



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

Estudo Fitoquímico de Plantas do Nordeste: *Annona squamosa*.
Obtenção de Derivados Reacionais do Ácido Caurenóico

RUDY CRISAFULLI

Fortaleza-CE

2007

Trabalho realizado sob orientação do professor Dr. Francisco José Queiroz Monte do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

A minha mãe, Francisca Eldeniza Moreira da Silva, mulher guerreira e talentosa, mãe dedicada e cuidadosa que nunca poupou esforços para que seus filhos tivessem uma boa educação.

AGRADECIMENTOS

A Grande Força que rege o universo, pela oportunidade de mais uma conquista e de poder compartilhá-la com pessoas que amo.

Ao professor Dr. Francisco José Queiroz Monte, pela orientação, pelo apoio e principalmente, pela amizade.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, pelo conhecimento transmitido e pela paciência dispensada.

Aos funcionários do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais, Pedro, Lana e Mundinha, pelo serviço prestado, pelos momentos de descontração e pela amizade.

A todos os amigos do curso de Química (Alexandre Praxedes, Aluísio, Andrews, Ayla, Bartô, Biel, Bebel, Ceixa, Cláudio, Deda, Daniel San, Erikixa, Farmacinha, Jacqueline, Lobinha, Milena, Moisés, Neto, Rivelino, Samy, Wagner e minha querida Edilane) que tornaram estes anos de curso momentos inesquecíveis e que com certeza, guardarei sempre como alguns dos momentos mais felizes de minha vida. Em especial aos amigos Artur, Jackson, Jefferson, João Carlos, João Henrique e Max que em vários momentos abdicaram de seu tempo para ajudar, de maneira direta ou indireta, na construção deste trabalho.

Ao meu pai, em memória, pelos valores transmitidos, pelo apoio, pelo incentivo, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, pela amizade única e pelos ensinamentos valiosos que só um pai, transmitiria a um filho.

A minha querida avó Maria, pelos cuidados, carinho, amor, dedicação de mãe e pela convivência maravilhosa que tivemos durante os anos em que vivemos juntos.

Aos meus irmãos Rodolfo e Mônica, pela superação nos momentos difíceis que vivemos juntos e por sabermos valorizar os momentos felizes.

As minhas tias Edilza, Nini e Branca e ao meu tio Arruda, pelos cuidados, carinho, dedicação, incentivo e pelo aconchego de casa.

Ao meu padrasto Ricardo, pelo carinho de pai, pela dedicação, apoio, incentivo e pelos bons conselhos.

Aos meus primos Aléxis e César Augusto, pelo companheirismo, pelos conselhos e pela inesquecível descontração.

Aos queridos amigos Hipólito e Linda, pelos conselhos, companheirismo, incentivo, força e, é claro, pela amizade.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	02
---------------------	----

CAPÍTULO 2

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	06
2.1. Considerações botânicas sobre a família <i>Annonaceae Juss</i>	06
2.2. Considerações botânicas sobre a espécie <i>A. squamosa</i>	06

CAPÍTULO 3

3. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. Diterpenos.....	10
3.2. Diterpenos cauranos	13
3.3. Diterpenos obtidos no gênero <i>Annona</i> registrados na literatura	14

CAPÍTULO 4

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL.....	36
4.1. Determinação da Composição de Ácidos Graxos no Óleo Fixo de EHLC.....	36
4.2. Determinação Estrutural de RC-1	40
4.3. Determinação Estrutural de RC-2.....	50

CAPÍTULO 5

5. OBTENÇÃO DE DERIVADOS	65
5.1. Hidrogenação catalítica do ácido caurenóico	65
5.2. Ozonólise do ácido caurenóico	73

5.3. Adição de metanol ao ácido caurenóico.....	80
5.4. Oxidação alílica do ácido caurenóico	89

CAPÍTULO 6

6. PARTE EXPERIMENTAL.....	100
6.1. Material vegetal (<i>Annona squamosa</i>).....	100
6.2. Métodos de análise.....	100
6.2.1. Métodos cromatográficos	100
6.2.2. Métodos Físicos de Análises.....	101
6.2.2.1. Espectroscopia de absorção na Região do Infravermelho (IV).....	101
6.2.2.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	101
6.2.2.3. Espectrometria de massa (EM).....	102
6.2.2.4. Ponto de fusão (pf).....	102
6.3. Estudo dos constituintes fixos de <i>Annona squamosa</i>	102
6.3.1. Preparação dos extratos do lenho do caule de <i>Annona squamosa</i>	102
6.3.2. Tratamento cromatográfico de EELC.....	103
6.3.3. Tratamento cromatográfico de EELC-H e isolamento de RC-1	104
6.3.4. Preparação do extrato hexânico da casca do caule de <i>Annona squamosa</i>	105
6.3.5. Tratamento cromatográfico de EHCC e isolamento de RC-1	105
6.3.6. Tratamento cromatográfico de EHCC-A.....	107
6.3.7. Tratamento cromatográfico de EECC-A- δ	108
6.3.8. Tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ	109
6.3.9. Tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ - π e isolamento de RC-2.....	110
6.4. Obtenção de derivados do ácido caurenóico	111
6.4.1. Hidrogenação catalítica	111
6.4.2. Ozonólise	111
6.4.3. Adição de metanol ao ácido caurenóico	112
6.4.4. Oxidação alílica.....	112
6.5. Estudo do óleo fixo de EHLC.....	112
6.5.1. Saponificação e obtenção dos ácidos graxos	112
6.5.2. Obtenção dos ésteres metílicos de EHCL.....	113

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSÕES	118
---------------------	-----

CAPÍTULO 8

8. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS	118
8.1. Constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas	118
8.1.1. RC-1.....	118
8.1.2. RC-2.....	119
8.2. Constantes físicas e dados espectrométricos dos derivados de RC-1	120
8.2.1. ACH.....	120
8.2.2. ACOZON.....	121
8.2.3. ACMET	122
8.2.4. ACOX.....	123

CAPÍTULO 9

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
-------------------------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estruturas do Ácido Caurenóico e do Ácido 16 β , 17-diidroxi- <i>ent</i> -cauran-19-óico	xvii
Figura 02 – Estruturas dos Ácidos Graxos Identificados	xvii
Figura 03 – Compostos isolados de <i>Annona squamosa</i>	04
Figura 04 – Foto de um espécime de <i>Annona squamosa</i>	08
Figura 05 – Foto da flor de <i>Annona squamosa</i>	08
Figura 06 – Foto das folhas, frutos e sementes de <i>Annona squamosa</i>	08
Figura 07 – Diterpenos acíclicos.....	10
Figura 08 – Ciclização do pirofosfato de geranylgeranila (GGPP) com o grupo pirofosfato (-OPP) atuando como grupo abandonador.....	11
Figura 09 – Ciclização do pirofosfato de geranylgeranila (GGPP) sob catálise ácida, levando aos diterpenos das séries NORMAL e ENANTIO (<i>ent</i> -).....	12
Figura 10 – Esqueleto básico de um diterpeno <i>ent</i> -caurano.....	13
Figura 11 – Cromatograma de OEHL.....	37
Figura 12 – Espectro de massa do éster metílico do ácido tetradecanóico.....	37
Figura 13 – Espectro de massa do éster metílico do ácido pentadecanóico	37
Figura 14 – Espectro de massa do éster metílico do ácido hexadecanóico	38
Figura 15 – Espectro de massa do éster metílico do ácido heptadecanóico	38
Figura 16 – Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico	38
Figura 17 – Espectro de massa do éster metílico do ácido 9-octadecenóico.....	39
Figura 18 – Espectro de massa do éster metílico do ácido octadecanóico	39
Figura 19 – Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,11-octadecadienóico	39
Figura 20 – Estrutura de RC-1	41
Figura 21 – Estruturas citadas na literatura utilizadas na comparação dos dados de RMN ¹³ C de RC-1	42
Figura 22 – Espectro de massa (I.E. 70 eV) de RC-1	43
Figura 23 – Espectro de absorção na região do IV (cm ⁻¹ , KBr) de RC-1.....	43
Figura 24 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de RC-1	44
Figura 25 – Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de RC-1	44
Figura 26 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de RC-1	45
Figura 27 – Espectro de RMN ¹³ C – DEPT – 135° (125 MHz, CDCl ₃) de RC-1	45

Figura 28 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de RC-1.....	46
Figura 29 – Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de RC-1.....	46
Figura 30 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$) de RC-1.....	47
Figura 31 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de RC-1.....	48
Figura 32 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de RC-1	49
Figura 33 – Estruturas de RC-2.....	51
Figura 34 – Estruturas citadas na literatura utilizadas na comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de RC-2	52
Figura 35 – Espectro de massa (I.E. 70 eV) de RC-2.....	53
Figura 36 – Espectro de absorção na região do IV (cm^{-1} , KBr) de RC-2.....	53
Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2.....	54
Figura 38 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2.....	54
Figura 39 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2.....	55
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2.....	55
Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2	56
Figura 42 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2.....	56
Figura 43 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de RC-2.....	57
Figura 44 – Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de RC-2.....	57
Figura 45 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ – HSQC) de RC-2.....	58
Figura 46 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2.....	59
Figura 47 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2	60
Figura 48 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2	61

Figura 49 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de RC-2	62
Figura 50 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de RC-2	63
Figura 51 – Hidrogenação catalítica do ácido caurenóico.....	65
Figura 52 – Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACH.....	67
Figura 53 – Espectro de absorção na região do IV (cm^{-1} , KBr) de ACH.....	67
Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de ACH	68
Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de ACH	68
Figura 56 – Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{DEPT} - 135^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de ACH.....	69
Figura 57 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$) de ACH.....	69
Figura 58 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$) de ACH.....	70
Figura 59 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACH.....	71
Figura 60 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACH.....	72
Figura 61 – Ozonólise do ácido caurenóico.....	73
Figura 62 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON	75
Figura 63 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON.....	75
Figura 64 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON.....	76
Figura 65 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON.....	76
Figura 66 – Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{DEPT} - 135^\circ$ (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON	77
Figura 67 – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{DEPT}$ (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON	77
Figura 68 – Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACOZON.....	78
Figura 69 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACOZON.....	79
Figura 70 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACOZON.....	79
Figura 71 – Estruturas possíveis para ACMET	81
Figura 72 – Adição de metanol ao ácido caurenóico	81
Figura 73 – Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACMET	83

Figura 74 – Espectro de absorção na região do IV (cm^{-1} , KBr) de ACMET	83
Figura 75 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de ACMET	84
Figura 76 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de ACMET	84
Figura 77 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT -135° (125 MHz, CDCl_3) de ACMET	85
Figura 78 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY) de ACMET.....	85
Figura 79 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$) de ACMET	86
Figura 80 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACMET	87
Figura 81 – Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACMET	88
Figura 82 – Oxidação alílica de RC-1	89
Figura 83 – Possíveis estruturas para ACOX	90
Figura 84 – Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACOX.....	92
Figura 85 – Espectro de absorção na região do IV (cm^{-1} , KBr) de ACOX.....	92
Figura 86 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de ACOX	93
Figura 87 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de ACOX	93
Figura 88 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, CDCl_3) de ACOX.....	94
Figura 89 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de ACOX	94
Figura 90 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$) de ACOX.....	95
Figura 91 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACOX.....	96
Figura 92 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACOX.....	97
Figura 93 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de ACOX.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Pesquisa bibliográfica de diterpenos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	15
Tabela 02 – Ácidos graxos livres identificados no óleo fixo do lenho do caule de <i>A. squamosa</i>	36
Tabela 03 – Dados de RMN ¹³ C – BB e DEPT de RC-1 (125 MHz, CDCl ₃)	41
Tabela 04 – Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de RC-1 e RMN ¹³ C (CDCl ₃) de 3, 4 e 5	42
Tabela 05 – Dados de RMN ¹³ C – BB e DEPT de RC-2 (125 MHz, C ₅ D ₅ N).....	51
Tabela 06 – Dados de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) de RC-2, 6 e 7	51
Tabela 07 – Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) e RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de RC-2 e RMN ¹³ C (CDCl ₃) de 6 e 7	52
Tabela 08 – Dados de RMN ¹³ C – BB e DEPT (125 MHz, CDCl ₃) de ACH.....	66
Tabela 09 – Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de ACH e RC-1 ...	66
Tabela 10 – Dados de RMN ¹³ C – BB e DEPT (125 MHz, C ₃ D ₆ O) de ACOZON	74
Tabela 11 – Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de ACOZON (125 MHz, C ₃ D ₆ O) e RC-1 (125 MHz, CDCl ₃)	74
Tabela 12 – Dados de RMN ¹³ C – BB e DEPT (125 MHz, CDCl ₃) de ACMET	82
Tabela 13 – Dados de RMN ¹ H de ACEMET (125 MHz, CDCl ₃) e 8 (400 MHz, CDCl ₃) ..	82
Tabela 14 – Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de ACEMET (125 MHz, CDCl ₃), RC-1 (125 MHz, CDCl ₃) e 8 (100 MHz, CDCl ₃)	82
Tabela 15 – Dados de RMN ¹ H de ACOX (300 MHz e C ₅ D ₅ N) e 10 (600 MHz, CDCl ₃) ..	90
Tabela 16 – Dados de RMN ¹³ C – BB e DEPT (75 MHz, C ₅ D ₅ N) de ACOX	91
Tabela 17 – Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de ACOX (75 MHz, C ₅ D ₅ N), RC-1 (125 MHz, CDCl ₃) e 10 (100 MHz, CDCl ₃).....	91
Tabela 18 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EELC	103
Tabela 19 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EELC-H	104
Tabela 20 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico do extrato EHCC	106
Tabela 21 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EHCC-A.....	107
Tabela 22 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECC-A.....	107
Tabela 23 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EECC-A-δ.....	108
Tabela 24 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECC-A-δ	109
Tabela 25 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EECC-A-δ-φ	109
Tabela 26 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECC-A-δ-φ.....	109

Tabela 27 – Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ - π	110
Tabela 28 – Tratamento cromatográfico dos ésteres metílicos de EHLC.....	113

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 – Obtenção dos extratos EHLC e EELC de <i>Annona squamosa</i>	103
Fluxograma 02 – Isolamento de RC-1 a partir de EELC	105
Fluxograma 03 – Isolamento de RC-1 a partir da casca do caule de <i>Annona squamosa</i> ...	106
Fluxograma 04 – Isolamento de RC-2 a partir de EHCC-A.....	111
Fluxograma 05 – Obtenção dos ácidos graxos livres de EHLC, metilação dos ácidos graxos livres e identificação de OEHL.....	114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BB	Broad Band
CENAUREMN	Centro Nordestino de aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EHLC	Extrato Hexânico do Lenho do Caule
EELC	Extrato Etanólico do Lenho do Caule
EHCC	Extrato Hexânico da Casca do Caule
EM	Espectrometria de Massa
F.M.	Fórmula Molecular
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
L	Altura
P.M.	Massa Molar

P.F.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Φ	Diâmetro
δ	Deslocamento químico - Delta

RESUMO

A espécie botânica *Annona squamosa*, é uma planta comum na região Nordeste do Brasil onde é cultivada e bastante apreciada por seu fruto conhecido comumente como ata. Popularmente, é empregada no tratamento de diarreias, estomatites, em sinapismos nas nevralgias e cefaléias, em furúnculos, úlceras e na erradicação de piolhos.

Embora já pesquisada anteriormente, o re-estudo dessa planta foi justificado, tendo em vista, estudar a parte do caule, pouco explorada, e também a possibilidade de isolamento de componentes possivelmente conhecidos ou menos comuns, visto que, possuem atividade biológica expressiva.

A investigação fitoquímica a partir do extrato etanólico do lenho do caule e do extrato hexânico da casca do caule de *A. squamosa* através de cromatografia em coluna de gel de sílica, levou ao isolamento dos diterpenos (Fig. 1, Pág. xiv) conhecidos como Ácido caurenóico e Ácido 16 β ,17-diidroxii-*ent*-cauran-19-óico.

Alguns derivados reacionais do Ácido caurenóico foram obtidos tendo em vista confirmação de sua estrutura, treinamento nas técnicas usuais de laboratório e, principalmente, visando efetuar, em etapa posterior, testes de atividade biológica.

O estudo do extrato hexânico do lenho do caule de *A. squamosa* após saponificação com KOH/MeOH seguida de metilação, forneceu uma mistura de ésteres metílicos que foram identificados por CG/EM. Os principais componentes (Fig. 2, Pág. xiv) foram: Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico), Ácido pentadecanóico, Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico), Ácido heptadecanóico, Ácido 9,12-octadecadienóico, Ácido 9,11-octadecadienóico, Ácido 9-octadecenóico (Ácido oléico) e Ácido octadecanóico (Ácido esteárico).

Os compostos originais, como também, os derivados de reação, foram caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C , IV e EM). Assinalamentos de RMN ^1H e ^{13}C em colaboração com dados da literatura, permitiram estabelecer a conformação e configuração dos produtos.

Figura 1: Estruturas do Ácido Caurenóico e do Ácido 16 β , 17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico

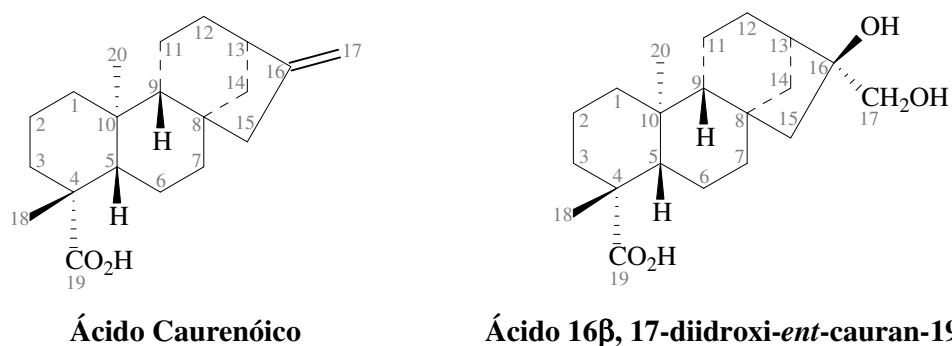
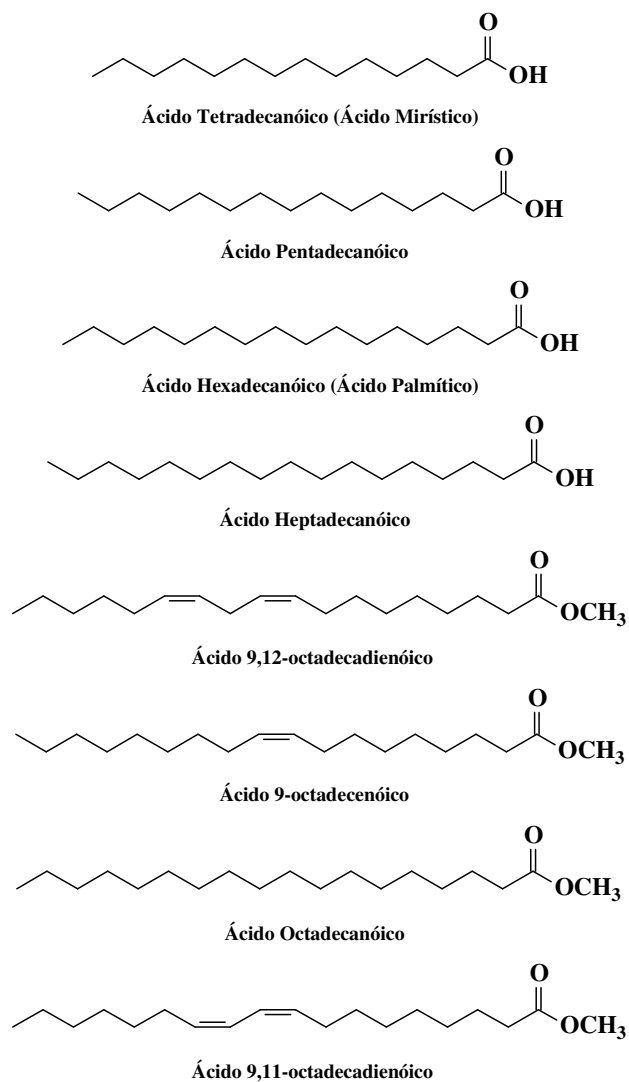


Figura 2: Estruturas dos Ácidos Graxos Identificados



ABSTRACT

Annona squamosa is a common tree popularly known as “ata”. In the folk medicine is used for treatment of stomach diseases, headache, diarrhea and for removal of louse.

Phytochemical investigation of EtOH and hexanic extraction using chromatographic techniques allowed identification of kaurenoic acid and 16 β , 17-Dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid.

Derivatives of kaurenoic acid were obtained in order to obtain biological activity and structure elucidation.

The hexanic extract of trunk was submitted to hydrolyse with KOH/MeOH, followed by methylation to yield ester mixture identified by CG-MS as: tetradecanoic acid, pentadecanoic acid, hexadecanoic acid, heptadecanoic acid, octadecadi-9,11-en-oic acid, octadecadi-9,12-en-oic acid, octadec-9-enoic acid, octadecanoic acid.

All natural compounds and derivatives were characterized by spectroscopic analysis including NMR ^1H and ^{13}C , IR and MS. Compounds structures were confirmed by comparison with literature data.

Capítulo 1



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Annona squamosa (Annonaceae) é uma planta tropical de porte médio, muito comum no nordeste brasileiro onde encontra condições favoráveis de desenvolvimento e cultivo [CORRÊA, 1996]. Produz o fruto conhecido popularmente como araticum, fruta do conde, pinha, ata e condessa.

Devido a importância sob o ponto de vista frutícola, seu cultivo tem se expandido no Brasil nos últimos anos, onde os maiores produtores são os estados de Alagoas, Bahia e São Paulo, com uma área total cultivada de aproximadamente 6.625 hectares [PELINSON et al., 2005].

A medicina popular apregoa o uso medicamentoso de várias partes da planta. Suas folhas apresentam propriedades sudorífica, carminativa, estomáquica, anti-reumática e anti-helmíntica e são usadas como auxiliar no tratamento de estomatites e em sinapismos nas nevralgias e cefaléias, bem como na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir supuração. Na Índia as sementes são usadas em preparações tidas como abortivas. As sementes trituradas têm emprego popular reputado como eficiente na erradicação de piolhos e outros ectoparasitas. As raízes mostram ter propriedade purgativa drástica. [LORENZI & MATOS, 2002]

Estudos químicos com *Annona squamosa*, permitiram identificar diversos constituintes (Fig. 3) que apresentam atividade farmacológica e biológica: nas folhas, é mencionado a presença de coridina, um alcalóide que apresenta atividade anticancerígena [BRAKUNI, 1972]; nas sementes é relatada a presença da squamosina que apresenta atividade pesticida [RUPPRECHT, 1990]; dos frutos foram isolados derivados caurânicos, dentre eles o ácido 16 β ,17-diidroxenti-cauran-19-óico que apresentou atividade anti-HIV em ensaios de laboratório [WU et al., 1996].

A escolha dessa espécie para a realização deste trabalho, teve como base o conhecimento prévio da multiplicidade e da variedade de ações biológicas demonstradas por *Annona squamosa* e pela presença de diferentes constituintes químicos ativos em sua composição, além de se tratar de uma planta domesticável e de fácil cultivo na região nordeste do Brasil.

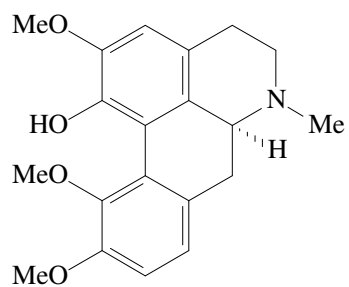
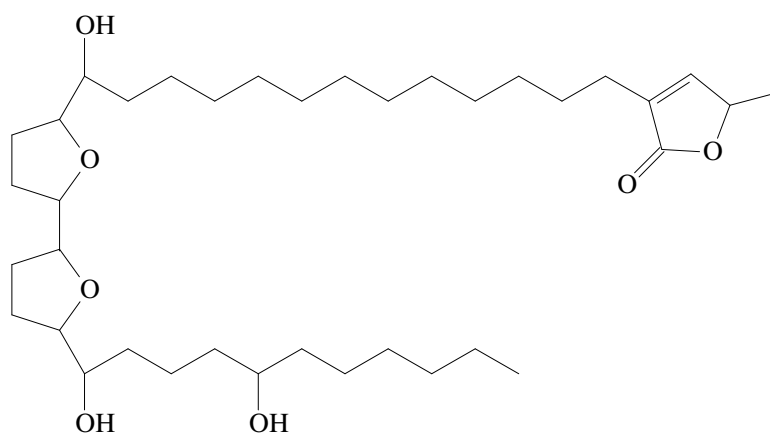
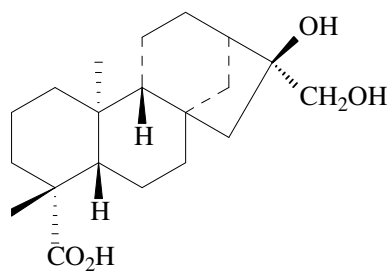
Optou-se pelo estudo dos componentes químicos do lenho e da casca do caule, considerando-se que a maioria dos trabalhos pesquisados, estão direcionados para

identificação dos constituintes das folhas e frutos. A investigação do extrato metanólico do lenho do caule e do extrato hexânico da casca do caule conduziu ao isolamento em quantidades apreciáveis de um composto formado por cristais incolores, identificado como o diterpeno conhecido por ácido caurenóico, um *ent*-caurano que possui um largo espectro de bioatividade, tais como, antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, moluscicida, dentre outras [GHISALBERTI et al., 1997]. Não é comercialmente disponível, mas é relativamente abundante em algumas espécies dos gêneros *Wedelia* [BATISTA et al., 1999], *Mikania* [ALVES, et al., 1995], *Annona* [OLIVEIRA et al., 2002] e *Xylopia* [MELO et al., 2001], o que tem motivado sua quantificação nessas espécies de plantas, caracterizando-as como fontes naturais deste diterpeno [BRESCIANI et al., 2004; BATISTA et al., 2005]. Ele também é um dos compostos intermediários envolvidos na biossíntese de diversos diterpenos caurano, incluindo gibberallinas, um grupo de hormônios de crescimento. Assim, não é surpreendente que muitos cauranos atuam como reguladores do crescimento em plantas [VIEIRA, et al., 2005].

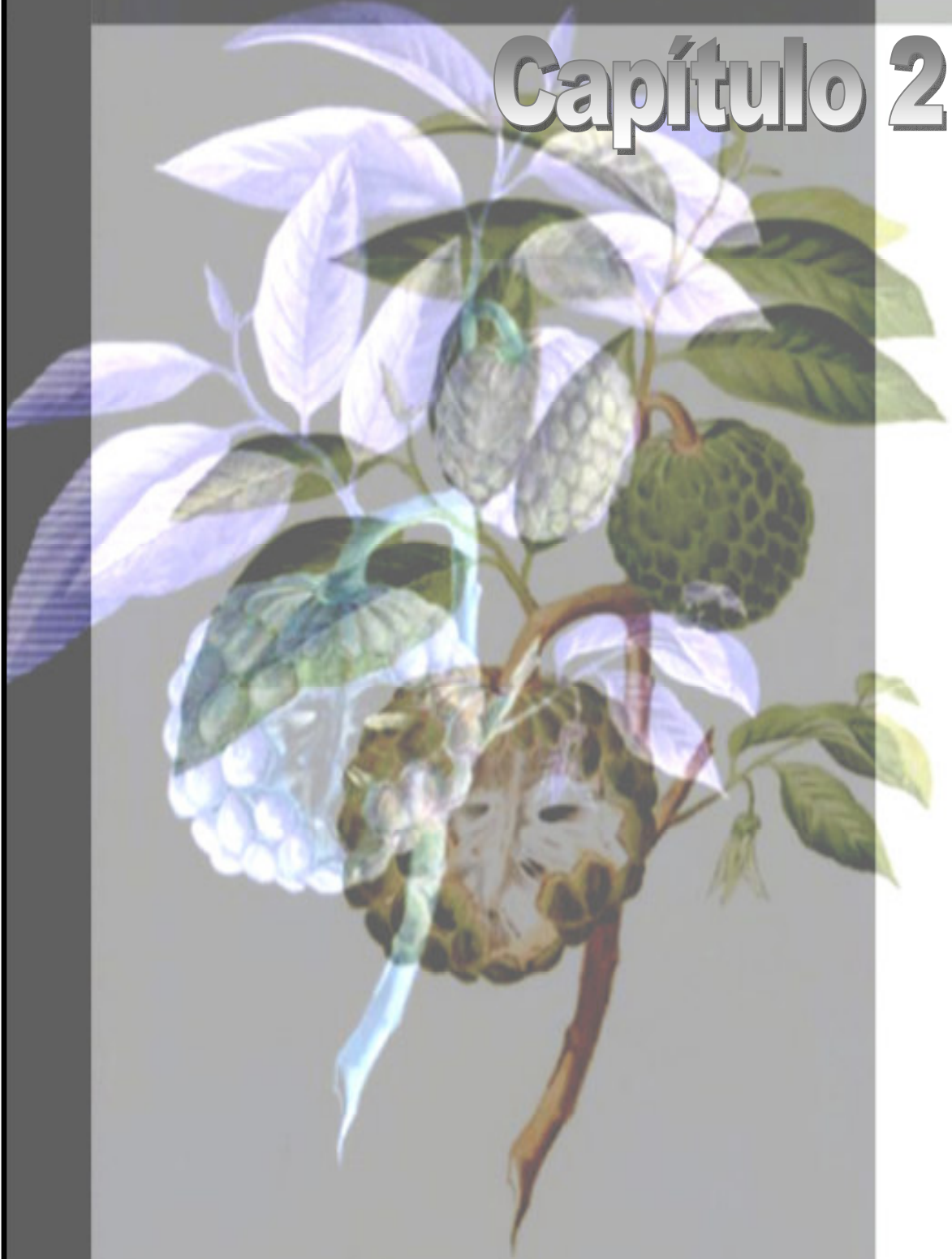
Devido a relativa abundância deste composto nos extratos estudados e da possibilidade da modificação de sua estrutura, tendo em vista a presença dos grupos funcionais (ligação olefínica e ácido carboxílico) bastante reativos e, portanto, facilmente modificáveis, primou-se pela produção de derivados dessa substância. A obtenção dos derivados, teve como objetivo não somente a comprovação estrutural, como também, testar e potencializar a atividade do composto isolado e obter treinamento referente ao manuseio de reagentes químicos, aparelhagem e técnicas de laboratório.

Diferentes técnicas foram utilizadas no estudo dos constituintes químicos. No isolamento e purificação: cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD) e, na análise: cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG/EM), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C), envolvendo técnicas bidimensionais como $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY, HMQC ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) e HMBC ($^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) com detecção no canal de hidrogênio].

Foi ainda realizado o estudo dos ácidos graxos livres presentes no extrato hexânico do lenho do caule de *Annona squamosa* a partir da análise dos espectros de massa obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa dos ésteres metílicos provenientes de esterificação dos referidos ácidos graxos.

Figura 3: Compostos isolados de *Annona squamosa***Coridina** [CADOGAN et al., 1996]**Squamosina** [RUPPRECHT et al., 1990]**Ácido 16β,17-diidroxi-ent-cauran-19-óico** [WU et al., 1996]

Capítulo 2



CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1. Considerações botânicas sobre a família *Annonaceae* Juss.

A família *Annonaceae* Juss. é constituída por cerca de 122 gêneros que englobam 1.100 espécies, em média. Desses gêneros, 36 são americanos, dois ocorrem na África (*Annona* e *Xylopia*) e um na Ásia (*Anaxagorea*). No Brasil, estão registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 260 espécies [BARROSO, 1991].

A família é caracterizada pelo hábito arbóreo, ou muitas vezes pela presença de arvoretas, raramente na forma de lianas (*Annona haematantha*). Vegetativamente a família pode ser reconhecida pelo odor forte do corte do tronco ou dos ramos, pela presença de fibras longas e resistentes na casca, conhecida popularmente como envira, pelas folhas dísticas e pela presença de marcas de chamuscas no corte transversal do tronco [RIBEIRO, 1999].

As flores têm tamanhos que variam de pequena a grande, com três sépalas, livres ou unidas; as pétalas são livres, geralmente em 2-3 verticilos. As cores variam, podendo ser esbranquiçadas, creme-amareladas, esverdeadas, alaranjadas e até cor-de-vinho.

Os frutos são geralmente apocárpicos, e são carnosos e indecentes, ou deicentes. Frutos sincárpicos podem ser encontrados em *Annona*.

Muitas espécies são cultivadas, principalmente no gênero *Annona*, devido aos seus frutos comestíveis (por exemplo graviola, fruta do conde, etc.). A envira é utilizada na confecção de utensílios [RIBEIRO, 1999].

2.2. Considerações botânicas sobre a espécie *A. squamosa*.

Embora a origem desta espécie tenha motivado muita discussão entre os botânicos, ela foi finalmente reconhecida como proveniente da América. Como planta importante sob o ponto de vista frutícola, foi rapidamente levada para todos os países tropicais, de modo que, três séculos após seu descobrimento, já existia no estado semi-selvagem em muitos pontos do nosso continente, assim como na África, e principalmente na Ásia, dando a ilusão de dissminuição espontânea [CORRÊA, 1996].

É admissível, entretanto, que a sua introdução no interior do Estado do Pará tenha sido feita pelos aborígenes na época pré-histórica, isto é, antes da chegada dos portugueses, não

havendo dúvida alguma de que foram estes, precedidos pelos árabes e pelos chineses, que a levaram para a Índia e a maior parte da Ásia, onde hoje é subespontânea em todo o Indostão. Um fato histórico, que parece incontestável, é que a espécie foi introduzida na Bahia em 1626 pelo conde de Miranda (D. Diogo Luiz de Oliveira), então governador e, no Rio de Janeiro em 1811, juntamente com outras plantas trazidas de Caiena, por um agrônomo francês vindo ao Brasil a convite de D. João VI [CORRÊA, 1996].

Abaixo, são apresentados alguns detalhes botânicos de *A. Squamosa*, cuja descrição completa é dada por Correia, 1996.

"Anona squamosa L. (A. sericea Dunal), da família das Anonáceas, árvore pequena com até 8 m de altura; folhas alternas, pecioladas e verde-escuras na página superior, glaucas pubescentes na página inferior (enquanto jovens), com 8-11 pares de nervuras laterais; flores solitárias e opostas às folhas, pequenas, esverdeadas ou brancas; sépalas pequenas, triangulares e pubescentes; fruto quase esférico ou cordiforme, até 12 cm de diâmetro, quase sempre com a epiderme glauco-pruinosa-aveludada enquanto jovem e verde-amarelada quando madura, composta de carpelos areolados, separando-se facilmente na maturação; polpa branco-amarelada, macia, densa e doce; sementes lisas, castanho-escuras ou pretas. O fruto, embora conserve sempre a adstringência, mesmo quando bem maduro, é desprovido de acidez e evidentemente um dos melhores de toda a família e com certeza o melhor do gênero, rescendendo forte e agradável aroma de canela da Índia; o sabor delicado da polpa, branca, macia, muito doce, sadia e nutritiva, comestível crua, torna-a uma fruta de mesa geralmente apreciada..."

Figura 4: Foto de um espécime de *Annona squamosa* (fonte: <http://caribfruits.cirad.fr>)



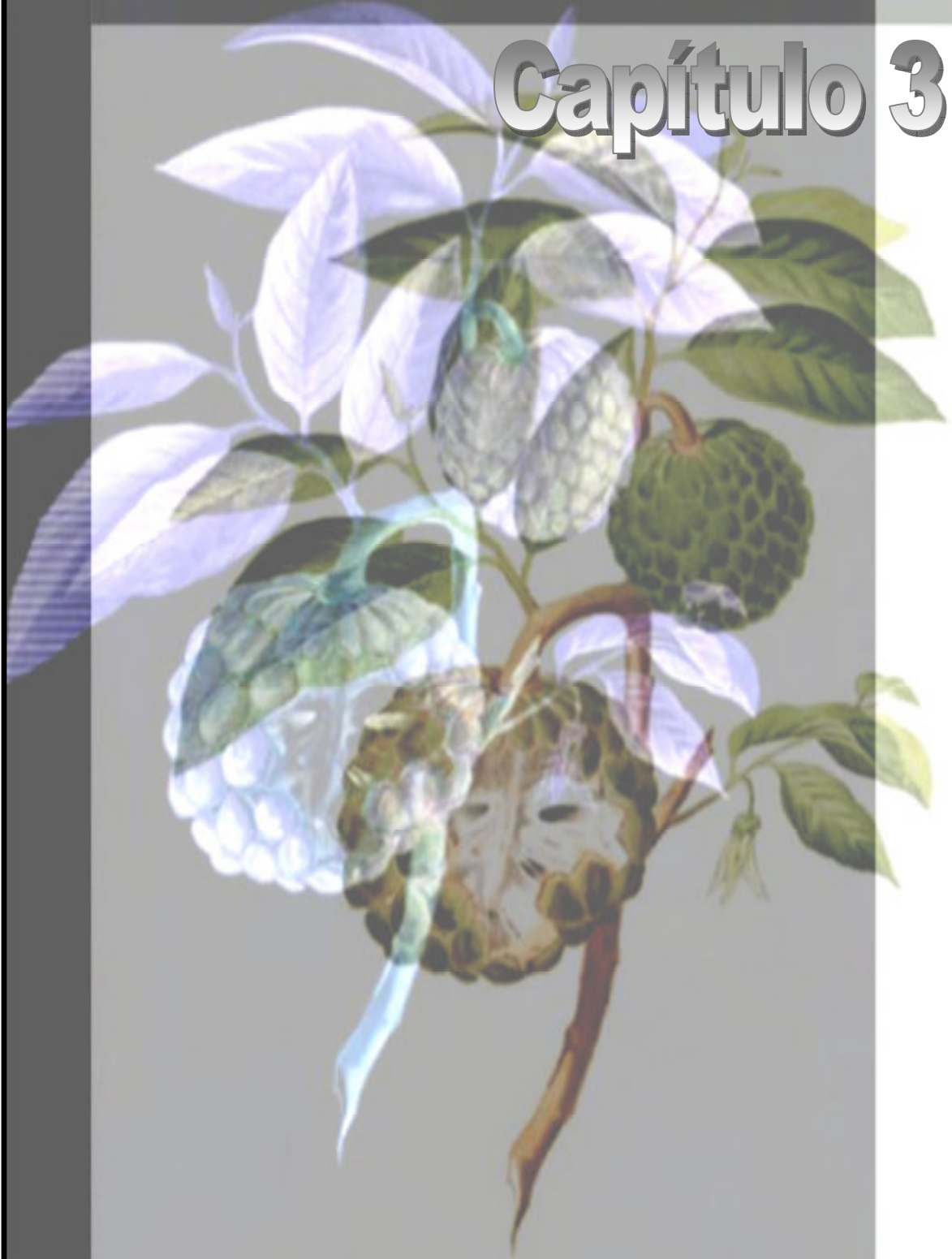
Figura 5: Foto da flor de *Annona squamosa* (fonte: <http://caribfruits.cirad.fr>)



Figura 6: Foto das folhas, frutos e sementes de *Annona squamosa*
(fonte: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/sugar_apple.html)



Capítulo 3



PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

3. PESQUISA BIBLIGRÁFICA

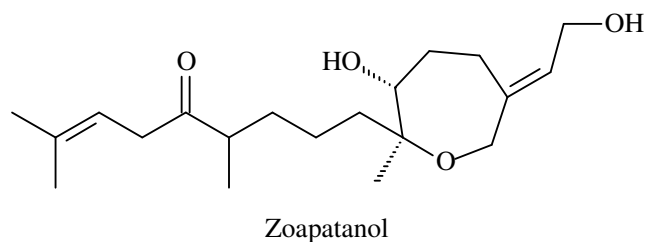
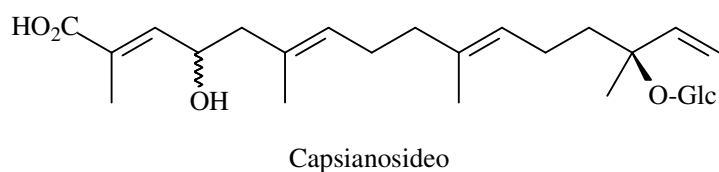
3.1 Diterpenos

Diterpenos constituem uma vasta classe de produtos naturais isoprenoidais, biossintetizados a partir do ácido mevalônico, cuja seqüência biossintética leva 2*E*,6*E*,10*E*-pirofosfato de geranylgeranila (GGPP) [BRUNETON, 1995]. Presentes em alguns insetos e em vários organismos animais, eles são muito difundidos em plantas, onde apresentam maior ocorrência nas Lamiales e Asterales (com mais de 1200 compostos reportados, somente, para Asteraceae) e ainda encontram-se espalhados nas Gentianales, Geraniales e Fabales [BRUNETON, 1995; HANSON, 1991].

A estrutura dos diterpenos é altamente variável e depende estritamente de sua biogênese, assim como, sua classificação.

Diterpenos acíclicos (fitanos): Não são de ocorrência muito comum entre os diterpenos. Eles podem ser linear ou podem conter uma lactona ou um anel contendo oxigênio (Fig. 7) formado pela abertura de oxiranas.

Figura 7: Diterpenos acíclicos

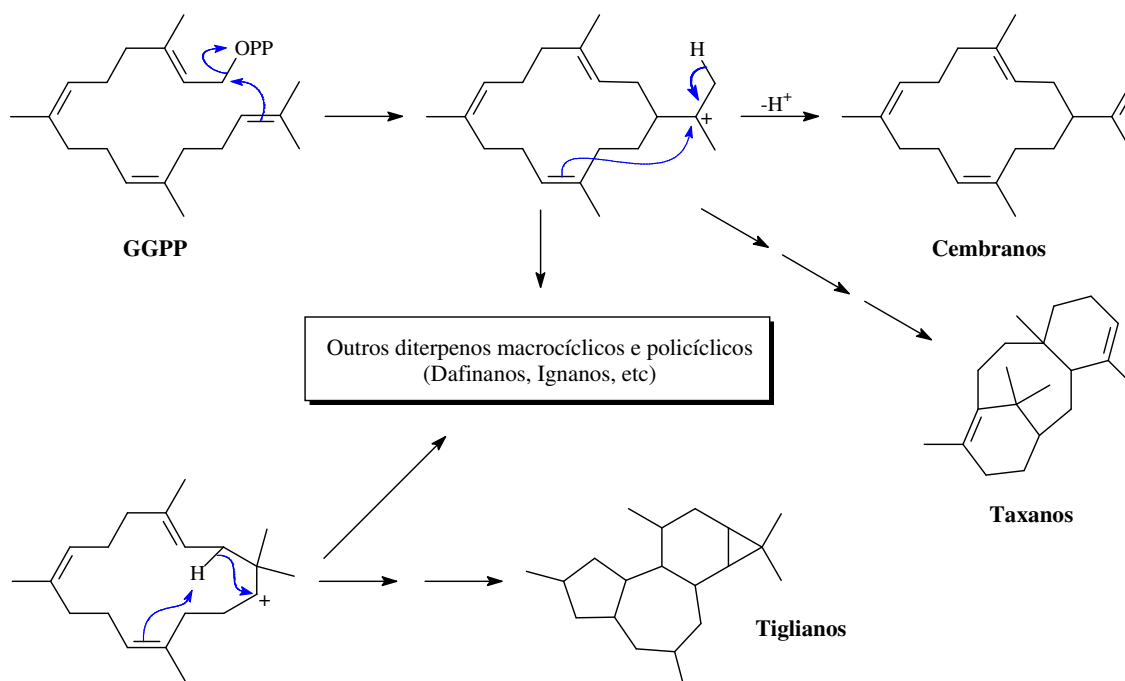


Diterpenos Cíclicos: Podem ser bicíclicos (labdanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, vouacapanos, podocarpanos), tetracíclicos (traquilobanos, cauranos, afidicolanos, estemodanos, estemaranos, beieranos, atisanos, gibberalanos), macrocíclicos (taxanos, cembranos, dafinanos, tiglianos, ingenanos) e compostos mistos, em acordo com o número e o padrão de ciclização ocorrido em seus esqueletos [HANSON, 2004].

