



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
VITEX AGNUS CASTUS L.

ANTÔNIA LÚCIA DE SOUZA

Fortaleza – Ceará
2003

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
VITEX AGNUS CASTUS L.



*Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Química Orgânica, como requisito para obtenção do título de
Doutor.*

ANTÔNIA LÚCIA DE SOUZA

ORIENTADORA: *YVONE BRÍGIDO MEMÓRIA POULIQUEN*

*Fortaleza – Ceará
2003*

S713c Souza, Antônia Lúcia de

Contribuição ao estudo químico e biológico de *Vitex agnus castus*
L. [manuscrito] / Antônia Lúcia de Souza
162 f. : il. color. ; enc.

Orientadora: Yvone Brígido Memória Pouliquen
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003
Área de concentração: Produtos Naturais

1. Flavonóides 2. Plantas medicinais 3. Fitoquímica I. Pouliquen,
Yvone Brígido Memória (orient.) II. Universidade Federal do Ceará –
Pós-Graduação em Química Orgânica III. Título

CDD 547

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Antônia Lúcia de Souza

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 20/06/2003

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Yvone B. M. Pouliquen (orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Maria Célia de Oliveira Chaves
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dra. Tereza Neuma de Castro Dantas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Profa. Yvone Brígido Memória Poulighen do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

A Deus, aos meus pais, aos amigos e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Yvone Brígido Memória Pouliquen pela orientação, amizade e pela compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei no período final desta tese, além da confiança depositada em meu trabalho.

Ao professor Raimundo Braz Filho pela colaboração na elucidação das estruturas dos compostos isolados, indispensáveis para a elaboração desta tese.

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes anos.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeira.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE QUADROS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.2. Relatos históricos da planta	9
1.3. Porque estudar <i>Vitex agnus castus</i> L.	10
CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>V. AGNUS CASTUS</i> L...	11
2.1. Considerações etnobotânicas sobre a espécie <i>Vitex agnus castus</i> L.	11
2.2. Considerações farmacológicas	14
CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>VITEX</i>	17
CAPÍTULO 4. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	18
CAPÍTULO 5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DE <i>V. AGNUS CASTUS</i> L	34
5.1. Determinação estrutural de CV1 (1)	34
5.2. Determinação estrutural de FV1 (2)	44
5.3. Determinação estrutural de FV2 (3) e (4)	51
5.4. Determinação estrutural de FV3 (5)	56
5.5. Determinação estrutural de FV4 (6)	63
5.6. Determinação estrutural de FV5 (7) e (8)	69
5.7. Determinação estrutural de FV6 (9)	72
5.8. Determinação estrutural de FV7 (10)	77
5.9. Determinação estrutural de FV8 (11)	85
5.10. Determinação estrutural de FV9 (12)	88
5.11. Determinação estrutural de CV2 (13)	93
CAPÍTULO 6. ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	100
6.1. Determinação da composição química dos constituintes voláteis de <i>V. agnus castus</i> L.	100
CAPÍTULO 7. ATIVIDADE BIOLÓGICA	111
7.1. Avaliação da atividade biológica dos constituintes isolados de <i>V. agnus castus</i> L.	111
7.2. Atividade citotóxica dos flavonóides isolados de <i>V. agnus castus</i> L.	112

7.2.1. Considerações gerais	112
7.2.2. Conseqüência biológica da interação substância/DNA	112
7.2.3. Mecanismo de ação	113
7.2.4. Resultado do teste de avaliação citotóxica	113
7.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	117
CAPÍTULO 8. PARTE EXPERIMENTAL	119
8.1. Material botânico: coleta e identificação	119
8.2. Métodos cromatográficos	119
8.3. Métodos físicos	120
8.3.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	120
8.4. Ponto de fusão (p. f.)	121
8.5. Constituintes voláteis de <i>V. agnus castus</i> L.	122
8.5.1. Obtenção dos óleos essenciais através de hidrodestilação	122
8.6. Obtenção e fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>V. agnus castus</i> L.	124
8.6.1. Tratamento cromatográfico de FVM – A	124
8.6.1.1. Isolamento de FV1 (2)	125
8.6.2. Tratamento cromatográfico de VFM – C	125
8.6.2.1. Tratamento cromatográfico de (F24 – 36)	126
8.6.2.1.1. Purificação de f(39 – 46) e isolamento de FV2 (3) e (4)	127
8.6.3. Tratamento cromatográfico de F (42 – 56)	127
8.6.4. Tratamento cromatográfico de f(9-15) e isolamento de FV3 (5)	128
8.6.5. Tratamento cromatográfico de f(18-25) e isolamento de FV4 (6)	128
8.6.6. Isolamento de FV5 (7) e (8)	129
8.6.7. Tratamento cromatográfico de f(27 – 36) e isolamento de FV6 (9)	129
8.6.8. Tratamento cromatográfico de f(39 – 45) e isolamento de FV7 (10)	130
8.6.9. Tratamento cromatográfico de f(94 – 105) e isolamento de FV8 (11)	130
8.6.10. Tratamento cromatográfico da fração f(25 – 42) e isolamento de FV9 (12)	130
8.6.11. Obtenção dos constituintes fixos do caule	131
8.6.12. Tratamento cromatográfico de CVM – C	132
8.6.13. Tratamento cromatográfico de f 15 – 35 e isolamento de CV1 (1)	132

8.6.14. Tratamento cromatográfico de CVM – A e isolamento de CV2 (13)	132
8.7. Atividade citotóxica dos flavonóides isolados de <i>V. agnus castus</i> L.	133
8.7.1. Metodologia	133
CAPÍTULO 9. CONCLUSÃO	135
CAPÍTULO 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01 - <i>Vitex agnus castus</i> Lineu. Flores brancas	02
Fig. 02 - <i>Vitex agnus castus</i> Lineu. Flores lilás	02
Fig. 03 - Fotos da árvore <i>Vitex agnus castus</i> L. que se encontra no Horto de Plantas Medicinais da UFC	12
Fig. 04 - Frutos de <i>V. agnus castus</i> L.	13
Fig. 05 - Espectro de massas de CV1	40
Fig. 06 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CV1	40
Fig. 07 - Expansão do espectro de RMN ^1H da região 3,54 de CV1	41
Fig. 08 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de CV1	41
Fig. 09 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de CV1.....	42
Fig. 10 - Espectro de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY de CV1	42
Fig. 11 - Espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMQC de CV1	43
Fig. 12 - Espectro de correlação heteronuclear a longa distância ^1H x ^{13}C – HMBC de CV1.	43
Fig. 13 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de FV1	48
Fig. 14 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de FV1	48
Fig. 15 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de FV1	49
Fig. 16 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de FV1 (expansão).....	49
Fig. 17 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de FV1 (expansão).....	50
Fig. 18 - Estruturas evidenciando os possíveis acoplamentos de hidrogênios de carbonos carbinólicos vicinais de FV1	45
Fig. 19 - Possíveis estereoquímicas de FV1	45
Fig. 20 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de FV2	54
Fig. 21 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de FV2	54
Fig. 22 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de FV2	55
Fig. 23 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de FV3	60
Fig. 24 - Sistema aromático orto/para substituído	56
Fig. 25 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de FV3	60
Fig. 26 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de FV3	61
Fig. 27 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear – HMQC de FV3	61
Fig. 28 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear – HMBC de FV3	62

Fig. 29 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de FV4	67
Fig. 30 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de FV4	67
Fig. 31 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de FV4	68
Fig. 32 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de FV5	71
Fig. 33 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de FV5	71
Fig. 34 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de FV6	75
Fig. 35 - Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de FV6	75
Fig. 36 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CD_3OD) de FV6	76
Fig. 37 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de FV6	76
Fig. 38 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de FV7	82
Fig. 39 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CD_3OD) de FV7	82
Fig. 40 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de FV7	83
Fig. 41 - Carbono aromático adjacente a dois carbonos oxigenados	78
Fig. 42 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de FV7	78
Fig. 43 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC de FV7	84
Fig. 44 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de FV8	87
Fig. 45 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de FV8	87
Fig. 46 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, DMSO) de FV9	91
Fig. 47 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, DMSO) de FV9	91
Fig. 48 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) de FV9	92
Fig. 49 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de CV2	97
Fig. 50 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de CV2	97
Fig. 51 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CV2	98
Fig. 52 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear – HMQC (CD_3OD) de CV2	98
Fig. 53 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear – HMBC (CD_3OD) de CV2	99
Fig. 54 - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de <i>V. agnus castus</i> L. variedade de flores brancas.....	102
Fig. 55 - Cromatograma dos óleos essenciais dos frutos de <i>V. agnus castus</i> L. variedade de flores brancas.....	103

Fig. 56 - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de <i>V. agnus castus</i> L. variedade de flores lilás	104
Fig. 57 - Cromatograma dos óleos essenciais dos frutos de <i>V. agnus castus</i> L. variedade de flores lilás	105
Fig. 58 - Espectro de massas do α -tujeno (1')	107
Fig. 59 - Espectro de massas do α -pineno (2')	107
Fig. 60 - Espectro de massas do sabineno (3')	107
Fig. 61 - Espectro de massas do β -mirceno (4')	107
Fig. 62 - Espectro de massas do 1,8-cineol (5')	108
Fig. 63 - Espectro de massas do trans-sabineno (6')	108
Fig. 64 - Espectro de massas do linalol (7')	108
Fig. 65 - Espectro de massas do humuleno (8')	108
Fig. 66 - Espectro de massas do citronelal (9')	109
Fig. 67 - Espectro de massas do α -terpineno (10')	109
Fig. 68 - Espectro de massas do α -terpineol (11')	109
Fig. 69 - Espectro de massas do β -sesquifelandreno (12')	109
Fig. 70 - Espectro de massas do acetato de terpenila (13')	110
Fig. 71 - Espectro de massas do Espulenol (14')	110
Fig. 72 - Espectro de massas do trans-cariofileno (16')	110
Fig. 73 - Espectro de massas do β -farneseno (17')	110
Fig. 74 - Cromatograma I pico do DNA eluído com metanol/água (3:7)	114
Fig. 75 - Cromatograma II DNA + brometo de etidimium	114
Fig. 76 - Cromatograma III DNA + FV3	115
Fig. 77 - Cromatograma IV DNA + FV4	115
Fig. 78 - Cromatograma V DNA + FV6	116
Fig. 79 - Cromatograma VI DNA + FV7	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes químicos isolados de <i>V. agnus castus</i> L. oriunda da região do Mediterrâneo	3
Tabela 2. Constituintes químicos isolados de <i>V. agnus castus</i> L. neste trabalho	4
Tabela 3. Espécies do gênero <i>Vitex</i> , atividade biológica e seus constituintes químicos	20
Tabela 4. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hydrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³ C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CDCl ₃)	35
Tabela 5. Dados de HMQC e HMBC de CV1	39
Tabela 6. Padrão de hidrogenação dos carbonos de FV1	44
Tabela 7. Comparação dos valores de deslocamento químico de RMN ¹³ C de FV1 (2) com os dados da literatura para o composto Ácido 2 α , 3 α , 19 α -triidroxiurs-12-en-28-óico	47
Tabela 8. Comparação dos valores de deslocamento químico de RMN ¹³ C de FV2 com os dados da literatura para a α -Amirina e β -Amirina	53
Tabela 9. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hydrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³ C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CDCl ₃)	57
Tabela 10. Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de FV3 (3) com os valores da literatura para a casticina	59
Tabela 11. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hydrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³ C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CDCl ₃)	64
Tabela 12. Comparação dos valores de deslocamento químico de RMN ¹³ C de FV4 com os dados da literatura para a 5,7-Diidroxi-4',6,8-trimetoxiflavona.....	66
Tabela 13. Comparação dos valores de deslocamento químico de RMN ¹³ C de FV5 com os dados da literatura para a o β -Sitosterol e Estigmasterol	70

Tabela 14. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados e metínicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD)	73
Tabela 15. Comparação dos valores de deslocamento químico de carbono-13 de FV6 com valores descritos na literatura para a flavona luteolina	74
Tabela 16. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados e metínicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CD_3COCD_3)	78
Tabela 17. Dados de HMQC e HMBC de FV7.....	80
Tabela 18. Comparação dos valores de deslocamento químico de carbono-13 de FV6 com valores descritos na literatura para a flavona quercetina	81
Tabela 19. Dados de RMN13C de FV8 comparados com os registrados na literatura para o glicosídeo do β -sitosterol	86
Tabela 20. Padrão de hidrogenação dos carbonos de FV9.....	88
Tabela 21. Dados de RMN ^{13}C de FV8 comparados com os registrados na literatura para o ácido 3 β -hidroxi-urs-12-eno-28-óico	90
Tabela 22. Comparação dos dados de ^{13}C de CV2 com os dados de ^{13}C de agnosídeo	96
Tabela 23. Constituintes voláteis de <i>V. agnus castus</i> L. Folhas e frutos das variedades de flores brancas, de flores lilás e de uma espécie da Croácia	106
Tabela 24. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos frutos e das folhas de <i>V. agnus castus</i> L. (flores brancas e flores lilás)	118
Tabela 24. Fracionamento do extrato metanólico das folhas	124
Tabela 25. Fracionamento de VFM – C	126
Tabela 26. Fracionamento de F (42 – 56)	127
Tabela 27. Fracionamento do extrato metanólico do caule	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substâncias isoladas de <i>Vitex agnus castus</i> L. neste trabalho e constantes	5
Quadro 2. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Vitex</i> com registro...	24
Quadro 3. Possíveis caminhos de fragmentação para CV1 (1) no espectrômetro	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BB	Broad-Band
CGL/EM	Cromatografia Gás-Líquido acoplada a Espectrometria de Massa
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
HMBC	Heteronuclear Multiple Band Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
DEPT	Distortionless Enhancement By Polarization Transfer
EM	Espectrometria de Massa
J	Constante de Acoplamento
COSY	Correlation Spectroscopy
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
IK	Índice de Kovats
CG	Cromatografia Gasosa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
pf	Ponto de Fusão
FV1	Primeiro composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV2	Segundo composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV3	Terceiro composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV4	Quarto composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV5	Quinto composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV6	Sexto composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV7	Sétimo composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
FV8	Oitavo composto isolado das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
CV1	Primeiro composto isolado do caule de <i>Vitex agnus castus</i> L.
CV2	Segundo composto isolado do caule de <i>Vitex agnus castus</i> L.
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
mg	Miligrama

mm	Milímetro
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
VFM -H	Fração hexânica do extrato metanólico das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
VFM -C	Fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
VFM -A	Fração acetato de etilado extrato metanólico das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
VFM -M	Fração metanólica do extrato metanólico das folhas de <i>Vitex agnus castus</i> L.
CVM -H	Fração hexânica do extrato metanólico do caule de <i>Vitex agnus castus</i> L.
CVM -C	Fração clorofórmica do extrato metanólico do caule de <i>Vitex agnus castus</i> L.
CVM -A	Fração acetato de etila do extrato metanólico do caule de <i>Vitex agnus castus</i> L.
CVM -M	Fração metanólica do extrato metanólico do caule de <i>Vitex agnus castus</i> L.

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico de *Vitex agnus castus* L (Verbenaceae), planta nativa da região do Mediterrâneo, adaptada ao Brasil, onde é conhecida popularmente como pau-d'angola, pimenta dos monges e alecrim-pimenta.

A análise cromatográfica do extrato metanólico das folhas e dos frutos de *V. agnus castus* L. levou ao isolamento das substâncias: dois triterpenos: Ácido $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -trihidroxiurs-12-en-28-óico (2) e Ácido 3β -hidroxiurs-12-en-28-óico (12), além de uma mistura dos triterpenos α -Amirina (3) e β -Amirina (4); quatro flavonóides: 5,4'-Diidroxí-3,3',6,7-tetrametoxiflavona (5), 5,7-Diidroxí-4',6,8-trimetoxiflavona (6), 3',4',5,7-Tetraidroxiflavona (9), e 3,3',4',5,7-Pentaidroxiflavona (10), além de uma mistura contendo dois fitoesteróides, β -sitosterol e Estigmasterol (7) e (8) além do Glicosídeo do β -sitosterol (11).

As substâncias (2), (3), (4), (7), (8), (9), (10), (11) e (12), estão sendo relatadas pela primeira vez nesta espécie e as substâncias (10), (11) e (12), no gênero.

O tratamento cromatográfico do extrato metanólico do caule resultou no isolamento de um sesquiterpeno, 3-formil-4,5-dimetil-9-oxo-5H-6,7-diidronafto(2,3b)furano (1) e de um iridóide glicosilado, Agnosídeo (13). A substância (1), é um sesquiterpeno isolado pela segunda vez e este é o primeiro relato de sua presença na espécie.

Os flavonóides isolados neste trabalho foram testados para avaliar suas atividades citotóxicas, usando o método de quelação com o DNA da célula e mostraram resultados significativos.

Os óleos essenciais das folhas e frutos foram extraídos de duas variedades de *V. agnus castus* L. (flores brancas e flores lilás) através de hidrodestilação e apresentaram composição química semelhante.

Os óleos essenciais das folhas e frutos foram avaliados quanto às suas atividades antimicrobianas contra as seguintes bactérias: *Bacillus subtilis* (6633), *Staphylococcus*

aureus (6538P), *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* (1303) e *Klebsiella pneumoniae* (10031) e apresentaram resultados satisfatórios.

A determinação estrutural dos compostos foi estabelecida com base na análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais do tipo ^1H , ^1H – COSY e ^1H , ^{13}C – COSY ($^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 1, 2$ e 3) com detecção normal e inversa, espectroscopia de massas e comparação com dados descritos na literatura.

ABSTRACT

This work describe the phytochemistry study of *Vitex agnus castus* L. (*Verbenaceae*), native plant from the Mediterranean region, adapted in Brasil, where known popularly as “pau-d’angola”, “pimenta dos monges” and “alecrim-pimenta”.

Analysis chromatographic for methanol extract from leaves of *V. agnus castus* L. led to the isolation of the following substances: two triterpenes: $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -Trihydroxiurs-12-en-28-oic acid (2) and 3β -hidroxiurs-12-en-28-oic acid (12), a mixture of α and β -Amirine (3) and (4), a mixture β -Sytosterol (7) and Stigmasterol (8) além do β -Sytosterol glucoside (11); four flavonoids: 5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7-tetramethoxyflavone (5), 5,7-Dihydroxy-4',6,8-trimethoxyflavone (6), 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone (9) and 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone (10). The substances (2), (3), (4), (6), (7), (8), (10), (11) and (12) are reported for the first time for the species and substances (2), (3), (4) and (12) for the genus.

The tratament chromatographic the methanol extract of stem of *V. agnus castus* L. allowed isolation of this sesquiterpene 3-Formyl-4,5-dimetyl-8-oxo-5H-6,7-dihydronaphto(2,3b)furan (1) and iridoid glucoside, Agnuside (13). The substance (1) is reported for the first time in this species.

The flavonoids isoled were examined for the cytotoxic activity showed potential activity.

Essential oils of flowers and fruits were extracted from two varieties of *V. agnus castus* L. (white flower and lilac flower) by hydrodistillation and presented similarity in majoritary constituents.

Essential oils of flowers and fruits were tested for antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* (6633), *Staphylococcus aureus* (6538P), *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* (1303) and *Klebsiella pneumoniae* (10031), and showed satisfactory result.

Structural determination of the compounds was established by analysis spectroscopic of ^1H and ^{13}C , NMR techniques and comparison with literature data.



Capítulo 01

1. INTRODUÇÃO

Vitex agnus castus L., é uma espécie da família *Verbenaceae*, conhecida como árvore casta, distribuída em toda região do Mediterrâneo, Ásia central e sul da Europa é usada em vários países, no tratamento da síndrome pré-menstrual e no controle do equilíbrio hormonal feminino¹.

Em vários países da Europa a planta é comercializada como fitoterápico, sendo utilizada preferencialmente em terapias de reposição hormonal durante o climatério. A mesma é encontrada na forma de extrato e de cápsulas, podendo seu preço variar de cinco a vinte dólares.

Trata-se de uma planta ornamental, aromática, muito cultivada em jardins, oriunda da região do Mediterrâneo e adaptou-se perfeitamente ao clima brasileiro, onde é conhecida popularmente pelos nomes de “alecrim-pimenta”, “pau-d’angola” e “pimenta dos monges”.^{1,2}

A planta ocorre em duas variedades, *V. agnus castus* de flores brancas (Fig. 1, pág. 2) e *V. agnus castus* de flores lilás (Fig.2, pág. 2), sendo a variedade de flores lilás a mais comum e a de flores brancas, de rara ocorrência. A literatura relata que na região do Mediterrâneo tem ocorrência apenas a variedade de flores lilás.

Este trabalho relata um levantamento bibliográfico sobre a planta e traz uma abordagem fitoquímica comparativa entre as espécies da região do Mediterrâneo, através de dados obtidos da literatura (Tab. 1, pág. 3), assim como de uma espécie do Brasil, mais especificamente do estado do Ceará, esta com dados obtidos através de um estudo experimental envolvendo o isolamento, a identificação e a investigação biológica de alguns constituintes fixos isolados da planta (Tab. 2, pág. 4), bem como dos óleos essenciais extraídos das folhas e frutos. As estruturas das substâncias isoladas de *V. agnus castus* L. neste trabalho e em trabalhos da literatura estão no Quadro 1.pág.5-8.

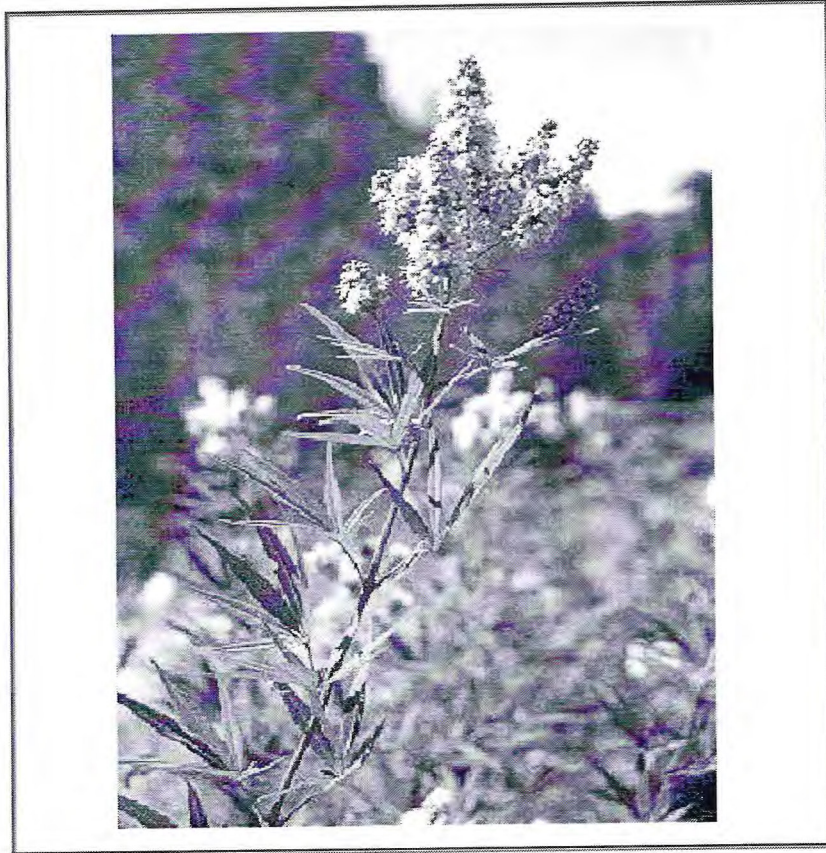


Figura 1. *Vitex agnus castus* Lineu. (variedade de flores brancas).

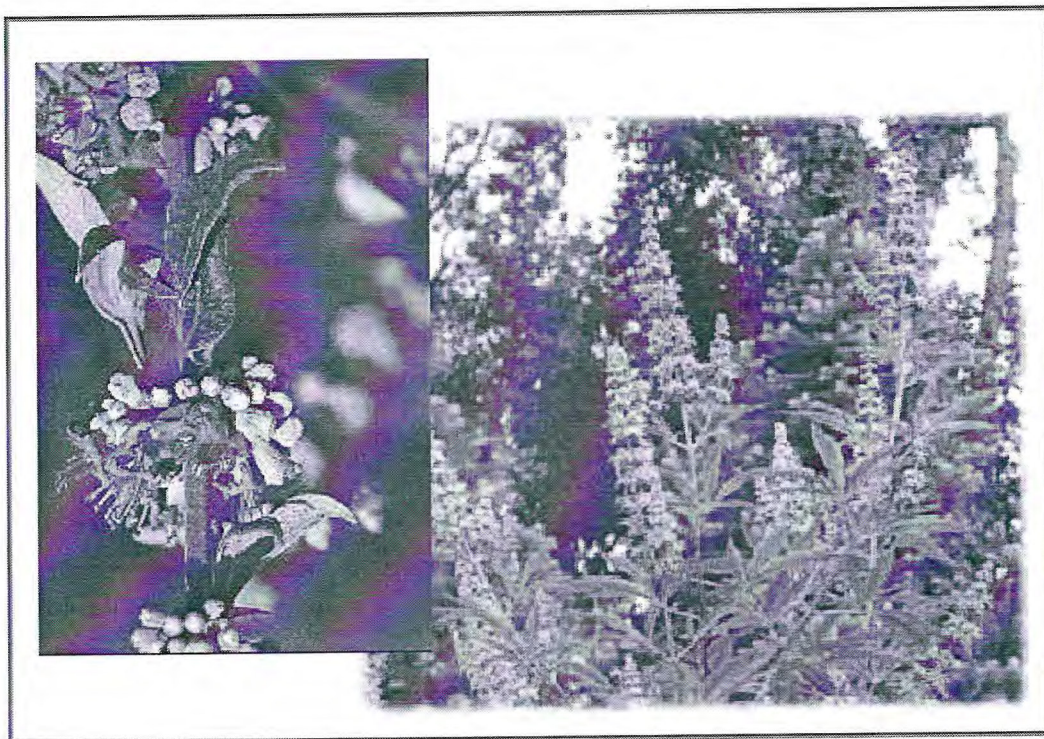


Figura 2. *Vitex agnus castus* Lineu. (variedade de flores lilás).

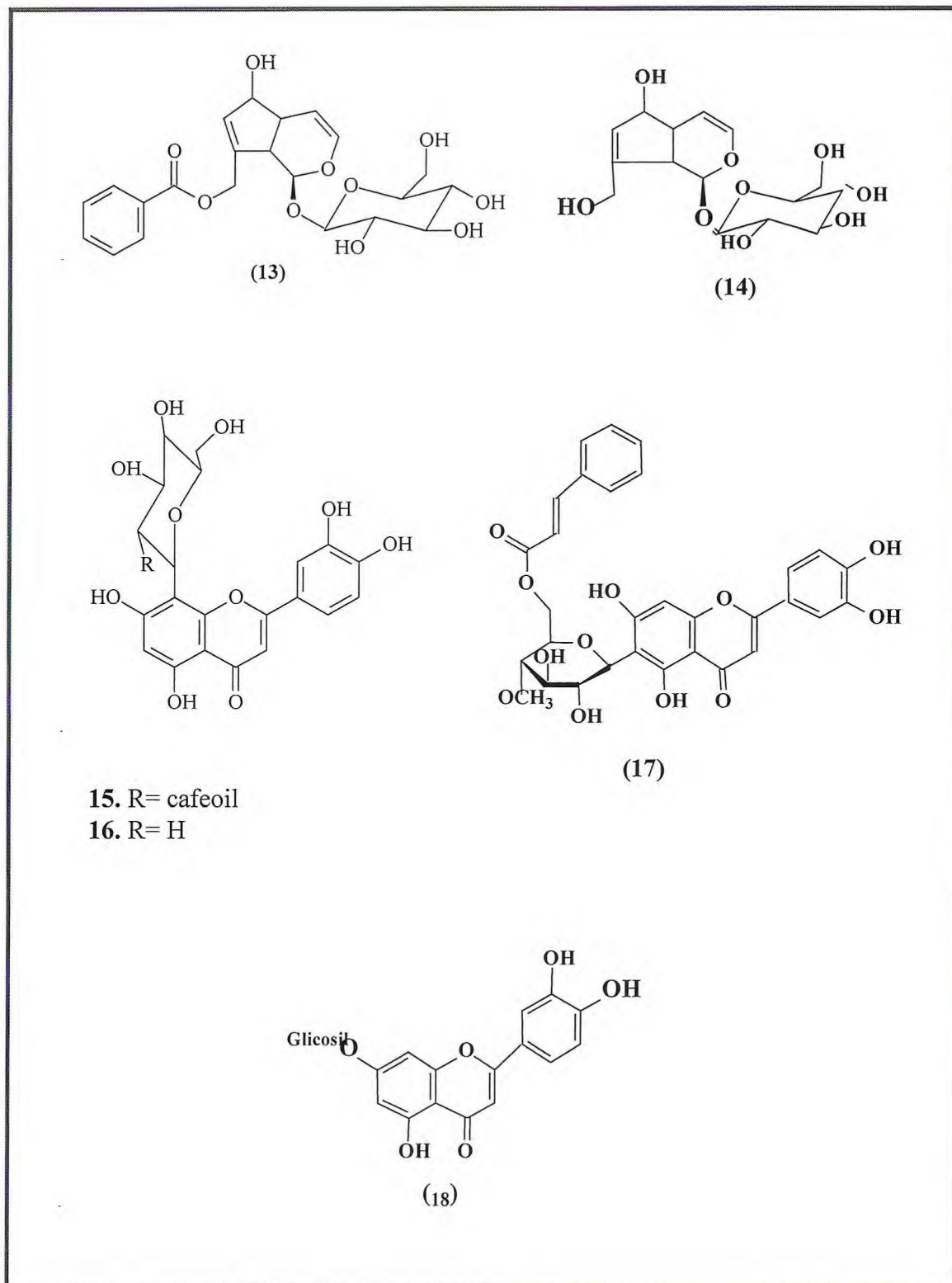
Tabela 1. Constituintes Químicos Isolados de *V. agnus castus* L. oriunda da região do Mediterrâneo, relatados na literatura.^{4,8}

Constituintes Químicos
Agnosídeo (13)
Aucubina (14)
Casticina (5)
Orientina (15)
2''-O-Cafeoil-orientina (16)
7-Glicosil-luteolina (17)
Glicosídeo 6-C-(4''-metil-6''-O-transcafeoil) luteolina (18)
Glicosídeo 6-C-(6''-O-transcafeoil) luteolina (19)
Glicosídeo 6-C-(2''-O-transcafeoil) luteolina (20)
Glicosídeo 7-O-(6''-p-benzoil) luteolina (21)
4',5'-Diidroxí-3,3',6,7-tetrametoxiflavona (22)
Luteolina (9)
Artemetina (23)
Isorametina (24)

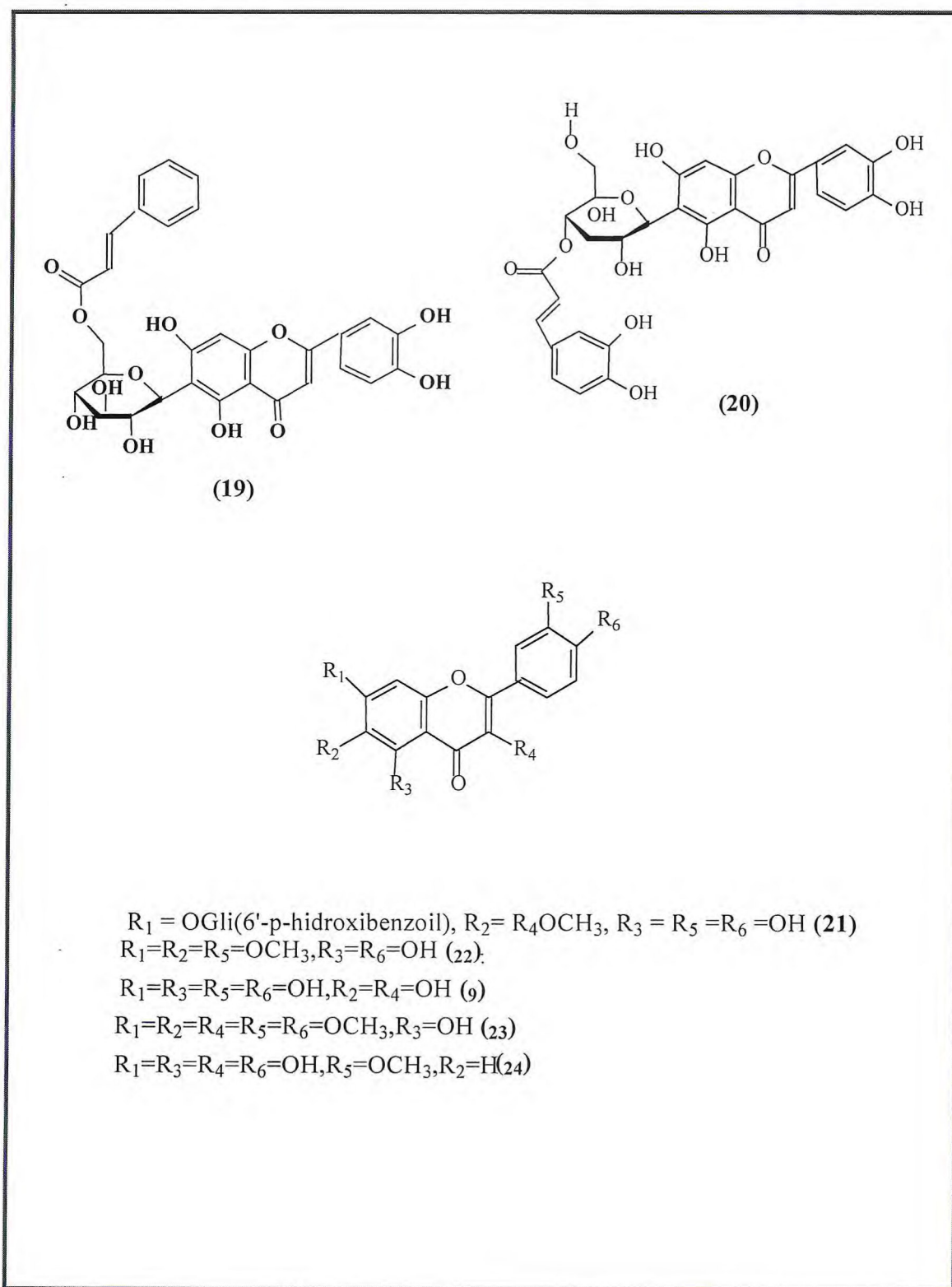
Tabela 2. Constituintes Químicos Isolados de *V.agnus castus* L. neste trabalho.

Constituintes Químicos
3-Formil-4,5-dimetil-8-oxo-5H-6,7-dihidronafto(2,3b)furano (1)
Ácido- 2 α ,3 α ,19 α -triidroxiurs-12-em-28-óico (2);
α -Amirina (3)
β -Amirina (4)
Casticina (5)
5,7-Diidroxi-4',6,8-trimetoxiflavona (6)
β -Sitosterol (7)
Estigmasterol (8)
Luteolina (9)
3,3',4',5,7-Pentaidroxiflavonol (10)
Glicosídeo do β -Sitosterol (11)
Ácido 3 β -hidroxi-urs-12-eno-28-óico (12)
Agnosídeo (13)

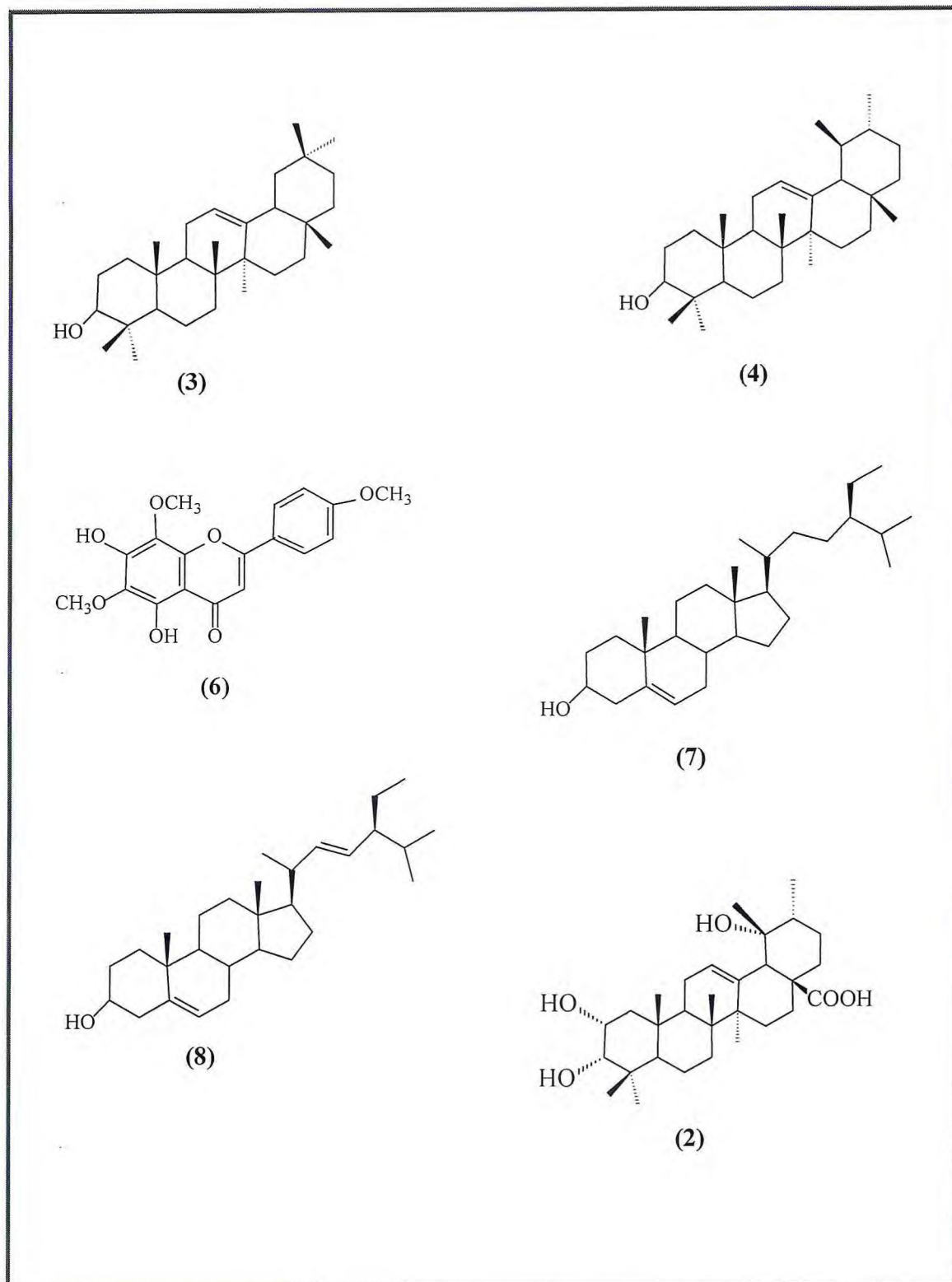
Quadro 1. Substâncias de *Vitex agnus castus* L. isoladas neste trabalho e descritas na literatura.^{2,3}



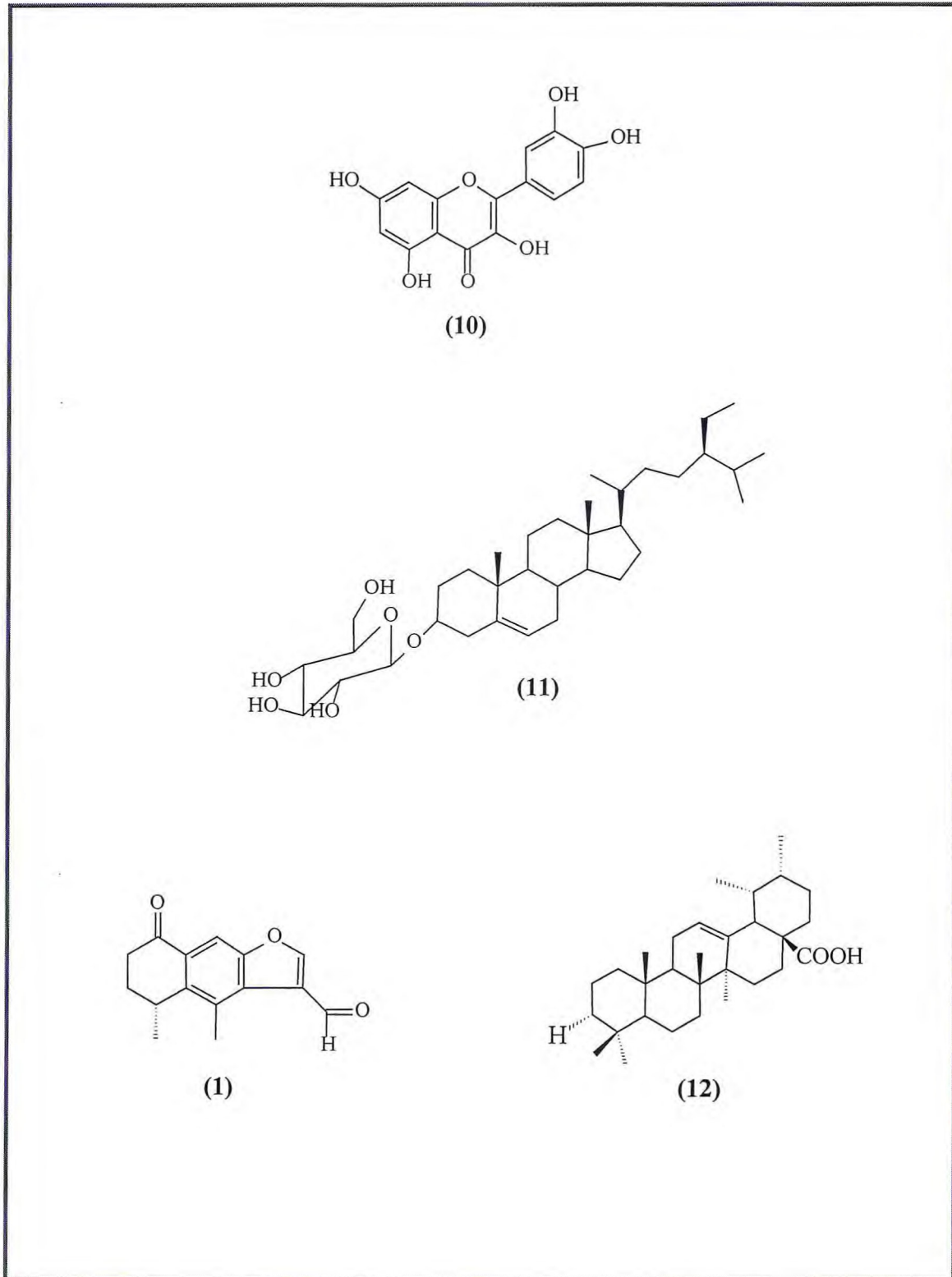
Quadro 1. Substâncias isoladas de *Vitex agnus castus* L. neste trabalho e constantes na literatura.



Quadro 1. Substâncias isoladas de *Vitex agnus castus* L. neste trabalho e constantes na literatura.



Quadro 1. Substâncias isoladas de *Vitex agnus castus* L. neste trabalho e constantes na literatura.



