

JULIANA CRISTINA HOLZBACH

Aristolactamas e alcamidas isoladas de *Aristolochia gigantea* Mart.

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

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

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

H762a	Holzbach, Juliana Cristina Aristolactamas e alcamidas isoladas de <i>Aristolochia gigantea</i> Mart. / Juliana Cristina Holzbach. – Araraquara : [s.n], 2011 108 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Lucia Maria Xavier Lopes 1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Antiofídica. 4. Aristolochiaceae. I. Título.
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

JULIANA CRISTINA HOLZBACH

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

Araraquara, 21 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Conceição de Fátima Alves Olguin
Centro de Engenharia e Ciências Exatas / UNIOESTE / Toledo



Profª Drª Maria de Meneses Pereira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UFA / Manaus

DADOS CURRICULARES

JULIANA CRISTINA HOLZBACH

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 28/07/1986

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Toledo – PR

Profissão: Química

Endereço Profissional: Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – Unesp, C. P. 355, CEP 14801-970, Araraquara – SP.

Endereço eletrônico: juholzbach@iq.unesp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Bacharelado em Química

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Monografia: Produtos Naturais: Importância e conflitos na variabilidade de espécies utilizadas com a mesma denominação popular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Conceição de Fátima Alves Olguin

Período: 01/03/2004 – 21/12/2007

Mestrado: Química, Área de Concentração – Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista – Unesp

Instituto de Química de Araraquara

Dissertação: Aristolactamas e alcanidas isoladas de *Aristolochia gigantea* Mart.

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

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES

Período: 01/03/2009 – 28/02/2011.

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

SIMÕES, M. R.; COSTA, T. A.; SOUZA, M. L.; HOLZBACH, J. C.; CARNEIRO, L. B.; GUBIANI, A. M. Análise físico-química de linguças coloniais comercializadas no

município de Toledo, Estado do Paraná e comparação com valores fornecidos pelos fabricantes. **Acta Scientiarum Technology**, v. 31, p. 221-224, 2009.

HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and Alkamides of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9462-9472, 2010.

PRINCIPAIS PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS

HOLZBACH, J. C.; SEBASTIEN, N. Y.; GABRIEL, E. A.; FORNARI, G. G.; OLSEN, M. F.; DIMER, O.; SOUZA, B. V. C.; ÁVILA, A. P.; JOHANN, A. S. T.; BENASSI, S. F. Avaliação da qualidade ambiental das microbacias dos rios São Francisco verdadeiro (SFV), São Francisco Falso (SFF) e do Ocoi-Paraná. In: **XI Congresso Brasileiro de Limnologia**, 2007, Macaé – RJ.

HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Constituintes químicos de *Aristolochia gigantea* Mart. In: **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010, Águas de Lindóia – SP.

Aos meus pais, Luciano e Maristela,
meus irmãos, Rafael e Luciana,
e ao meu amor Maike,
pelo apoio e carinho
que sempre me fortaleceu.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e me ajudaram a superar os obstáculos que surgiram em meu caminho, e que mesmo tão longe se fazem presentes em minha vida a cada instante do dia.

Aos meus irmãos, pelas conversas, risadas, por serem meus melhores amigos, e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu amor Maíke, por me apoiar e confortar em todos os momentos que precisei.

À Prof^a. Dr^a. Lucia M. X. Lopes, pela orientação, apoio, incentivo e paciência que teve comigo durante a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Isabele R. Nascimento, pelos ensinamentos, por sempre me escutar e aconselhar nos momentos em que mais precisei e pelo sorriso que contagia e conforta.

Ao Dr. Nivaldo Borallo e ao Jorge, pelas amizades e pela realização dos experimentos de RMN.

Ao Dr. Alberto C. Alécio, pelas risadas e pela obtenção dos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares e a doutoranda Renata do Santos Fernandes pelo auxílio e realização dos testes biológicos.

Aos colegas e amigos, em especial para Carolina, Mariana, Kelly, Gisele, Erika, Dony, Cláudio, Gislaíne, Andressa, Marcelo, Michele, Cris, Vanessa, Bruna e a Rosana.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Os poderosos podem matar uma, duas ou três rosas, mas jamais conseguirão deter a primavera inteira.”
(Che Guevara)

RESUMO

O presente trabalho descreve o isolamento e a elucidação estrutural dos constituintes químicos de *Aristolochia gigantea* Mart. *A. gigantea* desenvolve um forte sistema subterrâneo de caules e raízes (tubérculos e rizomas). Os extratos etanólicos destas partes da planta foram submetidos a cromatografia (CC, CCDP e CLAE), resultando em doze e oito substâncias, respectivamente. Entre as quais, uma nova aristolactama, aristolactama 9-[O-β-glicopiranosil-O-(1''→2')-β-glicopiranosídeo], e duas alcanidas, *cis*- e *trans*-*N*-*p*-coumaroil-3-*O*-metildopamina juntamente com as substâncias conhecidas alantoína, β-sitosterol, *E*-nerolidol, (+)-kobusina, (+)-eudesmina, *cis*- e *trans*-*N*-feruloiltiramina, *trans*-*N*-coumaroiltiramina, *cis*- e *trans*-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina, aristolactama Ia 8-β-*O*-glicosídeo, aristolactama Ia *N*-β-glicosídeo, aristolactama IIIa e magnoflorina. Suas estruturas foram determinadas por análises espectroscópicas. Os efeitos dos extratos, da alantoína, (+)-kobusina e (+)-eudesmina na ação das fosfolipases e proteases dos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus* foram avaliados. A alantoína foi o inibidor mais eficiente das fosfolipases enquanto a (+)-eudesmina e os extratos apresentaram atividade inibitória moderada. Além disso, os extratos, a alantoína e a (+)-eudesmina mostraram atividade moderada para as proteases de *Bothrops jararacussu* enquanto a (+)-kobusina apresentou maior potencial inibitório.

Palavras-chave: *Aristolochia gigantea*, Aristolochiaceae, aristolactamas, alcanidas.

ABSTRACT

The present work describes the isolation and structural elucidation of the chemical constituents of *Aristolochia gigantea* Mart. *A. gigantea* develops a strong system of subterranean stems and roots (tuberous or rhizomatous roots). Ethanol extracts of these plant parts were subjected to chromatography (CC, TLC, and HPLC) to give twelve and eight compounds, respectively. Among which, a new aristolactam, aristolactam 9-O- β -D-glucopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -D-glucoside, and two alkamides, *cis*- and *trans*-*N*-*p*-coumaroyl-3-O-methyldopamine together with the known compounds allantoin, *E*-nerolidol, β -sitosterol, (+)-kobusin, (+)-eudesmin, *cis*- and *trans*-*N*-feruloyltyramine, *trans*-*N*-coumaroyltyramine, *cis*- and *trans*-*N*-feruloyl-3-O-methyldopamine, aristolactam Ia 8- β -O-glucoside, aristolactam Ia *N*- β -D-glucoside, aristolactam IIIa, and magnoflorine. Their structures were determined by spectroscopic analyses. Effects of extracts, allantoin, (+)-kobusin and (+)-eudesmin on action of phospholipases and proteases from venoms of the snakes *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus* were evaluated. Allantoin was the most efficient inhibitor of phospholipases whereas (+)-eudesmin and the extracts showed moderate inhibitory activity. In addition, the extracts, allantoin, and (+)-eudesmin showed moderate activity on proteases from *Bothrops jararacussu* whereas (+)-kobusin showed the highest inhibitory potential.

Keywords: *Aristolochia gigantea*, Aristolochiaceae, aristolactams, alkamides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de aristolactamas.	20
Figura 2. Foto da espécie <i>A. gigantea</i> .	24
Figura 3. Alcaloides previamente isolados das folhas de <i>A. gigantea</i> (ref. 7,32,35,37)	25
Figura 4. Número de acidentes envolvendo animais peçonhentos no Brasil. Fonte Ministério da Saúde ⁴⁷ .	27
Figura 5. Acidentes ofídicos ocorridos no Brasil, de 1987 a 2008. Fonte:SVS/MS ⁴⁸ .	27
Figura 6. Mecanismo de ação das fosfolipases ⁵⁷ .	30
Figura 7. Estruturas determinadas para os constituintes químicos isolados de <i>A. gigantea</i> .	32
Figura 8. Espectro de RMN de ¹ H do extrato etanólico de rizomas (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	42
Figura 9. Espectro de RMN de ¹ H do extrato etanólico de ramos (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	43
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H de 1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	44
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H de 2 com ampliação (CDCl ₃ , 7,1 T).	45
Figura 12. Espectro de RMN de ¹³ C de 2 (CDCl ₃ , 7,1 T).	46
Figura 13. Principais correlações observadas pelo experimento <i>g</i> HMBC (¹ H→ ¹³ C) de 2 .	46
Figura 14. Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 2 (CDCl ₃ , 7,1 T).	47
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H de 3 (CDCl ₃ , 11,7 T).	49
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C de 3 (CDCl ₃ , 11,7 T).	49
Figura 17. Possíveis configurações relativas para lignanas furofurânicas.	51
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H de 4 com ampliação (CDCl ₃ , 11,7 T).	52
Figura 19. Espectro de RMN de ¹³ C de 5 (CDCl ₃ , 11,7 T).	54
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H de 5 com ampliação (CDCl ₃ , 11,7 T).	54
Figura 21. Espectro de massas de baixa resolução de 5 (ESI, +20 eV)	55
Figura 22. Espectro de RMN de ¹ H de 6 + 15 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,1 T).	56
Figura 23. Conformações propostas para os isômeros geométricos (a) <i>trans</i> e (b) <i>cis</i> .	57

Figura 24. Espectro de <i>g</i> NOESY 1D de 6 + 15 irradiando em δ 3,80 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,1 T).	57
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H de 12 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,1 T).	58
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H de 13 + 16 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,1 T).	59
Figura 27. Espectro de <i>g</i> NOESY 1D de 13 + 16 irradiando em: (a) δ 3,79 e (b) δ 3,74 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,1 T).	59
Figura 28. Espectro de RMN de ¹ H de 14 + 17 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	62
Figura 29. Correlações de <i>g</i> HMBC ($\rightarrow$) e interações de <i>g</i> NOESY 1D ($\leftrightarrow$) de 14 + 17 .	63
Figura 30. Espectro de <i>g</i> NOESY 1D de 14 + 17 irradiando em δ 3,73 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	63
Figura 31. Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 14 + 17 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	64
Figura 32. Mapa de contornos de <i>g</i> COSY ¹ H - ¹ H de 14 + 17 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	64
Figura 33. Espectros <i>g</i> TOCSY 1D de 14 + 17 irradiando em δ 7,56 e 7,36 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	65
Figura 34. Ampliação dos espectros de RMN de ¹ H do: (a) isômero <i>trans</i> (14) e (b) isômero <i>cis</i> (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	66
Figura 35. Espectros de HOMODEC de 14 + 17 irradiando em: (a) δ 7,36 e (b) δ 7,56. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	67
Figura 36. Espectro de massas de alta resolução de 14 (ESI, – 4000 eV).	67
Figura 37. Fluorescência das aristolactamas 8 , 7 , 9 e 10 sob irradiação de luz UV (365 nm).	69
Figura 38. Espectro de RMN de ¹ H de 7 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	70
Figura 39. Mapa de contornos <i>g</i> HMQC de 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	70
Figura 40. Principais correlações observadas no experimento de <i>g</i> HMBC (¹ H $\rightarrow$ ¹³ C) de 7 .	71
Figura 41. Mapa de contornos <i>g</i> HMBC de 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	72
Figura 42. Mapa de contornos de <i>g</i> COSY ¹ H - ¹ H de 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	72
Figura 43. Espectro <i>g</i> TOCSY 1D de 7 irradiando em δ 5,07 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	73
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H de 8 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	74
Figura 45. Espectro de RMN de ¹ H de 9 com ampliação (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	74
Figura 46. Espectro de absorção no IV de 10 (KBr).	76
Figura 47. Espectro de massas de 10 (ESI, – 4500 eV)	77

Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de 10 com ampliação (DMSO- d_6 , 11,7 T).	78
Figura 49. Estrutura da triangularine-B.	79
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C de 10 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	79
Figura 51. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 10 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	80
Figura 52. Ampliação do mapa de contornos de gHMQC de 10 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	80
Figura 53. Ampliação do espectro de gNOESY 1D de 10 irradiando em δ 3,94 - 3,93 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	81
Figura 54. Ampliação do espectro de gNOESY 1D de 10 irradiando em δ 7,23 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	82
Figura 55. Correlações de gCOSY($\longleftrightarrow$) e interações de gNOESY 1D ($\leftrightarrow$) para 10 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	82
Figura 56. Mapa de contornos gCOSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de 10 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	83
Figura 57. Principais correlações observadas pelo experimento de gHMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) de 10 e a estrutura do limocitrinil-3-O- β -sophoroside.	84
Figura 58. Mapa de contornos gHMBC de 10 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	84
Figura 59. Espectro gTOCSY 1D ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) de 10 irradiando em: (a) δ 5,08 e (b) δ 4,66 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	85
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C de 11 (DMSO- d_6 , 7,1 T).	87
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de 11 (DMSO- d_6 , 7,1 T).	88
Figura 62. Mapa de contornos gHMQC de 11 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	89
Figura 63. Mapa de contornos gHMBC de 11 (DMSO- d_6 , 11,7 T).	89
Figura 64. Foto ilustrativa dos halos formados pela atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> .	93
Figura 65. Ação inibitória das substâncias 1 e 5 sobre a atividade fosfolipásica induzida por <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjussu).	93
Figura 66. Ação inibitória das substâncias 1 e 5 sobre a atividade fosfolipásica induzida pela toxina BthTX-II isolada de <i>Bothrops jararacussu</i> .	94
Figura 67. Ação inibitória da substância 1 , dos extratos etanólicos de rizomas (Ex Riz) e ramos (Ex Ram) de <i>A. gigantea</i> sobre a atividade fosfolipásica induzida por <i>Crotalus durissus terrificus</i> (CDT).	94
Figura 68. Ação inibitória das substâncias 1 , 4 , 5 e dos extratos etanólicos de rizomas (Ex Riz) e de ramos (Ex Ram) sobre a atividade proteolítica induzida pela peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjussu).	96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biogênese de aristolactamas e ácidos aristolóquicos adaptada da ref. 26.	21
Esquema 2. Biossíntese de amidas hidroxicinamoílicas. Coenzima A ligase (4CL), fenilalanina amônialiase (PAL), Tiramina N-hidroxicinamoiltransferase (THT) (baseado nas referências 28-31).	23
Esquema 3. Fracionamento do extrato etanólico de rizomas de <i>A. gigantea</i> .	39
Esquema 4. Fracionamento do extrato etanólico de ramos de <i>A. gigantea</i>	40
Esquema 5. Proposta de fragmentação de 10 .	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H de 1 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 11,7 T)	44
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 2 (CDCl_3 , δ , J = Hz)	48
Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C de 3 (CDCl_3 , δ , 11,7 T).	50
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H de 4 (CDCl_3 , δ , J = Hz, 11,7 T).	52
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 5 (CDCl_3 , δ , J = Hz, 11,7 T).	55
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H de 6 , 12 , 13 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 7,1 T).	60
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H de 15 e 16 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 7,1 T).	61
Tabela 8. Dados de RMN de 14 + 17 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 11,7 T)	68
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H de 7 , 8 , 9 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 11,7 T)	75
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 10 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 11,7 T).	86
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 11 (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 7,1 T).	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
2D	Bidimensional
AA	Ácido aristolóquico
AL	Aristolactama
<i>c.</i>	Concentração (massa/volume)
$W_{1/2}$	Constante de acoplamento aparente
J	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Electrospray ionization
$\nu_{\max}^{KBr}$	Frequência de absorção máxima na região de infravermelho medida em KBr
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOMODEC	Homonuclear decouple
int. rel.	Intensidade relativa
IV	Infravermelho
LDL	Low Density Lipoprotein
lit.	Literatura
<i>m</i>	Multiplete
MS	Mato Grosso do Sul

nOe	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p.	Página
p.f.	Ponto de fusão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
<i>s</i>	Singleto
<i>s/</i>	Singleto largo
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
<i>t</i>	Tripleto
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultravioleta
1D	Unidimensional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Família Aristolochiaceae	19
1.2. Aristolactamas	20
1.3. Alcamidas	22
1.4. A espécie <i>Aristolochia gigantea</i> Mart.	23
1.4.1. Descrição e classificação botânica	24
1.4.2. Estudo fitoquímico de <i>A. gigantea</i>	24
1.5. Atividade antiofídica de extratos e substâncias de espécies do gênero <i>Aristolochia</i>	26
1.6. Acidentes ofídicos	26
1.6.1. <i>Bothrops jararacussu</i>	28
1.6.2. <i>Crotalus durissus terrificus</i>	28
1.6.3. Função e composição do veneno	29
1.6.4. Atividade Fosfolipásica	29
1.6.5. Atividade Proteolítica	30
2. OBJETIVOS GERAIS	31
2.1. Objetivos específicos	31
3. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>ARISTOLOCHIA GIGANTEA</i>	32
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
4.1. Coleta e identificação do material vegetal	34
4.2. Preparação dos extratos de <i>A. gigantea</i>	34
4.3. Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico de rizomas	35
4.3.1. Estudo químico da fração insolúvel em metanol	35
4.3.2. Estudo químico das frações F-7 e F-9	35
4.3.3. Estudo químico das frações F-12 a F-14	36
4.3.4. Estudo químico das frações F-15 e F-18	36
4.3.5. Estudo químico da fração F-21	36
4.3.6. Estudo químico das frações F-23 e F-25	36

4.4. Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico de ramos	37
4.4.1. Estudo químico da parte insolúvel em metanol	37
4.4.2. Estudo químico da fração G-6	37
4.5. Bioensaios	40
4.5.1. Inibição da atividade fosfolipásica	40
4.5.2. Inibição da atividade proteolítica sobre a azocaseína	41
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>42</u>
5.1. Determinação estrutural dos constituintes químicos de <i>A. gigantea</i>	43
5.1.1. Alantoína (1)	43
5.1.2. <i>E</i> -nerolidol (2)	45
5.1.3. -Sitosterol (3)	48
5.1.4. Lignanas furofurânicas (4 e 5)	50
5.1.5. Alcamidas (6, 12 – 17)	55
5.1.6. Aristolactamas (7 – 10)	68
5.1.7. Magnoflorina (11)	86
5.2. Atividades biológicas descritas na literatura para algumas das substâncias isoladas de <i>Aristolochia gigantea</i>	91
5.3. Testes biológicos para atividade antiofídica	92
5.3.1. Atividade Fosfolipásica	92
5.3.2. Atividade Proteolítica	95
<u>6. DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS</u>	<u>97</u>
<u>7. CONCLUSÕES</u>	<u>99</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>100</u>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Aristolochiaceae

A família Aristolochiaceae é constituída por espécies de trepadeiras, decumbentes ou não, herbáceas eretas ou prostadas; sendo geralmente, providas de rizomas e tubérculos¹.

A posição sistemática desta família apresentou várias modificações no decorrer dos anos. Em 2003, a família Aristolochiaceae foi inserida na ordem Piperales², que juntamente com Canellales, Laurales e Magnoliales apresentam características genéticas próximas e formam o grupo das Magnoliideae³.

A literatura apresenta divergências em relação ao número de gêneros pertencentes a esta família, existindo classificações de cinco até dezenove gêneros. Atualmente, com base em caracteres morfológicos e dados moleculares, são reconhecidas duas subfamílias para a família Aristolochiaceae. A subfamília Asaroideae consiste dos gêneros *Asarum* e *Saruma* e a subfamília Aristolochioideae com os gêneros *Aristolochia* sensu lato e *Thottea*. O gênero *Aristolochia* s.l. foi dividido em: *Isotrema*, *Endoteca*, *Pararistolochia* e *Aristolochia*⁴⁻⁶.

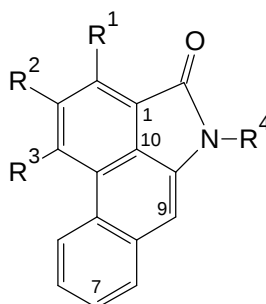
A família Aristolochiaceae é composta por cerca de 600 espécies, sendo que, mais de 100 espécies foram estudadas quimicamente⁷. O interesse pelos estudos fitoquímicos da família Aristolochiaceae deve-se ao amplo uso de suas espécies na medicina tradicional e homeopática.

Nas últimas décadas, cerca de 700 substâncias foram isoladas de espécies da família Aristolochiaceae⁷. Embora metabólitos secundários como ácidos aristolóquios, açúcares, lignanas e alantoína ocorram frequentemente nas espécies de Aristolochiaceae, alguns metabólitos são específicos, tais como: bicubebinas em *Aristolochia lagesiana* e *A. pubescens*⁸, lignanas ariltetralônicas em *Holostylis reniformis*⁹, neolignanas benzofurânicas e diterpenos esterificados com ácidos aristolóquicos em *A. pubescens*¹⁰, alcanidas em *A. gehrtii*¹¹, bi- e tetraflavonoides em *A. ridicula*¹².

1.2. Aristolactamas

Aristolactamas são alcaloides fenantrênicos que possuem um grupo lactâmico ligado por C-1 e C-10, a maioria possui substituintes oxigenados nas posições C-3, C-4, C-6 e C-8¹³. Aristolactamas que apresentam substituintes oxigenados em C-9 são raras na natureza, sendo relatadas na literatura somente seis substâncias distintas¹⁴ dentre as mais de 60 aristolactamas isoladas de plantas^{14,15}.

A distribuição das aristolactamas em plantas não é restrita às espécies da família Aristolochiaceae¹⁴, como exemplos tem-se: aristolactamas II e BII que ocorrem em *Stephania cepharantha* (Menispermaceae) e em *Schefferomitra subaequalis* (Annonaceae)¹⁵⁻¹⁷, piperolactama E em *Piper taiwanense* (Piperaceae)¹⁸ e a sauroactama e novamente a aristolactama BII de *Saururus chinensis* (Saururaceae)¹⁹ (Figura 1, p 20).



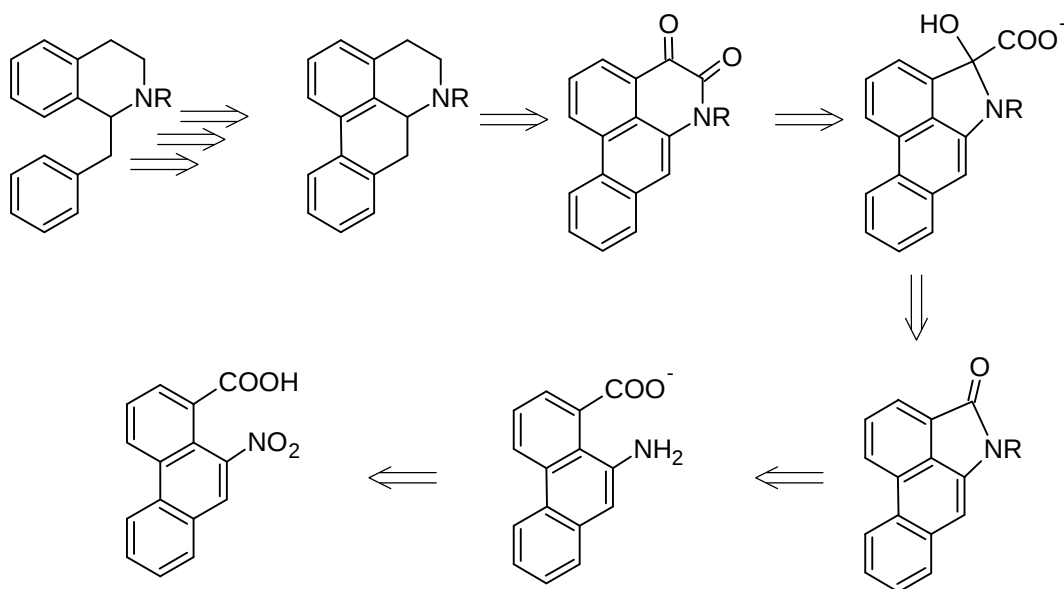
$R^2+R^3=OCH_2O$; $R^1=R^4=H$	Aristolactama II
$R^2=R^3=OCH_3$; $R^1=R^4=H$	Aristolactama BII
$R^1=R^2=OCH_3$; $R^3=OH$; $R^4=CH_3$	Piperolactama E
$R^1=H$; $R^2=OH$; $R^3=OCH_3$; $R^4=CH_3$	Sauroactama

Figura 1. Exemplos de aristolactamas.

As aristolactamas apresentam atividades biológicas comprovadas incluindo antimicobacteriana, anti-inflamatória e neuroprotetora²⁰. Como exemplo tem-se a aristolactama BII que inibe a proliferação de linfócitos T e B, enquanto a aristolactama FI tem efeito inibitório na geração de NO¹⁹ e a aristolactama III apresenta atividade citotóxica para três tipos de linhagens de células cancerígenas¹⁴.

Vários casos de intoxicação renal foram associados ao uso de espécies de *Aristolochia* que continham ácidos aristolóquicos (AA) e aristolactamas (AL)²¹. O mecanismo de ação destas substâncias no organismo humano ainda não está completamente elucidado²², embora alguns trabalhos nesta área relatem que os ácidos aristolóquicos são ativados pelo citocromo P-450 e, posteriormente, reagem com proteínas celulares e com o DNA resultando em substâncias tóxicas aos seres humanos²³. Devido à formação destas substâncias, a US Food and Drug Administration proibiu a comercialização de produtos que contêm aristolactamas e ácidos aristolóquicos em sua formulação²⁴.

Pouco se sabe sobre a biossíntese de aristolactamas. Porém, estas estão biogeneticamente relacionadas aos alcaloides aporfínicos dos quais provavelmente se originam¹⁵. De acordo com Lee e Han (1992)²⁵ e Lin (1997)²⁶, a rota biossintética para a formação dos ácidos aristolóquicos, aristolactamas, alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos e aporfínicos poderia ser explicada como mostrada no Esquema 1. Sendo que os alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos, derivados dos aporfínicos, seriam os intermediários da biossíntese das aristolactamas, que por sua vez, seriam as precursoras dos ácidos aristolóquicos.



Esquema 1. Biogênese de aristolactamas e ácidos aristolóquicos adaptada da ref. 26.

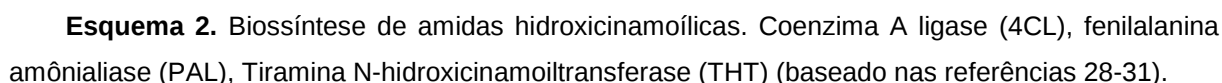
Até o momento, não se encontram descritos na literatura estudos que comprovem que as aristolactamas são precursores biossintéticos dos ácidos aristolóquicos ou que estes seriam os precursores das aristolactamas.

1.3. Alcamidas

As alcamidas são metabólitos secundários da classe das amidas fenólicas que incluem mais de 200 compostos distribuídos em várias famílias de plantas²⁷. Este tipo de composto é comum em espécies do gênero *Aristolochia* e, em sua maioria, são formados por unidades de tiramina ligados a ácidos fenólicos como cumárico, ferúlico, cinâmico e, raramente, ao ácido acético¹⁴.

Estas amidas possuem atividade anti-inflamatória, pois inibem a produção de óxido nítrico, além de antitumoral e antimicobacteriana. Nas plantas, os derivados da tiramina podem estar associados a defesa da planta contra o ataque de patógenos²⁸. Estes derivados de tiramina são sintetizados em pequenas quantidades na maioria das plantas. Com isso, tem-se buscado formas de aumentar a produção destes metabólitos secundários em plantas, porém dificuldades relacionadas à expressão de múltiplos genes e/ou mecanismos de controle metabólico desconhecidos tem limitado esta busca. A utilização de micro-organismos para a produção em massa destes metabólitos demonstrou ser uma boa alternativa²⁸.

O ácido cinâmico é o produto da desaminação da fenilalanina catalizada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Em algumas plantas os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido *p*-cumárico, ferúlico e cafeico, podem estar ligados a tiramina e seus derivados, dando origem às amidas hidroxicinamoílicas conforme o Esquema 2²⁸⁻³¹.



O gênero *Aristolochia* é composto por cerca de 400 espécies, sendo o mais numeroso da família Aristolochiaceae³². Espécies deste gênero ocorrem em regiões tropicais e temperadas. Na China e no Brasil as espécies de *Aristolochia* são amplamente utilizadas na medicina popular¹⁴.

A espécie *Aristolochia gigantea* Mart. é conhecida popularmente por papo-de-peru, cipó-mil-homens ou erva-de-urubu³³. O nome “erva-de-urubu” relaciona-se ao odor desagradável presente nas flores, assemelhando-se à matéria animal em decomposição, sendo atrativo para moscas³⁴. Este fato foi comprovado por Adler e

Jacobson (1982) que, ao submeterem insetos adultos de *Musca domestica* Linn. (Diptera: Muscidae) ao extrato etéreo de flores de *A. gigantea*, com o intuito de avaliar o efeito repelente, observaram o efeito atrativo³⁵.

Esta espécie é utilizada de forma ornamental e, na medicina popular, como abortífero, para o tratamento de feridas e doenças na pele³⁶ e pode atuar também como antídoto para veneno de serpentes³⁷.

1.4.1. Descrição e classificação botânica

A espécie *A. gigantea* é liana, de caule suberoso com ramos sulcados-estriados. Suas folhas são alternas, glabras; pecioladas, com pecíolo levemente sulcado. A flor é solitária, axilar, pêndula, pêndulo floral de 16,6-29 cm de comprimento incluindo o ovário. Sementes ovaladas ou triangulares, planas, achatadas, 0,9-1,1 × 0,7-0,8 cm, face adaxial verrugosa e abaxial escura com nervura central (Figura 2, p. 24)³⁸. Esta espécie desenvolve um forte sistema de caules e raízes, que com o passar dos anos tornam-se espessos e resistentes. A planta floresce de abril a outubro, podendo ser encontrada florida durante todo o ano em regiões mais quentes, e apresenta frutos de novembro a junho³⁸.

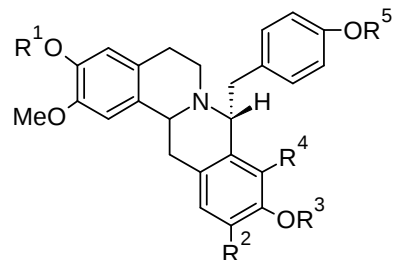
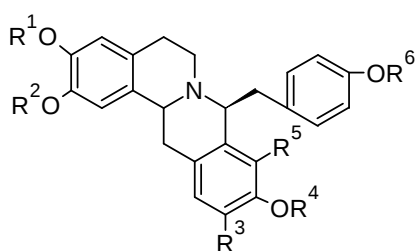


Figura 2. Foto da espécie *A. gigantea*.

1.4.2. Estudo fitoquímico de *A. gigantea*

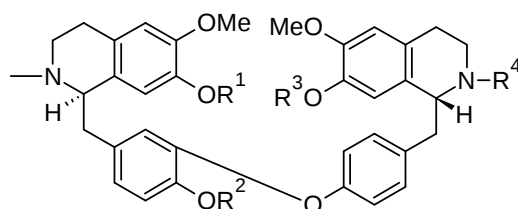
Os estudos fitoquímicos anteriormente realizados com as folhas evidenciaram a ocorrência em *A. gigantea* de alcaloides, alantoína, sitosterol, salsolinol, higenamina e pinitol^{7,39,40}. Destas substâncias destacam-se doze alcaloides do tipo 8-benzilberberínicos de esqueleto carbônico raro^{36,41} (I – XII) e sete alcalóides

bisbenzilisquinolínicos³⁹ (**XIII – XIX**) (Figura 3, p. 25). A análise do óleo essencial revelou a presença de α -felandreno (60,9 %) e linalool (16,6 %) como constituintes majoritários das raízes, enquanto que nas folhas predominou a presença do germacrene D e γ -elemeno^{12,42}.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
I	H	Me	OH	β -Glc	H	H
II	H	Me	OH	β -Xyl	H	H
III	H	Me	OH	H	H	H
IX	Ac	Me	H	Ac	α -Glc-Ac ₄	Ac
X	Ac	Me	OAc	Ac	H	Ac
XI	Me	H	OH	Glc	H	H
XII	Me	H	H	Glc	OH	H

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
IV	Ac	OAc	β -Glc-Ac ₄	H	Ac
V	H	OH	H	H	Me
VI	H	H	β -Xyl	OH	H
VII	H	H	β -Glc	OH	H
VIII	Ac	H	Ac	OAc	β -Glc-Ac ₄



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
XIII	H	H	Me	H
XIV	Me	Me	Me	H
XV	H	H	Me	Me
XVI	Me	H	H	Me
XVII	H	Me	Me	H
XVIII	H	H	H	H
XIX	H	H	H	Me

Figura 3. Alcaloides previamente isolados das folhas de *A. gigantea* (ref. 7,32,35,37).

O salsolinol e a higenamina também foram isolados de *A. gigantea*, os estudos sobre o primeiro correlacionaram a presença desta substância no cérebro e na urina de pacientes alcoólatras e portadores da doença de Parkinson, com os efeitos

danosos desta substância sobre os neurônios^{7,43}. A higenamina é conhecida por sua significativa propriedade de relaxar a musculatura lisa e estimular contrações uterinas⁴⁴.

1.5. Atividade antiofídica de extratos e substâncias de espécies do gênero *Aristolochia*

Várias espécies de *Aristolochia* são utilizadas popularmente no tratamento de picadas causadas por ofídios. Na farmacopéia chinesa encontram-se descritas as espécies *A. contorta* Bge., *A. debilis* Sieb, *A. albida* Duch., *A. asclepiadifolia* Brandg, *A. brevipens* Benth, *A. constricta* Mutis, *A. cucurbitafolia* Hayata, *A. elegans* Mast, *A. gigantea* Mart, *A. grandiflora* Sw, *A. heterophylla*, *A. indica*, *A. kankuaensis*, *A. serpentaria* L, *A. triangularis* Cham.^{37,45}. Porém, os relatos na literatura de espécies de *Aristolochia* que apresentam atividade antiofídica comprovada ainda são raros, um exemplo são os extratos de *A. indica* que são capazes de neutralizar atividade hemorrágica, coagulante, fibrinogênica, e fosfolipásica do veneno de *Daboia russelli*⁴⁶.

O ácido aristolóquico I, presente na maioria das espécies, inativa o veneno das serpentes *Naja atra* e *Bungarus multicinctus*. Estudos realizados com a espécie *A. albida* resultaram no isolamento do diterpeno columbina que apresentou uma redução significativa dos sintomas de intoxicação induzidos pelo veneno de *Naja nigricollis* e *Bitis arietans*¹⁴.

1.6. Acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública grave em países tropicais, tornando a pesquisa por agentes antiofídicos e conhecimentos de seus efeitos tóxico-farmacológicos de grande relevância.

Entre os animais peçonhentos de importância para a saúde pública no Brasil estão serpentes, aranhas, escorpiões, lagartas e abelhas (Figura 4, p. 27). As

notificações de acidentes envolvendo animais peçonhentos vêm aumentando progressivamente nos últimos anos, chegando a quase 100 mil casos por ano. Apesar dos acidentes ofídicos representarem o segundo maior em número de casos, são os que apresentam o maior índice de letalidade nos seres humanos⁴⁷.

No Brasil, o número de acidentes envolvendo ofídios aumentou consideravelmente desde 2001, alcançando o maior índice em 2005. Desde então houve um decréscimo, e 27.069 casos foram registrados em 2009⁴⁷ (Figura 5, p. 27).

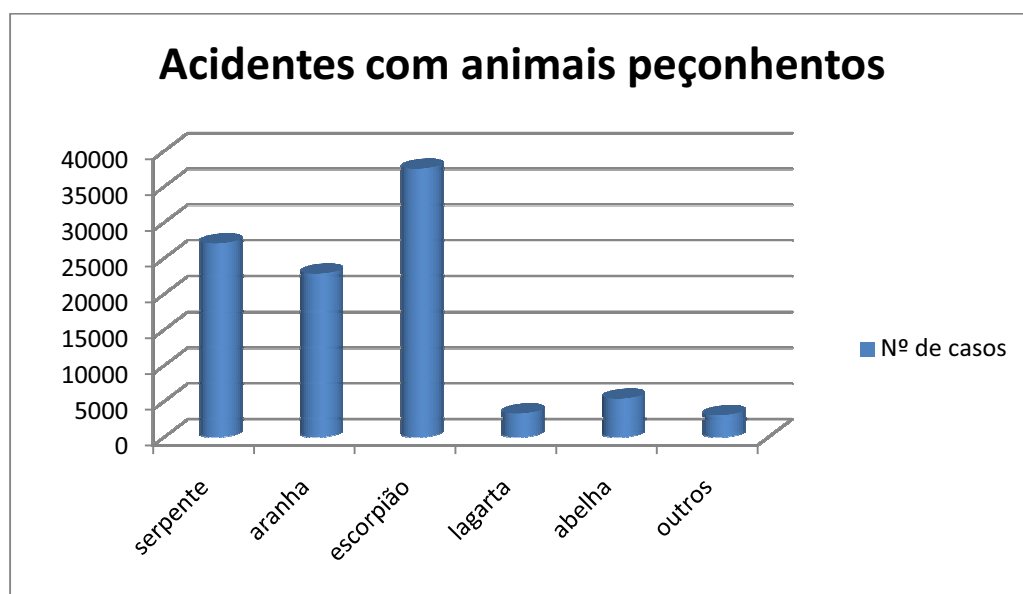


Figura 4. Número de acidentes envolvendo animais peçonhentos no Brasil. Fonte Ministério da Saúde⁴⁷.

