

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES DO ESTADO DO
CEARÁ: *Heliotropium indicum* Linn, *Heliotropium polyphyllum* Lehm e
Ganoderma lucidum

JOÃO SAMMY NERY DE SOUZA

FORTALEZA – CE

2009

JOÃO SAMMY NERY DE SOUZA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO ESTADO
DO CEARÁ: *Heliotropium indicum* Linn, *Heliotropium polyphyllum* Lehm e
*Ganoderma lucidum***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Telma Leda Gomes de Lemos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências.

FORTALEZA – CE

2009

(i)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

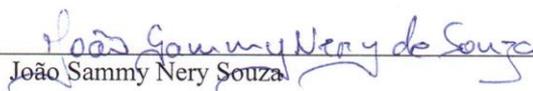
-
- S715c Souza, João Sammy Nery de.
Contribuição ao estudo químico de espécies do Estado do Ceará : *Heliotropium indicum* Linn, *Heliotropium polyphyllum* Lehm e *Ganoderma lucidum* / João Sammy Nery de Souza. – 2009.
250 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2009.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.
1. Química vegetal. 2. Helitropium – Química. 3. Reishi – Química. 4. Alcalóides. I. Título.

CDD 547

JOÃO SAMMY NERY DE SOUZA

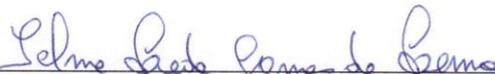
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO ESTADO DO
CEARÁ: *Heliotropium indicum* Linn, *Heliotropium polyphyllum* Lehm e
Ganoderma lucidum

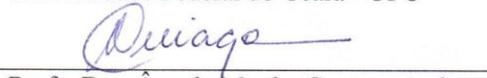
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

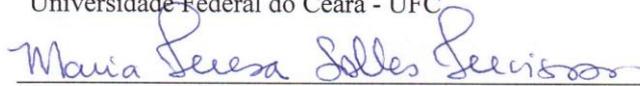

João Sammy Nery Souza

TESE APROVADA EM: 29/05/2009

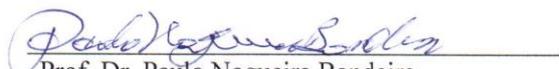
EXAMINADORES:


Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes
Universidade Federal do Piauí - UFPI


Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Dedico este trabalho à minha família,
em especial, a meu filho João Pedro
e a minha querida mãe Maria Nery,
bem como a todos aqueles que acreditaram
e contribuíram para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus por sempre nos iluminar e nos guiar...

À prof^a. Telma Leda Gomes de Lemos pela dedicação, atenção, paciência, competência e por todos os ensinamentos, acadêmicos e humanos, durante a realização deste trabalho.

A todo o corpo docente do curso de Pós-Graduação em Química, que em todos os estágios da longa e intrincada tarefa de produção deste trabalho, prestou enorme compreensão e valiosos ensinamentos, especialmente, aos(as) professores(as): Marcos Carlos de Mattos, Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, Mary Anne Sousa Lima, Otilia Deusdênia Loiola Pessoa, Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Francisco Queiroz Monte, Ângela Martha Campos Arriaga, Edilberto Rocha Silveira, Manuel Andrade Neto e Nilce Viana Gramosa.

Ao prof. Dr. Raimundo Braz-Filho (UENF), pela valiosa colaboração nas análises dos espectros, bem como no empenho em colaborar neste trabalho.

Ao prof. Edson Paula Nunes pela identificação dos materiais botânicos.

Aos amigos dos laboratórios da inorgânica, em especial: Célio, Durcilene, Leônia Jeanne e Neto que, generosamente, sempre se disponibilizaram em colaborar com o trabalho e me enriqueceram como suas valorosas amizades.

A todos do LPN que sempre, gentilmente, mostraram-se disponibilizados em contribuir, em especial, a Prof^a. Maria Goretti de Vasconcelos Silva, Leandro Bezerra de Lima e Fábio de Oliveira Silva que realizaram a extração dos óleos essenciais pelas técnicas de fluido supercrítico e arraste a vapor d'água.

A todos os amigos do curso de Química Orgânica que me deram a oportunidade única de conviver e aprender, em especial, aos do LBPN: Aluísio, Ayla, Cleane, Délcio, Hélcio, Irineu, Leila, Leonardo Alcântara, Leonardo Carvalho, Luciana Bertini, Luciana Gregório, Luciana Lucas, Mozarina, que tive o privilégio de conviver e compartilhar, além da solidariedade, dúvidas, angústias e conhecimentos.

Aos colegas que participaram da turma, com os quais tive o ótimo convívio e pude contar com suas amizades, incentivos e conhecimentos, em especial, Franciglauber, João Carlos, João Henrique, Rosa Virgínia e Alexandre Praxedes.

À secretária do curso de pós-graduação Célia pelo seu exemplo de simplicidade, simpatia, educação e profissionalismo.

A todos os funcionários, em especial, Lana, Sr. Paulo e Mundinha que pela simplicidade, competência e sabedoria, sempre nos privilegiam em conviver.

Ao CENAUREMN, através de seu diretor e seus operadores, pela valiosa contribuição nas análises das amostras.

À Central de Análise do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica pela análise dos materiais em infravermelho, polarimetria e espectrometria de massas.

Aos órgãos financiadores FUNCAP, CNPq e CAPES.

“A própria comunidade promove a preservação da natureza,
na medida que ela obtiver o conhecimento
sobre as plantas medicinais.”

Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos.

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico de duas espécies do gênero *Heliotropium*: *H. indicum* Linn e *H. polyphyllum* Lehm e do macrofungo *Ganoderma lucidum*, coletados no Estado do Ceará. A análise dos óleos essenciais das partes aéreas das espécies de *Heliotropium*, por diferentes técnicas de extração, permitiu a identificação de diferentes metabólitos secundários, desde hidrocarbonetos, terpenóides, álcoois até sesquiterpenóides. No óleo essencial das raízes OEHI, foram identificados 17 constituintes químicos, sendo o fitol (49,10%) o composto majoritário. A investigação fitoquímica do extrato etanólico das raízes de *H. indicum* resultou no isolamento, entre outros compostos, um alcalóide pirrolizidínico denominado helindicina (HI-2). O estudo fitoquímico do extrato etanólico das partes aéreas de *H. polyphyllum* permitiu o isolamento do alcalóide licopsamina (HP-1). A análise cromatográfica dos constituintes fixos do extrato etanólico de *Ganoderma lucidum* permitiu o isolamento dos esteróides ergostanos: ergosta-7,22,-dien-3-ona, ergosta-22-en-3 α ,4 α ,8 α -triol, ergosta-1,4,8(14),22-tetraen-3-ona e a mistura de ergosta-5,9,22-trien-3 β -ol e ergosta-5,22-dien-3 β -ol. Uma série de derivados do esteróide ergosta-7,22-dien-3-ona foi desenvolvida a partir da modificação no carbono C-3 com obtenção de álcoois, ésteres (formil e acetil) e oxima. A determinação estrutural dos contituíntes não voláteis e derivados foi realizada através de métodos espectroscópicos EM, IV e RMN ^1H e ^{13}C , incluindo sequencias de pulso uni e bi-dimensionais. A identificação dos constituintes voláteis foi desenvolvida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para análise qualitativa, enquanto (CG/DIC) para análise quantitativa e ainda comparação com dados descritos na literatura.

ABSTRACT

This work reports the phytochemistry study of two species of the genus *Heliotropium*: *H. indicum* Linn and *H. polyphyllum* Lehm, and of the macrofungal *Ganoderma lucidum*, collected in the State of Ceará. The analysis of the essential oils from aerial parts' of the species of *Heliotropium*, for different extraction techniques, allowed the identification of different secondary metabolic, from hydrocarbons, terpenoids, alcohols even sesquiterpenoids. For the essential oil from roots OEHI all 17 constituents chemicalents were identified and the fitol (49,10%) were the major compound. The phytochemistry investigation from etanolic extract of the roots of *H. indicum* resulted in the isolation, among others compounds, one pirrolizidine alkaloid that has been named as helindicine (HI-2). The phytochemistry study from extract etanolic for aerial parts' of *H. polyphyllum* allowed the isolation of the alkaloid licopsamine (HP-1). The chromatographic analysis of the fixed constituents from etanolic extract of *Ganoderma lucidum* allowed the isolation of the steroids ergostane: ergosta-7,22,-dien-3-one, ergosta-22-en-3 α ,4 α ,8 α -triol, ergosta-1,4,8(14),22-tetraen-3-one, and the mixture of ergosta-5,9,22-trien-3 β -ol and ergosta-5,22-dien-3 β -ol. A series of derived from steroid ergosta-7,22-dien-3-one was developed starting from the modification in the carbon C-3 with obtaining of alcohols, steres (formil and acetyl) and oxima. The structural determination of all natural products, and derived was performed by mean of spectroscopic techniques such MS, IR, ^1H and ^{13}C NMR, including uni and bi-dimensional pulse sequences. The identification of the volatile constitution was performed by GC/MS for the qualitative analysis while GC/FID was used for the quantitative analysis, and still comparison to data published in the literature was also used for identification wherever the case.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias da espécie <i>Heliotropium indicum</i> L. -----	37
Figura 2: Fotografias da espécie <i>Heliotropium polyphyllum</i> L. -----	39
Figura 3: Estrutura de heliofenantrona, isolada de <i>H. ovalifolium</i> -----	55
Figura 4: Compostos não alcaloídicos isolados de <i>H. subulatum</i> -----	55
Figura 5: Flavonóides isolados de <i>Heliotropium</i> -----	56
Figura 6: Outros constituintes isolados de <i>Heliotropium</i> -----	57
Figura 7: Triterpenos e esteróides isolados de <i>H. ellipticum</i> e <i>H. indicum</i> -----	58
Figura 8: Representação das estruturas básicas dos alcalóides pirrolizidínicos. -----	60
Figura 9: Classificação dos alcalóides pirrolizidínicos, de acordo com Hartmann e Witte (1995) ----	61
Figura 10: Espectro de IV (KBr) de HI-1 -----	66
Figura 11: Estrutura de HI-1 -----	67
Figura 12: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de HI-1 -----	69
Figura 13: Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de HI-1 -----	69
Figura 14: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (75 MHz, CDCl ₃) de HI-1 -----	70
Figura 15: Espectro de massas de HI-1 (70 eV)-----	70
Figura 16: Espectro de IV (KBr) de HI-2 -----	71
Figura 17: Partes da estrutura de HI-2 -----	72
Figura 18: Atribuição de hidrogênios H α e H β no esqueleto pirrolizidínico -----	73
Figura 19: Estruturas dos epímeros retronecina e heliotridina -----	74
Figura 20: Estrutura de HI-2 (Licopsamina)-----	75
Figura 21: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de HI-2 -----	77
Figura 22: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de HI-2-----	77
Figura 23: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (125 MHz, CDCl ₃) de HI-2 -----	78
Figura 24: Espectro de massas de HI-2 (70 eV)-----	78
Figura 25: Proposta de Fragmentação de HI-2 -----	79
Figura 26: Espectro de IV (KBr) de HI-3 -----	80
Figura 27: Estrutura de HI-3 (Helindicina) -----	83
Figura 28: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de HI-3 -----	85
Figura 29: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de HI-3 -----	85
Figura 30: Espectro de RMN ¹³ C-APT (100 MHz, CD ₃ OD) de HI-3 -----	86
Figura 31: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H-COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de HI-3 -----	86
Figura 32: Espectro de RMN bidimensional NOESY (400 MHz, CD ₃ OD) de HI-3 -----	87

Figura 33: Espectro de massas de HI-3 (70 eV)-----	88
Figura 34: Proposta de Fragmentação de HI-3 -----	88
Figura 35: Espectro de IV (KBr) de HI-4 -----	89
Figura 36: Grupos estruturais de HI-4 -----	90
Figura 37: Estruturas dos componentes de HI-4 -----	91
Figura 38: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de HI-4 -----	93
Figura 39: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de HI-4 -----	94
Figura 40: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (125 MHz, CD ₃ OD) de HI-4 -----	94
Figura 41: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear – COSY (¹ H- ¹ H) (500 MHz, CD ₃ OD) de HI-4 -----	95
Figura 42: Espectro de massas de HI-4 (70 eV)-----	95
Figura 43: Espectro de IV (KBr) de HP-1 -----	66
Figura 44: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, MeOD) de HP-1 -----	69
Figura 45: Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, MeOD) de HP-1 -----	69
Figura 46: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (75 MHz, MeOD) de HP-1 -----	70
Figura 47: Espectro de massas de HP-1 (70 eV)-----	70
Figura 48: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. indicum</i> -----	105
Figura 49: Espectro de massas de 3-metilpentanal com m/z 100-----	107
Figura 50: Espectro de massas de dietilcarbonato com m/z 118 -----	107
Figura 51: Espectro de massas de hexan-2-ol com m/z 102-----	107
Figura 52: Espectro de massas de nonanal com m/z 142 -----	107
Figura 53: Espectro de massas de 2-(2-hidróxifenil)etanoato de etila (salicilato de etila) com m/z 166 -----	201
Figura 54: Espectro de massas de hexadecanal com m/z 240-----	108
Figura 55: Espectro de massas de hexadecan-1-ol com m/z 242 -----	108
Figura 56: Espectro de massas de 2,6,10,14-tetrametil-hexadecano com m/z 282 -----	108
Figura 57: Espectro de massas de nonadecano com m/z 268 -----	109
Figura 58: Espectro de massas de eicosano com m/z 282 -----	109
Figura 59: Espectro de massas de 2-metileicosano com m/z 296 -----	109
Figura 60: Espectro de massas de 3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol (fitol) com m/z 296 -----	109
Figura 61: Espectro de massas de docosano com m/z 310 -----	110
Figura 62: Espectro de massas de tricosano com m/z 324-----	110
Figura 63: Espectro de massas de tetracosano com m/z 338-----	110
Figura 64: Espectro de massas de pentacosano com m/z 352-----	110
Figura 65: Espectro de massas de octacosano com m/z 394 -----	110

Figura 66: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. polyphyllum</i> extraído por hidrodestilação -----	111
Figura 67: Espectro de massas de 3-metilbutan-1-ol com m/z 88-----	113
Figura 68: Espectro de massas de pent-(2Z)-en-1-ol com m/z 86-----	113
Figura 69: Espectro de massas de hex-(3Z)-en-1-ol com m/z 100 -----	113
Figura 70: Espectro de massas de hex-(2E)-en-1-ol com m/z 100 -----	113
Figura 71: Espectro de massas de metanoato de hexila com m/z 130 -----	114
Figura 72: Espectro de massas de 6-metil-hept-5-en-2-ona com m/z 126 -----	114
Figura 73: Espectro de massas de 2-feniletanal (fenilacetaldéido) com m/z 120 -----	114
Figura 74: Espectro de massas de etanoato de benzila (acetato de benzila) com m/z 150-----	114
Figura 75: Espectro de massas de 2-(2-hidróxifenil)etanoato de metila (salicilato de metila) com m/z 152 -----	201
Figura 76: Espectro de massas de 2-(4,8,12-trimetiltridecanil)but-1,3-dieno (neofitadieno) com m/z 152 -----	201
Figura 77: Espectro de massas de heneicosano com m/z 296-----	115
Figura 78: Espectro de massas de 3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol (fitol) com m/z 296 -----	109
Figura 79: Espectro de massas de docosano com m/z 310 -----	116
Figura 80: Espectro de massas de tricosano com m/z 324-----	116
Figura 81: Espectro de massas de tetracosano com m/z 338-----	116
Figura 82: Espectro de massas de pentacosano com m/z 352-----	116
Figura 83: Espectro de massas de octacosano com m/z 394 -----	117
Figura 84: Espectro de massas de hentriacontano com m/z 436-----	117
Figura 85: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. polyphyllum</i> extraído através de destilação por arraste com vapor d'água-----	117
Figura 86: Espectro de massas de 3,7-dimetil-oct-2(E),6-dienal (geranial) com m/z 152-----	119
Figura 87: Espectro de massas de 2-isopropil-5-metil-hidróxibenzeno (timol) com m/z 150 -----	119
Figura 88: Espectro de massas de tridecano com m/z 184 -----	119
Figura 89: Espectro de massas de 1 α -metil-1 β -propen-3-il-2 α ,4 α -dipropen-2-il-ciclo-hexano (β -elemeno) com m/z 204 -----	119
Figura 90: Espectro de massas de (1R,4Z,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undec-4-eno [(E)- β -cariofileno] com m/z 204 -----	119
Figura 91: Espectro de massas de (E,E,E)-2,6,6,9-tetrametilcicloundeca-1,4,8-trieno (α -humuleno) com m/z 204-----	119

Figura 92: Espectro de massas de (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,5 <i>S</i>)-8-isopropil-2-metil-8-metilenociclodeca-1,6-dieno (germacreno-D) com m/z 204 -----	119
Figura 93: Espectro de massas de [<i>R,R</i>]-5-(1,5-dimetil-hex-4-en-1-il)-2-metilciclo-hexa-1,3-dieno (α -zingibereno) com m/z 204-----	119
Figura 94: Espectro de massas de 5-(1-metileno-5-metil-hex-4-en-1-il)-1-metilciclo-hex-1-eno (β -bisaboleno) com m/z 204 -----	119
Figura 95: Espectro de massas de 7-hidr3xi-4 α -isopropil-1 β ,7 β -dimetil-triciclo[4.3.0.0]decano (cubebol) com m/z 222 -----	119
Figura 96: Espectro de massas de 6-(1,5-dimetil-hex-4-en-1-il)-3-metilenociclo-hex-1-eno (β -sesquifelandreno) com m/z 222-----	119
Figura 97: Espectro de massas de 1 α -etenil-4-(2-hidr3xi)isopropil-1 β -propen-2-ilciclohexano (elemol) com m/z 222-----	119
Figura 98: Espectro de massas de 3,7,11-trimetildodec-1,6(<i>E</i>),10-trien-3-ol [(<i>E</i>)-nerolidol] com m/z 222-----	119
Figura 99: Espectro de massas de 2 β -(2-hidr3xi)isopropil-5 β -metilbiciclo[5.3.0]dec-6(10)-eno (guaiol) com m/z 222 -----	119
Figura 100: Espectro de massas de 2-(4,8,12-trimetiltri)decanilbut-1,3-dieno (neofitadieno) com m/z 278-----	119
Figura 101: Espectro de massas de 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona com m/z 268 -----	122
Figura 102: Espectro de massas de 3cido hexadecan3ico (3cido palm3tico) com m/z 256 -----	123
Figura 103: Espectro de massas de heneicosano com m/z 296 -----	123
Figura 104: Espectro de massas de dotriacontano com m/z 450 -----	123
Figura 105: Cromatograma do 3leo essencial das partes 3reas de <i>H. polyphyllum</i> extra3do por fluido supercr3tico com CO ₂ -----	124
Figura 106: Espectro de massas de fenilmetanol (3lcool benz3lico) com m/z 108 -----	126
Figura 107: Espectro de massas de hexadecanoato de metila (palmitato de metila) com m/z 270-----	126
Figura 108: Espectro de massas de 3cido hexadecan3ico (3cido palm3tico) com m/z 256 -----	126
Figura 109: Espectro de massas de octadeca-9(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>)-dienoato de metila (linoleato de metila) com m/z 294 -----	127
Figura 110: Espectro de massas de octadecanoato de metila (estearato de metila) com m/z 298 -----	127
Figura 111: Espectro de massas de 3cido octadeca-9(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>)-dien3ico (3cido linol3ico) com m/z 280 -----	127
Figura 112: Espectro de massas de 3cido octadecan3ico (3cido este3rico) com m/z 284 -----	128
Figura 113: Espectro de massas de tricosano com m/z 324 -----	128
Figura 114: Espectro de massas de pentacosano com m/z 352 -----	128

Figura 115: Espectro de massas de octacosano com m/z 394-----	128
Figura 116: Espectro de massas de triacontano com m/z 422 -----	129
Figura 117: Espectro de massas de hentriacontano com m/z 436 -----	129
Figura 118: Espectro de massas de heptatriacontano com m/z 520 -----	129
Figura 119: Imagens de um espécime de <i>G. lucidum</i> -----	132
Figura 120: Espectro de IV (KBr) de G1-----	150
Figura 121: Estrutura de G1 -----	152
Figura 122: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de G1 -----	154
Figura 123: Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de G1 -----	154
Figura 124: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (75 MHz, CDCl ₃) de G1-----	155
Figura 125: Espectro de massas de G1 (70 eV) -----	155
Figura 126: Proposta de fragmentação de G1 -----	156
Figura 127: Espectro de IV (KBr) de G2-G3 -----	157
Figura 128: Estruturas dos componentes da mistura G2-G3 -----	159
Figura 129: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) da mistura G2-G3 -----	161
Figura 130: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) da mistura G2-G3 -----	161
Figura 131: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (125 MHz, C ₅ D ₅ N) da mistura G2-G3 -----	162
Figura 132: Espectro de massas de G2-G3 (70 eV) -----	162
Figura 133: Espectro de IV (KBr) de G4-----	163
Figura 134: Estrutura com esqueleto esteroidal (GUNATILAKA <i>et al.</i> , 1981) -----	164
Figura 135: Estrutura de G4 -----	167
Figura 136: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) de G4-----	167
Figura 137: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de G4 -----	168
Figura 138: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de G4-----	168
Figura 139: Espectro de massas de G4 (70 eV) -----	169
Figura 140: Espectro de IV (KBr) de G5-----	170
Figura 141: Estrutura de G5 -----	172
Figura 142: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de G5 -----	174
Figura 143: Espectro de RMN ¹ H – Expansão (500 MHz, CDCl ₃) de G5 -----	174
Figura 144: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de G5 -----	175
Figura 145: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 ⁰ (125 MHz, CDCl ₃) de G5 -----	175
Figura 146: Espectro de massas de G5 (70 eV) -----	176
Figura 147: Esquema reacional de obtenção de derivados esteroidais de G1 -----	178
Figura 148: Redução de G1 -----	179

Figura 149: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) nos C-2, C-3 e C-4, nas substâncias G1.1 e G1-----	126
Figura 150: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de G1.1 -----	182
Figura 151: Espectros de RMN ^1H – expansões (CDCl_3 , 500 MHz) de G1.1 -----	182
Figura 152: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.1 -----	183
Figura 153: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 0 (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.1 -----	183
Figura 154: Espectro de IV de G1.1 -----	184
Figura 155: Espectro de massas de G1.1 (70 eV)-----	184
Figura 156: Proposta de fragmentação de G1.1 -----	185
Figura 157: Acetilação de G1.1-----	185
Figura 158: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de G1.2-----	188
Figura 159: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.2 -----	188
Figura 160: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 0 (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.2 -----	189
Figura 161: Espectro de IV de G1.2 -----	189
Figura 162: Espectro de massas de G1.2 -----	190
Figura 163: Proposta de fragmentação de G1.2 -----	190
Figura 164: Síntese das oximas G1.3a e G1.3b -----	191
Figura 165: Espectro de RMN ^1H – expansão ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de G1.3a-----	194
Figura 166: Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de G1.3a -----	194
Figura 167: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de G1.3a -----	195
Figura 168: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 0 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de G1.3a -----	195
Figura 169: Espectro de IV de G1.3a -----	196
Figura 170: Espectro de massas de G1.3a-----	196
Figura 171: Proposta de fragmentação de G1.3 -----	197
Figura 172: Formilação de G1.1 -----	198
Figura 173: Comparação dos δ nos C-2 e C-4, nas substâncias G1.1, G1.2 e G1.4 -----	200
Figura 174: Projeção de Newman para o anel A dos esteróides. -----	200
Figura 175: Comparação dos δ nos núcleos de H dos C-2, C-3 e C-4, nas substâncias G1.2, G1.2 e G1.4 -----	201
Figura 176: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de G1.4-----	201
Figura 177: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.4 -----	202
Figura 178: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 0 (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.4 -----	202
Figura 179: Espectro de IV de G1.4 -----	203
Figura 180: Espectro de massas de G1.4 (70 eV)-----	203
Figura 181: Proposta de fragmentação de G1.4 -----	204

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Obtenção de OEH.....	209
Fluxograma 2: Obtenção das frações alcalóidicas e não alcalóidicas de <i>H. indicum</i>	211
Fluxograma 3: Obtenção do constituinte HI-1.....	213
Fluxograma 4: Obtenção dos alcalóides HI-2 e HI-3.....	218
Fluxograma 5: Isolamento do constituinte HI-4.....	222
Fluxograma 6: Obtenção das frações alcalóidicas e não alcalóidicas de <i>H. polyphyllum</i>	225
Fluxograma 7: Isolamento dos constituintes fixos de <i>G. lucidum</i>	230

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alcalóides pirrolizidínicos isolados de espécies do gênero <i>Heliotropium</i>	42
Quadro 2: Classificação taxonômica da espécie <i>Ganoderma lucidum</i>	131
Quadro 3: Esteróides isolados de <i>Ganoderma lucidum</i>	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de HI-1 por padrão de hidrogenação.-----	67
Tabela 2: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de HI-1 comparados com dados do β -sitosterol (FARIA, 2003).-----	68
Tabela 3: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de HI-2 por padrão de hidrogenação-----	72
Tabela 4: Comparação de dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H de HI-2 de licopsamina (ROEDER; BOURAUUEL, 1992) e seu epímero echinatina (WIEDENFELD; RODER, 1991), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	76
Tabela 5: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de HI-3 por padrão de hidrogenação-----	81
Tabela 6: Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C entre HI-3 e HI-2, com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	84
Tabela 7: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de HI-4 por padrão de hidrogenação-----	91
Tabela 8: Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H de HI-4, com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	92
Tabela 9: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (MeOD , 75 MHz) de HP-1 por padrão de hidrogenação-----	92
Tabela 10: Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C entre HP-1 e HI-2, com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	92
Tabela 11: Dados das equações de regressão linear dos constituintes dos óleos de <i>H. polyphyllum</i> -	105
Tabela 12: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. indicum</i> extraído por hidrodestilação-----	106
Tabela 13: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. polyphyllum</i> extraído por hidrodestilação-----	112
Tabela 14: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. polyphyllum</i> extraído através de destilação por arraste com vapor d'água-----	118
Tabela 15: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de <i>H. polyphyllum</i> extraído por fluido supercrítico de CO_2 -----	125

Tabela 16: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de G1 por padrão de hidrogenação-----	151
Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1, comparando-se com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), com correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	153
Tabela 18: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G2 por padrão de hidrogenação-----	159
Tabela 19: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da mistura G2 e G3, comparando-se com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), com correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	160
Tabela 20: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G4 por padrão de hidrogenação-----	165
Tabela 21: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G4, comparando-se com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), com correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	166
Tabela 22: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G5 por padrão de hidrogenação-----	172
Tabela 23: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G5, comparando-se com dados da literatura (MARINHO, 2006), com correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	173
Tabela 24: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.1, comparando-se com dados de G1 e Mo-1 (Literatura), com correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)-----	181
Tabela 25: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.2, comparando-se com dados de G1.1.-----	187
Tabela 26: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.3a, comparando-se com dados de G1.-----	193
Tabela 27: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.4, comparando-se com dados de G1.1 e G1.2.-----	199
Tabela 28: Correlação entre o material utilizado e quantidade de óleo obtida das espécies de <i>Heliotropium</i> estudadas-----	209
Tabela 29: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de HINAC-----	212
Tabela 30: Frações reunidas após separação cromatográfica de HINAC-----	212
Tabela 31: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de HIAEM-A e reunião das frações após cromatografia de HIAEM-A-----	214
Tabela 32: Dados do tratamento cromatográfico de C1C-----	215
Tabela 33: Dados do fracionamento cromatográfico de C2AB-----	216
Tabela 34: Dados do tratamento cromatográfico de HIAEMM-Ac-----	217
Tabela 35: Fracionamento do extrato etanólico das raízes de <i>H. indicum</i> pelo método B-----	219

Tabela 36: Dados do tratamento cromatográfico de MBAM-----	220
Tabela 37: Fracionamento cromatográfico de C3SAS -----	220
Tabela 38: Fracionamento cromatográfico de C4B para obtenção de HI-4-----	221
Tabela 39: Fracionamento cromatográfico de HPAEAAM para obtenção de HP-1-----	224
Tabela 40: Fracionamento cromatográfico de EEGLH -----	226
Tabela 41: Frações de EEGLH após análise em CCD -----	227
Tabela 42: Fracionamento cromatográfico de GLHC -----	227
Tabela 43: Fracionamento cromatográfico de GLHD-----	228
Tabela 44: Fracionamento cromatográfico de GLHE -----	229

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcOEt – acetato de etila
- APs – alcalóides pirrolizidínicos
- APT – *Attached Proton Test*
- BB – *Broad Band*
- CC – cromatografia em coluna
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CCDA – cromatografia em camada delgada analítica
- CG/EM – cromatografia gasosa-espectrometria de massas
- CG/DIC – cromatografia gasosa com detector de ionização em chamas
- COSY – *Correlation Spectroscopy*
- CPD – *Composite Pulse Decoupling*
- C1A – cromatografia 1-reunião das frações-A
- C1B – cromatografia 1-reunião das frações-B
- C1C – cromatografia 1-reunião das frações-C
- C2A – cromatografia 2-reunião das frações-A
- C2B – cromatografia 2-reunião das frações-A e B
- C2AB – cromatografia 2-reunião das frações-A e B
- C3A – cromatografia 3-reunião das frações-A
- C3B – cromatografia 3-reunião das frações-B
- C3C – cromatografia 3-reunião das frações-C
- DEPT 135⁰ – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135⁰*
- EEGL – extrato etanólico de *Ganoderma lucidum*
- EEGLH – fração hexânica de EEGL
- EERHI – extrato etanólico das raízes de *Heliotropium indicum*
- EM – espectrometria de massas
- GLHA – reunião das frações-A de EEGLH
- GLHB – reunião das frações-B de EEGLH
- GLHC – reunião das frações-C de EEGLH
- GLHD – reunião das frações-D de EEGLH
- GLHE – reunião das frações-E de EEGLH
- HI – *Heliotropium indicum*

HIAB – fração de *Heliotropium indicum* alcaloídica *n*-butanol
HIAE – fração de *Heliotropium indicum* alcaloídica etérica
HIAEM – fração metanólica de HIAE
HIAEM-A – fração acetônica de HIAEM
HIAEM-M – fração metanólica de HIAEM
HIAEMM-Ac – fração acetato de etila de HIAEM-M
HINA – fração de *Heliotropium indicum* não alcaloídica
HINAC – fração de *Heliotropium indicum* não alcaloídica clorofórmica
HMBC – *Heteronuclear Multiple-Bond Coherence*
HMQC – *Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence*
HP – *Heliotropium polyphyllum*
HPAH – extrato hexânico das partes aéreas de *Heliotropium polyphyllum*
HPAE - extrato etanólico das partes aéreas de *Heliotropium polyphyllum*
HPAENA – fração não alcaloídica de HPAE
HPAEA – fração alcaloídica de HPAE
HPAEB – fração *n*-butanol de HPAEA
HPAEAA – fração acetato de etila de HPAEA
HPAEAEH – fração hexânica de HPAEAA
HPAEAAC – fração clorofórmica de HPAEAA
HPAEAAM – fração metanólica de HPAEAA
IDH – índice de deficiência de hidrogênio
IK – índice de Kovat
IV – infravermelho
MBA – método B-fração acetato de etila
MBAH – fração hexânica de MBA
MBAA – fração acetato de etila de MBA
MBAM – fração metanólica de MBA
MBH – método B-fração hexânica
MBM – método B-fração metanólica
MBMA – método B-fração metanol/amina
MeOH - metanol
NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
OEH – óleo essencial de *Heliotropium*

ODS – octadecil-sílica

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

S1A – *sephadex* 1- reunião das frações-A

S1B – *sephadex* 1- reunião das frações-B

S1C – *sephadex* 1- reunião das frações-C

S1D – *sephadex* 1- reunião das frações-D

S1E – *sephadex* 1- reunião das frações-E

S1F – *sephadex* 1- reunião das frações-F

S1G – *sephadex* 1- reunião das frações-G

SUMÁRIO

PREFÁCIO	27
1. INTRODUÇÃO	29
2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE AS ESPÉCIES DE <i>HELIOTROPIUM</i> ESTUDADAS	34
2.1 Considerações botânicas sobre a família Boraginaceae	34
2.2 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Heliotropium indicum</i> Linn	35
2.3 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Heliotropium polyphyllum</i> Lehm	38
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE AS ESPÉCIES <i>Heliotropium indicum</i> L. e <i>Heliotropium polyphyllum</i> L.	41
3.1 Levantamento bibliográfico sobre as espécies em estudo	41
3.2 Considerações importantes sobre alcalóides pirrolizidínicos	59
4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS FIXOS ISOLADOS DE <i>HELIOTROPIUM</i>	66
4.1 Isolados de <i>Heliotropium indicum</i> L.	66
4.1.1 Determinação estrutural de HI-1	66
4.1.2 Determinação estrutural de HI-2	71
4.1.3 Determinação estrutural de HI-3	80
4.1.4 Determinação estrutural de HI-4	89
4.2 Isolados de <i>Heliotropium polyphyllum</i> L.	96
4.2.1 Determinação estrutural de HP-1	96
5. ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DE <i>Heliotropium indicum</i> L. e <i>Heliotropium polyphyllum</i> L.	102
5.1 Introdução	102
5.2 Procedimento experimental de análise dos óleos	103
5.2.1 Óleo essencial de <i>H. indicum</i>	103
5.2.2 Óleos essenciais de <i>H. polyphyllum</i>	104
5.3 Composição química do óleo essencial de <i>H. indicum</i> L.	105
5.4 Composição química dos óleos essenciais de <i>H. polyphyllum</i> L.	111
5.4.1 Hidrodestilação	111
5.4.2 Destilação por arraste com vapor d'água	117
5.4.3 Extração por fluido supercrítico de CO ₂	124
6. CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>GANODERMA LUCIDUM</i>	131
6.1 Considerações taxonômicas	131

6.2 Considerações históricas e importância econômica	133
6.3 Composição química de <i>G. Lucidum</i>	133
7. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE <i>Ganoderma lucidum</i>	137
8. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS FIXOS ISOLADOS DE <i>Ganoderma lucidum</i>	150
8.1 Determinação estrutural G1	150
8.2 Determinação estrutural de G2-G3	157
8.3 Determinação estrutural de G4	163
8.4 Determinação estrutural de G5	170
9. RESULTADOS E DISCUSSÕES DAS SÍNTESES DE DERIVADOS ESTEROIDAIIS	178
9.1 Redução de G1	179
9.2 Acetilação de G1.1	150
9.3 Síntese de oximas a partir de G1	150
9.4 Formilação de G1.1	150
10. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	178
10.1 Materiais e métodos	179
10.1.1 Coleta e identificação do material estudado	111
10.1.2 Métodos cromatográficos	111
10.1.3 Métodos físicos de análise	111
10.2 Obtenção dos óleos essenciais das espécies de <i>Heliotropium</i> estudadas	179
10.2.1 Hidrodestilação	111
10.2.2 Destilação por arraste com vapor d'água	111
10.2.3 Extração por fluido supercrítico de CO ₂	111
10.3 Isolamento dos constituintes químicos fixos dos extratos das raízes de <i>Heliotropium indicum</i> L.	179
10.3.1 Fracionamento cromatográfico de HINA (Fluxograma 3, p. 213)	111
10.3.2 Fracionamento cromatográfico de HINAC para obtenção de HI-1 (Fluxograma 3, p. 213)	111
10.3.3 Fracionamento cromatográfico de HIAE (Fluxograma 2, p. 211)	111
10.3.4 Fracionamento cromatográfico de HIAEM-A (Fluxograma 4, p. 218)	111
10.3.5 Fracionamento cromatográfico de C1C (Fluxograma 4, p. 218)	111
10.3.6 Fracionamento cromatográfico de C2AB para obtenção de HI-2 (Fluxograma 4, p. 218)	111
10.3.7 Fracionamento de HIAEM-M (Fluxograma 4, p. 218)	111

10.3.8 Tratamento cromatográfico de HIAEMM-Ac para obtenção de HI-3 (Fluxograma 4, p. 218)	111
10.3.9 Fracionamento do extrato etanólico das raízes de <i>H. Indicum</i>	111
10.3.10 Fracionamento cromatográfico de MBA	111
10.3.11 Fracionamento cromatográfico de MBAM	111
10.3.12 Fracionamento cromatográfico de C3SAS	111
10.3.13 Fracionamento cromatográfico de C4B	111
10.4 Isolamento dos constituintes químicos fixos do extrato etanólico de <i>Heliotropium polyphyllum</i> L. (Fluxograma 6, p. 225)	179
10.4.1 Fracionamento cromatográfico de HPAAEA	111
10.5 Isolamento dos constituintes químicos fixos do extrato etanólico de <i>Ganoderma lucidum</i> (Fluxograma 7, p. 230)	179
10.5.1 Fracionamento cromatográfico de EEGLH	111
10.5.2 Fracionamento cromatográfico de GLHC (Fluxograma 7, p. 230)	111
10.5.3 Fracionamento cromatográfico de GLHD (Fluxograma 7, p. 230)	111
10.5.4 Fracionamento cromatográfico de GLHE (Fluxograma 7, p. 230)	111
10.6 Procedimentos experimentais de síntese de derivados esteroidais	179
10.6.1 Redução de G1	111
10.6.2 Acetilação de G1.1	111
10.6.3 Síntese de oximas a partir de G1	111
10.6.4 Formilação de G1.1	111
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	178
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

PREFÁCIO

De acordo com as diretrizes e normas estabelecidas para a formação dos estudantes de pós-graduação do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a orientação da Prof^a. Telma Leda Gomes de Lemos, tanto na obtenção e análise de constituintes voláteis, bem como no isolamento e caracterização de componentes fixos de espécies do nordeste brasileiro, este trabalho relata a investigação fitoquímica de duas espécies de *Heliotropium* encontradas no Estado do Ceará: *Heliotropium indicum* Linn e *Heliotropium polyphyllum* Lehm.

Encontram-se descritas as técnicas de isolamento e de elucidação estrutural de substâncias isoladas das espécies do gênero *Heliotropium*, identificadas por métodos espectrométricos de IV, EM, RMN ¹H e ¹³C (uni- e bidimensionais), além de comparação com dados da literatura quando necessário.

Paralelamente a esse estudo, devido ao uso crescente de cogumelos na alimentação da população brasileira e, por conseguinte, maior necessidade conhecimento sobre este assunto, foi desenvolvida a investigação fitoquímica de uma espécie de macrofungo denominado *Ganoderma lucidum*, com os mesmos objetivos mencionados anteriormente.

No presente trabalho, constam as técnicas de purificação, de preparação de derivados e de elucidação estrutural através de métodos modernos de espectroscopia: IV, EM, RMN ¹H e ¹³C (uni- e bidimensional) dos constituintes fixos e sintetizados.

O capítulo **1** contém a introdução do estudo fitoquímico desenvolvido neste trabalho.

O capítulo **2** trata das considerações botânicas mais destacadas das espécies estudadas do gênero *Heliotropium*, bem como sobre a família Boraginaceae.

Os capítulos **3** e **4** descrevem, respectivamente, o levantamento bibliográfico sobre os constituintes químicos isolados no gênero *Heliotropium*, em particular, os alcalóides pirrolizidínicos; e as determinações estruturais das substâncias isoladas das espécies de *Heliotropium* estudadas.

Nos capítulos **5**, estão relatados os procedimentos experimentais, bem como o estudo dos componentes químicos voláteis das partes aéreas das espécies de *Heliotropium* investigadas.

Os capítulos **6** e **7** referem-se ao estudo sobre o macrofungo *Ganoderma lucidum*, em que constam, respectivamente, as considerações sobre esta espécie e o levantamento bibliográfico sobre os esteróides isolados neste fungo.

O capítulo **8** descreve as determinações estruturais dos componentes isolados no extrato etanólico de *G. lucidum*.

O capítulo **9** relata resultados e discussões sobre as sínteses de derivados esteroidais.

No capítulo **10**, constam as descrições dos equipamentos utilizados e a metodologia empregada, assim como os procedimentos do isolamento e purificação das substâncias obtidas, extração dos óleos essenciais das espécies de *Heliotropium* estudadas e das sínteses de derivados esteroidais.

O capítulo **11** é dedicado às considerações finais e, por fim, no capítulo **12**, encontram-se as referências bibliográficas.

A digitação desta tese está de acordo com as normas para apresentação de trabalhos científicos da Universidade Federal do Ceará (MELO *et al.*, 2007) que seguem as normas padrões da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) de acordo com NBR 14724/2005, NBR 6023/2002 e NBR 10520/2002.

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia ou o uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar identificada em praticamente todas as civilizações ou grupos culturais conhecidos desde os primórdios da humanidade (HOSTETTMANN; HAMBURGER, 1991; VAN STADEN *et al.*, 2004).

Mesmo diante de toda a modernização nas indústrias produtoras de medicamentos, as plantas continuam sendo fontes de drogas para uma grande parcela da população mundial. Estima-se que em todo o mundo, mais de 20.000 espécies de plantas superiores sejam usadas na medicina popular, que somadas às 250.000 espécies de plantas superiores conhecidas, formam um grande reservatório de novas substâncias potencialmente ativas (LOCK *et al.*, 2003; PHILLIPSON, 1995).

As plantas superiores continuam sendo fontes de drogas clinicamente úteis na medicina popular ocidental, como pode ser exemplificado pelo fato de que cerca de 25 % de todas as prescrições médicas nos países industrializados contêm substâncias derivadas de plantas superiores (BRAQUET; HOSFORD, 1991; FARNSWORTH; BINGEL, 1977). Por esta razão, as grandes companhias farmacêuticas têm especial interesse em plantas superiores, como fontes de novas estruturas químicas e de novos medicamentos.

Como no passado, as plantas ainda hoje representam a principal arma terapêutica conhecida nas comunidades mais excluídas e sua utilização muitas vezes é resultado de conhecimentos empíricos transmitidos geração após geração. Nos centros urbanos, a fitoterapia é utilizada muitas vezes como recurso alternativo de grande aceitação. Esta característica das plantas tem chamado a atenção da comunidade científica no sentido de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (VAN STADEN *et al.*, 2004). Vale ressaltar que as plantas são fontes naturais de uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas com várias finalidades, entre elas, protegê-las contra predadores ou atrair polinizadores (STEPP, 2004).

O reino vegetal guarda uma grande quantidade de moléculas novas a serem descobertas. Estima-se que existam em torno de 500.000 a 700.000 espécies de plantas no planeta, com aproximadamente 250.000 espécies conhecidas. Levando em consideração a biodiversidade vegetal que existe no planeta e que somente cerca de 5 a 15% foi investigada do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico, as pesquisas com plantas superiores apresentam-se como uma fonte extremamente promissora e necessária para a descoberta de

novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento de várias doenças (CORRÊA, 1984; LOCK *et al.*, 2003; PRINCIPE, 1989).

A família Boraginaceae (ordem Lamiales) é classificada como angiospermas dicotiledôneas, sendo dividida, recentemente, em subfamílias (Boraginaceae *sensu strictum*, Cordiaceae, Ehretiaceae, Heliotropiaceae, Hydrophyllaceae e Lennoaceae). Compreende cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies distribuídas por todas as partes do mundo: trópicos, subtropicais, regiões temperadas e árticas (BARROSO, 1984), com centros de dispersão principalmente em regiões tropicais (REITZ, 1970).

Dentre suas espécies, aproximadamente 130 alocadas em 10 gêneros ocorrem no Brasil, dispersas em todas as regiões (MELO; ANDRADE, 2007). Podem ser encontrados desde ervas, subarbustos, arbustos, lianas até árvores. No Nordeste brasileiro, em particular, na caatinga (área de 734.478 km²), segundo Melo e Andrade (2007), há registro de pelo menos 932 espécies na região, sendo 380 endêmicas, distribuídas em vinte gêneros, dentro as quais se sobressai *Auxemma* Miers, pertencente à família Boraginaceae.

O interesse pelo estudo do gênero foi desencadeado pelo fato de algumas de suas espécies apresentarem uso na medicina popular, dentre as quais, *Heliotropium indicum*, que é bastante utilizada como desobstruentes peitorais e diuréticos. Suas raízes são comercializadas em barracas de feira livre para formulação de xaropes caseiros utilizados para tratamento auxiliar de bronquites (BRAGA, 1976). Outro fator estimulante consiste no fato de que dentre as classes de substâncias isoladas, destaca-se principalmente os alcalóides pirrolizidínicos, por apresentarem uma grande variedade de atividades farmacológicas (SOUZA, 2004).

Neste trabalho, foi realizada uma investigação fitoquímica de duas espécies de *Heliotropium* encontradas no Estado do Ceará: *Heliotropium indicum* Linn e *Heliotropium polyphyllum* Lehm, visando o isolamento, a purificação e a identificação dos seus constituintes químicos fixos e voláteis, bem como possíveis aplicações farmacológicas.

Com relação à espécie *H. polyphyllum* Lehm, sabe-se que é bastante comum na vegetação costeira do nordeste brasileiro, que demonstra ser um ecossistema de rica diversidade vegetal, porém ainda pouco conhecida. Apesar de estarem tão presentes no cotidiano dos habitantes da região litorânea, os espécimes vegetais desse ecossistema são pouco valorizados, a prova disso é a quase ausência de cultivo de plantas pra fins ornamentais, como a espécie *H. polyphyllum* L.

É importante esclarecer que, na atualidade, a vegetação litorânea está protegida por lei por ocupar áreas de preservação permanente. A Lei n^o 9.605/98, de 12 de fevereiro de 1998, denominada Lei da Natureza ou dos Crimes Ambientais, refere-se, no capítulo V, seção

II, artigo 50, à especial preservação da vegetação fixadora de dunas e protetora de mangues (BRASIL, 1998). Porém, para que haja uma preservação efetiva, a Lei por si só, não garante, a comunidade local deve contribuir diretamente. Para que haja a participação eficaz da comunidade, é necessário antes de tudo que ela vincule essas espécies nativas a seu cotidiano. A participação de espécimes nativos no cotidiano da comunidade só será possível através dos seus conhecimentos botânicos, farmacológicos e fitoquímicos. A esse respeito, Brito *et al.* (2006, p. 18) faz o seguinte comentário: “É essencial, portanto, que conheçamos mais sobre a natureza. Só assim seremos capazes de respeitá-la e preservá-la”.

A ausência na literatura de estudos dos constituintes químicos e suas atividades farmacológicas com a espécie *H. polyphyllum* também nos despertou a contribuir para o conhecimento da biodiversidade de plantas na região litorânea.

Semelhante às plantas medicinais, nos países asiáticos, as populações utilizam os cogumelos na alimentação e na terapêutica há milênios, com relatos nas comunidades locais de vários benefícios à saúde e ao bem-estar.

No ocidente, a utilização de cogumelos como iguaria ou no tratamento de enfermidades é ínfima comparada às plantas medicinais. Entretanto, está cada vez mais crescente.

Favorecendo ainda mais a popularização dessa cultura asiática em nosso meio, pesquisas recentes demonstram a ocorrência de atividades farmacológicas atribuídas ao uso de cogumelos (WACHTEL-GALOR *et al.*, 2004).

Apesar dos avanços nos estudos sobre fungo no ocidente, o conhecimento científico acerca da eficácia dos cogumelos na terapêutica, bem como da elucidação dos constituintes químicos presentes nessas espécies ainda está imaturo.

Dessa forma, devido à necessidade de maior conhecimento sobre as espécies de cogumelos encontradas no Estado do Ceará, bem como a possibilidade de obtenção de novos modelos esteroidais, ampliou-se o estudo dos constituintes químicos do macrofungo *Ganoderma lucidum*, através do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico desta espécie.

CAPÍTULO 2

Considerações botânicas sobre as espécies
de *Heliotropium* estudadas

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE AS ESPÉCIES DE *HELIOTROPIMUM* ESTUDADAS

2.1 Considerações botânicas sobre a família Boraginaceae

As plantas pertencentes a esta família caracterizam-se por serem ervas, subarbustos ou árvores com caule geralmente ramoso. Suas folhas podem ser do tipo simples, alternadas, opostas ou verticiladas, sem estípulas. As inflorescências são, predominantemente, de tipo cimosos (cimas escorpióides), com ou sem brácteas. (BARRROSO, 1984; REITZ, 1970).

Além disso, segundo Barroso (1984, p. 88, 89, grifo nosso), estas plantas apresentam as seguintes características:

As flores são andróginas ou unissexuadas, por aborto, diclamídeas, actinomorfas ou zigomorfas. Cálice gramossépalo, tubuloso, com lobos curtos [...]. Corola tubulosa, infundibuliforme, campanulada, hipocrateriforme ou rotácea, com ou sem apêndices faucais [...], com bordos regular ou irregularmente lobados. Os apêndices da corola podem apresentar-se como saliências carnosas, de vários tipos, originados de dobras ou invaginações do tecido das pétalas [...], e localizar-se na fauce, ou constituir campos pilosos formados de cerdas uncinadas ou retas [...]. Androceu geralmente formado de cinco estames livres, exsertos ou não, com filetes curtos ou longos, filiformes ou mais ou menos robustos, com ou sem apêndices [...], anteras biloculares, rimosas, com lóculos globosos, ovóides, oblongos. Em *Heliotropium* e *Tourcefortia*, os estames podem ter anteras livres, com lóculos lineares, filetes curtos, inseridos na base ou na região mediana do tubo da corola, ou as anteras são coniventes, formando estrutura piramidal, sobre o estilete [...]. Gineceu composto de dois a quatro carpelos, constituindo ovário súpero, com dois a quatro lóculos, uniovulados, ou, raramente, uniloculares, com quatro óvulos. Óvulo anátropo, pêndulo do ápice do lóculo; estilete terminal ou ginobásico dividido em dois a quatro ramos ou lobos [...], ou dois estiletos. Fruto indeiscente, carnosos, constituindo uma drupa com dois a quatro lóculos ou unilocular por aborto [...] ou um esquizocarpo dissolvido em quatro núculas livres ou concrecidas duas a duas, com estrutura drupácea [...]; raramente o fruto é seco, unilocular, com pericarpo tênue [...]. Semente com ou sem endosperma. Embrião reto ou curvo [...], com cotilédones planos ou dobrados.

2.2 Considerações botânicas sobre a espécie *Heliotropium indicum* Linn

O gênero *Heliotropium* pertence à família Boraginaceae. O seu nome provém das flores todas viradas para o sol, do grego “helius”, que significa sol e “trope”, virando. As plantas que formam este gênero estão distribuídas predominantemente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente, as áridas (BARROSO, 1984).

A espécie *Heliotropium indicum* L. (Fig. 1A, p. 37) é uma planta daninha medianamente frequente nas regiões tropicais do país, onde infesta beira de estradas, terrenos baldios e pastagens. Caracteriza-se pela nítida preferência por solos úmidos e ricos em matéria orgânica. Popularmente denominada de *fedegoso*, nos Estados do Ceará e Pernambuco; podendo ser conhecida como *borragem-brava* na Bahia, *crista de galo* na Bahia, Norte de Minas Gerais e Amazonas ou como *água-raquiunhaçu*, *jamacanga*, *aguaraciunha-açu*, *jacuacanga*, *erva-de-são-fiacre*, *aguaraá*, *escorpião*, *cravo-de-urubu*, *tureroque*, *turirí* nas outras regiões brasileiras (BRAGA, 1976; LORENZI, 2000; REITZ, 1970).

É válido salientar que segundo Corrêa (1984) outras espécies de plantas também podem ser conhecidas popularmente de *fedegoso*.

Como as espécies da família das Leguminosas (divisão Cesalpiniáceas): *Cassia calycioides* DC, *C. chrysocarpa* Desv., *C. dysophylla* Benth., *C. Hirsuta* L., *C. leiophylla* Vog., *C. oblongifolia* Vog., *C. paradictyon* Vog., *C. pauciflora* HBK., *C. pentagonia* Mill., *C. pilífera* Vog., *C. praetexta* Vog., *C. rotundifolia* Pers., *C. splendida* Vog., *C. sulcata* DC., ou variações semelhantes tais como: fedegoso bravo (*Heliotropium parviflorum* DC., *H. portoricense* Bello, *H. angiospermum* Murray, *H. parviflorum* L.), fedegoso de folha torta (*Cassia corumbosa* Lam, *C. crassifólia* Ortega, *C. falcata* Dum., *C. floribunda* Hort.); fedegoso do mato (*Cassia pubescens* Jacq.); fedegoso do Pará (*Cassia sericea* Sw.); fedegoso dos jardins (*Cassia angulata* Vog.); fedegoso grande (*Cassia quinqueangulata* Rich., *C. medica* Vell.); fedegoso legítimo (*Cassia affinis* Benth.); fedegoso nativo (*Cassia appendiculata* Vog., *C. australis* Vell.); fedegoso verdadeiro (*Cassia occidentalis* L., *C. falcata* L., *C. geminiflora* Schrank, *C. linearis* Michx.).

As características peculiares à espécie devem-se a presença de frutos fortemente riscados, pecíolos alados, pelos todos singelos (REITZ, 1970), conforme Figura 1D (p. 37).

Essa planta é uma erva anual grosseira, miudamente vilosa, hispida ou hispidulosa, possui de 1,0 a 10,0 dm de altura. Os seus caules são soltamente ramosos, de 3,0 a 10,0 mm de espessura, folhosos, frequentemente fistulosos (Fig. 1E, p. 37). As folhas variam de lâminas ovadas até elípticas, evidentemente venosas, de 4,0 a 15,0 cm de comprimento, e de 2,0 a 10,0 cm de largura; apresentam margem repanda ou ondulosa; ápice

agudo; base obliquamente aguda até obtusa ou subcordada e pecíolo de 4,0 a 10,0 cm de comprimento, geralmente, alado especialmente além do meio (Fig. 1C, p. 37). As inflorescências são uma cima escorpióide singela, muito prolongada, de 5,0 a 30,0 cm de comprimento, levando 2 fileiras densas de flores e frutos (Fig. 1B-F, p. 37). O cálice largamente sésbil, de ordinário 1,5 a 2,0 mm de comprimento, lobos lineares ou linear-lanceolados, desiguais; corola azul, roxa ou raramente branca, miudamente pubescente ou estrigosa fora; limbo de 3,0 a 3,5 mm de diâmetro ou raramente estendendo-se até 4,5 mm; lobos largos, largamente ascendentes, obtusos, de 1,0 a 1,3 mm de largura, 0,6 a 0,8 mm de comprimento; tubo prolongado, evidentemente encimando o cálice, em cerca de 3,0 mm de comprimento, com cerca de 1,0 mm de espessura, constringido pela fauce; anteras de 0,5 a 0,6 mm de comprimento, agudas não coerentes, levadas de 0,8 a 1,0 mm acima da base da corola; capítulo estigmático cerca de 0,3 mm de largura e 0,2 mm de comprimento (REITZ, 1970). Os frutos são drupáceo, glabro, de 2,5 mm de comprimento (BRAGA, 1976) (Fig. 1D, p. 37).

As raízes, folhas e flores são utilizadas na medicina popular como desobstruentes diuréticos e peitorais. Suas raízes são comercializadas em barracas de feira livre para formulação de xaropes caseiros utilizados para tratamento auxiliar de bronquites (BRAGA, 1976). Suas folhas são usadas no tratamento de sinais e sintomas considerados como relacionados às infecções fúngicas (FENNER *et al.*, 2006).

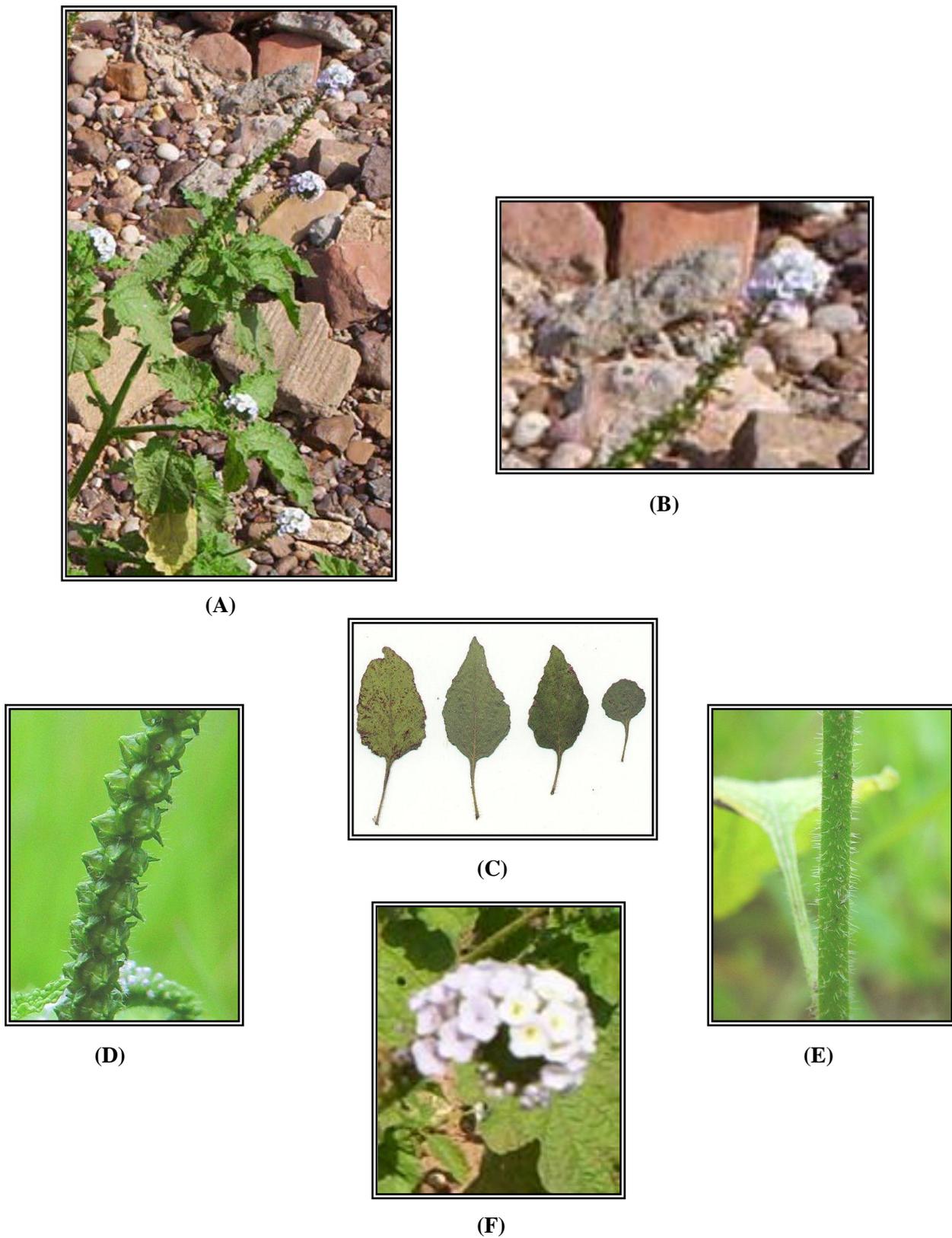


Figura 1: Fotografias da espécie *Heliotropium indicum* L

Legenda: Parte aérea **A**, inflorescência **B**, folhas **C**, frutos **D**, caule **E** e flores **F**.

Fotografia: João Sammy Nery de Souza (A, B, F)
Fonte: wikipédia (C, D, E)

2.3 Considerações botânicas sobre a espécie *Heliotropium polyphyllum* Lehm

A espécie *H. polyphyllum* L. (Fig. 2, p. 39) é um herbáceo de valor ornamental de caule de haste fina e áspera, ereto ou mais frequentemente decumbente ou prostrada, em geral bastante ramificadas, com ramos longos sobre o solo. No Nordeste brasileiro, ela é popularmente denominada de sete-sangrias, podendo ser conhecida também como crista-de-galo ou relógio (BRITO *et al.*, 2006). Esta planta está distribuída nas Américas do Norte, Central e do Sul e Antilhas. Além disso, sobre sua distribuição, Melo e Sales (2004, p. 79) fazem o seguinte comentário:

No Brasil, está distribuída ao longo da costa atlântica; indo desde o Estado do Pará até o Rio de Janeiro, em vegetação litorânea. [...] no Nordeste a espécie é encontrada tanto no litoral, como em áreas de vegetação de caatinga nos Estados de Pernambuco, Bahia e Rio Grande do Norte. Na região litorânea, habita dunas e ambientes de restinga, em solos arenosos, sendo uma espécie comum da vegetação de restinga.

Em relação às suas características botânicas, de acordo com Melo e Sales (2004, p.78, 79), esta planta apresenta a seguinte descrição:

Erva, prostrada a decumbente. Indumento seríceo, branco, revestindo ramos, folhas, inflorescências, flores e frutos. Ramos cilíndricos, com ritidoma desprendendo-se em faixas longitudinais. Folhas alternas, curto-pecioladas; pecíolo 0,3-1 mm, achatado, seríceo; lâmina 0,6-1,3 x 0,1-0,2 cm, oblanceolada, cartácea a subcoriácea, base cuneada, ápice agudo, margem plana, esparsa a densamente serícea em ambas as faces; venação reticulódroma. Inflorescência 1-15,5 cm compr., terminal solitária ou aos pares, bracteada; brácteas 3-4 x 1-1,3 mm, ovais, cartáceas, com venação semelhante às folhas, face adaxial glabra, face adaxial serícea. Flores 6-6,5 mm compr., curto-pediceladas; pedicelos ca. 0,5 mm compr. Cálice profundamente lobado, 3-4 mm compr., ligeiramente menor que o tubo da corola; lobos desiguais, os menores 2-2,5 x 0,6-0,8 mm, os maiores 3-4 x 0,8-1 mm, foliáceos, ovais a largo-ovais, margem inteira, ciliada, ápice agudo, externamente seríceos, internamente glabros. Corola 6-6,5 mm compr., hipocrateriforme, amarela, serícea externamente; tubo 3,6-4 mm compr., internamente seríceo na fauce; lobos 2,5-3 mm compr., oval-deltóides. Estames subsésseis, inseridos a 1 mm da base do tubo da corola; anteras ca. 1 mm compr., ovais, base truncada, ápice coerente, longo-caudado e pubescente. Ovário ca. 0,5 mm compr., subgloboso, 4-sulcado, falsamente 4-ocular, glabro; estilete cilíndrico, ca. 0,3 mm compr.; estigma 0,4 mm compr., cônico com ápice 4-denticulado; óvulo 1 por lóculo. Fruto ca. 1,5 mm diâm., subgloboso; núculas 4, trígonas, face dorsal serícea. Semente 1 por núcula, ca. 1 mm compr., trígonas, castanhas, lisas.



(G)



(H)



(I)



(J)



(L)



(M)

Figura 2: Fotografias da espécie *Heliotropium polyphyllum* L.

Legenda: Parte aérea G, H, I; frutos J; flores L;
Exsicata nº 39.832 M.

Fotografia: João Sammy Nery de Souza

CAPÍTULO 3

Levantamento bibliográfico sobre as espécies *Heliotropium indicum* L. e *Heliotropium polyphyllum* L.

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE AS ESPÉCIES *Heliotropium indicum* L. e *Heliotropium polyphyllum* L.

3.1 Levantamento bibliográfico sobre as espécies em estudo

Estudos fitoquímicos realizados em espécies de *Heliotropium* têm revelado a existência de metabólitos pertencentes à classe dos alcalóides, quinonas, flavonóides e derivados de geranila aromático, além do ácido carrizalóico. Dentre estas classes de metabólitos, podemos destacar a presença de alcalóides pirrolizidínicos, que podem ser considerados marcadores quimiosistemáticos deste gênero. Dessa maneira, foi realizada uma pesquisa bibliográfica no *science finder*, *web of science* e *sciencedirect* sobre tipos estruturais destes alcalóides, espécies estudadas, atividades biológicas, dados de RMN ^1H e ^{13}C e referências, uma vez que foram isoladas substâncias com os referidos esqueletos nas espécies em estudo: *H. Indicum* L. e *H. Polyphyllum* L.

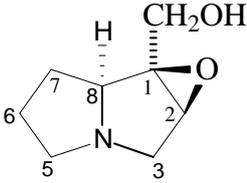
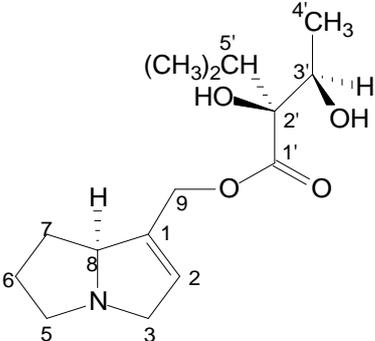
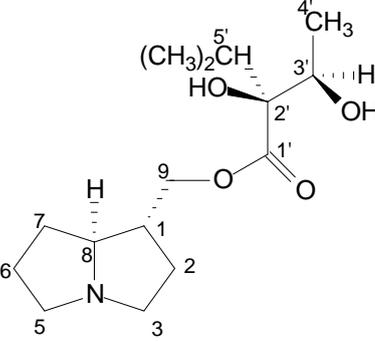
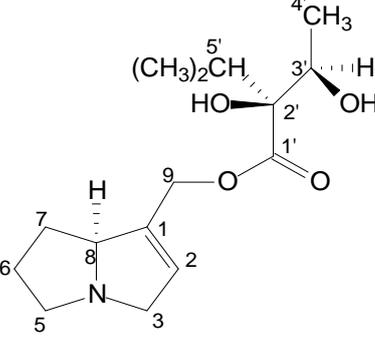
Os alcalóides pirrolizidínicos são encontrados em plantas de diversos ambientes por todo o mundo (MATTOCKS, 1986). Estes constituintes são encontrados principalmente nas famílias Asteraceae (*Senecio*, *Eupatorium*), Boraginaceae (*Heliotropium*, *Trichodesma*, *Symphytum*) e Fabaceae (*Crotalaria*) (WHO, 1988). Segundo Robins (1989), avalia-se que mais de 6.000 espécies vegetais contenham alcalóides pirrolizidínicos, o que corresponde a 3% das angiospermas.

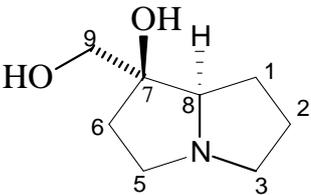
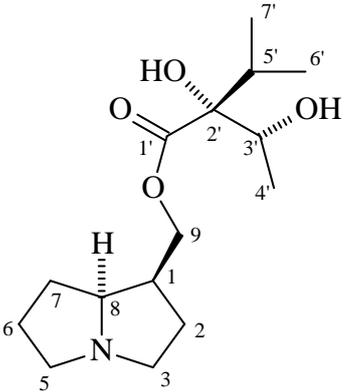
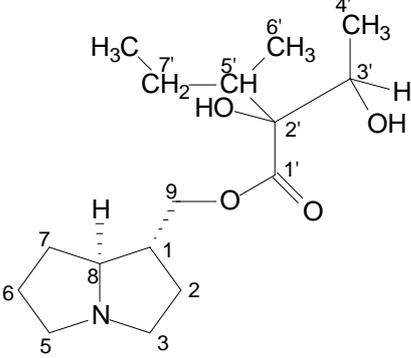
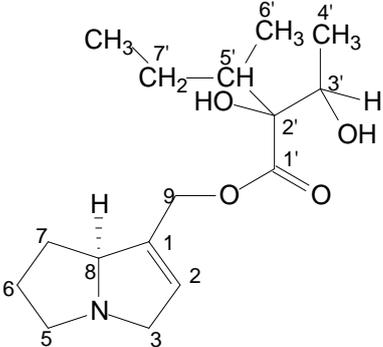
O levantamento bibliográfico realizado relata a ocorrência de alcalóides pirrolizidínicos e suas respectivas espécies presentes em *Heliotropium*, além da obtenção de artigos que continham dados de RMN, que se encontram no Quadro 1 (p. 42-54).

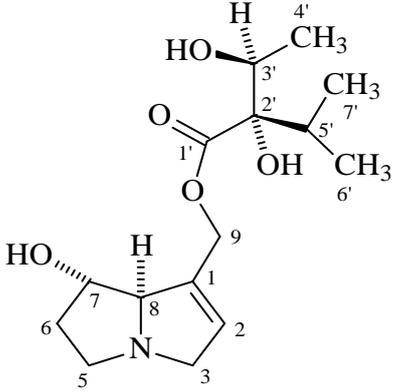
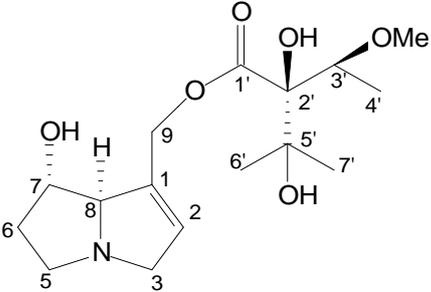
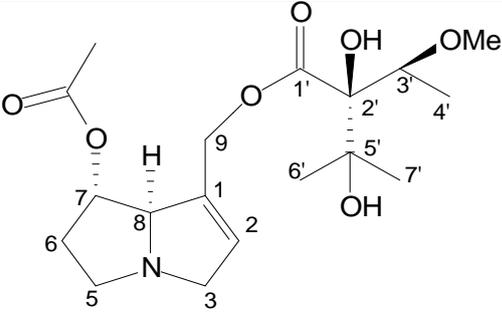
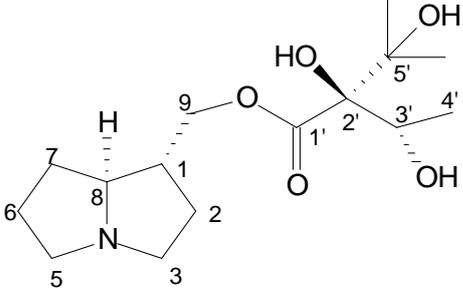
Nessa pesquisa bibliográfica, foram encontrados 48 alcalóides pirrolizidínicos no gênero *Heliotropium*. Estes compostos apresentam ou não dupla ligação entre os carbonos C-1 e C-2. As cadeias alquílicas ligadas aos anéis normalmente estão ligadas aos carbonos C-1 ou C-7. Em alguns destes alcalóides, o grupo amino encontra-se na forma de N-óxido.

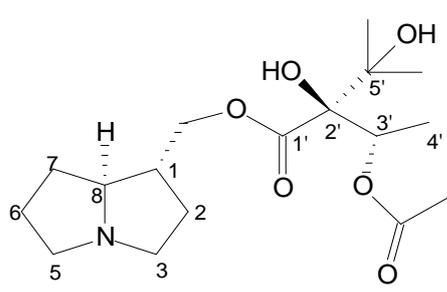
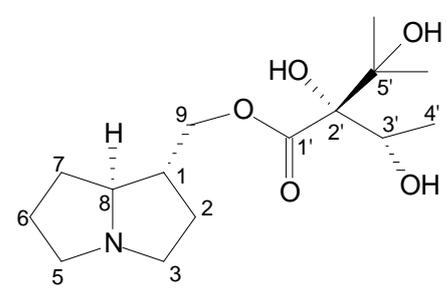
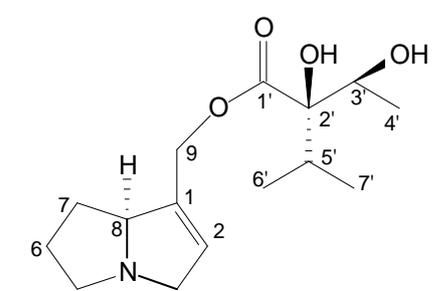
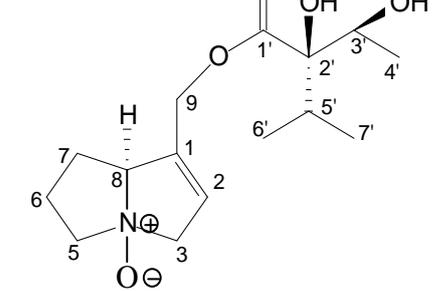
Na espécie estudada de *Heliotropium indicum* L., segundo o levantamento bibliográfico realizado, foram isolados dezessete alcalóides pirrolizidínicos, mostrados no Quadro 1 (p. 44-54). Nas outras espécies foram detectados quatro na espécie *H. subulatum*, dez em *H. spathulatum*, cinco na espécie *H. bovei*, cinco em *H. floridum*, três em *H. bracteatum*, três em *H. hirsutissimum*, dois em *H. scabrum*, três em *H. keralense*, dois em *H. megalanthum* e três em *H. curassavicum*.

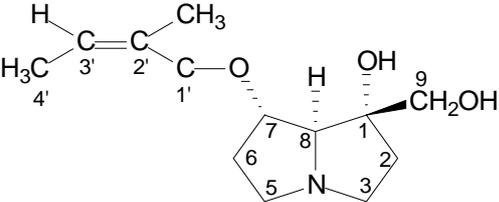
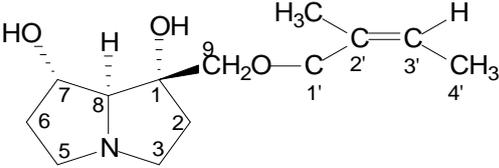
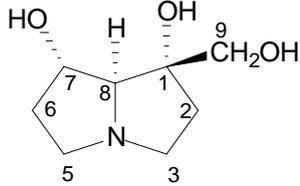
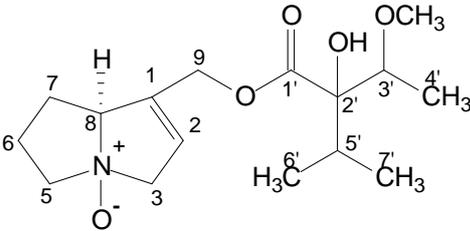
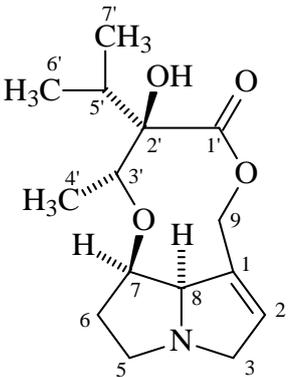
Quadro 1: Alcalóides pirrolizidínicos isolados de espécies do gênero *Heliotropium*.(As referências com dados de RMN ^1H estão marcadas com □, com dados de RMN ^{13}C com ■)

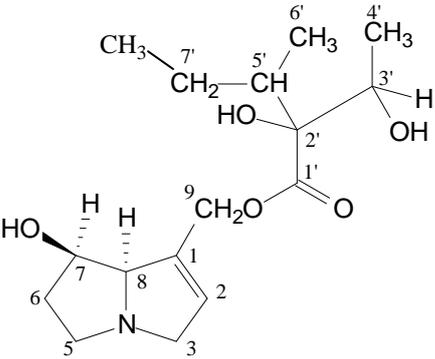
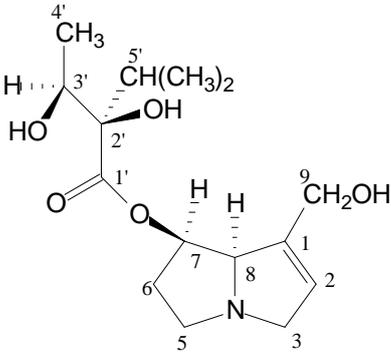
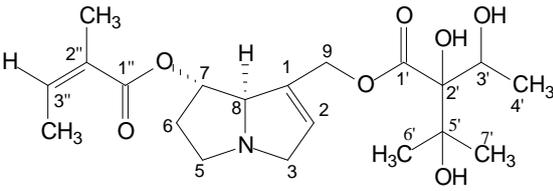
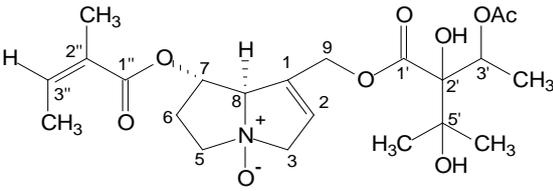
ESTRUTURA	FONTE NATURAL REFERÊNCIA	ATIVIDADES BIOLÓGICAS
 <p>1-hidroximetil-1β-2β-epoxipirrolizidina (1)</p>	<p><i>H. subulatum</i> MALIK <i>et al.</i>, 2005.</p>	<p>ND</p>
 <p>Amabilina (2)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Coromandalina (3)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Coromandalinina (4)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p>ND</p>

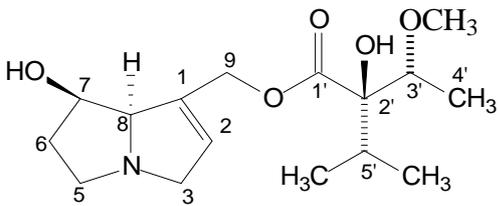
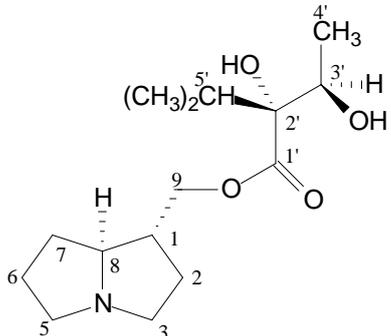
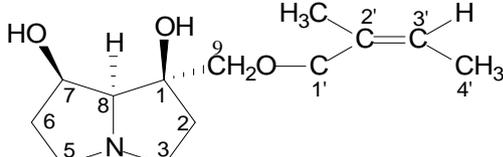
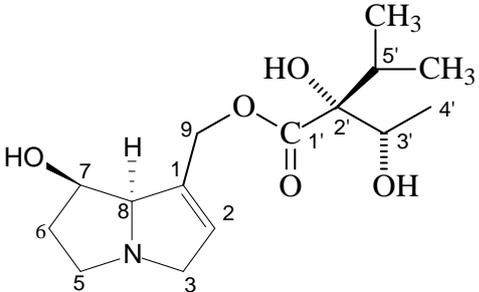
 <p>Curassanecina (5)</p>	<p><i>H. subulatum</i> MALIK <i>et al.</i>, 2005.</p>	<p>ND</p>
 <p>Heliocurassavicina (6)</p>	<p><i>H. subulatum</i> MALIK <i>et al.</i>, 2005.</p>	<p>ND</p>
 <p>Curassavina (7)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Curassavinina (8)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p>ND</p>

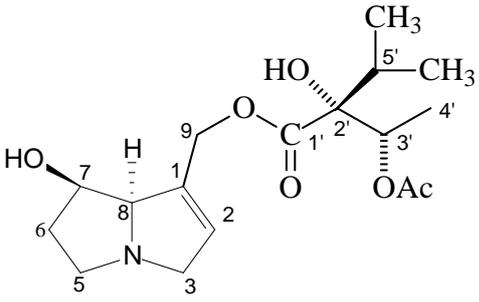
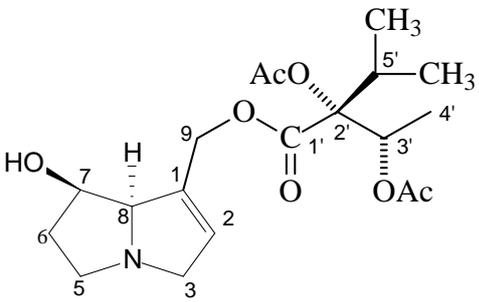
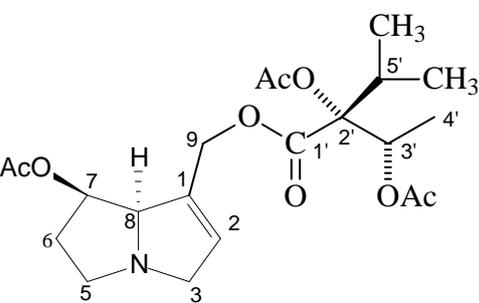
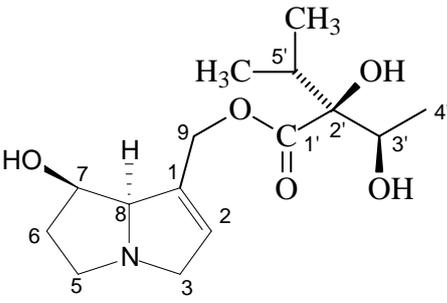
 <p>Echinatina (9)</p>	<p><i>H. indicum</i> HOQUE; GHANI; RASHID, 1976.</p>	<p>ND</p>
 <p>Europina (10)</p>	<p><i>H. bovei</i> REINA <i>et al.</i>, 1995. <i>H. indicum</i> SINGH <i>et al.</i>, 2003.</p>	<p>Antipredatória para insetos Antifúngica</p>
 <p>7-Acetil-europina (11)</p>	<p><i>H. bovei</i> REINA <i>et al.</i>, 1995.</p>	
 <p>Floridimina (12)</p>	<p><i>H. floridum</i> REINA <i>et al.</i>, 1997 (□, ■).</p>	<p>ND</p>

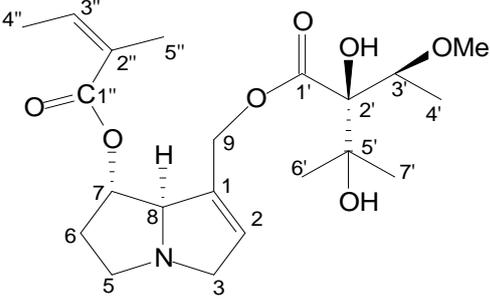
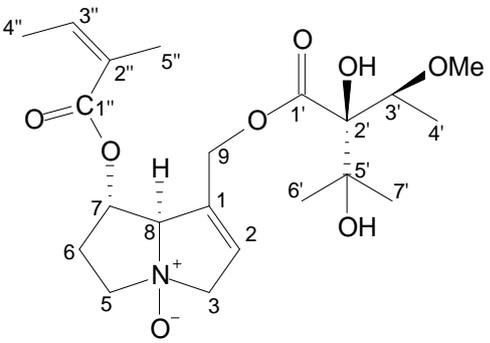
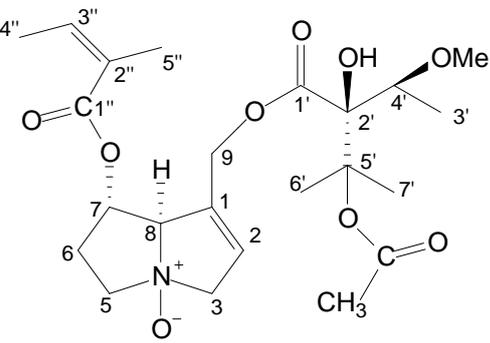
 <p style="text-align: center;">Floridina (13)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. floridum</i> REINA <i>et al.</i>, 1997 (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">Floridinina (14)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. floridum</i> REINA <i>et al.</i>, 1997 (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">Antifúngica Inseticida Herbicida</p>
 <p style="text-align: center;">Heleurina (15)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. indicum</i> HOQUE; GHANI; RASHID, 1976.</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">N-óxido de Heleurina (16)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. subulatum</i> MALIK <i>et al.</i>, 2005.</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>

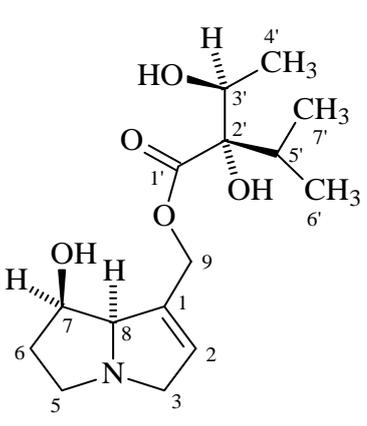
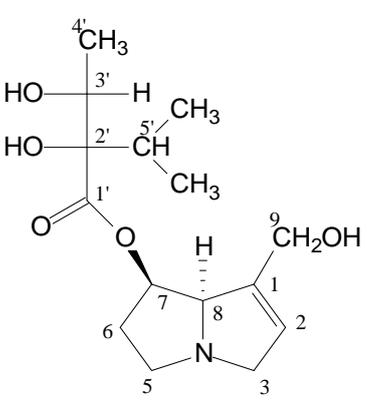
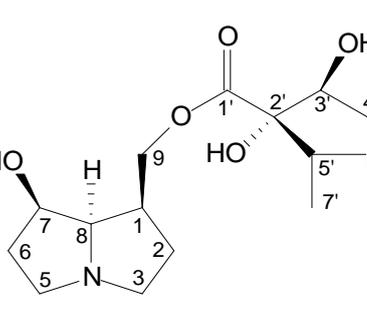
 <p>Helibracteatinina (17)</p>	<p><i>H. bracteatum</i> LAKSHMANAN; SHANMUGASUNDARAM, 1995b (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Helibracteatina (18)</p>	<p><i>H. bracteatum</i> LAKSHMANAN; SHANMUGASUNDARAM, 1995b (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Helibracteatinecina (19)</p>	<p><i>H. bracteatum</i> LAKSHMANAN; SHANMUGASUNDARAM, 1995b (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>N-óxido de Heleurina (20)</p>	<p><i>H. hirsutissimum</i> SKALTSOUNIS; CONSTANTINIDIS; HARVALA, 1993 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Helindicina (21)</p>	<p><i>H. indicum</i> SOUZA <i>et al.</i>, 2005 (□, ■).</p>	<p>Antioxidante</p>

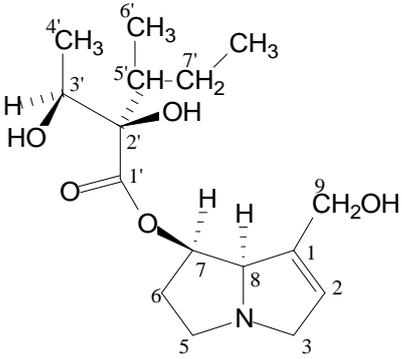
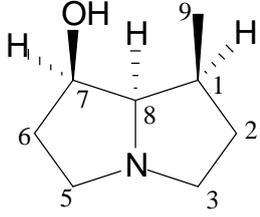
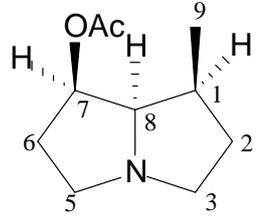
 <p style="text-align: center;">Heliospathina (22)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">Heliospathulina (23)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">Heliosupina (24)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. indicum</i> SINGH <i>et al.</i>, 2003.</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">N-óxido de 3'-acetil-heliosupina (25)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. hirsutissimum</i> SKALTSOUNIS; CONSTANTINIDIS; HARVALA, 1993 (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>

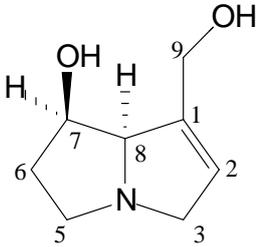
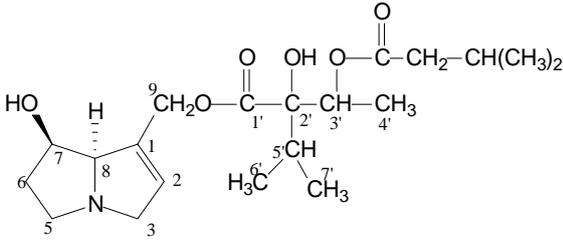
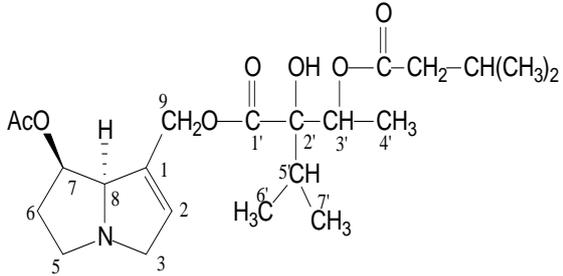
 <p style="text-align: center;">Heliotrina (26)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. indicum</i></p> <p>PANDEY <i>et al.</i>, 1982. PANDEY <i>et al.</i>, 1996. HOQUE; GHANI; RASHID, 1976.</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">Heliovicina (27)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. spathulatum</i></p> <p>BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p> <p style="text-align: center;"><i>H. floridum</i></p> <p>REINA <i>et al.</i>, 1997 (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">Heliscabina (28)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. scabrum</i></p> <p>LAKSHMANAN; SHANMUGASUNDARAM, 1995a (□, ■).</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>
 <p style="text-align: center;">Indicina (29)</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. indicum</i></p> <p>MATTOCKS <i>et al.</i>, 1961 MATTOCKS, 1967.</p>	<p style="text-align: center;">ND</p>

 <p>Acetil-indicina (30)</p>	<p><i>H. indicum</i> MATTOCKS, 1967.</p>	<p>ND</p>
 <p>Diacetil-indicina (31)</p>	<p><i>H. indicum</i> MATTOCKS, 1967.</p>	<p>ND</p>
 <p>Triacetil-indicina (32)</p>	<p><i>H. indicum</i> MATTOCKS, 1967.</p>	<p>ND</p>
 <p>Intermedina (33)</p>	<p><i>H. keralense</i> RAVI; LAKSHMANAN; HERZ, 1990 (□).</p>	<p>ND</p>

 <p>Lasiocarpina (34)</p>	<p><i>H. bovei</i> REINA <i>et al.</i>, 1995.</p> <hr/> <p><i>H. indicum</i> PANDEY <i>et al.</i>, 1996. HOQUE; GHANI; RASHID, 1976.</p>	<p>Antipredatória</p> <p>Antimicrobial</p>
 <p>N-óxido de Lasiocarpina (35)</p>	<p><i>H. bovei</i> REINA <i>et al.</i>, 1995.</p> <hr/> <p>SKALTSOUNIS; CONSTANTINIDIS; HARVALA, 1993 (□, ■).</p> <hr/> <p><i>H. indicum</i> HOQUE; GHANI; RASHID, 1976.</p>	<p>ND</p>
 <p>N-óxido de 5'-Acetil-lasiocarpina (36)</p>	<p><i>H. bovei</i> REINA <i>et al.</i>, 1995.</p> <hr/> <p><i>H. hirsutissimum</i> SKALTSOUNIS; CONSTANTINIDIS; HARVALA, 1993 (□, ■).</p>	<p>Citotóxica</p>

 <p>Licopsamina (37)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p> <p><i>H. megalanthum</i> REINA <i>et al.</i>, 1998.</p> <p><i>H. indicum</i> SOUZA <i>et al.</i>, 2005 (□, ■).</p> <p><i>H. steudneri</i> BIRECKA <i>et al.</i>, 1980 (□, ■).</p>	<p>Inseticida</p> <p>Antipredatória para inseto</p> <p>Antifúngica</p> <p>Antioxidante</p>
 <p>Iso-licopsamina (38)</p>	<p><i>H. keralense</i> RAVI; LAKSHMANAN; HERZ, 1990 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Megalanthonina (39)</p>	<p><i>H. megalanthum</i> REINA <i>et al.</i>, 1998 (□, ■).</p>	<p>Inseticida</p> <p>Antipredatória para insetos</p> <p>Antifúngica</p>

 <p>(2<i>R</i>)-2-hidroxi-2-((<i>S</i>)-1-hidroxi-etil)-3-metilpentanoato de (7<i>R</i>)-5,6,7,7a-tetrahidro-1-(hidroximetil)-3<i>H</i>-pirrolizina-7-ila (40)</p>	<p><i>H. spathulatum</i> BREITMAIER <i>et al.</i>, 1991 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>Retronecanol (41)</p>	<p><i>H. indicum</i> MATTOCKS, 1967.</p>	<p>ND</p>
 <p>Acetil-retronecanol (42)</p>	<p><i>H. indicum</i> MATTOCKS, 1967.</p>	<p>ND</p>

 <p>Retronecina (43)</p>	<p><i>H. indicum</i> MATTOCKS, 1967.</p> <p><i>H. keralense</i> RAVI; LAKSHMANAN; HERZ, 1990 (□).</p> <p><i>H. scabrum</i> LAKSHMANAN; SHANMUGASUNDARAM, 1995a (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>9-(3'-Isovaleryl)viridifloril retronecina (44)</p>	<p><i>H. curassavicum</i> DAVICINO; PESTCHANKER; GIORDANO, 1988 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
 <p>7-Acetil-9-(3'-isovaleryl)viridifloril retronecina (45)</p>	<p><i>H. curassavicum</i> DAVICINO; PESTCHANKER; GIORDANO, 1988 (□, ■).</p>	<p>ND</p>

<p>9-(3'-Acetil)viridifloril retronecina (46)</p>	<p><i>H. curassavicum</i> DAVICINO; PESTCHANKER; GIORDANO, 1988 (□, ■).</p>	<p>ND</p>
<p>Supinina (47)</p>	<p><i>H. indicum</i> HOQUE; GHANI; RASHID, 1976.</p>	<p>ND</p>
<p>3'-Acetil-traquelantamina (48)</p>	<p><i>H. floridum</i> REINA <i>et al.</i>, 1997 (□, ■).</p>	<p>Antipredatória Antifúngica Inseticida Herbicida</p>

Dessa forma, percebe-se que o grupo de constituintes químicos já isolados do gênero *Heliotropium* que merece destaque é o alcalóide pirrolizidínico. Entretanto, este não é o único tipo de constituinte isolado, encontram-se registrados: quinonas (Fig. 6, p. 57), flavonoides (Fig. 5, p. 56), esteróides, triterpenos (Fig. 7, p. 58), álcoois, ácidos graxos (Fig. 4, p. 55), dentre outros (Fig. 3, p. 55).

