



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE ARARAQUARA**



Carolina Mendes Viana

Estudo fitoquímico da espécie *Aristolochia giberti* (Aristolochiaceae)

Araraquara 2012

Carolina Mendes Viana

Estudo fitoquímico da espécie *Aristolochia giberti* (Aristolochiaceae)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara -
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia M. Xavier Lopes

Colaborador: Cláudio Rodrigo Nogueira

Departamento de Química Orgânica

Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Araraquara 2012

DADOS CURRICULARES

CAROLINA MENDES VIANA

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 08/11/1989

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Bernardo do Campo, São Paulo

Estado Civil: Solteiro

Filiação

Pai: José Luiz Bitarelli Viana **Mãe:** Rosemary Mendes Vieira Viana

Profissão: Estudante

Documento de Identidade: 34.185.122-X

Cadastro de Pessoa Física: 370.215.508-20

Endereço: Rua da Represa, nº 141, apartamento 71, Rudge Ramos, São Bernardo do Campo
– São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Pela oportunidade, paciência, compreensão, broncas, conversas e experiência adquirida, agradeço com profunda admiração à Prof^a. Lucia, a principal responsável por me ajudar com este trabalho. Agradeço também, com muito carinho, meus queridos companheiros de laboratório, Cláudio, Doni e Juliana, pessoas especiais que estiveram comigo e me ajudaram muito em todo o processo da pesquisa. Agradeço a FAPESP e CNPq pela oportunidade de bolsa para minha Iniciação Científica.

Pela experiência adquirida na minha formação como uma profissional da saúde, agradeço à entidade Jornada Farmacêutica da UNESP (JFU), junto com a qual aprendi que sou capaz de conquistar meus objetivos desde que eu me esforce e trabalhe.

Pelo carinho e exemplo de profissionais, agradeço em especial à Prof^a Márcia Silva e ao Alexandre Pazoti.

Com um aperto no peito, agradeço a Deus pela oportunidade de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas que conquistei nesses anos, amigos inesquecíveis os quais foram essenciais pelo meu crescimento e evolução como espírito.

Por fim, agradeço **IMENSAMENTE**, e com lágrimas nos olhos, aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir; por serem o meu maior orgulho e exemplo de profissionais, de seres humanos e de vida. Dedico a eles cada superação que tive, cada conquista e cada elogio que recebi em todos os anos da minha vida. Agradeço a Deus por tudo o que sou e por tudo o que aprendi nesses cinco anos.

SOLIS DOMI SALUS

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos	2
3. Desenvolvimento.....	3
3.1 Especificação dos materiais, instrumentos e reagentes utilizados.....	3
3.2 Coleta do material vegetal	3
3.3 Preparação dos extratos	3
3.4 Fracionamento do extrato acetônico de folhas	4
3.4.1 Substâncias identificadas no extrato acetônico de folhas.....	6
3.5 Fracionamento do extrato acetônico de raízes	14
3.5.1 Identificação estrutural da substância isolada	15
3.5.2 Substâncias identificadas no extrato acetônico de raízes	17
4. Conclusão	18
5. Referências Bibliográficas	19
6. Anexos.....	21

Resumo

O interesse pelo estudo fitoquímico e biológico das espécies pertencentes à *Aristolochiaceae* é devido ao vasto uso desta na medicina tradicional e homeopática. Muitas das espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* têm apresentado atividades diversas como antiinflamatórias, sedativas, diuréticas e abortivas. O presente trabalho descreve o isolamento, a identificação e a elucidação estrutural dos constituintes químicos da *Aristolochia giberti*, utilizando métodos de partição e cromatográficos. O extrato acetônico de folhas da espécie foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo as frações resultantes analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa e posteriormente por métodos espectrométricos (IV, UV, EM, RMN de ^1H e de ^{13}C) e análise elementar (C, H, N e S), identificando assim um total de cinco substâncias: ácido copálico, ácido *ent*-labdan-8 β -ol-15-óico, a lignana kusunoquinina, e os dois epímeros da cubebina. Da mesma forma, o extrato acetônico de raízes foi submetido ao mesmo tipo de fracionamento e às mesmas análises utilizadas no acetônico de folhas, resultando na identificação de quatro substâncias: ácido 13,14-dihidrocolavênico (composto até então não obtido da espécie *A. giberti*), os dois epímeros da cubebina e a kusunoquinina.

Palavras-chave: *Aristolochiaceae*, *A. giberti*, ácido 13,14-dihidrocolavênico, epímeros da cubebina.

Lista de Esquemas

Esquema 1: Fracionamento do extrato acetônico de folhas por CC.....	6
Esquema 2: Fracionamento do extrato acetônico de raízes por CC.....	15

Lista de Figuras

Figura 1 Substâncias isoladas do extrato acetônico de folhas de <i>A. giberti</i>	7
Figura 2. Ácido copálico (substância I).....	7
Figura 3. Ácido eperúico (substância II).....	8
Figura 4. Kusunoquinina (substância III)	10
Figura 5. Ácido ent-8 β -hidróxi-labdan-15-óico (substância IV)	12
Figura 6. Equilíbrio entre os isômeros da cubebina (substância V)	13
Figura 7. Ácido 13,14-dihidrocolavênico (substância VI).....	15
Figura 8. Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC	16

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H de I (CDCl_3 , 500MHz, $J = \text{Hz}$)	8
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H de II (CDCl_3 , 500MHz, $J = \text{Hz}$).....	9
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H de III (CDCl_3 , 300MHz, $J = \text{Hz}$)	11
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de IV (CDCl_3 , 300MHz, $J = \text{Hz}$)	12
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H de V (CDCl_3 , 300MHz, $J = \text{Hz}$)	13
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de VI (CDCl_3 , 500MHz, $J = \text{Hz}$)	17

1. Introdução

As espécies da família Aristolochiaceae são conhecidas popularmente como “cipó mil homens”, “patinho”, “serpentaria”, “batatinha”, “jarrinha” e “papo de peru”^{1,2}. Algumas destas apresentam atividades antiinflamatórias, sedativas, diuréticas, antitérmicas, antiofídicas, depurativas e abortivas, e por esta razão são amplamente utilizadas na medicina tradicional e homeopática³. Contudo, em doses altas, o uso de *Aristolochia* pode causar náuseas, vômitos, diarreias, distúrbios cerebrais e hemorragias internas, além de lesões renais e hepáticas irreversíveis².

A espécie *Aristolochia giberti* Hook, conhecida popularmente como “patinho” e “ipemi”, é uma planta robusta, glabra, presente na Argentina, Brasil e Paraguai². Estudos realizados no Paraguai relatam a atividade antioxidante, contra a peroxidação enzimática e não enzimática de lipídios, presente no extrato metanólico das folhas da espécie deste habitat⁴. Foi relatada, também, atividade antimicrobiana em variados extratos e frações da planta, em que a porção etanólica das partes aéreas da planta foi considerada como capaz de agir contra o fungo *Candida albicans* e contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, e assim pode ser caracterizada como uma espécie mais ativa que *A. triangularis*, já utilizada popularmente como medicinal⁵.

Foram isolados dos extratos hexânico de caules e etanólico de folhas, em estudos anteriores realizados nos nossos laboratórios, diterpenos labdânicos, diterpenos clerodânicos, esteróides e lignanas dibenzilbutirolactônicas⁶. A kusunoquinina, lignana butirolactônica presente no extrato hexânico, quando testada topicamente sobre a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*), apresentou alta atividade inseticida^{7,8}.

2. Objetivos

O objetivo do projeto foi o de dar continuidade ao estudo químico da espécie *Aristolochia giberti*, utilizando métodos de partição e cromatográficos para isolar e purificar constituintes químicos; métodos espectrométricos (IV, UV, EM, RMN de ^1H e de ^{13}C) e físicos ($[\alpha]_D$ e $\Delta p.f.$) para elucidar as suas estruturas.

3. Desenvolvimento

3.1 Especificação dos materiais, instrumentos e reagentes utilizados

- Para Cromatografia em Coluna (CC) foi utilizada sílica gel 0,05-0,2 mm Mesh ASTM; (60H);
- Para Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Preparativa (CCDP) foram utilizadas, respectivamente, sílica gel tipo 60 e sílica gel 60 PF₂₅₄;
- As revelações foram efetuadas com radiações UV de 254 nm e 365 nm, e vapores de iodo;
- Foram utilizados os solventes CDCl₃ e DMSO-*d*₆ para obtenção dos espectros de RMN em espectrômetro Varian INOVA 500 (11,74 T) e 300 (7,4 T);
- A concentração dos solventes foi feita sob pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotativo Büchi;
- Os solventes não deuterados foram da marca J. T. Baker, com grau HPLC.

3.2 Coleta do material vegetal

A coleta da espécie foi realizada nas dependências do Instituto de Química – UNESP (Araraquara – SP), em fevereiro de 2003. A identificação da espécie vegetal foi feita pelo Dr. Condorcet Aranha (Secretaria da Agricultura e Meio Ambiente-SAMA – Joinville-SC).