Os diterpenos cíclicos resultam de dois diferentes processos biossintéticos de ciclização a partir de GGPP [BRUNETON, 1995; HANSON, 1991]:

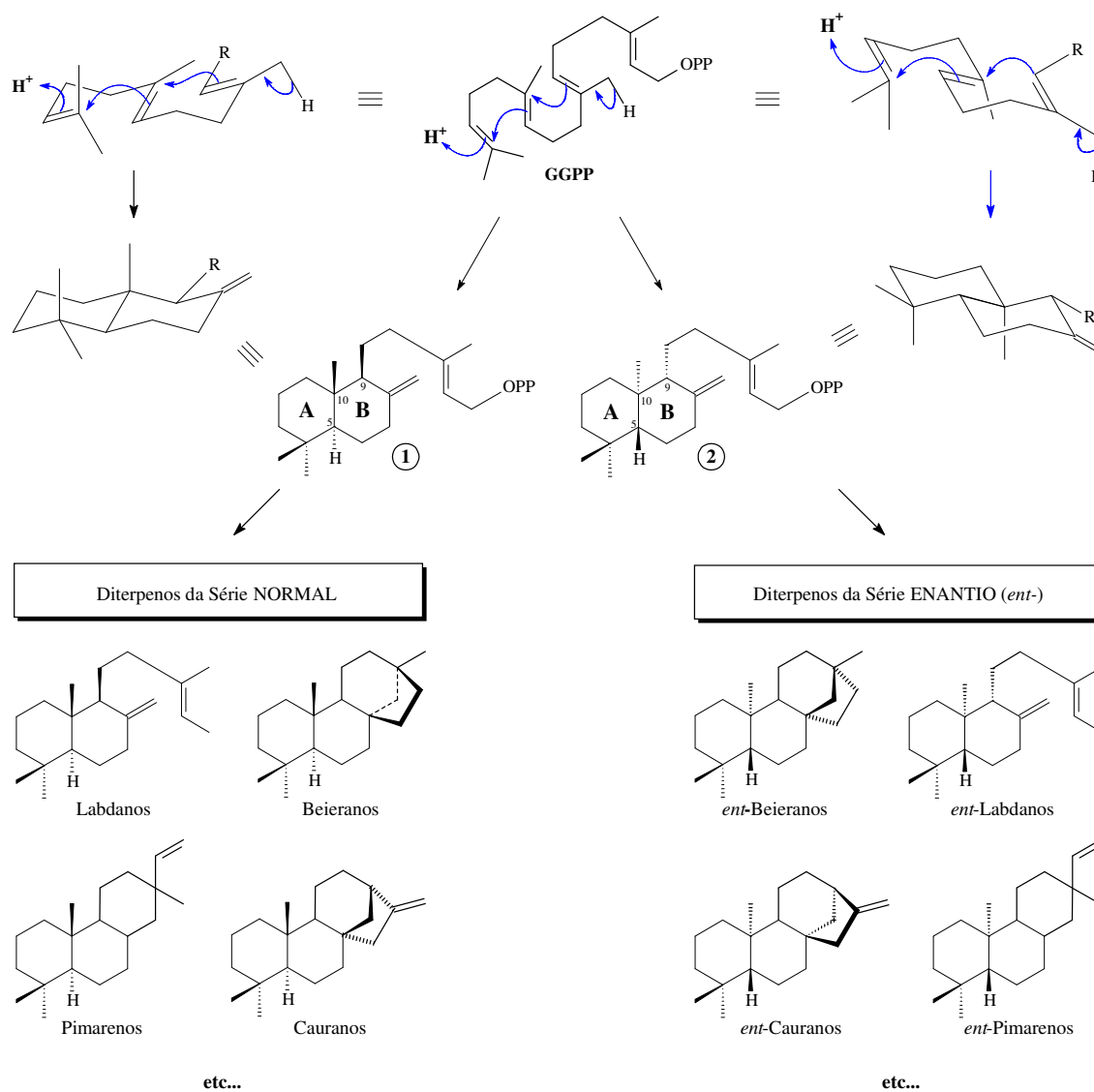
1. No primeiro tipo (Fig. 8), o grupo terminal pirofosfato (-OPP) atua como um grupo abandonador, resultando em um carbocátion alílico. O cátion macrocíclico poliinsaturado é muito reativo e pode ser estabilizado (pela eliminação de um próton) ou, na maioria das vezes, leva a uma estrutura policíclica por substituição nucleofílica, resultando, por exemplo, no taxino, tigliano, dafinano, ou ingenano.

Figura 8: Ciclização do pirofosfato de geranylgeranila (GGPP) com o grupo pirofosfato (-OPP) atuando como grupo abandonador



2. No segundo tipo, a ciclização (Fig. 9) ocorre sob catálise ácida [HANSON, 1991] de maneira bastante semelhante à ciclização que origina triterpenos cíclicos. Entretanto, não há o passo de epoxidação prévia que ocorre na ciclização de triterpenos, mas, ocorre a protonação da ligação dupla sobre a unidade isopropilideno inicial da cadeia do GGPP levando a dois intermediários bicíclicos perhidronaftaleno (Fig 9, estruturas 1 e 2), resultando em duas séries enantioméricas que se diferenciam pelas configurações invertidas dos carbonos C-5, C-9 e C-10.

Figura 9: Ciclização do pirofosfato de geranylgeranila (GGPP) sob catálise ácida, levando aos diterpenos das séries NORMAL e ENANTIO (*ent-*)

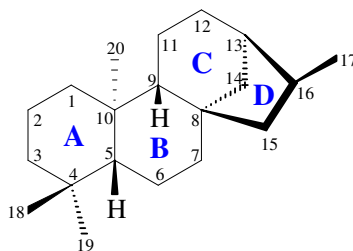


Geralmente, a série normal é caracterizada pelas estruturas cuja fusão entre os anéis **A** e **B** ocorre da mesma maneira que em esteróides, enquanto as estruturas da série “enantiomérica” (denominada “*ent-*”) são as que correspondem a imagem especular das estruturas da série normal.

3.2 Diterpenos cauranos

Diterpenos caurânicos representam um importante grupo de diterpenos tetracíclicos e suas estruturas são constituídas por uma unidade perhidrofenantreno (anéis A, B e C) unidos com uma unidade ciclopentano (anel D) formado por uma ponte de dois carbonos ligados a C-8 e C-13 (Fig 10) [BATISTA, et al., 2005].

Figura 10: Esqueleto básico de um diterpeno *ent*-caurano [GILES, 1999]



Diferentes critérios são usados para a nomenclatura dos diterpenos caurânicos, a mais freqüente utiliza o prefixo “*ent-*” quando há a inversão estereoquímica da série normal [BRUNETON, 1995; VELANDIA, et al., 1998; GILES, 1999]. Entretanto, a nomenclatura, numeração e estereoquímica do esqueleto *ent*-caurano já foi bem definida através de recomendações da IUPAC. Exceto em alguns poucos casos (aqueles em que uma ligação dupla entre os carbonos C-9 e C-11 está presente) a maioria dos *ent*-cauranos são caracterizados por valores negativos de rotação óptica específica, $[\alpha]_D$ [GHISALBERTI, 1997; REYNOLDS, et al., 1991].

Os diterpenos cauranos são bastantes encontrados em diferentes espécies de plantas pertencentes a várias famílias, tais como, Asteraceae [KOS et al., 2006; KLECAKOVA, et al., 2005], Annonaceae [ZGODA-POLS et al., 2002; CHANG et al., 1998], Euphorbiaceae [JAHAN et al., 2004; BANDARA et al., 1988], Celastraceae [DUAN et al., 2001; DUAN et al., 1999], Velloziceae [PINTO et al., 1983], Lamiaceae [LI et al., 2006; GHOUARI et al., 2005], Fabaceae [CUNHA et al., 2003], Rutaceae [GHISALBERTI et al., 1998],

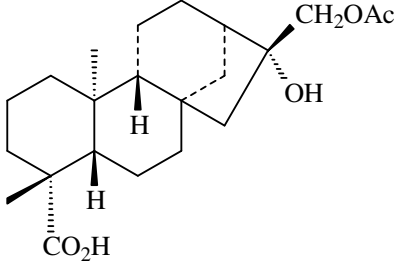
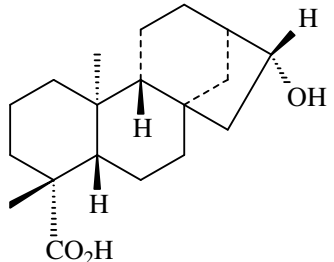
Jungermanniaceae [KONDOH et al., 2005], Erythroxyloaceae [SANTOS et al., 2005], Rhizophoraceae [HAN e al., 2004].

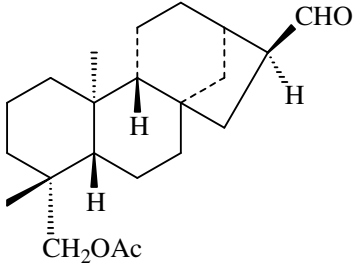
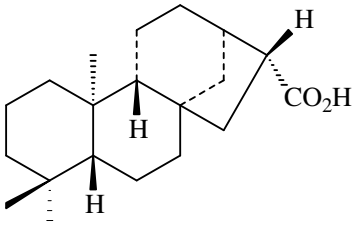
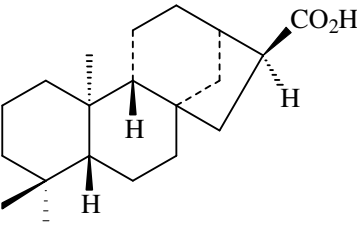
3.2 Diterpenos obtidos no gênero *Annona* registrados na literatura

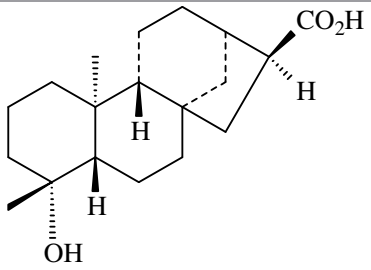
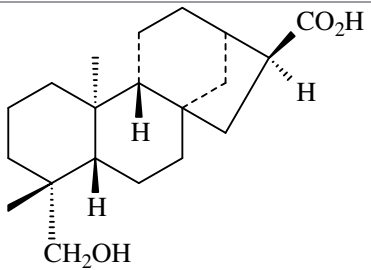
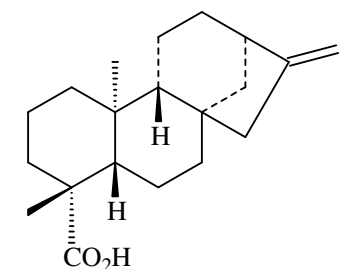
De acordo com a pesquisa bibliográfica foram reportados 53 diterpenos para o gênero *Annona*, sendo distribuídos nas seguintes espécies: *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. bullata*, *A. glabra*, *A. reticulate*, *A. senegalensis*, *A. spraguei* e *A. squamosa*. A pesquisa revelou ainda que, dentre os diterpenos relatados para o gênero *Annona*, a grande maioria (50) é do tipo caurano, com apenas dois representantes do tipo clerodano e um do tipo pimarano.

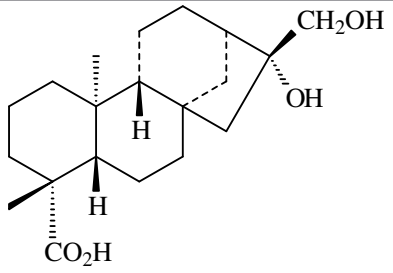
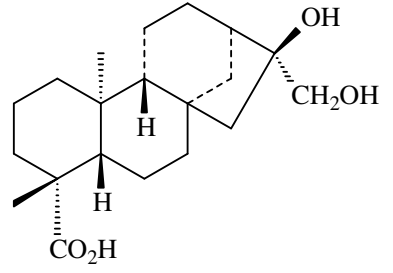
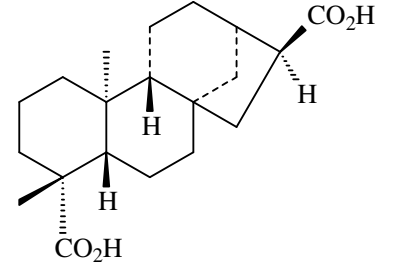
A pesquisa bibliográfica foi realizada via Internet com auxílio do software Sci Finder Scholar 2006 em julho de 2007 e a busca da foi restrita ao intervalo de 1910-2007. O resultado da pesquisa encontra-se resumido na Tabela 1 que mostra as estruturas e as nomenclaturas dos diterpenos cauranos isolado no gênero *Annona*, as respectivas espécies estudadas, a parte da planta da qual foi isolado o referido diterpeno e as referências.

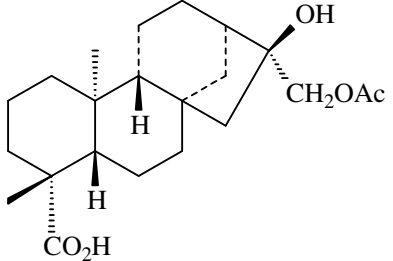
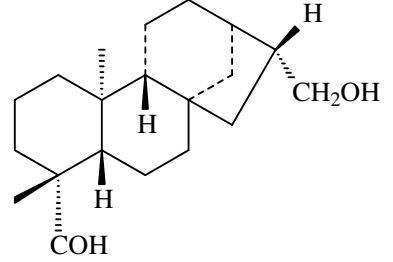
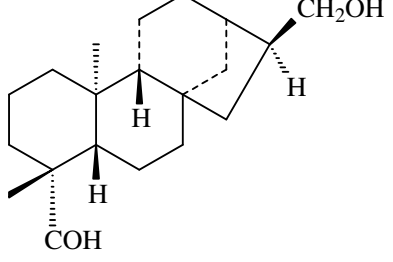
Tabela 1: Pesquisa bibliográfica de diterpenos isolados a partir do gênero *Annona*

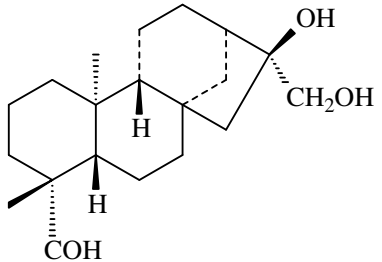
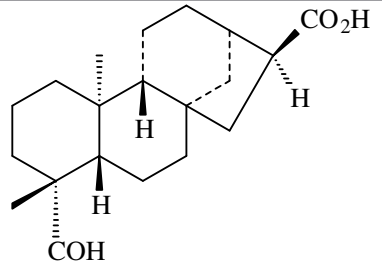
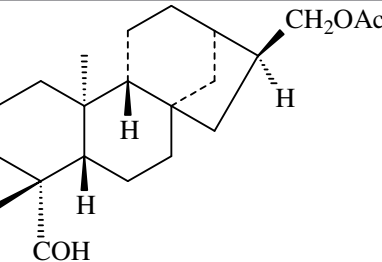
COMPOSTO	ESPÉCIE	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIAS
 <p>Ácido 16α-hidroxi-17-acetoxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Casca</p>	<p>KUAI et al., 2006</p>
 <p>Ácido 16-α-hidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona squamosa</i> <i>Annona glabra</i> <i>Annona reticulata</i> <i>Annona bullata</i></p>	<p>Fruto Fruto Casca Casca</p>	<p>WIART et al., 2005 HSIEH et al., 2004 HASAN et al., 1989 HUI et al., 1990</p>

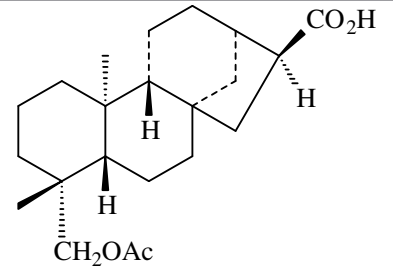
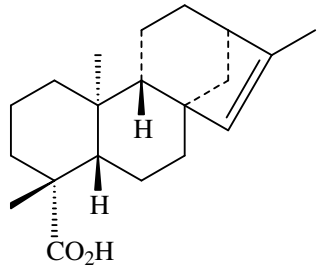
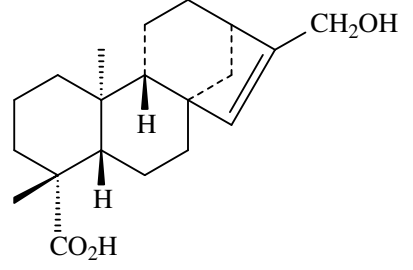
 <p>16α-Hidro-19-acetoxi-ent-cauran-17-al</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004</p>
 <p>Ácido 16β-hidro-ent-cauran-17-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004</p>
 <p>Ácido 16α-hidro-ent-cauran-17-oic</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004</p>

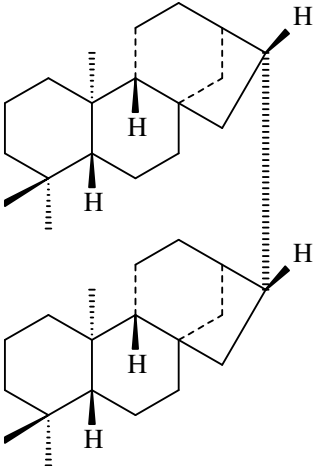
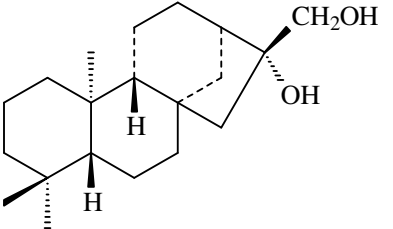
 <p>Ácido 19-nor-ent-cauran-4α-ol-17-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Fruto Ramos Fruto Casca</p>	<p>HSIEH et al., 2004 TIAN et al 2003 YANG et al., 2002 WU et al., 1996 ESHIET et al., 1972</p>
 <p>Ácido 16α-hidro-19-ol-ent-cauran-17-óico (Annoglabasin E)</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona glabra</i> <i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004 TIAN et al., 2001 CHEN et al., 2000</p>
 <p>Ácido ent-caur-16-en-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona glabra</i> <i>Annona cherimola</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona senegalensis</i> <i>Annona reticulata</i> <i>Annona spraguei</i> <i>Annona reticulata</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Fruto Folhas e Casca Ramos Ramos Fruto Casca Casca Casca Casca Casca</p>	<p>HSIEH et al., 2004 OLIVEIRA, et al, 2002 YANG et al., 2002 TIAN et al., 2001 CHEN et al., 1997 WU et al., 1996 TAKEDA et al., 1996 HASAN et al., 1989 DE DIAZ et al., 1988 ETSE et al., 1987 YANG et al., 1971 ESHIET et al., 1971</p>

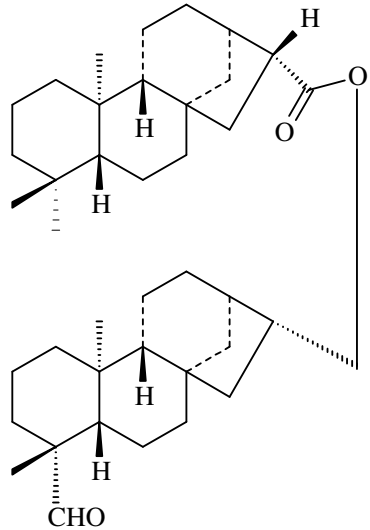
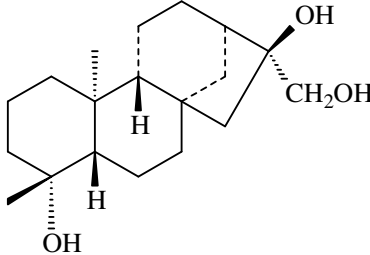
 <p>Ácido 16α,17-diidroxi-ent-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto Ramos Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002 WU et al., 1996</p>
 <p>Ácido 16β,17-diidroxi-ent-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto Ramos Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002 WU et al., 1996</p>
 <p>Ácido 16α-hidro-ent-cauran-17,19-dióico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto Ramos</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002</p>

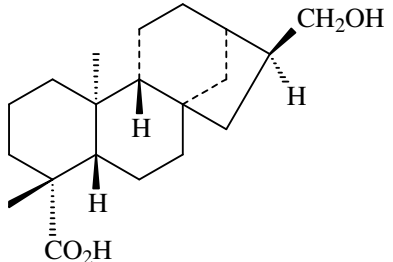
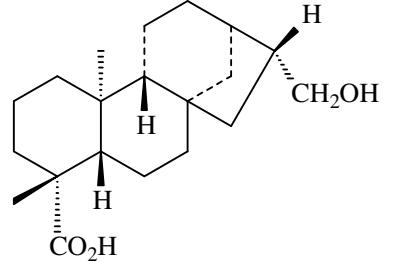
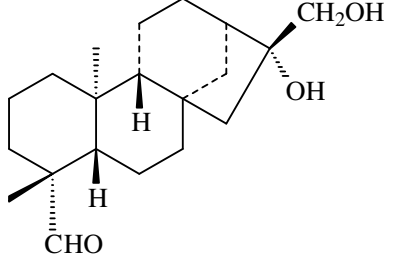
 <p>Ácido 16β-hidroxi-17-acetoxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona cherimola</i></p>	<p>Fruto Ramos Ramos</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002 CHEN et al., 1997</p>
 <p>16β-Hidro-17-hidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-al</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona cherimola</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto Ramos Ramos Ramos</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002 CHEN et al., 1998 WU et al., 1996</p>
 <p>16α-Hidro-17-hidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-al</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona cherimola</i></p>	<p>Fruto Ramos</p>	<p>HSIEH et al., 2004 CHEN et al., 1998</p>

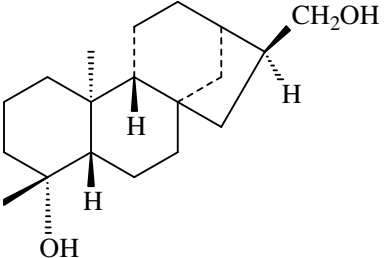
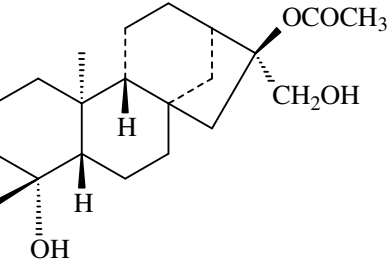
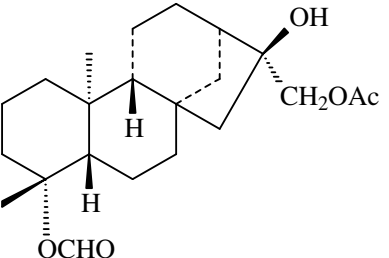
 <p>16β,17-Diidroxi-ent-cauran-19-al</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto Ramos Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002 WU et al., 1996</p>
 <p>Ácido 16α-hidro-19-al-ent-cauran-17-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona glabra</i> <i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Fruto Ramos Casca</p>	<p>HSIEH et al., 2004 YANG et al., 2002 TIAN et al., 2001 ESHIET et al., 1971</p>
 <p>16α-Hidro-17-acetoxi-ent-cauran-19-al</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004</p>

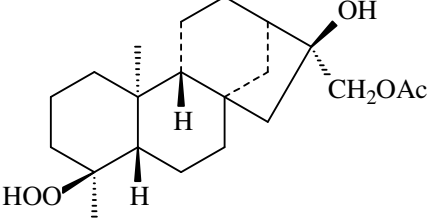
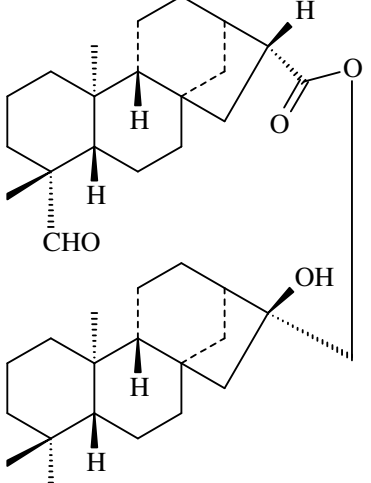
 <p>Ácido 16α-hidro-19-acetoxi-<i>ent</i>-cauran-17-óico (Annoglabasin B)</p>	<p><i>Annona glabra</i> <i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004 TIAN et al., 2001</p>
 <p>Ácido <i>ent</i>-Caur-15-en-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004</p>
 <p>Ácido <i>ent</i>-Caur-15-en-17-ol-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>HSIEH et al., 2004</p>

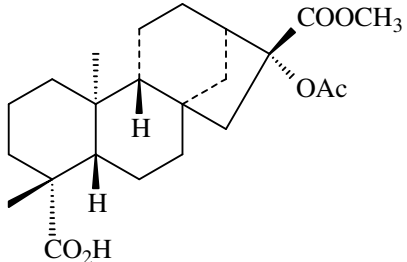
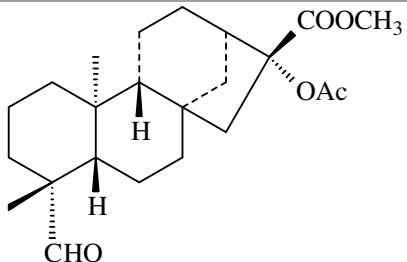
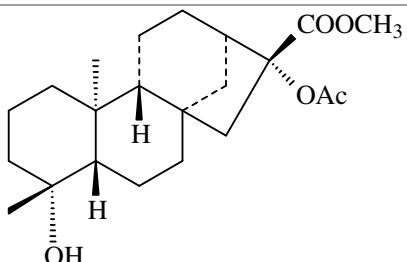
 <p>16,16'-Bi-17-norcaurano (Annoglabayin)</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>CHEN et al., 2004</p>
 <p>16α, 17-Diidroxicaurano</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>		<p>TIAN et al 2003</p>

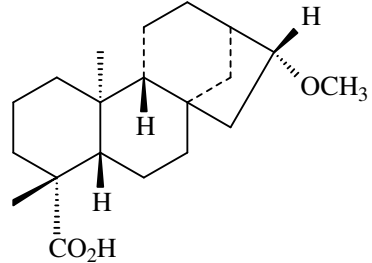
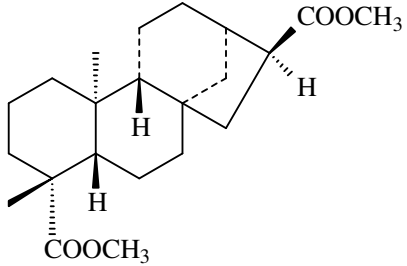
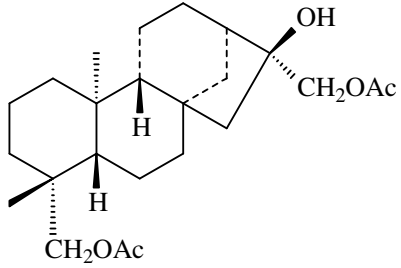
 <p><i>ent</i>-16β-Hidro-19-al-<i>ent</i>-cauran-17-yl 16β-hidro-<i>ent</i>-caurano</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2003</p>
 <p>19-Nor-<i>ent</i>-caurano-4α,16β,17-triol</p>	<p><i>Annona squamosa</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos Fruto</p>	<p>YANG et al., 2002 WU et al., 1996</p>

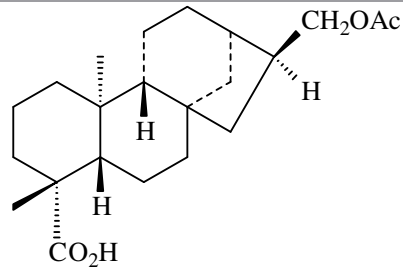
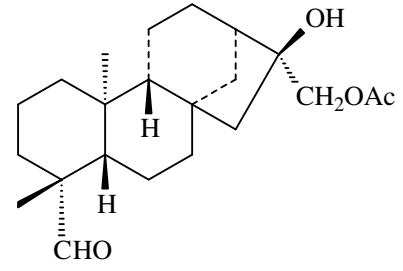
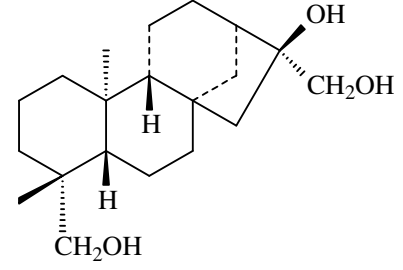
 <p>Ácido 16α-hidro-17-hidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona squamosa</i> <i>Annona cherimola</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona reticulata</i></p>	<p>Ramos Ramos Fruto Casca</p>	<p>YANG et al., 2002 CHEN et al., 1998 WU et al., 1996 ETSE et al., 1987</p>
 <p>Ácido 16β-hidro-17-hidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona squamosa</i> <i>Annona cherimola</i> <i>Annona squamosa</i> <i>Annona reticulata</i></p>	<p>Ramos Ramos Fruto Casca</p>	<p>YANG et al., 2002 CHEN et al., 1998 WU et al., 1996 ETSE et al., 1987</p>
 <p>16α,17-Diidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-al</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2002</p>

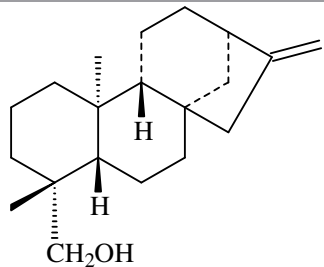
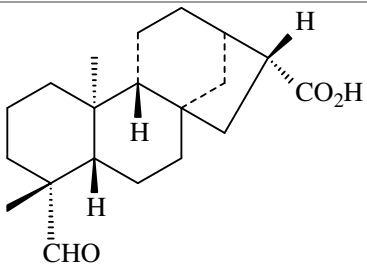
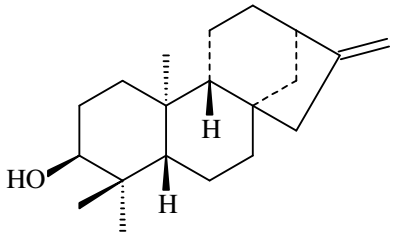
 <p>16α-Hidro-17-hidroxi-19-nor-<i>ent</i>-cauran-4-α-ol (Annosquamosin C)</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2002</p>
 <p>16β-Acetoxi-17-hidroxi-19-nor-<i>ent</i>-cauran-4α-ol (Annosquamosin D)</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2002</p>
 <p>16β-Hidroxi-17-acetoxi-19-nor-<i>ent</i>-cauran-4α- formiato (Annosquamosin E)</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2002</p>

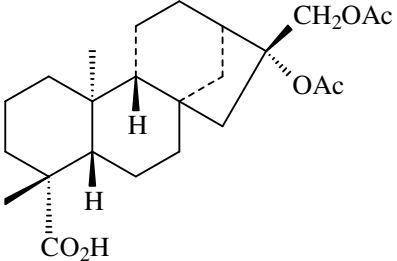
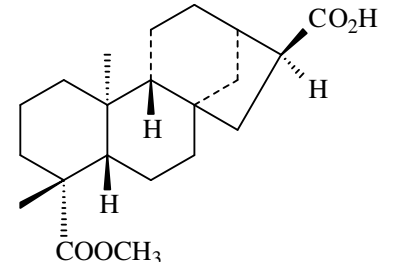
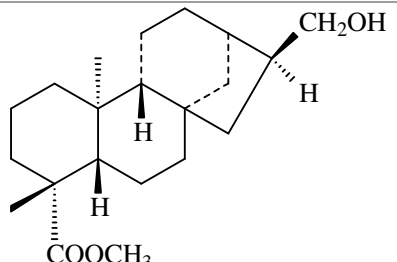
 <p>16β-Hidroxi-17-acetoxi-18-nor-<i>ent</i>-cauran-4-hidroperoxido (Annosquamosin F)</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2002</p>
 <p>16β-Hidroxi-19-al-<i>ent</i>-cauran-17-yl 16β-hidro-19-al-<i>ent</i>-cauran-17-oato (Annomosin A)</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>YANG et al., 2002</p>

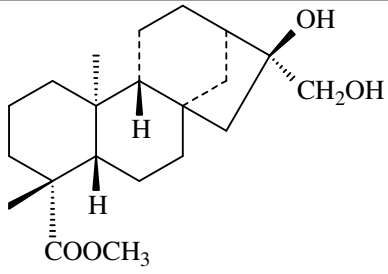
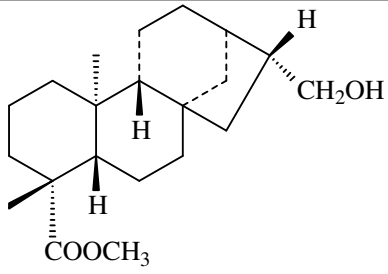
 <p>Ácido 16α-acetoxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico-17-carbometoxi (Annoglabasin C)</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>CHEN et al., 2000</p>
 <p>16α-Acetoxi-<i>ent</i>-cauran-19-al-17-carbometoxi (Annoglabasin D)</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>CHEN et al., 2000</p>
 <p>16α-Acetoxi-19-nor-<i>ent</i>-cauran-4α-ol-17-carbometoxi (Annoglabasin F)</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>CHEN et al., 2000</p>

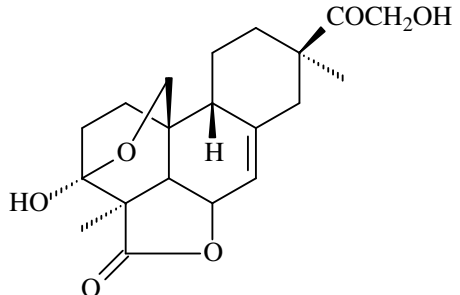
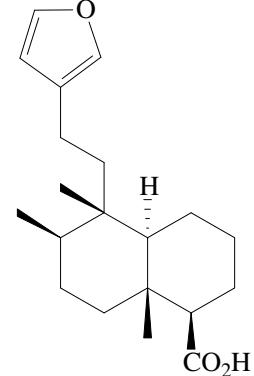
 <p>16α-Metoxi-ent-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>CHEN et al., 2000</p>
 <p>16α-Hidro-ent-cauran-17,19-dicarbometoxi</p>	<p><i>Annona glabra</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>CHEN et al., 2000</p>
 <p>16β-Hidroxi-17,19-diacetoxi-ent-caurano (Annocherin A)</p>	<p><i>Annona cherimola</i></p>	<p>Ramos</p>	<p>CHEN et al., 1998</p>

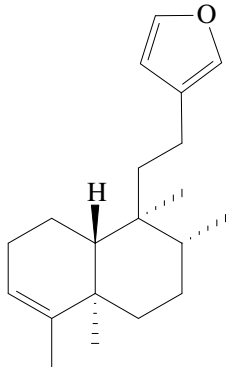
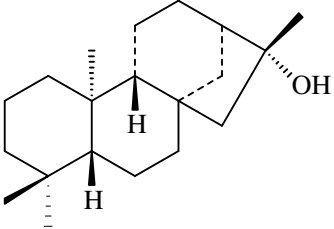
 <p>Ácido 16α-hidro-17-acetoxi-<i>ent</i>-cauran-19-óico</p>	<p><i>Annona cherimola</i> <i>Annona cherimola</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos Ramos Fruto</p>	<p>CHEN et al., 1998 CHEN et al., 1997 WU et al., 1996</p>
 <p>16β-Hidroxi-17-acetoxi-<i>ent</i>-cauran-19-al</p>	<p><i>Annona cherimola</i> <i>Annona squamosa</i></p>	<p>Ramos Fruto</p>	<p>CHEN et al., 1997 WU et al., 1996</p>
 <p><i>ent</i>-Caurano-16β,17,19-triol</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>WU et al., 1996</p>

 <p><i>ent</i>-Caur-16-en-19-ol</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>WU et al., 1996</p>
 <p>Ácido 19-formil-<i>ent</i>-cauran-17-óico</p>	<p><i>Annona squamosa</i></p>	<p>Fruto</p>	<p>WU et al., 1996</p>
 <p><i>ent</i>-3β-Hidroxicaur-16-eno</p>	<p><i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Casca</p>	<p>TAKEDA et al., 1996</p>

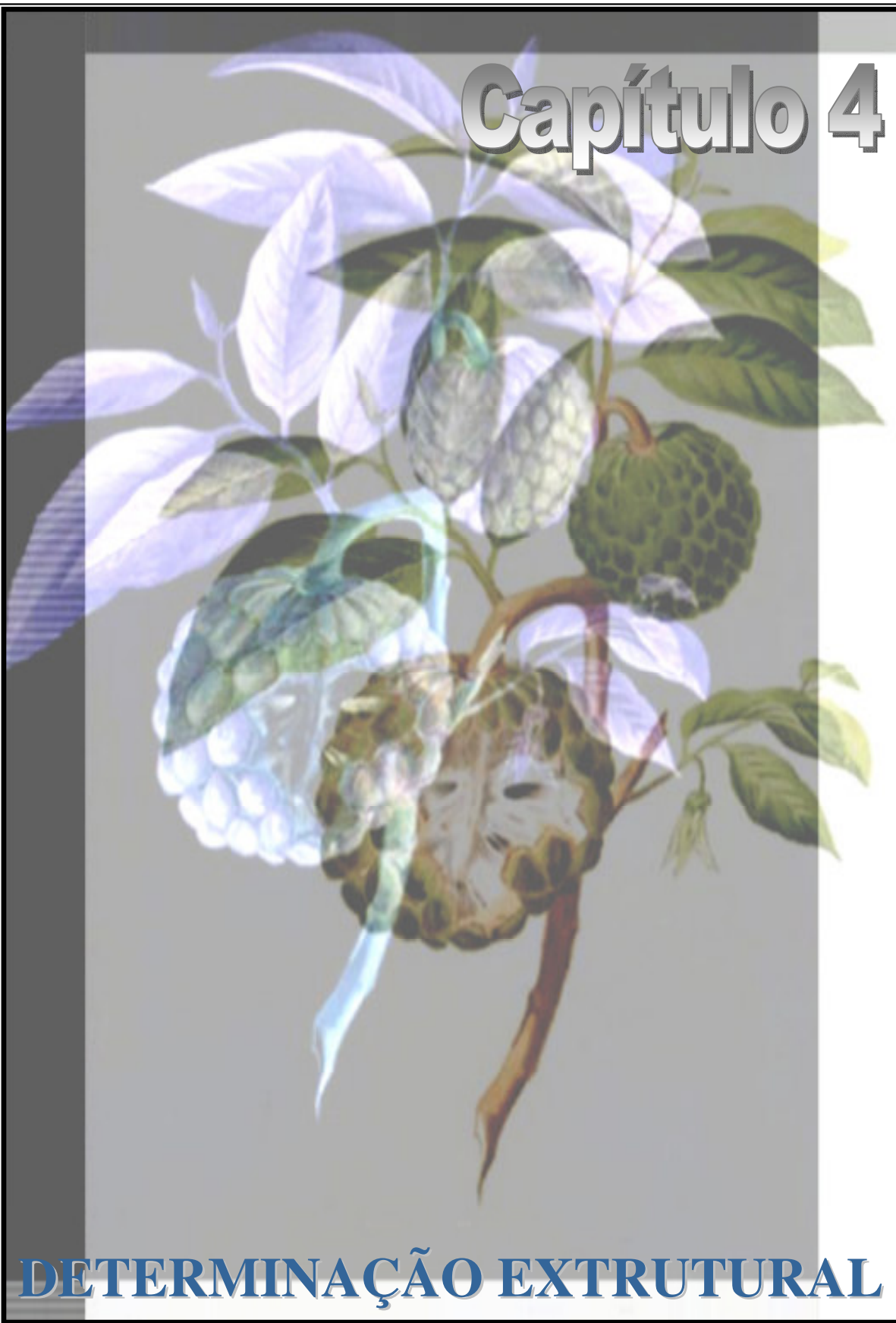
 <p>Ácido <i>ent</i>-16,17-diacetoxicauran-19-óico</p>	<p><i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Casca</p>	<p>TAKEDA et al., 1996</p>
 <p>Ácido <i>ent</i>-19-carbomethoxicauran-17-óico</p>	<p><i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Casca</p>	<p>TAKEDA et al., 1996</p>
 <p>16α-hidro-17-hidroxy-<i>ent</i>-kauran-19-carbometoxi</p>	<p><i>Annona reticulate</i> <i>Annona reticulata</i></p>	<p>Casca Casca</p>	<p>HASAN et al., 1989 ETSE et al., 1987</p>

 <p>16β,17-Diidroxi-<i>ent</i>-cauran-19-carbometoxi</p>	<p><i>Annona reticulata</i></p>	<p>Casca</p>	<p>ETSE et al., 1987</p>
 <p>17-Hidroxi-16β-<i>ent</i>-kauran-19-carmometoxi</p>	<p><i>Annona reticulata</i></p>	<p>Casca</p>	<p>ETSE et al., 1987</p>

 <p>4H-3,10b-Etano-1H,3H-benzo[h]furo[4,3,2-de]-2-benzopirran-4-ona, 3a,5a,7,8,9,10,10a,10c-octahidro-3-hidroxi-8-(hidroxiacetil)-3a,8-dimetil-, [3S-(3α,3aβ,5aβ,8α,10α,10bα,10cβ)] (Annonalide)</p>	<p><i>Annona coriacea</i></p>	<p>Bulbo</p>	<p>MUSSINI et al., 1973</p>
 <p>Ácido 1-Naftalenocarboxílico, 5-[2-(3-furanil)etil]decahidro-5,6,8a-trimetil- [1R-(1α,4aβ,5β,6α,8aα)]- (9CI)</p>	<p><i>Annona coriacea</i></p>	<p>Bulbo</p>	<p>FERRARI et al., 1971</p>

 <p>Furan, 3-[2-(1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil)etil]- [1S-(1α,2β,4aβ,8$\alpha\alpha$)]-(9CI)</p>	<p><i>Annona coriacea</i></p>	<p>Bulbo</p>	<p>FERRARI et al., 1971</p>
 <p><i>ent</i>-Kauran-16α-ol</p>	<p><i>Annona senegalensis</i></p>	<p>Casca</p>	<p>ESHIET et al., 1971</p>

Capítulo 4



DETERMINAÇÃO EXTRUTURAL

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1 Determinação da Composição de Ácidos Graxos no Óleo Fixo de EHLC

O extrato hexânico do lenho do caule de *Annona squamosa* (EHLC) foi submetido à saponificação para obtenção dos ácidos graxos livres, seguindo técnica usual (Item 6.5, Pág. 112) conforme fluxograma 5, página 114. Os ácidos graxos resultantes do processo de saponificação, foram metilados obtendo-se seus respectivos ésteres metílicos. Coluna cromatográfica de sílica gel (Tab. 28, Pág. 113) foi utilizada na purificação dos ésteres metílicos, obtendo-se um óleo amarelo denominado OEHLIC. Em seguida, o OEHLIC foi analisado por Cromatografia Gás-Líquido acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM), fornecendo o cromatograma visto na figura 11 da página 37 e os espectros de massa observados nas figuras 12-19, páginas 37-39.

Análise comparativa dos espectros de massa correspondentes aos picos observados no cromatograma (Fig. 11, Pág. 37), com os espectros de massa contidos em bancos de dados, permitiu a identificação de oito ácidos graxos livres do óleo fixo de OEHLIC através de seus ésteres metílicos, conforme tabela 2.