A partir da espécie *Heliotropium glutinosum* Phil (MODAK *et al.*, 2007), foram isolados os flavonóides 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona; 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona e 4'-acetil-5-hidroxi-7-metoxiflavanona (Fig. 5, p. 58), além do composto fenólico 4-metoxi-3-[(2)-7'-metil-3'-hidroximetil-2',6'-octadienil-]fenol (Fig. 6, p. 57). (MODAK *et al.*, 2007). Entretanto, sabe-se que estes três flavonóides já foram isolados em outras espécies de *Heliotropium*: *H. stenophyllum* (VILLARROEL *et al.*, 1991), *H. sp* (URZÚA *et al.*, 1993), *H. chenopodiace* var. *chenopodiaceum* e *H. chenopodiaceum* var. *ericoideum* (URZÚA *et al.*, 1998).

O composto heliofenantrona foi isolado a partir de *Heliotropium ovalifolium*, com sua configuração absoluta definida (Fig. 3). (HOSTETTMAN *et al.*, 2001).

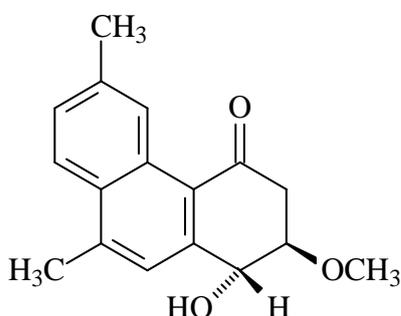


Figura 3: Estrutura de heliofenantrona, isolada de *H. ovalifolium*

Os compostos mais simples isolados a partir da espécie *Heliotropium subulatum* foram: triacontan-1-ol, ácido octadecanóico e 1-metóxicos-4(*E*)-en-3-ona (Fig. 4). (MALIK *et al.*, 2005).

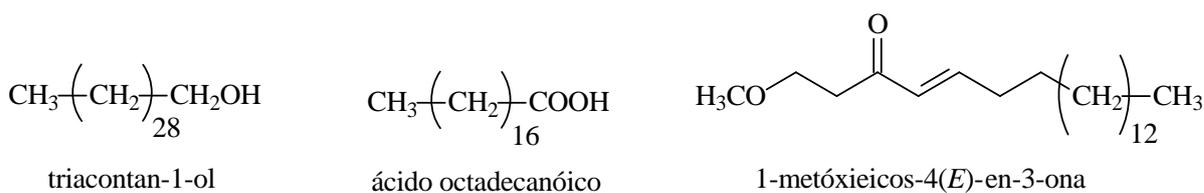


Figura 4: Compostos não alcaloídicos isolados de *H. subulatum*

Os flavonóides 5,7,4'-trihidróxiflavanona (naringenina), 5,3',4'-trihidróxi-7-metóxiflavanona (7-*O*-metileriodictiol), 5,7-dihidróxiflavanona (pinocembrina), 3-acetóxi-5,7-dihidróxiflavanona (3-*O*-acetatopinobanksin), 5,7,3'-trihidróxi-4'-metóxiflavanona (hesperetina), 5,7-dihidróxi-3-metóxiflavona (3-*O*-metilgalangina), 5,7,4'-trihidróxi-3,3'-dimetóxiflavona (3-*O*-metilisorhamnetina) e 5,4'-dihidróxi-3,7,3'-trimetóxiflavona (pachipodol) foram isolados da espécie *Heliotropium sinuatum* (TORRES *et al.*, 1996); enquanto que os flavonóides 5,7-dihidróxi-3-metóxiflavona (3-*O*-metilgalangina), 5-hidróxi-

3,7-dimetóxi flavona (3,7-*O*-dimetilgalangina) e (2*S*,3*S*)-3,5-dihidróxi-7-metóxi flavanona [(-)-alpinona] foram isolados da espécie *Heliotropium huascoense* (VILLARROEL *et al.*, 2001) (Fig. 5).

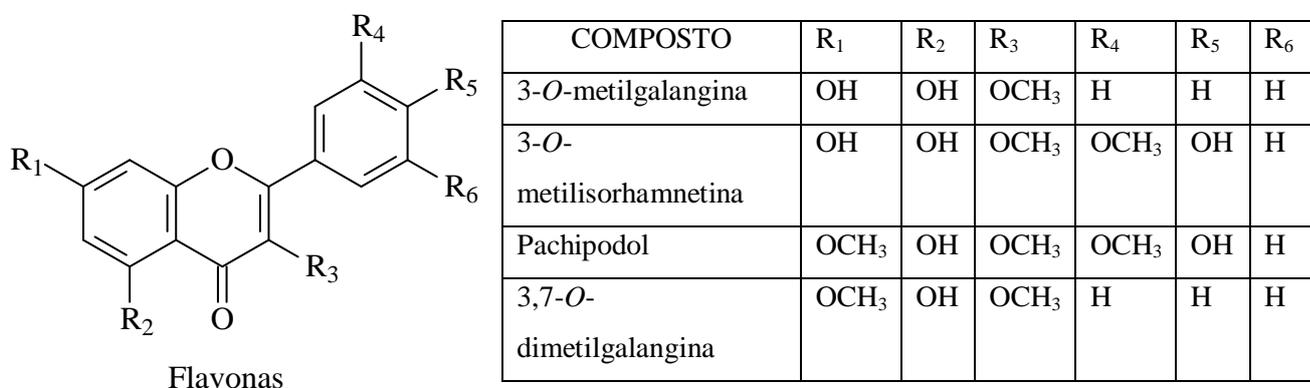
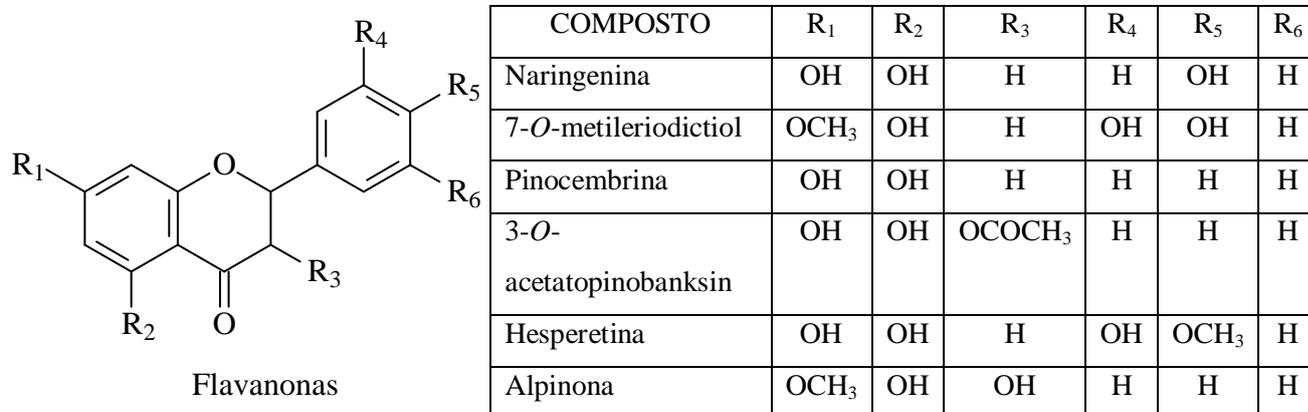


Figura 5: Flavonóides isolados de *Heliotropium*

Foi registrado também o isolamento do ácido [3-*rel*-(8*R*,9*R*-9-hidróxi-9,13,13-trimetil-12-oxo-10-ciclo-hexenil)metil]-4-metóxi-benzóico [ácido *rel*-(8*R*,9*R*)-carrizalóico] (Fig. 6, p. 57). (VILLARROEL *et al.*, 2001). Além disso, foram isolados o derivado aromático da geranila, identificado como filifolinol e o composto fenólico {4-metóxi-3-[(2)-7'-metil-3'-hidróximetil-2',6'-octadienil-]fenol} da espécie *Heliotropium filifolium* (Fig. 6, p. 57) (URZÚA; MODAK; TORRES, 2001).

As quinonas registradas na literatura foram as heliotropinonas A e B, isoladas das partes aéreas de *Heliotropium ovalifolium* (Fig. 6) (HOSTETTMANN *et. al.*, 2001).

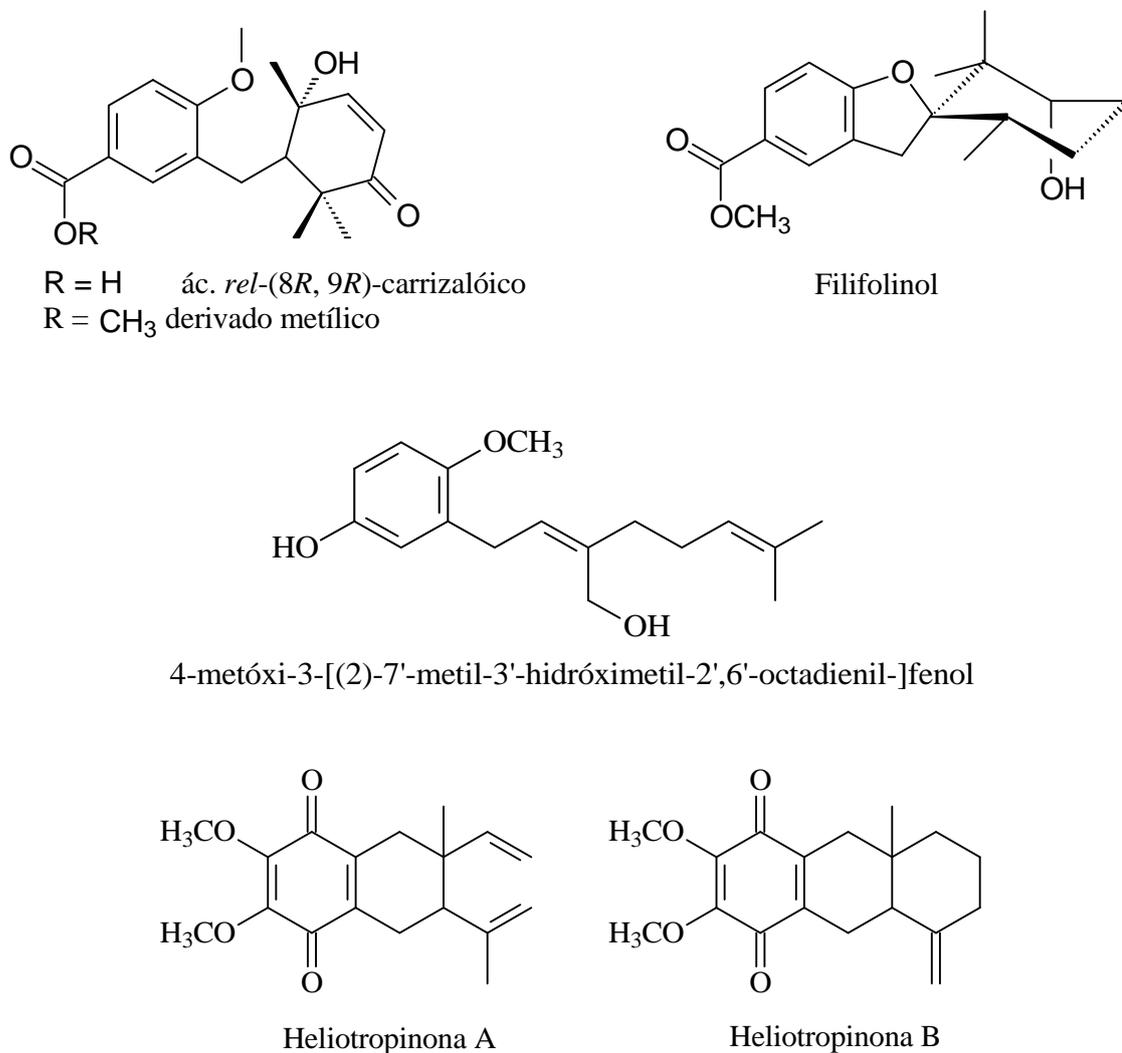


Figura 6: Outros constituintes isolados de *Heliotropium*

Os esteróides e triterpenos foram isolados das espécies *Heliotropium ellipticum* e *Heliotropium indicum*. Da primeira espécie foram isolados: β -sitosterol, estigmasterol, β -amirina, acetato de β -amirina, cicloartenona, friedelina e friedena-3 β -ol (epifriedelenol), cujas estruturas estão representadas na Figura 7 (p. 58) (JAIN; SINGH; JAIN, 2001).

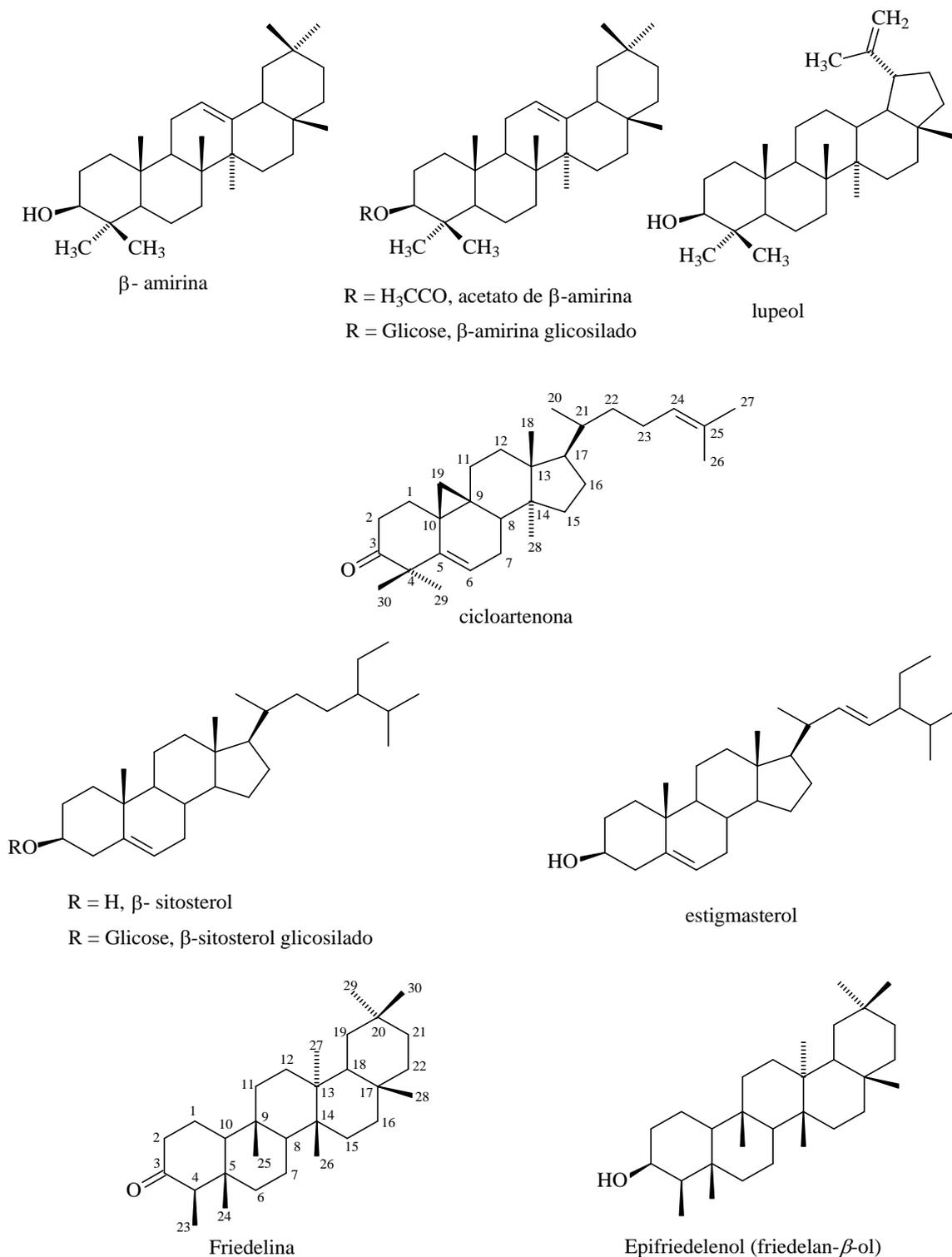


Figura 7: Triterpenos e esteróides isolados de *H. ellipticum* e *H. indicum*

A partir da espécie *Heliotropium indicum*, foram isolados os compostos lupeol (PANDEY *et al.*, 1996), β -sitosterol, β -sitosterol glicosilado, β -amirina glicosilado (PANDEY *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 2003) (Fig. 7) e os flavonóides: 7-hidróxilflavanona e 5-metilnaringenina (SINGH *et al.*, 2003) (Fig. 5, p. 56).

Em relação à espécie *H. polyphyllum*, levantamento bibliográfico realizado no *Science Finder*, *Web of Science* e *Scencedirect* demonstrou escassez de estudos sobre sua constituição química. Esta planta é bastante comum na vegetação costeira do Nordeste brasileiro, que demonstra ser um ecossistema de rica diversidade vegetal, porém ainda pouco conhecida. Apesar de estarem tão presentes no cotidiano dos habitantes da região litorânea, as espécies vegetais desse ecossistema são desvalorizadas, a prova disso é a quase ausência de cultivo dessa espécie para fins ornamentais.

A pesquisa bibliográfica sobre as espécies do gênero *Heliotropium* revelou a importância dos constituintes químicos pertencentes à classe dos alcalóides pirrolizidínicos. Diante disso, tornou-se necessário, no subtítulo a seguir, dissertar sobre importantes considerações sobre esta classe de metabólicos.

3.2 Considerações importantes sobre alcalóides pirrolizidínicos

Os primeiros registros de estudo sobre alcalóides pirrolizidínicos no Brasil iniciaram-se através de pesquisa sobre a toxicidade em animais domésticos (PAIVA, 2002). Entretanto, sobre as revisões bibliográficas desta classe de compostos, Paiva declara (2002, p. 3):

[...] sua primeira revisão em 1950 com apenas 27 estruturas e este número foi aumentando consideravelmente entre 1966-68 com registro de mais de 100 estruturas. Hartmann e Witte (1995), relatam a existência de 370 estruturas conhecidas de 560 espécies estudadas.

Essa classe de alcalóides tem apresentado merecido destaque nas últimas décadas, pois além de ter sua distribuição em diversos ambientes por todo o mundo (MATTOCKS, 1986), tem apresentado relevantes atividades biológicas, sendo fundamentais para o sistema de polinização de muitas espécies de plantas e influencia diretamente na cadeia alimentar de seres vivos, como borboletas (PANSARIN, 2003).

Os alcalóides pirrolizidínicos, denominados de APs, são produtos naturais secundários caracterizados pelo anel bicíclico de oito membros que contém um nitrogênio heterocíclico na posição 4, formando um sistema 1-azabicyclo-[3,3,0]-octano (PAIVA, 2002). De acordo com Rizk (1990), o anel pirrolizidínico é definido como a fusão de dois anéis por um átomo de nitrogênio agindo como cabeça de ponte. Mattocks (1986) relata que os APs, em sua maioria, são derivados de amino-álcoois, definido como base necina (1-hidroxi metilpirrolizidina), encontrados na forma de base livre ou de N-óxido, podendo apresentar uma insaturação entre os carbonos C-1 e C-2. (Figura 8, p. 60).

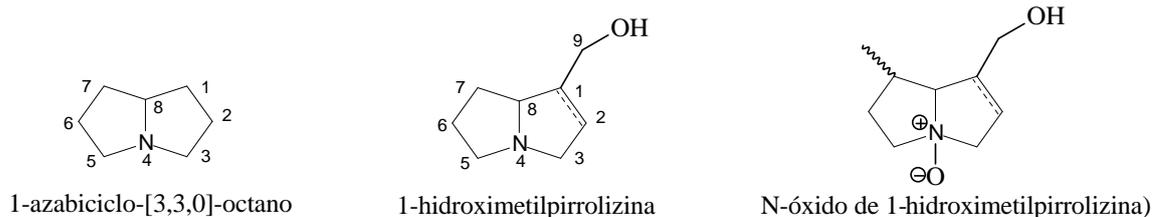


Figura 8: Representação das estruturas básicas dos alcalóides pirrolizidínicos.

São relatados na literatura diferentes tipos de alcalóides pirrolizidínicos. Os APs são geralmente alcalóides esterificados, formados por uma base necina e um ácido néxico. A base necina difere no grau de hidroxilação, estereoquímica, substituintes e número de insaturações do anel.

As principais diferenças nos alcalóides pirrolizidínicos encontrados no gênero *Heliotropium* estão na presença ou ausência de insaturação nos carbonos C-1 e C-2, sendo que geralmente há uma ligação dupla; na presença ou não de ramificações nos carbonos C-1 e C-7 (Figura 8).

Segundo Robins (1989), os alcalóides pirrolizidínicos ocorrem usualmente sob a forma de monoésteres, diésteres de cadeia aberta ou cíclica e, geralmente, em C-7 e C-9. Podem apresentar como diésteres ou triésteres de cadeia aberta ou sob a forma de macrociclo (HARTMANN; WITTE, 1995).

Em 1995, Hartmann e Witte propuseram uma classificação para estes alcalóides incluindo implicações biogénéticas, distribuindo-os em 7 grupos (Figura 9, p. 61):

Senecionina (A): a maioria é representada por diéster macrocíclico de 12 membros, que são derivados de estruturas cíclicas do tipo senecionina.

Triangularina (B): monoésteres ou diésteres com ácido em C₅ (a maioria anfoloila, tigloila ou senecioila) e seus derivados hidroxilados.

Licopsamina (C): monoésteres ou diésteres contendo o ácido 2-isopropilbutírico hidroxilado.

Monocrotalina (D): macrociclo de 11 membros com base do tipo retronecina e uma variação de substituição associada à parte do ácido néxico.

Falaenopsina (E): monoéster de (-)-isoretronecanol, lindefolina, laburnina ou (-)-traquelantamina, com arila e arilaquila e, raramente, com alquila no ácido néxico.

Lolina (L): são derivados de 1-aminopirrolizidinas com ponte éterea ligando C-2 e C-7. Eles são biogeneticamente não relatados para o 1-hidroximetilpirrolizidinas.

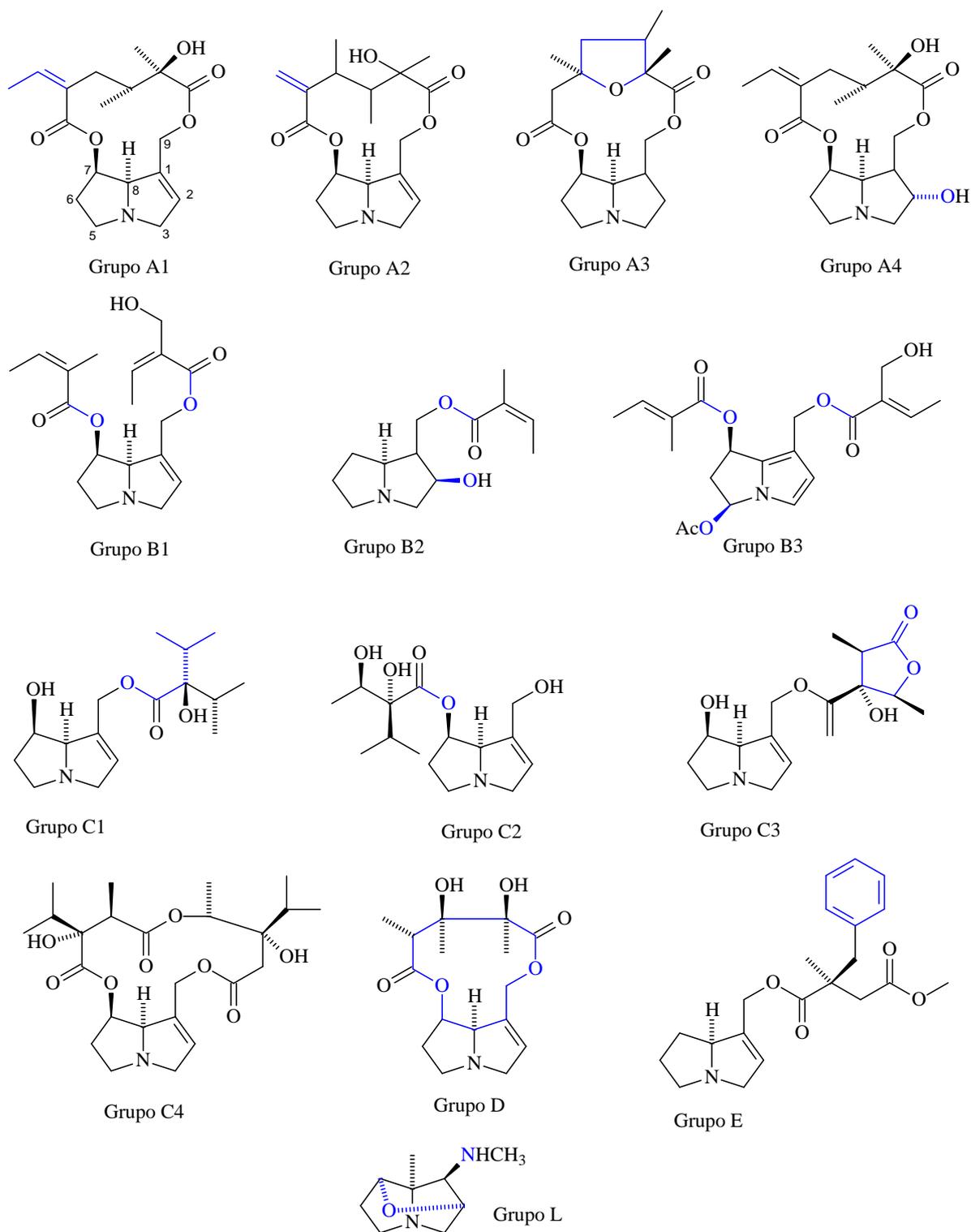


Figura 9: Classificação dos alcalóides pirrolizidínicos, de acordo com Hartmann e Witte (1995)

Esses compostos ocorrem como bases terciárias ou N-óxidos em muitos gêneros das famílias *Compositae*, *Boraginaceae*, *Leguminosae*, *Asteraceae* e *Orchidaceae* (BIRECKA *et al.*, 1980; WINK *et al.*, 1998). Atualmente, eles têm sido usados como marcadores quimiotaxonômicos na família *Boraginaceae* (EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; HUIZING; MALINGRE, 1981; PEDERSEN, 1975).

A literatura menciona uma ampla diversidade de ação biológica atribuída aos alcalóides pirrolizidínicos e seus análogos, como os descritos a seguir.

Os alcalóides pirrolizidínicos mostram importância toxicológica por apresentar ação hepatotóxica (BIRECKA *et al.*, 1980; EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; MATTOCKS, 1986; REINA *et al.*, 1997; ROEDER, 1995; WINK *et al.*, 1998) e efeito pneumotóxico (BICCHI *et al.*, 1993; BIRECKA *et al.*, 1980; EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; SCHULTZE; ROTH, 1993; WINK *et al.*, 1998).

Essas substâncias têm sido identificadas como agentes mutagênicos e carcinogênicos (BIRECKA *et al.*, 1980; EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; HERRMANN; JOPPE; SCHMAUS, 2002; MATTOCKS, 1986; REINA *et al.*, 1997; WINK *et al.*, 1998). Além disso, elas apresentam ação embriotóxica, antileucêmica, hemolítica, antimitótica e teratogênica (BIRECKA *et al.*, 1980; EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; HARTMANN; WITTE, 1995; MATTOCKS, 1986; PRAKASH *et al.*, 1999; RIZK, 1990; ROEDER, 1995, 1999; SCHMELLER; EL-SHAZLY; WINK, 1997; STEGELMEIER *et al.*, 1999; WINK *et al.*, 1998).

Esses efeitos têm sido atribuídos aos resultados de uma reação de intoxicação no fígado: enzimas hepáticas convertem os alcalóides pirrolizidínicos em pirróis com grupos exometileno, compostos estes bastante reativos, na qual são capazes de ligar-se a várias pontes semelhantes do DNA celular (WINK *et al.*, 1998).

Acredita-se que a toxicidade desses compostos esteja relacionada à insaturação presente no anel e à esterificação nos carbonos C-7 e/ou C-9 (EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; MATTOCKS, 1986; REINA *et al.*, 1997; WINK *et al.*, 1998).

A seguir destacaremos alguns alcalóides pirrolizidínicos atribuindo suas respectivas atividades biológicas com validade científica.

Segundo Reina e colaboradores (1997), os compostos lasiocarpina (**34**) e heliotrina (**26**) mostram forte ação hepatotóxica, pulmotóxica, hemolítica, antimitótica, teratogênica e carcinogênica. Estas atividades desses dois alcalóides reforçam a idéia da relação da insaturação presente nestes compostos e seus efeitos. Além disso, lasiocarpina (**34**) e europina (**10**) são descritos como agentes antimicrobial; e os alcalóides senkirkina e

lasiocarpina (**34**) revelaram atividade antipredatória contra *L. decemlineata*, uma espécie de escaravelho, devido à insaturação da cadeia lateral.

Em 1980, Birecka e colaboradores registraram uma valiosa contribuição ao estudo das atividades biológicas e ações farmacológicas de alguns alcalóides pirrolizidínicos. Os ésteres de heliotridina (lasiocarpina **34** e heliosuprina **24**) e de retronecina (**43**) (monocrotalina, senecifilina e indicina N-óxido) revelaram ação antitumoral. Platifilina e ésteres saturados platinecina com ácido senécico mostraram atividade antiespasmódica. Ésteres semissintéticos de heliotridina e platinecina têm efeito anestésico local. Heliosupina (**24**) e vários alcalóides quaternários semissintéticos exibiram ação hipotensiva.

Segundo Pandey e colaboradores (1982), o composto heliotrina (**26**) apresenta atividade no domínio do bloqueio de gânglios.

Os alcalóides pirrolizidínicos conhecidos como alexina, australina, 1-epiaustralina, 3-epialexina, 7-epialexina, 1,7,7a-triepiealexina, homoalexina, 8-epihomoaustralina, homoaustralina, 8-epihomoalexina e casuarina têm eficiente inibição do processo de enzima glicoprotéica. Por outro lado, estes compostos são potentes drogas no tratamento terapêutico de câncer e infecção viral (NIETO-ALVAREZ; CALDERÓN; MANCILLA, 2003).

Os alcalóides pirrolizidínicos apresentam um relevante papel ecológico. Alguns desses compostos, talvez devido ao seu gosto amargo, são responsáveis diretos na defesa das plantas contra insetos e vertebrados herbívoros (BROWN; TRIGO, 1995; DETZEL; WINK, 1993; EL-SHAZLY; ABDEL-GHANI; WINK, 2003; WINK; ROBERTS, 1998).

Algumas espécies de animais como: mariposas, borboletas, escaravelhos, gafanhotos sequestram os alcalóides pirrolizidínicos das suas plantas hospedeiras e os usam para a própria proteção contra seus predadores (BROWN; TRIGO, 1995; HARTMANN; WITTE, 1995; NICKISCH-ROSENEGK; WINK, 1993; WINK *et al.*, 1998).

Segundo Birecka e colaboradores (1980), algumas plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos do gênero *Heliotropium* e de outros gêneros, especialmente nas épocas mais inóspitas, atraem numerosas borboletas machos. Alguns alcalóides testados, heliotrina (**26**) e indicina (**29**), possuem um alto poder de atração. Além disso, há evidências que as borboletas usam os 1,2-dihidropirrolizidinas para produzirem dihidropirrolizinas, feromônios necessários ao acasalamento. A licopsamina (**37**), éster viridiflórico de retronecina, isolado de *H. steudneri* mostrou ser precursor de um feromônio presente na secreção da borboleta macho *Danaus*.

Contudo, atualmente, diversos alcalóides pirrolizidínicos são alvos para investigação científica, visando às suas utilizações como matérias-primas na síntese de fármacos ou na terapêutica, puros, em associação ou na forma de derivados.

CAPÍTULO 4

Determinação estrutural dos
constituintes químicos fixos isolados de
Heliotropium

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS FIXOS ISOLADOS DE *HELIOTROPIUM*

4.1 Isolados de *Heliotropium indicum* L.

4.1.1 Determinação estrutural de HI-1

Após tratamento cromatográfico em gel de sílica de HINA (Fluxograma 2, p. 211), foi isolada uma substância denominada HI-1 (40,0 mg), na forma de um sólido branco, amorfo, homogêneo em CCDA, com $R_f = 0,3$ (CHCl_3) e ponto de fusão entre 122,4-124,1 °C.

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 10) mostra uma absorção larga em 3.437 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O – H de grupamento hidroxila; absorção de grande intensidade em 2.940 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1.053 cm^{-1} característica de deformação angular da ligação C – O – H, de grupo funcional álcool.

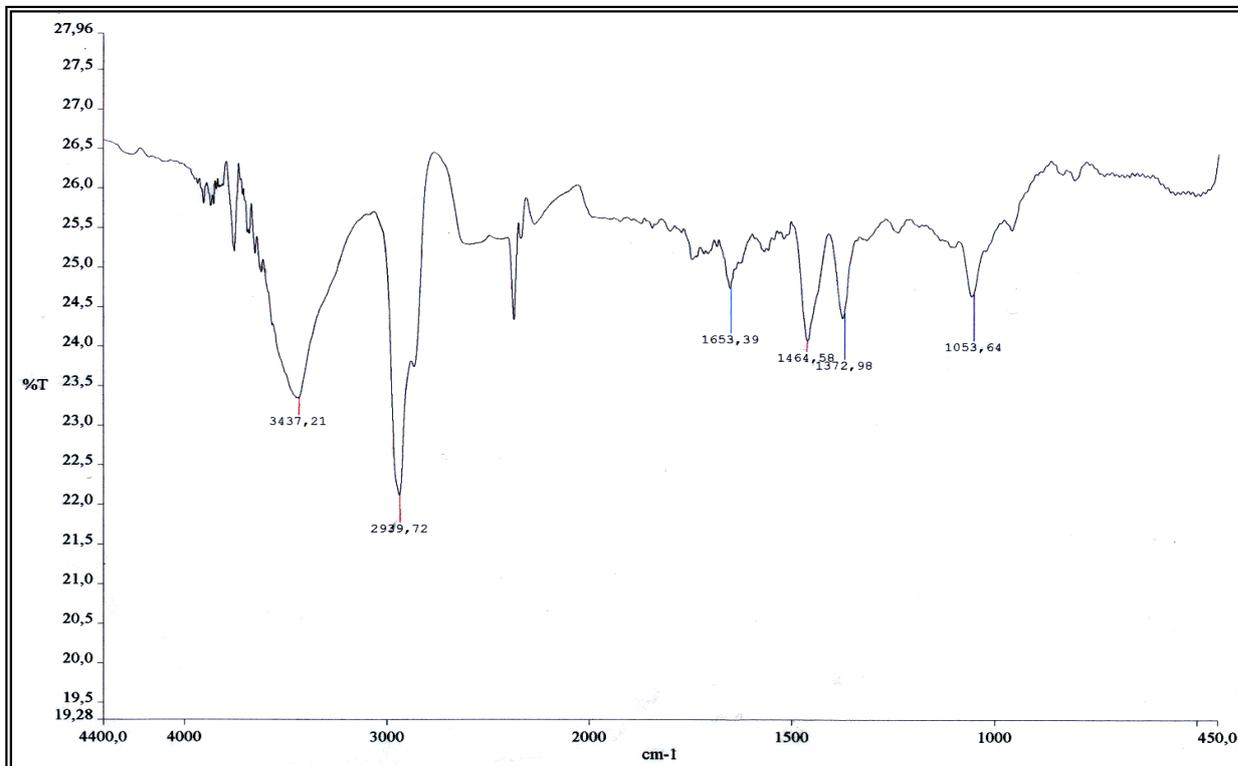


Figura 10: Espectro de IV (KBr) de HI-1

O espectro de RMN ^1H de HI-1 (Fig. 12, p. 69) revelou um dubleto em δ 5,36 (d, 5,11 Hz) na região de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos e ainda vários sinais na faixa de δ 2,29 a 0,69 ppm correspondentes a uma substância com esqueleto esteroidal.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (Fig. 13, p. 69) de HI-1 mostrou 27 linhas espectrais, sendo que as absorções em δ 140,9 e 121,9 indicam a presença de uma dupla ligação trissubstituída, característica do esteróide β -sitosterol. Análise comparativa com o espectro de RMN DEPT 135° (Fig. 14, p. 70) revelou a presença de três carbonos não hidrogenados, seis carbonos metílicos (CH_3), onze carbonos metilênicos (CH_2) e nove carbonos metínicos (CH), conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de HI-1 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH_2	CH_3
140,9	121,9	42,5	20,0
40,0	72,0	39,9	19,6
36,7	56,9	37,4	19,2
	56,2	34,2	19,0
	50,3	31,9	12,2
	46,0	31,8	12,1
	36,3	28,4	
	31,8	26,3	
	29,4	24,5	
		23,2	
		21,3	
C =	C – OH		
	C =		
C_3	$\text{C}_9\text{H}_9\text{OH}$	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}$	C_6H_{18}
		TOTAL	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$

A espectrometria de massas de HI-1 corroborou com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ prevista na Tabela 1, a partir do pico do íon molecular com razão $m/z = 414$ (Fig. 15, p. 70).

Análise desses dados juntamente com comparação com dados da literatura (Tab. 2, p. 68) permitiu identificar HI-1 como sendo β -sitosterol (Fig. 11).

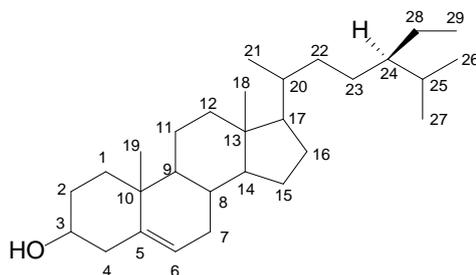


Figura 11: Estrutura de HI-1

Tabela 2: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de HI-1 comparados com dados de β -sitosterol (FARIA, 2003).

	HI-1	β -sitosterol (FARIA, 2003)
C	δc	δc
1	37,4	37,2
2	31,9	31,6
3	72,0	71,7
4	42,5	42,3
5	140,9	140,7
6	121,9	121,6
7	31,8	31,8
8	31,8	31,8
9	50,3	50,1
10	36,7	36,4
11	21,3	21,1
12	39,9	39,7
13	40,0	42,3
14	56,9	56,7
15	24,5	24,2
16	28,4	28,1
17	56,2	56,1
18	12,1	11,9
19	20,0	19,3
20	36,3	36,0
21	19,0	18,7
22	34,2	33,9
23	26,3	26,1
24	46,0	45,8
25	29,4	29,1
26	19,2	19,6
27	19,6	18,9
28	23,2	23,0
29	12,2	11,9

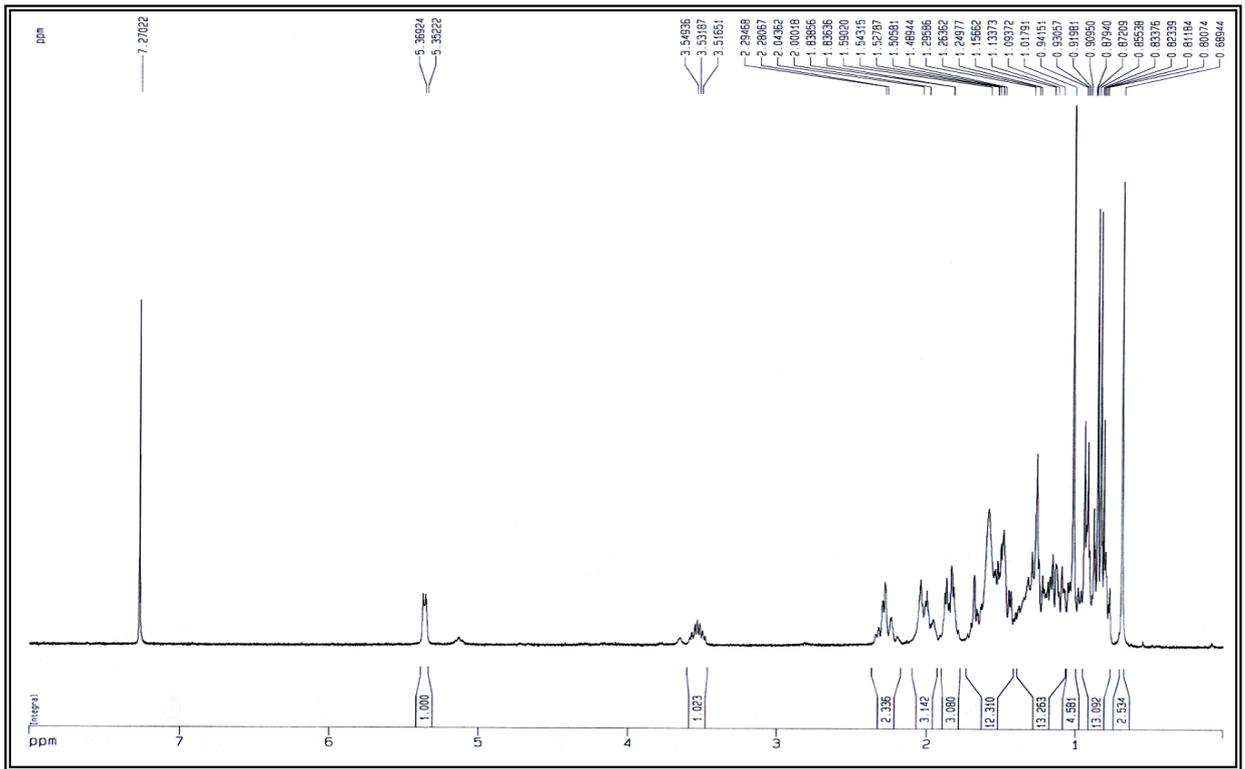


Figura 12: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de HI-1

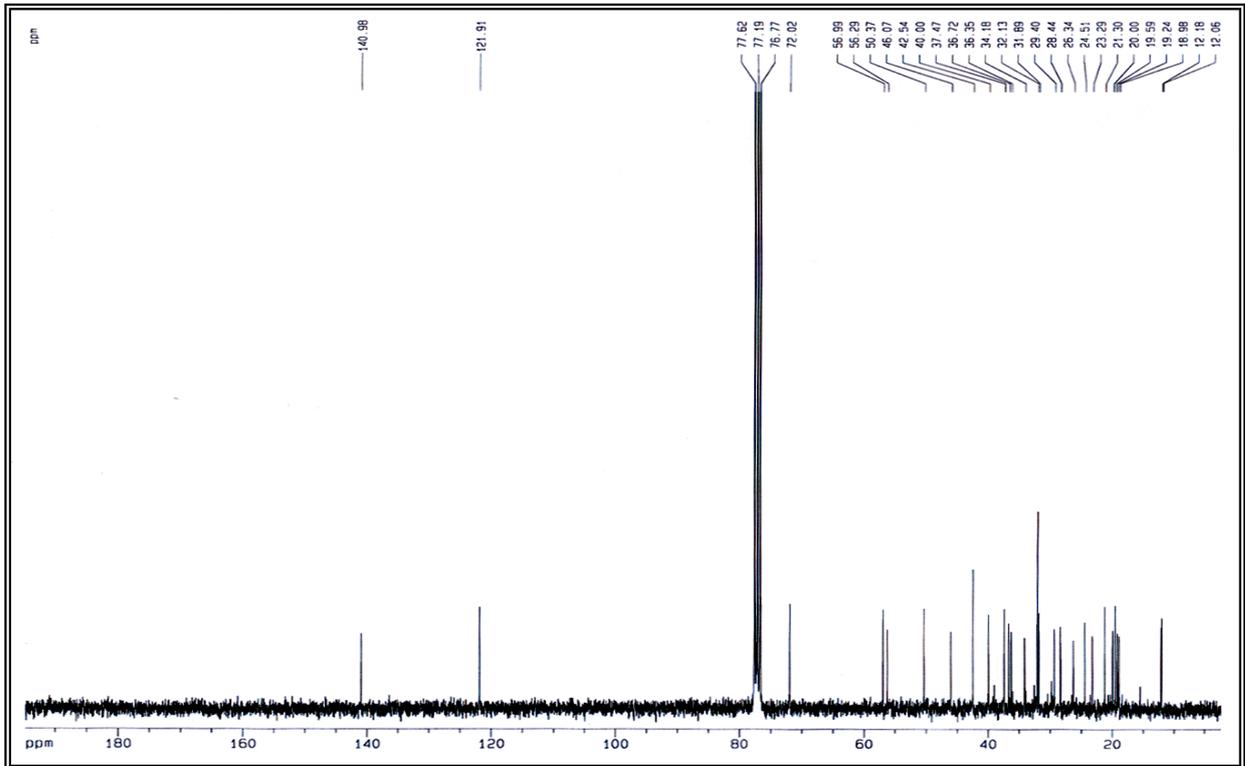


Figura 13: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de HI-1

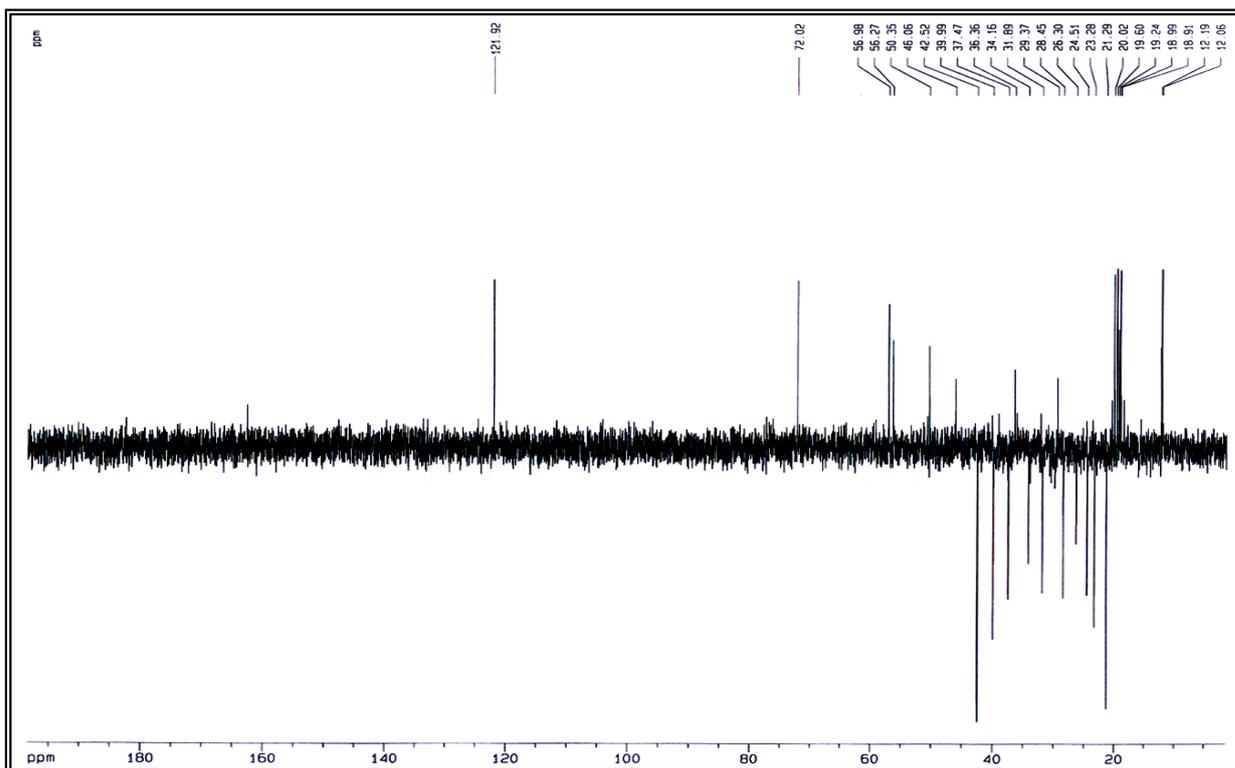


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de HI-1

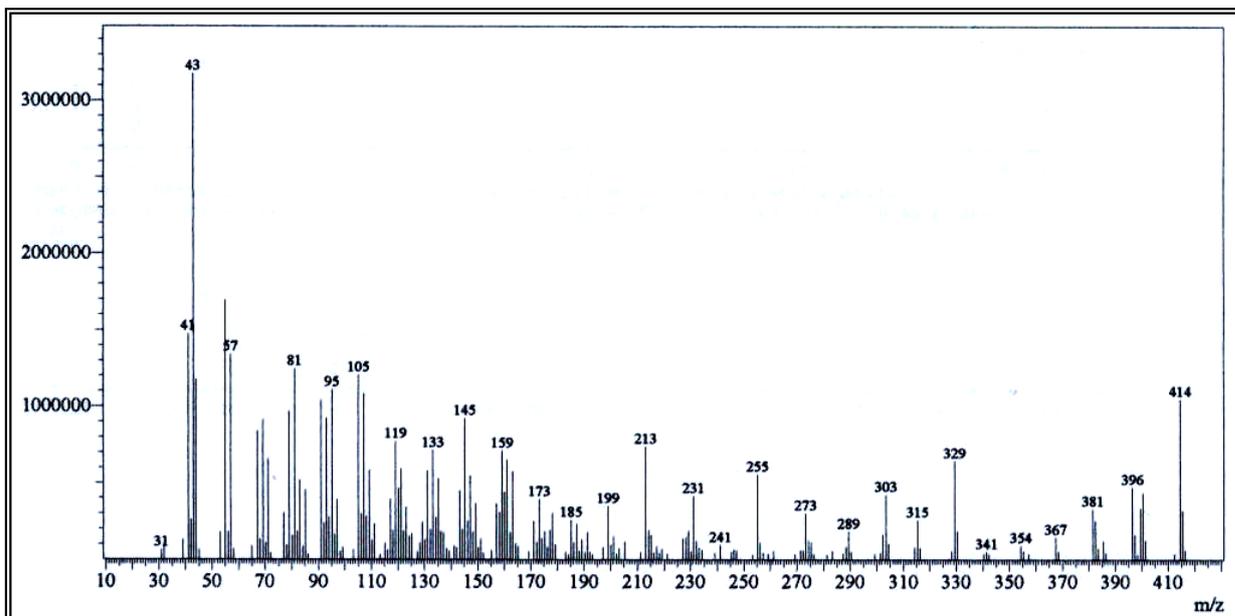


Figura 15: Espectro de massas de HI-1 (70 eV)

4.1.2 Determinação estrutural de HI-2

O fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica HIAEM-A (Fluxograma 4, p. 218) obtida do extrato etanólico das raízes de *Heliotropium indicum* L., forneceu um material viscoso que foi recromatografado em gel de sílica, originando um material resinoso, amarelo, homogêneo em CCDA, denominado de HI-2 (64 mg), com $[\alpha]_{D}^{20} = +0,12^0$ (*c*, 0,05, CHCl_3) [$+3,4^0$; *c*, 4,4; EtOH, ROEDER; BOURAUUEL, 1992].

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 16) mostra uma absorção larga em 3.396 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O – H típica de grupamento hidroxila; absorções em 2.974 e 2.875 cm^{-1} referentes à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1.730 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C = O de grupamento carbonílico de éster.

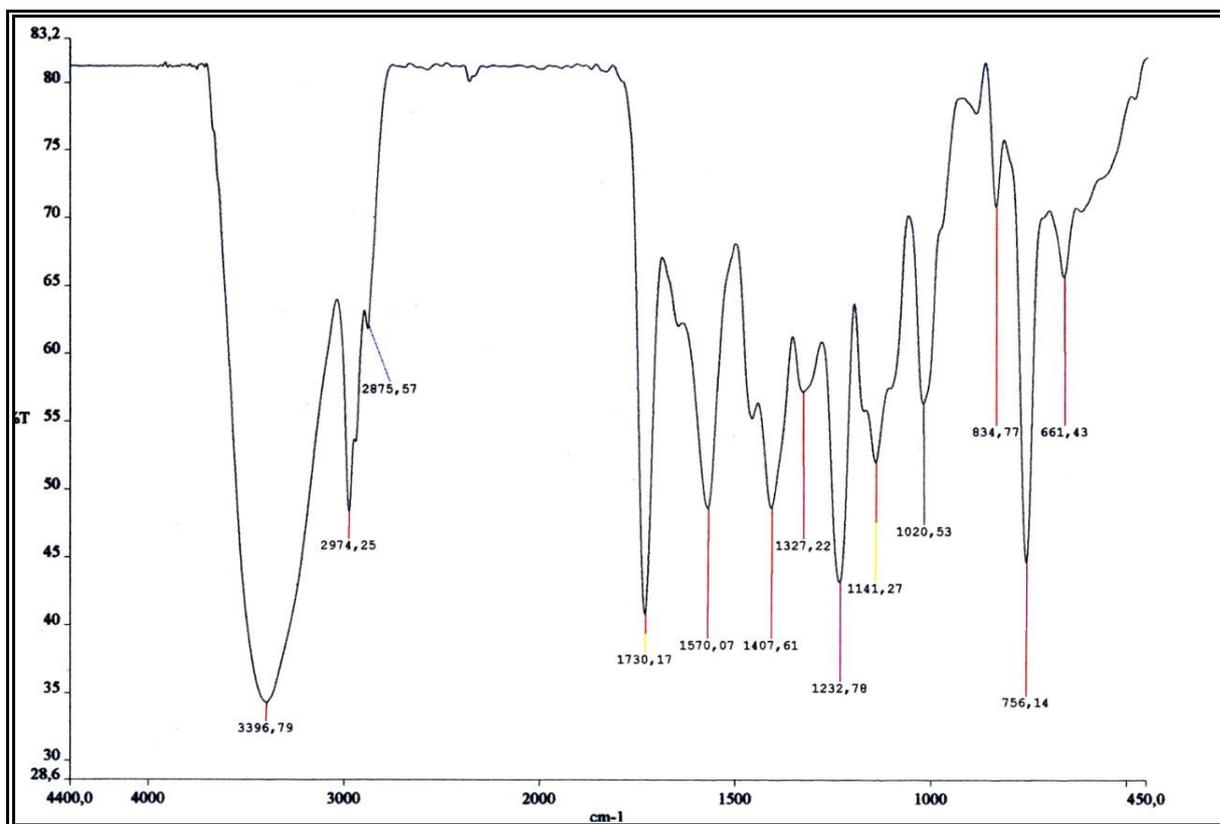


Figura 16: Espectro de IV (KBr) de HI-2

O espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 22, p. 77) apresentou 15 linhas espectrais. Pode-se observar uma absorção na região de carbono carbonílico, possivelmente de éster, em δ 175,6 ppm; duas absorções na região de carbonos olefínicos em δ 133,2 e 129,6 ppm; sete absorções referentes a carbonos sp^3 oxigenados e/ou nitrogenados em δ 83,3; 78,7; 71,3; 69,6;

62,8; 62,8; 54,1 ppm; sendo que a absorção em δ 83,3 indica que o carbono está bastante desprotegido, as demais absorções foram relacionadas a carbonos saturados não funcionalizados.

A análise comparativa com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 23, p. 78) revelou a presença de três carbonos metílicos (CH_3), quatro carbonos metilênicos (CH_2), cinco carbonos metínicos (CH) e três carbonos não hidrogenados (C), conforme a Tabela 3.

Dessa forma, pode-se prever que os dois sinais de carbonos olefínicos no espectro de RMN ^{13}C , em δ 133,2 e 129,6 ppm, são carbonos de dupla trissubstituída, sendo o carbono não hidrogenado o mais desprotegido. O terceiro carbono não hidrogenado ($\delta = 83,3$ ppm) refere-se a carbono desprotegido, possivelmente ligado a hidroxila, corroborando com a absorção observada no espectro de infravermelho em 3.411 cm^{-1} (Fig. 16, p. 71), mesmo assim, a presença apenas de hidroxila não justifica tanta desproteção, portanto é possível que um dos substituintes R seja a carbonila. O carbono metínico ($\delta = 32,9$ ppm) não funcionalizado pode estar ligado a dois grupos metílicos. (Fig. 17).

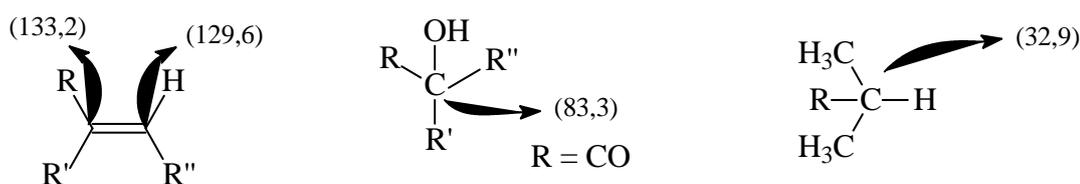


Figura 17: Partes da estrutura de HI-2

Tabela 3: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de HI-2 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃
175,6	129,6	62,8	17,7
133,2	78,7	62,8	17,5
83,3	71,3	54,1	17,1
	69,6	36,5	
	32,9		
C ₃	C ₃ H ₅	C ₄ H ₈	C ₃ H ₉
		TOTAL	C ₁₅ H ₂₂

De acordo com os dados da Tabela 3, pode-se sugerir para este composto a fórmula molecular parcial $\text{C}_{15}\text{H}_{22}$.

Alcalóides pirrolizidínicos são constituídos por duas porções: o ácido néxico e a base necina (Fig. 8, p. 60). Os grupamentos de hidrogênios dos anéis da base são bastante distintos e permitem um reconhecimento imediato de aspectos importantes da estrutura, como grau de oxigenação na base necina e presença de insaturação. As oxigenações, geralmente, são esperadas nos carbonos C-7 e C-9. O hidrogênio do carbono C-8, por estar na junção dos anéis e em carbono diretamente ligado ao nitrogênio, destaca-se pelo deslocamento químico no espectro de RMN ^1H . (CULVENOR; HEFFERNAN; WOODS, 1965).

Para as bases saturadas, obtêm-se deslocamentos químicos para H-2 em $\sim 2,0 - 2,5$ ppm e para as bases insaturadas $\sim 5,8$ ppm (CULVENOR; HEFFERNAN; WOODS, 1965; RODER; WIEDENFELD; PFITZER, 1988). Ao analisar o espectro de RMN ^1H (Fig. 21, p. 77), observou-se um sinal em $\delta 5,87$ (s) ppm, correspondente a um hidrogênio ligado a carbono olefínico, sugerindo ser o H-2 da base necina insaturada. Sendo um alcalóide pirrolizidínico insaturado, os carbonos olefínicos (Fig. 17, p. 72) tratam-se dos carbonos insaturados C-1 e C-2 da base necina.

Além disso, nesse mesmo espectro, há três sinais dubletos referentes a grupamentos metilas em $\delta 1,16$ (d, 6.4 Hz) ppm; 0,93 (d, 7.0 Hz) ppm; 0,91 (d, 7.0 Hz) ppm. Assim, estas constantes de acoplamentos iguais, observado nos sinais de hidrogênios metílicos, corroboram com a possibilidade de que duas destas metilas estejam ligadas a um carbono metínico sp^3 , conforme Figura 17 (p. 72). Percebe-se vários multipletos na faixa de $\delta 5,09$ a 3,36 ppm, referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 oxigenados e/ou nitrogenados, que corroboram com a possibilidade da existência da base necina conforme Figura 18. Culvenor, Heffernan e Woods (1965), após estudo sobre as conformações da base necina, definiram os hidrogênios ligados aos dois anéis como sendo α e β , de acordo com a Figura 18 a seguir.

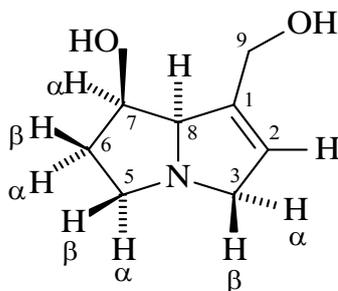


Figura 18: Atribuição de hidrogênios H α e H β no esqueleto pirrolizidínico.

Os três carbonos metilênicos desprotegidos ($\delta = 62,9; 62,8; 54,1$ ppm) referem-se aos carbonos C-3, C-5 e C-9. O sinal em $\delta 54,1$ ppm deve ser atribuído ao carbono menos desprotegido C-5, pois está ligado apenas ao átomo de nitrogênio, enquanto que os outros dois devem ser atribuídos aos carbonos C-3 e C-9, devido à ligação com carbono olefínico e um átomo retirador de elétrons (nitrogênio e oxigênio, respectivamente). A distinção entre estes carbonos pode ser feita através da multiplicidade dos sinais no espectro de RMN ^1H , pois os hidrogênios do carbono C-9 apresentam-se na forma de dubleto, devido ao acoplamento geminal (d, 12.7 Hz, Tab. 4, p. 76). O quarto carbono metilênico não funcionalizado ($\delta = 36,5$ ppm) trata-se do carbono C-6.

Observa-se também, ao analisar o espectro de RMN ^1H (Fig. 21, p. 77), que os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-5 apresentam diferenças no deslocamento químico dentro de cada par, caracterizando um sistema AB. Este fato provavelmente é atribuído à influência do par de elétrons desemparelhados do átomo de nitrogênio, fato que não é percebido para os hidrogênios H-6. (Tab. 4, p. 76).

O deslocamento químico dos dois hidrogênios 2H-6 pode ser utilizado como importante informação preliminar para a estereoquímica da base necina, pois o multipletto referente a este núcleo ocorre usualmente abaixo de 2,3 ppm para alcalóides pirrolizidínicos do tipo retronecina e acima deste valor para os compostos do tipo heliotridina (CULVENOR; HEFFERNAN; WOODS, 1965; CULVENOR; WOODS, 1965; RODER; WIEDENFELD; PFITZER, 1988). Ao analisar o espectro de RMN ^1H , constata-se o sinal de H-6 em $\delta 1,98$ (m) ppm, confirmando a estereoquímica semelhante à retronecina nos carbonos C-7 e C-8 na base necina do composto estudado (Fig. 19).

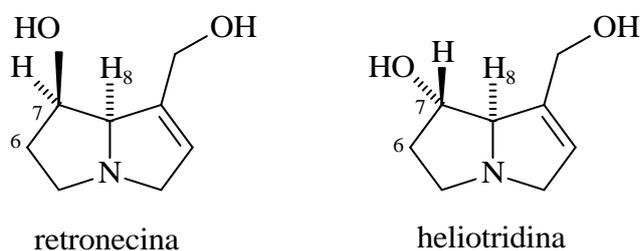


Figura 19: Estruturas dos epímeros retronecina e heliotridina

Os dois sinais singletos largos ($\delta = 4,33$ e $4,29$ ppm), no espectro de RMN ^1H (Fig. 21, p. 77), podem ser atribuídos aos H-7 e H-8, respectivamente, pois o hidrogênio ligado ao carbono oxigenado é mais desprotegido, devido ao efeito indutivo retirador de elétrons ser mais acentuado para este átomo, comparando-se ao átomo de nitrogênio.

A partir da análise do espectro de massas de HI-2, verificou-se a fórmula molecular do composto em estudo como sendo $C_{15}H_{25}NO_5$, representado pelo pico do íon molecular com razão $m/z = 299$ (Fig. 24, p. 78). Uma proposta de fragmentação do espectro de massas é ilustrada na Figura 25 (p. 79).

As atribuições de forma inequívoca de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos podem ser verificadas através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (HMQC). Esses dados de correlação do composto HI-2 são apresentados na Tabela 4 (p. 76), incluindo dados bidimensionais heteronuclear a mais de uma ligação (HMBC).

Essas informações permitiram elucidar a estrutura do composto HI-2 como sendo alcalóide pirrolizidínico denominado licopsamina (Fig. 20), de acordo com os dados descritos na literatura (ROEDER; BOURAUUEL, 1992), cujos dados de correlação de RMN 1H estão demonstrados na Tabela 4 (p. 76).

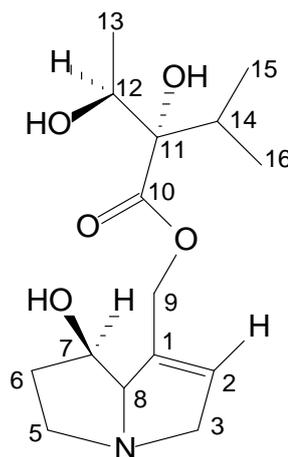


Figura 20: Estrutura de HI-2
(Licopsamina)

Tabela 4: Comparação de dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H de HI-2 com dados de licopsamina (ROEDER; BOURAUUEL, 1992) e seu epímero echinatina (WIEDENFELD; RODER, 1991), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC).*

HI-2					Licopsamina ROEDER; BOURAUUEL, 1992 (CDCl_3)		Echinatina WIEDENFELD; RODER, 1991 ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$)
	HMQC		HMBC		HMQC		δ_{C}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	
C							
1	133,21	-	H-2; H-8	2H-3	132,7	-	135,6
10	175,68	-		2H-9; H-12; H-14	174,3	-	173,7
11	83,33	-	H-14	3H-13; 3H- 15; 3H-16	83,7	-	83,48
CH							
2	129,68	5,87 (sl)	2H-3	H-8	129,9	5,88 (1H) sext	124,8
7	69,62	4,33 (s)	2H-6	2H-5	71,0	4,27 (1H) td	72,9
8	78,77	4,29 (sl)		H-2; 2H-6	78,2	4,15 (1H) ddt	80,6
12	71,38	4,04 (q, 6.4)	3H-13		71,0	3,96 (1H) q	70,5
14	32,91	2,78 (m)	3H-15;3H-16		32,3	2,14 (1H) sept	32,7
CH₂							
3	62,88	3,96 3,45	H-2	H-5b	62,8	3,90 (1H) dquin 3,38 (1H) ddq	61,9
5	54,11			2H-3	53,8	3,24 (1H) ddd 2,70 (1H) ddd	54,4
6	36,51	1,98 (m)	H-5b		36,1	1,95 (1H) ddt 1,90 (1H) dddd	33,3
9	62,84	5,09 (d, 12.7) 4,58 (d, 12.7)		H-2	62,5	4,83 (1H) dqd 4,73 (1H) dqd	61,5
CH₃							
13	17,55	1,18 (d, 5.0)			17,2	1,25 (3H) d	18,0
15	17,12	0,93 (d, 6.9)	H-14		15,9	0,91 (3H) d	18,0
16	17,73	0,91 (d, 7.0)	H-14		17,7	0,86 (3H) d	16,3

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz

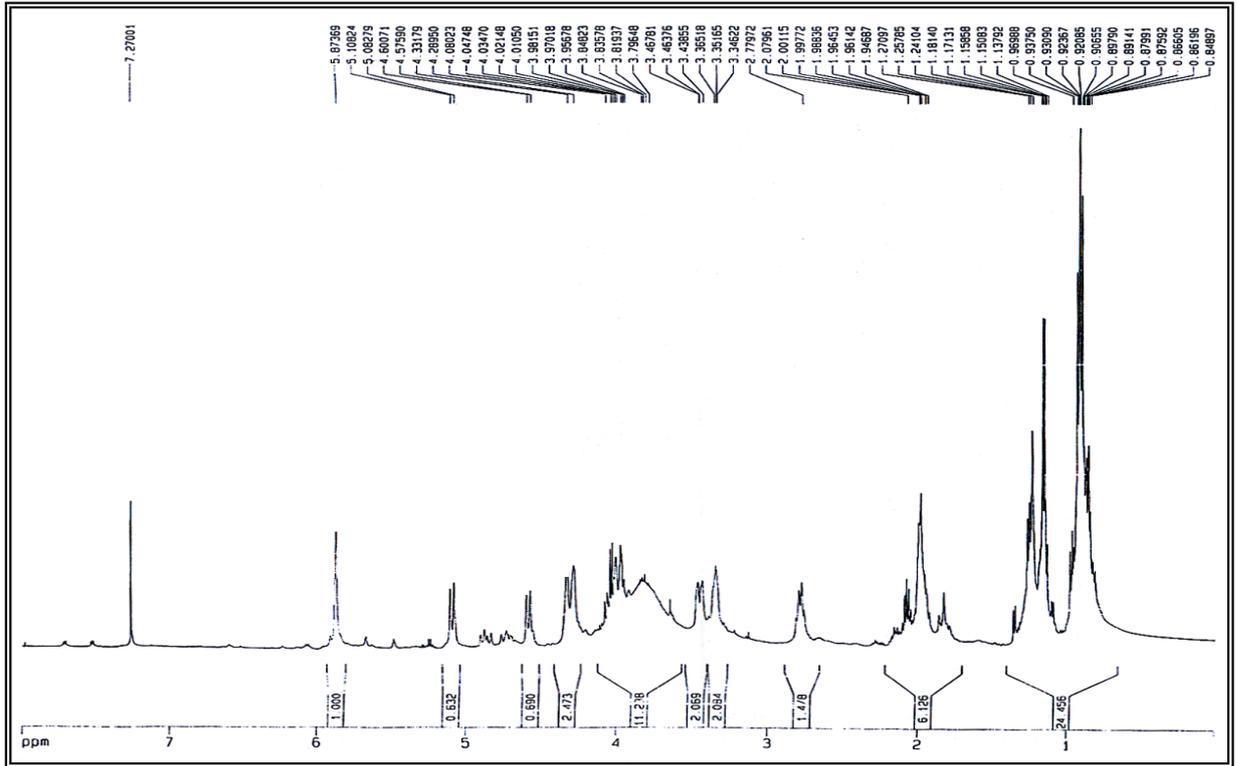


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de HI-2

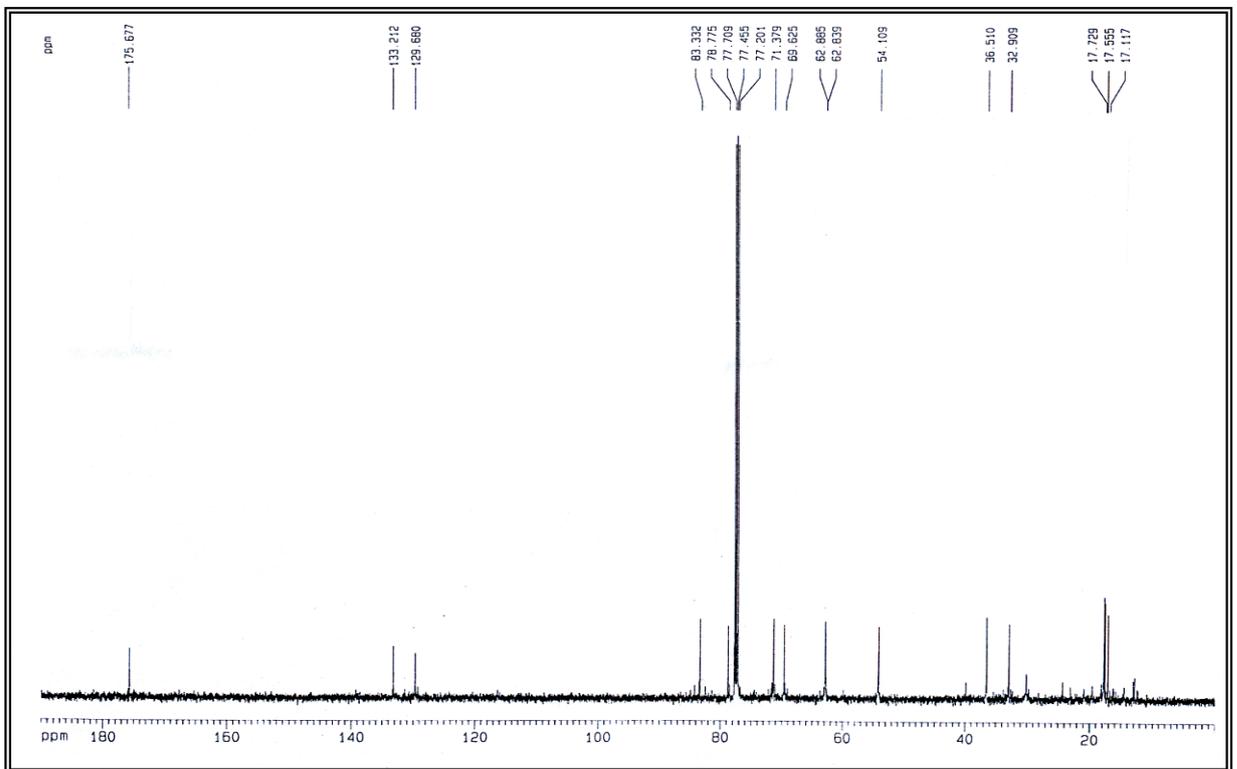


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de HI-2

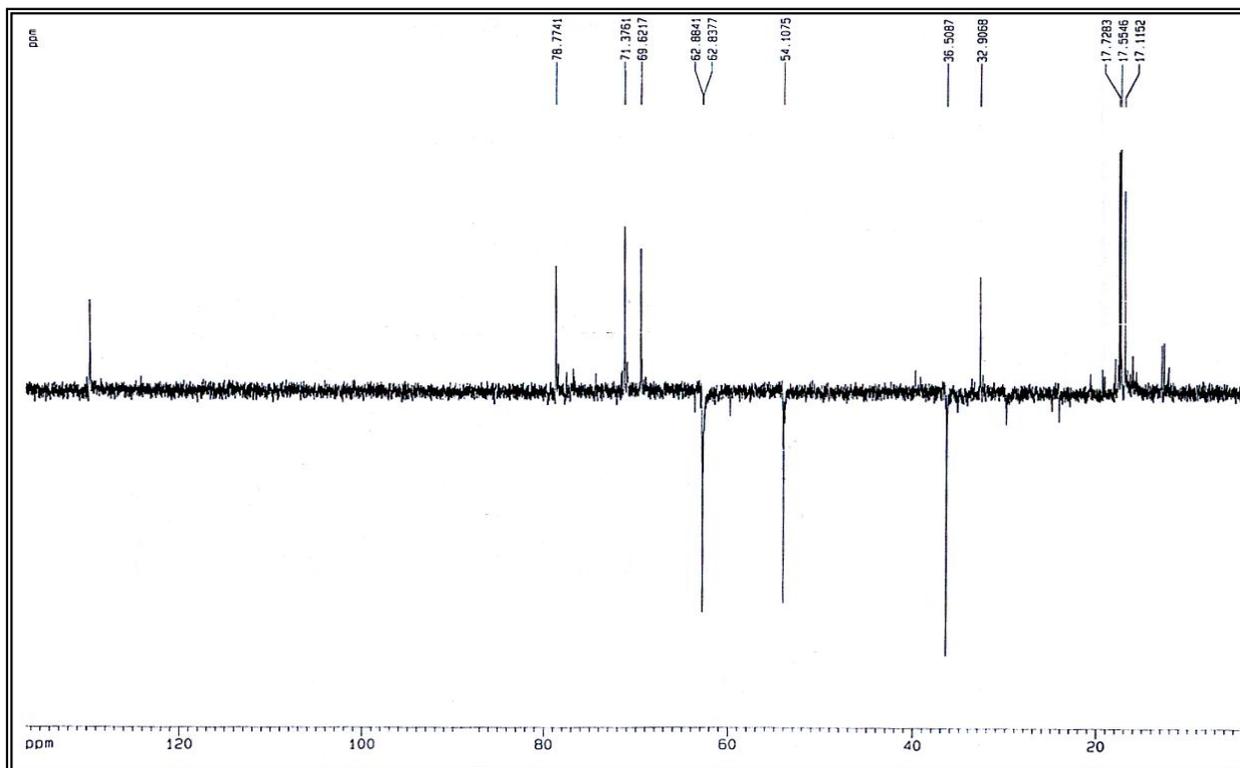


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^{\circ}$ (125 MHz, CDCl_3) de HI-2

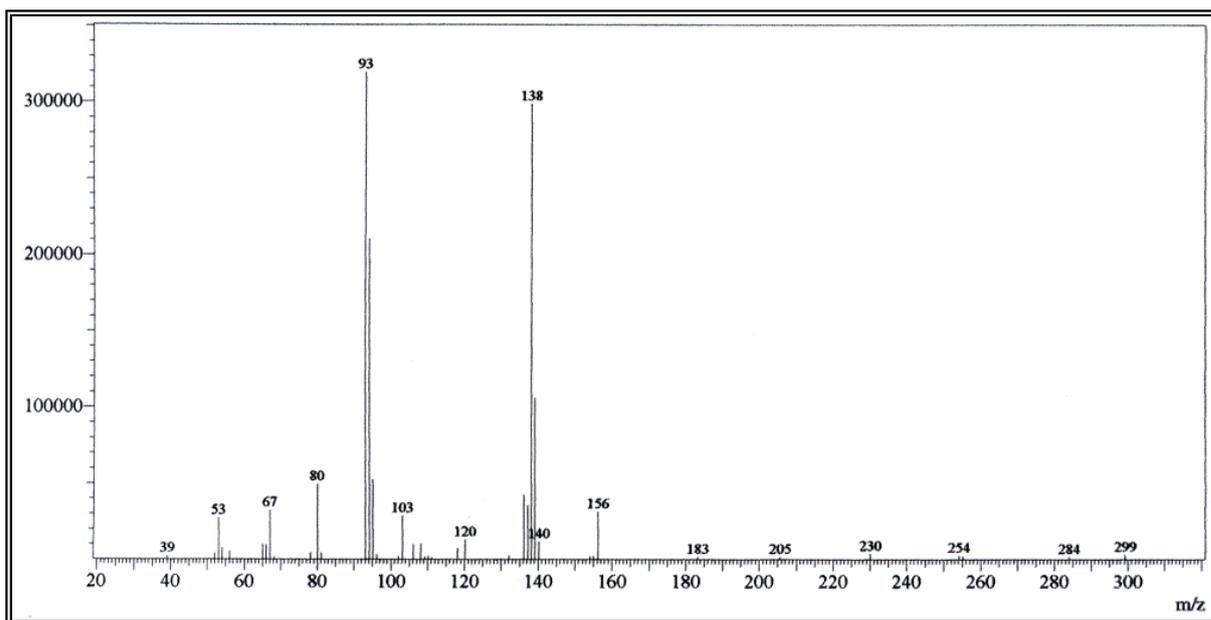


Figura 24: Espectro de massas de HI-2 (70 eV)

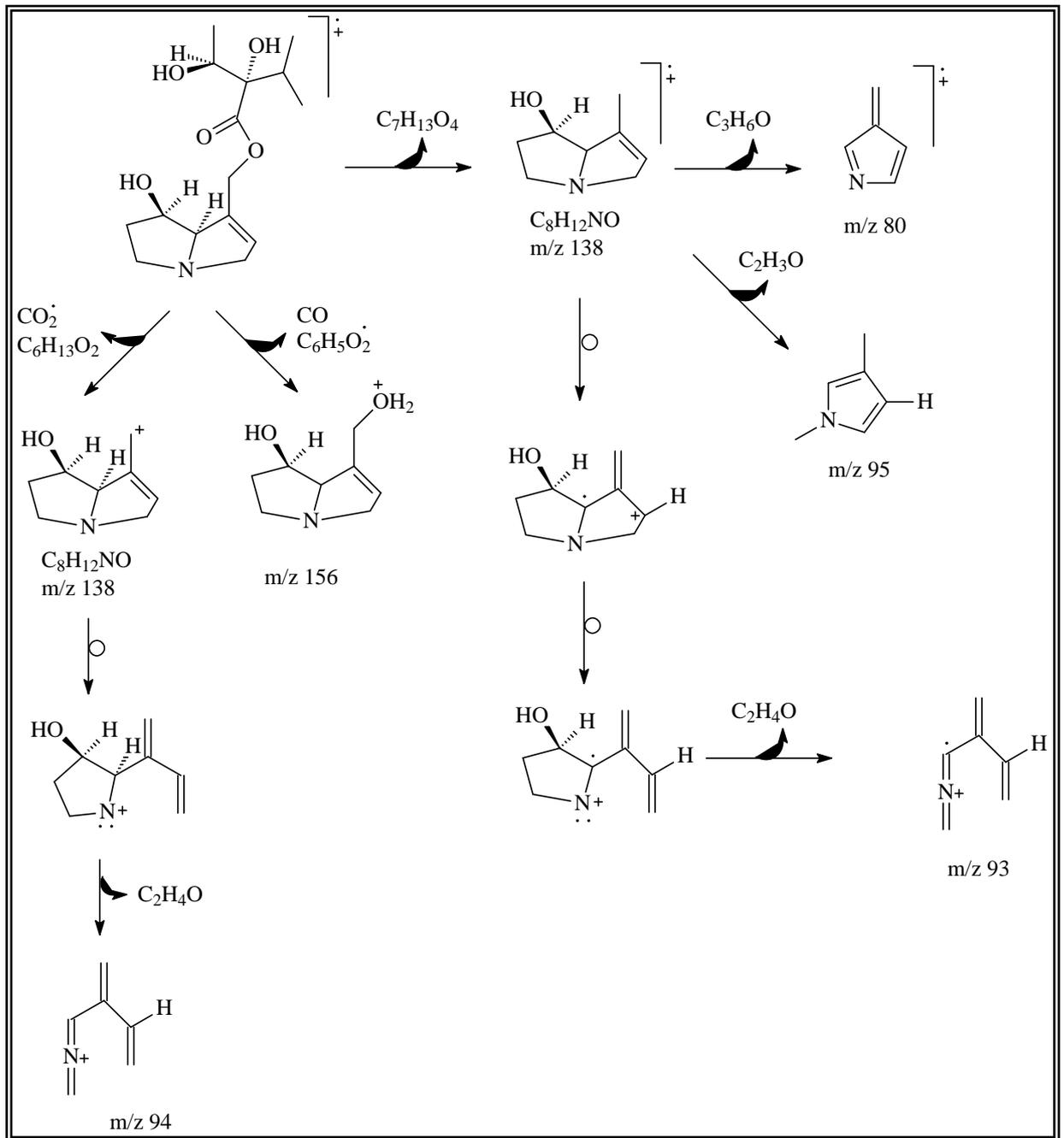


Figura 25: Proposta de Fragmentação de HI-2

4.1.3 Determinação estrutural de HI-3

Sucessivas cromatografias da fração HIAEM-M (Fluxograma 4, p. 218) em gel de sílica obtida a partir do extrato etanólico, permitiram o isolamento de um líquido viscoso, amarelo, homogêneo em CCDA, denominado de HI-3 (48,5 mg), com $[\alpha]_D^{20} = -0,64^0$ ($c, 0,05, \text{CH}_3\text{OH}$).

