

DENISE ZELAK BASTOS

**CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE**  
***Annona glabra* Linnè – ANNONACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-  
Graduação em Química, Setor de Ciências  
Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA

2000

TERMO DE APROVAÇÃO

CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE

*ANONNA GLABRA* LINNÈ - ANNONACEAE

por

**DENISE ZELAK LEITE BASTOS**

Dissertação aprovada como requisito

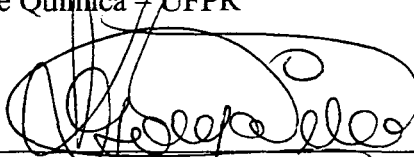
parcial para obtenção do grau de

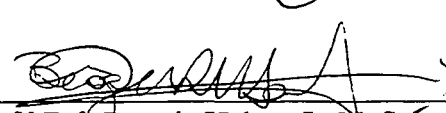
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Bras Heleno de Oliveira  
Deptº de Química - UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Dias de Sousa Filho  
Deptº de Química - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena L. N. Sales Maia  
Deptº de Química - UFPR

Curitiba, 01 de dezembro de 2000.

Aos meus filhos, Fernando e Henrique  
Ao meu marido, Roberto  
Aos meus pais, Eduardo e Danúcia.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelos ensinamentos e eficiente orientação em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química pelo conhecimento transmitido.

Às Prof. Drs. Adriana Contin, Ana Luiza Lordello, Beatriz Helena Sales Maia, Mária Élide Stefanello pelas discussões e sugestões a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Olavo Guimarães e a funcionária Simone pela identificação botânica da planta.

Ao Prof. Antônio Euzébio Sant'Anna pelo extrato inicial da planta.

Ao Prof. Dr. José Dias de Souza Filho do Departamento de Química da UFMG, pela realização por espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Prof. Dr. Nelson Duran do Departamento de Química da UNICAMP pela realização dos espectros de massa.

Ao Angelo Oliveira pelos espectros de infravermelho.

A Francisco e Wanda Prólico sem os quais a coleta da planta não seria possível.

Aos colegas do laboratório de produtos naturais, Ana Paula, Cristina, Maria Cristina.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, Adelson, Sirlei, Eliane, Aderli, Lenise.

Aos novos e velhos amigos, especialmente Alike, pela cumplicidade nas horas difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Química por sua colaboração.

À CAPES que proporcionou o suporte financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

À meus familiares pelo apoio e incentivo.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b><i>Annona glabra</i> L. E A FAMÍLIA ANNONACEAE.....</b>	<b>1</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 OBJETIVO.....	1
1.3 FAMÍLIA ANNONACEAE.....	1
1.4 <i>Annona glabra</i> .....	3
<b>DITERPENOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	10
2.2 BIOSÍNTESE.....	10
2.3 CLASSIFICAÇÃO.....	14
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	14
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	14
3.2 MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	14
3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO.....	14
3.4 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO.....	14
3.5 DADOS ESPECTROMÉTRICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	14

3.5.1 AD-1 ( ácido caurenóico).....	14
3.5.2 AD-2 (ácido <i>ent</i> -19-carbometoxicauran-17-óico) .....	14
3.5.3 AD-3 (ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico).....	14
3.5.4 AD-4 (16 $\beta$ ,17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-al).....	14
<b>3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>14</b>
3.6.1 AD-1 (Ácido Caurenóico) .....	14
3.6.2 AD-2 (ácido <i>ent</i> -19-carbometoxicauran-17-óico) .....	14
3.6.3 AD-3 (ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico).....	14
3.6.4 AD-4 (16 $\beta$ ,17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-al).....	14
<b>ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÁCIDO CAURENÓICO NA <i>Annona glabra</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>14</b>
4.2.1 Coleta do material botânico.....	14
4.2.2 Preparação da amostra .....	14
4.2.3 Instrumentos e coluna .....	14
4.2.4 Condições cromatográficas.....	14
4.2.5 Determinação e calibração.....	14
4.2.6 Testes de Recuperação .....	14
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>14</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais gêneros da família Annonaceae.....	2
Tabela 2: Alcalóides encontrados em <i>A. glabra</i> .....	4
Tabela 3: Acetogeninas encontrados em <i>A. glabra</i> .....	7
Tabela 4: Diterpenos encontrados em <i>A. glabra</i> .....	9
Tabela 5: Plantas medicinais contendo diterpenos e suas ações farmacológicas....	16
Tabela 6: Frações obtidas da partição líquido/líquido.....	19
Tabela 7: Frações obtidas da cromatografia líquida a vácuo .....	21
Tabela 8: Dados de RMN de <sup>1</sup> H do ácido caurenóico (CDCl <sub>3</sub> , 200MHz).....	26
Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C do ácido caurenóico (CDCl <sub>3</sub> ; 200MHz).....	27
Tabela 10: Atribuições dos sinais de átomos de carbono de AD-2.....	29
Tabela 11: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100;400MHz).....	30
Tabela 12: Atribuições dos sinais de átomos de carbono de AD-3 .....	32
Tabela 13: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 200;50 MHz).....	32
Tabela 14: Atribuições dos sinais de átomos de carbono de AD-4.....	34
Tabela 15: Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C do 16β, 17 diidroxi- <i>ent</i> - cauran-19-al (CDCl <sub>3</sub> ; 200MHz).....	35
Tabela 16: Quantificação do ácido caurenóico por extração em soxhlet da casca do caule de <i>A. glabra</i> após cada 3 ciclos.....	43
Tabela 17: Quantificação do ácido caurenóico por extração em soxhlet das folhas de <i>A. glabra</i> após cada 3 ciclos.....	44
Tabela 18: Doseamento do ácido caurenóico, por estação climática na casca do caule de <i>A. glabra</i> para soxhlet e sonicação .....	45
Tabela 19: Teor do ácido caurenóico na casca do caule de <i>A. glabra</i> por estação climática e por método de extração (mg % ).....	46
Tabela 20: Doseamento do ácido caurenóico, por estação climática nas folhas de <i>A. glabra</i> para soxhlet e sonicação.....	47
Tabela 21: Teor do ácido caurenóico nas folhas de <i>A. glabra</i> por estação climática e por método de extração (mg % ).....	47
Tabela 22: Recuperação do éster de esteviol e do ácido caurenóico, extração em soxhlet na casca do caule de <i>A. glabra</i> .....	49

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Quadro geral de biossíntese.....	11
Esquema 2: Biossíntese dos terpenos pela via mevalônica.....	12
Esquema 3: Biossíntese dos terpenos pela via metil eritritol fosfato.....	13
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico da casca do caule de <i>A. glabra</i> .....	20



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas dos alcalóides encontrados em <i>A. glabra</i> .....	5
Figura 2: Estrutura dos monoterpenos encontrados em <i>A. glabra</i> .....	8
Figura 3: Diterpenos encontrados em <i>A. glabra</i> .....	9
Figura 4: Unidade isopreno .....	10
Figura 5: Estruturas de diterpenos.....	14
Figura 6: Estruturas de diterpenos com ação farmacológica:.....	14
Figura 7: Curva de calibração do ácido caurenóico.....	14
Figura 8: Curva de calibração do éster de esteviol.....	14
Figura 9: Teor do ácido caurenóico na casca do caule de <i>A. glabra</i> por estação climática e por método de extração. ....	14
Figura 10: Teor do ácido caurenóico nas folhas de <i>A. glabra</i> , por estação climática e por método de extração. ....	14
Figura 11: Cromatograma do extrato de casca de <i>A. glabra</i> .....	14
Figura 12: Cromatograma do extrato de folha de <i>A. glabra</i> .....	14
Figura 13: Espectro no infravermelho - ácido caurenóico.....	70
Figura 14: Atribuição no espectro de RMN de <sup>1</sup> H – ácido caurenóico.....	71
Figura 15: Atribuição no espectro de RMN de <sup>1</sup> H expandido – ácido caurenóico.....	72
Figura 16: Atribuição no espectro de RMN de <sup>13</sup> C – ácido caurenóico.....	74
Figura 17: Atribuição no espectro DEPT – ácido caurenóico.....	75
Figura 18: Espectro no infravermelho–ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	76
Figura 19: Atribuição no espectro de RMN de <sup>1</sup> H – ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	77
Figura 20: Mapa de contorno COSY de <sup>1</sup> H – ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	78
Figura 21: Atribuição no espectro de RMN de <sup>13</sup> C-ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	79
Figura 22 : Atribuição no espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT-ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	80
Figura 23: Mapa de contorno HMQC-ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	81
Figura 24: Espectro de massa-ácido <i>ent</i> -19-carbometoxi cauran-17-óico.....	82
Figura 25: Espectro no infravermelho-ácido 16 β-hidro-19- <i>of-ent</i> -cauran-17-óico.....	83

Figura 26: Atribuição no espectro de RMN de $^1\text{H}$ – ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico.....	84
Figura 27: Mapa de contorno COSY de $^1\text{H}$ ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico.....	85
Figura 28: Atribuições no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico.....	86
Figura 29: Atribuição no espectro DEPT ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico..	87
Figura 30: Mapa de contorno HMQC-ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico.....	88
Figura 31: Espectro de massa ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol- <i>ent</i> -cauran-17-óico.....	89
Figura 32: Espectro no infravermelho 16 $\beta$ -17-diidroxi- <i>ent</i> - cauran-19-al.....	90
Figura 33: Atribuição no espectro de RMN de $^1\text{H}$ -16 $\beta$ -17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-al	91
Figura 34: Mapa de contorno COSY de $^1\text{H}$ 16 $\beta$ -17-diidroxi- <i>ent</i> - cauran-19-al.....	92
Figura 35: Atribuição no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ 16 $\beta$ -17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-al.....	93
Figura 36: Atribuição no espectro DEPT 16 $\beta$ -17-diidroxi- <i>ent</i> - cauran-19-al.....	94
Figura 37: Espectro de massa 16 $\beta$ -17-diidroxi- <i>ent</i> - cauran-19-al.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$  - deslocamento químico  
°C – grau Celsius  
 $\mu\text{m}$  – micrômetros  
 $\lambda_{\text{máx}}$  - comprimento de onda (nm) de absorção máxima  
CCD - cromatografia em camada delgada  
CCDC – cromatografia em camada delgada centrífuga  
 $\text{CDCl}_3$  - clorofórmio deuterado  
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência  
CLAE-FR – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa  
CLV – cromatografia líquida à vácuo  
COSY- correlação homonuclear (H x H)  
CPD – composition pulse decoupling  
cm - centímetro  
d - duplete  
dt - duplo tripleto  
DEPT- espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  utilizando transferência de polarização  
DMSO - dimetilsulfóxido  
EM – espectrometria de massas  
g - grama  
g/L – grama por litro  
HMQC – hetero multiple quantum coherence  
Hz - hertz  
IV – infravermelho  
m - multiplete  
Me – grupo metila  
mg - miligrama  
mL - mililitro  
mm – milímetros  
ppm – parte por milhão  
q - quarteto  
Rf - razão de frente  
RMN de  $^{13}\text{C}$  – ressonância magnética nuclear de carbono –13  
RMN de  $^1\text{H}$  – ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
s – simpleto  
t - tripleto  
TMS - tetrametilsilano  
tr- tempo de retenção  
UV – ultravioleta

## RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo químico de *Annona glabra* Linnè. O fracionamento cromatográfico da casca do caule levou ao isolamento de diterpenóides com esqueleto caurânico: ácido caurenóico, ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico, ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-caran-17-óico, 16 $\beta$ ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al. Dentre esses o ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-caran-17-óico e 16 $\beta$ ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al foram isolados pela primeira vez na espécie; o ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico é inédito na família. As determinações estruturais foram baseadas em técnicas espectrométricas usuais.

Foi também realizada a quantificação do principal composto isolado, o ácido caurenóico, devido as suas importantes propriedades farmacológicas. Através de CLAE-FR foi realizado um estudo da distribuição deste metabólito na planta. Os maiores teores foram encontrados na casca do caule (503,22 mg%) e os menores nas folhas (10,53 mg%). A variação sazonal deste composto foi significativa, tendo sido encontrado os maiores teores no outono e os menores no inverno.

Palavras Chave – *Annona glabra*; diterpenos ;ácido caurenóico.

## ABSTRACT

This work describes the chemical study of *Annona glabra* Linnè. The chromatographic fractionation of stem bark led to the isolation of kaurenoic acid, *ent*-19-carbomethoxykauran-17-oic acid, 16 $\beta$ -hydro-19-ol-*ent*-kauran-17-oic acid, 16 $\beta$ , 17-dihydroxi-*ent*-kauran-19-al. This is the first report of these compounds in the plant except the first one. The structure determination was based on spectrometric data.

The determination of the main compound isolated, kaurenoic acid, was also carried out due to its important pharmacological properties. Using RP-HPLC a study of the distribution of the metabolite in the plant was accomplished. The highest concentration of kaurenoic acid was found in the bark (503,22 mg %) and the lowest in the leaves (10,53 mg %). The seasonal variation of this compound was also significative. The highest concentrations were found in the autumn and the lowest in the winter.

## CAPÍTULO I

### *Annona glabra* L. E A FAMÍLIA ANNONACEAE

#### 1.1 INTRODUÇÃO

Os homens, diante de suas necessidades de saúde, identificaram as propriedades terapêuticas de várias plantas acumulando dados preciosos e valiosos até hoje. Na busca de compreender as questões relacionadas com esta biodiversidade, o estudo fitoquímico vem ganhando importância, procurando identificar os princípios ativos e as interações destes vegetais com o ambiente onde se localizam ou devido a variação climática.

*Annona glabra* L. é uma planta da família Annonaceae, conhecida popularmente como araticum-do-brejo. Ela é encontrada em quase toda região costeira brasileira e é utilizada na medicina popular como vermífugo e no tratamento de reumatismo (SANTOS,1998). Muito pouco de sua composição química é conhecida.

#### 1.2 OBJETIVO

Devido ao pequeno número de relatos de seu estudo na literatura resolvemos realizar o estudo químico da planta *A. glabra* L. com ênfase para diterpenóides tetracíclicos. Tal escolha se baseou no fato de haver apenas dois trabalhos descritos para este grupo de compostos na planta (YANG,1973; CHANG,1998) e que vários compostos desta classe possuem propriedades biológicas relevantes (DEWICK,1997;BLOCK,1998). Além disso era nosso objetivo quantificar algum metabólito encontrado que fosse biologicamente ativo.

#### 1.3 FAMÍLIA ANNONACEAE

Annonaceae é uma grande família de árvores e arbustos composta de 120 gêneros e mais de 2000 espécies. Estas plantas ocorrem em regiões tropicais e subtropicais sendo que a Ásia e a Austrália possuem a maior diversidade de espécies. No continente americano encontram-se 38 gêneros e 740 espécies. No Brasil, em particular, estão descritos 29 gêneros compreendendo 260 espécies

(BARROSO,1978). Os principais gêneros desta família estão relacionados na tabela1.

TABELA 1: PRINCIPAIS GÊNEROS DA FAMÍLIA Annonaceae

Gênero	Número de Espécies
<i>Guatteria Ruiz &amp; Pav.</i>	~250
<i>Uvaria L</i>	150
<i>Xylopia L.</i>	(~100 – 150)
<i>Annona L.</i>	120
<i>Polyalthia Bl</i>	120
<i>Goniothalamus Hook. F. &amp; Thoms</i>	115
<i>Artabotrys R.Br.</i>	~100
<i>Duguetia A St. Hil.</i>	70
<i>Fissistigma Griff.</i>	~70
<i>Rollinia A St. Hil.</i>	65

Esta família vegetal tem importância econômica por ser fonte de frutos comestíveis. A *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa), são muito apreciadas e tem um alto valor comercial. Os frutos e sementes possuem carboidratos (frutose, sacarose e glicose), lipídeos, aminoácidos e proteínas o que confere alto valor nutritivo. As sementes produzem óleo comestível e utilizado para fabricação de sabão.

Durante a década de 70, muitos estudos químicos (e em menor escala farmacológicos) da família foram realizados (LEBOEUF,1982). Grande parte das investigações centraram-se sobre alcalóides, tendo sido encontrados vários de estrutura isoquinolínica, notavelmente os aporfínicos. Compostos de outras classes como os polifenóis, flavonóides, óleos essenciais, terpenóides, compostos aromáticos e poliprenóis também já foram encontrados. Mais recentemente tem sido amplamente estudadas as acetogeninas e ciclopeptídeos (LIU,1998 a,b; 1999 a,b) Diterpenóides também tem sido encontrados na família principalmente aqueles com esqueletos caurano, traquilobano e clerodano (ETSE,1987; FERRARI,1971).

#### 1.4 *Annona glabra*

O gênero *Annona* é representativo dentro da família Annonaceae. Isto se deve ao grande número de espécies deste gênero e a presença de metabólitos secundários de várias classes, principalmente alcalóides e acetogeninas. Estas últimas tem sido intensamente estudadas recentemente devido a propriedades anti-cancerígenas. Estes fatores justificam o grande interesse de estudo deste gênero.

A *A. glabra*, cujo nome popular é araticum-do-brejo, é uma planta nativa da América. É encontrada no litoral atlântico da América do Sul desde a Guiana até Santa Catarina. Ela prefere terrenos baixos das margens dos lagos, foz dos rios e mangues onde frequentemente se encontra com as raízes imersas na água salobra.

Segundo Pio Corrêa esta planta é um “arbusto grande ou árvore pequena, geralmente até 4 metros de altura, às vezes maior, alcançando até 8 metros, casca grossa, avermelhada, muito aromática, revestida de epiderme espessa, crustácea, parda e pardacenta, irregularmente fendida; folhas alternas pecioladas, muito variáveis, ovadas ou oblongas, agudas, simples, inteiras, quase coriáceas, geralmente glabras, às vezes sericeo-tomentosas, saliente-nervadas (nervação avermelhada) nas duas páginas, sendo a superior vernicosa, flores carnosas, verde amareladas externamente, com mácula púrpura e uma zona amarelada na base das pétalas dispostas em pedúnculos com uma bráctea solitários, axilares; fruto baga composta quase lisa, cordiforme, tuberculado, vermelho-amarelo ou pardacento de 6-13cm. de diâmetro”.(PIO CORRÊA,1984).

Segundo a classificação de A CRONQUIST *A. glabra* está assim caracterizada (BARROSO, 1978):

Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliidae
Ordem	Magnoliales
Família	Annonaceae
Sub-família	Annonoideae
Tribo	Unnoneae
Gênero	<b><i>Annona</i></b>
Espécie	<b><i>Annona glabra</i></b>

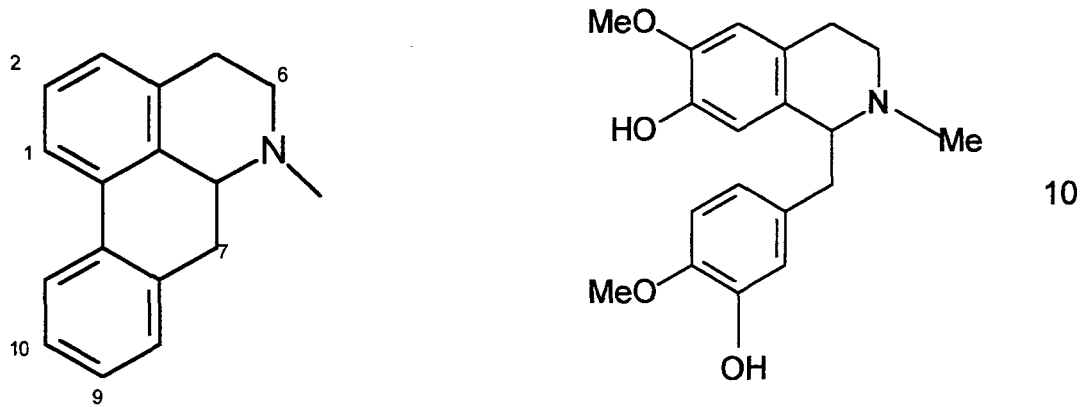


Em medicina popular *A. glabra* é usada como vermífugo e no tratamento de reumatismo (SANTOS,1998).

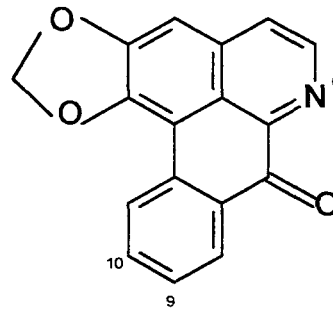
Estudos iniciais sobre *A. glabra* relataram o isolamento de alcalóides. O primeiro deles descreve o isolamento da liriodenina da casca do caule, uma substância com atividade antitumoral. Trabalhos subsequentes levaram ao isolamento de outros 10 alcalóides. Estas informações estão resumidas na tabela 2 e figura 1.

TABELA 2: ALCALÓIDES ENCONTRADOS EM *A. glabra*.

Alcalóide	Estrutura	Localização	Ref. Bibliográfica
Anolobina	1	Casca de caule/tronco	YANG,1974
Anonaina	2	Casca de caule/tronco	idem
Asimilobina	3	Tronco	Idem
Isoboldina	4	Tronco	Idem
Liriodenina	5	Casca de caule/tronco	WARTHEN,1969
N-Metilactinodafnina	6	Folha	YANG,1973
Nornuciferina	7	Tronco	Idem
Norushinsunina	8	Tronco	Idem
Phanostenina	9	Folhas	CASTAÑEDA,1994
Reticulina	10	Folhas	YANG,1971
		Casca do caule/tronco	Idem
Roemerina	11	Tronco	idem

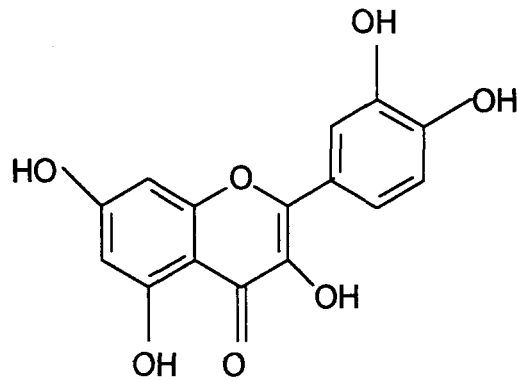
FIGURA 1: ESTRUTURAS DOS ALCALÓIDES ENCONTRADOS EM *A. glabra*

	1	2	6	7	9	10
1	OCH <sub>2</sub> O		H	-	OH	-
2	OCH <sub>2</sub> O		H	-	-	-
3	OMe	OH	H	-	-	-
4	OH	OMe	Me	-	OH	OMe
6	OCH <sub>2</sub> O		Me	-	OH	OMe
7	OMe	OMe	H	-	-	-
8	OCH <sub>2</sub> O		H	OH <sub>α</sub>	-	-
11	OCH <sub>2</sub> O		Me	-	-	-



	6	9	10
5	-	-	-
9	Me	OMe	OH

O único flavonóide descrito na *A. glabra* foi a quercetina (12). Este composto, que é comum no reino vegetal, foi encontrado nas folhas da planta (LEBOEUF,1982.)



12

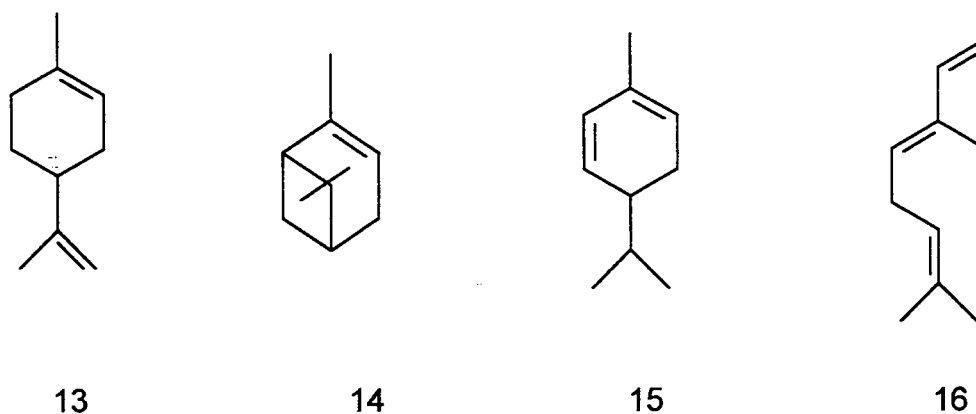
A maioria dos trabalhos fitoquímicos sobre a *A. glabra* se concentraram no isolamento de acetogeninas. Estes compostos são importantes devido às suas atividades biológicas, principalmente a anti-tumoral. Na década de 90 foram realizados sete estudos sobre acetogeninas onde foram relatados 28 estruturas na espécie conforme tabela 4 sendo que as estruturas encontram-se descritas no anexo 2, pág.64.

TABELA 3: ACETOGENINAS ENCONTRADAS EM *A. glabra*.

Acetogenina	Localização	Ref. Bibliográfica
Glacina A	Folha	LIU, 1998 a
Glacina B	Folha	Idem
Glabranina	Semente	GALLARDO, 1998
Muricatetrocina-B	Semente	Idem
Gigantetronenina	Semente	Idem
Gigantetrocina-A	Semente	Idem
Annonacina	casca de caule	CHEN, 1995
	Semente	GALLARDO, 1998
Annonacinona	Semente	Idem
Corossolina	Semente	Idem
Corossolona	casca de caule	CHEN, 1995
	Semente	GALLARDO, 1998
Molvizarina	Semente	Idem
Parviflorina	Semente	Idem
Laherradurina	Semente	Idem
Itrabina	Semente	Idem
Glabracina A	Folhas	LIU, 1998 b
Glabracina B	Folhas	Idem
Bullatanocina	Folhas	Idem
Squamocina	Semente	OHSAWA, 1991
Asimicina	semente	Idem
Desacetilivaricina	Semente	Idem
Cherimolina-2	Semente	LI, 1995
Annonina I	Semente	Idem
4-desoxicherimolina-2	Semente	Idem
Solamina	casca de caule	CHEN, 1995
Annonaglxina	Folhas	LIU, 1999 a
27-hidroxiullatacina	Folhas	Idem
Annoglacina A	Folhas	LIU, 1999 b
Annoglacina B	folhas	Idem

Monoterpenos tem sido encontrados como constituintes voláteis em frutos verdes e maduros da espécie (SANTOS, 1998). Os principais monoterpenos identificados, representando 75% dos voláteis em frutos verdes e 56% em maduros, são:  $\alpha$ -pineno (13), limoneno(14),  $\alpha$ -felandreno (15), (E)- $\beta$ -ocimeno (16). Outros 39 monoterpenos encontram-se em concentrações menores.

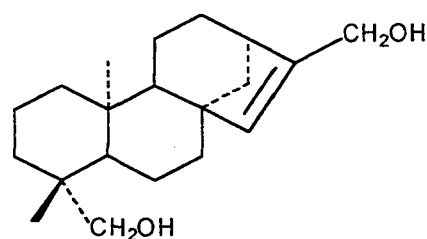
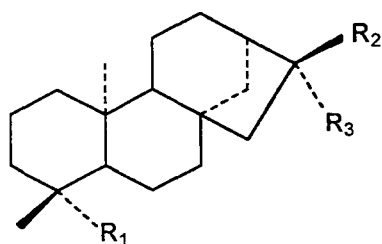
FIGURA 2: ESTRUTURA DOS MONOTERPENOS ENCONTRADOS EM *A. glabra*



Diterpenos também tem sido descritos na espécie principalmente com esqueleto caurano. Os dados estão resumidos na tabela 4 e figura 3. Outros diterpenos descritos no gênero estão relacionados no anexo 1, pág.59.

TABELA 4 : DITERPENOS ENCONTRADOS EM *A. glabra*

Diterpeno	Estrutura	Localização	Ref.Bibliográfica
Ácido <i>ent</i> caur-16-en-19-óico	17	tronco	YANG,1973
		fruto	CHANG,1998
Ácido 16 $\alpha$ -17-dihidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-óico	18	fruto	Idem
Ácido 16 $\beta$ -hidroxi-17-acetoxi- <i>ent</i> -cauran-19-óico	19	fruto	Idem
Ácido 16 $\beta$ -hidro- <i>ent</i> -cauran-17-óico	20	fruto	Idem
Ácido 16 $\alpha$ -hidro- <i>ent</i> -cauran-17-óico	21	fruto	Idem
<i>ent</i> -caur-16-en-19-ol	22	fruto	Idem
<i>ent</i> -caur-15-ene-17,19-diol	23	fruto	Idem
Ácido 16 $\alpha$ -hidro-19-al- <i>ent</i> -cauran-17-óico	24	fruto	Idem
Metil-16 $\alpha$ -hidro-19-al- <i>ent</i> -cauran-17-oato	25	fruto	Idem
16 $\beta$ -hidroxil-17-acetoxi- <i>ent</i> -cauran-19-al	26	fruto	Idem
Ácido 19-nor- <i>ent</i> -cauran-4 $\alpha$ -ol-17-óico	27	fruto	Idem
Ácido 16 $\alpha$ -hidro-19-acetoxi- <i>ent</i> -cauran-17-óico	28	fruto	Idem
Metil-16 $\beta$ -acetoxi-19-al- <i>ent</i> -cauran-17-oato	29	fruto	Idem

FIGURA 3: DITERPENOS ENCONTRADO EM *A.glabra*.

	R1	R2	R3
17	COOH	=CH <sub>2</sub>	
18	COOH	CH <sub>2</sub> OH	OH
19	COOH	OH	CH <sub>2</sub> OAc
20	CH <sub>3</sub>	H	COOH
21	CH <sub>3</sub>	COOH	H
22	CH <sub>2</sub> OH	=CH <sub>2</sub>	
24	CHO	COOH	H
25	CHO	COOCH <sub>3</sub>	H
26	CHO	OH	CH <sub>2</sub> OAc
27	OH	COOH	H
28	CH <sub>2</sub> OAc	COOH	H
29	CHO	OAc	COOCH <sub>3</sub>

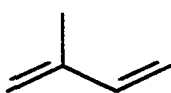
## CAPÍTULO II

### DITERPENOS

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Diterpenos são compostos de 20 átomos decarbonos pertencentes a grande classe dos terpenos. Os terpenos são metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza. Eles são encontrados em abundância nas plantas superiores e com uma rica diversidade química, estruturalmente baseados na repetição da unidade isopreno (2-metil-1,3-butadieno, fig. 4).

