



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

**RICARDO DE ARAUJO MARQUES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Humirianthera ampla* MIERS (ICACINACEAE)**

**FORTALEZA**

**2007**

**RICARDO DE ARAÚJO MARQUES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Humirianthera ampla* MIERS (ICACINACEAE)**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais

Orientadora: Prof. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan

Co-orientadora: Prof. Dra. Janete Eliza Soares de Lima

**FORTALEZA**

**2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

---

M32e Marques, Ricardo de Araújo.

Estudo Fitoquímico e Biológico de Humirianthera ampla Miers (Icacinaceae) / Ricardo de Araújo Marques. – 2007.  
132 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2007.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

1. Doença de Alzheimer. 2. Química orgânica. 3. Química vegetal. 4. Plantas - Análise. I. Título.  
CDD 540

---


**RICARDO DE ARAÚJO MARQUES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Humirianthera ampla* MIERS  
(ICACINACEAE)**

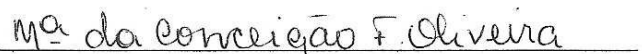
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 23/02/2007

EXAMINADORES:



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



Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Janete Eliza Soares de Lima  
Universidade Federal do Ceará – UFC - FFOE

**Aos meus Pais Maria e Mourão**

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Janete Eliza Soares de Lima pela amizade, incentivo, colaboração no desenvolvimento deste trabalho e ainda por me introduzir no fabuloso mundo da pesquisa em Química Orgânica.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan pela confiança neste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Cristina Vasconcelos pela valiosa transmissão de conhecimentos e pela amizade.

Às Professoras Maria da Conceição, Mary Anne Lima e Otília Pessoa pelo apoio acadêmico e pelos préstimos ao Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará que diretamente estiveram envolvidos no ótimo nível de estudos em Química Orgânica.

À amiga Leopoldina Veras minha gratidão pelo amparo sempre disponível.

Ao amigo Rowdens Andrade pela amizade e pelo auxílio na coleta da espécie em estudo.

Aos colegas Daniel, Renata Mendonça, Grazielle e Glauber pela realização dos espectros de RMN.

Aos colegas Alexandre e Sami pela realização dos espectros de EM e no IV.

A todos que compõe o Laboratório de Produtos Naturais, professores, funcionários e alunos: Dr. Matos, Prof. Goreti, Amélia, Francilene, Marilac, Sales, Zeca e aos amigos Edângelo, Ivan, Lúcia, Fábio, Rogério, Leandro, Rodrigo, sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos Tasso Gabriel, Jefferson, Bartolomeu, Jackson, Rudy, Artur, Max, João Carlos, Natália, Ayla, Milena, Gisele, Almir e Andreza pelo estímulo mútuo e convívio agradável durante a realização deste trabalho.

Aos sempre prestativos secretários do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica: Orlando e Célia.

Aos funcionários Lana, Mundinha e Paulo pela constante disposição em servir.

À CAPES pela bolsa concedida, FUNCAP e CNPq pelo suporte financeiro que viabilizou este trabalho.

"No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz." (Ayrton Senna)

## RESUMO

A investigação fitoquímica das raízes de *Humirianthera ampla* (Icacinaceae) resultou no isolamento e identificação da mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, annonalida, lupeol e 3- $\beta$ -*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol. As estruturas destes compostos foram estabelecidas por análise espectrométrica (IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) incluindo técnicas de RMN bidimensional (COSY, HMQC, HMBC E NOESY) e por comparação com dados registrados na literatura.

Todos os extratos foram testados usando o ensaio de Ellman. Somente o extrato acetato de etila e suas frações mostraram inibição da acetilcolinesterase.

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método descrito por Owen *et al*, 2001. O extrato etanólico foi o mais ativo. O extrato acetato de etila mostrou inibição da enzima xantina oxidase.

Palavras-chave: *Humirianthera ampla*. Icacinaceae. Annonalida.



## ABSTRACT

The chemical investigation of the roots of *Humirianthera ampla* (Icacinaceae) resulted in the isolation and identification of a mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, annonalide, lupeol and the 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopyranosyl sitosterol. The structures of these compounds were established by spectrometric analysis (IR, MS, NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) including bidimensional NRM techniques (COSY, HMQC, HMBC and NOESY) and for comparison with data described in the literature.

All extracts were tested using the Ellman assay. Only ethyl acetate extract and their fractions showed acetylcholinesterase inhibition.

The antioxidant capacity of the extracts were measured as method described by Owen *et al*, 2001. The ethanolic extract was the most active. The ethyl acetate extract showed xanthine oxidase inhibition.

Keywords: *Humirianthera ampla*. Icacinaceae. Annonalide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplares de <i>H. ampla</i> em seu <i>habitat</i> natural e com ênfase em sua raiz, respectivamente. (Foto: Dayan Marques).....	24
Figura 2 - Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica.....	33
Figura 3 - Visão esquemática da hipótese colinérgica e localização dos receptores muscarínicos. ....	35
Figura 4 - Resumo do processo das formas de intervenção desde a liberação até a degradação da ACh.....	36
Figura 5 - Doenças associadas às espécies reativas de oxigênio ou radicais livres.....	43
Figura 6 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 1-HA-HX ( $\text{CDCl}_3/500$ MHz).....	68
Figura 7 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-HX ( $\text{CDCl}_3/125$ MHz).....	69
Figura 8 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT $135^\circ$ de 1-HA-HX ( $\text{CDCl}_3/125$ MHz). ....	70
Figura 9 - Espectro de massas de 1-HA-AE-PT (IE, 70 eV).....	73
Figura 10 - Espectro de absorção na região do infravermelho de 1-AE-PT-HA ( $\text{KBr}, \text{cm}^{-1}$ ). A. Deformação axial de C-H, $2941\text{-}2886 \text{ cm}^{-1}$ . B. Deformação axial de O-H, $3471 \text{ cm}^{-1}$ . C. Deformação axial de C=O de cetona, $1704 \text{ cm}^{-1}$ . D. Deformação axial de C=O de lactona, $1743 \text{ cm}^{-1}$ . E. Deformação axial C=C, $1661 \text{ cm}^{-1}$ . F. Deformação axial C-CH <sub>3</sub> , $1461 \text{ cm}^{-1}$ . G. Deformação axial C-O, $1036 \text{ cm}^{-1}$ .....	74
Figura 11 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz).....	76
Figura 12 – Expansão 1 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz). ....	77
Figura 13 – Expansão 2 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz). ....	78
Figura 14 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$ MHz). ....	79
Figura 15 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT $135^\circ$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz). ....	80
Figura 16 – Espectro de RMN-2D COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	82
Figura 17 – Expansão do espectro de RMN-2D COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas.....	83
Figura 18 - Espectro de RMN-2D HMQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	85
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN-2D HMQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas.....	86
Figura 20 - Espectro de RMN-2D HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	88
Figura 21 – Expansão 1(A) do espectro de RMN-2D HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	89

Figura 22 - Expansão 1(B) do espectro de RMN-2D HMBC $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	90
Figura 23 - Expansão 2 do espectro de RMN-2D HMBC $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	91
Figura 24 - Expansão 3 do espectro de RMN-2D HMBC $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	92
Figura 25 - Expansão 4 do espectro de RMN-2D HMBC $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	93
Figura 26 - Espectro de RMN-2D NOESY $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz) e as respectivas correlações observadas. ....	95
Figura 27 - Espectro de massas de 1-HA-AE-FT (IE/70 eV). (M) = 426 D. ....	99
Figura 28 - Espectro de absorção na região do infravermelho de 1-HA-AE-FT ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ). A. Deformação axial de C-H, 2941 e 2869 $\text{cm}^{-1}$ . B. Deformação angular simétrica e assimétrica de $-\text{CH}_3$ , 1381 e 1456 $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Deformação axial de O-H, 3408 $\text{cm}^{-1}$ . D. Deformação axial de C-O, 1039 $\text{cm}^{-1}$ . E. Deformação axial de C=C, 1640 $\text{cm}^{-1}$ . ....	100
Figura 29 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/500$ MHz). ....	102
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/500$ MHz). ....	103
Figura 31 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/125$ MHz). ....	104
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/125$ MHz). ....	105
Figura 33 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135 ° de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/125$ MHz). ....	106
Figura 34 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$ MHz). ....	109
Figura 35 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 2-HA-AE-FT/ME ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$ MHz). ....	110
Figura 36 - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$ MHz). ....	111
Figura 37 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135 ° de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$ MHz). ....	112
Figura 38 - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135 ° de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$ MHz). ....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura de ocorrência das Emmotinas (KAPLAN <i>et al.</i> , 1991).....	28
Tabela 2 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico do extrato hexânico-HX.	57
Tabela 3 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico do extrato de etila precipitado-AE-PT.....	58
Tabela 4 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico da fração AE-FT/DM.....	59
Tabela 5 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico da fração AE-FT/AE.....	62
Tabela 6 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico da fração AE-FT/ME .....	63
Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C (δ) para os esteróides β-sitosterol e estigmasterol (1-HX-HA)* isolado e da literatura (GOAD, 1991)**.....	71
Tabela 8 - Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 1-AE-PT-HA (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 300/75 MHz)* .....	96
Tabela 9 - Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C (δ) para o diterpeno annonalida isolado (1-AE-PT-HA)* e da literatura (MUSSINI <i>et al.</i> , 1973)**.....	97
Tabela 10 - Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C (δ) para o triterpeno Lupeol isolado (1-AE-FT-HA)* e da literatura (PINHEIRO <i>et al.</i> , 2004)**.....	107
Tabela 11 - Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C (δ) para o 3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol isolado (2-HA-AE-FT)* e da literatura (BANDEIRA, 2002)**.....	114
Tabela 12 - Porcentagem de inibição dos extratos das raízes de <i>H. ampla</i> na formação dos ADHBs.....	117
Tabela 9 - Porcentagem de inibição da annonalida na formação dos DHBAs.....	118

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Relações geográficas de alguns gêneros da família Icacinaceae (KAPLAN; RIBEIRO; GOTTLIEB, 1991). .....	22
Esquema 2 - Reação de biossíntese de acetilcolina (ACh).....	32
Esquema 3 – Princípio do ensaio de Ellman (Ellman <i>et al.</i> , 1961). .....	49
Esquema 4 – Princípio do ensaio de atividade antioxidante HX/XO (OWEN, <i>et al.</i> , 2000a). .....	52
Esquema 5 – Procedimento experimental para a realização do ensaio de Ellman. ....	64

## LISTA DE FLUGRAMAS

Fluxograma 1 - Obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila, filtrado e precipitado, e etanólico e fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila filtrado. ....	56
Fluxograma 2 - Isolamento e purificação de 1-HA-HX. ....	58
Fluxograma 3 - Isolamento e purificação de 1-HA-AE-PT. ....	60
Fluxograma 4 - Isolamento e purificação de 1-AE-FT-HA. ....	61
Fluxograma 5 - Isolamento e purificação de 2-HA-AE-FT. ....	63
Fluxograma 6 - Fracionamento bioguiado dos extratos das raízes de <i>Humirianthera ampla</i> (os extratos, frações e sub-frações ativas estão demonstradas em verde e as inativas em vermelho). ....	116

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos das raízes de <i>Humirianthera ampla</i> pelo método HX/XO. ....	118
Gráfico 2 - Avaliação da atividade antioxidante daannonalida pelo método HX/XO. ....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\beta$	Beta
$\delta$	Deslocamento químico
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEI	Inibidores da acetilcolinesterase
ADBH	Ácido dihidroxibenzóico
AE-FT	Extrato acetato de etila filtrado
AE-FT/DM	Fração diclorometano do extrato acetato de etila filtrado
AE-FT/AE	Fração acetato de etila do extrato acetato de etila filtrado
AE-FT/ME	Fração metanólica do extrato acetato de etila filtrado
AE-PT	Extrato acetato de etila precipitado
BB	Broad Band
BSA	Albumina sérica bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
$C_5D_5N$	Piridina deuterada
DA	Doença de Alzheimer
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico], reagente de Ellman
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
IE	Ionização eletrônica
ET	Extrato etanólico
ev	electron-volt
<i>H. ampla</i>	<i>Humirianthera ampla</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HX	Extrato hexânico
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<sup>n</sup> <i>J</i> <sub>CH</sub>	Constante de acoplamento de ordem n entre carbonos e hidrogênios
<sup>n</sup> <i>J</i> <sub>HH</sub>	Constante de acoplamento de ordem n entre hidrogênios
nAChE	Receptor nicotínico da acetilcolina
Me	Metil
MHz	Megahertz
m/z	Relação massa/carga
°C	Graus Celsius
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
Rf	Fator de Retenção
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Tris/HCL	Cloridrato de triidroximetilamina
UV	Ultravioleta
1-HÁ-HX	<i>β</i> -sitosterol e estigmasterol
1-HÁ-AE-PT	Annonalida
1-HÁ-AE-FT	Lupeol
2-HÁ-AE-FT	3- <i>β</i> - <i>O</i> - <i>β</i> -D-glicopiranosil sitosterol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS</b> .....	21
2.1 Sinopse da família Icacinaceae.....	21
2.2 Descrição do gênero <i>Humirianthera</i> .....	23
2.2.1 Descrição da espécie em estudo – <i>Humirianthera ampla</i> .....	23
<b>3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	26
3.1 Estudos químicos realizados com outros gêneros da família Icacinaceae e com o gênero <i>Humirianthera</i> .....	26
3.1.1 Estudos químicos realizados com outros gêneros da família Icacinaceae .....	26
3.1.2 Estudos químicos realizados com o gênero <i>Humirianthera</i> .....	29
3.2 Doença de Alzheimer .....	30
3.2.1 A doença de Alzheimer: impacto social e fisiopatologia da doença .....	30
3.2.2 Biossíntese, hidrólise e função da acetilcolinesterase .....	32
3.2.3 Terapia colinomimética da doença de Alzheimer .....	33
3.2.4 Fármacos comerciais para o tratamento da DA.....	36
3.2.5 Busca de novos candidatos de origem natural para o tratamento da DA .....	37
3.3 ANTIOXIDANTES.....	42
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
4.1 Procedimentos gerais.....	45
4.1.1 Métodos cromatográficos .....	45
4.1.2 Métodos espectrométricos .....	46
4.1.2.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e carbono-13 (RMN <sup>13</sup> C).....	46
4.1.2.2 Espectrometria na região do infravermelho (IV).....	47
4.1.2.3 Espectrometria de massas (EM) .....	47
4.1.3 Ponto de fusão (PF) .....	47
4.2 Atividade biológica <i>in vitro</i> .....	48
4.2.1 Estudo da atividade anticolinesterásica .....	48
4.2.1.1 Tampões .....	48
4.2.1.2 Enzima utilizada nos ensaios de CCD.....	49
4.2.1.3 Substrato .....	50



4.2.1.4 Reagente de Ellman.....	50
4.2.1.5 Placas para ensaios em CCD .....	50
4.2.1.6 Inibidores de referência .....	50
4.2.2 Estudo da atividade antioxidante.....	51
4.2.2.1 Método HX/XO (xantina/xantina oxidase).....	51
4.2.2.1.1 Soluções e reagentes.....	53
<b>5 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>55</b>
<b>5.1 Material vegetal</b> .....	<b>55</b>
5.1.1 Coleta e identificação .....	55
<b>5.2 Extração e isolamento dos constituintes</b> .....	<b>55</b>
5.2.1 Tratamento cromatográfico do extrato hexânico - HX.....	57
5.2.2 Tratamento cromatográfico do extrato acetato de etila precipitado- AE-PT.....	58
5.2.3 Tratamento cromatográfico da fração AE-FT/DM.....	59
5.2.4 Tratamento cromatográfico da fração AE-FT/AE.....	61
5.2.5 Tratamento cromatográfico da fração AE-FT/ME .....	62
5.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e substâncias isoladas das raízes de <i>H. ampla</i> .....	64
5.3.1 Procedimento experimental do ensaio de Ellman em CCD .....	64
5.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e do diterpenoannonalida isolado das raízes de <i>H. ampla</i> .....	65
5.4.1 Procedimento experimental do ensaio da Xantina/Xantina oxidase (HX/XO) .....	65
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
6.1 Isolamento e determinação estrutural de 1-HA-HX .....	67
6.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 1-HA-HX.....	67
6.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 1-HA-HX.....	67
6.2 Isolamento e determinação estrutural de 1-HA-AE-PT .....	72
6.2.1 Espectrometria de Massas de 1-HA-AE-PT .....	72
6.2.2 Espectrometria no Infravermelho de 1-HA-AE-PT.....	72
6.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 1-HA-AE-PT .....	75
6.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 1-HA-AE-PT .....	75
6.2.5 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 1-HA-AE-PT.....	81
6.2.5.1 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D COSY <sup>1</sup> H— <sup>1</sup> H de 1-HA-AE-PT .....	81
6.2.5.2 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D HMQC <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H de 1-HA-AE-PT .....	84

6.2.5.3 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D HMBC $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT .....	87
6.2.5.4 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D NOESY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de 1-AE-PT-HA .....	94
6.3 Isolamento e determinação estrutural de 1-HA-AE-FT .....	98
6.3.1 Espectrometria de Massas de 1-HA-AE-FT .....	98
6.3.2 Espectrometria no Infravermelho de 1-HA-AE-FT .....	98
6.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 1-HA-AE-FT .....	101
6.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 1-HA-AE-FT .....	101
4.4 Isolamento e determinação estrutural de 2-HA-AE-FT .....	108
4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 2-HA-AE-FT .....	108
4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 2-HA-AE-FT .....	108
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	121
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	123
<b>APÊNDICE</b> .....	129

# *CAPÍTULO 1*

## *INTRODUÇÃO*

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza é uma enorme fonte de novas moléculas naturais, moléculas estas que podem servir como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. A espetacular diversidade molecular de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais de origem vegetal, como flavonóides, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, cromonas, isocromonas, quinonas, alcalóides, terpenos, entre outras, representa fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura molecular (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Considerando que na Terra existam aproximadamente 600.000 espécies vegetais e que somente cerca de 5% foram investigadas, especificamente sob os aspectos químicos e farmacológicos, é de se esperar que o arsenal terapêutico irá paulatinamente se enriquecer com novas drogas de origem vegetal (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

A grande diversidade de espécies existentes na flora brasileira, em especial na Amazônia, desafia nossos pesquisadores a estudá-las do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, em busca de novos ou mais eficazes fármacos para uso na terapêutica humana (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Entre as plantas amazônicas encontra-se *Humirianthera ampla*, uma liana de médio porte, pertencente à família Icacinaceae, que se caracteriza por possuir uma raiz tuberosa bastante desenvolvida. Conhecida popularmente por surucuína, mairã ou mairá, tem suas raízes usadas por índios e seringueiros da região no tratamento de pessoas e animais picados por cobras (MING; GAUDÊNCIO; SANTOS, 1997).

Poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre o gênero *Humirianthera*, que engloba apenas duas espécies: *H. ampla* e *H. rupestris*.

Dobereiner e Tokarnia (1982) realizaram ensaios de toxicologia experimental em bovinos com folhas de *H. ampla* e *H. rupestris*, onde demonstraram a toxicidade das folhas de

ambas as espécies estudadas, sendo que as folhas de *H. ampla* mostraram-se letais aos bovinos em doses muito inferiores do que *H. rupestris*. *H. ampla* foi letal com dosagem de 6,3 g/Kg e *H. rupestris* com 20 g/Kg.

Graebner (2000) relatou o isolamento de três diterpenos pimaranos das raízes de *H. ampla* e os avaliou em ensaios de atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. Apenas o diterpeno humiranthol demonstrou atividade frente ao fungo *Candida albicans*.

O estudo fitoquímico com monitoramento biológico de *H. ampla* justifica-se por tratar-se de uma planta pouco investigada, tornando-se necessário um estudo mais aprofundado sobre a natureza de seus constituintes, em especial os presentes em suas raízes. O estudo é estimulado principalmente pela informação etno-botânica na região amazônica de ação antiofídica de suas raízes, indicativos de efeitos farmacológicos que possam ser investigados concomitantemente ao estudo fitoquímico.

A diversidade estrutural dos inibidores da acetilcolinesterase conhecidos e a possibilidade de se explorar modos de ação distintos têm estimulado o estudo fitoquímico de várias espécies vegetais, que possam fornecer novos modelos de substâncias anticolinesterásicas. Estas substâncias são a alternativa terapêutica mais comumente empregada e que apresentam os melhores resultados para o controle da doença de Alzheimer (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

As pesquisas envolvendo agentes antioxidantes em espécies vegetais têm aumentado consideravelmente desde a década de 80, pois a mesmas se mostram de suma importância tanto para indústria alimentícia quanto para a indústria farmacêutica. No que diz respeito ao ramo alimentício, as pesquisas de agentes antioxidantes se mostram importantes no sentido de obter aditivos alimentícios com menos efeitos colaterais possíveis, características estas indesejáveis que são observadas nos atuais antioxidantes empregados. Já no ramo farmacêutico a busca é de substâncias de excelência quanto aos aspectos funcionais no combate aos radicais livres e todos os possíveis males que os mesmos podem causar à saúde humana (MARRONI; MARRONI, 2002).