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 26) mostra uma absorção larga em 3.435 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O – H de grupamento hidroxila; absorção em 2.977 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1.728 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C = O de grupamento carbonílico de éster.

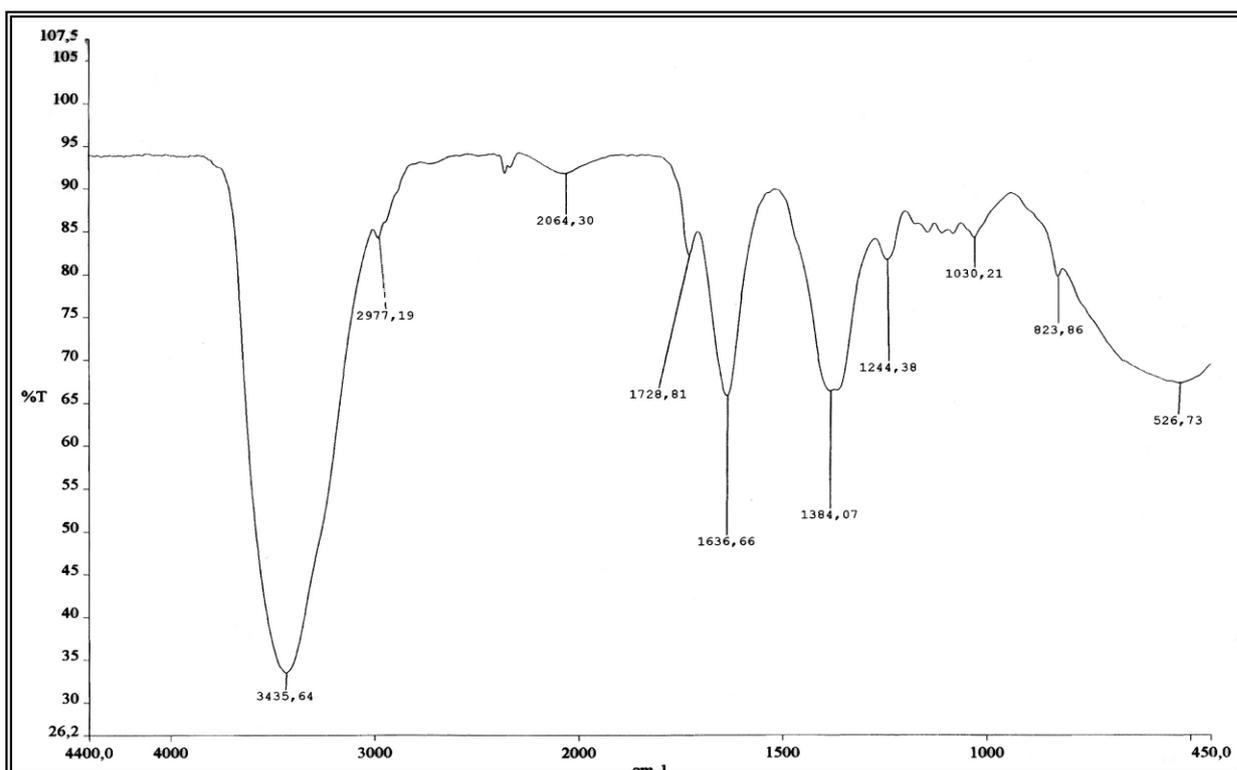


Figura 26: Espectro de IV (KBr) de HI-3

O espectro de RMN ^1H de HI-3 (Fig. 28, p. 85) revelou um sinal em $\delta 5,94$ (1H, sl) na região de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos; três sinais dubletos referentes a grupamentos metilas em $\delta 1,20$ (d, 6.4 Hz); $0,98$ (d, 7.0 Hz) e $0,95$ (d, 6.8 Hz) ppm e ainda vários multipletos na faixa de $\delta 4,98$ a $3,34$ ppm, correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados e/ou nitrogenados.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 29, p. 85) de HI-3 mostrou 15 linhas espectrais, as quais foram relacionadas a uma absorção correspondente a carbonila em δ 175,6 ppm; a duas absorções em δ 134,2 e 125,2 ppm, referentes a carbonos olefínicos; e a sete absorções correspondentes a carbonos oxigenados e/ou nitrogenados em δ 84,5; 80,5; 70,5; 70,5; 62,4; 61,7 e 55,5 ppm; sendo que a absorção em δ 84,5 ppm indica que o carbono está bastante desprotegido, sugerindo na vizinhança uma carbonila e um oxigênio possivelmente de hidroxila. As demais absorções foram relacionadas a carbonos saturados não funcionalizados. Análise comparativa com o espectro de RMN APT (Fig. 30, p. 86) revelou a presença de três carbonos metílicos (CH_3), quatro carbonos metilênicos (CH_2), cinco carbonos metínicos (CH) e três carbonos não hidrogenados (C), conforme Tabela 5.

Tabela 5: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de HI-3 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH_2	CH_3
175,6	129,6	62,8	17,7
133,2	78,7	62,8	17,5
83,3	71,3	54,1	17,1
	69,6	36,5	
	32,9		
C_3	C_5H_5	C_4H_8	C_3H_9
TOTAL			$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$

A partir desses dados, observou-se que os espectros de RMN ^1H e ^{13}C -BB de HI-2 e HI-3 mostraram-se bastante semelhantes, conforme Tabela 6 (p. 84). Entretanto, observa-se uma proteção do carbono metínico C-2 (δ 125,3 ppm); ou seja, havia uma diferença de 4,37 ppm para o mesmo carbono entre HI-2 e HI-3. Essa proteção poderá ser explicada pelo efeito de compressão da cadeia lateral.

A partir da espectrometria de massas de HI-3, pode-se verificar a sua fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ representada pelo pico do íon molecular com razão $m/z = 281$ (Fig. 33, p. 88). Portanto, diferindo-se em 18 unidades de massa atômica em relação a HI-2, equivalente à perda de uma molécula de água. Os fragmentos de HI-3 estão dispostos na Figura 34 (p. 88). Esta diminuição em 18 unidades é bastante importante para determinação do composto, pois isto ocorre nas reações de eliminação e a sua principal consequência é a

formação de dupla ligação entre os carbonos. Entretanto, a existência de uma nova ligação dupla não é detectada, no espectro de RMN ^{13}C (Fig. 29, p. 85). Portanto, uma condição para que ocorra esta redução da massa molecular é através da interação entre uma das hidroxilas do carbono C-11 ou C-12 e o hidrogênio da hidroxila do carbono C-7. Para comprovação da estrutura foram realizados experimentos 2D de HMBC e HMQC, COSY e NOESY.

A opção em propor alcalóide pirrolizidínico com cadeia cíclica ligada entre os carbonos C-7 e C-1 foi estabelecida principalmente após análise dos espectros de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação (HMBC), que revelou a correlação entre hidrogênios e carbonos, conforme Tabela 6 (p. 84). O acoplamento entre o C-12 e o H-7 ($^3J_{\text{CH}}$) evidencia a ciclização, ou seja, houve possivelmente a liberação da hidroxila do carbono C-12 com o ataque nucleofílico da hidroxila do carbono C-7. Portanto, este tipo de composto apresenta ciclo de 9 membros.

Segundo Culvenor e colaboradores (1965), para tamanhos diferentes de anéis macrocíclicos tem-se diferentes valores de $\Delta\delta$ para os hidrogênios H-9 α e H-9 β . Para estruturas macrocíclicas de doze membros, os hidrogênios do C-9 apresentam valores de $\Delta\delta$ de 1,0-1,5 ppm. Para compostos com anéis de onze membros os valores de $\Delta\delta$ dos hidrogênios em C-9 são próximos de 0,9 ppm. Para diferentes tamanhos de macrocíclicos, tem-se diferentes valores de $\Delta\delta$, com isto, tem-se uma forma de determinar o número de elementos do anel macrocíclico pela diferença nos deslocamentos químicos dos hidrogênios de C-9. Entretanto, a literatura não informa valores para 9 membros, sendo que o valor observado de $\Delta\delta = 0,18$ ppm para o composto HI-3 corrobora com esta hipótese.

Para comprovação da estrutura foram realizados experimentos 2D de HMBC e HMQC, COSY e NOESY.

As atribuições de forma inequívoca de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos podem ser verificadas através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (HMQC). Esses dados de correlação do composto HI-3 são apresentados na Tabela 6 (p. 84), incluindo dados bidimensionais heteronuclear a mais de uma ligação (HMBC) e comparação com o composto HI-2.

De acordo com a análise do espectro de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY, Fig. 31, p. 86), destacou-se os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio de H-9b e H9a; H-7 e H-8; H-3a com H-3b; H-2 e H-8; H-3b com H-2; H-5a com H-5b e 2H-6; H-5b com H-5a e 2H-6; 2H-6 e H-8; 3H-13 e H-12; (3H-15, 3H-16) com H-14.

A determinação da configuração relativa foi realizada através da interpretação do espectro NOESY (Fig. 32, p. 87), em que se destacam os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio (3H-15, 3H-16) com os três hidrogênios da metila (3H-13); os hidrogênios 3H-13 com o hidrogênio H-7 e o hidrogênio H-7 com o hidrogênio H-8.

A partir da análise do espectro de massas de HI-3, verificou-se a fórmula molecular do composto em estudo como sendo $C_{15}H_{25}NO_5$, representado pelo pico do íon molecular com razão $m/z = 299$ (Fig. 33, p. 88). Uma proposta para fragmentação do espectro de massas é apresentada na Figura 34 (p. 88).

Essas informações permitiram elucidar a estrutura de HI-3 como alcalóide pirrolizidínico, de caráter inédito na literatura, denominado de helindicina (Fig. 27).

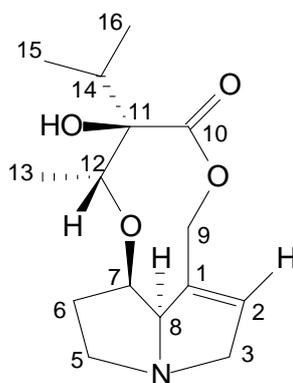


Figura 27: Estrutura de HI-3
(Helindicina)

Tabela 6: Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C entre HI-3 e HI-2, com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)*

	HI-3				HI-2	
	HMQC		HMBC		HMQC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
1	134,22	-	H-2; H-8	2H-3	133,21	-
10	175,64	-		2H-9; H-12; H-14	175,68	-
11	84,59	-	H-14	3H-13; 3H-15; 3H-16	83,33	-
CH						
2	125,31	5,94 (sl)	2H-3	H-8	129,68	5,87 (sl)
7	70,53	4,63 (sl)	2H-6	2H-5	69,62	4,33 (s)
8	80,51	4,90		H-2; 2H-6	78,77	4,29 (sl)
12	70,52	4,05 (q, 6.2)	3H-13	H-7	71,38	4,04 (q, 6.4)
14	34,16	2,03 (sept, 7.0)	3H-15;3H-16		32,91	2,78 (m)
CH₂						
3	62,47	4,40 (d, 15.0) 3,92 (dl, 15.0)	H-2	H-5b	62,88	3,96 3,45
5	55,52	3,87 (m) 3,33 (m)		2H-3	54,11	
6	36,76	2,15 (m, 2H)	H-5b		36,51	1,98 (m)
9	61,72	4,98 (d, 13.56) 4,80		H-2	62,84	5,09 (d, 12.7) 4,58 (d, 12.7)
CH₃						
13	17,28	1,17 (d, 6.6)			17,55	1,18 (d, 5.0)
15	17,19	0,95 (d, 7.0)	H-14		17,12	0,93 (d, 6.9)
16	17,67	0,93 (d, 7.0)	H-14		17,73	0,91 (d, 7.0)

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

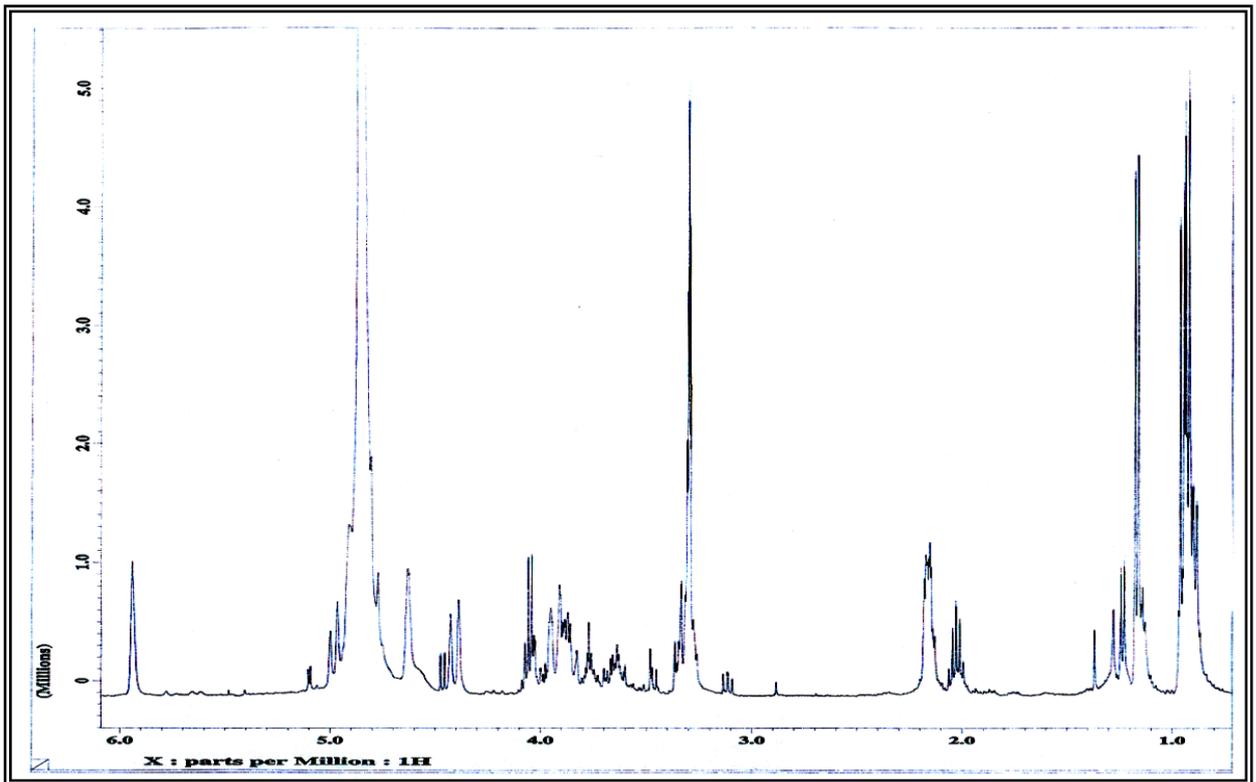


Figura 28: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de HI-3

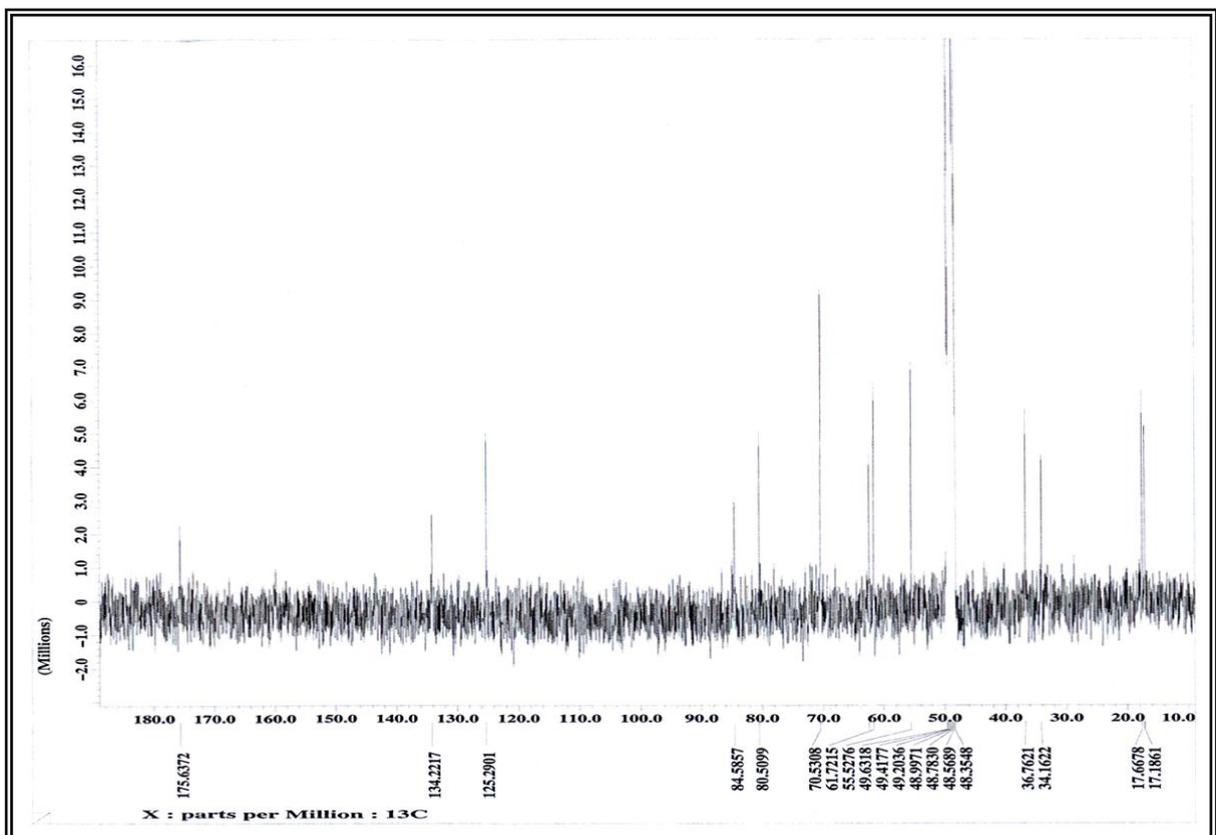


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de HI-3

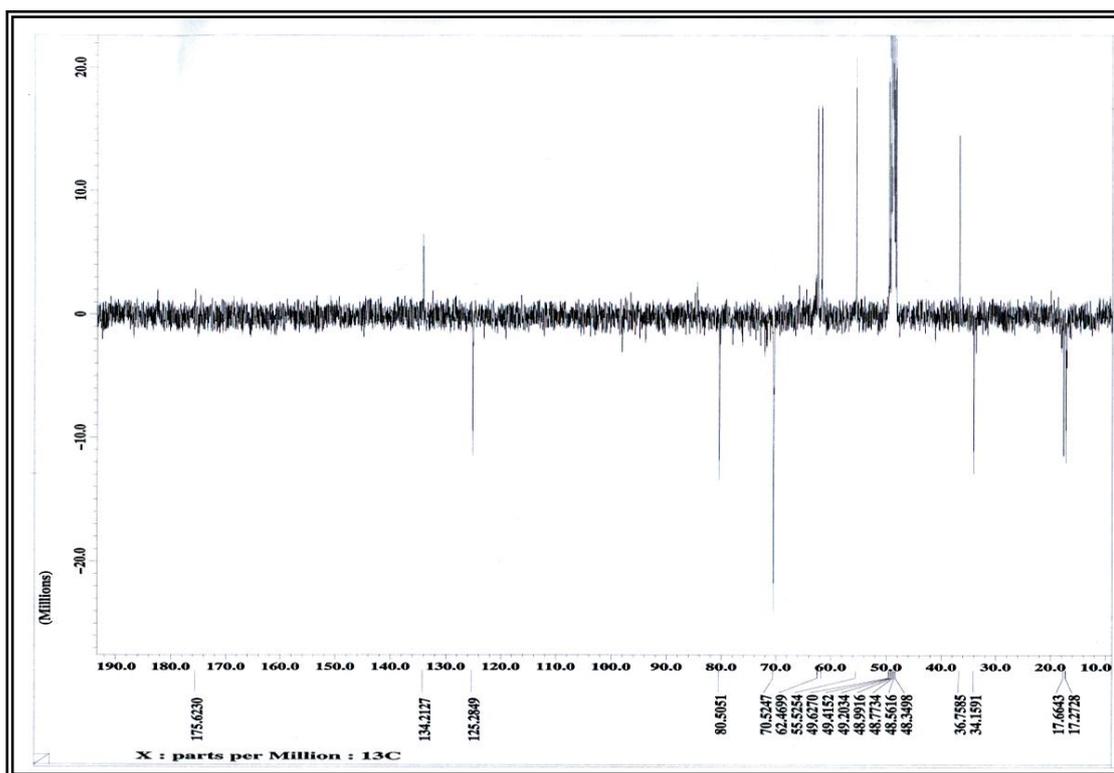


Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CD_3OD) de HI-3

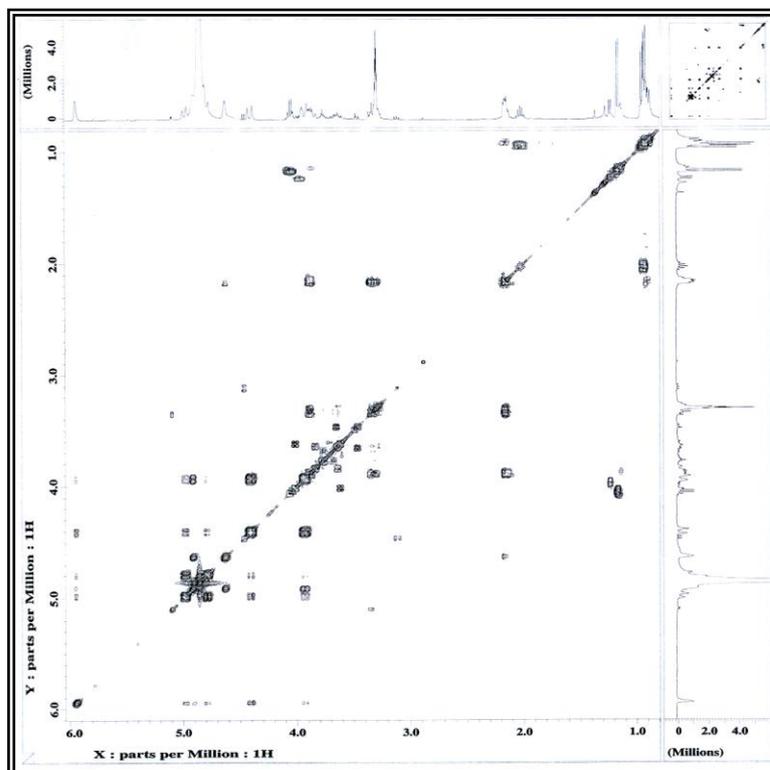


Figura 31: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (400 MHz, CD_3OD) de HI-3

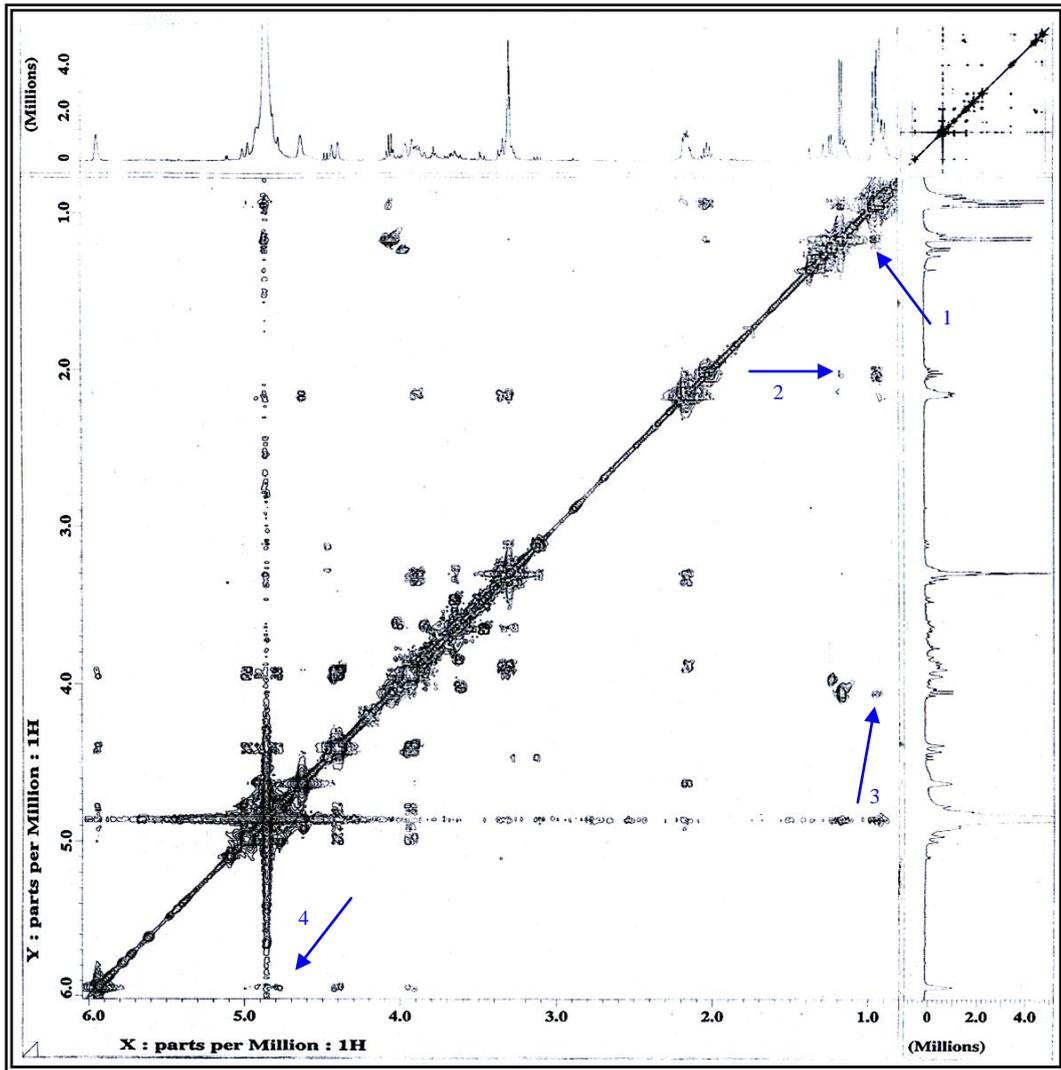
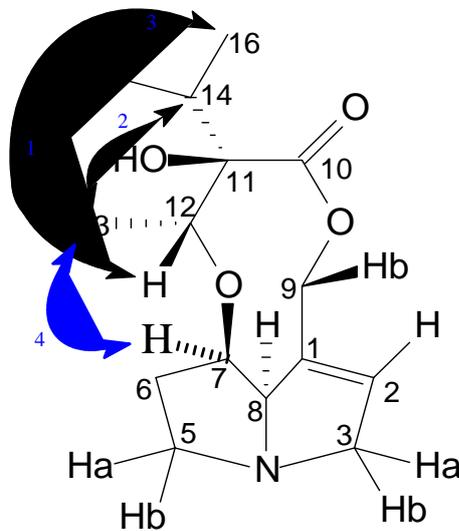


Figura 32: Espectro de RMN bidimensional NOESY (400 MHz, CD₃OD) de HI-3



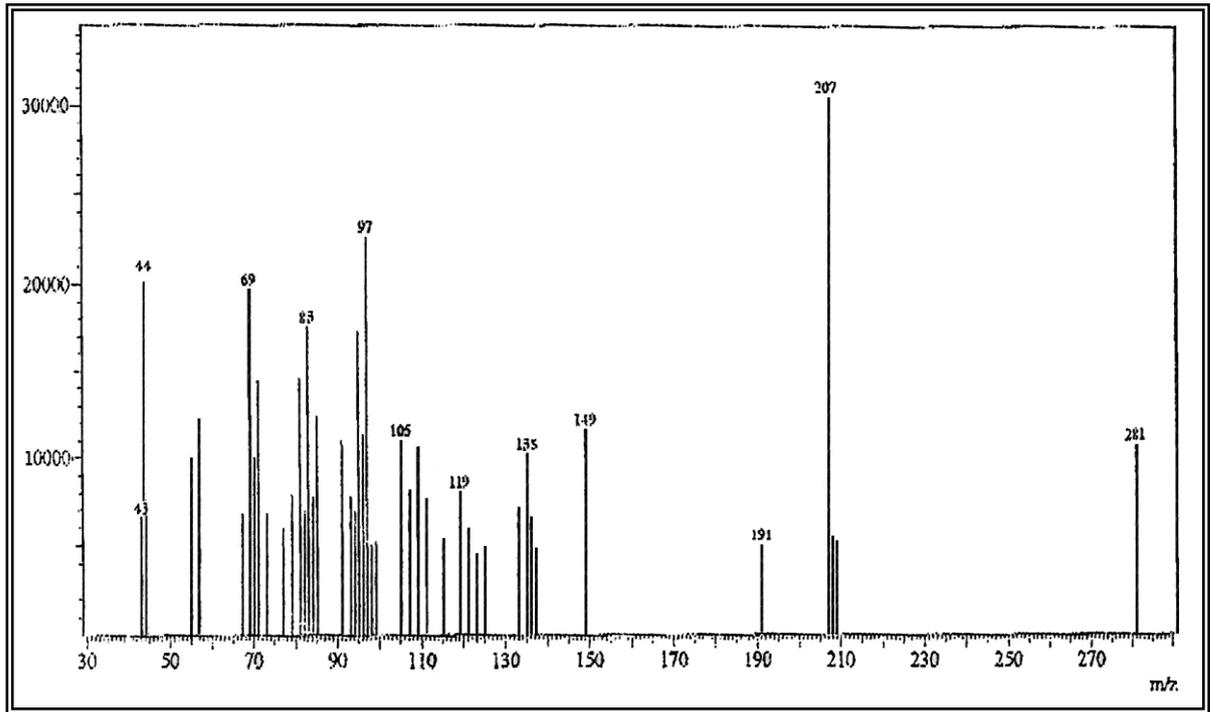


Figura 33: Espectro de massas de HI-3 (70 eV)

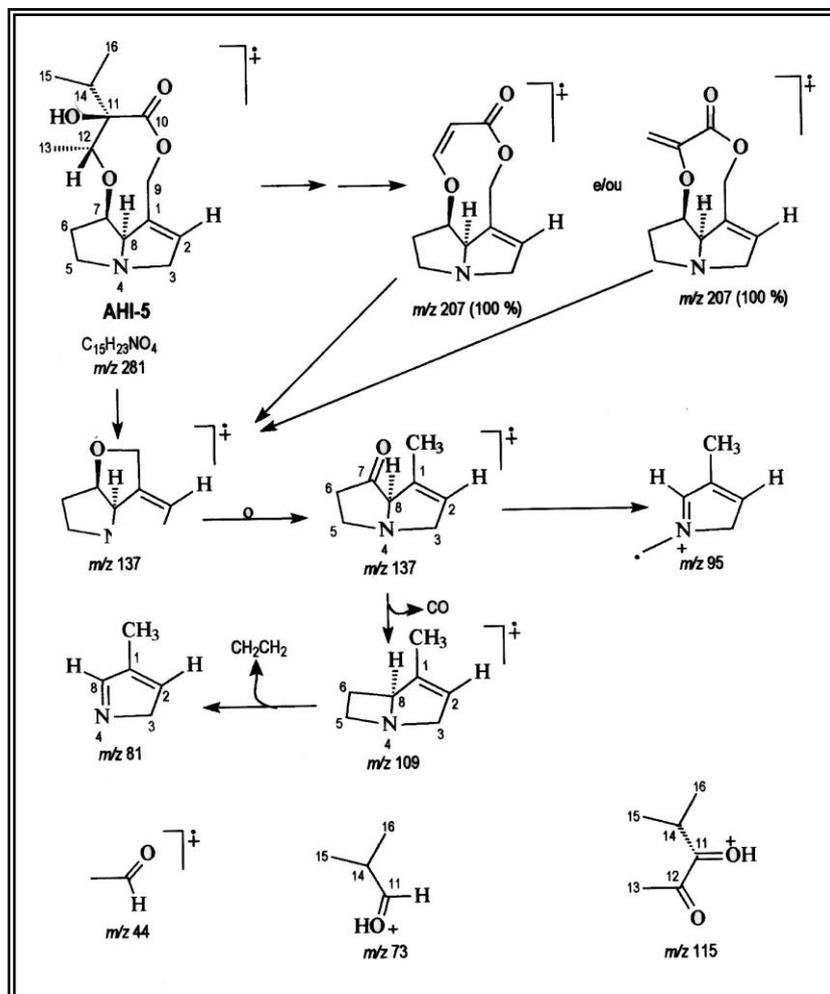


Figura 34: Proposta de Fragmentação de HI-3

4.1.4 Determinação estrutural de HI-4

O fracionamento cromatográfico de EERHI (Fluxograma 5, p. 222) obtida do extrato etanólico das raízes de *Heliotropium indicum* L., forneceu um sólido branco, amorfo, homogêneo em CCDA, denominado de HI-4 (13,0 mg).

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 35) mostra uma absorção larga em 3411 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O – H típica de grupamento hidroxila; absorção em 2972 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1711 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C = O de ácido carboxílico.

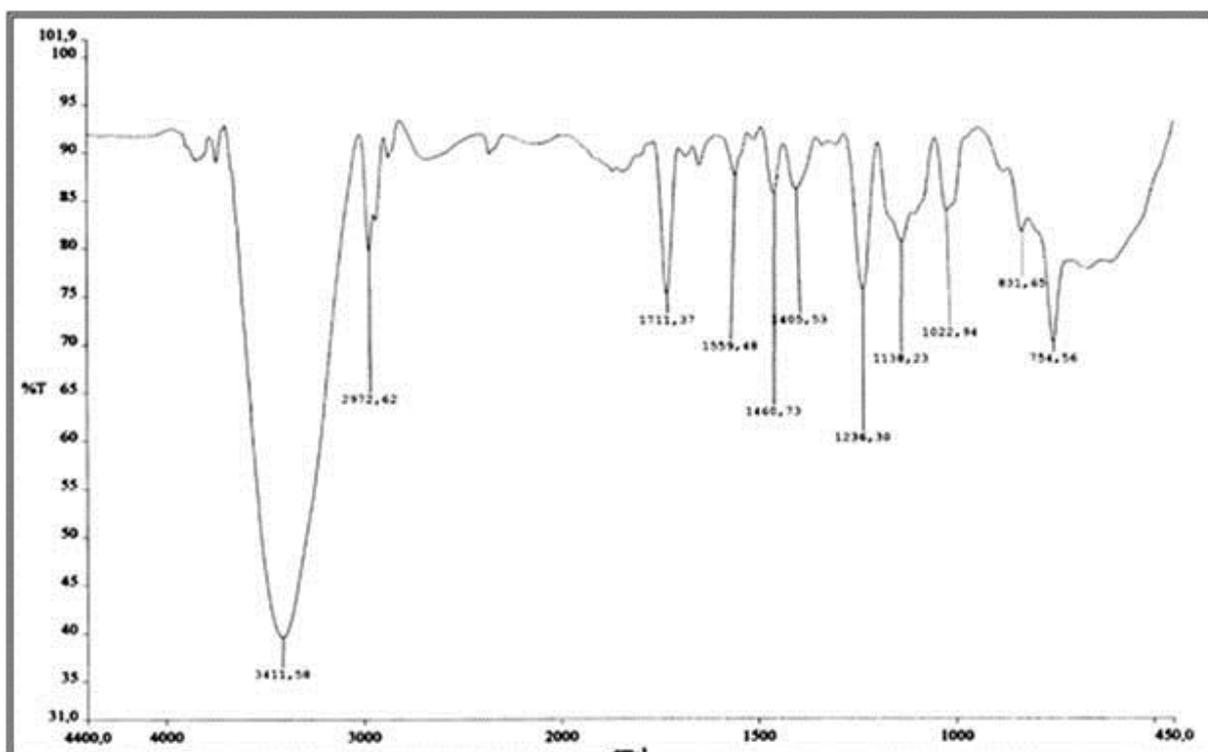


Figura 35: Espectro de IV (KBr) de HI-4

O espectro de RMN ^1H (Fig. 38, p. 93) apresentou sinais similares típicos de mistura. Neste espectro, observaram-se três sinais dubletos na região de hidrogênios metílicos em δ 1,12 (d, 6.3 Hz); δ 0,92 (d, 6.8 Hz) e δ 0,84 (d, 6.8 Hz) ppm, com integração cada um para três hidrogênios. Esses desdobramentos dos sinais referem-se a grupamentos metílicos acoplando com hidrogênios metínicos na vizinhança. Dessa forma, os dois sinais dubletos com deslocamentos próximos (δ 0,92 e 0,84 ppm) sugerem que podem estar acoplando com o mesmo hidrogênio, bem como o sinal em (δ 1,12 ppm) deve estar acoplando com outro hidrogênio metínico. Dessa forma, o sinal septeto em δ 2,31 (6.8 Hz), com integração para

um hidrogênio, confirma a presença do grupamento isopropílico (Fig. 36). Assim como, o sinal quarteto em δ 3,77 (q, 6.3 Hz) ppm, com integração para um hidrogênio, sugere estar acoplando com os hidrogênios metílicos em δ 1,12 ppm (3H, 6.3 Hz). Além disso, este sinal de hidrogênio metínico (δ 3,77 ppm) está em região de carbono sp^3 ligado a oxigênio. A partir desses dados, sugere-se que o composto apresente as seguintes partes em sua estrutura, conforme ilustra a Figura 36.

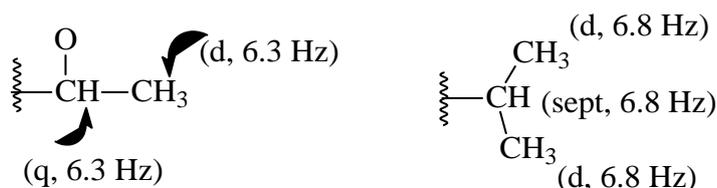


Figura 36: Grupos estruturais de HI-4

O espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 39, p. 94) apresentou 14 linhas espectrais, sendo que os sinais dobrados corroboram com a idéia de tratar-se de uma mistura com dois compostos análogos. O sinal observado em δ 180,1 ppm é característico de carbono carbonílico de ácido carboxílico.

A análise comparativa com o espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 39, p. 94) com DEPT 135 0 (Fig. 40, p. 94) revelou a presença de dois carbonos não hidrogenados (C) em δ 180,1 e 80,7 ppm, sendo que o primeiro sinal corrobora com a presença de uma carbonila de ácido carboxílico, conforme absorção observado em 3.411 cm^{-1} no espectro de absorção na região de infravermelho (Fig. 35, p. 89) e o segundo sinal sugere um carbono saturado (sp^3) ligado a oxigênio; observaram-se ainda dois carbonos metínicos (CH) em δ 68,5 e 30,7 ppm, sugerindo que o carbono metínico mais desprotegido está ligado a um oxigênio, e o segundo carbono metínico se refere ao grupamento isopropílico, corroborando com a interpretação do espectro de RMN 1H , conforme ilustra a Figura 36; além disso, identificou-se três carbonos metílicos (CH_3) em δ 17,9; 17,0 e 15,2 ppm, conforme a Tabela 7 (p. 91).

Os dados da Tabela 7 (p. 91) permitiram deduzir a fórmula molecular $C_7H_{14}O_4$. Além disso, o índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a um é compatível com a presença de apenas uma carbonila como insaturação.

Tabela 7: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de HI-4 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₃
180,1	68,5	17,9
80,7	30,7	17,0
		15,2
C OOH	1 CH – OH	
C – OH		
C ₂ O ₃ H ₂	C ₂ H ₂ OH	C ₃ H ₉
	TOTAL	C ₇ H ₁₄ O ₄

O espectro de massas (Fig. 42, p. 95) corrobora com a fórmula molecular proposta (Tab. 7) ao apresentar íon molecular com razão m/z 162.

O espectro de correlação bidimensional homonuclear COSY (^1H - ^1H) de HI-4 (Fig. 41, p. 95) corroborou com os dados de RMN ^1H , conforme ilustra a Figura 36 (p. 90), ao observar os acoplamentos entre o hidrogênio metínico em δ_{H} 2,31 ppm e os metílicos em δ 0,84 e 0,92 ppm, bem como o hidrogênio metínico em δ_{H} 3,77 ppm com a metila em δ_{H} 1,12 ppm.

Os dados de correlação do composto HI-4 são apresentados na Tabela 8 (p. 92), incluindo dados bidimensionais. Com esses dados espectroscópicos observados, pode-se propor para HI-4 a mistura dos ácidos néricos: ácido viridiflórico (2*S*, 1'*S*) e traquelântico (2*S*, 1'*R*), conforme ilustra a Figura 37. A partir da integração dos sinais metílicos em δ 1,18 e 1,12 ppm, foi permitido calcular a proporção entre os dois compostos de 82,6/17,4%, sendo o composto com absorção em δ_{H} 1,12 (d) o majoritário (HI-4a)(Tab. 8, p. 92).

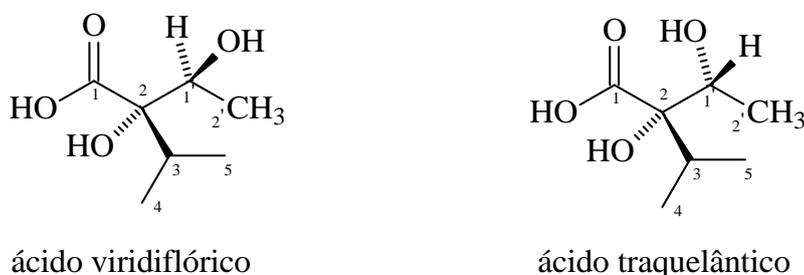


Figura 37: Estruturas dos componentes de HI-4

Tabela 8: Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H de HI-4, com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)*

	HI-4a				HI-4b			
	HMQC		HMBC		HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C								
1	180,1	-		H-1'	178,6			
2	80,7	-	H-1'; H-3	3H-4; 3H-5; 3H-2'	82,7			3H-5 3H-2'
CH								
3	30,7	2,31 (sept, 6.8)	3H-4 3H-5	H-1'	32,5	2,09 (sept, 6.8)		3H-5
1'	68,5	3,77 (q, 6.3)	3H-2'		69,8	4,06 (q, 6.3)		3H-2'
CH₃								
4	17,0	0,84 (d, 6.8)	H-3	3H-5	17,3	0,89 (d)		3H-5
5	15,2	0,92 (d, 6.8)	H-3	3H-4	16,5	1,00 (d, 6.8)		
2'	17,9	1,12 (d, 6.3)			17,6	1,18 (d, 6.3)		

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

Percebe-se que a diferença entre os ácidos viridiflórico (2*S*,1'*S* ou 2*R*,1'*R*) e traquelântico (2*S*,1'*R* ou 2*R*,1'*S*) está apenas na estereoquímica no carbono 1' (Fig. 37, p. 91), ou seja, tratam-se de um par diastereoisomérico.

A determinação da configuração nos carbonos 2 e 1' foi realizada através da interpretação dos valores destes núcleos nos experimentos unidimensional de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Segundo Wiedenfled e Roeder (1991), a configuração desses ácidos ligados à base necina, pode ser determinada através dos valores observados nos grupos metílicos (C-4 e C-5) e carbono 1'. Quando os valores de H-1' e C-1' são, respectivamente, próximos a 3,95 ppm e 70-71 ppm, a configuração estabelecida será idêntica (*R,R* ou *S,S*). Entretanto, na

configuração oposta (*R,S* ou *S,R*), os valores serão, respectivamente, 4,05-4,10 e 69 ppm. Ao analisar os grupos metílicos C-4/C-5, os valores mostrados em RMN ^1H serão aproximadamente idênticos, porém diferentes valores em RMN ^{13}C serão observados, sendo que $\Delta\delta \geq 1,5$ ppm a configuração será idêntica (*R,R* ou *S,S*), enquanto que valores de $\Delta\delta$ inferiores a 1,5 ppm (geralmente próximos a 0,2 ppm) a configuração será oposta (*R,S* ou *S,R*). Portanto, a diferença de deslocamento químico entre os carbonos C-4/C-5 de 1,8 ppm ($\Delta\delta \geq 1,5$ ppm) e deslocamento químico de H-1' igual a 3,77 ppm ($\delta_{\text{H}} \approx 3,95$ ppm), permitiram sugerir que o componente majoritário HI-4a representaria o ácido viridiflórico. Assim como, o deslocamento químico entre os carbonos C-4/C-5 de 0,8 ppm ($\Delta\delta < 1,5$ ppm) e deslocamento químico de H-1' igual a 4,06 ppm ($\delta_{\text{H}} = 4,05\text{-}4,10$ ppm), permitiu sugerir que o composto minoritário (HI-4b) trata-se do ácido traquelântico.

A confirmação que o componente majoritário HI-4a corresponderia ao ácido viridiflórico foi realizada a partir do valor de ponto de fusão de HI-4 (pf = 111-114 $^{\circ}\text{C}$) ser próximo do ácido viridiflórico (pf = 117 $^{\circ}\text{C}$, NIWA; OGAWA; YAMADA, 1990). Enquanto que o ácido traquelântico apresenta ponto de fusão entre 88,5-89,5 $^{\circ}\text{C}$ (NIWA; OGAWA; YAMADA, 1990). É válido ressaltar que ácido viridiflórico participa da formação do alcalóide pirrolizidínico isolado de HI-2 (licopsamina).

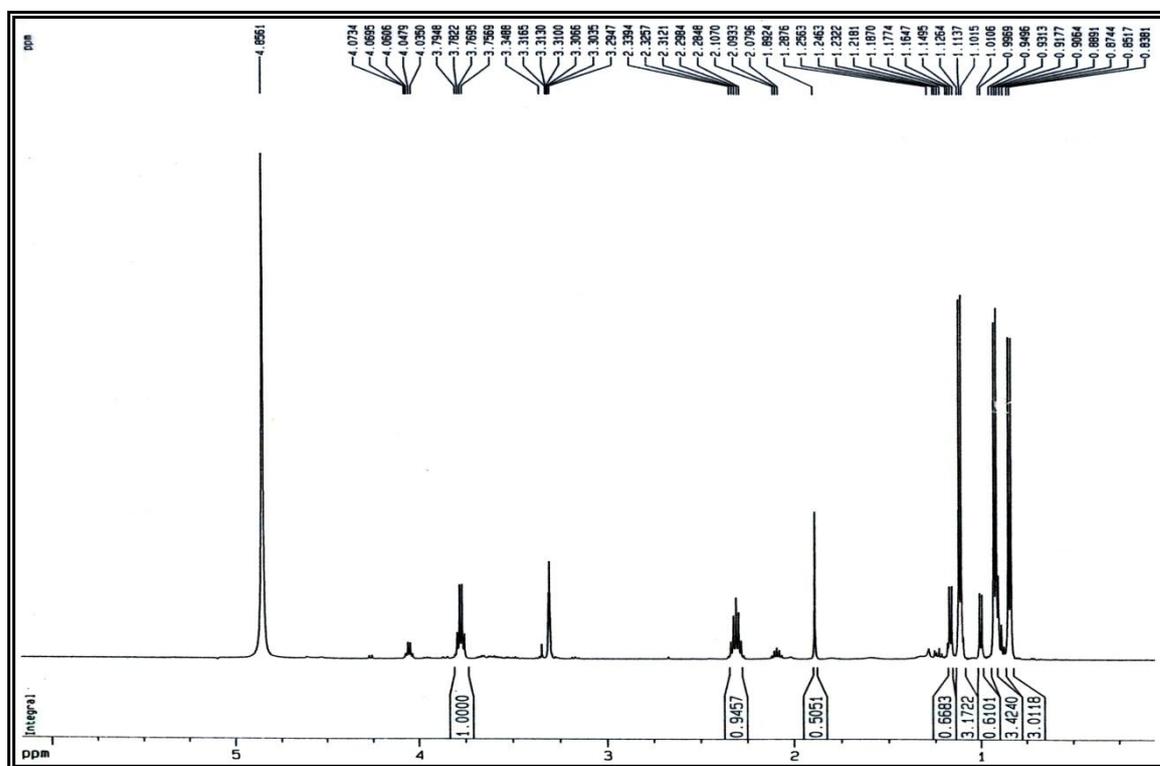


Figura 38: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de HI-4

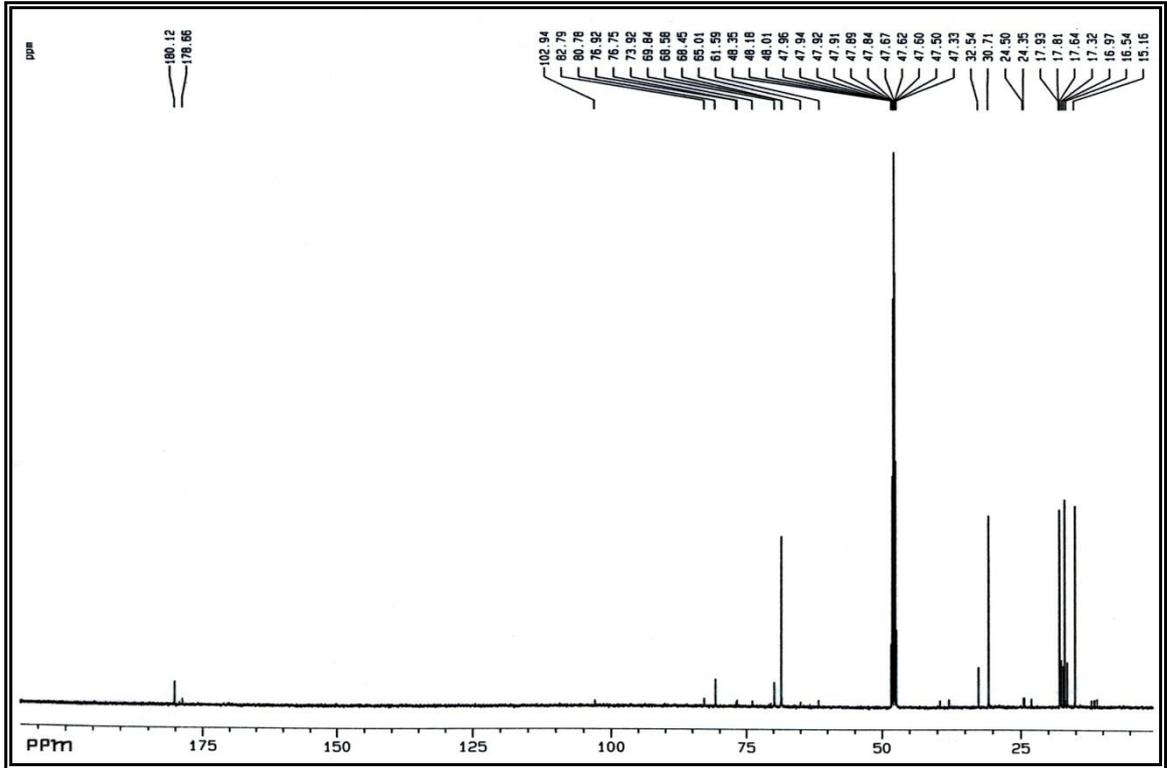


Figura 39: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) de HI-4

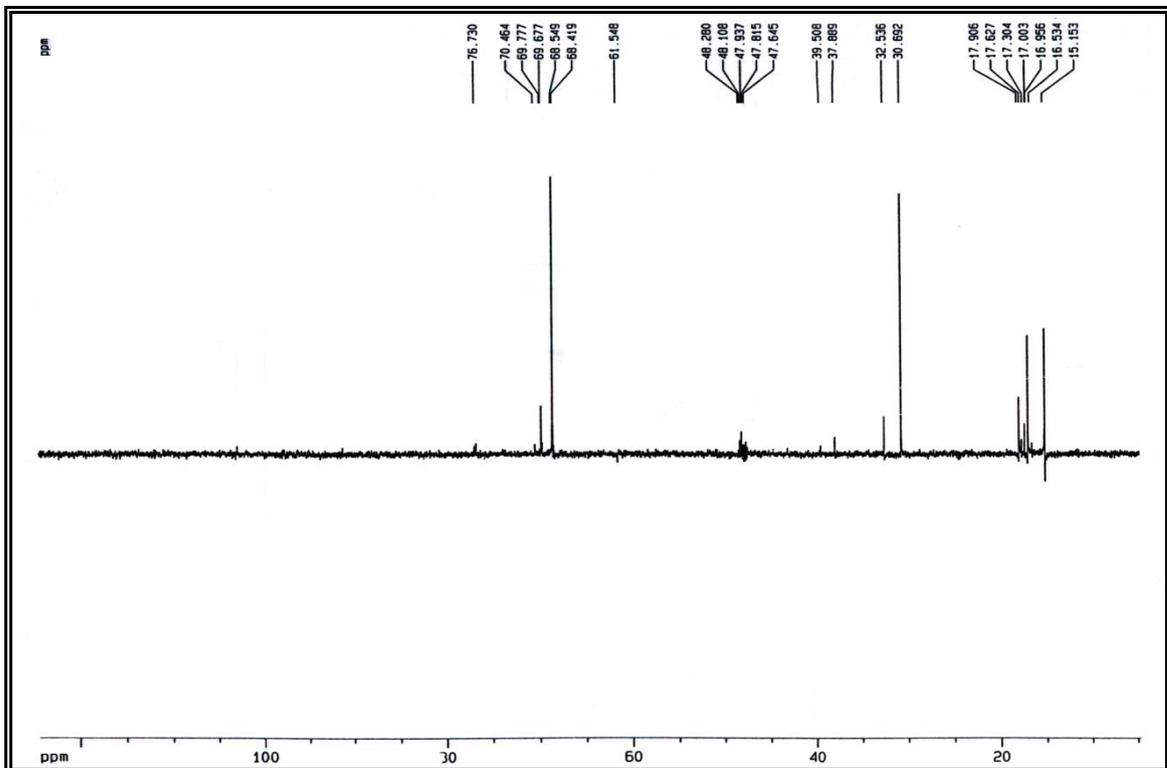


Figura 40: Espectro de RMN ¹³C – DEPT 135⁰ (125 MHz, CD₃OD) de HI-4

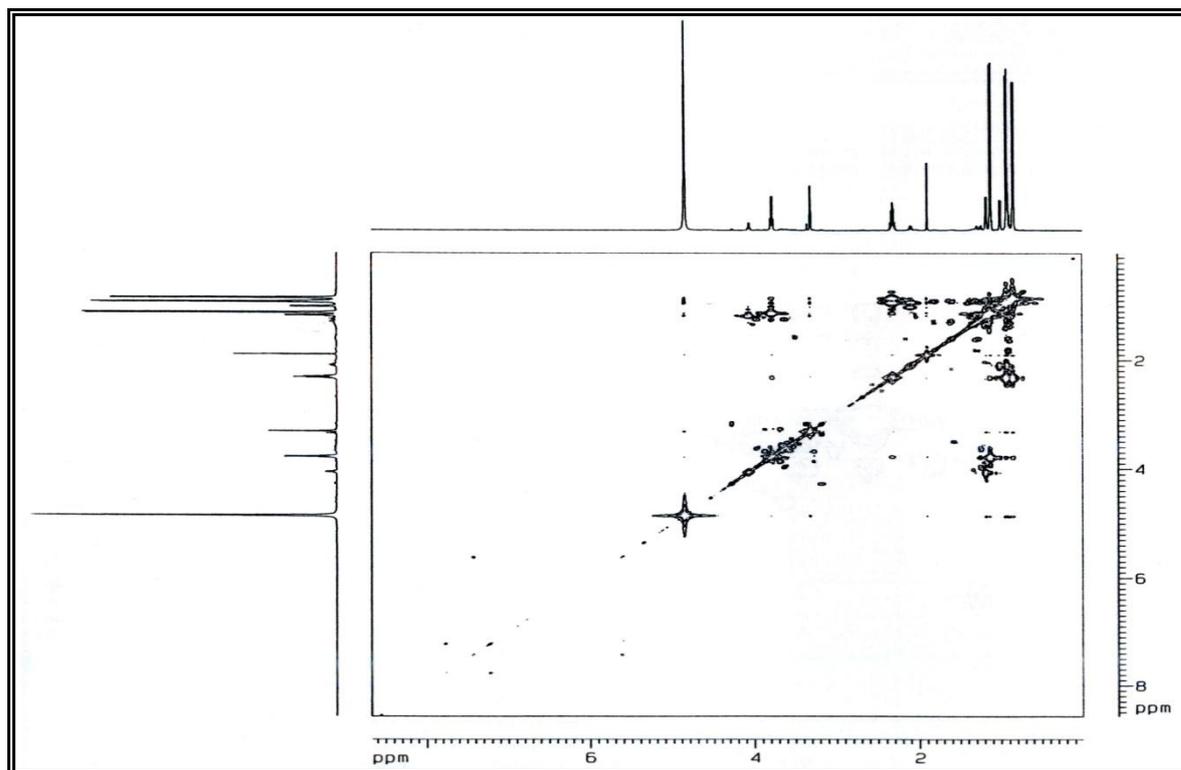


Figura 41: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear – COSY (¹H-¹H) (500 MHz, CD₃OD) de HI-4

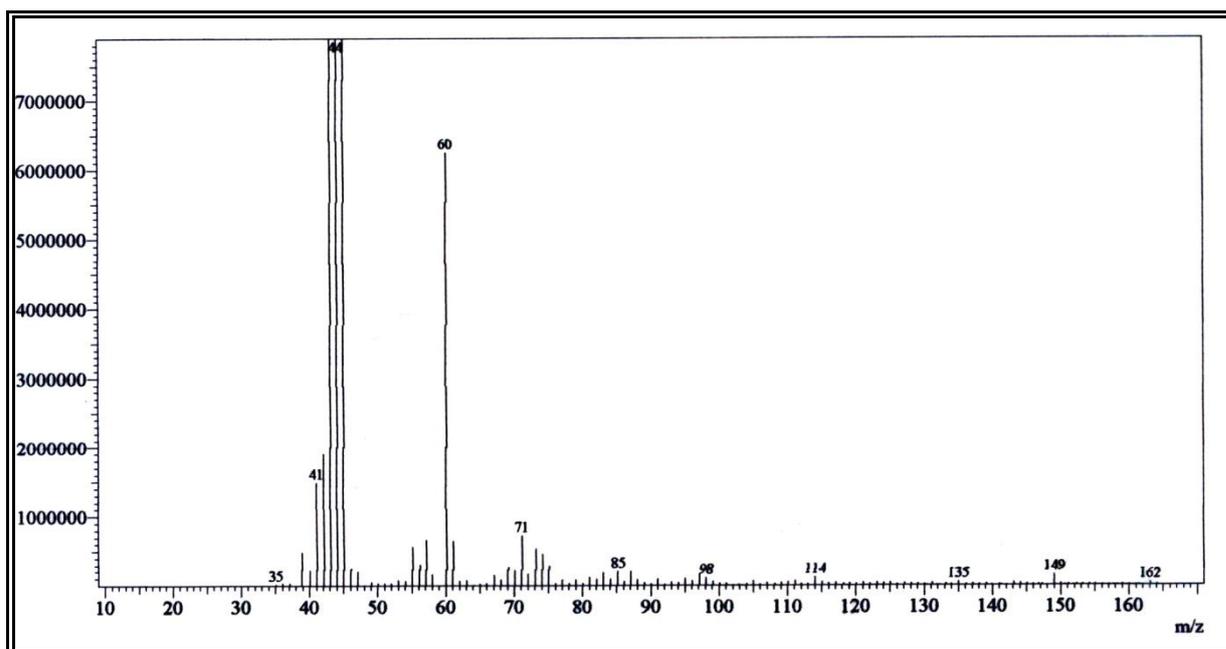


Figura 42: Espectro de massas de HI-4 (70 eV)

4.2 Isolados de *Heliotropium polyphyllum* L.

4.2.1 Determinação estrutural de HP-1

Sucessivas cromatografias da fração HPAE (Fluxograma 6, p. 225), em gel de sílica, obtida a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *H. polyphyllum*, permitiu o isolamento de um líquido viscoso, amarelo, homogêneo em CCDA, no qual foi denominado de HP-1 (13,0 mg).

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 43) mostrou absorção larga em 3.396 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O – H; absorção em 2.974 e 2.875 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1.730 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C = O de grupamento carbonílico de éster.

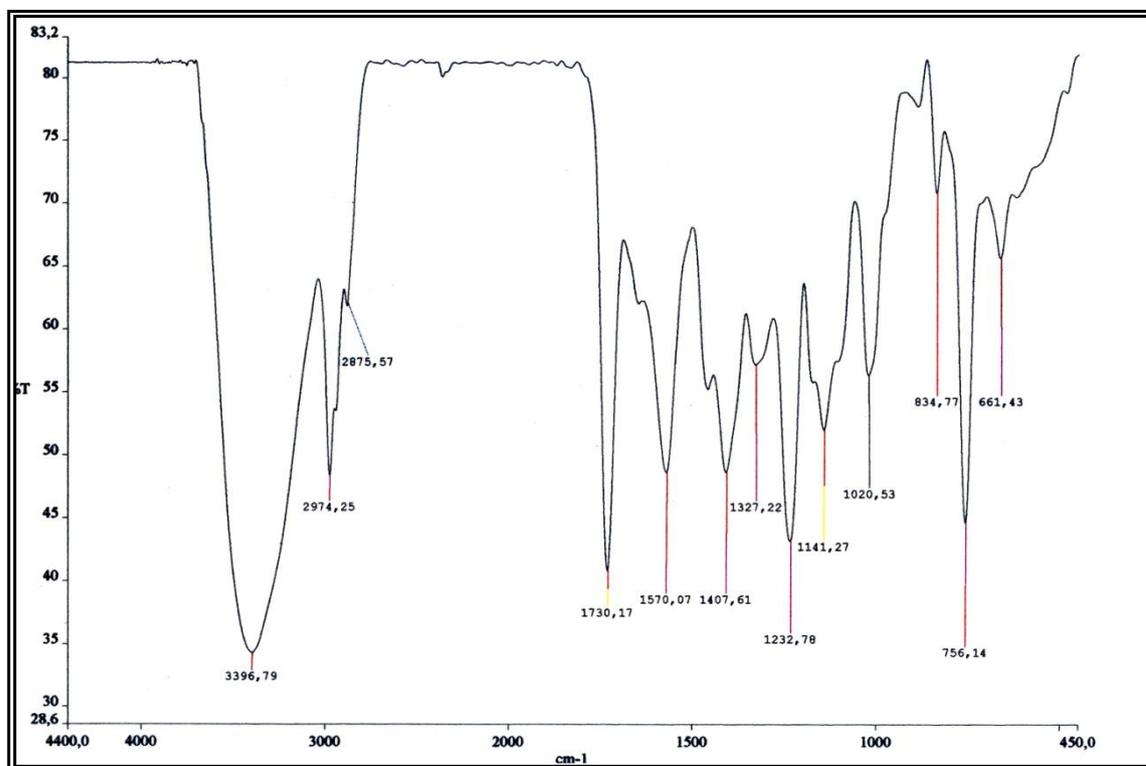


Figura 43: Espectro de IV (KBr) de HP-1

O espectro de RMN ^1H de HP-1 (Fig. 45, p. 99) revelou bastante semelhante ao espectro do alcalóide pirrolizidínico HI-2 (Item 4.1.2. p, 71), ao apresentar três sinais dubletos, na região de hidrogênios metílicos, com integração para três hidrogênios cada um, em δ 1,17 (3H-13, d, 6.3 Hz), 0,93 (3H-15, d, 7.0 Hz) e 0,90 (3H-16, d, 7.0 Hz) ppm; um quarteto distorcido em δ 4,38 ppm (1H-12, q, 6.3Hz); um singleto largo em 4,30 (1H-8); um singleto em δ 4,03 ppm (1H-7); dois hidrogênios em sistema AB com δ 3,95 (1H-3, m) e 3,51

(1H, m) ppm; dois sinais em sistema AB com δ 3,31 (1H-5, m) e 2,84 (1H-m) ppm; um multiplete em δ 2,07 (1H-14, m) ppm e outro multiplete em δ 1,98 (1H-6, m) ppm.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (Fig. 46, p. 100) de HP-1 mostrou 15 linhas espectrais, as quais foram relacionadas a uma absorção correspondente a carbonila em δ 175,9 ppm; a duas absorções em δ 135,2 e 128,2 ppm, referentes a carbonos olefínicos; e a sete absorções correspondentes a carbonos oxigenados e/ou nitrogenados em δ 84,5; 79,1; 71,8; 70,5; 63,3; 62,9 e 54,8 ppm; sendo que a absorção em δ 84,5 ppm indica que o carbono está bastante desprotegido, sugerindo a vizinhança uma carbonila e um oxigênio possivelmente de hidroxila. As demais absorções restantes foram relacionadas a carbonos saturados não funcionalizados (δ 37,2; 34,1; 17,8; 17,5 e 17,3 ppm). Análise comparativa com o espectro de RMN DEPT ^{135}C (Fig. 47, p. 100) revelou a presença de três carbonos metílicos (CH_3), quatro carbonos metilênicos (CH_2), cinco carbonos metínicos (CH) e três carbonos não hidrogenados (C), conforme Tabela 9.

Tabela 9: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (MeOD, 75 MHz) de HP-1 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH_2	CH_3
175,9	128,2	63,3	17,8
135,2	79,1	62,9	17,5
84,5	71,8	54,8	17,3
	70,5	37,2	
	34,1		
C_3	C_5H_5	C_4H_8	C_3H_9
TOTAL			$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$

A partir da espectrometria de massas de HP-1, pode-se verificar a sua fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ representado pelo pico do íon molecular com razão $m/z = 299$ (Fig. 48, p. 105). Portanto, semelhante ao HI-2.

A partir desses dados, observou-se que os espectros de RMN ^1H e ^{13}C -CPD de HI-2 e HP-1 mostraram-se bastante semelhantes. As atribuições de forma inequívoca de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos podem ser verificadas através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação (HMQC). Esses dados de correlação do composto HP-1 são apresentados na Tabela 10 (p. 98), incluindo

dados bidimensionais heteronuclear a mais de uma ligação (HMBC) e comparação com o composto HI-2 (licopsamina).

Os dados obtidos em comparação com os dados de HI-2 (Tab. 10) permitiu identificar HP-1 como sendo o alcalóide pirrolizidínico licopsamina (Fig. 20, p. 75).

Tabela 10: Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C entre HP-1 e HI-2, com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC).*

		HP-1			HI-2
		HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
1	135,2	-	H-2; H-8	2H-3	133,2
10	175,9	-		2H-9; H-12; H-14	175,6
11	84,5	-	H-14	3H-13; 3H-15; 3H-16	83,3
CH					
2	128,2	5,87 (sl)	2H-3	H-8	129,6
7	70,5	4,03 (sl)	2H-6	2H-5	69,6
8	79,1	4,30		H-2; 2H-6	78,8
12	71,8	4,38 (q, 6.3)	3H-13		71,4
14	34,1	2,07 (m)	3H-15;3H-16		32,9
CH₂					
3	63,3	3,95 (m) 3,51 (m)	H-2	H-5b	62,9
5	54,8	3,31 (m) 2,84 (m)		2H-3	54,1
6	37,2	1,98 (m, 2H)	H-5b		36,5
9	62,9	4,91 (d, 13.7); 4,76 (d, 13.7)		H-2	62,8
CH₃					
13	17,5	1,17 (d, 6.3)			17,5
15	17,3	0,95 (d, 7.0)	H-14		17,1
16	17,8	0,93 (d, 7.0)	H-14		17,7

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

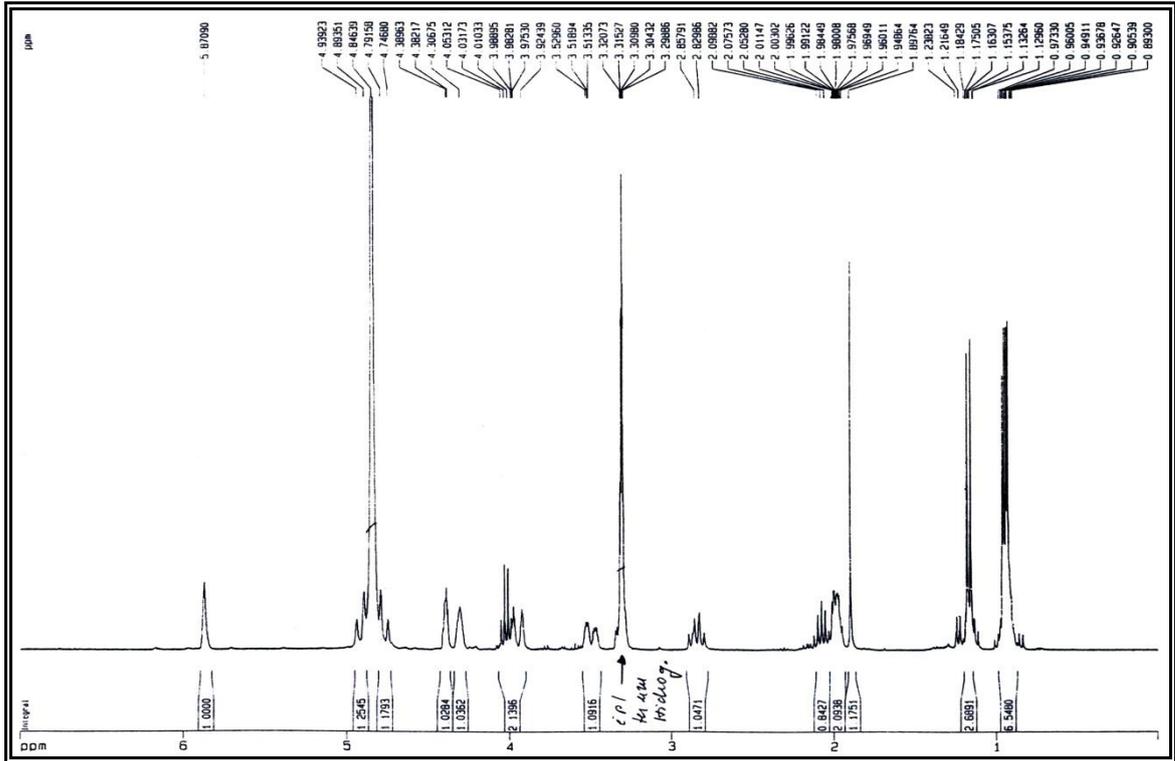


Figura 44: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, MeOD) de HP-1

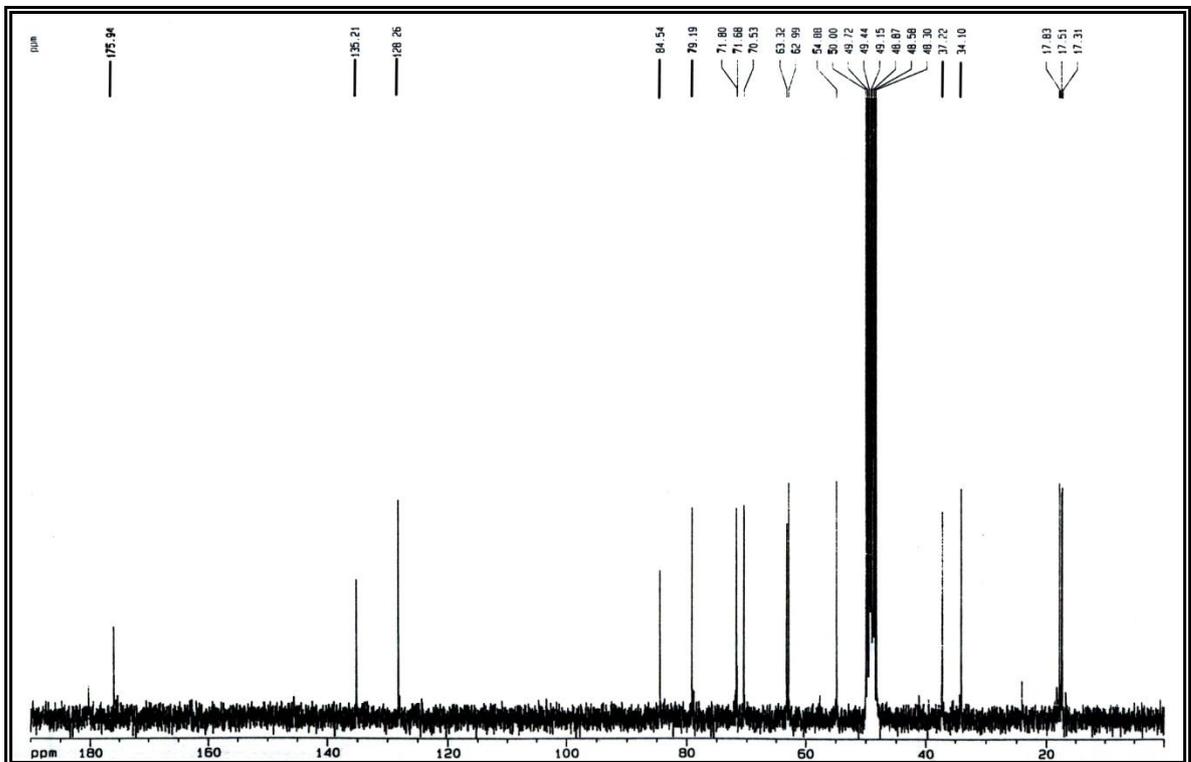


Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) de HP-1

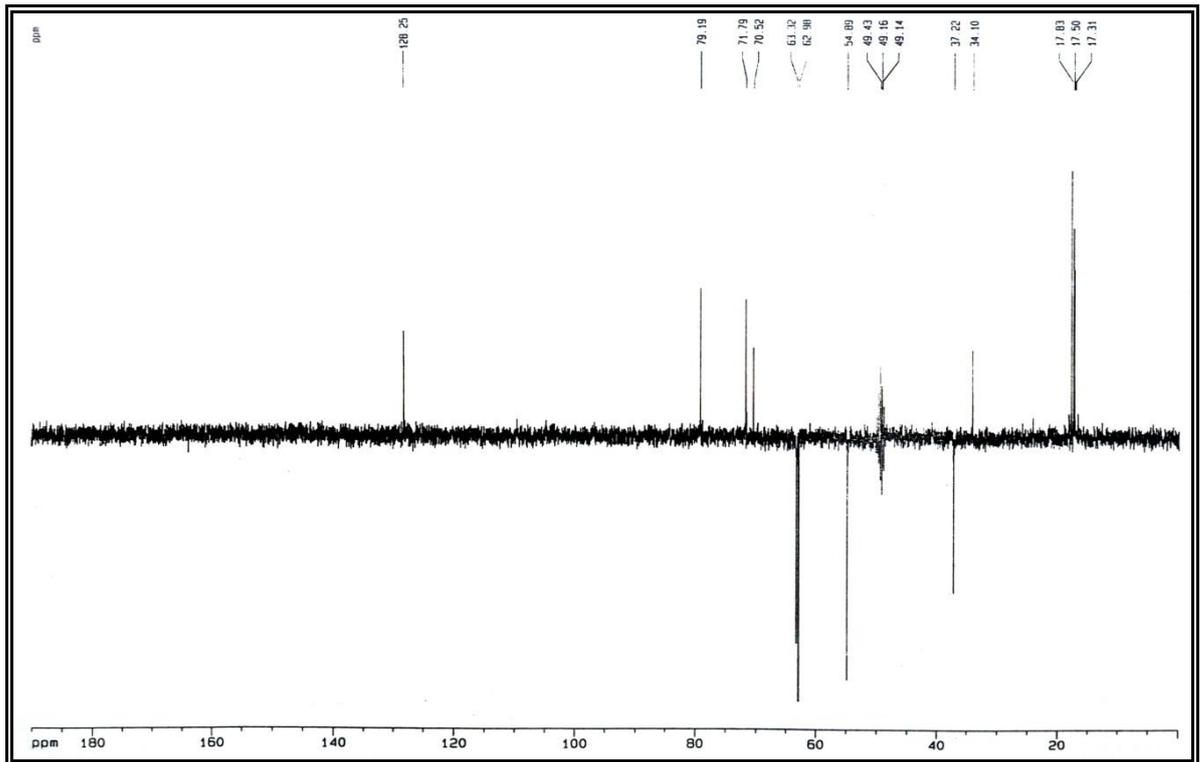


Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^{\circ}$ (75 MHz, MeOD) de HP-1

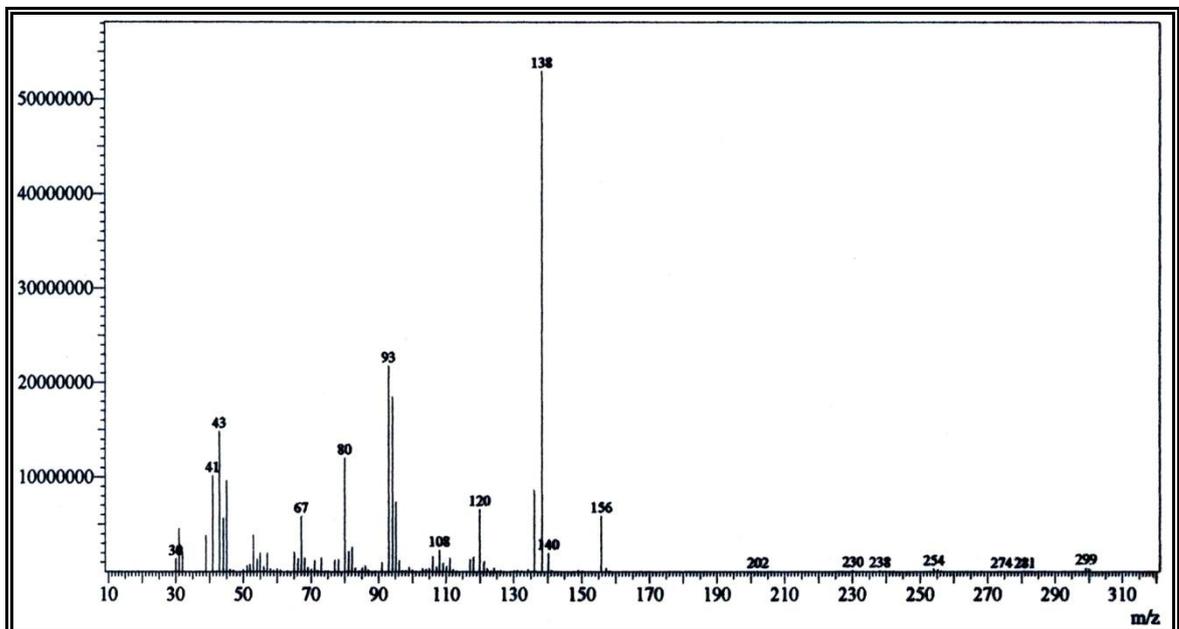


Figura 47: Espectro de massas de HP-1 (70 eV)

CAPÍTULO 5

Estudo dos componentes voláteis de
Heliotropium indicum L. e
Heliotropium polyphyllum L.

5. ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DE *Heliotropium indicum* L. e *Heliotropium polyphyllum* L.

5.1 Introdução

Óleos voláteis são definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas de órgãos de espécies de plantas (folhas, flores, raízes, tronco), extraídas por diversas técnicas, sendo a destilação por arraste com vapor d'água a mais utilizada, bem como por expressão dos pericarpos de frutos cítricos, podendo ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências (SIMÕES *et al.*, 2004).

Essas denominações são por suas características físico-químicas, por exemplo, geralmente líquidos viscosos, de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua característica principal é a volatilidade, diferenciando-se dos óleos fixos que são, geralmente, obtidas de sementes e caracteriza-se por serem misturas de substâncias lipofílicas de maior massa molar. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo por isso denominados essências.

Os óleos essenciais são solúveis em solventes orgânicos como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos ou, em latim, *aetheroleum*. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar soluções aquosas, dependendo da constituição química.

Seus constituintes químicos apresentam variedade, podendo ser hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (SANTOS, 2007). Esses compostos encontram-se em diferentes concentrações na mistura, havendo a possibilidade de existir um componente em concentração superior denominado de constituinte majoritário (FEITOSA, 2004). A diversidade em sua composição depende de vários fatores: técnica de extração utilizada; localização geográfica e estágio do ciclo vegetativo da planta; condições edafoclimáticas, técnicas de cultivo, variações sazonais e circadianas (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007).

A importância do estudo de óleos essenciais está relacionada a suas inúmeras funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação, proteção contra predadores e polinizadores; e sua grande importância econômica devida a seu uso na indústria de alimentos (condimentos e aromatizantes) e de cosméticos (perfumes e produtos de

higiene), além de suas propriedades terapêuticas (SIMÕES *et al.*, 2004; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007).