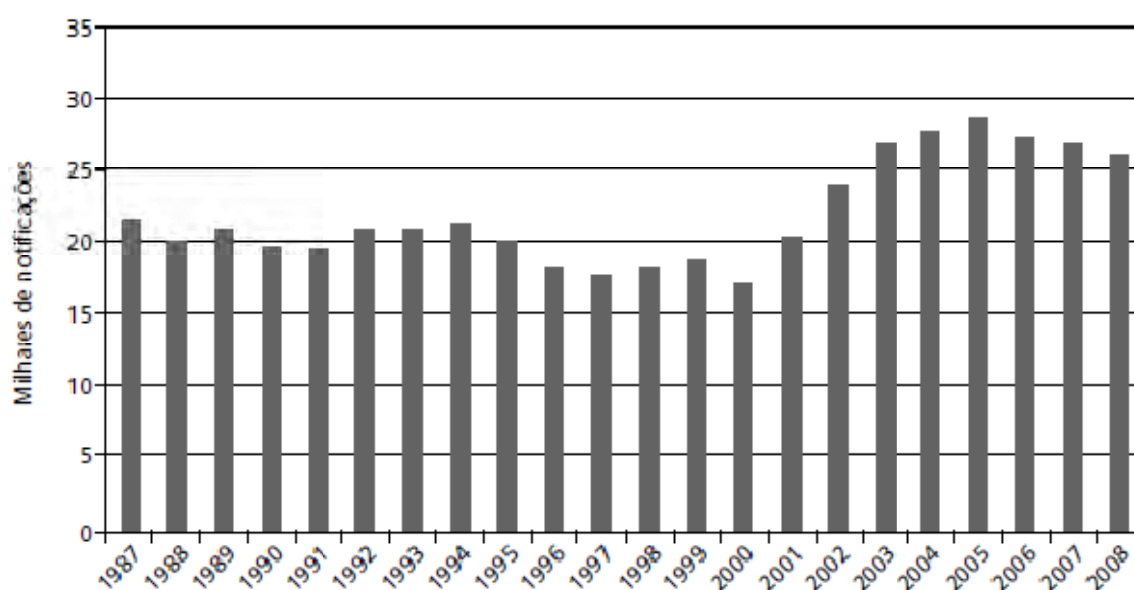


Figura 5. Acidentes ofídicos ocorridos no Brasil, de 1987 a 2008. Fonte : SVS/MS⁴⁸.

Dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas encontradas no Brasil, o gênero *Bothrops* é responsável por 72,6% do número de casos, seguido por *Crotalus*, que apresenta o maior índice de acidentes fatais para os seres humanos (1,2 %) ⁴⁸.

Atualmente, o envenenamento por picada de serpente é tratado pela administração parenteral de soro antiofídico produzido por cavalos ou ovelhas. Apesar da soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, algumas desvantagens devem ser consideradas, tais como, os efeitos colaterais na vítima (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas do soro), ineficiência no combate dos efeitos locais do veneno e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade ⁴⁹.

Portanto, é necessária a busca por terapias alternativas ou que complementem a soroterapia, neutralizando os efeitos causados pelo veneno das serpentes nas vítimas de acidentes ofídicos.

1.6.1. *Bothrops jararacussu*

O gênero *Bothrops* é composto por 25 espécies distribuídas por todo território nacional. A espécie *Bothrops jararacussu* é encontrada em toda a América Latina. No Brasil, esta espécie ocorre nos estados de Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia. O envenenamento causado por serpentes deste gênero resulta em um grande dano tecidual local que incluem dores, edemas, hemorragias e necroses, podendo levar a falência renal e amputação do membro atingido ⁵⁰.

1.6.2. *Crotalus durissus terrificus*

Popularmente conhecidas como cascavéis, o gênero *Crotalus* apresenta várias subespécies pertencentes a espécie *Crotalus durissus*, como a *Crotalus durissus durissus* e *Crotalus durissus terrificus* ⁵¹.

A espécie *Crotalus durissus terrificus* pode ser encontrada desde a Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina até nas regiões sul e sudeste do Brasil. Seu veneno apresenta intensa ação neurotóxica, coagulante e, principalmente, miotóxica. As vítimas de acidentes envolvendo esta espécie de ofídio apresentam quadros clínicos

graves que podem resultar em óbito por insuficiência renal aguda e mais raramente por insuficiência respiratória⁵¹.

1.6.3. Função e composição do veneno

Para as serpentes, os seus venenos servem tanto como defesa na luta contra predadores, como para armamento ofensivo para capturar e digerir suas presas⁵².

Os venenos de serpentes são formados por uma mistura complexa de substâncias orgânicas que incluem carboidratos, lipídios, aminoácidos, nucleotídeos, peptídeos e substâncias inorgânicas, tais como, cálcio, ferro, cobre, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco. No entanto, cerca de 90-95% do peso seco do veneno é composto de proteínas que, em sua maioria, apresentam atividades enzimáticas responsáveis pelos efeitos biológicos causadores do envenenamento⁵³.

Os venenos contêm cardiotoxinas, citotoxinas, lectinas e várias enzimas, dentre as quais, proteases, fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, oxidases e catalases⁵⁴. Deve-se salientar que todas estas enzimas podem agir em sinergia causando um efeito único, ou uma toxina pode apresentar maior efeito farmacológico do que as demais⁵⁵.

1.6.4. Atividade Fosfolipásica

Entre as enzimas dos venenos de serpentes as fosfolipases são os constituintes majoritários⁵⁶. Estas enzimas atuam especificamente na hidrólise do segundo carbono (C-2) dos fosfoglicerídeos (lipídeos formados pela esterificação das hidroxilas do glicerol em C-1 e C-2 e por um grupamento fosfato em C-3), liberando quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos⁵⁷ (Figura 6, p. 30). Esta hidrólise constitui a via predominante para a produção do ácido araquidônico, precursor de mensageiros como: prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Os derivados do ácido araquidônico, além de mediadores de fenômenos fisiológicos, estão envolvidos em processos inflamatórios⁵⁸.

As fosfolipases estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiopatológicos, como neurotoxicidade e miotoxicidade e apresentam efeito anticoagulante, de inibição da agregação plaquetária, inflamação e letalidade⁵⁶.

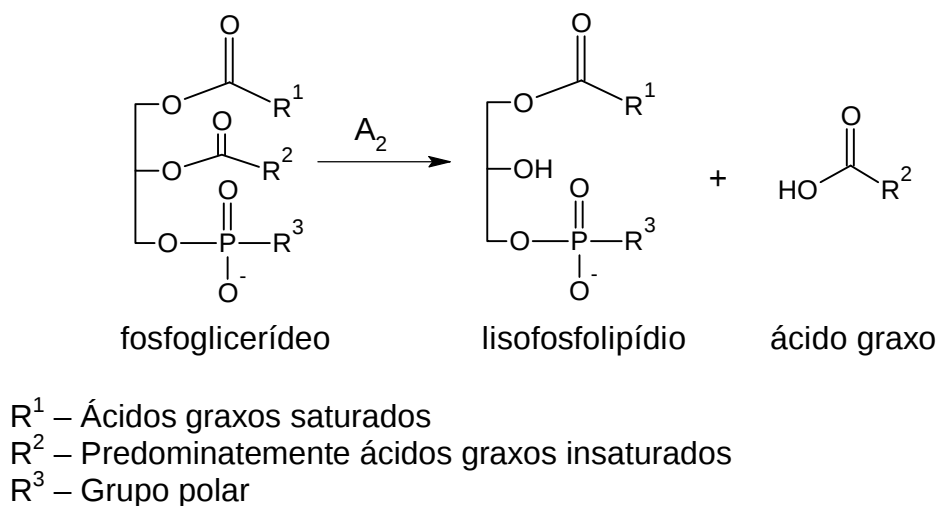


Figura 6. Mecanismo de ação das fosfolipases⁵⁷.

1.6.5. Atividade Proteolítica

As proteases são enzimas, contidas no veneno de serpentes, que podem atuar em vários substratos e estão envolvidas nos mecanismos de digestão e degradação protéica, coagulação sanguínea e fibrinólise, sendo responsáveis pelos quadros de hemorragia, dor e necrose tecidual observados nos acidentes envolvendo ofídios⁵⁹.

O método para determinação da atividade proteolítica de enzimas que utiliza a azocaseína foi inicialmente desenvolvido por Charney & Tomarelli (1947). A azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, que tem coloração alaranjada. A digestão de uma solução de azocaseína por enzimas proteolíticas resulta na formação de componentes coloridos solúveis em ácido tricloroacético. A atividade proteolítica da solução é mensurada pela absorção apresentada pela parte solúvel no ácido tricloroacético⁶⁰.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo geral conhecer a constituição química dos rizomas e dos ramos de *Aristolochia gigantea*, e avaliar o potencial dos constituintes desta espécie para inibição do veneno de serpentes.

2.1. Objetivos específicos

- Isolar os constituintes químicos e determinar as estruturas dos mesmos;
- Avaliar o potencial de inibição das atividades fosfolipásicas e proteolíticas de venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus* provocadas pelos constituintes químicos da espécie *Aristolochia gigantea*.

3. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Aristolochia gigantea*

Este trabalho descreve o isolamento e a determinação estrutural de dezessete substâncias de *A. gigantea* (Figura 7, p. 32).

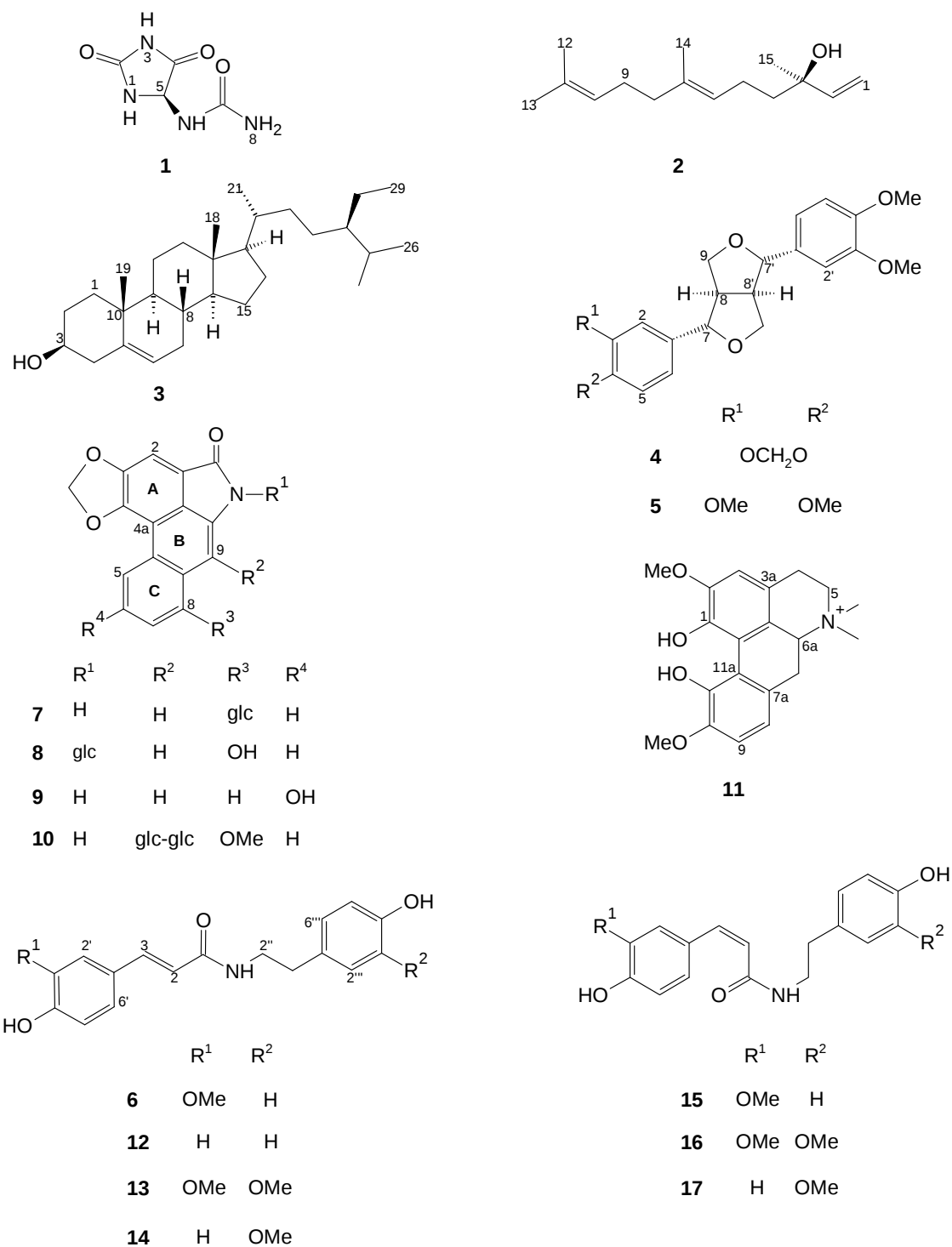


Figura 7. Estruturas determinadas para os constituintes químicos isolados de *A. gigantea*.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1. Os solventes orgânicos empregados nos processos cromatográficos e nas etapas de lavagem das frações, extratos e cristalizações foram de grau cromatográfico; a água foi destilada e deionizada (resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm a 25° C).

2. Para CCDC utilizou-se sílica gel 60G. As revelações das cromatoplasmas foram efetuadas por irradiações UV (254 nm e 365 nm) e/ou em cuba com vapores de iodo.

3. As separações cromatográficas em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60H (Merck), sílica gel de fase reversa C-18 de 230-400 mesh (Merck) e Sephadex LH-20, partículas de 25-100 µm (Sigma).

4. Todas as frações e/ou subfrações obtidas foram concentradas com auxílio de evaporador rotatório (Büchi TM, RE 111 e B 461) e o solvente residual eliminado em capela com exaustão.

5. As análises por CLAE foram realizadas em Cromatógrafos da ShimadzuTM: controlador SCL-10Avp, bomba quaternária (SPD-10AVp) para analítico e bomba isocrática (SPD-10AVvp) para semipreparativo, detector SPD-10AVvp UV-vis e injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (analítico) e 5 mL (semipreparativo). As colunas cromatográficas utilizadas foram: coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, 250 x 4,6 mm, 5 µm) e coluna semipreparativa de fase reversa C-18 (Shimpack, 250 x 20 mm, 10 µm). Os cromatogramas foram adquiridos em 254 e/ou 365nm.

6. Os espectros de RMN de ¹H (500 MHz e 300 MHz) e de ¹³C (126 MHz) 1D e 2D foram adquiridos em espectrômetros Varian INOVA 500 (11,7 T) e Varian INOVA 300 (7,0 T), empregando-se sequências de pulso tradicionais para os experimentos de correlação homo- e heteronucleares. Para as análises utilizou-se solventes deuterados [(CD₃)₂SO e CDCl₃] da Sigma-Aldrich TM com pureza ≥ 99,8% para D, como referência interna foram utilizados os sinais relativos aos hidrogênios residuais dos solventes para RMN de ¹H (δ 7,20 e 2,50) e dos carbonos do solvente para RMN de ¹³C (δ 39,51 e 77,2), respectivamente.

7. As medidas de rotação óptica específica, $[\alpha]_D$, foram feitas em polarímetro digital Perkin Elmer TM 341 LC, com filtro de sódio (589 nm) e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm.

8. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro Fisons TM Platform II por injeção direta com detecção em modo positivo ou negativo por “Electrospray ionization”.

9. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Bruker Daltonics TM MicroTOF Ic com detecção em modo negativo por “Electrospray ionization”.

10. As medidas de determinação de intervalo de fusão foram registradas em aparelho digital Microquímica Ind. e Com. Ltda MQAPF-301.

11. Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos compostos foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum 2000, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando-se pastilha de KBr.

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado na região de Araraquara/SP, em fevereiro de 2004. A identificação da espécie vegetal foi feita pelo Dr. Condorcet Aranha e a responsabilidade por essa etapa foi compartilhada pelo Dr. Lindolpho Capellari Jr. (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP), uma exsicata número 88281 foi depositada no herbáreo da ESALQ.

4.2. Preparação dos extratos de *A. gigantea*

Os materiais vegetais coletados foram separados de acordo com as partes da planta, secos individualmente ao ar e em seguida em estufa a 45 °C. Após a secagem, foram moídos com auxílio de um moinho de facas. Os rizomas (1,6 kg) e ramos (1,4 kg) foram extraídos à temperatura ambiente por sete dias com hexano, acetona e etanol, sucessivamente, e por fim, as tortas resultantes foram extraídas

com etanol em aparelho de sohxlet. Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, secos em capela com exaustão e analisados por CCDC e RMN de ^1H . Com base nos perfis cromatográficos e feições espectrais foram selecionados os extratos etanólicos de rizomas (Riz, 34,1 g) e de ramos (Ram, 36,9 g), para estudos químicos e biológicos.

4.3. Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico de rizomas

Uma parte do extrato de rizomas (8,8 g) foi lavada com metanol (3×10 ml) obtendo-se duas frações: a parte insolúvel (P.I, 0,8 g) e a parte solúvel (P.S, 8,0 g), sendo esta submetida a cromatografia em coluna com sílica gel 60H, eluída com sistemas isocráticos e misturas binárias de hexano, acetato de etila e metanol, com gradiente de polaridade crescente. Este processo cromatográfico resultou em 25 frações (aproximadamente 125 mL cada), as quais foram analisadas por CCDC e RMN de ^1H . A partir da análise desses dados foram selecionadas as seguintes frações para o isolamento dos constituintes: F-7, F-9, F-12 a F-15, F-18, F-21, F-23 e F-25 (Esquema 3, p. 39).

4.3.1. Estudo químico da fração insolúvel em metanol

A fração P.I do extrato etanólico foi cristalizada em metanol resultando em cristais incolores, os quais foram analisados por RMN de ^1H resultando na identificação da substância alantoína (**1**, 743,0 mg). Esta substância foi isolada de outras frações e representa 8,64% do extrato bruto etanólico de rizomas.

4.3.2. Estudo químico das frações F-7 e F-9

As frações F-7 (42,0 mg) e F-9 (80,0 mg) foram individualmente submetidas a lavagens com metanol (3×10 mL), obtendo-se um sólido levemente amarelado e um sólido branco amorfo, respectivamente. As análises espectroscópicas por RMN de ^1H e ^{13}C resultaram na identificação do sesquiterpeno *E*-nerolidol (**2**, 25,0 mg, 0,28%) da F-7 e o β -sitosterol (**3**, 23,0 mg, 0,26%) da F-9.

4.3.3. Estudo químico das frações F-12 a F-14

As frações F-12 (426,0 mg), F-13 (230,0 mg) e a F-14 (188,0 mg) foram individualmente lavadas com CHCl_3 ($3 \times 10\text{ mL}$). Todas as subfrações solúveis foram analisadas por CCDC e RMN de ^1H culminando na identificação de duas lignanas furofurânicas: (+)-kobusina (**4**, 409,0 mg, 4,65%) das frações 12 e 13 e a (+)-eudesmina (**5**, 158,0 mg, 1,79%) da fração 14.

4.3.4. Estudo químico das frações F-15 e F-18

As frações F-15 (124,0 mg) e F-18 (84,0 mg) foram lavadas, individualmente, com CHCl_3 ($3 \times 10\text{ mL}$), e da parte insolúvel (26,0 mg) obteve-se a mistura das alcamidas *trans* e *cis*-*N*-feruloiltiramina (**6** + **15**, 26,0 mg, 0,29%).

4.3.5. Estudo químico da fração F-21

A fração F-21 (1,1 g) foi lavada com metanol e a parte solúvel (F21a, 1,0 g) foi submetida a fracionamento por CC de sílica gel de fase reversa C-18, eluída com gradiente de polaridade decrescente metanol/água. Das dezessete subfrações obtidas, as subfrações 10 e 11 (SF10 e SF11) foram selecionadas para separação por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa de fase reversa C-18; fase móvel $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v), $\lambda = 254\text{ nm}$ e fluxo de 10,0 mL/min. Da SF10 obteve-se as substâncias: aristolactama Ia 8- β -O-glicosídeo (**7**, 2,8 mg), aristolactama Ia *N*- β -glicosídeo (**8**, 4 mg, 0,04%), aristolactama IIIa (**9**, 1,8 mg, 0,02%) e a aristolactama 9-[O- β -glicopiranosil-O-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -glicopiranosídeo] (**10**, 1,2 mg). Da SF11 isolou-se novamente as substâncias **7** (6,8 mg, 0,11%) e **10** (8,9 mg, 0,11%).

4.3.6. Estudo químico das frações F-23 e F-25

A fração F-23 (192,4 mg) foi exaustivamente lavada com metanol para remoção da alantoína (**1**). A parte solúvel em metanol (F-23a, 157,9 mg) foi fracionada por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa de fase reversa C-18. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram: fase móvel $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ (6:4:0,5% v/v/v), λ

= 254 nm e fluxo de 8 mL/min. Deste processo obteve-se duas principais subfrações e as análises espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C indicaram o isolamento do alcaloide magnoflorina (**11**, 17,2 mg) e da alantoína (**1**, 16,5 mg).

Devido as semelhanças observadas entre os espectros de RMN de ^1H das frações F-25 e F-23, adotou-se o mesmo procedimento de separação para a F-25 (13,9 mg), obtendo-se as substâncias **11** (3,2 mg, 0,23%) e **1** (2 mg).

4.4. Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico de ramos

Uma parte do extrato de ramos (10,0 g) também foi lavada com metanol resultando na parte insolúvel (2,3 g) e a solúvel (7,7 g), esta foi fracionada em coluna com Sephadex LH-20, eluída com metanol. Este procedimento resultou em dezessete frações (aproximadamente 125 mL cada), as quais foram analisadas por CCDC e RMN de ^1H . Sendo a fração seis (G-6) selecionada para estudo químico (Esquema 4, p. 40).

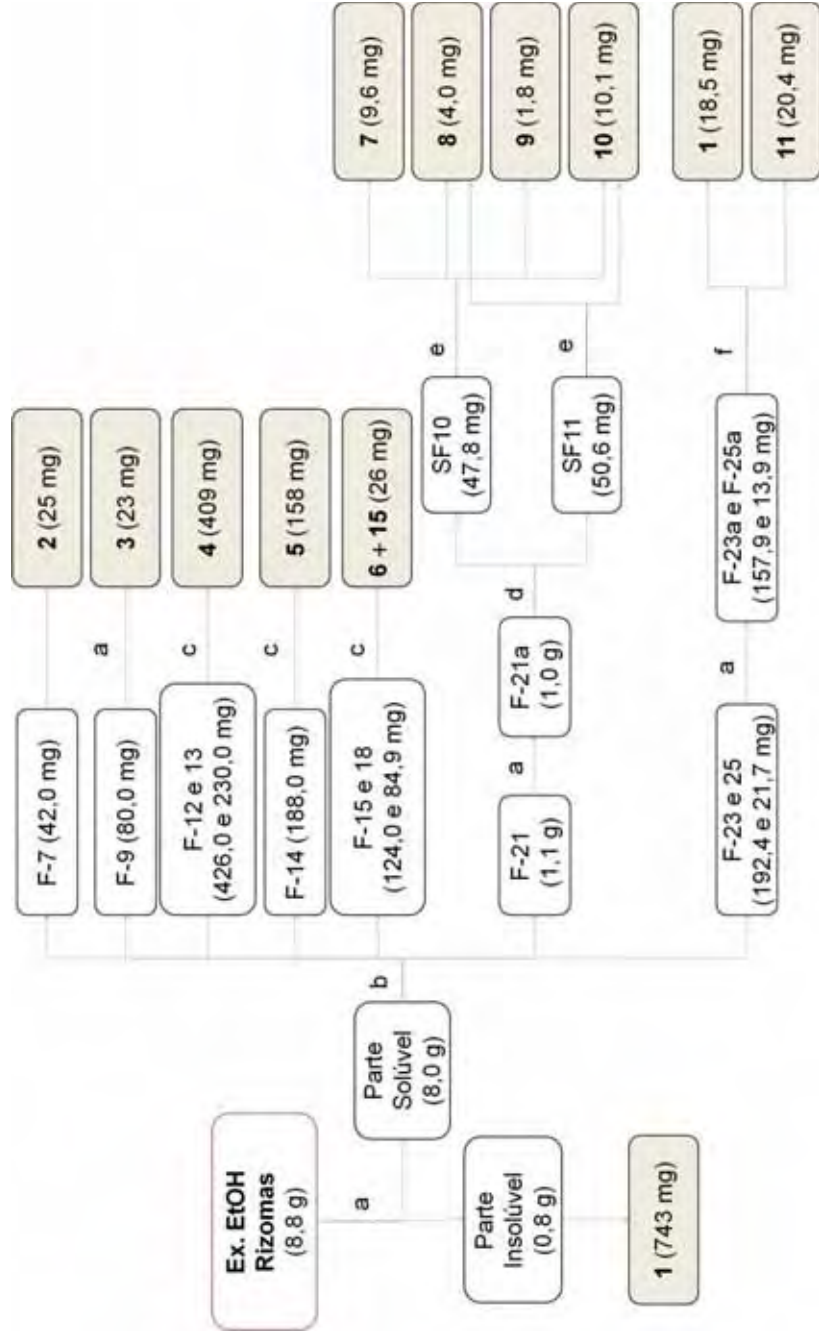
4.4.1. Estudo químico da parte insolúvel em metanol

Da parte insolúvel foram obtidos cristais incolores e por análise do espectro de RMN de ^1H pode-se identifica-los como sendo a alantoína (**1**, 0,75 g, 7,5%).

4.4.2. Estudo químico da fração G-6

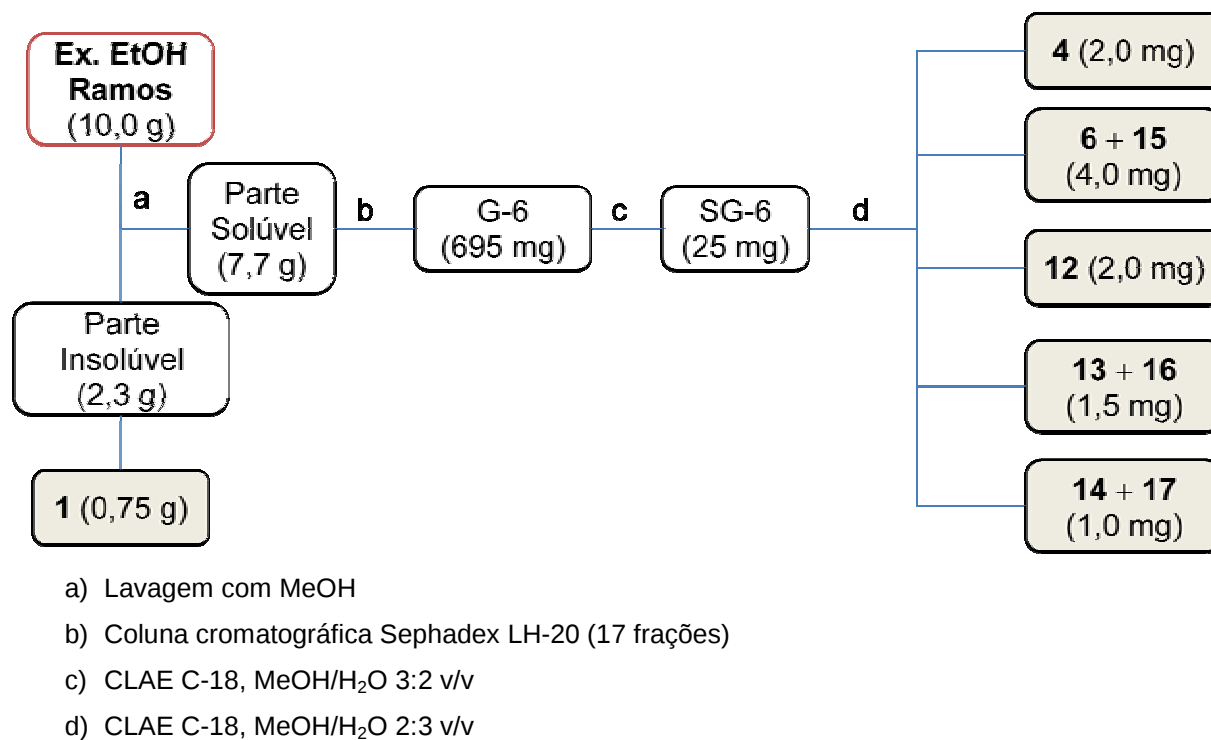
A fração G-6 (695 mg) foi fracionada por CLAE, empregando-se uma coluna semipreparativa de fase reversa C-18. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram: fase móvel MeOH/H₂O (3:2 v/v), λ = 254 nm e fluxo de 8 mL/min. Este fracionamento resultou em nove subfrações, sendo que a subfração seis (SG-6; 25 mg) foi novamente submetida a CLAE utilizando como fase móvel MeOH/H₂O (2:3 v/v) λ = 254 nm e fluxo de 0,8 mL/min. Deste procedimento foi isolada a substância **4** (2 mg, 0,02%) e as alcanidas: *trans*-N-coumaroiltiramina (**12**, 2 mg, 0,02%), *trans* e *cis*-N-feruloil-3-O-metildopamina (**13** + **16**, 1,5 mg, 0,015%), *trans* e *cis*-N-p-

coumaroil-3-O-metildopamina (**14** + **17**, 1 mg, 0,01%) e novamente isolou-se a mistura das substâncias **6** + **15** (4 mg 0,04%).



- a) Lavagem com MeOH
- b) CC sílica gel 60H (25 frações)
- c) Lavagem com CHCl₃
- d) CC C-18 MeOH/H₂O
- e) CLAE C-18, MeOH/H₂O 1:1 v/v
- f) CLAE C-18, MeOH/H₂O/NH₄OH 6:4:0,5% v/v/v

Esquema 3. Fracionamento do extrato etanólico de rizomas de *A. gigantea*.



Esquema 4. Fracionamento do extrato etanólico de ramos de *A. gigantea*

4.5. Bioensaios

4.5.1. Inibição da atividade fosfolipásica

A etapa de avaliação da atividade fosfolipásica foi realizada com a colaboração do professor Dr. Andreimar Martins Soares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo – Ribeirão Preto, e com o auxílio da doutoranda Renata dos Santos Fernandes.

Para a avaliação da inibição da atividade fosfolipásica preparou-se um gel [CaCl₂ 0,01 M; gema de ovo (fonte de fosfoglicerídeos) 1:30 v/v PBS, pH 7,2; eritrócitos 1:3-v/v PBS; ágar bacteriológico 1%; azida de sódio 0,005%, sendo o volume final completado com PBS em temperatura de 45-50 °C] que foi vertido em placas. Após o gel solidificar, fez-se orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) para a aplicação das amostras (40 µL). As amostras, em diferentes proporções, constaram de soluções de venenos brutos e diferentes extratos ou frações, que foram mantidas por 30 min a 37 °C. Os géis foram colocados em estufa

a 37 °C por 12 horas. Os testes foram realizados em triplicata e obteve-se a média dos valores e o desvio padrão.

4.5.2. Inibição da atividade proteolítica sobre a azocaseína

Cerca de 50 µg do veneno bruto de *B. jararacussu* foi pré-incubado por 30 minutos a 37 °C juntamente com as soluções das substâncias a serem testadas na proporção 1:60 (m/m) peçonha:substância. Após decorrido o tempo, foram adicionados 200 µL de Tris-HCl 50 mM pH = 7,8 em NaCl 150 mM e incubada por 30 minutos com 100µL de uma solução de azocaseína (1 mg/mL). A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético 15 % e as absorções das soluções foram lidas a 280 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de RMN de ^1H do extrato etanólico de rizomas (Figura 8, p. 42) e o de ramos (Figura 9, p. 43) apresentaram maior quantidade de sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos quando comparados com os dos extratos hexânicos e acetônicos. Em virtude disso, os extratos hexânicos, acetônicos e etanólicos de sohxlet foram selados e adequadamente guardados para posteriores fracionamentos.

O estudo químico dos extratos etanólicos de rizomas e de ramos de *A. gigantea* resultou no isolamento de 17 substâncias: alantoína (**1**), *E*-nerolidol (**2**), β -sitosterol (**3**), (+)-kobusina (**4**), (+)-eudesmina (**5**), *trans* e *cis*-*N*-feruloiltiramina (**6** + **15**), aristolactama Ia 8- β -*O*-glicosídeo (**7**), aristolactama Ia *N*- β -glicosídeo (**8**), aristolactama IIIa (**9**), magnoflorina (**11**), *trans*-*N*-coumaroiltiramina (**12**), *trans* e *cis*-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina (**13** + **16**); destacando-se as substâncias: aristolactama 9-[*O*- β -glicopiranosil-*O*-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -glicopiranosídeo] (**10**) e *trans* e *cis*-*N*-*p*-coumaroil-3-*O*-metildopamina (**14** + **17**) relatadas pela primeira vez na literatura.

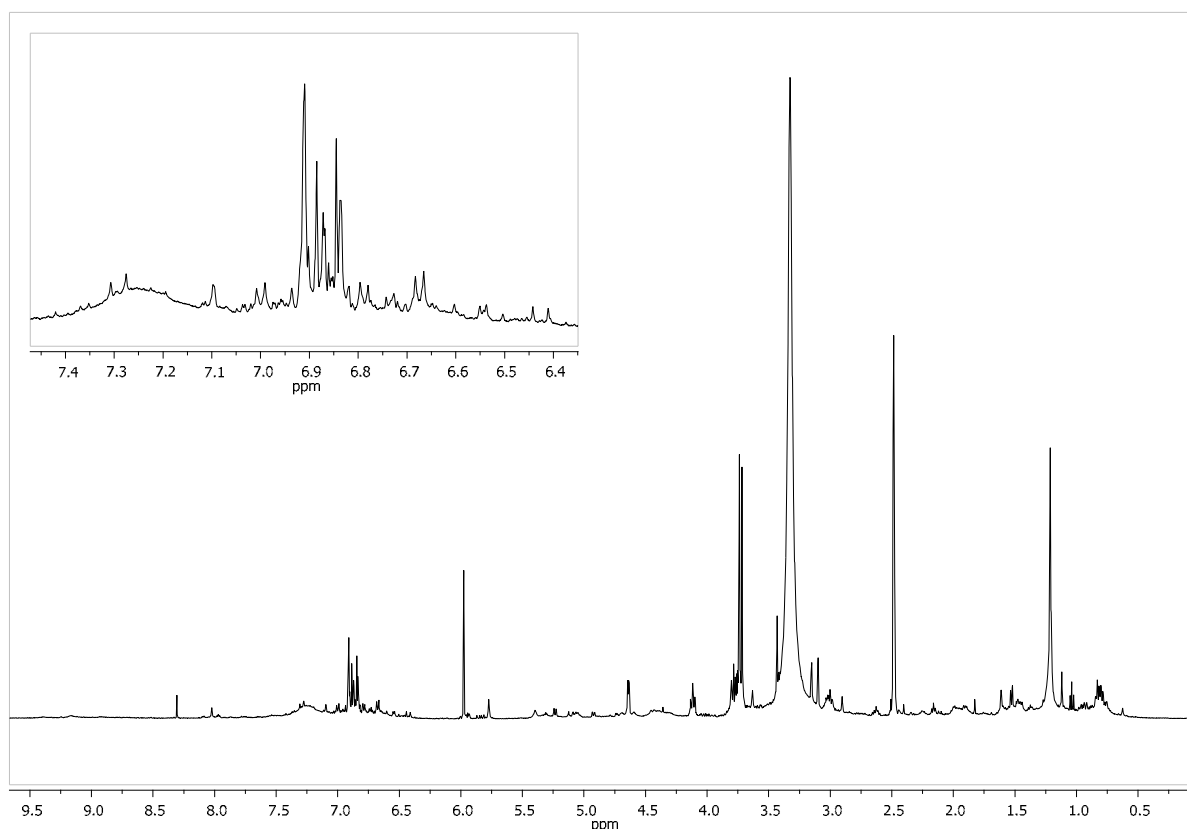


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico de rizomas (DMSO- d_6 , 11,7 T).

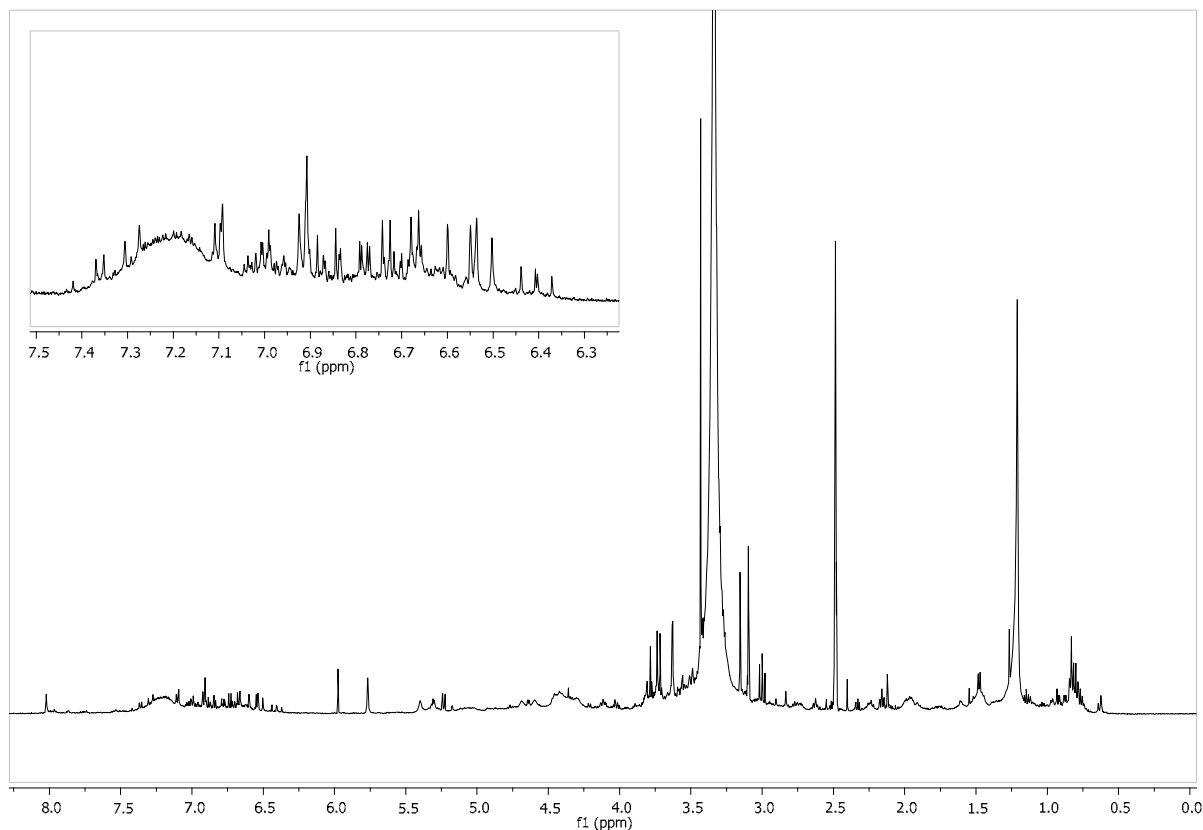
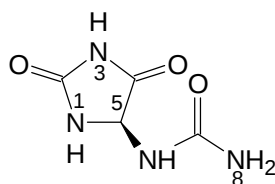


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico de ramos ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

5.1. Determinação estrutural dos constituintes químicos de *A. gigantea*

A elucidação estrutural das substâncias foi realizada por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais, EM e IV). Os valores de deslocamentos químicos apresentados foram corrigidos, quando necessário, em relação aos padrões internos de referência para cada solvente.