Tabela 2: Ácidos graxos livres identificados no óleo fixo do lenho do caule de *A. squamosa*

Substância	T.R. (min)	Teor (%)	P.M.	F.M.
Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)	20,6	2,0	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido pentadecanóico	22,5	2,9	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	24,0	28,8	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido heptadecanóico	25,3	2,0	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Ácido 9,12-octadecadienóico	26,1	7,3	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Ácido 9-octadecenóico (Ácido oléico)	26,2	13,4	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ácido octadecanóico (Ácido esteárico)	26,5	0,98	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido 9,11-octadecadienóico	27,1	4,34	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂

T.R. – Tempo de Retenção; P.M. – Peso Molecular; F.M. – Fórmula Molecular

Figura 11: Cromatograma de OEHL

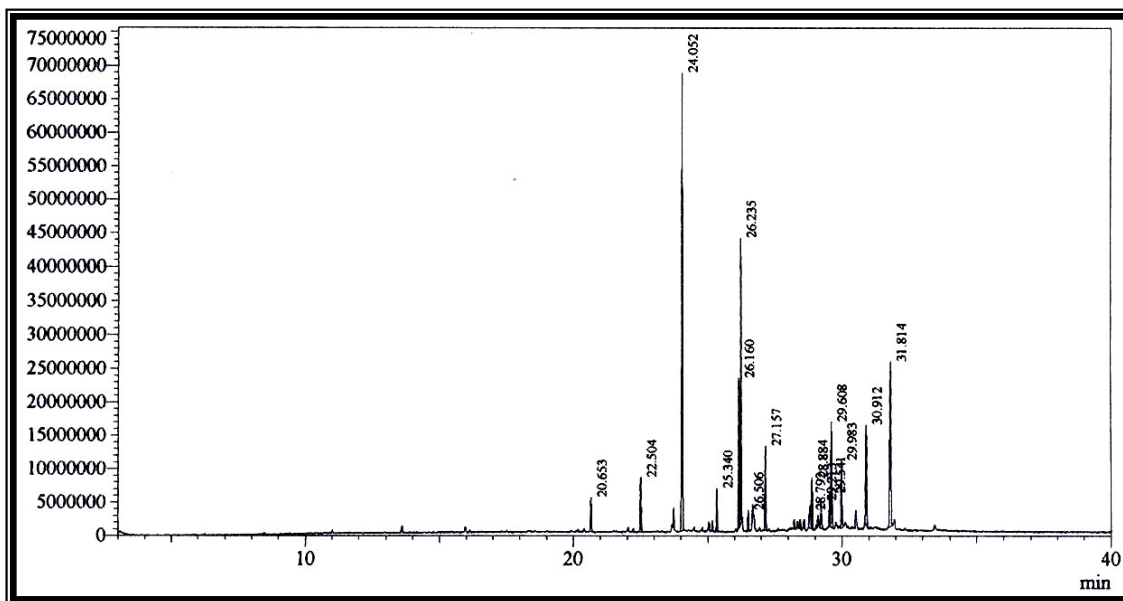


Figura 12: Espectro de massa do éster metílico do ácido tetradecanóico

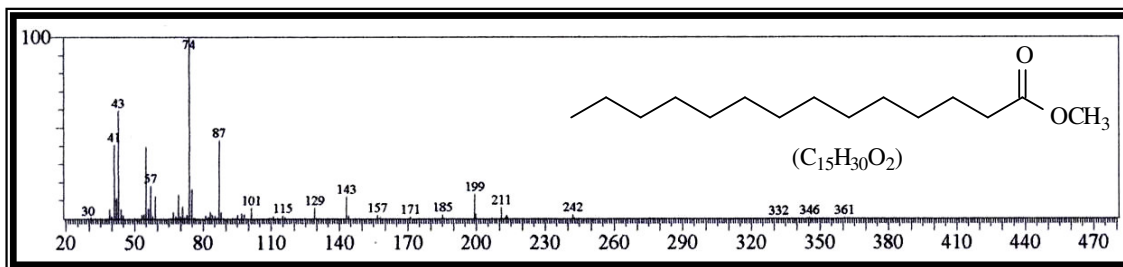


Figura 13: Espectro de massa do éster metílico do ácido pentadecanóico

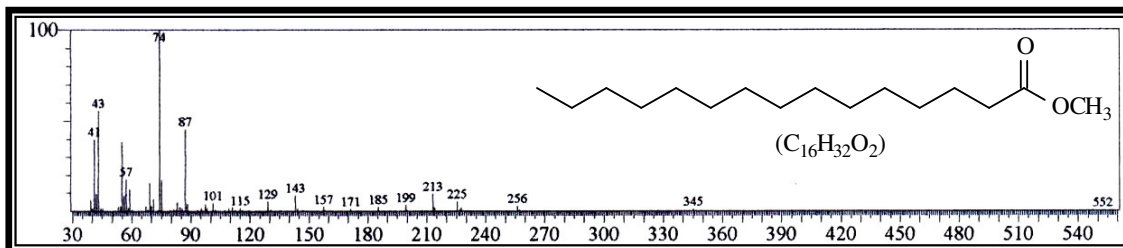


Figura 14: Espectro de massa do éster metílico do ácido hexadecanóico

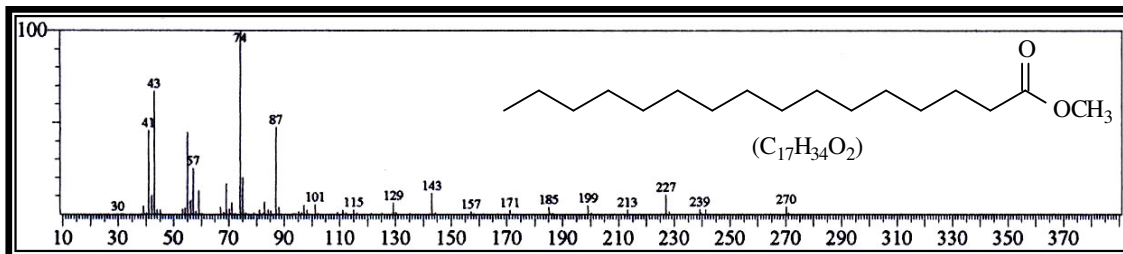


Figura 15: Espectro de massa do éster metílico do ácido heptadecanóico

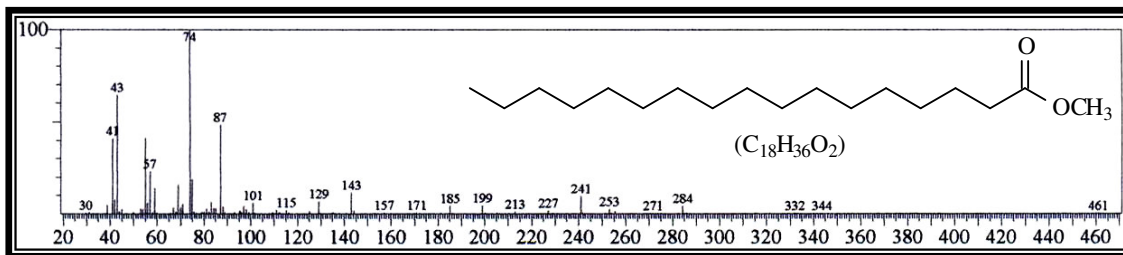


Figura 16: Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico

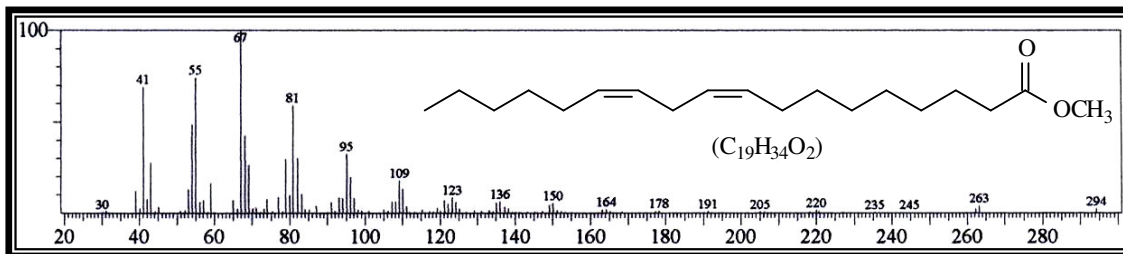


Figura 17: Espectro de massa do éster metílico do ácido 9-octadecenóico

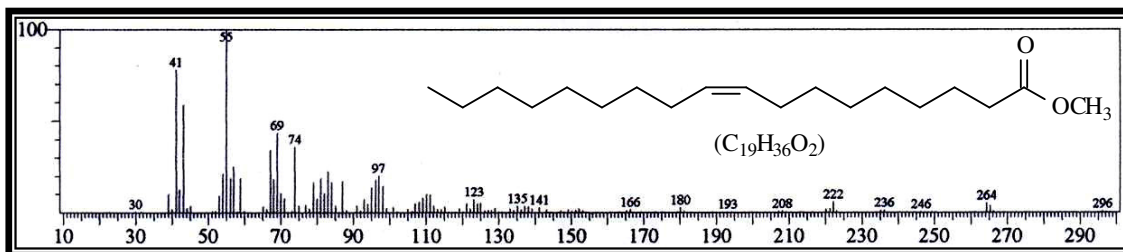


Figura 18: Espectro de massa do éster metílico do ácido octadecanóico

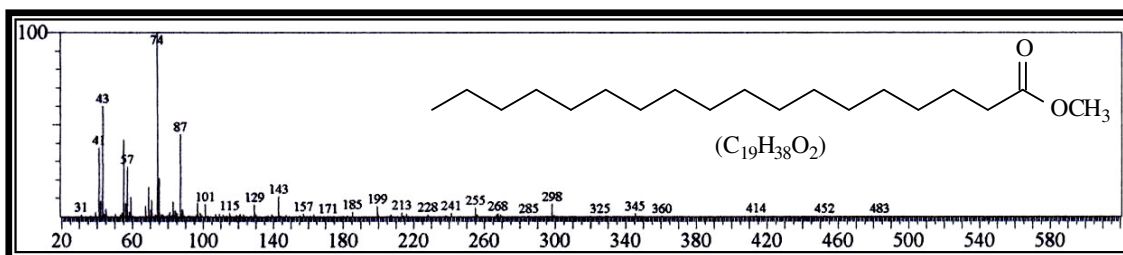
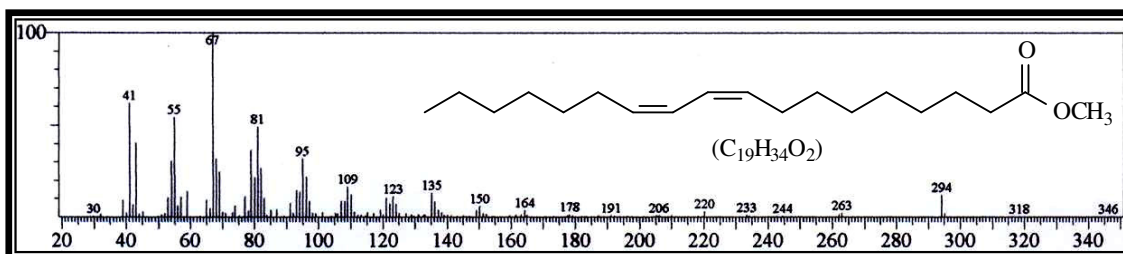


Figura 19: Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,11-octadecadienóico



4.2 Determinação estrutural de RC-1

Tratamentos cromatográficos sucessivos em gel de sílica dos extratos EELC e EHCC produziu RC-1, um sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão 176-177 °C.

O espectro na região do infravermelho de RC-1 (Fig. 23, Pág. 43) mostrou absorções indicativas de ácido carboxílico ($\nu_{C=O}$ 1690 cm^{-1} , ν_{C-O} 1259 cm^{-1}) e ligação dupla carbono-carbono ($\nu_{C=C}$ 1656 cm^{-1}), além de uma forte e característica absorção compreendida entre 3100 e 2600 cm^{-1} resultante de superposição das absorções de grupo hidroxila (ν_{O-H}) de ácido carboxílico e de grupos metil, metileno e metino (ν_{C-H}) de parte alcânica.

A fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$ de RC-1 foi deduzida a partir de seu espectro de massa (M^+ 302) (Fig. 22, Pág. 43) em combinação com os espectros de RMN 1H (Figs. 24 e 25, Pág. 44), RMN ^{13}C – BB (Fig. 26, Pág. 45) e RMN ^{13}C – DEPT 135 (Fig. 27, Pág. 45). A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135 permitiu identificar sinais correspondentes a átomos de dois carbonos metílicos, dez metilênicos, três metínicos e cinco de carbonos não hidrogenados (Tab. 3, Pág. 41) que, em adição à fórmula molecular, indicaram tratar-se de um metabólito de natureza diterpênica do tipo caurano. Dos carbonos metilênicos, um é olefínico (δ_C 103,21) e dos carbonos não hidrogenados, um olefínico (δ_C 156,12) e outro carbonílico de ácido carboxílico (δ_C 184,60). Desta forma foram propostas três estruturas (Fig 21, Pág. 42) com as prováveis variações de posição para o grupo carboxila.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios (δ_H) e dos carbonos (δ_C) hidrogenados foi dada através da análise do espectro 1H – ^{13}C HMQC (correlação spin-spin de hidrogênio e carbono através de uma ($^1J_{CH}$) ligação) (Fig. 30, Pág. 47), enquanto a atribuição dos carbonos quaternários, como também, a confirmação dos hidrogênios dos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos, foi dada pelo espectro 1H – ^{13}C – HMBC (correlação spin-spin de hidrogênio e carbono através de duas ($^2J_{CH}$) e três ($^3J_{CH}$) ligações) (Figs. 31 e 32, Págs. 48 e 49), conforme tabela 4, página 42.

O espectro de RMN 1H mostrou, como destaque, sinais para dois grupos metila terciários em δ_H 1,25 (s, 3H) e 0,96 (s, 3H) e sinais em δ_H 4,80 (s, 1H) e 4,74 (s, 1H) que foram atribuídos inequivocadamente a dois hidrogênios de uma ligação olefínica exocíclica

através de suas interações com o sinal em δ_C 103,2 no espectro $^1H - ^{13}C - HMQC$, onde foram observados também, os acoplamentos entre os hidrogênios metínicos em δ_H 1,25 e 0,96 com os carbonos em δ_C 29,2 e 15,8, respectivamente.

No espectro $^1H - ^{13}C - HMBC$ foram observadas fortes correlações entre esses hidrogênios (δ_H 4,80 e 4,74) e o carbono olefínico não hidrogenado em δ_C 156,12, estando em acordo com a ligação dupla exocíclica. Foi possível observar também o acoplamento $^3J_{CH}$ dos hidrogênios de um dos grupos metila (δ_H 1,25) com o carbono carboxílico (δ_C 184,60) e com um carbono metínico (δ_C 57,8), indicando que a carbonila encontra-se ligada ao carbono 4 e, portanto, com o grupo carboxila em C-19 ou C-18. O acoplamento dos hidrogênios em δ_H 1,01 e 2,15 com o carbono em δ_C 57,8 e dos hidrogênios metílicos em δ_H 1,25 com o carbono em δ_C 38,0 indica que o carbono em δ_C 57,8 trata-se do carbono metínico C-5.

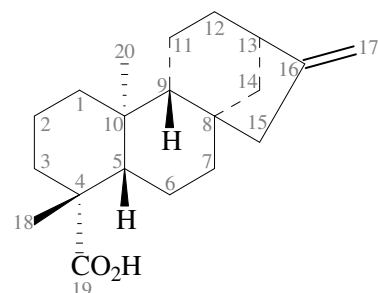
No espectro $^1H - ^1H$ COSY (Figs. 28 e 29, Pág. 46) pode-se destacar a correlação dos hidrogênios 2H-15 (δ_H 2,05 e 2,06) com os hidrogênios vinílicos 2H-17 (δ_H 4,80 e 4,74).

Todas as argumentações, como também, a comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de substâncias do gênero (Fig. 21, Pág 42) registrados na literatura [MONTE, 1988; OHNO, 1979; HANSON et al, 1979], permitiram identificar RC-1 como sendo o Ácido Caurenóico (Fig. 20), um *ent*-caurano já isolado a partir de *A. squamosa* e de algumas outras espécies botânicas.

Tabela 3: Dados de RMN $^{13}C - BB$ e DEPT de RC-1 (125 MHz, $CDCl_3$)

C	CH	CH ₂	CH ₃
184,6	57,8	103,2	29,2
156,1	55,3	49,2	15,8
44,4	44,0	41,5	–
43,9	–	40,9	–
39,8	–	39,9	–
–	–	38,0	–
–	–	33,3	–
–	–	22,0	–
–	–	19,3	–
–	–	18,6	–
C ₅	C ₃ H ₃	C ₁₀ H ₂₀	C ₂ H ₆
Total C₂₀H₃₀			

Figura 20: Estrutura de RC-1



Ácido *ent*-caur-16-en-19-óico
(Ácido Caurenóico)

Figura 21: Estruturas citadas na literatura [MONTE et al., 1988; OHNO et al., 1979; HANSON et al., 1979] utilizadas na comparação dos dados de RMN ^{13}C de RC-1

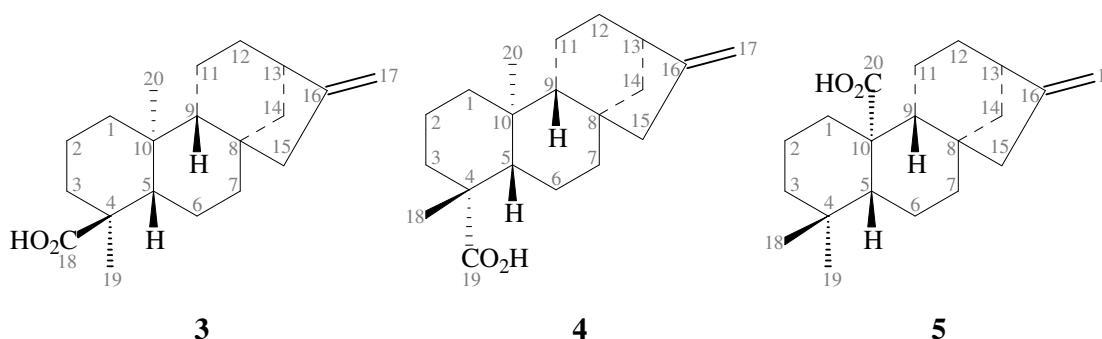


Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de RC-1 e RMN ^{13}C (CDCl_3) de **3** [MONTE et al., 1988], **4** [OHNO et al., 1979] e **5** [HANSON et al., 1979]

C(n°)	RC-1		RC-1		3	4	5
	HMQC		HMBC				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$			
1	40,9	1,88; 0,82			39,9	40,8	41,3
2	19,3	1,90; 1,43			18,0	19,2	18,7
3	38,0	2,15; 1,01			37,0	37,8	42,2
4	43,9	–	H-5; 3H-18	2H-2	47,6	43,9	33,3
5	57,8	1,07	2H-6	3H-20; 3H-18	50,0	57,2	54,6
6	22,0	1,85; 1,81			23,3	21,9	20,3
7	41,5	1,52; 1,42			40,7	41,4	40,5
8	44,4	–	2H-7; 2H-15	H-13	44,4	44,3	44,3
9	55,3	1,06	2H-11	H-5; 3H-20	56,2	55,3	56,1
10	39,8	–	H-5; 3H-20	2H-2; 2H-11	39,8	39,8	39,4
11	18,6	1,60; 1,55	H-9; H-12	H-13	18,0	18,5	18,2
12	33,3	1,62; 1,48			33,3	33,2	33,3
13	44,0	2,64	2H-12; 2H-14	2H-17	44,0	43,9	44,1
14	39,9	1,98; 1,13			39,5	39,8	39,9
15	49,2	2,05			49,1	49,1	49,3
16	156,1	–	H-15; 2H-17	2H-12	155,3	155,9	156,1
17	103,2	4,80; 4,74			103,2	103,1	102,8
18	29,2	1,25			185,0	29,0	33,7
19	184,6	–		3H-18	17,8	185,1	21,7
20	15,8	0,96		H-9	16,1	16,6	17,6

Figura 22: Espectro de massa (I.E. 70 eV) de RC-1

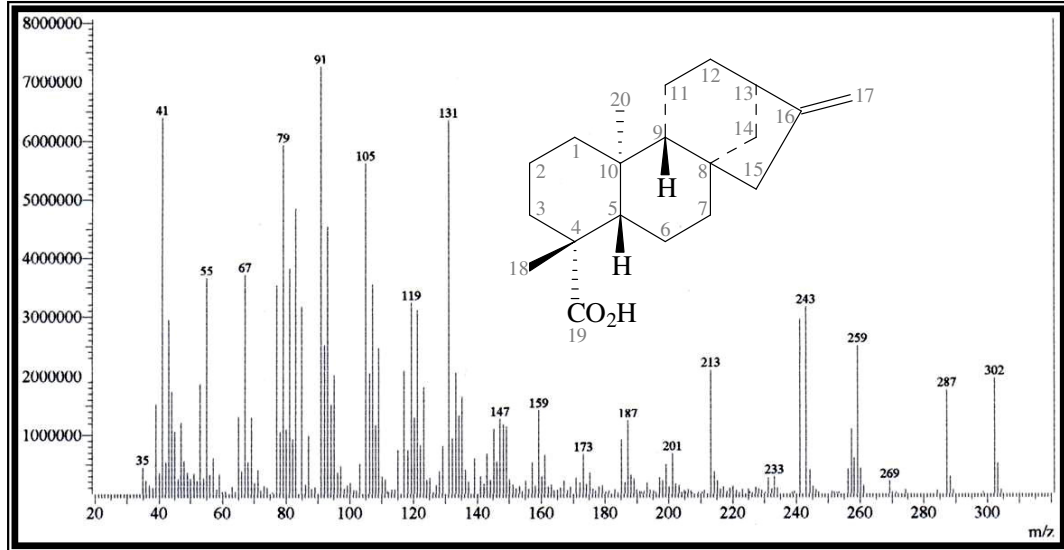


Figura 23: Espectro de absorção na região do IV (cm⁻¹, KBr) de RC-1

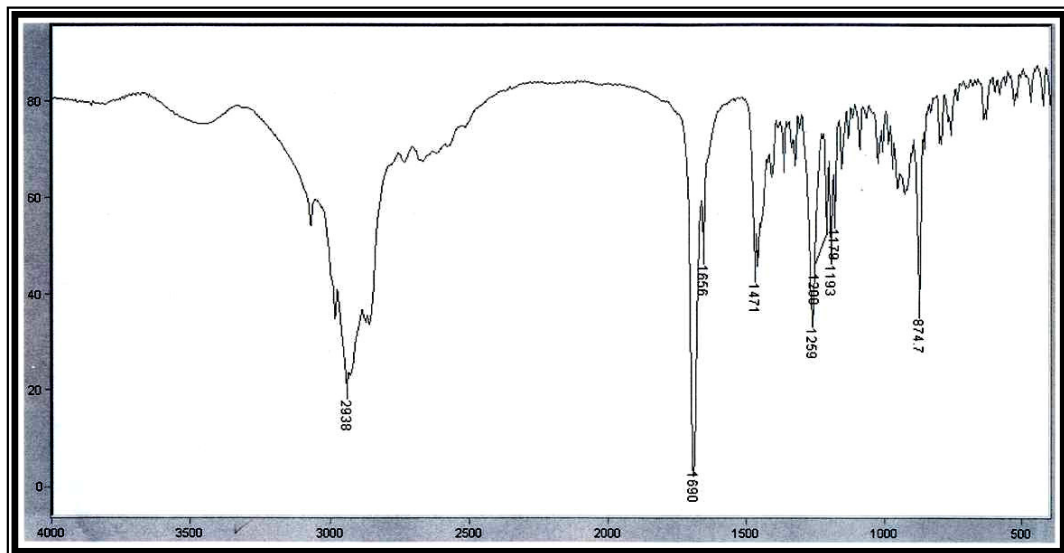


Figura 24: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de RC-1

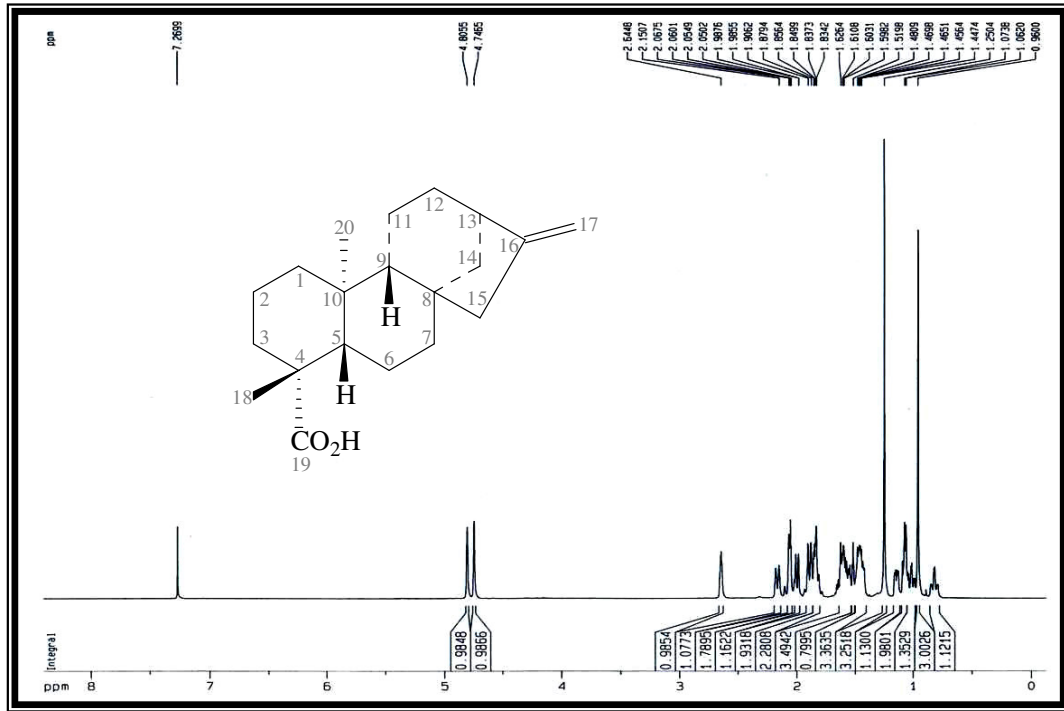


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de RC-1

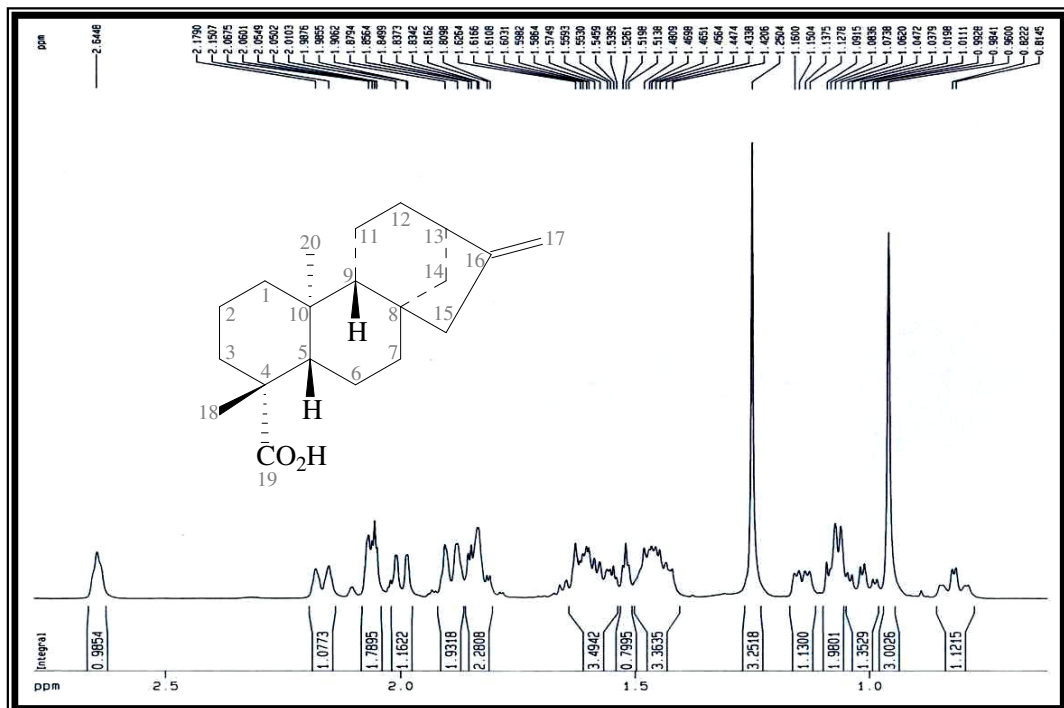


Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de RC-1

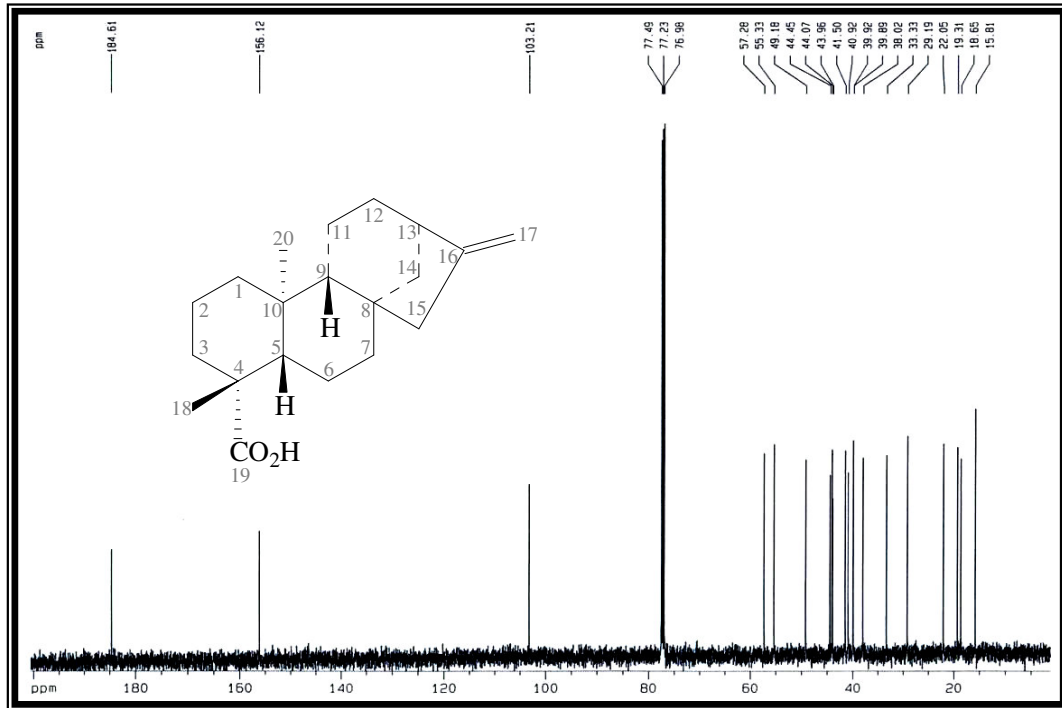


Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, CDCl_3) de RC-1

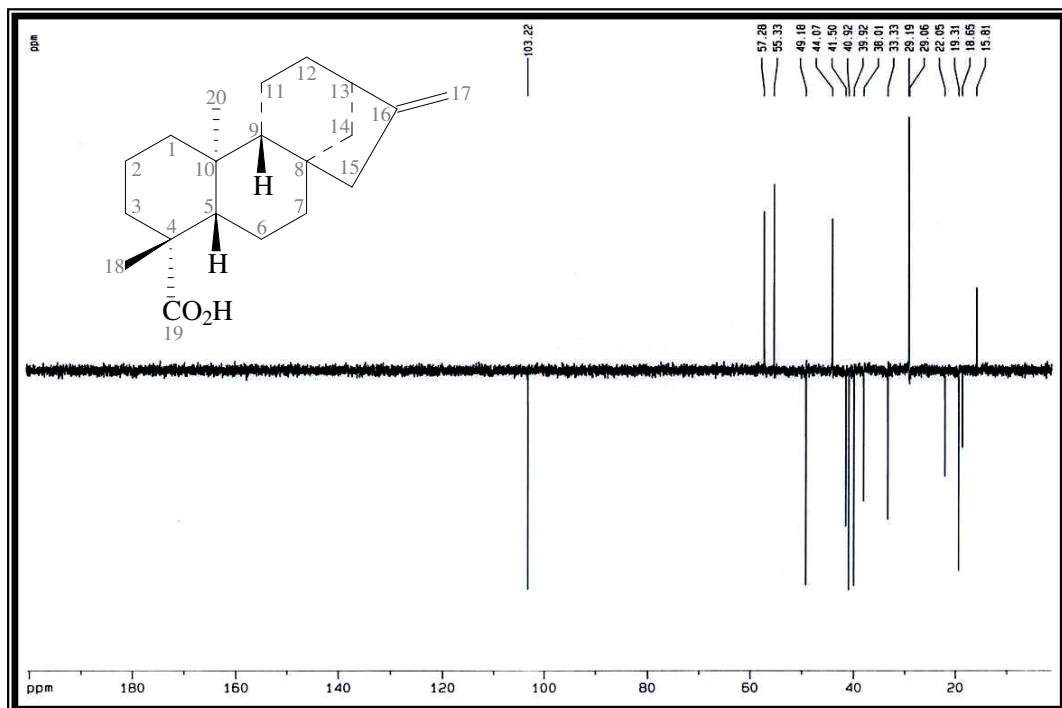


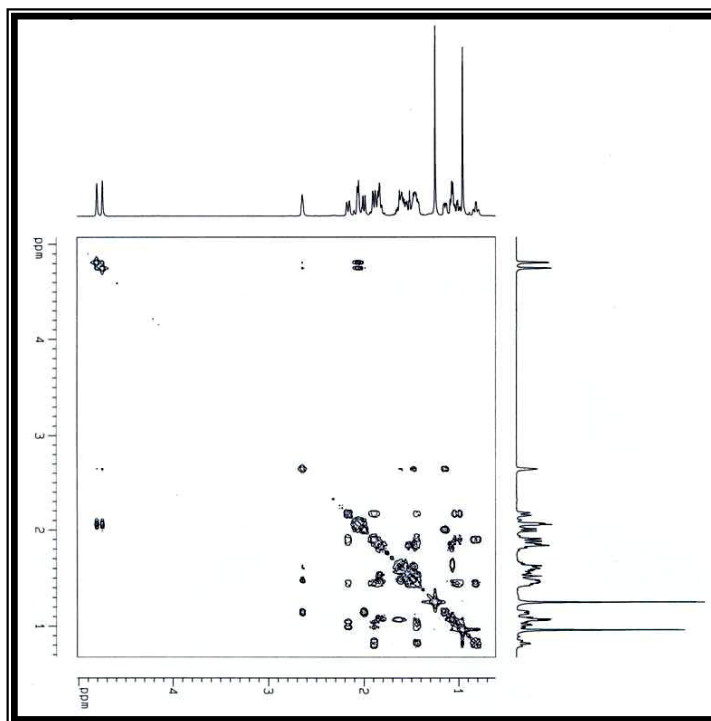
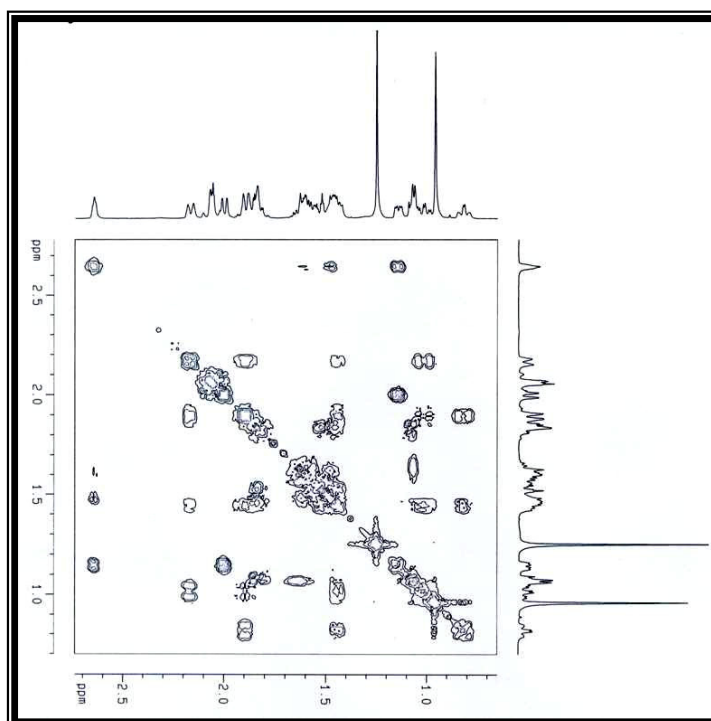
Figura 28: Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$) de RC-1**Figura 29:** Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$) de RC-1

Figura 30: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1J_{\text{CH}}$) de RC-1

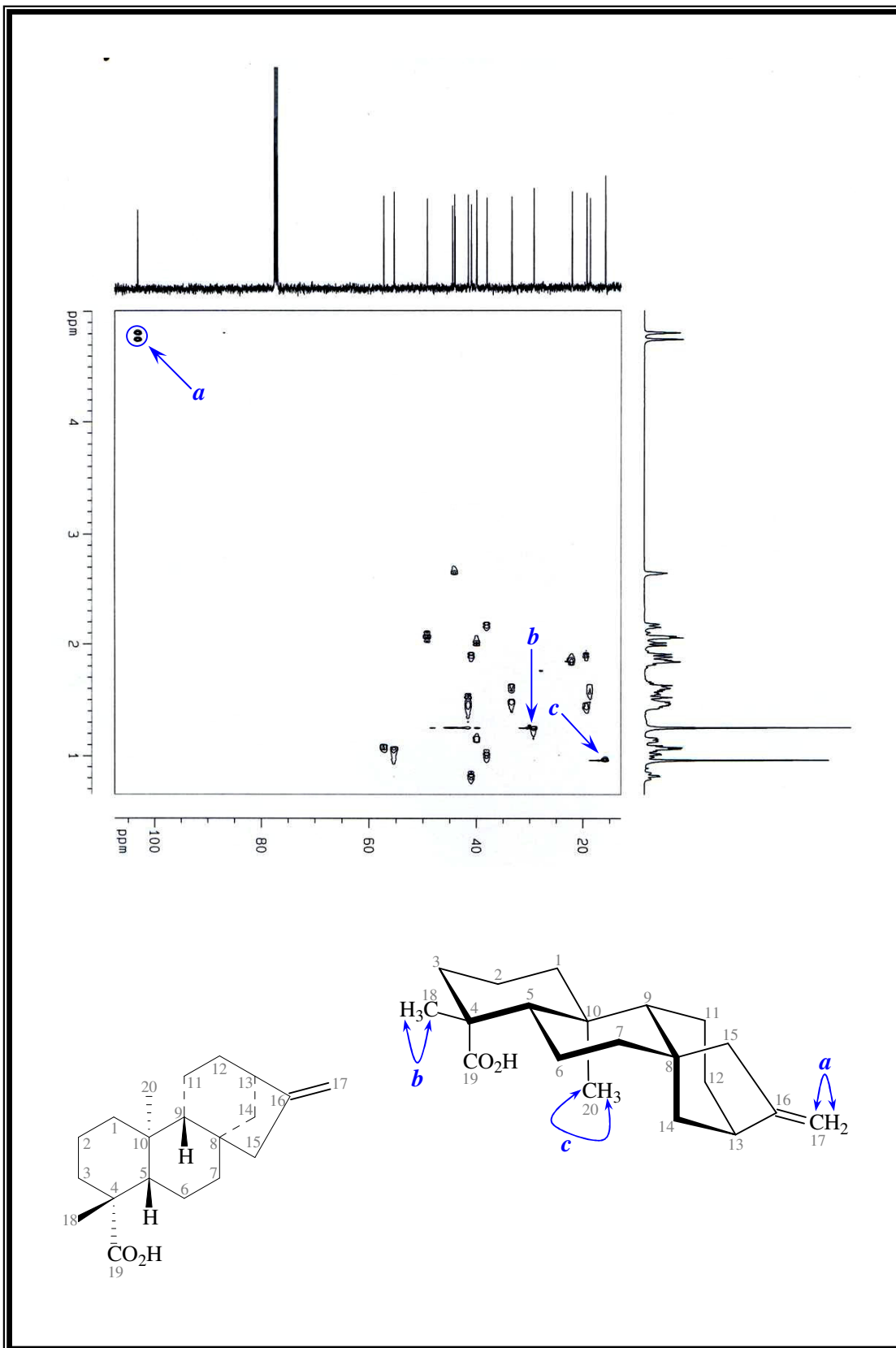


Figura 31: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de RC-1

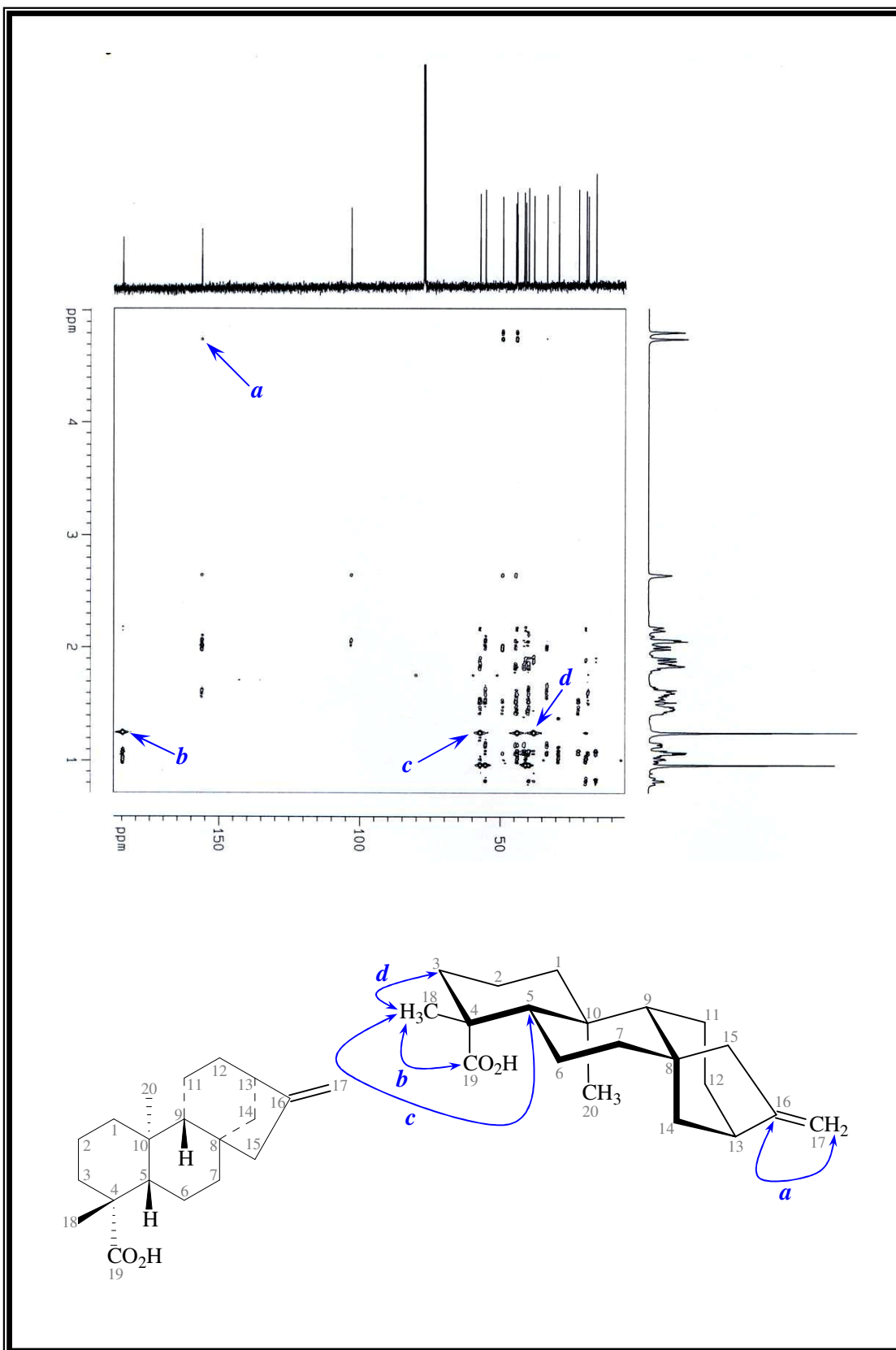
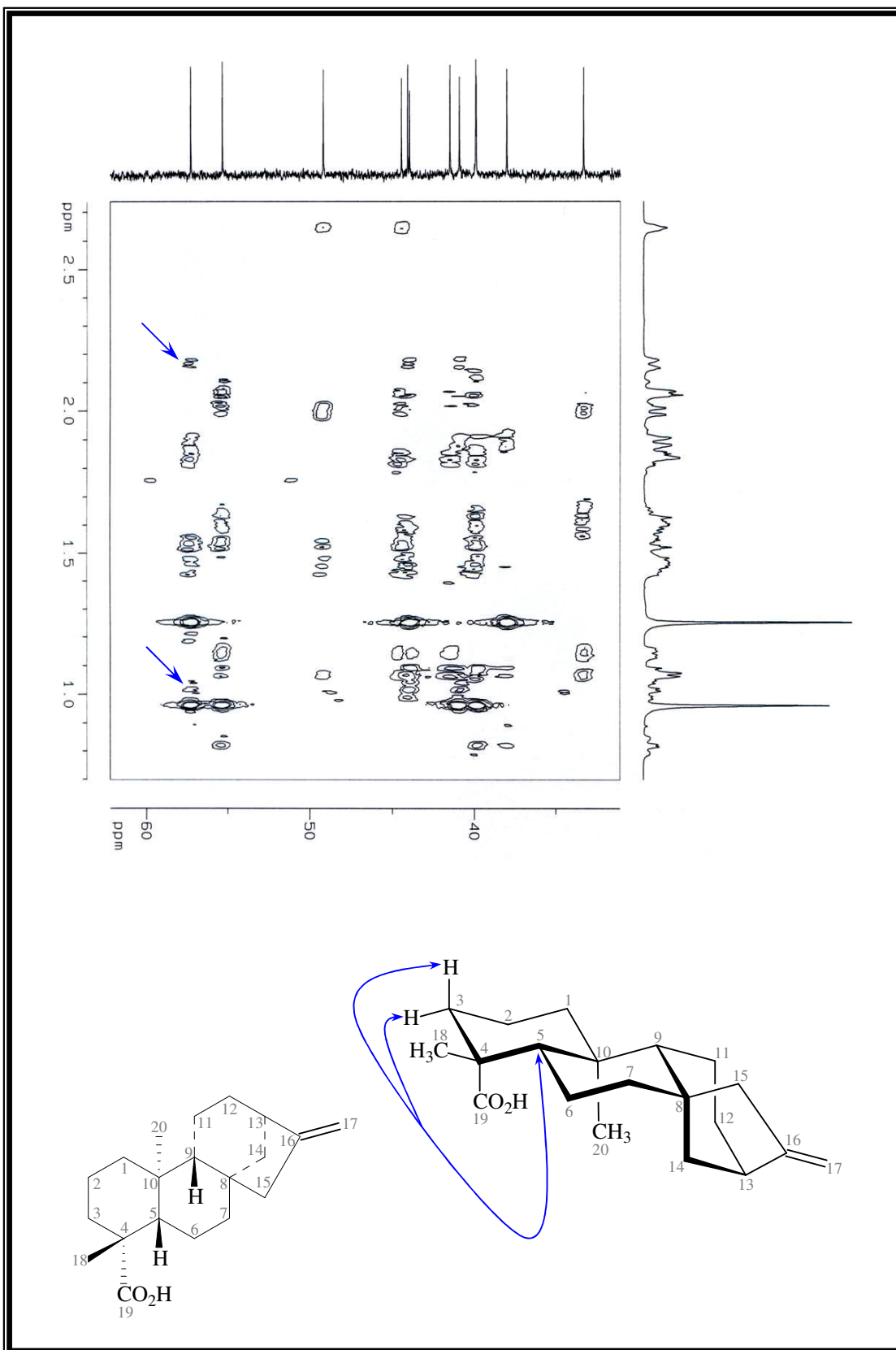


Figura 32: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de RC-1



4.3 Determinação estrutural de RC-2

Tratamentos cromatográficos em gel de sílica a partir do extrato hexânico da casca do caule de *A. squamosa* (EHCC) produziu RC-2, isolado como um sólido cristalino branco, solúvel em piridina e faixa de fusão 297-300 °C.

O espectro na região do infravermelho (Fig. 36, Pág. 53) de RC-2 apresentou absorções em 1693 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), 1239 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) e banda compreendida entre 3100 e 2600 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$ e $\nu_{\text{C-H}}$) referentes a presença de ácido carboxílico (semelhante a RC-1), além de banda forte e larga em 3400 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$) referente a presença de grupos hidroxila de álcool. Assim, o espectro no IV apresenta para RC-2, a presença de grupo OH de álcool e a ausência de função alceno, em relação a RC-1.

Em acordo com esta última observação, o espectro de RMN ^1H (Figs. 37 e 38, Pág. 54) de RC-2 não exibiu os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos nem o sinal referente ao hidrogênio alílico observados no espectro de RC-1. O espectro mostrou sinais para dois grupos metila terciários (δ_{H} 1,30 e 1,24) e como destaque, sinais em δ_{H} 3,87 (1H, d, 10,7) e 3,79 (1H, d, 10,7) acoplados mutuamente em concordância com o espectro $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (Figs. 43 e 44, Pág. 57).

O espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{BB}$ de RC-2 (Figs. 39 e 40, Pág. 55) apresentou dois sinais (δ_{C} 80,20 e δ_{C} 70,91) para carbonos alifáticos oxigenados, C e CH_2 , respectivamente, conforme comparação com o espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{DEPT}$ (Figs 41 e 42, Pág 56) (5, página 51).

Por sua vez, o espectro HSQC (Fig. 45, Pág. 58) correlacionou o sinal do carbono em δ_{C} 70,91 com os sinais em δ_{H} 3,87 (d, 10,7) e 3,79 (d, 10,7), definindo um sistema AB de hidrogênios metilênicos diastereotópicos.