*CAPÍTULO 2*

*CONSIDERAÇÕES*

*BOTÂNICAS*

## 2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1 Sinopse da família Icacinaceae

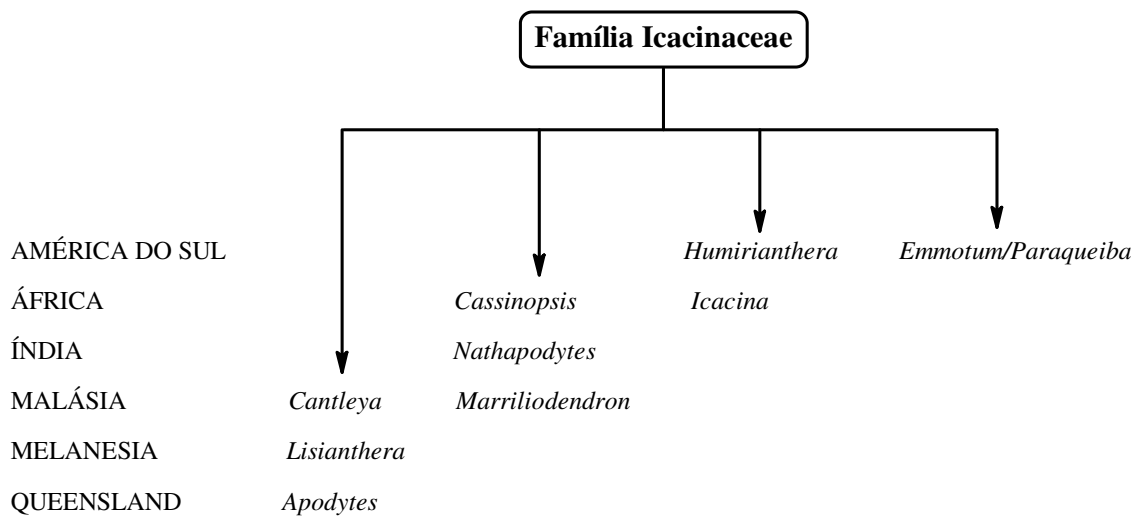
A família Icacinaceae (nome originado do latim, derivado do gênero *Icacina*) tem sido associada por diferentes autores como pertencente à Ordem Celestrales (ROULEAU, 1981 e STEBBINS, 1974). Outros preferem inseri-la na Ordem Santalales (ENGLER, 1986), Sapindales (BENSON, 1979) ou ainda Rhamnales (GOLDBERG, 1986). O problema se torna mais evidente quando, ao mesmo tempo, a família Icacinaceae aparece em quatro das mais modernas classificações de angiospermas em posições incompatíveis (KAPLAN; RIBEIRO; GOTTLIEB, 1991).

O número da relação gênero/espécie da família Icacinaceae varia de acordo com a origem da informação: 40/220 (HEGNAUER, 1966), 45/400 (SCHOLZ, 1964), 60/400 (HEYWOOD, 1978), 50/400 (CRONQUIST, 1981), 56/300 (THORME, 1983) e 60/320 (MABBERLEY, 1987). Entretanto, a maior parte dos gêneros, trinta e oito de acordo com Engler (1986), pertencentes à Icacinaceae, inserem-se em uma das quatro tribos da subfamília Icacinoidae. Praticamente todos os gêneros os quais há dados químicos relevantes pertencem a esta tribo.

A divergência na classificação da família Icacinaceae deve-se à diferença na importância atribuída, por cada autor em particular, aos caracteres anatômicos, morfológicos e embriológicos. Caracteres químicos têm sido usados, como critério auxiliar, somente por Dahlgren (1980) que se refere à presença de iridóides. Entretanto, a verificação da presença/ausência de compostos químicos é, na melhor das hipóteses, aplicável a compostos naturais raros. Iridóides constituem uma classe numerosa e biossinteticamente difundida, e assim a sua presença em Icacinaceae e sua ausência em Aquafoliaceae (PHILIPSON, 1977) tem pouca importância sistemática. Algumas relações têm sido feitas baseadas em critérios dinâmicos

(GOTTLIEB, 1982), como grau de oxidação, tipo de esqueleto, proteção molecular contra degradação e padrão de substituição.

O Esquema 1 mostra a distribuição geográfica de alguns gêneros da família Icacinaceae.



Esquema 1 - Relações geográficas de alguns gêneros da família Icacinaceae (KAPLAN; RIBEIRO; GOTTLIEB, 1991).

Na América, ocorrem reconhecidamente doze gêneros. O centro da dispersão das espécies americanas está situado na Amazônia, e algumas espécies passaram a ser encontradas no norte do México (HOWARD, 1942).

No Brasil são encontrados oito gêneros pertencentes à família Icacinaceae: *Citronella*, *Dendrobangia*, *Discophora*, *Emmotum*, *Humirianthera*, *Loretia*, *Pleurisanthes* e *Poraqueiba*. (BARROSO, 1984).

Estes gêneros são árvores, arbustos ou lianas. As espécies de *Humirianthera*, *Loretia* e *Pleurisanthes*, apresentam-se como lianas de médio à grande porte (HEYWOOD, 1978).



As folhas são alternas, simples, sem estípulas, e podem ser glabras ou pilosas. As flores, unissexuadas ou hermafroditas, são dispostas em inflorescência terminal ou lateral (axilar, supra-axilar, extra-axilar) e, em geral, são articuladas ao pedicelo abaixo do cálice. O cálice é curto, com sépalas imbricadas, livres ou concrecidas, entre si. Pétalas, geralmente cinco, livres entre si. Possuem cinco estames livres entre si, alternados com as pétalas, eretos, com filetes geralmente carnosos, cilíndricos ou comprimidos, com ou sem pêlos; anteras dorsifixas ou basifixas, com quatro lóculos, rimosos. Em geral, ovário completo, unilocular, com dois óvulos pêndulos, colaterais, anátropos, em cada lóculo. Um estilete, freqüentemente acompanhado de rudimentos, curto ou longo, terminal mais ou menos excêntrico. Estigma capitado ou discóide. Fruto drupáceo, com epicarpo carnosos, geralmente oleaginoso, e endocarpo duro e lenhoso. Sementes com endosperma carnosos, embrião muito reduzido, localizado, no ápice da semente ou bem desenvolvido, geralmente, com eixo radículo-hipocótilo longo (BARROSO, 1984).

## **2.2 Descrição do gênero *Humirianthera***

O gênero *Humirianthera* apresenta apenas duas espécies: *Humirianthera ampla* Miers e *Humirianthera rupestris* Ducke (BAEHNI, 1936).

### **2.2.1 Descrição da espécie em estudo – *Humirianthera ampla***

A espécie *Humirianthera ampla* (Figura 1, Página 24) é uma planta de pequeno porte que tem como centro de dispersão a Amazônia brasileira. Caracteriza-se por possuir uma raiz tuberosa bastante desenvolvida e rica em fécula. Conhecida popularmente como mairá, mairã, surucuína ou surucucuína tem suas raízes usadas por índios e seringueiros da região como medicamento antiofídico (MING; GAUDÊNCIO; SANTOS, 1997).

*H. ampla* é um arbusto ascendente, os ramos jovens cilíndricos com casca lenticelosa, os ramos adultos em geral com casca esfoliativa. Folhas jovens glabras, as adultas de 12-21 cm de comprimento, 7-12 cm de largura, obovado-oblongas, base arredondada, ápice obtuso, subcartáceas, glabras em ambos os lados, somente alguns pelos na nervura primária na face superior, densamente reticulado-venosas em ambas as faces. Inflorescência paniculado-recemosa, axilar, terminal ou subterminal, ferrugíneo-pubescente; flores brancas, pétalas (5) oblongas iguais, estames amarelos com anteras oblongas, flexuosas, obtusas; ovário piloso, estiletes simples. Fruto globoso de cerca 3,5 cm de diâmetro ainda imaturo, superfície ferrugíneo-puberulenta (DOBEREINER; TOKARNIA, 1982).



Figura 1 – Exemplos de *H. ampla* em seu *habitat* natural e com ênfase em sua raiz, respectivamente. (Foto: Dayan Marques)

# ***CAPÍTULO 3***

***LEVANTAMIENTO***

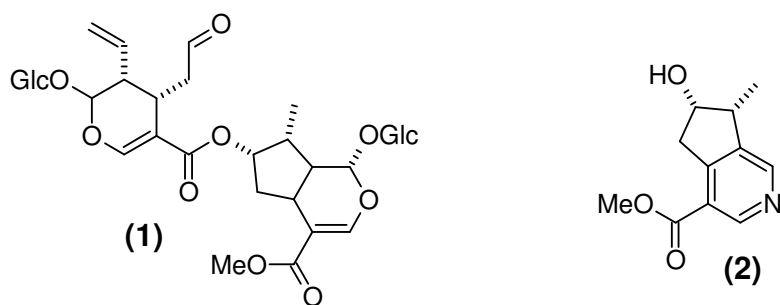
***BIBLIOGRÁFICO***

### 3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

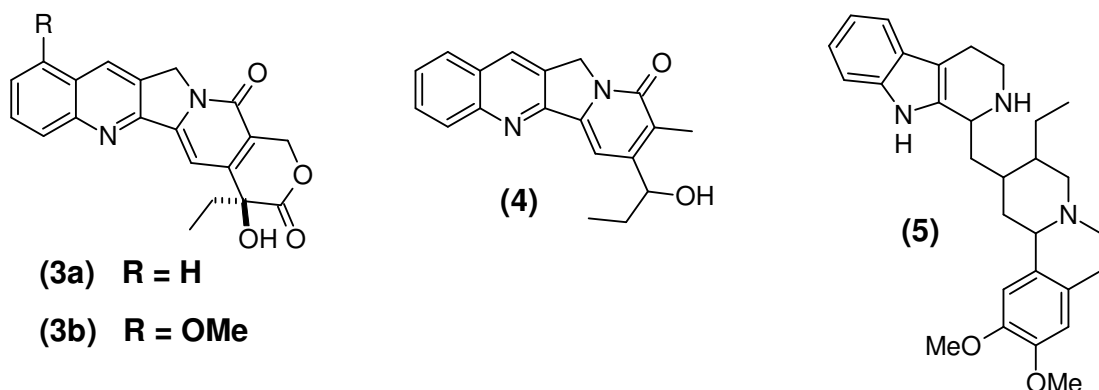
#### 3.1 Estudos químicos realizados com outros gêneros da família Icacinaceae e com o gênero *Humirianthera*

##### 3.1.1 Estudos químicos realizados com outros gêneros da família Icacinaceae

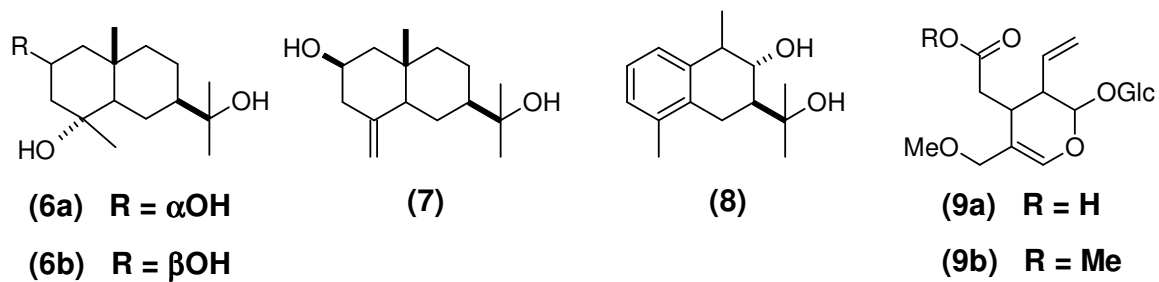
Nos gêneros *Apodytes*, *Cantleya* e *Lisianthera* é relatada a presença de iridóides carbocíclicos. *C. corniculata* produz cantleyosídeo (**1**) e cantleyina (**2**) (SEVENET *et al.*, 1971). O composto (**2**) também foi encontrado em *L. austrocaledonica* (SEVENET *et al.*, 1971). Em *A. dimiata* foram detectados derivados carbocíclicos apenas cromatograficamente (KOOIMAN, 1971).



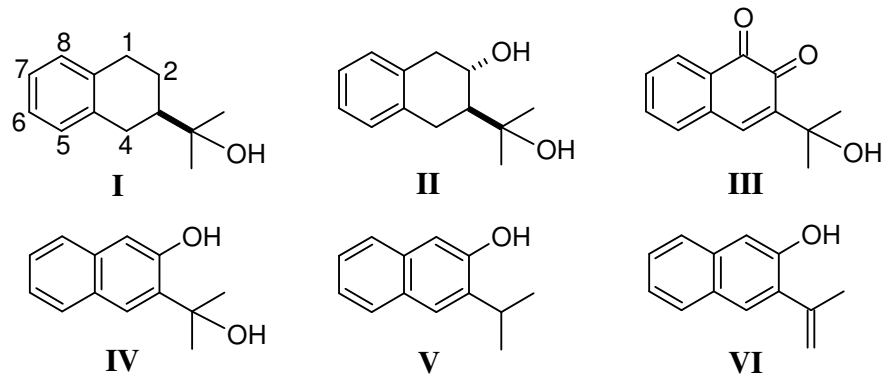
Os gêneros *Merriliodendron*, *Nathapodytes* e *Cassinopsis* caracterizam-se por possuírem alcalóides, incluindo a camptotecina e seus derivados. *M. megacarpum* contém camptotecina (**3a**) e 9-metoxi-camptotecina (**3b**) (ARISAWA, *et al.*, 1981). *N. foetida* contém mappicina (**4**) (AGARVAL; RASTOGI, 1973 e GOVINDACHARI *et al.*, 1974) e *C. ilicifolia* contém desoxitubulosina (**5**) (MONTEIRO *et al.*, 1965).



Os gêneros *Paraqueiba* e *Emmotum* possuem como constituintes marcantes as emmotinas, que são sequiterpenos baseados no esqueleto eudesmano rearranjado. No caule de *E. nitens* foram encontrados três derivados eudesmanos autênticos (**6a**, **6b** e **7**) e o produto rearranjado rishitinol (**8**) (OLIVEIRA *et al.*, 1985). Em *P. guianensis*, espécie da região amazônica, foi relatada a presença de secologanosídeo (**9a**) e seu éster metílico (**9b**) (OLIVEIRA *et al.*, 1981). Foi relatada também a presença da emmotina Z (Figura 3, p.12) em duas espécies de *Paraqueiba*: *P. paraensis* e *P. guianensis* (OLIVEIRA *et al.*, 1985).



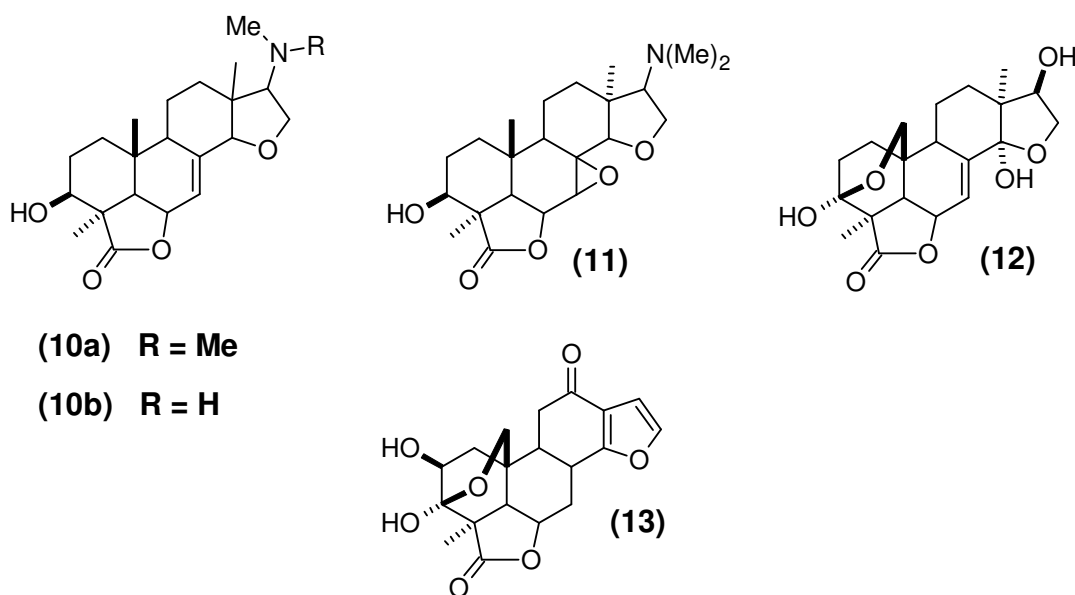
Outras emmotinas encontradas nos gêneros *Paraqueiba* e *Emmotum* estão relacionadas na Tabela 1, Página 28.

Tabela 1 – Estrutura de ocorrência das Emmotinas (KAPLAN *et al.*, 1991)

Posições nas estruturas I-VI								
	8	1	2	5	6	7	Nome dos compostos	Espécies
I	2	Me		$\beta$ OH	CHO	OH	Emmotina Z	Pg, Pp
	3	Me		$\beta$ OH	CHO	OMe		Pg Pp
	4	CHO			Me			Eo
	5	CO <sub>2</sub> H			Me			Eo
II	1	Me			Me		Emmotina F	En2
	2	Me			Me	OMe	7-metoxiammotina F	Eg
	3	CH <sub>2</sub> OMe	O		Me		Emmotina A	En1, Eg
	4	CH <sub>2</sub> OH	O		Me		Emmotina X	En1
	5	CH <sub>2</sub> OMe	O		CH <sub>2</sub> OH		Emmotina B	En1
	6	CH <sub>2</sub> OMe	O		CHO		Emmotina U	En1
III	1	Me			Me		Emmotina H	En2, Eg
	2	Me			Me	OMe	7-metoxiemmotina H	Eg
	3	CH <sub>2</sub> OMe			Me		Emmotina T	En1
IV	1	Me			Me		Emmotina G	En2
	2	CH <sub>2</sub> OMe			Me		Emmotina S	En1
	3	CHO			Me		Emmotina O	En1
	4	CHO	OH		Me		Emmotina I	En1
	5	C(O)	O		Me		Emmotina D	En1, Eo
	6	CO <sub>2</sub> H	OH		Me		emmotina J	En1
	7	CH <sub>2</sub> OMe			CHO		emmotina R	En1
V	1	CHO	OH		Me		emmotina C	En1
	2	C(O)	O		Me		emmotina M	En1
	3	CO <sub>2</sub> H	OH		Me		emmotina Q	En1
VI	1	C(O)	O		Me		emmotina L	En1

\* Espécies (procedências brasileiras): Pg, *Poraqueiba guianensis* (Manaus, AM); Pp, *Poraqueiba paraensis* (PA), En1, *Emmotum nitens* (Diamantina, MG); En2, *Emmotum nitens* (Linhares, ES); Eo, *Emmotum orbiculatum* (Manaus, AM), Eg, *Emmotum glabrum* (Amazônia).

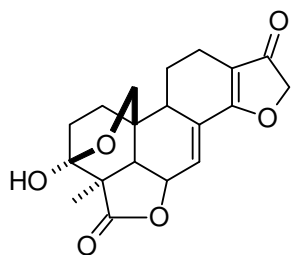
O gênero *Icacina* produz derivados de diterpenóides com sistema de anéis AB similares. Os alcalóides icaceína (**10a**), des-*N*-metilicaceína (**10b**) e icacina (**11**) são encontrados em *I. claessensis* e *I. guesfeldtii* (ON'OKOKO *et al.*, 1977 e 1980), e ainda o composto C<sub>20</sub> icacinol (**12**) (ON'KOKO *et al.*, 1985(A)) com esqueleto pimarano completo, em contraste com o composto C<sub>19</sub> icacinona (**13**) de *I. mannii* (ON'KOKO *et al.*, 1985(B)) com a metila em C-13 ausente.



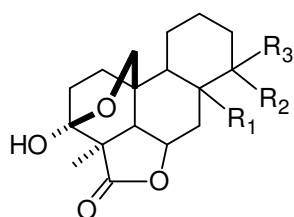
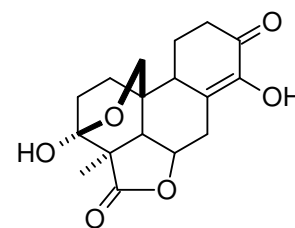
### 3.1.2 Estudos químicos realizados com o gênero *Humirianthera*

Zoghbi e colaboradores (1981) isolaram e identificaram, de *Humirianthera rupestris*, vários metabólitos secundários, classificados como diterpenóides  $\gamma$ -lactônicos degradados, com estruturas contendo entre dezessete e dezenove átomos de carbono, denominadas de humiriantenolídeos A (**14**), B (**15a**), C (**15b**), D (**15c**), E (**15d**), F (**16**), além de sitosterol.

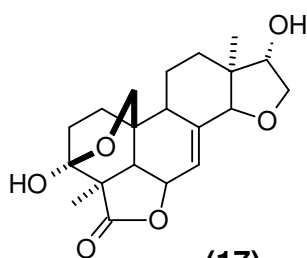
Graebner e colaboradores (2000) relataram o isolamento e identificação de três diterpenóides  $\gamma$ -lactônicos de *Humirianthera ampla*, sendo eles o humirianthol (**17**), o acrenol (**18**) e a annonalida (**19**).



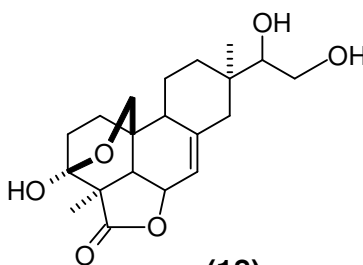
(14)

(15a)  $R_1 = \beta H, R_2 + R_3 = O$ (15b)  $R_1 = \beta H, R_2 = H, R_3 = OH$ (15c)  $R_1 = \alpha H, R_2 + R_3 = O$ (15d)  $R_1 = \alpha H, R_2 = H, R_3 = OH$ 

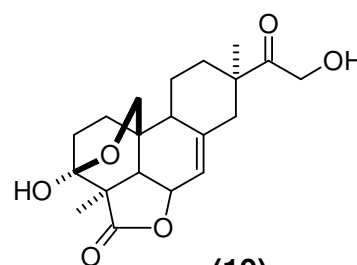
(16)



(17)



(18)



(19)

## 3.2 Doença de Alzheimer

### 3.2.1 A doença de Alzheimer: impacto social e fisiopatologia da doença

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa de grande impacto sócio-econômico, responsável por cerca de 50-60% do número total de casos de demência entre pessoas acima dos 65 anos. Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).



