UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

Estudo químico da fração hidroalcoólica de sementes de *Aristolochia gigantea* (Aristolochiaceae)

ARARAQUARA
2019

GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

Estudo químico da fração hidroalcoólica de sementes de *Aristolochia gigantea* (Aristolochiaceae)

Monografia apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Isabele R. Nascimento

Araraquara

2019

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre me apoiarem e me incentivarem a seguir os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre me apoiar e me incentivar a seguir os meus sonhos. Por todo amor e carinho, pelos conselhos e por sempre apoiar as minhas escolhas, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, pela oportunidade de poder realizar esse trabalho, por toda dedicação e paciência que teve para me orientar e por me incentivar a sempre oferecer o meu melhor.

À doutoranda Camila Cunha, por toda paciência e carinho que você teve para me ensinar, por todos os conselhos e risadas que dividimos e pelo laço de amizade que desenvolvemos durante esse período que trabalhamos juntas.

Aos meus amigos Mayara, Thais, Flávia, Jessica, Larissa, Luiza e Thales, por todos os momentos felizes e também por todos os perrengues que passamos, eu não conseguiria ter chegado até aqui sem a amizade de vocês.

Aos meus colegas de laboratório por todo o aprendizado e momentos divertidos que compartilhamos no laboratório.

A todos funcionários do Instituto de Química por estarem sempre de prontidão para nos auxiliarem no que for preciso.

Ao Instituto de Química, pelo fornecer o espaço e todo o suporte indispensável para a realização deste trabalho.

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

RESUMO

As espécies do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) são conhecidas na medicina popular por serem abortivas, antiofídicas, estomáquicas, anti-inflamatórias, antiasmáticas, antissépticas, expectorantes, sedativas, depurativas, e por ajudarem no emagrecimento. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar os constituintes químicos presentes na fração hidroalcoólica das sementes de *Aristolochia gigantea*. A fração foi submetida à Cromatografia em Coluna usando Sephadex LH-20 e metanol, o que resultou em doze frações e, posteriormente, no isolamento de quatro substâncias. As estruturas dessas substâncias foram determinadas através experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni (^{1}H, ^{13}C) e bidimensionais (HSQC e HMBC) e a configuração absoluta foi atribuída através da medida da rotação específica. No final identificou-se duas lignanas (kobusina e eudesmina), alantoína e um sal inorgânico (KNO_3).

Palavras-chave: *Aristolochia gigantea*, sementes, lignanas.

ABSTRACT

The species of *Aristolochia* genus (Aristolochiaceae) are known in folk medicine for being abortifacients, antiophidics, stomachics, anti-inflammatories, antiasthmatics, antiseptics, expectorants, sedatives, and in slimming therapies. The aim of this work was to isolate and identify de chemical constituents of the hydroalcoholic fraction from the seeds of *Aristolochia gigantea*. The fractions were submitted to Column Chromatography using Sephadex LH-20 and methanol, led to twelve fractions and the isolation of four compounds. The structures of the compounds were determined by 1D (^{1}H, ^{13}C) and 2D (HSQC e HMBC) NMR techniques and the absolute configuration was attributed by the measurement of the specific rotation. As a result, two lignans (kobusin and eudesmin), alantoine and an inorganic salt (KNO_3) were identified.

Keywords: *Aristolochia gigantea*, seeds, lignans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Aristolochia gigantea* 12
Figura 2: Envoltório e sementes de *A. gigantea* 12
Figura 3: Substâncias isoladas de folhas, rizomas e ramos de *Aristolochia gigantea.* 13
Figura 4: Preparo e fracionamento do extrato bruto. 18
Figura 5: Separação da fração hidroalcoólica das sementes de *A. gigantea* .. 20
Figura 6: Espectros de RMN de ^{1}H da fração hidroalcoólica (DMSO-d_6,14,1 T) e da fração hexânica ($CDCl_3$, 14,1 T) 22
Figura 7: Substâncias isoladas (**1**-**4**). 23
Figura 8: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T) 24
Figura 9: Espectro ampliado de DEPTQ de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T) 25
Figura 10: Mapa de contornos HSQC de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T) 25
Figura 11: Mapa de contornos HMBC de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T). 26
Figura 12: Estrutura de lignanas 27
Figura 13: Configurações relativas de lignanas tetrahidrofurofurânicas com base nos intervalos de deslocamento químico para H-7 e H-7'. 28
Figura 14: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H de **1** e **2** (DMSO-d_6, 14,1 T) 29
Figura 15: Mapa de contornos HSQC de **1** e **2** (DMSO-d_6, 14,1 T) 30
Figura 16: Correlações observadas no mapa de contorno HMBC para a estrutura **2** 31
Figura 17: Mapa de contornos HMBC de **1** e **2** (DMSO-d_6, 14,1 T). 31
Figura 18: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H de **3** ($CDCl_3$, 14,1 T) 33
Figura 19: Reações redox da difenilamina em presença de nitrato. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **1** (DMSO-d_6, J = Hz, 14,1 T) 27
Tabela 2: Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **2** (DMSO-d_6, J = Hz, 14,1 T) 32
Tabela 3: Dados de RMN de ^{1}H de **3** ($CDCl_3$, 14,1 T) 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	Dupleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
dd	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC	*Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy*
J	Constante de acoplamento
m	Multipleto
MeOH	Metanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

1.1 *Aristolochia gigantea* 12

2 OBJETIVOS 15

2.1 Objetivo geral 15

2.2 Objetivos específicos 15

3 PARTE EXPERIMENTAL 16

3.1 Solventes 16

3.2 Análises cromatográficas 16

3.3 Equipamentos 16

3.4 Coleta e identificação do material vegetal 17

3.5 Preparo dos extratos vegetais 17

3.6 Separação da fração hidroalcoólica 18

3.7 Testes qualitativos 21

3.7.1 Teste de chama 21

3.7.2 Prova de potássio 21

3.7.3 Prova de nitrato 21

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 22

4.1 Triagem das frações do extrato vegetal 22

4.2 Análise da fração hidroalcoólica 23

4.3 Alantoína 24

4.4 Lignanas 27

4.4.1 Kobusina 28

4.4.2 Eudesmina 32

4.5 Testes qualitativos 34

5 CONCLUSÃO 36

REFERÊNCIAS 37

1 INTRODUÇÃO

A família Aristolochiaceae contempla aproximadamente 600 espécies de plantas, cuja distribuição é predominante nas regiões tropicais e subtropicais do planeta.[1,2] Ela está dividida em quatro gêneros: *Aristolochia L.*, *Asarum L.*, *Saruma Oliv.* e *Thottea Rottb*. O gênero *Aristolochia* é o mais expressivo da família com cerca de 550 espécies,[1] sendo que no Brasil se encontram cerca de 92 espécies catalogadas.[3] A família Aristolochiaceae é constituída basicamente por trepadeiras, podendo também ser encontradas como arbustos e ervas, porém em menores quantidades.[1]

O amplo uso das espécies da família Aristolochiaceae na medicina tradicional e homeopática gera o interesse pelos estudos fitoquímicos, uma vez que são utilizadas como analgésicas, estomáquicas, anti-inflamatórias, antiofídicas, sedativas, diuréticas, emenagogas, abortivas, expectorantes, antiasmáticas, antidiarreicas, além de serem utilizadas no tratamento de feridas e de alguns tipos de câncer.[4,5,6]

Os estudos fitoquímicos realizados nas últimas décadas utilizando espécies da família Aristolochiaceae permitiram isolar e identificar cerca de 700 substâncias, sendo metabólitos secundários como lignanas, aristolactamas, ácidos aristolóquicos, além de flavonoides, terpenoides, esteroides, ácidos graxos, cumarinas, saponinas e derivados fenólicos que apresentam diversas atividades biológicas relatadas na literatura.[7,8,9]

As espécies do gênero *Aristolochia* também tem sido foco de estudos na área da saúde devido a descoberta da relação dos ácidos aristolóquicos I e II com a incidência de câncer urotelial do trato urinário superior (CCT-TUS) na Ásia e devido a sua nefrotoxicidade, uma vez que são responsáveis por causar nefrite intersticial em pessoas que consomem plantas medicinais contendo esses dois ácidos aristolóquicos.[10,11]

Dentre as espécies do gênero *Aristolochia*, somente três apresentam registros de estudos fitoquímicos de suas sementes na literatura, sendo elas *A. bracteata*, *A. baetica* e *A. indica*. Os estudos das sementes de *A. bracteata* resultaram no isolamento do ácido aristolóquico I e magnoflorina, cujo efeito de diminuir a pressão sanguínea arterial foi reportado na literatura.[12] A partir de estudos dos óleos de

sementes de *A. bracteata* e *A. indica* foram isolados ácidos graxos, como o ácido oleico, o ácido linoleico e o ácido palmítico.[13,14] Os estudos das sementes de *A. baetica* levaram ao isolamento dos ácidos aristolóquicos I e II, e das aristolactamas I e IIIa.[15]

1.1 *Aristolochia gigantea*

Na flora brasileira a espécie *Aristolochia gigantea* (Figura 1) pode ser encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná.[3] É conhecida pelos nomes populares papo-de-peru, jarra-açu, cipó-mil-homens, jarrinha, papo-de-peru-babada e papo-de-peru-grande.

Figura 1: *Aristolochia gigantea*



Fonte: Foto obtida por Camila L. Cunha.

As sementes de *Aristolochia gigantea* se encontram em um envoltório produzido pela planta (Figura 2).