FIGURA 4: UNIDADE ISOPRENO



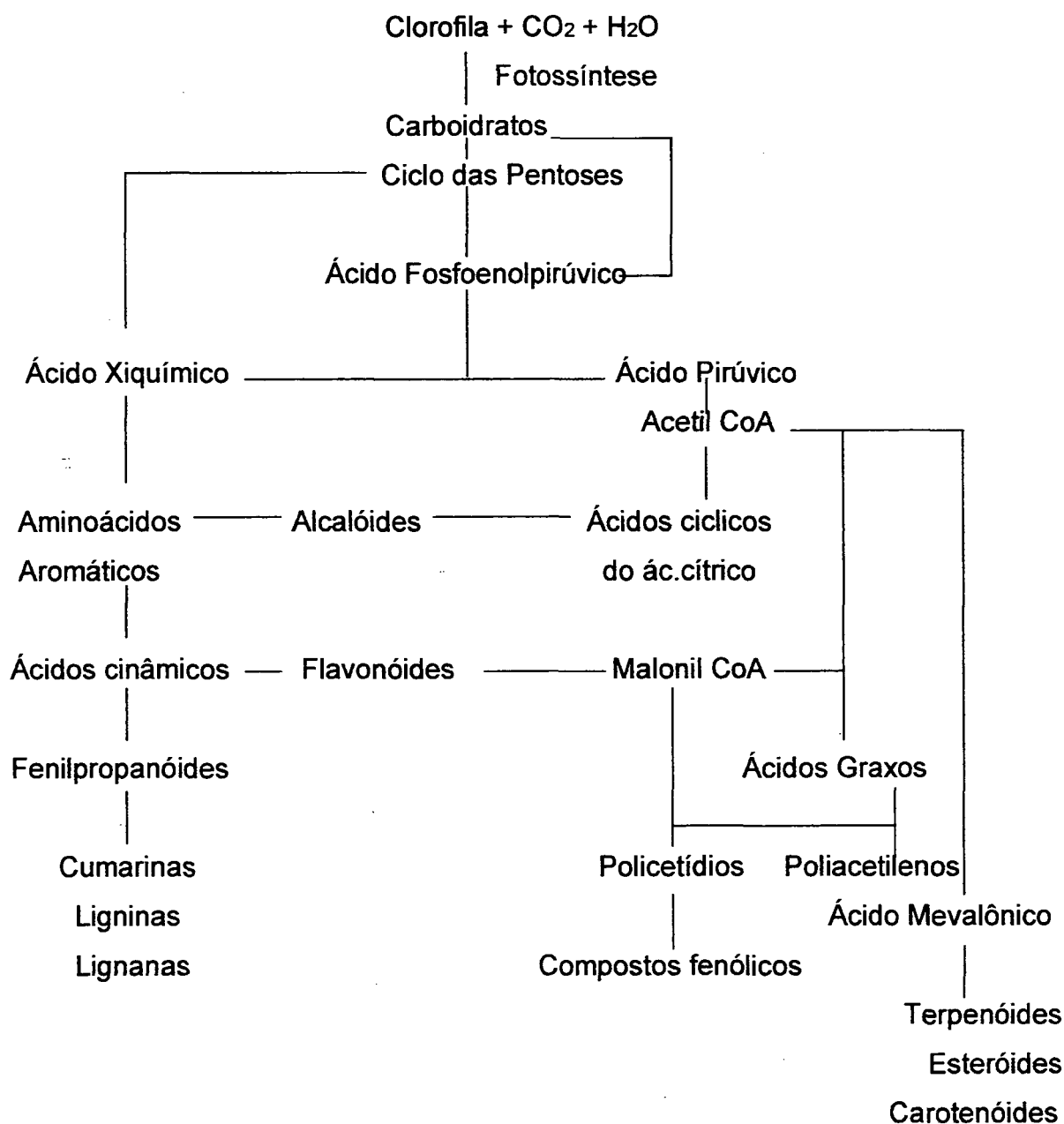
O número de unidades de isopreno de determinado terpeno serve de base para a classificação desses compostos; monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ); diterpenos ( $C_{20}$ ) e triterpenos ( $C_{30}$ ). Durante a biossíntese destes compostos depois de formado o esqueleto carbônico podem ocorrer reações de oxidação, redução, rearranjo, ciclização ou outras. O metabólito resultante é, por isso, chamado genericamente de terpenóide.

A maioria dos terpenóides são encontrados livres no tecido da planta, mas muitas vezes podem ser encontrados como glicosídeos, ácidos de ésteres orgânicos ou combinados com proteínas.

#### 2.2 BIOSÍNTESE

Segundo GEISSMAN as rotas biossintéticas das diversas classes de metabólitos secundários podem ser resumidamente visualizadas no esquema a seguir:

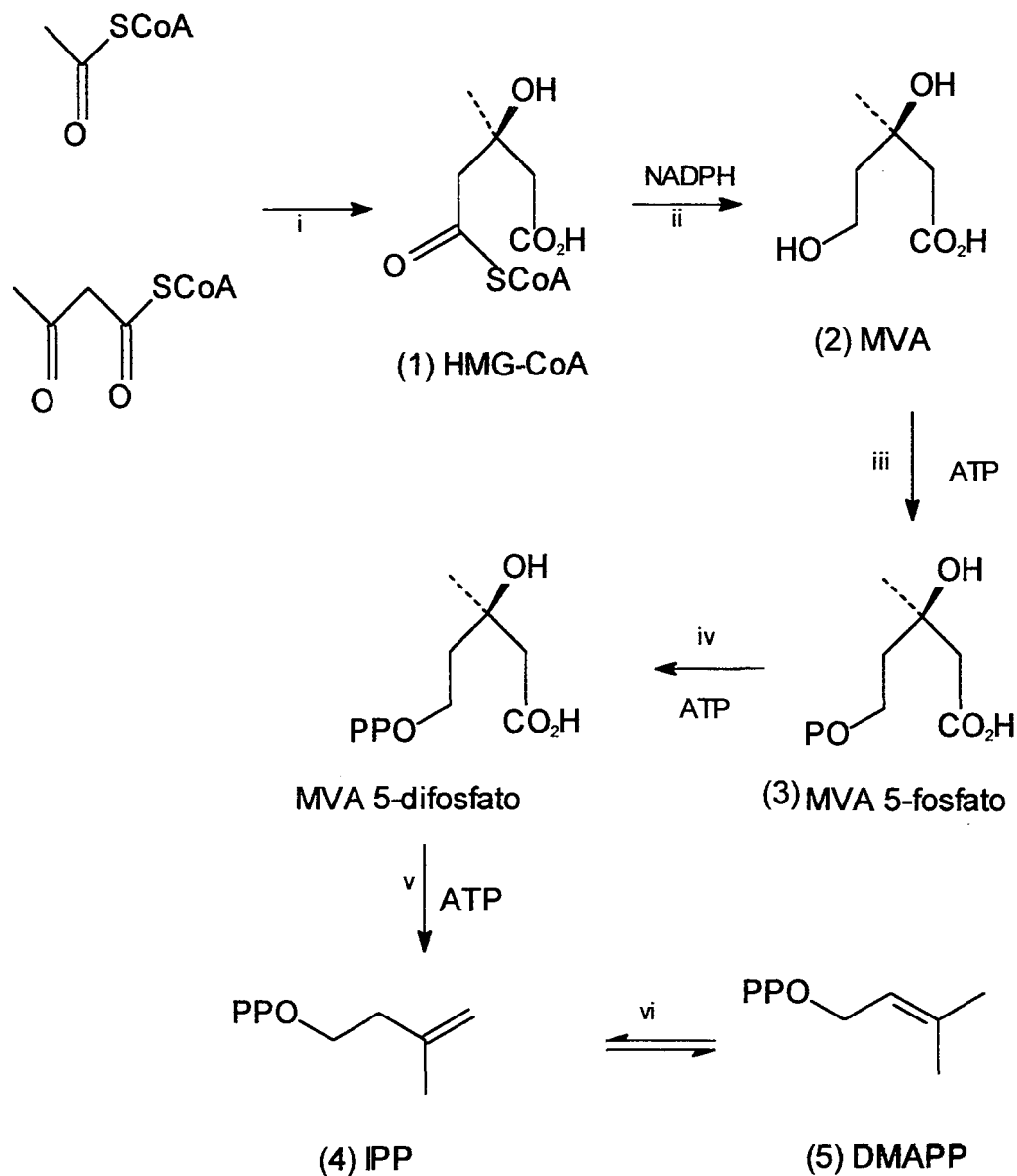
## ESQUEMA 1 : QUADRO GERAL DE BIOSSÍNTESE



O isopreno não é encontrado na natureza. Apesar de servir didaticamente como unidade básica de terpenos ele não é de fato o precursor destes compostos. A biossíntese de terpenos tem como base o pirofosfato de isopentila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). A partir da união de malonil CoA com acetil CoA, origina o ácido mevalônico (MVA) sendo este o precursor do IPP e DMAPP; conseqüentemente dos outros terpenos (esquema 2). Por muitos anos, acreditou-se que esta seria a única rota biossintética possível para a formação de compostos terpenóides.



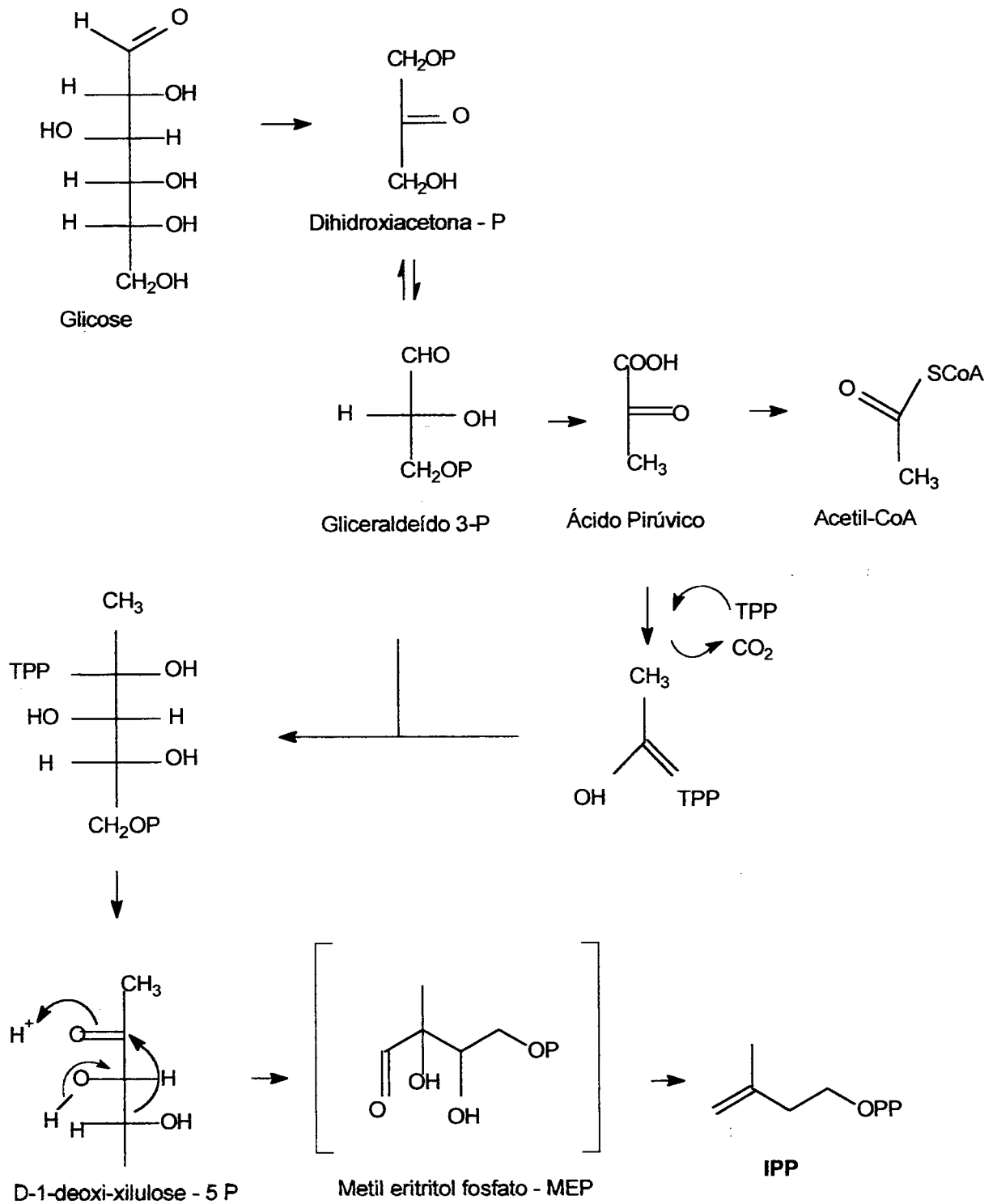
## ESQUEMA 2: BIOSÍNTESE DOS TERPENOS PELA VIA MEVALÔNICA.



Enzimas: i – HMG CoA sintase; ii – HMG CoA redutase; iii – mevalonato kinase;  
iv – fosfomevalonato kinase; v – mevalonato 5-difosfato decarboxilase; vi – IPP isomerase.

Recentemente foi proposta uma rota alternativa para a biossíntese dos terpenos. Ela foi descoberta na bactéria *Rhodospirillum rubrum* e encontrada também em algas verdes e plantas superiores. Nesta rota a partir do gliceraldeído-3-fosfato e ácido pirúvico é formado o 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato precursor do IPP conforme mostra o esquema 3. (ROHMER, 1992; ROHMER, 1993; LICHTENTHALER, 1996.)

ESQUEMA 3 : BIOSÍNTESE DOS TERPENOS PELA VIA METIL ERITRITOL FOSFATO.



TPP : Difosfato de tiamina (LICHTENTHALER, 1997).

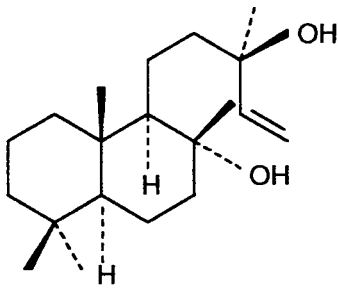
## 2.3 CLASSIFICAÇÃO

Os diterpenóides compreendem um grande grupo de compostos  $C_{20}$  com vários tipos de estruturas. Há diterpenóides acíclicos, mas a grande maioria é de compostos cíclicos com até cinco anéis. Os vários esqueletos carbônicos conhecidos de diterpenóides cíclicos estão mostrados na figura 5.

FIGURA 5: ESTRUTURAS DE DITERPENOS.

### Bicíclicos

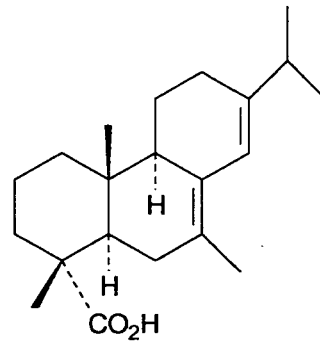
#### Série de labdanos



Esclareol

### Tricíclicos

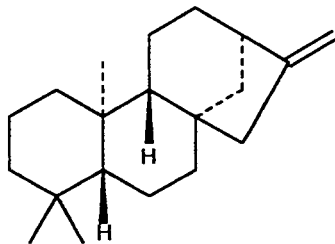
#### Série de abietanos



(-)- Ácido Abiético

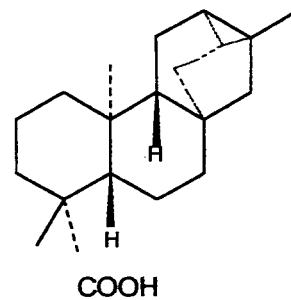
### Tetracíclicos

#### Séries caurênicas:



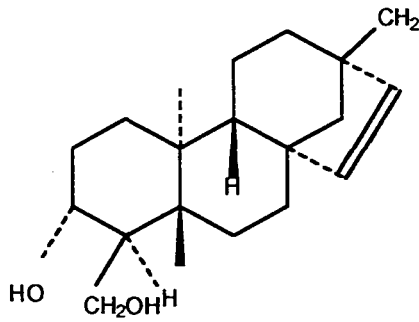
*ent*-caureno

#### Série de traquilobanos



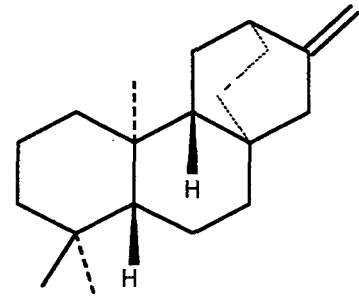
Ácido traquilobanóico

Série de baieranos:



Baierol

Série de atisiranos:



Atisireno

Os diterpenóides podem existir tanto na configuração normal quanto na estereoquímica antipodal. A série normal tem uma fusão de anéis A/B que se relaciona estereoquimicamente com a dos esteróides enquanto que as séries em que a fusão dos anéis é antipodal são conhecidas como séries *ent.* revelando a inversão de configuração de todos os centros quirais envolvidos numa substância com configuração definida. Na mesma espécie vegetal podem ocorrer exemplos de ambas.

## 2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os diterpenóides têm vasta gama de atividades biológicas. Eles podem agir em vários sistemas biológicos ocasionando várias respostas.

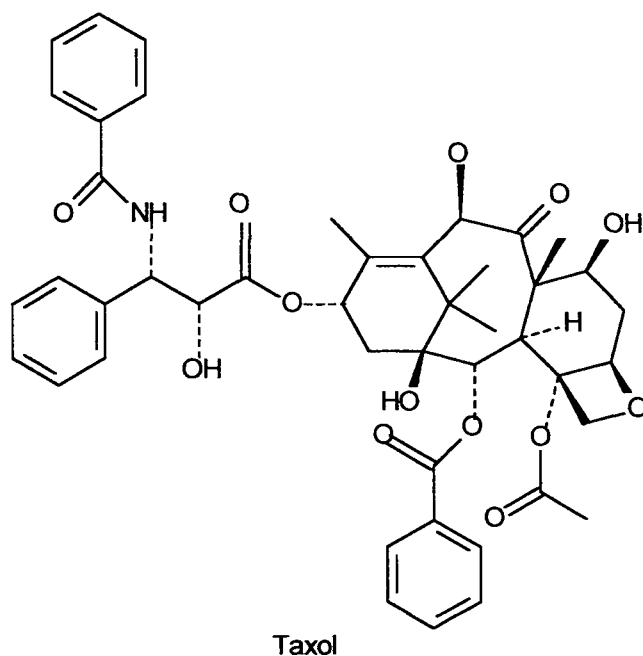
Os ácidos resínicos como o abiético são exsudados da madeira das árvores, especialmente as coníferas e protegem-nas de infecções e do ataque dos insetos. As giberelinas são hormônios vegetais que estimulam o crescimento da planta, enquanto as prodolactonas são inibidores do seu crescimento. Os diésteres do forbol são muito usados em estudos farmacológicos sobre a carcinogênese por sua capacidade de provocar a formação de tumores.

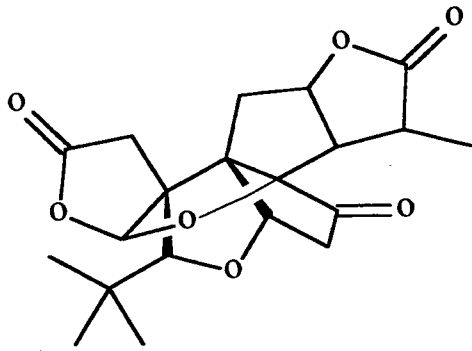
Algumas plantas tem sido amplamente estudadas devido a ação terapêutica dos diterpenos nelas encontrados. Exemplos de plantas contendo diterpenos estão sumarizadas na tabela 5. (DEWICK,1997.)

TABELA 5 : PLANTAS MEDICINAIS CONTENDO DITERPENOS  
E SUAS AÇÕES FARMACOLÓGICAS

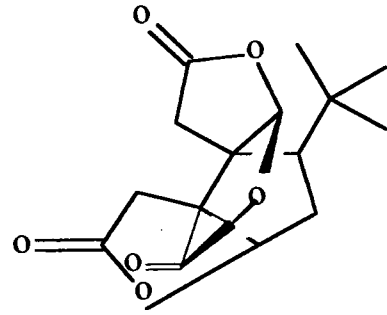
Espécie/ Família	Efeito Terapêutico	Constituintes diterpenoídicos
<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)	Anticancerígeno	Taxol
Ginkgo biloba (Ginkgoaceae)	Melhora a circulação periférica e cérebro-vasculares	Ginkgolídeo Bilobalídeo
<i>Coleus forskohlii</i> (Lamiaceae)	Propriedades cardiovasculares, regula pressão sanguínea	Forskolina
<i>Polyalthia</i> <i>macropoda</i> (Annonaceae)	Atividade contra <i>Leishmania</i> <i>donovani</i>	(4S,9R,10R) 18-carboxi-labda - 8,13(E)-diene-15-oato de metila

FIGURA 6: ESTRUTURAS DE DITERPENOS COM AÇÃO FARMACOLÓGICA:

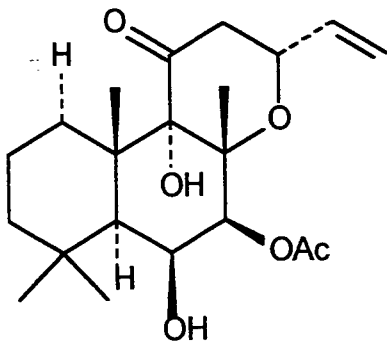




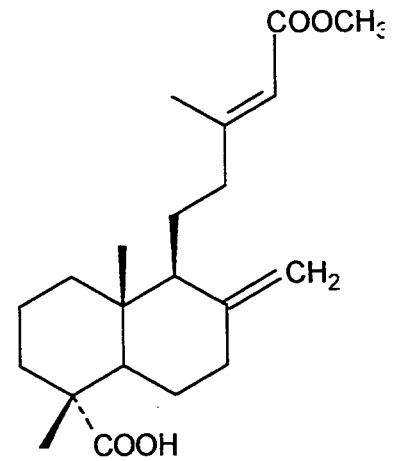
Ginkgolideo



Bilobalideo



Forskolina



(4S,9R,10R)-18-carboxylabda-8,13  
(E)-diene-15-oato de metila

## CAPÍTULO III

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

1. Para as extrações, partições e sistemas cromatográficos foram utilizados solventes de grau comercial os quais foram destilados. Para o uso em CLAE foram utilizados metanol (Merck, art. 2007), acetonitrila (Vetec art.2011) e água ultra-pura com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico.
2. O tipo da fase estacionária utilizada variou de acordo com o tipo de separação:
  - para cromatografia líquida à vácuo utilizou-se sílica Si-60 (Merck, art.7744), partículas de 5 - 40  $\mu\text{m}$  e sílica Si-60 H ( Merck, art.7736)
  - para cromatografia camada delgada centrífuga (CCDC) utilizou-se sílica Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, art.7749). Os rotores foram preparados com uma camada de sílica de espessura de 2 mm.
  - para cromatografia em camada delgada – CCD, utilizou-se como adsorvente Si-60 F254 (Merck, art.5554) com espessura de 0,2 mm.
3. As revelações dos cromatogramas em CCD foram feitas com solução de ácido sulfúrico e aquecimento e/ou irradiação no UV (254 e 336nm).
4. A cromatografia circular foi realizada em aparelho Chromatotron.
5. Para cromatografia líquida de alta eficiência preparativa – CLAE foi utilizado um sistema da marca Varian constituído do bomba quaternária modelo 9012Q, detetor de fotodiodo modelo 9065, injetor automático marca Rainin modelo AI-200, e o sistema foi controlado pelo programa Star versão 4.5. A coluna utilizada foi uma C18 de 5  $\mu\text{m}$  da marca Rainin.
6. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrometros da marca Broker Avance DRX 400 e Broker Avance DPX 200, operando a 400 MHz para hidrogênio utilizando como solventes e padrão de referência interna o TMS.

7. Os espectros no IV foram registrados em aparelho Bomem MB-100.

8. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetros da Shimadzu.

### 3.2 MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.

A casca do caule de *A. glabra* foi coletada em Maceió (Alagoas), e o extrato etanólico foi preparado e fornecido pelo professor Antônio Euzébio G. Sant'Anna, do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas.

### 3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

O extrato bruto etanólico (20,18g), foi dissolvido em metanol:água 60:40 (1150 ml), filtrado e particionado consecutivamente com hexano, diclorometano, acetato de etila (3 vezes 200ml cada). Os solventes foram então destilados em rotaevaporador e as massas dos resíduos foram determinadas (tabela 6).

TABELA 6: FRAÇÕES OBTIDAS DA PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO

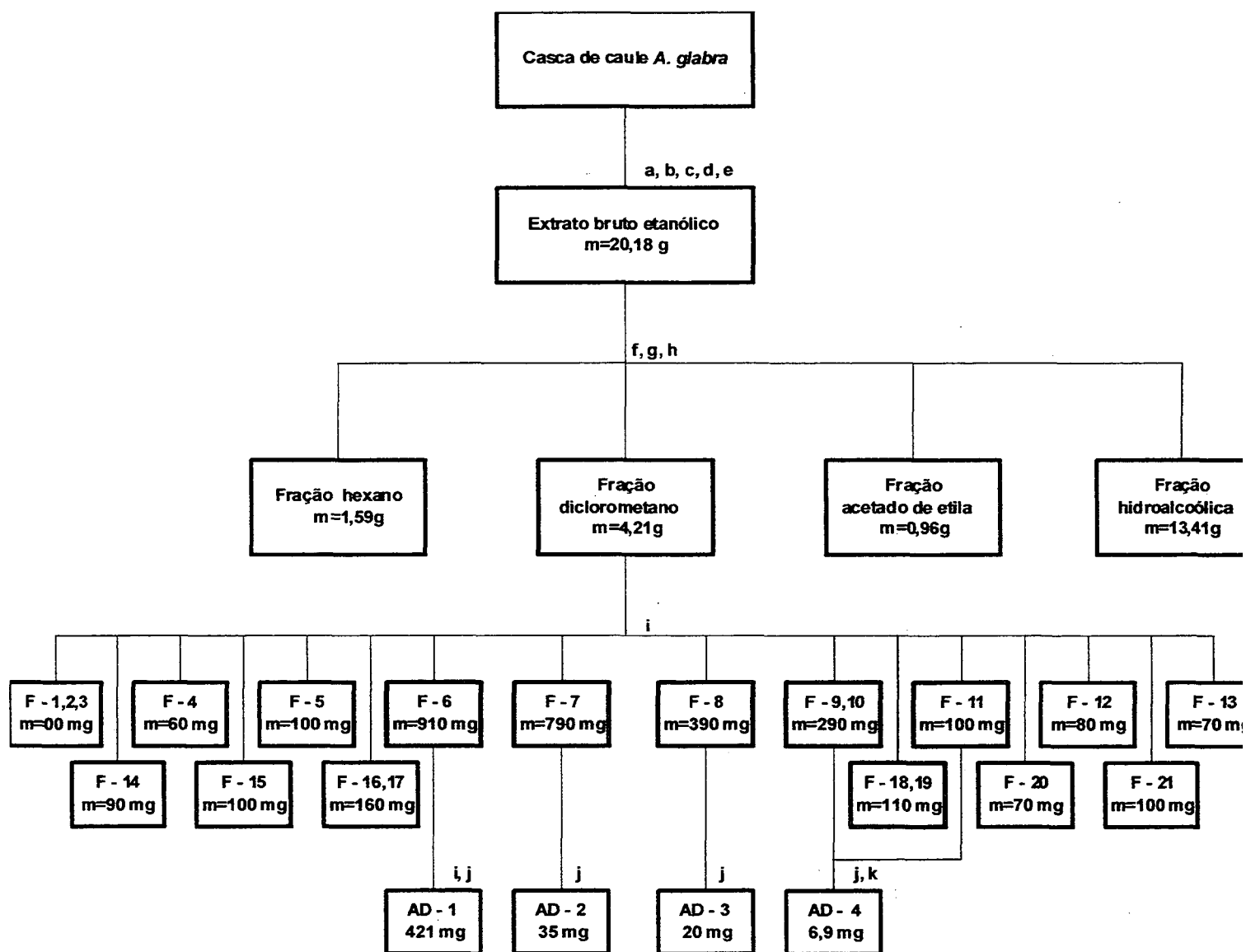
<b>Frações</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Hexânica	1,594	7,90
Diclorometano	4,210	20,86
Acetato de etila	0,960	4,76
Hidroalcoólica	13,416	66,48



## 3.4 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

O fracionamento foi realizado de acordo com o fluxograma mostrado no esquema 4.

ESQUEMA 4: FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA CASCA DO CAULE DE *A. glabra*



- a. secagem
- b moagem
- c maceração
- d refluxo
- e centrifugação
- f concentração em rotaevaporador
- g adição de água (10 a 40 %)
- h partição
- i cromatografia sólido - líquida à vácuo em sílica
- j cromatografia em camada delgada centrifuga (CCDC)
- k cromatografia líquida de alta eficiência preparativa - CLAE

A fração diclorometânica (4,21g) foi incorporada em celite e submetida a cromatografia líquida a vácuo, sendo utilizadas 82,44 g de sílica 5-40  $\mu\text{m}$  em uma coluna de 3 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com hexano; hexano: acetato de etila até acetato de etila 100% (gradiente de 5%) e acetato de etila:etanol 1:1. Foram coletadas vinte e uma frações de 200 ml, as quais foram analisadas por CCD. Depois de destilados os solventes em rotaevaporador suas massas foram determinadas (tabela 7).

TABELA 7 : FRAÇÕES OBTIDAS DA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA A VÁCUO

Frações	Resíduo seco (g)	Frações	Resíduo seco (g)
1	0,000	11	0,100
2	0,000	12	0,080
3	0,000	13	0,070
4	0,060	14	0,090
5	0,100	15	0,100
6	0,913	16	0,090
7	0,791	17	0,070
8	0,390	18	0,070
9	0,200	19	0,040
10	0,090	20	0,070
		21	0,100

A fração 6 foi submetida a nova cromatografia líquida a vácuo utilizando 20 g de sílica 5-40  $\mu\text{m}$ . A eluição foi feita com hexano (3 frações); hexano – acetato de etila 95:5 (7 frações); acetato (1 fração). Frações destas foram refractionadas por CCDC usando como eluente 200 ml hexano – acetato de etila 95:5. Destes experimentos foi isolado o composto AD-1 (421mg).

Parte da fração 7 (313mg) foi refractionadas por CCDC utilizando como eluente 200 ml de hexano:acetato de etila (95: 5). Após análise algumas frações foram reunidas e refractionadas pela mesma técnica com hexano – acetato de etila 80: 20 como eluente. Isto levou ao isolamento do composto AD-2 (35 mg).

A fração 8 formou um precipitado, o qual foi separado por filtração. O precipitado foi ressolubilizado em acetato de etila com uma gota de metanol, e recromatografado por CCDC, utilizando hexano – acetato de etila 7:3 como eluente. Este procedimento levou ao isolamento do composto AD-3 (20 mg), o qual estava também presente no sobrenadante.

As frações 9 e 10 foram reunidas e cromatografadas por CCDC. A fase móvel foi hexano – acetato 6:4 e foram coletadas 30 frações. Parte destas foram reunidas e recromatografadas pela mesma técnica, utilizando-se como eluente clorofórmio – acetato (8:2). Foi obtida uma mistura de dois compostos (14 mg) com  $R_f$  muito próximos, a qual foi submetida à CLAE preparativa. Usando metanol/água (8:2) como fase móvel foi obtido o composto AD-4 (3,7mg).

A fração 11 foi refractionada através de CCDC. Eluição com clorofórmio - acetato de etila 8:2 produziu 25 frações. As frações 12 a 18 foram reunidas (24 mg) e recromatografadas por CLAE preparativa. Eluição com metanol/água (8:2) resultou também no isolamento do composto AD-4 (6,9 mg).

As substâncias isoladas tiveram sua identificação e/ou determinação estrutural baseadas em espectros de massa, infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , e comparados com os dados espectrométricos apresentados na literatura.

### 3.5 DADOS ESPECTROMÉTRICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

#### 3.5.1 AD -1 (ÁCIDO CAURENÓICO)

IV  $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$  : 2937, 1689, 1448, 1263, 873.

RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 200MHz,  $\delta$ , multiplicidade, J/Hz]  $\delta$ : 0,95 (s, 3H); 1,24 (s, 3H); 2,63 (s, 1H); 4,79 (s, 1H); 4,73 (s, 1H) 8,20 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 15,58; 18,42; 19,08; 21,82; 28,96; 33,10; 37,80; 39,66; 39,69; 40,70; 41,27; 43,72; 43,84; 44,22; 48,95; 55,10; 57,04; 102,98; 155,89; 184,12

#### 3.5.2 AD -2 (ÁCIDO *ent*-19-CARBOMETOXICAURAN-17-ÓICO)

IV  $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$  : 2975, 1726, 1701, 1234, 1153.

RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400MHz,  $\delta$ , multiplicidade, J/Hz]  $\delta$ : 0,808 (s, 3H); 1,16 (s, 3H); 3,64 (s, 3H); 2,05 (d, 1H, J=12,8); 2,16 (d, 1H, J=13,2); 2,57 (s, 1H) ,2,94 (dt, 1H);

RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 15,35; 18,21; 19,12; 22,14; 27,31; 28,71; 38,07; 39,40; 39,60; 40,62; 40,65; 41,61; 41,61; 43,77; 44,39; 45,22; 51,08; 56,96; 178,09

#### 3.5.3 AD -3 (ÁCIDO 16 $\beta$ -HIDRO-19-OL-*ent*-CAURAN-17-ÓICO).

IV  $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$  : 2929, 1708, 1454, 1220, 1030.

RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 200MHz,  $\delta$ , multiplicidade, J/Hz]  $\delta$ : 0,92 (s, 3H); 1,04 (s, 3H); 3,4 (d, 1H, J=10,7); 3,8 (d, 1H, J=10,7); 7,8 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 17,24; 17,31; 17,45; 19,77; 26,62; 26,66; 37,89; 38,19; 38,82; 39,50; 39,75; 41,29; 41,32; 43,35; 44,93; 55,90; 56,49; 63,20; 176,12; 184,02

### 3.5.4 AD – 4 (16 $\beta$ ,17-DIIDROXI-*ent*-CAURAN-19-AL)

IV  $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$  : 3374, 2942, 2844, 1693, 1240, 1022

RMN de  $^1\text{H}$  [ $\text{CDCl}_3$ , 400MHz,  $\delta$ , multiplicidade J/Hz]  $\delta$ : 0,87 (s, 3H); 1,17(s, 3H); 2,6 (d,t, 1H,); 3,31 (d, 1H, J=10,0); 3,41 (d, 1H, J=10,8); 9,72 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 15,6; 17,7; 18,1; 19,0; 23,6; 26,1; 33,6; 37,7; 38,9; 39,1; 40,6; 41,2; 42,7; 47,8; 51,6; 54,9; 55,8; 69,0; 78,9; 205,3.

## 3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

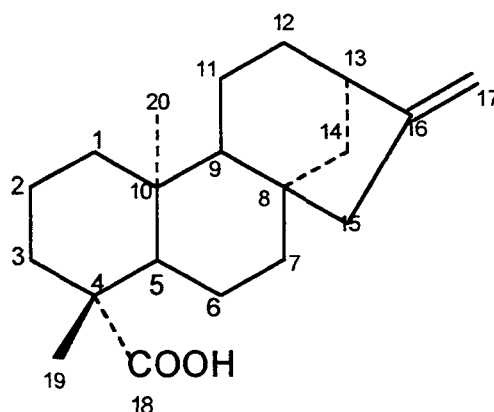
O levantamento bibliográfico de *A. glabra* revelou a existência de apenas dois trabalhos publicados sobre diterpenos na espécie (YANG, 1973; CHANG, 1998). Estes trabalhos resultaram no isolamento de 13 diterpenos com esqueleto caurano apresentados na tabela 4 (pág. 8).

Verificou-se que em outras espécies de *annonas* existiam diterpenos diferentes daqueles encontrados nos estudos desenvolvidos em Taiwan para *A. glabra* (anexo 1, pág. 59); a confirmação dos diterpenos já conhecidos numa espécie nativa no Brasil, a atividade biológica potencial dos diterpenos e o crescimento espontâneo desta espécie no litoral do estado do Paraná nos levou a iniciar um procedimento sistematizado com intuito de identificar metabólitos secundários presentes na espécie, com atenção especial aos diterpenóides.

Após a extração foi realizada partições do extrato bruto com solventes de polaridade crescentes. Esta etapa tem por objetivo a obtenção de frações mais simples e separados de acordo com o coeficiente de partição de seus constituintes nestes solventes.

Devido ao melhor rendimento em massa obtida da fração diclorometânica e por ser se tratar de uma fração de polaridade intermediária, esta foi submetida a cromatografia de adsorção a vácuo com sílica 5–40  $\mu\text{m}$ . As frações obtidas foram analisadas através de CCD, reveladas com ácido sulfúrico mostrando-se ainda bastante complexas o que as levou a serem refracionadas em coluna a vácuo e/ou cromatografia circular até obtermos os compostos puros AD –1, AD-2, AD-3, AD-4.

## 3.6.1 AD-1 (ÁCIDO CAURENÓICO)



O composto AD-1, caracterizado como ácido caurenóico através de comparações em CCD com padrão desta substância, apresentou no espectro no IV banda larga entre 2800 a 3400 e pico em 1689 característicos dos grupos OH e CO, respectivamente, indicando assim a presença de um ácido e o pico em 2937 relativo ao estiramento C-H  $sp^3$  (figura 13, pág. 70).

O espectro de RMN de  $^1H$  (figura 14, pág. 71) mostrou-se bastante complexo na região de  $\delta$  0,8 e 2,6 sendo possível observar a existência de dois grupos metila como simpletos em  $\delta$  1,24 (H-19); 0,95 (H-20) e os hidrogênios metilênico do H-17 da dupla ligação terminal em  $\delta$  4,79 e 4,73 representado por um sistema de spins AB com acoplamento gem conforme tabela 8 indicada na literatura (ENRIQUEZ,1997). A presença de um quarteto centrato em  $\delta$  4,10 refere-se a impureza de acetato de etila.

TABELA 8: DADOS DO RMN DE  $^1\text{H}$  DO ÁCIDO CAURENÓICO ( $\text{CDCl}_3$ )

C	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$
1	1,88	0,82
2	1,86	1,42
3	2,16	1,02
4	-	-
5	-	1,06
6	1,80	1,80
7	1,47	1,62
8	-	-
9	-	1,04
10	-	-
11	1,56	1,60
12	1,52	1,45
13	2,63	-
14	1,99	1,13
15	2,05	2,05
16	-	-
17	4,80*	4,73
18	-	-
19	-	1,24
20	0,95	-

\* $\alpha, \beta$  não condiz com hidrogênios olefínicos, e sim próton *cis* ao C-13

Este fato foi confirmado pela inspeção do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (figura 16 e 17, pág. 73 e 74) do composto em questão com dados de literatura para o ácido caurenóico como mostra a tabela 9 (ENRIQUEZ, 1997). A localização do grupo carboxila em posição axial *trans* em relação ao átomo de hidrogênio H-5 baseou-se no deslocamento químico do carbono C-5 ( $\delta_{\text{c}}$  57,04) devido aos efeitos  $\gamma$  dos átomos de oxigênio do grupo carboxila. (VELANDIA, 1998).

TABELA 9 : COMPARAÇÃO DOS DADOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO ÁCIDO CAURENÓICO  
( $\text{CDCl}_3$  ; 200)

C	1	2
1	40,70	40,70
2	19,09	19,08
3	37,83	37,80
4	43,71	43,72
5	57,04	57,04
6	21,83	21,82
7	33,10	33,10
8	44,23	44,22
9	55,11	55,10
10	39,66	39,66
11	18,43	18,42
12	41,27	41,27
13	43,85	43,84
14	39,70	39,69
15	48,96	48,95
16	155,90	155,89
17	102,98	102,98
18	183,74	184,12
19	28,96	28,96
20	15,60	15,58

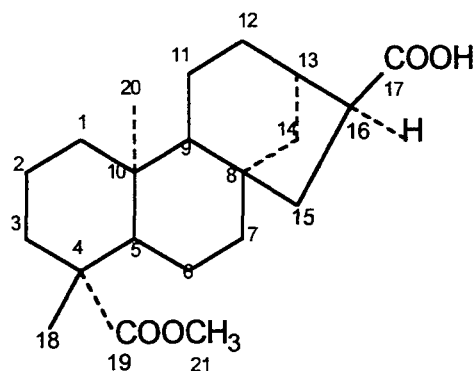
1. ácido caurenóico dados de literatura

2. ácido caurenóico deste trabalho.

Apesar do ácido caurenóico já ter sido isolado em diversas anonáceas, inclusive na *A. glabra*, é importante tê-lo identificado devido a ser o componente majoritário na planta e por apresentar interessantes atividades biológicas.

Várias atividades biológicas foram atribuídas ao ácido caurenóico: citotóxica (CHAVEZ et al. 1997); tripanosomicida (*Trypanossoma cruzi* causador da doença de Chagas; ALVES et al. 1995); larvicida eliminando os ovos do mosquito *Aedes aegypti* transmissor da dengue (SLIMESTAD, 1995); antimicrobiano, vermífugo, esporicida (PADMAJA, 1995; OGUNTINEUM, 1986). Ele possui também atividade analgésica mais potente que a do ácido acetilsalicílico e dipirona (BLOCK et al. 1998) e ainda atividade contraceptiva (VALENCIA, 1986; PAGE, 1992).



3.6.2 AD-2 (ÁCIDO *ent*-19-CARBOMETOXICAURAN-17-ÓICO)

Da fração 7 da coluna do extrato de diclorometano foi isolado o composto AD-2 que possui esqueleto caurano, sendo que o espectro no infravermelho (figura 18, pág. 75) mostra a banda larga entre 2900 a 3400 indicativo de OH, apesar da amostra ter apresentado problema de umidade. As bandas em 1726 e 1701  $\text{cm}^{-1}$  são características do grupo carboxílico de éster e ácido respectivamente. Os sinais em 1234 e 1153 referem-se ao grupo C-O comprovando a presença da função de ácido e éster na molécula. O pico em 2976  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao estiramento C-H  $\text{sp}^3$

O espectro RMN de  $^1\text{H}$  (figura 19, pág. 76) revela os sinais dos grupos metila como simpletos em  $\delta$ : 0,80 (H-20); 1,16 (H-18) e 3,64 (H-21) sendo a última metila ligada a oxigênio; duplo-triplete centrado em  $\delta$  2,94 ( $J = 6,0$ , H-16); multiplete  $\delta$  2,57 (H-13);  $\delta$  2,16 (d,  $J = 13,2$ , H-3);  $\delta$  2,05 (d,  $J = 12,8$ , H-15) e muitos sinais na região  $\delta$  0,78 - 1,88.

A análise dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ ; CPD e DEPT 135; (figuras 21 e 22, pág. 78 e 79) permite a construção da tabela abaixo onde observa-se a presença de 4 carbonos metínicos, 9 metilênicos e 3 metílicos sendo um oxigenado ( $\delta_c$ :51,1). A diferença entre o número de sinais dos espectros obtidos pelas duas técnicas indica a existência de 5 sinais correspondente a átomos de carbono quartenário sendo dois  $\text{sp}^2$  carboxílicos ( $\delta_c$  178,08, 179,5) e 3  $\text{sp}^3$  inseridos num esqueleto carbônico.

TABELA 10: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE ÁTOMOS DE CARBONO DE AD-2.

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
179,5	56,9	41,6	51,1
178,0	56,1	41,6	28,7
44,3	45,2	40,6	15,3
43,8	39,6	40,6	
39,4		38,0	
		27,3	
		22,1	
		19,1	
		18,2	
(COO) <sub>2</sub>			
C <sub>3</sub>	(CH) <sub>4</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
C <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub>

Pode-se, então, concluir que o composto AD-2 é o ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico substância identificada anteriormente em *A. senegalensis* (FATOPE,1996), mas pela primeira vez isolada em *A. glabra*. É interessante observar que este composto possui atividade moderada contra câncer de próstata.

Na tabela tem-se os valores de  $\delta$  para <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H em função da análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C (CPD e DEPT), com a literatura. Pode-se verificar divergência nos C12 a C16. O C16 encontra-se ligado ao grupamento carboxílico fortemente eletronegativo, portanto mais desblindado, é de se esperar que tenha sinal em campo mais baixo que o C13 que se encontra mais distante deste grupamento. No COSY e HMQC ( figuras 20 e 23, pág. 77 e 80) pode-se identificar o acoplamento entre o H13 e H16 e as atribuições dos sinais de H aos seus respectivos C.

TABELA 11: DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  100;400 MHz).

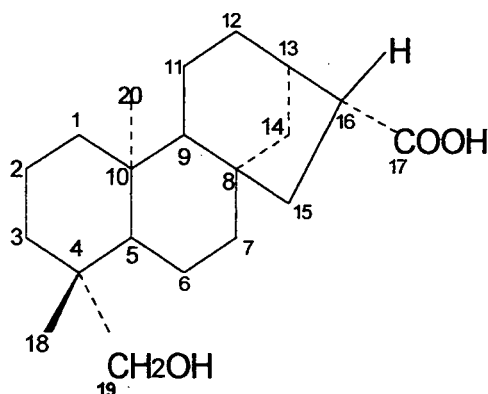
Posição	$\delta_{\text{C1}}$	$\delta_{\text{C2}}$	$\delta_{\text{H2}}$
1	40,7	40,6	
2	19,2	19,1	
3	38,1	38,0	2,16
4	43,9	43,8	-
5	57,0	56,9	1,05
6	22,2	22,1	
7	41,7	41,6	
8	44,5	44,3	-
9	56,2	56,0	1,05
10	40,0	39,3	-
11	18,3	18,2	1,50
12	30,0	27,3	
13	45,3	39,6	2,57
14	39,8	41,6	
15	39,4	40,6	2,05
16	27,4	45,2	2,94
17	179,8	179,5*	
18	28,8	28,7	1,16
19	178,1	178,0*	
20	15,4	15,3	0,808
CO <sub>2</sub> Me	51,4	51,1	3,64

1. Dados de literatura

2. Dados deste trabalho.

\* C-17 e C-19 podem interconverter

Esta proposta pode ser confirmada pelo espectro de massa por impacto eletrônico (70eV), através da presença do fragmento  $m/z$  289 ( $\text{M} - \text{COOCH}_3$ ) e a ausência do pico correspondente ao íon molecular se deve as condições operacionais (figura 24, pág. 81).

3.6.3 AD-3 (ÁCIDO 16 $\beta$ -HIDRO-19-OL-*ent*-CAURAN-17-ÓICO).

As informações do espectro RMN de  $^1\text{H}$  (figura 26, pág. 83) mostram a presença de dois grupos metila como simpletos em  $\delta$ :0,92 (H-20) e 1,04 (H-18); os sinais dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos em  $\delta$ :3,4 (d, J= 10,7, H-19); 3,8 (d, J=10,7, H-19) referente ao álcool primário representados por um sistema de spin AB devido a acoplamento gem; o multiplete centrado em  $\delta$ :3,0 (H-16) é devido ao próton adjacente ao grupo carboxílico; um simpleto largo  $\delta$ : 4,3 indicando grupamento OH; simpleto em  $\delta$ : 7,8 referente ao próton de ácido e restante dos sinais na região de 0,8 a 2,6 ppm.

A análise comparativa dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (espectro totalmente desacoplado com o DEPT; figuras 28 e 29, pág. 85 e 86) mostrou a presença de 16 sinais de C  $\text{sp}^3$  ligados a hidrogênio sendo 4 metínicos, 10 metilênicos (um oxigenado  $\delta$ :63,2) e dois metílicos. A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos pelas duas técnicas indica a existência de 4 sinais correspondentes a átomos de carbono quaternário sendo um  $\text{sp}^2$  carboxílico ( $\delta$ : 176,12) e 3  $\text{sp}^3$  inseridos num esqueleto carbônico. Estas deduções estão resumidas na tabela abaixo e fornecem dados para deduzir a fórmula “quasemolecular” através da análise espectrométrica de  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ .

TABELA 12: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE ÁTOMOS DE CARBONO DE AD—3

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
176,12	56,5	63,2	26,6
43,3	55,9	41,3	17,3
38,2	44,9	41,3	
37,9	38,8	39,7	
		39,5	
		34,8	
		26,6	
		19,7	
		17,4	
		17,2	
COOH		OCH <sub>2</sub>	
C <sub>3</sub>	(CH) <sub>4</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
C <sub>4</sub> O <sub>2</sub> H	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>

O espectro HMQC (figura 30, pág. 87) junto com o RMN de <sup>13</sup>C levaram a sugerir a estrutura abaixo para AD-3, ácido 16β-hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico, composto inédito na família das anonáceas, e a atribuir os sinais de carbono e hidrogênio mostrados na tabela:

TABELA 13: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> e gotas de piridina, 200;50 MHz)

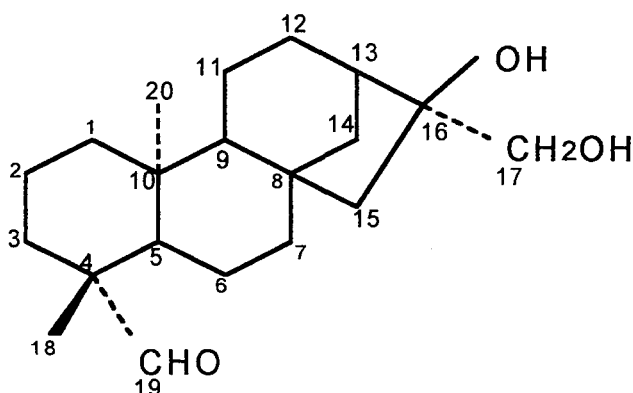
Posição	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	39,5	1,8
2	17,2	
3	34,8	2,0
4	38,2	-
5	56,5	
6	19,7	
7	41,3	2,1
8	43,3	-
9	55,9	
10	37,9	-
11	17,5	
12	26,6	1,5
13	38,8	2,6
14	39,7	
15	41,3	2,1
16	44,9	3,0
17	184,0	7,8
18	26,6	1,04
19	63,2	3,4d 3,8d
20	17,3	0,92

A orientação  $\alpha$  do grupo carboxílico ligado ao C16 é definida pelo deslocamento químico dos H-13 e H-15 que são desblindados pela influência deste grupamento (BOHLMANN, 1982).

No espectro IV (figura 25, pág. 80) observamos as bandas relacionadas a carboxila ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ); a hidroxila ( $2900 - 3400\text{ cm}^{-1}$ ) indicativo das funções ácido e álcool, ainda o pico em  $2929\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento C-H  $\text{sp}^3$ .

Os fragmentos mais característicos do espectro de massa por impacto eletrônico a 70 eV (figura 31, pág. 88) correspondem ao íon molecular  $M^+ = 320$  (1,66%), o pico base ( $M - \text{CH}_2\text{OH}$ ) em  $m/z$  289 (100%);  $m/z$  302 ( $M - \text{H}_2\text{O}$ , 9,5%) e o pico relativo a  $m/z$  123 ( $[\text{C}_9\text{H}_{15}]^+$ , 63,66%).

#### 3.6.4 AD-4 (16 $\beta$ ,17-DIIDROXI-ENT-CAURAN-19-AL)



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e COSY (figura 33 e 34, pág. 90 e 91) do composto AD-4 mostra os sinais de dois grupos metilas como simpletos em  $\delta$ :0,87 (H-20) e 1,17 (H-18); os sinais dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$ :3,41 (d,  $J=10,8$ ); 3,31 (d,  $J=10,0$ ) referente a um álcool primário representados por um sistema de spin AB do H-17; o multiplete centrado em  $\delta$ :4,02; duplete-triplete em  $\delta$ :2,6 do H-13 e duplete em  $\delta$ :9,72 referente ao próton do aldeído; diversos sinais na faixa compreendida entre  $\delta$ : 0,78-2,17. A presença de um quarteto centrado em  $\delta$ :4,10; em  $\delta$ :2,86 refere-se a impurezas de acetato de etila e DMSO utilizado como solvente.

A comparação entre o RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro totalmente desacoplado) com o DEPT; (figuras 35 e 36, pág. 92 e 93) mostraram a presença 15 sinais de C  $\text{sp}^3$  ligados a hidrogênio sendo 3 metínicos, 10 metilênicos (um oxigenado,  $\delta$ :69,0) e dois metílicos; além de um C  $\text{sp}^2$  referente a carbonila de aldeído  $\delta$ :205,3. A diferença entre os números de sinais entre as duas técnicas indica a existência de 4 átomos de carbono quaternário sendo um oxigenado ( $\delta$ :78,9) e 3  $\text{sp}^3$  inseridos em esqueleto carbônico.

TABELA 14: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE ÁTOMOS DE CARBONO DE AD-4

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
78,9	55,8	69,0	23,6
47,8	54,9	51,6	15,6
42,7	40,6	41,2	
38,9	205,3	39,1	
		37,7	
		33,6	
		26,1	
		19,0	
		18,1	
		17,7	
CO	COH	CH <sub>2</sub> O	
C <sub>3</sub>	(CH) <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
C <sub>4</sub> O	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>

Analisando a estrutura descrita na literatura por WU, Y.,(1996) como 16 $\beta$ ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al isolado da *A. squamosa*, percebe-se que se trata do composto AD-4 ainda não isolado na espécie em estudo.

TABELA 15: COMPARAÇÃO DOS DADOS DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO 16 $\beta$ ,17-DIIDROXI-*ent*-CAURAN-19-AL ( $\text{CDCl}_3$ ; 200)

C	1	2
1	41,8	41,2
2	18,8	18,1
3	34,2	33,6
4	48,4	47,8
5	56,5	55,8
6	19,6	19,0
7	39,4	39,1
8	43,3	42,8
9	55,5	54,9
10	39,7	38,9
11	18,3	17,7
12	26,5	26,1
13	40,6	40,6
14	38,3	37,7
15	52,3	51,6
16	79,8	78,9
17	69,7	69,0
18	24,2	23,6
19	206,0	205,3
20	16,3	15,6

1. Dados de literatura em  $\text{CDCl}_3$

2. Dados deste trabalho em  $\text{CDCl}_3$  e gotas de DMSO.

O levantamento bibliográfico para 16, 17-diidroxi-*ent*-cauranolídeos mostra que os deslocamentos químicos dos C16 e 17 são sensíveis às orientações dos grupos hidroxilas em C16. Geralmente, os sinais de C16 e C17 ocorrem em  $\delta$ :79,7-79,8 (C) e 69,5-70,4 ( $\text{CH}_2$ ); entre  $\delta$ :81,6-81,8 (C) e 66,2-66,5 ( $\text{CH}_2$ ) para *ent*-cauranolídeos com 16 $\beta$ , 17 $\alpha$ - e 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol respectivamente (AGRAWAL et al. 1995). Com base nestas informações e verificando que os sinais para o composto AD-4 do C16 e C17 aparecem em  $\delta$ 78,9 e 69,0 sugere a orientação  $\beta$  para o grupo hidroxila ligado ao C16. Esta suposição é confirmada analisando os sinais de  $\text{H}_2$  – 17 em  $\delta$ :3,31 e 3,41 como um par de dupletos com sistema de spins AB que estão em concordância com a revisão da estereoquímica realizada por ETSE et al.,1987; DING,1991.

O espectro no IV mostra a banda larga em  $3374\text{ cm}^{-1}$  indicativo de OH, função álcool, uma banda fraca em 2942 e 2844 referente a ligação CHO, e o pico em  $1693\text{ cm}^{-1}$  característico do grupo carbonila (figura 32, pág. 89).



O espectro de massa mostrou a ausência do pico correspondente ao íon molecular justificado pelas condições operacionais (impacto eletrônico a 70 eV). Observaram-se os picos  $m/z$  305 ( $M-CH_3$ ; 31%) ;  $m/z$  287 ( $m/z$  305- $H_2O$ ; 12%);  $m/z$  259 ( $m/z$  305-OH- $CH_2O$ ; 19%);  $m/z$  241 ( $m/z$  305-CHO- $H_2O$ -OH; 8,5%); (figura 37, pág. 94).

Em resumo, dos compostos isolados o ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico (AD-2) e 16 $\beta$ ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al (AD-4) foram previamente descritos na gênero *annona* (FATOPE,1996; WU,1996), enquanto o ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico (AD-3) é composto inédito na família das anonáceas tendo sido isolado anteriormante em Euphorbiaceae - *Ricinocarpus stylosus* D. (HENRICK,1964) e Asteraceae - *Baccharis minutiflora* (BOHLMANN,1982).

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÁCIDO CAURENÓICO NA *Annona glabra*.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Na pesquisa de plantas medicinais deve-se ter em mente que o crescimento e o desenvolvimento das plantas e, geralmente, a natureza e a quantidade de seus metabólitos secundários sofrem influência de diversos fatores tais como: clima; idade; cultivo; altitude e estado patológico. (OLIVEIRA, 1996; EVANS, 1991).

Dentre os fatores climáticos pode-se citar a ação não só da temperatura da região como as variações de temperatura durante o dia e ao longo dos meses, também, a quantidade e a intensidade de luz requerida para o desenvolvimento da planta.

Com relação aos fatores climáticos – edáficos que derivam da interrelação clima – solo encontram-se: as precipitações pluviométricas que influenciam nos aspectos da umidade do ar e da retenção da água pelo solo; a porcentagem de gás carbônico presente na atmosfera e no solo e a altitude.

Os fatores edáficos levam em conta a quantidade de nutrientes, minerais, microorganismos, o pH do solo e no caso de plantas cultivadas o tipo de cova, a profundidade onde foram colocadas as sementes.

A colheita influi no teor do princípio ativo da planta medicinal pois este varia de órgão para órgão em que está armazenado, com a idade, com a época da colheita e mesmo com o período do dia no qual é efetuado.

O ácido caurenóico é um metabólito secundário encontrado com frequência na família Annonacea inclusive na *A. glabra* (anexo 1). Este diterpenóide possui atividades analgésica, antimicrobiana, vermífuga, fungicida, larvicida, contraceptiva e tripanosomicida conforme descrito no capítulo 3.

Considerando o isolamento em alta concentração do ácido caurenóico da casca do caule de *A. glabra* na primeira parte deste trabalho surgiu o interesse em quantificá-lo mais precisamente na planta.

O uso de CLAE para análise de extratos vegetais tem aumentado consideravelmente. Várias classes de compostos naturais podem ser analisadas utilizando detetor apropriado (REHWALD, 1994). A obtenção de cromatogramas “impressão digital” (“fingerprint”) em condições padronizadas é o método mais confiável para controle de qualidade e padronização.

Devido as propriedades biológicas do ácido caurenóico e a sua presença em *A. glabra* resolvemos desenvolver um método para a quantificação deste metabólito na planta, utilizando CLAE em fase reversa e detecção no UV. Nenhum relato foi encontrado na literatura a este respeito na planta. O único trabalho encontrado se refere à determinação do ácido caurenóico nas folhas de *Mikania glomerata* através de CG. (VILEGAS, 1997 a e b). Resolvemos então determinar os teores deste diterpenóide na casca e nas folhas da planta através de CLAE-FR assim como verificar a variação sazonal dos teores encontrados.

## 4.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.2.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas da *A. glabra* foram coletadas de um mesmo indivíduo no Município de Guaratuba, litoral do Estado do Paraná, no início de cada estação climática, entre abril de 1999 a janeiro de 2000. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Olavo Guimarães, curador do Herbário da UFPR. Uma nova exsicata foi preparada depositada naquele herbário sob o número 40.105.

### 4.2.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As folhas e casca foram separadas, secas em estufa a 40° C, moídas e peneiradas.

#### a) Extração Contínua.

Aproximadamente 1 g do pó (caule ou folha) foi extraído, em triplicata, em um aparelho de Soxhlet com 125ml de clorofórmio. Cada extrato obtido foi filtrado, o solvente foi destilado em rotaevaporador e o extrato foi ressolubilizado em hexano.

#### b) Extração com Sonicação

Aproximadamente 1 g do pó (caule ou folha) foi extraído com 10 ml de clorofórmio em um erlenmeyer mergulhado em um banho ultrassônico, por 20 minutos. Após filtração, novo solvente foi adicionado e as amostras foram reextraídas sob as mesmas condições. O processo foi executado quatro vezes, em duplicata. Os solventes foram destilados em rotaevaporador e os extratos foram ressolubilizados em hexano.

#### c) Limpeza da Amostra

As amostras obtidas pelos dois sistemas de extração foram purificadas por extração em fase sólida. Foi usada uma coluna de sílica 60 PF254 (40-65  $\mu\text{m}$ , 500 mg), empacotada em uma pipeta de Pasteur e previamente condicionada com hexano. Após aplicação da amostra dissolvida em hexano na coluna foi feita eluição com: a) hexano (4 ml); b) hexano-acetato de etila (8: 2, 4 ml) e c) hexano-acetato de etila (1:1, 4 ml). O solvente do extrato b foi evaporado e o resíduo foi redissolvido em metanol.

### 4.2.3 INSTRUMENTOS E COLUNA

Foi utilizado um sistema da marca Varian constituído de: bomba quaternária modelo 9012Q; detetor de fotodiodo modelo 9065; injetor automático marca Rainin modelo AI-200; estação de trabalho Star versão 4.5. A coluna cromatográfica foi uma C18 de 5  $\mu\text{m}$ , (4,5X250 mm) da marca Rainin.

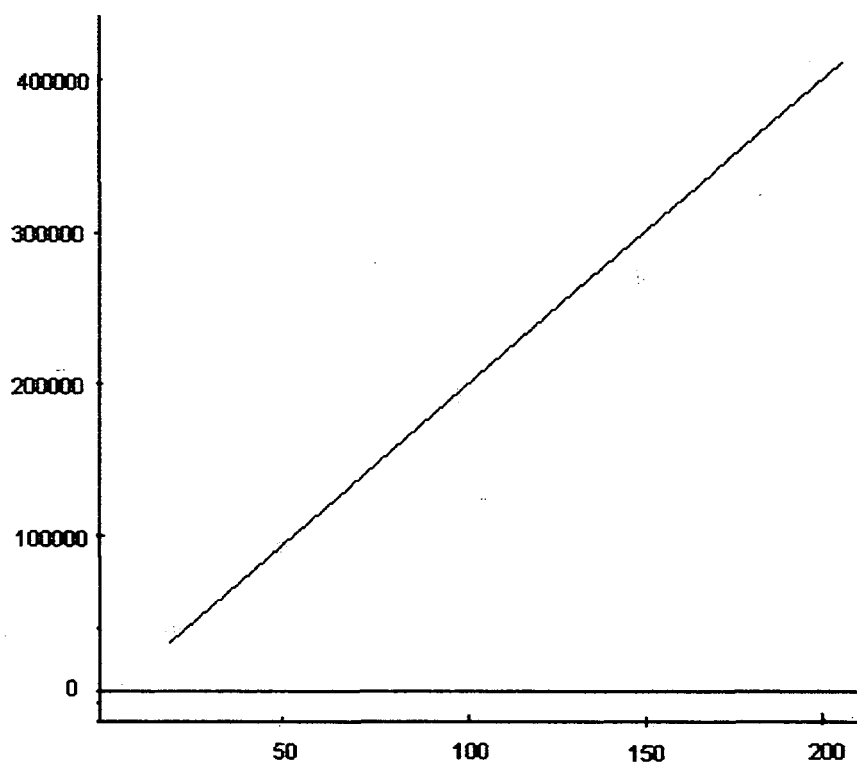
#### 4.2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fase móvel utilizada era composta de acetonitrila (A) e água com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (B). A separação foi realizada utilizando-se eluição isocrática (0 –15 minutos, solução A:85% e solução B:15%) com um fluxo de 1,00 ml/min e coluna à temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e a detecção foi realizada em 205 nm.

#### 4.2.5 DETERMINAÇÃO E CALIBRAÇÃO

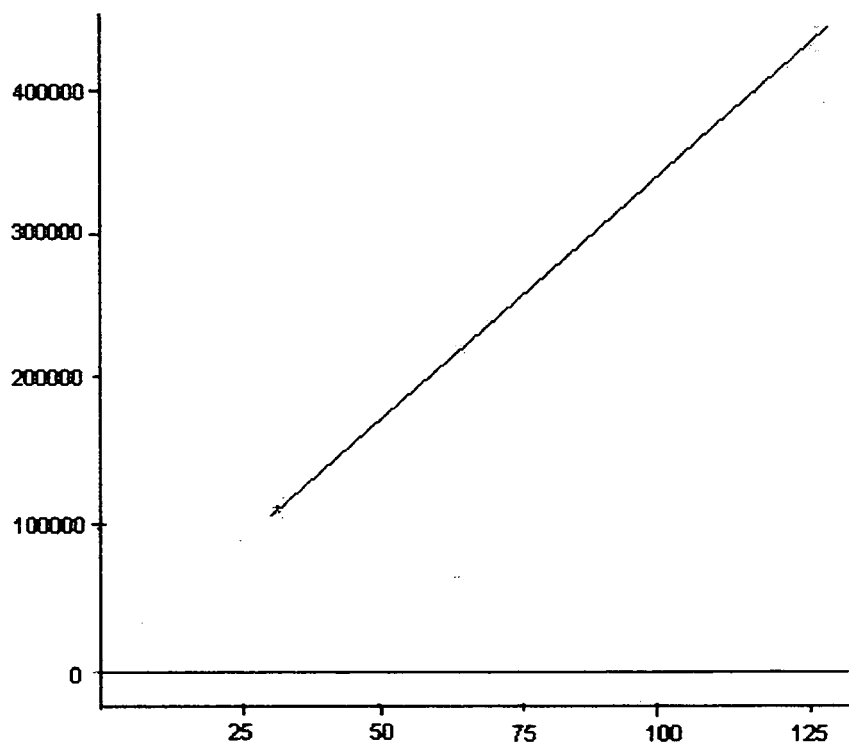
A determinação do ácido caurenóico foi realizada utilizando o método de padrão externo. A curva de calibração, com aplicação em duplicata, mostrou uma resposta linear do detetor nas concentrações de 25-200 mg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9886 para o ácido caurenóico determinada pela equação  $y = 2,0372e+0,03x - 8,2747e+0,03$  ( figura 7) e 25-200 mg/mL e coeficiente de correlação de 0.9993 para o éster de esteviol obedecendo a equação  $y = 1,670244e+003x + 2,516104e+003x$  (figura 8).