Nos Estados Unidos, é considerada um dos principais problemas de saúde devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, familiares, sistema de saúde e à sociedade como um todo, uma vez que metade dos pacientes são internados em instituições de saúde. O restante recebe o tratamento em casa, envolvendo em seu cuidado, familiares, parentes e amigos. Invariavelmente, o acompanhamento do paciente traz um enorme *stress* emocional, psicológico e financeiro às famílias, uma vez que o tratamento é caro e o paciente perde gradativamente suas funções motoras e de aprendizado, passando a não reconhecer os familiares mais próximos (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

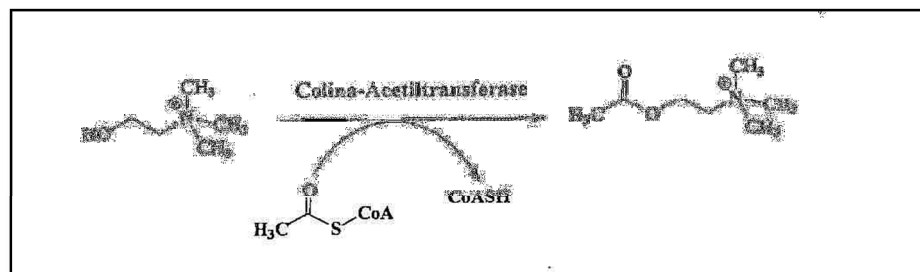
Cientistas estimam que cerca de 4 milhões de pessoas possuem esta doença e que a sua incidência duplica a cada 5 anos, após os 65 anos de idade. Além disso, 4 milhões de americanos possuem 85 anos ou mais e, no país mais industrializado do mundo, este grupo etário é um dos segmentos da população que mais cresce, devendo atingir pelo menos 19 milhões de indivíduos no ano de 2050, dos quais metade poderá desenvolver alguma forma de DA. Um estudo recente estima que o custo anual do tratamento de um paciente com DA leve é de U\$ 18.408,00, U\$ 30.096,00 para DA moderada e U\$ 36.132,00 para um paciente com DA severa (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

O processo degenerativo progressivo das funções psicomotoras e cognitivas, descrito inicialmente pelo patologista alemão Alois Alzheimer em 1907, dura cerca de 8,5-10 anos, desde o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos até a morte. As regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, particularmente o córtex frontal e o hipocampo, são aquelas mais comprometidas pelas alterações bioquímicas decorrentes da DA. Dentre as causas mais evidentes da gênese da doença estão a ocorrência da deposição extracelular de peptídeo  $\beta$ -amilóide (derivado do precursor amilóide de proteína – APP) em plaquetas senis e a formação errática de neurofibrilas intracelulares (contendo uma forma anormal, fosforilada, de uma proteína associada a microtúbulos – TAU). Todo este processo resulta em perda da função neuronal e dano sináptico, com subsequente dano na memória, da coordenação motora e do raciocínio, além da perda da capacidade cognitiva e demência (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Em nível celular, a DA está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão. Estudos mais recentes demonstraram ocorrência de redução do número de receptores nicotínicos e muscarínicos ( $M_2$ ) de ACh, muitos dos quais localizados nas terminações colinérgicas pré-sinápticas, havendo preservação dos receptores muscarínicos ( $M_1$  e  $M_2$ ) pós-sinápticos (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

### 3.2.2 Biossíntese, hidrólise e função da acetilcolinesterase

A acetilcolina é biossintetizada a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase (Esquema 2).



Esquema 2 - Reação de biossíntese de acetilcolina (ACh).

Este neurotransmissor é encontrado no cérebro e nas junções neuromusculares, compondo parte do sistema nervoso parassimpático. Seus efeitos incluem a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos; no cérebro está envolvido nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição. Sua atividade e permanência na fenda sináptica são reguladas por hidrólise catalisada pela acetilcolinesterase (AChE), que regenera a colina, seu precursor. O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200),

histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) (Figura 2). O mecanismo de hidrólise da AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

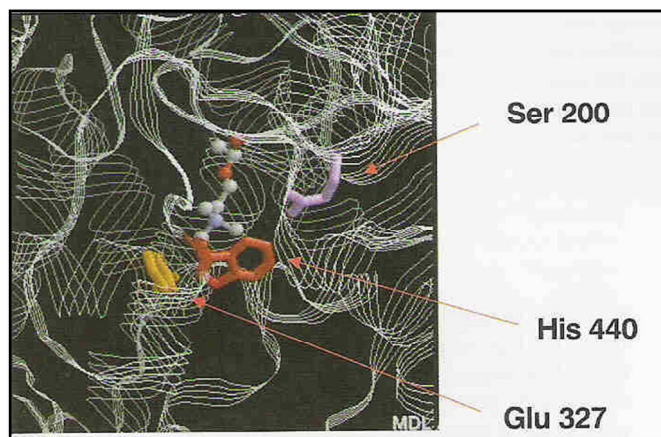


Figura 2 - Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica.

### 3.2.3 Terapia colinomimética da doença de Alzheimer

O fundamento da hipótese colinérgica está relacionado à capacidade de fármacos potencializadores da função colinérgica central induzirem melhora do perfil cognitivo e, também, de alguns efeitos comportamentais oriundos da doença. Várias alternativas terapêuticas foram avaliadas no intuito de corrigir o déficit colinérgico em portadores de DA. Algumas estratégias inicialmente empregadas envolveram a utilização ou substituição de precursores de ACh, como colina ou lecitina, as quais, entretanto, não se mostraram eficientes no incremento da atividade colinérgica central. Outros estudos investigaram o uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChEI) que reduzissem a hidrólise de ACh, aumentando, conseqüentemente, seu tempo de vida-média, como exemplo se teve a fisostigmina. Recentemente, têm sido exploradas abordagens terapêuticas envolvendo agonistas específicos de receptores muscarínicos ( $M_1$ ) e nicotínicos ou

antagonistas muscarínicos ( $M_2$ ). Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da gênese de DA têm demonstrado que o uso de inibidores de AChE deve ser a forma mais eficiente de controle da evolução da doença (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Outra abordagem terapêutica para DA é o desenvolvimento de agonistas diretos de receptores muscarínicos pós-sinápticos  $M_1$  (Figura 3, Página 35). A estimulação destes receptores demonstrou efeitos de aumento da cognição em animais. Entretanto, apesar dos esforços no desenvolvimento de ligantes agonistas de receptores  $M_1$ , muitos dos compostos testados mostraram baixa seletividade, além de vários efeitos colaterais devidos à ativação de iso-receptores muscarínicos  $M_3$  nos intestinos, bexiga e pulmão (Figura 3). Agonistas de receptores  $M_1$  não-seletivos podem, também, interagir com receptores  $M_4$  e  $M_5$  no SNC, com conseqüências ainda desconhecidas (Figura 3). Alternativamente, dados farmacológicos em modelos animais demonstraram que o bloqueio dos auto-receptores  $M_2$  pré-sinápticos (Figura 3) acarreta o aumento dos níveis de ACh, e a conseqüente melhora do déficit cognitivo. Entretanto, a despeito de um grande número de antagonistas  $M_2$  terem sido relatados, poucos mostraram seletividade frente a outros subtipos de receptores muscarínicos (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

A observação inicial de que os antagonistas muscarínicos tipo escopolamina produziam *déficits* na memória de curta duração levou à proposta de que o *déficit* colinérgico na DA era predominantemente de natureza muscarínica. Entretanto, este ponto de vista foi alterado por uma série de evidências, incluindo estudos autoradiográficos e histoquímicos de autópsia de tecido cerebral, além de estudos em imagens cerebrais em pacientes, que demonstraram a perda específica de receptores nicotínicos em maior extensão que de muscarínicos na DA (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Atualmente, existem muitas evidências indicando que substâncias moduladoras de receptores nicotínicos afetam o aprendizado e a memória. A nicotina e outros agonistas nicotínicos podem melhorar as funções cognitiva e psicomotora, enquanto que antagonistas nicotínicos causam deficiência na cognição. Além disso, a incidência da DA em fumantes é menor que em não-fumantes, o que pode se relacionar ao aumento dos níveis de expressão dos receptores nicotínicos da ACh (nAChRs) observados no cérebro de fumantes. Assim sendo,

moduladores nicotínicos podem apresentar efeitos agudos e crônicos na função cognitiva, dentre os quais pode-se incluir a neuroproteção (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

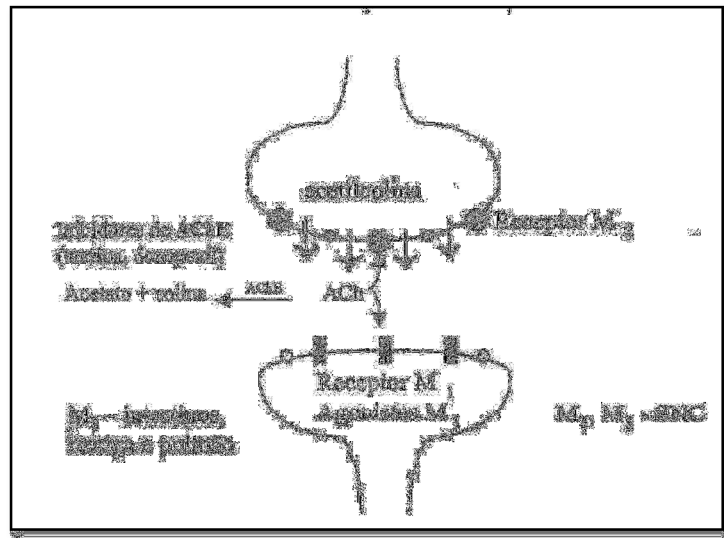


Figura 3 - Visão esquemática da hipótese colinérgica e localização dos receptores muscarínicos.

Modernamente, há duas estratégias principais sendo aplicadas para equilibrar o déficit colinérgico em portadores de DA: inibição da degradação da ACh e administração de agonistas de receptores nicotínicos (Figura 4, Página 36). Os fármacos inibidores da acetilcolinesterase vêm sendo, atualmente, a alternativa terapêutica mais comumente empregada por apresentarem melhores resultados no controle da doença sem, entretanto, serem capazes de impedir a sua progressão em nenhum dos seus níveis (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Vários agonistas de receptores nicotínicos encontram-se em fase de ensaios pré-clínicos e clínicos, embora já se saiba que seja relativamente difícil seu ajuste de dosagem; em níveis mais elevados, podem causar dessensibilização de nAChR em maior extensão que o aumento de sua ativação. Outros desafios, ainda insolúveis até o presente momento, consistem no transporte do fármaco até o receptor nicotínico-alvo no cérebro e o incremento da seletividade pelo subtipo de receptor específico (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Os últimos avanços realizados no estudo dos receptores nicotínicos permitiram a melhor caracterização de alguns aspectos relacionados à sua fisiologia, bioquímica e expressão

gênica, bem como sua efetiva participação nos eventos relacionados à DA. Adicionalmente, estes estudos com nAChR permitiram caracterizar uma nova estratégia possível para o tratamento de DA, através da modulação alostérica. Moduladores alostéricos são substâncias que interagem com o receptor através de sítios de ligação distintos daqueles utilizados pela ACh e pelos agonistas e antagonistas nicotínicos. Como a DA está associada com a redução da neurotransmissão nicotínica, os moduladores alostéricos são potencializadores da atividade da ACh sobre os canais iônicos dos receptores nicotínicos. Estas propriedades deram origem a uma nova classe de ligantes de nAChR, os ligantes potencializadores alostéricos (APL) (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

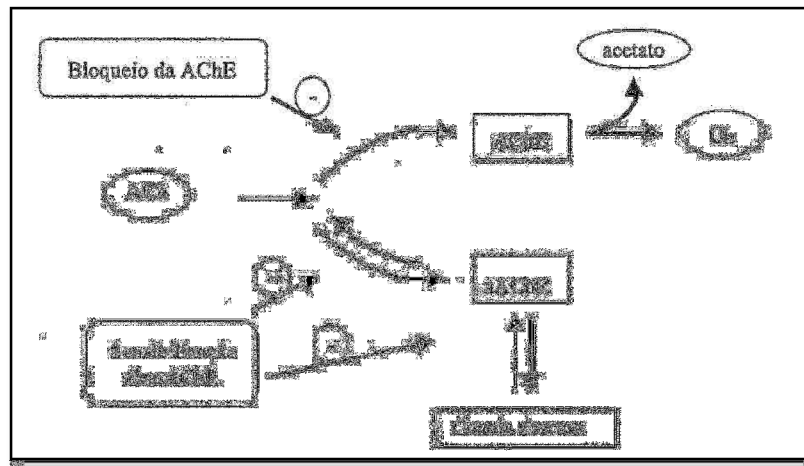


Figura 4 - Resumo do processo das formas de intervenção desde a liberação até a degradação da ACh.

### 3.2.4 Fármacos comerciais para o tratamento da DA

A tacrina (THA, Cognex<sup>®</sup>, **20**) foi o primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos para uso terapêutico, demonstrando efeito moderado, mas significativo no alívio dos sintomas de DA de intensidade, média e leve. Entretanto, sua aplicação tem sido limitada devido aos sérios efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade, que têm forçado os pacientes a descontinuarem o tratamento. Além da tacrina, atualmente outros três fármacos estão sendo comercializados nos EUA e Europa: donepezil (**21**,

Aricept<sup>®</sup>), rivastigmina (**22**, Exelon<sup>®</sup>) e, por último, a galantamina (**23**, Reminyl<sup>®</sup>). Dentre estes, as substâncias 1, 2 e 4 são inibidores reversíveis da AChE, sendo que a galantamina (**23**) é um produto natural, recentemente aprovado pelo FDA, que está servindo de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

### 3.2.5 Busca de novos candidatos de origem natural para o tratamento da DA

A diversidade estrutural dos IACHEs conhecidos e a possibilidade de se explorar modos de ação distintos têm estimulado o estudo fitoquímico de várias espécies vegetais e de microorganismos, que possam fornecer novos modelos de substâncias anticolinesterásicas. Neste sentido, vários exemplares da biodiversidade têm sido estudados em decorrência de sua utilização popular ou de dados etno-botânicos. Um dos exemplos mais difundidos como fitomedicamentos são os extratos de Ginkgo. A *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) é uma árvore fóssil utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa para a melhoria do estado de alerta. Hoje em dia, a ginkgo é, talvez, o extrato vegetal mais difundido especificamente para aumento da função cognitiva, sendo seu uso prevalente especialmente na Europa onde, recentemente, o “German Bundesgesundheits Association” aprovou a utilização para tratamento de demência. A maioria das evidências sugere que a capacidade de aumento da função cognitiva está associado ao uso de um extrato padronizado, o EGb 761. A medida dos efeitos cognitivos vem sendo realizada em testes de atenção, aprendizado, memória de tempo-curto, e tempo de reação e escolha, mas os resultados não são reprodutivos interpopulações. Além disso, muitos estudos estão publicados em periódicos de circulação restrita, o que dificulta o acesso às informações; na maior parte dos casos, os experimentos *in vivo*, tanto em animais como em humanos, restringe-se a pequeno número de indivíduos, o que compromete uma avaliação conclusiva e abrangente dos resultados (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Alguns estudos utilizando pacientes tratados com o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e com placebo revelaram que os efeitos foram comparáveis aos obtidos com o donepezil

(21), que atualmente é um dos fármacos de escolha para o tratamento da DA. Aparentemente, muitos dos efeitos protetores do SNC associados ao uso crônico de extratos de Ginkgo estão relacionados à presença de constituintes terpênicos e flavonóides com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Estas substâncias podem atuar de diferentes formas, contribuindo para a integridade do tecido neuronal: a) inibindo a atividade das enzimas superóxido-desmutase e monoamina-oxidase, que contribuem para a geração de radicais livres no cérebro e no corpo; b) seqüestrando radicais livres que poderiam causar dano aos neurônios e, conseqüentemente, retardar as mudanças associadas a idade do cérebro e c) reduzindo a liberação de ácido araquidônico, um co-produto tóxico do metabolismo lipídico, que aparece no cérebro logo após o episódio isquêmico (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

A necessidade de tornar mais objetivas e menos dispendiosas as pesquisas por constituintes químicos de plantas, animais e microorganismos levou ao desenvolvimento de numerosas técnicas de ensaios químicos e bioquímicos para monitoramento e seleção de extratos, frações de extratos e substâncias puras bio/farmacologicamente úteis.

Quanto à busca de inibidores de AChE, dois teste bioautográficos em cromatografia em camada delgada foram recentemente desenvolvidos. Marston e colaboradores utilizaram um corante azóico para identificar a atividade da AChE sobre o acetato de 1-naftila; no outro caso, Rhee e colaboradores preconizaram a utilização de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (reagente de Ellmann) para a visualização da atividade enzimática. Aparentemente, o único inconveniente da utilização do reagente de Ellmann é o limite de detecção visual, pois, em ambos os casos, formam-se halos de inibição brancos sobre a placa corada de azul e amarelo, respectivamente (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

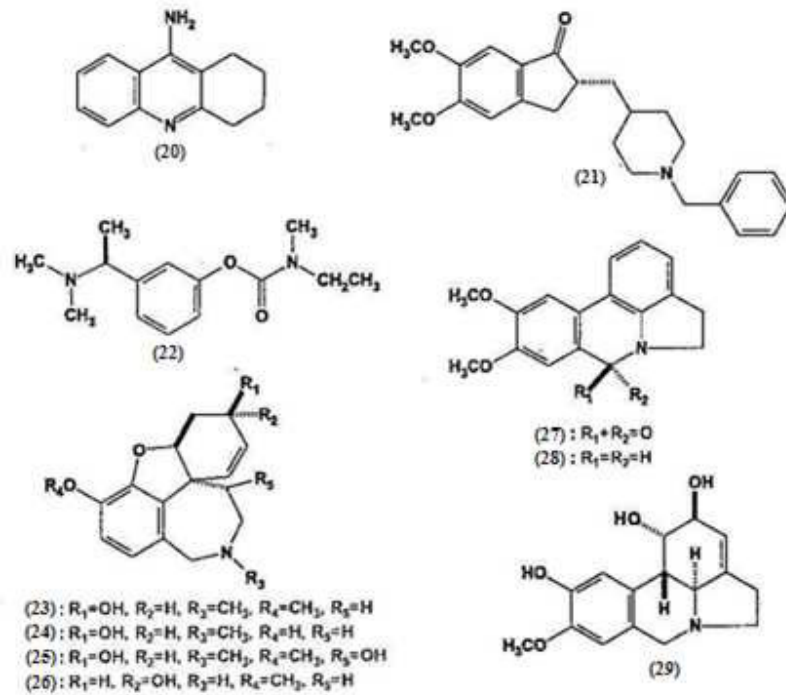
Um estudo recente com plantas brasileiras utilizou o ensaio bioautográfico de Rhee e o ensaio de Ellmann em microplaca, para identificar extratos que poderiam conter substâncias inibidoras da AChE. Foram estudados 58 extratos de 30 espécies de diversos gêneros vegetais, dos quais os autores consideraram os resultados de inibição maior ou igual a 50% como critério de seleção para fracionamento químico. A partir do trabalho de triagem, *Paullinia cupana* (guaraná), *Amburana cearensis* (cumaru) e *Lippia sidoides* foram as espécies que demonstraram



os melhores resultados, inibindo de 65-100% da atividade enzimática, em ambos os bioensaios. No caso do guaraná, foi evidenciado um efeito positivo de incremento de memória após a administração aguda e crônica; o fracionamento bioguiado dos extratos de *A. cearensis* e *L. sidoides* levou ao isolamento de 12 cumarinas até o momento, demonstrando a utilidade e praticidade deste tipo de ensaio para a bioprospecção de novos fármacos anticolinesterásicos (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

A galantamina (**23**) é um alcalóide isolado de várias espécies vegetais da família Amaryllidaceae e mostrou-se um inibidor da AChE de ação longa, seletivo, reversível e competitivo, cujos efeitos terapêuticos permanecem mesmo após o término do tratamento. O excelente perfil terapêutico de **23**, que caracterizou um grande avanço no planejamento de fármacos para o tratamento da DA, é decorrente de seu mecanismo de ação duplo, como inibidor da AChE e como APL nos receptores nicotínicos cerebrais. A galantamina (**23**) atua ligando-se ao sítio ativo da AChE cerebral e ainda estimula os receptores nicotínicos pré- e pós-sinápticos frente aos neurotransmissores como ACh e glutamato, estimulando diretamente a função cerebral (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Outro alcalóide isolado de *Eucharis grandiflora* (Amaryllidaceae), a sanguinina (9-*O*-desmetilgalantamina, **24**), mostrou-se 10 vezes mais ativo do que a própria galantamina em ensaios *in vitro*. A busca por outras substâncias inibidoras da AChE (IAChE) nesse gênero vegetal levou ao isolamento de outros dois derivados ativos da galantamina, a 11-hidroxicgalantamina (**25**) e a epinorgalantamina (**26**). Outro padrão estrutural de alcalóides, tipo-licorina, foi isolado desse gênero, cujos constituintes mais ativos foram a oxoassoanina (**27**), a assoanina (**28**) e a pseudolicorina (**29**) (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

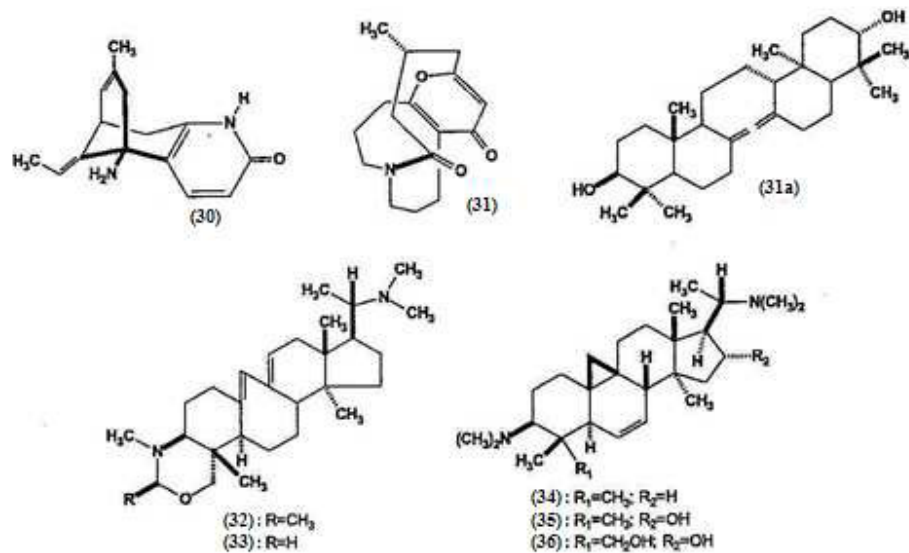


O estudo de várias espécies vegetais de uso corrente na medicina popular chinesa e do Oriente Médio levou ao isolamento de vários alcalóides ativos. Exemplo disso foi *Huperzia serrata* (sinonímia: *Lycopodium serratum*), que fornece um chá prescrito há séculos na China para o tratamento da febre e da inflamação. O estudo fitoquímico dessa planta levou ao isolamento de huperzina A (**11**), um candidato interessante para o tratamento de distúrbios no SNC e epilepsia, cujo efeito diminui a morte neuronal causada por altas concentrações de glutamato. É um IACHÉ seletivo, muito potente e o uso sistêmico aumenta a liberação de ACh, dopamina e norepinefrina, sendo que o aumento da concentração de ACh persiste por até 6h e praticamente não possui ação sobre a butirilcolinesterase plasmática (BuChE). Dessa mesma planta foi obtida a huperzina P (**31**), um novo alcalóide tipo-licopodium, entretanto a sua atividade foi menor que aquela evidenciada para a huperzinaA (**30**) (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos com a huperzina A estimularam Orhan *et al.* a estudarem outras 5 espécies de *Lycopodium*, à procura de outros metabólitos inibidores de AChE. Após uma avaliação preliminar dos extratos pelo ensaio de Ellmann, o extrato das partes aéreas de *L. clavatum* foi selecionado e o fracionamento bio-guiado resultou no isolamento da  $\alpha$ -onocerina

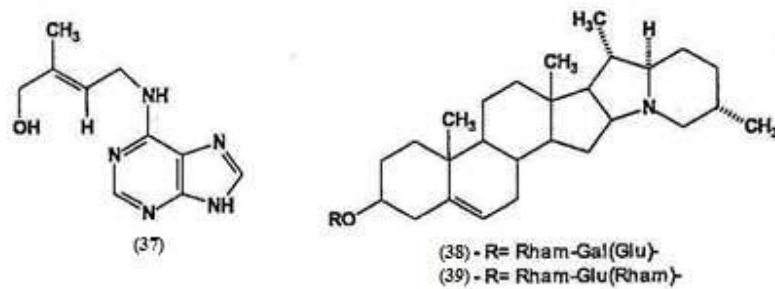
(31a). Os resultados da atividade anticolinesterásica demonstraram que a  $\alpha$ -onocerina ( $IC_{50}=5,2\mu M$ ) foi melhor que o donepezil (21) nas concentrações de 1 e 3 mg/mL, embora não tenha atingido a potência da galantamina em nenhuma dose testada (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Alguns alcalóides triterpênicos foram isolados de *Buxus hyrcana*, como a homomoenjodaramina (32) e a moenjodaramina (33), os quais mostraram-se promissores inibidores de AChE. Desta família, *Buxus papillosa* forneceu outros três alcalóides esteroidais inibidores seletivos de AChE: cicloprotobuxina C (34), ciclovirobuxina A (35) e ciclomicrofilina A (36) (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).



