .	97
Figura 74. Expansão do mapa de correlações COSY de AcF-158 entre δ_H 0,87-2,64, em CDCl ₃ .	97
Figura 75. Mapa de correlações NOESY de AcF-158, em CDCl ₃ .	98
Figura 76. Expansão do mapa de correlações NOESY de AcF-158 entre δ_C 0,87-2,64, em CDCl ₃ .	98
Figura 77. Mapa de correlações da AcF-158, em CDCl ₃ .	99
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de AcF-158, em CDCl ₃ /D ₃ COD.	102
Figura 79. Espectro de RMN ¹³ C-APT (100 MHz) da AcF-158, em CDCl ₃ /D ₃ COD.	103
Figura 80. Mapa de correlações HMQC da AcF-158, em CDCl ₃ /CD ₃ OD.	103
Figura 81. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de AcF-158, em piridina- <i>d</i> ₅ .	105
Figura 82. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) de AcF-158, em piridina- <i>d</i> ₅ .	105
Figura 83. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da AcF-158 entre δ_C 39,75-56,98, em piridina- <i>d</i> ₅ .	106
Figura 84. Mapa de correlações HMQC da AcF-158, em piridina- <i>d</i> ₅ .	106
Figura 85. Mapa de correlações HMBC da AcF-158, em piridina- <i>d</i> ₅ .	107
Figura 86. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por impacto eletrônico de AcF-158.	107
Figura 87. Estrutura cristalina do ácido <i>ent</i> -(16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158b).	109
Figura 88. Espectro na região do infravermelho (IV) da AcF-0291, obtido em pastilha de KBr.	113
Figura 89. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da AcF-2325-P3, obtido em CDCl ₃ .	117
Figura 90. Isômeros constituintes da mistura de Anoreticuín-9-ona (Mo-5), Mosine C (Mo-6) e Mosine B (Mo-7) isolados de <i>A. squamosa</i> .	117
Figura 91. Espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz) da AcF-2325-P3 em CDCl ₃ .	118
Figura 92. Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz) da AcF-2325-P3 na região de δ_C 67-85, em CDCl ₃ .	119
Figura 93. Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz) da AcF-2325-P3 na região de δ_C 31-43, em CDCl ₃ .	119
Figura 94. Mapa de correlação HMQC da AcF-2325-P3, em CDCl ₃ .	120
Figura 95. Mapa de correlações HMBC da AcF-2325-P3, em CDCl ₃ .	121
Figura 96. Mapa de correlações COSY (400 MHz) da AcF-2325-P3, em CDCl ₃ .	122
Figura 97. Espectro de massas de alta resolução da AcF-2325-P3 obtido através de ionização por eletrospray.	123
Figura 98. Espectro de massas da AcF-2325-P3 obtido através de ionização por impacto de elétrons.	124
Figura 99. Espectro na região do infravermelho (IV) da AcF-2325-P5, obtido em KBr.	126
Figura 100. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da AcF-2325-P5, em CDCl ₃ .	128
Figura 101. Espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz) da AcF-2325-P5, em CDCl ₃ .	128
Figura 102. Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz) da AcF-2325-P5 na região de δ_C 67-85, em CDCl ₃ .	129

Figura 103. Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz) da AcF-2325-P5 na região de δ_C 13-44, em CDCl ₃ .	129
Figura 104. Espectro de massas de AcF-2325-P5 obtido através de ionização por impacto de elétrons.	130
Figura 105. Mapa de correlações HMQC da AcF-2325-P5, em CDCl ₃ .	134
Figura 106. Mapa de correlações HMBC da AcF-2325-P5, em CDCl ₃ .	135
Figura 107. Mapa de correlações COSY da AcF-232P5, em CDCl ₃ .	136
Figura 108. Espectro de massas de alta resolução da AcF-2325-P5, obtido através de ionização por eletrospray.	137
Figura 109. Espectro na região do infravermelho da AcF-0214, obtido em KBr.	142
Figura 110. Espectro de massas da AcF-0214 obtido através de ionização por eletrospray.	142
Figura 111. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz) da AcF-0214, em CDCl ₃ .	143
Figura 112. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) da AcF-0214, em CDCl ₃ .	143
Figura 113. Mapa de correlações HMQC da AcF-0214, em CDCl ₃ .	144
Figura 114. Expansão do mapa de correlações HMQC da AcF-0214 na região de δ_C 25 a 45, em CDCl ₃ .	144
Figura 115. Expansão do mapa de correlações HMQC da AcF-0214 na região de δ_C 70 a 85, em CDCl ₃ .	145
Figura 116. Espectro de DEPT 135° (125 MHz) da AcF-0214, em CDCl ₃ .	145
Figura 117. Expansão do espectro de DEPT 135° (125 MHz) da AcF-0214 na região de δ_C 20 a 50, em CDCl ₃ .	146
Figura 118. Mapa de correlações COSY da AcF-0214, em CDCl ₃ .	146
Figura 119. Expansão do mapa de correlações COSY da AcF-0214 na região de δ_H 1,3 a 2,4, em CDCl ₃ .	147
Figura 120. Mapa de correlações HMBC da AcF-0214, em CDCl ₃ .	147
Figura 121. Mapa de correlações NOESY da AcF-0214, em CDCl ₃ .	148
Figura 122 – Espectro de massas da AcF-0214 realizado através de impacto de elétron.	148
Figura 123. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) da mistura acetilada AcF-0214Ac, em CDCl ₃ .	152
Figura 124. Espectro de RMN ¹³ C da mistura acetilada AcF-0214Ac, em CDCl ₃	152
Figura 125. Mapa de correlações HMQC da mistura acetilada AcF-0214Ac, em CDCl ₃ .	154
Figura 126. Mapa de correlações COSY da mistura acetilada AcF-0214Ac, em CDCl ₃ .	154

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção e partição do extrato em acetato de etila dos frutos frescos de <i>Acacans</i> .	20
Esquema 2: Fracionamento e obtenção de substâncias da fração metanólica dos frutos frescos de <i>A. cacans</i> .	21
Esquema 3: Obtenção de misturas complexas de acetogeninas da fração metanólico dos frutos fresco de <i>A. cacans</i> .	22
Esquema 4: Preparação dos extratos brutos e fracionamento cromatográfico da madeira de <i>A. cacans</i> .	24
Esquema 5 Partição do extrato etanólico e fracionamento do extrato em clorofórmio da madeira de <i>A. cacans</i> .	25
Esquema 6- Fracionamento do extrato em clorofórmio das folhas de <i>A. cacans</i> .	26
Esquema 7. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados para a substância AcF-2911A.	35
Esquema 8. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas para AcF-2911B.	39
Esquema 9. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas para AcF-2911C.	40
Esquema 10. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas da mistura AcF-1822.	51
Esquema 11. Proposta mecanística de fragmentação para justificar a estrutura da AcF-2245.	56
Esquema 12. Formação do pirofosfato de 3-isopentenila (IPP), pirofosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAPP), pirofosfato de farnesila (FPP) e pirofosfato de geranilgeranil (GGPP), a partir da acetil-CoA, via ácido mevalônico (DEWICK, 1997).	59
Esquema 13. Biossíntese do ácido <i>ent</i> -caurenóico a partir do pirofosfato de geranilgeranil (GGPP), via pirofosfato de copalil PP (DEWICK, 1997).	60
Esquema 14. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas do diterpeno AcF-01.	70
Esquema 15. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas do diterpeno AcF-01b.	80
Esquema 16. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas do diterpeno AcF-195.	86
Esquema 17. Proposta mecanística para justificar os principais sinais presentes no espectro de massas de AcF-158.	108
Esquema 18. Proposta mecanística de fragmentação postuladas para justificar as perdas de moléculas de água da AcF-2325-P3 no espectrômetro de massas (EM-ES).	123
Esquema 19. Proposta mecanística de fragmentação da AcF-2325-P3 no espectrômetro de massas operando por impacto eletrônico.	125
Esquema 20. Proposta mecanística de fragmentação da AcF-2325-P5 no espectrômetro de massas operando por impacto eletrônico.	131
Esquema 21. Proposta mecanística de fragmentação postuladas para justificar as perdas de moléculas de água da AcF-2325-P5 no espectrômetro de massa (EM-ES).	137
Esquema 22. Proposta mecanística de fragmentação no EM-IE com valores diagnósticos da AcF-0214.	149
Esquema 23. Proposta mecanística de fragmentação no EM-IE para a mistura (2,4-cis/-trans)-xylomaticinonas conforme dados registrados na literatura.	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-2911A obtidos através de experiências em 1D e 2D, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.	29
Tabela 2. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-2911B obtidos através de experiências em 1D e 2D, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) estão em ppm e a constantes de acoplamento (J) em Hz.	30
Tabela 3. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-2911C obtidos através de experiências em 1D e 2D, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.	31
Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C (δ em ppm), em CDCl_3 para os fitoesteróides β sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (MOREIRA, 2001; KOJIMA <i>et al</i> , 1990, <i>apud</i> BORGES, 2006).	41
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (δ em ppm), $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ da parte glicosídica da mistura AcF-09A e AcF-09B.	44
Tabela 6. Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de AcF-1822, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos em (δ) ppm e constante de acopamento (J) em Hz.	48
Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C (δ em ppm, J em Hz), em CDCl_3 para os alcalóides AcF-2245 e AcF-2245a.	54
Tabela 8. Diterpenos cauranóides isolados pela primeira vez de <i>Annona cacans</i> Warming e seus derivados.	62
Tabela 9. Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de AcF-01, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.	67
Tabela 10. Dados espectrais de RMN ^{13}C da AcF-01a, incluindo resultados em 2D HMQC. Os deslocamentos químicos δ estão em ppm.	71
Tabela 11. Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de AcF-01b, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.	77
Tabela 12. Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de AcF-195, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hz.	82
Tabela 13. Dados espectrais de RMN ^{13}C (100 MHz) de AcF-1216 (piridina, d_6) [deslocamentos químicos (δ) em ppm e as constantes de acoplamento (J) estão em Hz].	89
Tabela 14. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-158 obtidos através de experiências 1D e 2D, em CDCl_3 como solvente. Deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H} , em ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.	95
Tabela 15. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-158 e seus derivados obtidos através de experiências 1D e 2D, em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ como solventes. Deslocamentos químicos em δ (δ_{C} e δ_{H} , ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.	100
Tabela 16. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-158 obtidos através de experiências 1D e 2D, em piridina- d_5 como solventes. Deslocamentos químicos em δ (δ_{C} e δ_{H} , ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.	104

Tabela 17. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de modelos sintéticos com configurações relativas definidas, (BORN et al., 1990) e comparação com os valores correspondentes da annonina I, uma acetogenina isolada de <i>Annona squamosa</i> (RUPPRECHT et al, 1990 e CAVÉ et al., 1997). em CDCl ₃ . Deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.	110
Tabela 18. Dados de RMN ¹³ C de modelos sintéticos preparados por Fujimoto et al (1990). (RUPPRECHT et al, 1990 e CAVE et a., 1997), em CDCl ₃ . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	111
Tabela 19. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C das subunidades γ-lactona saturada e insaturadas (CAVÉ et al., 1997) (tipo, L-C ₁ -Figura 5, p.) (tipos, L-B e L-A-Figura 5, p.). Deslocamentos químicos em δ (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.	111
Tabela 20. Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C de mistura contendo 2,4- <i>cis</i> - e 2,4- <i>trans</i> -xyломaticinona (ALALI et al., 1999), em CDCl ₃ . Deslocamentos químicos em δ (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.	112
Tabela 21. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da AcF-2325-P3, incluindo-se resultados obtidos através de espectros HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos estão em ppm e valores de constantes de acoplamento (J) em Hz.	115
Tabela 22. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da AcF-0291 e da mistura constituída dos isômeros Annoreticuín-9-ona, (Mo-5), Mosine C (Mo-6), Mosine B (Mo-7) (HOPP et al., 1997).	116
Tabela 23. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da AcF-2325-P5, incluindo se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e valores de constantes de acoplamento (J) em Hz.	132
Tabela 24. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da mistura AcF-0214 (Rbrazilinonas A e B), em CDCl ₃ . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	141
Tabela 25. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da mistura acetilada AcF-0214Ac [(<i>cis/trans</i>)-Rbrazilinonas, AcF-0214A1 e AcF-B1], em CDCl ₃ . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	153
Tabela 26. Resultados preliminares da toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> de <i>A. cacasn</i> Warm.	156
Tabela 27. Os resultados da análise (TAS) em fase apurada de <i>A. cacasn</i> Warm.	156
Tabela 28. Ensaio preliminar da atividade moluscicida sobre <i>B. glabrata</i> (adulto).	158
Tabela 29. Ensaio preliminar da atividade moluscicida sobre <i>B. glabrata</i> (desova).	159
Tabela 30. Dados de concentrações(M) e número de moscas vivas e mortas.	161
Tabela 31. Valores de DL ₅₀ dos extratos de <i>Annona cacans</i> Warm.	161

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Diterpenos caurânicos e caurênicos com configurações absolutas definidas (VELANDIA et al, 1998)	63
Anexo I.	170

LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

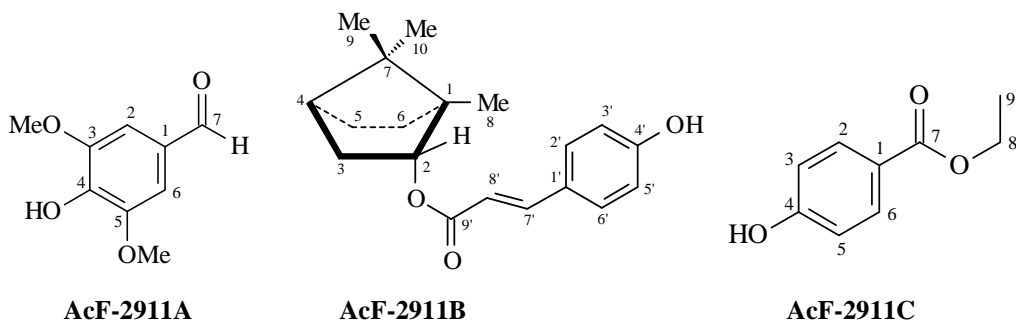
δ	deslocamento químico (ppm)
Ac ₂ O	anidrido acético
AcOEt	acetato de etila
AcOH	cido acético
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
Col.	Coluna de gel de sílica
Crist.	cristalização
d	duplete
dd	duplo duplete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
dl	duplete largo
EI	<i>Electronic impact</i>
ES	Eletrospray
EtOH	etanol
Evap.	Evaporação
Extr.	extrato
Hex.	hexno
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IES	Ionização por eletrospray
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hertz
m	multiplete
<i>m/z</i>	relação massa/carga
M ⁺	pico do in molecular
MeOH	metanol
Mo.	modelo
MHz	megahertz
mp	média pressão
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy</i>
pf	ponto de fusão
q	quarteto
ql	quarteto largo
Rec.	recristalização
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13

RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
TAS	Teste com <i>Artemia salina</i>
s	simpleto
sl	simpleto largo
t	triplete
tl	triplete largo

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta lista, encontram-se no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Substâncias caracterizadas neste trabalho e produtos de derivações

Substâncias benzílicas e cinâmica

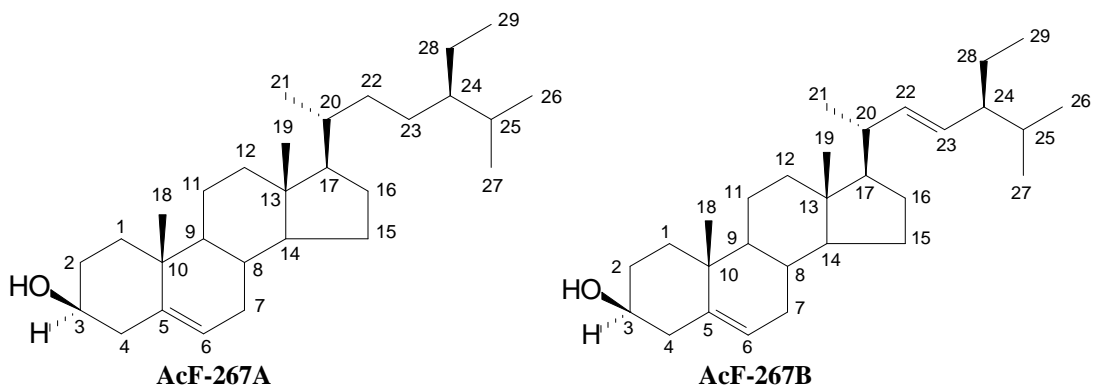


4-Hidroxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído - **AcF-2911A**

p-Hidroxicinamato de bornila - **AcF-2911B**

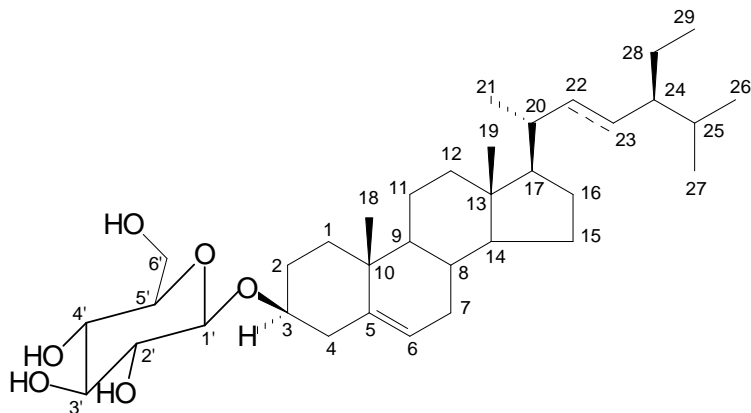
p-Hidróxibenzoato de etila - **AcF-2911C**

Esteróides



β -sitosterol - **AcF-267A**

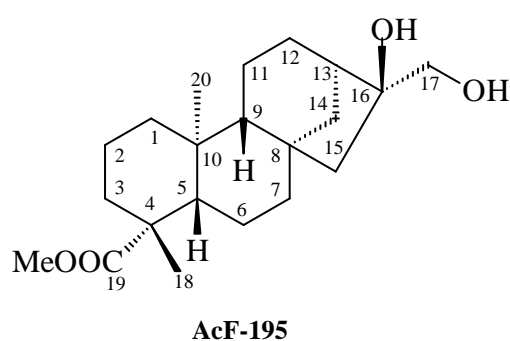
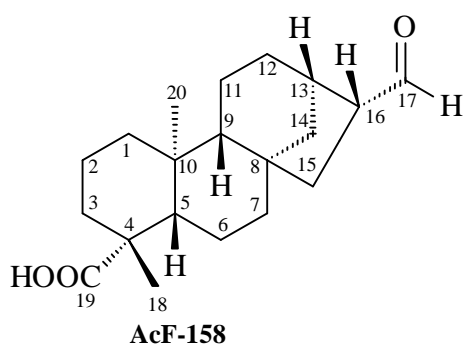
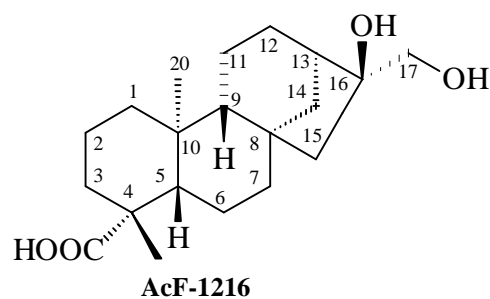
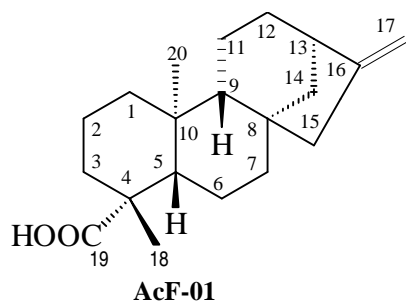
Estigmasterol - **AcF-267B**



3-O- β -D-Glicopiranosílsitosterol - **AcF-09A**

3-O- β -D-Glicopiranosilestigmasterol - **AcF-09B**

Diterpenos caurânicos naturais



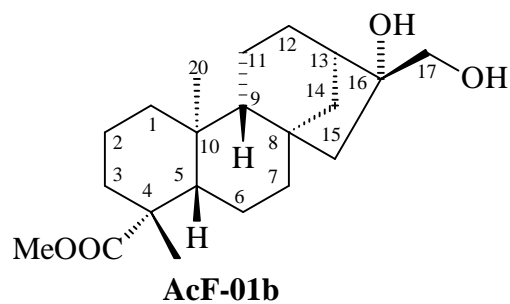
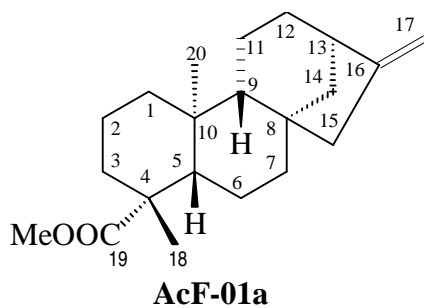
Ácido *ent*-caur-16-en-19-óico - **AcF-01**

Ácido *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-óico - **AcF-1216**

Ácido *ent*-17-formil-cauran-19-óico - **AcF-158**

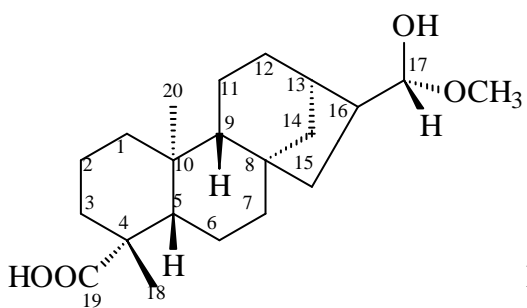
ent-16 β ,17-Diidroxicauran-19-ato de metila - **AcF-195**

Diterpenos caurânicos, produtos de derivações

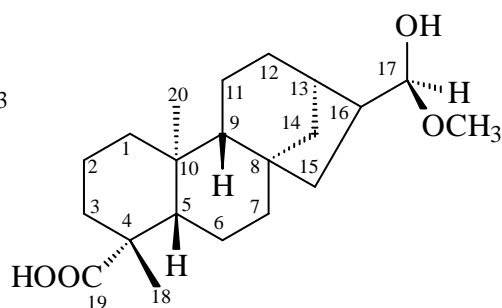


ent-Caur-16-en-19-ato de metila - **AcF-01a**

ent-16 α ,17-Diidroxicauran-19-ato de metila - **AcF-01b**



AcF-158a

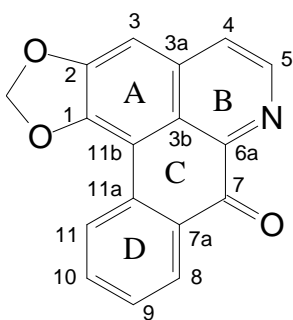


AcF-158b

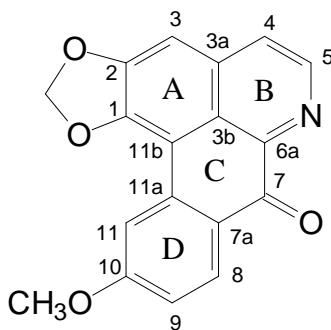
Ácido *ent*-(16*R*,17*S*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico - **AcF-158a**

Ácido *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico - **AcF-158b**

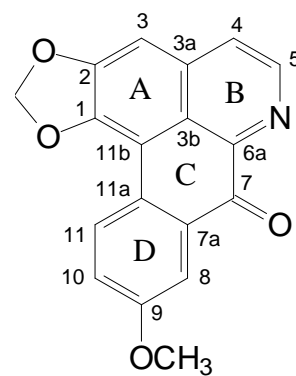
Alcalóides oxoporfínicos



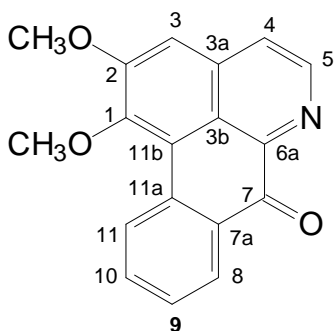
AcF-1822a



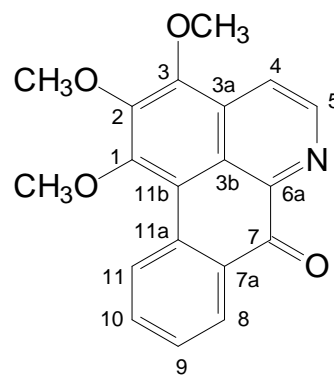
AcF-1822b



AcF-1822c



AcF-2245



AcF-2245a

1,2-Metilenodioxido-7-oxaporfina, liriodenina - **AcF-1822a**

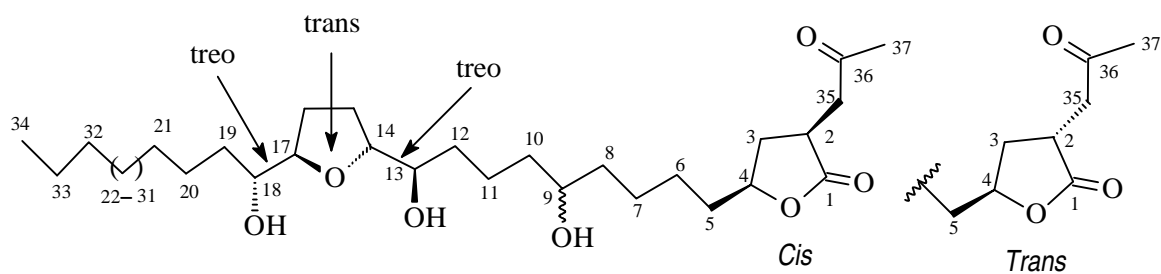
10-Metóxi-1,2-metilenodioxido-7-oxaporfina, oxolaurelina - **AcF-1822b**

9-Metóxi-1,2-metilenodioxido-7-oxaporfina, lanuginosina - **AcF-1822c**

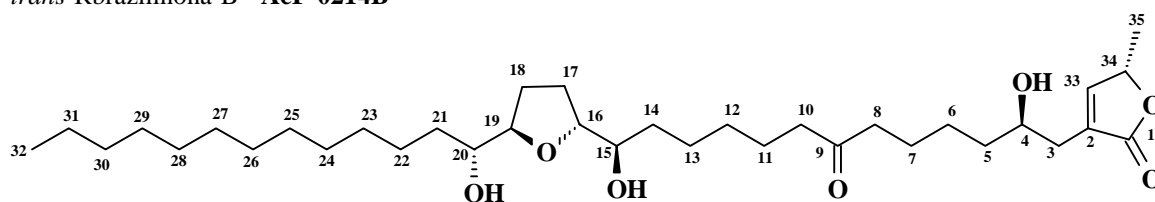
1,2-Dimetóxi-7-oxaporfina, lisicamina - **AcF-2245**

1,2,3-Trimetóxi-7-oxaporfina, *O*-metilmoscatoлина - **AcF-2245a**

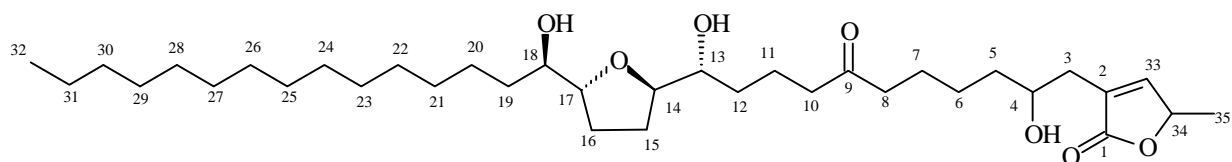
Acetogeninas monotetraidrofurânicas naturais



cis-Rbrazilinona-A - AcF-0214A
trans-Rbrazilinona-B - AcF-0214B

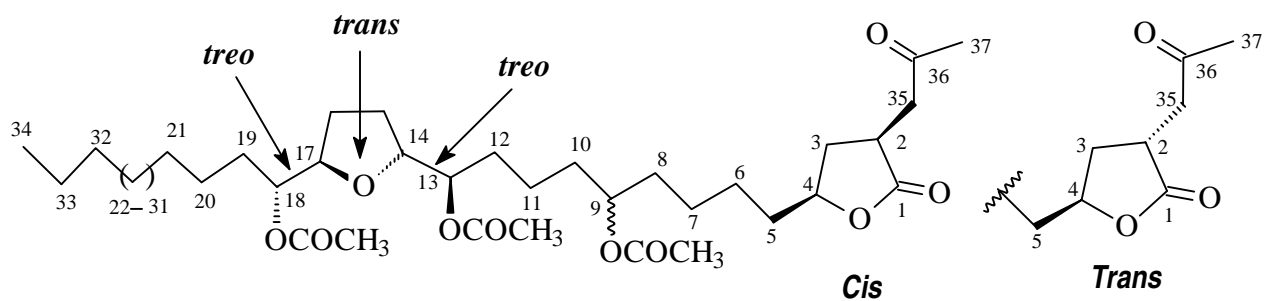


Anoreticuina-9-ona - AcF-2325-P3



Cacansina-9-ona - AcF-2325-P5

Acetogeninas monotetraidrofurânicas produtos de derivação



cis-Rbrazilinona-A1 - AcF-0214A1
trans-Rbrazilinona-B1 - AcF-0214B1

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS	1
1.1 Objetivos do Trabalho	2
2 ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>Annona cacans</i> WARMING	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Relatos de estudos químicos <i>A. cacans</i> Warming	4
3.2 Generalidades sobre a família Annonaceae	5
3.3 O gênero <i>Annona</i>	9
3.4 Acetogeninas de Annonaceae	11
3.4.1 Classificação de acetogeninas de Annonaceae	13
3.4.2 Hipóteses da origem biossintética de acetogeninas de Annonaceae	15
4 MATERIAL E MÉTODOS I	16
4.1 Material botânico	16
4.2. Reagentes e equipamentos	16
4.3. Reações de derivações	18
4.3.1. Metilação com diazometano	18
4.3.2. Acetilação com piridina e anidrido acético	18
4.3.3 Oxidação com tetróxido de ósmio	18
4.4. Análise por CLAE	18
5 MATERIAL E MÉTODOS II	19
5.1 Obtenção, partição e fracionamento dos extratos dos frutos de <i>A. cacans</i> Warming, isolamento e purificação de substâncias	19
5.2 Obtenção, partição e fracionamento dos extratos da madeira de <i>A. cacans</i> Warming, isolamento e purificação de substâncias	23
5.3 Obtenção, partição e fracionamento dos extratos das folhas de <i>A. cacans</i> Warming, isolamento e purificação de substâncias	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
6.1 Caracterização das substâncias, 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzaldeído (AcF-2911A), <i>p</i> -hidróxi-benzoato de etila (AcF-2911B) e <i>E-p</i> -hidroxicinamato de bornila (AcF-2911C)	27
6.2 Caracterização estrutural dos esteróides livres, β -sitosterol (AcF-267A) e estigmasterol (AcF-267B)	40
6.3 Caracterização estrutural dos esteróides: 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil- β -sitosterol (AcF-09A) e 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosilestigmasterol (AcF-09B)	44
6.4 Caracterização estrutural dos alcalóides oxoaporfínicos, Liriodenina (AcF-1822a), Oxolaurelina (AcF-1822b) e lanuginosina (AcF-1822c)	47

6.5 Caracterização estrutural dos alcalóides oxoaporfínicos, lisicamina (AcF-2245) e <i>O</i> -metilmoscatoлина (AcF-2245a)	52
6.6 Biossíntese de diterpenos cauranóides	58
6.7 Diterpenos cauranóides isolados de <i>A. cacans</i> Warm., e seus derivados	61
6.7.1 Caracterização estrutural do ácido <i>ent</i> -caur-16,17-en-19-óico (AcF-01)	64
6.7.2 Caracterização estrutural do éster caurênico, o <i>ent</i> -caur-16,17-en-19-ato de metila (AcF-01a)	70
6.7.3 Caracterização estrutural do éster caurânico, <i>ent</i> -caur-16 α ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (AcF-01b)	73
6.7.4 Caracterização estrutural do <i>ent</i> -16 β ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (AcF-195)	80
6.7.5 Caracterização estrutural do ácido <i>ent</i> -16 β ,17-diidróxi-cauran-19-óico (AcF-1216)	86
6.7.6 Caracterização estrutural dos diterpenos caurânicos, ácido <i>ent</i> -cauran-17-formil-19-óico (AcF-158) e seus derivados hemiacetálicos, ácido <i>ent</i> -(16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158a) e ácido <i>ent</i> -(16 <i>R</i> ,17 <i>S</i>)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158b)	90
6.8 Metodologia utilizada na elucidação estrutural das acetogeninas	110
6.8.1 Caracterização estrutural da substância anoreticuín-9-ona (AcF-2325-P3)	113
6.8.2 Caracterização estrutural da acetogenina cacansin-9-ona (AcF-2325-P5)	125
6.8.3 Caracterização estrutural das substâncias, <i>cis</i> -Rbrazilinona-A (AcF-0214A) e <i>trans</i> -Rbrazilinona-B (AcF-0214B)	139
6.8.4 Caracterização estrutural dos derivados acetilados, <i>cis</i> -Rbrazilinona-A1 (AcF-0214A1) e <i>trans</i> -Rbrazilinona-B1 (AcF-0214B1)	151
7 TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	155
7.1 Avaliação da toxidez de extratos de <i>A. cacans</i> Warming frente à <i>Artemia salina</i> Leach	155
7.2 Avaliação da atividade moluscicida com o caramujo <i>biomphalaria glabrata</i> de extratos e partições de <i>Annona cacans</i>	157
7.3 Avaliação da atividade inseticida contra <i>Musca domestica</i> de extratos e partições de <i>Annona cacans</i>	159
8 CONCLUSÕES	162
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
10 ANEXO I	170

INTRODUÇÃO

1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

A busca de recursos naturais para melhorar as condições de vida e aumentar as chances de sobrevivência na Terra, pelo homem, teve início em tempos que remota ao início das civilizações. Como resultado dessa busca, o homem encontrou nas espécies vegetais propriedades terapêuticas importantes e passou a utilizá-las no tratamento e cura de doenças e sintomas, a partir da observação de que nas plantas existe algo que administrado de alguma forma atua na recuperação da saúde. Esse algo atuante é conhecido como princípio ativo e pode ser representado por uma substância ou um conjunto delas, o complexo fitoterápico, que agem simultaneamente na recuperação da saúde.

A utilização de plantas com fins medicinais, pelas populações, é uma prática que ultrapassou os obstáculos e as barreiras do tempo e chegou aos nossos dias (DI STASI, 1995). Contudo necessitamos, hoje, de incentivos às pesquisas, por parte de nossas autoridades, para que essa prática seja cientificamente orientada e possa atingir as comunidades mais carentes do nosso país, de uma forma simples e de baixo custo. Embora a utilização de plantas medicinais, quando usadas corretamente, não traga prejuízo a quem usa os riscos não podem ser ignorados, principalmente, quanto á dosagem e a forma adequada de preparação e escolha da planta.

O conhecimento e uso de espécies vegetais para tratamento da saúde, passado de geração a geração, serviu e continua servindo como fonte de informação para a descoberta de novos medicamentos e tem motivado a busca de uma maior racionalização na procura de substâncias com atividades biológicas. Essa prática foi considerada durante muitos séculos como a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, mas a partir do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, ela passou a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos.

Os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 40% de novas drogas e após algumas décadas do século XX, a Química de Produtos Naturais tornou-se a principal linha de pesquisa para a descoberta de novos agentes anticancerígenos e de outras patologias. Nos países industrializados 25% dos medicamentos prescritos são de origem vegetal e entre 120 mil compostos de origem natural, 100 mil são oriundas de plantas, obtidas a partir de cerca de 90 espécies de vegetais.

Estima-se que na Terra existam entre 250 a 500 mil espécies de plantas, mas apenas uma pequena porcentagem foi investigada (cerca de 20 %) do ponto de vista fitoquímico, e um número ainda menor do ponto de vista farmacológico. O Brasil contribui com 120 mil espécies e cerca de 10 mil, com propriedades medicinais. A maior parte está concentrada na Floresta Amazônica e Mata Atlântica. Esta última, apesar da grande devastação sofrida nos últimos anos, ainda detém a maior variedade de espécies vegetais do mundo.

O que torna possível à descoberta de muitas espécies de plantas com propriedades medicinais, que podem ser estudadas e suas substâncias isoladas e caracterizadas estruturalmente corroborando, assim, para o cadastramento fitoquímico das espécies das famílias e auxiliando futuramente no estudo da Quimiosistemática ou da Ecologia Química.

De *Annona cacans* Warming, pouco se sabe dos seus constituintes químicos e suas atividades biológicas, trata-se de um espécime da família Annonaceae relativamente pouco conhecida do ponto de vista químico e farmacológico e faz parte da lista de 600 espécies

ameaçadas de extinção, segundo textos retirados de material distribuído pela Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SEMA - *W.W. W.agirasul.com.br/Espécie/flora.htm* - 2002) R. G. do Sul. Estes fatos tornam relevante seu estudo químico e suas atividades biológicas como também sua preservação.

1.1 Objetivos do Trabalho

a) Isolamento e caracterização estrutural de constituintes bioorgânicos, presentes nos extratos da madeira, folhas e frutos da espécie vegetal *Annona cacans* Warming (Annonaceae), coletada na mata Atlântica do Brasil no subúrbio da cidade do Rio de Janeiro.

b) Isolamento e caracterização estrutural de acetogeninas, uma nova classe de substâncias, presentes até o momento apenas na família Annonaceae, conhecidas como, acetogeninas de Annonaceae, que ainda não foram descritas na espécie *A. cacans* Warm.

c) Avaliar a toxicidez dos extratos frente o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, a atividade moluscicida contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* e atividade inseticida contra a *Musca domestica*.

2 ASPECTOS BOTÂNICOS DE ANNONA CACANS WARM.

Annona cacans Warming. Vidensk. Meddel. Dansk Naturhist. Foren. Kjöbenhavn 3(5): 155.1873; R. E. Fr., Acta Horti Berg. 1092: 262-3. 1931.

Apresenta os seguintes nomes populares: cortiçã, araticum-cagão, araticum-de-paca, quaresma, corticeira, coração-de-boi, anona-cagona, corticeiro (LORENZI, 2002; MAAS, *et al*, 2001) e as seguintes sinonímia científica: *Annona quaresma* Dutra msctpt sec. R. E. Fries Arkiv. for Botanik 4 (5): 16.1905, *Annona cacans* Warm. var. *glabiuscula* R. E. Fries (HOEHNE, 1941, *apud*, SAITO, 1990; LORENZI 2002), *Xilopia cacanes* Warm. Kjoeb. Videnok. Medell 155.1873.

A. cacans Warming (Figura 1, p.3) ocorre no Sudoeste e Sul do Brasil, nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ANGELY, 1965 e 1969, REITZ *et* KLEIN, 1964, *apud*, SAITO, 1990). É decídua e perde suas folhas entre os meses de julho e agosto, refloresce em outubro e dá frutos nos meses de fevereiro e março, por este motivo é conhecida vulgarmente pelo nome de “fruta de quaresma” no Rio Grande do Sul (HOEHNE, 1946, *apud*, SAITO, 1990).

Árvore de 10-30 metros de altura (MAAS, *et al*, 2001), dotada de copa globosa, e tronco cilíndrico de 50 a 70 cm de diâmetro. O tronco apresenta casca gretada em todos os sentidos, mas profundamente no sentido longitudinal, essa parte do vegetal apresenta-se áspera de coloração acinzentada a marrom, podendo algumas vezes apresentar placas de líquenes foliáceos. O lenho é poroso, leve de coloração castanho amarronzado, provido de lenticelas brancas puntiformes e de estrias dispostas longitudinalmente (HOEHNE, *et al*, 1941; *apud*, SAITO, 1990).

As folhas são glabras, de 8-17 cm de comprimento por 3-6 cm de largura e o pecíolo com cerca de 1,5 cm de comprimento, simples, alternas, lanceoladas ou oblongo-lanceoladas de ápice alongado agudo ou acuminado e de base cuneada. A margem foliar é lisa e a inervação peninérvea com nervuras secundárias emergindo da principal, que apresenta coloração

amarelada, num ângulo de aproximadamente 45 graus. As folhas de disposição alterna localizam-se nas extremidades dos ramos com os pontos de inserção distantes um dos outros de 1.0 a 1.5 cm apresentando-se voltadas para baixo (HOEHNE, 1941; LORENZI e MATOS 2002).

As flores são esverdeadas, apresentam disposição axilar, são solitárias ou em grupos de duas ou quatro, providas de pedúnculo curto, ligado a eixo comum. Os frutos medem de 10-12 cm de diâmetro apresentam, quando maduros, coloração verde amarelada e são providos de casca lisa levemente escamiforme e desenhadas. A massa polpuda alvo-amarelado, aromática e doce tem ação catártica, o que justifica o nome vulgar de “araticum-cagão” e o nome científico de *Annona cacans* Warm. (HOEHNE *et al*, 1941).

A morfologia das sementes de *A. cacans* Warm., revela que estas são de forma orbicular, de superfície lisa e de cor marrom escura, e apresenta em média 11,1 mm de comprimento, 7,5 mm de largura e 4,5 mm de espessura com cerca de 5040 sementes por quilo (FURLAN *et al*, 2002).



Figura 1. *Annona cacans* Warming (LORENZI, 2002).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Relatos de estudos químicos *A. cacans* Warming

Até o momento a literatura registra que em trabalho anterior a este foi realizado um estudo químico sazonal de partes do tronco, caules finos, folhas, flores e frutos de *A. cacans* de onde foram isolados os flavonóides: éter 7,3',4'-trimetílico do eriodictiol (**1**), 4', 5-diidroxi-3', 7-dimetoxiflavanona (**2**), ramnoglicosídeo da quecetina (rutina) (**3**) e a 7-*O*-glicosídeo de 5,4'-diidroxiflavona (**4**), os alcalóides: 3-metoxi-2-hidroxi noraporfina (asimilobina) (**5**), diacetato de noraporfina-1,2-metilenodióxido (michelalbina) (**6**), oxoaporfina (liriodenina) (**7**), aristolactama metoxilada nas posições 3 e 4 (aristolactama B-II) (**8**), aristolactama A-II. (**9**) e *N*-acetil-1,2-dimetoxi proaporfina (estefarina-acetilada) (**10**) e o ácido *p*-cumárico (**11**) (Figura 2, p. 4) (SAITO, 1990).

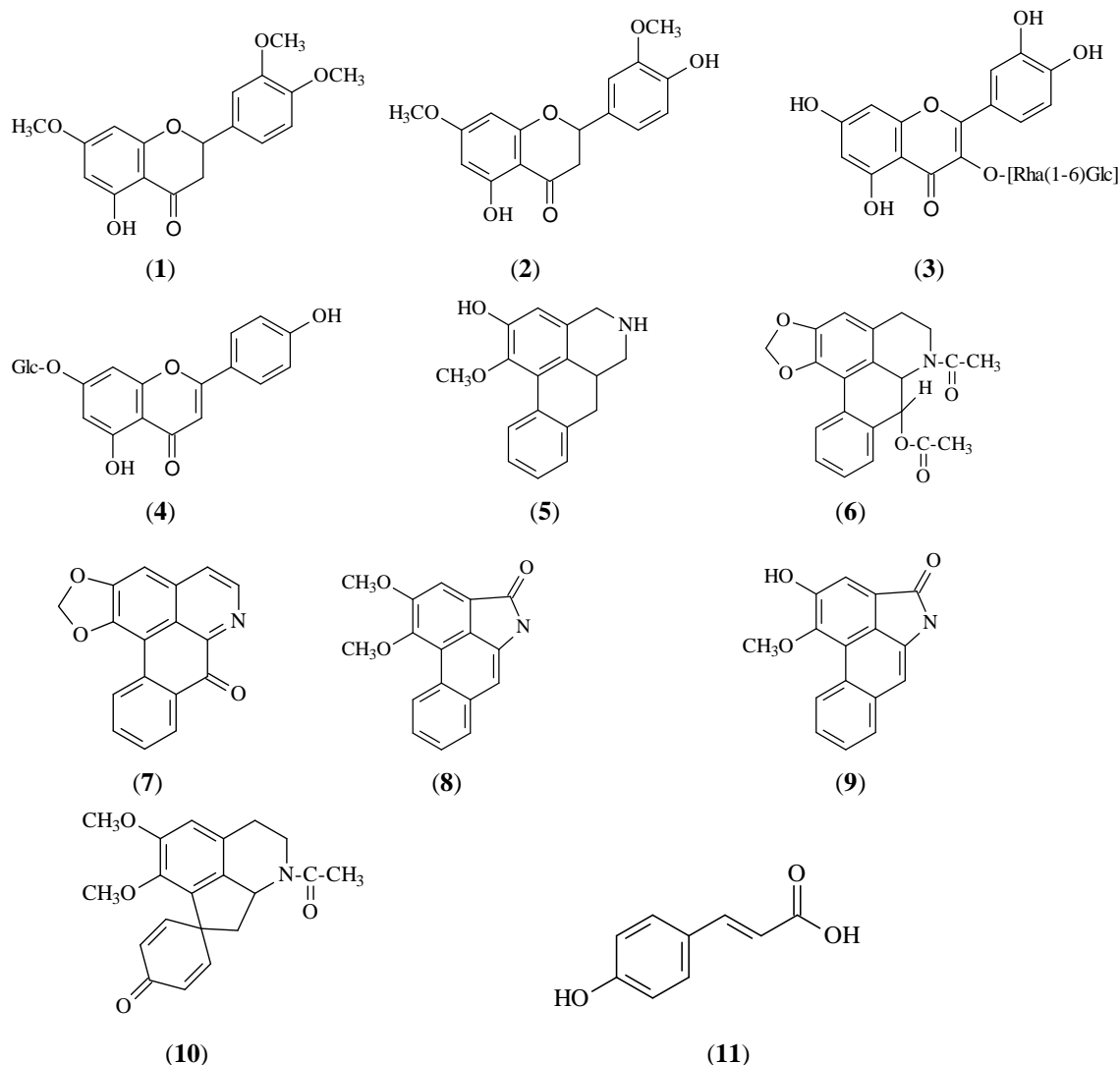


Figura 2. Substâncias isoladas de *A. cacans* Warm., em trabalho anterior a este.

3.2 Generalidades sobre a família Annonaceae

Esta família foi estabelecida por Antoine Laurent De Jussieu em 1789 (SILVA, 1982) é uma das maiores famílias, da Ordem Magnoliales (KESSLER, 1993; *apud*, MAAS, *et. al.*, 2001) com cerca de 130 gêneros e 2300 espécies (ALALI, 1999), constando de árvores, arbustos e lianas, espalhadas nas regiões tropicais, onde predomina, e subtropicais do globo terrestre (DI STASI, 2002), estando dividida em duas subfamílias: Annonoideae e Monoroideae. No Brasil só ocorrem representantes da primeira subfamília (BARROSO, 1978, *apud*, SANTOS, 1993).

Entre os gêneros conhecidos, 36 são americanos, destes, 29 são citados no Brasil, correspondendo a 260 espécies (BARROSO, 1978; *apud*, SANTOS, 1993; DI STASI, 2002).

Uma terça parte das espécies pertence aos gêneros *Guatteria* (250 *sp*), *Uvaria* (175 *sp*), *Xylopi*a (160 *sp*), *Polyalthia* (150 *sp*) (CRONQUIST 1981; *apud*, SANTOS, 1993) e *Annona* com aproximadamente 150 *sp* considerado o mais importante (KIILL e COSTA, 2003).

Com exceção daquelas do gênero *Asimina*, nativas de clima temperado que ocorrem na América do Norte e a espécie *Annona cherimola* Mill de origem altiplanos andinos, cultivadas em outras regiões do mundo, muitas das demais são nativas do Brasil (KAVATI, 1992, *apud* SCALOPPI, 2004). Aqui, a maior diversidade encontra-se na Amazônia, com um segundo centro na Mata Atlântica (LOBÃO *et al*, 2006).

Segundo Maas e colaboradores (2001) 19 gêneros e 153 espécies desta família foram identificados nas regiões, Central e Leste do Brasil, no Distrito Federal, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins.

Nos trabalhos de Laboeuf e colaboradores (1982), está reportada uma revisão da química dessa família.

Esta revisão cita a presença de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas, ácidos fenólicos como: caféico (12) e *p*-cumárico (13); alcalóides, sendo em sua maioria derivados da isoquinolina tais como, a coridaldina (14), isoquinolona isolada de *Enantia polycarpa*; salsinol (15) e seu precursor a dopamina (16) isolados de *Annona reticulata*; benzilisoquinolinas; policarpina (17) isolada da madeira de *E. polycarpa*, anomuricina (18) de *A. muricata* e reticulina (19) de *A. reticulata*; bisbenzilisoquinolina quaternária (20) isolada dos gêneros *Crematosperma*, *Uvária* e outros; bisbenzil-tetraidroisoquinolina, plebicina ou flebicina (21), isolada de *Uvária* e outros gêneros; protoberberinas; oxipalmatina (22) de *E. polycarpa*, e berberina (23) de *Xylopi*a *policarpa*; tetraidroprotoberberinas; aequalina (24) de *Mitrella kentii* e coreximina (25) de *A. Montana*; proaporfinas; crotisparina (26) de *Monodora angolensis* e estefarina (27) de *A. muricata* e *purpurea*; aporfinas; anonaina (28) de *A. cherimólia* e outras; anolobina (29) de *A. glaba* e outra; oxoaporfinas; aterospermidina (30) de *Enantia*, *Guatteria* e *Annona*, lanuginosina (31) de *Xylopi*a e várias outras espécies de Annonaceae; fenantrenos (aporfinas abertas); 8-metóxi-uvariopsina (32) de *Uvariopsina guineensis* e uvariopsina (33) de *U. solheidii*, *congolana* e *guineensis*; alcalóides indólicos (embora raros até o momento): annomontina (34) e metóxi-annomotina (35) de *A. Montana*.

São citadas também as presenças de flavonóides como a quercetina (36) e quercetina 3,7,3'-trimetil éter (pachipodol) (37) das cascas de *Pachypodanthium confine* e outros polifenóis; substâncias aromáticas como, pachisontol (38) e asaraldeído (39) de *Pachypodanthium staudtii*; além de óleos essenciais, sesterpeno β -cariofileno (40) das raízes de *A. Squamosa*.

Estão também presentes terpenóides como: o ácido xilopico (41) com propriedades antimicrobial isolado dos frutos de *Xylopi*a *aethopica*, o ácido polialtico (42), com esqueleto labdano isolado das cascas de *Polyalthia fragrans* e diterpeno com esqueleto do tipo esclerodano

(43) de *A. coriacea*; neolignanais (44) de *Duguetia surinamensis*, a piperina (45) isolada de *Xilopia brasiliensis* e triterpenos como o policarpol (46) (Figura 3, p.6-8) e outros, encontrados nas cascas de *Polythia oliveri*, como constituintes típicos desta família.

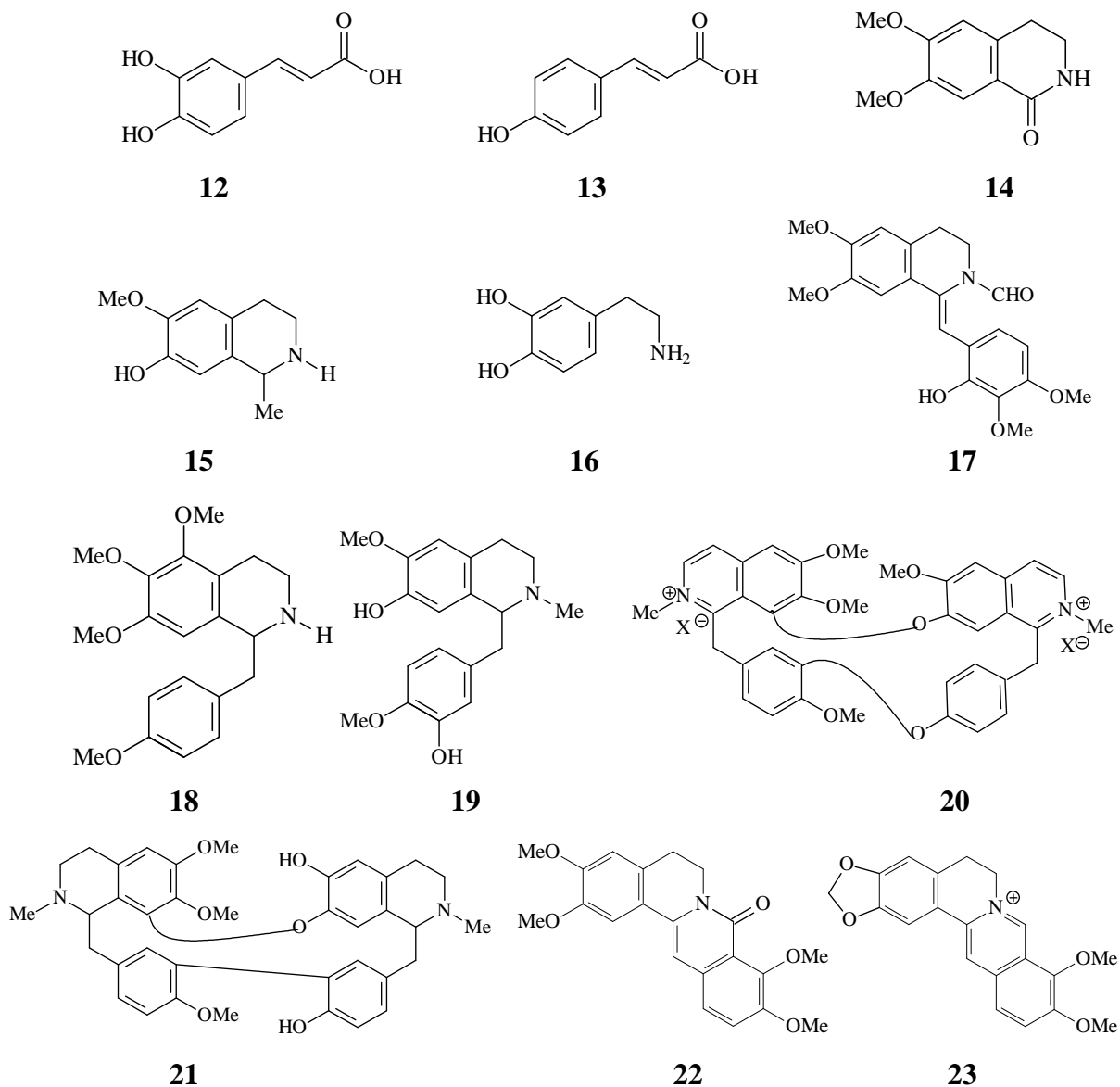
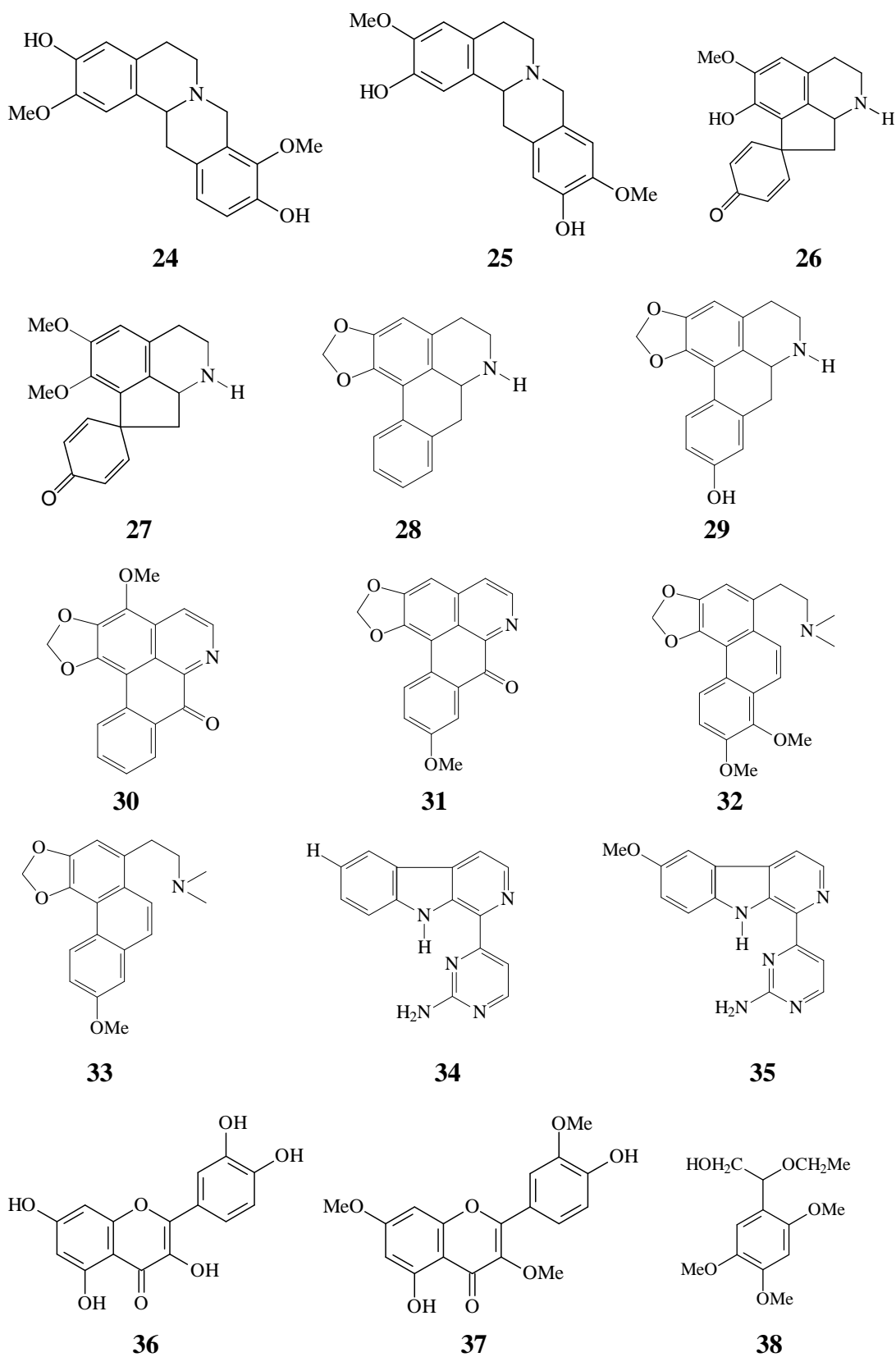


Figura 3. Substâncias consideradas típicas da família Annonaceae.

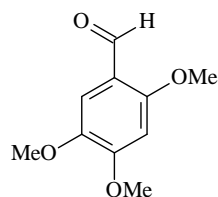
Continua página seguinte

Continuação da Figura 3.

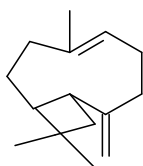


Continua página seguinte

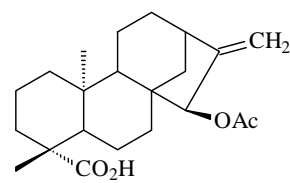
Continuação da Figura 3.



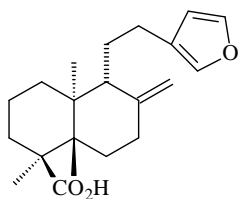
39



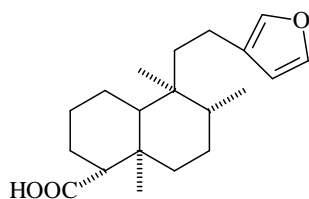
40



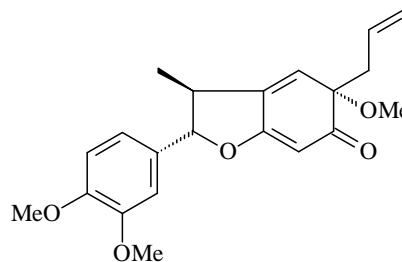
41



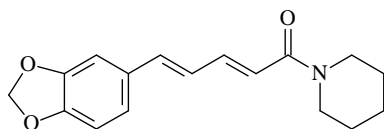
42



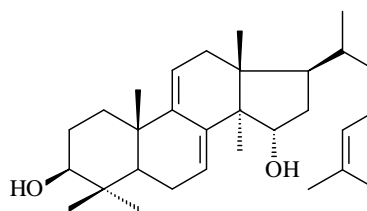
43



44



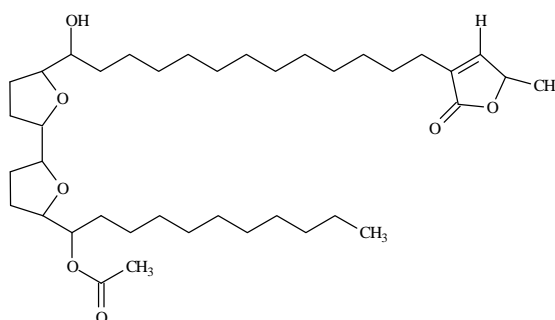
45



46

Embora a principal investigação química das Annonaceae, até 1982, estivesse voltada para os alcalóides, observa-se que esta família também produz uma variedade muito grande de substâncias pertencentes a vários grupos fitoquímicos (WATERMAN, 1986, *apud* PIMENTA, 1995).

Um estudo biomonitorado realizado por Jolad e colaboradores (1990), do extrato etanólico das raízes de *Uvaria accuminata*, direcionado por testes de atividade antileucêmica e teste de citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach (ATS), conduziu ao isolamento de uma substância cuja estrutura proposta foi a uvaricina (47). Esta foi o primeiro exemplo de uma nova classe de substâncias, extremamente bioativas, conhecidas como “acetogeninas de anonácea”. Depois disto várias acetogeninas foram isoladas de outros gêneros.



47

Economicamente a família é de apreciável importância como fonte de frutos comestíveis, principalmente dos gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Cananga* e *Rollinia*. As sementes de algumas espécies fornecem óleos comestíveis, enquanto as madeiras de outras são empregadas na construção civil e produção de álcool. As flores de *Cananga odorata* L., fornecem material para perfumaria (BARROSO, 1978, *apud* SANTOS, 1993).

Na fruticultura, dois gêneros são citados como os de maior importância, *Annona* e *Rollinia* (MAHDEEN, 2004, *apud*, SCALOPPI, 2004).

A família também é fonte de substâncias tóxicas. A literatura registra que o suco da casca da espécie de *Guatteria vernificiorlum* Mart., é usada misturada com outros vegetais para produzir o “Curare” que os indígenas costumam utilizar para envenenar as suas flechas (HOHNE, 1930).

3.3 O gênero *Annona*

O gênero *Annona* L. descrito por Carl Linnaeus inclui aproximadamente 150 espécies (DI STASI, 2002) é o segundo maior gênero da família Annonaceae depois de *Guatteria* nas regiões neotropicais (do México a Patagônia) (www.botanik.univie.ac.at/~rainer/annona.htm - 5k, 2005).

A distribuição geográfica das espécies neotropicais estende-se desde o norte do México com espécies como, *Annona purpúrea*, *A. globiflora*, sul da Flórida (*A. glabra*), Ilhas do Caribe, Brasil (*A. cacans*), estendendo-se através do continente sul Americano. Centros endêmicos incluem o México, as Grandes Antilhas, especialmente Cuba, altiplanos andinos e Planalto Central do Brasil (www.botanik.univie.ac.at/~rainer/annona.htm - 5k, 2005). Cerca de 130 espécies estão distribuídas no continente africano (DI STASI, 2002).

O nome *Annona* deriva de *Anon*, nome popular da planta no Haiti e que significa “colheita do ano” (DI STASI, 2002) e procede dos povos, *Taíno annon*, nativos da América pré-Colombiana que habitavam as Bahamas e as Grandes Antilhas (GUITAR, 2000).

As espécies cultivadas estão distribuídas em cinco grupos, sendo “**Guanabani**” (grupo das graviolas), “**Bilae florae**” (anonas com cera), “**Acutiflorae**” (pétalas afiladas), “**Annonellae**” (anonas anãs), e as “**Attae**” (anonas comuns) (SCALOPPI, 2004).

Os frutos comestíveis do gênero são de grande valor econômico como, às espécies conhecidas vulgarmente por pinha, ata, cherimólia, marolo, fruta de conde, pinha azeda, graviola e condessa (KIILL E COSTA, 2003). São exemplos relevantes os frutos do grupo, “**Guanabani**” tendo como principais representantes, a gravioleira, considerada a anonácea de maior potencial de industrialização, utilizada principalmente na produção de polpa (*Annona muricata* L.), a falsa gravioleira (*Annona montana* Macfad), além de outras e o grupo das “**Attae**” representados pelas espécies, condessa (*Annona reticulata* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), cherimólia (*Annona cherimola* Mill.) e atemólia (*A. cherimola* Mill x *A. squamosa*) (SCALOPPI, 2004).

A medicina popular cita que os frutos verdes, sementes, folhas e raízes de *Annona squamosa* L. são utilizadas como inseticida, as sementes são abortivas, as raízes atuam como purgativo drástico, as folhas são usadas contra furúnculos e ulcerações e, quando maceradas com sal, produzem cataplasma que induzem a supuração (HOHNE, 1930, *apud*, SANTOS, 1993, LORENZI e MATOS, 2002). A esta planta são atribuídas propriedades medicinais como, antitumoral e esterilizante (RAO *et al.*, 1979; ASOLKAR *et al.*, 1992; *apud* SHIRWAIKAR, *et al.*, 2004) e em vários grupos tribais na Índia as folhas jovens de *A. squamosa* são usadas para tratamento de diabetes (ATIQUE, *at al.*, 1985; *apud* SHIRWAIKAR, *et al.*, 2004).

Atividade antihelmítica foi observada de *A. senegalensis* Pers (MACKEI, *et al.*, 1956, *apud*, SAITO, 1990), um espécime africano.

No estado da Bahia as espécies, *Annona silvatica* St. Hil e *Annona cornifolia* St. Hil, cujos frutos são todos de sabor e cheiro agradável, são citadas na medicina popular como antiofídico. As sementes dos frutos, bem amadurecidos, torradas, e moídas em pilões de pedra até completa pulverização são usadas como antídoto contra veneno das cobras, qualquer que seja ela. Também é usada como preventivo para pessoas que trabalham em áreas de risco de serem atacadas por animais peçonhentos. O pó das sementes misturado com óleo de coco é usado para matar piolhos (BOMFIM, 1926), prática também utilizada na Índia Ocidental e América Central (ATIQUÉ, 1985).

Annona muricata L (gravioleira) é citada na literatura como uma espécie relativamente utilizada, com base na tradição popular, para tratamento de diversas enfermidades. Embora não haja comprovação científica da eficácia e segurança de suas preparações (LORENZI e MATOS, 2002), as folhas são usadas como antidiarréica e contra espasmo, as sementes como adstringentes e vomitivas, as casca como antidiabética e espasmolíticas (SOUZA, 1991, *apud*, LORENZI e MATOS, 2002) o chá das folhas como emagrecedor e contra algum tipo de câncer (TAYLOR, 1998, SOUZA; 1991, *apud*, LORENZI e MATOS, 2002). As flores, os brotos e raízes têm as mais variadas aplicações até como antídoto contra envenenamento (DI STASI, 2002). A infusão das folhas de *Annona montana* tem aplicação no tratamento de gripe e insônia (MOOTOO, *at al.*, 2000, *apud* WANG *et al.*, 2002)

Do ponto de vista químico o gênero *Annona* segue o mesmo perfil da família (SAITO, 1990). Alcalóides, terpenos, flavonóides e as acetogeninas são exemplos relevantes de substâncias com atividades biológicas presentes no gênero.

Trabalhos revelaram que os alcalóides aporfínicos presentes em *A. cherimolia* Mill, são responsáveis pela atividade antimicrobiana da espécie (DESPACHO, 1984, *apud* SANTOS, 1993).

Um estudo biomonitorado da raiz de *Annona dióica*, reveu elevada atividade citotóxica em células tumorais humana (VEGA, 2007)

De *Annona squamosa* L., foram isolados vários diterpenos cauranóicos dentre os quais o ácido *ent-16 β ,17*-diidroxicaur-19-óico, um princípio ativo anti-HIV, com $EC_{50} = 0,8 \mu\text{g/mL}$ (isolado também de *A. cacans* Warm. neste trabalho, Tabela 19, p.87). O extrato metanólico dos frutos fresco desta planta apresentou significativa inibição da replicação do HIV em células linfocíticas H9 (WU, *et al.*, 1996). O ácido caurenóico também presente em algumas espécies do gênero mostrou-se ativo *in vitro* contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas (*American trypanosomiasis*), na dose de 0,68 mg/mL (MELO, *et al.*, 2001) [sendo também isolado de *A. cacans* e codificado de AcF-01, (Tabela 16, p.69)]. Em diterpenos *ent*-cauranóicos, também foram observadas atividades de agregação antiplaquetária (YANG, *et al.*, 2002).

As substâncias caurânicas pertencem a uma classe de produtos naturais conhecidos como diterpenos, originalmente encontrados em plantas e fungos, podendo também ocorrer em organismos marinhos e insetos. Possuem uma ampla variedade de atividades biológicas tais como: hormonal, atuando no crescimento de plantas, abortiva, anti-hipertensiva, inibitória de crescimento de plantas, repelente de insetos além de atividade anti-HIV (TAKAHASHI, 1994, WU, *et al.*, 1996).

As acetogeninas presentes também neste gênero têm despertado um grande interesse por parte de pesquisadores devido o seu grande potencial de atividades biológicas como, inseticida, acaricida, fungicida, antiparasíticos e agente antitumoral (ZEFRA-POLO, *et al.*, 1996, *apud*

CORTÉS, 2005). Elas são consideradas como potentes inibidores do complexo I, NADH, Ubiquinona Oxiredutase, em mamíferos e em sistemas de transporte de elétrons mitocondrial de insetos e do NADH-oxidase do plasma de membranas de células cancerígenas (ZAFRA-POLO *et al.*, 1998; ALALI, *et al.*, 1999).

3.4 Acetogeninas de Annonaceae

As acetogeninas têm sido encontradas até agora em cerca de 14 gêneros da família Annonaceae (*Annona*, *Anomianthus*, *Artabotry*, *Asimina*, *Saccopetalum*, *Uvária*, *Xilopia*, *Dasymaschalon*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Ophrypetalum*, *Polyalthia*, *Porcelia* e *Rollinia*) (RUPPRECHT *et al.*, 1990; FANG *et al.*, 1993; ZENG *et al.*, 1995; CAVE *et al.*, 1997; ALALI *et al.*, 1999; CORTES *et al.*, 2005; *apud* LIMA, 2006), contudo é no gênero *Annona* onde está registrado o maior número destas substâncias (cerca de 289 correspondendo a aproximadamente 65% das descritas na literatura) em 20 espécies estudadas (*Annona atemóia* (*A. cherimola* x *squamosa*), *bullata*, *cherimolia*, *coriacea*, *crassiflora*, *densicoma*, *glabra*, *glauca*, *jahnii*, *montana*, *muricata*, *nutans*, *purpurea*, *reticulata*, *salzmanii*, *senegalensis*, *spinescens*, *Annona aff. Spraguei*, *squamosa* e *cornifolia*) (CORTES, *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006).

Estas substâncias apresentam-se como uma série de produtos naturais contendo em sua estrutura básica de 35 a 37 átomos de carbono. Estes são caracterizados por apresentarem uma longa cadeia alifática com um anel, γ -lactona-metil substituído (**48**) que pode algumas vezes sofrer rearranjo (Figura 7, p. 15) para cetolactona (**49**). Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados um, (**47**, **48**, **49** e **54**), dois (**50** e **47**) ou três (**51**) anéis tetraidrofurânicos (THF) e grupos funcionais oxigenados como: hidroxilas, (**47-52**, **54** e **56**), acetóxilas (**47**), cetonas (**52**), epóxidos (**53**), além de uma ligação dupla (**49**) ou ligações duplas (**54**) e/ou triplas (**55**). Um número menor dessas substâncias apresenta anel tetraidropirano (THP) (**56**) (Figura 4, p.11-12) (ALALI, *et al.*, 1999).

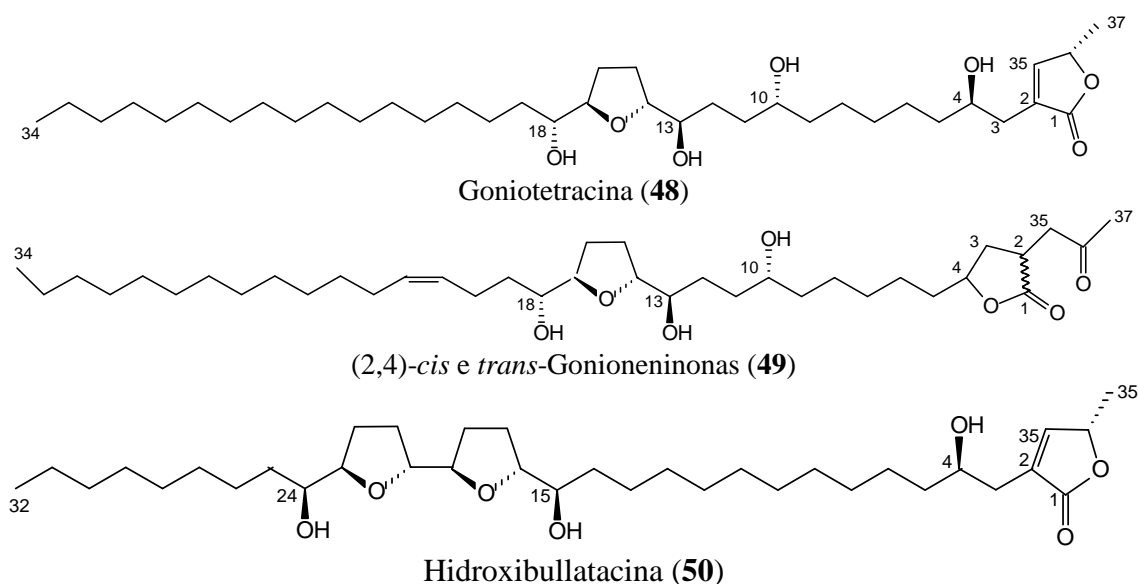
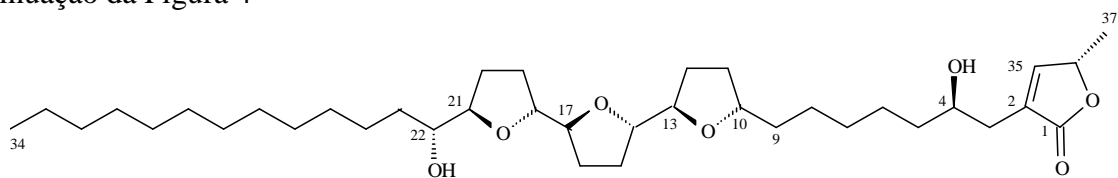


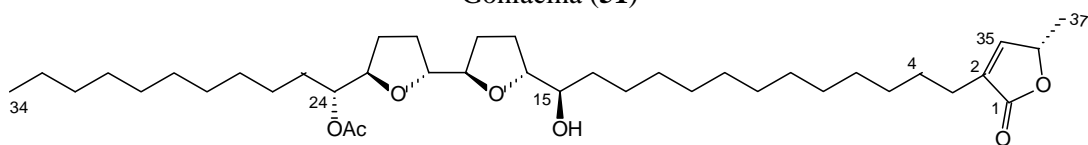
Figura 4. Características estruturais comuns em acetogeninas de Annonaceae.

Continua na próxima página

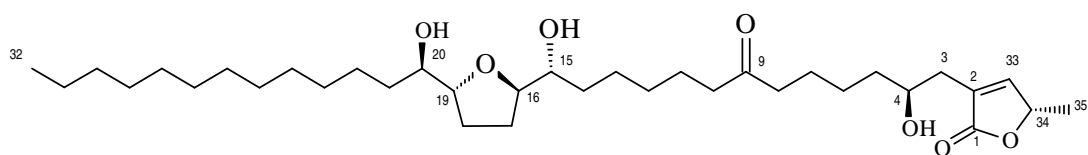
Continuação da Figura 4



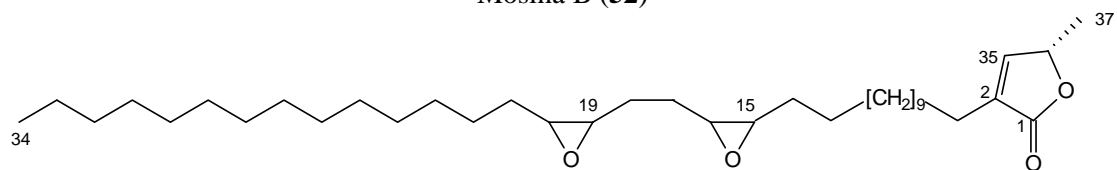
Goniacina (51)



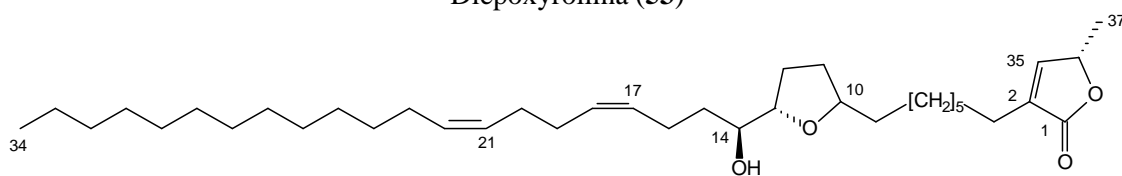
Uvaricina (47, p. 8)



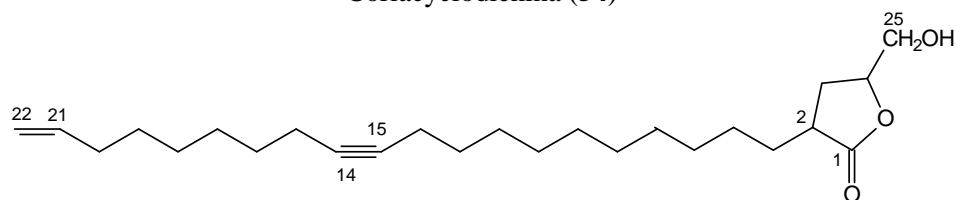
Mosina B (52)



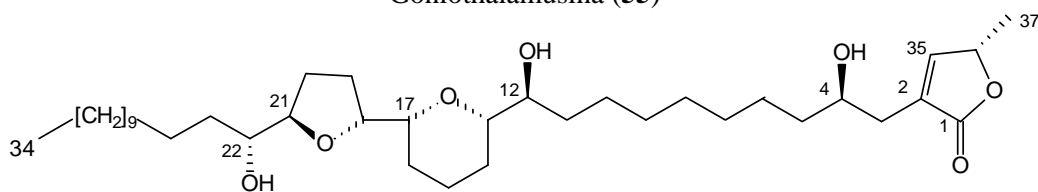
Diepoxyrollina (53)



Coriacyclodienina (54)



Goniotalamusina (55)



Muconina (56)

3.4.1 Classificação de acetogeninas de Annonaceae

Os diferentes tipos de acetogeninas estão classificados de acordo com as características estruturais das subunidades γ -lactona terminal 2,4 substituídas, número e rearranjo dos anéis tetraidrofurânico (THF) e/ou tetraidropirano (THP) e anéis epóxidos.

Os anéis lactônicos podem ser classificados como, γ -lactonas substituídas.

Os tipos descritos na literatura até o momento são: L-A, L-B, L-C₁, L-C₂, L-D, L-E, L-F, L-G e L-H (CORTÉZ *et al.*, 2005) (Figura 5, p. 13).

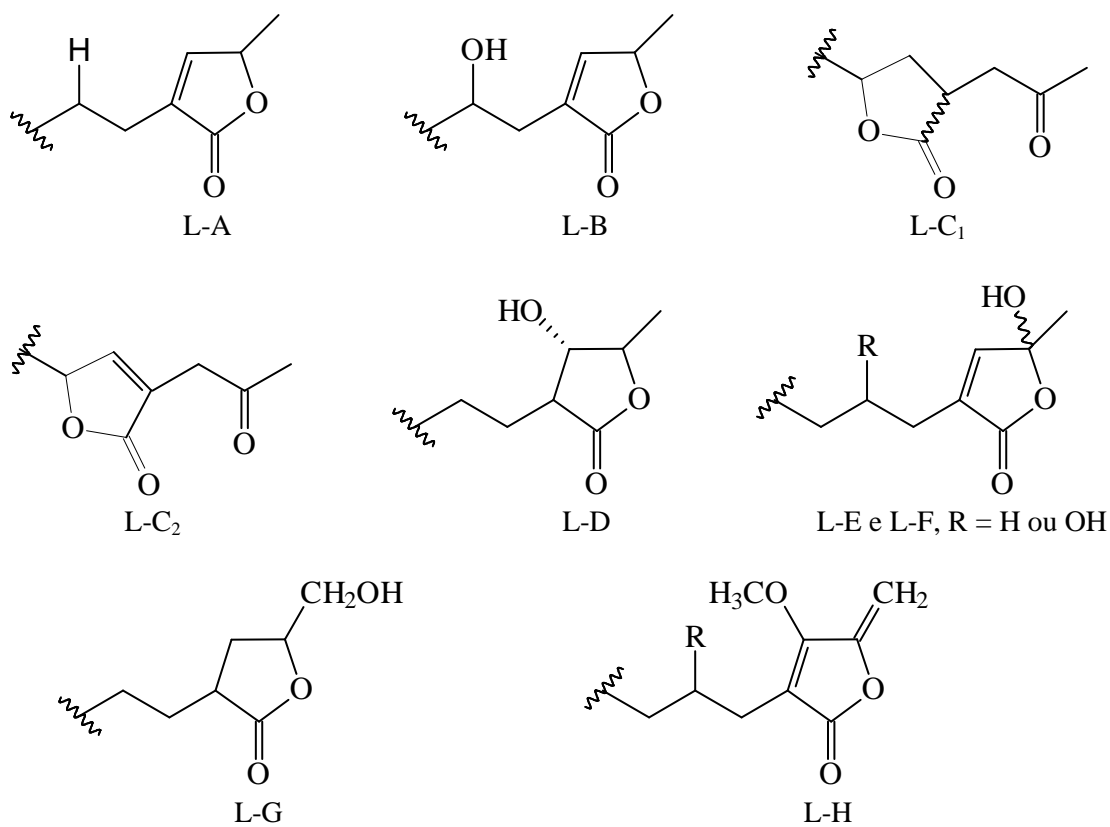


Figura 5. Classificação de anéis γ -lactônicos em acetogeninas de Annonaceae.

Os anéis (THF) e/ou (THP) podem ser α,α' -hidroxilados ou α -hidroxilados sendo classificados como: mono-THF e THP (T-A, T-B e T-G.3), *bis*-THF e/ou (THP) adjacentes (T-C, T-E e T-G.2), *bis*-THF e/ou (THP) não-adjacentes (T-D, T-H e T-G.1) e tri-THF (T-F). Os anéis epóxidos são dos tipos, E-A, E-B e E-C (Figura 6, p.14).

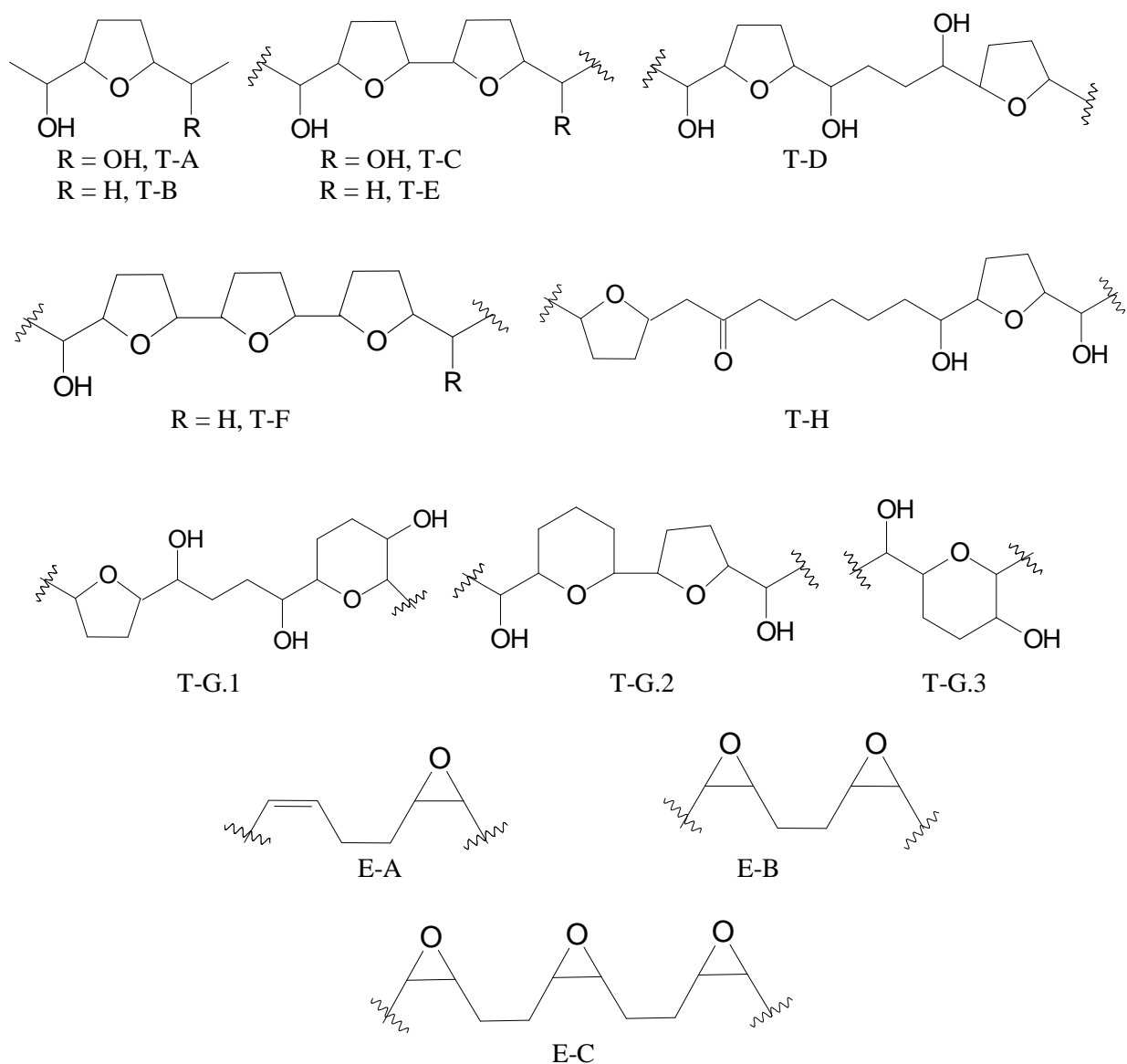


Figura 6. Classificação dos néis THF e/ou THP e anéis epóxidos em acetogeninas de Annonaceae.