A ausência de relato na literatura da análise dos componentes químicos voláteis de *Heliotropium indicum* L. e *Heliotropium polyphyllum* L. do Nordeste brasileiro, em especial do Estado do Ceará, motivou a desenvolver este estudo a partir do óleo essencial extraído de suas partes aéreas.

Os óleos essenciais de *Heliotropium indicum* L. foram obtidos por hidrodestilação em aparelho doseador tipo Cleavenger (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960). A análise da composição do óleo foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), enquanto a quantificação de seus componentes foi desenvolvida por cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (CG/DIC).

Os óleos essenciais de *Heliotropium polyphyllum* L. foram obtidos por três processos de extração: hidrodestilação em aparelho doseador tipo Cleavenger (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960), arraste a vapor d'água e fluido supercrítico de CO₂. As análises qualitativas e quantitativas dos componentes destes óleos foram realizadas por cromatografias gasosas, como descritas no parágrafo anterior.

5.2 Procedimento experimental de análise dos óleos

5.2.1 Óleo essencial de *H. indicum*

A análise qualitativa foi feita em aparelho de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, modelo Shimadzu QP5050A. Os experimentos foram conduzidos usando coluna capilar DB-1, com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e filme de 0,25 µm. As condições de programação do equipamento: gás de arraste He (0,8 mL/min), temperatura de injetor 250 °C, temperatura de interface 280 °C, razão (*split*) 61, temperatura inicial do forno 40 °C, variação de 40-180 °C a 4 °C/min e 180-280 °C a 20 °C/min.

Os espectros de massas foram produzidos por impacto eletrônico de (70 eV). A identificação dos constituintes químicos do óleo foi desenvolvida através de determinação dos índices de Kovats simulados (ALENCAR *et al.*, 1990), pesquisa em banco de dados padrões em espectroteca (Wiley) e comparações visuais com espectros de massas de substâncias encontradas na literatura (ADAMS, 2007; NIST - National Institute of Standards and Technology - <http://webbook.nist.gov/chemistry>).

A análise quantitativa foi feita em aparelho de cromatografia gasosa e detecção por ionização de chamas (CG/DIC), modelo Thermo. Os experimentos foram conduzidos semelhantes à análise qualitativa.

5.2.2 Óleos essenciais de *H. polyphyllum*

A análise qualitativa foi feita em aparelho de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, modelo Shimadzu QP5050A. Os experimentos foram conduzidos usando coluna capilar OV-5, com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e filme de 0,25 µm. As condições de programação do equipamento: gás de arraste He (1,0 mL/min), temperatura de injetor 250 °C, temperatura de interface 280 °C, razão (*split*) 48, temperatura inicial do forno 40 °C, variação de 40-180 °C a 4 °C/min e 180-280 °C a 20 °C/min.

Os espectros de massas foram produzidos por impacto eletrônico de (70 eV). A identificação dos componentes do óleo foi desenvolvida através de comparação com os padrões (Wiley) e comparações visuais com banco de dados da literatura (ADAMS, 2007; NIST–<http://webbook.nist.gov/chemistry>). Os tempos de retenção dos picos referentes às substâncias identificadas, pelo espectro de massas, e os seus respectivos índices de Kovats foram utilizados para a determinação dos índices de Kovats simulados (ALENCAR, 1990). A equação de regressão linear dos constituintes de cada óleo essencial analisado foi formulada como: $y = A + B x$, em que y é o índice de Kovats e x é o tempo de retenção dos compostos, de acordo com Tabela 11 (p. 105).

As condições das análises qualitativas e quantitativas dos três óleos obtidos de *H. polyphyllum* foram as mesmas. Com isso, todos os componentes identificados como hidrocarbonetos dos três óleos foram reunidos e analisados em conjunto para a identificação e determinação dos seus respectivos índices de Kovats. A equação de regressão linear dos hidrocarbonetos foi formulada como: $y = -4105,39966 + 156,6107 x$ ($r = 0,99992$), em que y é o índice de Kovats e x é o tempo de retenção dos compostos.

A análise quantitativa foi feita em aparelho de cromatografia gasosa e detecção por ionização de chamas (CG/DIC), modelo Thermo. Os experimentos foram conduzidos semelhantes à análise qualitativa.

Tabela 11: Dados das equações de regressão linear dos constituintes dos óleos de *H. polyphyllum*

Identificação do óleo/ método de extração	A	B	R
OEHP Hidrodestilação	648,64164	32,35862	0,99892
OEHP Arraste a vapor	653,61051	30,15191	0,99978
OEHP Fluido supercrítico	614,28655	35,82881	0,99193

A = coeficiente linear, B = coeficiente angular (equação $y = A + B x$),

R = coeficiente de correlação

5.3 Composição química do óleo essencial de *H. indicum* L.

A análise do cromatograma do óleo essencial de *H. indicum* L. (OEHI) (Fig. 48) indicou a presença de uma variedade estrutural de compostos com tempos de retenções bastante variados, sendo que a proporção maior é dos constituintes com tempo de retenção acima de 34 min, demonstrando ser compostos de alta massa molar.

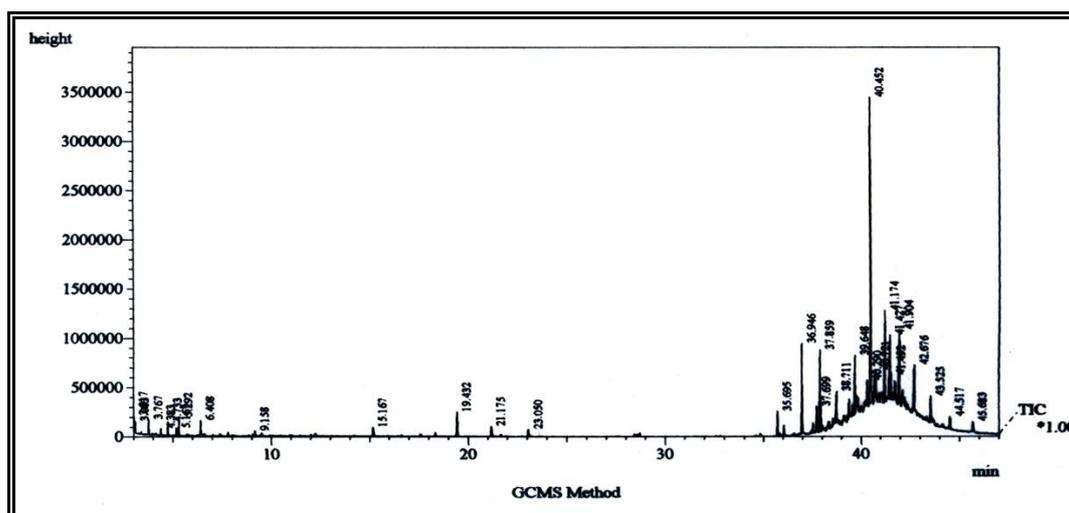


Figura 48: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *H. indicum*

As análises por CG-EM e CG-DIC de OEHI forneceram 30 picos, dos quais 17 foram identificados, num total de 74,34 % do teor do óleo.

A composição química identificada dos constituintes desse óleo (Tabela 12) é constituída por álcoois (36,10 %), hidrocarbonetos saturados (29,28 %), aldeídos lineares (3,85 %), entre outras classes, tendo como componente majoritário o sesquiterpenóide fitol (27,89 %), seguido pelo hexadecan-1-ol e pelos hidrocarbonetos docosano e tricosano. Segundo Pyne *et al.* (2006), o componente majoritário do óleo essencial das partes aéreas extraído pelo mesmo processo de *Heliotropium indicum* Linn é o fitol com 49,10 %, seguido por dodecan-1-ol (6,40%) e β -linalool (3,00%). Os espectros de massas dos componentes identificados são mostrados nas Figuras 49-65 (p. 107-110).

Tabela 12: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de *H. indicum* extraído por hidrodestilação

COMPOSTOS	Porcentagem (%)
3-metilpentanal	0,45
Dietilcarbonato	0,92
Hexan-2-ol	0,56
Nonanal	1,01
2-(2-hidróxifenil)etanoato de etila (salicilato de etila)	1,12
Hexadecanal	2,39
Hexadecan-1-ol	7,65
2,6,10,14-tetrametil-hexadecano	2,21
Nonadecano	2,54
Eicosano	3,84
2-metileicosano	2,15
Fitol (3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol)	27,89
Docosano	7,49
Tricosano	5,68
Tetracosano	3,67
Pentacosano	2,72
Octacosano	1,19
TOTAL (%)	74,34

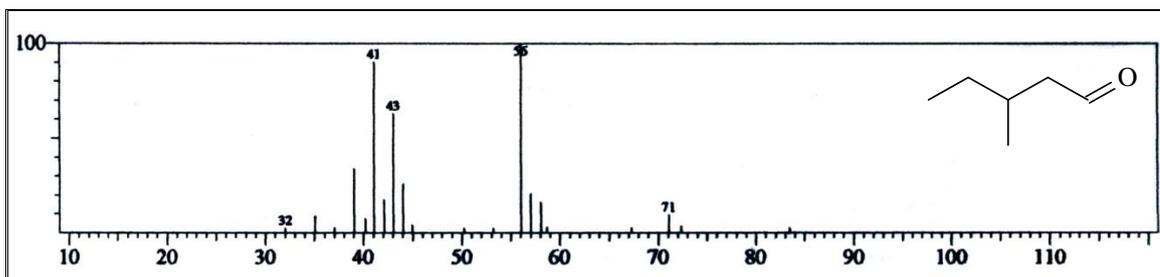
Espectros de massas dos constituintes químicos voláteis de *H. indicum*

Figura 49: Espectro de massas de 3-metilpentanal com m/z 100

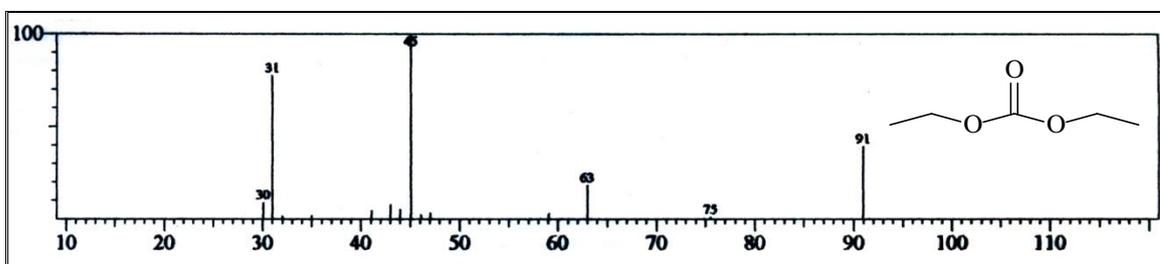


Figura 50: Espectro de massas de dietilcarbonato com m/z 118

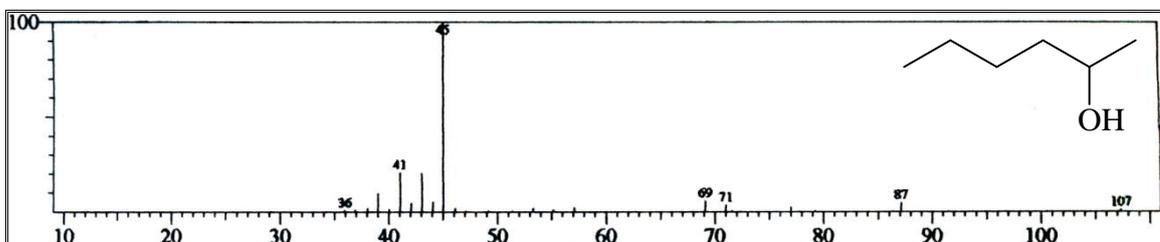


Figura 51: Espectro de massas de hexan-2-ol com m/z 102

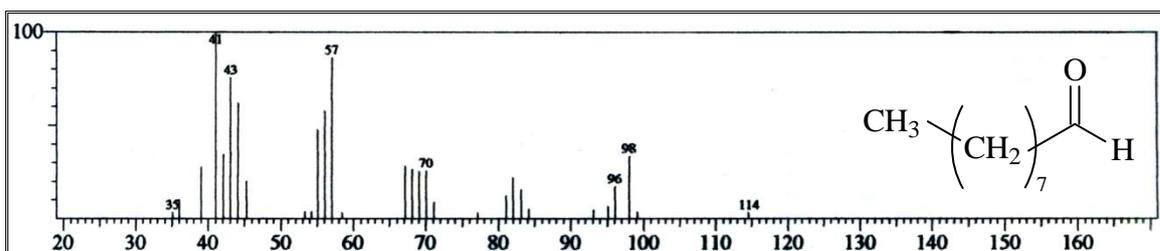


Figura 52: Espectro de massas de nonanal com m/z 142

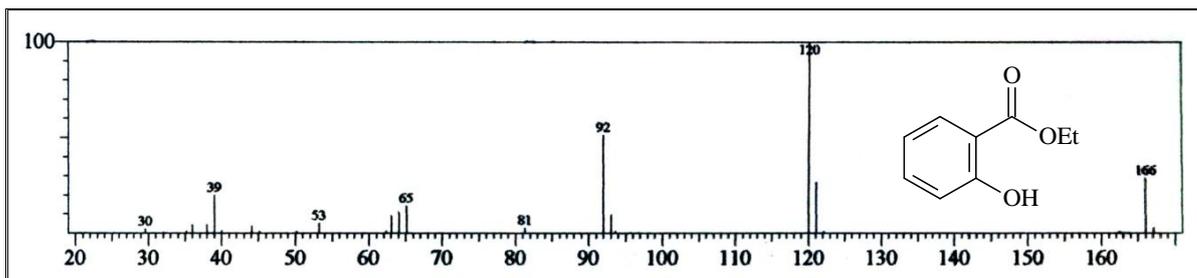


Figura 53: Espectro de massas de 2-(2-hidróxifenil)etanoato de etila (salicilato de etila) com m/z 166

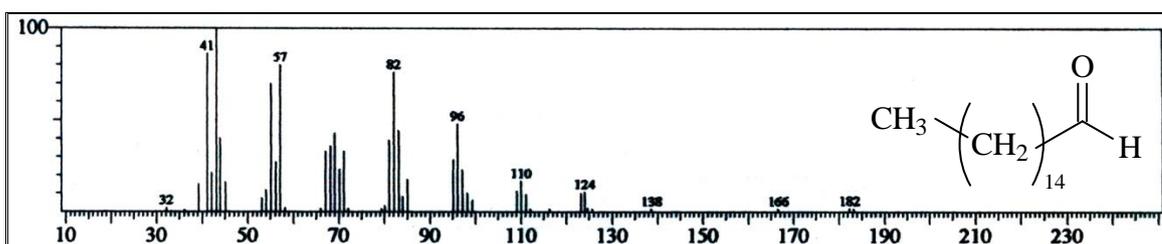


Figura 54: Espectro de massas de hexadecanal com m/z 240

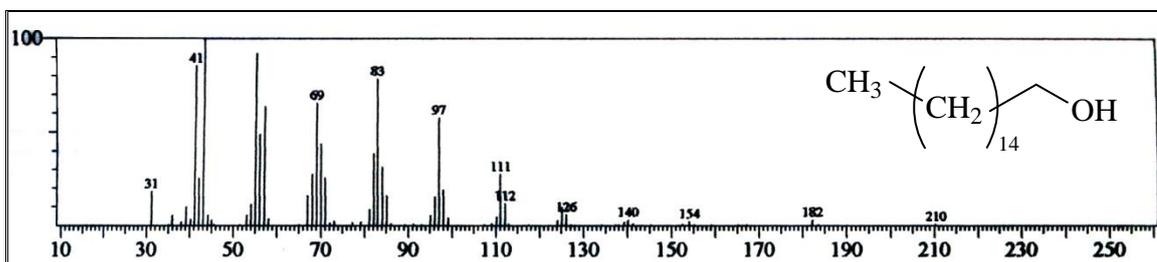


Figura 55: Espectro de massas de hexadecan-1-ol com m/z 242

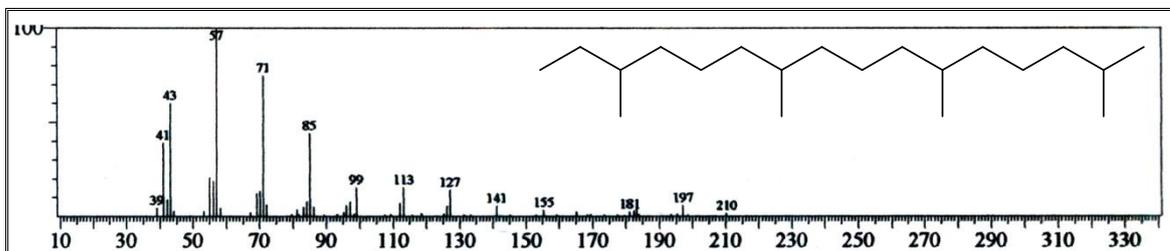


Figura 56: Espectro de massas de 2,6,10,14-tetrametil-hexadecano com m/z 282

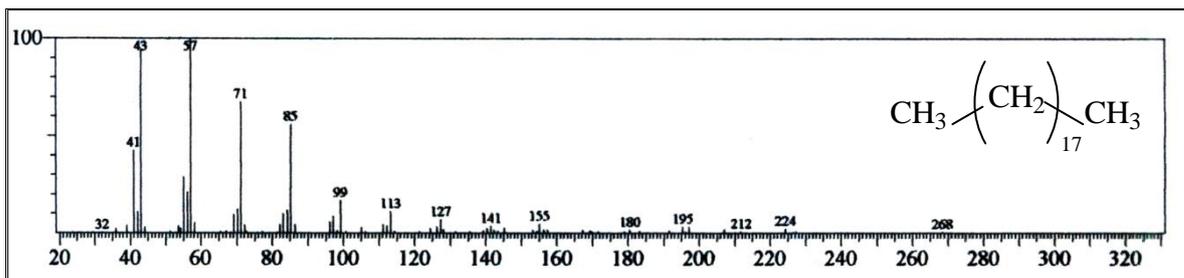


Figura 57: Espectro de massas de nonadecano com m/z 268

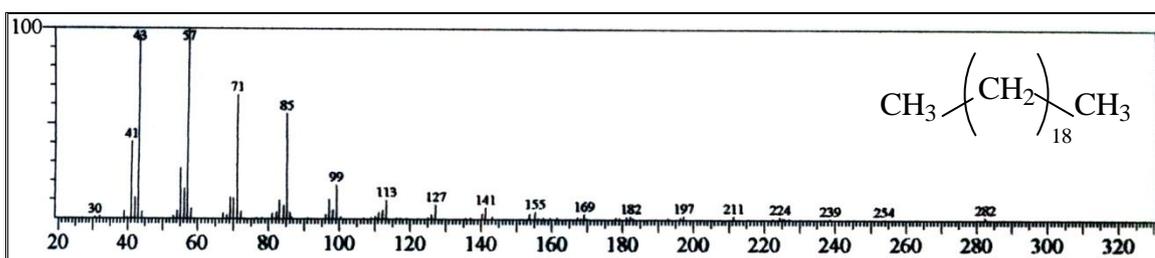


Figura 58: Espectro de massas de eicosano com m/z 282

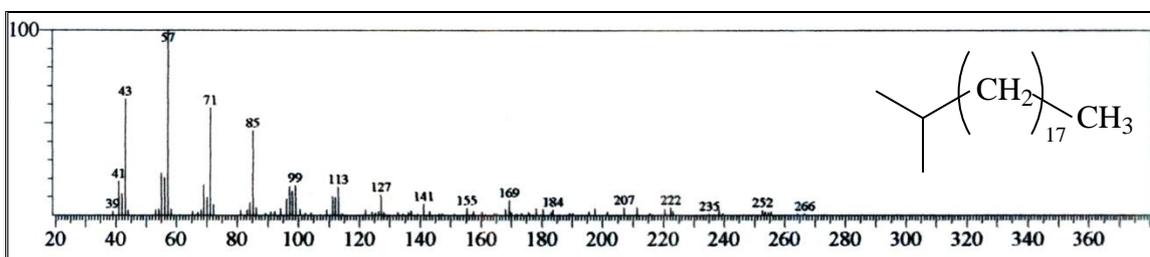


Figura 59: Espectro de massas de 2-metileicosano com m/z 296

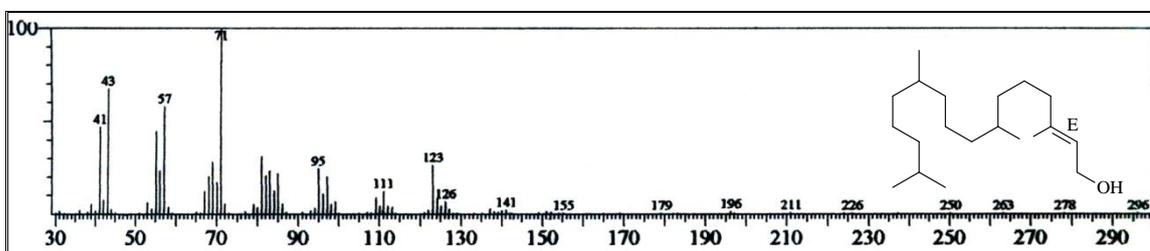


Figura 60: Espectro de massas de 3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol (fitol) com m/z 296

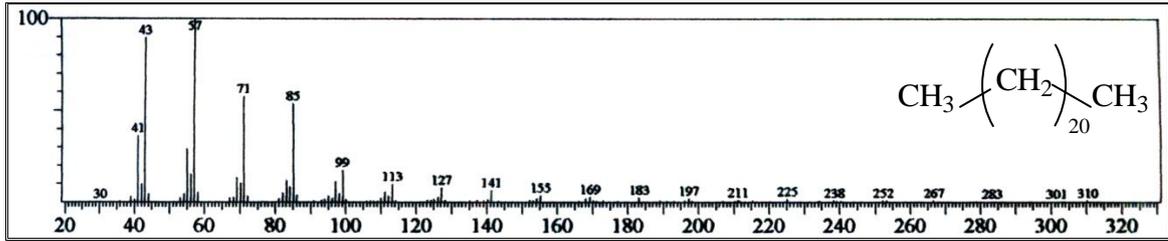


Figura 61: Espectro de massas de docosano com m/z 310

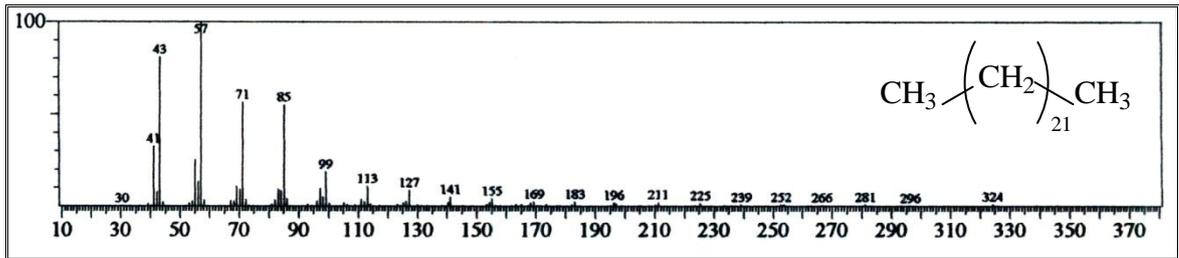


Figura 62: Espectro de massas de tricosano com m/z 324

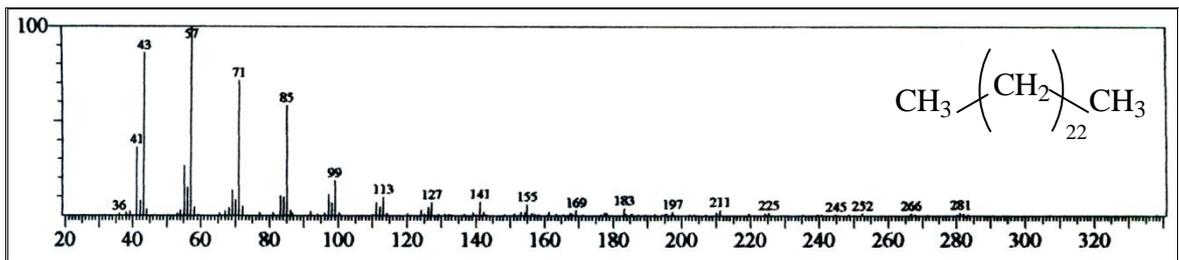


Figura 63: Espectro de massas de tetracosano com m/z 338

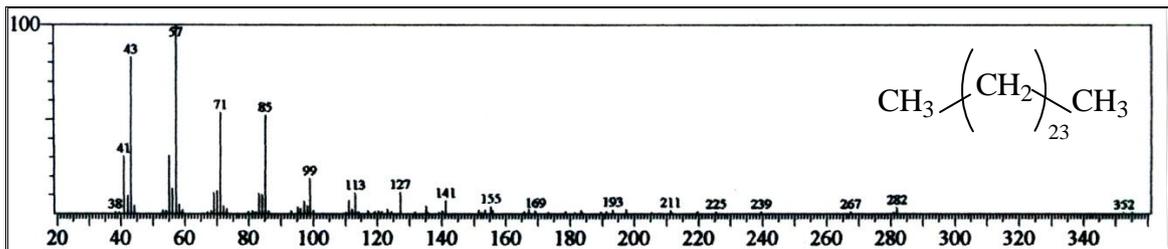


Figura 64: Espectro de massas de pentacosano com m/z 352

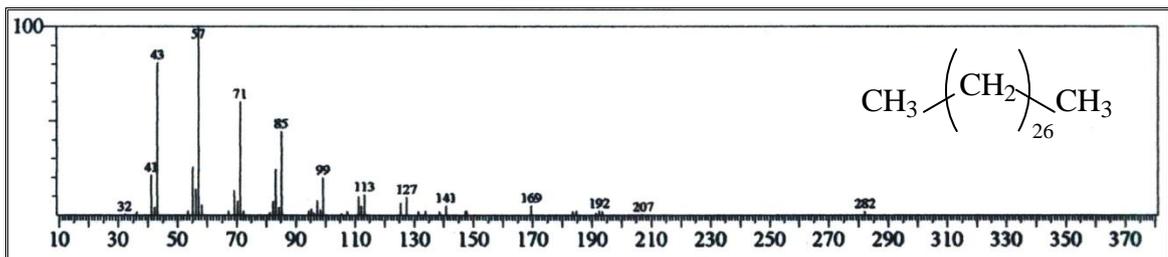


Figura 65: Espectro de massas de octacosano com m/z 394

5.4 Composição química dos óleos essenciais de *H. polyphyllum* L.

5.4.1 Hidrodestilação

A análise do cromatograma do óleo essencial de *H. polyphyllum* L. (OEHP) (Fig. 66), extraído por hidrodestilação, indica a presença de uma variedade estrutural de compostos com tempos de retenções bastante variados. Este fato também foi observado no óleo essencial de *H. indicum* extraído por este mesmo processo.

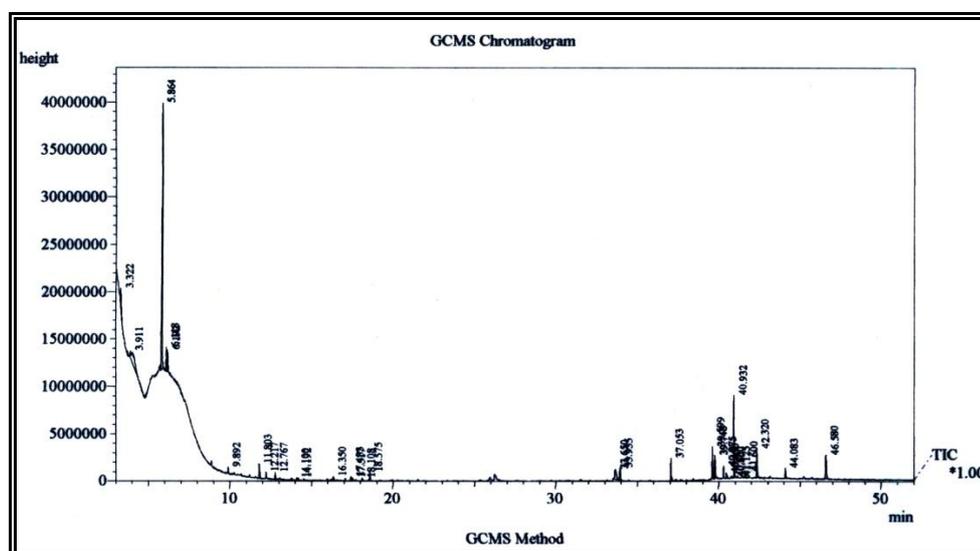


Figura 66: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *H. polyphyllum* extraído por hidrodestilação

As análises por CG-EM e CG-DIC de OEHI evidenciaram 31 picos, dos quais 18 foram identificados, num total de 87,32 % do teor do óleo.

A composição química identificada dos constituintes voláteis desse óleo (Tabela 13, p. 112) é constituída por hidrocarbonetos saturados (20,84 %), álcoois (58,01 %), aldeídos (2,30 %), ésteres (3,45%), dentre outras classes, tendo como componentes majoritários os álcoois hex-(3Z)-en-1-ol (41,16%) e pent-(2Z)-en-1-ol (8,85 %). Os espectros de massas dos constituintes identificados são mostrados nas Figuras 67-84 (p. 113-117).

Tabela 13: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de *H. polyphyllum* extraído por hidrodestilação

COMPOSTOS	I.K	IK calculado	Porcentagem (%)
3-metilbutan-1-ol	740	-	1,89
Pent-(2Z)-en-1-ol	773	775	8,85
Hex-(3Z)-en-1-ol	859	-	41,16
Hex-(2E)-en-1-ol	862	847	2,62
Metanoato de hexila	-	849	2,48
6-metil-hept-5-en-2-ona	985	-	0,65
2-feniletanal (fenilacetaldeído)	1042	-	2,30
Etanoato de benzila (acetato de benzila)	1162	-	0,58
2-(2-hidróxifenil)etanoato de metila (salicilato de metila)	1191	-	0,39
Neofitadieno [2-(4,8,12-trimetiltridecanil)but-1,3-dieno]	-	1848	2,07
Heneicosano	2100	-	2,41
Fitol (3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol)	1943	-	3,49
Docosano	2200	2202	1,05
Tricosano	2300	-	7,31
Tetracosano	2400	2410	0,69
Pentacosano	2500	2522	3,39
Octacosano	2800	-	1,41
Hentriacontano	3100	3190	4,58
TOTAL (%)			87,32

Espectros de massas dos constituintes químicos voláteis obtidos de OEHP
extraídos por hidrodestilação

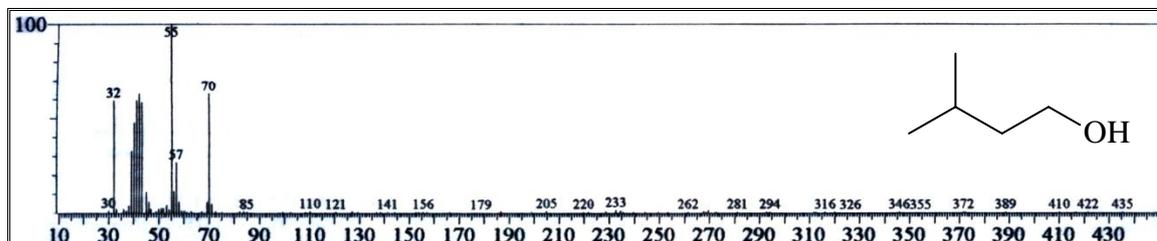


Figura 67: Espectro de massas de 3-metilbutan-1-ol com m/z 88

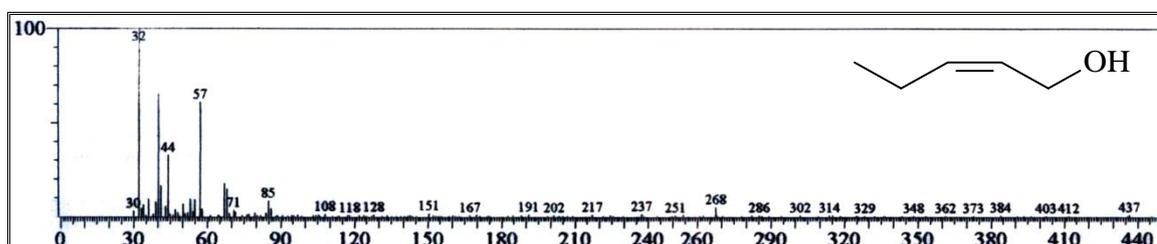


Figura 68: Espectro de massas de pent-(2Z)-en-1-ol com m/z 86

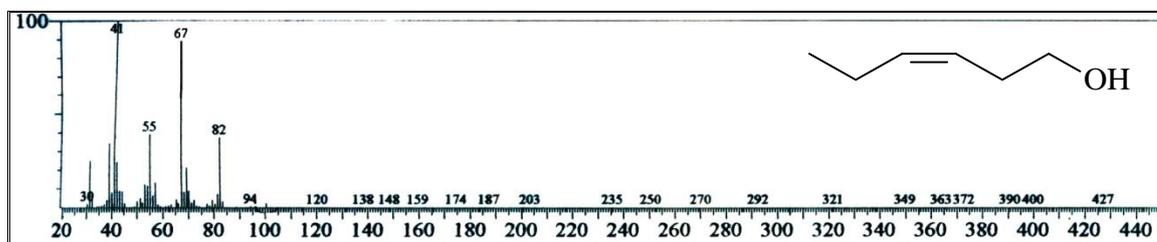


Figura 69: Espectro de massas de hex-(3Z)-en-1-ol com m/z 100

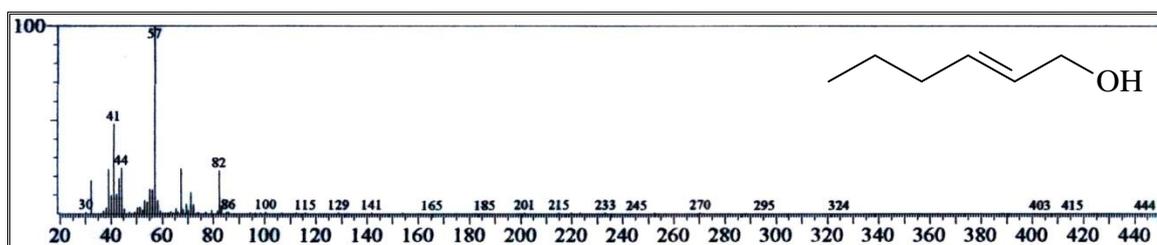


Figura 70: Espectro de massas de hex-(2E)-en-1-ol com m/z 100

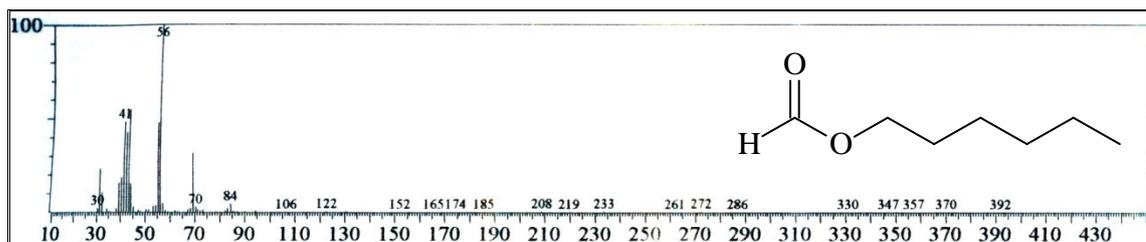


Figura 71: Espectro de massas de metanoato de hexila com m/z 130

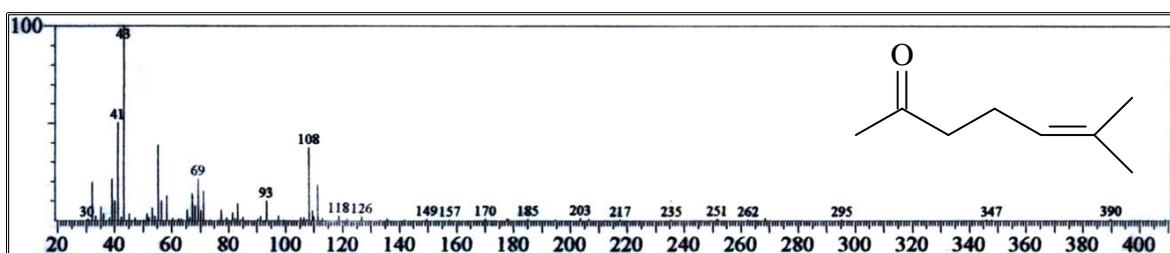


Figura 72: Espectro de massas de 6-metil-hept-5-en-2-ona com m/z 126

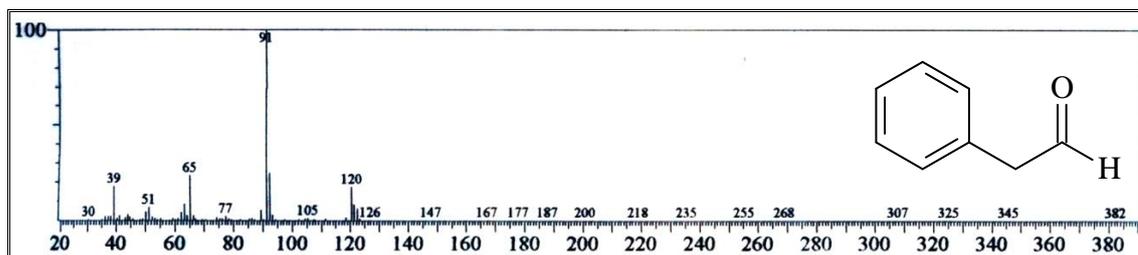


Figura 73: Espectro de massas de 2-feniletanal (fenilacetaldéido) com m/z 120

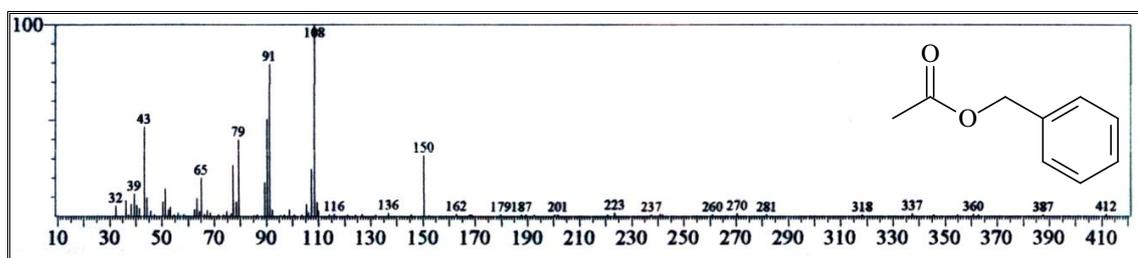


Figura 74: Espectro de massas de etanoato de benzila (acetato de benzila) com m/z 150

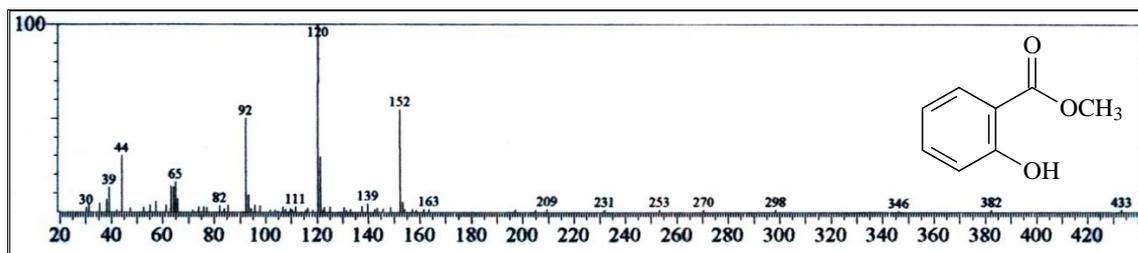


Figura 75: Espectro de massas de 2-(2-hidróxifenil)etanoato de metila (salicilato de metila) com m/z 152

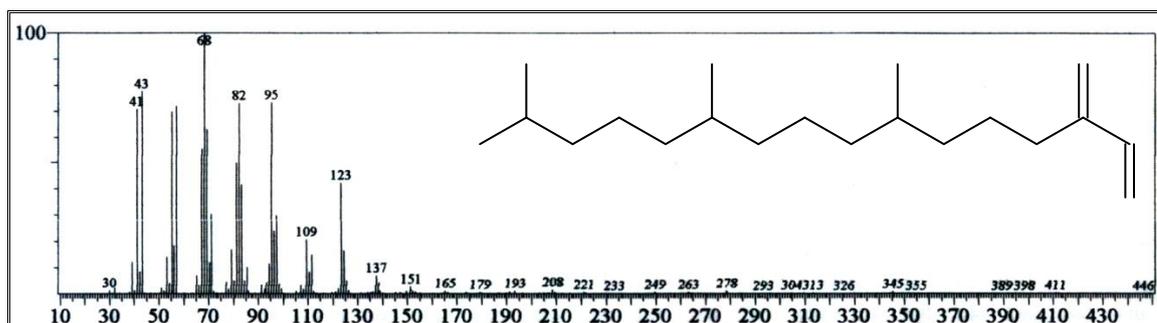


Figura 76: Espectro de massas de 2-(4,8,12-trimetiltridecanil)but-1,3-dieno (neofitadieno) com m/z 278

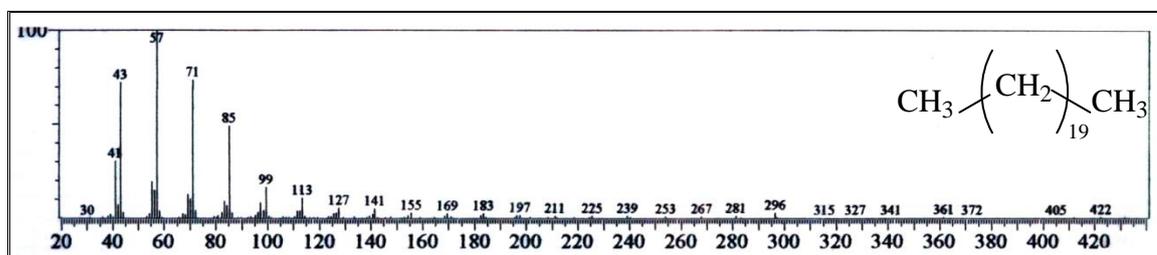


Figura 77: Espectro de massas de heneicosano com m/z 296

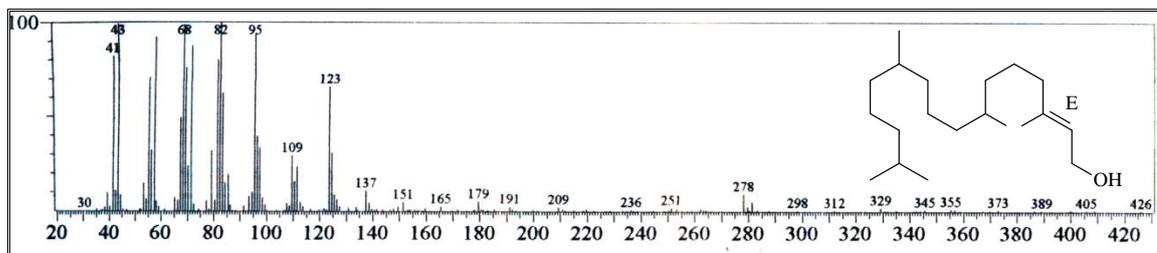


Figura 78: Espectro de massas de 3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol (fitol) com m/z 296

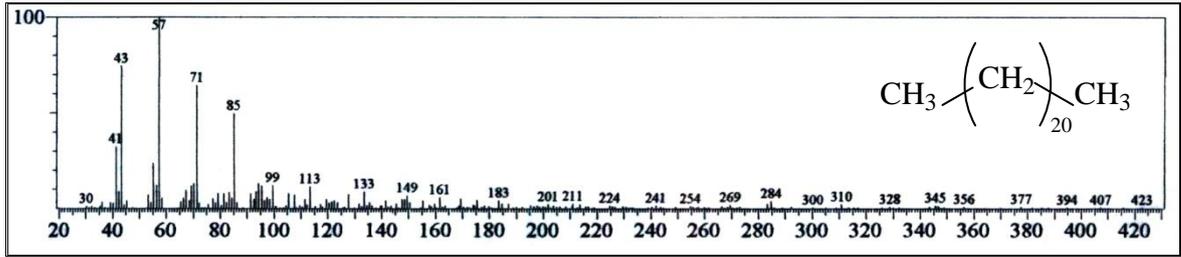


Figura 79: Espectro de massas de docosano com m/z 310

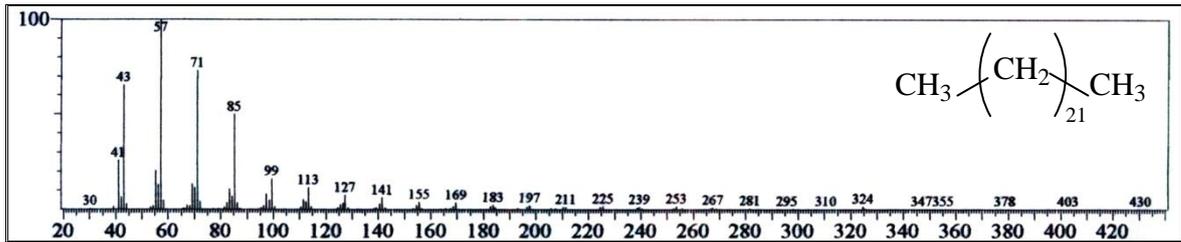


Figura 80: Espectro de massas de tricosano com m/z 324

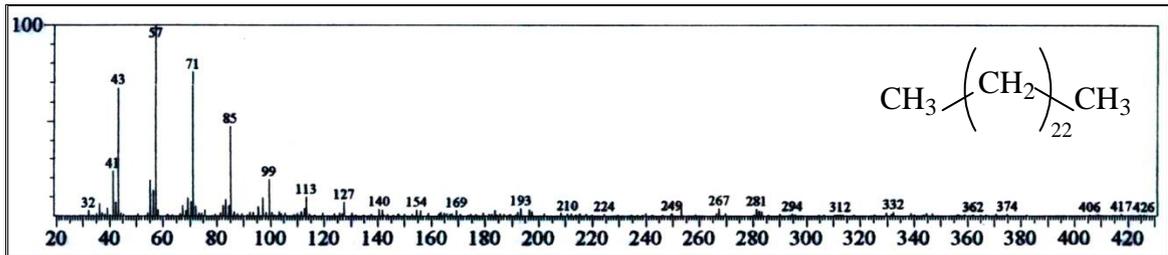


Figura 81: Espectro de massas de tetracosano com m/z 338

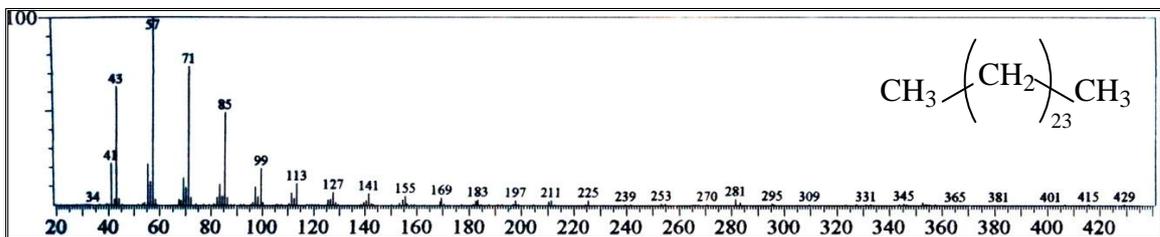


Figura 82: Espectro de massas de pentacosano com m/z 352

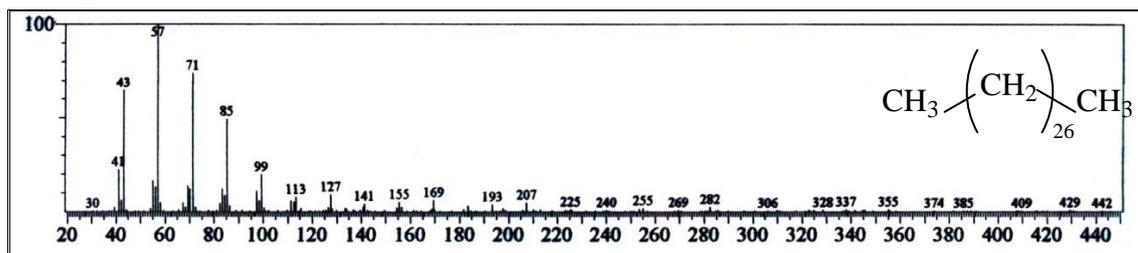


Figura 83: Espectro de massas de octacosano com m/z 394

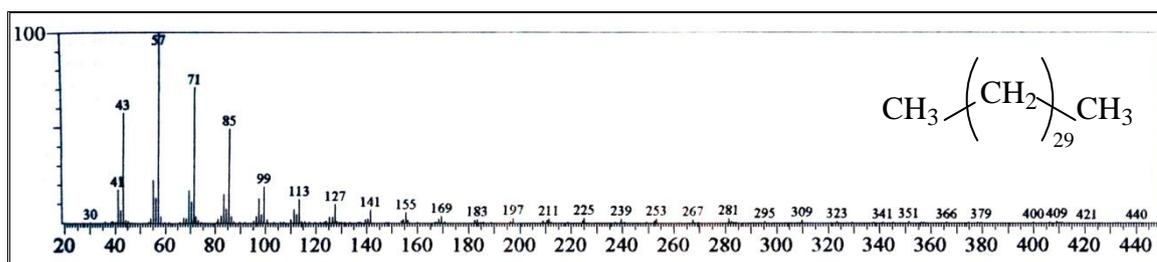


Figura 84: Espectro de massas de hentriacontano com m/z 436

5.4.2 Destilação por arraste com vapor d'água

A análise do cromatograma do óleo essencial de *H. polyphyllum* (OEHP) (Fig. 85), extraído através de destilação por arraste com vapor d'água, indica a presença de compostos com tempos de retenções compreendidos entre 17 e 47 min, ou seja, maiores que no óleo essencial extraído por hidrodestilação (Fig. 66, p. 111).

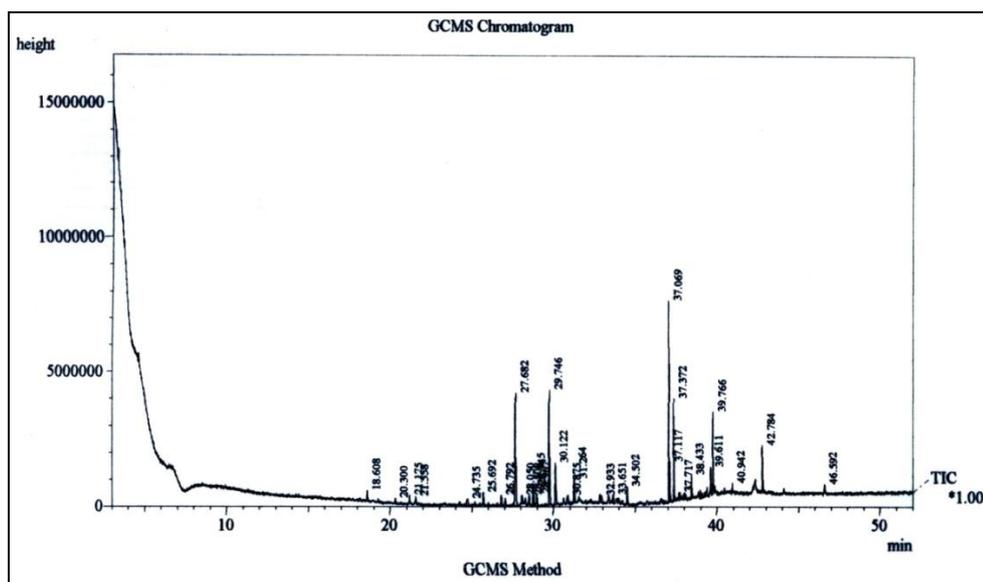


Figura 85: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *H. polyphyllum* extraído através de destilação por arraste com vapor d'água

As análises por CG-EM e CG-DIC de OEHI evidenciaram 29 picos, dos quais 19 foram identificados, num total de 74,50 % do teor do óleo.

A composição química identificada dos constituintes voláteis desse óleo (Tabela 14) é classificada como sesquiterpenos (50,81 %), hidrocarbonetos saturados (3,02 %), terpenos (1,23 %), entre outras classes.

Os componentes majoritários foram os sesquiterpenos germacreno-D (16,34) e elemol (14,54 %), além do diterpeno neofitadieno (14,16 %).

Os espectros de massas dos constituintes identificados são mostrados nas Figuras 86-104 (p. 119-123).

Tabela 14: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de *H. polyphyllum* extraído através de destilação por arraste com vapor d'água

COMPOSTOS	I.K	IK calc.	Porcent. (%)
Geranial (3,7-dimetiloct-2(E),6-dienal)	1267	-	0,56
Timol (2-isopropil-5-metil-hidróxibenzeno)	1290	1292	0,67
Tridecano	1300	1303	0,66
β -elemeno (1 α -metil-1 β -propen-3-il-2 α ,4 α -dipropen-2-ilciclo-hexano)	1390	1399	1,48
(E)- β -cariofileno {(1R,4Z,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undec-4-eno}	1419	1428	1,51
α -humuleno [(E,E,E)-2,6,6,9-tetrametilcicoundeca-1,4,8-trieno]	1454	1461	1,12
Germacreno-D [(2E,6E,5S)-8-isopropil-2-metil-8-metilenociclo-deca-1,6-dieno]	1485	-	16,34
α -zingibereno [(R,R)-5-(1,5-dimetil-hex-4-en-1-il)-2-metilciclo-hexa-1,3-dieno]	1493	1499	1,41
β -bisaboleno [5-(1-metileno-5-metil-hex-4-en-1-il)-1-metilciclo-hex-1-eno]	1505	1513	1,24
Cubebol {7-hidróxi-4 α -isopropil-1 β ,7 β -dimetil-triciclo[4.3.0.0]decano}	1515	1520	2,63
β -sesquifelandreno [6-(1,5-dimetil-hex-4-em-1-il)-3-metilenociclo-hex-1-eno]	1522	1527	2,21
Elemol [1α-etenil-4-(2-hidróxi)isopropil-1β-propen-2-ilciclohexano]	1549	-	14,54
E-nerolidol [3,7,11-trimetildodec-1,6(E),10-trien-3-ol]	1563	1562	5,27
Guaiol {2 β (2-hidróxi)isopropil-5 β -metilbicyclo[5.3.0]dec-6(10)-eno}	1600	-	2,83
Neofitadieno [2-(4,8,12-trimetiltridecanil)but-1,3-dieno]	-	1771	14,16
6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona	-	1773	2,12
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	1960	1812	1,85
Heneicosano	2100	2101	1,37
Dotriacontano	3200	3191	0,99
TOTAL (%)			74,50

Espectros de massas dos constituintes químicos voláteis obtidos de OEHP extraídos por destilação por arraste com vapor d'água

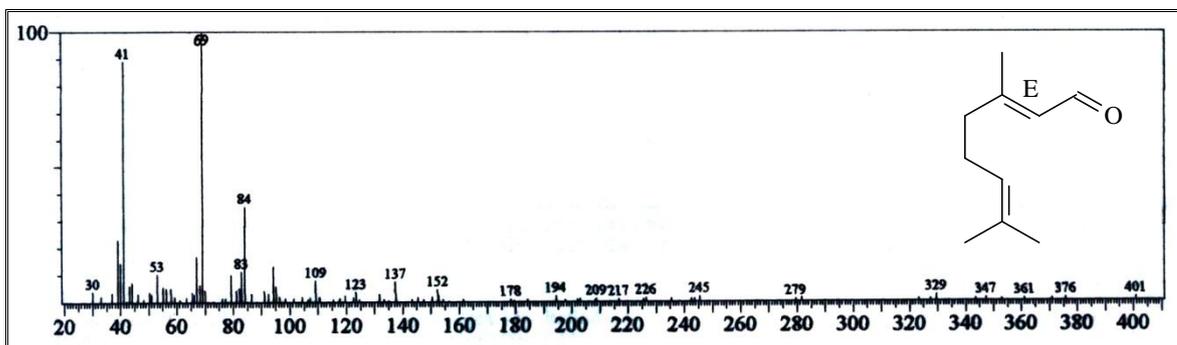


Figura 86: Espectro de massas de 3,7-dimetiloct-2(E),6-dienal (geranial) com m/z 152

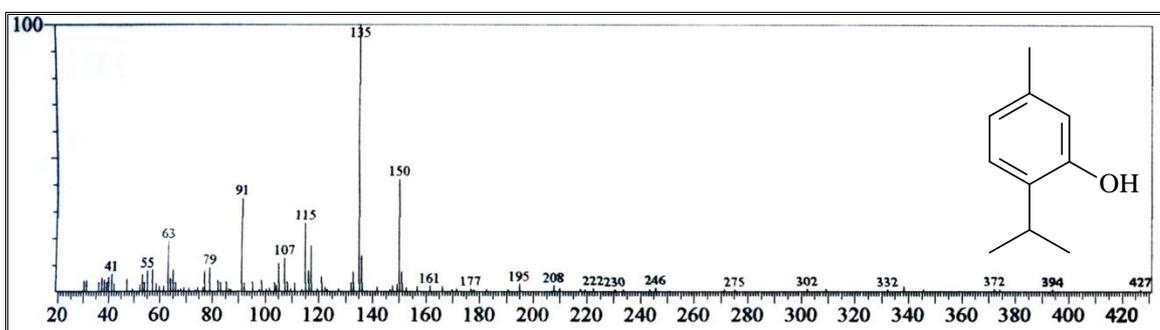


Figura 87: Espectro de massas de 2-isopropil-5-metil-hidróxibenzeno (timol) com m/z 150

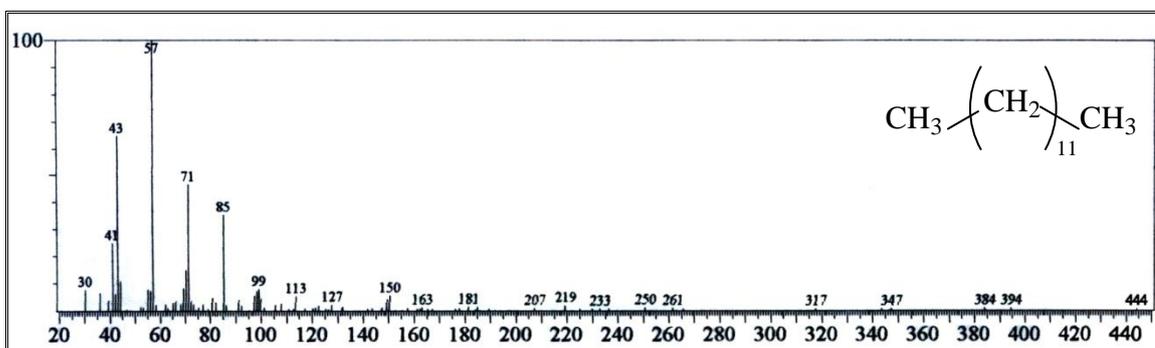


Figura 88: Espectro de massas de tridecano com m/z 184

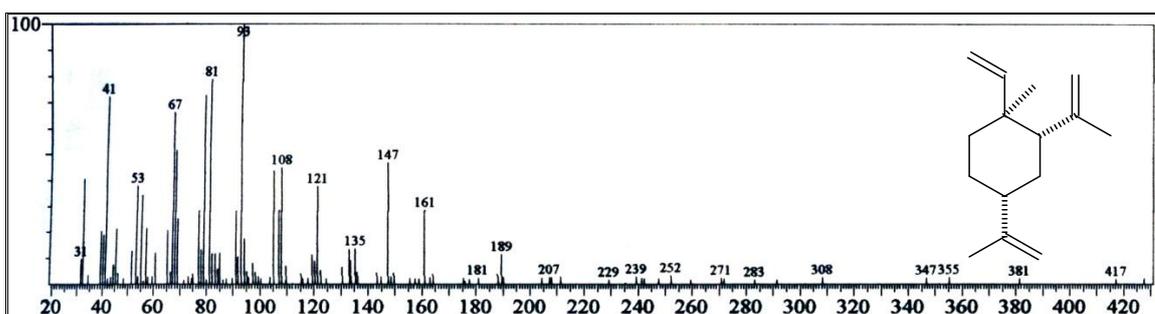


Figura 89: Espectro de massas de 1α-metil-1β-propen-3-il-2α,4α-dipropen-2-ilciclo-hexano (β-elemeno) com m/z 204

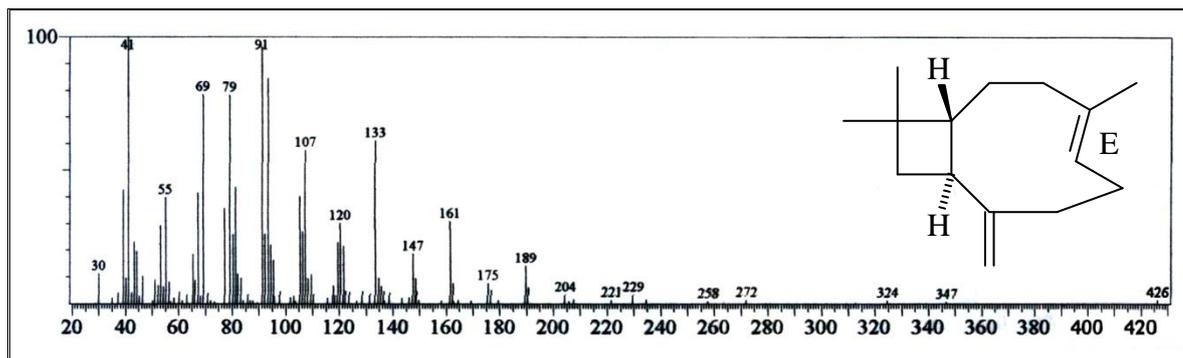


Figura 90: Espectro de massas de (1*R*,4*Z*,9*S*)-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-4-eno [(*E*)-β-cariofileno] com m/z 204

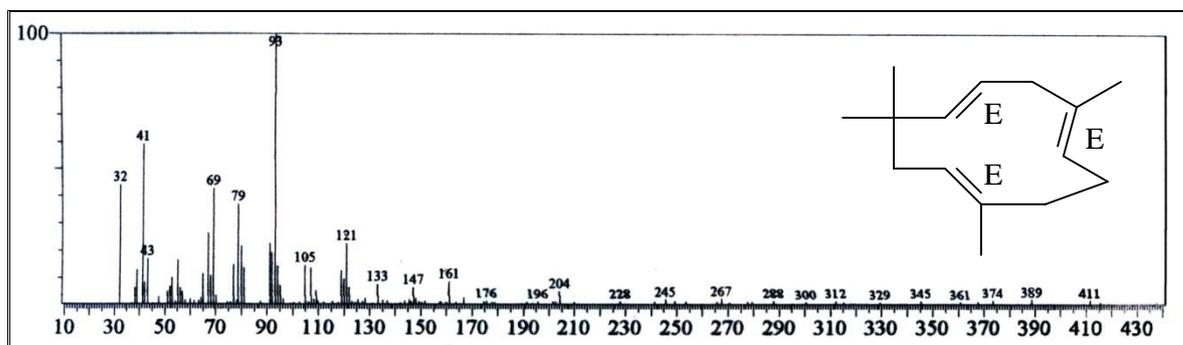


Figura 91: Espectro de massas de (*E,E,E*)-2,6,6,9-tetrametilcicloundeca-1,4,8-trieno (α -humuleno) com m/z 204

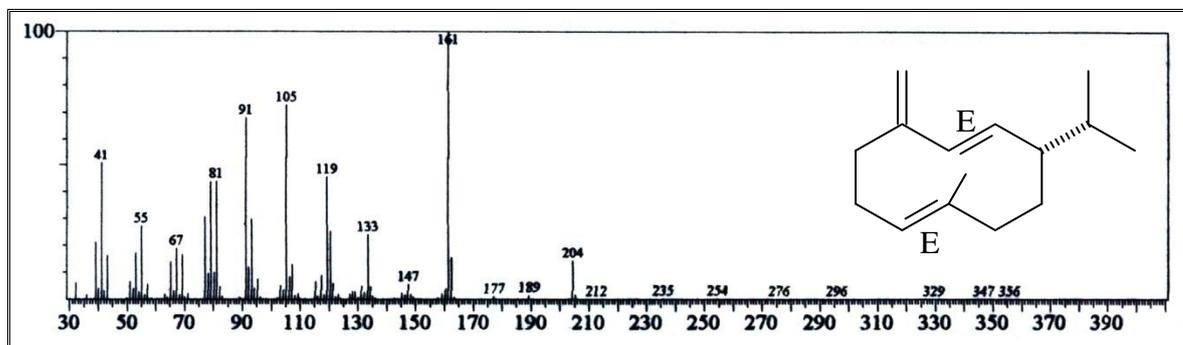


Figura 92: Espectro de massas de (2*E*,6*E*,5*S*)-8-isopropil-2-metil-8-metilenocyclodeca-1,6-dieno (germacreno-D) com m/z 204

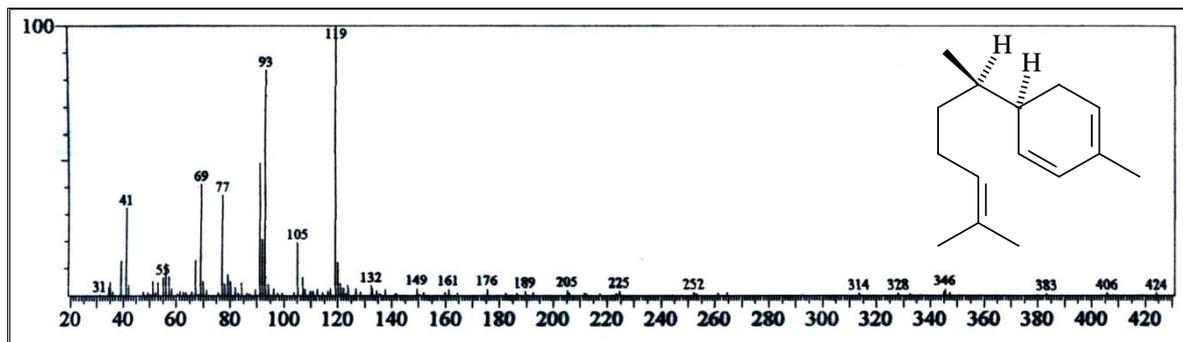


Figura 93: Espectro de massas de [*R,R*]-5-(1,5-dimetil-hex-4-en-1-il)-2-metilciclo-hexa-1,3-dieno (α -zingibereno) com m/z 204

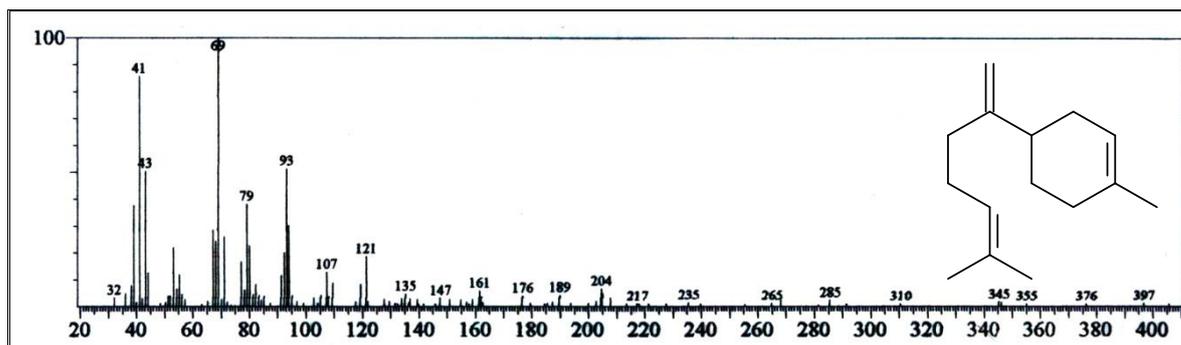


Figura 94: Espectro de massas de 5-(1-metileno-5-metil-hex-4-en-1-il)-1-metilciclo-hex-1-eno (β -bisaboleno) com m/z 204

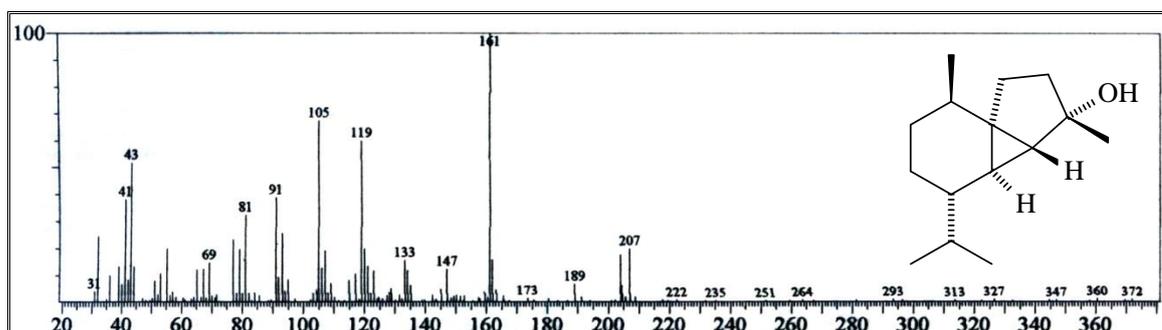


Figura 95: Espectro de massas de 7-hidróxi-4 α -isopropil-1 β ,7 β -dimetil-triciclo[4.3.0.0]decano (cubebol) com m/z 222

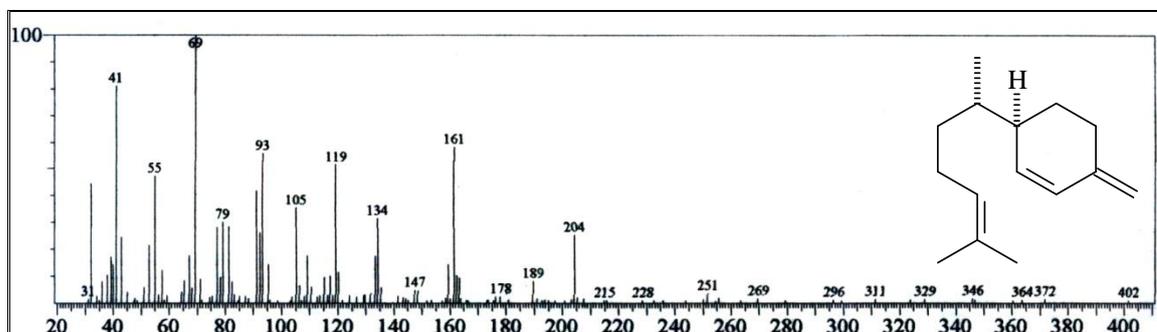


Figura 96: Espectro de massas de 6-(1,5-dimetil-hex-4-en-1-il)-3-metilenociclo-hex-1-eno (β -sesquifelandreno) com m/z 222

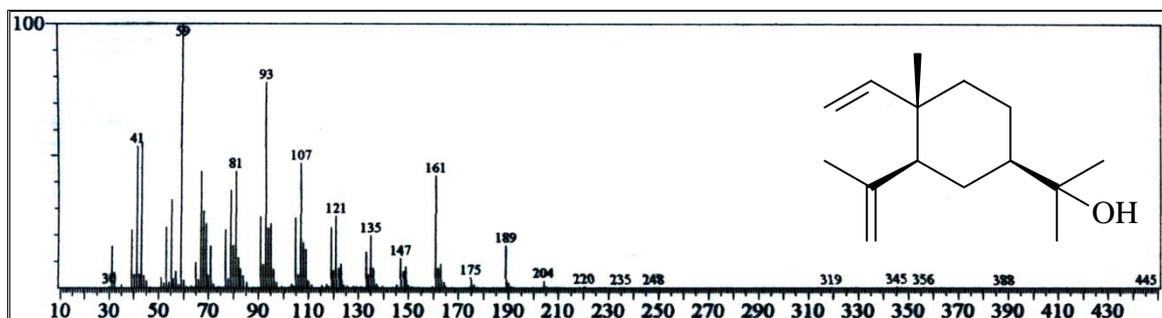


Figura 97: Espectro de massas de 1 α -etenil-4-(2-hidróxi)isopropil-1 β -propen-2-ilciclohexano (elemol) com m/z 222

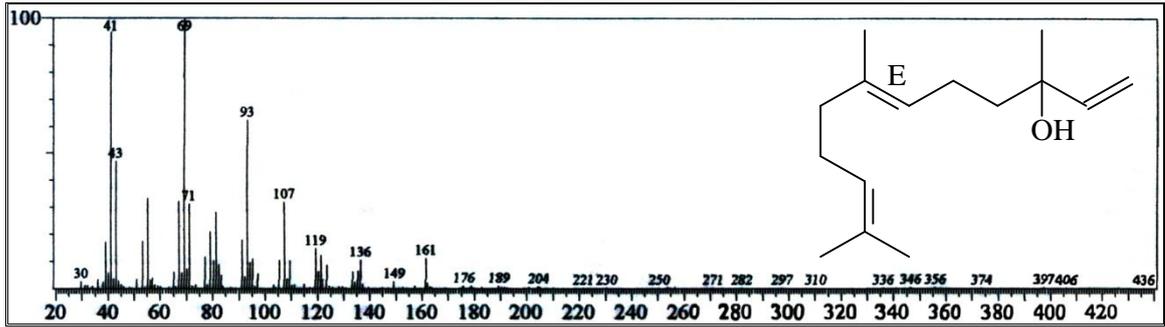


Figura 98: Espectro de massas de 3,7,11-trimetildodec-1,6(E),10-trien-3-ol [(E)-nerolidol] com m/z 222

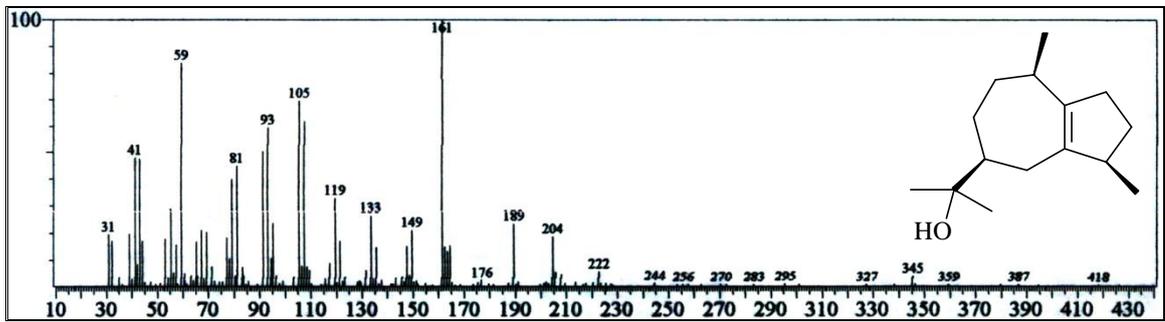


Figura 99: Espectro de massas de 2β-(2-hidroxi)isopropil-5β-metilbiciclo[5.3.0]dec-6(10)-eno guaiol com m/z 222

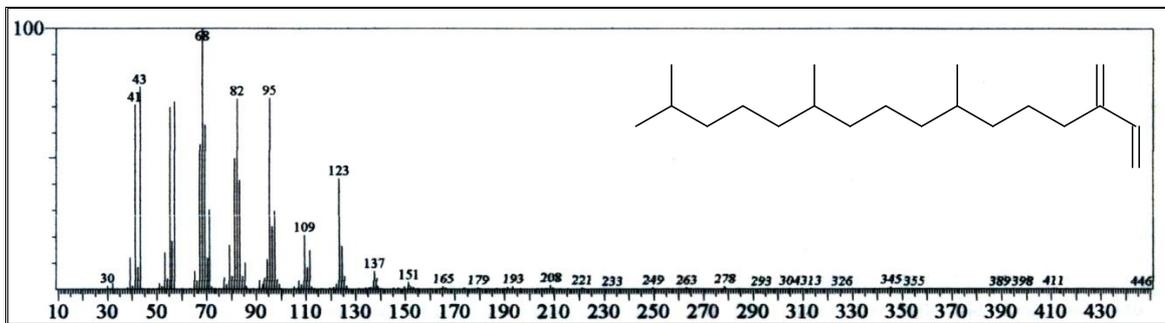


Figura 100: Espectro de massas de 2-(4,8,12-trimetiltridecanil)but-1,3-dieno (neofitadieno) com m/z 278

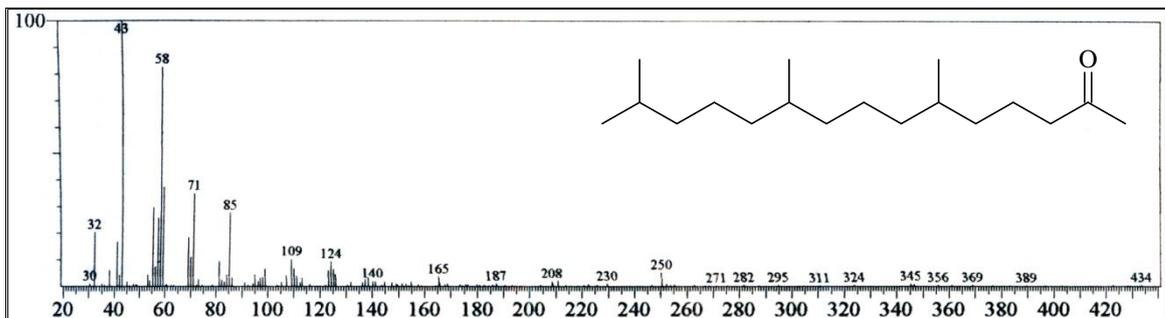


Figura 101: Espectro de massas de 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona com m/z 268

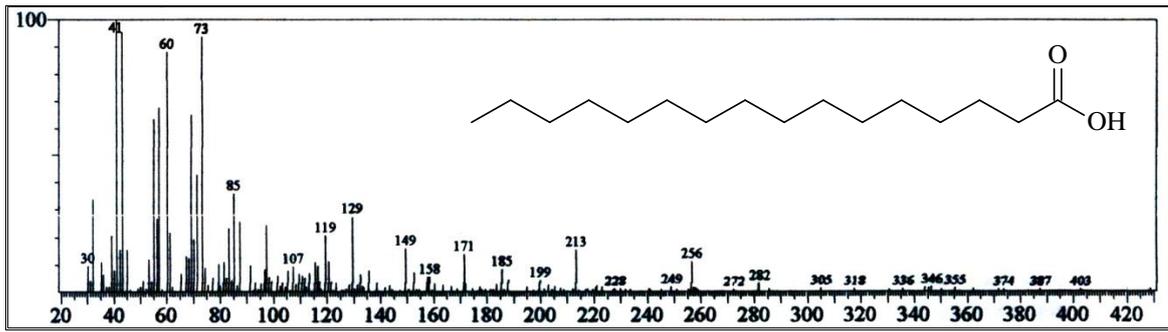


Figura 102: Espectro de massas de ácido hexadecanóico (ácido palmítico) com m/z 256

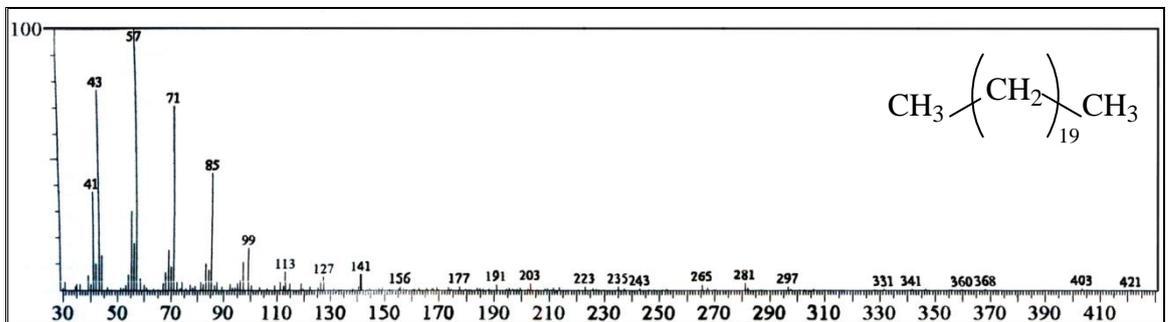


Figura 103: Espectro de massas de heneicosano com m/z 296

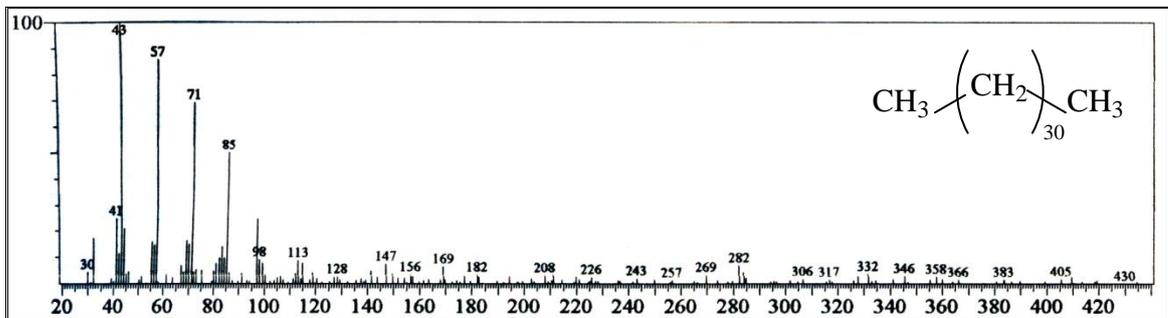


Figura 104: Espectro de massas de dotriacontano com m/z 450

5.4.3 Extração por fluido supercrítico de CO₂

Ao analisar o cromatograma do óleo essencial de *H. polyphyllum* L. (OEHP) na Figura 105, extraído por fluido supercrítico de CO₂, percebe-se a presença de compostos com tempos de retenções bastante altos.

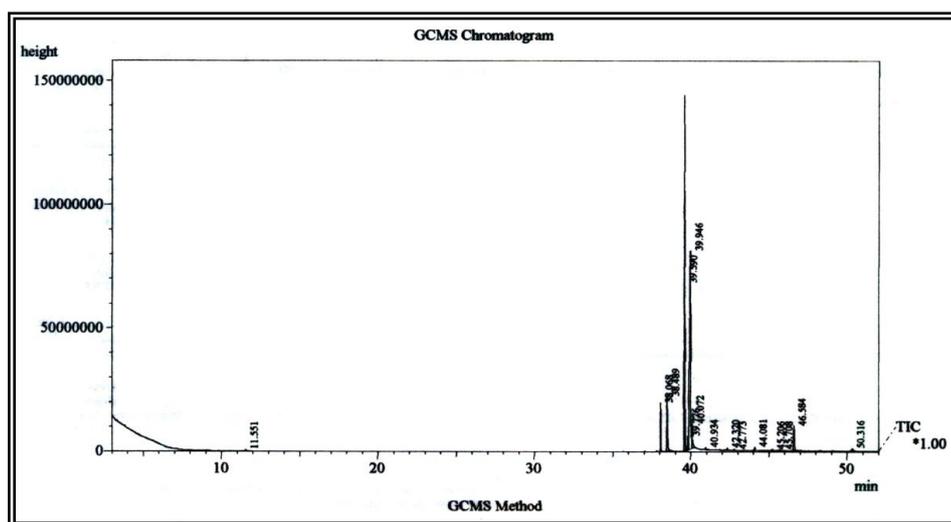


Figura 105: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *H. polyphyllum* extraído por fluido supercrítico com CO₂

Nas análises por CG-EM e CG-DIC de OEHI, observaram-se 15 picos, dos quais 13 foram identificados, num total de 99,68 % do teor do óleo.

A composição química identificada dos constituintes voláteis desse óleo (Tabela 15, p. 125), na sua maioria, é classificada como ácidos graxos (54,53 %), ésteres de ácidos graxos (39,80 %) e hidrocarbonetos lineares saturados (5,16 %).

Os componentes majoritários foram o ácido octadeca-9(Z),12(Z)-dienóico (ácido linoléico) (44,19 %) e o seu respectivo éster octadeca-9(Z),12(Z)-dienoato de metila (linoleato de metila) (35,64 %).

É válido ressaltar que, com exceção do fenilmetanol (álcool benzílico) (0,19%), em teor bastante baixo, percebe-se que os constituintes extraídos por esse processo apresentam elevadas massas molares. Os espectros de massas dos constituintes identificados são mostrados nas Figuras 106-118 (p. 126-129).