A zeatina (37), inicialmente descrita como agente indutor de crescimento de plântulas, foi isolada de *Fiatoua villosa*, cujo extrato metanólico havia sido selecionado após triagem para atividade inibitória de AChE. A substância pura 37 inibiu a atividade da AChE de modo dose-dependente com  $IC_{50}$  de  $1,09 \times 10^{-4}$  M (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Os glico-alcalóides presentes em alta concentração na casca da batata (*Solanum tuberosum* L.) têm sido responsáveis por vários casos de intoxicação alimentar. A observação de pacientes intoxicados revelou sintomas como confusão mental, depressão e fraqueza. Estes efeitos foram atribuídos à inibição da AChE pela  $\alpha$ -solanina (38) e  $\alpha$ -chaconina (39), que correspondem a 95% dos glicoalcalóides presentes em *S. tuberosum* (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).



Pelo exposto, torna-se evidente a necessidade de se explorar os produtos naturais oriundos da grande biodiversidade brasileira, como fonte de inspiração para o planejamento racional de novos candidatos a fármacos potentes e seletivos e com baixo perfil de toxicidade, que permitam o controle da evolução da doença de Alzheimer (VIEGAS Jr. *et al.*, 2004).

### 3.3 ANTIOXIDANTES

O elemento oxigênio constitui cerca de 21% da composição do ar. Este composto é considerado indispensável para a produção eficiente de energia tanto nos animais, quanto nas plantas. Existe, porém, um paradoxo, pois o oxigênio, assim como é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando os seres vivos são expostos a ele em altas concentrações (MENEHINI, 1987).

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos à ação oxidativa do oxigênio, sendo que diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, pode produzir uma ação protetora efetiva contras estes processos oxidativos que ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças (Figura 5, Página 43) entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, mal de Parkinson e doença de Alzheimer, podem estar ligadas a danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “substâncias reativas oxigenadas” ou ROS. Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (MENEHINI, 1987).

Os produtos alimentícios também se mostram susceptíveis a estes processos oxidativos, resultando em substâncias finais prejudiciais ou com características sensoriais indesejáveis, reduzindo com isso o prazo de validade dos produtos. A partir dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais (principalmente compostos fenólicos) para emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade. (MARRONI *et al.*, 2002).

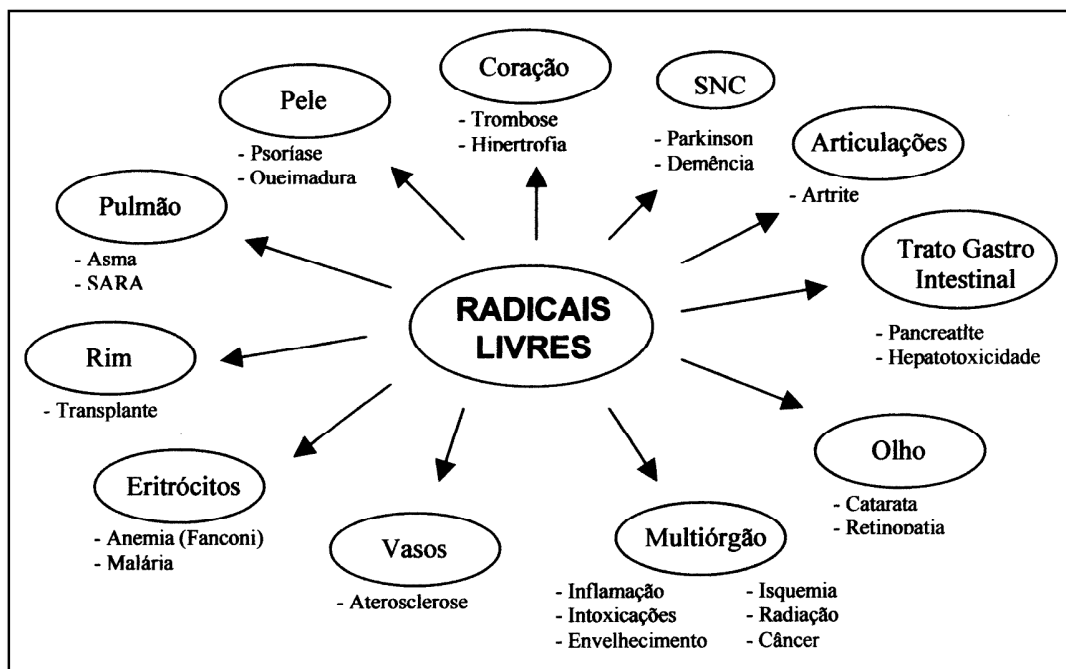


Figura 5 - Doenças associadas às espécies reativas de oxigênio ou radicais livres.

# *CAPÍTULO 4*

## *MATERIAIS E MÉTODOS*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Procedimentos gerais

#### 4.1.1 Métodos cromatográficos

Para o fracionamento dos extratos de *H. ampla*, foi empregada a técnica da cromatografia de adsorção em coluna, tendo como fase estacionária gel de sílica da marca VETEC (70-230 mesh).

O diâmetro e o comprimento das colunas cromatográficas variaram conforme a quantidade de material a ser cromatografado. Os eluentes utilizados na fase móvel, tanto na cromatografia de adsorção como na cromatografia em camada delgada (CCD), foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Os eluentes utilizados seguiram uma série eluotrópica, que podia ser isocrática ou de gradiente, sendo todos estes de natureza P.A.

Para a CCD, foram utilizadas cromatoplasas de gel de sílica 60 F 254 da Merck, de dimensões 10 x 5 cm, com revestimento em sílica de 0,25 mm de espessura, contendo indicador de fluorescência na faixa de 254 nm.

A revelação das substâncias nas cromatoplasas foi feita através da exposição destas à radiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 nm e 365 nm), obtidos por lâmpada modelo UVSL-28 da Sovereign Computer Systems, pela exposição aos vapores de iodo e ainda pela pulverização com solução de vanilina/ácido perclórico em etanol. Após pulverização com vanilina nas cromatoplasas, as amostras foram reveladas em estufa à temperatura de 100 °C, por aproximadamente 3 minutos.

Os extratos e as frações obtidas das colunas cromatográficas foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo Fisaton - modelo 802, com condensador resfriado por refrigerador circulatório, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 60 °C.

#### 4.1.2 Métodos espectrométricos

##### 4.1.2.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C)

Os espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C unidimensionais (1-D) e bidimensionais (2-D) foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DRX-300 e modelo Avance DRX-500, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, operando na frequência do hidrogênio a 300 MHz e 500 MHz e na frequência do carbono a 75 MHz e 125 MHz, respectivamente.

Para a obtenção dos espectros, as amostras foram dissolvidas nos solventes deuterados: clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) e piridina (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados, no caso dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado utilizado: clorofórmio ( $\delta$  7,27) e piridina ( $\delta$  8,7; 7,6 e 7,2). Para os espectros de RMN <sup>13</sup>C, os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados pelos picos dos carbonos 13 dos solventes clorofórmio ( $\delta$  77,23) e piridina ( $\delta$  123,5; 135,5 e 149,2).

As multiplicidades dos sinais em RMN <sup>1</sup>H foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dubleto), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete), dd (duplo dubleto) e td (triplete de dubletos).



O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN<sup>13</sup>C foi determinado através da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° (CH e CH<sub>3</sub> com amplitudes em oposição aos CH<sub>2</sub>), e foi descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH<sub>2</sub> (carbono metilênico) e CH<sub>3</sub> (carbono metílico), sendo que os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro BB.

#### 4.1.2.2 Espectrometria na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perckin Elmer, modelo 1000-FT, da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) para análise das amostras.

#### 4.1.2.3 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas das substâncias isoladas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV, em espectrômetro de baixa resolução Shimadzu, modelo QP 5000, DI-50, da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.1.3 Ponto de fusão (PF)

O ponto de fusão das substâncias foi determinado em aparelho da Microquímica, modelo APF-301. A determinação foi realizada a uma velocidade de aquecimento de 5 °C/min. e não foi corrigida.

## 4.2 Atividade biológica *in vitro*

### 4.2.1 Estudo da atividade anticolinesterásica

O método para a determinação da atividade anticolinesterásica foi baseado no ensaio enzimático descrito por Ellman modificado para CCD (Rhee *et al.*, 2001).

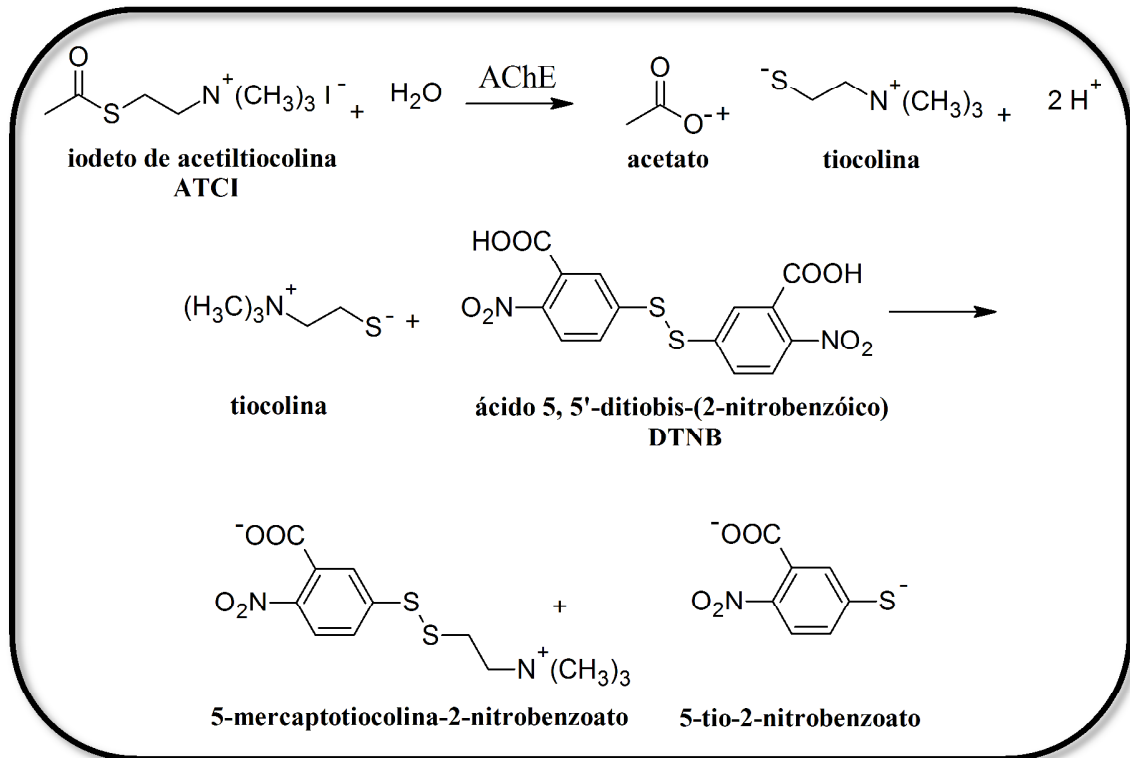
A medida da atividade da AChE pode ser realizada segundo o Método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) adaptado para CCD por Rhee (Rhee *et al.*, 2001), que é um método colorimétrico e pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa. Este ensaio destaca-se como um dos bioensaios mais rápidos e sensíveis para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica

O princípio deste método é a medida da razão de produção de tiocolina, quando o substrato acetiltiocolina é hidrolisado pela enzima AChE. Esta reação é então acompanhada pela reação contínua do ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), para produzir o ânion de coloração amarela 5-tio-2-nitrobenzoato (Esquema 3, Página 49). A razão da produção da cor amarela é medida a 405 nm ou é visualizada em CCD, através de manchas brancas em um campo amarelo.

#### 4.2.1.1 Tampões

Os seguintes tampões foram utilizados no ensaio enzimático para determinação da inibição da enzima AChE:

A) Tampão 1: Tris/HCl (Tris(hidroximetil)amina) 50 mM, pH 8,0;



Esquema 3 – Princípio do ensaio de Ellman (Ellman *et al.*, 1961).

B) Tampão 2: Tris/HCl (Tris(hidroximetil)amina) 50 mM, pH 8,0, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA);

C) Tampão 3: Tris/HCl (Tris(hidroximetil)amina) 50 mM, pH 8,0 contendo NaCl 0,1M e  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,02M.

#### 4.2.1.2 Enzima utilizada nos ensaios de CCD

A enzima acetilcolinesterase (AChE) (tipo VI-s, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg de proteína) foi obtida da Sigma Chemical Co. Os ensaios em CCD foram realizados com a enzima diluída na concentração de 3U/mL em tampão (1).

#### 4.2.1.3 Substrato

O substrato utilizado para os ensaios em CCD foi o iodeto de acetiltiocolina (ATCI), obtido da Aldrich Chem. Co., o qual foi diluído em tampão (1) para obtenção de uma solução de ATCI 1mM.

#### 4.2.1.4 Reagente de Ellman

Nos ensaios em CCD, foi utilizado o ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) obtido da Aldrich Chem. Co., 1mM em tampão (1).

#### 4.2.1.5 Placas para ensaios em CCD

Foram utilizadas placas do tipo DC-Alufolien, silicagel 60 F 254, 0,2 mm de espessura, obtidas da Merck.

#### 4.2.1.6 Inibidores de referência

Nos ensaios em placas de CCD foi utilizado como controle positivo a cafeína, obtida do isolamento da espécie *Paulinia cupana*.

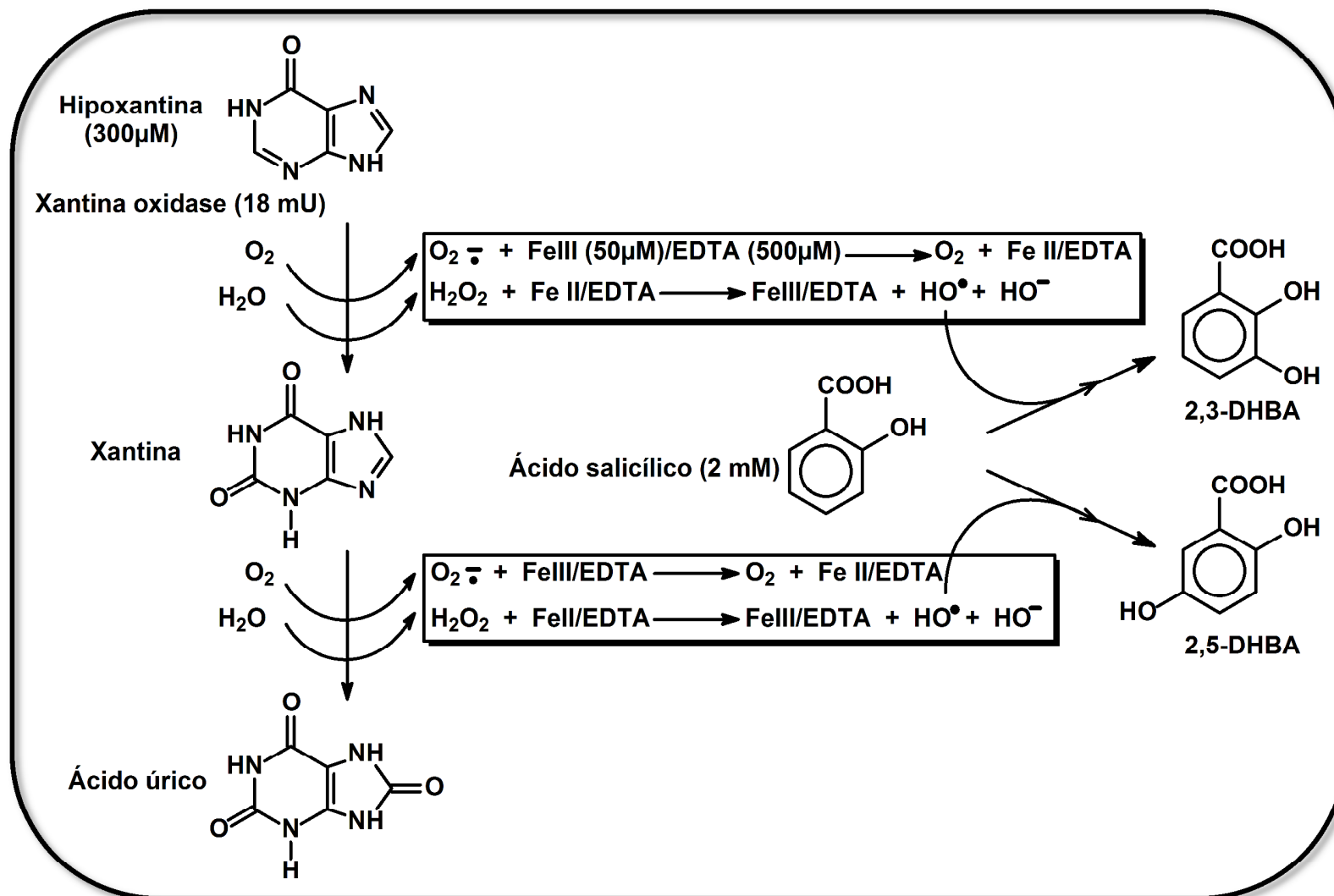
## 4.2.2 Estudo da atividade antioxidante

### 4.2.2.1 Método HX/XO (xantina/xantina oxidase)

O método HX/XO consiste em um sistema enzimático contendo a hipoxantina como substrato e uma enzima, a xantina oxidase. Esta enzima atua sobre a hipoxantina oxidando-a a xantina e esta última é, em seguida, oxidada a ácido úrico. Em ambas as etapas da oxidação da hipoxantina a ácido úrico há a liberação de radicais hidroxilas, que por sua vez reagem com o ácido salicílico, presente no meio, e levam a formação dos ácidos benzóicos dihidroxilados (ácido 2,3-diidroxibenzóico e ácido 2,5-diidroxibenzóico). A hipoxantina e o ácido salicílico incluindo os produtos de oxidação de ambos, são previamente quantificados por um experimento padrão utilizando CLAE (Cromatografia líquida de Alta Eficiência) (OWEN, *et al.*, 2000a). Portanto, é possível adicionar ao sistema uma amostra que tenha um potencial antioxidante para ser avaliado. Assim, se a referida amostra conseguir competir com o ácido salicílico na captura dos radicais hidroxila, menores quantidades de 2,3-ADHB, 2,5-ADHB e ácido úrico serão formadas, indicando assim uma capacidade antioxidante para amostra analisada (Esquema 4, Página 52).

Os ensaios antioxidantes, pelo método do HX/XO, foram realizados através de análise em CLAE, em um cromatógrafo líquido Hewlett-Packard (HP) 1090, utilizando coluna C-18 (Latex, Eppelheim, Germany), de fase reversa 25 cm (5 $\mu$ ) e coluna de diâmetro interno de 4,0 mm. Foram detectados compostos fenólicos com detector de ultravioleta (UV) na absorvância de 278 nm, à temperatura ambiente.

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados pela Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan, na Division of Toxicology and Cancer Risk Factors - German Cancer Research Centre, Heidelberg, Alemanha.

Esquema 4 – Princípio do ensaio de atividade antioxidante HX/XO (OWEN, *et al.*, 2000a).