5.1.1. Alantoína (**1**)



A substância **1** foi cristalizada em metanol formando cristais incolores. O espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO}-d_6$ (Figura 10, p. 44) apresenta somente sinais na região de frequência alta, referentes a: três singletos largos em δ 5,76 (NH_2 -8), 8,03 (NH -1) e 10,51 (NH -3); um dubleto em δ 6,88 (NH -6), além de um dubleto em δ 5,25 referente ao hidrogênio metínico (H-5) (Tabela 1, p. 44). A comparação dos dados com os descritos na literatura⁶¹ e com amostra autêntica de alantoína permitiu a identificação da substância **1**.

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H de **1** ($\text{DMSO}-d_6$, δ , $J = \text{Hz}$, 11,7 T).

Posição	1 (δ_H)	Alantoína (δ_H) ⁶¹
1	8,03 <i>s</i> /	8,04 <i>s</i>
3	10,51 <i>s</i> /	10,54 <i>s</i>
5	5,25 <i>d</i> (8,1)	5,24 <i>d</i> (8,2)
6	6,88 <i>d</i> (8,1)	6,89 <i>d</i> (8,2)
8	5,76 <i>s</i> /	5,78 <i>s</i>

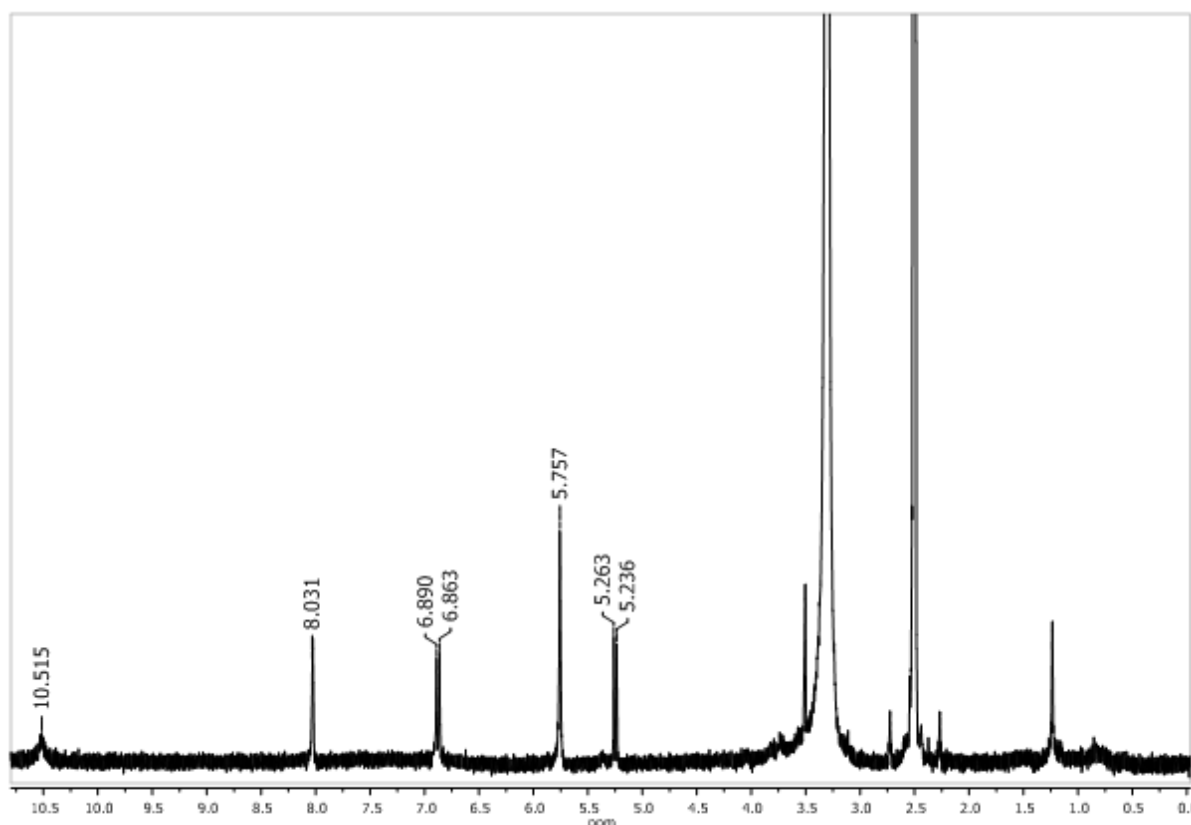
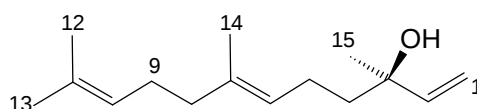


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H de **1** ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).

5.1.2. *E*-nerolidol (**2**)

A identificação da substância **2** foi feita pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 11, p. 45), o qual apresentou vários sinais característicos de hidrogênios vinílicos em δ 5,0 – 5,9. Pela análise das constantes de acoplamento ($J=17,5$; 11,0 e 1,5 Hz) pode-se deduzir a presença de uma ligação dupla terminal na estrutura da substância **2**. O espectro também apresentou sinais na região de frequência baixa, atribuídos aos hidrogênios metílicos e demais hidrogênios alifáticos (Tabela 2, p. 48).

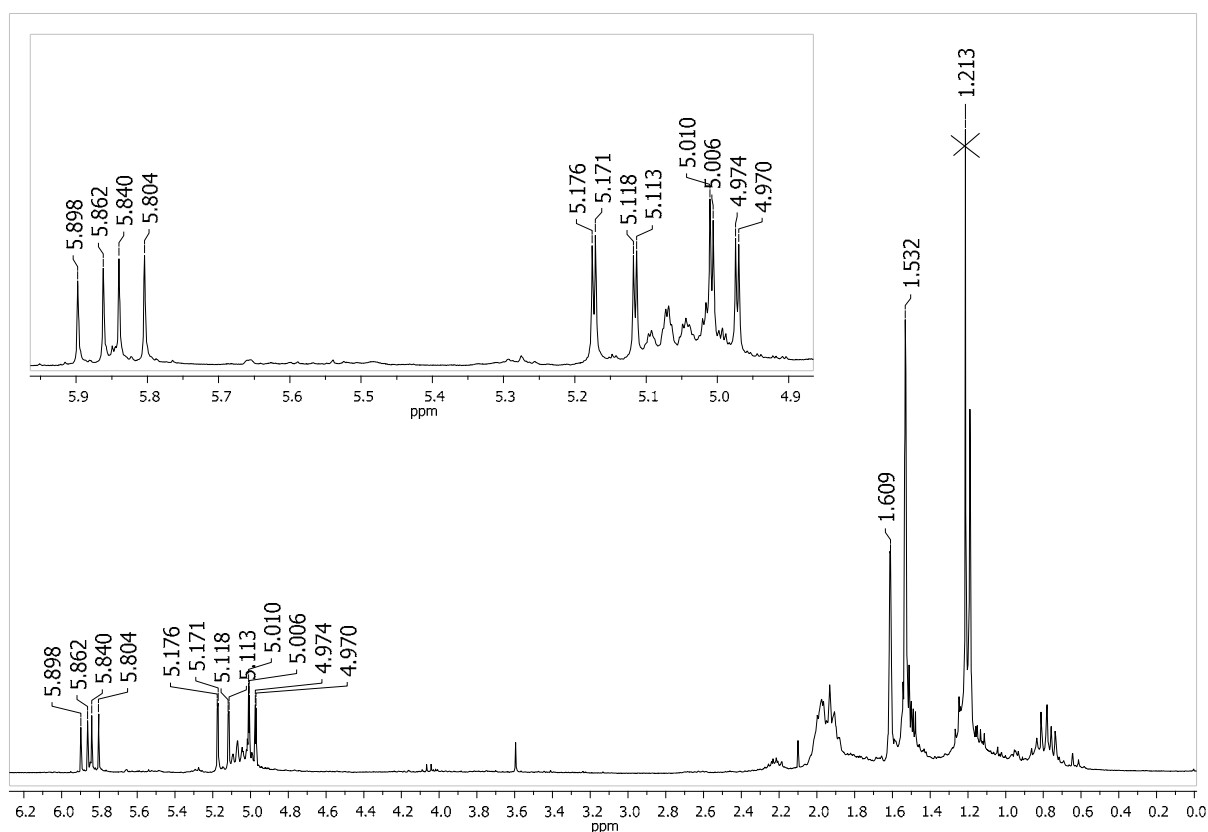


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H de **2** com ampliação (CDCl_3 , 7,1 T).

Pelos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12, p. 46) notou-se seis sinais na região de frequência alta (δ 145,2 – 111,8) referentes a carbonos olefínicos; um carbono carbinólico em δ 73,6; e outros sinais em região de

frequência baixa associados aos carbonos metilênicos e metílicos, totalizando sinais para quinze carbonos. As correlações observadas no mapa de contornos *g*HMBC (Figura 14, p. 47) possibilitaram a atribuição dos deslocamentos químicos relativos às metilas e aos carbonos sp^2 , uma vez que foram observadas as correlações entre H-15 (δ 1,22) e C-4 (δ 42,1) e C-2 (δ 145,0); H-14 (δ 1,54) e C-8 (δ 39,7), C-7 (δ 135,5) e C-6 (δ 124,2*); H-12 (δ 1,54) e C-13 (δ 25,7) e C-10 (δ 124,2*); H-13 (δ 1,61) e C-12 (δ 17,7), C-11 (δ 131,3) e C-10 (δ 124,2*).

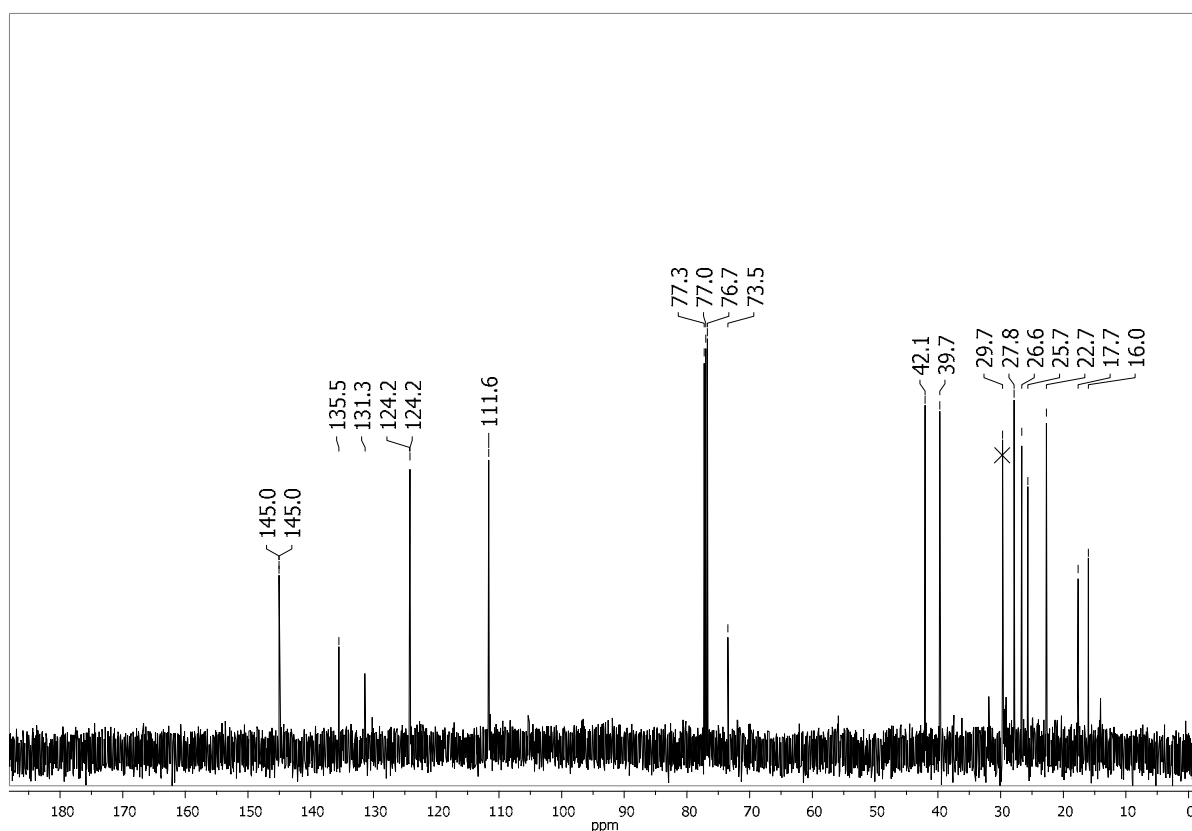


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C de **2** (CDCl_3 , 7,1 T).

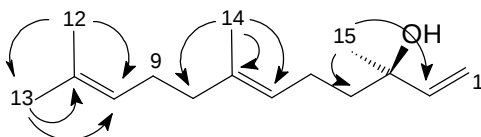


Figura 13. Principais correlações observadas pelo experimento *g*HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) de **2**.

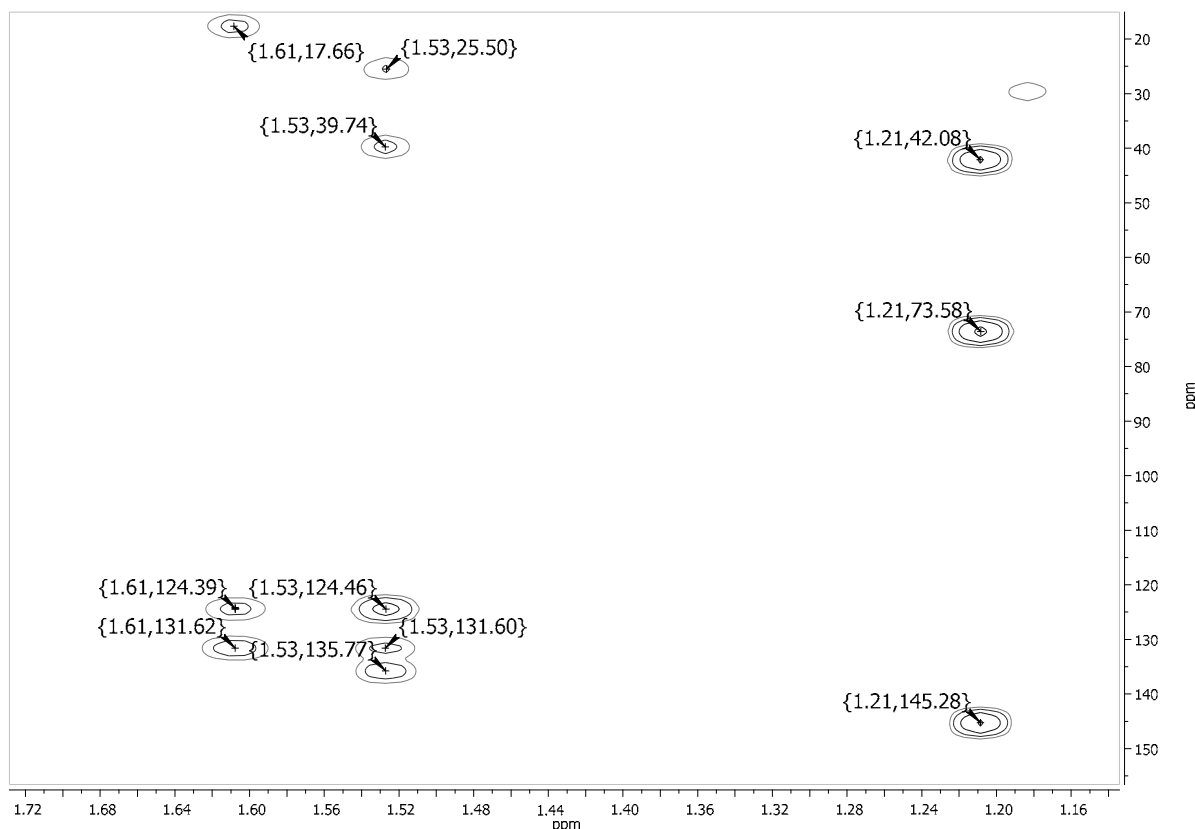


Figura 14. Mapa de contornos gHMBC de **2** (CDCl₃, 7,1 T).

A análise do espectro de RMN de ¹³C foi essencial para a elucidação estrutural desta substância, uma vez que permitiu estabelecer qual dos possíveis isômeros geométricos (*E*-nerolidol ou *Z*-nerolidol) se tratava a substância em questão. A principal distinção entre estes isômeros é referente ao deslocamento químico do carbono metílico C-14, pois no isômero *Z* a ausência do efeito de proteção γ gauche faz com que o deslocamento químico do C-14 seja próximo a δ 23,5; enquanto no isômero *E* este carbono apresenta um deslocamento para campo alto. Como foi observado um deslocamento químico de 16,0 ppm para C-14, foi possível confirmar que a substância **2** é o isômero *E*-nerolidol⁶².

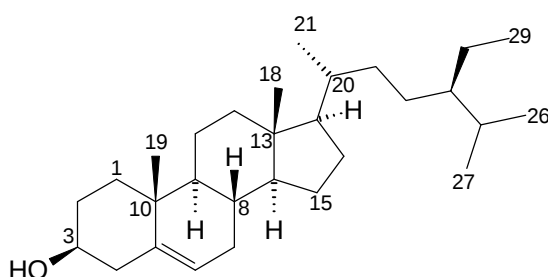
Além disto, o valor de rotação óptica específica da substância foi -17° (CHCl₃; c 0,2; t = 26,0 °) e comparando com a literatura⁶³ onde $[\alpha]_D = -12,5^\circ$ (CHCl₃; c 0,02; t = 23,0 °), juntamente com os demais dados, pode-se confirmar que a substância **2** é o sesquiterpeno (–)-(3R)-*E*-nerolidol.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **2** (CDCl_3 , δ , $J = \text{Hz}$)

Posição	Substância 2		<i>E</i> -Nerolidol ⁶⁴	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	Ha 5,15 <i>dd</i> (17,5; 1,5) Hb 5,00 <i>dd</i> (10,5; 1,5)	111,6	5,24 - 5,04 <i>m</i>	111,6
2	5,86 <i>dd</i> (17,5; 10,8)	145,0	5,92 <i>dd</i>	145
3	-	73,5	-	73,5
4	1,54 - 1,51 <i>m</i>	42,1	1,62 - 1,45 <i>m</i>	42
5	2,00 - 1,92 <i>m</i>	22,7	2,10 - 1,90 <i>m</i>	22,7
6	5,10 - 5,02 <i>m</i>	124,2*	5,24 - 5,04 <i>m</i>	124,2
7	-	135,5	-	135,5
8	2,00 - 1,92 <i>m</i>	39,7	2,10 - 1,90 <i>m</i>	39,6
9	2,00 - 1,92 <i>m</i>	26,6	2,10 - 1,90 <i>m</i>	26,6
10	5,10 - 5,02 <i>m</i>	124,2*	5,24 - 5,04 <i>m</i>	124,2
11	-	131,3	-	131,4
12	1,53 <i>s</i>	17,7	1,68 <i>s</i>	17,6
13	1,61 <i>s</i>	25,7	1,60 <i>s</i>	25,7
14	1,53 <i>s</i>	16,0	1,60 <i>s</i>	16,0
15	1,22 <i>s</i>	27,8	1,28 <i>s</i>	27,8

* Os valores na mesma coluna podem estar trocados.

5.1.3. β -Sitosterol (**3**)



O espectro de RMN ^1H da substância **3** (Figura 15, p. 49) mostrou um conjunto de sinais na região de δ 0,63 a 2,00, além de sinais atribuíveis a um hidrogênio vinílico em δ 5,31 e a um hidrogênio carbinólico em δ 3,44.

Além do sinal em δ 29,2, correspondente aos $(\text{CH}_2)_n$ da contaminação, o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16, p. 49) apresenta sinais correspondentes a 29 átomos de carbono: dois carbonos olefínicos em δ 140,6 e 121,1; um sinal de

carbono carbinólico em δ 71,0 e 26 sinais referentes a carbonos alifáticos (Tabela 3, p. 50).

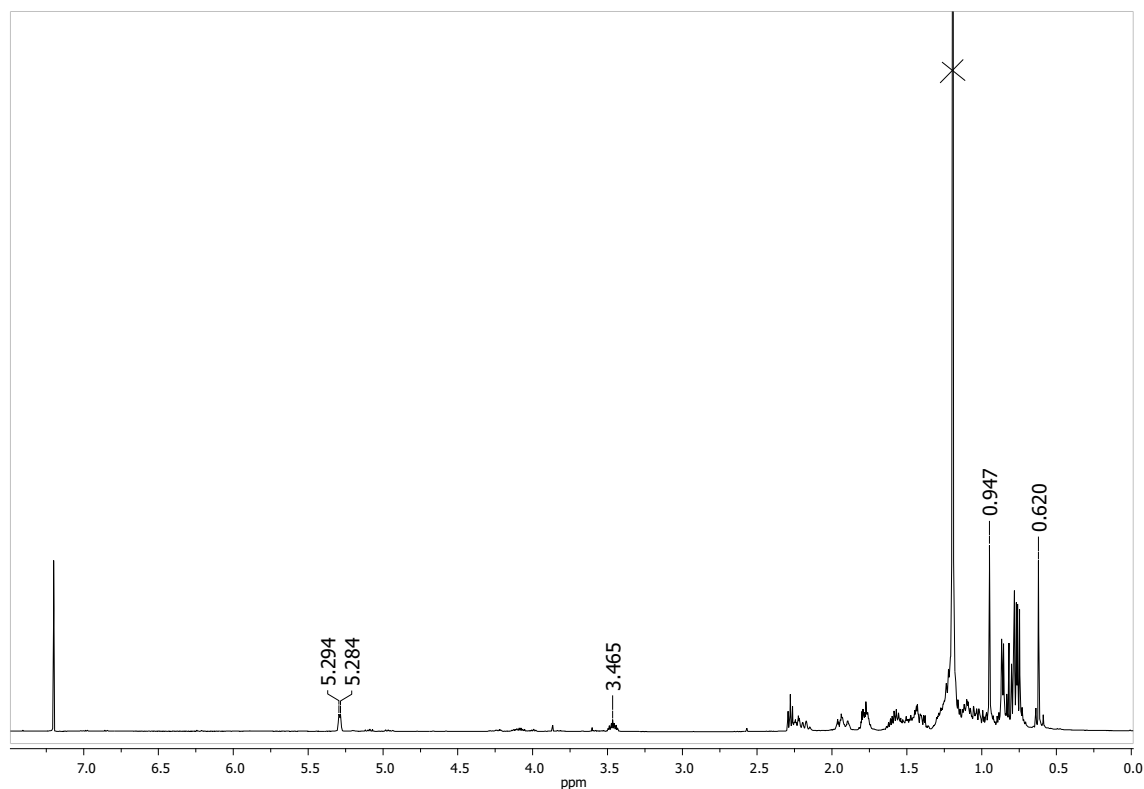


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H de **3** (CDCl_3 , 11,7 T).

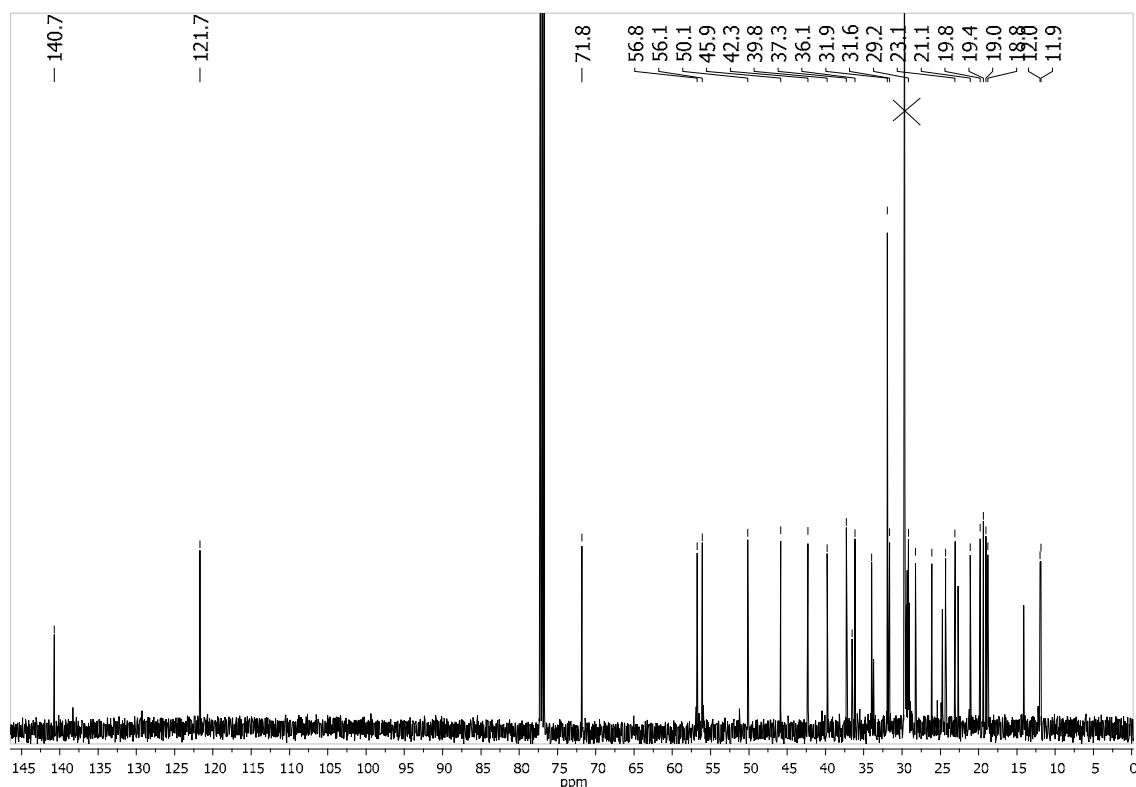


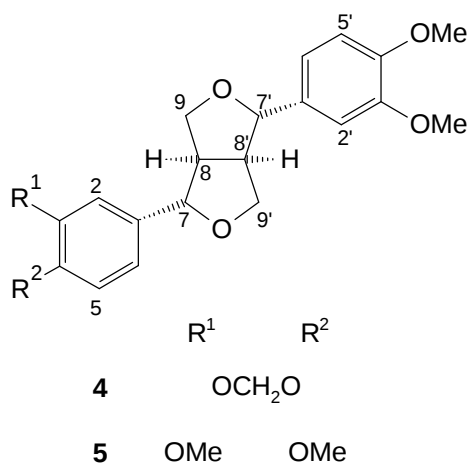
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , 11,7 T).

A comparação do sinal de $[\alpha]_D$ observado para **3** $[\alpha]_D = -15,2^\circ$ (CHCl_3 ; c 0,23; $t = 30,8^\circ$) com o relatado na literatura⁶⁵ para o β -sitosterol $[\alpha]_D = -26,0^\circ$ (CHCl_3 ; c 0,1; $t = 25,0^\circ$) e a análise dos dados espectroscópicos possibilitaram a identificação de **3** com o β -sitosterol.

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , δ , 11,7 T).

Posição	3 (δ_c)	Sitosterol (δ_c) ⁶⁶	Posição	3 (δ_c)	Sitosterol (δ_c) ⁶⁶
1	37,3	37,2	16	28,2	28,2
2	31,6	31,6	17	56,1	56,0
3	71,8	71,8	18	11,9	11,9
4	42,3	42,5	19	19,4	19,4
5	140,7	140,0	20	36,1	36,1
6	121,7	121,7	21	18,8	18,8
7	31,9	31,8	22	34,0	33,9
8	31,9	31,9	23	26,1	26,0
9	50,1	50,1	24	45,9	45,8
10	36,5	36,5	25	29,2	29,1
11	21,1	21,1	26	19,8	19,8
12	39,8	39,7	27	19,0	19,1
13	42,3	42,3	28	23,1	23,0
14	56,8	56,7	29	12,0	12,0
15	24,3	24,3			

5.1.4. Lignanas furofurânicas (**4** e **5**)



Para as lignanas do tipo furofurânica a junção dos anéis é sempre *cis* e existem três possibilidades de configurações relativas, que são diferenciadas pelo valor do deslocamento químico dos hidrogênios carbinólicos benzílicos H-7 e H-7' (Figura 17, p. 51). Quando estão em posição *pseudo-axiais* a faixa de deslocamento químico é δ 4,65 – 4,75 (Ia); quando estão em posição *pseudo-equatoriais* apresentam-se mais desprotegidos e o deslocamento químico é δ 5,1(Ic); se os hidrogênios em questão possuem configurações distintas entre si, observa-se dois dubletos distintos em δ 4,75 – 4,85 e 4,35 – 4,45 (Ib)⁶⁷.

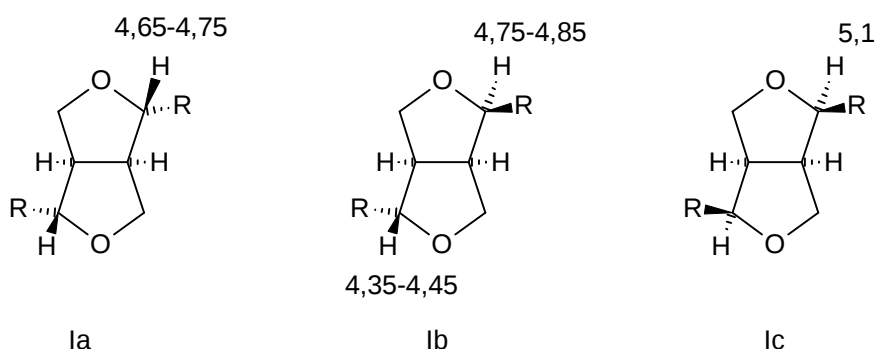


Figura 17. Possíveis configurações relativas para lignanas furofurânicas.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 18, p. 52) da substância **4** apresenta sinais na região de frequência alta, onde são observados sinais de seis hidrogênios aromáticos em δ 6,70 – 6,84; a região ainda apresenta um singlete em δ 5,88 atribuído a dois hidrogênios metilênicos dioxílicos. Na região de frequência média, são observados sinais atribuídos a oito hidrogênios: dois dubletos em δ 4,67 referentes a dois hidrogênios carbinólicos benzílicos dispostos em posições *pseudo-axiais*; dois duplo dubletos em δ 4,18 e um multipeto em δ 3,82 atribuídos a hidrogênios metilênicos carbinólicos, dispostos nas posições *pseudo-axiais* e *pseudo-equatoriais*; além de um multipeto centrado em δ 3,02 referente a dois hidrogênios metínicos em posições *pseudo-axiais*.

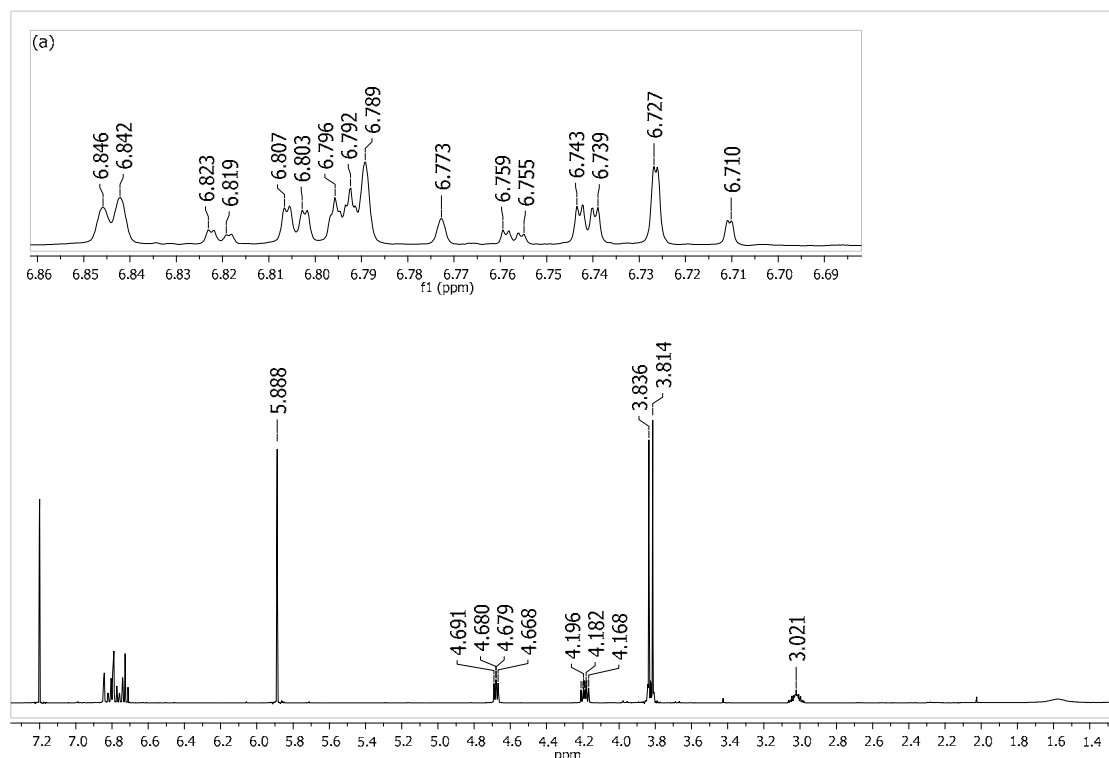


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de **4** com ampliação (CDCl_3 , 11,7 T).

O valor da rotação óptica específica para a substância **4** foi de $+51,4^\circ$ (CHCl_3 , c 0,22) sendo o valor da literatura para a (+)-kobusina de $+58,0^\circ$ (CHCl_3 , c 0,03)⁶⁸. Os dados de RMN de ^1H (Tabela 4, p. 52) e a rotação óptica específica quando comparados com a literatura permitem concluir que a substância **4** trata-se da lignana (+)-kobusina.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H de **4** (CDCl_3 , δ , J = Hz, 11,7 T).

4				
Posição	(δ_{H})	Posição	(δ_{H})	(+)-Kobusina (δ_{H}) ⁶⁸
2	6,84 <i>d</i> (2,0)	2'	6,79 <i>d</i> (2,0)	6,76 - 6,84 <i>m</i>
5	6,77 <i>d</i> ($w_{1/2}$ 8,0)	5'	6,71 <i>d</i> ($w_{1/2}$ 8,0)	6,76 - 6,84 <i>m</i>
6	6,81 <i>dd</i> ($w_{1/2}$ 2,0; 8,0)	6'	6,74 <i>dd</i> ($w_{1/2}$ 2,0; 8,0)	6,76 - 6,84 <i>m</i>
7	4,67 <i>d</i> (5,5)	7'	4,68 <i>d</i> (5,5)	
8	3,02 <i>m</i>	8'	3,02 <i>m</i>	3,08 <i>m</i>
9 β	4,18 <i>dd</i> (9,5; 6,5)	9' β	4,18 <i>dd</i> (9,5; 6,5)	4,24 <i>dd</i> (7,9)
9 α	3,82 <i>m</i>	9' α	3,82 <i>m</i>	3,84 - 3,94 <i>m</i>
OCH_3 -3',4'	3,83 <i>s</i> e 3,80 <i>s</i>			3,84 <i>s</i> e 3,86 <i>s</i>
(- OCH_2O -)	5,88 <i>s</i>			5,92 <i>s</i>

O espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (Figura 19, p. 54) apresenta onze sinais correspondentes a 22 átomos de carbonos equivalentes. Apresenta sinais em δ 149,2 e 148,6 relativos a carbonos quaternários oxigenados, além de sinais em δ 85,7 e 71,6 referentes a carbonos carbinólicos benzílicos e metilênicos carbinólicos, respectivamente, sinais referentes a carbonos aromáticos e quatro carbonos metoxílicos.

A mesma metodologia de análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 20, p. 54) aplicada para a elucidação estrutural de **4** foi utilizada para elucidar a estrutura de **5**. Os deslocamentos químicos de H-7 e H-7' foram analisados e constatou-se que estes devem estar axialmente ligados a unidade furofurânica (Tabela 5, p. 55).

A análise do espectro de massas apresentou o pico do íon *quasi*-molecular de m/z 387 $[\text{M}+\text{H}]^+$ compatível com a fórmula molecular da eudesmina $\text{C}_{22}\text{O}_6\text{H}_{26}$ (Figura 21, p 55). O valor da rotação óptica específica para a substância **5** foi de $+17,5^\circ$ (CHCl_3 , c 0,12) sendo que o valor da literatura para a (+)-eudesmina é $[\alpha]_D = +61^\circ$ (CHCl_3 , c 0,4)⁶⁸. Como os espectros de RMN de **5** indicaram que a amostra estava contaminada com um composto de natureza alifática, pode-se deduzir que a substância **5** que possui a configuração absoluta da (+)-eudesmina esteja em predominância na amostra.