1.2. RELATOS HISTÓRICOS DE *VITEX AGNUS CASTUS* L.

V. agnus castus L. era uma das espécies que fazia parte das plantas medicinais oficiais da antiguidade, sendo mencionada nos trabalhos de Hipócrates, Dioscórides e Teofrasto.^{1,2, 4}

A maior indicação do uso da planta tem sido nos problemas decorrentes da disfunção hormonal feminina e tem sido relatado que seu maior benefício é durante a menopausa.¹

O nome da espécie *agnus castus*, é originário do latim castitas, que significa castidade, o nome agnus é comparado ao termo grego agnos, que significa cordeiro.¹

Cientistas e escritores da antiguidade são unânimes em atribuir o poder especial à planta de suprimir o desejo sexual, tendo sido por isso usada em forma de chás pelas esposas dos soldados romanos na ausência destes por causa das guerras.³

A igreja Católica, na Europa, colocava ramos da planta nas roupas dos monges noviços no intuito de inibir a libido dos mesmos.^{2,3}

Os gregos antigos chamavam a planta de “árvore casta” e a usavam no culto a Demeter, deusa grega da agricultura. Eles acreditavam que a abstinência à coisas materiais e ao sexo fazia com que fossem retribuídos com a renovação da terra uma boa colheita.^{3,5}

Para alguns, *V. agnus castus* é uma contradição, pois ao mesmo tempo que suas ações biológicas promovem a restauração dos órgãos reprodutores, inibem o impulso sexual, ou seja torna o útero saudável e reprime o desejo sexual, o que faz com que se torne um artifício perigoso.

Em todo caso as preparações de *V. agnus castus* L. seriam muito bem empregadas no tratamento da compulsividade ao sexo, patologia que tem acometido muitas pessoas e que se não tratada adequadamente pode causar sérios transtornos às vidas das pessoas que sofrem desta doença.⁴

A história também traz referência à planta na cura da insanidade e da loucura. Na idade média era comercializada na Europa como calmante para histeria e na Renascença, nas farmacopéias européias, a planta teve seu uso oficializado.

A planta é usada como fitoterápico no mundo inteiro, Brasil, Japão, Inglaterra, França e Alemanha, não somente por suas ações referentes às funções reprodutivas, mas também como diurético e digestivo. Neste trabalho, levando-se em consideração o alto teor de 1,8-cineol presente nos óleos essenciais da planta, uma das possíveis recomendações seria o uso das folhas como antisséptico das vias respiratórias superiores, uma analogia ao uso do eucalipto.^{5,6}

Atualmente, a busca por terapias alternativas tem sido uma constante, principalmente no que diz respeito aos produtos naturais,⁷

1.3. PORQUE ESTUDAR *V. AGNUS CASTUS* L

Diversos fatores motivaram o estudo de *V. agnus castus* L.:

1. O fato da planta ser oriunda de fora do Brasil e ter se adaptado muito bem às condições de solo e clima brasileiro;
2. O uso da planta como um possível fitoestrogênio;
3. O isolamento de substâncias químicas com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os constituintes químicos de uma espécie do Brasil e as espécies nativas da região do mediterrâneo.



Capítulo 02

2. Considerações Sobre a Espécie *Vitex agnus castus* L.

2.1. Considerações Etnobotânicas

Vitex agnus castus L. é uma árvore bastante ramificada que pode chegar a medir até treze metros de altura (Fig. 3, pág. 12). Com folhas fortemente aromáticas, digitadas, opostas e flores labiadas, violáceas ou brancas, em cachos terminais. Floresce no verão e desenvolve frutos de coloração marrom, quase pretos, com cerca de 3,5 mm de diâmetro (Fig. 4, pág. 13).^{8,9}

Os frutos têm forte aroma agradável e é a parte da planta usada como medicamento. A espécie pertence ao gênero *Vitex*, família Verbenaceae, ordem Lamiales.

Nativa da região do mediterrâneo e da Criméia, sendo encontradas em regiões quentes da Ásia, África e das Américas.

Trata-se de uma espécie usada medicinalmente desde os tempos de Hipócrates e atualmente é usada como fitoterápico com base nos dados científicos relatados sobre sua eficácia no tratamento de diversas desordens ginecológicas feminina.¹⁰

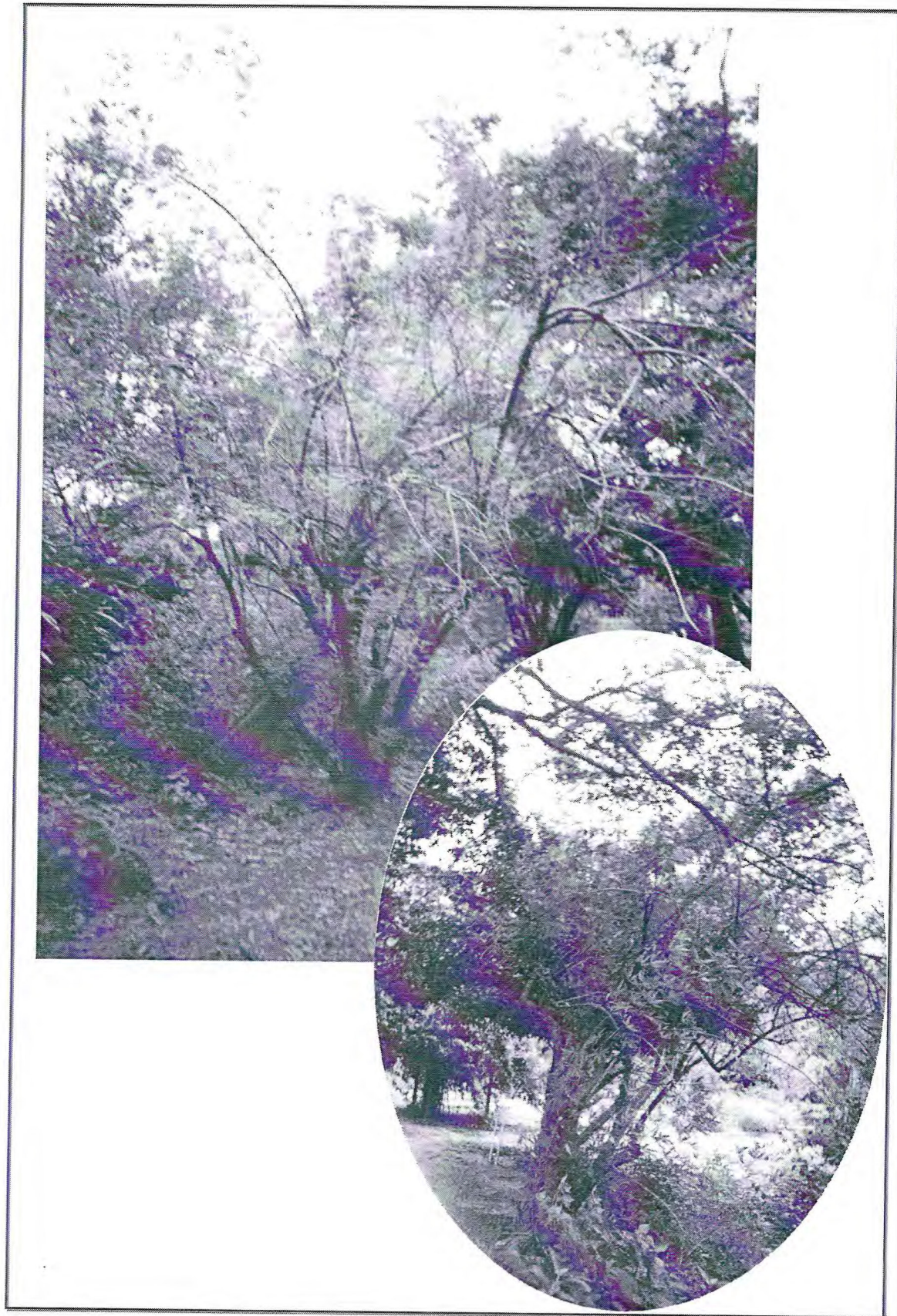


Figura 3. Fotos da árvore *Vitex agnus castus* L. que se encontra no Horto de Plantas Medicinais da UFC.

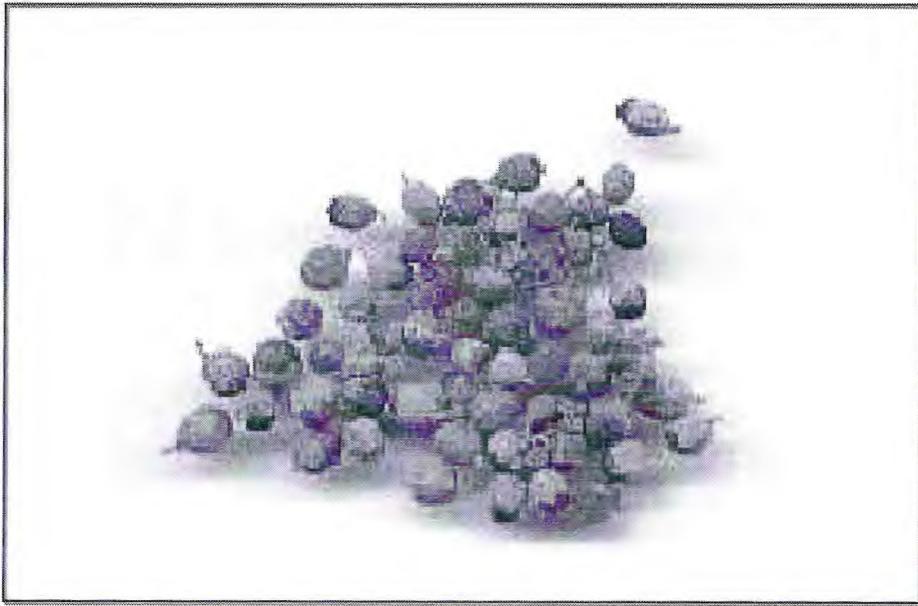


Figura 4. Frutos de *Vitex agnus castus* L.

2.2. Considerações farmacológicas

As primeiras pesquisas feitas com *V. agnus castus* L considerando a atividade benéfica nas desordens menstruais foram realizadas na Alemanha, pelo médico Gerhard Madaus, no ano de 1938. Os experimentos foram realizados em ratas usando os extratos das folhas, frutos e caule da planta. Os resultados com o extrato dos frutos de *V. agnus castus* mostrou-se bastante promissor nos modelos utilizados por Gerhard. Durante a segunda guerra mundial, na Alemanha, extratos da planta também foram usados para promover o suprimento da lactação em mulheres, o que ocasionou a base de uma nova pesquisa para a descoberta de substâncias estimuladoras para a lactação.^{9,10}

Os demais testes realizados nesta área levaram aos pesquisadores a postularem que *V. agnus castus* continha algum(s) componente(s) que alterava(m) a produção de hormônios no organismo. Este fato fez com várias pesquisas farmacológicas fossem realizadas e o resultado destas pesquisas indicou que as formulações feitas com a *V. agnus castus* atuavam no organismo feminino, ao nível da glândula pituitária, centro de regulação da produção de alguns hormônios, principalmente dos hormônios que controlam a menstruação e a fertilidade.^{1,10}

Nos anos de 1940 e 1950, foram realizadas experiências pré-clínicas e os resultados levaram quase toda a Europa a adotar o uso da planta nas indicações do tratamento das desordens menstruais e tratamento da infertilidade relacionada à insuficiência do corpo lúteo.¹⁰

No ano de 1986, também na Alemanha, foi realizado, por um período de três meses, um teste com 36 pacientes portadoras da Síndrome Pré-Menstrual. O grupo de pacientes consumiu durante os três meses 40 gotas diárias da tintura de *V. agnus castus* durante o período de teste e o resultado ao final deste tempo foi a supressão dos sintomas inerentes à Síndrome Pré-Menstrual em todo o grupo.¹

Estes resultados promissores levaram a um novo teste com 1571 pacientes. Deste grupo noventa por cento dos pacientes mostraram resultados positivos e os sintomas adversos foram considerados insignificantes, apenas 1,9%. Dentre os sintomas indesejados mais relatados pelo grupo estavam as desordens de natureza gástrica e

nenhum sintoma de alto risco foi citado. Estes dados foram suficientes para considerar a planta como fitoterápico de primeira escolha para estes males.

Atualmente, tem sido dado à esta espécie uma importância fundamental, devido à descoberta das atividades da planta não somente nas desordens menstruais, mas também nos problemas inerentes à menopausa e pós-menopausa.

A espécie está cotada como um potente meio alternativo à terapia de reposição hormonal em virtude dos graves problemas que têm sido relatados em decorrência do uso da terapia de reposição hormonal por mulheres na pós-menopausa.^{10,11}

Estudos científicos relatam que no período pós-menopausa muitas mulheres apresentam alguns sintomas indesejáveis em decorrência da diminuição da produção dos hormônios estrógeno e progesterona.¹⁰

Estes sintomas combinados com o aumento da incidência de osteoporose, problemas cardiovasculares e surgimento do mal de Alzheimer, fizeram com que fosse iniciado um tratamento nestas mulheres com reposição dos hormônios estrógeno e progesterona.^{10,11}

A indústria farmacêutica patrocinadora dos hormônios sintéticos acobertou por muito tempo os efeitos provavelmente causados pela terapia da reposição hormonal. E destes, o principal era a tendência do surgimento de câncer de mama em pacientes adeptos desta terapia.¹²

A mídia tentou esconder por muito tempo, haja vista a quantidade de dinheiro envolvida, até que a ética prevaleceu e não se pode mais ocultar os efeitos adversos da terapia de reposição hormonal.¹²

Um ponto básico a se discordar da terapia de reposição hormonal é que a menopausa não é uma doença, é uma fase da vida da mulher, uma seqüência lógica da vida. O outro ponto bastante racional é que não se pode repor um hormônio no organismo, uma vez que os hormônios são produzidos à necessidade do corpo e em cadeia. Na menopausa a mulher diminui a produção de estrógeno e de progesterona porque estes hormônios estão ligados ao ciclo reprodutivo feminino e na menopausa

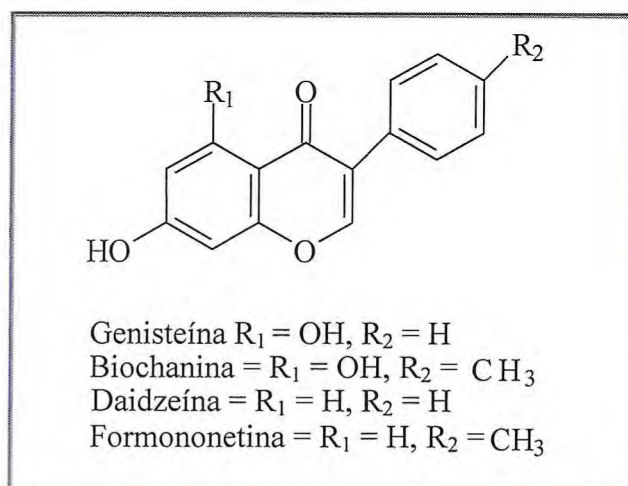
todo o organismo da mulher já está propenso a não mais reproduzir e o natural é a diminuição destes hormônios.¹²

Fato considerado real é a osteoporose, porém alguns sintomas como calor excessivo e depressão estão relacionados com a menopausa e a perda da juventude, tão temida por homens e mulheres.

Alguns sintomas podem ser aliviados pelos produtos de procedência natural, porém a osteoporose não. Esta somente se resolve com a reposição hormonal. Porém os casos de aumento da incidência de câncer tem sido tão alarmante que mesmo sem resolver os problemas da osteoporose, os produtos naturais tem sido considerados uma terapia alternativa com muitas indicações.

Como por exemplo temos os casos das mulheres que tiveram, ou têm, história na família de câncer de mama, para elas esta totalmente contra indicado o tratamento com reposição hormonal. É neste contexto que entram as formulações utilizando *Vitex agnus castus*, principalmente em países da Europa e na China onde a medicina natural utiliza também formulações com outras plantas tais como: *Angélica sinensis*, *Glycyrrhiza glabra* L., *Cimifuga racemosa*, *Trifolium pratense* L. e *Mumulus Lupulus* L.¹²

Com relação à classe de produtos naturais, é muito variada, porém são sempre referências as isoflavonas, como as substâncias genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina na fig. ao lado, porém a literatura cita outras substâncias com semelhante atividade.





Capítulo 03

3. Considerações Sobre o Gênero *Vitex*

O gênero *Vitex* (Verbenaceae) compreende aproximadamente 270 espécies conhecidas, quase todas de clima tropical e/ou subtropical, com poucas ou raríssimas espécies na zona temperada.¹²

São árvores ou arbustos de pequeno porte, bastante aromáticas e quase todas de uso medicinal, principalmente na Índia e no México, como é o caso da espécie *Vitex mollis*, usada para aliviar os problemas causados pela disfunção do intestino, é usada também como analgésico, antiinflamatório e indicada nas mordidas de escorpiões.¹³ É atribuído também às espécies *V. gaumeri*, *V. agnus castus* e *V. negundo* propriedades antimalárica, antimicrobiana e antifúngica, que são as espécies. Em muitos países as espécies do gênero são usadas por suas propriedades inseticidas e larvicidas, como é o caso da espécie *V. negundo* que apresenta atividade larvicida contra o mosquito *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensis* e *Aedes aegypti*.¹⁴

O gênero *Vitex* apresenta espécies com variados constituintes químicos, porém a característica principal das espécies deste gênero tem sido a presença de flavonóides e iridóides. Entretanto neste vasto gênero são encontradas também substâncias pertencentes a outras classes de produtos naturais tais como: diterpenos labdanos, alcalóides, lignanas, chalconas e ecdisteróides.^{15, 17}

A maioria das espécies do gênero *Vitex* é nativa da região do Mediterrâneo, porém são plantas bem adaptáveis a outras regiões de clima semelhante. No Brasil há registros da ocorrência de espécies do gênero *Vitex* do Amazonas ao Rio Grande do Sul; e destas as espécies *Vitex montevidens*, *Vitex trifolia*, *V. odorata* Hub e *Vitex agnus castus* L. são as de ocorrência mais citadas.



Capítulo 04

4. Levantamento Bibliográfico

O gênero *Vitex*, como já foi citado no capítulo anterior, compreende um vasto número de espécies, cerca de 270. É comum às espécies do gênero a presença de substâncias das classes de produtos naturais flavonóides, iridóides e ecdisteróides. Porém também tem sido isolados algumas lignanas, chalconas e diterpenos. Neste trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico a cerca de substâncias isoladas do gênero *Vitex* com atividades biológicas relatadas pela literatura.^{18,19,20}

Os resultados deste levantamento encontram-se na Tabela 3, págs.19-23, citando as espécies e suas respectivas substâncias isoladas. As estruturas estão no Quadro 2.pág. 24-33.

Tabela 3. Espécies do gênero *Vitex*, atividade biológica e seus constituintes químicos

Espécie	Atividade biológico	Constituintes químicos	Ref.
<i>Vitex agnus castus</i> L	Estrogênica	Agnosídeo (13) Aucubina (14) Casticina (5) Orientina (15) 2''-O-cafeoil-orientina (16) 7-Glicosil-luteolina (17) Glicosídeo 6-C-(4''-metil-6''-O-transcafeoil) luteolina (18) Glicosídeo 6-C-(6''-O-transcafeoil) luteolina (19) Glicosídeo 6-C-(2''-O-transcafeoil) luteolina (20) Glicosídeo 7-O-(6''-p-benzoil) luteolina (21) 4',5-Diidroxi-3,3',6,7-tetrametoxiflavona (22) Luteolina (9) Artemetina (23) Isoartemetina (24) Rotundifurano (25) Vitexlactona (26) 6β,7β-Diacetoxi-13-hidroxi-labda-8,14-dieno (27) Vitexlactma (28)	20, 22, 23

Tabela 3. Espécies do gênero *Vitex*, atividade biológica e seus constituintes químicos (continuação).

Espécie	Atividade biológico	Constituintes químicos	Ref.
<i>Vitex rotundifolia</i>	Anticancerígena, inseticida e Antibacteriana	Agnosídeo (13) Rotundifurano (25) Vitrofolal A (29) Vitrofolal B (30) Vitrofolal C (31) 1-(3,4-Dimetoxifenil)-2,7-diidroxil-8-metoxinaftaleno-3-carbaldeído (32) Vitexcarpina (33) Artemetina (23) 2',3',5-Triidroxil-3,6,7-trimetoxiflavona (34) Vitetrifolina A (35) Vitetrifolina B (36) Vitetrifolina C (37)	24, 25, 26
<i>Vitex negundo</i>	Antireumática	Agnosídeo (13) Aucubina (14) Ácido 2'- <i>p</i> -hidroxibenzoil mussaenosídico (38) Ácido 6'- <i>p</i> -hidroxibenzoil mussaenosídico (39) 3-formil-4,5-dimetil-8-oxo-5H-6,7-diidronafto (2,3- <i>b</i>)furano (1) Vitexcarpina (32)	27, 28, 29, 30, 8

Tabela 3. Espécies do gênero *Vitex*, atividade biológica e seus constituintes químicos (continuação).

Espécie	Atividade biológica	Constituintes químicos	Ref.
<i>Vitex scabra</i>	Antiinflamatória	24-Epi-pinasterona (40) Escabrasterona (41) 20-hidroxiecdisona (42) Pinasterona (43) Turkesterona (44)	31, 32, 33
<i>Vitex trifolia</i>	Inseticida	Casticina (5) Luteolina (9) Rotidufurano (25) Vitetrifolina A (34) Vitetrifolina B (35) Vitetrifolina C (36) Diidrosolidagenosa (45) Isorientina (46) Abietatrieno-3 β -ol (47)	39, 40
<i>Vitex polygama</i>	Antiinflamatória	Orientina (15) Isorientina (46) Luteolina (9) Quercetina (10) 2''-O-cafeoilorientina (16) Vitexina (48)	

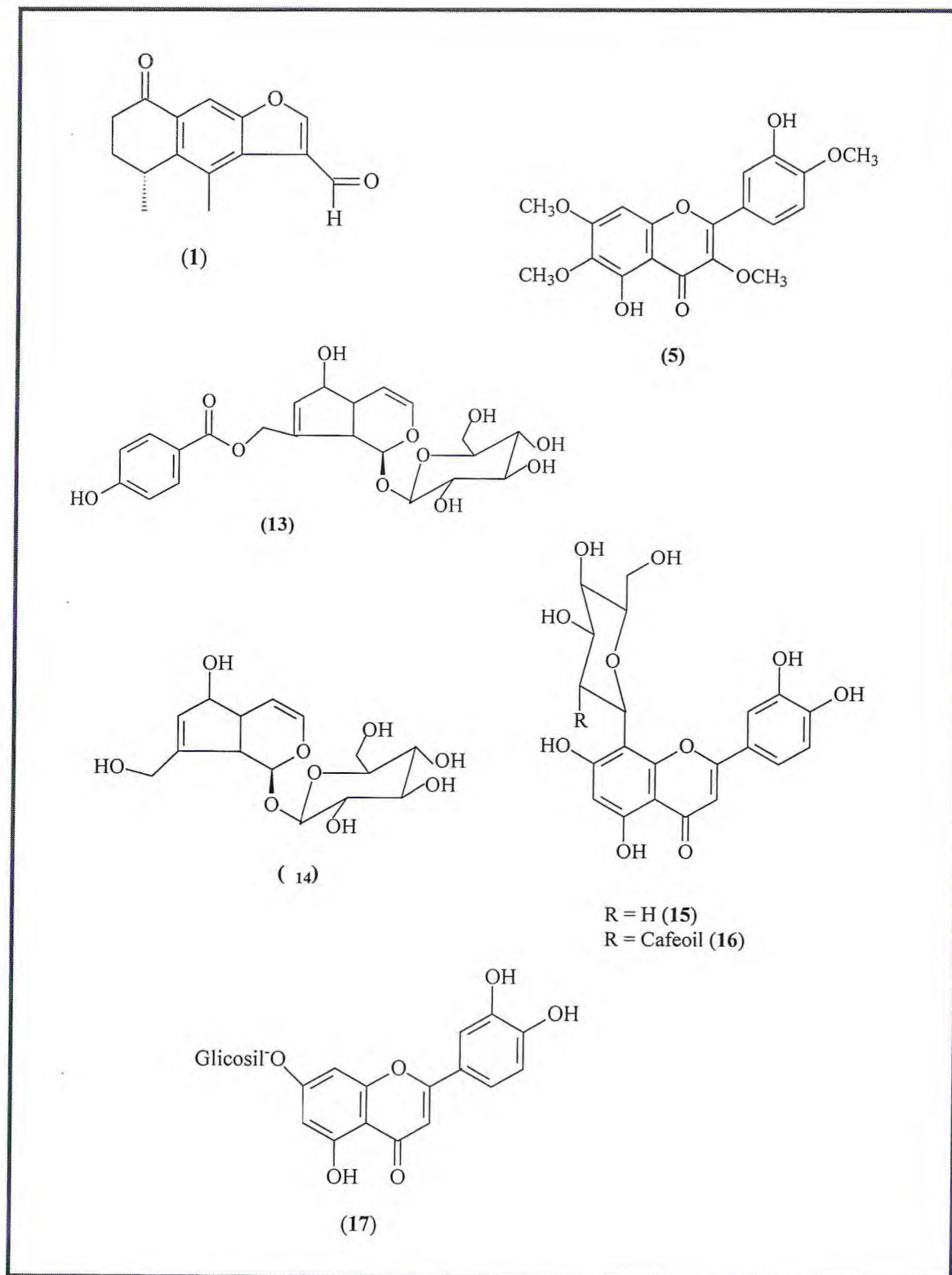
Tabela 3. Espécies do gênero *Vitex*, atividade biológica e seus constituintes químicos (continuação).

Espécie	Atividade biológico	Constituintes químicos	Ref.
<i>Vitex canescens</i>	Antiinflamatória	20-Hidroxiecdisona (42) 24-Epi-makisterona A (49) 11 α ,20,26-Triidroxiecdisona (50) Turkesterona (44) 24-Epi-abusterona (51) Chidasterona (52) Calonisterona (53) (24R)-11 α ,20,24-Triidroxiecdisona (54) Abutasterona (55) Canescensterona (56)	41,42
<i>Vitex pinnata</i>	Antiinflamatória	Turkesterona (43) 20-Hidroxiecdisona (41) Abustaterona (55) Pinatasterona (42) Ajugasterona C (57)	45,46

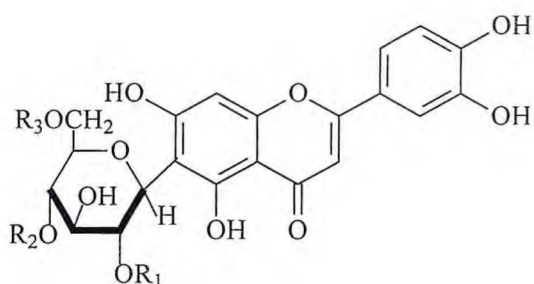
Tabela 3. Espécies do gênero *Vitex*, atividade biológica e seus constituintes químicos (continuação).

Espécie	Atividade biológico	Constituintes químicos	Ref.
<i>Vitex strickeri</i>	Antiinflamatória	20-hidroxiecdisona (41) Ajugasterona C (57) Abutasterona (55) 11 α -Hidroxiecdisona (58)	49, 50
<i>Vitex leptobotrys</i>	Anti-reumática	Cardamomina (59) Helichrisetina (60) 2',4'-Dihidroxi-4,6'-dimetoxichalcona (61) 4,4'-Dihidroxi-4,6'-dimetoxichalcona (62) 4'-Hidroxi-4,2',6'-trimetoxichalcona (63) 4,2',4' β -Tetraidroxi-6'-metoxi- α,β -dihidrochalcona (64)	37, 38, 39, 30

Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura

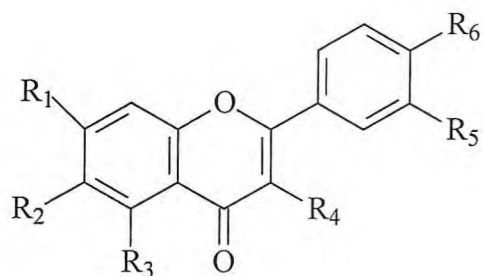
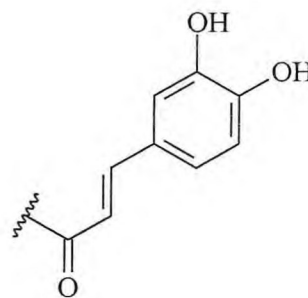


$R_1 = H$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = \text{transcafeoil}$ (**18**)

$R_1 = R_2 = H$; $R_3 = \text{transcafeoil}$ (**19**)

$R_1 = \text{transcafeoil}$; $R_2 = R_3 = H$ (**20**)

trans cafeoil



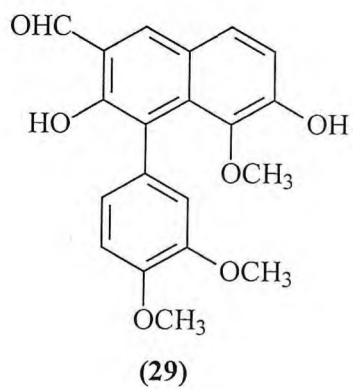
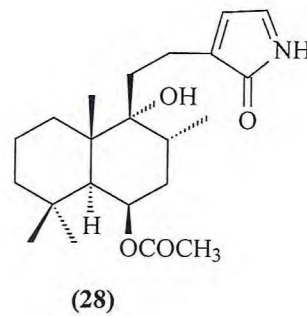
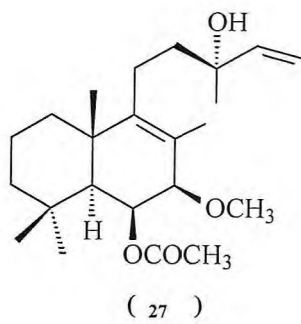
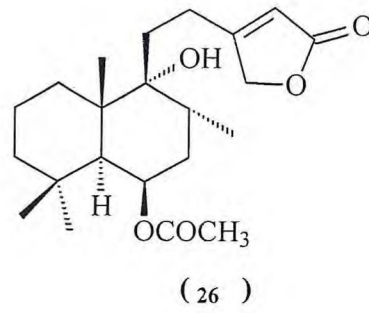
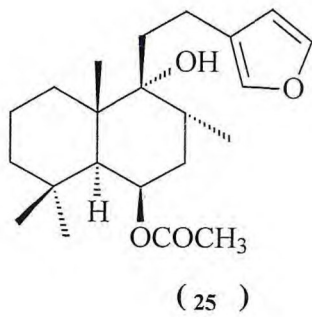
$R_1 = O\text{-Gli}(6''\text{-}p\text{-hidroxibenzoil})$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = R_5 = R_6 = OH$ (**21**)

$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = OCH_3$, $R_3 = R_6 = OH$ (**22**)

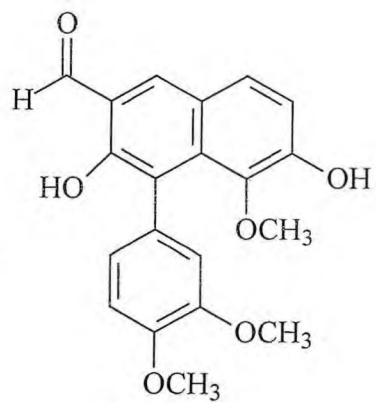
$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = OCH_3$, $R_3 = OH$ (**23**)

$R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = OH$, $R_5 = R_2 = H$ (**24**)

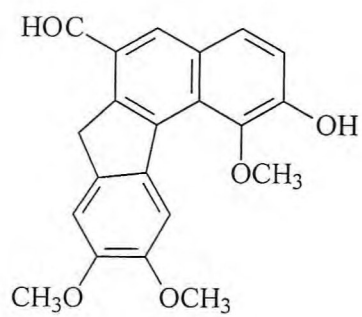
Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



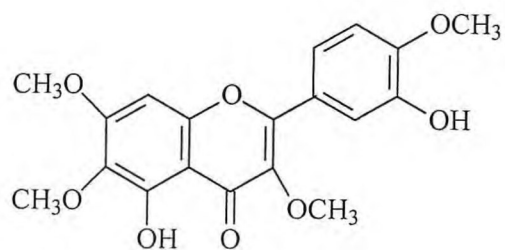
Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



(30)

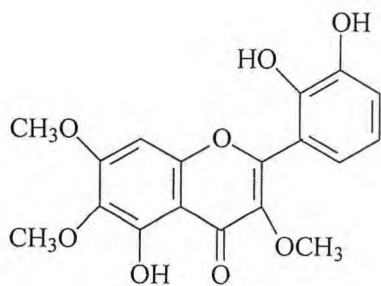


(31)

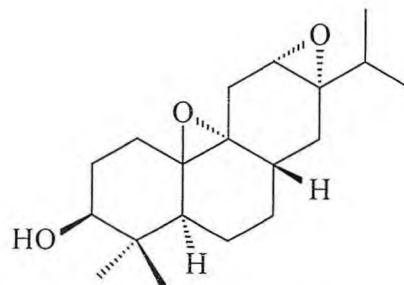


(32)

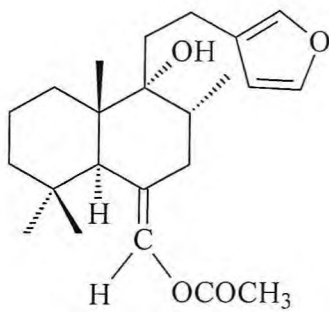
Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



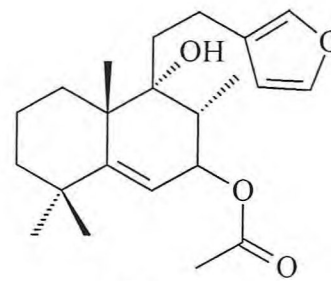
(33)



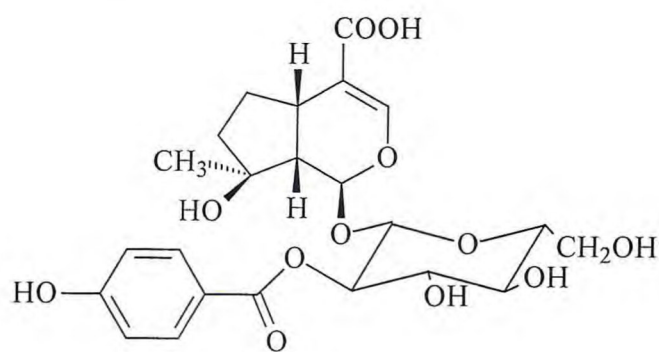
(34)



(35)

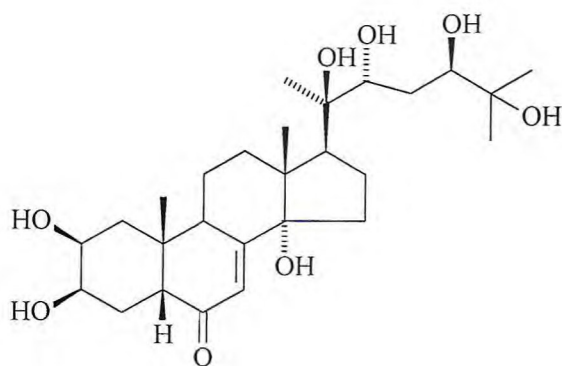
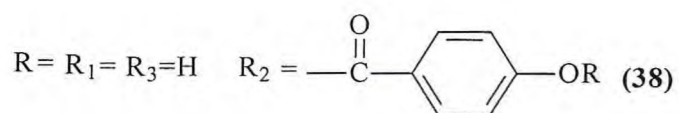
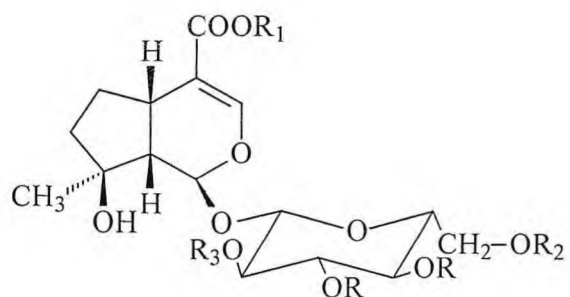


(36)

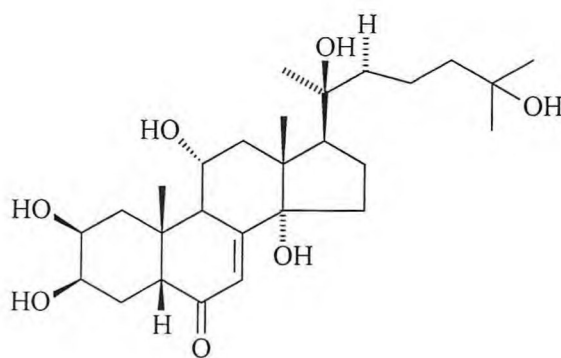


(37)

Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura

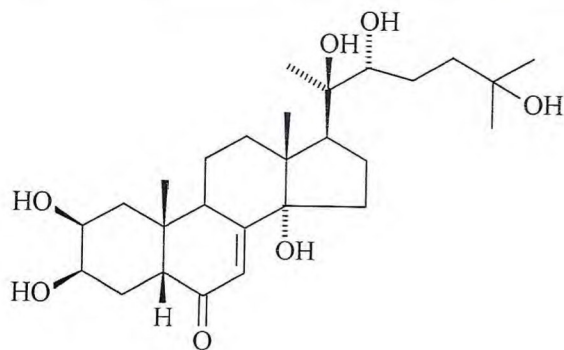


(40)

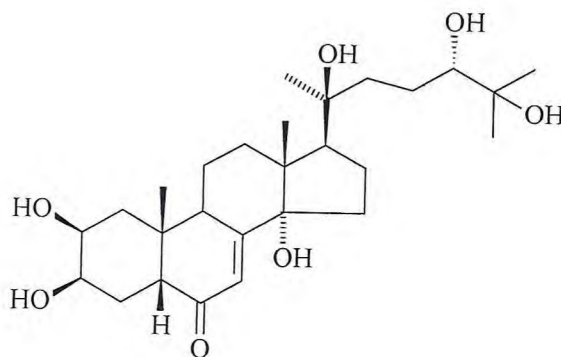


(41)

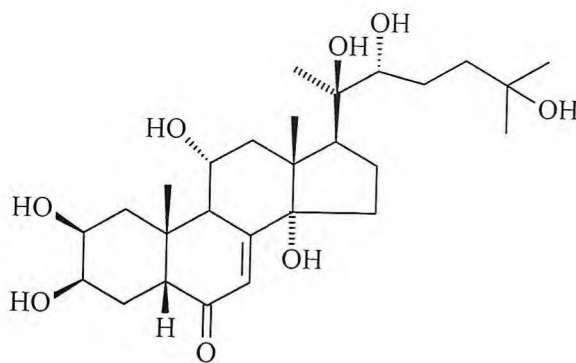
Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



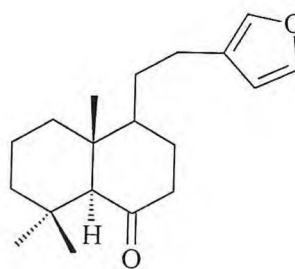
(42)



(43)

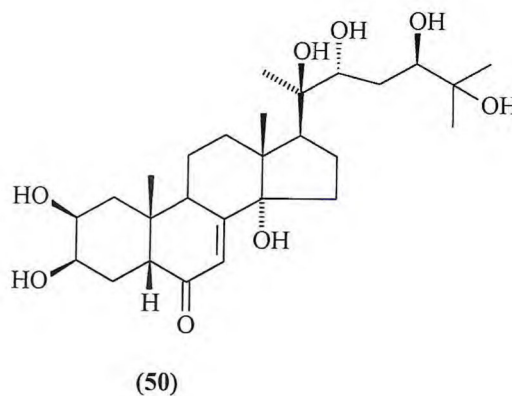
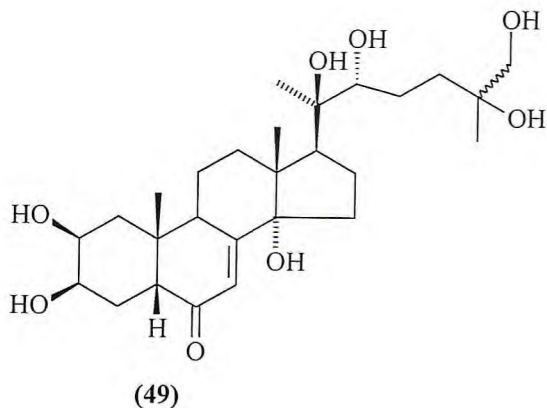
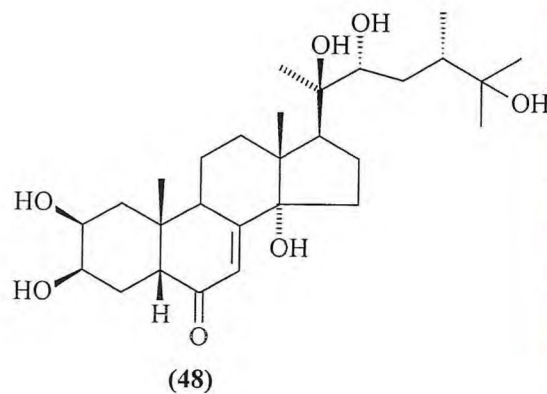
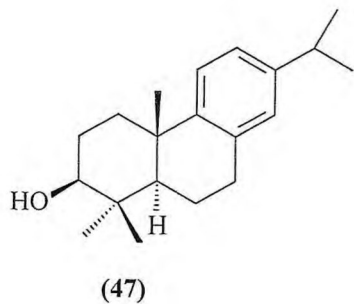


(44)

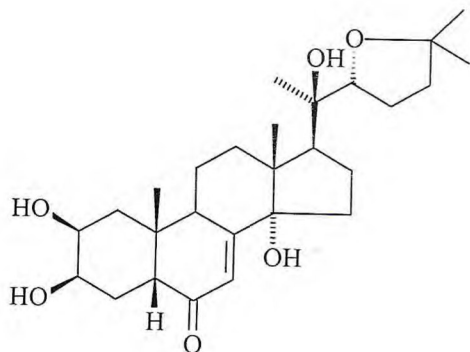


(45)

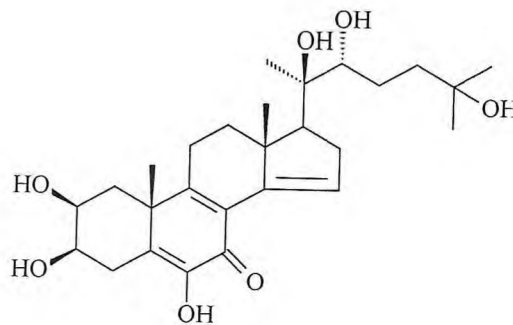
Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



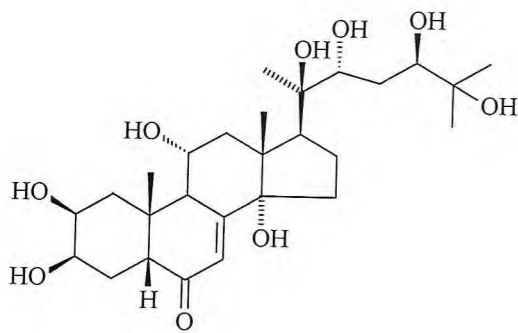
Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



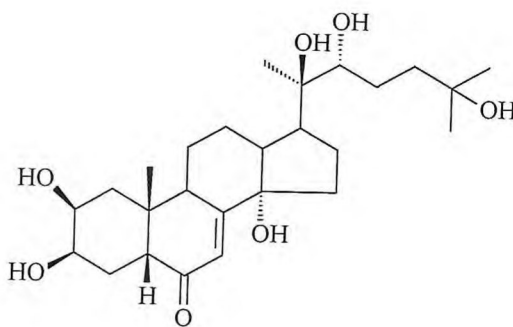
(51)



(52)

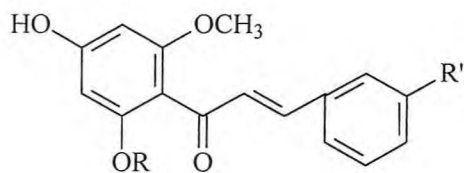
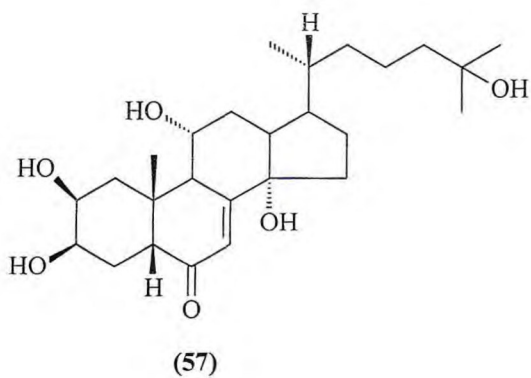


(53)

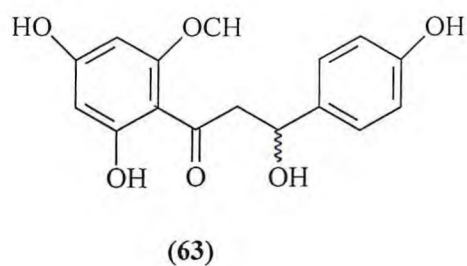


(55)

Quadro 02. Estruturas de substâncias isoladas de espécies do gênero *Vitex* com registro na literatura



- 58. R = H, R' = H
- 59. R = H, R' = OH
- 60. R = H, R' = OCH₃
- 61. R = CH₃, R' = OH
- 62. R = CH₃, R' = OCH₃





Capítulo 05

5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DE *V. AGNUS CASTUS* L.

