

GISELE BARALDI MESSIANO

“Terpenos e lignanas de Aristolochiaceae”

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M585t Messiano, Gisele Baraldi
Terpenos e lignanas de Aristolochiaceae / Gisele Baraldi Messiano. –
Araraquara : [s.n], 2010
128 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Lucia Maria Xavier Lopes

1. Química orgânica. 2. Óleos essenciais. 3. Lignanas. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

GISELE BARALDI MESSIANO

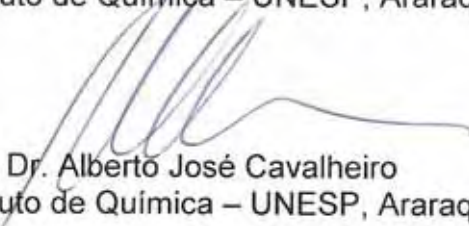
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 29 de março de 2010.

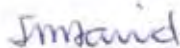
BANCA EXAMINADORA



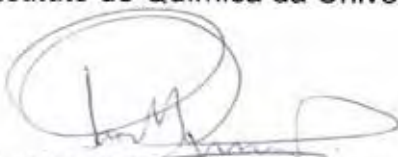
Profª Drª Lucia Maria Xavier Lopes (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



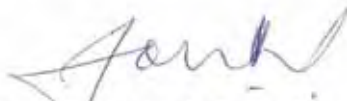
Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador - BA



Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas



Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

Aos meus pais, Valda e Euclides,
e ao Cleber, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia M. Xavier Lopes, pela orientação e ensinamentos.

À toda a minha família pelo apoio.

Aos amigos e colegas de laboratório pela convivência durante todos esses anos.

Aos alunos, docentes e funcionários do Departamento de Química Orgânica pelas discussões e momentos de descontração.

Um agradecimento especial a todas as pessoas que passaram pela minha vida durante todos esses anos no Instituto de Química.

Às meninas da república pelas conversas sobre outros assuntos.

Ao Dr. Nivaldo Boralle pela amizade e aulas de RMN.

À Profa. Dra. Antoniana U. Krettli pelos bioensaios de atividade antiplasmódica.

Ao Prof. Dr. Sérgio A. de Bortoli pelos bioensaios de atividade inseticida.

Ao Prof. Dr. Lindolpho Capellari Jr. pelas identificações botânicas.

I would like to thank all the people of the Southwest Center for Natural Products Research and Commercialization (The University of Arizona), in special to Prof. Dr. Leslie Gunatilaka, for the teachings and the good time in Tucson.

À Fapesp pelo suporte financeiro.

Ao CNPq e Capes pelas bolsas de estudo concedidas.

"Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution."

Albert Einstein

RESUMO

As espécies brasileiras do gênero *Aristolochia* possuem similaridade morfológica. Sendo assim, foi desenvolvido um método para a classificação e identificação destas espécies baseado no estudo dos óleos essenciais por CG-EM e quimiometria. Foi também realizado um estudo fitoquímico de duas espécies de Aristolochiaceae, ricas em terpenos e lignanas, e um estudo sintético de lignanas ariltetralônicas e derivados, já que estas lignanas mostraram *in vitro* uma alta atividade antiplasmódica. Uma das rotas sintéticas estudada foi regioseletiva, e em quatro etapas dois pares enantioméricos de lignanas ariltetralônicas foram produzidos. As misturas enantioméricas foram testadas *in vitro* e os resultados mostraram que os pares enantioméricos possuem menor atividade que as lignanas naturais, o que sugere que a atividade antiplasmódica depende das configurações relativa e absoluta dos compostos. A segunda síntese proposta para obtenção de lignanas ariltetralônicas envolveu duas reações de acilação de Friedel-Crafts, e não produziu lignanas, mas seis produtos, incluindo benzofuranos e isocoumarinas. Além disso, lignanas ariltetralônicas foram também alvo de transformações químicas e biotransformações com os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Beauveria bassiana*, e foram obtidas duas lignanas ariltetralônicas e uma nova lignana ariltetralina [(7'R,8S,8'S)-8,8'-dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-8-ol]. Esta tese também descreve os estudos das investigações de *Aristolochia malmeana* e *Holostylis reniformis*. Os compostos foram isolados por técnicas cromatográficas, principalmente CC e CCDP, e foram caracterizados por métodos espectrométricos, particularmente estudos de RMN e medidas de atividade óptica. De *H. reniformis* foram isoladas quatro lignanas ariltetralônicas, incluindo a inédita ariltetralônica, *rel.* (7R,7'R,8S,8'S)-4-hidróxi-3',4',5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol. Enquanto de *A. malmeana* foram isoladas cinco substâncias (um diterpeno e quatro lignanas). A atividade inseticida de alguns constituintes desta espécie foi avaliada, e o extrato hexânico de raízes e um dos seus constituintes, a lignana (-)-kusunoquinina, mostraram uma atividade significativa contra *Anticarsia gemmatalis*.

Palavras-chave: Aristolochiaceae. *Aristolochia malmeana*. *Holostylis reniformis*. *Cunninghamella echinulata*. *Beauveria bassiana*. Lignanas. Óleos essenciais. Biotransformação.

ABSTRACT

The Brazilian *Aristolochia* species have strong morphological similarities. Thus, a method to classify and identify these species based on analyses of their essential oils by GC-MS and chemometry was developed. Phytochemical study of two Aristolochiaceae species, rich in terpenes and lignans, and syntheses of aryltetralone lignans and derivatives were performed, as these lignans have shown high *in vitro* antiplasmodial activity. A regioselective synthetic route led to two pairs of enantiomeric aryltetralone lignans in four steps. The antiplasmodial activity of these enantiomeric pairs was evaluated *in vitro*, and the activity was lower than that of the natural lignans, which suggests that the antiplasmodial activity depends on the relative and absolute configuration of the compounds. A second synthetic route proposed for obtaining the A-B ring portion of aryltetralone lignans, involving two Friedel-Crafts acylation reactions of 1-(3',4'-dimethoxyphenyl)-2-propanol, did not produce the expected aryltetralone lignans, but six products, including benzofurans and isocoumarins. Moreover, chemistry transformations and biotransformations of lignans by fungus (*Cunninghamella echinulata* and *Beauveria bassiana*) were studied, from which two aryltetralone lignans and a new aryltetralin lignan [(7'R,8S,8'S)-8,8'-dimethyl-3',4',4,5-tetramethoxy-2,7'-ciclolignan-8-ol] were obtained by the biotransformations. This thesis also describes the results of the investigations of *Aristolochia malmeana* and *Holostylis reniformis*. The compounds were isolated by chromatographic techniques, mainly by TLC and CC, and were characterized by spectrometric methods, particularly by NMR experiments and optical rotation measurements. From *H. reniformis* four lignans were isolated, including a new aryltetralol lignan [*rel.* (7R,7'R,8S,8'S)-4-hydroxy-3',4',5-trimethoxy-2,7'-ciclolignan-7-ol]. In addition, from *A. malmeana* five compounds (a labdane diterpene, two dibenzylbutyrolactone lignans, a dibenzylbutyrolactol lignan, and a furofuran lignan) were isolated. The insecticidal activities of these extracts and of their chemical constituents were evaluated. The hexane extract of the roots and its constituent, (-)-kusunokinin, showed significant insecticidal activity against *Anticarsia gemmatalis*.

Keywords: Aristolochiaceae. *Aristolochia malmeana*. *Holostylis reniformis*. *Cunninghamella echinulata*. *Beauveria bassiana*. Lignans. Essential oils. Biotransformations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas básicas de uma lignana e de uma neolignana.	19
Figura 2. Lignanar ariltetralina lactônicas utilizadas no tratamento do câncer.	20
Figura 3. Algumas lignanas ariltetralônicas com atividades biológicas.	20
Figura 4. Algumas substâncias isoladas do gênero <i>Aristolochia</i> .	22
Figura 5. Fotos das espécies <i>A. malmeana</i> e <i>H. reniformis</i> , respectivamente.	23
Figura 6. Estruturas de algumas substâncias isoladas de <i>A. malmeana</i> em estudos anteriores.	23
Figura 7. Algumas lignanas ariltetralônicas isoladas de <i>H. reniformis</i> .	26
Figura 8. Esqueletos carbônicos de lignanas biossintetizadas por <i>H. reniformis</i> .	26
Figura 9. Substâncias isoladas de <i>A. malmeana</i> .	34
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	35
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).	36
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de 3 (CDCl_3 , 500 MHz).	37
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H de 4 (CDCl_3 , 500 MHz).	38
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H de 5 (CDCl_3 , 500 MHz).	39
Figura 15. Substâncias utilizadas na avaliação da atividade inseticida.	40
Figura 16. Mortalidade absoluta de <i>A. gemmatalis</i> utilizando-se constituintes químicos de <i>A. malmeana</i> .	41
Figura 17. Efeitos de (2), soluções B (2+6) e C (2+3), como uma função da concentração de 2 , nas doses de $381,7 \pm 0,3 \mu\text{g/larva}$, na mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> .	41
Figura 18. PCA dos constituintes químicos dos óleos essenciais das raízes de espécies de <i>Aristolochia</i> . PC1 e PC3 contêm aproximadamente 68,5% de informação.	55
Figura 19. Gráfico dos “loadings” de PC1 e PC3 obtidos dos óleos essenciais das raízes de espécies de <i>Aristolochia</i> .	55
Figura 20. Dendograma obtido da análise de HCA dos óleos essenciais de <i>A. giberti</i> de diferentes países.	60
Figura 21. PCA dos constituintes químicos dos óleos essenciais de caules e folhas da espécie <i>A. giberti</i> . PC1 e PC2 contêm aproximadamente 89,6% de informação.	61
Figura 22. Gráfico de “loadings” de PC1 e PC2 obtidos dos óleos essenciais de caules e folhas de <i>A. giberti</i> .	61
Figura 23. Substâncias isoladas de <i>H. reniformis</i> .	65
Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C de 7 (CDCl_3 , 125 MHz).	66
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de 7 (CDCl_3 , 500 MHz).	67

Figura 26. Mapa de contornos $g\text{COSY } ^1\text{H-}^1\text{H}$ de 7 (CDCl_3 , 11,7 T).	67
Figura 27. Mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de 7 (CDCl_3 , 11,7 T).	68
Figura 28. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de 7 (CDCl_3 , 11,7 T).	68
Figura 29. Principais Interações espaciais observadas no espectro $g\text{NOESY-2D}$ de 7 .	69
Figura 30. Mapa de contornos $g\text{NOESY}$ de 7 (CDCl_3 , 11,7 T).	69
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H de 8 (CDCl_3 , 500 MHz).	70
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H de 9 (CDCl_3 , 500 MHz).	71
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de 10 (CDCl_3 , 500 MHz).	72
Figura 34. Estruturas das substâncias obtidas por síntese (é mostrada somente uma lignana de cada par enantiomérico).	78
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H de 13 (CDCl_3 , 500 MHz).	81
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H de 14 (CDCl_3 , 500 MHz).	82
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H de 16 (CDCl_3 , 500 MHz).	82
Figura 38. Cromatograma do produto final obtido na síntese (9p + 17p).	83
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H de 17p (CDCl_3 , 500 MHz).	83
Figura 40. Cromatograma do produto 17p (separação dos enantiômeros).	84
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H de 18 (CDCl_3 , 500 MHz).	84
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de 22 (CDCl_3 , 500 MHz).	85
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C de 22 (CDCl_3 , 125 MHz).	85
Figura 44. Mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de 22 (CDCl_3 , 11,7 T).	86
Figura 45. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de 22 (CDCl_3 , 11,7 T).	86
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H de 23 (CDCl_3 , 500 MHz).	87
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C de 23 (CDCl_3 , 125 MHz).	87
Figura 48. Mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de 23 (CDCl_3 , 11,7 T).	88
Figura 49. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de 23 (CDCl_3 , 11,7 T).	88
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de 24 (CDCl_3 , 500 MHz).	89
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H de 19 (CDCl_3 , 500 MHz).	89
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H de 25 (CDCl_3 , 500 MHz).	90
Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C de 25 (CDCl_3 , 125 MHz).	90
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H de 26 (CDCl_3 , 500 MHz).	91
Figura 55. Proposta para a formação do produto 22 .	91
Figura 56. Proposta para a formação dos produtos 23 e 25 .	92
Figura 57. Proposta para a formação do produto 24 .	92

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H de 27 (CDCl_3 , 500 MHz).	104
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H de 28 (CDCl_3 , 500 MHz).	105
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H de 29 (CDCl_3 , 500 MHz).	106
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de 30 (CDCl_3 , 500 MHz).	107
Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C de 31 (CDCl_3 , 125 MHz).	108
Figura 63. Espectro de RMN de ^1H de 31 (CDCl_3 , 500 MHz).	109

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Fracionamento do extrato hexânico de raízes	43
Esquema 2. Fracionamento do extrato hexânico de folhas	44
Esquema 3. Fracionamento do extrato hexânico de raízes	74
Esquema 4. Rota sintética A para obtenção de lignanas ariltetralônicas	78
Esquema 5. Proposta sintética B para a obtenção de lignanas ariltetralônicas	79
Esquema 6. Rota sintética B (B1 – acilação de Friedel-Crafts)	79
Esquema 7. Rota sintética B (B2 – acilação de Friedel-Crafts)	80
Esquema 8. Rota sintética B (B3 – acilação de Friedel-Crafts)	80
Esquema 9. Transformações químicas da lignana ariltetralônica 9	104
Esquema 10. Biotransformação da lignana ariltetralônica 9 por <i>C. echinulata</i>	105
Esquema 11. Biotransformação da lignana ariltetralina 28 por <i>C. echinulata</i> e <i>B. bassiana</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade inseticida de espécies de <i>Aristolochia</i>	24
Tabela 2. Extratos obtidos de <i>A. malmeana</i>	42
Tabela 3. Lista das plantas investigadas com localização, abreviação e número de voucher	50
Tabela 4. Composição química dos óleos essenciais de espécies de <i>Aristolochia</i>	51
Tabela 5. Lista dos óleos investigados de <i>A. giberti</i> com localização, abreviação e data da coleta	56
Tabela 6. Composição química dos óleos essenciais de <i>A. giberti</i> do Brasil, Argentina e Paraguai	57
Tabela 7. Extratos obtidos de <i>H. reniformis</i>	73
Tabela 8. Atividade antiplasmódica das misturas enantioméricas de 9p e 17p	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AcOEt	Acetato de etila
<i>c</i>	Concentração (g/100 ml)
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo-dubleto
<i>ddt</i>	Duplo duplo-triplete
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Electrospray Ionization
<i>g</i> COSY	Gradient Correlated Spectroscopy
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
IBX	Ácido 2-iodo-oxibenzóico
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
PCA	Principal Component Analysis
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PMA	Phosphomolybdic acid (ácido fosfomolíbico)
p.f.	Intervalo de ponto de fusão

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singleto
<i>s/</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
THF	Tetraidrofurano

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$	Rotação óptica
DL ₁₀	Dose letal 10%
DL ₅₀	Dose letal 50%
eV	Elétron-Volt
Hz	Hertz
<i>I</i>	Linear Retention Index
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50%
<i>J</i>	Constante de acoplamento
lb/in ²	Libras por polegadas ao quadrado
[M + H] ⁺	Íon <i>quasi</i> -molecular
min	Minutos
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
R _f	Fator de retenção
<i>w</i> _{1/2}	Constante acoplamento aparente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Lignanas	19
1.2 A família Aristolochiaceae	21
1.3 O gênero <i>Aristolochia</i>	21
1.3.1 <i>Aristolochia malmeana</i> Hoehne	22
1.3.2 Atividade inseticida de espécies de <i>Aristolochia</i> spp.	23
1.3.3 Óleos essenciais de <i>Aristolochia</i> spp.	25
1.4 O gênero <i>Holostylis</i>	25
1.4.1 Biossíntese de lignanas de <i>H. reniformis</i>	26
1.5 Atividade antimalárica	27
1.6 Biotransformações de compostos orgânicos	27
2 OBJETIVOS	29
3 ESPECIFICAÇÕES DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	30
CAPÍTULO I – ESTUDOS DE <i>Aristolochia malmeana</i> Hoehne	32
I.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Estudo de <i>A. malmeana</i>	33
I.1.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>A. malmeana</i>	33
I.1.1.1 (–)-(8S,8'R,9S)-Cubebina (1)	34
I.1.1.2 Elucidação estrutural das lignanas dibenzilbutirolactônicas 2 e 3	35
I.1.1.3 (–)-Filigenina (4)	37
I.1.1.4 (–)-Ácido 2-oxocolavênico (5)	38
I.1.2 Teste de Susceptibilidade de <i>A. gemmatalis</i>	39
I.2 PARTE EXPERIMENTAL – Estudo de <i>A. malmeana</i>	42
I.2.1 Coleta e identificação de material vegetal	42
I.2.2 Preparação dos extratos	42
I.2.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos	43
I.2.3.1 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de raízes	43
I.2.3.2 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de folhas	43
I.2.4 Avaliação da atividade inseticida dos constituintes químicos	44
I.2.4.1 Metodologia dos bioensaios	44
I.2.5 Dados físicos e espectrométricos das substâncias	45
CAPÍTULO II – CLASSIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Aristolochia</i> PELO ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	48

II.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Análise dos óleos essenciais	49
II.1.1 Classificação de <i>Aristolochia</i> brasileiras	49
II.1.2 Análise da procedência de espécimes de <i>Aristolochia giberti</i>	56
II.2 PARTE EXPERIMENTAL – Análise dos óleos essenciais	62
II.2.1 Coleta e identificação de material vegetal	62
II.2.2 Análise dos óleos essenciais	62
II.2.3 Análise quimiométrica	62
CAPÍTULO III – OBTENÇÃO DE LIGNANAS ARILTETRALÔNICAS	64
III.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Estudo de <i>H. reniformis</i>	65
III.1.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>H. reniformis</i>	65
III.1.1.1 (7 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,8' <i>S</i>)-4-Hidroxi-3',4',5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol (7)	66
III.1.1.2 Identificação das lignanas 8-10	69
III.2 PARTE EXPERIMENTAL – Estudo de <i>H. reniformis</i>	72
III.2.1 Coleta e identificação de material vegetal	72
III.2.2 Preparação dos extratos	72
III.2.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos	73
III.2.3.1 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de raízes	73
III.2.4 Dados físicos e espectrométricos das substâncias de <i>H. reniformis</i>	74
CAPÍTULO IV – SÍNTESE DE LIGNANAS ARILTETRALÔNICAS E DERIVADOS	76
IV.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Síntese de lignanas	77
IV.1.1 Elucidação estrutural dos compostos obtidos por síntese	77
IV.1.1.1 Caracterização dos produtos e intermediários da rota sintética A	80
IV.1.1.2 Caracterização dos intermediários e produtos da rota sintética B	84
IV.1.2 Mecanismos de reação propostos para produtos da rota sintética B	91
IV.1.3 Teste da atividade antiplasmódica	93
IV.2 PARTE EXPERIMENTAL – Síntese de lignanas	93
IV.2.1 Rota sintética A	93
IV.2.1.1 Reação de Reformastky	93
IV.2.1.2 Lactonização	94
IV.2.1.3 Reação de condensação tipo Friedel-Crafts	94
IV.2.1.4 Reação de acilação de Friedel-Crafts	95
IV.2.1.5 Separação dos diastereoisômeros (9p + 17p)	95
IV.2.1.6 Análise das misturas enantioméricas dos pares 9p e 17p	95

IV.2.2 Rota sintética B	96
IV.2.2.1 Redução de carbonila	96
IV.2.2.2 Acilação de Friedel-Crafts (B-1)	96
IV.2.2.3 Proteção do grupo hidroxílico de 18 (B-2)	97
IV.2.2.4 Acilação de Friedel-Crafts (B-2)	97
IV.2.2.5 Acilação de Friedel-Crafts (B-3)	97
IV.2.3 Avaliação da atividade antiplasmódica de lignanas ariltetralônicas obtidas por sínteses	98
IV.2.4 Dados físicos e espectrométricos dos produtos e intermediários	98
CAPÍTULO V – TRANSFORMAÇÃO QUÍMICAS E MICROBIANAS DE LIGNANAS	102
V.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Biotransformações e Transformações	103
V.1.1 Análise dos compostos obtidos por transformações químicas	103
V.1.2 Biotransformações de lignanas	105
V.1.2.1 Biotransformação da lignana ariltetralônica 9	105
V.1.2.2 Biotransformação da lignana ariltetralínica 28	107
V.1.3 Resultados das atividades antitumoral e antimicrobiana	109
V.2 PARTE EXPERIMENTAL – Biotransformações e Transformações	110
V.2.1 Transformações químicas de 9	110
V.2.1.1 Método A (Redução de Wolff-Kishner)	110
V.2.1.2 Método B (Redução e Hidrogenólise)	110
V.2.2 Preparação dos fungos	111
V.2.2.1 <i>Cunninghamella echinulata</i>	111
V.2.2.2 <i>Beauveria bassiana</i>	111
V.2.3 Biotransformação da lignana 9 por <i>C. echinulata</i>	111
V.2.4 Biotransformação da lignana 28 por <i>C. echinulata</i>	112
V.2.5 Biotransformações das lignanas 9 e 28 por <i>B. bassiana</i>	112
V.2.6 Avaliação das atividades antitumorais e antimicrobianas	113
V.2.6.1 Ensaio de atividade antitumoral	113
V.2.6.2 Ensaio de atividade antimicrobiana	114
V.2.7 Dados físicos e espectrométricos dos produtos biotransformados e de transformações químicas	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	120

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lignanas

As lignanas pertencem a uma grande classe de metabólitos secundários distribuída no reino vegetal. O termo lignana foi primeiro introduzido por Harworth nos meados de 1940, e descreve o grupo de derivados fenólicos caracterizados estruturalmente pelo acoplamento oxidativo nas posições 8 e 8' de duas unidades fenilpropanoídicas.^{1, 2} Quando este acoplamento ocorre entre outros carbonos destas unidades, estes compostos são chamados de neolignanas (Figura 1).^{2, 3}

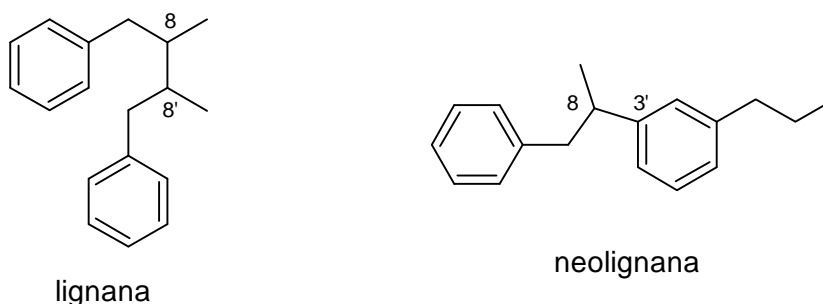


Figura 1. Estruturas básicas de uma lignana e de uma neolignana.

Lignanas e neolignanas têm atraído muito interesse durante anos, ambos devido a sua ampla ocorrência na natureza e por sua extensa gama de atividades biológicas.¹ Destas, pode-se destacar as lignanas ariltetralínicas, principalmente o seu membro mais importante, a (–)-podofilotoxina, isolada de diversas espécies de *Podophyllum*.⁴ Esta substância tem despertado o interesse de grupos de pesquisa e de indústrias farmacêuticas, pois os seus derivados sintéticos, Etoposídeo® e Teniposídeo®, são amplamente utilizados como quimioterápicos, e pela dificuldade sintética de reproduzir os quatro centros estereogênicos que eles contêm (Figura 2).⁴

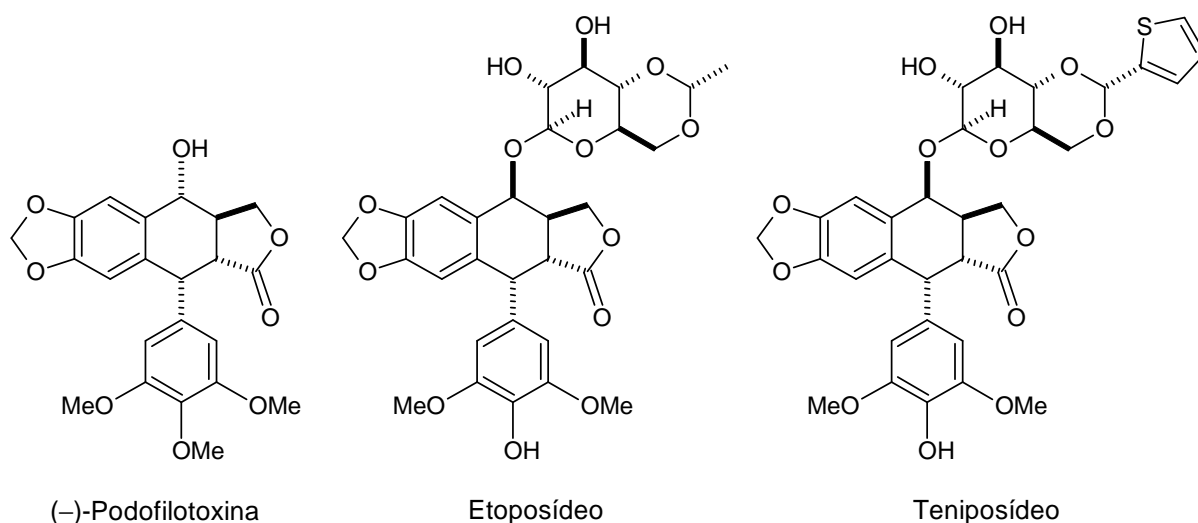


Figura 2. Lignanas ariltetralina lactônicas utilizadas no tratamento do câncer.

As lignanas ariltetralônicas, que não possuem oxigenação nos carbonos 9 e 9' como as ariltetralina lactônicas, compreendem outro grupo de lignanas que está despertando o interesse científico, mas ainda há poucos relatos na literatura descrevendo atividades biológicas deste grupo de compostos. Alguns dos relatos referem-se à utilização de schisandrona no tratamento de doença de Alzheimer,⁵ outro à atividade antioxidante da (7'R,8'S,8S)-2'-hidróxi-3,4,4',5'-bis-(metilenodiox)-7-oxo-2,7'-ciclolignana,⁶ e por fim a atividade antiplasmódica destas lignanas, como por exemplo (-)-8'-*epi*-aristoligona, isolada de *Holostylis reniformis* (Aristolochiaceae) (Figura 3).^{7,8}

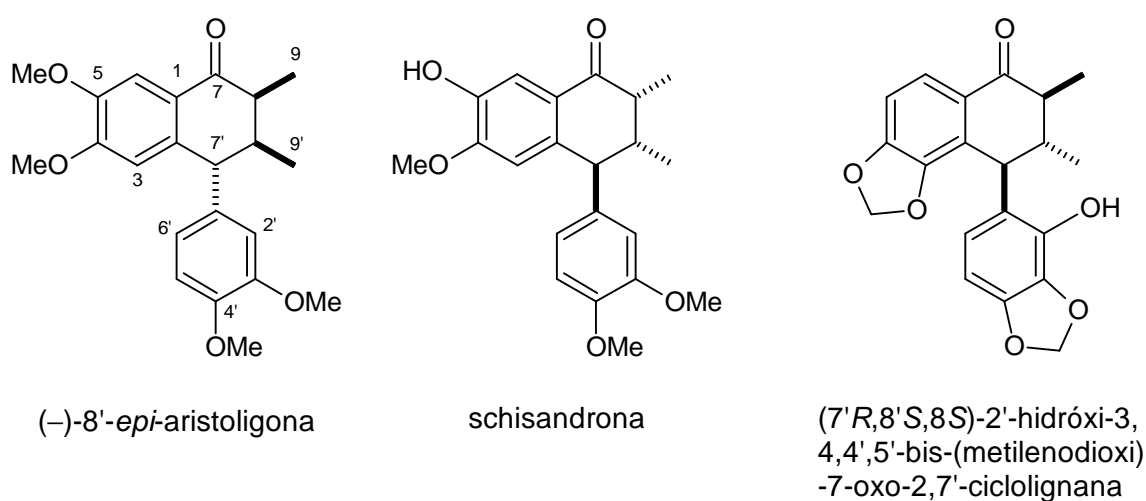


Figura 3. Algumas lignanas ariltetralônicas com atividades biológicas.

Existem poucas rotas sintéticas descritas na literatura para este tipo de lignana, entre elas a descrita por Adjangba e Billet (1962).⁹ Nesta rota, as lignanas ariltetralônicas são obtidas via uma síntese regioseletiva, que consiste da reação entre 3,4-dimetoxifenil-propanona, 2-bromo-propionato de etila e veratrol, produzindo, em quatro etapas, dois pares enantioméricos de lignanas ariltetralônicas.⁹

1.2 A família Aristolochiaceae

O interesse pelo estudo fitoquímico e biológico das espécies pertencentes à família Aristolochiaceae é devido ao vasto uso destas na medicina tradicional e homeopática. Muitas das espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* têm apresentado diversas atividades como anti-inflamatórias, sedativas, diuréticas e abortivas.¹⁰

Existem na literatura divergências quanto ao número de gêneros pertencentes à família Aristolochiaceae, tendo classificações de cinco até dezenove gêneros, sendo aquela de Hoehne (1942)¹¹ uma das mais utilizadas: *Saruma*, *Asarum*, *Thottea*, *Holostylis* e *Aristolochia*.¹⁰

Nas duas últimas décadas foram descritas cerca de 700 substâncias provenientes de espécies da família Aristolochiaceae, a qual é composta por 450 a 600 espécies. Estas espécies possuem uma composição química diversificada de metabólitos secundários, como ácidos graxos, terpenoides, lignoides, flavonoides, alcaloides e compostos fenantrênicos.¹⁰

A partir destas considerações, para este trabalho foram escolhidas espécies pertencentes a dois gêneros da família Aristolochiaceae: *Aristolochia* e *Holostylis*.

1.3 O gênero *Aristolochia*

Um dos gêneros mais importantes da família Aristolochiaceae é o *Aristolochia*, que é constituído por aproximadamente 400 espécies e se encontra vastamente distribuído nas zonas tropicais e temperadas,¹⁰ sendo que as espécies deste gênero são muito utilizadas nas medicinas populares do Brasil e da China.^{10, 12}

Dentre os compostos isolados deste gênero, destacam-se os ácidos aristolóquicos, que são substâncias de ocorrência restrita às espécies de

Aristolochiaceae e a algumas espécies de borboletas da família Papilionidae, cujas larvas se alimentam das folhas de *Aristolochia* spp. As lagartas pertencentes a esta família são altamente especializadas, capazes de acumular e/ou desintoxicar os ácidos aristolóquicos presentes em suas plantas hospedeiras (Figura 4).¹⁰ Estes ácidos apresentam no homem e em outros animais, comprovadas atividades contraceptiva, estimulante gástrica, bem como redução do edema provocado pelo veneno de cobra.¹⁰ Além destas, apresentam atividade antialimentar sobre alguns insetos.^{10, 13} Várias outras substâncias isoladas desta família possuem atividade biológica comprovada. Entre elas destacam-se a alantoína, por possuir atividade anti-inflamatória, antipsoríase e cicatrizante, sendo também utilizada no tratamento do vitiligo,¹⁴ e a (-)-cubebina, por apresentar atividade anti-inflamatória (Figura 4).¹⁵

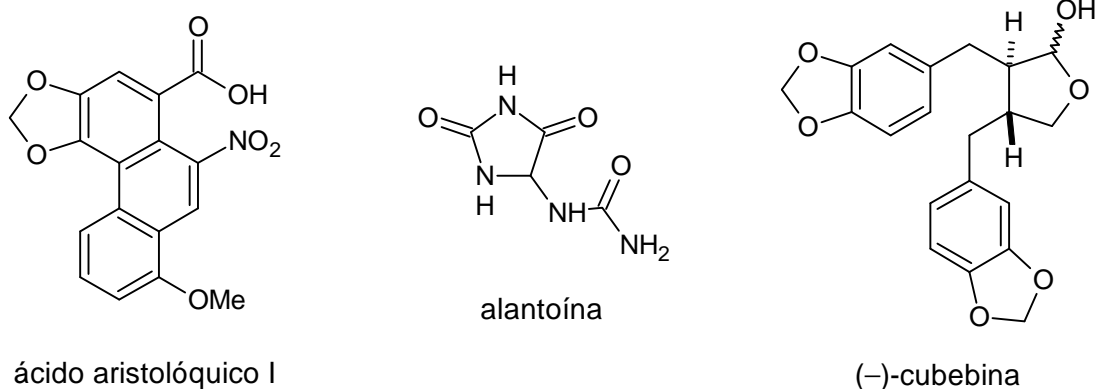


Figura 4. Algumas substâncias isoladas do gênero *Aristolochia*.

1.3.1 *Aristolochia malmeana* Hoehne

A espécie *A. malmeana* Hoehne (Figura 5) é conhecida popularmente como “Milhomes” ou “Papo-de-peru”. Esta espécie é abundante no sul do Mato Grosso, e não é distinguível facilmente da espécie *Aristolochia esperanzae* e de espécies afins, devido à grande semelhança morfológica entre elas.¹¹

Desta espécie foram previamente isolados diterpenos (clerodânicos e labdânicos), lignanas (dibenzilbutirolactônicas, dibenzilbutirolactólicas e furofurânicas), flavonóis diglicosilados e alantoína (Figura 6).^{16, 17} A análise do óleo essencial obtido das raízes de *A. malmeana* evidenciou a presença de alta concentração de monoterpenos, sendo o canfeno o constituinte majoritário.¹⁸



Figura 5. Fotos das espécies *A. malmeana* e *H. reniformis*, respectivamente.

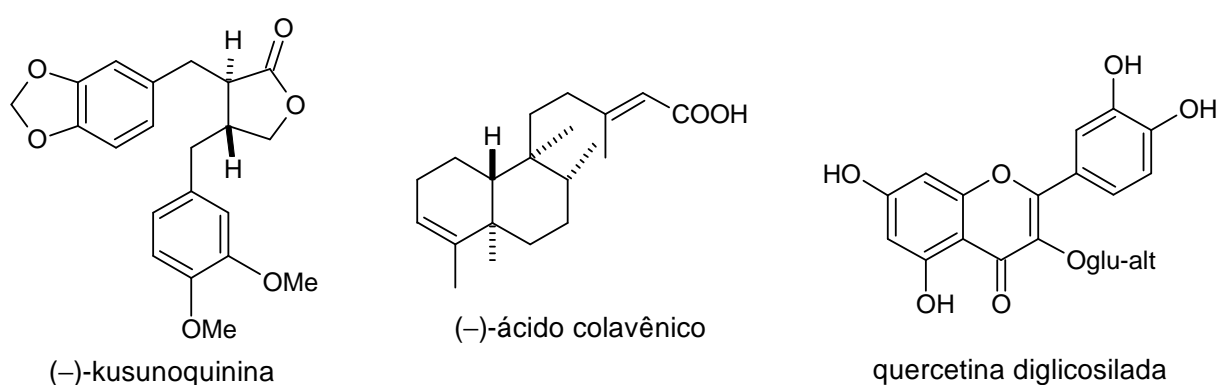


Figura 6. Estruturas de algumas substâncias isoladas de *A. malmeana* em estudos anteriores.^{16, 17}

1.3.2 Atividade inseticida de espécies de *Aristolochia* spp.

A descoberta de inseticidas, que são substâncias ou misturas utilizadas para matar, atrair e repelir insetos, é um vasto campo de pesquisas e tem-se desenvolvido muito nas últimas décadas.¹⁹ Neste cenário, o Brasil, como um dos maiores produtores mundiais de produtos agrícolas, tem no controle de pragas nativas e exóticas um dos desafios que persiste e que tem se agravado ano após ano.¹⁹

Produtos naturais com potencial atividade inseticida são considerados como uma alternativa para os pesticidas sintéticos convencionais usados na agricultura.²⁰

Um levantamento bibliográfico mostrou que algumas espécies de *Aristolochia* têm apresentado atividade inseticida, e esses dados são mostrados na Tabela 1.

Sendo assim, neste estudo são apresentados os resultados obtidos com a espécie *A. malmearna* e o inseto-praga lagarta-da-soja [*Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)], um inseto originário do hemisfério ocidental, cuja distribuição se dá principalmente nas regiões subtropicais. Este inseto é uma das principais pragas desfoliadora de lavouras de soja no Brasil, e devido a isso, o seu controle desperta muito interesse econômico.^{13, 21} O ciclo de vida da lagarta-da-soja pode ser dividido em quatro estágios: a) o tempo de vida dos ovos de aproximadamente três dias; b) o período larval com duração de duas a cinco semanas; c) o estágio pupal de sete dias e d) a fase adulta (20 dias).²¹

Tabela 1. Atividade inseticida de espécies de *Aristolochia*

Espécie	Atividade/inseto	Ref.
<i>A. aff. orbicularis</i>	Óleo essencial (raízes) — Atividade repelente/ <i>Sitophilus zeamais</i>	22
<i>A. albida</i>	Extrato metanólico (raízes) — Atividade antialimentar/ <i>Spodoptera litura</i>	23
<i>A. argentina</i>	Extratos metanólico e diclorometânico (partes aéreas) — Atividade inseticida/ <i>Sitophilus oryzae</i>	24
<i>A. baetica</i>	Extrato metanólico (caules e folhas) — Inibição do crescimento/ <i>Tribolium castaneum</i>	25
<i>A. bracteata</i>	Extrato aquoso (caules) — Atividade inseticida/ <i>Anopheles arabiensis</i>	26
<i>A. bracteata</i>	Extrato de éter de petróleo (folhas) — Atividade inseticida/ <i>Culex quinquefasciatus</i>	27
<i>A. clematitis</i>	Atividade repelente de insetos/moscas e gafanhotos	28
<i>A. grandiflora</i>	Atividade repelente de insetos/moscas e larvas	28
<i>A. lagesiana</i>	Ext. acetônico (caules, folhas e raízes) — Atividade inseticida/ <i>A. gemmatalis</i>	29
<i>A. pubescens</i>	Ext. acetônico (tubérculos) — Atividade inseticida/ <i>A. gemmatalis</i>	13
<i>A. triangularis</i>	Ext. metanólico e diclorometânico (casca) — Atividade inseticida/ <i>Aedes aegypti</i>	30

1.3.3 Óleos essenciais de *Aristolochia* spp.