Figura 2: Envoltório e sementes de *A. gigantea*

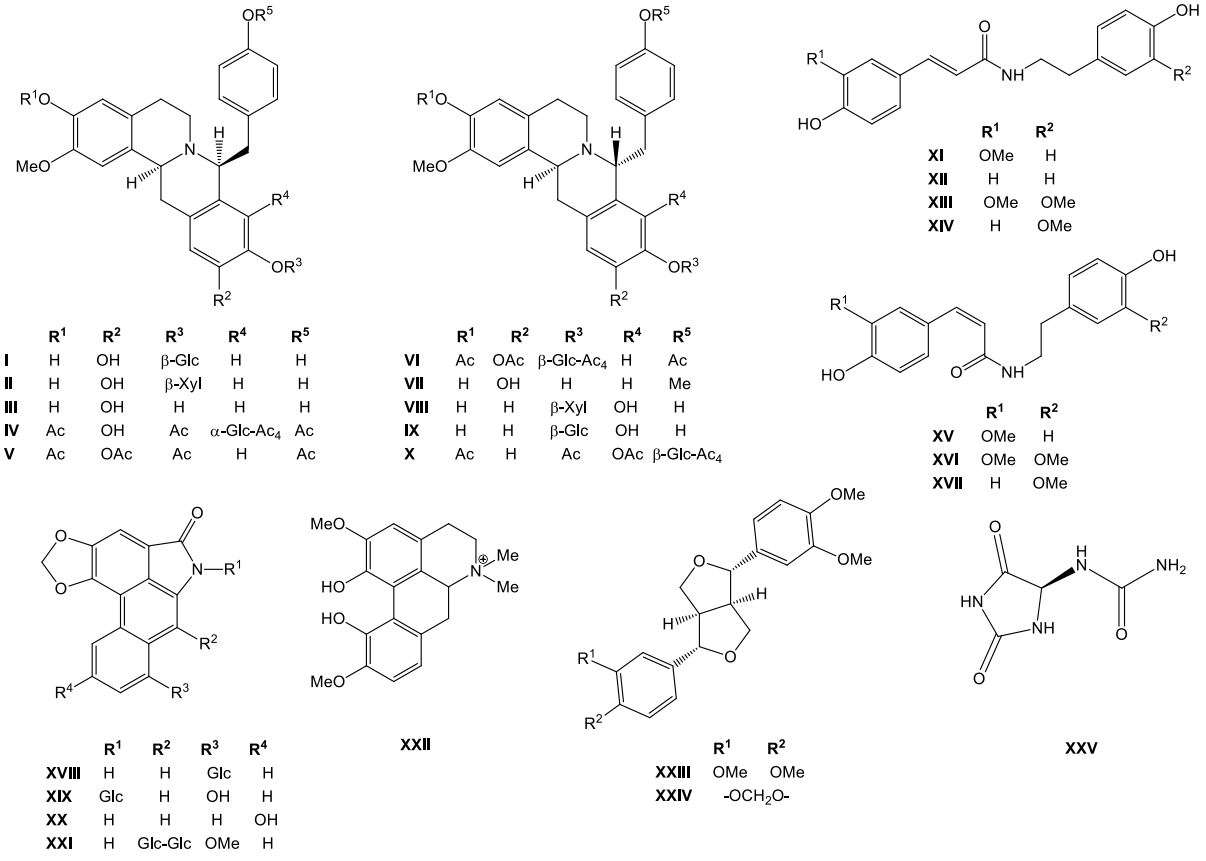


Fonte: Foto obtida por Camila L. Cunha.

Aristolochia gigantea é usada popularmente para o tratamento de doenças de pele e de feridas, como abortiva, como antiofídica e também pode ser utilizada de maneira ornamental.[16]

Algumas das substâncias isoladas a partir de folhas, rizomas e ramos de *Aristolochia gigantea* são alcaloides 8-benzilberbínicos (**I-X**), alcamidas (**XI-XVII**), aristolactamas (**XVIII-XXI**), magnoflorina (**XXII**), lignanas tetraidrofurofurânicas (**XXIII, XXIV**) e alantoína (**XXV**) (Figura 3).[16,17] Dentre essas substâncias isoladas, as que apresentam atividades biológicas evidenciadas são a aristolactama IIIa (**XX**) com atividade anti-inflamatória, as lignanas tetrahidrofurofurânicas (+)-eudesmina (**XXIII**) e (–)-kobusina (**XXIV**), com atividades antiespasmódica e antialérgica, respectivamente.[7] Também foi isolada alantoína (**XXV**), que é muito utilizada na indústria farmacêutica devido as suas propriedades cicatrizante, queratolítica e hidratante.[18]

Figura 3: Substâncias isoladas de folhas, rizomas e ramos de *Aristolochia gigantea*.



Embora existam diversos estudos químicos de folhas, rizomas e ramos da espécie *Aristolochia gigantea*, não se encontram estudos referentes ao potencial químico e biológico das sementes dessa espécie na literatura. Sendo assim, esse trabalho procura contribuir com a análise e prospecção química dos constituintes presentes em sementes de *Aristolochia gigantea.*

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Colaborar com o conhecimento químico da espécie *Aristolochia gigantea* (Aristolochiaceae).

2.2 Objetivos específicos

Efetuar a separação dos constituintes químicos presentes no extrato hidroalcoólico de sementes de *Aristolochia gigantea* por técnicas cromatográficas (CLAE-DAD) e identificar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas (RMN de ^{1}H e de ^{13}C uni e bidimensionais) e testes químicos qualitativos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Solventes

Os solventes utilizados nos métodos cromatográficos em grau HPLC foram das marcas LiChrosolv e J.T.Baker®. Já os solventes deuterados empregados nas análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), $CDCl_3$ (pureza ≥ 99,8% para D) e DMSO-d_6 (pureza de 99,9% para D), foram da marca Sigma-Aldrich™.

3.2 Análises cromatográficas

Para as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) realizou-se extrações em fase sólida das amostras com cartuchos Macherey-Nagel C18 ec (3,0 mL; 500 mg, Chromabond®) e posterior filtração em microfiltro de PVDF (13 mm; 0,22 µm, Exacta®).

Foi realizada a triagem dos extratos e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa de vidro coberta por sílica gel 60 Å (40-63 µm, Sigma-Aldrich®).

3.3 Equipamentos

Utilizou-se o cromatógrafo JASCO® com controlador LC-Net II/ADC, injetor automático AS-2055 Plus, bomba PU-2086 Plus, detector de arranjo de fotodiodos MD-2018 Plus e detector de dicroísmo circular CD-2095 para a execução das análises de amostras por CLAE.

Nas análises por CLAE em escala analítica foi utilizada uma coluna C-18 ODS (Zorbax RX-C18, 4,6 × 250 mm, 5 µm, Agilent®). Já nas análises em escalla semi-preparativa foi empregada uma coluna C18 ODS (Zorbax RX-C18, 9,4 × 250 mm, 5 µm, Agilent®).

Os espectros de RMN unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional (HSQC e HMBC) foram obtidos em um espectrômetro Bruker, modelo Avance III HD 600 (14,1 T), com frequência de 600 MHz para o núcleo de ^1H e de 151 MHz para o ^{13}C.

Todas as análises foram feitas em uma sonda criogênica de 5 mm com detecção inversa e três canais de aquisição (^{1}H, ^{13}C e ^{15}N) na temperatura de 23 °C.

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

3.4 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta das sementes foi realizada no Instituto de Química da UNESP na cidade de Araraquara - SP durante o ano de 2018.

A espécie *Aristolochia gigantea* foi identificada pelo Ms. Joelcio Freitas, doutorando da Universidade Estadual Feira de Santana – UEFS.

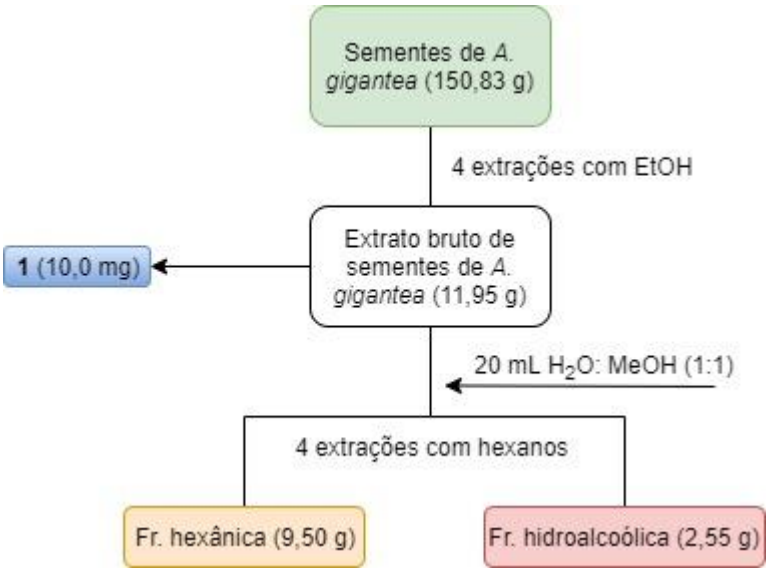
3.5 Preparo dos extratos vegetais

As sementes foram secas em estufa a 45 ºC por 24 horas. Após a secagem, o material foi moído com auxílio de um moinho de facas, obtendo uma massa de 150,83 g. As sementes moídas foram submetidas a extrações utilizando etanol a temperatura ambiente como solvente extrator durante 24 horas para cada extração, totalizando quatro extrações, sendo que cada uma delas utilizou um volume de 635 mL de etanol. Durante o preparo do extrato foi observado a formação de um precipitado branco (10,0 mg), o qual posteriormente foi analisado por RMN uni e bidimensional e identificado como substância **1**. O extrato etanólico bruto foi concentrado sob pressão reduzida e seco em capela de exaustão.

O extrato etanólico bruto (11,95 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido, onde o mesmo foi solubilizado em 20 mL de uma solução hidroalcoólica (água: metanol 1:1) e submetido a quatro extrações com hexanos (4 x 60 mL), dando origem a uma fração hexânica (9,50 g) e a solução remanescente originou a fração hidroalcoólica (2,55 g) (Figura 4).

As frações hexânica e hidroalcoólica foram rotaevaporadas, secas em capela com exaustão e posteriormente submetidas a análise por RMN de ^{1}H.

Figura 4: Preparo e fracionamento do extrato bruto.