FIGURA 7: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO CAURENÓICO.



Condições de operação: fase móvel acetonitrila – água (85:15); volume de injeção 20 μl; detecção 205nm; temperatura 25 °C;

FIGURA 8: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÉSTER DE ESTEVIOL



Condições de operação: fase móvel acetonitrila – água (85:15); volume de injeção 20  $\mu$ l; detecção 205nm; temperatura 25  $^{\circ}$ C

#### 4.2.6 TESTES DE RECUPERAÇÃO

Para verificar se o ácido caurenóico estava sendo eficientemente extraído foi realizado um teste de recuperação, em duplicata. A casca do caule (1,00 g) foi extraída com 125 ml de clorofórmio em aparelho de Soxhlet por 5 horas. Após cada hora (3 ciclos) o solvente foi substituído e os cinco extratos obtidos foram secos e pesados. Os extratos foram então ressolubilizados em hexano e levadas ao sistema de purificação após o que tiverem os teores de ácido caurenóico determinados. Os resultados estão resumidos na tabela 16.

TABELA 16: QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CAURENÓICO POR EXTRAÇÃO EM SOXHLET DA CASCA DO CAULE DE *A. glabra* APÓS CADA 3 CICLOS.

No. de ciclos	Ácido caurenóico (mg/g de material seco)		Porcentagem	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
0 – 3	445,70	409,20	84,82	85,16
3 – 6	54,54	50,07	10,38	10,42
6 – 9	12,12	9,39	2,31	1,95
9 – 12	6,90	6,22	1,31	1,29
12 – 15	6,17	5,60	1,17	1,17

Análise em CCD que mostrava de forma qualitativa grande redução na quantidade de ácido caurenóico a partir do nono ciclo.

O resultado da análise em CLAE corresponde a expectativa criada por CCD. Nas 2 horas iniciais a maior parte do ácido caurenóico é extraída (95%), o que faz que o processo não seja muito demorado levando três horas.

O mesmo procedimento foi executado para as folhas, os resultados estão apresentados na tabela 17. Conclui-se que após 3 horas houve o esgotamento do ácido caurenóico presente na amostra.



TABELA 17: QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CAURENÓICO POR EXTRAÇÃO EM SOXHLET DAS FOLHAS DE *A. glabra* APÓS CADA 3 CICLOS.

No. de ciclos	Ácido caurenóico (mg/g de material seco)		Porcentagem	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
0 – 3	12,10	14,95	65,30	70,85
3 – 6	3,95	3,58	21,15	16,96
6 – 9	2,51	2,57	20,74	12,18
9 – 12	0,00	0,00		

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários fatores podem influenciar no teor de determinado metabólito em uma planta. Um desses fatores que resolvemos estudar foi a sazonalidade. Para que fosse possível o estudo deste na produção do ácido caurenóico, tomou-se o cuidado de utilizar amostras sempre do mesmo indivíduo. Dessa forma eliminamos os fatores fase de desenvolvimento e as condições do solo. A colheita, a cada estação climática, foi realizada sempre no período da manhã.

Os extratos foram obtidos através de dois procedimentos para comparação. O primeiro foi por extração contínua e exaustiva em um aparelho Soxhlet e o segundo foi por sonicação. Em ambos os casos foi utilizado clorofórmio como solvente.

A preparação da amostra é um dos passos mais importantes em qualquer procedimento analítico. Ela é especialmente importante na análise por CLAE de matrizes complexas como os materiais vegetais. Essa preparação pode ser resumida em duas fases: extração, onde o analito é removido da matriz (material vegetal) e a limpeza da amostra, onde grande parte de outros componentes do extrato é removida.

A limpeza das amostras foi feita por extração em fase sólida. A fase estacionária foi sílica gel empacotada em uma mini-coluna e o condicionamento foi feito com hexano. Após aplicação da amostra foi feita eluição dos componentes

pouco polares com hexano. O analito foi então eluído com hexano/acetato de etila (8:2). Após evaporação do solvente e ressolubilização em metanol a amostra foi quantificada por CLAE.

Utilizando as condições descritas obteve-se uma boa resolução do pico do ácido caurenóico ( $t_r = 12$  minutos). Foi obtida uma resolução de linha de base, essencial para uma quantificação precisa. O detetor foi ajustado para 205 nm, pois este valor é próximo do  $\lambda_{\text{máx}}$  do ácido caurenóico e do éster de esteviol.

TABELA 18: DOSEAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO, CONFORME ESTAÇÃO CLIMÁTICA, NA CASCA DO CAULE DE *A. glabra* PARA SOXHLET E SONICAÇÃO.

Estação	Amostra	Soxhlet concentração (mg%)	Ultrassom concentração(mg%)
Outono	1	519,26	398,33
	2	512,60	454,07
	3	477,80	
Inverno	1	436,42	312,70
	2	370,40	291,69
	3	366,10	
Primavera	1	407,50	321,40
	2	367,30	300,80
	3	365,39	
Verão	1	506,29	438,40
	2	481,50	411,50
	3	433,14	

TABELA 19: TEOR DO ÁCIDO CAURENÓICO NA CASCA DO CAULE DE *A.glabra* POR ESTAÇÃO CLIMÁTICA E POR MÉTODO DE EXTRAÇÃO (mg%)

Estação	Soxhlet (n=3)	Ultrassom (n=2)
Outono	503,22 ± 18,18	426,20 ± 27,87
Inverno	390,97 ± 32,18	302,20 ± 10,50
Primavera	380,05 ± 19,42	311,10 ± 10,30
Verão	473,64 ± 30,37	424,95 ± 13,45

FIGURA 9: TEOR DO ÁCIDO CAURENÓICO NA CASCA DO CAULE DE *A. glabra* POR ESTAÇÃO CLIMÁTICA E POR MÉTODO DE EXTRAÇÃO.

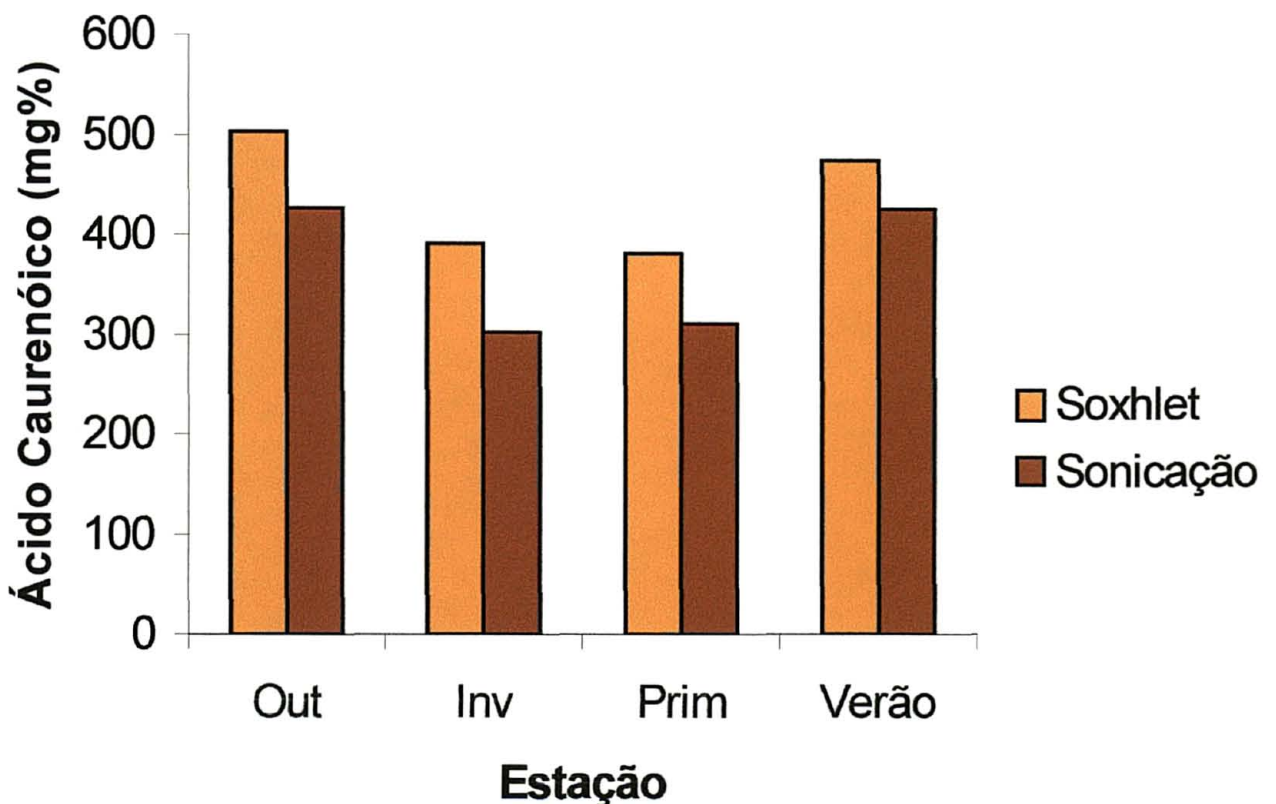


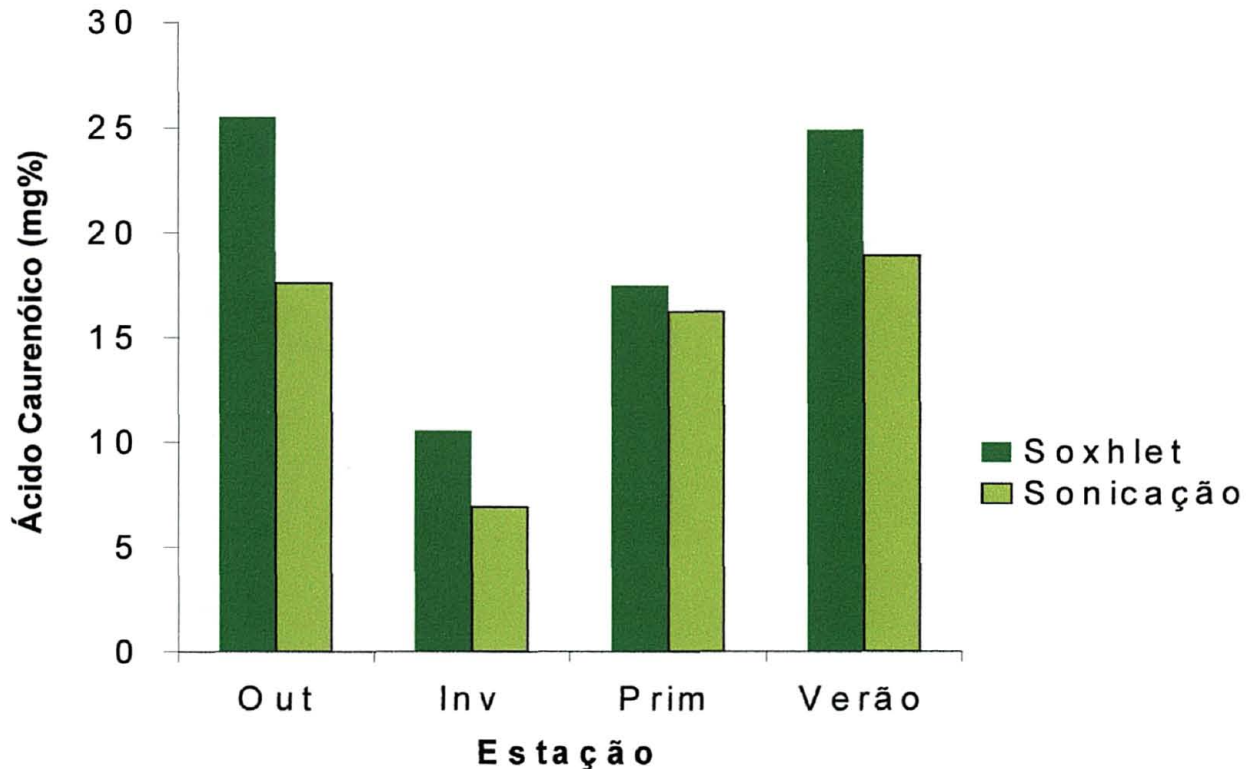
TABELA 20: DOSEAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO, CONFORME ESTAÇÃO CLIMÁTICA, NAS FOLHAS DE *A. glabra* PARA SOXHLET E SONICAÇÃO.

Estação	Amostra	Soxhlet	Ultrassom
		concentração (mg%)	concentração (mg%)
Outono	1	26,89	18,51
	2	25,34	16,69
	3	24,24	
Inverno	1	11,08	7,22
	2	10,88	6,58
	3	9,65	
Primavera	1	18,39	16,20
	2	18,01	16,22
	3	15,88	
Verão	1	26,68	19,76
	2	24,93	18,01
	3	23,02	

TABELA 21: TEOR DO ÁCIDO CAURENÓICO NAS FOLHAS DE *A. glabra*, POR ESTAÇÃO CLIMÁTICA E POR MÉTODO DE EXTRAÇÃO.

Estação	Soxhlet (n=3)	Ultrassom (n=2)
Outono	25,49 ± 1,40	17,60 ± 0,91
Inverno	10,53 ± 0,63	6,90 ± 0,32
Primavera	17,43 ± 1,10	16,21 ± 0,01
Verão	24,88 ± 1,49	18,88 ± 0,87

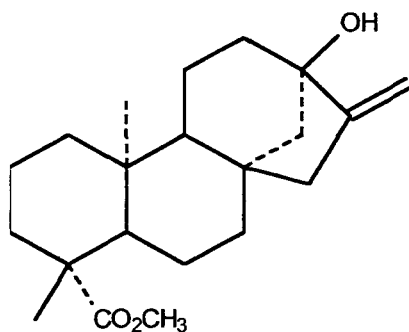
FIGURA 10: TEOR DO ÁCIDO CAURENÓICO NAS FOLHAS DE *A. glabra*, POR ESTAÇÃO CLIMÁTICA E POR MÉTODO DE EXTRAÇÃO.



Os resultados mostraram que a metodologia de extração por Soxhlet é mais eficiente que a do ultrassom nos dois tipos de amostras. Para verificar a confiabilidade do método fizemos a extração por Soxhlet do ácido caurenóico da casca do caule (0,500g) adicionando a ela um padrão interno; o éster metílico do esteviol (133 mg).

A preparação do padrão interno consistiu na hidrólise química do esteviosídeo tendo como produto principal o esteviol. Este foi purificado por CCDC e esterificado com diazometano etéreo.

O éster de esteviol (abaixo,  $t_r = 7,5$  minutos) foi utilizado como padrão interno, pois apresentou tempo de retenção próximo ao do ácido caurenóico ( $t_r = 12$  minutos), não fazia parte dos componentes da amostra, seu pico ficava separado das demais substâncias presentes e possui estrutura química semelhante a da substância em questão.

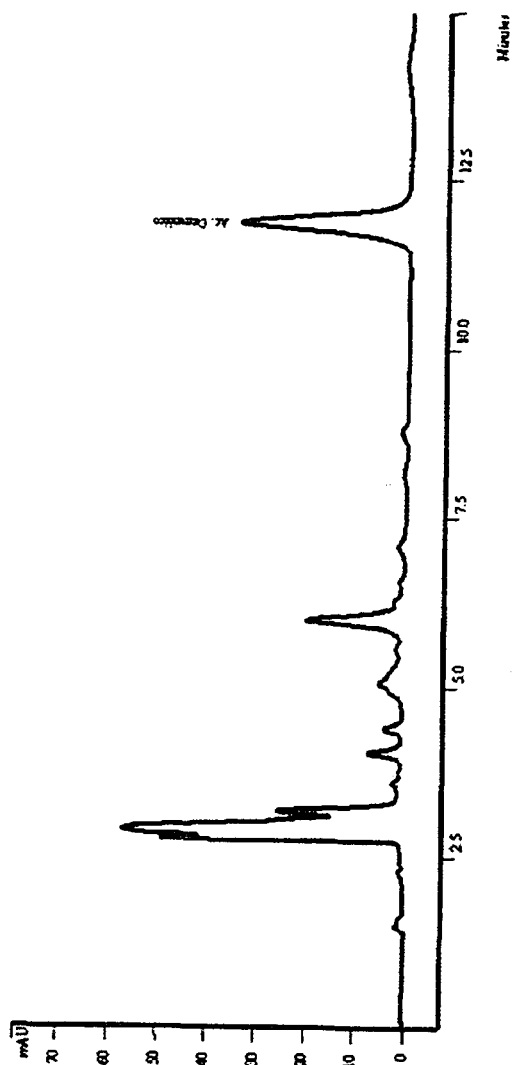


Esta extração foi feita em duplicata e apresentou índice de recuperação satisfatória apresentada na tabela abaixo.

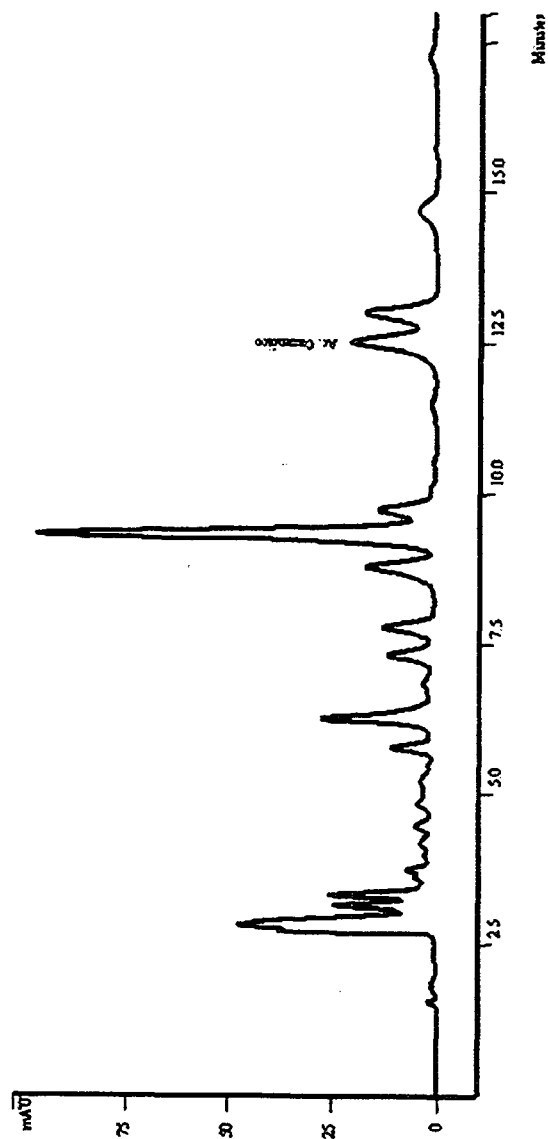
TABELA 22: RECUPERAÇÃO DO ÉSTER DE ESTEVIOL E DO ÁCIDO CAURENÓICO, EXTRAÇÃO EM SOXHLET NA CASCA DO CAULE DE *A. glabra*.

Amostra	Ácido caurenóico concentração (mg%)	Éster de esteviol concentração (mg%)
1	218,20	129,40
2	205,58	125,20

A recuperação do éster de esteviol foi boa havendo a recuperação em torno de 95% do éster de esteviol comprovando a eficiência do método.

FIGURA 11: CROMATOGRAMA DO EXTRATO DE CASCA DE *A. glabra*

Condições de operação: fase móvel acetonitrila – água (85:15); volume de injeção 20  $\mu$ l; detecção 205nm; temperatura 25  $^{\circ}$ C

FIGURA 12: CROMATOGRAMA DO EXTRATO DE FOLHA DE *A. glabra*

Condições de operação: fase móvel acetonitrila – água (85:15); volume de injeção 20  $\mu$ l; detecção 205nm; temperatura 25  $^{\circ}$ C



## CAPÍTULO V

### CONCLUSÃO

O estudo químico do extrato de diclorometano da casca do caule de *A. glabra* resultou no isolamento de quatro compostos com esqueleto caurano: ácido caurenóico(I); ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico(II); ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico(III); 16 $\beta$ ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al(IV). Os compostos II e IV haviam sido previamente descritos na gênero *annona* (FATOPE,1996; WU,1996), enquanto o composto III é inédito na família.

A metodologia desenvolvida neste trabalho utilizando CLAE-FR permitiu quantificar o ácido caurenóico, em extratos de caule e folha de *A. glabra*, com características analíticas desejáveis para a quantificação como rapidez, precisão e exatidão.

A aplicação do método permitiu verificar os efeitos da sazonalidade na produção ou armazenamento de ácido caurenóico ao longo do ano. Também, por essa metodologia conclui-se que o ácido caurenóico se acumula na casca da planta sendo que as folhas não apresentam quantidades significativas do mesmo.

Pode-se observar, a medida em que foram feitas as replicatas, que neste caso, a extração contínua e exaustiva por Soxhlet foi mais eficiente apesar de mais demorada do que o banho ultrassônico, apresentando uma taxa de recuperação do ácido caurenóico em torno de 20% superior. Portanto, este último precisa ter sua metodologia otimizada para aumentar seu poder e consistência de extração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESOGAN, E.K.; DURODOLA, J.I. Antitumour and antibiotic principles of *Annona senegalensis*. **Phytochemistry**, v.15, p.1312-1313, 1976.
- AGRAWAL, P.K.; BISHNOI, V.; SINGH, A.K. NMR C hemical shift correlations in 16, 17-dihydroxy-kauranoids: implication for stereochemical assignments. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.929-930, 1995.
- ALVES, T.M.A.; CHAVES, P.P.G., SANTOS, L.M.S.T.; NAGEM, T.J.; MURTA, S.M.F.; CERAVOLO, I.P.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. A diterpene from *Mikania tusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Médica**, v.61, p.85-87, 1995.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: LTC/EDUSP, 1978.325 p.v.1.
- BLOCK, L.C.; SANTOS, A.R.S.; SOUZA, M.M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R.A.; SANTOS, M.A.; MONACHE, F.; CECHINEL, V. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p.85-89, 1998.
- BOHLMANN, F.; KRAMP, W.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H.; KING, R.M. Diterpenes from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v.21, n.2, p.399-403, 1982.
- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Editorial Arribia, S.A., 1991.
- CASTAÑEDA, P.; GARCIA, E.; MATA, R. Constituents of *Annona glabra*. **Fitoterapia**, v.64, n.5, p.478, 1994.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro : Ministério da Agricultura, 1984. v.1.
- CHANG, Fang-Rong; YANG Pey-Yuh; LIN, Jung-Yaw; LEE, Kuo-Hsiung; WU, Yang-Chang. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v.61, p.437-439, 1998.
- CHAVEZ, P.I.; SÁNCHEZ, L.A.; GONZÁLEZ, F.A.; RODRÍGUEZ, J.L.; AXELROD, F. Citotoxicity correlations of Puerto Rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. **International Journal of Pharmacognosy**, v.35, n.4, p.222-226, 1997.
- CHEN, Wen-Sem; YAO, Zhu-Jun; WU, Yu-Jlin. Study on the chemical constituents of *Annona glabra* Linn. **Youji Huaxue**, v.15, n.1, p85-88, 1995.
- CHEN, Chug-Yi; CHANG, Fang-Rong; WU, Yang-Chang. The constituents from steam of *Annona cherimoya*. **Journal Chinese Chemical Society**, v.44, n.3, p.313-319, 1997.

- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1997.
- DÍAZ, A.M.P.; DÍAZ, P.P.; JOSEPH-NATHAN, P. Diterpenes and alkaloids from *Annona spraguei* Safford. **Revista Latinoamericana de Química.**, v.19,n.2. p.58-60, 1988.
- ENRIQUEZ, R.G.; BARAJAS, J.; ORTIZ, B.; LOUGH, A.J.; REYNOLDS, W.F.; YU, M.; LEON, I.; GNECCO, D. Comparison of crystal and solution structures and <sup>13</sup>C chemical shifts for grandiflorenic acid, kaurenoic acid, and monogoinic acid. **Canadian Journal Chemical.**, v.75, p.342 – 347, 1997.
- ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C. Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars. **Chromatographia.**, v.52, n.1/2, p.37-43, 2000.
- ESHIET, I.T.U.; AKISANYA, A.; TAYLOR, D.A.H. Diterpenes from *Annona senegalensis*. **Phytochemistry.**, v.10, p.3294-3295, 1971
- ETSE, J.T.; ALEXANDER I.G.; WATERMAN P.G. Chemistry in the Annonaceae, XXIV. Kaurane and kaur-16-ene diterpenes from the stem bark of *Annona reticulata*. **Journal of Natural Products.**, v.50, n.5, p.979-983, 1987.
- EVANS, W.C. **Trease y Evans : Farmacognosia**. 13.ed. México, D.F.: Nueva Editorial Interamericana, 1991. 901p.
- FATOPE, M. O & AUDU O T. Bioactive *ent*-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. **Journal of Natural Products.**, v.59, p.301-303, 1996.
- FERRARI, M. & PELIZZONI. New diterpenoids with clerodane skeleton. **Phytochemistry.**, v.10, p.3267-3269, 1971.
- GEISSMAN, T.A & CROUT, D.H. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. New York: John Wiley & Sons
- GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; TORMO, J.R.; BLAZQUEZ, M.A.; ZAFRA-POLO, C.; CORTES, D. Acetogeninas from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry.**, v.47,n.5, p.811-816, 1998.
- HASAN, C.N.; ZAMAN, N.; ISLAM, S.N. Kaurane and karene diterpene from *Annona reticulata* stem bark. **Journal Bangladesh Academic Science.**, v.13, n.2, p.157-160, 1989.
- HENRICK, C.A.; JEFFERIES, P.R. The chemistry of the Euphorbiaceae. **Australian Journal of Chemistry.**, v.17, p.915-33, 1964.
- HUI, Y.H.; GHANG, C.J.; SMITH D.L.; McLAUGHIN J.L. 16 $\alpha$ -hydroxy –(-) kaurenoic acid: a selectively cytotoxic diterpene from *Annona bullata*. **Pharm. Pharm. Res.**, v.7, n.4, p.376-378, 1990

- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982.
- LI, Chao-Ming; SUN, Han-Dong; ZHENG, Hui-Lan; TAO, Guoda. Annonaceous acetogenins from *Annona glabra*. **Yunnan Zhiwu Yanjiu.**, v.17, n.2, p.221-224, 1995.
- LICHTENTHALER, H.K.; SCHEWENDER, J.; SEEMANN, M.; ROHMERS, M. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinines) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Biochemistry Journal.**, v.316, p.73-80, 1996.
- LIU, Xiao-Xi; ALALI, F.Q.; PILARINOU, E.; McLAUGHLIN, J. Glacins A and B: two novel bioactive mono-tetra-hydrofuran acetogenins from *Annona glabra*. **Journal Natural Products.**, v.61, p.620-624, 1998 (a).
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. HOPP, D.C.; ROGERS, L.L. Glabracins A and B, two new acetogenins from *Annona glabra*. **Bioorganic Medicinal Chemical.**, v.6, n.1, p.959-965, 1998 (b).
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin from *Annona glabra*. **Journal Natural Products.**, v.62, p.848-852, 1999 (a).
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. **Phytochemistry.**, v.50, p.815-821, 1999 (b).
- MUKHOPADHYAY, G.; MUKHERJEE, B.; PATRA, A.; GHOSH, R.; ROYCHOWDHURY, P.; LOWE, P. Refined NMR and X-ray crystallographic studies with a diterpene from *Annona squamosa*. **Fitoterapia.**, v.64, n.1, 1993.
- MUSSINI, P.; ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; FERRARI, G. Constituents of *A. coriacea* structure of a new diterpene. **Journal Chemical Society Perkin Trans 1.**, v.21, p.2551-2557, 1973.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo : Editora Atheneu. 1996. 412p.
- OGUNTOMEIN, B.O. The terpenoids of *Annona reticulata*. **Fitoterapia.**, v.58, n.6, p.411-413, 1986.
- OSHAWA, K.; ATSUZAWA, S.; MITSUI, T.; YAMAMOTO, I.; **Nippon Noyaku Gakkaishi.**, v.16, n.1, p.93-96, 1991.
- PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.48, p.21-24., 1995.

- PAGE, J.E.; BALZA F.; NISHIDA, T.; NEIL TOWERS G.H. Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. **Phytochemistry**, v.31, n.10, p.3437-3439, 1992.
- REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O Qualitative and quantitative reversed-phase chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. **Journal of Chromatography A**, v.67, p25-33, 1994.
- ROHMER, M.; LLOPIZ, P.; NEUNLIST, S. Prokaryotic triterpenoids: O- $\alpha$ -D-glucuronopyranosyl bacteriohopanetetrol, a novel hopanoid from bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemistry Journal**, v.287, p.159-161, 1992.
- ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. Isoprenoids biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentyl diphosphate. **Biochemistry Journal**, v.295, p.517-524, 1993.
- SANTOS, A.S.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G.S. Volatile constituents of fruits of *Annona glabra* L. from Brazil. **Flavor Fragrance Journal**, v.13, n.3, p.148-150, 1998.
- SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin – A textbook of pharmacognosy**. Stockholm : Swedish Pharmaceutical Press. 1992. 319 p.
- SLIMESTAD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Médica**, v.61, p.562-563, 1995.
- VALENCIA, A.; WENS, A.; PONCE-MONTER, H.; PEDRÓN, N.; GALLEGOS, A.J.; QUIJANO, L.; CALDERÓN, J.; GÓMEZ, F.; RÍOS T. Zooplata XII. In vitro effects of kaurenoic acid isolated from *Montanoa frutescens* and two derivatives upon human spermatozoa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.18, p.89-94, 1986.
- VELANDIA, J.R.; CARVALHO, M.G.; BRAZ FILHO, R. Ácido ent-16 $\alpha$ , 17-dihidrocauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereobquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. **Química Nova**, v.21, n.4, p.397-404, 1998.
- VILEGAS, J.H.Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ('Guaco') leaves by capillary gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.8, n.2, p.74-77, 1997(a).
- VILEGAS, J.H.Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Extraction of low- polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('Guaco') leaves. **Phytochemical Analysis**, v.8, n.5, p.266-270, 1997(b).
- WARTHEN, D.; GOODEN, E.L.; JACOBSON M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.5, p.637-638, 1969.

- WU, Yang-Chang et alii. Identification of *ent*-16 $\beta$ ,17-dihydroxykauran-19-oic acid as a anti- HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products.**, v.59, p.635-637, 1996.
- YANG, Tsang-Hsiung; CHEN, Chi-Ming; KUAN, Sung-Shen. Alkaloids of *Annona glabra*.I. Isolation of (-) N-methylactinodaphnine. **Journal Chinese Chemistry Society.** Taiwan., v.18, n.3, p.133-136, 1971.
- YANG, Tsang-Hsiung & CHEN, Chi-Ming. Studies on the alkaloids of *Annona glabra*.II. **Tai-wan Yao Hsueh Tsa Chih.**, Taiwan, v.25, n.1-2, p.1-7, 1973.
- YANG, Tsang-Hsiung & CHEN, Chi-Ming. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* L. **Proc. Natl. Sci. Counc.**, Taiwan. v.7, p.177-184, 1974.