3.3 Preparação dos extratos

As diferentes partes do material vegetal foram secas em estufa à aproximadamente 45°C, moídas e submetidas à extração por maceração com solventes orgânicos inertes e de polaridade diferente (hexano, acetona e etanol).

3.4 Fracionamento do extrato acetônico de folhas

Os extratos obtidos foram inicialmente analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) (hex/AcOEt 7:3; CHCl₃/MeOH 9:1 e 7:3) e RMN de ¹H. Com base nos perfis cromatográficos e nos espectros, foi selecionado o extrato acetônico de folhas para dar início ao isolamento dos constituintes.

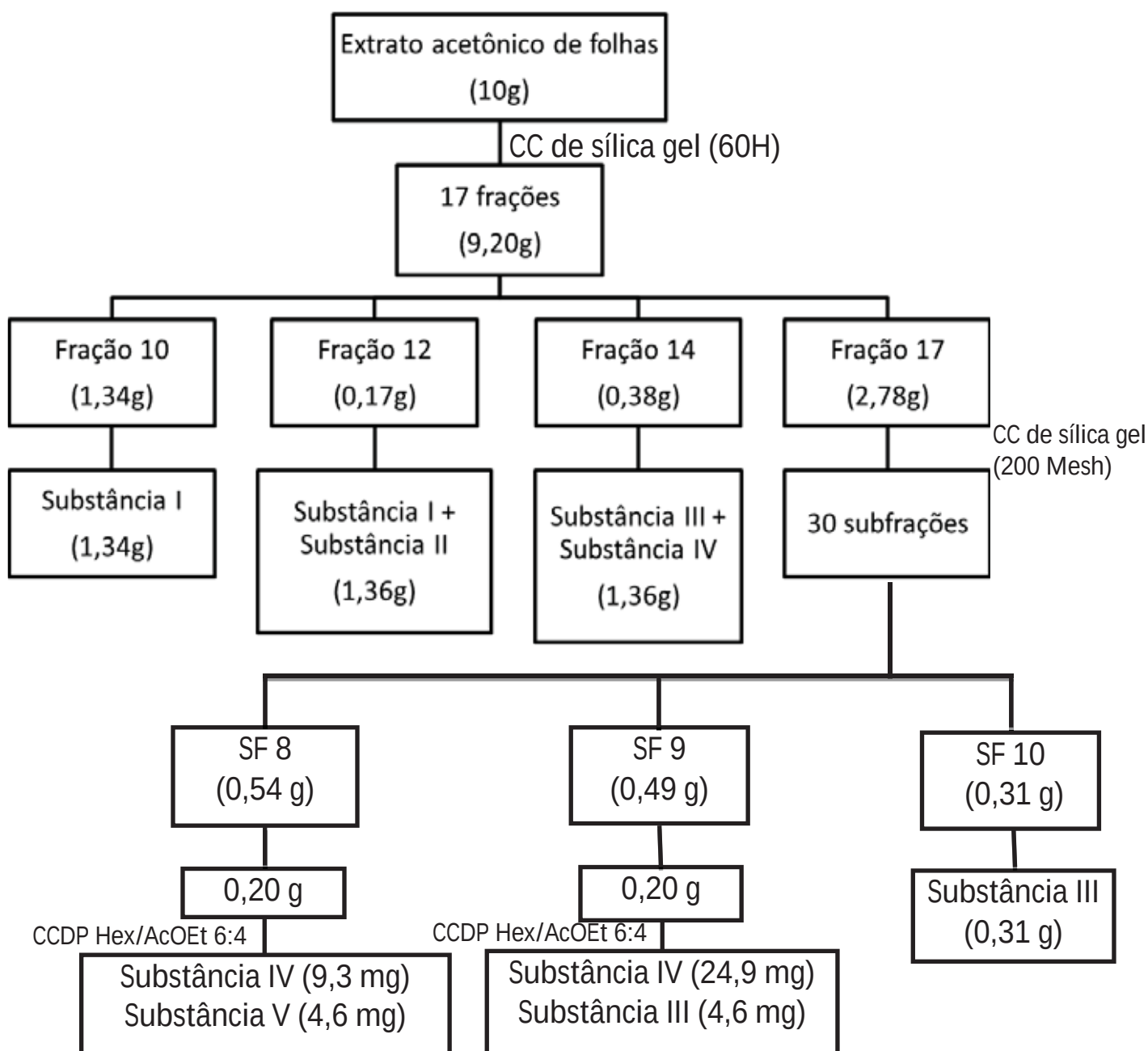
Uma porção do extrato acetônico (10 g) foi submetida à Cromatografia em Coluna (CC) de sílica gel 60H (200 g), eluída com hexano, acetato de etila, e metanol, em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se 17 frações de 125 mL cada. Mediante análises por CCDC [hex/AcOEt (4:1; 7:3 e 3:2) e CHCl₃/MeOH (9:1; 4:1 e 7:3)] e RMN de ¹H foram selecionadas as frações 10 (1,34 g), 12 (0,17 g), 14 (0,38 g) e 17 (2,78 g) para análise e posteriores fracionamentos. De acordo com a análise por RMN de ¹H, verificou-se o isolamento do diterpeno ácido copálico na primeira (**I**; Fr. 10; 1,34 g), e misturas de substâncias presentes nas frações seguintes. Verificou-se também a presença de uma mistura de dois diterpenos na fração 12, o ácido eperúico (**II**; Fr. 12), e em menor quantidade o diterpeno **I** (Fr. 12; 0,17g), (Anexos, Figuras 2 e 3). Do mesmo modo, foi identificada uma mistura dos compostos kusunoquinina (**III**) e ácido *ent*-8β-hidróxi-labdan-15-óico (**IV**) presentes na fração 14 (Fr. 14; 0,38 g), (Anexos, Figura 4).

Por conter ainda uma mistura de lignanas e terpenos, utilizou-se o método de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) para isolar em pequena quantidade os compostos presentes na fração 17. Com isso, foram aplicados 100,8 mg da fração, utilizando hex/AcOEt (3:2) como fase móvel. Todas as subfrações obtidas foram analisadas por CCDC, eluídas com a mesma proporção de hex/AcOEt (3:2), e encaminhadas para obtenção dos espectros de RMN de ¹H.

Para a obtenção de maior massa das substâncias isoladas, a fração 17 (2,78 g) foi submetida à CC de sílica gel (70-230 mesh) (60 g), fracionada com solventes inertes e de polaridade gradativa (100% hex, aumentando até 100% AcOEt e sucessivamente para 100% MeOH), resultando em 30 subfrações, as quais foram analisadas posteriormente por CCDC com fase móvel hex/AcOEt (6:4).

De acordo com a análise dos espectros de RMN de ^1H , pode-se observar que da subfração 10 (SF. 10; 0,31 g), resultante do fracionamento da fração 17, foram isolados 0,31 g da lignana kusunoquinina (**III**) a qual apresenta atividade significativa contra *Anticarsia gemmatilis*^{7,8}. Aproximadamente 0,20 g da subfração 8 (SFr. 8; 0,54 g) foi submetido à separação por CCDC com fase móvel 3:2 hex/AcOEt, isolando 4,6 mg dos epímeros da lignana cubebina (**V**) e 9,3 mg do diterpeno (**IV**), (Anexos, Figura 6). Da mesma forma, 0,20 g da subfração 9 (SFr. 9; 0,49 g) também foi submetido à separação por CCDC de mesma fase móvel, isolando 24,9 mg do diterpeno (**IV**) e 4,6 mg da lignana (**III**), (Anexos, Figura 7).

Esquema 1. Fracionamento do extrato acetônico de folhas por CC.



3.4.1 Substâncias identificadas no extrato acetônico de folhas

Do extrato acetônico de folhas foram isoladas, portanto, seis substâncias, sendo dois epímeros de cubebina, três diterpenos e a lignana kusunoquinina.