Tabela 15: Constituintes químicos identificados do óleo essencial das partes aéreas de *H. polyphyllum* extraído por fluido supercrítico de CO₂

COMPOSTOS	I.K	IK calculado	Porcentagem (%)
Fenilmetanol (Álcool benzílico)	1031		0,19
Hexadecanoato de metila (palmitato de metila)	1921		3,27
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	1960		7,14
Octadeca-9(Z),12(Z)-dienoato de metila (linoleato de metila)	2095	2033	35,64
Octadecanoato de metila (estearato de metila)	2125		0,89
Ácido octadeca-9(Z),12(Z)-dienóico (ácido linoléico)	2133	2046	44,19
Ácido octadecanóico (ácido esteárico)	-	2050	3,20
Tricosano	2300		0,17
Pentacosano	2500	2522	0,21
Octacosano	2800		0,48
Triacotano	3000	2972	0,15
Hentriacotano	3100	3190	3,66
Heptatriacotano	3700	3775	0,49
TOTAL (%)			99,68

Espectros de massas dos constituintes químicos voláteis obtidos de OEHP
extraídos por fluido supercrítico de CO₂

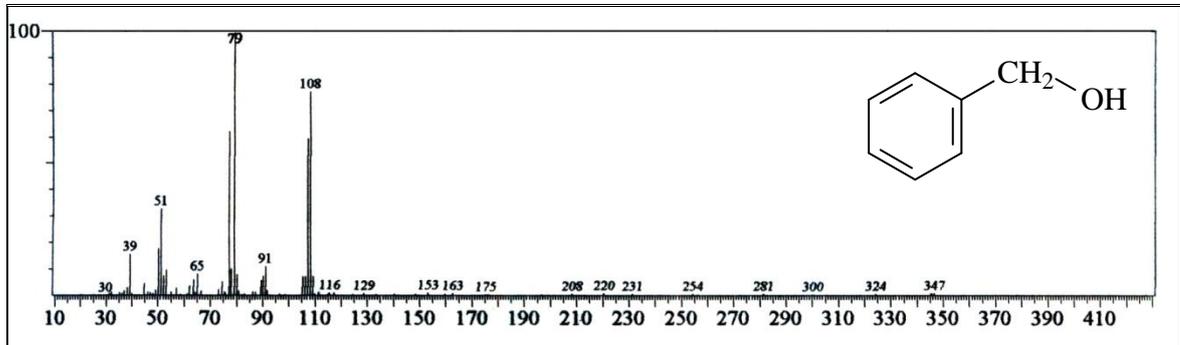


Figura 106: Espectro de massas de fenilmetanol (álcool benzílico) com m/z 108

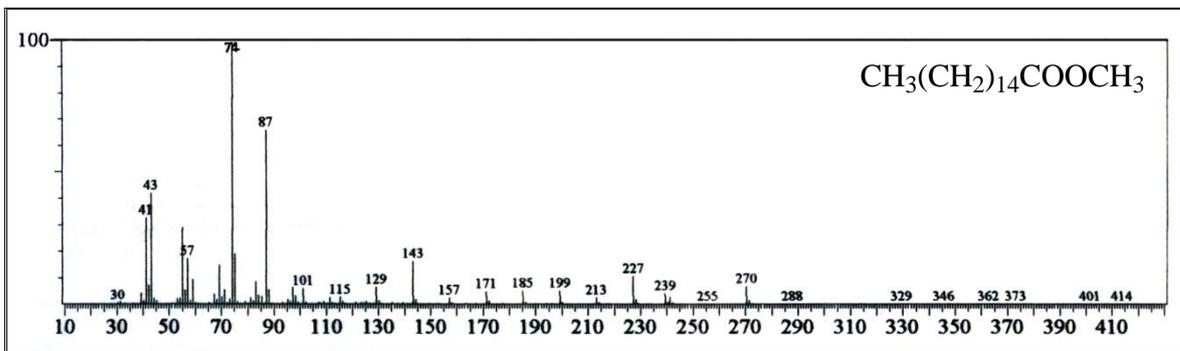


Figura 107: Espectro de massas de hexadecanoato de metila (palmitato de metila) com m/z 270

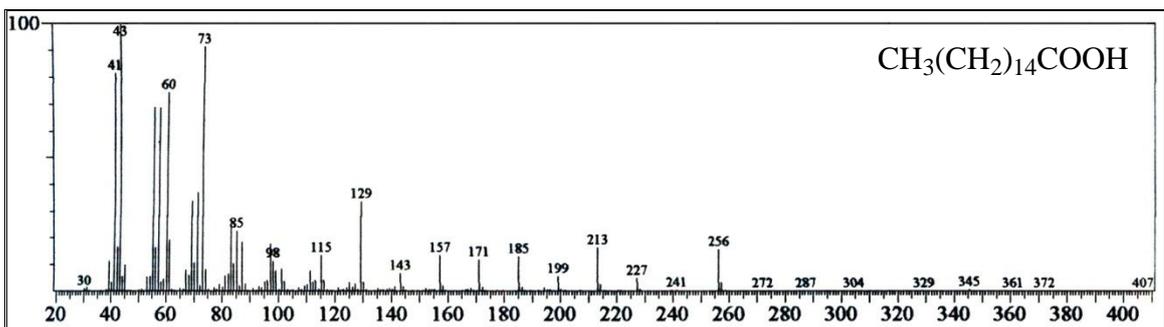


Figura 108: Espectro de massas de ácido hexadecanóico (ácido palmítico) com m/z 256

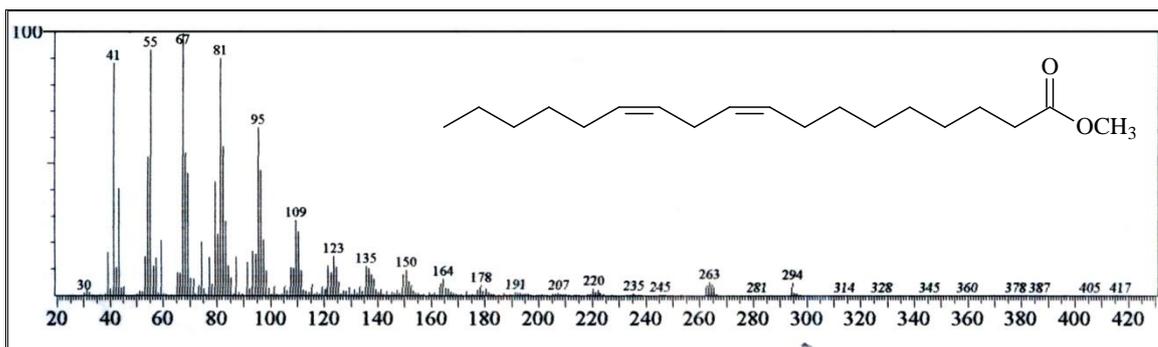


Figura 109: Espectro de massas de octadeca-9(Z),12(Z)-dienoato de metila (linoleato de metila) com m/z 294

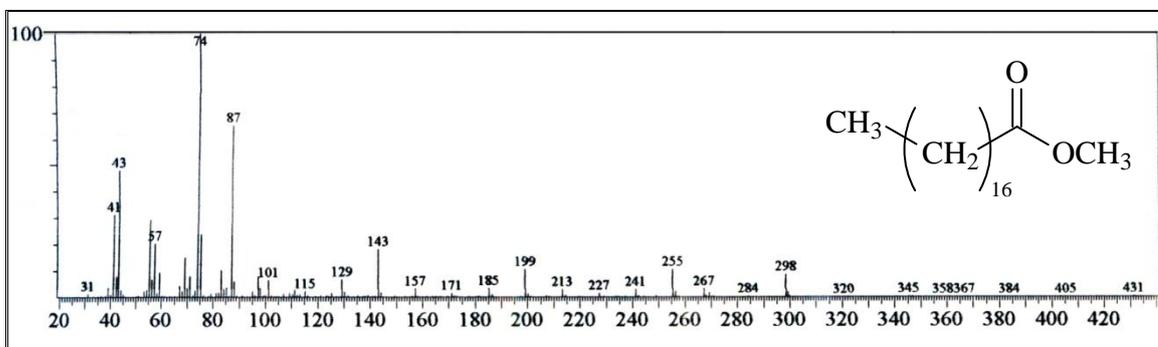


Figura 110: Espectro de massas de octadecanoato de metila (estearato de metila) com m/z 298

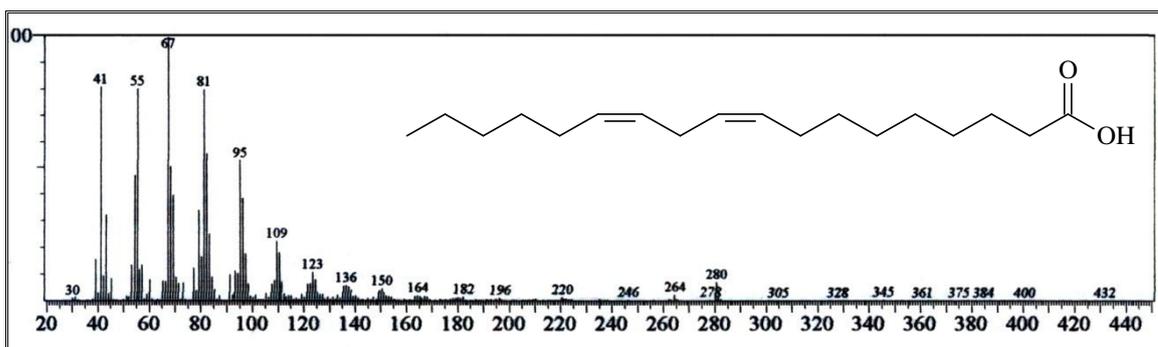


Figura 111: Espectro de massas de ácido octadeca-9(Z),12(Z)-dienóico (ácido linoléico) com m/z 280

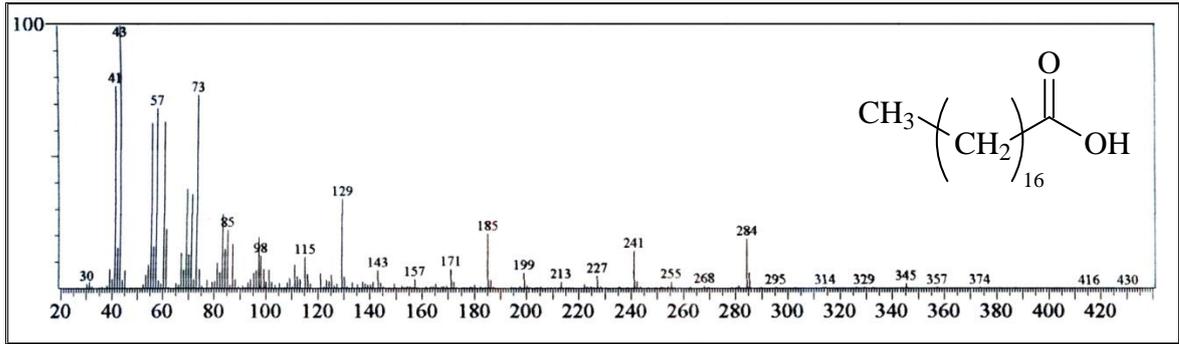


Figura 112: Espectro de massas de ácido octadecanóico (ácido esteárico) com m/z 284

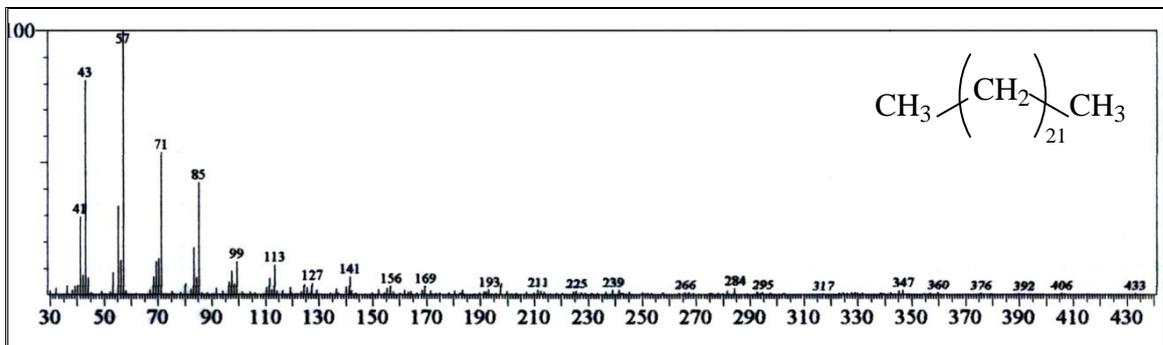


Figura 113: Espectro de massas de tricosano com m/z 324

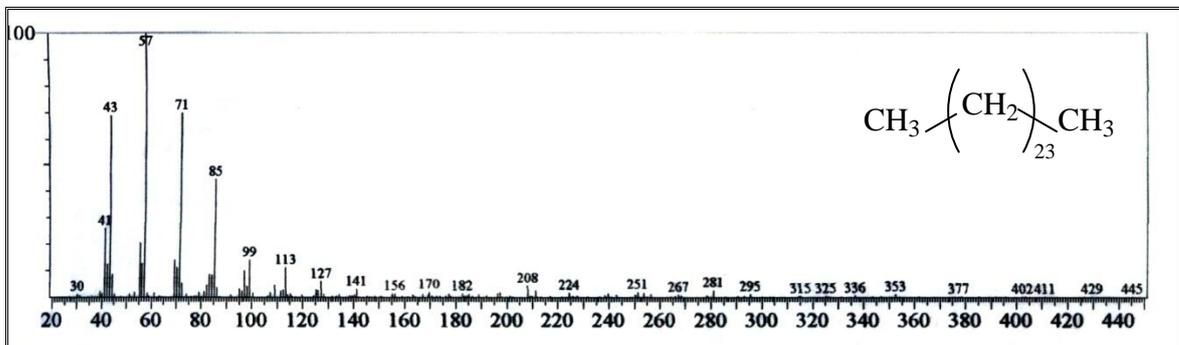


Figura 114: Espectro de massas de pentacosano com m/z 352

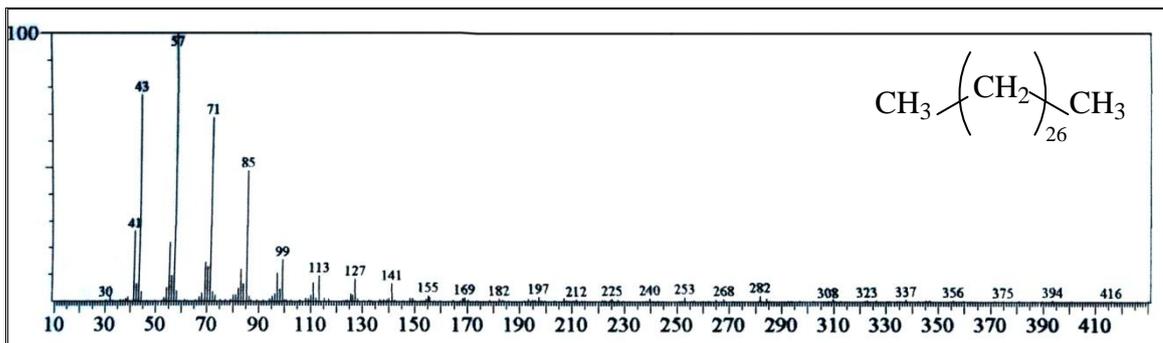


Figura 115: Espectro de massas de octacosano com m/z 394

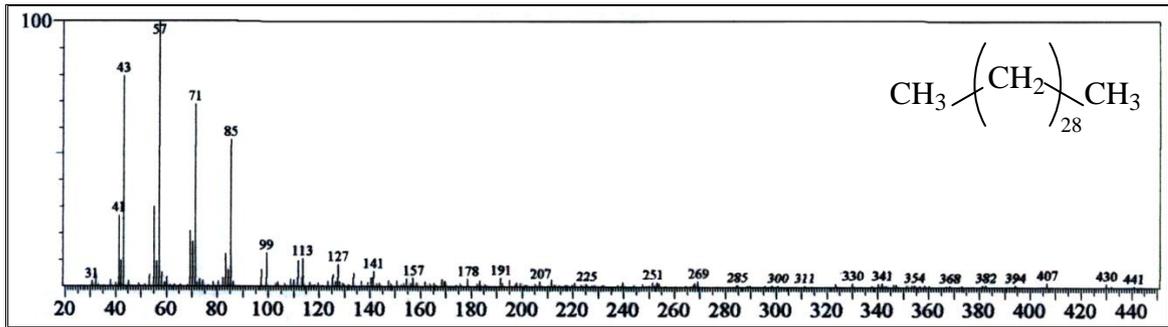


Figura 116: Espectro de massas de triacontano com m/z 422

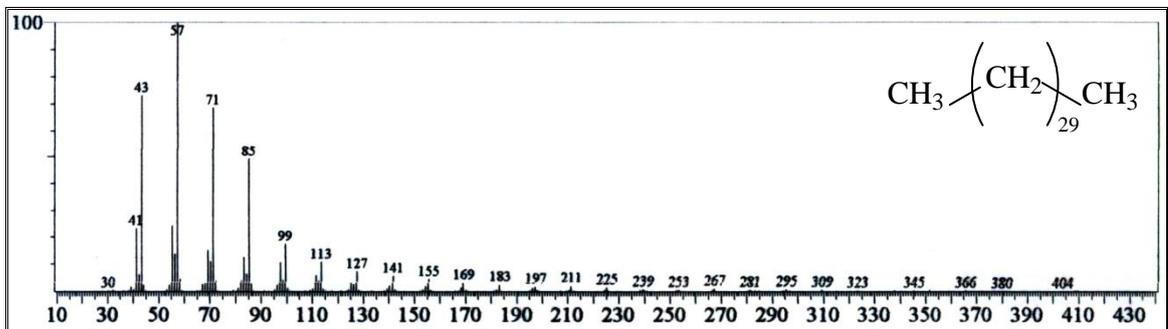


Figura 117: Espectro de massas de hentriacontano com m/z 436

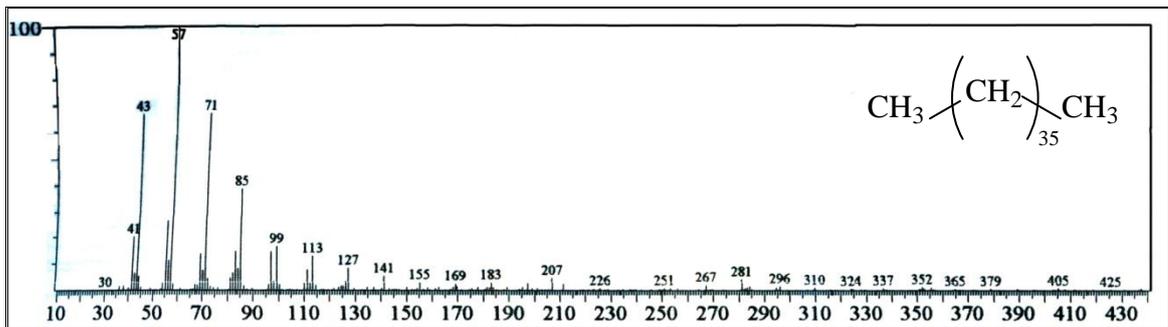


Figura 118: Espectro de massas de heptatriacontano com m/z 520.

CAPÍTULO 6

Considerações sobre *Ganoderma lucidum*

6. CONSIDERAÇÕES SOBRE *GANODERMA LUCIDUM*

6.1 Considerações taxonômicas

A espécie *Ganoderma lucidum* (Fr.) Krast é um cogumelo basidiomiceto, pertencente ao grupo dos políporos, segundo a classificação descrita por Seo e Kirk (2000), como demonstrada no quadro 2:

Quadro 2: Classificação taxonômica da espécie *Ganoderma lucidum*

REINO	<i>Fungi</i>
CLASSE	<i>Basidiomycetes</i>
ORDEM	<i>Ganodermatales*</i>
FAMÍLIA	<i>Ganodermataceae (Polyporaceae)</i>
GÊNERO	<i>Ganoderma</i>

*alguns autores denominam como *Aphyllphorales*.

Segundo Moncalvo e Ryvarden (1997), o gênero *Ganoderma* apresenta cerca de 387 espécies. O termo *Ganoderma* é de origem grega (ganos = “brilho”; derma = “pele”) e adotado principalmente em função das espécies lacadas, típicas desse gênero, por apresentarem superfície brilhosa e aspecto envernizado (RUBEL, 2006).

Os cogumelos do gênero *Ganoderma* são popularmente denominados como “Lingzhi” na China e “Mannentake” ou “Reishi” no Japão e considerados “ervas da longevidade e da boa fortuna”. No Brasil, é nomeado como “Cogumelo Rei”, “Cogumelo Brilhante”, “Cogumelo Imperador” e, principalmente, “Orelha-de-pau” (URBEN, 2004).

As características macromofológicas do basidiocarpo como as dimensões e a cor mostram diferenças significativas entre as espécies, sendo que a a maneira do estipe se ligar ao hospedeiro e ao píleo apresenta distinção. O píleo do basidiocarpo é geralmente ligado lateralmente ao estipe. As características do estipe como tipo de ligação, diâmetro e comprimento, são ferramentas importantes para diferenciação das espécies (RYVARDEN, 1991).

O desenvolvimento do basidiocarpo, segundo Urben (2004), pode levar de 3 a 6 meses, dependendo da linhagem, substrato de cultivo e fatores bióticos e abióticos. Os

hospedeiros mais usuais da espécie *G. lucidum* são troncos de árvores constituídos por madeiras duras (SEO; KIRK, 2000; LIU *et al.*, 2005), conforme demonstra Figura 119.



Figura 119: Imagens de um espécime de *G. lucidum*

Fotografia: Prof. Aluísio Marques da Fonseca

6.2 Considerações históricas e importância econômica

Os cogumelos são empregados nos países asiáticos há milênios, principalmente, na China, no Japão e na Coreia. O seu uso é reconhecido tradicionalmente como fontes de produtos nutricionais e medicinais (CHAN *et al.*, 2005; WACHTEL-GALOR *et al.*, 2004).

Apesar de causarem prejuízos, afetando a produção de borracha, chá, café, cacau, entre outras culturas, as espécies de cogumelos, descritas como complexo de *G. lucidum*, apresentam a importante função ecológica decompositora de árvores mortas, devido a sua capacidade de degradar lignina e celulose (BUCHANAN, 2001).

No ocidente, o potencial terapêutico das espécies de *G. lucidum* despertou a atenção pela comunidade científica nas últimas décadas. Esse interesse é ocasionado por dois motivos simples: o primeiro diz respeito ao uso pela população há centenas de anos, sem que haja a ocorrência aparente de efeitos colaterais. O segundo está sendo evidenciado pelos recentes resultados científicos que demonstram a ocorrência de atividades farmacológicas importantes, como: atividades antitumorais, antioxidantes e imunomoduladores; efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (CHAN *et al.*, 2005; WACHTEL-GALOR *et al.*, 2004; TOMODA *et al.*, 1986).

6.3 Composição química de *G. lucidum*

A composição química de *G. lucidum* está diretamente relacionada a condições de cultivo, tipos de linhagem e fatores ambientais. A literatura descreve que entre os diversos metabólitos existentes, os polissacarídeos e os triterpenos têm destaques nesta espécie, devido às atividades farmacológicas importantes que apresentam. Em vista disso, Rubel (2006) comenta:

[...] Mais de 100 tipos de polissacarídeos e mais de 100 tipos de triterpenos já foram isolados de *G. lucidum*. Porém, existem várias outras substâncias de baixo peso molecular presentes no corpo de frutificação e no micélio, como proteínas, monossacarídeos livres, oligossacarídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, esteróides, lipídeos, cumarina e substâncias tânicas. [...] Os carboidratos de *G. lucidum* são constituídos principalmente por glicose e manose. [...] Os lipídeos incluem principalmente ácidos graxos insaturados (>80%) e em menor quantidade ácidos graxos saturados, os quais estão localizados na membrana celular.

A composição química de *G. lucidum* influencia diretamente as pesquisas frente a seus diversos efeitos farmacológicos. Segundo Rubel (2006), a literatura descreve diversas ações farmacológicas: “diurético, hepatoprotetor, cardiotônico, normalizador da pressão sanguínea, hipoglicêmico, anticoagulante, hipocolesterolêmico, antimicrobiano, antiinflamatório, antialérgico, antitumoral, antiviral, analgésico, etc”, atribuídas aos seus metabólitos existentes nesta espécie de fungo. Atualmente, as pesquisas buscam comprovar a veracidade dessas atividades biológicas e relacioná-las aos princípios ativos presentes.

A diversidade estrutural dos polissacarídeos identificados em *G. Lucidum* é bastante importante para promover a sua atividade imunomoduladora e antitumoral. Várias pesquisas têm atribuído os seus efeitos farmacológicos como inibição da agregação plaquetária, atividade antialérgica, antiandrogênica, anti-hipertensiva, antiviral e antitumoral aos triterpenos presentes. Outras pesquisas sugerem que princípios ativos presentes, como os triterpenos, agem diretamente sobre a sinalização celular, interrompendo o ciclo celular, promovendo a diferenciação ou a apoptose. (RUBEL, 2006).

Dentre as proteínas purificadas a partir de *G. lucidum*, algumas merecem destaque. A primeira, denominada de Ling Zhi-8 (LZ-8), é uma proteína que se acredita possuir efeitos mitogênico e imunossupressor. A literatura descreve ser um homodímero com dois polipeptídeos de 110 aminoácidos, peso molecular entre 13 a 17 kDa, contendo menos que 2% de carboidrato e apresentando estruturas primária e secundária similares às encontradas nas cadeias pesadas de imunoglobulinas. Devido a isso, pesquisadores sugeriram que LZ-8 possa ser um ancestral protéico das imunoglobulinas. (RUBEL, 2006).

A segunda classe de proteínas importante trata-se das lectinas, presente nos seres, incluindo bactérias, vírus e fungos. Certos cogumelos sintetizam lectinas com atividades imunomoduladoras, antitumorais e citotóxicas. A literatura relatou lectina extraída de micélio e corpo de frutificação de *G. lucidum*. As duas lectinas diferiram da proteína LZ-8, apresentando peso molecular distinto e diferentes atividades de ligação a açúcares. Dentre as atividades biológicas diretamente relacionadas às lectinas nos cogumelos, ao comparar nos vegetais, sugerem-se sendo como material de reserva, com potencial função de defesa contra insetos e fungos. Lectinas contendo manose e N-acetilglucosamina agem nos estágios primários da fagocitose. Além disso, as lectinas estão envolvidas na migração de linfócitos da circulação para os órgãos linfóides. (RUBEL, 2006).

Rubel (2006) relatou ainda a presença de outra classe de biomoléculas importantes caracterizada como proteínas, as citocinas. Moléculas protéicas solúveis que apresentam uma

diversidade de ações biológicas, como efeito sobre o crescimento, a mortalidade, a diferenciação e a função celular.

CAPÍTULO 7

Levantamento bibliográfico sobre
Ganoderma lucidum

7. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE *Ganoderma lucidum*

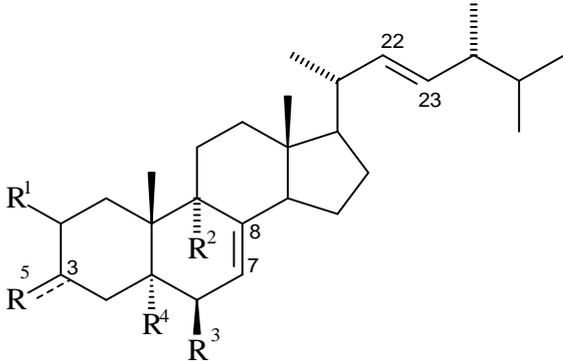
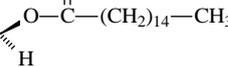
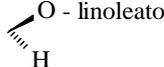
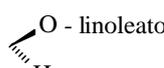
A prospecção química de cogumelos da espécie *G. lucidum* tem sido intensificada nos últimos anos. Esses estudos visam principalmente à obtenção de metabólitos biologicamente ativos que possam justificar o seu amplo uso popular.

O isolamento de substâncias de natureza esteroideal a partir de um espécime de *G. lucidum* justificou a necessidade da obtenção de dados acerca desta classe de produtos naturais, para uma melhor identificação estrutural das mesmas. Dessa forma, realizou-se um amplo levantamento bibliográfico nos *Science Finder*, *Web of Science* e *Scencedirect* sobre a ocorrência de esteróides nesta espécie, além da obtenção de artigos que continham dados de RMN¹H e ¹³C.

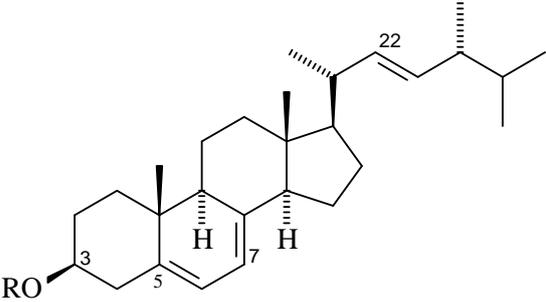
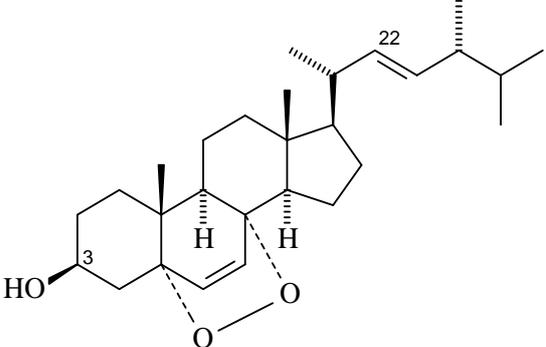
Foram encontrados 72 esteróides no levantamento bibliográfico isolados na espécie *Ganoderma lucidum*, disponíveis no Quadro 3 (p. 138-148), onde constam estruturas, nomes e referências bibliográficas.

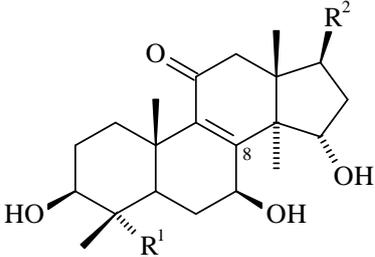
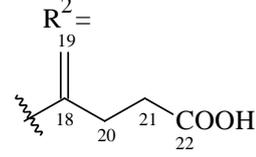
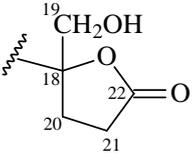
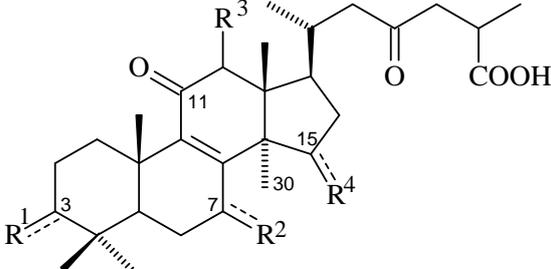
Percebe-se que a maioria dos esteróides isolados pertence à classe do ergostano ou lanostano.

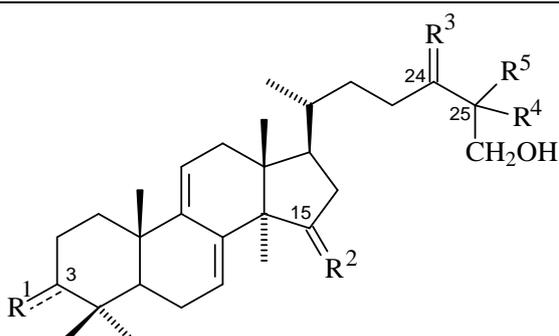
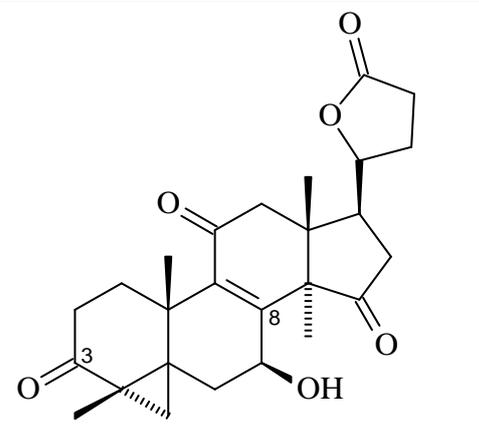
Quadro 3: Esteróides isolados de *Ganoderma lucidum*

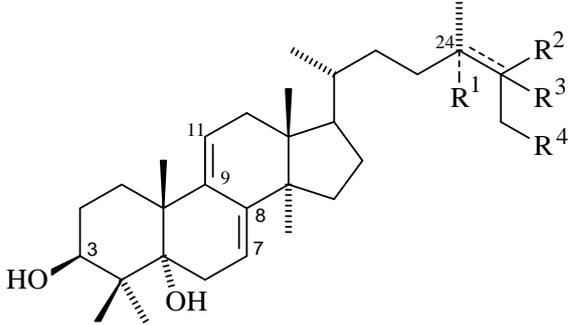
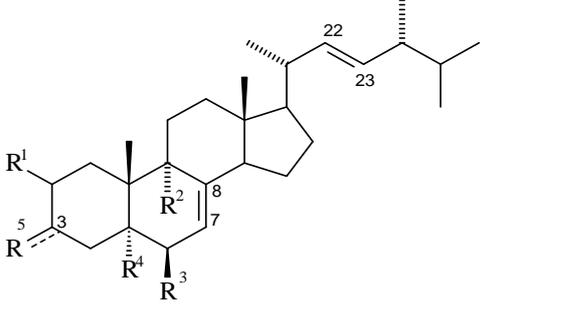
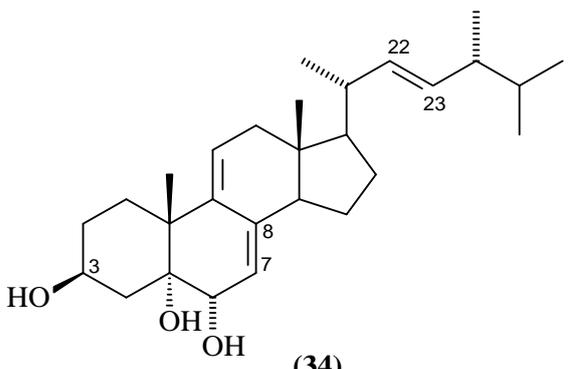
Estrutura	Nome	Referência
 <p> $R^1=$ $R^2=$ $R^3=$ $R^4=$ $R^5=$ (1) H H H H  (2) H H H H  (3) H H H H O (4) OH OH H H  (5) H H H H  (6) H H H H  (7) H H OH OH  (8) H H OCH₃ OH OH </p>	<p> Ergosta-7,22-dien-3β-ol. Palmitato de ergosta-7,22-dien-3β-ila. Ergosta-7,22-dien-3-ona. Ergosta-7,22-dien-2β,3α,9α-triol. Linoleato de ergosta-7,22-dien-3β-ila. Pentadecanoato de ergosta-7,22-dien-3β-ila. Cerevisterol. 3β,5α-di-hidróxi-6β-metóxi-ergosta-7,22-dieno. </p>	<p> LIN <i>et al.</i>, 2008. ZIEGENBEIN; HANSEN; KONIG, 2006. SAKAGUCHI <i>et al.</i>, 1999. HATTORI <i>et al.</i>, 1998. WON; LIN; TOME, 1991. WON; LIN; TOME, 1990. YOKOKAWA <i>et al.</i>, 1987. </p>

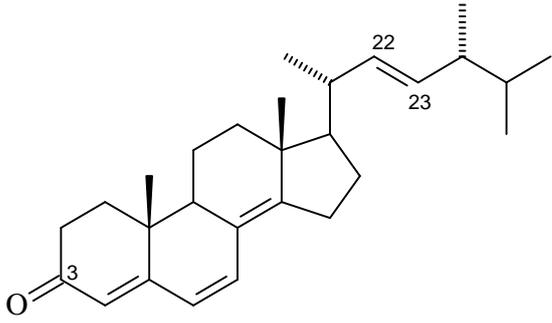
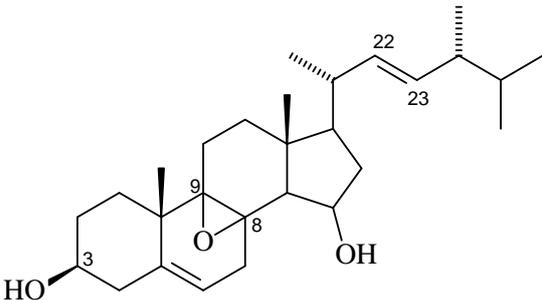
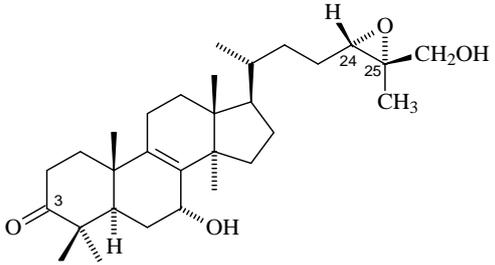
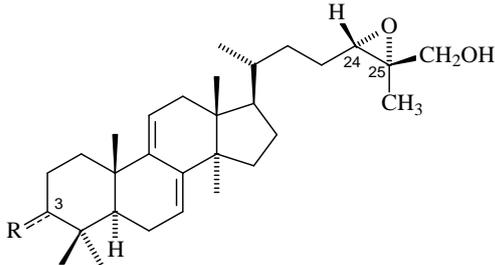
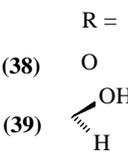
<p>(10) R = H (11) R = O-linoleato</p>	<p>5α,8α-epidioxi-ergosta-6,22-dien-3β-ol. Linoleato de 5α,8α-epidioxi-ergosta-6,22-dien-3β-ila.</p>	<p>LIN <i>et al.</i>, 2008.</p>
<p>(12) R = O, R' = CHO (13) R = OH, R' = CH₂OH</p>	<p>Ganoderal A. Ganoderal B.</p>	<p>WON; LIN; TOME, 1990.</p>
<p>(14)</p>	<p>Genoderal A.</p>	

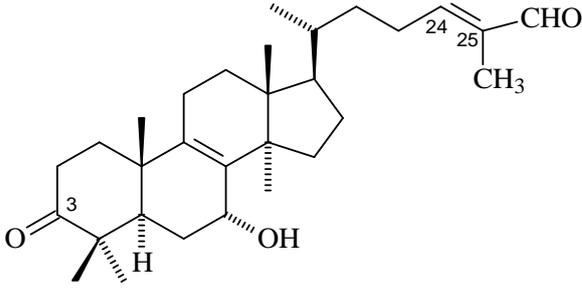
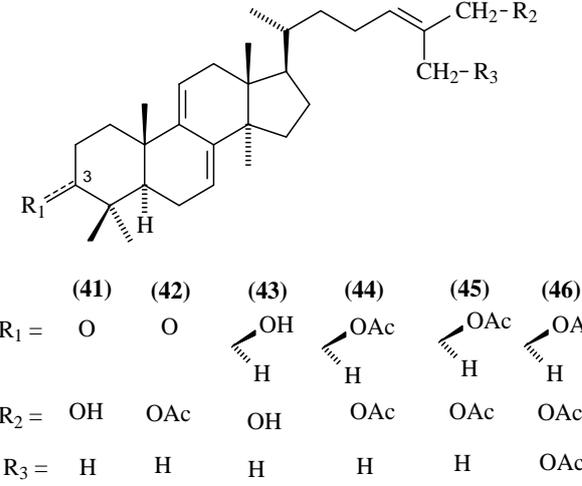
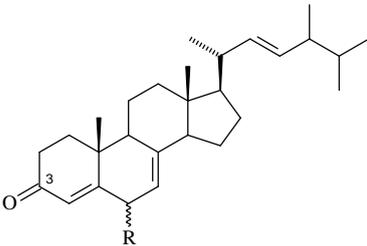
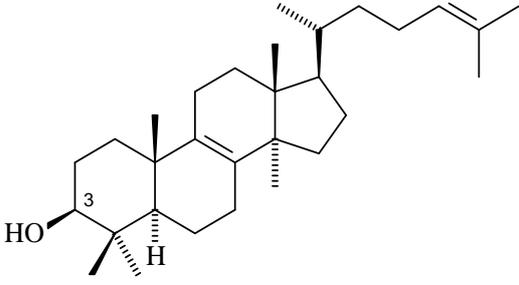
 <p style="text-align: center;">R =</p> <p>(14) H</p> <p>(15) $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-C(=O)-}$</p>  <p style="text-align: center;">(16)</p>	<p>Ergosterol.</p> <p>Palmitato de ergostila.</p> <p>Peróxido de ergosterol.</p>	<p>HATA <i>et al.</i>, 2001.</p> <p>HATTORI <i>et al.</i>, 1998.</p> <p>NGUYEN, 1995.</p> <p>CHEN; WANG; YU, 1991.</p> <p>WON; LIN; TOME, 1990.</p> <p>YOKOKAWA <i>et al.</i>, 1987.</p> <p>KAC <i>et al.</i>, 1984.</p>
--	--	--

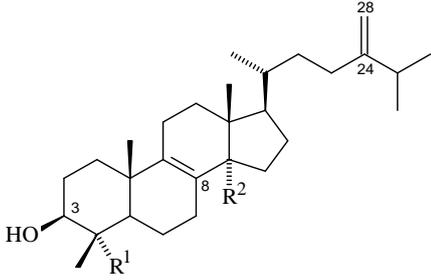
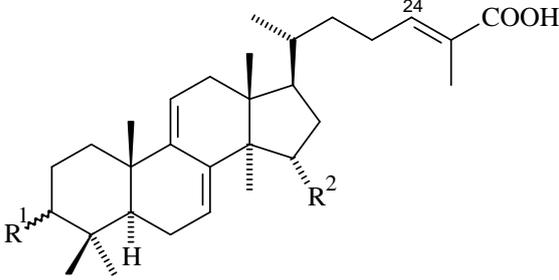
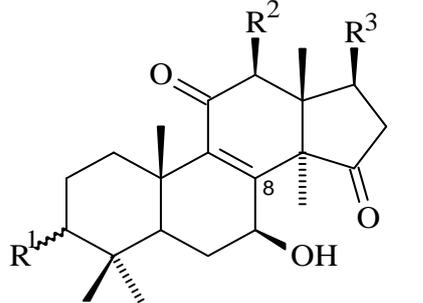
 <p>(17) $R^1 = \text{CH}_2\text{OH}$</p> <p>(18) $R^1 = \text{CH}_3$</p> <p>$R^2 =$ </p> <p></p>	<p>Ácido lucidênico O.</p> <p>Lucidênico lactona.</p>	<p>SAKAGUCHI <i>et al.</i>, 1999.</p>
 <p>(19) $R^1 = \text{OH}$ $R^2 = \text{O}$ $R^3 = \text{OAc}$ $R^4 = \text{OH}$</p> <p>(20) $R^1 = \text{O}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{H}_2$ $R^4 = \text{OH}$</p> <p>(21) $R^1 = \text{OH}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{H}_2$ $R^4 = \text{O}$</p> <p>(22) $R^1 = \text{O}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{H}_2$ $R^4 = \text{O}$</p> <p>(23) $R^1 = \text{OH}$ $R^2 = \text{O}$ $R^3 = \text{OAc}$ $R^4 = \text{O}$</p>	<p>Ácido ganodérico α.</p> <p>Ácido ganodérico A.</p> <p>Ácido ganodérico B.</p> <p>Ácido ganodérico C1.</p> <p>Ácido ganodérico H.</p>	<p>HATTORI <i>et al.</i>, 1998.</p>

 <p>(24) $R^1 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$ $R^2 = \text{H}_2$ $R^3 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$ $R^4 = \text{OH}$ $R^5 = \text{CH}_3$</p> <p>(25) O $\begin{matrix} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$ $\triangle^{24(25)}$ $-$ CH_2OH</p> <p>(26) O H_2 $\triangle^{24(25)}$ $-$ CH_2OH</p> <p>(27) O H_2 $\begin{matrix} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$ OH CH_3</p>	<p>Ganoderiol A.</p> <p>Ganoderiol B.</p> <p>Ganoderiol F.</p> <p>Ganodermanontriol.</p>	<p>HATTORI <i>et al.</i>, 1998.</p>
 <p>(28)</p>	<p>7β-hidróxi-3,11,15-trioxolanost-8(9)-eno-24,20-lactona.</p>	<p>CAI <i>et al.</i>, 1996.</p>

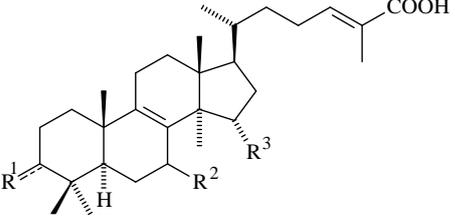
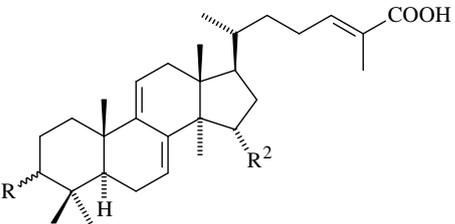
 <p> $R^1 =$ $R^2 =$ $R^3 =$ $R^4 =$ (29) OH H OH OH (30) - $H \triangle^{24(25)}$ - OH (31) - $H \triangle^{24(25)}$ - OH </p>	<p>CAI <i>et al.</i>, 1996.</p> <p>5α-lanosta-7,9(11)-dieno-3β,24,25,26-tetrol.</p> <p>5α-lanosta-7,9(11),24-trieno-3β,26-diol.</p> <p>5α-lanosta-7,9(11),24-trieno-3β,26,27-triol.</p>	
 <p> $R^1 =$ $R^2 =$ $R^3 =$ $R^4 =$ $R^5 =$ (32) H H OH OH  (33) H  OH  </p>  <p>(34)</p>	<p>CHEN; WANG; YU, 1991.</p> <p>Ergosta-7,22-dien-3β,5α,6β-triol.</p> <p>Ergosta-7,22-dien-3β,5α,6α-triol.</p> <p>Ergosta-7,9,22-trien-3β,5α,6α-triol.</p>	

 <p style="text-align: center;">(35)</p>	<p>Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.</p>	<p>CHEN; WANG; YU, 1991.</p>
 <p style="text-align: center;">(36)</p>	<p>8,9-epoxiergosta-5,22-dien-3β,15-diol.</p>	<p>CHIANG; CHU, 1991.</p>
 <p style="text-align: center;">(37)</p>  <p style="text-align: center;">(38)</p> <p style="text-align: center;">R =</p>  <p style="text-align: center;">(39)</p>	<p>Epoxiganoderiol A.</p> <p>Epoxiganoderiol B.</p> <p>Epoxiganoderiol C.</p>	<p>NISHITOBA; SATO; SAKAMURA, 1988.</p>

 <p>(40)</p>	<p>3-oxo-7α-hidróxilanost-8(9),24-dienal.</p>	<p>NISHITOBA; SATO; SAKAMURA, 1988.</p>
 <p>(41) (42) (43) (44) (45) (46)</p> <p>R₁ = O O    </p> <p>R₂ = OH OAc OH OAc OAc OAc</p> <p>R₃ = H H H H H OAc</p>  <p>R =</p> <p>(47) </p> <p>(48) </p>	<p>Ganodermenonol. Acetato de ganodermenonol. Ganoderol B (Ganodermadiol). Acetato de ganodermadiol. Ganodermatriol. Acetato de ganodermatriol.</p>	<p>NISHITOBA; ARISAWA <i>et al.</i>, 1986. SATO; SAKAMURA, 1988.</p> <p>6α-hidróxi-ergosta-4,7,22-trien-3-ona. 6β-hidróxi-ergosta-4,7,22-trien-3-ona.</p>
 <p>(49)</p>	<p>Lanosterol.</p>	<p>YOKOKAWA <i>et al.</i>, 1987.</p>

 <p style="text-align: center;"> $R^1 =$ $R^2 =$ (50) CH₃ CH₃ (51) CH₃ H (52) H H </p>	<p style="text-align: right;">YOKOKAWA <i>et al.</i>, 1987.</p> <p>Eburicol. 4,4-dimetil-ergosta-8,24(28)-dien-3β-ol. 4-metil-ergosta-8,24(28)-dien-3β-ol.</p>	
 <p style="text-align: center;"> $R^1 =$ $R^2 =$ (53)  OAc OAc H (54)  OAc OAc H </p>	<p style="text-align: right;">SHIAO <i>et al.</i>, 1987.</p> <p>Ácido ganodérmico R. Ácido ganodérmico S.</p>	
 <p style="text-align: center;"> $R^1 =$ $R^2 =$ $R^3 =$ (55)  OH OH  CH₂CH₂CO₂H H (56) oxo H  CH₂CH₂CO₂H (57) oxo OH  CH₂CH₂CO₂H (58)  OH H Ac H </p>	<p style="text-align: right;">HONDA; SAKAMURA, 1985.</p> <p>Ácido 3β,7β,12β-tri-hidróxi-11,15-dioxolanost-8(9)-enóico. Ácido 7β-hidróxi-3,11,15-trioxolanost-8(9)-enóico. Ácido 7β,12β-di-hidróxi-3,11,15-trioxolanost-8(9)-enóico. 3β,7β-di-hidróxi-11,15-dioxo-17-acetillanost-8(9)-eno.</p>	

<p style="text-align: center;"> $R^1 =$ (59) H $\Delta^{22(23)}$ (60) CH₃ </p>	<p style="text-align: right;">KAC <i>et al.</i>, 1984.</p> <p>Metilcoleston-7,22-dien-3β-ol. 24-metilcoleston-7-en-3β-ol.</p>																																																		
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th>R =</th> <th>R¹ =</th> <th>R² =</th> <th>R³ =</th> <th>R⁴ =</th> <th>R⁵ =</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(61)</td> <td>H</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{8(9)}$</td> <td>H</td> <td>H₂</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>(62)</td> <td>H</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{8(9)}$</td> <td>HO</td> <td>O</td> <td>OAc</td> </tr> <tr> <td>(63)</td> <td>H</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{8(9)}$</td> <td>H</td> <td>HOAc</td> <td>OAc</td> </tr> <tr> <td>(64)</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{9(11)}$</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{7(8)}$</td> <td>HOAc</td> <td>OAc</td> </tr> <tr> <td>(65)</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{9(11)}$</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{7(8)}$</td> <td>HO</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>(66)</td> <td>H</td> <td>-</td> <td>- $\Delta^{8(9)}$</td> <td>H</td> <td>HO</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R =	R ¹ =	R ² =	R ³ =	R ⁴ =	R ⁵ =	(61)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	H	H ₂	OH	(62)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	HO	O	OAc	(63)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	H	HOAc	OAc	(64)	-	- $\Delta^{9(11)}$	-	- $\Delta^{7(8)}$	HOAc	OAc	(65)	-	- $\Delta^{9(11)}$	-	- $\Delta^{7(8)}$	HO	H	(66)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	H	HO	H	<p style="text-align: right;">TOTH <i>et al.</i>, 1983.</p> <p>Ácido ganodérico U. Ácido ganodérico V. Ácido ganodérico W. Ácido ganodérico X. Ácido ganodérico Y. Ácido ganodérico Z.</p> <p style="text-align: right;">TOTH; LUU; OURISSON, 1983.</p>	
	R =	R ¹ =	R ² =	R ³ =	R ⁴ =	R ⁵ =																																													
(61)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	H	H ₂	OH																																													
(62)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	HO	O	OAc																																													
(63)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	H	HOAc	OAc																																													
(64)	-	- $\Delta^{9(11)}$	-	- $\Delta^{7(8)}$	HOAc	OAc																																													
(65)	-	- $\Delta^{9(11)}$	-	- $\Delta^{7(8)}$	HO	H																																													
(66)	H	-	- $\Delta^{8(9)}$	H	HO	H																																													

 <p>(67) $R^1 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = \text{H}$</p> <p>(68) $R^1 = \begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{OAc} \end{matrix}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{OAc}$</p> <p>(69) $R^1 = \text{O}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{OAc}$</p> <p>(70) $R^1 = \begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{OH} \end{matrix}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{H}$</p>  <p>(71) $R^1 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$ $R^2 = \text{H}$</p> <p>(72) $R^1 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$ $R^2 = \text{OAc}$</p>	<p>Ácido 3β-hidróxilanost-8(9),24-dienóico.</p> <p>Ácido 3α,15α-diacetil-7-hidróxilanost-8(9),24-dienóico.</p> <p>Ácido 3-oxo-7-hidróxi-15-acetillanost-8(9),24-dienóico.</p> <p>Ácido 3α,7-di-hidróxilanost-8(9),24-dienóico.</p> <p>Ácido 3β-hidróxilanost-7,9(11),24-trienóico.</p> <p>Ácido 3α-hidróxi-15-acetillanost-7,9(11),24-trienóico.</p>	<p>TOTH; LUU; OURISSON, 1983.</p>
--	--	-----------------------------------

CAPÍTULO 8

Determinação estrutural dos
constituintes químicos fixos isolados
de *Ganoderma lucidum*

8. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS FIXOS ISOLADOS DE *Ganoderma lucidum*

8.1 Determinação estrutural G1

Após tratamento cromatográfico em gel de sílica de EEGL (Item 10.5, p. 226), foi isolada uma substância denominada G1 (100,2 mg), na forma de um sólido branco amorfo, homogêneo em CCDA, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região de infravermelho (Fig. 120) mostrou a absorção em 2.940 e 2.870 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C – H; absorção intensa em 1.719 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação C = O; absorções em 1.459 e 1.382 cm^{-1} decorrente de deformações angulares da ligação C – H de grupo metila e absorção em 968 cm^{-1} indicativa de deformação angular do grupo H – RC = CR' – H (trans).

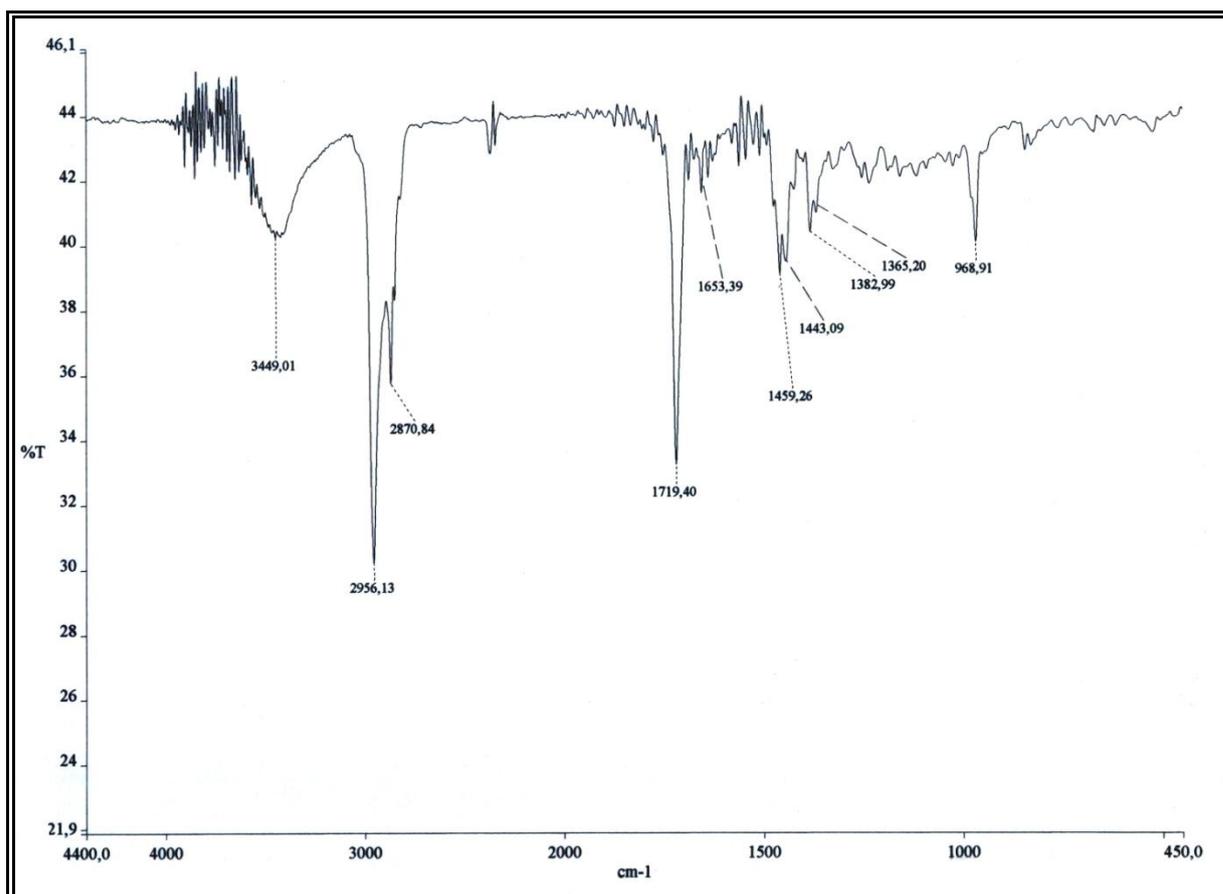


Figura 120: Espectro de IV (KBr) de G1

O espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 123, p. 154) de G1 revelou 28 linhas espectrais. A absorção em δ 211,9 ppm é indicativa de carbonila de cetona, que corrobora

com a absorção intensa de 1.719 cm^{-1} no espectro de IV (Fig. 120, p. 150). Os quatro sinais em δ 139,7; 135,8; 132,2 e 117,2 ppm fortalecem a idéia da presença de carbonos olefínicos, como previsto no espectro de IV a partir das absorções em 1.459 e 1.365 cm^{-1} (Fig. 120, p. 150). A análise comparativa com o espectro de RMN DEPT 135° (Fig. 124, p. 155) revelou que os três sinais (δ 135,8; 132,2 e 117,2 ppm) representam carbonos metínicos (CH). Além disso, indica a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C). Destes, os sinais em δ 211,9 e δ 139,7 ppm são, respectivamente, de carbono carbonílico e carbono olefínico. A comparação destes espectros revelou ainda a presença de dez carbonos metínicos (CH), oito carbonos metilênicos (CH_2) e seis carbonos metílicos (CH_3), conforme Tabela 16.

Tabela 16: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de G1 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH_2	CH_3
211,9	135,8	44,4	21,3
139,7	132,2	39,5	20,1
43,5	117,2	39,0	19,8
34,6	56,1	38,3	17,8
	55,2	30,2	12,6
	49,0	28,3	12,3
	43,1	23,1	
	43,0	21,9	
	40,7		
	33,3		
C = O	4 HC =		
C =			
C_4O	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}$	C_8H_{16}	C_6H_{18}
TOTAL			$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$

Os dados da Tabela 16 permitiram deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$, demonstrando índice de oxidação baixo. Além disso, o índice de deficiência de hidrogênio (IDH) sete é compatível com esteróides, devido à presença de quatro anéis, com duas ligações duplas de carbonos olefínicos e outra ligação dupla de carbonila.

O espectro de RMN ^1H de G1 (Fig. 122, p. 154) corroborou com os dados de RMN ^{13}C com absorções na região em δ_{H} 5,25-5,10 ppm, correspondente a hidrogênio na região de duplas. O espectro de RMN ^1H ainda mostrou sinais de grupos alquila característicos de esteróides na região entre 2,20 e 0,58 ppm. Entre estes sinais, seis correspondentes a grupo metila (CH_3), todos ligados a carbonos sp^3 , como é esperado para compostos esteroidais. Este fato, evidenciou-se através dos dois sinais singletos δ_{H} 1,02 e 0,58 ppm, sendo dois singletos (1,02 e 0,58) e quatro dubletos [1,03 (7.1 Hz); 0,92 (6.8 Hz); 0,84 (7.2 Hz) e 0,83 (7.1 Hz)].

Os dados de correlação do composto G1 são apresentados na Tabela 17 (p. 153), incluindo dados bidimensionais e comparação com a literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996). Com esses dados espectroscópicos observados e comparação com dados do composto ergosta-7,22-dien-3-ol (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996) foi possível propor para G1 um composto com esqueleto esteroidal, contendo uma carbonila, duas duplas e uma cadeia lateral em C-17.

Analisando os dados da Tabela 17 (p. 153), as diferenças significativas entre os carbonos não funcionalizados foram observadas para os carbonos C-1, C-2, C-4 e C-5. Fato bastante previsível, devido à modificação do carbono C-3 para carbonila, que apresenta efeito anisotrópico de desproteção mais acentuado que o carbono ligado a hidroxila.

Os dados obtidos em comparação com os dados da literatura permitiram identificar G1 como sendo o esteróide ergostano de nome ergosta-7,22-dien-3-ona, conforme ilustra a Figura 121.

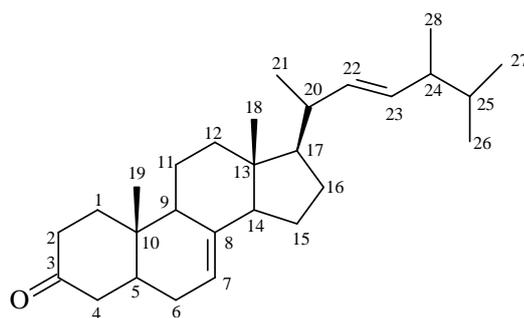


Figura 121: Estrutura de G1

O espectro de massas (Fig. 125, p. 155) corroborou com a estrutura proposta apresentando íon molecular 396. Uma proposta para fragmentação do espectro de massas é apresentada na Figura 126 (p. 156).

Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1, comparando-se com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC)*

G1					Literatura (CDCl_3)
	HMQC		HMBC		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
3	211,9	-			-
8	139,7	-			139,6
10	34,6	-	3H-19		34,2
13	43,5	-	3H-18		43,3
CH					
3	-	-	H-2a; H-4b		71,0
5	43,1	1,85		H-7	40,2
7	117,2	5,25-5,10 (m)			117,4
9	49,1	1,75		3H-19	49,4
14	55,2	1,85		3H-18	55,1
17	56,2	1,29		3H-18; H-20; 3H-21	55,9
20	40,7	2,23	3H-21; H-22	H-23	40,5
22	135,8	5,25-5,10 (m)	H-20; H-23	3H-21; H-24	135,1
23	132,2	5,25-5,10 (m)	H-22	H-20; H-25; 3H-28	131,9
24	43,0	1,85	H-23; H-25; 3H-28	H-22; 3H-26; 3H-27	42,8
25	33,3	1,45	3H-26; 3H-27	3H-28	33,1
CH₂					
1	39,0	2,12; 1,45			37,1
2	38,3	2,45; 2,30			29,6
4	44,4	2,05			38,0
6	30,2	1,85	H-5		31,5
11	21,9	1,60			21,5
12	39,5	2,12		3H-18	39,4
15	23,1	1,50; 1,35	H-16b	H-14	22,9
16	28,3				28,1
CH₃					
18	12,3	0,58 (s)		H-12b; H-14	12,1
19	12,6	1,02 (s)			13,0
21	21,3	1,03 (d, 7.1)		H-22	21,1
26	19,8	0,84 (d, 7.2)			19,6
27	20,2	0,83 (d, 7.1)			19,9
28	17,8	0,92 (d, 6.8)		H-23; H-25	17,6

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

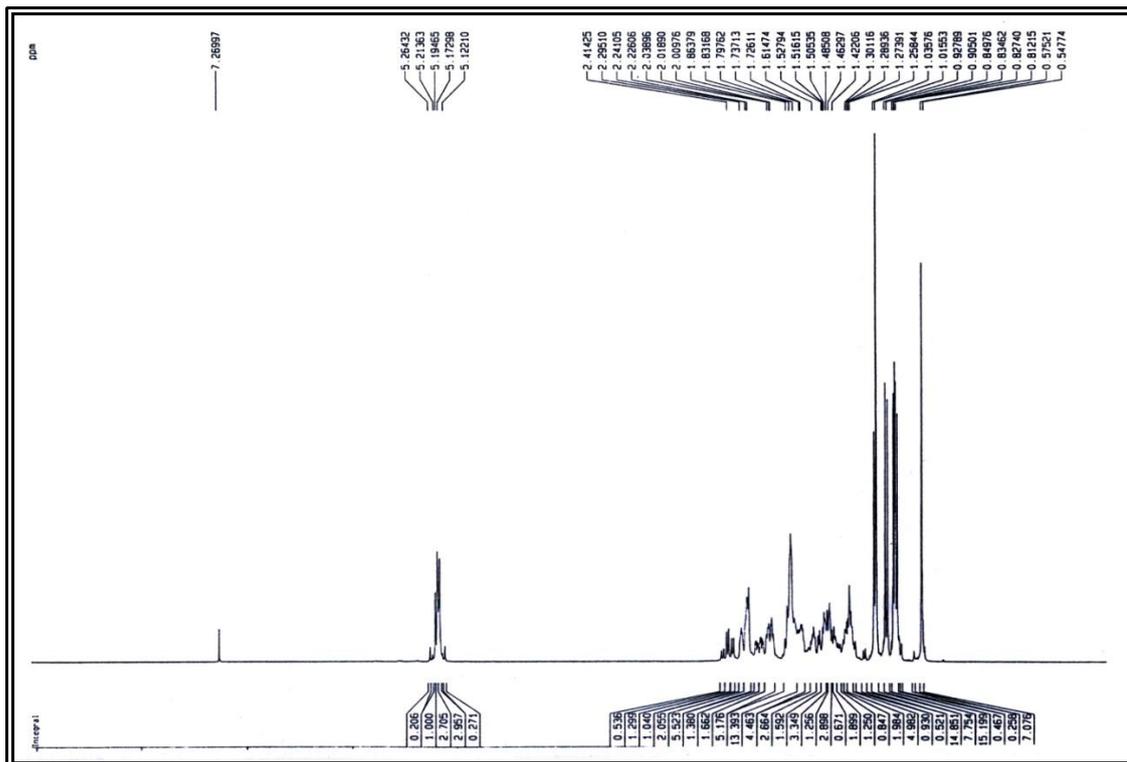


Figura 122: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de G1

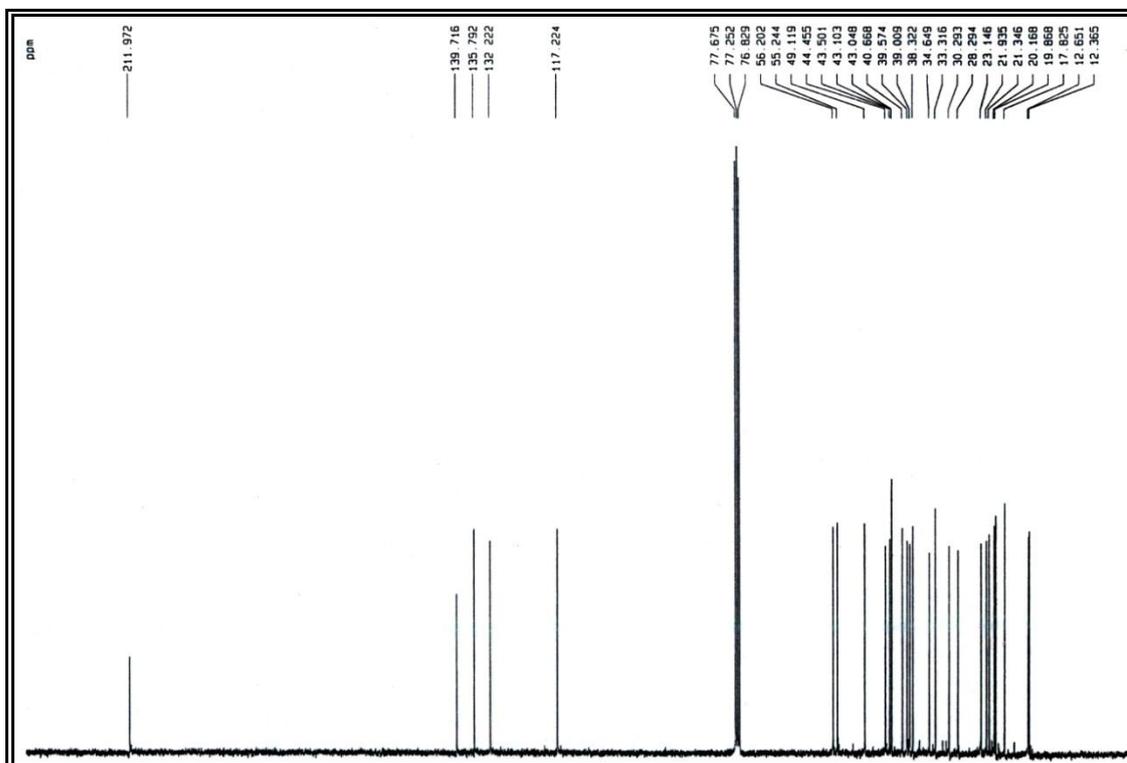


Figura 123: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de G1

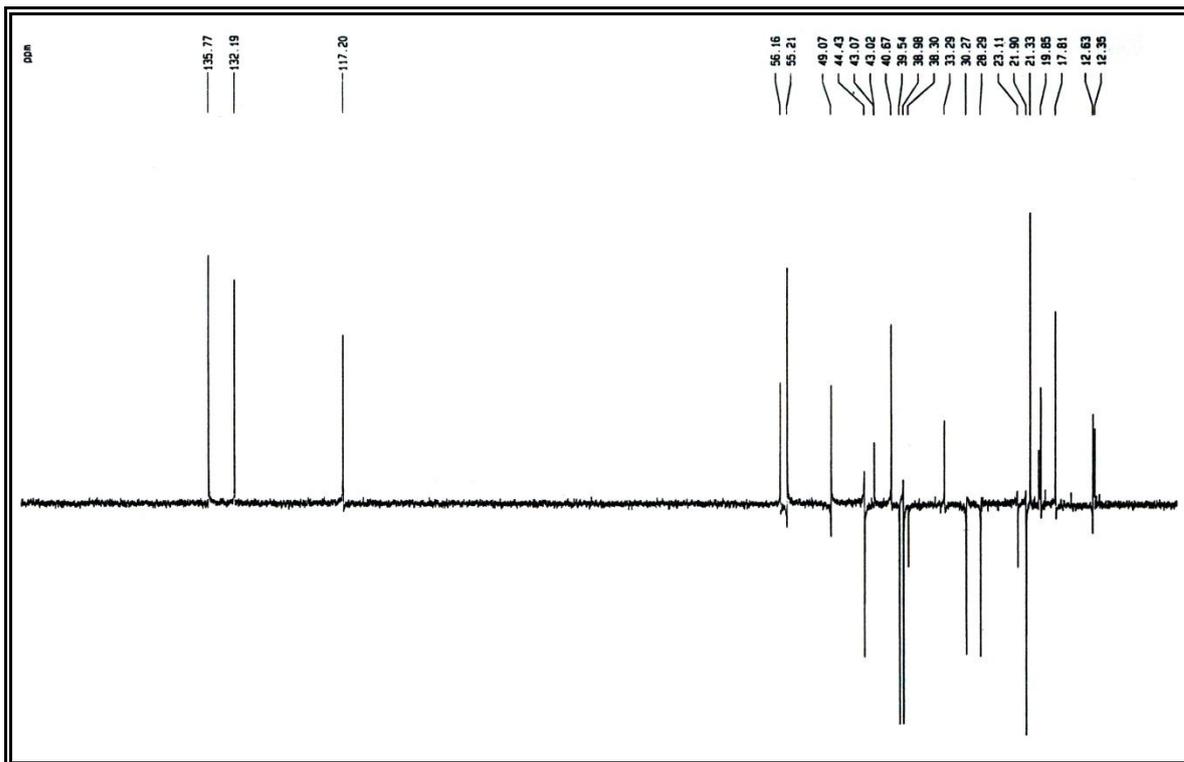


Figura 124: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de G1

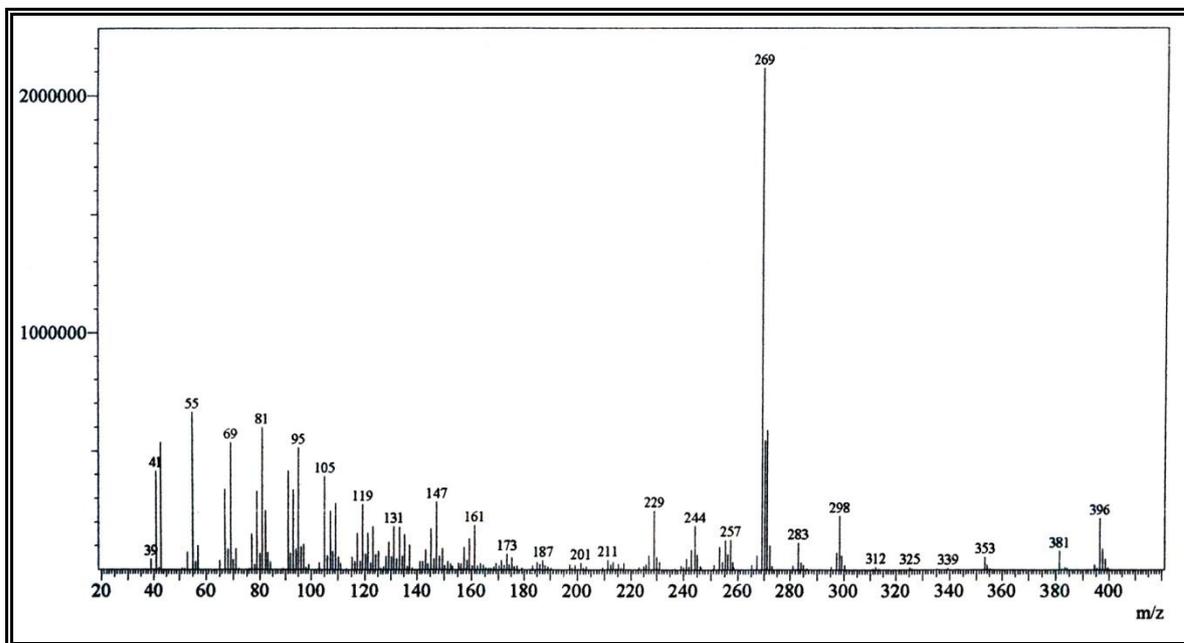


Figura 125: Espectro de massas de G1 (70 eV)

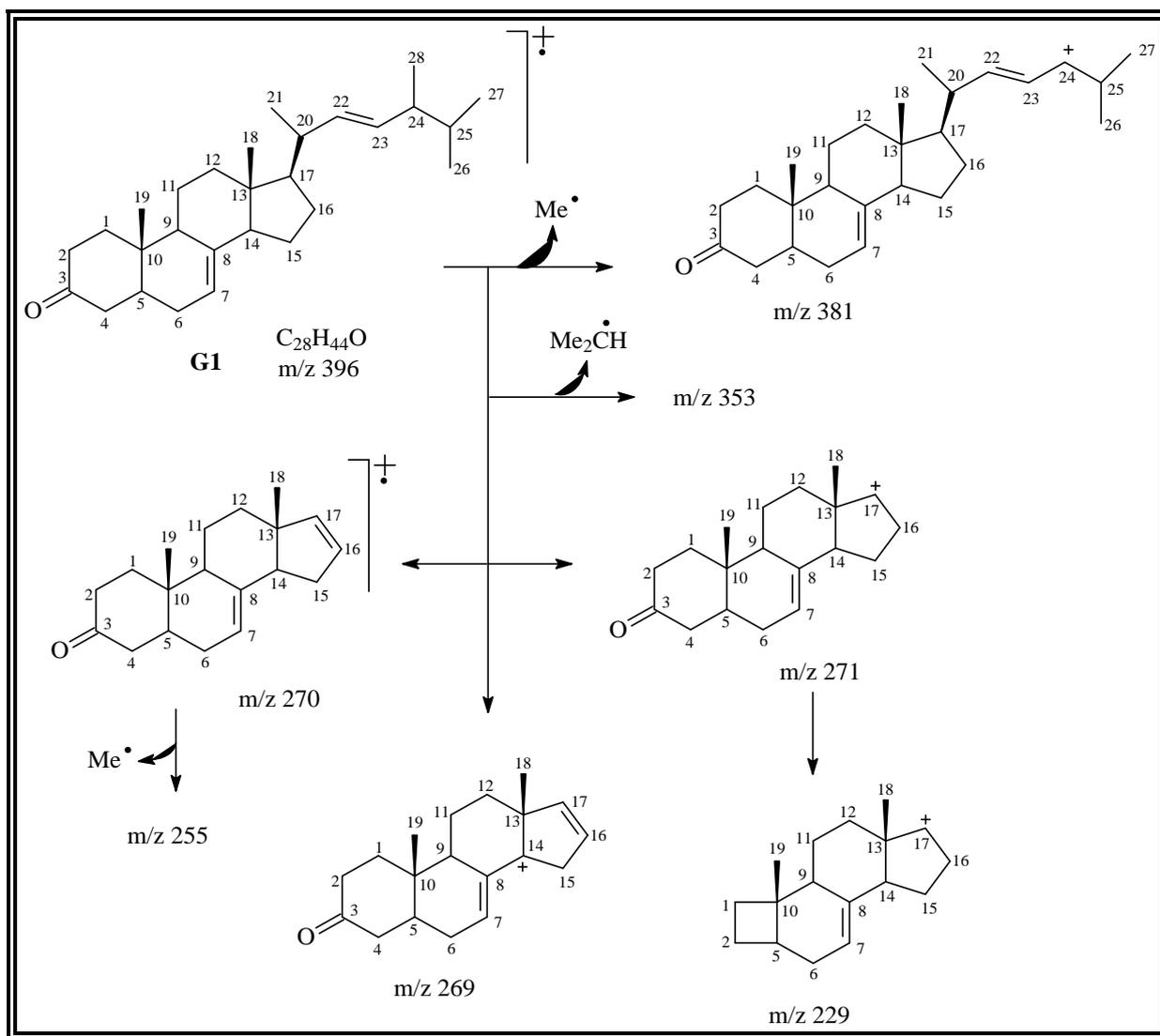


Figura 126: Proposta de fragmentação de G1

8.2 Determinação estrutural de G2-G3

Após tratamento cromatográfico em gel de sílica flash de GLHD (Item 10.5.3, p. 228), foi isolada um material denominado G2-G3 (70,0 mg), na forma de um sólido branco amorfo, homogêneo em CCDA, solúvel em piridina

No espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 127), observaram-se bandas em 3.416 cm^{-1} , característica de deformação axial O – H; em 2.957 e 2.872 cm^{-1} , referentes à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1459 e 1372 cm^{-1} decorrente de deformações angulares da ligação C – H de grupo metila; em 1.039 cm^{-1} , característica de deformação angular de C – O – H de álcool e absorção em 971 cm^{-1} indicativa de deformação angular do grupo H – RC = CR' – H (trans).

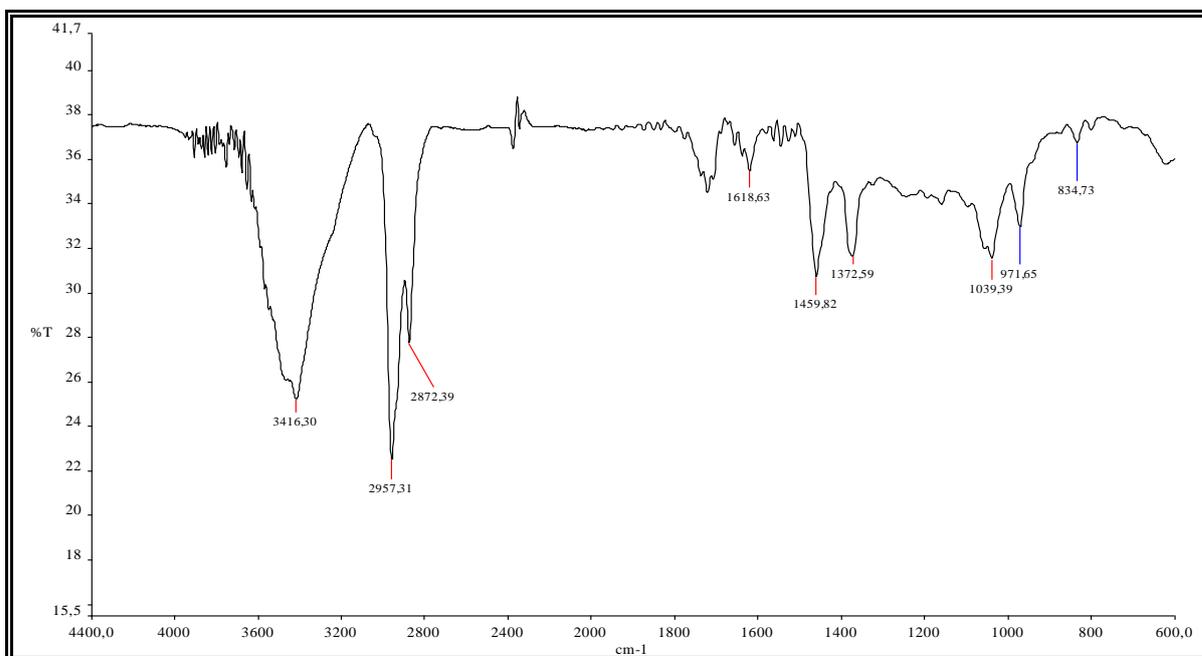


Figura 127: Espectro de IV (KBr) de G2-G3

O espectro de RMN ^1H de G2-G3 (Fig. 129, p. 161) exibiu sinais na faixa compreendidos entre δ 2,15-0,64 ppm, indicativo de composto de esqueleto esteroidal; apresentou ainda multipletos em δ 3,99-3,97 ppm característico de hidrogênio carbinólico; um multipletos entre δ 5,34 -5,25 ppm, semelhante ao composto G1, característico de hidrogênios olefínicos. Este espectro também revelou dois sinais largos em δ 5,72 e 5,53 ppm característico de hidrogênios olefínicos.

O espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 130, p. 161) apresentou sinais dobrados característicos de mistura. Este espectro revelou oito sinais em δ 141,0; 140,5; 139,3; 135,9;

135,8; 131,8; 119,3; 117,7 e 116,8 ppm presentes na região de carbonos olefínicos. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135^0 (Fig. 131, p. 162) mostrou que somente os quatro sinais mais desprotegidos (141,0; 140,5; 139,3 e 135,9 ppm) tratavam de carbonos não hidrogenados, enquanto que os sinais em δ 135,8; 131,8; 119,3; 117,7 e 116,8 ppm tratam-se de carbonos metínicos (CH). Entretanto, estes dois últimos sinais também sugerem tratar-se de uma mistura de dois compostos com estruturas intimamente relacionadas, ou seja, são sinais pertencentes ao mesmo tipo de carbono, sendo que o sinal em δ 116,8 ppm pertence ao composto majoritário. Caso semelhante, é percebido através dos dois sinais presentes em δ 70,0 e 69,6 ppm com intensidades diferentes, característicos de carbonos carbinólicos, sugerindo tratar-se de uma mistura de dois compostos, sendo que a substância que contém o sinal em δ 69,6 ppm poderá estar em maior proporção. Este último dado, corrobora com as absorções em δ_{H} 3,99 e 3,97 (m) ppm para hidrogênio (H-3), bem como a absorção intensa de 3.416 cm^{-1} no espectro de IV (Fig. 127, p. 157). Através das integrações destes dois sinais multipletos no espectro de RMN ^1H (Fig. 129, p. 161), pode-se propor a relação entre os dois compostos de 66,99/33,01 %, sendo o composto com absorção em δ_{H} 3,99 (m) o majoritário.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 130, p. 161) e DEPT 135^0 (Fig. 131, p. 162) revelou que o composto majoritário G2 apresentou quatro sinais (δ 141,0; 140,5; 42,8 e 34,2 ppm) para carbonos não hidrogenados; onze sinais (δ 135,9; 131,8; 119,3; 116,8; 69,8; 55,7; 54,7; 46,5; 43,0; 40,7 e 33,2 ppm) representam carbonos metínicos (CH); sete sinais (δ 41,9; 39,2; 38,9; 32,9; 32,9; 28,6 e 23,3 ppm) para carbonos metilênicos e seis sinais (δ 21,3; 20,1; 19,8; 17,8; 16,5 e 12,1 ppm) para carbonos metílicos, conforme Tabela 18 (p. 159).

Ao analisar a Tabela 19 (p. 160), percebeu-se que há similaridade enorme entre os dois compostos G2 e G3, sendo que os dados de correlação da mistura G2-G3 estão apresentados, incluindo dados bidimensionais e comparação com a literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996). Com esses dados espectroscópicos observados e comparação com dados do composto ergosta-7,22-dien-3-ol (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996) foi possível identificar G2-G3 como esteróides ergostano, respectivamente, com nomes ergosta-5,9,22-trien-3 β -ol e ergosta-5,22-dien-3 β -ol, conforme ilustra Figura 128 (p. 159).