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são os compostos mais comumente encontrados. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários dos óleos essenciais.³¹

Apesar do significativo número de espécies de *Aristolochia* brasileiras, somente de algumas delas são conhecidos os compostos destes óleos. Os dados dos óleos essenciais de *Aristolochia* sul-americanas limitam-se as seguintes espécies: *A. argentina*,³² *A. elegans*,³³ *A. giberti*,^{34, 35} *A. birostris*, *A. cymbifera*, *A. gigantea*, *A. longa*, *A. macroura*, *A. papillaris*, *A. rodriguesia*, *A. triangularis*^{36, 37} e *A. odoratissima*.³⁸ Os constituintes desses óleos são basicamente monoterpenos, bem conhecidos, e sesquiterpenos, alguns hidroxilados.³⁹

1.4 O gênero *Holostylis*

A espécie *Holostylis reniformis* Duch. (Figura 5), vulgarmente conhecida por “Flor de sapo” e/ou “Capeba do Maranhão”, constitui o gênero monotípico *Holostylis*, da família Aristolochiaceae.^{10, 11} Esta é uma espécie endêmica da região central da América do Sul, encontrada em terrenos húmidos, sombrios e levemente úmidos das bordas das matas ou barrancas dos rios.¹¹

Desta espécie foram isoladas principalmente lignanas do tipo ariltetralônicas (Figura 7),⁴⁰ as quais têm ocorrência restrita na natureza, tendo sido isoladas também de algumas espécies das famílias Myristicaceae,⁴¹ Schisandraceae⁴² e de apenas duas espécies do gênero *Aristolochia*: *Aristolochia chilensis* e *Aristolochia contorta*.¹⁰

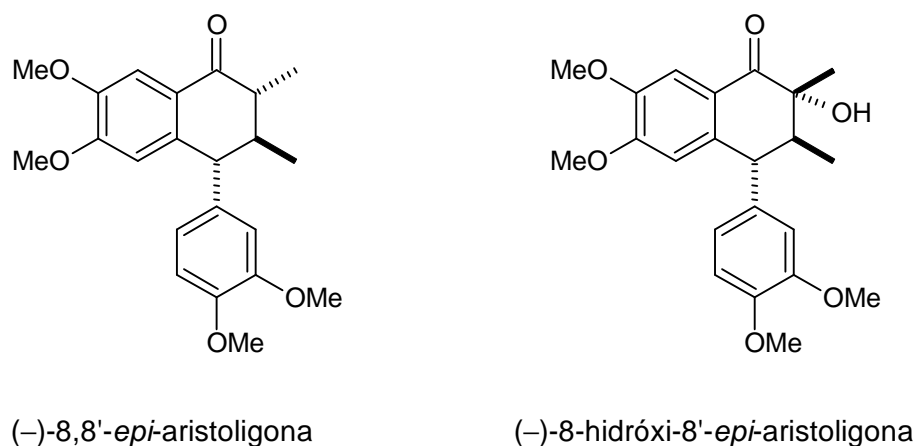


Figura 7. Algumas lignanas ariltetralônicas isoladas de *H. reniformis*.⁴⁰

1.4.1 Biossíntese de lignanas de *H. reniformis*⁴³

A espécie *H. reniformis* biossintetiza lignanas com ligações entre os carbonos 8-8' e sem oxigenação nas posições 9 e 9'. Para a elucidação da rota biossintética dessas lignanas, os supostos precursores [U-¹⁴C]-fenilalanina, [9-³H₁]-álcool coniferílico e [9-³H₁]-isoeugenol foram administrados nas raízes da planta, o que levou à incorporação de ³H e ¹⁴C em dez lignanas ligadas pelas posições 2,7' (lignanas ariltetralônicas) e duas 7,7'-epoxilignanas (lignanas furânicas). Estes experimentos demonstraram que as lignanas são derivadas do propenilfenol e que *H. reniformis* pode exibir um controle regioseletivo sobre o acoplamento radicalar (via o radical isoeugenol), já que a planta contém um número considerável de lignanas (ariltetralonas), que são exclusivamente derivadas do acoplamento 8-8'. Também foi observado um controle regioespecífico sobre a biossíntese destas lignanas, junto com um controle diastereosseletivo na formação da ligação C2-C7' nas lignanas ariltetralônicas (7'*R*). Estes experimentos forneceram evidências que o isoeugenol é um intermediário biossintético para lignanas ariltetralônicas e furânicas.⁴³

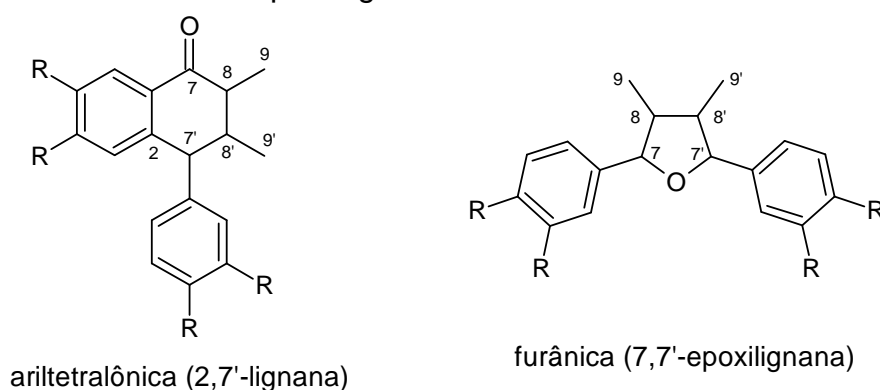


Figura 8. Esqueletos carbônicos de lignanas biossintetizadas por *H. reniformis*.

1.5 Atividade antimalárica

A malária é uma doença causada por protozoários das espécies *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. No Brasil, a malária é transmitida ao homem principalmente pelas fêmeas dos mosquitos *Anopheles*. Atualmente, a maioria dos casos graves de malária e consequentes mortes são causadas pelo *P. falciparum*.⁴⁴

Esta é uma das doenças parasitárias mais importantes no mundo, responsável por 500 milhões de novos casos e 2 a 3 milhões de mortes todo ano. Esta situação, junto com a expansão progressiva de linhagens cloroquina-resistentes de *P. falciparum* e, mais recentemente, *P. vivax*, causou uma procura intensiva por esquizotomicidas sanguíneos para substituir a cloroquina, uma barata, segura e, antigamente, efetiva droga terapêutica antimalárica.⁷

Até o momento, o controle da malária no Brasil depende do tratamento dos pacientes infectados e da proteção individual contra a picada dos mosquitos infectantes, sendo este último pouco eficiente. O tratamento da malária é feito utilizando-se basicamente derivados da quinina (cloroquina, amodiaquina e mefloquina) e da artemisina (nos casos resistentes a quinina) durante os sintomas agudos da malária.^{44, 45}

Além da resistência dos parasitos às drogas antimaláricas, vários outros fatores dificultam o controle desta endemia tais como: fatores ambientais, condições socioeconômicas, desnutrição das populações e ineficácia dos inseticidas para o controle dos vetores.^{45, 46}

Estudos mostraram que extratos de raízes de *H. reniformis* (Aristolochiaceae) reduzem os níveis de parasitemia em camundongos infectados com *P. berghey*, e que lignanas ariltetralônicas (Figuras 3 e 7) isoladas deste extrato mostraram potencial atividade antimalárica em experimentos realizados *in vitro* empregando-se *P. falciparum*.^{7, 8}

1.6 Biotransformações de compostos orgânicos

Transformações microbianas englobam uma série de reações biológicas de substratos xenobióticos catalisadas por todo micro-organismo celular ou enzima obtida de fontes microbianas. Devido à alta regio- e estereosseletividade, e por

possuir a vantagem de acontecer sob condições brandas, transformações microbianas complementam sínteses orgânicas e têm, frequentemente, sido empregadas nas indústrias farmacêutica e alimentar.^{47, 48}

A capacidade hidrolítica e redutiva dos micro-organismos, especialmente fungos, é bem conhecida a um longo tempo e estas são exploradas em reações em escala preparativa.⁴⁸

As transformações de lignanas por fungos têm sido investigadas, como exemplo tem-se a metabolização das lignanas furofurânicas (+)-eudesmina e (+)-magnolina por *Aspergillus niger*.⁴⁹

O fungo filamentosso, *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae), causa uma doença em insetos chamada muscadina branca, e já foi empregado para biotransformações de mais de 300 diferentes substratos, e tem demonstrado uma variedade de atividades enzimáticas, principalmente a de adição de glucosídeos nos metabólitos biotransformados.^{47, 50}

Espécies do gênero *Cunninghamella* (Cunninghamellaceae) têm metabolizado uma ampla variedade de xenobióticos em regio- e estereosseletivas maneiras. *Cunninghamella* é um fungo filamentosso encontrado no solo e em material vegetal, particularmente no Mediterrâneo e em zonas subtropicais. Fungos deste gênero também têm sido encontrados em material animal, queijos e castanhas-do-Brasil.^{48, 49} Este gênero contém espécies de importância na medicina e biotecnologia, e as mais comuns são *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella elegans* e *Cunninghamella echinulata*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o conhecimento químico de Aristolochiaceae brasileiras, incluindo os seguintes objetivos específicos:

- Isolamento de constituintes químicos de *Aristolochia malmeana* para a avaliação da atividade inseticida destes no inseto *Anticarsia gemmatalis*;
- Investigação das composições químicas dos óleos essenciais de algumas espécies de *Aristolochia* brasileiras e correlacioná-las com a morfologia das espécies para a identificação das mesmas;
- Isolamento de massa maior e de novas lignanas de *Holostylis reniformis* para avaliação da atividade antiplasmódica e para o estudo da relação estrutura × atividade;
- Obtenção de lignanas ariltetralônicas por processos sintéticos;
- Biotransformações de lignanas por fungos e avaliação da atividade antitumoral de lignanas.

3 ESPECIFICAÇÕES DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Sílica-gel tipo 60 Merck, utilizada para CCDC;
- Sílica-gel PF₂₅₄ Merck, utilizada para CCDP;
- Placas de alumínio de sílica-gel 60 PF₂₅₄ (20 × 20 cm) EMD Chemical Inc., utilizada para CCDC e CCDP;
- As revelações de CCD foram executadas com irradiações UV 254 e 365 nm e/ou vapores de iodo e spray de PMA com aquecimento;
- Espalhador Quickfit, utilizado para espalhar suspensão de sílica-gel em água deionizada sobre placas de vidro;
- Sílica 60H Merck, utilizada para CC;
- Evaporador rotativo da Büchi 461;
- Os solventes deuterados utilizados para RMN foram da marca Sigma-Aldrich e Cambridge com grau de pureza ≥ 99,8% D (CDCl₃);
- Os solventes não deuterados utilizados foram das marcas Merck, Mallinckrodt, Sigma-Aldrich, EMD e Fisher Scientific de grau p.a., CLAE e CG;
- Os espectros de RMN uni- e bidimensionais foram obtidos em Espectrômetros Varian INOVA 500 (11,7 T), Bruker AC 200F (4,7 T) e Bruker Avance III 400 (9,4 T);
- Os espectros de massas foram obtidos em Espectrômetro Shimadzu LCMS – QP 8000α;
- Os bioensaios de aplicação tópica nos insetos foram realizados, utilizando-se uma microseringa Hamilton de 100,0 µl e um microaplicador Burkard 900-x;
- Os intervalos de fusão foram determinados sem correção em aparelho digital MQAPF – 301 (MicroQuímica);
- Os valores de rotação óptica específica foram obtidos em polarímetros 341-LC (Perkin Elmer) e JASCO Dip-370;
- Cromatógrafos: Analítico quaternário Shimadzu (modelos: SCL-10A – controlador, LC-10 AD – bomba, com detectores: UV-Vis Shimadzu modelo SPD-10 e polarímetro Perkin Elmer modelo 341-LC), Preparativo binário Shimadzu (modelos: SCL-10A – controlador, LC-10 AD – bomba, com detector UV-Vis Shimadzu SPD-10A) e Analítico ternário Hitachi (modelos: D-

- 6000 Interface – controlador, L-6200A Intelligent pump – bomba, AS-4000 Intelligent Auto Sampler – injetor, com detector: L-4500 Diode Array Detector);
- Colunas CLAE analítico: ODS (250 × 4,6 mm, 5 μm, Chrompack – Varian), Kromasil C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm, Supelco Inc.), β-CD Br (250 × 4,6 mm, 5 μm, YMC Corp.) e Lux 5u Cellulose-1 (250 × 4,6 mm, 5 μm, Phenomenex);
 - Colunas CLAE semipreparativo: ODS (250 × 20 mm, 15 μm, Shim-pack – Shimadzu) e β-CD Br (250 × 10 mm, 5 μm, YMC Corp.);
 - Sistema GCMS-QP5050A Shimadzu modo EI (70 eV) equipado com um injetor split/splitless (220 °C) com uma razão de 1/10, usando uma coluna capilar VF-1MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm). Hélio foi usado gás de arraste (0,8 ml/min);
 - Benzeno (Merck), utilizado para síntese, tratado com sódio metálico;
 - Bases inorgânicas utilizadas (NaOH e NaHCO₃) são da marca Dinâmica;
 - Ácidos utilizados: HCl, H₂SO₄, ácido acético, AlCl₃ e SnCl₄, são das marcas Synth, Aldrich, Fluka e Alkimia;
 - Reagentes utilizados: 2-bromo-propionato de etila (Aldrich), veratrol (Aldrich), 3,4-dimetoxi-fenilacetona (Aldrich), PCI₅ (Aldrich), NaBH₄ (Sigma-Aldrich e Sigma) e NH₄Cl (Synth), cloreto de propionila (Sigma-Aldrich), Zinco (Merck), Etileno glicol (Aldrich), Hidrazina monohidratada (Sigma-Aldrich) e Pd/C (Aldrich);
 - Secantes utilizados: CaCl₂ anidro (Synth), Na₂SO₄ anidro (Aldrich) e MgSO₄ anidro (J.T.Baker);
 - Kits de padrões utilizados nas análises de CG-EM (Aldrich);
 - Meios de cultura: PDA e PDB (BD Pharmaceutical Systems), glicose (Spectrum), K₂HPO₄ (J.T. Baker), NaCl (EM Chemical), soja e levedura (BD Pharmaceutical Systems).

CAPÍTULO I – ESTUDOS DE *Aristolochia malmeana* Hoehne

I.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Estudo de *Aristolochia malmeana*

O estudo fitoquímico da espécie *A. malmeana* foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes. A avaliação da atividade inseticida foi realizada no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, em colaboração com o Dr. Leandro Vieira e sob a coordenação do Prof. Dr. Sergio Antonio de Bortoli.

O objetivo deste estudo foi o isolamento de novos constituintes químicos que colaboraram com o conhecimento químico da espécie em questão e da família Aristolochiaceae como um todo. O reisolamento de algumas substâncias foi de extrema importância para a avaliação da atividade inseticida da espécie, sendo que os resultados obtidos são também muito importantes para a agricultura do Brasil.

I.1.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *A. malmeana*

As estruturas das substâncias isoladas (Figura 9) foram determinadas utilizando-se técnicas espectrométricas e dados físicos: Ressonância Magnética Nuclear unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional (*g*HMQC e *g*HMBC); rotação específica $[\alpha]_D$ e intervalo de ponto de fusão (p.f.).

Em estudos anteriores dos extratos hexânicos de raízes e folhas de *A. malmeana*, foram isolados duas lignanas dibenzilbutirolactônicas, duas lignanas dibenzilbutirolactólicas, uma lignana furofurânica, um diterpeno clerodânico e dois diterpenos labdânicos.^{16, 17}

Do presente trabalho resultou o isolamento de: (-)-(8*S*,8'*R*,9*S*)-cubebina (**1**), uma lignana dibenzilbutirolactólica, previamente isolada de espécies de Aristolochiaceae (Esquema 1 e Figura 9),¹⁰ duas lignanas dibenzilbutirolactônicas [(-)-kusunoquinina (**2**) e (-)-hinoquinina (**3**)], já isoladas desta espécie, a (-)-filigenina (**4**), isolada pela primeira vez no gênero *Aristolochia*, e um diterpeno

clerodânico [(-)-ácido 2-oxocolavênico (**5**)], de ocorrência comum em espécies da família Aristolochiaceae (Esquema 2 e Figura 9).¹⁰

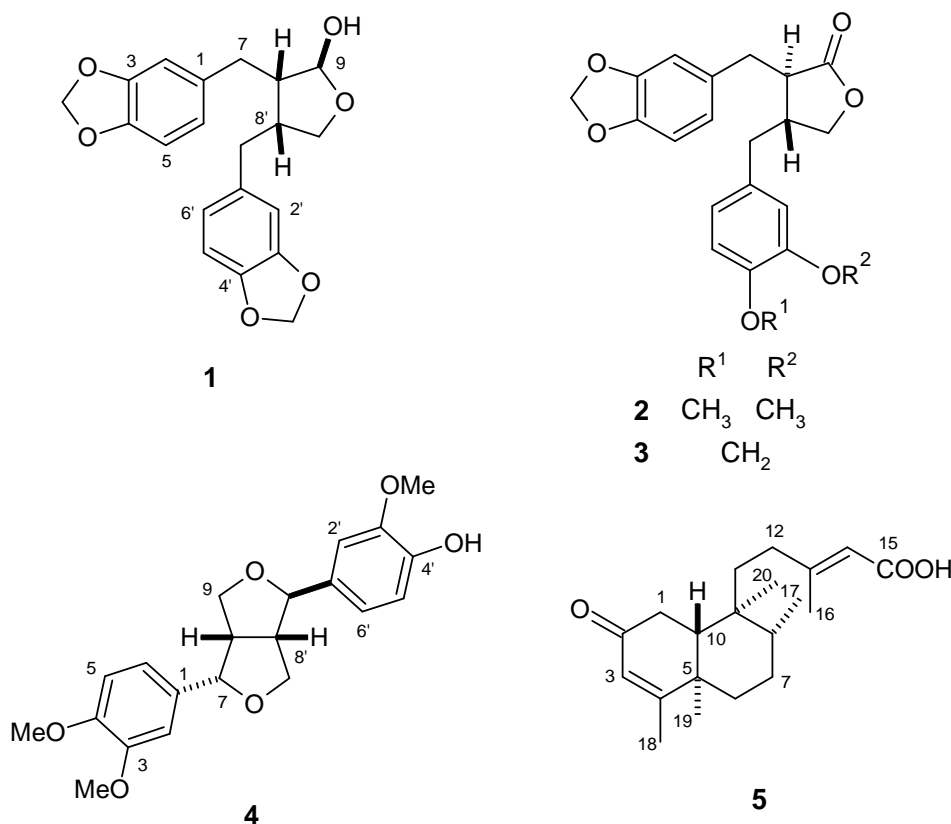


Figura 9. Substâncias isoladas de *A. malmeana*.

I.1.1.1 (-)-(8S,8'R,9S)-Cubebina (**1**)

A substância **1** foi isolada como um óleo incolor, e seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C indicam que se trata de uma lignana dibenzilbutirolactólica.¹⁰

O espectro de RMN de ^1H de **1** (Figura 10) apresenta um dubleto em aproximadamente δ 5,04, sendo este sinal referente ao hidrogênio do grupo hidroxílico em C-9, além de apresentar sinais de grupos metilenodioxílicos aromáticos (δ ~5,80), hidrogênios aromáticos (δ 6,61-6,41), carbinólicos (δ 3,83 e 3,32) e hidrogênios alifáticos (δ 2,56-2,02). Este espectro juntamente com o espectro de RMN de ^{13}C permitiu a identificação desta substância com a da 8,8'-*cis*-cubebina, previamente isolada de *Aristolochia lagesiana* e de *Aristolochia pubescens*.⁵¹

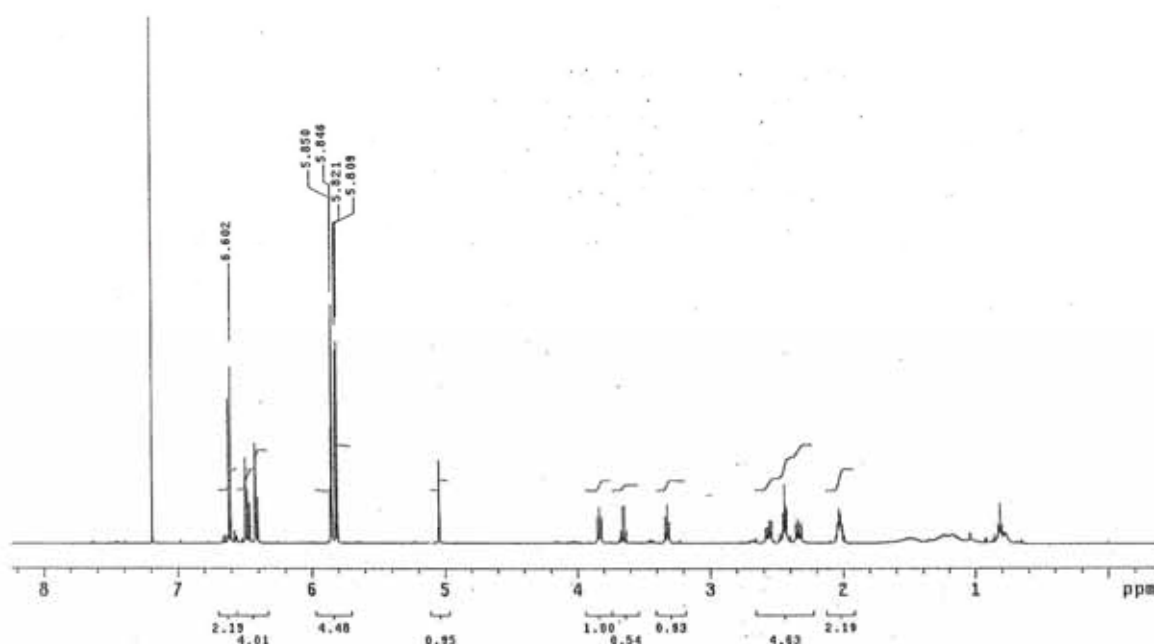


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H de **1** (CDCl_3 , 500 MHz).

A configuração absoluta de **1** foi confirmada pela comparação do valor de sua rotação específica: $[\alpha]_D^{25} = -99,0^\circ$ (c 0,3, CHCl_3) com aquela descrita na literatura $\{[\alpha]_D^{25} = -102,3^\circ$ (c 0,6, CHCl_3) $\}$ para a (-)-*cis*-cubebina.⁵¹

1.1.1.2 Elucidação estrutural das lignanas dibenzilbutirolactônicas **2** e **3**

A substância **2** foi isolada como um óleo amarelo. O espectro de RMN de ^1H de **2** (Figura 11) é muito semelhante ao de **1**, sendo as principais diferenças a presença de dois singletos referentes a grupamentos metoxílicos aromáticos (δ 3,79 e 3,77), a ausência dos sinais dos hidrogênios anoméricos em $\delta \sim 5,00$ e de dois hidrogênios metilenodioxílicos em $\delta \sim 5,80$. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais de 21 átomos de carbono para a substância **2**, incluindo doze carbonos aromáticos (δ 149,1-108,0), um metilenodioxílico aromático (δ 100,9), um carbinólico (δ 71,1), um carbono carbonílico (δ 178,4), dois carbonos metoxílicos (δ 55,7 e 55,6) e sinais de carbonos metilênicos e metínicos (δ 46,3-34,6).

A comparação dos seus espectros de RMN com os de uma amostra autêntica (este composto já havia sido isolado de outro extrato de *A. malmeana*) indica que esta substância é a lignana dibenzilbutirolactônica kusunoquinina.¹⁷ A configuração absoluta de **2** foi estabelecida pela comparação da rotação específica $[\alpha]_D^{25} = -40,0^\circ$

(c 0,2, CHCl₃) observada com aquela descrita na literatura { $[\alpha]_D^{25} = -26,3^\circ$ (c 0,14, CHCl₃)} para a (-)-kusunoquinina.⁵²

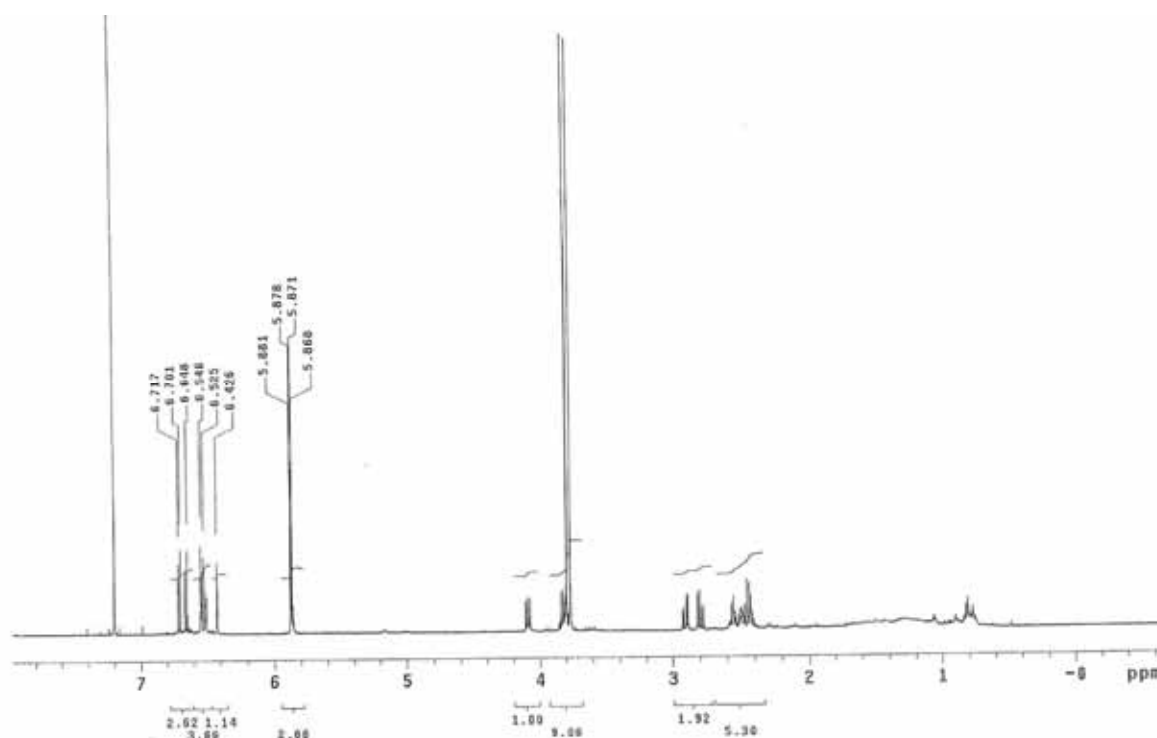


Figura 11. Espectro de RMN de ¹H de **2** (CDCl₃, 500 MHz).

A substância **3** foi isolada como um óleo amarelo. A principal diferença entre os espectros de RMN de ¹H (Figura 12) e de ¹³C de **3** e os espectros da substância **2** é a ausência dos sinais em aproximadamente δ_H 3,90 e δ_C 55,0, referentes aos grupos metoxílicos aromáticos, e o aumento da intensidade dos sinais em δ_H 5,86 e δ_C 101,0, referentes ao grupo metilenodioxílico aromático. A comparação destes espectros de RMN com os de uma amostra autêntica da hinoquinina (composto previamente isolado de outro extrato de *A. malmeana*) propiciou a identificação desta substância.¹⁷ A configuração absoluta de **3** foi estabelecida pela comparação do valor da rotação específica: $[\alpha]_D^{25} = -30,3^\circ$ (c 0,6, CHCl₃) com aquele descrito na literatura {lit. $[\alpha]_D^{25} = -26,3^\circ$ (c 0,12, CHCl₃)} para a (-)-hinoquinina.⁵²

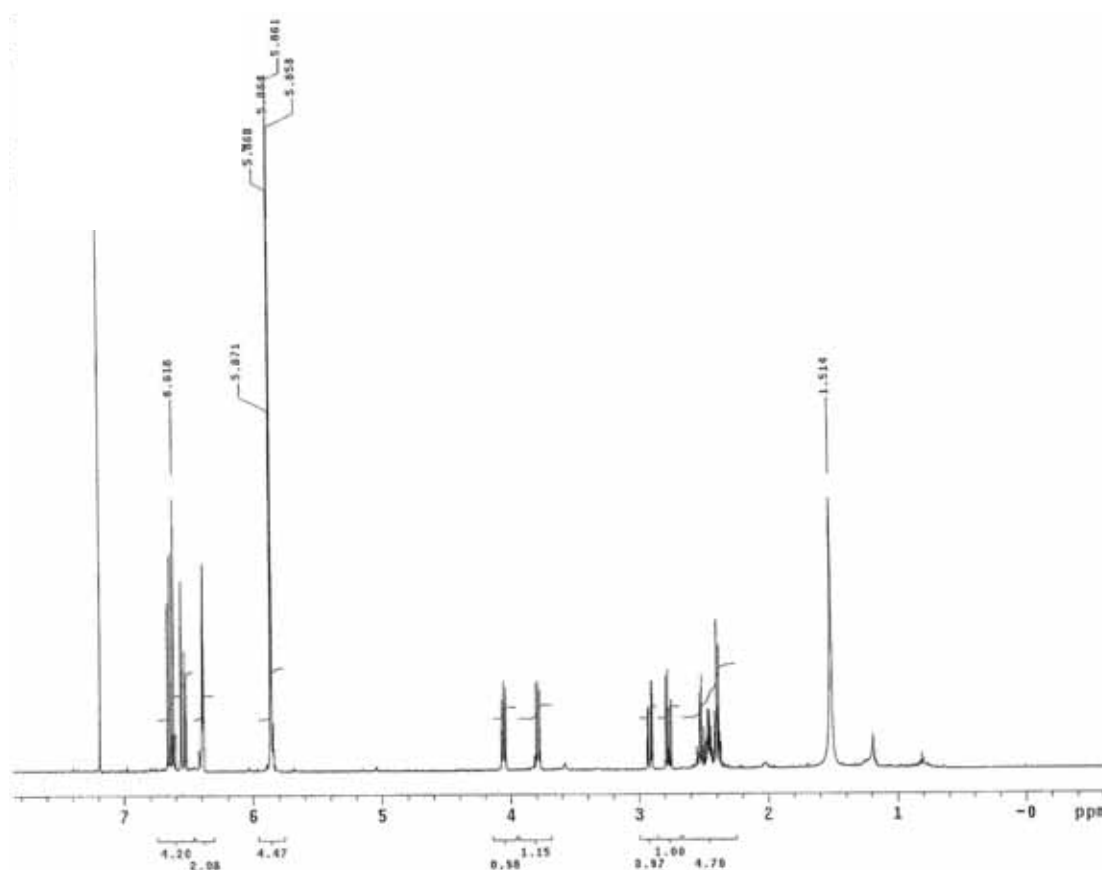


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de **3** (CDCl_3 , 500 MHz).

1.1.1.3 (-)-Filigenina (**4**)

A substância **4** foi isolada como um óleo amarelo. A análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 13) e de ^{13}C indica que **4** é uma lignana furofurânica. O espectro RMN de ^1H evidencia a presença de seis hidrogênios aromáticos (δ 6,96-6,86), nove metoxílicos (δ ~3,90), dupletos referentes a dois hidrogênios carbinólicos benzílicos (δ 4,89 e 4,46), além de sinais referentes a hidrogênios metínicos e carbinólicos na estrutura de **4**. O espectro de ^{13}C apresenta sinais referentes a 21 carbonos, sendo doze aromáticos e três metoxílicos aromáticos.

Após a comparação dos dados obtidos com aqueles da literatura, pode-se constatar que a substância **4** é a lignana filigenina, sendo que a posição dos substituintes, tanto nos anéis furofurânicos quanto aromáticos, foram confirmadas pelas correlações observadas no mapa de contorno $g\text{HMBC}$.⁵³

Para confirmação da configuração absoluta de **4**, foram realizadas medidas de rotação óptica: $[\alpha]_D^{25} = -120,0^\circ$ (c 0,2, CHCl_3) {lit. $[\alpha]_D^{25} = -114,0^\circ$ (c 0,1, CHCl_3)},⁵³

o que culminou na identificação da (-)-filigenina. A medida do intervalo de ponto de fusão: 130-131 °C, também é coerente com o descrito na literatura [lit. 128-130 °C].⁵³

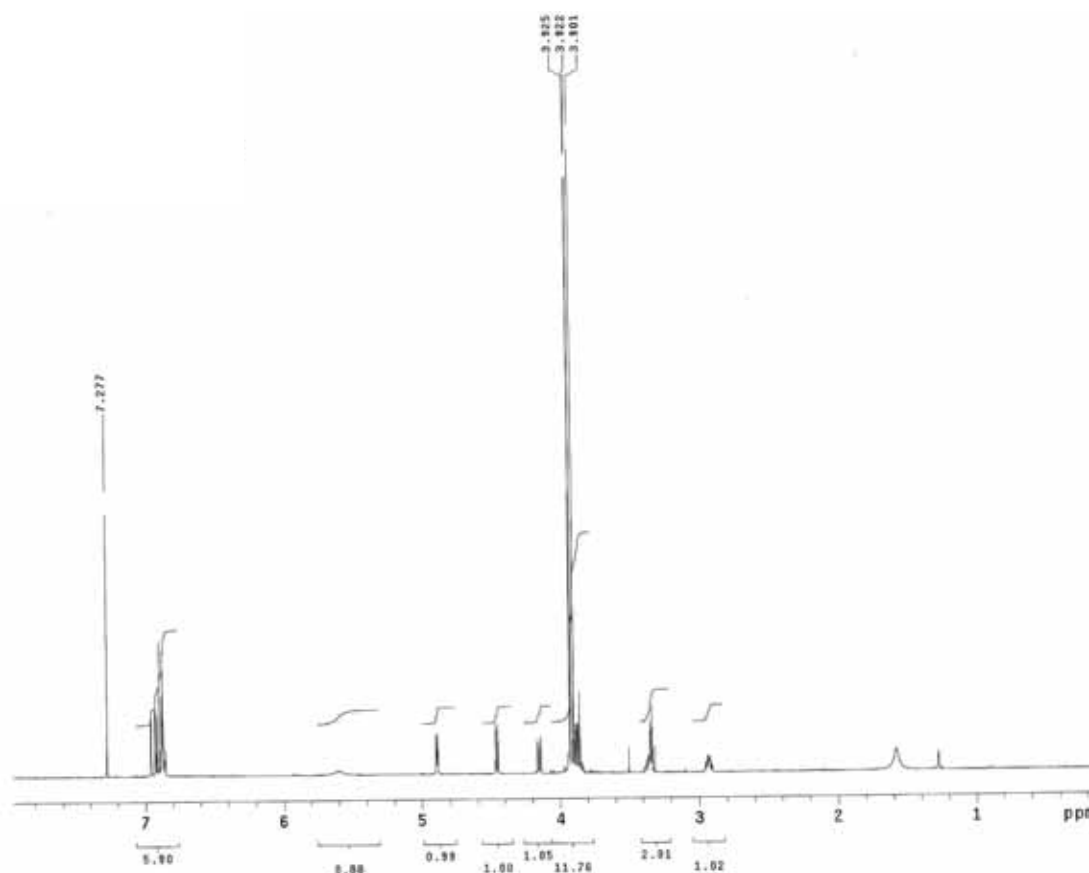


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H de **4** (CDCl_3 , 500 MHz).

1.1.1.4 (-)-Ácido 2-oxocolavênico (**5**)

A substância **5** foi isolada como um óleo amarelo, e seus espectros de RMN de ^1H (Figura 14) e de ^{13}C indicam que se trata de um diterpeno clerodânico, tendo como principais características a presença de sinais referentes a um carbono carbonílico e um acílico (δ 199,9 e 173,0) e cinco carbonos metílicos (δ 19,2, 18,9, 18,4, 17,8 e 15,7). Após a comparação dos dados descritos na literatura, pode-se constatar que a substância **5** é o diterpeno ácido 2-oxocolavênico.⁵⁴ A configuração absoluta de **5** foi estabelecida pela comparação de sua rotação específica: $[\alpha]_D^{25} = -48,1^\circ$ (c 0,7, CHCl_3) com aquela do (-)-ácido 2-oxocolavênico {lit. $[\alpha]_D^{21} = -54,0^\circ$ (c 1,0, CHCl_3)}.⁵⁵

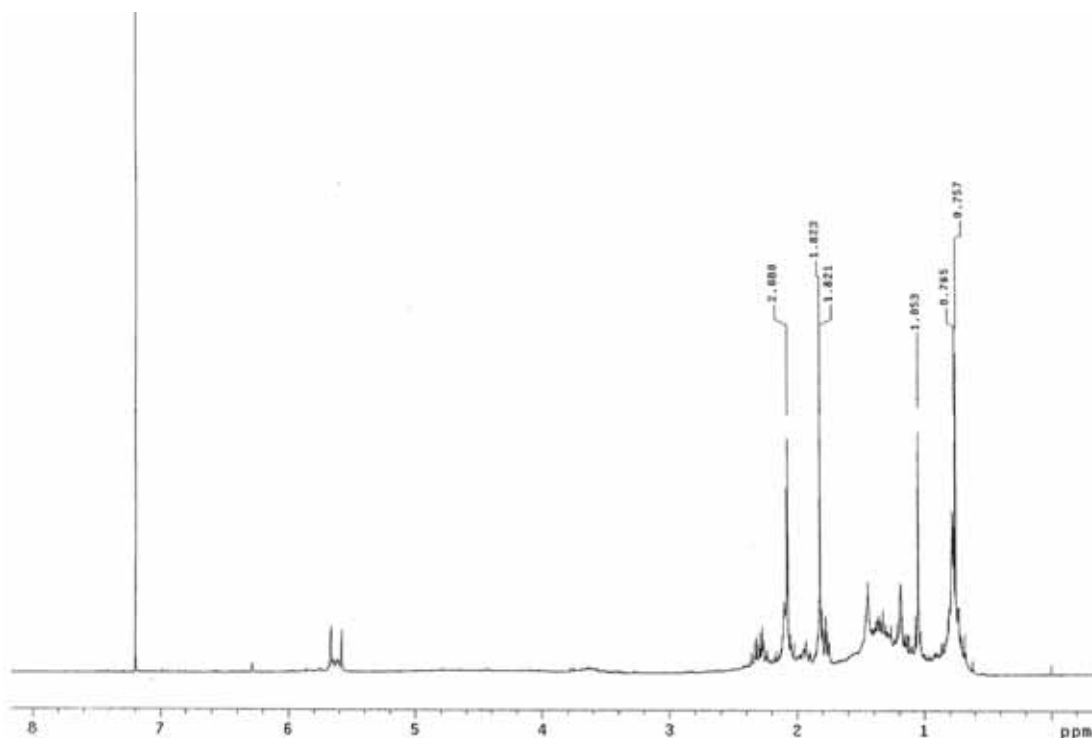


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H de **5** (CDCl_3 , 500 MHz).