#### 4.2.2.1.1 Soluções e reagentes

- A) Tampão  $K_2HPO_4/ KH_2PO_4$  pH 6,6: 38 mL de  $K_2HPO_4$  1M e 61,9 mL de  $KH_2PO_4$  1M foram transferidos para um balão volumétrico de 1L e volume foi completado para 1L com água bidestilada;
- B) Tampão do ensaio (HX/XO): 73,0 mg de EDTA, 37,2 mg de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 20,0 mg de hipoxantina e 125,0 mg de ácido salicílico foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 1 L e volume foi completado para 1 L com tampão 1;
- C) Xantina oxidase: 18 mU em  $NH_4SO_4$  3,2 M;
- D) HCl concentrado

# *CAPÍTULO 5*

## *PARTE EXPERIMENTAL*



## **5 PARTE EXPERIMENTAL**

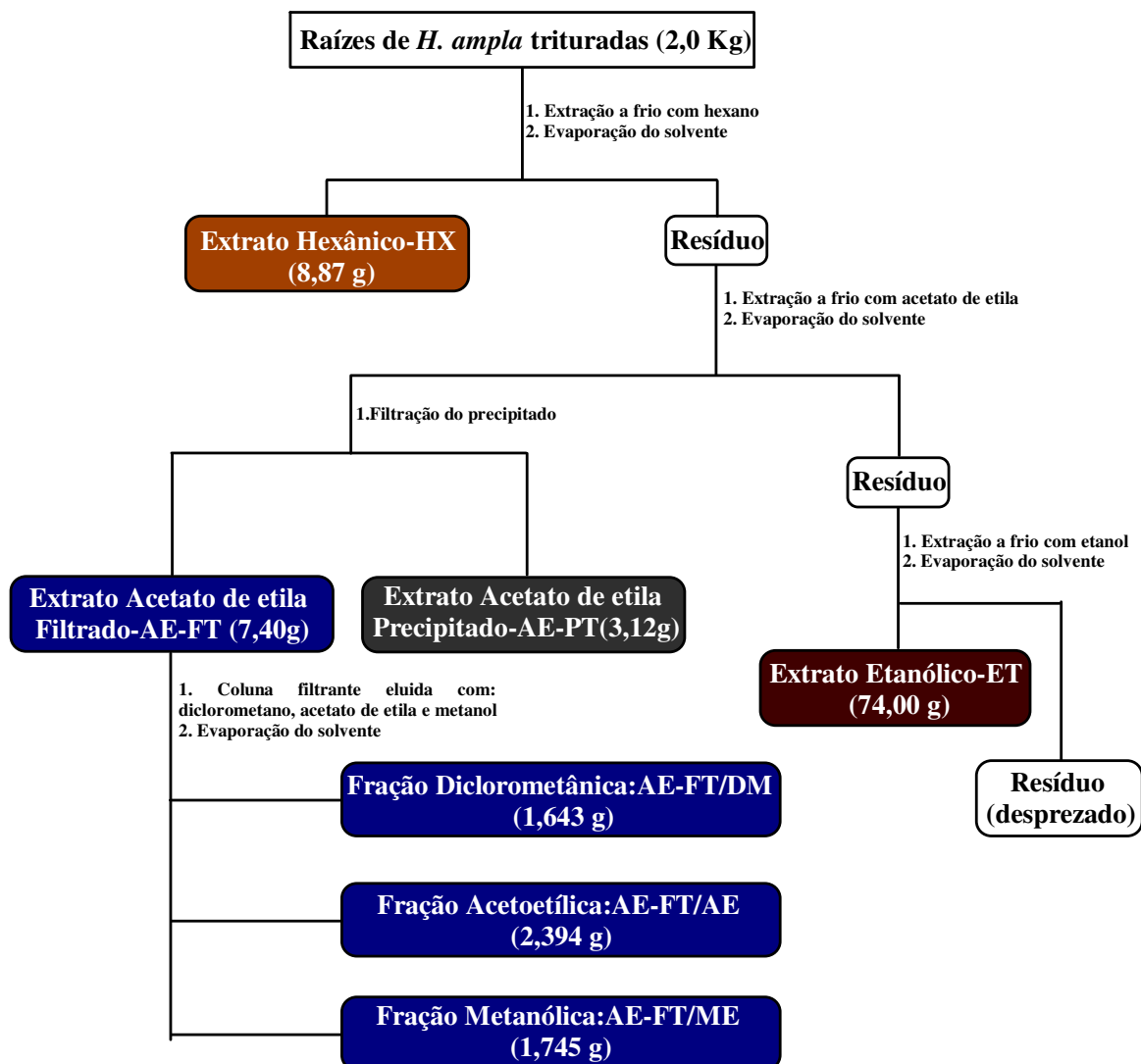
### **5.1 Material vegetal**

#### **5.1.1 Coleta e identificação**

Exemplares de *Humirianthera ampla* foram coletados no município de Plácido de Castro, estado do Acre, em janeiro de 2005. A identificação botânica da espécie foi realizada pelos botânicos do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, local cuja exsicata encontra-se depositada (nº 12159).

### **5.2 Extração e isolamento dos constituintes**

As raízes de *H. ampla* foram fragmentadas em pequenos pedaços, os quais foram secos à temperatura ambiente. Em seguida os fragmentos foram pulverizados mecanicamente em moinho elétrico. O material vegetal (2,0 Kg) foi submetido à extração exaustiva a frio, utilizando-se dos solventes hexano, seguido de acetato de etila e etanol. Após a destilação do solvente em evaporador rotativo, foram obtidos os extratos hexânico-HX (8,87g), acetato de etila, filtrado-AE-FT (7,40g) e precipitado-AE-PT (3,12g) e etanólico-ET (74,00g). O extrato AE-FT foi submetido a uma coluna filtrante, a qual foi eluída com diclorometano (600 mL), acetato de etila (600 mL) e metanol (600 mL). Todo o processo encontra-se resumido no Fluxograma 1, Página 56.



Fluxograma 1 - Obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila, filtrado e precipitado, e etanólico e fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila filtrado.

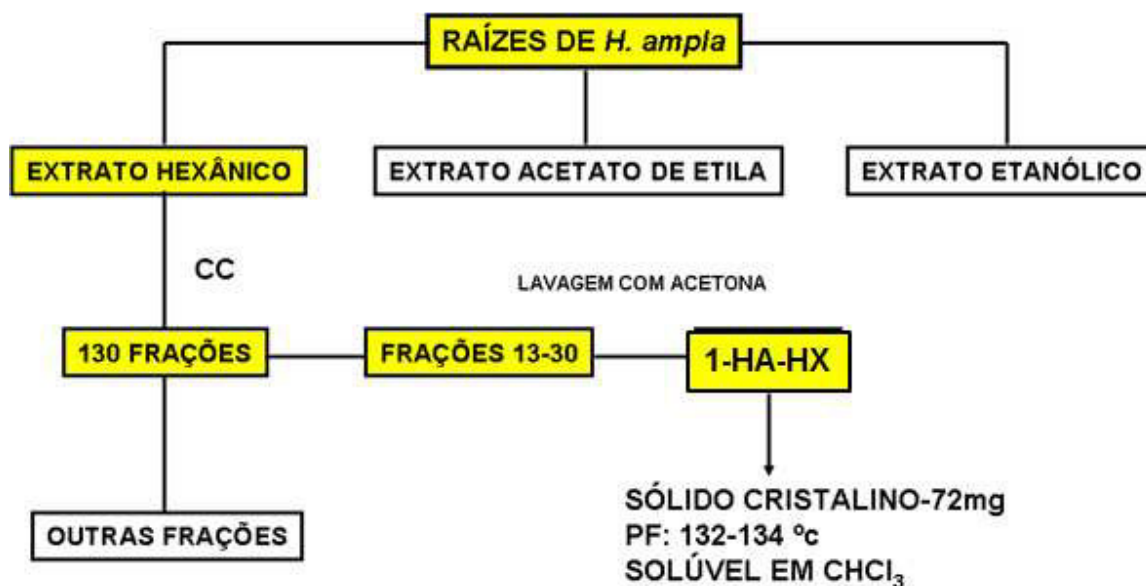
### 5.2.1 Tratamento cromatográfico do extrato hexânico - HX

O extrato hexânico-HX (4,0g) apresentou-se com um material sólido de coloração marron clara. O extrato foi adsorvido em gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana, colocado no topo da coluna cromatográfica (70 g de gel de sílica) e eluído com solventes orgânicos e suas misturas conforme as proporções indicadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico do extrato hexânico-HX

Eluente	Solvente	%	Volume (mL)
1	Hexano	100	300
2	Hexano-diclorometano	80:20	200
3	Hexano-diclorometano	60:40	200
4	Hexano-diclorometano	40:60	150
5	Hexano-diclorometano	20:80	150
6	Diclorometano	100	150
7	Diclorometano-acetato de etila	80:20	150
8	Diclorometano-acetato de etila	50:50	200

Foram coletadas 130 frações de 7 mL. Após da análise em CCD, as frações de 13-30 foram reunidas. Em seguida, após a evaporação do solvente, a fração 13-30 foi lavada repetidas vezes com pequenas quantidades de acetona. Este processo levou a purificação de um sólido cristalino branco em forma de agulhas (72 mg), solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão 132-134 °C e que foi denominado de 1-HA-HX (Fluxograma 2, Página 58). Em análise de CCD, 1-HX-HA apresentou-se como uma única mancha de coloração avermelhada quando revelada com vanilina. Após a realização de experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com padrões em CCD, concluiu-se que a fração 1-HX-HA tratava-se de uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (Capítulo 6, Página 67).



Fluxograma 2 - Isolamento e purificação de 1-HA-HX.

### 5.2.2 Tratamento cromatográfico do extrato acetato de etila precipitado- AE-PT

O extrato acetato de etila precipitado-AE-PT, que apresentou-se como um sólido amorfo esbranquiado (400 mg), em análise de CCD, mostrou-se ser composto por aparentemente três substâncias. O extrato foi cromatografado sobre 18 g gel de sílica e eluído com os eluentes listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico do extrato de etila precipitado-AE-PT

Eluente	Solvente	%	Volume (mL)
1	Hexano	100	100
2	Hexano-diclorometano	50:50	100
3	Diclorometano	100	100
4	Diclorometano-metanol	90:10	300

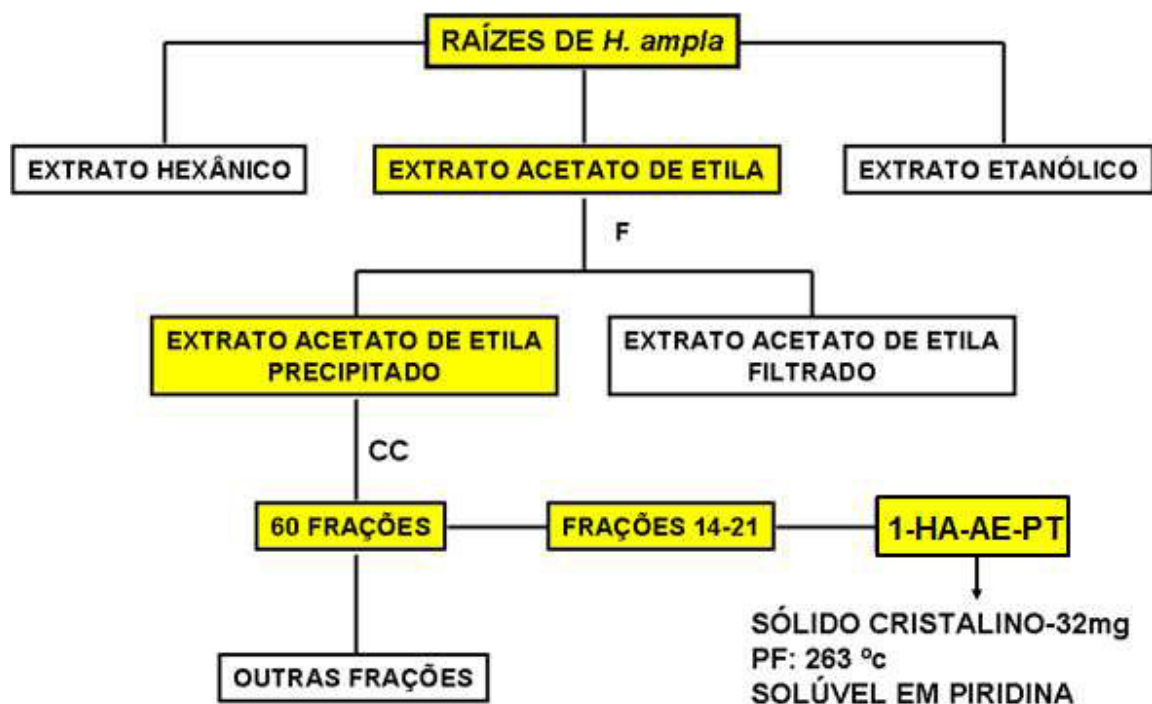
Foram coletadas 60 frações de 7 mL. Em análise de CCD, as frações de 14-21 apresentaram-se com Rfs semelhantes e foram reunidas. O sólido branco em forma de agulhas (32 mg), solúvel em piridina e dimetilsulfóxido, com ponto de fusão 263 °C, proveniente da reunião, foi denominado 1-HÁ-AE-PT (Fluxograma 3, Página 60). Em CCD, 1-HÁ-AE-PT mostrou-se com uma única mancha de coloração amarela quando revelada com vanilina. Os dados de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e DEPT 135°, juntamente com RMN 2D, espectrometria no infravermelho e espectrometria de massas, indicaram que 1-AE-PT-HA se tratava do diterpeno com esqueleto pimaranoannonalida (Capítulo 6, Página 62).

### 5.2.3 Tratamento cromatográfico da fração AE-FT/DM

A fração AE-FT/DM (1,643 g) foi fracionada em coluna cromatográfica sobre 40 g gel de sílica utilizando como eluentes solventes orgânicos e suas misturas em crescentes polaridades, conforme Tabela 4.

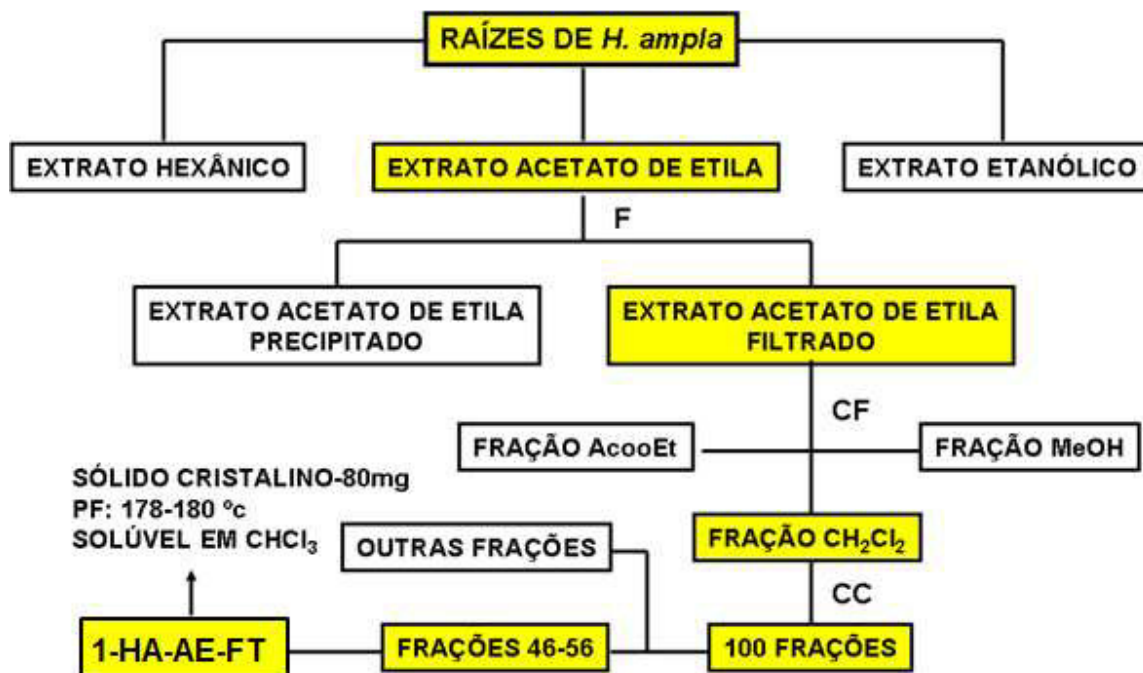
Tabela 4 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico da fração AE-FT/DM.

Eluente	Solvente	%	Volume (mL)
1	Hexano	100	100
2	Hexano-diclorometano	80:20	150
3	Hexano-diclorometano	60:40	150
4	Hexano-diclorometano	40:60	150
5	Hexano-diclorometano	20:80	150
6	Diclorometano	100	150
7	Diclorometano-acetato de etila	80:20	150
8	Diclorometano-acetato de etila	50:50	100



Fluxograma 3 - Isolamento e purificação de 1-HA-AE-PT.

Foram coletadas 100 frações de 7 mL. Depois da análise em CCD, as frações foram reunidas em 8 grupos: 1DM (9-18), 2 DM (19-28), 3 DM (37-40), 4 DM (41-45), 5 DM (46-56), 6 DM (57-61), 7 DM (62-70) e 8 DM (85-90). A fração 46-56 (5DM) foi lavada repetidas vezes com pequenas quantidades de acetona. Este processo forneceu um sólido cristalino branco (80 mg), de ponto de fusão 178-180 °C e solúvel em clorofórmio e que foi denominado 1-HÁ-AE-FT (Fluxograma 4, Página 61). Em análise de CCD, 1-AE-FT-HA apresentou-se como uma única mancha de cor laranja após ser revelada com vanilina. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , juntamente com espectros no infravermelho e de massas, indicaram que a amostra estava pura e que se tratava do triterpeno lupano lupeol (Capítulo 6, Página. 98).



Fluxograma 4 - Isolamento e purificação de 1-AE-FT-HA.

#### 5.2.4 Tratamento cromatográfico da fração AE-FT/AE

A fração AE-FT/AE (2,394 g), que apresentou-se como um material pastoso de cor marrom escura, foi cromatografada sobre 34 g de gel de sílica e eluída com os sistemas de solventes mostrados na Tabela 5, Página 62.

Foram coletadas 100 frações de 7mL. Após análise em CCD, as frações foram reunidas em 9 grupos: 1AE (1-2), 2 AE (3-6), 3 AE (7-19), 4 AE (20-32), 5 AE (33-40), 6 AE (41-49), 7 AE (50-57), 8 AE (58-87) e 9 AE (88-100). Devido à pequena quantidade de material e pela complexidade química apresentada pelos grupos de frações, não foi possível isolar nenhuma substância.

Tabela 5 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico da fração AE-FT/AE.

<b>Eluente</b>	<b>Solvente</b>	<b>%</b>	<b>Volume (mL)</b>
1	Hexano	100	100
2	Hexano-diclorometano	50:50	150
3	Diclorometano	100	150
4	Diclorometano-acetato de etila	75:25	150
5	Diclorometano-acetato de etila	50:50	200
6	Diclorometano-acetato de etila	25:75	150
7	Acetato de etila	100	150
8	Acetato de etila-metanol	80:20	150

### 5.2.5 Tratamento cromatográfico da fração AE-FT/ME

A fração AE-FT/ME (1,745 g), foi cromatografada sobre 18 g gel de sílica e eluída com os sistemas de solventes listados na Tabela 6, Página 63.

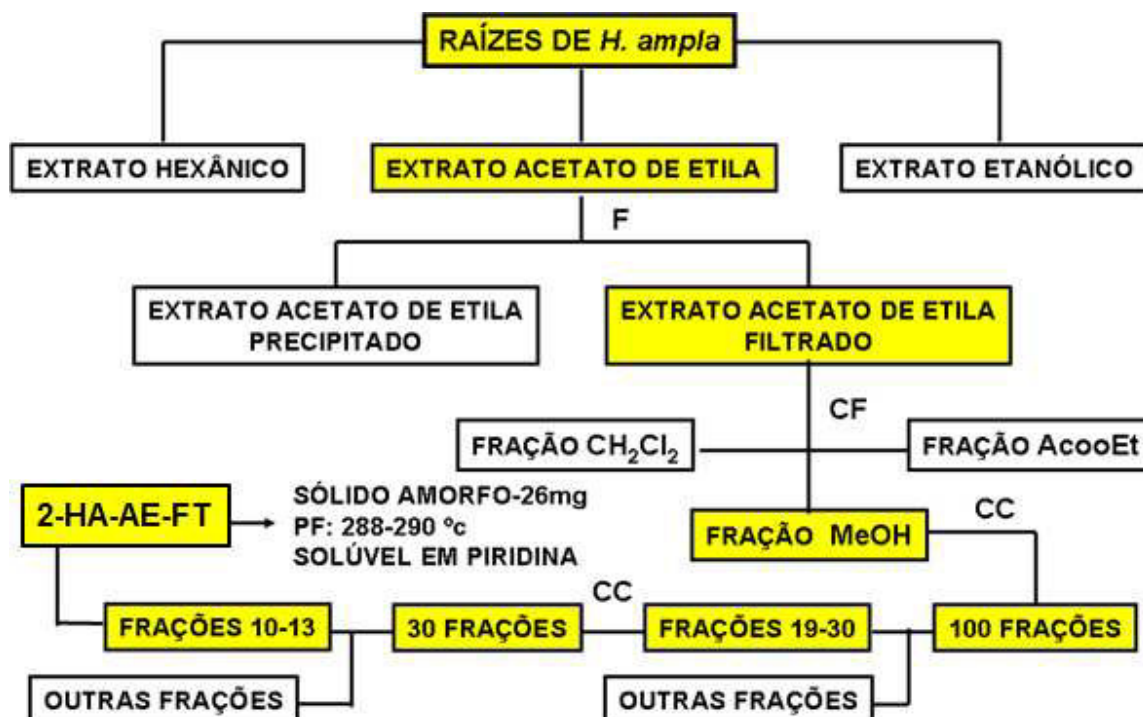
Foram coletadas 100 frações de 7 mL cada. As frações de 19-30 (67,2 mg), após análise em CCD, foram reunidas e recromatografadas (sobre 4 g de gel de sílica), eluindo-se inicialmente com 100 mL de diclorometano e seguido por 200 mL de diclorometano-Metanol (90:10).