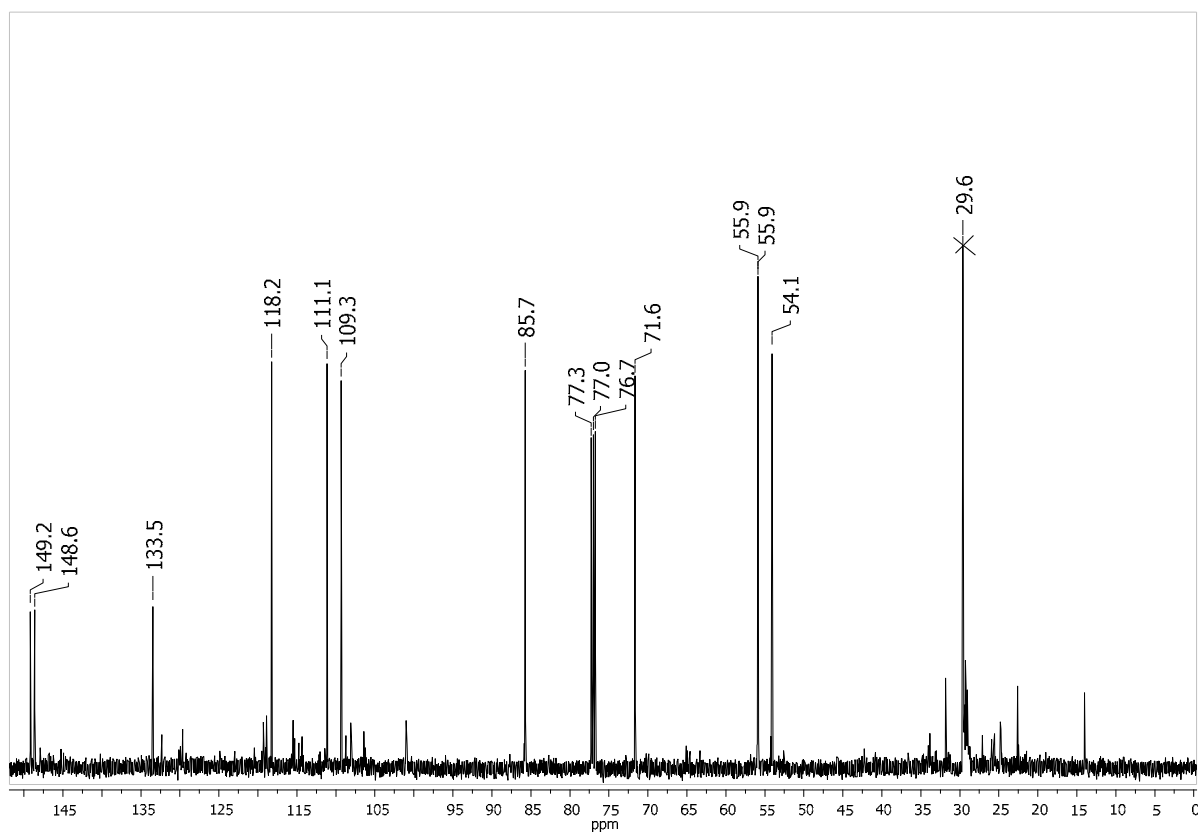


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C de **5** (CDCl_3 , 11,7 T).

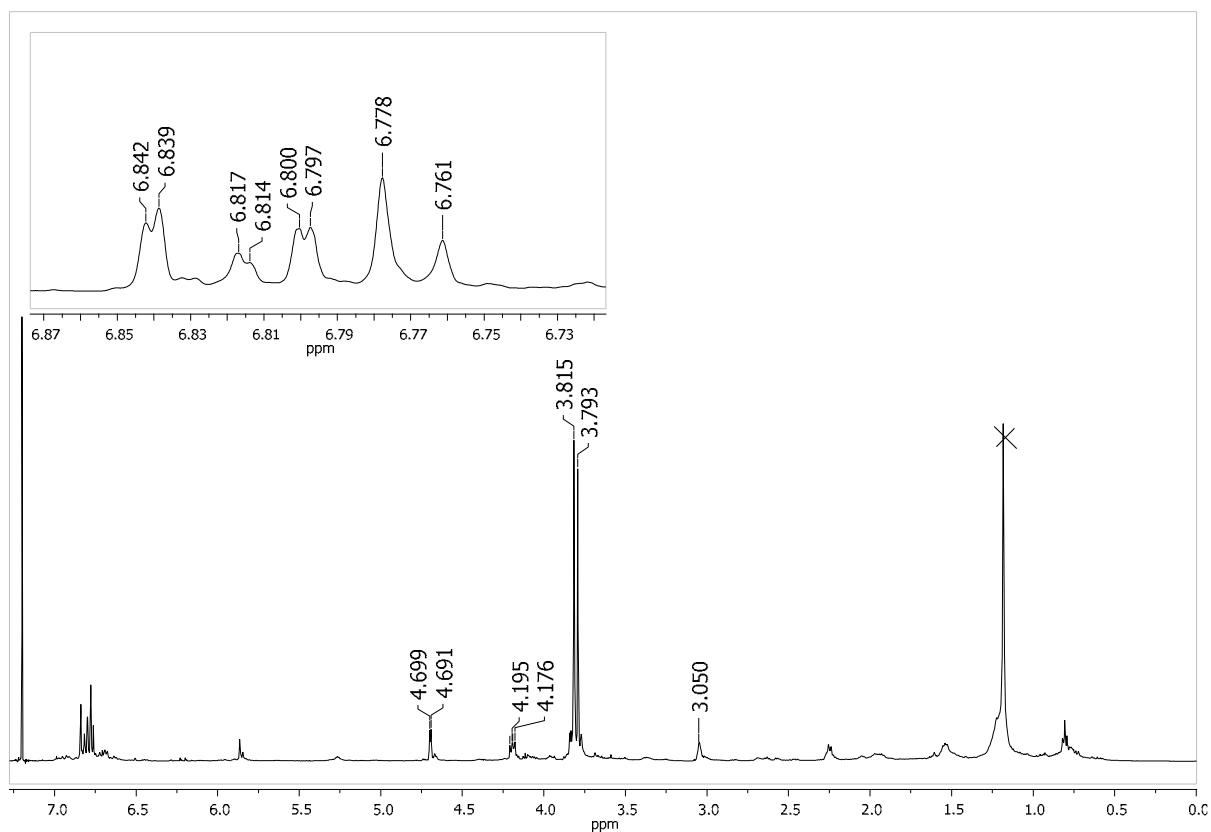


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de **5** com ampliação (CDCl_3 , 11,7 T).

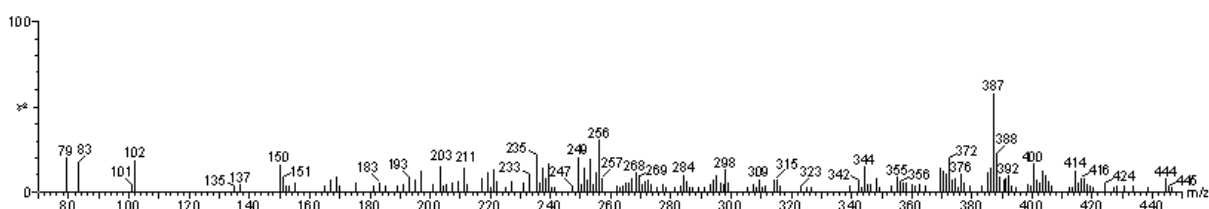
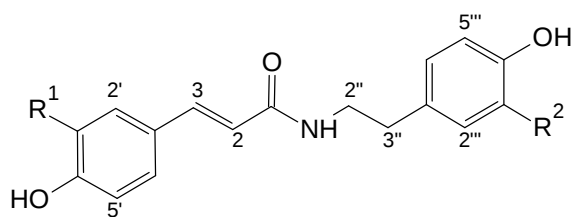


Figura 21. Espectro de massas de baixa resolução de **5** (ESI, +20 eV)

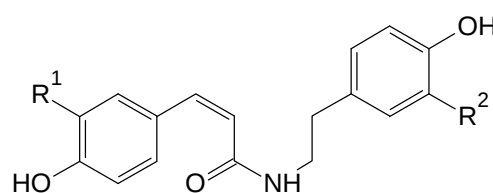
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **5** (CDCl_3 , δ , J = Hz, 11,7 T).

Posição	Substância 5		(+)–Eudesmina ⁶⁸	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1,1'	-	133,5	-	133,8
2,2'	6,84 <i>d</i> (1,5)	109,3	6,84-6,92 <i>m</i>	109,5
3,3'	-	148,6	-	148,9
4,4'	-	149,2	-	149,4
5,5'	6,77 <i>d</i> (8,5)	111,1	6,84-6,92 <i>m</i>	111,3
6,6'	6,82 <i>dd</i> (1,5; 8,5)	118,2	6,84-6,92 <i>m</i>	118,5
7,7'	4,69 <i>d</i> (4,0)	85,7	4,76 <i>d</i> (4,0)	86,0
8,8'	3,02 <i>m</i>	54,1	3,12 <i>m</i>	54,4
9 β ,9 β '	4,19 <i>dd</i> (6,5;9,0)	71,6	4,26 <i>dd</i> (7,0; 9,0)	71,9
9 α ,9 α '	3,80 <i>m</i>		3,86-3,96 <i>m</i>	
OCH ₃	3,81 <i>s</i> ; 3,79 <i>s</i>	55,9	3,86 <i>s</i> ; 3,90 <i>s</i>	56,1;56,2

5.1.5. Alcamidas (**6**, **12** – **17**)



	R^1	R^2
6	OMe	H
12	H	H
13	OMe	OMe
14	H	OMe



	R^1	R^2
15	OMe	H
16	OMe	OMe
17	H	OMe

Os espectros de RMN de ^1H evidenciaram para as substâncias **6**, **12** – **17** sinais referentes a dois anéis aromáticos (δ 6,60 – 7,58), hidrogênios metilenobenzílicos (δ ~2,6), sinais correspondentes a hidrogênios vinílicos *trans* com δ ~6,4 e 7,3 ($J = \sim 15$ Hz) e *cis* com δ ~5,7 e 6,4 ($J = \sim 12$ Hz), além de hidrogênios metilênicos ligados a um heteroátomo (δ ~3,3), porém, este sinal foi obscurecido pelos sinais da água residual do solvente DMSO- d_6 , na maioria dos espectros obtidos.

A análise do espectro de RMN de ^1H de **6** + **15** (Figura 22, p. 56) confirmou a presença de um anel aromático *para*-substituído e outro trissubstituído na estrutura. O anel aromático que apresenta valores de deslocamentos químicos mais elevados dos hidrogênios é o anel trissubstituído que está conjugado com uma dupla ligação. A integração do espectro permitiu estabelecer a proporção 6:1 entre os isômeros *trans* e *cis* da amostra. Para os hidrogênios relativos às ligações duplas do isômero geométrico *cis* é observado um deslocamento para campo alto (δ 5,7 e 6,4) em relação aos hidrogênios do isômero *trans* (δ 6,4 e 7,3), este efeito resulta da perda de planaridade da molécula, com isso a conjugação entre a ligação dupla e o anel aromático deixa de ser efetiva (Figura 23, p. 57)^{69,70}.

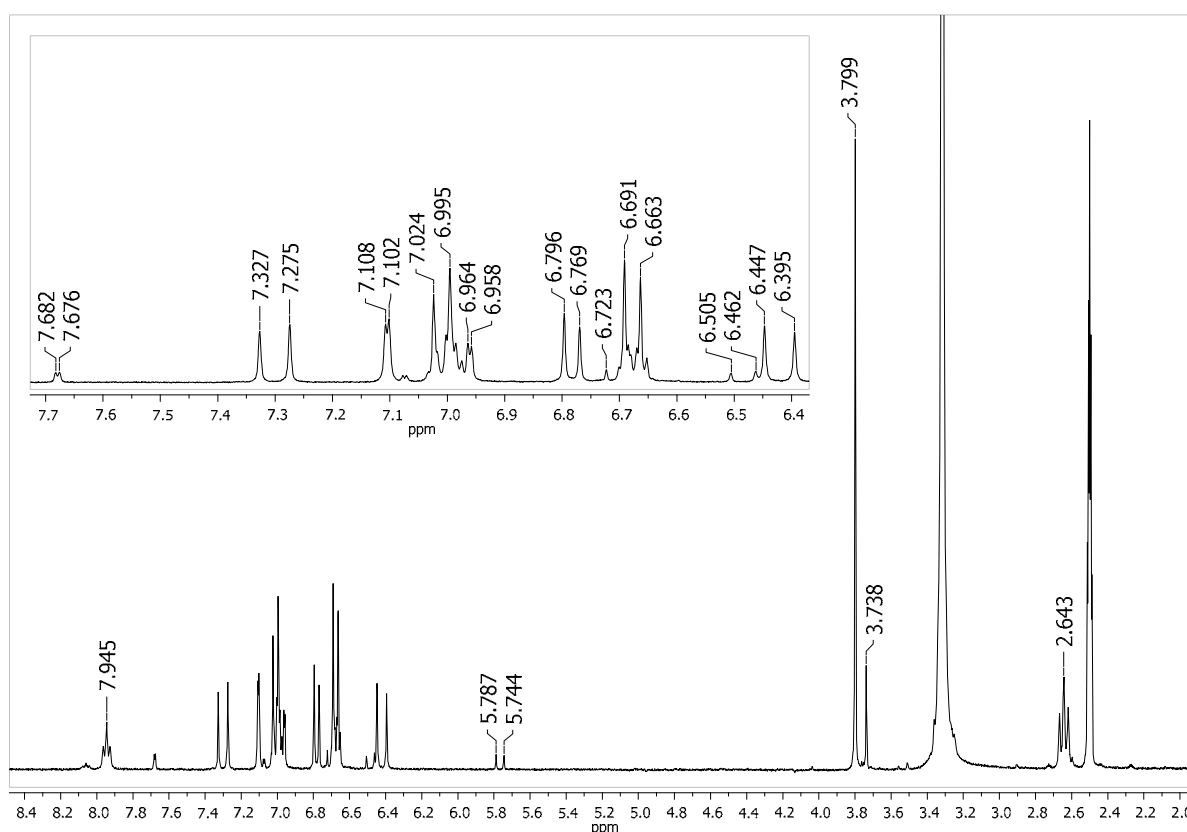


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H de **6** + **15** com ampliação (DMSO- d_6 , 7,1 T).

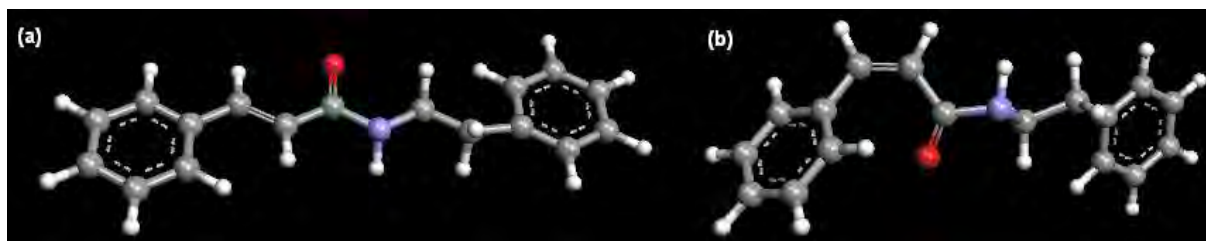


Figura 23. Conformações propostas para os isômeros geométricos (a) *trans* e (b) *cis*.

No experimento de NOESY 1D de **6** + **15** (Figura 24, p. 57) observou-se a interação espacial da metoxila (δ 3,80) com o H-2' (δ 7,1), confirmando a posição desta em C-3'. Comparando-se os dados obtidos com os descritos na literatura⁷¹ identificou-se a substância **6** (Tabela 6, p. 60) com a *trans*-*N*-feruloiltiramina e a substância **15** (Tabela 7, p. 61) com a *cis*-*N*-feruloiltiramina.

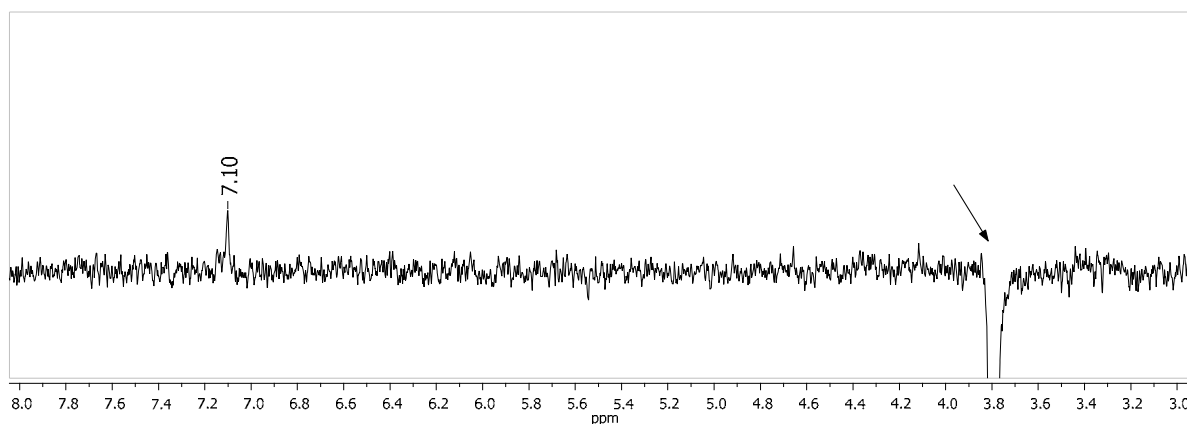


Figura 24. Espectro de *g*NOESY 1D de **6** + **15** irradiando em δ 3,80 (DMSO-*d*₆, 7,1 T).

Da substância **12** destaca-se no espectro de RMN de ¹H (Figura 25, p. 58) sinais referentes a hidrogênios acoplado com outros hidrogênios em posição *orto*, os quais foram atribuídos a dois sistemas aromáticos *para*-substituídos. Além destes sinais de hidrogênios, observou-se sinais referentes a hidrogênios vinílicos *trans*. Assim, a substância **12** foi identificada com a *trans*-*N*-*p*-coumaroiltiramina.

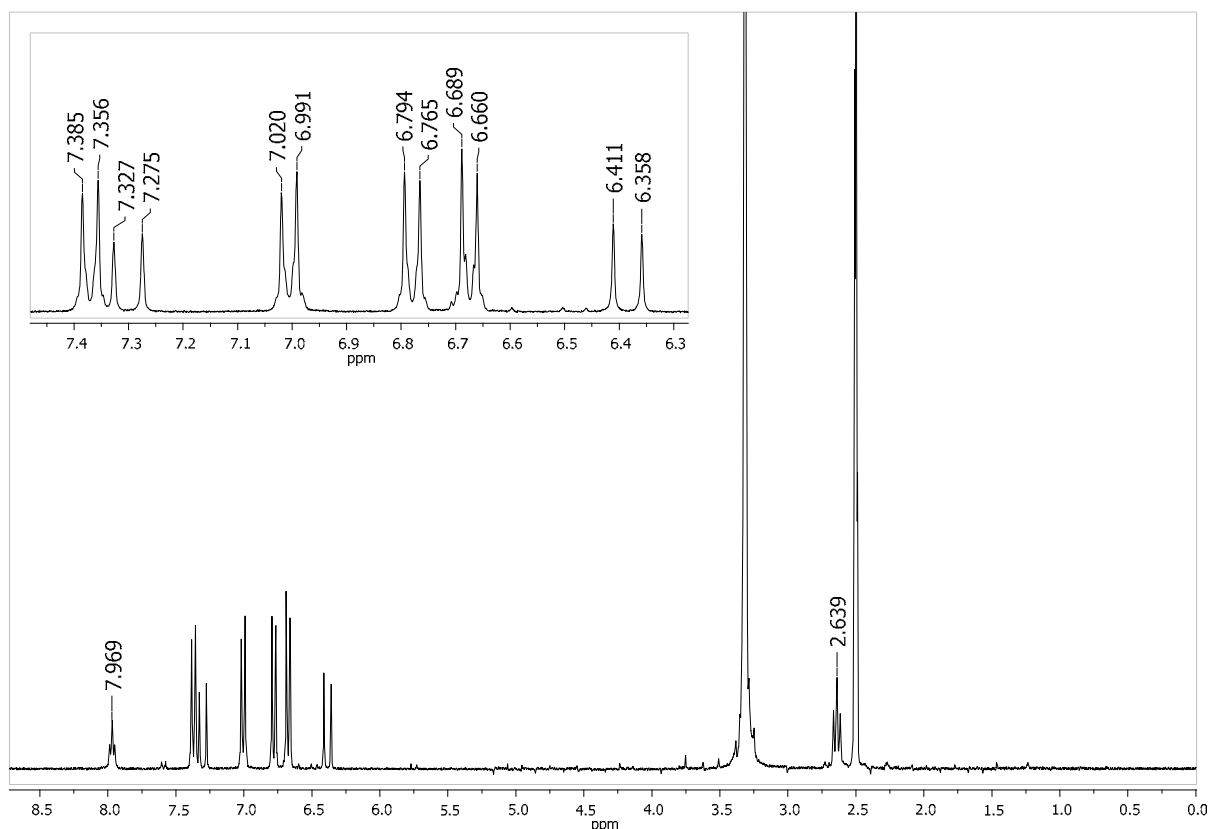


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de **12** com ampliação ($\text{DMSO}-d_6$, 7,1 T).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 26, p. 59) da substância **13** + **16** observou-se, além do tripleto em δ 2,65, sinais referentes a dois sistemas aromáticos trissubstituídos, ligações duplas *trans* e *cis* na proporção 4:1 de **13** + **16**, e dois sinais referentes a duas metoxilas. O experimento de NOESY 1D (Figura 27, p. 59) revelou as interações espaciais entre uma das metoxilas (δ 3,80) ligada ao C-3' e H-2' (δ 7,1), e entre a outra metoxila (δ 3,74) ligada ao C-3''' e H-2''' (δ 6,77). Comparando os dados obtidos com os relatados na literatura^{11,72} identificou-se a substância **13** com a *trans*-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina (Tabela 6, p. 60) e a substância **16** com a *cis*-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina (Tabela 7, p. 61).

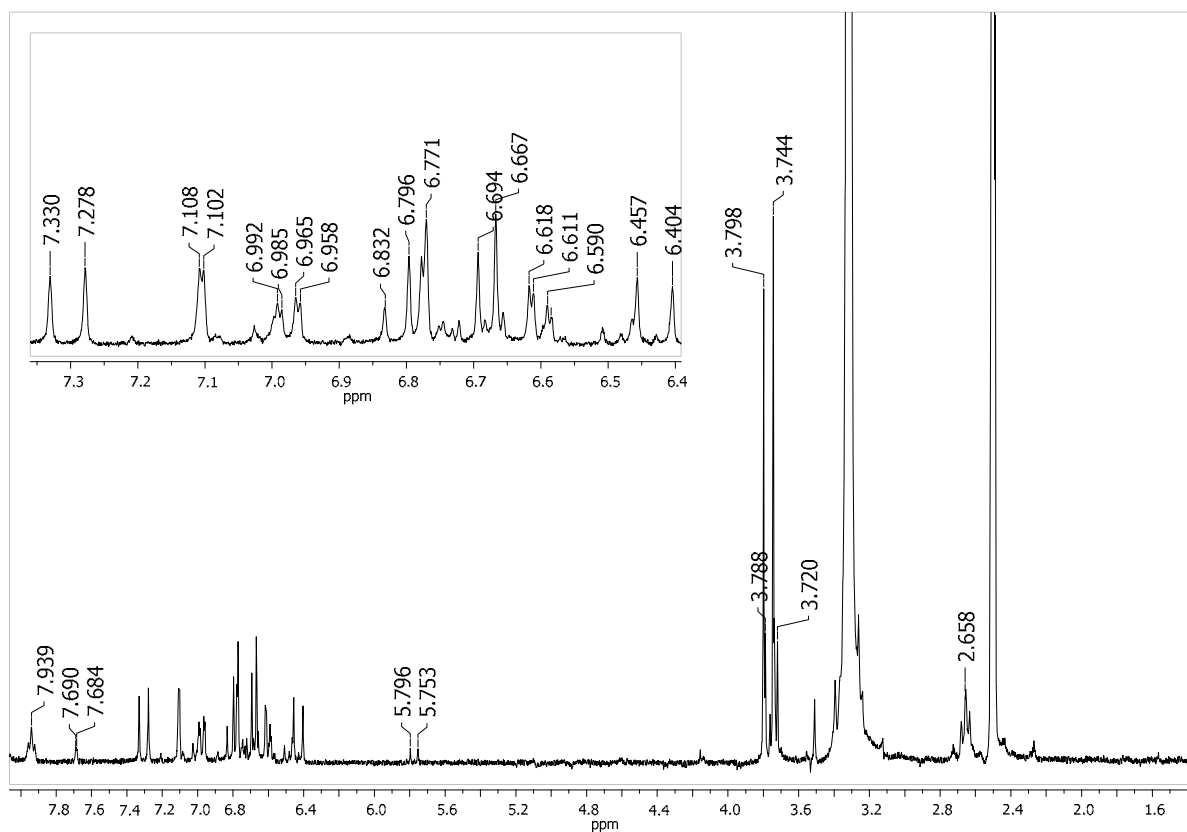


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H de **13** + **16** com ampliação ($\text{DMSO}-d_6$, 7,1 T).

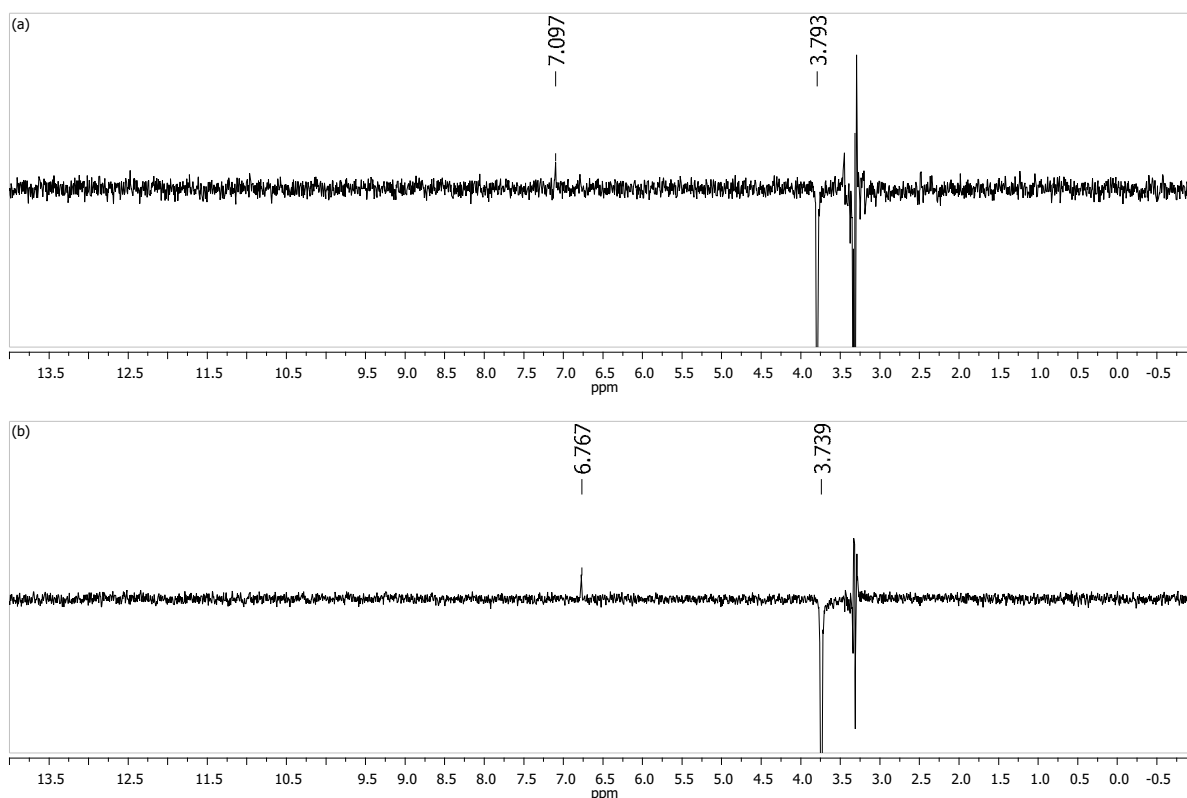


Figura 27. Espectro de gNOESY 1D de **13** + **16** irradiando em: (a) δ 3,79 e (b) δ 3,74 ($\text{DMSO}-d_6$, 7,1 T).

Resultados e Discussão

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H de **6**, **12**, **13** (DMSO- d_6 , δ , $J = \text{Hz}$, 7,1 T).

Posição	<i>trans-N-</i> feruloliltramina ^{a71} (δ_{H})		<i>trans-N-p-</i> coumaroliltramina ^{a73} (δ_{H})		<i>trans-N-feruloil-3-</i> O-metildopamina ^{a72} (δ_{H})	
	6 (δ_{H})	12 (δ_{H})	13 (δ_{H})			
2	6,42 <i>d</i> (15,6)	6,38 <i>d</i> (15,9)	6,38 <i>d</i> (15,8)	6,43 <i>d</i> (15,6)	-	
3	7,30 <i>d</i> (15,6)	7,30 <i>d</i> (15,9)	7,44 <i>d</i> (15,8)	7,30 <i>d</i> (15,6)	7,44 <i>d</i> (15,8)	
2'	7,10 <i>d</i> (1,8)	7,37 <i>d</i> (8,7)	7,40 <i>d</i> (8,6)	7,10 <i>d</i> (1,8)	7,12 <i>d</i> (1,8)	
3'	-	6,78 <i>d</i> (8,7)	6,79 <i>d</i> (8,6)	-	-	
5'	6,78 <i>d</i> (8,1)	6,80 <i>d</i> (8,2)	6,79 <i>d</i> (8,6)	6,78 <i>d</i> (8,1)	6,80 <i>d</i> (7,7)	
6'	6,98 <i>dd</i> (8,1; 1,8)	7,03 <i>dd</i> (8,2; 1,8)	7,40 <i>d</i> (8,6)	6,97 <i>dd</i> (8,1; 1,8)	7,03 <i>dd</i> (7,7; 1,8)	
2''	^b	3,48 <i>t</i> (7,5)	3,46 <i>t</i> (7,7)	^b	3,49 <i>t</i> (7,1)	
3''	2,64 <i>t</i> (7,2)	2,76 <i>t</i> (7,5)	2,75 <i>t</i> (7,7)	2,65 <i>t</i> (6,9)	2,77 <i>t</i> (7,1)	
2'''	7,01 <i>d</i> (8,5)	7,05 <i>d</i> (8,4)	7,06 <i>d</i> (8,6)	6,77 <i>d</i> (2,1)	6,82 <i>d</i> (1,8)	
3'''	6,68 <i>d</i> (8,5)	6,72 <i>d</i> (8,4)	6,72 <i>d</i> (8,6)	-	-	
5'''	6,68 <i>d</i> (8,5)	6,72 <i>d</i> (8,4)	6,72 <i>d</i> (8,6)	6,68 <i>d</i> (8,1)	6,73 <i>d</i> (8,2)	
6'''	7,01 <i>d</i> (8,5)	7,05 <i>d</i> (8,4)	7,06 <i>d</i> (8,6)	6,60 <i>dd</i> (8,1; 2,1)	6,67 <i>dd</i> (8,2; 1,8)	
OCH ₃ -3'	3,80 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>	-	3,80 <i>s</i>	3,90 <i>s</i>	
OCH ₃ -3'''	-	-	-	3,74 <i>s</i>	3,82 <i>s</i>	
NH	7,9 <i>t</i> (5,7)	-	7,97 <i>t</i> (5,7)	7,94 <i>t</i> (5,4)	-	

^a Dados obtidos em CD₃OD.^b Sinal obscurecido pelo sinal da água do solvente.

Resultados e Discussão

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H de **15** e **16** (DMSO- d_6 , δ , $J = \text{Hz}$, 7,1 T).

Posição	15 (δ_{H})	<i>cis</i> - <i>N</i> -feruloiltiramina ^{a 71} (δ_{H})	16 (δ_{H})	<i>cis</i> - <i>N</i> -feruloil-3- <i>O</i> - metildopamina ^{a 11} (δ_{H})
2	5,76 <i>d</i> (12,9)	5,68 <i>d</i> (11,8)	5,77 <i>d</i> (12,9)	5,80 <i>d</i> (12,6)
3	6,48 <i>d</i> (12,9)	6,44 <i>d</i> (11,8)	6,49 <i>d</i> (12,9)	6,58 <i>d</i> (12,6)
2'	7,67 <i>d</i> (1,8)	7,36 <i>d</i> (2,0)	7,69 <i>d</i> (1,8)	7,45 <i>d</i> (2,0)
5'	6,71 <i>d</i> (8,1)	6,74 <i>d</i> (8,1)	6,81 <i>d</i> (8,1)	6,73 <i>d</i> (8,2)
6'	7,03 <i>dd</i> (8,1; 1,8)	6,93 <i>dd</i> (8,1; 2,0)	7,10 <i>dd</i> (8,1; 1,8)	6,85 <i>dd</i> (8,2; 2,0)
2''	^b	3,39 <i>t</i> (7,0)	^b	3,39 – 3,48 <i>m</i>
3''	2,64 <i>t</i> (7,2)	2,70 <i>t</i> (7,0)	2,65 <i>t</i> (6,9)	2,62 – 2,67 <i>m</i>
2'''	7,01 <i>d</i> (8,5)	7,00 <i>d</i> (8,4)	6,77 <i>d</i> (2,1)	6,65 <i>d</i> (1,6)
3'''	6,68 <i>d</i> (8,5)	6,69 <i>d</i> (8,4)	-	-
5'''	6,68 <i>d</i> (8,5)	6,69 <i>d</i> (8,4)	6,67 <i>d</i> (8,1)	6,62 <i>d</i> (8,3)
6'''	7,01 <i>d</i> (8,5)	7,00 <i>d</i> (8,4)	6,60 <i>dd</i> (8,1; 2,1)	6,78 <i>dd</i> (8,3; 1,6)
OCH ₃ -3'	3,74 <i>s</i>	3,76 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>
OCH ₃ -3'''	-	-	3,72 <i>s</i>	3,82 <i>s</i>
NH	7,94 <i>t</i> (5,7)	-	-	5,58 <i>m</i>

^a Dados obtidos em CD₃OD.^b Sinal obscurecido pelo sinal da água do solvente.

A análise do espectro de RMN de ^1H do composto **14** + **17** (Figura 28, p. 62) evidenciou uma mistura dos isômeros *trans* (**14**) e *cis* (**17**) das alcanidas na proporção 2:1, respectivamente. Observou-se a existência de um anel *para*-substituído conjugado com a ligação dupla; um sistema aromático trissubstituído e uma metoxila.

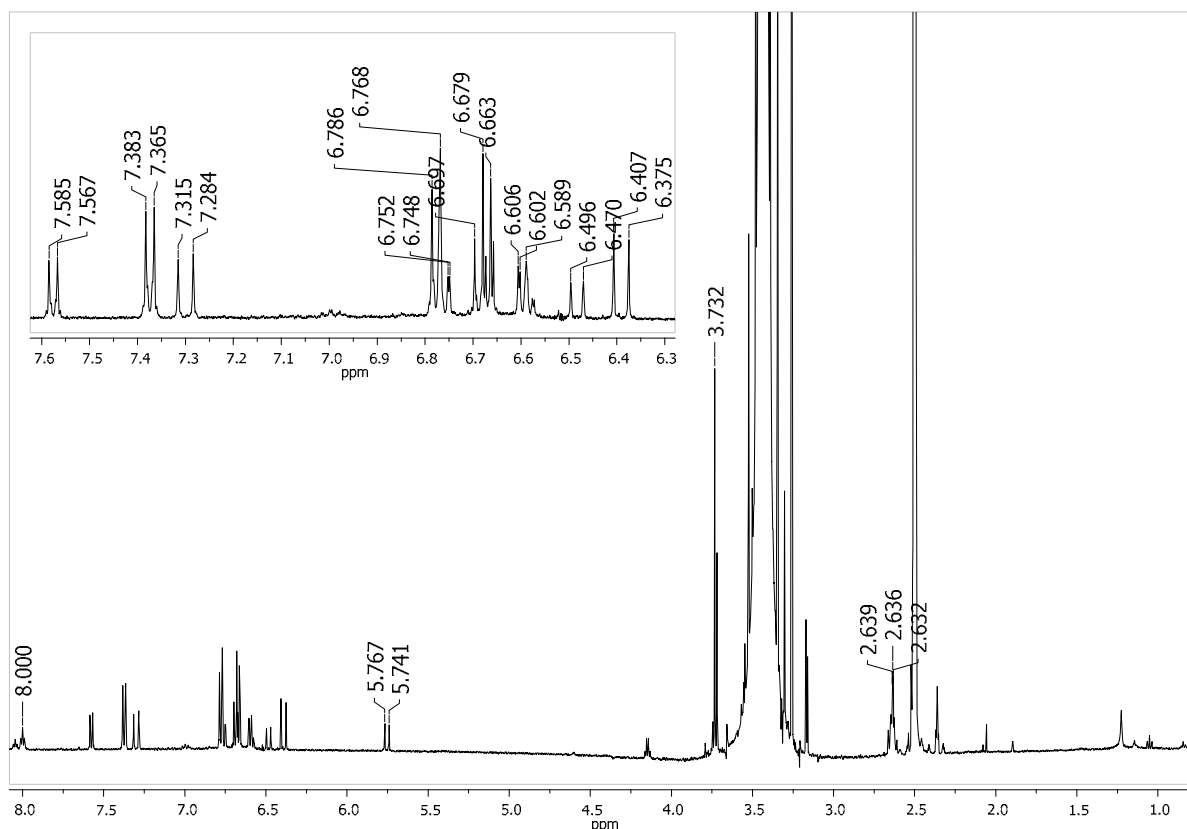


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H de **14** + **17** com ampliação ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).