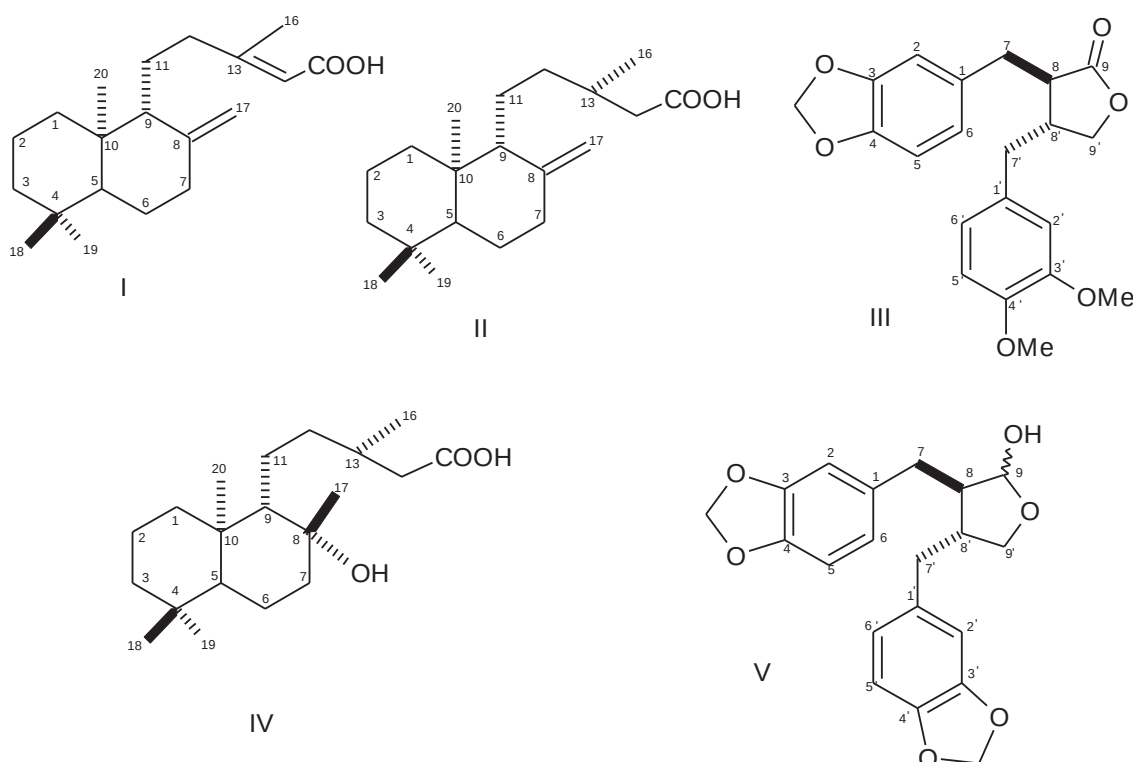


Figura 1 Substâncias isoladas do extrato acetônico de folhas de *A. giberti*

O espectro de RMN de ^1H da substância **I**, (Anexos, Figura 1), apresentou predominância de sinais na região de hidrogênios alifáticos (δ 0,70 - 2,20), incluindo sinais em δ 0,80, 0,74, 0,62 e 2,10 atribuíveis a hidrogênios metílicos. Foram ainda observados neste espectro, dois dubletos em δ 4,78 ($J = 1,3$ Hz) e 4,43 ($J = 1,3$ Hz) relativos a hidrogênios do grupo metilênico, além do duplo dubleto em δ 5,61 ($J = 2,5$ Hz e $J = 1,0$ Hz) referente a hidrogênio metínico. A comparação desses dados com aqueles descritos na literatura sugere que a substância **I** seja o ácido copálico.

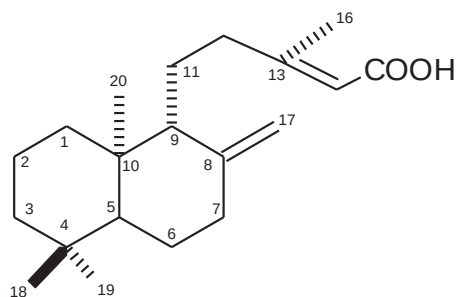


Figura 2. Ácido copálico (substância **I**)
Araraquara 2012

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H de **I** (CDCl_3 , 500MHz, $J = \text{Hz}$)

Posição	^1H (δ)
1a e 1b	1,76 <i>m</i> e 1,02 <i>m</i>
2a e 2b	1,58 <i>m</i> e 1,50 <i>m</i>
9	1,58 <i>m</i>
11a e 11b	1,50 <i>m</i> e 1,68 <i>m</i>
12 ^a	1,94 <i>m</i>
12 ^b	2,25 <i>dd</i> (14,5 e 1,5 Hz)
14	5,61 <i>m</i>
16	2,10 <i>d</i> (1,0 Hz)
17 ^a	4,78 <i>d</i> (1,3 Hz)
17 ^b	4,43 <i>d</i> (1,3 Hz)
18	0,81 <i>s</i>
19	0,74 <i>s</i>
20	0,62 <i>s</i>

O espectro de RMN de ^1H da substância **II** é semelhante ao do ácido copálico, destacando-se os sinais em δ 0,80, 0,74 e 0,61 relativos aos hidrogênios metílicos, Me-18, Me-19 e Me-20. Porém, foi observada diferença significativa no deslocamento químico entre os hidrogênios da Me-16 desses compostos, sendo que o valor em δ 0,90 encontrado na substância **II** foi sugestivo da ausência de uma dupla ligação entre os C-13 e C-14, quando comparada ao ácido copálico, o qual apresenta a dupla ligação, com sinais em δ 2,10. Isso foi evidenciado também pela presença do sinal em δ 30,9 no espectro de RMN de ^{13}C .

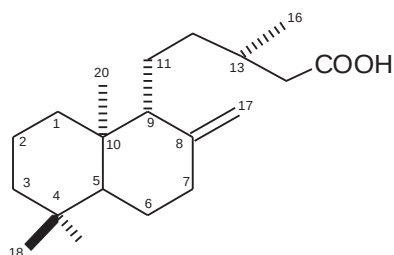
**Figura 3.** Ácido eperúico (substância **II**)
Araraquara 2012

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H de **II** (CDCl_3 , 500MHz, J = Hz)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	1,68 <i>m</i>	39,1
	0,92 <i>d</i> (1,5 Hz)	
2	1,46 <i>m</i>	19,4
	1,41 <i>m</i>	
3	1,32 <i>m</i>	42,2
	1,11 <i>m</i>	
4	-	33,6
5	1,02 <i>m</i>	55,6
6	1,65 <i>m</i>	24,4
	1,24 <i>m</i>	
7	2,30 <i>m</i>	38,4
8	-	148,7
9	1,46 <i>m</i>	57,2
10	-	39,1
11	1,19 <i>s</i>	20,9
	1,46 <i>m</i>	
12	1,19 <i>s</i>	35,9
	1,70 <i>m</i>	
13	1,02 <i>dt</i> (14,3 e 3,8 Hz)	30,9
14	2,06 <i>dd</i> (16,5 e 9,5 Hz)	41,2
	2,30 <i>dd</i> (16,5 e 9,5 Hz)	
16	0,90 <i>s</i>	19,9
17	4,74 <i>d</i> (1,5 Hz)	106,2
	4,41 <i>d</i> (1,5 Hz)	
18	0,80 <i>s</i>	33,6
19	0,74 <i>s</i>	21,7
20	0,61 <i>s</i>	14,4

A substância **III** foi identificada na subfração 10 após a análise por RMN de ^1H , (Anexos, Figura 5), o qual apresenta seis sinais relativos a hidrogênios aromáticos de dois sistemas trissubstituídos, δ 6,40 - 6,70. A presença das metoxilas é evidenciada pelos singletos em δ 3,74 e δ 3,79. Além disso, o espectro apresenta sinais de hidrogênios metilenodioxílicos aromáticos em δ 5,86, e carbinólicos em δ 3,80 e δ 4,07 e sinais de outros hidrogênios ligados a carbonos sp^3 alifáticos. Esses dados foram compatíveis com aqueles relatados na literatura para a kusunoquinina⁶.

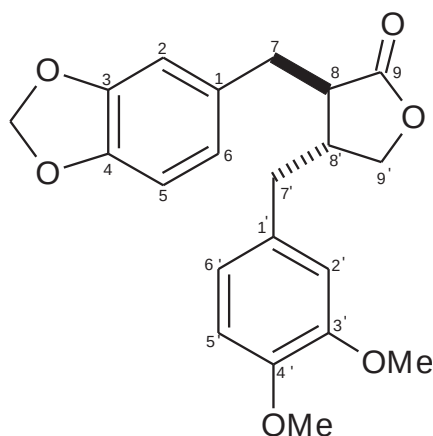


Figura 4. Kusunoquinina (substância **III**)

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H de **III** (CDCl_3 , 300MHz, $J = \text{Hz}$)

Posição	^1H (δ)
2	6,52 <i>d</i> (2,0 Hz)
2'	6,62 <i>d</i> (2,1 Hz)
5	6,65 <i>d</i> (7,5 Hz)
5'	6,70 <i>d</i> (8,0 Hz)
6	6,51 <i>m</i>
6'	6,49 <i>dd</i> (8,1 e 2,1 Hz)
7	2,90 <i>dd</i> ($W_{1/2}$ 13,8 e 4,8 Hz) 2,77 <i>dd</i> ($W_{1/2}$ 13,8 e 6,6Hz)
7'	2,48 <i>m</i>
8	2,48 <i>m</i>
8'	2,48 <i>m</i>
9'	4,07 <i>dd</i> (9,3 e 6,9 Hz) 3,80 <i>dd</i> (9,3 e 7,2 Hz)
MeO	3,75 <i>s</i>
MeO	3,78 <i>s</i>
OCH ₂ O	5,87 <i>d</i> (1,5 Hz) 5,86 <i>d</i> (1,5 Hz)

O espectro de ^1H da subfração 9 apresenta também uma predominância de absorção na região de menor frequência entre δ 0,67 - 2,30, e se diferencia dos outros dois diterpenos apresentados, pela ausência de dupla ligação exocíclica no esqueleto terpênico. Comparando-se a substância **II** com a **IV**, os sinais dos H-17 em δ 4,73 e δ 4,43 são substituídos por um singlete em δ 1,04. Além disso, do espectro de ^{13}C pode-se destacar a presença do sinal δ 73,3, característico de carbono carbinólico quaternário. Baseando-se nesses dados, e por comparação com os disponibilizados na literatura, pode-se sugerir para **IV** a estrutura do ácido *ent*-8 β -hidróxi-labdan-15-óico.