No espectro HMBC (Figs. 46-50, Págs. 59-63) observou-se interação desses hidrogênios metilênicos com o carbono oxigenado não hidrogenado em δ_{C} 80,20. Todas essas observações foram justificadas admitindo-se a localização de duas hidroxilas nos carbonos C-16 e C-17, ou seja, um sistema diol vicinal, já encontrado em diterpenos cauranos isolados de *Annona*, entre outros. Vale destacar, a evidente correlação no espectro HMBC entre o sinal dos hidrogênios de um dos grupos metila (δ_{H} 1,30) e o sinal do carbono carboxílico (δ_{C} 180,60) exigindo o posicionamento destes grupos no carbono C-4 (como em RC-1).

Finalmente, os dados obtidos dos espectros uni- (1D: RMN ^1H , RMN ^{13}C BB e RMN ^{13}C DEPT) e bidimensionais (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC) e, principalmente, a comparação com valores de δ_{H} (Tab. 6) e δ_{C} (Tab. 7, Pág. 52) de substâncias descritas na literatura [YANG et al., 2002; WU et al., 1996], permitiram identificar RC-2, como o diterpeno Ácido 16 β , 17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico (Fig. 33), já isolado de *A. squamosa* e de algumas outras espécies.

O espectro de massa (Fig. 35, Pág. 53) de RC-2 não exibiu o pico do íon molecular em m/z 336. Isto foi interpretado admitindo-se que ocorreu uma fragmentação do tipo α,β com perda de 31 u.m.a. ($^{\bullet}\text{CH}_2\text{-OH}$) originando um intenso pico em m/z 305.

A estereoquímica do carbono C-16 foi estabelecida tendo em vista os valores de deslocamentos químicos do carbono C-17 para os isômeros **6** e **7** (Fig. 34, Pág. 52) [YANG et al., 2002; WU et al., 1996]. Em **7**, o carbono C-17 sofre proteção (efeito γ) e absorve em torno de δ_{C} 66,00. Em **6**, em torno de δ_{C} 70,00. O deslocamento químico em δ_{C} 70,76 do carbono C-17 de RC-2, indica uma configuração como em **6**.

Tabela 5: Dados de RMN ^{13}C – BB e DEPT de RC-2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

C	CH	CH ₂	CH ₃
180,60	57,5	70,91	29,01
44,41	42,0	53,84	16,41
40,48	57,1	42,94	–
80,20	–	41,60	–
44,23	–	39,05	–
–	–	38,99	–
–	–	28,02	–
–	–	22,93	–
–	–	20,30	–
–	–	19,83	–
C ₅	C ₃ H ₃	C ₁₀ H ₂₀	C ₂ H ₆
Total C₂₀H₃₀			

Figura 33: Estrutura de RC-2

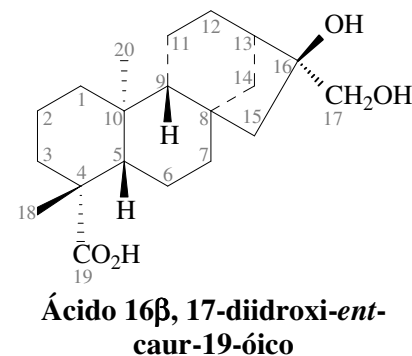


Tabela 6: Dados de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2, **6** e **7** [YANG et al., 2002]

6	7	RC-2
δ_{H} (J / Hz)	δ_{H} (J / Hz)	δ_{H} (J / Hz)
3,78; d (11.2)	4,07; d (11.2)	3,78; d
3,86; d (11.2)	4,17; d (11.2)	3,86; d

Figura 34: Estruturas citadas na literatura [YANG et al., 2002; WU et al., 1996] utilizadas na comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C de RC-2

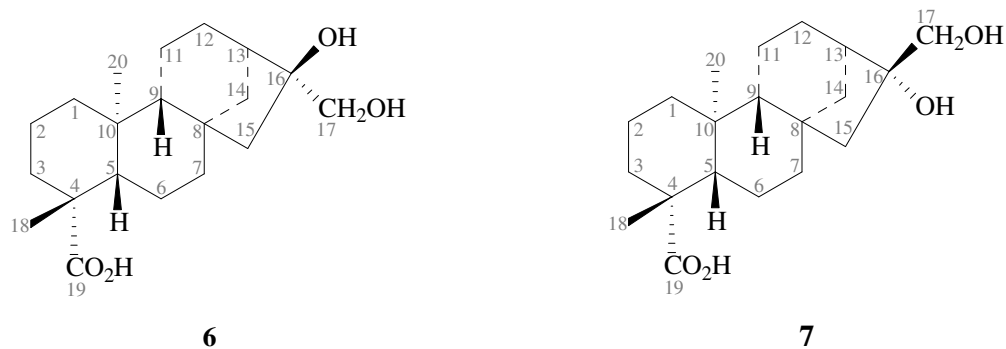


Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2 e RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **6** e **7** [WU et al., 1996]

C (n°)	RC-2		RC-2		6	7
	HMQC		HMBC			
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{C}
1	41,60	1,94; 0,87		3H-20	41,2	41,1
2	20,30	2,28; 1,51			19,9	19,8
3	39,05	2,48; 1,10		3H-18	38,8	38,7
4	44,41	–	H-5; 3H-18		44,0	43,9
5	57,52	1,10		3H-18; 3H-20	57,1	57,0
6	22,93	2,20; 2,05			22,5	23,0
7	42,94	2,45; 1,40		H-15a	42,6	42,8
8	44,23	–			43,9	45,0
9	57,15	1,22	H-11	2H-15; 3H-20	56,8	56,3
10	40,48	–	H-11a; 3H-20		40,1	40,1
11	19,83	2,50; 1,68	H-9		19,5	19,0
12	28,02	2,19; 1,52		H-9	27,6	26,8
13	42,11	1,51		2H-17	41,7	45,9
14	38,99	2,08; 1,20			38,6	37,8
15	53,84	1,73; 1,68		2H-17	53,5	53,9
16	80,20	–	2H-15; 2H-17		79,8	81,7
17	70,91	3,87; 3,79		2H-15	70,5	66,5
18	29,01	1,30			29,4	29,3
19	180,60	–		H-5; 3H-18	180,2	180,1
20	16,41	1,24		H-9	16,0	16,0

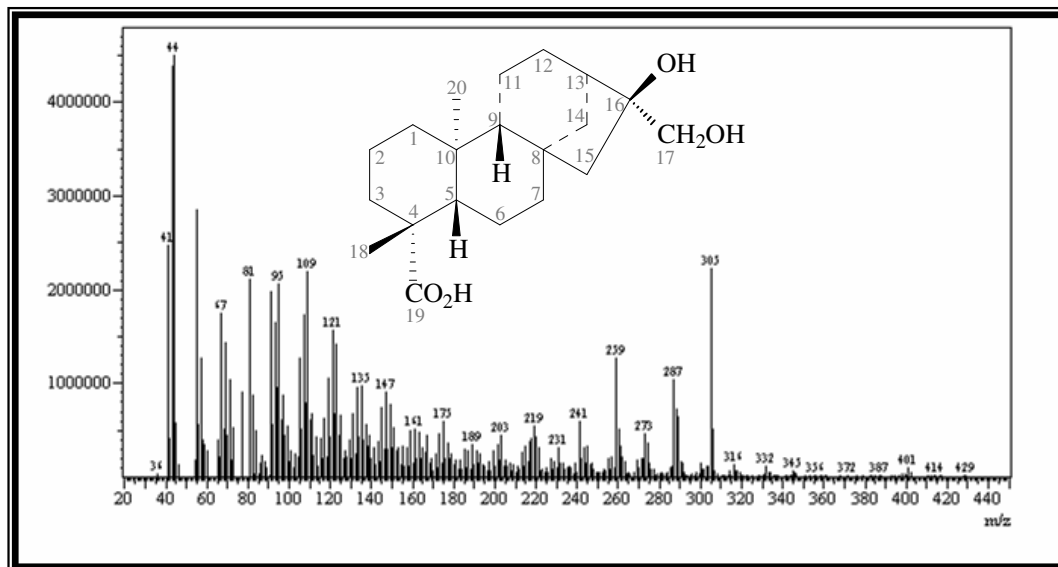
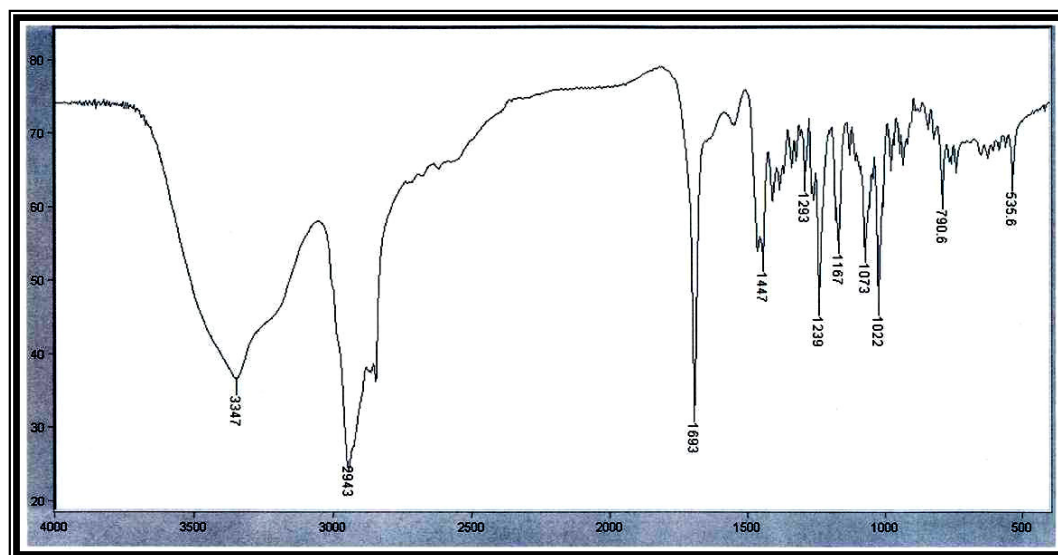
Figura 35: Espectro de massa (I.E. 70 eV) de RC-2**Figura 36:** Espectro de absorção na região do IV (cm⁻¹, KBr) de RC-2

Figura 39: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2

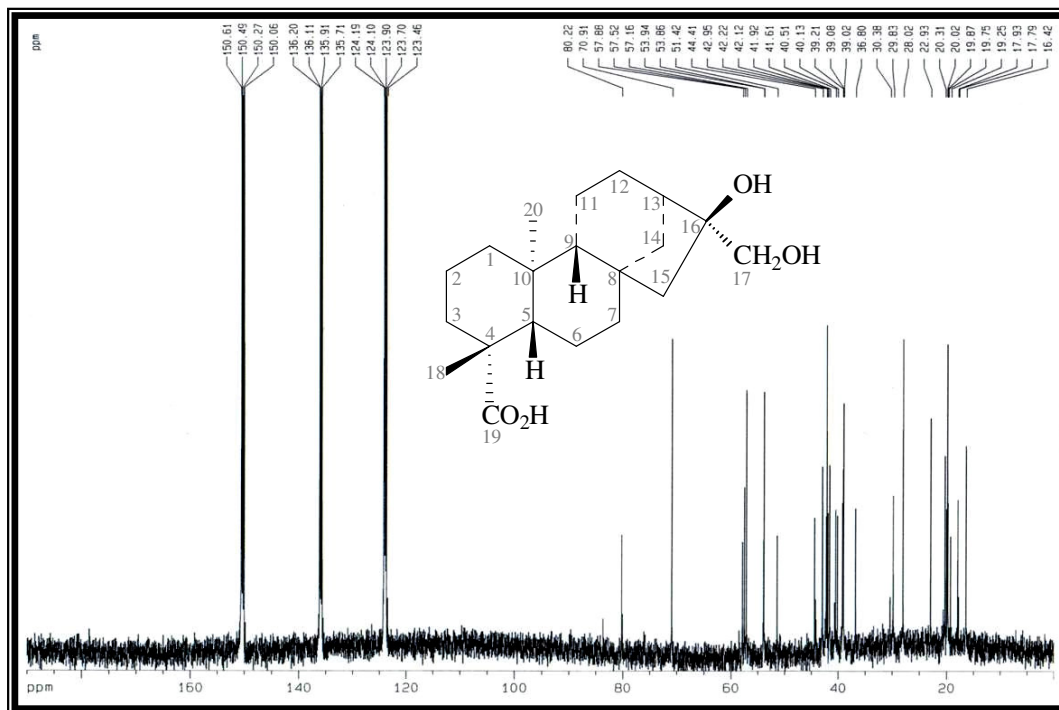


Figura 40: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2

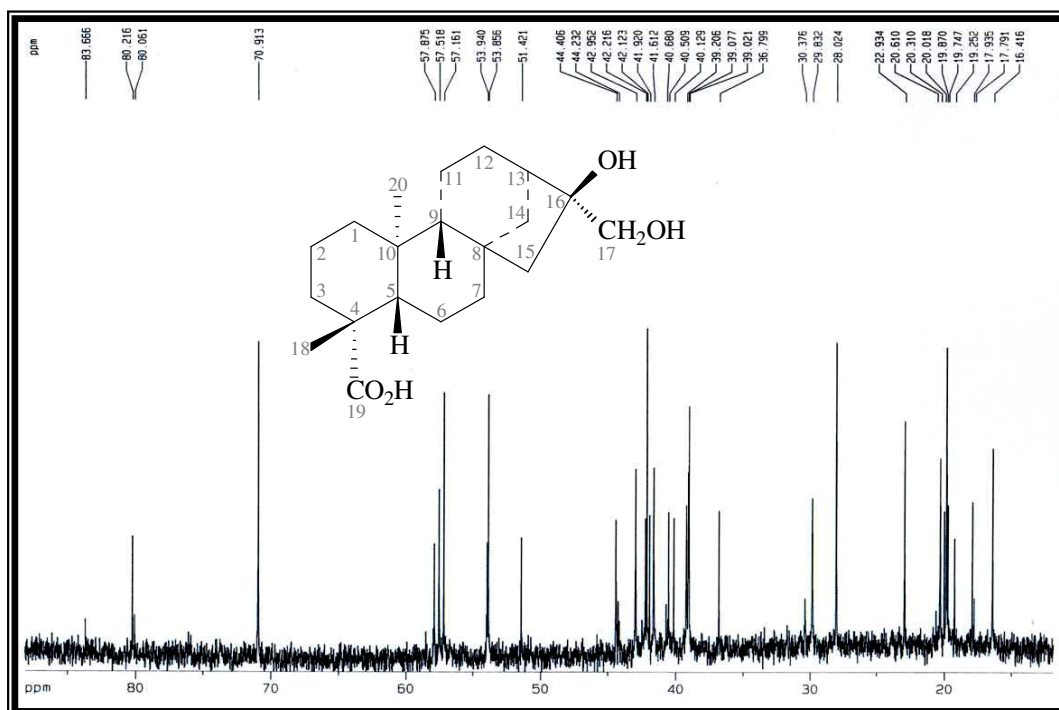


Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2

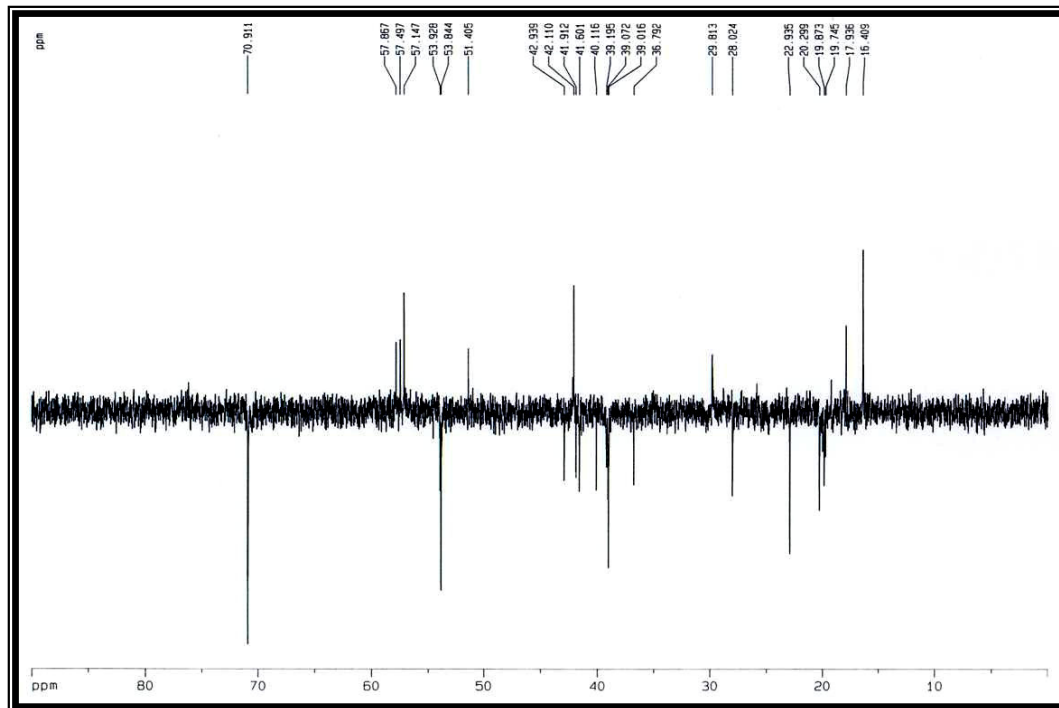


Figura 42: Expansão do espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de RC-2

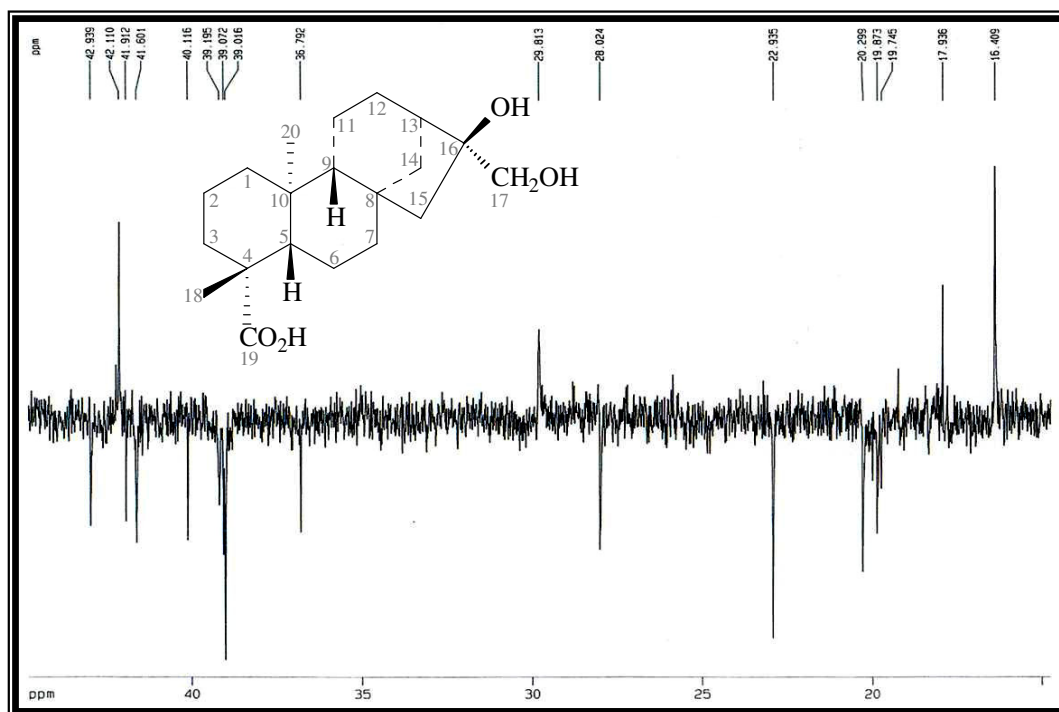


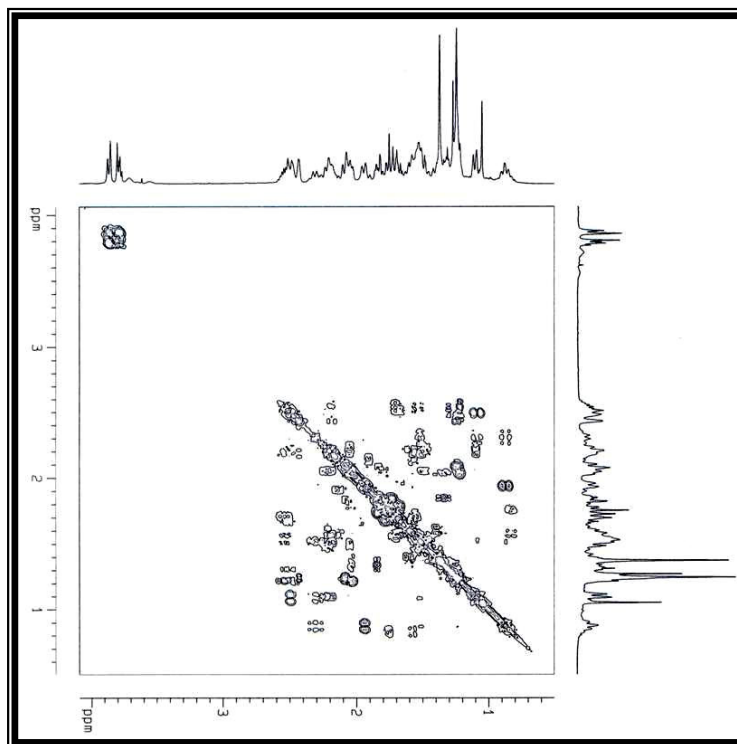
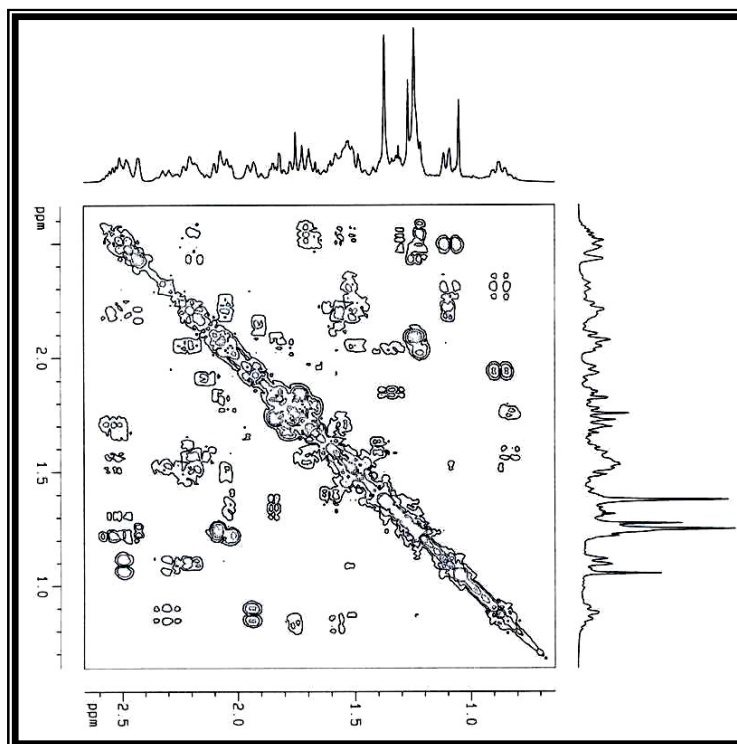
Figura 43: Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de RC-2**Figura 44:** Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de RC-2

Figura 45: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}} - \text{HSQC}$) de RC-2

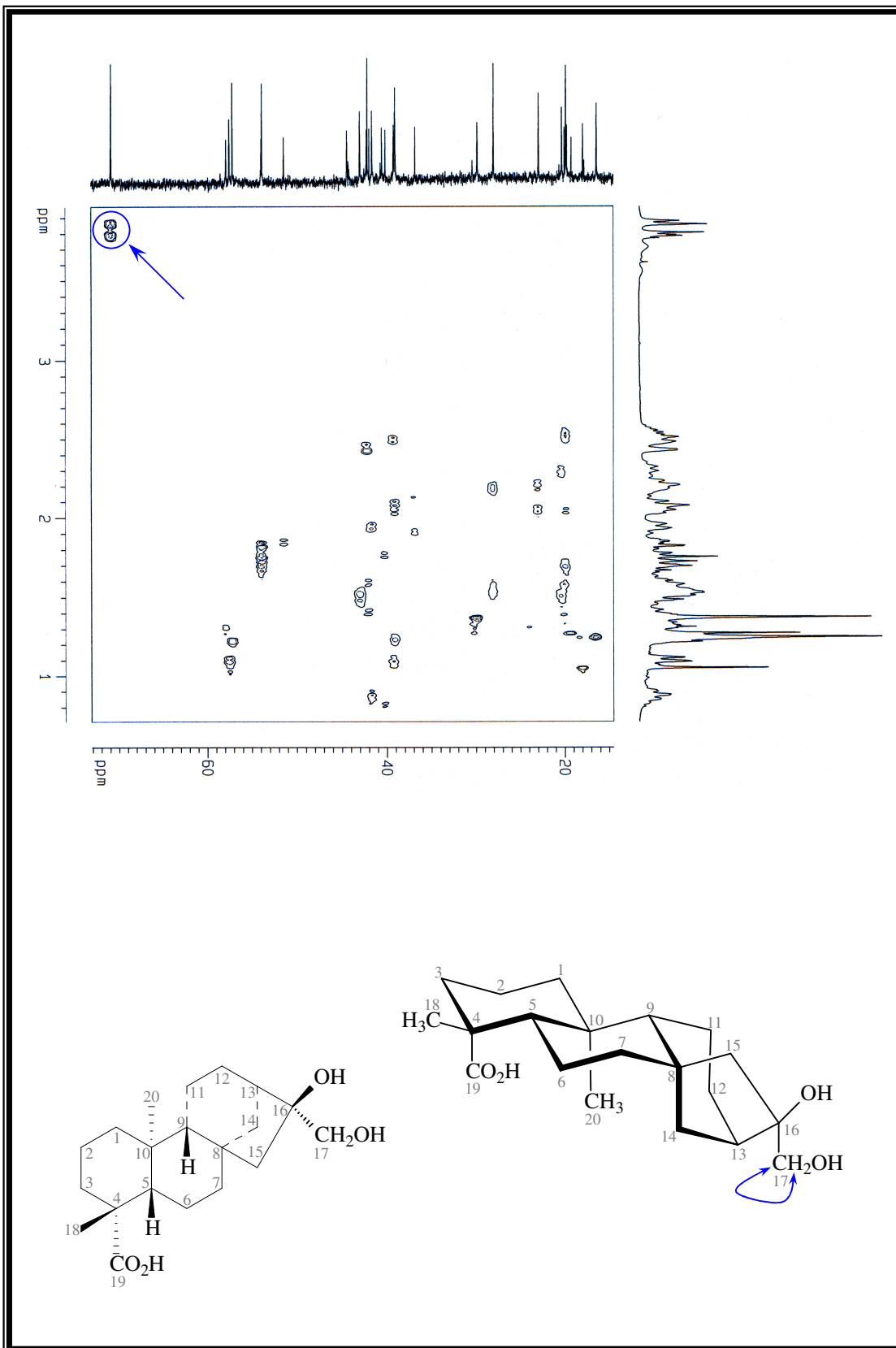


Figura 46: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de RC-2

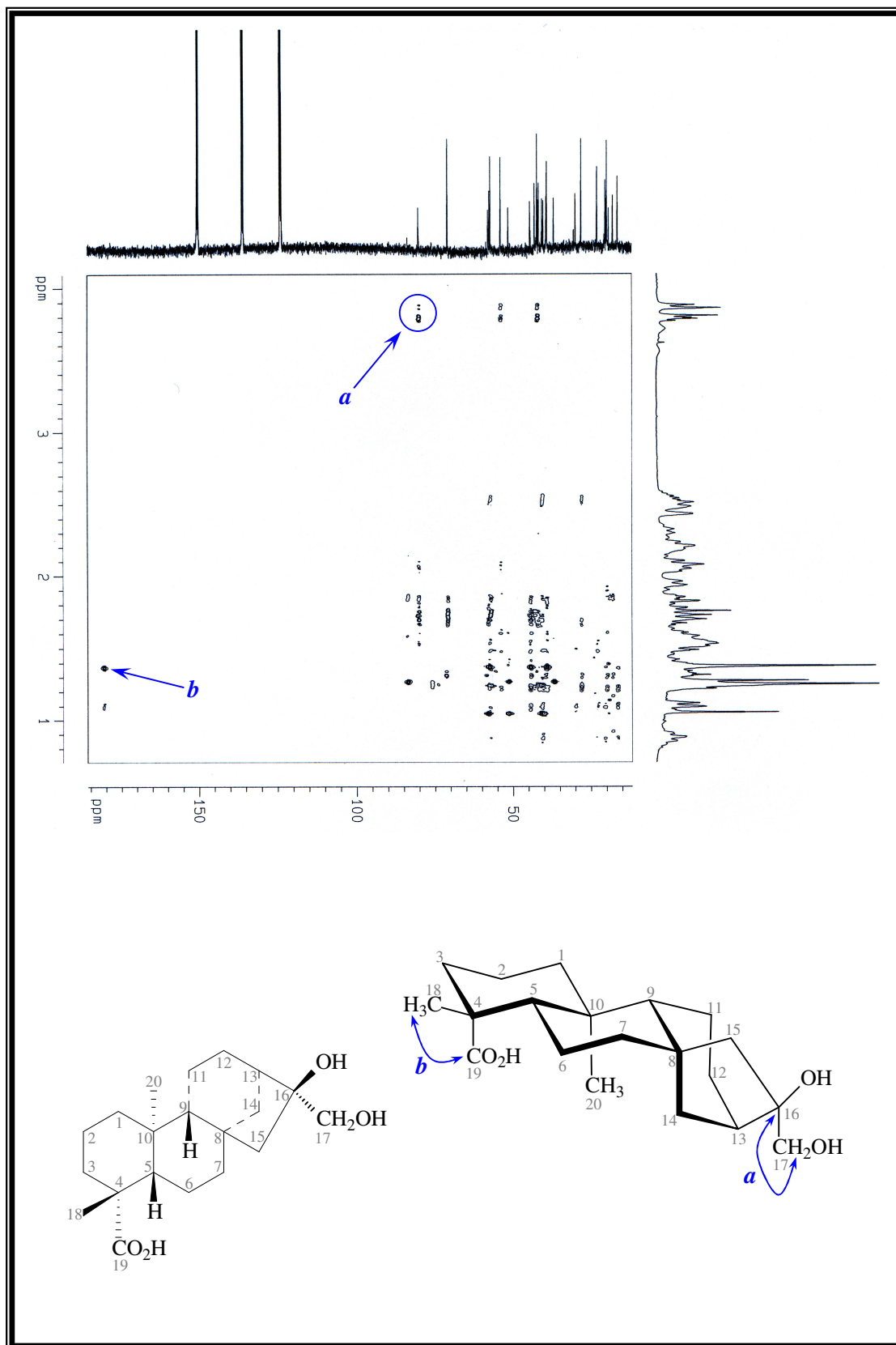


Figura 47: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2

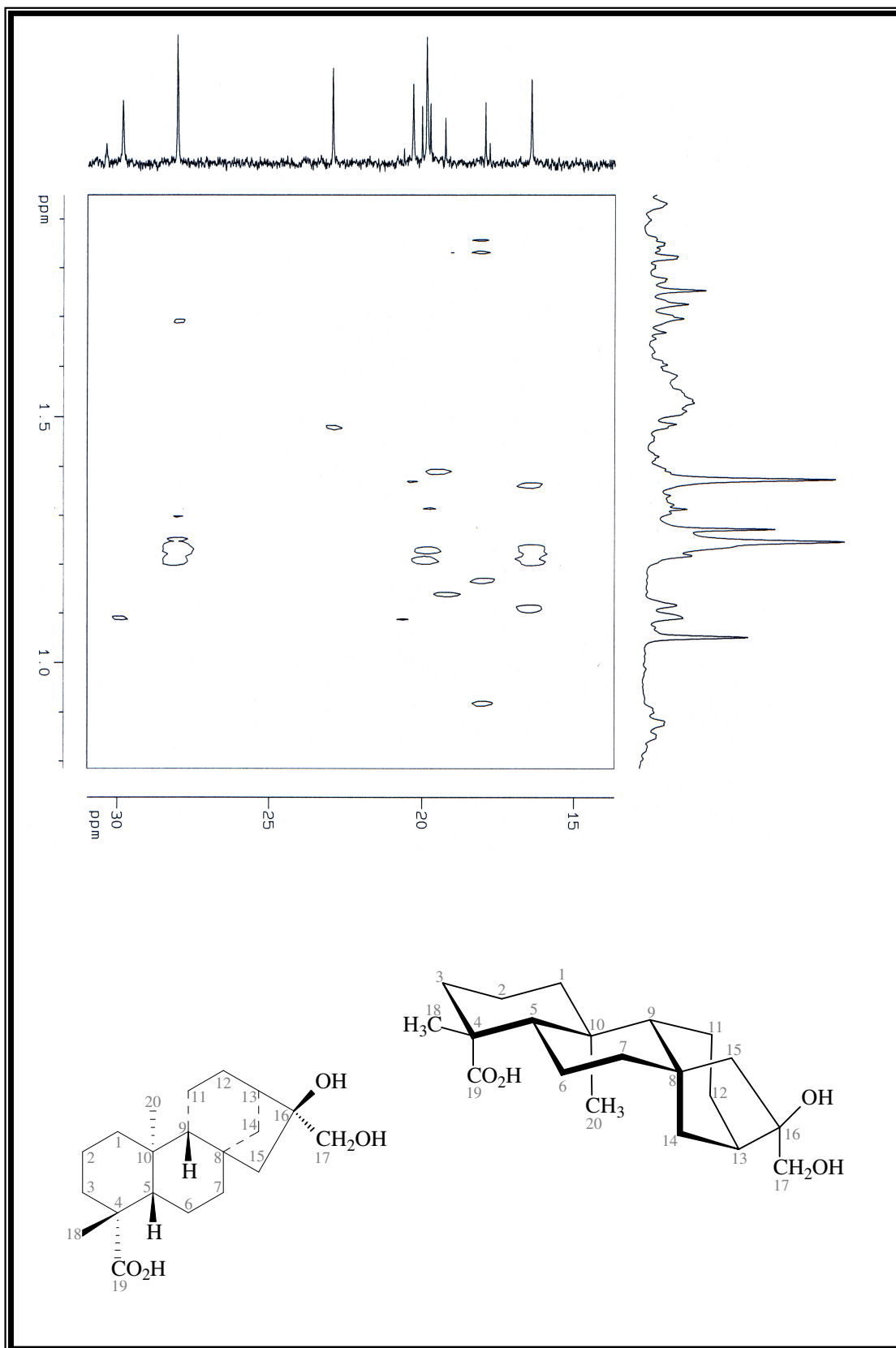


Figura 48: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^{2,3}J_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2

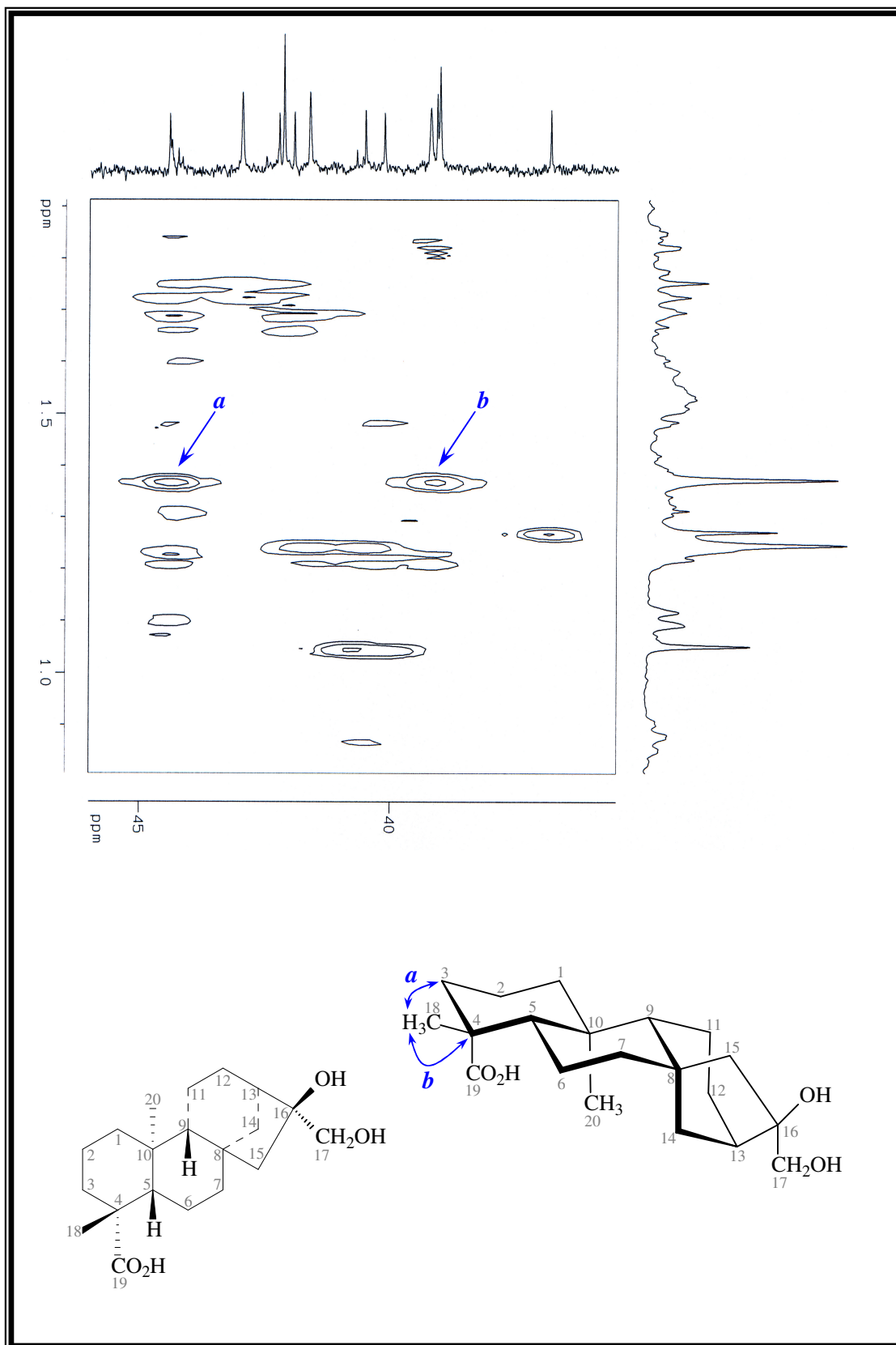


Figura 49: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}J_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2

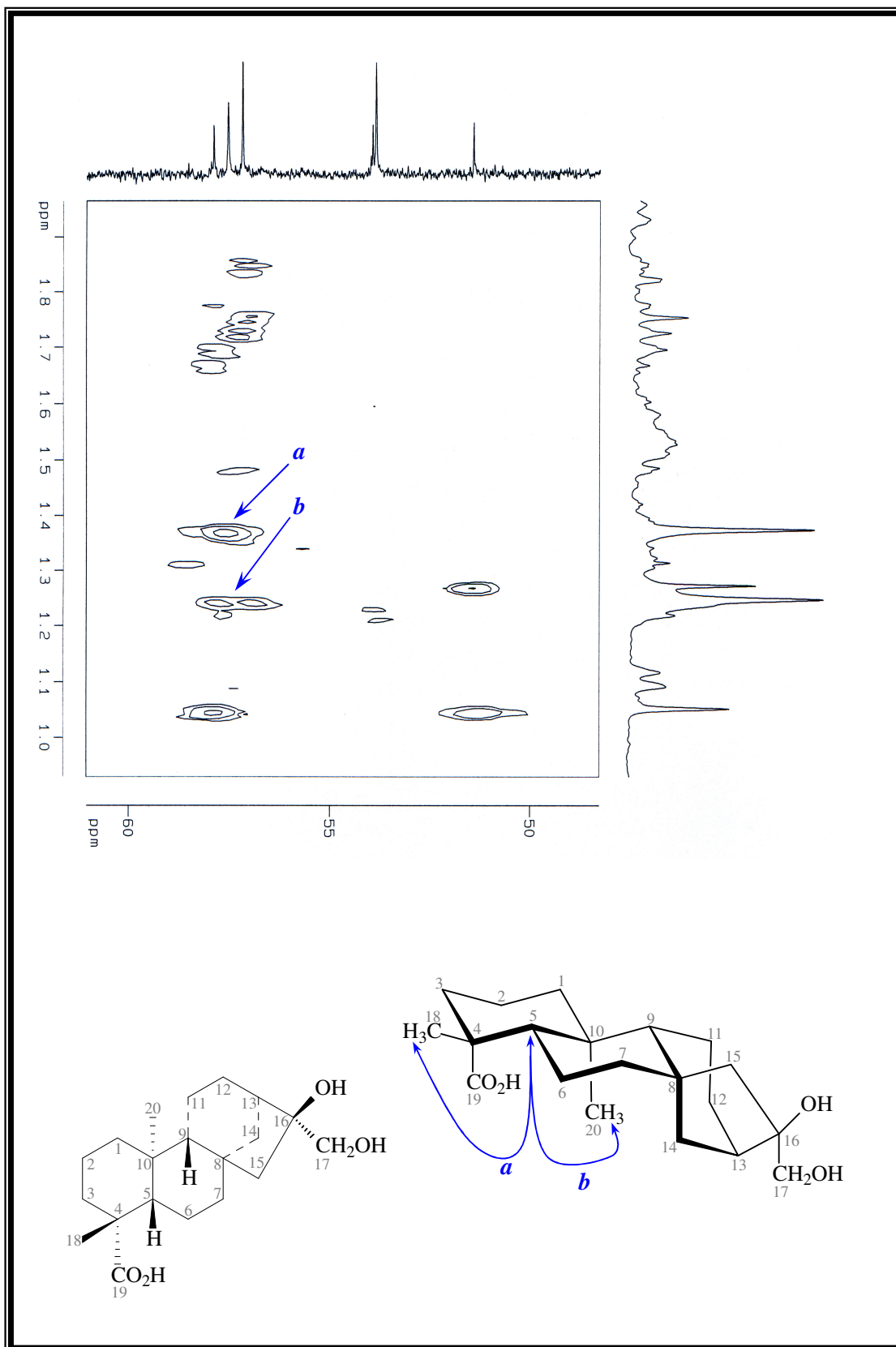
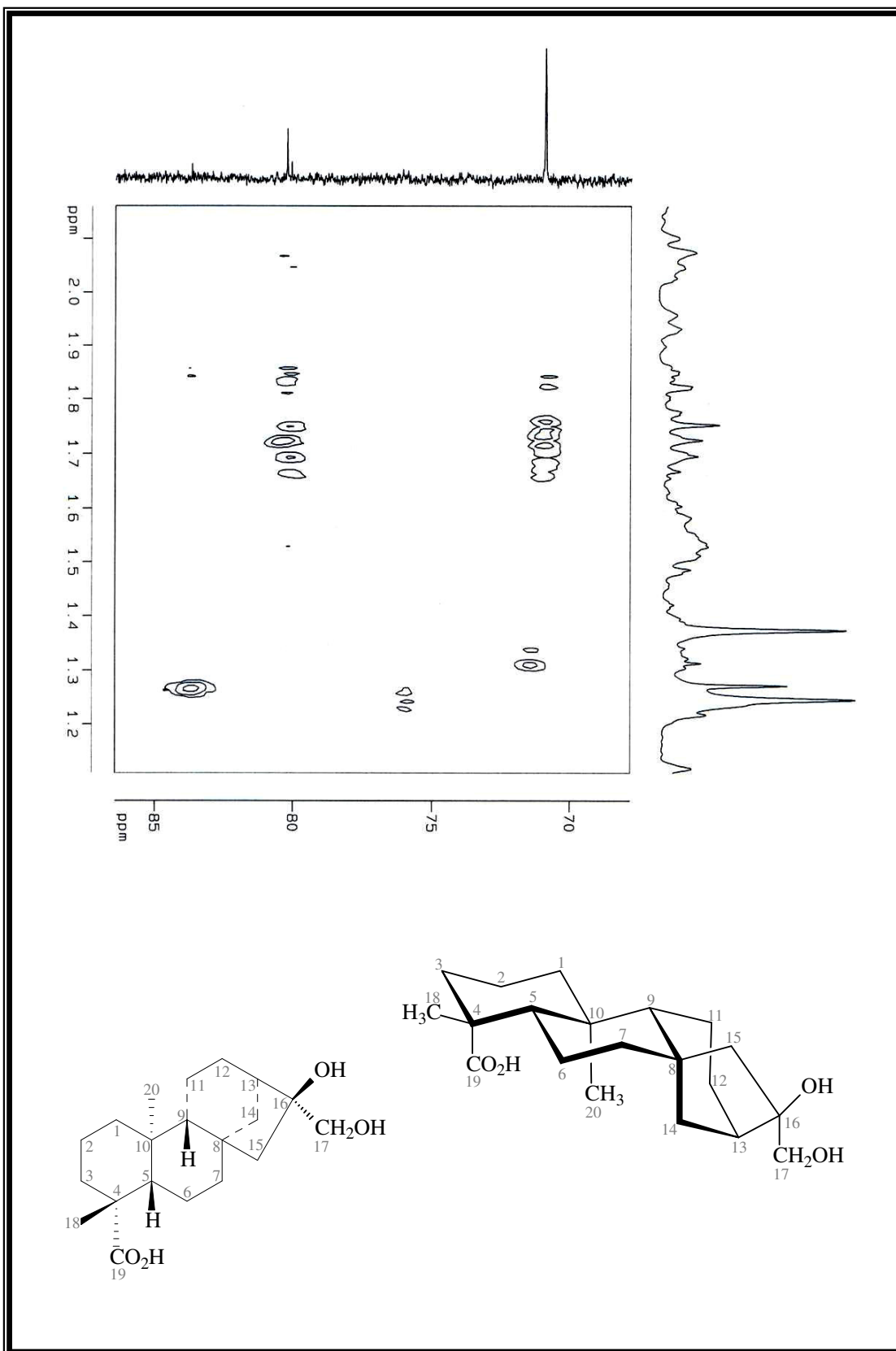


Figura 50: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^{2,3}J_{\text{CH}}$ – HMBC) de RC-2



Capítulo 5



OBTENÇÃO DE DERIVADOS

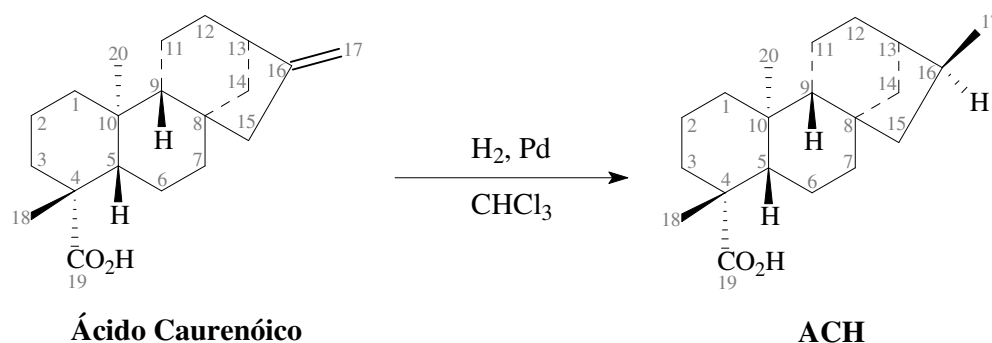
5. OBTENÇÃO DE DERIVADOS

O Ácido Caurenóico, além de ocorrer em grande concentração e de ser facilmente isolado a partir do caule de *Annona squamosa*, contém em sua estrutura grupos funcionais bastante reativos (ligação olefínica e grupo ácido carboxílico). Isto, aliado à sua enorme gama de atividades biológicas, assim como, de seus derivados funcionais, ensejou a preparação de alguns produtos, utilizando reagentes químicos usuais (HCl/MeOH, H₂/Pd, H₂O₂/SeO₂, O₃).