Segundo Duret *et al.*, (1990) as acetogeninas do com anel lactônico do tipo L-B com hidroxila em C-4 (Figura 5, p. 13) algumas vezes podem sofrer rearranjo (caminhos **a** ou **b**), conforme o meio reacional (se ácido ou básico) durante o processo de extração, através de

translactonização para cetolactonas (*cis* e *trans*) conhecidas como isoacetogeninas do tipo L-C₁ (Figura 7). (CAVÉ *et al.* 1997).

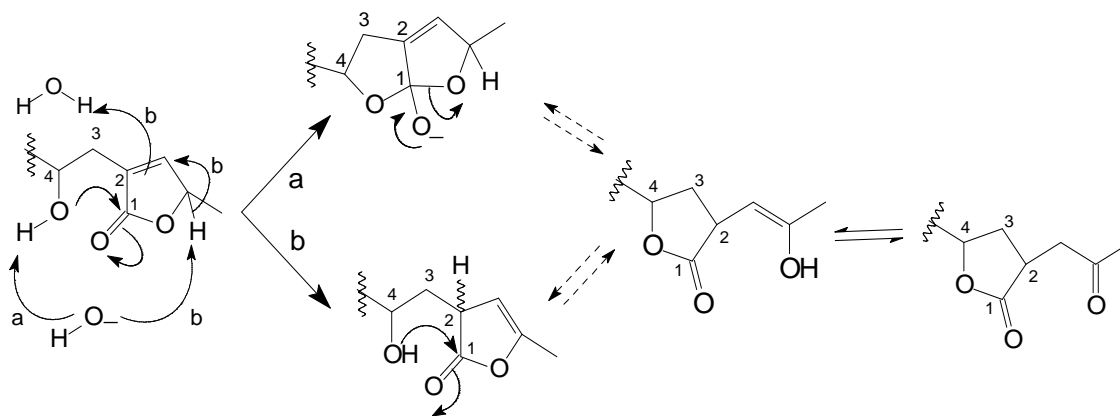


Figura 7. Propostas mecânicas para translactonização de acetogeninas do tipo L-B para o tipo L-C₁.

3.4.2 Hipóteses da origem biossintética de acetogeninas de Annonaceae

Acetogeninas são substâncias de origem policetídica, derivadas de ácidos graxos com cadeias contendo de 32 a 34 átomos de carbono combinados com uma unidade de 2-propanol (ALALI, *et al.*, 1999). Embora não haja relatos na literatura de trabalhos experimentais sobre a biossíntese de acetogeninas, análise retrossintética de substâncias conhecidas revela que estas são biossintetizadas através de combinações lineares de duas ou três unidades de carbono (ácido acético e propanóico) via acetil-CoA, malonil-CoA e propanil-CoA, através de mecanismos semelhantes a rota para a biossíntese de ácidos graxos (RUPPRECHT, *et al.*, 1990).

Os anéis tetraidrofurânicos podem ser obtidos por epoxidação de intermediários dieno trieno e cetotrienona (RUPPRECHT, *et al.*, 1990) (Figura 8, p.16). A existência de acetogeninas de cadeias lineares com ligações duplas, com anéis epóxidos e duplas e com mais de um anel epóxido, reforçam a proposta de serem estas precursoras das demais acetogeninas (Figura 4, p.11-12.). A estereoquímica dos anéis THF e dos grupos hidroxila adjacentes dependem da posição das ligações duplas, da face da epoxidação da forma de abertura e fechamento dos anéis epóxidos e dos anéis THF (RUPPRECHT, *et al.*, 1990; CAVÉ *et al.*, 1997).

O anel lactônico seria formado por uma condensação do tipo aldólica e um precursor com três átomos de carbono.

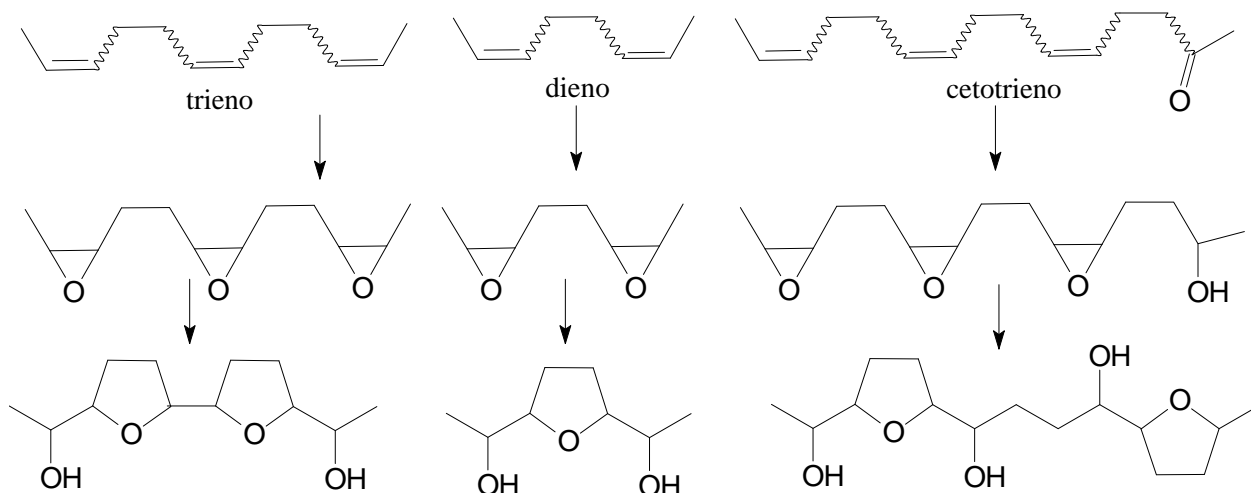


Figura 8. Hipótese para a biossíntese de anéis tetraidrofurânicos em acetogênicas de Annonaceae.

4 MATERIAL E MÉTODOS I

4.1 Material botânico

Annona cacans Warming (Annonaceae) foi coletada em Santa Cruz, subúrbio da cidade do Rio de Janeiro em junho de 2000 por Fernando Luiz da Silva Lopes, aluno do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A planta foi identificada com a colaboração dos botânicos, Dr. Rogério E. de Oliveira, da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) e das Dras. Marilene de Menezes Silva Conde e Inês Machile Oliveira da Silva da UFRRJ.

Uma exsiccata se encontra no herbário da UFRRJ sob o nº RBR 9962 e mudas foram plantadas no Jardim Botânico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica-RJ-Brasil).

4.2. Reagentes e equipamentos

Os solventes utilizados na preparação dos extratos foram de grau comercial e nas reações de derivações de grau P.A. das marcas MERCK e VETEC e os solventes de grau espectroscópico das marcas TÉDIA, MERCK e VETEC, foram usados para análise por CLAE.

Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatoplasmas de alumínio de gel de sílica F₂₅₄ da MERCK e para cromatografia em camada preparativa (CCP) placas de vidro de diâmetros variados. As cromatoplasmas foram reveladas por irradiação com luz no ultravioleta em comprimento de onda 254 e 366 nm e/ou com uso de reveladores químicos específicos ou por imersão em cuba contendo vapores de iodo.

Nas separações cromatográficas em coluna utilizou-se como adsorvente gel de sílica 60 G (70 - 230 mesh e 230 - 400 mesh, VETEC e MERCK) e Sephadex LH-20 (Sigma USA). As colunas de vidro utilizadas foram de vários tamanhos e diâmetros e eluídas a pressão ambiente ou a média pressão. A quantidade utilizada de suporte cromatográfico foi de 20 a 30 vezes a quantidade de amostra a ser cromatografada.

Os critérios de pureza adotados foram a obtenção de uma única mancha em cromatografia em camada delgada (CCD), variando-se a fase móvel e reveladores e a determinação de alguns pontos de fusão.

Como reveladores foram utilizadas, soluções de sulfato cérico (preparada com 0,3 g de sulfato cérico e 7 mL de ácido sulfúrico para 100 mL de solução aquosa). Reativo de Liebermann – Buchard (preparado com 50 mL anidrido acético e 1 mL de H₂SO₄ conc). Vanilina sulfúrica (preparado com 3,0 g de vanilina, C₈H₈O₃ 100% pura, 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de EtOH, e 30 mL de H₂SO₄). Reativo de Dragdorff (preparado com 1 mL de solução estoque, 2 mL de ácido acético e 10 mL de H₂O destilada) e Reativo de Kedde (2% de ácido 3,5-dinitrobenzôico-2N em KOH metanólico (1:1), para o diagnóstico para γ -lactona α,β -insaturada, dando cor rosa avermelhada). Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho MQAPF - 301 da Microquímica (sem correção) (UFRRJ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de ¹H e ¹³C (incluindo experimento em 2D), foram obtidos em espectrômetro da marca JEOL JNM-GX-400 (¹H: 400 e ¹³C: 100 MHz) (UENF) e BRUKER DRX-500 (¹H: 500 e ¹³C: 125 MHz) (UFC), utilizando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) ou resíduo do solvente CHCl₃ (δ_H 7,24) e o sinal central do tripleto em δ_C 77,00 do CDCl₃. Os solventes utilizados foram: clorofórmio, metanol, benzeno, piridina e água, todos deuterados.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico (EM IE) em aparelho CG/MS – QP505 -SHIMADZU, operando a 70 eV (UENF).

Os espectros de massas com modo de ionização por eletronspray foram obtidos em QtofMicro Micromass- Cromatografo Liquido da Waters modelo 2795 (UFRJ).

Dados de análise:

Faixa de massa molecular analisada de 50-1000,

Tempo de injeção 3 minutos,

Voltagem do cone (analito) 20v,

Voltagem do cone (referência) 25v,

Voltagem do capilar 1900v,

Temperatura da fonte 100 °C

Temperatura de dessolvatacao 120 °C,

Vazão do gás do cone 50 L/min

Vazão do gás de dessolvataçao 400 L/min.,

Referência, ácido fosfórico

Fluxo de injeção da referência 5,0 μ L/min.,

Fluxo de injeção do analito 0,05 ml/min.,

Fase móvel água/acetonitrila.

Amostras foram solubilizadas em aproximadamente 1mL de acetonitrila e 2 μ L de ácido fórmico.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR, utilizando pastilhas em KBr e ou/ filme em NaCl.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em cromatógrafo líquido Waters, bombas modelo 501, com detector UV-VIS modelo 486, injetor Rheodyne e integrador modelo 746 (Departamento de Química – ICEX - UFMG).

4.3. Reações de derivações

4.3.1. Metilação com diazometano

As preparações de derivados metilados auxiliou na determinação estrutural das substâncias isoladas, além de aumentar a solubilidade em clorofórmio deuterado. A solução de diazometano foi preparada de acordo com experimental descrito na literatura (VOGEL, 1989). Adicionou-se às substâncias dissolvidas em metanol uma solução etérea de diazometano em excesso. O solvente foi evaporado fornecendo as substâncias metiladas.

4.3.2. Acetilação com piridina e anidrido acético

As substâncias a serem acetiladas foram dissolvidas em anidrido acético e piridina (1:1) e deixadas e agitação magnética por 24 horas. Após as 24 horas foram lavadas com água destilada gelada formando um precipitado que foi filtrado e lavado várias vezes com água destilada. O material foi dissolvido em diclorometano, seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Após evaporação do solvente obtiveram-se as substâncias acetiladas (SHRINER, 1979).

4.3.3 Oxidação com tetróxido de ósmio

Numa solução de caurenoato de metila (AcF-01a) (26,0 mg, 0,082 mmol) em éter etílico (3,0 mL) foram adicionados piridina (13,0 mg, 0,164 mmol) e OsO_4 , (22,9 mg, 0,090 mmol). A mistura foi submetida a agitação magnética a temperatura ambiente. Após 3 horas foram adicionados 5 mL de solução saturada de bissulfito de sódio e a mistura agitada por mais 5 horas. O produto foi extraído com éter etílico (3 x 5 mL) e seco com NaSO_4 anidro, fornecendo 24,7 mg de um sólido branco correspondendo ao diol (AcF-01b) com 86% de rendimento (COREY *et al*, 1987; JAYANTA *et al*, 2000).

4.4. Análise por CLAE

A metodologia utilizada nesse trabalho para o estudo dos constituintes de *A. cacans* foi adaptada do descrito na literatura por Hoop e col., 1998 e Liaw e col., 1999.

A separação das substâncias foi realizada em coluna analítica de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm x 5µm de tamanho de partícula, Supelco), e como fase móvel foi utilizada

acetonitrila grau espectroscópico: água de milli-Q (40:60). A eluição foi desenvolvida em sistema isocrático, com velocidade de fluxo de 1 mL.min⁻¹ e monitorada a 220 nm. As amostras foram injetadas através de injetor Rheodyne (modelo 1725) com *loop* de 20 µL. As amostras e solventes analisados por CLAE foram, previamente, filtradas em membranas de nylon de 0,45µm obtidas da Sartorius.

Para as análises cromatográficas semipreparativa das frações (fl, 23-25, 155,0 mg; Cromatograma 1, Anexo I), o mesmo aparelho Waters foi utilizado, porém o *loop* utilizado foi de 1 mL. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna semipreparativa de fase reversa SPLC-18 (250 mm x 10 mm x 5µm de tamanho de partícula, Supelco), e como fase móvel acetonitrila: água (40:60). A eluição foi desenvolvida com velocidade de fluxo de 2,0 mL. min⁻¹ e o monitoramento feito a 220 nm. O volume de injeção da amostra foi de 100 µL.

5 MATERIAL E MÉTODOS II

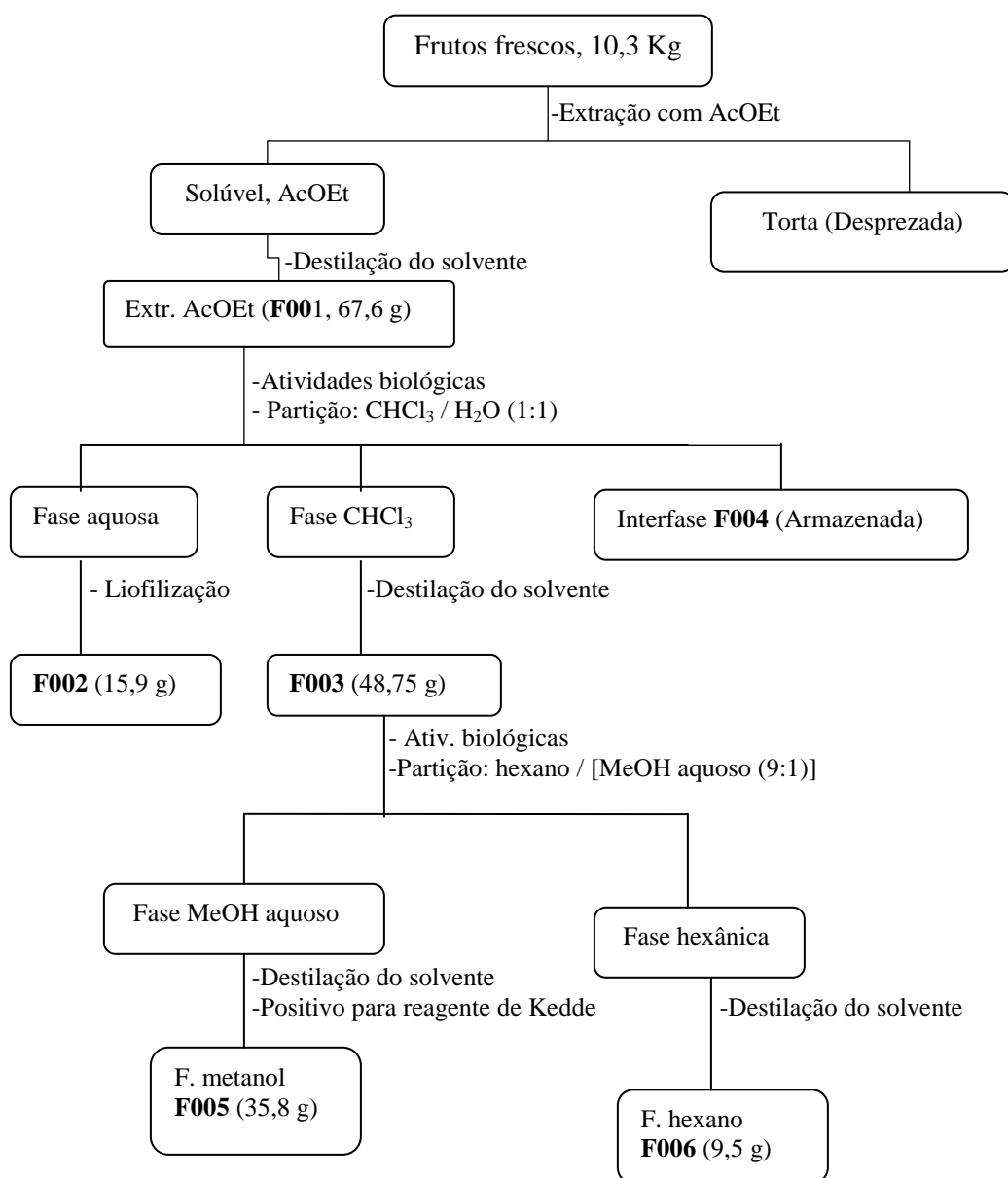
5.1 Obtenção, partição e fracionamento dos extratos dos frutos de *A. cacans* Warming, isolamento e purificação de substâncias

Os frutos frescos (10,3 Kg) foram cortados, apiloados e extraídos com cerca de 15 litros de AcOEt a temperatura ambiente até completa exaustão. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida em rotavapor. O extrato obtido (F001, 67,6 g) foi particionado entre clorofórmio e água (1:1) fornecendo após concentração dos solventes, uma fração aquosa (F002, 15,9 g), uma clorofórmica (F003, 48,75 g) e uma interfase (F004), que foi congelada para análise posterior. A fração em CHCl₃ (F003) foi particionado entre MeOH aquoso (9:1) e hexano, após evaporação dos solventes, a fração em hexano, um material graxo foi concentrada e pesada (F006, 9,6 g), bem como a fração em MeOH (F005, 35,8 g) (Esquema 1, p. 20). A fração em MeOH (F005) revelou teste positivo com reagente de Kedde, que é diagnóstico para a presença de acetogeninas (LIAW e col., 1999) deste foram tomados 30,0 g e cromatografado em coluna sobre gel de sílica usando como sistemas de eluentes, hexano/clorofórmio/acetato de etila nas seguintes proporções: hexano/CHCl₃ (8:2 até CHCl₃ 100%) e CHCl₃-AcOEt (9:1 até AcOEt 100%). Foram recolhidas 140 frações e reunidas segundo CCD e codificadas de FrAc₁ e o número das frações correspondentes (Esquema 2, p.21).

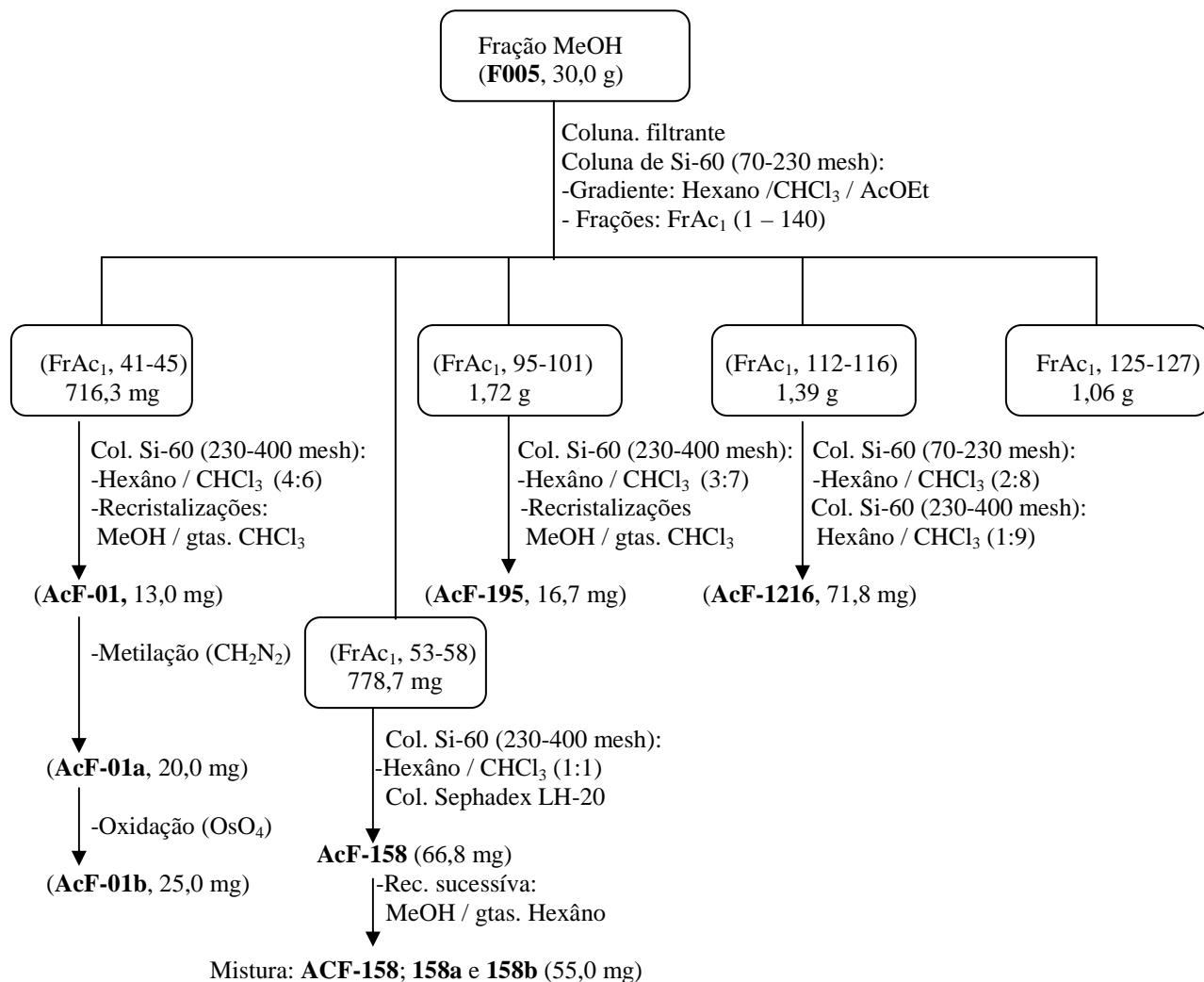
Os grupos de frações FrAc₁ (41-45), FrAc₁ (53-58), FrAc₁ (95-101) e FrAc₁ (112-116), revelaram teste positivo para terpenóides após tratamento com sulfato sérico e foram recromatografados em coluna sobre gel de sílica, as demais frações não foram trabalhadas seja porque constituem misturas muito complexa ou pouca quantidade de material ou por tratar-se de substâncias já identificadas. Subfrações obtidas foram cristalizadas e recristalizadas para fornecer quatro diterpenos caunânicos: o ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (AcF-01) - do qual se preparou o derivado metílico o *ent*-caur-16-en-19-ato de metila (AcF-01a) -, que foi usado também para a obtenção do éster metílico diidroxilado o *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (AcF-01b); o ácido *ent*-16 β ,17-diidroxilcauran-19-óico (AcF-1216), o *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (AcF-195) e ácido *ent*-cauran-17-formil-19-óico (AcF-158), que forneceu dois derivados caurânicos hemiacetálicos o ácido *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158a) e o ácido *ent*-(16*R*,17*S*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-

158b) (Esquema 2, p. 21). A estrutura de AcF-158a foi confirmada por cristalografia de RX (Figura 87, p. 106).

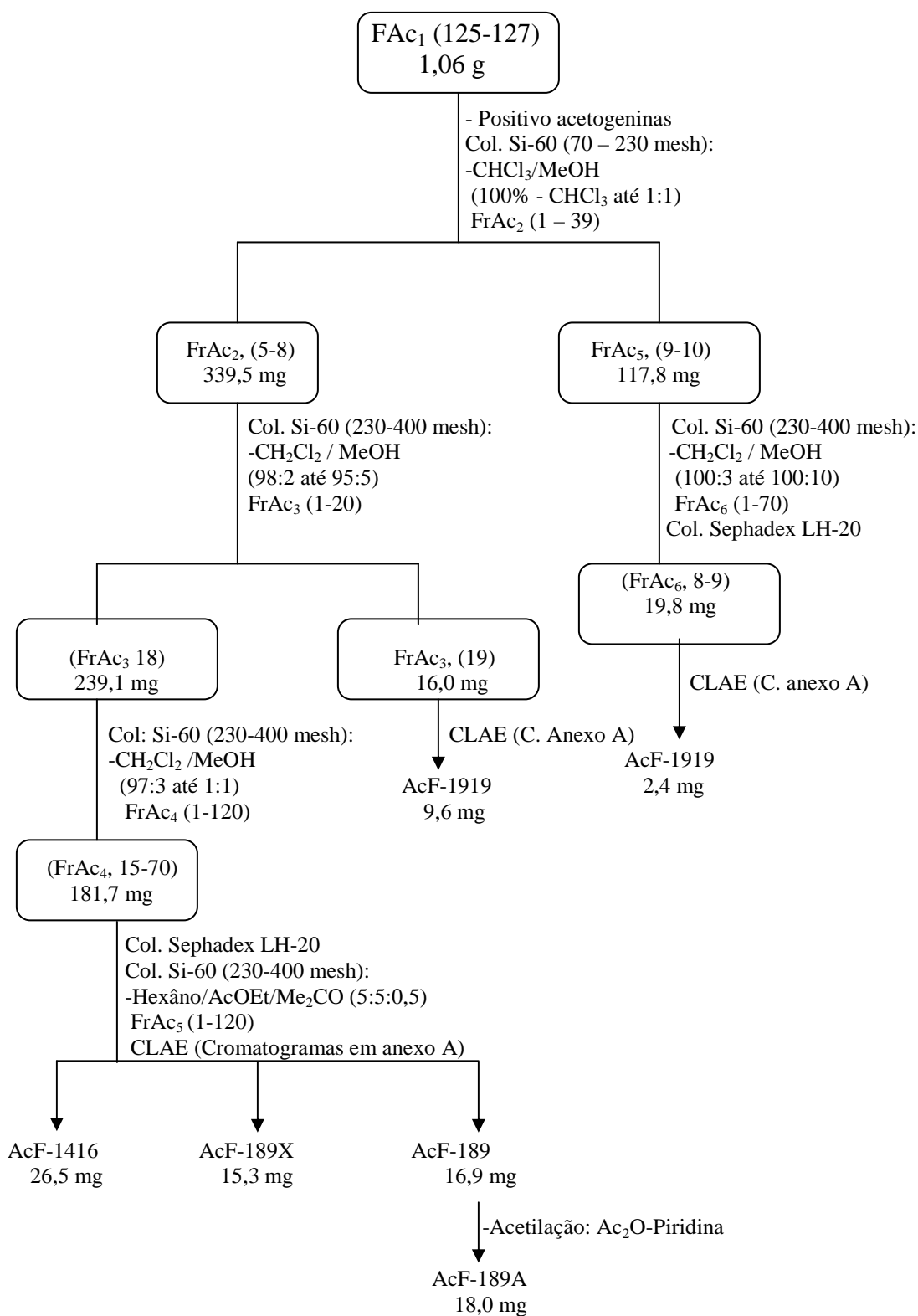
O grupo de frações FrAc₁ (125-127) revelou teste positivo para presença de acetogeninas e foi então recromatografado em coluna sobre com gel de sílica, depois com sephadex LH-20 e finalmente por CLAE (Cromatogramas 2, 3, 4, 5 e 6, anexo I) fornecendo misturas de acetogeninas que foram codificadas como AcF-1919, AcF-1416, AcF-189X e AcF-189. Esta última foi acetilada fornecendo AcF-189A (Esquema 3, p. 22). Devido à complexidade das misturas as acetogeninas presentes não tiveram suas estruturas definidas, o que deverá ser feito em trabalho posterior conforme metodologia registrada na literatura (GU *et al*, 1997).



Esquema 1: Obtenção e partição do extrato em acetato de etila dos frutos frescos de *A. cacans*.



Esquema 2: Fracionamento e obtenção de substâncias da fração metanólica dos frutos frescos de *A. cacans*.



Esquema 3. Obtenção de misturas complexas de acetogeninas da fração metanólico dos frutos fresco de *A. cacans*.

5.2 Obtenção, partição e fracionamento dos extratos da madeira de *A. cacans* Warming, isolamento e purificação de substâncias

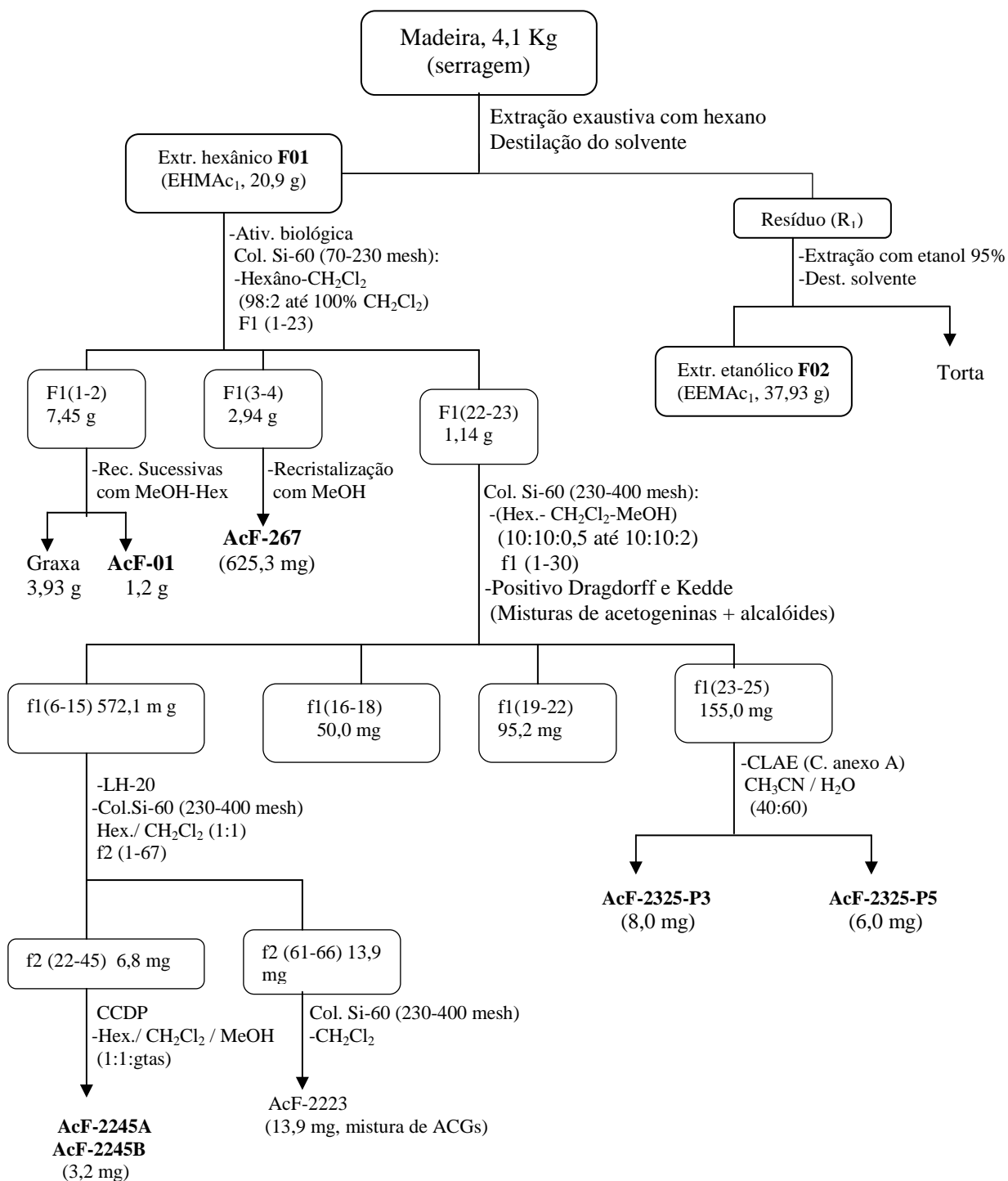
A madeira seca e pulverizada (serragem, 4,1 Kg) foi submetida à extração exaustiva a temperatura ambiente com cerca de 20 L hexano o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em rotavapor, obtendo-se uma fase solúvel em hexano, que após concentração do solvente forneceu 20,9 g de extrato hexânico (EHMAc₁, F01), e um resíduo (R₁) (Esquema 4, p.24).

O resíduo (R₁) foi suspenso em etanol 95% (cêrca de 15 L) e extraído exaustivamente. A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida em rotavapor, obtendo-se de extrato etanólico 37,93 g (EEMAc₁, F02).

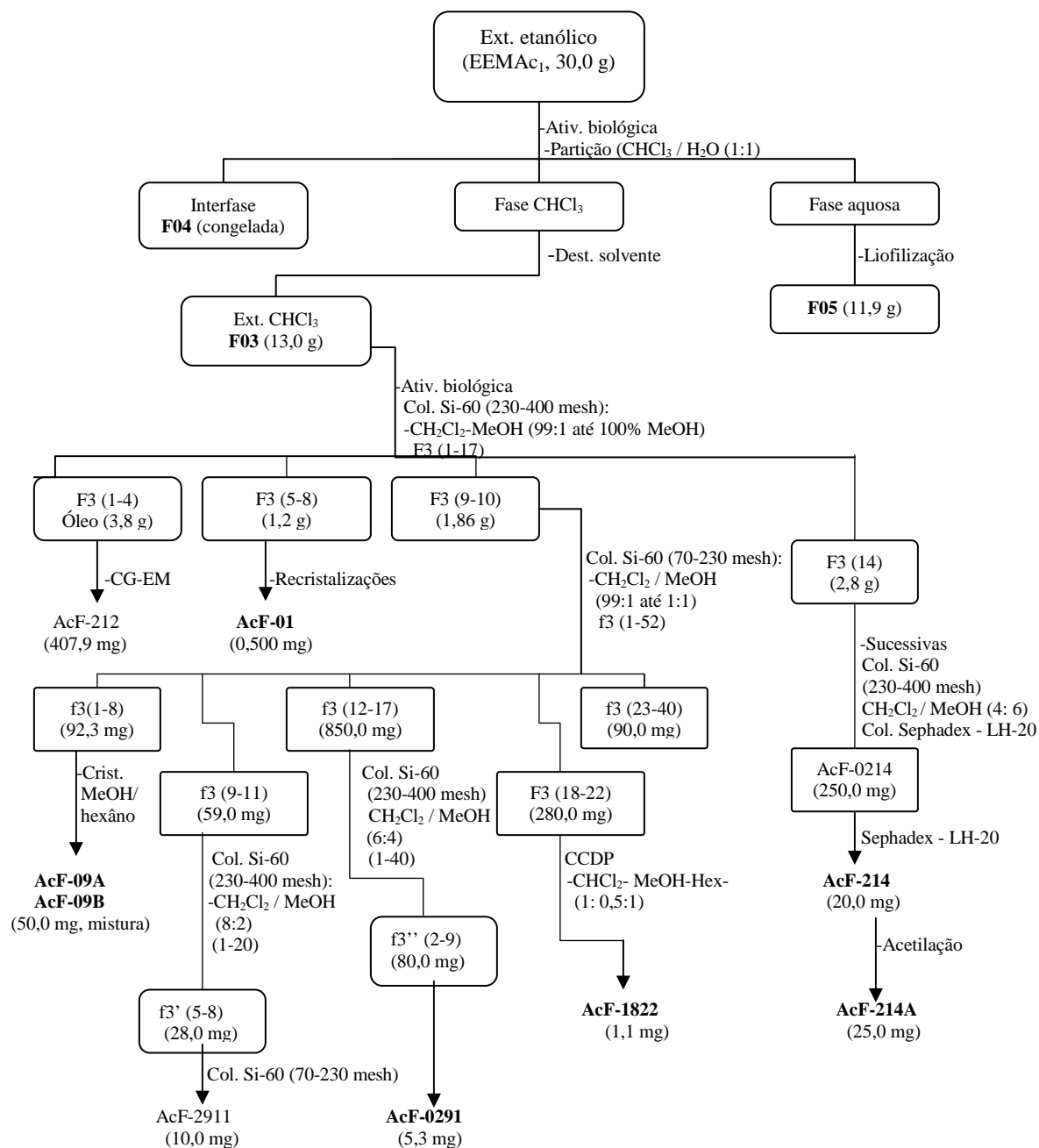
Após testes de atividade biológica os extratos hexânico (20,0 g) e etanólico (30,0 g) foram submetidos à cromatografia em coluna sobre gel de sílica 60 (70-230 e 230-400 mesh) com gradiente de solventes. As frações foram reunidas com base na observação da igualdade de R_f, sobre CCD.

Os grupos de subfrações foram submetidos a cristalizações sucessivas, recromatografia em coluna sobre gel de sílica, Sephadex LH-20 (Esquema 4, p. 24 e 5, p.25) e CLAE semipreparativa (Cromatograma 6, em anexo I).

Os procedimentos para fracionamento cromatográfico das subfrações analisadas estão representados através de esquemas. As frações não trabalhadas foram armazenadas em geladeira para análise posterior.



Esquema 4. Preparação dos extratos brutos e fracionamento cromatográfico da madeira de *A. cacans*.



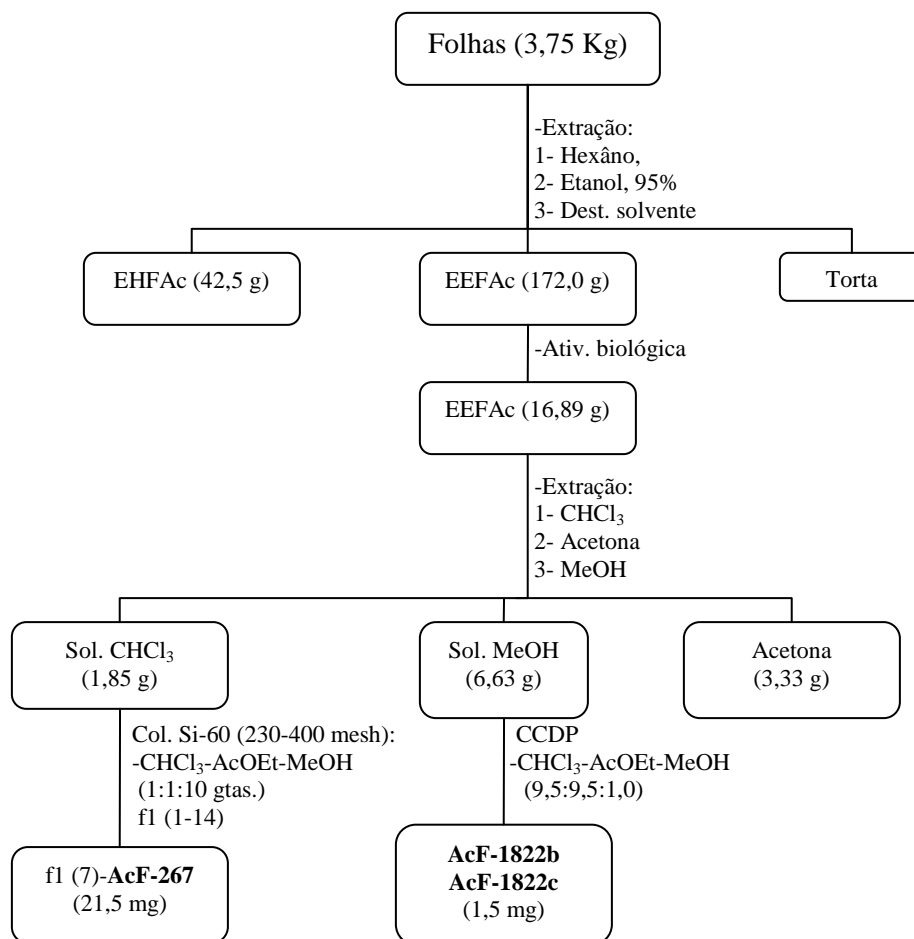
Esquema 5 Partição do extrato etanólico e fracionamento do extrato em clorofórmio da madeira de *A. cacas*.

5.3 Obtenção, partição e fracionamento dos extratos das folhas de *A. cacans* Warming, isolamento e purificação de substâncias

As folhas secas (3,75 Kg) foram moídas em moinho de bolas e os extratos obtidos por maceração a frio, até completa exaustão. Primeiro em hexano, 20 litros, e depois em 15 litros de etanol (95%). As soluções extraídas foram concentradas em rotavapor sob pressão reduzida. Obtiveram-se o extrato em hexano (EHFAc₁, 42,5 g) e em etanol (EEFAc₁, 172,0 g) que foram submetidos aos testes de atividades biológicas.

Do extrato etanólico foram tomadas 16,89 gramas, destas obtiveram-se três frações, uma solúvel em clorofórmio (ECFAc), uma em metanol (EMFAc) e um precipitado em acetona.

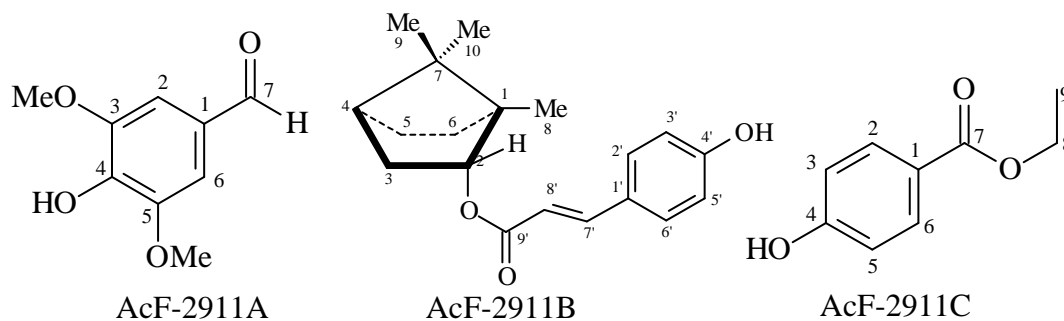
As frações em clorofórmio e metanol foram parcialmente cromatografadas (Esquema 6). Os extratos e frações não trabalhados foram guardados em geladeira para estudo posterior.



Esquema 6-Fracionamento do extrato em clorofórmio das folhas de *A. cacans*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização das substâncias, 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzaldeído (AcF-2911A), *p*-hidróxi-benzoato de etila (AcF-2911B) e *E*-*p*-hidroxicinamato de bornila (AcF-2911C)



Os derivados benzílicos e cinâmico codificados de AcF-2911A foram separados e identificados em uma mistura contendo mais de oito componentes conforme cromatograma de íons totais resultados da análise por CG/EM (Figura 9, p. 28). (Identificaram-se apenas as substâncias majoritárias com tempos de retenção: 6,25, 12,06 e 5,29 minutos e área integrada de 35,84 % (AcF-2911A), 40,79% (AcF-2911B) e 7,02%) (AcF-2911C) respectivamente.

A identificação das substâncias: AcF-2911A, AcF-2911B e AcF-2911C (Tabelas 1, p. 29, 2, p. 30 e 3, p. 31), foi obtida através da análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 10, p. 32) e ^{13}C (Figura 11, p. 33) que mostrou múltiplos sinais na região de substâncias aromáticas com intensidades diferentes.

Para a substância AcF-2911A (Tabela 1, p. 29) foram observados dois hidrogênios com valores de deslocamentos químicos em δ_{H} 7,16 (H-2 e H-6) e um hidrogênio em δ_{H} 9,82 (aldeídico), além de um intenso sinal em δ_{H} 3,98 (s), correspondente a duas metoxilas ligadas aos carbonos C-3 e C-5. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 11, p. 33) é visto um sinal referente à presença de carbonila aldeídica em δ_{C} 190,81 (C-7) que de acordo com os dados de correlação no espectro HMQC (Figura 12, p. 34) estar a uma ligação com o hidrogênio em δ_{H} 9,82.

O espectro de massas correspondente a AcF-2911A (Figura 13, p. 35; Esquema 7, p. 35), apresentou sinais em m/z 182 (M^+), 181 ($\text{M}^+ - 1$) 153, 167 e 139, consistentes com o padrão de fragmentação para a substância 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzaldeído.

O grupo *p*-hidroxicinamoíla da substância AcF-2911B, foi caracterizado pela presença de sinais de hidrogênios aromáticos do tipo AA'BB'em δ_{H} 7,44 (2H, d, $J = 8,4$; H-2' e H-6') e em δ_{H} 6,84 (2H, d, $J = 8,4$; H-3' e H-5') e dois sinais de hidrogênios *trans*-olefínicos em δ_{H} 7,61 [d, $J = 16,1$; H-7'] e δ_{H} 6,33 [d, $J = 16,1$, H-8'], conforme pode ser observados no espectro de RMN ^1H (Figura 10, p. 32).

A presença de um sinal em δ_{H} 5,01 (ddd, $J = 9,9$; 3,3; 2,0, H-2) a uma ligação com o carbono em δ_{C} 79,85 (C-2), revelada no espectro HMQC (Figura 12, p. 34) estar compatível com a presença de éster cuja carbonila é observada em δ_{C} 167,76 (C-9'). O grupo alifático da molécula foi caracterizado através da observação da presença de três metilas em δ_{C} 0,88 (C-8), 0,94 (C-9) e 0,90 (C-10), carbonos metilênicos e metínicos nos espectros de RMN ^{13}C (Figura 11, p. 33). Os espectros de correlação COSY (Figura 14, p. 36), NOESY (Figura 15, p. 37), HMBC (Figura 16, p. 38) e espectro de massas (Figura 17, p. 39; Esquema 8, p. 39) também foram

utilizados na identificação das unidades cinamoil e bornil. Após análises destes dados e comparação com a literatura (SUIRE, 1982) pode-se propor que AcF-2911B trata-se da substância *p*-hidroxicinamato de bornila (Biondinina C) substância majoritária na mistura.

A proposta estrutural para a substância AcF-2911C (Tabela 2, p. 30) foi estabelecida através da análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 10, p. 32) e ^{13}C (Figura 11, p. 33). No espectro de RMN ^1H pode-se observar os sinais em δ_{H} 7,95 (d, $J = 8,4$; H-2 e 6), 6,85 (d, $J = 8,4$; H-3 e 5). Os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C não foram todos observados devido à complexidade dos espectros e a sobreposição de sinais, contudo o espectro de massas (Figura 18, p.40; Esquema 9, p. 40) corroborou com a proposta de que AcF-2911C, trata-se da substância *p*-hidroxibenzoato de etila.

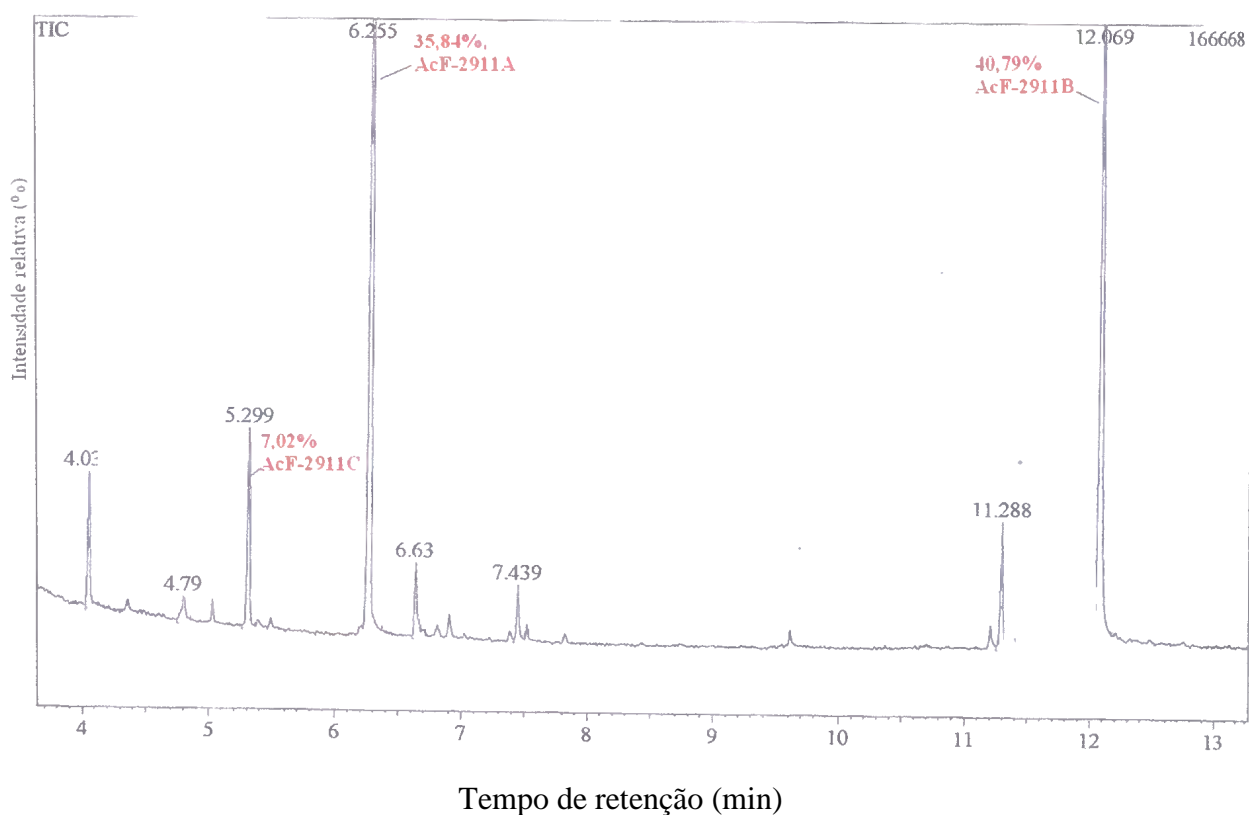
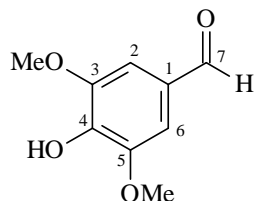


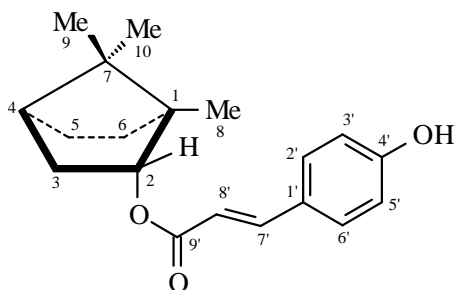
Figura 9. Cromatograma de íons totais obtidos por CG/EM para a mistura AcF-2911.

Tabela 1. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-2911A obtidos através de experiências em 1D e 2D, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.



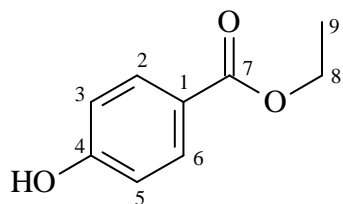
	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
1	128,37	-	H-7	
3	147,33	-		H-2
4	140,82	-		H-2, H-6
5	147,33	-		H-6
CH				
2	106,71	7,16 (s)		H-7
6	106,71	7,16 (s)		H-7
7	190,81	9,82 (s)		H-2, H-6
CH₃				
MeO-3	56,47	3,98 (s)		MeO-3
MeO-5	56,47	3,98 (s)		MeO-5

Tabela 2. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-2911B obtidos através de experiências em 1D e 2D, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) estão em ppm e a constantes de acoplamento (J) em Hz.



		HMQC	HMBC
C	δ_{C}	δ_{H}	
4'	157,59	-	H-2',H-6'
9'	167,76	-	H-7'
CH			
2	79,85	5,01 (ddd, 9,9, 3.3, 2,0)	3H-8
4	44,94	1,70	3H-9; 3H-10
2',6'	129,89	7,44 (d, 8,4)	H-7'
3',5'	115,81	6,84 (d, 8,4)	
7'	143,87	7,61 (d, 16,1)	H-2',H-6'
8'	116,25	6,33 (d, 16,1)	
CH₂			
3	36,86	2,40 1,05	
5	28,06		
6	27,22		3H-8
CH₃			
8	13,54	0,88 (s)	
9	18,87	0,94 (s)	3H-10
10	19,72	0,90 (s)	3H-9

Tabela 3. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-2911C obtidos através de experiências em 1D e 2D, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.



HMQC		
C	δ_{C}	δ_{H}
1	129,89	-
4	159,77	-
7	190,81	-
CH		
2,6	131,86	7,95 (d, 8,4)
3,5	115,09	6,85 (d, 8,4)
CH₂		
8	60,67	4,34 (q, 7,3)
CH₃		
9	28,06	1,38 (t, 7,3)

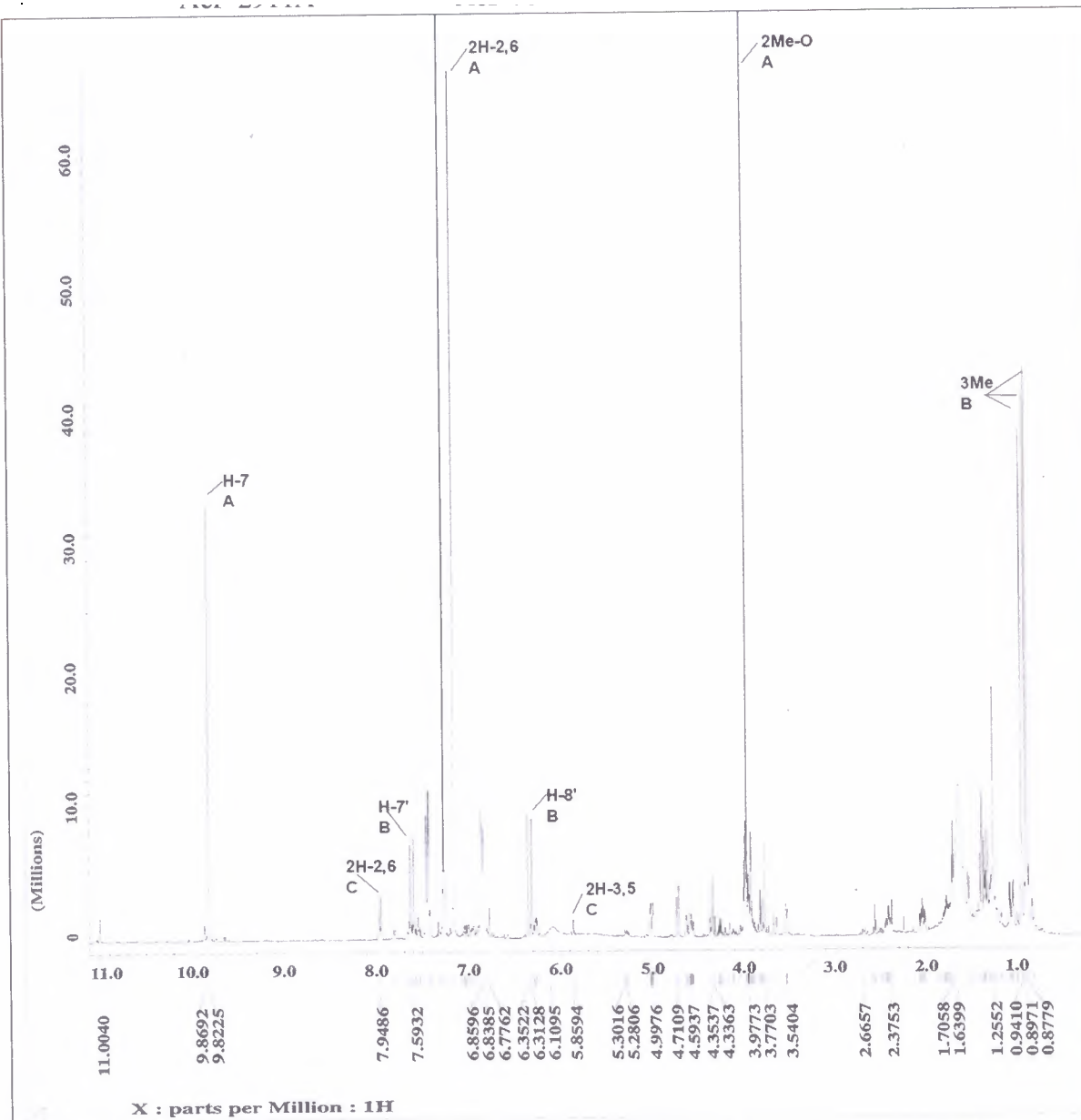
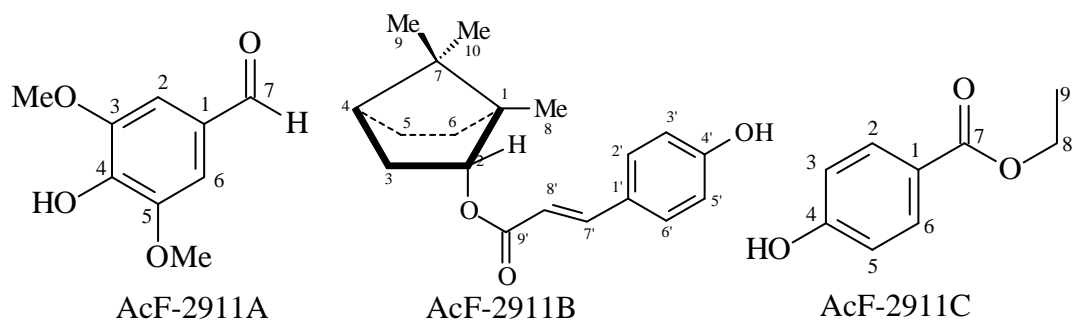


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da mistura AcF-2911, em CDCl_3 .

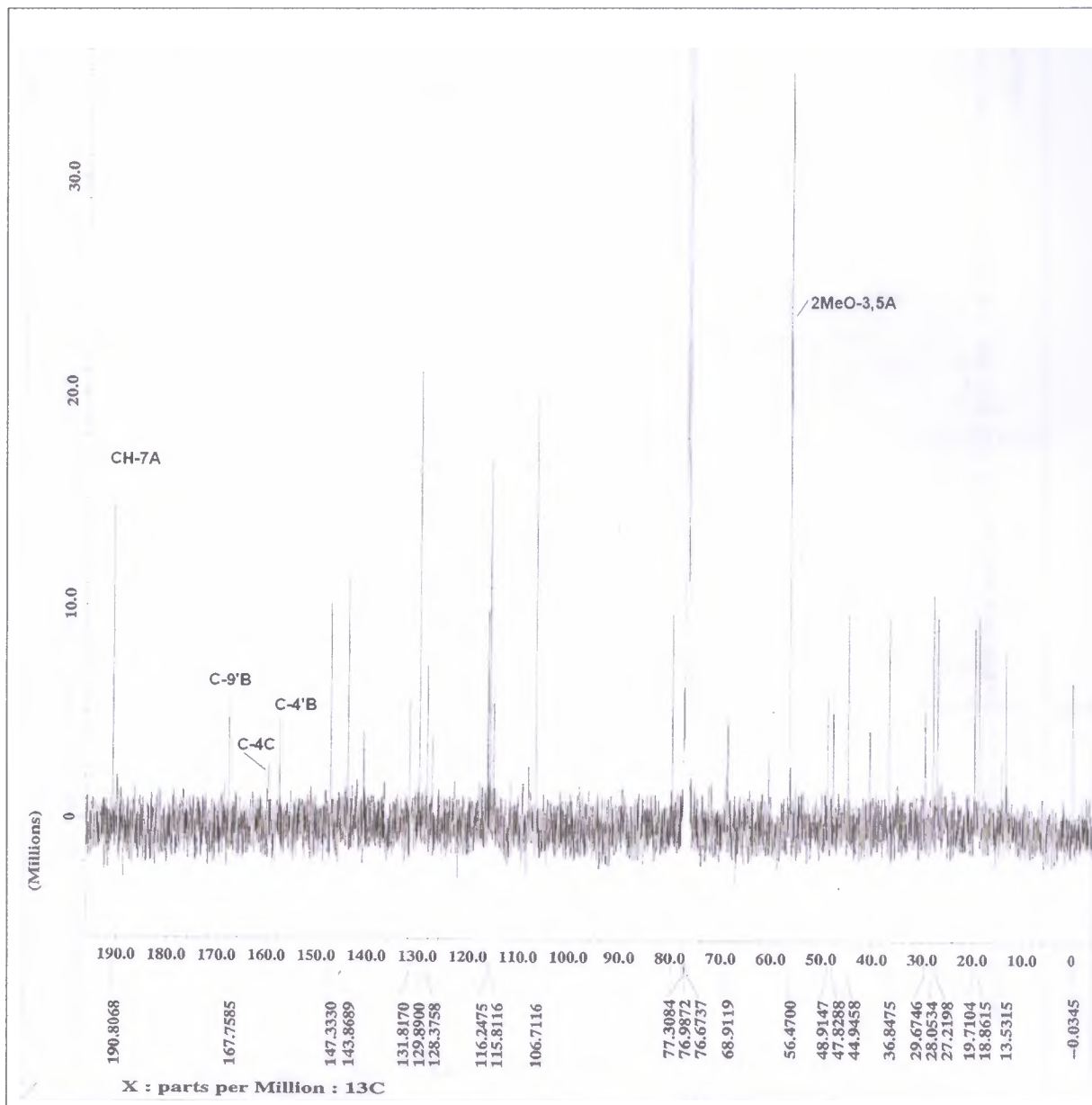
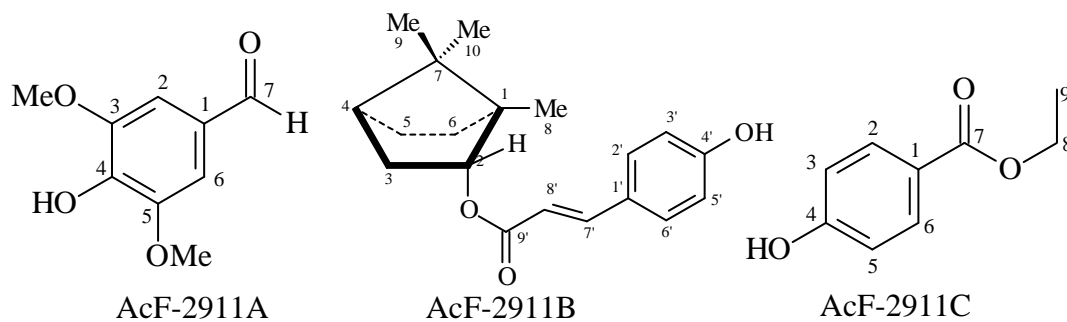


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura AcF-2911, em CDCl_3 .

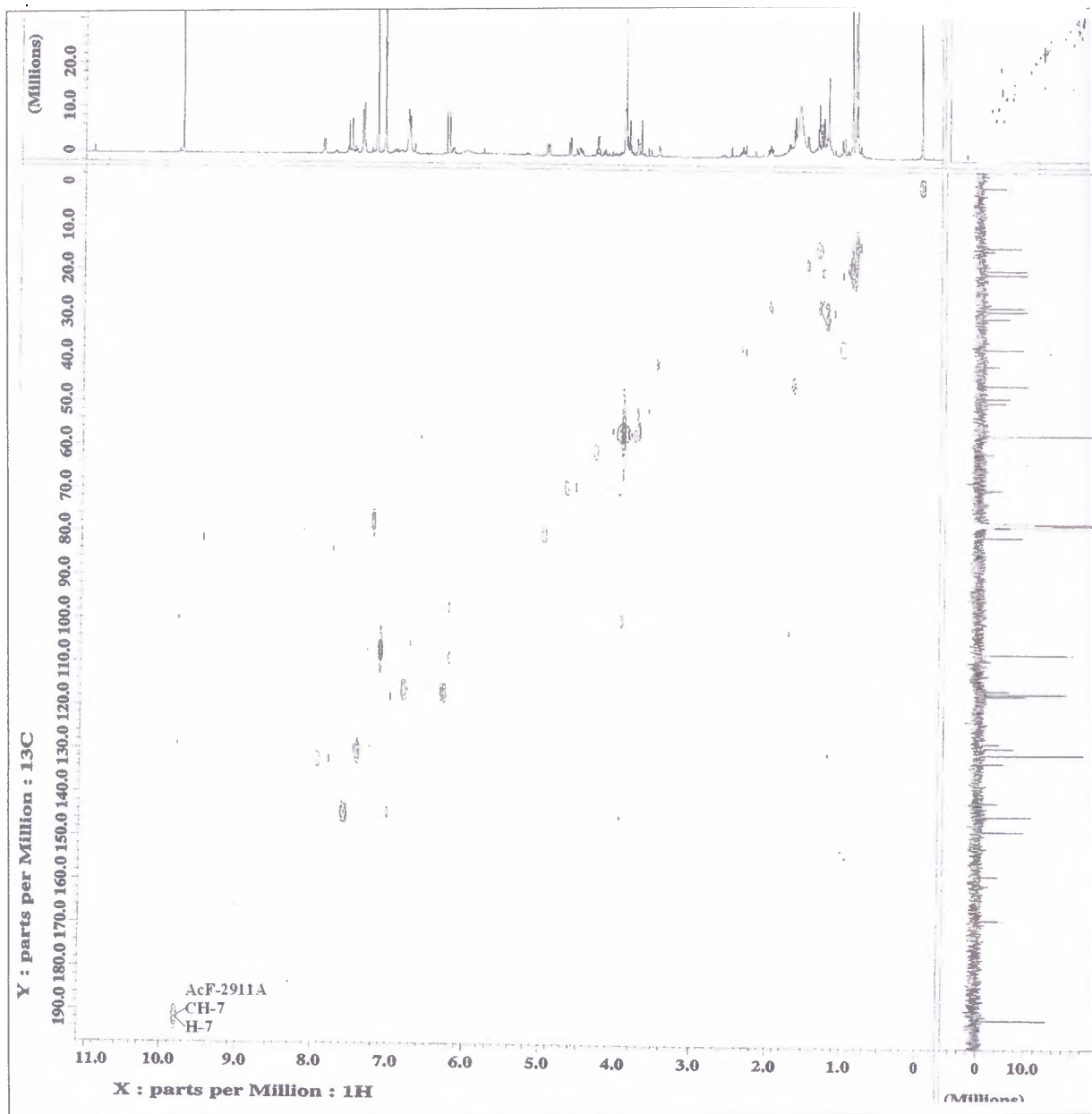
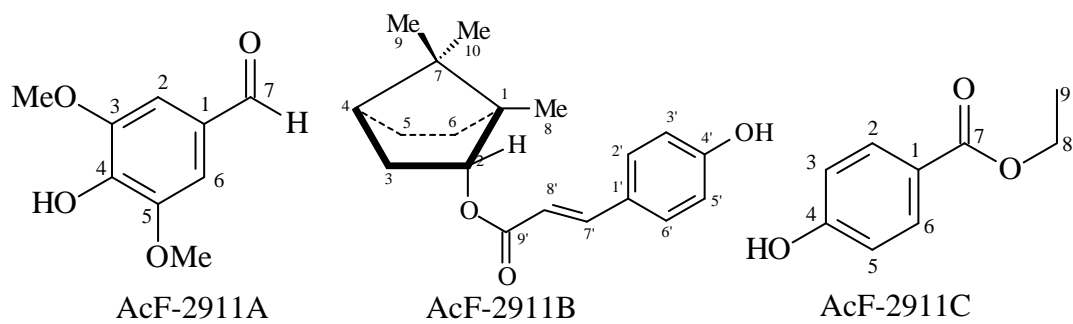


Figura 12. Mapa de correlações HMQC da mistura AcF-2911, em CDCl_3 .

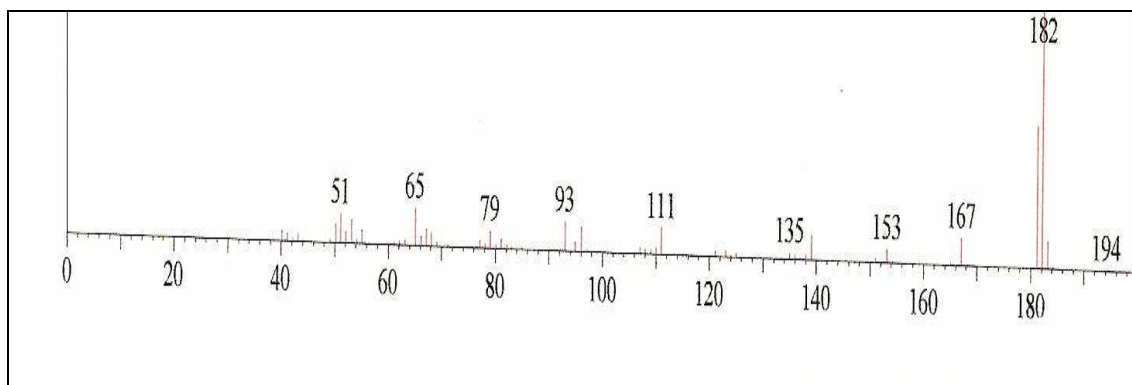
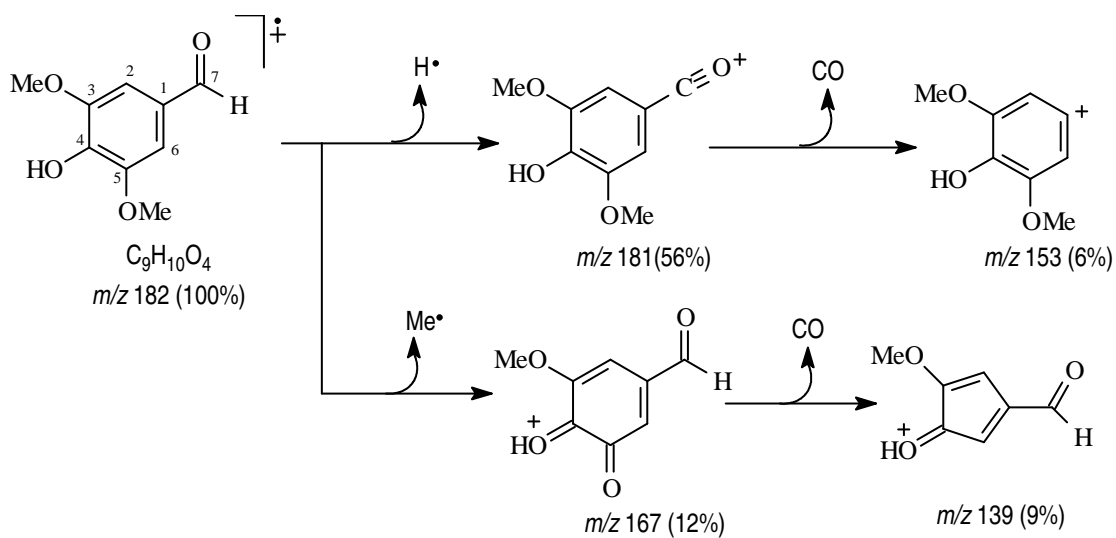


Figura 13. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF-2911A.



Esquema 7. Proposta mecânica de fragmentação para justificar os principais sinais observados para a substância AcF-2911A.

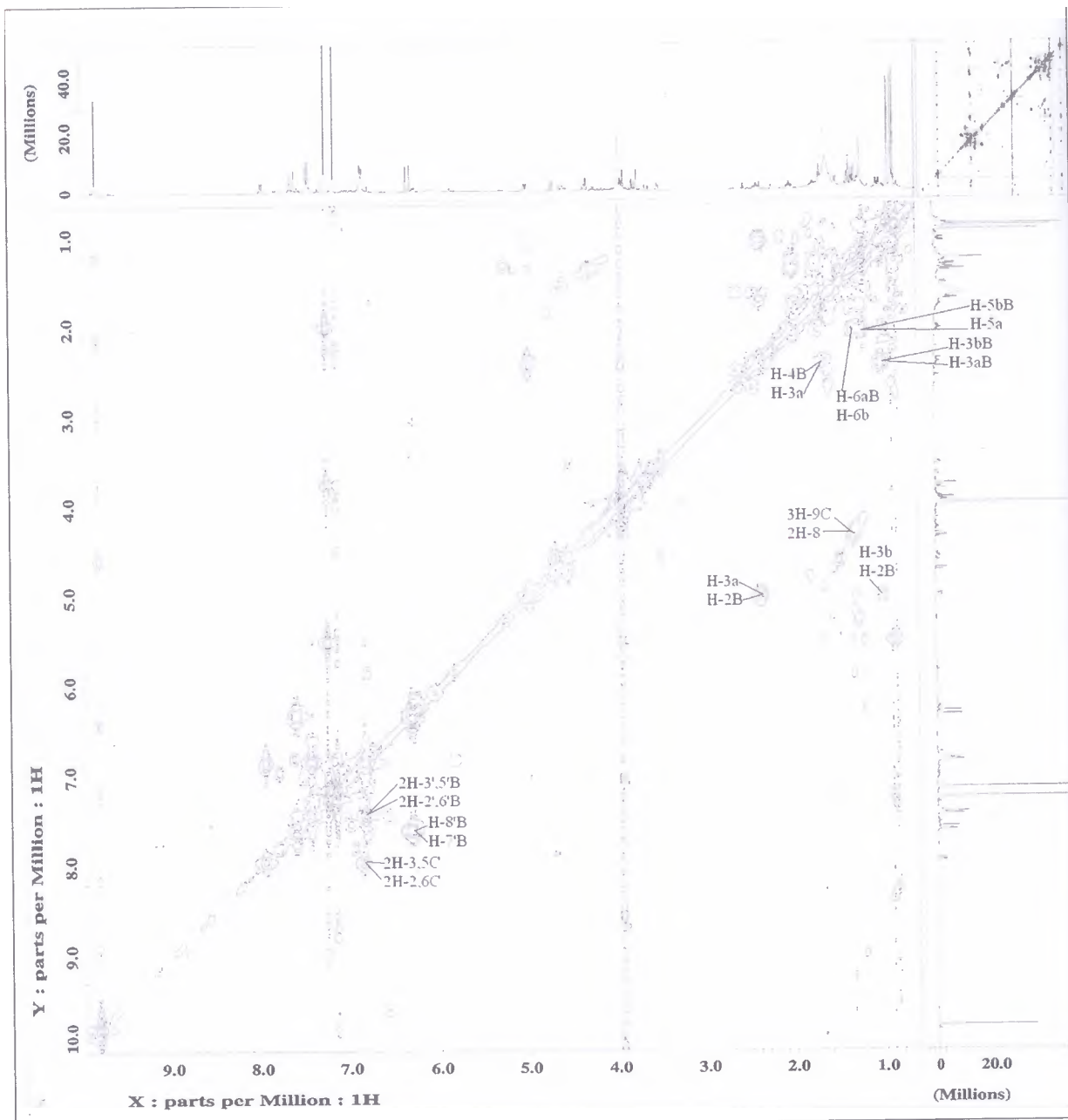
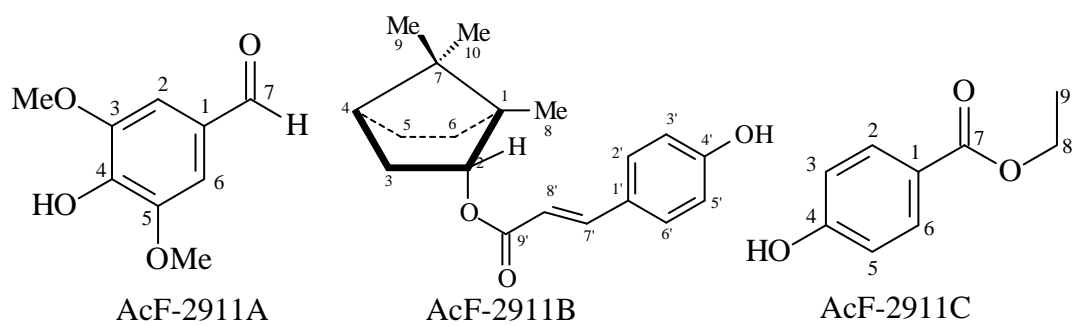


Figura 14. Mapa de correlações COSY da mistura AcF-2911, em CDCl_3 .

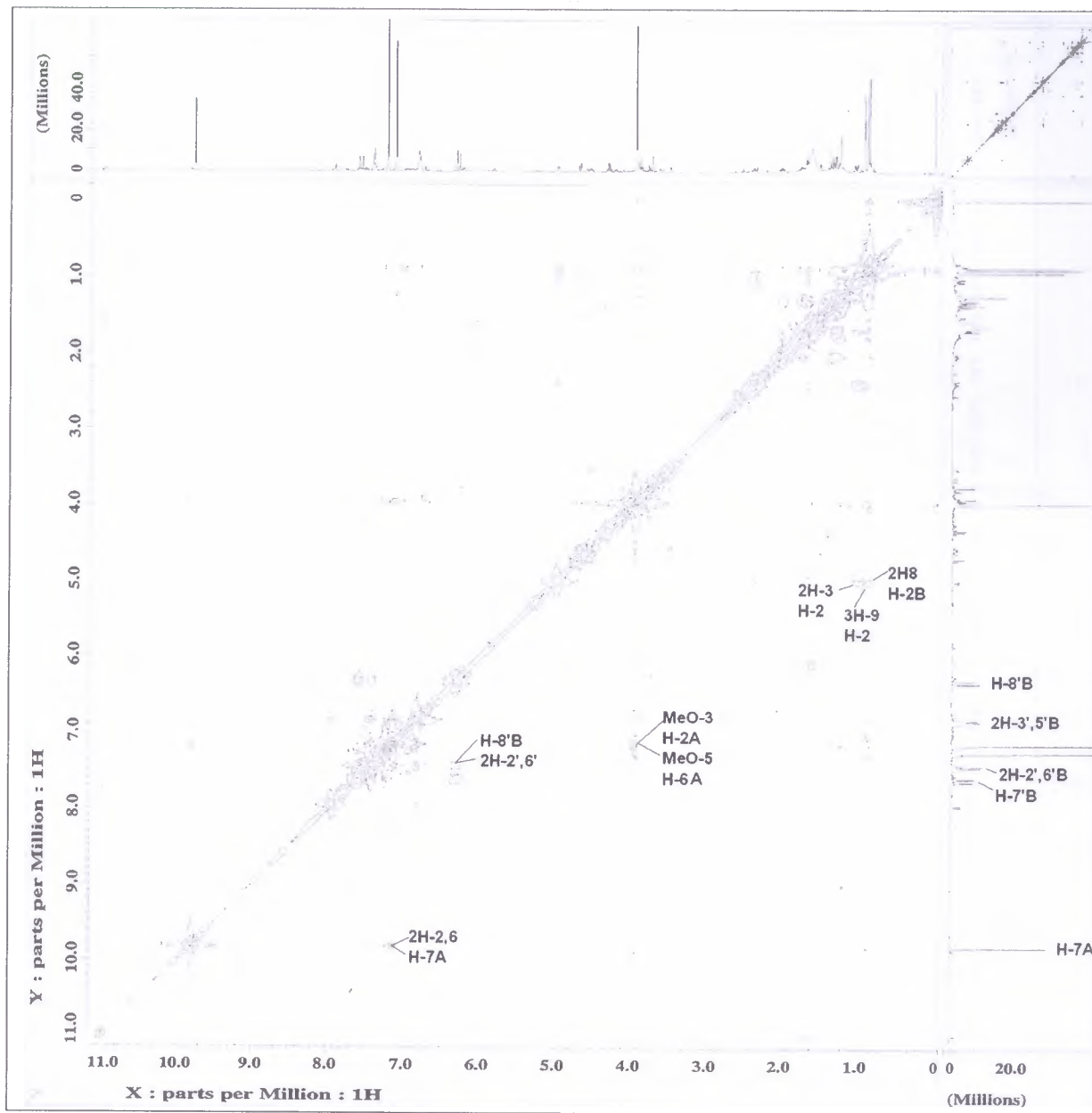
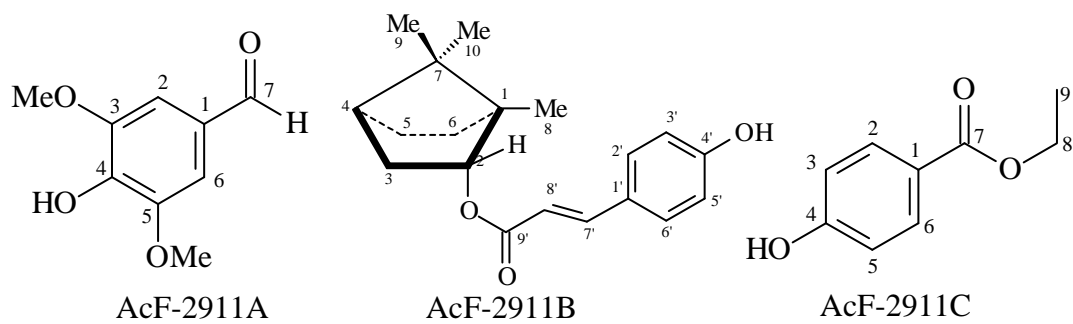


Figura 15. Mapa de correlações NOESY da mistura AcF-2911, em CDCl_3 .

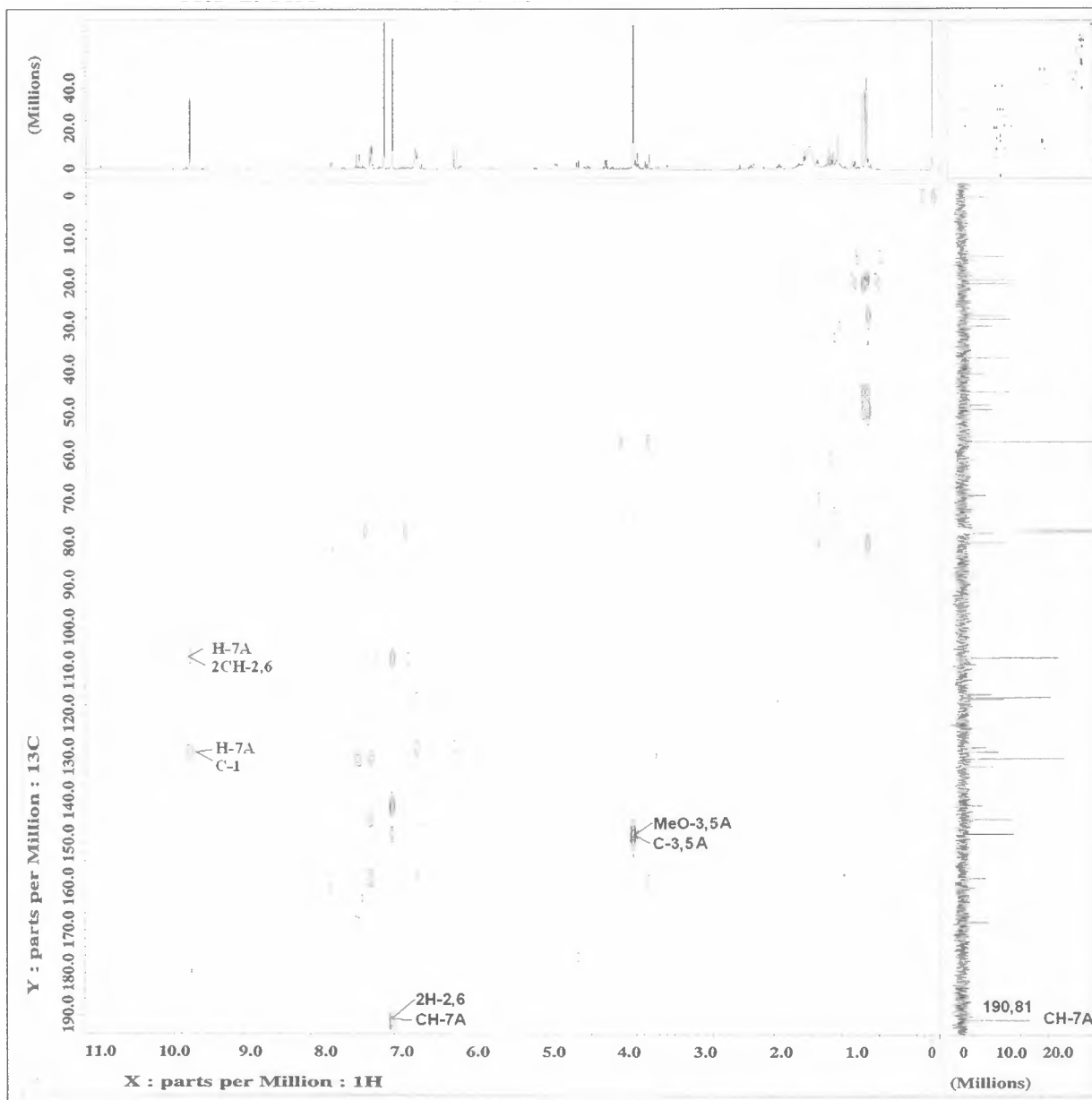
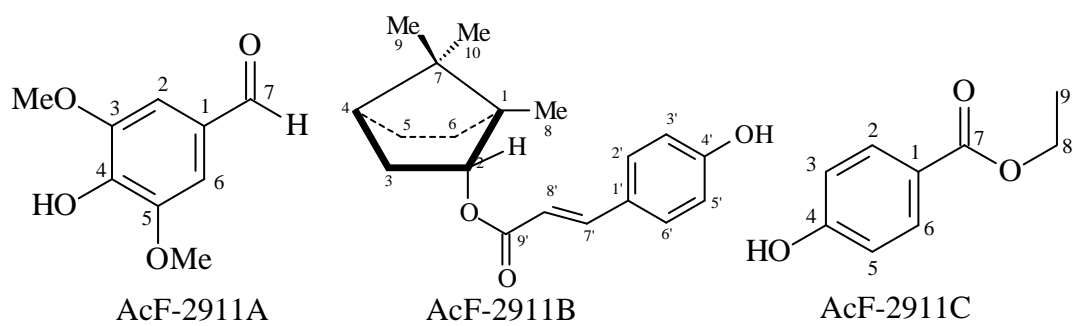


Figura 16. Mapa de correlações HMBC da mistura AcF-2911, em CDCl_3 .