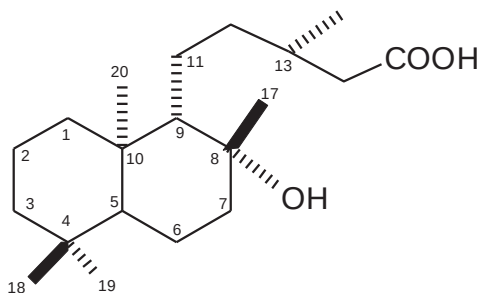


Figura 5. Ácido ent-8β-hidróxi-labdan-15-óico (substância **IV**)

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **IV** (CDCl_3 , 300MHz, J = Hz)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	-	39,2
2	1,50 <i>m</i>	18,3
3	-	42,0
4	-	33,2
5	-	55,9
6	1,65 <i>m</i>	18,2
7	1,47 <i>m</i>	42,2
8	-	73,3
9	-	59,4
10	-	22,7
11	1,57 <i>d</i> (2,1 Hz)	40,9
12	1,57 <i>d</i> (2,1 Hz)	31,3
13	-	30,9
14	2,05 <i>dd</i> (16,0 e 8,0 Hz) 2,26 <i>dd</i> (16,0 e 6,0 Hz)	42,0
16	0,80 <i>s</i>	20,0
17	1,05 <i>s</i>	30,5
18	0,88 <i>s</i>	33,4
19	0,79 <i>s</i>	21,6
20	0,92 <i>s</i>	15,1

A subfração 8 ao ser fracionada, foi analisada por RMN de ^1H e apresentou muitos sinais na região de hidrogênios aromáticos, além de sinais na região de hidrogênios metilenodioxílico aromático e metilênicos benzílicos. Este espectro diferencia-se do espectro da lignana kusunoquinina pela presença dos sinais referentes a hidrogênios carbinólicos em δ 5,24, sugerindo desta forma a presença dos epímeros da cubebina.

Os lactóis podem sofrer abertura e fechamento do anel em solução. Quando armazenada em solução de CDCl_3 , a cubebina sofre uma epimerização via equilíbrio ceto-enólico⁹.

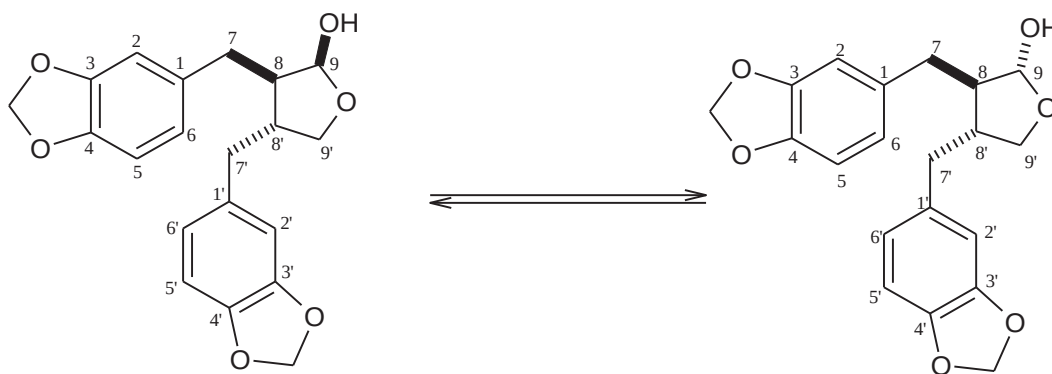


Figura 6. Equilíbrio entre os isômeros da cubebina (substância **V**)

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H de **V** (CDCl_3 , 300MHz, $J = \text{Hz}$)

Posição	^1H (δ)
7	2,45 <i>m</i>
	2,62 <i>dd</i> (6,9 e 3,3 Hz)
8	2,04 <i>m</i>
8'	2,45 <i>m</i>
9	5,24 <i>d</i> (1,8 Hz)
9'	3,59 <i>dd</i> (8,7 e 7,5 Hz)
	4,02 <i>dd</i> (8,4 e 7,0 Hz)
OCH_2O	5,94 <i>d</i> (1,5 Hz)
	5,93 <i>d</i> (1,5 Hz)

3.5 Fracionamento do extrato acetônico de raízes

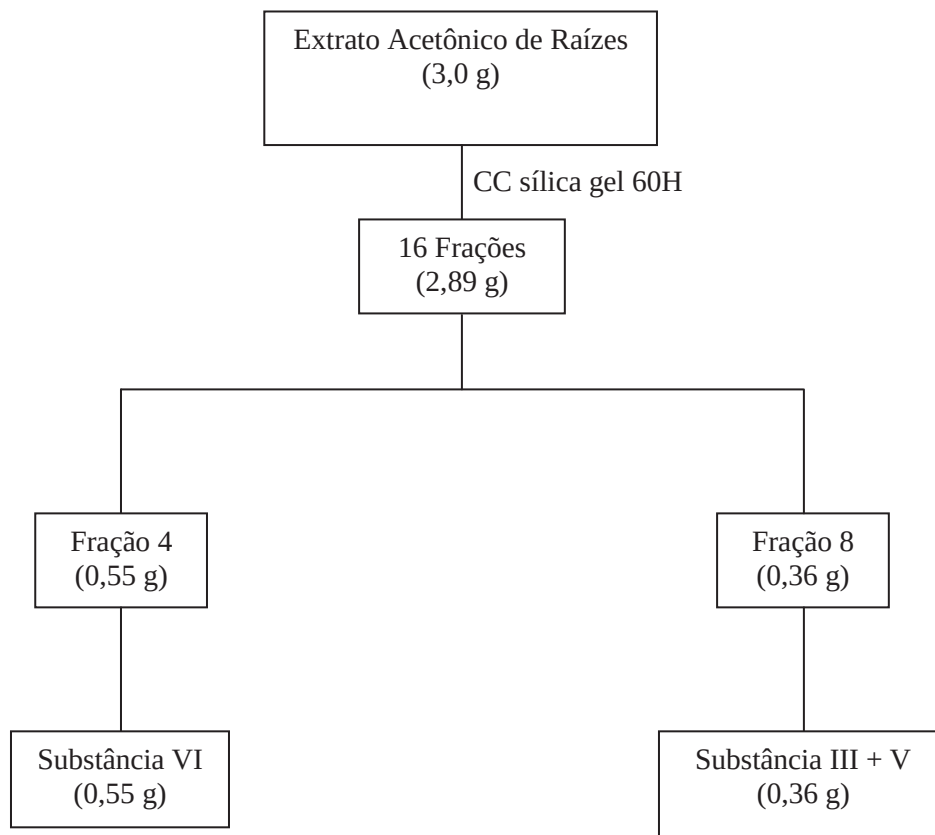
Após a finalização do fracionamento do extrato acetônico de folhas, os outros extratos obtidos em estudos anteriores foram analisados por CCDC (hex/AcOEt 7:3; CHCl₃/MeOH 7:3 e 9:1) e RMN de ¹H. Com base nos perfis cromatográficos e nos espectros obtidos, o extrato acetônico de raízes foi selecionado para dar continuidade ao isolamento dos constituintes.

Uma porção do extrato acetônico de raízes (3,00 g) foi fracionada por CC de sílica gel 60H (35 g), eluída com solventes em gradiente de polaridade crescente, hexano, acetato de etila, e metanol, resultou em 16 frações de 125 mL cada. Mediante análises por CCDC [hex/AcOEt (4:1; 7:3 e 3:2) e CHCl₃/MeOH (9:1; 17:3 + 0,5% Ácido acético; 4:1 e 7:3)] e RMN de ¹H, foram selecionadas as frações 4 (0,55 g) e 8 (0,36 g) para análise utilizando RMN de ¹H e de ¹³C.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C da fração 4 conjuntamente com os dados obtidos por experimentos bidimensionais de RMN (mapas de contorno em duas dimensões *g*HMQC, *g*HMBC, *g*COSY e *g*NOESY), resultaram na constatação do isolamento do diterpeno ácido 13,14-dihidrocolavênico (**VI**; Fr.4; 0,55 g), (Anexos, Figuras de 9 a 13).