3.6 Separação da fração hidroalcoólica

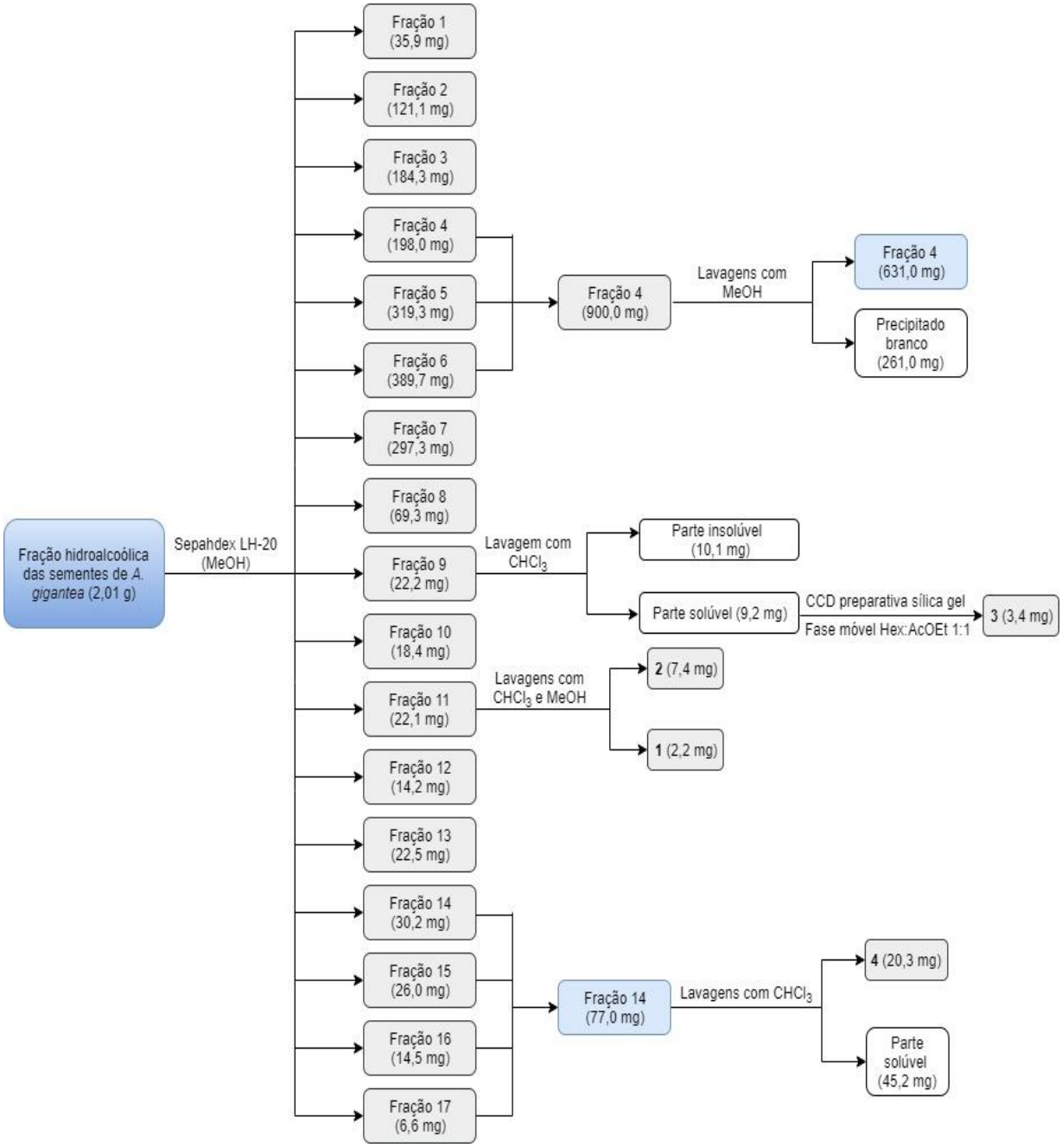
A fração hidroalcoólica (2,55 g) foi solubilizada em 20,0 mL de MeOH e submetida a centrifugação. A parte solúvel (2,01 g) foi então submetida à cromatografia em coluna por exclusão com fase estacionária de Sephadex LH-20 (Φ 2,8 x 72,0 cm) e fase móvel isocrática de MeOH 100%, onde foram coletadas 17 frações. Todas as frações foram submetidas a CLAE em escala analítica e a análises de RMN de ^{1}H para traçar-se o perfil químico. A partir dessas análises foi possível unir as frações 4, 5 e 6, resultando em uma única fração denominada de fração 4 (900,0 mg), uma vez que seus perfis químicos foram muito parecidos. Notou-se a presença de um precitado branco insolúvel em MeOH, de modo que se separou esse precipitado (261,0 mg) da fração 4 (631,0 mg) através de lavagens com MeOH. Uniu-se também as frações 14, 15, 16 e 17 que resultaram na fração 14 (77,0 mg). A fração 14 foi então submetida a lavagens com clorofórmio para separar o precipitado presente nessa, sendo esse precipitado a substância **4** (20,3 mg). Com isso as 17 frações coletadas se tornaram de fato 12 frações.

A fração 9 (22,2 mg) foi lavada com clorofórmio e a parte solúvel (9,2 mg) foi submetida a CCD preparativa em sílica gel utilizando-se uma fase móvel Hex:AcOEt 1:1, onde foram obtidas 12 subfrações. Todas as subfrações foram submetidas a análises de RMN de ^{1}H, onde foi possível identificar a presença da substância **3** (3,4 mg) na subfração 3.

Através da análise dos espectros de RMN de ^{1}H uni e bidimensionais da fração 11 identificou-se que essa era uma mistura 1:1 das substâncias **1** e **2**. Separou-se a substância **1** (2,2 mg) realizando-se lavagens com MeOH, e a substância **2** (7,4 mg) lavando-se a fração 11 com clorofórmio.

Após os procedimentos de isolamento, foram identificadas quatro substâncias (**1**-**4**, Figura 5).

Figura 5: Separação da fração hidroalcoólica das sementes *de A. gigantea*



3.7 Testes qualitativos

3.7.1 Teste de chama

Para esse teste utilizou-se um bico de Bunsen que foi ajustado para a chama de coloração azul. Utilizou-se um fio de platina preso a um bastão de vidro previamente limpo para levar pequenas quantidades do precipitado da fração 14 à chama oxidante, observando-se a coloração produzida.[19]

3.7.2 Prova de potássio

A presença de potássio foi detectada a partir da reação com ácido perclórico.[19] Primeiramente, solubilizou-se o precipitado da fração 14 (3,4 mg) em aproximadamente 2 mL de água destilada. Adicionou-se então três gotas dessa solução em um tubo de ensaio juntamente com cinco gotas de uma solução de ácido perclórico (2,0 mol/L) e uma quantidade de etanol o suficiente para dobrar o volume de solução presente no tubo (oito gotas). O teste é positivo para presença de potássio quando se observa a formação de um precipitado branco.

3.7.3 Prova de nitrato

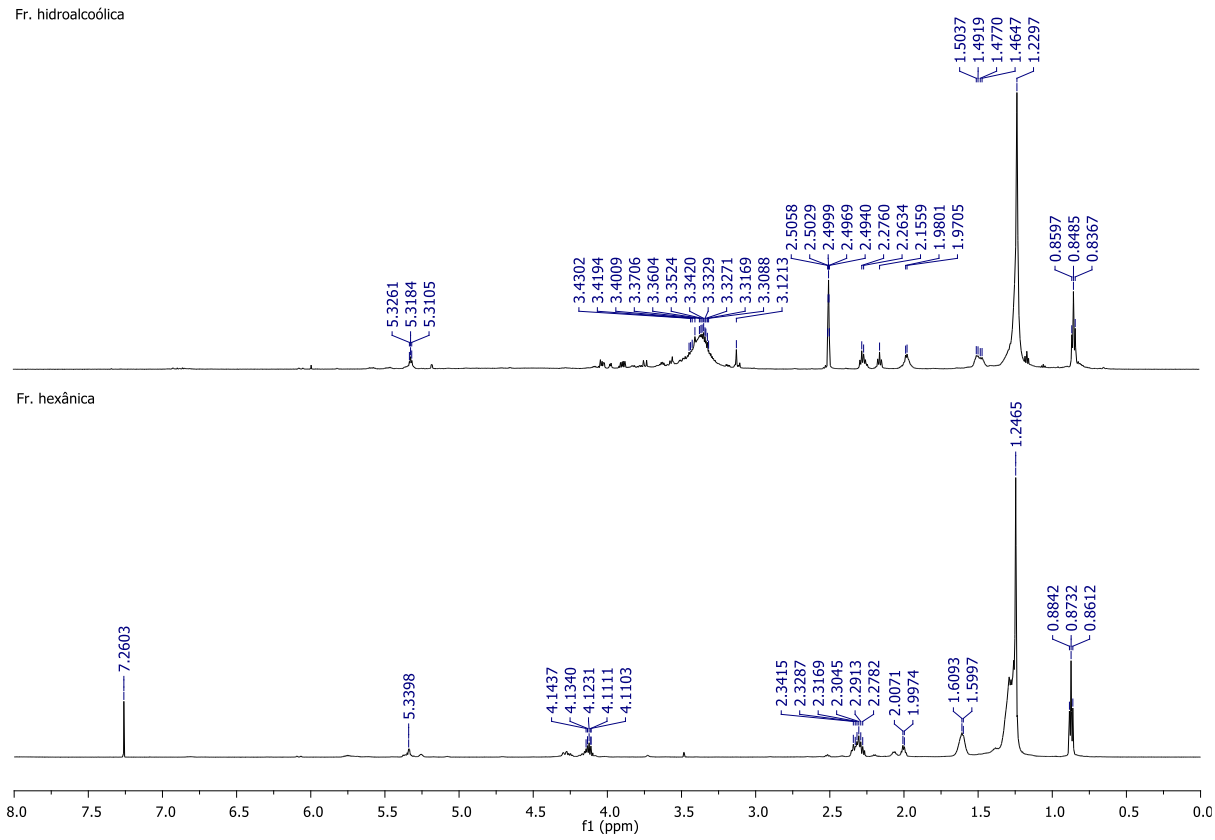
A presença de nitrato foi detectada a partir da reação com difenilamina.[19] Adicionou-se duas gotas da mesma solução preparada para o teste de potássio em um vidro de relógio e em seguida adicionou-se quatro gotas de uma solução de difenilamina em ácido sulfúrico concentrado (0,5 g de difenilamina, 20 mL de água destilada e ácido sulfúrico concentrado em quantidade suficiente para completar 100 mL), observando se houve mudança de coloração. O aparecimento de uma coloração azul escura indica a presença de nitrato na amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem das frações do extrato vegetal

As frações hidroalcoólica e hexânica obtidas do extrato etanólico das sementes de *A. gigantea* foram submetidas a testes de solubilidade e analisadas por RMN de ^{1}H (Figura 6) e CCD. Foram observados, em ambas as frações, sinais na região de hidrogênios aromáticos, hidrogênios metoxílicos, hidrogênios carbinólicos, hidrogênios carbinólicos benzílicos e hidrogênios metínicos. No entanto, a fração hidroalcoólica apresentou uma maior quantidade de sinais nessas regiões. Levando em consideração tanto a solubilidade como a separação das substâncias por CCD, além do aspecto espectral, a fração hidroalcoólica foi escolhida para dar início aos estudos químicos.