I.1.2 Teste de Susceptibilidade de *Anticarsia gemmatalis*

Em estudos anteriores, observou-se que o extrato hexânico de raízes de *A. malmeana* demonstrava atividade inseticida promissora em *A. gemmatalis*.¹⁷

Visando determinar quais compostos seriam os responsáveis pela atividade deste extrato, a susceptibilidade de *A. gemmatalis* às substâncias majoritárias puras {(–)-kusunoquinina (**2**), (–)-hinoquinina (**3**) e (–)-ácido colavênico (**6**)} (Figura 15) foi avaliada. O diterpeno clerodânico **6** foi isolado em estudos anteriores de *A. malmeana*,¹⁶ e a sua estrutura foi confirmada pela análise dos experimentos de raios X.⁵⁶

A. gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) foi selecionado como inseto-modelo para a avaliação da susceptibilidade a constituintes químicos de *A. malmeana*, pois se baseou no fato do inseto apresentar ciclo de vida, reprodução e manejo bem conhecidos dos entomologistas colaboradores deste projeto, e pela possibilidade de serem criados em laboratórios em condições ambientais controladas.

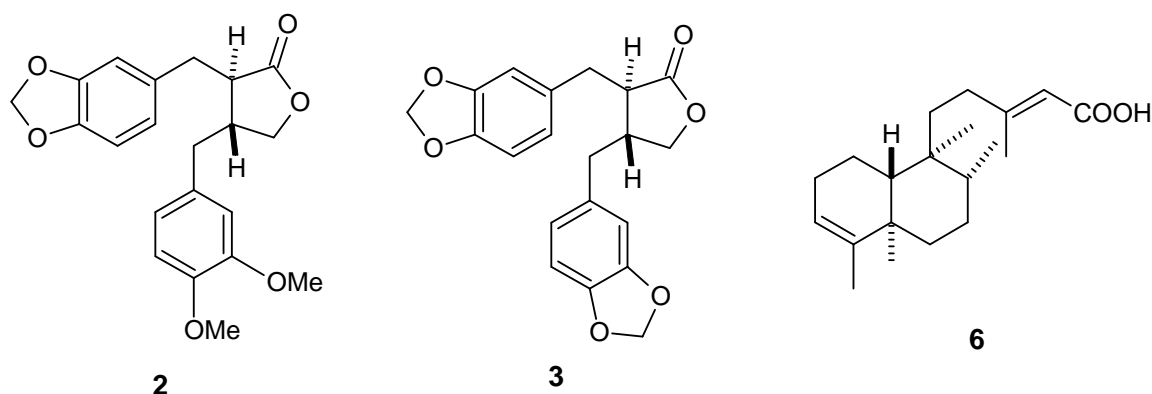


Figura 15. Substâncias utilizadas na avaliação da atividade inseticida.

Das três substâncias testadas, somente a (-)-kusunoquinina (**2**) apresentou atividade inseticida significativa (Figura 16). Uma informação importante observada foi que a (-)-kusunoquinina (**2**) mostrou maior atividade inseticida em *A. gemmatalis* ($DL_{10} = 9,3$ e $DL_{50} = 230,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) do que o extrato hexânico de raízes de *A. malmeana* ($DL_{10} = 92,0$ e $DL_{50} = 308,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), e que esta atividade é dose-dependente.¹⁷

Para verificar se a (-)-kusunoquinina seria a única substância responsável pela atividade do extrato, e se existia sinergismo e/ou antagonismo sobre esta atividade, realizaram-se testes com soluções ($c = 381,7 \pm 0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) preparadas a partir das três substâncias puras (**2**, **3** e **6**) em várias proporções. Como mostrado na Figura 17 (mortalidade expressa em função da proporção de **2** nas misturas) o efeito de **2** na mortalidade diminuiu na presença de **3** e **6**, indicando um efeito antagonista destas sobre a atividade inseticida. Estes resultados também sugerem que substâncias minoritárias do extrato ($< 1\% \text{ m/m}$), como a (-)-(8*S*,8'*R*,9*S*)-cubebina (**1**), possam contribuir para a atividade da lignana **2**.¹⁷

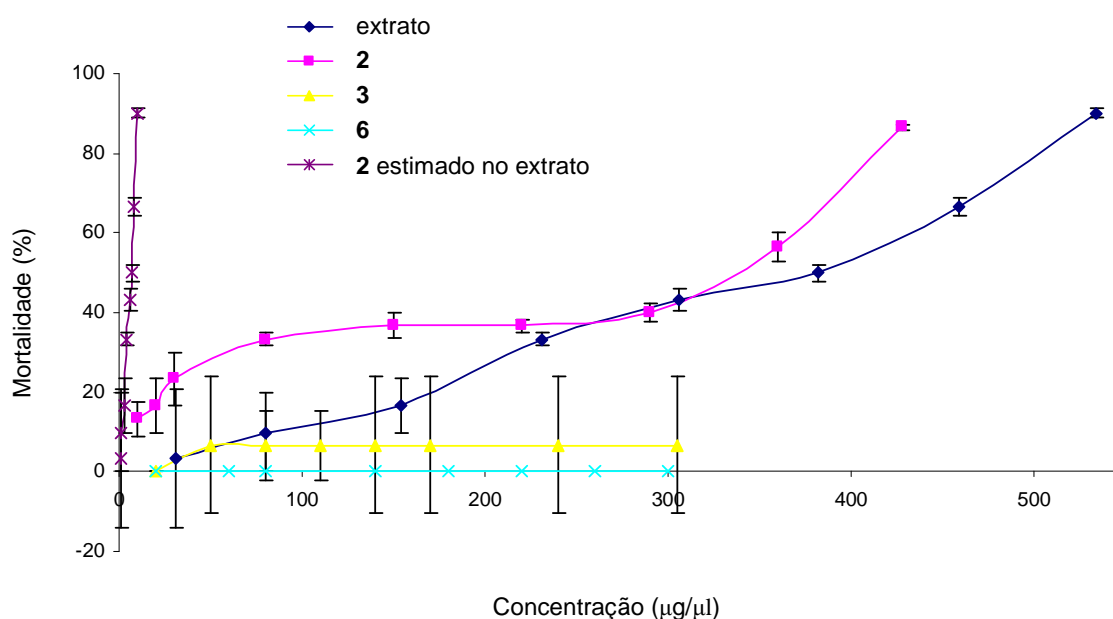


Figura 16. Mortalidade absoluta de *A. gemmatalis* utilizando-se constituintes químicos de *A. malmeana*.

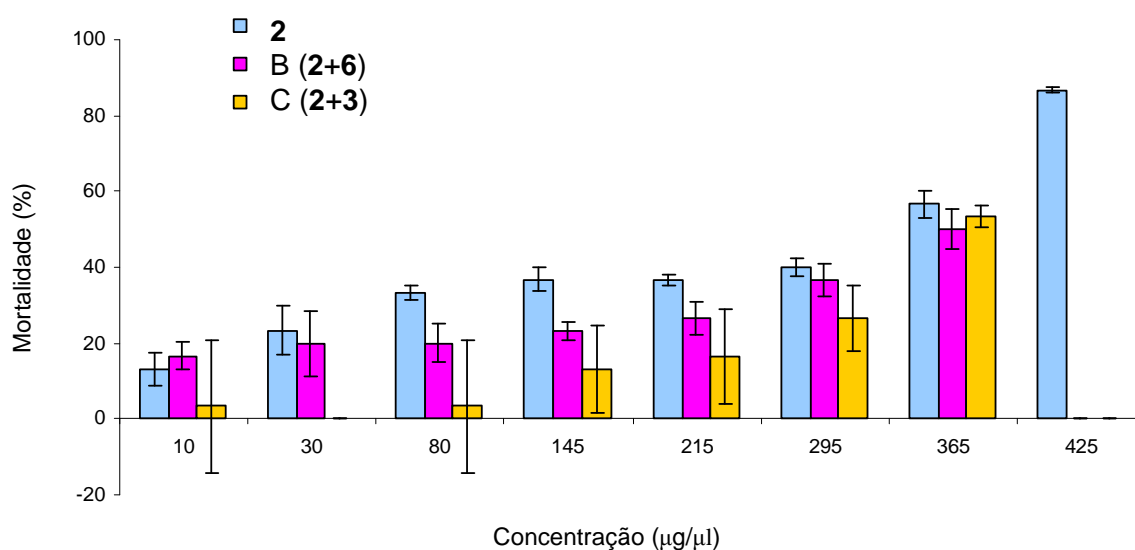


Figura 17. Efeitos de (2), soluções B (2+6) e C (2+3), como uma função da concentração de 2, nas doses de $381,7 \pm 0,3$ µg/larva, na mortalidade de *A. gemmatalis*.

* a solução A (3+6) não apresentou efeito significativo na mortalidade de *A. gemmatalis*.

** as proporções mostradas nas misturas B e C são as da substância (-)-kusunoquina (2).

I.2 PARTE EXPERIMENTAL – Estudo de *A. malmeana*

I.2.1 Coleta e identificação de material vegetal

As plantas foram coletadas na região de Ituiutaba – MG, em fevereiro de 2003. A identificação da espécie vegetal foi feita pelo Dr. Condorcet Aranha (Secretaria do Meio Ambiente – Prefeitura de Joinville – SC) e pelo Prof. Dr. Lindolpho Capellari Jr. (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba – SP). Uma exsicata está depositada no herbário da ESALQ (voucher nº. ESA-88883).

I.2.2 Preparação dos extratos

As diferentes partes da planta (raízes e folhas) foram separadas, secas ao ar e, posteriormente, em estufa a 45 °C. Após isto, fez-se a moagem mecânica do material seco e realizou-se a extração por maceração com solventes inertes e de diferentes polaridades: hexano, acetona, etanol e por extração com etanol em Soxhlet, obtendo-se oito extratos (Tabela 2).¹⁷

Tabela 2. Extratos obtidos de *A. malmeana*

Material vegetal seco	Extrato	Massa do extrato (g)
Raízes (496,0 g)	Hexânico	41,6
	Acetônico	20,4
	Etanólico	44,8
	Etanólico-Soxhlet	37,4
Folhas (367,0 g)	Hexânico	37,9
	Acetônico	17,7
	Etanólico	5,9
	Etanólico-Soxhlet	16,8

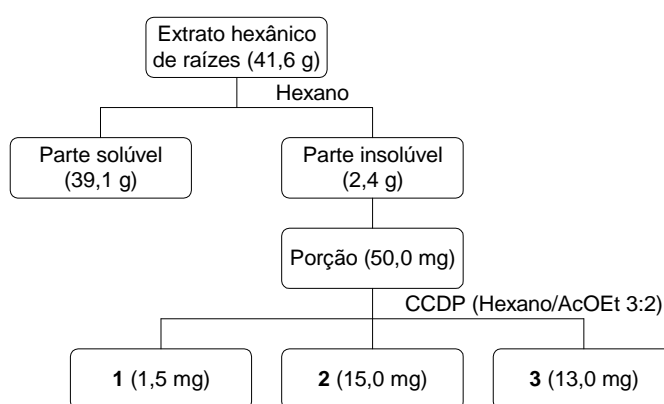
A triagem dos extratos brutos de *A. malmeana* foi baseada em análises cromatográficas (CCDC), utilizando-se vários sistemas de eluentes, e em análises espectrométricas (RMN de ¹H).

I.2.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

I.2.3.1 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de raízes

O extrato foi lavado com hexano, e uma porção da parte insolúvel foi submetida a uma CCDP (sílica-gel PF₂₅₄, Hexano/AcOEt – 3:2), o que permitiu a separação das substâncias **1**, **2** e **3**, cujos rendimentos em relação ao extrato foram de 0,2%, 2,0% e 1,5%, respectivamente (Esquema 1 e Figura 9).

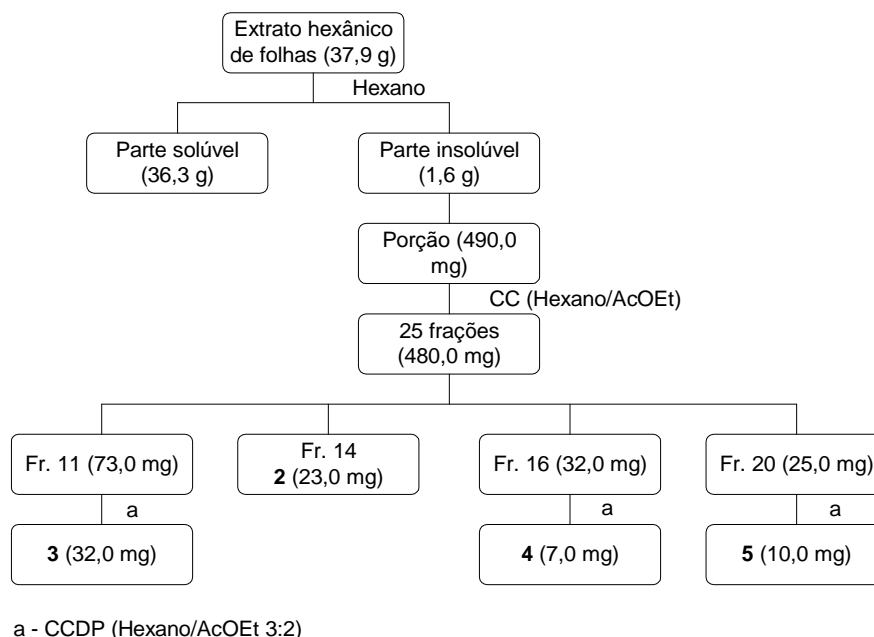
Esquema 1. Fracionamento do extrato hexânico de raízes



I.2.3.2 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de folhas

Este extrato também foi submetido a uma lavagem com hexano, e uma porção da parte insolúvel foi fracionada em uma CC (sílica 60H, Hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade), obtendo-se 25 frações. Após análise por RMN de ¹H e CCDC em diversos sistemas de eluentes, a fração 11 foi submetida a uma CCDP (sílica-gel PF₂₅₄, Hexano/AcOEt – 3:2) fornecendo a substância **3** (32,0 mg); as frações 16 e 20 também foram fracionadas na mesma condição cromatográfica que a anterior, levando à purificação das substâncias **4** (7,0 mg) e **5** (10,0 mg), respectivamente. A fração 14 forneceu a substância **2** (23,0 mg) (Esquema 2 e Figura 9).

Esquema 2. Fracionamento do extrato hexânico de folhas



I.2.4 Avaliação da atividade inseticida dos constituintes químicos

I.2.4.1 Metodologia dos bioensaios ¹⁷

As larvas de *A. gemmatilis* (lagarta-da-soja) foram criadas com dieta artificial apropriada e mantidas em ambiente controlado (temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $75 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas).

Os testes de susceptibilidade envolveram a aplicação tópica dos constituintes químicos de *A. malmeana*, os quais foram solubilizados em um solvente não tóxico para os insetos (acetona) nas condições experimentais empregadas. Aplicou-se 1,0 µl de cada solução no mesotórax de lagartas no 3º instar com cinco dias de fase larval.

Para cada experimento foram utilizadas três placas de Petri, cada uma com dez larvas. As avaliações foram efetuadas após 24, 48 e 72 horas da aplicação e as respostas obtidas foram interpretadas como sobrevivência ou morte, baseado na resposta das larvas aos estímulos mecânicos. Os tratamentos-controle foram realizados com aplicação de iguais volumes de solvente puro (acetona) sobre os insetos.

Neste bioensaio foi avaliada a atividade inseticida do extrato hexânico de raízes (utilizando oito concentrações diferentes) dissolvido em acetona, e de três substâncias isoladas deste extrato: (-)-kusunoquinina (**2**), (-)-hinoquinina (**3**), (-)-

ácido colavênico (**6**), também dissolvidos em acetona e em diferentes concentrações (Figura 16).

Foram também testadas soluções de $381,7 \pm 0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de **3+6** (A), **2+3** (B) e **2+6** (C), em diferentes proporções, para avaliar os efeitos sinérgicos e antagonísticos que poderiam estar influenciando a atividade observada para o extrato hexânico de raízes, do qual estas substâncias foram isoladas (Figura 17).

A análise estatística dos valores de DL_{10} e DL_{50} foi realizada pela análise de Probit usando Pólo-PC (software Leora).⁵⁷

I.2.5 Dados físicos e espectrométricos das substâncias

(-)-(8S,8'R,9S)-Cubebina (1): Sólido incolor; $[\alpha]_D^{25} = -99,0^\circ$ (c 0,3, CHCl_3); EM-ESI, m/z 357 $[\text{M} + \text{H}]^+$; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6,49 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz, H-2), 6,61 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz, H-5), 6,47 (1H, *dd*, $J = 7,5, 1,5$ Hz, H-6), 2,33 (1H, *dd*, $J = 14,0, 8,0$ Hz, H-7_a), 2,56 (1H, *dd*, $J = 14,0, 7,5$ Hz, H-7_b), 2,02 (1H, *m*, H-8), 5,04 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz, H-9), 6,42 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz, H-2'), 6,61 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz, H-5'), 6,41 (1H, *dd*, $J = 7,5, 1,5$ Hz, H-6'), 2,44 (2H, *m*, H-7'), 2,02 (1H, *m*, H-8'), 3,32 (1H, *t*, $J = 8,5$ Hz, H-9_a'), 3,83 (1H, *dd*, $J = 8,5, 7,0$ Hz, H-9_b'), 5,85, 5,84, 5,82, 5,81 (4H, *4d*, $w_{1/2} = 1,5$ Hz, OCH_2O); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 133,8 (C-1), 109,5 (C-2), 147,8 (C-3), 146,1 (C-4), 108,3 (C-5), 122,1 (C-6), 38,6 (C-7), 52,5 (C-8), 104,5 (C-9), 134,5 (C-1'), 109,2 (C-2'), 147,8 (C-3'), 146,1 (C-4'), 108,2 (C-5'), 121,6 (C-6'), 39,3 (C-7'), 46,0 (C-8'), 72,3 (C-9'), 101,0 ($2 \times \text{OCH}_2\text{O}$).

(-)-Kusunoquinina (2): Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} = -40,0^\circ$ (c 0,2, CHCl_3); EM-ESI, m/z 371 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 6,54 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,65 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,53 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6), 2,90 (1H, *dd*, $J = 14,4, 5,5$ Hz, H-7_a), 2,79 (1H, *dd*, $J = 14,4, 7,0$ Hz, H-7_b), 2,47 (1H, *ddd*, $J = 8,7, 7,0, 5,5$ Hz, H-8), 6,42 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,71 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,51 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6'), 2,55 (1H, *dd*, $J = 12,5, 5,5$ Hz, H-7_a'), 2,44 (1H, *d*, $J = 12,5$ Hz, H-7_b'), 2,44 (1H, *ddt*, $J = 8,7, 5,5, 7,0$ Hz, H-8'), 4,07 (1H, *dd*, $J = 9,0, 7,0$ Hz, H-9_a'), 3,81 (1H, *dd*, $J = 9,0, 7,0$ Hz, H-9_b'), 5,87, 5,88 (2H, *2d*, $w_{1/2} = 1,5$ Hz, OCH_2O), 3,77 (3H, *s*, $\text{OMe-3}'$) e 3,80 (3H, *s*, $\text{OMe-4}'$); ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3): δ 131,4 (C-1), 109,5 (C-2), 147,9 (C-3), 146,5 (C-4), 108,2 (C-5), 122,3 (C-6), 34,8 (C-7), 46,5 (C-8), 178,5 (C-9),

130,5 (C-1'), 111,8 (C-2'), 149,2 (C-3'), 148,0 (C-4'), 111,4 (C-5'), 120,7 (C-6'), 38,3 (C-7'), 41,3 (C-8'), 71,2 (C-9'), 55,8 (OMe-3'), 55,9 (OMe-4'), 101,0 (OCH₂O).

(-)-Hinoquinina (3): Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} = -30,3^\circ$ (c 0,6, CHCl₃); EM-ESI, m/z 355 [M + H]⁺; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6,39 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,66 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,53 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6), 2,91 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-7_a), 2,77 (1H, *dd*, $J = 14,0, 7,5$ Hz, H-7_b), 2,46 (1H, *ddd*, $J = 8,0, 7,5, 5,0$ Hz, H-8), 6,56 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,63 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,39 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6'), 2,52 (1H, *m*, H-7_a'), 2,39 (1H, *m*, H-7_b'), 2,39 (1H, *m*, H-8'), 4,06 (1H, *dd*, $J = 9,0, 7,0$ Hz, H-9_a'), 3,86 (1H, *dd*, $J = 9,0, 7,5$ Hz, H-9_b'), 5,86 (4H, *m*, OCH₂O); ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 131,5 (C-1), 108,3 (C-2), 147,8 (C-3), 146,4 (C-4), 108,2 (C-5), 121,5 (C-6), 34,8 (C-7), 46,4 (C-8), 178,4 (C-9), 131,3 (C-1'), 109,4 (C-2'), 147,5 (C-3'), 146,3 (C-4'), 108,8 (C-5'), 122,2 (C-6'), 38,3 (C-7'), 41,2 (C-8'), 71,1 (C-9'), 101,0 (2 × OCH₂O).

(-)-Filigenina (4): Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} = -120,0^\circ$ (c 0,2, CHCl₃); EM-ESI, m/z 373 [M + H]⁺; p. f.: 130-131 °C; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,96 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz, H-2), 6,87 (1H, *sl*, H-5), 6,87 (1H, *sl*, H-6), 4,89 (1H, *d*, $J = 5,5$ Hz, H-7), 3,34 (1H, *m*, H-8), 3,34 (1H, *m*, H-9_a), 3,85 (1H, *m*, H-9_b)^{*}, 6,93 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,91 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,86 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6'), 4,46 (1H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H-7'), 2,93 (1H, *m*, H-8'), 4,15 (1H, *dd*, $J = 10,0, 1,0$ Hz, H-9_a'), 3,87 (1H, *m*, H-9_b)^{*}, 3,93 (3H, *s*, OMe-3), 3,90 (3H, *s*, OMe-4), 3,92 (3H, *s*, OMe-3'); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 131,0 (C-1), 109,1 (C-2), 148,9 (C-3), 148,1 (C-4), 111,2 (C-5), 117,8 (C-6), 82,1 (C-7), 50,2 (C-8), 69,7 (C-9), 133,1 (C-1'), 108,6 (C-2'), 146,7 (C-3'), 145,4 (C-4'), 114,3 (C-5'), 119,2 (C-6'), 87,7 (C-7'), 54,5 (C-8'), 71,0 (C-9'), 2 × 56,0, 55,9 (3 × OMe).

* os sinais podem estar trocados.

(-)-Ácido 2-oxocolavênico (5): Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} = -48,1^\circ$ (c 0,7, CHCl₃); EM-ESI, m/z 319 [M + H]⁺; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5,70 (1H, *s*, H-3), 5,67 (1H, *s*, H-14), 2,08 (3H, *s*, H-16), 0,76 (3H, *d*, $J = 4,0$ Hz, H-17), 1,83 (3H, *s*, H-18), 1,05 (3H, *s*, H-19), 0,76 (3H, *s*, H-20); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 34,9 (C-1), 199,9 (C-

2), 125,5 (C-3), 172,0 (C-4), 39,9 (C-5), 34,3 (C-6), 26,9 (C-7), 36,1 (C-8), 38,8 (C-9), 45,7 (C-10), 34,0 (C-11), 35,6 (C-12), 160,3 (C-13), 115,2 (C-14), 173,0 (C-15), 19,2 (C-16), 15,7 (C-17), 18,9 (C-18), 18,4 (C-19), 17,8 (C-20).

**CAPÍTULO II – CLASSIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aristolochia*
PELO ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

II.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Análise dos óleos essenciais

O estudo dos óleos essenciais de espécies de *Aristolochia* foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes e colaboração dos pesquisadores Carla Santana Francisco, Dr. Aristeu G. Tininis, Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira, Prof. Dr. Lindolpho Capellari Jr.

II.1.1 Classificação de *Aristolochia* brasileiras

Apesar do significativo número de espécies de *Aristolochia* brasileiras, existem poucos relatos na literatura sobre o estudo dos constituintes químicos de óleos essenciais.¹⁸

Óleos essenciais foram obtidos das diferentes partes vegetais de dez espécies de *Aristolochia* por hidrodestilação e estes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, onde os constituintes foram identificados pela comparação dos índices de retenção e dos espectros de massas. A variabilidade intraespecífica foi examinada pela análise dos dados obtidos dos óleos com diferentes tempos de extrações. Os resultados foram comparados com a morfologia e a taxonomia do gênero para obter evidências de possível significância quimiotaxonômica. Na Tabela 3 consta uma relação das espécies analisadas neste estudo e na Tabela 4 o resultado da análise da composição química dos óleos essenciais destas espécies.

Tabela 3. Lista das plantas investigadas com localização, abreviação e número de voucher

Espécie	Código^a	Localidade	Voucher nº
<i>A. arcuata</i>	arc 2R	Araraquara, SP	ESA88280
<i>A. chamissonis</i>	cha 2R	São Joaquim da Barra, SP	ESA88274
<i>A. elegans</i>	ele 2R	Descalvado, SP	ESA88279
<i>A. esperanzae</i>	esp 2R	Ituiutaba, MG	ESA88881
<i>A. galeata</i>	gal 2R	Descalvado, SP	ESA88278
<i>A. galeata</i>	gal 4R	Descalvado, SP	ESA88278
<i>A. gigantea</i>	gig 2R	Araraquara, SP	ESA88281
<i>A. lagesiana</i>	lag 2R	Ituiutaba, MG	ESA88885
<i>A. malmeana</i>	mal 2R	Ituiutaba, MG	ESA88883
<i>A. melastoma</i>	mel 2RS	Araraquara, SP	ESA88883
<i>A. pubescens</i>	pub 2R	Ituiutaba, MG	ESA88882
<i>A. pubescens</i>	pub 4R	Ituiutaba, MG	ESA88882

^a Código: nome da espécie, tempo de extração (2 ou 4 horas) e parte da planta (raízes e caules).

Tabela 4. Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Aristolochia*

I	Composto	Espécie (código)														
		arc 2R	cha 2R	ele 2R	esp 2R	gal 2R	gal 4R	gig 2R	lag 2R	mal 2R	mel 2RS	pub 2R	pub 4R			
857	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
923	2	-	-	-	-	6,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
928	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
934	4	5,4	-	1,2	-	-	18,6	2,6	0,7	-	-	19,1	6,5	7,3	-	-
948	5	8,0	4,1	2,3	-	48,8	32,4	1,6	1,1	46,3	-	15,3	24,8	36,1	-	-
953	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
974	7	2,3	1,0	0,6	-	-	7,3	-	-	-	-	12,6	6,4	9,1	-	-
978	8	-	-	-	-	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	-	-
979	9	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
985	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-
1011	11	-	-	-	-	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1013	12	-	-	-	-	-	-	60,9	-	-	-	-	-	-	-	-
1014	13	38,6	-	-	-	12,4	-	-	-	-	-	6,2	-	-	-	-
1017	14	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-
1023	15	8,7	-	0,5	-	10,5	9,8	-	-	10,3	-	34,5	2,4	2,8	-	-
1042	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-
1054	17	-	-	-	-	13,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1082	18	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-	-	-	-
1088	19	-	2,6	-	-	-	-	16,6	-	-	-	-	-	-	-	-
1118	20	-	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1118	21	-	10,3	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-
1152	22	-	1,8	1,4	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-
1198	23	-	10,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1219	24	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1219	25	-	-	-	-	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	-	-
1222	26	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1248	27	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1252	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,2	11,0	-
1274	29	13,2	3,9	3,8	-	-	23,8	-	-	-	-	5,3	45,7	33,7	-	-

1576	63	2-Óxido-aromadendreno	-	-	10,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1576	64	(-)-B-óxido-cariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1580	65	Globulol	-	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5
1582	66	Viridiflorol	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1591	67	Guaiol	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1598	68	Epi-globulol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,0
1609	69	Cubenol	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1613	70	δ-Cadinol	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1614	71	1,6-Humuladien-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,1
1620	72	Aristol-9-en-3-ol	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1623	73	Não identificado 4	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1632	74	α-Eudesmol	-	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1638	75	τ-Cadinol	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1641	76	β-Bisabolol	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1650	77	1-Óxido-aromadendreno	-	-	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1685	78	Eudesmen-7(11)-en-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,9
2075	79	8,14-Cedranediol	-	14,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2399	80	Não identificado 5	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (%)			100,1	99,9	96,9	100,1	100,0	100,1	100,1	100,1	100,2	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Alifáticos

Alcanos, Alcenos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcoóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aldeídos, Cetonas	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácidos graxos, ésteres alifáticos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9

Terpenóides

Monoterpenos	63,0	5,1	4,5	-	100,0	68,1	65,1	1,7	60,9	92,0	40,1	55,3
Monoterpenos oxigenados	19,2	34,0	6,5	-	-	32,0	16,6	8,6	-	5,3	59,9	44,7
Sesquiterpenos	15,8	13,6	7,6	100,1	-	-	10,8	30,0	39,1	2,1	-	-
Sesquiterpenos oxigenados	2,1	41,4	72,2	-	-	-	-	52,8	-	-	-	-

Aromáticos

Outros/Não identificados	-	4,6	6,1	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
---------------------------------	---	-----	-----	---	---	---	---	-----	---	---	---	---

Aproximadamente 50 óleos foram obtidos das raízes das plantas utilizando-se diversos tempos de extração (0,5, 2 e 4 horas) e em triplicatas. Os óleos com somente 30 minutos não se mostraram reprodutíveis e estes foram caracterizados pela presença do derivado 2,2-dimetildecano. As composições e os rendimentos das extrações de duas e quatro horas mudaram significativamente entre elas, mas foram reprodutíveis. Assim, as análises estatísticas foram realizadas usando 2 e 4 horas de extração, e envolveram 80 compostos (75 conhecidos), sendo que os melhores resultados obtidos pela análise de PCA foram obtidos com os óleos extraídos por 2 horas.

O canfeno ($I = 948$) foi identificado em quase todos os óleos, com exceção de *A. esperanzae*, e é o constituinte majoritário dos óleos de *A. galeata* e *A. malmeana*. Foi observado uma alta concentração de monoterpenos (60,9-100,0%) nos óleos de *A. arcuata*, *A. galeata*, *A. gigantea*, *A. malmeana* e *A. melastoma*, enquanto o óleo de *A. pubescens* possui uma predominância de monoterpenos oxigenados (59,9%). O óleo de *A. esperanzae* teve somente sesquiterpenos oxigenados (100,0%) e aqueles de *A. chamissonis*, *A. elegans* e *A. lagesiana* mostraram uma alta concentração de sesquiterpenos oxigenados (41,4-72,2%).

Como pode-se observar no gráfico de escores (Figuras 18 e 19), quatro grupos podem ser sugeridos para a classificação dos óleos, sendo que a componente principal 1 (PC1) é caracterizada por monoterpenos e a componente principal 3 (PC3) por sesquiterpenos. O primeiro grupo consiste das espécies *A. arcuata*, *A. chamissonis*, *A. lagesiana*, *A. melastoma* e *A. pubescens*. *A. gigantea* e *A. elegans* formam dois grupos distintos, e um quarto grupo é formado por *A. esperanzae*, *A. galeata* e *A. malmeana*. A comparação destes quatro grupos com a classificação morfológica proposta por Hoehne (1942)¹¹ mostra que a única diferença está na colocação de *A. elegans* e *A. gigantea* no mesmo grupo morfológico.¹⁸

As análises por CG-EM e quimiometria dos constituintes químicos dos óleos essenciais das raízes de dez espécies de *Aristolochia*, que foram obtidas depois com duas horas de hidrodestilação, mostraram ser ótimas ferramentas para ajudar na identificação e classificação de espécies de *Aristolochia* em grupos morfológicos. Estas análises poderão também auxiliar na identificação de mais espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia*, incluindo aquelas disponíveis em mercados populares.¹⁸

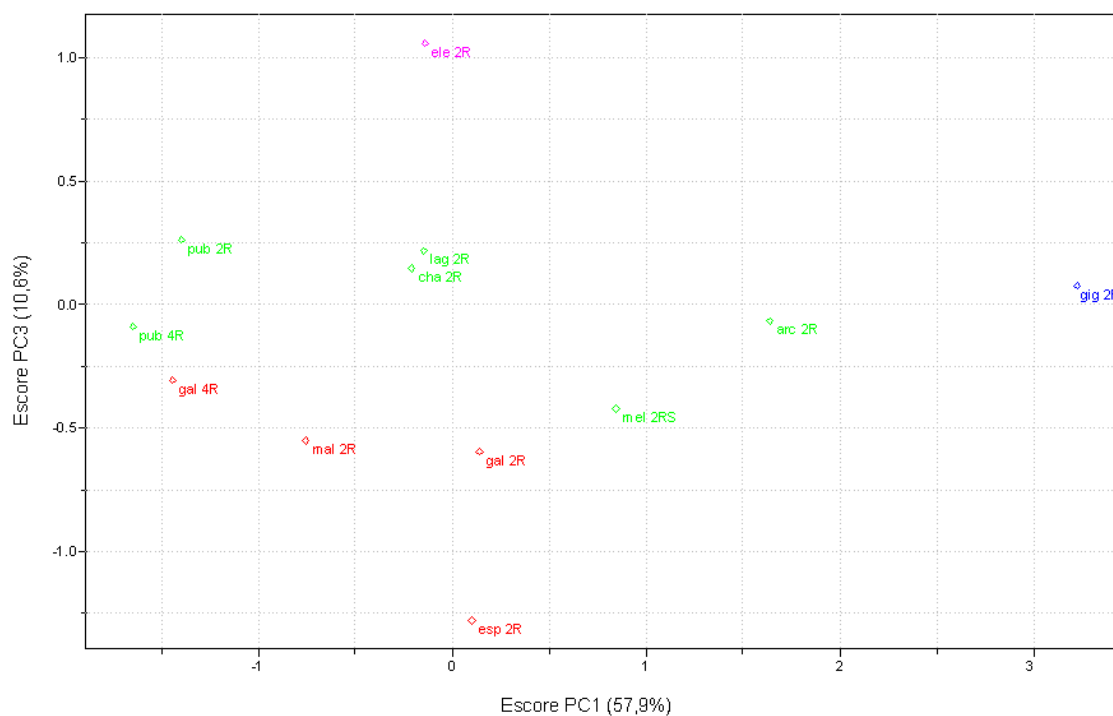


Figura 18. PCA dos constituintes químicos dos óleos essenciais das raízes de espécies de *Aristolochia*. PC1 e PC3 contêm aproximadamente 68,5% de informação.

* As abreviações são apresentadas na Tabela 3.

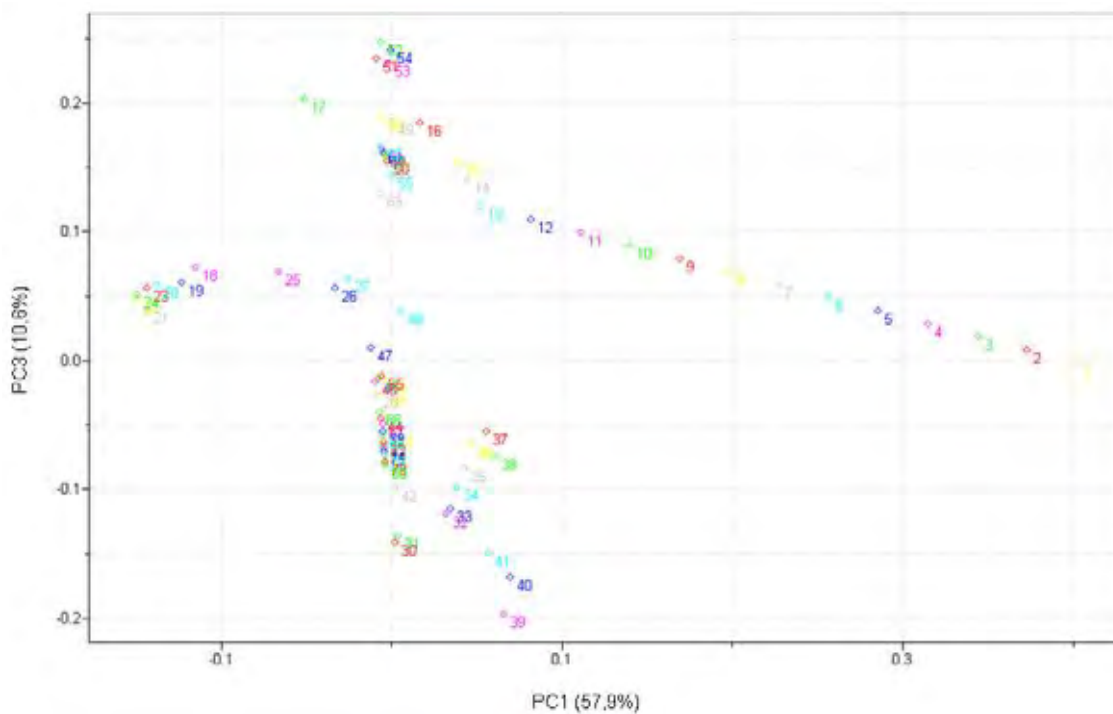


Figura 19. Gráfico dos “loadings” de PC1 e PC3 obtidos dos óleos essenciais das raízes de espécies de *Aristolochia*.

* Os números correspondem aos compostos apresentados na Tabela 4.

II.1.2 Análise da procedência de espécimes de *Aristolochia giberti*

O objetivo deste estudo foi a investigação da composição química dos óleos essenciais de caules e folhas de *A. giberti* cultivada no Brasil e correlacionar a composição química desta com daquelas relatadas na literatura para plantas coletadas na Argentina e no Paraguai,^{34, 35} empregando-se CG-EM e quimiometria como ferramentas analíticas para a identificação de plantas e se possível diferenciar a procedência dos óleos.