Tabela 18: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G2 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃
141,0	135,9	41,9	21,3
140,5	131,8	39,2	20,1
42,8	119,3	38,9	19,8
34,2	116,8	32,9	17,8
	69,8	32,9	16,5
	55,7	28,6	12,1
	54,7	23,2	
	46,5		
	43,0		
	40,7		
	33,2		
C =	4 HC =		
	1 HC – OH		
C ₄	C ₁₁ H ₁₁ OH	C ₇ H ₁₄	C ₆ H ₁₈
TOTAL			C ₂₈ H ₄₄ O

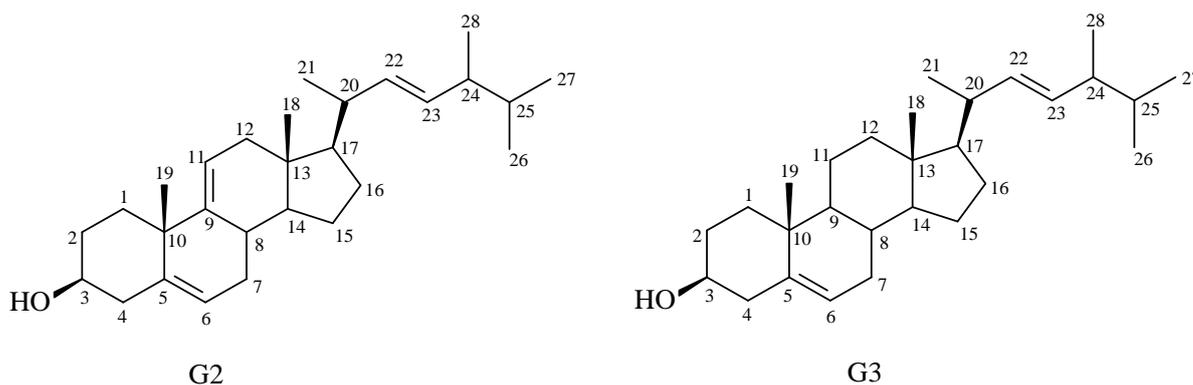


Figura 128: Estruturas dos componentes da mistura G2-G3

O espectro de massas (Fig. 132, p. 162) corroborou com a estrutura proposta ao apresentar íon molecular m/z 396. O pico do íon molecular m/z 398, correspondente à substância G3, foi percebida no espectro de massas, porém com intensidade bastante inferior à G2, devido a sua proporção ser menor na mistura.

Tabela 19: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da mistura G2-G3, comparando-se com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC).*

	G2				G3		Literatura (CDCl_3)
	δ_{C}	HMQC δ_{H}	HMBC $^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	HMQC δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C							
5	141,0	-	H-4a, H-6	3H-19	139,34	-	-
8	-	-			-	-	139,6
9	140,56	-		3H-19	-	-	-
10	34,2	-	3H-19		34,2	-	34,2
13	42,8	-	H-16a		42,7	-	43,3
CH							
3	69,8	3,99 (m)			70,2	3,97 (m)	71,0
5	-	-	-	-	-	-	40,2
6	119,3	5,72 (sl)		H-4 ^a	117,7	-	-
7	-	-			-	-	117,4
8	46,5	1,97			46,5	-	-
9	-	-	-	-	49,7	1,70	49,4
11	116,8	5,53 (sl)			-	-	-
14	54,7	1,92		3H-18	55,3	-	55,1
17	55,7	1,28 (m)		3H-18; 3H-21	56,0	-	55,9
20	40,7	2,08 (m)	3H-21; H-22		40,7	-	40,5
22	135,8	5,27	H-23	3H-21	135,9	-	135,1
23	131,8	5,32	H-22	3H-28	131,8	-	131,9
24	43,0	1,94 (m)		3H-26; 3H-27	43,4	-	42,8
25	33,2	1,52 (m)	3H-26; 3H-27	3H-28	33,2	-	33,1
CH₂							
1	32,9	2,15-1,76			32,4	-	37,1
2	38,9	1,28-1,24			39,0	-	29,6
4	41,9	2,82 (dl, 12.4) 2,69 (t, 12.4)			41,2	-	38,0
6	-	-			-	-	31,5
7	32,9	2,15-1,76			30,0	-	-
11	-	-	-	-	21,7	1,62	21,5
12	39,2	2,08-1,94		3H-18	39,6	-	39,4
15	23,3	1,62-1,47			23,2	-	22,9
16	28,6	1,80-1,39			28,5	-	28,1
CH₃							
18	12,1	0,71 (s)			12,2	-	12,1
19	16,5	1,07 (s)			16,5	-	13,0
21	21,3	1,12 (d, 6.0)			21,3	-	21,1
26	20,1	0,91 (d, 5.9)			20,1	-	19,6
27	19,8	0,90 (d, 6.0)			19,8	-	19,9
28	17,8	1,01 (d, 6.7)			17,8	-	17,6

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

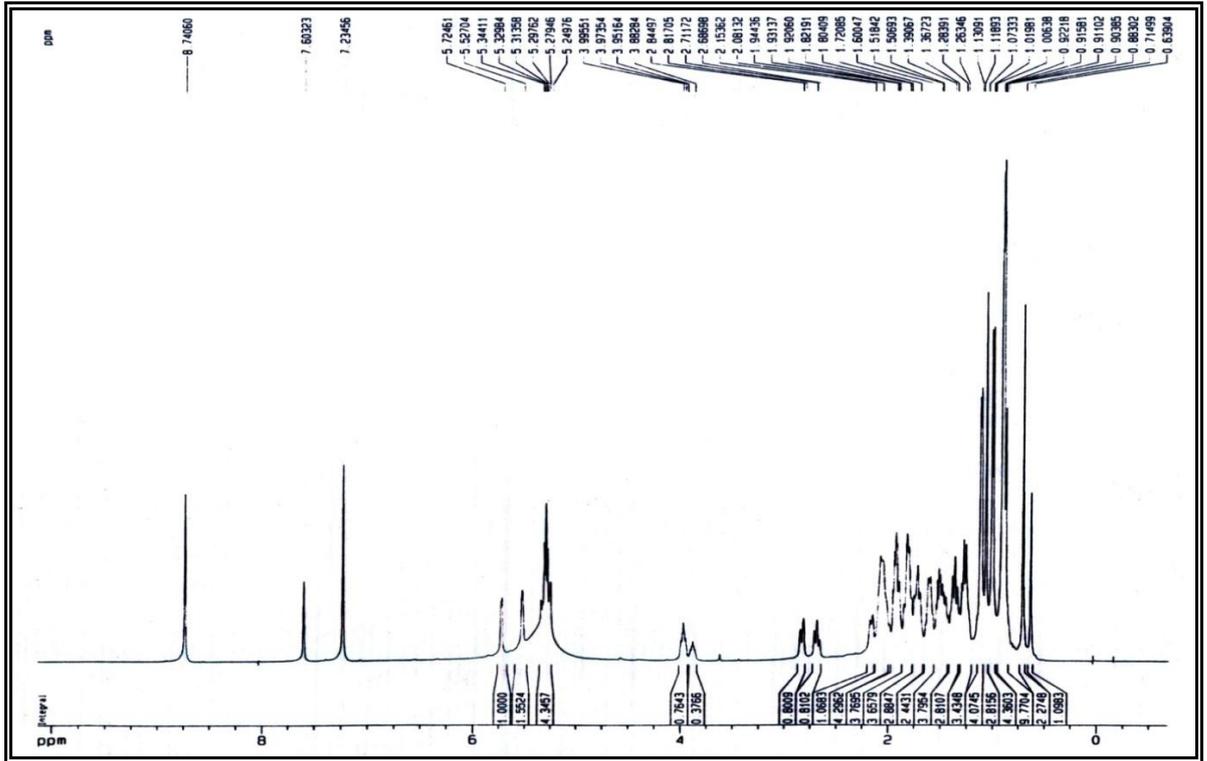


Figura 129: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) da mistura G2-G3

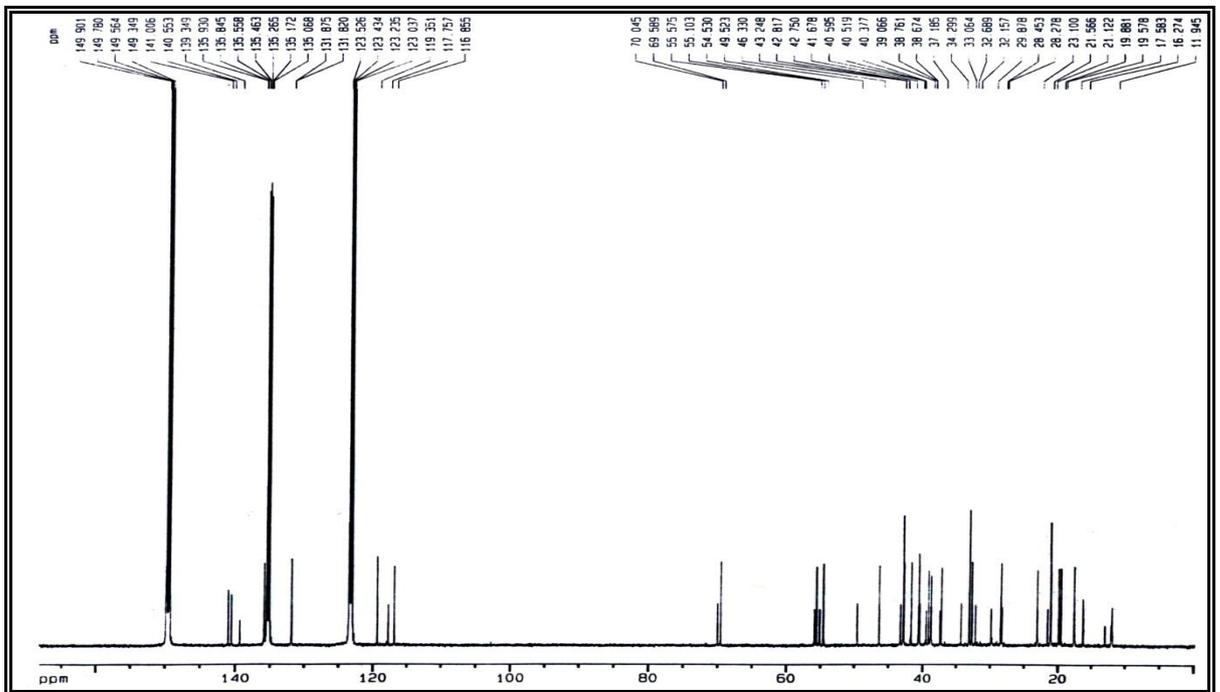


Figura 130: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N) da mistura G2-G3

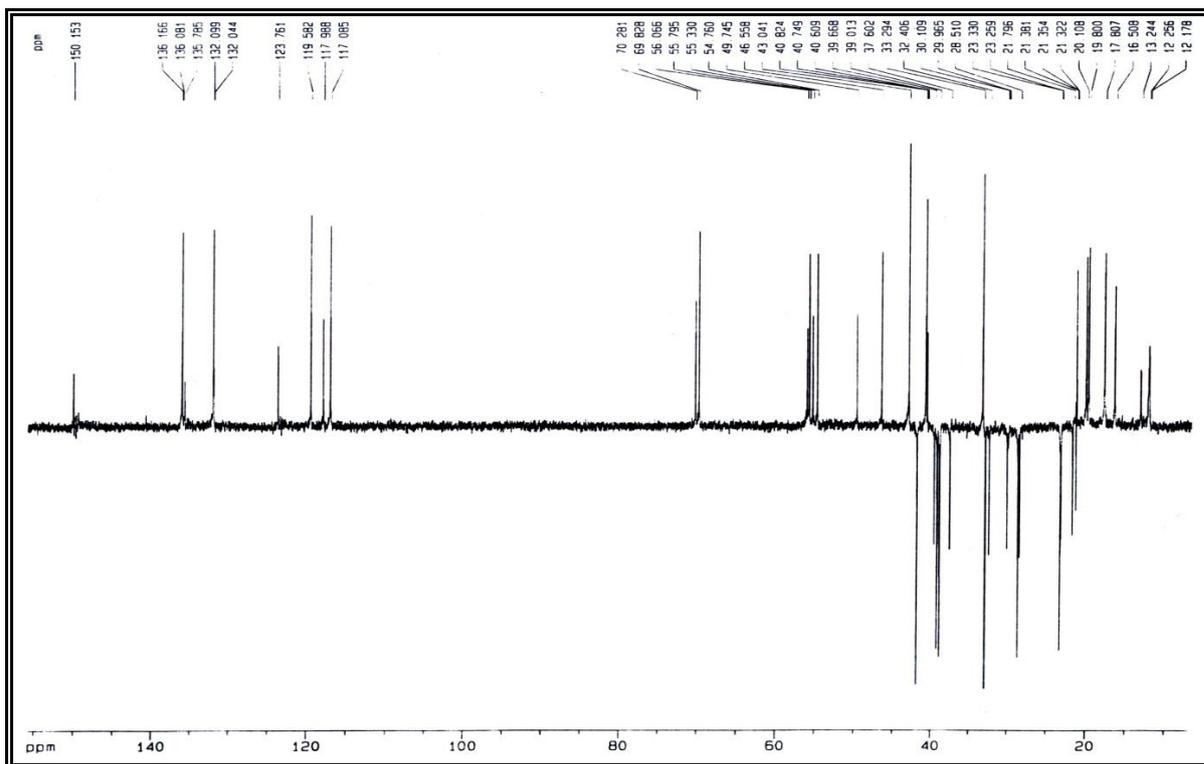


Figura 131: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura G2-G3

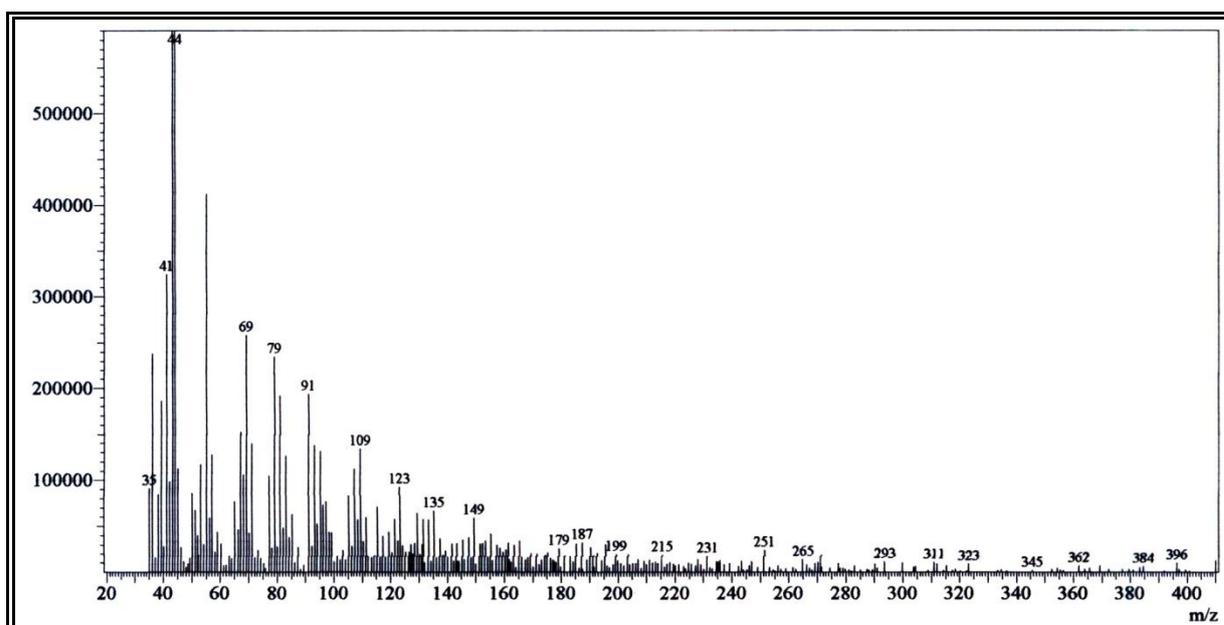


Figura 132: Espectro de massas de G2-G3 (70 eV)

8.3 Determinação estrutural de G4

Após tratamento cromatográfico em gel de sílica de GLHE, (Item 10.5.4, p. 228), foi isolada uma substância denominada G4 (22,0 mg), na forma de um sólido branco amorfo, homogêneo em CCDA, solúvel em piridina.

No espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 133), observaram-se bandas em 3.400 cm^{-1} , característica de deformação axial O – H; em 2.955 e 2.872 cm^{-1} , referentes à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1.458 e 1.375 cm^{-1} decorrente de deformações angulares da ligação C – H de grupo metila; em 1.074 e 756 cm^{-1} , indicativas de deformação angular de C – O – H e absorção em 969 cm^{-1} característica de deformação angular do grupo H – RC = CR' – H (trans).

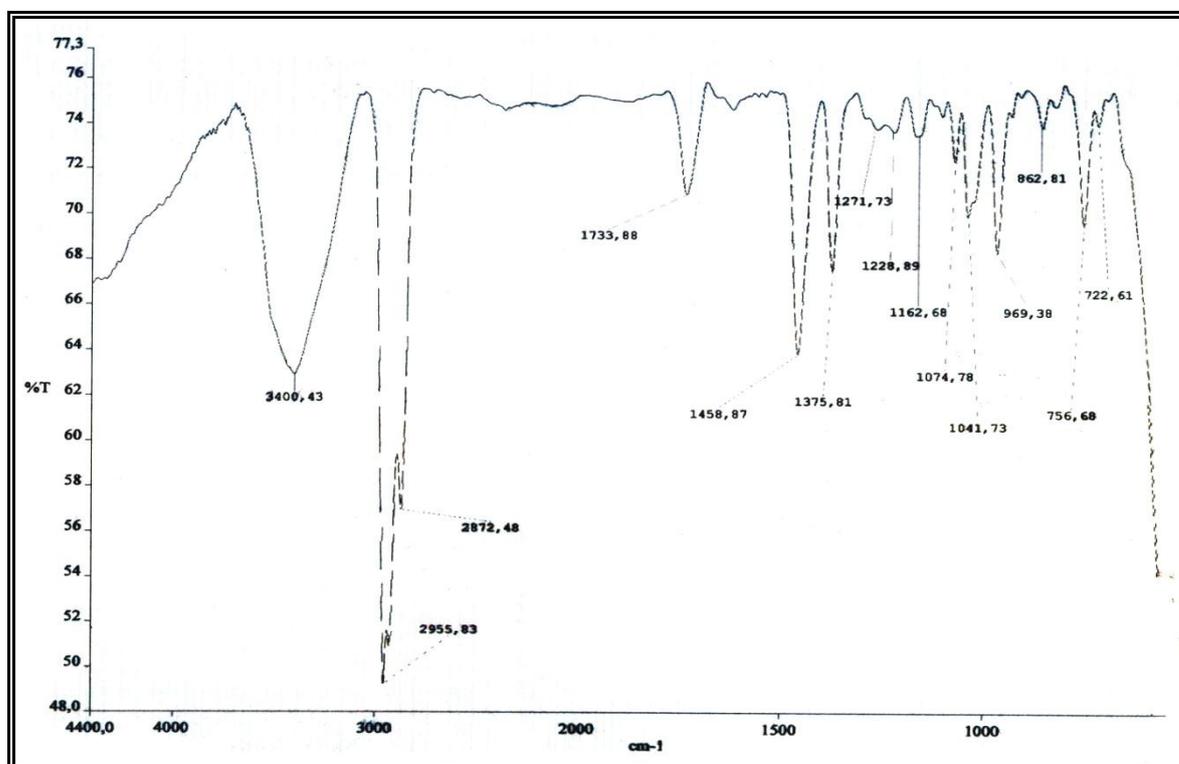


Figura 133: Espectro de IV (KBr) de G4

O espectro de RMN ^1H de G4 (Fig. 136, p. 167) mostrou-se bastante semelhante aos espectros já comentados anteriormente, exibindo sinais na faixa compreendidos entre δ 2,45-0,77 ppm, característicos de composto de esqueleto esteroidal. Este espectro apresentou ainda um sinal multiplete em δ 4,39 ppm característico de hidrogênio carbinólico; que corroborou com as absorções em 3.400 , 1.074 e 756 cm^{-1} observadas no espectro de IV (Fig. 133); além de, dois dubletos em δ 6,55 e 6,33 ppm, característico de hidrogênios

olefínicos, com constantes de acoplamentos iguais ($J = 8,4$ Hz), confirmando o acoplamento entre si, que segundo Silverstein e colaboradores (1994) é típico de hidrogênios de ligação dupla com configuração *cis*. Além disso, conforme a literatura (GUNATILAKA *et al.*, 1981), cujo composto está representado na Figura 134, o H-3 apresenta deslocamento em δ_H 3,90 (m), o H-6 em δ_H 5,94 (d, $J = 8,3$ Hz) e o H-7 em δ_H 6,28 (d, $J = 8,3$ Hz).

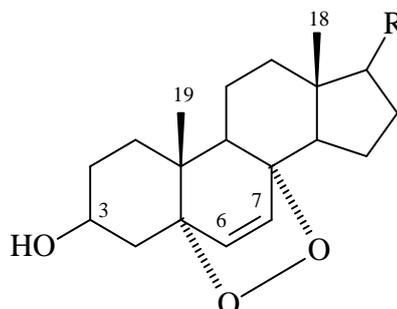


Figura 134: Estrutura com esqueleto esteroidal (GUNATILAKA *et al.*, 1981)

No espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 137, p. 168), observaram-se 28 linhas espectrais; sendo quatro sinais em δ 136,5; 136,2; 132,6 e 131,2 ppm típicos de sinais na região de carbonos olefínicos. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (Fig. 138, p. 168) mostrou que estes quatro sinais mais desprotegidos tratavam de carbonos metínicos (CH), assim como os sinais em δ 66,1; 56,6; 52,4; 52,2; 43,3; 40,3 e 33,6 ppm; revelou ainda que os sinais em δ 39,9; 38,5; 35,7; 31,5; 29,3; 23,9 e 21,0 ppm correspondem a carbonos metilênicos (CH_2) e os sinais em δ 21,0; 20,4; 20,1; 18,6; 18,1 e 13,3 ppm representam carbonos metílicos (CH_3).

A análise desses dados sugeriu que os três sinais em δ 82,6; 79,6 e 66,1 ppm correspondem a carbonos saturados ligados a oxigênio, possivelmente hidroxilas, corroborando com as absorções, no espectro de IV (Fig. 133, p. 163), em 3.400, 1.074 e 756 cm^{-1} . Além disso, o sinal em δ 66,1 ppm, corroborou com o multipeto observado no espectro de RMN ^1H (Fig. 136, p. 167) em δ_H 4,39 ppm, característico de hidrogênio (H-3) carbinólico. A diferença entre os deslocamentos químicos de C-3 presente no composto G4 e no composto da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), de acordo com Tabela 21 (p. 166), sugeriu que a estereoquímica da hidroxila seja alfa (α). O composto G4 apresenta quatro carbonos não hidrogenados, onze carbonos metínicos (CH), sete carbonos metilênicos (CH_2) e seis carbonos metílicos (CH_3), conforme Tabela 20 (p. 165).

Tabela 20: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G4 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH₂	CH₃
82,6	136,5	39,9	21,0
79,6	136,2	38,5	20,4
45,0	132,6	35,7	20,1
37,7	131,2	31,5	18,6
	66,1	29,3	18,1
	56,6	23,9	13,3
	52,4	21,0	
	52,2		
	43,3		
	40,3		
	33,6		
2 C - OH	4 HC = 1 HC - OH		
$\text{C}_4(\text{OH})_2$	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{OH}$	C_7H_{14}	C_6H_{18}
		TOTAL	$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$

A análise da Tabela 20 permitiu deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$, demonstrando índice de deficiência de hidrogênio (IDH) seis que é compatível com esteróides, devido à presença de quatro anéis, com duas ligações duplas de carbonos olefínicos. O espectro de massas (Fig. 139, p. 169) corroborou com esta proposta de fórmula molecular para G4 ao apresentar o pico do íon molecular com m/z 430.

Os dados de correlação do composto G4 estão apresentados na Tabela 21 (p. 166), incluindo dados bidimensionais e comparação com a literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996). Com esses dados espectroscópicos observados em comparação com dados do composto ergosta-7,22-dien-3-ol (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), foi possível propor para G4 um composto com esqueleto esteroidal, contendo uma hidroxila no C-3, duas ligações duplas e uma cadeia lateral em C-17.

Tabela 21: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G4, comparando-se com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC).

G4					Literatura (CDCl_3)
	HMQC		HMBC		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
5	82,6	-	2H-4; H-6	H-7	-
8	79,6	-	H-7	H-6	139,6
10	37,7	-	3H-19	H-6	34,2
13	45,0	-	3H-18		43,3
CH					
3	66,1	4,39 (m)	2H-4		71,0
5	-	-			40,2
6	136,5	1,85			-
7	131,2	5,25-5,10 (m)			117,4
9	52,2	1,75		3H-19	49,4
14	52,4	1,85		H-7; 3H-18	55,1
17	56,6	1,29		3H-18; 3H-21	55,9
20	40,3	2,23	3H-21		40,5
22	136,2	5,25-5,10 (m)		3H-21	135,1
23	132,6	5,25-5,10 (m)		3H-28	131,9
24	43,3	1,85	3H-28	3H-26; 3H-27	42,8
25	33,6	1,45	3H-26; 3H-27	3H-28	33,1
CH₂					
1	35,7	2,12; 1,45		3H-19	37,1
2	31,5	2,45; 2,30			29,6
4	38,5	2,05			38,0
6	-	-	-		31,5
11	21,0	1,60			21,5
12	39,9	2,12		3H-18	39,4
15	23,9	1,50; 1,35	H-16b		22,9
16	29,3				28,1
CH₃					
18	13,3	0,58 (s)			12,1
19	18,6	1,02 (s)			13,0
21	21,0	1,03 (d, 7.1)			21,1
26	20,4	0,84 (d, 7.2)			19,6
27	20,1	0,83 (d, 7.1)			19,9
28	18,1	0,92 (d, 6.8)			17,6

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

Com esses dados espectroscópicos observados em comparação com dados da literatura (HOSTETTMANN; KELLER; MAILLARD, 1996), bem como os disponíveis de G1 e G3, foi possível identificar G4 como sendo esteróide ergostano, denominado de ergosta-6,22-dien-3 α , 5 α , 8 α -triol, conforme ilustra Figura 135.

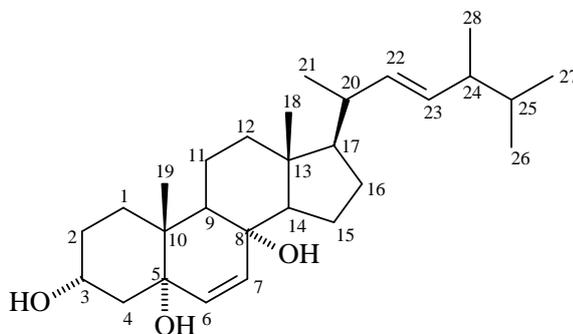


Figura 135: Estrutura de G4

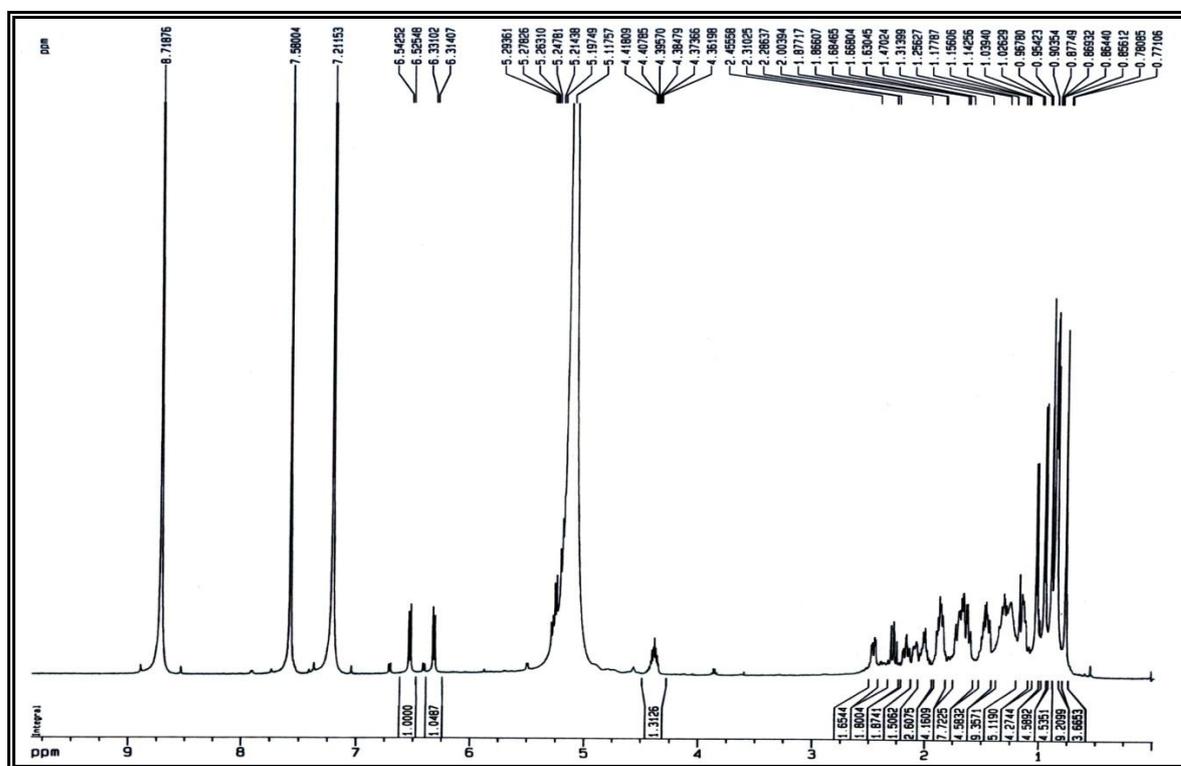


Figura 136: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de G4

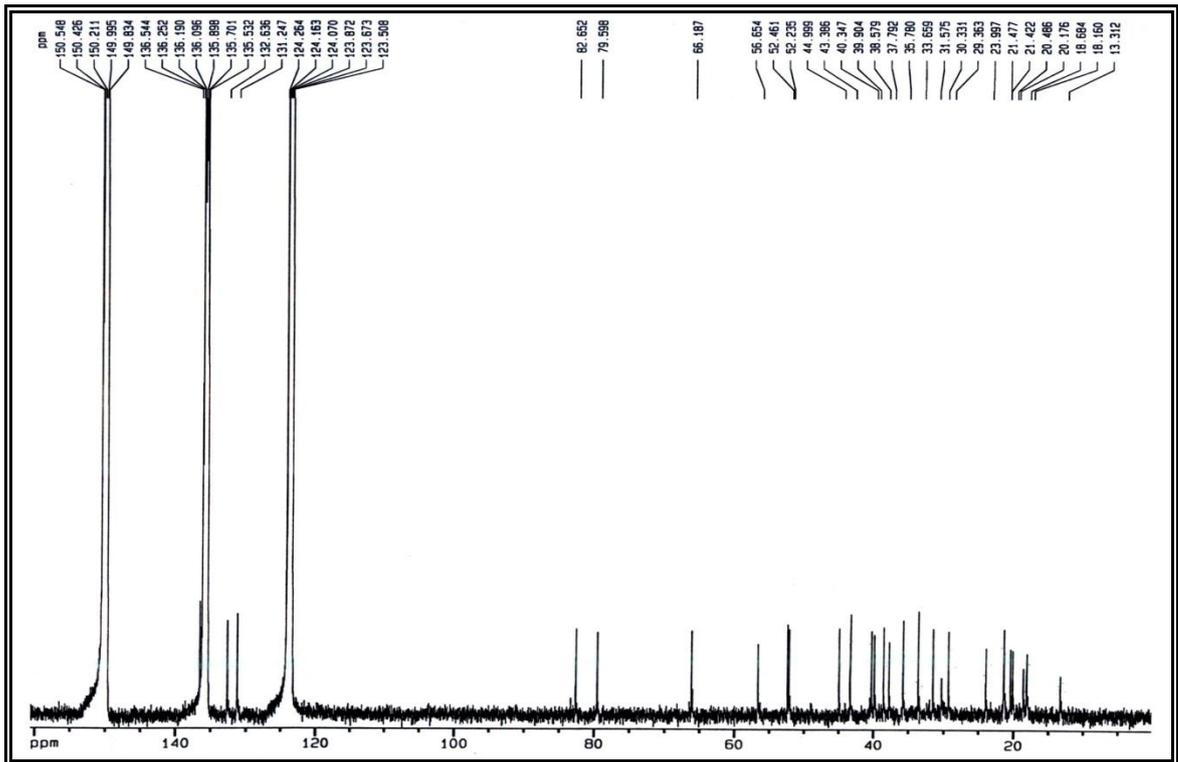


Figura 137: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N) de G4

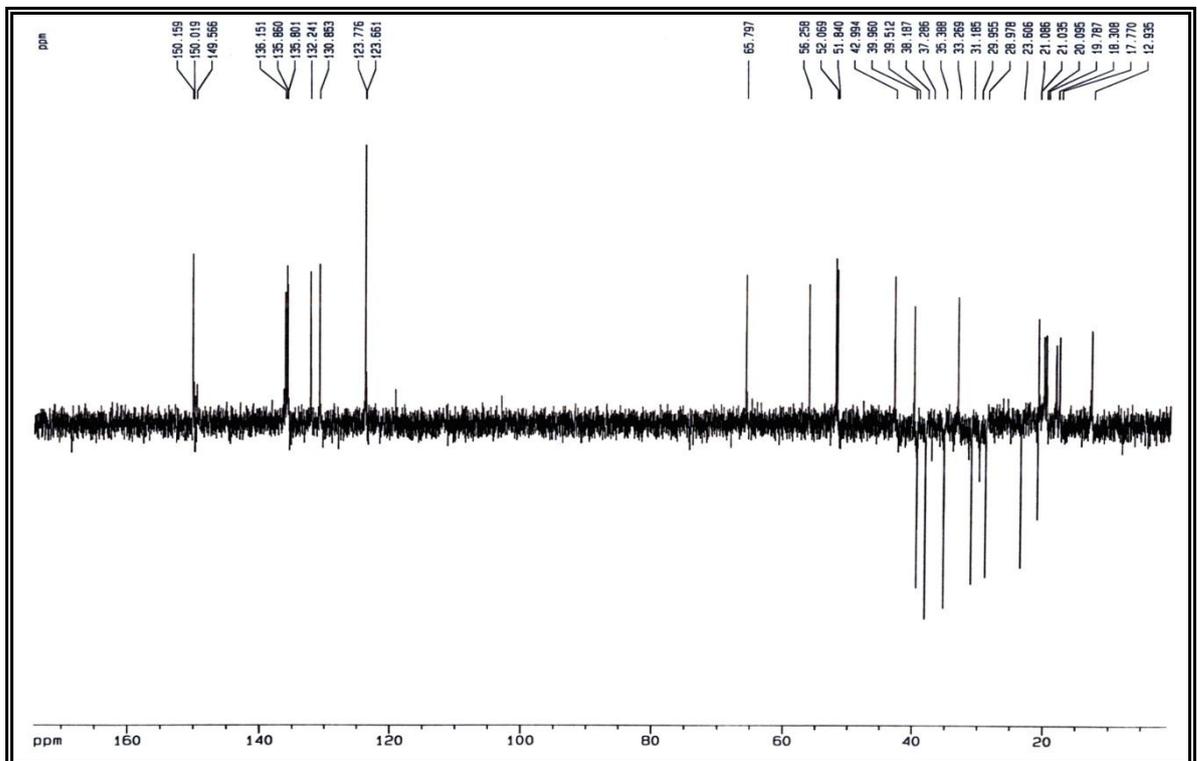


Figura 138: Espectro de RMN ¹³C – DEPT 135⁰ (125 MHz, C₅D₅N) de G4

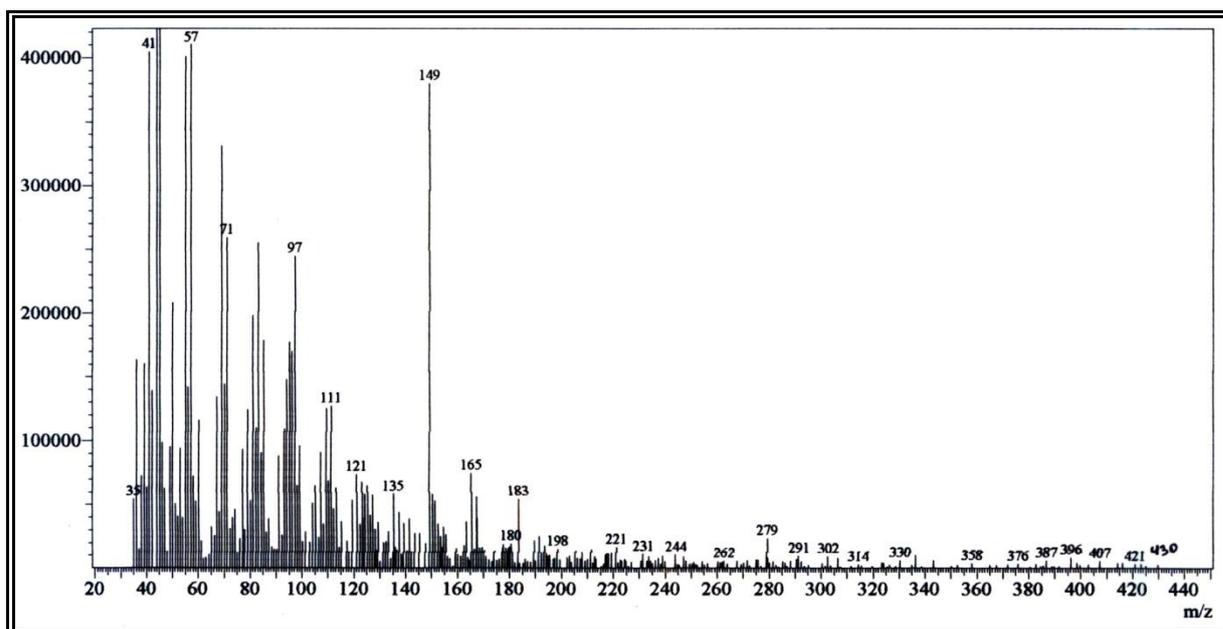


Figura 139: Espectro de massas de G4 (70 eV)

8.4 Determinação estrutural de G5

Após tratamento cromatográfico em gel de sílica de GLHC (Item 10.5.2, p. 227), foi isolada uma substância denominada G5 (22,1 mg), na forma de um sólido branco amorfo, homogêneo em CCDA, solúvel em clorofórmio.

No espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 140), observaram-se bandas em 1.700 cm^{-1} , característica de deformação axial C = O de carbonila de cetona conjugada; em 2.957 e 2.869 cm^{-1} , referentes à deformação axial da ligação C – H; absorção em 1.458 e 1.382 cm^{-1} decorrentes de deformações angulares da ligação C – H de grupo metila.

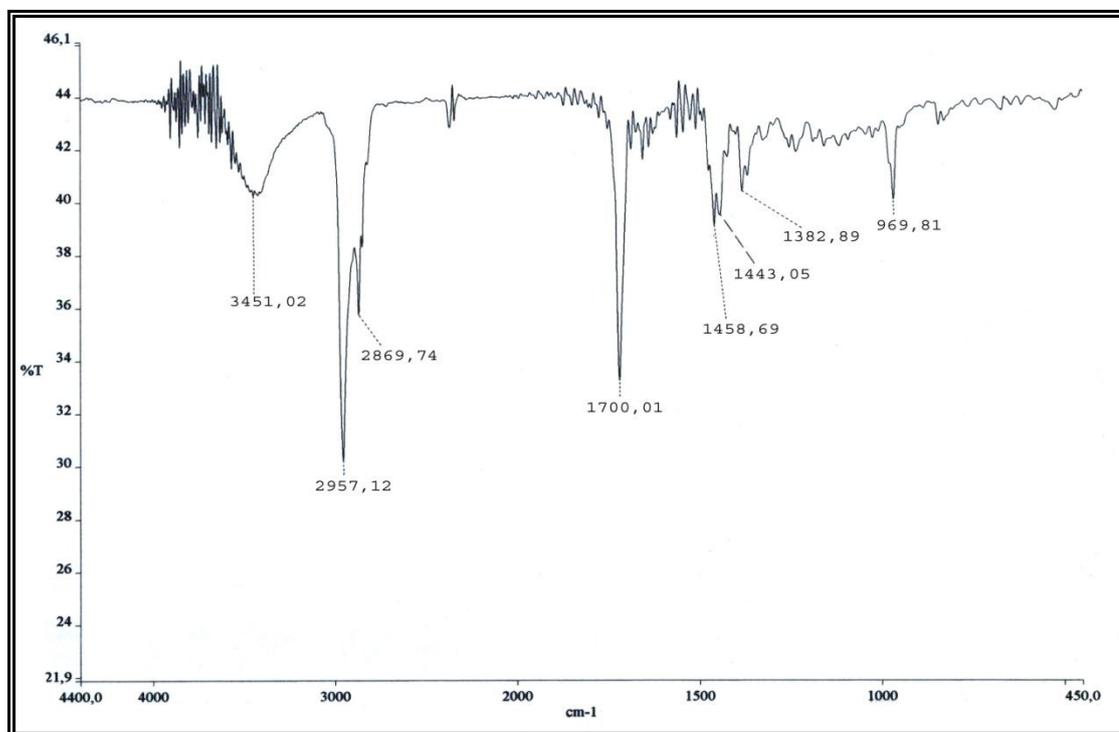


Figura 140: Espectro de IV (KBr) de G5

O espectro de RMN ^1H de G5 (Fig. 142, p. 174) também se mostrou bastante semelhante aos espectros já comentados anteriormente, exibindo sinais na faixa compreendidos entre δ 2,51-0,83 ppm, característicos de compostos com esqueleto esteroidal; apresentou ainda sinais em δ 5,27 ppm (dd, $J_1 = 15,3$; $J_2 = 8,1$ Hz) e em δ 5,22 ppm (dd, $J_1 = 15,3$; $J_2 = 7,3$ Hz), característicos de hidrogênio olefínico, com integração para dois hidrogênios. A partir desta primeira constante de acoplamento (J_1), entre esses dois

hidrogênios olefínicos, cujo valor está compreendido entre 12-18 Hertz, segundo Silverstein e colaboradores (1994), sugeriu-se que os hidrogênios apresentam configuração *trans*.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 142, p. 174) ainda revelou dois sinais dubletos em δ 6,61 ($J = 9,5$ Hz) e δ 6,03 ($J = 9,5$ Hz) ppm, cada um com integração para um hidrogênio, na região de hidrogênios olefínicos. A confirmação dos valores iguais de acoplamento entre estes hidrogênios confirmam que há correlação entre estes núcleos, sendo que, segundo Silverstein e colaboradores (1994), este valor é típico de hidrogênios de ligação dupla com configuração *cis*. Além disso, também na mesma região de hidrogênios olefínicos, apresentou um singlete em δ 5,74 ppm, com integração para um hidrogênio, sugerindo uma ligação dupla trissubstituída, com nenhum outro hidrogênio a três ligações na vizinhança. Na região característica da presença de hidrogênios metílicos, compreendida entre δ 1,07-0,83 ppm, observou-se a existência de dois sinais singletos (δ 1,00 e 0,97 ppm) e quatro sinais dubletos (δ 1,07; 0,94; 0,85 e 0,84 ppm) (Fig. 143, p. 174).

No espectro de RMN ^{13}C – CPD (Fig. 144, p. 175), observaram-se 28 linhas espectrais; dos quais um sinal em δ 199,7 ppm, característico de carbonila de cetona que corroborou com a absorção observada no espectro de IV em 1.700 cm^{-1} (Fig. 140, p. 170) de carbonila de cetona conjugada; oito sinais em δ 164,6; 156,3; 135,2; 134,2; 132,7; 124,6; 124,6; 123,2 ppm na região de carbonos olefínicos. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (Fig. 145, p. 175) mostrou que, em relação a estes oito sinais de carbonos olefínicos, os sinais em δ 164,6; 156,3 e 124,6 ppm correspondem a carbonos não hidrogenados e os cinco sinais em δ 135,2; 134,2; 132,7; 124,6 e 123,2 ppm tratavam de carbonos metílicos (CH). Além disso, há mais dois sinais de carbonos não hidrogenados (C), não funcionalizados, em δ 44,2 e 36,9 ppm; assim como, mais cinco sinais de carbonos metílicos (CH), não funcionalizados, em δ 55,9; 44,7; 43,0; 39,7 e 33,3 ppm. Esta análise revelou ainda os sinais em δ 35,8; 34,5; 34,5; 27,9; 25,5 e 19,4 ppm correspondem a carbonos metilênicos (CH_2), e os sinais em δ 21,6; 20,4; 20,0; 19,3; 18,0 e 17,0 ppm representam carbonos metílicos (CH_3). Com isso, conforme descreve a Tabela 22 (p. 172), o composto G5 apresenta cinco carbonos não hidrogenados, dez carbonos metílicos, seis carbonos metilênicos e seis carbonos metílicos.

Tabela 22: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G5 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃
199,7	135,2	35,8	21,6
164,6	134,2	34,5	20,4
156,3	132,7	34,5	20,0
124,6	124,6	27,9	19,3
44,2	123,2	25,5	18,0
36,9	55,9	19,4	17,0
	44,7		
	43,0		
	39,7		
	33,3		
3 C = C	5 HC = C		
1 C = O			
C ₅ O	C ₁₀ H ₁₀	C ₆ H ₁₂	C ₆ H ₁₈
		TOTAL	C ₂₈ H ₄₀ O

A análise da Tabela 22 permitiu deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$, demonstrando índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove, que é compatível com esteróides, devido à presença de quatro anéis, com quatro ligações duplas de carbonos olefínicos e a presença de uma carbonila. O espectro de massas (Fig. 146, p. 176) corroborou com a estrutura proposta ao apresentar pico do íon molecular com m/z 392.

Os dados de correlação do composto G5 estão apresentados na Tabela 23 (p. 173), incluindo dados bidimensionais e comparação com o composto ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (MARINHO, 2006).

Esses dados espectroscópicos observados em comparação com dados da literatura (MARINHO, 2006), permitiram identificar G5 como um esteróide, com nome de ergosta-1,4,8(14),22-tetraen-3-ona, conforme ilustra a Figura 141.

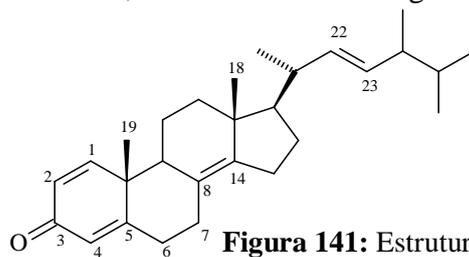


Figura 141: Estrutura de G5

Tabela 23: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G5, comparando-se com dados da literatura (MARINHO, 2006), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC).

G5					MARINHO, 2006 (CDCl_3)	
	HMQC		HMBC		HMQC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
3	199,7	-			199,3	-
5	164,6	-		3H-19	164,2	-
8	124,6	-			124,5	-
10	36,9	-	3H-19		36,8	-
13	44,2	-	3H-18		44,1	-
14	156,3	-		3H-18	156,0	-
CH						
1	134,2	6,61 (d, 9.5)		3H-19	-	
2	124,6	6,03 (d, 9.5)			-	
4	123,2	5,74 (s)			123,1	5,72 (s)
6	-	-			124,5	6,01 (d, 9.4)
7	-	-			133,9	6,60 (d, 9.4)
9	44,7	2,15		H-1; 3H-19	44,5	
17	55,9	1,29		3H-18; 3H-21	55,8	
20	39,7	2,15	3H-21	H-23	39,2	
22	135,2	5,22 (dd, 15.3, 7.3)		3H-21	135,0	5,22 (m)
23	132,7	5,27 (dd, 15.3, 8.1)		3H-28	132,6	5,22 (m)
24	43,0	1,89	3H-28	3H-26; 3H-27	42,9	
25	33,3	1,50	3H-26; 3H-27	3H-28	33,1	
CH₂						
1	-	-			34,1	
2	-	-			34,2	
6	25,5	2,50-2,30			-	
7	34,5	2,60-2,25			-	
11	19,4	1,70-1,60			19,0	
12	35,8	2,08-1,30		3H-18	35,7	
15	34,5	2,05-1,80			25,4	
16	27,9	1,82-1,50			27,7	
CH₃						
18	19,3	0,97 (s)			19,0	0,95 (s)
19	17,0	1,00 (s)			16,7	0,98 (s)
21	21,6	1,07 (d, 6,6)			21,2	1,05 (d, 6,7)
26	20,4	0,85 (d, 7.0)			20,0	0,82 (d, 6,8)
27	20,0	0,84 (d, 6.9)			19,7	0,84 (d, 6,8)
28	18,0	0,94 (d, 6.7)			17,6	0,92 (d, 6,8)

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

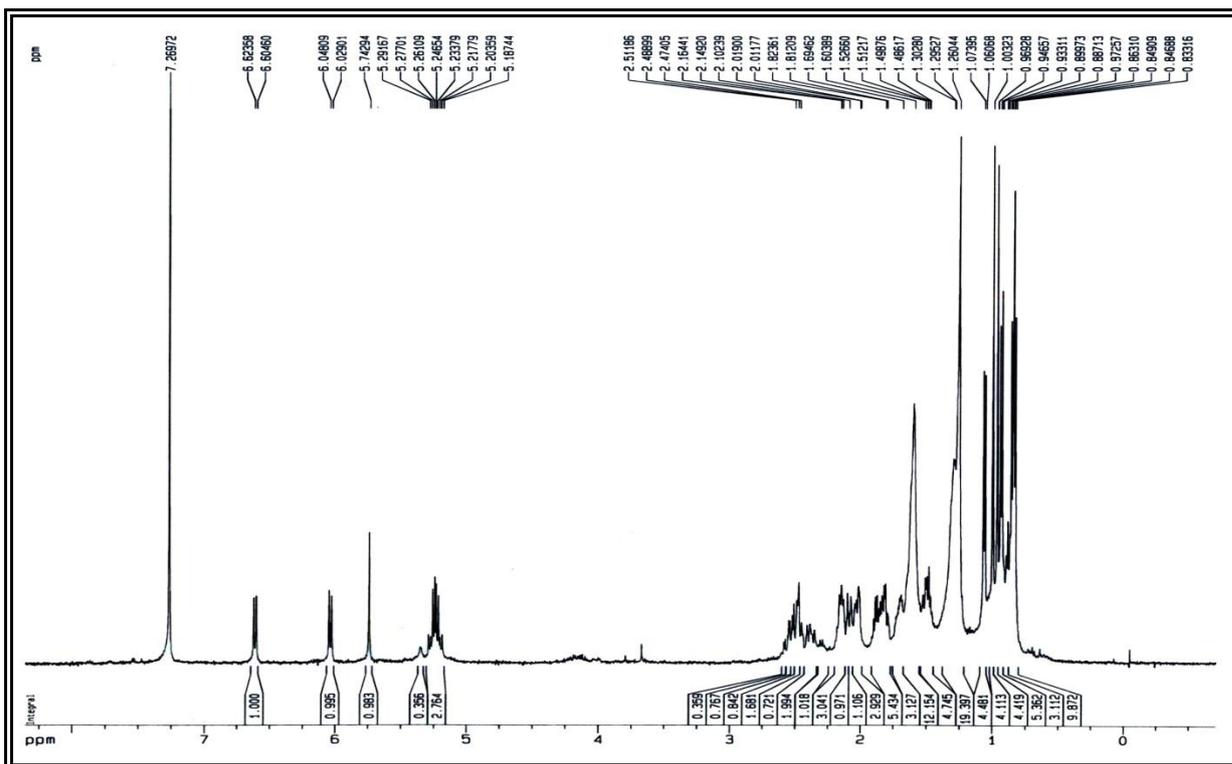


Figura 142: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de G5

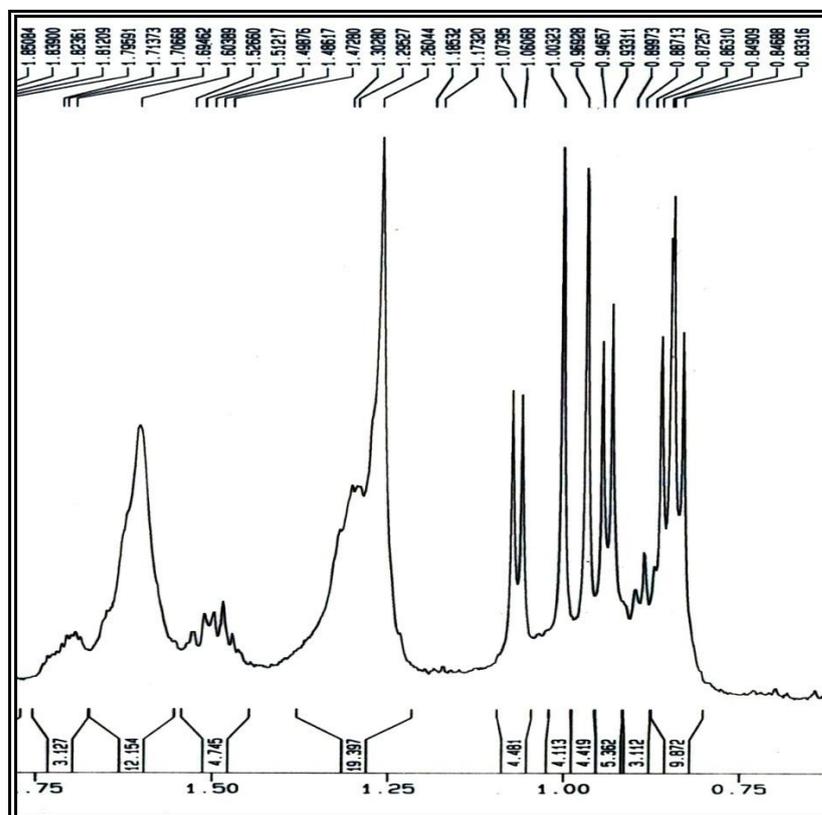


Figura 143: Espectro de RMN ¹H – Expansão (500 MHz, CDCl₃) de G5

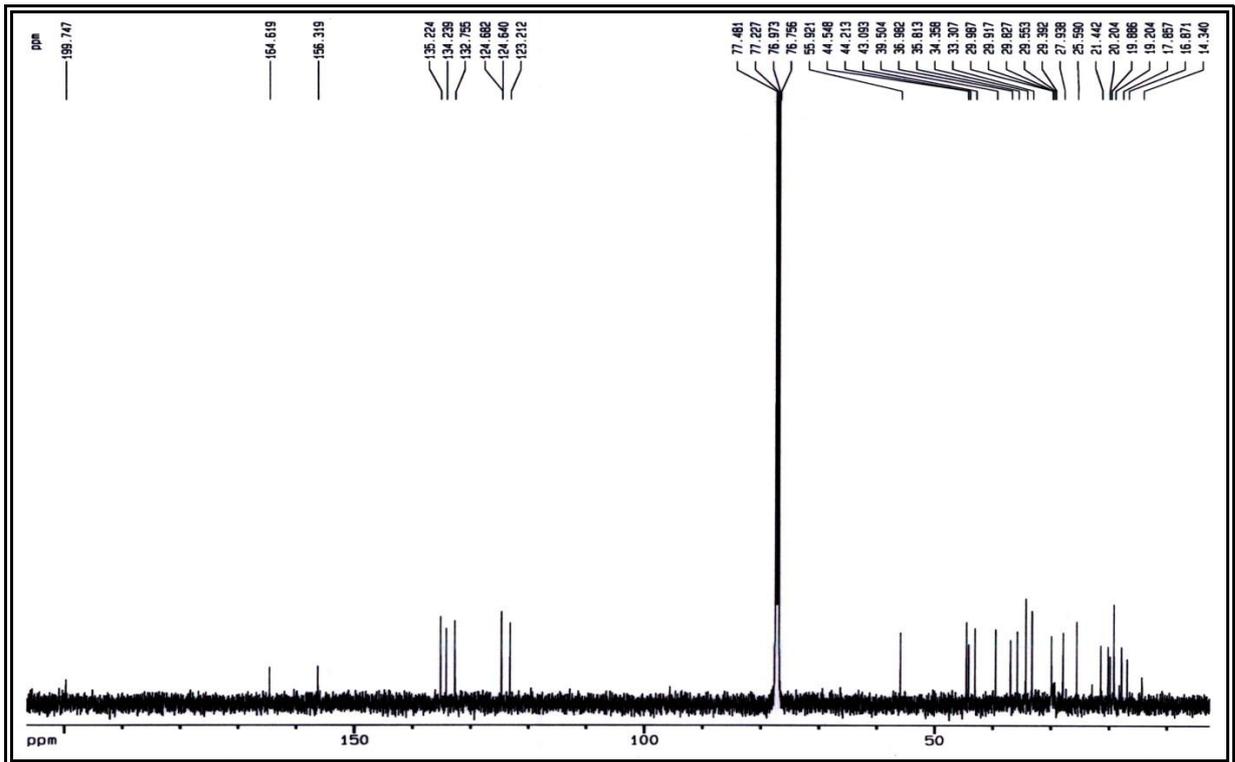


Figura 144: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de G5

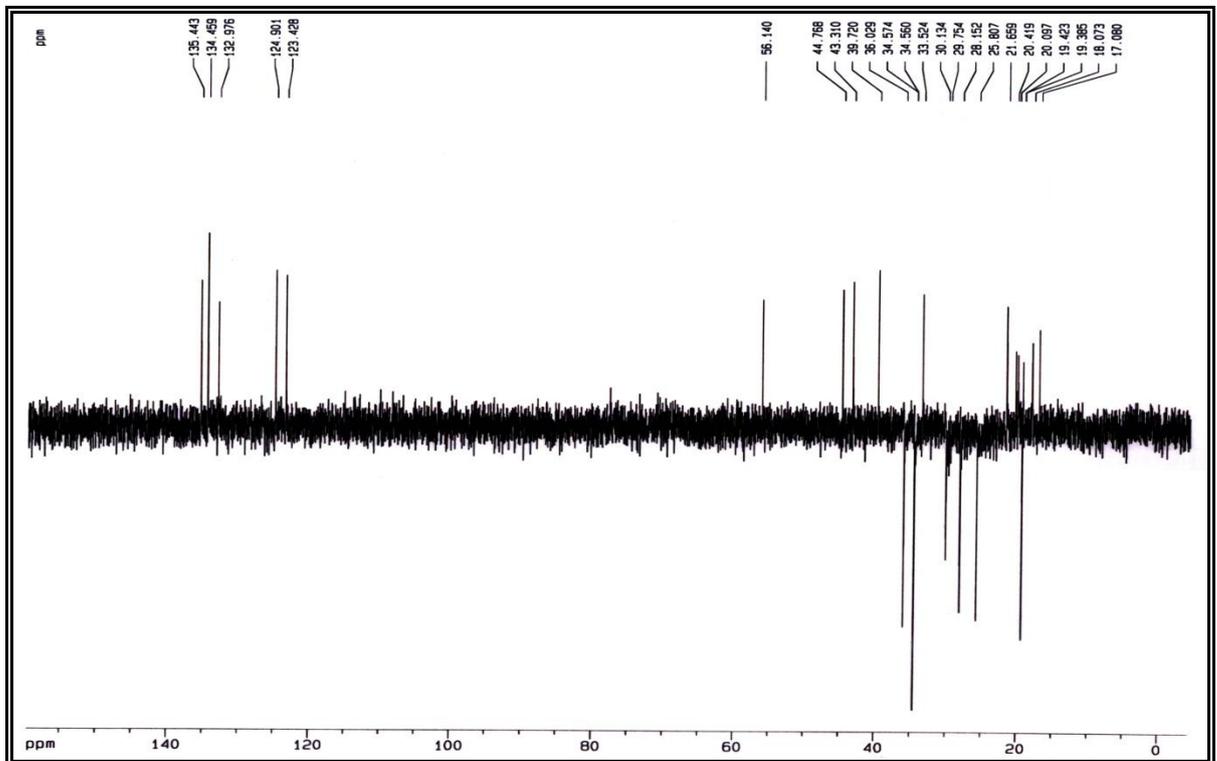


Figura 145: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de G5

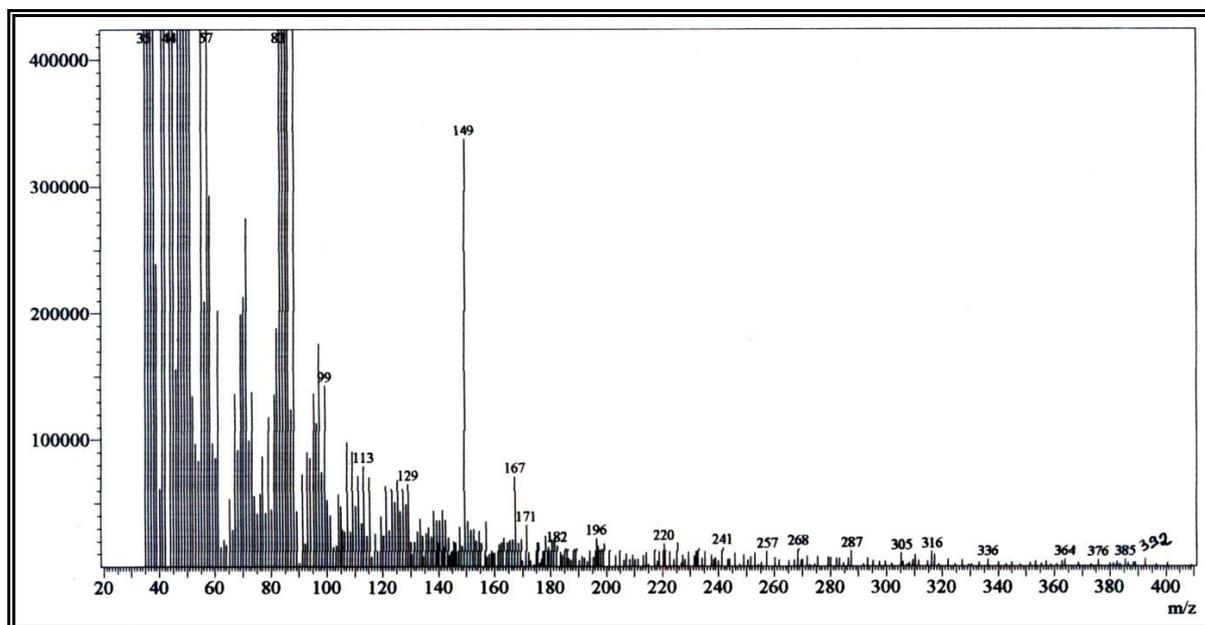


Figura 146: Espectro de massas de G5 (70 eV)

CAPÍTULO 9

Resultados e discussões das sínteses de
derivados esteroidais

9. RESULTADOS E DISCUSSÕES DAS SÍNTESES DE DERIVADOS ESTEROIDAIIS

Estudos mostrando a relação estrutura química/atividade biológica de esteróides encontram-se bem representados na literatura, onde modificações estruturais são obtidas objetivando a potencialização da ação farmacológica do composto (DJERASSI, 1963; FIESER; FIESER, 1959; MOREIRA, 2008).

O esteróide G1 foi obtido em quantidade significativa a partir do extrato etanólico de *G. lucidum*. Por apresentar em sua estrutura função oxigenada na posição C-3 e duplas ligações no anel B e na cadeia lateral, optou-se por realizar uma série de derivados funcionalizando o esteróide, especialmente na função oxigenada localizada em C-3. Dentre os derivados, programou-se a redução da carbonila, esterificações do álcool obtido, além da obtenção de oximas na carbonila. Um esquema reacional para obtenção dos derivados pode ser visto na Figura 147.

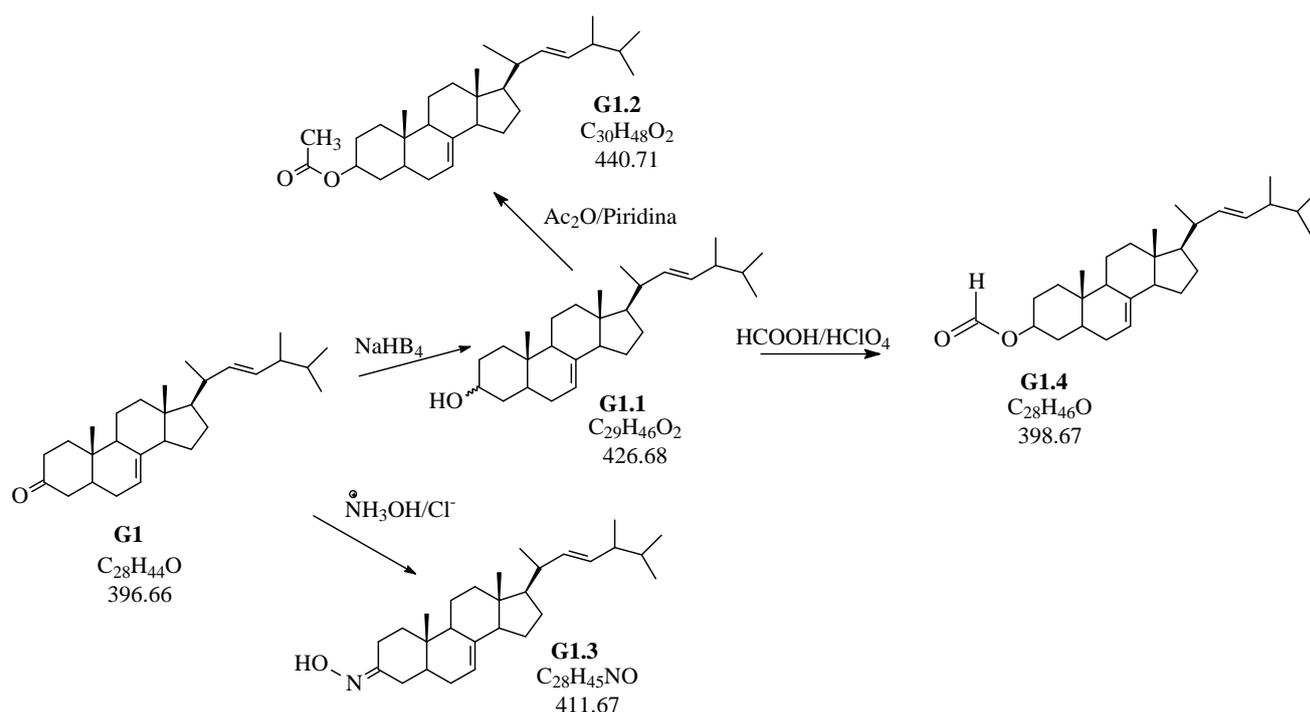


Figura 147: Esquema reacional de obtenção de derivados esteroidais de G1

A obtenção desses esteróides teve como objetivo de sintetizar novos derivados da substância ergosta-7,22-dien-3-ona, com disponibilização de dados espectroscópicos e com possibilidades de apresentar atividades biológicas diferenciadas.

9.1 Redução de G1

Os derivados obtidos através da redução da carbonila em C-3 do composto ergosta-7,22-dien-3-ona estão representados no esquema reacional na Figura 148 a seguir. A reação de redução foi realizada com NaBH_4 com bom rendimento (64%), obtendo-se conforme esperado dois produtos, um com o grupo hidroxila em posição alfa e outro na posição beta.

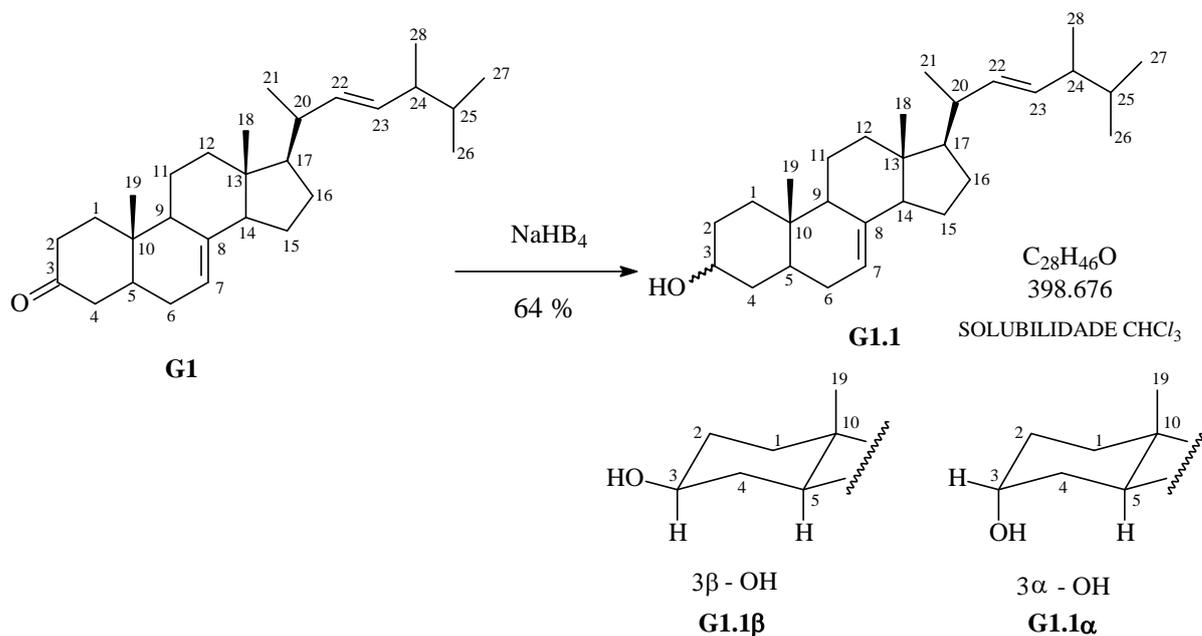


Figura 148: Redução de G1

No espectro de absorção na região do infravermelho IV (Fig. 154, p. 184), observaram-se bandas em 3.426 cm^{-1} , característico de deformação axial O – H; em 2.956 e 2.867 cm^{-1} , característicos de deformação axial de C – H; absorção em 1.458 e 1.378 cm^{-1} decorrente de deformações angulares da ligação C – H de grupo metila; em 1.045 cm^{-1} , característico de deformação angular de C – O – H de álcool e absorção em 967 cm^{-1} característico de deformação angular do grupo H – RC = CR' – H (trans).

Na análise em RMN ^1H (151, p. 182), o deslocamento químico em δ 3,60 ppm (1H, m, CH-3) permitiu verificar a presença da hidroxila ligada ao carbono C-3, confirmando a formação do produto desejado.

Na análise em RMN ^{13}C (152, p. 183), a ausência de sinais próximo de δ 210 ppm, referente a carbono carbonílico de cetona, corroborou com a proposta de formação do álcool desejado a partir da redução da carbonila C-3. A duplicação de alguns sinais permitiu

propor a formação de dois compostos. A diferença na intensidade dos dois picos δ 66,69 (C-3, α - OH) e 71,28 (C-3, β - OH) ppm apoiou a idéia de formação de dois compostos, demonstrando a predominância do produto com grupo OH na posição beta. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^{\circ}$ (Fig. 153, p. 183) confirmou de forma clara a ausência de carbono carbonílico.

Os dados de correlação do composto G1.1 são apresentados na Tabela 24 (p. 181), incluindo dados bidimensionais e comparação com a literatura. Comparando-se os deslocamentos químicos no carbono C-3 entre os compostos G1 e G1.1, percebe claramente que, na substância G1.1, na qual apresenta a hidroxila, ocorre uma desproteção menor neste carbono (δ 71,28 ppm), uma vez que este núcleo, na substância G1, está na forma de carbonila (δ 211,97 ppm). Nos carbonos C-2 e C-4, para a substância G1, seus deslocamentos químicos são maiores que no composto G1.1, devido ao efeito anisotrópico de desproteção da carbonila (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994). O núcleo de C-4, comparando-se ao C-2, nos dois compostos, está mais desprotegido, devido ao efeito β de desproteção do anel esteroidal B (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994), conforme demonstra a Figura 149.

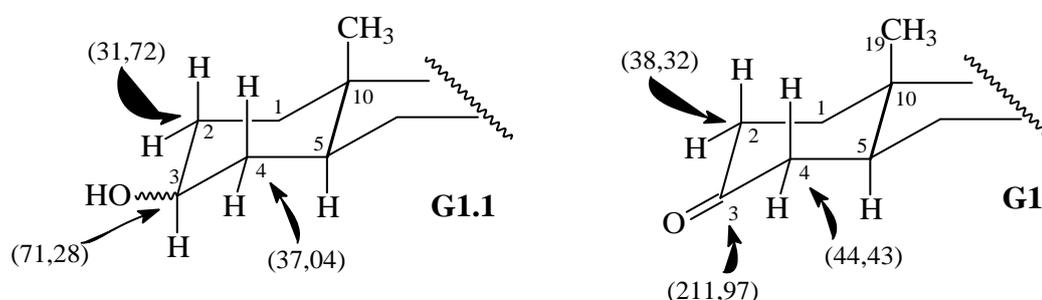


Figura 149: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) nos C-2, C-3 e C-4, nas substâncias G1.1 e G1

O espectro de massas (Fig. 155, p. 184) corroborou com a estrutura proposta apresentando íon molecular com m/z 398, ou seja, duas unidades a mais que o composto de partida. Uma proposta para fragmentação do espectro de massas foi apresentada na Figura 156 (p.185).

Tabela 24: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.1, comparando-se com dados de G1 e Mo-1 (Literatura), com correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ (HMBC).*

G1.1				G1		Mo-1**	
C	HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$			
3	-	-			211,97	-	-
8	139,78	-			139,72	-	139,0
10	34,48	-	3H-19		34,62	-	34,1
13	43,55	-	3H-18	H-15b; H-16a	43,50	-	43,1
CH							
3	71,28	3,60 (m)	H-2a; H-4b		-	-	70,9
5	40,52	1,40		H-7	43,10	1,85	40,2
7	117,78	5,15 (m)			117,22	5,25-5,10 (m)	117,1
9	49,73	1,64		3H-19	49,12	1,75	49,4
14	55,36	1,82		3H-18	55,24	1,85	55,0
17	56,25	1,28		3H-18; H-20; 3H-21	56,20	1,29	55,8
20	40,67	1,99	3H-21; H-22	H-23	40,67	2,23	40,4
22	135,91	5,17 (dd, 15.3, 7.6)	H-20; H-23	3H-21; H-24	135,79	5,25-5,10 (m)	135,2
23	132,15	5,22 (dd, 15.3, 7.0)	H-22	H-20; H-25; 3H-28	132,22	5,25-5,10 (m)	131,4
24	43,07	1,80	H-23; H-25; 3H-28	H-22; 3H-26; 3H-27	43,05	1,85	42,7
25	33,33	1,51	3H-26; 3H-27	3H-28	33,29	1,45	33,0
CH₂							
1	38,24	1,82; 1,10			39,01	2,12; 1,45	37,1
2	31,72	1,80; 1,38			38,32	2,45; 2,30	31,4
4	37,41	1,75; 1,30			44,43	2,05	37,9
6	29,89	1,80	H-5		30,27	1,85	29,6
11	21,79	1,58; 1,51			21,90	1,60	21,5
12	39,72	2,01; 1,26		3H-18	39,57	2,12	39,4
15	23,17	1,52; 1,48	H-16b	H-14	23,14	1,50; 1,35	22,9
16	28,31	1,71; 1,31			28,32		28,1
CH₃							
18	12,32	0,55 (s)		H-12b; H-14	12,35	0,58 (s)	12,1
19	13,25	0,80 (s)			12,63	1,02 (s)	13,0
21	21,35	1,02 (d, 6.6)		H-22	21,33	1,03 (d, 7.1)	21,1
26	19,87	0,84 (d, 7.1)			19,85	0,84 (d, 7.2)	19,6
27	20,17	0,83 (d, 7.1)			20,17	0,83 (d, 7.1)	19,9
28	17,83	0,92 (d, 6.8)		H-23; H-25	17,82	0,92 (d, 6.8)	17,5

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

**An. Acad. Brasil. Ciênc. v. 58, n. 3, p. 363, 1986.

O composto Mo-1 (Tab. 24) corresponde ao esteróide com hidroxila no carbono C-3, com estereoquímica *S* (β), semelhante ao G1.1 β .