**ANEXOS**

ANEXO 1: Diterpenos encontrados na família das Annonaceae.....	59
ANEXO 2: Estruturas de acetogeninas encontradas <i>A.glabra</i> .....	64
ANEXO 3: Espectros.....	69

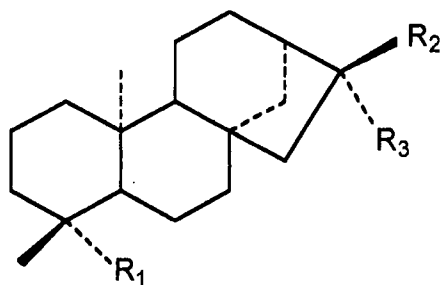
DITERPENOS DE ESQUELETO CAURANO ENCONTRADOS NO GÊNERO *ANNONA* .

Diterpeno	Estrutura	espécie	Localização	Ref.Bibliográfica
Ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico	1	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	ESHIEt,1971.
		<i>A.glabra</i>	tronco	YANG,1973.
		<i>A.squamosa</i>	casca de tronco	YANG,1971
		<i>A.reticulata</i>	fruto	OGUNTIMEIN,1987
		<i>A.paludosa</i>	casca de tronco	LAPREVOTE,1988
		<i>A.spraguei</i>	casca de tronco	DÍAZ,1988
		<i>A.bullata</i>	casca de tronco	HUI,1989.
		<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	HASAN, 1989
		<i>A.squamosa</i>	fruto	CHANG,1996
		<i>A.cherimoya</i>	tronco	CHEN, 1997
		<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG,1998.
<i>Ent</i> -cauran-16 $\alpha$ -ol	2	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	ESHIEt,1971
		<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	ETSE, 1987
<i>Ent</i> -caur-16-en-19-ol	11	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU, 1996
		<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG,1998.
Ácido- <i>ent</i> -cauran-19-al-17-oico	3	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	ESHIEt, 1971
Ácido- <i>ent</i> -cauran-17,19-dioico	4	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	ESHIEt,1971
Ácido 19-nor- <i>ent</i> -cauran-4 $\alpha$ -ol-17-oico	5	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	ESHIEt,1971
		<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG,1998
<i>Ent</i> -cauran-17-ol-19-al	6	<i>A.squamosa</i>		LEBOEUF, 1982
<i>Ent</i> -cauran-17-acetoxi-19-al	7	<i>A.squamosa</i>		LEBOEUF, 1982
<i>Ent</i> -caur-16-en-19-al	24	<i>A.squamosa</i>		LEBOEUF, 1982
Acetato <i>ent</i> -caur-16-en-19-il	25	<i>A.squamosa</i>		LEBOEUF, 1982
Ácido 16 $\alpha$ -hidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-oico	13	<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	HASAN, 1989
		<i>A.bullata</i>	casca de tronco	HUI, 1990
16 $\beta$ , <i>Ent</i> -caurano-16,17,19-triol	8	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU, 1996
Ácido 16 $\beta$ ,17-hidroxi-- <i>ent</i> -cauran-19-oico	9	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU,1996
		<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	ETSE, 1987

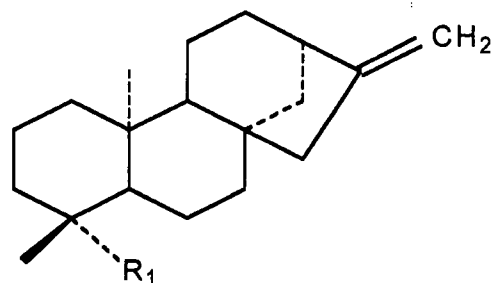


Ácido 16 $\alpha$ ,17-hidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-oico	10	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU,1996
		<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	ETSE, 1987
Ácido 16 $\alpha$ ,17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-oico	13	<i>A.squamosa</i>	galhos/fruto	YANG,1992
		<i>A.squamosa</i>	fruto	WU,1996
		<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG, 1998
Ácido 17-acetoxi-16 $\beta$ - <i>ent</i> -cauran-19-oico	14	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU,1996
		<i>A.cherimoya</i>	tronco	CHEN, 1997
Ácido19-formil- <i>ent</i> -cauran-17-oico	15	<i>A.squamosa</i>	galhos	YANG,1992
16 $\beta$ ,17-dihidroxi <i>ent</i> -cauran-19-al	16	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU,1996
17 hidroxi-16 $\beta$ - <i>ent</i> -cauran-19-al	17	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU, 1996
16 $\beta$ -hidroxi-17-acetoxi- <i>ent</i> -cauran-19-al	18	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU, 1996
		<i>A.cherimoya</i>	tronco	CHEN, 1997
		<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG, 1998
Ácido19-nor- 4 $\alpha$ -hidroxi- <i>ent</i> -cauran-17-oico	19	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU, 1996
		<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG, 1998
19- nor- <i>ent</i> -caurano-4 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17-triol	20	<i>A.squamosa</i>	fruto	WU, 1996
Metil-19-nor- <i>ent</i> -cauran-4 $\alpha$ -ol-17-oato	37	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	ADESOGAN,1976.
Metil 16 $\beta$ ,17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-oato	21	<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	ETSE, 1987
Metil 16 $\beta$ , 17-hidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-oato	22	<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	ETSE, 1987
Metil 16 $\alpha$ ,17-hidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-oato	23	<i>A.reticulata</i>	casca de tronco	ETSE, 1987
<i>ent</i> - 3 $\beta$ -hidroxicaur-16-ene	36	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	FATOPE,1996
Ácido <i>ent</i> -16,17-diacetoxicauran-16-oico	26	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	FATOPE,1996
Ácido <i>ent</i> -19-carbometoxicauran-19-oico	27	<i>A.senegalensis</i>	casca de tronco	FATOPE 1996
Metil-16 $\beta$ -acetoxi-19-al- <i>ent</i> -cauran-17-oato	28	<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG, 1998
Ácido 16 $\alpha$ -hidro-19-acetoxi- <i>ent</i> -cauran-17-oico	29	<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG,1998.
Ácido 16 $\beta$ -hidroxi-17-acetoxi- <i>ent</i> -cauran-19-oico	30	<i>A.cherimoya</i>	tronco	CHEN, 1997
		<i>A.glabra.</i>	fruto	CHANG,1998.
Ácido 16 $\alpha$ -hidro- <i>ent</i> -cauran-17-oico	31	<i>A.glabra</i>	fruto	CHANG 1998.
		<i>A.spraguei</i>	madeira	DÍAZ, 1988

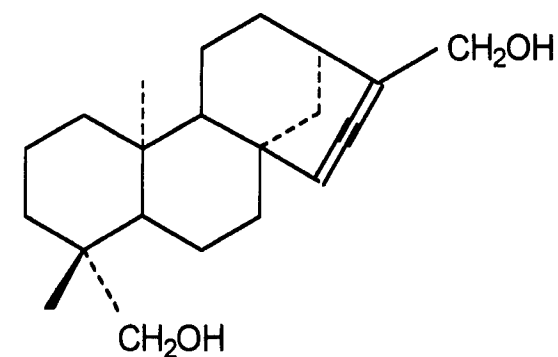
Ácido 16 $\beta$ -hidro- <i>ent</i> -cauran-17-oico	32	<i>A. glabra</i>	fruto	CHANG, 1998.
Ácido 16 $\alpha$ -hidro-19-al- <i>ent</i> -cauran-17-oico	33	<i>A. glabra</i>	fruto	CHANG, 1998.
Metil-16 $\alpha$ -hidro-19-al- <i>ent</i> -cauran-17-oato	34	<i>A. glabra</i>	fruto	CHANG, 1998.
<i>ent</i> -caur-15-ene-17,19-diol	38	<i>A. glabra</i>	fruto	CHANG, 1998.
Ácido stachanoico		<i>A. senegalensis</i>	casca de tronco	ADESOGAN, 1976.



	R1	R2	R3
2.	H	CH <sub>3</sub>	OH
3.	CHO	COOH	H
4.	COOH	COOH	H
5.	OH	H	COOH
6.	CHO	H	CH <sub>2</sub> OH



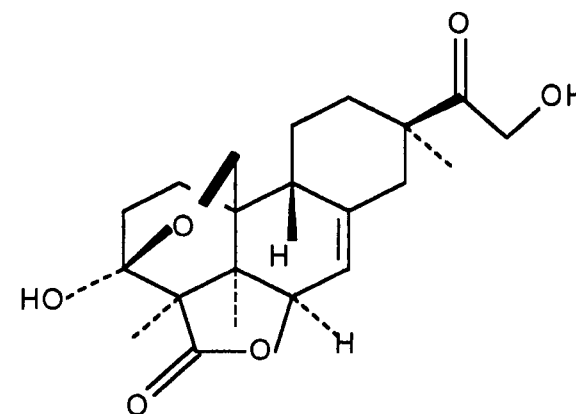
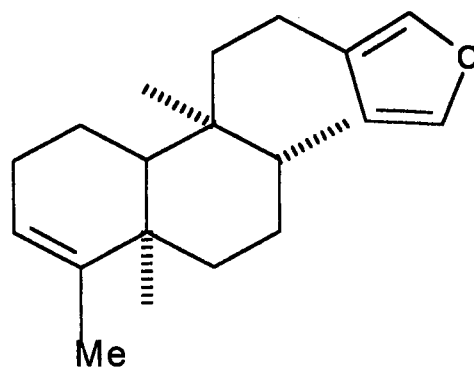
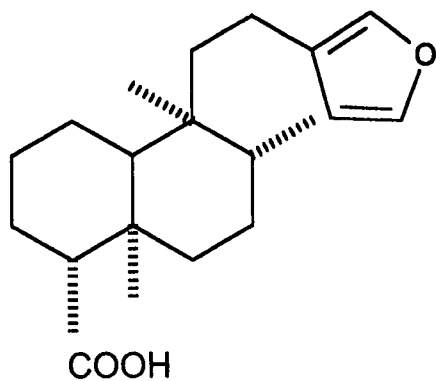
	R1	R2
1.	COOH	H
11.	CH <sub>2</sub> OH	H
24.	CHO	H
25.	CH <sub>2</sub> OAc	H
36.	CH <sub>3</sub>	OH



38

7.	CHO	H	CH <sub>2</sub> OAc	
8.	CH <sub>2</sub> OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	
9.	COOH	H	CH <sub>2</sub> OH	
10.	COOH	CH <sub>2</sub> OH	H	
12.	COOH	OH	CH <sub>3</sub>	
13.	COOH	CH <sub>2</sub> OH	OH	
14.	COOH	H	CH <sub>2</sub> OAc	
15.	CHO	H	COOH	
16.	CHO	OH	CH <sub>2</sub> OH	
17.	CHO	H	CH <sub>2</sub> OH	
18.	CHO	OH	CH <sub>2</sub> OAc	
19.	OH	H	COOH	
20.	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	
21.	COOCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>2</sub> OH	
22.	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H	
23.	COOCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH	
26.	COOH	CH <sub>2</sub> OAc	OAc	
27.	CO <sub>2</sub> Me	COOH	H	
28.	CHO	OAc		COOCH <sub>3</sub>
29.	CH <sub>2</sub> OAc	COOH	H	
30.	COOH	OH	CH <sub>2</sub> OAc	
31.	CH <sub>3</sub>	COOH	H	
32.	CH <sub>3</sub>	H	COOH	
33.	CHO	COOH		H
34.	CHO	COOCH <sub>3</sub>	H	
35.	OH	COOH	H	
37.	OH	H	COOCH <sub>3</sub>	

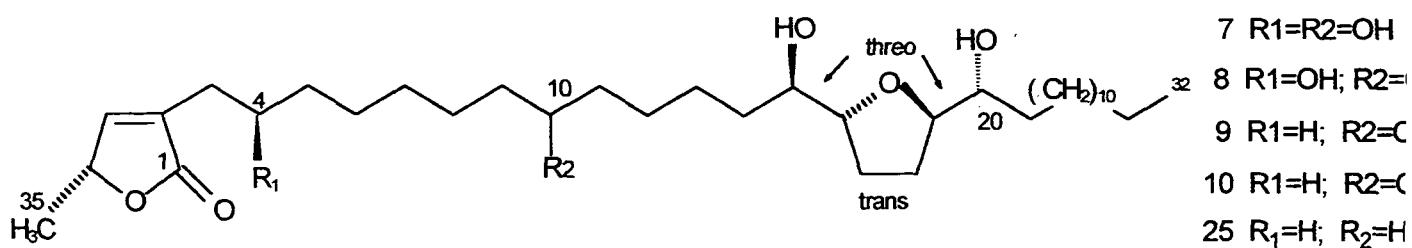
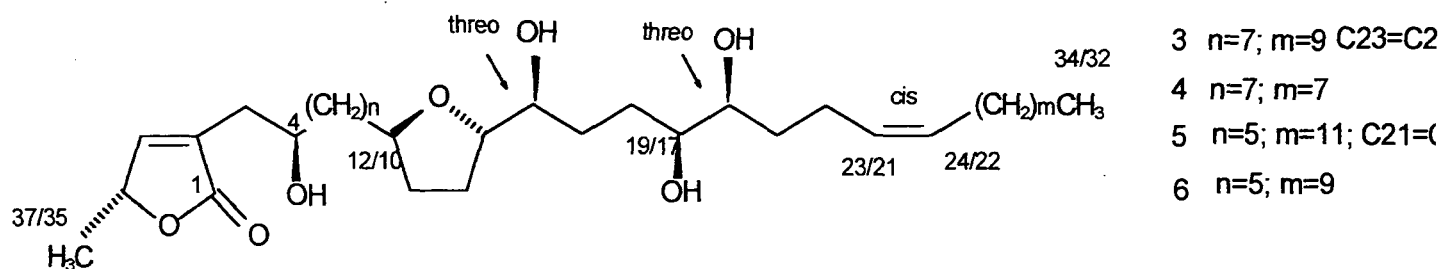
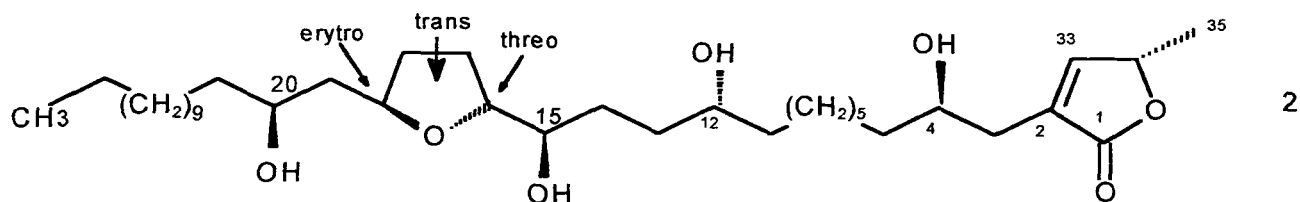
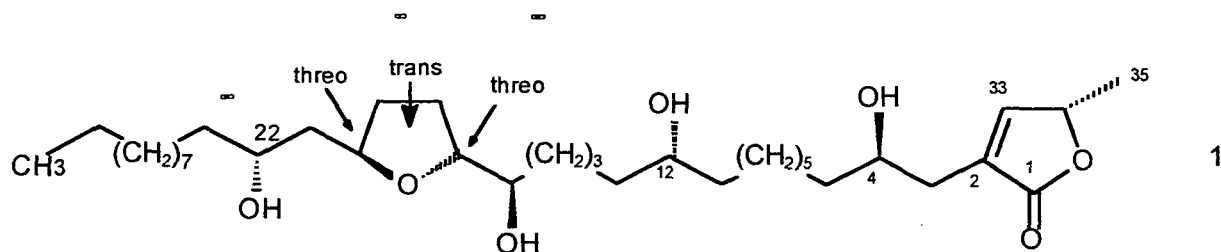
Somente na *A. coriacea* foram encontrados dois diterpenos com esqueletos clerodanos (FERRARI, 1971) e um pimarano (MUSSINI, 1973) são eles:

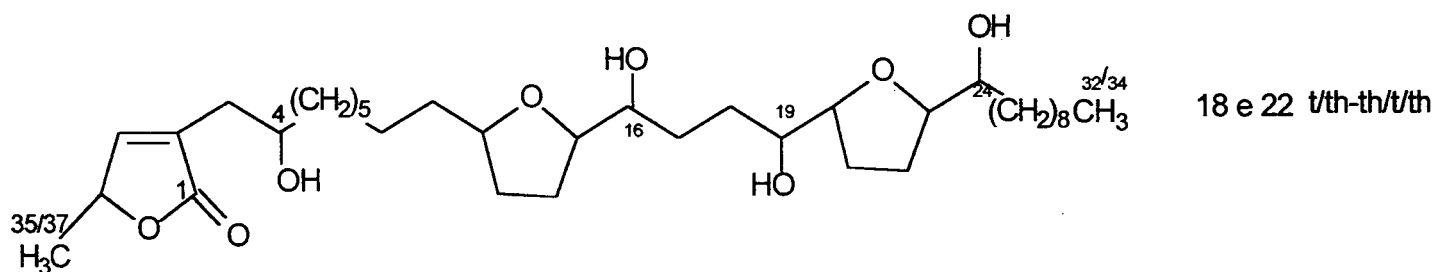
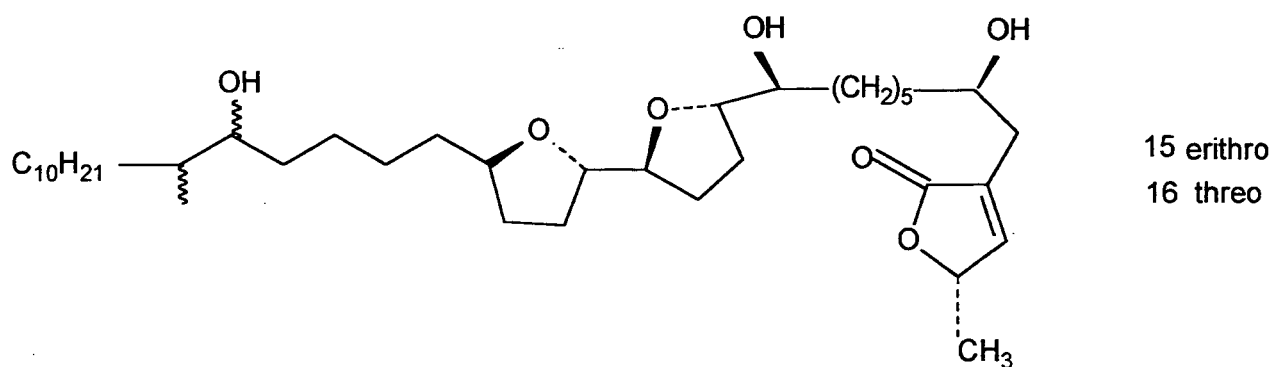
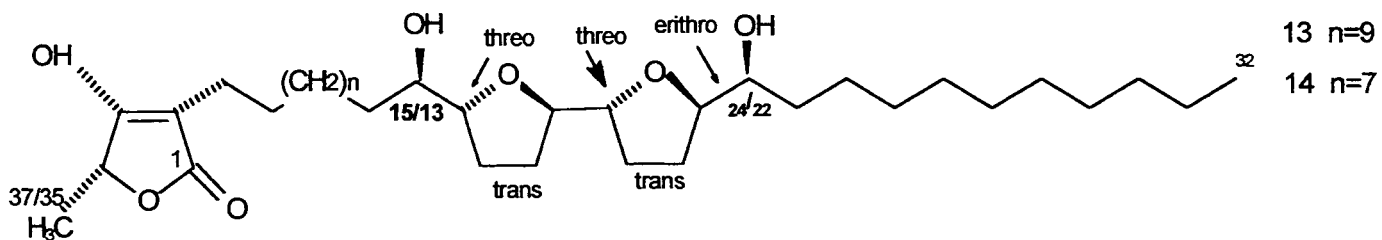
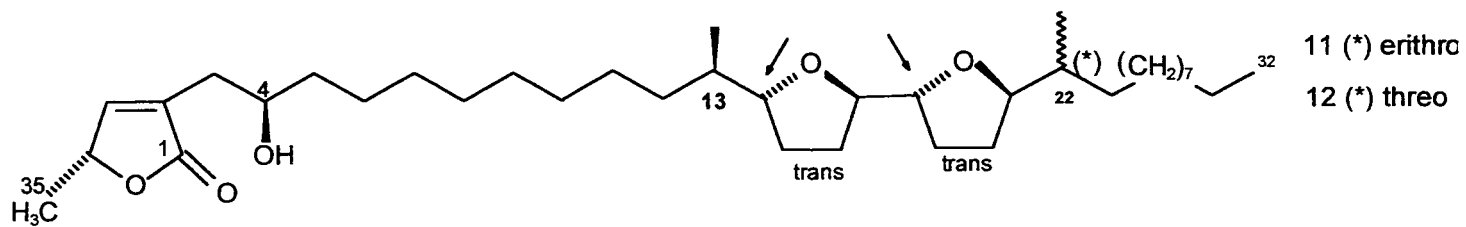


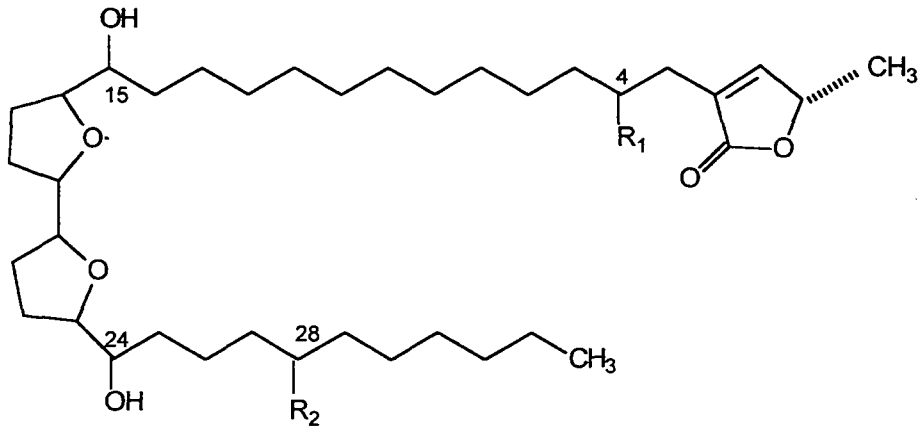
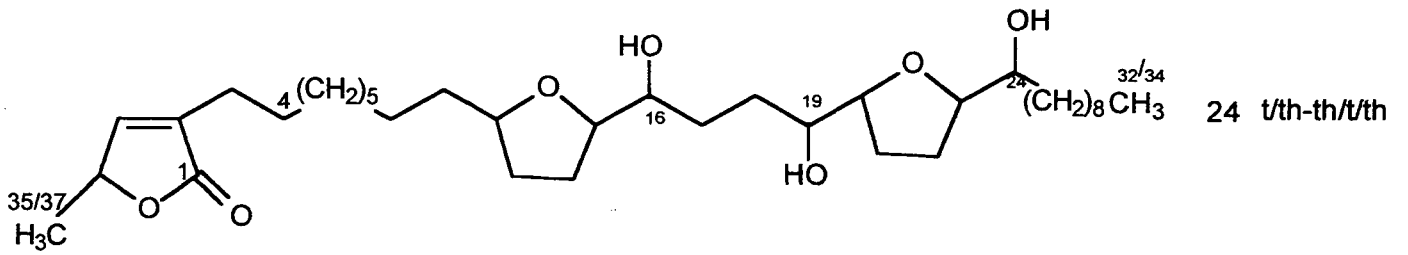
ACETOGENINAS ENCONTRADAS NA *A. glabra*

Acetogenina	Estrutura	Localização	Ref. Bibliográfica
Glacin A	1	Folha	LIU, 1998 a
Glacin B	2	Folha	IDEM
Glabranin	3	Semente	GALLARDO, 1998
Muricatetrocin-B	4	Semente	IDEM
Gigantetronenin	5	Semente	IDEM
Gigantetrocin-A	6	Semente	IDEM
Annonacin	7	Casca de caule	CHEN, 1995
		Semente	GALLARDO, 1998
Annonacinona	8	Semente	IDEM
Corossolin	9	Semente	IDEM
Corossolona	10	Casca de caule	CHEN, 1995
		Semente	GALLARDO, 1998
Molvizarin	11	Semente	IDEM
Parviflorin	12	Semente	IDEM
Laherradurin	13	Semente	IDEM
Itrabin	14	Semente	IDEM
Glabracin A	15	Folhas	LIU, 1998 b
Glabracin B	16	Folhas	LIU, 1998 b
Bullatanocin	18	Folhas	IDEM
Squamocin	19	Semente	OHSAWA, 1991
Asimicin	20	Semente	IDEM
Desacetiluaricin	21	Semente	IDEM
Cherimolin-2	22	Semente	LI, 1995
Annonin I	23	Semente	IDEM
4-desoxicherimolin-2	24	Semente	IDEM
Solamin	25	Casca de caule	CHEN, 1995
Annonaglaxin	26	Folhas	LIU, 1999 a
27-hidroxi bullatacin	27	Folhas	IDEM
Annoglacin A	28	Folhas	LIU, 1999 b
Annoglacin B	29	Folhas	IDEM

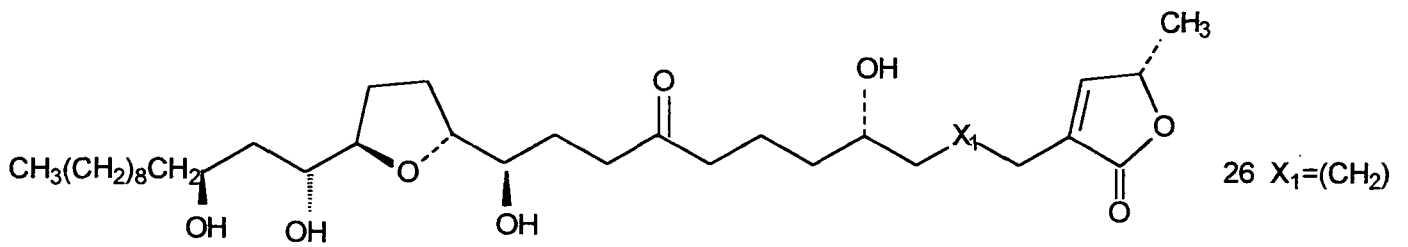
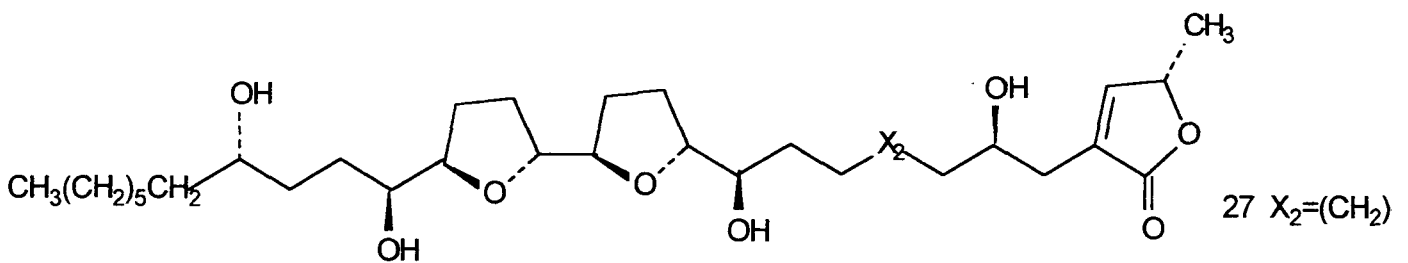
## Estrutura das acetogeninas:



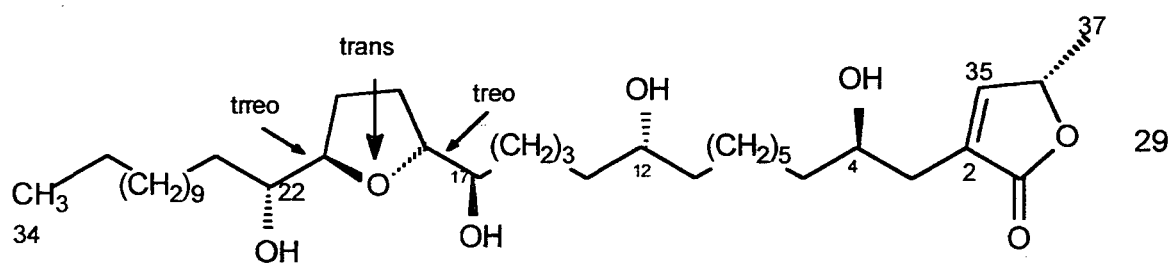
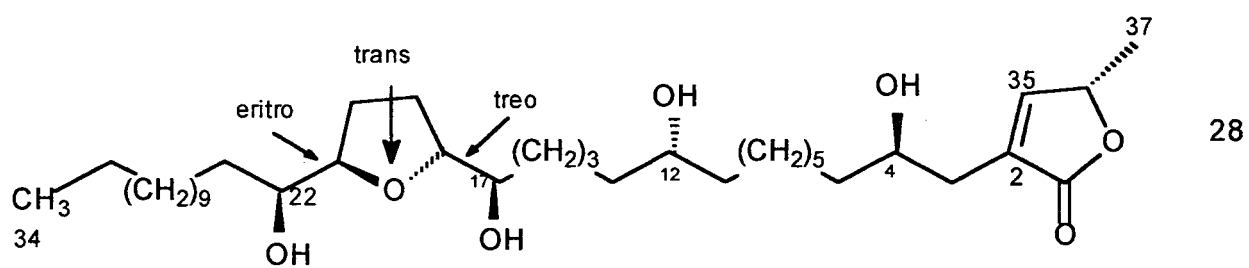


19 th/t/th/er R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OH20 th/t/th/th R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=H21 th/t/th/er R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H23 th/t/th/er R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OH

24 t/th-th/t/th

26 X<sub>1</sub>=(CH<sub>2</sub>)27 X<sub>2</sub>=(CH<sub>2</sub>)





# ESPECTROS

FIGURA 13: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO - ÁCIDO CAURENÓICO