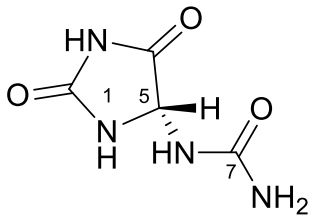
Figura 6: Espectros de RMN de ^{1}H da fração hidroalcoólica (DMSO-d_6,14,1 T) e da fração hexânica ($CDCl_3$, 14,1 T)



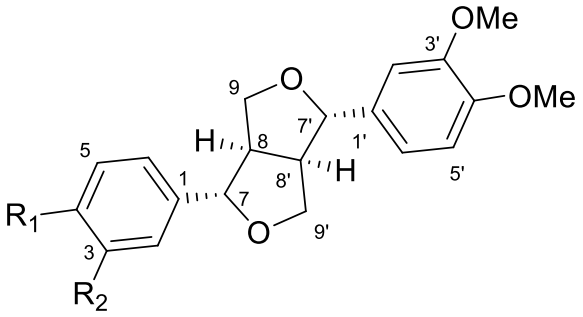
4.2 Análise da fração hidroalcoólica

Após a triagem das frações, prosseguiu-se com o estudo químico da fração escolhida, a fração hidroalcoólica, cuja parte solúvel em MeOH (2,01 g) foi fracionada obtendo-se efetivamente 12 frações. Essas frações foram analisadas por CLAE e RMN de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais o que resultou no isolamento e identificação quatro substâncias sendo elas, alantoína (**1**), kobusina (**2**), eudesmina (**3**) e nitrato de potássio (**4**) (Figura 7). As estruturas das substâncias foram elucidadas por meio dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais e a configuração absoluta foi determinada por meio da medida de rotação específica.

Figura 7: Substâncias isoladas (**1**-**4**).



1

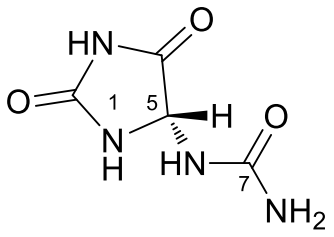


	R_1	R_2
2	$-OCH_2O-$	
3	OMe	OMe

KNO_3

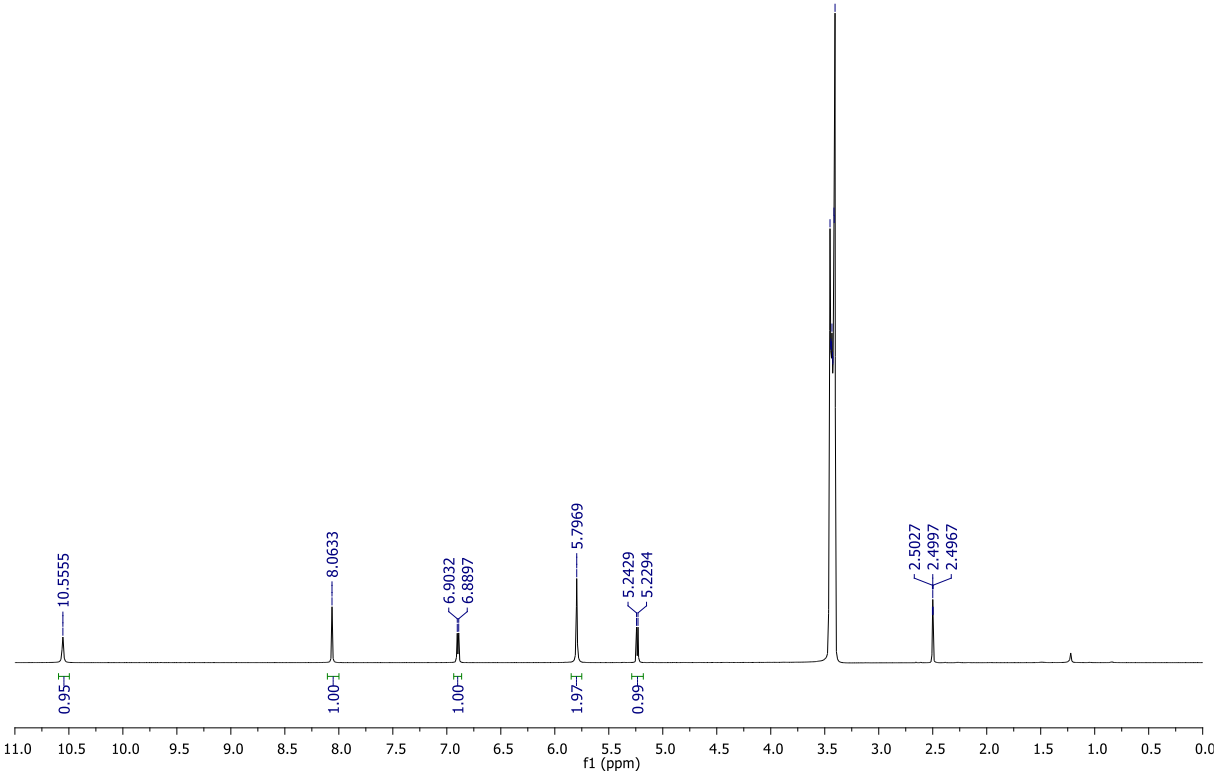
4

4.3 Alantoína



No espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (Figura 8) observou-se sinais na região de alta frequência, sendo três singletos em δ 5,80 (NH_2-8), δ 8,06 (NH-1) e δ10,56 (NH-3); dois dubletos em δ 5,24 (*J* = 8,2 Hz, H-5), referente ao hidrogênio metínico, e outro em δ 6,90 (*J* = 8,2 Hz, NH-6) .

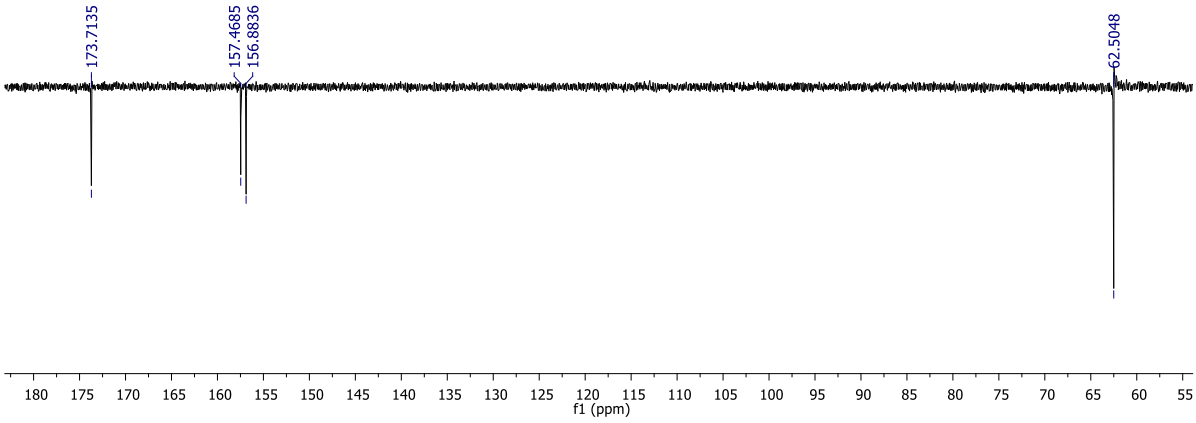
Figura 8: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T)



O experimento de DEPTQ de **1** (Figura 9) apresentou sinais atribuíveis a quatro carbonos. Foi possível observar a presença de três grupos carbonílicos na região de alta frequência (δ 156,9, δ 157,5 e δ 173,7), sendo que o carbono em δ

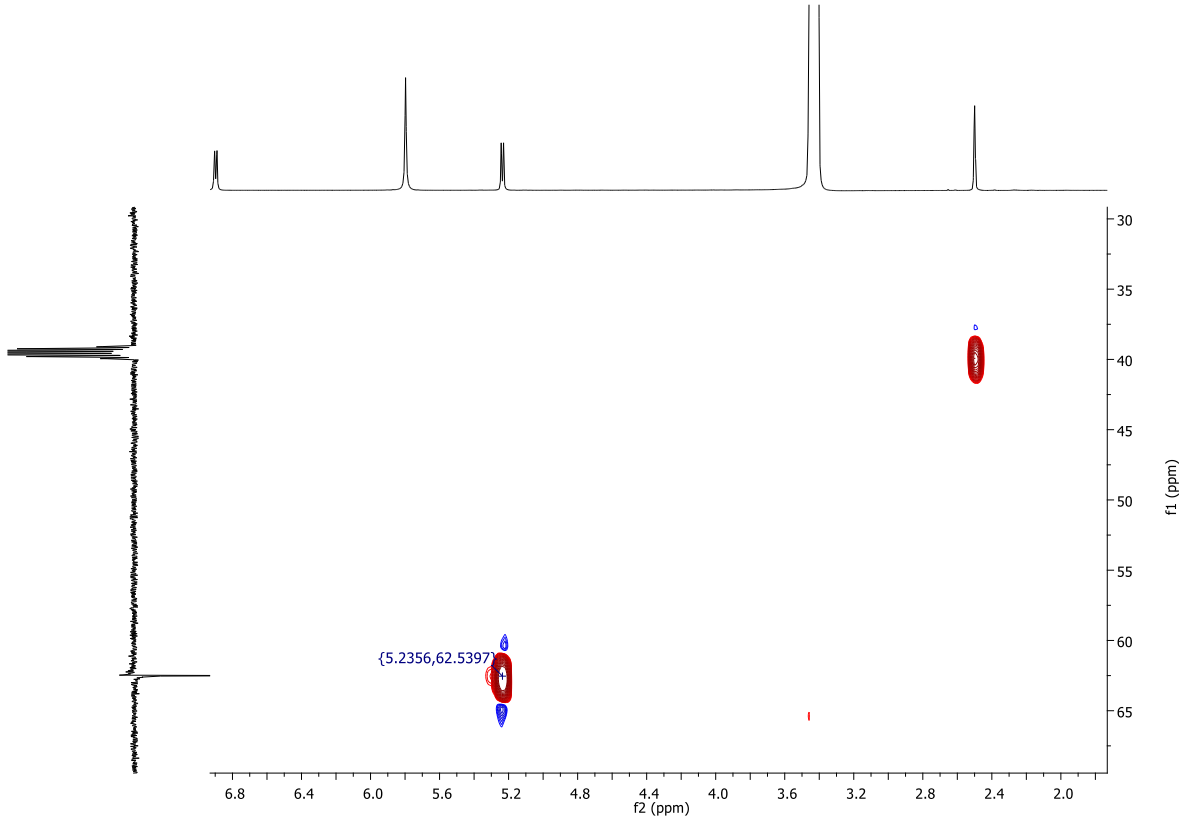
173,7 é mais desblindado. Notou-se também a presença de um carbono metínico ligado a um heteroátomo em δ 62,5.