O experimento *g*NOESY 1D (Figura 30, p. 63) juntamente com o mapa de contornos *g*HMBC (Figura 31, p. 64) mostraram que a metoxila em δ 3,72 está ligada ao sistema aromático trissubstituído, pois observa-se a interação espacial entre os hidrogênios metoxílicos e o H-2''' em δ 6,75, além das correlações entre C-3''' (δ 147,4), H-5''' (δ 6,66) e a metoxila em δ 3,72, a atribuição do deslocamento químico de alguns carbonos desta mistura isomérica foi realizada com o auxílio do espectro *g*HMBC. O deslocamento químico do H-2'' em δ 3,34 foi atribuído com base no experimento *g*COSY onde é observado a correlação entre este e o NH em δ 8,00 (Figura 32, p. 64).

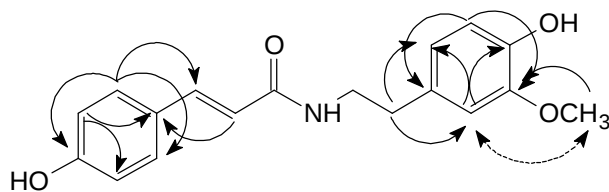


Figura 29. Correlações de gHMBC (→) e interações de gNOESY 1D (↔) de **14** + **17**.

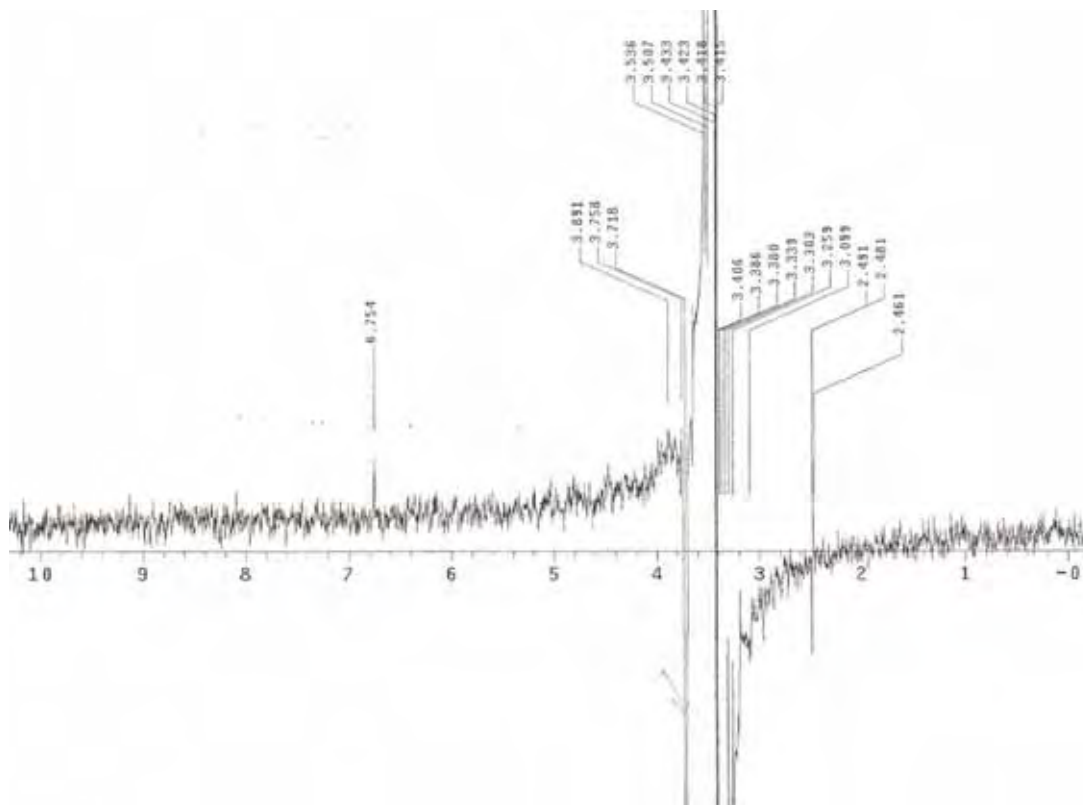


Figura 30. Espectro de gNOESY 1D de **14** + **17** irradiando em δ 3,73 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

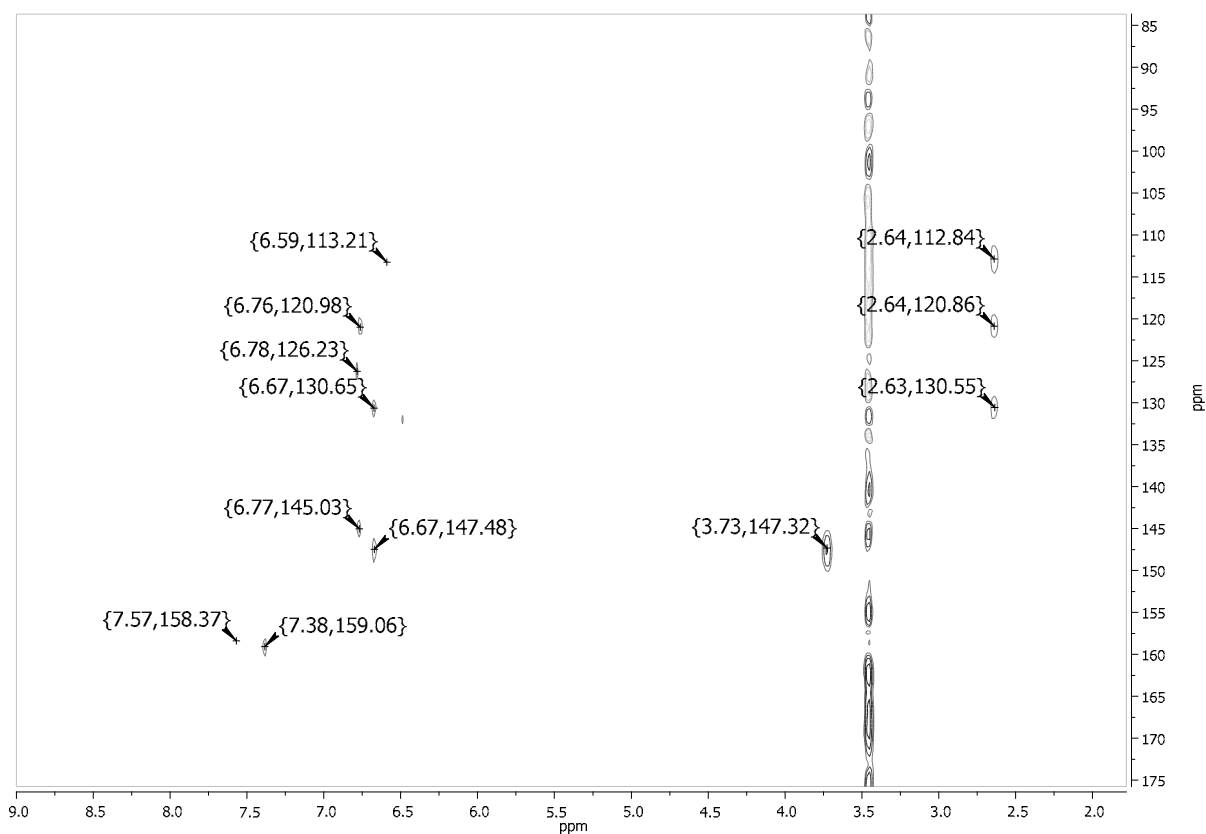


Figura 31. Mapa de contornos gHMBC de **14** + **17** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

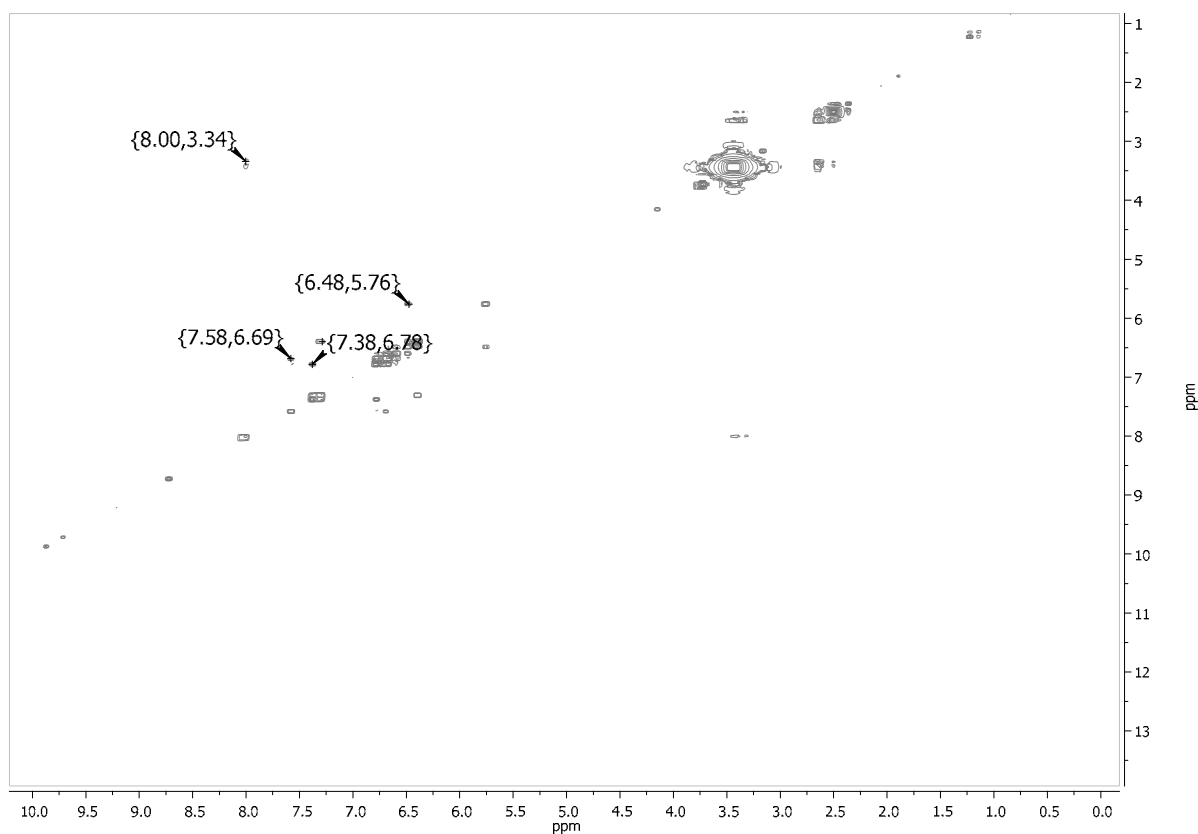


Figura 32. Mapa de contornos de gCOSY ^1H - ^1H de **14** + **17** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Para completar a elucidação estrutural dos dois isômeros realizaram-se os experimentos HOMODEC e *g*TOCSY 1D (Figura 33, p. 65), que possibilitaram a determinação inequívoca dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel trissubstituído, que para os dois isômeros apresentam valores semelhantes, e dos hidrogênios do sistema *para*-substituído, onde os valores de deslocamento químico apresentam variações significativas, conforme apresentados na Tabela 8, p. 68.

Com o intuito de confirmar a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios das substâncias, a mistura das alcaloides **14** + **17** foi exposta a luz solar por quatro horas proporcionando assim uma condição para que houvesse um equilíbrio na isomerização *cis-trans*. A interconversão entre os isômeros é possibilitada pela quebra da ligação π , que requer energia, ocorrendo a transição de um elétron do orbital π (ligante) para o orbital π^* (antiligante), mantendo a ligação σ existente e proporcionando a rotação⁷⁴. Este processo resultou na inversão da proporção isomérica, obtendo-se uma proporção de 2:1 dos isômeros *cis/trans*, que foi evidenciada pela análise da mudança na intensidade dos sinais no espectro de RMN de ^1H (Figura 34, p. 66).

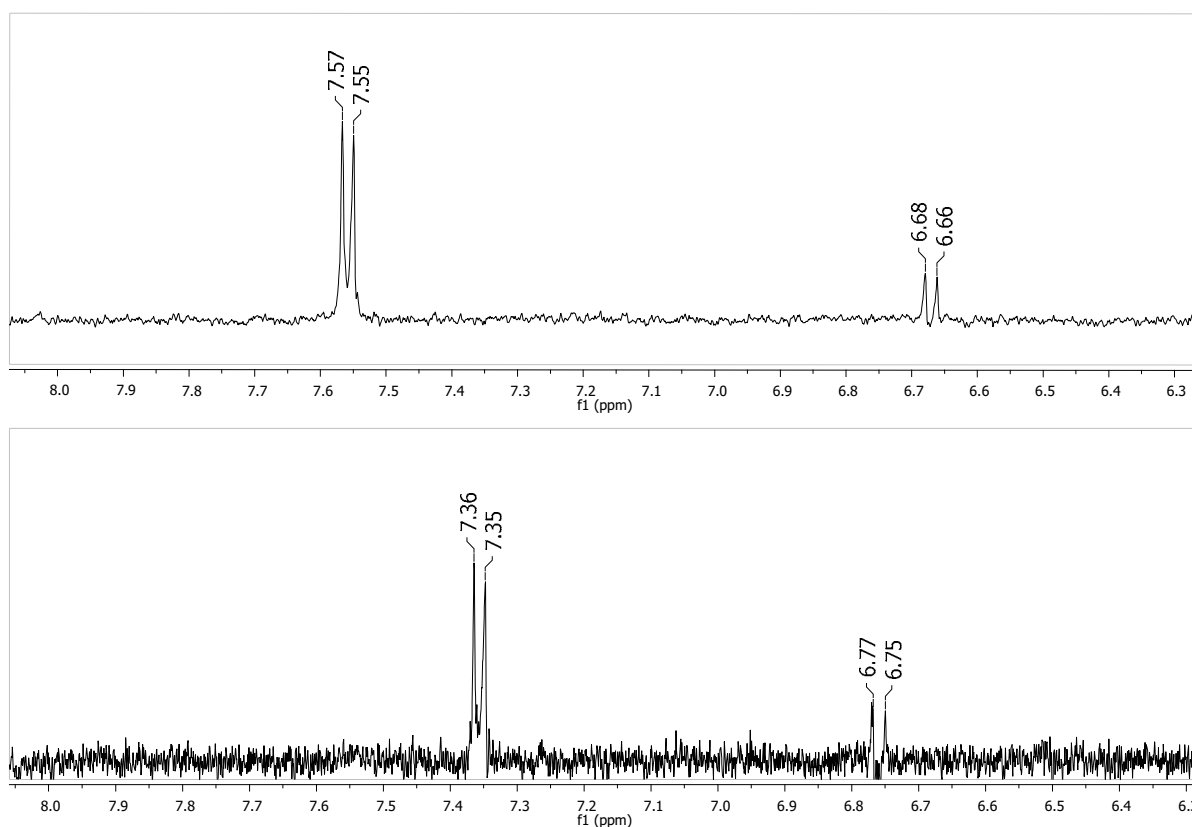


Figura 33. Espectros *g*TOCSY 1D de **14** + **17** irradiando em δ 7,56 e 7,36 (DMSO- d_6 , 11,7 T)

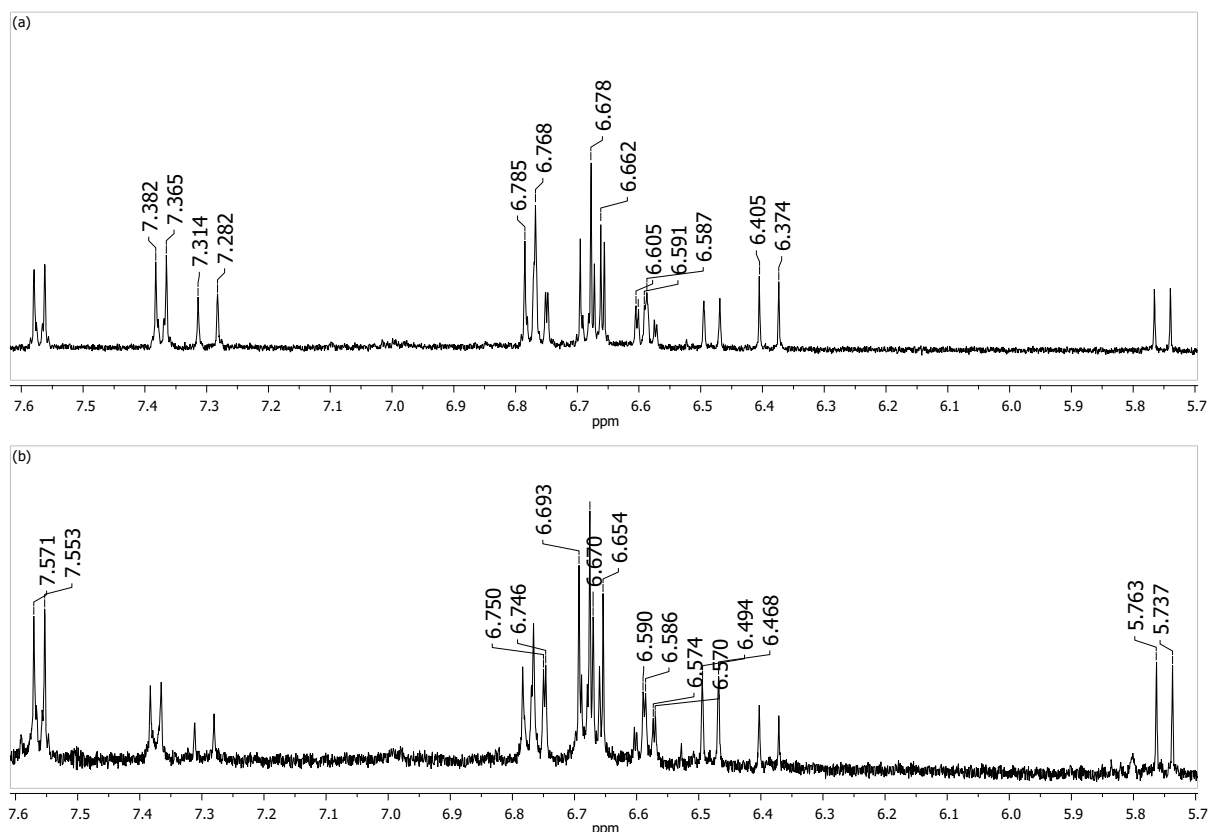


Figura 34. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H do: (a) isômero *trans* (**14**) e (b) isômero *cis* (**17**) ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).

Ao irradiar na frequência referente as absorções dos hidrogênios 2' e 6' (δ 7,36) de **14**, observa-se a perda de acoplamento destes com os hidrogênios 3' e 5' (δ 6,78) que alteram a multiplicidade de um dubleto com constante de 8,5 Hz para um singlete. Com esta irradiação foi possível observar o deslocamento químico referente ao H-2'', dubleto de constante de 2 Hz, que coalesce com os H-3', 5' (Figura 35a, p. 67). Ao irradiar na frequência referente as absorções dos hidrogênios 2' e 6' (δ 7,56) do isômero **17**, observa-se a alteração da multiplicidade dos hidrogênios 3' e 5' (δ 6,68) (Figura 35b, p. 67).

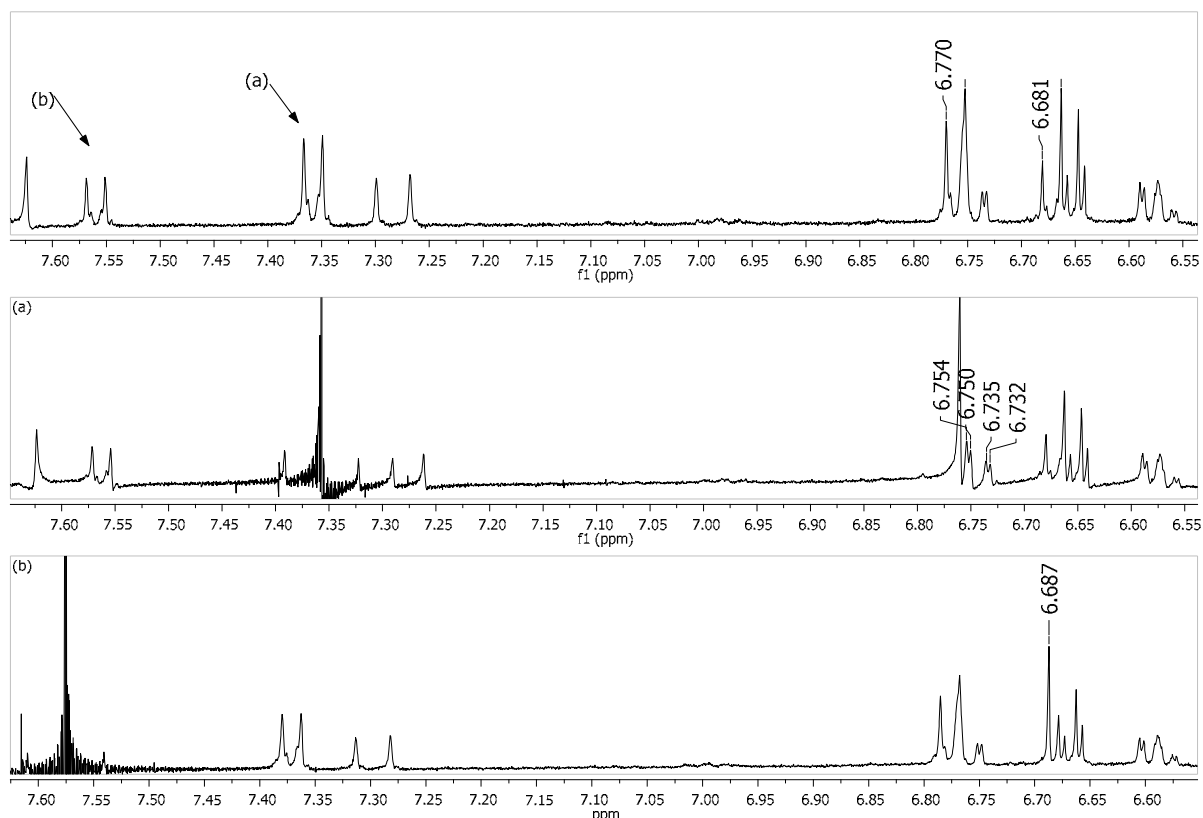


Figura 35. Espectros de HOMODEC de **14 + 17** irradiando em: (a) δ 7, 36 e (b) δ 7,56. (DMSO- d_6 , 11,7 T).

A análise do espectro de massas de alta resolução sugeriu a fórmula molecular $C_{18}H_{19}O_4N$ (Figura 36; p. 67) pois evidenciou moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ de m/z 312,1233 (100%) (valor calculado para: $C_{18}H_{18}O_4N = 312,1236$), que estão de acordo com as estruturas propostas.

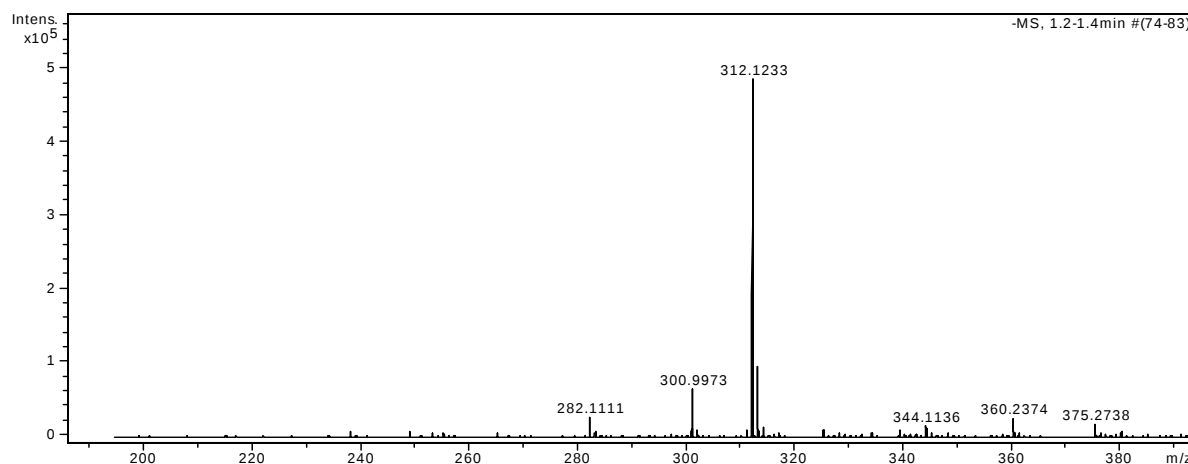


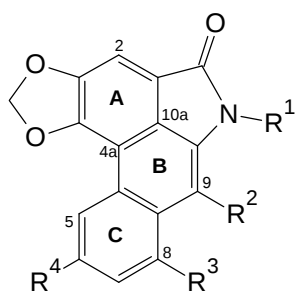
Figura 36. Espectro de massas de alta resolução de **14** (ESI, – 4000 eV).

Assim, foi possível a determinação de **14** como sendo a *trans-N-p-coumaroil-3-O-metildopamina* e **17** como sendo a *cis-N-p-coumaroil-3-O-metildopamina*, descrita pela primeira vez na literatura⁷⁵.

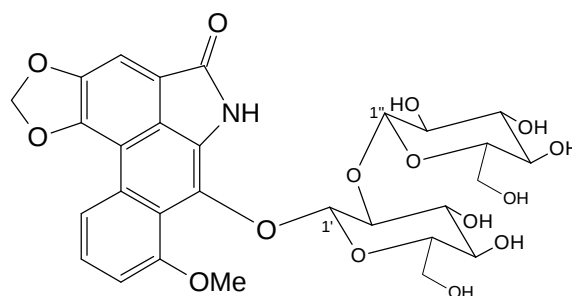
Tabela 8. Dados de RMN de **14** + **17** (DMSO-*d*₆, δ , *J* = Hz, 11,7 T).

Posição	14 (δ_H)	17 (δ_H)	<i>g</i> HMBC	<i>g</i> COSY	HOMODEC
2	6,38 <i>d</i> (15,5)	5,75 <i>d</i> (13,0)	C-1'	H-3	-
3	7,28 <i>d</i> (15,5)	6,48 <i>d</i> (13,0)	-	-	-
2', 6'	7,36 <i>d</i> (8,5)	7,56 <i>d</i> (8,5)	C-3, C-4'	H-3'	H-3'
3', 5'	6,78 <i>d</i> (8,5)	6,68 <i>d</i> (8,5)	C-1'	-	H-2'
2''	3,34 <i>m</i>	3,34 <i>m</i>	-	-	-
3''	2,64 <i>t</i> (5,5)	2,62 <i>t</i> (5,5)	C-1''', C-2''', C-6'''	-	-
2'''	6,75 <i>d</i> (2,0)	6,74 <i>d</i> (2,0)	C-4''', C-	-	-
5'''	6,67 <i>d</i> (8,0)	6,66 <i>d</i> (8,0)	C-1''', C-	-	-
6'''	6,59 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	6,58 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	-	-	H-5'''
OCH ₃ -3'''	3,73 <i>s</i>	3,72 <i>s</i>	C-3'''	-	-
NH	8,00 <i>t</i> (5,5)	7,98 <i>t</i> (5,5)	-	H-2''	-

5.1.6. Aristolactamas (**7** – **10**)



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
7	H	H	glc	H
8	glc	H	OH	H
9	H	H	H	OH



10

As aristolactamas são compostos fenantrênicos que apresentam um sistema π com alto grau de conjugação, esta característica confere a estes compostos

propriedades fluorescentes, que em solução apresentam coloração azul ou verde intensa quando irradiadas por luz UV (365 nm) (Figura 37, p. 69).

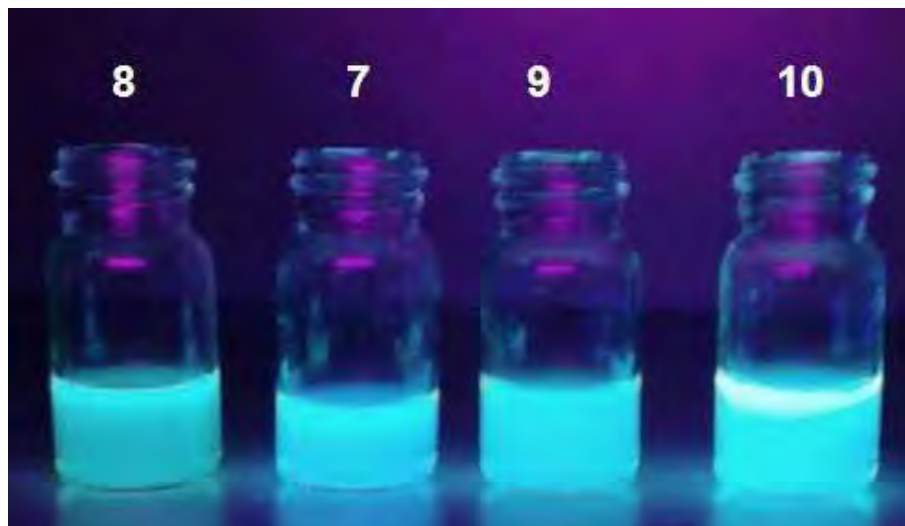


Figura 37. Fluorescência das aristolactamas **8**, **7**, **9** e **10** sob irradiação de luz UV (365 nm).

As substâncias **7** a **10** apresentam em seus espectros de RMN de ^1H sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos em sistemas com alto grau de conjugação (δ 7,1 – 8,3), hidrogênios metilenodioxílicos aromáticos ($\delta \sim 6,49$) e para as substâncias **7**, **8** e **10** hidrogênios anoméricos ($\delta \sim 5,1$ e 4,6) e carbinólicos (δ 2,9 a 4,0).

A análise dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais dos hidrogênios aromáticos referentes ao anel C, sugere que as substâncias **7**, **8** e **10** possuem substituintes em C-8.

O espectro de RMN de ^1H da substância **7** (Figura 38, p. 70) apresenta um hidrogênio anomérico em δ 5,07 com constante de acoplamento de 7,5 Hz, um singlete em δ 6,49 referente a dois hidrogênios metilenodioxílicos, sinais entre δ 7,10 – 8,10 relativos a cinco hidrogênios aromáticos e de um hidrogênio deslocado para campo baixo (δ 10,83) ligado a um heteroátomo. Com os mapas de contornos *g*HMQC (Figura 39, p. 70) e *g*HMBC (Figura 41, p. 72) foi possível estabelecer os deslocamentos químicos de alguns carbonos com sinais característicos de um sistema fenantrênico, três carbonos quaternários aromáticos ligados a oxigênios (δ 147,4; 149,2 e 153,8), além de carbonos com deslocamento químicos típicos de unidade glicosídica.

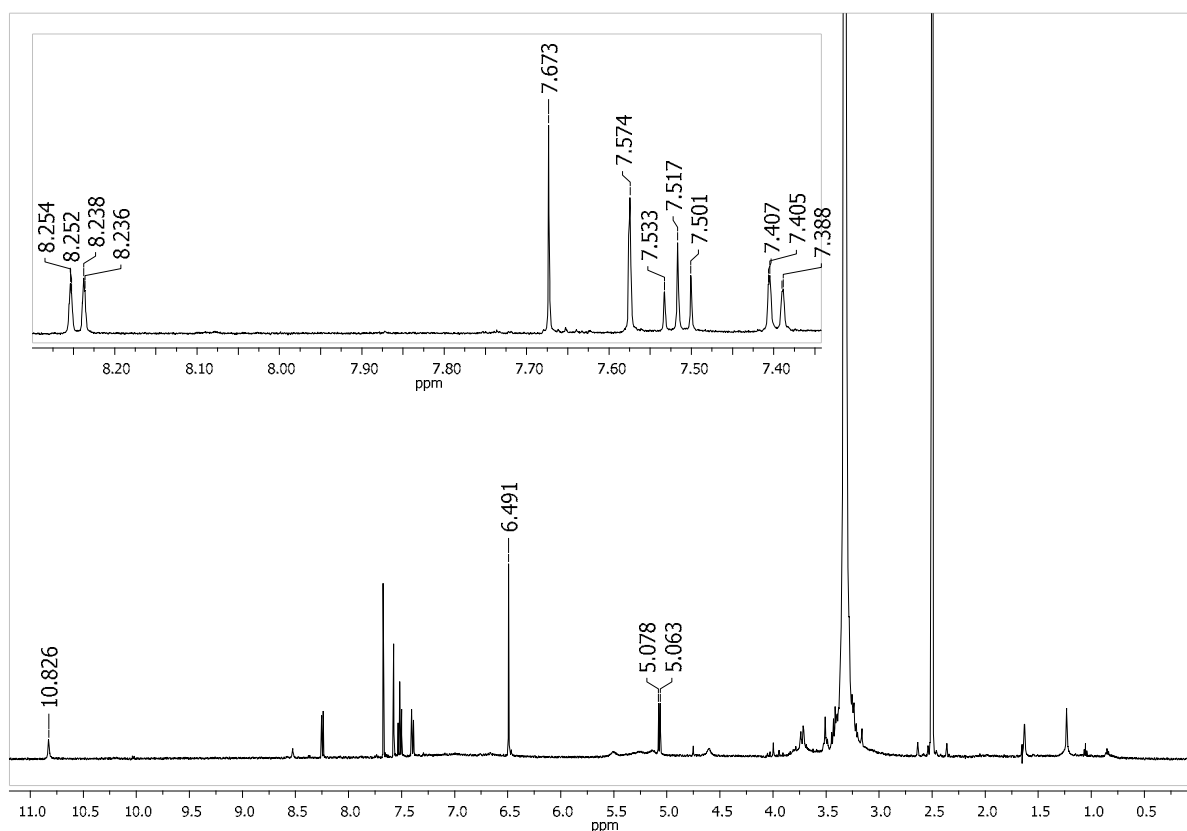


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H de **7** com ampliação (DMSO- d_6 , 11,7 T).

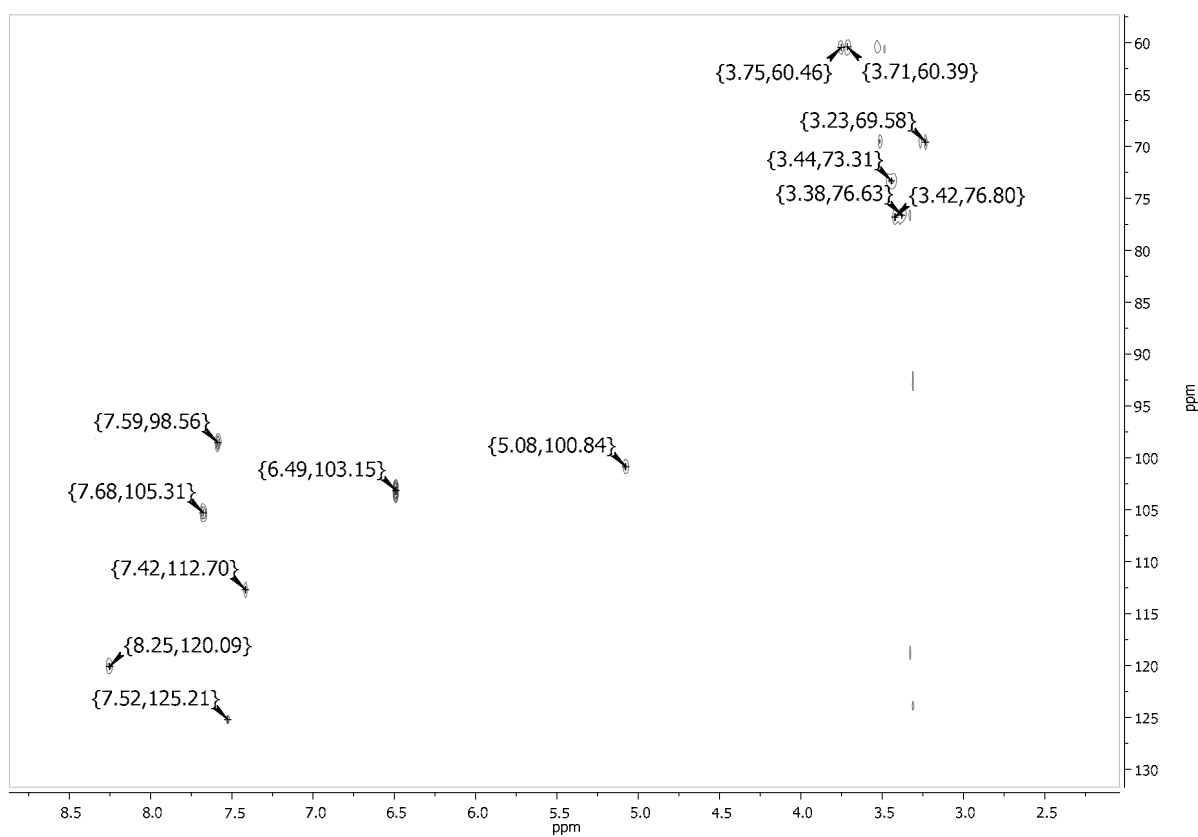


Figura 39. Mapa de contornos gHMBC de **7** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Com o experimento de *g*HMBC foi possível confirmar a posição da unidade glicosídica no C-8, pois observou-se a correlação entre C-8 (δ 153,6) e H-1' (δ 5,07) e H-6 (δ 7,50). A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios glicosídicos foi feita com base nas correlações observadas nos experimentos de *g*COSY entre H-1' (δ 5,07) e o H-2' (δ 3,44) (Figura 42, p. 72) e nas correlações do *g*HMBC entre H-3' (δ 3,38) e C-2' (δ 73,3) e C-4' (δ 69,6). Com o auxílio do experimento de *g*TOCSY 1D (Figura 43, p. 73) foi possível observar os sinais que estavam obscurecidos pelos sinais do solvente e da água contida neste. A análise deste espectro e do mapa de contornos *g*HMQC permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da unidade glicosídica (Tabela 9, p. 75).