5.1 Hidrogenação catalítica do ácido caurenóico

O ácido caurenóico após 4 horas de reação com hidrogênio catalisada por paládio (Item 6.4.1, Pág. 111), forneceu um produto (ACH) de aspecto cristalino e cor branca, com faixa de fusão 183-185 °C e rendimento de 41%.

Figura 51: Hidrogenação catalítica do ácido caurenóico



Os espectros no infravermelho ($\nu_{\text{C=O}}$ 1693 e 1265 cm^{-1}) e de massa (M^{++} 304) estão em acordo com o produto esperado. O espectro de RMN ¹³C – BB de ACH (Fig. 55, Pág. 68) apresentou como característica fundamental a ausência dos sinais em δ_{C} 156,1 e 103,2 relativos aos carbonos olefínicos C-16 e C-17 observados no espectro RMN ¹³C – BB de RC-1 (Fig. 26, Pág. 45). O espectro de RMN ¹H (Fig. 54, Pág. 68) além da ausência dos sinais dos hidrogênios olefínicos, mostrou como peculiaridade adicional, sinal para hidrogênios de um terceiro grupo metila em δ_{H} 1,02 (3H-17, d, 7,0).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos de ACH (Tab. 8, Pág. 66) foi realizada por comparação com os de RC-1 e com a ajuda dos espectros DEPT (Fig. 57, Pág. 69), HMQC (Fig. 58, Pág. 70) e HMBC (Figs. 59 e 60, Págs. 71 e 72). Conforme pode ser visto na tabela 9, página 66, exceto a variação nos deslocamentos químicos esperada para os

carbonos C-16 e C-17, apenas dois outros carbonos (C-12 e C-13) tiveram sinais com valores diferenciados consideráveis em relação aos correspondentes carbonos do composto original. Ao carbono C-12 foi atribuído o deslocamento químico δ_C 26,1 (CH₂ no espectro DEPT) e o sinal em δ_C 34,6 foi correlacionado ao carbono C-13 (CH) tendo em vista sua correlação com o sinal dos hidrogênios metílicos 3H-17 (δ_H 1,02, d, 7,0) no espectro HMBC. Outras correlações puderam ser observadas, tais como, dos hidrogênios 3H-17 (δ_H 1,02) com os carbonos C-15 (δ_C 48,9) e C-16 (δ_C 40,2). No espectro HMQC pode ser observado a conectividade do sinal do carbono C-13 (δ_C 34,6) com o sinal do hidrogênio H-13 (δ_H 2,05) e do carbono C-16 (δ_C 40,2) com o do hidrogênio H-16 (δ_H 1,98). No espectro ¹H – ¹H COSY pode-se destacar as correlações do hidrogênio H-16 (δ_H 1,98) com o hidrogênio 2H-15 (δ_H 1,65 e 0,95) e os hidrogênios 3H-17 (δ_H 1,05). Todas as argumentações acima descritas indicam que o produto de reação trata-se do Ácido 16 α -hidro-*ent*-cauran-19-óico, já isolado a partir de *Copaifera paupera* [TINCUSI et al., 2002] e *Copaifera langsdorfii* [FERRARI et al., 1971] e que apresenta atividade antimicrobiana [TINCUSI et al., 2002].

Tabela 8: Dados de RMN ¹³C – BB e DEPT (125 MHz, CDCl₃) de ACH

C	CH	CH ₂	CH ₃
184,8	57,3	48,9	29,2
43,9	56,8	42,4	16,0
43,9	40,2	41,0	15,8
39,8	34,6	40,9	–
–	–	38,0	–
–	–	26,1	–
–	–	22,3	–
–	–	19,3	–
–	–	19,2	–
C ₄	C ₄ H ₄	C ₉ H ₁₈	C ₃ H ₉
Total C₂₀H₂₁			

Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de ACH e RC-1

C n°	ACH	RC-1
	δ_C	δ_C
1	40,9	40,9
2	19,3	19,3
3	38,0	38,0
4	43,9	43,9
5	57,3	57,2
6	22,3	22,0
7	42,4	41,5
8	43,9	44,4
9	56,8	55,3
10	39,8	39,9
11	19,2	18,6
12	26,1	33,3
13	34,6	44,0
14	41,0	39,9
15	48,9	49,2
16	40,2	156,1
17	16,0	103,2
18	29,2	29,2
19	184,8	184,6
20	15,8	15,8

Figura 52: Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACH

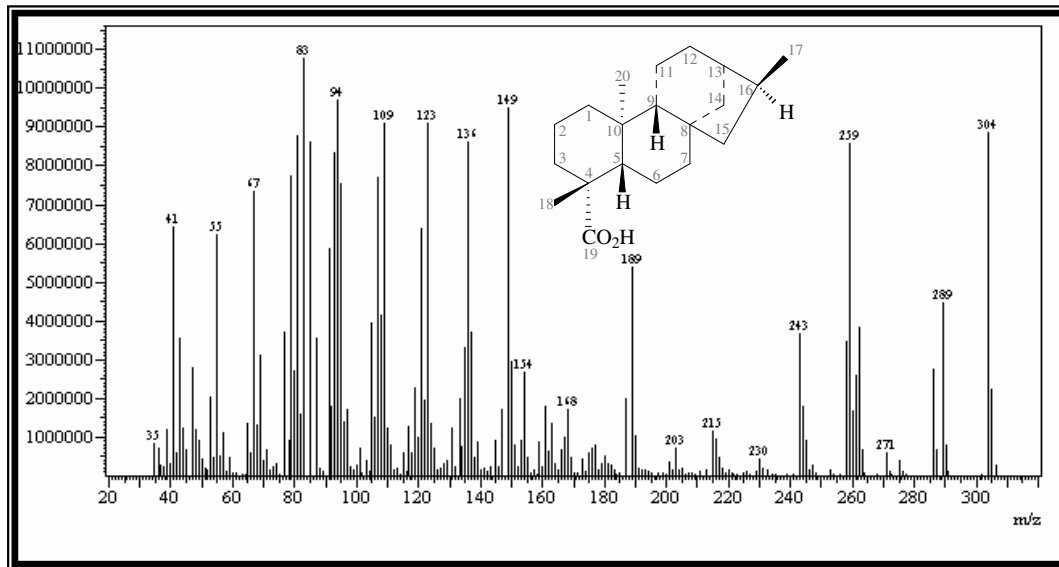


Figura 53: Espectro de absorção na região do IV (cm^{-1} , KBr) de ACH

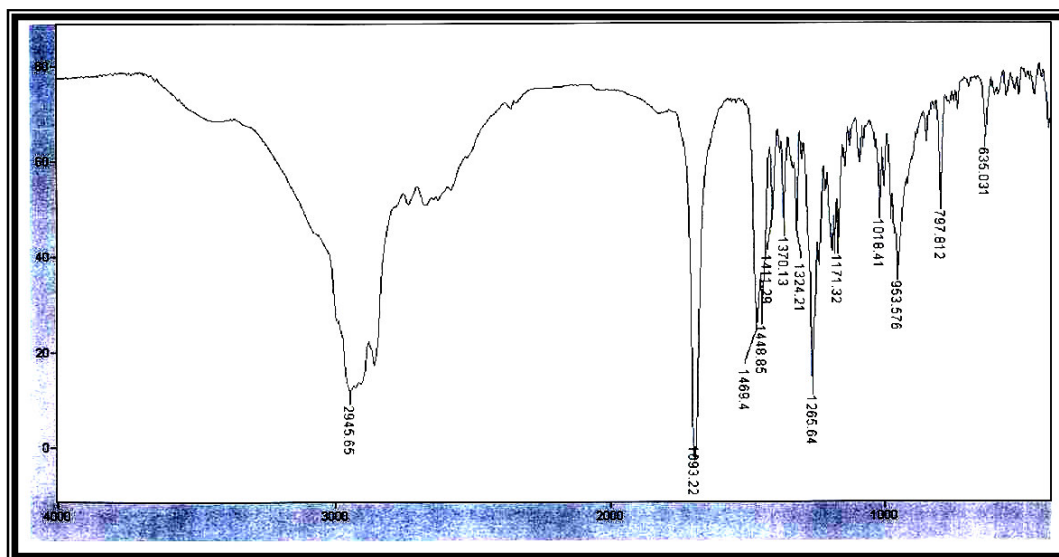


Figura 54: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de ACH

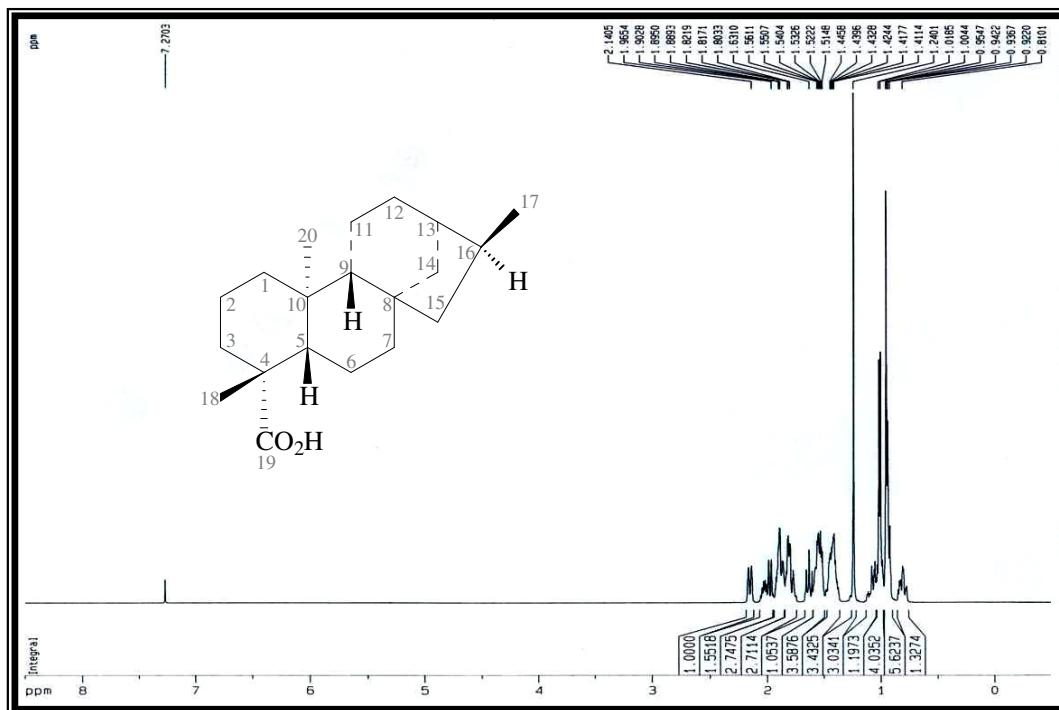


Figura 55: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de ACH

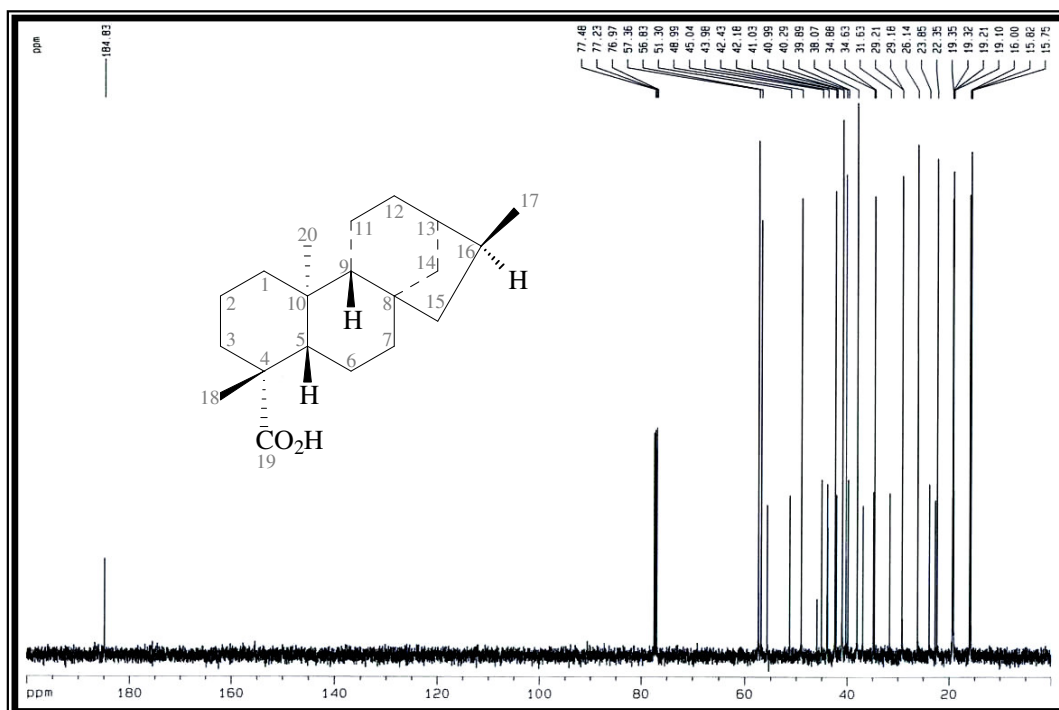


Figura 56: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, CDCl_3) de ACH

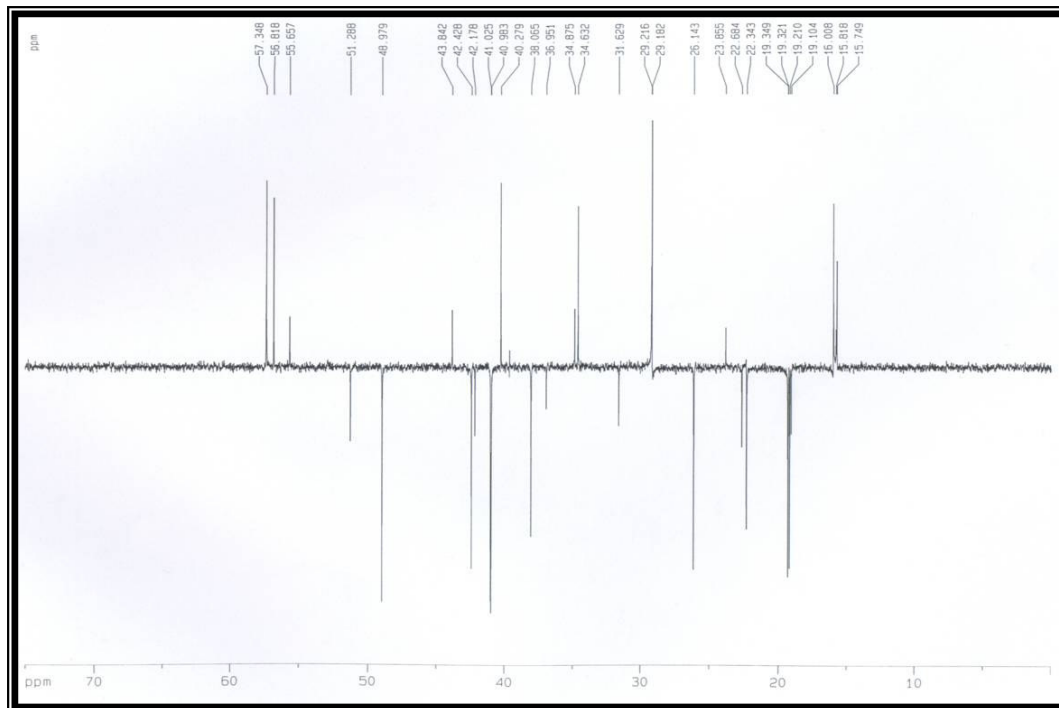


Figura 57: Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de ACH

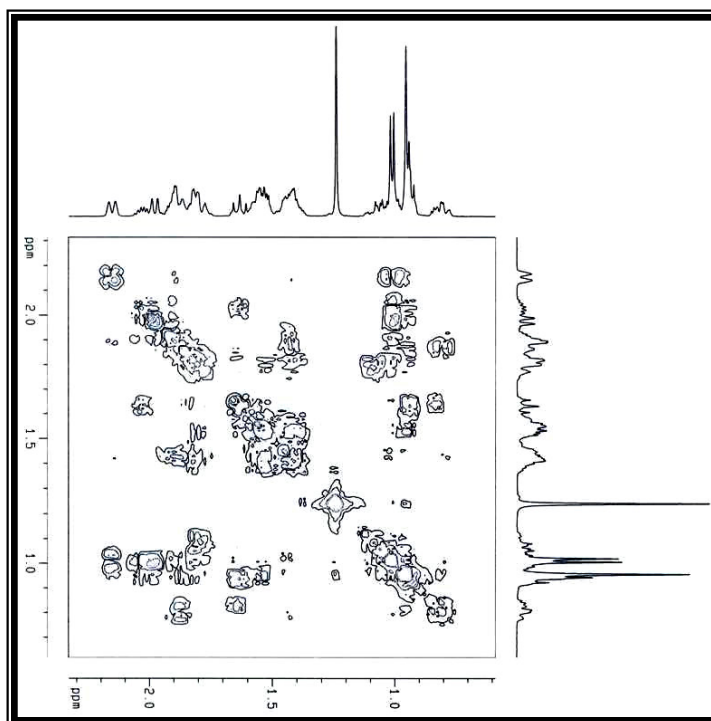


Figura 58: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1J_{\text{CH}}$) de ACH

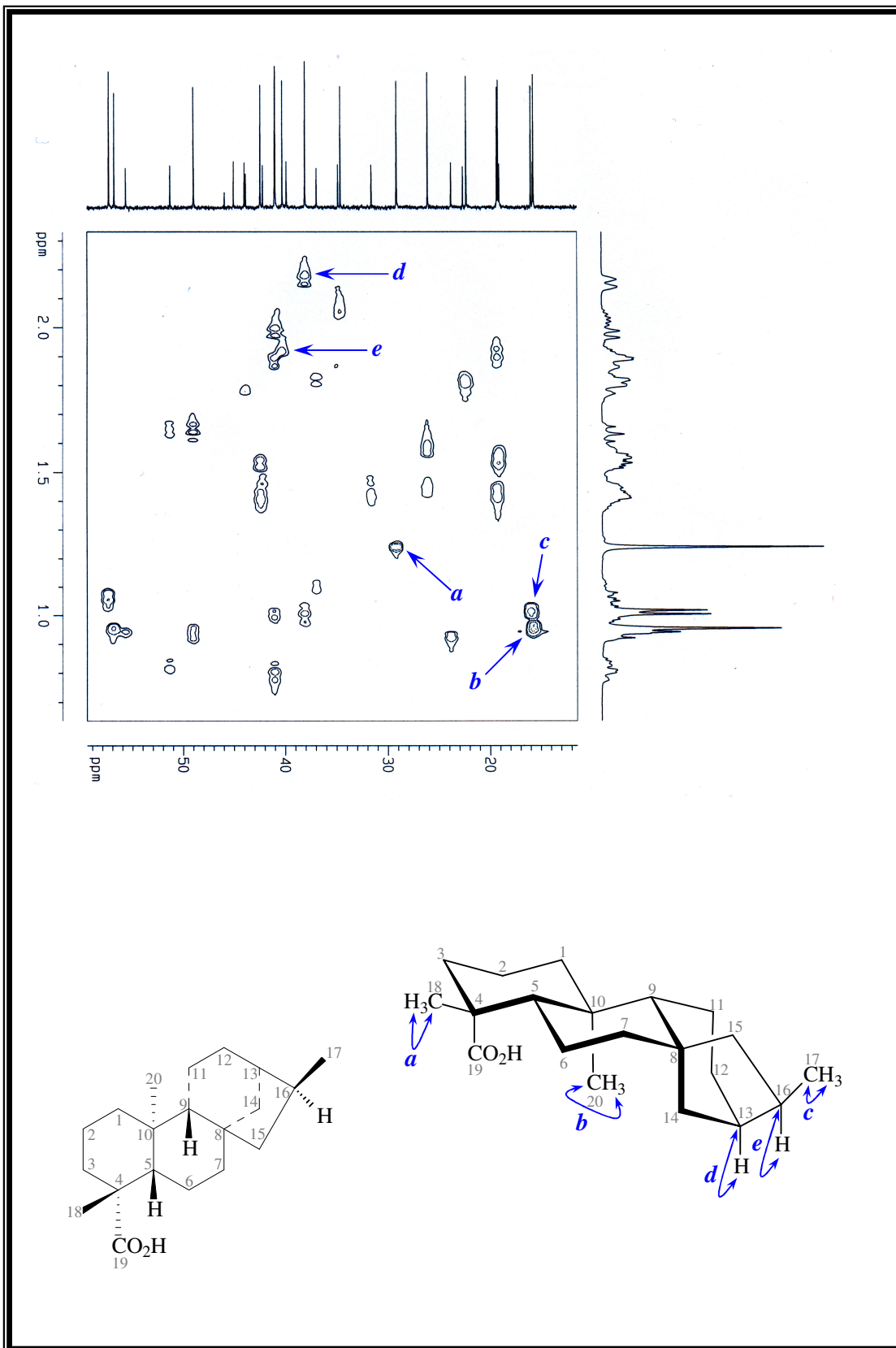


Figura 59: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACH

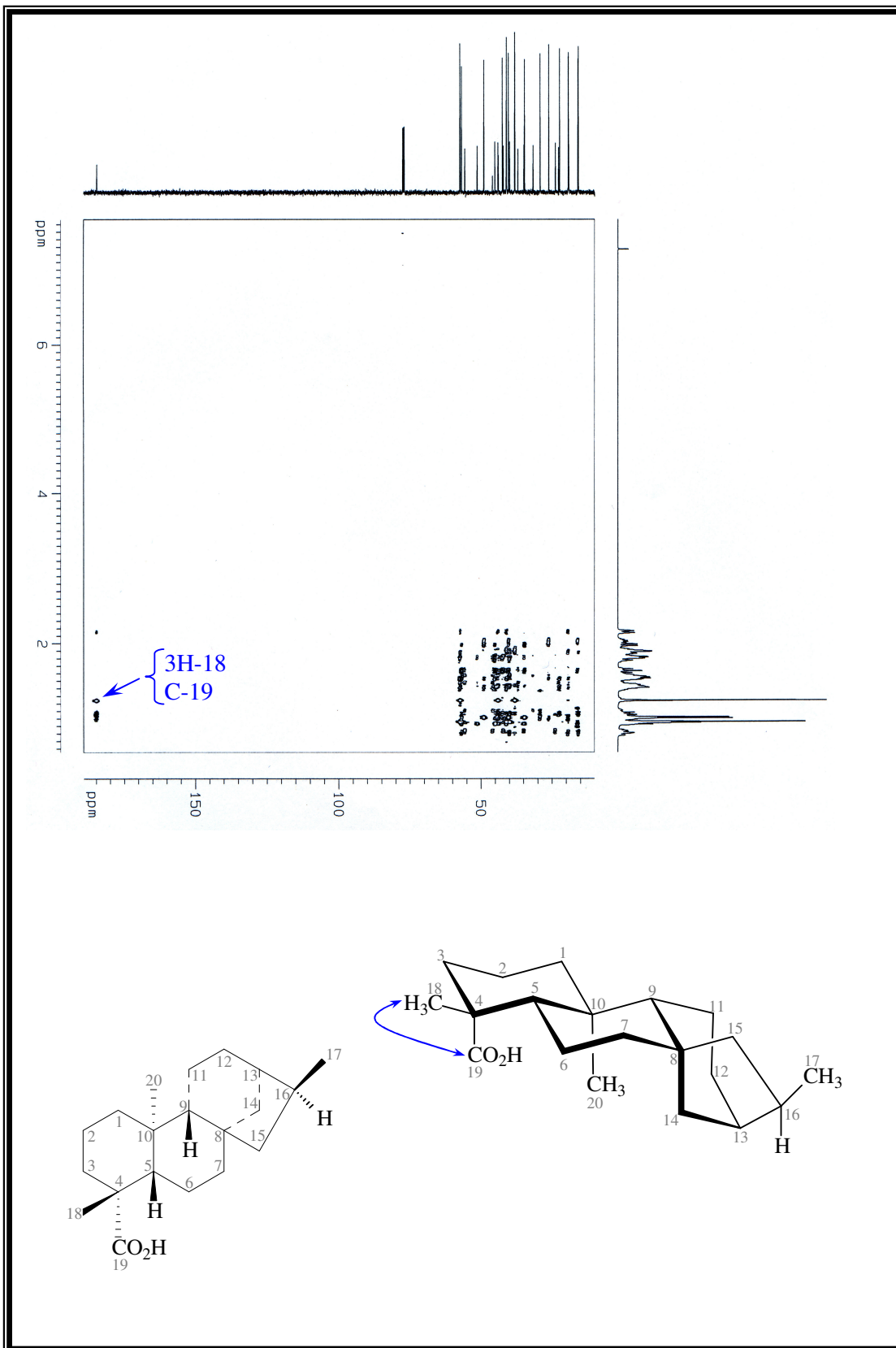
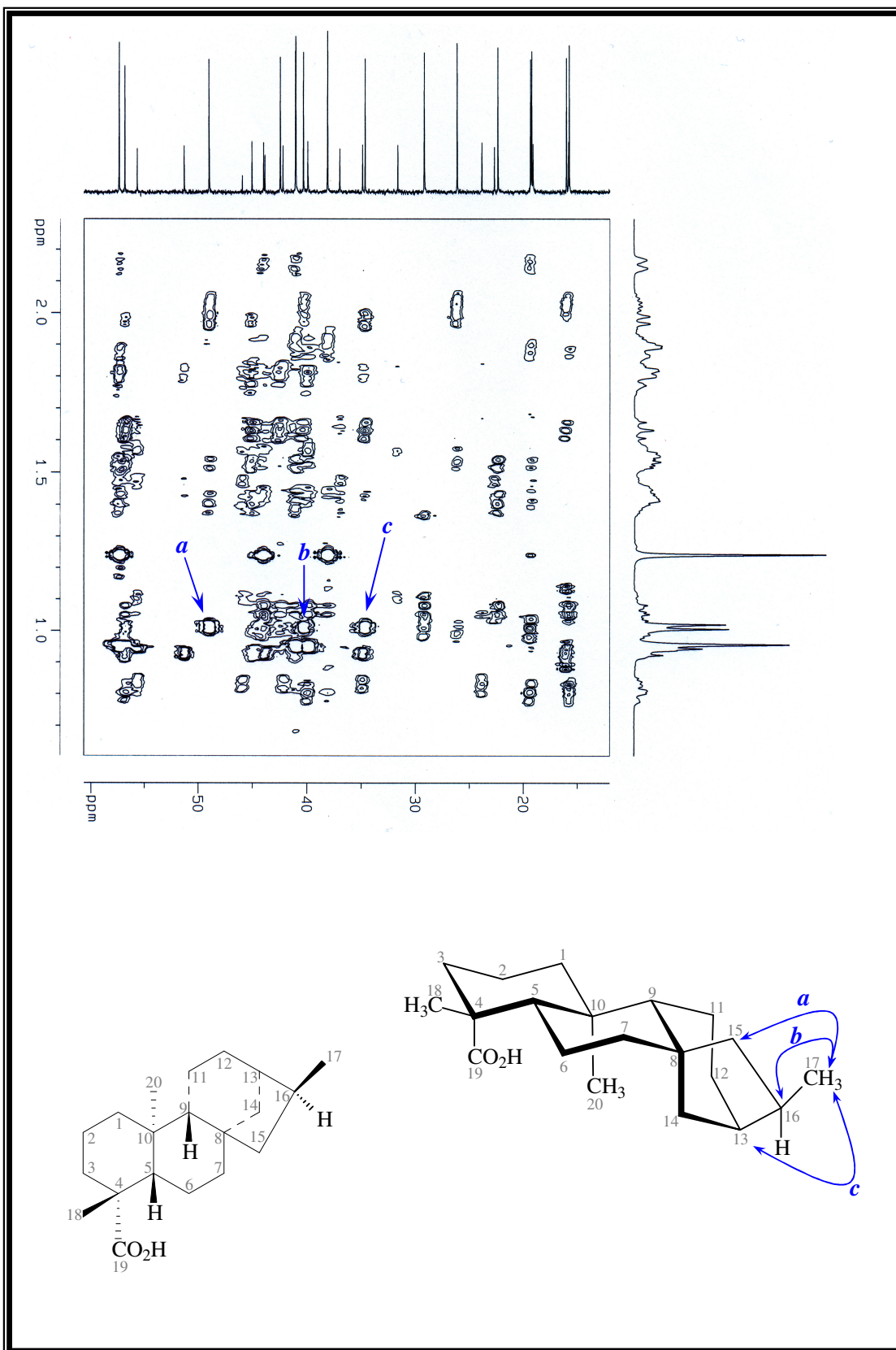


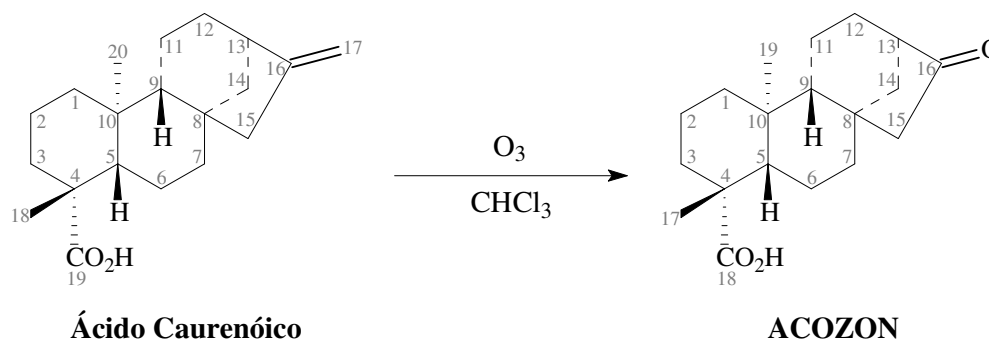
Figura 60: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{-2,3}J_{\text{CH}}$) de ACH



5.2 Ozonólise do ácido caurenóico

O composto RC-1 (ácido caurenóico) após 45 min sob a ação de ozônio (Item 6.4.2, Pág. 111), forneceu um produto de aspecto cristalino e cor amarelo claro, com faixa de fusão 234-236 °C, denominado ACOZON, com rendimento de 66,3%.

Figura 61: Ozonólise do ácido caurenóico



A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB (Figs. 64 e 65, Pág. 76) e RMN ^{13}C – DEPT 135 (Figs. 66 e 67, Pág. 77) de ACOZON, tornou possível reconhecer sinais correspondentes aos átomos de carbono, sendo, dois de carbonos metílicos (C-19 e C-17), nove de carbonos metilênicos (C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, C-11, C-12, C-14 e C-15), três de carbonos metínicos (C-13, C-9 e C-5) e cinco de carbonos não hidrogenados (C-18, C-16, C-10, C-8 e C-4) conforme tabela 10, página 74. Em adição, o espectro de RMN ^{13}C – BB de ACOZON apresentou como características principais, a ausência dos sinais em δ_{C} 156,1 e 103,2 relativos aos carbonos olefínicos (C-16 e C-17) observados no espectro RMN ^{13}C – BB de RC-1 (Fig. 26, Pág. 45) e a presença de um sinal em δ_{C} 221,0, indicando a transformação da ligação dupla exocíclica, em função cetona. A atribuição dos sinais referentes a cada carbono foi efetuada fazendo-se a comparação dos deslocamentos químicos de RC-1 com os dos correspondentes carbonos de ACOZON (Tab. 11, Pág. 74). Salvo os carbonos C-16 (δ_{C} 221,0) e C-19 (δ_{C} 179,2) e, em parte, os carbonos C-12 (δ_{C} 30,1), C-13 (δ_{C} 48,3) e C-15 (δ_{C} 54,7) (próximos ao centro de reação) todos os outros mantiveram, como esperado, praticamente, os mesmos valores de deslocamentos químicos. Alguns carbonos puderam ter suas atribuições comprovadas através das interações observadas no espectro de correlação ^1H – ^{13}C HMBC (Figs. 69 e 70, Págs. 78 e 79). Por exemplo, pode-se ressaltar as correlações entre o sinal dos hidrogênios metílicos 3H-18 (δ_{H} 1,23) e os sinais em 179,2 (C-19), 57,3 (C-5), 43,6 (C-4) e 37,8 (C-3), assim como, entre o sinal dos hidrogênios metílicos 3H-20 (δ_{H}

1,04) e os sinais em δ_C 57,3 (C-5), 54,7 (C-9), 40,4 (C-10) e 41,7 (C-1). No espectro de RMN 1H (Figs. 62 e 63, Pág 75) de ACOZON, vale destacar o desaparecimento dos sinais em δ_H 4,80 e 4,74 correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla exocíclica de RC-1, conforme esperado. O espectro de Massa (Fig. 68, Pág. 78) de ACOZON, apresentou pico do íon molecular m/z 304, estando de acordo com estrutura esperada para o produto de reação.

Com base nos dados expostos, concluiu-se que o derivado reacional trata-se do Ácido 17nor-16-oxo-ent-cauran-19óico já isolado como produto natural a partir das espécies *Werneria ciliolata* [PIACENTE et al., 1994], *Dipteris conjugata* [TANAKA et al., 1985], *Xylopiya aethiopica* [EKONG & OGAN, 1968] e *Ricinocarpos stylosus* [HENRICK & JEFFERIES, 1964] e possui atividade anti-HIV [PIACENTE et al., 1994].

Tabela 10: Dados de RMN ^{13}C – BB e DEPT (125 MHz, C_3D_6O) de ACOZON

C	CH	CH ₂	CH ₃
221,0	57,3	54,7	29,2
179,2	54,7	41,7	16,6
44,0	48,3	41,4	–
43,6	–	38,7	–
40,4	–	37,8	–
–	–	21,6	–
–	–	19,9	–
–	–	19,4	–
C ₅	C ₃ H ₃	C ₉ H ₁₈	C ₂ H ₆
Total C₁₉H₂₇			

Tabela 11: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ACOZON (125 MHz, C_3D_6O) e RC-1 (125 MHz, $CDCl_3$)

Carbono n°	ACOZON	RC-1	Carbono n°	ACOZON	RC-1
	δ_C	δ_C		δ_C	δ_C
1	41,4	40,9	11	19,4	18,6
2	19,9	19,3	12	30,1	33,3
3	37,8	38,0	13	48,3	44,0
4	43,6	43,9	14	38,7	39,9
5	57,3	57,2	15	54,7	49,2
6	21,6	22,0	16	221,0	156,1
7	41,7	41,5	17	Nor	103,2
8	44,0	44,4	18	29,2	29,2
9	54,7	55,3	19	179,2	184,6
10	40,4	39,9	20	16,7	15,8

Figura 62: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₃D₆O) de ACOZON

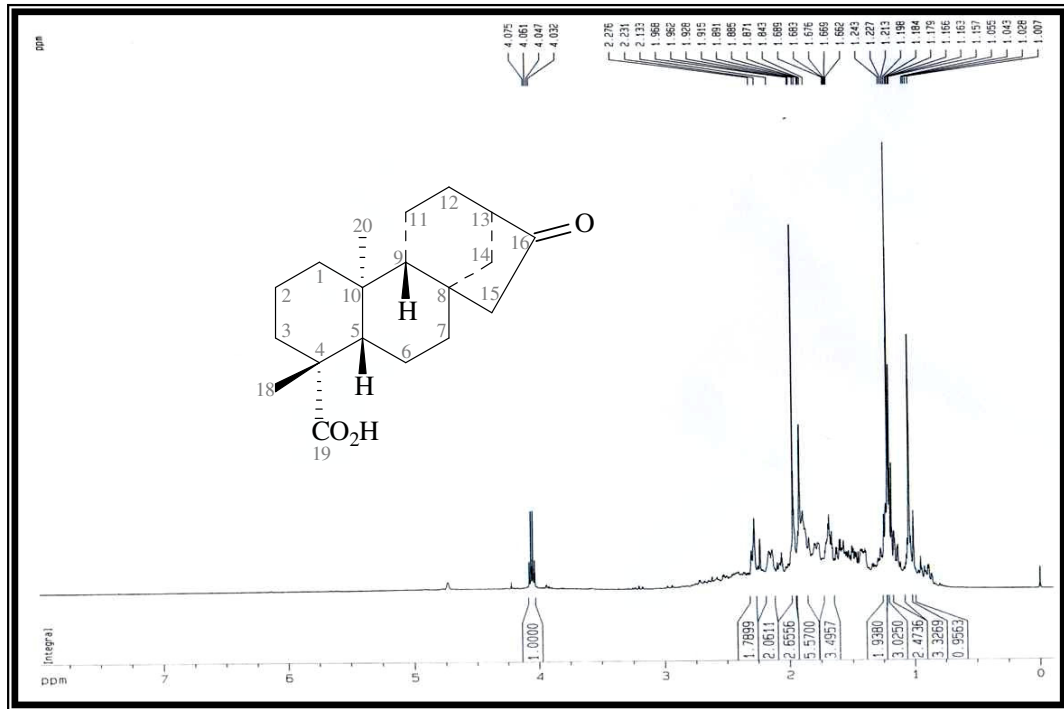


Figura 63: Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₃D₆O) de ACOZON

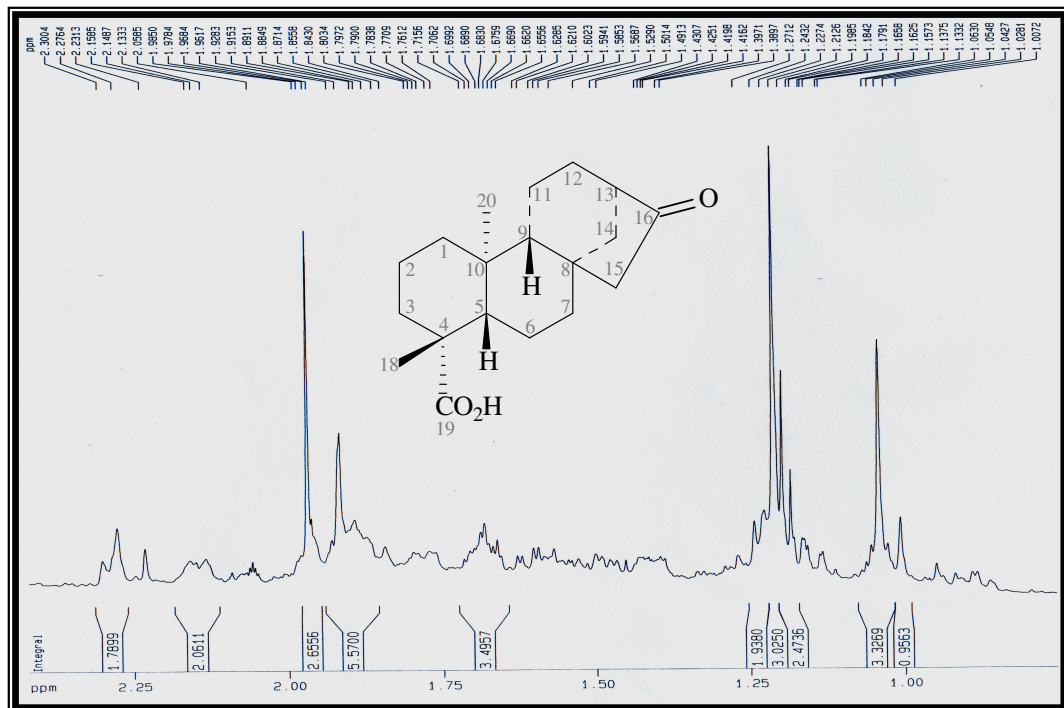


Figura 64: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON

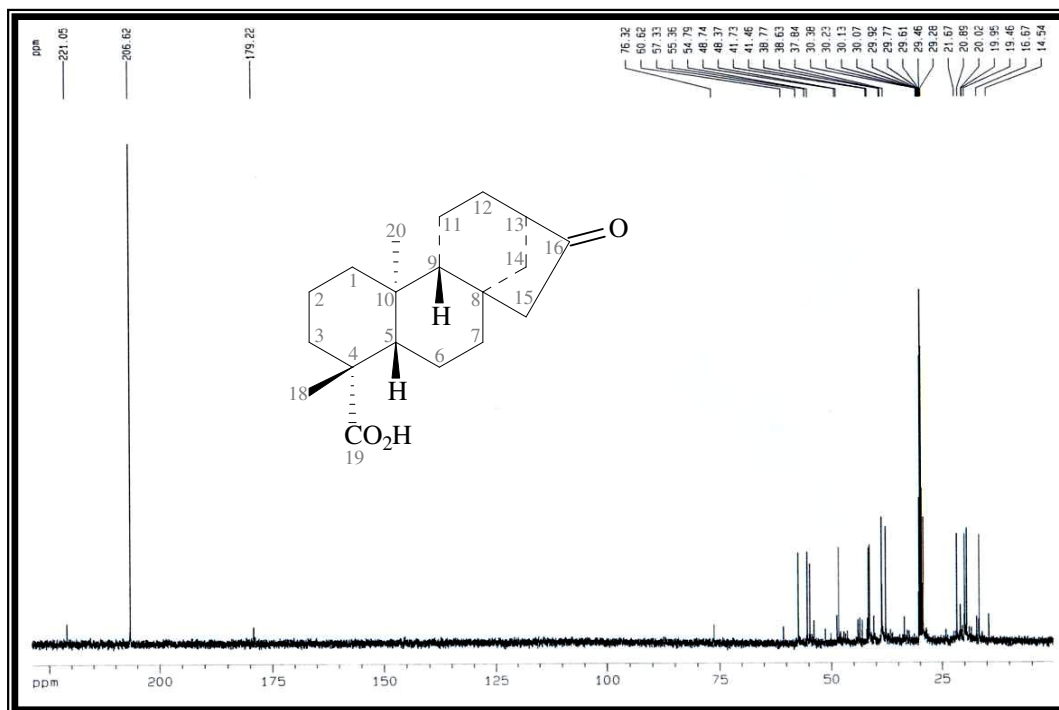


Figura 65: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON

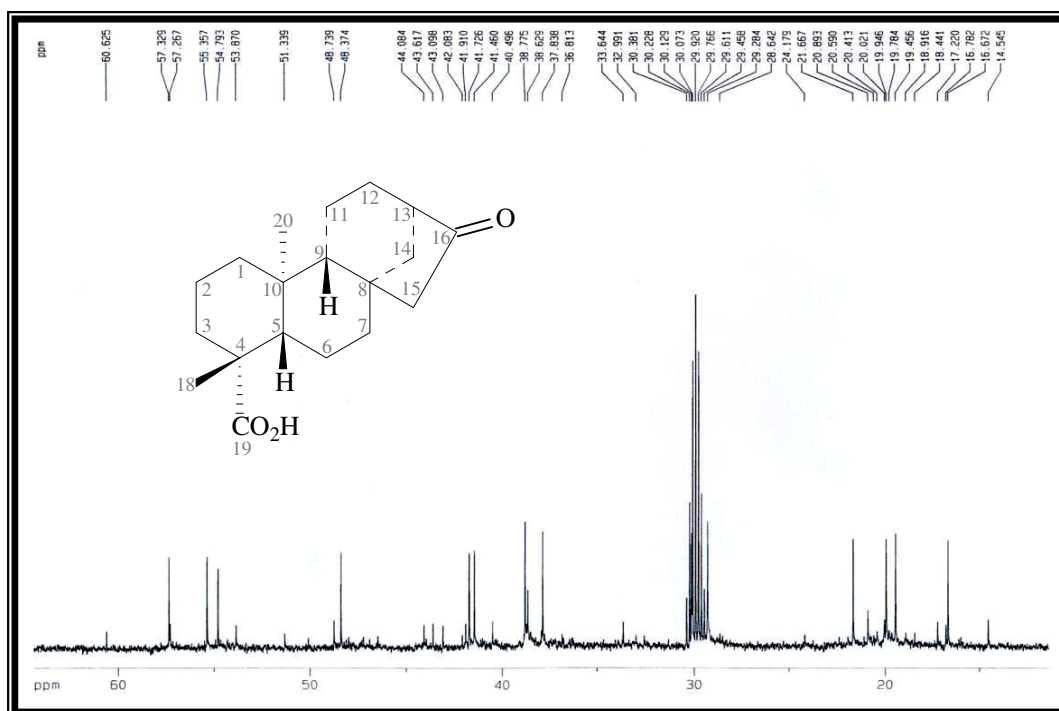


Figura 66: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON

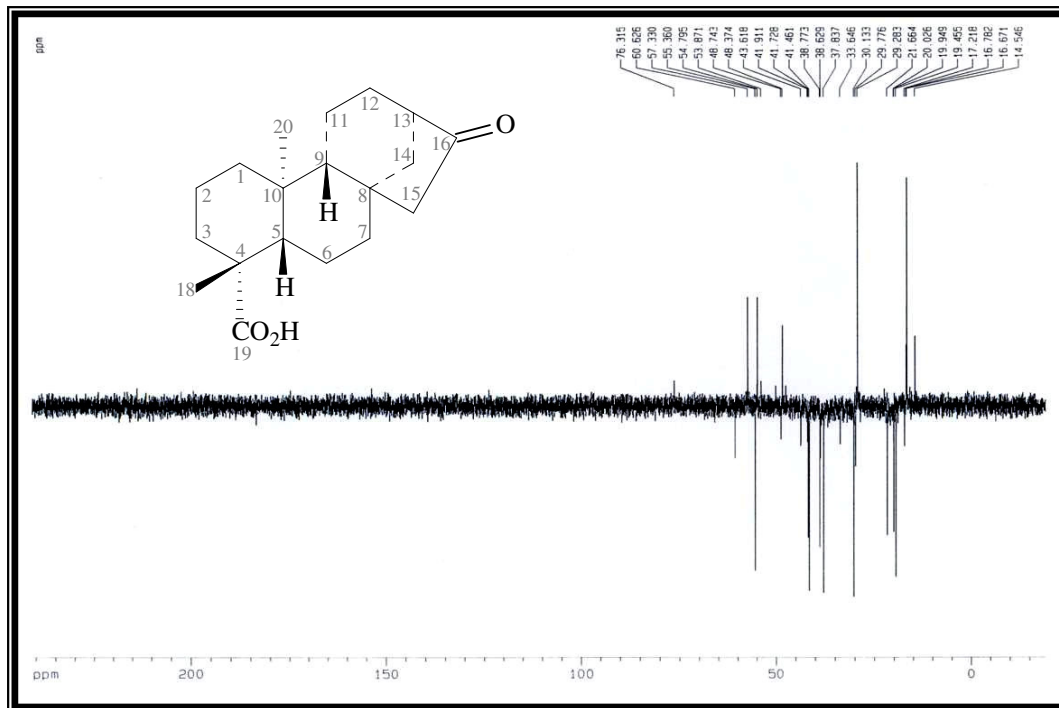


Figura 67: Expansão do espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) de ACOZON