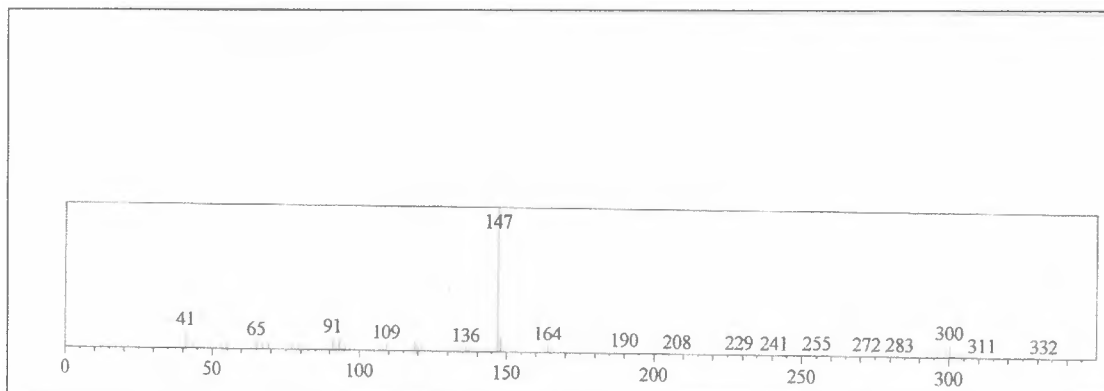
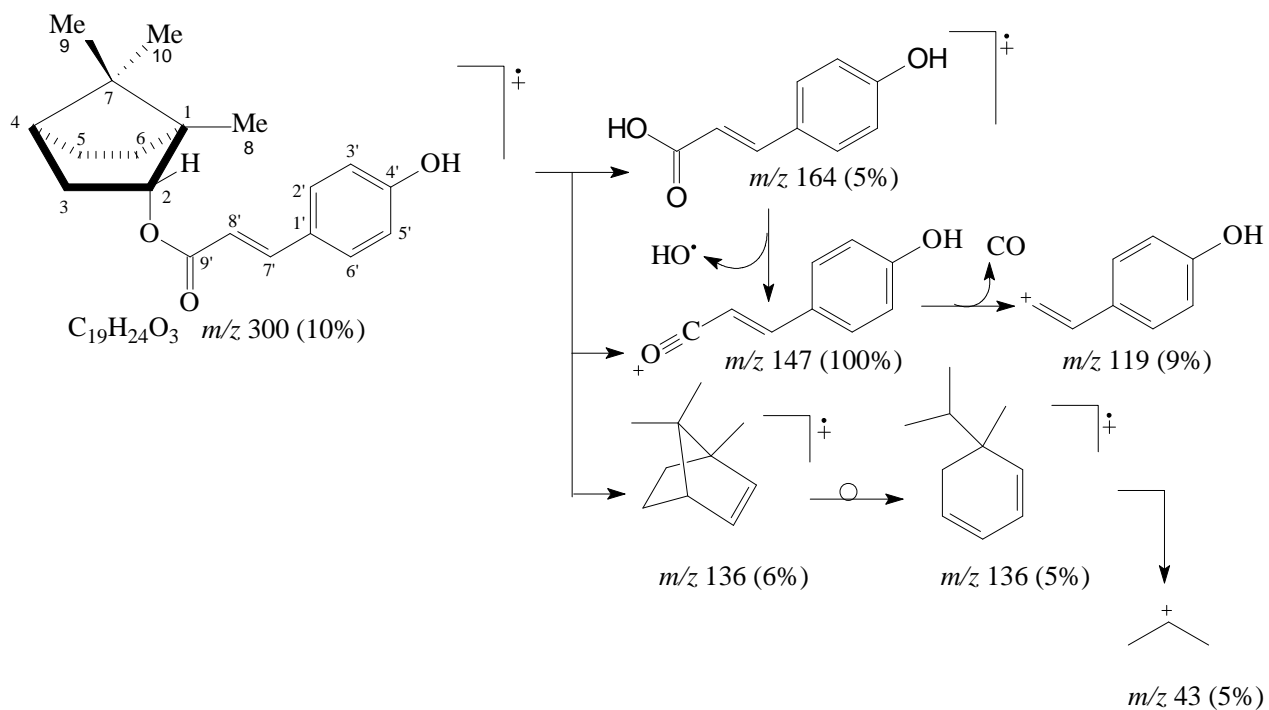


Figura 17. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM AcF-2911B.



Esquema 8. Proposta mecânica de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas para AcF-2911B.

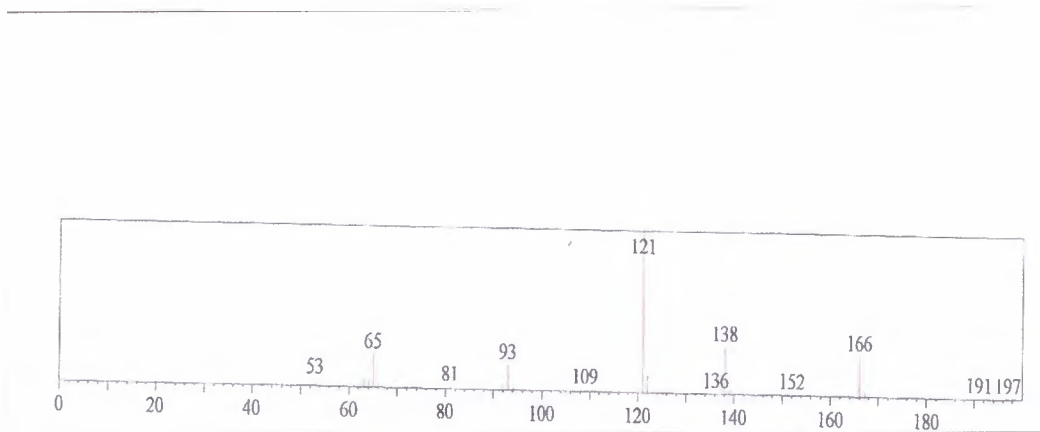
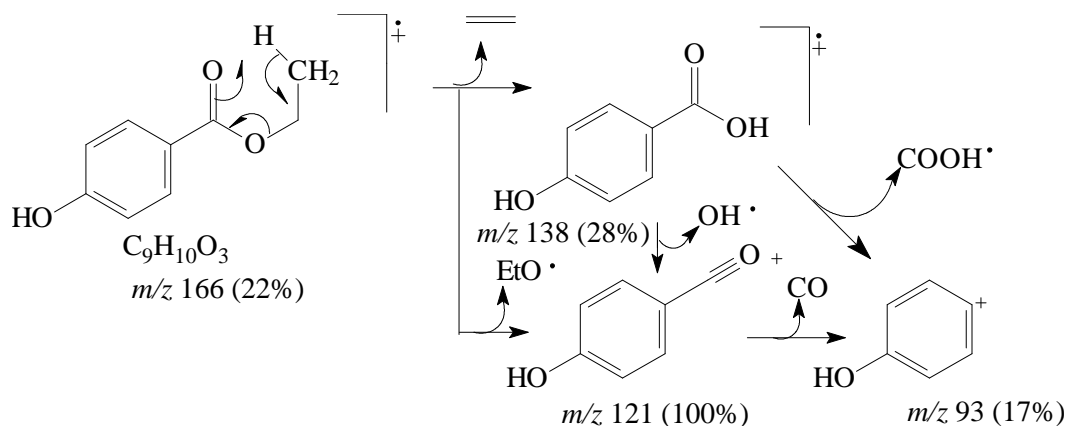


Figura 18. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF-2911C.



Esquema 9. Proposta mecânica de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas para AcF-2911C.

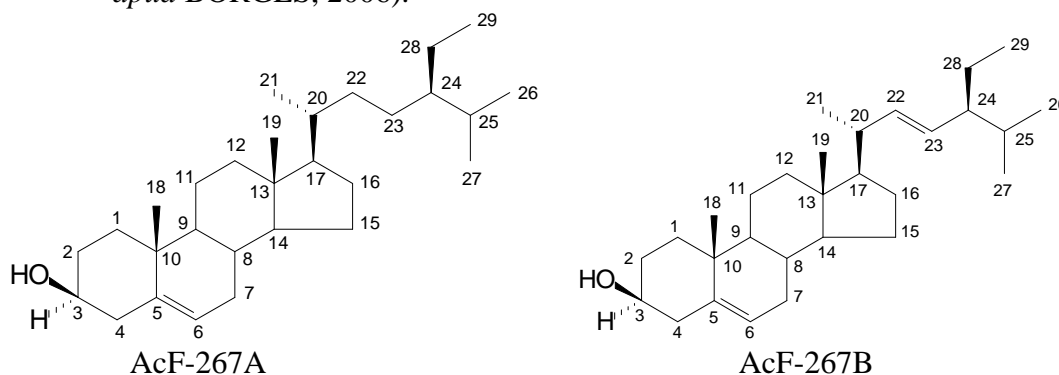
6.2 Caracterização estrutural dos esteróides livres, β -sitosterol (AcF-267A) e estigmasterol (AcF-267B)

A amostra denominada AcF-267 após análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C e também por comparação com dados descritos na literatura (MOREIRA, 2001; KOJIMA *et al.*, 1990, *apud* BORGES, 2006) (Tabela 4, p. 41) permitiu identificar a presença de dois fitoesteróides livres, o 3-*O*- β -D-sitosterol (AcF-267A) e o estigmasterol (AcF-267B).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 19, p. 42 e 20 p. 43) da mistura apresentou vários sinais entre δ_{H} 0,68 e 2,32 que podem ser atribuídos aos grupos metílicos e metilênicos, um multiplete em δ_{H} 3,52 referente aos hidrogênios carbinólicos (H-3), dois duplos dupletos em δ_{H} 5,15 e 5,0 condizentes com os hidrogênios olefinicos do estigmasterol (H-22 e H-23; *J* 8,4 e 15,2 Hz), e um multiplete em δ_{H} 5,35 compatível com o hidrogênio olefinico (H-6) presentes em ambas as substâncias. Estes sinais são característicos para estes fitoesteróides comumente encontrados em plantas.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 21, p. 43) observa-se a presença de sinais característicos para estes esteróides. O sinal δ_{C} 140,74 e 121,69 (C-5 e C-6) são comuns aos dois esteróides. Já os sinais em δ_{C} 138,3 e 129,26 correspondem aos carbonos olefínicos (C-22 e C-23) do estigmasterol. O deslocamento químico observado em δ_{C} 71,8 (H-3) condiz com hidroxila em posição beta (β) comum as duas substâncias (KOJIMA *et al.*, 1990 *apud* BORGES, 2006).

Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C (δ em ppm), em CDCl_3 para os fitoesteróides β -sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (MOREIRA, 2001; KOJIMA *et al.*, 1990, *apud* BORGES, 2006).



C	δ_{C} β -sitosterol (AcF-267A)		δ_{C} estigmasterol (AcF-267B)	
	δ_{C} Literatura	δ_{C} Experimental	δ_{C} Literatura	δ_{C} Experimental
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
5	140,7	140,7	140,7	140,7
10	36,6	36,5	36,6	36,1
13	42,3	42,3	42,2	42,3
CH				
3	71,8	71,8	71,8	71,8
6	121,7	121,7	121,7	121,7
8	31,9	31,6	31,9	31,6
9	50,1	50,1	50,1	51,2
14	56,6	56,7	56,6	56,8
17	56,0	56,0	55,9	55,9
20	36,1	36,1	40,5	40,5
22	-	-	138,3	138,3
23	-	-	129,2	129,3
24	45,5	45,8	51,2	51,2
25	29,1	29,1	31,9	31,9
CH₂				
1	37,1	37,2	37,2	37,2
2	31,6	31,6	31,6	31,6
4	42,3	42,3	42,3	42,2
7	31,9	31,9	31,9	31,9
11	21,1	21,1	21,1	21,2

Continua na página seguinte

Continuação tabela 4.

12	39,9	39,8	39,7	40,5
15	24,3	24,3	24,4	24,3
16	28,8	28,2	28,9	28,9
22	33,9	33,9	-	-
23	26,6	26,1	-	-
28	23,0	23,0	25,4	25,4
CH₃				
18	11,9	11,9	12,0	12,0
19	19,4	19,4	19,4	18,9
21	18,8	18,8	21,2	21,2
26	19,9	19,8	21,1	21,1
27	19,0	19,0	19,0	19,4
29	12,0	12,0	12,3	12,2

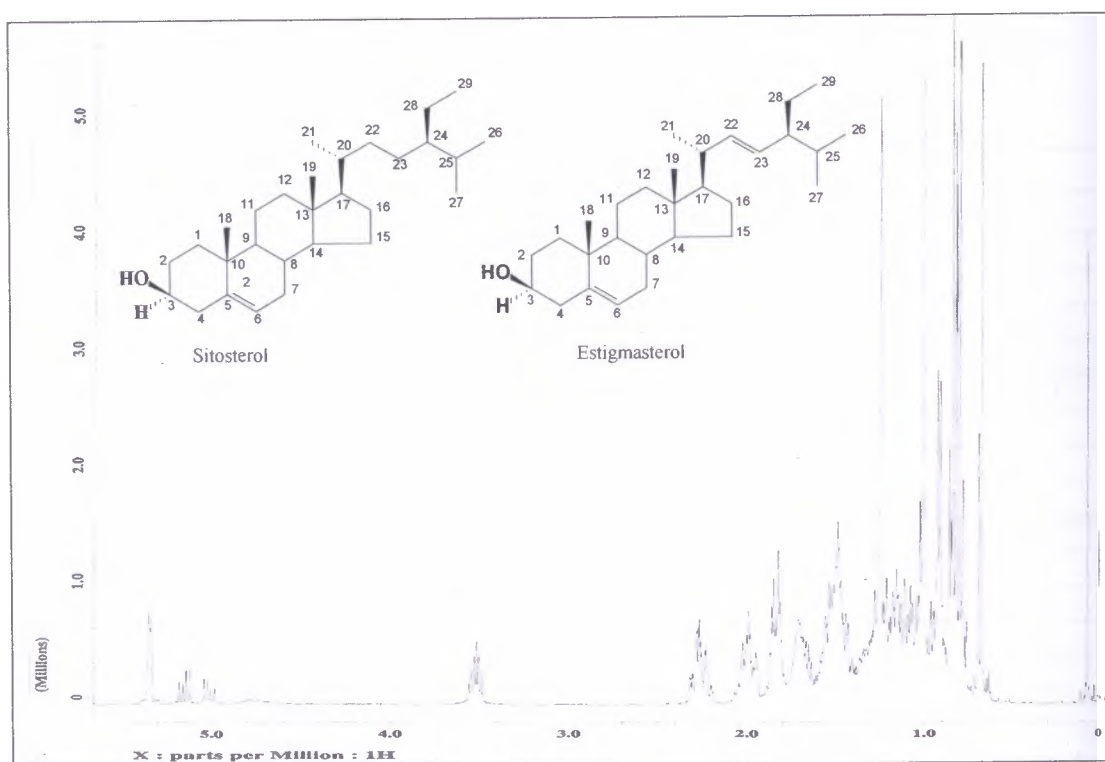


Figura 19. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da mistura de esteróides AcF-267 em CDCl₃.

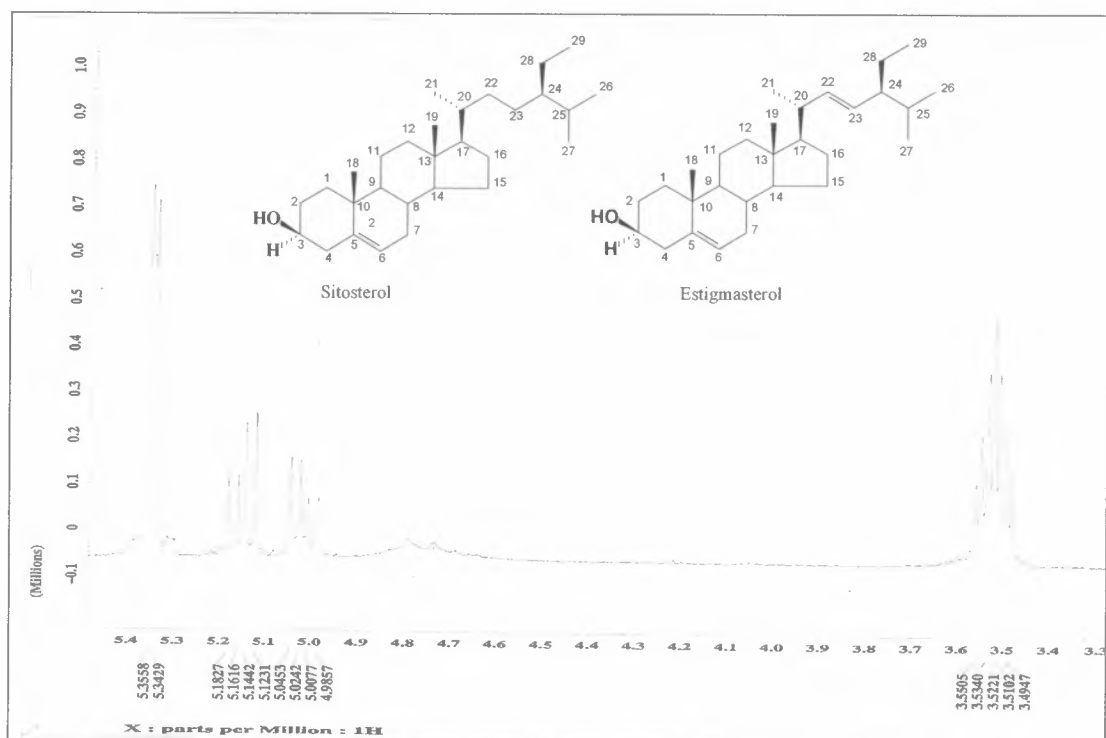


Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da mistura de esteróides AcF-267 na região de δ_{H} 3,3 a 5,4, em CDCl_3 .

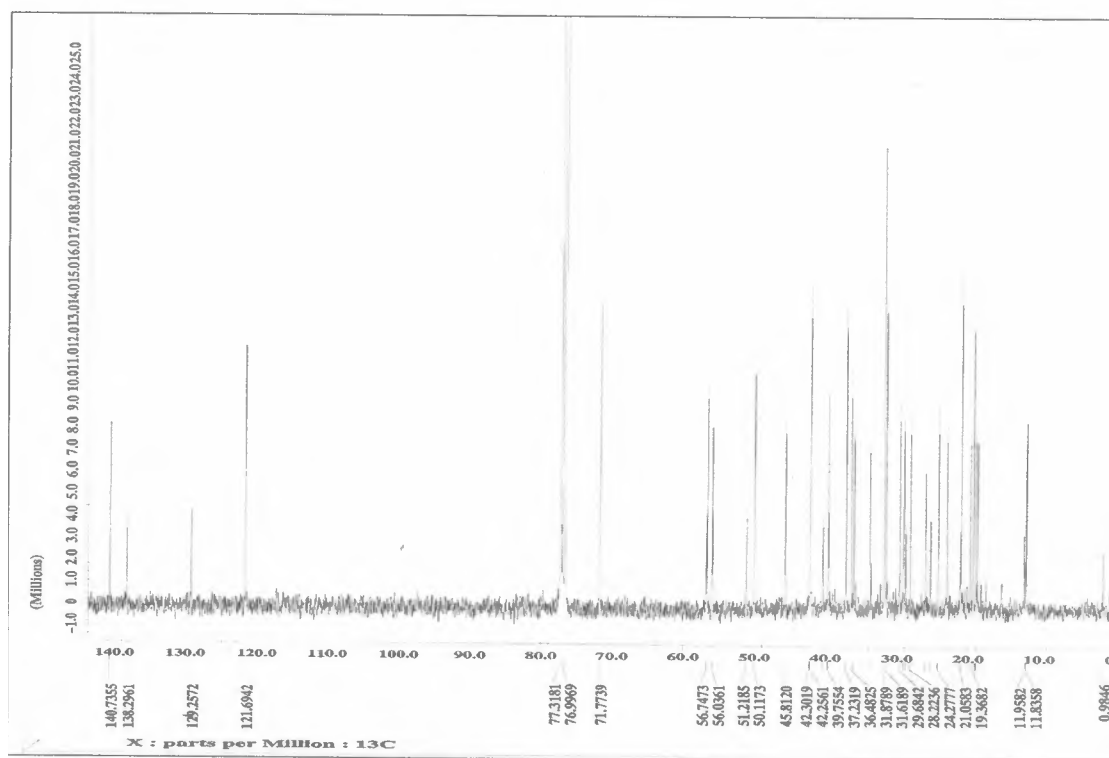


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura de esteróides AcF-267, em CDCl_3 .

6.3 Caracterização estrutural dos esteróides: 3-*O*-β-D-glicopiranosil-β-sitosterol (AcF-09A) e 3-*O*-β-D-glicopiranosilestigmasterol (AcF-09B)

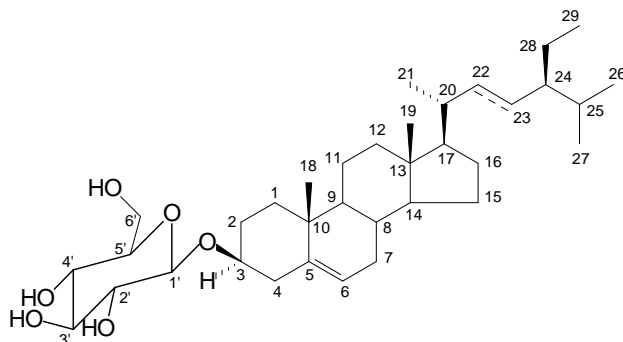
Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura AcF-09 quando comparados com aqueles da mistura dos esteróides livres AcF-267A e AcF-267B e comparação com dados da literatura (KOJIMA et al., 1990; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000) permitiu assegurar que a mistura está constituída das substâncias, 3-*O*-β-D-glicopiranosil-sitosterol (AcF-09A) e 3-*O*-β-D-glicopiranosilestigmasterol (AcF-09B) (Tabela 5, p. 44).

A natureza glicosídica destas substâncias foi indicada pelo número de sinais oximetilênicos e oximetínicos observados nos espectros de RMN ^1H (Figura 22, p. 45) ^{13}C (Figura 23, p. 45) e mapa de correlação heteronuclear (HMQC) (Figuras 24 e 25, p. 46).

Observou-se nos espectros de RMN ^1H sinais de deslocamentos químicos entre δ_{H} 0,65 e 1,0 correspondentes a grupos metílicos e entre δ_{H} 1,2 a 2,4 a grupos metilênicos, dois duplos dupletos em δ_{H} 5,0 (H-23) e 5,1 (H-22) com J 15,2 e 8,4 Hz, um multipletto em 5,35 (H-6) referente aos hidrogênios olefínicos que são compatíveis com a parte esteroidal da aglicona. Além destes sinais são observadas absorções entre δ_{H} 3,15-4,4 de hidrogênios carbinólicos que caracterizam a presença de açúcar na molécula e também um dupletto em δ_{H} 4,37 ($J = 7,8$ Hz) relativo ao hidrogênio anomérico H-1' da unidade glicosídica.

Nos espectros RMN ^{13}C além dos sinais que caracterizam a aglicona são observados sinais em δ_{C} 101,8 relativo ao carbono anomérico (C-1') e os sinais em δ_{C} 70,9 (C-2'), 77,2 (C-3'), 74,3 (C-4'), 76,7 (C-5') e 62,3 (C-6') que confirmam a presença de carbonos carbinólicos para as unidades glicosídicas conforme dados descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (δ em ppm), MeOD/ CDCl_3 da parte glicosídica da mistura AcF-09A e AcF-09B.



3-*O*-β-D-glicopiranosil-β-sitosterol (AcF-09A) e 3-*O*-β-D-glicopiranosilestigmasterol (AcF-09B).

C	δ_{C}	H	δ_{H}
3	79,6	3	3,5-3,6 (m)
1'	102,8	1'	4,37 (d, J 7,8 Hz)
2'	70,9	2'	3,36 (m)
3'	77,2	3'	3,37 (m)
4'	74,3	4'	3,17 (m)
5'	76,7	5'	3,26 (m)
6'	62,3	6'a	3,70 (dd, J 2,9, 11,9 Hz)
		6'b	3,83 (dd, J 5,1, 11,8 Hz)

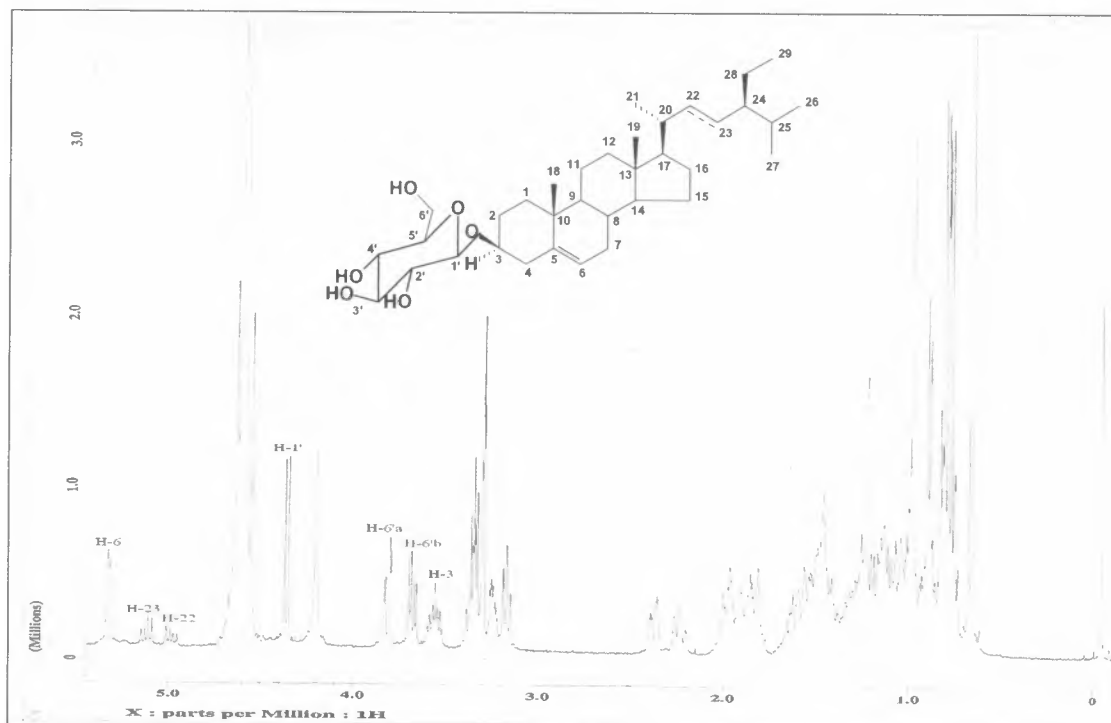


Figura 22. Espectro de RMN ^1H : (400 MHz) da mistura de esteróides glicosilados AcF-09A e AcF-09A em MeOD/ CDCl_3 .

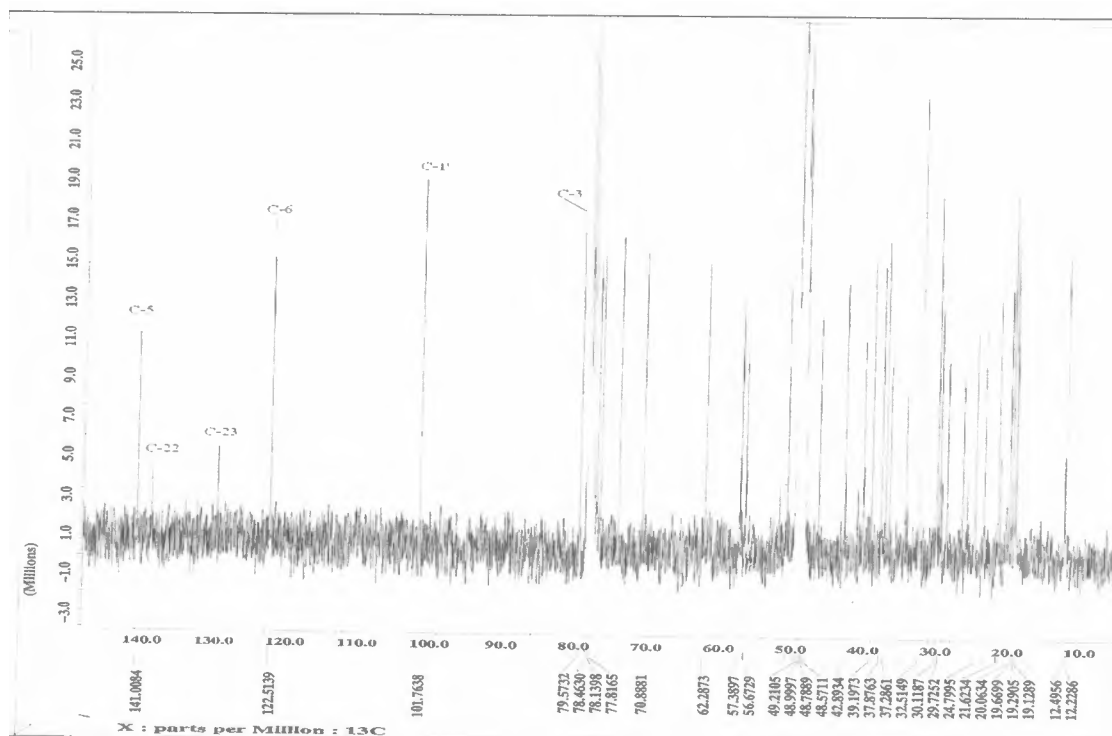


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura de esteróides glicosilados AcF-09A e AcF-09B, em MeOD/ CDCl_3 .

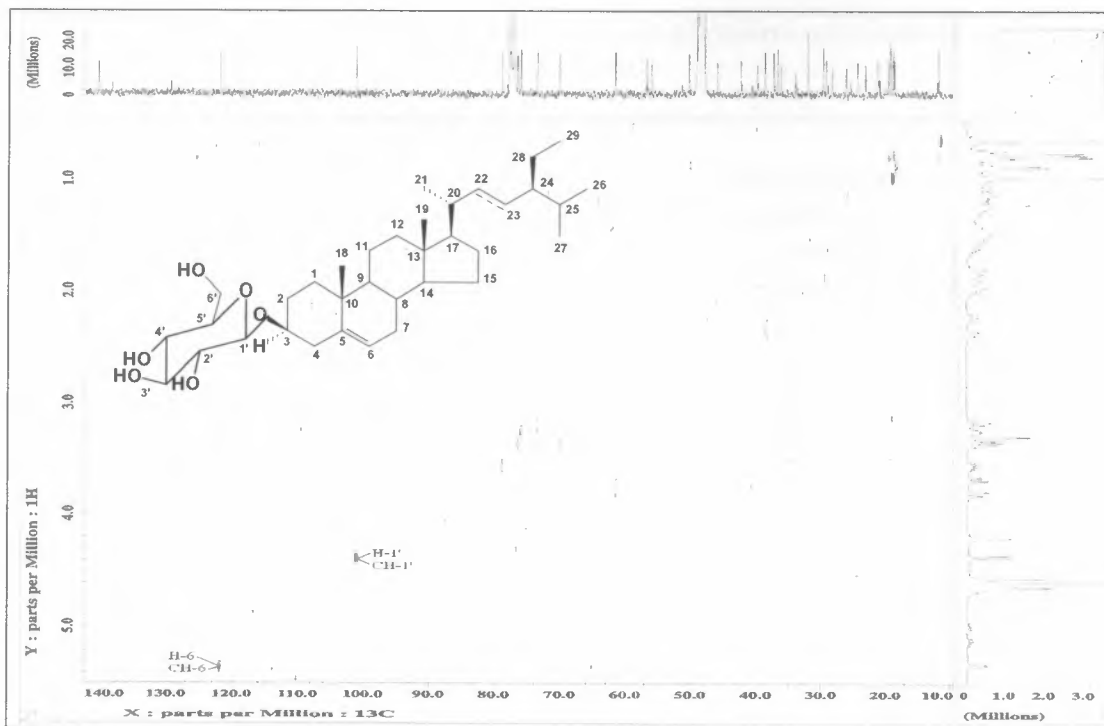


Figura 24. Mapa de correlação HMQC da mistura AcF-09A e AcF-09B, em MeOD/CDCl₃.

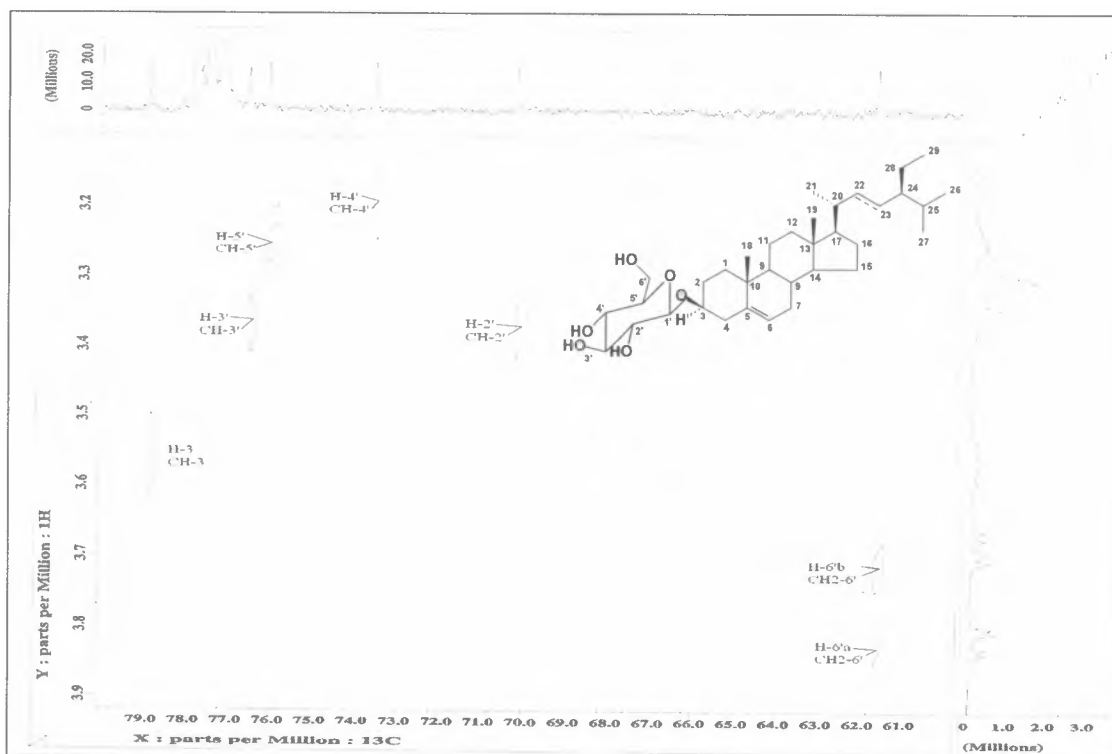


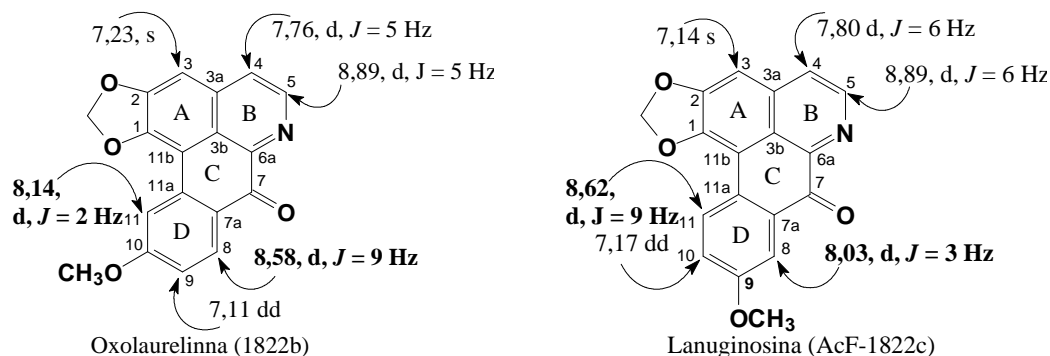
Figura 25. Expansão do mapa de correlação HMQC da mistura de AcF-09A e AcF-09B, em MeOD/CDCl₃.

6.4 Caracterização estrutural dos alcalóides oxaporfínicos, Liriodenina (AcF-1822a), Oxolaurelina (AcF-1822b) e lanuginosina (AcF-1822c)

A natureza alcaloídica da mistura codificada de AcF-1822 ficou evidenciada através da reatividade com reagente de Dragendoff apresentando uma coloração laranja e através de dados espectrais que permitiram caracterizar essa mistura como de alcalóides do subgrupo oxaporfínicos, que possuem esqueleto totalmente aromático com a presença de grupo carbonílico em C-7 (CAVÉ *et al*, 1987; *apud* SILVA *et al*, 2007)

Na Tabela 6 página 48, estão registrados os dados espectrais da mistura em análise comparados com a literatura (SIQUEIRA *et al*, 2001; ORTIZ *et al*, 2007; SILVA *et al*, 2007). Os espectros de RMN ^1H (Figuras 26, p. 49 e 27, p. 50) exibem sinais de hidrogênios aromáticos na região entre δ_{H} 7,0 e 9,0. Os pares de sinais com deslocamentos químicos em δ_{H} 8,89 e 7,77 para o constituinte AcF-1822a e em δ_{H} 8,88 e 7,76 para o constituinte AcF-1822b e/ou AcF-1822c, com constantes de acoplamento igual a 5,1 Hz, estão compatíveis com hidrogênios α e β ao anel piridínico (anel B) (SIQUEIRA *et al*, 2001) atribuídos a H-5 e H-4 respectivamente. Os mesmos espectros apresentam dois simpletos em δ_{H} 7,19 para H-3 de AcF-1822a e 7,14 para H-3 de AcF-1822b e/ou AcF-1822c completando assim o padrão de substituição para os anéis A e B característicos para alcalóides com esqueleto oxaporfínico (URZÚA, 1976). Observam-se também, dois sinais em δ_{H} 6,38 e 6,22 de hidrogênios metilendióxidos atribuídos aos constituintes da mistura, e um sinal em δ_{H} 3,99 de grupo metoxila ligado ao carbono C-10 e/ou C-9.

De acordo com os dados registrados na literatura (URZÚA, 1976) os hidrogênios do anel D para o constituinte AcF-1822b (oxolaurelina) com grupo metoxila em C-10 apresenta os valores de deslocamentos químicos (em CDCl_3) de H-8 em campo mais baixo que H-11 (devido o efeito de desproteção da carbonila em C-7 e ausência do efeito de proteção do grupo metílico da metóxila em C-9), enquanto que AcF-1822c (lanuginosina) estes valores estão invertidos (devido o efeito de desproteção causado pelo anel bifenila e ausência do efeito de proteção causado pelo grupo metílico da metóxila em C-10) o que leva a proposição da presença de uma ou das duas substâncias na mistura. Para diferenciá-las seria necessário comparar os pontos de fusão das substâncias puras (oxolaurelina pf. 268 °C; lanuginosina pf. 302-303°C ou 317-319°C) e avaliação de dados espectrais mais completos, o que não foi possível devido a pouca quantidade da mistura (3,0 mg) e o grau de dificuldade para purificar.

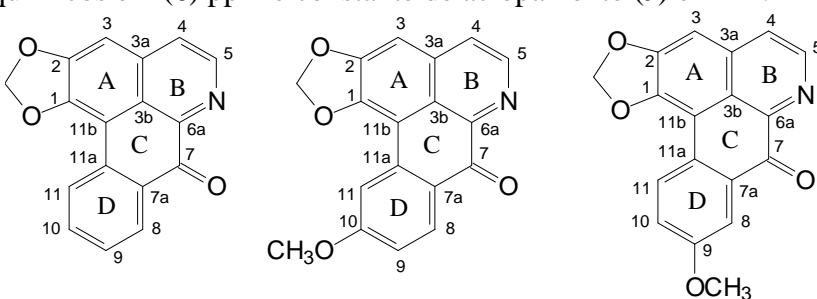


A análise espectral de RMN ^{13}C (Figura 28, p. 50) revelou a presença de sinais de carbonila em δ_{C} 182,47 (C-7), para os constituintes da mistura e sinal de carbonos metoxilados em δ_{C} 159,77 (C-10 e/ou C-9).

O espectro de massas (EM-IE) (Figura 29, p. 51; Esquema 10, p. 51) mostra os principais íons fragmentários da mistura.

Com base na análise destes dados pode-se propor que a mistura AcF-1822 está constituída dos alcalóides: 1,2-metilenodióxido-7-oxaporfina (liriodenina, AcF-1822a) e 10-metóxi-1,2-metilenodióxido-7-oxaporfina, oxolaurelina, (AcF-1822b) ou 9-metóxi-1,2-metilenodióxido-7-oxaporfina, lanuginosina AcF-1822c, já descritos na literatura (URZÚA, 1976).

Tabela 6. Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de AcF-1822, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos em (δ) ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



	AcF-1822a		AcF-1822b		AcF-1822c	
	Liriodenina (AcF-1822a)		Oxolaurelina (AcF-1822b) e lanuginosina (AcF-1822c)		Liriodenina * (Ortiz et al, 2007)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C		-		-		
1	147,93				147,9	
2	151,74				151,7	
3a	135,73				135,7	
3b	144,89				123,2	
6a	145,45				145,2	
7	182,47				182,3	
7a	132,90				131,2	
11a	135,78				132,8	
11b	131,32				130,2	
CH						
3	103,26	7,19 (s)	103,,26	7,14 (s)	103,2	7,15 (s)
4	124,24	7,77 (d, 5,1)	124,27	7,76 (d, 5,1)	124,2	7,74 (d; 5,0)
5	144,95	8,89 (d, 5,1)	144,89	8,88 (d, 5,1)	144,8	8,88 (d; 5,0)
8	128,84	8,65 (dl, 8,0)	124,27	8,55 (d, 8,8)	128,8	8,56 (dd; 7,8, 0,7)
9	128,59	7,58 (dt, 8,0; 1,5)	123,27	7,30 (dd, 2,9, 8,8)	128,5	7,55 (7,7, 7,4)
10	133,91	7,75 (dt, 8,0; 1,5)	159,76		133,9	7,71 (dt; 8,2, 1,2)
11	127,36	8,58 (dd, 8,0; 1,5)	122,57	8,02 (d, 2,9)	127,3	8,59 (d; 8,1)
CH₂						
OCH ₂ O	102,44	6,38 (s)	102,29	6,35 (s)	102,4	6,36 (s)
CH₃						
MeO			55,78	3,99 (s)		

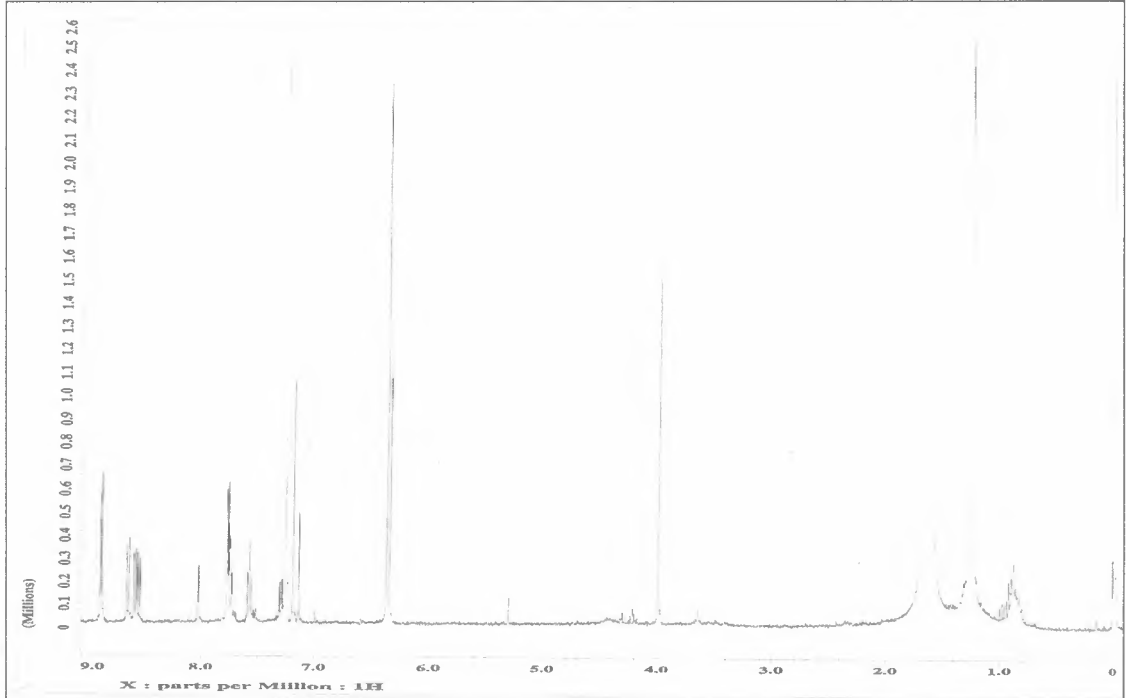
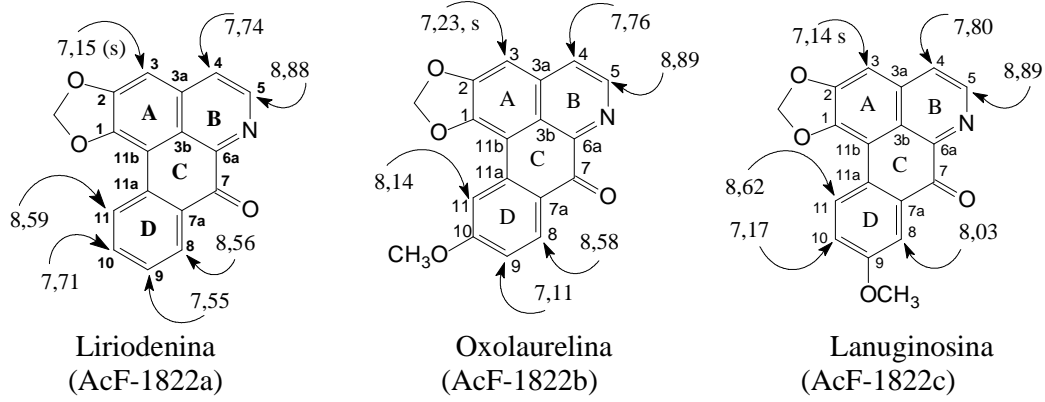


Figura 26. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da mistura AcF-1822, obtido em CDCl₃.

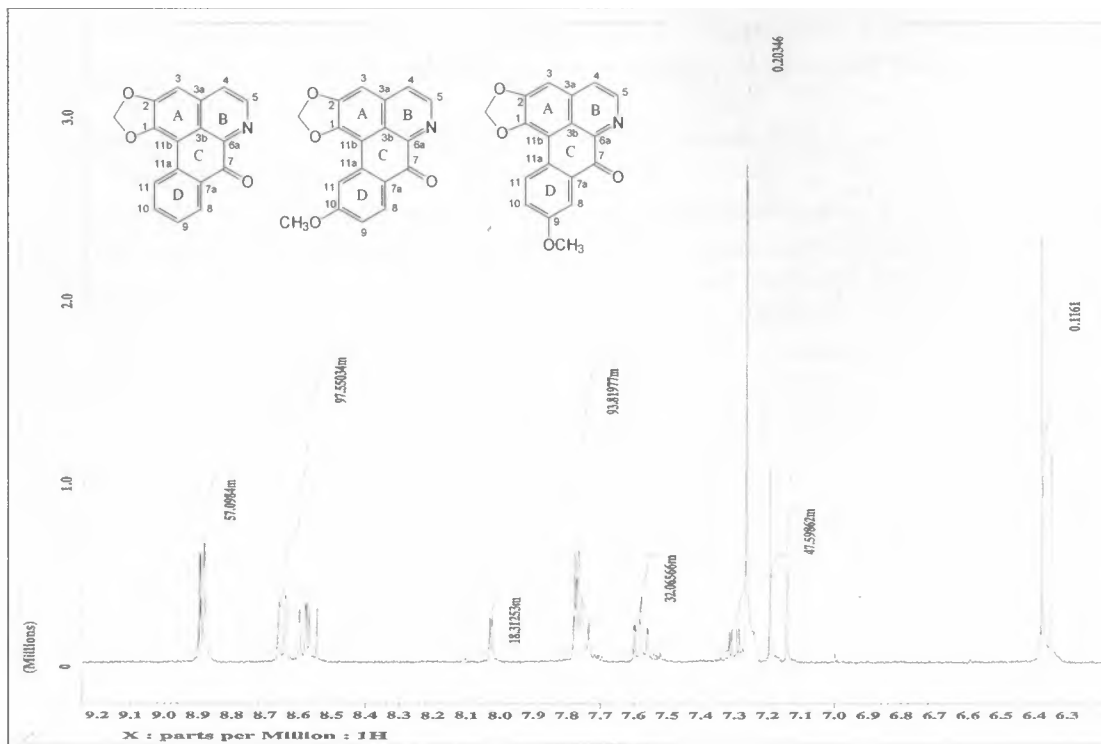


Figura 27. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da mistura AcF-1822 na região de δ_{H} 6,3-9,2, em CDCl_3 .

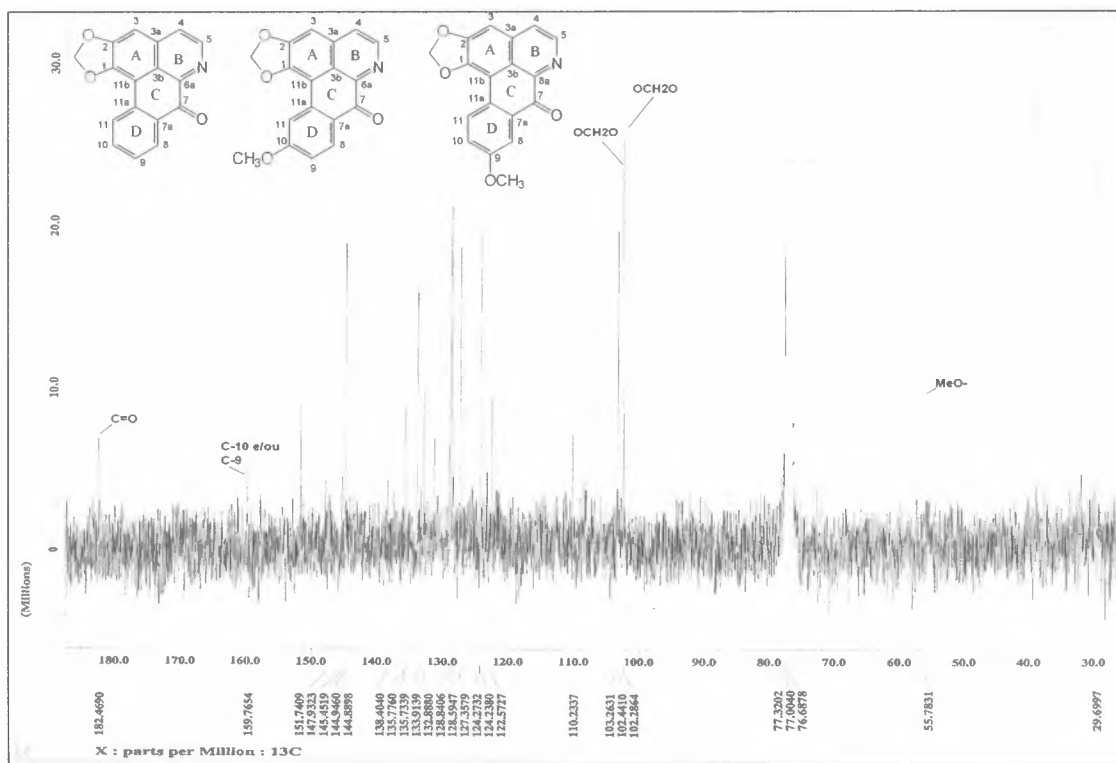


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura AcF-1822, em CDCl_3 .

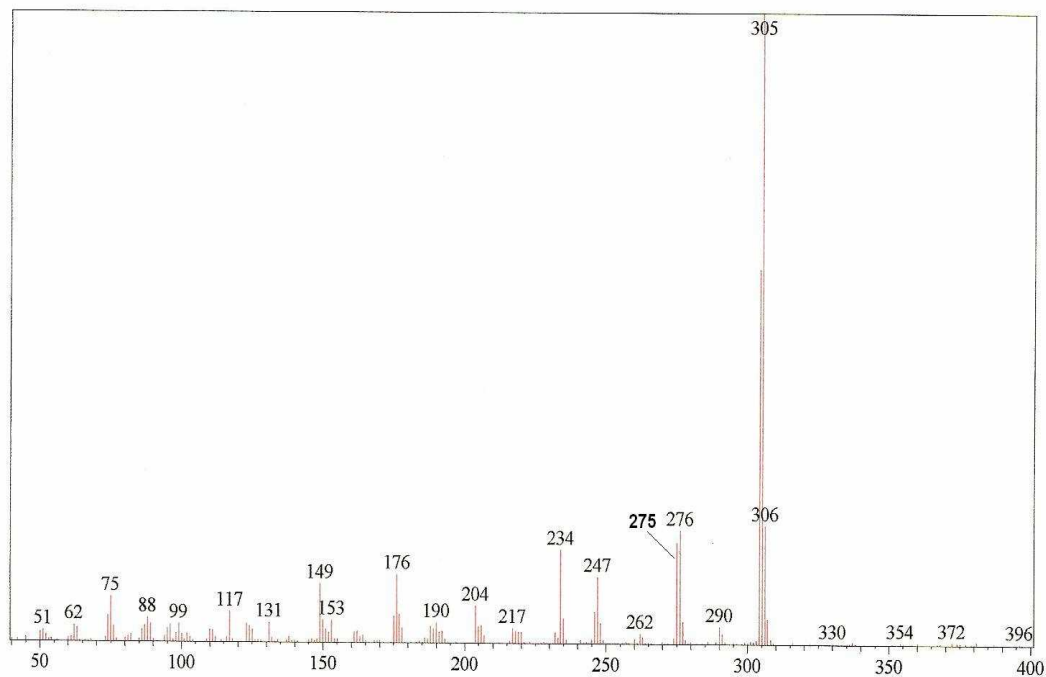
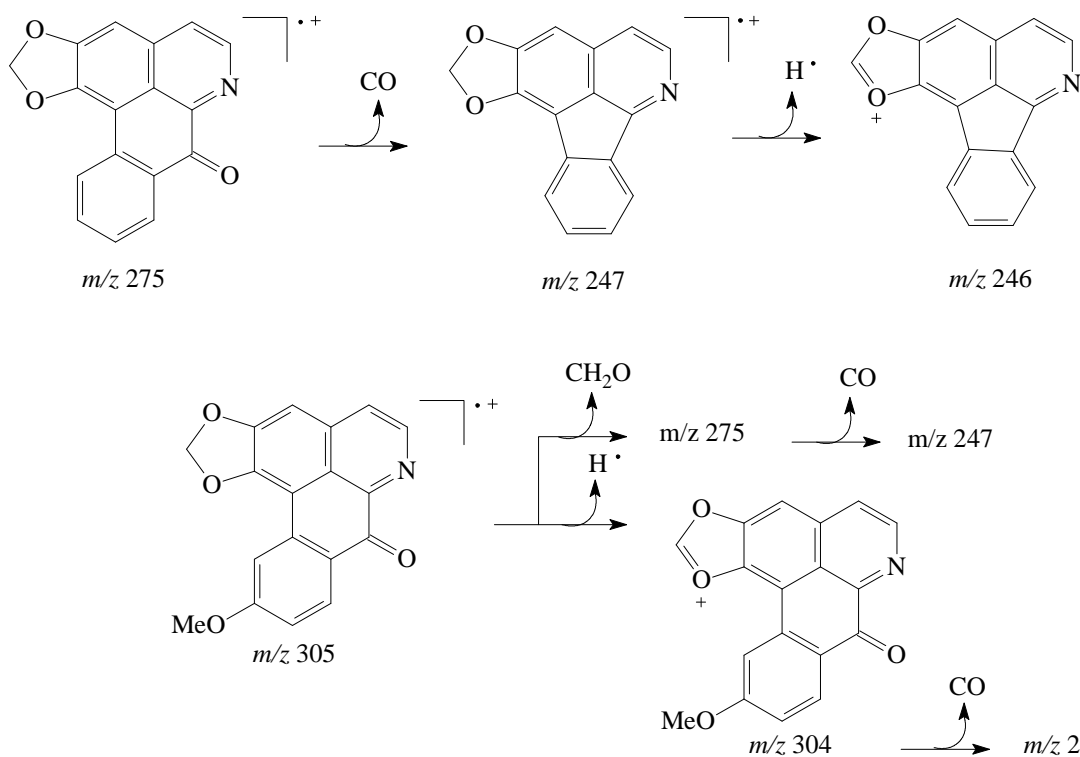
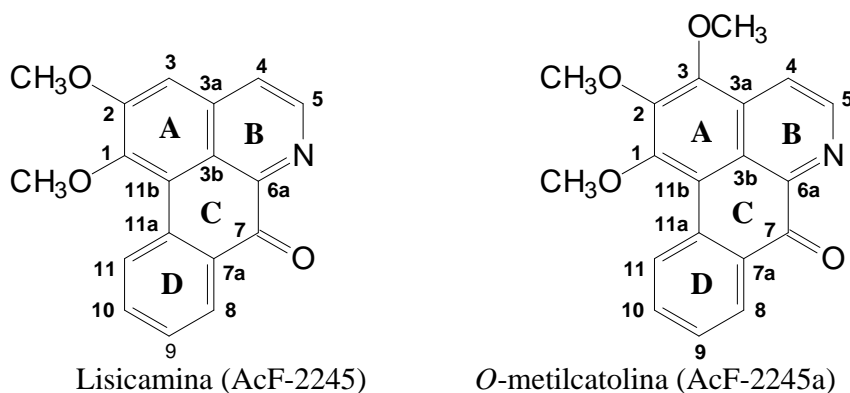


Figura 29. Espectro de massas (EM-IE) da mistura AcF-1822.



Esquema 10. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas da mistura AcF-1822.

6.5 Caracterização estrutural dos alcalóides oxoaporfínicos, lisicamina (AcF-2245) e *O*-metilmoscatolina (AcF-2245a)



A reação positiva para alcalóides e comparação com dados da literatura (ORTIZ *et al*, 2007; SILVA *et al*, 2007) não deixou dúvidas quanto à natureza alcaloídica das substâncias.

Os valores de deslocamentos químicos registrados nos espectros de RMN ^1H de AcF-2245 (Figura 30, p. 53) quando comparados com os da liriodenina (AcF-1822a, Tabela 6, p. 48), apresenta semelhanças estruturais, porém observa-se a ausência do sinal relativo aos hidrogênios metilenodióxido e a presença dos sinais em δ_{H} 4,03 e 4,12 compatíveis com grupos metoxilas nas posições C-1 e C-2 [as interações espaciais (NOE) observadas nos espectros em 2D, ^1H - ^1H -NOESY (Figura 31 e 32, p. 55) confirmam esta proposta]. Os sinais entre δ_{H} 7,6-9,21 de hidrogênios aromáticos está condizente com anel D não substituído.

O espectro de massas de AcF-2245 (Figura 33, p. 56) indica o íon molecular em m/z 291 como pico base, além de apresentar m/z ímpar que é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_3$, que apresenta número ímpar de nitrogênio (Esquema 11, p. 56).

Devido a pouca quantidade do material em análise não foi possível realizar espectro de RMN ^{13}C , contudo os dados analisados, e comparação com a literatura (ORTIZ *et al*, 2007) permitiu propor que a substância AcF-2245 tem a estrutura da lisicamina (1,2-dimetóxi-7-oxaporfina) substância já reportada no gênero *Annona* e em outros gêneros da família Annonaceae.

O espectro de RMN ^1H (Figura 34, p. 57) (Tabela 7, p. 54) do composto codificado de AcF-2245a mostrou semelhanças estruturais com os alcalóides já descritos anteriormente (AcF-1822a e AcF-2245), porém observa-se a presença de três sinais de metoxilas com deslocamentos químicos em δ_{H} 4,08, 4,11 e 4,20, ao invés de duas, quando comparado com AcF-2245.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 35, p. 57) além de outros sinais, foi possível observar os sinais de carbonila (C-7) em δ_{C} 182,61 e três grupos metoxila em δ_{C} 60,98, 61,45 e 61,78, embora a amostra tenha como contaminante a presença de ftalato e material graxo. A revisão desses dados permitiu identificar que a oxaporfina AcF-2245a é a *O*-metilmoscatolina (1,2,3-trimetoxi-aporfina).

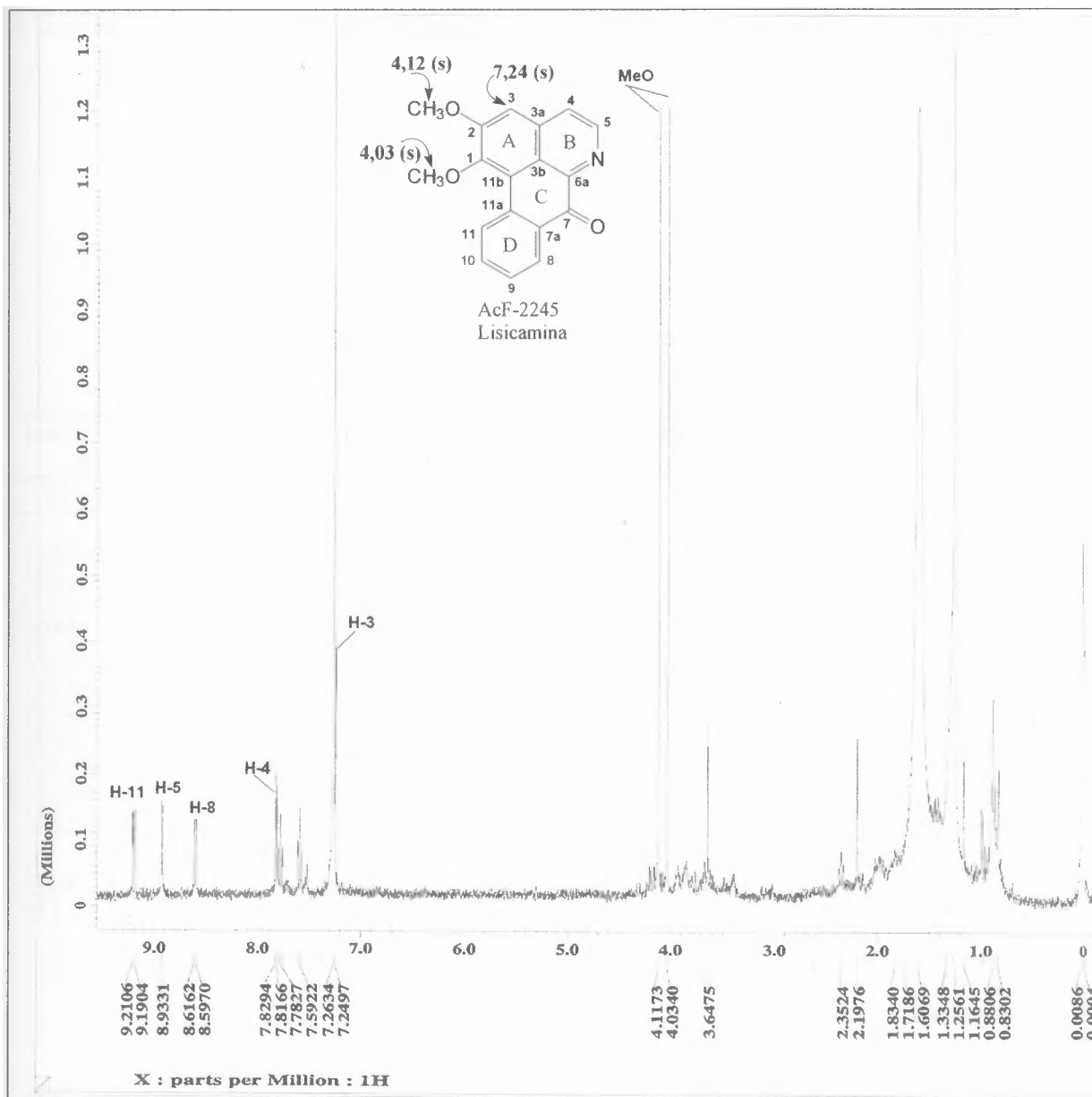
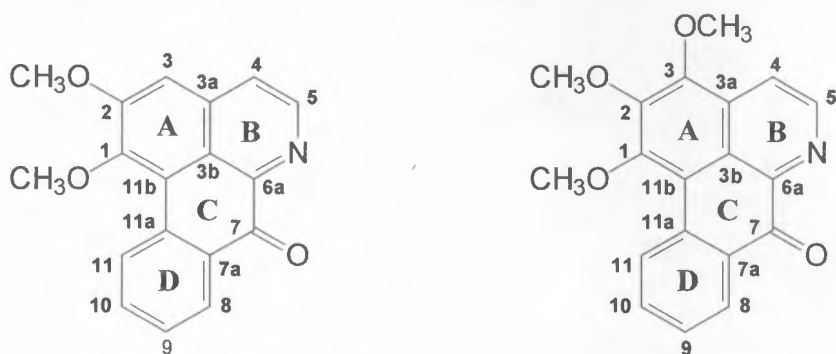


Figura 30. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de AcF-2245, obtido em CDCl₃.

Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C (δ em ppm, J em Hz), em CDCl_3 para os alcalóides AcF-2245 e AcF-2245a.



Lisicamina (AcF-2245)

O-metilcatolina (AcF-2245a)

	Liriodenina (AcF-1822)		Lisicamina AcF-2245	O-metilmoscatolina AcF-2245a	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}
C					
1	147,93	-			156,47
2	151,74	-			147,36
3a	135,73	-			148,45
3b	144,89	-			122,83
6a	145,45	-			145,43
7	182,47	-			182,61
7a	132,90	-			131,46
11a	135,78	-			132,45
11b	110,23	-			115,71
CH					
3	103,26	7,19 (s)	7,24 (s)	-	148,45
4	124,24	7,77 (d, 5,1)	7,82 (d, 5,1)	8,23 (d, 5,5)	119,16
5	144,95	8,89 (d, 5,1)	8,93 (d, 5,1)	8,98 (d, 5,5)	144,55
8	127,36	8,65 (dl, 8,0)	8,60 (dd, 7,7, 1,5)	8,58 (d, 8,0)	128,96
9	128,84	7,58 (dt, 8,0; 1,5)	7,59 (dd, 7,7, 1,1)	7,54	128,79
10	133,91	7,75 (dt, 8,0; 1,5)	7,78, (ddd, 8,1, 7,7, 1,5)	7,75	134,36
11	128,59	8,58 (dd, 8,0; 1,5)	9,20 (d, 8,1)	9,11 (d, 8,1)	127,64
CH₂					
OCH ₂ O	102,44	6,38 (s)	-	-	-
CH₃					
MeO-1			4,03 (s)	4,08 (s)	60,98
MeO-2			4,12 (s)	4,11 (s)	61,45 ^b
MeO-3				4,20 (s)	61,79

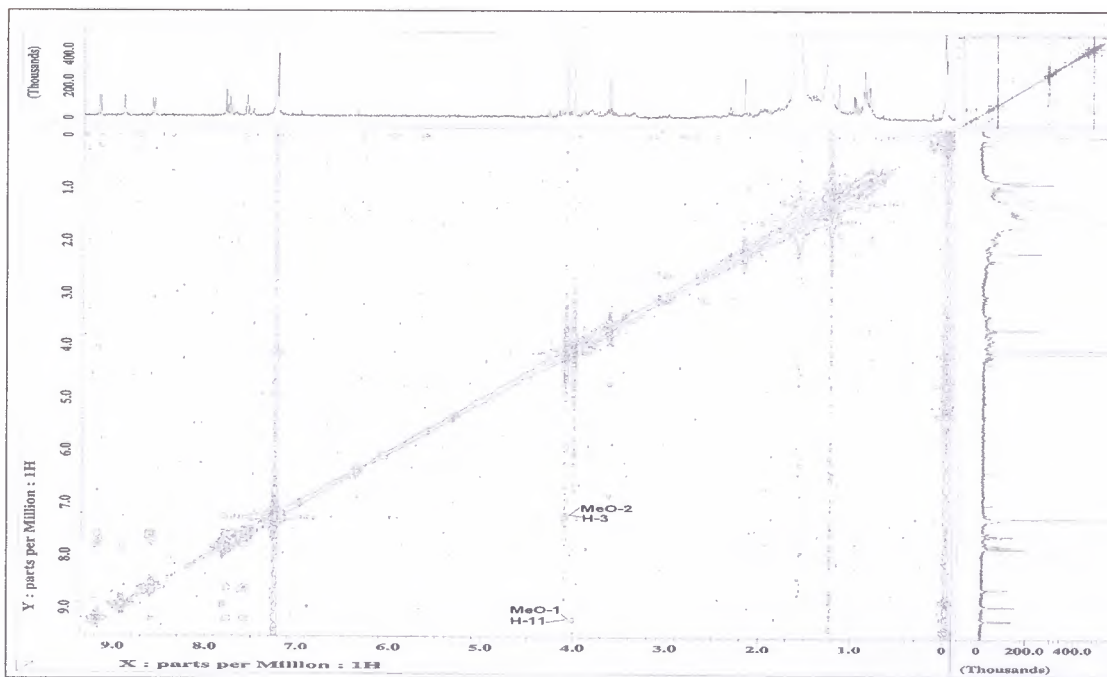


Figura 31. Mapa de correlações NOESY (400 MHz) da AcF-2245, em CDCl_3 .

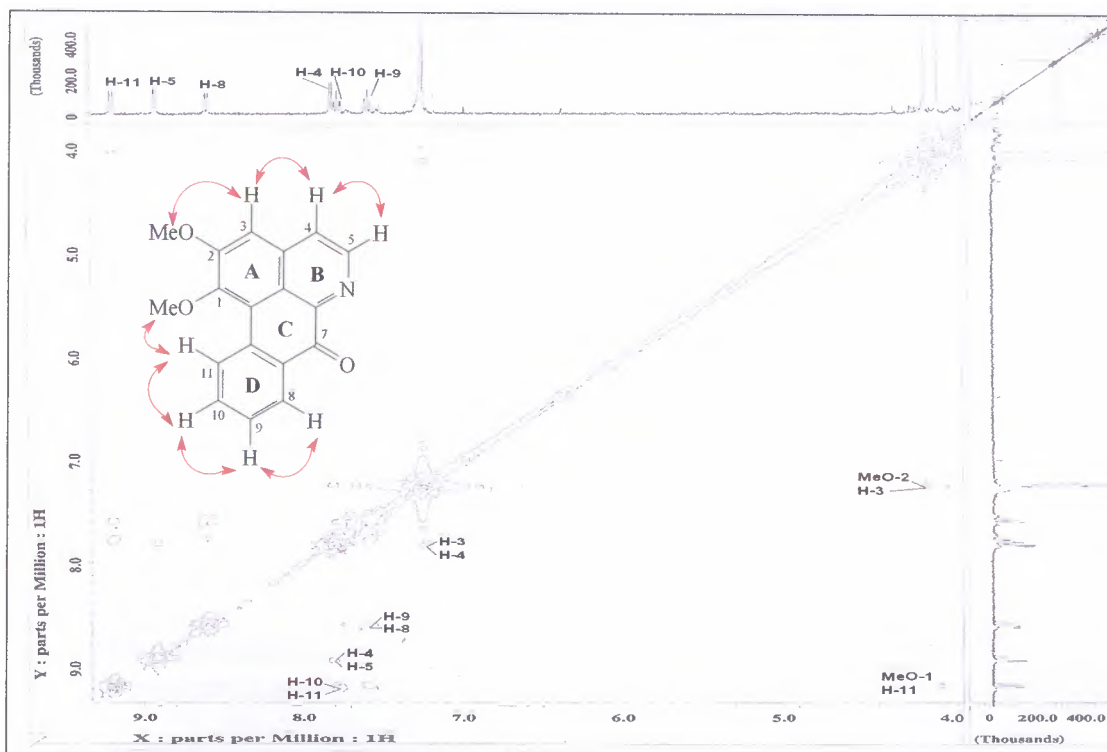


Figura 32. Expansão do mapa de correlações NOESY (400 MHz) de AcF-2245 na região de δ_{H} 4,0 a 9,3, em CDCl_3 .

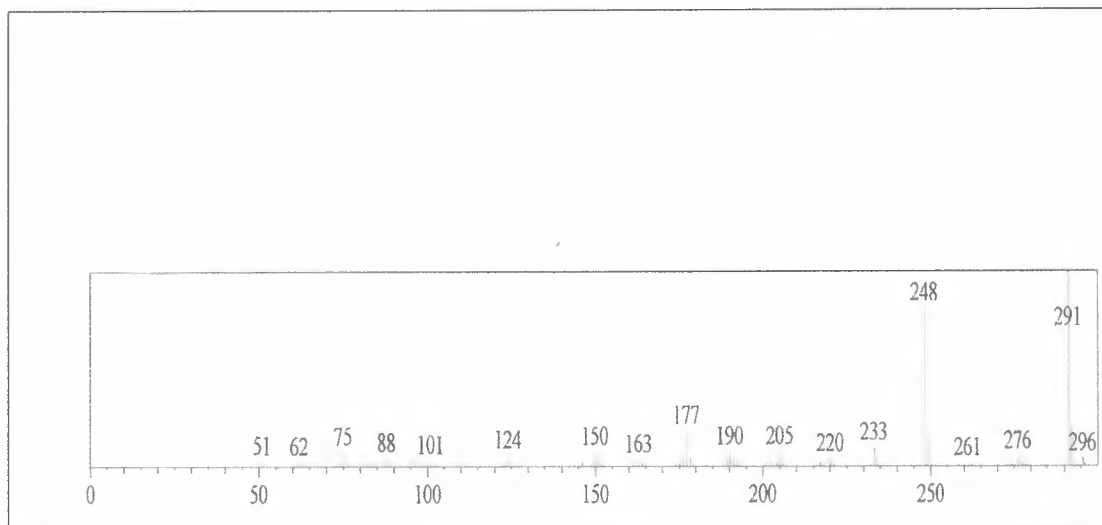
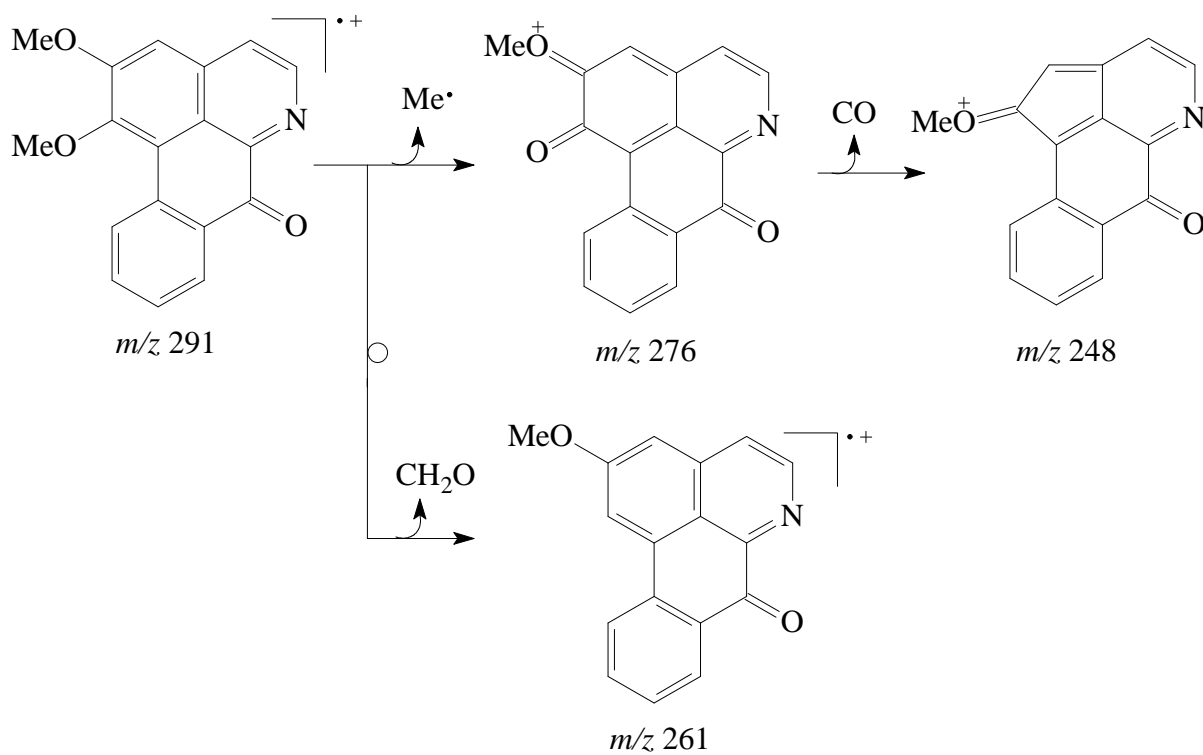


Figura 33. Espectro de massas da AcF-2245 obtido por CG/EM.



Esquema 11. Proposta mecanística de fragmentação para justificar a estrutura da AcF-2245.

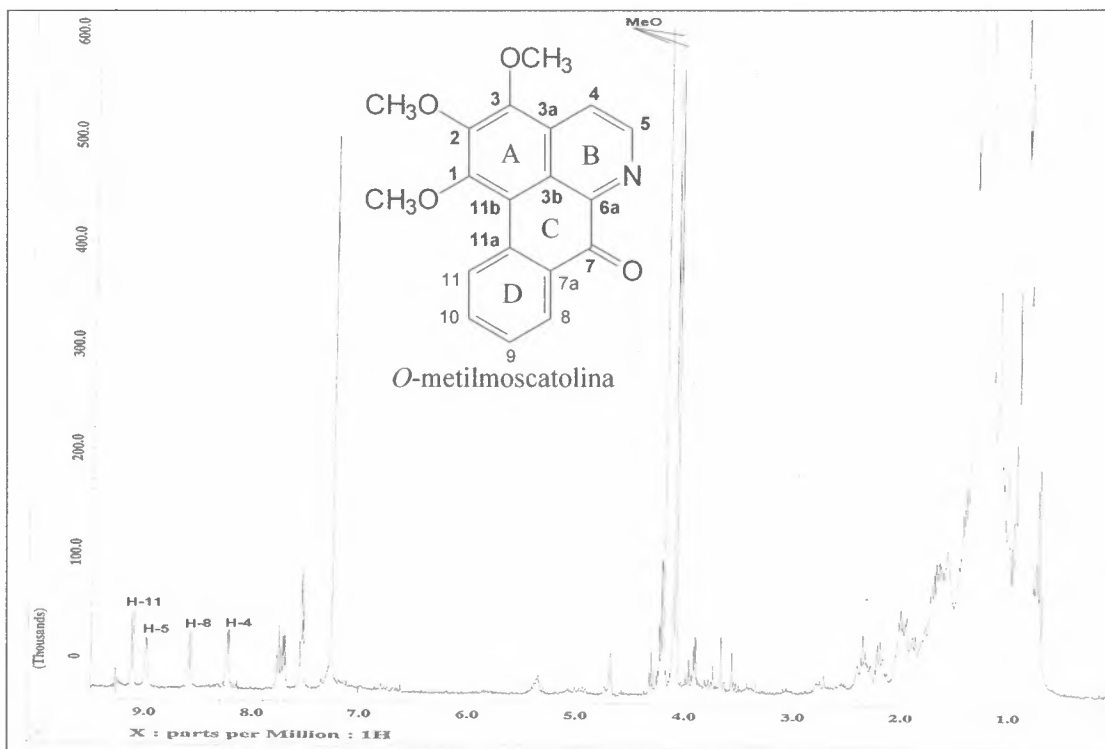


Figura 34. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de AcF-2245a, obtido em CDCl_3 .

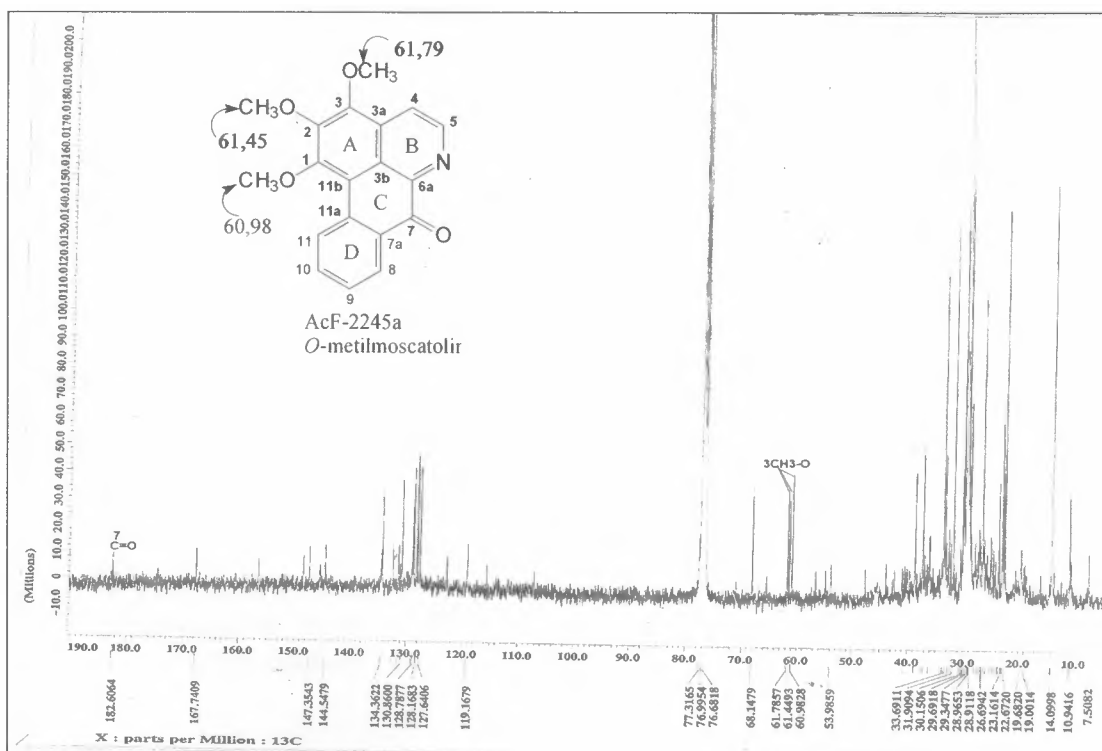


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de AcF-2245a, obtido em CDCl_3 .

6.6 Biossíntese de diterpenos cauranóides

A biossíntese dos produtos naturais, tem origem em um número limitado de precursores. O ácido acético na forma de seu tioéster, a acetil coenzima A (acetil-CoA), é o precursor de uma infinidade de substâncias conhecidas como metabólitos secundários. Ele é produzido nas células a partir do ácido pirúvico ou de ácidos graxos, ou ainda pode ser formado do acetato e coenzima A, tendo como catalisador o trifosfato de adenosina (ATP).

O ácido mevalônico (MVA), produzido a partir do acetil-CoA através de reações enzimáticas, produz o pirofosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAPP) e seu isômero o pirofosfato de 3-isopentenila (IPP), intermediários na biossíntese dos terpenóides (DEWICK, 1997).

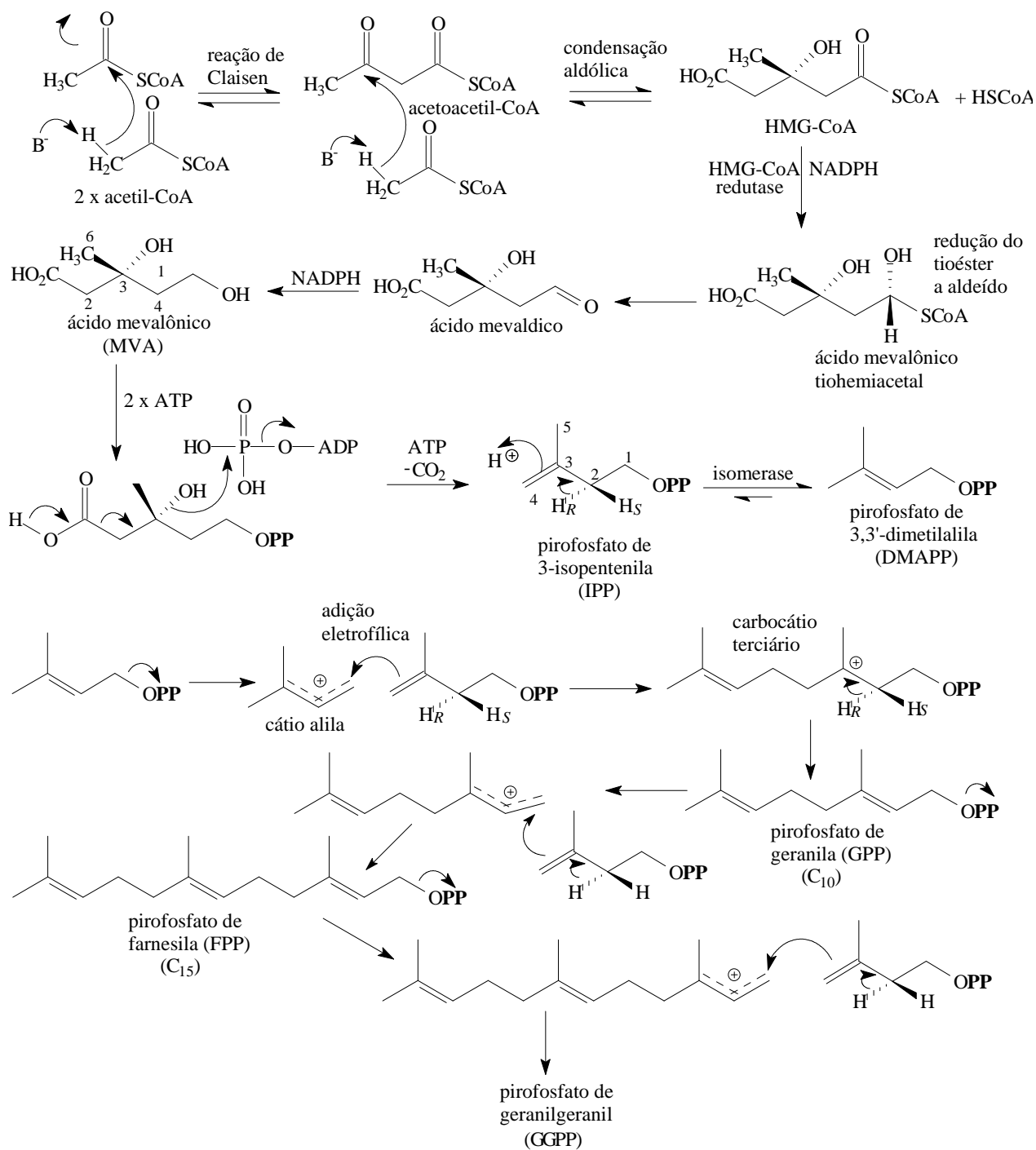
Os terpenóides são constituídos de unidades isoprênicas (C_5) pela junção do tipo cabeça-cauda e/ou cauda-cauda, regra do isoprêno ou de Ruzick. De acordo com o número de unidades isoprênicas existentes nas suas estruturas, são denominados: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), etc.

Sabe-se que os terpenóides não são biossintetizados a partir do isopreno, e sim do acetil-CoA; e que o isopreno (2-metil-1,3-butadieno) nunca foi isolado como produto natural. Contudo a identificação de unidades isoprênicas nos terpenóides constitui um grande auxílio na elucidação de suas estruturas (SOLOMONS, 2006).