A variação na constituição química dos óleos essenciais foi examinada levando-se em conta a parte da planta, o ano em que a coleta foi realizada e a procedência. Nesta análise, foram obtidos e identificados os óleos de caules e folhas de plantas coletadas no Brasil (material fresco) (Voucher nº ESA88888), e também utilizou-se os dados descritos na literatura para *A. giberti* da Argentina (material fresco), envolvendo 36 compostos (um não conhecido)³⁴ e do Paraguai (material seco), envolvendo 46 compostos (Tabelas 5 e 6).³⁵

Tabela 5. Lista dos óleos investigados de *A. giberti* com localização, abreviação e data da coleta

Código^a	Parte da planta	Localidade	Data
SA-1	caules	Argentina	Julho, 1994
SA-2	caules	Argentina	Julho, 1996
SA-3	caules	Argentina	Junho, 1997
SA-4	caules	Argentina	Julho, 1999
SB	caules	Brasil	Fevereiro, 2004
SP	caules	Paraguai	Dezembro, 2000
LA-1	folhas	Argentina	Maio, 1994
LA-2	folhas	Argentina	Junho, 1994
LB	folhas	Brasil	Fevereiro, 2004
LP	folhas	Paraguai	Dezembro, 2000

^a Código: parte da planta (caule e folha), país e ano.

Tabela 6. Composição química dos óleos essenciais de *A. giberti* do Brasil, Argentina e Paraguai

I	Composto	Espécie (código)																			
		SB	LB	LA-1	LA-2	SA-1	SA-2	SA-3	SA-4	LP	SP										
922	α -Tujeno	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
927	Triciclono	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
934	α -Pinenno	2,9	-	-	-	3,3	-	-	-	1,9	-	2,9	-	2,9	0,2	-	-	-	-	-	5,2
948	Canfeno	-	-	-	-	0,7	-	-	-	0,6	-	0,7	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-
953	Sabineno	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
973	β -Pinenno	0,7	-	-	-	0,9	-	-	-	0,4	-	0,7	-	0,8	-	-	-	-	-	-	1,4
984	β -Mirceno	6,5	-	-	-	0,1	-	-	-	0,9	-	1,3	-	1,2	-	-	-	-	-	-	0,9
996	δ -2-Careno	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1006	δ -3-Careno	4,5	-	-	-	0,8	-	-	-	1,0	-	0,8	-	0,7	-	-	-	-	-	-	0,8
1013	α -Felandreno	25,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1014	<i>o</i> -Cimeno	20,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1023	<i>p</i> -Cimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1023	Limoneno	15,1	-	0,4	1,2	53,3	-	-	-	38,5	-	56,8	-	54,3	0,4	-	-	-	-	-	11,1
a	β -Felandreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
1030	<i>cis</i> -Ocimeno	2,0	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1041	<i>trans</i> -Ocimeno	-	-	0,1	0,2	0,7	-	-	-	1,3	-	0,8	-	0,5	-	-	-	-	-	-	0,8
1082	Terpinoleno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
1087	β -Linalool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1
1136	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,7	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-
1151	Borneol	-	-	0,1	0,1	0,4	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,3	-	-	-	-	-	-	0,3
1170	Carvomentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1184	4(10)-Tujen-3-ol	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1218	Formato de isobornilla	-	-	-	-	0,5	-	-	-	0,6	-	0,9	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-
1290	Acetato de bornilla	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1340	δ -Elemeno	-	-	1,0	1,1	0,4	-	-	-	0,3	-	0,2	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
1380	α -Copaeno	-	-	0,4	0,3	0,3	-	-	-	0,8	-	0,2	-	0,3	0,4	-	-	-	-	-	0,4
1387	β -Bourboneno	-	-	0,5	0,5	0,4	-	-	-	0,8	-	0,3	-	0,4	0,8	-	-	-	-	-	0,7
1391	β -Elemeno	-	1,3	2,5	2,7	1,7	-	-	-	2,8	-	1,8	-	1,5	2,1	-	-	-	-	-	-
1407	Isocariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0
1415	β -Cariofileno	3,6	15,9	2,3	2,2	2,4	-	-	-	3,7	-	3,0	-	2,7	3,4	-	-	-	-	-	2,9
1440	β -Gurjuneno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	0,9

1660	66	τ -Muurolool	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	
1674	67	Bulnesol	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	
2068	68	Aristolactona	-	7,7	9,9	3,2	1,6	2,2	5,8	-	-	
		Total (%)	100,1	100,2	77,8	80,3	87,3	90,0	92,7	93,0	81,2	80,5

Terpenóides

Monoterpenos	78,3	-	0,5	1,4	60,2	45,6	64,3	61,2	0,6	21,1
Monoterpenos oxigenados	1,2	-	0,1	0,1	1,0	0,8	1,0	1,0	-	1,4
Sesquiterpenos	10,3	84,7	62,1	56,1	19,0	38,2	22,1	21,5	58,6	35,6
Sesquiterpenos oxigenados	10,3	15,5	15,1	22,7	6,4	4,9	4,6	8,6	22,0	22,4

Aromáticos

Outros/não identificados	-	-	-	-	0,7	0,5	0,7	0,7	-	-	-
---------------------------------	---	---	---	---	-----	-----	-----	-----	---	---	---

^a Dado não disponível.

HCA (Hierarchical Cluster Analysis) foi utilizado para tentar classificar as amostras pelas diferentes partes da planta e procedência. O dendograma obtido (Figura 20) forneceu um grau de similaridade dentre a composição química dos óleos e, de acordo com este dendograma, os óleos puderam ser separados em três grupos distintos. O primeiro e o segundo grupos (I e II) consistem dos dados dos óleos de caules e folhas, respectivamente, obtidos no Brasil e Argentina, e o terceiro grupo (III) consistem dos óleos de caules e folhas do Paraguai. Ainda neste dendograma pode-se observar que amostras de óleos essenciais de plantas (caules e folhas de espécies da Argentina) coletadas em diferentes anos, possuem um mesmo perfil químico, o que sugere a retenção da constituição química em diferentes populações.⁵⁸

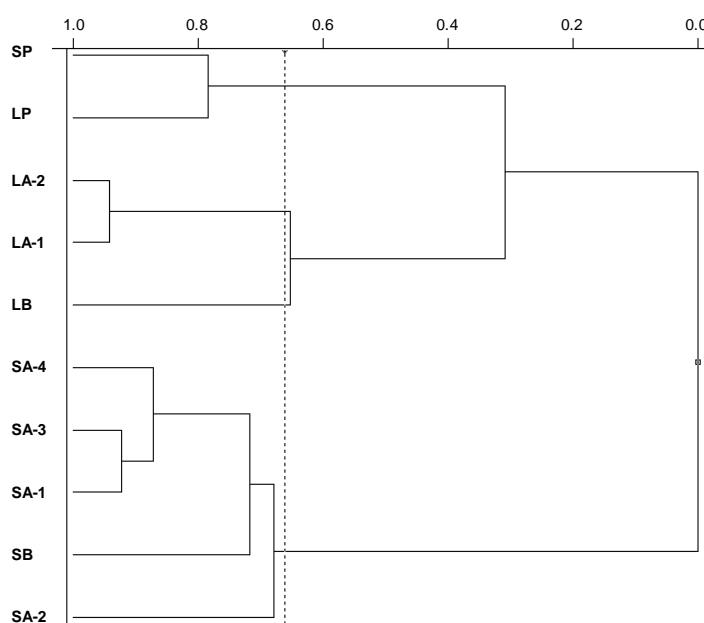


Figura 20. Dendograma obtido da análise de HCA dos óleos essenciais de *A. giberti* de diferentes países.

* As abreviações são apresentadas na Tabela 5.

Similarmente, uma análise dos dados dos óleos essenciais por PCA foi realizada para obter informações sobre quais compostos seriam mais discriminantes para a classificação das amostras (Figuras 21 e 22). Com essa ferramenta estatística, pode-se comprovar a divisão dos espécimes nos mesmos três grupos já apresentados no HCA, e que o grupo I (caules de espécies do Brasil e Argentina) é caracterizado por monoterpenos, o grupo II (folhas de espécies do Brasil e Argentina) por sesquiterpenos oxigenados. Os óleos do Paraguai (folhas e caules) foram caracterizados por sesquiterpenos. Os gráficos (Figuras 21 e 22) também

comprovam a similaridade entre os óleos do Brasil e da Argentina, e que os melhores resultados são obtidos quando se utiliza o material vegetal fresco e com um tempo de extração de duas horas.

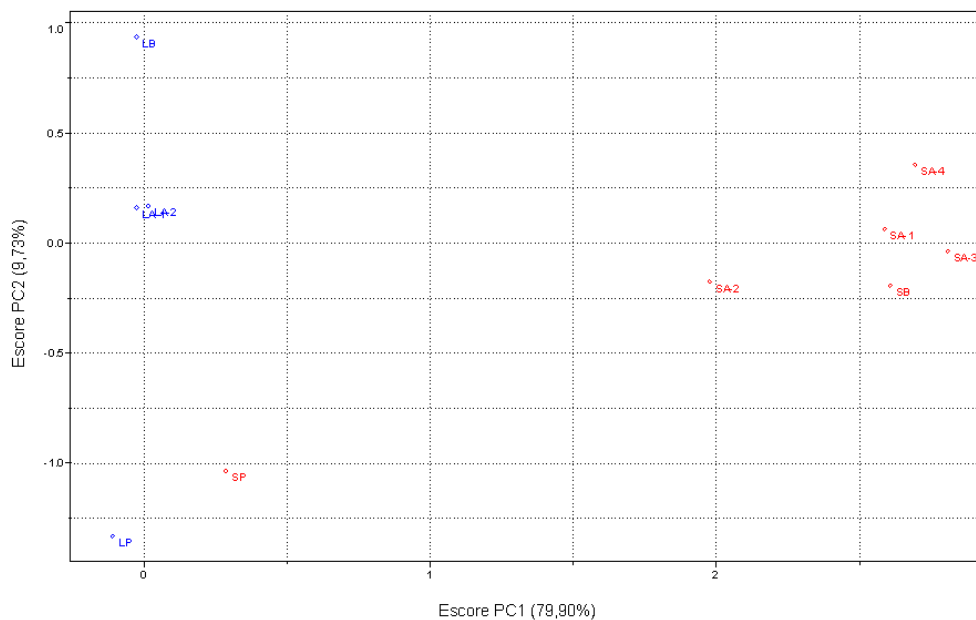


Figura 21. PCA dos constituintes químicos dos óleos essenciais de caules e folhas da espécie *A. giberti*. PC1 e PC2 contêm aproximadamente 89,6% de informação.
* As abreviações são apresentadas na Tabela 5.

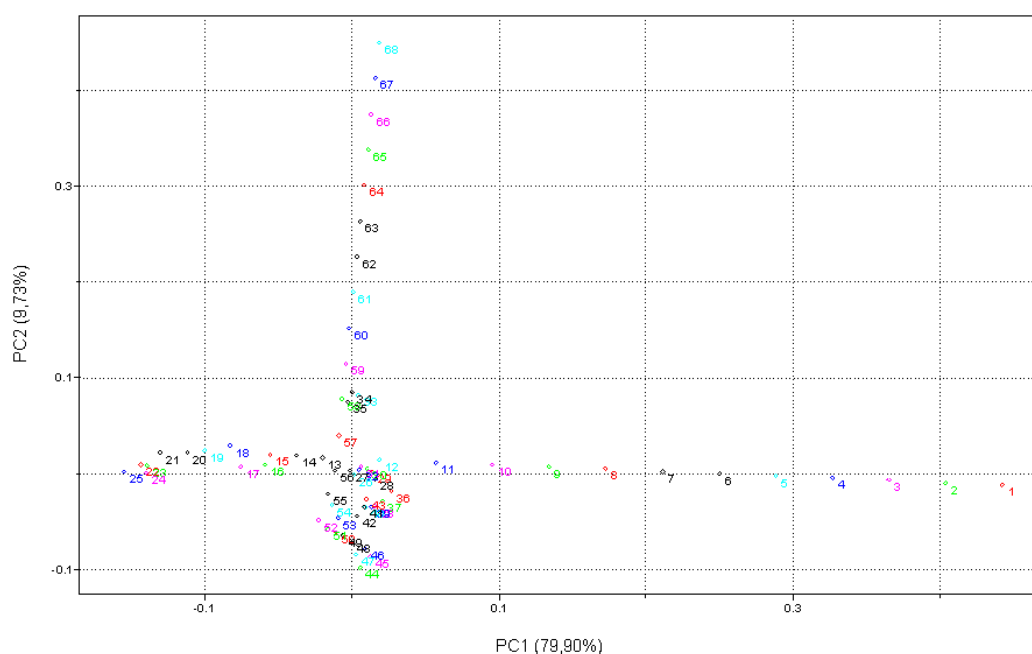


Figura 22. Gráfico de “loadings” de PC1 e PC2 obtidos dos óleos essenciais de caules e folhas de *A. giberti*.

* Os números correspondem aos compostos apresentados na Tabela 6.

II.2 PARTE EXPERIMENTAL – Análise dos óleos essenciais

II.2.1 Coleta e identificação de material vegetal

Todas as plantas (Tabelas 3 e 5) foram coletadas no estágio de floração. Uma excisada de cada planta foi identificada pelo Prof. Dr. Lindolpho Capellari Jr. (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba – SP), e todas encontram-se depositadas no herbário da ESALQ.

II.2.2 Análise dos óleos essenciais^{18, 58}

As diferentes partes de cada espécime (30 g) foram cortadas em pequenos pedaços e armazenadas a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em 250 ml de H_2O com diferentes tempos de extração em um aparelho modificado de Clevenger. Os óleos foram coletados com a adição de 1 ml de *n*-Hexano grau CG e secos com Na_2SO_4 anidro e peneira molecular. A composição destes óleos foi estabelecida pela análise dos cromatogramas e espectros de massas obtidos por CG-EM.

A identificação dos constituintes químicos foi baseada no índice de retenção linear (*I*), calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos,⁵⁹ e por comparação dos espectros de massas com dados disponíveis em bibliotecas como Wiley and NBS Libraries,⁶⁰ bem como os dados publicados por Adams (1995).⁶¹ Em alguns casos, os óleos essenciais foram coinjetados com compostos previamente isolados destas espécies ou comprados como padrões.

II.2.3 Análise quimiométrica^{18, 58}

PCA (Principal Component Analysis) e o HCA (Hierarchical Cluster Analysis) foram utilizados como métodos estatísticos para analisar as variáveis. O programa estatístico utilizado foi o Pirouette® version 3.11.⁶²

No primeiro estudo, foram utilizadas dez espécies de *Aristolochia*, e analisou-se 80 características (compostos químicos, dos quais, 75 foram identificados) (Tabela 4). Numa segunda etapa, estudou-se os dados obtidos dos óleos essenciais da espécie *A. giberti* e os dados encontrados na literatura para essa espécie, e

assim, foram analisadas 68 características (compostos químicos, sendo 67 identificados) (Tabela 6).

CAPÍTULO III – OBTENÇÃO DE LIGNANAS ARILTETRALÔNICAS

III.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Estudo de *Holostylis reniformis*

O estudo fitoquímico da espécie *H. reniformis* foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes e colaboração dos pesquisadores Dr. Joseph Oluwatope Adebayo, Kelly Francisco da Cunha e Michele de Lima Souza.

Considerando que lignanas isoladas de *H. reniformis* apresentam significativa atividade antiplasmódica,⁷ uma nova etapa de fracionamento de um extrato desta espécie foi realizada, com o objetivo de obter massa maior destas lignanas purificadas, as quais serão objetos de bioensaios e de transformações químicas, que auxiliarão nos estudos que relacionam a estrutura molecular com a atividade biológica.

III.1.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *H. reniformis*

As estruturas das substâncias isoladas (Figura 23) foram determinadas utilizando-se técnicas espectrométricas e dados físicos: Ressonância Magnética Nuclear unidimensional (¹H e ¹³C) e bidimensional (¹H-¹H gCOSY, gHMQC e gHMBC); rotação específica [α]_D e intervalo de ponto de fusão (p.f.).

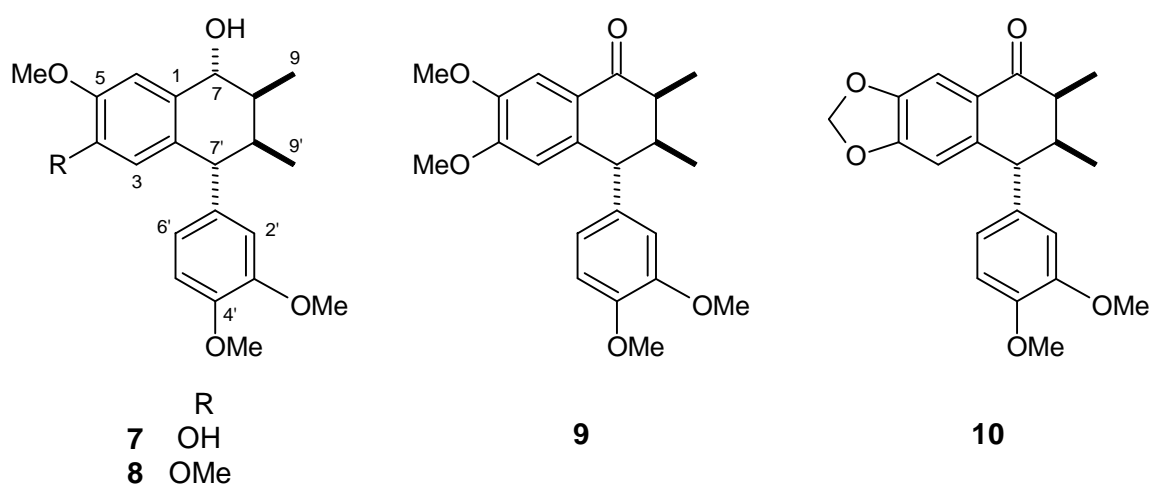


Figura 23. Substâncias isoladas de *H. reniformis*.

III.1.1.1 *rel.* (7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-4-Hidroxi-3',4',5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol (**7**)

A substância **7** foi isolada como um óleo amarelo e o seu espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24) apresenta sinais referentes a 21 carbonos. Destes destacam-se os sinais em δ 74,2 (C-7) atribuído a um carbono carbinólico benzílico, δ 48,7 (C-7'), 39,4 (C-8) e 35,1 (C-8') correspondentes a três carbonos metínicos, além de doze sinais de carbonos aromáticos entre δ 111,0-149,0. Observa-se ainda neste espectro sinais de deslocamentos químicos referentes a três grupos metoxílicos ligados a carbonos aromáticos em δ ~55,9.

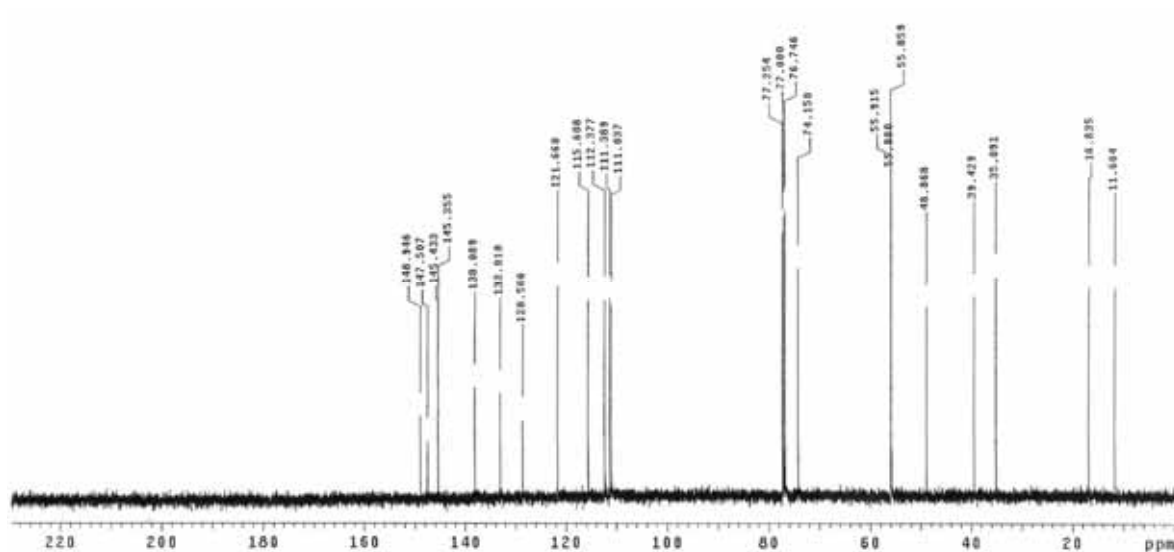


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C de **7** (CDCl_3 , 125 MHz).

O espectro de RMN de ^1H de **7** (Figura 25) é caracterizado pela presença de sinais de grupos metílicos em δ 0,81 (3H-9') e 0,83 (3H-9), sinais de hidrogênios alifáticos entre δ 3,40 e 1,98, sinais referentes a cinco hidrogênios aromáticos entre δ 6,80 e 6,25 e um hidrogênio carbinólico em δ 4,38. Observam-se ainda neste espectro sinais referentes a hidrogênios metoxílicos em δ 3,73 (OMe-3'), 3,81 (OMe-4') e 3,81 (OMe-5), e um sinal em δ 5,49 atribuído a um hidrogênio hidroxílico. Os dados obtidos da análise das constantes de acoplamento e das multiplicidades dos hidrogênios permitiram sugerir que a substância **7** possui dois anéis aromáticos, sendo um tetra- e outro trissubstituído.

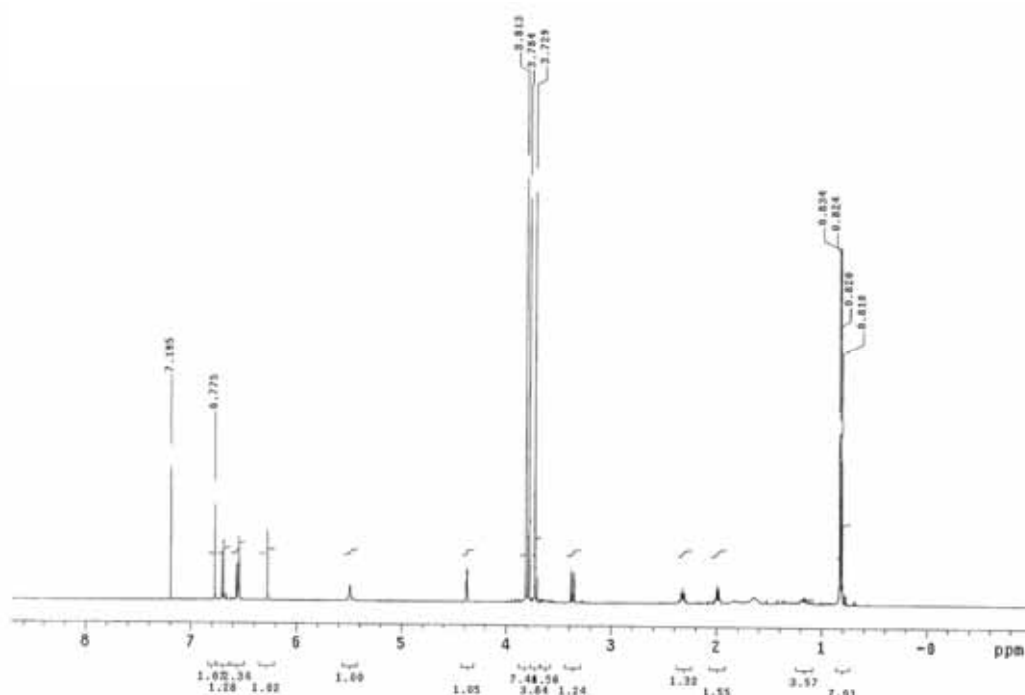


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de **7** (CDCl_3 , 500 MHz).

Pelas correlações observadas nos mapas de contornos $g\text{COSY}$, $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$ (Figuras 26-28) estabeleceu-se a constituição química de **7** como sendo de um ariltetralol.

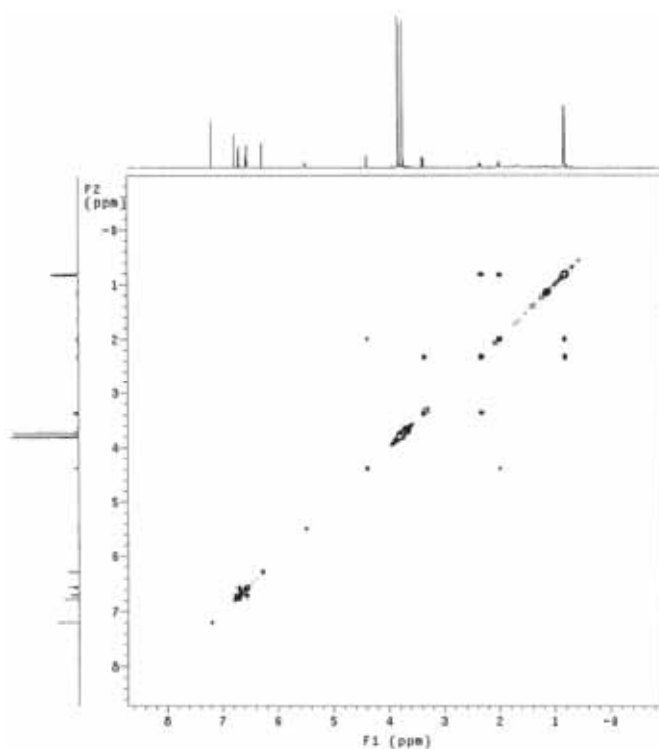


Figura 26. Mapa de contornos $g\text{COSY}$ ^1H - ^1H de **7** (CDCl_3 , 11,7 T).

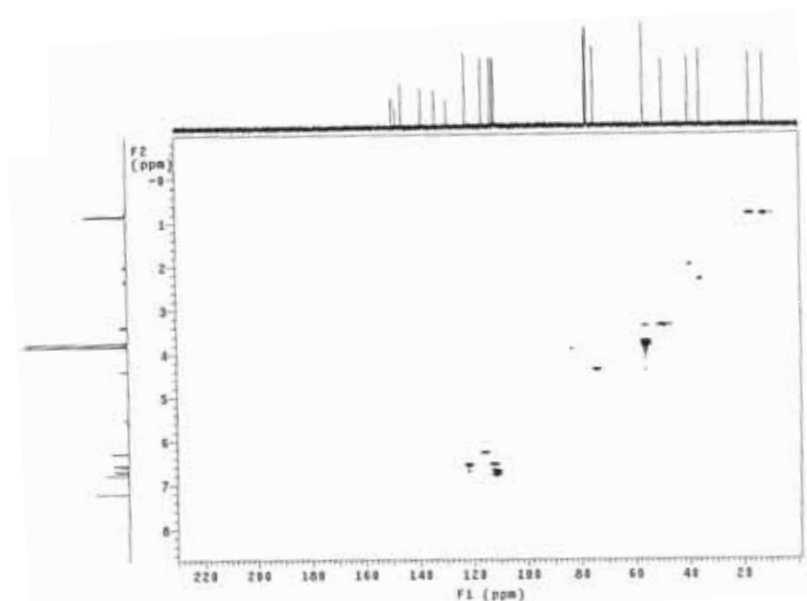


Figura 27. Mapa de contornos gHMBC de **7** (CDCl₃, 11,7 T).

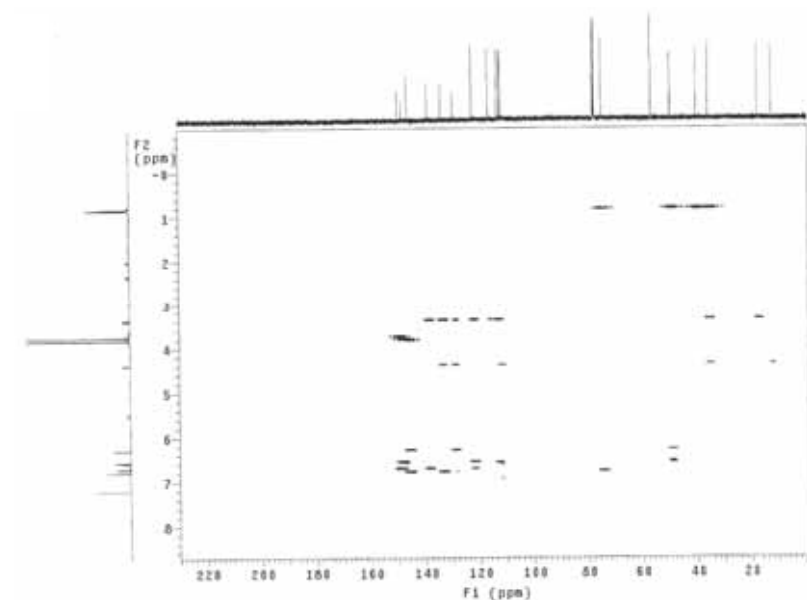


Figura 28. Mapa de contornos gHMBC de **7** (CDCl₃, 11,7 T).

As interações espaciais observadas no espectro de gNOESY (Figuras 29 e 30), os valores das constantes de acoplamento e a comparação com modelos permitiram determinar que **7** tinha uma configuração relativa (7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-4-hidróxi-3',4',5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol.

Após um levantamento bibliográfico na literatura, constatou-se que não havia descrição de substância com configuração relativa idêntica à de **7**. Portanto esta substância é inédita. A atividade óptica da substância **7** corresponde a $[\alpha]_D^{25} = -38,1^\circ$

(c 0,7, CHCl₃), o que sugere que a configuração absoluta de **7** seja a mesma da substância **8**.⁴⁰

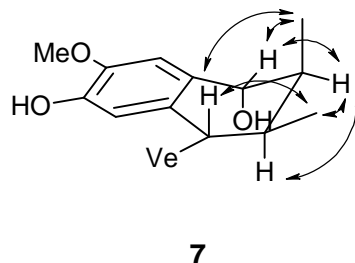


Figura 29. Principais Interações espaciais observadas no espectro gNOESY-2D de **7**.

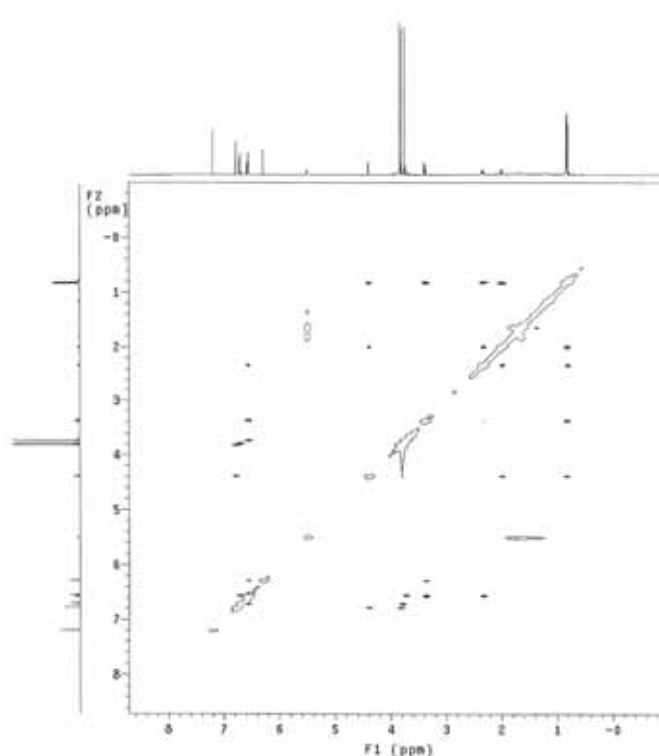


Figura 30. Mapa de contornos gNOESY de **7** (CDCl₃, 11,7 T).

III.1.1.2 Identificação das lignanas **8-10**

A substância **8** foi isolada como um óleo amarelo com $[\alpha]_D^{25} = -33,3^\circ$ (c 0,5, CHCl₃) {lit. $[\alpha]_D^{25} = -36,0^\circ$ (c 0,83, CHCl₃)}.⁴⁰ Os seus espectros de RMN de ¹H (Figura 31) e ¹³C são semelhantes aos da substância **7**, tendo como principal diferença a presença de quatro metoxilas δ_H 3,57, 3,75, 3,82 e 3,84 e δ_C 55,8, 2 × 55,9 e 56,0 (OMe-3',4',4,5) ao invés de três como em **7**, bem como a ausência do singlete referente ao grupamento OH.

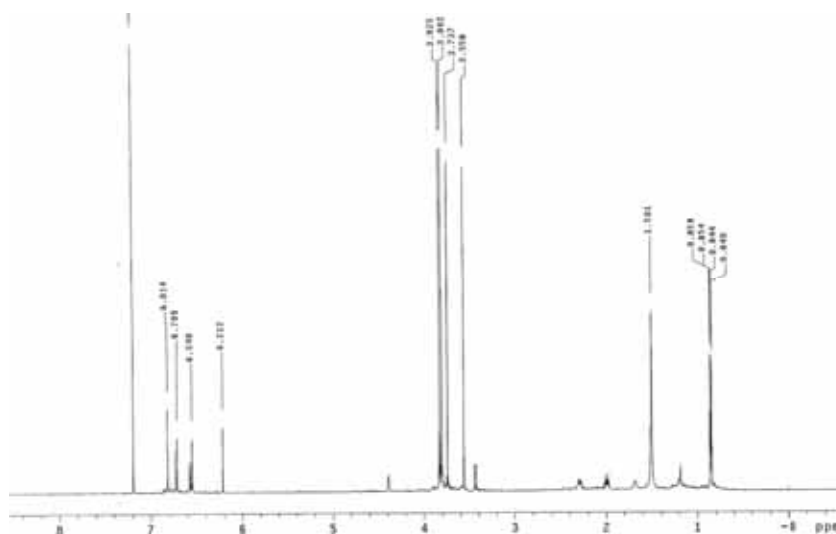


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H de **8** (CDCl_3 , 500 MHz).

A análise conjunta dos dados espectrométricos e a comparação com a literatura,⁴⁰ permitiu determinar **8** como sendo a lignana ariltetralol ($7R,7'R,8S,8'S$)-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol.

A substância **9** foi isolada como cristais brancos com $[\alpha]_D^{25} = -58,1^\circ$ (c 0,8, CHCl_3) {lit. $[\alpha]_D^{25} = -64,3^\circ$ (c 1,04, CHCl_3)},⁶³ e o seu espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais referentes a 21 carbonos. Neste espectro observa-se a ausência do sinal em $\delta \sim 74,0$ característico de carbonos carbinólicos benzílicos em ariltetralóis. Contudo, observa-se a presença de um sinal em $\delta \sim 200,0$ característico de um carbono carbonílico conjugado com um anel aromático. A presença de um carbono carbonílico na estrutura também é evidenciada no espectro de RMN de ^1H (Figura 32), onde o hidrogênio aromático H-6 absorve em $\delta \sim 7,50$, devido à desproteção causada pelo efeito de ressonância com uma carbonila.

A comparação destes dados com os da literatura mostrou que a substância **9** era idêntica a lignana ariltetralônica ($7'R,8S,8'S$)-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona.

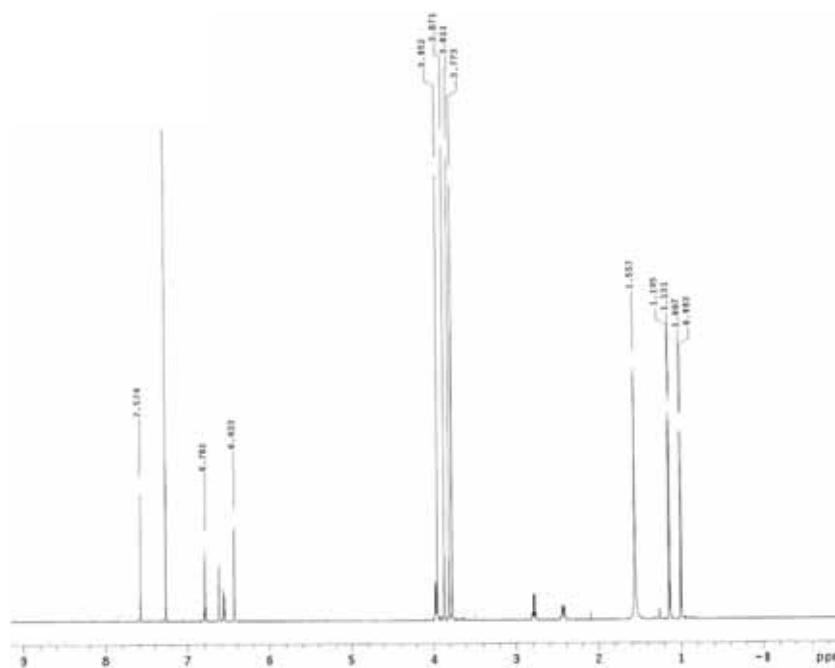


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H de **9** (CDCl_3 , 500 MHz).

A substância **10** foi isolada como um sólido amorfo com $[\alpha]_D^{25} = -42,3^\circ$ (c 0,5, CHCl_3) {lit. $[\alpha]_D^{25} = -47,1^\circ$ (c 1,0, CHCl_3)}.⁶³

A principal diferença entre os espectros de RMN de ^1H (Figura 33) e ^{13}C da substância **10** com os dados de **9** é a ausência de dois grupamentos metoxílicos ($\delta_{\text{H}} \sim 3,80$ e $\delta_{\text{C}} 56,0$) e a presença de sinais em $\delta_{\text{H}} \sim 5,90$ e $\delta_{\text{C}} 100,0$, referentes a um grupo metilenodióxido aromático. A posição deste grupo foi estabelecida com o auxílio de experimentos de RMN uni- e bidimensionais e comparação dos dados obtidos com aqueles da literatura.⁶³ Com isso, estabeleceu-se que **10** era idêntica a lignana ariltetralônica ($7'R,8S,8'S$)-3',4'-dimetoxi-4,5-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona.

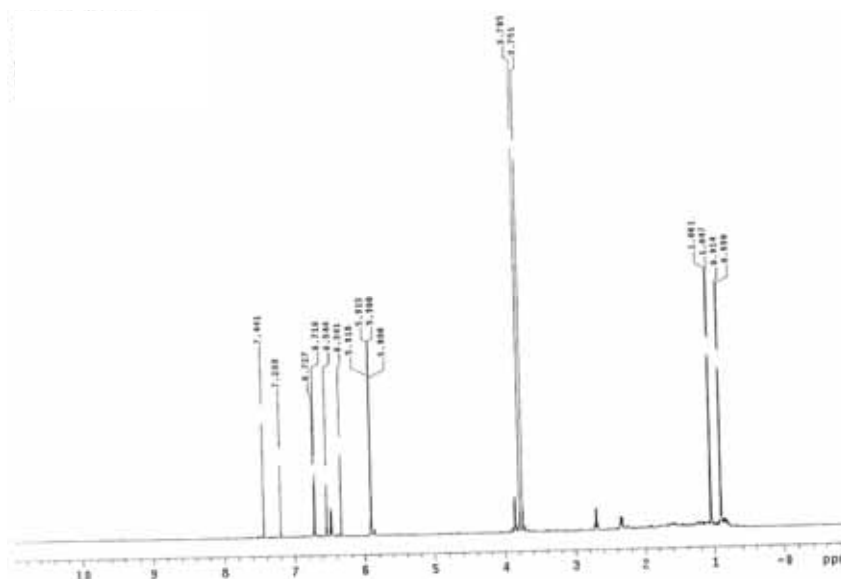


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de **10** (CDCl_3 , 500 MHz).