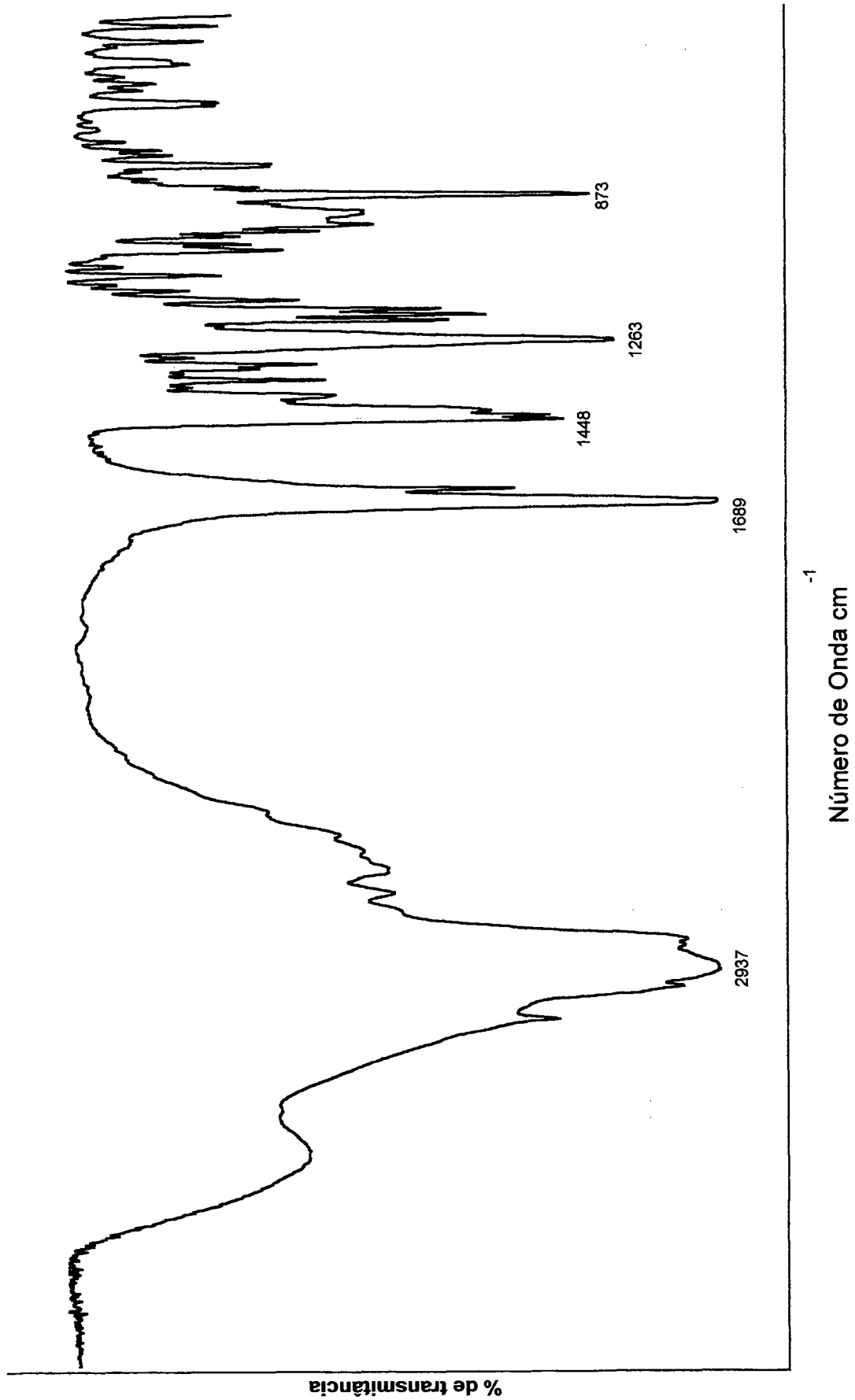


FIGURA 14: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$   
 ácido caurenóico (AD-1) -  $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz

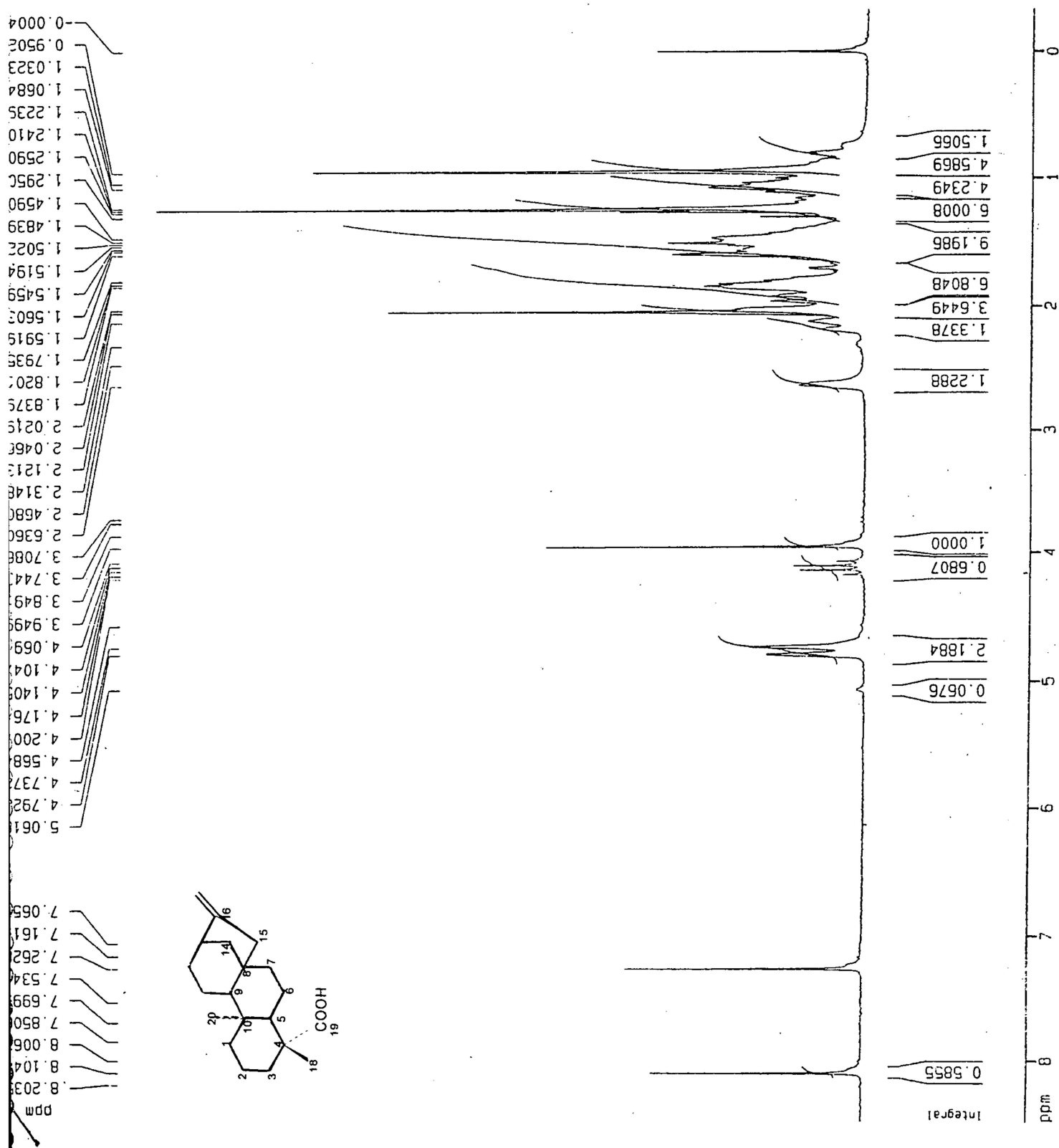
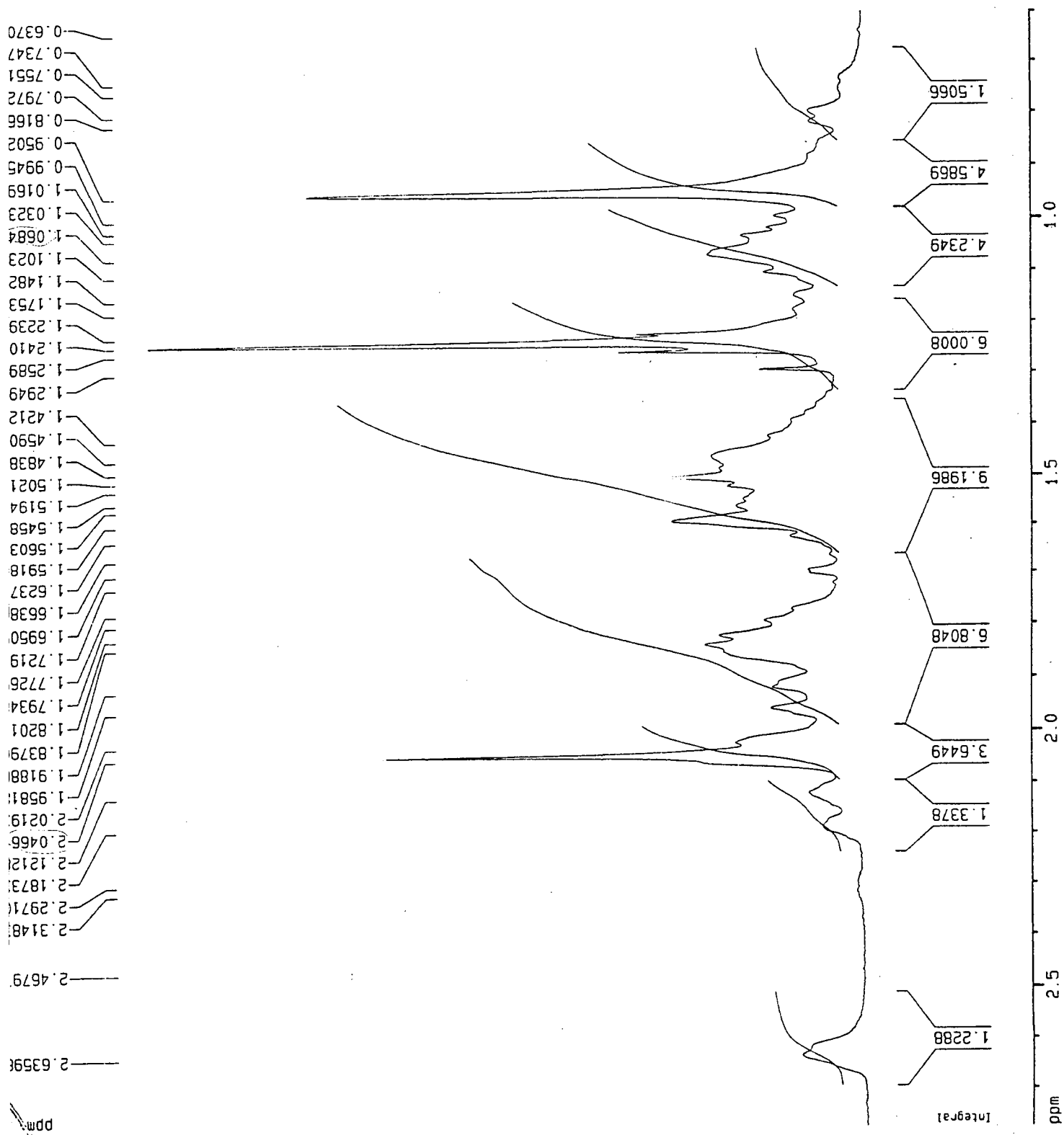


FIGURA 15: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  EXPANDIDO  
 ácido caurenóico (AD-1) -  $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz



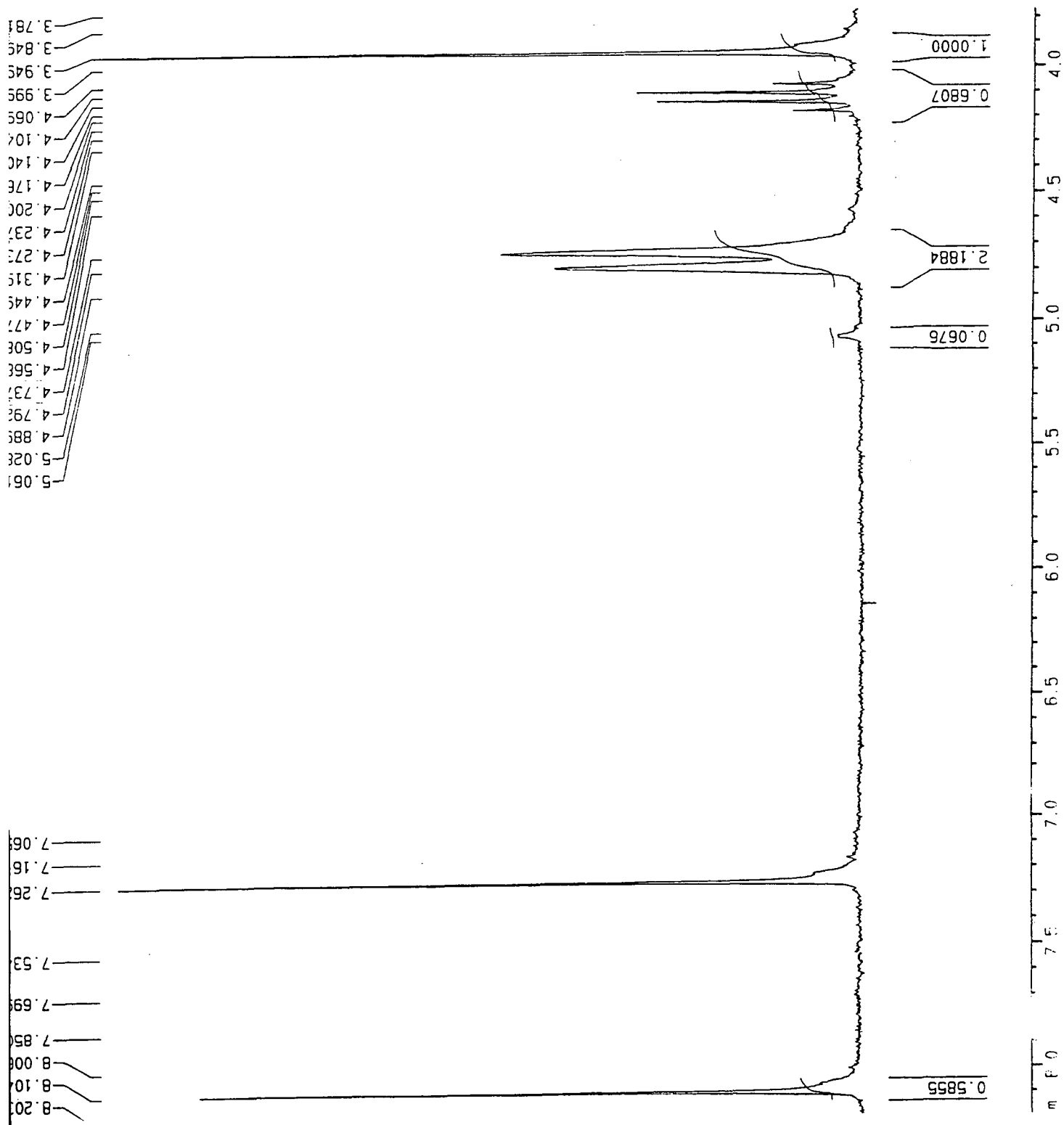


FIGURA 16: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$   
ácido caurenóico (AD-1) -  $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz

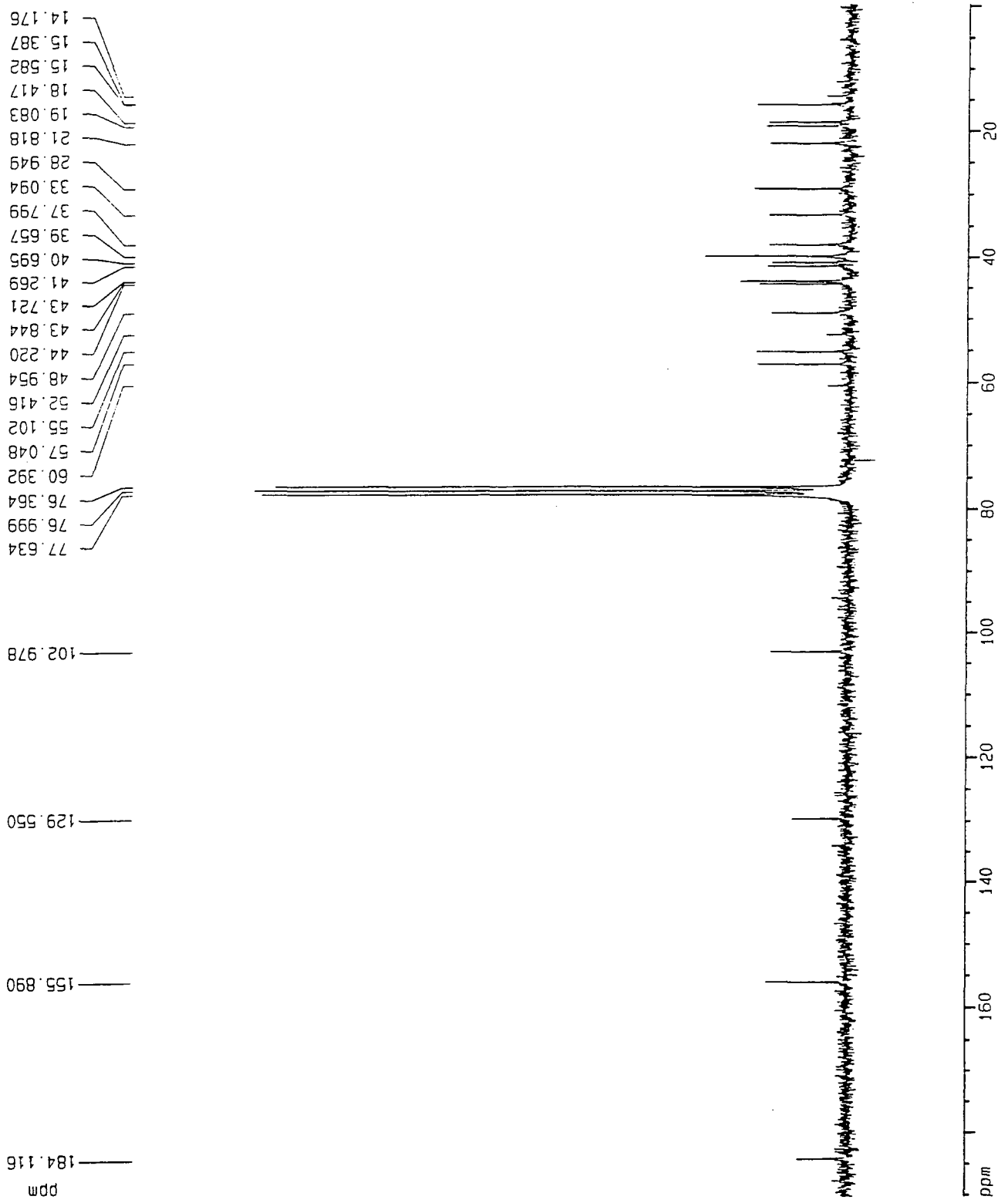


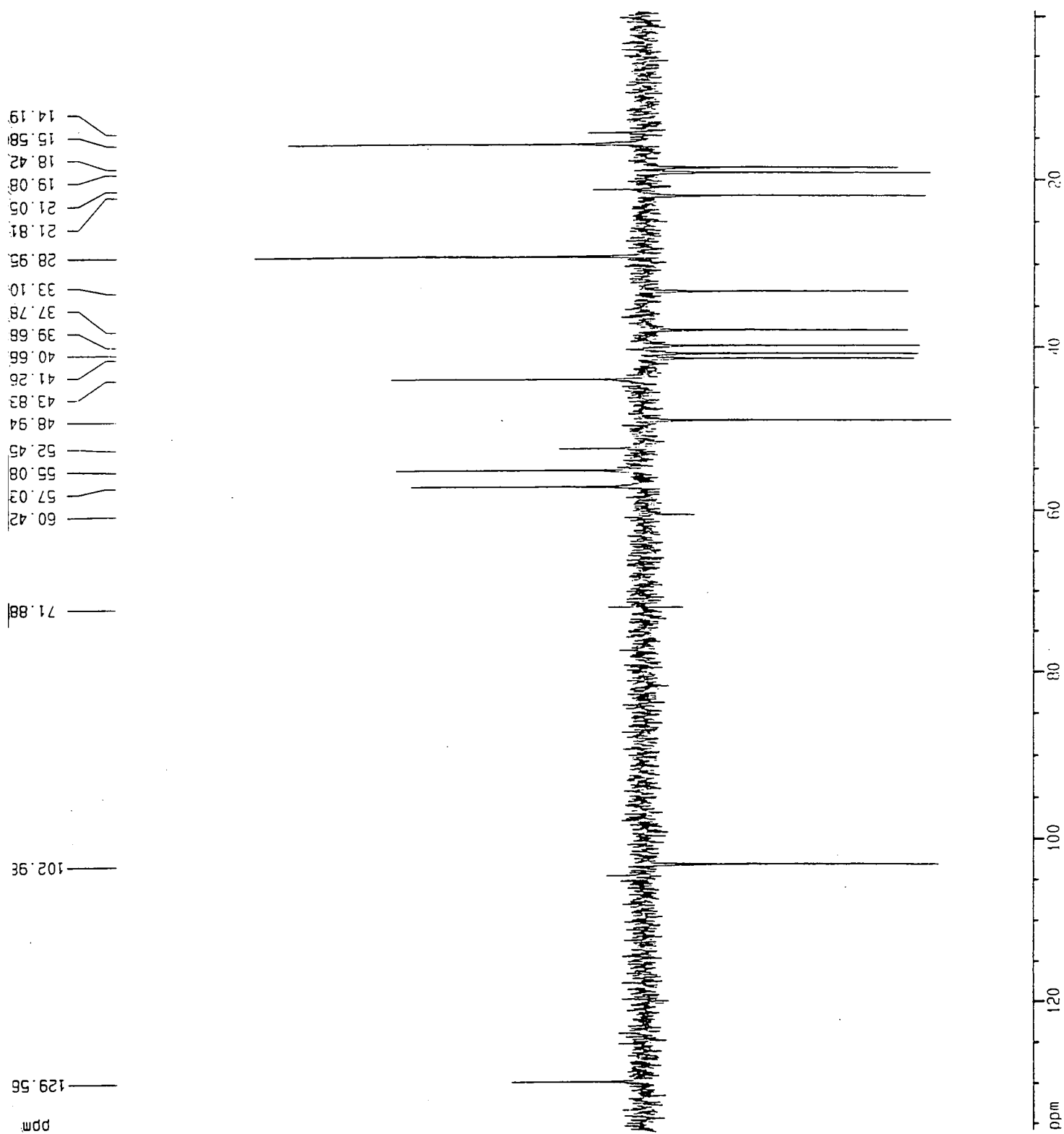
FIGURA 17: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DEPT – ácido caurenóico (AD-1) - CDCl<sub>3</sub>; 200 MHz



FIGURA 18: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO-ácido ent-19-carbometoxi cauran-17-óico

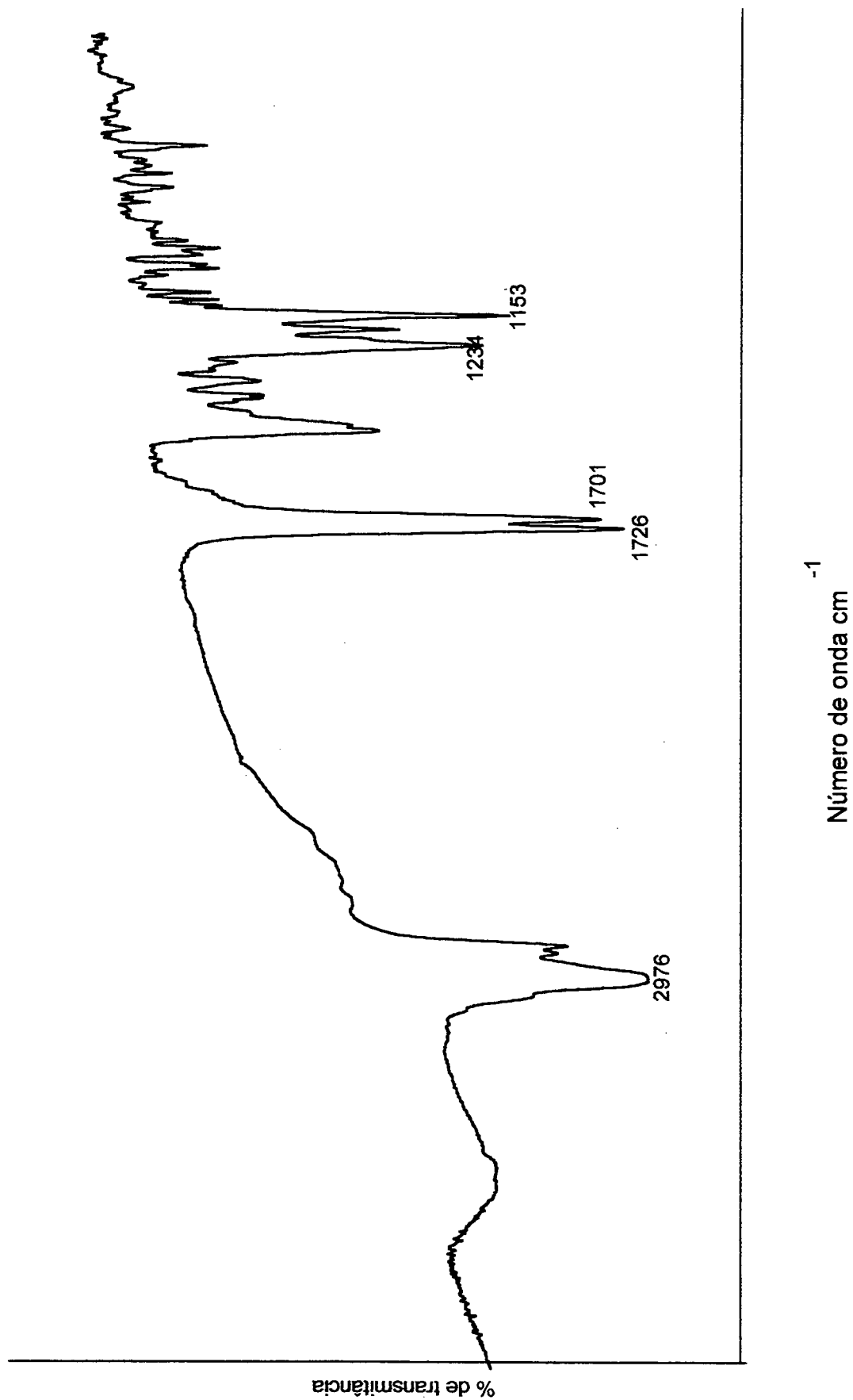


FIGURA 19: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  –  
 ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico (AD-2) -  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz

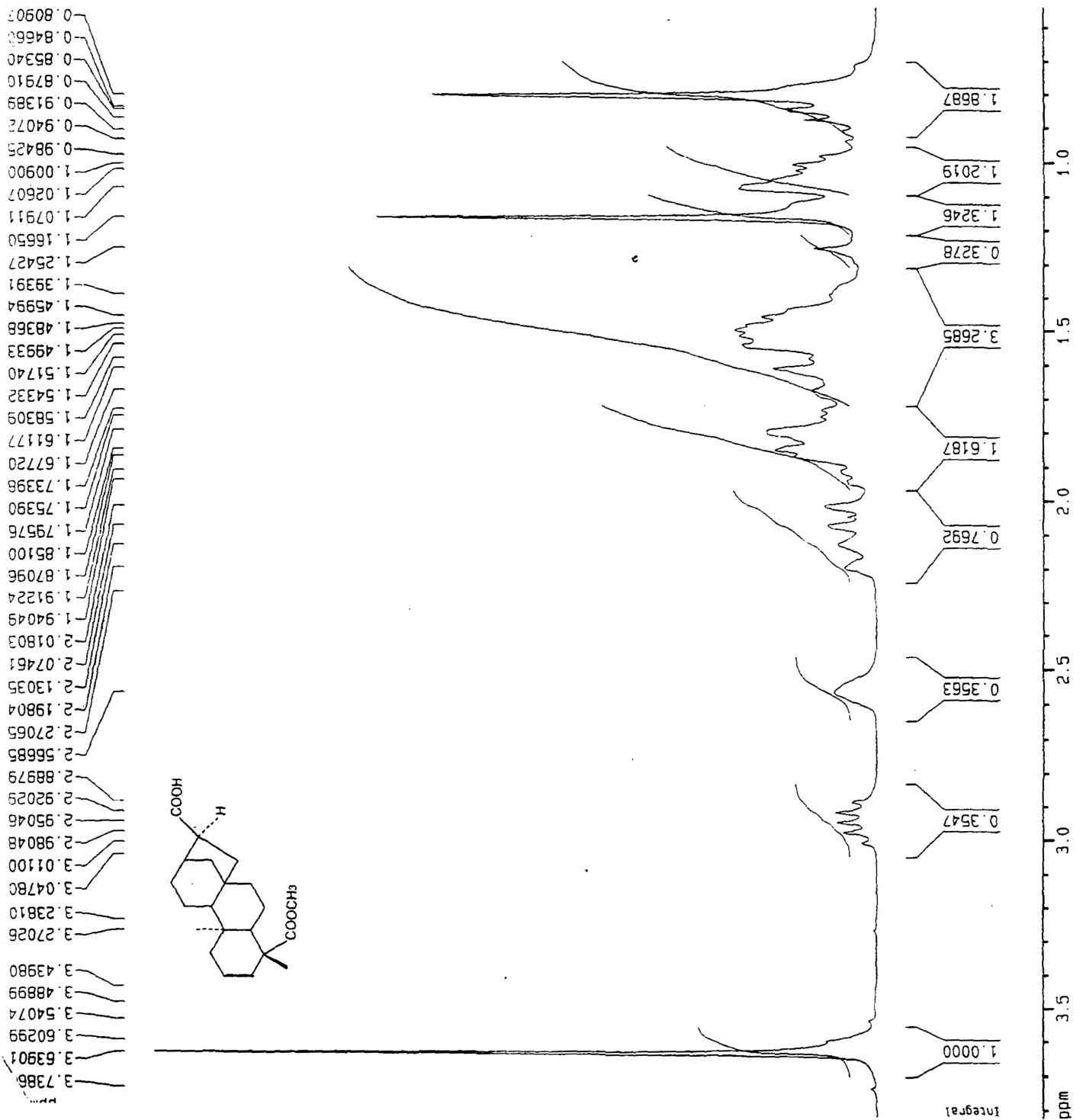


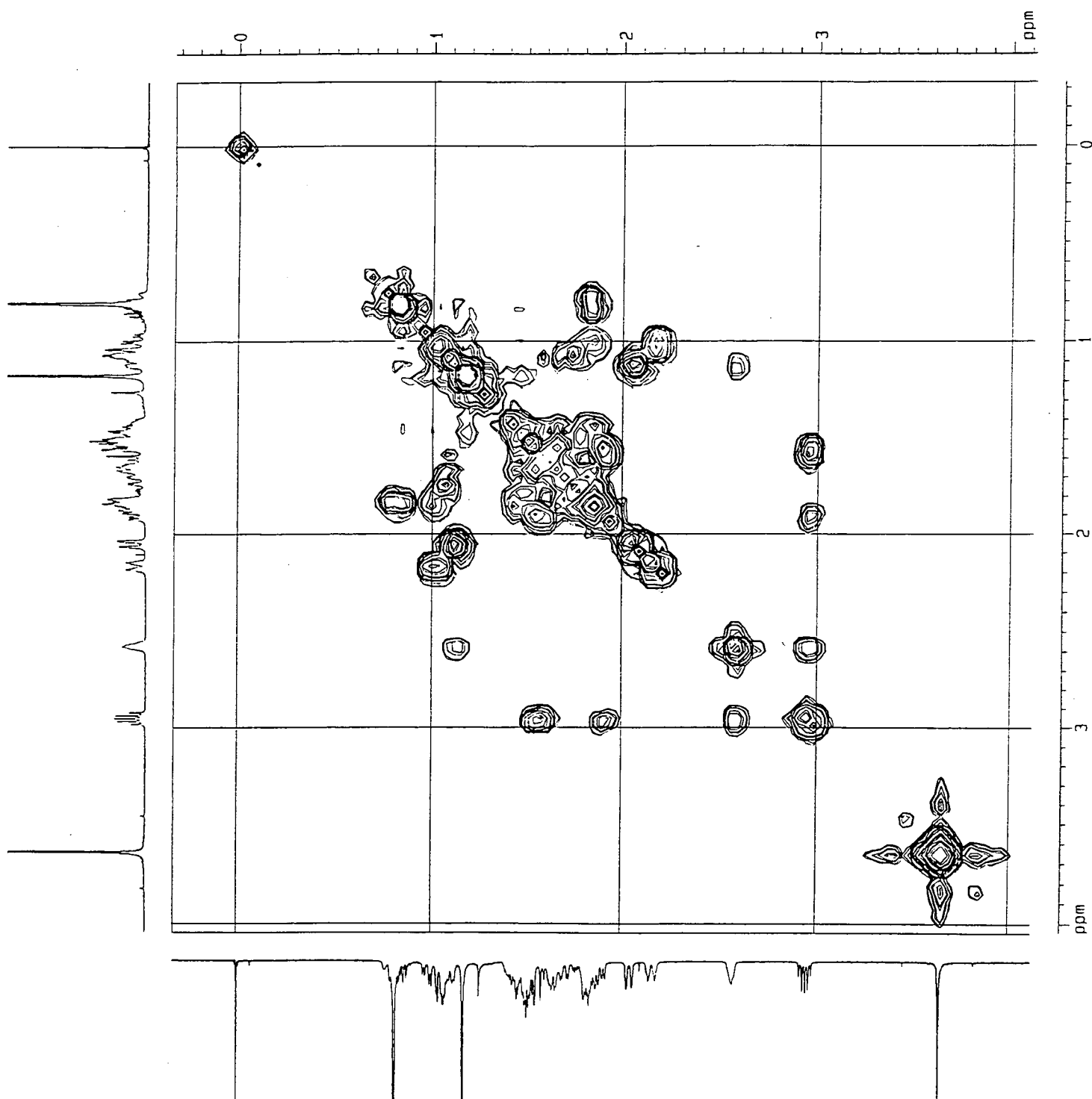
FIGURA 20: MAPA DE CONTORNO COSY DE  $^1\text{H}$  -ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico (AD-2) -  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz