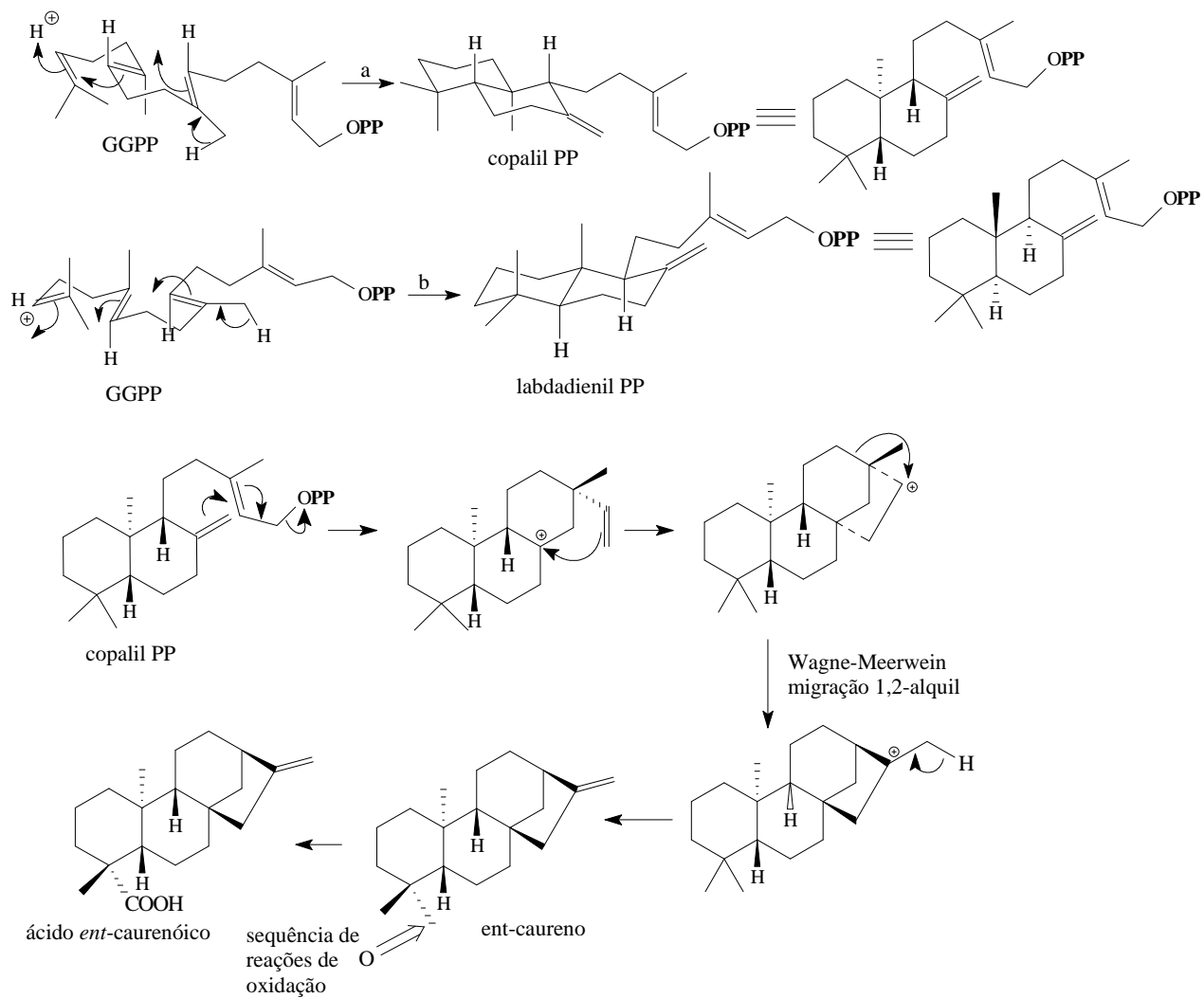
A molécula do ácido acético, após ser ativada através do grupo tiol da coenzima A (HS-CoA), segue nos passos biossintéticos para a formação do pirofosfato de 3-isopentenila (IPP) e do pirofosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAPP). A condensação do IPP com o DMAPP, leva à formação do pirofosfato de geranila (GPP), este se condensa com uma molécula de IPP para formar uma unidade C_{15} , o pirofosfato de farnesila (FPP) ou o 2-trans-6-trans-farnesila – ambas as etapas são catalisadas pela mesma enzima, a dimetilalil-trasferase, ou o pirofosfato de farnesila sintetase ou, ainda, a preniltrasferase. Uma outra condensação com mais uma unidade IPP via cátion alila do FPP, leva a formação do pirofosfato de geranylgeranil (GGPP) o precursor dos diterpenos cauranóides e outros terpenóides (Esquema 12, p. 59).

A formação da série *ent* e da série normal dos diterpenos cauranóicos depende do caminho biossintético seguido pelo precursor GGPP.

A protonação do GGPP leva a uma seqüência de ciclizações enzimáticas concertadas que termina com a perda de um próton de uma metila, com formação do pirofosfato de copalila (copalil PP) ou pirofosfato de labdadienila (labdadienila PP). A estereoquímica destas substâncias depende da conformação do substrato (GGPP) na superfície da enzima, podendo ocorrer formação do copalil-PP, e este através de uma série de ciclizações e rearranjos leva à formação dos cauranóides da série *ent* (caminho **a**), no enquanto se houver formação do pirofosfato de labdandienila (labdadienila PP) este tem as configurações opostas dos centros quirais e dão origem aos cauranóides normais (caminho **b**). (Esquema 13, p. 60)



Esquema 12. Formação do pirofosfato de 3-isopentenila (IPP), pirofosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAPP), pirofosfato de farnesila (FPP) e pirofosfato de geranylgeranil (GGPP), a partir da acetil-CoA, via ácido mevalônico (DEWICK, 1997).



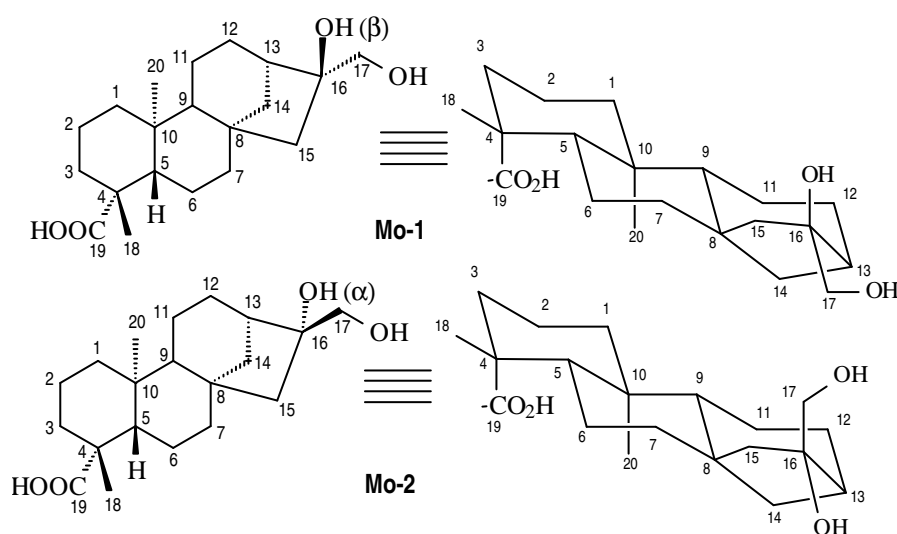
Esquema 13. Biossíntese do ácido *ent*-caurenóico a partir do pirofosfato de geranylgeranil (GGPP), via pirofosfato de copalil PP (DEWICK, 1997).

6.7 Diterpenos cauranóides isolados de *A. cacans* Warm., e seus derivados

Para elucidação estrutural das substâncias cauranóides isolados de *A. cacans* (Tabela 8, p. 62) utilizou-se da análise de espectros de RMN ^1H e ^{13}C em 1D e 2D (COSY, NOESY, HMQC e HMBC), EM-IE de baixa resolução e IV das substâncias naturais e seus derivados. A comparação com dados registrados na literatura (WU *et al.*, 1996; VELANDIA *et al.*, 1998 and YANG, *et al.*, 2002) auxiliou na interpretação de tais dados espectrais.

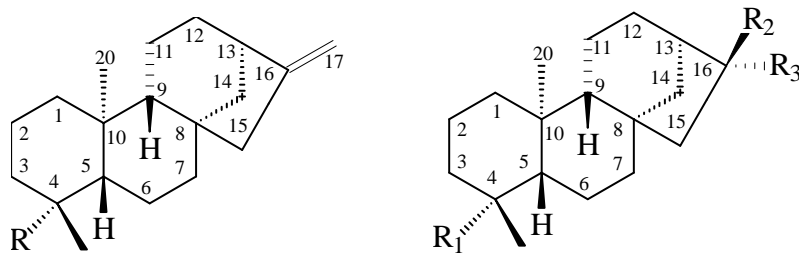
Os diterpenos caurânicos são classificados como *ent*-cauranos ou *ent*-caurenos nos casos dos enantiômeros (imagem especular) dos diterpenos caurânicos ou caurênicos normais. Assim, o prefixo *ent* representa “enantio” da palavra enantiômero e se relaciona com a inversão de todos os centros assimétricos envolvidos numa substância com configuração absoluta definida, os cauranóides de configuração normal. O resultado fornecido pela medida da atividade ótica ($[\alpha]$) pode permitir a caracterização de substância como pertencente à série *ent*-, quando alfa $[\alpha]$ for negativo, e normal, quando alfa $[\alpha]$ for positivo. Tal classificação se baseia nos resultados fornecidos pelos cauranóides análogos da mesma classe com configurações absolutas definidas por apresentarem sempre à mesma relação (Quadro 1, p. 63). Observa-se neste quadro que apenas uma modificação na estrutura dos anéis pode levar a uma mudança nos valores de alfa $[\alpha]$, o que demonstra a necessidade de tal aplicação ser feita com o devido cuidado. Com relação ao carbono 16, o diterpeno caurânico normal tem configuração absoluta *S* enquanto o *ent* tem a configuração *R* (VELANDIA *et al.*, 1998).

As estereoquímicas α (grupo localizado abaixo do plano estereoquímico) e β (grupo localizado acima) são definidas pela posição da hidroxila no carbono C-16 [Mo-1(β) e Mo-2 (α)].



Os carbonos (C-18) e (C-19) sustentados pelo carbono C-4 podem ser corretamente numerados pelas orientações, equatorial de C-18 e axial de C-19 e/ou pelas estereoquímicas *cis* (C-18) e *trans* (C-19) em relação a H-5 (Mo-1 e Mo-2) (VELANDIA *et al.*, 1998).

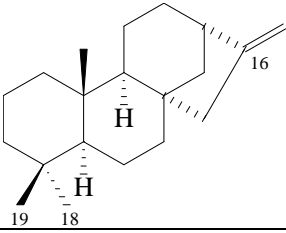
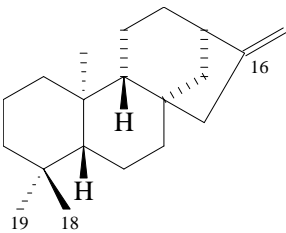
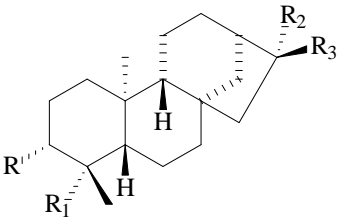
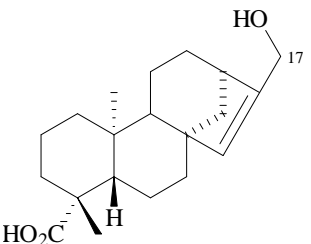
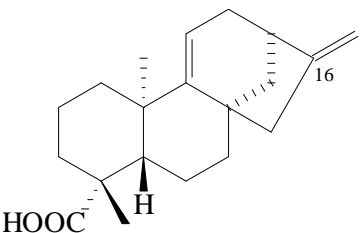
Tabela 8. Diterpenos cauranóides isolados pela primeira vez de *Annona cacans* Warming e seus derivados.



R	R₁	R₂	R₃	CODIFICAÇÃO*
COOH				AcF-01 (PN)
COOCH ₃				AcF-01a (D)
	COOMe	CH ₂ OH	OH	AcF-01b (D)
	COOMe	OH	CH ₂ OH	AcF-195 (PN)
	COOH	OH	CH ₂ OH	AcF-1216(PN)
	COOH	H	COH	AcF-158 (PN)
	COOH	H	CH(OH)OCH ₃	AcF-158a (D) 158b (D)

*PN = Produto natural; D = Derivado

Quadro 1. Diterpenos caurânicos e caurênicos com configurações absolutas definidas (VELANDIA *et al.*, 1998).

	$[\alpha]_D$	Nome
	+74,0° (c, 2,8 em CHCl ₃)	Caur-16-eno
	-80,0° (c, 1,0 em CHCl ₃)	<i>ent</i> -Caur-16-eno
 <p> R R₁ R₂ R₃ H CHO CH₂ H COOH COOH H H Me OH H OH CH₂OH CH₂OH H OH CH₂OH CH₂ </p>	-84,2° (c, 1,05 em CHCl ₃) -108,0° (c, 4,0 em EtOH) -45° (c, 0,9 em CHCl ₃) -39° (c, 1,35 em piridina) -66° (c, 1,66 em CHCl ₃)	<i>ent</i> -Caur-16-en-19-al Ácido <i>ent</i> -16β-caurano-17,19-dióico <i>ent</i> -16β-Cauranol <i>ent</i> -16β-Caurano-3β,17,19-triol <i>ent</i> -Caur-16-eno-3β,19-diol
	-37° (EtOH)	<i>ent</i> -caur-15-eno-17,19-diol
	+32,1° (c, 0,39 em CHCl ₃)	Ácido <i>ent</i> -caura-9(11),16-dien-19-óico

6.7.1 Caracterização estrutural do ácido *ent*-caur-16,17-en-19-óico (AcF-01)

O diterpeno de AcF-01 foi isolado como um sólido branco cristalino (ponto de fusão descrito na literatura 178,8-179,0 °C, ABREU *et al*, 2001). A natureza terpênica desta substância foi evidenciada através da reação positiva, dando coloração violeta, com solução ácida de sulfato cérico (JAIN *et al*, 1994, *apud* NASCIMENTO, 1998).

O espectro IV (Figura 36, p. 65) mostrou uma banda larga de grande intensidade em ν_{\max} 3300-2513 cm^{-1} compatível com estiramento de hidroxila ácida e banda em 1693 cm^{-1} de deformação (C=O) de ácido, além do estiramento de ligação dupla exocíclica em 1654 cm^{-1} (C=CH₂). As absorções correspondentes a deformações C-H alifáticas estão superpostas pelo grupo O-H de ácido (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN ¹³C (Figura 37, p. 65) de AcF-01 (Tabela 9, p. 67) apresentou 20 sinais de carbono e sua análise conjunta com o espectro de RMN ¹³C APT (Figura 38 e 39, p. 66) permitiu identificar a presença de sinais referentes a dois carbonos metílico, dez metilênicos (incluindo C-17 em δ_{H} 102,99) três metínicos, e cinco não hidrogenados (carbonos quaternários), entre os quais um em δ_{H} 184,78 relativo a carbonila de grupamento ácido (C-19) e outro em δ_{C} 155,78 (C-16) relativo a um dos carbonos olefínicos.

O espectro de RMN ¹H (Figura 40, p. 68; Tabela 9, p. 67) apresentou, entre outros, dois simpletos em δ_{H} 1,24 e 0,95, um simpleto largo em δ_{H} 2,64 e dois simpletos em δ_{H} 4,80 e 4,74 correspondentes a hidrogênios de grupos metílicos, atribuídos a H-18 e H-20, ao hidrogênio alílico em H-13 e aos dois hidrogênios olefínicos H-17a e H-17b, respectivamente e que estão condizentes com diterpeno com esqueleto caurênico (ABREU *et al*, 2001).

Os mapas de contornos HMQC (Figura 41, p. 68) e HMBC (Figura 42, p. 69) possibilitaram atribuir os deslocamentos químicos da AcF-01 de forma inequívoca.

A análise dos dados do espectro de massas (Figura 43, p. 69) permitiu atribuir á substância AcF-01 a fórmula molecular C₂₀H₃₀O₂, com equivalente de insaturação igual a seis, sendo consistente com a presença de uma ligação dupla olefínica, uma carbonila e, portanto quatro anéis do esqueleto caurênico. Os principais picos adicionais observados neste espectro foram atribuídos à formação dos fragmentos propostos no esquema 14 página 70.

A definição da configuração relativa do carbono, C-4 com grupo carbonila (C-19) em posição axial (*trans*) em relação a H-5 da AcF-01, baseou-se no deslocamento químico dos sinais de C-5, C-4 e C-19 (VELANDIA *et al*, 1998). Observou-se que o sinal de C-5 aparece em δ_{C} 57,05, porém se o grupo carboxílico (ou COOH) estivesse em posição equatorial (*cis*) o deslocamento químico de C-5 seria de aproximadamente δ_{C} 50,0. Conseqüentemente, o carbono metílico (C-18) ocupa a posição equatorial e seu deslocamento químico é observado em 28,96, pois em posição normal este seria de aproximadamente de δ_{C} 17,8, além disso o sinal de C-4 exibe um deslocamento químico em δ_{C} 43,74 e se o grupo carboxílico (C-19) estivesse em orientação equatorial seria δ_{C} 47,6 (VELANDIA *et al*, 1998) (Mo-3 e Mo-4).

Os dados espectrais, foram comparados com valores descritos na literatura, tanto para a série *ent*- quanto para os epimeros em C-4 (Tabela 9, p. 67) (VELANDIA *et al*, 1998, WU *et al*, 1996, ABREU *et al*, 2001), o que permitiu identificar a AcF-01 como o ácido *ent*-caur-16(17)-en-19-óico já descrito na literatura.

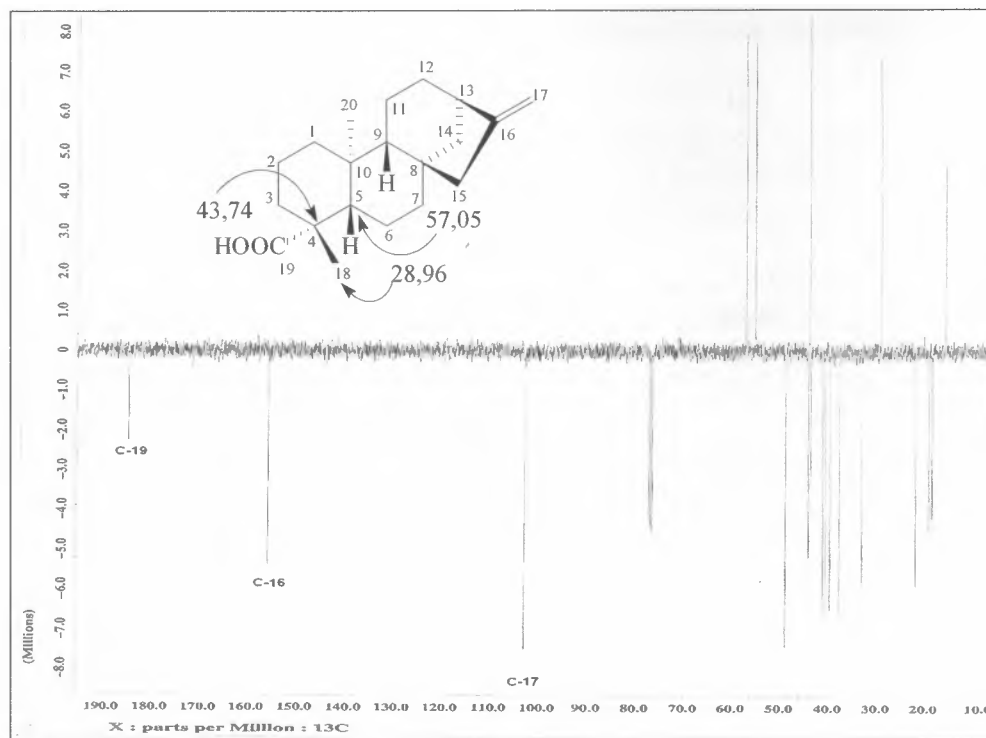


Figura 38. Espectro de RMN¹³C-APT (100 MHz) da AcF-01, em CDCl₃.

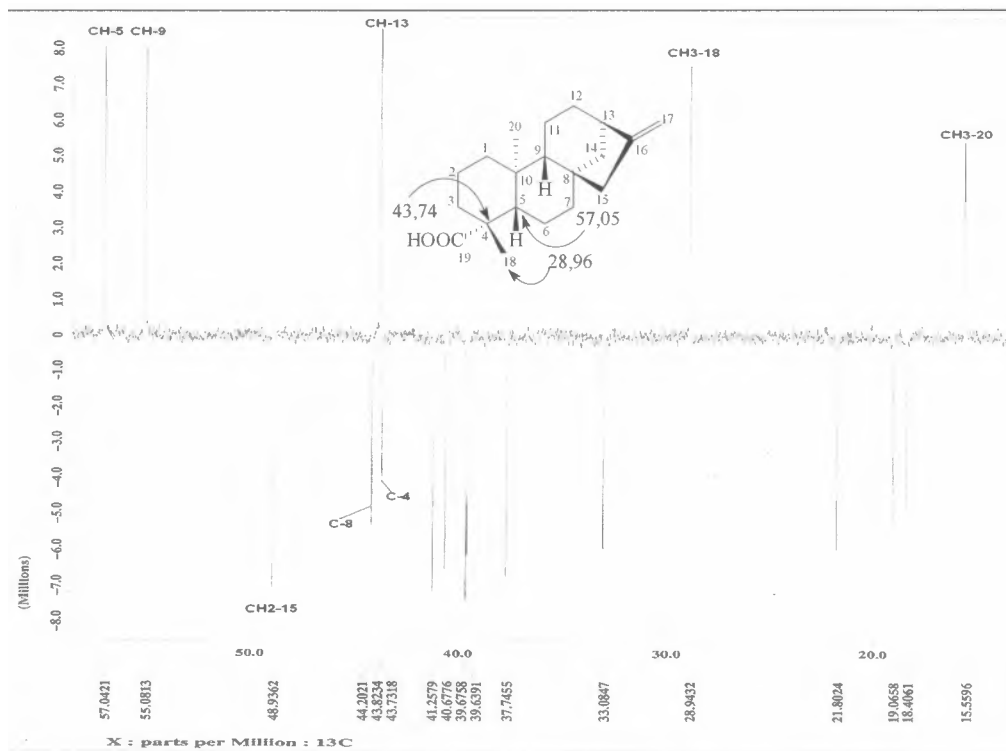
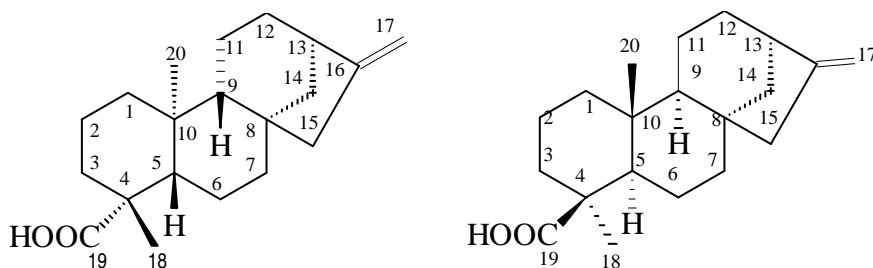


Figura 39. Expansão do espectro de RMN¹³C APT (100 MHz) da AcF-01 na região de δ_C 15,56-58,04, em CDCl₃.

Tabela 9. Dados espectrais de RMN¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) de AcF-01, em CDCl₃. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.



HMQC		HMBC		Literatura*		
C	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _C (ent)	δ _C (normal)
4	43,74		3H-19	H-2b	43,9	47,6
8	44,21		H-9	H-13	44,3	44,4
10	39,66		3H-20, H-5		39,8	39,8
16	155,87		2H-15		155,9	155,3
18/19	184,77				185,1 (19)	185,0 (18)
CH						
5	57,05	1,07		3H-18; 3H-20; H-7a	57,2	50,0
9	55,09	1,05		2H-15; 3H-20	55,3	56,2
13	43,84	2,64 (sl)			43,9	44,0
CH₂						
1	40,69	1,86; 0,80		3H-20	40,8	39,9
2	19,08	1,82; 1,40			19,2	18,0
3	37,76	2,14; 0,95		3H-18, H-1a	37,8	37,0
6	21,81	1,79	H-5		21,9	23,3
7	41,27	1,52; 1,40		H-9	41,4	40,7
11	18,42	1,62; 1,52		H13	18,5	18,0
12	33,09	1,58; 1,44			33,2	33,3
14	39,69	2,17; 1,11		H-7b	39,8	39,5
15	48,95	2,04		H-17a	49,1	49,1
17	102,99	4,80 (s) 4,74 (s)		2H-15	103,1	103,2
CH₃						
18/19	28,96	1,24 (s)			29,0 (18)	17,8 (19)
20	15,57	0,95 (s)		H-5	15,6	16,0

* VELANDIA *et al.*, 1998.

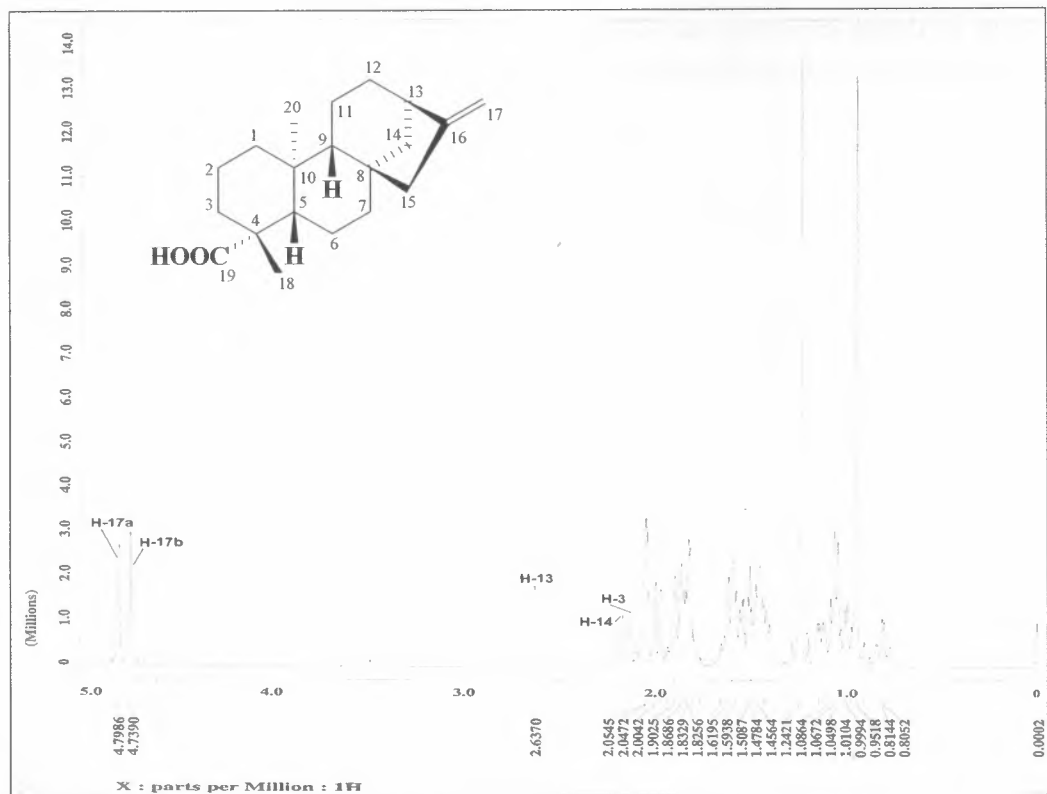


Figura 40. Espectro de RMN^1H (400 MHz) de AcF-01, em CDCl_3 .

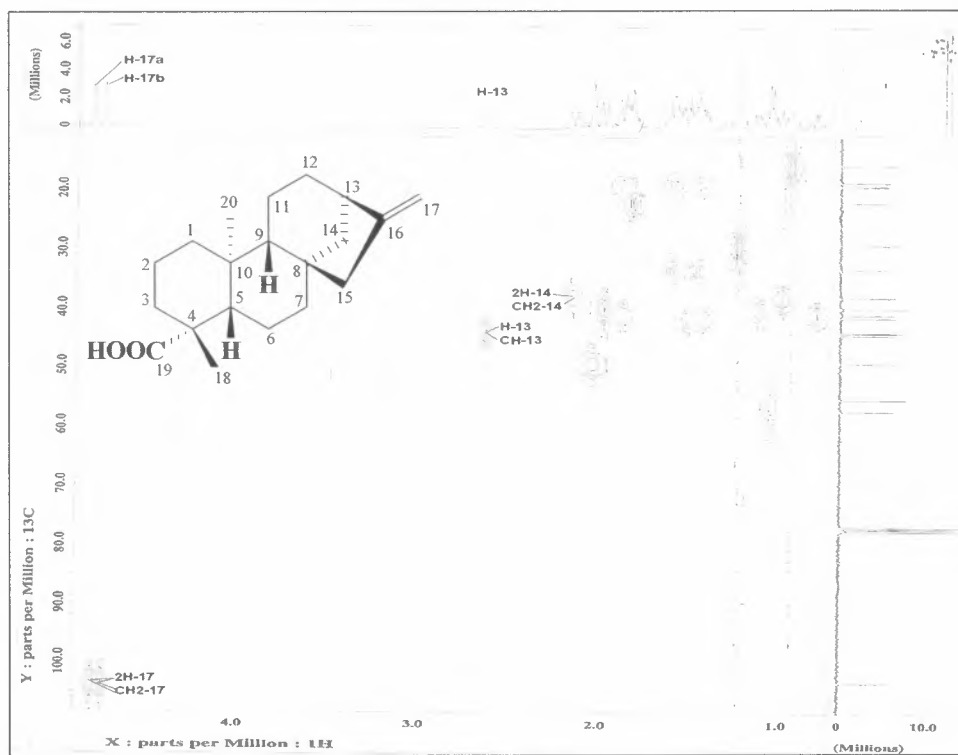


Figura 41. Mapa de correlações HMBC da AcF-01, em CDCl_3 .

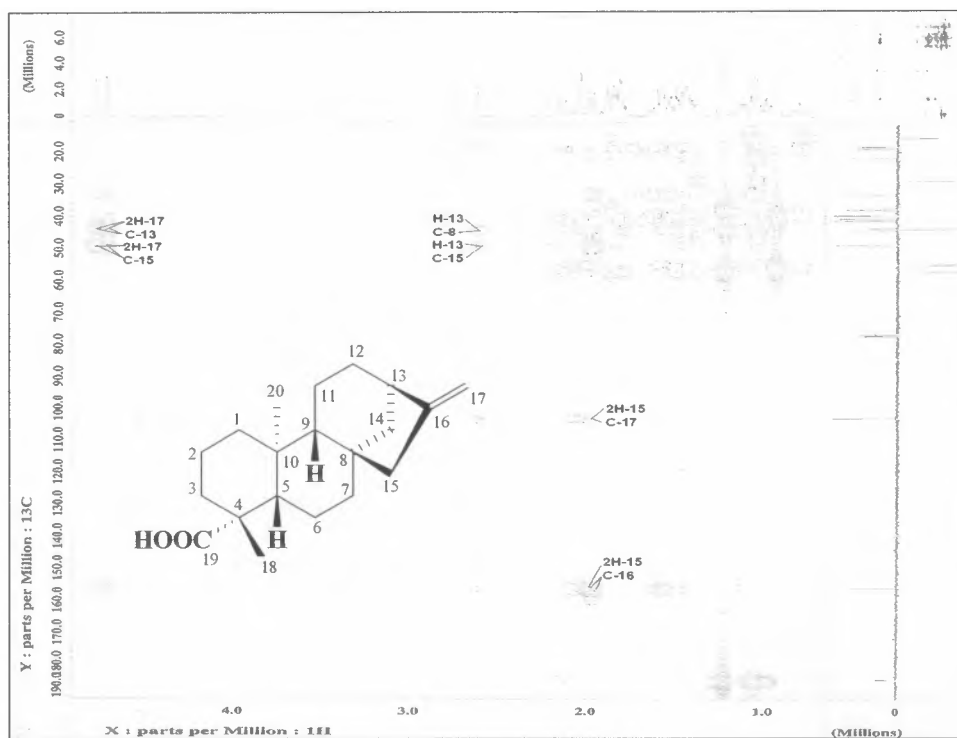


Figura 42. Mapa de correlações HMBC da AcF-01, em CDCl_3 .

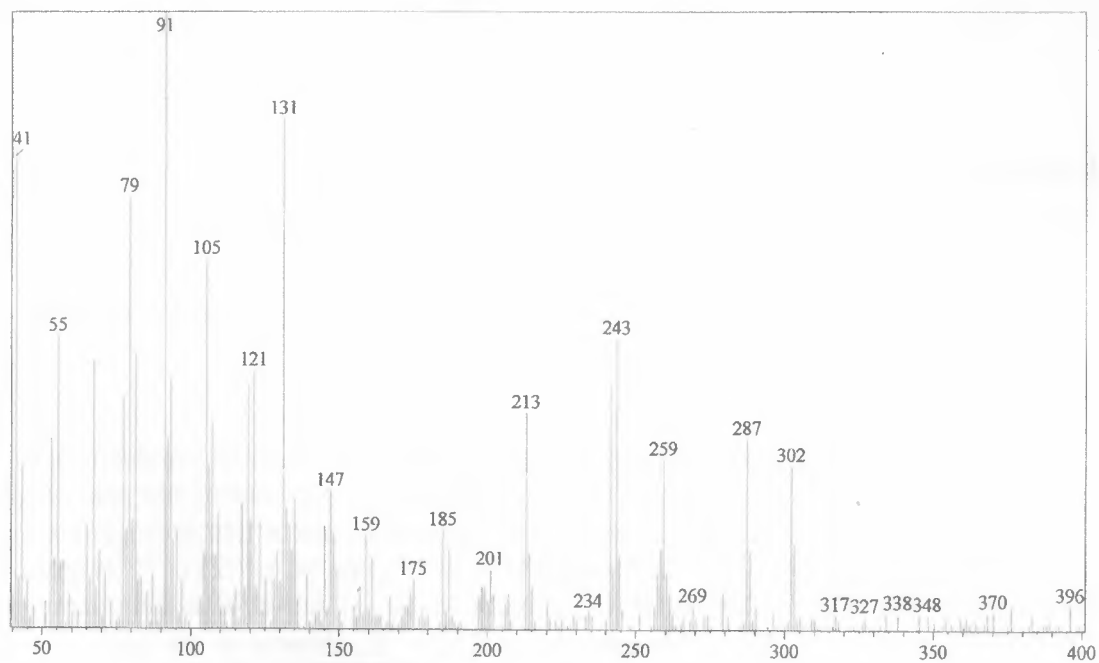
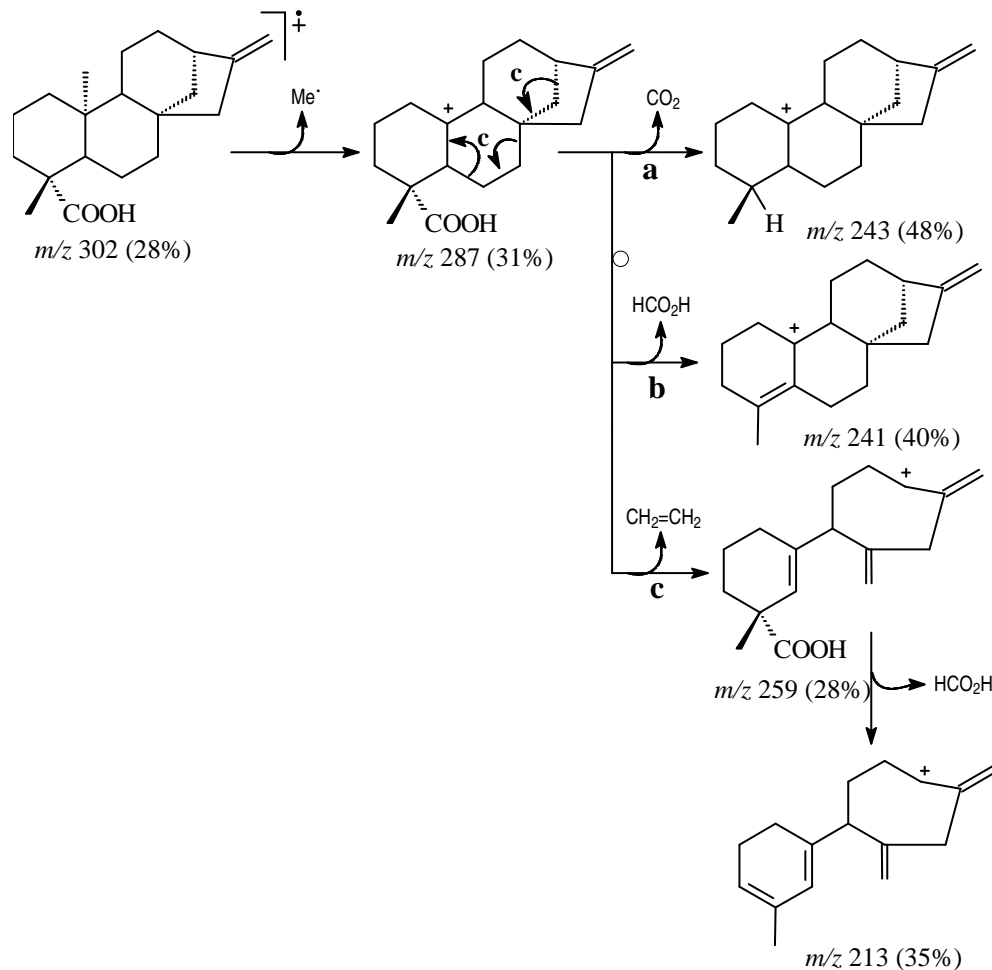


Figura 43. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por impacto eletrônico de AcF-01.



Esquema 14. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas do diterpeno AcF-01.

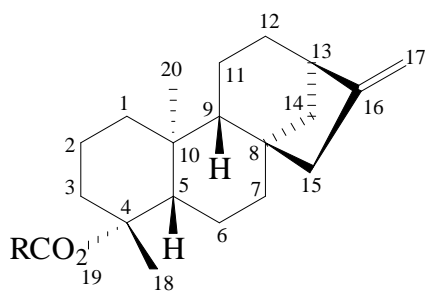
6.7.2 Caracterização estrutural do éster caurênico, o *ent*-caur-16,17-en-19-ato de metila (AcF-01a)

O tratamento do ácido caurenóico AcF-01 com diazometano conduziu a formação do produto metilado, AcF-01a, (Tabela 10, p. 71) cuja reação foi confirmada pela observação, no espectro de RMN ^1H , do simpleto em δ_{H} 3,65 correspondente a três hidrogênios metílicos do grupo acetoxi ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}=\text{O}$). Os dados de RMN ^1H (Figura 44, p. 72) e ^{13}C (Figura 45, p. 72), bem como os mapas de contornos HMQC (Figura 46, p. 73) de AcF-01a mantiveram a coerência esperada em relação a AcF-01. No espectro de RMN ^{13}C , observa-se um sinal adicional, em δ_{C} 51,09, correspondente a metoxila e o sinal de carbonila que foi deslocado para δ_{C} 178,11, caracterizando o éster. Estes dados foram comparados com os de AcF-01 (Tabela 9, p. 67) e com valores descritos na literatura para o ácido da série *ent* (WU et al, 1996).

Os dados de RMN observados para AcF-01a foram semelhantes aos registrados na literatura para o *ent*-caur-16,17-en-19-ato de metila já descrito como produto de derivação do

ácido *ent*-caur-16,17-en-19-óico (ETSE, *et al*, 1987; KIM, *et al*, 1988) e como produto natural isolado de uma espécie da família Compositae (DELGADO *et al*, 1984).

Tabela 10. Dados espectrais de RMN ^{13}C da AcF-01a, incluindo resultados em 2D HMQC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.



R = H - AcF-01

R = CH₃ - AcF-01a

Ácido <i>ent</i> -caur-16,17-en-19-óico (WU, <i>et al</i> , 1996)		HMQC AcF-01a	
C	δ_c	δ_c	δ_H
4	44,2	43,82	
8	44,7	44,21	
10	41,2	39,42	
16	156,4	155,90	
19	185,0	178,11	
CH			
5	57,5	57,05	1,06
9	55,6	55,08	1,03
13	44,3	43,82	2,63
CH ₂			
1	41,8	40,76	1,88; 0,76
2	19,6	19,14	1,82; 1,40
3	38,3	38,10	2,16; 0,96
6	22,3	21,91	1,78
7	41,8	41,29	1,53; 1,41
11	18,9	18,39	1,63; 1,51
12	33,6	33,10	1,58; 1,44
14	40,2	39,67	2,19; 1,11
15	49,4	48,93	2,03
17	103,5	102,95	4,79; 4,74
CH ₃			
18	29,5	28,74	1,19
20	16,1	15,40	0,83
MeO		51,09	3,65

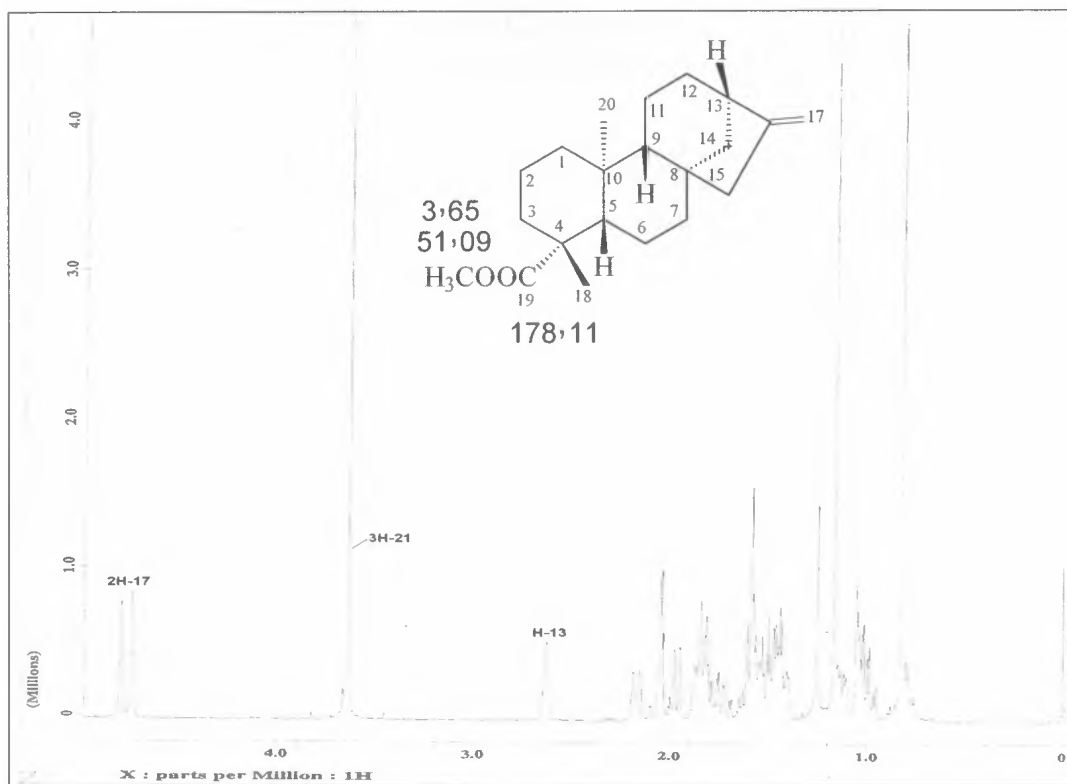


Figura 44. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da AcF-01a, em CDCl₃.

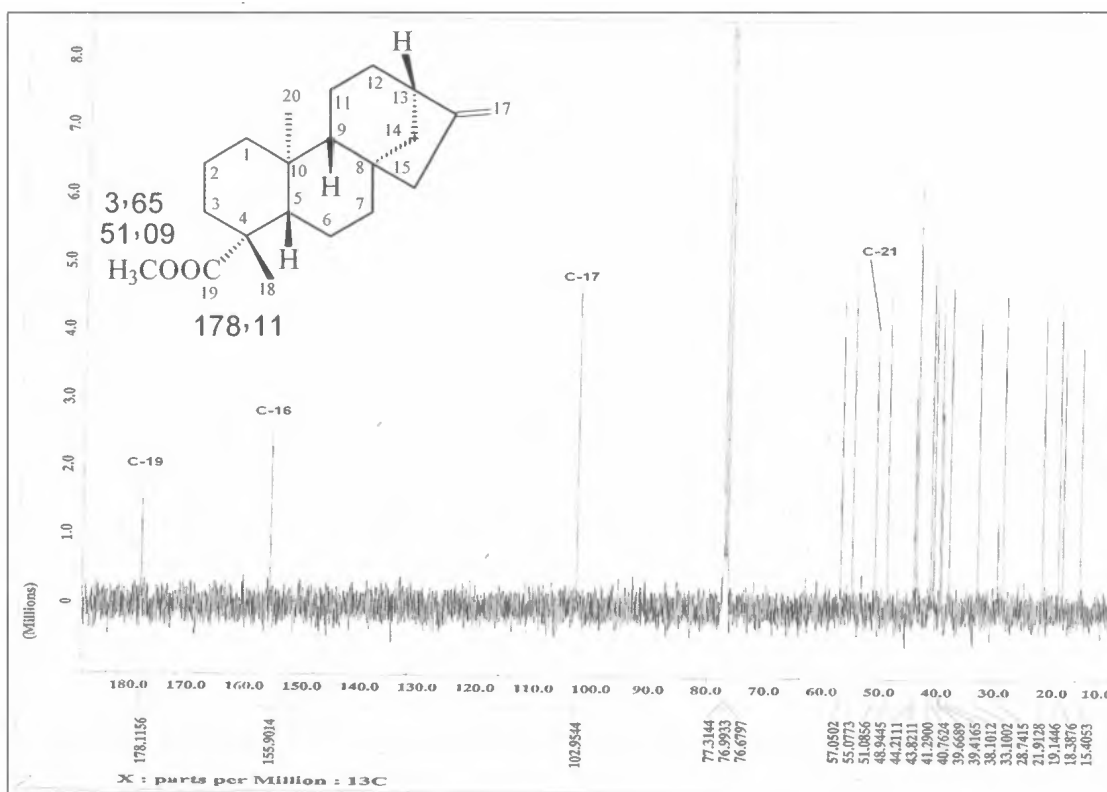


Figura 45. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz) da AcF-01a, em CDCl₃.

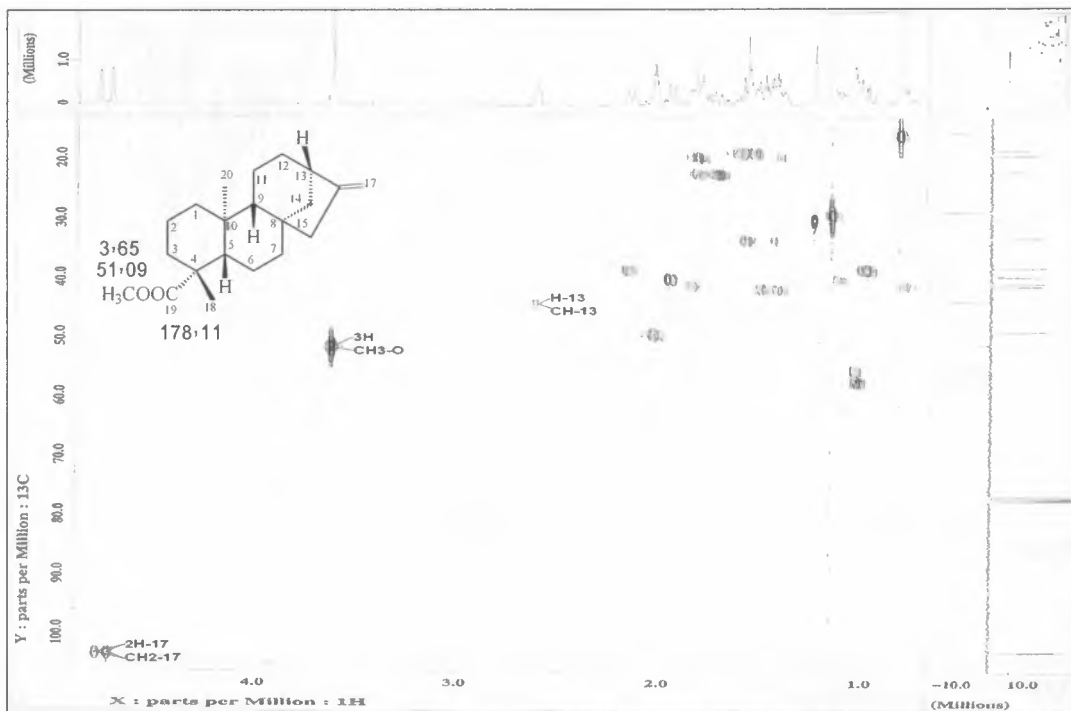
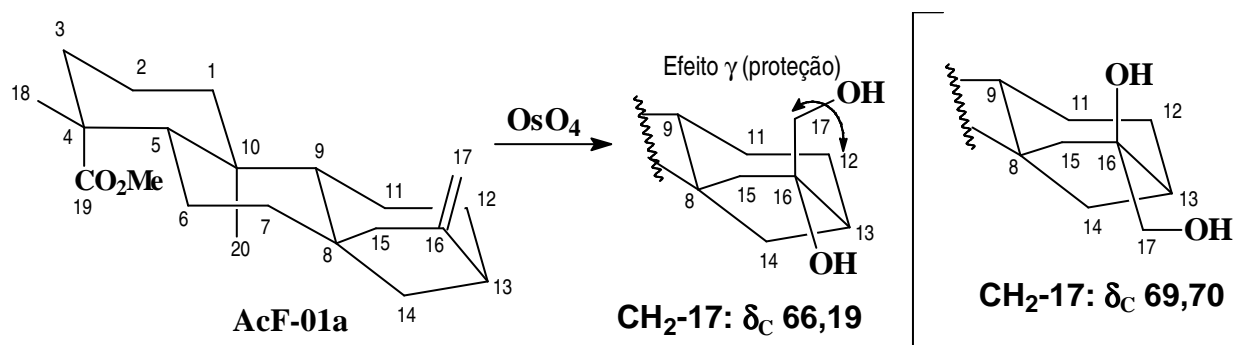


Figura 46. Mapa de correlações HMBC da AcF-01a, em CDCl_3 .

6.7.3 Caracterização estrutural do éster caurânico, *ent*-caur-16 α ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (AcF-01b)

O diterpeno *ent*-caur-16,17-en-19-ato de metila (AcF-01a) foi submetido a oxidação da ligação dupla em C-16(17) com tetróxido de ósmio (OsO_4) com o objetivo de obter o derivado 16, 17-diol (ETSE, *et al*, 1987).



O produto de derivação AcF-01b foi isolado como um sólido branco. O espectro na região do infravermelho (Figura 47, p. 74) apresentou bandas de absorções características de grupo hidroxila [(H-O) em ν_{max} 3417 cm^{-1}] e estiramento de carbonila de éster [(C=O) em ν_{max} 1720 cm^{-1}].

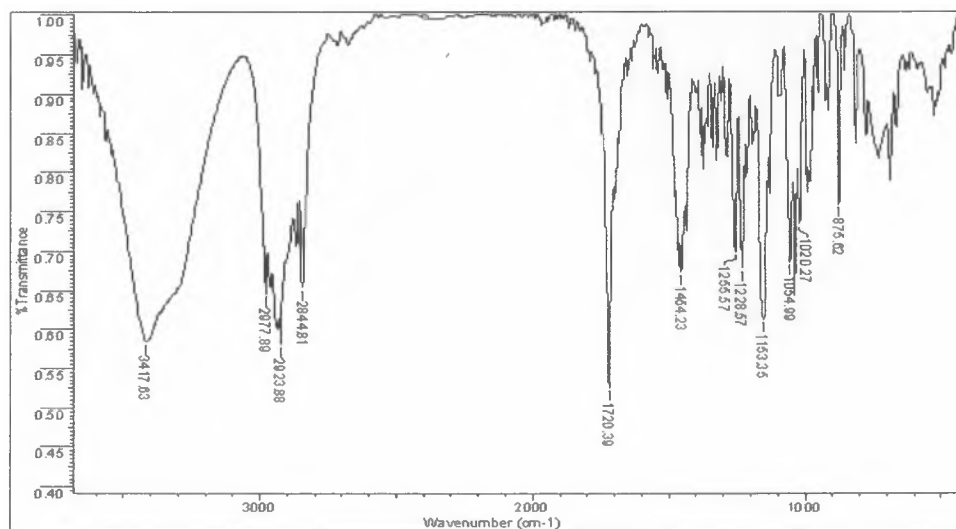


Figura 47. Espectro na região do infravermelho obtido em KBr, de AcF-01b.

A feição espectral bem como os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H (Figura 48, p. 75) e ^{13}C -APT (Figura 49, p. 76) (Tabela 11, p. 77) foram semelhantes aqueles do produto de partida AcF-01a quanto ao esqueleto caurânico.

A principal diferença observada no espectro de RMN ^1H foi a presença de dois dupletos de hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,77 (H-17a, $J = 11$ Hz) e 3,65 (H-17b, $J = 11$ Hz) que estão de acordo com a estrutura do 16 α ,17-diidroxicaurano. No caso do isômero 16 β ,17-diidroxicaurano estes sinais são observados em δ_{H} 3,37 e 3,51 ($J = 12$ Hz) (ETSE *et al*, 1987). Neste espectro foi possível observar duas hidroxilas com deslocamentos químicos em δ_{H} 2,96 e 2,88.

Com base na análise do espectro HMQC (Figura 50, p. 78) observou-se que os hidrogênios carbinólicos estão a uma ligação com o carbono em δ_{C} 66,19 (CH₂-17). Conforme dados observados na literatura (WU, *et al*, 1996) no isômero 16 β ,17-diidroxicaurano, o carbono C-17 tem deslocamento químico em δ_{C} 69,7. A diferença de 3,51 ppm de proteção para o carbono C-17 ocorre devida o efeito de proteção gama γ exercido pelo carbono C-12.

Os mapas de contornos ^1H - ^1H -COSY (Figura 51, p. 78) e HMBC (Figura 52, p. 79) possibilitaram atribuir os deslocamentos químicos para a substância AcF-01b.

No espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 49, p. 76) foi observado a presença de vinte e um sinais referentes a três carbonos metílicos (duas metilas e uma metoxila), dez metilênicos, três metínicos e cinco carbonos quaternários, entre os quais um sinal em δ_{C} 178,04, relativo à carbonila de grupamento éster.

A fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$ de AcF-01b foi proposta a partir de dados de RMN ^1H e ^{13}C -APT envolvendo experimentos em 1D e 2D e do espectro de massas.

A análise do espectro de massas obtido por impacto eletrônico (Figura 53, p. 79) permitiu confirmar a proposta, mesmo que neste não seja observada a presença do íon molecular ($[\text{M}]^+$, m/z 350). A presença do fragmento m/z 319 como pico base, corrobora com a estrutura proposta, visto ser oriundo da perda de 31 unidades de massa relativo à perda de metoxila [m/z 319 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$)]. Os demais íons fragmentários estão de acordo com a estrutura proposta (Esquema 15, p. 80).

O *ent*-caur-16 α ,17-dihidrocauran-19-ato de metila já se encontra reportado na literatura como produto natural isolado de *Annona reticulata* (ETSE *et al*, 1987) e como produto de derivação (KIM *et al*, 1988) e esta de acordo com a estrutura de AcF-01b.

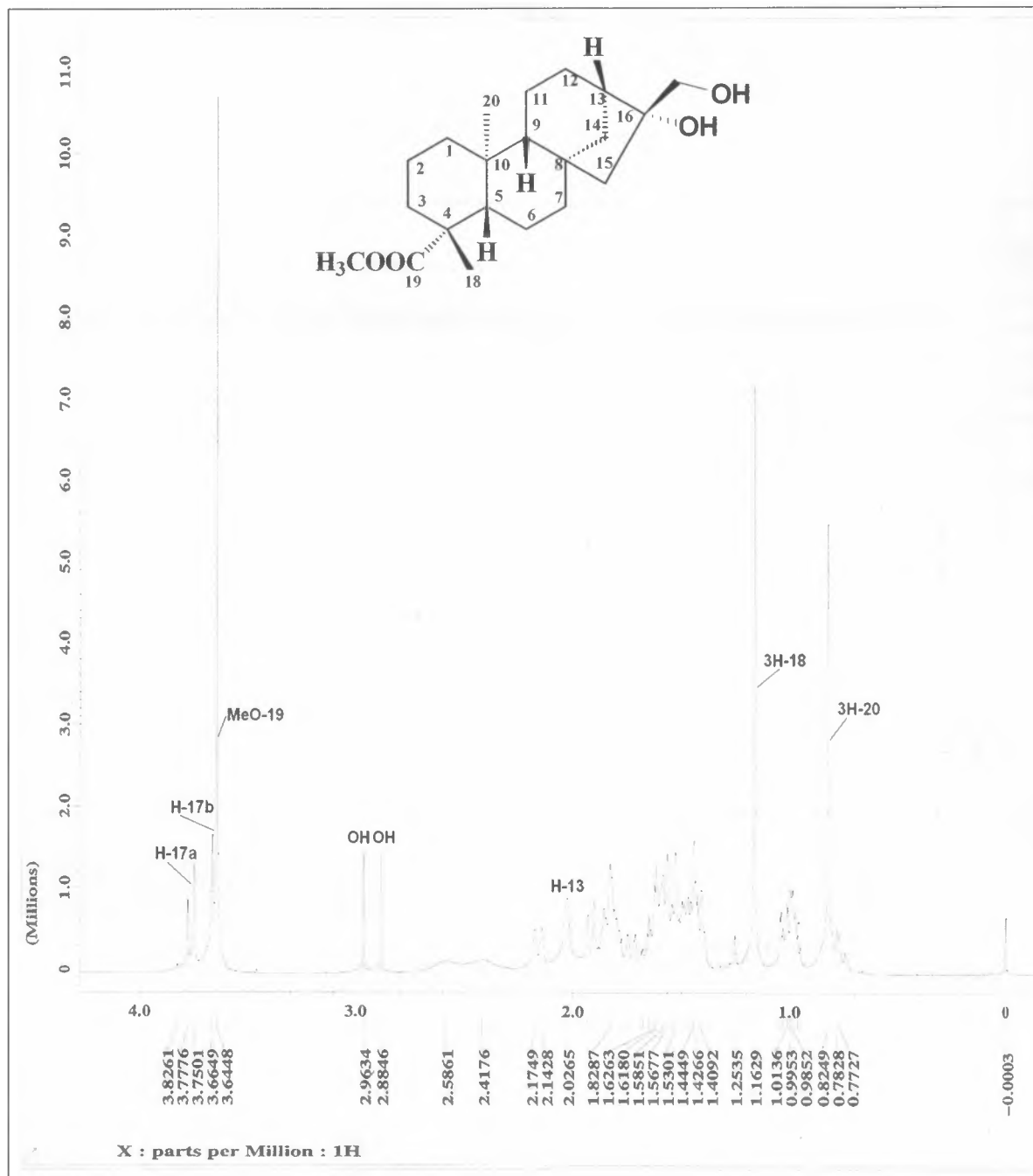


Figura 48. Espectro de RMN¹H (400 MHz) de AcF-01b, em CDCl₃.

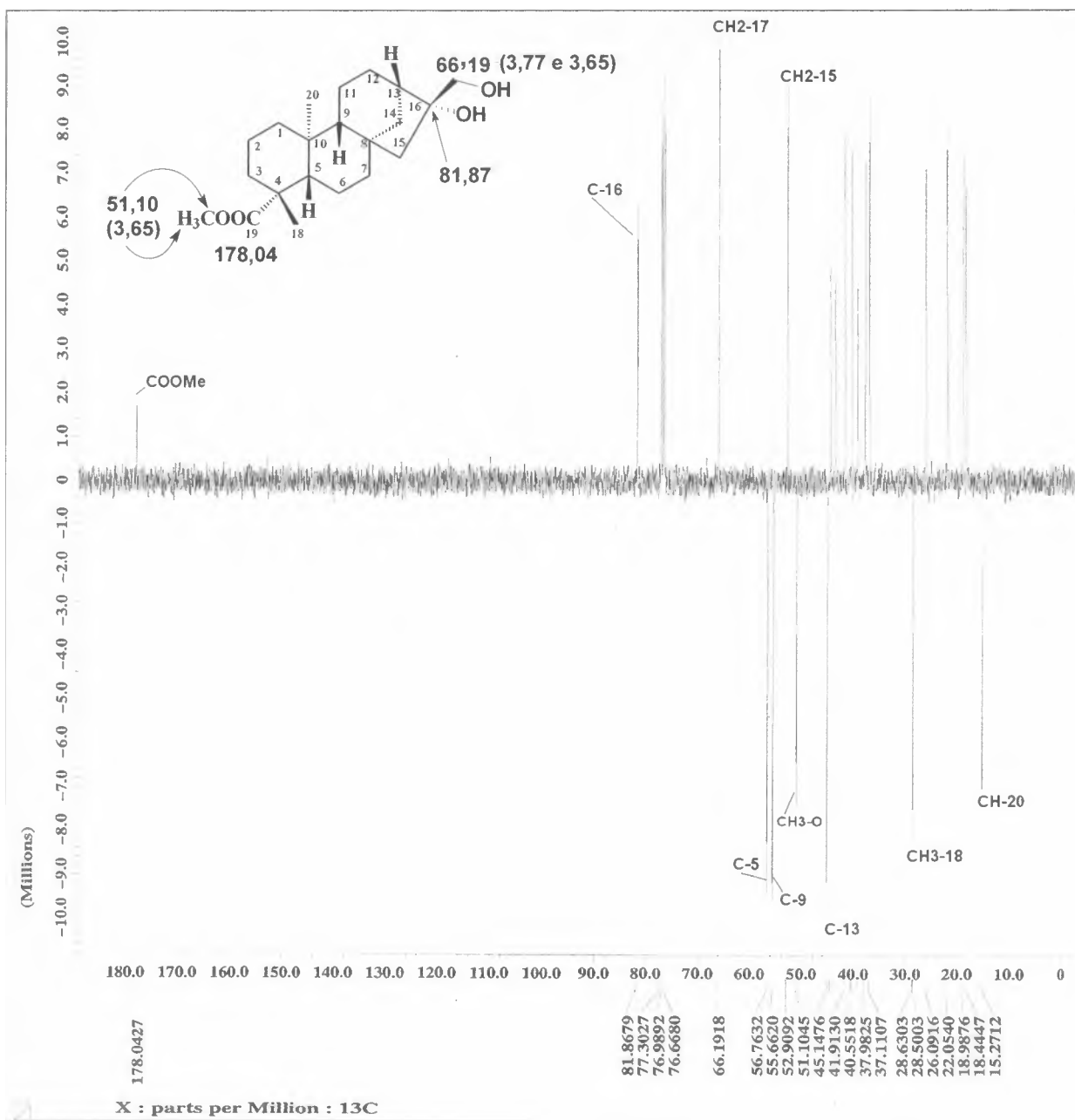
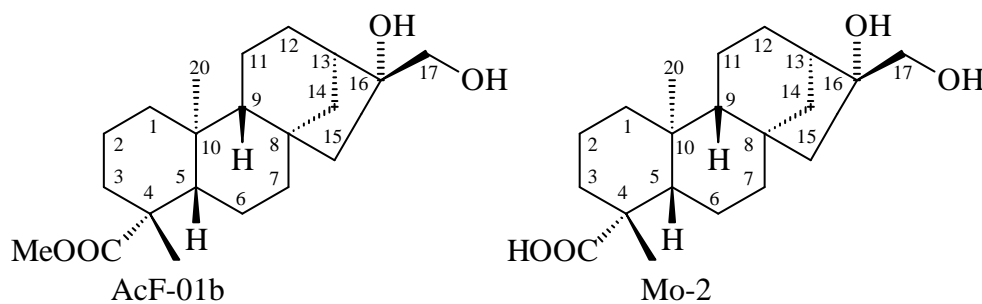


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-01b, em CDCl_3 .

Tabela 11. Dados espectrais de RMN¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) de AcF-01b, em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.



HMQC			HMBC		Mo-2 Literatura*
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C
4	44,59	-	3H-18		43,9
8	43,72	-			45,0
10	39,97	-	3H-20		40,1
16	81,87	-	H-17a	H-12b; H-14a	81,7
19	178,04	-		3H-18; MeO-19	180,1
CH					
5	56,76	1,02 (dd, 12,1, 2,6)		H-3a; 3H-18; 3H-20	57,0
9	55,66	0,98 (m)	2H-11	2H-12; 3H-20	56,3
13	45,15	2,03 (sl)			45,9
CH₂					
1	40,55	1,82; 0,78 (dt, 13,9, 4,0)		H-3a	41,1
2	18,99	1,80			19,8
3	37,98	2,15 (dl, 12,4); 1,00		3H-18	38,7
6	22,05	1,82; 1,68			23,0
7	41,91	1,64; 1,43			42,8
11	18,44	1,54; 1,46			19,0
12	26,09	1,58; 1,42		H-9; H-14a	26,7
14	37,11	1,92 (d, 11,7); 1,60	H-13		37,8
15	52,91	1,55; 1,43		2H-14	53,9
17	66,19	3,77 (d, 11,0); 3,65 (d, 11,0)		H-15a	66,5
CH₃					
18	28,50	1,16 (s)			29,3
19	-	-	-	-	-
20	15,27	0,82 (s)			16,0
MeO	51,10	3,65 (s)			-
HO	-	2,96 (s)			-
HO	-	2,88 (s)			-

*(WU *et al*, 1996)

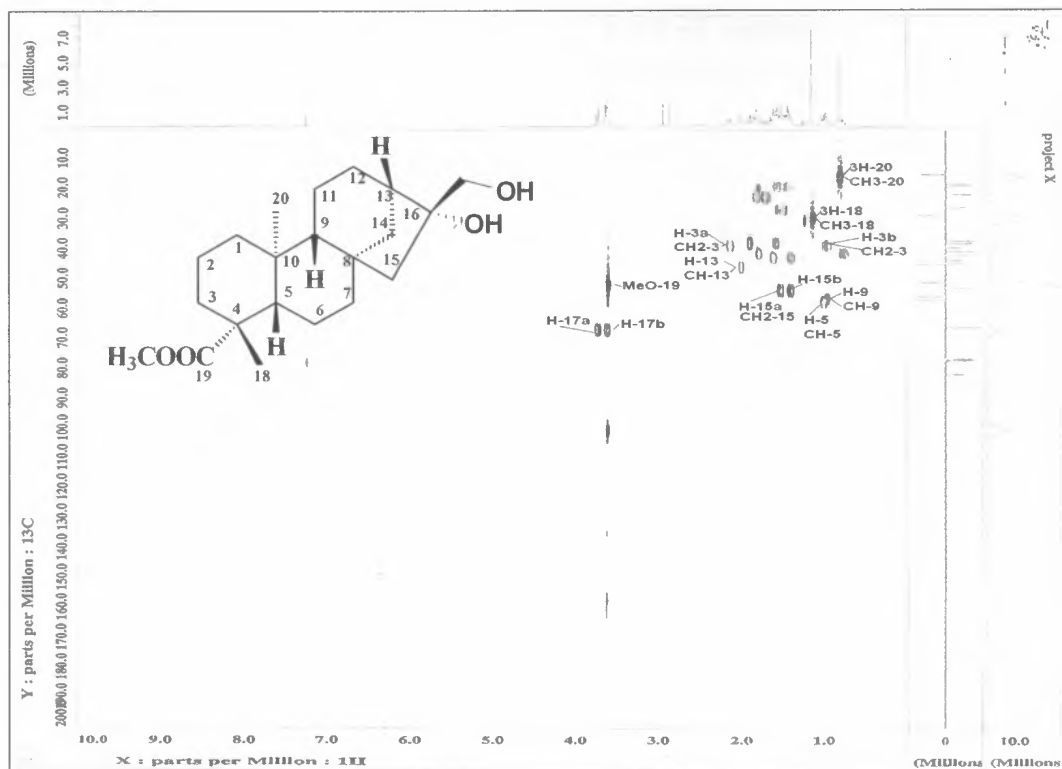


Figura 50. Mapa de correlações HMBC da AcF-01b, em CDCl_3 .

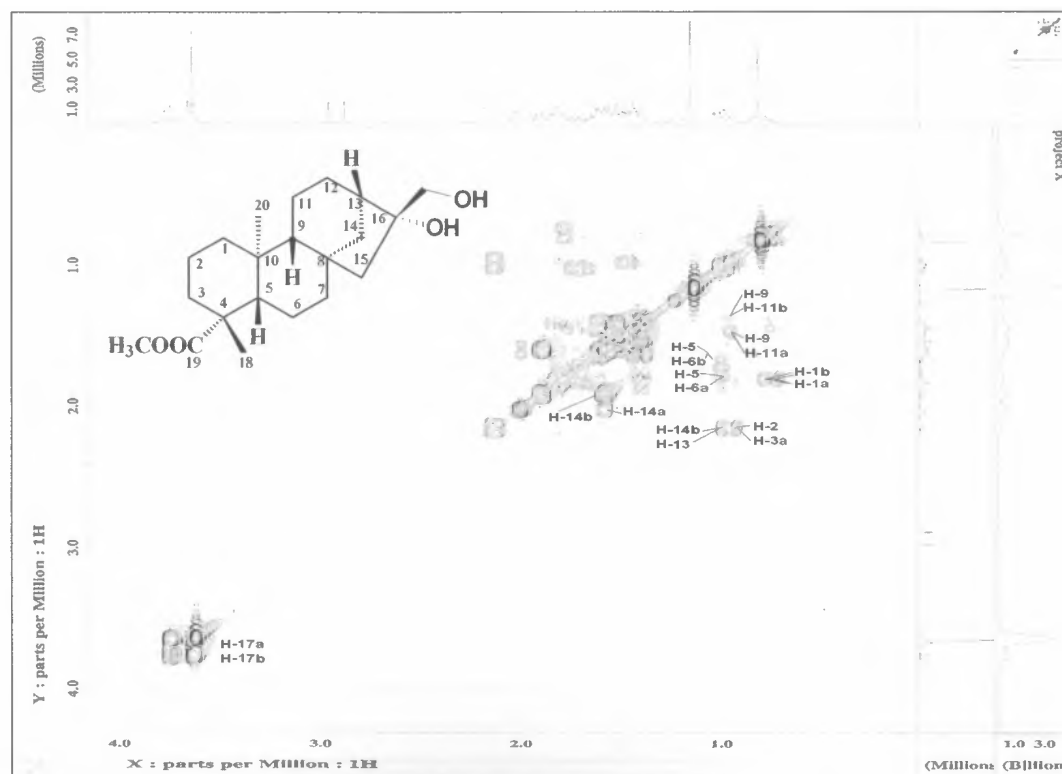


Figura 51. Mapa de correlação COSY da AcF-01b, em CDCl_3 .

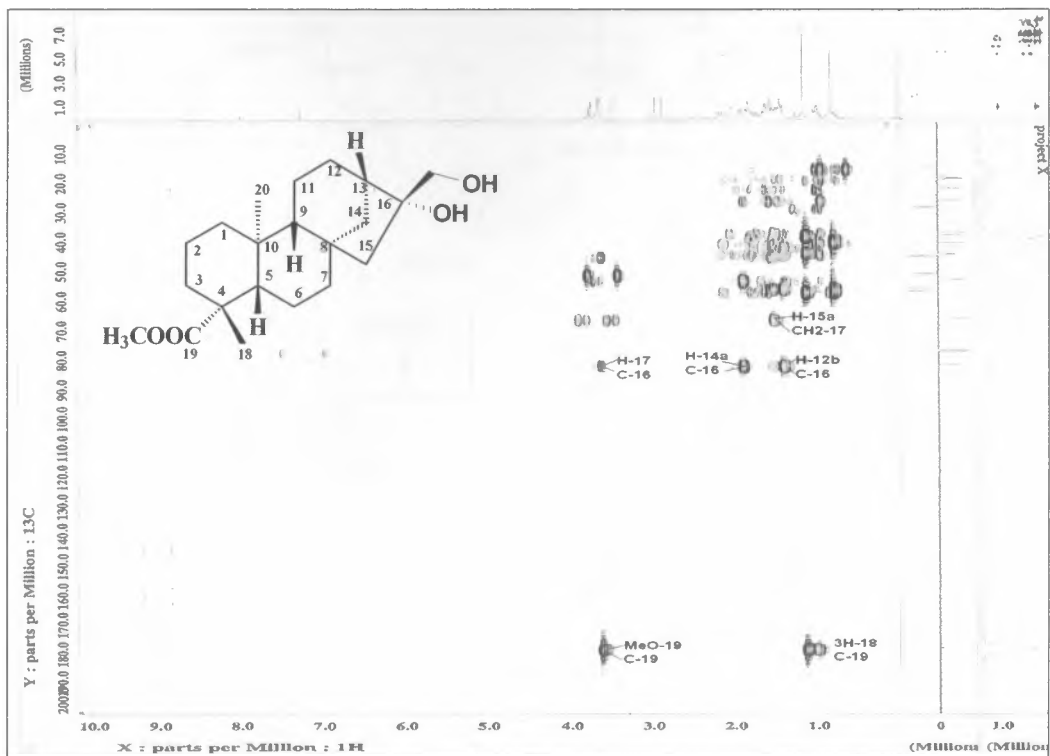


Figura 52. Mapa de correlação HMBC da AcF-01b, em CDCl_3 .

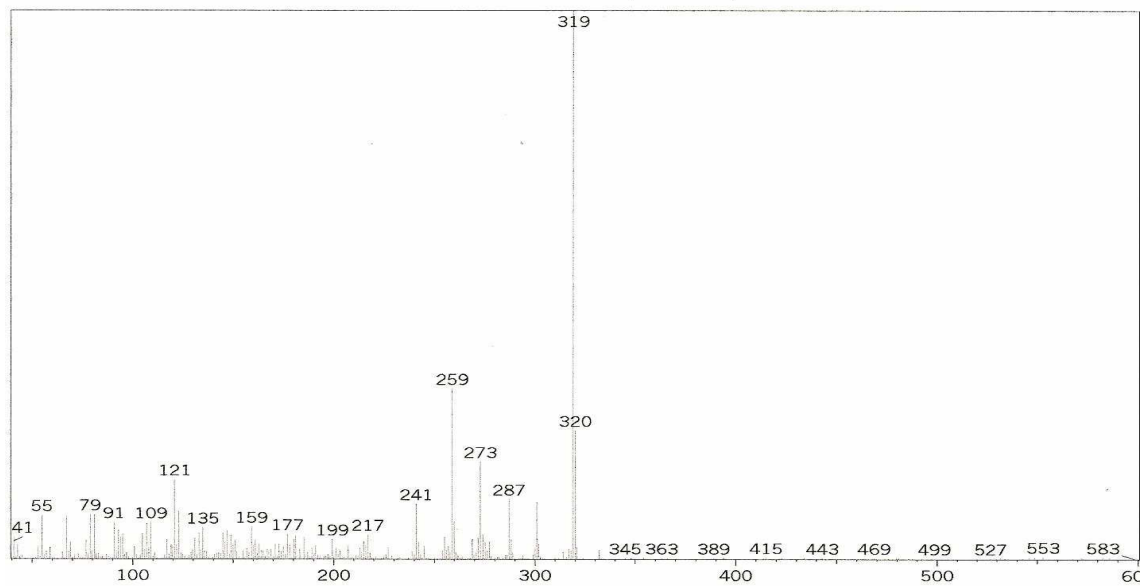
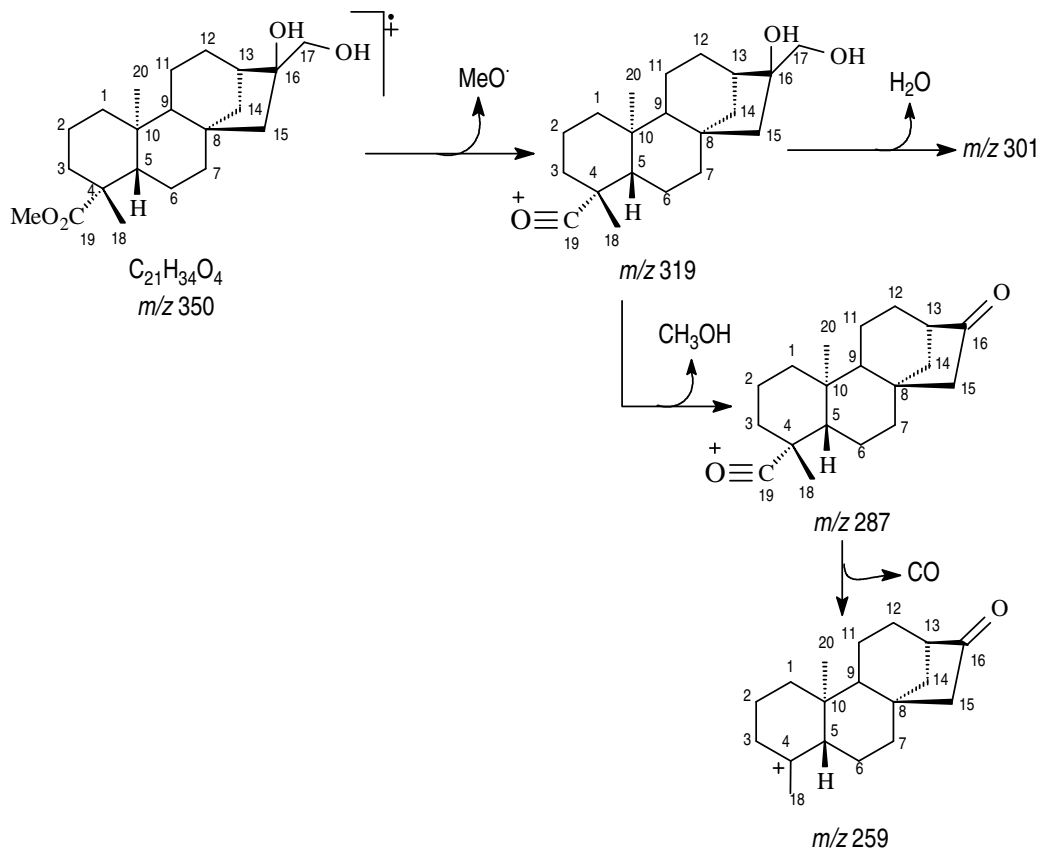


Figura 53. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por impacto eletrônico de AcF-01b.



Esquema 15. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas do diterpeno AcF-01b.

6.7.4 Caracterização estrutural do *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-ato de metila (AcF-195)

O diterpeno codificado de AcF-195 foi isolado como um sólido branco amorfo. Apresentou $[\alpha]_D$ -39,9 ($c = 0,42300$ g/100 mL; $CHCl_3$). Sua natureza terpênica foi evidenciada mediante análise em CCD, com solução ácida de sulfato cérico, onde apresentou coloração violeta.

O espectro na região do infravermelho (Figura 54, p. 81) apresentou bandas de absorção compatíveis com estiramento de grupo hidroxila (ν_{max} 3359-3508 cm^{-1}) e carbonila [ν_{max} 1722 cm^{-1} (C=O)].

A feição espectral assim como os deslocamentos químicos (Tabela 12, p. 82) observados nos espectros de RMN 1H (Figura 55, p. 83) e ^{13}C APT (Figuras 56, p. 83 e 57, p. 84) em conjunto com o valor negativo de $[\alpha]_D$, permitiu deduzir que AcF-195 pertence a classe dos diterpenos com esqueleto *ent*-caurânico. Essa dedução adveio da comparação dos respectivos espectros com aqueles da AcF-01, AcF-01a e mais precisamente da AcF-01b (Tabelas 11, p. 77) cuja estrutura leva a proposta de que se trata de um isômero.

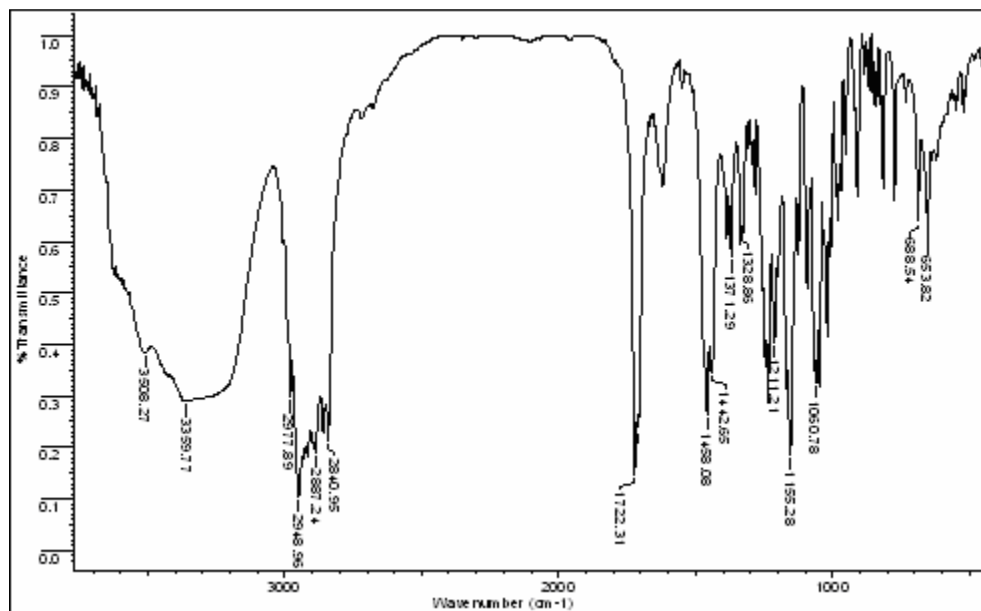


Figura 54. Espectro na região do infravermelho de AcF-195, obtido em pastilha de KBr.

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 55, p. 83) inicialmente notou-se a presença de um sinal intenso correspondente aos hidrogênios metílicos em δ_{H} 3,64 do grupo acetoxila ($\text{H}_3\text{CO}_2\text{-C-19}$) que de acordo com o espectro HMQC (Figura 58, p. 84) está ligado ao carbono metílico com deslocamento químico em δ_{C} 51,13, dois dupletos referentes aos hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,47 e 3,39 (2H-17) que no espectro HMQC estão a uma ligação com o carbono com deslocamento químico em δ_{C} 69,77 (C-17) [estes valores estão condizentes com a estrutura do 16β , 17-diidroxicaurano (ETSE, *et al*, 1987)], além de sinais de grupos metila em δ_{H} 1,16 (H-18) 0,82 (H-20). A presença de um simpleto largo em δ_{H} 2,35 (OH) corroborou com a proposta de que o diterpeno contém dois grupos hidroxila. O grupo éster metílico sustentado pelo carbono C-4, em posição axial, é observada pelo espectro HMBC (Figura 59, p. 85) através da correlação espacial do sinal da carbonila em δ_{C} 178,11 com o hidrogênio H-5, 3H-18 e MeCO_2 .

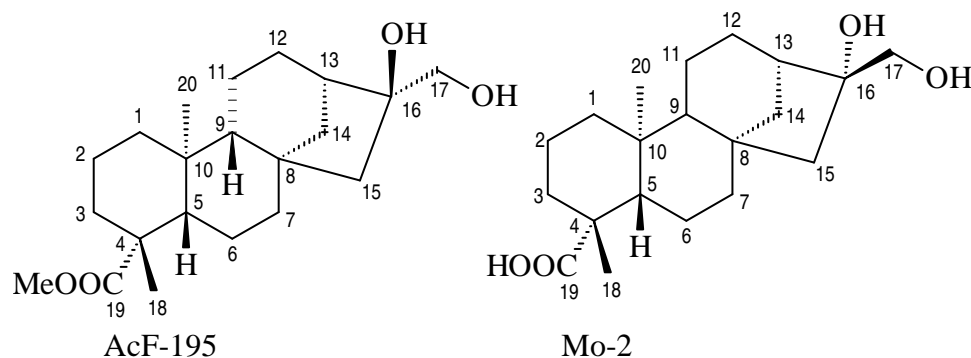
No espectro de RMN ^{13}C APT (Figuras 56, p. 83 e 57, p. 84) observou-se que os sinais em δ_{C} 69,77 para C-17 e em δ_{C} 79,86 para C-16 estão de acordo com a estereoquímica 16β para hidroxilas vicinais (WU, *et al*, 1996). Para seu epímero estes valores de deslocamentos químicos são observados em torno de δ_{C} 81,0 para C-16 e em torno de δ_{C} 66,0 para C-17, o que mostra um aumento de proteção γ -guache para os grupos que estão em posição β ao plano estereoquímico.

A análises destes dados evidenciam que AcF-195 trata-se de um derivado 16β , 17-diidroxicauran-19-ato de metila com estereoquímica do carbono C- 16β . O diterpeno 16α ,17-diidroxicauranato de metila é caracterizado por apresentar também dois dupletos (2H-17) com deslocamentos químicos em δ_{H} 3,66 e 3,78 ($J = 11$ Hz), enquanto o 16β ,17-diidroxicauranato de metila em δ_{H} 3,37 e 3,51 ($J = 12$ Hz) (ETSE, *et al*, 1987), o que suporta a proposta de que AcF-195 trata-se do diterpeno *ent*- 16β ,17-diidroxicauran-19-ato de metila.

O espectro de massas obtido por impacto de elétron (Figura 60, p. 85) apresentou padrão de fragmentação semelhante ao diterpeno AcF-01b (Figura 53, p. 77), o que permitiu confirmar a proposta para a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$, mesmo que neste não seja observada a presença do

íon molecular (M^+ , m/z 350). Os principais íons fragmentários estão propostos no esquema 16 página 86.

Tabela 12. Dados espectrais de RMN 1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de AcF-195, em $CDCl_3$. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hz.



HMQC			HMBC		*Mo-2
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C
4	43,78	-	3H-18		43,9
8	43,49	-	H-9		45,0
10	39,46	-	3H-20		40,1
16	79,86	-	2H-15; H-17b		81,7
19	178,11	-			180,1
CH					
5	56,89	0,98 (dd, 12,8, 4,4)		3H-18; 3H-20	57,0
9	55,97	1,09 (dl, 8,8)		H-5; 2H-15; 3H-20	56,3
13	40,60	2,07 (m)		2H-17	45,9
CH₂					
1	40,69	1,86; 0,84		3H-20	41,1
2	19,09				19,8
3	38,03			3H-18	38,7
6	21,61				23,0
7	41,83				42,8
11	18,98				19,0
12	26,64				26,7
14	38,11				37,8
15	52,39			H-9; 2H-17	53,9
17	69,77	3,47 (d, 10,9) 3,39 (d, 10,9)		2H-15	66,5
CH₃					
18	28,73	1,16 (s)		H-5	29,3
19	-	-	-	-	-
20	15,24	0,84 (s)		H-9	16,0
MeO	51,13	3,64 (s)			-

* WU, *et al*, 1996.