Foram coletadas 30 frações. Após análise em CCD, as frações 10-13 foram reunidas por apresentarem semelhanças. O material reunido apresentou-se como um sólido amorfo esbranquiçado (26 mg), solúvel em piridina e com ponto de fusão 288-290 °C, que foi denominado 2-HA-AE-FT (Fluxograma 5, Página 63). Experimentos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C indicaram que a amostra se tratava do esteróide β-sitosterol glicosilado (Capítulo 6, p. 108).



Tabela 6 - Sistemas de eluentes usados no tratamento cromatográfico da fração AE-FT/ME

Eluente	Solvente	%	Volume (mL)
1	Acetato de etila	100	100
2	Acetato de etila-metanol	90:10	100
3	Acetato de etila-metanol	80:20	100
4	Acetato de etila-metanol	70:30	100
5	Acetato de etila-metanol	60:40	100
6	Acetato de etila-metanol	50:50	100
7	Acetato de etila-metanol	40:60	100
8	Acetato de etila-metanol	30:70	100
9	Acetato de etila-metanol	80:20	100
10	Metanol	100	100

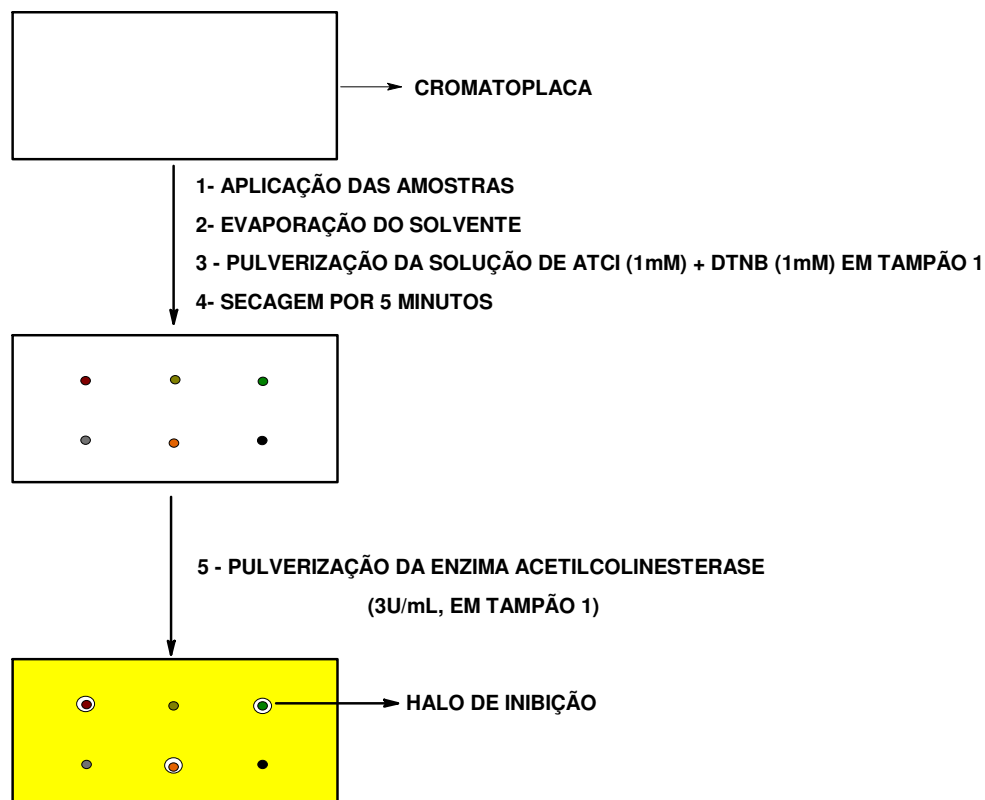


Fluxograma 5 - Isolamento e purificação de 2-HA-AE-FT.

### 5.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e substâncias isoladas das raízes de *H. ampla*

#### 5.3.1 Procedimento experimental do ensaio de Ellman em CCD

As amostras foram aplicadas na cromatoplaca por meio de um capilar de vidro e, após a evaporação do solvente, borrifou-se uma solução contendo o substrato (ATCI, 1 mM em tampão 1) e o reagente de Ellman (DTNB, 1 mM em tampão 1) e aguardou-se a secagem durante 3 a 5 minutos. Após a secagem borrifou-se a enzima acetilcolinesterase (3 U/mL em tampão 1). Após cerca de 5 minutos a cromatoplaca desenvolveu uma coloração amarela, exceto onde houve inibição da enzima, isto é, um halo branco em torno dos “spots” das amostras (Esquema 5).



Esquema 5 – Procedimento experimental para a realização do ensaio de Ellman.

## **5.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e do diterpenoannonalida isolado das raízes de *H. ampla***

### **5.4.1 Procedimento experimental do ensaio da Xantina/Xantina oxidase (HX/XO)**

Uma pequena quantidade de amostra, aproximadamente 20 mg, foi solubilizada em metanol e em seguida foi transferida para tubos plásticos de centrífuga em duplicata e o solvente foi removido sobre fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi pesado e novamente solubilizado em um tampão de fosfato (1,0 mL) contendo hipoxantina (300 $\mu$ M), ácido salicílico (2 mM), Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (50 $\mu$ M) e EDTA (500 $\mu$ M). E em seguida foram adicionados 5  $\mu$ L de uma diluição de xantina oxidase (18 um) em NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (3,2 mol/L) para iniciar a reação. Os tubos foram incubados a 37°C durante 3 horas para que a reação se completasse. Depois da incubação, 20  $\mu$ L da mistura reacional foram analisados por CLAE usando as seguintes condições: para a avaliação dos fenóis totais, a fase móvel foi metanol (100%), injetados isocraticamente por 20 minutos e, para a separação dos compostos individuais, a fase móvel consistiu de 2% de ácido acético em água (A) e metanol (B) usando os seguintes gradientes num total de análise de 45 minutos: 95% de A por 2 minutos, 75% de A por 8 minutos, 60% de A por 10 minutos, 50 % de A por 10 minutos e 0 de A até o final da análise. As concentrações dos difenóis (ácido 2,3-dihidroxibenzóico e ácido 2,5-dihidroxibenzóico) produzidos pelo ataque do radical hidroxila ao ácido salicílico, foram determinadas através de curvas padrões dos respectivos difenóis.

# ***CAPÍTULO 6***

***RESULTADOS E***

***DISCUSSÃO***

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Isolamento e determinação estrutural de 1-HA-HX

A fração 1-HA-HX apresentou-se como um sólido cristalino branco, solúvel em clorofórmio e PF 132-134 °C. Através de análise em CCD, 1-HA-HX apresentou-se com uma mancha de coloração avermelhada após revelação com vanilina. Esta fração foi obtida a partir do fracionamento do extrato hexânico das raízes de *H. ampla* (Fluxograma 2, Página 58).

#### 6.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 1-HA-HX

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/500\text{ MHz}$ ) de 1-HA-HX (Figura 6, Página 68), apresentou sinais em 5,38  $\delta$  (d,  $^3J_{\text{H-6,H-7}} = 5,1\text{ Hz}$ ) e 3,55  $\delta$  (m) característicos dos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente, presentes nos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol; em 5,18  $\delta$  (dd,  $^3J_{\text{H-22,H-23 trans}} = 15,0\text{ Hz}$  e  $^3J_{\text{H-22,H-20}} = 8,6\text{ Hz}$ ) e 5,04  $\delta$  (dd,  $^3J_{\text{H-23,H-22 trans}} = 15,1\text{ Hz}$  e  $^3J_{\text{H-23,H-24}} = 8,6\text{ Hz}$ ) referentes aos hidrogênios vinílicos adicionais H-22 e H-23 do estigmasterol, respectivamente. O espectro ainda apresentou sinais entre 0,70-2,30  $\delta$  referentes a hidrogênios metílicos e metilênicos que caracterizam o esqueleto esteroidal.

#### 6.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 1-HA-HX

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CDCl}_3/125\text{ MHz}$ ) de 1-HA-HX (Figura 7, Página 69), apresentou sinais em 140,8  $\delta$  e 121,7  $\delta$  característicos da ligação dupla entre C-5 e C-6 do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol; os sinais em 138,3  $\delta$  e 129,3  $\delta$  característicos da ligação dupla entre os carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol, bem como o sinal em 71,8  $\delta$  atribuído ao carbono carbinólico C-3. A análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (Figura 8, Página 70) permitiu a identificação do padrão de hidrogenação dos 29 átomos de carbono presentes nas estruturas dos esteróides (Tabela 7, Página 71).

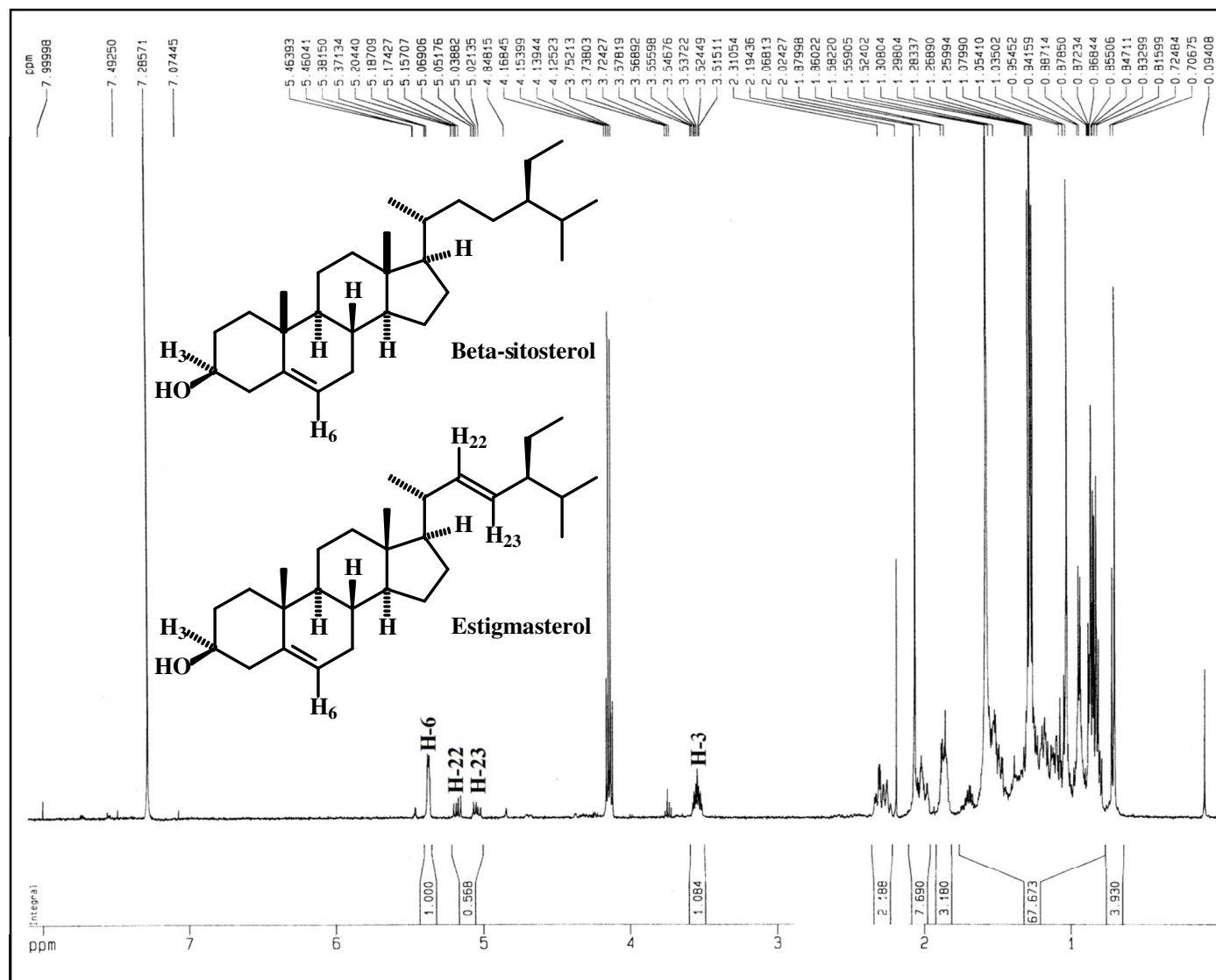


Figura 6 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1-HA-HX ( $\text{CDCl}_3/500$  MHz).

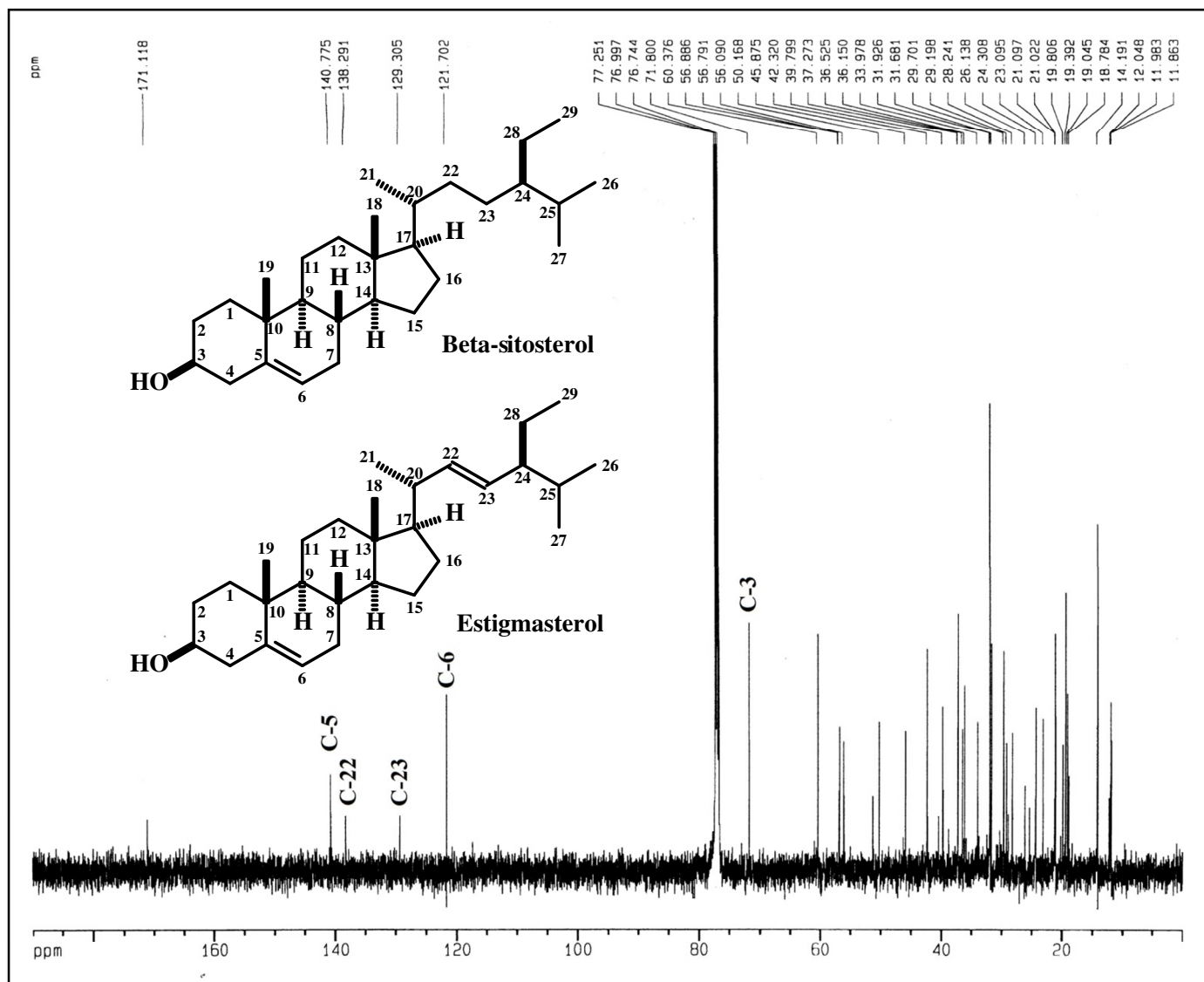


Figura 7 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-HX ( $\text{CDCl}_3/125\text{ MHz}$ ).

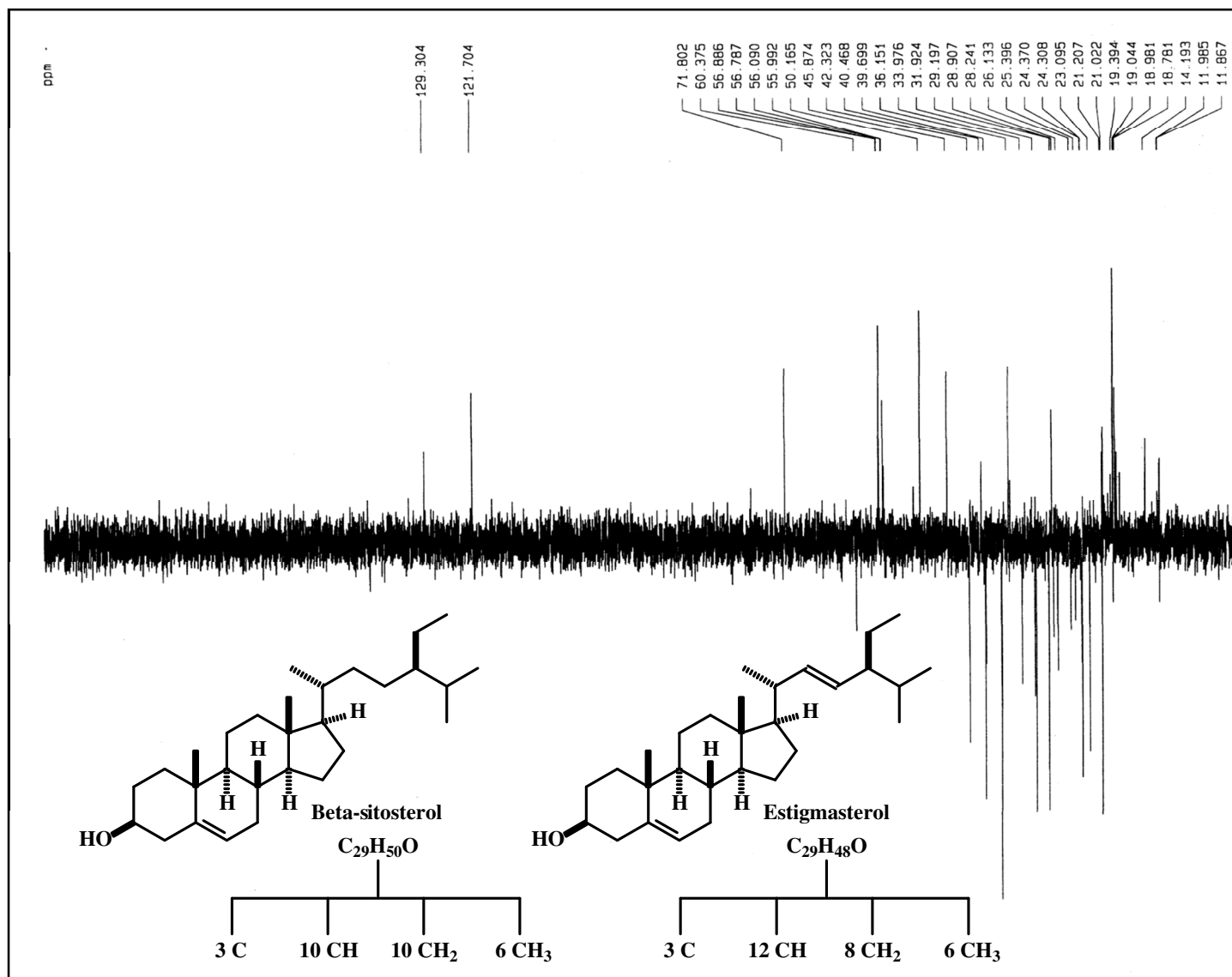


Figura 8 - Espectro de RMN  $^{13}C$  - DEPT 135 ° de 1-HA-HX ( $CDCl_3/125$  MHz).



A comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração 1-HX-HA com os encontrados na literatura (GOAD, 1991) para os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, permitiu a identificação desta como sendo uma mistura destes esteróides, conforme Tabela 7. A presença destes dois esteróides já foi relatada nas raízes de *H. ampla* (GRAEBNER *et al*, 2002).

Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) para os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (1-HX-HA)\* isolado e da literatura (GOAD, 1991)\*\*.