Figura 9: Espectro ampliado de DEPTQ de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T)



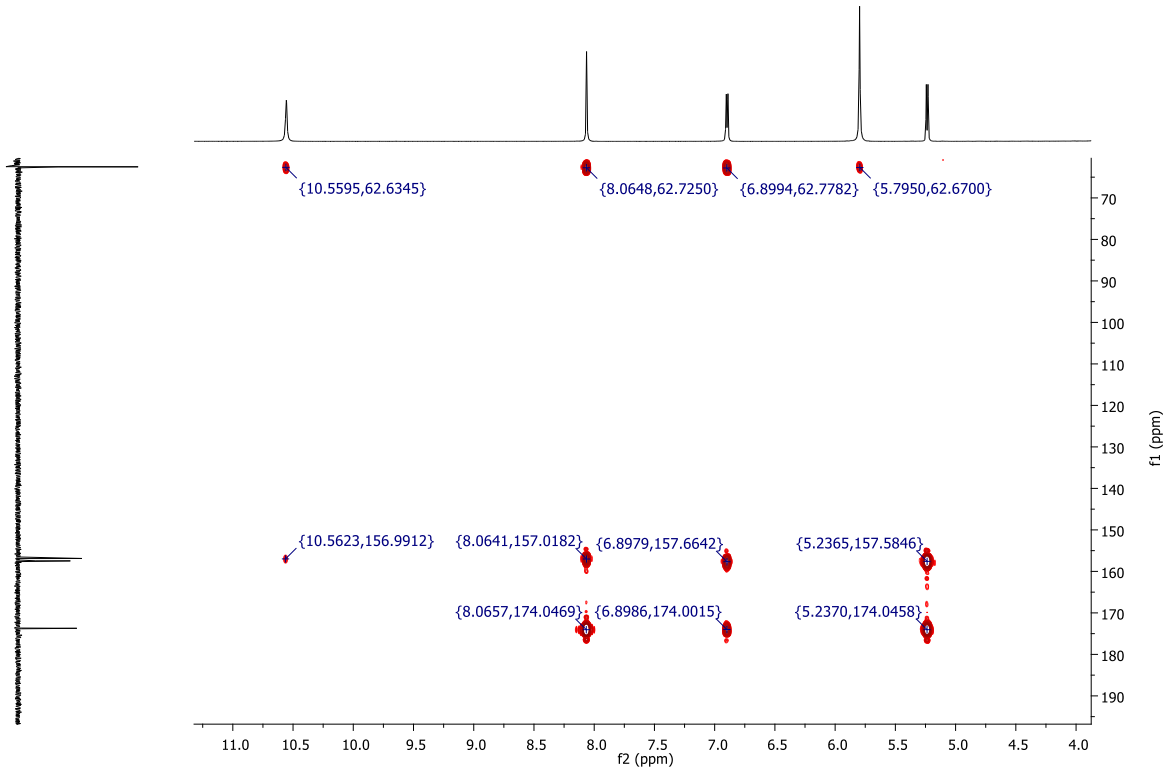
No mapa de contornos HSQC (Figura 10) observou-se uma única correlação entre o hidrogênio H-5 em δ 5,24 e o carbono metínico em δ 62,5.

Figura 10: Mapa de contornos HSQC de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T).



A partir do mapa de contornos HMBC (Figura 11) observou-se as correlações entre e o hidrogênio H-5 em δ 5,24 (*d*, J = 8,0 Hz) e o carbono em δ 174,0 (C-4) e entre o mesmo hidrogênio e o carbono em δ 157,6 (C-7) que permitiram atribuir a posição das carbonilas determinar a estrutura da substância **1**.

Figura 11: Mapa de contornos HMBC de **1** (DMSO-d_6, 14,1 T).



A medida de rotação óptica obtida foi de $[\alpha]_D$ + 3,20 (*c* 0,22; MeOH). Ao comparar os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos experimentalmente com os dados da literatura (Tabela 1) foi possível identificar que a substância **1** é a (+)-(*R*)-alantoína[20], que já foi isolada anteriormente em estudos de folhas, rizomas e ramos de *Aristolochia gigantea*.[16]

A alantoína é conhecida pelas suas propriedades analgésica, cicatrizante, hidratante e removedora de tecido necrótico, sendo muito utilizada na indústria farmacêutica.[21]

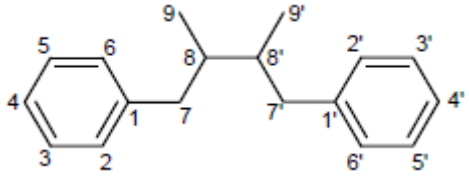
Tabela 1: Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **1** (DMSO-d_6, *J* = Hz, 14,1 T)

Posição	1		Alantoína[20]	
	δc	**δ_H**	**δc**	**δ_H**
1	-	8,06 *s*	-	8,04 *s*
2	156,9	-	156,6	-
3	-	10,56 *s*	-	10,54 *s*
4	174,0	-	173,4	-
5	62,5	5,24 *d* (8,2)	62,2	5,24 *d* (8,2)
6	-	6,90 *d* (8,2)	-	6,89 *d* (8,2)
7	157,6	-	157,2	-
8	-	5,80 *s*	-	5,78 *s*

4.4 Lignanas

As lignanas são uma classe de produtos naturais caracterizadas pela ligação de duas unidades C_6C_3 unidas pelos carbonos C-8 e C-8’ (Figura 12).[22]

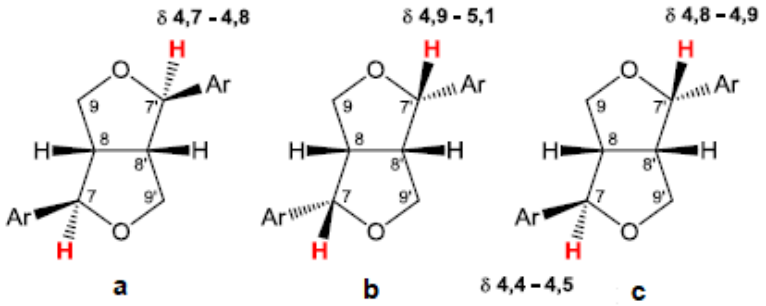
Figura 12: Estrutura de lignanas



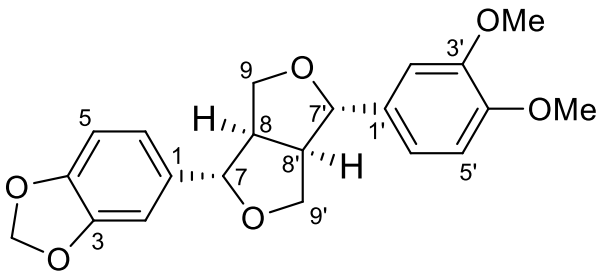
Devido aos diferentes padrões estruturais que as lignanas podem apresentar, elas são divididas em oito classes sendo elas arilnaftaleno, ariltetralina, dibenzociclo-octadieno, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactol, dibenzilbutirolactona, furofurano e furano.[23]

No caso das lignanas tetrahidrofurofurânicas, dependendo da orientação dos substituintes aromáticos ligados aos carbonos C-7 e C-7’ existe uma diferença nos valores de deslocamento químico dos hidrogênios carbinólicos benzílicos H-7 e H-7’ podendo-se assim diferenciar as configurações relativas dessas lignanas (Figura 13).[24]

Figura 13: Configurações relativas de lignanas tetrahidrofurofurânicas com base nos intervalos de deslocamento químico para H-7 e H-7'.