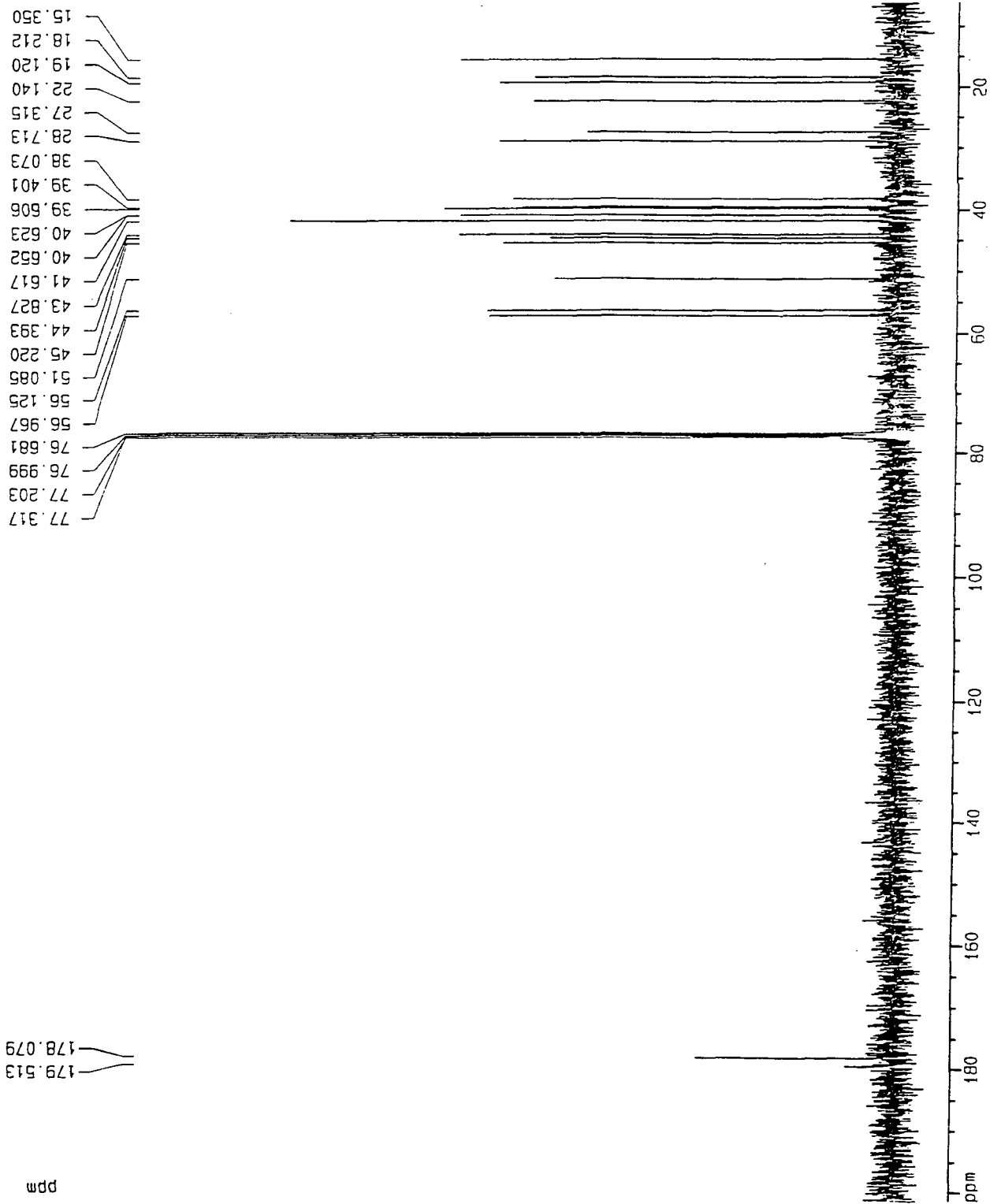
FIGURA 21: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  -ácido *ent*-19-carbometoxiauran-17-óico (AD-2) -  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz

FIGURA 22 : ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E DEPT-  
ácido *ent*-19-carbometoxicauran-17-óico (AD-2) -  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz

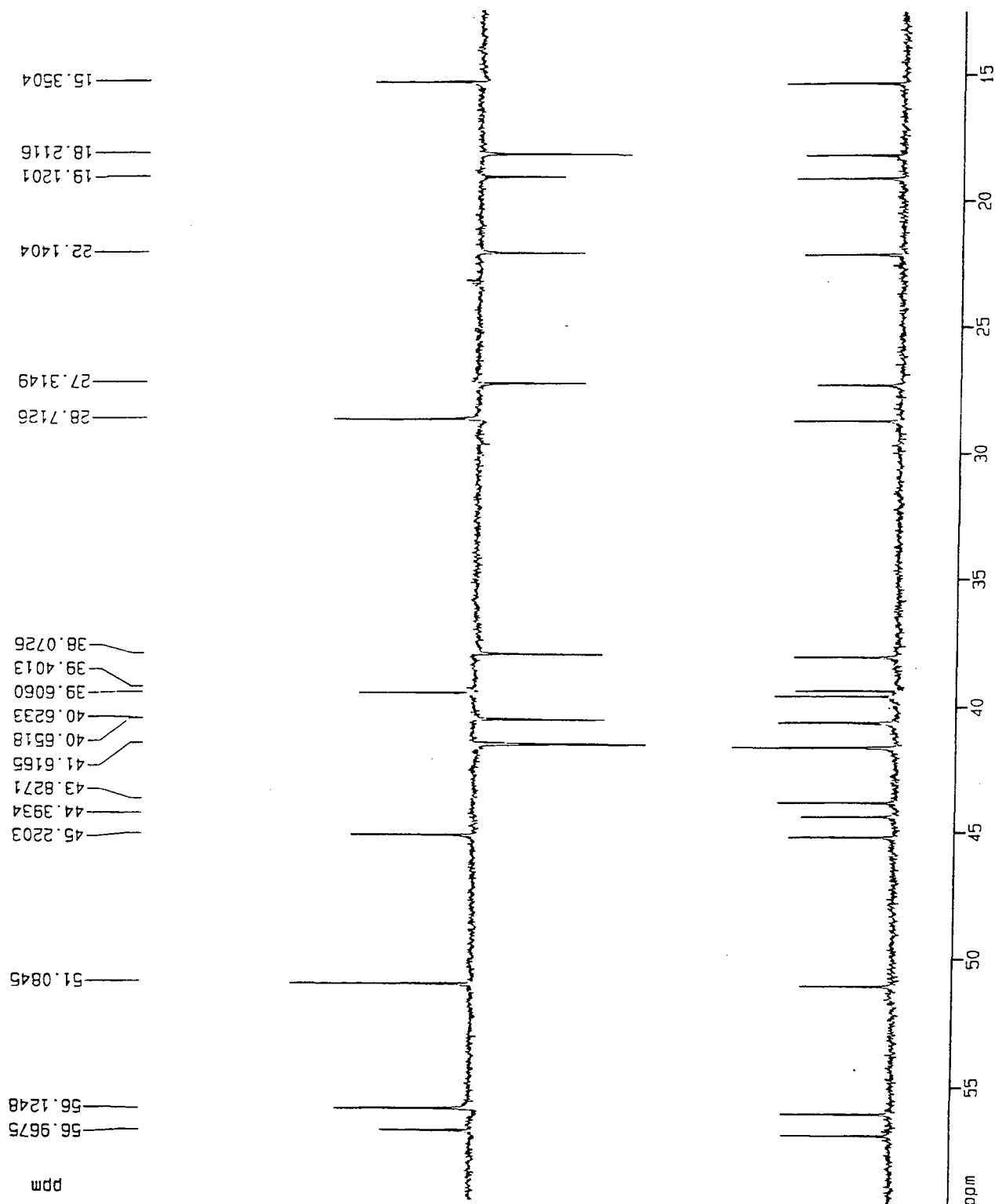


FIGURA 23: MAPA DE CONTORNO HMQC

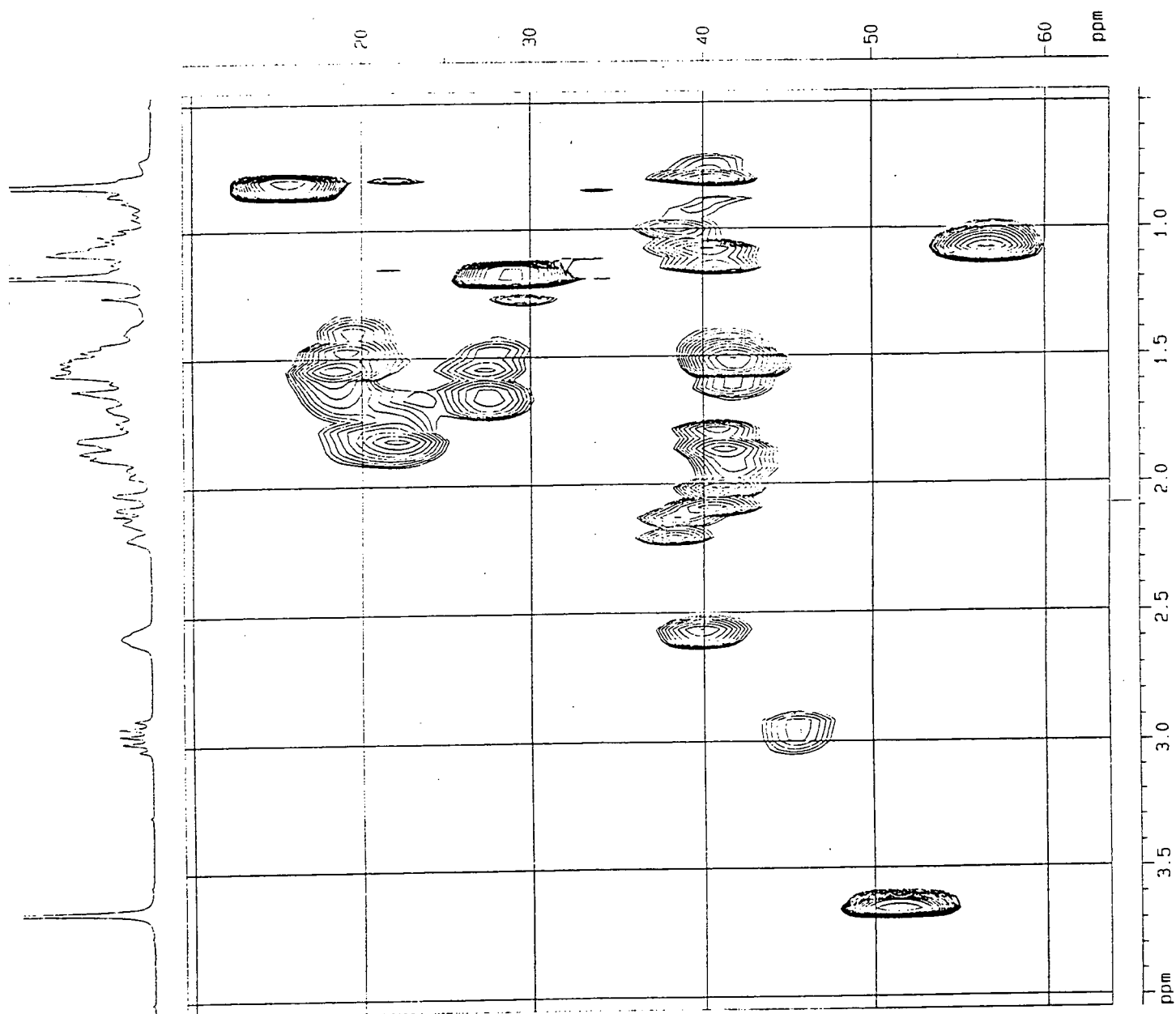
ácido *ent*-19-carbometoxi cauran-17-óico (AD-2) - CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz

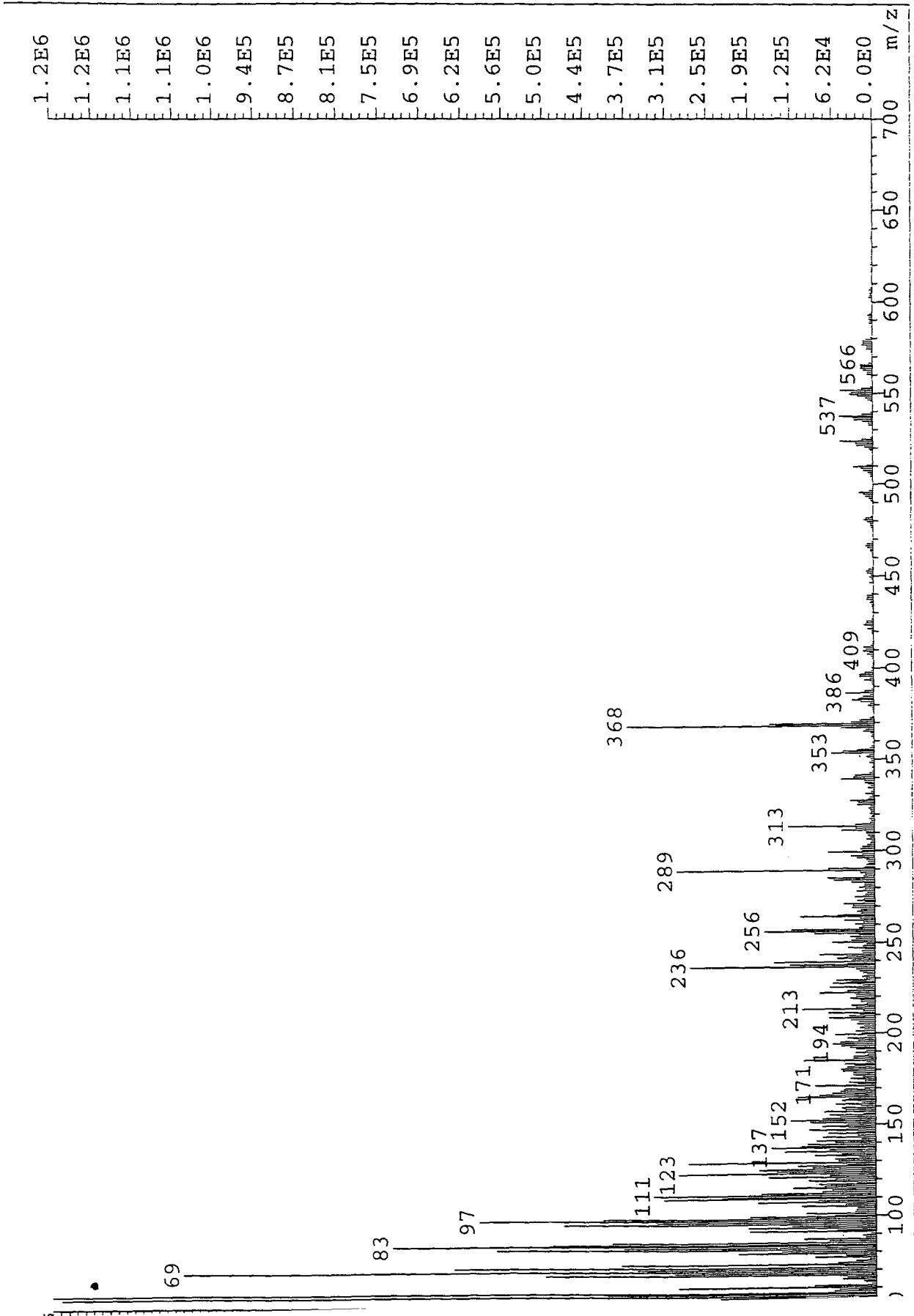
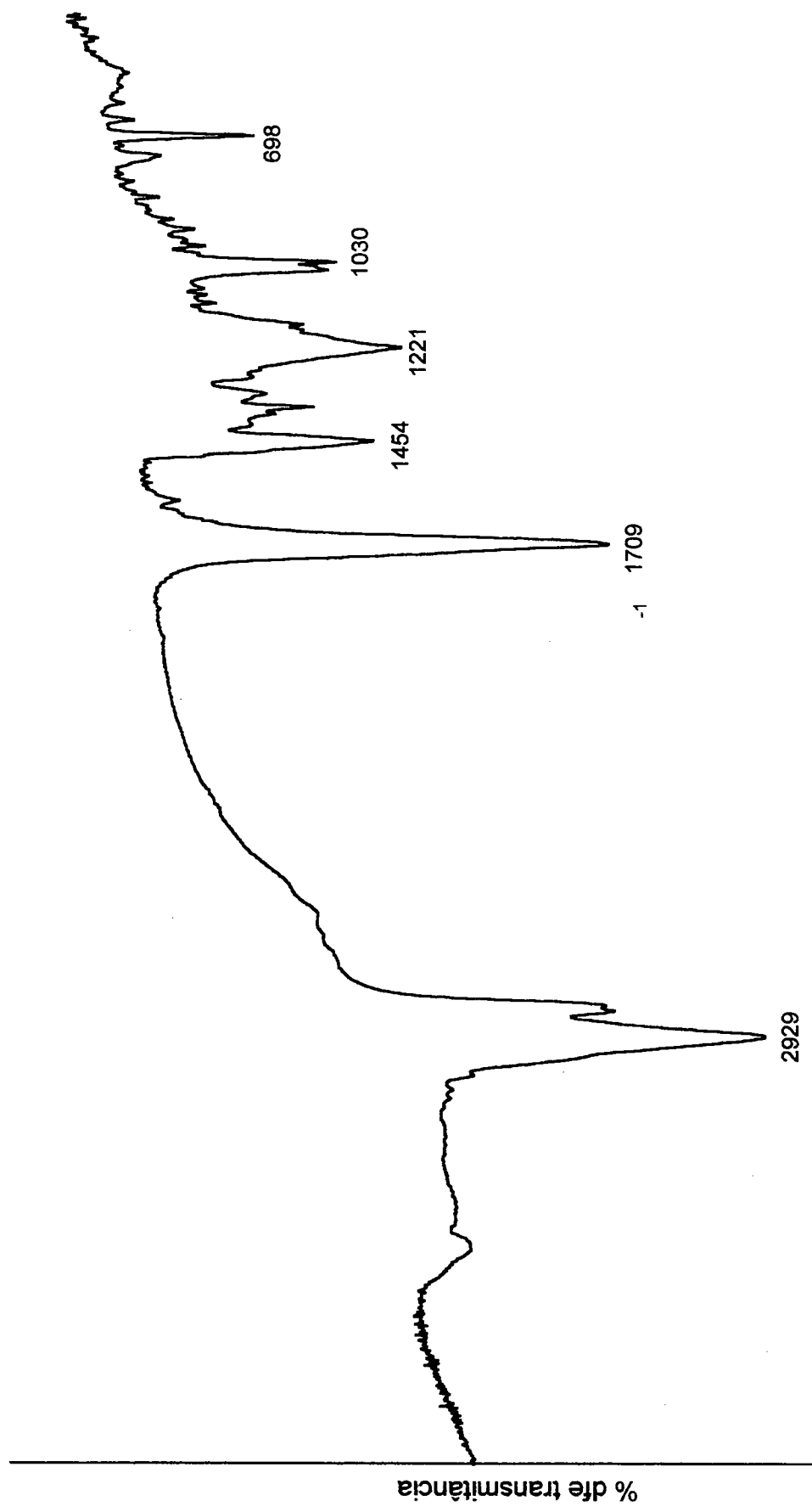
FIGURA 24: ESPECTRO DE MASSA - ácido *ent*-19-carbometoxi cauran-17-óico (AD-2)

FIGURA 25: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO-ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-ent-cauran-17-óico



Número de ondas cm<sup>-1</sup>



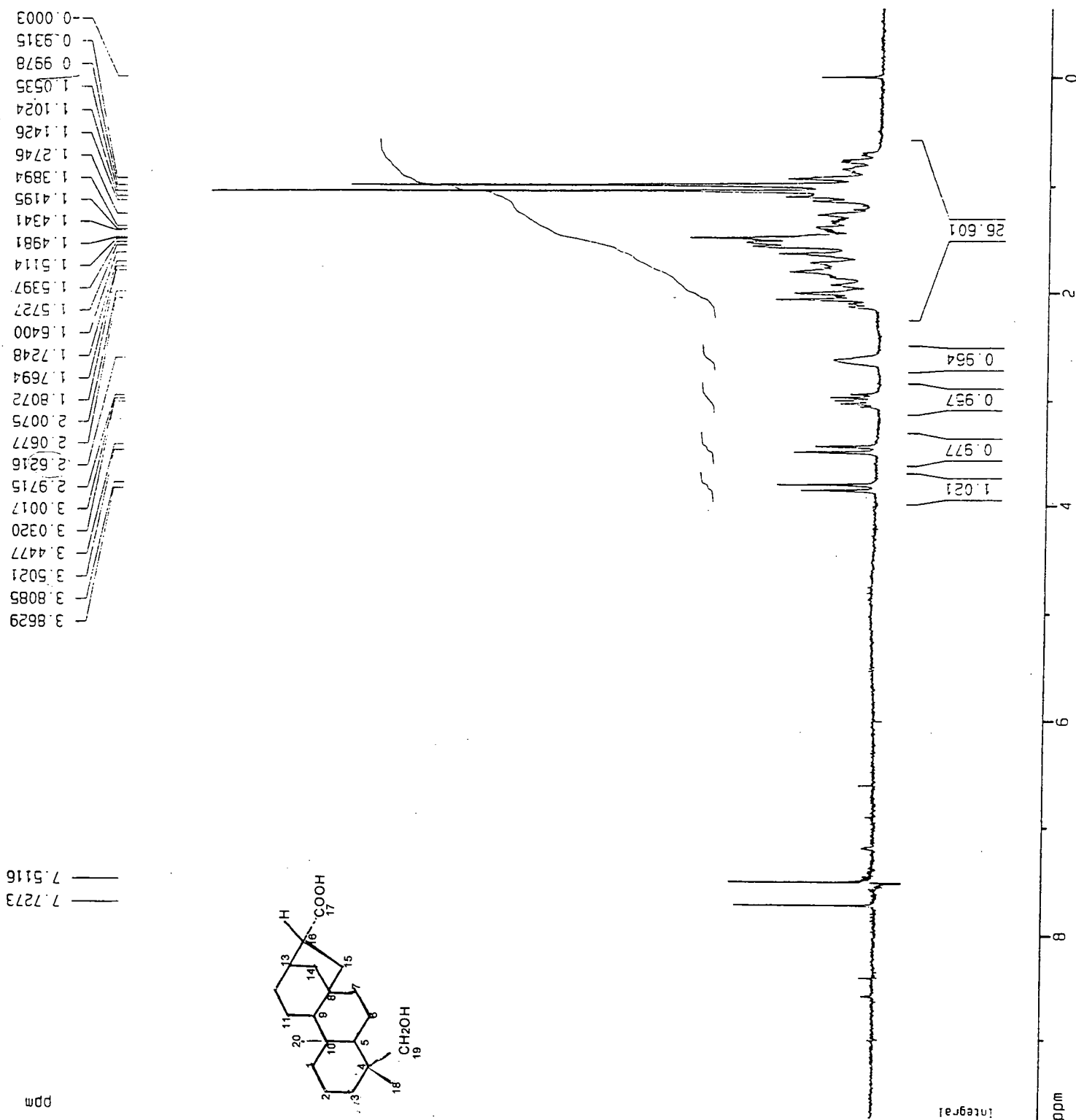
FIGURA 26: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  –ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico (AD-3) -  $\text{CDCl}_3$ ; gotas de piridina; 200 MHz

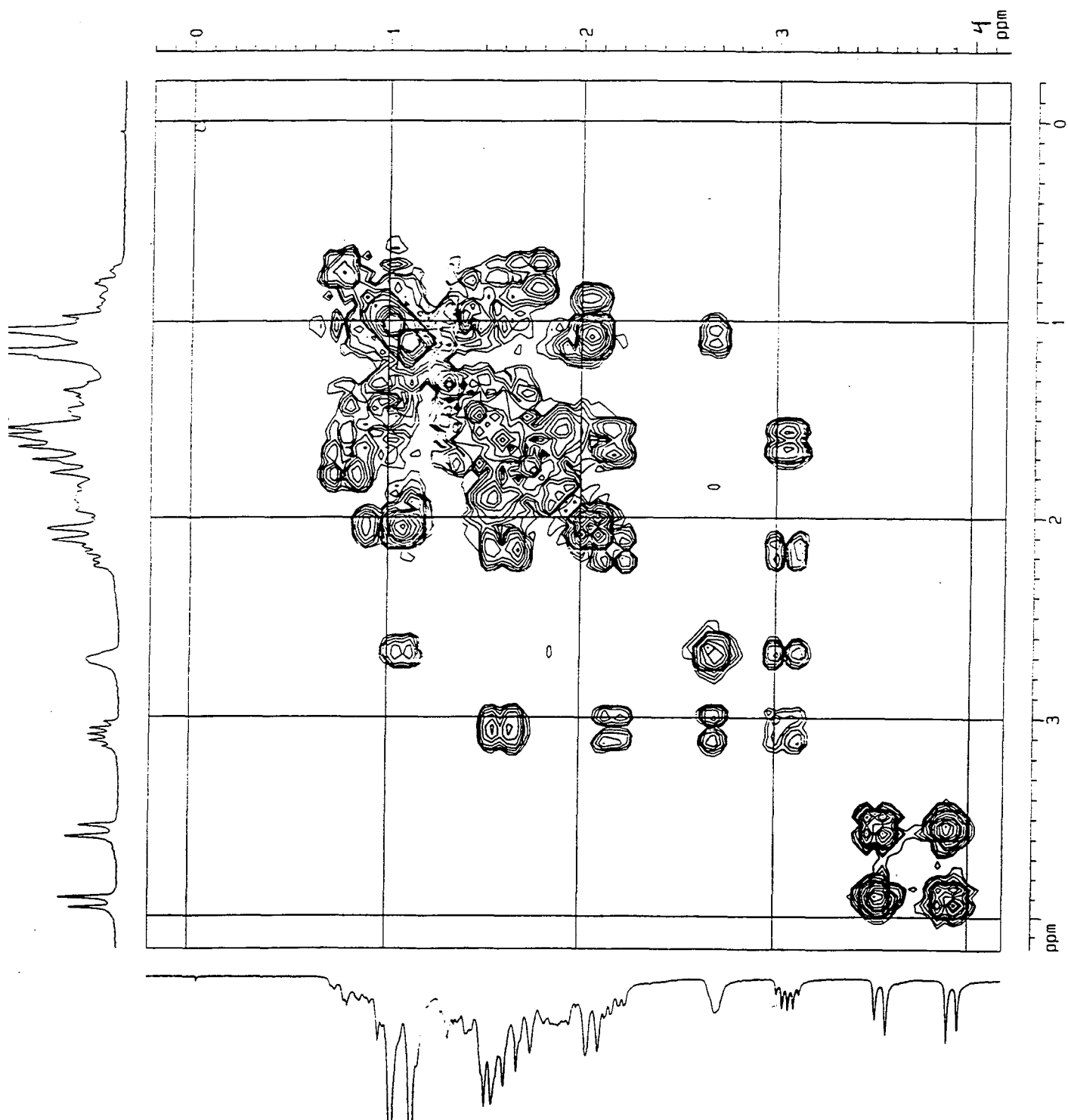
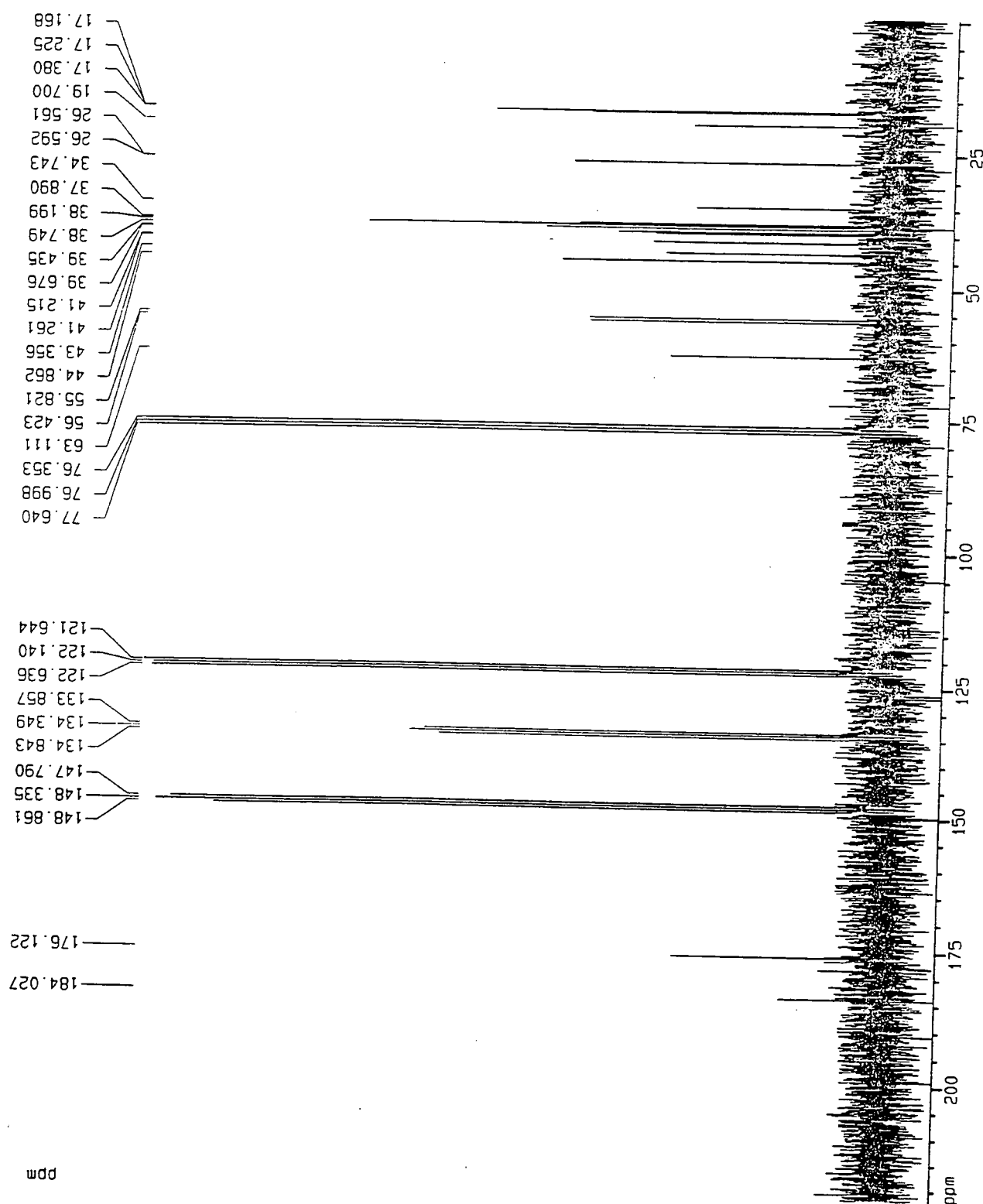
FIGURA 27: MAPA DE CONTORNO COSY DE  $^1\text{H}$ ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-ent-auran-17-óico (AD-3) -  $\text{CDCl}_3$ ; gotas de piridina; 200 MHz