Carbono	Tipo de C	$\beta$ -sitosterol		Estigmasterol	
		Isolado	Literatura	Isolado	Literatura
1	CH <sub>2</sub>	37,3	37,3	37,3	37,3
2	CH <sub>2</sub>	31,7	31,6	31,7	31,7
3	CH	<b>71,8</b>	<b>71,7</b>	<b>71,8</b>	<b>71,8</b>
4	CH	42,2	42,3	42,2	42,4
5	C	<b>140,8</b>	<b>140,8</b>	<b>140,8</b>	<b>140,8</b>
6	CH	<b>121,7</b>	<b>121,6</b>	<b>121,7</b>	<b>121,7</b>
7	CH <sub>2</sub>	31,9	31,9	31,9	31,9
8	CH	31,9	31,9	31,9	31,9
9	CH	50,2	50,2	50,2	50,2
10	C	36,5	36,5	36,5	36,6
11	CH <sub>2</sub>	21,1	21,1	21,2	21,1
12	CH <sub>2</sub>	39,8	39,8	39,7	39,7
13	C	42,3	42,3	42,3	42,4
14	CH	56,8	56,8	56,9	56,9
15	CH <sub>2</sub>	24,3	24,3	24,3	24,4
16	CH <sub>2</sub>	28,2	28,3	29,0	29,0
17	CH	56,1	56,1	56,1	56,1
18	CH <sub>3</sub>	11,9	11,9	12,0	12,1
19	CH <sub>3</sub>	19,4	19,4	19,4	19,4
20	CH	36,2	36,2	40,4	40,5
21	CH <sub>3</sub>	19,0	18,8	21,1	21,1
22	CH <sub>2</sub> /CH	<b>33,9</b>	<b>33,9</b>	<b>138,3</b>	<b>138,4</b>
23	CH <sub>2</sub> /CH	<b>26,1</b>	<b>26,1</b>	<b>129,3</b>	<b>129,3</b>
24	CH	45,9	45,9	51,2	51,3
25	CH	29,2	29,2	31,9	31,9
26	CH <sub>3</sub>	19,8	19,8	21,2	21,3
27	CH <sub>3</sub>	19,0	19,1	19,0	19,0
28	CH <sub>2</sub>	23,1	23,1	25,4	25,4
29	CH <sub>3</sub>	12,2	12,3	12,2	12,3

\*Em CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz

\*\*Em CDCl<sub>3</sub> a 75 MHz

## 6.2 Isolamento e determinação estrutural de 1-HA-AE-PT

A substância 1-HA-AE-PT apresentou-se como um sólido cristalino incolor em forma de agulhas, solúvel em piridina e dimetilsulfóxido, e com ponto de fusão 263-267 °C. Em análise de CCD, 1-HA-AE-PT apresentou-se como uma única mancha de coloração amarela após revelação com vanilina. Esta substância foi isolada a partir do fracionamento do precipitado do extrato acetoetílico (AE-PT) das raízes de *H. ampla* (Fluxograma 3, Página 60).

### 6.2.1 Espectrometria de Massas de 1-HA-AE-PT

O espectro de massas (IE/70 eV) de 1-HA-AE-PT (Figura 9, Página 73), mostrou pico base em  $m/z = 43$  e pico íon molecular de pequena intensidade em  $m/z = 362$ , sugerindo a fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_6$ .

### 6.2.2 Espectrometria no Infravermelho de 1-HA-AE-PT

O espectro de absorção na região do infravermelho ( $KBr/cm^{-1}$ ) de 1-HA-AE-PT (Figura 10, Página 74) revelou algumas absorções importantes:  $1704\text{ cm}^{-1}$  e  $1742\text{ cm}^{-1}$ , referente à vibração de deformação axial de ligação  $C=O$ ; vibrações entre  $1220$  e  $1120\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformações axiais de ligações  $C-O$ ;  $1661\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação  $C=C$  e  $3470\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial da ligação  $O-H$ .

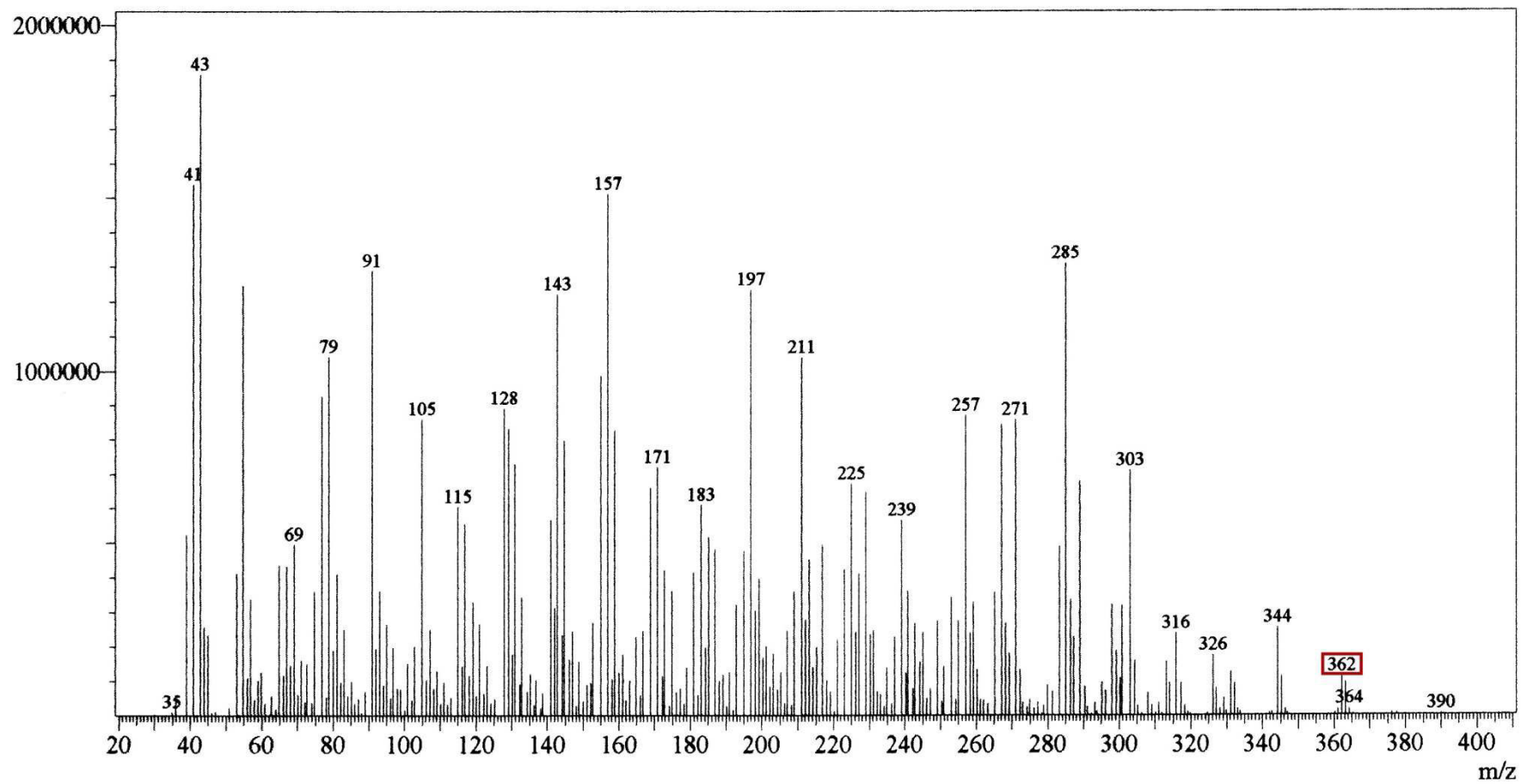


Figura 9 - Espectro de massas de 1-HA-AE-PT (IE, 70 eV).

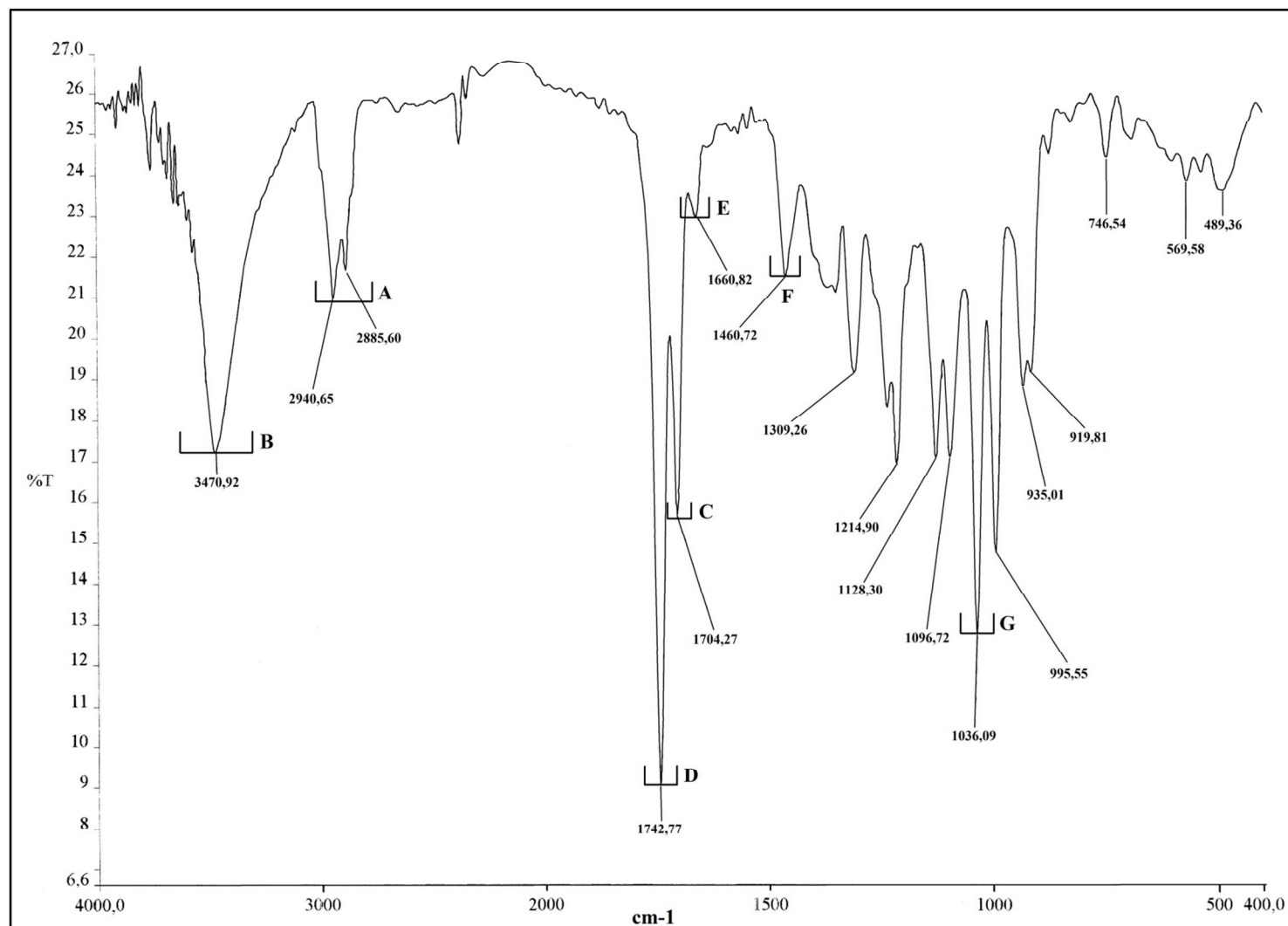


Figura 10 - Espectro de absorção na região do infravermelho de 1-AE-PT-HA (KBr, cm<sup>-1</sup>). A. Deformação axial de C-H, 2941-2886 cm<sup>-1</sup>. B. Deformação axial de O-H, 3471 cm<sup>-1</sup>. C. Deformação axial de C=O de cetona, 1704 cm<sup>-1</sup>. D. Deformação axial de C=O de lactona, 1743 cm<sup>-1</sup>. E. Deformação axial C=C, 1661 cm<sup>-1</sup>. F. Deformação axial C-CH<sub>3</sub>, 1461 cm<sup>-1</sup>. G. Deformação axial C-O, 1036 cm<sup>-1</sup>.

### 6.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 1-HA-AE-PT

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) de 1-HA-AE-PT (Figuras 11, 12 e 13, Páginas 76, 77 e 78, respectivamente), mostrou os seguintes sinais: 1,02  $\delta$  (s, 3H, H-17); 1,55  $\delta$  (s, 3H, H-18); 4,72  $\delta$  (s, 2H, H-16); 3,60  $\delta$  e 4,20  $\delta$  (dd, 1H, H-20a e d, 1H, H-20b, respectivamente); 2,39  $\delta$  e 2,15  $\delta$  (d, 1H, H-14a e d, 1H, H-14b, respectivamente); 2,20  $\delta$  e 2,09  $\delta$  (d, 1H, H-2a e d, 1H, H-2b, respectivamente); 1,72  $\delta$  (dd, 2H, H-12); 1,14  $\delta$  e 1,57  $\delta$  (m, 1H, H-11a e m, 1H, H-11b); 1,50  $\delta$  (m, 2H, H-1); 5,69  $\delta$  (d, 1H, H-7); 4,96  $\delta$  (dd, 1H, H-6); 2,25  $\delta$  (dd, 1H, H-5) e 1,36  $\delta$  (dd, 1H, H-9).

### 6.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 1-HA-AE-PT

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) de 1-HA-AE-PT (Figura 14, Página. 79), mostrou vinte sinais espectrais referentes às ressonâncias dos carbonos da estrutura mostrada na Figura 79. Os deslocamentos químicos dos carbonos foram assinalados através da análise dos espectros do tipo BB, DEPT 135°, HMQC e por comparação com deslocamentos químicos descritos na literatura (MUSSINI *et al.*, 1973) (Tabela 8, Página 96).

Através da análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (Figura 15, Página 80), observou-se à presença de seis sinais que aparecem com amplitude positiva e sete sinais com amplitude negativa, referentes a sete carbonos metilênicos (24,46  $\delta$ , C-11; 28,39  $\delta$ , C-2; 29,04  $\delta$ , C-1; 33,57  $\delta$ , C-12; 43,48  $\delta$ , C-14; 64,79  $\delta$ , C-16 e 72,69  $\delta$ , C-20). Dos seis sinais com amplitude positiva, dois são referentes a carbonos metílicos (19,09  $\delta$ , C-17 e 19,22  $\delta$ , C-18, segundo foi descrito no espectro de RMN  $^1\text{H}$ ) e os quatro restantes se referem a carbonos metínicos (42,69  $\delta$ , C-9; 44,57  $\delta$ , C-5; 72,78  $\delta$ , C-6 e 115,98  $\delta$ , C-7). Além disso, a comparação do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° com o espectro totalmente desacoplado (BB), sugeriu a presença de sete carbonos não hidrogenados na estrutura (30,71  $\delta$ , C-10; 48,86  $\delta$ , C-13; 50,91  $\delta$ , C-4; 97,11  $\delta$ , C-3; 145,15  $\delta$ , C-8; 179,53  $\delta$ , C-19 e 214,02  $\delta$ , C-15).

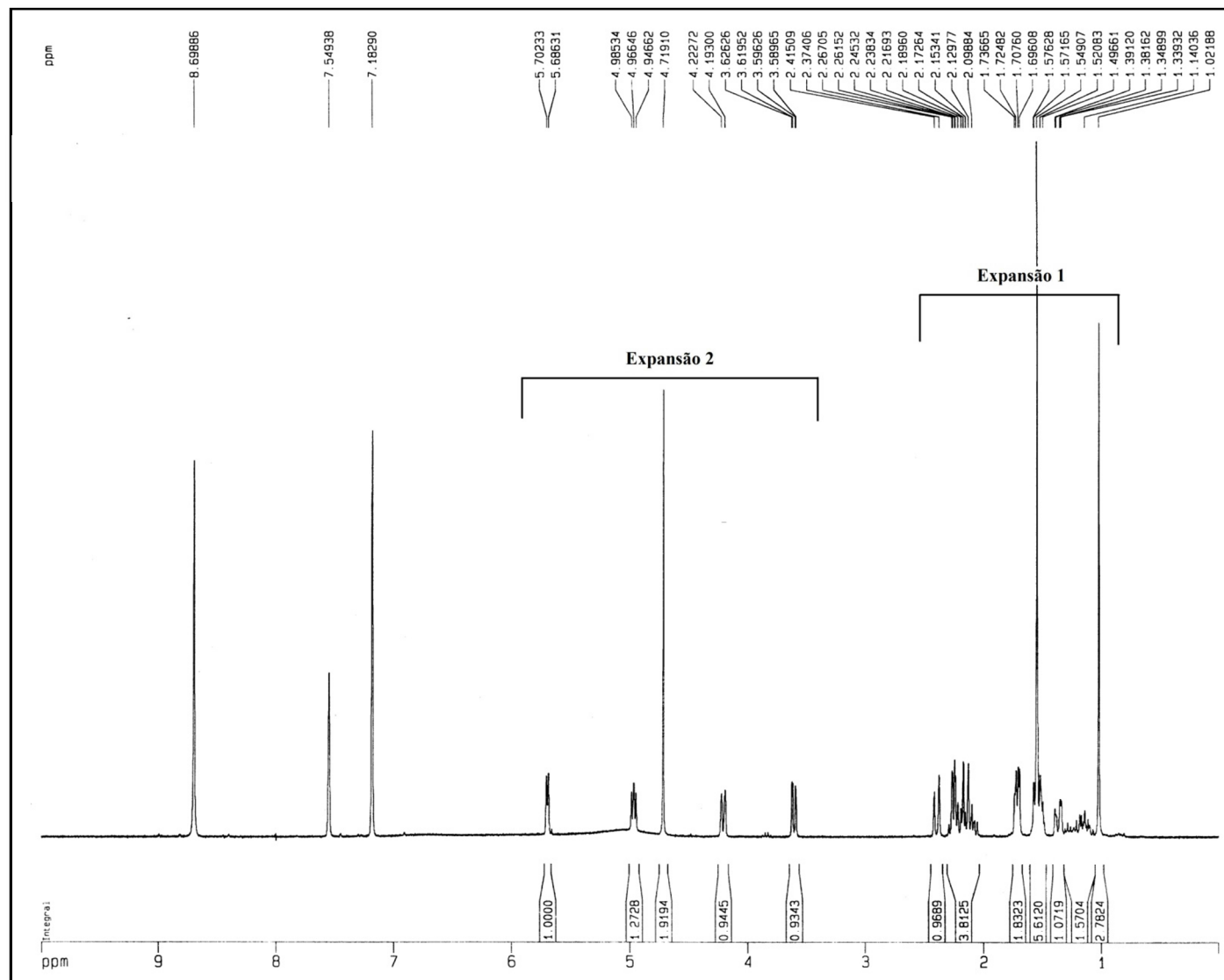


Figura 11 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz).

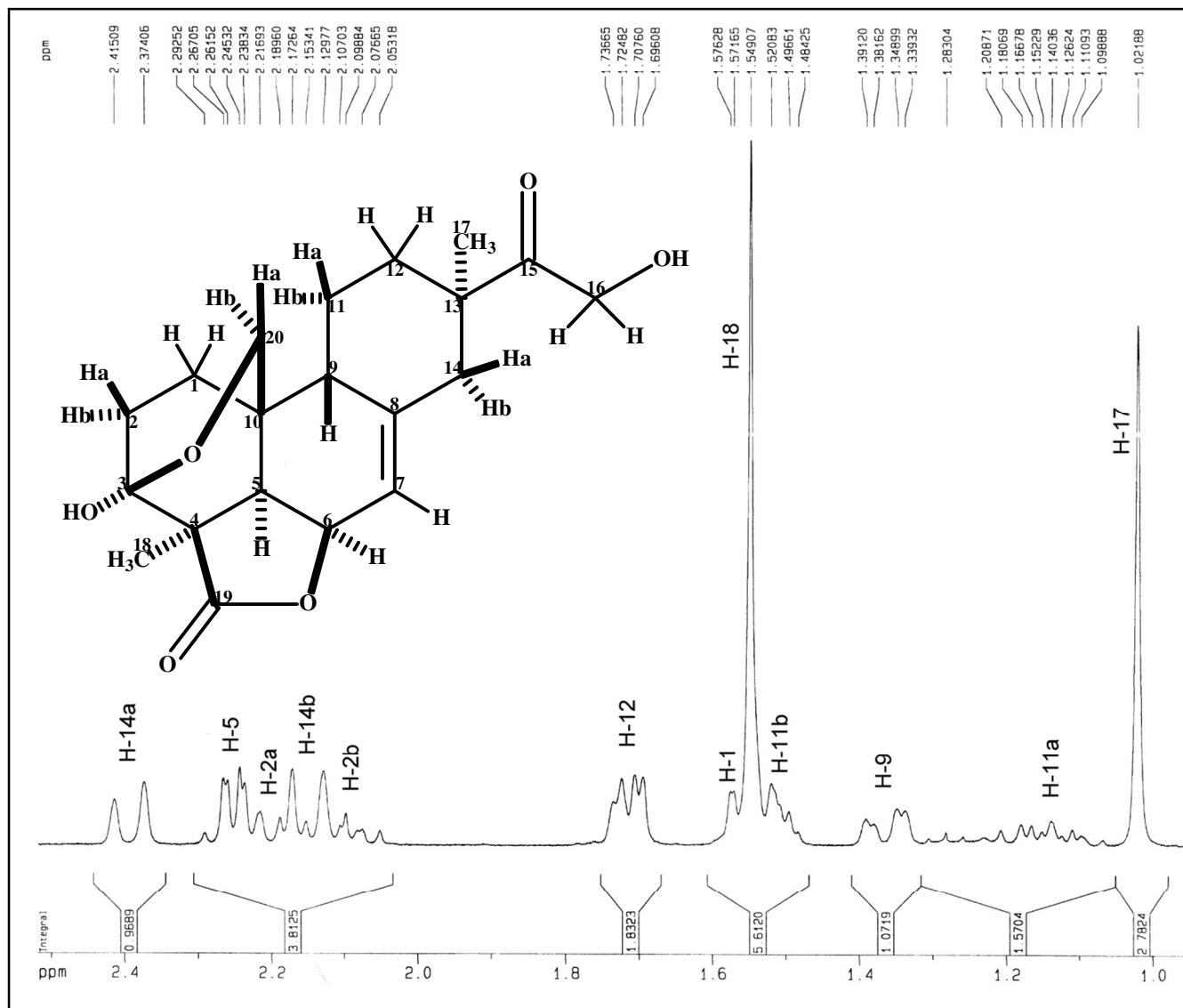


Figura 12 – Expansão 1 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}/300$  MHz).