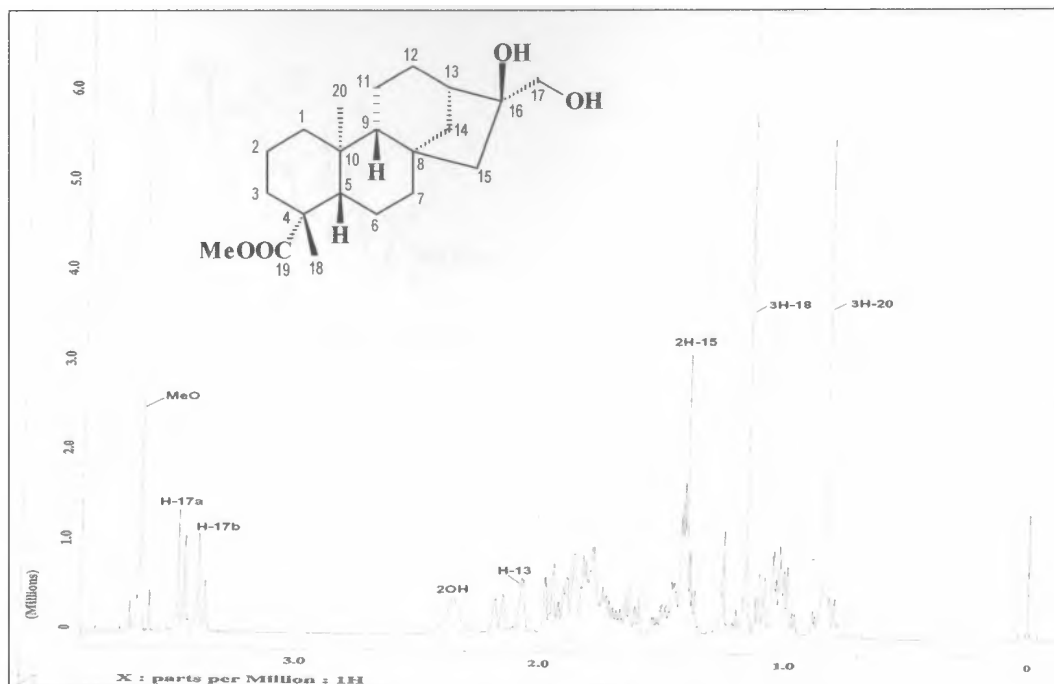


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de AcF-195, em CDCl_3 .

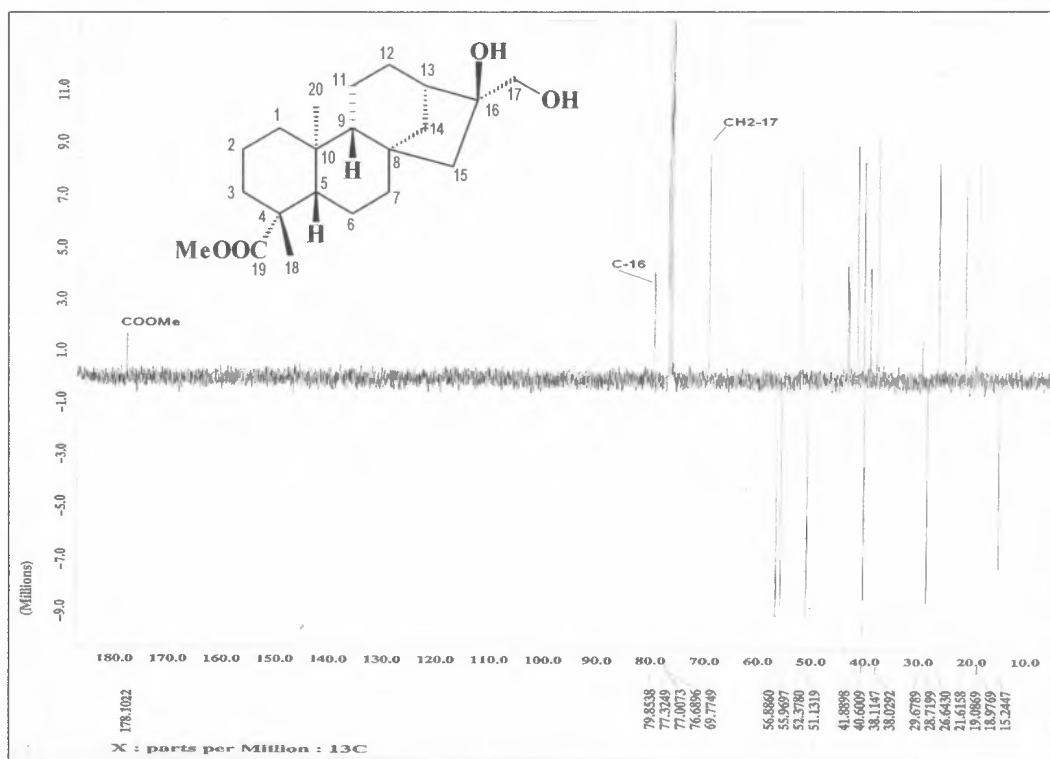


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-195, em CDCl_3 .

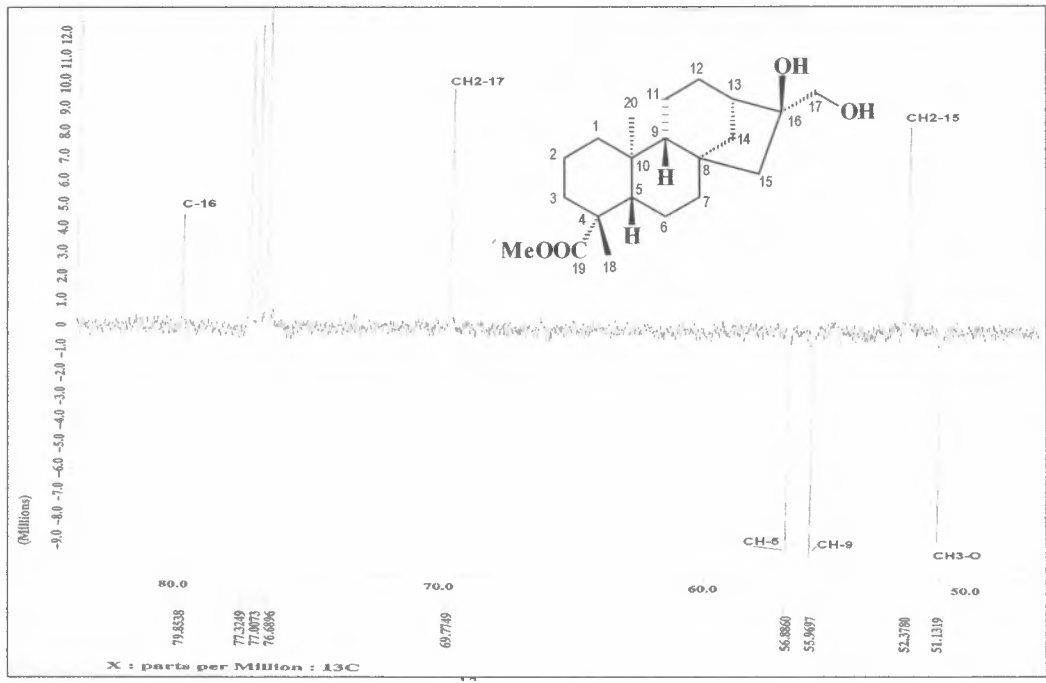


Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-195 na região de δ_{C} 50,0-80,0, em CDCl_3 .

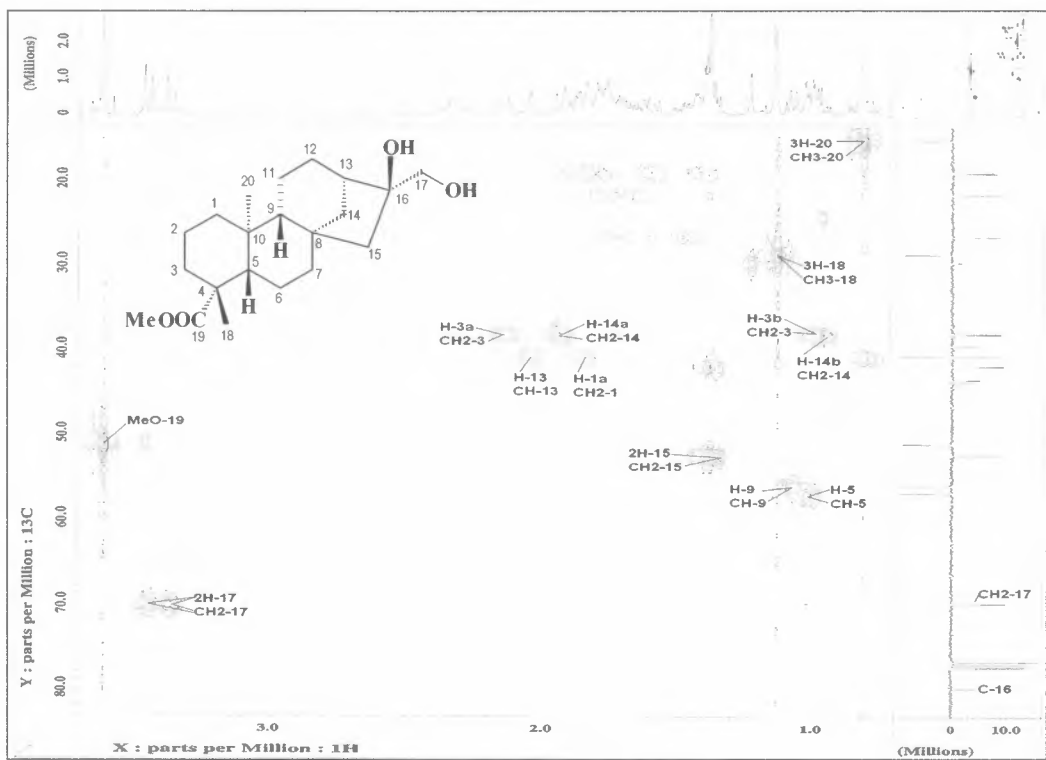


Figura 58. Mapa de correlações HMBC da AcF-195, em CDCl_3 .

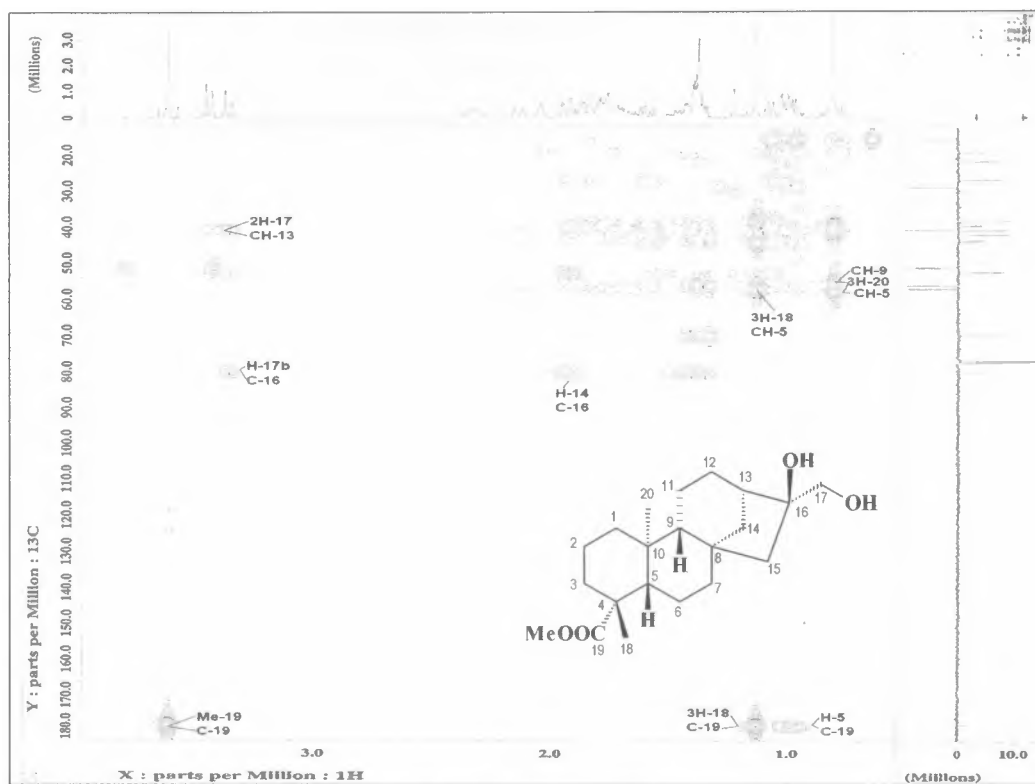


Figura 59. Mapa de correlações HMBC da AcF-195, em CDCl_3 .

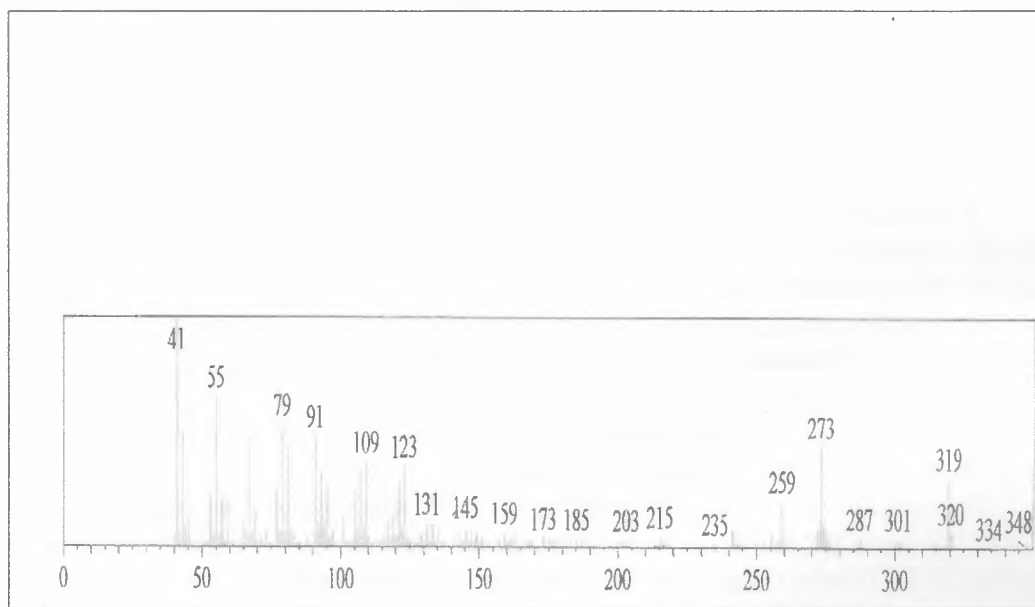
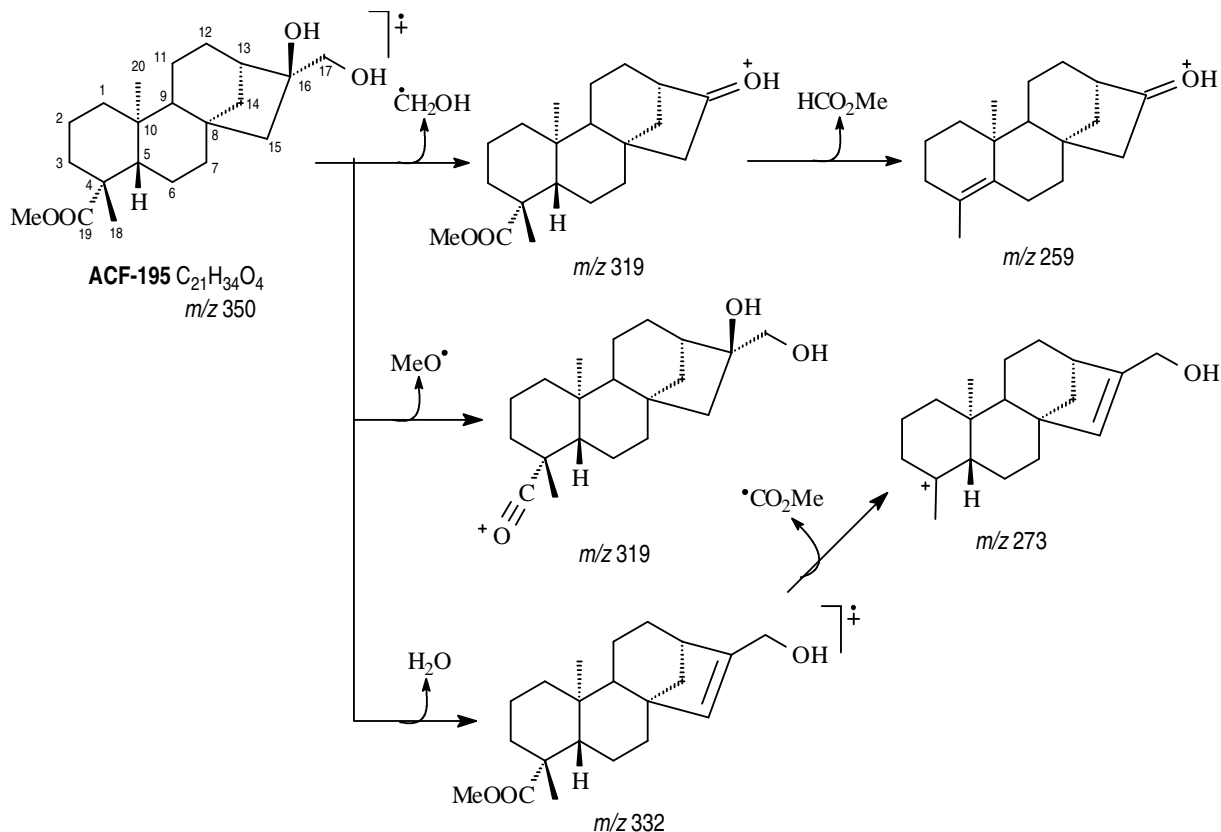


Figura 60. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por CG/EM de AcF-195.



Esquema 16. Proposta mecanística de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas do diterpeno AcF-195.

6.7.5 Caracterização estrutural o ácido *ent*-16 β ,17-diidróxi-cauran-19-óico (AcF-1216)

A substância codificada de AcF-1216 foi isolada como um sólido branco amorfo. Quando analisada através de CCD mostrou uma mancha de cor violeta em presença de sulfato cérico, revelado assim sua natureza terpênica.

O espectro na região do infravermelho (Figura 61, p. 87) mostrou banda larga em ν_{\max} 3341-3200 cm^{-1} relacionada ao estiramento de hidroxila de ácido, que pode ser confirmada pelo estiramento em ν_{\max} 1692 cm^{-1} (C=O). As absorções em ν_{\max} 2941, 2848 e em 1411 cm^{-1} são referentes aos estiramentos de carbonos sp^3 (CH, CH_2 , CH_3), enquanto a absorção em 1170 cm^{-1} está condizente com o estiramento C-O de álcool.

Os espectros RMN ^1H (Figura 62, p. 87), ^{13}C totalmente desacoplados (Figura 63, p. 88) e ^{13}C -APT (Figuras 64, p. 88) de AcF-1216, quando comparados com aqueles dos diterpenos AcF-01 e AcF-195 (Tabela 13, p. 89) e com modelo da literatura Mo1-2 (WU, et al, 1996) permitiram assegurar que AcF-1216 trata-se de um diterpeno com esqueleto caurânico também da série *ent*.

Nos espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplados (Figura 63) e ^{13}C -APT (Figuras 64) foi possível observar a presença de vinte sinais de carbono sendo três metínicos (CH)₃, dois metílicos em δ_c 29,28 (C-18) e 15,88 (C-20), dez metilênicos (CH_2)₁₀: onde um carbono hidroxilado está em δ_c 70,39 (C-17) e nove fazem parte do esqueleto diterpênico e cinco

carbonos quaternários, entre os quais um correspondente à carboxila [δ_c 180,05; IV: 1692 cm^{-1} (C-19)] e outro um carbono sp^3 hidroxilado em δ_c 79,69 (C-16).

Dois dupletos observados no espectro de RMN ^1H (Figura 62, p. 87) em δ_{H} 3,76 e 3,84 (d, $J=10,6$) estão correlacionados com o carbono em δ_c 79,69 (CH_2 -17) no espectro HMQC (Figura 65, p. 89).

A análise destes dados permitiu confirmar que AcF-1216 trata-se do ácido *ent*-16 β ,17-diidroxicauran-19-óico um diterpeno com atividade anti-HIV, já registrado na literatura (WU, *et al.*, 1996).

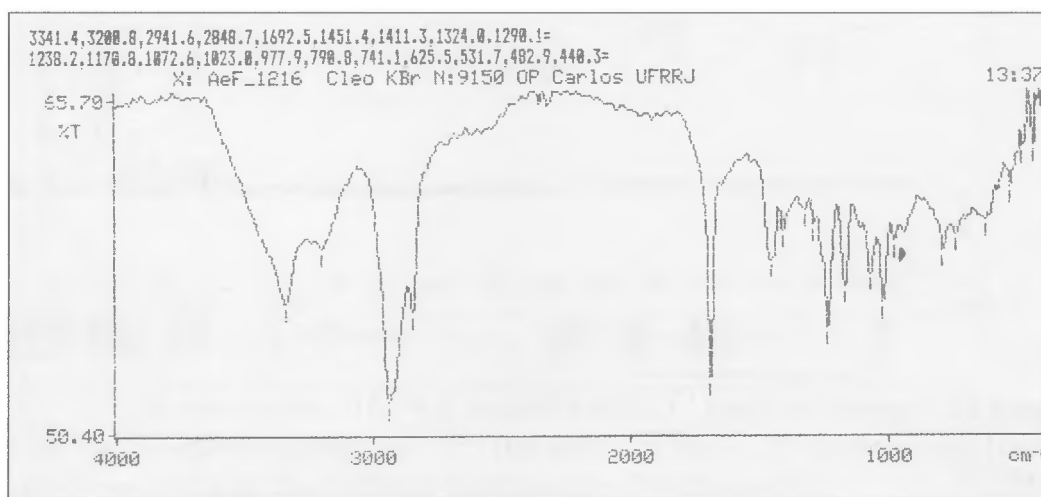


Figura 61. Espectro na região do infravermelho de AcF-1216, obtido em pastilha de KBr.

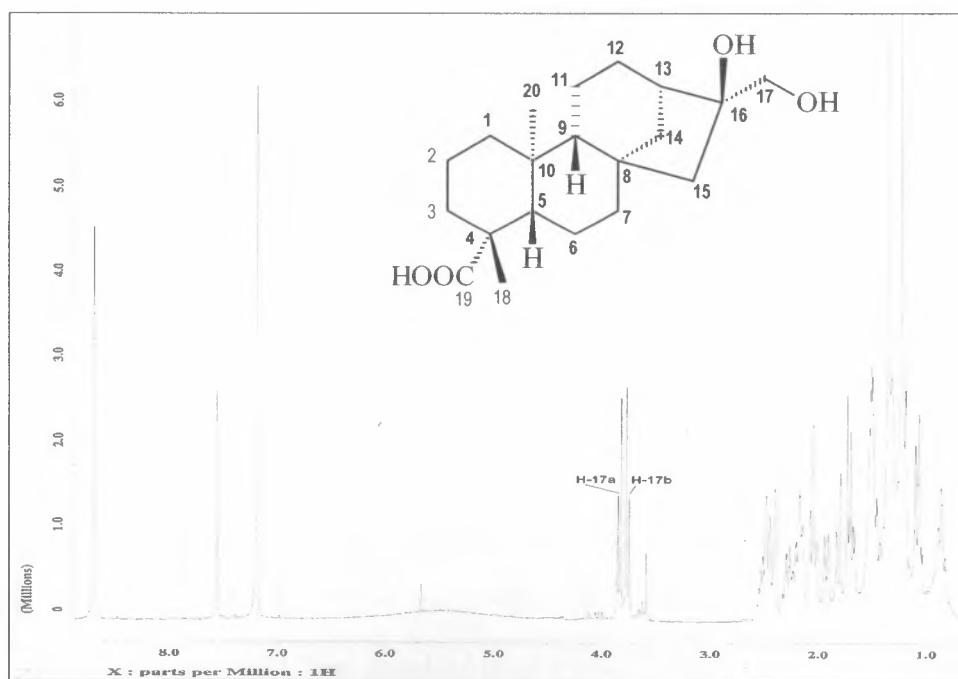


Figura 62. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de AcF-1216, em piridina d_5 .

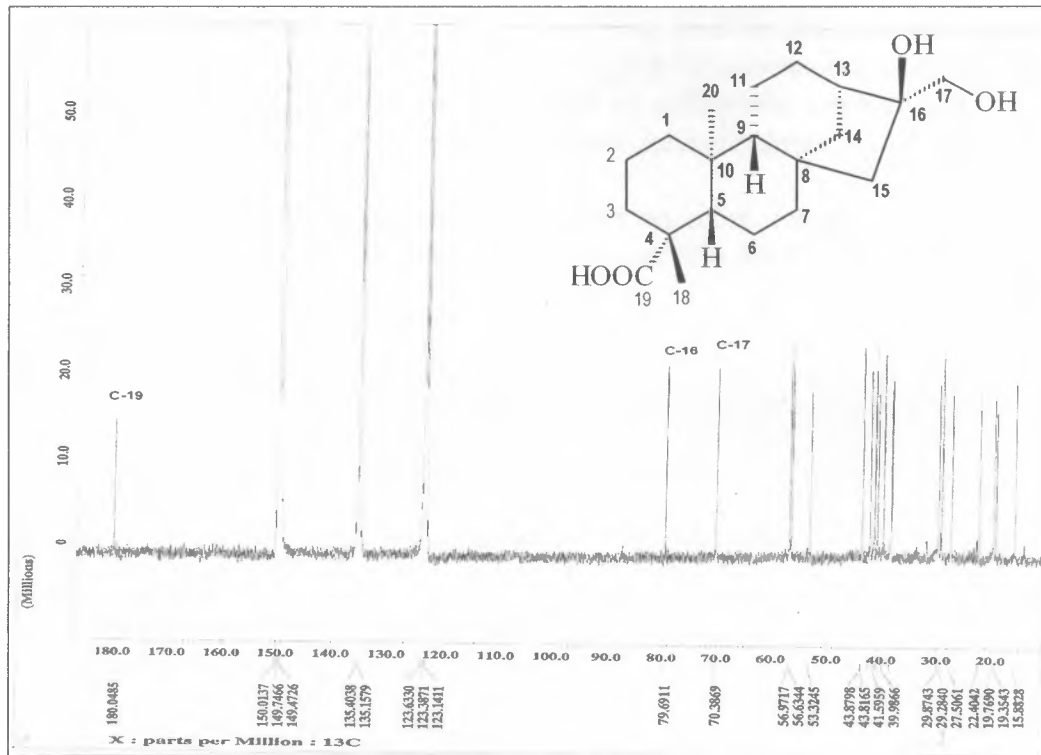


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-1216, em piridina d_5 .

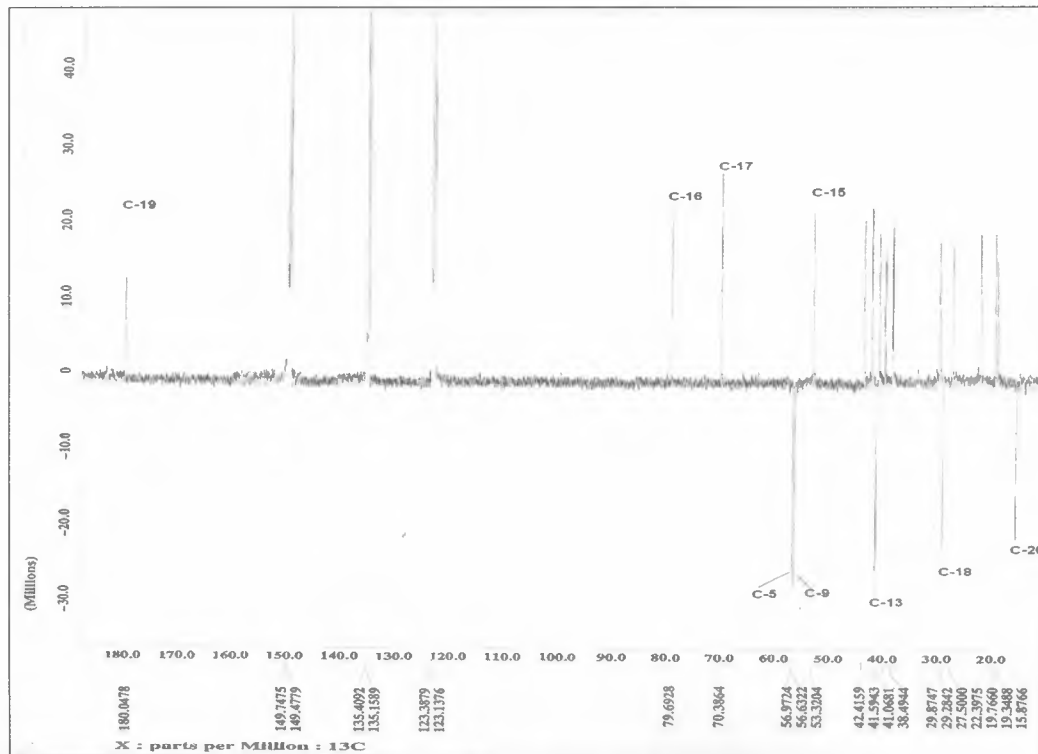


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-1216, em piridina d_5 .

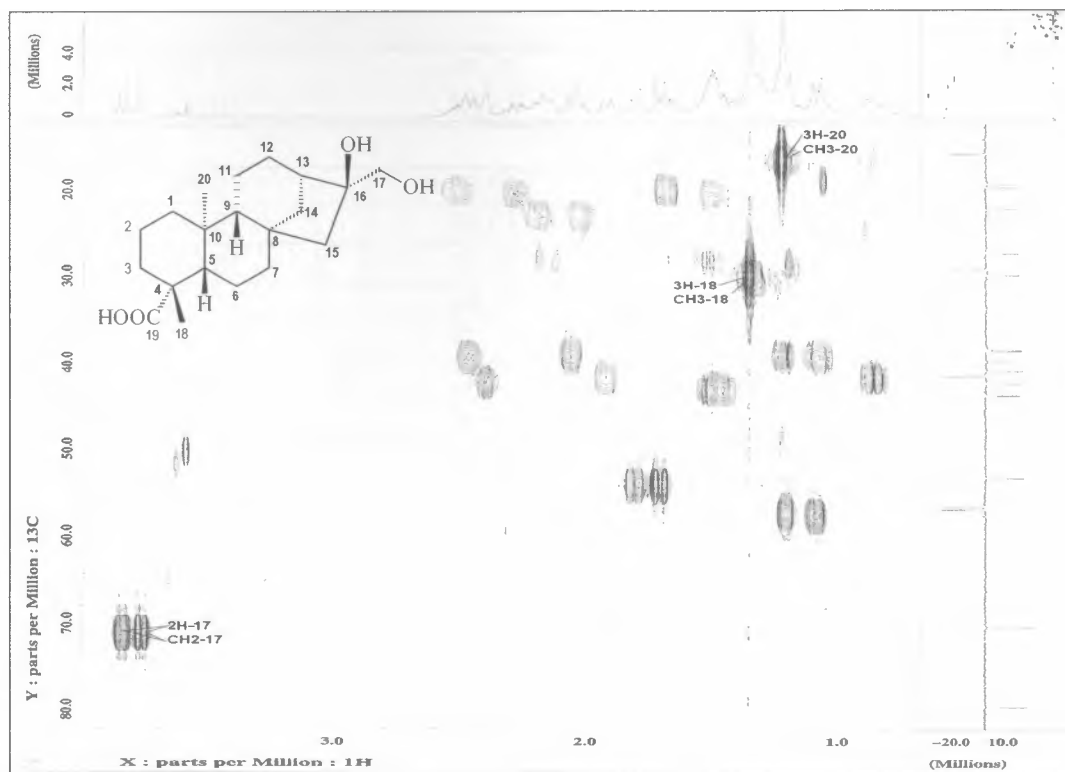
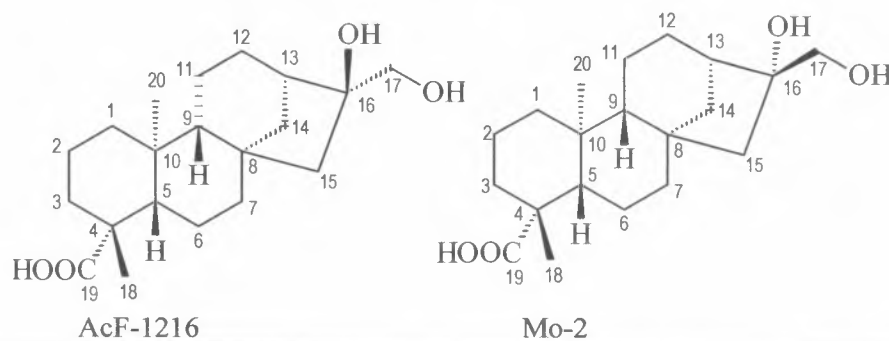


Figura 65. Mapa de correlação HMQC da AcF-1216, em piridina d_5 .

Tabela 13. Dados espectrais de RMN ^{13}C (100 MHz) de AcF-1216 (piridina, d_6) [deslocamentos químicos (δ) em ppm e as constantes de acoplamento (J) estão em Hz].



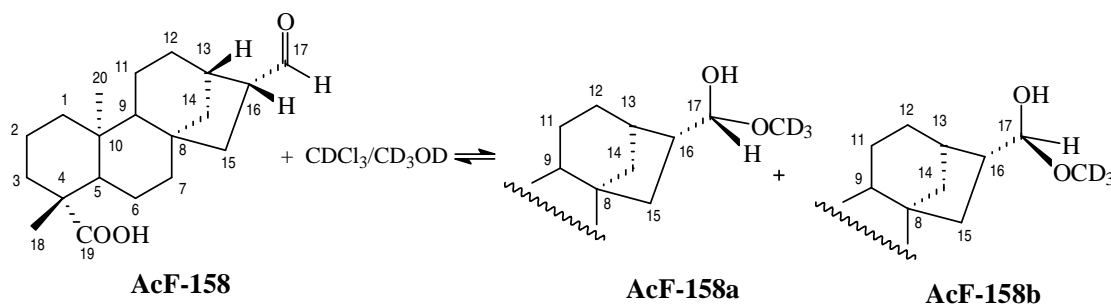
	AcF-1216	AcF-01	AcF-195	Mo-2 Lit*
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
4	43,82	43,74	43.78	43,9
8	43,88	44,21	43.49	45,0
10	39.99	39,66	39.46	40,1
16	79,69	155,87	79.86	81,7
19	180,05	184,77	178.11	180,1
CH				
5	56,97	57,05	56.89	57,0

Continua na página seguinte

Continuação da tabela 13

9	56,63	55,09	55,97	56,3
13	41,59	43,84	40,60	45,9
CH₂				
1	41,07	40,69	40,69	41,1
2	19,77	19,08	19,09	19,8
3	38,49	37,76	38,03	38,7
6	22,38	21,81	21,61	23,0
7	41,42	41,27	41,83	42,8
11	19,35	18,42	18,98	19,0
12	27,50	33,09	26,64	26,7
14	38,65	39,69	38,11	37,8
15	53,32	48,95	52,39	53,9
17	70,39	102,99	69,77	66,5
CH₃				
18	29,28	28,96	28,73	29,3
20	15,88	15,57	15,24	16,0
MeO			51.13	

6.7.6 Caracterização estrutural dos diterpenos caurânicos, ácido *ent*-cauran-17-formil-19-óico (AcF-158) e seus derivados hemiacetálicos, ácido *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158a) e ácido *ent*-(16*R*,17*S*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158b)



A substância denominada AcF-158 foi isolada como um sólido amorfo branco, e sua natureza terpênica ficou evidenciada mediante teste realizado em CCD com solução ácida de sulfato cérico, onde apresentou coloração violeta. Apresentou $[\alpha]_D -33$ ($c = 0,24$ g/100 mL; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$).

O espectro na região do infravermelho (Figura 66, p. 91) apresentou bandas de absorções compatíveis com a presença de grupo hidroxila (banda larga entre ν_{max} 3100 e 2500 cm^{-1}) e de carbonilas (C=O) de aldeído (ν_{max} 1720 cm^{-1}) de ácido carboxílico (ν_{max} 1691 cm^{-1}). A presença da função aldeído pode ser confirmada pelas bandas de absorção em 2704 e 2802 relativas a deformação axial C-H.

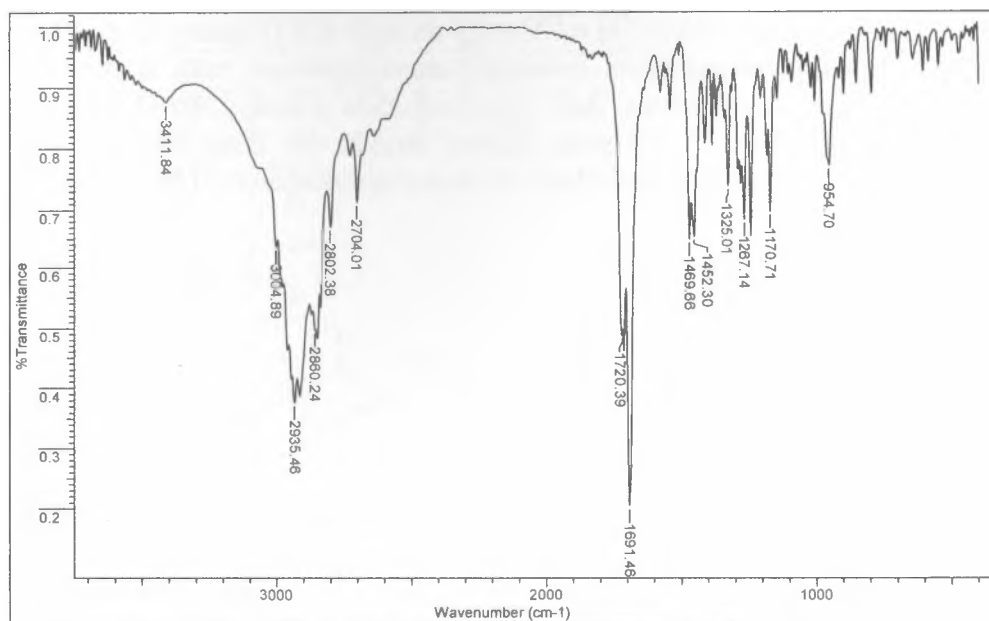


Figura 66. Espectro IV da AcF-158 registrado em pastilha de KBr.

Os deslocamentos químicos dos sinais de átomos de hidrogênio e carbono observados nos espectros de RMN ^1H (Figuras 67 e 68, p. 93) e ^{13}C (Figuras 69 e 70, p. 94) permitiram deduzir que AcF-158 pertence a mesma classe dos demais diterpenos caurânicos isolados neste trabalho, que foram enquadrados na série dos *ent*-cauranos com base na comparação dos valores de deslocamentos químicos registrados na literatura e no resultado negativo revelado pelo $[\alpha]_{\text{D}} = -33$.

A análise comparativa dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 14, p. 95) desta substância com os de AcF-1216 (Tabela 13, p. 89) e Mo-2 (Tabela 12, p. 82) mostrou a presença de dois sinais simples de hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,97 e 1,28 que são característicos para grupos metila em posição equatorial (CH_3 -18) e axial (CH_3 -20) em diterpenos *ent*-caurânicos com grupo carboxílico em C-19 (δ_{C} 183,97). A principal diferença observada entre estes espectros, quando comparados com os demais diterpenos caurânicos descritos neste trabalho, foi a presença de um duplete em δ_{H} 9,69 (J , 1,3 Hz) compatível com a presença de hidrogênio aldeídico.

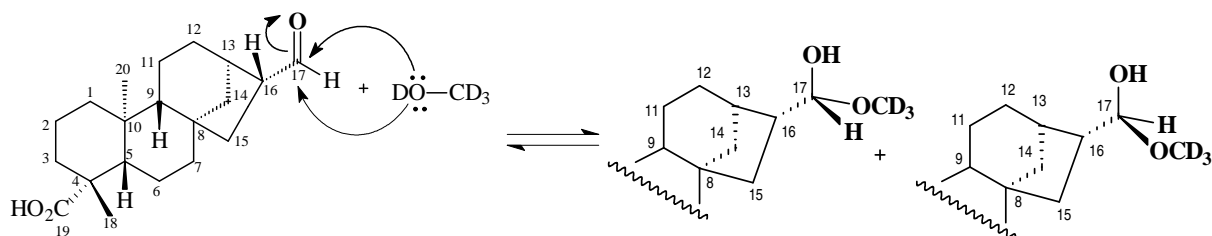
O mapa de contornos HMQC (Figuras 71 e 72, p. 96) revela que este hidrogênio está a uma ligação com o carbono em δ_{C} 203,67.

A observação das correlações nos espectros de RMN, COSY (Figuras, 73 e 74, p. 97), NOESY (Figuras, 75 e 76, p. 98), e HMBC (Figura 77, p. 99) permitiram postular a estrutura para AcF-158, embora não haja na literatura dados espectrais para esta substância. Após recristalização de AcF-158, para completar sua caracterização, registrou-se os espectros em 1D e 2D de RMN ^1H e ^{13}C em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ e em piridina- d_5 .

Na tabela 15 página 100, estão registrados os dados espectrais de RMN de ^1H (Figura 78, p. 102), ^{13}C -APT (Figura 79, p. 103) e em 2D, HMQC (Figura 80, p. 103) obtidos em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$. A análise destes dados revelou uma mistura de três constituintes (Tabela 15).

A literatura registra que a reação de aldeído com metanol (MeOH), leva a formação de hemiacetal através de adição nucleofílica no carbono carbonílico aldeídico, estabelecendo-se um equilíbrio lento dos componentes da mistura reacional (SOLOMONS & FRYHLE, 2006).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C -APT de AcF-158 (Figuras 78, p. 102 e 79, p. 103) usando $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ como solvente revelaram-se compatíveis com a presença de tal equilíbrio envolvendo três componentes, AcF-158, AcF-158a e AcF-158b (Tabela 15, p. 100), já que a adição do nucleófilo CD_3OD pode ocorrer através das duas faces (*Si* e *Re*) da carbonila do aldeído, tornando possível a existência de dois estereoisômeros (*R*) e (*S*) no carbono C-17.



Na análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 78, p. 102) notou-se a presença de dois dupletos em δ_{H} 4,20 (d, 7,7) e 4,17 (d, 8,1) (H-17) que estão correlacionados respectivamente no espectro HMQC (Figura 80, p. 101) com os sinais dos carbonos metínicos em δ_{C} 101,87 e 101,73 (CH-17). Estes estão condizentes com a presença de dois produtos contendo carbonos hemiacetálicos epiméricos, que foram denominados, AcF-158a [(17*R*)-17-hidroxi-17-metoxi] e AcF-158b [(17*S*)-17-hidroxi-17-metoxi]. Observou-se também um duplete em δ_{H} 9,64 (d, $J = 1,8$) que se correlaciona com o carbono em δ_{C} 204,43 (C-17) no espectro em 2D HMQC, mostrando ainda a presença do aldeído (AcF-158) no equilíbrio com dois hemeacetais isoméricos na mistura.

Os dados espectrais, obtidos em piridina- d_5 , de RMN em 1D de ^1H (Figura 81, p. 105) e ^{13}C (Figura 82, p. 105 e 83, p. 106), HMQC (Figura 84, p. 106) e HMBC (Figura 85, p. 107) de AcF-158, estão reportados na Tabela 16 página 104. Nestes espectros pode-se observar, além de outros, a presença de hidrogênios (em δ_{H} 3,59 e 3,54) de grupos metoxilas que se correlacionam com seus respectivos carbonos (δ_{C} 49,54 e 47,84) o que também é um indicativo da presença dos isômeros epiméricos formados provavelmente devido a presença de metanol durante a recristalização da amostra. Pela intensidade dos sinais nos espectros de RMN ^{13}C deduz-se que os isômeros, AcF-158a e AcF-158b estão em menor quantidade na mistura.

A literatura ainda não registrou a presença de diterpeno *ent*-caurano com grupo aldeído no carbono C-17. No entanto, a estrutura cristalina de um hemiacetal em C-17 encontra-se descrita na literatura (VICKOVIC *et al.*, 1984).

A comparação de todos os dados espectrais com valores descritos na literatura (WU *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2002) contribuiu para a definição estrutural do ácido *ent*-17-formilcauran-19-óico (AcF-158).

O Esquema 17, página 108, resume a proposta de fragmentação para justificar os principais sinais observados no espectro de massas de AcF-158 (Figura 86, p. 107).

Foi publicada a estrutura cristalina de configuração relativa do ácido *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158a) em 2004 (NASCIMENTO *et al.*, 2004), deduzida através de análise por raios X (Figura 87, p. 109), confirmando as deduções estruturais obtidos através da interpretação dos espectros de RMN 1D e 2D (*vide supra*).

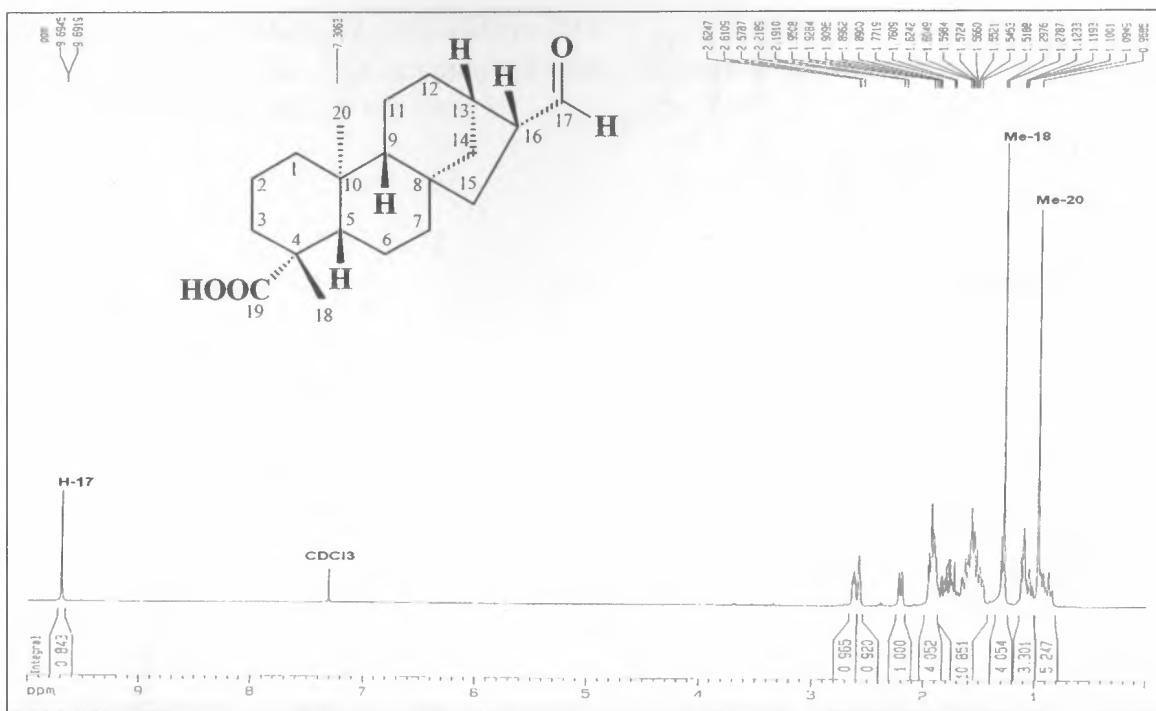


Figura 67. Espectro de RMN^1H (500 MHz) de AcF-158, em CDCl_3 .

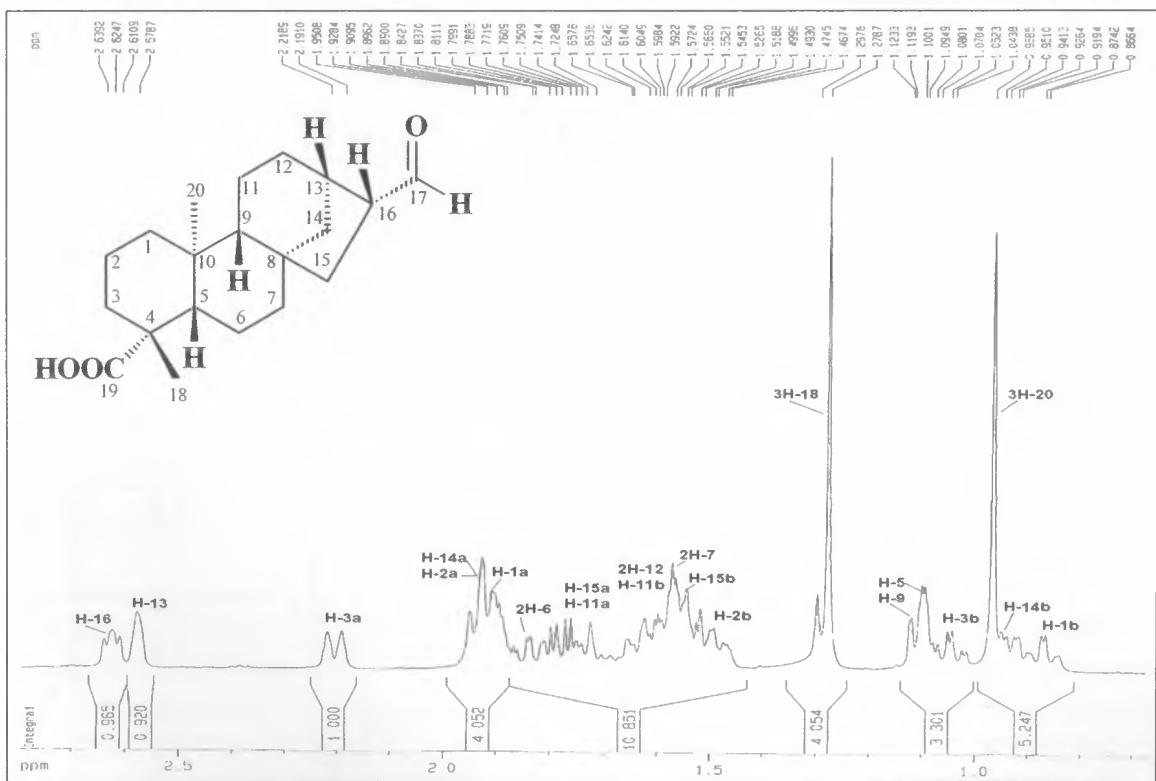


Figura 68. Expansão do espectro de RMN^1H (500 MHz) de AcF-158 entre δ_{H} 0,87-2,64, em CDCl_3 .

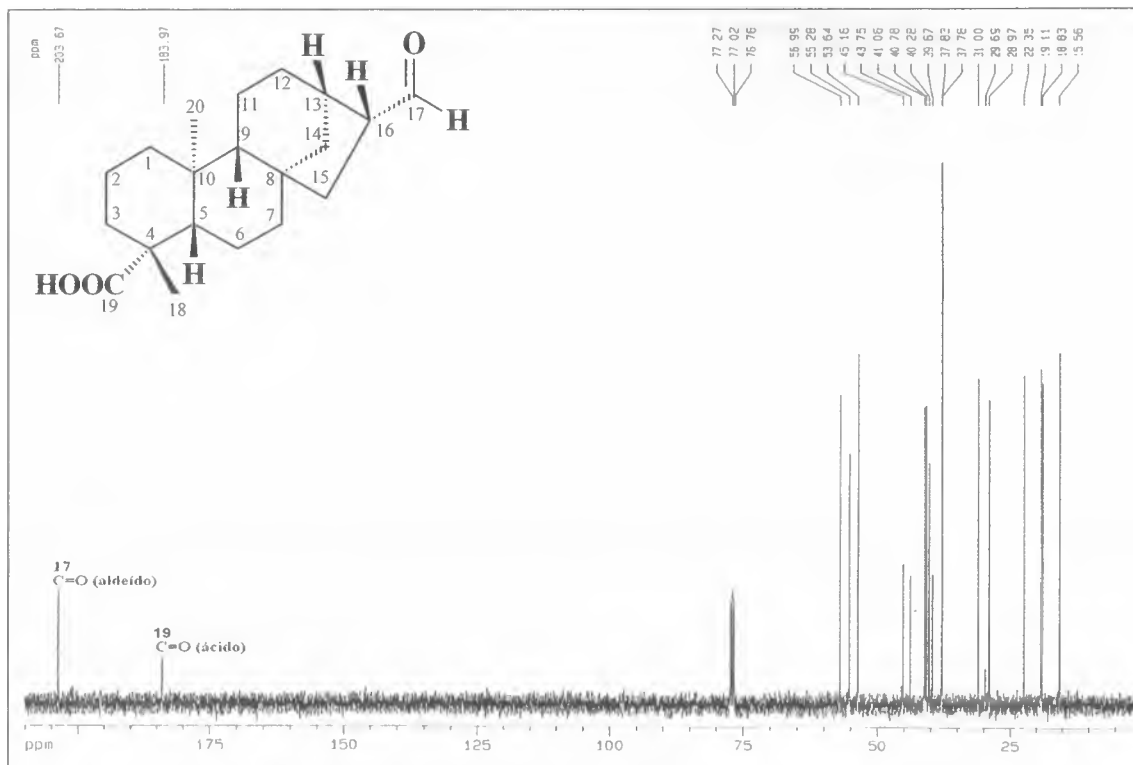


Figura 69. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-158, em CDCl_3 .

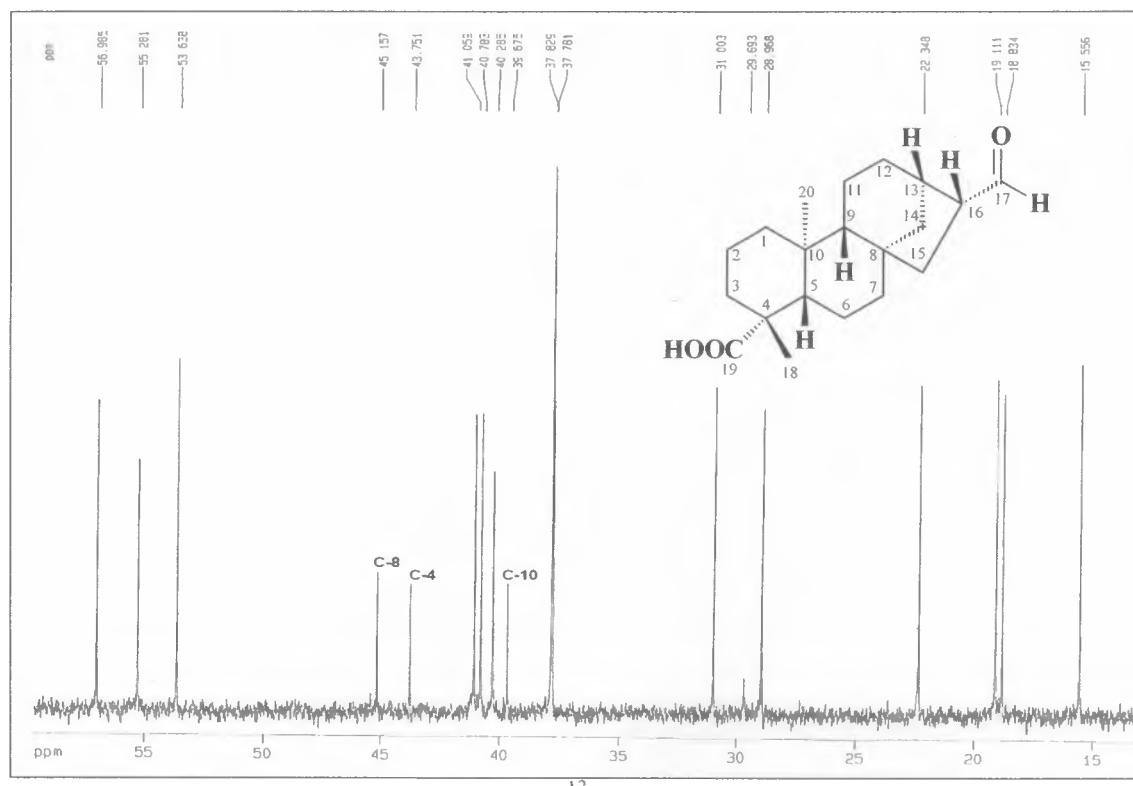
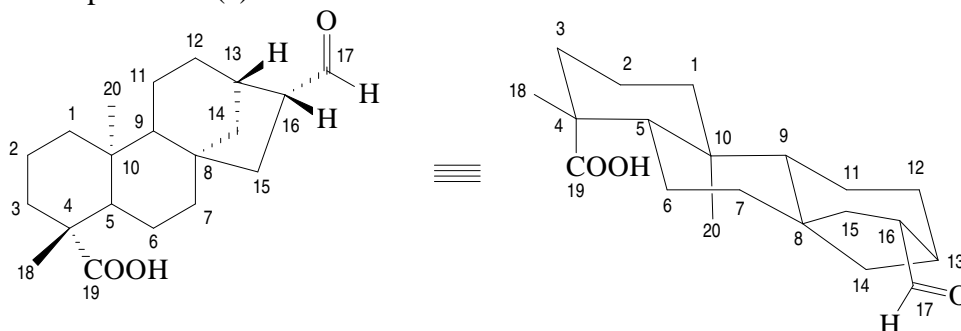


Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-158 entre δ_{C} 15-60, em CDCl_3 .

Tabela 14. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-158 obtidos através de experiências 1D e 2D, em CDCl_3 como solvente. Deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H} , em ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.



		HMQC		HMBC		NOESY
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^2J_{\text{CH}}$	NOE**	
4	43,75	-	H-5; 3H-18	H-2b		
8	45,16	-	2H-15	H-13		
10	39,67	-	H-b; H-9; 3H-20	H-2b		
19	183,97	-		H-5; H-3b; 3H-18		
CH						
5	56,98	1,11 (dd, 14,2; 2,0)		3H-19; 3H-20	H-1ax, H-2ax, H-3ax, 3H-19	
9	55,28	1,10		H-7; H-15a; 3H-20	H-1ax, H-6ax, H-12ax, H-15ax	
13	37,81	2,58 (sl)				
16	53,64	2,62 (m)	H-17; H-15a	H-12; H-14a		
17	203,67	9,69 (d, 1,3)		2H-15		
CH₂						
1	40,78	1,95; 0,87 (dt)		3H-20		
2	19,11	1,96; 1,50	H-1b; H-3b			
3	37,78	2,20 (dt, 13,9); 1,06 (dt, 13,9; 4,2)		3H-18		
6	22,34	1,90 – 1,75				
7	41,06	1,65 – 1,50		H-15a		
11	18,83	1,74; 1,63	H-9; 2H-12			
12	31,00	1,70 – 1,54	2H-11	H-9; 2H-14; H-16		
14	37,78	1,96; 0,94 (m)		H-15b; H-16		
15	40,27	1,80; 1,58		H-14a; H-17		
CH₃						
18	28,97	1,28 (s)		H-5	2H-3, H-5, 2H-6	
20	15,56	0,97 (s)		H-1b; H-5; H-9	H-2ax, H-6ax, H-11ax	

*Número de átomos de hidrogênio ligados a cada átomo de carbono foi deduzido pela análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ e RMN ^{13}C -DEPT. Espectro 2D ^1H - ^1H -COSY foi também usado durante a análise;

** Somente as principais interações espaciais (NOE) classificadas como mais informativas.

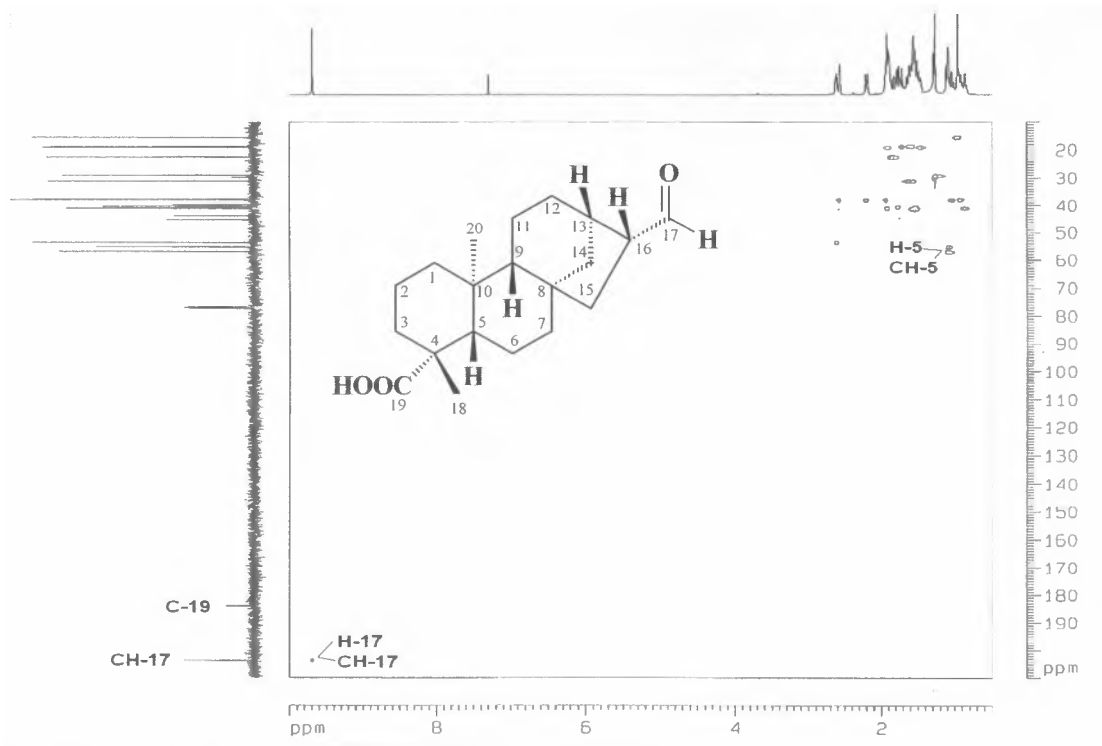


Figura 71. Mapa de correlações HMQC da AcF-158, em CDCl_3 .

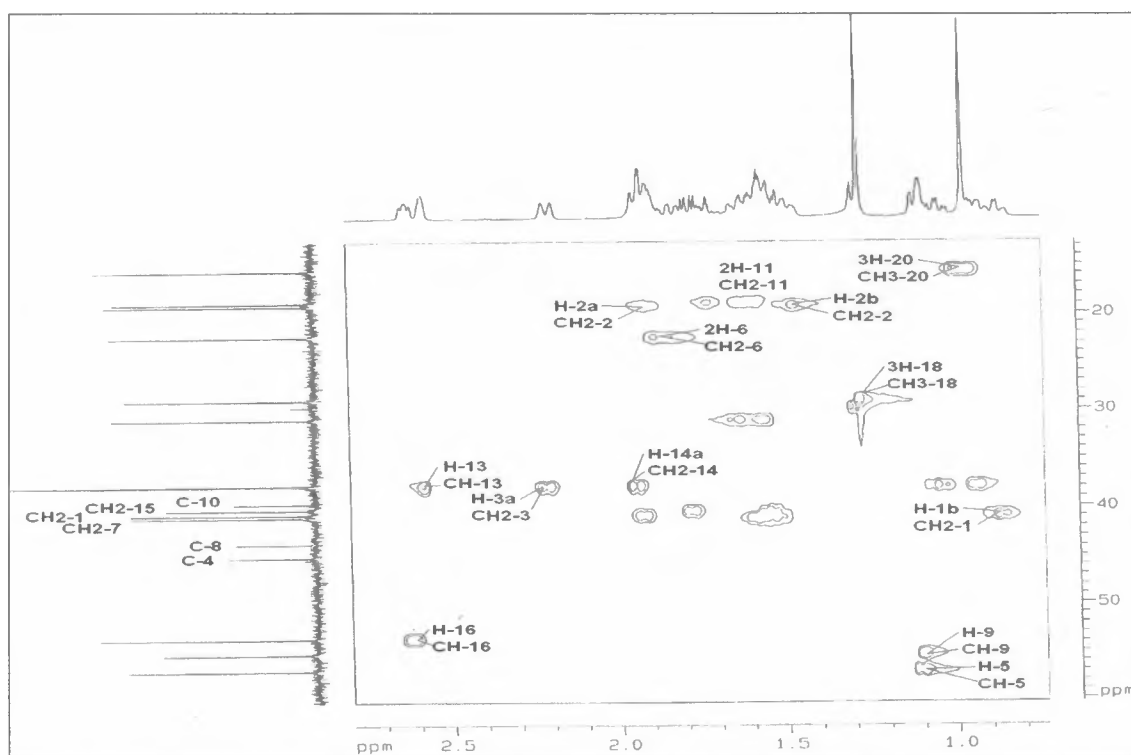


Figura 72. Expansão do mapa de correlações HMQC da AcF-158 entre δ_{H} 0,87-2,64 e entre 15-60, em CDCl_3 .

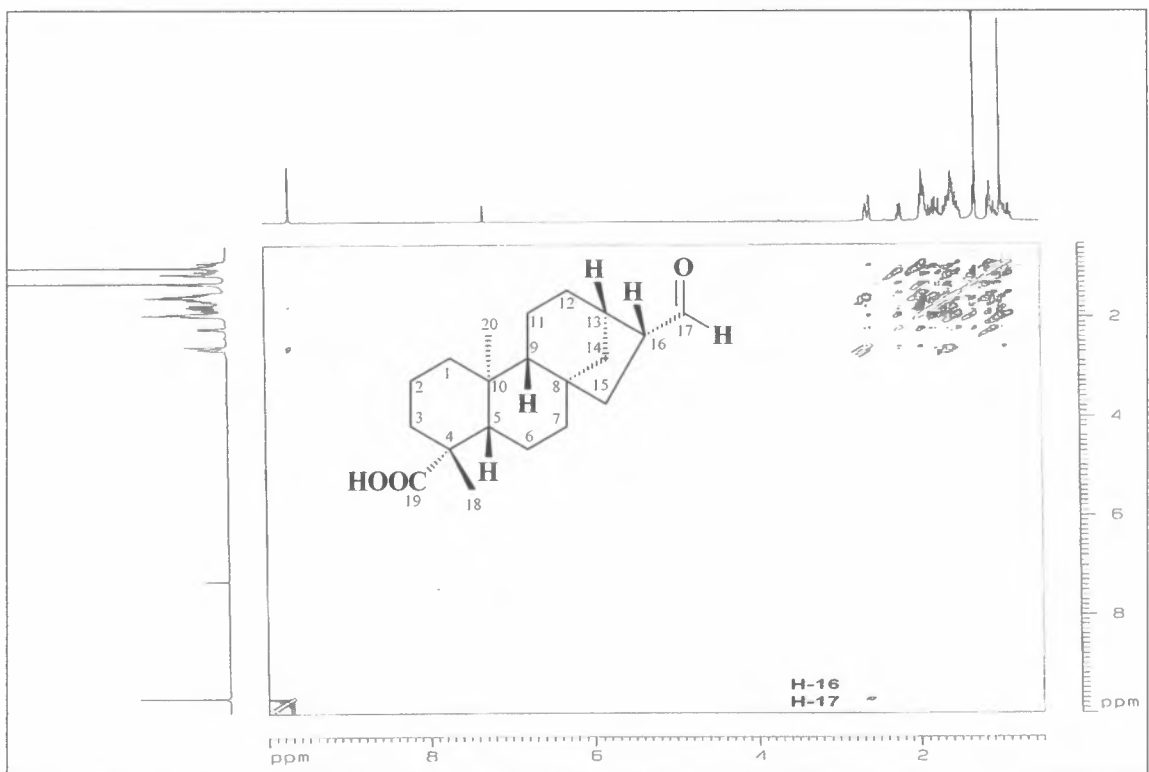


Figura 75. Mapa de correlações NOESY de AcF-158, em CDCl_3 .

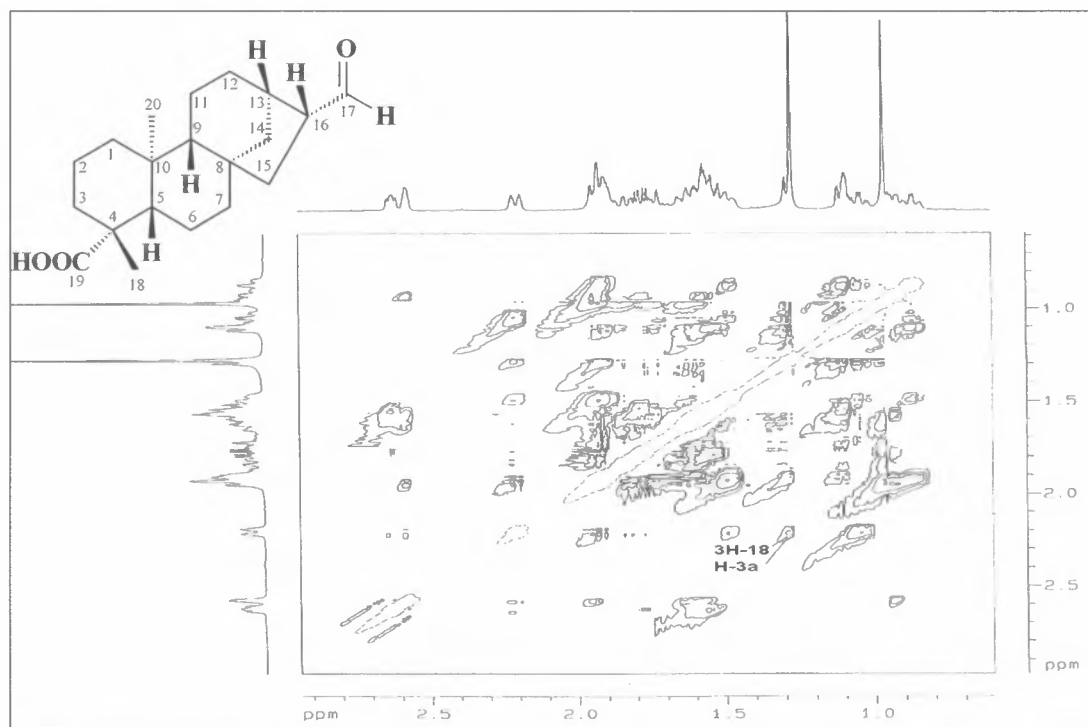


Figura76. Expansão do mapa de correlações NOESY de AcF-158 entre δ c 0,87-2,64, em CDCl_3 .

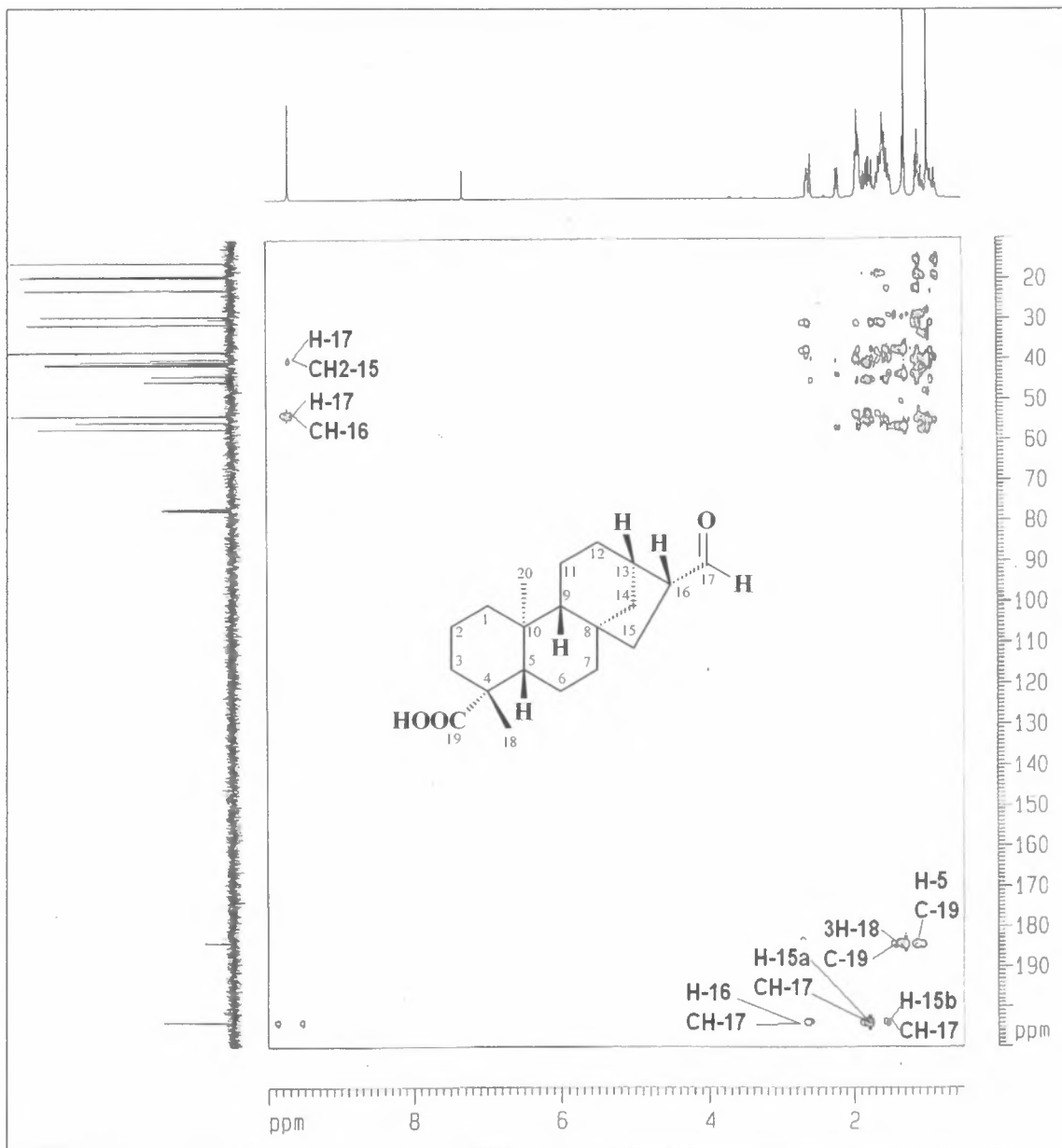
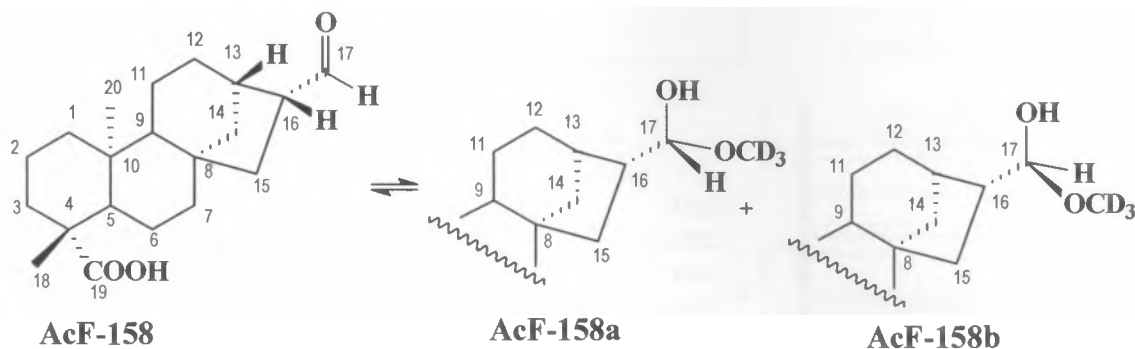


Figura 77. Mapa de correlações da AcF-158, em CDCl_3 .

Tabela 15. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-158 e seus derivados obtidos através de experiências 1D e 2D, em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ como solventes. Deslocamentos químicos em δ (δ_{C} e δ_{H} , ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.

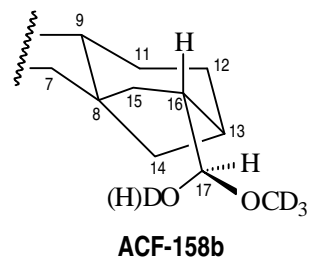
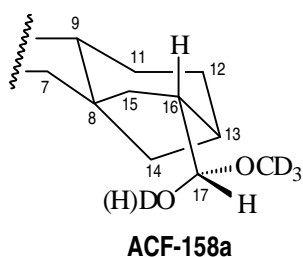
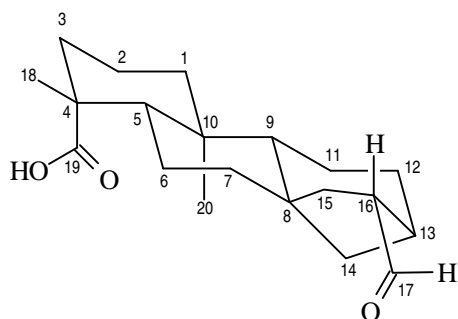


	AcF-158		AcF-158a		AcF-158b	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
4	43,13	-	-	-	-	-
8	41,18	-	-	-	-	-
10	39,14	-	-	-	-	-
19	180,93	-	180,65	-	180,65	-
CH						
5	56,45	1,00	56,55			
9	54,80	1,06				
13	37,42	2,54 (m)	37,55			
16	53,19	2,63 (m)				
17	204,43	9,64 (d, 1,8)	101,87	4,20 (d, 7,7)	101,73	4,17 (d, 8,1)
CH₂						
1	40,42	1,57; 0,84				
2	18,70	1,60; 0,99	18,73			
3	37,63	2,14; 1,01	37,68			
6	21,97	1,56	22,02			
7	43,97		43,66			
11	18,30	1,48; 1,30	43,66			
12	30,49	1,40; 1,26	30,96		30,90	
14	37,25	1,92				
15	39,71	1,72 (dd, 13,2, 5,5) 1,52				
CH₃						
18	28,44	1,20 (s)	28,44	1,20 (s)	28,44	1,20 (s)
20	14,95	0,95 (s)	14,95	0,95 (s)	14,95	0,95 (s)

Continua próxima página

Continuação Tabela 15.

HMBC		
AcF-158		
C	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
4	3H-18	
8		
10	3H-20	
19		H-5; 3H-18
CH		
5		3H-18; 3H-20
9		2H-25; 3H-20
13	H-16	2H-25
16	H-17; H-15a	H-14a
17		H-13; 2H-15
CH₂		
1		3H-20
2	H-3b	
3		3H-18
6	H-5	
7		H-15a
11	H-9	
12		H-9; 2H-14; H-16
14		H-16
15		
CH₃		
18		H-5
20		H-5



A observação do deslocamento químico, em δ_C 30,49 para CH₂-12 (Tabela 15, p. 100), permitiu postular esta estereoquímica para CH-16. A ausência de efeito γ neste caso justifica o maior δ_C do CH₂-12 quando comparado (*e. g.*) com o da AcF-195 (δ_C 26,64, Tabela 12, p. 82).

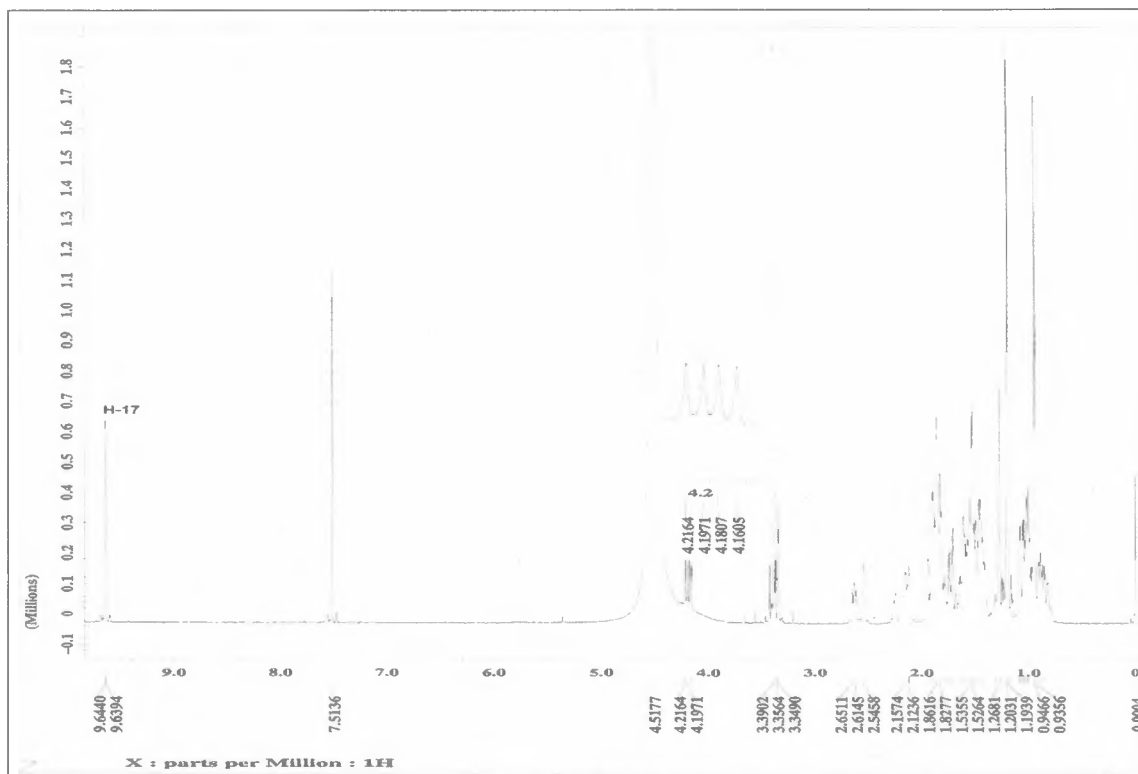
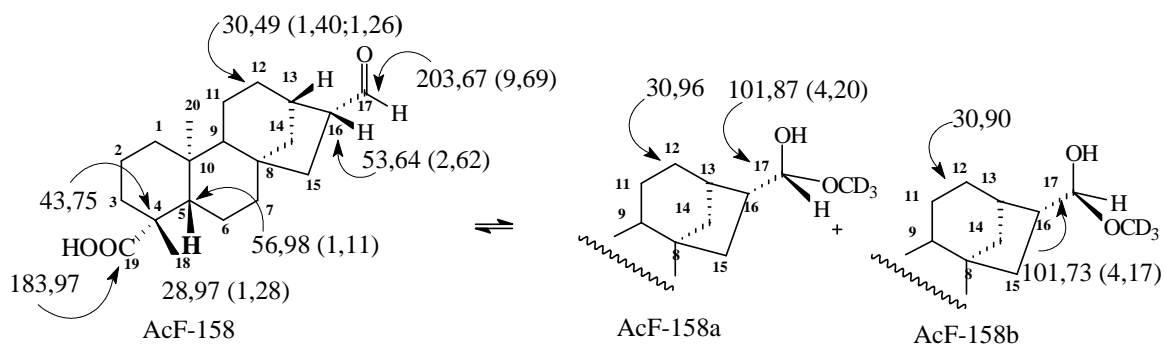


Figura 78. Espectro de RMN^1H (400 MHz) de AcF-158, em $\text{CDCl}_3/\text{D}_3\text{COD}$.

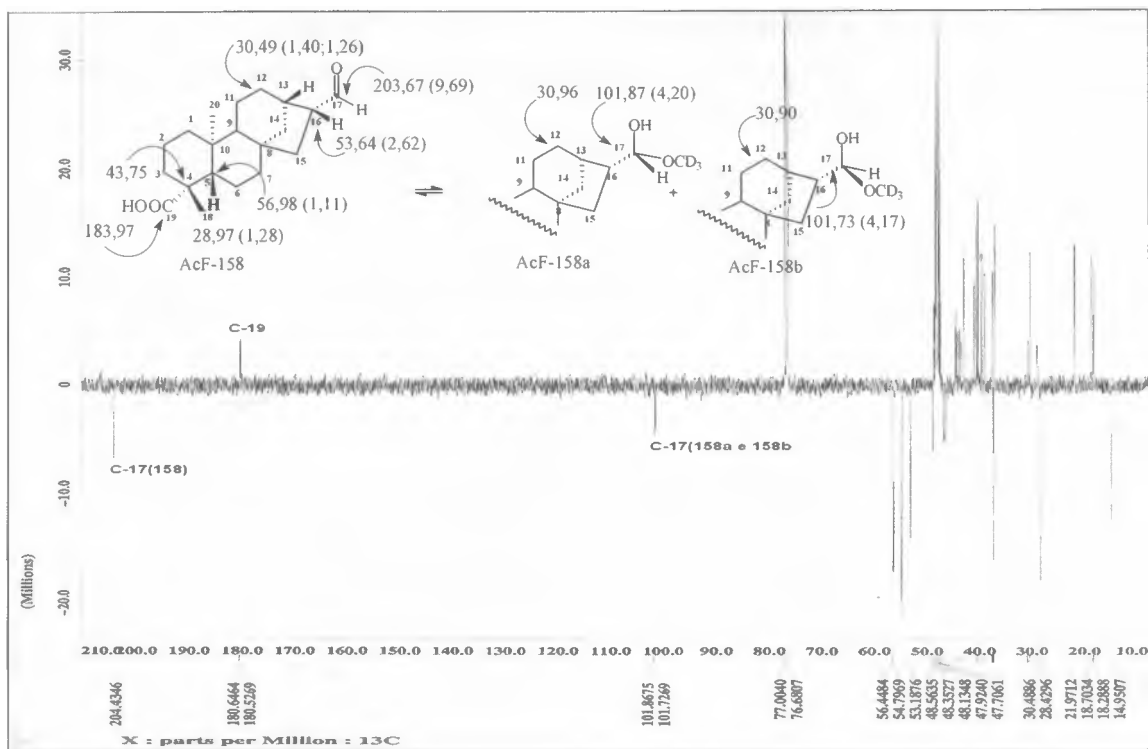


Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz) da AcF-158, em $\text{CDCl}_3/\text{D}_3\text{COD}$.