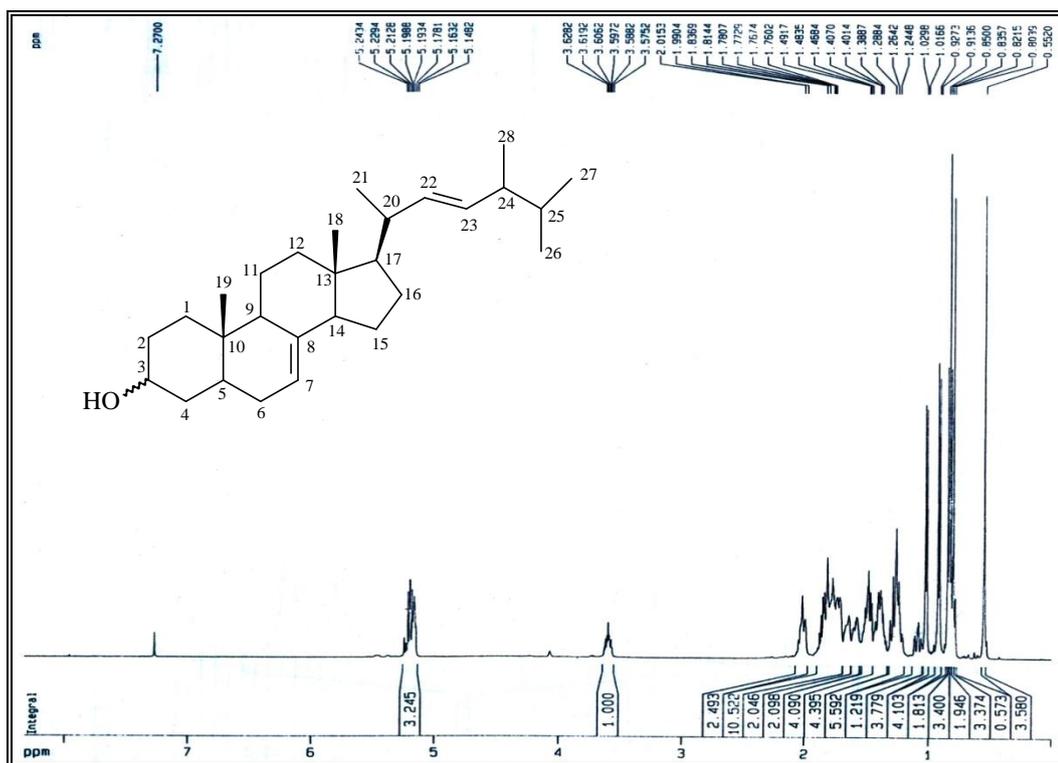


Figura 150: Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de G1.1

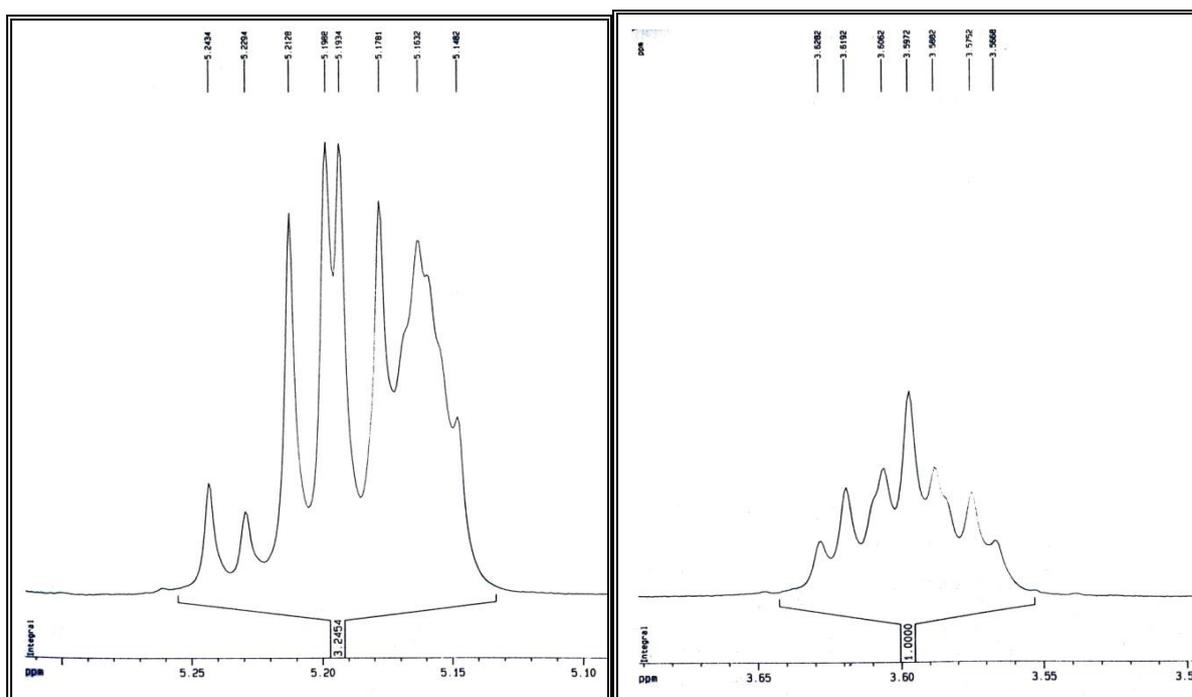


Figura 151: Espectros de RMN ¹H – expansões (CDCl₃, 500 MHz) de G1.1

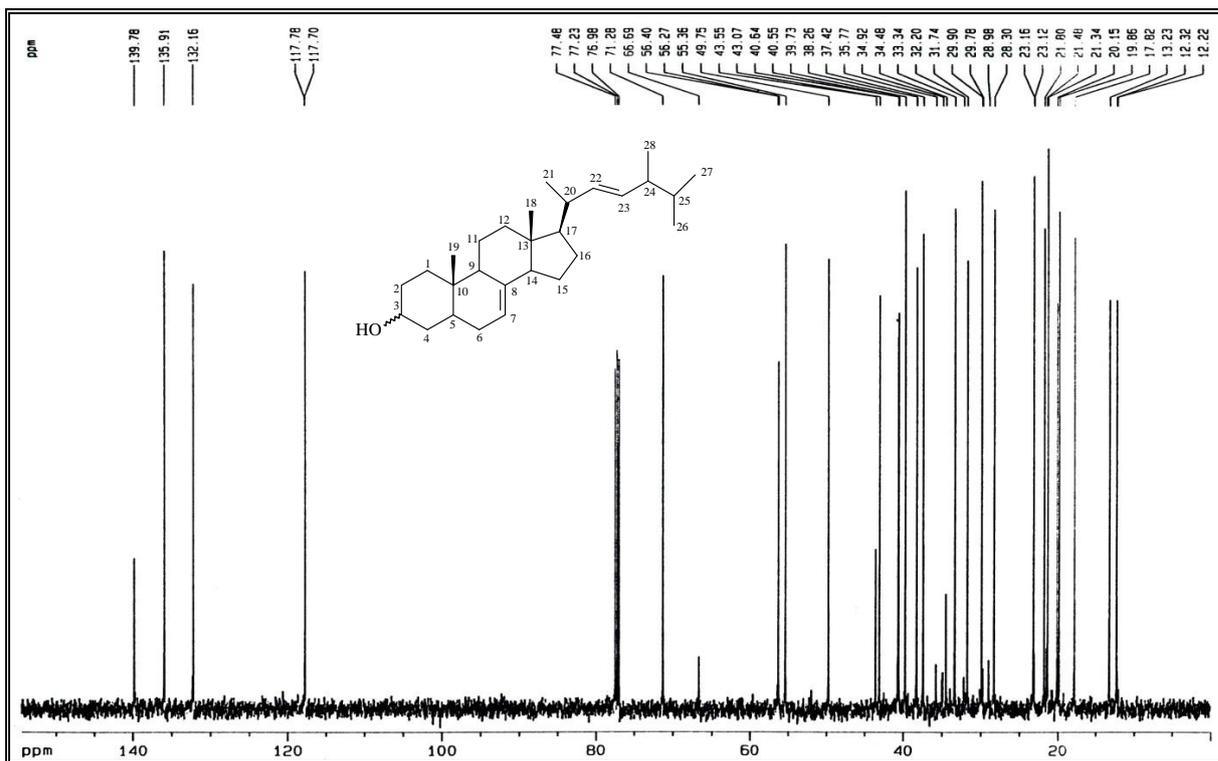


Figura 152: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.1

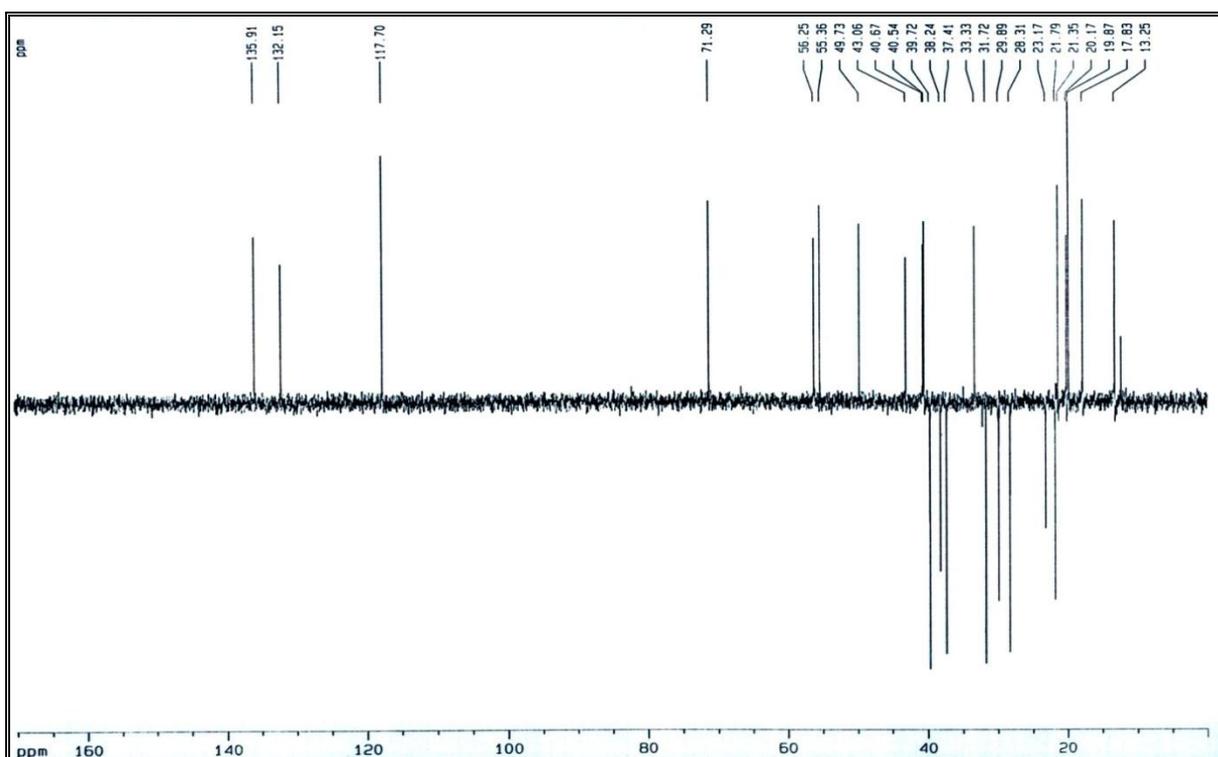


Figura 153: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^{\circ}$ (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.1

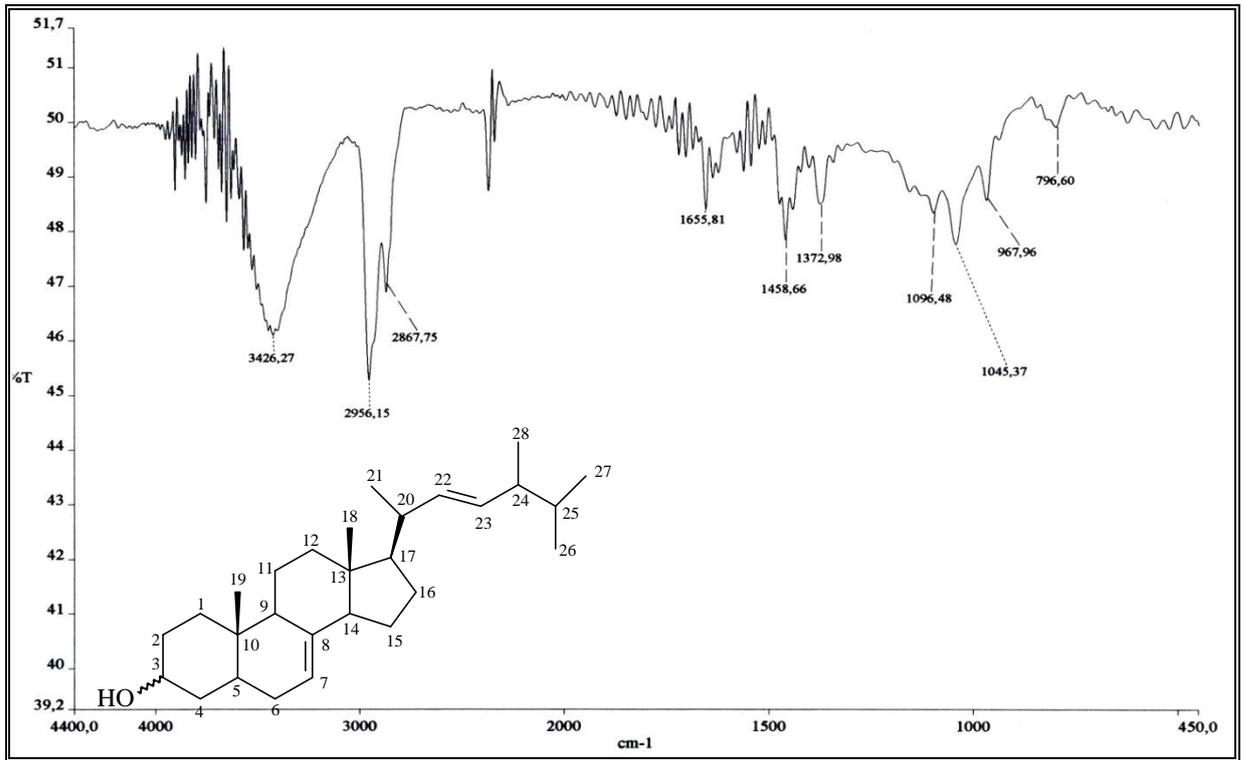


Figura 154: Espectro de IV de G1.1

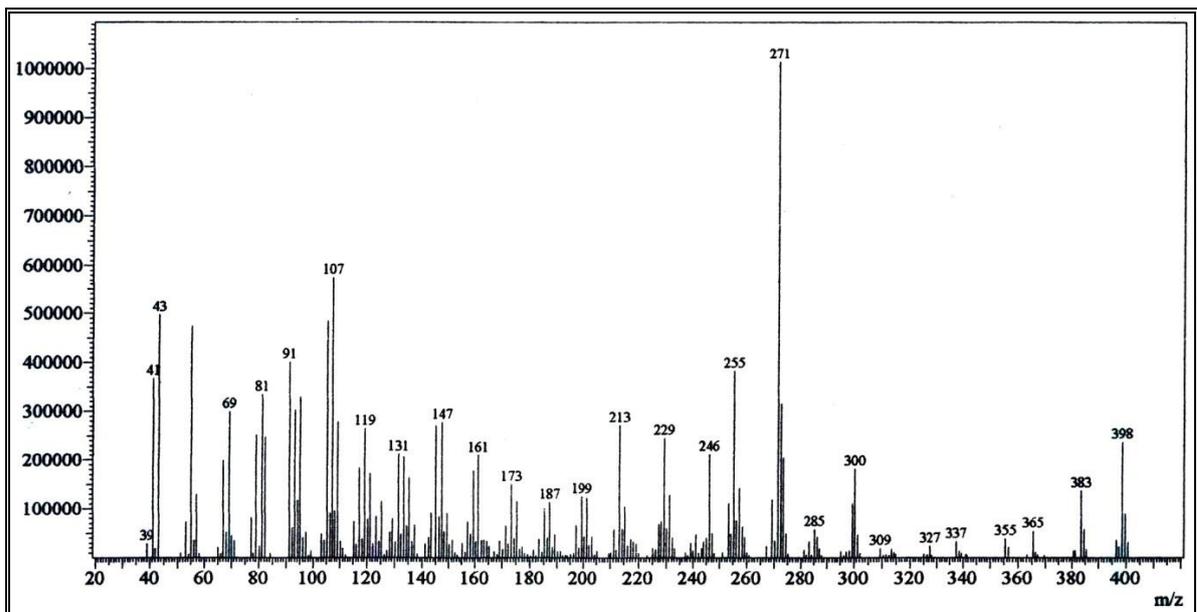


Figura 155: Espectro de massas de G1.1 (70 eV)

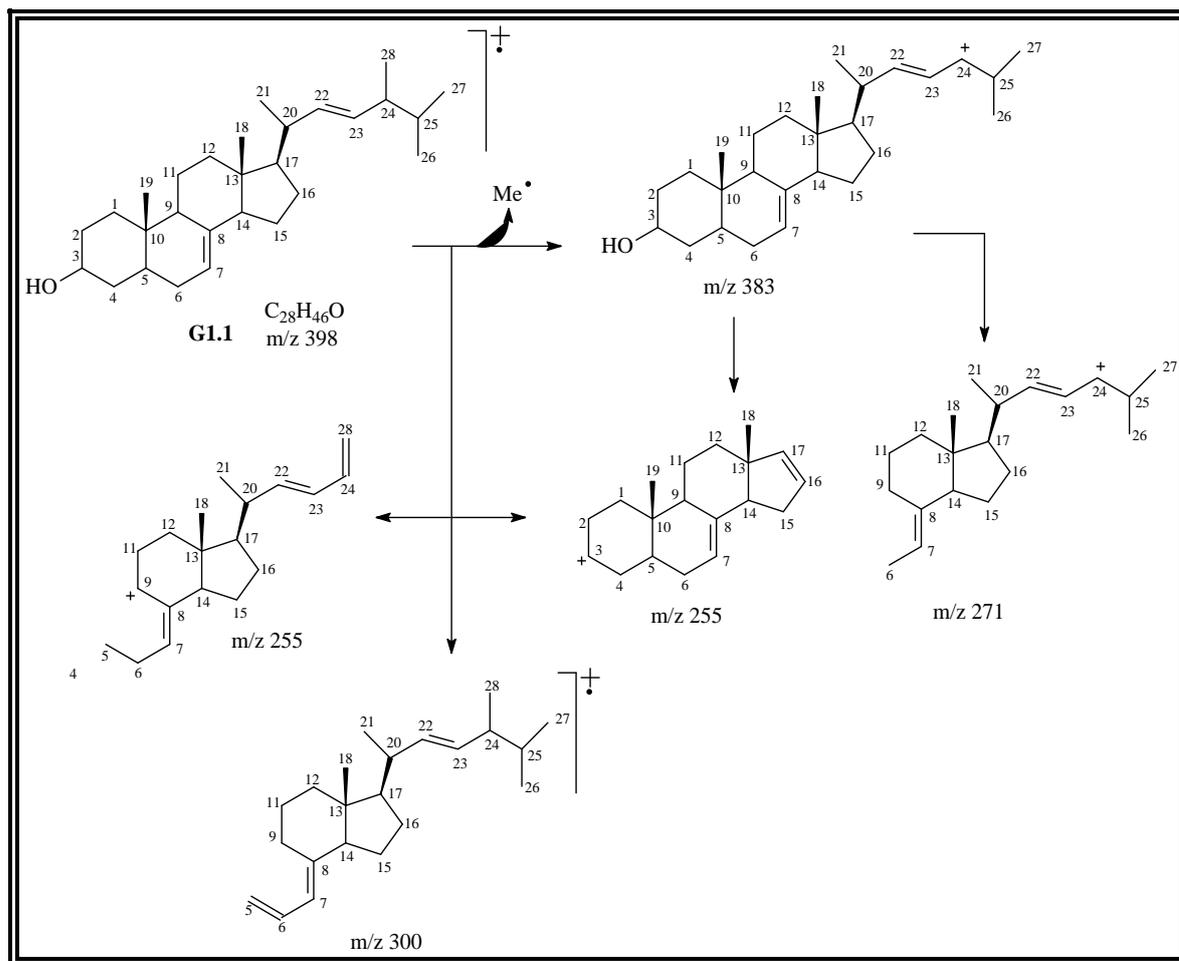


Figura 156: Proposta de fragmentação de G1.1

9.2 Acetilação de G1.1

O derivado obtido através da reação de acetilação do esteróide ergosta-7,22-dien-3-ol (G1.1) está representado na Figura 157. Nesta reação, utilizou-se como agente acetilante anidrido acético, obtendo-se o produto com bom rendimento (75,5%).

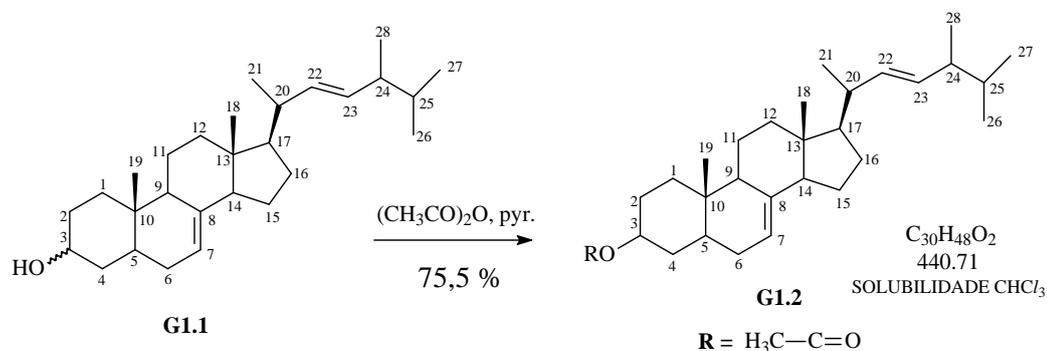


Figura 157: Acetilação de G1.1

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 161, p. 189) demonstrou a formação do produto desejado pelo surgimento de banda em 1.736 cm^{-1} , característico de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ de carbonila de éster, além da ausência de absorção na região de hidroxila.

Na análise de RMN ^1H (Fig. 158, p. 188), observou-se o deslocamento químico em $\delta 2,03\text{ ppm}$ (3H, s, $\text{CH}_3\text{-2}'$) referente a grupo metílico de éster; $\delta 4,70\text{ ppm}$ (1H, m, CH-3), referente a hidrogênio ligado a carbono oxigenado, bastante desprotegido, sugerindo hidrogênio de carbono ligado ao grupo esterificado.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 159, p. 188) revelou um sinal em $\delta 170,85\text{ ppm}$, indicando a presença de carbonila no composto, corroborando com os dados de IV (Fig. 161, p. 189), além do sinal em $\delta 73,69\text{ ppm}$ (C-3), característico de carbono saturado oxigenado. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de RMN $^{13}\text{C-DEPT } 135^\circ$ (Fig. 160, p. 189) confirmou de forma clara a existência de carbono carbonílico.

Os dados de correlação do composto G1.2 são apresentados na Tabela 25 (p. 187), incluindo dados bidimensionais e comparação com o composto de partida.

O espectro de massas (Fig. 162, p. 190) confirmou a formação do derivado desejado ao apresentar íon molecular com $m/z 440$, ou seja, quarenta e duas unidades a mais que o composto de partida. Uma proposta para fragmentação do espectro de massas é apresentada na Figura 163 (p. 190).

Tabela 25: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.2, comparando-se com dados de G1.1.*

C	G1.2			G1.1		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
3	-	-			-	-
8	139,78	-			139,78	-
10	34,48	-	3H-19		34,48	-
13	43,51	-	3H-18		43,55	-
1'	170,05		2H-2'			
CH						
3	73,69	4,70 (m)		H-1a	71,28	3,60 (m)
5	40,30	1,48		H-1a	40,52	1,40
7	117,53	5,15 (m)			117,78	5,15 (m)
9	49,51	1,70		3H-19	49,73	1,64
14	55,20	1,82		3H-18	55,36	1,82
17	56,19	1,25		3H-18; 3H-21	56,25	1,28
20	40,69	2,02	3H-21		40,67	1,99
22	135,89	5,22 (dd)	H-20	3H-21; H-24	135,91	5,17 (dd, 15.3,7.6)
23	132,14	5,19 (dd)	H-24	H-20; H-25; 3H-28	132,15	5,22 (dd, 15.3, 7.0)
24	43,04	1,85	3H-28	3H-26; 3H-27	43,07	1,80
25	33,32	1,48	H-24	3H-28	33,33	1,51
CH₂						
1	37,07	1,87; 1,15		H-5; 3H-19	38,24	1,82; 1,10
2	27,73	1,80; 0,83			31,72	1,80; 1,38
4	34,04	1,75; 1,38			37,41	1,75; 1,30
6	29,75	1,86-1,76			29,89	1,80
11	21,70	1,58; 1,50			21,79	1,58; 1,51
12	39,82	2,02; 1,24		H-14; 3H-18	39,72	2,01; 1,26
15	23,14	1,50; 1,46	H-16b		23,17	1,52; 1,48
16	28,30	1,76; 1,25			28,31	1,71; 1,31
CH₃						
18	12,32	0,55 (s)			12,32	0,55 (s)
19	13,14	0,82 (s)			13,25	0,80 (s)
21	21,34	1,02 (d, 6.0)			21,35	1,02 (d, 6.6)
26	20,16	0,84 (d)	H-25		19,87	0,84 (d, 7.1)
27	19,86	0,83 (d)	H-25		20,17	0,83 (d, 7.1)
28	17,81	0,92 (d, 6.3)	H-24	H-25	17,83	0,92 (d, 6.8)
2'	21,65	2,03 (s)				

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

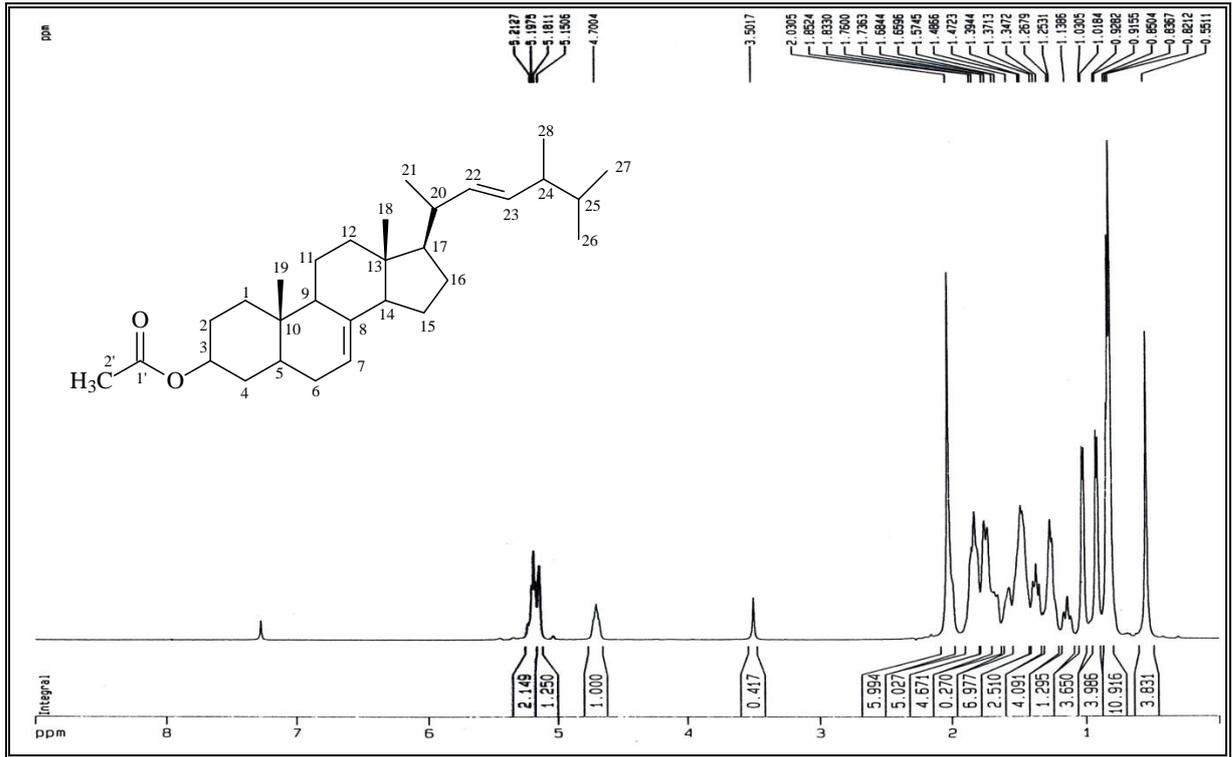


Figura 158: Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de G1.2

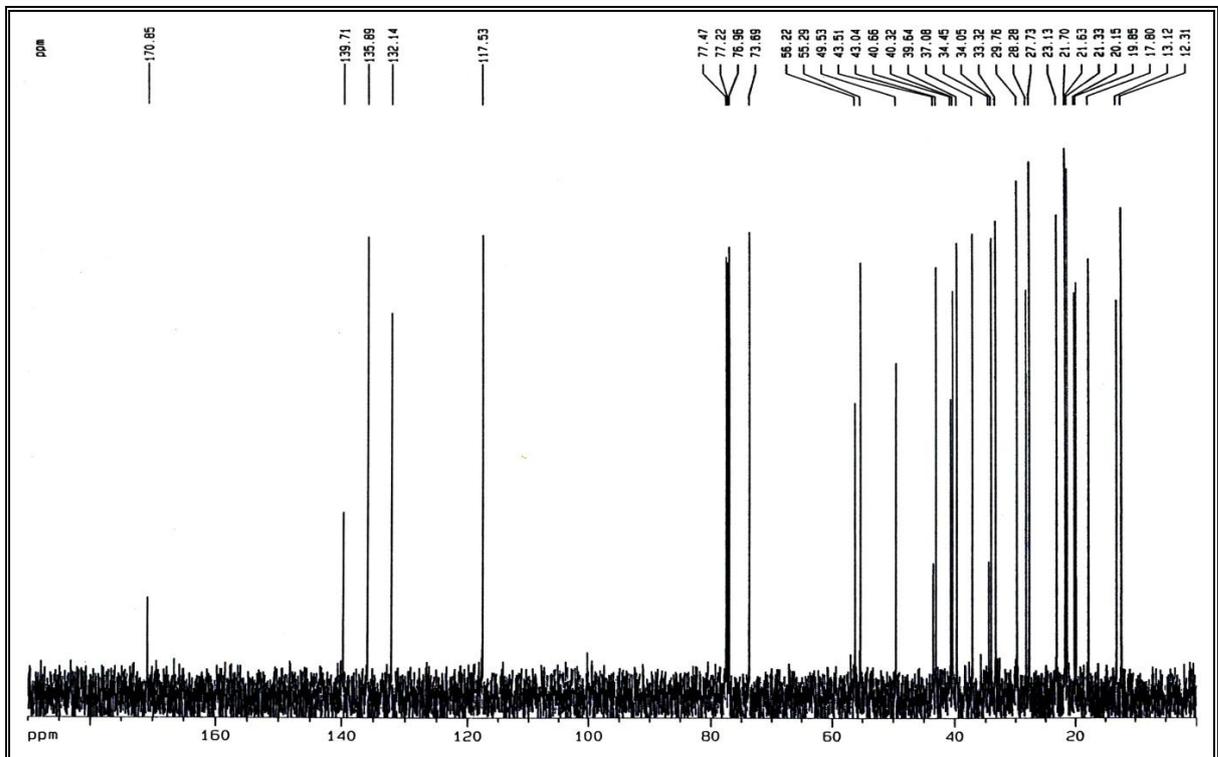


Figura 159: Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de G1.2

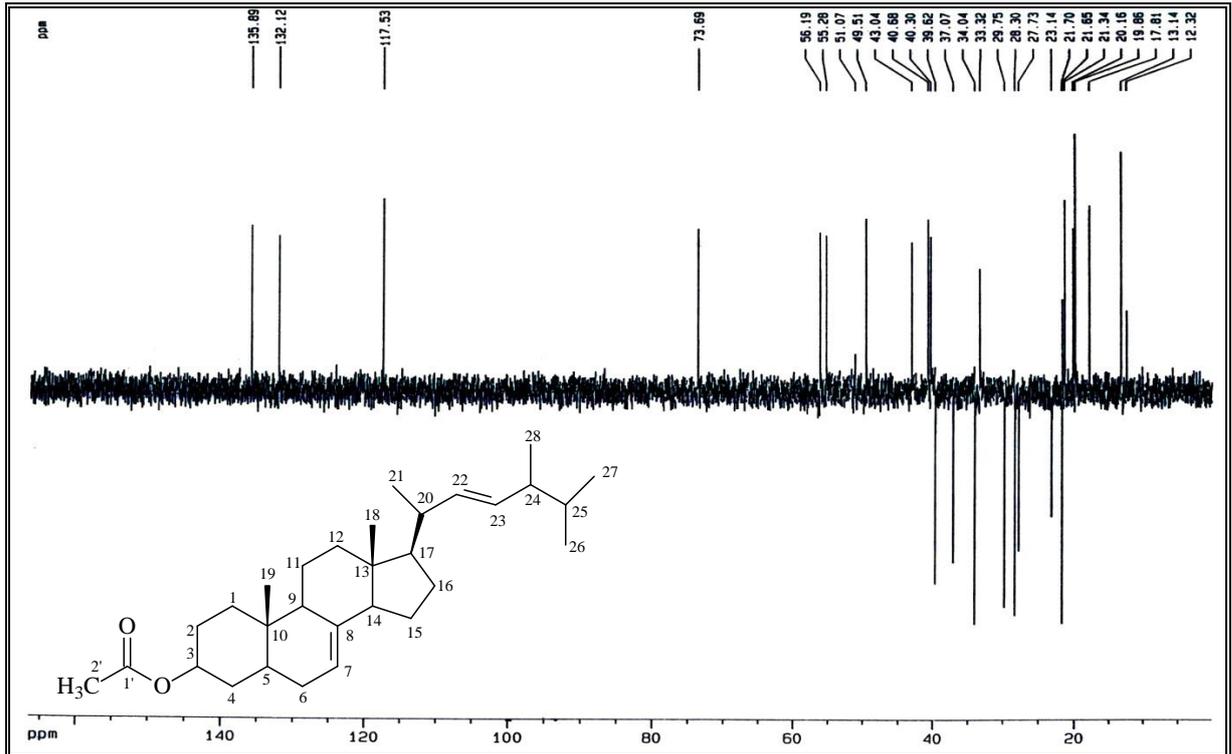


Figura 160: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^{\circ}$ (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.2

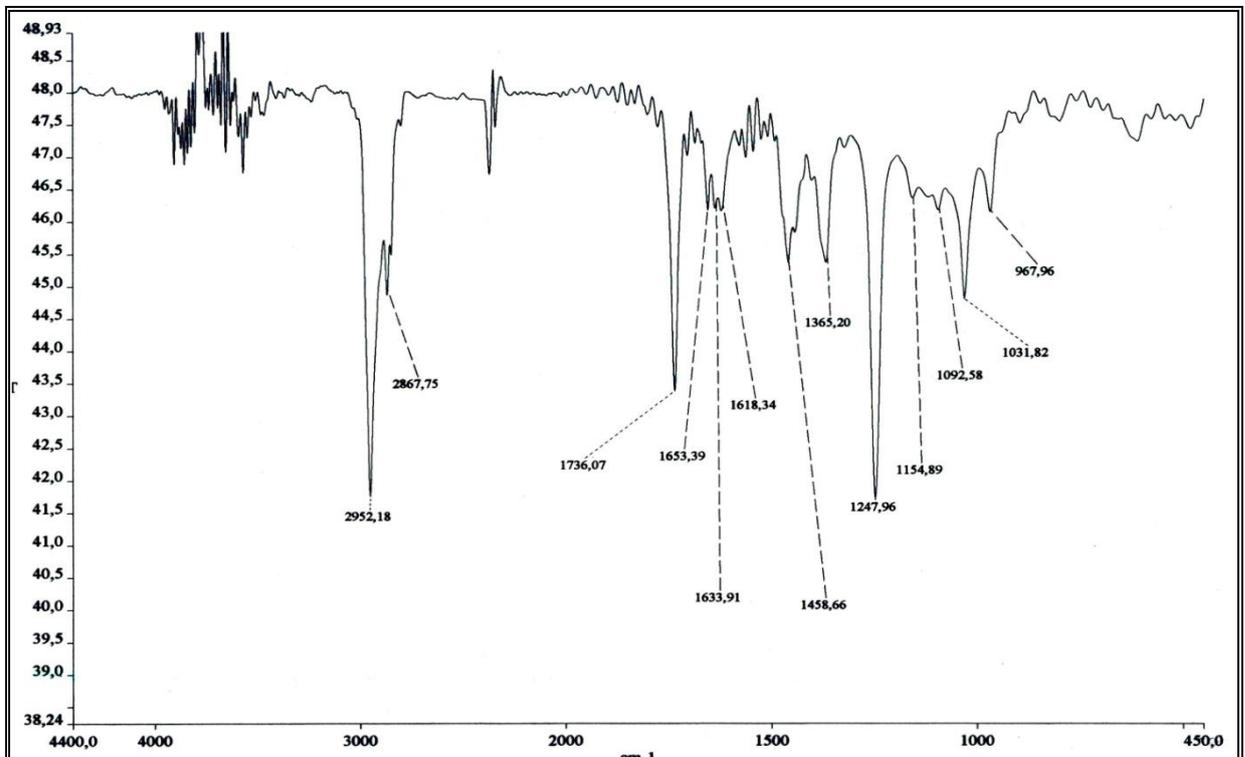


Figura 161: Espectro de IV de G1.2

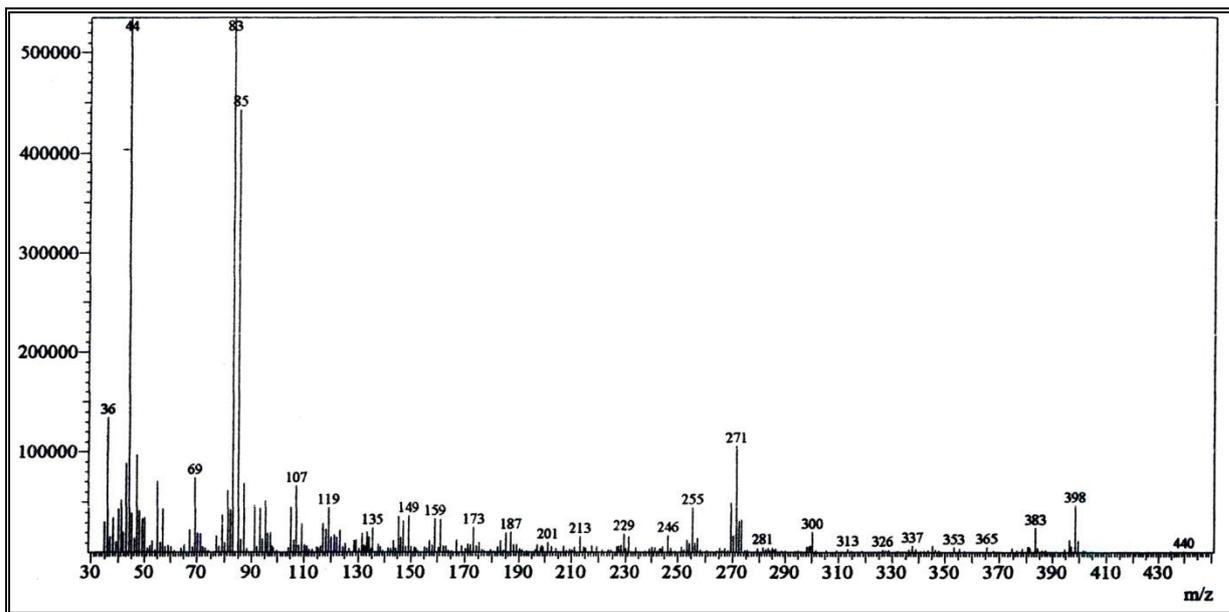


Figura 162: Espectro de massas de G1.2

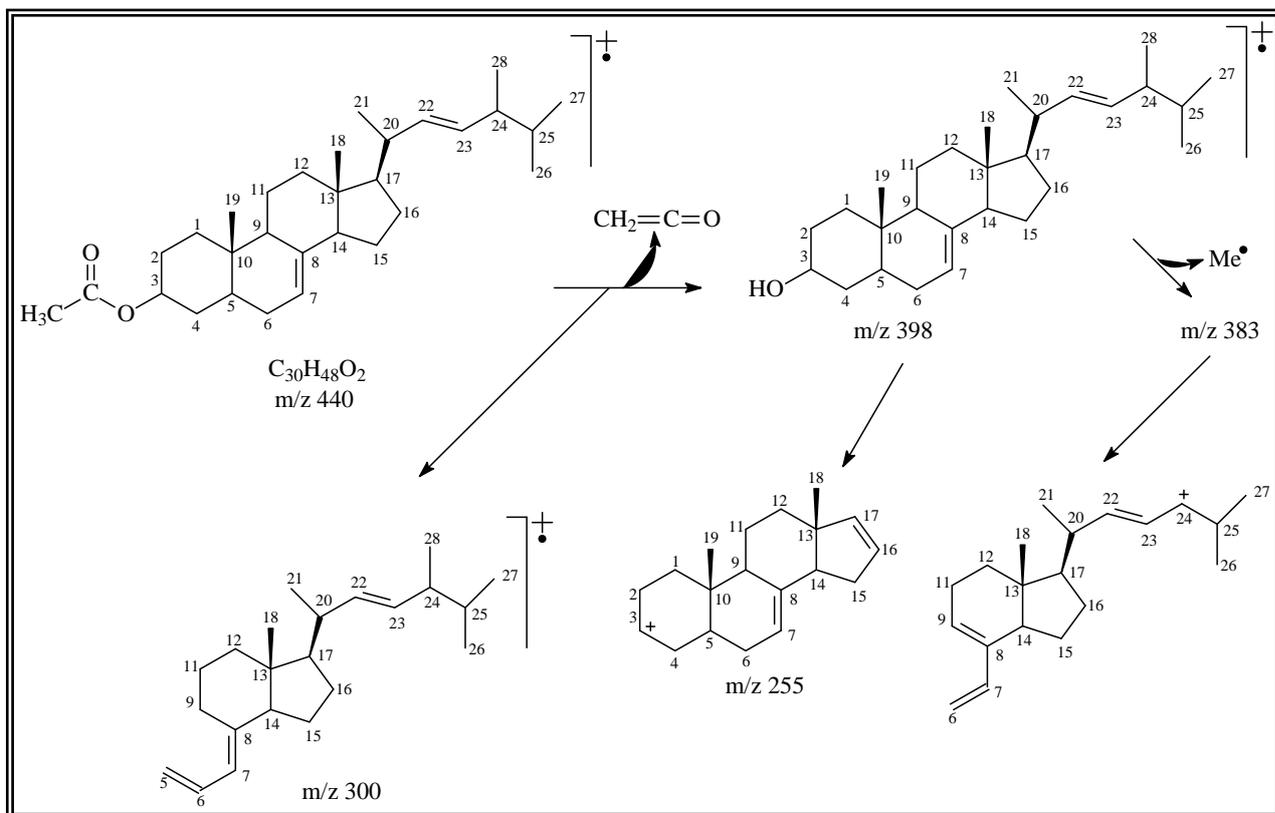


Figura 163: Proposta de fragmentação de G1.2

9.3 Síntese de oximas a partir de G1

Os derivados obtidos a partir do esteróide ergosta-7,22-dien-3-ona (G1) através da formação de oxima estão representados na Figura 164. Nesta reação, utilizou-se o sal cloridrato de hidroxilamina, obtendo a mistura de oximas G1.3a e G1.3b, com rendimento de 100%.

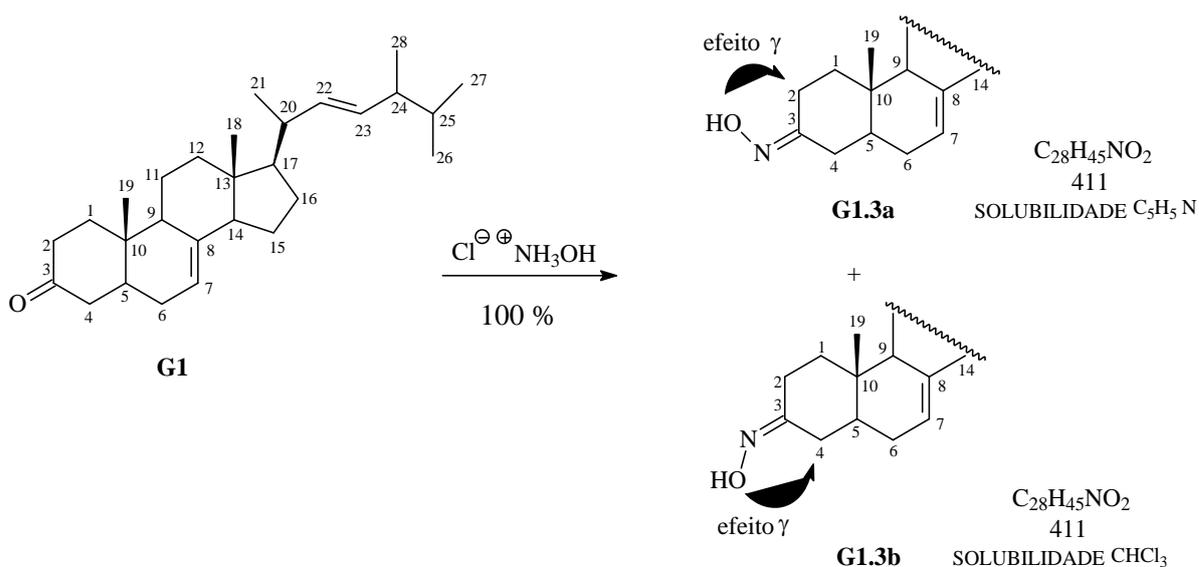


Figura 164: Síntese das oximas G1.3a e G1.3b

O espectro de absorção na região de infravermelho (Fig. 164, p. 191) revelou bandas em 3.275 cm^{-1} , característico de deformação axial de O – H; além da ausência de absorção na região de carbonila que confirmam o êxito da reação.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 160, p. 189) apresentou sinais semelhantes aos apresentados pelo composto de partida G1.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 162, p. 190) revelou sinal em δ 158,19 ppm, característico de carbono ligado ao grupo oxima (BREITMAIER; VOELTER, 1987); além da ausência de sinal característico de carbono carbonílico de cetona, corroborando com análise do espectro de infravermelho. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^{\circ}$ (Fig. 163, p. 190) confirmou de forma clara a inexistência de carbono carbonílico.

Os sinais destes compostos são muito semelhantes, diferindo significativamente apenas nos núcleos dos C-2, C-3 e C-4, conforme mostram os dados a seguir. Para G1. 3a, tem-se: RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 35,26 (C-2); 158,17 (C-3) e 40,30 (C-4). Para G1.3b, tem-se: RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 38,61(C-2) e 39,47(C-4).

É válido ressaltar que o grupo hidroxila *cis* em relação ao CH₂-2 ocasiona o efeito γ de proteção no composto G1.3a. Este efeito é calculado pelo $\Delta\delta_C = 35,26$ (G1.3a) – 38,32 (G1) = - 2,71 ppm. Enquanto que o grupo hidroxila *cis* em relação ao CH₂-4 ocasiona este mesmo efeito γ de proteção no composto G1.3b pelo $\Delta\delta_C = 39,47$ (G1.3b) – 44,43 (G1) = - 4,96 ppm (Figura 160, p.189). (BREITMAIER; VOELTER, 1987).

Os dados de correlação do composto G1.3a são apresentados na Tabela 27 (p. 199), incluindo dados bidimensionais e comparação com o composto de partida.

O espectro de massas (Fig. 165, p. 194) corroborou com a estrutura proposta apresentando íon molecular com m/z 411, ou seja, quinze unidades a mais que o composto de partida, além de apresentar um valor de m/z ímpar, indicando a presença de um átomo de nitrogênio. Uma proposta para fragmentação do espectro de massas é apresentada na Figura 166 (p. 194).

Tabela 26: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.3a, comparando-se com dados de G1.*

C	G1.3 ^a			G1		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
CH						
3	-	-	-	-	-	-
5	41,97	1,48		H-9; 3H-19	43,10	1,85
7	118,19	5,55 (m)			117,22	5,25-5,10 (m)
9	50,24	1,75		H-7; 3H-19	49,12	1,75
14	55,91	1,90	2H-15	H-7; 2H-12; 3H-18	55,24	1,85
17	57,04	1,35	2H-16; H-20	3H-18; 3H-21	56,20	1,29
20	40,90	2,15	3H-21; H-22	H-23	40,67	2,23
22	136,61	5,34 (dd)	H-20	H-17; 3H-21; H-24	135,79	5,25-5,10 (m)
23	132,88	5,38 (dd)	H-24	H-20; H-25; 3H-28	132,22	5,25-5,10 (m)
24	43,64	2,00	H-23; H-25; 3H-28	H-22; 3H-26; 3H-27	43,05	1,85
25	33,91	1,55	3H-26; 3H-27	3H-28	33,29	1,45
CH₂						
1	38,65	1,98; 1,25		3H-19	39,01	2,12; 1,45
2	35,26	2,45; 2,15			38,32	2,45; 2,30
4	40,30	2,05			44,43	2,05
6	30,66	1,95	H-7		30,27	1,85
11	21,22	1,65; 1,55			21,90	1,60
12	39,77	1,98; 1,30		3H-18	39,57	2,12
15	23,77	1,60; 1,50			23,14	1,50; 1,35
16	28,74	1,85; 1,40			28,32	
CH₃						
18	12,66	0,67 (s)			12,35	0,58 (s)
19	12,82	0,96 (s)		2H-1	12,63	1,02 (s)
21	21,85	1,14 (d, 6.6)		H-22	21,33	1,03 (d, 7.1)
26	20,50	0,94 (d)		3H-27	19,85	0,84 (d, 7.2)
27	20,28	0,93 (d)		3H-26	20,17	0,83 (d, 7.1)
28	18,20	1,03 (d, 6.7)		H-23	17,82	0,92 (d, 6.8)

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

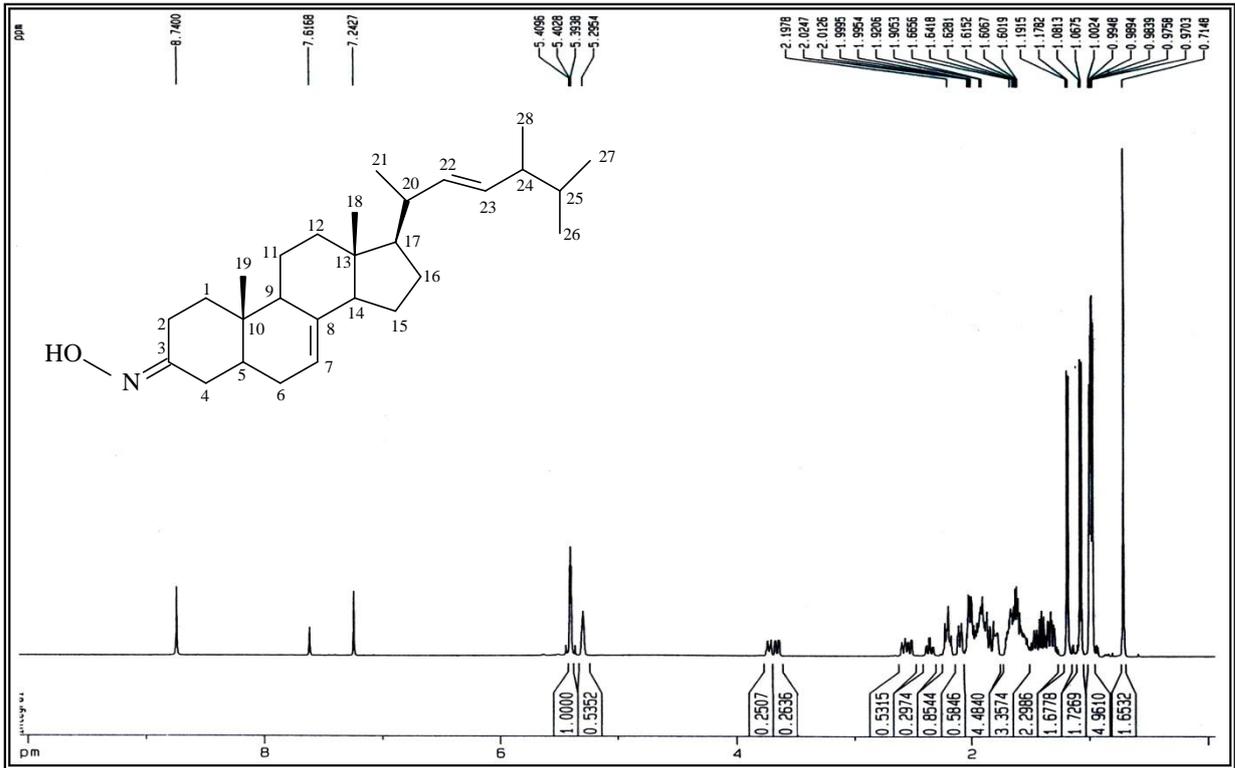


Figura 165: Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N, 500 MHz) de G1.3a

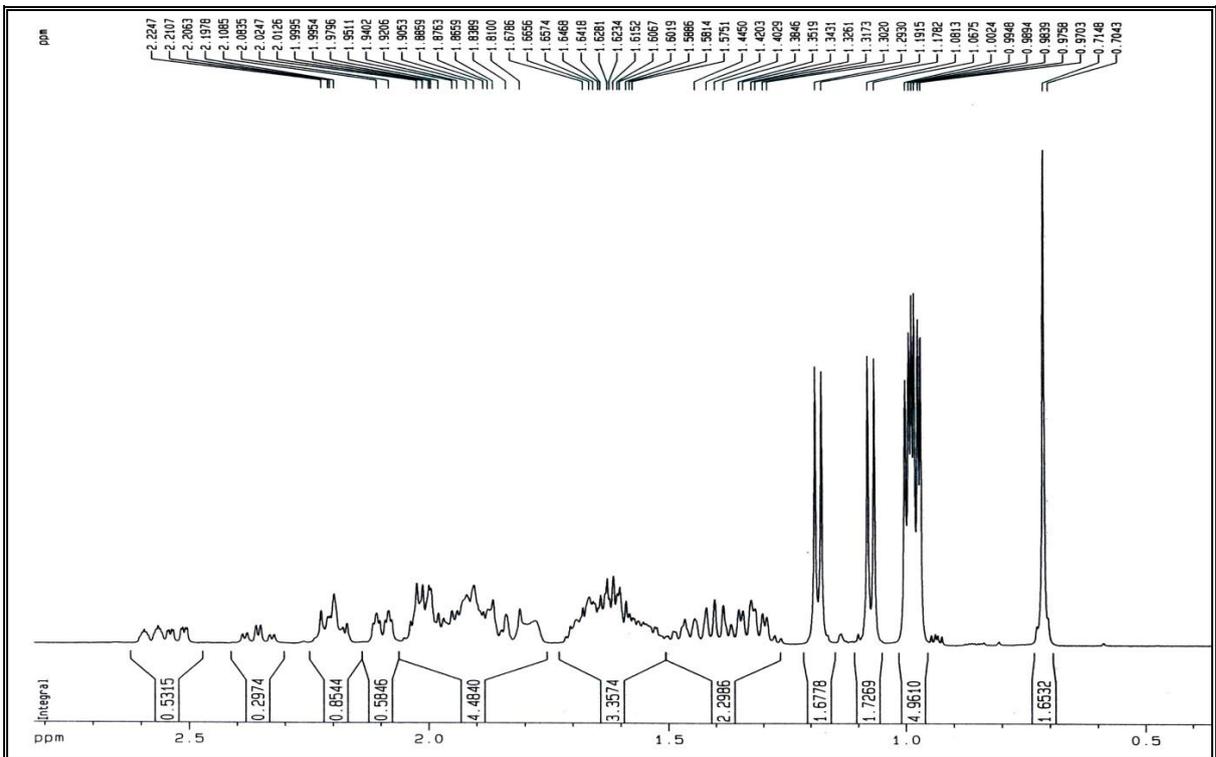


Figura 166: Espectro de RMN ¹H – expansão (C₅D₅N, 500 MHz) de G1.3a

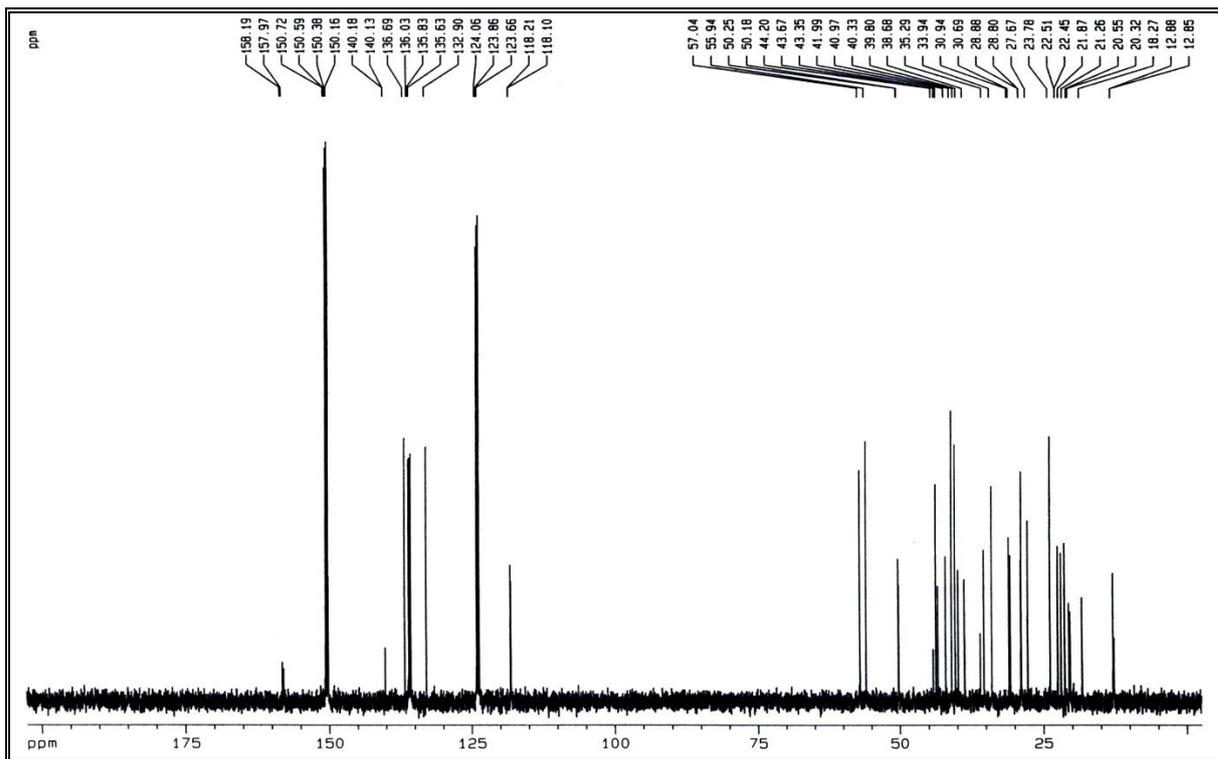


Figura 167: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de G1.3a

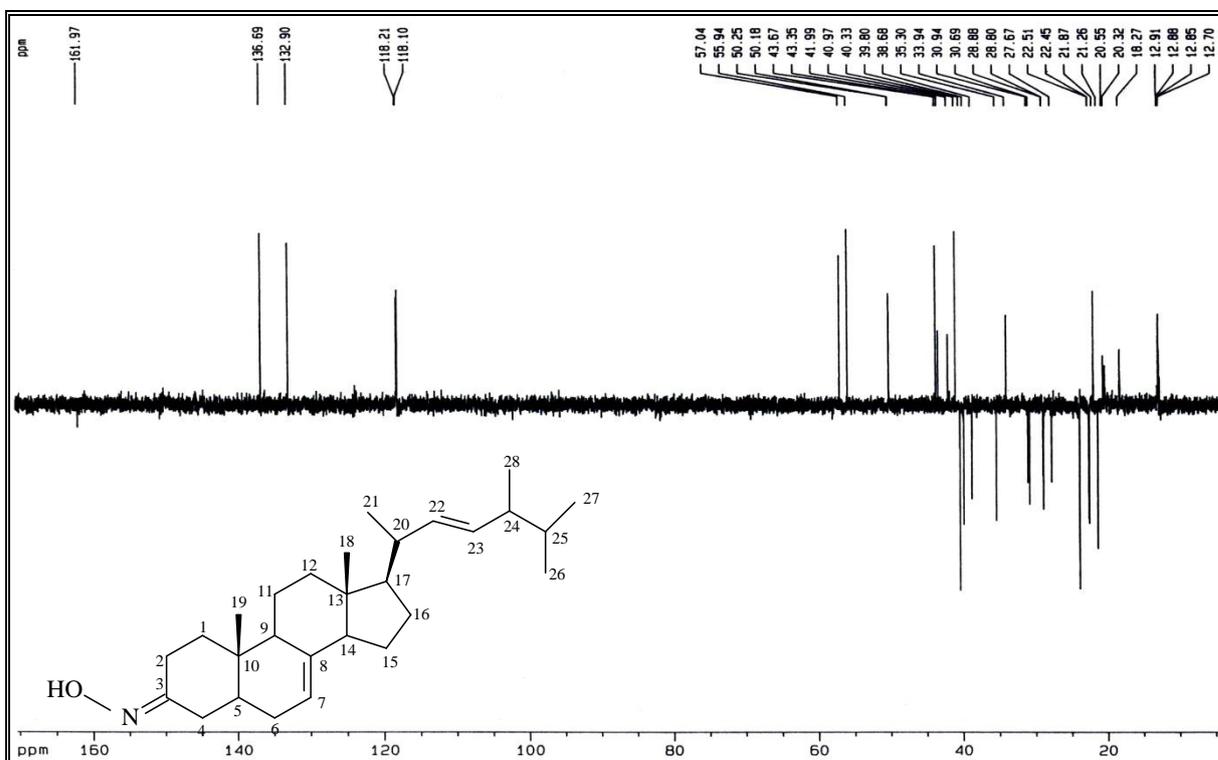


Figura 168: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 0 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de G1.3a

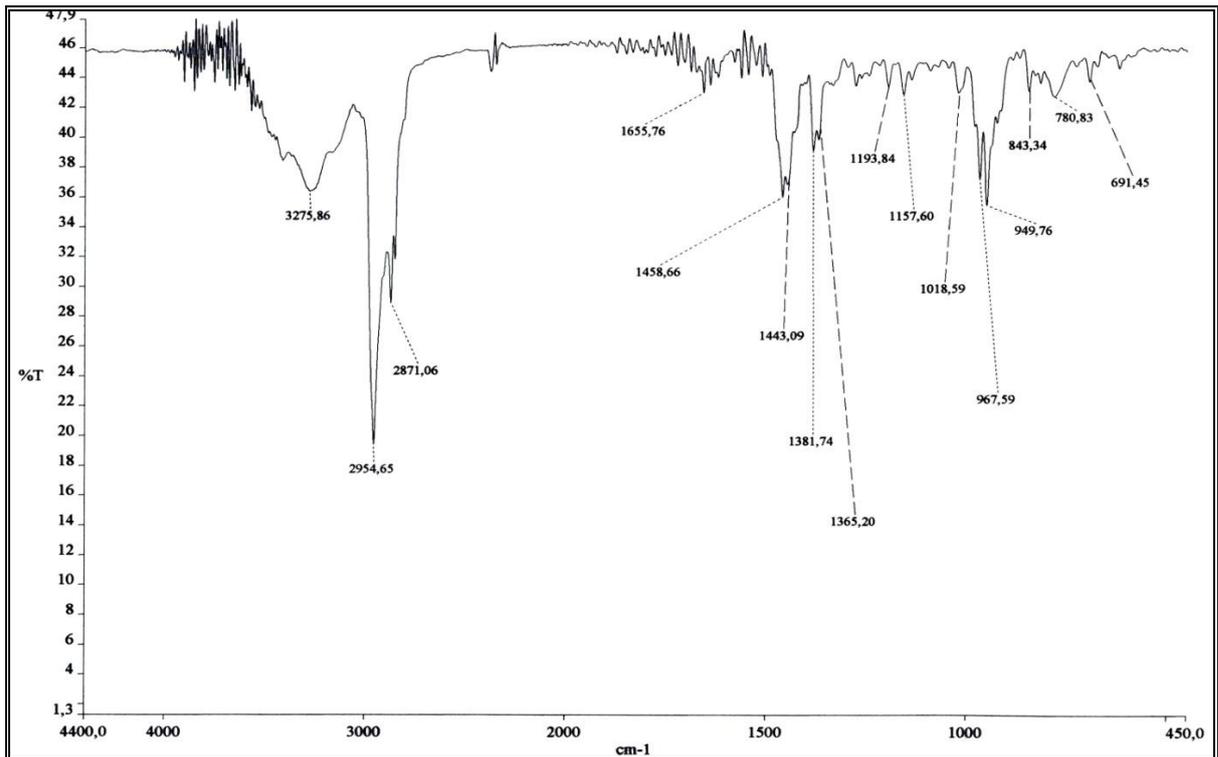


Figura 169: Espectro de IV de G1.3a

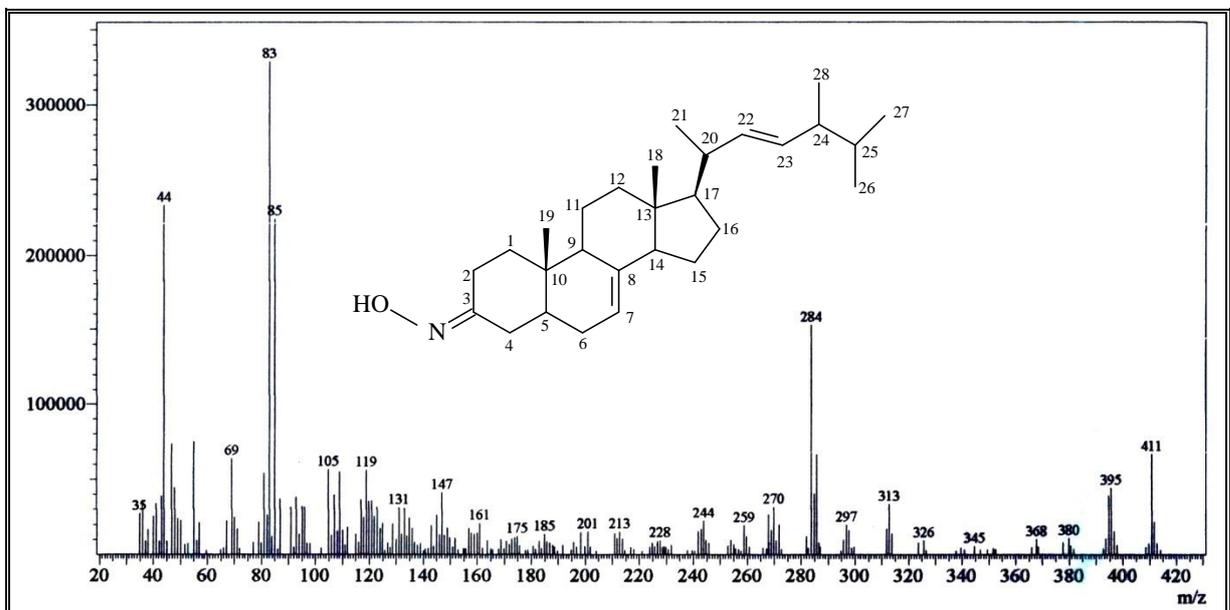


Figura 170: Espectro de massas de G1.3a

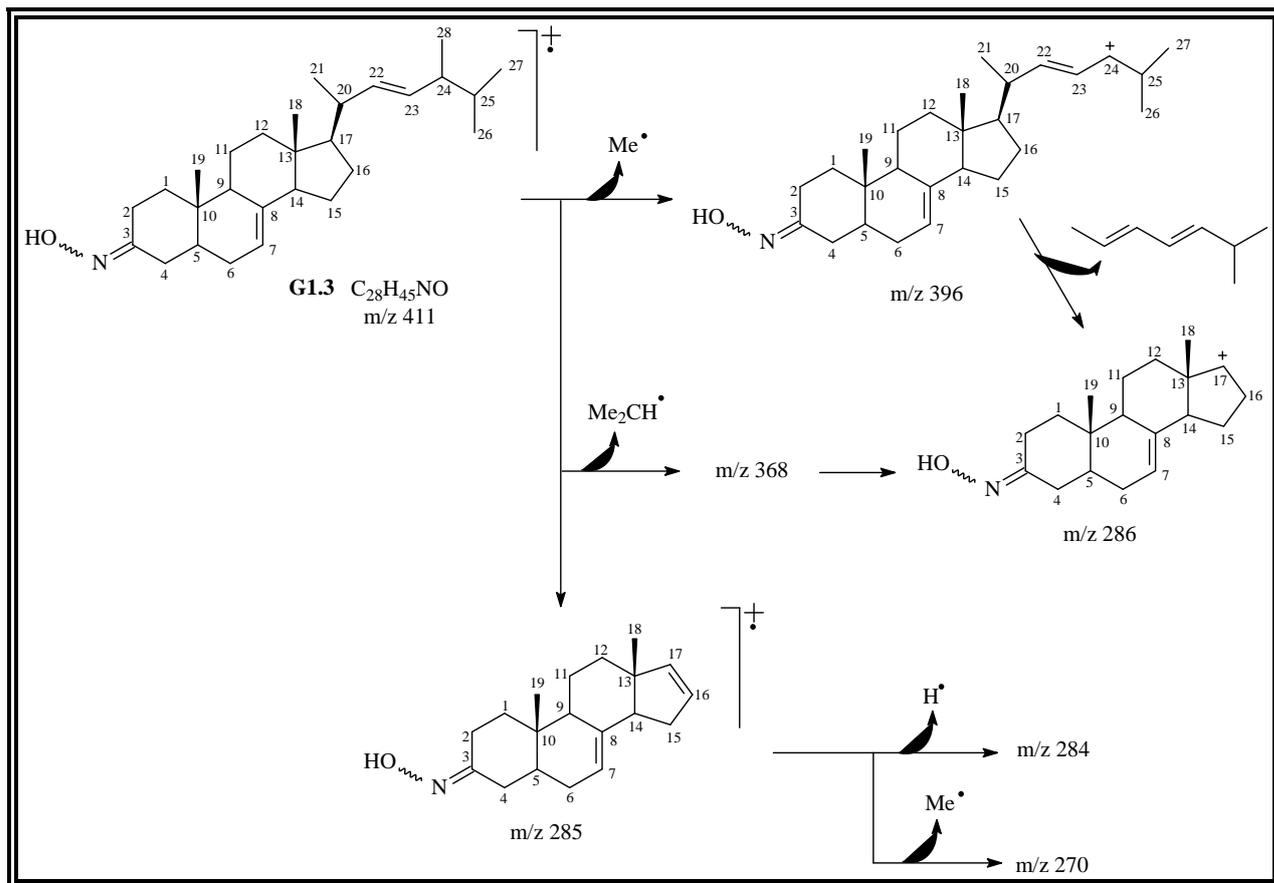


Figura 171: Proposta de fragmentação de G1.3

9.4 Formilação de G1.1

O derivado obtido através da reação de formilação do esteróide ergosta-7,22-dien-3-ol (G1.1) está representado no esquema reacional na Figura 172. Utilizou-se, nesta reação, a mistura de $\text{HCOOH}/\text{HClO}_4/(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, obtendo-se o produto formilado com rendimento cromatográfico de 34,1%.

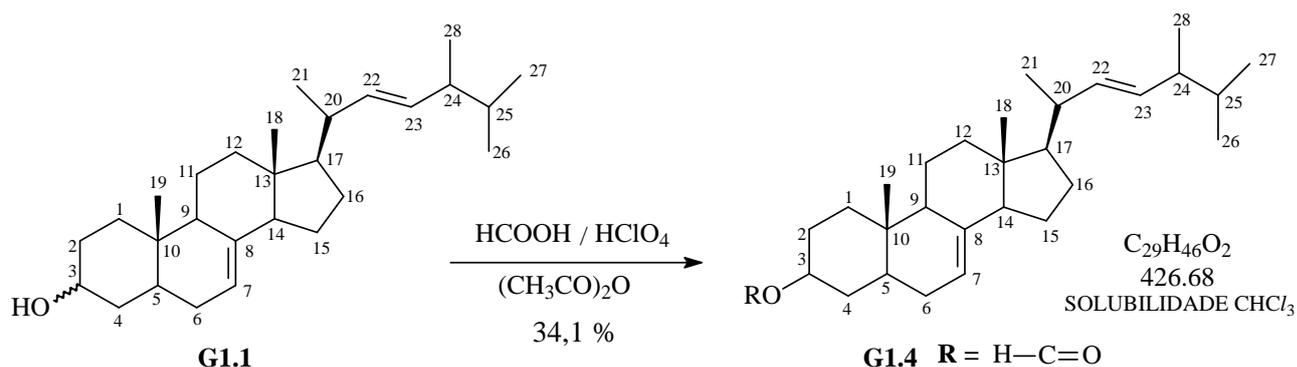


Figura 172: Formilação de G1.1

O espectro de absorção na região de infravermelho IV (Fig. 179, p. 203) revelou banda intensa em 1.721cm^{-1} , característico de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ de carbonila de éster; além de uma banda na região de hidroxila pouco intensa, sugerindo a formação do produto desejado, com rendimento considerável.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 176, p. 201) revelou um sinal em δ 8,82 ppm, característico de hidrogênio ligado a carbono carbonílico (aldeído), corroborando com a análise do espectro de infravermelho.

Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 177, p. 202), observou-se uma linha espectral em δ 161,14 ppm, referente a carbono carbonílico, além de uma desproteção no carbono C-3 (δ 73,59 ppm), justificando a presença do grupo $\text{HC}=\text{O}$ (formil) ligado ao átomo de oxigênio.

Os dados de correlação do composto G1.4 estão apresentados na Tabela 27 (p. 199), incluindo dados bidimensionais e comparação com os compostos G1.1 (substância de origem) e G1.2 (derivado acetilado).

O espectro de massas (Fig. 180, p. 203) corroborou com a estrutura proposta apresentando íon molecular com m/z 426, ou seja, vinte e oito unidades a mais que o composto de partida. Uma proposta para fragmentação do espectro de massas é apresentada na Figura 181 (p. 204).

Tabela 27: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de G1.4, comparando-se com dados de G1.1 e G1.2.*

	G1.4				G1.2		G1.1	
	HMQC		HMBC		HMQC		HMQC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C								
3	-	-	-	-	-	-	-	-
8	139,61	-			139,78	-	139,78	-
10	34,35	-			34,48	-	34,48	-
13	44,28	-			43,51	-	43,55	-
1'	-	-			170,05			
CH								
3	73,59	4,83 (m)	H-2b	H-1a	73,69	4,70 (m)	71,28	3,60 (m)
5	41,16	1,50		3H-19	40,30	1,48	40,52	1,40
7	117,54	5,14 (m)			117,53	5,15 (m)	117,78	5,15 (m)
9	49,42	1,70		3H-19	49,51	1,70	49,73	1,64
14	56,12	1,80		3H-18	55,20	1,82	55,36	1,82
17	57,18	1,28		3H-18; 3H-21	56,19	1,25	56,25	1,28
20	40,75	2,02	3H-21		40,69	2,02	40,67	1,99
22	165,81	5,18 (m)	H-20	3H-21; H-24	135,89	5,22 (dd)	135,91	5,17 (dd, 15.3,7.6)
23	132,07	5,20 (m)	H-24	H-20; H-25; 3H-28	132,14	5,19 (dd)	132,15	5,22 (dd, 15.3, 7.0)
24	43,57	1,80	3H-28	3H-26; 3H-27	43,04	1,85	43,07	1,80
25	33,76	1,50			33,32	1,48	33,33	1,51
1'	161,14	8,82 (s)						
CH₂								
1	37,46	1,78; 1,20		3H-19	37,07	1,87; 1,15	38,24	1,82; 1,10
2	29,41	1,70; 1,32			27,73	1,80; 0,83	31,72	1,80; 1,38
4	34,42	1,70; 1,40			34,04	1,75; 1,38	37,41	1,75; 1,30
6	30,17	1,80-1,70			29,75	1,86-1,76	29,89	1,80
11	22,16	1,60; 1,50			21,70	1,58; 1,50	21,79	1,58; 1,51
12	40,05	2,00; 1,25		3H-18	39,82	2,02; 1,24	39,72	2,01; 1,26
15	23,60	1,55; 1,38			23,14	1,50; 1,46	23,17	1,52; 1,48
16	28,18	1,85; 1,52			28,30	1,76; 1,25	28,31	1,71; 1,31
CH₃								
18	12,78	0,54 (s)			12,32	0,55 (s)	12,32	0,55 (s)
19	13,60	0,81 (s)			13,14	0,82 (s)	13,25	0,80 (s)
21	21,73	1,01 (d, 6.3)			21,34	1,02 (d, 6.0)	21,35	1,02 (d, 6.6)
26	20,64	0,82 (d)			20,16	0,84 (d)	19,87	0,84 (d, 7.1)
27	20,33	0,80 (d)			19,86	0,83 (d)	20,17	0,83 (d, 7.1)
28	18,29	0,91 (d, 7.4)			17,81	0,92 (d, 6.3)	17,83	0,92 (d, 6.8)
2'	-	-			21,65	2,03 (s)		

* Deslocamento químico em δ_{C} e δ_{H} (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

Comparando os deslocamentos químicos no carbono C-3 entre os compostos G1.4, G1.2 e G1.1 (Tab. 27, p. 199), percebeu-se claramente que na substância (G1.1) com hidroxila ligada ao carbono C-3 (δ 71,28 ppm) ocorre uma desproteção menos acentuada neste carbono, uma vez que este apresenta apenas um efeito α de desproteção. Enquanto que nos outros dois compostos G1.4 (δ 73,59 ppm) G1.2 (δ 73,69 ppm) a desproteção no carbono C-3 é maior, devido ao acréscimo de um efeito β de desproteção do carbono carbonílico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

A comparação dos deslocamentos químicos nos carbonos C-2 e C-4, entre esses três compostos, revela que, nas substâncias G1.4 e G1.2 com substituintes volumosos no C-3, há uma compressão estérica, ocasionando uma maior proteção nesses núcleos, como demonstrado na Figura 173.

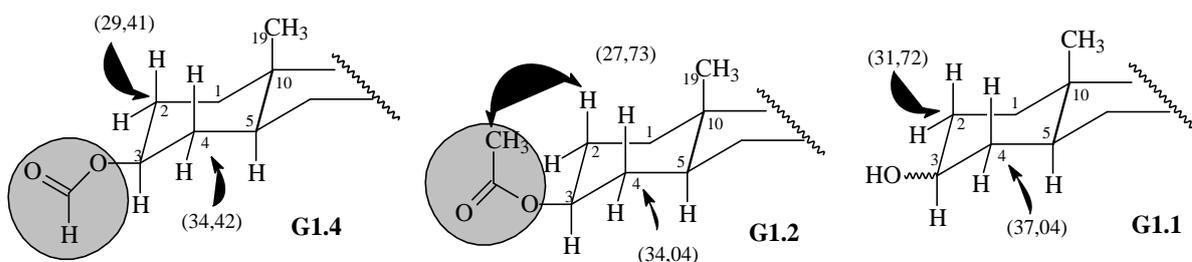


Figura 173: Comparação dos δ nos C-2 e C-4, nas substâncias G1.1, G1.2 e G1.4

Entretanto, a proteção no C-2 é superior para o composto G1.2. Este fato é esclarecido devido a dois fatores: primeiro, o seu substituinte é mais volumoso, além de que, apesar da existência da rotação livre na ligação C-3 e oxigênio, este substituinte está mais próximo do C-2, por causa da repulsão estérica dos outros anéis do esteróide, conforme mostra a Figura 174.

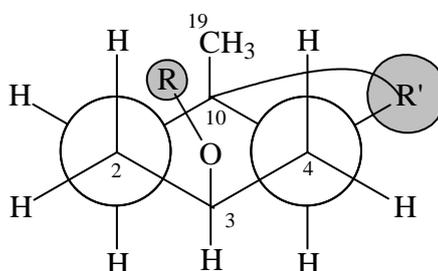


Figura 174: Projeção de Newman para o anel A dos esteróides.

Comparando os deslocamentos químicos nos núcleos de hidrogênio, percebeu-se que o hidrogênio ligado ao C-3, nos compostos G1.4 e G1.2, respectivamente, δ 4,83 ppm e

δ 4,70 ppm, está mais desprotegido que em G1.1 (3,60 ppm), conforme Tabela 27 (p. 199) e Figura 175. Este fato é devido ao efeito anisotrópico de desproteção da carbonila. Entretanto, na substância G1.2 a desproteção é menor, devido ao seu substituinte ser mais volumoso que no composto G1.4, ocasionando uma maior compressão estérica. Percebeu-se também um menor deslocamento químico no hidrogênio axial ligado ao C-2 do composto G1.2 (δ 0,83 ppm) (Fig. 175). Este fato é atribuído a maior compressão estérica nesta substância, conforme demonstrado na Figura 173 (p. 200), devido a sua maior proximidade a este núcleo, como esclarecido na Figura 174 (p. 200).

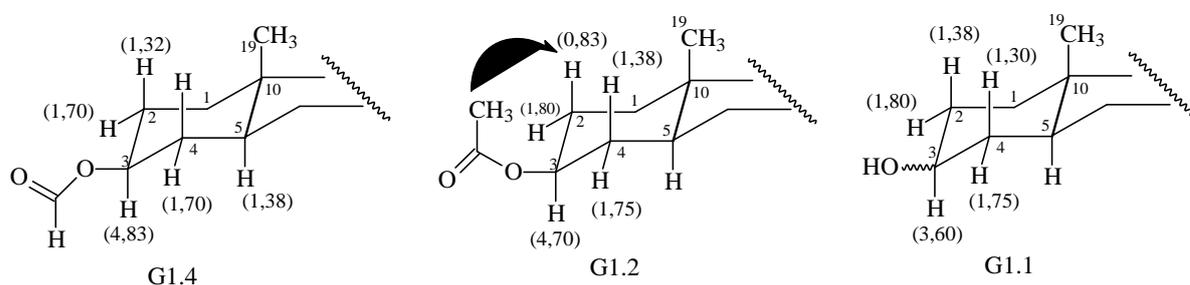


Figura 175: Comparação dos δ nos núcleos de H dos C-2, C-3 e C-4, nas substâncias G1.2, G1.2 e G1.4

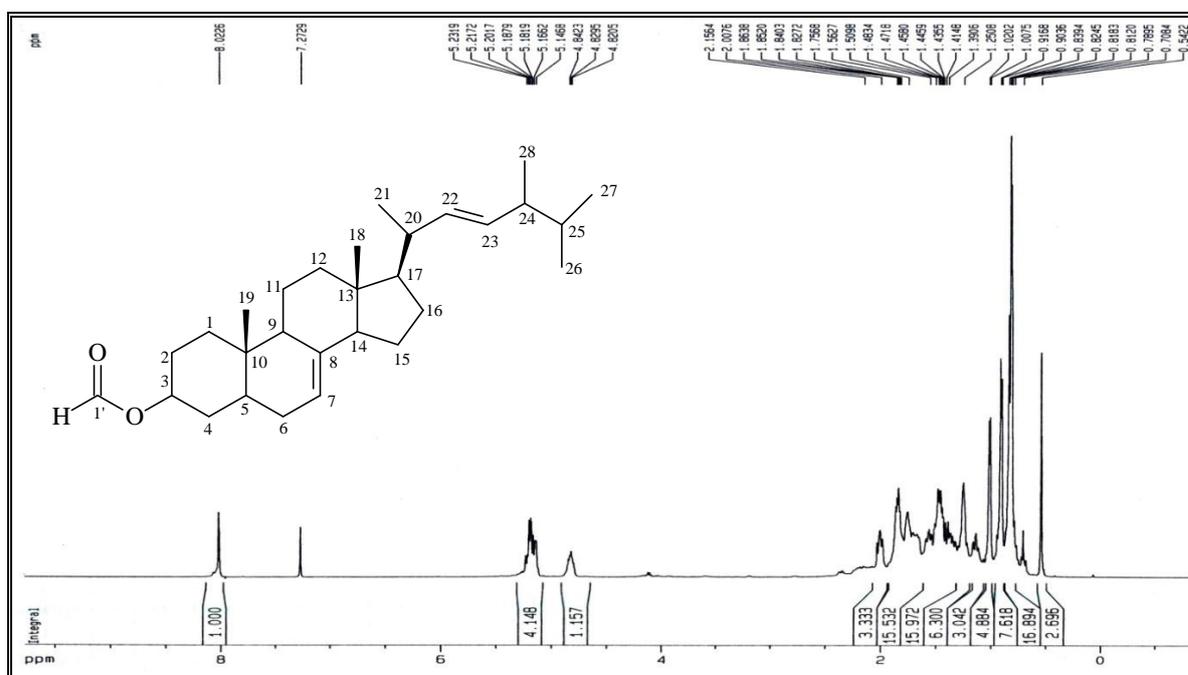


Figura 176: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de G1.4

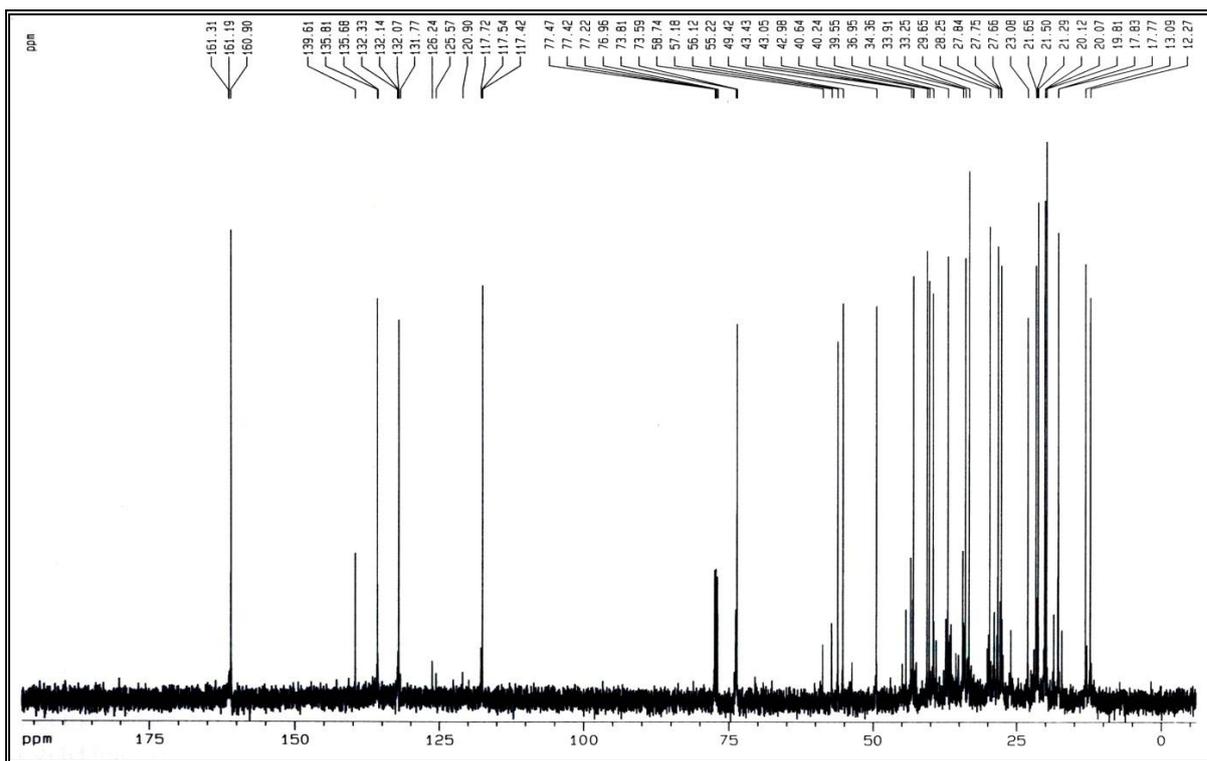


Figura 177: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.4

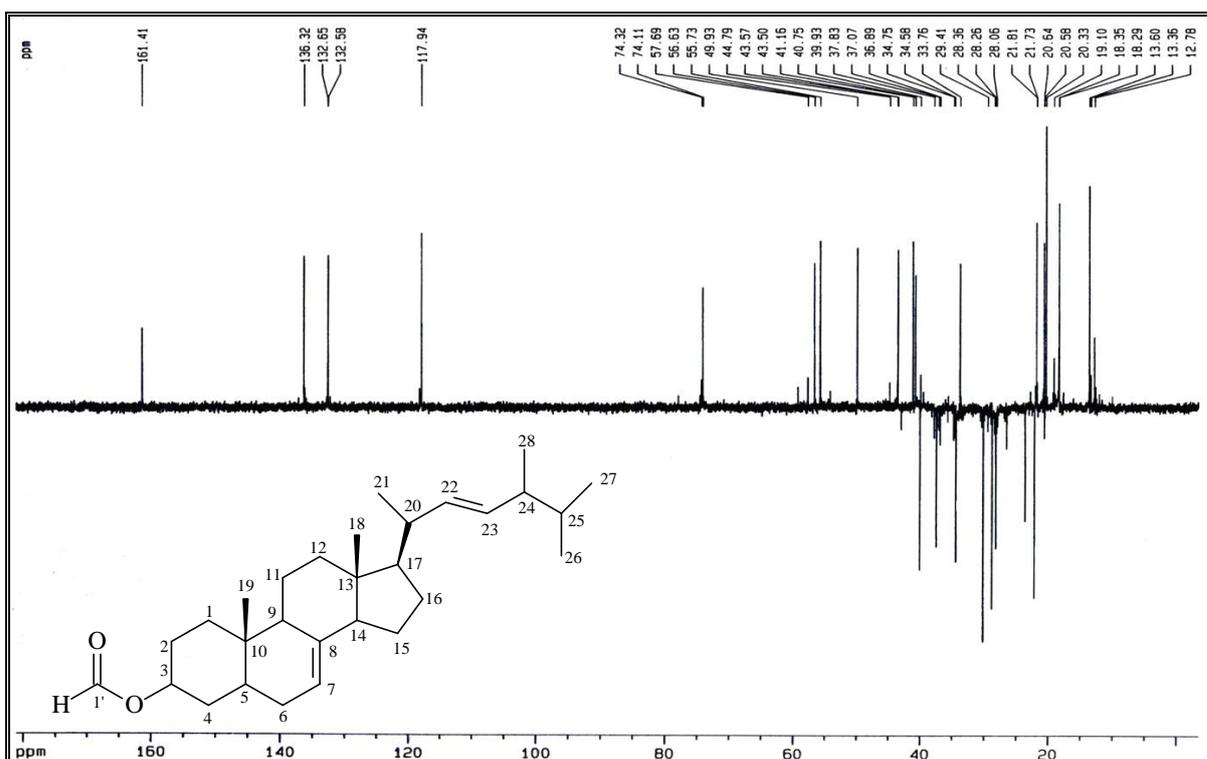


Figura 178: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (CDCl_3 , 125 MHz) de G1.4

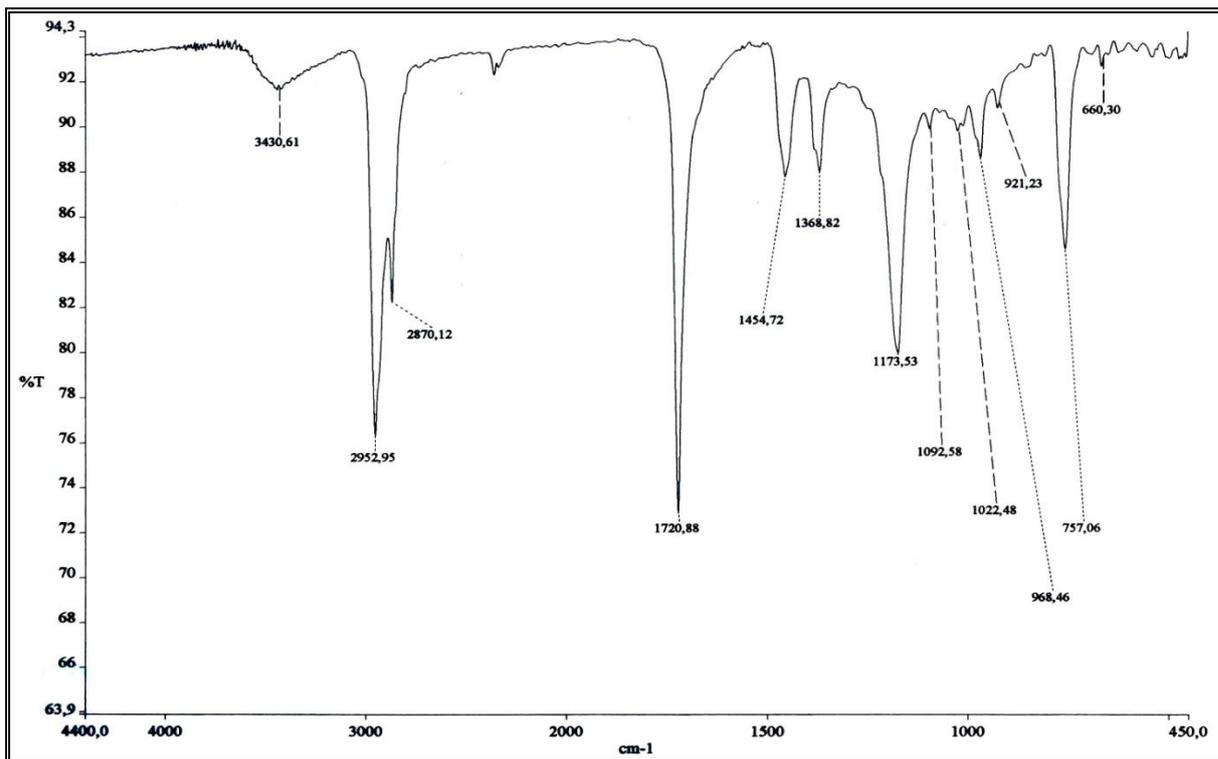


Figura 179: Espectro de IV de G1.4

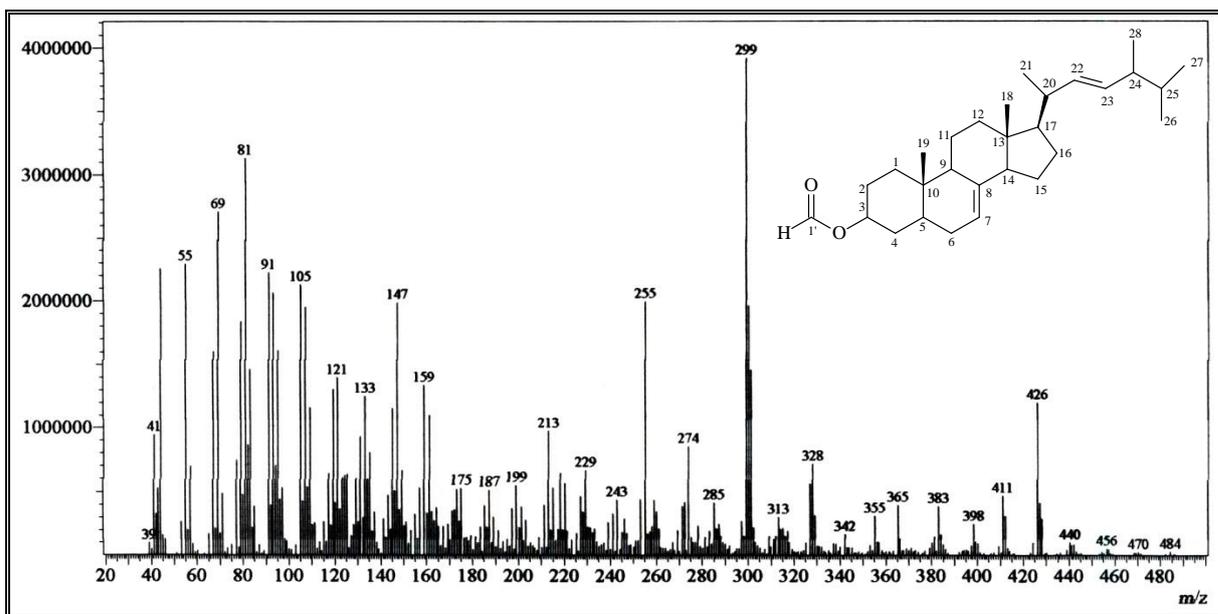


Figura 180: Espectro de massas de G1.4 (70 eV)

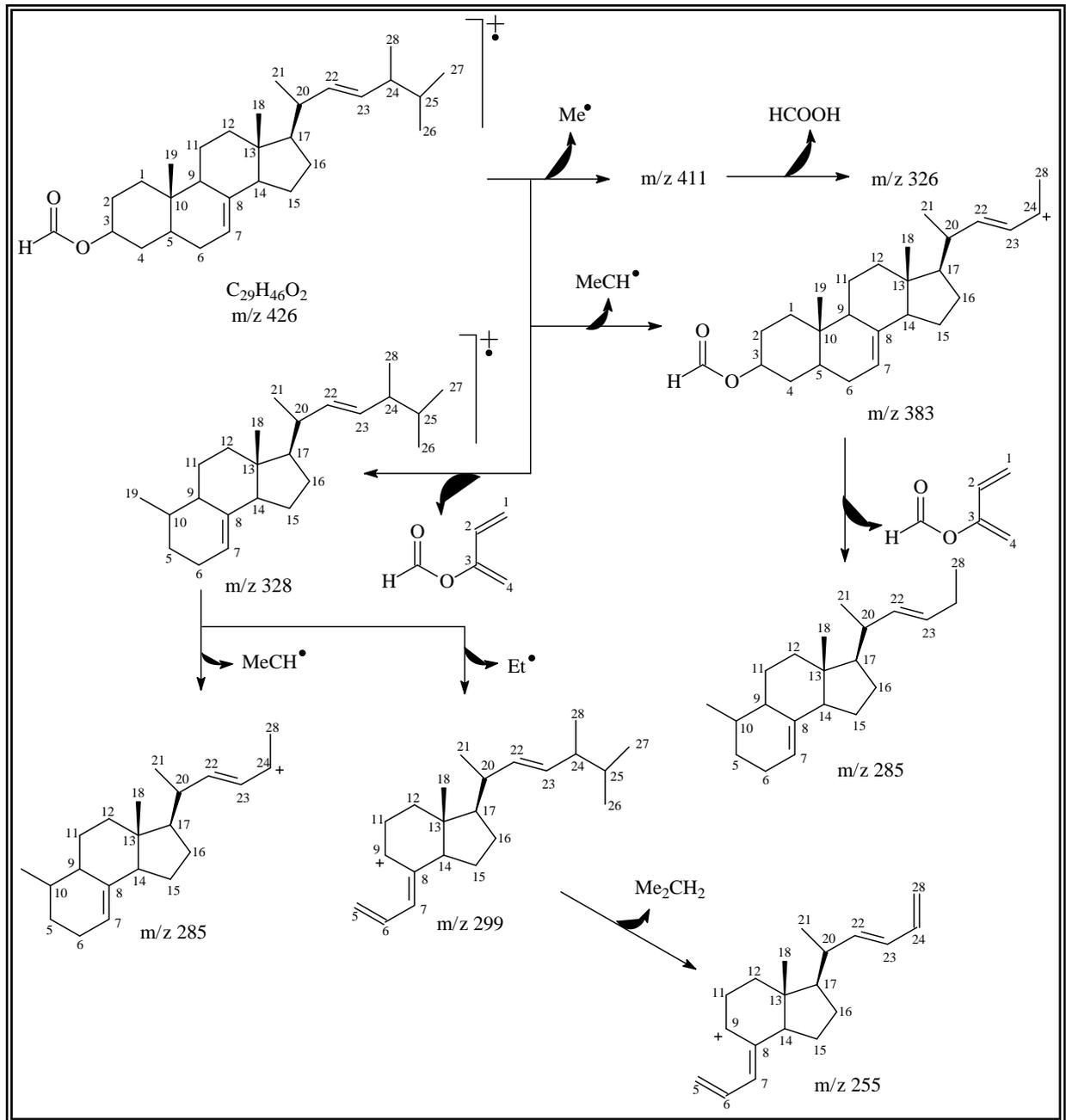


Figura 181: Proposta de fragmentação de G1.4

CAPÍTULO 10

Procedimento experimental

10. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

10.1 Materiais e métodos

10.1.1 Coleta e identificação do material estudado

Foram estudados os constituintes químicos fixos isolados e voláteis de duas espécies do gênero *Heliotropium*: *H. indicum* L. e *H. polyphyllum* L.