5.1. Determinação estrutural de CV1 (1)

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica do extrato metanólico do caule de *V. agnus castus* L. forneceu dentre outros materiais não analisados, um sólido branco, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão na faixa de 143 – 145°C, que foi denominada **CV1**.

O espectro de massas (Fig. 5, pág. 40) de **CV1** obtido por impacto eletrônico a 70 ev, forneceu o pico do íon molecular $[M]^+$ em m/z 242 daltons. No quadro 3, pág. 40, encontram as fragmentações atribuídas a este espectro.

A integração do espectro de RMN ^1H (Fig. 6, pág. 40.) revelou a presença de quatorze átomos de hidrogênios e de acordo com a teoria do deslocamento químico dois destes hidrogênios em δ 8,15 (s) e δ 8,39 (s) foram atribuídos a hidrogênios de carbonos aromáticos e ainda um sinal em δ 10,16 (s) que foi relacionado à presença de um hidrogênio de grupamento aldeídico.

Prosseguindo-se a análise do espectro de RMN ^1H , verificou-se a presença de dois sinais intensos relativos a hidrogênios de dois grupamentos metilas, sendo um em δ 2,90 (s), atribuído a hidrogênio de carbono metílico ligado a anel aromático e um sinal em δ 1,35 (d, $J = 7,1$ Hz) que foi atribuído a um grupamento metila ligado a um carbono metínico benzílico. O sinal na região δ 3,35 (m) (ver expansão) (Fig. 7, pág.41) foi atribuído a um hidrogênio de carbono metínico acoplado a a hidrogênios de metila, justificando o sinal dubleto anterior. Os demais sinais foram em δ 2,13 (ddt, $J = 14,9; 5,5$ e $2,3$ Hz); δ 2,33 (tt, $J = 14,9$ e $4,7$ Hz); δ 2,68 (ddd, $J = 18,1; 4,7$ e $1,8$ Hz) e δ 2,93 (ddd, $J = 18,1; 14,9$ e $5,5$ Hz) (ver expansão) que foram atribuídos a átomos de hidrogênios de dois grupos metilênicos adjacentes.

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig.8, pág. 41) revelou quinze átomos de carbonos e a comparação deste com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 9, pág. 42) permitiu atribuir o padrão de hidrogenação dos carbonos de **CV1** (Tab. 4, pág. 35),

onde verificou-se que **CV1** continha sete carbonos não hidrogenados, quatro carbonos metínicos, dois carbonos metilênicos e dois carbonos metílicos.

Tabela.4. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3).

C	CH	CH ₂	CH ₃
125,6	29,2	29,2	17,6
127,6	109,2	33,1	19,3
130,7	160,4		
133,2	183,9		
144,0			
155,4			
198,4			
7C	4CH	2CH₂	2CH₃

O sinal em δ 198,4 de carbono não hidrogenado foi atribuído a uma carbonila possivelmente de cetona, enquanto o sinal em δ 183,2 de carbono metínico foi atribuído a uma carbonila de aldeído, confirmando o sinal em δ 10,16 (s) observado no espectro de RMN ^1H de **CV1**.

Dos sinais atribuídos a carbonos não hidrogenados, o sinal em δ 155,4 foi atribuído a um carbono aromático e oxigenado e os sinais em δ 144,0; δ 133,2; δ 127,6; δ 130,7 e δ 125,6 foram atribuídos a carbonos aromáticos possivelmente não oxigenados.

Os sinais referentes aos carbonos metínicos em δ 29,2 e δ 109,2 foram relacionados à presença de carbonos metínicos saturado e insaturado, respectivamente, e o sinal em δ 160,4 foi atribuído a carbono insaturado e oxigenado, sugerindo uma ligação dupla conjugada à carbonila aldeídica, o que justificaria a proteção observada à carbonila aldeídica.

Foram observados ainda dois sinais em δ 29,2 e em δ 33,1 atribuídos a carbonos de dois grupos metilênicos.

Os dados espectrais de RMN ^1H , RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° juntamente com as informações presentes no espectro de massas, considerando as possíveis fragmentações (Quadro 3, pág. 38), permitiram atribuir para **CV1** a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$.

Pesquisa realizada na literatura juntamente com a análise dos dados do espectro de massas e dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C – BB e DEPT 135°, permitiram atribuir a estrutura de um sesquiterpeno contendo um grupo funcional carbonila de cetona, uma carbonila de aldeído, além da presença de carbonos aromáticos e duas metilas, sendo uma acoplada a carbono metínico para CV1.

A análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $1\text{H} \times 1\text{H}$ – COSY (Fig. 10, pág. 42) revelou os acoplamentos entre os hidrogênios em δ 2,33 (tt, $J = 14,9$ e $4,7$ Hz) e δ 2,13 (ddt, $J = 14,9$; $5,5$ e $2,3$ Hz) e deste com o sinal em δ 2,68 (ddd, $J = 18,1$; $4,7$ e $1,8$ Hz) e em δ 2,93 (ddd, $J = 18,1$; $14,9$ e $5,5$ Hz). Verificou-se ainda acoplamento entre os hidrogênios atribuídos ao grupo metila em δ 1,35 (d, $J = 7,1$ Hz) com o multiplete em δ 3,95 confirmando a presença de um acoplamento vicinal entre um hidrogênio de carbono metínico e três hidrogênios de carbono metila.

Na análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ (Fig. 11, pág. 43), verificou-se a correlação entre o sinal de carbono em δ 183,9 (carbonila de aldeído) com o hidrogênio em δ 10,16 (s). Observou-se ainda as correlações entre os sinais de carbonos em δ 109,2 e δ 160,4 com os hidrogênios em δ 8,15 (s) e δ 8,39 (s), respectivamente.

Foi verificado ainda que os sinais em δ 29,2 e em δ 33,14 de carbonos saturados não oxigenados estavam correlacionados aos hidrogênios em δ 2,68 (ddd, $J = 18,1$; $4,7$ e $1,8$ Hz) e em δ 2,93 (ddd, $J = 18,1$; $14,9$ e $5,5$ Hz) e aos hidrogênios em δ 2,33 (tt, $J = 14,9$ e $4,7$ Hz) e 2,13 (ddt, $J = 14,9$; $5,5$ e $2,3$ Hz) respectivamente.

A análise complementar veio com as informações contidas no espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$), (Fig. 12, pág.

43), onde se verificou uma correlação a duas ligações do sinal de carbono carbonílico em δ 198,4 com os hidrogênios em δ 2,93 (ddd, $J = 18,1; 14,9$ e $5,5$ Hz) e δ 2,68 (ddd, $J = 18,1; 4,7$ e $1,8$ Hz) e a três ligações com o hidrogênio aromático em δ 8,15 (s).

Ainda no referido espectro foi observada a correlação do sinal de carbono em δ 144,0 a três ligações com os hidrogênios em δ 8,15 (s); δ 1,35 (d, $J = 7,1$ Hz) e δ 2,90 (s).

Na Tabela 5, pág. 39, constam as correlações observadas nos espectros HMQC e HMBC.

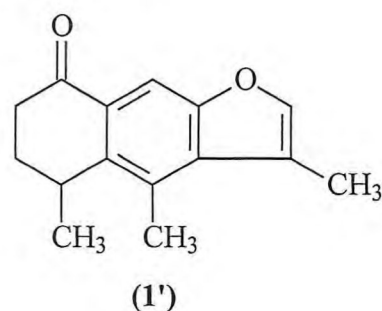
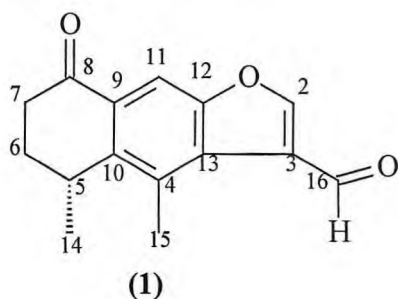
A análise dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais permitiram atribuir para CV1 a estrutura (1), um sesquiterpeno furânico, denominado 3-formil-4,5-dimetil-8-oxo-5H-6,7-diidronafto(2,3b)furano, que foi isolado da espécie *V. negundo*, porém é a primeira vez que é relatado na espécie *V. agnus castus* L.

A literatura relata que o composto (1), um sesquiterpeno de esqueleto eremofilano, raramente ocorre no gênero *Vitex*, sendo esta a segunda vez que o mesmo é isolado de uma espécie do gênero *Vitex*.

Segundo informações também constantes na literatura, o composto (1) parece ser o sucessor biogênico de 1-oxo-9-desoxicacolol(3,4,5-trimetil-8-oxo-5H-6,7-diidronafto(2,3b)furano (1').

Quando isolado de *V. negundo*, o composto (1), teve seus dados de RMN ^1H obtidos em um aparelho de ressonância magnética nuclear de 90 MHz e isto não possibilitou a detecção das constantes de acoplamentos vistos nos experimentos deste trabalho, uma vez que estes foram realizados em um aparelho de RMN de 500 MHz.

Os dados de RMN ^{13}C , assim como as informações obtidas em experimentos bidimensionais estão sendo relatadas pela primeira vez na literatura.



Quadro 3. Possíveis caminhos de fragmentação para CV1 (1) no espectrômetro de massa.

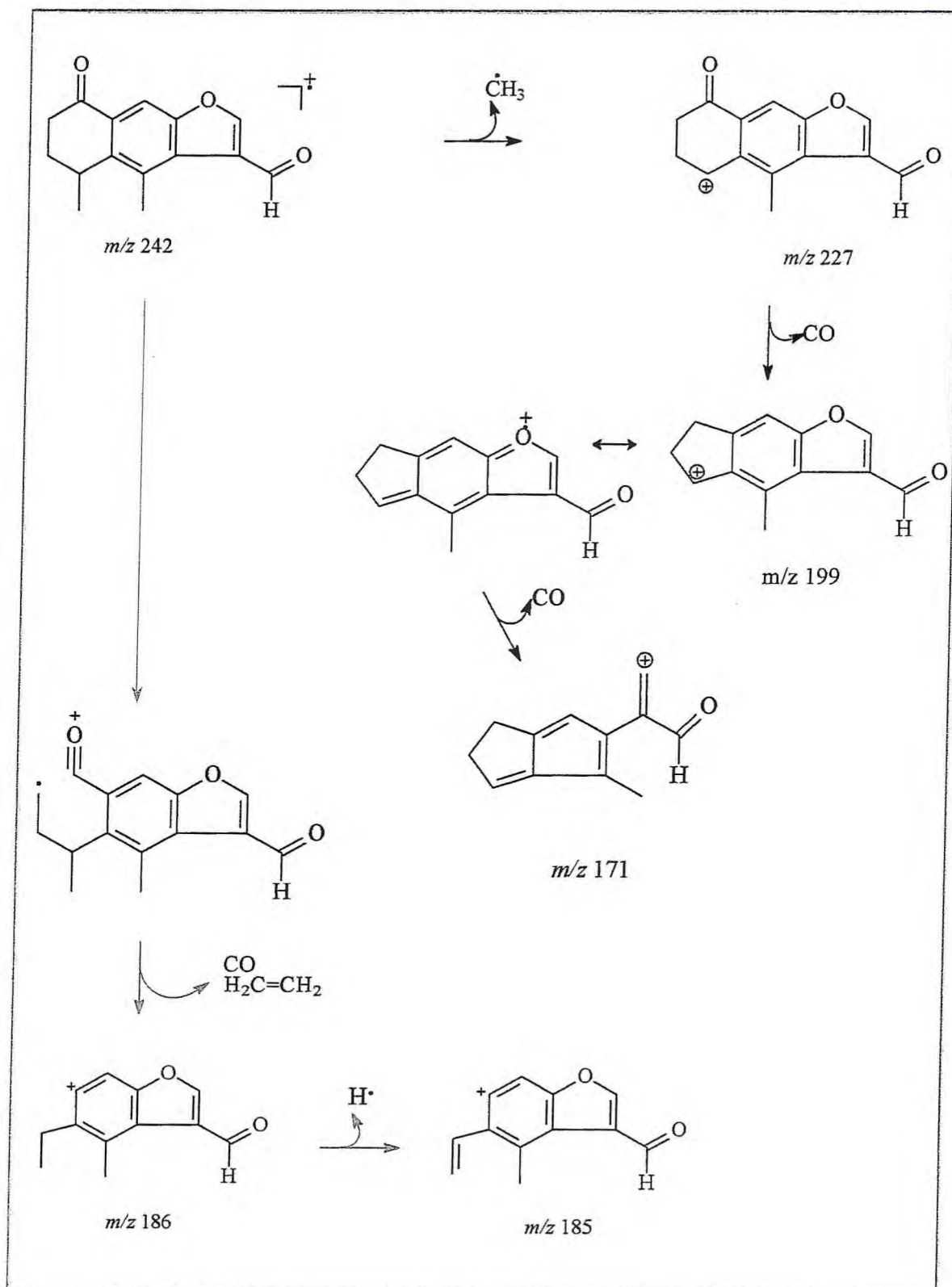


Tabela 5. Dados de HMQC e HMBC de CV1

CV1				
C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HMQC-}^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HMBC-}^nJ_{\text{CH}}$	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
3	125,6	—	H-16; H-2	—
4	133,2	—	3H-15	—
8	198,4	—	2H-7	H-11
9	130,7	—	H-11	—
10	144,0	—	—	H-11; 3H-14; 3H-15
12	155,4	—	H-11	—
13	127,6	—	—	H-11; H-16; H-2; 2H-15
CH				
2	160,4	8,39 (s)		
5	29,2	3,35 (m)		
11	109,2	8,15 (s)		
16	183,9	10,16 (s)		
CH ₂				
6	29,2	2,93 (ddd, J = 18,1; 14,9 e 5,5 Hz), H-6 ax, 2,68 (ddd, J = 18,1; 4,7 e 1,8 Hz), H-6 eq		
7	33,1	2,33 (tt, J = 14,9 e 4,7 Hz) H-7ax, 2,13 (ddt, J = 14,9; 5,5 e 2,3 Hz) H-7eq		
CH ₃				
14	19,3	1,35 (d, J = 7,1 Hz)		
15	17,6	2,90 (s)		

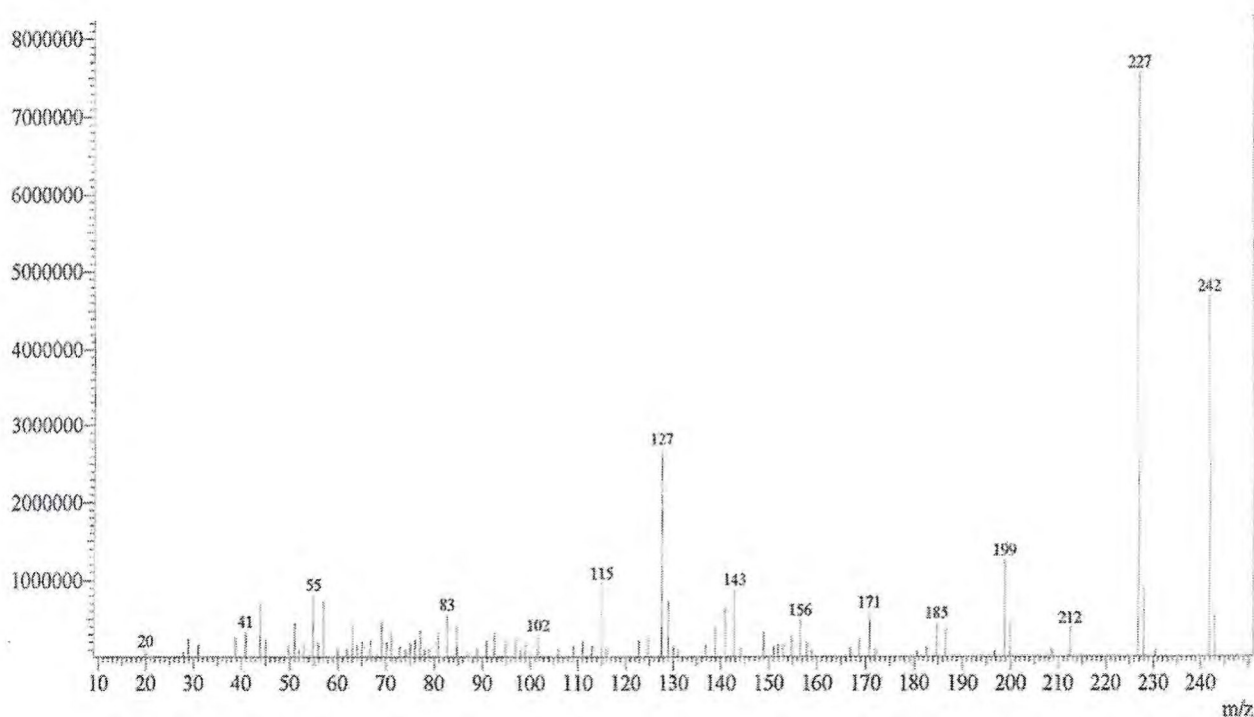


Fig. 5. Espectro de massas de CV1

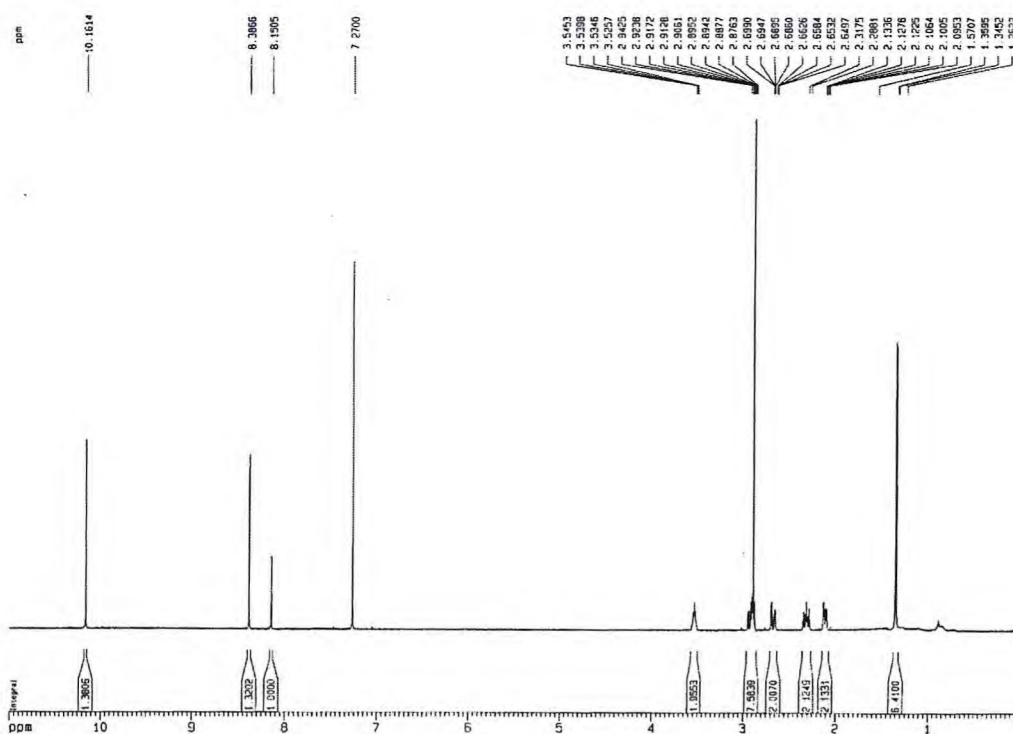


Fig. 6. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CV1

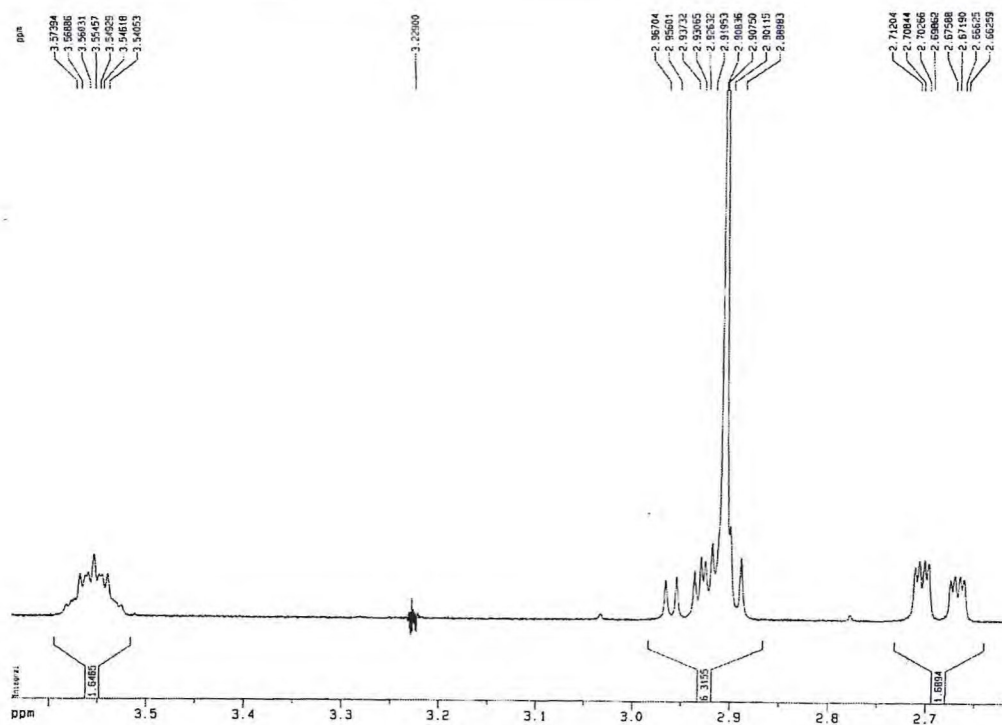


Fig. 7. Expansão do espectro de RMN ^1H da região 3,54 (m) de CV1

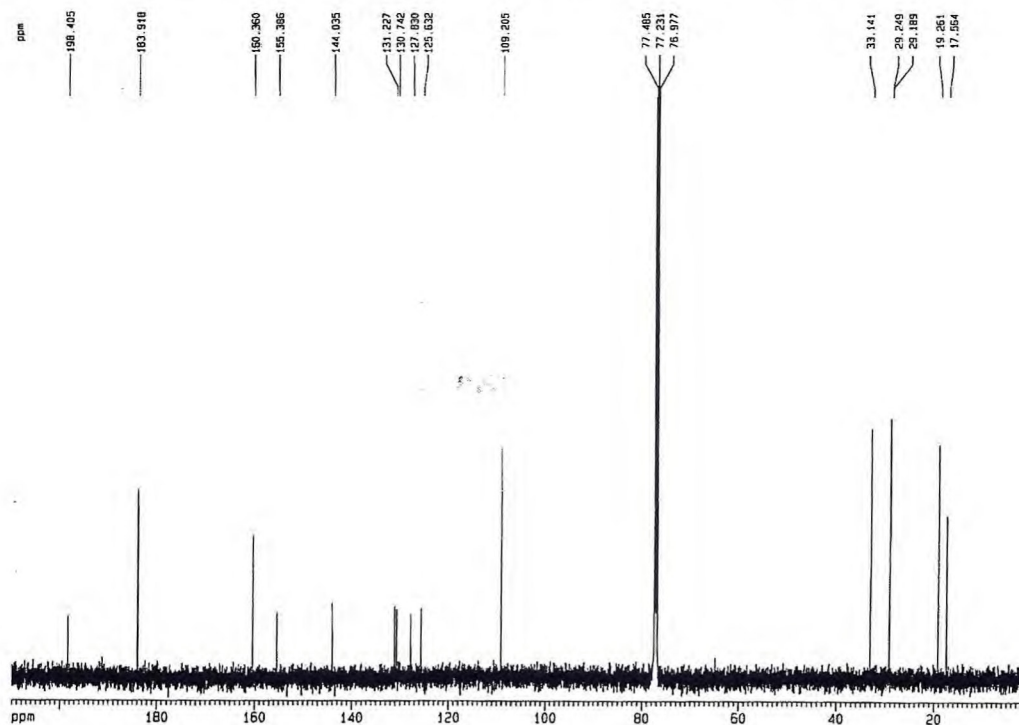


Fig. 8. Espectro de RMN ^{13}C - BB (125 MHz, CDCl_3) de CV1

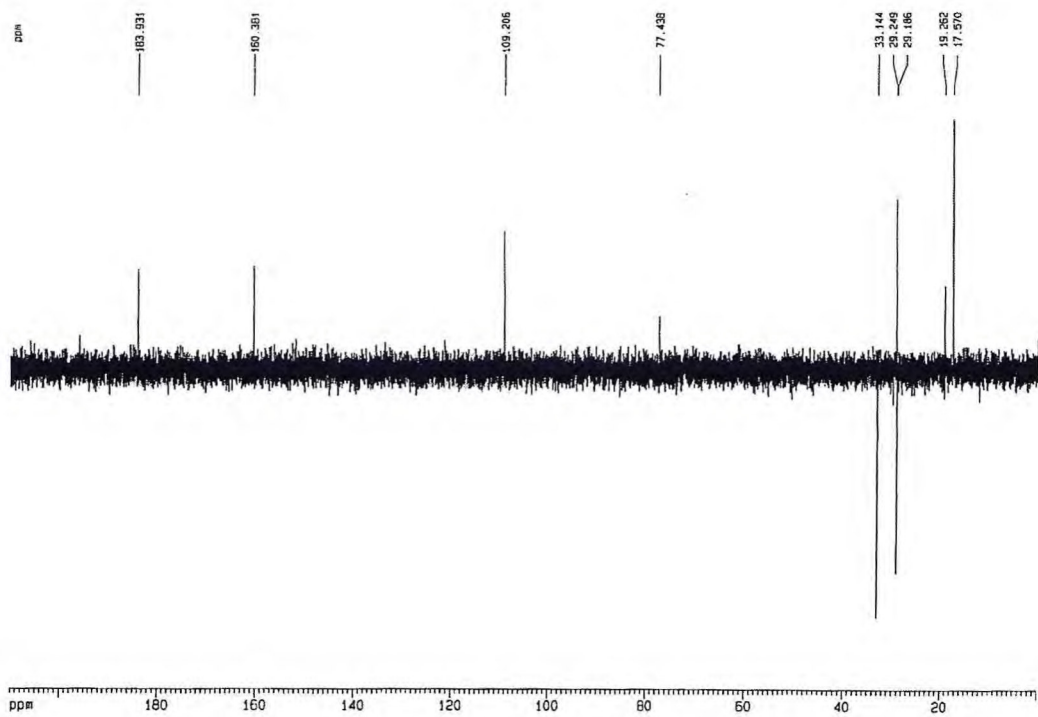


Fig. 9. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de CV1

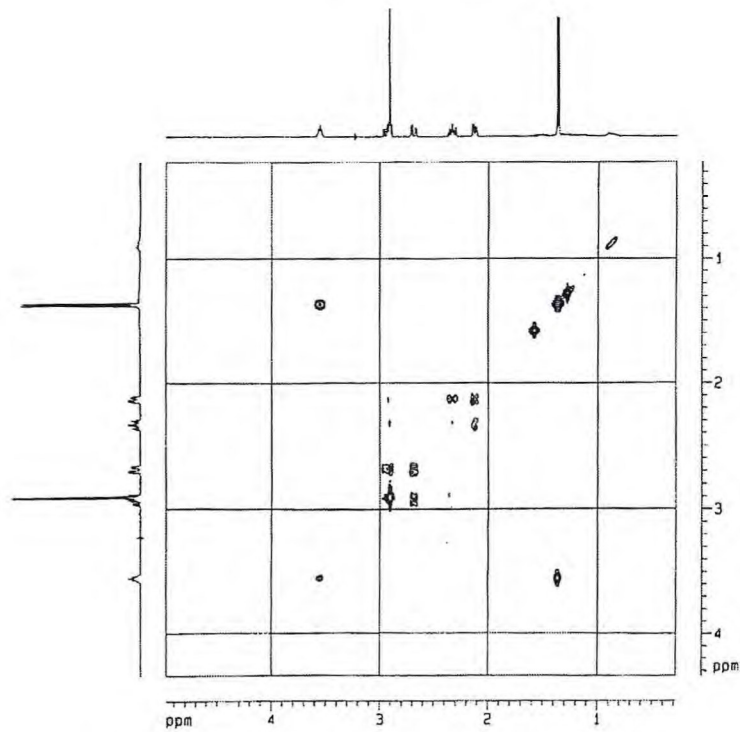


Fig. 10. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de CV1.

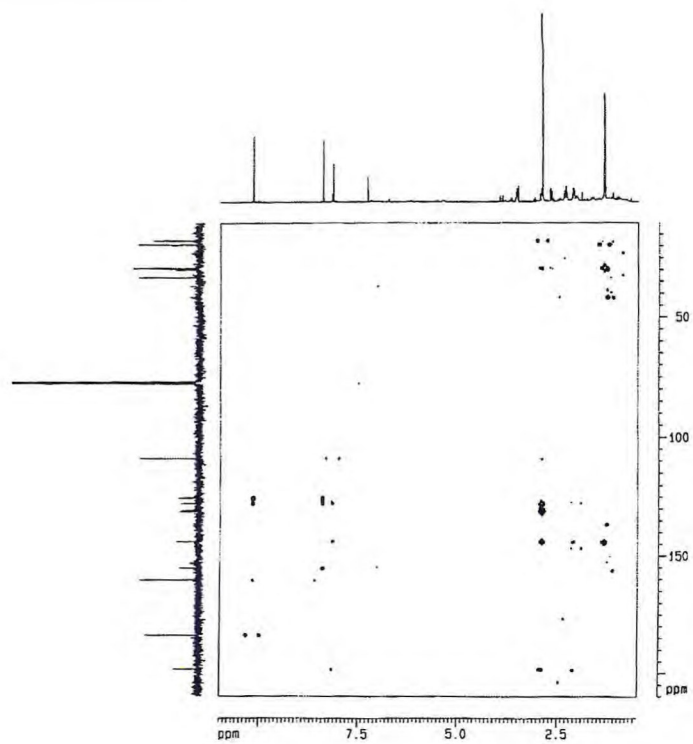


Fig. 11. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CV1.

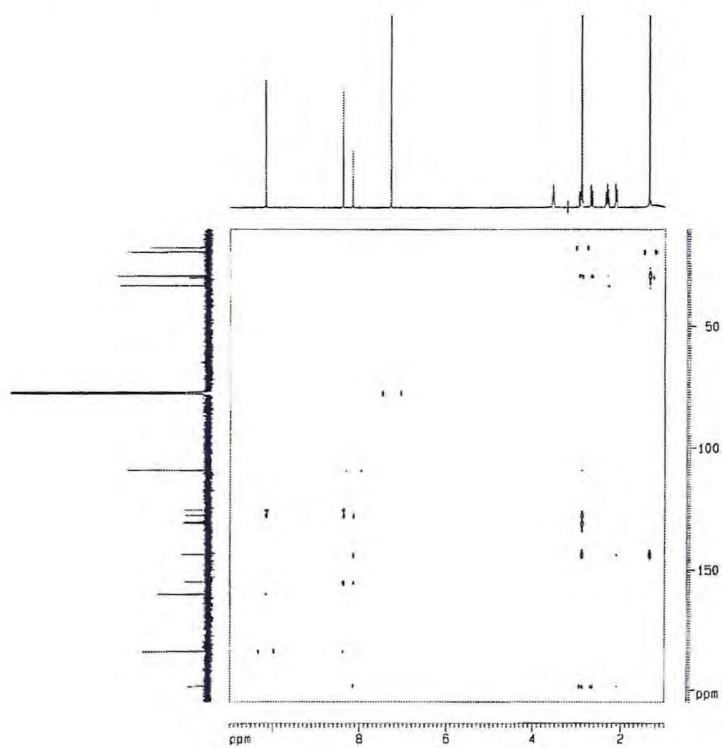


Fig. 12. Espectro de correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CV1.

5.2. Determinação Estrutural de FV1 (2)

Da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L. foi possível isolar um sólido branco solúvel em metanol, de ponto de fusão na faixa de 264 – 266°C, que foi denominado **FV1**.

No espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 13, pág. 48) de **FV1** constatou-se a presença de trinta átomos de carbonos através da análise das linhas espectrais.

A análise do espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 14, pág. 48) permitiu a determinação do padrão de hidrogenação apresentado na Tabela 6. abaixo. Os carbonos não hidrogenados foram determinados por comparação deste com o espectro de RMN ^{13}C – BB de **FV1**.

Tabela .6. Padrão de hidrogenação dos carbonos de FV1

C	CH	CH ₂	CH ₃
181,3	128,3	41,4	28,2
139,0	79,1	38,0	26,3
72,5	66,1	33,0	23,7
48,5	54,1	28,5	21,4
41,7	48,3	26,1	16,5
38,4	47,2	25,6	15,9
38,2	42,0	23,9	15,6
40,2		18,3	

Com base na teoria do deslocamento químico, observou-se a presença de uma carbonila possivelmente de ácido carboxílico em δ 181,3, três sinais referentes a carbonos saturados e oxigenados em δ 79,1; δ 72,5 e δ 66,1 e dois sinais de carbonos olefinicos em δ 139,0 e δ 128,3.

A presença dos sinais de carbono-13 em δ 128,3 e δ 139,0 caracterizou uma dupla ligação própria de triterpenos pertencentes à série urs-12-eno; e os sinais em δ 79,1; δ 72,5 e δ 66,1 evidenciaram um esqueleto triterpênico trioxigenado.

O espectro de RMN ^1H (Fig.15, pág. 49) apresentou sinais de hidrogênios correspondentes a sete grupamentos metila em δ 0,81; δ 0,89; δ 0,96; δ 0,97; δ 1,01; δ 1,19 e δ 1,36 (Ver expansão) (Fig. 16, pág. 49). Ainda no referido espectro observou-se um sinal em δ 5,31 (1H, s) que foi atribuído a hidrogênio de carbono olefínico e dois sinais em δ 3,95 (1H, ddd $J = 10,7; 4,2$ e $2,9$ Hz) e δ 3,34 (1H, $J = 2,3$ Hz) (Ver expansão) (Fig. 17, pág. 50) que foram atribuídos de acordo com o valor do deslocamento químico a hidrogênios de carbonos carbinólicos. O valor da constante de acoplamento, 2,3 Hz, indica acoplamento axial-equatorial ou diequatorial, conforme figura 18, abaixo.



Figura. 18.. Estruturas evidenciando os possíveis acoplamentos de hidrogênios de carbonos carbinólicos vicinais de FV1.

Os valores das constantes de acoplamento axial – equatorial e diequatorial são bem próximos e, devido a este fato, as duas estruturas da figura 19 abaixo foram considerados possíveis em relação a estereoquímica dos carbonos carbinólicos vicinais de FV1.



Figura 19. Possíveis estereoquímicas de FV1.

Analisando os dados espectrais e juntamente com pesquisa comparativa em banco de dados de deslocamento químico de carbonos – 13 constantes na literatura⁵¹ para triterpenos, foi possível propor a estrutura abaixo, do Ácido 2 α -3 α -19 α -triidroxius-12-en-28-óico para FV1. Na Tabela.7, pág. 47. consta a comparação entre os deslocamentos de carbono – 13 de FV1 e do referido ácido, na qual constata-se equivalência espectroscópica de carbono - 13 entre os dados das duas substâncias.

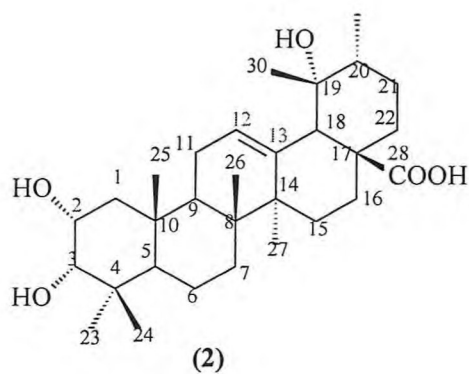


Tabela 7. Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de FV1 (2) com os dados da literatura⁵¹ para o composto Ácido 2 α -3 α -19 α -triidroxiurs-12-en-28-óico.

C	Literatura (51)	FV1 (21)
1	41,4 (t)	41,4
2	65,2 (d)	66,1
3	78,3 (d)	79,1
4	37,8 (s)	38,4
5	47,7 (d)	48,3
6	17,7 (t)	18,3
7	32,5 (t)	33,0
8	39,6 (s)	40,2
9	46,6 (d)	47,2
10	37,7 (s)	38,3
11	23,1 (t)	23,9
12	127,0 (d)	128,3
13	138,9 (s)	139,0
14	41,8 (s)	41,7
15	28,2 (t)	28,5
16	25,4 (t)	25,6
17	47,3 (s)	48,5
18	53,6 (d)	54,0
19	71,8 (s)	72,5
20	41,2 (d)	42,0
21	26,0 (t)	26,1
22	37,5 (t)	38,0
23	28,4 (q)	28,2
24	21,4 (q)	22,4
25	15,8 (q)	15,9
26	16,3 (q)	16,5
27	23,7 (q)	23,7
28	179,7 (q)	181,3
29	26,2 (q)	26,3
30	15,7 (q)	15,6

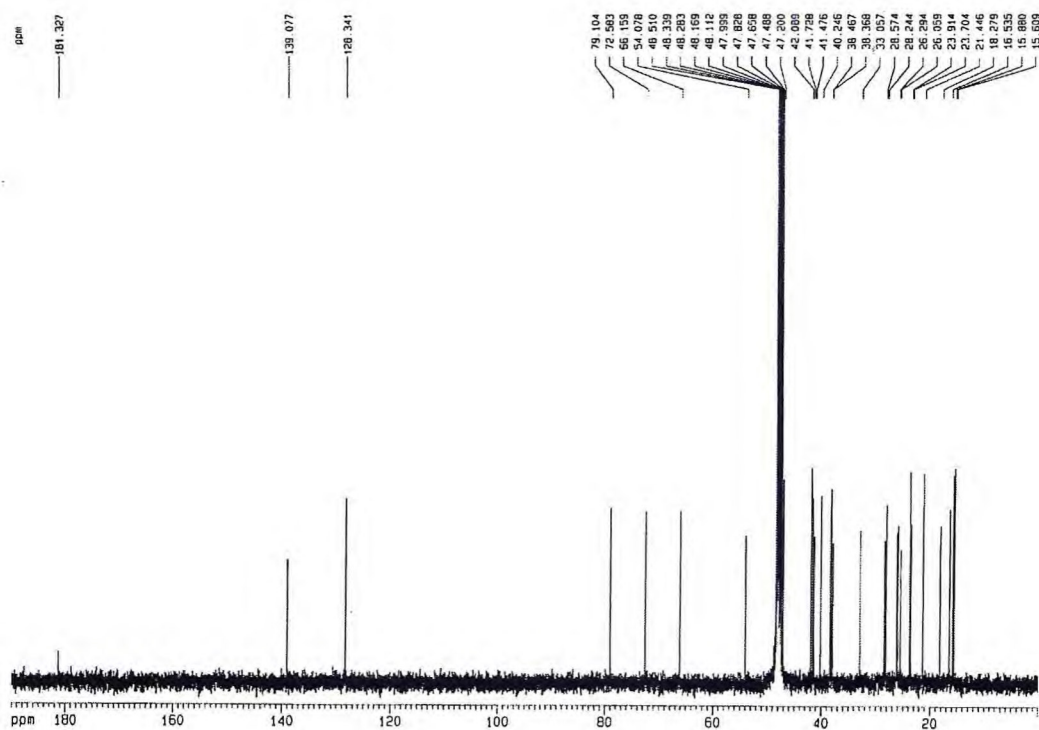


Fig. 13. Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de FV1.

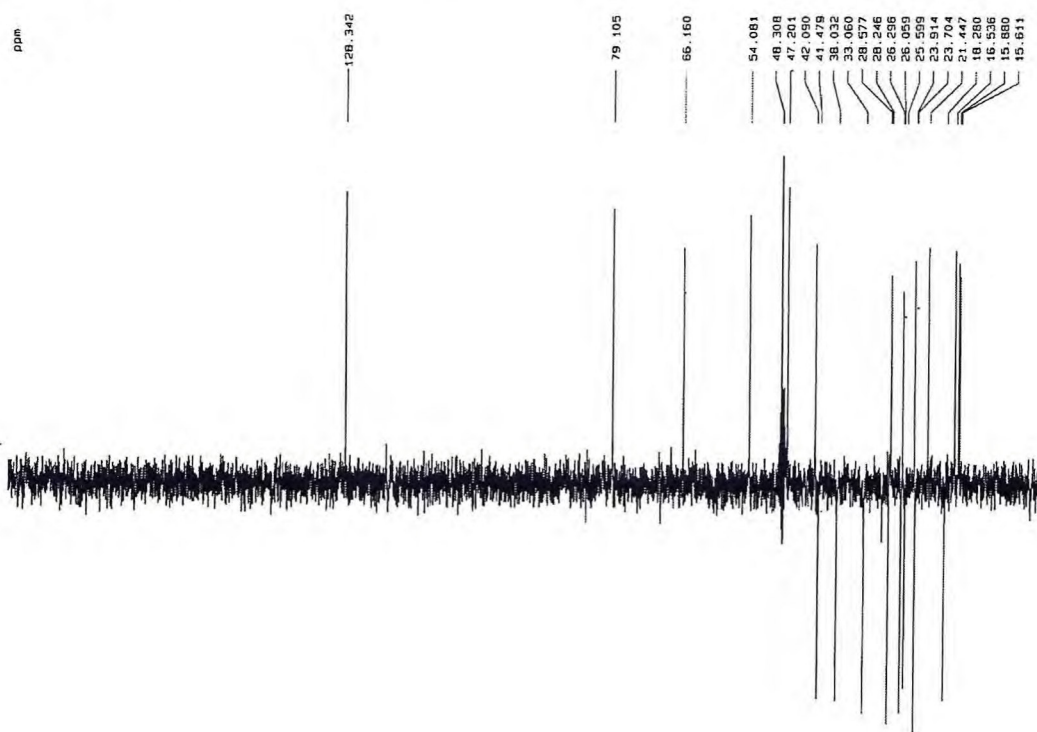


Fig. 14. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de FV1.