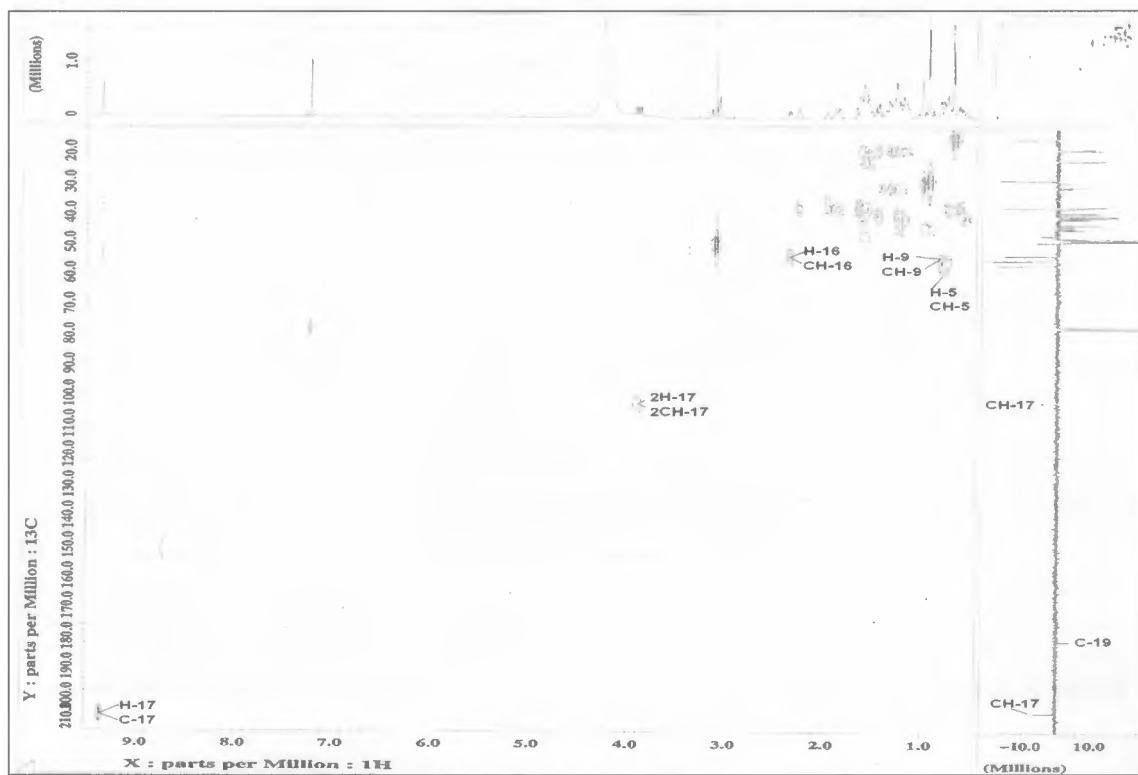
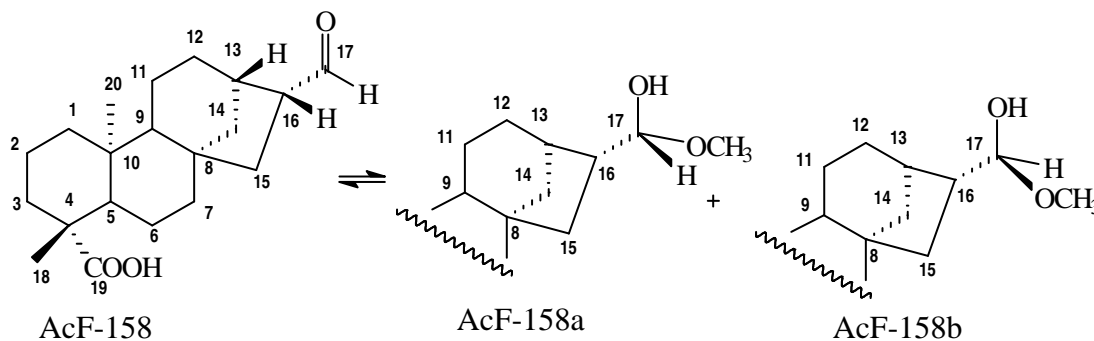


Figura 80. Mapa de correlações HMBC da AcF-158, em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

Tabela 16. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-158 obtidos através de experiências 1D e 2D, em piridina- d_5 como solventes. Deslocamentos químicos δ (δ_{C} e δ_{H} , ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.



		HMQC AcF-158		HMBC AcF-158	AcF-158a [(17R)- 17-OH-17-OMe]		AcF-158b [(17S)- 17-OH-17-OMe]	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
4	43,74		H-5; 3H-18	43,79		43,79		
8	45,16		H-6b; H-9; 2H-7	44,86		44,86		
10	39,75		3H-20	39,86		39,86		
19	180,04		H-5; 3H-18	180,04		180,04		
CH								
5	56,80	1,02	3H-18; 3H-20	56,97		56,97		
9	55,19	0,96	2H-14	55,44		55,44		
13	38,57	2,43 (sl)		38,49		38,64		
16	53,64	2,52 (dd, 11,4; 7,7)	H-14a; H-17	54,03		54,03		
17	203,18	9,70 (s)	2H-15; H-16	102,33	4,64	102,33	4,62	
CH₂								
1	40,30	1,82; 0,78	3H-20	41,06		41,06		
2	19,73	2,24; 1,48		19,15		19,15		
3	37,80	2,46; 1,04	3H-18	38,20		38,20		
6	22,97	2,10; 2,02	H-5	23,12		23,12		
7	41,30	1,52-1,36	H-6b	41,99		41,99		
11	18,79	1,56; 1,46	H-9	19,15		19,15		
12	30,99	1,45; 1,35	H-9; 2H-11, 2H-14; H-16	29,29		31,88		
14	37,73	1,82; 0,84	H-9; 2H-11; H-16					
15	40,23	1,82; 1,40	H-13; H-14a	41,06		39,86		
CH₃								
18	29,24	1,32 (s)	H-3b	29,24	1,34 (s)	29,24	1,34 (s)	
20	15,80	1,08 (s)	H-1b; H-5; H-9	15,88	1,15 (s)	15,88	1,15 (s)	
MeO				49,54	3,59 (s)	47,84	3,54 (s)	

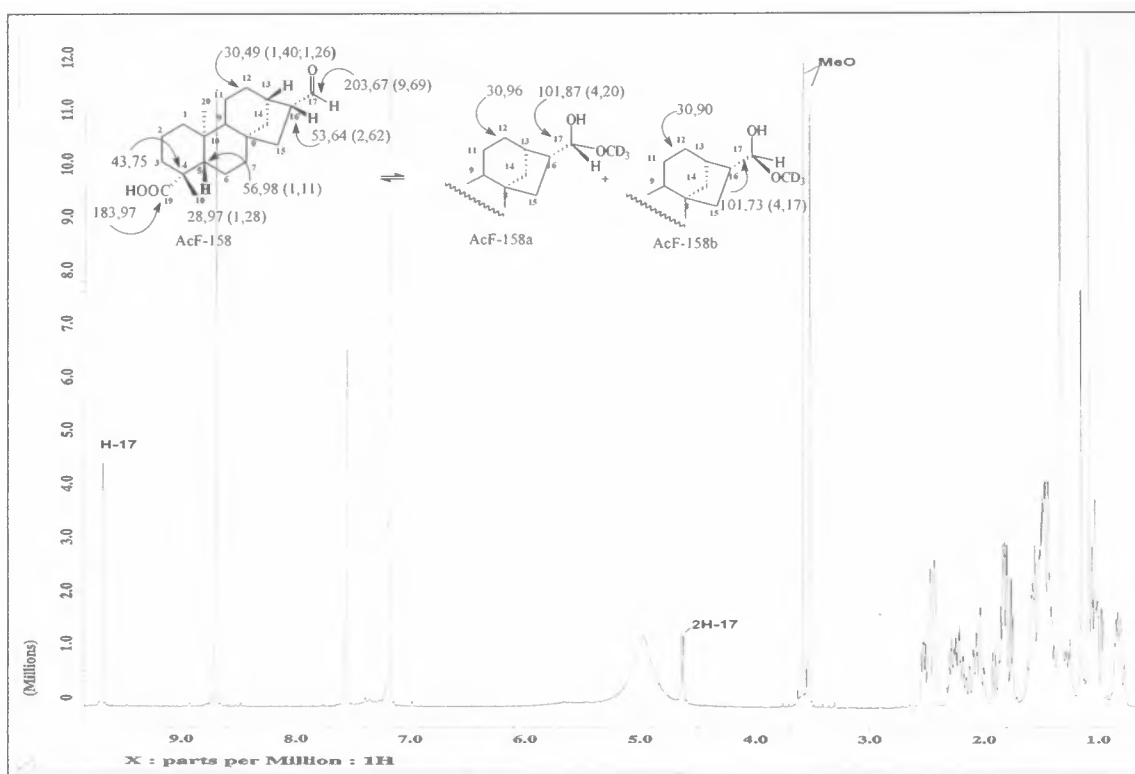


Figura 81. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de AcF-158, em piridina- d_5 .

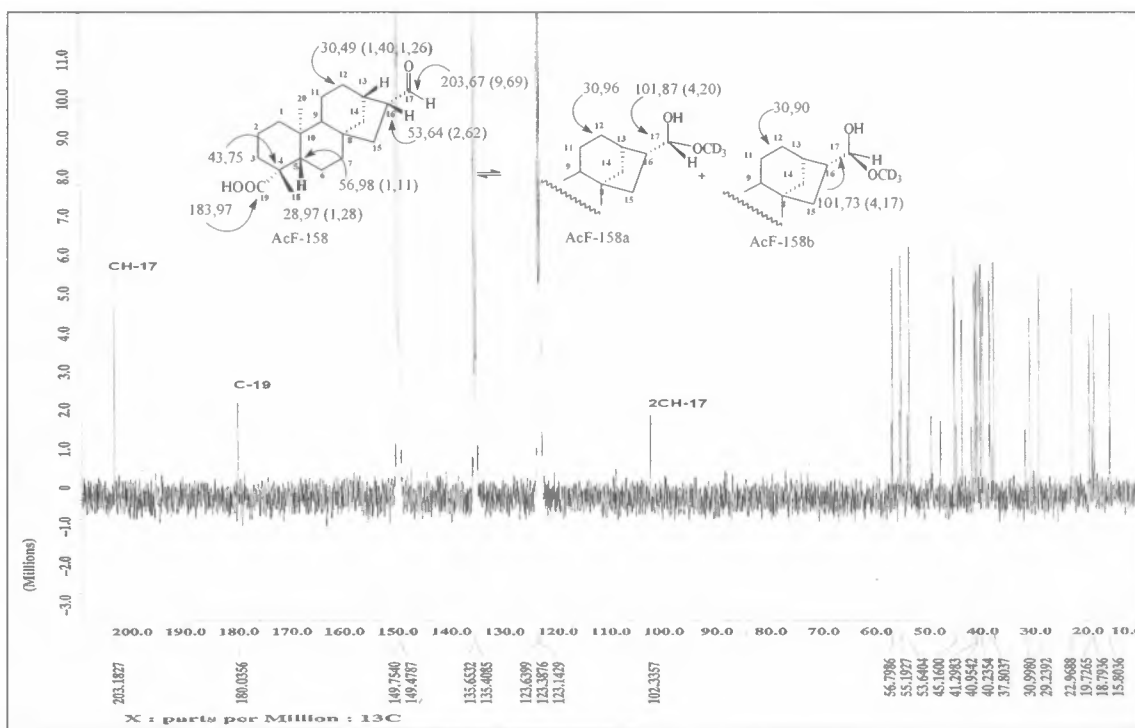


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de AcF-158, em piridina- d_5 .

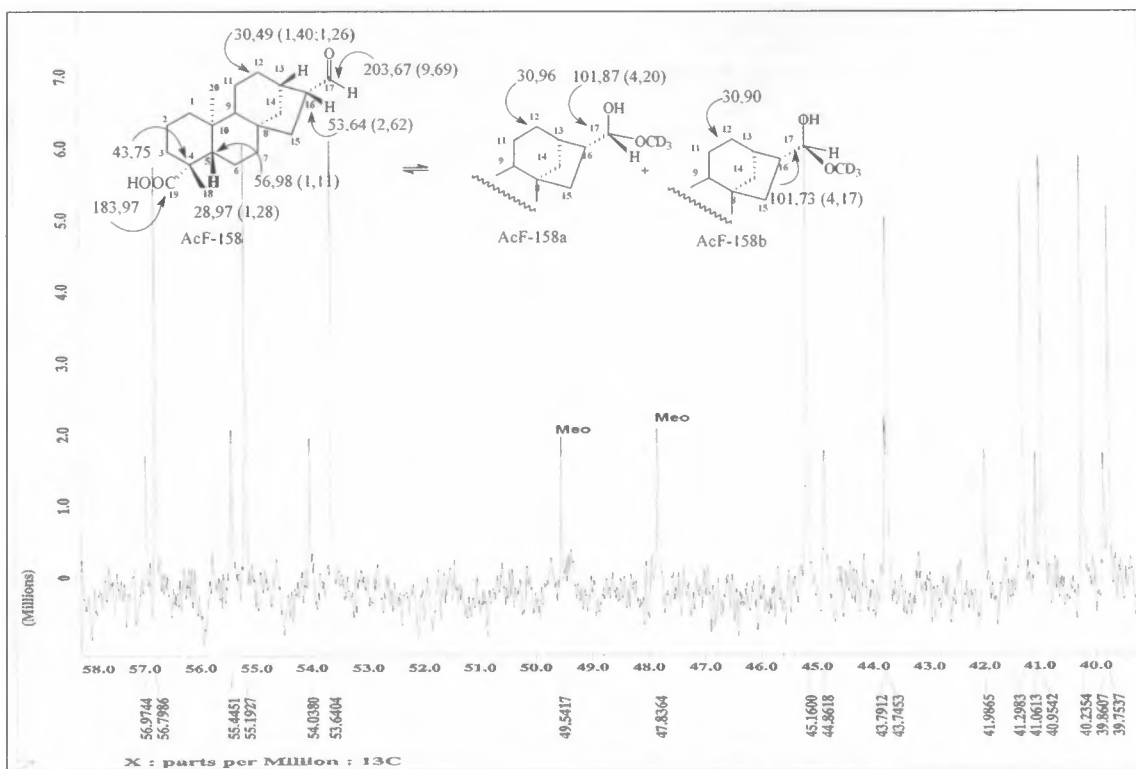


Figura 83. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da AcF-158 entre δ_{C} 39,75-56,98, em piridina- d_5 .

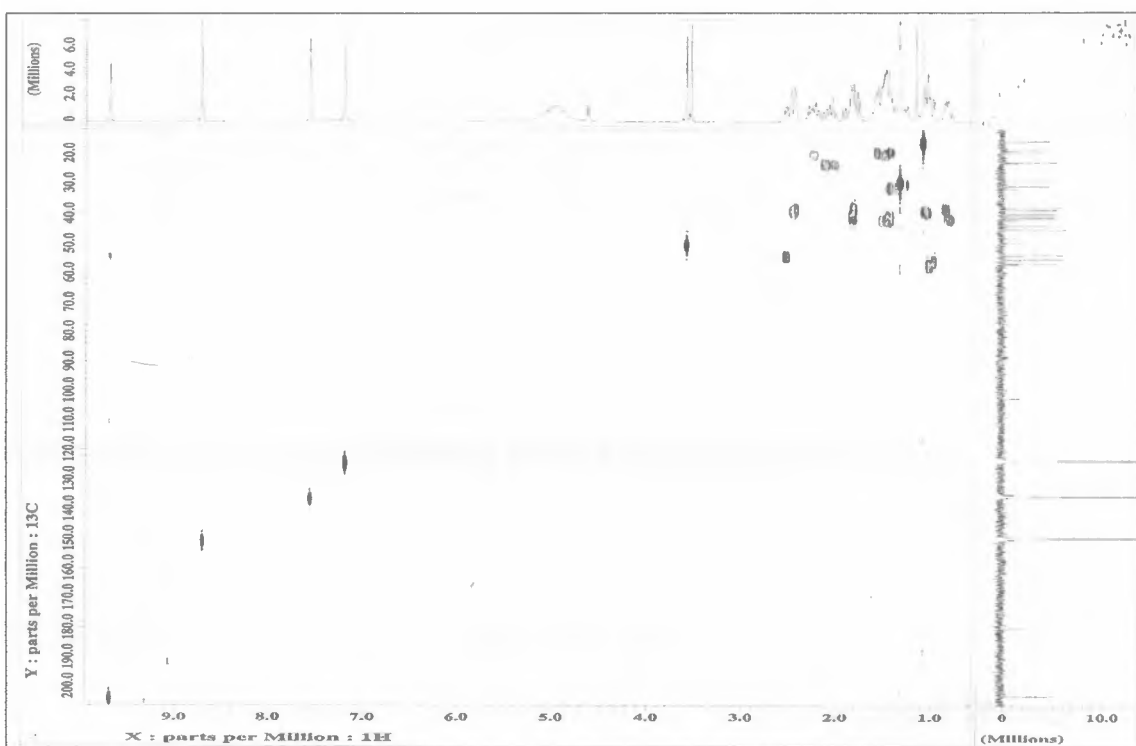


Figura 84. Mapa de correlações HMQC da AcF-158, em piridina- d_5 .

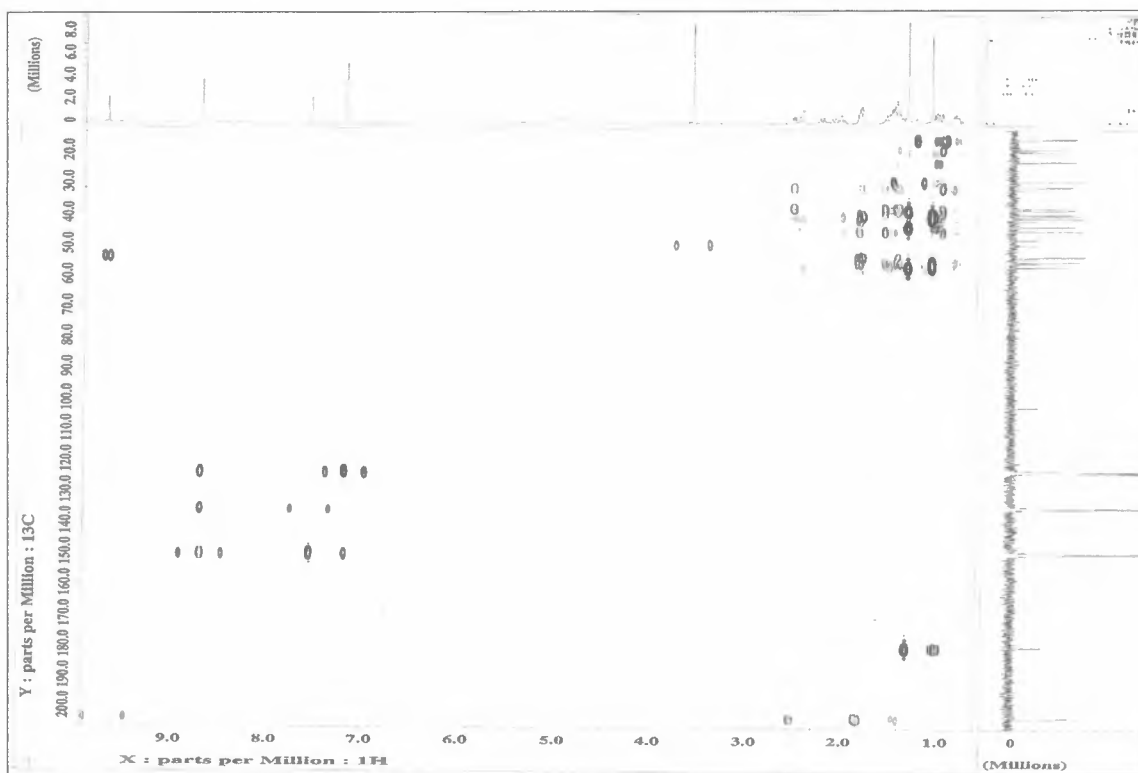
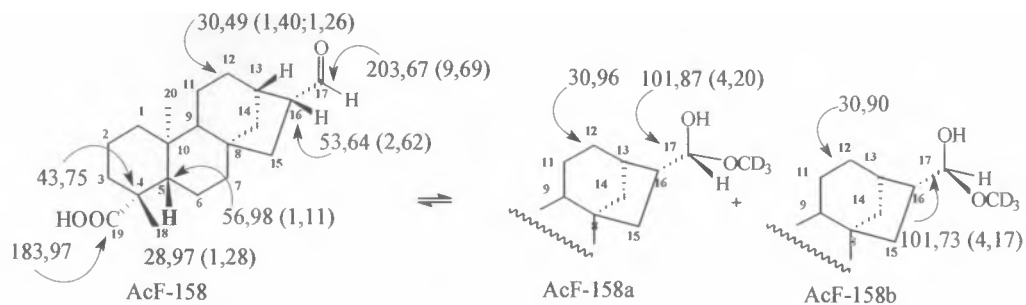


Figura 85. Mapa de correlações HMBC da AcF-158, em piridina- d_5 .

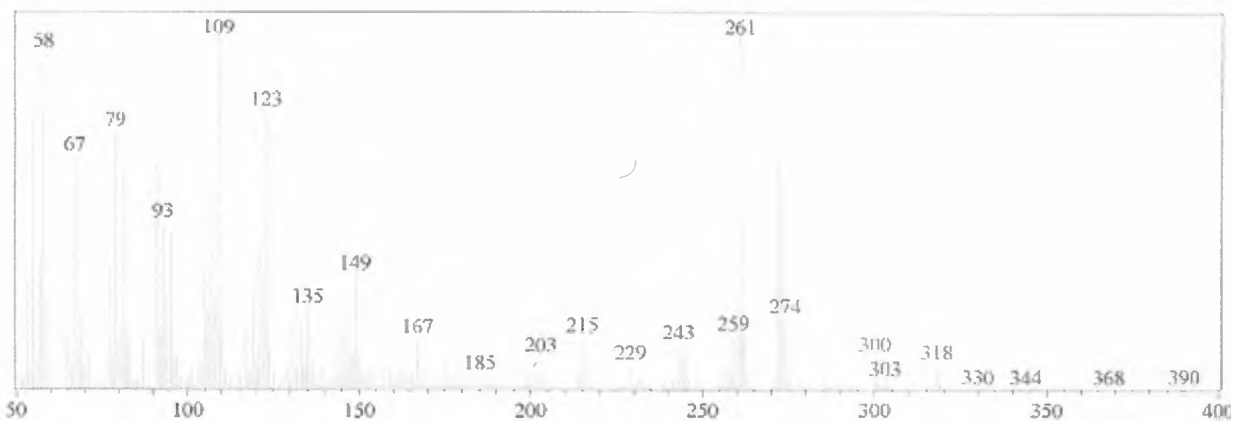
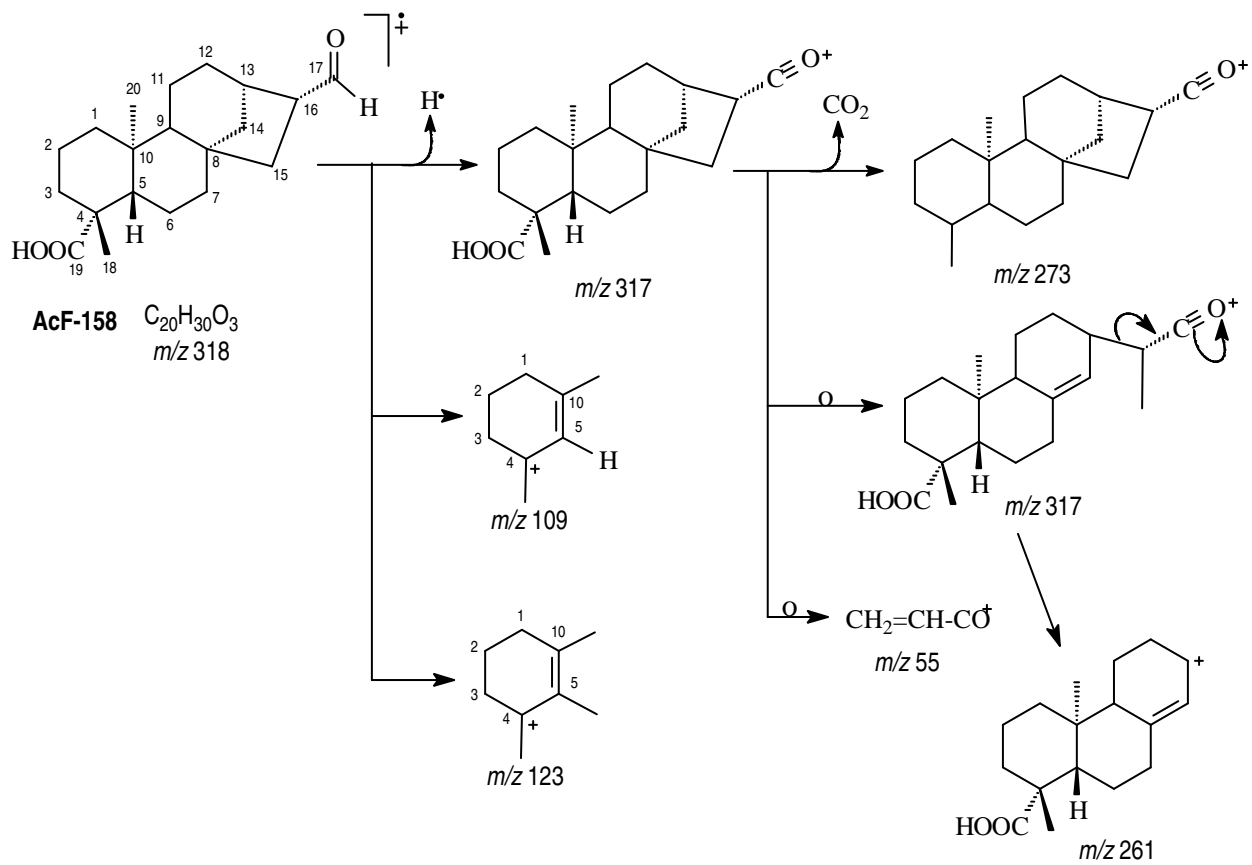


Figura 86. Espectro de massas de íons fragmentários obtidos por impacto eletrônico de AcF-158.



Esquema 17. Proposta mecânica para justificar os principais sinais presentes no espectro de massas de AcF-158.

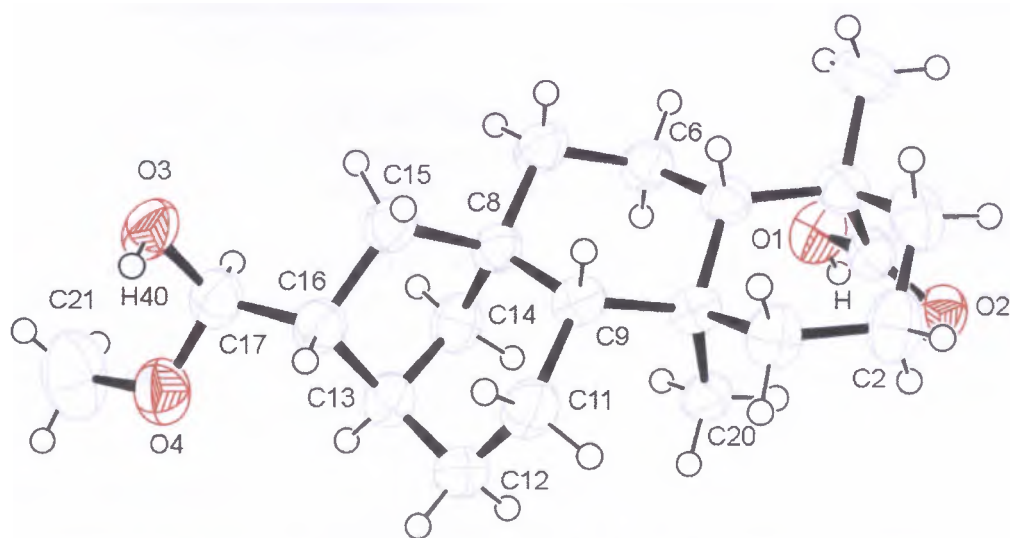


Figura 87. Estrutura cristalina* do ácido *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hidroxi-17-metoxicauran-19-óico (AcF-158b).

*A determinação estrutural obtida através de cristalografia de Raios-X, foi realizada pelo grupo de Cristalografia da Universidade Federal de Alagoas, Prof. Dr. Mariano Alves Pereira, Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone e Profa.Dra. Valeria R. S. Malta.

A estrutura foi resolvida por Métodos Diretos e síntese de fourier diferença, e refinada anisotropicamente por mínimos quadrados em F².

O pacote de programas utilizado foi o WinGX (FARRUGIA, L.J., 1999).

6.8 Metodologia utilizada na elucidação estrutural das acetogeninas

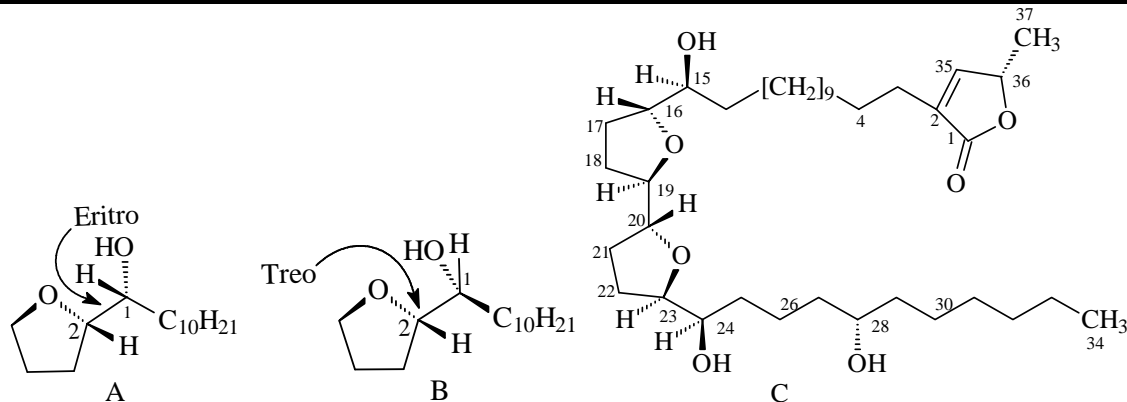
A elucidação estrutural das acetogeninas envolveu a análise de dados fornecidos por métodos espectrométricos, principalmente espectros 1D e 2D de RMN (^1H e ^{13}C) e de massas de baixa e alta resolução, obtidos após a separação de misturas livres de impurezas não acetogenínicas.

Foram analisados espectros de RMN ^1H (inclusive 2D ^1H - ^1H -COSY e ^1H - ^1H -NOESY) e ^{13}C (1D: {1H} e DEPT ou APT) e 2D de correlação heteronuclear de átomos de hidrogênio e carbono-13, através de uma ligação: HMQC; e duas e três ligações: HMBC e EM-IE e EM-ES de baixa e alta resolução, além de IV das substâncias naturais e de produtos de derivação.

Utilizou-se também a análise comparativa com dados de produtos naturais e de modelos sintéticos (Tabelas 17, 18, 19 e 20, p. 110-112) registrados na literatura, o que tornou possível determinar a constituição das acetogeninas e propor suas configurações relativas, ficando para análise posterior a determinação das configurações absolutas.

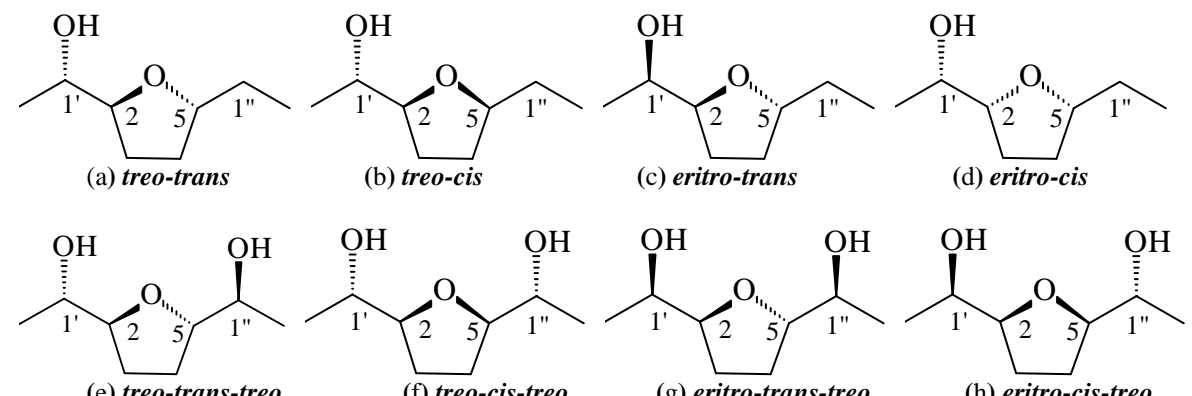
Cabe destacar que a nomenclatura *eritro* (dois substituintes do mesmo lado da molécula ou unidade molecular) e *treo* (dois substituintes localizados em lados opostos da molécula ou unidade molecular) (ROMERO, 1998) é comumente usada para indicar a estereoquímica de centros assimétricos (centros estereogênicos) em posição α ao anel ou anéis tetraidrofurânicos (Tabelas 17 e 18, p. 110-111). Já se referindo às posições relativas 2 e 4 de anéis γ -lactônico das acetogeninas, com subunidades γ -lactona saturada, utiliza-se a nomenclatura *cis* (2,4-*cis*) e *trans* (2,4-*trans*) (Tabela 19 e 20, p. 111-112) (RUPPRECHT *et al.*, 1990 e CAVÉ *et al.*, 1997).

Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de modelos sintéticos com configurações relativas definidas, (BORN *et al.*, 1990) e comparação com os valores correspondentes da annonina I, uma acetogenina isolada de *Annona squamosa* (RUPPRECHT *et al.*, 1990 e CAVÉ *et al.*, 1997). em CDCl_3 . Deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.



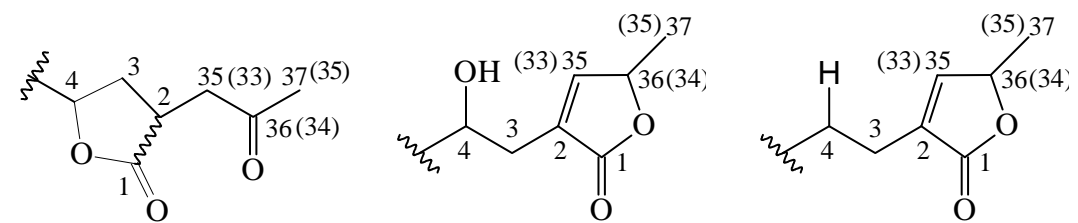
Modelos sintéticos			Annonina I (Squamocina)			
Átomos	A	B	Átomos	C	Átomos	C
	<i>Eritro</i>	<i>Treo</i>		<i>Eritro</i>		<i>Treo</i>
H-1	3,84	3,40	H-24	3,87	H-15	3,40
H-2	3,84	3,79	H-23	3,87	H-16	3,88
C-1	71,83	73,87	C-24	71,66	C-15	74,00
C-2	82,29	82,47	C-23	82,87	C-16	83,38

Tabela 18. Dados de RMN ^{13}C de modelos sintéticos preparados por Fujimoto *et al* (1990). (RUPPRECHT *et al*, 1990 e CAVE *et a.*, 1997), em CDCl_3 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



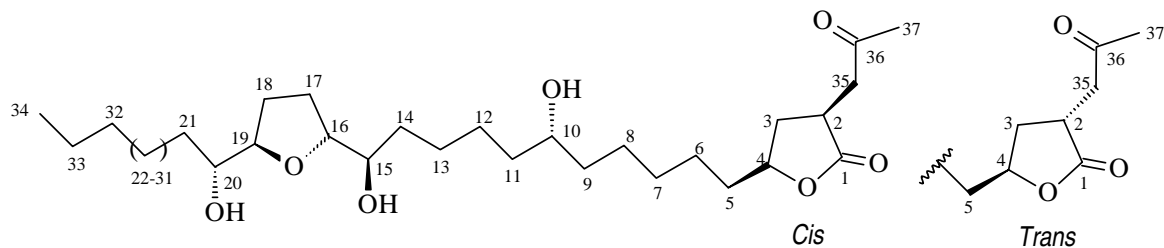
Átomos	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
	tr-t	tr-c	eri-t	eri-c	tr-t-tr	tr-c-tr	eri-t-tr	eri-c-tr
1'	74,2	74,5	72,0	71,6	74,0	74,3	71,6	72,1
2	81,9	82,2	81,5	82,1	82,7	82,8	82,2	82,8
3	28,4	27,8	25,0	23,9	28,8	28,1	25,2	24,1
4	32,4	31,4	32,3	31,4	28,8	28,1	28,6	28,4
5	79,3	79,9	80,2	79,6	82,7	82,8	83,3	82,3
1''	35,7	36,1	36,1	35,8	74,0	74,3	74,3	74,2

Tabela 19. Dados de RMN ^1H e ^{13}C das subunidades γ -lactona saturada e insaturadas (CAVÉ *et al.*, 1997) (tipo, L-C₁-Figura 5, p.) (tipos, L-B e L-A-Figura 5, p.). Deslocamentos químicos em δ (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.



C	Bulatacinonas – tipo L-C ₁		Gigantetrocina – tipo L-B		Corossolone – tipo L-A	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
	<i>Cis / trans</i>		<i>Cis / trans</i>			
1	-	178,8/181,7	-	174,6	-	173,8
2	3,01	33,4/36,7	-	131,1	-	134,2
3a	2,61/1,99 (m)	33,36	2,51 (dd)	33,3	2,26	25,6
3b	1,48/2,23 (m)	33,36	2,38 (dd)	-	-	-
4	4,39/4,55 (m)	78,9/79,4	3,38 (m)	69,8	1,52	27,3
35 (33)a	3,11/3,04 (dd)	43,8/44,2	7,17	151,8	6,95	148,9
35 (33)b	2,61/2,67 (dd)	43,8/44,2	-	-	-	-
36 (34)	-	205,5	5,04 (dq)	77,7	4,99	77,4
37 (35)	2,20 (s)	29,9	1,42 (d)	19,0	1,42	19,2

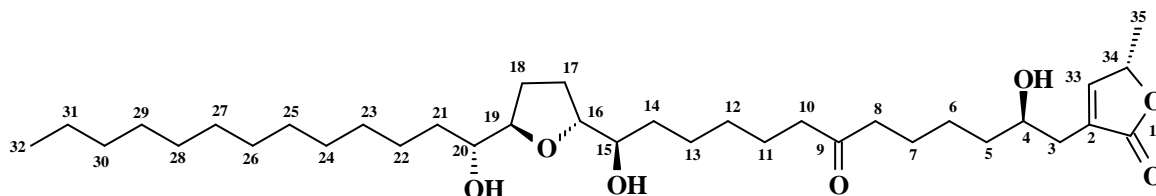
Tabela 20. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de mistura contendo 2,4-*cis*- e 2,4-*trans*-xylomaticinona (ALALI *et al.*, 1999), em CDCl_3 . Deslocamentos químicos em δ (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.



	Cis	Cis/trans	Trans	Cis	Cis/trans	Trans
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H} e J	δ_{H} e J	δ_{H} e J
C						
1	178,3		178,9			
36	205,7		205,8			
CH						
2	34,4		36,7	3,03 m		3,00 m
4	79,3		78,9	4,40 (dddd, 10,5; 7,5; 5,5; 5,3)		4,55 (dddd, 8,5; 8,5; 5,5;
10		71,7			3,59 m	
15		73,97 ^a			3,41 m	
16		82,60 ^b			3,80 m	
19		82,66 ^b			3,80 m	
20		74,04 ^a			3,41 m	
CH₂						
3a		25.2-37.4		2,61 m		2,27 m
3b		25.2-37.4		1,49 m		2,00 m
5a		25.2-37.4		1,62 m		1,58 m
5b		25.2-37.4		1,72 m		1,71 m
6-9		25.2-37.4			1,17-1,80	
11- 13		25.2-37.4			1,17-1,80	
14		25.2-37.4			1,43 m	
17e, 18e		25.2-37.4			1,68 m	
17a, 18a		25.2-37.4			2,00 m	
21		25.2-37.4			1,43 m	
22		25.2-37.4			1,17-1,80	
23- 31		25.2-37.4			1,17-1,80	
32		31,9			1,17-1,80	
33		22,6			1,17-1,80	
35a	43,7		44,2	2,61 (dd, 18,5; 8,5)		2,67 (dd, 19,0; 9,0)
35b				3,10 (dd, 18,5; 3,5)		3,03 (dd, 9,0; 3,5)
CH₃						
34		14,1			0,88 (t, 7,0)	
37		30,0			2,20 s	

a, b, e – pode ocorrer inversão de valores.

6.8.1 Caracterização estrutural da substância anoreticuín-9-ona (AcF-2325-P3)



As substâncias AcF-2325-P3 e AcF-0291 foram obtidas como uma graxa branca, que reagiram positivamente com os reagentes de Dragendoff e Kedde, em CCD, sendo o último resultado, apresentando cor vermelho pálido (RUPPRECHT *et al*, 1990), usado como diagnóstico para a presença de um sistema γ -lactona α , β -insaturada.

A análise dos espectros na região do infravermelho (IV) da AcF-0291 (Figura 88, p. 113), obtido em pastilha de KBr, revelou a presença de bandas de absorção em ν_{\max} 3439 cm^{-1} de deformação axial de O-H, e 1075 cm^{-1} de C-O, em 2925, 2854 cm^{-1} (CH_2 e CH_3 olefinicos), em 1463 e 1373 cm^{-1} de deformação angular (CH_2 e CH_3), em 1752 e 1713 cm^{-1} estiramento de duas carbonilas diferentes, e em 1655 cm^{-1} (estiramento ligação dupla α,β -insaturada) (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Estes dados permitiram propor a presença de unidade γ -lactona α,β -insaturada **A** e de grupo carbonílico cetônico **B** na molécula. A substância AcF2325-P3 mostrou espectro IV semelhante.

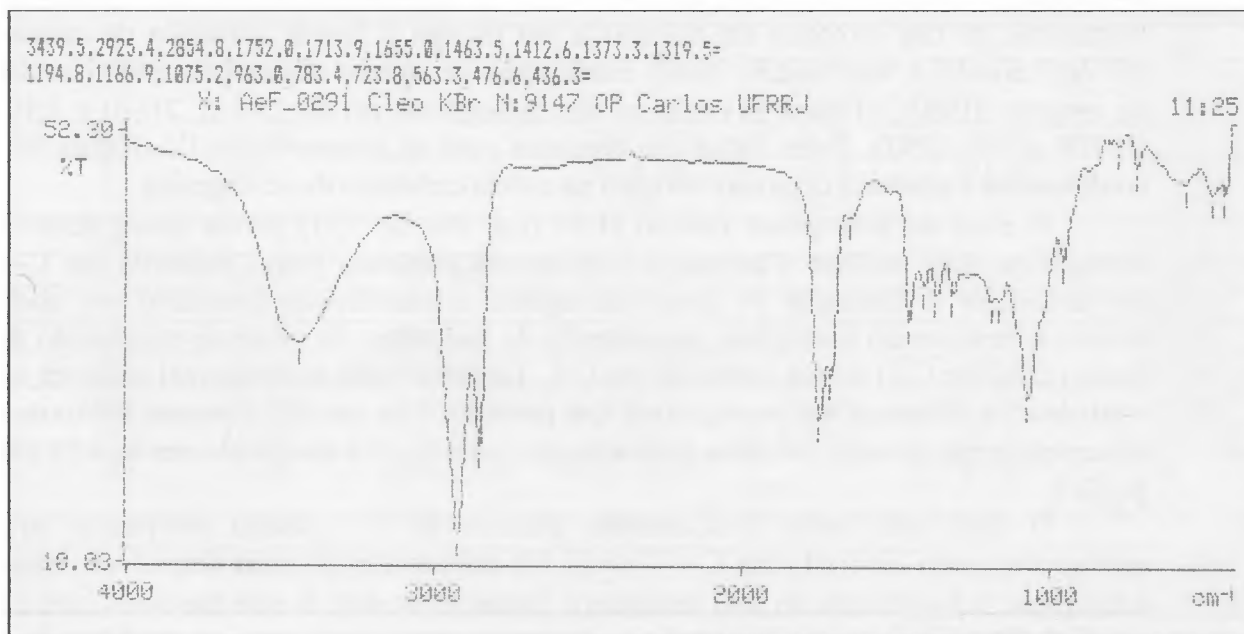
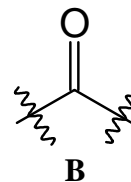
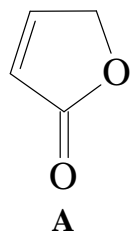


Figura 88. Espectro na região do infravermelho (IV) da AcF-0291, obtido em pastilha de KBr.

A análise dos espectros de RMN ^1H da AcF-2325-P3 (Tabela 21, p. 115, Figura 89, p. 117) e da AcF-0291 (Tabela 22, p. 116) permitiu reconhecer semelhanças estruturais das duas substâncias. A mesma semelhança foi observada na comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio com os valores descritos na literatura para a anoreticuina-9-ona (Mo-5, Tabelas 21 e 22). A anoreticuina-9-ona (Mo-5) é uma acetogenina componente de uma mistura contendo também os isômeros mosina-C (Mo-6) e mosina-B (Mo-7) (Figura 90, p. 117; Tabela 22). Esta mistura foi isolada das cascas da madeira de *Annona squamosa* e apresentou atividade anticancer em vários tipos de células (HOPP *et al.*, 1997).

As atribuições dos deslocamentos químicos dos sinais observados no espectro de RMN ^1H da AcF-2325-P3 (Figura 89) em δ_{H} 7,21 (H-33), 5,08 (q, H-34), 1,43 (d, 3H-35), 2,50-2,44 (m, H-3), 3,84 (m, H-4) envolveram também a comparação com dados da literatura (HOPP *et al.*, 1997) e revelaram-se em acordo com a presença de uma unidade γ -lactona α,β -insaturada, contendo função hidroxila em C-4 (tipo L-B, Figura 5, p. 13) (CAVÉ *et al.*, 1997).

Nos espectros de RMN ^{13}C -APT da AcF-2325-P3 (Figura 91, 92 e 93, p.118-119) foram observados dois sinais de carbonilas em δ_{C} 211,31 (C-9) e 174, 58 (C-1) e dois na região de carbonos olefínicos em δ_{C} 151,87 (CH-33) e 131,04 (C-2), que juntamente com os sinais em δ_{C} 77,96 (CH-34), 69,58 (CH-4) e 19,04 (CH₃-35) confirmaram a presença da unidade γ -lactona α,β -insaturada contendo hidroxila em C-4 (CAVÉ *et al.*, 1997).

O sistema mono-tetraidrofurânico α,α' -dihidroxiado foi sugerido pela presença nos espectros de RMN ^{13}C -APT de AcF-2325-P3 de dois sinais em δ_{C} 82,66 (CH-16) e 82,50 (CH-19) e dois de carbonos carbinólicos em δ_{C} 74,04 (CH-15) e 73,89 (CH-20), em consonância com os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio observados no espectro de RMN ^1H (Figura 89, p. 115) em δ_{H} 3,40 (m, H-15 e H-20), 3,88 (m, H-16 e H-19) e em 1,98-1,66 (m, 2H-17 e 2H-18). Tais atribuições foram confirmadas através das correlações heteronuclear observadas nos espectros HMQC (Figura 94, p. 120) e HMBC (Figura 95, p. 121) e homonuclear COSY (Figura 96, p. 122).

Os espectros de RMN ^{13}C APT revelaram também a presença de dois sinais de grupos metilênicos em δ_{C} 42,63 (CH₂-8) e 42,49 (CH₂-10), deslocamentos químicos compatíveis com a localização de tais carbonos em posição α em relação à função carbonila da cadeia alifática (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Estes sinais de átomos de carbono estão correlacionados no espectro HMQC (Figura 94) com os dos hidrogênios em δ_{H} 2,42 (t, 2H-8) e 2,40 (2H-10) (HOPP *et al.*, 1997). Estes dados em conjunto com as absorções no IV (Figura 88, p. 113) confirmaram a presença de grupo cetônico na cadeia carbônica da acetogenina.

O sinal do hidrogênio vinílico H-33 (*e.g.* em δ_{H} 7,21) revela maior desproteção em acetogenina com unidade γ -lactona α,β -insaturada contendo grupo hidroxila em C-4, devido provavelmente à formação de ponte hidrogênio intramolecular formando um anel de sete membros envolvendo o oxigênio da carbonila do C-1, além do efeito de conjugação da ligação dupla (CH-33 e C-2) com a carbonila em C-1. Tal observação experimental pode ser usada para estabelecer a diferença das acetogeninas que possuem e as que não possuem hidroxila em C-4. As acetogeninas que não possuem hidroxila em C-4 o H-33 é observado em δ_{H} 6,95 (Tabela 19, p. 111).

O sinal com maior deslocamento químico de C-1 quando comparado aquelas das acetogeninas sem hidroxila em C-4 (Tabela 19) também revela uma desproteção causada pela conjugação α,β -carbonila do anel lactônico e formação de anel de sete membros com a hidroxila em C-4. Os demais sinais também se revelaram compatíveis com os modelos da literatura (HOPP, *et al.*, 1997).

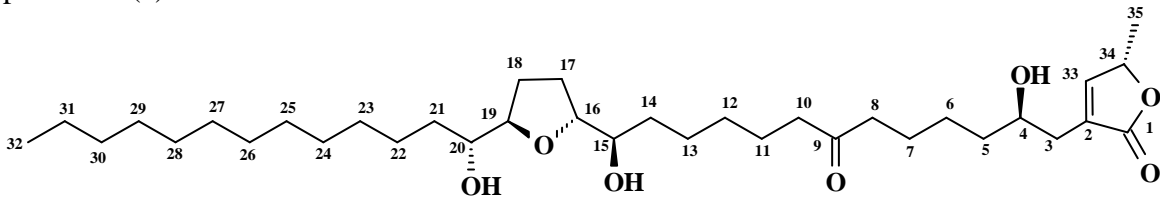
O espectro de massas de alta resolução obtido através de ionização por eletrospray, (Figura 97, p. 123) da AcF-2325-P3 apresentou o íon aduto sódico $[M+Na]^+$ de m/z 671,4236 indicando uma massa molar de m/z 594, 4236 compatível com a fórmula molecular $C_{35}H_{62}O_7$. O espectro revelou também picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de água (Esquema 18, p.123).

Nos espectros de massas obtidos através de ionização por impacto de elétrons da AcF-2325-P3 (Figura 98, p. 122; Esquema 19, p. 125) foram observados, além de outros, os picos correspondentes aos íons fragmentos resultantes de clivagem na posição α em relação aos carbonos oxigenados, o que permitiu confirmar a presença de um anel tetraidrofurânico, três grupos hidroxilas e de um grupo carbonila na cadeia carbônica, bem como suas respectivas localizações.

A análise comparativa dos dados citados de AcF-0219 e AcF-2325-P3, com os modelos Mo-5, Mo-6 e Mo-7 (Figura 90, p. 117; Tabelas, 21 e 22, p. 115 e 116), permitiu propor a configuração relativa para o anel tetraidrofurânico como sendo *treo/trans/treo* semelhante a annoreticuín-9-ona (Mo-5).

Pode-se então concluir que as substâncias AcF-2325-P3 e AcF-0291 são idênticas e trata-se da acetogenina annoreticuín-9-ona.

Tabela 21. Dados de RMN 1H e ^{13}C da AcF-2325-P3, incluindo-se resultados obtidos através de espectros HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos estão em ppm e valores de constantes de acoplamento (J) em Hz.



C	HMQC $^1J_{CH}$		HMBC $^nJ_{CH}$		Mo-5 (Annoreticuín-ona)	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
1	174,58	-	-	2H-3; H-33	174,61	-
2	131,04	-	2H-3; H-33	H-34	131,03	-
9	211,31	-	2H-8; 2H-10	2H-7; 2H-11	211,40	-
CH						
4	69,58	3,84 (m)	2H-3; 2H-5		69,56	3.86
15	74,04	3,40 (m)	2H-14	H-17b	74,05 ^a	3.40 (m)
16	82,66	3,80 (m)	2H-17	2H-18	82,66 ^b	3.79 (m)
19	82,50	3,80 (m)	2H-18	2H-17	82,58 ^b	3.79 (m)
20	73,89	3,40 (m)	2H-21	H-18b	73,89 ^a	3.40 (m)
33	151,87	7,21 (s)	H-34	2H-3; 3H-35	151,92	7.19(d, 1.5)
34	77,96	5,08 (q, 7.0)	H-33 – 3H-35		77,99	5.06 (dq, 6.5, 1.5)
CH₂						
3	33,41	2,50-2,44 (m)		H-33; 2H-5	33,30	2.40 (dddd) 2.52 (dddd)

Continua na página seguinte

Continuação da tabela 21.

5	36,99	1,47	2H-6	2H-3b; 2H-7	36,98	1,47 (m, 2H)
6	25,13	1,60-1,30	2H-5; 2H-7		25,55 ^c	1,26 (sl)
7	23,65	1,58 (qd;7,3)	2H-8		23,44- 33,30	1,26 (sl)
8	42,63	2,42 (t; 6,6)	2H-7		42,64 ^d	2,40 (t, 7,0)
10	42,49	2,40 (t; 6,9)	2H-11		42,51 ^d	2,42 (t, 7,5)
11	23,46	1,58 (qd; 7,3)			23,44- 33,30	1,26 (sl)
12	29,67- 29,29	1,25 (m)	2H-11	2H-10	23,44- 33,30	1,26 (sl)
13	25,25	1,60-1,30	2H-14	H-15	25,26 ^c	1,26 (sl)
14	33,31	1,38 (m)	H-15	H-16	33,39 ²	1,41 (m)
17	28,71	1,98-1,66 (m)	H-16	H-15;H-19	28,73	1,99 -1,69 (m)
18	28,71	1,98-1,66 (m)	H-19	H-16; H-20	28,73	1,99 -1,69 (m)
21	33,13	1,38 (m)	H-20	H-19	33,39	1,41 (m)
22	25,54	1,60 -1,30	2H-21	H-20	25,13 ^c	1,26 (sl)
23- 29	29,67- 29,29	1,25 (m)			23,44- 33,30	1,26 (sl)
30	31,86	1,25 (m)	2H-31	2H-32	31,86	1,26 (sl)
31	22,62	1,25 (m)	2H-30; 3H-32		22,66	1,26 (sl)
CH₃						
32	14,05	0,87 (t; 6,6)			14,07	0,88 (t, 7,0)
35	19,04	1,43 (d; 7,0)			19,05	1,44 (d, 7,0)

a, b, c, d –podem estar invertidos

Tabela 22. Dados de RMN ¹H e ¹³C da AcF-0291 e da mistura constituída dos isômeros Annoreticuín-9-ona, (Mo-5), Mosine C (Mo-6), Mosine B (Mo-7) (HOPP *et al.*, 1997).

	AcF-0291		Mo-5		Mo-6		Mo-7	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
CH ₂ -13	25,21	1,40-1,28	25,26	1,26 (sl)	25,32	1,26 (sl)	25,28	1,26 (sl)
CH ₂ -14	33,21	1,36	33,39	1,41 (m)	34,07	1,41 (m)	32,94	1,41 (m)
CH-15	74,04	3,40 (m)	74,05	3,40 (m)	74,38	3,42 (m)	74,21	3,38 (m)
CH-16	82,64	3,79 (m)	82,66	3,79 (m)	82,66	3,81 (m)	83,18	3,81 (m)
CH ₂ -17	28,83	1,98 1,62	28,73	1,99 (m) 1,69 (m)	28,10	1,94 (m) 1,56 (m)	28,57	1,97 (m) 1,75 (m)
CH ₂ -18	28,83	1,98 1,62	28,73	1,99 (m) 1,69 (m)	28, 10	1,87 (m) 1,83 (m)	25,23	1,94 (m) 1,75 (m)
CH-19	82,67	3,79 (m)	82,58	3,79 (m)	82,66	3,81 (m)	82,14	3,82 (m)
CH-20	73,88	3,4 (m)	73,89	3,40 (m)	74,28	3,42 (m)	71,15	3,87 (m)
CH ₂ -21	33,30	1,36	33,39	1,41 (m)	33,73	1,41 (m)	32,51	1,41 (m)
CH ₂ -22	25,50	1,40-1,28	25,13	1,26 (sl)	25,14	1,26 (sl)	25,12	1,26 (sl)

Deslocamentos químicos (δ) de ¹H e ¹³C em ppm.

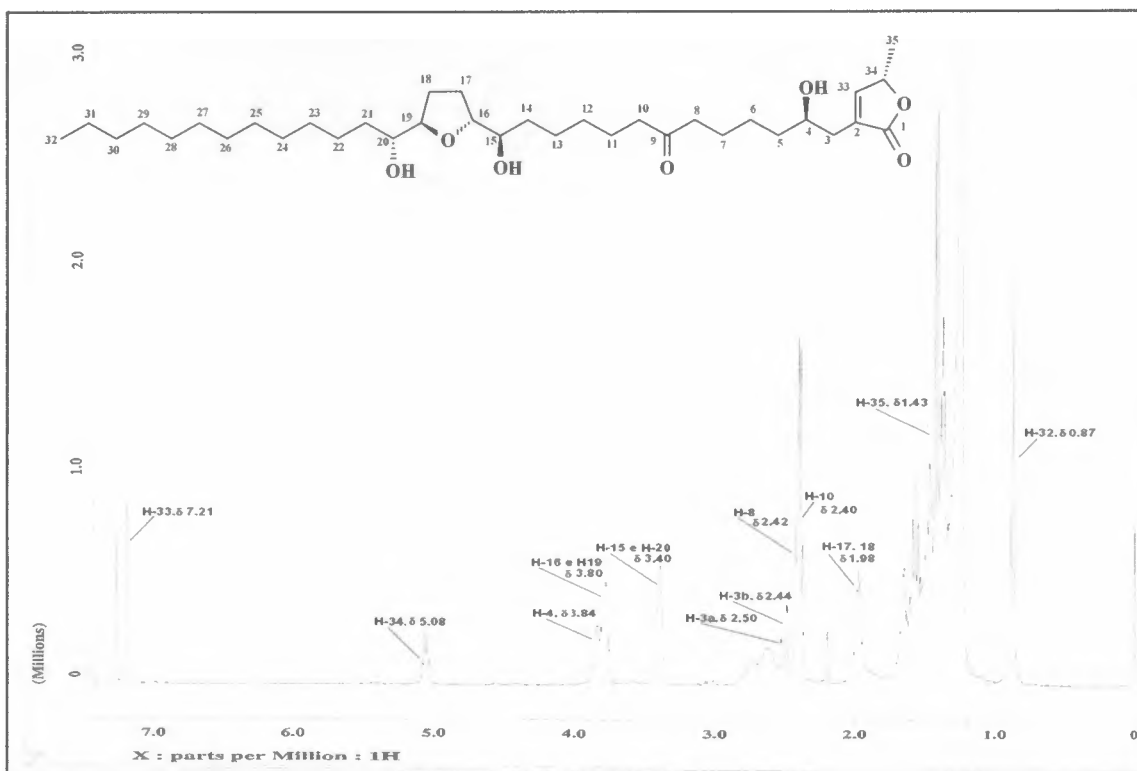


Figura 89. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da AcF-2325-P3, obtido em CDCl_3 .

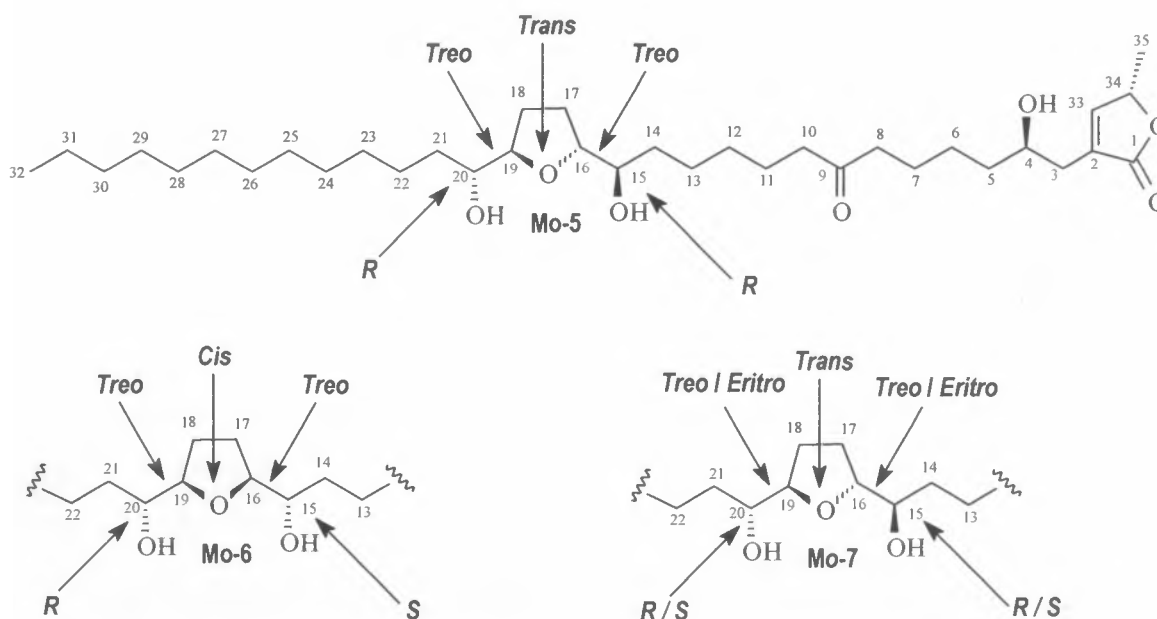


Figura 90. Isômeros constituintes da mistura de Anoreticuín-9-ona (Mo-5), Mosine C (Mo-6) e Mosine B (Mo-7) isolados de *A. squamosa* (HOPP *et al.*, 1997).

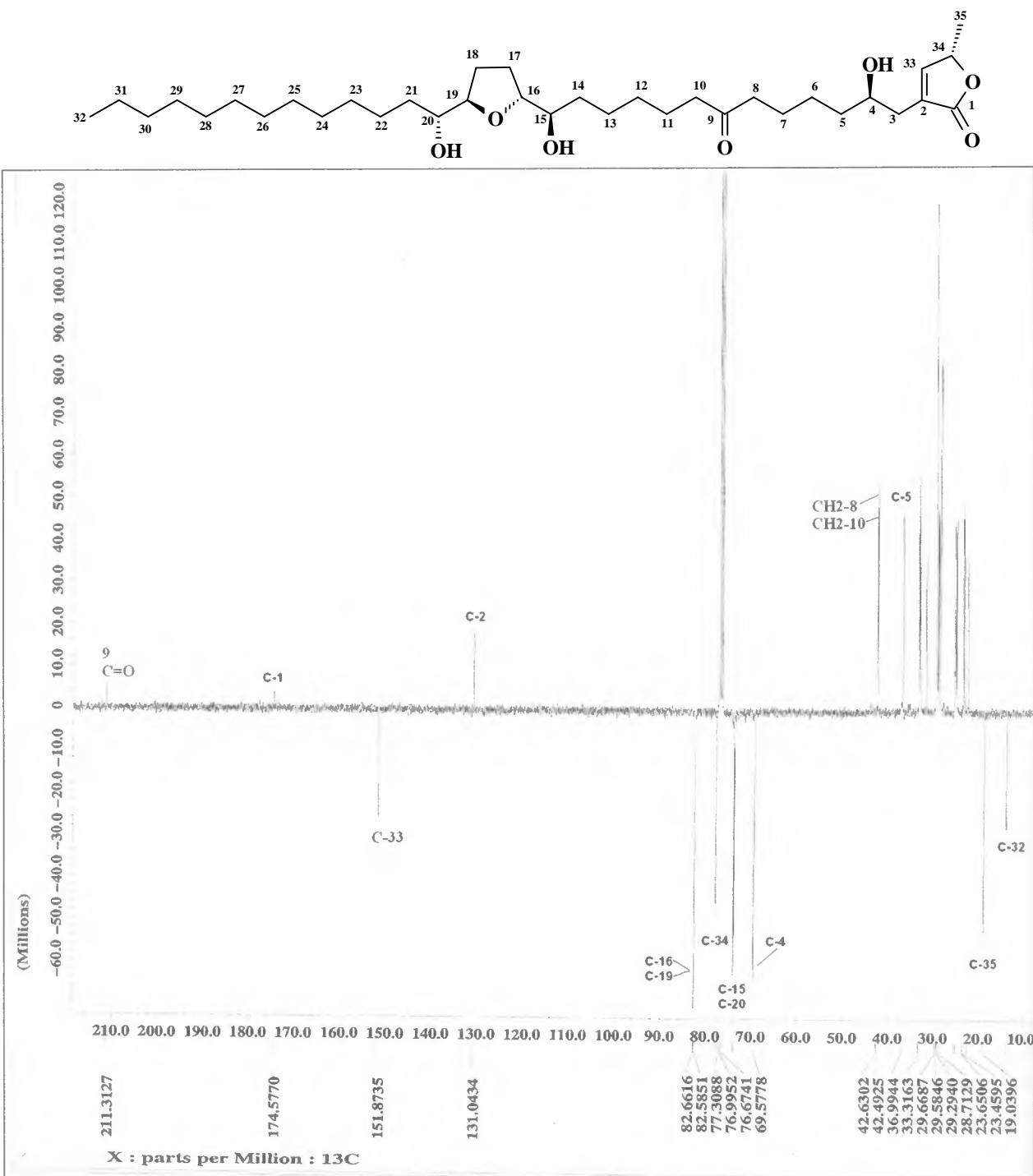


Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-2325-P3 em CDCl_3 .

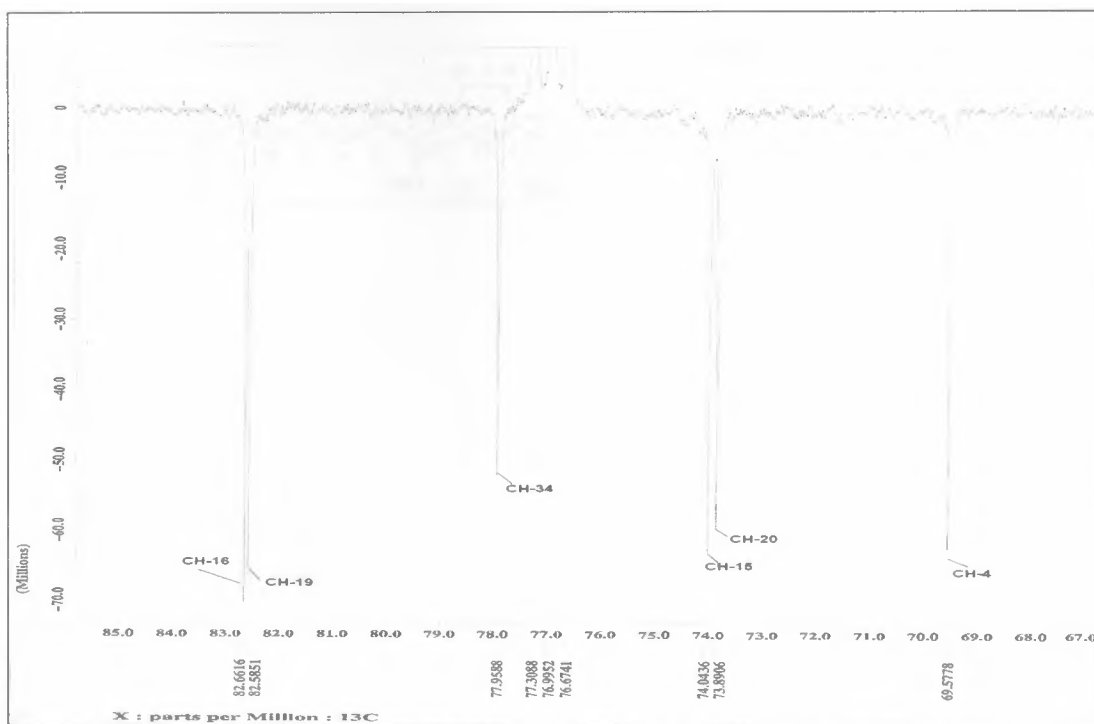


Figura 92. Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-2325-P3 na região de δ_{C} 67-85, em CDCl_3 .

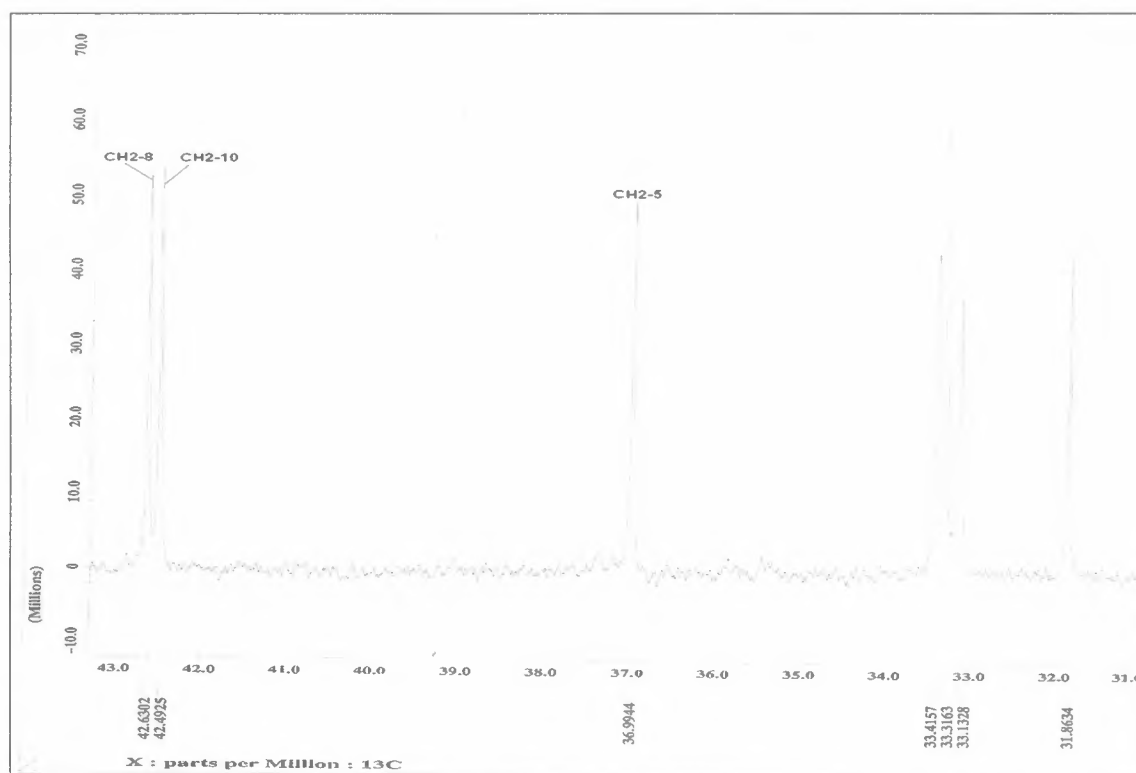


Figura 93. Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-2325-P3 na região de δ_{C} 31-43, em CDCl_3 .

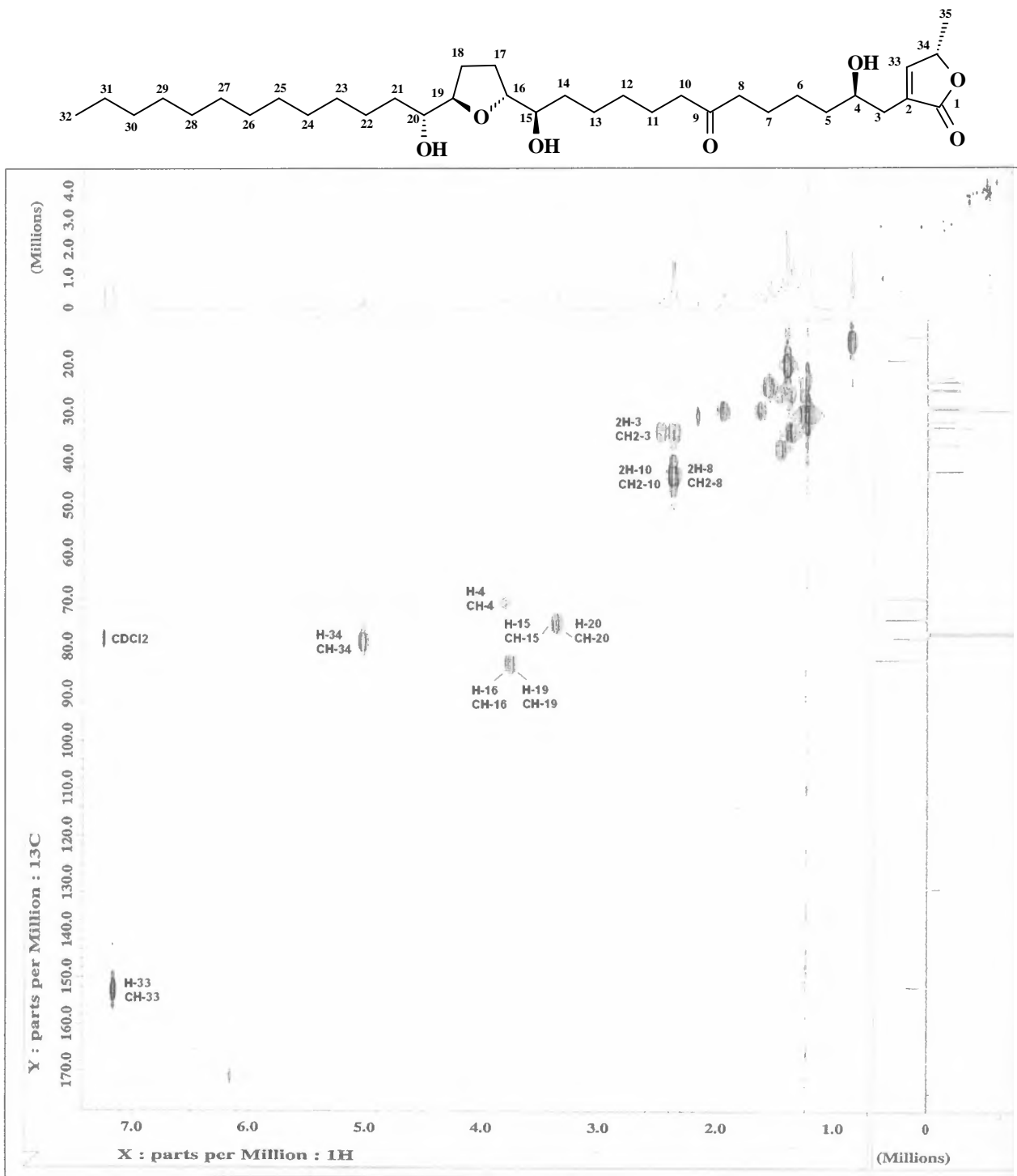


Figura 94. Mapa de correlação HMQC da AcF-2325-P3, em CDCl_3 .

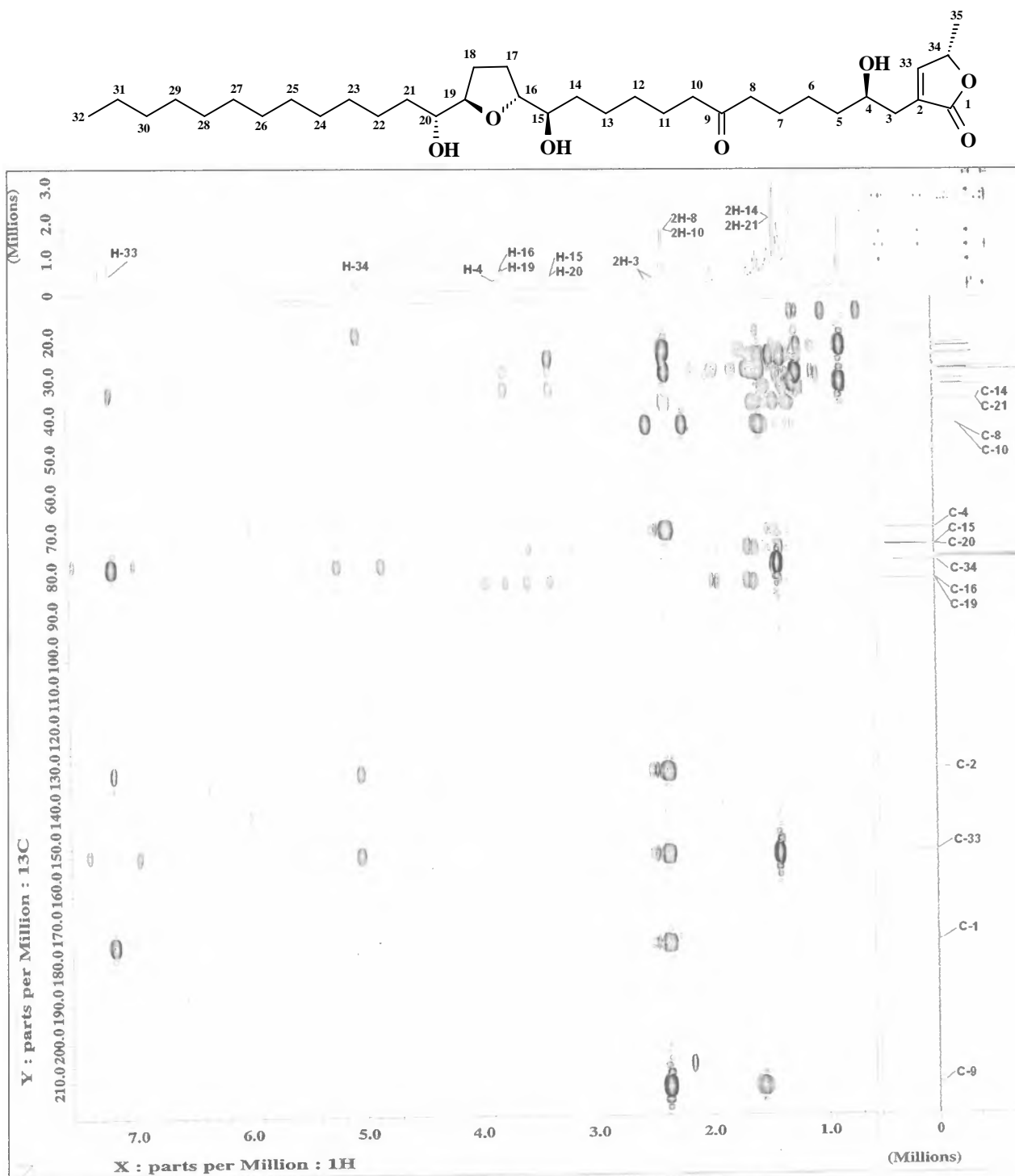


Figura 95. Mapa de correlações HMBC da AcF-2325-P3, em CDCl₃.

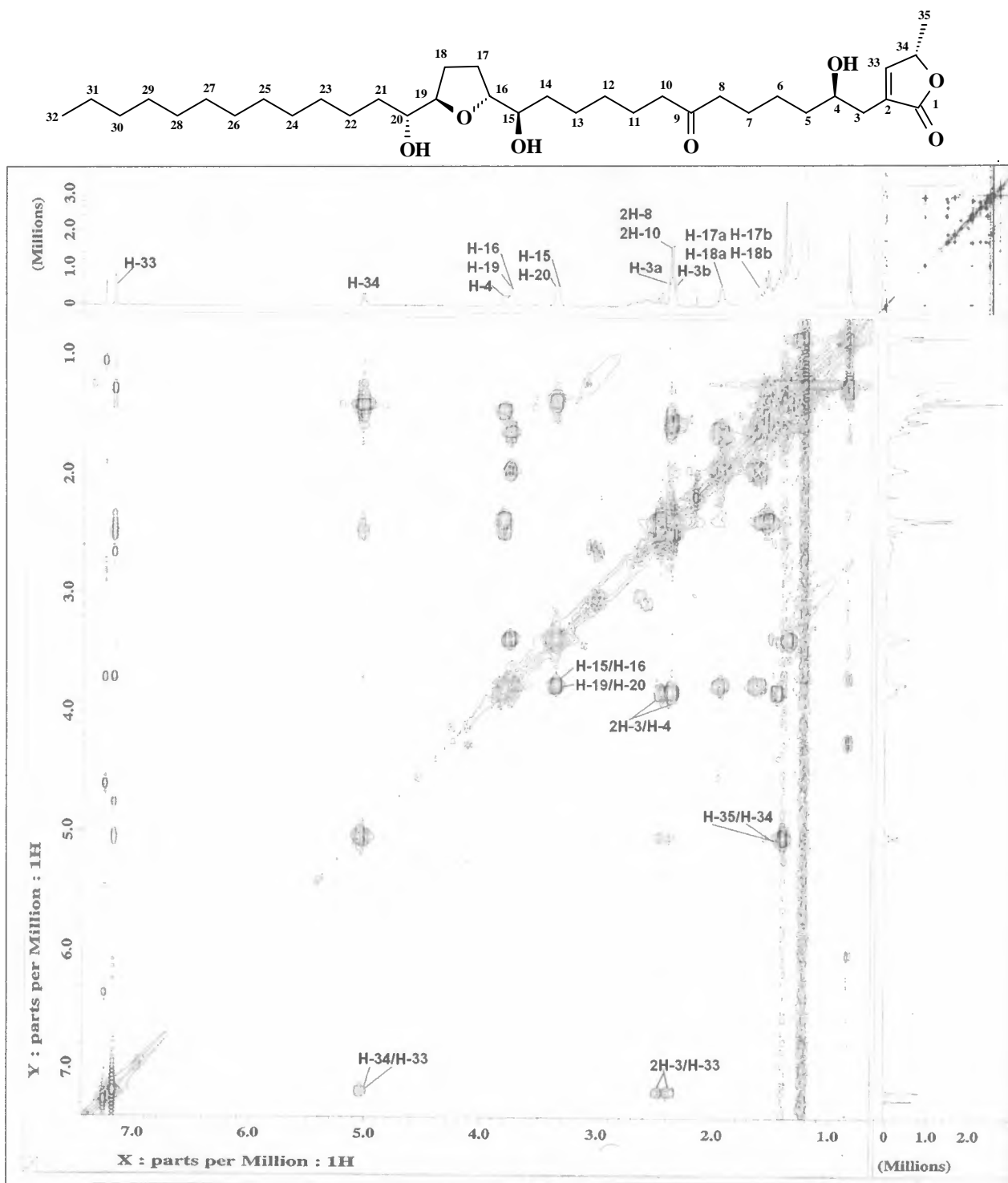


Figura 96. Mapa de correlações COSY (400 MHz) da AcF-2325-P3, em CDCl_3 .

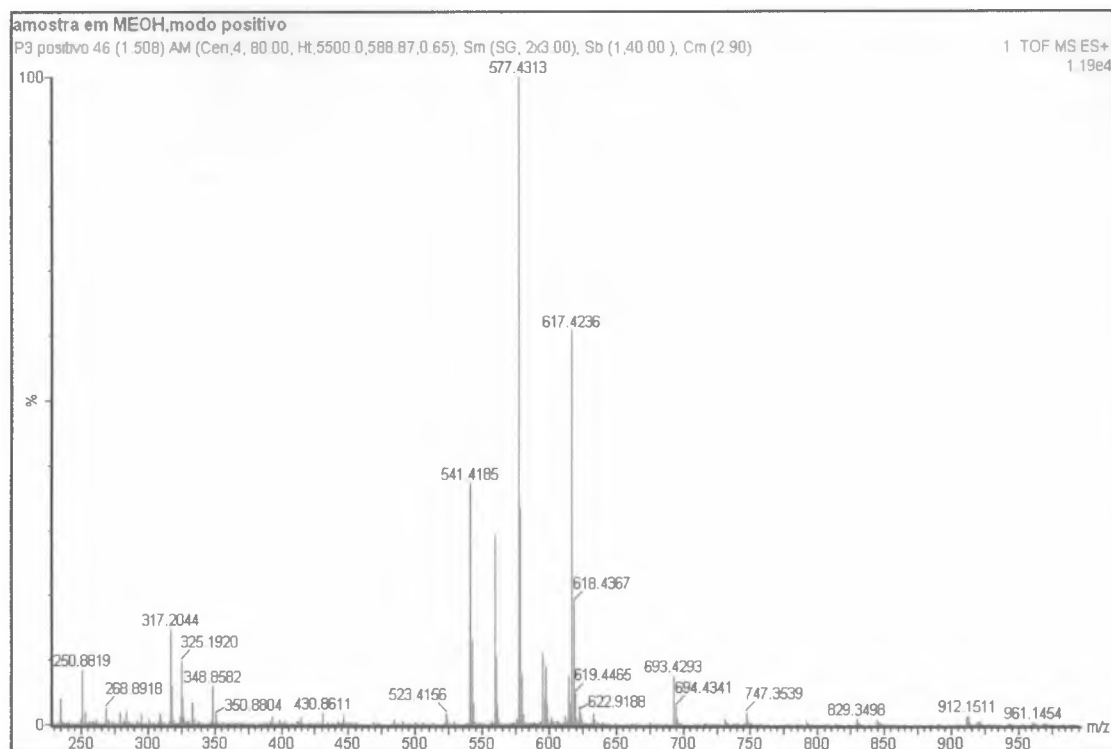
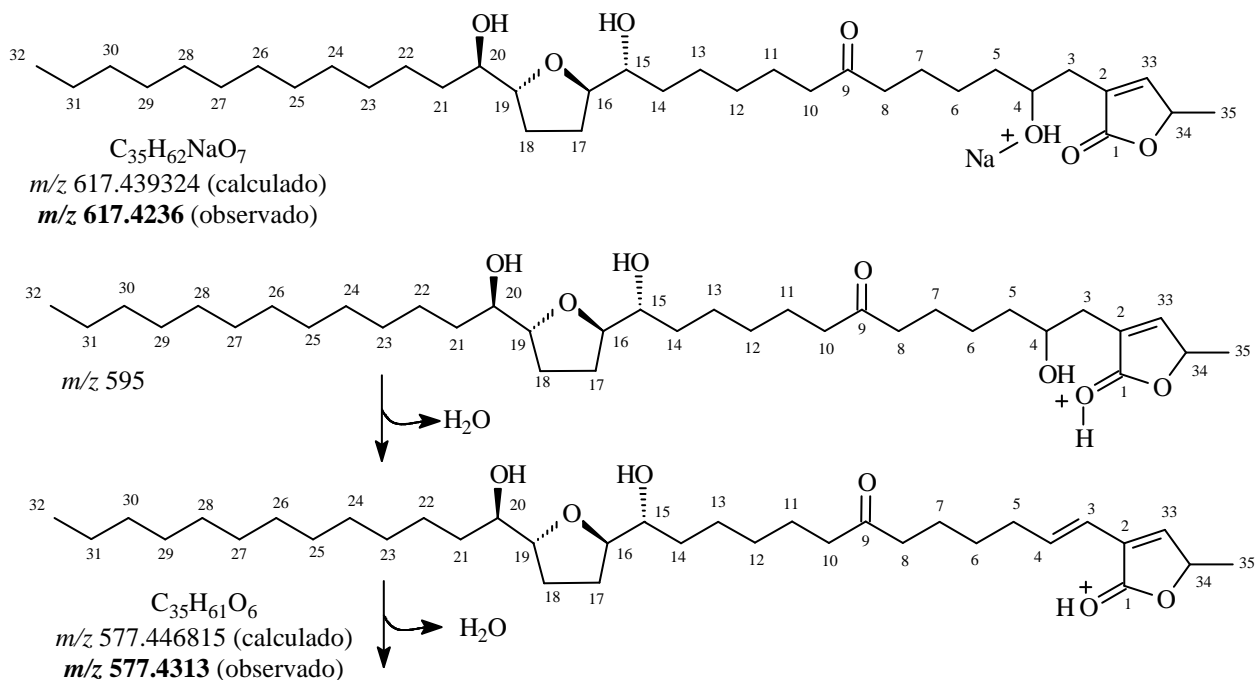


Figura 97. Espectro de massas de alta resolução da AcF-2325-P3 obtido através de ionização por eletrospray.