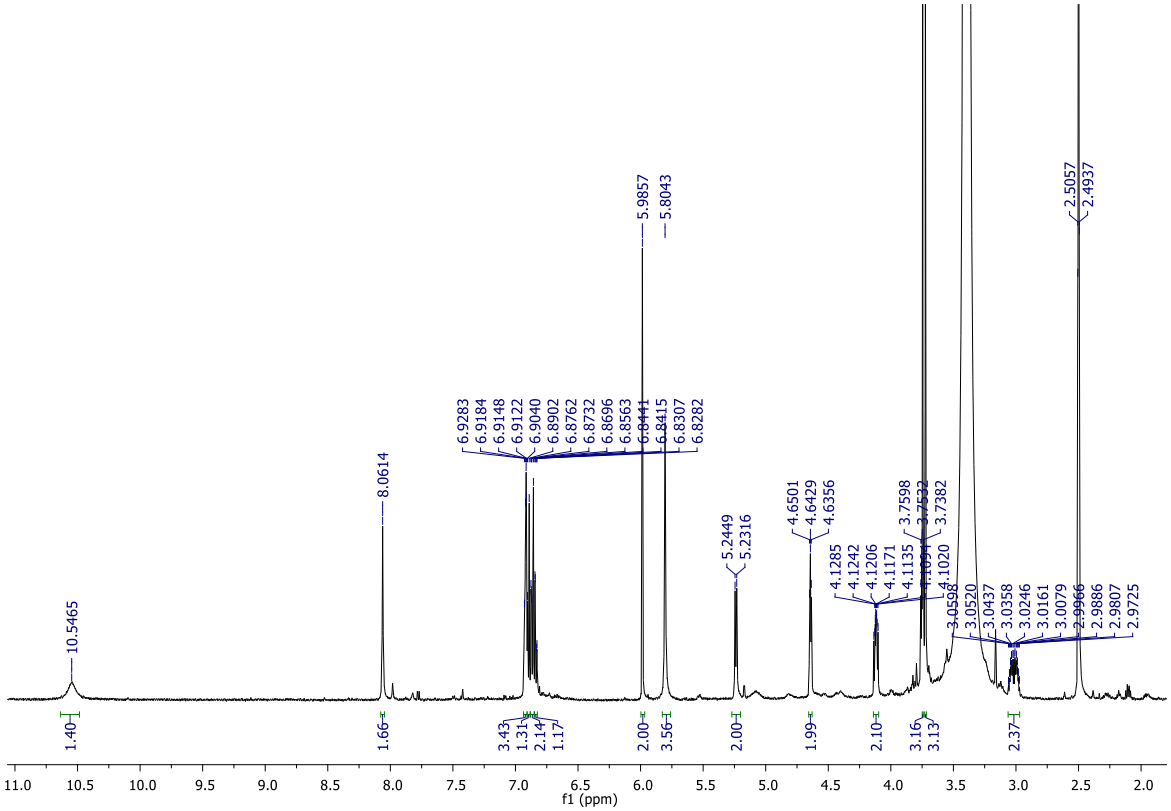
4.4.1 Kobusina



Ao analisar os espectros de RMN uni e bidimensionais da fração 11 chegou-se à conclusão de que essa continha uma mistura das substâncias **1** e **2** na proporção 1:1. Para a substância **2**, observou-se no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 14), a presença de um multipleto em δ 4,64-4,65, referente aos hidrogênios carbinólicos benzílicos H-7 e H-7´, e um multipleto em δ 2,98-3,06 correspondente aos hidrogênios metínicos H-8 e H-8´. Dois multipletos em δ 3,74-3,76 e em δ 4,10-4,14 correspondem aos quatro hidrogênios carbinólicos H-9 e H-9´. Notou-se também um simpleto em δ 5,98, correspondente aos dois hidrogênios metilenodioxílicos, e dois simpletos em δ 3,72 e em δ 3,74 referentes a duas metoxilas aromáticas.

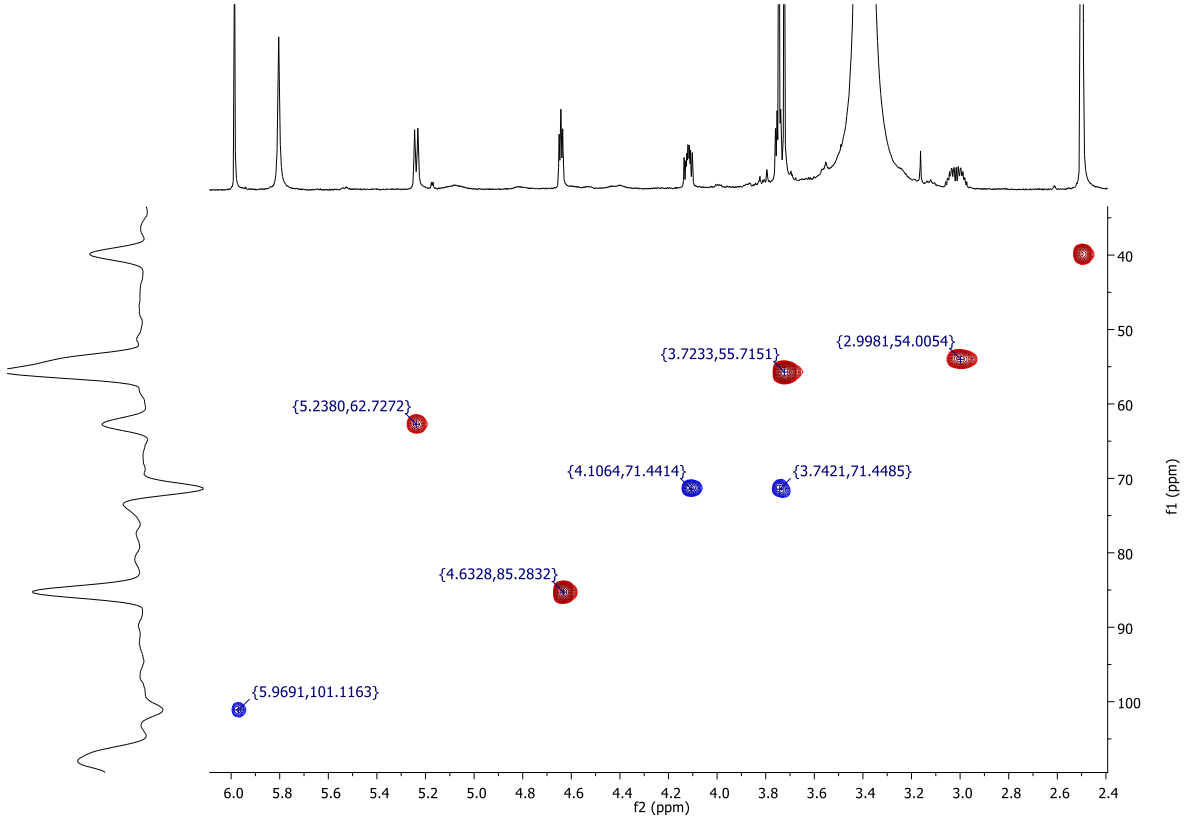
De acordo com os intervalos de deslocamento químicos δ 4,64-4,65 de H-7 e H-7´, a configuração relativa esperada para a lignana **2** é a configuração **a** (Figura 13).

Figura 14: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H de **1** e **2** (DMSO-d_6, 14,1 T)



Observou-se no mapa de contornos HSQC (Figura 15) as correlações entre o hidrogênio em δ 3,72 e o carbono em δ 55,7, confirmando a presença de metoxila aromática, e entre os dois hidrogênios em δ 5,97 com o carbono em δ 101,1, comprovando a presença do substituinte metilenodioxílico no anel aromático.

Figura 15: Mapa de contornos HSQC de **1** e **2** (DMSO-d_6, 14,1 T).



Foram atribuídos os padrões de substituição dos anéis aromáticos da substância **2** (Figura 16) com base em correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC (Figura 17) entre os hidrogênios metoxílicos em δ 3,72 (*s*) e o carbono em δ 148,2 (C-3'), entre os hidrogênios metoxílicos em δ 3,74 (*s*) e o carbono em δ 146,9 (C-4') juntamente com a correlação entre os hidrogênios metilenodioxílicos δ 5,98 (*s*) e os carbono em δ 148,2 (C-3 e C-4). Observou-se também a correlação entre o hidrogênio carbinólico H-9 em δ 3,74-3,76 com o carbono em δ 71,3 (C-7) e entre hidrogênio carbinólico H-9' em δ 4,10-4,14 com o carbono em δ 71,3 (C-7') que confirmaram a presença do anel tetrahidrofurano.

Figura 16: Correlações observadas no mapa de contorno HMBC para a estrutura **2**

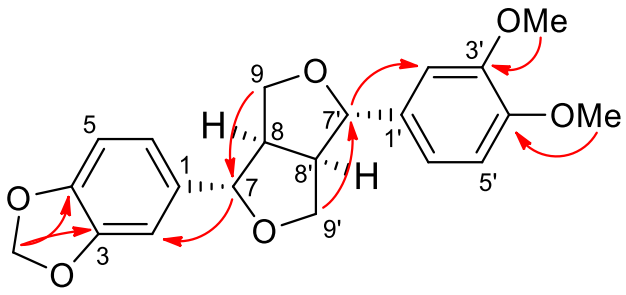
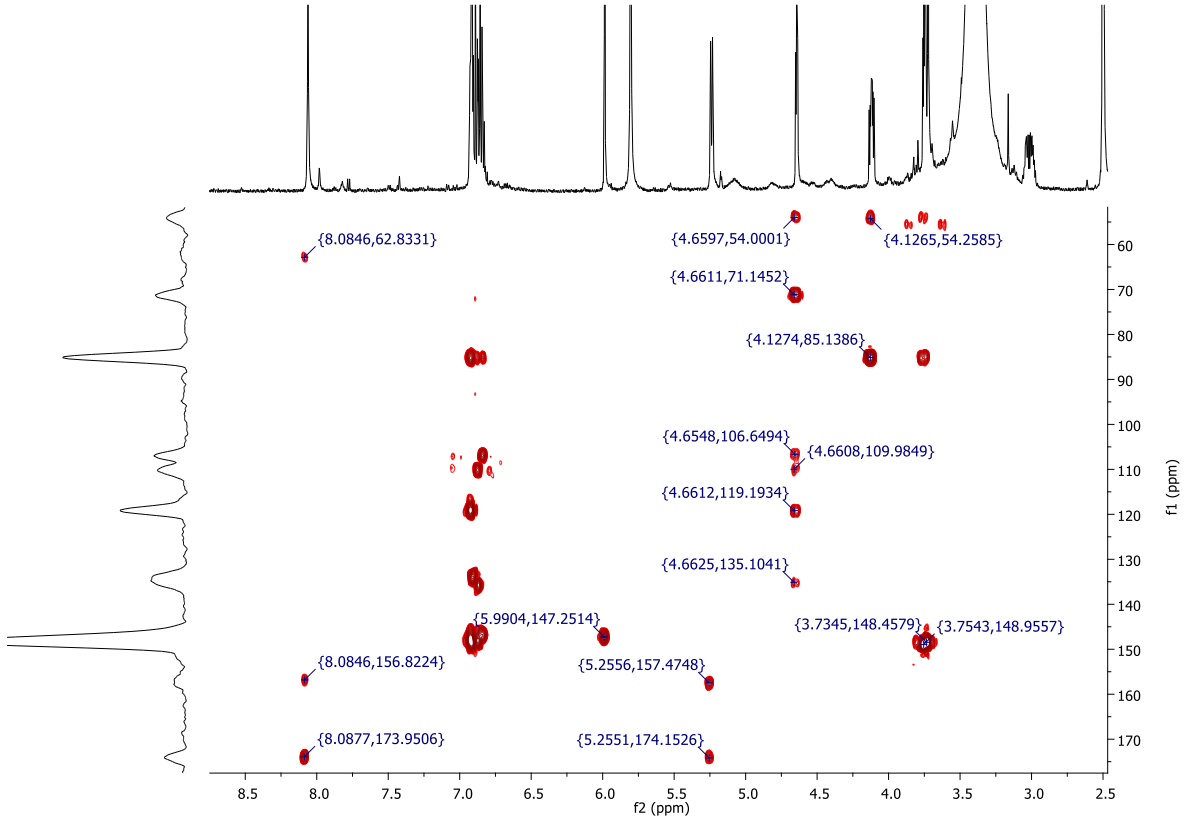


Figura 17: Mapa de contornos HMBC de **1** e **2** (DMSO-d_6, 14,1 T).