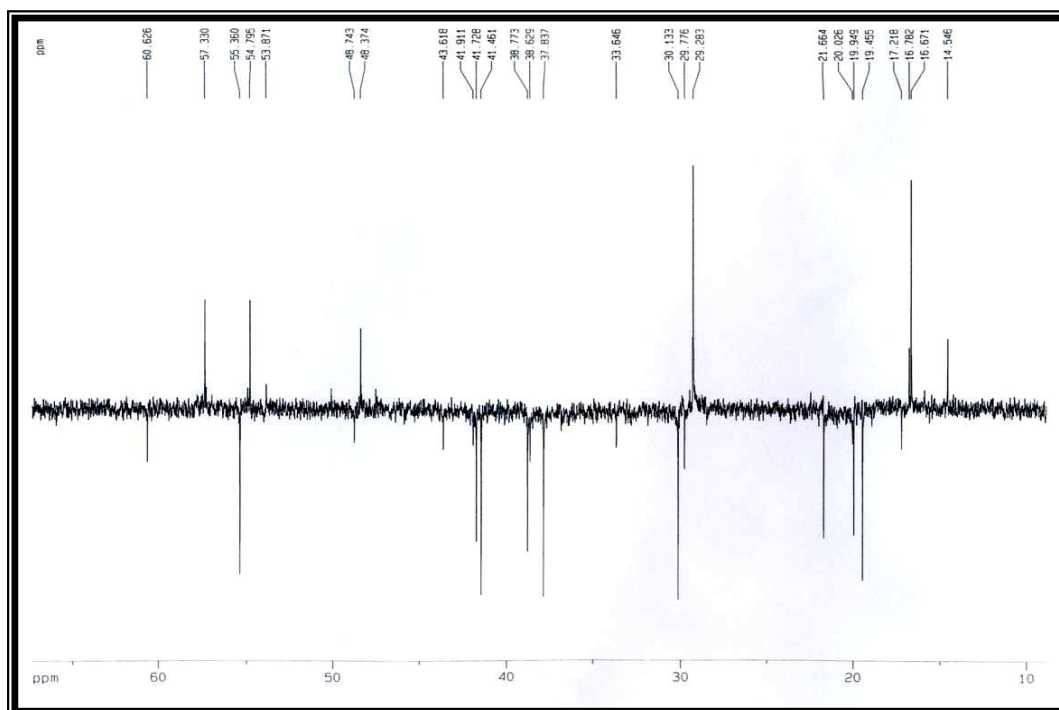


Figura 68: Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACOZON

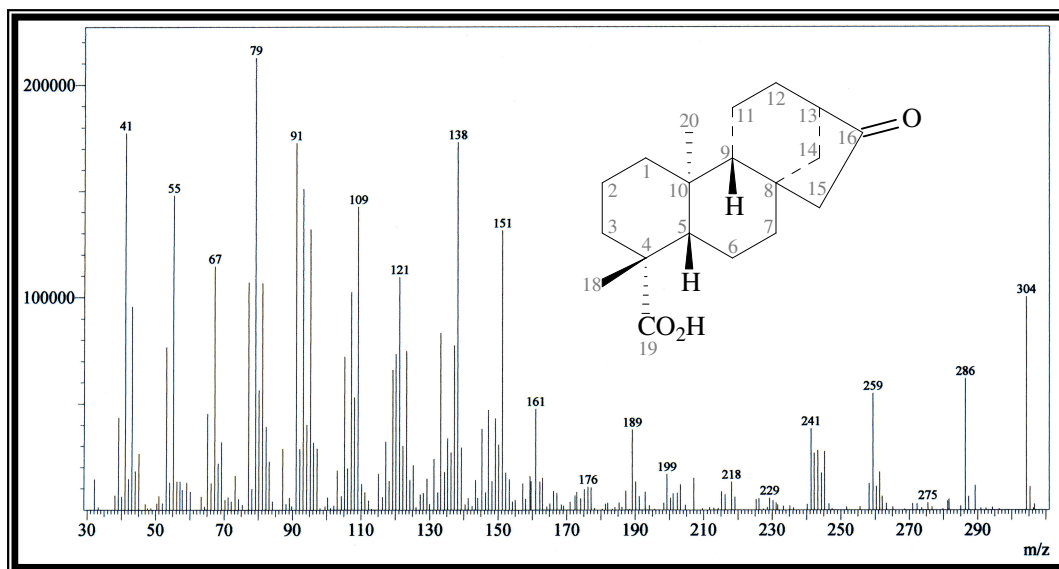


Figura 69: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACOZON

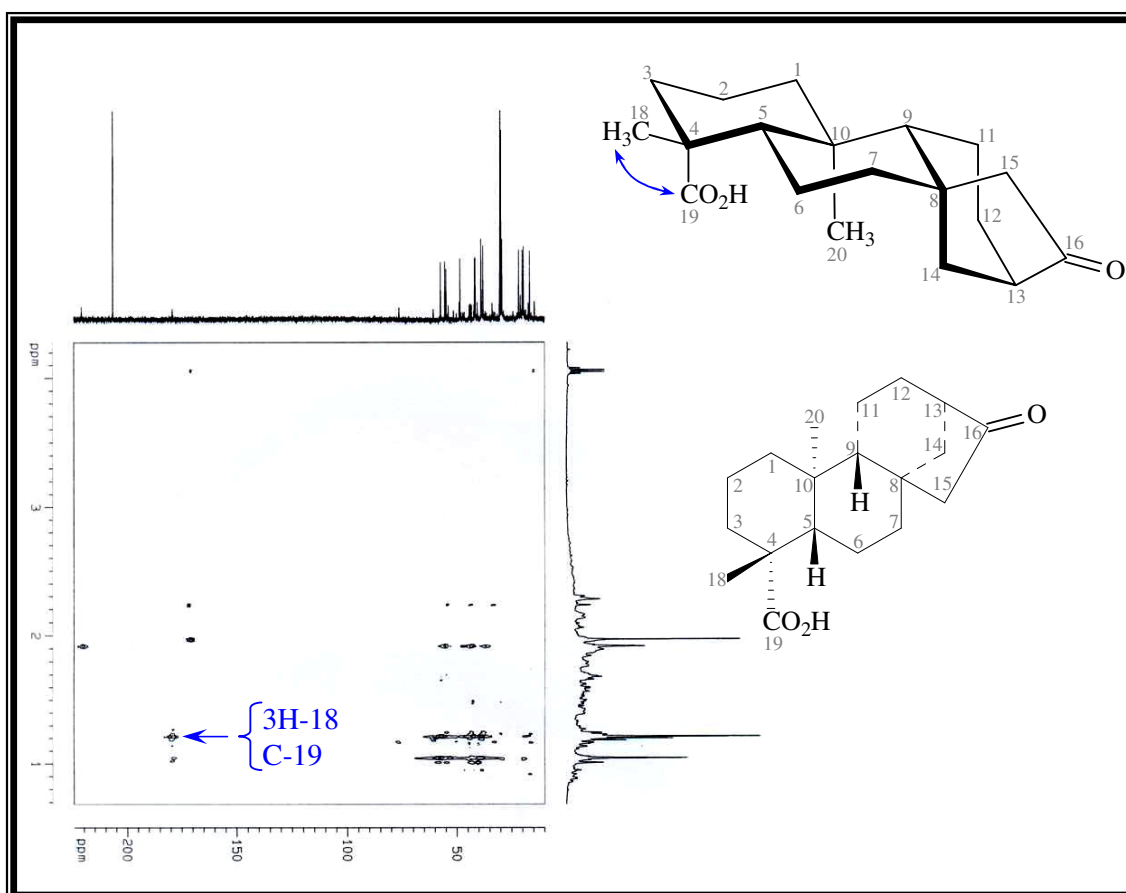
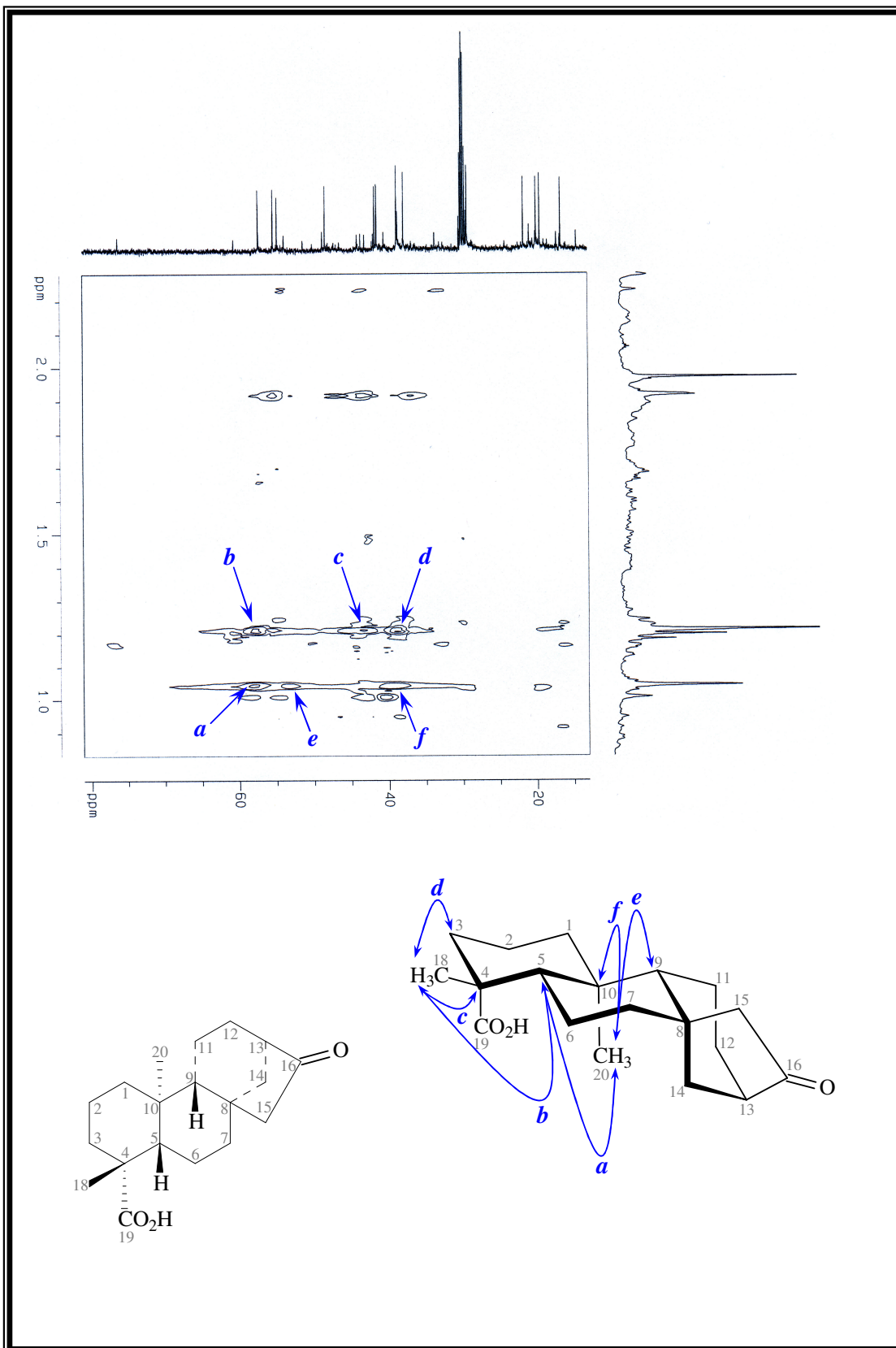


Figura 70: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACOZON

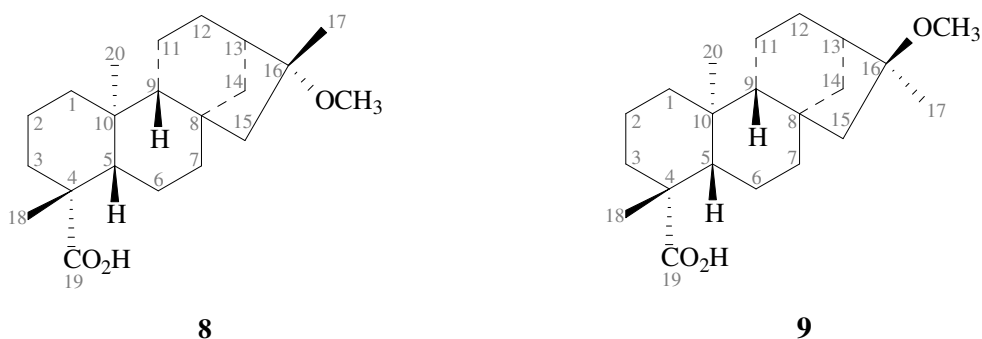


5.3 Adição de metanol ao ácido caurenóico

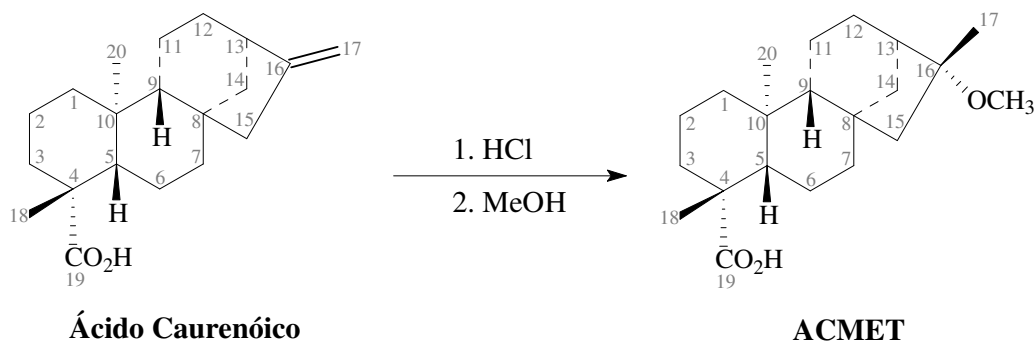
Visando a obtenção do éster metílico (Item 6.4.3, Pág 112), o ácido Caurenóico (RC-1) foi dissolvido em metanol na presença de ácido clorídrico e após refluxo por 4 horas, forneceu um material (ACMET) cristalino branco na forma de agulhas com faixa de fusão 219-222 °C e rendimento de 62,0 %.

A análise inicial do espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 76, Pág 84) do produto de reação sinalizou com dois dados importantes indicando que ACMET poderia não se tratar do composto esperado: a) foi observado a ausência dos sinais em δ_{C} 156,1 (C-16) e 103,2 (C-17) relativos aos carbonos olefínicos que aparecem no espectro RMN ^{13}C – BB (Fig. 26, Pág. 45) de RC-1 e que deveriam permanecer no espectro RMN ^{13}C – BB de ACMET; b) o sinal relativo ao carbono carbonílico (δ_{C} 183,9) foi mantido no produto de reação (ACMET). Essas evidências e, o surgimento de um sinal para carbono sp^3 oxigenado (δ_{C} 84,3) levantaram a possibilidade de adição (MeOH) na ligação dupla carbono-carbono, o que foi em acordo com o espectro de massa (Fig. 73, Pág. 83) de ACMET que registrou pico do íon molecular em m/z 334. Em adição, o espectro de RMN ^1H (Fig. 75, Pág. 84) de ACMET não exibiu os sinais em δ_{H} 4,80 e 4,74 correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla exocíclica (existente em RC-1) que deveria permanecer em ACMET. Porém, apresentou dois sinais intensos em δ_{H} 3,13 (s, 3H) e δ_{H} 1,28 (s, 3H), correspondentes a um grupo metoxila e a um terceiro grupo metila terciário, respectivamente. A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT 135 (Fig. 77, Pág. 85) de ACMET, tornou possível reconhecer a multiplicidade correspondentes aos átomos de carbono, sendo, quatro carbonos metílicos, nove metilênicos, três metínicos e cinco de carbonos não hidrogenados (Tab. 12, Pág. 82).

Com base nessas evidências e tendo em vista o carbono (δ_{C} 84,3) sp^3 oxigenado, foram possíveis duas estruturas (Fig. 71, Pág 81) para ACMET, considerando a estereoquímica no carbono C-16, ou seja, que sustenta o grupo metoxila.

Figura 71: Estruturas possíveis para ACMET

A opção pela configuração estabelecida para ACMET deve-se a semelhança nos deslocamentos químicos dos hidrogênios 3H-17 (Tab. 13, Pág. 82), dos carbonos (C-16 e C-17) envolvidos na reação e dos carbonos (C-12, C-13, C-14 e C-15) próximos ao centro de reação, de ACMET e de **8** [CHEN et al., 2000]. Como visto na tabela 14, página 82, os valores para todos são praticamente os mesmos, isto é, concordantes com a estrutura **8**.

Figura 72: Adição de metanol ao ácido caurenóico

No espectro HSQC (Fig. 79, Pág. 86) foi incontestável a correlação no grupo metoxila entre os hidrogênios (δ_H 3,13) e seu respectivo carbono (δ_C 49,3), enquanto, no espectro HMBC (Figs. 80 e 81, Págs. 87 e 88) foi observado, claramente, a correlação dos hidrogênios dos grupos metoxila (δ_H 3,13) e metila 3H-17 (δ_H 1,28) com o carbono C-16 (δ_C 84,3), além das correlações dos hidrogênios 3H-17 (δ_H 1,28) com os carbinos C-13 (δ_C 43,5) e C-15 (δ_C 54,8). Estas observações, afora outras, confirmam indiscutivelmente, a estrutura **8** [CHEN et al., 2000].

O espectro $^1H - ^1H$ NOESY (Fig. 78, Pág. 85) mostrou picos de correlação entre os hidrogênios metoxílicos (δ_H 3,13) e o hidrogênio H-13 (δ_H 2,06), enquanto que, os

hidrogênios 3H-17 (δ_H 1,28) mostraram correlação com os hidrogênios 2H-12 (δ_H 1,51), em conformidade com a configuração proposta para o carbono C-16.

Todas as argumentações acima expostas, indicam que o produto de reação trata-se do Ácido 16 α -metoxi-*ent*-cauran-19-óico, já isolado como produto natural a partir das espécies *Annona glabra* [CHEN et al., 2000], *Annona squamosa* [YANG et al., 1992] *Didymocarpus oblonga* [DAS et al., 1979] e *Aralia cordata* [TANAKA et al., 1972].

Tabela 12: Dados de RMN ^{13}C – BB e DEPT (125 MHz, CDCl_3) de ACMET

C	CH	CH ₂	CH ₃
183,9	57,2	54,8	49,3
84,3	56,2	42,2	29,1
44,9	43,5	40,9	19,2
43,9	–	38,1	15,7
39,9	–	37,3	–
–	–	26,9	–
–	–	22,3	–
–	–	19,3	–
–	–	18,7	–
C ₅	C ₄ H ₄	C ₉ H ₁₈	C ₃ H ₈
Total C₂₁H₂₈			

Tabela 13: Dados de RMN ^1H de ACMET (125 MHz, CDCl_3) e **8** (400 MHz, CDCl_3) [CHEN et al., 2000]

8	ACMET
δ_H (J / Hz)	δ_H (J / Hz)
3,12 (3H, s, OCH ₃)	3,13 (3H, s, OCH ₃)
1,27 (3H, s, H-17)	1,28 (3H, s, H-17)
1,22 (3H, s, H-18)	1,23 (3H, s, H-18)
0,94 (3H, s, H-20)	0,95 (3H, s, H-20)

Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ACMET (125 MHz, CDCl_3), RC-1 (125 MHz, CDCl_3) e **8** (100 MHz, CDCl_3) [CHEN et al., 2000]

C n°	ACMET	RC-1	8	C n°	ACMET	RC-1	8
	δ_C	δ_C	δ_C		δ_C	δ_C	δ_C
1	40,9	40,9	42,1	11	18,7	18,6	18,5
2	19,3	19,3	19,1	12	26,9	33,3	26,7
3	38,1	38,0	37,1	13	43,5	44,0	43,3
4	43,9	43,9	44,7	14	37,3	39,9	37,9
5	57,2	57,2	56,9	15	54,8	49,2	54,6
6	22,3	22,0	22,1	16	84,3	156,1	84,1
7	42,2	41,5	40,7	17	19,2	103,2	18,3
8	44,9	44,4	43,7	18	29,1	29,2	28,9
9	56,2	55,3	56,0	19	183,9	184,6	183,7
10	39,9	39,9	39,7	20	15,7	15,8	15,5
				OCH₃	49,3	-	54,6

Figura 73: Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACMET

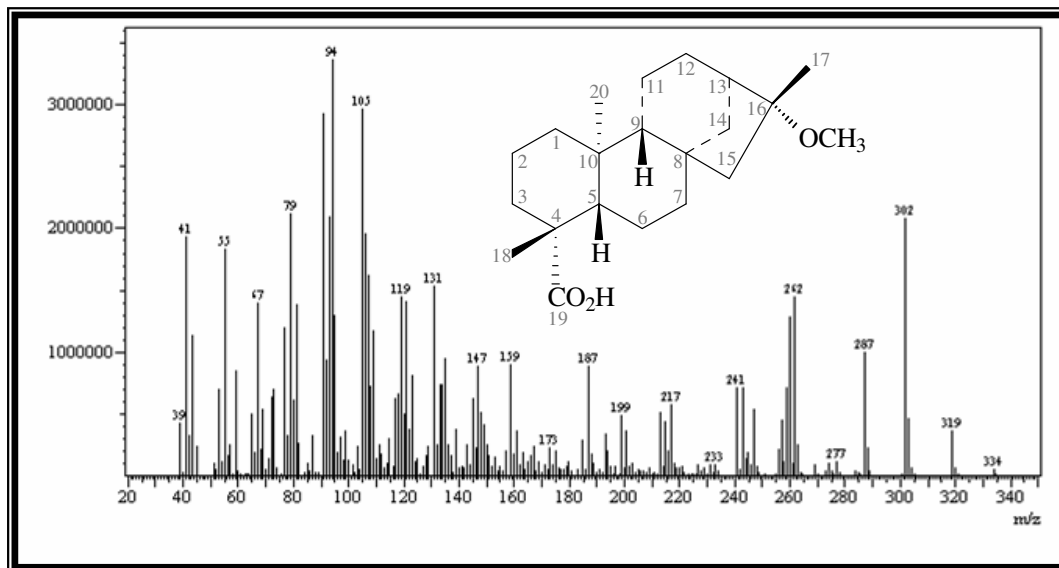


Figura 74: Espectro de absorção na região do IV (cm^{-1} , KBr) de ACMET

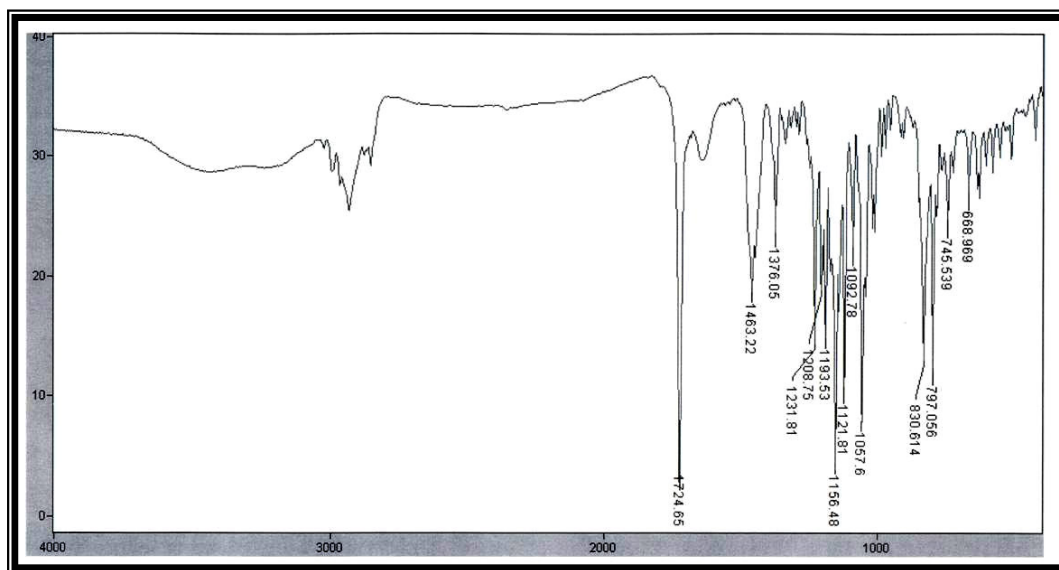


Figura 75: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de ACMET

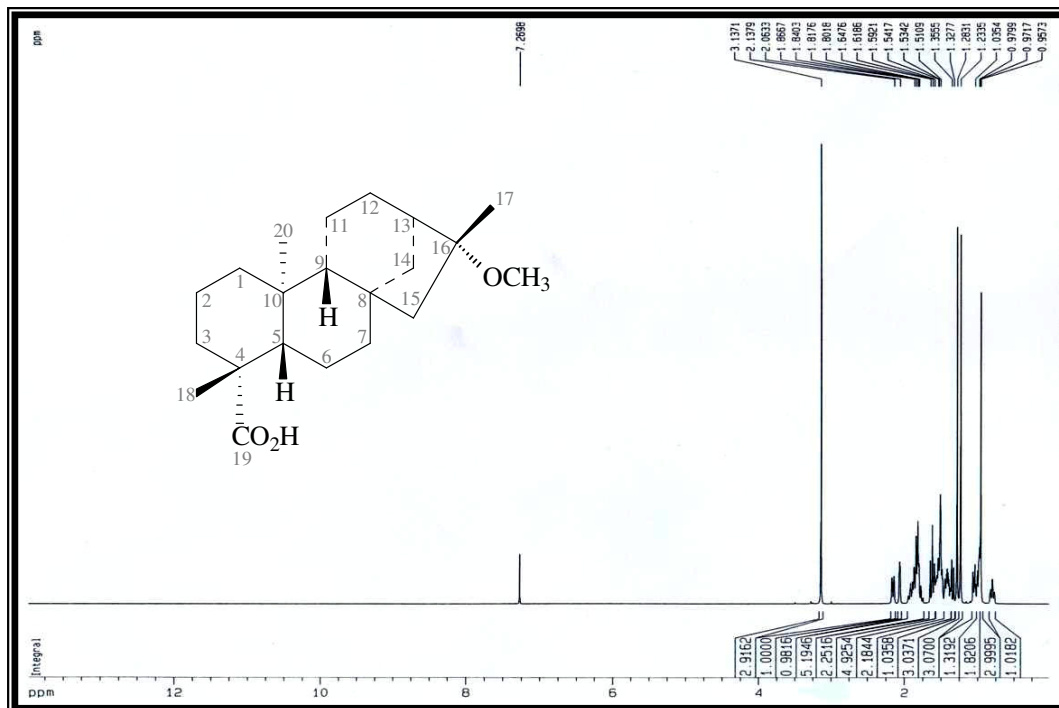


Figura 76: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de ACMET

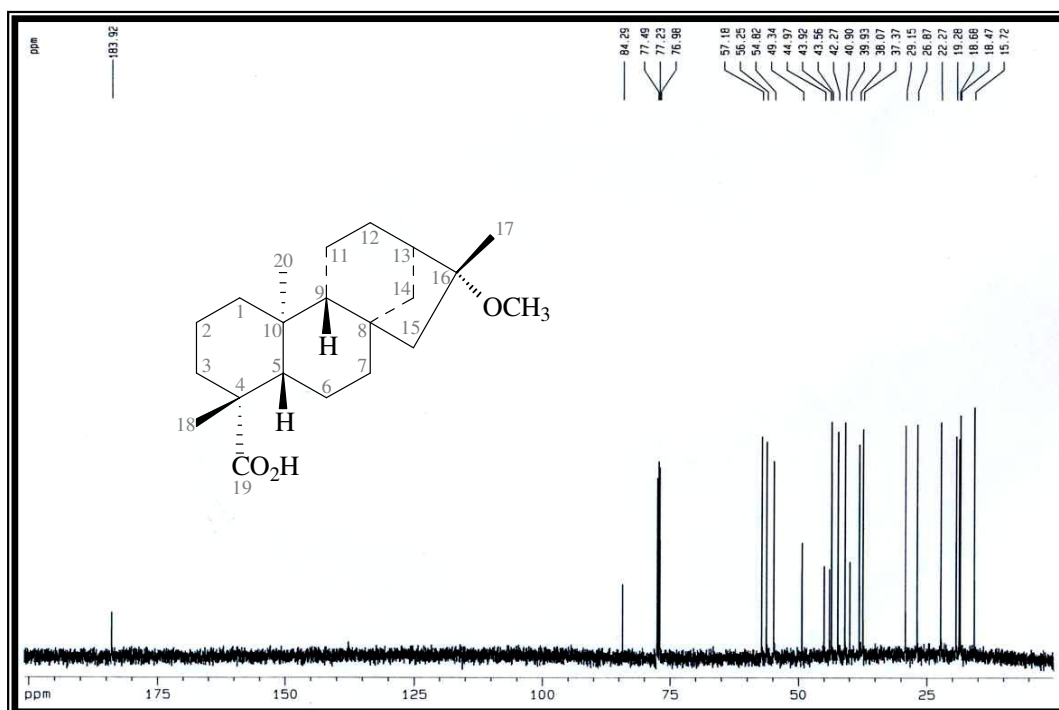


Figura 77: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (125 MHz, CDCl_3) de ACMET

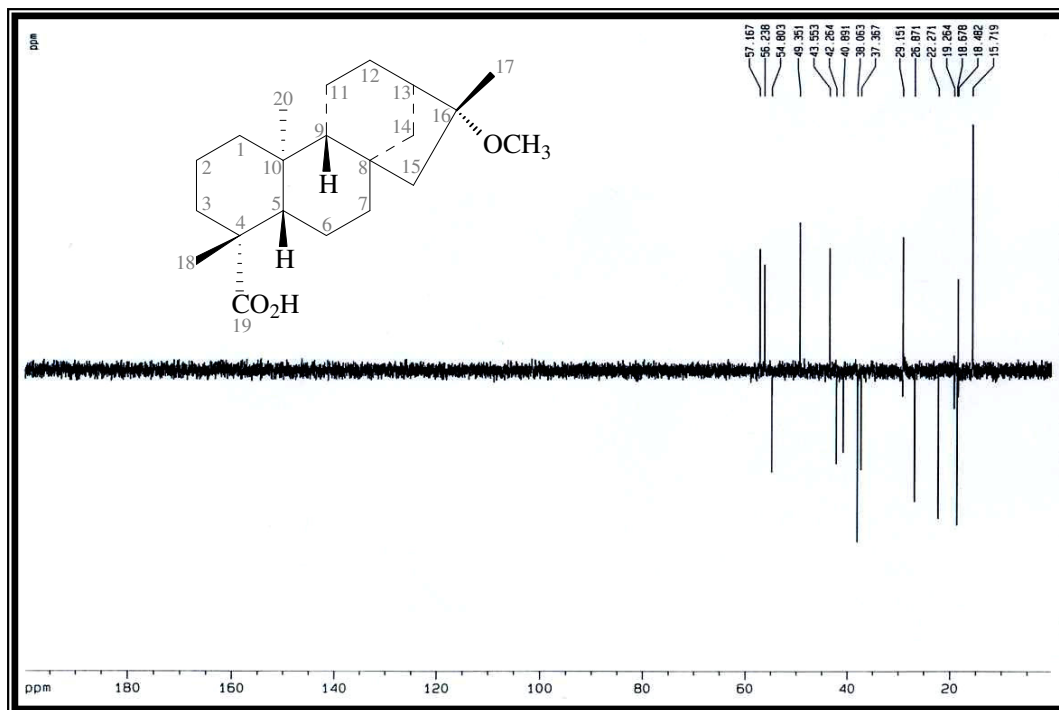


Figura 78: Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY) de ACMET

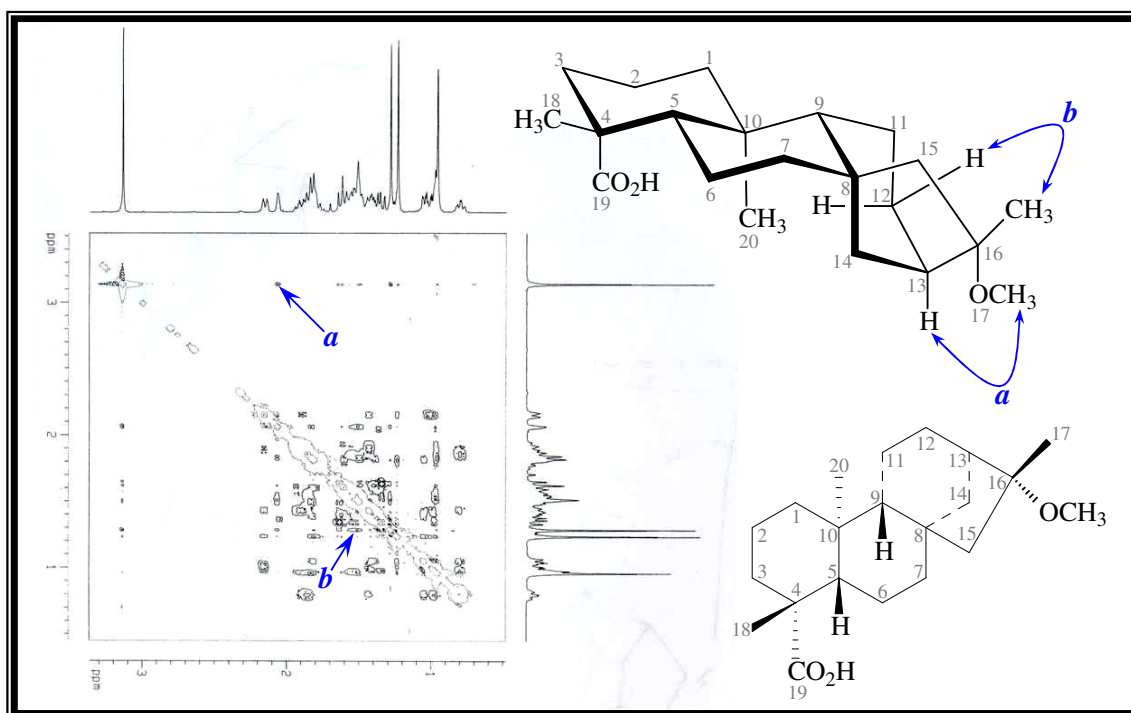


Figura 79: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HSQC} - ^1J_{\text{CH}}$) de ACMET

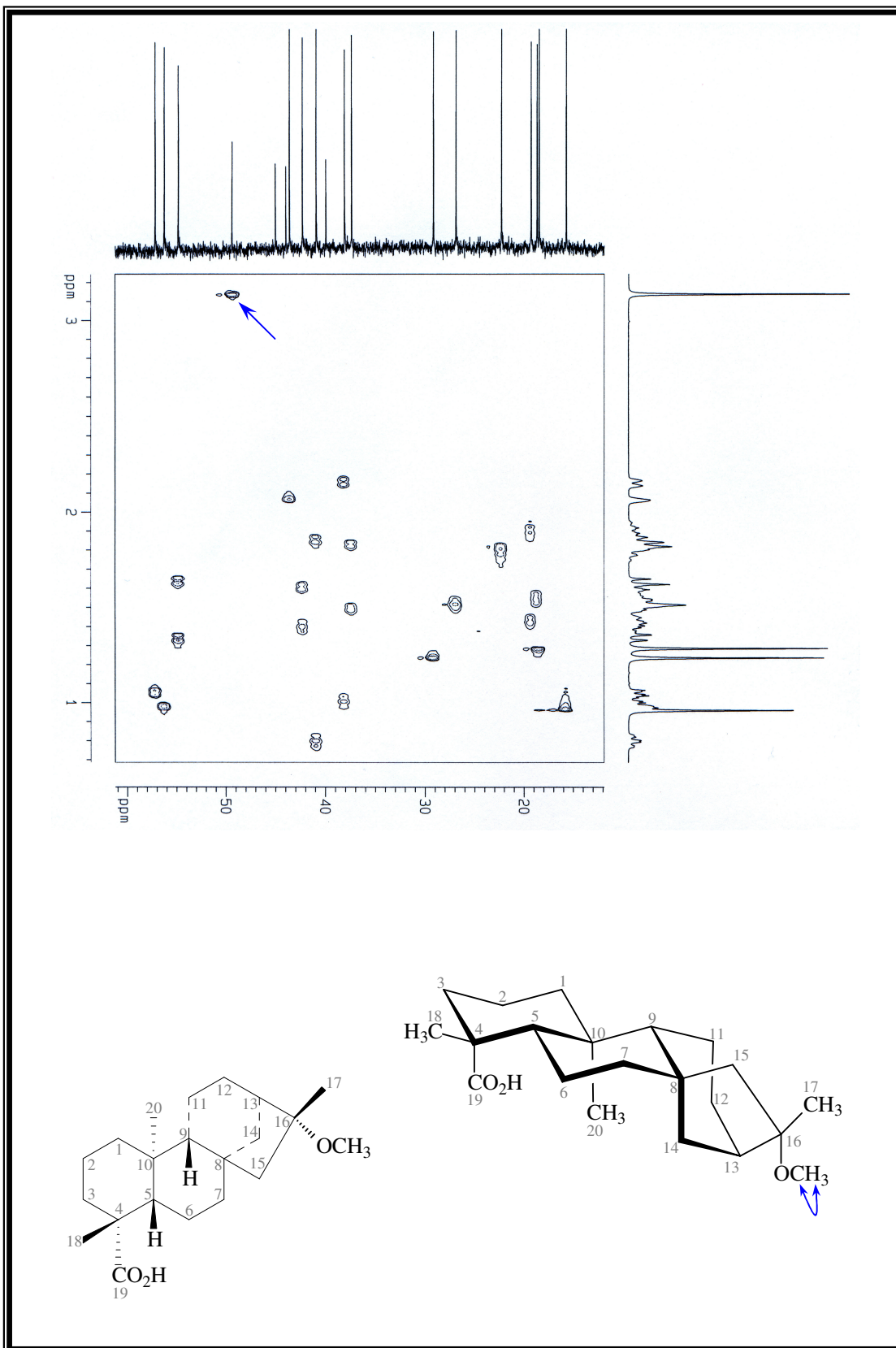


Figura 80: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACMET

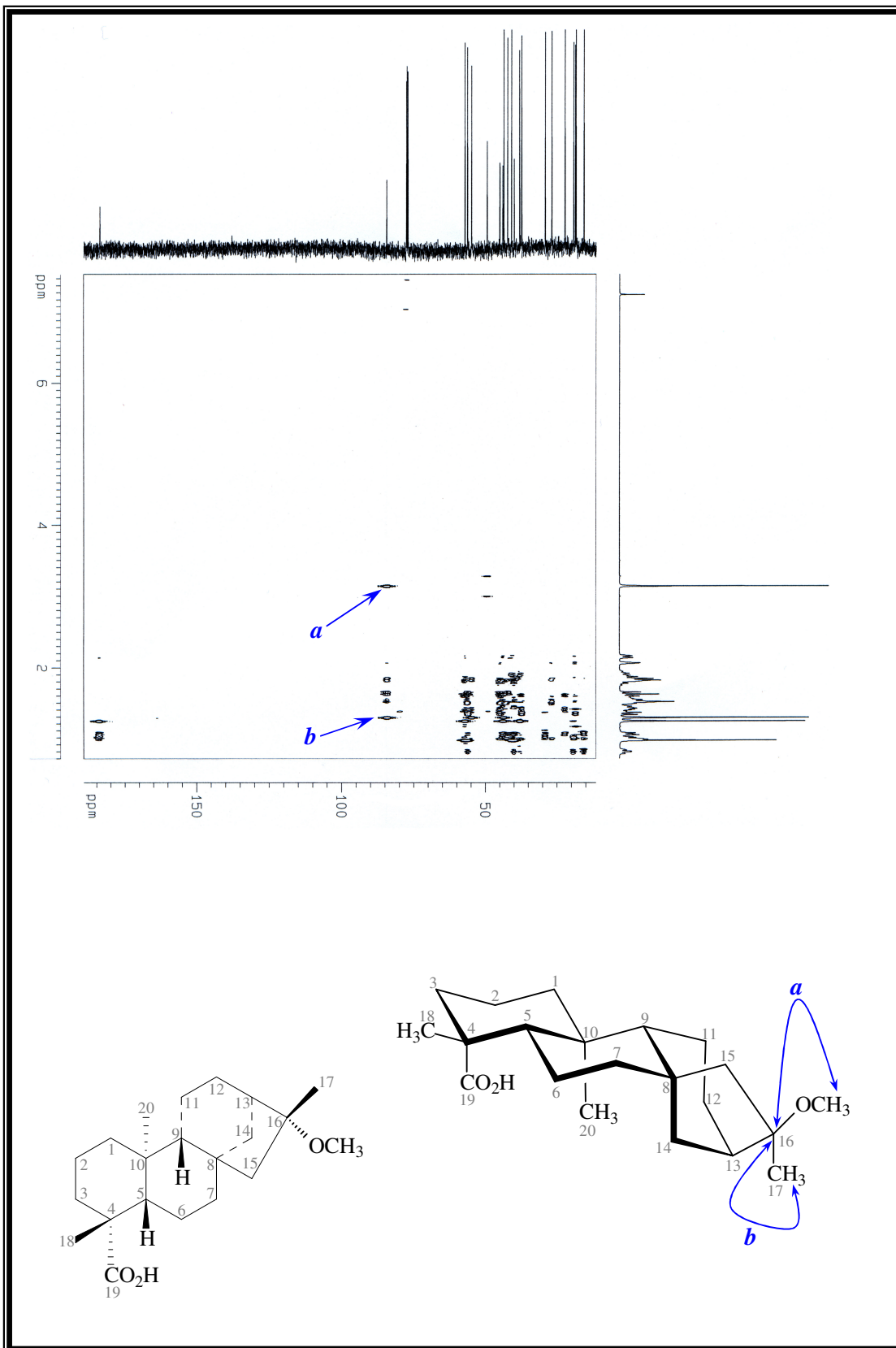
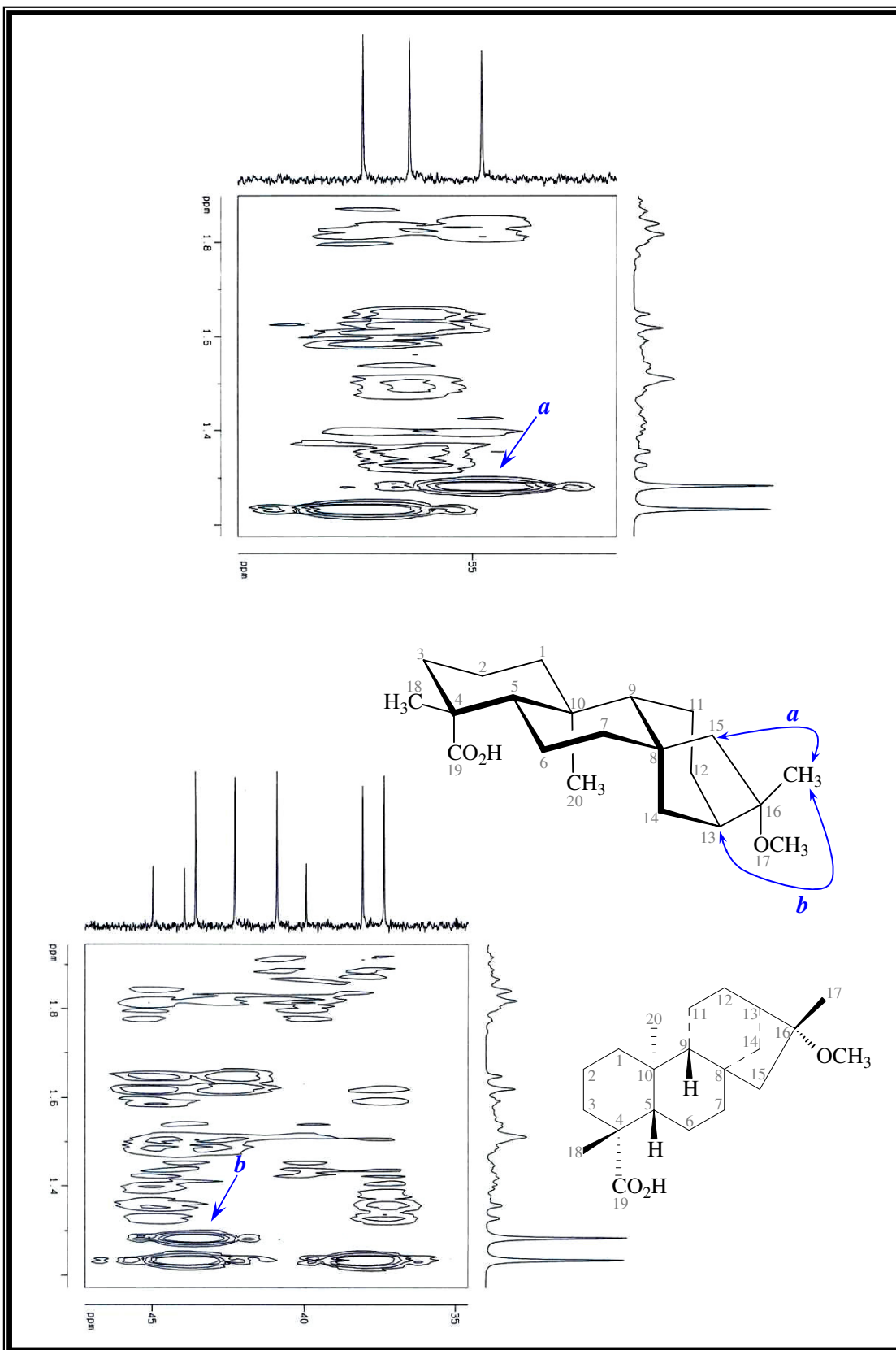


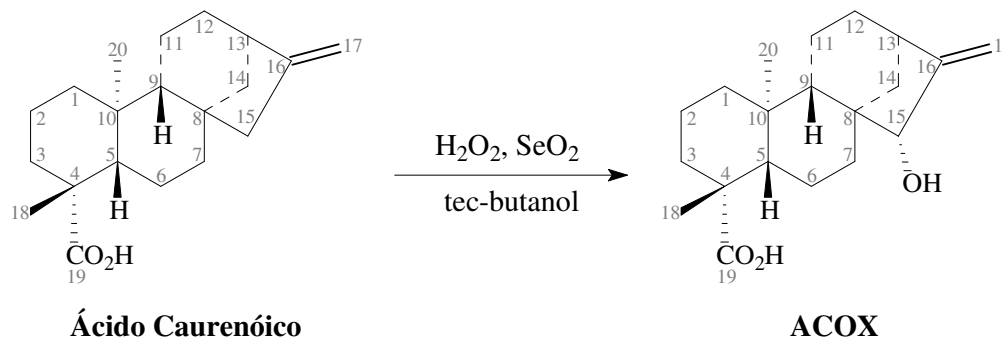
Figura 81: Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACMET



5.4 Oxidação alílica do ácido caurenóico

Segundo a literatura [COXON et al., 1977], a oxidação de carbonos alílicos utiliza como agente oxidante o dióxido de hidrogênio (H_2O_2 30%) na presença de SeO_2 . A reação com RC-1 (Item 6.4.4, Pág. 112) forneceu um produto (ACOX) cristalino, branco, com faixa de fusão 220-221 °C e rendimento de 62 %.