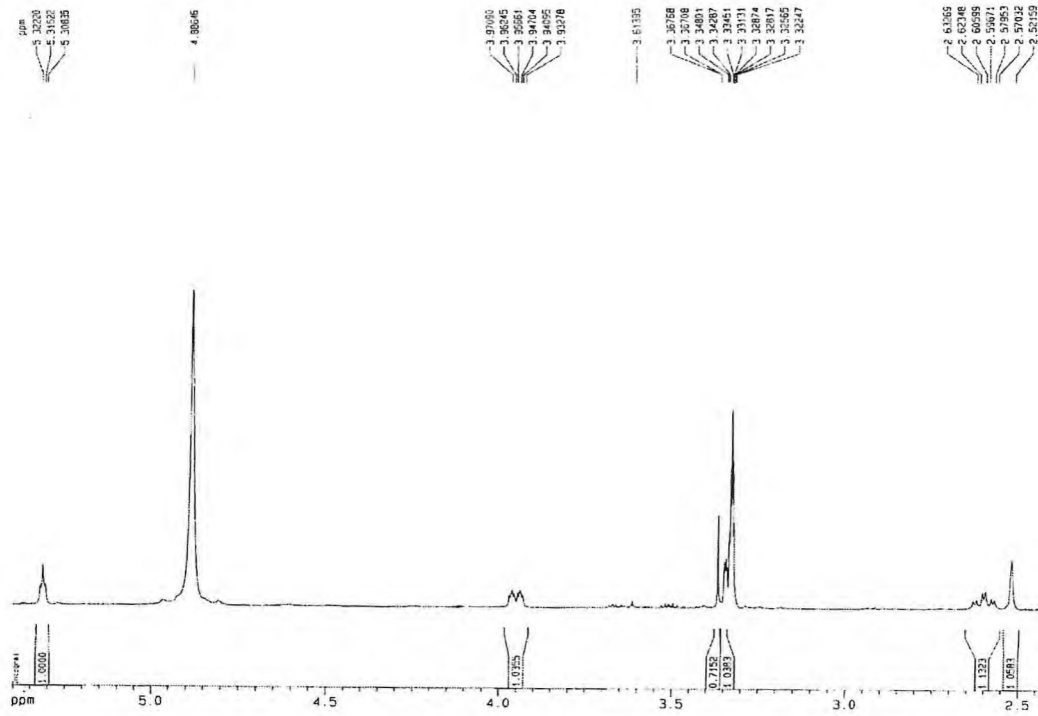


Fig. 17. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de FV1 (expansão).

5.3. Determinação Estrutural de FV2 (3) e (4)

FV2, isolado da fração clorofórmica do extrato metanólico de *V. agnus castus* L. apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão na faixa de 182 – 185°C.

O espectro de RMN ^1H de **FV2** (Fig. 20, pág. 54), mostrou sinais bem concentrados na região compreendida entre δ 0,7 – 2,0 ppm, indicando o caráter triterpênico da substância.

Analisando os demais sinais apresentados no espectro de RMN ^1H , observou-se o sinal em δ 3,23 (dd, $J = 10,3$ e $5,0$ Hz) que foi atribuído a hidrogênio em acoplamento axial / axial ($J = 10,3$ Hz) e axial / equatorial ($J = 5,0$ Hz) e pelo valor do deslocamento, o referido sinal foi atribuído a hidrogênio de carbono carbinólico. Outro sinal também presente no espectro foi em δ 5,10 (t, $J = 3,6$ Hz) que foi atribuído a hidrogênio de carbono olefínico em acoplamento com dois hidrogênios de grupo metilênico.

O espectro de RMN ^{13}C – BB de **FV2** (Fig. 21, pág. 54) mostrou a presença de trinta e cinco linhas espectrais e em comparação com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 22, pág. 55) revelou que **FV2** apresentava em sua estrutura oito átomos de carbonos metílicos, treze átomos de carbonos metilênicos, sete átomos de carbonos metínicos e sete átomos de carbonos não hidrogenados.

Dos sinais referentes a RMN ^{13}C de **FV2**, o sinal em δ 79,1 foi atribuído a carbono carbinólico justificando o sinal em δ 3,23 (dd, $J = 10,3$ e $5,0$ Hz) visto no espectro de RMN ^1H . Os sinais em δ 121,7; δ 124,4; δ 139,6 e δ 145,2 foram atribuídos a quatro carbonos olefínicos.

A literatura relata para os compostos da classe dos produtos naturais triterpênicos das séries urs-12-eno e olean-12-eno uma diferença nos deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos C/12, C/13.

Na série ursano C-12 é desprotegido de 2 ppm em relação ao mesmo átomo de carbono dos oleanos, enquanto C-13 nos ursanos é protegido em relação a C-13 dos oleananos em cerca de 5 ppm, isto em decorrência dos triterpenos ursanos apresentarem

um grupamento metila em posição equatorial em C-19, causando um efeito de proteção β em C-13.

Feitas estas análises a cerca dos dados espectroscópicos obtidos de experimentos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono -13 para **FV2** e fazendo uso de um banco de dados presentes na literatura⁵³ com deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para triterpenos, chegou-se as estruturas dos triterpenos α -amirina (**3**) e β -amirina (**4**) para **FV2**. Comparando todos os dados das duas substâncias com os dados de **FV2**, atribuiu-se a **FV2** uma composição da mistura dos dois triterpenos (Tab. 8, pág. 53).

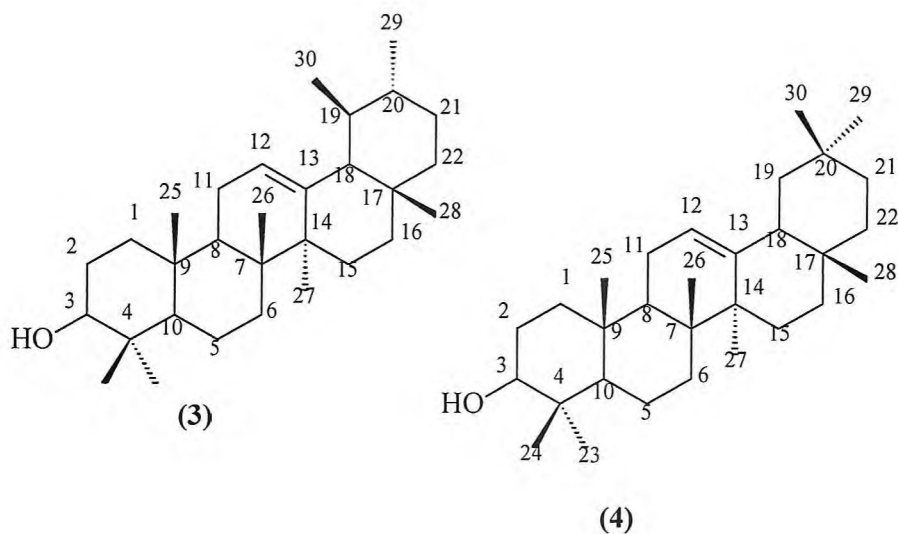


Tabela 8. Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de FV2 com os valores da literatura para a α - amirina e β - amirina. ⁵³

C	FV2	α - amirina	β - amirina	FV2
1	38,8	38,7	38,7	39,6
2	21,4	22,2	27,3	27,3
3	79,1	78,3	79,0	79,1
4	38,8	38,7	38,8	38,8
5	55,2	55,2	55,3	55,3
6	18,4	18,3	18,5	18,4
7	32,9	32,9	32,8	32,9
8	40,0	40,0	38,8	38,8
9	47,7	47,7	47,7	47,6
10	36,9	36,9	37,6	37,1
11	23,3	23,3	23,6	23,5
12	124,4	124,3	121,8	121,7
13	139,6	139,3	145,1	145,2
14	42,1	42,0	41,8	41,5
15	28,7	28,7	27,0	27,3
16	26,6	26,6	26,2	26,6
17	33,8	33,7	32,5	32,9
18	59,1	58,9	47,4	47,2
19	39,7	39,6	46,9	47,2
20	40,0	39,9	31,1	31,3
21	31,3	31,2	33,9	33,8
22	41,5	41,5	37,2	36,9
23	28,1	28,1	28,2	28,7
24	15,6	15,6	15,6	15,6
25	15,7	15,6	15,7	15,7
26	16,9	16,8	16,9	16,9
27	23,4	23,3	26,0	26,6
28	28,1	28,1	28,4	28,1
29	17,5	17,4	33,1	33,8
30	21,4	21,3	23,6	23,71

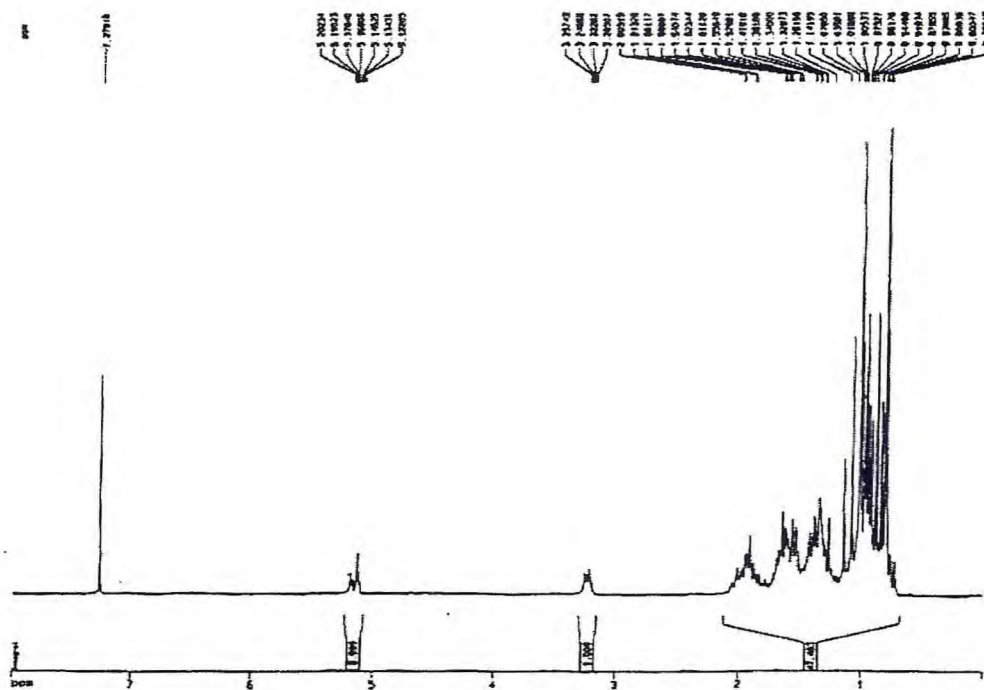


Fig. 20. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de FV2.

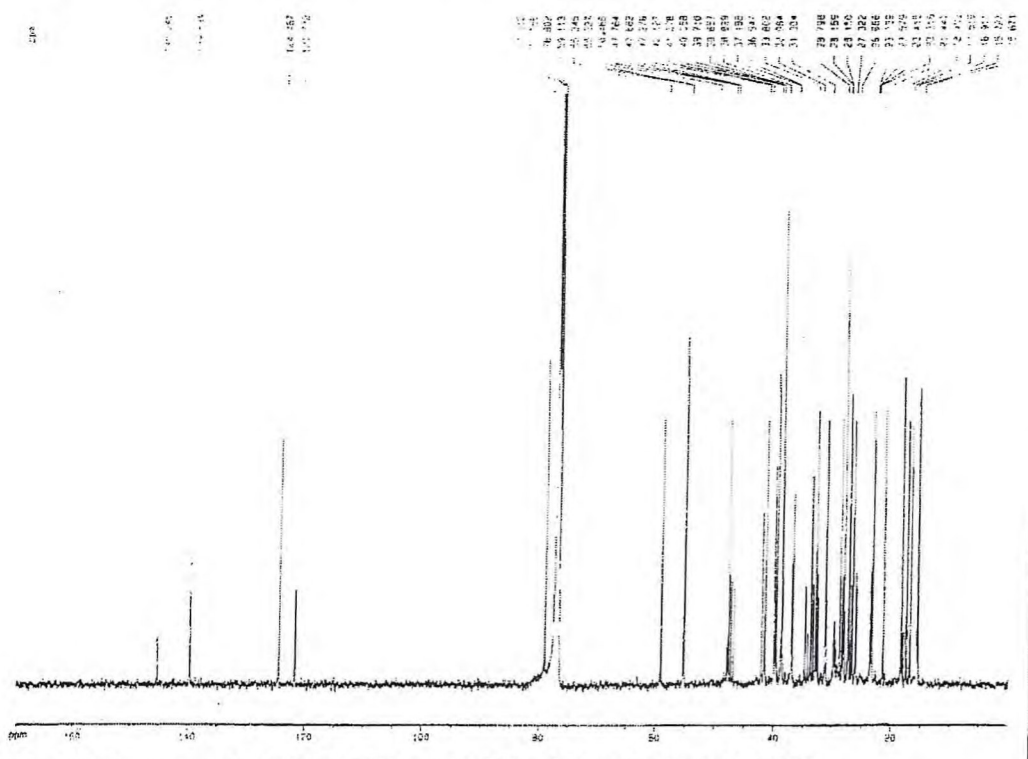


Fig. 21. Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de FV2

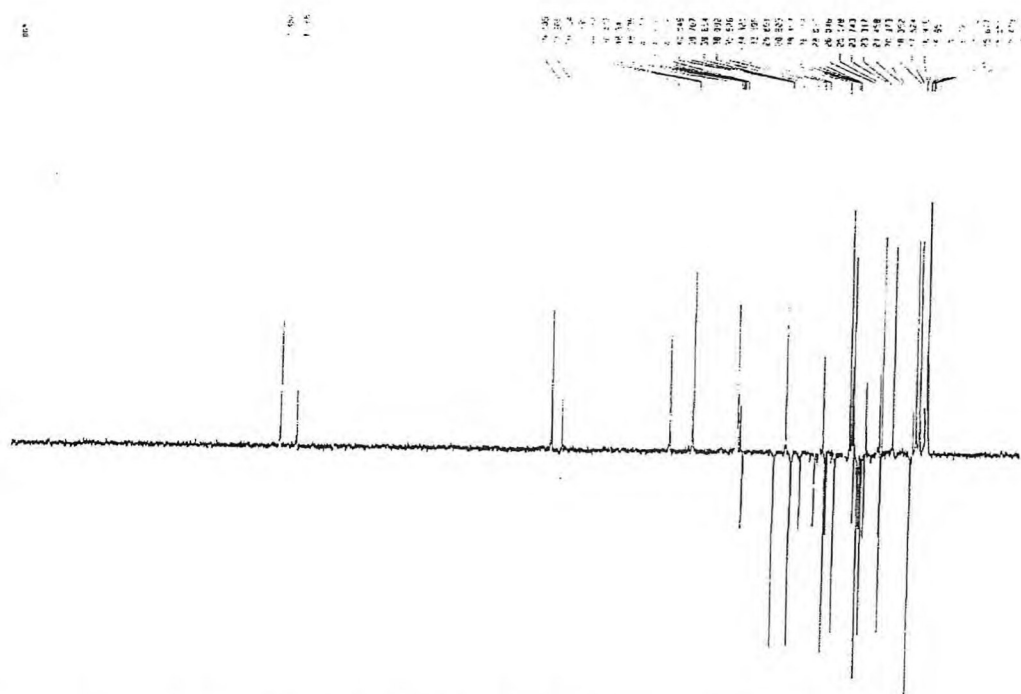


Fig. 2. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de FV2

5.4. Determinação estrutural de FV3 (5)

A fração f^o(9-15) proveniente do tratamento cromatográfico da fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L., após sucessivos tratamentos cromatográficos resultou no isolamento de um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão na faixa de 204-206°C.

O espectro de RMN ¹H de FV3 (Fig. 23, pág. 60) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos e na região de hidrogênios de metoxilas

Os sinais em δ 7,01 (d, $J=8,6$ Hz), em δ 7,68 (d, $J=2,2$ Hz) e em δ 7,75 (dd, $J=8,6$ e $2,2$ Hz) sugerem a presença de um sistema aromático com substituição do tipo 1,2,4 (Fig. 24, abaixo).

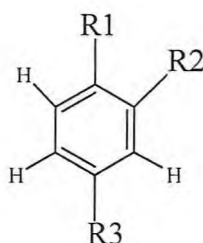


Fig.26.. Sistema aromático *orto/para* substituído

Os quatro sinais em δ 3,89; δ 3,94; δ 3,98 e δ 4,01 intensos singletos, foram atribuídos pelo valor do deslocamento a átomos de hidrogênios de grupos metoxilas, ligados a sistemas aromáticos. E finalmente o singlete em δ 6,52 foi relacionado à presença de um hidrogênio aromático ou olefínico.

No espectro de RMN ¹³C – BB (Fig. 25, pág. 60) apresentou sinais correspondentes a dezenove átomos de carbonos. A comparação do espectro de RMN ¹³C-BB com o espectro DEPT 135° (Fig. 26, pág. 61) revelou a presença de onze carbonos não hidrogenados, quatro carbonos metínicos e quatro carbonos metílicos (Tabela 9, pág. 57).

Tabela 9. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos e metílicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3).

C	CH	CH ₃
106,8	90,5	56,2
123,9	110,6	56,5
132,5	114,5	60,3
139,2	121,8	61,0
145,7		
148,9		
152,5		
152,9		
155,8		
159,0		
179,1		

Dos onze carbonos não hidrogenados, oito, são carbonos insaturados oxigenados δ 139,2; δ 145,7; δ 148,9; δ 152,5; δ 152,9; δ 155,8; δ 159,0 e δ 179,1. O sinal em δ 179,13 foi atribuído a uma carbonila.

Os quatro sinais referentes a carbonos metínicos, pelo valor do deslocamento em δ 90,5; δ 110,6; δ 114,5 e δ 121,8 caracterizam carbonos aromáticos não oxigenados.

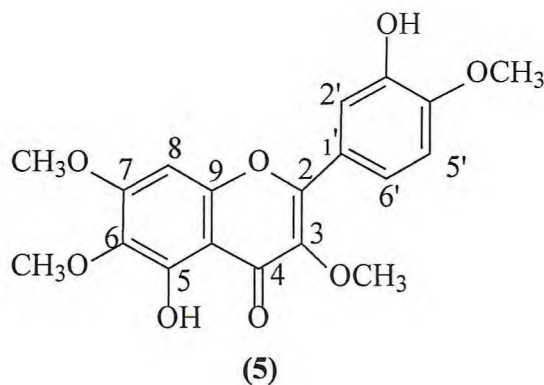
Os sinais em δ 56,2; δ 56,5; δ 60,3 e δ 61,0 são coerentes a presença de quatro grupamentos metoxilas ligados a sistema aromático.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (Fig. 27, pág. 61) permitiu associar os sinais de hidrogênios aos seus respectivos carbonos. De acordo com a análise deste espectro observou-se que o sinal de carbono-13 em δ 90,8 com o sinal de hidrogênio em δ 6,5 singlete. Esta informação veio a confirmar a existência de apenas um carbono hidrogenado em um dos anéis aromáticos. Observou-se ainda no

referido espectro a correlação entre o carbono-13 em δ 110,84 com o hidrogênio em δ 7,01 (d, $J = 8,6$ Hz); do carbono-13 em δ 114,8 com o hidrogênio em δ 7,68 (d, $J = 2,2$ Hz) e do carbono-13 em δ 121,94 com o hidrogênio em δ 7,75 (dd, $J = 8,6$ e $2,2$ Hz).

A atribuição dos sinais dos carbonos não hidrogenados foi feita baseada na análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 28, pág. 62), onde foi possível verificar a correlação entre o hidrogênio singlete em δ 6,52 a três ligações com os carbonos em δ 106,96; δ 132,64 e a duas ligações com os carbonos em δ 158,12; δ 152,50 e δ 152,90. Observou-se também a correlação a duas ligações do sinal em δ 7,01 (d, $J = 8,6$ Hz) com os carbonos em δ 123,90 e δ 145,99; evidenciando que este hidrogênio estava posicionado equidistante a estes dois carbonos.

Com base na análise dos dados espectrais obtidos comparados com dados da literatura (Tabela.10, pág. 59) e conhecimento do tipo de substâncias presentes na espécie atribuiu-se a estrutura (5), abaixo, para FV3.



A substância 3',5'-diidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona ou casticina (5) atribuída a FV3, já foi isolado da espécie *V. agnus castus* e de outras espécies de *Vitex*, sendo uma flavona bem comum no gênero.

Tabela 10. Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de FV3 (3) com os valores da literatura para a casticina.

C	FV3 (3)	Casticina ⁽⁵⁵⁾
2	152,5	155,1
3	139,2	137,6
4	179,1	177,6
5	152,5	151,4
6	132,5	131,2
7	155,8	151,1
8	90,5	90,8
9	159,0	158,2
10	106,8	105,3
1°	123,9	122,0
2°	110,6	111,4
3°	145,7	146,0
4°	148,9	149,9
5°	114,5	111,7
6°	121,7	120,1

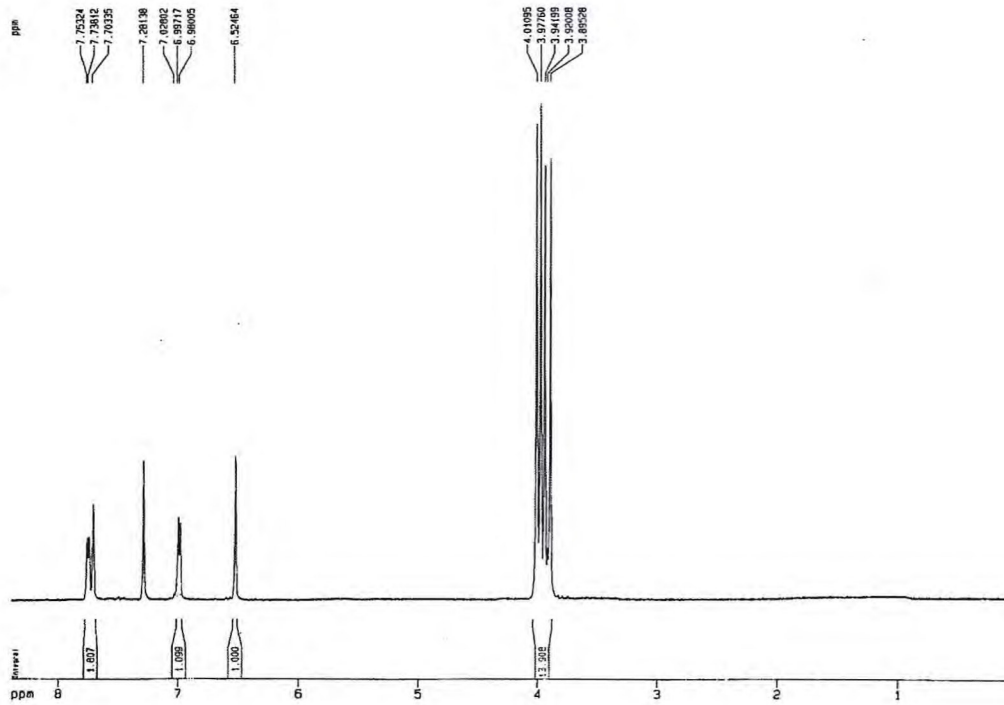


Fig. 23. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de FV3

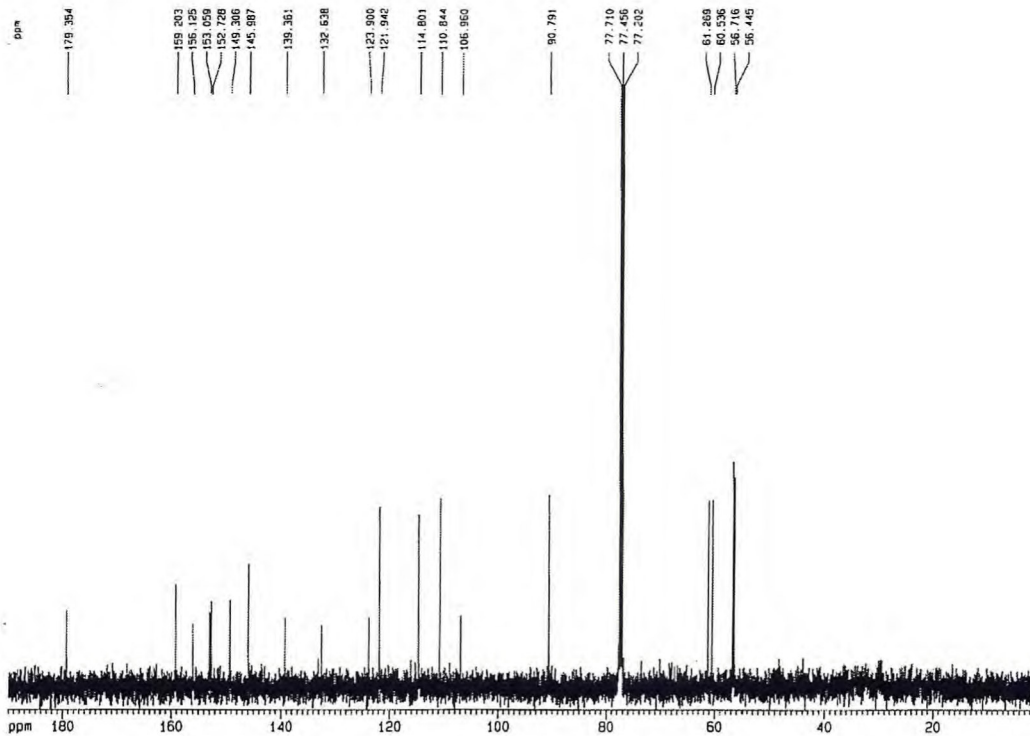


Fig. 24. Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de FV3

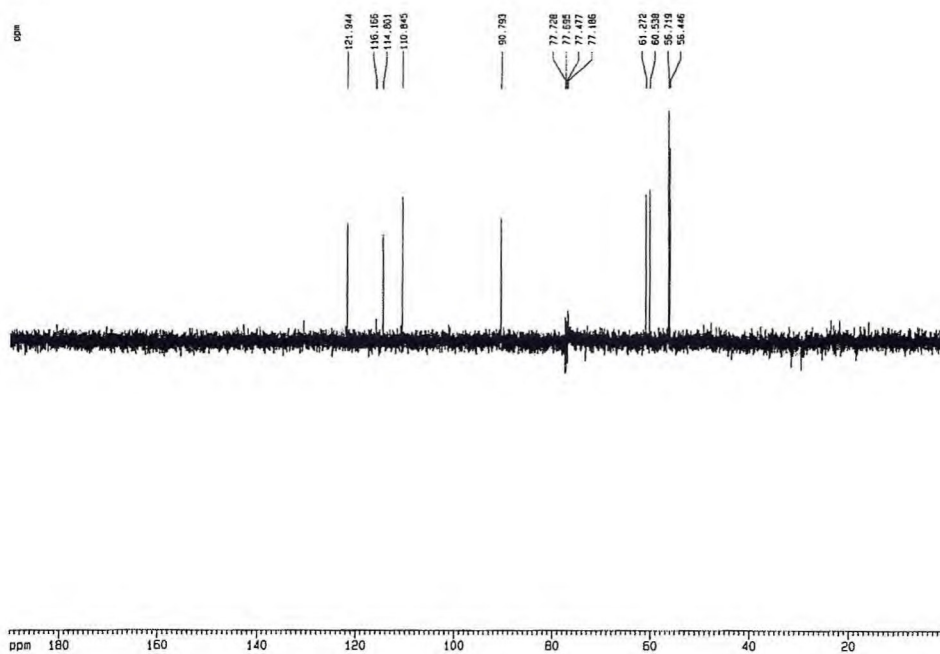


Fig. 26. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de FV3

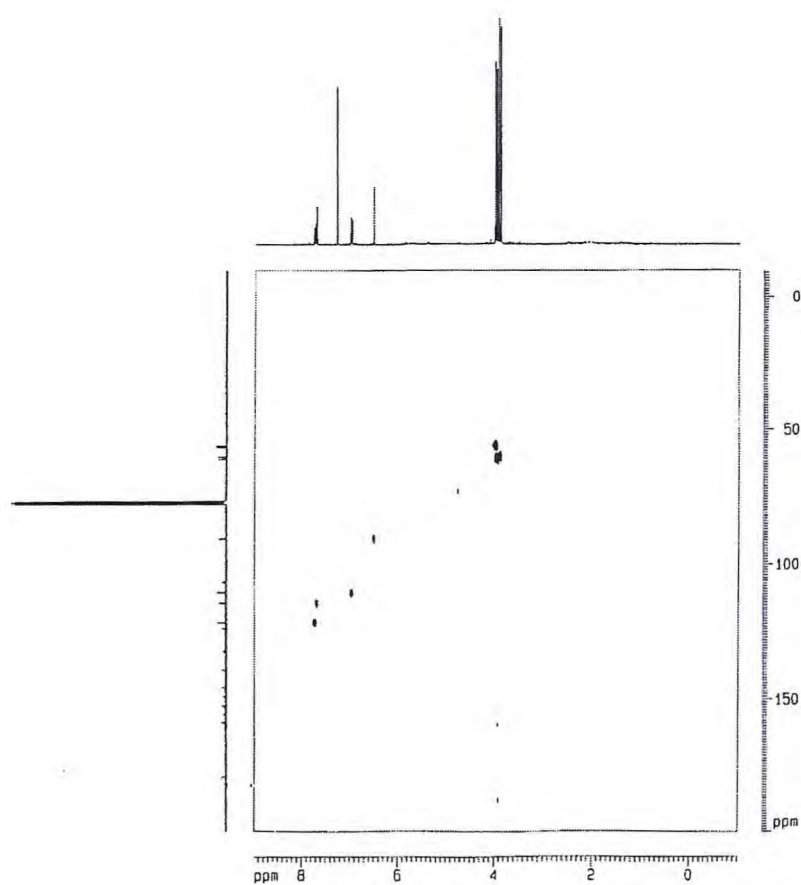


Fig. 27. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear - HMQC de FV3

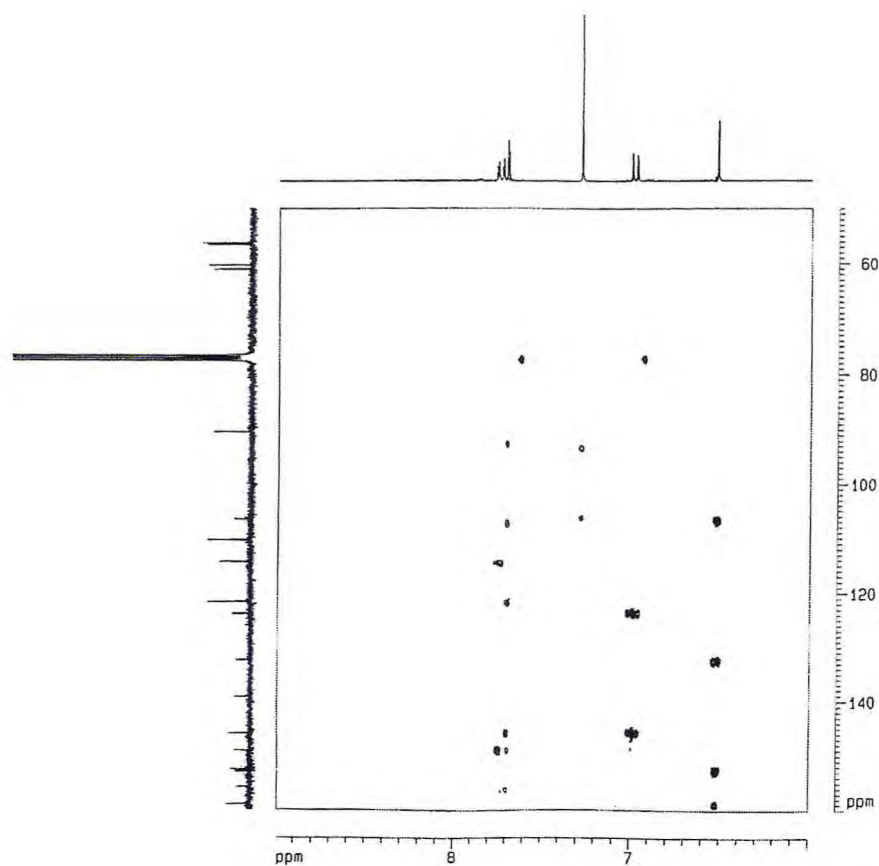


Fig. 28. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear - HMBC de FV3

5.5. Determinação estrutural de FV4 (6)

FV4, substância isolada da fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L., apresentou-se como um sólido amarelo claro, solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão na faixa de 189- 192°C.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 29, pág. 67) de **FV4** revelou dois sinais duplos centrados em δ 7,87 (d, J = 8,8 Hz, 2H) e em δ 7,02 (d, J = 8,9 Hz) que de acordo com a integração indicou dois hidrogênios cada, sugerindo portanto, a presença de um anel aromático *para* substituído.

O espectro revelou ainda a presença de três sinais em δ 3,87; δ 3,99 e δ 4,02, singletos, com integração para três hidrogênios cada, que foram atribuídos à presença de três grupamentos metoxilas.

No espectro também foi visualizado um sinal simples em δ 6,56 que foi relacionado a um hidrogênio ligado a átomo de carbono olefínico e um singlete em δ 12,75 que foi atribuído a um átomo de hidrogênio de hidroxila fenólica quelada a uma carbonila.

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 30, pág. 67) mostrou dezesseis linhas espectrais, e duas delas foram atribuídas a dois átomos de carbonos em decorrência de terem apresentado intensidade bem superior às demais, totalizando dezoito átomos de carbonos em **FV3**.

Comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 31, pág. 68) revelou que **FV4** continha dez carbonos não hidrogenados, cinco carbonos metínicos e três carbonos metílicos (Tabela 11, pág. 64).

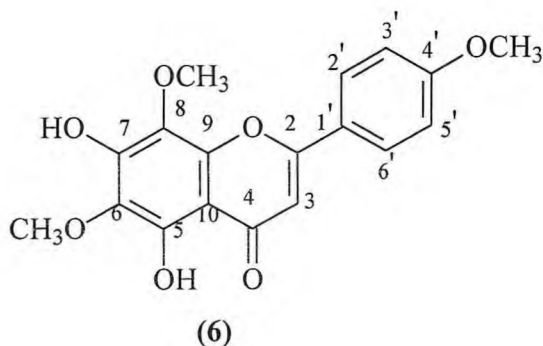
Tabela 11. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos e metílicos. Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3).

C	CH	CH ₃
104,6	103,8	55,6
123,6	114,7 (2x)	61,1
127,4	128,1 (2x)	61,9
130,7		
145,8		
148,4		
148,8		
162,8		
163,9		
183,0		
10C	5CH	3CH₃

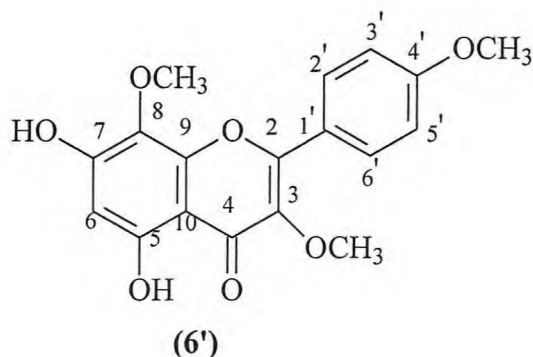
Os sinais relativos a carbonos não hidrogenados em δ 130,7; δ 145,8; δ 148,4; δ 148,8; δ 162,8 e δ 163,9; foram atribuídos a carbonos aromáticos oxigenados, e o sinal em δ 183,0 foi relacionado à presença de um carbono carbonílico.

Os sinais de carbonos metoxílicos em δ 55,6; δ 61,1 e δ 61,9 confirmaram os três grupos metoxilas evidenciados pelos sinais em δ 3,87; δ 3,99 e δ 4,02; observados no espectro de RMN ^1H .

De acordo com os dados espectroscópicos observados para **FV4**, foi possível atribuir para o composto a estrutura de um flavonóide, trimetoxilado, com hidroxila fenólica na posição C-5, portanto, quelada à carbonila, com um hidrogênio olefínico, que aparece como um singleto e um anel aromático *para* substituído. Estes dados levaram à estrutura (6).



A estrutura (6'), abaixo, também foi levada em consideração, porém foi logo descartada, pois se FV4 fosse uma estrutura do tipo (6'), deveríamos ter obrigatoriamente, segundo a literatura, um carbono metínico * com um deslocamento químico em torno de δ 93 – 96.



A estrutura (6) é uma flavona já descrita na literatura, cuja nomenclatura é 5,7-dihidroxi-4',6,8 –trimetoxiflavona. Comparação feita entre os deslocamentos de RMN ^{13}C de FV4 com os mesmos deslocamentos para esta flavona (Tabela 12, pág. 66) indicou compatibilidade entre os respectivos valores. Apesar desta flavona (6) já ter sido isolada de outras espécies, esta é a primeira vez que é isolada de *V. agnus castus* L.

Tabela 12. Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de FV4 com os valores da literatura para a 5,7-dihidroxi-4',6,8-trimetoxiflavona.

C	5,7-dihidroxi-4',6,8-trimetoxiflavona ⁵⁶	FV4
2	163,9	163,0
3	104,6	103,0
4	183,0	182,0
5	148,4	148,3
6	130,7	131,5
7	148,8	150,8
8	127,4	127,9
9	145,8	147,3
10	103,8	102,9
1'	123,6	122,9
2'	128,1	128,1
3'	114,7	114,6
4'	162,8	162,3
5'	114,7	114,6
6'	128,1	128,1
OCH3	55,6	55,6
OCH3	61,1	61,0
OCH3	61,9	61,9

5.6. Determinação estrutural de FV5 (7) e (8)

FV5, mostrou-se como um sólido cristalino, solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão na faixa de 128 – 131°C.

A análise cromatográfica comparativa por CCD, utilizando-se padrões dos fitoesteróides β -Sitosterol (6) e Estigmasterol (7), sugeriu a presença da mistura das duas citadas substâncias na amostra. Com a finalidade de identificar inequivocamente a composição da amostra, foi feita a aquisição de seus respectivos espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT 135°.

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 32, pág. 71) de **FV5** revelou a presença de carbonos olefínicos através da presença dos sinais em δ 121,8; 129,3; 138,4 e 140,8.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB (Fig. 32, pág. 71) e RMN ^{13}C – DEPT 135°C (Fig. 33, pág. 71) de **FV5**, permitiu verificar que o sinal em δ 140,8 correspondia a um carbono sp^2 não hidrogenado e os sinais em δ 121,8; δ 129,3 e δ 138,4, atribuídos a carbonos olefínicos monohidrogenados.

A presença destes quatro carbonos insaturados e entre estes, os sinais em δ 121,8 e 138,4, juntamente com análise comparativa entre os dados experimentais de ressonância magnética nuclear de RMN ^{13}C obtidos e os relatados na literatura (Tab. 13, pág. 70), permitiram indicar **FV5** como uma mistura contendo β - Sitosterol (6) e Estigmasterol (7).

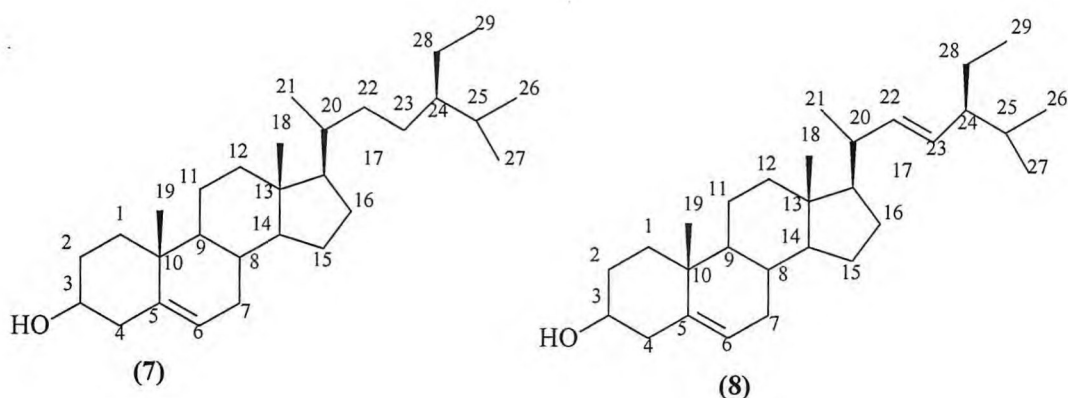


Tabela 13. Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de FV5 com os valores da literatura para o β -Sitosterol e para o Estigmasterol.