FIGURA 28: ATRIBUIÇÕES NO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$ ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico (AD-3) -  $\text{CDCl}_3$ ; gotas de piridina; 200 MHz

## FIGURA 29: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DEPT

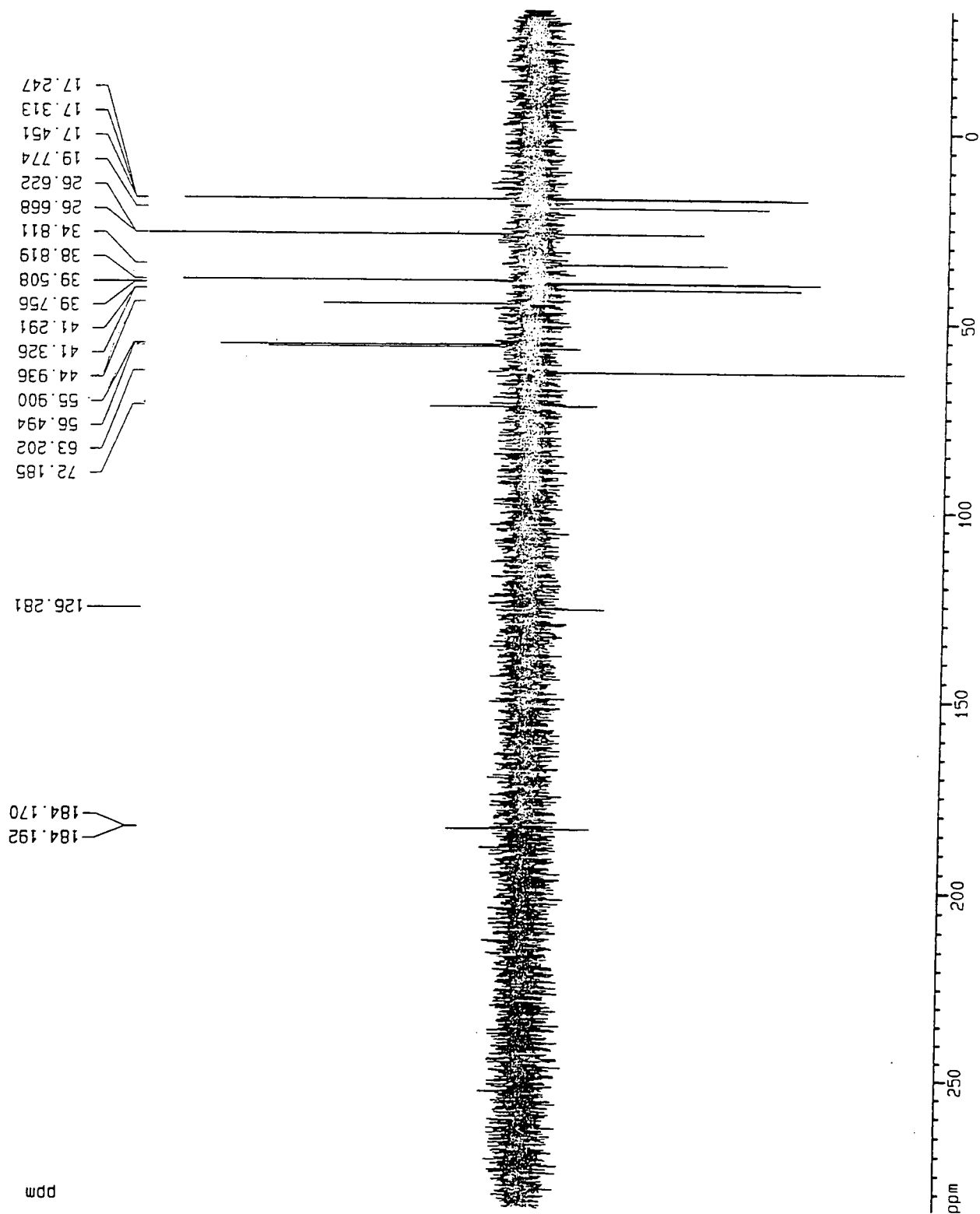
ácido 16 $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico (AD-3) - CDCl<sub>3</sub>; gotas de piridina; 200 MHz

FIGURA 30: MAPA DE CONTORNO HMQC

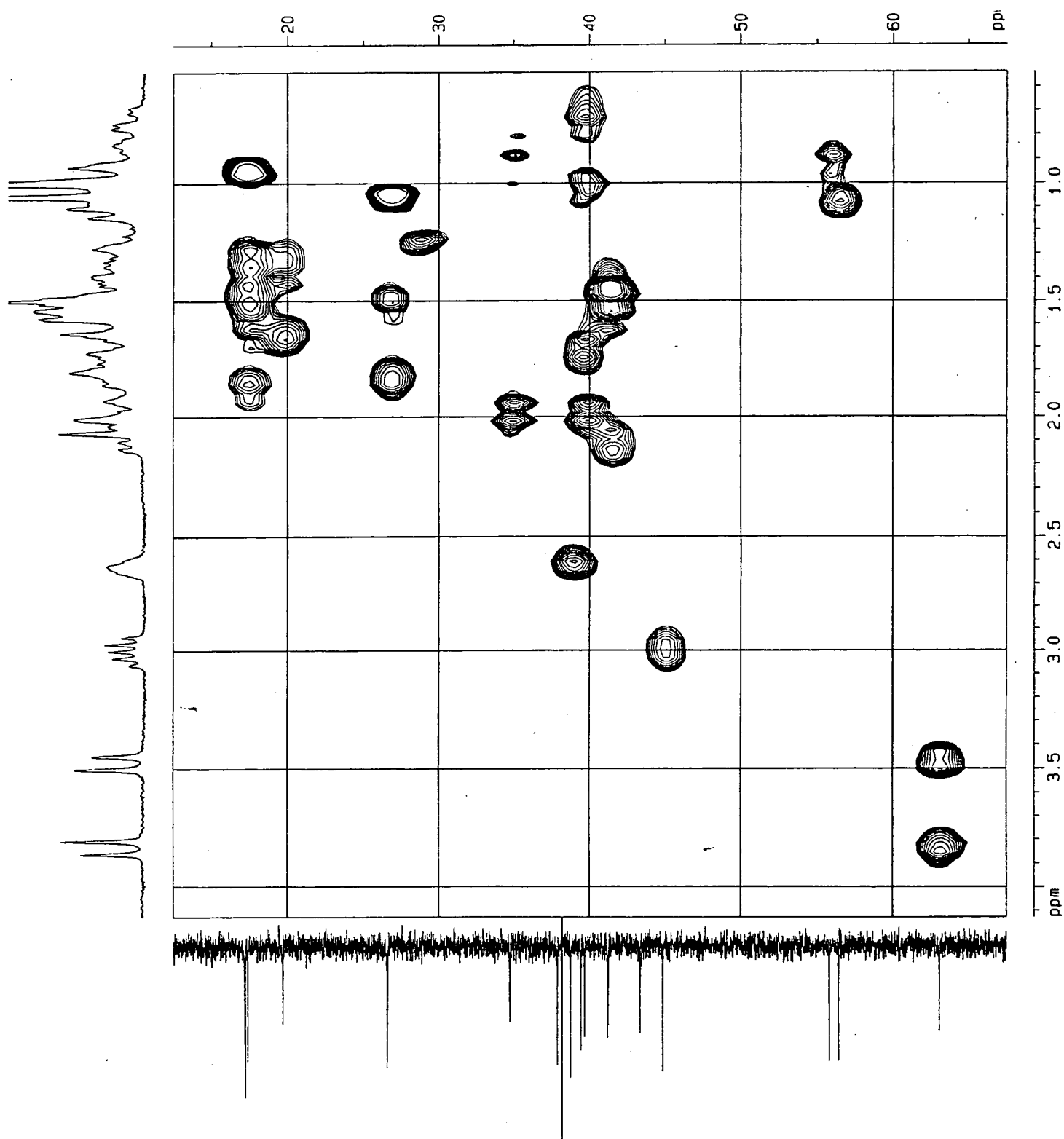
ácido 16  $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico (AD-3) - CDCl<sub>3</sub>; gotas de piridina; 200 MHz

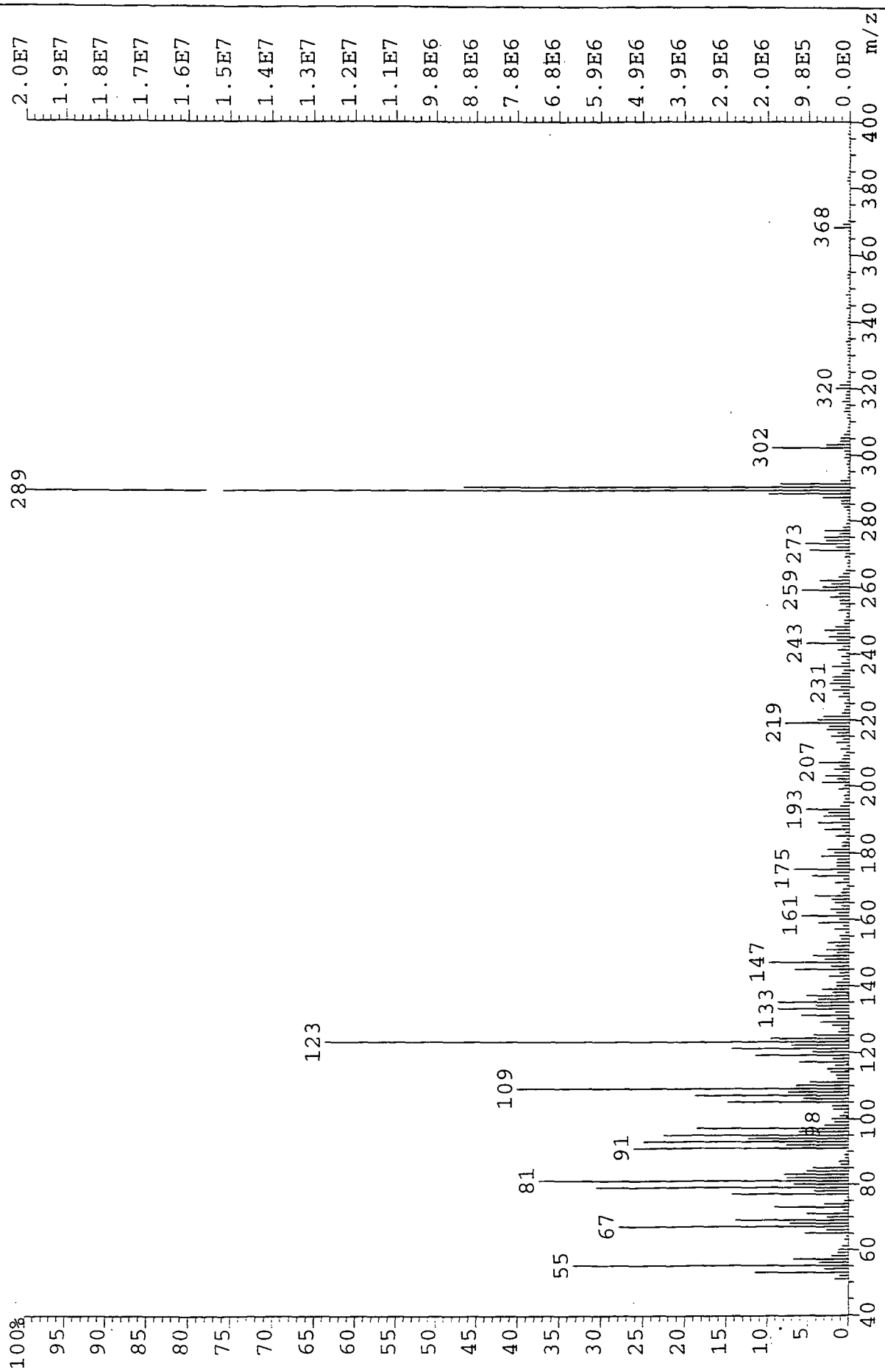
FIGURA 31: ESPECTRO DE MASSA - ácido 16  $\beta$ -hidro-19-ol-*ent*-cauran-17-óico (AD-3)

FIGURA 32: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO - 16,17-dihidroxi-ent-cauran-19-al

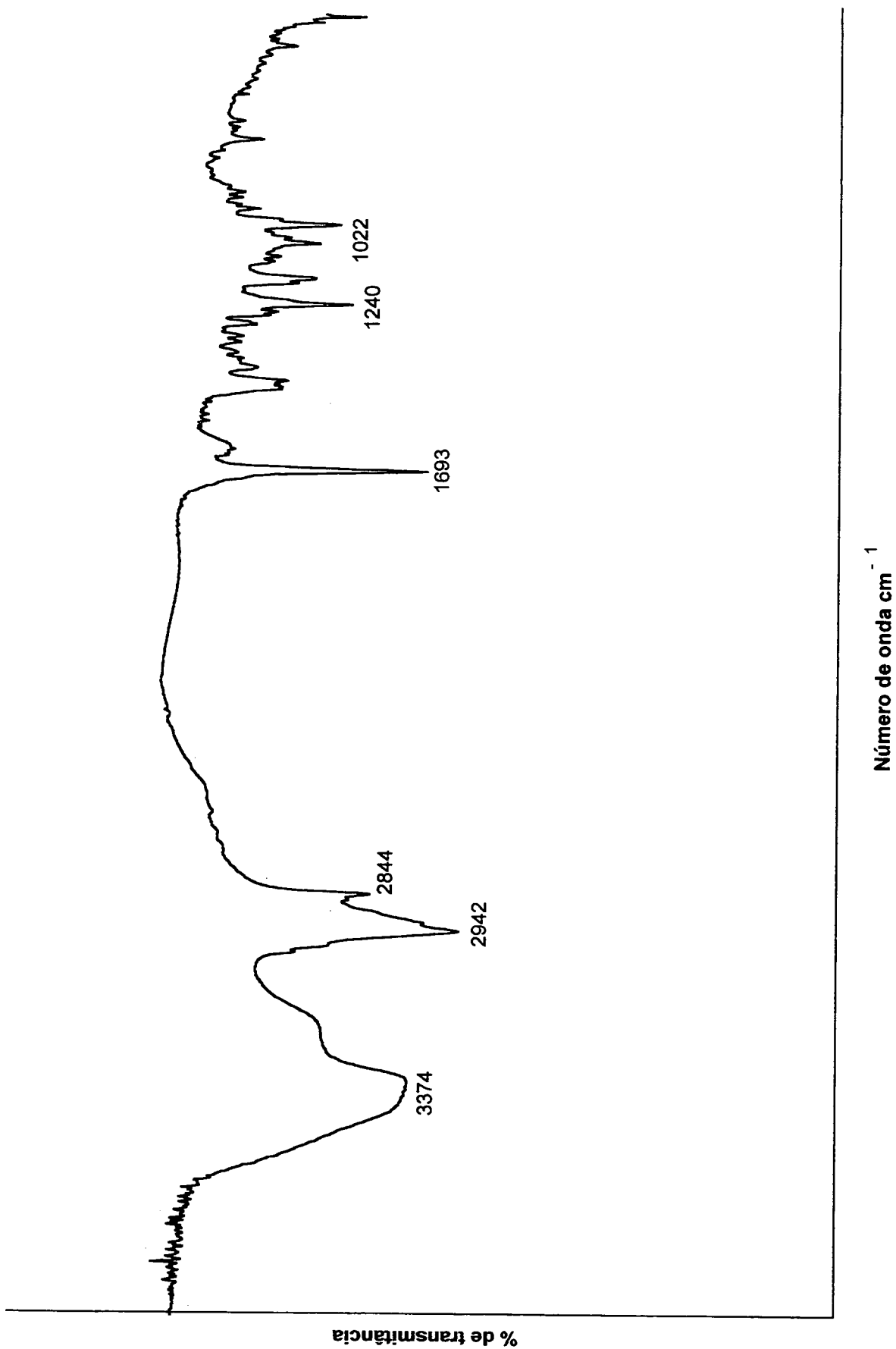


FIGURA 33: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$

16 $\beta$ -17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al (AD-4) -  $\text{CDCl}_3$ ; gotas de DMSO; 400 MHz

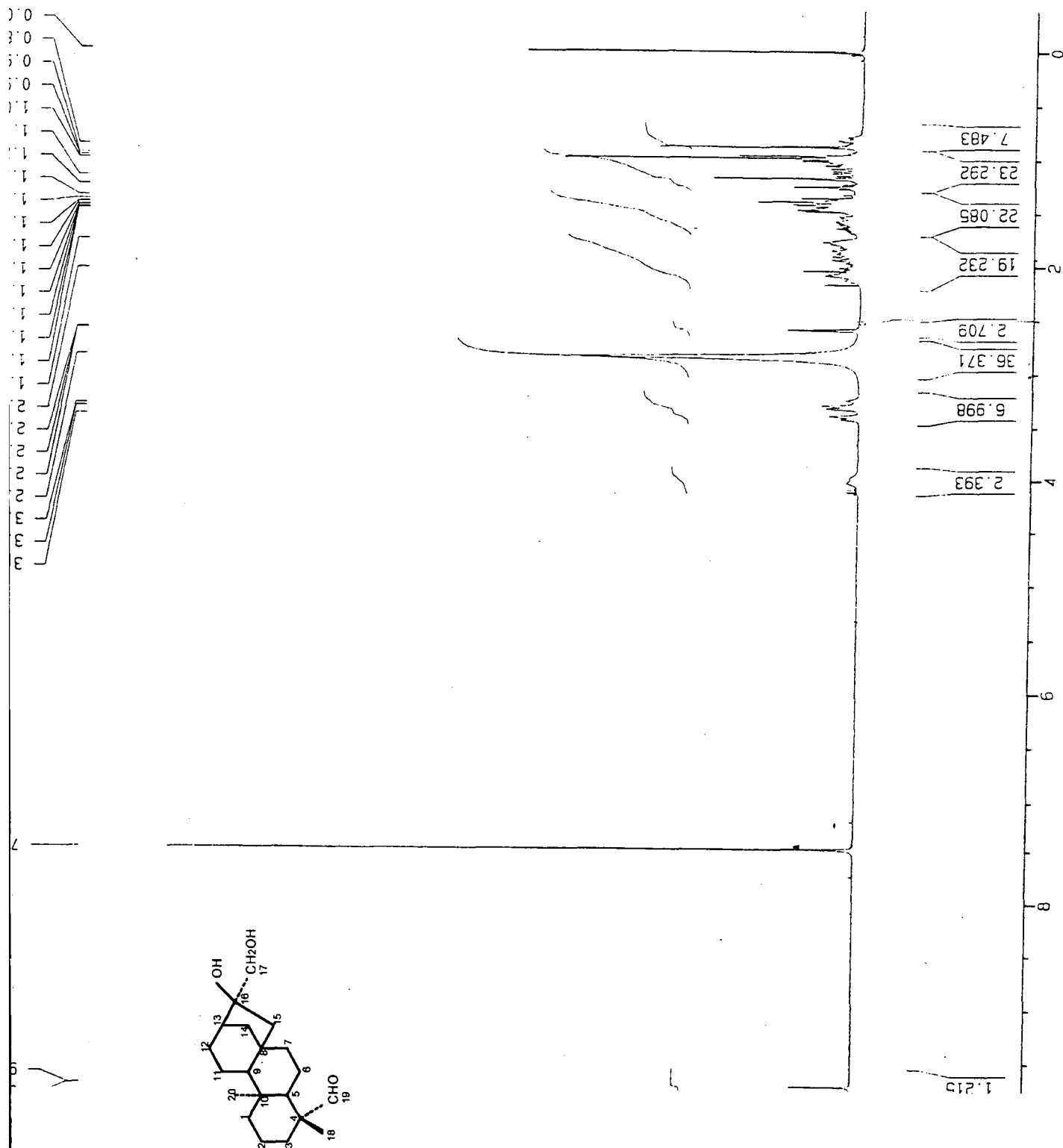




FIGURA 34: MAPA DE CONTORNO COSY DE  $^1\text{H}$  -16 $\beta$ -17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al (AD-4)  
CDCl<sub>3</sub>; gotas de DMSO; 400 MHz

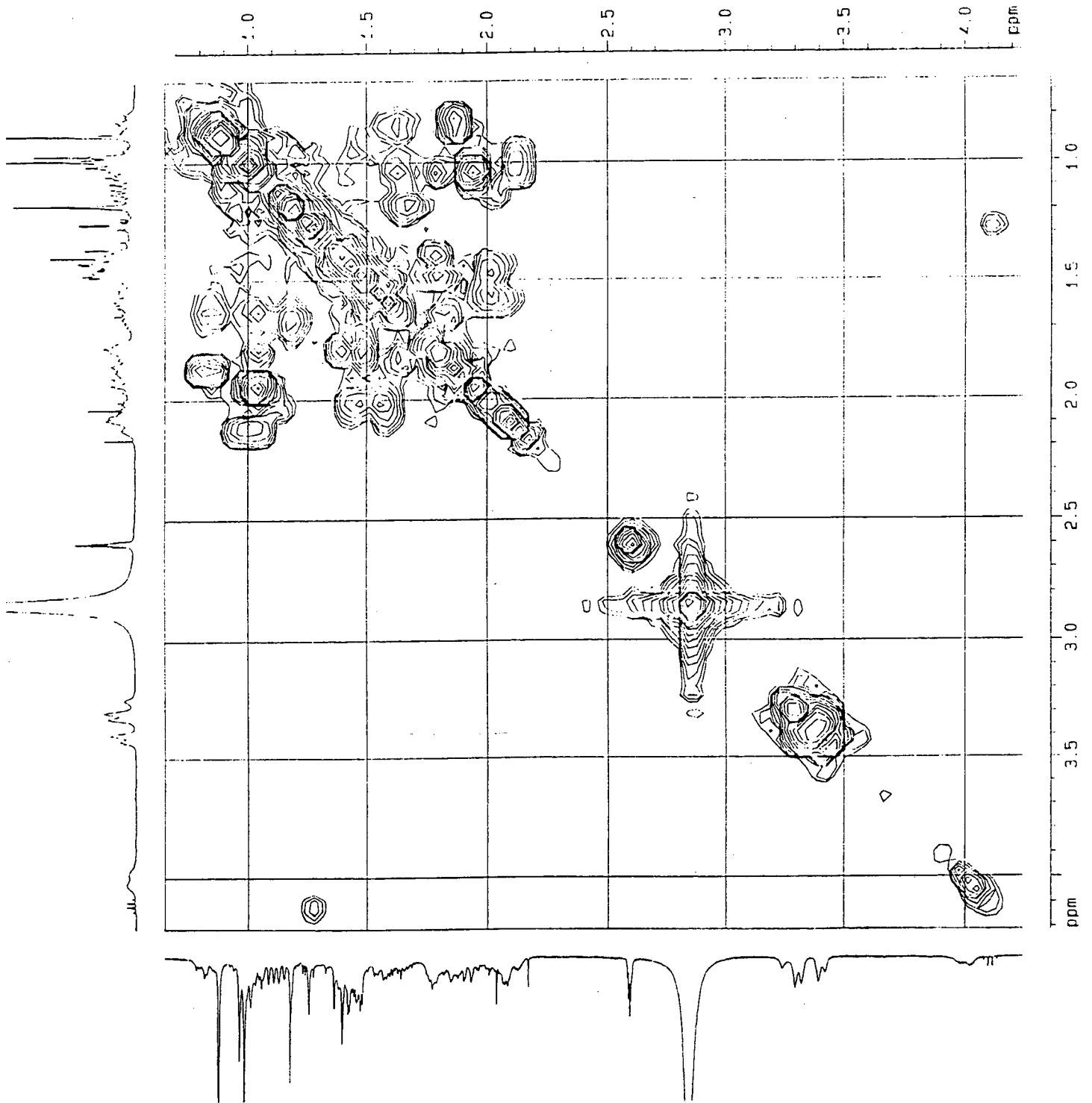


FIGURA 35: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  -16 $\beta$ -17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al (AD-4)  
CDCl<sub>3</sub>; gotas de DMSO; 100 MHz

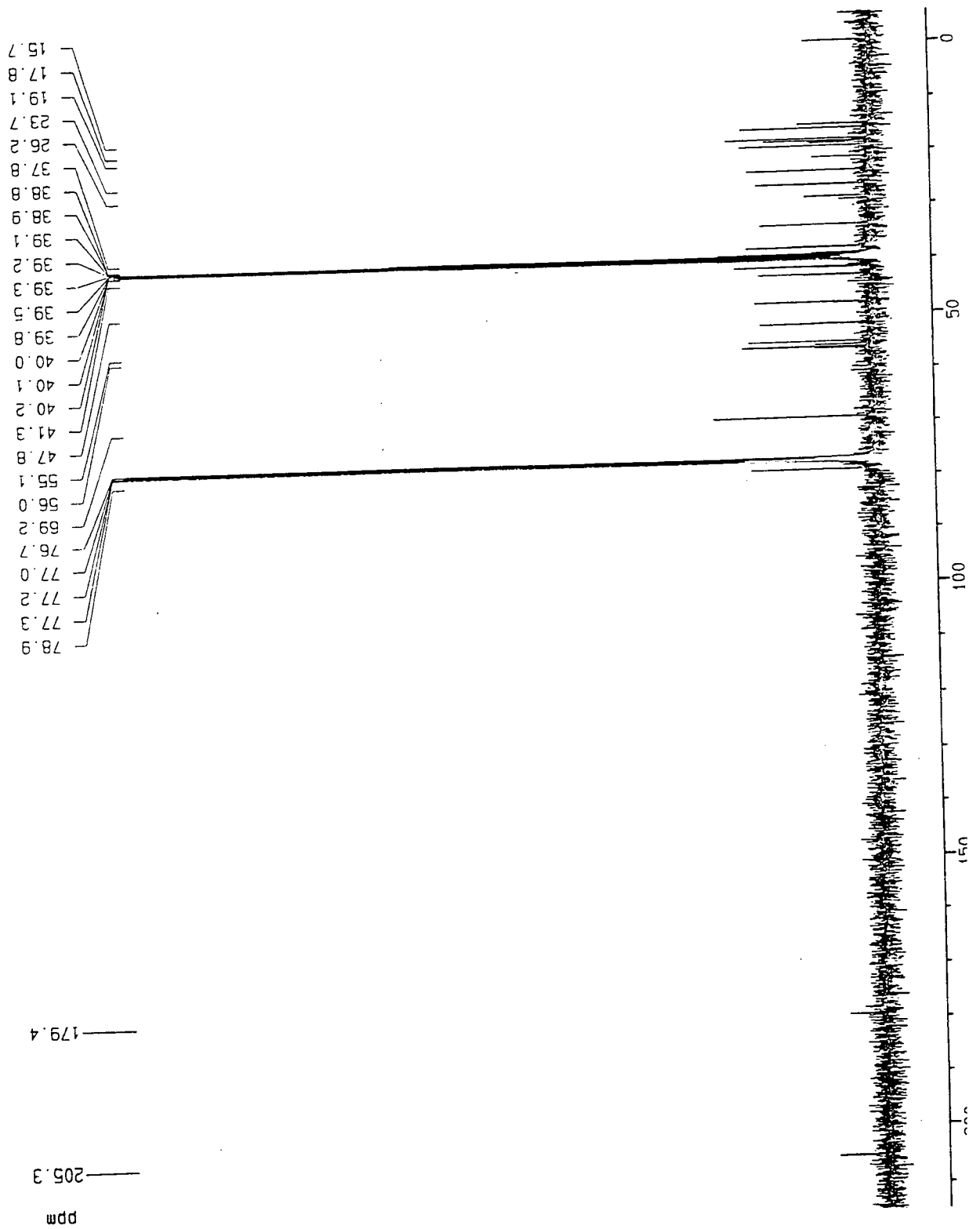


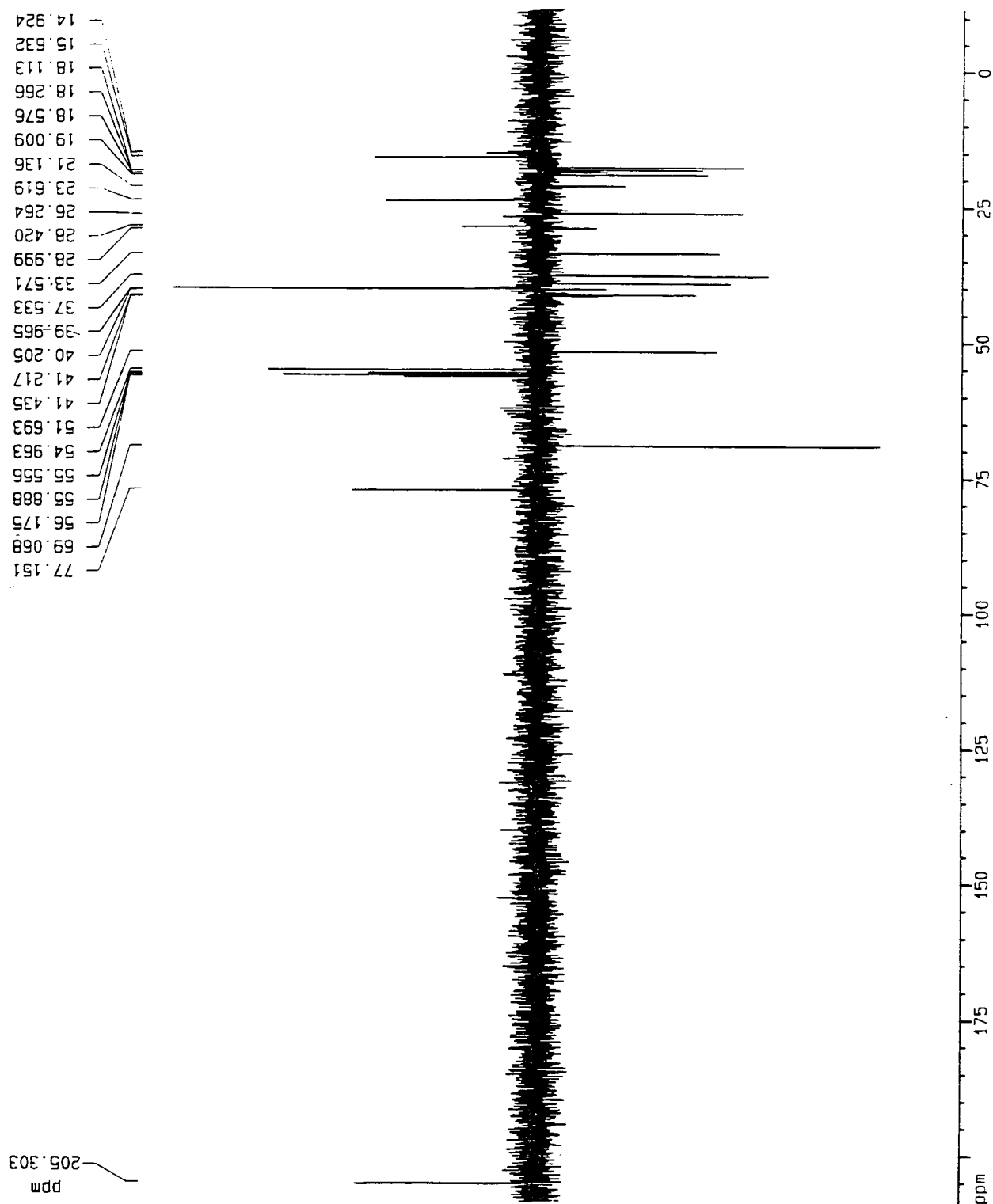
FIGURA 36: ATRIBUIÇÃO NO ESPECTRO DEPT -16 $\beta$ -17-diidroxi-*ent*-cauran-19-al (AD-4)CDCl<sub>3</sub>; gotas de DMSO; 100 MHz

FIGURA 37: ESPECTRO DE MASSA -16 $\beta$ -17-dihidroxi-*ent*-cauran-19-al (AD-4)

Scan # : ( 974 - 1079 ) B.G. Scan # : ( 460 - 784 )  
Mass Peak # : 270 Ret. Time : ( 9.108 - 9.983 )  
Base Peak : 44.05 ( 744839 )