Figura 82: Oxidação alílica de RC-1



O espectro na região do infravermelho (Fig. 85, Pág. 92) de ACOX mostrou absorção relevante referente a presença de grupo hidroxila (ν_{O-H} 3418,9 cm^{-1}). Já o espectro de RMN ^{13}C – BB (Fig. 87, Pág. 93) de ACOX, em comparação ao correspondente espectro de RC-1 (Fig. 26, Pág. 44), revelou como característica principal, o surgimento de um sinal em δ_C 83,1 relativo a carbono sp^3 metínico oxigenado. Através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT 135 (Fig. 88, Pág. 94), foi possível reconhecer os sinais correspondentes a dois átomos de carbono metílicos (C-20 e C-18), nove metilênicos (C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, C-11, C-12 e C-14), quatro metínicos (C-15, C-13, C-9 e C-5) e cinco de carbonos não hydrogenados (C-18, C-16, C-10, C-8 e C-4), os quais encontram-se relacionados na tabela 16, página 91. A atribuição dos sinais referentes a cada carbono foi efetuada fazendo-se a comparação dos deslocamentos químicos de RC-1 com os dos correspondentes carbonos de ACOX, conforme tabela 17, página 91. Salvo os carbonos C-15 (δ_C 83,1, centro de reação) e os carbonos C-17 (δ_C 108,1), C-16 (δ_C 161,8), C-8 (δ_C 48,8) e C-7 (δ_C 36,8), próximos ao centro de reação, todos os outros, como esperado, não apresentaram variação significativa nos respectivos valores de deslocamentos químicos. Em adição, o espectro de RMN 1H de ACOX (Fig. 86, Pág. 93) exibiu um novo sinal em δ_H 4,18 (s, 1H) correspondente a hidrogênio carbinólico (H-15) e, o espectro de massa (Fig. 84, Pág. 92), por sua vez, apresentou pico do $[M]^+$ em m/z 318, ou seja, 16 u.m.a. a mais que RC-1.

Desta forma, levando em consideração o centro estereogênico C-15, foram possíveis dois estereoisômeros (Fig. 83). A estereoquímica, conforme visto em ACOX (Fig. 82, Pág. 89), foi determinado pela comparação do deslocamento químico do carbono C-15 de ACOX, como também, dos deslocamentos químicos dos carbonos (Tab. 17, Pág. 91) e hidrogênios (Tab. 15, Pág. 90) próximos ao centro reacional, com valores registrados na literatura [BUSCEMI et al, 2004; LOBITZ et al., 1998].

Em relação ao produto de oxidação, é significativo ressaltar também os acoplamentos nos espectros: ^1H - ^1H COSY (Fig. 89, Pág. 94), do hidrogênio carbinólico H-15 (δ_{H} 4,18) com os hidrogênios 2H-17 (δ_{H} 5,51 e 5,21); HMQC (Fig. 90, Pág. 95) do hidrogênio carbinólico H-15 (δ_{H} 4,18) com o respectivo carbono C-15 (δ_{C} 83,13) e, no HMBC (Figs. 91-93, Pág. 96-98), dos hidrogênios 2H-17 (δ_{H} 5,51 e 5,21) com os carbonos C-15 (δ_{C} 83,1) e C-13 (δ_{H} 43,3).

Todas as argumentações acima descritas indicam que o produto de reação trata-se do Ácido 15 α -hidroxi-ent-caur-16-en-19-óico, já isolado como produto natural a partir das espécies *Eupatorium betonicaeforme* [ALBUQUERQUE et al., 2006], *Baccharis illinita* [VERDI et al., 2004], *Mikania banisteriae* [ESPITIA, 2003], *Mikania stipulacea* [DO NASCIMENTO et al., 2001], *Mikania hirsutissima* [Ohkoshi et al., 1999], *Espeletia schultzei* [DE LOS RIOS et al., 1999], dentre outras.

Figura 83: Possíveis estruturas para ACOX

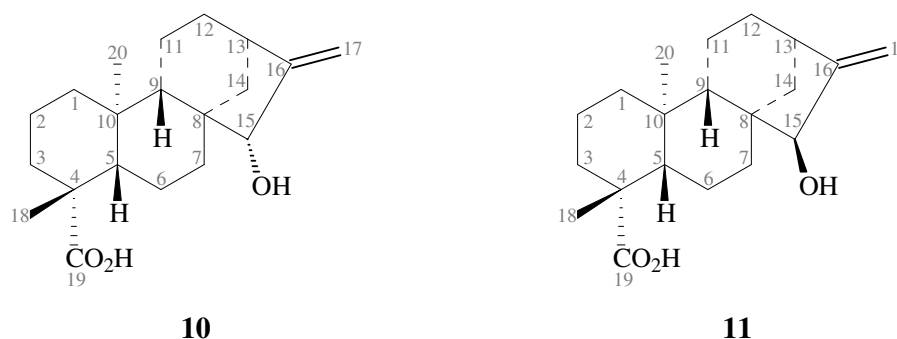


Tabela 15: Dados de RMN ^1H de ACOX (300 MHz e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e **10** (600 MHz, CDCl_3) [BUSCEMI et al, 2004]

ACOX	10 [BUSCEMI et al, 2004]
δ_{H} (J / Hz)	δ_{H} (J / Hz)
4,18 (H-15)	3,80 (H-15)
5,51; 5,22 (H-17)	5,20; 5,05 (H-17)

Tabela 16: Dados de RMN ^{13}C – BB e DEPT (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de ACOX

C	CH	CH ₂	CH ₃
180,6	83,1	108,1	29,8
161,8	57,7	41,6	16,7
48,8	54,5	39,1	–
44,4	43,3	37,1	–
40,7	–	36,8	–
–	–	33,5	–
–	–	22,4	–
–	–	20,3	–
–	–	19,1	–
C ₅	C ₄ H ₄	C ₉ H ₁₈	C ₂ H ₆
Total C ₂₀ H ₂₈			

Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ACOX (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), RC-1 (125 MHz, CDCl_3) e **10** (100 MHz, CDCl_3) [BUSCEMI et al, 2004; LOBITZ et al., 1998]

C n°	10			
	ACOX	RC-1	[BUSCEMI et al., 2004]	[LOBITZ et al., 1998]
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	41,6	40,9	40,7	40,7
2	20,3	19,3	19,1	19,1
3	39,1	38,0	37,7	37,9
4	44,4	43,9	43,7	43,1
5	57,7	57,2	57,0	57,0
6	22,4	22,0	20,9	21,0
7	36,8	41,5	35,2	36,3
8	48,8	44,4	47,7	47,8
9	54,5	55,3	53,3	53,4
10	40,7	39,9	39,8	39,8
11	19,1	18,6	18,3	18,3
12	33,5	33,3	32,6	32,6
13	43,3	44,0	42,3	42,3
14	37,1	39,9	36,2	35,3
15	83,1	49,2	82,7	82,7
16	161,8	156,1	160,2	160,4
17	108,1	103,2	108,3	108,3
18	29,8	29,2	28,9	29,0
19	180,6	184,6	183,8	182,8
20	16,7	15,8	15,8	15,9

Figura 84: Espectro de massa (I.E. 70 eV) de ACOX

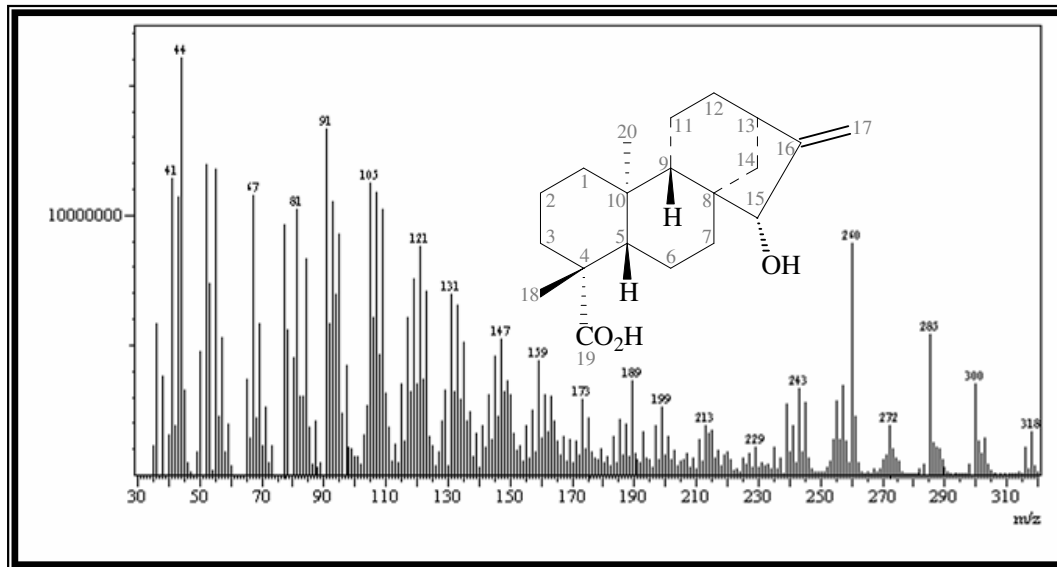


Figura 85: Espectro de absorção na região do IV (cm⁻¹, KBr) de ACOX

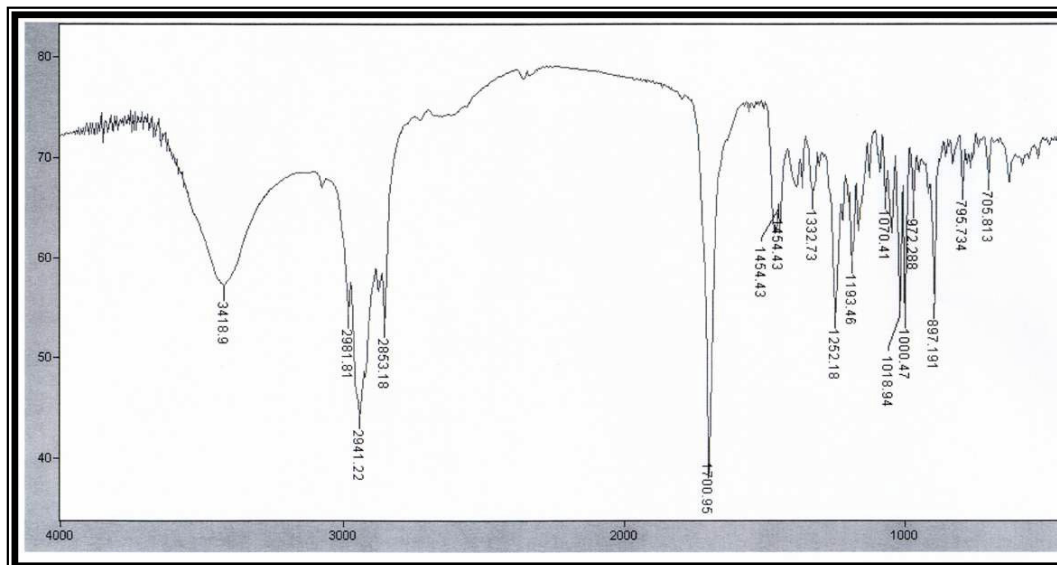


Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT – 135° (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de ACOX

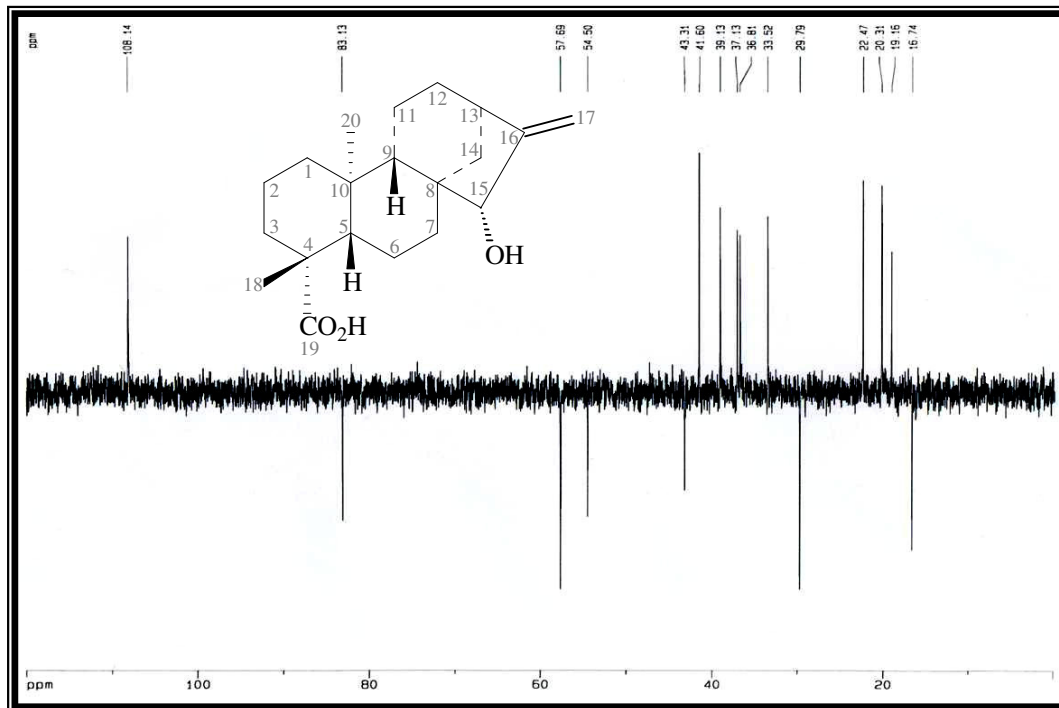


Figura 89: Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY) de ACOX

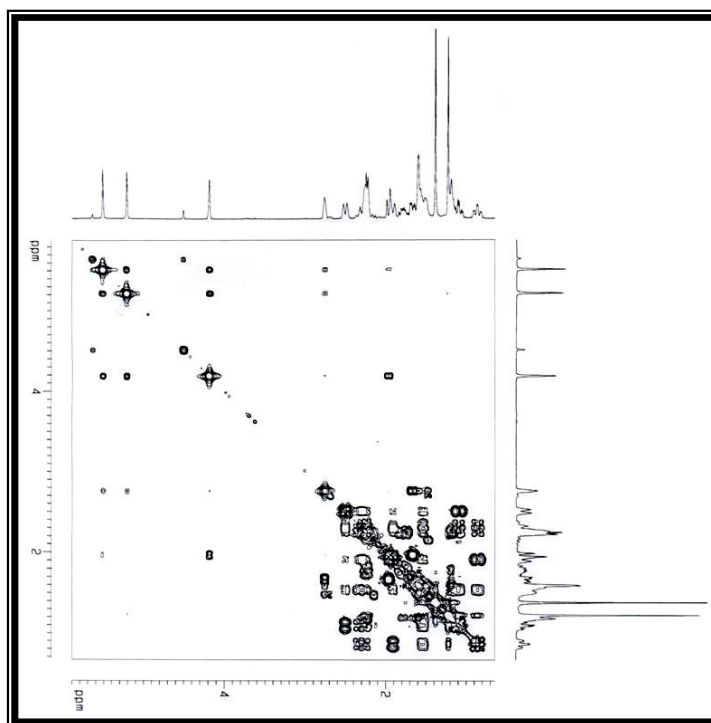


Figura 90: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1J_{\text{CH}}$) de ACOX

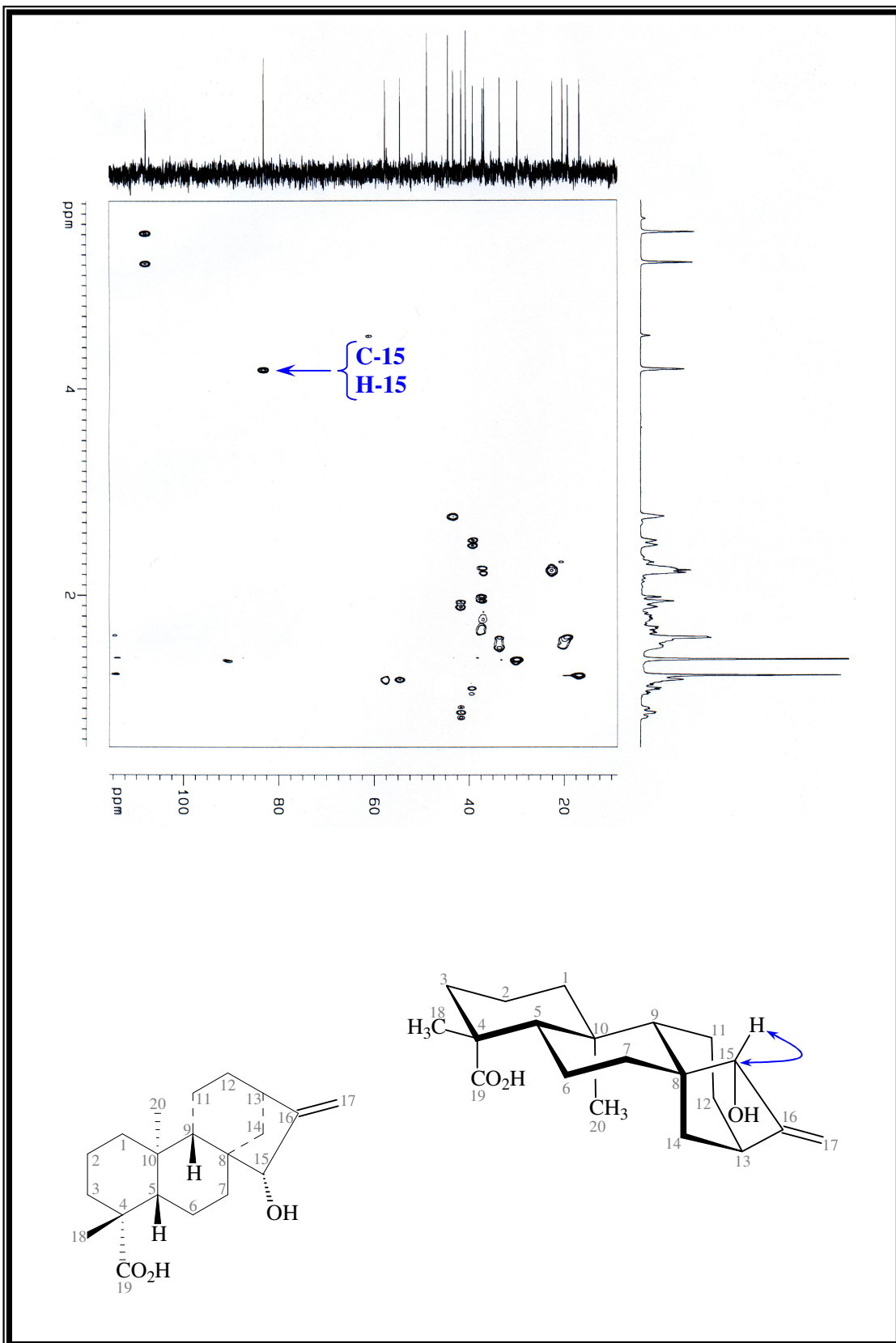


Figura 91: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACOX

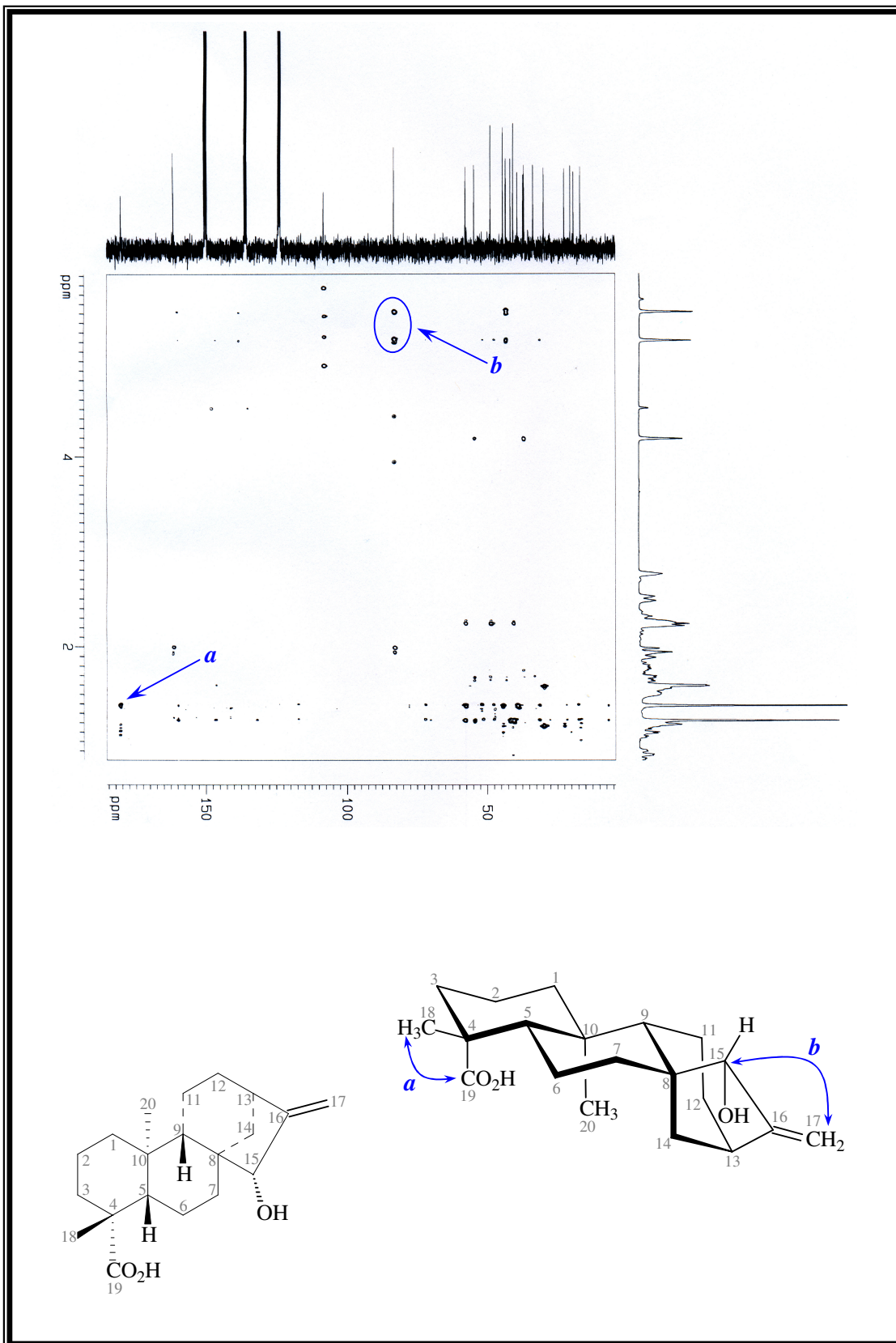


Figura 92: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACOX

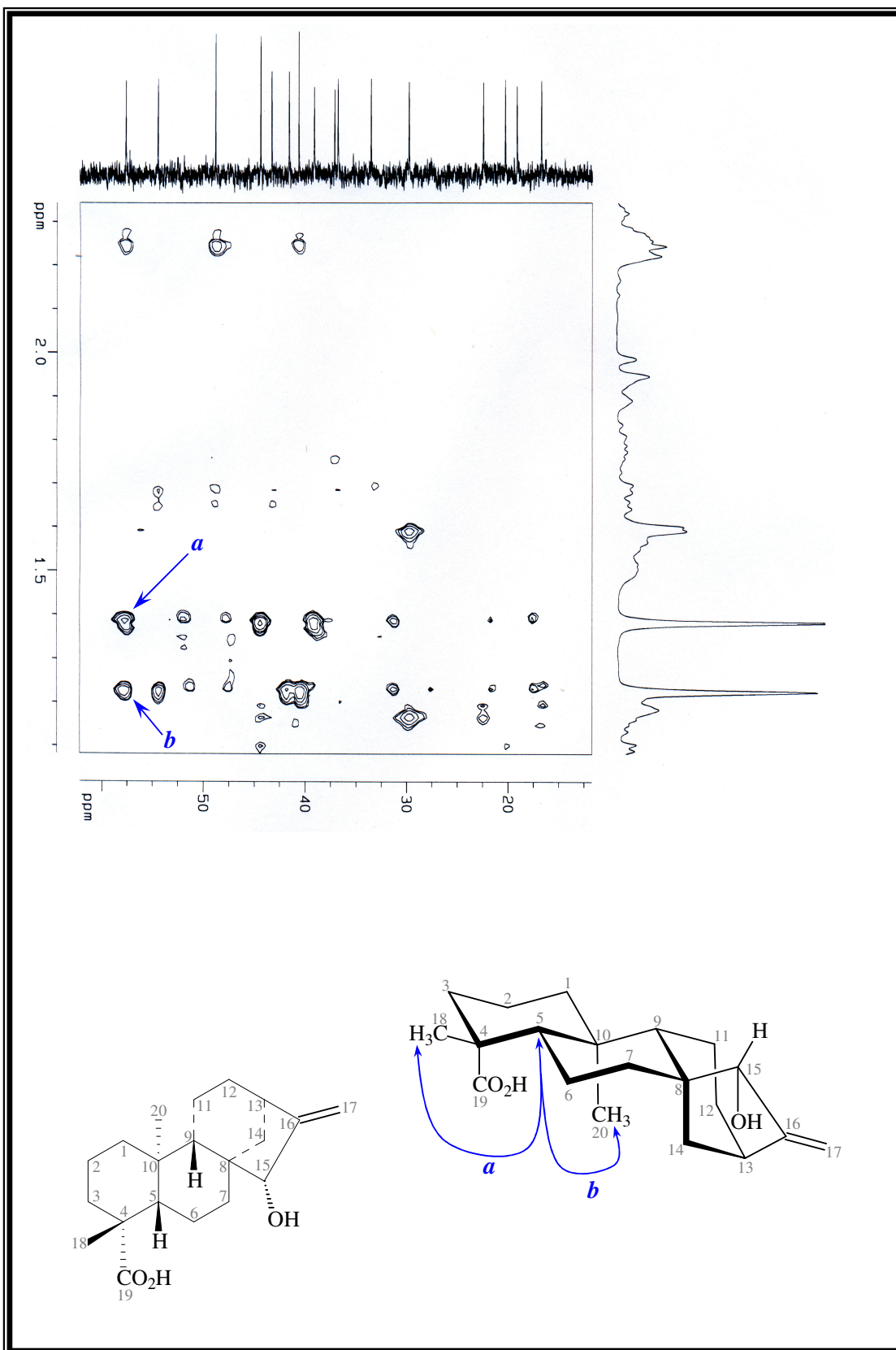
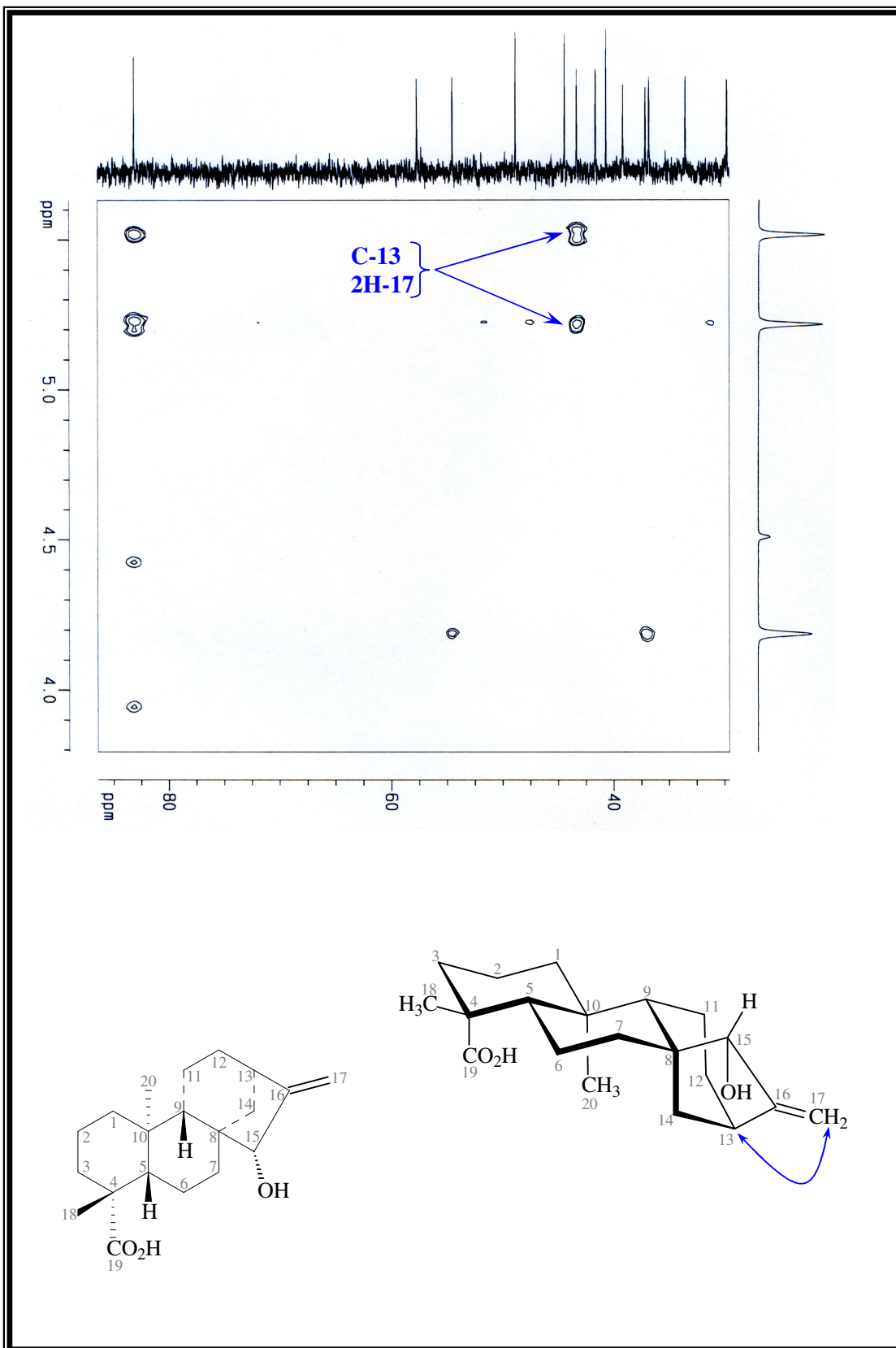
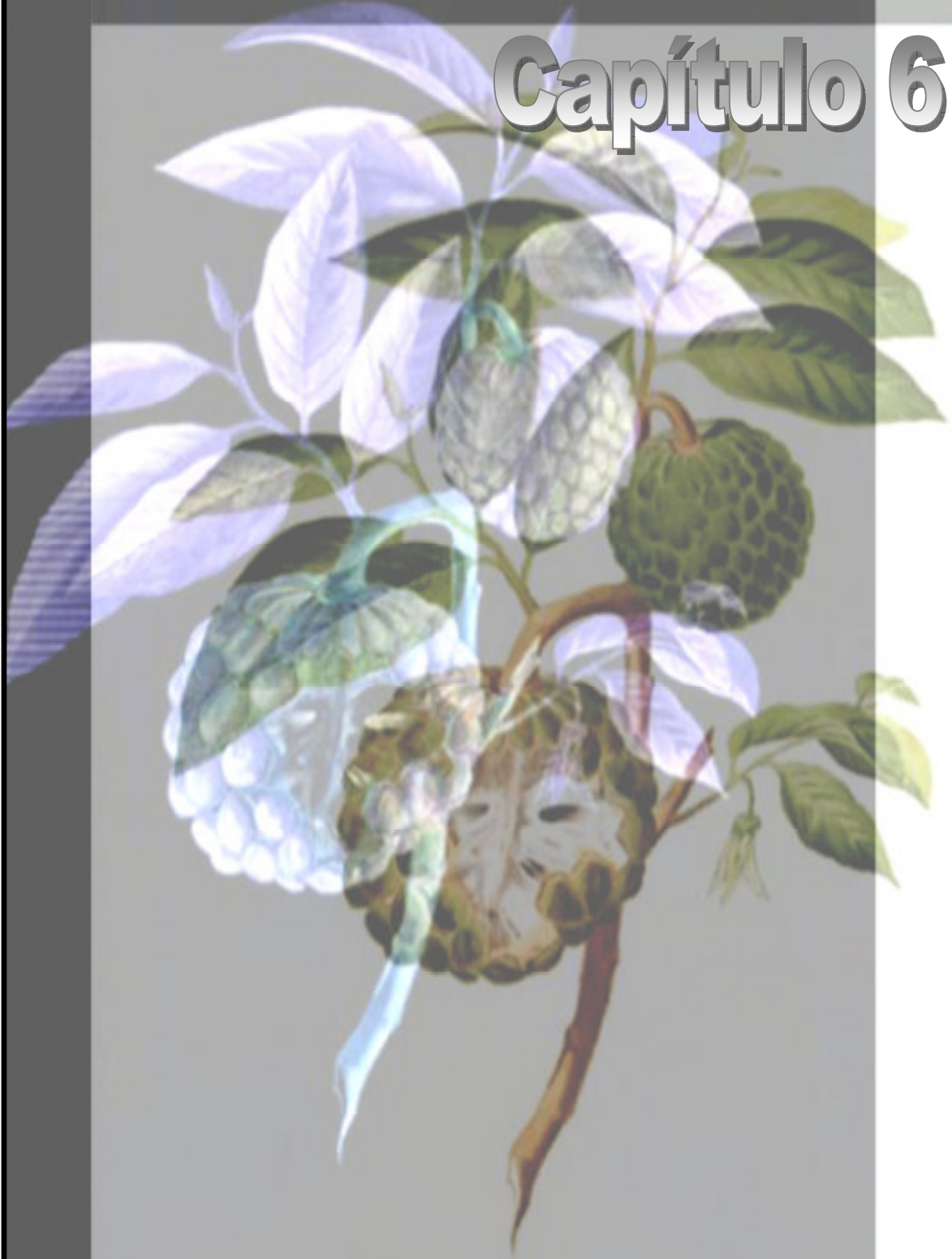


Figura 93: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^{2,3}J_{\text{CH}}$) de ACOX



Capítulo 6



PARTE EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Material vegetal (*Annona squamosa*)

Annona squamosa foi coletada no município de Acarape-CE. A exsicata, devidamente registrada sob o número 31710, foi depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

6.2 Métodos de análise

6.2.1 Métodos cromatográficos

As cromatografias em coluna aberta (CC) foram desenvolvidas utilizando gel de sílica 60 (Φ mm 0,063-0,200), da marca VETEC e sílica 60 (Φ mm 0,040-0,063) para cromatografia “flash”, da marca MERK. O Comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades dos materiais a serem cromatografados.

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se gel de sílica 60 (Φ mm 0,002-0,025), da marca CARLO ERBA e cromatofolhas de plástico e/ou de alumínio AL TLC de gel de sílica 60 F₂₅₄, da MERCK.

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas através da exposição à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm), emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da marca MINERAL LIGHT, pela pulverização com solução de vanilina (C₈H₈O₃) e ácido perclórico (HClO₄) em etanol (C₂H₆O), seguido de aquecimento em placa aquecedora à aproximadamente 120 °C e por saturação em câmara de iodo.

Foram empregados eluentes previamente destilados ou de qualidade PA (Synth) tais como éter de petróleo, hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol, puros ou em misturas binárias numa ordem crescente de polaridade.

A remoção dos solventes de extratos e das frações resultantes das cromatografias, foi realizada em evaporador rotatório BÜCHI Waterbath, à pressão reduzida.

6.2.2 Métodos Físicos de Análises

6.2.2.1 Espectroscopia de absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em Espectrômetro PERKIN ELMER, modelo 720-FT da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Utilizou-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) para análise das amostras.

6.2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos DRX-300 (^1H : 300 MHz e ^{13}C : 75 MHz) e DRX-500 (^1H : 500 MHz e ^{13}C : 125 MHz), ambos pertencentes ao CENAUREMN (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear).

Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio (CD_3Cl), piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e acetona ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) deuterados.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados, no caso dos espectros de RMN ^1H , pelos picos de hidrogênio pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ_{H} 7,24), piridina (δ_{H} 8,73; 7,58; 7,21) e acetona (δ_{H} 1,98). Para os espectros de RMN ^{13}C , os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos picos do carbono-13 dos solventes clorofórmio deuterado (δ_{C} 77,0), piridina deuterada (δ_{C} 150,0; 135,7; 123,4) e acetona deuterada (δ_{C} 206,6; 29,8).

As multiplicidades das bandas em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multipeto).

O padrão de hidrogenação dos átomos de carbono nos espectros de RMN ^{13}C , foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° (CH e CH_3 com amplitude em oposição aos CH_2). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração entre os espectros BB (Broad Band) e DEPT – 135° .

6.2.2.3 Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa dos ésteres metílicos foram obtidos em instrumento GC/MS QP5000/QP5050A da SHIMADZU, utilizando-se coluna DB-5-dimetilpolisiloxano [30 m x 0,25 mm, 80-180°C (10°C/min), 180-280°C (20°C/min)]. Os espectros de massa das substâncias sólidas foram obtidas por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massa SHIMADZU, modelo QP5050A, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

6.2.2.4 Ponto de fusão (pf)

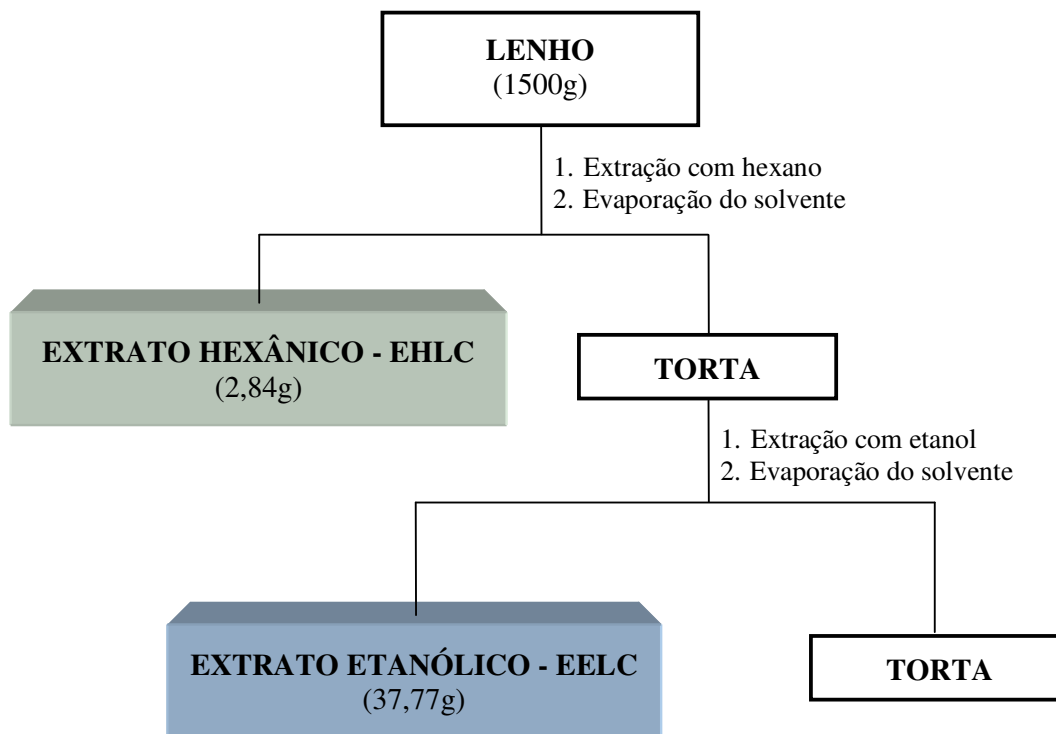
Os pontos de fusão foram determinados em aparelho digital de ponto de fusão MICROQUÍMICA modelo MQAPF-302. As determinações foram realizadas a uma velocidade de 5 °C / min.

6.3 Estudo dos constituintes fixos de *Annona squamosa*

6.3.1 Preparação dos extratos do lenho do caule de *Annona squamosa*

O lenho do caule (1500 g) de *Annona squamosa* após triturado, foi submetido a extração exaustiva com hexano à temperatura ambiente. A solução resultante, depois de filtrada e evaporada à pressão reduzida, forneceu 2,84 g de material resinoso verde escuro, denominado EHLC.

A torta resultante da extração com hexano foi submetida a extração exaustiva com etanol à temperatura ambiente. A solução resultante, depois de filtrada e evaporada à pressão reduzida, forneceu 37,77 g de material pastoso castanho escuro, denominado EELC.

Fluxograma 1: Obtenção dos extratos EHLC e EELC de *Annona squamosa*

6.3.2 Tratamento cromatográfico de EELC

O extrato EELC (37,77g) foi adsorvido em aproximadamente 87 g de gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana. O material resultante foi cromatografado em funil de Büchner sob vácuo, procedendo-se eluições sucessivas com hexano, hexano/diclorometano 50%, diclorometano, acetato de etila e metanol (Tab. 18).