Comparando o valor de rotação óptica específica desta substância $[\alpha]_D^{25} = -8,2^\circ$ (MeOH, *c* 0.1) [lit. -10.5° (MeOH, *c* 0.2)]⁷⁶ e os demais dados obtidos pode-se identificar a substância **7** com a aristolactama Ia 8- β -O-glicosídeo, previamente isolada de *Aristolochia manshuriensis*⁷⁶.

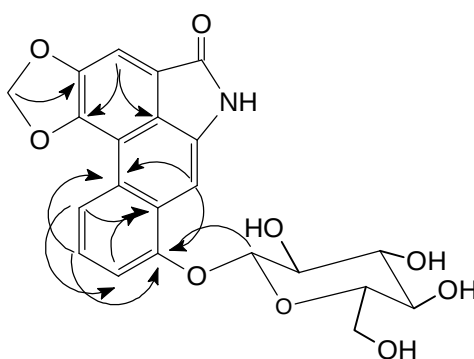


Figura 40. Principais correlações observadas no experimento de *g*HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) de **7**.

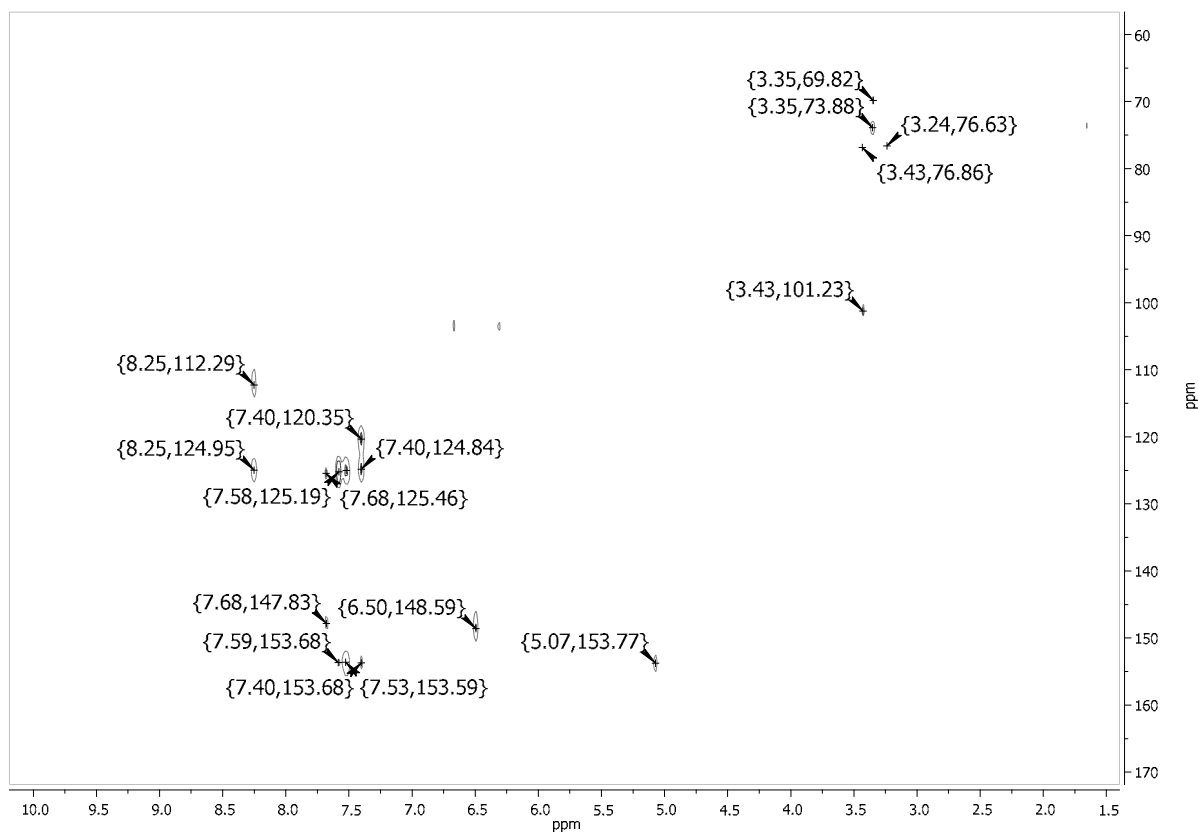


Figura 41. Mapa de contornos gHMBC de **7** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

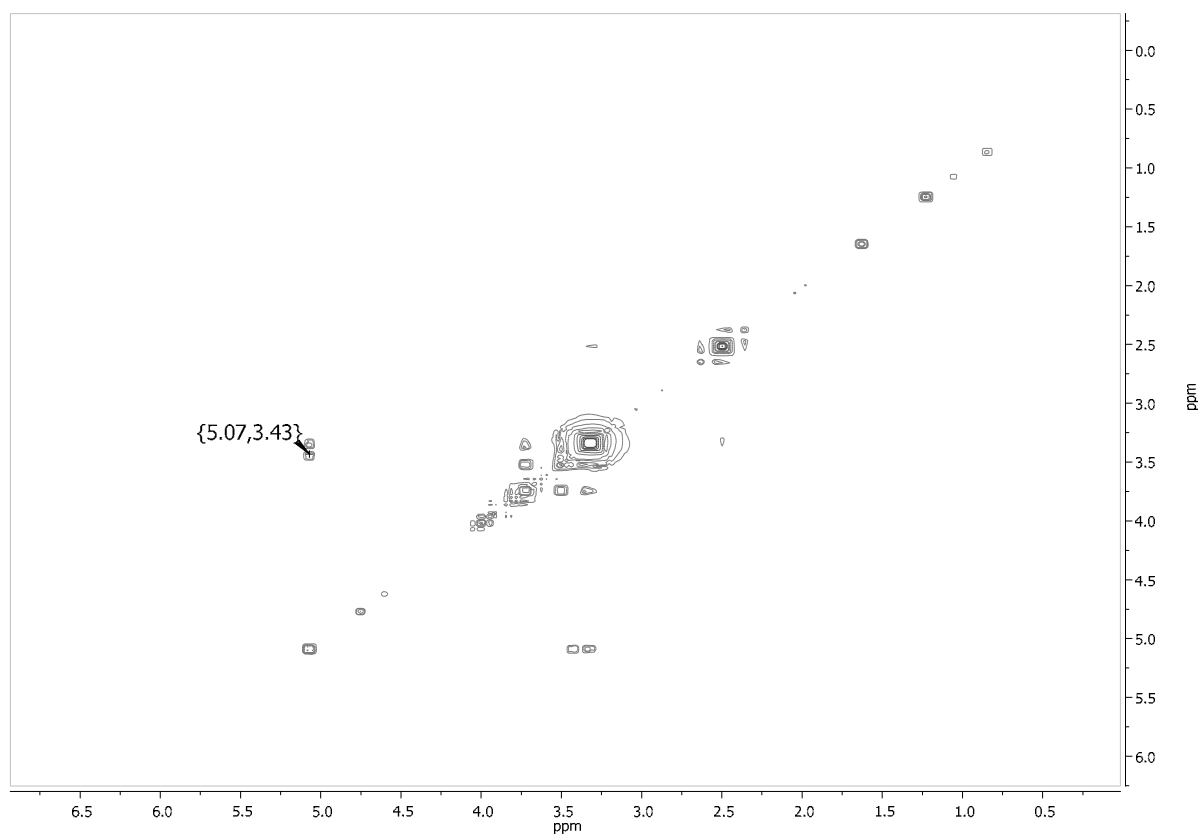


Figura 42. Mapa de contornos de gCOSY ^1H - ^1H de **7** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

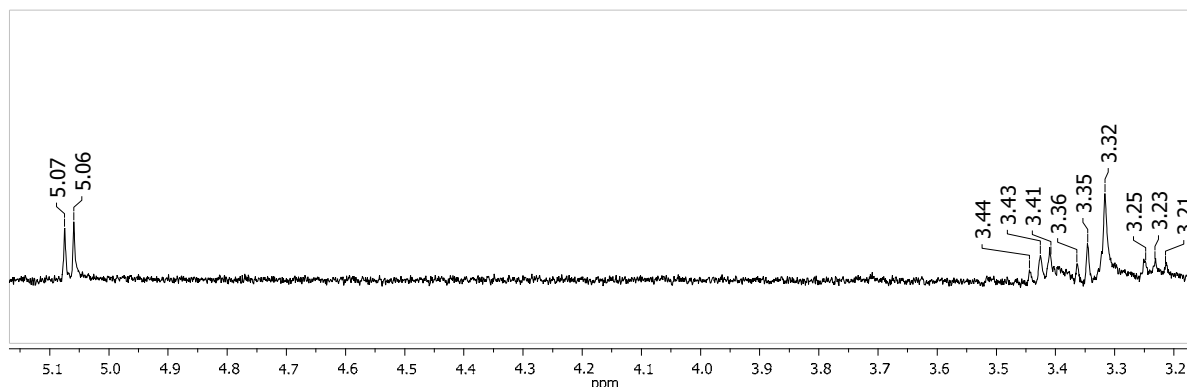


Figura 43. Espectro gTOCSY 1D de **7** irradiando em δ 5,07 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

No espectro de RMN de ^1H da substância **8** (Figura 44, p. 74) verifica-se a ausência de singlete em $\delta \sim 10$ referente ao NH , a presença de um dubleto em δ 5,35 com constante de acoplamento de 9,5 Hz e de sinais em δ 4,0-3,1, os quais sugerem que a lactama **8** apresenta um glicosídeo ligado ao nitrogênio lactâmico.

A rotação óptica específica desta substância foi $-7,9^\circ$ (MeOH, c 0,1) [lit. $[\alpha]_D^{25} -9,9^\circ$ (MeOH, c 0.07)]⁷⁷. Os dados obtidos (Tabela 9, p. 75) foram comparados com a literatura³¹ e permitiram identificar a substância **8** com a aristolactama Ia N - β -glicosídeo, anteriormente isolada da espécie *Aristolochia foveolata*⁷⁷.

A substância **9** apresenta um espectro RMN de ^1H (Figura 45, p. 74) com um padrão de substituição distinto em relação as demais aristolactamas apresentadas neste trabalho. A multiplicidade e deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel C sugerem uma substituição em C-6 e juntamente com os demais dados de RMN (Tabela 9, p. 75) possibilitaram a confirmação de **9** como sendo a aristolactama IIIa, previamente isolada da espécie *Aristolochia argentina*¹⁶.

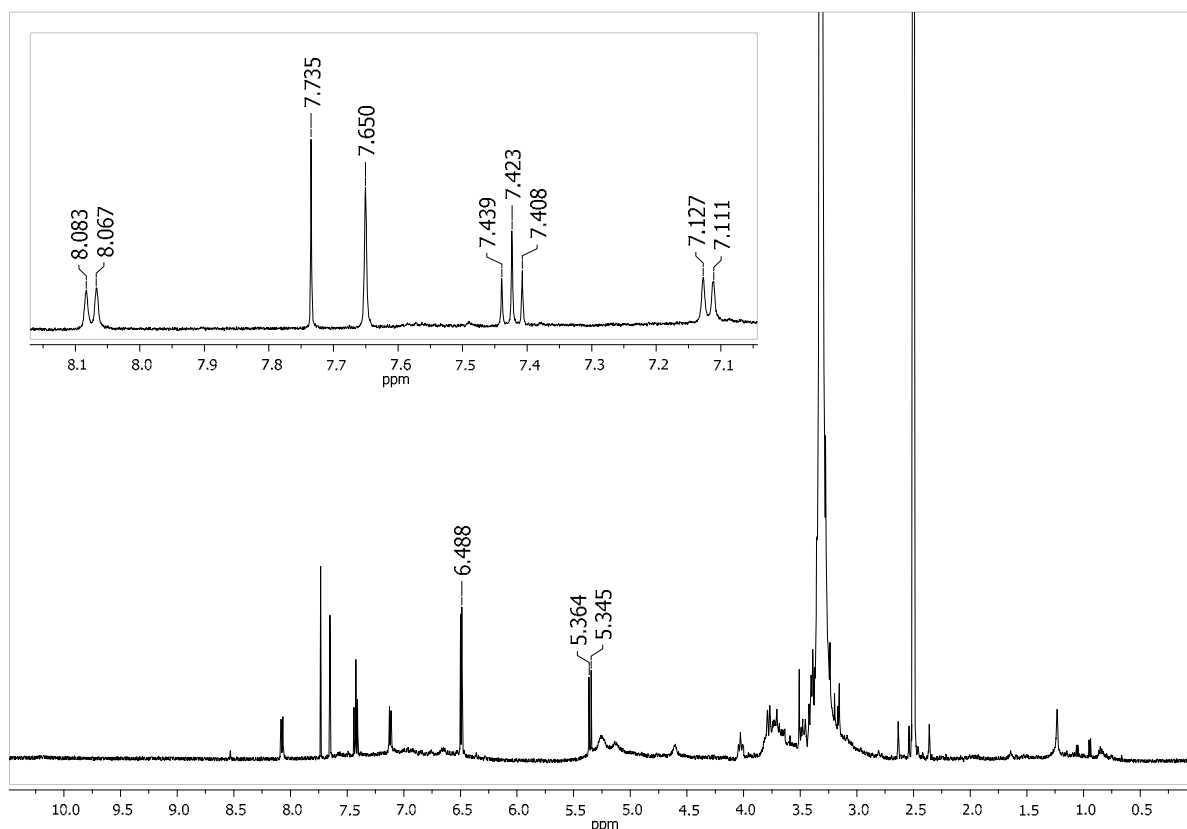


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de **8** com ampliação ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

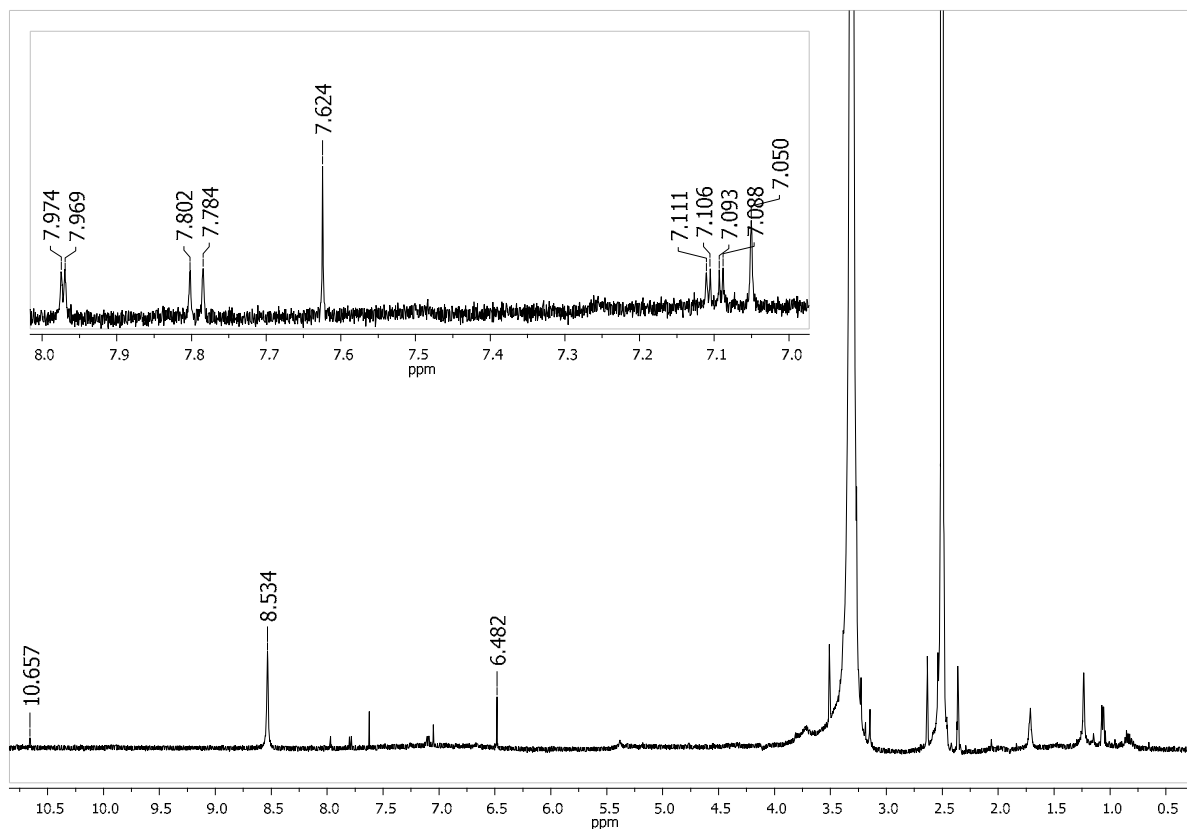


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H de **9** com ampliação ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

Resultados e Discussão

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H de **7**, **8**, **9** (DMSO- d_6 , δ , $J = \text{Hz}$, 11,7 T).

Posição	7 (δ_{H})	Aristolactama Ia 8- (β -D-glicosídeo) ⁷⁶	8 (δ_{H})	Aristolactama Ia N- β -glicosídeo ⁷⁷	9 (δ_{H})	Aristolactama IIIa ¹⁶
2	7,67 s	7,66 s	7,73 s	7,73 s	7,62 s	7,60 s
5	8,25 <i>dd</i> (8,0; 1,0)	8,23 <i>d</i> (8,0)	8,07 <i>dl</i> (8,0)	8,07 <i>d</i> (8,2)	7,97 <i>d</i> (2,5)	7,96 <i>d</i> (2,5)
6	7,52 <i>t</i> (8,0)	7,51 <i>t</i> (8,0)	7,42 <i>t</i> (8,0)	7,42 <i>dd</i> (8,2; 8,0)	-	-
7	7,40 <i>dd</i> (8,0;1,0)	7,39 <i>d</i> (8,0)	7,12 <i>dl</i> (8,0)	7,10 <i>d</i> (8,0)	7,10 <i>dd</i> (2,5; 9,0)	7,14 <i>dd</i> (2,5; 8,5)
8	-	-	-	-	7,79 <i>d</i> (9,0)	7,78 <i>d</i> (8,5)
9	7,57 s	7,56 s	7,65 s	7,63 s	7,05 s	7,05 s
OCH ₂ O	6,49 s	6,49 s	6,49 <i>d</i> ($w_{1/2}$ 0,6)	6,49 s	6,48 s	6,47 s
1'	5,07 <i>d</i> (7,5)	5,08 <i>d</i> (7,6)	5,35 <i>d</i> (9,5)	5,34 <i>d</i> (9,1)	-	-
2'	3,44 <i>m</i>	3,73 <i>dd</i> (7,6; 8,5)	4,00-3,00 <i>m</i>	4,00-3,00 <i>m</i>	-	-
3'	3,38 <i>t</i> (8,5)	3,36 <i>t</i> (8,5)	4,00-3,00 <i>m</i>	4,00-3,00 <i>m</i>	-	-
4'	3,23 <i>t</i> (8,5)	3,26 <i>t</i> (8,5)	4,00-3,00 <i>m</i>	4,00-3,00 <i>m</i>	-	-
5'	3,42 <i>m</i>	3,31-3,43 <i>m</i>	4,00-3,00 <i>m</i>	4,00-3,00 <i>m</i>	-	-
6' α	3,75 <i>m</i>	3,50 <i>dd</i> (6,0;11,7)	4,00-3,00 <i>m</i>	4,00-3,00 <i>m</i>	-	-
6' β	3,71 <i>m</i>	3,38 <i>dd</i> (11,7;1,8)			-	-
NH	10,83 s	10,79 s	-	-	10,66 s	10,68 s

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho de **10** (Figura 46, p. 76) confirma a presença de lactama ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 1654 cm^{-1}), de grupo hidroxila ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3442 cm^{-1}) e de C–O ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 1088 cm^{-1}) na estrutura da substância.

A análise do espectro de massas evidenciou moléculas desprotonadas $[\text{M} - \text{H}]^-$ de m/z 632,0 (100%), sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{O}_{15}\text{N}$ (Figura 47, p. 77). A análise do espectro de massas de **10** sugere fragmentações de moléculas desprotonadas $[\text{M} - \text{H}]^-$ que, pela perda das duas unidade glicosídicas, formam íons de m/z 308,1 (92%). Além destas fragmentações, pela perda da primeira unidade glicosídica formam-se os íons m/z 469,9 (9%) (Esquema 5, p. 77).

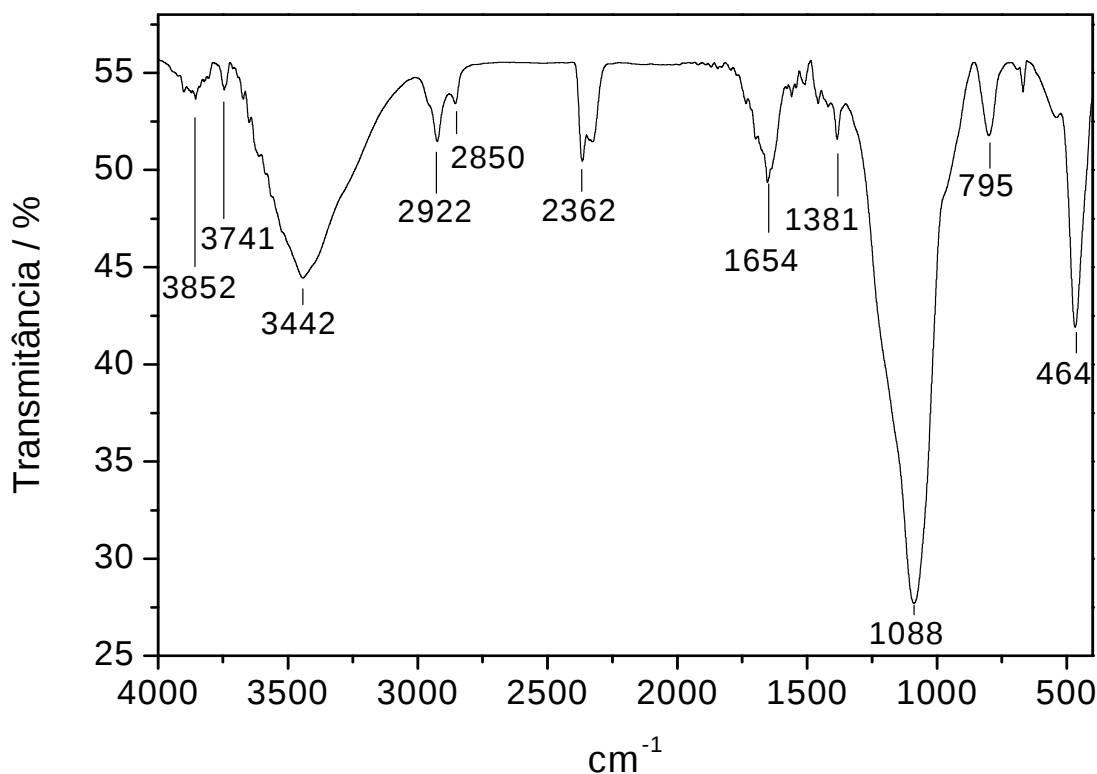


Figura 46. Espectro de absorção no IV de **10** (KBr).

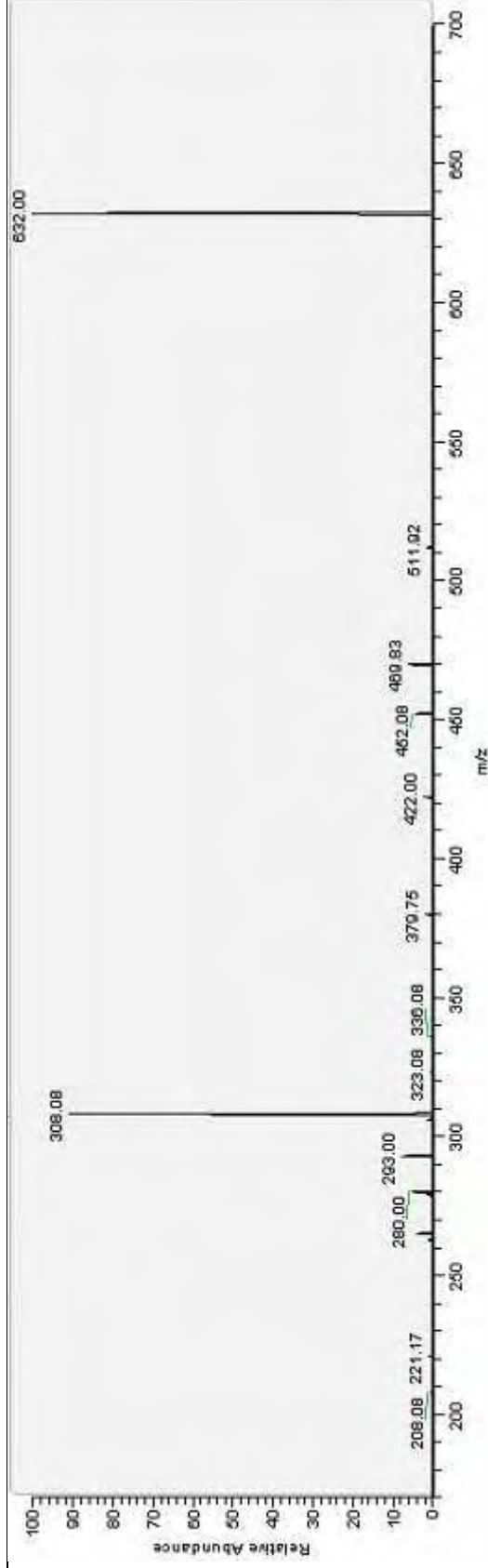
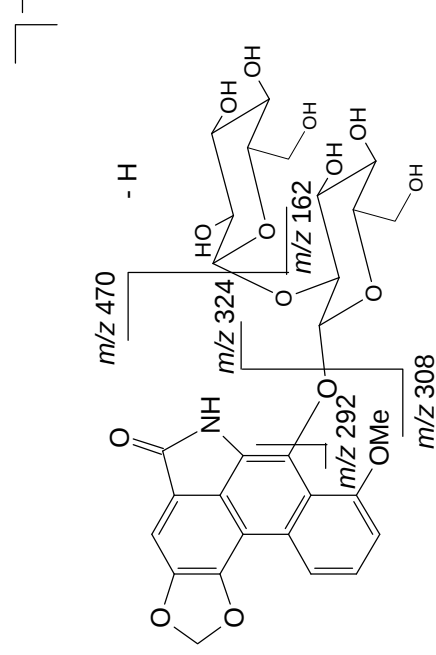


Figura 47. Espectro de massas de **10** (ESI, - 4500 eV)



$[M-H]^-$ 632,0 (100%)

Esquema 5. Proposta de fragmentação de **10**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 48, p. 78) da substância **10** apresenta sinais referentes a dois hidrogênios anoméricos em δ 5,08 ($J = 6,5$ Hz) e δ 4,66 ($J = 8,0$ Hz), um singlete em δ 6,43 característico de hidrogênios metilenodioxílicos, além de um sinal em δ 3,94 atribuído a hidrogênios metoxílicos. Estes dados, associados a ausência de um dos singletos na região dos aromáticos evidenciou uma possível substituição em C-2 ou C-9 de uma aristolactama.

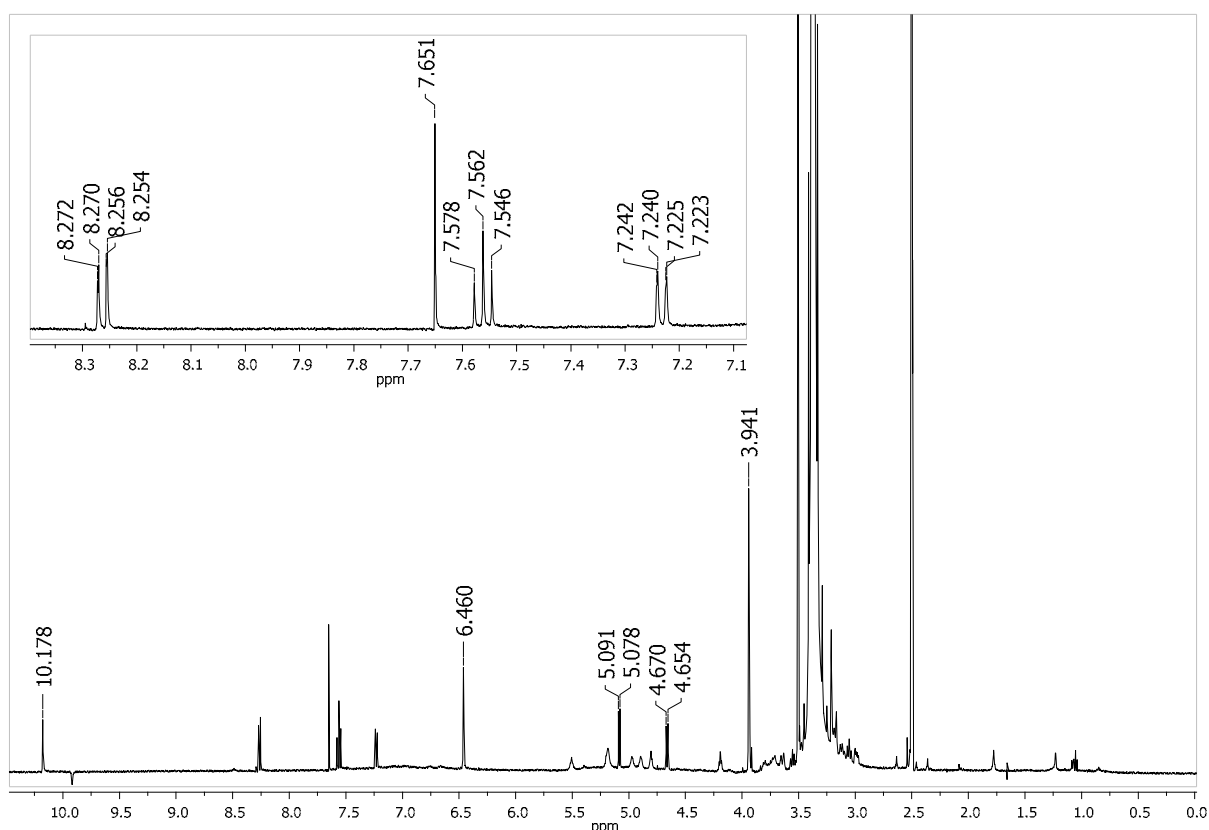


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de **10** com ampliação (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Os dados de RMN de ^{13}C (Figura 50, p. 79) apresentam deslocamentos químicos típicos de carbonos quaternários oxigenados em δ 157,2; 148,2, 146,9 e 132,6; uma carbonila em δ 167,4, dois carbonos anoméricos em δ 103,0 e 102,4 e um carbono em δ 81,1 característico de C-2' da primeira unidade glicosídica ligado à segunda unidade.

Com os dados de RMN de ^{13}C foi possível descartar a hipótese da substância ser a triangularine-B (Figura 49, p. 79), uma aristolactama com um diglicosídeo ligado em C-8 e uma metoxila em C-9, isolada da espécie *Aristolochia triangularis*²⁶. A principal distinção entre os dados da triangularine-B e os da substância **10** está no

valor de deslocamento químico do carbono metoxílico, pois na triangularine-B a metoxila encontra-se fora do plano dos anéis aromáticos na molécula devido o impedimento estérico causado pelo açúcar em C-8, fazendo com que o deslocamento químico seja $\delta \sim 60$. Já a substância **10** apresenta um valor de δ 56,0 para o carbono metoxílico, indicando com isso que a mesma se encontra no plano dos anéis aromáticos. Com a análise do espectro de *g*HMQC (Figura 52, p. 80) foi possível atribuir os deslocamentos químicos da maioria dos carbonos na estrutura de uma aristolactama glicosilada.

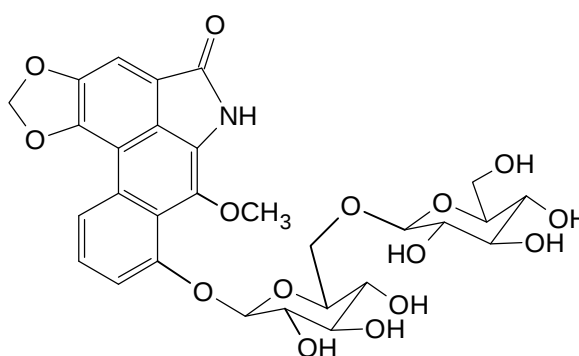


Figura 49. Estrutura da triangularine-B.

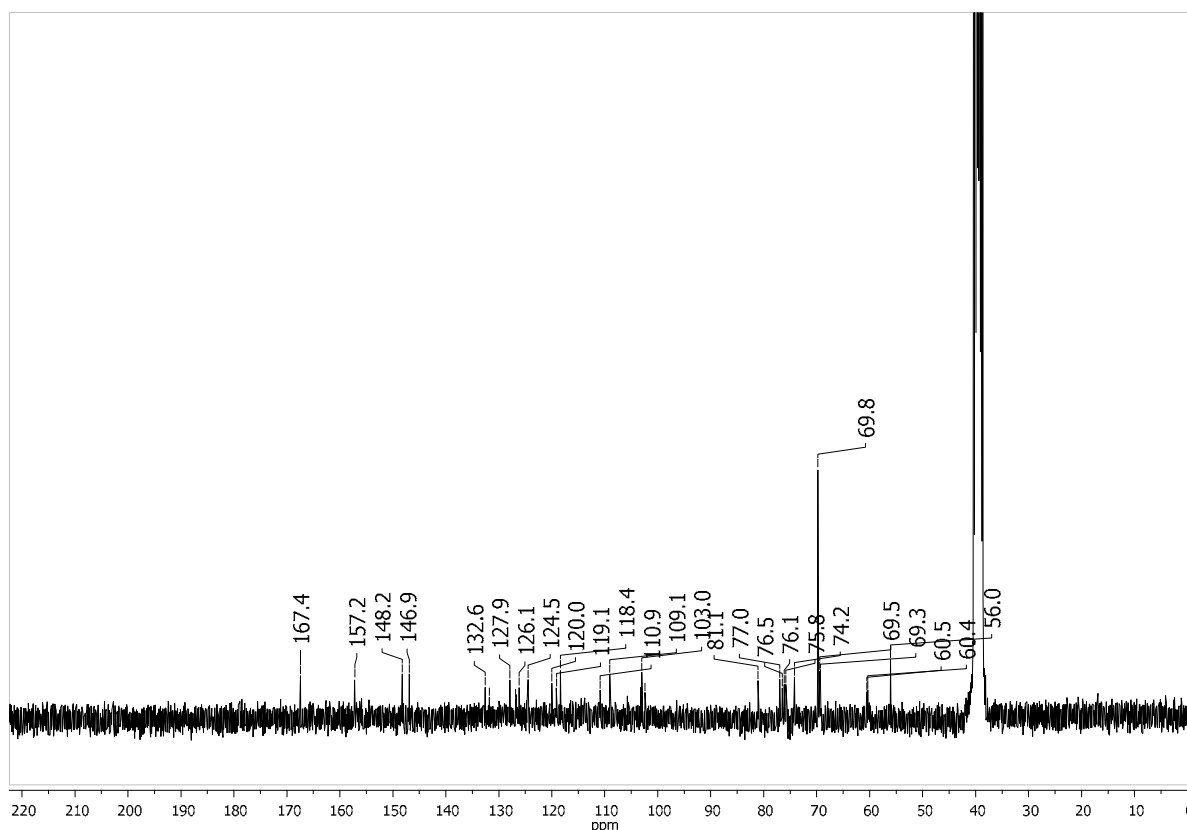


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

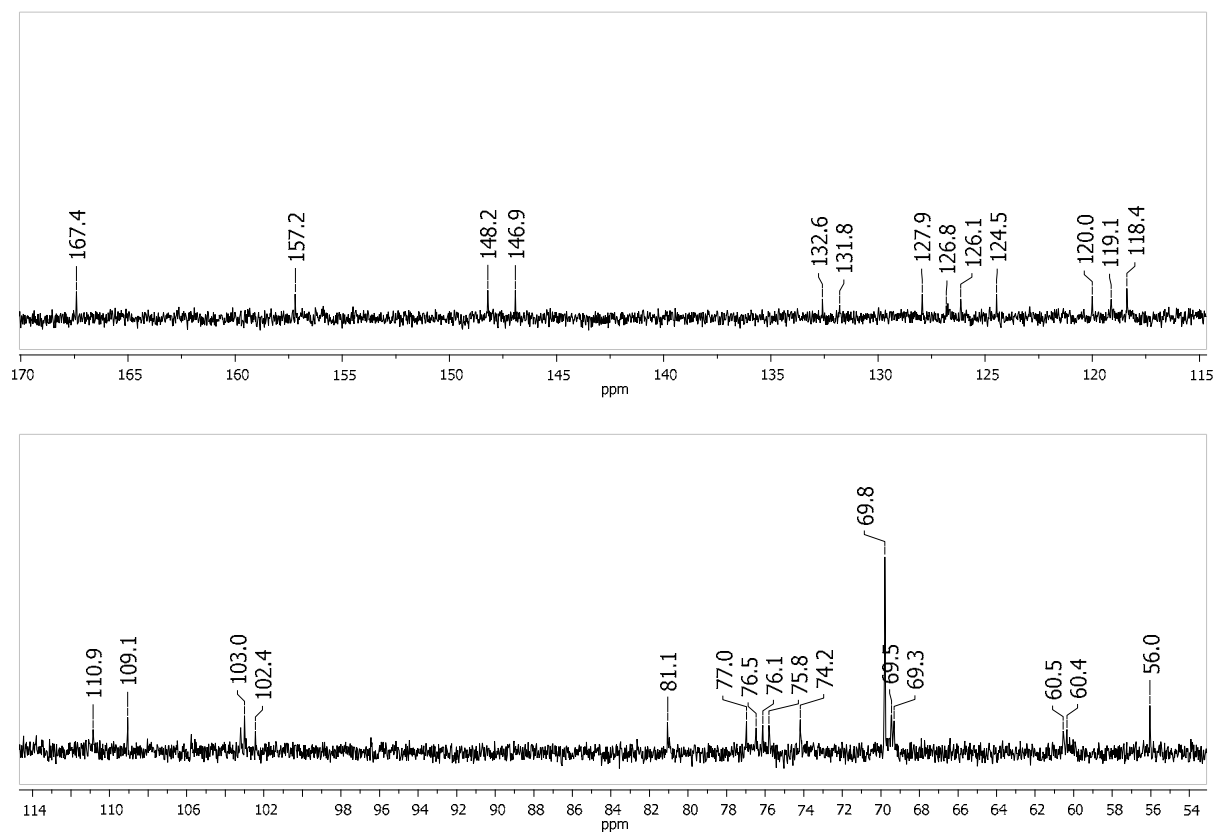


Figura 51. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **10** ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

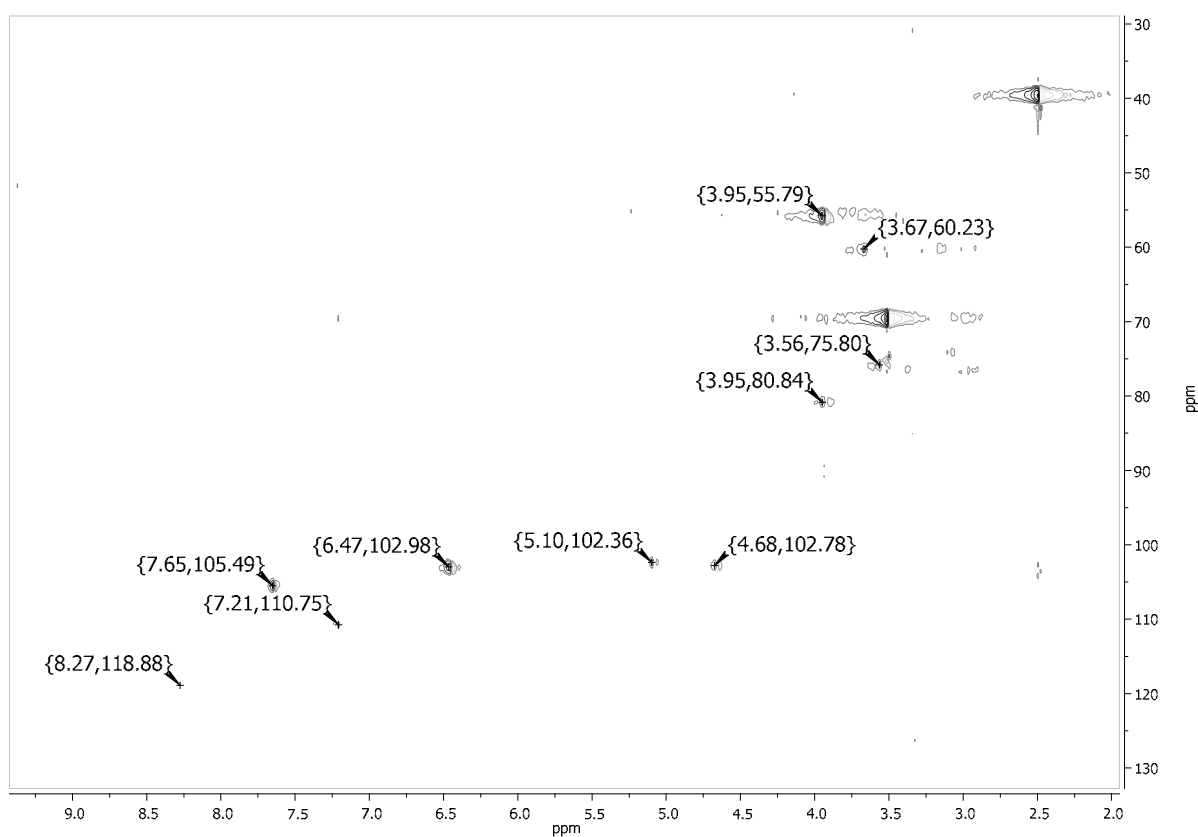


Figura 52. Ampliação do mapa de contornos de gHMQC de **10** ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

Para determinar com segurança a posição da metoxila foram realizados os experimentos de *g*NOESY 1D e *g*HMBC. No experimento *g*NOESY 1D (Figura 53, p. 81) a irradiação na frequência de absorção dos hidrogênios metoxílicos (δ 3,94) resultou em informações não muito esclarecedoras sobre a estrutura, uma vez que observou-se interações espaciais tanto com o H-7 (δ 7,23) quanto com o H-1'' (δ 4,66). Na realidade, este experimento ficou comprometido pois H-2' tem um deslocamento químico (δ 3,92) muito próximo dos hidrogênios metoxílicos (δ 3,94). Portanto, estas interações poderiam ter sido geradas pelos hidrogênios metoxílicos quanto pelo H-2'. Com isso, foi necessária a busca por uma irradiação em outra frequência de absorção que possibilitasse a atribuição do posicionamento da metoxila na estrutura.