Esquema 18. Proposta mecânica de fragmentação postuladas para justificar as perdas de moléculas de água da AcF-2325-P3 no espectrômetro de massas (EM-ES).

0Continua na página seguinte

Continuação do esquema 18.

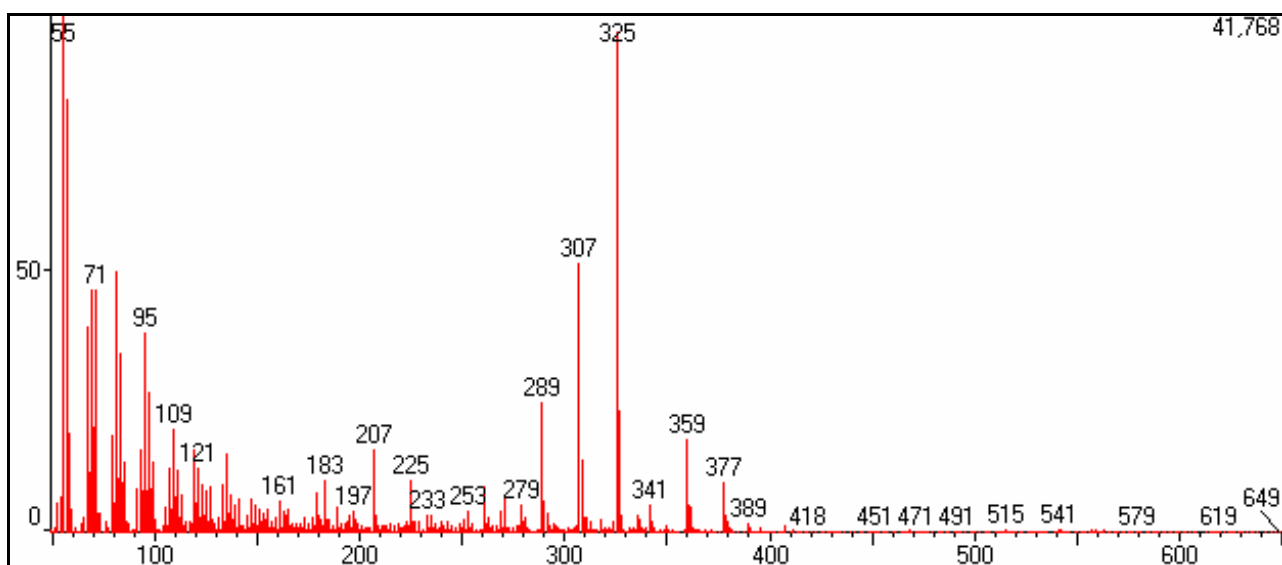
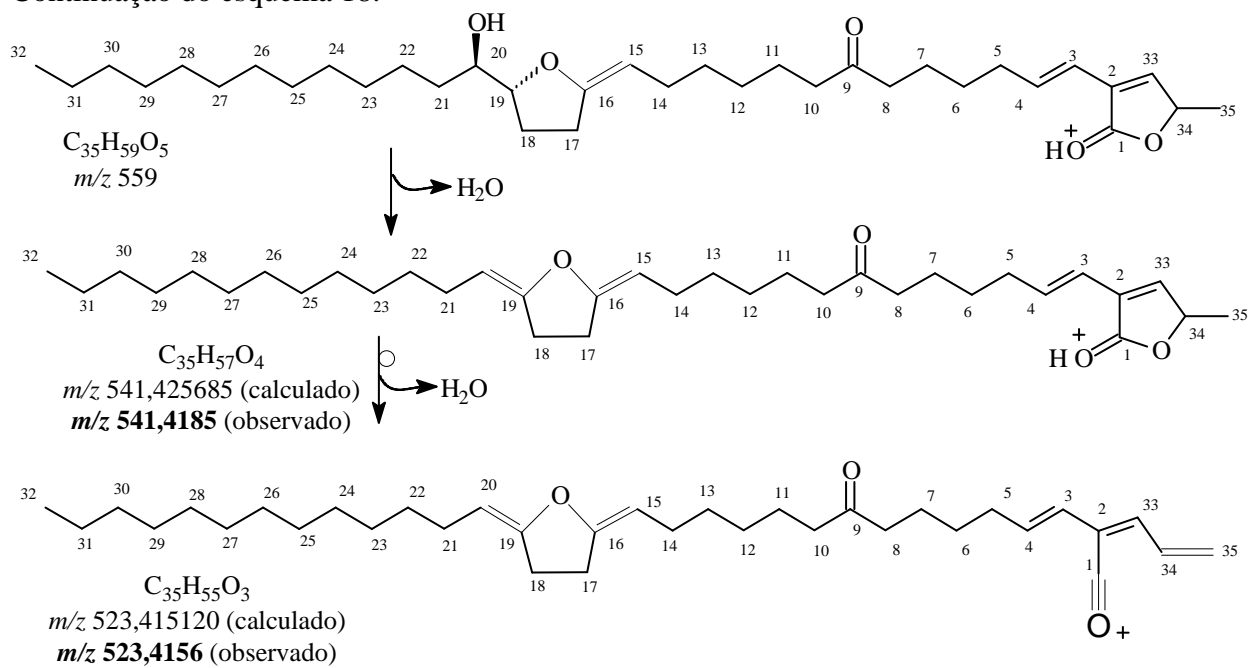
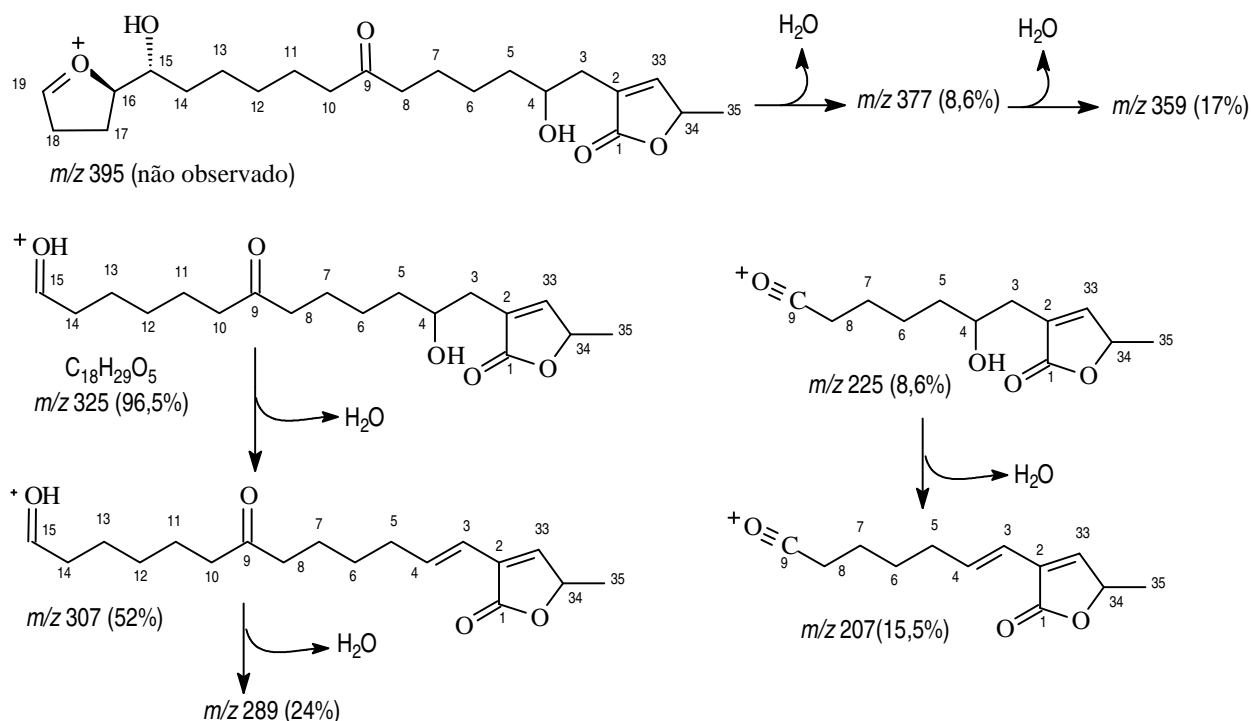


Figura 98. Espectro de massas da AcF-2325-P3 obtido através de ionização por impacto de elétrons.



Esquema 19. Proposta mecanística de fragmentação da AcF-2325-P3 no espectrômetro de massas operando por impacto eletrônico.

6.8.2 Caracterização estrutural da acetogenina cacansin-9-ona (AcF-2325-P5)

A acetogenina codificada de AcF-2325-P5 foi obtida como um sólido amorfo branco, que reagiu positivamente com os reagentes de Dragendoff e Kedde em análise por CCD, sendo este último resultado um diagnóstico para γ -lactonas- α - β -insaturada (RUPPRECHT *et al.*, 1990).

O espectro na região do IV (Figura 99, p. 126) obtido em pastilha de KBr apresentou bandas de absorção em ν_{\max} 3438, 1076 (OH), 2920 e 2850 (CH) 1764 – 1755 (grupos carbonílicos) e 1699 cm^{-1} (ligação dupla).

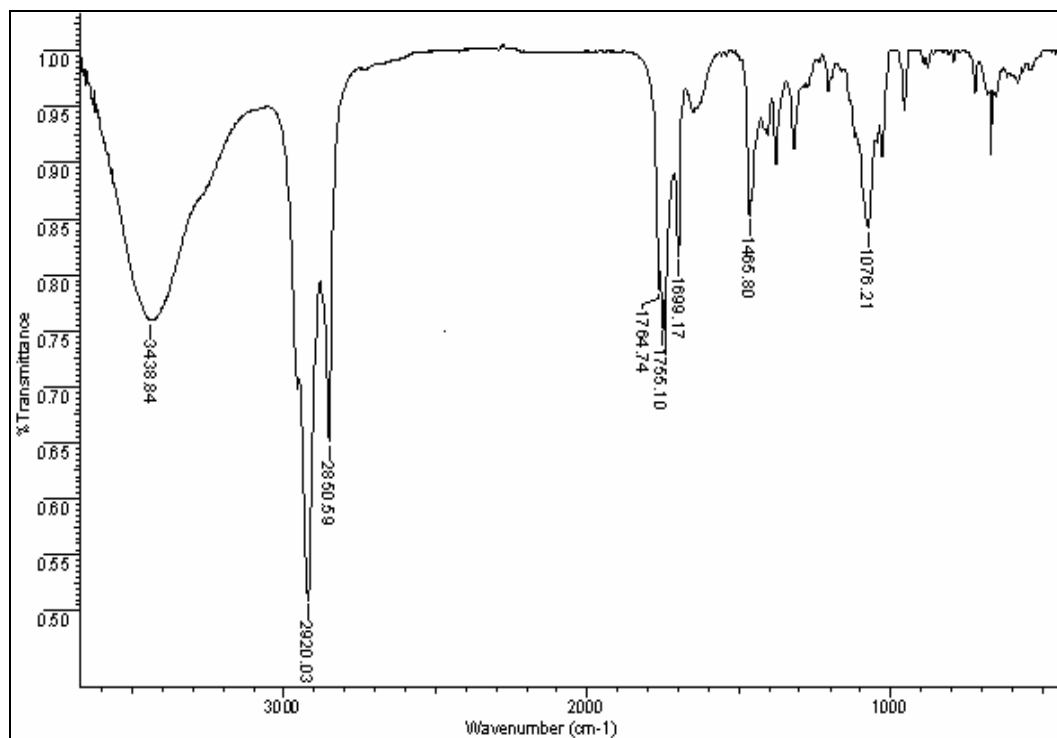


Figura 99. Espectro na região do infravermelho (IV) da AcF-2325-P5, obtido em KBr.

A análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 100, p. 128) e ^{13}C APT de AcF-2325-P3 (Figuras 101, p. 128; 102 e 103, p. 129) revelou semelhanças estruturais com AcF-2325-P3 (Tabela 21, p. 115).

Os sinais observados no espectro de RMN ^1H com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,20 (H-33), 5,06 (H-34) e 1,43 (d, 3H-35) (Tabela 30, p. 128) sugeriram que as acetogeninas contêm uma unidade γ -lactona- α - β -insaturada com hidroxila em C-4. Estes dados em conjunto com os sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C APT, em δ_{C} 174,61 (C-1), 131,11 (C-2), 151,91 (CH-33) e 78,00 (CH-34) confirmam a tal unidade estrutural. A banda de absorção em ν_{max} 1755 cm^{-1} no espectro na região do IV (Figura 99) revelou-se também em acordo com esta dedução estrutural. A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono envolveu também a comparação com valores descritos na literatura (CAVÉ *et al*, 1997; HOPP *et al*, 1997).

As informações adicionais obtidas pela análise nas regiões com δ_{H} 3,84 (H-4), 3,82 (H-14 e H-17) e 3,40 (H-13 e H-18) no espectro de RMN ^1H (Figura 100) e os sinais em δ_{C} 82,73 (CH-14), 82,36 (CH-17) e 73,70 (CH-13) e 74,17 (CH-18) nos espectros de RMN ^{13}C -APT (Figuras 101, 102 e 103) indicaram a presença de um anel tetraidrofurânico com duas hidroxilas adjacentes. Nestes últimos observa-se também a presença de sinal correspondente a um grupo carbonílico cetônico em δ_{C} 211,16 (C-9), permitindo também justificar os sinais de carbonos metilênicos localizados em posição α á carbonila, pelos deslocamentos químicos em δ_{C} 42,57 (CH₂-8) e 42,43 (CH₂-10). A localização da carbonila no átomo de carbono C-9 e o anel THF envolvendo o átomo de carbono C-14 foi sugerida pelo deslocamento químico do CH₂-11 em δ_{C} 19,93 (Tabela 30), revelando-se compatível com a influência dos efeitos de proteção γ (gama) do átomo de oxigênio da carbonila em C-9 e do grupo hidroxila em C-13. Esta dedução apoiou-se

também na análise dos picos em m/z 297, 279, 225 e 207 observados no espectro de massas obtido através de ionização por impacto eletrônico (EM-IE, Figura 104, p.130), que foram atribuídos aos fragmentos **A**, **B**, **C** e **D**, respectivamente (Esquema 20, p. 131).

Os espectros de correlações HMQC (Figura 105, p. 134), HMBC (Figura 106, p. 135) e COSY (Figura 107, p. 136) foram também usados no trabalho de elucidação estrutural desta substância e permitiram a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios e carbonos (Tabela 23, p. 132).

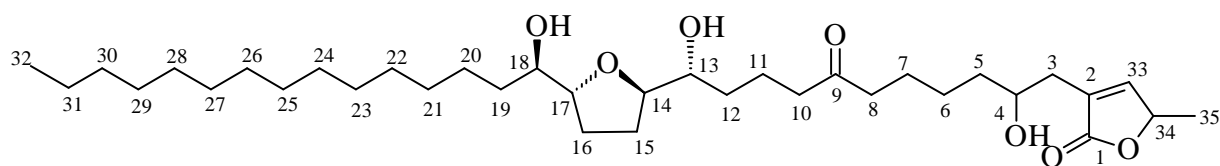
A análise do espectro de massas de alta resolução obtido através de ionização por electrospray (Figura 108, p. 137) revelou a presença do íon $[M+Na]^+$ em m/z 617,4248 compatível com acetogenina de massa molecular m/z 594 (m/z 617 -23 = 594) e fórmula molecular $C_{35}H_{62}O_7$ (GU, *et al.*, 1997). Este espectro de massas permitiu também confirmar a presença de hidroxilas pela observação de picos m/z 577,4048 ($[M+H-H_2O]^+$), 559,4041 ($[M+H-2 H_2O]^+$) e 541,3835 ($[M+H-3 H_2O]^+$), justificados por reações de fragmentação correspondentes à perda de moléculas de água (Esquema 21, p. 137).

Os principais picos observados no espectro de massas obtido através de ionização por impacto eletrônico (Figura 104, p. 130) foram justificados pelos íons fragmentários relativos às clivagens entre os carbonos C-13/C-14 (m/z 297), C-18/C-19 (m/z 379, correspondente a 397- H_2O), C-9/C-10 (m/z 225 e 207, este último corresponde a 225- H_2O) (Esquema 20, p. 131).

A interpretação dos espectros de massas permitiu justificar as diferenças estruturais entre AcF-2325-P5 e AcF-2325-P3 pela posição dos anéis THF em cada substância localizados nos carbonos C-14 e C-16 respectivamente.

Através de comparação com dados da literatura (FUGIMOTO *et al.*; 1994; RUPPRECHT *et al.*, 1990; CAVE, *et al.*, 1997 e HOPP *et al.*, 1997) foi possível atribuir á configuração relativa de AcF-2325-P5 como sendo *treo/trans/treo*.

De acordo com revisão na literatura, até o momento a AcF-2325-P5 aparece como uma acetogenina inédita denominada cacansin-9-ona.



Cacansin-9-ona

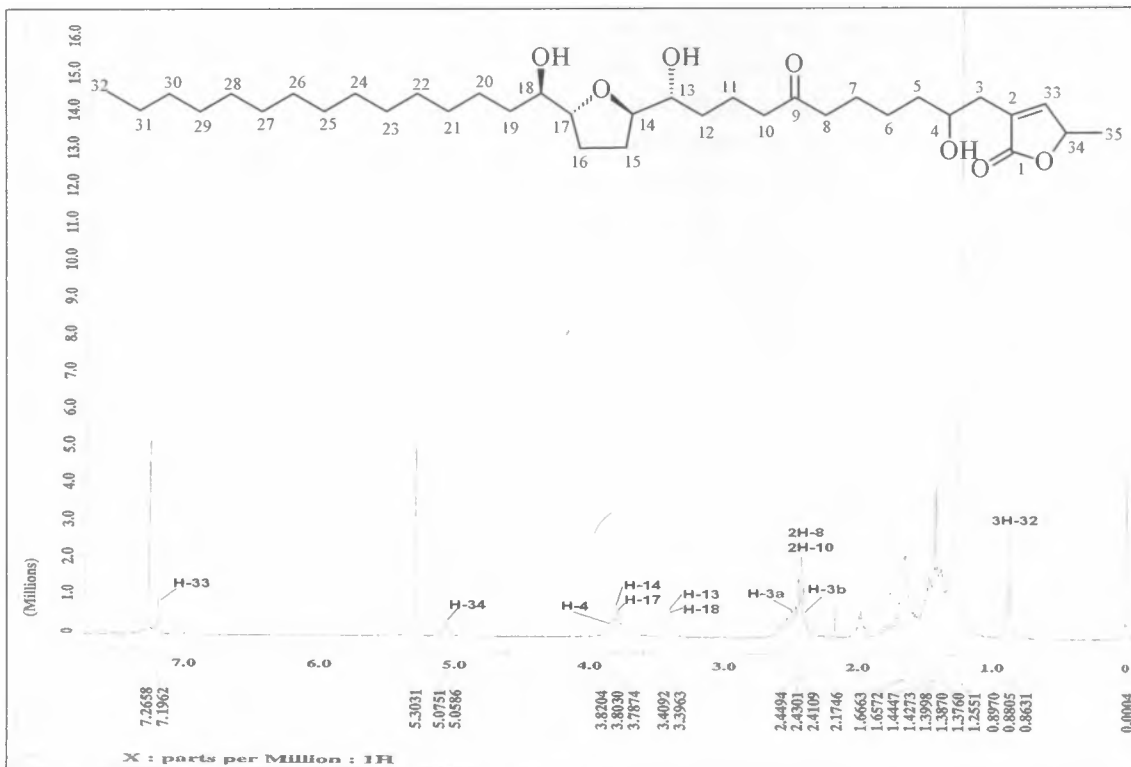


Figura 100. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da AcF-2325-P5, em CDCl_3 .

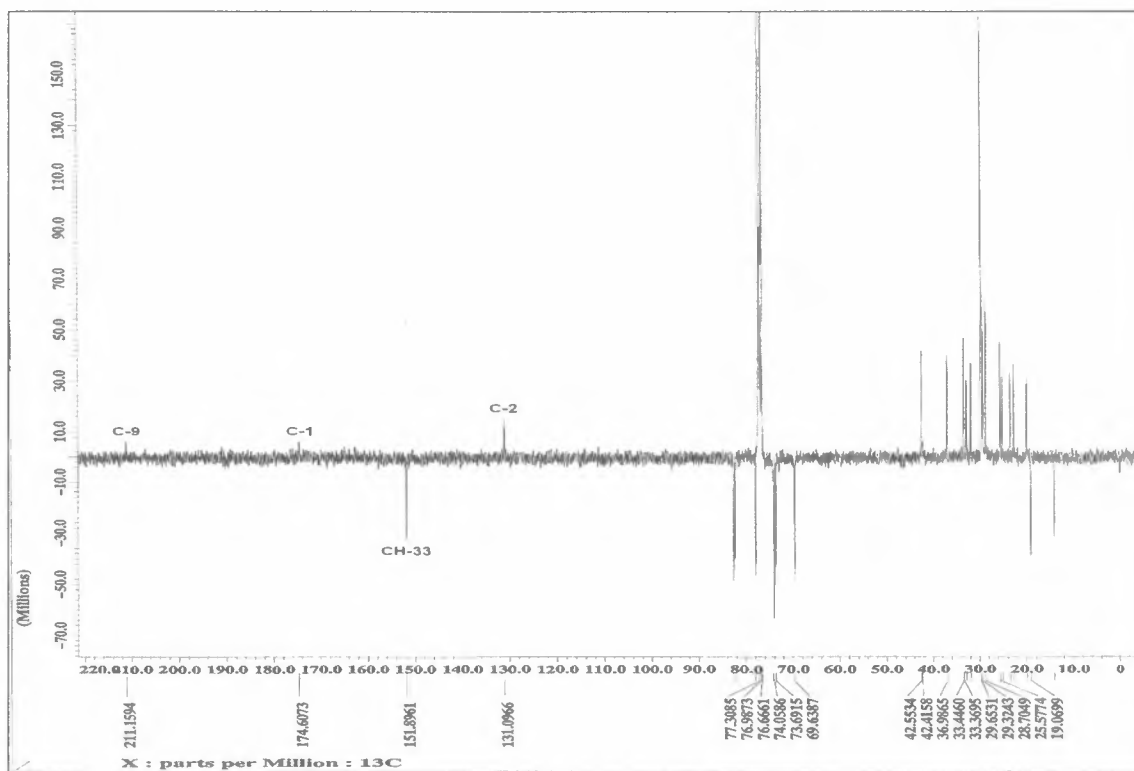


Figura 101. Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) da AcF-2325-P5, em CDCl_3 .

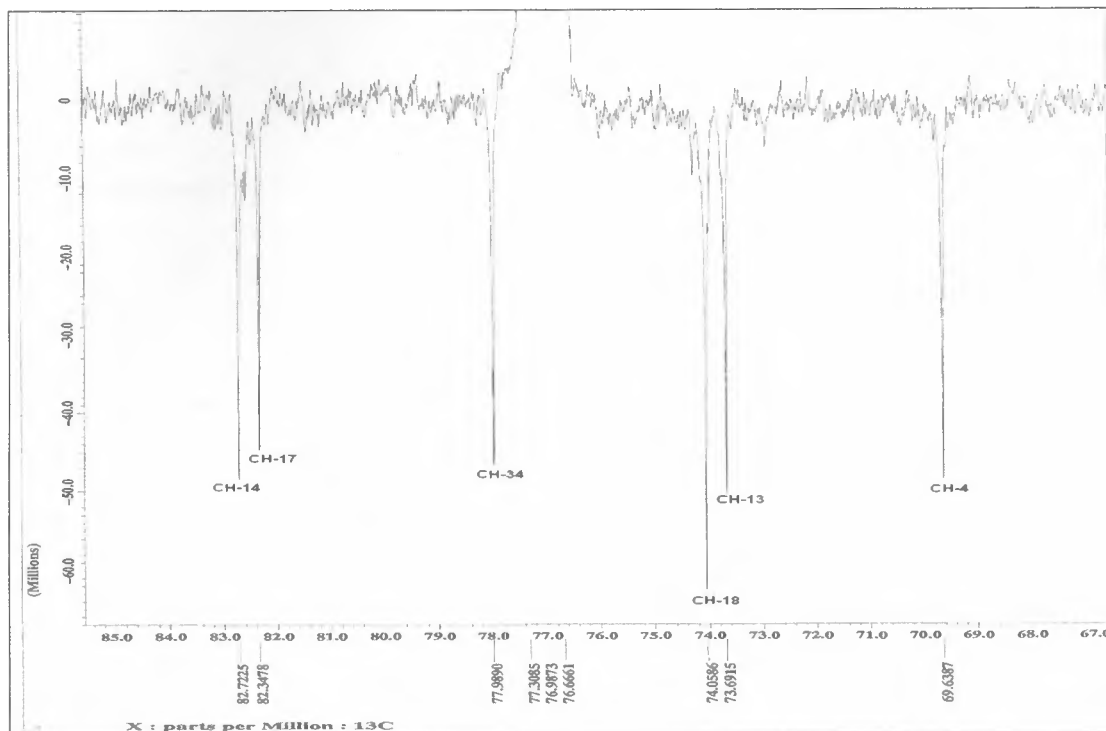


Figura 102. Expansão do espectro de RMN¹³C APT (100 MHz) da AcF-2325-P5 na região de δ_C 67-85, em CDCl₃.

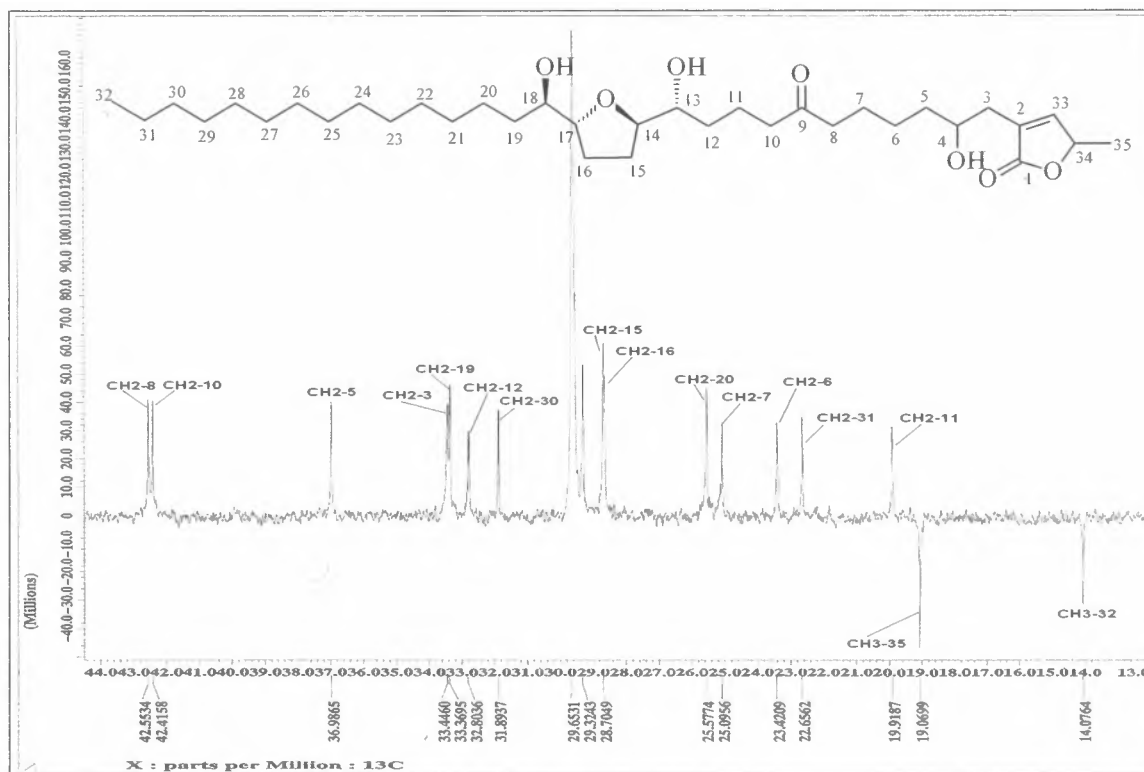


Figura 103. Expansão do espectro de RMN¹³C APT (100 MHz) da AcF-2325-P5 na região de δ_C 13-44, em CDCl₃.

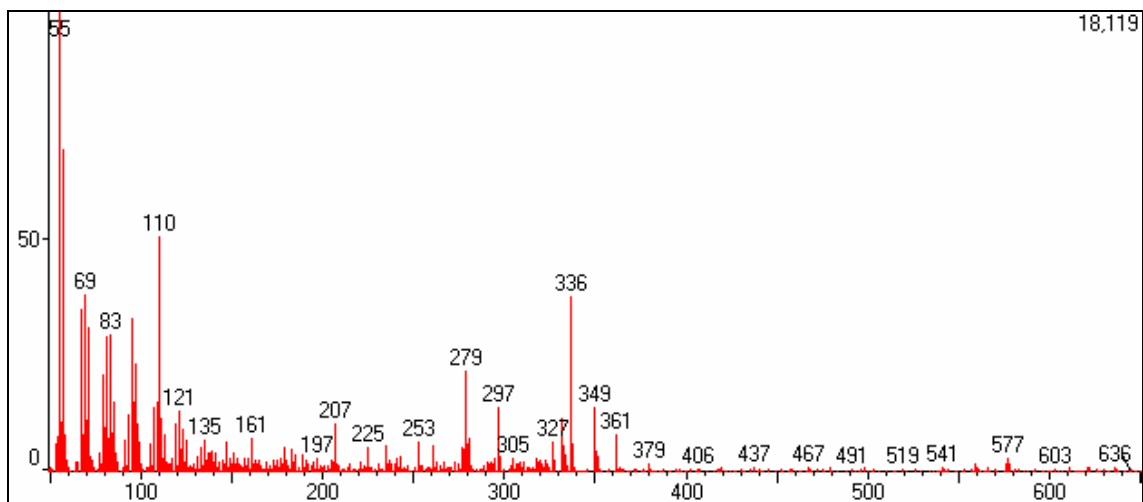
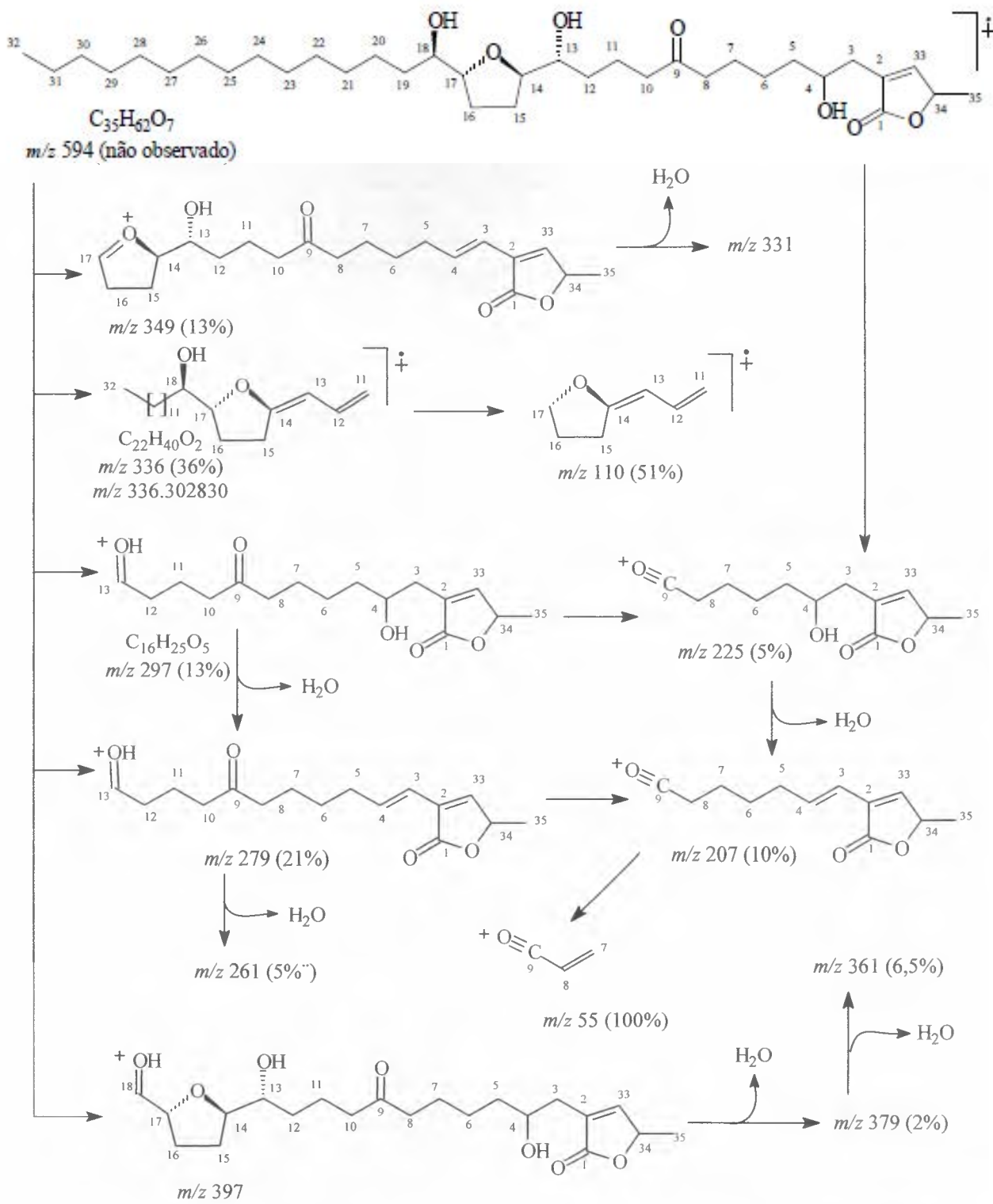
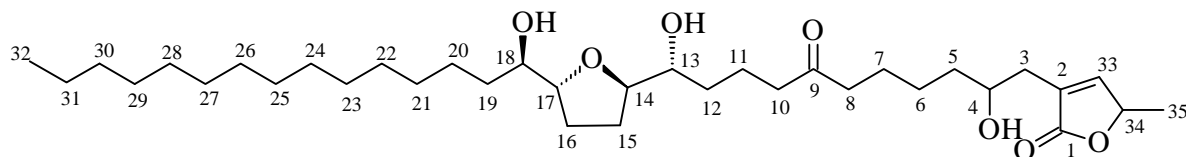


Figura 104. Espectro de massas de AcF-2325-P5 obtido através de ionização por impacto de elétrons.



Esquema 20. Proposta mecânica de fragmentação da AcF-2325-P5 no espectrômetro de massas operando por impacto eletrônico.

Tabela 23. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da AcF-2325-P5, incluindo se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e valores de constantes de acoplamento (J) em Hz*.



	AcF-2325-P5				AcF-2325-P3	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
1	174,61	-	-	2H-3; H-33	174,58	-
2	131,10	-	2H-3; H-33	H-34	131,04	-
9	211,16	-	2H-8; 2H-10	2H-7; 2H-11	211,31	-
CH						
4	69,65	3,84 (m)	2H-3	-	69,58	3,84 (m)
13	73,70	3,40 (m)	2H-12	H-11a; H-15b	-	-
14	82,73	3,82 (m)	2H-15	2H-16	-	-
15	-	-	-	-	74,04	3,40 (m)
16	-	-	-	-	82,66	3,80 (m)
17	82,36	3,82 (m)	2H-16	2H-15	-	-
18	74,17	3,40 (m)	2H-19	H-16b	-	-
19	-	-	-	-	82,58	3,80 (m)
20	-	-	-	-	73,89	3,40 (m)
33	151,91	7,20 (s)	H-34	2H-3; 3H-35	151,87	7,21 (s)
34	78,00	5,06 (dq)	H-33; 3H-35	-	77,96	5,08 (q, 7,0)
CH₂						
3	33,46	2,50 (m), 2,40 (m)	-	H-33	33,41	2,50-2,44 (m)
5	36,99	1,48	2H-6	H-3b	36,99	1,47
6	23,43	1,49	-	2H-8	25,13	1,60-1,30
7	25,11	1,48	2H-8	-	23,65	1,58 (qd; 7,3)
8	42,57	2,43 (t, 7,7)	2H-7	-	42,63	2,42 (t; 6,6)
10	42,43	2,43 (t, 7,7)	2H-11	-	42,49	2,40 (t; 6,9)
11	19,93	1,80 (m), 1,70 (m)	2H-10; 2H-12	H-13	23,46	1,58 (qd; 7,3)
12	32,82	1,39	2H-11	2H-10	29,67-29,29	1,25 (m)
13	-	-	-	-	25,25	1,60-1,30
14	-	-	-	-	33,31	1,38 (m)
15	28,72	1,98 (m)- 1,66 (m)	-	-	-	-

Continua na próxima página

Continuação da tabela 23.

16	28,71	1,98 (m)- 1,66 (m)	-	-	-	-
17	-	-	-	-	28,71	1,98-1,66 (m)
18	-	-	-	-	28,71	1,98-1,66 (m)
19	33,38	1,37	-	-	-	-
20	25,59	1,45, 1,36	2H-19	H-18	-	-
21	29,67-29,33	1,30-1,20			33,13	1,38 (m)
22	29,67-29,33	1,30-1,20			25,54	1,60 -1,30
23- 29	29,67-29,33	1,30-1,20			29,67- 29,29	1,25 (m)
30	31,91	1,25		3H-32	31,86	1,25 (m)
31	22,67	1,25	2H-30;3H-32		22,62	1,25 (m)
CH₃						
32	14,09	0,88 (t, 6,6)	2H-31	2H-30	14,05	0,87 (t; 6,6)
35	19,08	1,43 (d, 7,4)	H-34		19,04	1,43 (d; 7,0)

*O espectro 2D ¹H-¹H-COSY também foi usado nesta interpretação de resultados experimentais.

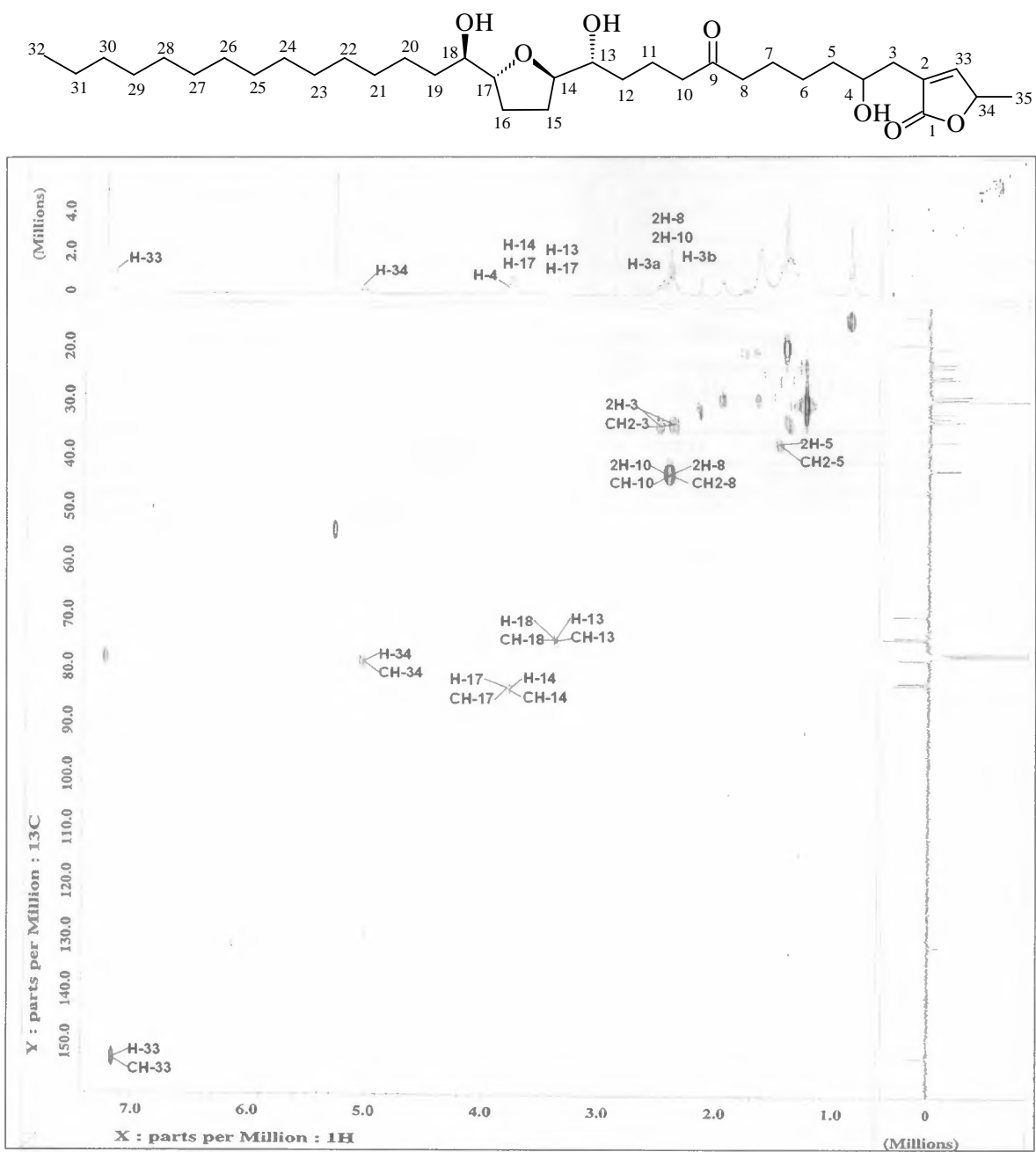


Figura 105. Mapa de correlações HMQC da AcF-2325-P5, em CDCl_3 .

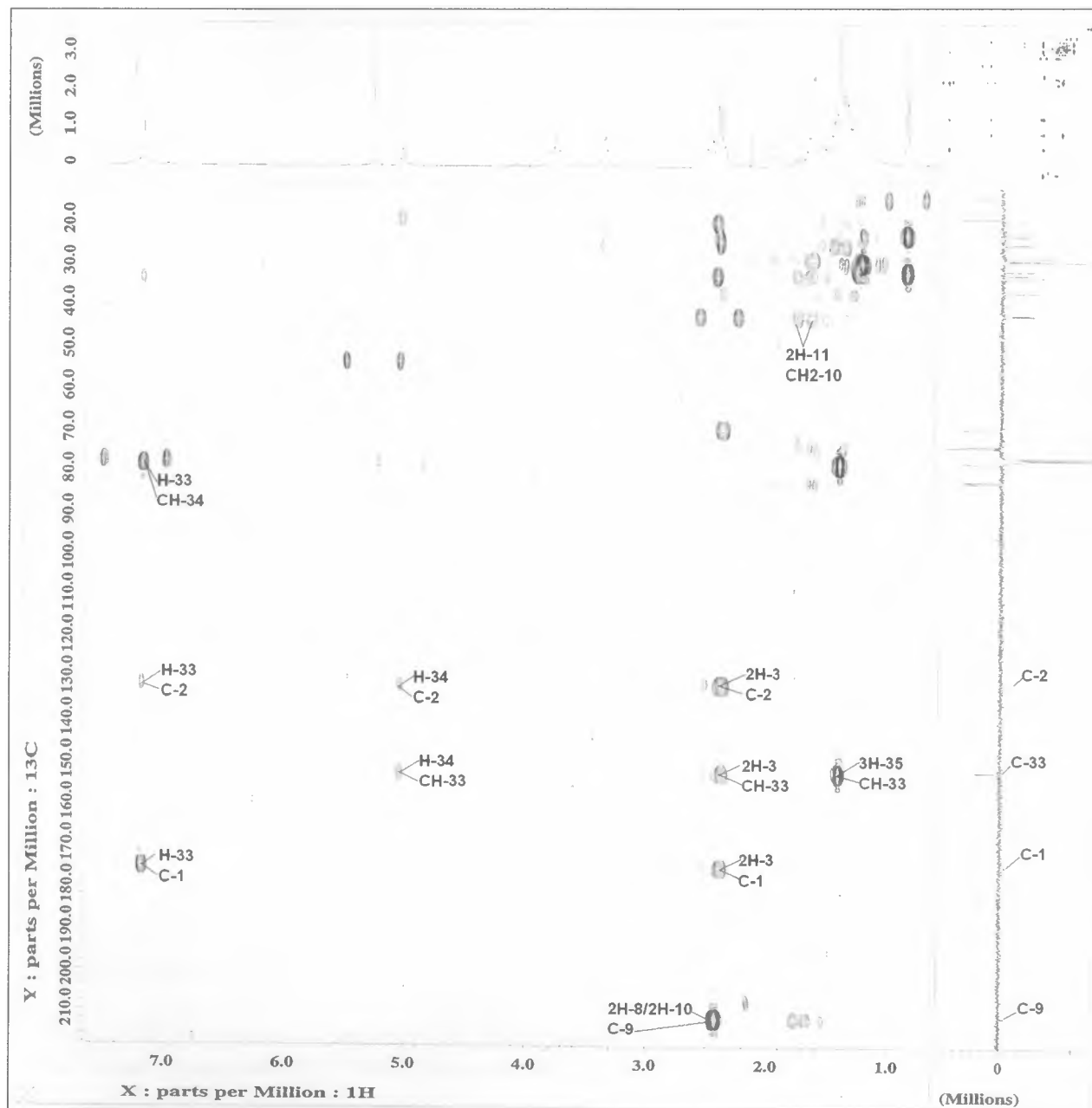
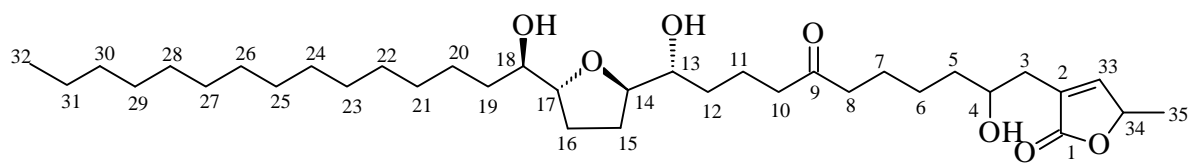


Figura 106. Mapa de correlações HMBC da AcF-2325-P5, em CDCl_3 .

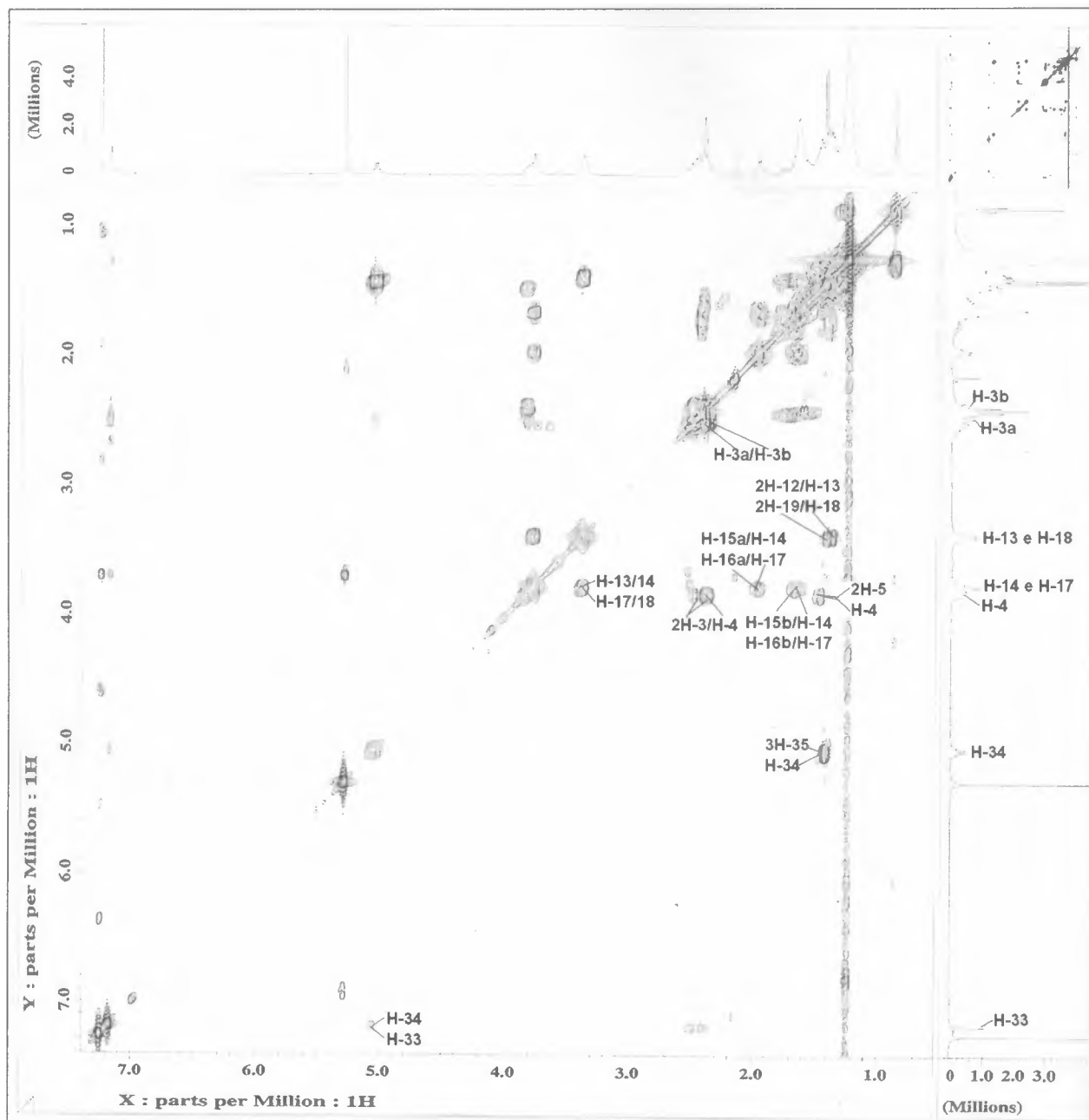
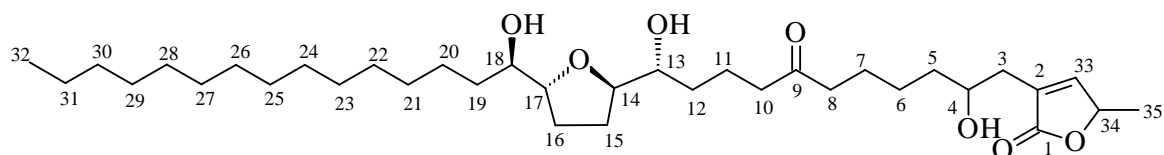


Figura 107. Mapa de correlações COSY da AcF-232P5, em CDCl_3 .

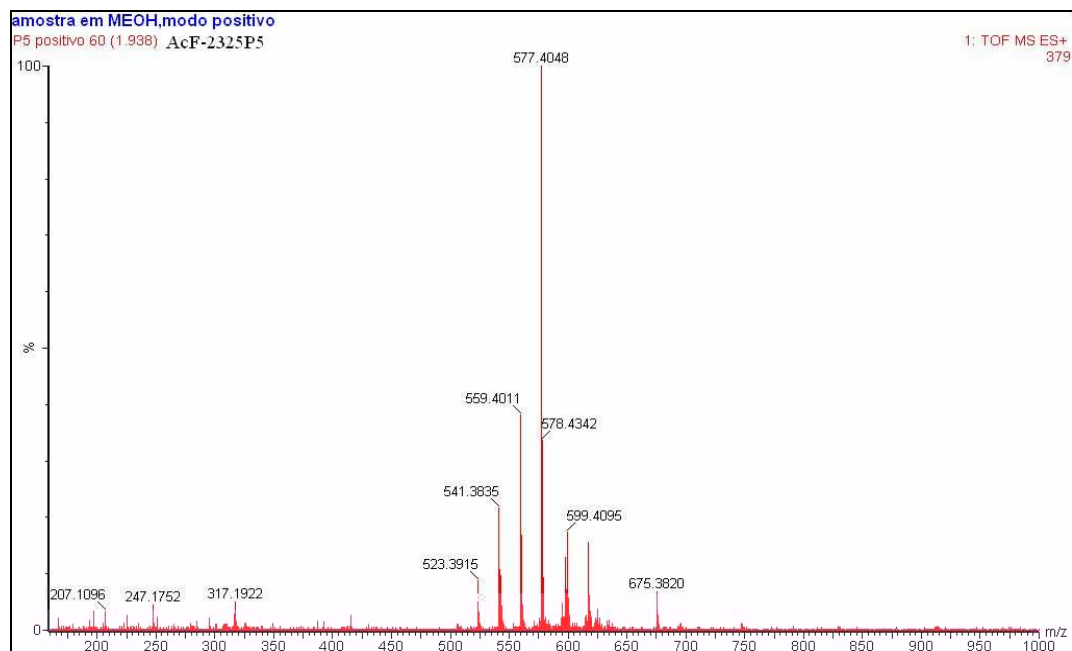
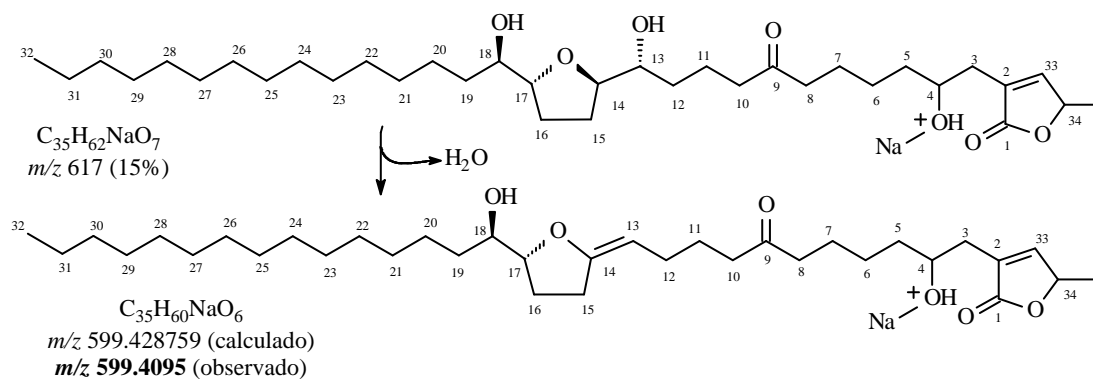


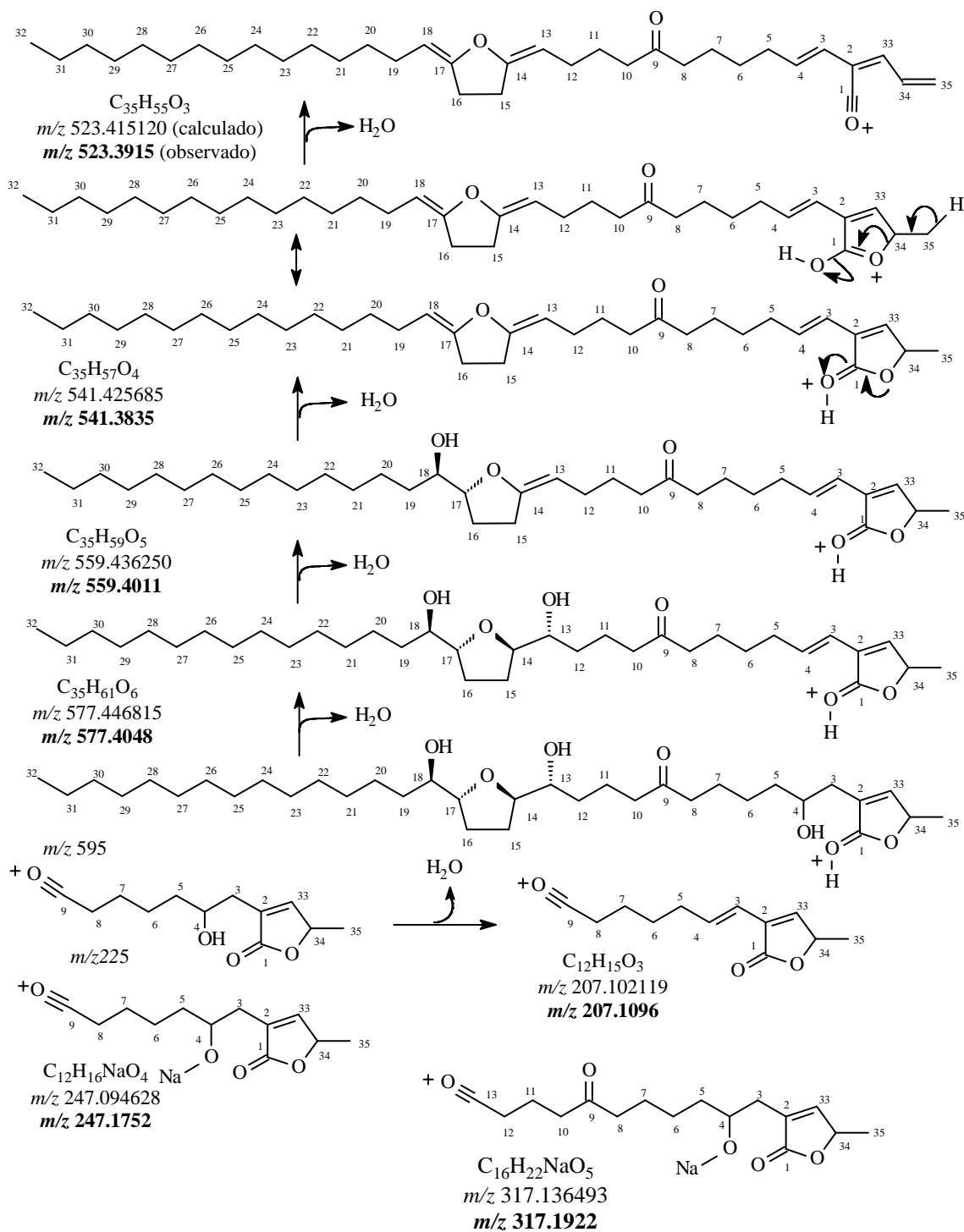
Figura 108. Espectro de massas de alta resolução da AcF-2325-P5, obtido através de ionização por eletrospray.



Esquema 21. Proposta mecanística de fragmentação postuladas para justificar as perdas de moléculas de água da AcF-2325-P5 no espectrômetro de massa (EM-ES).

Continua na próxima página

Continuação Esquema 21.



6.8.3 Caracterização estrutural das substâncias, *cis*-Rbrazilinona-A (AcF-0214A) e *trans*-Rbrazilinona-B (AcF-0214B)

A mistura isomérica (AcF-0214) constituída das acetogeninas, AcF-0214A (2,4-*cis*) e AcF-0214B (2,4-*trans*) (Tabela 24, p. 141) foi isolada como uma graxa branca amorfa. Este sólido não reagiu em CCD com o reagente de Kedde, sugerindo a ausência de sistema γ -lactona α,β -insaturada (RUPPRECHT *et al.*, 1990), e mostrou-se transparente quando submetido à revelação usando radiação UV na faixa de 254-366 nm, também em acordo com a ausência de tal cromóforo. O resultado $[\alpha]_D = +9$ ($c = 0,20600$ g/100 mL; CHCl_3) é indicativo da presença de carbono assimétrico na molécula (SOLOMONS & FRYHLE, 2006).

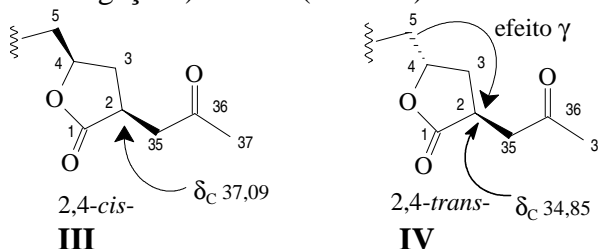
O espectro na região do infravermelho (Figura 109, p. 142) mostrou absorções em ν_{\max} 3419 e 1070 cm^{-1} , correspondentes respectivamente a estiramentos de ligações O-H de álcool e C-O; em ν_{\max} 2920 e 2850 de estiramento simétrico e assimétrico de CH_2 e/ou CH_3 ; em ν_{\max} 1467 e 1409 cm^{-1} de deformação angular de grupos CH_3 e CH_2 alifáticos e em ν_{\max} 1747 cm^{-1} e 1714 cm^{-1} correspondentes a estiramentos C=O de duas carbonilas distintas, sugerindo a presença de carbonilas δ -lactônica (ν_{\max} 1747 cm^{-1}) e cetônica (ν_{\max} 1714 cm^{-1}).

O espectro de massas da AcF-0214 obtido através de ionização por eletrospray (Figura 110, p. 142) revelou o pico correspondente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 647 ($[\text{M} + 23]$), permitindo deduzir massa molecular m/z 624 (GU, *et al.*, 1997) e, conseqüentemente, a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{O}_7$ para as duas acetogeninas. Esta fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{O}_7$ revela-se com menos oito átomos hidrogênio ($\text{C}_{37}\text{H}_{76}\text{O}_7 - \text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{O}_7 = \text{H}_8$) e, assim, deficiência igual a quatro.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C da AcF-0214 (Figura 111, p. 143; Tabela 24, p. 141), revelou a presença de pares de sinais com deslocamentos químicos em: δ_{C} 178,78 e 179,32 (C-1); 37,09 e 34,85 (C-2); 79,28 e 79,70 (C-4); 44,40 e 44,59 (C-35); δ 206,11 e 206,05 (C-36) e 30,35 e 30,41 (37), cuja as atribuições foram feitas por comparação com dados da literatura (ALALI *et al.*, 1999).

O espectro de RMN ^1H (Figura 112, p. 143) revelou sinais em δ_{H} 4,42 e 4,57 (m, H-4); 3,01 e 3,04 (m, H-2); 2,02 e 1,98 (m, H-3a e H-3b); 3,05 e 2,73 (m, H-35a e 35b) e um sinpleto em δ_{H} 2,21 (3H-37) atribuído a grupo metil α à carbonila. Estes dados são característicos para a presença de duas unidades cetolactona α,β -saturada (2,4-*cis* e 2,4-*trans*) (Tabela 20, p. 112).

Os espectros HMQC da AcF-0214 (Figuras 113, 114, p. 144 e 115, p. 145) foram usados para confirmar as correlações entre carbonos e hidrogênios das subunidades γ -lactonas. Observa-se que para o isômero *cis* C-2 absorve em δ_{C} 37,09 e o *trans* em δ_{C} 34,85. A blindagem de $\Delta_{\text{C}} = 3,14$ ppm observada no isômero *trans* em relação ao *cis* pode ser atribuída ao efeito de proteção gama (γ , envolvendo três ligações) do C-5 (III e IV).



A comparação destes dados com os valores correspondentes descritos na literatura para a mistura isomérica de 2,4-*cis*- e 2,4-*trans*-xylomatinona (Tabela 20) permitiu assegurar que a

mistura AcF-0214 está constituída de duas subunidades γ -lactona α,β -saturada (2,4-*cis*- e 2,4-*trans*).

A presença de um sistema mono-tetraidrofurânico α,α' -diidroxilado foi sugerida pelos sinais de carbonos metínicos em δ_C 74,60 (CH-13), 82,16 (CH-14), 82,02 (CH-17) e 74,48 (CH-18) observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 111, p. 143).

No espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° da AcF-0214 (Figuras 116, p. 145 e 117, p. 146) observou-se um sinal adicional de carbono metínico oxigenado em δ_C 71,94 (CH-9), indicando a presença de uma terceira hidroxila. O espectro HMQC (Figuras 113, 114, p. 144 e 115, p. 145) revelou a correlação dos sinais em δ_C 71,94 (CH-9) com H-9 em δ_H 3,65-3,55 (m).

O espectro COSY da AcF-0214 (Figuras 118 e 119, p. 146 e 147) mostrou correlações correspondentes às interações spin-spin homonucleares dos átomos de hidrogênio: a) H-2 (δ_H 3,10 e 3,08, m) com 2H-35 (δ_H 3,05 e 2,73, m) e 2H-3 (δ_H 2,02-1,98, m); b) H-4 (δ_H 4,57 e 4,42, m) com 2H-3 (δ_H 2,02-1,98, m) e 2H-5 (δ_H 1,70-1,60, m); H-9 (δ_H 3,65-3,55, m) com hidrogênios na região alifática (δ_H 1,50-1,20, m), permitindo propor que este átomo de hidrogênio não se encontra próximo ao anel mono-tetraidrofurânico α,α' -dihidroxilado. Os sinais dos hidrogênios próximos ao anel THF revelaram também as esperadas correlações: a) H-13 (δ_H 3,45-3,40, m) acoplado com H-14 (δ_H 3,85-3,70, m) e com 2H-12 (δ_H 1,65-1,55, m); b) H-14 (δ_H 3,85-3,70, m) com 2H-15 (δ_H 2,02-1,98/1,61-1,50, m). Esta análise foi facilitada através de confirmações obtidas pela análise dos espectros HMBC (Figura 120, p. 147) e NOESY (Figura 121, p. 148).

A análise das áreas integradas dos sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio H-4 no isômero 2,4-*cis*- (δ_H 4,42, m) e no 2,4-*trans*- (δ_H 4,57, m) no espectro de RMN 1H (Figura 112, p. 139) tornou possível deduzir as porcentagens aproximadas dos isômeros 2,4-*cis*- (24,9%) e 2,4-*trans*- (75,1%) na mistura AcF-0214.

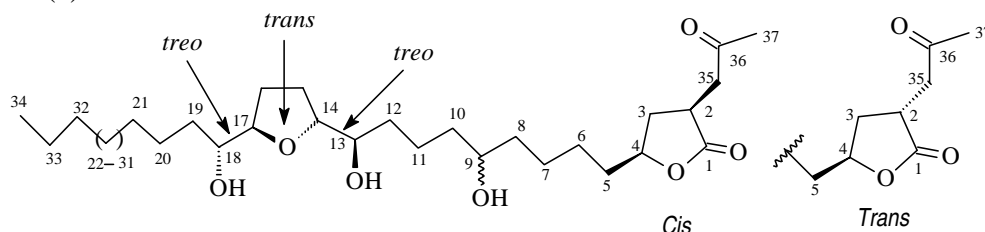
No espectro de massas AcF-0214 obtido através da ionização por impacto de elétrons (EM-IE) (Figura 122, p. 148; Esquema 22, p. 149) observou-se a presença de picos significativos em m/z 325 e m/z 299, que foram atribuídos aos fragmentos iônicos oriundos de clivagem entre C-13 e C-14, m/z 399 (clivagens entre C-18 e C-19), m/z 225 e 369 (clivagem entre C-18 e C-17), 227 (clivagens entre C-9 e C-10) e em m/z 169 provavelmente correspondente ao fragmento formado através de rearranjo de McLafferty. Tais íons fragmentários e os dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C permitiram postular a presença de grupo hidroxila no átomo de carbono CH-9 (δ_C 71,94 e δ_H 3,55-3,65), localizado na cadeia alifática entre a unidade cetolactona e o anel THF e não nas proximidades do anel heterocíclico. Esta observação revela-se importante porque um anel THF α,α' -dihidroxilado em configuração *eritro* tem deslocamento químico entre δ_C 71 e 72 (Tabela 18, p. 111) e os respectivos hidrogênios entre δ_H 3,84 e 3,87 (Tabela 17, p. 110).

A comparação dos dados de RMN da AcF-0214 com os valores descritos na literatura para produtos naturais e modelos sintéticos (BORN *et al.*, 1990; FUGIMOTO *et al.*, 1994, *apud* CAVE *et al.*, 1997) permitiu sugerir que os carbonos C-13, C-14; C-17 e C-18 dos componentes da mistura AcF-0214 têm configurações relativas *treo/trans/treo*.

Os dados do espectro de massas de AcF-0214 foram também comparados com os correspondentes da mistura 2,4-*cis*- e 2,4-*trans*-xylomaticinona (Esquema 23, p. 150), que contém uma hidroxila localizada no átomo de carbono CH-10 e o anel THF em C-16, enquanto, na AcF-0214 (Esquema 22, p. 149) a hidroxila adicional encontra-se localizada em CH-9 e um anel THF em C-14. Tal comparação permitiu concluir que AcF-0214 está constituída por uma mistura de dois novos isômeros 2,4-*cis*- e 2,4-*trans* ainda não descritos na literatura. Estas novas acetogeninas de Annonaceae também estão sendo descritas pela primeira vez na espécie *A.*

cacans e foram denominadas de Rbrazilinona A (AcF-0214A) e Rbrazilinona B (AcF-0214B) em homenagem ao Professor Raimundo Braz-Filho.

Tabela 24. Dados de RMN ^1H (500 MHz), e ^{13}C (125 MHz) da mistura AcF-0214 (Rbrazilinonas A e B), em CDCl_3 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz*.



	HMQC				HMBC	
	<i>Cis</i> δ_{C}	<i>Trans</i> δ_{C}	<i>Cis</i> δ_{H}	<i>Trans</i> δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
C						
1	178,78	179,32				2H-35; 2H-3
36	206,11	206,05			2H-35; 3H-37	
CH						
2	37,09	34,85	3,08	3,04	2H-3; 2H-35	
4	79,72	79,28	4,42 (m)	4,57 (m)	H-3b	
9	71,94		3,55-3,65			
13	74,60 ^a		3,45-3,40			
14	83,02 ^b		3,83-3,70			2H-15
17	83,16 ^b		3,83-3,70		2H-16	2H-15; H-14
18	74,48 ^a		3,45-3,40			2H-16
CH₂						
3	33,65	33,76	2,02-1,98			2H-35
5	35,84	35,81	1,70-1,60			
6	25,79-25,99		1,60-1,30			
7-8	30,13-29,73		1,50-1,20			
10	33,59-33,44		1,50-1,20			
11	21,99-22,51		1,60-1,30			H-13
12	33,59-33,44		1,65-1,55		H-13	H-14
15	29,24		2,02-1,98/1,61-1,50		H-14	H-13
16	29,21		2,02-1,98/1,61-1,50		H-17	H-18
19	33,59-33,44		1,65-1,55		H-18	H-17
20	25,79-25,99		1,50-1,20			
21-31	30,13-29,73		1,50-1,20			
32	32,32		1,65-1,55			
33	23,09		1,28		3H-34	3H-34
35	44,40	44,59	3,05	2,73	H-2	H-3b; 3H-37
CH₃						
34	14,53		0,89 (t, 7,0 Hz)			
37	30,35	30,41	2,21 (s)			

*A presença do isômero *trans* em AcF-0214 é a maior percentagem. Valores de deslocamentos químicos inter-cambiáveis (^a, ^b). O número de átomos de hidrogênio ligado a cada átomo de carbono foi deduzido pela comparação dos espectros de RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ e RMN ^{13}C -DEPT-135°. Os espectros COSY e NOESY foram utilizados.

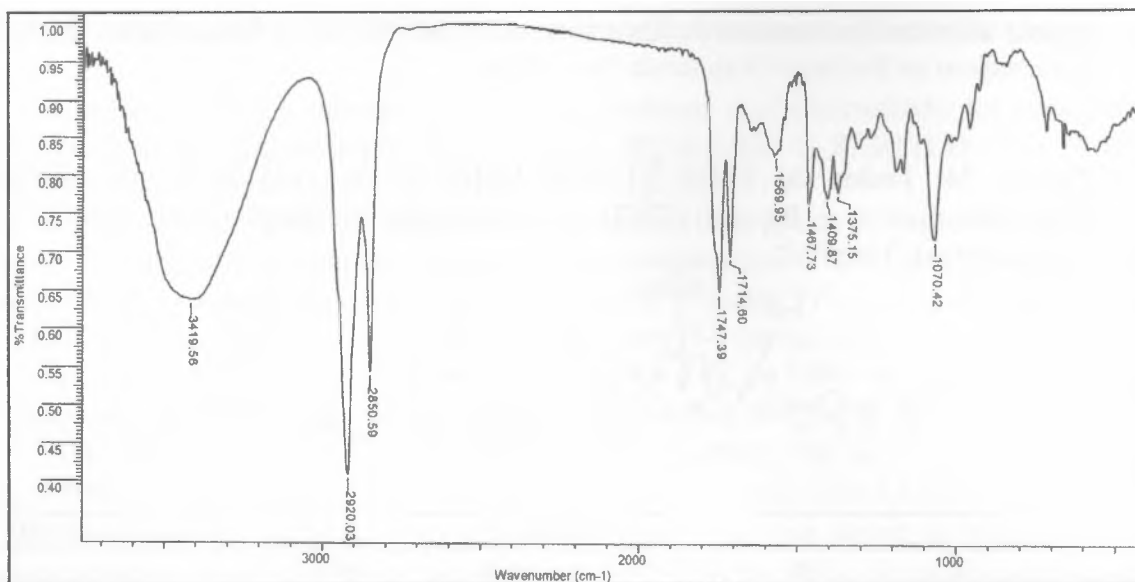


Figura 109. Espectro na região do infravermelho da AcF-0214, obtido em KBr

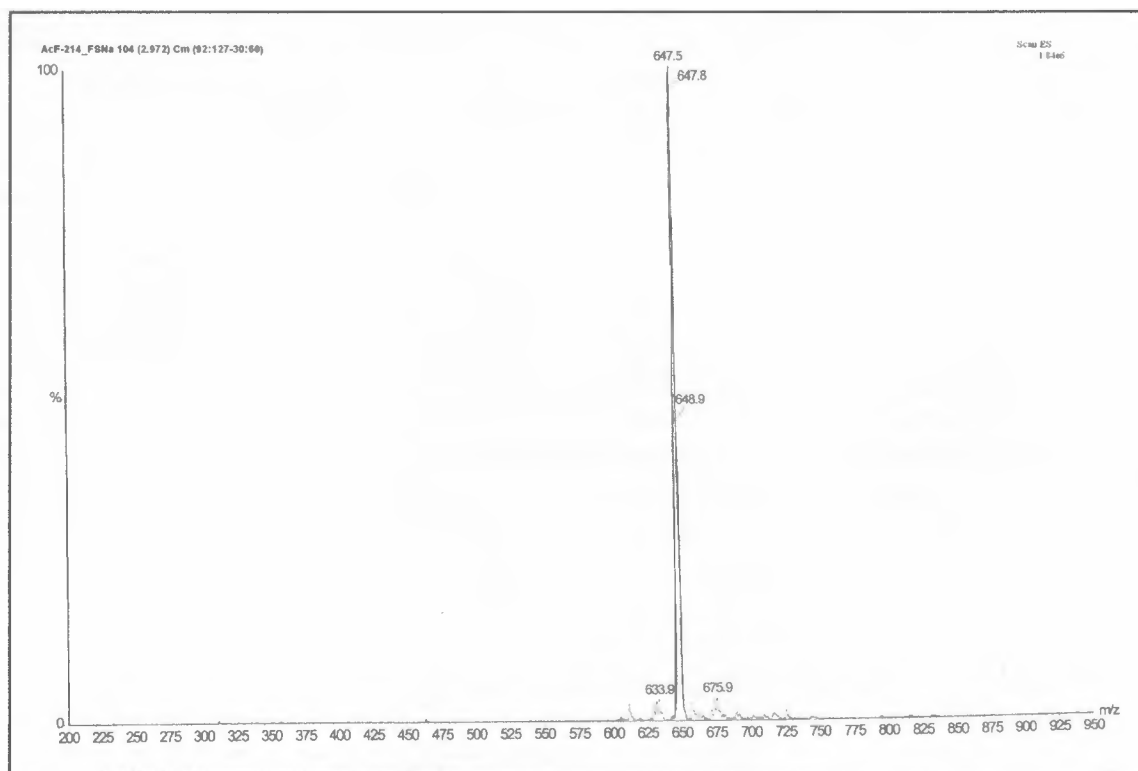


Figura 110. Espectro de massa da AcF-0214 obtido através de ionização por eletrospray.

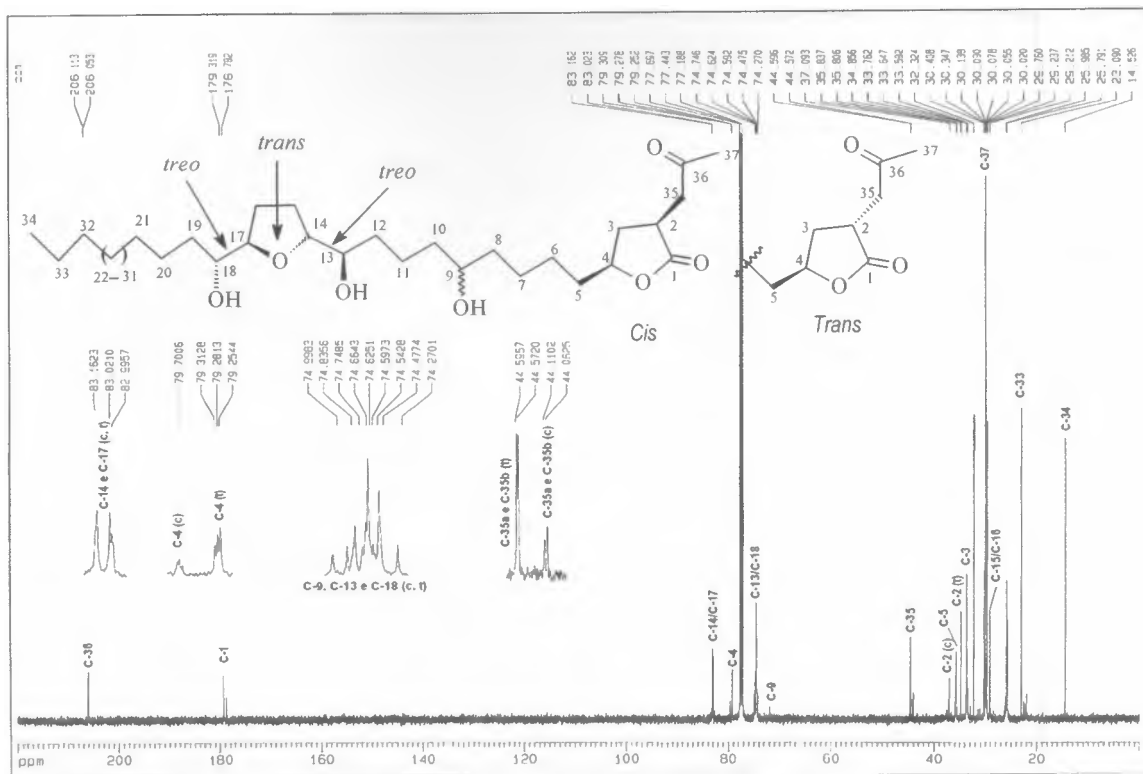


Figura 111. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da AcF-0214, em CDCl_3 .

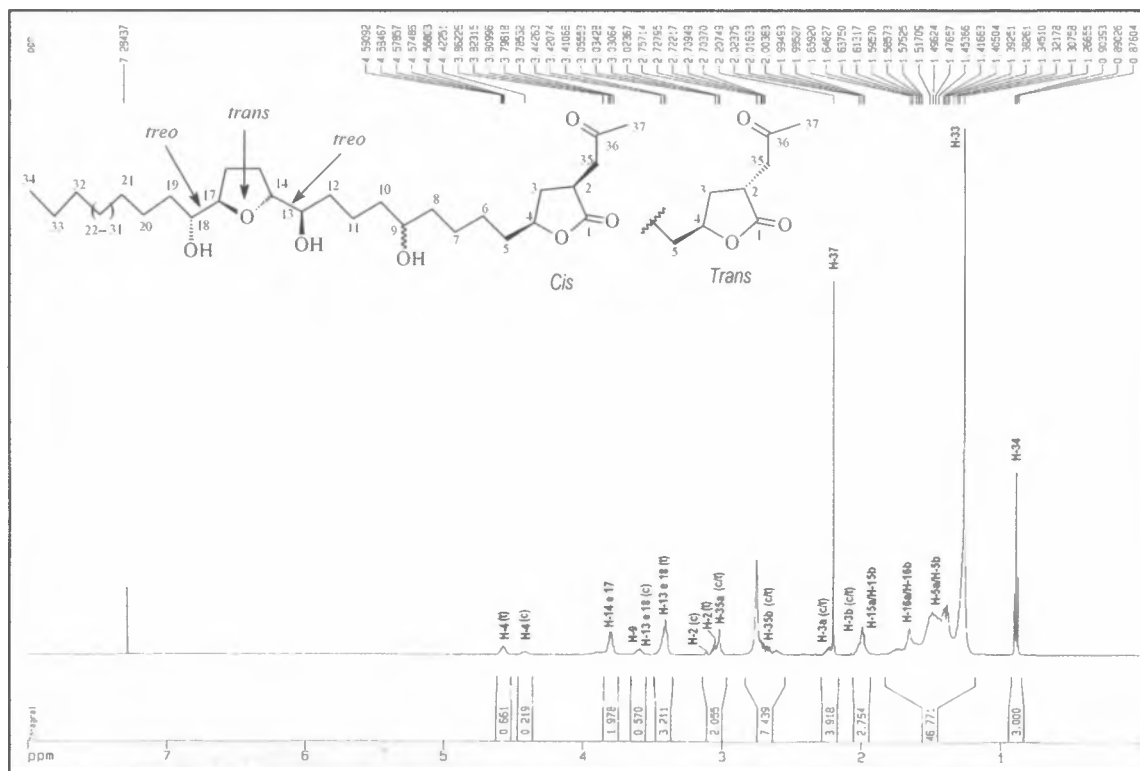


Figura 112. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da AcF-0214, em CDCl_3 .

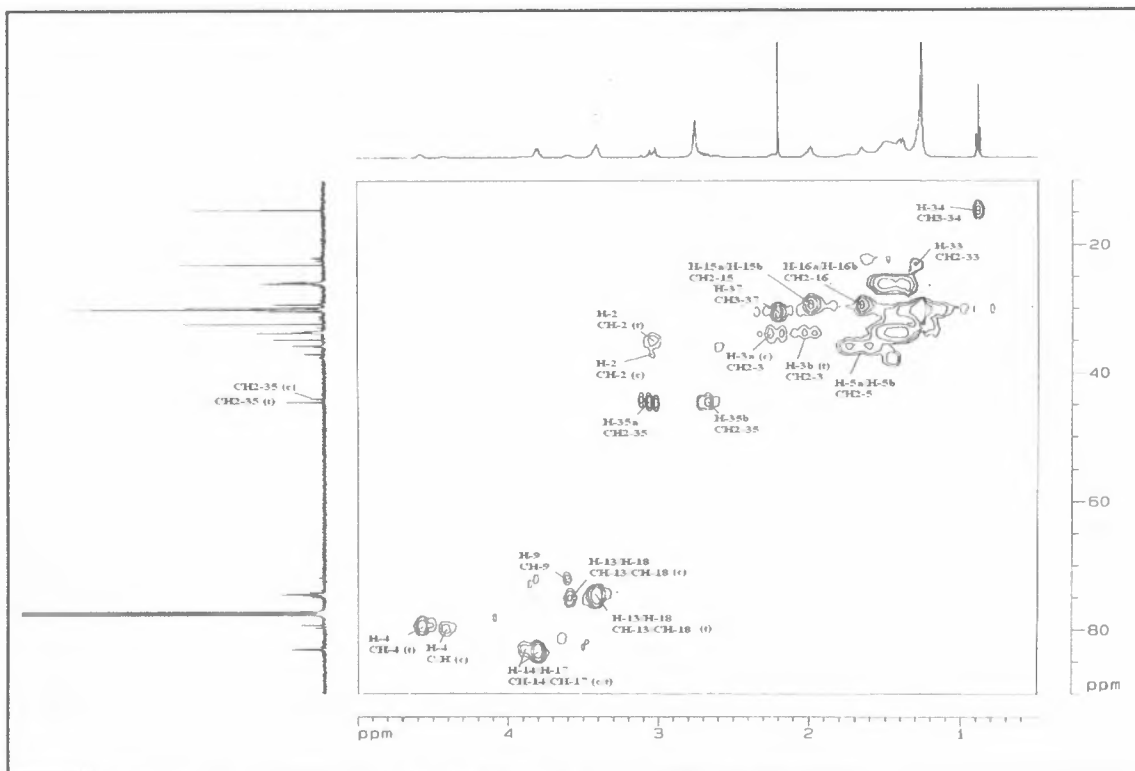


Figura 113. Mapa de correlações HMQC da AcF-0214, em CDCl_3 .

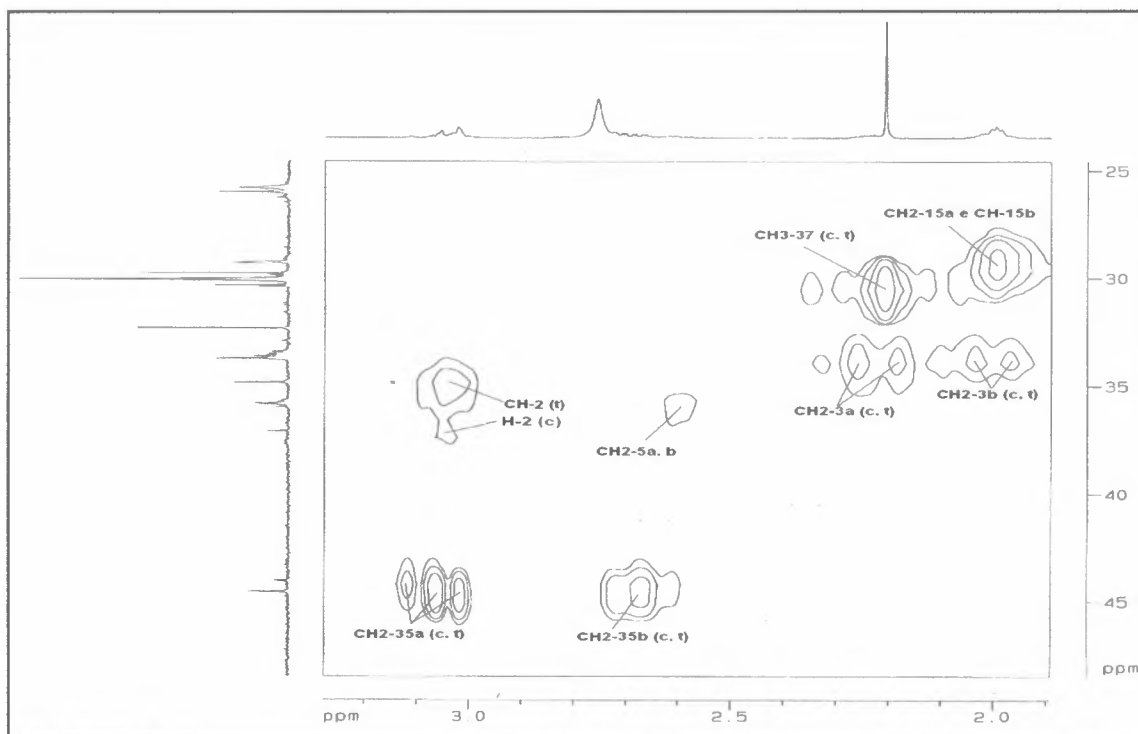


Figura 114. Expansão do mapa de correlações HMQC da AcF-0214 na região de δ_c 25 a 45, em CDCl_3 .