As partes aéreas de *H. indicum* foram coletadas no município de Feiticeiro, Região Jaguaribana do Estado do Ceará, pela Prof^ª. Telma Leda Gomes de Lemos, no dia 25 de fevereiro de 2006 às 9:00 h, para o estudo dos constituintes químicos voláteis, enquanto que suas raízes foram utilizadas para o estudo dos constituintes fixos.

A espécie *H. polyphyllum* foi coletada na localidade situada na Lagoa do Cauípe, litoral oeste do município de Caucaia no Estado do Ceará pela Prof^ª. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, no dia 26 de janeiro de 2007 para o estudo dos seus constituintes fixos. As partes aéreas das espécies de *H. polyphyllum* foram coletadas por mim, na mesma localidade, nos dias 25, 27 e 30 de abril de 2007 às 11:00 h, para o estudo dos seus constituintes químicos voláteis, através da extração por hidrodestilação, fluido supercrítico e arraste à vapor d'água.

As identificações botânicas das espécies de *H. indicum* e *H. polyphyllum* foram realizadas pelo Prof. Edson Paula Nunes, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Ceará. As suas respectivas exsiccatas encontram-se sob os números de registro 31.610 e 39.832 no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará.

Foram também estudados os constituintes químicos fixos do macrofungo *Ganoderma lucidum* coletado no município de Fortaleza, bairro parquelândia, pelo Prof. Aluísio Marques da Fonseca, identificada na EMBRAPA, Unidade Ceará.

10.1.2 Métodos cromatográficos

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas em gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm) da marca VETEC. É válido ressaltar que a sílica utilizada nas cromatografias em coluna foi submetida a tratamento de neutralização com bicarbonato de sódio (500g de sílica para 1,0 L de solução saturada de NaHCO₃) durante 24 h, filtrada à vácuo e seca em estufa por 30 min. A utilização das colunas variou de comprimento e diâmetro de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada e com a quantidade de

adsorvente utilizado, geralmente, na proporção de 1:10 de amostra e adsorvente. Os solventes utilizados para a eluição foram: hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura binária, em ordem crescente de polaridade.

Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se gel de sílica 60 (0,004-0,005 mm), da marca VETEC e para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica (2-25 μm) sobre poliéster T-6145 da SIGMA CHEMICAL CO.

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas foram realizadas, através da exposição destas, com solução de vanilina, seguida de aquecimento; cromatoplasmas analíticas com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm ou com a pulverização com solução de Dragendorff (5g de subnitrito de bismuto, 12 ml de HCl, 25 g KI, em 88 ml de água destilada) seguida de acondicionamento em cuba de iodo por aproximadamente 5 minutos.

10.1.3 Métodos físicos de análise

Os pontos de fusão (pf.) foram obtidos em equipamento com placa aquecedora da METTLER TOLEDO do Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Perkin Elmer, modelo (720 FT) FT-IR Spectrum 1000. O manuseio das amostras para análise de IV foi realizado através da técnica de depósito de um filme entre placas de KBr (Brometo de Potássio), sem espaçadores. A determinação da rotação óptica específica foi realizada em um Polarímetro 341 da Perkin-Elmer. Estas duas análises foram desenvolvidas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , uni e bidimensionais, foram realizados em duas centrais de análises: no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, utilizando-se Espectrômetros Bruker modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, que operam na frequência do hidrogênio a 300 MHz e 500 MHz, e na frequência do carbono a 75 MHz e 125 MHz, respectivamente; e nos aparelhos UM-400 (^1H : 400 MHz e ^{13}C : 100 MHz) da VARIAN, pertencentes à Universidade Estadual do Norte Fluminense.

As dissoluções das amostras foram realizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ou metanol deuterado (CD_3OD).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciadas para RMN ^1H pelo pico do átomo de hidrogênio pertencente às moléculas residuais não deuteradas dos solventes utilizados: clorofórmio ($\delta = 7,27$ ppm), piridina ($\delta = 7,19; 7,55$ e $8,71$ ppm) e metanol ($\delta = 4,86$ ppm); e para RMN ^{13}C , pelo pico do átomo de carbono-13 pertencente à parte não deuterada dos solventes utilizados: clorofórmio ($\delta = 77,0$ ppm), piridina ($\delta = 124,4; 136,2$ e $150,5$ ppm) e metanol ($\delta = 48,6$ ppm).

As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), ddd (duplo-duplo-dubleto), dddd (duplo-dubleto de dubleto-dubleto), ddt (duplo-duplo-triplete), ddq (duplo-duplo-quarteto), dqd (duplo-quarteto de dubleto), ddt (duplo-dubleto de triplete-triplete), t (triplete), q (quarteto), quint (quinteto), sept (septeto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado por uma destas duas técnicas: através da técnica APT (*Attached Proton Test*) ou DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*, com ângulo de 135°). O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi discutido segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico), CH_3 (carbono metílico). Para a técnica APT, os C e CH_2 mostravam-se com amplitudes em oposição aos CH e CH_3 . Já para a técnica DEPT, CH e CH_3 mostravam-se opostos aos CH_2 e os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro pelo espectro de CPD (*Composite Pulse Decoupling*) ou BB (*Hydrogen Broad Band Decoupled*).

Os espectros de massas dos óleos essenciais foram obtidos no Laboratório de Cromatografia Gasosa, da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando-se equipamento Shimadzu, modelo QP5050A, operando em 70 eV, usando coluna capilar OV5-dimetilpolisiloxano com 30,0 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm filme, com gradiente de temperatura de $4,0^\circ\text{C}/\text{min}$ ($40\text{-}180^\circ\text{C}$) e de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ ($180\text{-}280^\circ\text{C}$), com as temperaturas de injetor e interface, respectivamente, 250°C e 280°C , fluxo da coluna 0,8 mL/min e split 61, para as análises qualitativas. As análises quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas no mesmo laboratório de análise através do equipamento modelo THERMO, com detecção por

ionização em chamas (DIC) e nas mesmas condições cromatográficas do equipamento CG-EM descritos anteriormente.

10.2 Obtenção dos óleos essenciais das espécies de *Heliotropium* estudadas

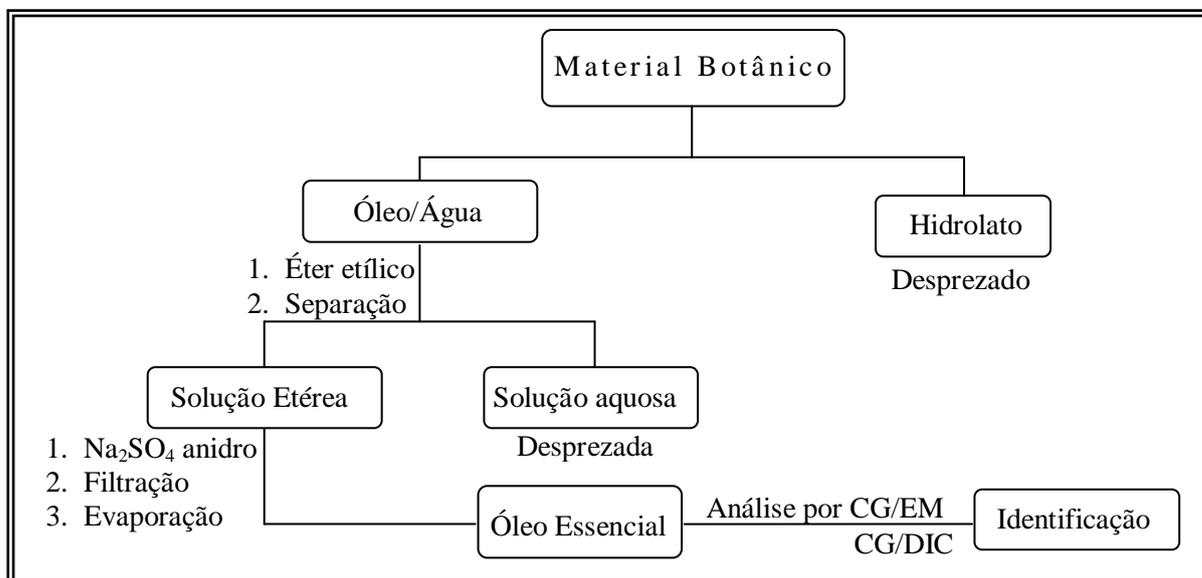
10.2.1 Hidrodestilação

As partes aéreas de duas espécies de *Heliotropium* recém-coletadas (Tabela 28) foram colocadas em um balão de vidro de 5 L, juntamente com 2 L de água e mantidos por duas horas em ebulição. Após este período, a mistura água/óleo contida no doseador foi separada, em funil de separação através de partição com éter etílico. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo óleo essencial (Fluxograma 1).

Tabela 28: Correlação entre o material utilizado e quantidade de óleo obtida das espécies de *Heliotropium* estudadas

Espécies	Material vegetal	Quantidade obtida de óleo (mL)
<i>Heliotropium indicum</i> L.	Partes aéreas (1.070 g)	0,3
<i>Heliotropium polyphyllum</i> L.	Partes aéreas (950 g)	0,5

Fluxograma 1: Obtenção de OEH



10.2.2 Destilação por arraste com vapor d'água

As partes aéreas de *H. Polyphyllum* recém-coletadas (2.570 g) foram colocadas em um tubo de Mariotte (10 L) e submetidas à extração por arraste com vapor de água, por 1:40 min, utilizando-se aparelho tipo Cleavenger modificado por Gottlieb (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960), obtendo-se após tratamento com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), o seu óleo essencial (1,73 g; 0,067 %). O óleo obtido foi analisado em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) e detector por ionização de chamas (CG-DIC).

10.2.3 Extração por fluido supercrítico de CO_2

Para realização dos experimentos foi utilizado módulo de bancada HP 7680T da Hewlett Packard contendo célula de extração em aço inoxidável autosselante de 7 mL e coletor analítico empacotado com ODS (octadecil-sílica) para retenção do óleo com volume de 540 μL . Para lavagem de coletor, foi utilizado acetonitrila PA na pre-extração e hexano PA na extração. A extração foi realizada com 25,74 g de material vegetal seco e o solvente supercrítico utilizado foi CO_2 líquido industrial fornecido pela empresa White Martins.

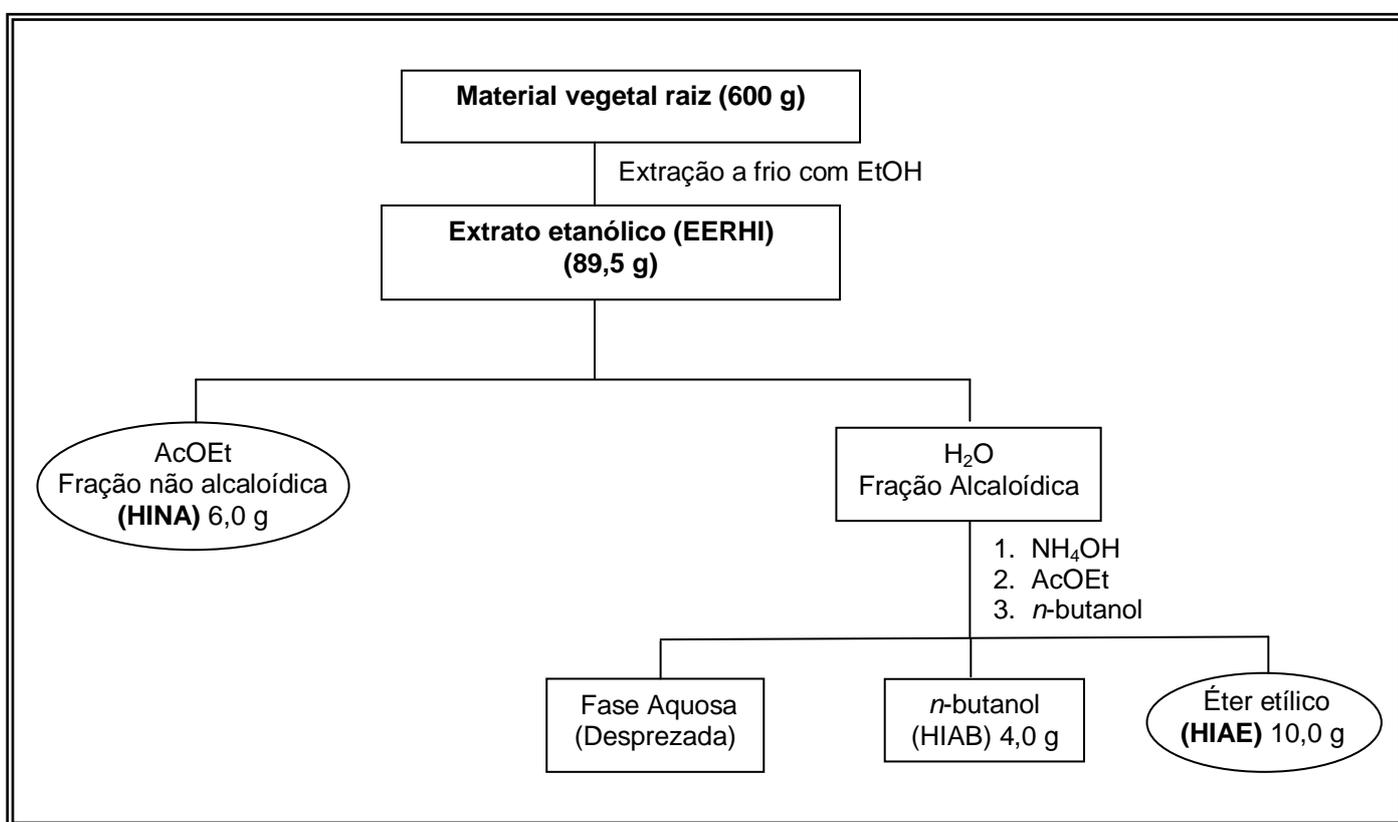
As condições experimentais foram: temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$, pressão de 80 atm (81,1 Bar). O material vegetal, nas condições de temperatura e pressão descritos anteriormente, ficou em contato com o fluido supercrítico por 30 minutos e, em seguida, extraiu-se o óleo por 2 horas. A massa do óleo obtido foi de 3,0 mg, assim o seu rendimento foi de 0,012% em massa.

10.3 Isolamento dos constituintes químicos fixos dos extratos das raízes de *Heliotropium indicum* L.

As raízes (600 g), secas à temperatura ambiente, foram trituradas e submetidas à extração a frio com etanol (3x). A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida fornecendo o extrato etanólico denominado EERHI (89,5 g), que foi submetido ao tratamento ácido-base, para extrair-se a fração alcaloídica, com 300 mL de solução de ácido clorídrico (HCl , 10 %) e deixada sob agitação mecânica por 4 horas (MATOS, 1997). A mistura reacional foi particionada com AcOEt (2 x 150 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de

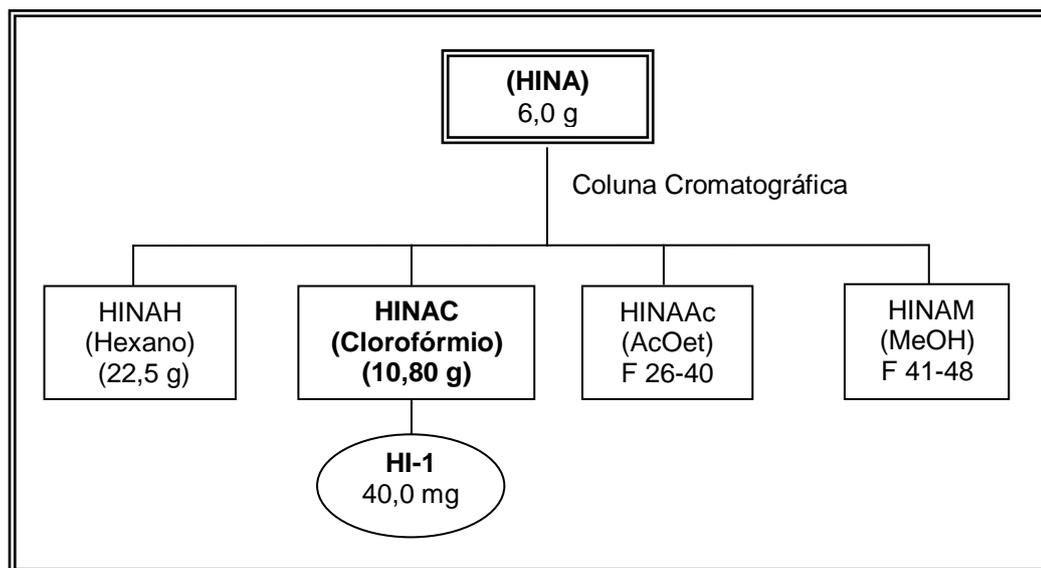
sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida, produzindo 6,0 g de fração não alcaloídica, denominada (HINA). A fase aquosa foi neutralizada com hidróxido de amônio (NH_4OH) até pH 8,0. Os alcalóides livres foram, então, extraídos com partição água/éter etílico (3 x 150 mL). A solução orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se 10,0 g de material, denominado de HIAE. A fase aquosa remanescente foi novamente submetida a uma partição água/*n*-butanol (3 x 150 mL), resultando na fração alcaloídica *n*-butanol, denominada de HIAB (4,0 g).

Fluxograma 2: Obtenção das frações alcaloídicas e não alcaloídicas de *H. indicum*.



10.3.1 Fracionamento cromatográfico de HINA (Fluxograma 3, p. 213)

A fração HINA (6,0 g) (Item 10.3, p. 210) foi submetida a fracionamento em coluna filtrante ($\Phi = 5$ cm), em gel de sílica (60 g), utilizando-se gradiente de eluição os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se suas respectivas frações denominadas de HINAH (0,3 g), HINAC (1,4 g), HINAAc (1,9 g) e HINAM (1,3 g), totalizando um rendimento cromatográfico de 82 %.

Fluxograma 3: Obtenção do constituinte HI-1

10.3.3 Fracionamento cromatográfico de HIAE (Fluxograma 2, p. 211)

A fração alcaloídica HIAE (10,0 g) (Item 10.3, p. 210) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna filtrante ($\Phi = 5$ cm), em gel de sílica (45,0 g), e eluída sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem binária e crescente de polaridade, resultando em suas respectivas frações HIAE-H (0,5 g), HIAE-C (2,0 g), HIAE-A (2,5 g) e HIAE-M (3,5 g), perfazendo um rendimento cromatográfico de 85 %.

A fração HIAE-M, por apresentar maior percentual em massa, foi submetida à análise fracionada. Nesta fração HIAE-M, ocorreu a formação de um precipitado ppt1. Efetuou-se a lavagem do precipitado com dois solventes, acetona e metanol, que após concentração sob pressão reduzida, obteve-se as frações HIAEM-A (1,14 g) e HIAEM-M (854,0 mg), respectivamente. A análise espectroscópica de IV do precipitado ppt1, solúvel em água, evidenciou ser um material inorgânico.

10.3.4 Fracionamento cromatográfico de HIAEM-A (Fluxograma 4, p. 218)

O fracionamento cromatográfico de HIAEM-A (1,14 g) (Item 10.3.3) em coluna ($\Phi = 5$ cm), em gel de sílica (37,0 g), eluída com hexano, acetato de etila, acetona e metanol, puros ou em mistura binária, com escala crescente de polaridade, levou a obtenção de 10

frações (50,0 mL). As frações obtidas, após análise comparativa por CCDA, foram reunidas de acordo com semelhança no perfil cromatográfico (Tab. 31).

Tabela 31: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de HIAEM-A das frações após cromatografia de HIAEM-A

Frações	Eluente	Frações	Sigla	Massa (mg)	Rend. (%)
1	hexano	1	C1A	10,5	1,1
2	hexano/AcOEt 50 %	2-6	C1B	25,0	2,5
3	AcOEt				
4	AcOEt/acetona				
5-6	acetona				
7	acetona/metanol	7-10	C1C	819,8	81,9
8-10	metanol				
					85,5

10.3.5 Fracionamento cromatográfico de C1C (Fluxograma 4, p. 218)

A fração C1C (819,8 mg) (Item 10.3.4, p. 213) foi submetida a fracionamento cromatográfico de coluna ($\Phi = 6$ cm), em gel de sílica (32,0 g). Os solventes utilizados para a eluição foram acetato de etila e metanol, puros e/ou em misturas binárias, com escala crescente de polaridade. Foram coletadas 34 frações (20,0 mL) e submetidas à análise por CCDA, comparadas e reunidas de acordo com a semelhança no perfil cromatográfico (Tab. 32, p. 215).

As frações C2A e C2B continham água. Com isso, efetuou-se a partição água/clorofórmio, obtendo-se as frações clorofórmicas, respectivamente. Após comparar estas duas frações por CCDA, reuniuram-nas e a denominou de C2AB (70,0 mg).

Tabela 32: Dados do tratamento cromatográfico de C1C

Frações	Eluente	Frações	Sigla	Massa (mg)	Rend. (%)
1-3	AcOEt	1-7	C2A	25,4	3,1
4	AcOEt/metanol (5%)				
5	AcOEt/metanol (10%)				
6	AcOEt/metanol (15%)				
7	AcOEt/metanol (20%)				
8	AcOEt/metanol (25%)	8-19	C2B	44,6	5,4
9	AcOEt/metanol (30%)				
10	AcOEt/metanol (40%)				
11	AcOEt/metanol (50%)				
12	AcOEt/metanol (55%)				
13	AcOEt/metanol (60%)				
14-16	AcOEt/metanol (65%)				
17-19	AcOEt/metanol (70%)				
20-22	AcOEt/metanol (75%)	20-29	C2C	270,3	33,0
23-25	AcOEt/metanol (80%)				
26-34	Metanol	30-34	C2D	89,8	11,0
					52,5

10.3.6 Fracionamento cromatográfico de C2AB para obtenção de HI-2 (Fluxograma 4, p. 218)

A C2AB (70,0 mg) (Item 10.3.5, p. 214) foi submetida à cromatografia isocrática por exclusão ($\Phi = 15,0$ cm), em sephadex LH-20, utilizando-se metanol. Foram obtidas 28 frações (8 gotas) e reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico, como estão descritas na Tabela 33 (p. 216). A fração C3C apresentou-se como um material resinoso e como única mancha na cromatoplaça, tornando possível a identificação de uma substância denominada HI-2 (64,0 mg) (Fluxograma 4, p. 218), que após análise por EM, IV e RMN ^1H e RMN ^{13}C , mostrou tratar-se do alcalóide licopsamina (Item 4.1.2, p. 71).

Tabela 33: Dados do fracionamento cromatográfico de C2AB

Sigla	Frações	Massa (mg)	Rend. (%)	Sigla	Frações	Massa (mg)	Rend. (%)
C3A	4-10	2,5	3,6	C3C	13-20	64,0	91,4
C3B	11-12	1,0	1,4	C3D	21-28	2,5	3,6
							100,0

10.3.7 Fracionamento de HIAEM-M (Fluxograma 4, p. 218)

A fração HIAEM-M (854,0 mg) (Item 10.3.3, p. 213) apresentou a formação de precipitado denominado de ppt2. A purificação deste precipitado foi realizada através de lavagem com acetato de etila a quente, resultando na fração denominada de HIAEMM-Ac (589,3 mg). O precipitado ppt2 apresentou as mesmas características do precipitado ppt1 (Item 10.3.3, p. 213), por isso também foi desprezado.

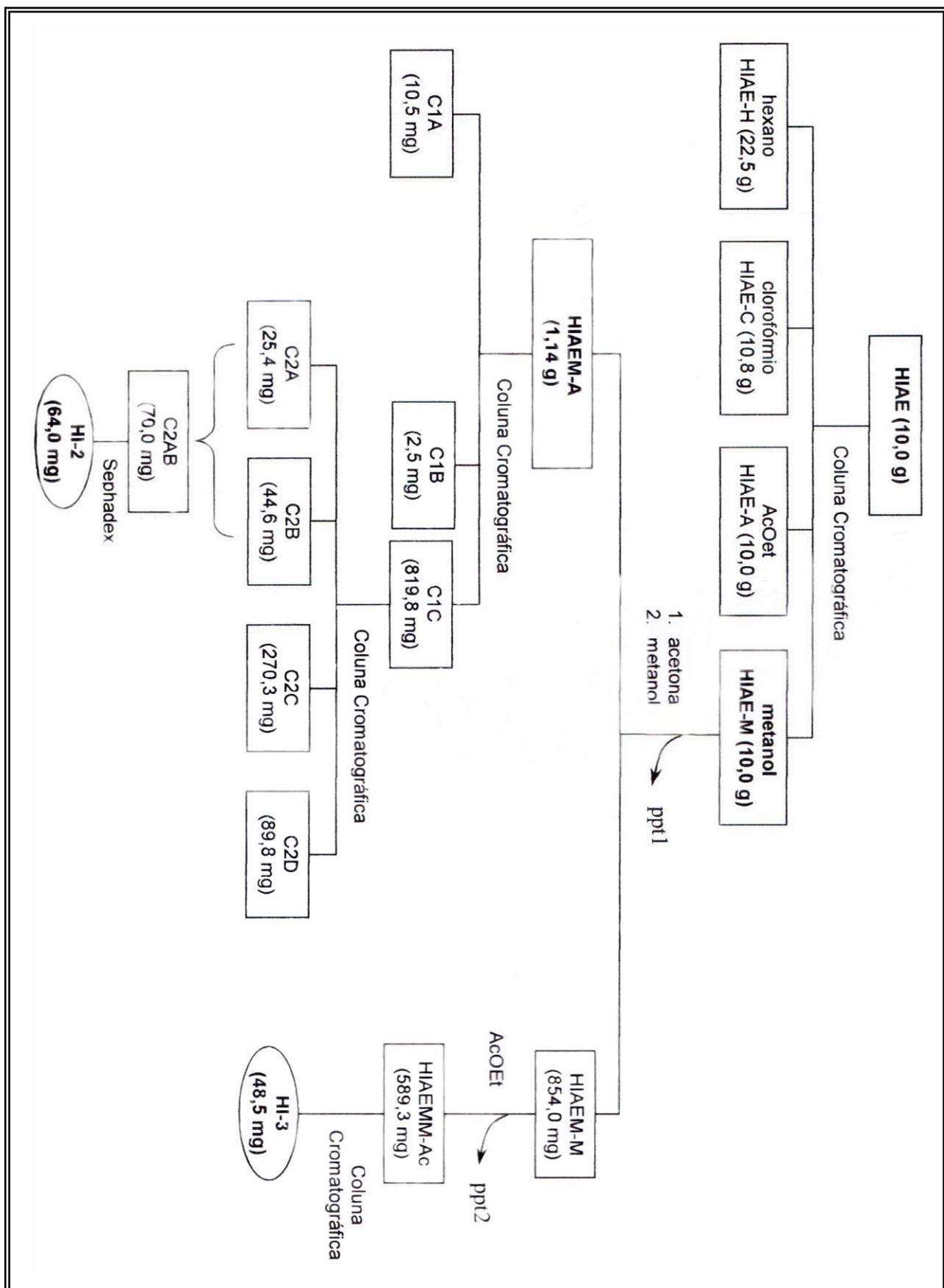
10.3.8 Tratamento cromatográfico de HIAEMM-Ac para obtenção de HI-3 (Fluxograma 4, p. 218)

A fração HIAEMM-Ac (589,3 mg) (Item 10.3.7) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna ($\Phi = 6$ cm), em gel de sílica (25,0 g), utilizando-se os eluentes, puros e/ou combinações binárias, em gradiente crescente de polaridade hexano, acetato de etila, acetona e metanol, sendo coletadas frações de 20 mL. As frações foram analisadas por CCDA e as que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram agrupadas como descrito na Tabela 34 (p. 217). A fração S1B apresentou-se como um líquido viscoso amarelado e como uma única mancha no perfil cromatográfico em CCDA, tornando possível a identificação de uma substância denominada de HI-3 (48,5 mg), a qual foi analisada por EM, IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C e seus resultados demonstraram ser o alcalóide helindicina (Item 4.1.3, p. 80).

Tabela 34: Dados do tratamento cromatográfico de HIAEMM-Ac

Frações	Eluente	Frações	Sigla	Massa (mg)	Rend. (%)
1-2	hexano	1-7		-	
3-4	hexano/AcOEt 50 %	3-4		-	
5-6	AcOEt	5-7		-	
7-8	AcOEt/acetona 20%	8-10	S1A	191,8	
9-10	AcOEt/acetona 30%	11	S1B	48,5	
11-13	AcOEt/acetona 50%	12-15	S1C	106,3	
14-16	AcOEt/acetona 70%				
17-18	AcOEt/acetona 90%	17-19	S1D	36,8	
19-20	acetona	20-23	S1E	23,0	
21-22	acetona/metanol 20%				
23-24	acetona/metanol 20%	24-33	S1F	25,6	
25-26	acetona/metanol 20%				
27-28	acetona/metanol 20%				
29-30	acetona/metanol 20%				
31-34	acetona/metanol 20%	34-35	S1G	17,9	
35-36	acetona/metanol 20%				
37	metanol			-	
					76,3

Fluxograma 4: Obtenção dos alcalóides HI-2 e HI-3



10.3.9 Fracionamento do extrato etanólico das raízes de *H. indicum*

Com o objetivo de aprimorar a técnica de obtenção de alcalóides (extração ácido-base), realizou-se a investigação pela metodologia B, descrito a seguir:

O extrato etanólico das raízes da espécie (10,0 g), denominado de EERHI (Fluxograma 5, p. 222), foi macerado com sílica (10,0 g), acondicionado em funil de Buchner (1,0 L) e eluído sob pressão reduzida com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, AcOEt, metanol e metanol/dietilamina-95:5). Após concentração em rotarevaporador com pressão reduzida, obteve-se os seus respectivos extratos hexânicos (0,7 g), AcOEt (2,9 g), MeOH (2,5 g) e MeOH/NH(CH₂CH₃)₂ (2,6 g), como descritos na Tabela 35.

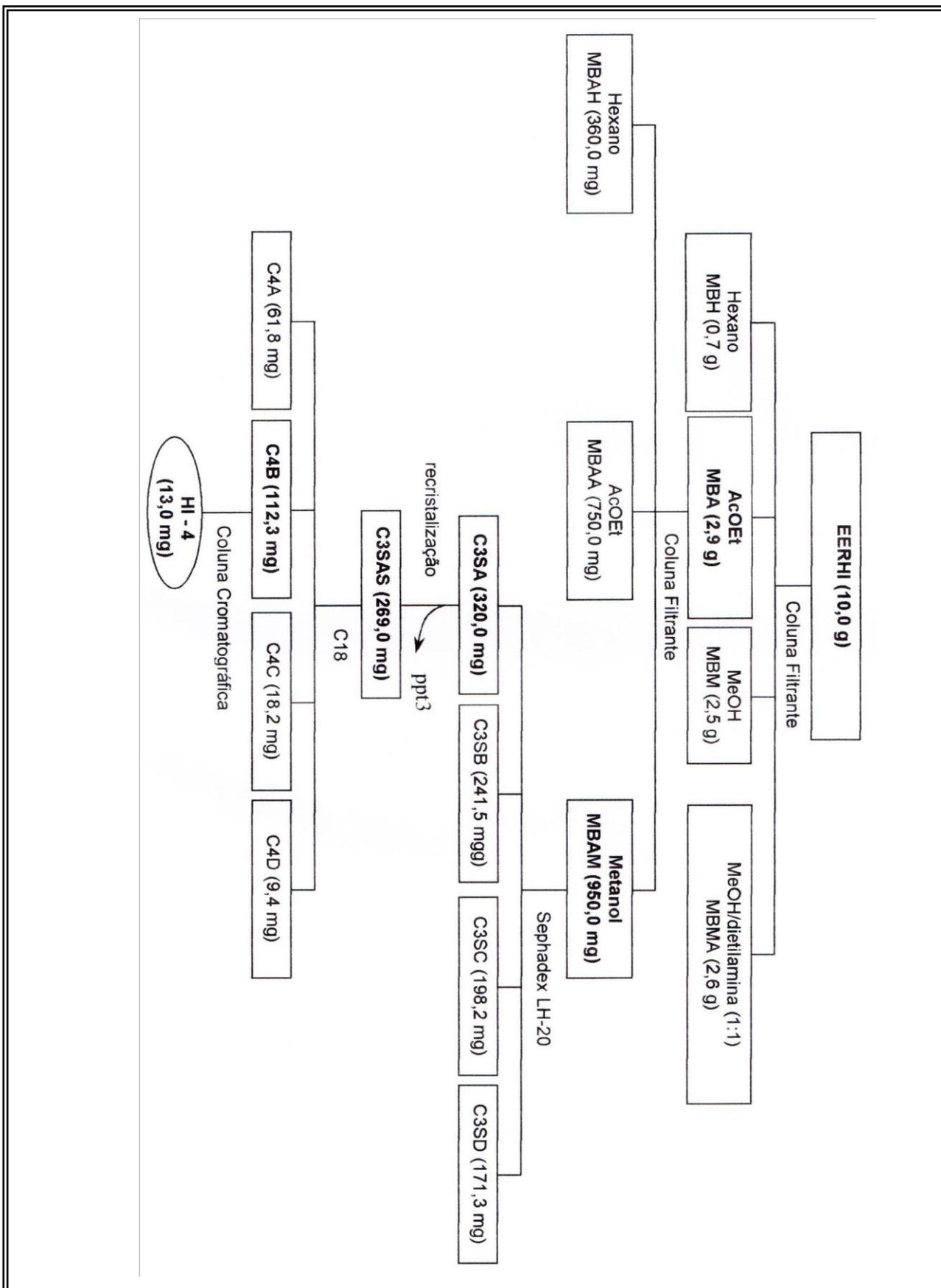
Tabela 35: Fracionamento do extrato etanólico das raízes de *H. indicum* pelo método B

Eluente	Sigla	Massa (g)	Rend. (%)
hexano	MBH	0,7	7
AcOEt	MBA	2,9	29
MeOH	MBM	2,5	25
MeOH/NH(CH ₂ CH ₃) ₂	MBMA	2,6	26
			87,0

10.3.10 Fracionamento cromatográfico de MBA

A partir da fração AcOEt (MBA; 2,9 g) (Item 10.3.9), desenvolveu-se o estudo fitoquímico usando cromatografia filtrante em coluna ($\Phi = 6$ cm), em gel de sílica tratada com NaHCO₃ (29,0 g), utilizando-se os eluentes em gradiente crescente de polaridade hexano, AcOEt e metanol, respectivamente, denominados de MBAH (360,0 mg), MBAA (750,0 mg) e MBAM (950,0 mg), obtendo-se o percentual cromatográfico de 71,0 %.

Fluxograma 5: Isolamento do constituinte HI-4



10.4 Isolamento dos constituintes químicos fixos do extrato etanólico de *Heliotropium polyphyllum* L. (Fluxograma 6, p. 225)

As partes aéreas (5,0 Kg) foram submetidas ao processo de extração de seus constituintes fixos descrito no Item 10.3 (p. 210). Secas à temperatura ambiente e trituradas, foram submetidas à extração a frio (3x), primeiramente, com hexano e, posteriormente, com etanol. As soluções HPAH e HPAE foram concentradas sob pressão reduzida, obtendo-se, respectivamente, 54,0 g e 90,0 g.

O extrato etanólico denominado HPAE (90,0 g) foi submetido ao tratamento ácido-base, para extrair-se a fração alcaloídica, com 300 mL de solução de ácido clorídrico (HCl, 10 %) e deixada sob agitação mecânica por 4 horas (MATOS, 1997). A mistura reacional foi particionada com AcOEt (2 x 150 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida, obtendo-se 6,3 g de fração não alcaloídica, denominada (HPAENA). A fase aquosa foi neutralizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 8,0. Os alcalóides livres foram extraídos com partição água/AcOEt (3 x 150 mL). A solução orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato orgânico alcaloídico, denominado de HPAEAA (760,0 mg). A fase aquosa remanescente foi novamente submetida a uma partição água/*n*-butanol (3 x 150 mL), resultando na fração alcaloídica *n*-butanol, denominada de HPAEAB (827,0 mg).

10.4.1 Fracionamento cromatográfico de HPAEAA

A fração alcaloídica HPAEAA (760,0 mg) (Item 10.4) foi submetida ao fracionamento cromatográfico filtrante ($\Phi = 5$ cm), em gel de sílica tratada com Na₂CO₃ (45,0 g), e eluída sucessivamente com hexano, clorofórmio e metanol, em ordem crescente de polaridade, resultando em suas respectivas frações HPAEAAH (43,2 mg), HPAEAAAC (191,7 mg) e HPAEAAAM (160,3 mg), perfazendo um rendimento cromatográfico de 52,0 %.

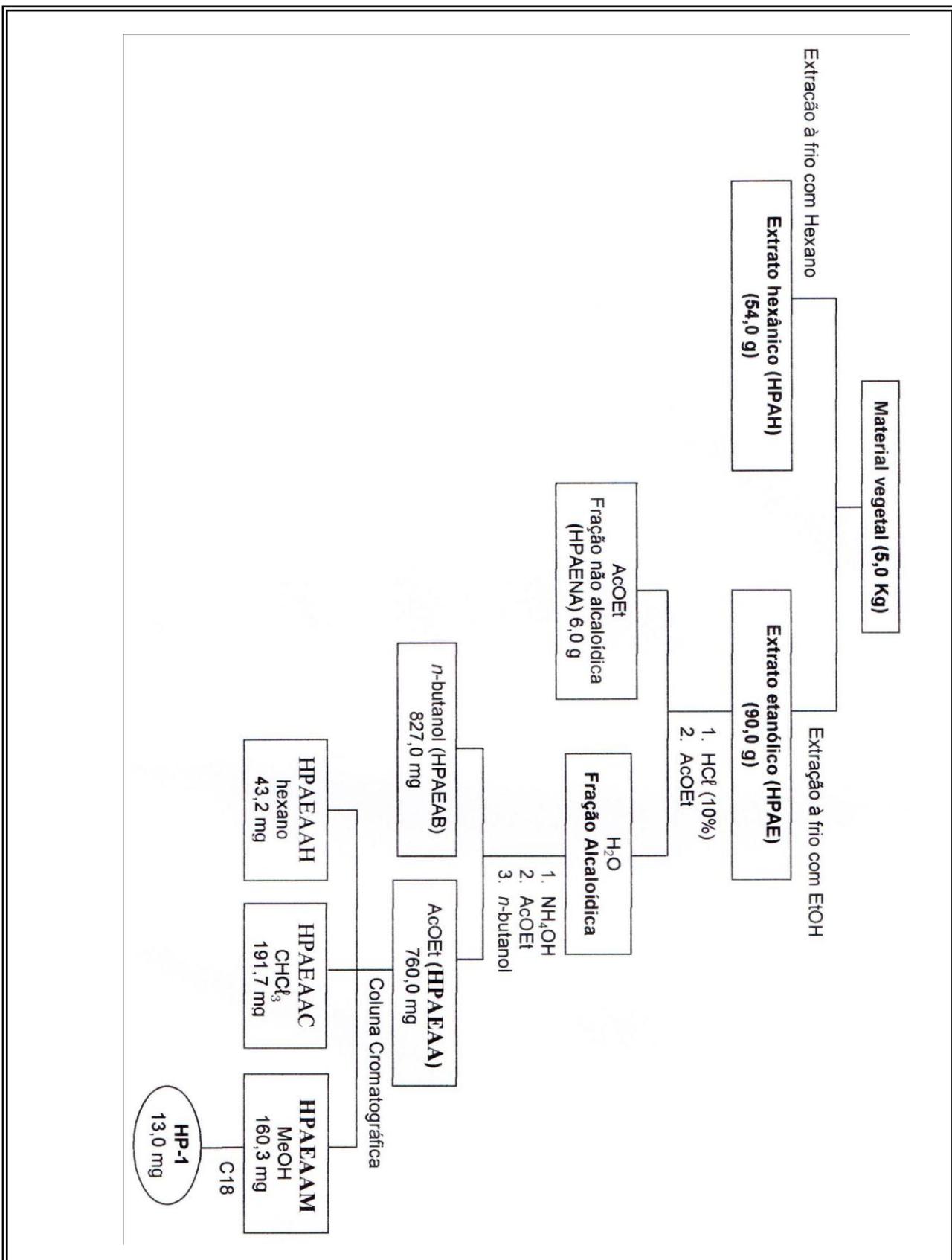
A fração HPAEAAAM, por apresentar um bom perfil cromatográfico, foi submetida à cromatografia em fase reversa (C18, $\Phi = 10,0$ cm), em metanol, obtendo-se 35 frações (10,0 mL). As frações foram analisadas por CCDA, e somente as que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram agrupadas como descrito na Tabela 39 (p. 224).

Tabela 39: Fracionamento cromatográfico de HPAEAAM para obtenção de HP-1

Frações	Sigla	Massa (mg)	Rend. (%)
1		-	-
2		-	-
3-4	C2A	52,4	32,7
5-6	C2B	60,2	37,5
7-10	C2C	13,0	8,1
12-13	C2D	7,0	4,4
14-20	C2E	2,4	1,5
21-25	C2F	3,2	2,0
26-29	C2G	1,7	1,0
30-35	C2H	-	
			87,2

A fração C2C (Tab. 39) (13,0 mg), após análise em CCDA, apresentou-se pura, tornando possível a obtenção de uma substância denominada HP-1, a qual foi analisada por EM, IV e RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e identificada como licopsamina (Item 4.2.1. p, 96).

Fluxograma 6: Obtenção das frações alcaloidicas e mão alcaloidicas de *H. polyphyllum*



10.5 Isolamento dos constituintes químicos fixos do extrato etanólico de *Ganoderma lucidum* (Fluxograma 7, p. 230)

O fungo coletado em Fortaleza (288 g), próximo ao campus do Pici, após ser seco e triturado, foi submetido ao processo de extração com etanol a frio, obtendo-se 8,5 g do extrato etanólico de *Ganoderma lucidum* (EEGL).

EEGL foi fracionado por cromatografia filtrante ($\Phi = 6$ cm) em gel de sílica (85 g) com solventes em ordem crescente de polaridade, obtendo-se os extratos: Hexânico, AcOEt e MeOH, respectivamente, denominados de EEGLH, EEGLAc, EEGLM com 4,1 g; 2,0 g e 1,1 g, perfazendo um rendimento cromatográfico de 85 %.

10.5.1 Fracionamento cromatográfico de EEGLH

A fração hexânica EEGLH (4,1 g) (Item 10.5) foi submetida à coluna cromatográfica ($\Phi = 5$ cm) em gel de sílica (41 g), usando uma mistura isocrática de hexano:CH₂Cl₂ (1:1). Foram coletadas 26 frações de 10 mL (Tabela 40), as quais foram analisadas em CCD e reunidas por suas semelhanças, obtendo-se 5 frações nomeadas como GLHA, GLHB, GLHC, GLHD e GLHE (Tab. 41, p. 228). A fração GLHB (100,2 mg) apresentou-se pura, tornando possível a identificação de uma substância denominada G1 (Fig. 121, p. 152), a qual foi analisada por EM, IV e RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D) e identificada como ergosta-7,22-dien-3-ona (Item 8.1, p. 150).

Tabela 40: Fracionamento cromatográfico de EEGLH

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
F1	59,8	F10	31,0	F19	58,5
F2	196,2	F11	56,4	F20	73,9
F3	101,7	F12	382,3	F21	15,3
F4	84,4	F13	268,2	F22	79,2
F5	74,7	F14	25,8	F23	46,8
F6	25,5	F15	239,6	F24	53,1
F7	159,1	F16	127,7	F25	26,8
F8	220,6	F17	98,2	F26	10,4
F9	647,3	F18	120,3		

10.5.3 Fracionamento cromatográfico de GLHD (Fluxograma 7, p. 230)

A fração GLHD (1,100 g) (Item 10.5.1, p. 226) foi submetida à coluna cromatográfica ($\Phi = 10$ cm) em gel de sílica flash (35 g), usando uma mistura isocrática de hexano: CH_2Cl_2 (1:1). Foram coletadas 52 frações de 10 mL, as quais foram agrupadas em função do perfil cromatográfico, após análise em CCD, obtendo-se 17 frações denominadas na Tabela 43. A fração GLHD13 (70,0 mg) após análise em CCDA, foi denominada de denominada G2-G3 (Fig. 123, p. 154) e enviada para análise por EM, IV e RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), na qual foi identificada como a mistura de ergosta-5,9,22-trien-3 β -ol e ergosta-5,22-dien-3 β -ol (Item 8.2, p. 157).

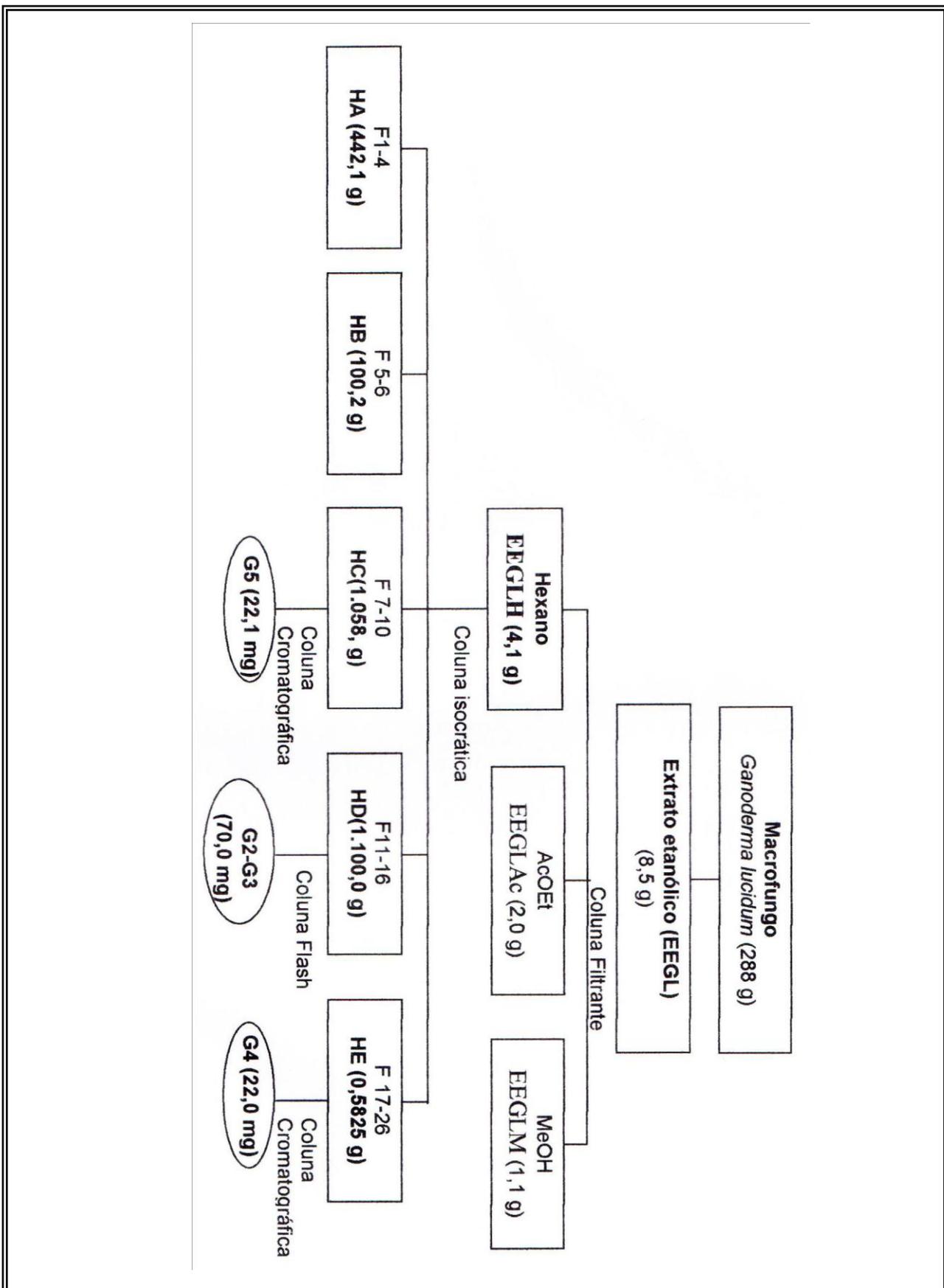
Tabela 43: Fracionamento cromatográfico de GLHD

Sigla	Frações	Massa (mg)	Rend. (%)	Sigla	Frações	Massa (mg)	Rend. (%)
GLHD1	1-4	10,4	0,9	GLHD10	36-37	6,5	0,6
GLHD2	5	15,7	1,4	GLHD11	38-39	42,0	3,8
GLHD3	6-10	22,9	2,1	GLHD12	40-41	32,6	3,0
GLHD4	11-14	49,8	4,5	GLHD13	42-46	70,0	7,3
GLHD5	15-19	165,3	15,0	GLHD14	47-49	6,8	0,6
GLHD6	20-22	49,3	4,5	GLHD15	50-51	1,2	0,1
GLHD7	23	176,3	16,0	GLHD16	52	7,8	0,7
GLHD8	24-27	79,8	7,3				
GLHD9	28-35	15,6	1,4				
						TOTAL	69,2

10.5.4 Fracionamento cromatográfico de GLHE (Fluxograma 7, p. 230)

A fração GLHE (582,5 mg) (Item 10.5.1, p. 226) foi submetida a coluna cromatográfica ($\Phi = 8$ cm) em gel de sílica (20 g), usando uma mistura isocrática de hexano: CH_2Cl_2 (1:1). Foram coletadas 46 frações de 10 mL, as quais foram agrupadas em função do perfil cromatográfico após análise em CCD, obtendo-se 16 frações descritas e denominadas na Tabela 44 (p. 229). A fração GLHE14 (22,0 mg), após análise em CCDA, foi

Fluxograma 7: Isolamento dos constituintes fixos de *Ganoderma lucidum*



10.6 Procedimentos experimentais de síntese de derivados esteroidais

10.6.1 Redução de G1

O composto G1 (100,2 mg, 0,25 mmol) foi dissolvido em etanol (10,0 mL) sendo adicionado 1,0 g de borohidreto de sódio (NaBH_4). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em banho de gelo durante 4 horas. Adicionou-se 50,0 mL de água à mistura reacional. A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 10,0 mL) e tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e o solvente destilado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (eluente hexano/AcOEt 8:2), obtendo-se um pó branco (64,0 mg, rendimento 64%), caracterizado como uma mistura de G1.1 β e G1.1 α , como mostra a Figura 148 (p. 179). A amostra foi analisada por espectroscopia de IV, RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D).

10.6.2 Acetilação de G1.1

O composto G1.1 (185,4 mg, 0,47 mmol) foi dissolvido em anidrido acético (2,0 mL) e piridina (1,0 mL). A mistura ficou mantida sob agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente. Adicionou-se 30,0 mL de solução de sulfato de cobre (CuSO_4 , 5%) e efetuou-se a extração por partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 30,0 mL). A fase orgânica foi lavada com água e tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Em seguida, a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se 191,6 mg (BANDEIRA *et al.*, 2007). O resíduo foi purificado por cromatografia isocrática em coluna (eluente clorofórmio), obtendo-se dois sólidos, respectivamente, G1.1 (10,4 mg) e G1.2 (158,5mg), correspondendo ao rendimento de 75,5 %, conforme mostra a Figura 157 (p. 185). As amostras foram analisadas por espectroscopia de IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D).

10.6.3 Síntese de oximas a partir de G1

Dissolveu-se em balão de fundo redondo (50,0 mL) cerca de 1,5 g de cloridrato de hidroxilamina ($\text{Cl}^- \text{NH}_3\text{OH}$) em metanol (30,0 mL). Em seguida, adicionou-se G1 (200,0 mg, 0,50 mmol). A mistura reacional ficou em agitação, sob refluxo, por 6 (seis) horas

(KATELEY *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005). O produto reacional foi concentrado em rotaevaporador sob refluxo e, em seguida, adicionou-se 15,0 mL de água destilada para extração por partição líquido-líquido com acetato de etila (2 x15,0 mL). A fase aquosa foi desprezada. A fase orgânica foi lavada com água destilada e seca com sulfato de sódio, filtrada e rotaevaporada sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido amorfo e branco (207,0 mg, rendimento 100 %). Este sólido foi lavado e filtrado a vácuo, respectivamente, com AcOEt e CHCl_3 . As fases orgânicas foram concentradas sob pressão reduzida obtendo-se respectivamente 67,9 mg (AcOEt) e 79,0 mg (CHCl_3). As amostras foram analisadas por espectroscopia de IV, RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), sendo que o resíduo branco foi denominado G1.3a, enquanto que o material extraído com clorofórmio tratava-se de um outro isômero denominado G1.3b, de acordo com a Figura 164 (p. 191).

10.6.4 Formilação de G1.1

O composto G1.1 (185,0 mg, 0,46 mmol) foi submetido a reação de formilação com 1,5 mL de ácido fórmico (90 %) e 15 gotas de ácido perclórico. A mistura foi mantida em banho maria a $60\text{ }^\circ\text{C}$ e agitação magnética, durante 4 (quatro) horas (BANDEIRA *et al.*, 2007). O produto foi resfriado em banho de gelo sob agitação. Em seguida, adicionou-se anidrido acético 1,0 mL e água destilada (5,0 mL), obtendo-se um precipitado que foi filtrado e lavado a vácuo. Após seco em dessecador, foi denominado G1.4 (532,0 mg).

O composto G1.4 (532,0 mg) foi submetido a cromatografia de coluna em gel de sílica, utilizando-se como eluente: hexano, hexano: CHCl_3 (1:1), CHCl_3 , AcOEt e MeOH, resultando em 35 frações. A análise das frações em CCDA, possibilitou a reunião das frações F9-21 e F22-28, sendo identificadas, respectivamente, como G1.4 (55,8 mg), produto desejado, e G1.1(107,0 mg) que não reagiu, correspondendo ao rendimento cromatográfico de 34,3 % (Figura 172, p. 198). O composto G1.4 foi caracterizado por métodos espectroscópico de IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D).

CAPÍTULO 11

Considerações finais

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O levantamento bibliográfico sobre o gênero *Heliotropium* no *Science Finder*, *Web of Science* e *Sciencedirect* evidenciou trabalhos em que constam o isolamento de compostos pertencentes às seguintes classes de metabólicos secundários: quinonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, álcoois, ácidos graxos e, principalmente, alcalóides pirrolizidínicos.

O estudo fitoquímico desenvolvido neste trabalho, abordando as duas espécies de *Heliotropium*, permitiu verificar a presença de alcalóides pirrolizidínicos, legitimando a possibilidade desta classe tratar-se de um quimiomarcador para este gênero, a partir do isolamento dos alcalóides licopsamina e helindicina, bem como da mistura dos ácidos nécicos viridiflórico e traquelântico que se agrupam à base necina para formação desta classe de alcalóides. Entretanto, a utilização da espécie *Heliotropium indicum* pela medicina popular, principalmente, na formulação de xaropes caseiros para tratamento auxiliar de bronquites não poderia ser validada, devido aos registros científicos que atribuem a forte ação hepatotóxica, pneumotóxica, hemolítica, antimiotóxica, teratogênica e carcinogênica de alcalóides pirrolizidínicos, apesar da evidência de atividades biológicas contra infecções virais e bacteriológicas de alguns compostos desta classe.

A mistura dos ácidos viridiflórico e traquelântico está sendo relatada pela primeira vez na espécie *Heliotropium indicum* Linn, bem como o alcalóide pirrolizidínico licopsamina na espécie *Heliotropium polyphyllum* Lehm.

Verificou-se que o isolamento de alcalóides pirrolizidínicos através de sílica tratada com NaHCO₃ com espécies de *H. indicum* e *H. polyphyllum* coletadas no Estado do Ceará é possível, porém demonstra ser um árduo trabalho, sugerindo que há um percentual elevado de alcalóides pirrolizidínicos do tipo N-óxidos.

A investigação dos constituintes voláteis das partes aéreas de *H. indicum*, por hidrodestilação, revelou a presença de uma variedade de compostos pertencentes a diferentes classes de metabólicos secundários: álcoois, hidrocarbonetos saturados, aldeídos de cadeia linear, entre outras, com peso molecular superior aos monoterpenos, sendo o composto majoritário o sesquiterpenóide fitol (27,89%).

O estudo dos constituintes voláteis das partes aéreas de *H. polyphyllum*, através das técnicas de hidrodestilação, destilação por arraste com vapor d'água e fluido supercrítico, permitiu identificar 43 componentes, pertencentes a diferentes classes como álcoois, hidrocarbonetos alifáticos de cadeia linear, monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos graxos,

ésteres de cadeia longa, entre outras. Como constituintes majoritários destacaram-se hex-3Z-en-1-ol (41,16%) na hidrodestilação, germacreno-D (16,34%), elemol (14,54%) e neofitadieno (14,16%) na destilação por arraste com vapor e ácido linoléico (44,19%) e linoleato de metila (35,64%) na extração com fluido supercrítico.

O levantamento bibliográfico sobre os constituintes fixos isolados do macrofungo *Ganoderma lucidum* no *Science Finder*, *Web of Science* e *Sciencedirect* evidenciou o relato de uma variedade de compostos como proteínas, monossacarídeos livres, oligossacarídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outras; sendo os polissacarídeos, triterpenos e esteróides as classes com maiores destaques. Neste trabalho, verificou-se que a literatura registra a presença de 67 esteróides do tipo ergostano ou lanostano.

A investigação dos constituintes químicos fixos do extrato etanólico da espécie *G. lucidum* permitiu o isolamento dos esteróides do tipo ergostano: ergosta-7,22-dien-3-ona; ergosta-22-en-3 β ,4 α ,8 β -triol; ergosta-1,4,8,22-tetraen-3-ona; além da mistura de ergosta-5,9,22-trien-3 β -ol e ergosta-5,22-dien-3 β -ol. Com exceção do primeiro composto, todos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie.

A ampliação do estudo sobre os constituintes químicos, através da modificação estrutural do esteróide ergosta-7,22-dien-3-ona no carbono C-3, proporcionou a obtenção dos compostos 3-acetil-ergosta-7,22-dieno; 3-formil-ergosta-7,22-dieno; 3E-hidroxi-imino-ergosta-7,22-dieno e 3Z-hidroxi-imino-ergosta-7,22-dieno, bem como a mistura de ergosta-7,22-dien-3 α -ol e ergosta-7,22-dien-3 β -ol, com rendimentos satisfatórios. Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) destes compostos sintetizados permitiram averiguar as modificações nos deslocamentos químicos em C-3, bem como a correta atribuição dos dados de deslocamento químico dos núcleos de carbono e hidrogênio para estes compostos que estão sendo relatados pela primeira vez na literatura.

CAPÍTULO 12

Referências Bibliográficas

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J.; MACHADO, M. I. L. Kovats indices simulation essential oils analysis. **Química Nova**, v. 1, p. 282, 1990.

ARISAWA, M.; FUJITA, A.; SAGA, M.; FUKUMURA, H.; HAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; MORITA, N. Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 621-625, 1986.

BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; SANTOS, H. S. dos. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α e β -amirina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 204-208, 2007.

BARROSO, G. M. **Sistemática botânica de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária (UFV), 1984. v. 2, p. 88-90.

BICCHI, C.; WITTE, L.; RUBIOLO, P.; HARTMANN, T. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 32, p. 187-196, 1993.

BIRECKA, H.; FROHLICH, M. W.; HULL, L.; CHASKES, M. J. Pyrrolizidine Alkaloids of *Heliotropium* from Mexico and Adjacent U.S.A. **Phytochemistry**, v. 19, p. 421-426, 1980.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Fortaleza, CE: UFC, Coleção Mossoroense, 1976. v. 11, p. 249-250.

BRASIL. A Lei da natureza: lei de crimes ambientais. Lei n^o 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Brasília: IBAMA, 1998.

BRAQUET, P.; HOSFORD, D. Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 135-139, 1991.

BREITMAIER, E.; ROEDER, E.; BIRECKA, H.; FROHLICH, M. W.; BADZIES-CROMBACH, A. Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium spathulatum*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1703-1706, 1991.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon – NMR spectroscopy: high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. 3 ed. VCH Publishers, 1987. 515p.

BRITO, A. E. R. M.; MADEIRA, Z. R.; COSTA, F. A. P. de; NUNES, E. P.; MATIAS, L. Q.; SILVA, F. H. M. e. **Vegetação costeira do Nordeste semi-árido: guia ilustrado**. Fortaleza: Edições UFC, 2006. p. 233-237.

BROWN, K. S., TRIGO, J. R. The ecological activity of alkaloids. **In: Cordell, G. (Ed.), The Alkaloids**. New York: Academic Press, 1995. v. 47, p. 227-354.

BUCHANAN, P. K. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with special reference to species of medicinal and nutraceutical importance. **Proc. Int. Symposium Ganoderma Sci**, Auchland, 27-29 April, 2001. < <http://www.google.com.br/search?hl=pt-BR&q=Proc.+Int.+Symposium+Ganoderma+Sci&meta=> > Disponível em: Acesso: 21. nov. 2008.

CAI, H.; YANG, J.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; WANG, F. Studies on the triterpenoids constituents from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Yaoxue Xuebao**, v. 31, p. 200-204, 1996.

CHAN, W. K.; LAM, D. T. W.; LAW, H. K. W.; WONG, W. T.; KOO, M. W. L.; LAU, A. S. Y.; LAU, Y. L.; CHAN, G. C. *Ganoderma lucidum* mycelium and spore extracts as natural adjuvants for immunotherapy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, p. 1047-1057, 2005.

CHEN, R.; WANG, Y.; YU, D. Chemical constituents of the spores from *Ganoderma lucidum*. **Zhiwu Xuebao**, v. 33, p. 65-68, 1991.

CHIANG, H. C.; CHU, S. C. Studies on the constituents of *Ganoderma lucicum*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 38, p. 71-76, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Agricultura, Inst. Brás. de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 3., p. 47-57.

CULVENOR, C. C. J.; HEFFERNAN, M. L.; WOODS, W. G. Nuclear magnetic resonance spectra of pyrrolizidine alkaloids. (I). The spectra of retronecine and heliotridine. **Australian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 1605-1624, 1965.

CULVENOR, C. C. J.; WOODS, W. G. Nuclear magnetic resonance spectra of pyrrolizidine alkaloids. (II). The pyrrolizidine nucleus in ester and non-ester alkaloids and their derivatives. **Australian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 1625-1637, 1965.

DAVICINO, J. G.; PESTCHANKER, M. J.; GIORDANO, O. S. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium curassavicum*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 960-962, 1988.

DETZEL, A., WINK, M. Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. **Chemoecology**, v. 4, p. 8-18, 1993.

DJERASSI, C. **Steroid reactions**: an outline for organic chemists. San Francisco: Holden-Day, INC, 1963. 657p.

EL-SHAZLY, A.; ABDEL-GHANI, A.; WINK, M. Pyrrolizidine alkaloids from *Onosma arenaria* (Boraginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 477-485, 2003.

FARIA, R. A. P. G. **Estudo químico de *Bauhinia forticata* Link**. 2003. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciência, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003. p. 22.

FARNSWORTH, N. R.; BINGEL, A. S. In new natural products and plant drugs with pharmacological or therapeutical activity (H. WAGNER AND P. WOLFF., eds). New York: Springer, 1977. p. 61-73.

FEITOSA, E. M. A. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil: avaliação biológica e estudo fitoquímico de *Rolliniopsis leptopetala* (R. E. Fr.) Saff e *Zanthoxylum articulatum* Engler.** 2004. 256 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004. p. 88.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FIESER, L. F.; M. FIESER. **Steroids**. London: Reinhold Publishing Corporation, 1959. 945p.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemist analyst**. p. 49-114, 1960.

GUNATILAKA, A. A. L.; GOPICHAND, Y.; SCHMITZ, F. J.; DJERASSI, C. Minor and trace sterols in marine invertebrates 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5 α , 8 α -epidioxy sterols from four marine organisms. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 46, p. 3860-3866, 1981.

HARTMANN, T., WITTE, L. Chemistry, biology and chemecology of pyrrolizidine alkaloids. In: **Pelletier, S. W. (Ed.), Alkaloids: Chemical and Biological Perspective**, Oxford: Pergamon, 1995. v. 9, p. 155-233.

HATA, K.; HORI, K.; MIURA, N.; SAKAMOTO, K.; TAKAHASHI, S. Inhibition of melanin synthesis from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi). **Japanese Society of Pharmacology**, v. 55, p. 304-307, 2001.

HATTORI, M.; EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M. R.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T. Anti-Hiv-1 and anti-Hiv-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1651-1657, 1998.

HERRMANN, M.; JOPPE, H.; SCHMAUS, G. Thesinine-4'-O- β -D-glucoside the first glycosylated plant pyrrolizidine alkaloid from *Borago officinalis*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 399-402, 2002.

HONDA, J.; SAKAMURA, S. Cholane steroids. JP 60258197, 05 jun. 1984, 20 dezembro 1985.

HOQUE, M. S.; GHANI, A.; RASHID, H. Alkaloids of *Heliotropium indicum* Linn. Grown in Bangladesh. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v. 5, p. 13-15, 1976.

HOSTETTMAN, K.; GUILLET, D.; GUNTERN, A.; IOSET, J. R.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; FOGGIN, C. M. Absolute configuration of a tetrahydrophenanthrene from *Heliotropium ovalifolium* by LC-NMR of its Mosher Esters. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 17-20, 2003.

HOSTETTMANN, K.; GUNTERN, A.; IOSET, J.; QUEIROZ, E. F.; FOGGIN, C. M. Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 631-635, 2001.

HOSTETTMANN, K.; HAMBURGER, M. Bioactive in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HOSTETTMAN, K.; KELLER, A. C.; MAILLARD, M. P. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1041-1046, 1996.

HUIZING, H. J., MALINGRE, T. M. A chemotaxonomical study of some Boraginaceae: Pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds. **Plant Systematics and Evolution**, v. 137, p. 127-134, 1981.

JAIN, S. C.; SINGH, B.; JAIN, R. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 666-668, 2001.

KAC, D.; BARBIERI, G.; FALCO, M. R.; SELDES, A. M.; GROS, E. G. The major sterols from three species of Polyporaceae. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2686-2687, 1984.

KATELEY, L. J.; MARTIN, W. B.; WISER, D. C.; BRUMMOND, C. A. Microscale synthesis of a diphenylisoxazoline by a 1,3-dipolar cycloaddition. **Journal of Chemical Education**, v. 79, p. 225, 2002.

LAKSHMANAN, A. J.; SHANMUGASUNDARAM, S. Heliscabine, a pyrrolizidine ester alkaloid from *Heliotropium scabrum*. **Phytochemistry**, v. 39, 473-475, 1995.

_____. Ester alkaloids of *Heliotropium bracteatum*. **Phytochemistry**, v. 40, 291-294, 1995.

LIN, C.; KO, H.; HUNG, C.; WANG, J. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 234-239, 2008.

LIU, J.; FUJITA, R.; SATO, M.; SHIMIZU, K.; KONISHI, F.; NODA, K.; KUMAMOTO, S.; UEDA, C.; TAJIRI, H.; KANEKO, S.; SUIMI, Y.; KONDO, R. The effect of strain, growth stage, and cultivating condition of *Ganoderma lucidum* on 5 α -reductase inhibition. **Journal of Wood Science**, v. 51, p. 189-192, 2005.

LOCK, O.; ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNÁNDEZ, I.; ALBÁN, J. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 88, p. 199-204, 2003.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

PYNE, S. G.; MACHAN, T.; KORTH, J.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S. Composition and antituberculosis of the volatile oil of *Heliotropium indicum* Linn. growing in Phitsanulok, Thailand. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 265-267, 2006.

MALIK, A.; PERVEEN, S.; KHAN, S. B.; AFZA, N. Phytochemical studies on *Heliotropium subulatum*. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 27, p. 538-540, 2005.

MARINHO, A. M. R. **Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados às plantas *Murraya paniculata* (Rutaceae) e *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 2006. 334f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005. 316p.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza, CE: EUFC, 1997. p. 54, 63, 64.

MATTOCKS, A. R. Minor alkaloids of *Heliotropium indicum*. **Journal of the Chemical Society**, v. 5, p. 329-331, 1967.

MATTOCKS, A. R. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal. In: _____. **Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids**. New York, USA: Academic Press, 1986. p. 191-219.

MATTOCKS, A. R.; SCHOENTAL, R.; CROWLEY, H. C.; CULVENOR, C. C. J. Indicine: major alkaloid of *Heliotropium indicum*. **Journal of the Chemical Society**, p. 5400-5403, 1961.

MELO, J. I. M.; ANDRADE, W. M. Boraginaceae *s.l.* A. Juss. em uma área de caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 369-378, 2007.

MELO, A. A.; MOURA, E.; ANSELM, G.; MESQUITA, M.; AQUINO, M.; COSTA, R. M. **Normas para apresentação de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, CE: Imprensa Universitária, 2007.

MELO, J. I. M.; SALES, M. F. *Heliotropium* L. (Boraginaceae – Heliotropioideae) de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, p. 65-87, 2004.

SAKAGUCHI, K.; MIZUSHINA, Y.; TAKAHASHI, N.; HANASHIMA, L.; KOSHINO, H.; ESUMI, Y.; UZAWA, J.; SUGAWARA, F. Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2047-2052, 1999.

MODAK, B.; ROJAS, M.; TORRES, R.; RODILLA, J.; LUEBERT, F. Antioxidant activity of a new aromatic geranyl derivative of the resinous exudates from *Heliotropium glutinosum* Phil. **Molecules**, v. 12, p. 1057-1063, 2007.

MONCALVO, J. M.; RYVARDEN, L. **A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk**. Oslo: Fungiflora A/S. Série Synopsis Fungorum, v. 11, p. 1-114, 1997.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. **Produtos naturais: estudos químicos e biológicos**. Fortaleza, CE: EdUECE, 2007. p. 91-101.

MOREIRA, V. M. A. **Novos esteróides inibidores da biossíntese de androgénios**. 2008. 278f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

NGUYEN, A. D. Chemical compositions of *Ganoderma lucidum* (Leyss, ex Fr.) Karst. **Tap Chi Duoc Hoc**, v. 2, p. 14-15, 1995.

NICKISCH-ROSENEGK, E. V.; WINK, M. Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiid moths (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p. 1889-1903, 1993.

NIETO-ALVARES, D. A.; CALDERÓN, J. S.; MANCILLA, T. Síntesis of (1R,2R,7R,7aS)-1-hydroxymethyl-2,3,5,6,7,7a-hexahydropyrrolizidine-1,2,7-triol from rosmarinine degradation. **Natural Product Research**, v. 17, p. 33-36, 2003.

NIWA, H.; OGAWA, T.; YAMADA, K. Stereoselective synthesis of (-)-trachelantonic acid and (+)-viridifloric acid, necic acid components of pyrrolizidine alkaloids from a common intermediate. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 63, p. 3707-3709, 1990.

NISHITOBA, T.; SATO, H.; ODA, K.; SAKAMURA, S. Novel triterpenoids and a steroid from the fungus *Ganoderma lucidum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 211-216, 1988.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C. BRAZ-FILHO, R. Oximas do lapachol. Citato em: 28 jun. 2005. Disponível em:
<<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0859-1/>> Acesso em 20 jan. 2009.

PAIVA, J. A. de. **Estudo fitoquímico em espécies do gênero senecio (Asteraceae)**. 2002. 163f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.

PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; RAO, Y. V.; ACHARYA, S. B. Isolation and pharmacology action of heliotrine, the major alkaloid of *Heliotropium indicum* Seeds. **Planta Medica**, v. 45, p. 229-233, 1982.

PANDEY, D. P.; SINGH, J. P. ROY, R.; SINGH, V. P.; PANDEY, V. B. Constituents of *Heliotropium indicum*. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 12, p. 321-322, 1996.

PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 203-211, 2003.

PEDERSEN, E., Pyrrolizidine alkaloids in Danish species of the family Boraginaceae. **Archives of Pharmaceutical Chemistry Science Education**, v. 3, p. 55-64, 1975.

PHILLIPSON, J. D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1319-1343, 1995.

PRAKASH, A. S., PEREIRA, T. N., REILLY, P. E., SEAWRIGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research**, v. 443, p. 53-67, 1999.

PRINCIPE, P. **In economic and medicinal plant research**. (WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARSWORTH, N. R. eds). London: Academic Press, 1989. v. 3, p. 1-11.

RAVI, S.; LAKSHMANAN, A. J.; HERZ, W. Iso-lycopsamine, a pyrrolizidine from *Heliotropium keralense*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 361-364, 1990.

REINA, M.; GONZALEZ-COLOMA, A.; GUTIERREZ, C.; CABRERA, R.; HENRIQUEZ, J. And VILLARROEL, L. Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 845-853, 1997.

_____. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1418-1420, 1998.

REINA, M.; MERICLI, A. L.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 355-358, 1995.

REITZ, R. Flora ilustrada catarinense, I parte: fascículo: **as plantas Bora**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1970. p. 03-04, 46-47, 60-61.

RIZK, A. M. **Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids**. CRC Press, Boca Raton. 1990.

ROBINS, D. J. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. **Chemical Society Reviews**, v. 18, p. 375-408, 1989.

RODER, E.; WIEDENFELD, H.; PFITZER, A. Doriasenine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio doria*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 4000-4001, 1988.

ROEDER, E., Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, p. 83-98, 1995.

ROEDER, E. Analysis of pyrrolizidine alkaloids. **Current Organic Chemistry**, v. 3, p. 557-576, 1999.

ROEDER, E.; BOURAUDEL, F. Pyrrolizidine alkaloids from *Neatostema apulum*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3613-3615, 1992.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RYVARDEN, L. **Genera of polypores, nomenclature and taxonomy**. Oslo: Fungiflora A/S. Série Synopsis Fungorum, v. 5, p. 1-363, 1991.

SANTOS, H. S. dos. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste brasileiro reinvestigação fitoquímica e atividade larvívica contra o *Aedes aegypti* das espécies *Croton zehntneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides***. 2007. 137 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciência, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. p. 28.

SCHMELLER, T.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. Allelochemical activities of pyrrolizidine alkaloids: Interactions with neuroreceptors and acetylcholine related enzymes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 399-416, 1997.

SCHULTZE, A. E.; ROTH, R. A. Fibrinolytic activity in blood and lungs of rats treated with monocrotaline. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 121, p. 129-137, 1993.

SEO, G. S.; KIRK, P. M. *Ganoderma*: nomenclature and classification. In: **Ganoderma diseases of perennial crops**. FLOOD, J.; HOLDERNESS, M. UK, Royal Garden Academy: CABI Bioscience, 2000. Disponível em: Acesso: 20 nov. 2008.

SHIAO, M. S.; LIN, L. J.; YEH, S. F.; CHOU, C. S. Two new triterpenes of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 886-890, 1987.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, SC: Editora UFSC, 2004.

SINGH, J. P.; PANDEY, D. P.; PANDEY, M. B.; SINGH, A.; SINGH, R. Constituents of *Heliotropium indicum*. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 19, p. 723-724, 2003.

SKALTSOUNIS, A. L.; CONSTANTINIDIS, T.; HARVALA, C. Pyrrolizidine N-oxide alkaloids of *Heliotropium hirsutissimum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1335-1337, 1993.

SOUZA, J. S. N. de. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil: *Heliotropium indicum* L. e redução de cetonas aromáticas utilizando biocatalisadores**. 2004. 152 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SOUZA, J. S. N.; MACHADO, L. L.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; OVERK, C. R.; YAO, P.; CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1410-1414, 2005.

STEGELMEIER, B. L., EDGAR, J. A., COLEGATE, S. M., GARDNER, D. R., SCHOCH, T. K., COULOMB, R. A., MOLYNEUX, R. J. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. **Journal of Natural Toxins**, v. 8, p. 95-116, 1999.

STEPP, J. R. The role of weeds as sources of pharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 163-166, 2004.

TOMODA, M.; GONDA, R.; KASAHARA, Y.; HIKINO, H. Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2817-2820, 1986.

TORRES, R.; MODAK, B.; VILLARROEL, L.; URZÚA, A.; DELL MONACHE, F.; SÁNCHEZ, F. F. Flavonoids from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatim*. **Boletín de La Sociedad Chilena de Química**, v. 41, p. 195-197, 1996.

TOTH, J. O.; LUU, B.; BECK, J. P.; OURISSON, G. Chemistry and biochemistry of Oriental drugs. Part IX. Cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae): structures of ganoderic acids U-Z. **Journal of Chemical Research, Synopses**, v. 12, p. 299, 1983.

TOTH, J. O.; LUU, B.; OURISSON, G. Les acides ganoderiques T à Z: triterpenes cytotoxiques de *Ganoderma lucidum* (Polyporacée). **Tetrahedron Letters**, v. 24, p. 1081-1084, 1983.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2004.

URZÚA, A.; MODAK, B.; TORRES, R. Identification of a new aromatic geranyl derivate in the resinous exudates of *Heliotropium filifolium* (Boraginaceae). **Boletín de La Sociedad Chilena de Química**, v. 46, p. 175-178, 2001.

URZÚA, A.; MODAK, B.; VILLARROEL, L.; TORRES, R.; ANDRADE, L. Comparative flavonoids composition of the resinous exudate from *Heliotropium chenopodiace* var. *chenopodiaceum* and *H. chenopodiaceum* var. *ericoideum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 127-130, 1998.

URZÚA, A.; VILLARROEL, L.; TORRES, R.; TEILLIER, S. Flavonoids in the resinous exudate of Chilean *Heliotropium* species from Cochranea Section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, p. 744, 1993.

VAN STADEN, J.; FENNELL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGRAW, L.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205-217, 2004.

VILLARROEL, L.; TORRES, R.; URZÚA, A. Compuestos fenólicos en el exudado resinoso de *Heliotropium stenophyllum*. Determinación estructural y efectos antialimentario y antioxidantes. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 36, p. 169-174, 1991.

VILLARROEL, L.; TORRES, R.; URZÚA, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; GONZÁLES-COLOMA, A. *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1123-1126, 2001.

WACHTEL-GALOR, S.; SZETO, Y. T.; TOMLINSON, B.; BENZIE, I. F. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 55, p. 75-83, 2004.

WHO, The International Program of Chemical Safety (IPCS): Criteria 80 pyrrolizidine alkaloids, World Health Organization. Geneva, 1988.

WIEDENFELD, H.; RODER, E. Pyrrolizidine alkaloids from *Ageratum conyzoides*. **Planta Medica**, v. 57, p. 578-579, 1991.

WINK, M.; EL-SHAZLY, A.; EL-DOMIATY, M.; WITTE, L. Pyrrolizidine alkaloids in members of the Boraginaceae from Sinai (Egypt). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 619-636, 1998.

WINK, M.; ROBERTS, M. F. Compartmentation of alkaloids synthesis, transport and storage. In: Roberts, M.F., Wink, M. (Eds.), **Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal Application**. New York: Plenum Press, 1998. p. 239-269.

WON, S.; LIN, C.; TOME, W. A lanostanoid of Formosan *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 673-675, 1990.

_____. Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 998-1002, 1991.

YOKOKAWA, H. Sterol composition of the fruit bodies of higher fungi. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 28, p. 313-318, 1987.

ZIEGENBEIN, F. C.; HANSEN, H.; KONIG, W. A. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 202-211, 2006.