C	β -Sitosterol	FV5	Estigmasterol	FV5*
1	37,2	37,4	37,4	37,3
2	31,5	31,7	31,7	31,7
3	71,7	71,9	71,8	71,9
4	42,1	42,3	42,4	42,3
5	140,7	140,8	140,9	140,8
6	121,6	121,8	121,7	121,8
7	31,8	31,9	31,9	31,9
8	31,8	31,7	31,9	31,7
9	50,0	50,2	50,3	50,2
10	36,4	36,6	36,6	36,6
11	21,1	21,3	21,1	21,3
12	39,6	39,7	39,8	39,9
13	42,2	42,3	42,4	42,3
14	56,7	56,1	57,0	56,8
15	24,3	24,3	24,4	24,4
16	28,2	28,3	28,9	29,0
17	55,9	56,0	56,0	56,0
18	11,8	12,2	12,2	12,3
19	19,3	19,4	19,4	19,4
20	36,1	36,2	40,5	40,5
21	19,0	19,0	21,1	21,1
22	33,8	34,0	138,4	138,4
23	25,9	26,1	129,4	129,3
24	45,7	45,9	51,3	51,3
25	29,3	29,2	31,9	31,9
26	19,7	19,0	19,0	19,1
27	19,7	19,8	21,1	21,3
28	22,9	23,1	25,4	25,5
29	11,9	11,9	12,0	12,0

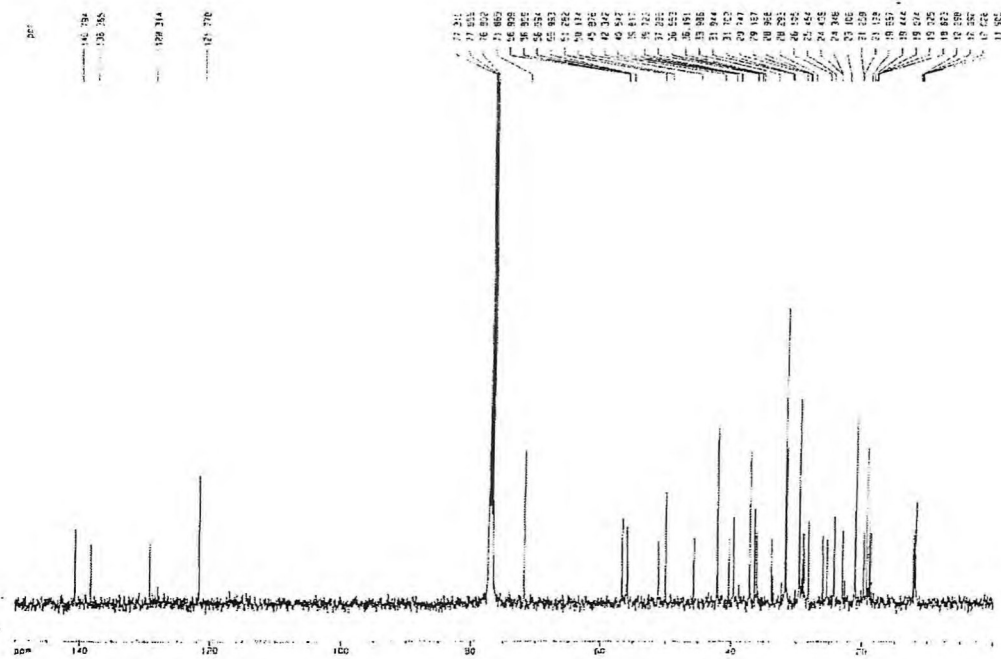
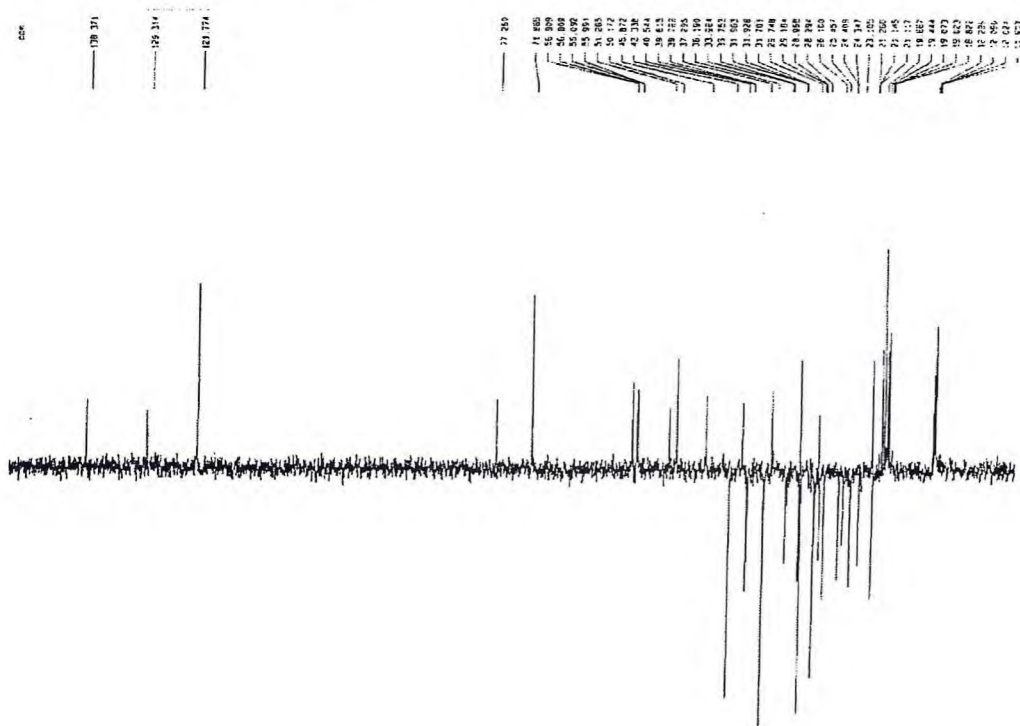


Fig. 32. Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de FV5



5.7. Determinação Estrutural de FV6 (9)

A fração f^r(27-36) proveniente do tratamento cromatográfico da fração F(42-56) obtida quando da cromatografia em coluna de sílica gel da fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L. forneceu um material esverdeado impuro que após recristalização apresentou-se sob análise em CCD, como uma única substância que foi denominada **FV6**.

A substância **FV6**, apresentou-se como um sólido amarelo esverdeado, solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 270 – 274°C.

A análise do espectro de RMN ¹H (Fig. 34, pág. 75) mostrou a presença de hidrogênios aromáticos. Destes, os sinais em δ 6,22 e δ 6,44, atribuídos a hidrogênios aromáticos com constantes de acoplamento iguais a $J = 2,1$ Hz (acoplamento *meta*), indicaram a presença de um sistema aromático com padrão de substituição 1,2,4.

Os outros sinais presentes no espectro, um singlete em δ 6,51 foi atribuído a um hidrogênio de carbono olefínico e os sinais em δ (6,90 d, $J = 9,0$ Hz; 7,38 dd, $J = 9,0$ e 2,1 Hz e 7,39 d, $J = 2,1$ Hz), foram indicativos de um outro anel aromático com substituições nas posições 1, 2, 4.

Os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio foram confirmados no espectro bidimensional de correlação homonuclear – COSY (Fig. 35, pág. 75), onde se verificou acoplamento entre os hidrogênios em δ (6,90 d, $J = 9,0$ Hz; 7,38 dd, $J = 9,0$ e 2,1 Hz e 7,39 d, $J = 2,1$ Hz).

O espectro de RMN ¹³C – BB (Fig. 36, pág. 76) revelou quinze linhas espectrais, indicativo de quinze átomos de carbonos.

A análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C – BB e DEPT 135° (Fig. 37, pág. 76) permitiu atribuir o padrão de hidrogenação dos carbonos de **FV6** (Tabela 14, pág. 73), onde pode se verificar a presença de nove carbonos não hidrogenados em δ (105,5; 120,5; 147,2; 151,1; 159,6; 163,4; 166,1; 166,5 e 184,0) e seis carbonos metínicos em δ (95,1; 100,3; 104,0; 114,3; 116,9 e 120,4).

Tabela 14. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados e metínicos .
 Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de
 RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD).

C	CH
166,1	104,1
184,0	100,3
163,4	95,1
164,5	114,3
159,6	116,9
105,5	123,9
120,5	
147,2	
151,1	

Os carbonos não hidrogenados em δ 105,5 e δ 123,9 foram atribuídos de acordo com os valores de seus deslocamentos químicos a carbonos insaturados não oxigenados e os demais carbonos não hidrogenados que apresentaram deslocamentos químicos na região compreendida entre δ 147,2 – 166,5. E o carbono não hidrogenado com deslocamento químico em δ 184,03 foi atribuído a uma carbonila de flavona.

Os dados espectrais analisados juntamente com informações da literatura (Tabela.15, pág. 74) permitiram atribuir para FV6 a estrutura (9) abaixo, uma flavona, luteolina, já isolada em *V. agnus castus* L.

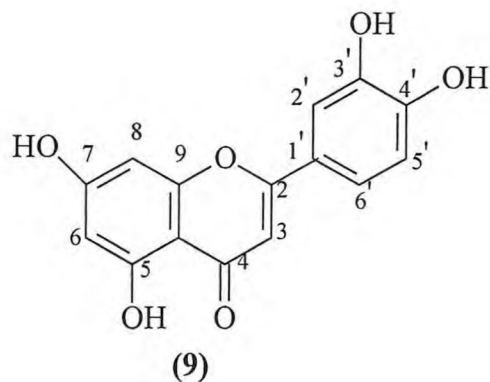


Tabela 15. Comparação dos valores de deslocamento químico de carbono –13 de FV6 com os valores descritos na literatura para a flavona luteolina.

C	Luteolina ⁵⁶	FV6 (9)
2	164,5	166,1
3	103,1	104,1
4	182,0	184,0
5	161,9	163,4
6	99,1	100,3
7	164,5	166,5
8	94,1	95,1
9	157,7	159,6
10	104,0	105,5
1'	119,1	120,5
2'	113,7	114,3
3'	146,1	147,2
4'	147,0	151,1
5'	115,8	116,9
6'	122,0	123,9

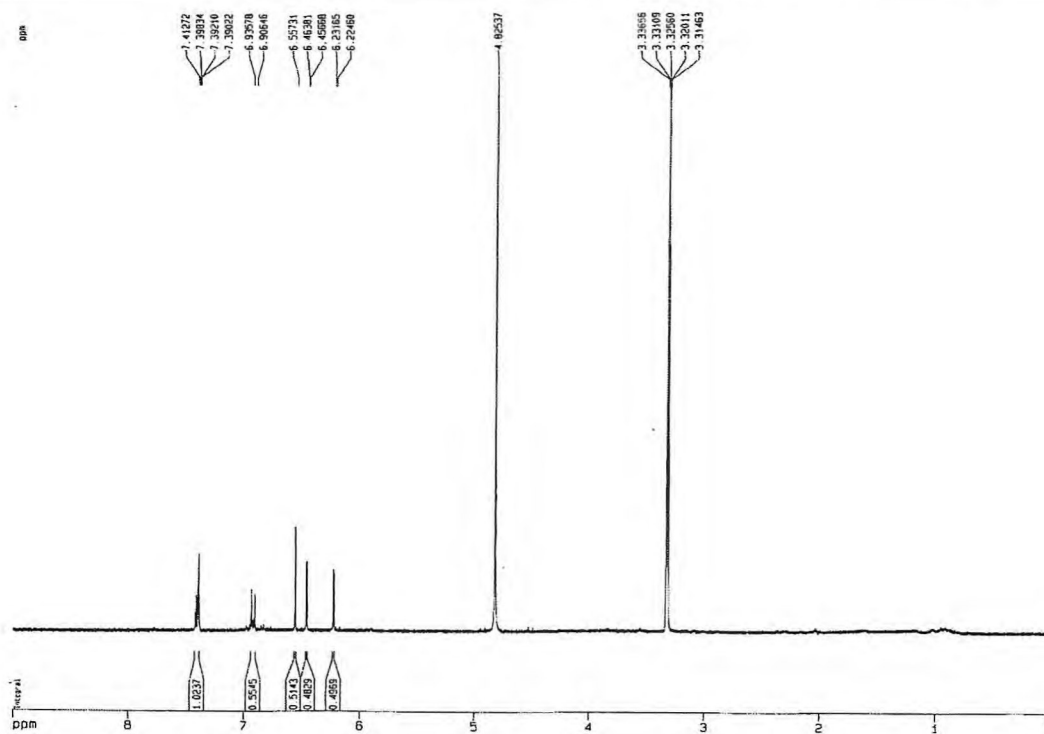


Fig. 34. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de FV6

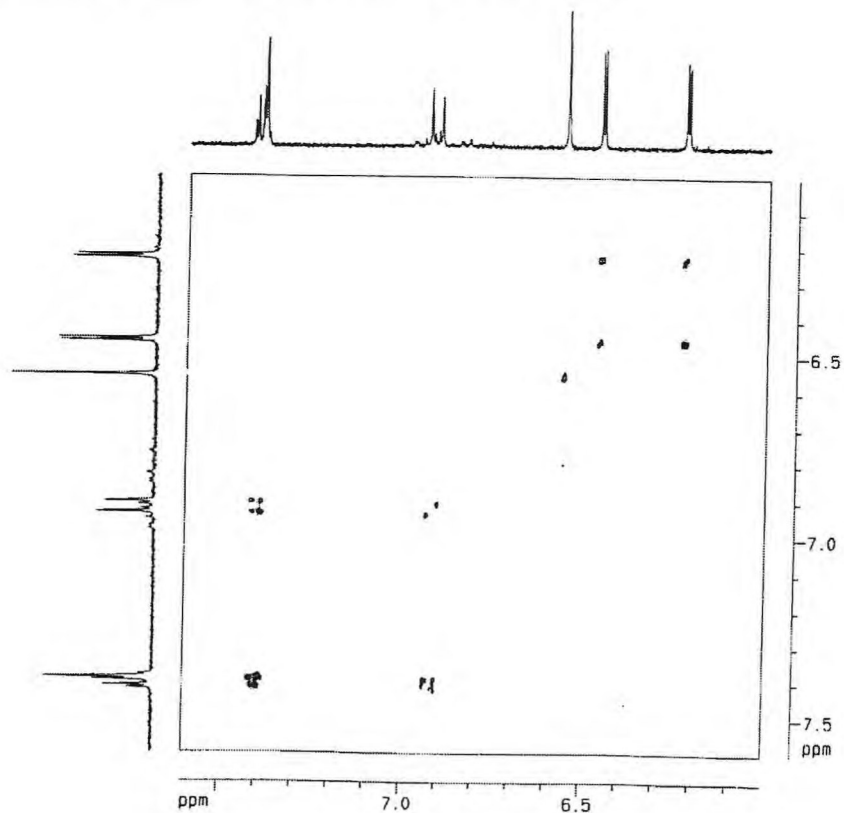


Fig. 35. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de FV6

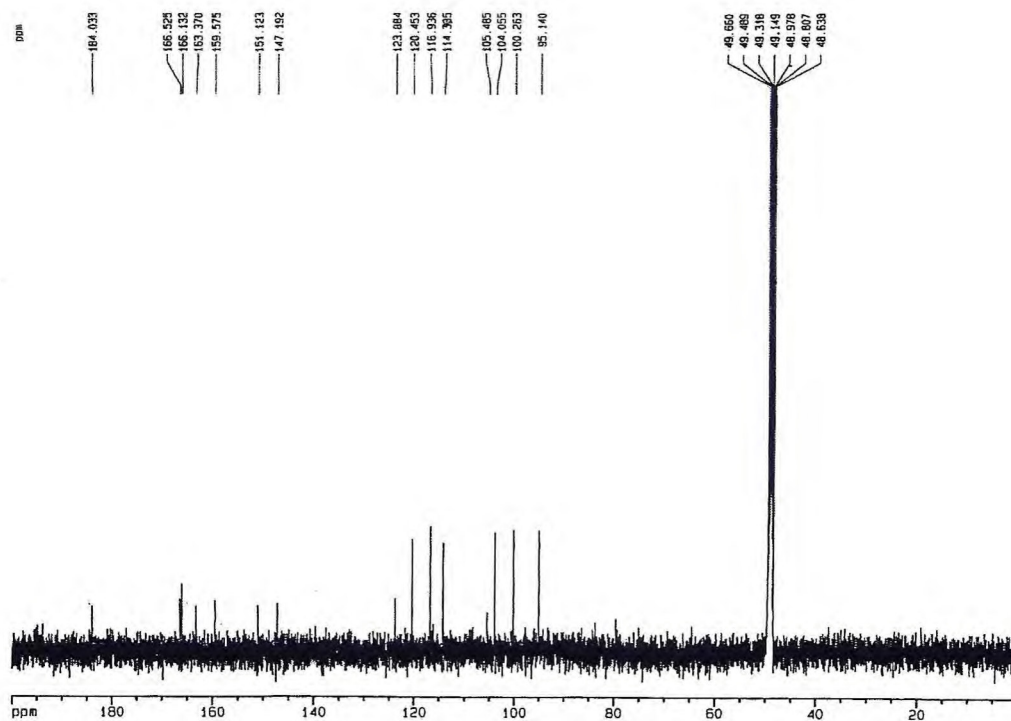


Fig. 36. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de FV6

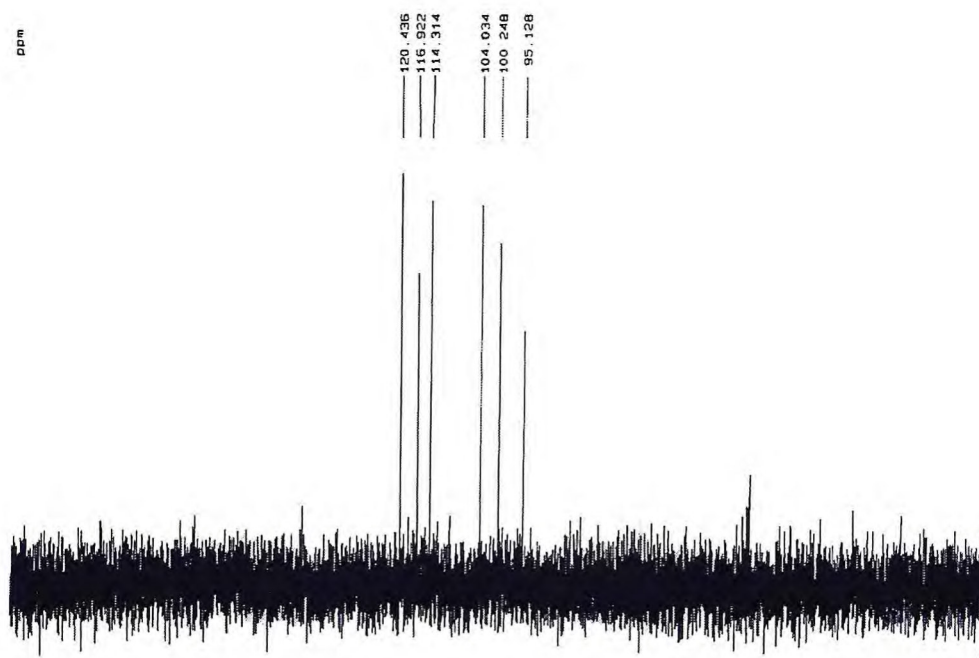


Fig.37. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de FV6

5.8. Determinação estrutural de FV7 (10)

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica proveniente do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L., permitiu o isolamento de um sólido cristalino amarelo, solúvel nos solventes metanol e acetona, de ponto de fusão na faixa de 240-242°C, que foi denominado FV7.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 38, pág. 82) de FV7 apresentou sinais compatíveis com a presença de hidrogênios aromáticos, além de um singlete em δ 12,16 característico da presença de uma hidroxila fenólica quelada a uma carbonila.

Os sinais atribuídos a hidrogênios aromáticos foram localizados em δ 6,26 (d, $J = 1,9$ Hz) e δ 6,52 (d, $J = 1,9$ Hz) e pelo valor da constante de acoplamento, estes hidrogênios evidenciaram um acoplamento em posição *meta*, levando-se a concluir que a estrutura do composto FV7 apresentava um anel aromático tetrassubstituído.

Os sinais em δ 6,99 (d, $J = 8,6$ Hz), δ 7,69 (dd, $J = 8,6$ e $2,1$ Hz) e δ 7,82 (d, $J = 2,1$ Hz), indicaram a presença de um anel aromático trissubstituído em padrão 1,2,4. Este fato foi observado em decorrência dos valores apresentados pelas constante de acoplamento, que indicaram três hidrogênios aromáticos com acoplamento *orto*, ($J = 8,6$ Hz), *meta*, ($J = 2,1$ Hz) e *orto / meta*, ($J = 8,6$ e $2,1$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 39, pág. 82), revelou a presença de quinze linhas espectrais, sugerindo a presença de quinze átomos de carbonos para FV7.

A Comparação estabelecida entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 40, pág. 83), proporcionou o conhecimento do padrão de hidrogenação dos átomos de carbonos do composto (Tabela 16, pág. 78) e através desta análise verificou-se que FV7 continha dez átomos de carbonos não hidrogenados e cinco átomos de carbonos mono-hidrogenados.

Tabela 16. Atribuição dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados e metínicos . Informação obtida através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° (75 MHz, CD_3COCD_3).

C	CH
146,8	99,0
136,5	94,3
176,4	115,6
162,2	116,0
164,9	121,3
157,7	
104,0	
123,6	
145,7	
148,2	

Dos sinais atribuídos aos átomos de carbonos não hidrogenados, o sinal em δ 176,4 foi atribuído pelo valor do deslocamento, a carbono carbonílico e os sinais em δ 136,5; δ 145,6; δ 146,6; δ 148,2 e δ 162,1 foram relacionados à presença de carbonos aromáticos oxigenados.

Com relação aos cinco carbonos metínicos de FV7, os sinais em δ 94,3 e δ 99,0 foram atribuídos a carbonos aromáticos, situados ambos em posição adjacente a dois carbonos aromáticos oxigenados, conforme Fig. 41, abaixo.

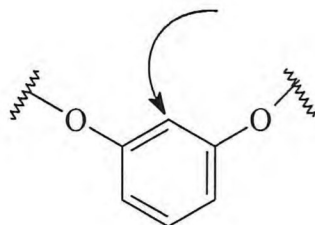


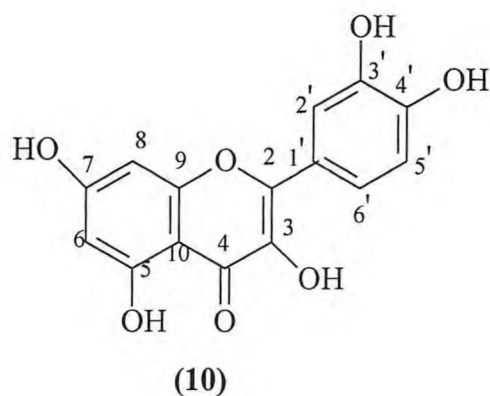
Fig 41. Carbono aromático adjacente a dois carbonos oxigenados.

Analisando todos os dados espectrais obtidos, concluiu-se que **FV7** apresentava em sua estrutura quinze átomos de carbonos e foi atribuído ao mesmo presença de um esqueleto flavonoídico, com hidroxila na posição C-5, justificada pelo sinal em δ 12,15 (hidroxila fenólica quelada à carbonila) no espectro de RMN ^1H .

Análise feita no espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (Fig.,42 pág. 83) verificaram-se as correlação entre os átomos de carbonos C-6 (δ 99,0) com o hidrogênio em δ 6,26 (d, $J= 1,9$ Hz); C-8 (δ 94,3) com o hidrogênio em δ 6,52 (d, $J= 1,9$ Hz); C-2' (δ 115,6) com o hidrogênio em δ 7,82 (d, $J= 2,1$ Hz); C-5' (δ 116,0) com o hidrogênio em δ 6,99 (d, $J= 8,6$ Hz) e C-6' (δ 121,3) com o hidrogênio em δ 7,69 (dd, $J= 8,6$ e 2,1 Hz). Estes dados enfatizaram a presença dos dois anéis aromáticos, com os padrões de substituição tetra e trissubstituídos.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 43, pág. 84) verificou-se que o carbono C-4 (δ 176,4); carbono carbonílico, não apresentava nenhuma correlação a duas ou a três ligações, indicando que na estrutura flavonoídica de FV7 não existiam hidrogênios nas posições C-3 e C-5, fato este coerente com a presença de um sinal em δ 12,16 (s), visto no espectro de RMN ^1H de FV7, atribuído a uma hidroxila quelada. As demais correlações vistas no referido espectro encontram-se na Tabela 17, pág.80.

As informações obtidas nos espectros de RMN uni e bidimensionais, permitiram atribuir para **FV7** a estrutura (10), abaixo, flavonóide, 3,3',4,4',7-penta-hidroxiavonol ou quercetina. Trata-se de uma substância já conhecida na literatura, porém inédita na espécie.



Com a finalidade de evitar equívocos na atribuição da estrutura de **FV7**, foi feita uma comparação entre os dados de ^{13}C do flavonóide quercetina, constantes na literatura com os dados de ^{13}C obtidos para **FV7** (Tabela 18, pág. 81). Os dados mostraram semelhança suficiente para permitir que fosse atribuída a estrutura (9), quercetina a **FV7**.

Tabela 17. Dados de HMQC e HMBC de **FV7**

FV7					
C	δ_{C}	$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HMQC-}^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HMBC-}^nJ_{\text{CH}}$	
		δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	146,8	-			H-2' e H-6'
3	136,5	-			-
4	176,4	-			-
5	162,2	-	H-6		-
7	164,9	-	H-6 e H-8		-
9	157,7	-	H-8		-
10	104,0	-	-		H-6 e H-8
1'	123,6	-	H-2' e H-6'		H-5'
3'	145,6	-	H-2'		H-5'
4'	148,2	-	H-5'		H-2' e H-6'
CH					
6	99,0	6,26 (d, $J= 1,9$ Hz)			
8	94,3	6,52 (d, $J= 1,9$ Hz)			
2'	115,6	7,82 (d, $J= 2,1$ Hz)			
5'	116,0	6,99 (d, $J= 8,6$ Hz)			
6'	121,3	7,69 (dd, $J= 8,6$ e $2,1$ Hz)			

Tabela 18. Comparação dos valores de deslocamento químico de carbono -13 de FV7 com os valores descritos na literatura⁵⁴ para o flavonóide quercetina.

C	Quercetina ⁵⁴	FV7 (10)
2	147,9	146,8
3	136,8	136,5
4	176,6	176,4
5	162,1	162,2
6	99,1	99,0
7	165,0	164,9
8	94,5	94,3
9	157,8	157,7
10	104,1	104,0
1'	123,8	123,6
2'	115,7	115,6
3'	145,8	145,6
4'	148,3	148,2
5'	116,2	116,0
6'	121,5	121,3

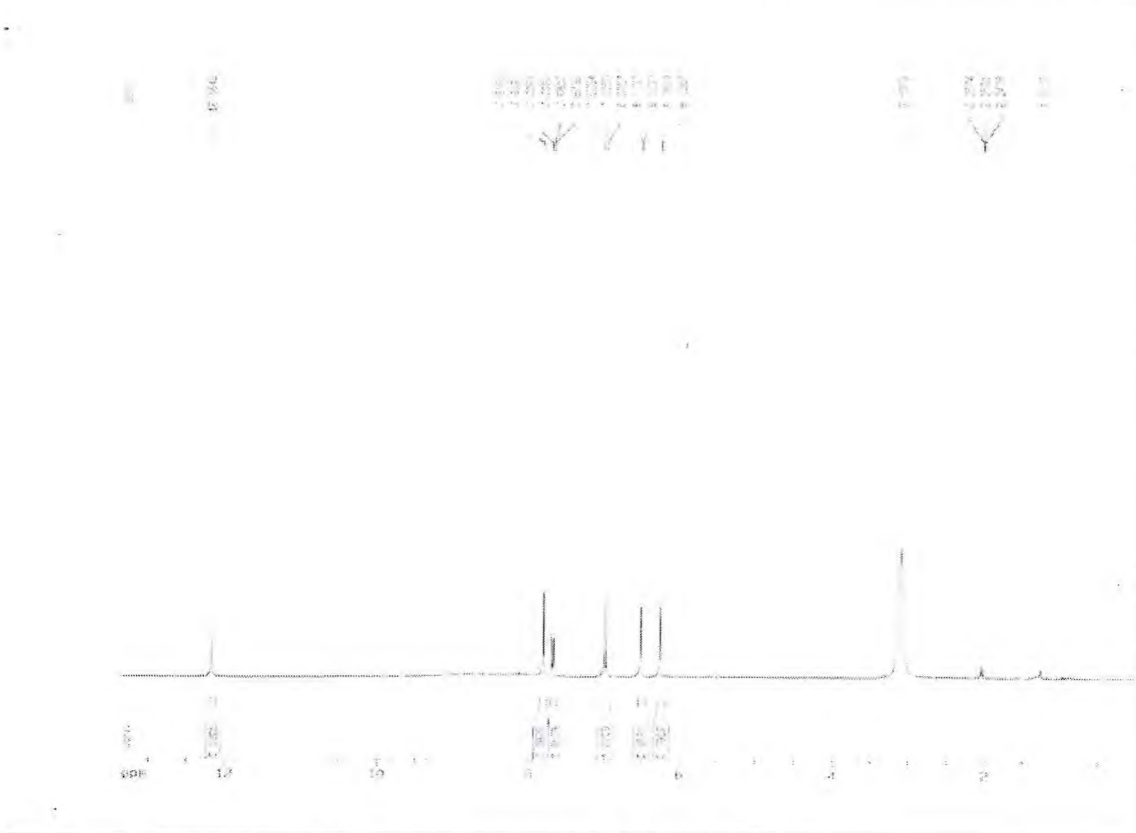


Fig.38. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de FV7

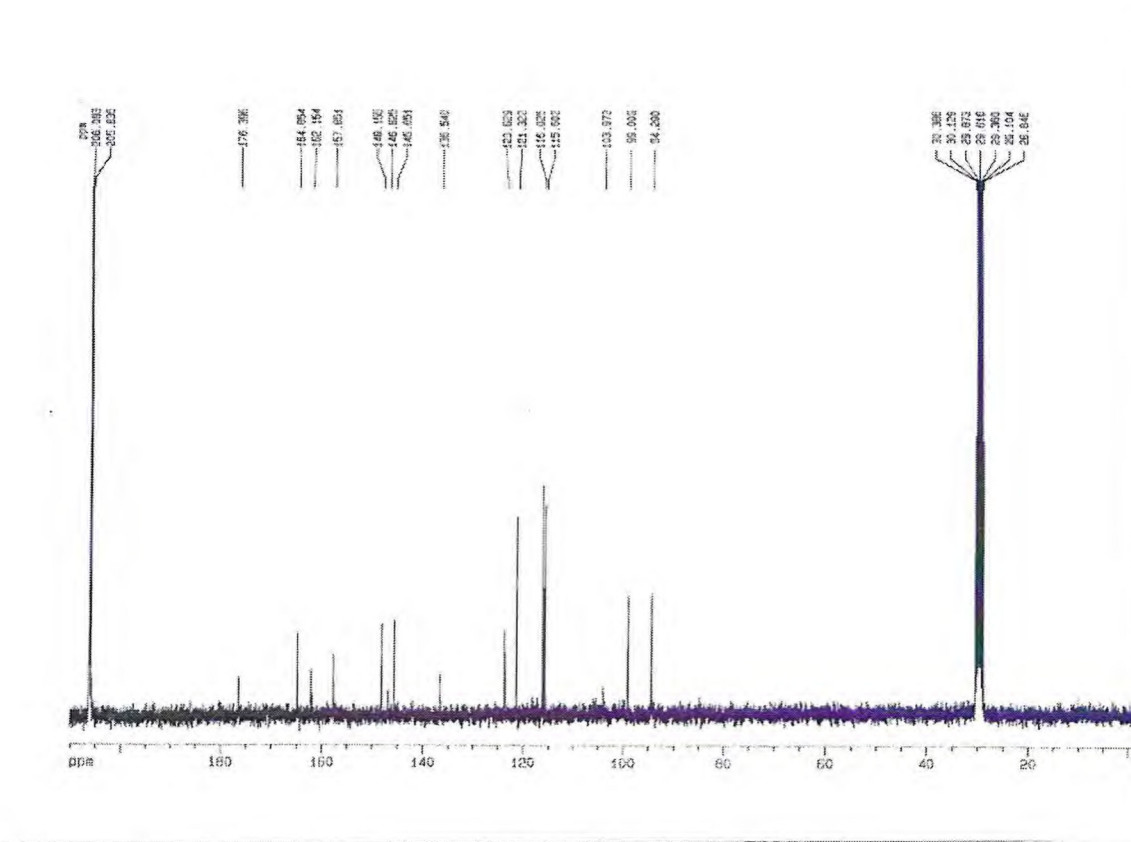


Fig.39. Espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CD_3OD) de FV7

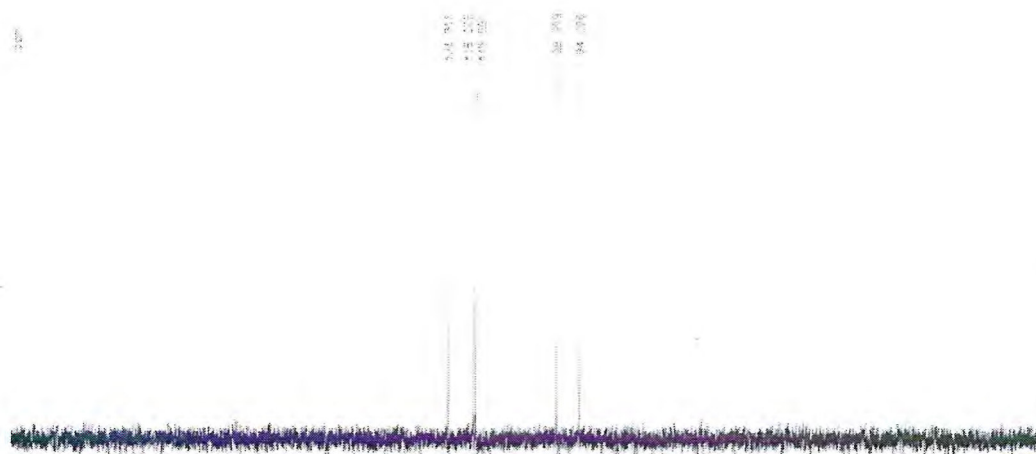


Fig.40. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de FV7

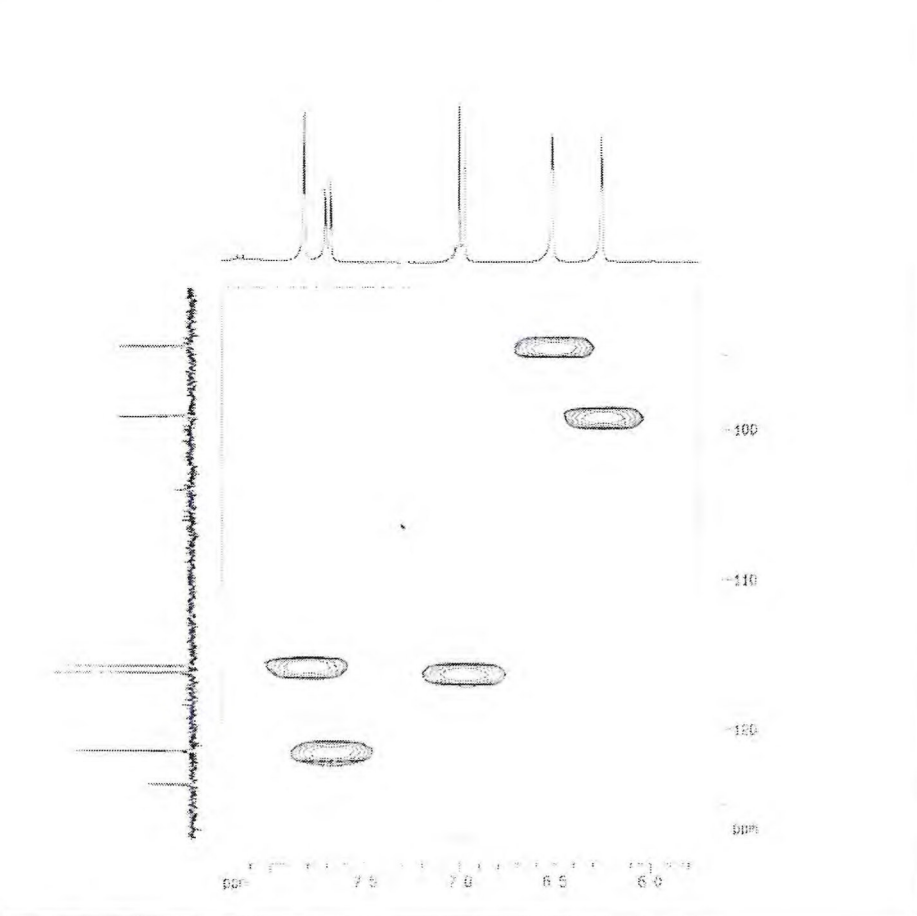


Fig. 42. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear - HMQC de FV7

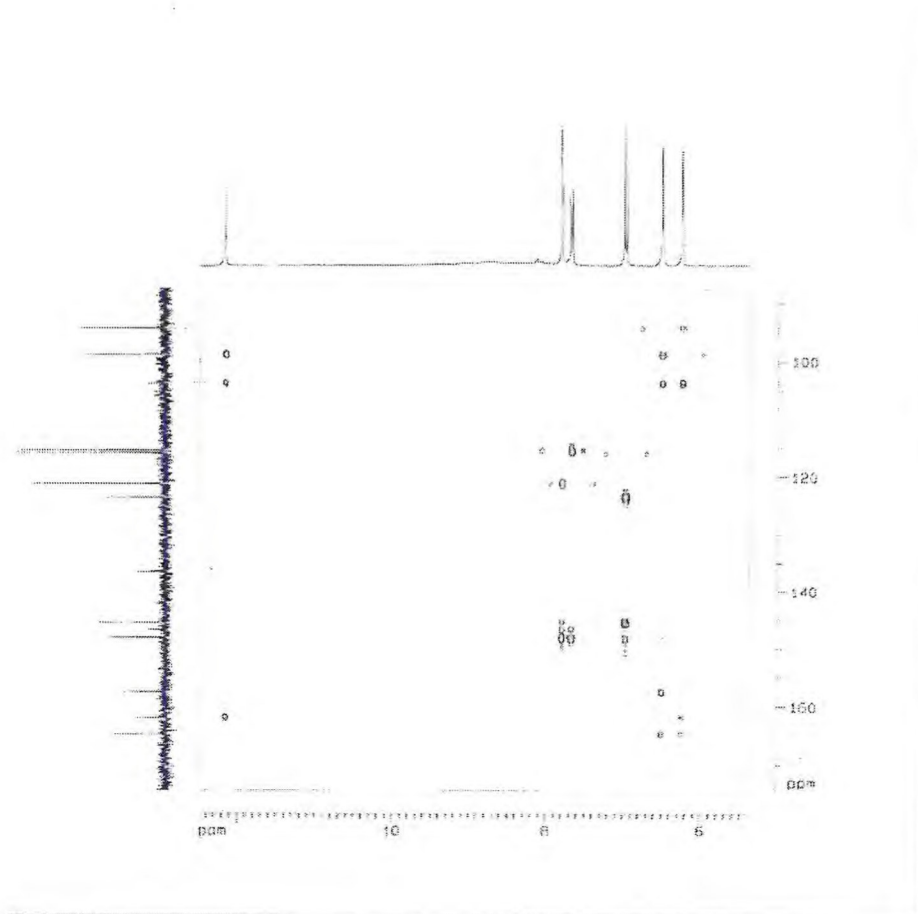


Fig. 43. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear - HMBC de FV7

5.9. Determinação estrutural de FV8 (11)

O composto codificado como **FV8**, foi isolado a partir do tratamento cromatográfico da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus L.*

FV8, um sólido branco, insolúvel em clorofórmio e em metanol e solúvel em piridina, com ponto de fusão na faixa de 290-293°C. Análise por CCD, usando como revelador solução ácida de vanilina, **FV8** apresentou coloração lilás, que levou-se a sugerir que a amostra tratava-se do Glicosídeo do β -Sitosterol.

A análise do seu espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 44, pág. 87) revelou a presença de trinta e cinco linhas espectrais e juntamente com a análise de seu espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 45, pág. 87), permitiram identificar a amostra como sendo o Glicosídeo do β -sitosterol (**11**).

Os sinais em δ 121,73 e em δ 140,70 foram atribuídos aos dois carbonos olefínicos C-5 e C-6 presentes no esqueleto do β -Sitosterol e a presença de um sinal de carbono em δ 102,40 revelou um carbono anomérico, indicando uma unidade de glicose.

A tabela. 19, pág. 86, apresenta uma comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C obtidos para FV8 e dados registrados na literatura para o Glicosídeo do β -Sitosterol.

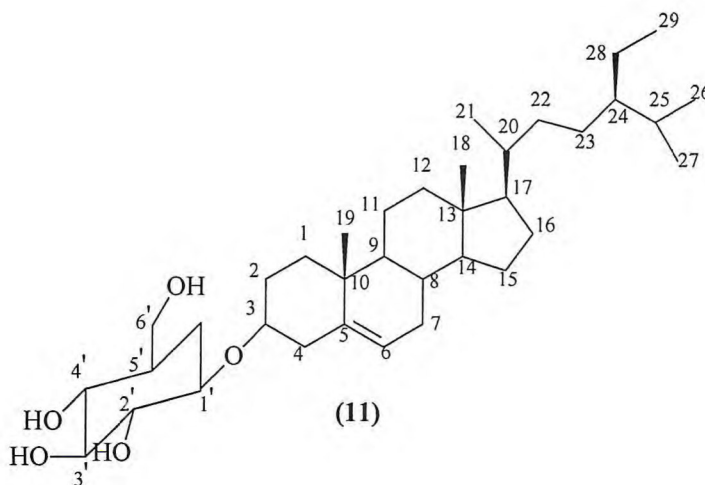


Tabela 19. Dados de RMN ^{13}C de FV8 comparados com os registrados na literatura para o Glicosídeo do β -sitosterol.

C	FV8 (23)	Glicosídeo do β -sitosterol ⁵⁵
1	37,3	37,3
2	31,9	31,9
3	78,4	78,3
4	39,2	39,8
5	140,7	140,7
6	121,7	121,6
7	29,8	30,0
8	32,0	32,0
9	50,2	50,0
10	36,7	36,7
11	21,1	21,1
12	39,8	39,1
13	42,3	42,3
14	56,1	56,1
15	24,3	24,3
16	28,3	28,3
17	56,7	56,6
18	11,9	11,8
19	19,2	19,0
20	36,2	36,2
21	18,8	19,2
22	34,0	34,0
23	29,3	29,3
24	45,8	45,8
25	26,2	26,2
26	19,8	18,8
27	19,0	19,7
28	23,2	23,5
29	11,8	11,2
1'	102,4	102,3
2'	75,1	75,1
3'	77,9	77,9
4'	71,5	71,5
5'	77,9	78,2
6'	62,6	62,3

5.10. Determinação estrutural de FV9 (12)

Da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L., obteve-se uma substância branca, solúvel em metanol, acetona e em DMSO, de ponto de fusão na faixa de 272 – 274°C, que foi denominada de **FV9**.

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 46, pág. 91) apresentou trinta linhas espectrais referentes a trinta átomos de carbonos.

A análise do espectro de carbono – 13, usando a técnica DEPT (Fig. 47, pág. 91) permitiu a determinação do padrão de hidrogenação apresentado na tabela 20 abaixo. Os carbonos não hidrogenados foram determinados por comparação com o espectro de RMN ^{13}C – BB.

Tabela 20. Padrão de hidrogenação dos carbonos de FV9

δC	δCH	δCH_2	δCH_3
39,3	76,8	38,2	28,2
39,5	54,7	26,9	16,1
36,5	47,0	18,0	15,2
138,1	124,5	32,7	16,9
41,6	52,3	22,8	23,2
46,8	38,5	27,5	17,0
178,3	38,4	23,8	21,1
		30,2	
		36,3	
7C	7CH	9CH₂	7CH₃

Com base na teoria do deslocamento químico observou-se a presença de uma carbonila possivelmente de ácido carboxílico em δ 178,3; um carbono metínico oxigenado em δ 76,8 e dois carbonos olefínicos em δ 124,5 e δ 138,1 e vinte e seis carbonos saturados e oxigenados entre δ 15,2 e δ 54,7.

Os dois sinais em δ 124,5 e δ 138,1 evidenciaram um composto triterpênico pertencente à série urs-12-eno.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 48, pág. 92) apresentou cinco sinais simples correspondentes a grupamentos metilas na região entre δ 0,67 e δ 1,03; além de um sinal simples em δ 5,13 atribuído a um hidrogênio de carbono olefínico e um sinal em δ 3,33 atribuído a hidrogênio de carbono carbinólico.

A análise dos dados espectrais de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135°, juntamente com comparação de dados contidos na literatura para triterpenos da série urs-12-eno, permitiu inferir que a substância em análise correspondia ao Ácido 3 β -hidroxi-urs-12-eno-28-óico (**12**), conhecido também por ácido ursólico. A comparação dos dados de ^{13}C de FV9 e do Ácido 3 β -hidroxi-urs-12-eno-28-óico na literatura consta na tabela 21, pág. 90.

Através de levantamento bibliográfico sobre substâncias isoladas das espécies do gênero *Vitex*, verificou-se que esta substância é inédita para o gênero.