Para a fração 8, a análise do RMN de ¹H, (Anexos, Figura 14), apresentou sinais semelhantes aos sinais presentes nos espectros da kusunoquinina (**III**) (Figura 4) e nos dos isômeros da cubebina (**V**) (Figura 6) (Fr. 8; 0,36 g). A comparação por CCDC, em fase móvel hex/AcOEt (3:2), desta fração com estas duas substâncias já isoladas do extrato acetônico de folhas, confirmou a presença destas substâncias na fração.

Esquema 2. Fracionamento do extrato acetônico de raízes por CC.



3.5.1 Identificação estrutural da substância isolada

Assim, do extrato acetônico de raízes foi isolada uma substância até então não obtida da espécie *A. giberti*:

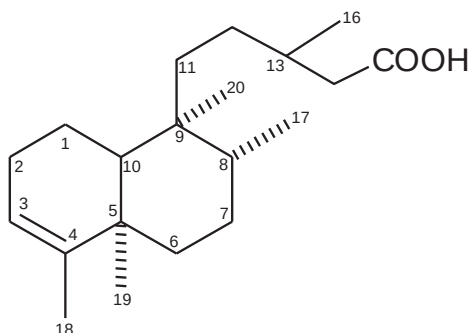


Figura 7. Ácido 13,14-dihidrocolavênico (substância VI)

Araraquara 2012

O espectro de RMN de ^1H da substância **VI** apresentou predominância de sinais na região de hidrogênios alifáticos (δ 0,70 - 2,20) característicos de diterpenos, apresentando como diferencial um singlete na região de δ 5,08 referente ao hidrogênio H-3, decorrente da insaturação no C-3. No espectro de RMN de ^{13}C , essa insaturação é evidenciada pelo sinal em δ 120,6 e δ 144,4, os quais em conjunto com mais dezoito sinais, permitiram propor a fórmula molécula $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ para esta substância. Para a determinação da estrutura molecular e, inclusive da configuração relativa, foram realizados experimentos bidimensionais de RMN (mapas de contorno em duas dimensões *g*HMQC, *g*HMBC e *g*COSY) (Figura 8, Anexos figuras 11, 12 e 13). A partir da análise de todos os espectros obtidos, pôde-se observar a grande semelhança entre os dados desta substância com aqueles do diterpeno ácido colavênico, previamente isolado desta espécie. A diferença principal observada entre os espectros de RMN dessas duas substâncias é decorrente da ausência da insaturação em C-13 em **VI**. As principais correlações observadas no mapa de contornos *g*HMBC de **VI** estão apresentadas na Figura 8. A comparação desses dados com aqueles descritos na literatura¹⁰ sugere que a substância **VI** seja o ácido 13,14-dihidrocolavênico.

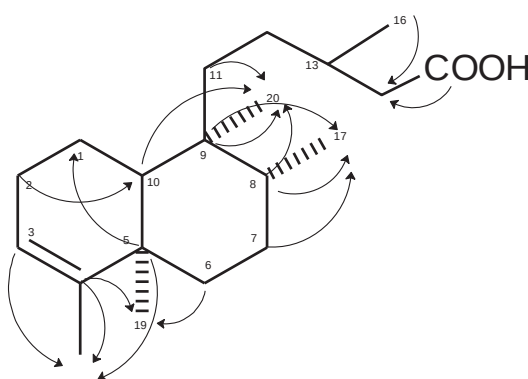


Figura 8. Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de VI (CDCl_3 , 500MHz, $J = \text{Hz}$)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	1,3 <i>m</i>	18,2
2	1,97 <i>m</i>	26,8
3	5,17 <i>m</i>	120,5
4	-	144,5
5	-	38,1
6	1,69 <i>dt</i> (13,0 e 3,3 Hz)	36,8
7	-	27,5
8	-	36,2
9	-	38,5
10	-	46,4
11	-	35,4
12	-	29,4
13	2,36 <i>dd</i> (15,0 e 6,5 Hz) 2,16 <i>dd</i> (15,0 e 8,0 Hz)	30,9
14	-	41,4
15	-	179,3
16	0,98 <i>d</i> (8,5 Hz)	19,9
17	0,78 <i>d</i> (6,0 Hz)	15,9
18	1,58 <i>d</i> (2,0 Hz)	18,0
19	0,99 <i>m</i>	19,9
20	0,71 <i>s</i>	18,4

3.5.2 Substâncias identificadas no extrato acetônico de raízes

O espectro de RMN de ^1H da fração 8 apresentou muitos sinais na região de hidrogênios aromáticos, além de outros na região de absorção de hidrogênios metilenodioxílicos aromáticos e metilênicos benzílicos. Esta fração também apresenta sinais para hidrogênios carbinólicos (δ 5,24), incluindo metoxílicos (δ 3,79 e δ 3,74). A comparação deste espectro com os das lignanas cubebina (**V**) (Figura 6) e kusunoquina (**III**) (Figura 4) permitiram estabelecer que estas substâncias estão em mistura na fração 8. A presença dos

epímeros da cubebina, devido ao fato de que os lactóis podem sofrer abertura e fechamento do anel em solução (equilíbrio ceto-enólico)⁹, foi também evidenciada pelo espectro.

Para a confirmação dos constituintes desta mistura, utilizou-se o método de comparação por CCDC desta fração com as mesmas substâncias (padrões) em questão já isoladas no extrato anterior, verificando-se a semelhança dos R_fs das três manchas apresentadas com as manchas dos padrões.

4. Conclusão

O estudo fitoquímico do extrato acetônico de folhas da espécie *Aristolochia giberti* (Aristolochiaceae) resultou na identificação de seis substâncias, sendo três diterpenos labdânicos: ácido copálico, ácido *ent*-labdan-8 β -ol-15-óico e ácido eperúico; e três lignanas dibenzilbutirolactônicas, os dois epímeros da cubebina e a kusunoquinina. Destas substâncias, a lignana kusunoquinina isolada pode ser destacada por possuir atividade biológica comprovada contra a lagarta *Anticarsia gemmatalis*, podendo esta em outros estudos ser utilizada como uma substância inseticida. O estudo do extrato acetônico de raízes da espécie resultou no isolamento do ácido 13,14-dihidrocolavênico (substância **VI**), o qual não havia sido identificado como substância presente na planta, até o presente estudo; e na identificação de três substâncias já identificadas no extrato anterior (epímeros da cubebina e kusunoquinina em mistura).

5. Referências Bibliográficas

1. LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. *Research Advances in Phytochemistry*, p.19-108, 2001.
2. HOENE, F. C. Flora Brasílica: Aristolochiaceae. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, v. 5, parte 2, 1942.
3. HOCHSLETTER. 1976. *Guia Homeopático*, 11 ed., Santiago do Chile, p. 457.
4. VELÁZQUEZ, E. *et al.* Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, v. 74, p. 91-97, 2003.
5. ALVARENGA, N. C.; FERRO, E. A. Evaluacion de la actividad antimicrobiana de *Aristolochia giberti* (patito). *Revista de Ciencia y tecnología*, v. 1, n. 2, p.71-77, 2000.
6. MARCHESINI, A. M.; PRADO, G. G.; MESSIANO, G. B.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. **2009**. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. *J. Braz. Chem. Soc.* (In press).

- 7.** LOPES, L. M. X.; MESSIANO, G. B.; VIEIRA, L.; MACHADO, M. B.; BORTOLI, S. A. de; Zukerman-Schpector, J. **2008**. Evaluation of Insecticidal Activity of Diterpenes and Lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2655 – 2659.
- 8.** LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; MURATA, A. T.; BORTOLI, S. A. de. **2004**. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Pest Manage.Sci.* **60**, 413 - 416.
- 9.** PASCOLI, I.C.; NASCIMENTO, I.R.; LOPES, L. M. X. **2006**. Configurational analysis of cubebins and bicubebins from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. *Phytochemistry* **67**, 735-742.
- 10.** LOPES, L. M. X.; BOLZANI, V. S.; TREVISAN, L. M. V. Clerodane diterpenes from *Aristolochia* species. *Phytochemistry* **10**, v. 26, 2781-2784, 1987.
- 11.** LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. *Kerala: Global Research Network*, v.2, p. 19-108, 2001.
- 12.** LEE, M. Y. et al. *International Immunopharmacology*, v. 10, **4**, 474-480, 2010.