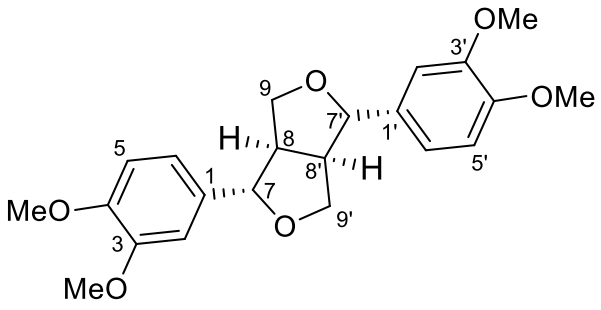
Ao comparar os dados RMN de ^{1}H e de ^{13}C obtidos experimentalmente com os dados da literatura[25] (Tabela 2) chegou-se à conclusão de que a substância **2** é a kubosina, que já foi isolada e identificada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Para se determinar a configuração absoluta da substância **2**, a fração 11 foi submetida a lavagens com MeOH e $CHCl_3$ de modo a separar e purificar **2**. A

medida de rotação óptica de **2** obtida foi $[\alpha]_D$ +47,0 (*c* 0,37; $CHCl_3$), de modo que foi possível atribuir a configuração absoluta como (+)-(7*S*, 8*R*, 7'*S*, 8'*R*)-kobusina.

Tabela 2: Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **2** (DMSO-d_6, *J* = Hz, 14,1 T)

	2		**Kobusina**[25]	
Posição	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	134,1	-	133,8	-
2	110,5	6,91 (*d*, *J* = 1,6)	109,5	6,79-6,92 (*m*)
3	148,2	-	148,9	-
4	148,2	-	149,4	-
5	111,3	6,90 (*d*, *J* = 8,2)	111,3	6,79-6,92 (*m*)
6	118,9	6,87 (*dd*, *J* = 8,2; 1,6)	118,5	6,79-6,92 (*m*)
7	85,3	4,64-4,65 (*m*)	86,0	4,76 (*m*)
8	54,0	2,98-3,06 (*m*)	54,6	3,10 (*m*)
9	71,3	3,74-3,76 (*m*)	72,0	3,91 (*m*)
		4,10-4,14 (*m*)		4,27 (*dd*, *J* = 9,0; 4,0)
1´	135,7	-	135,3	-
2´	106,8	6,92 (*d*, *J* = 1,5)	106,7	6,79-6,92 (*m*)
3´	148,2	-	148,2	-
4´	146,9	-	147,3	-
5´	108,4	6,86 (*d*, *J* = 8,0)	108,4	6,79-6,92 (*m*)
6´	119,7	6,84 (*dd*, *J* = 8,0; 1,5)	119,6	6,79-6,92 (*m*)
7´	85,3	4,64-4,65 (*m*)	86,1	4,76 (*m*)
8´	54,0	2,98-3,06 (*m*)	54,4	3,10 (*m*)
9´	71,3	3,74-3,76 (*m*)	71,9	3,91 (*m*)
		4,10-4,14 (*m*)		4,27 (*dd*, *J* = 9,0; 4,0)
CH_3O-3	55,7	3,72 (*s*)	56,1	3,80 (*s*)
CH_3O-4	55,7	3,74 (*s*)	56,2	3,89 (*s*)
-OCH_2O-3´,4´	101,1	5,98 (*s*)	101,3	5,97 (*s*)

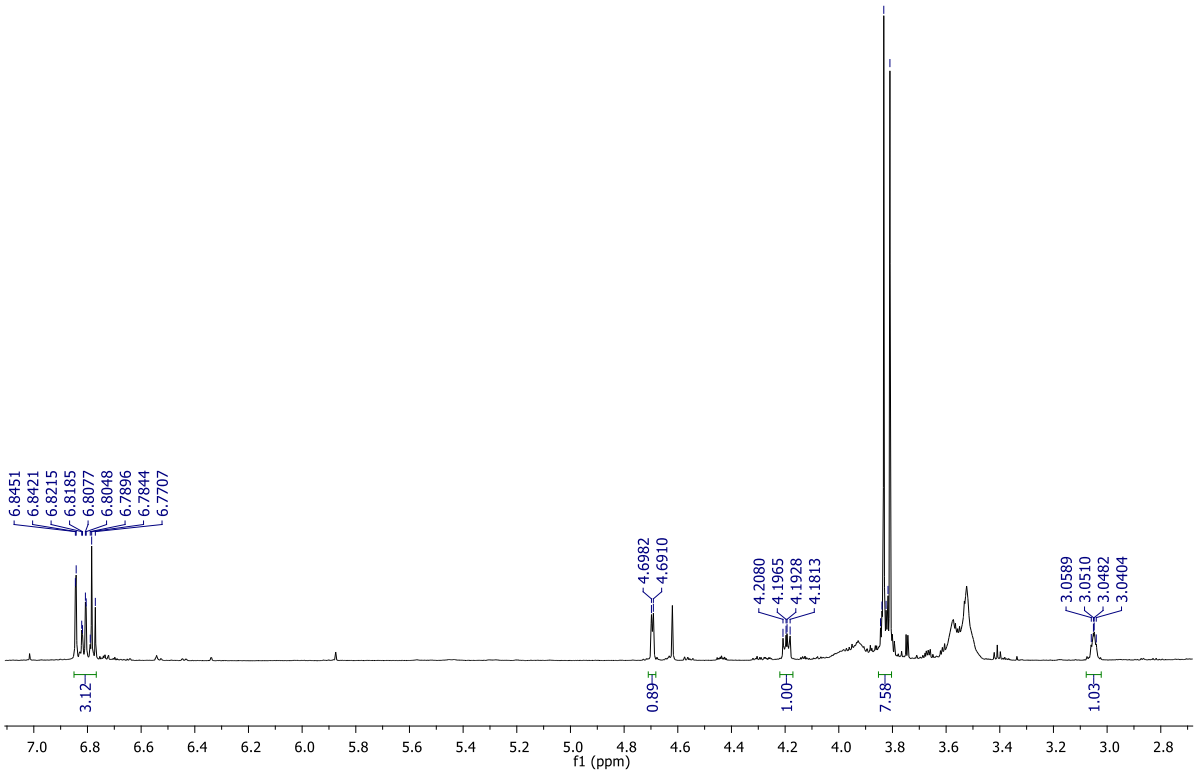
4.4.2 Eudesmina



Ao analisar os espectros de RMN de ^{1}H das subfrações da fração 9 foi possível observar a presença de uma substância completamente simétrica, a substância **3**. Observou-se no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 18) a presença de um dupleto em δ 4,69 (*d*, *J* = 4,3 Hz) correspondente aos hidrogênios carbinólicos benzílicos H-7 e H-7´, um multipleto em δ 3,04-3,06 referente aos hidrogênios metínicos H-8 e H-8´, um multipleto um em δ 3,82-3,84 que corresponde aos quatro hidrogênios carbinólicos H-9 e H-9'. Constatou-se também a presença dois simpletos em δ 3,81 e em δ 3,83 referentes as quatro metoxilas aromáticas.

É possível observar pelo espectro de RMN de ^{1}H (Figura 18) da substância **3** que a mesma não se encontra pura.

Figura 18: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H de **3** ($CDCl_3$, 14,1 T)



Determinou-se que a substância **3** é a eudesmina através da comparação dos dados RMN de ^{1}H obtidos experimentalmente com os dados da literatura[26] (Tabela 3), sendo que essa substância também já foi isolada e identificada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

Tabela 3: Dados de RMN de ^{1}H de **3** ($CDCl_3$, 14,1 T)

	3	**Eudesmina**[26]
Posição	δ_H	δ_H
2, 2´	6,84 (*d*, *J* = 1,8)	6,83-6,89 (*m*)
5, 5´	6,78 (*d*, *J* = 8,2)	6,83-6,89 (*m*)
6, 6´	6,81 (*dd*, *J* = 8,2; 1,8)	6,83-6,89 (*m*)
7, 7´	4,69 (*d*, *J* = 4,3)	4,75 (*d*, *J* = 4,2)
8, 8´	3,04-3,06 (*m*)	3,12 (*m*)
9, 9´	3,82-3,84 (*m*)	3,83-3,91 (*m*)
	4,19 (*dd*, *J* = 9,1; 6,9)	4,25 (*dd*, *J* = 9,1; 6,9)
CH_3O-3,3´	3,81 (*s*)	3,87 (*s*)
CH_3O-4,4´	3,83 (*s*)	3,89 (*s*)