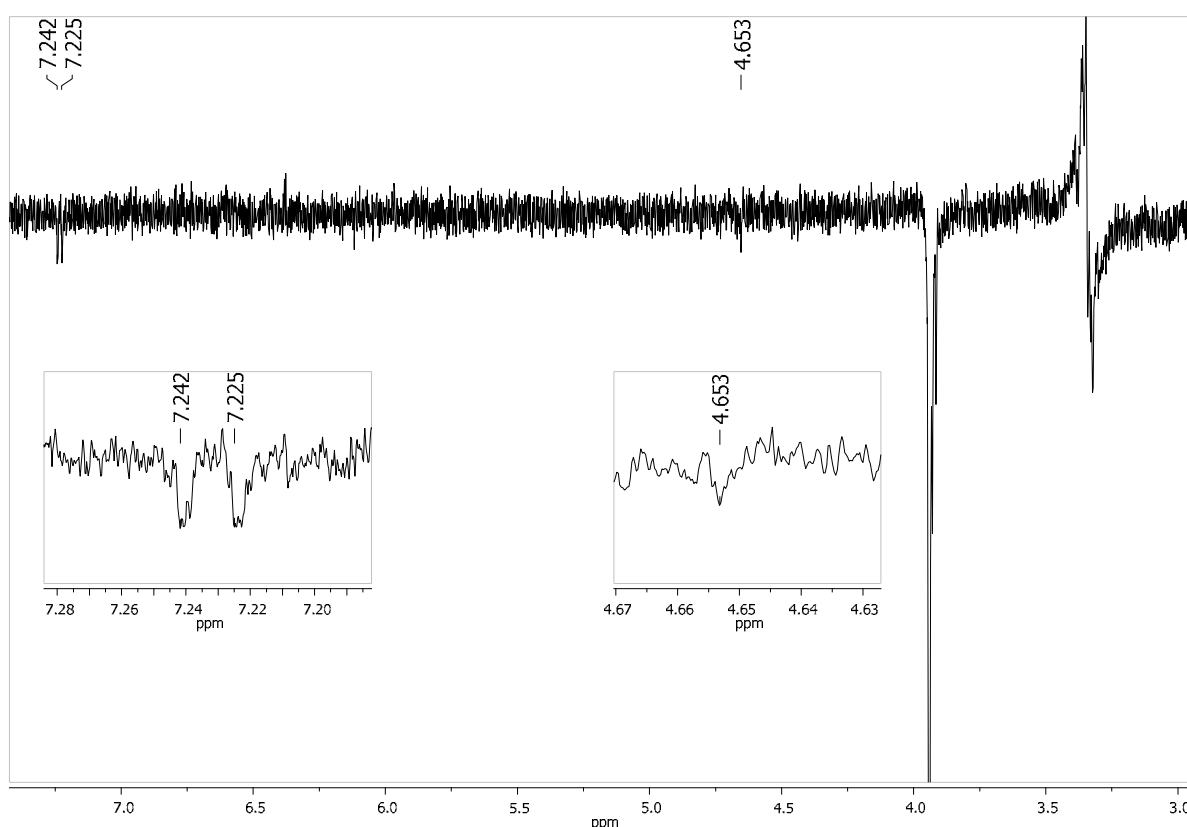


Figura 53. Ampliação do espectro de *g*NOESY 1D de **10** irradiando em δ 3,94 - 3,93 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

Pelas informações anteriormente citadas, como multiplicidade, constantes de acoplamento e valor do deslocamento químico do C-8, pode-se definir a existência de um substituinte nesta posição. Assim, realizou-se o experimento de *g*NOESY 1D irradiando na frequência de absorção do H-7 (δ 7,23) (Figura 54, p. 82), onde

observou-se as interações espaciais com H-6 [δ 7,56 *t* (8,0 Hz)] e com a metoxila (δ 3,94 *s*); um fator relevante desta irradiação foi a observação da multiplicidade dos hidrogênios que interagiram espacialmente, pois com isso pode-se descartar a hipótese da interação ocorrer com o H-2' [δ 3,92 *dd* (8,5; 6,5 Hz)], o que possibilitou determinar que a metoxila estava de fato ligada ao C-8.

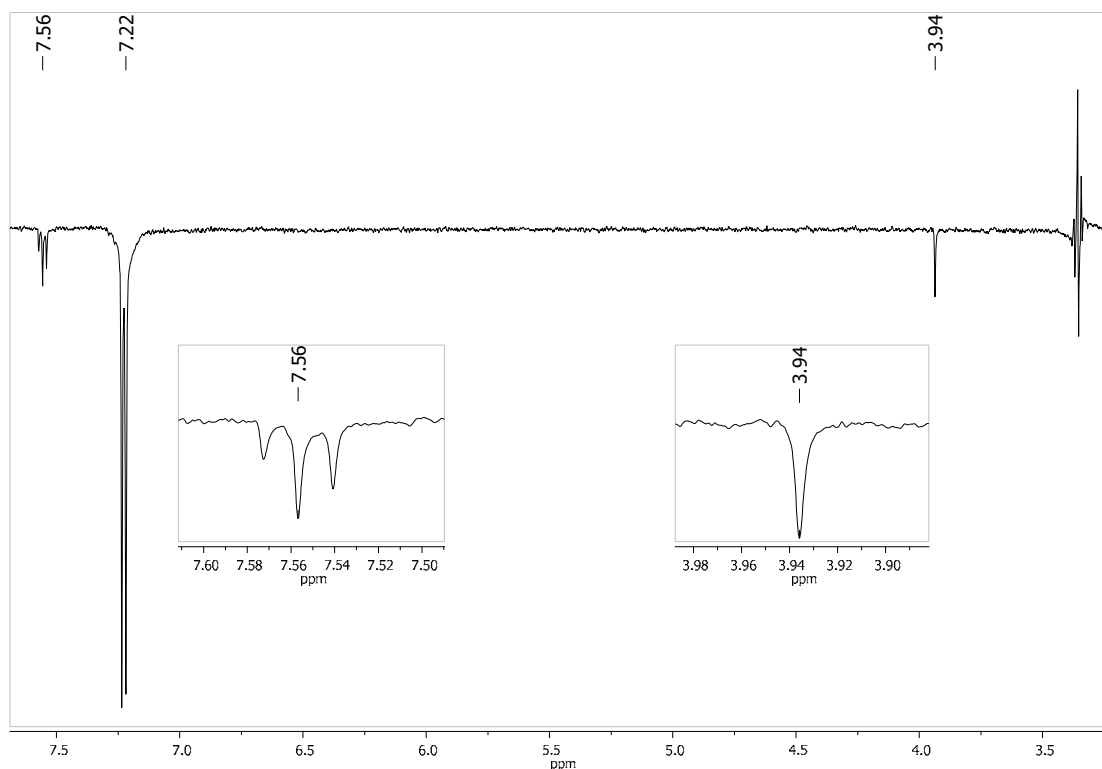


Figura 54. Ampliação do espectro de *g*NOESY 1D de **10** irradiando em δ 7,23 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

A análise do mapa de contornos *g*COSY (Figura 56, p. 83) apresenta as correlações entre H-5 (δ 8,26) e H-6 (δ 7,56), além das correlações da primeira unidade glicosídica entre H-1' (δ 5,08) e H-2' (δ 3,92) e da segunda unidade entre H-1'' (δ 4,66) e H-2'' (δ 3,06).

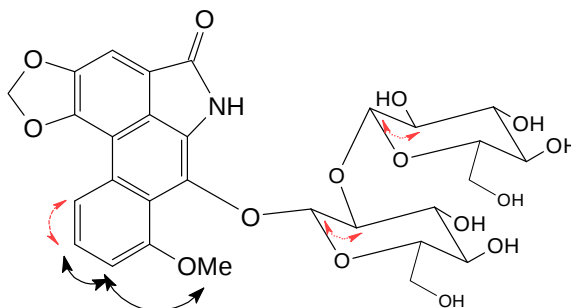


Figura 55. Correlações de *g*COSY (↔) e interações de *g*NOESY 1D (↔) para **10** (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

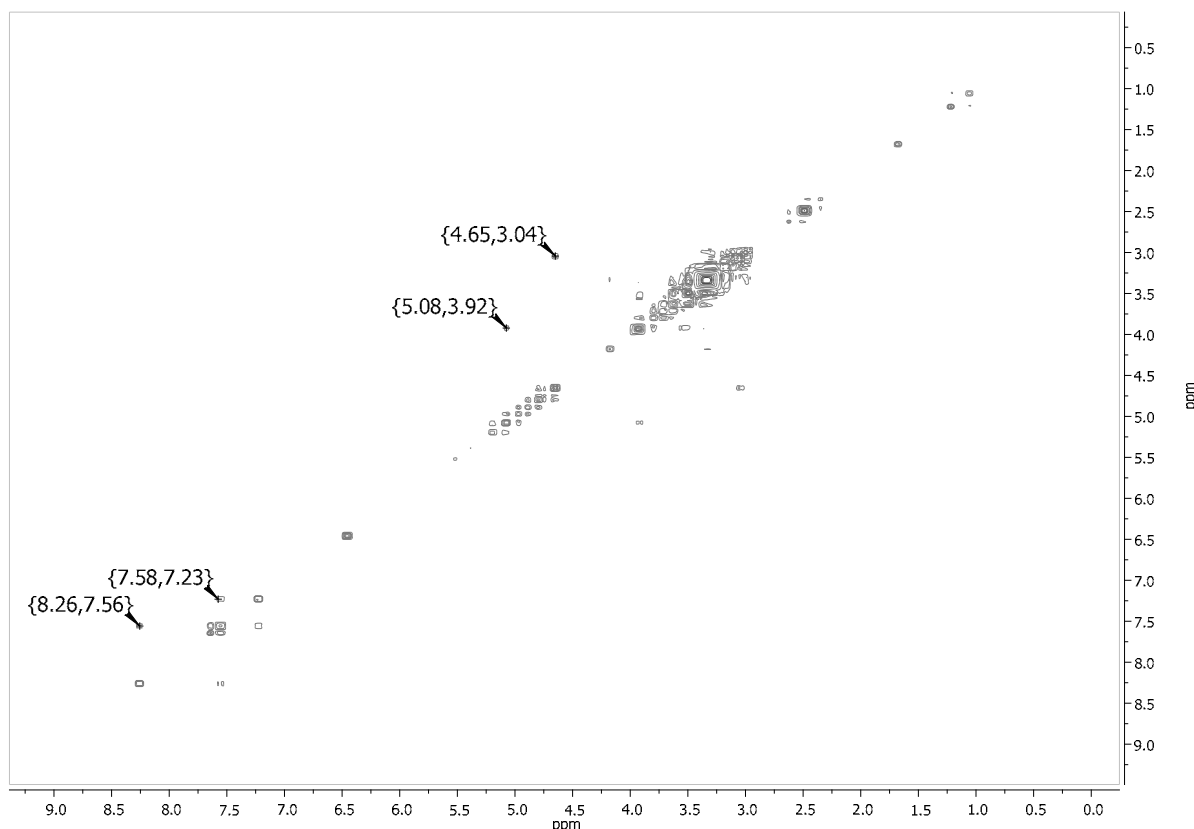


Figura 56. Mapa de contornos $g\text{COSY } ^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **10** ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

As correlações do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ (Figura 58, p. 84) confirmam a posição da metoxila em C-8, pois observa-se as correlações entre C-8 (δ 157,2) e H-6 (δ 7,56) e OCH_3 (δ 3,94). A posição do diglicosídeo foi atribuída com base na correlação observada entre H-1' (δ 5,08) e C-9 (δ 132,6), e com a correlação existente entre H-1'' (δ 4,66) e C-2' (81,1) foi possível confirmar que a ligação entre as duas unidades é feita por C-2'.

A determinação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes as duas unidades glicosídicas foi realizada com base nas correlações observadas nos experimentos $g\text{COSY } 1\text{D}$, citadas anteriormente, e no $g\text{HMBC}$ onde, além das correlações já citadas, observa-se as correlações entre H-3' (δ 3,54) e C-2' (δ 81,0) e C-4' (δ 69,4) para a primeira unidade glicosídica, e para a segunda observa-se a correlação entre H-2'' (δ 3,06) e C-3'' (δ 76,1). Os demais valores foram atribuídos com o auxílio do experimento $g\text{TOCSY } 1\text{D}$ (Figura 59, p. 85), pelas análises das multiplicidades observadas no espectro de RMN de ^1H e dos valores de deslocamento químico dos carbonos, assim como, comparação com dados de outros glicosídeos descritos na literatura⁷⁸.

A medida de rotação óptica específica foi $-3,9^\circ$ (MeOH, c 0,5), ao comparar este valor com a rotação óptica de uma substância aromática ligada ao mesmo diglicosídeo da substância **10**, como no caso da limocitrinil-3-O- β -sophoroside⁷⁹, sugere-se que o açúcar possua a configuração D-glicopiranosil-O-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -D-glicopiranosídeo.

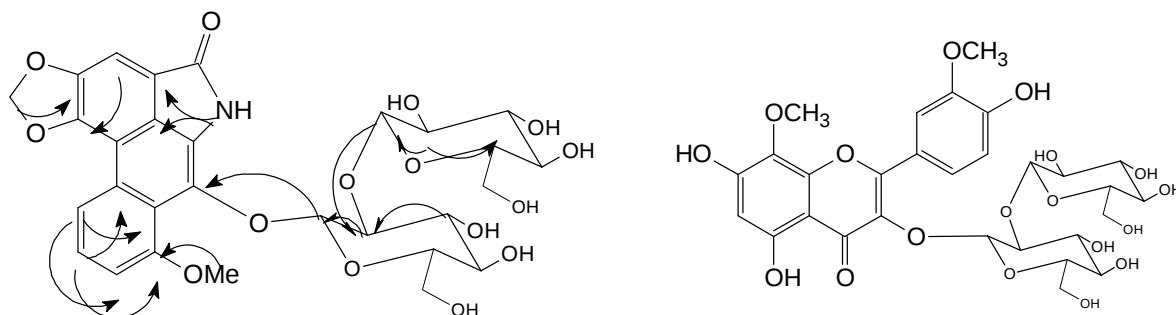


Figura 57. Principais correlações observadas pelo experimento de gHMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) de **10** e a estrutura do limocitrinil-3-O- β -sophoroside.

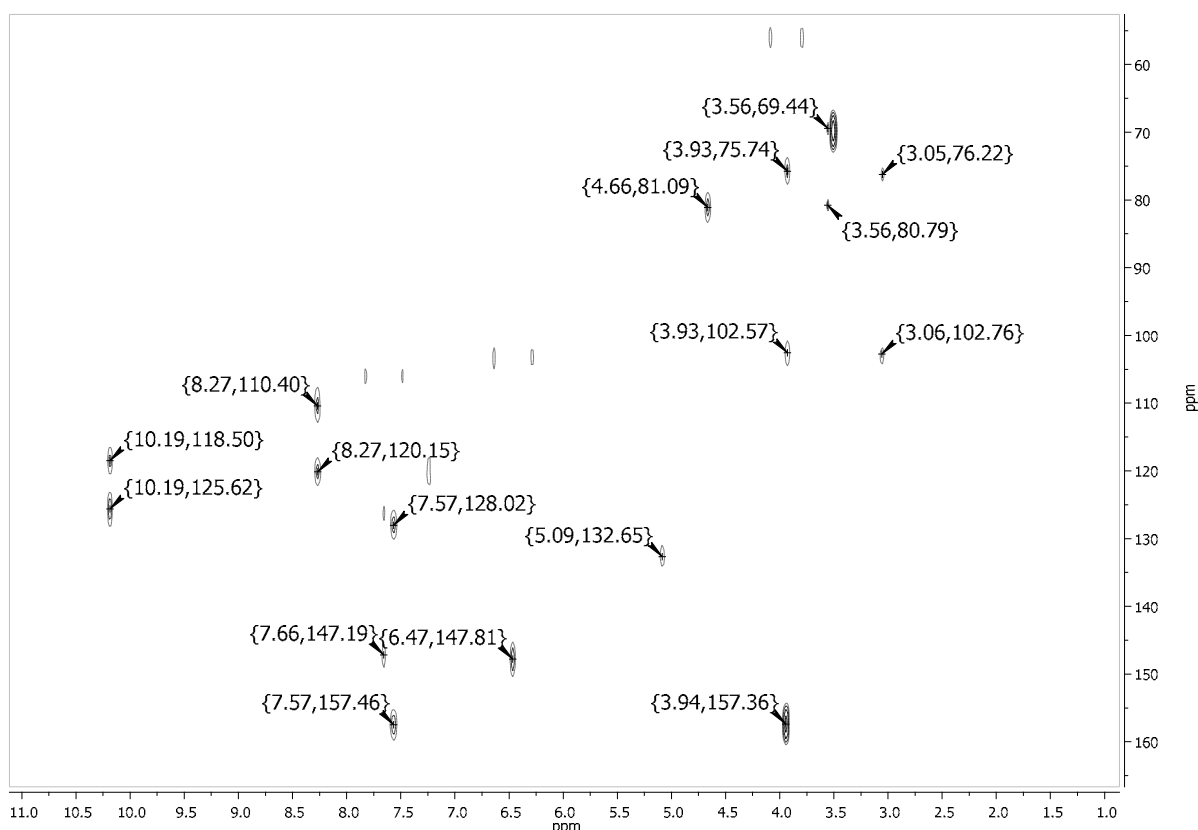


Figura 58. Mapa de contornos gHMBC de **10** (DMSO- d_6 , 11,7 T).

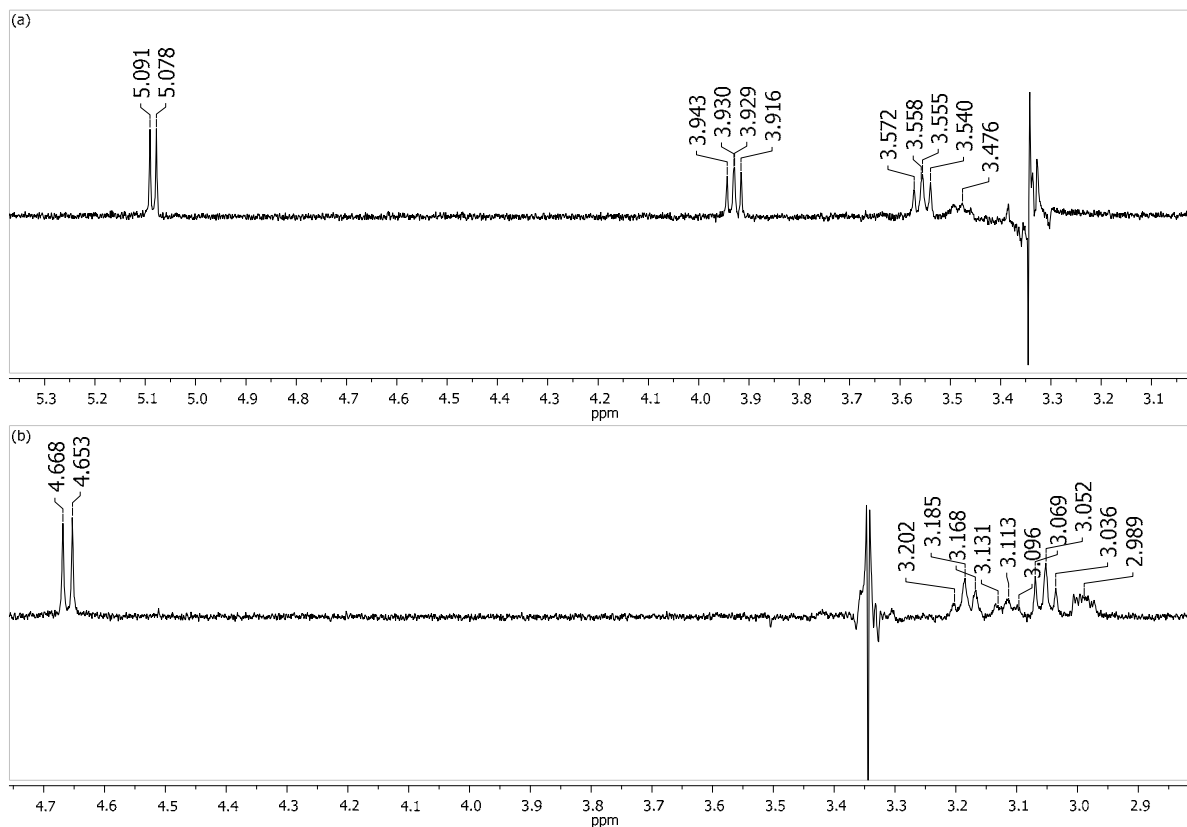
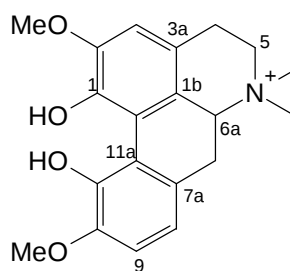


Figura 59. Espectro *g*TOCSY 1D ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) de **10** irradiando em: (a) δ 5,08 e (b) δ 4,66 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

A análise conjunta dos dados da substância **10** (Tabela 10, p. 86) culminou na determinação da estrutura da aristolactama 9-[O- β -D-glicopiranosil-O-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -D-glicopiranosídeo], sendo que esta foi descrita pela primeira vez na literatura⁷⁵.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **10** (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 11,7 T).

Posição	δ_{H}	δ_{C}	Posição	δ_{H}	δ_{C}
1	-	119,1	OCH ₂ O	6,46 s	103,0
2	7,65 s	105,7	OCH ₃	3,94 s	56,0
3	-	148,2	1'	5,08 d (6,5)	103,0
4	-	146,9	2'	3,92 dd (8,5; 6,5)	81,0
4a	-	109,0	3'	3,54 t (8,5)	75,8
4b	-	127,9	4'	3,47 t (8,5)	69,4
5	8,26 dd (8,5; 1,0)	118,4	5'	3,18 m	76,9
6	7,56 dd (8,0; 8,5)	126,1	6' α , 6' β	3,8 – 3,6 m	60,5
7	7,23 d (8,0; 1,0)	110,8	1''	4,65 d (7,5)	102,4
8	-	157,2	2''	3,06 dd (7,5; 8,5)	74,1
8a	-	120,0	3''	3,10 d (8,5)	76,1
9	-	132,6	4''	3,17 t (8,5)	69,3
10	-	^a	5''	2,99 ddd (8,5; 4,7; 2,5)	76,4
10a	-	124,4	6'' α , 6'' β	3,35 m 3,8 – 3,6 m	60,3
CO	-	167,4	NH	10,18 s	-

^a Sinal não observado.5.1.7. Magnoflorina (**11**)**11**

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 60, p. 87) apresenta sinais referentes a 20 carbonos, os sinais em δ 42,5 e 52,6 podem ser atribuídos a carbonos metílicos ligados a um heteroátomo, outros quatro sinais em δ 150,0 – 153,0 são característicos de carbonos quaternários oxigenados, além de oito sinais entre δ 108,8 e δ 125,1 atribuíveis a carbonos aromáticos (Tabela 11, p. 90).

No espectro de RMN de ^1H da substância **11** (Figura 61, p. 88) observa-se a presença de sinais referentes a três hidrogênios aromáticos, cujas multiplicidades e deslocamentos químicos sugerem ser de dois anéis aromáticos; sinais correspondentes a hidrogênios alifáticos em δ ~2,5 – 4,4; e de dois grupos metoxílicos em δ 3,67 e 3,70.

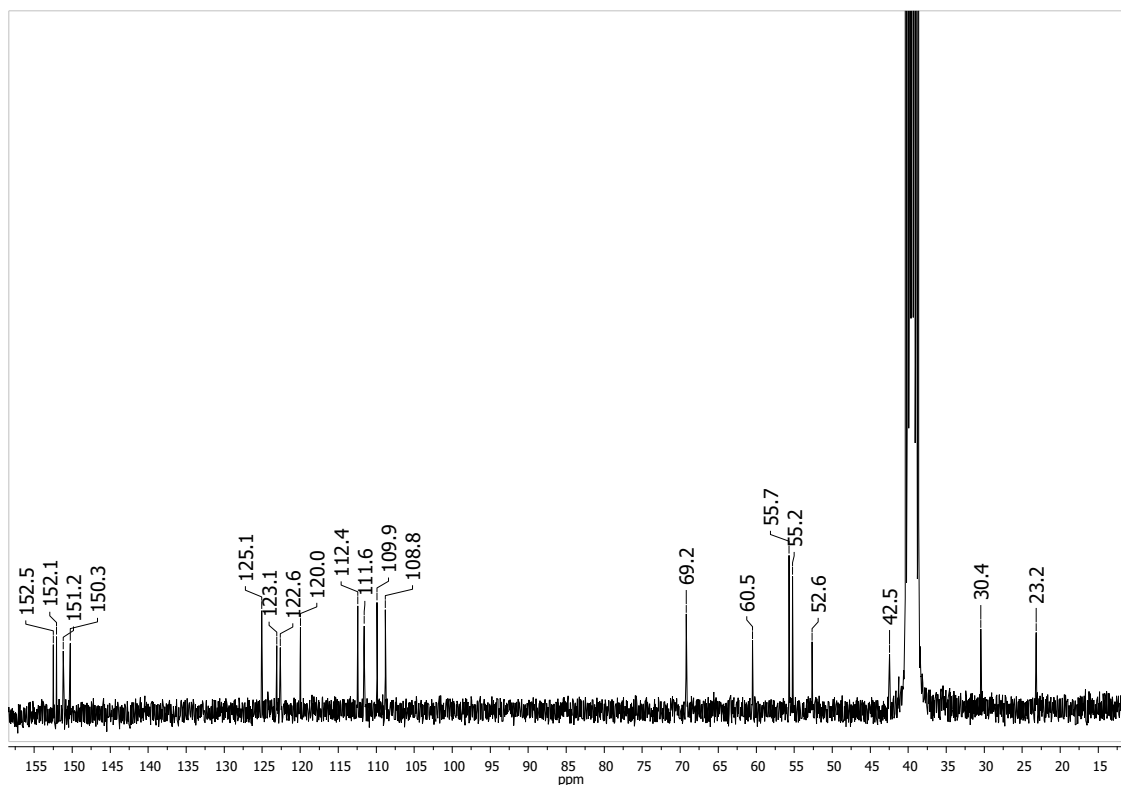


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (DMSO- d_6 , 7,1 T).

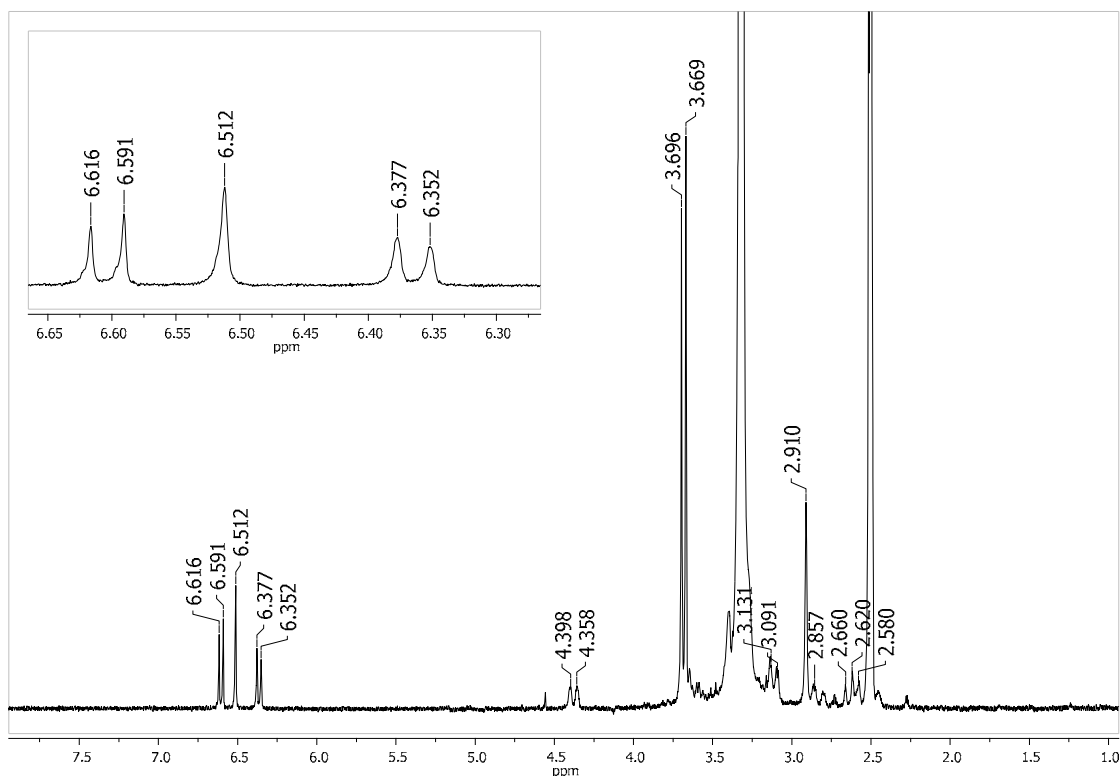


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de **11** ($\text{DMSO-}d_6$, 7,1 T).

Pela análise do mapa de contornos $g\text{HMQC}$ (Figura 62, p. 89) pode-se atribuir, inequivocamente, os deslocamentos químicos dos hidrogênios e os correspondentes carbonos alifáticos. As correlações observadas no mapa de contornos $g\text{HMBC}$ (Figura 63, p. 89) entre o H-3 (δ 6,51), C-1 (δ 152,1) e C-1b (δ 120,0); H-8 (δ 6,36), C-10 (δ 150,3) e C-11a (δ 123,1); H-9 (δ 6,60), C-7a (δ 125,1) e C-11 (δ 152,5); H-5 (δ 3,66) e C-3a (δ 111,6) possibilitaram a atribuição de todos os carbonos quaternários da estrutura. Com as correlações entre H-3 (δ 6,51) e C-4 (δ 23,2); H-4 (δ 3,15) e C-5 (δ 60,5); e as correlações das metilas (δ 2,91 e δ 3,31) com C-5 (δ 60,5) e C-6a (δ 69,2) foi possível determinar que a substância **11** tratava-se de um alcaloide aporfínico.

O valor de deslocamento químico observado para C-6a (δ 69,2) é característico de um sal de alcaloide aporfínico. Com a análise do deslocamento químico de C-4 (δ 23,2) e com a correlação entre a metila (δ 2,91) e N-CH_3 (δ 52,6) pode-se confirmar que a substância é um sal de alcaloide aporfínico, uma vez que a proteção causada em C-4 é consequência do efeito γ da metila ligada ao nitrogênio. A posição das metoxilas foi determinada com base nas correlações entre OCH_3 (δ 3,70) e C-2 (δ 151,2); e OCH_3 (δ 3,67) e C-10 (δ 150,3).