III.2 PARTE EXPERIMENTAL – Estudo de *H. reniformis*

III.2.1 Coleta e identificação de material vegetal

As plantas foram coletadas na região de Ituiutaba – MG, em março de 2008. A identificação da espécie vegetal foi feita pelo Dr. Condorcet Aranha (Secretaria do Meio Ambiente – Prefeitura de Joinville – SC) e pelo Prof. Dr. Lindolpho Capellari Jr. (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba – SP). Uma exsicata está depositada no herbário da ESALQ (voucher nº. ESA-88282).

III.2.2 Preparação dos extratos

As diferentes partes da planta (raízes, caules e folhas) foram separadas, secas ao ar e, posteriormente, em estufa a 45 °C. Após isto, fez-se a moagem mecânica do material seco (raízes) e realizou-se a extração por maceração com solventes inertes e de diferentes polaridades: hexano, acetona, etanol e etanol quente, obtendo-se quatro extratos (Tabela 7).

Tabela 7. Extratos obtidos de *H. reniformis*

Material vegetal seco	Extrato	Massa do extrato (g)
Raízes (3,7 kg)	Hexânico	150,2
	Acetônico	134,2
	Etanólico	193,0
	Etanólico-Soxhlet	274,9

A triagem dos extratos brutos de *H. reniformis* foi baseada em análises cromatográficas (CCDC), utilizando-se vários sistemas de eluentes, e em análises espectrométricas (RMN de ^1H).

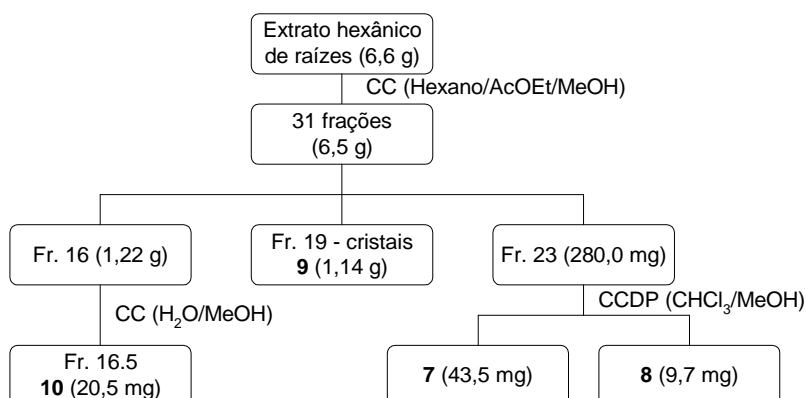
III.2.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

Visando o isolamento de maior massa de algumas substâncias para a avaliação antiplasmódica e de novas substâncias da espécie *H. reniformis*, foi escolhido para o estudo fitoquímico o extrato hexânico de raízes, por este apresentar concentração maior de lignanas que os demais, como evidenciado por análises de RMN de ^1H .

III.2.3.1 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de raízes

Uma porção do extrato (6,6 g) foi fracionada em uma CC (200 g de sílica-gel 60H, Hexano/AcOEt/MeOH em ordem crescente de polaridade) dando um total de 31 frações. Após a análise por CCDC (em diferentes eluentes) e por RMN de ^1H pode-se constatar que os cristais formados na fração 19 eram da lignana ariltetralônica **9**. A fração 16 foi submetida a uma separação por CC (60 g de sílica C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ em ordem decrescente de polaridade), o que resultou em 15 subfrações da qual foi isolada a substância **10**. A fração 23 foi separada por CCDP (sílica PF₂₅₄, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1) separando-se as substâncias **7** e **8** (Esquema 3).

Esquema 3. Fracionamento do extrato hexânico de raízes



III.2.4 Dados físicos e espectrométricos das substâncias de *H. reniformis*

rel. (7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-4-Hidroxi-3',4',5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol (7): Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} = -38,1^\circ$ (*c* 0,7, CHCl₃); EM-ESI, *m/z* 359 [M + H]⁺; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,28 (1H, *s*, H-3), 6,78 (1H, *s*, H-6), 4,38 (1H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-7), 1,99 (1H, *m*, H-8), 0,83 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-9), 6,55 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,70 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5'), 6,56 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6'), 3,36 (1H, *dl*, *J* = 9,5 Hz, H-7'), 2,32 (1H, *m*, H-8'), 0,81 (1H, *d*, *J* = 7,0 Hz, H-9'), 3,81 (3H, *s*, OMe-5), 3,73 (3H, *s*, OMe-3'), 3,81 (3H, *s*, OMe-4'), 5,49 (1H, *sl*, OH); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 128,6 (C-1), 133,0 (C-2), 115,6 (C-3), 145,3 (C-4), 145,4 (C-5), 111,4 (C-6), 74,1 (C-7), 39,4 (C-8), 11,7 (C-9), 138,1 (C-1'), 112,4 (C-2'), 148,9 (C-3'), 147,5 (C-4'), 111,0 (C-5'), 121,7 (C-6'), 48,7 (C-7'), 35,1 (C-8'), 16,8 (C-9'), 3 x 55,9 (OMe-5,3',4').

(7*R*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-3',4',4,5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol (8): Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} = -33,3^\circ$ (*c* 0,5, CHCl₃); EM-ESI, *m/z* 373 [M + H]⁺; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,22 (1H, *s*, H-3), 6,83 (1H, *s*, H-6), 4,40 (1H, *d*, *J* = 4,5 Hz, H-7), 2,00 (1H, *ddq*, *J* = 4,5, 3,1, 7,0 Hz, H-8), 0,87 (1H, *d*, *J* = 7,0 Hz, H-9), 6,56 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,73 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5'), 6,58 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6'), 3,45 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-7'), 2,30 (1H, *ddq*, *J* = 9,0, 3,1, 7,0 Hz, H-8'), 0,86 (1H, *d*, *J* = 7,0 Hz, H-9'), 3,57 (3H, *s*, OMe-4), 3,84 (3H, *s*, OMe-5), 3,75 (3H, *s*, OMe-3'), 3,82 (3H, *s*, OMe-4'); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 129,4 (C-1), 131,9 (C-2), 112,6 (C-3), 148,9 (C-4), 147,9 (C-5), 111,8 (C-6), 74,0 (C-7), 39,2 (C-8), 12,0 (C-9), 138,2 (C-1'), 112,3 (C-2'),

148,8 (C-3'), 147,5 (C-4'), 110,9 (C-5'), 121,7 (C-6'), 49,3 (C-7'), 35,9 (C-8'), 16,7 (C-9'), 55,8 (OMe-4), 55,9 (OMe-5), 56,0 (OMe-3'), 55,9 (OMe-4').

(7'R,8S,8'S)-3',4',4,5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona (9): Cristais brancos; $[\alpha]_D^{25} = -58,1^\circ$ (c 0,8, CHCl₃); EM-ESI, m/z 371 [M + H]⁺; p. f.: 129-130 °C; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,43 (1H, s, H-3), 7,57 (1H, s, H-6), 2,78 (1H, dq, $J = 7,0, 4,2$ Hz, H-8), 1,14 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-9), 6,52 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,78 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,56 (1H, dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6'), 3,97 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-7'), 2,43 (1H, ddq, $J = 7,0, 5,5, 4,2$ Hz, H-8'), 1,00 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-9'), 3,81 (3H, s, OMe-4), 3,95 (3H, s, OMe-5), 3,77 (3H, s, OMe-3'), 3,87 (3H, s, OMe-4'); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 125,6 (C-1), 138,2 (C-2), 111,9 (C-3), 153,7 (C-4), 148,2 (C-5), 108,2 (C-6), 200,0 (C-7), 42,7 (C-8), 11,9 (C-9), 136,3 (C-1'), 111,8 (C-2'), 149,1 (C-3'), 147,8 (C-4'), 111,0 (C-5'), 121,1 (C-6'), 50,3 (C-7'), 42,5 (C-8'), 15,9 (C-9'), 56,0 (OMe-4), 56,0 (OMe-5), 55,9 (OMe-3'), 55,8 (OMe-4').

(7'R,8S,8'S)-3',4'-Dimetoxi-4,5-metilenodioxo-2,7'-ciclolignan-7-ona (10): Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{25} = -42,3^\circ$ (c 0,5, CHCl₃); EM-ESI, m/z 355 [M + H]⁺; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,35 (1H, s, H-3), 7,45 (1H, s, H-6), 2,71 (1H, dq, $J = 7,0, 4,3$ Hz, H-8), 1,06 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-9), 6,55 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,72 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,49 (1H, dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6'), 3,86 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-7'), 2,35 (1H, ddq, $J = 7,0, 5,5, 4,3$ Hz, H-8'), 0,91 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-9'), 3,76 (3H, s, OMe-4), 3,80 (3H, s, OMe-5), 5,92 e 5,93 (2H, 2d, $w_{1/2} = 1,5$ Hz, OCH₂O); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 127,0 (C-1), 141,6 (C-2), 109,5 (C-3), 152,2 (C-4), 147,2 (C-5), 105,8 (C-6), 199,5 (C-7), 43,0 (C-8), 11,7 (C-9), 136,0 (C-1'), 111,9 (C-2'), 147,9 (C-3'), 149,2 (C-4'), 111,1 (C-5'), 121,1 (C-6'), 50,5 (C-7'), 42,0 (C-8'), 15,9 (C-9'), 55,9 (OMe-3'), 56,0 (OMe-4'), 101,6 (OCH₂O).

CAPÍTULO IV – Síntese de lignanas ariltetralônicas e derivados

IV.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Síntese de lignanas

As sínteses e derivatizações de lignanas ariltetralônicas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes. A avaliação da atividade antiplasmódica foi realizada no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR, FIOCRUZ/MG sob coordenação da Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettl.

Este estudo visou: a obtenção de lignanas ariltetralônicas em maior quantidade para a utilização em ensaios biológicos; o desenvolvimento de uma rota sintética mais eficiente e seletiva, e transformações químicas para o entendimento da relação entre a presença e/ou ausência de grupos funcionais e a atividade antiplasmódica já comprovada para estas lignanas ariltetralônicas obtidas de fonte natural.

IV.1.1 Elucidação estrutural dos compostos obtidos por síntese

As estruturas das substâncias sintetizadas foram elucidadas utilizando-se RMN unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional (^1H - ^1H *g*COSY, *g*HMQC, *g*HMBC e *g*NOESY).

A rota sintética **A**, utilizada neste trabalho para obtenção regioseletiva de lignanas, envolveu quatro etapas de reações, e foram realizadas por modificações nos procedimentos apresentados por Adjangba e Billet (1962) (Esquema 4),⁹ sendo que quatro lignanas ariltetralônicas diastereoisoméricas (**9p** e **17p**) foram sintetizadas (Figura 34).

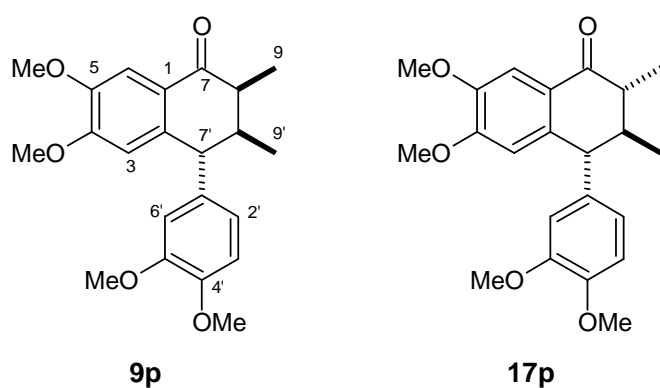
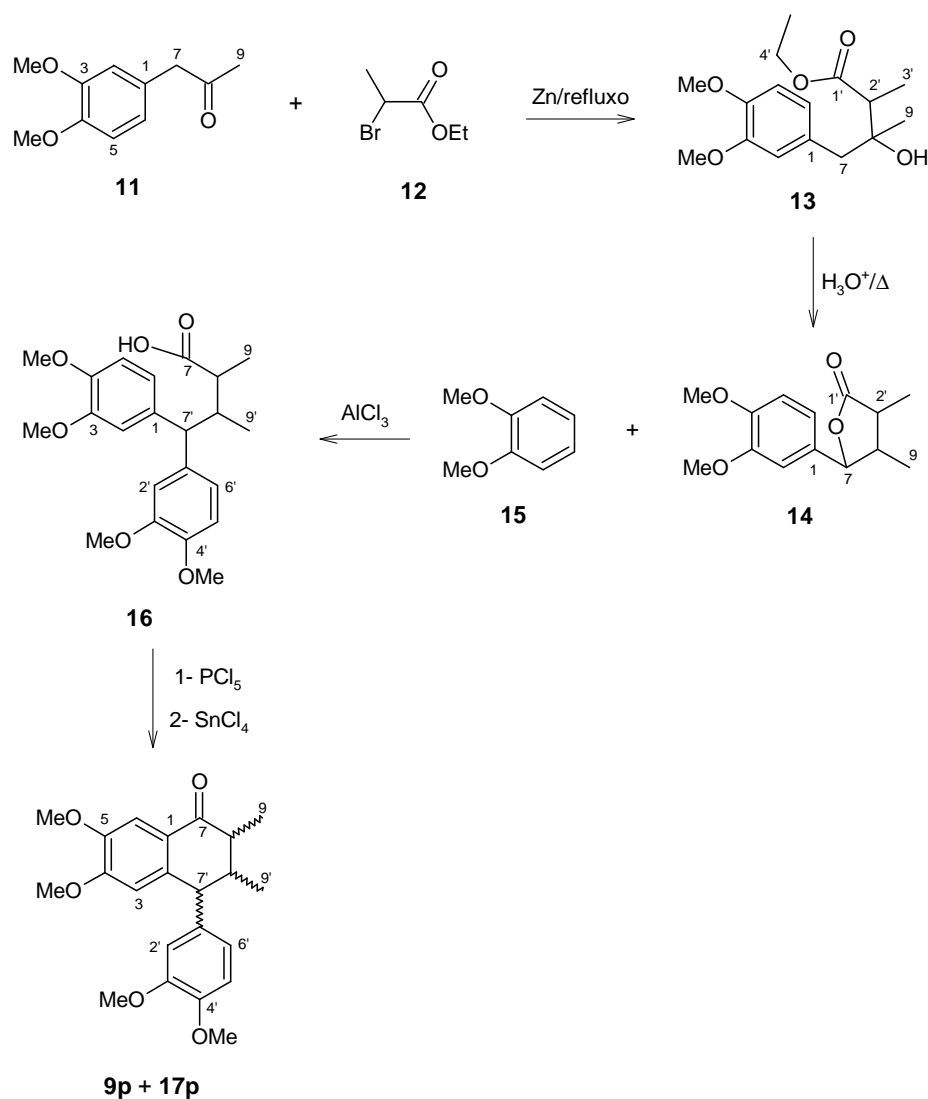


Figura 34. Estruturas das substâncias obtidas por síntese (é mostrada somente uma lignana de cada par enantiomérico).

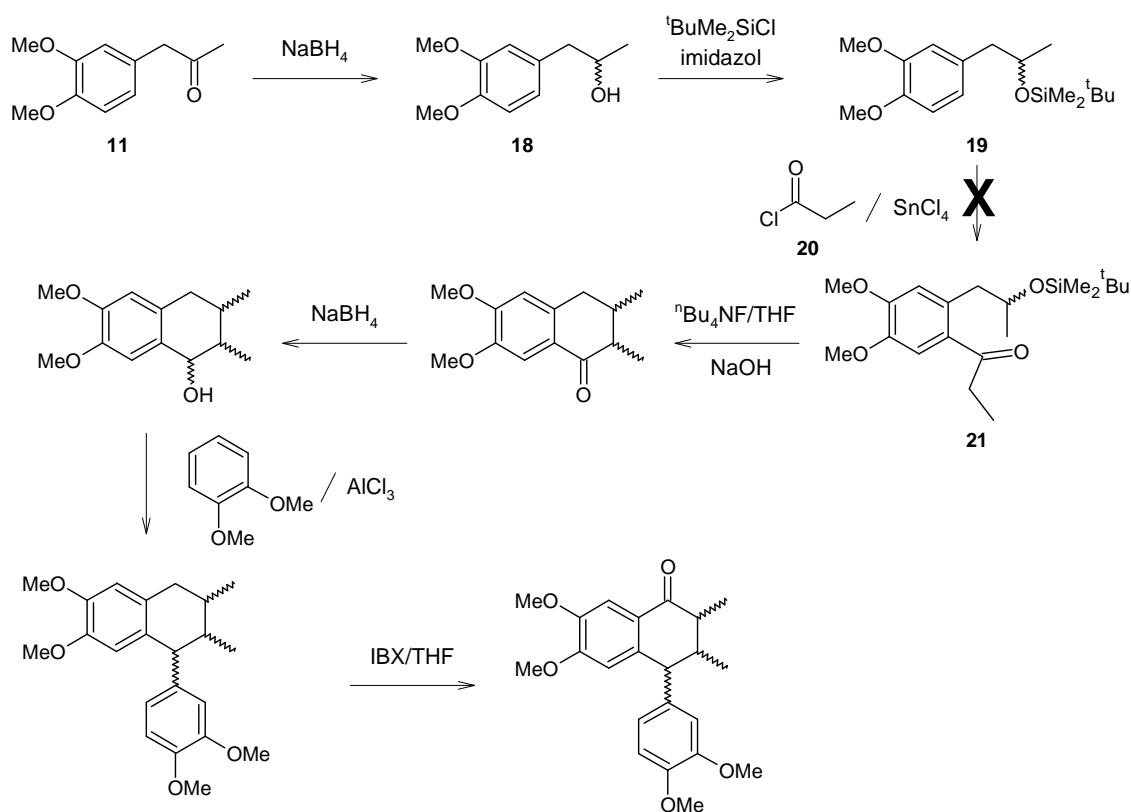
Esquema 4. Rota sintética **A** para obtenção de lignanas ariltetralônicas



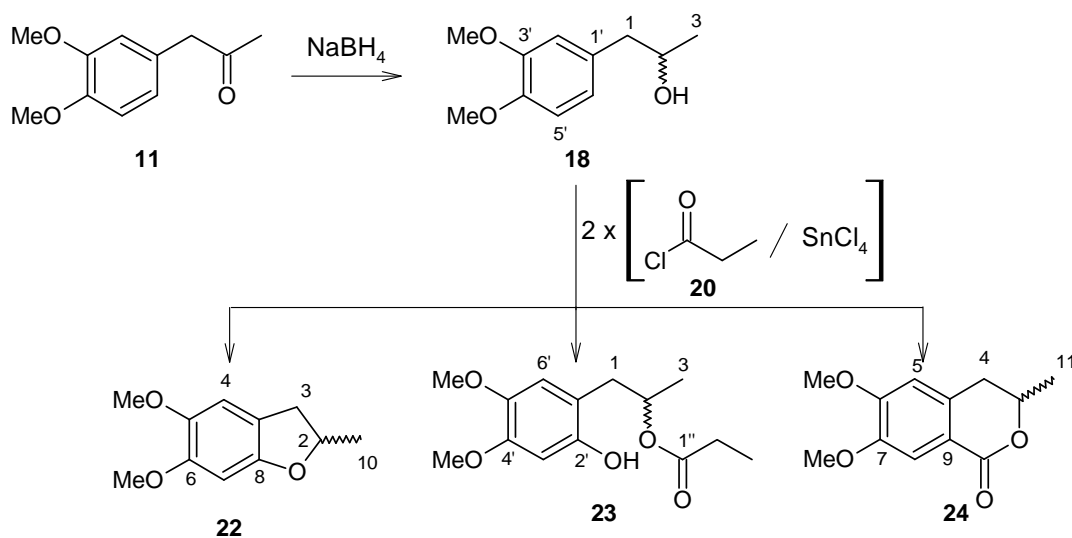
Visando obter estas lignanas com maior rendimento e facilitar os procedimentos experimentais para separação de misturas enantioméricas, propôs-

se a rota sintética **B**. Esta rota não se mostrou eficiente para a síntese de lignanas, pois o intermediário acilado desejado **21** não foi obtido, mas outros produtos foram obtidos (**18**, **19**, **22-26**). No esquema 5, está apresentada a proposta que foi desenvolvida, e nos esquemas 6-8 são mostrados os resultados obtidos das três metodologias empregadas para a obtenção do intermediário **21**.

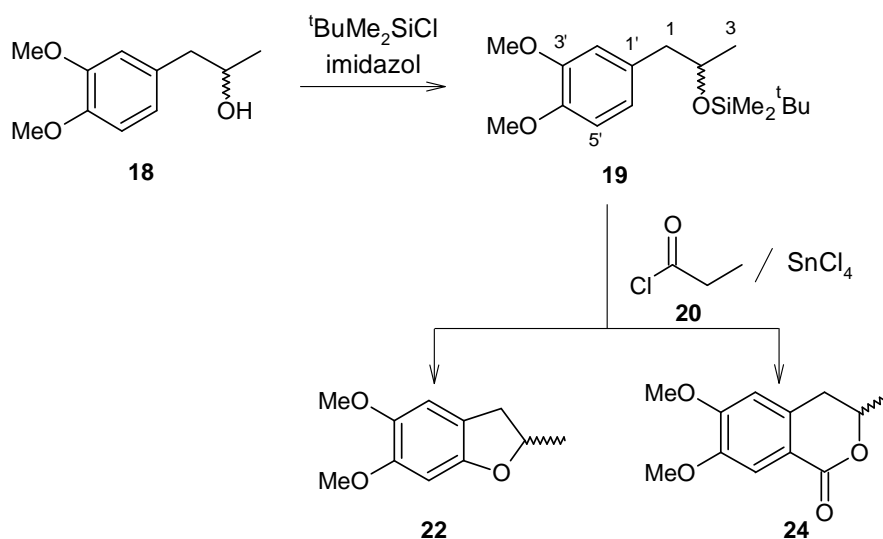
Esquema 5. Proposta sintética **B** para a obtenção de lignanas ariltetralônicas



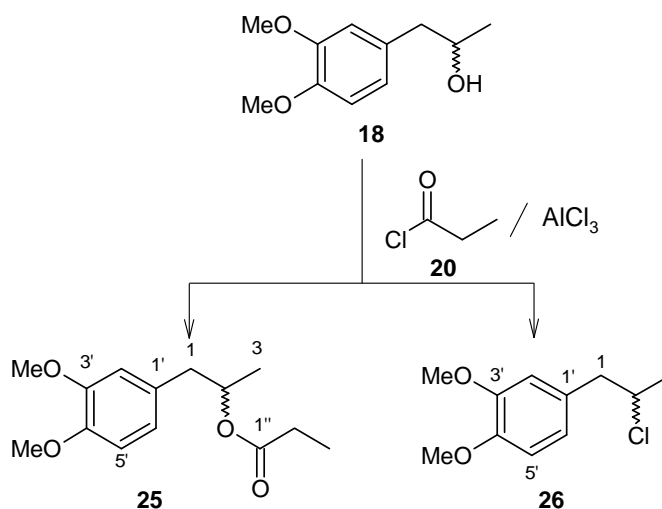
Esquema 6. Rota sintética **B** (B1 – acilação de Friedel-Crafts)



Esquema 7. Rota sintética B (B2 – acilação de Friedel-Crafts)



Esquema 8. Rota sintética B (B3 – acilação de Friedel-Crafts)



A elucidação estrutural dos produtos finais, bem como dos seus intermediários, são apresentados a seguir.

IV.1.1.1 Caracterização dos produtos e intermediários da rota sintética A

No espectro de RMN de ^1H (Figura 35) do intermediário **13** observam-se sinais duplicados, indicando a presença de duas substâncias, que é justificado pelas diferentes formas de ataque nas faces *re* ou *si* do carbono carbonílico de **11** pelo reagente **12**, gerando dois centros estereogênicos (C-8 e C-2') em **13**. São observados neste espectro, multipletos na região dos hidrogênios aromáticos (δ 6,72-6,65), atribuídos a dois anéis trissubstituídos. Na região em δ 4,10 observa-se dois quadrupletos (q , 7,0 Hz) atribuídos aos hidrogênios carbinólicos do grupo etílico.

Neste espectro observam-se ainda sinais referentes a hidrogênios metilênicos (δ 2,80-2,53), grupos metoxílicos (δ ~3,79) e sinais de hidrogênios referentes a seis grupos metílicos em δ 1,03-1,23.

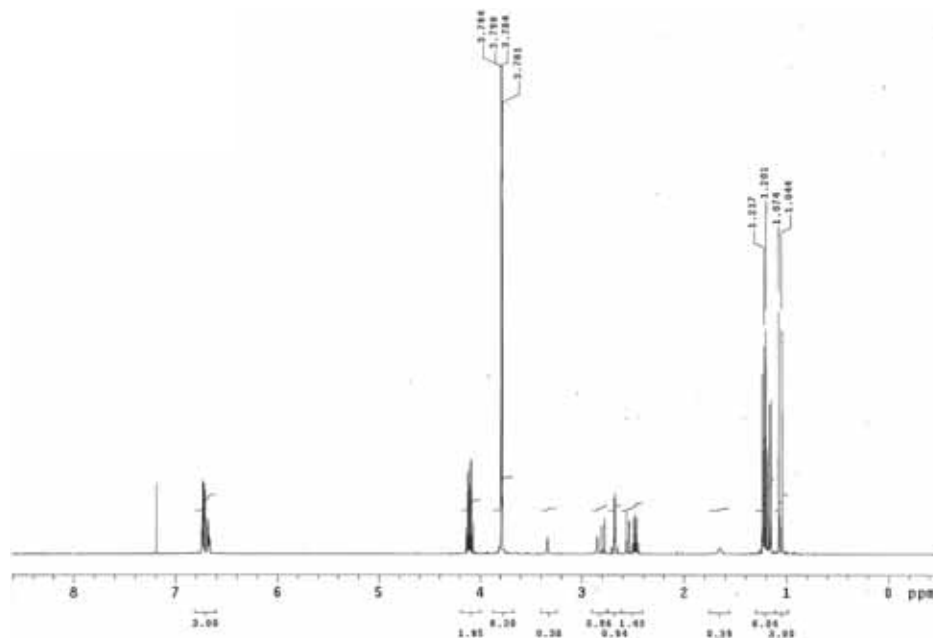


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H de **13** (CDCl₃, 500 MHz).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 36) de **14** apresenta sinais em δ 4,72 (*d*, 9,9 Hz) e 4,95 (*d*, 4,5 Hz) atribuídos a hidrogênios carbinólicos benzílicos, sinais correspondentes a quatro grupos metílicos em δ 1,25-1,00, sinais correspondentes a quatro hidrogênios metínicos em δ 2,75-1,96, além de sinais de hidrogênios aromáticos e metoxílicos, que indicaram tratar-se de uma mistura de diastereoisômeros numa proporção de 2:3, determinada pela integração obtida no espectro de RMN de ^1H .

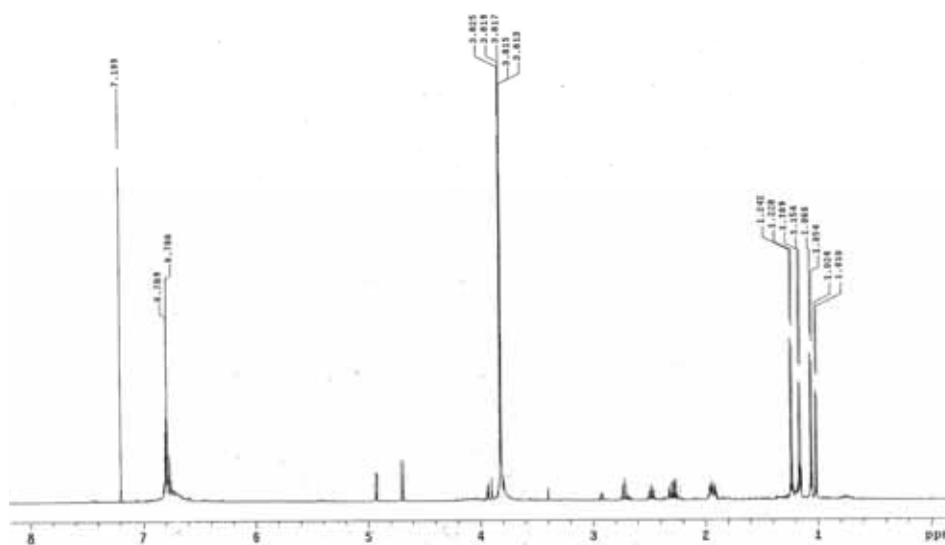


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H de **14** (CDCl_3 , 500 MHz).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 37) de **16** apresenta sinais de hidrogênios aromáticos entre δ 6,86-6,70, de hidrogênios metoxílicos em δ 3,80-3,74 e metínicos em δ 2,95-2,30, além de hidrogênios metílicos em δ 1,12-0,73. A presença de sinais duplicados de hidrogênios benzílicos em δ 3,93 e 3,42 evidencia que **16** é uma mistura diastereoisomérica.

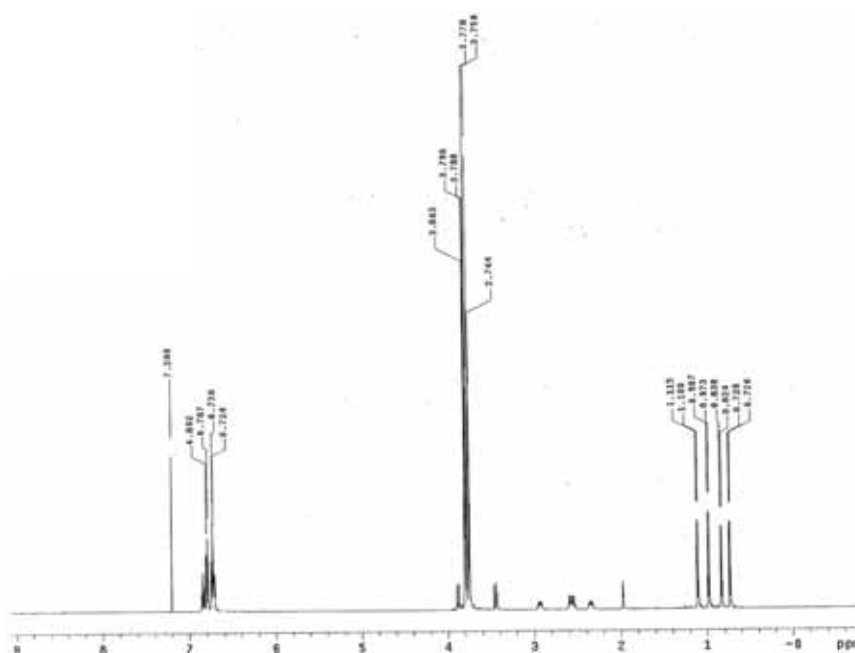


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H de **16** (CDCl_3 , 500 MHz).

Após a separação por CLAE (Figura 38), o produto **9p**, juntamente com seu enantiômero, foi isolado como um precipitado branco e o seu espectro de RMN de ^1H é idêntico ao do padrão natural **9** isolado previamente de *H. reniformis* (Figura 32).

O produto **17p** foi isolado como um óleo amarelo. Como a única diferença entre as estruturas de **9p** e de **17p** é a configuração do centro estereogênico 8, o espectro de RMN de ^1H (Figura 39) da substância **17p** é muito parecido com o da substância **9p**, tendo como principal diferença os valores de deslocamentos químicos correspondentes aos hidrogênios H-8 e H-8' (δ 2,31 e 2,00, respectivamente).

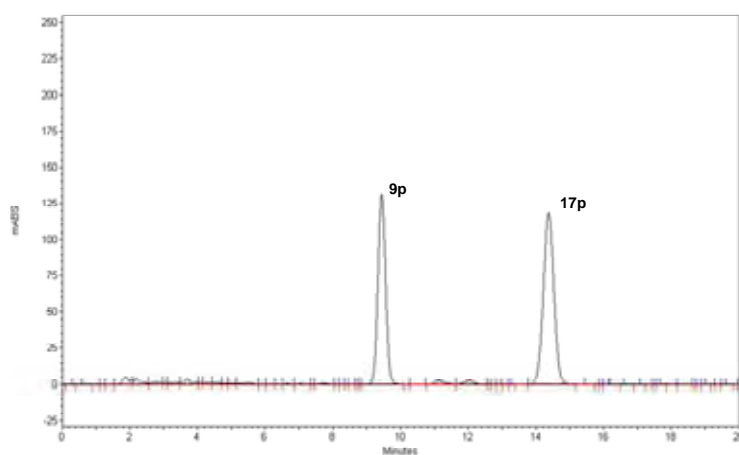


Figura 38. Cromatograma do produto final obtido na síntese (**9p** + **17p**).

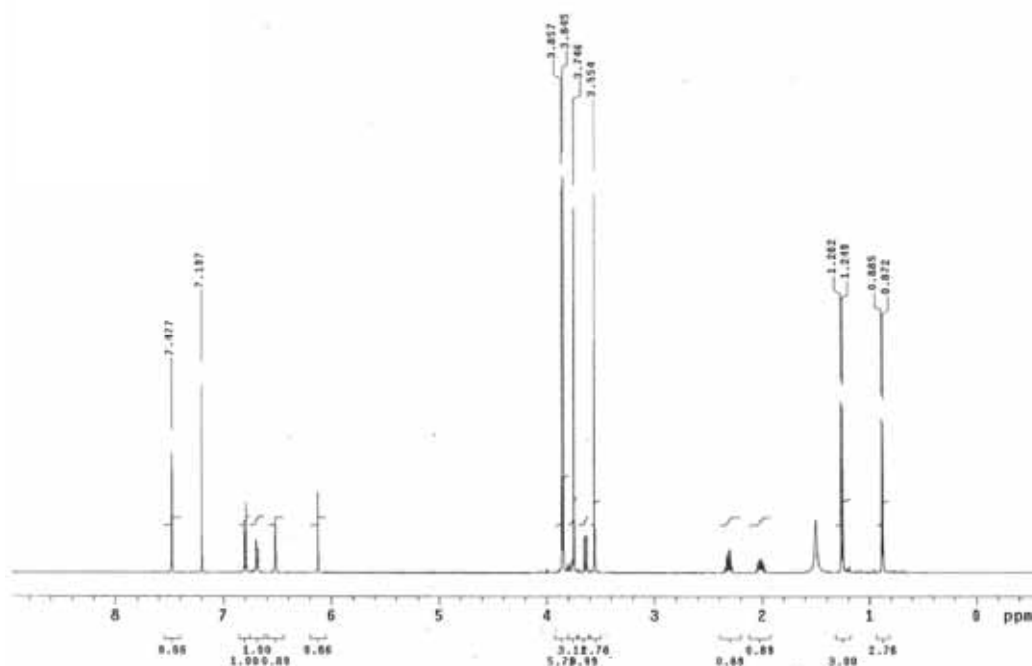


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H de **17p** (CDCl_3 , 500 MHz).

Pelo uso de CLAE empregando-se colunas quirálicas constatou-se que o produto **17p** é constituído por dois enantiômeros (Figura 40).

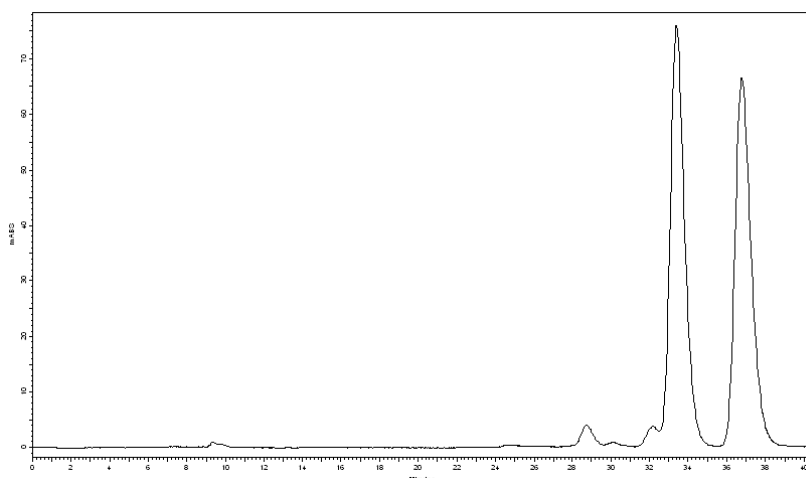


Figura 40. Cromatograma do produto **17p** (separação dos enantiômeros).
* **17p** com pequena contaminação de **9p**.

IV.1.1.2 Caracterização dos intermediários e produtos da rota sintética B

O espectro de RMN de ^1H (Figura 41) do intermediário **18** indica que a redução da carbonila de **11** ocorreu, pois agora tem-se a presença de sinais referentes a um hidrogênio carbinólico em δ 3,98 (H-2), além da mudança dos deslocamentos químicos e das multiplicidade dos hidrogênios vizinhos a este (H-1 e H-3).

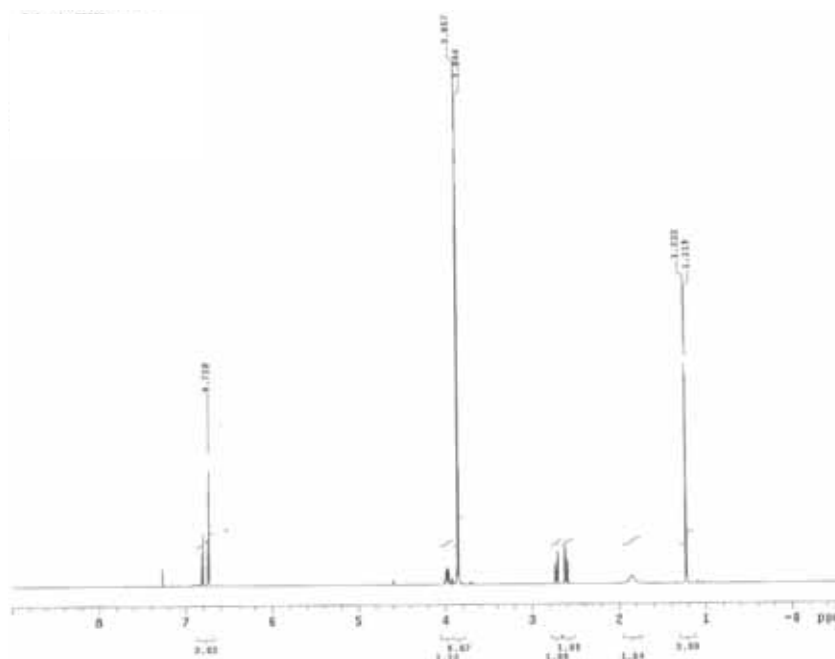


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H de **18** (CDCl_3 , 500 MHz).