Tabela 18: Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EELC

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa / (g)
Hexano	1200	EELC-H	3,11
Hexano / Diclorometano 50%	2000	EELC-HD	1,02
Diclorometano	2000	EELC-D	1,25
Acetato de Etila	2800	EELC-A	4,17

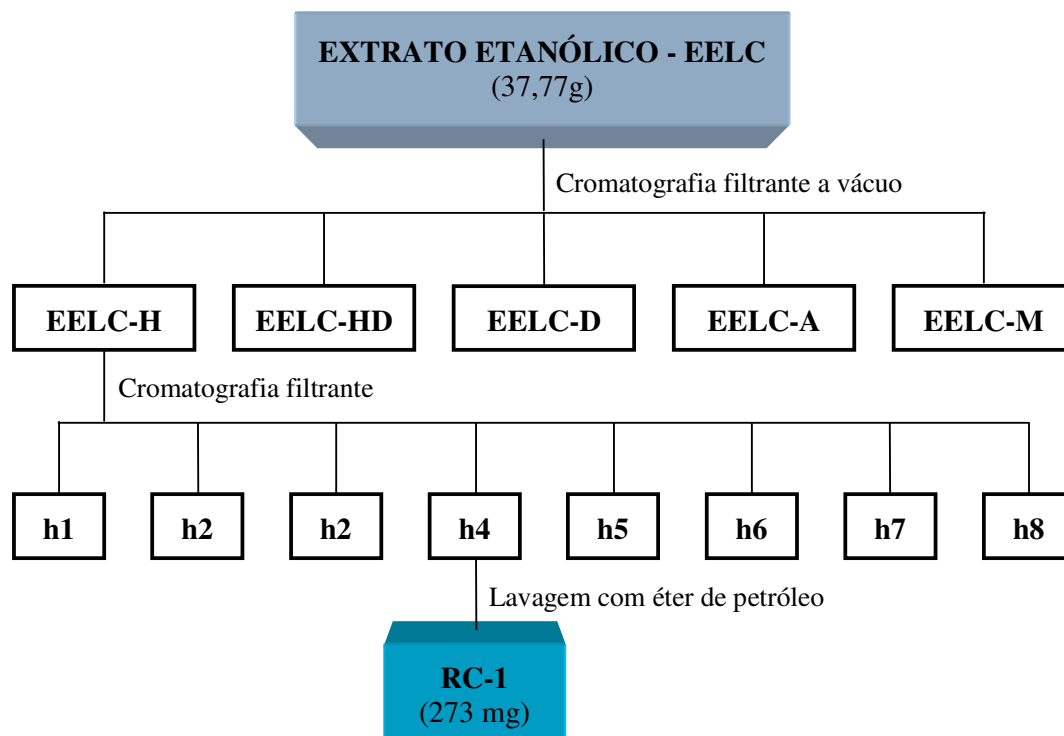
6.3.3 Tratamento cromatográfico de EELC-H e isolamento de RC-1

EELC-H (3,11g), foi adsorvido em aproximadamente 11,0 g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e acondicionado sobre 45,15 g de gel de sílica em coluna cromatográfica (L = 65 mm, ϕ = 45 mm) empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade (Tab. 19).

Tabela 19: Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EELC-H

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa / (mg)
Hexano	75	h1	40
Hexano / Clorofórmio 50%	100	h2	130
Clorofórmio	75	h3	350
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	100	h4	500
		h5	1850
Acetato de Etila	75	h6	70
Acetato de Etila / Etanol 50%	100	h7	50
Etanol	100	h8	60

Após sucessivas lavagens da fração h4 com éter de petróleo, o resíduo analisado por CCD, indicou a presença de uma substância pura (273 mg), como um sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 176-177 °C, denominado RC-1.

Fluxograma 2: Isolamento de RC-1 a partir de EELC**6.3.4 Preparação do extrato hexânico da casca do caule de *Annona squamosa***

A casca do caule (1575 g) de *Annona squamosa*, após seca e triturada, foi submetida a extração exaustiva com hexano à temperatura ambiente. A solução resultante, depois de filtrada e evaporada à pressão reduzida, forneceu 46,26 g de material pastoso verde escuro, denominado EHCC.

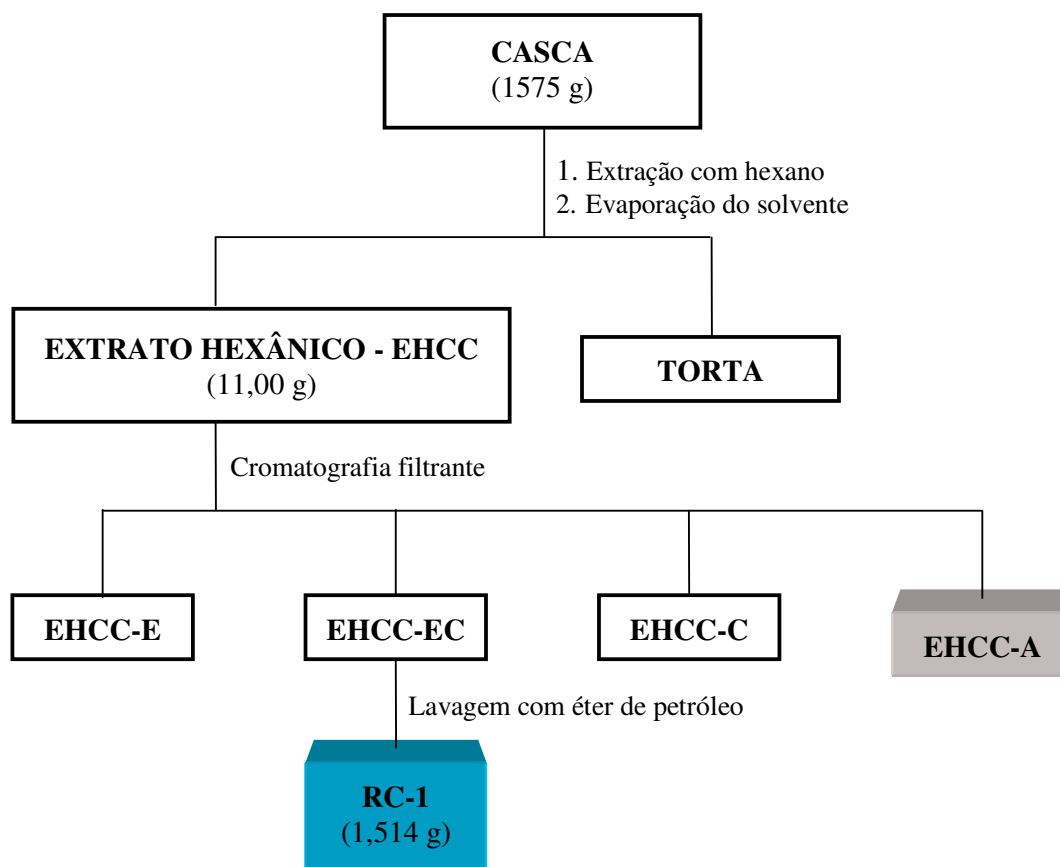
6.3.5 Tratamento cromatográfico de EHCC e isolamento de RC-1

Uma parte (11 g) de EHCC foi adsorvido em aproximadamente 16 g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e acondicionado sobre aproximadamente 82 g de gel de sílica em coluna cromatográfica empacotada com éter de petróleo. A eluição foi realizada com éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila, puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade (Tab. 20, Pág. 106).

Tabela 20: Dados referentes ao tratamento cromatográfico do extrato EHCC

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa / (g)
Éter de Petróleo	500	EHCC-E	0,06
Éter de Petróleo / Clorofórmio 50%	500	EHCC-EC	2,74
Clorofórmio	500	EHCC-C	4,58
Acetato de Etila	500	EHCC-A	1,05

A fração EHCC-EC (2,74g) foi lavada com éter de petróleo fornecendo um sólido (1,514 g) cristalino incolor, puro comprovado por análise em cromatografia em camada delgada (CCD). Ponto de fusão e comparação por CCD, indicaram tratar-se de RC-1.

Fluxograma 3: Isolamento de RC-1 a partir da casca do caule de *Annona squamosa*

6.3.6 Tratamento cromatográfico de EHCC-A

A fração eluída com acetato de etila (EHCC-A, 1,05g) foi misturada a uma pequena quantidade de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e acondicionada sobre coluna cromatográfica contendo 13,7 g gel de sílica empacotada com diclorometano. A eluição foi realizada com diclorometano, acetato de etila e acetona, puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade (Tab. 21).

Tabela 21: Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EHCC-A

Eluente	Volume (mL)	Frações
Diclorometano	125	1-15
Diclorometano / Acetato de etila 10%	100	16-27
Diclorometano / Acetato de etila 20%	100	28-38
Diclorometano / Acetato de etila 30%	100	39-49
Diclorometano / Acetato de etila 40%	100	50-60
Diclorometano / Acetato de etila 50%	50	61-66
Diclorometano / Acetato de etila 60%	50	67-72
Diclorometano / Acetato de etila 70%	50	73-78
Diclorometano / Acetato de etila 80%	50	79-84
Diclorometano / Acetato de etila 90%	50	85-90
Acetato de etila	50	91-96
Acetato de Etila / Acetona 10%	50	97-101
Acetato de Etila / Acetona 20%	50	102-107

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações obtidas foram reunidas dando origem a 9 novas frações, agrupadas conforme tabela 22.

Tabela 22: Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECC-A

Frações	Sigla	Massa (mg)
1-12	α	4,6
13-19	β	1,6
20-26	χ	237,3
27-31	δ	169,6
32-36	ϵ	115,6
37-44	ϕ	86,4
45-63	γ	45,2
64-83	η	80,6
84-107	ι	56,5

6.3.7 Tratamento cromatográfico de EECC-A- δ

A fração EECC-A- δ (169,6 mg), foi misturada a uma pequena quantidade de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre aproximadamente 11,8 g de gel de sílica em coluna cromatográfica empacotada com clorofórmio. A eluição foi realizada com clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade (Tab. 23).

Tabela 23: Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EECC-A- δ

Eluente	Volume (mL)	Frações
Clorofórmio	80	1
Clorofórmio / Acetato de etila 5%	40	2-6
Clorofórmio / Acetato de etila 10%	40	7-11
Clorofórmio / Acetato de etila 15%	40	12-16
Clorofórmio / Acetato de etila 20%	40	17-21
Clorofórmio / Acetato de etila 25%	40	22-26
Clorofórmio / Acetato de etila 30%	40	27-31
Clorofórmio / Acetato de etila 35%	40	32-36
Clorofórmio / Acetato de etila 40%	40	37-41
Clorofórmio / Acetato de etila 45%	40	42-46
Clorofórmio / Acetato de etila 50%	40	47-52
Clorofórmio / Acetato de etila 55%	40	53-57
Clorofórmio / Acetato de etila 60%	40	58-62
Clorofórmio / Acetato de etila 65%	40	63-66
Clorofórmio / Acetato de etila 70%	40	67-72
Clorofórmio / Acetato de etila 75%	40	73-76
Clorofórmio / Acetato de etila 80%	40	77-81
Metanol	40	82

Após análise por CCD as frações foram reunidas dando origem a 2 novas frações, as quais encontram-se relacionadas na tabela 24 da página 109.

Tabela 24: Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECC-A- δ

Frações	Sigla	Massa (mg)
1-6	–	desprezível
7-20	ϕ	101,0
21-33	–	desprezível
34-45	κ	3,3
46-55	–	desprezível
56-66	–	desprezível
67-82	–	desprezível

6.3.8 Tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ

A fração EECC-A- δ - ϕ (101,0 mg), foi misturada a uma pequena quantidade de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre aproximadamente 11,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash” em coluna cromatográfica (L = 68 mm, ϕ = 25mm) empacotada com clorofórmio / acetato de etila 20% (Tab. 25).

Tabela 25: Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ

Eluente	Volume (mL)	Frações
Clorofórmio / Acetato de etila 20%	550	1-100
Metanol	40	101

Após análise por CCD as frações foram reunidas dando origem a 6 novas frações, conforme tabela 26.

Tabela 26: Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ

Frações	Sigla	Massa (mg)
1-5	–	desprezível
6-11	λ	17,2
12-17	μ	16,5
18-29	ν	6,6
30-57	π	9,8
58-100	θ	3,3
101	ρ	7,5

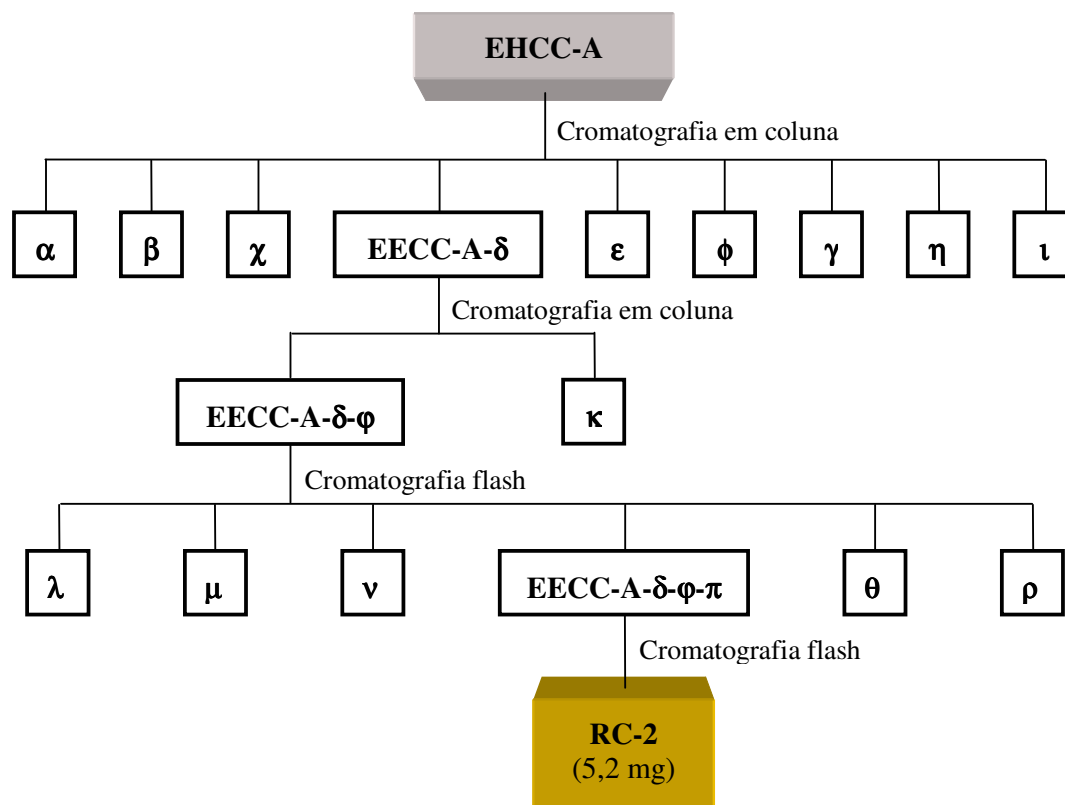
6.3.9 Tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ - π e isolamento de RC-2

A análise por CCD de EECC-A- δ - ϕ - π (9,8 mg), indicou a presença de um constituinte majoritário e mais duas em pequenas concentrações. O material (9,8 mg) foi misturado a uma pequena quantidade de gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana. A mistura foi acondicionada sobre aproximadamente 1,8 g de gel de sílica para cromatografia “flash” em coluna cromatográfica (L = 45 mm, ϕ = 18 mm) empacotada com hexano/diclorometano 80%. A eluição foi realizada de acordo com a tabela 27.

Tabela 27: Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EECC-A- δ - ϕ - π

Eluente	Volume (mL)	Frações
Hexano / Diclorometano 80%	6	1-2
Hexano / Diclorometano 85%	6	3-4
Hexano / Diclorometano 90%	6	5-6
Hexano / Diclorometano 95%	6	7-8
Diclorometano	6	9-10
Diclorometano / Acetato de etila 5%	6	11-12
Diclorometano / Acetato de etila 10%	6	13-14
Diclorometano / Acetato de etila 15%	6	15-16
Diclorometano / Acetato de etila 20%	6	17-18
Diclorometano / Acetato de etila 25%	6	19-20
Diclorometano / Acetato de etila 30%	6	21-22
Diclorometano / Acetato de etila 35%	6	23-24
Diclorometano / Acetato de etila 40%	6	25-26
Diclorometano / Acetato de etila 45%	6	27-28
Diclorometano / Acetato de etila 50%	6	29-30
Diclorometano / Acetato de etila 55%	6	31-32
Diclorometano / Acetato de etila 60%	6	33-34
Diclorometano / Acetato de etila 65%	6	35-36
Diclorometano / Acetato de etila 70%	6	37-38
Metanol	6	39-40

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) das frações geradas indicou que as frações de 24 a 40 continham apenas uma substância. A reunião destas frações forneceu 5,2 mg de um sólido branco, de aspecto cristalino, solúvel em piridina, com faixa de fusão 297-300 °C, denominado RC-2.

Fluxograma 4: Isolamento de RC-2 a partir de EHCC-A

6.4 Obtenção de derivados do ácido caurenóico

6.4.1 Hidrogenação catalítica

Em um balão de 100 mL de fundo redondo foram dissolvidos 62,3mg de ácido caurenóico em 2,5 mL de metanol. Em seguida foram adicionados 30 mg de catalisador (paládio finamente dividido). O sistema foi submetido à atmosfera de hidrogênio e mantido sob agitação por um período de 4 horas. Ao final, a mistura reacional foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se 25,7 mg de um material de cor branca e aspecto amorfo, denominado ACH, com rendimento de 41%.

6.4.2 Ozonólise

Em um balão de duas bocas de 100 mL, conectado a um aparelho produtor de ozônio foram dissolvidos 61,6 mg de ácido caurenóico em 5 mL de clorofórmio (CHCl₃). O sistema foi mantido sob agitação e atmosfera de ozônio (p = 0,9 bar, f = 50 L/h) por um período de 45 min. Em seguida, a mistura reacional foi concentrada à pressão reduzida obtendo-se 79,0 mg

de material. Análise por CG-EM, RMN ^1H e RMN ^{13}C do material obtido, indicou a presença de 41,1 mg do produto esperado, o qual foi denominado ACOZON, com rendimento de 66,3%.

6.4.3 Adição de metanol ao ácido caurenóico

Em um balão de 10 mL de fundo redondo equipado com manta aquecedora e sistema de refluxo foram dissolvidos 70,7 mg de ácido caurenóico em 3,0 mL metanol. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) e o sistema foi mantido sob refluxo por um período de 2 horas. Após resfriamento, a mistura reacional foi então diluída com 10 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), lavada com três alíquotas de 6 mL de água destilada e concentrada à pressão reduzida. O material obtido foi recristalizado em metanol e forneceu 48,4 mg de um sólido cristalino branco, denominado ACMET, com rendimento de 62%.

6.4.4 Oxidação alílica

Em um balão de 10 mL de fundo redondo foram misturados 13,0 mg de óxido de selênio (SeO_2), 5 mL de *tert*-butanol e 79,5 mg de ácido caurenóico. A mistura foi mantida sob aquecimento (40-50°C) e agitação magnética por um período de aproximadamente 15 min até a total dissolução do ácido caurenóico sendo, em seguida, resfriada a 10°C sob banho de água a temperatura ambiente. Adicionou-se 100 μL de dióxido de hidrogênio (H_2O_2 30%) e manteve-se sob agitação à temperatura ambiente, por um período de 2 horas. A mistura reacional foi então diluída com 10 mL de clorofórmio (CHCl_3), lavada com 3 alíquotas de 10 mL de uma solução saturada de sulfato de amônio (NH_4SO_4), seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada a pressão reduzida. O material obtido (72,1 mg) foi purificado por CC (utilizando clorofórmio e acetato de etila como solventes, puros ou em misturas binárias) obtendo-se 42,1 mg de um composto cristalino de cor branca, denominado ACOX, com rendimento de 62%.

6.5. Estudo do óleo fixo de EHLC

6.5.1 Saponificação e obtenção dos ácidos graxos

1,52 g de EHLC foram dissolvidos em 70 mL de metanol em um balão de 125 mL de fundo redondo, equipado com manta aquecedora e sistema de refluxo. Em seguida, adicionou-

se 1,54 g de KOH e manteve-se o sistema sob refluxo por um período de aproximadamente 4 horas.

Após resfriamento do sistema, à temperatura ambiente, foram adicionados 50 mL de água destilada. A solução hidroalcoólica formada, foi então extraída com 3 frações de 25 mL de clorofórmio.

A fase hidroalcoólica alcalina foi acidulada com 2,4 mL de HCl concentrado e extraída com três frações de 25 mL de clorofórmio. As frações orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentradas sob pressão reduzida, fornecendo 524,6 mg de um óleo marrom (ácidos graxos livres).

6.5.2 Obtenção dos ésteres metílicos de EHCL

O material saponificável obtido (524,6 mg), foi submetido a refluxo durante 3 horas com 30,0 mL de metanol e 5,0 mL de HCl concentrado. Após resfriamento, à temperatura ambiente, o produto foi lavado com 30,0 mL de água destilada e extraído com clorofórmio (3 x 30 mL), seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrado a pressão reduzida, fornecendo 369,6 mg de produto metilado (EHLC-Met).

A purificação dos ésteres metílicos foi realizada através de coluna cromatográfica, utilizando como eluentes hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade (Tab. 28).

Tabela 28: Tratamento cromatográfico dos ésteres metílicos de EHLC

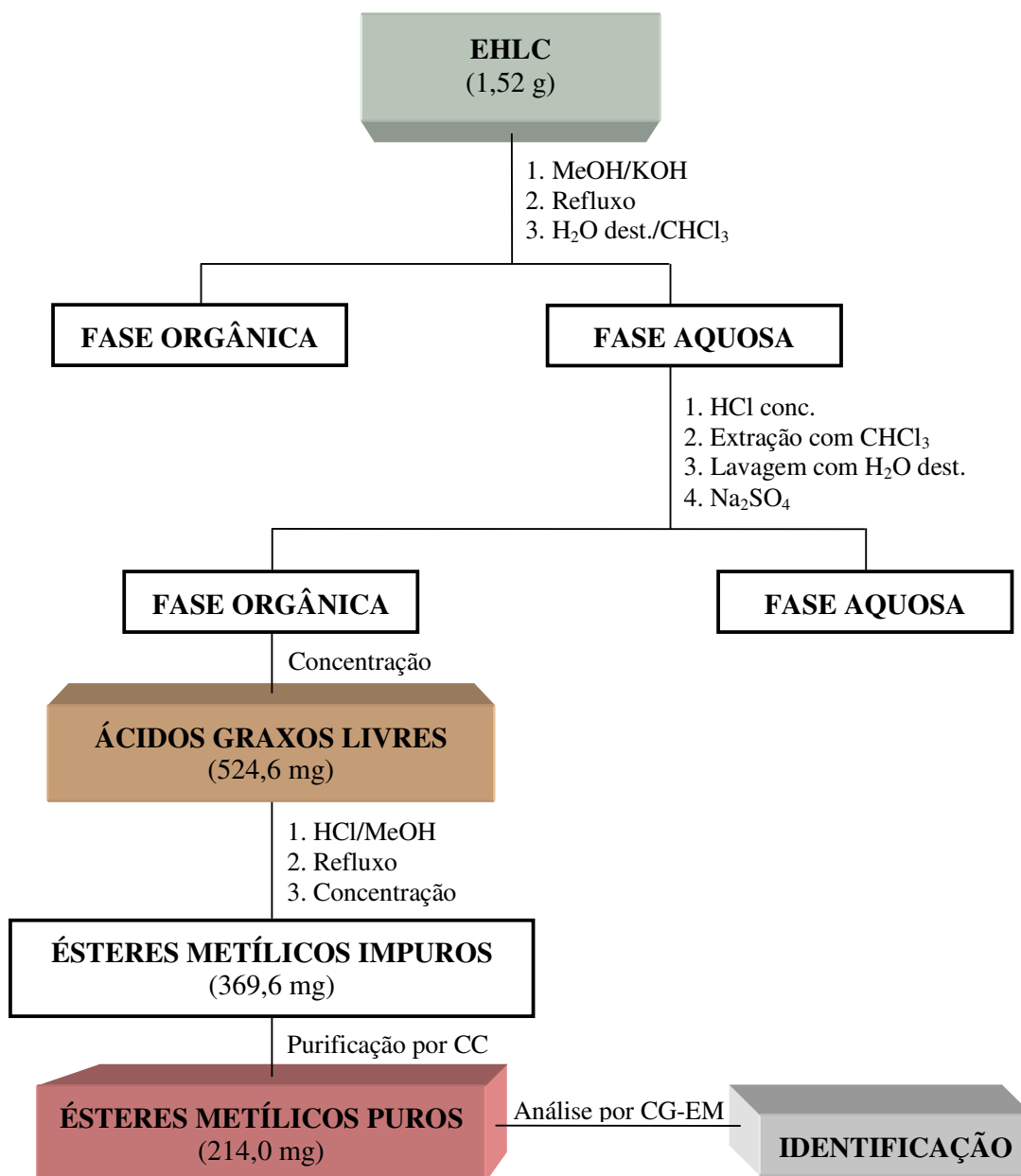
Eluente	Volume (mL)	Frações
Hexano / Clorofórmio 50%	300	1-33
Metanol	100	34

Foram reunidas, após análise por CCD, as frações: (4-8), (9-14), (20-22) e (23-33). A reunião das frações (4-8) apresentou um spot quando analisadas por CCD e foi denominada EHLC-Met-(4-8), um óleo de cor amarelo claro com massa igual a 214,0 mg.

A determinação da constituição química de EHLC-Met-(4-8), foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), sendo os ácidos

tetradecanóico (mirístico), pentadecanóico, hexadecanóico (palmítico), ácido heptadecanóico, 9,12-octadecadienóico, 9-octadecenóico (oléico), octadecanóico (esteárico) e 9,11-octadecadienóico identificados na forma de seus ésteres metílicos, como componentes de EHLC-Met-(4-8).

Fluxograma 5: Obtenção dos ácidos graxos livres de EHLC, metilação dos ácidos graxos livres e identificação de OEHLC



Capítulo 7



CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Trabalhos realizados anteriormente, atestam a presença de diterpenos caurânicos nas folhas, frutos e ramos de *Annona squamosa*. Entretanto, no presente trabalho, podemos comprovar que esses metabólitos podem ser encontrados em quantidades apreciáveis também no caule.

No extrato do caule, além dos dois diterpenos isolados e caracterizados, pode-se observar através dos espectros de RMN (^1H e ^{13}C) que outros compostos, possivelmente, diterpenos, se encontravam presentes em pequenas quantidades e que não foram identificados. Isto, poderia justificar ainda, um outro estudo da espécie em pauta.

Estudos anteriores mostraram que os diterpenos cauranos Ácido 16β , 17 diidroxí-*ent*-cauran- 19 oico [WU et al., 1996] e 16α -Hidroxi-*ent*-caurano [CHEN et al., 1992], constituem princípios ativos anti-HIV. O derivado ACMET obtido no presente trabalho, possui estrutura semelhante, constituindo um composto com possível potencial de atividade contra a citada doença.

Além dos derivados reacionais desse trabalho, outros produtos (amidas, haletos, aldeídos, ésteres, etc.) poderiam ser obtidos utilizando reagentes convencionais através de reações simples, tendo em vista os grupos funcionais clássicos presentes nos compostos originais e, que poderiam servir como modelos para vários testes de avaliação de atividade biológica.

Nas condições utilizadas para reação de metilação do ácido caurenóico (refluxo e HCl/MeOH) foi obtido ACMET como único produto, com rendimento de aproximadamente 65 %. A obtenção do éster metílico, neste caso, exigiria então a utilização de um reagente de metilação específico.

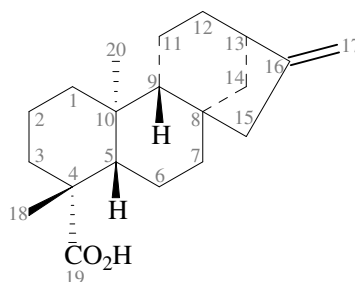
Capítulo 8

**CONSTANTES FÍSICAS E DADOS
ESPECTROSCÓPICOS**

8. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

8.1 Constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas

8.1.1 RC-1



Ácido *ent*-caur-16-en-19-óico

F.M.: C₂₀H₃₀O₂

P.M.: 302 u.m.a.

P.F.: 176-177 °C

Aspecto: sólido cristalino incolor

Solubilidade: clorofórmio

Espectroscopia na região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

3100, 2600, 1690, 1656, 1471, 1259, 1200, 1193, 1179 e 875.

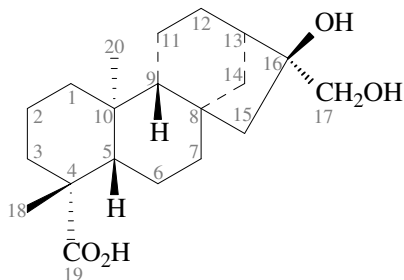
Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – Deslocamento químico (δ ppm) e Constante de Acoplamento (J Hz):

1,88 (m, Ha-1); 0,82 (ddd, J=13,3; 3,85, Hb-1); 1,90 (Ha-2); 1,43 (Hb-2); 2,15 (d, J=14,1, Ha-3); 1,01 (Hb-3); 1,07 (H-5); 1,85 (Ha-6); 1,81 (Hb-6); 1,52 (Ha-7); 1,42 (Hb-7); 1,06 (H-9); 1,60 (Ha-11); 1,55 (Hb-11); 1,62 (Ha-12); 1,48 (Hb-12); 2,64 (s, H-13); 1,98 (Ha-14); 1,13 (Hb-14); 2,06 (m, 2H-15); 2,05 (Hb-16); 4,80 (sl, Ha-17); 4,74(sl, Hb-17); 1,25 (s, 3H-18); 0,96 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – Deslocamento químico (δ ppm):

Tabela 3, página 40 e tabela 4, página 41.

8.2.2 RC-2



Ácido 16 β ,17-diidroxi-ent-cauran-19-óico

F.M.: C₂₀H₃₂O₄

P.M.: 334 u.m.a.

P.F.: 297-300 °C

Aspecto: sólido cristalino branco

Solubilidade: piridina

Espectroscopia na região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

3347, 2943, 1693, 1447, 1239, 1167, 1073, 1022.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) – Deslocamento químico (δ ppm) e Constante de Acoplamento (J Hz):

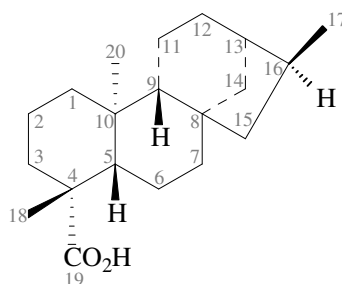
1,94 (m, Ha-1); 0,87 (m, Hb-1); 2,28 (Ha-2); 1,51(Hb-2); 2,48 (Ha-3); 1,10 (Hb-3); 1,10 (d, J=12,6, H-5); 2,20 (Ha-6); 2,05 (Hb-6); 2,45 (Ha-7); 1,40 (Hb-7); 1,22 (H-9); 2,50 (Ha-11); 1,68 (Hb-11); 2,19 (Ha-12); 1,52 (Hb-12); 1,51 (H-13); 2,08 (Ha-14); 1,20 (Hb-14); 1,73 (d, J=13,8, Ha-15); 1,68 (d, J=13,8, Hb-15); 3,87 (d, J=10,7, Ha-17); 3,79 (d, 10,7, Hb-17) 1,30 (s, 3H-18); 1,24 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N) – Deslocamento químico (δ ppm):

Tabela 5, página 50 e tabela 7 página 51.

8.2 Constantes físicas e dados espectroscópicos dos derivados de RC-1

8.2.1 ACH



Ácido 16 α -ent-cauran-19-óico

F.M.: C₂₀H₃₂O₂

P.M.: 304 u.m.a.

P.F.: 183-185 °C

Aspecto: sólido cristalino branco

Solubilidade: clorofórmio

Espectroscopia na região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

2945, 1693, 1469, 1448, 1265, 1171, 953.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – Deslocamento químico (δ ppm) e Constante de Acoplamento (J Hz):

1,97 (dl, J=11,4, Ha-1) 0,80 (ddd, J=14,0; 4,0, Hb-1); 2,15 (dl, J=12,9, Ha-3); 1,06 (m, H-5); 1,63 (tl, Ha-15, J=12,5); 1,01 (d, J=7, 3H-17); 1,24(s, 3H-18); 0,95 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – Deslocamento químico (δ ppm):

Tabelas 8 e 9, página 65.

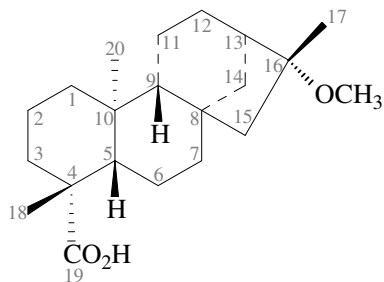
8.2.2 ACOZON**Ácido 17-nor-16-oxo-*ent*-cauran-19-óico****F.M.:** C₁₉H₂₈O₃**P.M.:** 304 u.m.a.**P.F.:** 234-236 °C**Aspecto:** sólido cristalino amarelo**Solubilidade:** acetona**Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, C₃D₆O) – Deslocamento químico (δ ppm) e Constante de Acoplamento (J Hz):**

1,05 (s, 3H-20); 1,21 (s, 3H-18); 2,23 (sl, H-13).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, C₃D₆O) – deslocamento químico (δ ppm):

Tabela 10 e 11, página 73.

8.2.3 ACMET



Ácido 16 α -metoxi-ent-cauran-19-óico

F.M.: C₂₁H₃₄O₃

P.M.: 334 u.m.a.

P.F.: 219-222 °C

Aspecto: sólido cristalino branco

Solubilidade: clorofórmio

Espectroscopia na região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

1724, 1463, 1376, 1231, 1208, 1193, 1156, 1121, 1092, 1057.

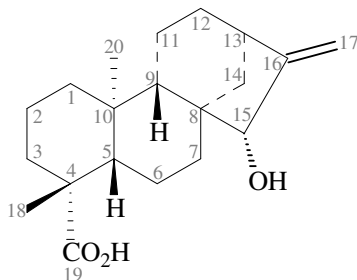
Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – Deslocamento químico (δ ppm) e Constante de Acoplamento (J Hz):

0,79 (ddd, J=13,0; 3,85, H_b-1); 2,15 (dl, J=13,4, H_a-3); 1,00 (dl, J=4,15, H_b-3); 1,04 (m, H-5); 2,06 (s, H-13); 1,34 (dl, J=13,9, H_b-15); 1,28 (s, 3H-17); 1,23 (s, 3H-18); 0,96 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – Deslocamento químico (δ ppm):

Tabela 12 e 14, página 82.

8.2.3 ACOX

Ácido 15 α -hidroxi-*ent*-caur-16-en-19-óico

F.M.: C₂₀H₃₀O₃

P.M.: 318 u.m.a.

P.F.: 220-221 °C

Aspecto: sólido cristalino amarelo

Solubilidade: piridina

Espectroscopia na região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

3418, 2981, 2941, 2853, 1700, 1454, 1252, 1193, 1070, 1018, 1000.

Espectroscopia de RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) – Deslocamento químico (δ ppm) e Constante de Acoplamento (J Hz):

0,86(ddd, J=13,0 ;3,57); 2,50 (dl, J=13,0, Ha-3); 1,09 (ddd, J=13,2; 4,1, Hb-3); 2,76 (sl, H-13); 4,19 (s, H-15); 7,59 (sl, Ha-17); 7,23 (sl, Hb-17); 1,38 (s, 3H-18); 1,22 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (75 MHz, C₅D₅N) – Deslocamento químico (δ ppm):

Tabela 15, página 90 e tabela 17, página 91.

Capítulo 9



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PIRES, A. M. L.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2006**, *17(1)*, 68-72.

ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M. F.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. *Planta Medica* **1995**, *61*, 85.

BANDARA, B. M. R.; WIMALASIRI, W. R.; MACLEOD, J. K. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 869.

BARROSO, G. M., Sistemática de Angiosperma do Brasil. Universidade Federal de Viçosa – Imprensa Universitária, Minas Gerais, **1991**.

BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 119.

BATISTA, R.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. *Planta Medica* **1999**, *65*, 283.

BATISTA, R.; GARCÍA, P. A.; CASTRO, M. A.; DEL CORRAL, J. M. M.; SPEZIALI, N. L.; OLIVEIRA, A. B. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2005**, *E-61*, o1525.

BRAGA, R., Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. Mossoró: ESAM, **1976**.

BRAKUNI, D. S.; TEWARI, S.; DHAR, M. M. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1819-22.

BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; BURGER, C.; OLIVEIRA, L. E.; BÓF, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Z. *Naturforsch., C: J. Biosci.* **2004**, *59C*, 229.

BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants* **1995**; *part 3*, 387, 511.

BUSCEMI S., ROSSELLI S., BRUNO M., SCAGLIONI L., VIVONA N., PIOZZI F. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2004**, *162*, 381–386.

CADOGAN J. I. G.; LEY S. V.; PATTENDEN G.; *DictionarY,ofOrganic Compounds*, Sixth Edition, Val. 2, **1996**, Chapman & Hall.

CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 437.

CHEN, C. H.; HSIEH, T. J.; LIU, T. Z.; CHERN, C. L.; HSIEH, P. Y.; CHEN C. Y. *Journal of Natural Products* **2004**, 67, 1942-1946.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; CHO, C. P.; WU, Y. C. *Journal of Natural Products* **2000**, 63, 1000-1003.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. *Journal of the Chinese Chemical Society* **1997**, 44(3),313-119.

CHEN, C. Y.; WU, T. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. *Journal of the Chinese Chemical Society* **1998**, 45(5), 629-634.

CORRÊA, M. P.; *Dicionário das Plantas do Brasil*, Vol III, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, **1996**.

COXON, J. M.; DANSTED, E.; HARTSHORN, M. P. *Organic Syntheses* **1977**, 56, 25-7.

CUNHA, K.M.A.; PAIVA, L.A.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S. *Phytother. Res.* **2003**, 17, 320.

DAS, A. K.; MITRA, S. R.; ADITYACHAUDHURY, N.; PATRA, A.; MITRA, A. K.; CHATTERJEE, MRS. A. *Indian Journal of Chemistry* **1979**, 18B(6), 550-2.

DE DIAZ, AURA M. P.; DIAZ D., PEDRO P.; JOSEPH-NATHAN, PEDRO. *Revista Latinoamericana de Quimica* **1988**, 19(2), 58-60.

DE LOS RIOS, C.; BAEZ, D. H.; CONTRERAS, Q.; CRESCENTE, O.; CASERTA, A. *Ciencia* **1999**, 7(1), 72-77.

DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2001**, 12(4), 552-555.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.; TAKI, T.; JIA, Y.; LI, Y. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, 1522.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.; TAKI, T.; TORI, M.; TAKAOKA, S.; JIA, Y.; LI, Y. *Tetrahedron* **2001**, 57, 8413.

- EKONG, D. E. U.; OGAN, A. U. *Journal of the Chemical Society* **1968**, 3, 311-12.
- ESHIET, I. T. U.; AKISANYA, A.; TAYLOR, D. H. *Phytochemistry* **1971**, 10(12), 3294-5.
- ESPITIA D. C. *Revista Colombiana de Quimica* **2003**, 32(2), 75-80.
- ETSE, T. J.; GRAY I. A.; WATERMAN G. P. *Journal of Natural Products* **1987**, 50(5), 979-983.
- FERRARI, M.; PAGNONI, U. M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G. *Phytochemistry* **1971**, 10(4), 905-7.
- FERRARI, M.; PELIZZONI, F.; FERRARI, G. *Phytochemistry* **1971**, 10(12), 3267-9.
- GHISALBERTI, E.L. *Fitoterapia* **1997**, 68, 303.
- GHISALBERTI, E.L.; PENNACCHIO, M.; ALEXANDER, E. *Pharm. Biol.* **1998**, 36, 237.
- GHOUMARI, H.; BENAJIBA, M. H.; AZMANI, A.; GARCIA-GRANADOS, A.; MARTINEZ, A.; PARRA, A.; RIVAS, F.; SOCORRO, O. *Phytochemistry* **2005**, 66, 1492.
- GILES, P. M. Jr. *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 587.
- HAN, L.; HUANG, X.; SATTLER, I.; DAHSE, H.M.; FU, H.; LIN, W.; GRABLEY, S. *Journal of Natural Products* **2004**, 67,1620.
- HANSON J. R. et al. *J. Chem Soc. Perkin Trans.* **1979**, 1, 114-115.
- HANSON, J. R. In *Diterpenoids*; DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (series eds.); CHARLWOOD, B.V.; BANTHORPE, D.V. *Methods in Plant Biochemistry* **1991**; 7, 263-287.
- HANSON, J.R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 785.
- HASAN, CHOUDHURY M.; ZAMAN, NUZHAT; ISLAM, S. NAZRUL. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences* **1989**, 13(2), 157-60.
- HENRICK, C. A.; JEFFERIES, P. R. *Journal of Chemistry* **1964**, 17(8), 915-33.

HSIEH, T. J.; WU, Y. C.; CHEN, S. C.; HUANG, C. S.; CHEN, C. Y. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2004**, *51*(4), 869-876.

HUI, Y. H.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J. L. *Pharmaceutical Research* **1990**, *7*(4), 376-8.

JAHAN, I. A.; NAHAR, N.; MOSIHUZZAMAN, M.; SHAHEEN, F.; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 1789.

KLECAKOVA-KARLICKOVA, J.; JAHODAR, L. *Ceska Slov. Farm.* **2005**, *54*, 141.

KONDOH, M.; NAGASHIMA, F.; SUZUKI, I.; HARADA, M.; FUJII, M.; ASAKAWA, Y.; WATANABE, Y. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1005.

KOS, O.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; POVEDA, L.; MERFORT, I. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 62.

KUAI, Y. H.; BI, Z. M.; PING, L.; ZHANG, Y. H. *Linchan Huaxue Yu Gongye* **2006**, *26*(2), 13-15.

LI, L. M.; LI, G. Y.; HUANG, S. X.; LI, S. H.; ZHOU, Y.; XIAO, W. L.; LOU, L. G.; DING, L. S.; SUN, H. D. *Journal of Natural Products* **2006**, *69*, 645.

LOBITZ G. O., TAMAYO-CASTILLO G., POVEDA L., MERFORT I. *Phytochemistry*, **1998**, *49*(3), 805-809.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas Mediciniais no Brasil – Nativas e Exóticas. *Nova Odessa, SP- Instituto Plantarum*, **2002**.

MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 40.

MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G.; BRAZ F. R. *Phytochemistry* **1988**, *27*(10), 3209-12.

MUSSINI, P.; ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; FERRARI, G. *Journal of the Chemical Society*, **1973**, *21*, 2551-7.

OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1999**, *47*(10), 1436-1438.

OHNO, N.; MABRY, T. J.; ZABEL, V.; WATSON, W. H. *Phytochemistry* **1979**, 18(10), 1687-9.

OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E.; BASTOS, D. Z. L. *Phytochemical Analysis* **2002**, 13, 368.

OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E. G.; BASTOS, D. Z. L. *Phytochemical Analysis* **2002**, 13(6),368-371.

PELINSON, G. J. B.; BOLIANI, A. C.; TARSITANO, M. A. A.; CORREA, L. D. S. *Rev. Bras. Frutic.*, Ago **2005**, vol.27, no.2, p.226-229.

PIACENTE, S.; AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; PIZZA, C.; LOCK DE UGAZ, O.; CHAVEZ O. H.; MAHMOOD, N. *Phytochemistry* **1994**, 36(4), 991-6.

PINTO, A. C.; PINCHIN, R.; PRADO, S. K. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2017.

REYNOLDS, W. F.; LOUGH, A. J.; SAWYER, J. F.; ENRIQUEZ, R. G.; ORTIZ, B.; WALLS, F. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1991**, C-47, 973.

RIBEIRO, J. E. L. Guia de identificação das plantas vasculares de uma flora de terra firme na Amazônia, **1999**, p 121.

RUPPRECHT, K. J.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. *Journal of Natural Products* **1990**, 53(2), 237-278.

SANTOS, C. C.; SOUSA-LIMA, M. A.; BRAZ-FILHO, R.; SIMONE, C. A.; SILVEIRA, E. *R. Magn. Res. Chem.* **2005**, 43, 1012.

TAKEDA, Y.; ZENG L.; SHI, G.; SHIMADA, H.; MCLAUGHLIN, L. J. *Journal of Natural Products* **1996**, 59, 301-303.

TANAKA, N.; MURAKAMI, T.; SAIKI, Y.; CHEN, C. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1985**, 33(1), 152-7.

TANAKA, O.; MIHASHI, S.; YANAGISAWA, I.; NIKAIDO, T.; SHIBATA, S. *Tetrahedron* **1972**, 28(17), 4523-37.

TIAN, L.; HAN, Y.; MENG, Z.; XIA, C.; ZHANG, J. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* **2001**, 32(1), 10-12.

TIAN, L.; YANG, N.; MENG, Z.; HAN, Y. *Jinling Pharmaceutical Corporation Limited* **2003**, 38(4), 258-260.

TINCUSI, B. M.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNANDEZ, B. V. *Planta Medica* **2002**, 68(9), 808-812.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. *Química Nova* **1998**, 21, 397.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; PIZZOLATTI, M. G. *Biochemical Systematics and Ecology* **2004**, 32(9), 837-840.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Z. *Naturforsch., C: J. Biosci.* **2005**, 60C, 72.

WIART, C.; AU, T. S.; MOHD, Y.; HAMIMAH, H.; SULAIMAN, M. *International Journal of Pharmacology* **2005**, 1(3), 296-298.

WU, Y. C.; HUNG, Y. C.; CHANO, F. R.; COSENTINO, M.; W ANO, H. K.; LEE, K. I. *Journal of Natural Products* **1996**, 59, 635-637.

YANG, N. Y.; TIAN, L. J.; MENG, Z. M.; HAN, Y. *Chinese Chemical Letters* **2003**, 14(1), 58-61.

YANG, T. H.; CHEN, C. M.; CHANG, J. L.; CHUNG, K. W. *Taiwan Yaoxue Zazhi* **1971**, 23(1), 8-11.

YANG, Y. L.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; WANG, W. Y.; WU, Y. C. *Journal of Natural Products* **2002**, 65, 1462-1467.

ZGODA-POLS, J. R.; FREYER, A. J.; KILLMER, L. B.; PORTER, J. R. *Fitoterapia* **2002**, 73, 434.