6. Anexos

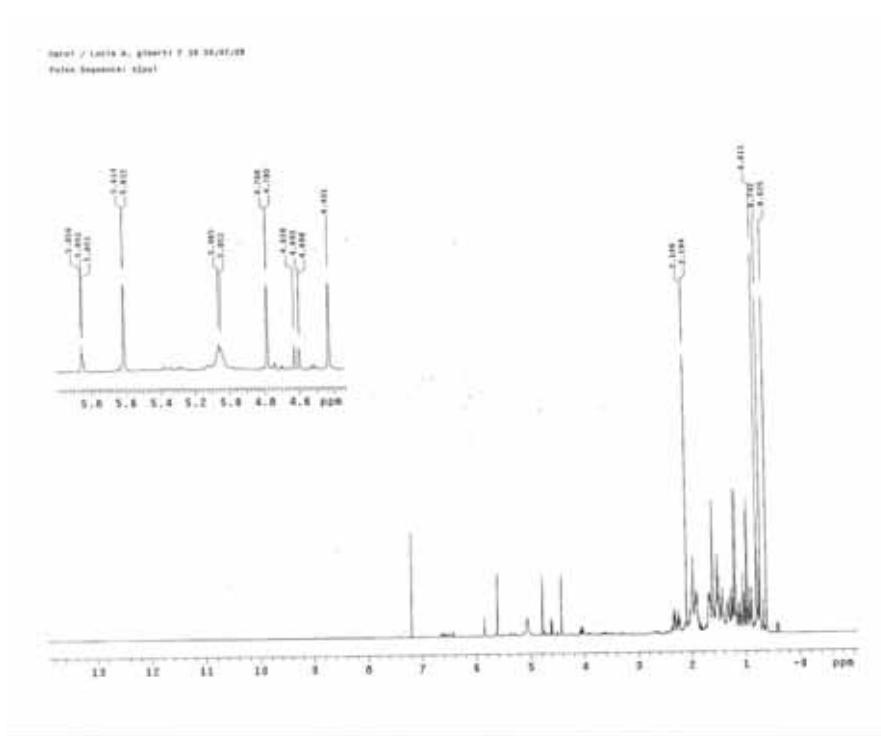


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H da fração 10 do extrato acetônico de folhas (CDCl_3 , 500 MHz).

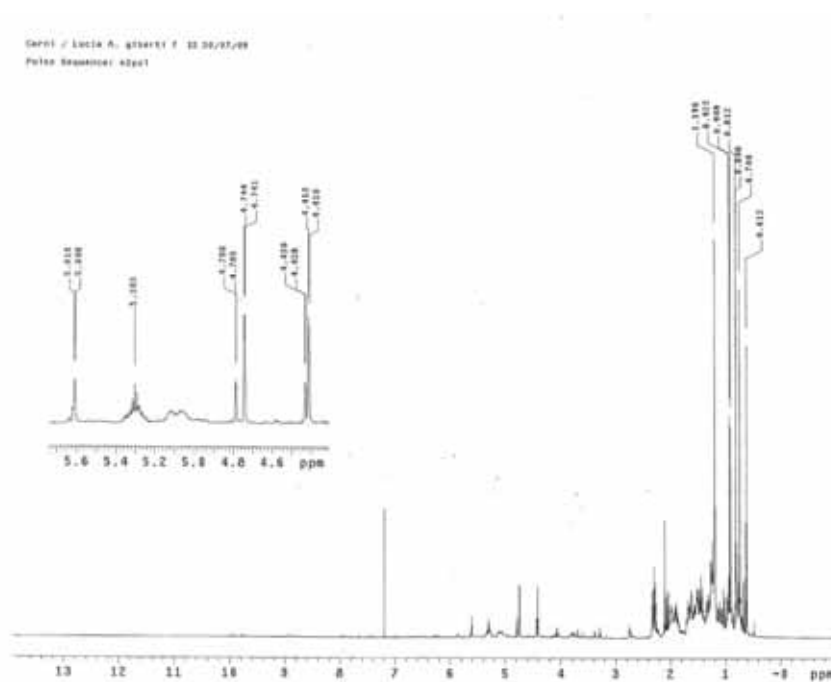


Figura 2. Espectro de RMN de ^1H da fração 12 do extrato acetônico de folhas (CDCl_3 , 500 MHz)

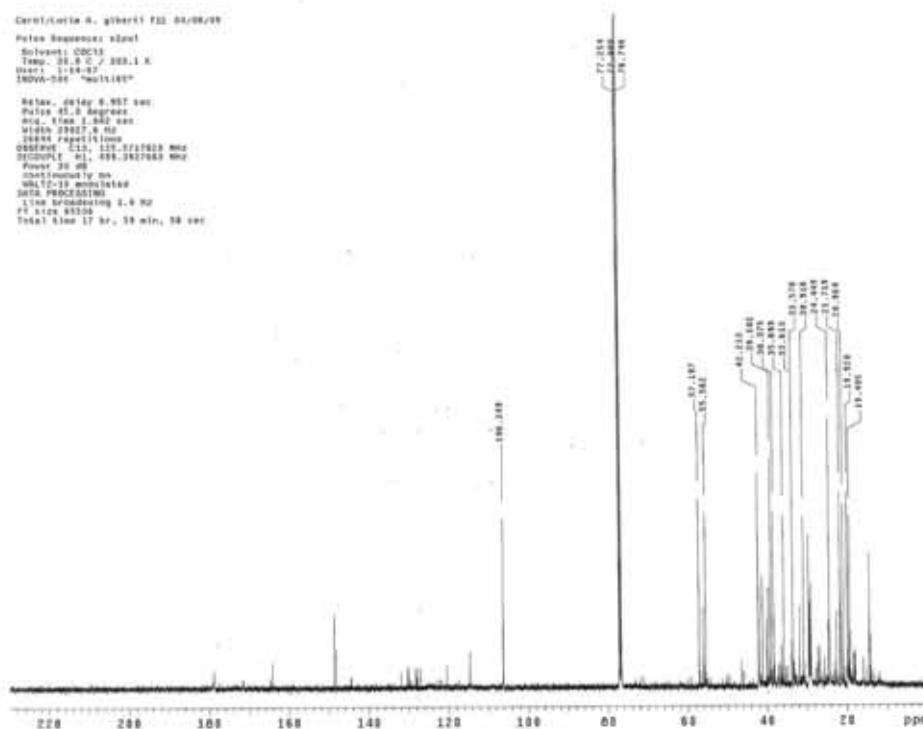


Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C da fração 12 do extrato acetônico de folhas (CDCl_3 , 126 MHz).

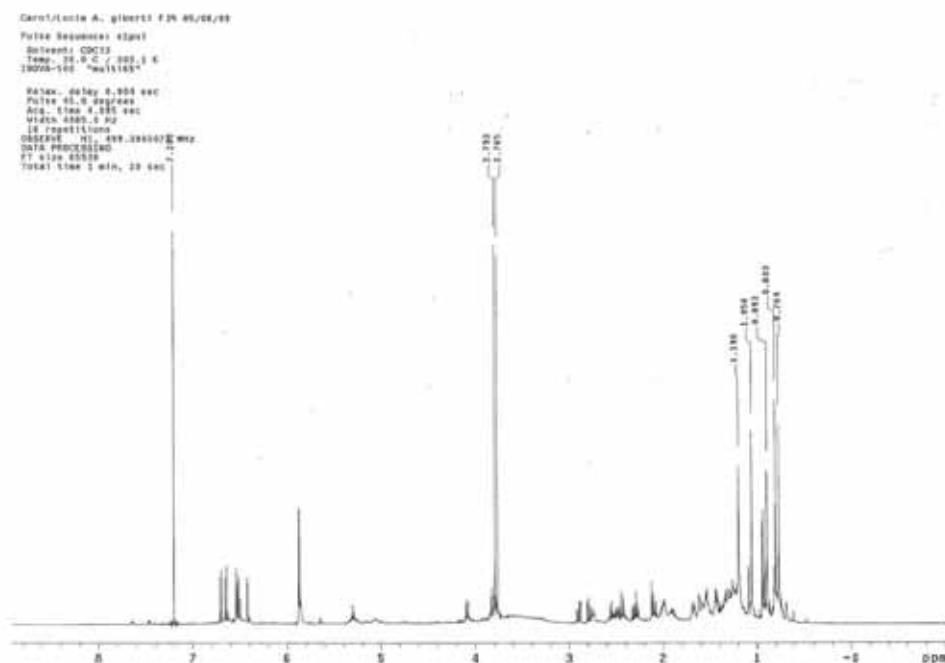


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H da fração 14 do extrato acetônico de folhas (CDCl_3 , 500 MHz).