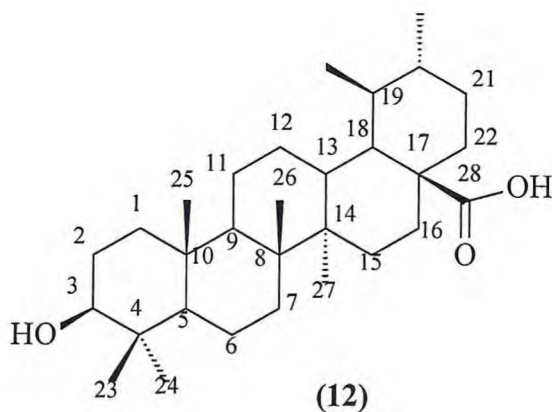


Tabela 21. Dados de RMN ^{13}C de FV9 comparados com os registros na literatura para o Ácido ursólico.

δC	FV9 (25)	Literatura ⁵⁰
1	38,2	39,8
2	26,9	28,6
3	76,8	78,6
4	39,3	39,5
5	54,7	56,3
6	18,0	19,2
7	32,7	34,0
8	39,5	40,4
9	47,0	48,5
10	36,5	37,7
11	22,8	24,1
12	124,5	126,1
13	138,1	139,7
14	41,6	43,0
15	27,5	29,1
16	23,8	25,4
17	46,8	48,5
18	52,3	54,0
19	38,5	39,9
20	38,4	39,9
21	30,2	31,5
22	36,3	37,9
23	28,2	29,3
24	16,1	17,0
25	15,2	16,1
26	16,9	17,9
27	23,2	24,4
28	178,3	180,0
29	17,0	18,0
30	21,1	21,9

5.11. Determinação estrutural de CV2 (13)

Da fração acetato de etila do extrato metanólico do caule de *V. agnus castus* L., foi uma substância de aspecto sólido amorfo, esbranquiçado, de ponto de fusão na faixa de 182-184°C, solúvel em metanol, que foi denominado **CV2**, que representou o constituinte majoritário na referida fração.

O espectro de RMN ^{13}C – BB de **CV2**, (Fig. 49, pág. 97), apresentou vinte linhas espectrais, sendo duas destas atribuídas a dois átomos de carbonos, por ter apresentado intensidade bem superior às demais (δ 115,4 e δ 131,9).

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPET 135° (Fig. 50, pág.97) revelou o padrão de hidrogenação dos átomos de carbonos de **CV2**. Através desta análise foi possível verificar que **CV2** continha quatro carbonos não hidrogenados, dezesseis carbonos metínicos e dois carbonos metilênicos.

Dos sinais atribuídos aos carbonos não hidrogenados, o sinal em δ 166,8 foi atribuído a carbono de carbonila e o sinal em δ 162,7 foi atribuído a carbono aromático oxigenado e os sinais em δ 121,1 e δ 141,9 foram relacionados a carbonos olefínicos ou aromáticos.

Com relação aos carbonos metínicos, os sinais em δ 115,3 e δ 131,9 foram atribuídos a carbonos aromáticos, salientando que cada um desses sinais correspondeu a dois carbonos aromáticos equivalentes. Anexando esta informação, a presença de dois carbonos aromáticos não hidrogenados, permitiu atribuir para **CV2** a presença de um anel aromático *para* substituído.

Os sinais em δ 70,5; δ 73,9; δ 77,0 e δ 77,3 evidenciaram a presença de uma unidade de açúcar, no caso a glicose. O sinal atribuído ao carbono anomérico foi o sinal em δ 99,2. Dos demais sinais de carbonos metínicos de **CV2**, os sinais em δ 104,9; 131,5 e 140,7 foram atribuídos à presença de carbonos olefínicos e os sinais em δ 45,3; δ 47,6 e δ 81,9 foram atribuídos a carbonos saturados, sendo que o sinal de carbono-13 em δ 81,9 foi relacionado a um carbono saturado oxigenado. O sinal em δ 97,0 foi atribuído a um carbono saturado ligado a dois oxigênios ou um carbono aromático

situado entre dois carbonos aromáticos oxigenados. Todavia pela análise dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos de **CV2**, só foi encontrado um sinal atribuível a carbono aromático oxigenado, este fato significou que o sinal em δ 97,0 só poderia pertencer a um carbono saturado ligado a dois átomos de oxigênios.

Com relação aos carbonos metilênicos os dois sinais em δ 61,8 e δ 62,7 foram atribuídos a carbonos saturados e oxigenados.

No espectro de RMN ^1H (Fig. 51, pág. 98), verificou-se a presença de dois sinais em δ 7,94 (d, $J = 8,86$ Hz, 2H) e δ 6,86 (d, $J = 8,86$ Hz, 2H), cada sinal atribuído a dois hidrogênios aromáticos e pelo valor da constante de acoplamento, acoplados em *orto*. A presença destes dois sinais enfoca a presença de um anel aromático *para* substituído.

Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se dois sinais em δ 6,36 (dd, $J = 1,9$ e 8,01 Hz) atribuídos a hidrogênio olefínico com acoplamento vicinal a dois hidrogênios distintos. O outro sinal observado foi em δ 5,01 (d, $J = 8,01$ Hz), atribuído a hidrogênio olefínico com acoplamento vicinal.

Foi observado ainda um sinal em δ 5,85 (sl) que foi atribuído a hidrogênio olefínico. A unidade de glicose foi relacionada à presença de dois multipletos em δ 2,72 (m) e δ 4,49 (m).

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ (Fig. 52, pág. 98) permitiu associar os sinais de hidrogênios em δ 5,85 (s) com o carbono olefínico em δ 104,85 e do sinal em δ 81,88 com o hidrogênio em δ 4,98 (dd, $J = 7,8$ e 6,8 Hz). Esta correlação evidenciou um carbono carbinólico hidrogenado adjacente a dois carbonos hidrogenados.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 53, pág. 99) observou-se a correlação a duas ligações entre o carbono δ 141,9 com o hidrogênio em δ 4,74 (d, $J = 8,9$ Hz) e a três ligações com o hidrogênio de carbono carbinólico em δ 4,98 (dd, $J = 7,8$ e 6,8 Hz). Observou-se ainda a correlação a três ligações do carbono de carbonila de éster em δ 166,8 com o hidrogênio em δ 7,94 (d, $J = 8,7$ Hz), este sinal de acordo com o valor da integral indicou dois átomos de hidrogênios e pelo valor do deslocamento químico indicou hidrogênios aromáticos, confirmando a presença de um

anel aromático *para* substituído, com um dos substituintes sendo um grupamento funcional éster.

Com base nos dados espectroscópicos estabelecidos até aqui, concluiu-se que **CV2** continha um anel aromático, com substituição *para*, com apenas um carbono oxigenado no anel, uma unidade de glicose, além de outros carbonos olefínicos oxigenados e não oxigenados e carbonos saturados oxigenados e não oxigenados, sendo que um desses carbonos saturados estava ligado a dois oxigênios.

A espécie *V. agnus castus*, é usada como medicamento fitoterápico em vários países e um dos princípios ativos da planta é o iridóide glicosilado agnosídeo.

Comparação estabelecida entre os possíveis fragmentos constituintes de **CV2** com a os da estrutura do agnosídeo, mostrou semelhança entre os mesmos, a ponto de ser possível atribuir para **CV2** a estrutura do agnosídeo, estrutura **(13)**, abaixo. Maior certeza da identidade de **CV2** veio com a comparação feita entre os deslocamentos de carbono-13 do agnosídeo (verificado em literatura) com os deslocamentos químicos de carbono-13 obtidos para **CV2**. Esta comparação se encontra na Tabela 22, pág. 96.

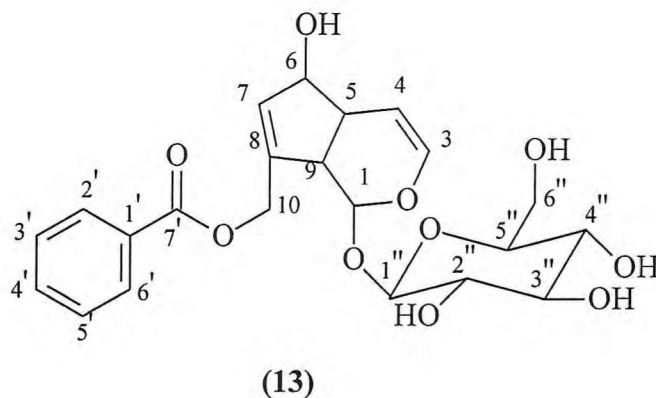


Tabela 22. Comparação dos dados de ^{13}C de CV2 com os dados de ^{13}C de agnosídeo (ref.)

	CV1	AGNOSÍDEO
C	δ_{C}	δ_{C}
8	141,9	142,8
1''	121,1	122,0
4''	162,7	163,6
7''	166,8	167,8
CH	—	—
1	97,0	97,9
3	140,7	141,7
4	104,9	105,5
5	45,3	46,2
6	81,9	82,8
7	131,5	132,8
9	47,6	48,7
1'	99,2	100,1
2'	73,9	74,8
3'	77,0	77,8
4'	70,5	71,3
5'	77,3	78,1
2'', 6''	131,9	132,3
3'', 5''	115,3	116,2
CH ₂		
10	62,7	63,6
6'	61,8	62,6

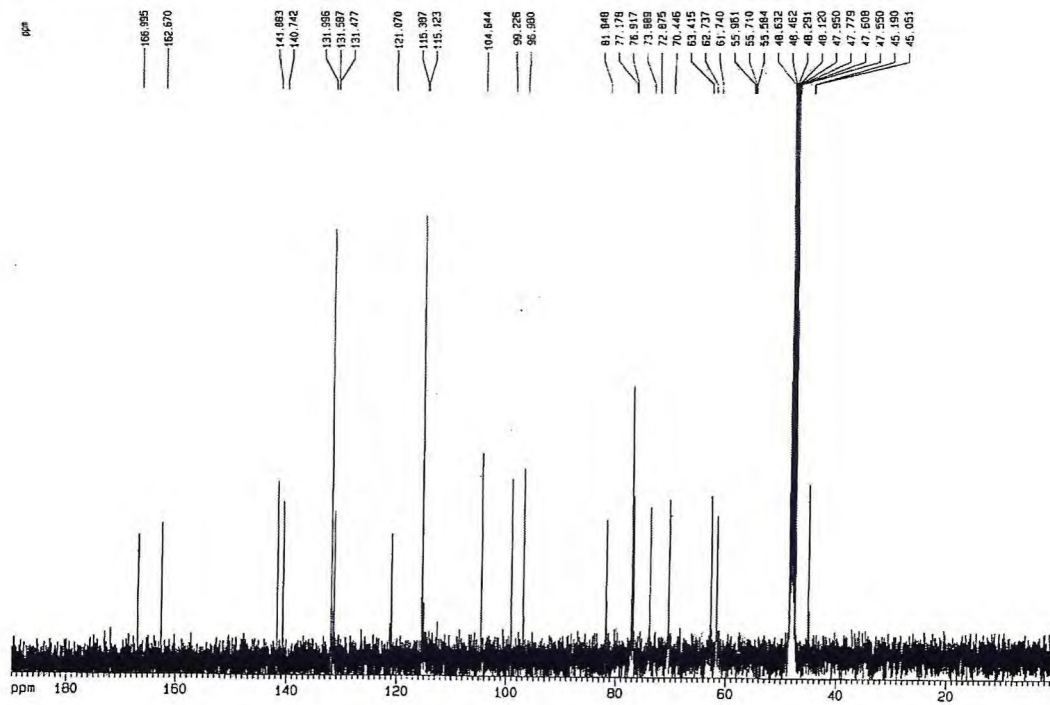


Fig. 49. Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de CV2

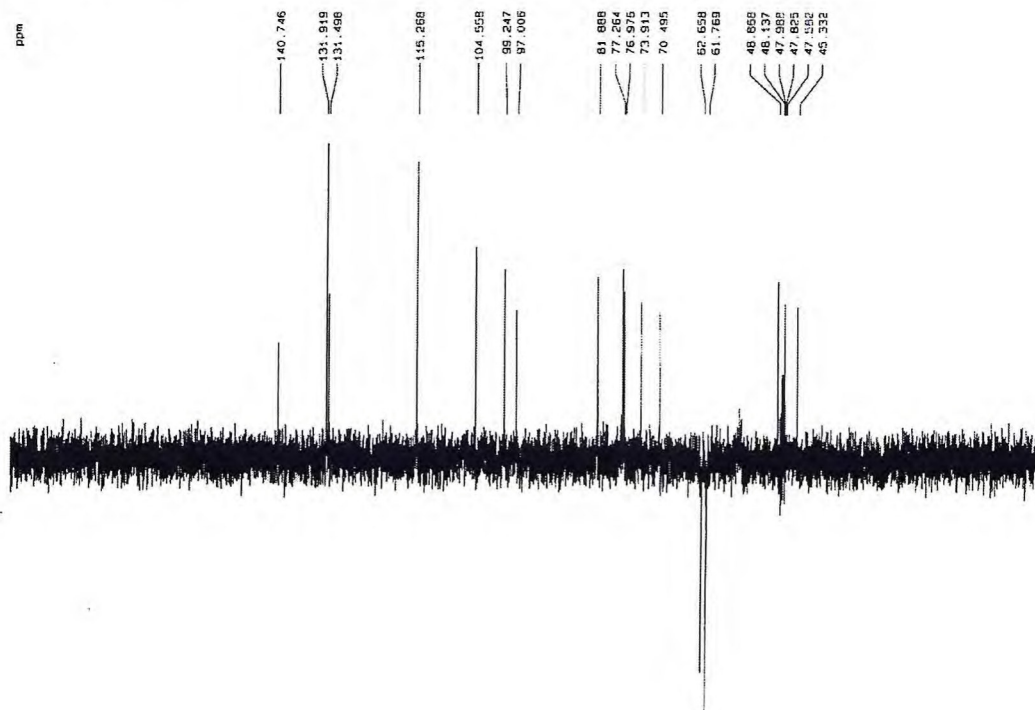


Fig. 50. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de CV2

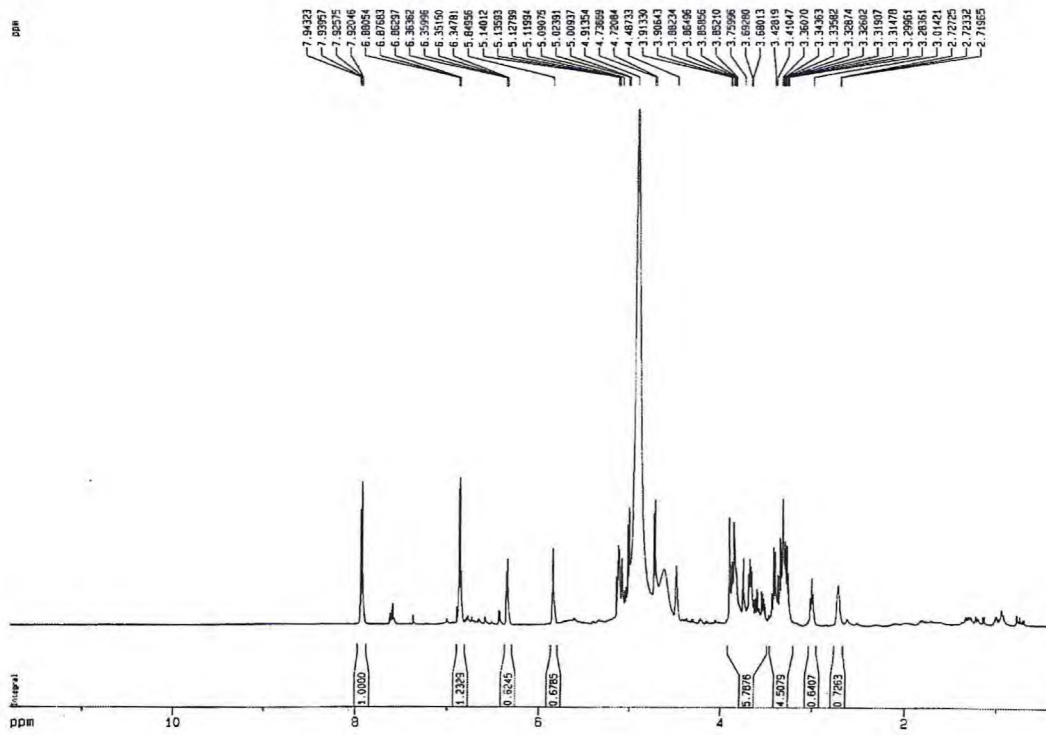


Fig.51. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CV2

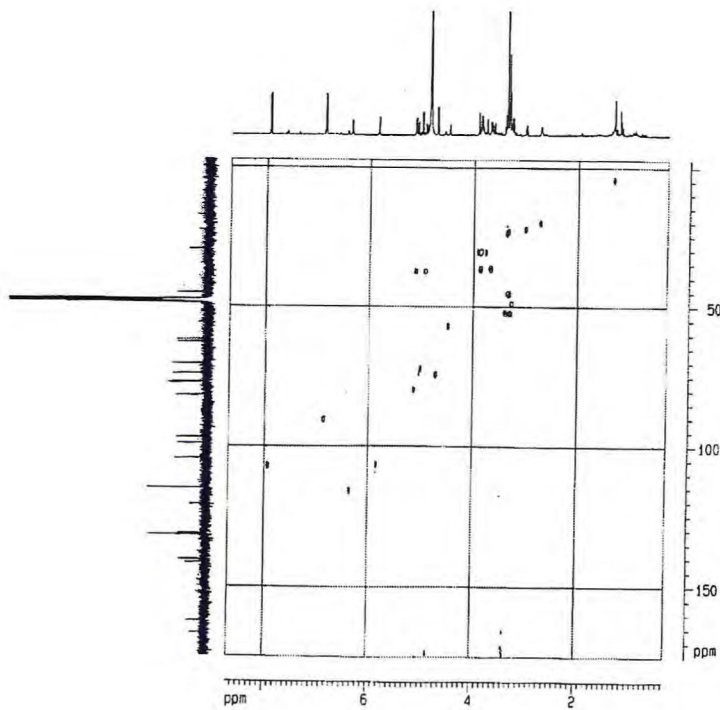


Fig.52. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear - HMQC (CD_3OD) de CV2

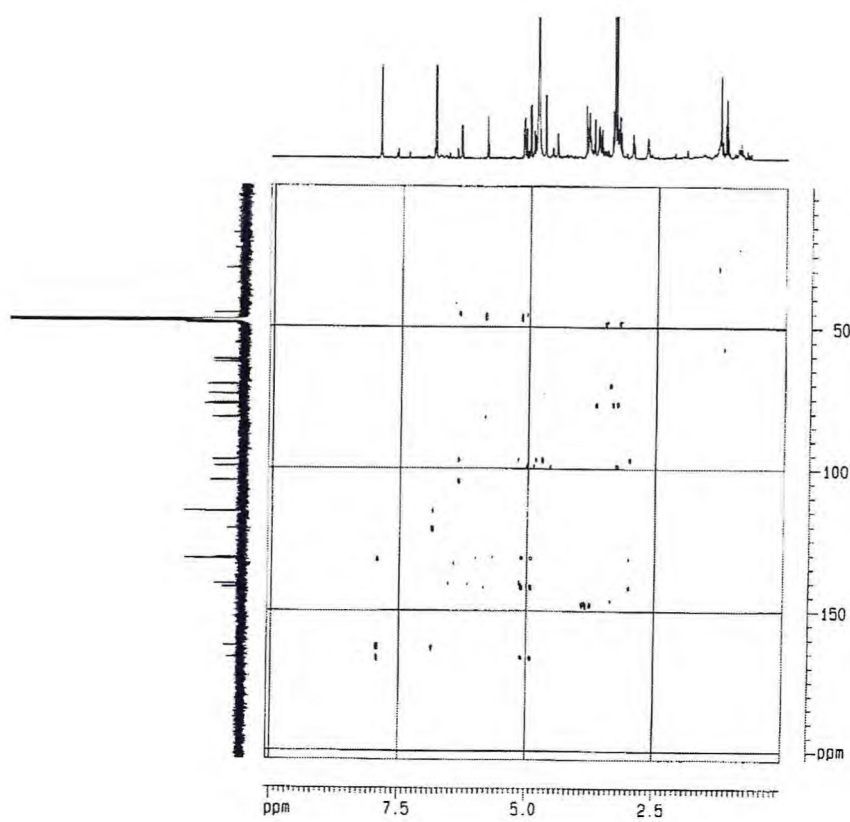


Fig. 53. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear - HMBC (CD₃OD) de CV2



Capítulo 06

6. ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

6.1. Determinação da composição química dos constituintes voláteis de *V. agnus castus* L.

A composição química dos óleos essenciais de *V. agnus castus* L., já tem vários registros na literatura, ^{46,47} porém com o objetivo de comparar a composição dos constituintes químicos dos óleos essenciais das duas variedades da planta (flores brancas e flores lilás), além de equiparar estes dados aos de uma espécie do mediterrâneo (através de informações da literatura), e investigar a atividade antimicrobiana dos constituintes voláteis, foram feitas extrações dos óleos essenciais das folhas e dos frutos das duas variedades, através do processo de hidrodestilação (ver parte experimental).

Os óleos essenciais dos frutos da variedade de flores brancas apresentaram quarenta constituintes, dentre os quais os constituintes majoritários identificados foram 1,8-cineol (**5'**); 1- α -terpineol (**11'**); α -terpineno (**10'**); *trans*-cariofileno (**16'**) e *Z*-*beta*-farneseno (**17'**). Das folhas da variedade de flores brancas os constituintes majoritários foram 1,8-cineol (**5'**); 1- α -terpineol (**11'**) e *trans-beta*-farneseno (**17'**).

Os constituintes majoritários dos frutos da variedade de flores lilás foram sabineno (**3'**); 1,8-cineol (**5'**); 1- α -terpineol (**11'**); α -terpineno (**10'**); *trans*-cariofileno (**16'**) e *cis-beta*-farneseno (**17'**).

Os óleos essenciais de uma espécie de *V. agnus castus* L. da Grécia, região do mediterrâneo apresentaram como constituintes principais 1,8-cineol (**5'**); *trans* – cariofileno (**10'**); sabineno (**3'**) e *trans-beta*-farneseno (**17'**). Um outro trabalho, utilizando uma espécie da Croácia, relata um elevado percentual tanto para os óleos essenciais dos frutos quanto das folhas de 1,8-cineol (**5'**) e de sabineno (**3'**).

Em todas as análises realizadas foi observada constante presença de 1,8-cineol (**5'**) e de sabineno (**3'**), como compostos majoritários para *V. agnus castus* L.

Os óleos essenciais extraídos neste trabalho foram analisados através de cromatografia gás-líquido acoplada a um espectrometro de massa (CGL/EM).

A identificação dos constituintes foi realizada por meio de interpretação dos espectros de massas, comparação com espectros de massas em um banco de dados (espectroteca) associada à determinação e correção dos índices de Kovats simulados e por comparação com dados da literatura.⁴⁸ A Tabela. 23, pág. 106, apresenta a relação de constituintes químicos identificados nos óleos essenciais dos frutos e das folhas das duas variedades.

Os óleos essenciais das folhas da variedade de flores brancas apresentaram 28 constituintes constantes no cromatograma (Fig. 54, pág. 102) das quais foram identificados 80% dos constituintes. Com relação aos óleos essenciais dos frutos da mesma variedade, o cromatograma (Fig. 55, pág. 103) apresentou 40 constituintes dentre os quais 60 % foram identificados.

Dos óleos essenciais das folhas da variedade de flores lilás, o cromatograma (Fig. 56, pág. 104) apresentou 26 constituintes, enquanto o cromatograma dos óleos essenciais dos frutos da variedade apresentou 28 constituintes (Fig. 57, pág. 105). Para estes óleos foram identificados 60 % dos constituintes para os das folhas e 80% dos constituintes para os óleos dos frutos.

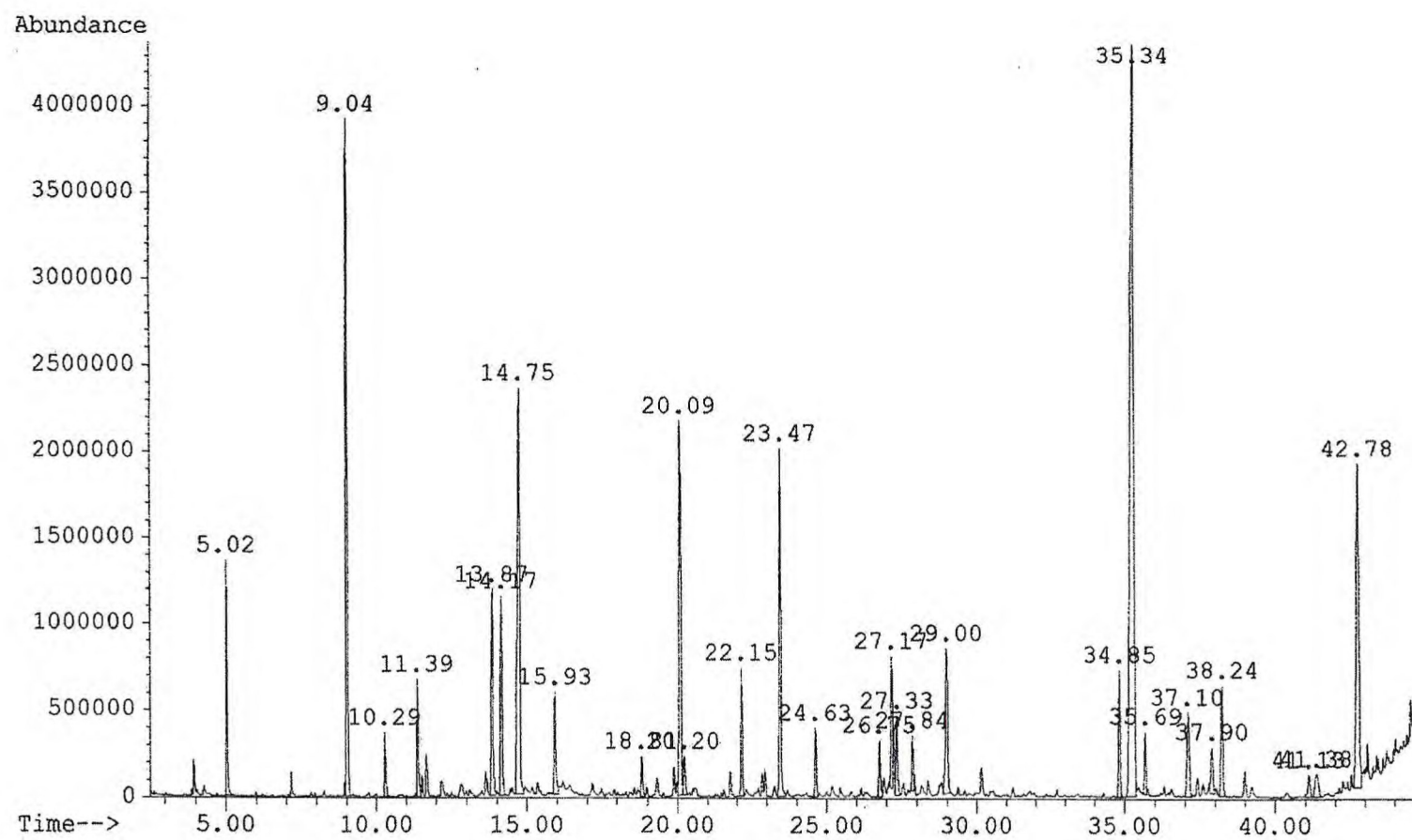


Fig. 54 - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *V. agnus castus* L. variedade de flores brancas.

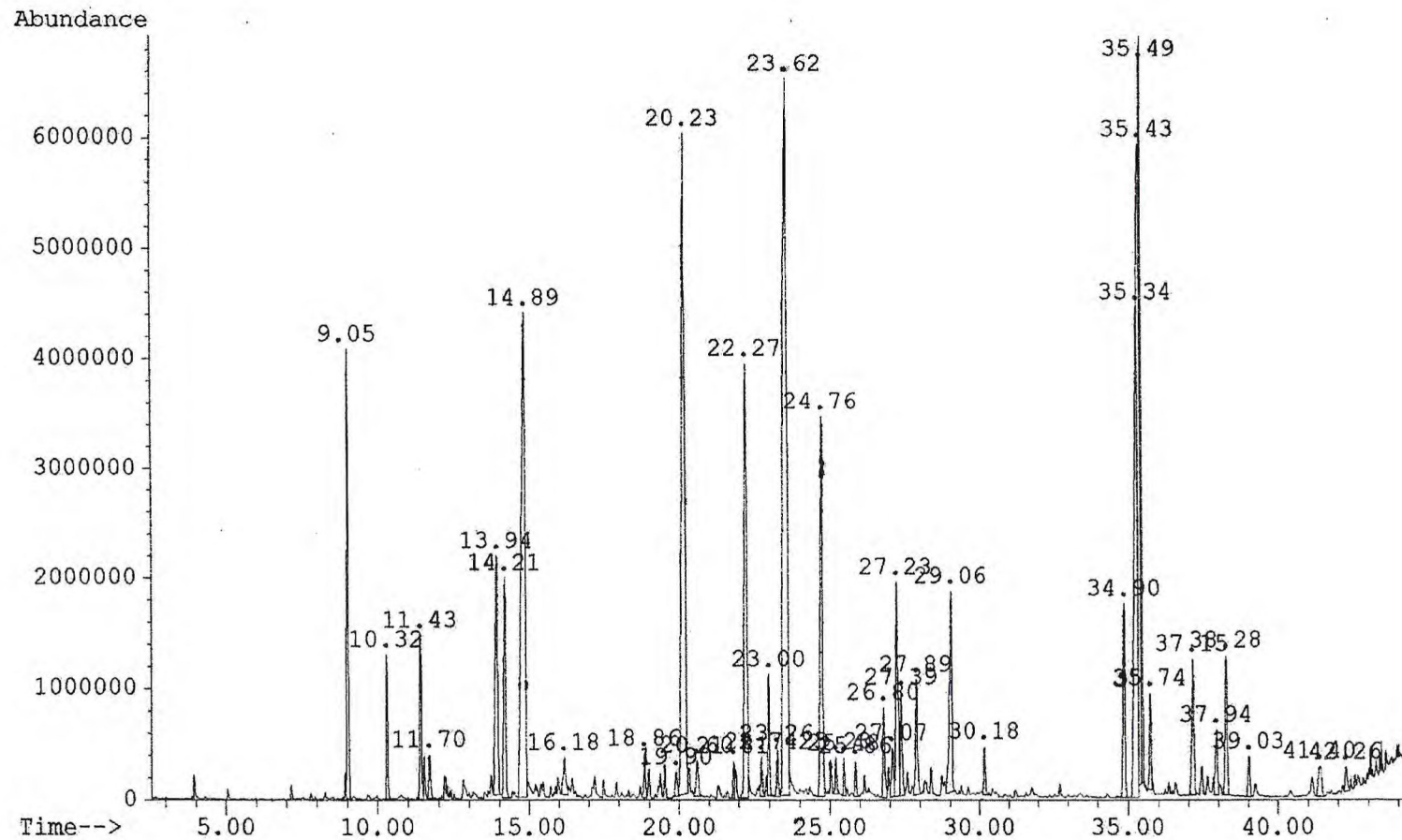


Fig. 5 - Cromatograma dos óleos essenciais dos frutos de *V. agnus castus* L. variedade de flores brancas.

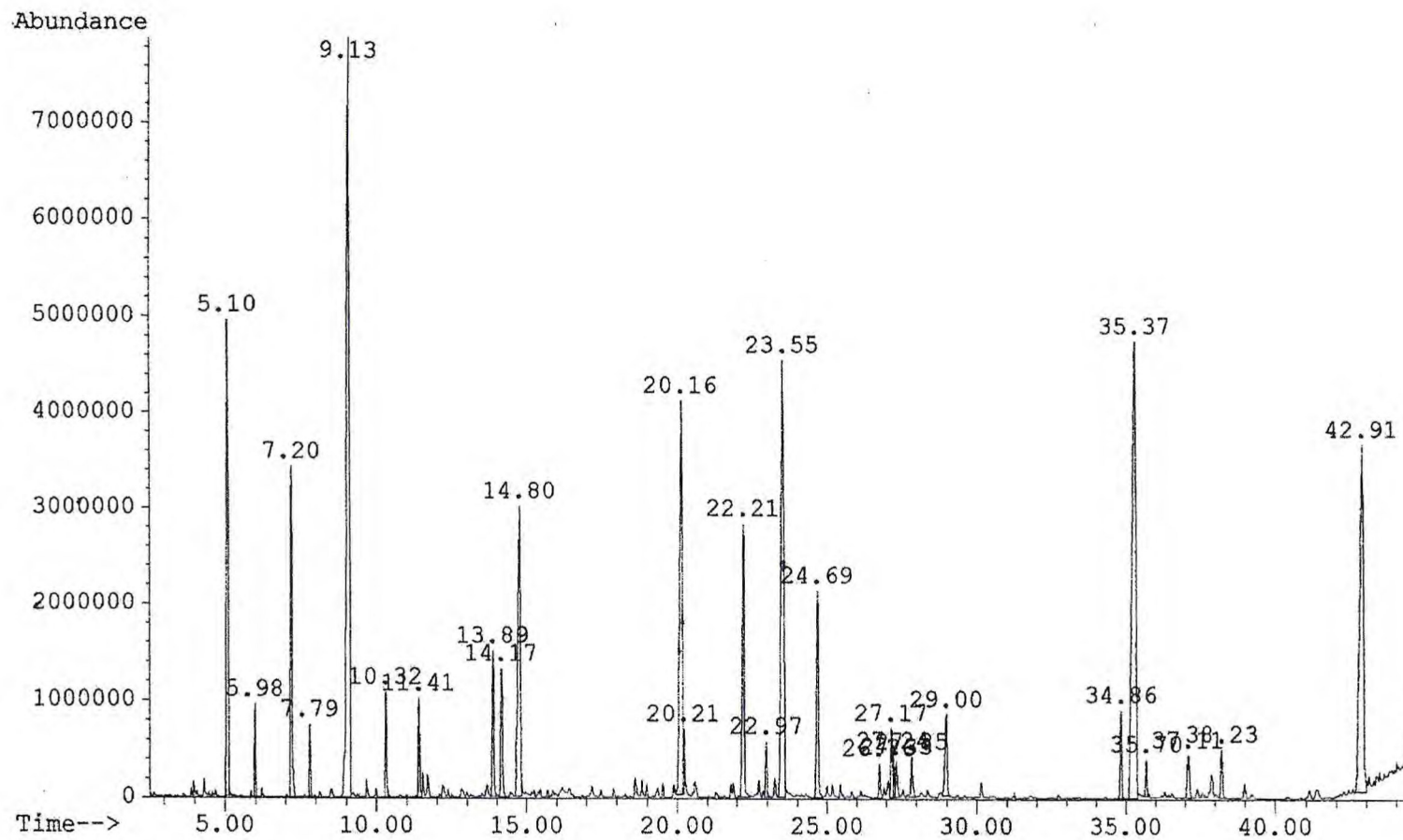


Fig. 56 - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *V. agnus castus* L. variedade de flores lilás.

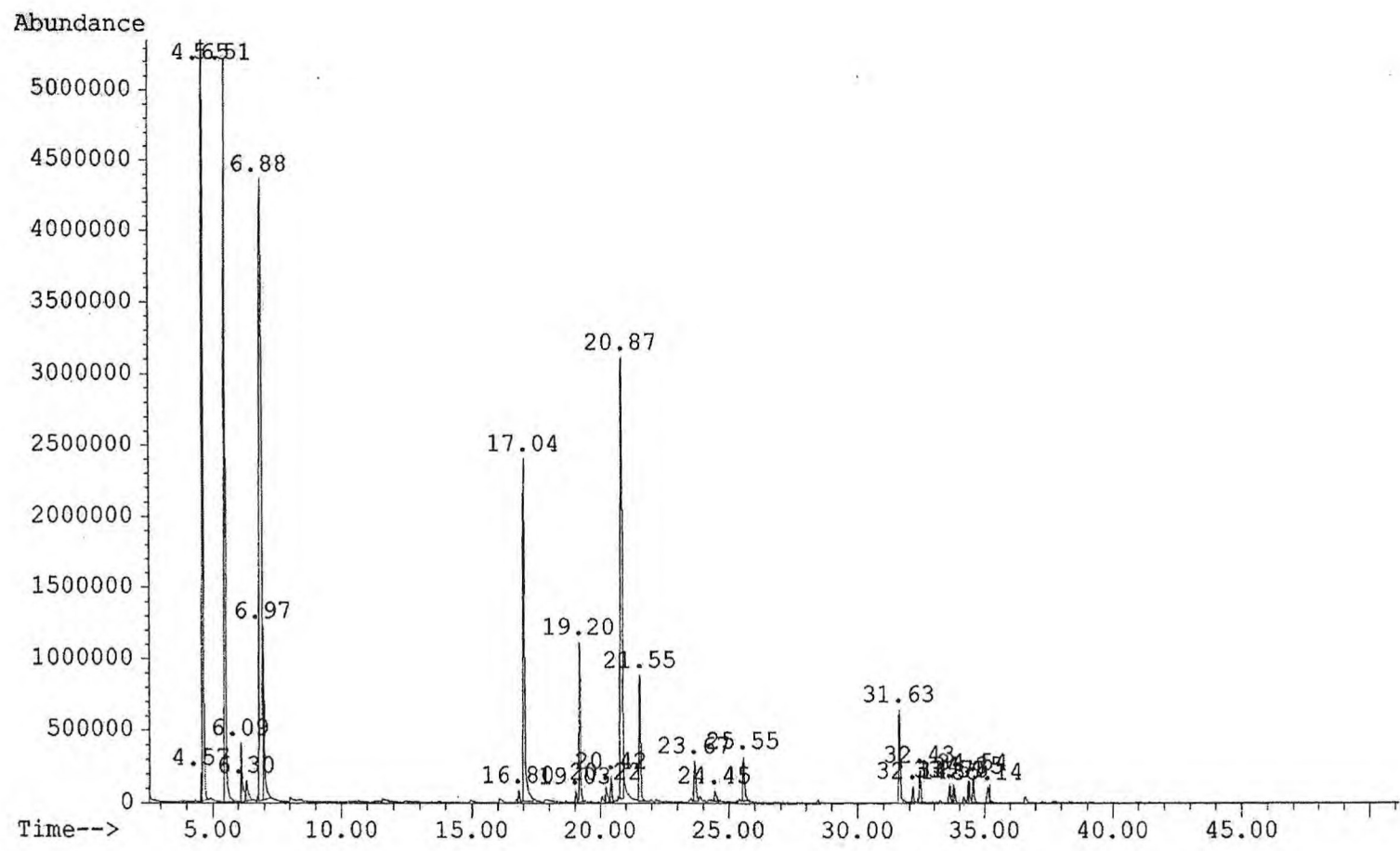


Fig. 57 - Cromatograma dos óleos essenciais dos frutos de *V. agnus castus* L. variedade de flores lilás.

Tabela.23. Constituintes voláteis de *V. agnus castus* L. Folhas e frutos das variedades de flores brancas, de flores lilás e de uma espécie da Croácia.

COMPOSTO						
Terpenos	flvb	frvb	flvl	frvl	flvCr	frvCr
α -tujeno (1')	–	–	–	0,32	8,56	4,06
α -pineno(2')	–	0,40	0,71	14,62	0,22	0,40
Sabineno (3')	0,33	3,62	17,35	2,27	2,27	2,56
β -mirceno (4')	–	–	0,64	1,5	1,11	1,05
1,8-cineol (5')	9,75	3,47	17,41	21,62	18,17	33,40
Hidrato de trans sabineno (6')	0,78	1,08	1,12	–	–	–
Linalool (7')	1,49	1,42	1,09	–	0,19	3,00
α -humuleno(8')	–	0,44	–	0,48	1,88	0,45
β -citronelal (9')	–	0,51	–	–	–	–
α -terpineno (10')	5,99	11,00	7,91	9,25	–	–
α -terpineol (11')	3,39	10,08	6,53	–	7,24	–
β -sesquifelandreno (12')	–	0,94	0,64	–	0,51	2,03
Acetato de terpenila (13')	–	–	–	0,23	–	0,47
Esptulenol (14')	–	0,97	1,03	–	–	–
Globulol (15')	–	–	–	0,58	0,12	–
trans-cariofileno (16')	2,13	2,63	9,53	1,43	1,95	3,96
β -farneseno (17')	5,68	14,14	4,49	15,13	3,79	8,99

flvb = folhas de *V. agnus castus* L. variedade de flores brancas;

frvb = frutos de *V. agnus castus* L. variedade de flores brancas;

flvl = folhas de *V. agnus castus* L. variedade de flores lilás;

frvl = frutos de *V. agnus castus* L. variedade de flores lilás;

flvCr = folhas de *V. agnus castus* L. da Croácia e

frvCr = folhas de *V. agnus castus* L. variedade da Croácia.