Após a tentativa de acilação do anel aromático de **18** (B-1), notou-se a formação dos produtos **22-24**. O espectro de RMN de ^1H (Figura 42) do produto **22** apresentou somente dois singletos decorrentes do sistema aromático (δ 6,48 e 6,47) o que indicou uma ciclização envolvendo a cadeia lateral e que a posição destes hidrogênios poderia ser *para* um em relação ao outro. A estrutura deste novo benzofurano foi confirmada pelos experimentos RMN de ^{13}C , gHMQC e gHMBC (Figuras 43-45).

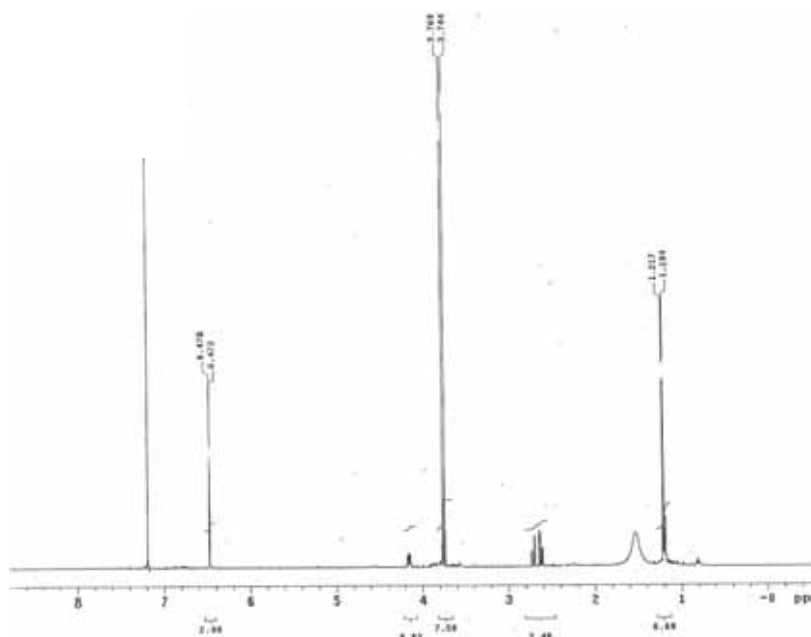


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de **22** (CDCl_3 , 500 MHz).

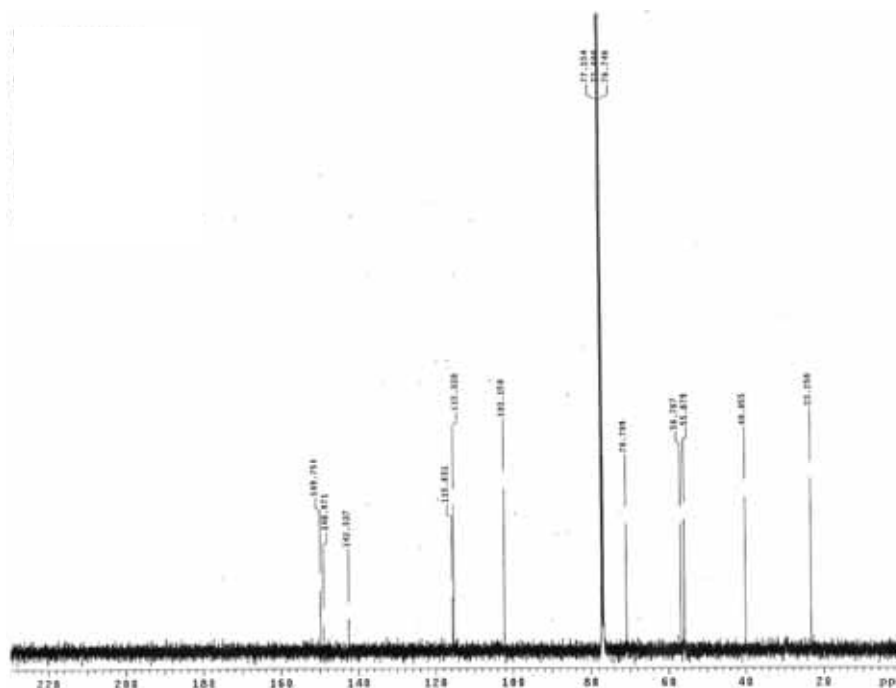


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C de **22** (CDCl_3 , 125 MHz).

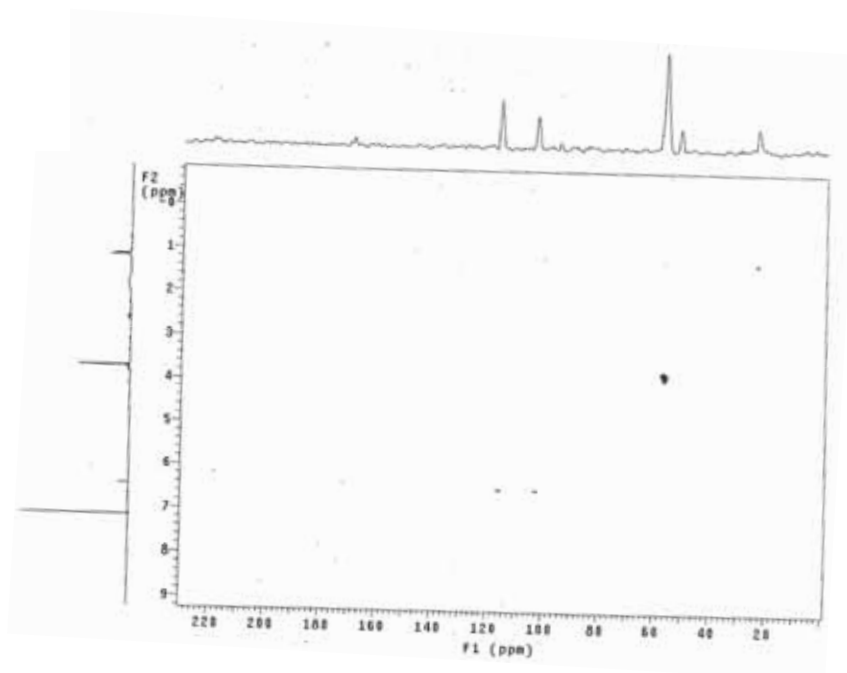


Figura 44. Mapa de contornos gHMBC de **22** (CDCl₃, 11,7 T).

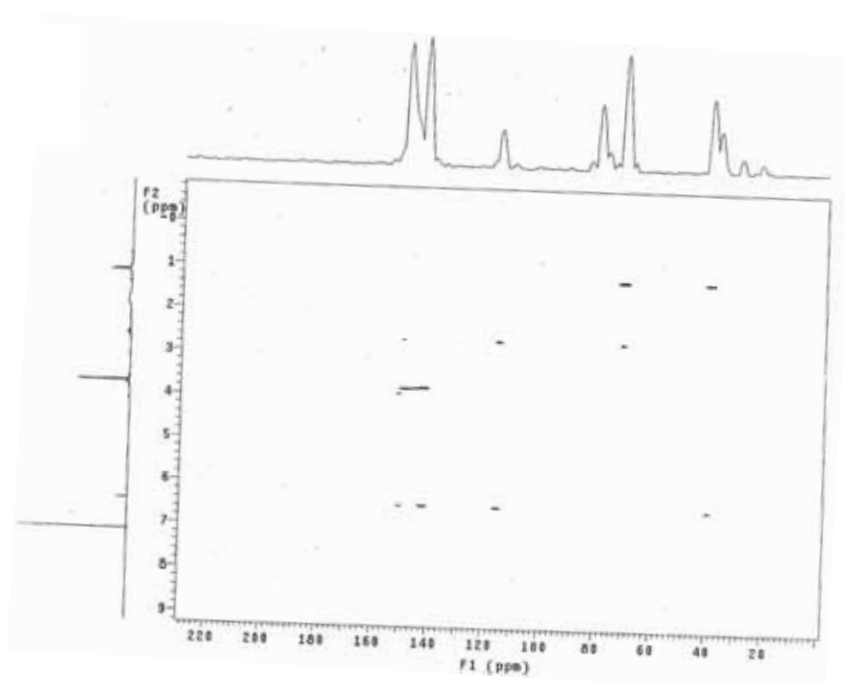


Figura 45. Mapa de contornos gHMBC de **22** (CDCl₃, 11,7 T).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 46) do produto **23** também possui somente dois hidrogênios em posições *para*, além de um sistema etilênico (δ 2,31 e 1,09), indicando que ocorreu uma reação de acilação na hidroxila inicial em C-2, o que foi confirmado pelo deslocamento para frequência mais alta do H-2 ($\Delta\delta = 0,77$) em

relação a **18**. Como não foram encontrados dados referentes a este composto na literatura, a estrutura foi confirmada pelos experimentos RMN de ^{13}C , gHMQC e gHMBC (Figuras 47-49).

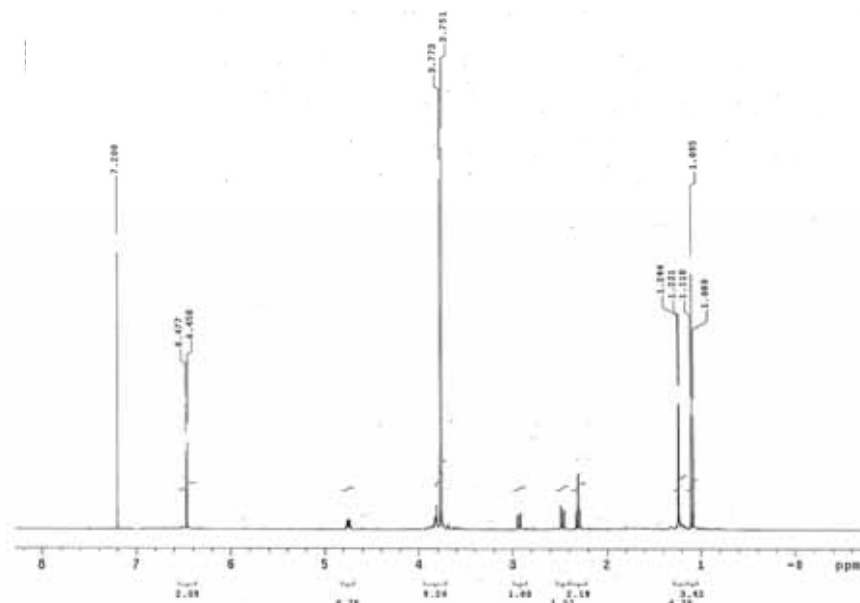


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H de **23** (CDCl_3 , 500 MHz).

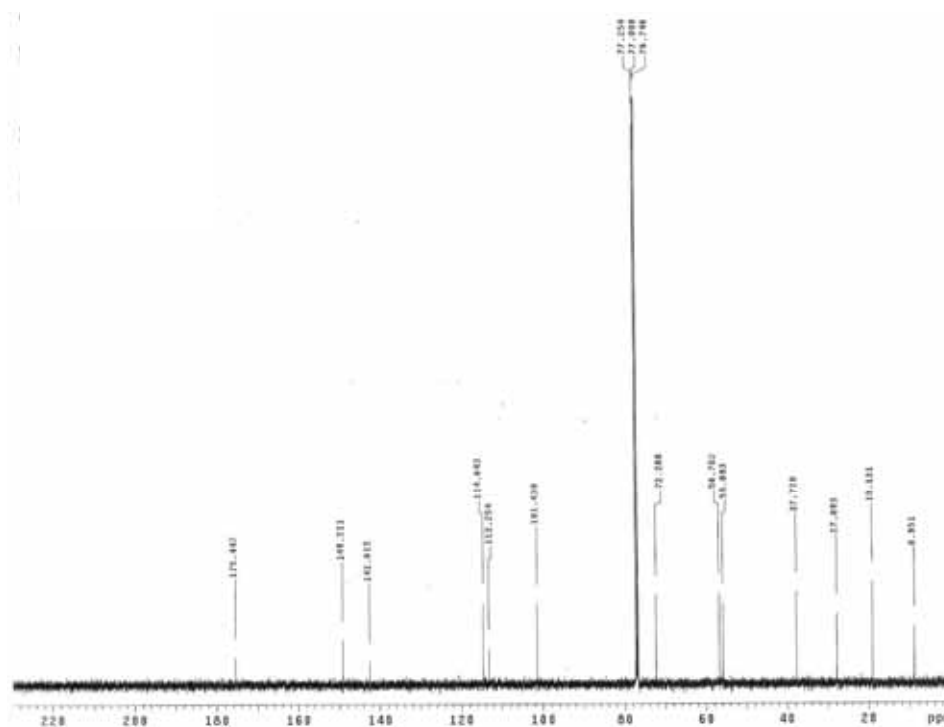


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C de **23** (CDCl_3 , 125 MHz).

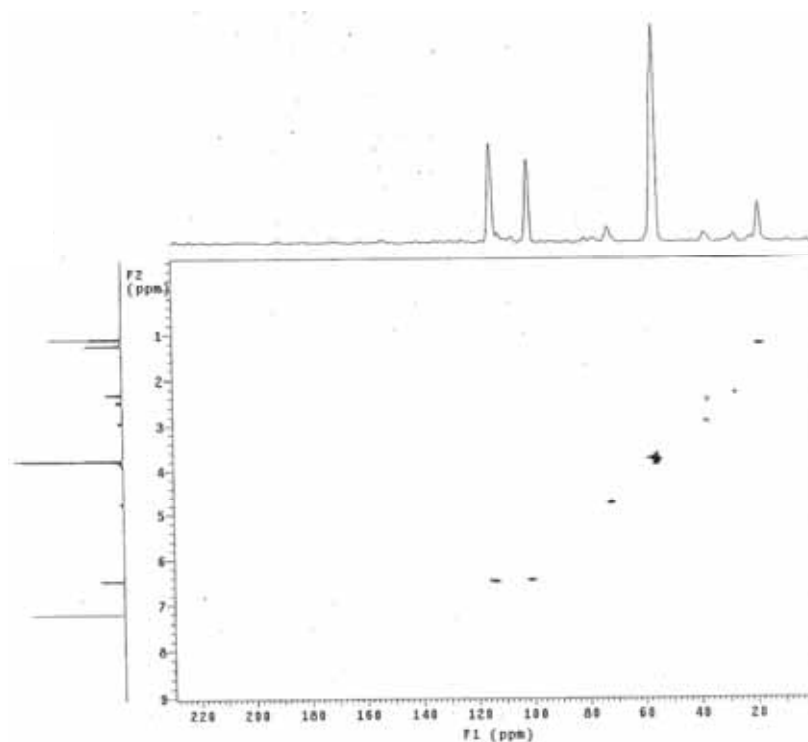


Figura 48. Mapa de contornos gHMBC de **23** (CDCl₃, 11,7 T).

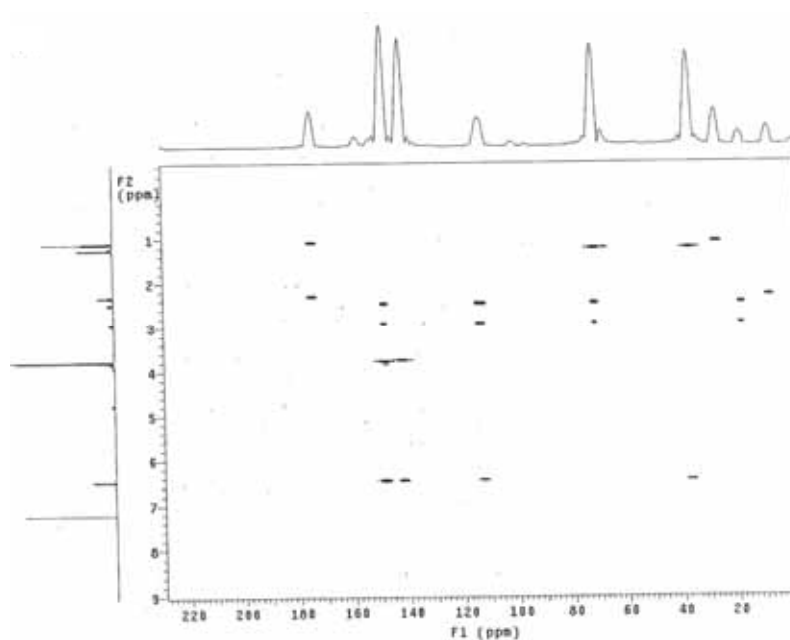


Figura 49. Mapa de contornos gHMBC de **23** (CDCl₃, 11,7 T).

A principal diferença entre o espectro de RMN de ¹H (Figura 50) de **24** em relação ao de **22**, foi a desproteção do hidrogênio aromático H-8 ($\Delta\delta = 1,01$), o qual correlaciona-se com um carbono carbonílico de éster ou lactona conforme

evidenciado pelo experimento *g*HMBC. Este experimento, juntamente com o de *g*HMQC, indicou que a carbonila benzílica está ligada ao anel aromático por C-9. Pela comparação dos dados obtidos com aqueles da literatura, constatou-se que o composto **24** era a 3,4-diidro-6,7-dimetoxi-3-metil-isocoumarina.⁶⁴

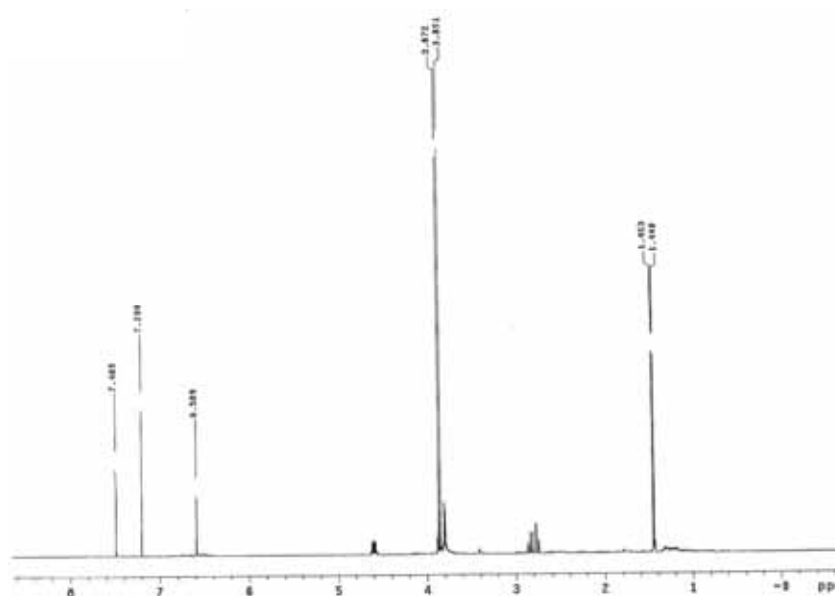


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de **24** (CDCl_3 , 500 MHz).

Pela segunda rota (B-2) obteve-se, como esperado, o produto **19**. O espectro de RMN de ^1H (Figura 51) de **19** indicou a presença de sinais na região de baixa frequência do espectro (δ -0,22 e -0,12), referentes às metilas do grupo de proteção $^t\text{BuMe}_2\text{Si}$ -. Os produtos obtidos após acilação foram novamente **22** e **24**.

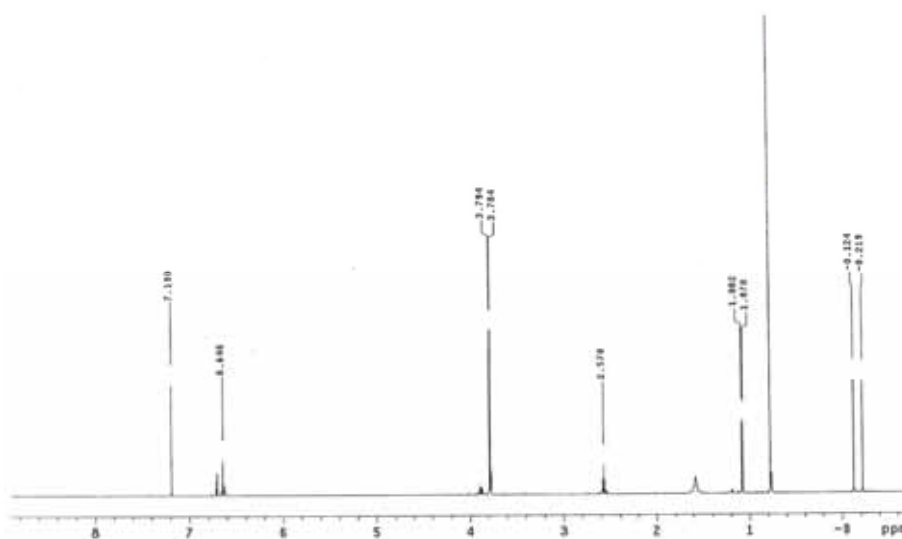


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H de **19** (CDCl_3 , 500 MHz).

Para compreender por que a reação de acilação não estava acontecendo e verificar a influência do catalisador, substituiu-se o ácido de Lewis SnCl_4 por AlCl_3 , mas mesmo assim, não obteve-se o produto desejado, e ocorreu a acilação do grupo hidroxílico (**25**) e a substituição deste por um átomo de cloro (**26**) (Figuras 52-54).

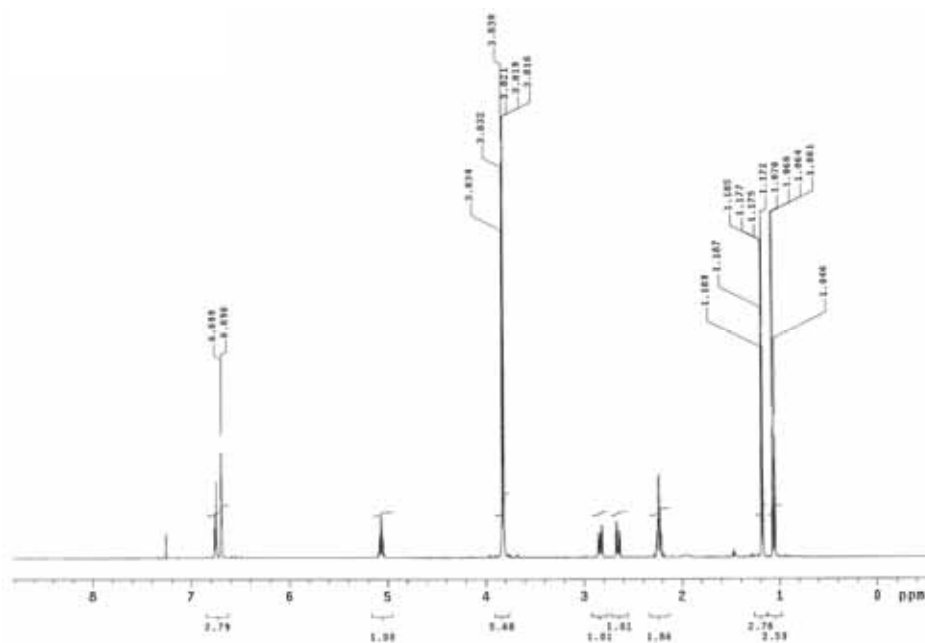


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H de **25** (CDCl_3 , 500 MHz).

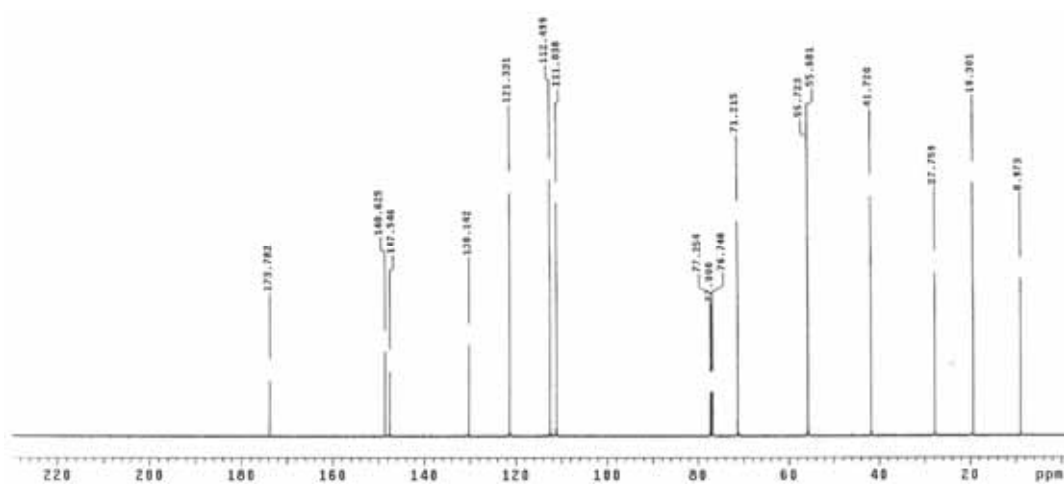


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C de **25** (CDCl_3 , 125 MHz).

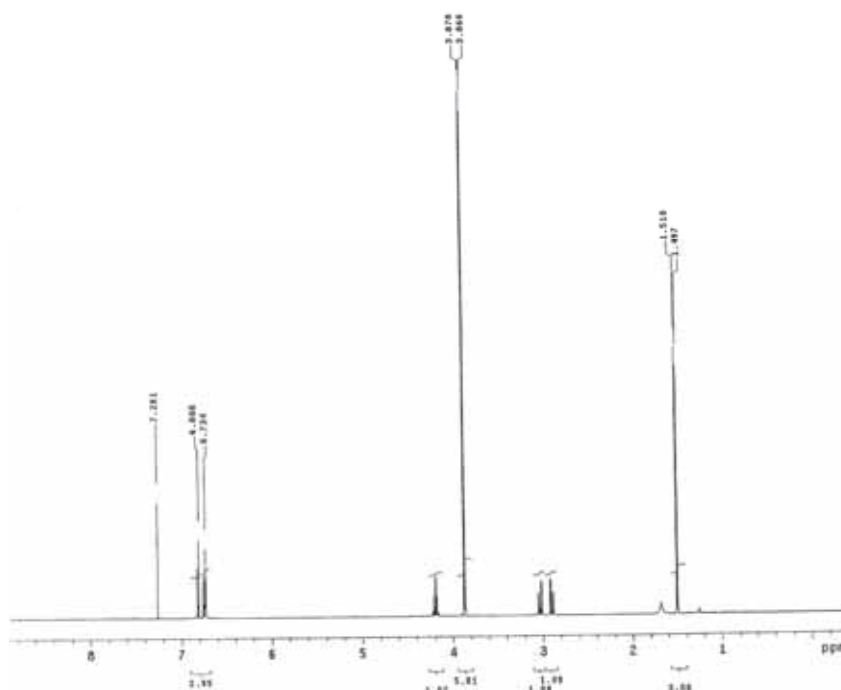


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H de **26** (CDCl_3 , 500 MHz).

IV.1.2 Mecanismos de reação propostos para produtos da rota sintética B

A seguir são apresentados propostas para a formação dos produtos obtidos na rota sintética **B** (Figuras 55-57).

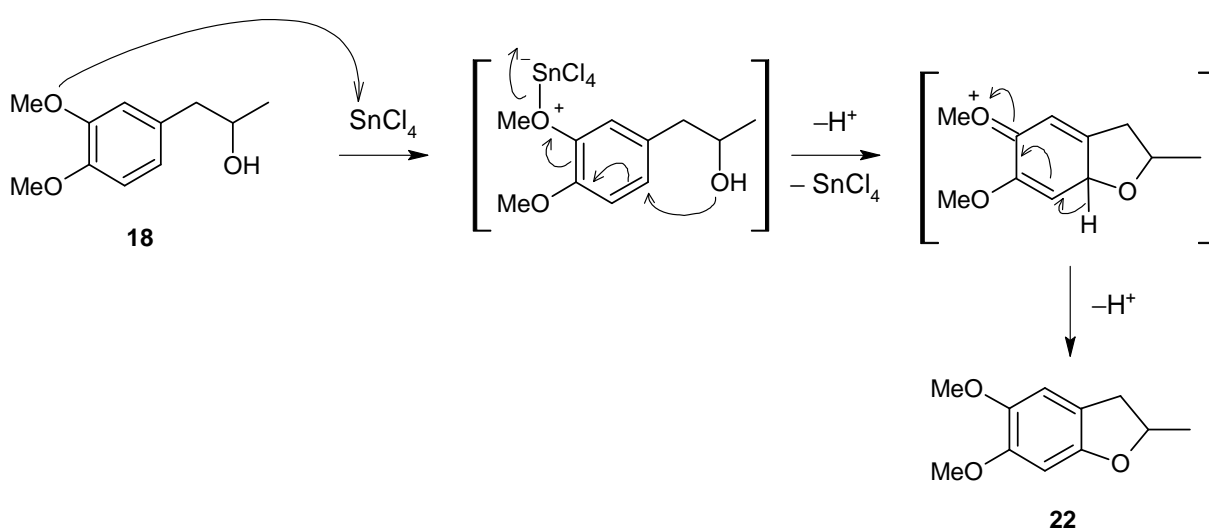


Figura 55. Proposta para a formação do produto **22**.⁶⁵

Na formação de **22** e **23**, o ácido de Lewis SnCl_4 , pode formar um complexo com um grupamento metoxílico, e assim auxiliar o ataque do nucleófilo ao eletrófilo (Figura 55 e 56).⁶⁵ Na formação de **24**, sugere-se que ocorre uma alquilação de Friedel-Crafts com o solvente CH_2Cl_2 ,⁶⁴ seguida de uma oxidação aeróbica catalisada por SnCl_4 ,⁶⁶ ou via uma acilação de Friedel-Crafts com o CO_2 do ar (Figura 57).

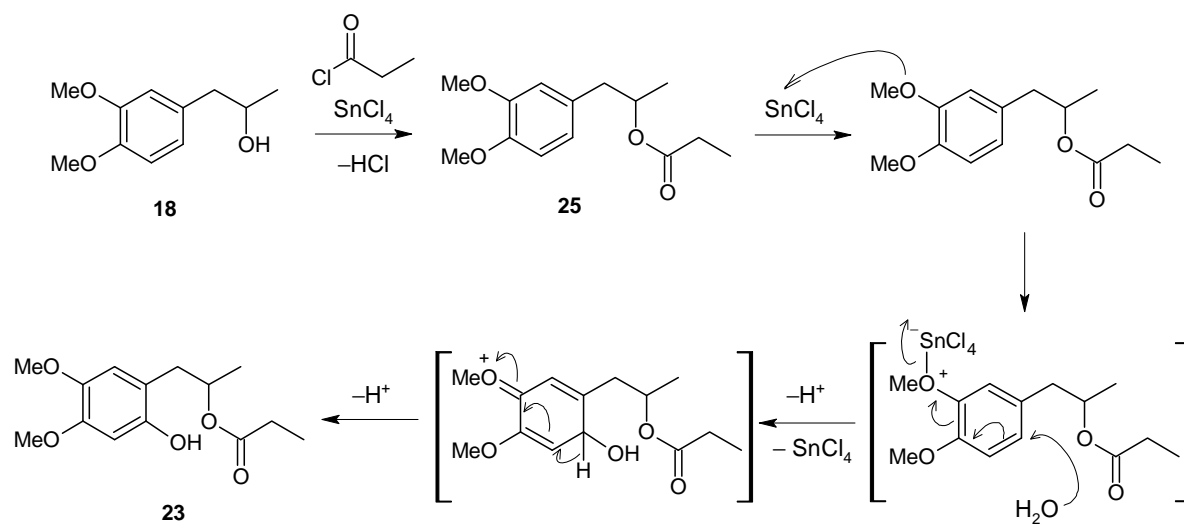


Figura 56. Proposta para a formação dos produtos **23** e **25**.

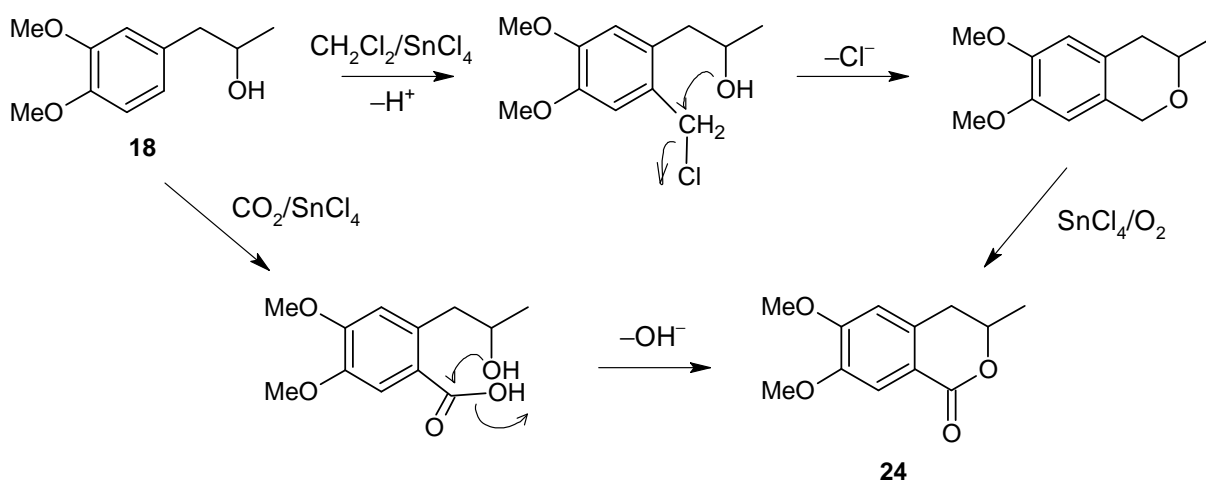


Figura 57. Proposta para a formação do produto **24**.

IV.1.3 Teste de avaliação da atividade antiplasmódica

As misturas das lignanas ariltetralônicas **9p** e **17p** obtidas por síntese foram submetidas a ensaios biológicos *in vitro*, empregando-se o protozoário *Plasmodium falciparum*. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Atividade antiplasmódica das misturas enantioméricas de **9p** e **17p**

Compostos	Cl ₅₀ (µg/ml)		Atividade
	Experimento 1	Experimento 2	
9p	> 50	indeterminado	indeterminada
17p	> 25 Cl ₅₀ < 50	< 25	parcialmente ativa
Cloroquina	0,194	> 0,5	ativa

A lignana isolada naturalmente **17** possui o Cl₅₀ muito semelhante ao da cloroquina (0,20 µM) e a lignana natural **9** também é muito ativa (0,63 µM). Entretanto, **9p** e **17p** (misturas enantioméricas) são praticamente inativas o que sugere que a atividade antiplasmódica é dependente da configuração absoluta das lignanas ariltetralônicas.⁷

IV.2 PARTE EXPERIMENTAL – Síntese de lignanas

IV.2.1 Rota sintética A (Esquema 4)

IV.2.1.1 Reação de Reformatsky

A reação de Reformatsky é utilizada para a síntese de β-hidróxi-éster a partir de um aldeído ou cetona com organozinco. Nesta reação ocorre a extensão da cadeia carbônica de cetona.

Para esta síntese utilizou-se 3,4-dimetoxi-fenilacetona (**11**, 17,2 mmol) dissolvido em benzeno seco (9,0 ml) e 2-bromo-propionato de etila (**12**, 17,4 mmol) em presença de Zn (48,0 mmol) previamente tratado com HCl 10%. O reagente **12** foi adicionado gota-a-gota. A reação foi mantida em refluxo, em atmosfera inerte (N₂) e sob agitação durante quatro horas. Após extração com CHCl₃, o intermediário **13** (15,6 mmol) foi obtido como um óleo amarelo, com um rendimento de 90,7%.

O método de extração com CHCl_3 e a utilização de atmosfera inerte mostrou ser mais viável (~10% maior) do que o apresentado na literatura,⁹ onde **13** foi obtido por destilações sob pressão reduzida (0,4 mm/Hg) e à temperaturas elevadas (25 à 178 °C).

IV.2.1.2 Lactonização

A lactonização ocorre em moléculas de ácidos carboxílicos ou ésteres que possuem grupos hidroxílicos nos carbonos γ ou δ a estes, em presença de ácidos minerais e/ou orgânicos.

A lactonização de **13** (15,6 mmol) ocorreu após adição de ácido acético (13 ml). A mistura foi resfriada e adicionou-se H_2SO_4 (3,0 ml) gota-a-gota sob agitação constante por uma hora. Em seguida manteve-se a solução em banho-maria por quatro horas sob atmosfera inerte (N_2). A solução foi extraída com CHCl_3 , neutralizada com solução de NaHCO_3 , lavada com água e seca com CaCl_2 anidro. O solvente foi evaporado em capela com exaustão. O intermediário **14** (15,6 mmol) foi obtido como um sólido marrom com rendimento de 99,8%.

A modificação no tempo de reação (três horas a mais), na utilização de atmosfera inerte e extração com CHCl_3 forneceu um maior rendimento nesta etapa (aproximadamente 75%) do que o apresentado por Adjangba e Billet (1962).⁹

IV.2.1.3 Reação de condensação tipo Friedel-Crafts

O intermediário **16** foi obtido como um óleo de cor marrom pela reação de substituição eletrofílica aromática do veratrol (**15**) com **14** em presença de um ácido de Lewis.

Em um balão de fundo redondo colocou-se 15,6 mmol de **14** e 62,3 mmol de **15**. Em seguida adicionou-se à mistura uma solução de AlCl_3 (62,3 mmol) com **15** (62,3 mmol) gota-a-gota por 15 minutos. A mistura foi mantida a temperatura ambiente, atmosfera inerte (N_2) e sob agitação por dez horas. O complexo de AlCl_3 formado foi decomposto por dissolução em etanol e solução de HCl 10%. Após o desaparecimento das partículas sólidas do complexo fez-se extração com CHCl_3 . Sucessivas extrações ácido-base (NaHCO_3 10% e HCl 10%) foram realizadas para obtenção de **16** (8,1 mmol) com um rendimento de 51,8% nesta etapa.

A literatura sugere que seja utilizado um excesso do aromático **15** (aproximadamente 14 \times), mas com isso houve a formação de um derivado pela reação simultânea de condensação de **15** na carbonila do ácido carboxílico (C-7).⁹

IV.2.1.4 Reação de acilação de Friedel-Crafts

A mistura das lignanas **9p + 17p** foi obtida submetendo **16** a uma reação de acilação de Friedel-Crafts.