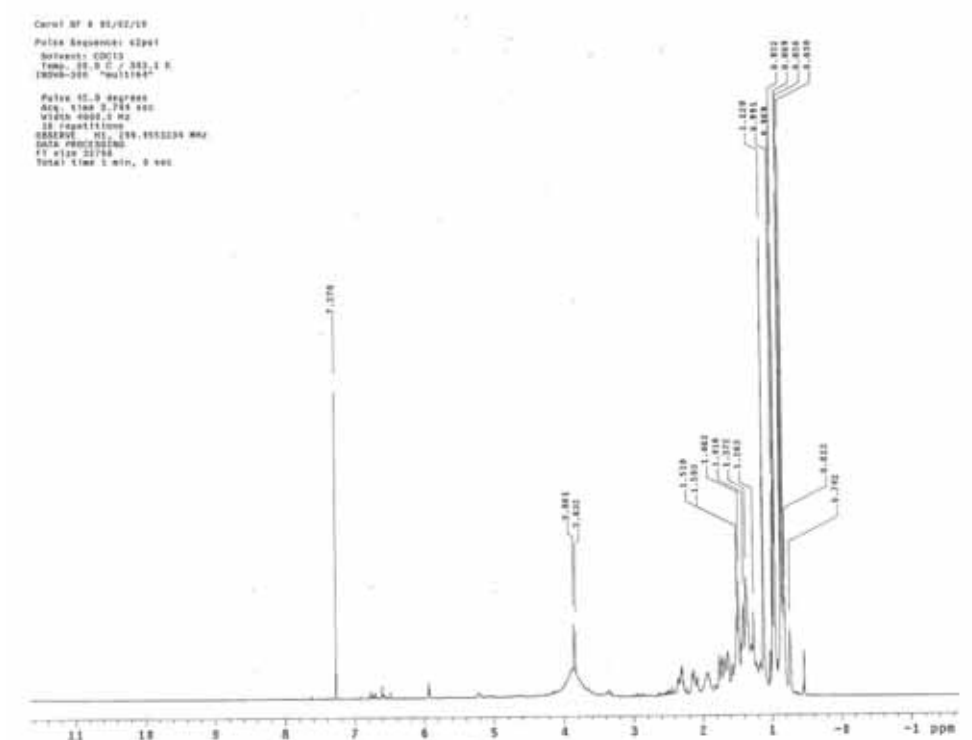


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H da subfração 9 do extrato acetônico de folhas (CDCl_3 , 300 MHz).

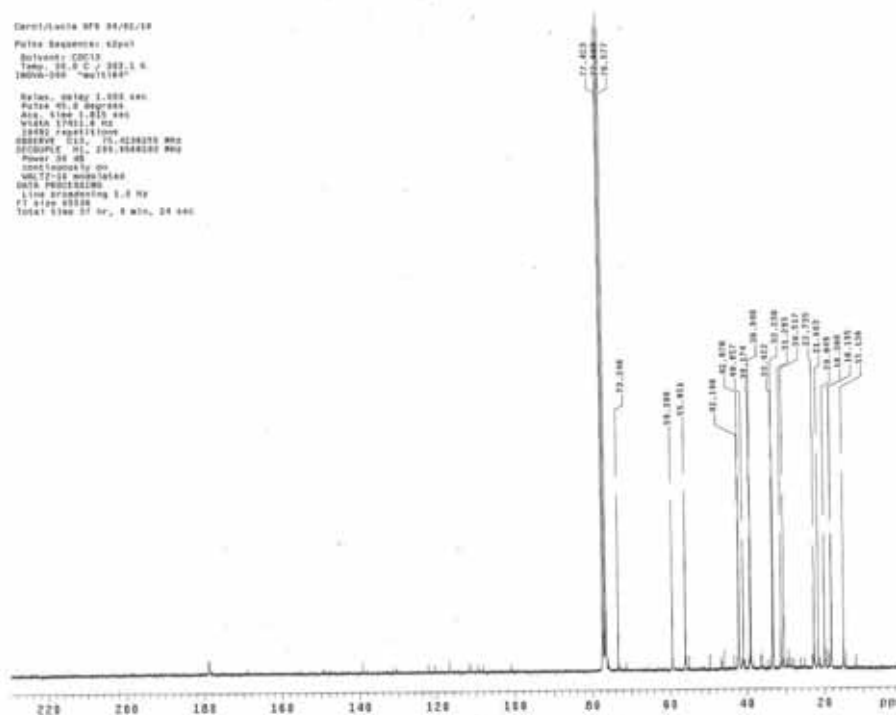


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C da subfração 9 do extrato acetônico de folhas (CDCl_3 , 126 MHz).

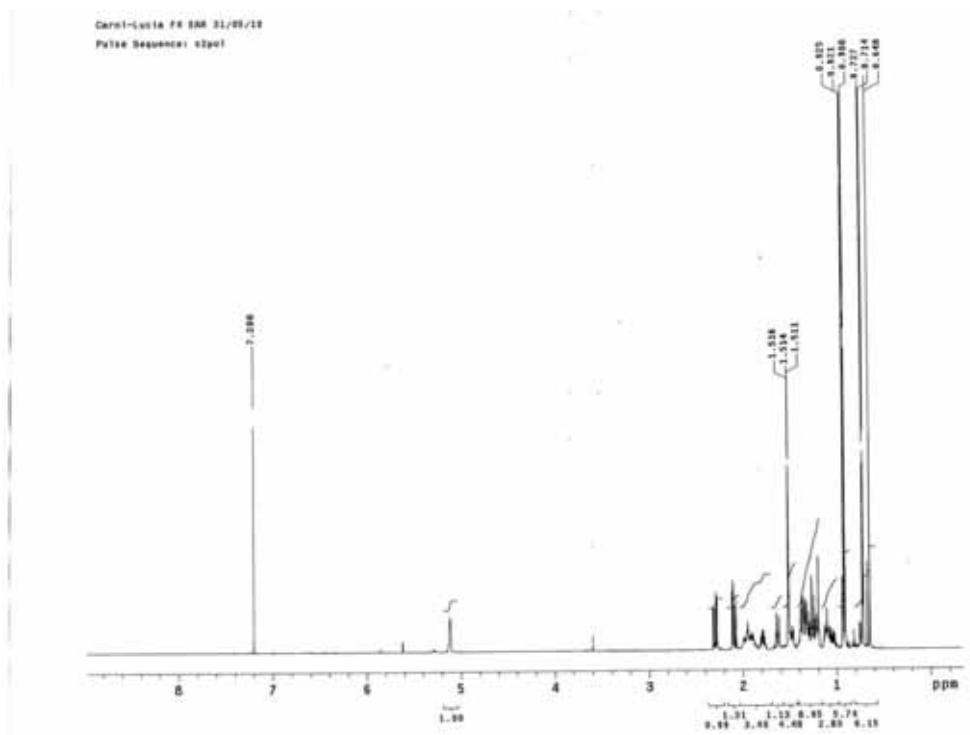


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H da fração 4 do extrato acetônico de raízes (CDCl_3 , 500 MHz).

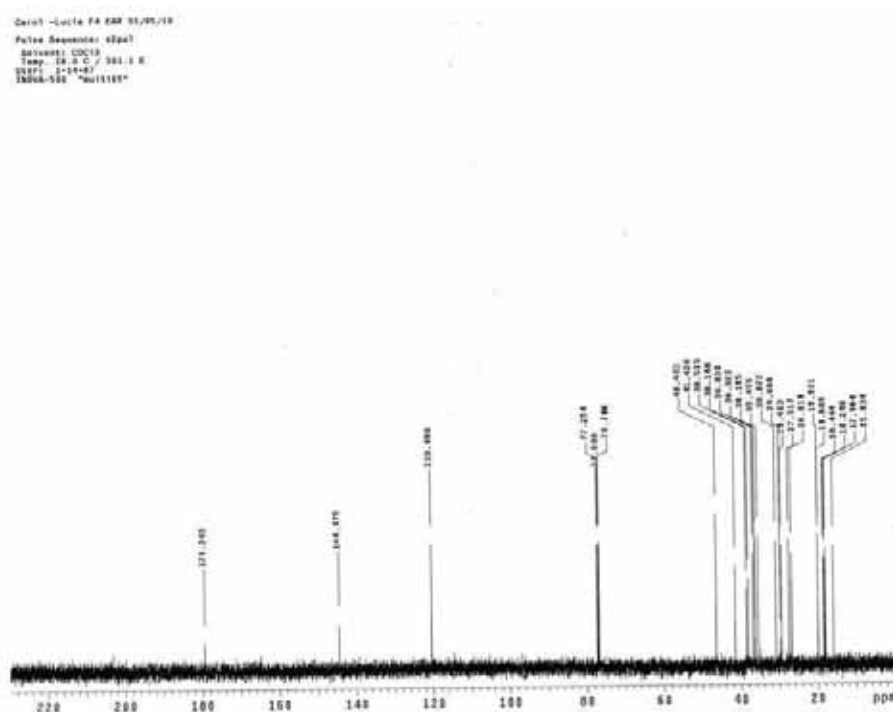


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C da fração 4 do extrato acetônico de raízes (CDCl_3 , 500 MHz).