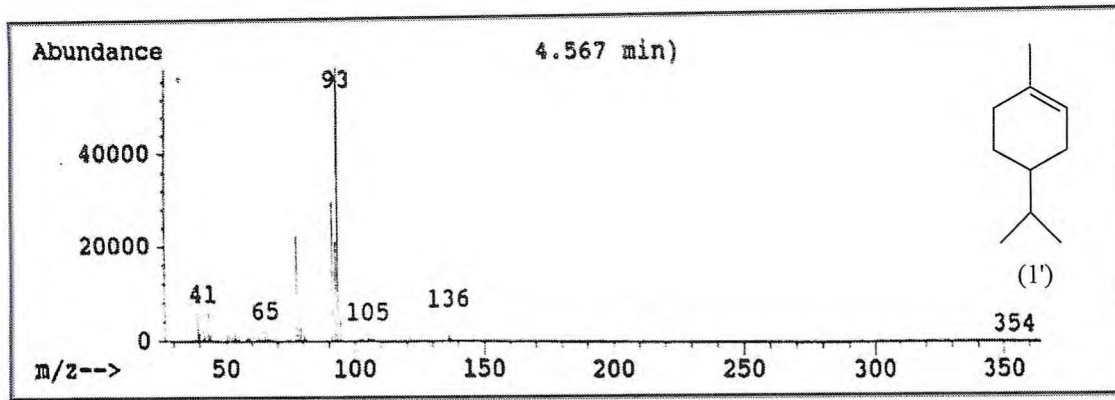


Fig. 58 - Espectro de massas do α -tujeno (1')

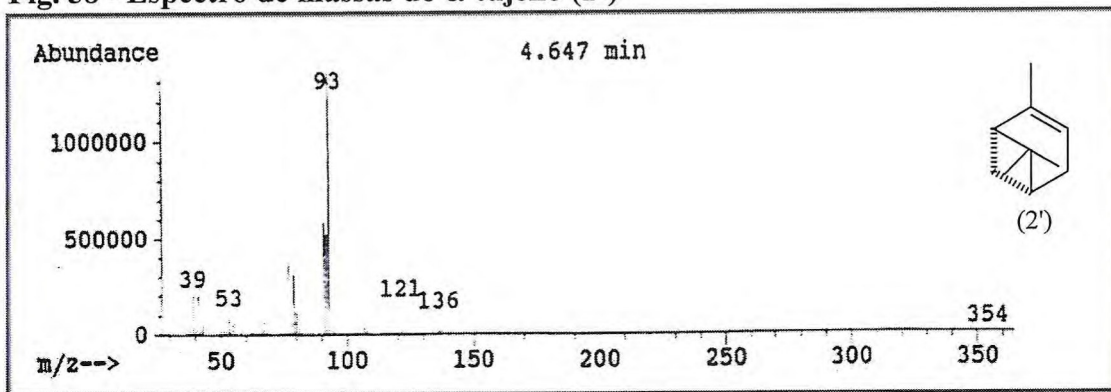


Fig. 59 - Espectro de massas do α -pineno (2')

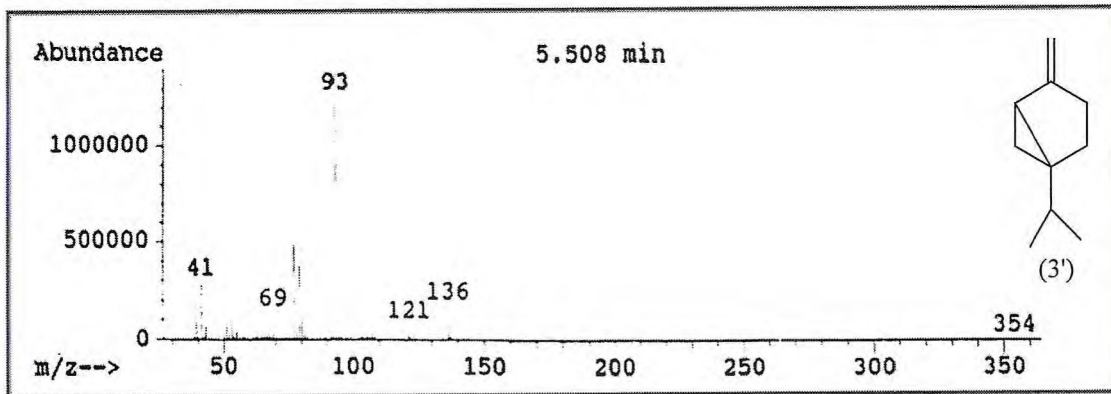


Fig.60 - Espectro de massas do sabineno (3')

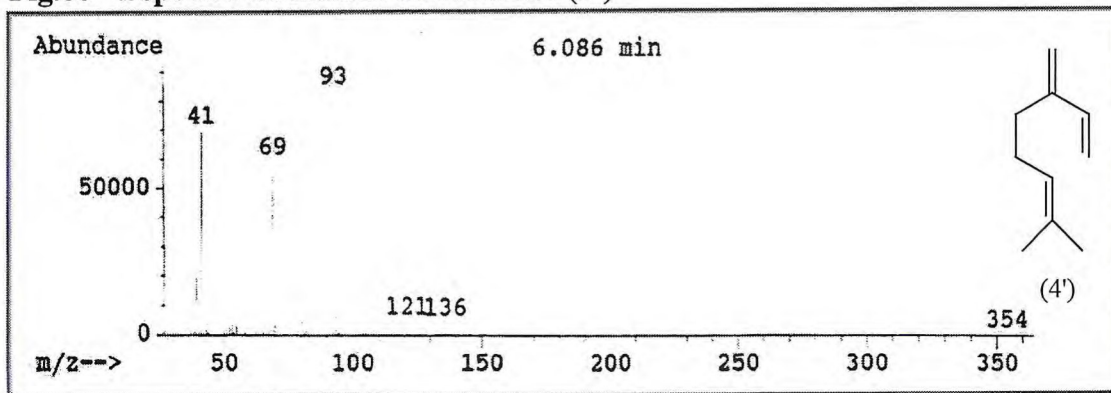


Fig.61 - Espectro de massas do β -mirceno (4')

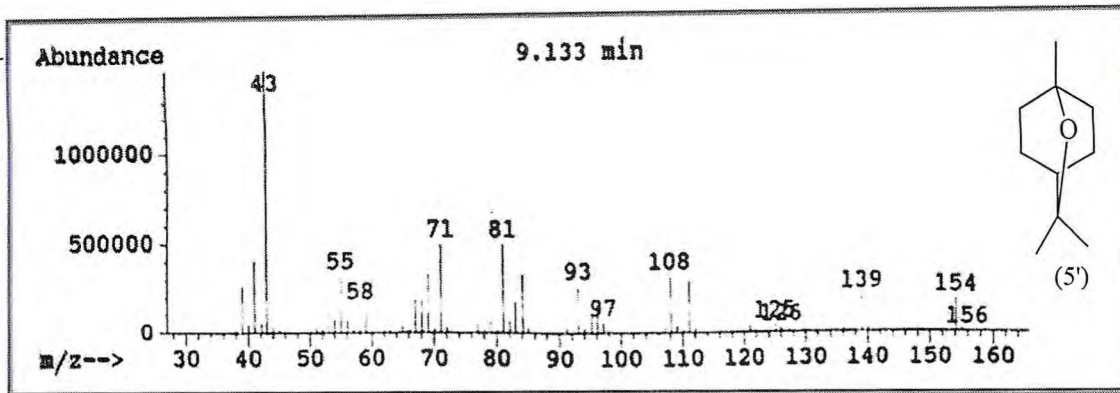


Fig.62. Espectro de massas do 1,8-cineol (5')

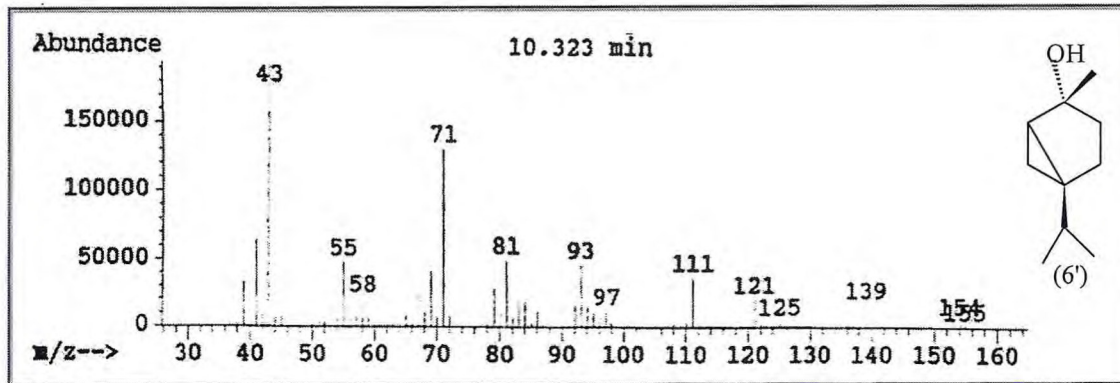


Fig. 63. Espectro de massas do hidrato de trans-sabineno (6')

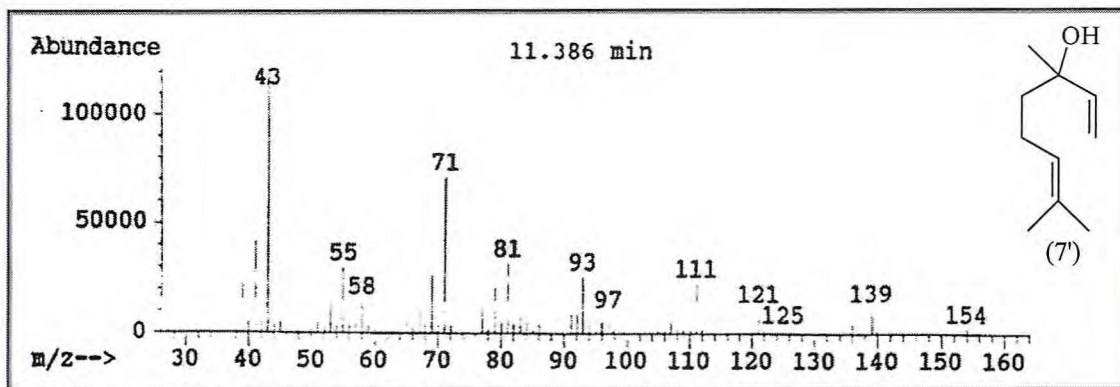


Fig. 64. Espectro de massas do linalol (7')

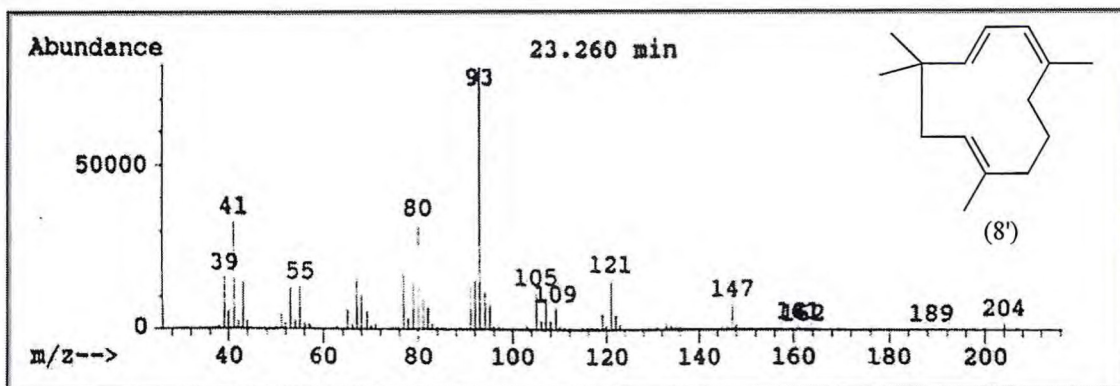


Fig. 65 - Espectro de massas do humuleno (8')

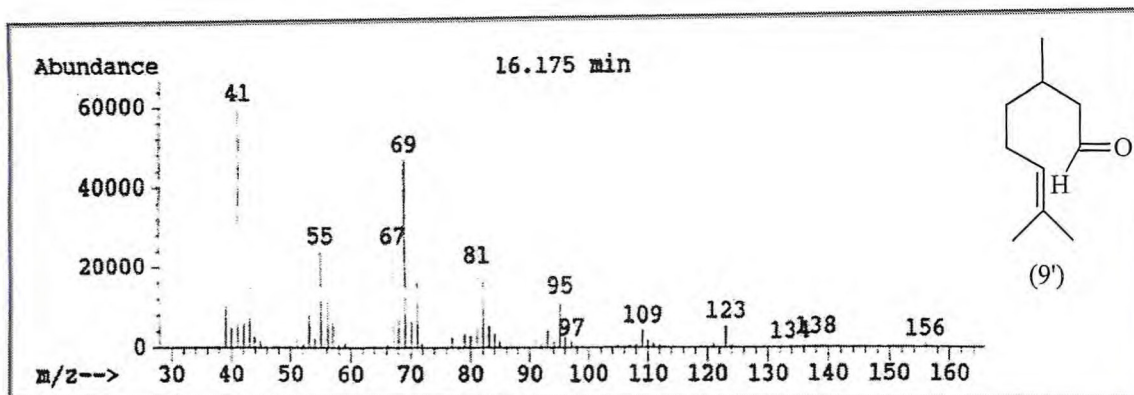


Fig.66 - Espectro de massas do citronelal (9')

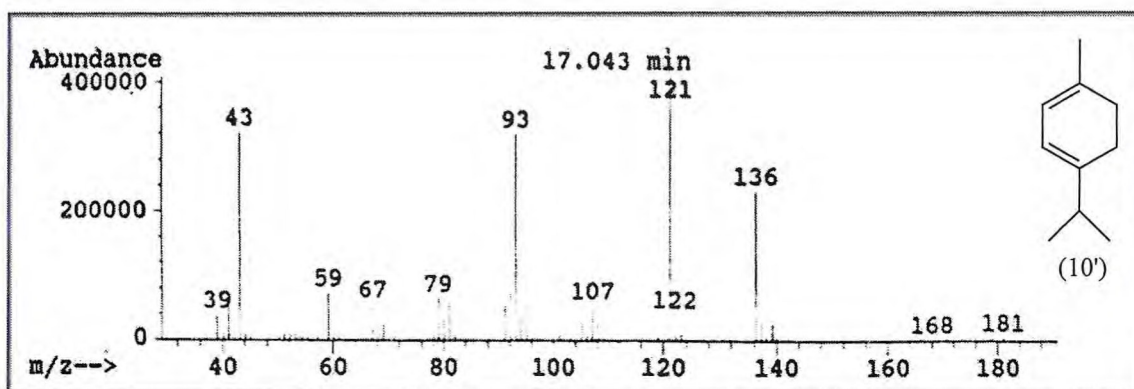


Fig.67 - Espectro de massas do α -terpineno (10')

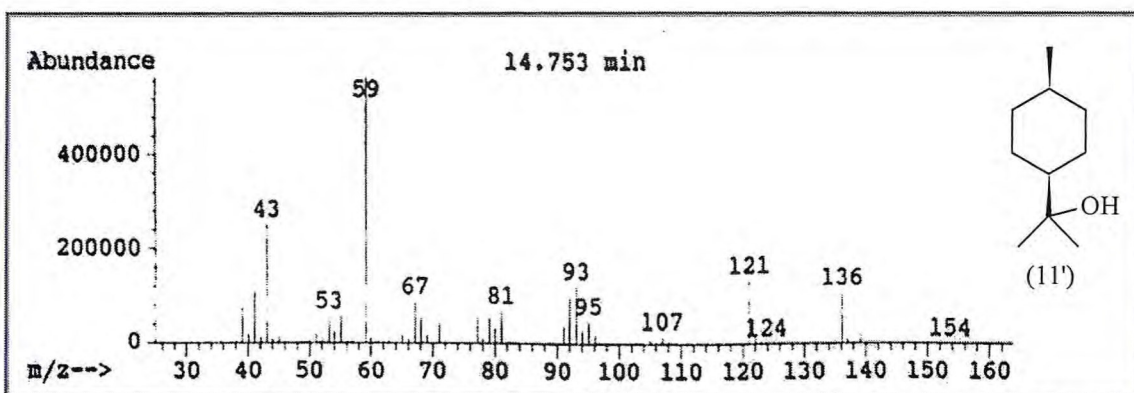


Fig.68 - Espectro de massas do α -terpineol (11')

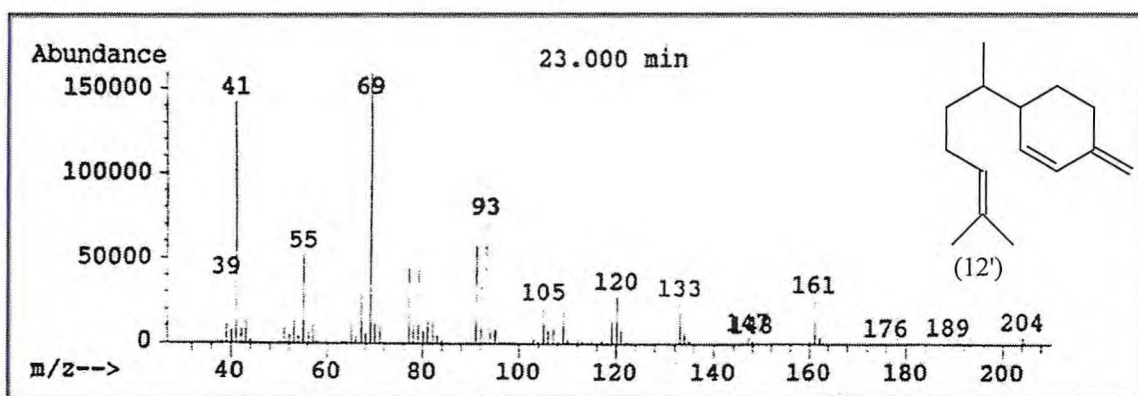
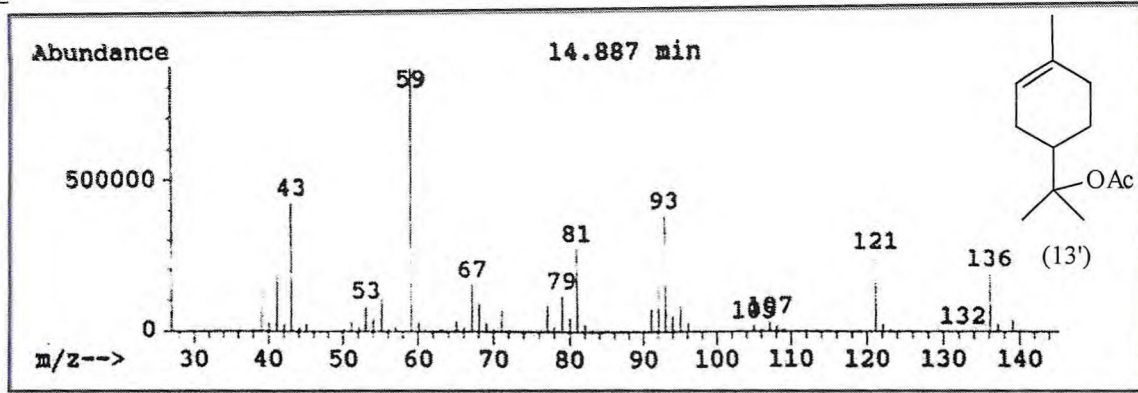


Fig.69 - Espectro de massas do β -sesquifelandreno (12')



.70 - Espectro de massas do acetato de terpenila (13')

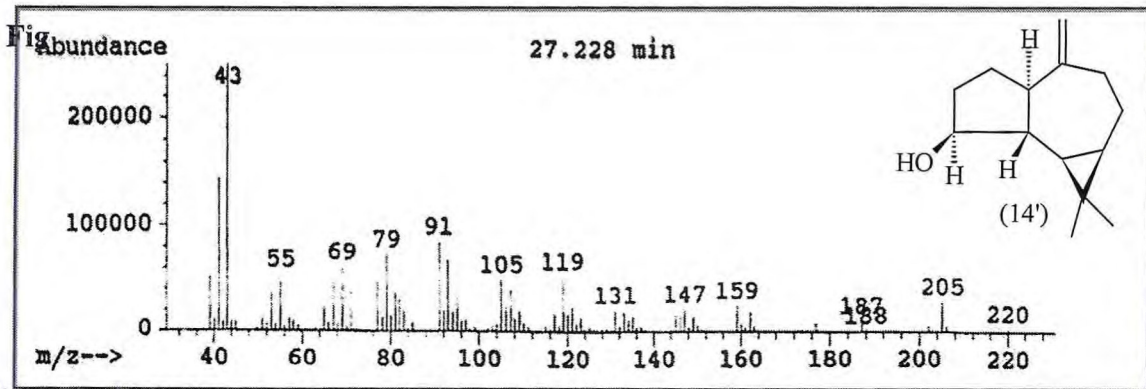


Fig.71 - Espectro de massas do Eputulenol (14')

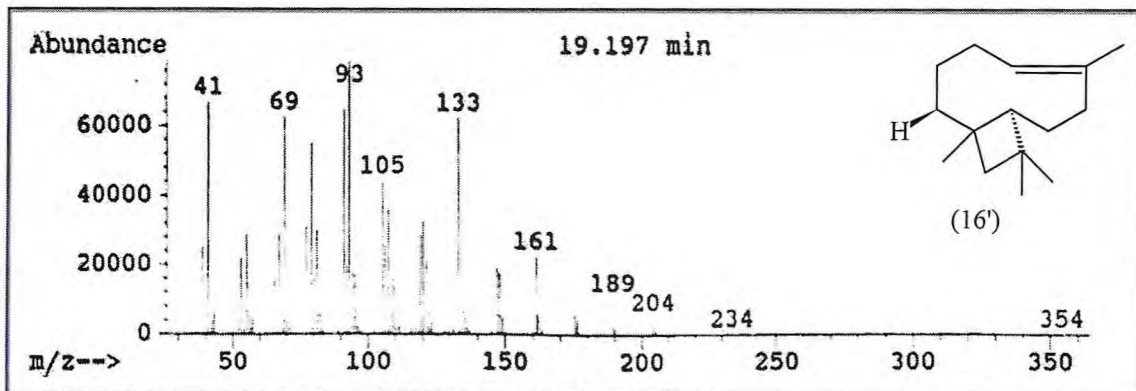


Fig.72 - Espectro de massas do trans-cariofileno (16')

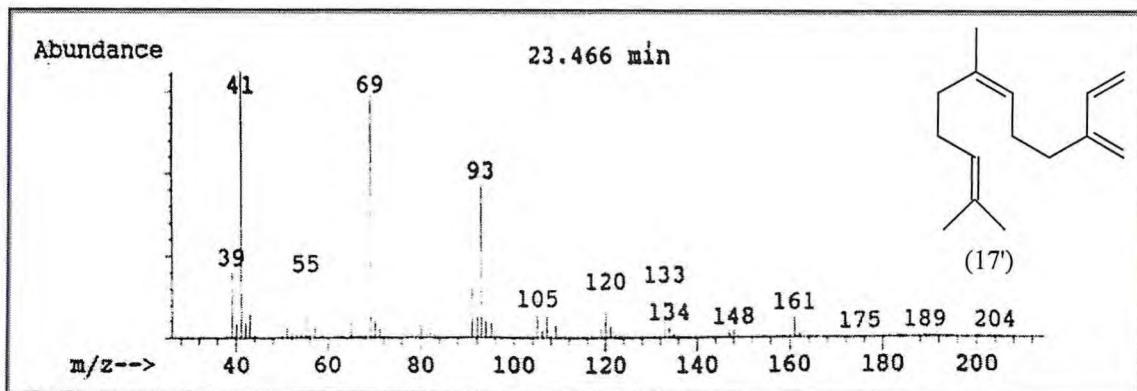
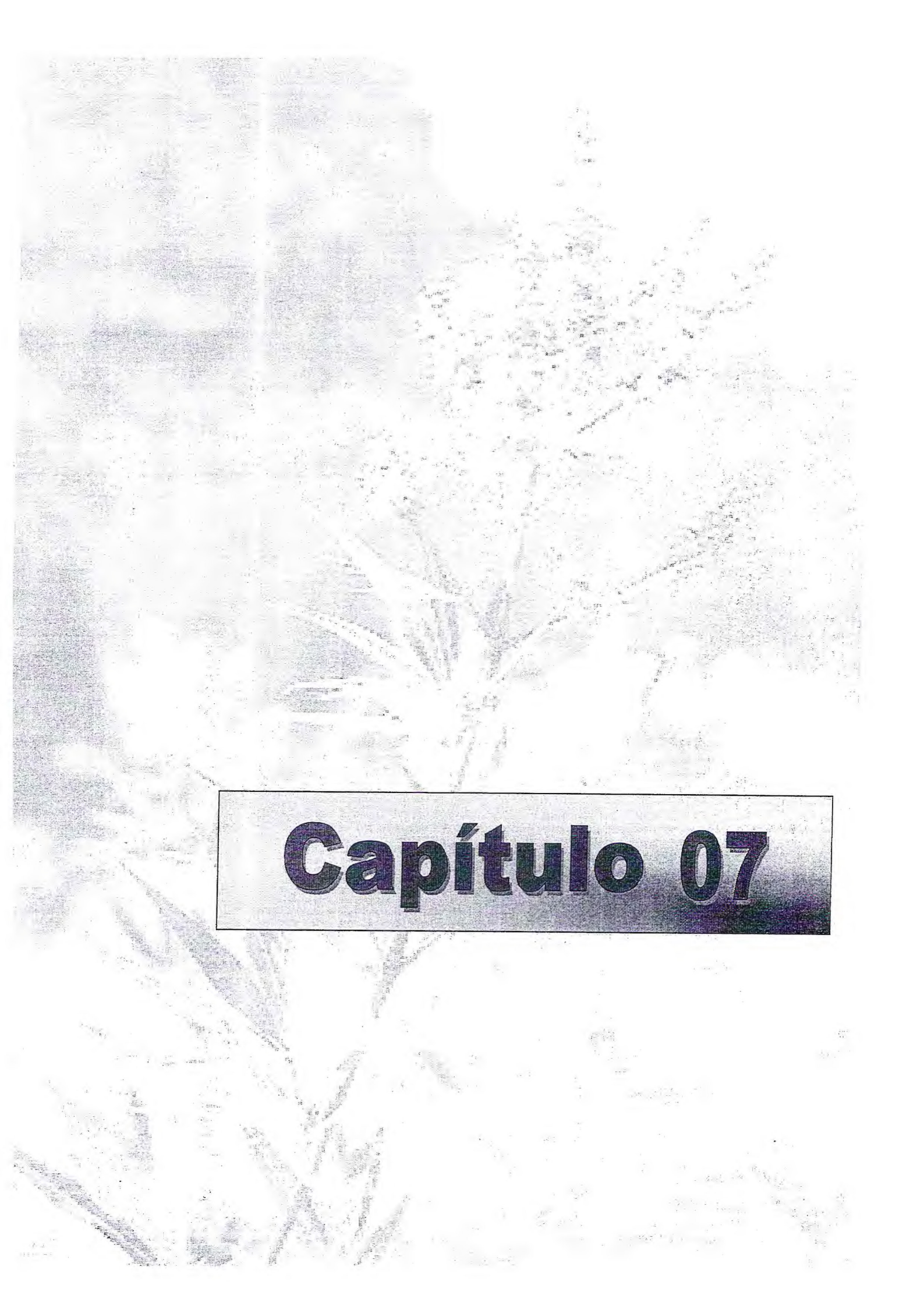


Fig.73 - Espectro de massas do β - farneseno (17')



Capítulo 07

7. ATIVIDADE BIOLÓGICA

7.1. Avaliação da atividade biológica dos constituintes isolados de *V. agnus castus* L.

Os usos terapêuticos da espécie *V. agnus castus* L.^{1,2} são sempre direcionados para as ações de controle hormonal que a planta exerce sobre o aparelho reprodutor feminino, entretanto neste trabalho dois pontos básicos foram considerados: O fato da espécie apresentar grandes quantidades e diversos tipos de flavonóides e o outro foram os tipos de constituintes químicos dos óleos essenciais, onde os componentes majoritários, eram os terpenos 1,8-cineol, α -pineno, sabineno, β -farneseno e *trans*-cariofileno,^{47,48,49} que são constituintes muitas vezes presentes em óleos com atividade antimicrobiana.

Os flavonóides são citados na literatura por apresentarem diversas atividades farmacológicas^{50,51}, tais como antioxidante, antiinflamatória, anticancerígena, diurética e antiagregação plaquetária.

Um dos flavonóides mais abundante na espécie *V. agnus castus* L., 3',5-Diidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**5**), é citado na literatura como um flavonóide citotóxico, juntamente com o flavonóide luteolina (**9**), em menor proporção na planta. Baseado neste fato, resolveu-se neste trabalho investigar a atividade citotóxica dos quatro flavonóides isolados frente ao DNA da célula de porco, com uso de CLAE.

Com os óleos essenciais foi realizado um trabalho com o intuito de verificar a atividade antimicrobiana frente a microorganismos usando a metodologia de avaliação da sensibilidade antimicrobiana em meio sólido.

7.2. ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE V.AGNUS CASTUS L.

7.2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O mecanismo de ação de algumas drogas antitumorais envolve a interação com o DNA. Alguns agentes alquilantes e alguns agentes antitumorais como a bleomicina e a cisplatina, entre outros, agem segundo este mecanismo.^{51, 52, 53}

Baseados na interação de moléculas de pequeno peso molecular com o DNA, tem se baseado muitos pesquisadores na descoberta de drogas oriundas de produtos naturais que agem por este mecanismo e posteriormente são usadas como anticancerígenos.

A literatura relata vários métodos empregados na verificação desta atividade, a metodologia usada neste trabalho, consiste na junção equimolar da substância alvo com o DNA da célula e eluição da mistura em CLAE. O resultado positivo é indicado pela supressão parcial ou total do pico correspondente ao DNA, visto em cromatograma.

7.2.2. CONSEQUÊNCIA BIOLÓGICA DA INTERAÇÃO SUBSTÂNCIA / DNA

Biologicamente o efeito é considerado citotóxico, porque a inativação do DNA da célula impede a divisão celular, acarretando no final em morte celular.⁵⁴

A princípio esta consequência pode parecer prejudicial ao organismo sadio, mas no caso de um organismo com uma massa tumoral, este efeito é de suma importância. As células que mais se dividem são as células mais prejudicadas neste processo, e os tumores cancerígenos apresentam como característica principal um exacerbado processo de divisão celular, que acarreta em crescimento rápido da massa tumoral. A droga age justamente no processo de divisão celular, impedindo que ocorra, não ocorrendo a divisão celular, ocorre decréscimo da massa tumoral, findando em desaparecimento do tumor.

Logicamente o organismo é prejudicado, mas o benefício final é o efeito mais importante a ser considerado.

7.2.3. MECANISMO DE AÇÃO

O DNA é uma molécula constituída por duas fitas, adquirindo uma conformação em dupla hélice. Cada fita de DNA é formada por bases nitrogenadas e o empareamento dessas bases através de ponte de hidrogênio é o que mantém as duas fitas de DNA.

No processo de divisão celular as duas fitas se separam e cada fita dará origem a uma nova molécula de DNA e conseqüentemente uma nova célula.

Quando uma substância quebra o DNA significa dizer que esta substância em algum ponto da cadeia faz uma ponte entre as duas fitas e o tipo de interação geralmente é através de uma ligação covalente, que é mais forte do que uma ponte de hidrogênio.

No momento da divisão celular a ponte de hidrogênio é rapidamente desfeita, mas a ligação entre a substância quelante e as duas fitas de DNA não se desfaz, e a conseqüência disto é a não divisão celular.⁵⁵

Geralmente as substâncias que podem exercer este efeito no DNA, são substâncias com moléculas pequenas e com átomos que possuam elétrons não ligantes para poderem formar uma nova ligação com as fitas do DNA.

Neste ponto os flavonóides são excelentes substâncias, apresentam moléculas pequenas, geralmente quinze átomos de carbonos e apresentam um alto nível de polaridade e elétrons não ligantes, dos oxigênios.

7.2.4. RESULTADOS DO TESTE DE AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

O resultado do teste de avaliação citotóxica está representado nos cromatogramas a seguir.

No cromatograma I (Fig. 74, pág. 114) temos o pico 1 representando o DNA eluído em metanol / água (3:7); no cromatograma II (Fig. 75, pág. 114) temos a junção

DNA + a substância padrão brometo de etidimium, e pela análise do cromatograma, verifica-se a supressão quase total do pico do DNA.

O teste realizado com as substâncias (FV3), (FV4), (FV6) e (FV7) de acordo com os cromatogramas III (Fig. 76, pág. 115), IV (Fig. 77, pág. 115), V (Fig. 78, pág. 116) e VI (Fig. 79, pág. 116) respectivamente indicou sempre a supressão do pico do DNA, semelhante ao que ocorre com a mistura DNA/substância padrão.

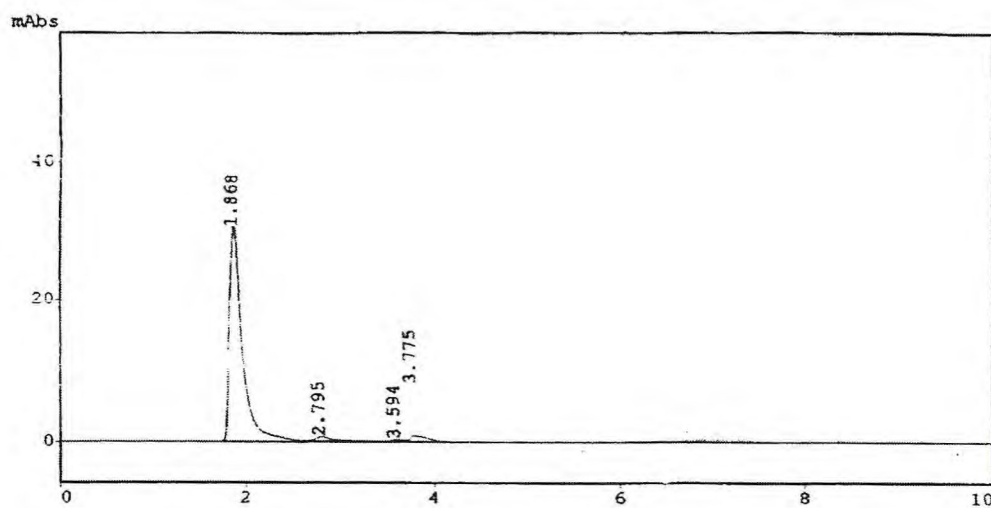


Fig. 74 Cromatograma I pico do DNA eluído em metanol/água (3:7)

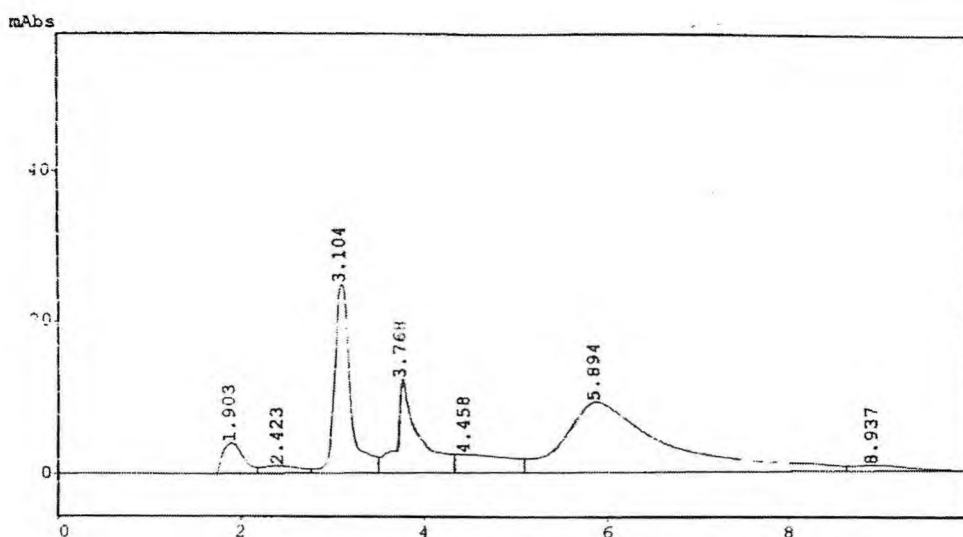


Fig. 75. Cromatograma II DNA + Brometo de etidimium

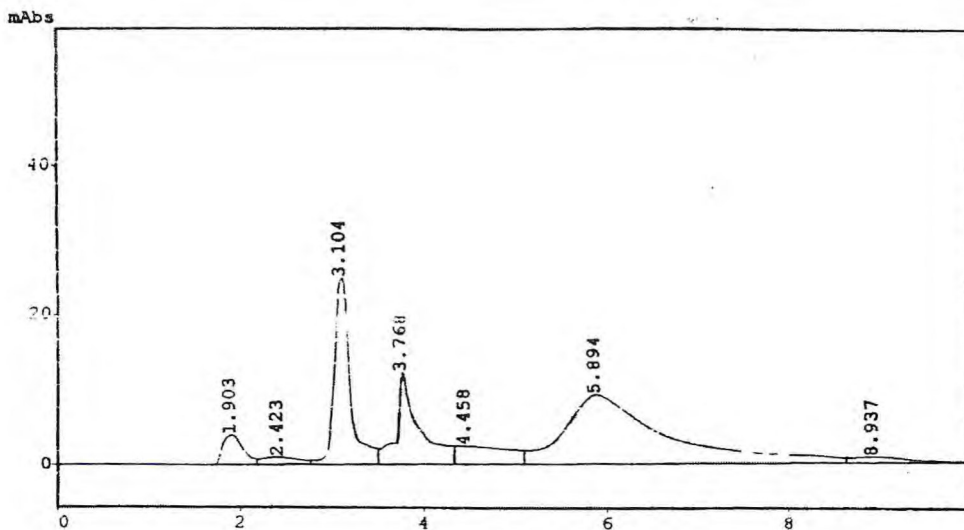


Fig. 76 Cromatograma III DNA + FV3

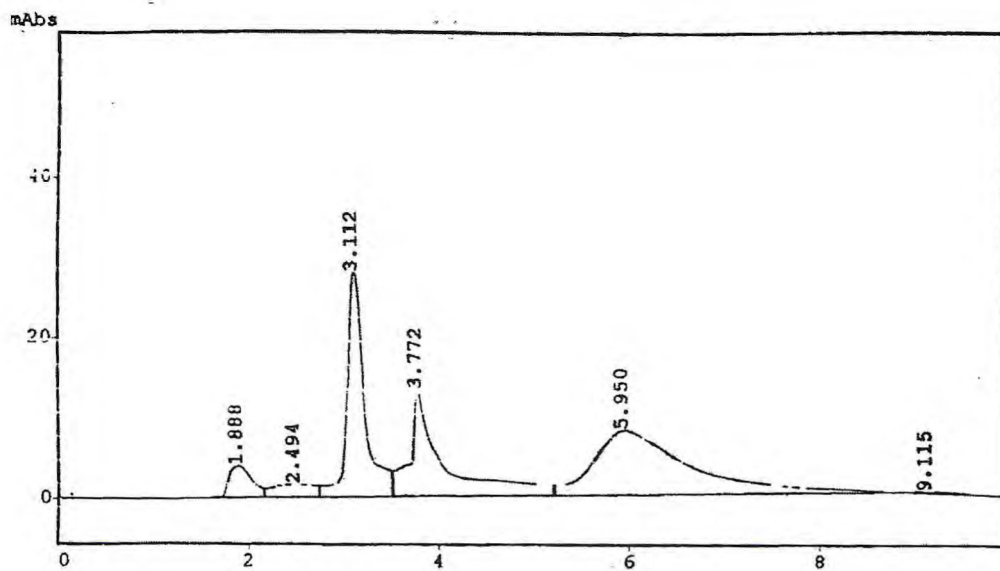


Fig. 77 Cromatograma IV DNA + FV4

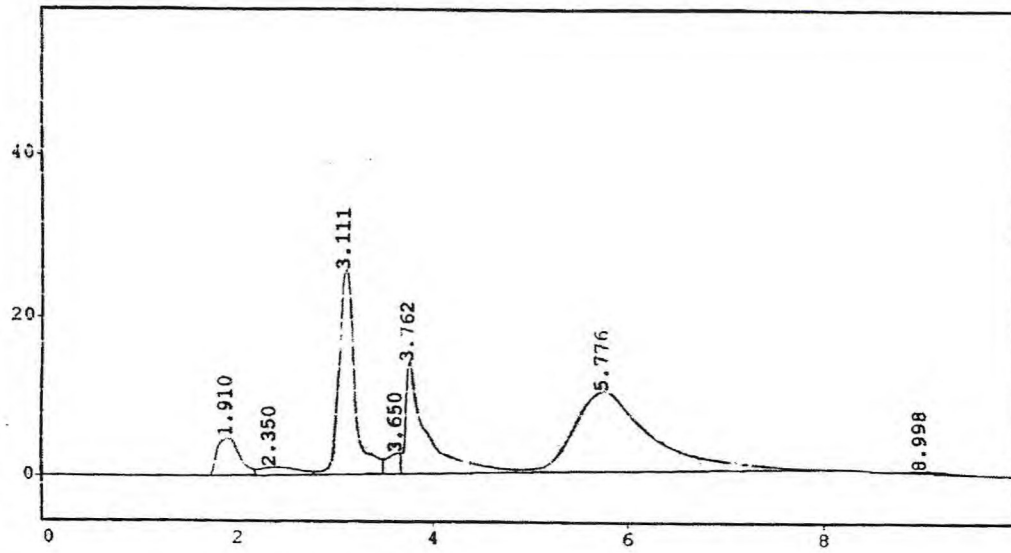


Fig. 78 Cromatograma V DNA + FV6

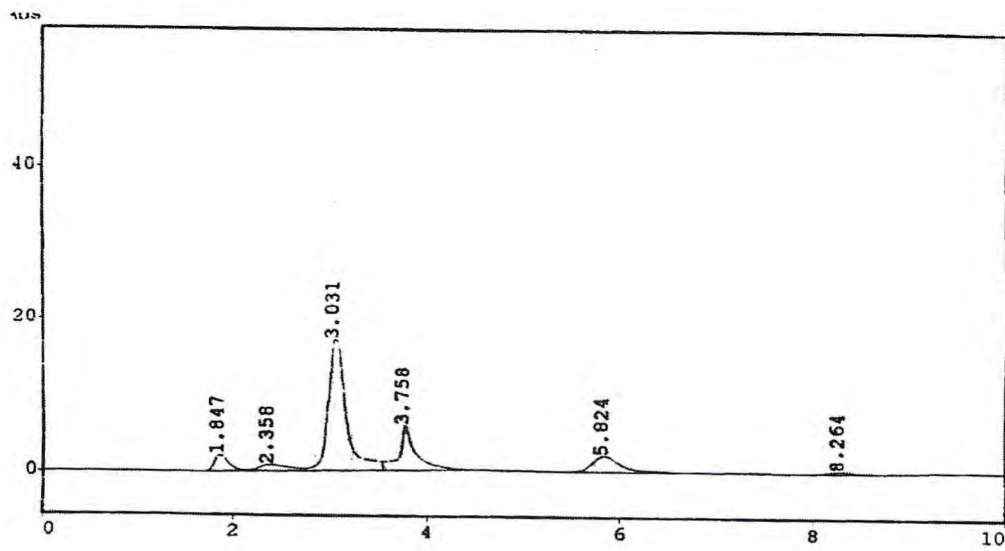


Fig. 79 Cromatograma VI DNA + FV7

7.2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os ensaios microbiológicos foram realizados segundo procedimentos padronizados descritos na literatura e foram realizados pelo professor Carlos Iberê Freitas da Escola Superior de Agronomia de Mosoró (RN).

Os microorganismos utilizados eram catalogados na ATCC, a metodologia empregada foi em meio sólido e o resultado consta na Tabela. 24, pág. 117. Os óleos foram codificados em OFVB óleo essencial de *V. agnus castus* L. (variedade de flores brancas); OFRVB óleo essencial dos frutos de *V. agnus castus* L. (variedade de flores brancas); OFLVL óleo essencial das folhas de *V. agnus castus* L. (variedade de flores lilás) e OFRVL óleo essencial dos frutos de *V. agnus castus* L. (variedade de flores lilás).

Pela análise dos resultados pode ser considerável a atividade antibacteriana dos óleos essenciais, principalmente quando o microorganismo foi *Bacillus subtilis* e com relação ao microorganismo *Pseudomonas aerogens*, porém este microorganismo é um tipo de bactéria muito resistente à maioria dos antibióticos.⁵⁶

Tabela 24. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos frutos e das folhas de *V. agnus castus* L. (flores brancas e flores lilás)

Microorganismo	Halo de inibição (mm)				Padrão gentamicina
	OFVB	OFVL	OFRVB	OFRVL	
<i>Bacillus subtilis</i>	29	29	24	29	48
<i>Staphilococcus aureus</i>	22	–	16	25	35
<i>Escherichia coli</i>	20	16	–	19	29
<i>Enterobacter aerogens</i>	–	–	9	10	40
<i>Klebisiella pneumoniae</i>	11	10	–	11	25
<i>Pseudomonas aerogens</i>	–	–	–	–	10

*halo de inibição da média de três experimentos. Os microorganismos cresceram no meio SDS 2% (solução de água deionizada + sulfato de dodecil de sódio).

*solvente usado para diluir os óleos essenciais (etanol).



Capítulo 08

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Material botânico: coleta e identificação

A espécie *V. agnus castus* L. foi coletada várias vezes, em Fortaleza, no Ceará, nos meses de abril de 1999, em novembro do mesmo ano e em fevereiro de 2001. As duas coletas feitas em 1999 foram da variedade de flores brancas e a coleta feita em 2001 foi da variedade de flores lilás.