4.5 Testes qualitativos

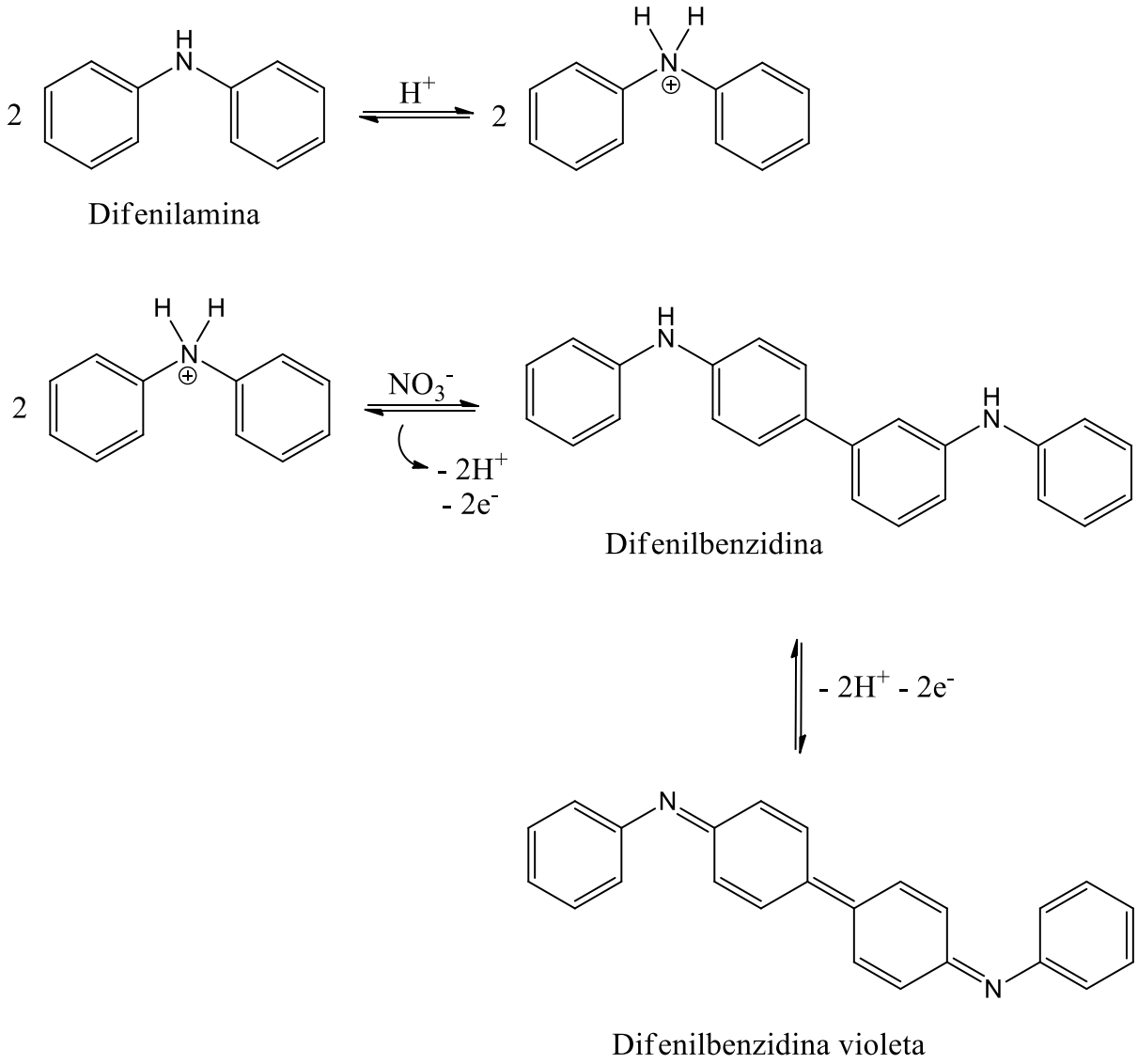
O precipitado da fração 14 foi analisado por RMN de ^{1}H, porém no espectro notou-se somente a presença do sinal do solvente, o que gerou suspeitas de que essa substância pudesse ser um sal inorgânico, uma vez que em estudos anteriores de caules e folhas da *Aristolochia gigantea* foi detectada a presença de KNO_3.[17]

Realizou-se um teste de chama e observou-se que na presença do sólido a chama apresentou uma leve coloração violeta, o que indica a presença de potássio. A presença de potássio foi confirmada através da reação com ácido perclórico, onde os íons potássio presentes na solução reagem com o ácido perclórico formando um precipitado branco, o perclorato de potássio, que é insolúvel em água.[19] O teste foi positivo uma vez que se observou que a solução ficou turva no fundo do tubo, confirmando a presença de íons potássio na amostra.

$$K^{+}_{(aq)} + HClO_{4\,(aq)} \longrightarrow KClO_{4\,(s)} + H^{+}_{(aq)}$$

Realizou-se também testes qualitativos para a presença de ânions, sendo que o teste apresentou resultado positivo para a presença de nitrato, utilizando-se uma solução de difenilamina em ácido sulfúrico concentrado. Íons nitrato na presença da solução de difenilamina formam ácido nítrico que oxida a difenilamina, formando a difenilbenzidina que ao entrar em contato com o ácido sulfúrico pode ser percebido uma coloração azul intensa, de acordo com as reações redox abaixo (Figura 19).[27,28]

Figura 19: Reações redox da difenilamina em presença de nitrato.



5 CONCLUSÃO

O estudo químico da fração hidroalcoólica das sementes de *A. gigantea* possibilitou isolar e identificar, neste trabalho, quatro substâncias, sendo duas lignanas (kobusina e eudesmina), alantoína e o sal inorgânico KNO_3. Esse é o primeiro registro dessas substâncias nas sementes da espécie *A. gigantea*, sendo essa apenas a quarta espécie do gênero *Aristolochia* a ter as suas sementes estudadas.

REFERÊNCIAS

1. FREITAS, J. **Aristolochiaceae Juss. no Espírito Santo, Brasil.** 2016. 142 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2016.

2. GONZÁLEZ, F. Florística y sistemática filogenética innecesariamente disyuntas: El caso de *Aristolochia*, *Euglypha* y *Holostylis*. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 36, p. 193-202, 2012.

3. Aristolochiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15749>. Acesso em: 19 Nov. 2019.

4. AIGBE, F. R.; SOFIDIYA, O. M.; JAMES, A. B.; SOWEMIMO, A. A.; AKINDERE, O. K.; ALIU, M. O.; DOSUNMU, A. A.; CHIJIOKE, M. C.; ADEYEMI, O. O. Evaluation of the toxicity potential of acute and sub-acute exposure to the aqueous root extract of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.244, p.112150, 2019.

5. SULYMAN, A. O.; AKOLADE, J. O.; SABIU, S. A.; ALADODO, R. A.; MURITALA, H. F. Antidiabetic potentials of ethanolic extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) roots. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 182, p. 122–128, 2016.

6. CHAOUKI, W.; LEGER, D. Y.; ELJASTIMI, J.; BENEYTOUT, J.; HMAMOUCHI, M. Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7, **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 269-274, 2010.

7. PEREIRA, M. D. P.; DA SILVA, T.; AGUIAR, A. C. C.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B.; LOPES, L. M. X. Chemical composition, antiprotozoal and cytotoxic activities of indole alkaloids

and benzofuran neolignan of *Aristolochia cordigera*. **Planta Medica**, v. 83, p. 912-920, 2017.

8. KUO, P. C.; LI, Y. C.; WU, T. S. Chemical constituents and pharmacology of the *Aristolochia* (馬兜鈴 mădōu ling) species. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 2, p. 249-266, 2012.

9. LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.

10. CHEN, C. H.; DICKMAN, K. G.; MORIYA, M.; ZAVADIL, J.; SIDORENKO, V. S.; EDWARDS, K. L.; GNATENKO, D. V.; WU, L.; TURESKY, R. J.; WU, X.; PU, Y.; GROLLMAN, A. P. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.109, 8241–8246, 2012.

11. HASHIMOTO, K., HIGUCHI, M., MAKINO, B., SAKAKIBARA, I., KUBO, M., KOMATSU, Y., OKADA, M. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 185-189, 1999.

12. EL TAHIR, K. E. H. Pharmacological actions of magnoflorine and aristolochic acid-1 isolated from the seeds of *Aristolochia bracteata.* **International Journal of Pharmacognosy**, v. 29, p. 101-110, 1991.

13. ALAGAWADI, K. R., RONAD, P. M., HUNSHAL, R. D., SHAH, T. M., & ASHIF, A. K. Physico-chemical and pharmacological characteristics of minor seed oils. **Journal of the Oil Technologists' Association of India**, v. 32, p. 3-5, 2000.

14. DAULATABAD, C. D., ANKALGI, R. E. Component fatty acids of some Indian seed oils. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 85, p. 404-406, 1983.

15. ACHENBACH, H.; FISCHER, A. Aristolochic Acids and Aristolactams from the Seeds of *Aristolochia baetica*. **Planta Medica**, v. 63, p. 387-387, 1997.

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

17. LOPES, L. M. X. 8-Benzylberbine alkaloids from *Aristolochia gigantea*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4005-4009, 1992.

18. DOI, T.; KAJIMURA, K.; TAKATORI, S.; FUKUI, N.; TAGUCHI, S.; IWAGAMI, S. Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 1005-1010, 2009.

19. BACAN, N.; GODINHO, O. E. S.; ALEIXO, L. M.; STEIN, E. **Introdução à Semimicroanálise Qualitativa.** 2.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988

20. SANG, S. et al. A phenylpropanoid glycoside from *Vaccaria segetalis*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 569-571, 1998

21. ARAÚJO, L. U.; GRABE-GUIMARÃES, A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; CARNEIRO, C. M.; SILVA-BARCELLOS, N. M. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, p. 460-461, 2010.

22. DE SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 197-207, 2012.

23. TEPONNO, R.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 1044-1092, 2016.

24. KATO, M. J. **Policetídeos e lignóides do tegumento de *Virola elongata* Warb. (Myristicaceae)**. 1984. 86 f. (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

25. CHANG, S. W.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of *Geranium eriostemon*. **Natural Product Sciences**, v. 15, p. 151-155, 2009.

26. SEO, Y. Antioxidant activity of the chemical constituents from the flower buds of *Magnolia denudata*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 400-406, 2010.

27. ALEXÉEV, M. V. **Análise Qualitativa**. 3.ed. Porto: Editora Lopes da Silva, 1983.

28. BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S; BARONE, J. S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. Editora E. Blücher, 3a ed., 2001.