O intermediário **16** (8,1 mmol) foi dissolvido em benzeno seco e adicionou-se PCl_5 (9,5 mmol). A mistura foi resfriada durante 30 minutos. Em seguida aqueceu-se a mistura reacional a 40 °C, agitando esta mistura até a completa dissolução dos reagentes. A mistura foi então esfriada e adicionou-se SnCl_4 (10,9 mmol). Em poucos minutos observou-se a formação de um precipitado vermelho que foi decomposto após a adição de HCl concentrado. O produto **9p + 17p** (7,7 mmol) foi isolado após extrações com CHCl_3 com um rendimento de 89,5%.

O rendimento total da síntese de **9p + 17p** foi de 42,0%, e esta síntese não é estereosseletiva, formando no final duas lignanas diastereoisoméricas com seus respectivos pares enantioméricos.

As modificações feitas na síntese de Adjangba e Billet (1962)⁹ mostraram-se mais viáveis, pois o rendimento final apresentado por eles foi aproximadamente 40% menor.

IV.2.1.5 Separação dos diastereoisômeros (**9p + 17p**)

Análise cromatográfica e espectrométrica utilizando RMN de ^1H revelou que o produto final da síntese era constituído por duas lignanas ariltetralônicas (**9p + 17p**). Para a separação dos diastereoisômeros, utilizou-se um CLAE semipreparativo (coluna com fase reversa ODS, fluxo de 8 ml/min, λ 254 nm, modo isocrático MeOH/H₂O 7:3) (Figura 38).

IV.2.1.6 Análise das misturas enantioméricas dos pares **9p e 17p**

Os pares enantioméricos de **9p** e de **17p** foram analisados utilizando-se um CLAE analítico [coluna quirállica de fase normal (Lux 5u Cellulose-1), fluxo de 1 ml/min, λ 254 nm, modo isocrático Hexano/Isopropanol 9:1] tendo um polarímetro como segundo detector (Figura 40). Utilizou-se também uma coluna quirállica de fase

reversa (β -CD Br), mas a separação dos enantiômeros de ambas misturas não foi conseguida empregando-se vários sistemas de eluentes.

IV.2.2 Rota sintética B (Esquemas 6-8)

IV.2.2.1 Redução de carbonila

A redução de carbonila de cetonas pode ser feita pelo agente redutor NaBH_4 , com rendimento bastante alto.⁶⁷ Assim, 3,4-dimetoxi-fenilacetona (**11**, 17,2 mmol) foi dissolvida em MeOH seco (~30 ml) em um balão, e foi adicionado boro-hidreto de sódio (27,0 mmol), também dissolvido em MeOH seco (~20 ml). Deixou-se a mistura reagir por quatro horas, sob agitação magnética e temperatura baixa (~2 °C). Depois de completado o tempo de reação, adicionou-se 25 ml de H_2O , e extraiu-se com AcOEt (3 \times 30 ml) em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 anidro (~1,10 g), e a análise por RMN de ^1H indicou que a redução ocorreu com rendimento de aproximadamente 100%, formando 3,30 g de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-2-propanol (**19**).

IV.2.2.2 Acilação de Friedel-Crafts (B-1)

A formação de ligação carbono-carbono em sistemas aromáticos pode ser feita por uma reação entre um haleto de acila em presença de um ácido de Lewis.⁶⁸

O álcool **18** (0,2344 mmol) foi dissolvido em 5 ml de CH_2Cl_2 seco em um balão e foi adicionado cloreto de propionila (**20**, 0,305 mmol) também dissolvido em CH_2Cl_2 (1 ml). Em banho de gelo (~2 °C), e sob agitação constante, adicionou-se SnCl_4 (0,46 mmol) em 2 ml de CH_2Cl_2 . Deixou-se a mistura reagir por 16 horas. A seguir, adicionou-se 10 ml de H_2O (a solução que era vermelha ficou amarela com a adição de H_2O). Extraiu-se com AcOEt (3 \times 10 ml), e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 anidro.

Como aparentemente a reação desejada não ocorreu, o que foi constatado pela análise do espectro de RMN de ^1H e por CCDC, todo o reagente **18** recuperado (aproximadamente 50,0 mg) foi utilizado em uma nova acilação nas mesmas condições já apresentadas e o produto obtido na fase orgânica foi separado por CCDP (sílica PF_{254} , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1), obtendo-se os produtos: **22** (5,9 mg), **23** (7,7 mg) e **24** (15,9 mg), respectivamente.

IV.2.2.3 Proteção do grupo hidroxílico de **18** (B-2)

Como os produtos obtidos na tentativa de acilação de **18** não foram os esperados, optou-se por primeiro proteger o grupo hidroxílico com um grupo volumoso.⁶⁹

O composto **18** (0,918 mmol) foi solubilizado em DMF anidra (5 ml) e adicionou-se imidazol (2,74 mmol) e ^tBuMe₂SiCl (1,84 mmol). A mistura reacional foi mantida por aproximadamente duas horas, sob agitação magnética, banho de gelo (2 °C) e atmosfera de N₂.

A formação do intermediário protegido foi acompanhada por CCDC e, depois de terminada a reação, adicionou-se H₂O e extraiu-se com CH₂Cl₂. A mistura orgânica resultante (170,0 mg) foi separada por CCDP (sílica PF₂₅₄, Hexano/AcOEt 4:1), obtendo-se três frações, sendo que de uma delas foi isolado o intermediário protegido **19** (59,5 mg).

IV.2.2.4 Acilação de Friedel-Crafts (B-2)

A uma solução de **19** (0,194 mmol em 10 ml de CH₂Cl₂ seco) adicionou-se **20** (0,252 mmol) e SnCl₄ (0,388 mmol). A reação foi monitorada por CCDC e após oito horas (sob agitação e banho de gelo), adicionou-se H₂O (10 ml) e extraiu-se com AcOEt (3 × 10 ml). A fase orgânica (31,5 mg) foi separada por CCDP (sílica PF₂₅₄, Hexano/AcOEt 4:1), obtendo-se 7 frações. Novamente os produtos **22** (7,1 mg) e **24** (6,6 mg) foram obtidos.

IV.2.2.5 Acilação de Friedel-Crafts (B-3)

Como em nenhuma das tentativas descritas anteriormente conseguiu-se realizar a acilação desejada no anel aromático, optou-se pela utilização de outro ácido de Lewis, o AlCl₃, onde as reações de Friedel-Crafts em geral são mais drásticas.

Preparou-se uma solução de **18** (1,26 mmol) em CH₂Cl₂ seco, e adicionou-se AlCl₃ (2,65 mmol), também em CH₂Cl₂, e em seguida, gotejou-se **20** (1,26 mmol). A reação procedeu-se em atmosfera de N₂, baixa temperatura e sob agitação constante. Após duas horas, adicionou-se 10 ml de uma solução de HCl 10% e extraiu-se com CHCl₃ (3 × 10 ml). A fase orgânica foi separada por CCDP (sílica PF₂₅₄, Hexano/AcOEt 4:1), dando seis frações. Das quais foram isolados os compostos **25** (82,5 mg) e **26** (31,0 mg).

IV.2.3 Avaliação da atividade antiplasmódica de lignanas ariltetralônicas obtidas por sínteses

As linhagens de *P. falciparum* (cepas BHz26/86, parcialmente resistentes a cloroquina), utilizadas neste ensaio, foram isoladas pelo laboratório de Malária – FIOCRUZ, de um caso de malária ocorrido na Amazônia.

As cepas foram mantidas em culturas de eritrócitos humanos (grupo sanguíneo A+ e AB+, utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro humano).⁷⁰

Na avaliação da susceptibilidade do *P. falciparum* às lignanas ariltetralônicas *in vitro* avaliou-se a inibição do crescimento de *P. falciparum* pelas misturas enantioméricas **9p** e **17p** em relação ao controle, por ensaios de incorporação química de [³H]-hipoxantina.^{7, 71, 72} Neste método os estágios trofozoitas em sangue sorbitol-sincronizado são cultivados em placas sem hipoxantina e com 1% de parasitemia e 1% de hematócitos. Posteriormente, as placas foram incubadas com os controles e as lignanas (dissolvidas em DMSO) em triplicatas a 37 °C. Após 24 horas de incubação, foi adicionado 25 µl/placa de meio contendo [³H]-hipoxantina. As placas foram imersas em um fluído cintilante, e a emissões radioativas contadas em um leitor Microbeta 1450, e assim, avaliada a inibição do crescimento do parasita.

IV.2.4 Dados físicos e espectrométricos dos produtos e intermediários

2,3-Dimetil-3-hidroxi-4-veratril-butirato de etila (13): Sólido amorfo; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,73-6,65 (6H, *m*, H-2, H-5 e H-6), 2,79 e 2,66 (2H, 2 × *d*, *J* = 14,0 Hz, H-7), 2,69 e 2,55 (2H, 2 × *d*, *J* = 13,5 Hz, H-7), 1,07 e 1,04 (6H, *s*, H-9), 2,47 (2H, 2 × *q*, *J* = 7,0 Hz, H-2'), 1,16 (6H, 2 × *d*, *J* = 7,0 Hz, H-3'), 4,10 (4H, 2 × *q*, *J* = 7,0 Hz, H-4'), 1,22 (6H, 2 × *t*, *J* = 7,0 Hz, H-5'), 3,79-3,78 (12H, *m*, 4 × OMe).

2,3-Dimetil-4-veratril-4-butirolactona (14): Sólido amorfo; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6,80-6,75 (6H, *m*, H-2, H-5 e H-6), 4,95 (1H, *d*, *J* = 4,5 Hz, H-7), 4,72 (1H, *d*, *J* = 9,9 Hz, H-7), 2,29 e 1,96 (2H, *m*, H-8), 1,06 e 1,02 (6H, 2H, 2 × *d*, *J* = 7,0 Hz,

H-9), 2,75 e 2,55 (2H, *m*, H-2'), 1,23 e 1,16 (6H, $2 \times d$, $J = 7,0$ Hz, H-3'), 3,83-3,81 (12H, *m*, $4 \times$ OMe).

3',4',4,5-Tetrametoxi-1,7-seco-2,7'-ciclolignan-7-carboxílico (16): Sólido amorfo; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6,86-6,70 (6H, *m*, H-2, H-5 e H-6), 2,91 e 2,58 (2H, *m*, H-8), 1,11 e 0,98 (6H, $2 \times d$, $J = 7,0$ Hz, H-9), 6,86-6,70 (6H, *m*, H-2', H-5' e H-6'), 3,93 e 3,42 (2H, $2 \times d$, $J = 11,5$ Hz, H-7'), 2,54 e 2,35 (2H, *m*, H-8'), 0,83 e 0,73 (6H, $2 \times d$, $J = 7,0$ Hz, H-9'), 3,80-3,74 (24H, *m*, $8 \times$ OMe).

(7'R,8R,8'S)-3',4',4,5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona (17p): Óleo amarelo; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6,12 (1H, *s*, H-3), 7,48 (1H, *s*, H-6), 2,31 (1H, *dq*, $J = 12,5, 6,5$ Hz, H-8), 1,25 (1H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-9), 6,51 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,79 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,68 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6'), 3,63 (1H, *d*, $J = 11,0$ Hz, H-7'), 2,00 (1H, *ddq*, $J = 12,5, 11,0, 6,5$ Hz, H-8'), 0,87 (1H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-9'), 3,55 (3H, *s*, OMe-4), 3,86 (3H, *s*, OMe-5), 3,75 (3H, *s*, OMe-3'), 3,85 (3H, *s*, OMe-4'); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 125,7 (C-1), 141,5 (C-2), 111,2 (C-3), 153,2 (C-4), 148,0 (C-5), 108,1 (C-6), 198,8 (C-7), 48,5 (C-8), 12,6 (C-9), 136,1 (C-1'), 111,8 (C-2'), 149,3 (C-3'), 147,9 (C-4'), 111,0 (C-5'), 122,2 (C-6'), 53,3 (C-7'), 43,8 (C-8'), 18,0 (C-9'), 55,9 (OMe-4), 56,0 (OMe-5), 55,8 (OMe-3'), 56,0 (OMe-4').

1-(3',4'-Dimetoxifenil)-2-propanol (18): Precipitado branco; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 2,72 (1H, *dd*, $J = 4,5, 13,5$ Hz, H-1_a), 2,61 (1H, *dd*, $J = 8,0, 13,5$ Hz, H-1_b), 3,98 (1H, *m*, H-2), 1,23 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-3), 6,73 (1H, *sl*, H-2'), 6,81 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,74 (1H, *dd*, $J = 2,0, 8,5$ Hz, H-6'), 3,86 (3H, *s*, OMe-3'), 3,84 (3H, *s*, OMe-4'), 1,85 (1H, *sl*, OH); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 45,2 (C-1), 68,8 (C-2), 22,6 (C-3), 131,0 (C-1'), 112,6 (C-2'), 147,7 (C-3'), 148,9 (C-4'), 111,4 (C-5'), 121,3 (C-6'), 55,8 (OMe-3'), 55,9 (OMe-4').

1-(3',4'-Dimetoxifenil)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-propano (19): RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ -0,22 e -0,12 (6H, $2 \times s$, $2 \times$ Me-TBS), 0,77 (9H, *s*, $3 \times$ Me-TBS), 2,57 (2H, *m*, H-1), 3,90 (1H, *m*, H-2), 1,08 (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, H-3), 6,75 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,81 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,74 (1H, *dd*, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6'), 3,79 (3H, *s*, OMe-3'), 3,78 (3H, *s*, OMe-4'); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ -5,3 e -5,1 ($2 \times$ Me-

TBS), 17,8 (C-TBS), 25,6 (3 × Me-TBS), 45,6 (C-1), 69,9 (C-2), 23,3 (C-3), 131,9 (C-1'), 113,0 (C-2'), 147,4 (C-3'), 148,7 (C-4'), 111,2 (C-5'), 121,4 (C-6'), 55,5 (OMe-3'), 55,7 (OMe-4').

2,3-Diidro-5,6-dimetoxi-2-metil-benzofurano (22): RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 4,16 (1H, *m*, H-2), 2,72 (1H, *dd*, $J = 4,0, 13,5$ Hz, H-3_a), 2,61 (1H, *dd*, $J = 8,0, 13,5$ Hz, H-3_b), 6,47 (1H, *s*, H-4), 6,48 (1H, *s*, H-7), 1,21 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-10), 3,77 (3H, *s*, OMe-5), 3,74 (3H, *s*, OMe-6); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 70,8 (C-2), 40,1 (C-3), 115,3 (C-4), 149,8 (C-5), 142,5 (C-6), 102,2 (C-7), 115,6 (C-8), 149,0 (C-9), 23,3 (C-10), 55,9 (OMe-5), 56,8 (OMe-6).

Propanoato de 1-(2'-hidroxi-4',5'-dimetoxifenil)-propan-2-ila (23): RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 2,93 (1H, *dd*, $J = 4,0, 14,0$ Hz, H-1_a), 2,47 (1H, *dd*, $J = 8,0, 14,0$ Hz, H-1_b), 4,75 (1H, *m*, H-2), 1,24 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-3), 6,48 (1H, *s*, H-3'), 6,46 (1H, *s*, H-6'), 2,31 (2H, *q*, $J = 7,5$ Hz, H-2''), 1,09 (3H, *t*, $J = 7,5$ Hz, H-3''), 3,75 (3H, *s*, OMe-4'), 3,77 (3H, *s*, OMe-5'); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 37,7 (C-1), 72,3 (C-2), 19,1 (C-3), 114,6 (C-1'), 113,3 (C-2'), 114,6 (C-3'), 142,6 (C-4'), 149,2 (C-5'), 101,4 (C-6'), 175,4 (C-1''), 27,9 (C-2''), 9,0 (C-3''), 56,8 (OMe-4'), 55,9 (OMe-5').

3,4-Diidro-6,7-dimetoxi-3-metil-isocoumarina (24): RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 4,61 (1H, *m*, H-3), 2,85 (1H, *dd*, $J = 4,0, 14,0$ Hz, H-4_a), 2,75 (1H, *dd*, $J = 8,0, 14,0$ Hz, H-4_b), 6,59 (1H, *s*, H-5), 7,49 (1H, *s*, H-8), 1,45 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-11), 3,85 (3H, *s*, OMe-6), 3,87 (3H, *s*, OMe-7); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 165,7 (C-1), 75,1 (C-3), 34,6 (C-4), 109,2 (C-5), 148,5 (C-6), 153,7 (C-7), 111,8 (C-8), 133,5 (C-9), 117,1 (C-10), 20,9 (C-11), 56,1 (OMe-6), 56,1 (OMe-7).

Propanoato de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-propan-2-ila (25): RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 2,84 (1H, *dd*, $J = 4,0, 13,0$ Hz, H-1_a), 2,65 (1H, *dd*, $J = 8,0, 13,0$ Hz, H-1_b), 5,03 (1H, *m*, H-2), 1,18 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-3), 6,70 (1H, *sl*, H-2'), 6,76 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,69 (1H, *dd*, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6'), 3,83 (3H, *s*, OMe-3'), 3,82 (3H, *s*, OMe-4'), 2,22 (2H, *m*, H-2''), 1,07 (3H, *t*, $J = 7,5$ Hz, H-3''); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 41,7 (C-1), 71,2 (C-2), 19,3 (C-3), 130,1 (C-1'), 112,5 (C-2'), 147,5 (C-3'),

148,6 (C-4'), 111,0 (C-5'), 121,3 (C-6'), 173,8 (C-1''), 27,8 (C-2''), 9,0 (C-3''), 55,7 (OMe-3'), 55,7 (OMe-4').

1-(3',4'-Dimetoxifenil)-2-cloro-propano (26): RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 3,05 (1H, *dd*, $J = 4,0, 13,0$ Hz, H-1_a), 2,91 (1H, *dd*, $J = 8,0, 13,0$ Hz, H-1_b), 4,21 (1H, *m*, H-2), 1,51 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-3), 6,73 (1H, *sl*, H-2'), 6,81 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,74 (1H, *dd*, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6'), 3,88 (3H, *s*, OMe-3'), 3,87 (3H, *s*, OMe-4'); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 46,3 (C-1), 68,8 (C-2), 24,6 (C-3), 131,0 (C-1'), 112,5 (C-2'), 147,8 (C-3'), 148,7 (C-4'), 111,0 (C-5'), 121,4 (C-6'), 58,7 (OMe-3'), 55,8 (OMe-4').

CAPÍTULO V – Transformação químicas e microbianas de lignanas

V.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES – Biotransformações e Transformações

As transformações químicas e microbianas de lignanas foram realizadas, durante o Doutorado-Sanduíche, nos laboratórios do Southwest Center for Natural Products Research and Commercialization, Office of Arid Lands Studies, College of Agriculture and Life Science – The University of Arizona (Tucson, AZ, USA), sob a supervisão do Prof. Dr. A. A. Leslie Gunatilaka, e com a colaboração do Dr. E. M. Kithsiri Wijeratne. A avaliação da atividade antitumoral foi realizada pela bioquímica Manping X. Liu.

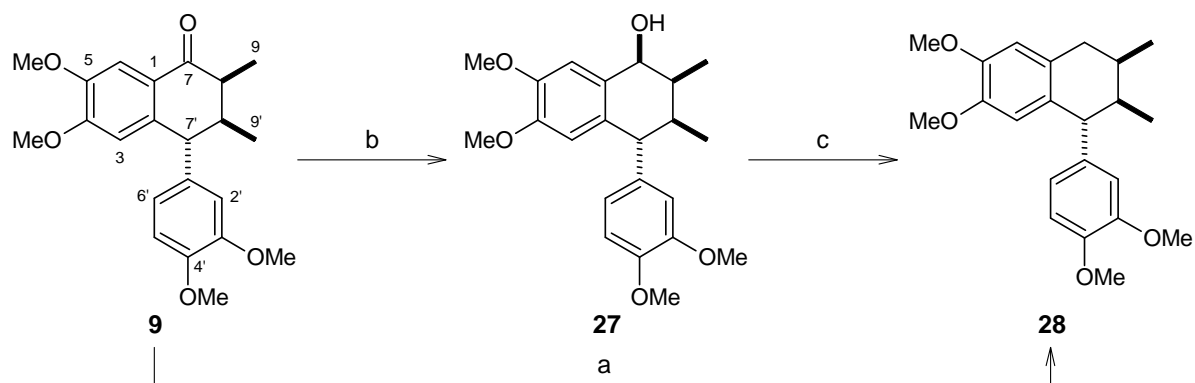
Para as biotransformações foram utilizadas duas lignanas, uma ariltetralona, isolada naturalmente de *Holostylis reniformis*, e uma ariltetralina, que foi obtida a partir de transformações químicas. Estas substâncias foram biotransformadas pelos fungos *Cunninghamella echinulata* e *Beauveria bassiana*, fornecendo três compostos. As estruturas destes compostos foram elucidadas utilizando-se técnicas espectrométricas e dados físicos: Ressonância Magnética Nuclear unidimensionais (^1H , ^{13}C) e bidimensionais (gHMQC e gHMBC), Espectrometria de massas (EM) e rotação específica $[\alpha]_D$.

V.1.1 Análise dos compostos obtidos por transformações químicas

Visando a determinação de atividade biológica de lignanas ariltetralínicas (sem a posição C-8 oxigenada), dois processos (Esquema 9) foram empregados para a obtenção da lignana **28** a partir da lignana ariltetralônica **9**, isolada de *Holostylis reniformis* (Capítulos III).

No primeiro método testado para a produção de **28**^{73, 74} foi empregado a reação de Wolff-Kishner (a), uma reação “one-pot” e o rendimento final obtido foi de 22%. O segundo método envolveu duas etapas. Na primeira (b) fez-se a redução da carbonila, utilizando NaBH_4 , e obteve-se o álcool **27**,⁴⁰ e na última etapa (c), uma hidrogenólise sobre paládio foi realizada (Figuras 58 e 59). Mesmo o segundo método tendo a desvantagem de ser realizado em duas etapas, o rendimento final de 92% foi decisivo para escolha do método para a produção de material suficiente para as biotransformações.

Esquema 9. Transformações químicas da lignana ariltetralônica **9** *



* (a) NH_2NH_2 , KOH, etilenoglicol, 170 °C, 3 horas; (b) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$, 0 °C, 1 hora; (c) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$, EtOH, temperatura ambiente, 2 horas.

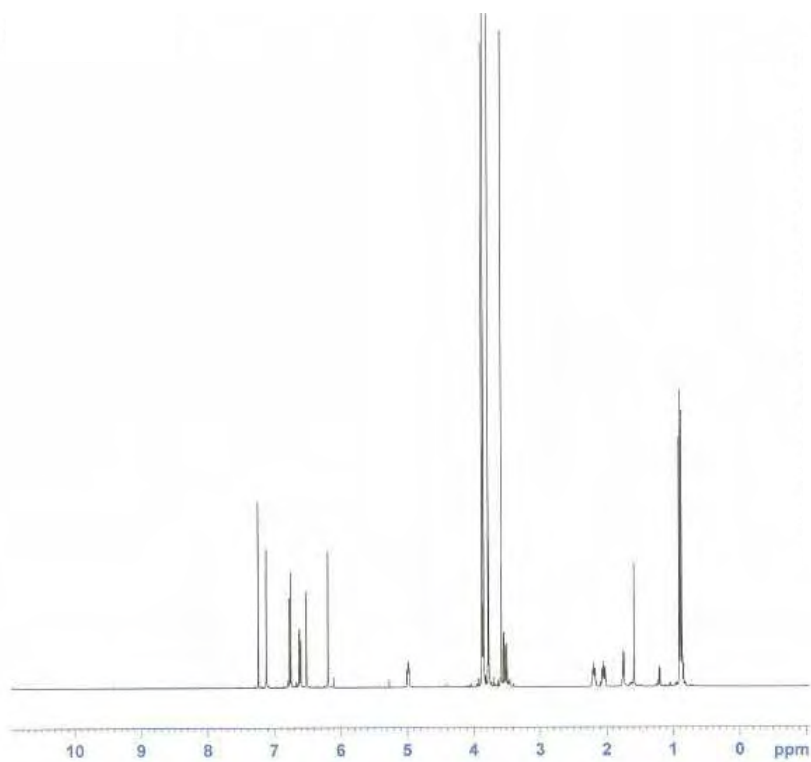


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H de **27** (CDCl_3 , 500 MHz).

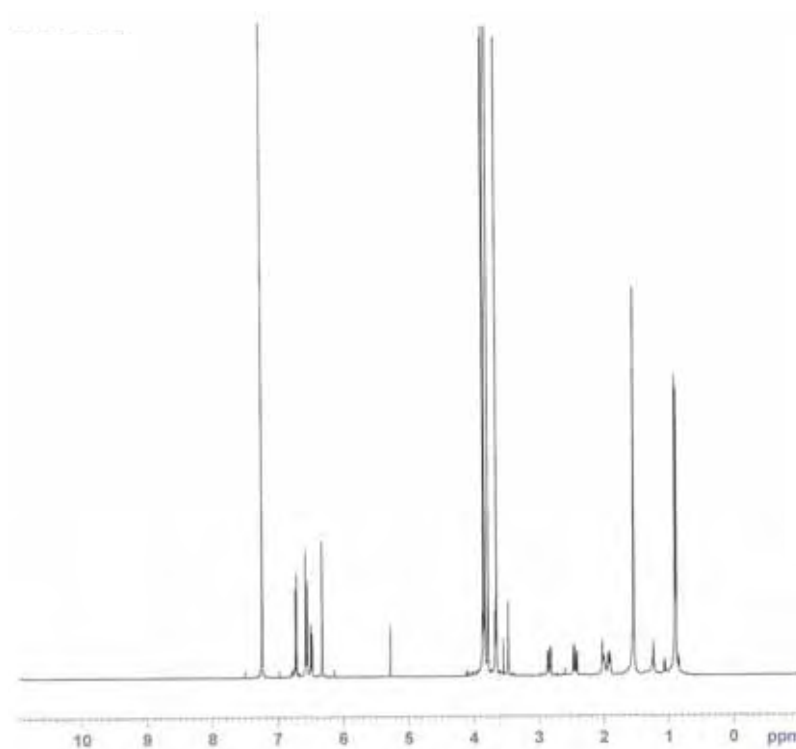


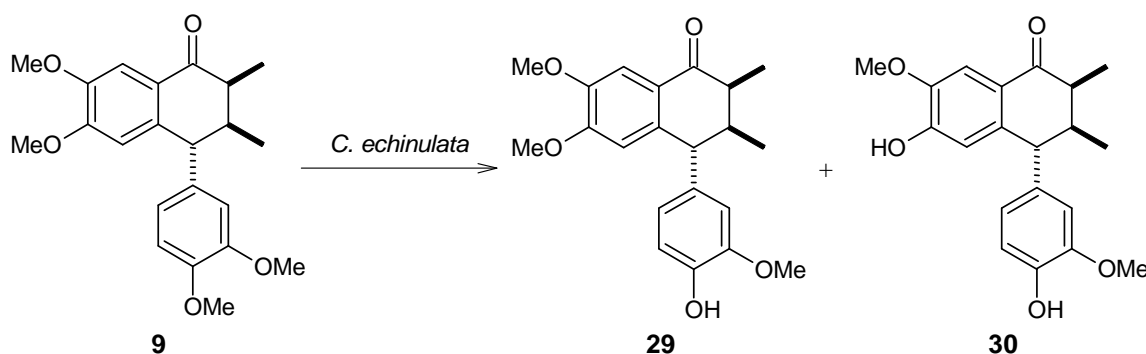
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H de **28** (CDCl_3 , 500 MHz).

V.1.2 Biotransformações de lignanas

V.1.2.1 Biotransformação da lignana ariltetralônica **9**

Para a primeira biotransformação, foram escolhidos o fungo *Cunninghamella echinulata* e a lignana natural **9**. Dois produtos transformados foram obtidos (**29** e **30**) (Esquema 10).

Esquema 10. Biotransformação da lignana ariltetralônica **9** por *C. echinulata*



O produto majoritário **29** tem a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$, determinada por RMN de ^1H e de ^{13}C e EM, e esta difere daquela do material de partida (**9**) por 14 u,

correspondendo a um metileno. No espectro de massas de **29**, o pico m/z de 357 corresponde ao fragmento $[M + H]^+$. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 60) e ^{13}C contêm sinais para um grupo veratrílico e um grupo guaiacílico como substituintes. O novo grupo hidroxílico, como deduzido dos experimentos de RMN bidimensionais, foi fixado no carbono 4' do anel C, sendo que o valor do deslocamento químico observado para este carbono que é δ 147,8 em **9**, muda para δ 144,3 após a biotransformação. Comparando os dados de RMN e rotação específica com os da literatura,⁴⁰ foi possível a identificação de **29** com a (-)-holostiligona.

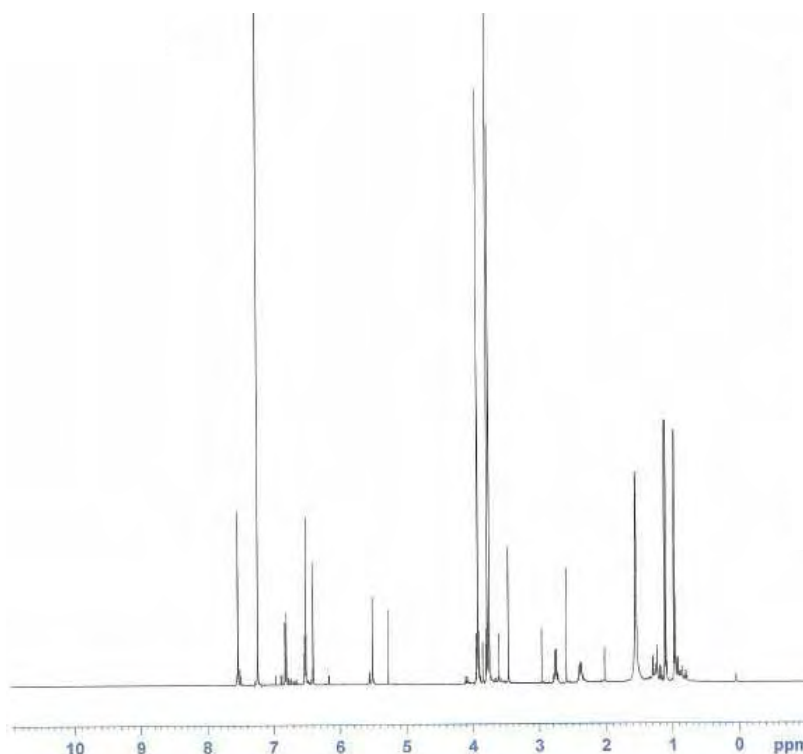


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H de **29** (CDCl_3 , 500 MHz).

O produto minoritário **30**, apresenta no EM os íons $[M + H]^+$ de 343 m/z , que são 28 u menores que os de **9**. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 61) e de ^{13}C revelaram a existência de somente dois grupos metoxílicos, e a posição destes grupos na estrutura molecular foi deduzida com o auxílio dos experimentos $g\text{HMBC}$ e $g\text{HMQC}$. Estes dados espectroscópicos indicam que substância **30** é a lignana arisantetralona.^{73, 75}

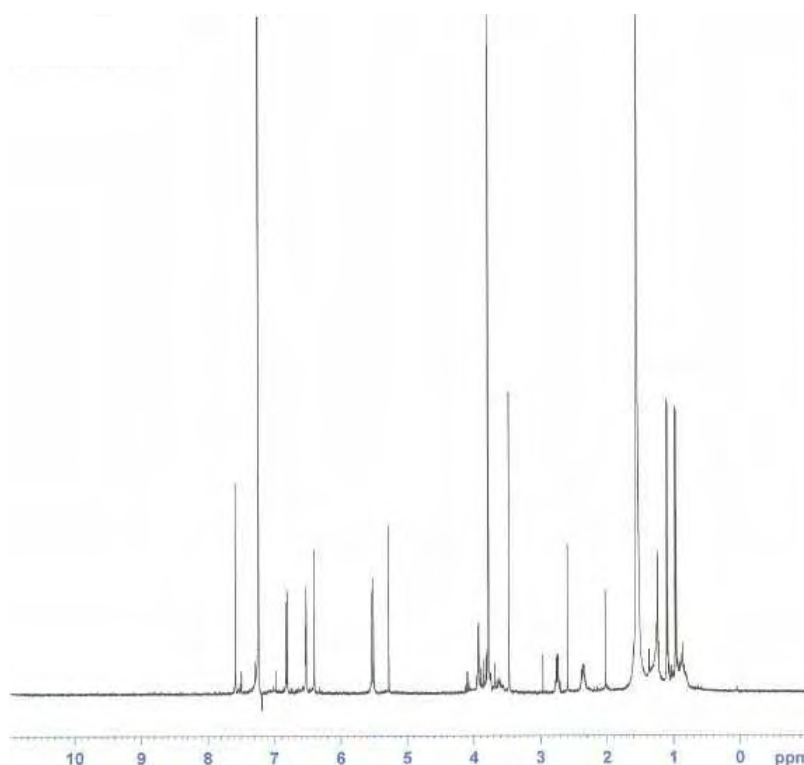


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de **30** (CDCl_3 , 500 MHz).

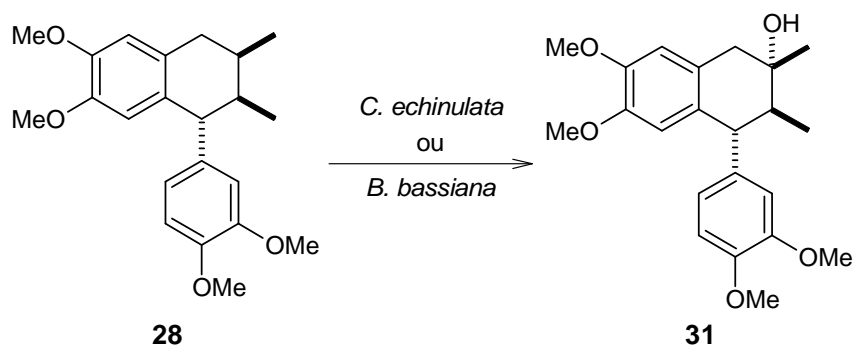
O fungo *C. echinulata* transformou **9** em **29** e **30** na razão 3:1.

Foram realizadas duas tentativas de transformação microbiana de **9** por *B. bassiana*, mas não foram isoladas lignanas biotransformadas com massas suficientes para as devidas identificações.

V.1.2.2 Biotransformação da lignana ariltetralínica **28**

Quando (-)-isogalbulina (**28**) foi incubada por 20 dias, tanto com *C. echinulata* quanto com *B. bassiana*, foi obtido o produto biotransformado **31** (Esquema 11). Este produto apresenta um oxigênio a mais que **28**, e fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_5$, como indicado pelos dados espectrométricos (RMN de ^1H e de ^{13}C e EM). O espectro de massas apresentou ainda o íon de $355\ m/z\ [\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$.

Esquema 11. Biotransformação da lignana ariltetralina **28** por *C. echinulata* e *B. bassiana*



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 62) de **31** apresenta sinais referentes a 22 carbonos, e destes destacam-se os carbonos compatíveis com quatro grupos metoxílicos aromáticos (δ 55,8-55,9) e com um carbono carbinólico (δ 72,2, C-8).

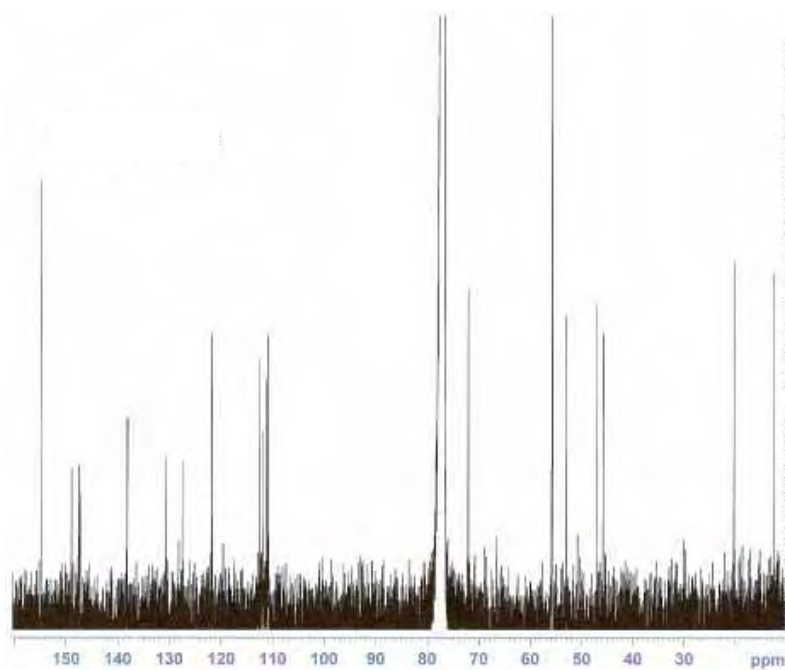


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C de **31** (CDCl_3 , 125 MHz).

As principais diferenças do espectro de RMN de ^1H (Figura 63) de **31** com o do material de partida **28** é a ausência do hidrogênio em δ 2,02 (H-8) e a mudança nas multiplicidades dos hidrogênios em H-7_{a,b} e da metila H-9, que em **28** eram δ 2,84 (*dd*, $J = 5,2, 16,4$ Hz), 2,44 (*dd*, $J = 8,0, 16,4$ Hz) e 0,89 (*d*, $J = 7,2$ Hz), respectivamente, mudando para δ 3,04 (*d*, $J = 15,2$ Hz, H-7_a), 2,82 (*d*, $J = 15,2$ Hz, H-7_b) e 1,16 (*s*, H-9) no espectro de **31**.