A identificação de ambas foi realizada pelo professor Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Suas exsicatas encontram-se depositadas no herbário Prisco Bezerra, do mesmo Departamento sob os números respectivamente 28559 e 28557.

8.2. Métodos Cromatográficos

8.2.1. Cromatografia de Adsorção

As cromatografias por adsorção em colunas (CC) foram realizadas utilizando-se como fase fixa sílica gel 60S da Carlo Erba. Os parâmetros de comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem cromatografadas.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas gel de sílica 60 (\emptyset 2-25 μm) da Carlo Erba cód.45335 e cromatoplasas de gel de sílica 60 (\emptyset 2-25 μm) sobre alumínio da Merck (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm).

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram feitas pela pulverização com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol P.A., com posterior aquecimento em estufa a 100°C por um período de três minutos aproximadamente e reagente de Dragendorff.

Foram utilizados como eluentes nas colunas e das placas cromatográficas os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros e em suas combinações binárias em ordem crescente de polaridade.

A remoção dos solventes dos extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório BUCHI, sob pressão reduzida.

8.2.2. Cromatografia por Exclusão

Os fracionamentos realizados por cromatografia de exclusão ou permeação foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro, ou combinado com clorofórmio ou acetona como fase móvel.

Os bioensaios foram realizados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelho Shimadzu LC –10AD com detector UV-VISRID-10^A e uma coluna analítica C₁₈ com dimensões (250 x 4,60 mm d.i) da LABTRON.

A curva de calibração foi obtida usando-se o eluente MeOH:H₂O (1:1) com fluxo de 0,7 ML/min, comprimento de onda de $\lambda=225$ nm e soluções padrões nas concentrações de 20 – 120 ppm, à temperatura ambiente.

8.3. Métodos Físicos

8.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de RMN (¹H e ¹³C) uni e bidimensionais foram obtidos em espectômetros modelo Avance DPX –300 e DRX-500, do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, operando na frequência do hidrogênio a 300, 13 MHz e a 500,47 MHz e na frequência do carbono a 75 MHz e a 125 MHz e um campo magnético de 17.7440 Tesla.

Os solventes utilizados para dissolução das amostras na obtenção dos espectros foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD) e piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de RMN ^1H , pelos picos pertencentes às moléculas não deuteradas dos solventes deuterados utilizados. Clorofórmio δ 7,28; metanol δ 3,30 e piridina δ (8,71; 7,55 e 7,19). Nos espectros de RMN ^{13}C , os deslocamentos químicos (δ), foram referenciados pelos picos dos carbonos-13 dos solventes. Clorofórmio δ 77,0; metanol δ 49,0 e piridina δ (123,87; 135,91 e 150,35).

As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multiplete).

Por meio da técnica DEPT com ângulos de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , determinou-se o padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , de acordo com a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos espectros DEPT 135° dos espectros BB (Broad Band).

8.4. Ponto de Fusão (p.f)

Os pontos de fusão foram determinados em um equipamento Mettler com placa aquecedora, modelo FP-52 e unidade de controle FP5, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas à velocidade de aquecimento de 2°C por minuto.

8.5. Constituintes voláteis de *V. agnus castus* L.

O estudo dos constituintes voláteis de *V. agnus castus* L. foi realizado com os óleos essenciais obtidos dos frutos e folhas de duas variedades da planta, *V. agnus castus* de flores branca e *V. agnus castus* de flores lilás.

8.5.1. Obtenção dos óleos essenciais através de hidrodestilação

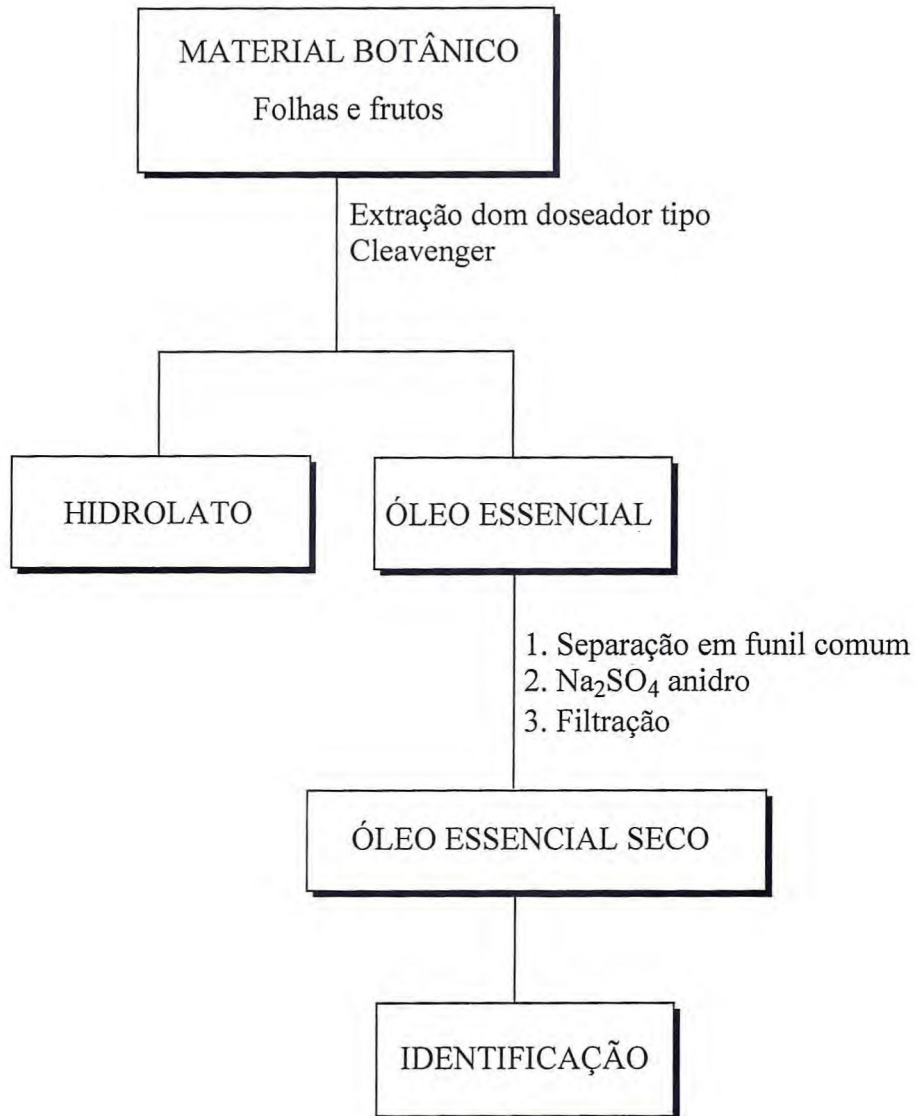
500 g de folhas de *V. agnus castus* L. (flores branca) foram acondicionados em um balão de 6 litros de capacidade juntamente com 3 litros de água e extraídos pelo processo de hidrodestilação. A mistura (água + óleo) foi coletada usando-se um aparelho tipo Cleavenger. Após extração exaustiva (3,5 h) a mistura (água / óleo) contida no doseador foi separada através de um funil de separação.

A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada, obtendo-se 1,5 % de óleo essencial.

Os óleos essenciais obtidos foram analisados através de cromatografia gás-líquido, acoplado a espectroscopia de massas.

Os óleos essenciais dos frutos frescos foram obtidos usando-se esta mesma técnica e uma quantidade de material vegetal (750g), obtendo-se 1,82% de óleo essencial.

Com a variedade de *V. agnus castus* L. (flores lilás), utilizou-se a mesma metodologia, as mesmas quantidades e as mesmas partes exploradas na variedade de flores branca e os óleos obtidos resultaram em 1,50% de rendimento nas folhas e 1,55% nos frutos.



Fluxograma 1. Método de extração do óleo essencial das folhas e dos frutos.

8.6. Obtenção e fracionamento do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L.

O material vegetal (1,2 Kg de folhas secas) de *V. agnus castus* L., após ser moído mecanicamente, foi submetido à extração exaustiva com metanol a frio, resultando em 45 g de extrato (VFM), após destilação do solvente à pressão reduzida.

VFM foi submetido à coluna filtrante usando como adsorvente sílica gel e eluentes os solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se as frações referentes ao uso de cada eluente (Tab. 25, pág. 124).

Tabela 25. Fracionamento do extrato metanólico das folhas

Eluente	Fração	Peso (g)
Hexano	VFM – H	4,0 g
Clorofórmio	VFM – C	15,8 g
Acetato de etila	VFM – A	6,0 g
Metanol	VFM - M	16,0 g

8.6.1. Tratamento cromatográfico de FVM – A

VFM – A, fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L., apresentou aspecto de um sólido escuro que através de análise em CCD revelou a presença de pelo menos três substâncias.

O tratamento cromatográfico de 5,0 g deste material utilizando 20 g de sílica gel em coluna e como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros e em suas combinações binárias em grau crescente de polaridade resultou na obtenção de 120 frações, dentre as quais foram reunidas as frações f (25 – 42), f(45 – 51) e f (94 – 105) e as demais foram desprezadas por não apresentarem quantidades de material suficiente nem

semelhança entre elas para que fossem reunidas ou armazenadas para estudo posterior. Estas frações totalizaram em 856 mg.

8.6.1.1. Isolamento de FV1

A fração f (45 – 51) (225 mg) mostrou-se quase pura, através de análise em CCD, sendo necessário apenas uma recristalização em etanol e algumas gotas de acetona para obtenção do composto em forma pura. O composto foi denominado FV1. FV1 apresentou-se como um sólido branco, solúvel em metanol com ponto de fusão na faixa 264 – 266°C. Após ser enviado para obtenção de espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional foi identificado como um triterpeno da série urs-12-eno.

As frações f (25 – 42) (642 mg) e f (94 – 105) (332 mg) foram analisadas através de CCD e mostraram-se constituídas de várias substâncias, e foram analisadas posteriormente à análise da fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L.

8.6.2. Tratamento cromatográfico de VFM – C

12 g de VFM – C foram adsorvidos em 20 g de sílica gel e submetidos à cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se 60 g de sílica e solventes orgânicos puros e suas combinações binárias de gradiente crescente de polaridade.

As frações foram coletadas em alíquotas de 10 ml cada (Tab. 26, pág. 126) e foram analisadas em cromatografia de camada delgada, sendo reunidas as frações semelhantes.

Tabela 26. Fracionamento de VFM-C

Eluentes	Frações
Hexano	F01 – F20
Hexano / Clorofórmio (1:1)	F21 – F38
Clorofórmio	F39 – F68
Clorofórmio / Metanol (9:1)	F69 – F88
Clorofórmio / Metanol (8:2)	F89 – F94
Clorofórmio / Metanol (7:3)	F95 – F110
Clorofórmio / Metanol (6:4)	F111 – F115
Clorofórmio / Metanol (1:1)	F116 – F125
Metanol	

As semelhanças reveladas através de CCD permitiram reunir as frações f(24 – 36), f(42 – 56), f(64 – 76) e f(81 – 92).

8.6.2. 1.Tratamento cromatográfico de f(24 – 36)

1,5 g de f(24-36) foram cromatografadas em coluna de sílica gel (40,0 g), utilizando-se como eluentes hexano, clorofórmio e metanol, puros e em suas combinações binárias com ordem crescente de polaridade, obtendo-se sessenta frações de 10,0 mL cada. As frações f(39–46), eluídas com clorofórmio mostraram-se semelhantes e foram reunidas e após a evaporação completa do solvente, obteve-se um sólido branco, solúvel em clorofórmio.

Uma análise feita deste sólido em cromatografia em camada delgada utilizando como revelador vanilina, indicou que o mesmo era constituído por apenas uma substância com rastro de impureza.

As demais frações obtidas neste processo cromatográfico não apresentaram evidências suficientes que justificassem seus estudos.

8.6.2.1.1. Purificação de f(39-46) e isolamento de FV2 (3) e (4)

A purificação de f(39-46) foi realizada através de recristalização utilizando como solvente metanol. Após este processo de purificação realizou-se uma análise em CCD e observou-se uma única mancha de cor rosa. Esta observação foi usada como parâmetro na indicação de pureza da amostra. Entretanto análise dos dados espectrais da mesma revelou que FV1 tratava-se de uma mistura de duas substâncias (3) e (4) de natureza triterpênica, que posteriormente foram identificadas como sendo os triterpenos α e β Amirina.

8.6.3. Tratamento cromatográfico de f (42 – 56)

A fração f (42 –56) proveniente do fracionamento da fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *V. agnus castus* L. foi a que apresentou maior quantidade de material (5,8 g). Após ser cromatografada em coluna de sílica gel (65,0 g), utilizando-se como eluente hexano, clorofórmio e metanol puros e em suas combinações binárias em crescimento de polaridade, foram obtidas duzentas frações de 10,0 mL cada, conforme tabela.27, abaixo.

Tabela 27. Fracionamento de F(42 – 56)

Eluentes	Frações
Hexano	1-20
Hexano / Clorofórmio (1:1)	21-38
Clorofórmio	39-78
Clorofórmio / Metanol (9:1)	79-120
Clorofórmio / Metanol (8:2)	121-134
Clorofórmio / Metanol (7:3)	135-142
Clorofórmio / Metanol (6:4)	143-155
Clorofórmio / Metanol (1:1)	156-189
Metanol	190-200

As frações foram analisadas em CCD, reveladas com solução ácida de vanilina e foram reunidas as que apresentaram semelhança: f'(9-15), f'(18-25), f'(27-36), f'(39-45), f'(46-58) e f'(64-82). As demais frações foram desprezadas por não apresentarem evidências que justificasse seus estudos.

8.6.4. Tratamento cromatográfico de f'(9-15) e isolamento de FV3 (5)

A fração f'(9-15), depois de evaporado todo o solvente, pesou 500 mg de um material amarelo contaminado com substância de aspecto esverdeado, provavelmente clorofila.

Análise através de CCD do material revelou que o mesmo continha apenas uma substância bem definida e um rastro verde de impureza. Devido ao fato do material ser de natureza sólida com tendência à formação de cristais optou-se pela purificação através de recristalização com metanol. Após este processo obteve-se um sólido amarelo na forma de cristal, solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão na faixa de 204-206°C, que foi denominado **FV3 (5)**.

8.6.5. Tratamento cromatográfico de f' 18-25 e isolamento de FV4 (6)

O material proveniente da reunião de f'(18 – 25), após evaporação completa do solvente rendeu 325 mg.

Análise através de CCD do material revelou a presença de pelo menos três substâncias e forte rastro de impureza.

O tratamento cromatográfico deste material utilizando 30 g de sílica gel em coluna e como eluentes hexano, clorofórmio e metanol puros e em combinações binárias em gradientes crescentes de polaridade, obteve-se um sólido amarelo nas frações 28-37, eluídas com clorofórmio / metanol 1:1. A análise deste sólido em CCD revelou uma mancha amarela bem forte com rastro de impurezas. Através de recristalização com

metanol e algumas gotas de clorofórmio, foram obtidos 15 mg de uma substância de aspecto sólido cristalino, amarelo, solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão na faixa de 189 – 192°C, que foi denominada **FV4 (6)**.

8.6.6. Isolamento de FV5 (7) e (8)

Nas frações 10-15 proveniente do tratamento cromatográfico de f^r(18-25), após serem reunidas, foi observada a presença de um sólido branco cristalino envolvido por uma substância de natureza oleaginosa. A lavagem do sólido com hexano possibilitou a purificação do mesmo que após seco, pesou 22 mg. Análise através de CCD mostrou apenas uma mancha e serviu como parâmetro para atribuir a presença de apenas uma substância em FV5. Todavia o resultado da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C e DEPT 135°, mostrou que FV4 estava constituída de uma mistura de duas substâncias (7) e (8).

8.6.8. Tratamento cromatográfico de f^r(27-36)- isolamento de FV6 (9)

O material proveniente da junção de f^r(27-36), após evaporação completa do solvente, forneceu 120 mg de um sólido amarelo esverdeado envolvido por um material de natureza resinosa. A lavagem com hexano, acetona e clorofórmio não proporcionou a purificação do material e a recristalização com metanol ou etanol não foi possível devido a solubilidade de f^r(27-36) em ambos os solventes.

A purificação de f^r(27-36) foi realizada através de cromatoplaça, utilizando como eluentes clorofórmio / metanol 8:2. O material eluído na cromatoplaça foi separado, dissolvido em metanol, filtrado em funil comum, o solvente evaporado em rotaevaporador à pressão reduzida e forneceu 10 mg de um sólido amarelo esverdeado, de ponto de fusão na faixa de 270-274°C, solúvel em metanol, que foi denominado **FV6 (9)**.

8.6.9. Tratamento cromatográfico de f^o(39-45) e isolamento de FV7 (10)

A fração f^o(39-45), reunida, evaporado o solvente, pesou 85 mg. A análise em CCD indicou como processo mais adequado de purificação a cromatografia em coluna de sílica gel. Neste procedimento foram usados 20 g de sílica gel e clorofórmio e metanol como eluentes. Foram obtidas vinte e cinco frações de 10,0 mL cada. Nas frações 10-16, após evaporação do solvente observou-se a presença de cristais amarelo com um certo grau de impureza. Procedeu-se então um processo de recristalização que veio a fornecer 12 mg de um sólido amarelo de aspecto cristalino, solúvel em acetona, de ponto de fusão na faixa de 240-242°C, que foi denominado **FV7 (10)**.

Tratamento cromatográfico de f (94 – 105) e isolamento de FV8 (11)

A fração f (94 – 105) mostrou-se como um sólido branco insolúvel em metanol, clorofórmio e acetato de etila. A purificação desta fração foi realizada através de coluna cromatográfica, utilizando sílica gel e como eluentes acetato de etila e hexano, puros e em suas combinações binárias em ordem crescente de polaridade.

Deste tratamento cromatográfico foram obtidas trinta frações de 10,0 mL cada. As frações f (20 – 25), eluídas com acetato de etila 100%, proporcionou o isolamento de um sólido branco de pouca solubilidade em metanol e solúvel totalmente em piridina, de ponto de fusão na faixa de 290 – 293 °C e foi identificado como sendo o glicosídeo do β - sitosterol.

Tratamento cromatográfico da fração f (25 – 42) e isolamento de FV9 (12)

A fração f (25 – 42) mostrou-se bastante impura, porém análise através de CCD revelou a presença de uma substância majoritárias às demais e este fato motivou a purificação da referida fração.

Após sucessivos tratamentos cromatográficos, foi obtido um sólido impuro, branco, insolúvel em clorofórmio, solúvel em metanol e acetona, que foi denominado FV9. A purificação de FV9 foi realizada através de recristalização utilizando etanol e clorofórmio 1:1. FV9, um sólido branco, solúvel em metanol, acetona e em DMSO, de ponto de fusão na faixa de 272-274°C e que posteriormente foi identificado como sendo um triterpeno da série urs-12-eno.

8.6.10. Obtenção dos constituintes fixos do caule

O material vegetal (1,00 Kg) após seco e moído mecanicamente foi submetido à extração com metanol a frio por sete dias. Após filtrado e evaporado o solvente em rotaevaporador à pressão reduzida forneceu 65 g de extrato que foi denominado CVM.

50g de CVM foram cromatografados em coluna filtrante utilizando como adsorvente sílica gel e eluentes os solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se frações referentes ao uso de cada um destes solventes, conforme tabela 28, abaixo.

Tabela 28. Fracionamento do extrato metanólico do caule

Eluente	Fração	Peso (g)
Hexano	CVM – H	4,5
Clorofórmio	CVM – C	17,0
Acetato de etila	CVM – A	10,0
metanol	CVM - M	12,5

8.6.11. Tratamento cromatográfico de CVM - C

A fração CVM – C (10,0 g) foi adsorvida em 80 g de sílica gel utilizando como eluentes os solventes hexano, clorofórmio e metanol, puros ou reunidos em misturas binárias em gradientes crescentes de polaridade. Foram obtidas cento e noventa frações, de 10, 0 mL cada. As frações foram analisadas através de CCD e reunidas as semelhantes: f (15-35), f (38-49), f (52-88), f (95-120), f (125-140), f (143-166) e f (170-190).

8.6.12. Tratamento cromatográfico de f (15-35) e isolamento de CV1 (1)

A fração f 15-35 (500 mg), eluída com hexano / clorofórmio 1:1, foi adsorvida em coluna de sílica gel, utilizando 40g de sílica e como eluentes os solventes hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em combinações binárias em gradientes crescentes de polaridade. Foram obtidas oitenta frações de 10, 0 ml cada . As frações foram analisadas através de CCD e reunidas as semelhantes.

As frações 10-25, eluídas com clorofórmio foram reunidas e após evaporação completa do solvente, obteve-se 35 mg de um sólido impuro. Sucessivos tratamentos cromatográficos em colunas e cromatoplasas permitiram o isolamento de um sólido branco solúvel em metanol que foi denominado CV1 (1).

8.6.13. Tratamento cromatográfico de CVM – A e isolamento de CV2 (13)

CVM – A apresentou-se como um material de natureza resinosa e de coloração bastante escura, entretanto análise em CCD mostrou que o mesmo continha quatro substâncias de rfs bem próximos, e revelados com vanilina, as quatro substâncias apresentaram a mesma coloração (preto).

O tratamento cromatográfico de CVM – A (5 g) de material utilizando 50 g de sílica gel em coluna e clorofórmio e metanol como eluentes, puros e em combinações

binárias de gradientes crescentes em polaridade. Foram obtidas cento e vinte frações de 10,0 ml cada.

Nas frações 50-95, eluídas com clorofórmio / metanol 7:3, observou-se a presença de apenas uma substância, através de análise em CCD. Reunidas as frações, obteve-se 25 mg de uma substância que foi denominada **CV2 (13)**.

Analisando os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C de **CV2 (13)** percebeu-se um alto teor de impurezas, sendo necessários procedimentos cromatográficos para purificação da referida substância.

Após ser recromatografada em várias colunas de sílica gel, utilizando sempre clorofórmio e metanol, obteve-se **CV2 (13)** com grau de pureza suficiente para ser determinada e identificada estruturalmente.

8.7. Atividade citotóxica dos flavonóides isolados de *V. agnus castus* L.

Os flavonóides isolados de *V. agnus castus* L., foram submetidos à avaliação citotóxica através do modelo baseado na interação de uma substância, a qual se investiga a atividade citotóxica, com a molécula do DNA da célula.

8.7.1. Metodologia

0,1 mg de DNA da célula de porco foram dissolvida em 1,00 mL de água em sistema CLAE, coluna Phenomenex C_{18} 250 mm, acoplado ao detector de ultra-violeta e usando como solvente metanol e água (3:7) para se determinar o tempo de retenção do pico do DNA. O fluxo usado foi de 0,8mm / momento.

O padrão, brometo de etidinium e as amostras 1,0 mg, cada, foram dissolvidas em 1,00 mL de metanol. Injetou-se inicialmente 10 μL de cada amostra e do padrão e posteriormente 20 μL da mistura (amostra + DNA), sendo 10 μL de cada parte,

previamente incubados por cerca de 30 minutos. Foram obtidos três cromatogramas de cada mistura e o resultado que consta na parte de atividade biológica deste trabalho, foi exposto somente usando um cromatograma para cada mistura, porém os três experimentos realizados para cada amostra apresentaram os três cromatogramas semelhantes.



Capítulo 09

9. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *Vitex agnus castus* L. levou ao isolamento de treze constituintes, sendo quatro flavonóides: 5,4'-diidroxiflavona (5), 3',4',5,7-tetraidroxiflavona (9), 5,7-diidroxiflavona (6) e 3,3',4',5,7-pentaidroxiflavona (10), quatro triterpenos: Ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxours-12-em-28-óico (2) e Ácido 3 β -hidroxours-12-en-28-óico (12), α -amirina (3) e β -amirina (4) três fitoesteróides: estigmasterol (8), β -sitosterol (7), e glicosídeo do β -sitosterol (11), um sesquiterpeno, 3-Formil-4,5-dimetil-8-oxo-5H-6,7-diidronafto(2,3b)furano (1) e um iridóide glicosilado, Agnosídeo (13).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, as substâncias (3), (4), (6),(7), (8),(2),(3),(11), (12) e (1) são relatadas pela primeira vez na espécie, destacando-se neste trabalho a presença inédita de triterpenos no gênero *Vitex*.

A substância (1), um sesquiterpeno, tem seu relato na literatura pela segunda vez e o iridóide glicosilado, agnosídeo, (13), é de acordo em citações da literatura³⁹, um constituinte presente em altos teores nas frações mais polares do lenho e provavelmente um dos princípios ativos da planta.

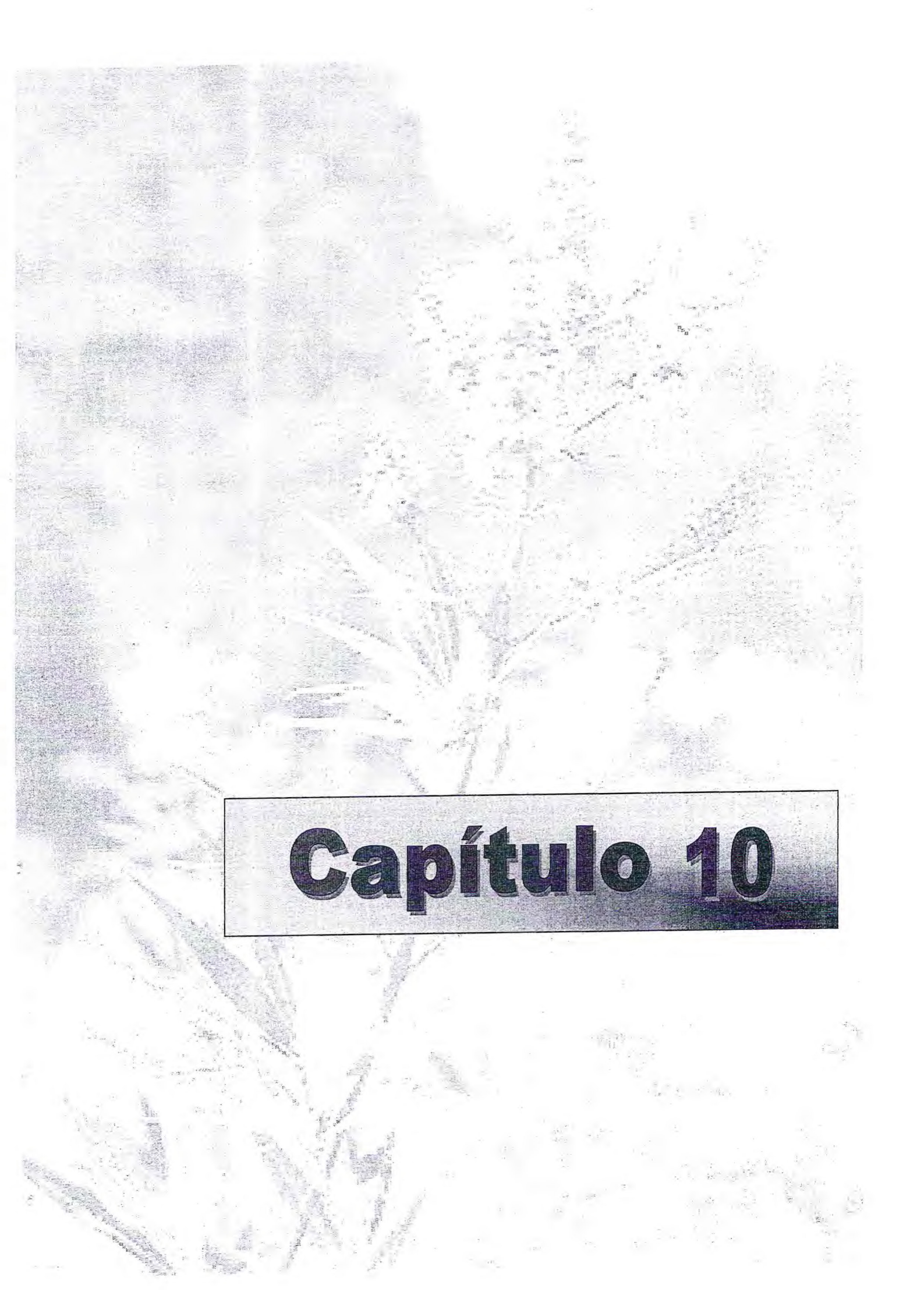
O estudo realizado com os óleos essenciais das folhas e frutos das duas variedades (flores brancas e flores lilás) mostrou semelhança entre os constituintes identificados e os constituintes relatados na literatura consultada⁶⁰, principalmente no que diz respeito aos constituintes majoritários.

Os ensaios biológicos realizados visando avaliar a atividade citotóxica dos flavonóides isolados de *V. agnus castus* L., foram baseados na inativação do DNA por interação deste com as moléculas dos flavonóides. O resultado mostrou-se promissor com atividade semelhante ao da substância usada como padrão positivo, brometo de etidium, que interage 100% como a molécula do DNA, inativando totalmente o mesmo. Entretanto este resultado por si só não é

suficiente para atribuir às substâncias testadas uma atividade citotóxica, cabendo um estudo futuro mais aprofundado para chegar-se a uma conclusão mais precisa.

Os óleos essenciais também foram testados quanto a atividade antibacteriana e os resultados mostraram-se também bastante promissores.

A espécie *V. agnus castus* L., não é uma planta nativa do Brasil, porém perfeitamente adaptada às condições climáticas brasileiras. Trata-se de uma planta já usada como fitoterápico, e que apesar de muito estudada na sua região de origem, não consta nenhum estudo fitoquímico aprofundado no Brasil, fatos estes que motivaram a escolha da planta para a realização deste trabalho.



Capítulo 10

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Augusto César C. M. Maia, Fábio César de Carvalho, Hilson Bezzera Martins Júnior, Éster Roseli Baptista. *Vitex agnus castus* L. Um estudo Etnobotânico e Etnofarmacológico. *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*, vol 1, Nº 2, julho (2001) 1-15.
2. Paula Gardiner. Chasteberry (*Vitex agnus castus*). (22) 1, disponível em http://www.mcp.cdu/herbal/dc_rault.htm. Acesso em 20 de março de 2003.
3. Jianghua Liu, Joana E. Burdette, Hayan Xu, Chungang Gu, B. van Breemen, Krishna D. L. Bhat, nancy Booth, Andréas I. Constantinou, John M. pezzuto, harry H. S. Fong, Norman R. Farnsworth and Judy L. Bolton. Evolution of Estrogenic Activity of Extracts for the Potentail Treatment of Menopause Symptoms. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2472-22479.
4. C. K. Sehgal L, S. C. Taneja, K. L. Dhar and C. K. Atal. 2'-p-Hydroxybenzoil mussuenosidic acid, a new iridoid glucoside from *Vitex negundo*, *Phytochemistry*. 21 (1982) 363-366.
5. Tetsuo Iwagawa, Akemi Nakahara and Munechiro Nakatani. Iridoids from *Vitex canabifolia*. *Phytochemistry*. 32 (1993) 453-454
6. Chieko Hirobe, Zhi-Sheng Qiao, Kiochi Takeya and Hideji Itokawa. Cytotoxic Flavonoids from *Vitex agnus castus*. *Phytochemistry*. 43 (1997) 521 -524.
7. Eva Hoberg, Jimmy Orjala, Beat Maier, Otto Sticher. Diterpenoids from the fruits of *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*. 52 (1999) 1555-1558.
8. Sheng-Hong Li, Hong-Jie Zhang, Sheng_Xiang Qiu, Xue-Mei Niu, Bernard D. Santarsiero, Andrew D. Mesecar, Horry H. S. Fong, Norman R. Farnsworth and Hang-Dong Sun. Vitexlactama A, a novel labdane diterpene lactam from the fruits of

- Vitex agnus-castus*. *Tetrahedron Letters*. 43 (2002) 5131-5134.
9. Andreas Giamakis, Ourania Kretsi, Ionna Chinou, caroline G. Spyropoulos. Eucalyptus camaldulensis: Volatilies from immature flowers and high production of 1,8-cineole and β -pineno by *in vitro* cultures. *Phytochemistry* 58 (2001) 351-355.
 10. Coeugniet, E., E. Elek and R. Kuhnast. Premenstrual Syndrome (PMS) and its treatment. *Arztezeitschr. Fur Naturheilverf* 27 (1986) 619-622.
 11. Bohnert, K. J. and G. Hahm. Phytoterapy in Gynecology and Obstetrices – *Vitex agnus castus* (chastetree). *Acta Medica Emperica* 9 (1990) 494-502.
 12. Dossiê Menopause. [www.redsaude](http://www.redsaude.org.br) – org.br.
 13. Harris, R. B.; Laws, A. Reddy, F. M.; King, A.; Haskell, W. L.; Are woman using postmenopause estrogens? A community survey. *Am. J. Public Healt* 80 (1990) 1266-1268.
 14. Golditz, G. A.; Hankinson, S. G.; Hunter, D. J.; Willett, W. C.; Manson, J. E.; Stampher, M. J.; Hennekens, C.; Rosner, B.; Speizer, F. E. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal woman. *New Engl. J. Med.* 332 (1995) 1589-1593.
 15. Kurzer, M.; Xu. Dietary Phytoestrogens. *Annu. Ver. Nutr.* 17 (1997) 353-381.
 16. Stolze, H. The other way to treat symptoms of menopause. *Gyne* (1982) 1-14.
 17. Kumage, A.; Nishino, K.; Shimonura, A. Effect of glycyrrhizin on estrogen action. *Endocrinol. Jpn* 14 (1967) 34-38.
 18. Sakamoto, K.; Murabe, K.; Watanabe, M. Inhibitory effect of glycyrrhetinec acid on testosterone production. *Jnp. J. Pharmacol* 39 (1985). Abstra. Ozel 1600.
 19. M. M. Hernández, C. Heraso, M. L. Villarreal, I. Vargas – Arispuro, E. Aranda

- Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *J. Ethnopharmacology* 67 (1999) 37-44.
20. Hebbalkar, D. S.; Hebbalkar, G. D. Sharma, R. N., Joshi, V. S., Bhat, V. S., Bhat, V. S. Mosquito repellent activity of oils from *Vitex negundo* Linn. Leaves. *Indian J. Med. Res.* 95 (1992) 200-203.
 21. Baijpai, A., Ojaha, J. K., Sant, H. R., Medicobotany of the varanise District Uttar Prdesh. Índia. *Int. J. Pharmacognosy* 33 (1995) 172-176.
 22. Vedantham, T. N. C., Subramanian, S. S., Non – Flavonoid components of *Vitex trifolia*. *Indian J. Pharmacol* 38 (1970) 13.
 23. Nair, A. G. R., Ramesh, P., Subramanian, S., Two unusual flavones (arthemetin and 7-Desmethyl arthemetin from the leaves of *Vitex trifolia*. *Curr. Sci.* 44 (1975) 214-216.
 24. TEreza C. dos Santos, Franco DEllemonache, Suzana G. Leitão. Ecdysteroids from two Brazilian *Vitex* species. *Fitoterapia* 72 (2001) 215-220.
 25. Correa, M. P. Dicionário das plantas do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, Brasil, 1926. IV. 208.
 26. Isao Kouno, Nasaaki Inque, Yoshiko Onizuka, Tamayo Fujisaki and Nobusuke Kawano. Iridoid and phenolic glucoside from *Vitex rotundifolia*. *Phytochemistry* 27 (1988) 611-612.
 27. Kazuyoshu Kawazoe, Aki Yutani, Yoshihisa Takaishi. Aryl Naftalenes norlignans from *Vitex rotundifolia*. *Phytochemistry* 52 (1999) 1657-1659.
 28. Kazuyoshi Kawazoe, Aki Yutani, Kimiko Tamemoto, Shuko Yuasa, Hirofume Shibata, Tomihiko Higute and Yoshihisa Takaish. Phenyl-naphthalene Compounds from *Vitex rotundifolia* and their Antibacterial Activity Against Methicillin. Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 588-591.

29. Masateru Ono, Takato Yanaka, Megumi Yakamoto, Yasuyuki Ito, and Toshihoro Nohara. New Diterpene and Norditerpene from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 537-541.
30. Masateru Ono, Takato Yanaka, Megumi Yakamoto, Yasuyuki Ito, Ehikako Masuoka and Toshihoro Nohara. Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *J. Nat. prod.* 62 (1999).
31. W. G. Ko, T. H. Kang, S. J. Lee, N. Y. Kim, Y. C. Kim, D. H. John and B. H. Lee. Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food and Chem. Toxicology* 38 (2000) 816-865.
32. A. Suksararn, N. Dromrangsa, A. Jintasirikul. Oxygenated ecdysteroids from *Vitex canescens* root bark. *Phytochemistry* 53 (2000) 921-924.
33. Apichart Suksarrarn, Nart Promrangsan, Bordin Chitkul, Suree Porn Homvisasevongsa and Achara Sirekate. Ecdysteroids of the root bark of *Vitex canescens*. *Phytochemistry* (1997) 1149-1152.
34. Trinh Thi Thay, Andrea Forzel, Helmut Ripperger, Tran Van Sung and Günter Adam. Chalcones and ecdysteroids from *Vitex leptobarys*. *Phytochemistry* 49 (1998) 2603-2605.
35. Apichart Suksamrarn and Chatriwat Sommechai. Ecdysteroids from *Vitex piñata*. *Phytochemistry* 32 (1993) 303-306.
36. Tetsuo Iwagawa, Akemi Nakahara and Munchire Nakatani. Iridoids from *Vitex cannabifolia*. *Phytochemistry* 32 (1992) 453-454.
37. A. S. Chawla, A. K. Sharma, S. S. Handa and K. L. Dhar. A lignon from *Vitex negundo* seeda. *Phytochemistry* 31 (1992) 4378-4379.

38. Surendra P. Vishnoe, Aboo Shoer, Randhor S. Kapil and Satya P. Popli. A furanoeremophilane from *Vitex negundo*. *Phytochemistry* 22 (1983) 597-598.
39. C. K. Sehgal, S. C. taneja, K. L. Dhar and C. K. Atol. 6'-p-Hydroxybenzoil mussaenosidic Acid, A new iridoid glucoside from *Vitex negundo*. *Phytochemistry* 21 (1982) 363-366.
40. C. K. Sehgal, S. C. taneja, K. L. Dhar and C. K. Atol. 2'-p-Hydroxybenzoil mussaenosidic Acid, A new iridoid glucoside from *Vitex negundo*. *Phytochemistry* 22 (1983) 1036-1038.
41. Apichart Sukamrarn, Saowenee Kumpun and Boom-ek Yingyongharoungkul. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1690-1692.
42. Masateru Ono, Hiromi Sawamura, Yasuyuki Ito, Koichi Mizuki, Toshihero Nohara. Diterpenoids from the fruits of *Vitex trifolia*. *Phytochemistry* 55 (2000) 873-877.
43. Chamy, M. C., Piovano, M., Garbarino, J. A. Miranda, C. Gambaro, V. Rodriguez, M. L. et al. Diterpenoids from *Vitex trifolia*. *Phytochemistry* 30 (1991) 589-592.
44. Suzana G. leitão and Franco Delle Manache. 2''o-Cafeoilorientina from *Vitex polygama*. *Phytochemistry* 49 (1998) 2167-2169.
45. MInli Zhang, Michael J. Stout and Isao kubo. Isolation of Ecdysteroids from *vitex strickere* using RLCC and Recycling HPLC. *Phytochemistry* 31 (1992) 247-250.
46. McLafferty Fred W. Interpretation de los espectros de massas. Ed. Reverte, S-a. 1969.
47. Silverstein M. Roberto e Francis X. Webster. Identificação Espectométrica de Compostos Orgânicos. 6ª ed. Livros Técnicos e Científicos eDitora S. A. 1998.
48. Shashi B. Mahato and Asish P. Kundu. ¹³ C NMR Spectro of Pentacyclic Triterpenoids-A compilation and Somessalient Frutures. *Phytochemistry* 37 (1994)

- 1517-1575.
49. Breitmaier Eberhard. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry. A Practical Guide. Other Wiley Editorial Offices 1993.
 50. Viqar Uddin Ahmad. Atta-ur-Rahman. *Handbook of Natural Product. Data* vol 2. Pentacyclic Triterpenoids. 849.
 51. Carla C. Mendes, Frederico G. Cruz e Jorge M. David. Triterpenos Esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Rsonima microphyla*. *Química Nova* 2 (1999) 185-188.
 52. Harbone J. B. and Mabry Helga. *The flavonóids* part 2 Academic pres. Inc. New York, 1975.
 53. Metazole, J. Contribuição ao Conhecimento Químico de e Plantas do Nordeste do Brasil – *Trigoniasciculata Grised* e *psidium* spp. Fortaleza, 1996. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará.
 54. Márcia Cristina Campos de Oliveira, Mario Geraldo de Carvalho, Dalva T. Ferreira e Raimundo Braz Filho. Flavonóides das flores de *Stifita chrysantha* Mikan. *Química Nova* 22 (1999)182-182.
 55. Kuster, R. M.; Bernardo, R. R.; Da Silva, A. J. R.; Parente, J. D.; and Nors, W. B.; Furocoumarens from rhizomas of *Dorstenia brasiliense*. *Phytochemistry* 23 (1994) 221-223.
 56. Sorensen, J. M.; Katsiotis, S. T. Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan *Vitex agnus castus* fruits. *Planta Medica* 66 (2000) 245-250.

57. J. H. Zwaving and R. Bos. Composition of the essential oil of *Vitex agnus castus*. *Planta Medica* 62 (1996) 83-84.
58. Zelijam Males, Nikola Blazevic and Ankica Antolic. The essential oil composition of *Vitex agnus castus* f. rosea and leaves and flowers. *Planta Medica* 64 (1998) 286-287.
59. Adams, R. P. Identification of Essential oils components by chromatography/Mass Spectroscopy San Diego. Cademic Pres Inc. (1989), San Diego.
60. M. J. Deena, J. E. Thoppil. Antimicrobial activity of the essential oil of *lantana camara*. *Fitoterapia* 71 (2000) 453-455.
61. A. Mantas, E. deretey, F. H. Ferreti, M. R. Estrada, I. G. Csizmadia. Structural analysis of flavonoids with anti HIV- activity. *J. Molecular Structure (Theochem)* 504 (2000) 171-179.
62. John M. Pezzuto, Chun-Tao Che, david . McPherson, Ji-Ping Zhu, Gulacti Topeu, Clemens A. J. Erdelmeier and Geoffrey A. cordel. DNA as na affinity probe useful I the detection and isolation of biologicalall active natural products. *J. nat. Prod.* 54 (1991) 1522-1530.
63. Lisa Dalla Via, Ornella Gia, Sebastiano Marciani Magno, Antonio da Settimo, Giampaolo Primofiore, Frederico da Settimo, Francesca Simorini and Ana Maria Morini. Dialkylaminoalkylindolonaphthyridines as potential antitumor agentes: Synthesis, cytotoxicity and DNA binding properties. *E. J. Medicinal Chemistry*. www.elsevier.co/locate/ejmech. Article in press.
64. M. Zeki Haznedarogh, N. Ulku Karabay, Ulvi Zeybek. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia* 72 (2001) 829-831.
65. Hiroshi Sugiyama, Guy, M. Ehrenfeld, Joshua B. Shipley. DNA Strand acission by bleomicyn group antibiotics. *J. Nat. Prod.* 48 (1985) 869-877.

66. M. H. Sohrab, M. A. Mazid, E. Rahman, C. m. Hasan, M. A. Rashid. Antibacterial activity of *Clausema heptaphylla*. *Fitoterapia* 72 (2001) 547-549.