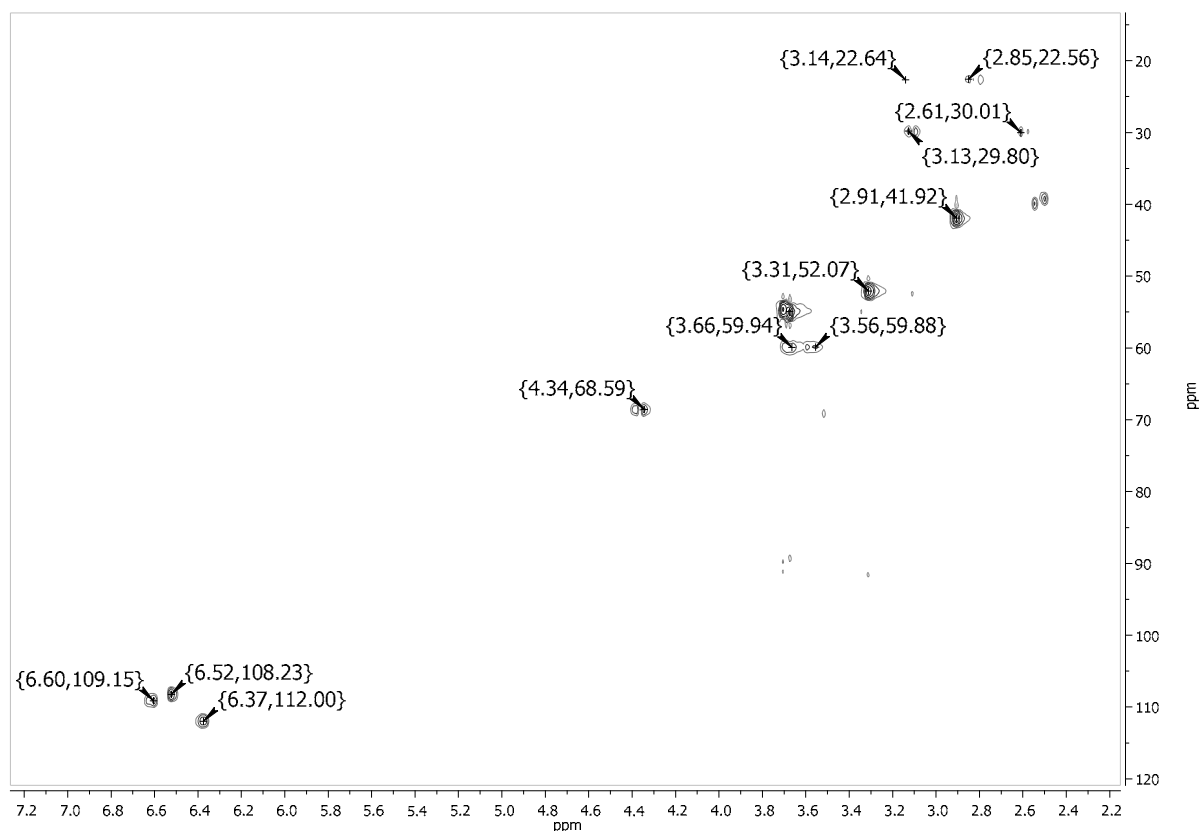


Figura 62. Mapa de contornos gHMQC de **11** (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

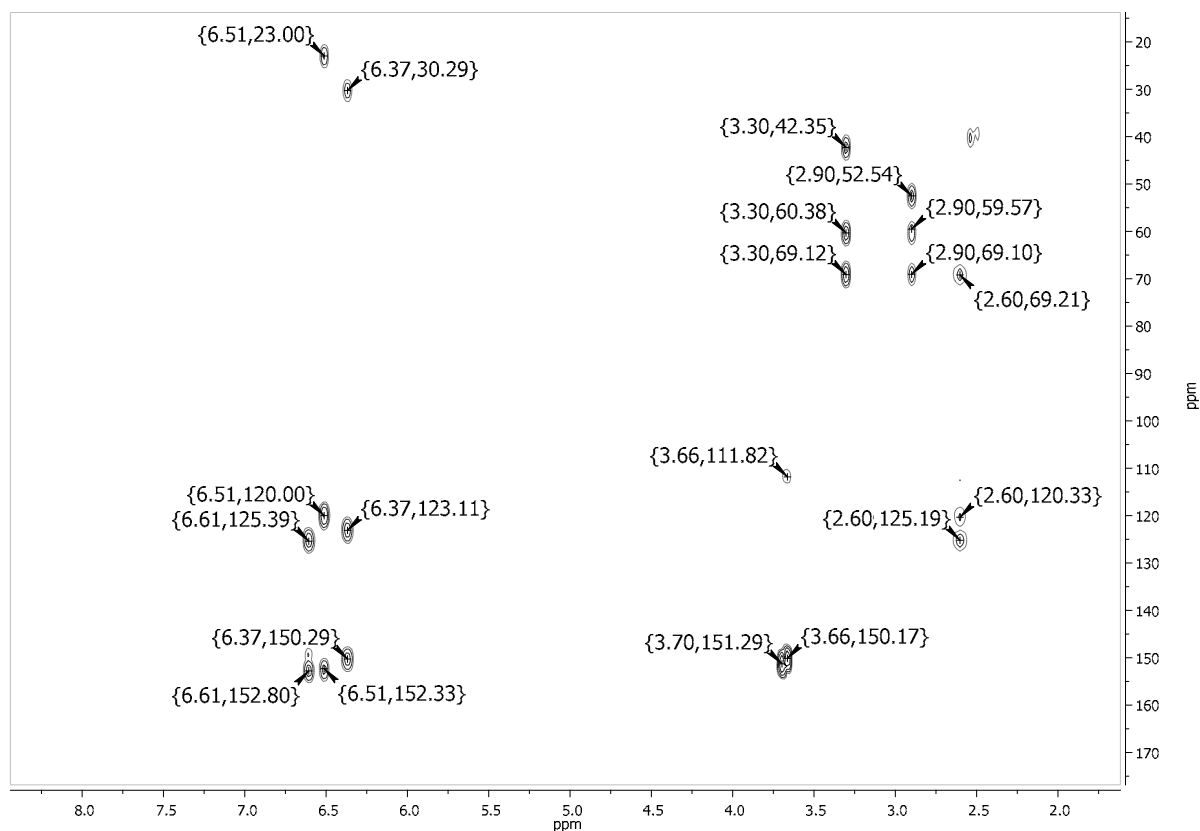


Figura 63. Mapa de contornos gHMBC de **11** (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

A atividade óptica específica observada foi de $+164,4^\circ$ (MeOH, c 0,03), e a descrita na literatura é $[\alpha]_D^{25} = +150,0^\circ$ (MeOH, c 0,1)⁸⁰ para a (+)-magnoflorina; com isso, identificou-se a substância **11**.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **11** (DMSO- d_6 , δ , J = Hz, 7,1 T).

Posição	11		Magnoflorina ^{a80}	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	152,1	-	150,4	-
2	151,2	-	152,9	-
3	108,8	6,51 s	109,5	6,48 s
3a	111,6	-	116,1	-
4	23,2	2,86 m	24,7	2,63 m
		3,15 m		3,17 m
5	60,5	3,66 m e 3,59 m	62,4	3,45 m e 3,11 m
6a	69,2	4,38 dl (12,0)	71,0	3,48 m
7	30,4	3,11 dl (12,0)	31,6	2,96 m
		2,62 t (12,0)		2,45 t (11,6)
7a	125,1	-	126,1	-
8	112,4	6,36 dl (7,5)	117,5	6,49 d (7,1)
9	109,9	6,60 d (7,5)	110,5	6,67 d (7,5)
10	150,3	-	151,6	-
11	152,5	-	149,6	-
11a	123,1	-	123,4	-
1a	122,6	-	123,3	-
1b	120,0	-	121,1	-
OCH ₃ -10	55,2	3,67 s	56,1	3,81 s
OCH ₃ -2	55,7	3,70 s	56,4	3,76 s
N-CH ₃	42,5	2,91 s	43,6	2,79 s
N-CH ₃	52,6	3,31 s	54,0	3,23 s

^a Espectro feito em CD₃OD.

5.2. Atividades biológicas descritas na literatura para algumas das substâncias isoladas de *Aristolochia gigantea*

A alantoína tem sua importância reconhecida pela propriedade cicatrizante, e pelo emprego em cosmética – principalmente em cremes e loções de barbear, no tratamento de pacientes portadores de vitiligo⁷, além de ser um potente agente anti-inflamatório para o tratamento de asma⁸¹.

As lignanas do tipo furofurânicas compõem uma das maiores subclasses da família dos lignoides e apresentam uma grande variedade de atividades biológicas. Estudos com as lignanas furofurânicas (+)-kobusina e (+)-eudesmina relatam que elas apresentam atividades biológicas em comum incluindo, antifúngica⁸², inibição da enzima cAMP fosfodiesterase^{83,84} e citotóxica^{85,86}. Outras atividades são particularmente atribuídas a eudesmina, como antibacteriana, e de apresentar efeitos inibitórios sobre a produção de fator de necrose tumoral alfa e de relaxação vascular⁸⁶.

O sesquiterpeno acíclico *E*-nerolidol possui atividade larvicida para o *Aedes aegypti*⁸⁷, apresenta efeito inibitório na formação de úlceras induzidas em diferentes tipos de animais e atividade antifúngica para *Microsporium gypseum*⁸⁸.

O alcaloide aporfínico magnoflorina apresenta significativa inibição da geração de peroxinitrito (ONOO⁻), substância extremamente tóxica por causar danos celulares e disfunções no organismo⁸⁹. Pesquisas sugerem a utilização da magnoflorina na prevenção da oxidação de várias formas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), evitando assim a aterosclerose⁹⁰, outra atividade importante é a inseticida para o *Spodoptera frugiperda*⁹¹.

Outros quatro alcaloides do tipo alcanida foram isolados *A. gigantea*, podendo-se destacar a *trans-N*-feruloiltiramina como moderado inibidor do óxido nítrico (NO), que está envolvido em processos inflamatórios e carcinogênicos⁹².

5.3. Testes biológicos para atividade antiofídica

A administração de soro antiofídico pode apresentar várias complicações para o paciente. Estudos mostram que a incidência de reações de hipersensibilidade ao soro varia de 5 a 33% dos casos⁹³.

Várias espécies de plantas usadas em comunidades brasileiras no tratamento de picadas por ofídios têm sido investigadas cientificamente. Estes inibidores naturais das atividades do veneno dos ofídios no organismo humano podem auxiliar no tratamento atual e/ou serem úteis como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos.

A busca por extratos e substâncias capazes de inibir a ação das fosfolipases A₂ (PLA₂s) tem apresentado bons resultados, um exemplo é o extrato da espécie *Mandevilla illustris* que inibiu totalmente a atividade fosfolipásica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*⁹⁴.

Neste contexto, e acrescentando o histórico de utilização do gênero *Aristolochia* em tratamentos antiofídicos, foram realizados os testes de inibição da atividade fosfolipásica e proteolítica dos venenos de *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e com a toxina BthTX-II, uma PLA₂ básica, isolada do veneno de *B. jararacussu*. As substâncias isoladas da espécie *A. gigantea* em maior concentração foram testadas, sendo estas, a alantoína (**1**), (+)-kobusina (**4**) e a (+)-eudesmina (**5**).

5.3.1. Atividade Fosfolipásica

Os testes de atividade fosfolipásica foram realizados em duas proporções distintas: 1:30 e 1:60 de quantidade de veneno/substância testada.

A leitura dos dados de inibição da atividade fosfolipásica consistiu na medida em centímetros do halo formado ao redor de cada orifício da placa contendo o gel onde foram introduzidas as soluções. Estes halos são formados pela hidrólise das hemácias causadas pelos lisofosfolípideos e ácidos graxos liberados (Figura 64, p. 93). Com isso, quanto menor for a medida do halo, maior a capacidade da substância em inibir a atividade fosfolipásica da peçonha.

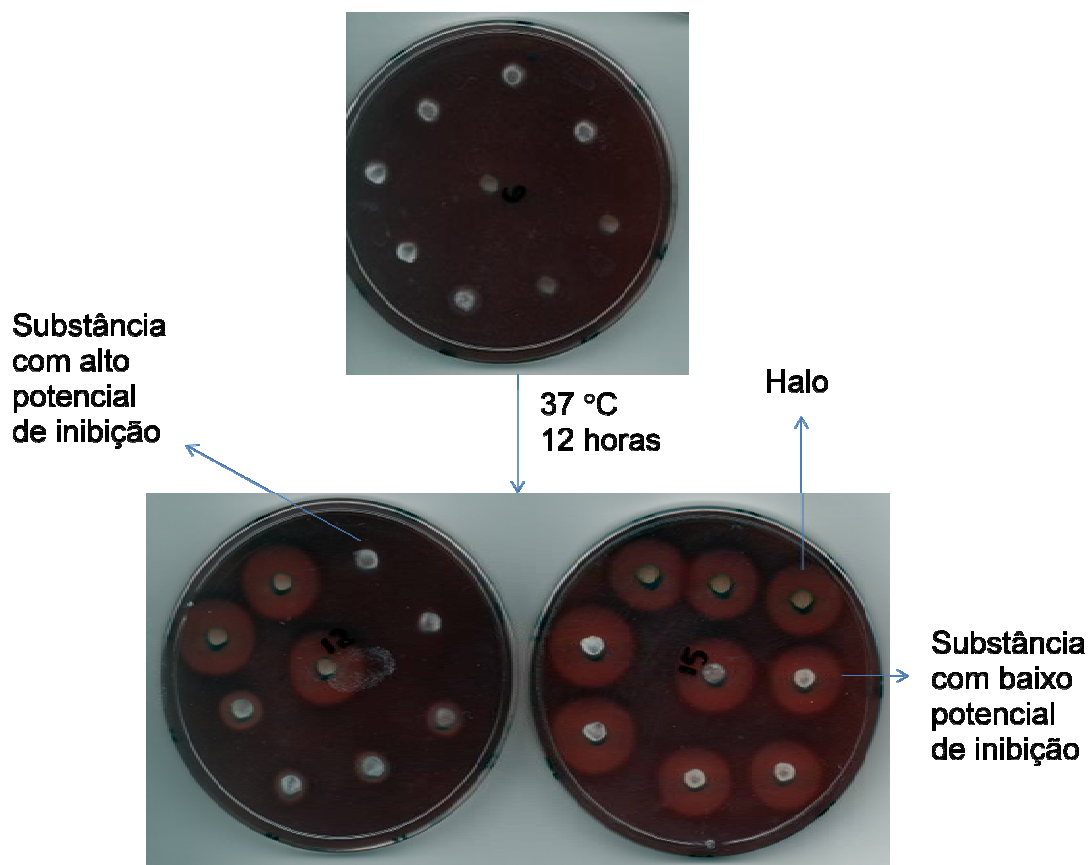


Figura 64. Foto ilustrativa dos halos formados pela atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararacussu*.

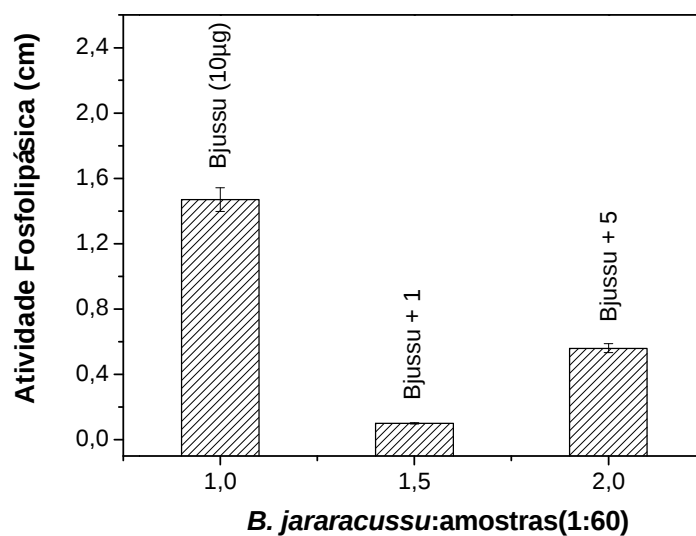


Figura 65. Ação inibitória das substâncias **1** e **5** sobre a atividade fosfolipásica induzida por *Bothrops jararacussu* (Bjussu). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (n=3).

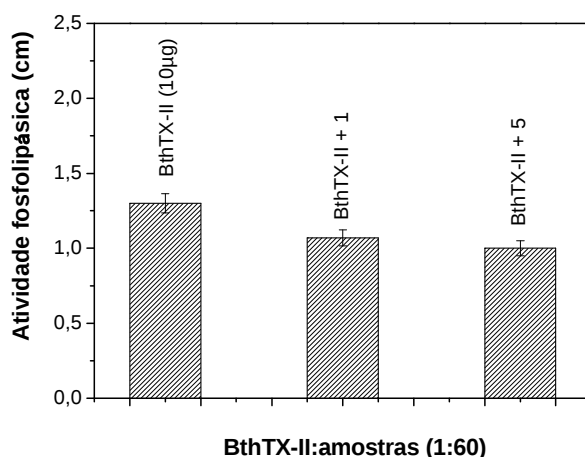


Figura 66. Ação inibitória das substâncias **1** e **5** sobre a atividade fosfolipásica induzida pela toxina BthTX-II isolada de *Bothrops jararacussu*. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Pela análise dos gráficos (Figuras 65 e 66, p. 93 e 94) nota-se a eficiente inibição da atividade fosfolipásica, do veneno de *Bothrops jararacussu*, apresentada pela alantoína. Porém, esta eficiência não é mantida com a toxina BthTX-II. A inibição da toxina BthTX-II causada pelas substâncias **1** e **5** não apresenta uma diferença significativa entre si, como mostra o desvio padrão obtido.

Uma explicação para os dados observados está na complexa mistura de componentes no veneno das serpentes. A alantoína pode ter inibido com maior eficiência as fosfolipases A₂ ácidas contidas no veneno responsáveis pela atividade fosfolipásica desta espécie de serpente.

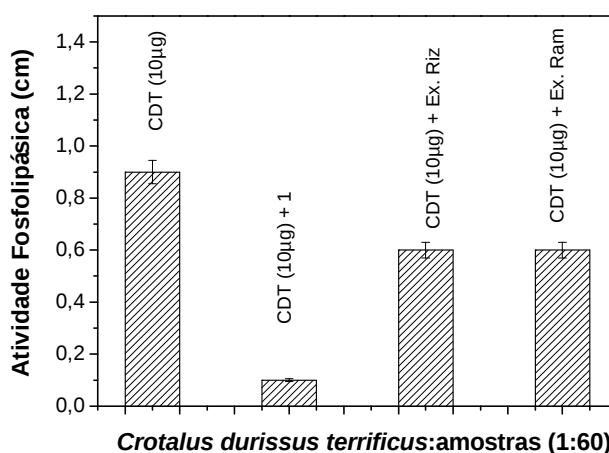


Figura 67. Ação inibitória da substância **1**, dos extratos etanólicos de rizomas (Ex Riz) e ramos (Ex Ram) de *A. gigantea* sobre a atividade fosfolipásica induzida por *Crotalus durissus terrificus* (CDT). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Os extratos mostraram moderada inibição da atividade fosfolipásica do veneno da espécie *C. d. terrificus* (Figura 67, p. 94), enquanto a alantoína apresentou bons resultados inibindo cerca de 90% da atividade fosfolipásica. Levando-se em consideração que os extratos inibiram aproximadamente 34% da atividade fosfolipásica do veneno e que os extratos etanólicos de *A. gigantea* são formados por cerca de 9% de alantoína, sugere-se a presença de substâncias com ação inibitória, juntamente com a alantoína, nos extratos.

Os testes realizados na proporção 1:60 veneno/substância empregando-se **4** e 1:30 empregando-se **1**, **4**, **5** e os extratos não evidenciaram atividade inibitória significativa.

5.3.2. Atividade Proteolítica

O teste de atividade proteolítica baseia-se na clivagem da azocaseína pelas enzimas proteolíticas presentes no veneno. A decantação ocasionada pela adição de ácido tricloroacético faz com que os peptídeos resultantes da clivagem permaneçam em suspensão. A reação das proteases do veneno com a azocaseína libera o corante azo em solução, assim, é realizada a medida de absorbância da solução, uma vez que as proteínas que não foram clivadas precipitam e são retiradas do meio por centrifugação⁶⁰.

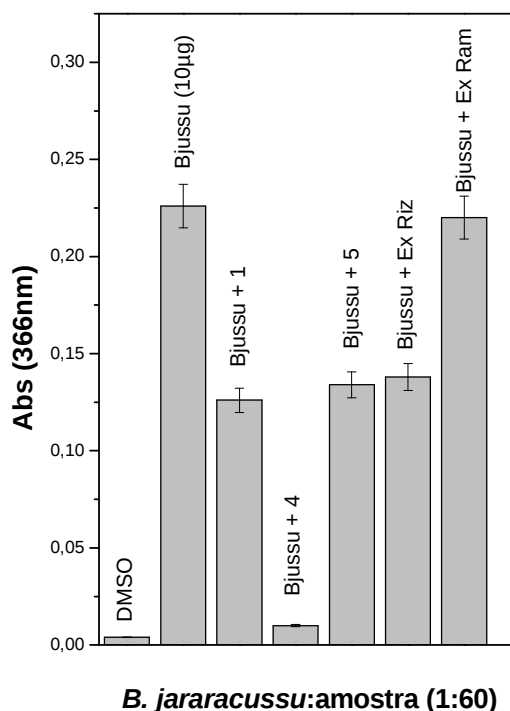


Figura 68. Ação inibitória das substâncias **1**, **4**, **5** e dos extratos etanólicos de rizomas (Ex Riz) e de ramos (Ex Ram) sobre a atividade proteolítica induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* (Bjussu). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A análise do gráfico (Figura 68, p. 96) evidencia o alto potencial de inibição da atividade proteolítica, do veneno da espécie *B. jararacussu*, apresentado pela substância **4**. As substâncias **1** e **5** e o extrato de rizomas apresentaram atividade moderada, enquanto o extrato de ramos mostrou-se inativo.

A proporção em que as substâncias testadas foram capazes de inibir parte das atividades enzimáticas e proteolíticas dos venenos de serpente foi de 1:60, porém, esta proporção pode ser considerada elevada quando comparada a outros extratos ou substâncias naturais com propriedades antiofídicas relatadas na literatura⁵⁶.

6. DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS*Alantoína (1)*

Cristais incolores. P. f. = 233-234 °C (lit. p. f. = 232-235 °C). Dados de RMN de ^1H na Tabela 1.

E-nerolidol (2)

Óleo amarelo. $[\alpha]_D^{25} = -17^\circ$ (CHCl_3 , c 0,2) [lit. $[\alpha]_D^{25} = -12,5^\circ$ (CHCl_3 , c 0,02)]. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C na Tabela 2.

 β -sitosterol (3)

Sólido amorfo. P. f. = 138-140 °C (lit. p. f. = 137-139 °C). $[\alpha]_D^{25} = -15,2^\circ$ (CHCl_3 , c 0,2) [lit. $[\alpha]_D^{25} = -26,1^\circ$ (CHCl_3 , c 0,1)]. Dados de RMN de ^{13}C na Tabela 3.

(+)-Kobusina (4)

Óleo amarelo. $[\alpha]_D^{25} = +51,4^\circ$ (CHCl_3 , c 0,21) [lit. $[\alpha]_D^{25} = +58,0^\circ$ (CHCl_3 , c 0,03)]. Dados de RMN de ^1H na Tabela 4.

(+)-Eudesmina (5)

Óleo vermelho. $[\alpha]_D^{25} = +17,5^\circ$ (CHCl_3 , c 0,12) [lit. $[\alpha]_D^{25} = +61^\circ$ (CHCl_3 , c 0,4)]. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C na Tabela 5.

trans-N-feruloiltiramina (6 + 15)

Sólido amorfo. Dados de RMN de ^1H na Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Aristolactama Ia N- β -glicosídeo (7)

Sólido amorfo. P. f > 360 °C (lit. p. f. > 280 °C). $[\alpha]_D^{25} = -7.9^\circ$ (MeOH, c 0.1) [lit. $[\alpha]_D^{25} = -9.9^\circ$ (MeOH, c 0.07)]. Dados de RMN de ^1H na Tabela 9.

Aristolactama Ia 8- β -O-glicosídeo (8)

Sólido amorfo. P. f. = 295-297 °C (lit. p. f. = 292-293 °C). $[\alpha]_D^{25} = -8,2^\circ$ (MeOH, c 0,1) [lit. $[\alpha]_D^{25} = -10,5^\circ$ (MeOH, c 0,2)]. Dados de RMN de ^1H na Tabela 9.

Aristolactama IIIa (9)

Sólido amorfo. P. f. = 335-337 °C (lit. p. f. = > 350 °C). Dados de RMN de ^1H na Tabela 9.

Aristolactama 9-[O- β -glicopiranosil-O-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -glicopiranosídeo] (10)

Sólido amorfo. P. f. > 360 °C. $[\alpha]_D^{25} = -3,9^\circ$ (c 0.5, MeOH). Dados de RMN de ^1H na Tabela 10.

Magnoflorina (11)

Sólido amorfo. P. f. = 195 °C (lit. p. f. = 197-198 °C). $[\alpha]_D^{25} = +164,4^\circ$ (MeOH, c 0.03) [lit. $[\alpha]_D^{25} = +150,0^\circ$ (MeOH, c 0.1)]. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C na Tabela 11.

trans-N-coumaroil-tiramina (12)

Sólido amorfo. Dados de RMN de ^1H na Tabela 6.

trans-N-feruloil-3-O-metildopamina (13 + 16)

Sólido amorfo. Dados de RMN de ^1H na Tabelas 6 e 7, respectivamente.

trans-N-p-coumaroil-3-O-metildopamina (14 + 17)

Sólido amorfo. Dados de RMN de ^1H na Tabela 8. ESI-HR-TOF-MS (probe) 4000V, m/z (rel. int.): 312.1233 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (100) (calculado para: $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N} - \text{H} = 312.1236$).

7. CONCLUSÕES

Os estudos fitoquímicos dos extratos etanólicos de rizomas e de ramos da espécie *Aristolochia gigantea* Mart. resultaram no isolamento de dezessete substâncias pertencentes a distintas classes de metabólitos especiais, destacando-se as alcanidas e aristolactamas.

A partir do extrato etanólico de rizomas, isolou-se: quatro aristolactamas, sendo a aristolactama 9-[O- β -glicopiranosil-O-(1'' $\rightarrow$ 2')- β -glicopiranosídeo] (**10**) descrita pela primeira vez na literatura, duas lignanas, uma mistura de alcanidas, um sal de alcaloide aporfínico, um sesquiterpeno, um esteroide e a alantoína. Do extrato etanólico de ramos, obteve-se: uma lignana e sete alcanidas, sendo as substâncias *trans*- e *cis*- *N-p*-coumaroil-3-*O*-metildopamina (**14** + **17**) relatadas pela primeira vez na literatura.

As substâncias isoladas neste trabalho contribuíram para a ampliação do conhecimento sobre a química da espécie *Aristolochia gigantea*, da qual foram relatados, anteriormente, o isolamento somente de alcaloides, alantoína e do β -sitosterol.

A atividade antiofídica foi mensurada com base nos testes de atividade fosfolipásica e proteolítica das espécies *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*. A alantoína apresentou uma eficiente inibição da atividade fosfolipásica dos venenos das espécies *B. jararacussu* e *C. d. terrificus*, enquanto que a (+)-eudesmina e os extratos etanólicos de rizomas e ramos apresentaram atividade moderada. A (+)-kobusina apresentou um bom potencial inibitório da atividade proteolítica da espécie *B. jararacussu*, a alantoína, (+)-eudesmina e os extratos mostraram atividade moderada. Com isso, pode-se concluir que as duas substâncias isoladas em maior concentração dos extratos etanólicos de *A. gigantea*, a alantoína e a (+)-kobusina, apresentam uma importante inibição da atividade fosfolipásica e proteolítica, respectivamente, o que poderia justificar o uso tópico da espécie *A. gigantea* na medicina popular.

Além da relevância dos resultados citados, pode-se ressaltar ainda que este trabalho forneceu dados que podem auxiliar na busca por substâncias que contribuam no tratamento de acidentes ofídicos.

REFERÊNCIAS

- 1 HOEHNE, F. C. **Flora brasílica**: Aristolochiaceae. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1942. v. 15, pt. 2, p. 1-141.
- 2 BREMER, B. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399-436, 2003.
- 3 QIU, Y-L. et al. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 404-407, 1999.
- 4 WANKE, S. et al. Evolution of Piperales-*matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.
- 5 GONZÁLEZ, F. A.; STEVENSON, D. W. A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 26, p. 25-60, 2002.
- 6 KELLY, L. M.; GONZÁLEZ, F. Phylogenetic relationships in Aristolochiaceae. **Systematic Botany**, v. 28, n. 2, p. 236-249, 2003.
- 7 LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.
- 8 DE 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, n. 7, p. 735-742, 2006.
- 9 SILVA, T. da; LOPES, L. M. X. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 929-937, 2006.
- 10 NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 8, p. 953-957, 2003.
- 11 NAVICKIENE, H. M. D.; LOPES, L. M. X. Alkamides and phenethyl derivatives from *Aristolochia gehrtii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 467-472, 2001.

- 12 FRANCISCO, C. S. et al. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 168-175, 2008.
- 13 MIX, D. B.; GUINAUDEAU, H.; SHAMMA, M. The Aristolochic acids and aristolactams. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 657-666, 1982.
- 14 TIAN-SHUNG, W. et al. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. In: RAHMAN, A-U. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. New York: Elsevier, 2005. v. 32, cap. 12, p. 855-1018.
- 15 KUMAR, V. et al. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 6, p. 565-583, 2003.
- 16 PRIESTAP, H. Seven aristolactams from *Aristolochia argentina*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 849-852, 1985.
- 17 TERUNA, H. Y.; WATERMAN, P. G. Alkaloids from the stem bark of *Orophea hexandra* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 7, p. 454-455, 2007.
- 18 CHEN, Y-C. et al. A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. **Planta Medica**, v. 70, n. 2, p. 174,177, 2004.
- 19 KIM, S. R. et al. Aristolactam BII of *Saururus chinensis* attenuates glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures probably by inhibiting nitric oxide production. **Planta Medica**, v. 70, n. 5, p. 391,396, 2004.
- 20 CHOI, Y. L. et al. Synthesis of aristolactam analogues and evaluation of their antitumor activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 11, p. 3036-3040, 2009.
- 21 ZHANG, J. et al. Selectively preparative purification of aristolochic acids and aristolactams from *Aristolochia* plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 446-451, 2010.
- 22 COUTURE, A. et al. Synthesis and biological evaluation of aristolactams. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 24, p. 3557-3559, 2002.
- 23 MEI, N. et al. DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver. **Mutation Research**, v. 602, n. 1-2, p. 83-91, 2006.

- 24 JOU, J. H. et al. Analysis of the analogues of aristolochic acid and aristolactam in the plant of *Aristolochia* genus by HPLC. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, n. 1, p. 40-45, 2004.
- 25 LEE, H. S.; HAN, D. S. A new acylated N-glycosyl lactam from *Aristolochia contorta*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 9, p. 1165-1169, 1992.
- 26 LIN, W-H. et al. Alkaloids from the roots of *Aristolochia Triangularis* (I). **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 8-13, 1997.
- 27 RAMIREZ-CHAVEZ, E. et al. Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 134, n. 3, p. 1058-1068, 2004.
- 28 KANG, K. et al. Production of plant-specific tyramine derivatives by dual expression of tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase and 4-coumarate:coenzyme A ligase *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1469-1475, 2009.
- 29 BASSARD, J-E. et al. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. **Phytochemistry**, v. 71, n. 16, p. 1808-1824, 2010.
- 30 ZACARÉS, L. et al. Induction of *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 11, p. 1439-1448, 2007.
- 31 NEWMAN, M-A. et al. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in Pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by *hrp* Gene-Dependent and *hrp* Gene-Independent mechanisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 6, p. 785-792, 2001.
- 32 OHI-TOMA, T. et al. Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. **Systematic Botany**, v. 31, n. 3, p. 481-492, 2006.
- 33 CARNEIRO, M. R. B. **A flora medicinal no centro oeste do Brasil**: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás. 2009. 243 f. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente, Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, 2009.
- 34 LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. 640 p.

- 35 ADLER, V. E.; JACOBSON, M. Evaluation of selected natural and synthetic products as house fly repellents. **Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering**, v. 17, n. 5, p. 667-673, 1982.
- 36 LOPES, L. M. X. 8-benzylberbine alkaloids from *Aristolochia gigantea*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 4005-4009, 1992.
- 37 AHUMADA, L. Z. Aristoloquíaceas. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1975. p. 1-55.
- 38 NASCIMENTO, D. S. D.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. A família Aristolochiaceae Juss. no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 414-422, 2010.
- 39 CORTES, D. et al. Nouveaux alcaloïdes Bis-benzylisoquinoleiques isolés des feuilles de *Aristolochia gigantea*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 5, p. 910-914, 1987.
- 40 LOPES, L. M. X.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Isolamento e identificação de alcalóides por CLAE-RMN. In: ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RMN, 5., 1995, Angra dos Reis. **Anais...** [S. l.; s. n.], 1995. v. 5, p. 107-109.
- 41 LOPES, L. M. X.; HUMPFER, E. 8-benzylberbine and N-oxide alkaloids from *Aristolochia gigantea*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 431-435, 1997.
- 42 LEITÃO, G. G. et al. Essential oils from Brazilian *Aristolochia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 6, p. 403-408, 1991.
- 43 JUNG, Y-J. et al. Salsolinol, a naturally occurring tetrahydroisoquinoline alkaloid, induces DNA damage and chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster lung fibroblast cells. **Mutation Research**, v. 474, n. 1-2, p. 25-33, 2001.
- 44 LIU, W. et al. Effects of higenamine on regulation of ion transport in Guinea pig distal colon. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 3, p. 244-251, 2000.
- 45 PISTELLI, L. Aristolochiaceae. In: AVALOS, J.; MAIBACH, H. I. **Dermatologic botany**. New York: CRC Press LLC, 2000. Cap. 19. Disponível em: <www.crcnetbase.com/doi/pdf/10.1201/9781420048391.ch19>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- 46 MEENATCHISUNDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; MICHAEL, A. Studies on antivenom activity of *Andrographis paniculata* and *Aristolochia indica* plant extracts against *Daboia russelli* venom by *in vivo* and *in vitro* methods. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 4, p. 76-79, 2009.

- 47 BRASIL. Ministério da Saúde. **Textos básicos de saúde**: cadernos de atenção básica. Brasília-DF, 2009.
- 48 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**: acidentes por animais peçonhentos. Brasília-DF, 2008.
- 49 CARDOSO, J. L. C.; FRANCA, F. O. D. S.; WEN, F. H. **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. 540 p.
- 50 GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.
- 51 CAMILLO, M. A. P. **Contribuição ao estudo das gioxinas (enzimas semelhantes à trombina) dos venenos das serpentes brasileiras *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus***. 1998. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade São Paulo, São Paulo, 1998.
- 52 FLETCHER, J. E.; JIANG, M-S. Lys49 phospholipase A₂ myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1549-1555, 1998.
- 53 CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.
- 54 MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 146-156, 2000.
- 55 MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.
- 56 BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.
- 57 CASTRO, R. C. D. **Mecanismo de ação de fosfolipases A₂ secretadas na reação antiinflamatória aguda**. 1998. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- 58 DE MARIA, L. et al. Phospholipases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 235-235, 2007.

- 59 SANTOS, P. M.; PROVAZI, M.; SOUZA, G. B. D. Determinação de atividade de protease em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. **Comunicado Técnico - Embrapa**, v. 62, p. 1-5, 2005.
- 60 CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.
- 61 SANG, S. et al. A phenylpropanoid glycoside from *Vaccaria segetalis*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 569-571, 1998.
- 62 BLANC, M-C.; BRADESI, P.; CASANOVA, J. Enantiomeric differentiation of acyclic terpenes by ^{13}C NMR spectroscopy using the chiral lanthanide shift reagent. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 176-179, 2005.
- 63 CANE, D. E. et al. The synthesis of (3R)-nerolidol. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 52, p. 7553-7554, 1990.
- 64 SUAREZ, L. E. C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F. D. Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 339-344, 2002.
- 65 NAKABAYASHI, R. et al. Metabolomics-oriented isolation and structure elucidation of 37 compounds including two anthocyanins from *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 8, p. 1017-1029, 2009.
- 66 NES, W. D.; NORTON, R. A.; BENSON, M. Carbon-13 nmr studies on sitosterol biosynthesized from ^{13}C mevalonates. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 805-811, 1992.
- 67 RAO, C. B. C. **Chemistry of lignans**. Waltair: Andhra University Press Pradesh, 1978. 213 p.
- 68 LATIP, J.; HARTLEY, T. G.; WATERMAN, P. G. Lignans and coumarins metabolites from *Melicopehayesii*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 1, p. 107-110, 1999.
- 69 NGUYEN, K. C.; WEIZMAN, H. Greening Wittig reactions: solvent-free synthesis of ethyl *trans*-cinnamate and *trans*-3- (9-Anthryl)-2-propenoic acid ethyl ester. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 1, p. 119-121, 2007.
- 70 HANAI, K. et al. A comparative vibrational and NMR study of *cis*-cinnamic acid polymorphs and *trans*-cinnamic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, n. 3, p. 513-519, 2001.

- 71 MA, J.; JONES, S. H.; HECHT, S. M. Phenolic acid amides: a new type of DNA strand scission agent from *Piper caninum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 14, p. 3885-3889, 2004.
- 72 CUTILLO, F. et al. Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seeds germination and plant growth. **Phytochemistry**, v. 64, n. 8, p. 1381-1387, 2003.
- 73 CHANG, Y-C. et al. Alkaloids from *Lindera glauca*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 48, p. 811-815, 2001.
- 74 CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University, 2001. 1490 p.
- 75 HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and alkalamides of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9462-9472, 2010.
- 76 ZHANG, Y. T.; JIANG, J. Q. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, n. 11, p. 2665-2670, 2006.
- 77 LEU, Y-L. et al. The constituents of the stem and roots of *Aristolochia foveolata*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, p. 539-541, 1998.
- 78 BJØRØY, Ø. et al. C-glycosylanthocyanidins synthesized from C-glycosylflavones. **Phytochemistry**, v. 70, n. 2, p. 278-287, 2009.
- 79 STOŠIĆ, D. I. et al. Nouveaux flavonosides de *Paeonia tenuifolia* L. **Helvetica Chimica Acta**, v. 71, n. 2, p. 348-353, 1988.
- 80 CHEN, J-H. et al. Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 1, p. 3-5, 2009.
- 81 LEE, M-Y. et al. Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 474-480, 2010.
- 82 BERGERON, C. et al. Isolation of polyphenols from *Polygala gazensis* and liquid chromatography-mass spectrometry of related African *Polygala* Species. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 1, p. 32-36, 1997.
- 83 ROJAS, S. et al. Calmodulin Inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*¹. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 221-224, 2003.

- 84 MacRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1207-1220, 1984.
- 85 GARCEZ, F. R. et al. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. **Planta Medica**, v. 71, n. 10, p. 923-927, 2005.
- 86 RAIMUNDO, J. M. et al. The lignan eudesmin extracted from *Piper truncatum* induced vascular relaxation via activation of endothelial histamine H₁ receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 606, n. 1-3, p. 150-154, 2009.
- 87 SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p. 46-49, 2004.
- 88 SHEN, Y. et al. Chemistry and bioactivity of *Flos Magnoliae*, a chinese herb for rhinitis and sinusitis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1616-1627, 2008.
- 89 YOKOZAWA, T. et al. Protective role of Coptidis Rhizoma alkaloids against peroxynitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 367-374, 2005.
- 90 HUNG, T. M. et al. Protective effect of Magnoflorine isolated from Coptidis Rhizoma on Cu²⁺-induced oxidation of human low density lipoprotein. **Planta Medica**, v. 73, n. 12, p. 1281-1284, 2007.
- 91 TRINGALI, C. et al. Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 538-543, 2001.
- 92 KIM, Y. et al. Inhibitory phenolic amides on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells from *Beta vulgaris* var. *cicla* seeds. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 983-985, 2003.
- 93 KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **British Journal of Anaesthesia**, v. 74, n. 3, p. 319-327, 1995.
- 94 BIONDO, R. et al. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Reports**, v. 22, n. 8, p. 549-552, 2004.