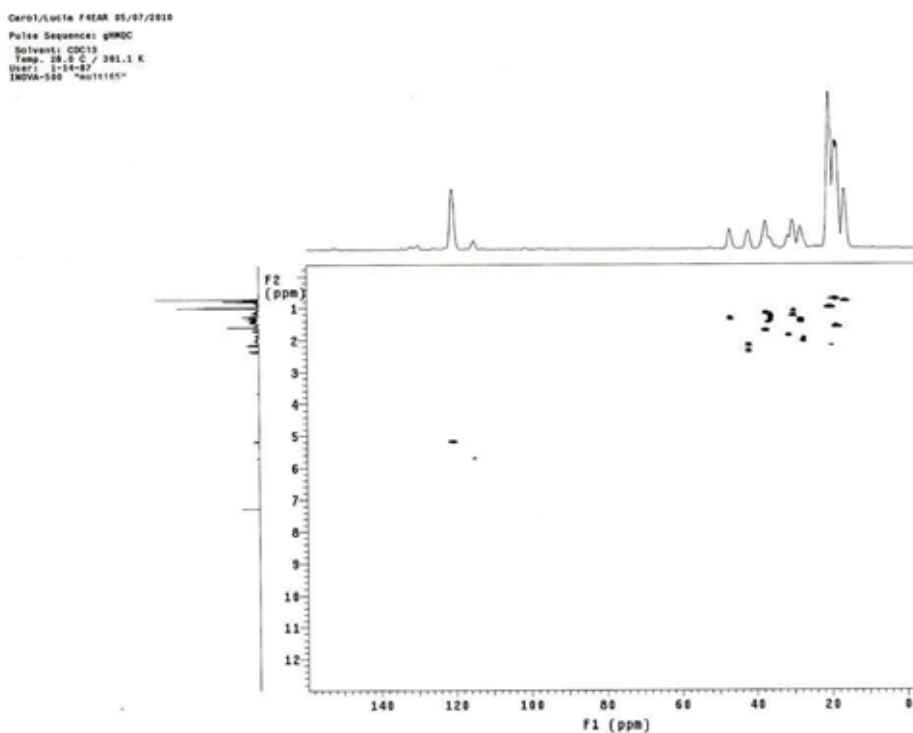


Figura 11. Mapa de contorno em duas dimensões *g*HMQC da fração 4 do extrato acetônico de raízes (CDCl₃, 500 MHz).

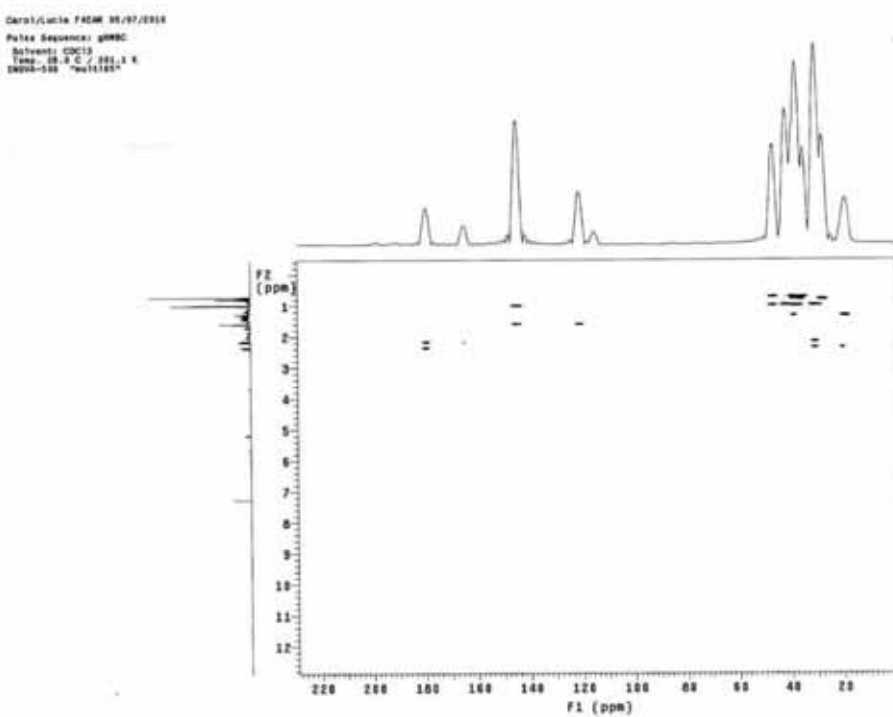


Figura 12. Mapa de contorno em duas dimensões *g*HMBC da fração 4 do extrato acetônico de raízes (CDCl₃, 500 MHz).

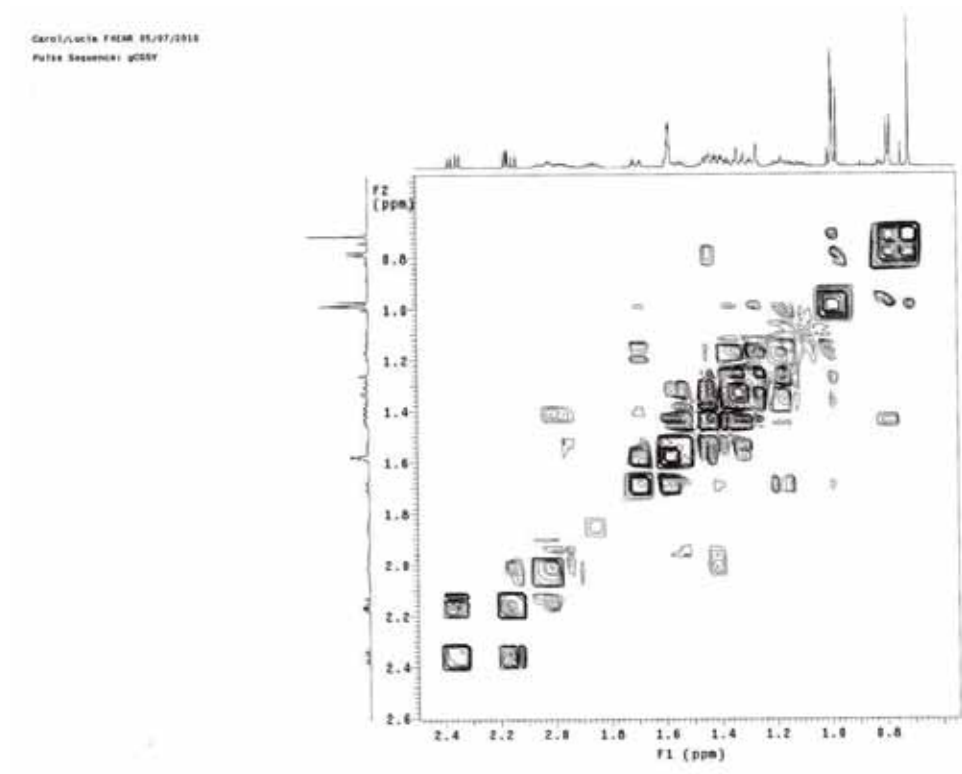


Figura 13. Mapa de contorno em duas dimensões $g\text{COSY}$ da fração 4 do extrato acetônico de raízes (CDCl_3 , 500 MHz).

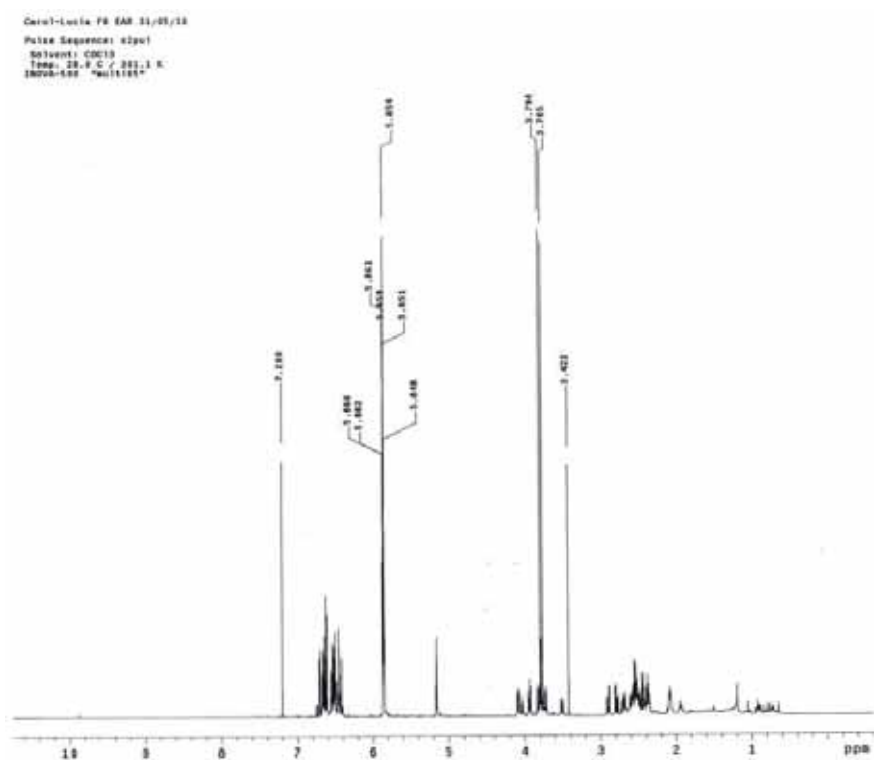


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da fração 8 do extrato acetônico de raízes (CDCl_3 , 500 MHz).