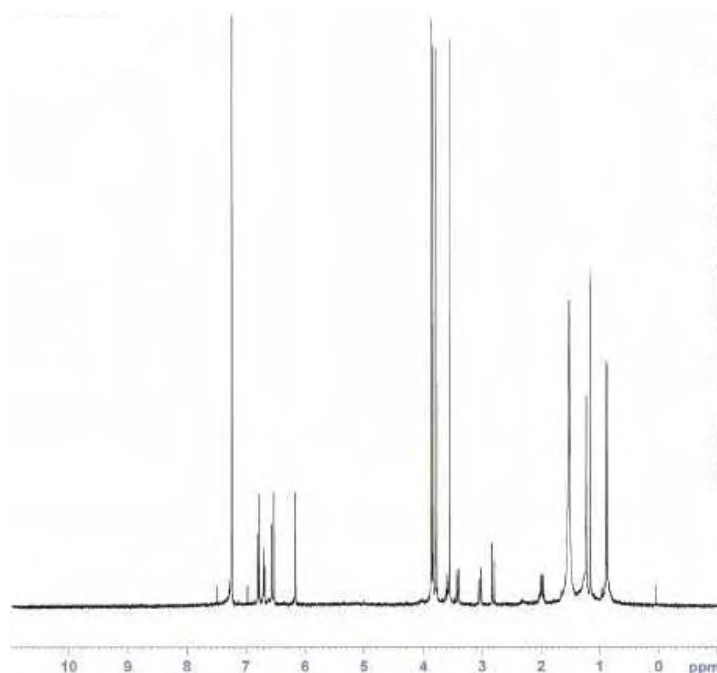


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H de **31** (CDCl_3 , 500 MHz).

Um composto de mesma estrutura básica foi sintetizado em 1960 e mencionado em três artigos científicos.⁷⁶⁻⁷⁸ Mas, em nenhum destes artigos encontra-se dados suficientes para a determinação das configurações relativas e absolutas do composto sintético. O composto descrito na literatura possui uma rotação óptica de $+43,65^\circ$ (em etanol), enquanto que o composto **31** apresentou uma rotação óptica de $-13,4^\circ$ (CHCl_3), portanto, os compostos possuem diferentes configurações.

V.1.3 Resultados das atividades antitumoral e antimicrobiana

Para as avaliações de atividade antitumoral, foram testadas as seis lignanas **9** e **27-31**. Nenhuma destas lignanas apresentaram atividade antitumoral pelos ensaios Wound Healing, MTT e Heat Shock, que utilizaram as células PC-3M (câncer de próstata).

As lignanas **9** e **28** foram as substâncias escolhidas para a avaliação da atividade microbiana com o fungo *Candida albicans* e com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Ambas lignanas não apresentaram atividade nas condições experimentais empregadas.

V.2 PARTE EXPERIMENTAL – Biotransformações e Transformações

V.2.1 Transformações químicas de **9** (Esquema 9)

V.2.1.1 Método A (Redução de Wolff-Kishner)

O composto **9** (6,1 mg, $1,64 \times 10^{-2}$ mmol) foi dissolvido em etileno glicol (200 μ l) e à solução adicionou-se hidrazina monohidratada (20 μ l, 0,41 mmol). A mistura reacional foi aquecida e agitada a 115 °C por duas horas sob atmosfera de N₂, e então KOH (23,3 mg, 0,41 mmol) foi adicionado. A mistura foi mantida nestas mesmas condições por uma hora, e então a temperatura foi aumentada para 170 °C, e a mistura agitada por mais uma hora. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, diluída com H₂O (2 ml) e extraída com AcOEt (3 \times 3 ml). Os extratos orgânicos foram combinados e lavados com H₂O, secos com Na₂SO₄ anidro e concentrados sob pressão reduzida. O produto bruto foi separado por CCDP (Hexano/AcOEt/CHCl₃ 6:3:1) fornecendo a lignana ariltetralínica **28** (1,3 mg, Rf 0,72) com um rendimento de 22%.

V.2.1.2 Método B (Redução e Hidrogenólise)

À uma solução de **9** (10,1 mg, $2,73 \times 10^{-2}$ mmol) em MeOH (350 μ l) foi adicionado NaBH₄ (5,3 mg, 0,9 mmol) a 0 °C. A mistura reacional foi mantida a esta temperatura e agitada por uma hora. A seguir, o solvente foi removido sob pressão reduzida, H₂O foi adicionada, e a solução foi extraída com AcOEt (3 \times 2 ml). A fase orgânica foi lavada com H₂O e seca (Na₂SO₄ anidro), e concentrada sob pressão reduzida para fornecer **27** (9,9 mg, 97%).

O álcool **27** (2,4 mg, $6,45 \times 10^{-3}$ mmol) foi dissolvido em EtOH (300 μ l) e 0,5 mg de Pd-C (5%) foi adicionado à solução. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por duas horas, sob atmosfera de H₂. A solução foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida para fornecer **28** (2,2 mg, 96%). O rendimento final de **28** por este método foi de 92%.

V.2.2 Preparação dos fungos

V.2.2.1 *Cunninghamella echinulata*⁷⁹

C. echinulata ATCC 10028B foi cultivado em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e estocado a 4 °C. No segundo estágio do processo de fermentação foi utilizado o meio de cultura glicose-soja, com a seguinte composição (g/l): soja (5), glicose (20), K₂HPO₄ (5), NaCl (5) e extrato de levedura (5) para 1 litro de H₂O destilada. O pH do meio foi ajustado para 7,0 (pela adição de uma solução de HCl 1 M), e depois foi autoclavado (15 lb/in²) a 121 °C por 15 min. Uma fermentação em pequena escala foi feita em erlenmeyers (frascos de 125 ml) contendo 25 ml do meio e aproximadamente 5 ml de esporos. Estes foram postos em um shaker rotatório operando a 220 rpm e a 28 °C. A fermentação em larga escala foi feita sob as mesmas condições em erlenmeyer (frascos de 250 ml) contendo 50 ml do meio e aproximadamente 5 ml do inóculo.

V.2.2.2 *Beauveria bassiana*^{50, 80}

B. bassiana ATCC 7159 foi cultivado em meio de cultura PDA e estocado a 4 °C. No segundo estágio do processo de fermentação foi utilizado o meio de cultura Difto PDB (Potato Dextrose Broth) (20 g/l). O pH do meio foi ajustado para 7,0 (pela adição de uma solução NaOH 1 M) e autoclavado (15 lb/in²) a 121 °C por 15 min. Uma fermentação em pequena escala foi feita em erlenmeyers (frascos de 125 ml) contendo 25 ml do meio e aproximadamente 5 ml de esporos. Estes foram postos em um shaker rotatório operando a 220 rpm e a 28 °C. A fermentação em larga escala foi feita sob as mesmas condições em erlenmeyer (frascos de 250 ml) contendo 50 ml do meio e 5 ml do inóculo.

V.2.3 Biotransformação da lignana **9** por *C. echinulata*

O substrato **9** (21,1 mg em 2,0 ml de DMF) foi adicionado após 24 horas de fermentação do segundo estágio de cultivo (aproximadamente 0,5 ml em cada erlenmeyer frasco). Em um dos frascos foi adicionado o mesmo volume de DMF como controle. A formação dos produtos foi monitorada por CCDC (sílica gel, Hexano/AcOEt/CHCl₃ 6:3:1) e revelada com spray de PMA (ácido fosfomolibdico) e aquecimento a 120 °C.

Depois de 20 dias de incubação, as soluções fermentadas foram combinadas, a micela foi filtrada e lavada com 250 ml de H₂O, que foi combinado com a solução filtrada. Essa solução foi neutralizada (HCl 1 M) e extraída com AcOEt (3 × 200 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante (20,1 mg) continha uma pequena quantidade do material de partida **9**, dois produtos majoritários (**29** e **30**), além de metabólitos do fungo *C. echinulata* (Esquema 10). As lignanas obtidas apresentaram R_f distintos em CCDC (sílica-gel PF₂₅₄, Hexano/AcOEt/CHCl₃ 6:3:1): 0,53 (**9**), 0,40 (**29**) e 0,22 (**30**).

Para o isolamento das lignanas biotransformadas, o sólido resultante da biotransformação de **9** (20,1 mg) por *C. echinulata*, foi dissolvido em CHCl₃/MeOH 1:1, e separado por CCDC (sílica gel 0,25 mm), Hexano/AcOEt/CHCl₃ (6:3:1), obtendo-se os compostos **29** (1,6 mg) e **30** (0,7 mg), em adição ao material de partida **9** (1,2 mg). Foi aplicado aproximadamente 10,0 mg em cada placa, os compostos foram visualizados com UV (254 nm), e extraídos com CHCl₃ (30 ml).

V.2.4 Biotransformação da lignana **28** por *C. echinulata*

O mesmo método apresentado para a biotransformação de **9** em **29** e **30** (Seção 13.3) foi aplicado para a transformação microbiana da lignana **28** (10,0 mg em 1,0 ml de DMF). O produto resultante (10,4 mg) foi analisado por CCDC (sílica-gel PF₂₅₄, CHCl₃/MeOH 97,5:2,5), e este continha o produto **31** (R_f 0,59) e os produtos de *C. echinulata* (Esquema 11). Este produto (10,4 mg) foi então dissolvido em CHCl₃/MeOH 1:1, e submetido à separação em CCDC (sílica gel 0,25 mm, CHCl₃/MeOH (49:1) para se obter **31** (1,5 mg)

V.2.5 Biotransformações das lignanas **9** e **28** por *B. bassiana*

O substrato **28** (10,0 mg em 1,0 ml de DMF) foi adicionado ao fungo após 24 horas de cultivo. A formação dos metabólitos foi acompanhada por CCDC (sílica gel, Hexano/AcOEt/CHCl₃ 6:3:1), e a revelação foi feita com spray de PMA seguida por aquecimento a 120°C.

Depois de 20 dias de incubação, os líquidos foram combinados, as micelas foram filtradas e lavadas com 250 ml de H₂O, que foi combinado com os filtrados. Este líquido foi neutralizado com solução de NaOH 1 M, e extraído com AcOEt (3 ×

200 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida.

O extrato amarelo resultante (8,3 mg) continha o composto **34** juntamente com os compostos do fungo. Este composto possui o R_f = 0,59 em CCDC sílica-gel PF₂₅₄ (Hexano/AcOEt/CHCl₃ 6:3:1) (Esquema 11).

O mesmo método de separação apresentado na seção 12.4 foi utilizado para a separação do extrato biotransformado de **28** por *B. bassiana*, onde foi isolado 0,8 mg de **31**.

A mesma metodologia apresentada foi utilizada para a biotransformação de **9** por *B. bassiana*. Ao final dos 20 dias de inoculação, notou-se que a quantidade de material biotransformado era muito pequena para a caracterização dos compostos obtidos.

V.2.6 Avaliação das atividades antitumorais e antimicrobianas

V.2.6.1 Ensaios de atividade antitumoral

- *Ensaio “Wound-Healing”*: os ensaios de inibição de migração celular envolveram exame da migração celular por “cortes” nas monocamadas da cultura celular no substrato plástico. Isto foi feito cuidadosamente com a ponta de uma pipeta esterilizada pela monocamada confluenta de células metastáticas PC-3M (câncer de próstata), deixando-se uma abertura livre na célula de aproximadamente 100 mm. A migração celular foi monitorada depois de 40 horas em culturas tratadas com as amostras (em DMSO) nas concentrações de 5 e 10 mg/ml. Os controles foram tratados com o mesmo volume de DMSO (controle negativo) e Monocilina I (controle positivo – um composto que o grupo do Prof. Dr. Gunatilaka descobriu como tendo ambas atividades: de indução da resposta “heat shock” e da inibição da motilidade celular). Uma amostra é considerada ativa se o corte permanecer limpo após 40 horas do término deste experimento;⁸¹
- *Ensaio MTT (Tetrazolium-based colorimetric assay)*: ensaio *in vitro* colorimétrico (porcentagem da viabilidade celular) utilizando a linhagem de células PC-3M (câncer de próstata) e WI-38 (células normais). Neste ensaio um composto é considerado ativo se só matar as células cancerígenas. O

tempo de incubação é de 4 horas e as células são analisadas em microscópio.

- *Ensaio “Heat Shock” (indução e inibição)*: o ensaio de inibição é designado por encontrar a expressão de inibição do tamanho Hsp90 – Proteína heat shock 90 kDa⁸² (quando uma célula é exposta ao choque térmico, Hsp90 aumenta), e esta inibição é avaliada pela medida da GFP (Green fluorescent protein). Neste ensaio, foi medida a capacidade das amostras de inibir o crescimento sem matar as células. O ensaio de indução utiliza células 3T3-Y9/B12 que contém Hsp90 (essa indução ocorre quando a célula sofre estresse). Nos dois experimentos as placas são incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera de CO₂ (10%).⁸²

V.2.6.2 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os micro-organismos utilizados nas avaliações da atividade antimicrobiana foram a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e o fungo *Candida albicans* ATCC 10261. Os controles positivos foram Vancomicina (antibactericida) e Benlato (antifúngico), e o controle negativo foi o solvente utilizado nos bioensaios DMSO/MeOH 1:1. Os micro-organismos cresceram em placas de Petri com o meio PDA (Potato Dextrose Agar), e após duas horas, com o auxílio de um molde esterilizado, foram feitos “poços” no meio de aproximadamente 6,0 mm. Cada amostra e os controles positivos, dissolvidos em DMSO/MeOH 1:1, foram preparados para uma concentração final de 200 µg/ml e aplicados em cada “poço” das placas. As placas com bactérias foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e as com fungos foram incubadas pelo mesmo período, mas a temperatura ambiente. A atividade anti-microbiana foi avaliada pela medida do diâmetro da zona limpa em torno dos poços que mostra inibição do crescimento microbiano (são considerados ativos os compostos com uma zona de inibição de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro).

V.2.7 Dados físicos e espectrométricos dos produtos biotransformados e de transformações químicas

(7*S*,7'*R*,8*S*,8'*S*)-8,8'-Dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol (27): Sólido amorfo incolor; $[\alpha]_D^{24}$ $-38,2^\circ$ (c 0,053, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,11 (1H, *sl*, H-3), 7,12 (1H, *sl*, H-6), 4,98 (1H, *tl*, *J* = 6,4 Hz, H-7), 2,19 (1H, *ddq*, *J* = 2,4, 6,4, 6,8 Hz, H-8), 0,90 (3H, *d*, *J* = 6,8 Hz, H-9), 6,52 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,76 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5'), 6,61 (1H, *dd*, *J* = 2,0, 8,4 Hz, H-6'), 3,51 (1H, *d*, *J* = 10,4 Hz, H-7'), 2,06 (1H, *ddq*, *J* = 2,4, 10,0, 6,8 Hz, H-8'), 0,88 (3H, *d*, *J* = 6,8 Hz, H-9'), 3,76 (3H, *s*, OMe-3'), 3,85 (3H, *s*, OMe-4'), 3,58 (3H, *s*, OMe-4), 3,87 (3H, *s*, OMe-5), 1,20 (1H, *d*, *J* = 6,4 Hz, OH); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 130,6 (C-1), 131,4 (C-2), 112,2 (C-3), 147,8 (C-4), 149,9 (C-5), 108,6 (C-6), 72,6 (C-7), 39,9 (C-8), 6,7 (C-9), 138,2 (C-1'), 112,3 (C-2'), 148,9 (C-3'), 147,5 (C-4'), 110,8 (C-5'), 121,7 (C-6'), 49,4 (C-7'), 39,4 (C-8'), 17,7 (C-9'), 55,8, 55,9 (4 × OMe-3',4',4,5); APCI-MS (probe) + 70 eV, *m/z*: 355 [M + H – H₂O]⁺.

(7'*R*,8*R*,8'*R*)-8,8'-Dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignana (28): Sólido amorfo incolor; $[\alpha]_D^{24}$ $-35,4^\circ$ (c 0,047, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,32 (1H, *s*, H-3), 6,58 (1H, *s*, H-6), 2,84 (1H, *dd*, *J* = 5,2, 16,4 Hz, H-7_a), 2,44 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 16,4 Hz, H-7_b), 2,02 (1H, *m*, H-8), 0,89 (3H, *d*, *J* = 7,2 Hz, H-9), 6,55 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,72 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-5'), 6,49 (1H, *dd*, *J* = 2,0, 8,4 Hz, H-6'), 3,67 (1H, *d*, *J* = 6,0 Hz, H-7'), 1,90 (1H, *m*, H-8'), 0,89 (3H, *d*, *J* = 7,2 Hz, H-9'), 3,85 (3H, *s*, OMe-3), 3,64 (3H, *s*, OMe-4), 3,78 (3H, *s*, OMe-3'), 3,83 (3H, *s*, OMe-4'); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 128,5 (C-1), 129,6 (C-2), 110,7 (C-3), 147,3 (C-4), 148,6 (C-5), 113,4 (C-6), 40,8 (C-7), 34,8 (C-8), 16,5 (C-9), 139,8 (C-1'), 111,3 (C-2'), 147,2 (C-3'), 147,2 (C-4'), 112,3 (C-5'), 121,3 (C-6'), 50,9 (C-7'), 28,6 (C-8'), 15,4 (C-9'), 55,9 (OMe-3'), 55,8 (OMe-4'), 55,8 (OMe-4), 55,8 (OMe-5); APCI-MS (probe) + 70 eV, *m/z*: 357 [M + H]⁺.

(7'*R*,8*S*,8'*S*)-8,8'-Dimetil-4'-hidróxi-3',4,5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona (29): Óleo incolor. $[\alpha]_D^{24}$ $-28,1^\circ$ (c 0,067, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,41 (1H, *s*, H-3), 7,54 (1H, *s*, H-6), 2,76 (1H, *dq*, *J* = 4,0, 7,2 Hz, H-8), 1,11 (3H, *d*, *J* = 7,2 Hz, H-9), 6,53 (1H, *m*, H-2'), 6,82 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-5'), 6,53 (1H, *m*, H-6'), 3,90 (1H, *d*, *J*

= 5,5 Hz, H-7'), 2,39 (1H, *ddq*, $J = 5,5, 4,0, 7,2$ Hz, H-8'), 0,97 (3H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-9'), 3,78 (3H, *s*, OMe-3'), 3,75 (3H, *s*, OMe-4), 3,93 (3H, *s*, OMe-5), 5,51 (1H, *sl*, OH); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 125,5 (C-1), 138,8 (C-2), 111,8 (C-3), 153,7 (C-4), 148,1 (C-5), 108,1 (C-6), 200,0 (C-7), 42,6 (C-8), 11,9 (C-9), 135,6 (C-1'), 110,9 (C-2'), 146,6 (C-3'), 144,3 (C-4'), 114,1 (C-5'), 121,8 (C-6'), 50,4 (C-7'), 42,6 (C-8'), 15,9 (C-9'), 56,0 (OMe-3'), 55,9 (OMe-4), 56,0 (OMe-5); APCI-MS (probe) + 70 eV, m/z : 357 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(7'R,8S,8'S)-8,8'-dimetil-4',5-dihidróxi-3',4-dimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona (30): Óleo incolor. $[\alpha]_D^{24}$ 47,9° (c 0,033, CHCl_3); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,40 (1H, *s*, H-3), 7,59 (1H, *s*, H-6), 2,75 (1H, *dq*, $J = 4,0, 7,2$ Hz, H-8), 1,09 (3H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-9), 6,55 (1H, *m*, H-2'), 6,82 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,55 (1H, *m*, H-6'), 3,93 (1H, *d*, $J = 5,2$ Hz, H-7'), 2,36 (1H, *ddq*, $J = 5,2, 4,0, 7,2$ Hz, H-8'), 0,96 (3H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-9'), 3,79 (3H, *s*, OMe-3'), 3,78 (3H, *s*, OMe-4), 5,54 (1H, *sl*, OH-5), 5,51 (1H, *sl*, OH-4'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 127,0 (C-1), 138,0 (C-2), 111,3 (C-3), 145,0 (C-4), 152,0 (C-5), 111,9 (C-6), 200,0 (C-7), 42,5 (C-8), 11,9 (C-9), 135,6 (C-1'), 111,0 (C-2'), 147,0 (C-3'), 144,3 (C-4'), 114,1 (C-5'), 121,8 (C-6'), 50,5 (C-7'), 42,6 (C-8'), 15,9 (C-9'), 55,9 (OMe-3'), 56,0 (OMe-4); APCI-MS (probe) + 70 eV, m/z : 343 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

rel. (7'R,8S,8'S)-8,8'-Dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-8-ol (31): Sólido amorfo incolor. $[\alpha]_D^{24}$ 13,4° (c 0,083, CHCl_3); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,17 (1H, *s*, H-3), 6,53 (1H, *s*, H-6), 3,04 (1H, *d*, $J = 15,2$ Hz, H-7_a), 2,82 (1H, *d*, $J = 15,2$ Hz, H-7_b), 1,16 (3H, *s*, H-9), 6,59 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,79 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,70 (1H, *dd*, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6'), 3,42 (1H, *d*, $J = 10,4$ Hz, H-7'), 1,99 (1H, *dd*, $J = 10,4, 6,4$ Hz, H-8'), 0,89 (3H, *d*, $J = 6,4$ Hz, H-9'), 3,78 (3H, *s*, OMe-3'), 3,84 (3H, *s*, OMe-4'), 3,56 (3H, *s*, OMe-4), 3,87 (3H, *s*, OMe-5); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 127,5 (C-1), 138,2 (C-2), 112,6 (C-3), 154,8 (C-4), 147,6 (C-5), 110,8 (C-6), 47,2 (C-7), 72,2 (C-8), 20,4 (C-9), 130,7 (C-1'), 111,9 (C-2'), 149,0 (C-3'), 147,3 (C-4'), 111,1 (C-5'), 121,6 (C-6'), 53,1 (C-7'), 45,9 (C-8'), 12,6 (C-9'), 55,9 (OMe-3'), 55,8 (OMe-4'), 55,8 (OMe-4), 55,8 (OMe-5); Positive APCI-MS (probe) 70 eV, m/z : 355 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos neste trabalho permitem fazer as seguintes considerações:

O estudo fitoquímico dos extratos hexânico de raízes e hexânico de folhas de *Aristolochia malmeana* resultou no isolamento e na identificação de cinco substâncias, sendo quatro lignanas e um diterpeno. Destes, destaca-se a (-)-(8S,8'R,9S)-cubebina, que foi isolada somente de duas outras espécies vegetais, *Aristolochia lagesiana* e *Aristolochia pubescens*, e a (-)-filigenina, que foi isolada pela primeira vez no gênero *Aristolochia*.

Na busca de novas fontes de inseticidas naturais, de extrema importância para a agricultura brasileira, foram realizados bioensaios utilizando a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) como inseto-modelo. Neste estudo de avaliação da atividade inseticida, ficou evidenciado que estas lagartas são susceptíveis ao extrato hexânico de raízes de *A. malmeana* e à lignana (-)-kusunoquinina. Os estudos também demonstraram que a (-)-kusunoquinina é a responsável pela atividade do extrato, e que os outros constituintes, tais como (-)-hinoquinina e (-)-ácido colavênico, possuem um efeito antagonista sobre esta atividade.

Como existe uma grande semelhança morfológica entre as diversas espécies de *Aristolochia*, e por estas plantas serem vendidas indiscriminadamente em mercados populares sem a devida identificação botânica para os mais diversos fins, era necessário se ter um método rápido e eficiente para a classificação e identificação destas espécies. As análises por CG-EM e quimiometria dos óleos essenciais obtidos das raízes de várias espécies de *Aristolochia* possibilitaram a classificação de *A. malmeana* e de outras espécies em grupos morfológicos. Além disto, estas análises mostraram ser uma ferramenta eficiente para identificação de espécies de *Aristolochia* brasileiras. As análises dos óleos essenciais de caules e folhas de espécies de *Aristolochia giberti*, por CG-EM e quimiometria, mostraram grande similaridade entre as espécies cultivadas no Brasil e aquelas na Argentina, o que permitiu confirmar a identificação da espécie e diferenciar os óleos de acordo com as partes da planta e a origem da planta (Brasil, Argentina e Paraguai).

O estudo fitoquímico do extrato hexânico de raízes de *Holostylis reniformis* resultou no isolamento de quatro lignanas, sendo uma inédita [*rel.* (7R,7'R,8S,8'S)-4-

hidroxi-3',4',5-trimetoxi-2,7'-ciclolignan-7-ol]. É importante destacar que algumas lignanas ariltetralônicas isoladas desta espécie possuem comprovada atividade antiplasmódica, e o isolamento de novas lignanas ajudará na investigação dos sítios ativos destas substâncias, permitindo correlacionar a estrutura com a atividade biológica.

Foram estudadas duas rotas sintéticas para a obtenção de lignanas ariltetralônicas com comprovada atividade antiplasmódica, e uma delas representa uma alternativa para a produção destas substâncias, pois desta forma, poder-se-á obter material suficiente para a realização de ensaios de biossegurança farmacológica fundamentais para a produção de um novo fármaco no futuro. Entretanto, esta síntese não é estereosseletiva, e pela avaliação da atividade antiplasmódica pode-se constatar que a atividade diminui quando se utiliza substâncias sintetizadas em vez de naturais, e que esta diminuição pode ter relação com a pureza enantiomérica. A outra rota sintética desenvolvida mostrou-se ineficiente para a obtenção de lignanas ariltetralônicas, mas foram obtidos outros produtos interessantes, como benzofuranos e isocoumarinas, sendo que três dos compostos obtidos são inéditos na literatura [2,3-diidro-5,6-dimetoxi-2-metil-benzofurano, propanoato de 1-(2'-hidroxi-4',5'-dimetoxifenil)-propan-2-ila e propanoato de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-propan-2-ila].

Transformações químicas e biotransformações de lignanas com os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Beauveria bassiana* foram realizados. Neste estudo, uma lignana ariltetralônica foi desmetilada por *C. echinulata* produzindo dois metabólitos, que sofreram desmetilação no anel C e nos anéis A e C, respectivamente. A mesma lignana foi transformada por reações químicas em uma lignana ariltetralínica que foi oxidada em C-8 por *C. echinulata* e *B. bassiana* produzindo uma nova lignana [(7'R,8S,8'S)-8,8'-dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-8-ol]. Com os resultados das biotransformações, tem-se agora caminhos abertos para a obtenção de lignanas com diferenças estruturais.

REFERÊNCIAS

- 1 AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. ^{13}C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, p. 389-418, 1985.
- 2 MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1493-1523, 2000.
- 3 GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1537-1570, 1972.
- 4 SELLARS, J. D.; STEEL, P. G. Advances in the synthesis of aryltetralin lignan lactones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 23, p. 3815-3828, 2007.
- 5 LU, J.; TUO, X.; YU, F. Effects of schisandrone on learning and memory abilities of rats with Alzheimer-like disease. **Shanxi Yiyao Zazhi**, v. 36, p. 27-29, 2007.
- 6 REZENDE, K. R.; DAVINO, S. C.; BARROS, S. B. M.; KATO, M. J. Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from *Virola sebifera* (Aubl.). **Natural Product Research**, v. 19, p. 661-666, 2005.
- 7 ANDRADE NETO, V. F.; SILVA, T. da; LOPES, L. M. X.; ROSÁRIO, V. E.; VAROTTI, F. P.; KRETTLI, A. U. Antiplasmodial activity of aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2346-2350, 2007.
- 8 FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (Brasil). T. da Silva; A. U. Krettli; V. F. Andrade Neto; L. M. X. Lopes. **Lignanas, lignanas ariltetralônicas, extratos, processos de obtenção de lignanas, processo de obtenção de extratos, uso de lignanas, uso de extratos e composição para prevenir e tratar malária**. PI0404986-1, 9 Ago. 2004, 31 Maio 2005.
- 9 ADJANGBA, S. M.; BILLET, M. D. Recherches sur les Lignanes. III – confirmation par synthèse totale de la structure de la galcatine. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, v. 1, p. 1970-1977, 1962.
- 10 LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.

11 HOEHNE, F. C. **Flora brasileira**: Aristolochiaceaes. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1942. v. 15, pt. 2.

12 MIZUNO, M.; OKA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, H.; INUMA, M.; MURATA, H. Comparison of *Aristolochia* species with chemical constituents. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1310-1311, 1991.

13 NASCIMENTO, I. R.; MURATA, A. T.; BORTOLI, S. A.; LOPES, L. M. X. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. **Pest Management Science**, v. 60, p. 413-416, 2003.

14 FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ FILHO, R. Constituintes das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v. 23, p. 42-46, 2000.

15 BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, G. E. P.; PEDRAZZI, A. H. P.; SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 279-282, 2001.

16 MESSIANO, G. B. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade inseticida de *Aristolochia malmeana***. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

17 MESSIANO, G. B.; VIEIRA, L.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X.; BORTOLI, S. A.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2655-2659, 2008.

18 FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E.; CAPELLARI JUNIOR, L. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 168-175, 2008.

19 VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

20 NAVICKIENE, H. M. D.; MIRANDA, J. E.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Management Science**, v. 63, p. 399-403, 2007.

21 UNIVERSITY OF FLORIDA. Institute of Food and Agricultural Sciences. **Featured creatures**.

Disponível em: <<http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm>>.

Acesso em: 24 fev. 2010.

22 RAUSCHER, J.; GUILLEN, R. M.; ALBORES-VELASCO, M.; GONZALEZ, G.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN, H. J. The repellence of *Aristolochia aff. orbicularis* roots against the corn borer *Sitophilus zeamais*. **Journal of Biosciences**, v. 56, p. 575-580, 2001.

23 LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Antifeedant activity of metabolites of *Aristolochia albida* against the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 669-673, 1993.

24 BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; MARTINO, V. S.; PINZÓN, R.; COUSSIO, J. D.; ALVAREZ, J. C. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 219-223, 1999.

25 JBILOU, R.; AMRI, H.; BOUAYAD, N.; GHAILANI, N.; ENNABILI, A.; SAYAH, F. Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, α -amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 959-964, 2008.

26 ZARROUG, I. M. A.; NUGUD, A. D.; BASHIR, A. K.; MAGEED, A. A. Evaluation of Sudanese plants extracts as mosquito larvicides. **Pharmaceutical Biology**, v. 26, p. 77-80, 1988.

27 KARMEGAM, N.; SAKTHIVADIVEL, M.; ANURADHA, V.; THILAGAVATHY, D. Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 137-140, 1997.

28 SECOY, D. M.; SMITH, A. E. Use of plants in control of agricultural and domestic pests. **Economic Botany**, v. 37, p. 28-57, 1983. In: SciFinder Scholar. Version 2007.

29 VIEIRA, L.; PASCOLI, I. C.; BORTOLI, S. A.; LOPES, L. M. X. Efeito de extratos de *Aristolochia lagesiana* (Aristolochiaceae) sobre a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 245-250, 2009.

30 CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 185-189, 2000.

31 CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, p. 55-57, 2004.

32 PRIESTAP, H. A.; VAN BAREN, C. M.; LIRA, P. D. L.; COUSSIO, J. D.; BANDONI, A. L. Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 221-225, 2003.

33 VILA, R.; MUNDINA, M.; MUSCHIETTI, L.; PRIESTAP, H. A.; BANDONI, A. L.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 1127-1129, 1997.

34 PRIESTAP, H. A.; VAN BAREN, C. M.; LIRA, P. D. L.; PRADO, H. J.; NEUGEBAUER, M.; MAYER, R.; BANDONI, A. L. Essential oils from aerial parts of *Aristolochia gibertii* Hook. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 69-71, 2002.

35 CANELA, N.; FERRO, E.; ALVARENGA, N.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S. Chemical composition of the essential oil of *Aristolochia gibertii* Hooker from Paraguay. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 566-567, 2004.

36 LEITÃO, G. G.; MENEZES, D. L. F. S.; KAPLAN, M. A. C.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. Essential oils from Brazilian *Aristolochia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, p. 403-408, 1991.

37 PRIESTAP, H. A.; BANDONI, A. L.; NEUGEBAUER, M.; RÜCKER, G. Investigation of the essential oils from *Aristolochia triangularis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, p. 95-98, 1990.

38 USUBILLAGA, A.; KHOURI, N.; ROJAS, L. B. Essential oil from the leaves of *Aristolochia odoratissima* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 128-129, 2001.

39 LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 73, p. 65-67, 1992.

40 SILVA, T. da; LOPES, L. M. X. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 929-937, 2006.

41 REZENDE, K. R.; KATO, M. J. Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 427-432, 2002.

42 LI, L-N.; HUNG, X. Schisandrone, a new 4-aryltetralone lignan from *Schisandra sphenanthera*. **Planta Medica**, v. 51, p. 217-219, 1985.

43 MESSIANO, G. B.; SILVA, T. da; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Biosynthesis of antimalarial lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 590-596, 2009.

44 FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Malária**. Disponível em:
<<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=19&sid=6>>.
Acesso em: 24 fev. 2010.

45 BRASIL. Ministério da Saúde. **Funasa**. Disponível em:
<http://www.funasa.gov.br/internet/desai/arquivos/desai_vigilanciaControleMalaria.pdf>.
Acesso em: 24 fev. 2010.

46 GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 564-573, 2002.

47 ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial transformation by *Beauveria bassiana*. In: RAI, M. (Ed.). **Advances in fungal biotechnology**. New Delhi: International Pvt, 2009. 514 p.

48 ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies – a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16, 2009.

49 MIYAZAWA, M.; KASAHARA, H.; KAMBOKA, H. Biotransformation of lignans: a specific microbial oxidation of (+)-eudesmin and (+)-magnolin by *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1501-1507, 1993.

50 ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial transformation of amino- and hydroxyanthraquinones by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1525-1527, 2006.

51 PASCOLI, I. C.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Configurational analysis of cubebins and bicubebin from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 735-742, 2006.

52 LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1516-1518, 1983.

53 SUN, N -J.; CHANG, C -J.; CASSADY, J. M. A cytotoxic tetralone derivative from *Pararistolochia flos-avis*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3051-3153, 1987.

54 SALAH, M. A.; BEDIR, E.; TOYANG, N. J.; KHAN, I. A.; HARRIES, M. D.; WEDGE, D. E. Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L) Muell. Et Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7607-7610, 2003.

55 AQUINO, R.; CIAVATTA, M. L.; TOMMASI, N.; GÁCS-BAITZ, E. Tetranorditerpenes from *Detarium microcarpum*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1823-1825, 1992.

56 ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MADUREIRA, L. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TIEKINK, E. R. T. (-)-Kolavenic acid. **Acta Crystallographica**, v. E64, p. o1114/1-o1114/13, 2008.

57 LEORA SOFTWARE. **Polo-PC, a user's guide to probit or logit analysis**. Berkeley, 1994.

58 MARCHESINI, A. M.; PRADO, G. G.; MESSIANO, G. B.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1598-1608, 2009.

59 VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

60 MASSADA, Y. **Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 334 p.

61 ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing, 1995. 469 p.

62 INFOMETRIX INC. **Pirouette® for Windows**. Woodinville, 2003. Version 3.11.

63 SILVA, T. da; LOPES, L. M. X. Aryltetralone lignans and 7,8-seco-lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 751-759, 2004.

64 KERTI, G.; KURTÁN, T; ILLYÉS, T-Z.; KÖVÉR, K. E.; SÓLYOM, S.; PESCIPELLI, G.; FUJIOKA, N.; BEROVA, N.; ANTUS, S. Enantioselective synthesis of 3-methylisochromans and determination of their absolute configurations by circular dichroism. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 296-305, 2007.

65 QUIDEAU, S.; POUYSÉGU, L.; LOONEY, M. A. Novel preparation of orthoquinol acetates and their application in oxygen heterocyclization reactions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 9597-9600, 1998.

66 TAKEYA, T.; DOI, H.; OGATA, T.; OKAMOTO, I.; KOTANI, E. Aerobic oxidative dimerization of 1-naphthols to 2,2'-binaphthoquinones mediated by SnCl₄ and its application to natural product synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 9049-9060, 2004.

67 KOUL, S.; SINGH, B.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. New chemo and chemo-enzymatic synthesis of β -benzyl- γ -butyrolactones. **Tetrahedron**, v. 59, p. 3487-3491, 2003.

68 GRASSO, S.; DE SARRO, G.; DE SARRO, A.; MICALÉ, N.; ZAPPALÁ, M.; PUJA, G.; BARALDI, M.; DE MICHELI, C. Synthesis and anticonvulsant activity of novel and potent 6,7-methylenedioxyphthalazin-1(2H)-ones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2851-2859, 2000.

69 NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Stereoselective synthesis of 8,9-licarinediols. **Tetrahedron**, v. 56, p. 9181-9193, 2000.

70 TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p. 673-675, 1976.

- 71 DEJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, p. 710-718, 1979.
- 72 ZALIS, M. G.; PANG, L.; SILVEIRA, M. S.; MILHOUS, W. K.; WIRTH, D. F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 630-637, 1998.
- 73 KONNO, C.; XUE, H. Z.; LU, Z. Z.; MA, B. X.; ERDELMEIER, C. A. J.; CHE, C. T.; CORDELL, G. A.; SOEJARTO, D. D.; WALLER, D. P.; FONG, H. H. S. 1-Aryltetralin lignans from *Larrea tridentate*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1113-1117, 1989.
- 74 KASATKIN, A. N.; CHECKSFIELD, G.; WHITBY, R. J. Short total synthesis of (±)-galbulin and (±)-isogalbulin using zirconium chemistry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 3236-3238, 2000.
- 75 CHENG, Y. B.; CHANG, M. T.; LO, Y. W.; HO, C. J.; KUO, Y. C.; CHIEN, C. T.; CHEN, S. Y.; LIOU, S. S.; KUO, Y. H.; SHEN, Y. C. Oxygenated lignans from the fruits of *Schisandra arisanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1663-1668, 2009.
- 76 NAZAROVA, Z. N.; CHUPRUNOVA, O. A. Chemistry of 5-halofurans – XIII. Reactions of 5-halofurfurals with metal thiocyanates. **Zhurnal Obshchei Khimii**, v. 30, p. 2825-2829, 1960.
- 77 TRAVERSO, G. Natural resinol – III. Constitution of olivil and derivatives. **Gazzeta Chimica Italiana**, v. 90, p. 792-807, 1960.
- 78 TRAVERSO, G. Natural resinols – IV. Constitution of iso-ovrddot-olivil. **Gazzeta Chimica Italiana**, v. 90, p. 808-830, 1960.
- 79 FUSKA, J.; PROKSA, B.; STURDÍKOVÁ, M.; FUSKOVÁ, A. Microbial transformation of 2,3-dihydro-3-methoxywithaferin-A by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1613-1615, 1986.
- 80 ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial metabolism of 1-aminoanthracene by *Beauveria bassiana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5085-5089, 2008.

81 ZHAN, J.; BURNS, A. M.; LIU, M. X.; FAITH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 227-232, 2007.

82 TURBYVILLE, T. J.; WIJERATNE, E. M. K.; LIU, M. X.; BURNS, A. M.; SELIGA, C. J.; LUEVANO, L. A.; DAVID, C. L.; FAETH, S. H.; WHITESELL, L.; GUNATILAKA, A. A. L. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran Desert. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 178-184, 2006.