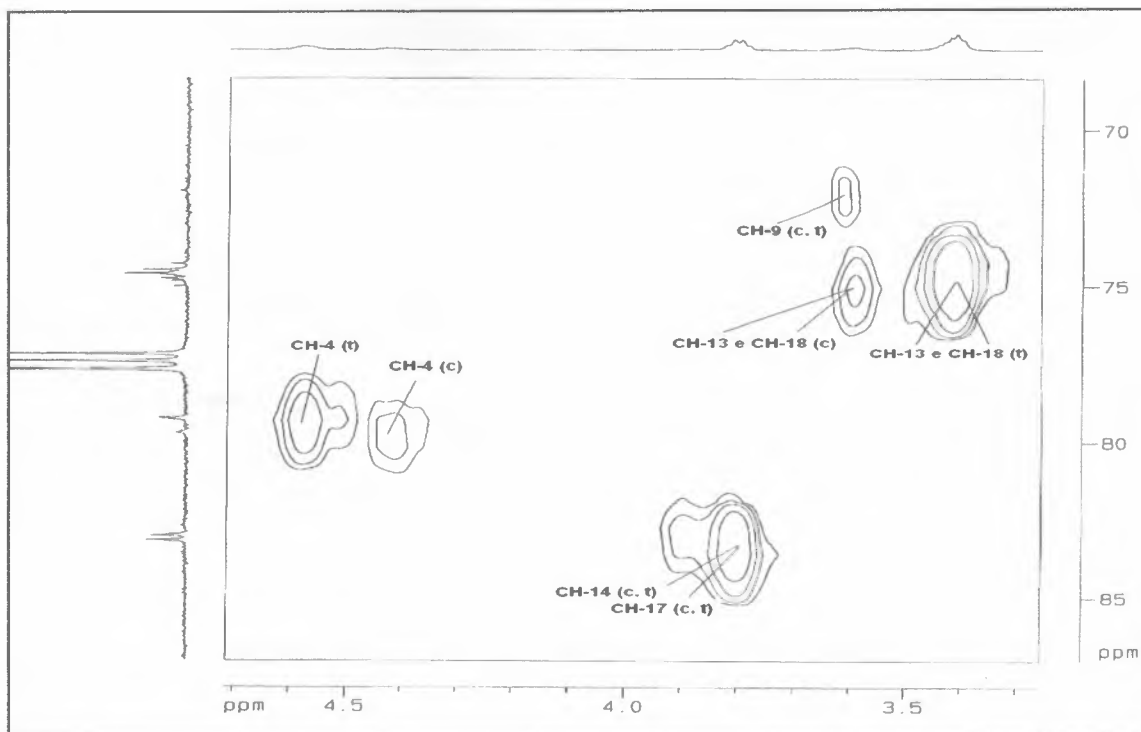


Figura 115. Expansão do mapa de correlações HMQC da AcF-0214 na região de δ_C 70 a 85, em $CDCl_3$.

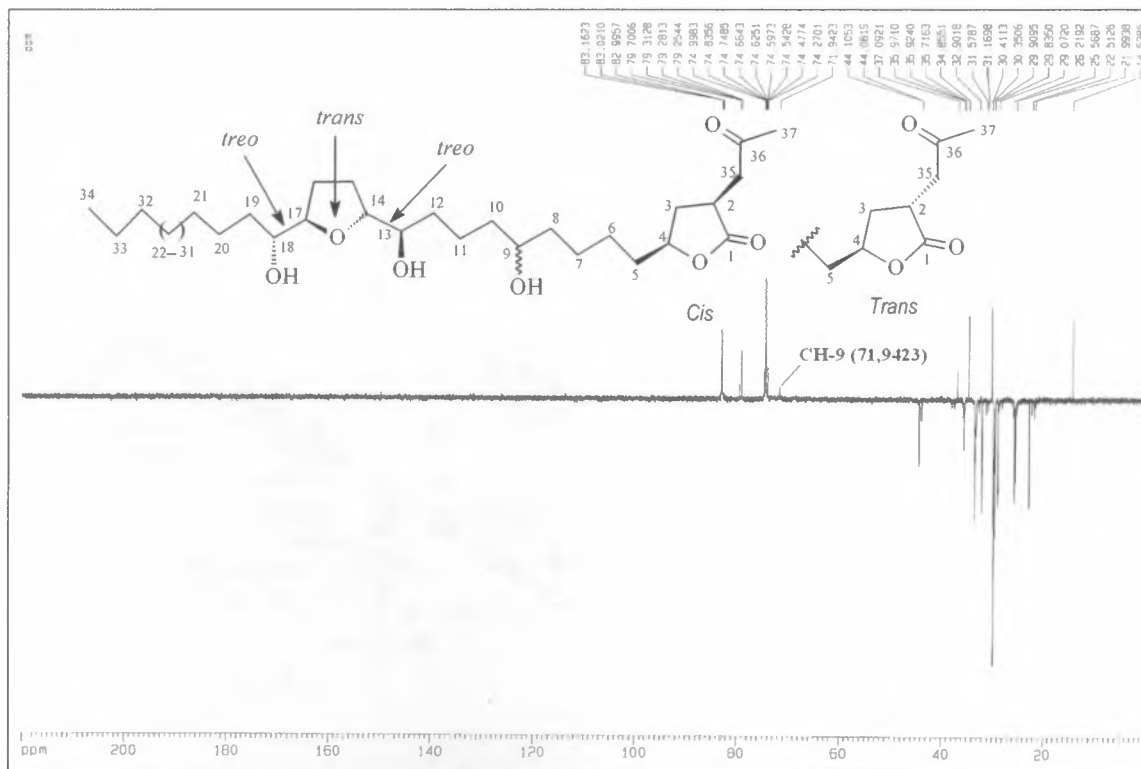


Figura 116. Espectro de DEPT 135° (125 MHz) da AcF-0214, em $CDCl_3$.

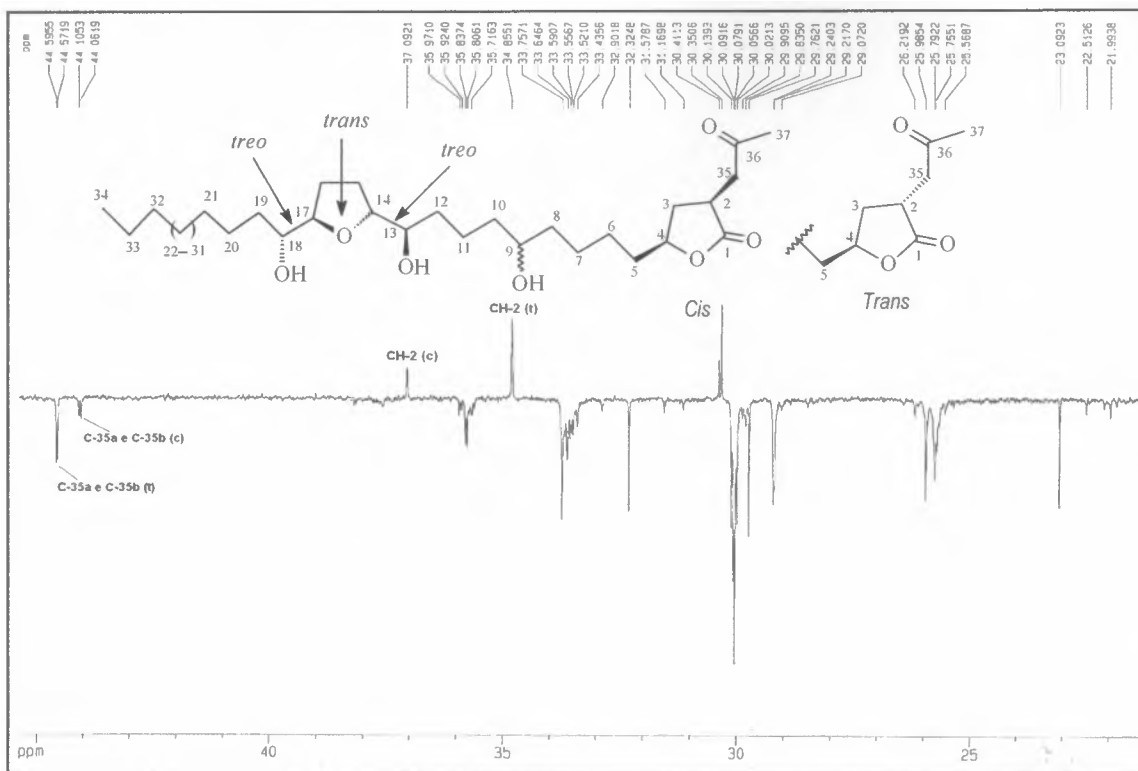


Figura 117. Expansão do espectro de DEPT 135° (125 MHz) da AcF-0214 na região de δ_C 20 a 50, em $CDCl_3$.

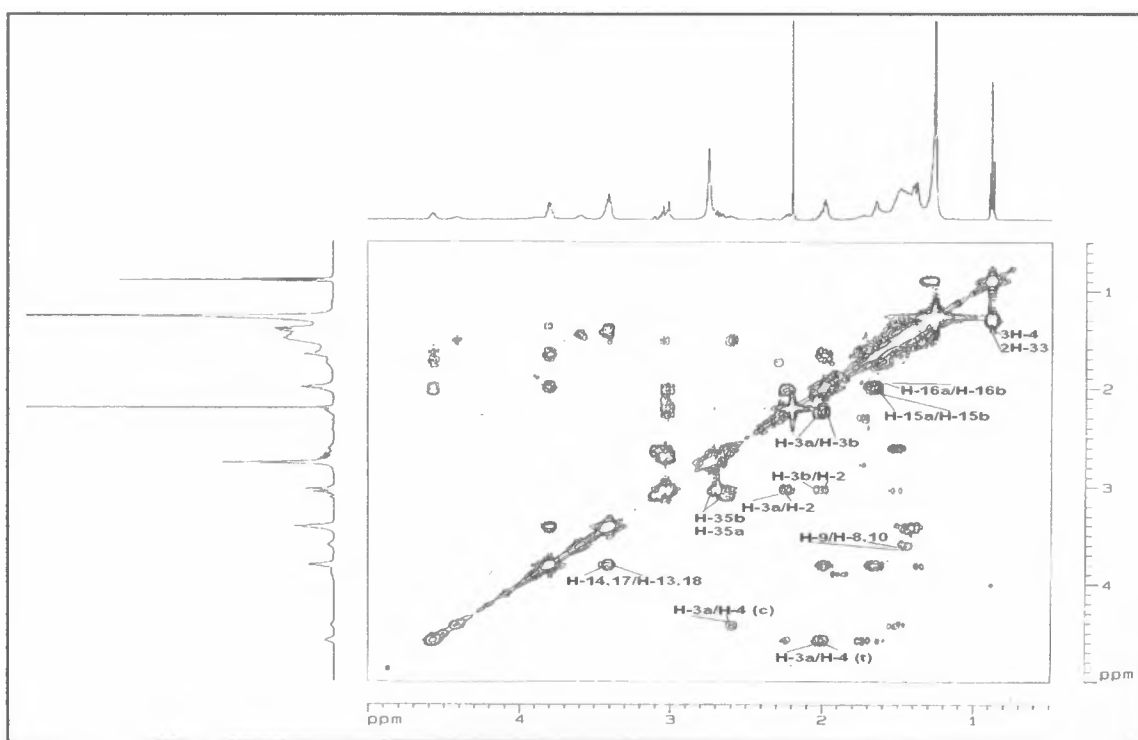


Figura 118. Mapa de correlações COSY da AcF-0214, em $CDCl_3$.

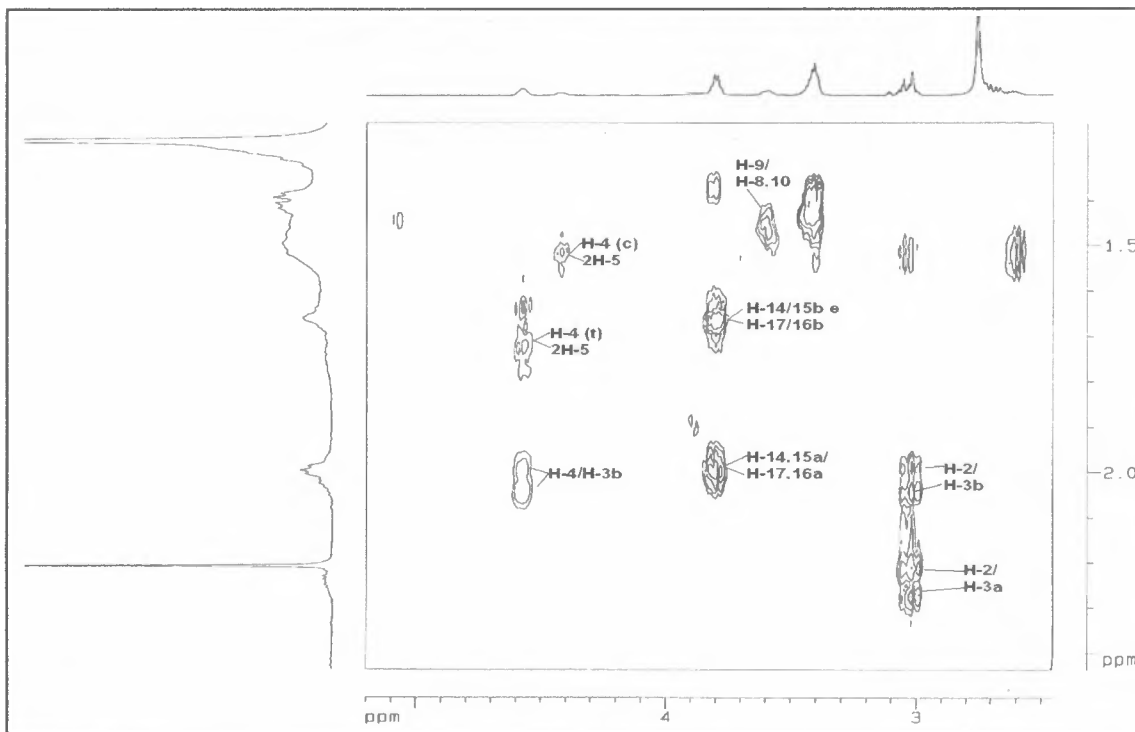


Figura 119. Expansão do mapa de correlações COSY da AcF-0214 na região de δ_H 1,3 a 2,4, em $CDCl_3$.



Figura 120. Mapa de correlações HMBC da AcF-0214, em $CDCl_3$.

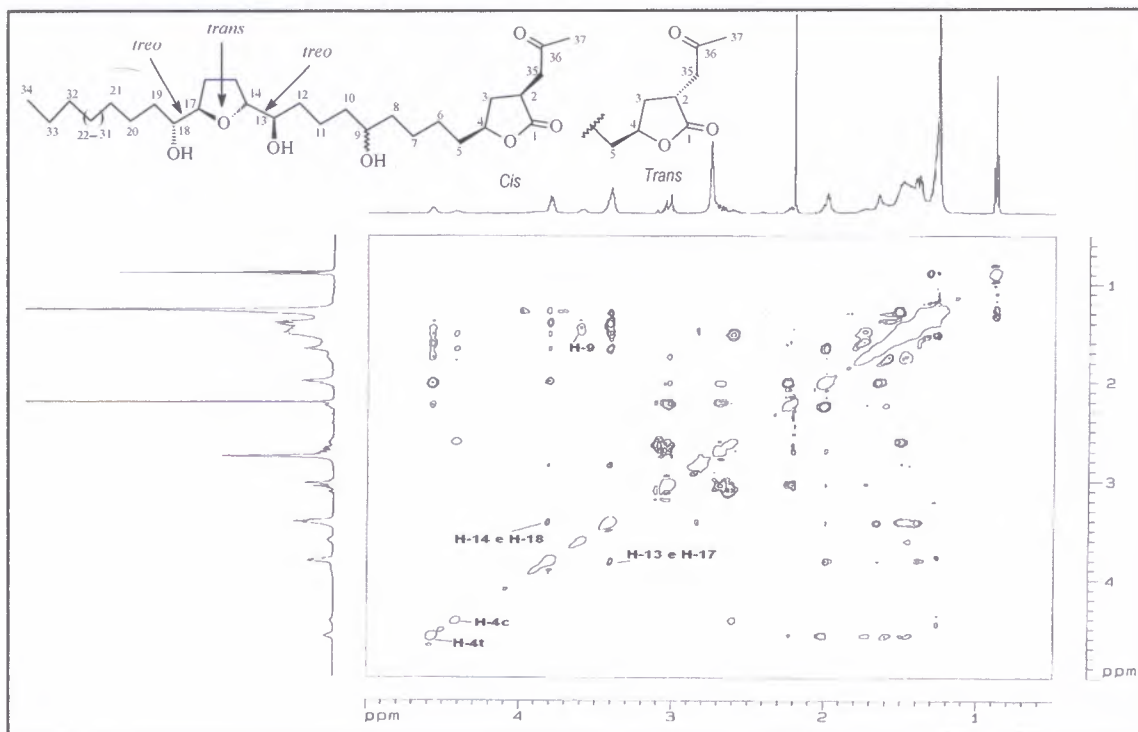


Figura 121. Mapa de correlações NOESY da AcF-0214, em CDCl_3 .

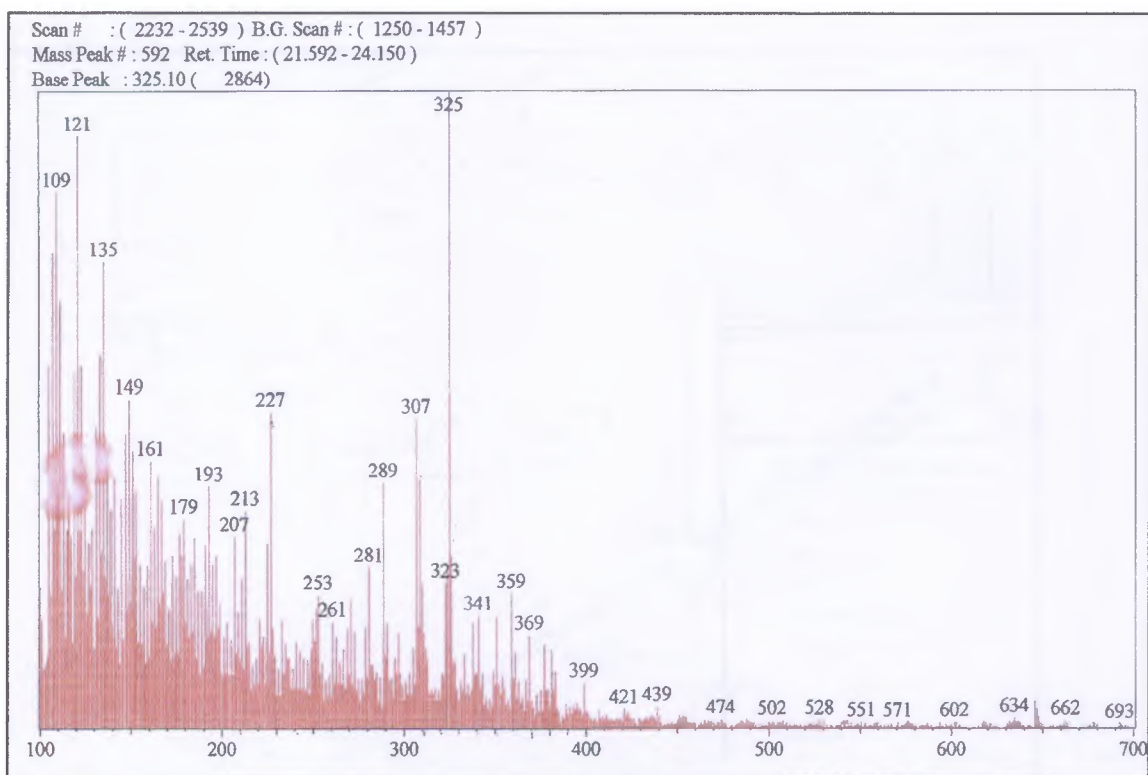
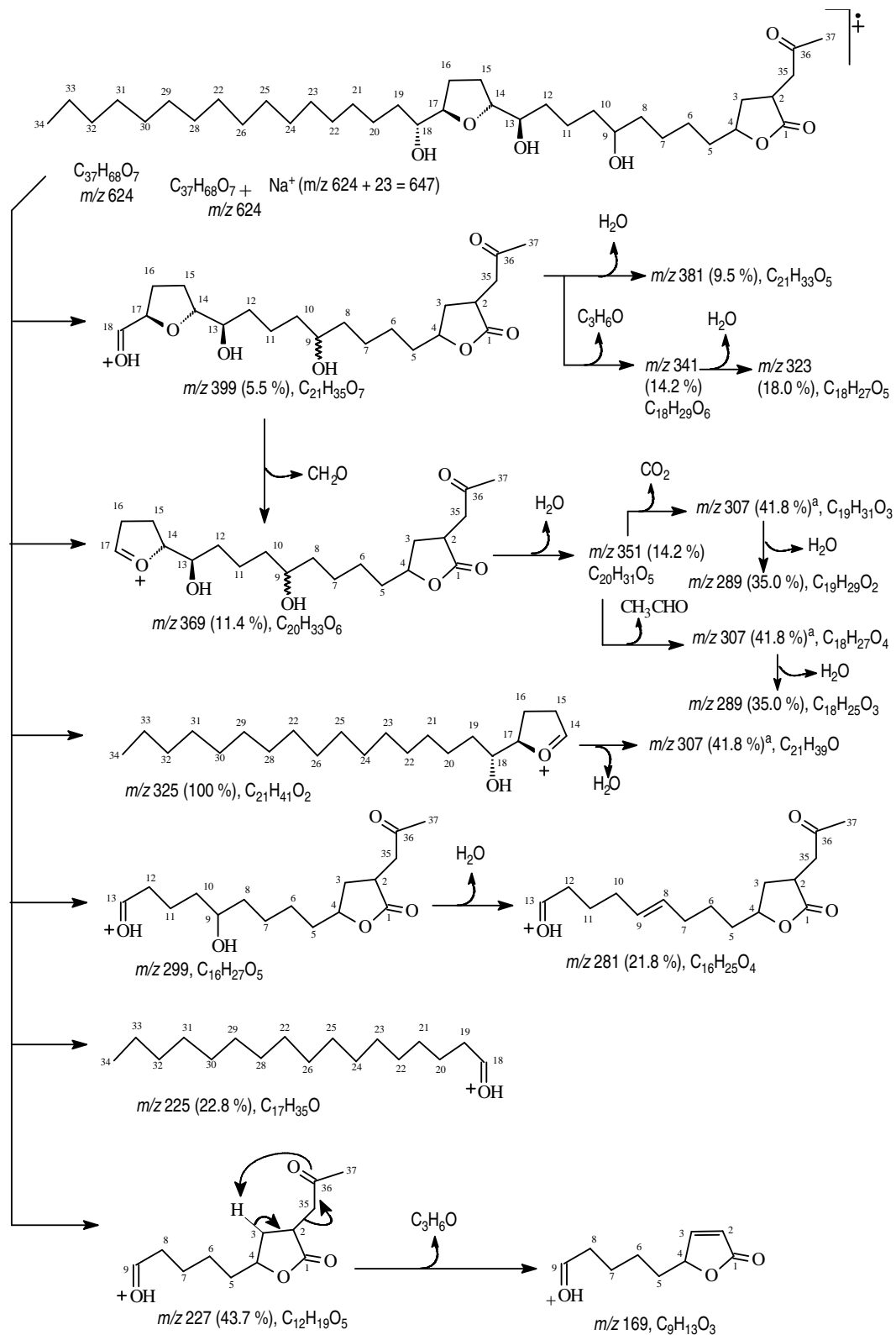
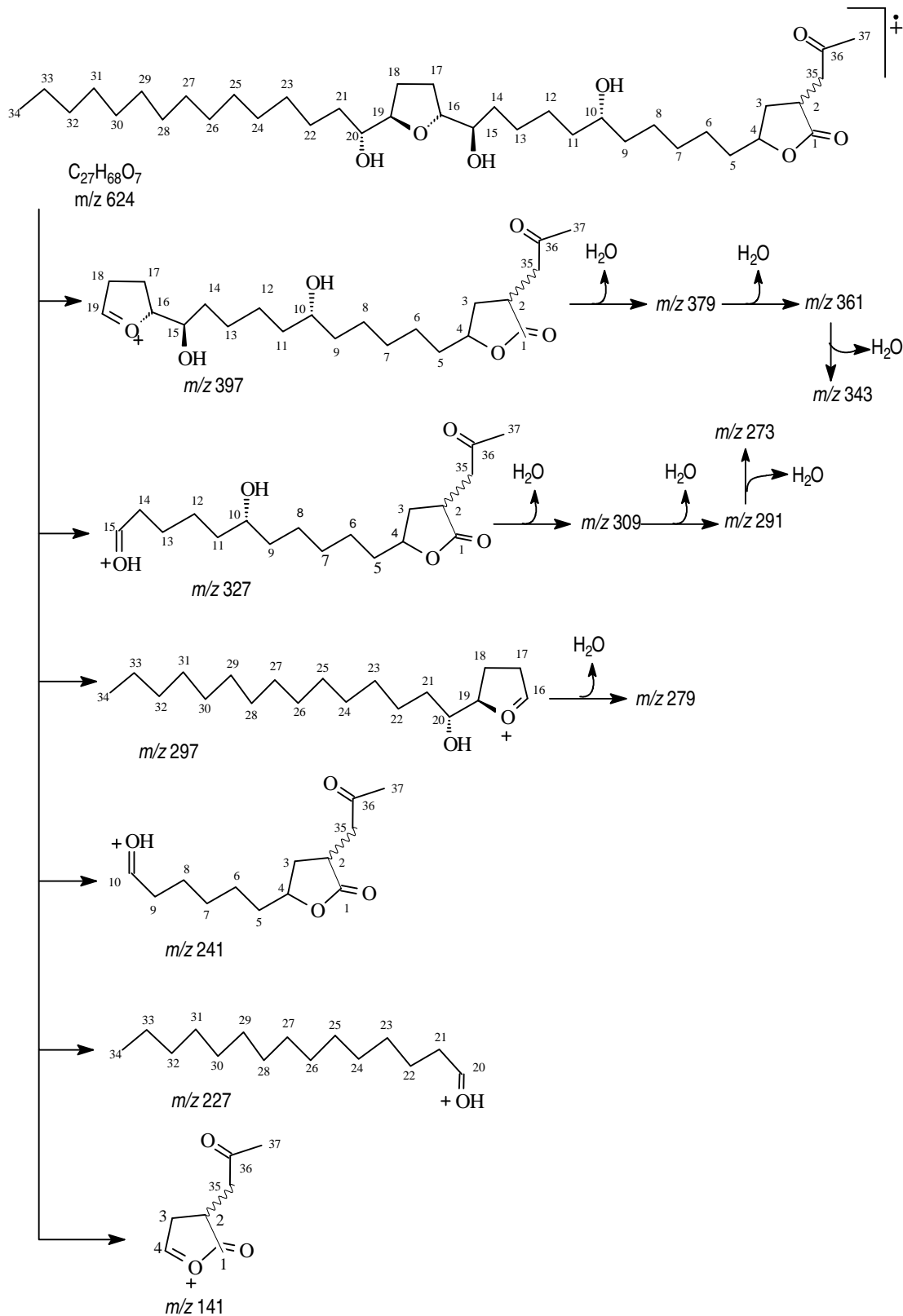


Figura 122. Espectro de massas da AcF-0214 realizado através de impacto de elétron.



Esquema 22. Proposta mecânica de fragmentação no EM-IE com valores diagnósticos da AcF-0214.



Esquema 23. Proposta mecanística de fragmentação no EM-IE para a mistura (2,4-cis/-trans)-xylomaticinonas conforme dados registrados na literatura (ALALI *et al.*, 1999).

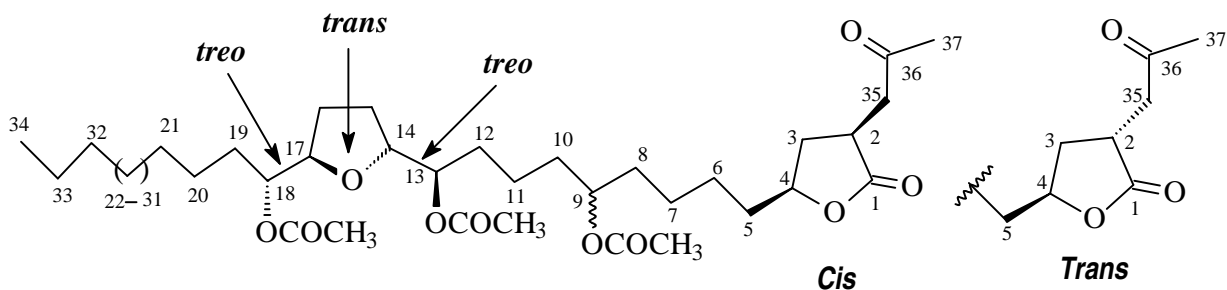
6.8.4 Caracterização estrutural dos derivados acetilados, *cis*-Rbrazilinona-A1 (AcF-0214A1) e *trans*-Rbrazilinona-B1 (AcF-0214B1)

Os dados espectrais de RMN ^1H (Figura 123, p. 152), RMN ^{13}C (Figura 124, p. 152) da mistura isomérica acetilada, denominada AcF-0214Ac (AcF-0214A1 e AcF-0214B1), foram usados para confirmação das estruturas deduzida. Os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios carbinólicos, de AcF-0214, CH-9 (δ_{H} 3,65-3,55, m), CH-13 (δ_{H} 3,45-3,40, m) e CH-18 (δ_{H} 3,45-3,40, m) (Tabela 24, p. 141), foram deslocados como previstos, para menor campo (menor densidade eletrônica promovida pelo efeito retirador de elétrons do grupo carbonila da função éster acetoxila – efeito indutivo) (SILVERSTEIN *et al.*, 2000): δ_{H} 4,98/4,99 (m, H-9) e 4,88 (m, H-13 e H-18). Os sinais correspondentes aos grupos metílicos das funções acetoxílicas, foram observados como simpletos em δ_{H} 2,10 e 2,06 (Tabela 25, p. 153).

A comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono carbinólicos observados nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° de AcF-0214 com os de RMN ^{13}C da AcF-0214Ac (Figura 124, p. 152) revelou as modificações nos deslocamentos químicos previstas pela acetilação dos grupos hidroxílicos: desproteção dos carbonos CH-9, CH-13 e CH-18 e proteção (efeito γ do oxigênio acetoxílico) dos carbonos CH₂-8, CH₂-10, CH₂-12, CH-14, CH-17 e CH₂-19 (MAHATO and KUNDU, 1994). O espectro de RMN ^{13}C da mistura acetilada mostrou ainda a presença sinais das unidades acetoxílicas com deslocamentos químicos em δ_{C} 171,34 (C=O, *cis*) e 171,02 (C=O, *trans*) e dos grupos metílicos α -carbonílicos em δ_{H} 21,56 e 21,65.

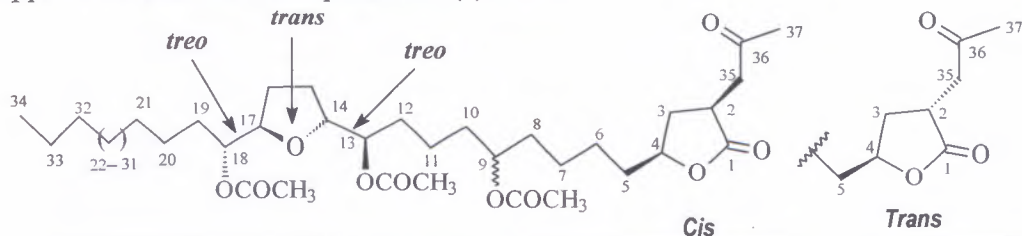
Os espectros em 2D HMQC (Figura 125, p. 154) e COSY da AcF-0214Ac (Figura 126, p. 154) foram também utilizados na interpretação dos espectros em 1D.

Após análises destes dados pode-se propor a estrutura das substâncias acetiladas: *cis*-Rbrazilinona-A1 e *trans*-Rbrazilinona-B1.



A preparação dos ésteres de Mosher para determinação das configurações absolutas através dos diastereoisômeros, envolvendo a utilização dos ácidos (*R*)- e (*S*)-metoxi-trifluorometil-fenil acético (MTPA), consta da próxima etapa a ser cumprida.

Tabela 25. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da mistura acetilada AcF-0214Ac [(*cis/trans*)-Rbrazilinonas, AcF-0214A1 e AcF-B1], em CDCl_3 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz*.



HMQC		HMBC		
	Cis/trans	Cis/trans	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C	δ_{C}	δ_{H}		
1	179,05/179,13			2H-35
36	205,90/205,86		2H-35; 3H-37	
CH				
2	34,76/34,81	3,01	2H-35	
4	79,05/78,98	4,44 (m)/4,54 (m)		
9	73,93/74,00	4,98 (m)/4,99 (m)		
13	75,37	4,88 (m)		
14	79,92	3,98 (m)		
17	80,00	3,98 (m)		
18	75,37	4,98 (m)		
CH₂				
3	33,70 - 33,68	3,20 - 2,00		H-3b
5	35,76 - 35,65	1,73 - 1,48		
6	25,84 - 25,49	1,50 - 1,30		
7-8	30,09 - 29,63	1,40 - 1,25		
10	30,09 - 29,63	1,40 - 1,25		
11	25,84 - 25,49	1,50 - 1,30		H-13
12	31,28 - 31,01	1,70 - 1,40	H-13	
15	28,43	1,95 - 1,60	H-14	H-13; H-17
16	28,43	1,95 - 1,60	H-17	H-17; H-14
19	31,28-31,01	1,70 - 1,40	H-18	
20	25,84 - 25,49	1,50 - 1,30		H-18
21-31	30,09 - 29,63	1,40 - 1,25		
32	32,34	1,38		3H-34
33	23,08	1,38	3H-34	
35	44,56/44,61	3,05/2,67		3H-37; H-3b
CH₃				
34	14,53	0,89 (t; 7,0)		
37	30,40/30,34	2,22 (s)/2,21 (s)		
Ac				
CH ₃	21,56 - 21,35	2,10 - 2,06 (s)		
C=O	171,34 - 171,02			

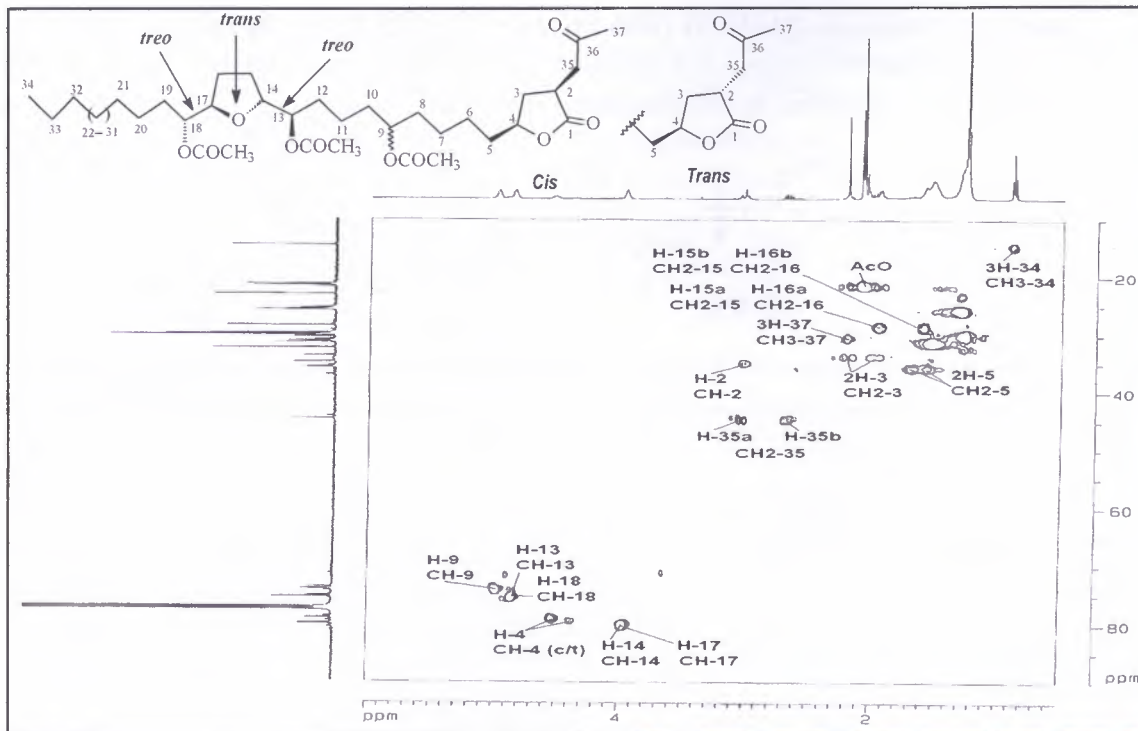


Figura 125. Mapa de correlações HMQC da mistura acetilada AcF-0214Ac, em CDCl_3 .

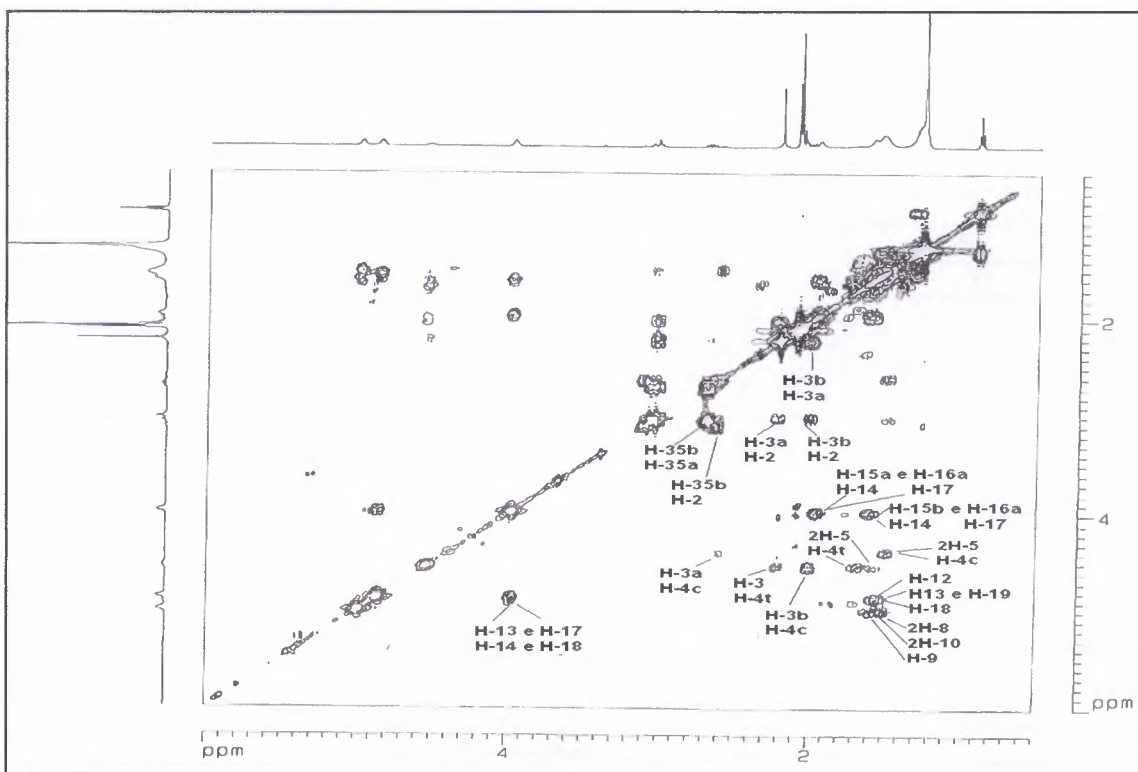


Figura 126. Mapa de correlações COSY da mistura acetilada AcF-0214Ac, em CDCl_3 .

7 TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O estudo de plantas direcionado por teste de atividades biológicas dos extratos e frações obtidas nas diferentes etapas de purificação, tem importância bastante significativa na busca de princípios ativos. Quanto mais apurados forem os testes, mais significativos serão os resultados já que as substâncias biologicamente ativas estão na maioria das vezes em baixas concentrações. Contudo nem sempre este monitoramento apurado é possível devido à necessidade de atuação de outros profissionais em outros centros de pesquisa. Os testes devem ser altamente sensíveis, fáceis de realizar (HOSTETTMANN e outros, 2003) e de baixo custo preferencialmente.

Crustáceos, moluscos e insetos são invertebrados que fazem parte de grupos alvos para realização de teste de atividade biológica (HOSTETTMANN e outros, 2003). Neste trabalho foi possível realizar testes com alguns invertebrados.

O ensaio da toxidez para o crustáceo *Artemia salina* L, tem sido utilizado como modelo para se detectar a presença de substâncias bioativas em extratos vegetais (MACLAUGHLIN *et al*, 1991) e tem mostrado uma boa relação com teste de citotoxicidade em células cancerígenas (P-388). A busca de acetogeninas em extratos de plantas da família Annonaceae também tem sido guiada por estes ensaios, que são simples e de baixo custo (PIMENTA, 1999).

7.1 Avaliação da toxidez de extratos de *A. cacans* Warming frente à *Artemia salina* Leach

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química – CCEN da Universidade Federal de Alagoas com a colaboração do Prof. Dr. Antonio Euzébio G. Sant’Ana e Dra. Aldenir Feitosa dos Santos.

A) Experimental

Foram usadas larvas de *Artemia salina* Leach após 48 horas de eclosão, obtidas a partir de duas incubações sucessivas de 24 horas sob iluminação parcial.

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi realizado conforme a metodologia citada por McLaughlin (MACLAUGHLIN *et al*, 1991). Foram testados os extratos e partições em hexano e etanol das folhas; em hexano, clorofórmio e etanol da madeira; metanol e acetato de etila dos frutos.

Na fase preliminar do teste, foram feitas diluições das amostras pelo método de diluições aritméticas em água do mar a 1% de DMSO (v/v). Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes (Tabela 26, p.156).

Na fase apurada cada amostra foi avaliada em função dos resultados apresentados no ensaio preliminar e cada concentração foi quadruplicada (Tabela 27, p 156). Utilizou-se para análise das doses letais o programa Finney.

Tabela 26. Resultados preliminares da toxicidade sobre *Artemia salina* de *A. cacasn* Warm.

Extratos de <i>A. cacans</i> Warm	% de Mortos			
	1000ppm	100ppm	10ppm	1ppm
Hexânico das folhas	100	100	80	1
Etanólico das folhas	100	95	86	2
Clorofórmio da madeira	100	100	83,5	5
Etanólico da madeira	100	95,6	92	10
Hexânico da madeira	100	90,5	48	36,2
Metanólico dos frutos	100	94,74	44,83	28,95
Acetato de etila dos frutos	100	100	73	20

Tabela 27. Os resultados da análise (TAS) em fase apurada de *A. cacasn* Warm.

<i>Annona cacans</i> Warm. Extratos	Conc. ppm	% de Mortos	Concentração Letal – ppm Intervalo de confiança -IC		
			CL ₁₀ [IC ₉₅]	CL ₅₀ [IC ₉₅]	CL ₉₀ [IC ₉₅]
Acetato de etila dos frutos	30	100	2,426 [0,842; 3,859]	7,534 [5,017; 12,098]	23,390 [13,953; 81,198]
	20	97,5			
	10	95			
	8	20			
	6	18,6			
	4	17,5			
	2	13			
1	0				
Hexânico das folhas	2	100	0,171 [0,057; 0,280]	0,486 [0,303; 0,697]	1,379 [0,923; 3,043]
	1	85			
	0,5	35			
	0,1	7,6			
Etanólico das folhas	6	100	1,346 [1,110; 1,54 9]	2,430 [2,164; 2,754]	4,389 [3,731; 5,534]
	4	75			
	2	55			
	1,5	5			
	1	2,5			
	0,8	0			

Continua próxima página

Continuação da Tabela 27.

Clorofórmio da madeira	2	100	0,0390 [0,0196; 0,060]	0,181 [0,134; 0,243]	0,843 [0,563; 1,599]
	1	83,3			
	0,5	82,9			
	0,2	83			
	0,1	28,57			
	0,08	19,5			
	0,06	9			
Etanólico da madeira	0,6	100	0,111 [0,089; 0,128]	0,176 [0,157; 0,199]	0,279 [0,241; 0,353]
	0,4	100			
	0,2	60			
	0,1	7,1			
Metanólico dos frutos	1	73	0,039 [0,0196; 0,060]	0,181 [0,134; 0,243]	0,843 [0,563; 1,599]
	0,8	61			
	0,6	58,53			
	0,4	53			
	0,3	50			
	0,2	30			
	0,1	0			
Hexânico da madeira	0,8	100	0,052 [0,0245; 0,080]	0,205; [0,151; 0,271]	0,810 [0,551; 1,557]
	0,6	90			
	0,4	45,9			
	0,2	47,5			
	0,1	32,5			
	0,05	10			

Valores de $DL_{50} \leq a$ 1000 ppm são considerados ativos para extratos.

Os extratos e partições foram considerados muito tóxicos sobre *A. salina* L. $DL_{90} < 25$ ppm.

7.2 Avaliação da atividade moluscicida com o caramujo *biomphalaria glabrata* de extratos e partições de *Annona cacans*

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas no mundo há mais de 3500 anos. O caramujo *Biomphalaria glabrata* é considerado o principal hospedeiro intermediário susceptível ao *Schistosoma mansoni* no Brasil, sendo considerado o vetor mais importante (SANTOS, 1977).

A busca de controle da esquistossomíase é uma preocupação mundial o que torna relevante a busca de resultados satisfatórios com uso de plantas ou substâncias nelas encontradas.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química – CCEN da Universidade Federal de Alagoas, pelos professores Antonio Euzébio G. Sant’Ana e Aldenir Feitosa dos Santos.

MÉTODOS

A) Organismo usado

Para realização dos ensaios utilizou-se de exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e descendentes de caramujos originários da região de Barreiro de Cima zona periférica de Belo Horizonte, Minas Gerais. Nestes foram utilizados exemplares adultos de tamanho uniforme (diâmetro médio da concha – 22 mm) e suas desovas.

B) Preparo das soluções teste

Nos ensaios com o caramujo adulto 0,025 g de cada amostra foi solubilizada, separadamente, em 250 mL de água desclorada a 0,15% de DMSO para obtenção da concentração de 100 ppm. Alíquotas desta solução foram adicionadas à água desclorada para obtenção das concentrações de 50 e 10 ppm, nos ensaios preliminares. Nos ensaios apurados 150 mg das amostras foram solubilizadas em 1,5 L de água desclorada a 0,15% de DMSO, para obtenção das soluções testes a 100 e 80 ppm.

Para avaliação da atividade frente aos embriões do caramujo 1,2 mg de cada amostra foi solubilizada em 12 mL de água desclorada a 0,15% de DMSO, para obtenção das soluções teste a 100 ppm. Alíquotas foram adicionadas à água desclorada para obtenção das soluções teste a 10 e 1 ppm.

C) Bioensaio preliminar para atividade moluscicida

Os ensaios biológicos envolvem basicamente a imersão dos organismos alvo nas soluções teste por 24 horas e, a observação da mortalidade dos mesmos no máximo 96 horas.

Em cada solução teste foram introduzidos 5 caramujos, nos bioensaios com o caramujo adulto e, uma desova nos realizados com embriões de caramujo. A temperatura da água foi registrada no início e no fim de cada experimento, variando de 24 – 28°C, tendo um pH constante igual a 6. Paralelo a cada experimento foi realizado controle (+) com carbonato cúprico a 50 ppm e controle (-) com água desclorada (Tabelas 28 e 29). Não foram realizados os cálculos de CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ conforme metodologia citada pela Organização Mundial de Saúde (Who, 1965), devido a problemas com as colônias de caramujos da UFAL.

Tabela 28. Ensaio preliminar da atividade moluscicida sobre *B. glabrata* (adulto).

Extrato Vegetal de <i>Annona cacans</i>	Parte testada	Mortalidade (%)		
		100 ppm	50 ppm	10 ppm
Acetato de Etila	Frutos	100	100	60
Hexano	Madeira	100	100	80

Tabela 29. Ensaio preliminar da atividade moluscicida sobre *B. glabrata* (desova).

Extrato e partições de <i>Annona cacans</i>	Parte testada	Mortalidade à (%)		
		100 ppm	10 ppm	1 ppm
Metanólico	Frutos	1,8	0	0
Acetato de Etila	Frutos	0	0	0
Hexânico	Madeira	0	0	0
Clorofórmico	Madeira	0	0	0
Etanólico	Madeira	0	0	0
Hexânico	Folha	0	0	0
Etanólico	Folha	0	0	0

Nos ensaios preliminares para avaliação da atividade moluscicida frente ao caramujo adulto destaca-se apenas os extratos dos frutos em acetato de etila e hexânico da madeira, que foram selecionados para avaliação em fase apurada, o que possibilita o cálculo das concentrações letais CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ conforme metodologia citada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965).

Nos ensaios preliminares para avaliação da atividade moluscicida frente à desova os extratos e partições avaliados não foram considerados ativos.

Os testes em fase apurada não foram realizados devido a problemas com a colônia dos caramujos na UFAL. Tão logo a colônia seja restabelecida será dado prosseguimento aos testes.

7.3 Avaliação da atividade inseticida contra *Musca domestica* de extratos e partições de *Annona cacans*

Dentre os dípteros terrestres mais importantes estão às espécies de moscas que vivem intimamente associadas às atividades humanas.

A *Musca domestica* é uma mosca não hematófaga cosmopolita e abundante, que vive habitualmente nos domicílios e peridomicílios humano. É um inseto que tem uma associação muito estreita com o homem e seu alimento, bebidas e lixo. Pelo seu hábito de regurgitar e depositar suas fezes nos alimentos, ela é a responsável pela transmissão de uma variedade de doenças (GEDEN, *et al*, 1990, *apud* SANTOS, 2003), sendo causadora de doenças, como os vírus, bactérias, protozoários e ovos de parasitos (vermes) (JACKSON, 1989, *apud* SANTOS, 2003).

As moscas podem carregar os agentes causadores das feridas purulentas, das diarréias (como a diarréia dos leitões, da cólera humana e outras desenterias bacterianas e as causadas por protozoários) e também os causadores das viroses (como o vírus da doença de Aujeszký), verminose e ovos da mosca do berne. Ainda entre as bactérias, as moscas transmitem o vírus causador da meningite estreptocócica dos suínos (*Streptococcus suis*) que também podem infectar humanos (KHIN, 1989, *apud* SANTOS, 2003).

Estes fatores negativos citados justificam a adoção de todas as medidas de controle destes insetos.

Os testes foram realizados na UFRRJ com a colaboração do prof. Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja e Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos.

Metodologia

As moscas foram coletadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, mantidas em gaiolas e alimentadas com água e leite em pó. Os seus ovos são depositados em meio de cultura, contendo farelo de trigo e farinha de soja na mesma proporção, em seguida foram colocados em potes contendo dieta larval (50% de farelo de soja e 50% de farelo de trigo) para o desenvolvimento das larvas e finalmente obter as moscas na fase adulta.

Aplicação tópica dos extratos: Com auxílio de um aspirador foram retirados os mucídeos e transferidos para o sistema de anestesia por CO₂ para realizar a imobilização por aproximadamente por 10 minutos. A aplicação foi feita no dorso do inseto com uma microseringa (Hamilton).

No teste foram utilizadas 20 moscas, sendo que cada uma foi tratada com 1,0 µL da amostra (diluída numa solução de 70% de etanol/30% de água) e com 4 repetições para cada concentração, neste trabalho foram preparadas 5 concentrações e a observação da mortalidade foi feita após 24 horas. Após a aplicação do extrato, as moscas são mantidas em vidros pequenos e alimentadas com glicose.

Foi feitos o testemunho com 80 moscas, onde a aplicação é feita somente com o solvente e 100% das moscas permaneciam vivas.

No ensaio com *Musca domestica* o extrato etanólico da madeira de *A. cacans* apresentou atividade inseticida nas seguintes concentrações: C (solução estoque) = 20 mg/mL, C₁ = 15 mg/mL, C₂ = 10 mg/mL, C₃ = 5,0 mg/mL, C₄ = 1 mg/mL. Para o extrato etanólico das folhas, as concentrações que apresentaram maior atividade inseticida foram: C (solução estoque) = 30 mg/mL, C₁ = 20 mg/mL, C₂ = 15 mg/mL, C₃ = 10 mg/mL, C₄ = 5 mg/mL. Para o extrato acetato de etila dos frutos as concentrações foram: C (solução estoque) = 50 mg/mL, C₁ = 40 mg/mL, C₂ = 25 mg/mL, C₃ = 15 mg/mL, C₄ = 10 mg/mL. As médias foram calculadas somando os dados de moscas mortas e vivas nas 4 repetições realizadas com cada concentração contendo grupo de 20 moscas para cada repetição. Com os dados obtidos de moscas mortas e vivas, determinou-se a dose letal 50 (DL₅₀) (Tabelas 30 e 31, p. 161), pelo método de regressão-probit, utilizando-se o programa computacional Pólo-PC.

Tabela 30. Dados de concentrações(M) e número de moscas vivas e mortas.

Extrato	Moscas		Extrato	Moscas		Extrato	Moscas	
	Vivas (média)	Mortas (média)		Vivas (média)	Mortas (média)		Vivas (média)	Mortas (média)
Etanólico das folhas			Acetato de etila dos frutos			Etanólico da madeira		
C (estoque)	1	19	C (estoque)	3	17	C (estoque)	0	20
C ₁	5	15	C ₁	8	12	C ₁	4	16
C ₂	9	11	C ₂	15	5	C ₂	8	12
C ₃	15	5	C ₃	18	2	C ₃	15	5
C ₄	20	0	C ₄	20	0	C ₄	18	2

Tabela 31. Valores de DL₅₀ dos extratos de *Annona cacans* Warm.

Extratos	DL ₅₀ (mg/mL)
Etanólico da madeira	8
Etanólico das folhas	13
Acetato de etila dos frutos	20

Não foi possível realizar o ensaio com os extratos em hexano devido á dificuldade de solubilização das amostras em DMSO e TUWIN e pelo fato do solvente matar os organismos mesmo sem o extrato.

Os extratos avaliados quando compara com o testemunho revelou possível atividade inseticida contra a *Musca domestica* com doses letais conforme dados da tabela acima.

8 CONCLUSÕES

Como se pode constatar a espécie *Annona cacans* Warming, segue o perfil fitoquímico da família (Annonaceae). Mostrou-se rica em uma variedade de estruturas que em sua maioria apresentam atividades biológicas conhecidas.

Os diterpenos caurânicos, as acetogeninas, os esteróides, os derivados benzílicos e cinâmico bem como os alcalóides, oxolaurelina, lanuginosina, lisicamina e *O*-metilmoscatolina, estão sendo descritos pela primeira nesta planta.

O estudo fitoquímico dessa espécie levou ao isolamento de seis substâncias inéditas: um caurano: Ácido *ent*-17-formil –cauran-19-óico e três acetogeninas naturais: Cacansin-9-ona, (*cis*)-Rbrazilinona A, (*trans*)- Rbrazilinona B e dois produtos de derivação, *cis*-Rbrazilinona-A1 e *trans*-Rbrazilinona-B1.

Devido à alta toxicidade de seus extratos frente a *Artemia salina* e uma possível atividade inseticida contra *Musca domestica*, por si, justifica-se dar continuidade ao estudo dos extratos da planta, bem como, dos seus constituintes isolados.

Devem-se realizar também, o estudo da atividade biológica das acetogeninas isoladas, em virtude de serem conhecidas atividades anticancer dessa classe de substâncias.

Nesta planta identificou-se, através de testes com reagentes específicos e análise por CLAE, misturas de acetogeninas que não tiveram suas estruturas definidas e que serão investigadas estruturalmente após suas purificações.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, ALCICLEY DA S.; BARBOSA, PATRICIA S.; MULLER, ADOLFO H. E GUILHON, GISELLE M. S. P. Constituintes Químicos do Caule e das Cascas do caule de *Croton pullei* Var. *Glabrior* (Euphorbiaceae) – *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica* da UFPA <http://www.ufpa.br/revistaic> Vol 1 Nº 2, julho de **2001**.

ALALI, FERAS Q; LIU, XIAO-XI, AND McLAUGHLIN, JERRY L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *J. Nat. Prod.* **62**, 504-540 (**1999**).

ALALI, FERAS Q; ROGERS, L.; ZHANG, YAN AND McLAUGHLIN, J. L. Goniotriocin and (2,4-*cis* and *trans*)-Xylomaticinones, Bioactive Annonaceous Acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. *J. Nat. Prod.* **62**, 31-34 (**1999**).

ANGELY, J. – “Flora Analítica do Paraná”. Curitiba, Ed. Phyton, **1965**, p. 331-333.
ASOLKAR, L. V., KAKKAR, K. K., CHAKE, O. J. In: Publications and Information Directorate. *Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles*, New Delhi, p. 72-73, **1992**.

ATIQUÉ, A.: IQBAL, M.: GHOUSE, A. K. M. Use of *Annona squamosa* and *Piper nigrum* against diabetes, *Fitoterapia* **56**, 190-192, **1985**.
BARROSO, G. M., "Sistemática de Angiosperma do Brasil", **1**, p. 28, São Paulo, Ed. Univ. S. Paulo (**1978**).

BONFIM, U., As Sementes de Ata ou do Araticum e o veneno de cobras, *Chácaras e Quintais*, São Paulo, vol. **34**, 355 (**1926**).

BORGES, ENDLER MARCEL. Estudo Fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae). *Dissertação de Mestrado* – USP/ Ribeirão Preto – **2006**.

BORN, L.; F. LIEB, J. P. LORENTZEN, H. MOESCHLER, M. NONFON, R. SÖLLNER, AND D. WENDISCH: The Relative Configuration of Acetogenins Isolated from *Annona squamosa*: Annonin I (Squamocin) and Annonin VI. *Planta Med.*, **56**, 312-316 (**1990**).

CAVÉ, A., CORTES, D., FIGADÈRE, B., LAURENS, A., E PETTIT, G.R. *Progress in Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlang wien New York (**1997**) pp. 81-288.

COREY EJ AND SU WG. Total Synthesis of a C-15 Ginkgolide, (+/-)-Bilobalide - *Journal of the American Chemical Society* **109** (24): 7534-7536 nov. 25, **1987**.

CORTES, D., BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. Review NPR – www.rsc.org/npr - *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, **22**, p. 269-303.

- CRONQUIST, A., "An Integrated System of Classification of Flowering Plants" New York, Columbia, *University Press*, p. 53 (1981).
- DELGADO, GUILHERMO; PELÁEZ, GUADALUPE; VIVAR, ALFONSO ROMO AND PEREDA-MIRANDA, ROGELIO – Terpenoids from *Viguiera excelsa* and *Viguiera oaxacana*. *Journal of Natural Products*, 47(6) 1042-1045 (1984).
- DESPACHO, P. B. "Estudo Químico de *Gatteria duckeana* D.C". Tese de Mestrado, UFRJ, (1984).
- DEWICK, PAUL M. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, 1997.
- DI STASI, LUIZ CLÁUDIO E HIRUMA-LIMA, CLÉLIA AKIKO. *Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica* (2002), 2ª Ed. Editora UNESP.
- DI STASI, LUIZ CLÁUDIO, *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudo Interdisciplinar* (1995) - 1ª reimpressão, Editora da UNESP.
- DURET, P., A. LAURENS, R. HOCQUEMILLER, D. CORTES, AND A. CAVÉ. Isoacetogens, Artefacts Issued from Translactonization from Annonaceous Acetogenins. *Heterocycles*, 39, 741-749 (1990).
- ETSE, JOSEPH T.; GRAY, ALEXANDER I. AND WATERMAN, PETER G. – Chemistry in the Annonaceae, XXIV. kaurane and kaur-16-ene diterpenes from the stem bark of *Annona reticulate*. *Journal of the Natural Products*. 50 (5) 979-983 (1987).
- FANG, X. -P.; REISER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. *Phytochem. Anal.* (1993), 4, 27-67.
- FARRUGIA, L.J.- WINGX. *J.Appl.Cryst.*(1999), 32,837-838.
- FUJIMOTO, Y., MURASAKI, H., SHIMADA, S., KAKINUMA, K., SING, S., GUPTA, K. K., SAHAI, M. Annonaceous Acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*, Non-adjacent Bis-Tetrahydrofuranic. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.*, v. 42, p. 1175-1184, 1994.
- FURLAN, LILIAN; KOTZ, IVAN A.; SIRTOLI, LUCHELE F.; TESSER, SAIONARA M. E MALAVASI, MARLENE MATOS. Morfologia de sementes de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e *Cytharexylum myrianthum* Charm. (Verbenaceae). XI Encontro Anual de Iniciação Científica – 1 a 4/10/2002 – Maringá – PR. (Universidade Estadual de Maringá).
- GEDEN C. J.; STEINKARAUS, D. C.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. & SHOOP, W. L. 1990. Susceptibility of insecticide – susceptible and wild house flies (*Díptera muscidae*) to abamectin on whitewashed and unpaint wood. *Journal Econ. Entomol.* 83: 1935-1939.
- GU, ZHE-MING; ZHOU, DAWEI; WU, JINN; SHI, GUOEN; ZENG, LU AND MCLAUGHLIN, JERRY L. *Journal of Natural Products* – 60, 242-248 (1997).

GUITAR, LYNNE, “Criollos: The Birth of a Dinamic New Indo – Afro – European People and Culture on Hispaniola”. KACIKE. *The Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropolog.* (2000), 1(1): 1-17 (<http://www.kacike.org/LynneGuitar.html>).

HOEHNE, F. C., *Frutas Indígenas* – São Paulo, Instituto de Botânica (1946).

HOEHNE, F. C., KUHLMANN ET HANDRO, O., *Jardim Botânico de São Paulo*, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de S. Paulo, p. 406, (1941).

HOHNE, F. C., “Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais”, São Paulo, *Graphicards*, p. 123 (1930).

HOPP, D. CRAIG; ALALI, FERAS Q.; GU, ZHE-MING AND MACLAUGHLIN, J.L. Three New Bioactive Bis-adjacent THF-ring Acetogenins from the Bark of *Annona squamosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* . 6 (1998) 569-575.

HOPP, D. CRAIG; ZENG, LU; GU, ZHE-MING; KOZLOWSKI, J. F. AND MACLAUGHLIN, J. L. Novel Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, from the Bark of *Annona squamosa*, Showing Cytotoxic Selectivities for the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line, PACA-2. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 581-586.

HOSTETTMANN, KURT; QUEIROZ, E. F; VIEIRA, PAULO C., *Princípios Ativos de Plantas Superiores*, Série de Textos da Escola de Verão em Química, EDUFSCAR (2003).

JACKSON, H. Invermectin as a Systemic insecticide. *Parasitol. Today.* 1989, 5: 146-155.

JAIN, N., YADAVA, R., *Phytochemistry*, 35, 1070 (1994).

JAYANTA K. RAY, SUSMITA GUPTA, GANDHI K. KAR, BIDHAN C. ROY, JYH-MING LIN AND SHANTU AMIN. Studies on the Synthesis of *trans*- Dihydrodiols of Polycyclic Aromatic Thiaarenes as Potential Proximate Carcinogenic Metabolites: First Synthesis of *trans-l* 0,1 1-Dihydroxy-10, 11-dihydroacenaphtho[1,2-b] benzo [d]th iophene and 6, 7-Dihydroxy-6, 7-dihydronaphtho[1,2-b]thiophene. *J. Org. Chem.*, v. 65, No. 24, (2000), p. 8135.

JUSSIEU, A. L. *Genera Plantarum*. 1789. p. 283-4.

KAVATI, R., O cultivo da atemóia. In: DONADIO, L. C.; MARTINS, A. B. G.; VALENTE, J. P. (Ed.). *Fruticultura Tropical*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 39-70 (*Toda Fruta*, 16/08/04).

KESSLER, P. J. A. Annonaceae. In: K. Kubitzki., J. C. Rohwer & V. Bittrich (eds) The families and genera of vascular plants II: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Springer-Verlag, Berlin, p. 93-129 -1993.

KHIN, N. O. O.; SEBASTIAN, A. A.; & AYE, T. J. 1989. Carriage of enteric bacterial pathogens by house flies in Yangon, Myanmar. *Diarrhoel Dis. Res.* 7 (3-4); 81-84.

KIILL, LÚCIA H. P., E COSTA, J. GOMES. *Ciência rural, Santa Maria*, v. 33, n.5, p. 851-856, set-out, **2003**.

KIM, YOUNG H.; CHUNG, Bo S. AND SANKAWA, USHIO – Pimaradiene diterpenes from *Acanthopanax koreanum*. *Journal of Natural Products*, 51(6) 1080-1083 (**1988**).

KOJIMA, H.; SATO, H.; HATANO, A. - Sterol Glucosides from *Prunilla vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2351-2355, **1990**.

LEBOEUF, M.; CAVÉ. A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE.; *Phytochemistry* **1982**. 21. 1283.

LIAW, CHIH-CHUANG; CHANG, FANG-RONG; CHEN, SHU-LI; WU, CHIN-CHUNG; LEE, KUO-HSIUNG AND WU, YANG-CHANG. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (**2005**) 4767-4776.

LIAW, CHIH-CHUANG; CHANG, FANG-RONG; CHEN, YUAN-YNG; CHIU, HUI-FEN; WU, MING-JUNG AND WU, YANG-CHANG. *Journal Natural Products*. (**1999**), 62, 1613-1617.

LIMA, LUCIANA A. R. Estudo Químico e Avaliação Biológica das Sementes de *Annona cornifolia* A. St. –Hil. (Annonaceae). *Tese UFMG*, **2006**.

LOBÃO, ADRIANA Q., FORZZA, RAFAELA C. & MELLO-SILVA, RENATO. Annonaceae da Reserva biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil, com uma nova espécie, *Unonopsis bauxitae*. *Rodriguésia* 57 (1): 137-147. (**2006**).

LORENZI, HARRI, Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, vol. 1, p. 29, 4º ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, (**2002**).

LORENZI, HARRI; MATOS, F. J. DE ABREU, *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, p. 60 (**2002**).

MAAS, PAUL J. M.; KAMER, H. MAAS-van de; JUNIKKA, L.; DE MELO-SILVA, R., E RAINER, H., “Annonaceae from Central-eastern Brazil” – *Rodriguésia* 52 (80): 65-98. (**2001**).

MACKEI, A. et MISRA, A. L. – Chemical investigation of the leaves of *Annona senegalensis* L., - Constituents of the leaf wax. *J. Sci. Food Agric.*, 7 (3), p. 203-209, **1956**.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.; *Phytochemistry*, 37, 1517, (**1994**).

MAHDEEN, H. Other Annonaceous fruits. In: *Fairchild Tropical Garden, Tropical Fruit World*, v.4, n.1, p. 118-20, 1990 (*Toda Fruta*, 16/08/**2004**).

McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J. AND SMITH, D. L. “Benth-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Ed. A. U. Rahman, Elsevier, Amsterdam (**1991**).

MELO, ANGELITA C.; COTA, BETÂNIA B.; OLIVEIRA, ALAIDE B., E FERNÃO, C. *Fitoterapia* 72 (2001) 40-45.

MOOTOO, B. S.; ALI, A.; KHAN, A.; REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S. *Journal of Natural Products*, **63**, 807, 2000.

MOREIRA, A., SÉRGIO N. “Constituintes Químicos de *Flindersia brayleyana*, uma Contribuição a Química da Família Rutaceae”. *Dissertação de Mestrado* – UENF (2001).

NASCIMENTO, M. C. B. S. “Estudo dos constituintes químicos da fração hexânica do caule de *Peltastes peltatus* (Vell.)Woodson” - *Dissertação de Mestrado* – UFAL (1998).

NASCIMENTO, M. C. B. S.; SANTOS G. L.; MALTA, V. R. S.; DE SIMONE, C. A.; PEREIRA, M.A.; CONSERVA L. M.; ANSELMO, A. AND BRAZ-FILHO, R. Crystal structure of *ent*-(16*R*,17*R*)-17-hydroxy-17-methoxykauran-19-oic acid, C₂₁H₃₄O₄. *Z. Kristallogr. NCS* 219 (2004) 285-286.

ORTIZ, A. ANGULO / SUÁREZ, LUÍZ E. CUCA / PATIÑO, G. SANTAFE. Aporfinoídes em folhas de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). *Scientia Et Technica* Año XIII, No. 33, p. 19-20, Mayo de 2007 – Universidad Tecnológica de Pereira – Pereira Colombia.

PIMENTA, L. P. S. “Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora*, objetivando o isolamento de Acetogeninas tetra-hidrofurânicas. *Tese*, UFMG, 1995.

RAO, V. S. N., DASARADHAN, P., KRISHNAIAH, K. S., Antifertility effect of some indigenous plants. *Indian Journal of Medical Research* (1979). 70, 217-520.

REITZ, P. R. KLEIN, R. M. – “O Reino Vegetal de Rio do Sul”. *Sellowia*, 16: 9-118, 1964.

ROMERO, JOSÉ RICARDO. Fundamentos de Estereoquímica dos Compostos Orgânicos. Holos Editora – Ribeirão Preto, 1998.

RUPPRECHT, J. KENT; HUI, YU-HUA, AND MCLAUGHLIN, JERRY L. Annonaceous Acetogenins: A Review. *Journal of Natural Products*. **53**, 237-278 (1990).

SAITO, M. L., Fitoquímica de *Annona cacans* Warming e Quimiosistemática de *Annonacia* Jussieu, *Tese de Doutorado*, (USP), São Paulo (1990).

SANTOS, A. F. *Dissertação* – UFAL (1997).

SANTOS, P. R. D., “Estudo Químico de *Annona dioica* (St. Hil. Annonaceae)”. – *Dissertação de Mestrado*, UFRRJ, (1993).

SANTOS, VIVIANE M. R. *Tese*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003.

SCALOPPI, J. ERIVALDO JUNIOR, Aspectos Fisiológico em Annonaceae e Implicação no Melhoramento (Artigo de Internet, sjunior@fcav.unesp.br). *Toda Fruta* (16-08-2004).

SEMA – SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE – RS-Dezembro de 2002. Listagem das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção – Angiospermae (www.Agirasul.com.br/espécies/flora.htm).

SHIRWAIKAR, ANNIE; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. DINESH; BODLA, RAMGOPAL, *Journal of Ethnopharmacology*, 91 (2004) p. 171-175.

SHRINER, R. L. The systematic identification of organic compounds, 6th ed., John Wiley & Sons, Singapore, p. 160, 1979.

SILVA, DENISE. B.; MATOS, MARIA F. C.; NAKASSHITA, SIMONE T.; MISU, CARINA K.; YOSHIDA, NÍDIA C.; CAROLLO, CARLOS A.; FABRI, JOÃO R.; MIGLIO, HÉRCULES S. E SIQUEIRA, JOÃO MÁXIMO. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Quim. Nova*, vol. 30, n. 8, 1809-1812, 2007.

SILVA, MARILENA DE MENEZES; “Considerações Sobre a Anatomia Foliar e Taxonomia de duas Annonaceae do Maciço da Tijuca” – *Tese de Mestrado*, UFRJ (1982).

SILVERSTEI , ROBERT M.; WEBSTER, FRANCIS X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. LTC – Editora S.A. 2000.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, MARIA A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriúscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Quim. Nova*, v. 24, No. 2, p. 185-187, 2001.

SOLOMONS, T. W. G., E FRYHLE, CRAIG B. *Química Orgânica* vol. 2 (2006) – LTC – Editora.

SOUSA, M. P., M. E. O. MATOS, F. J. A. MATOS *et al.* 1991. *Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileira*. Impr. Universitária/ UFC, Fortaleza, 416 pp.

SUIRE, CLAUDE; ASAKAWA, YOSHINORI; TOYOTA, MASAO END TAKEMOTO, TSUNEMATSU. Chirality of terpenoids isolated from the liverwort *Conocephalum conicum* – *Phytochemistry*, vol. 21, n. 2. pp. 349-352, 1982.

TAKAHASHI, J. A. Estudo Fitoquímico de *Xilopia frutescens* Aubl., e Transformações Microbianas de Cauranos, Afidicolanos e Estemodanos. *Tese de Doutorado*. (UFMG – 1994).

TAYLOR, L. *Herbal secrets of the Rainforest*. Prima Health, Roaklin, CA. 1998.

URZÚA, ALEJANDRO AND CASSELS, BRUCE K. Weak bases of *Laurelia novae-zelandiae* a cautionary note on oxoaporphine NMR assignments. *Heterocycles*, vol. 4, No. 12, 1976.

VEJA, MARIA RAQUEL GARCIA. Constituintes químicos de *Eupatorium macrocephalum* Less e *Annona dióica*: Uma contribuição ao estudo de plantas medicinais no Paraguay. Tese - UFRRJ, (2007).

VELANDIA, JAVIER RINCÓN; CARVALHO, MARIO G. E BRAZ-FILHO, RAIMUNDO – Ácido ent-16 α , 17-Diidroxicauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. *Química Nova*, 21 (4) (1998).

VICKOVIC, BY IVAN ; WATSON, WILLIAM H., SILVA, MARIO AND BITTNER, MAGALIS. *Acta Crystallography*, C-40, 1756-1758, (1984).

VOGEL, A. I. Vogel's Textbook of practical organic chemistry, 5th ed. Longman, England, p. 433, 1989.

WANG, HUI-KANG AND LEE, KUO-HSIUNG. *Journal of Natural Products*. 59, 635-637 (1996).

WANG, LI-QUAN; MIN, BYUNG-SUN; LI, YAN; NAKAMURA, NORIO; QIN, GUO-WEI; LI, CAN-JUN AND HATTORI, MASAO. Annonaceae acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10 (2002), 561-565.

WARTEMAN, P. G. Aphytochemist in the african rain forest. *Phytochemistry*, v. 25, n. 1, p. 3-17, 1986.

WHO. Molluscicide Screening and Evolution, Bull. World Health Organization, 33: 567-581 (1965).

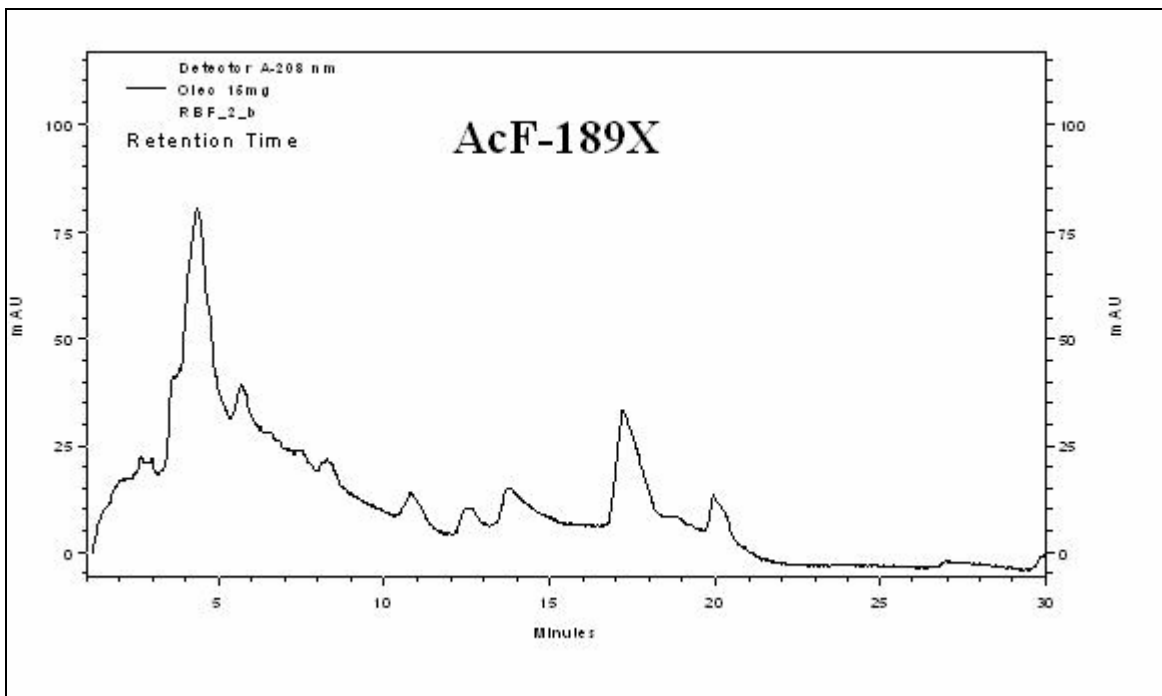
WU, YANG-CHANG; HUNG CHANG, FANG-RONG, FANG-RONG, COSENTINO MARK, YANG, YU-LIANG; CHANG, FANG-RONG; WU, CHIN-CHUNG; WANG, WEI-YA AND WU, YANG-CHANG. *Journal of Natural Products*. 65, 1462-1467 (2002).

ZEFRA-POLO, M. CARMEN; FIGADÈRE, B.; GALLARDO, TERESA TORMO, JOSÉ R., AND CORTES, D. *Phytochemistry*, 48, pp. 1087-1117, (1998).

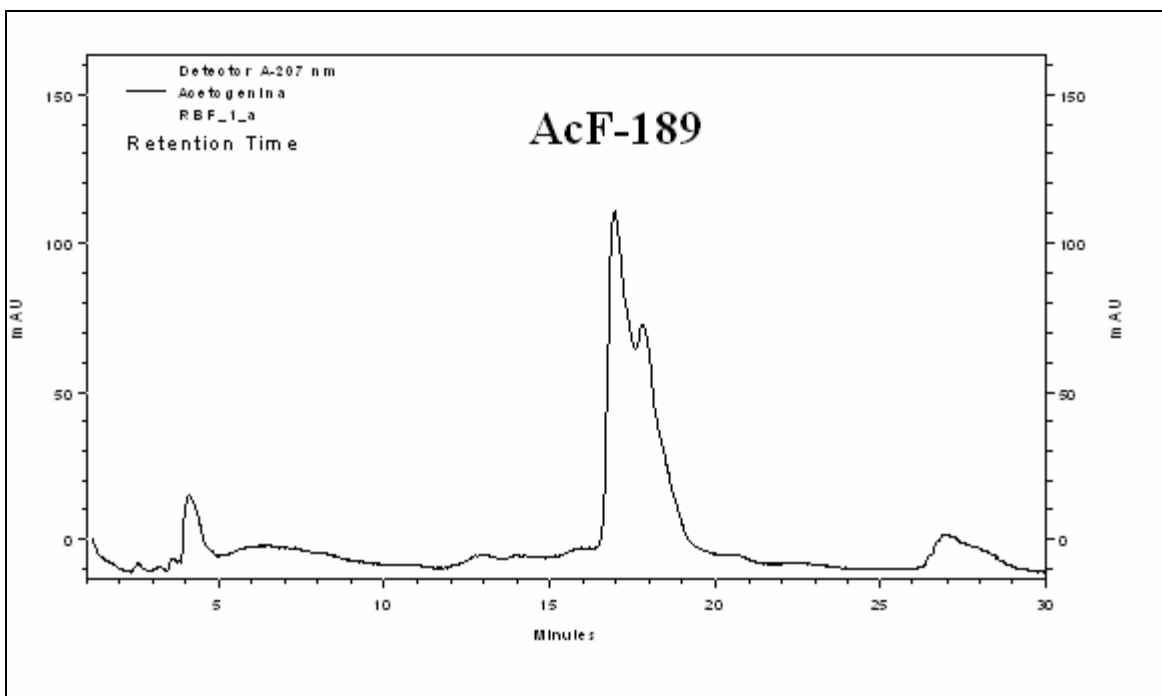
ZEFRA-POLO, M. CARMEN; GONZÁLEZ, M. CARMEN, ESTORNELL, E.; SAHPAZ, SEVSER AND CORTES, DIEGO. *Phytochemistry*, 42, pp. 253-271, (1996).

ZHENG, X. -C.; YANG, R. -Z.; QIN, G. -W.; XU, R. -S.; FON, D. -J. Three Novel chemical Compounds of Annonaceae Acetogenins from tre Seeds of *Annona squamosa*. *Acta botanica sinica*, v. 37 (3), p. 238-243, 1995.

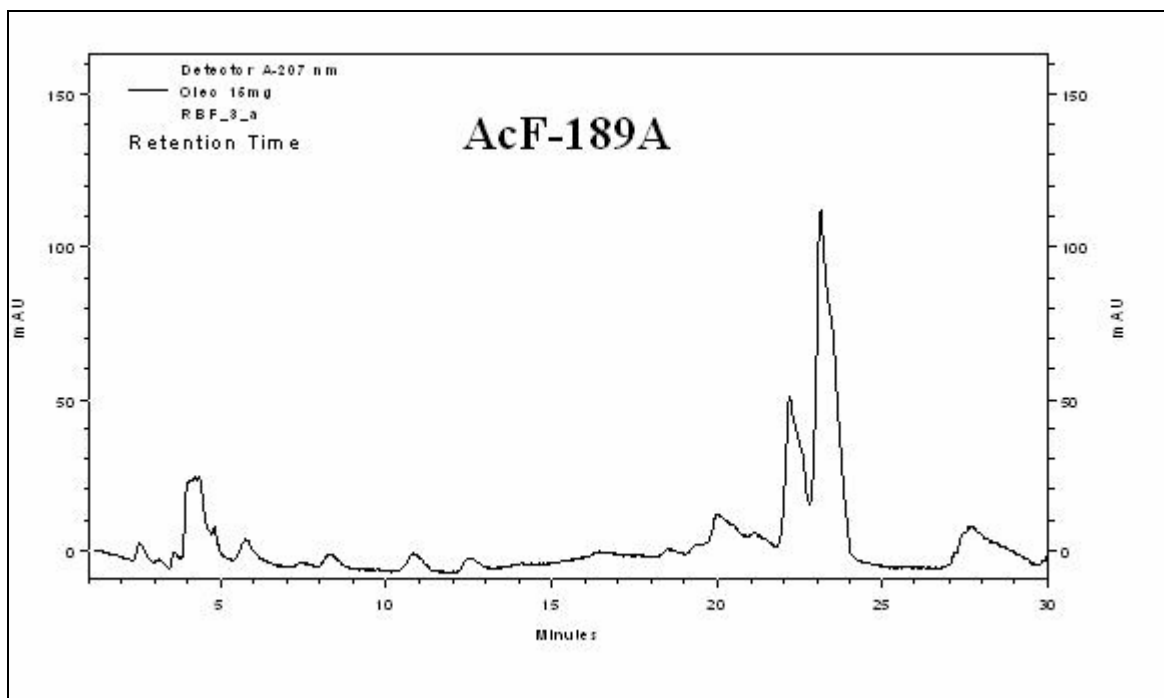
ANEXO I



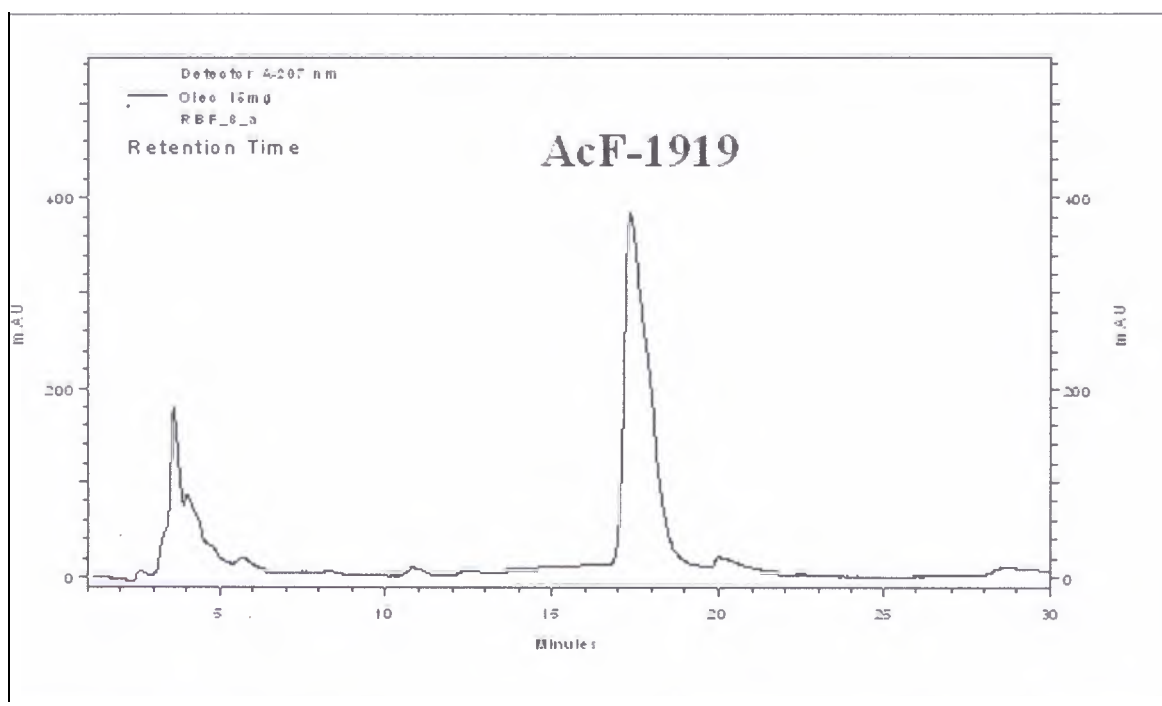
Cromatograma 3: Obtido por CLAE para a mistura de acetogeninas codificadas de AcF-189X.



Cromatograma 4: Obtido por CLAE para a mistura de acetogeninas codificadas de AcF-189X.



Cromatograma 5: Obtido por CLAE para a mistura de acetogeninas codificadas de AcF-189^a.



Cromatograma 6: Obtido por CLAE para a mistura de acetogeninas codificadas de AcF-189A.