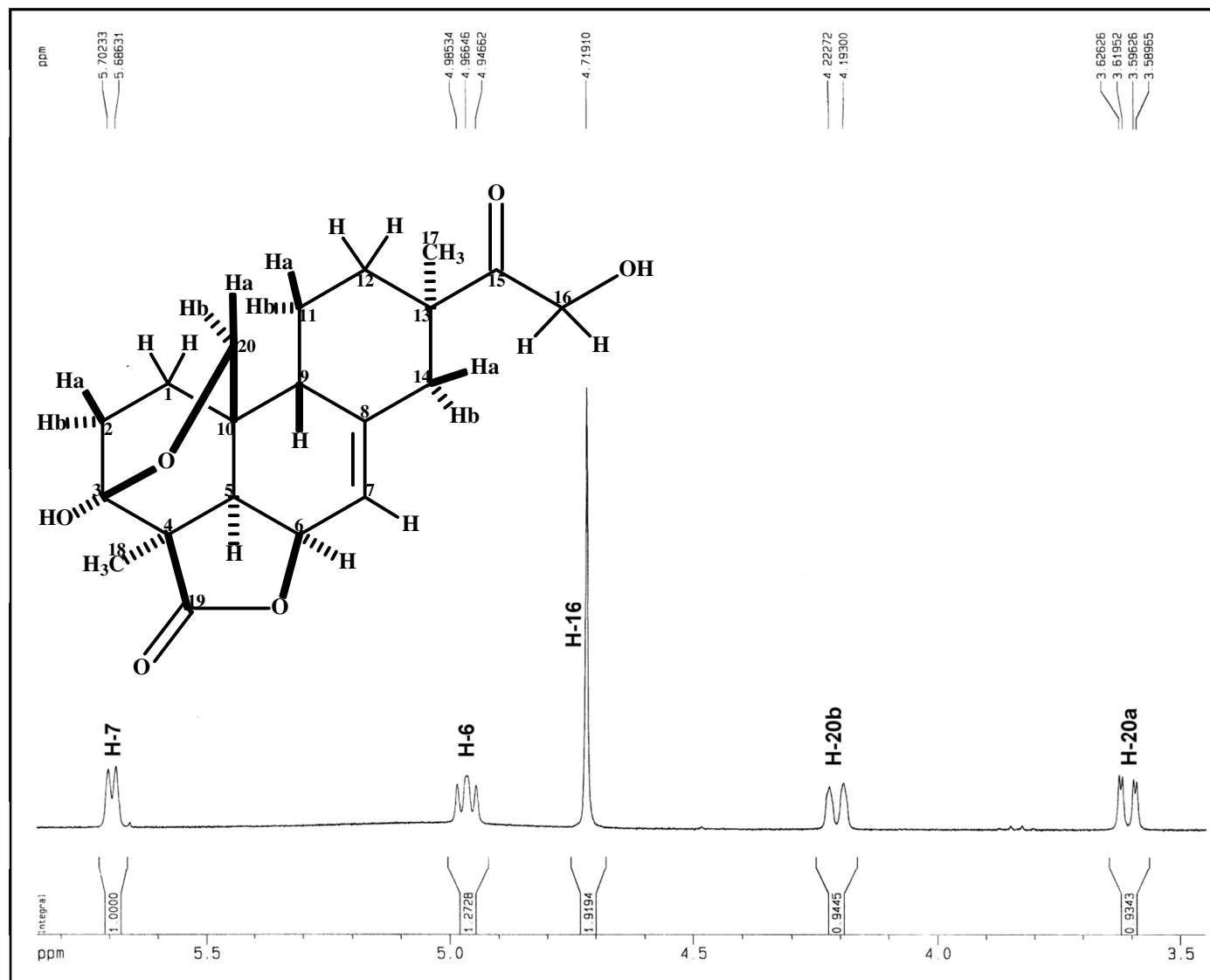


Figura 13 – Expansão 2 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz).



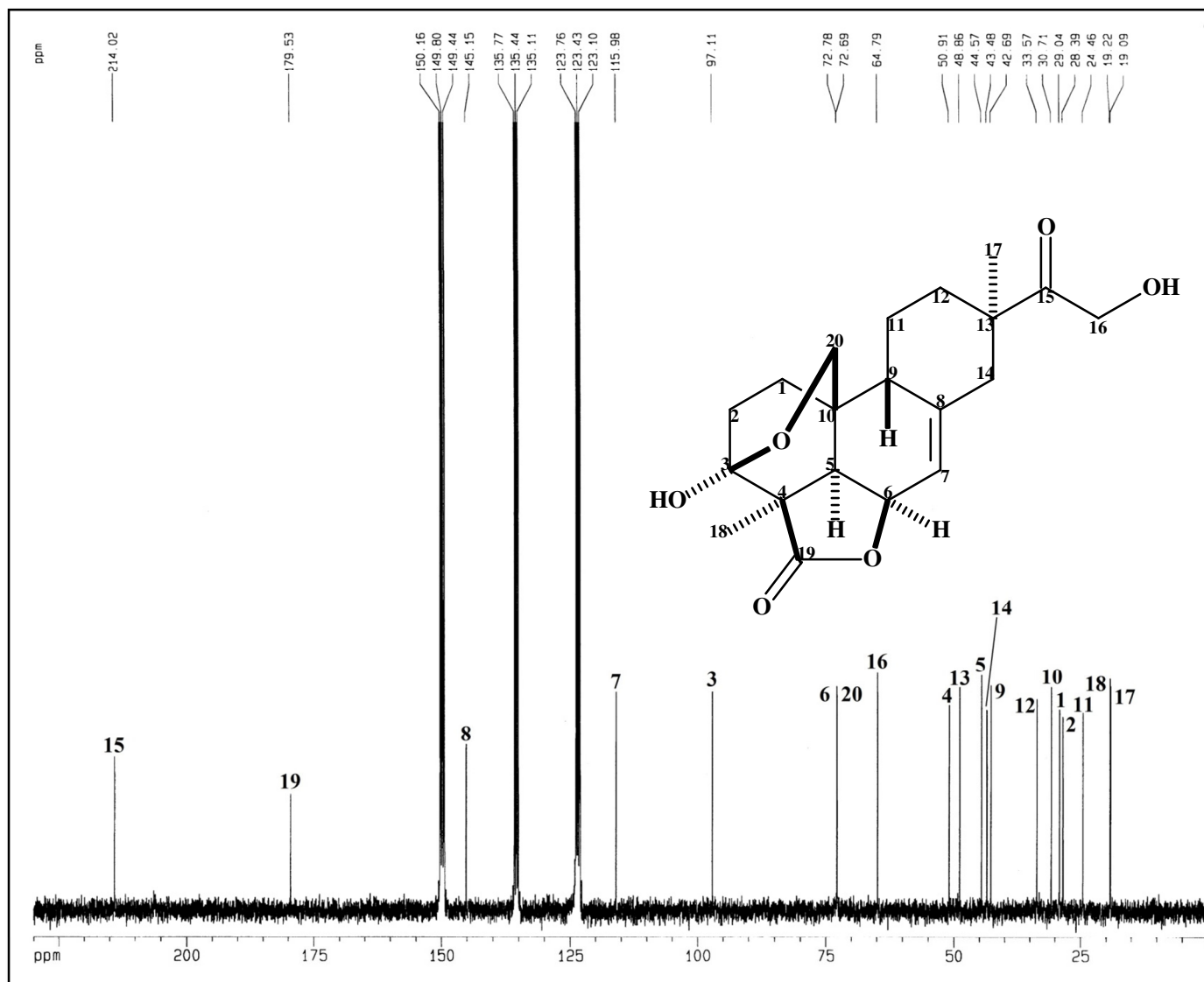


Figura 14 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$  MHz).

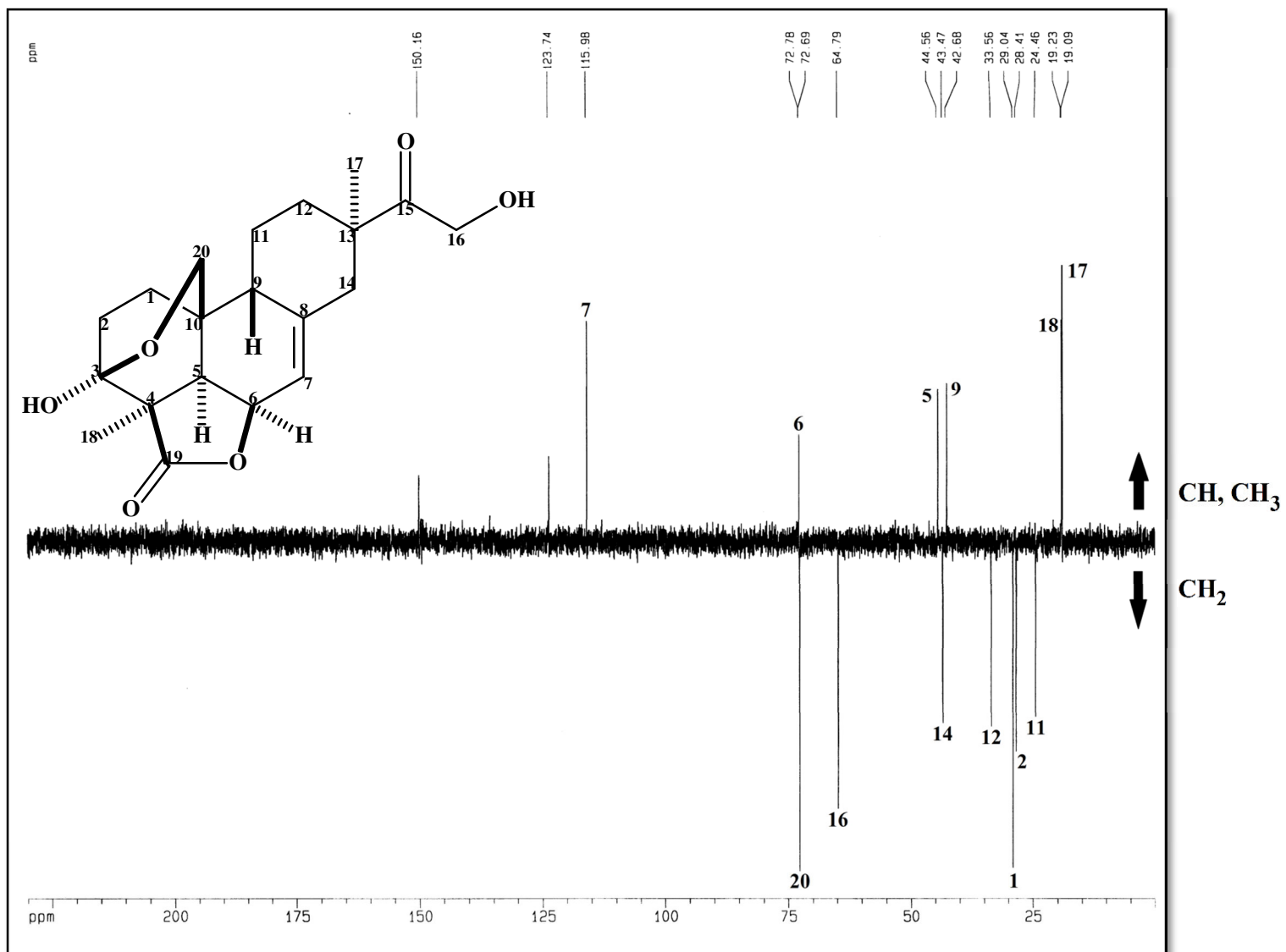


Figura 15 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135  $^\circ$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz).

## 6.2.5 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de 1-HA-AE-PT

Com a finalidade de ampliar as informações visando à elucidação da estrutura de 1-HA-AE-PT, foram utilizadas técnicas de RMN bidimensionais como COSY, HMQC, HMBC e NOESY.

### 6.2.5.1 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D COSY $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT

A análise do espectro RMN  $^1\text{H}$  COSY ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) de 1-HA-AE-PT (Figuras 16 e 17, Páginas 82 e 83, respectivamente) permitiu a identificação das correlações entre alguns sistemas de *spins* existentes na molécula. O hidrogênio olefínico em 5,69  $\delta$  (H-7) apresentou um pico de cruzamento com o hidrogênio em 4,97  $\delta$  (H-6), com constante de acoplamento vicinal de 4,8 Hz. O hidrogênio H-6 também acoplou com outro hidrogênio em 2,25  $\delta$  (H-5) com constante de acoplamento vicinal de 5,8 Hz. Já H-5 mostrou um acoplamento em W com H-20a ( $^4J_{\text{H}5\text{-H}20\text{a}} = 2,0$  Hz) e H-20a com H-20b ( $^2J_{\text{H}20\text{a}\text{-H}20\text{b}} = 8,9$  Hz). Outro sistema de *spins* foi detectado através do acoplamento do hidrogênio metínico centrado em 1,36  $\delta$  (H-9) com os hidrogênios metilênicos diasterotópicos em 1,14  $\delta$  e 1,57  $\delta$  (H-11a e H-11b, respectivamente), com constantes de acoplamento vicinais  $^3J_{\text{H-9, H-11a}} = 12,7$  Hz e  $^3J_{\text{H-9, H-11b}} = 2,9$  Hz. Os hidrogênios diasterotópicos H-11a e H-11b também interagiram com outro sistema de *spins* gerado pelos hidrogênios em 1,72  $\delta$  (H-12). Os hidrogênios metilênicos H-14 apresentaram-se no espectro como um sistema de *spins* isolados e centrados 2,15  $\delta$  e 2,39  $\delta$  (H-14b e H-14a, respectivamente), apresentando acoplamento do tipo geminal com  $^2J_{\text{H-14a, H-14b}} = 12,3$  Hz. Os acoplamentos descritos e outros também observados são demonstrados nas Figuras 16 e 17.

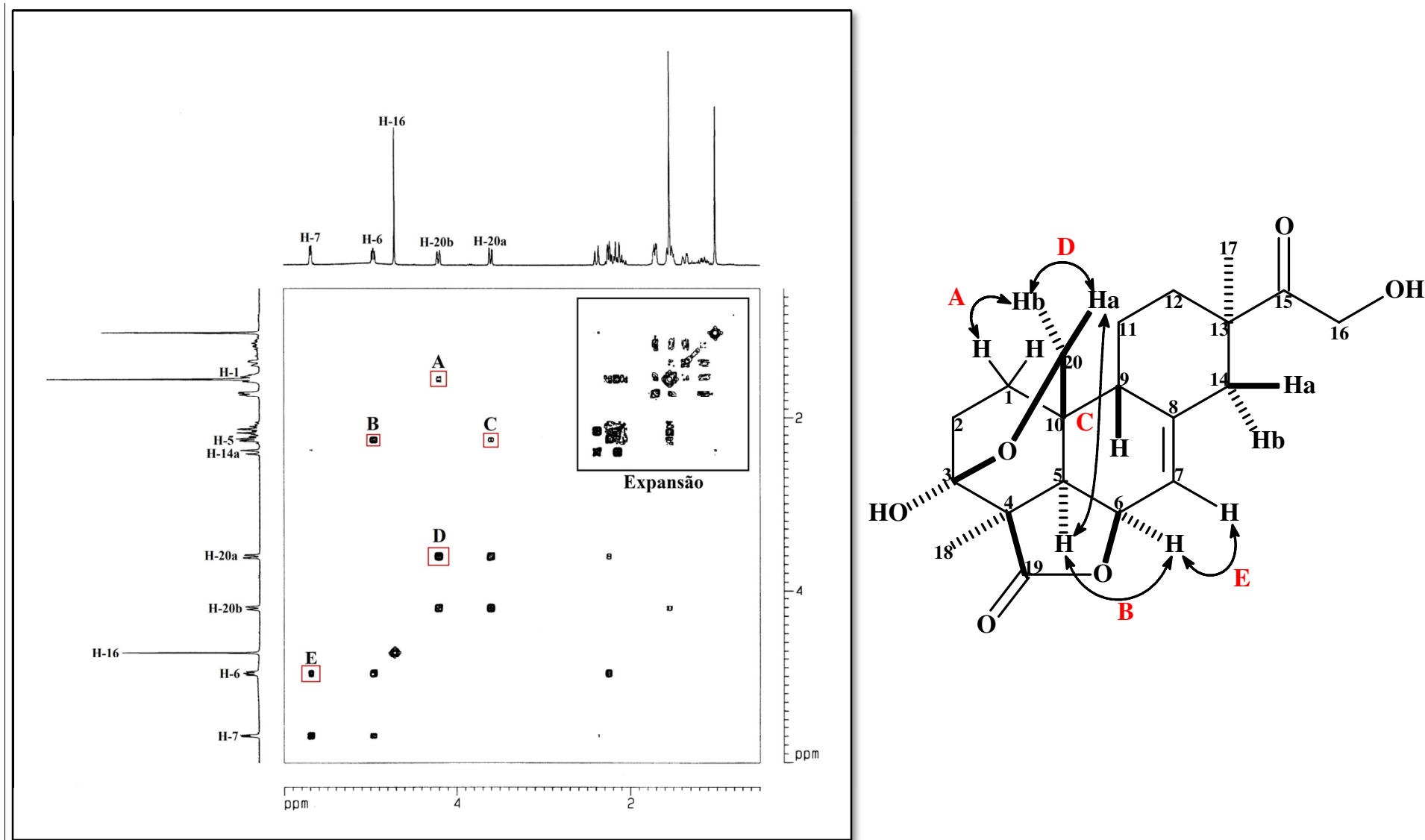


Figura 16 – Espectro de RMN-2D COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

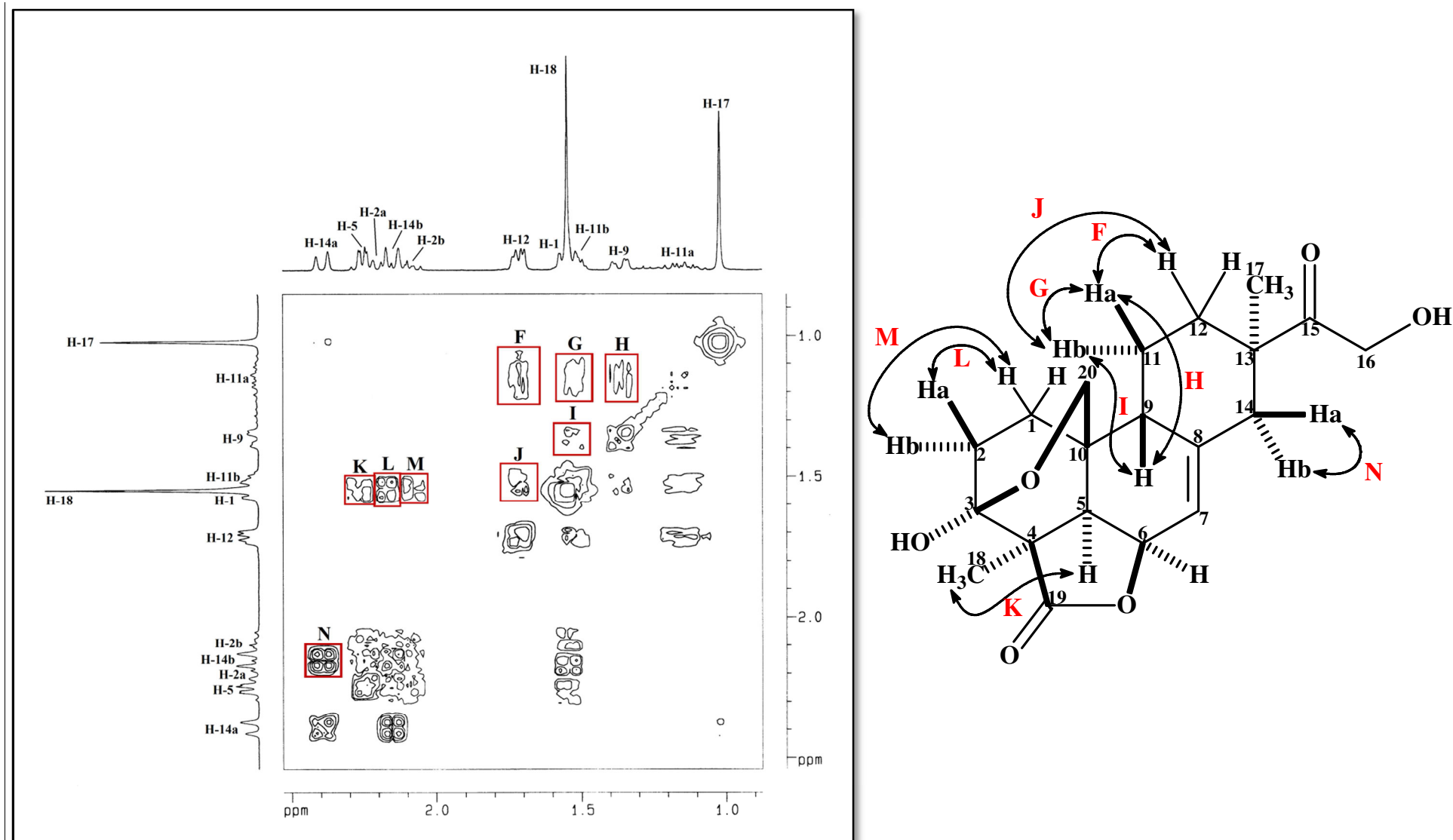


Figura 17 – Expansão do espectro de RMN-2D COSY  $^1\text{H}$  —  $^1\text{H}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

#### 4.2.5.2 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D HMQC $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT

A análise do espectro bidimensional heteronuclear HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) demonstra correlações  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , nas quais são observados os acoplamentos entre carbonos e hidrogênios que participam da mesma ligação química, ou seja, que estão diretamente ligados entre si. Além disso, este tipo de espectro 2-D é muito útil na identificação de prótons diasterotópicos na estrutura (SILVESTEIN *et al.*, 2000).

O espectro HMQC ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) de 1-HA-AE-PT (Figuras 18 e 19, Páginas 85 e 86) possibilitou a observação das seguintes correlações: dos hidrogênios metílicos em 1,02  $\delta$  (H-17) com o carbono em 19,09  $\delta$  (C-17); dos hidrogênios metílicos em 1,55  $\delta$  (H-18) com o carbono em 19,22  $\delta$  (C-18); dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em 1,14  $\delta$  e 1,57  $\delta$  (H-11a e H-11b, respectivamente) com o carbono em 24,46  $\delta$  (C-11); dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em 2,09  $\delta$  e 2,20  $\delta$  (H-2b e H-2a, respectivamente) com o carbono em 28,39  $\delta$  (C-2); dos hidrogênios metilênicos em 1,50  $\delta$  (H-1) com o carbono em 29,04  $\delta$  (C-1); dos hidrogênios metilênicos em 1,72  $\delta$  (H-12) com o carbono em 33,57  $\delta$  (C-12); do hidrogênio metínico em 1,36  $\delta$  (H-9) com o carbono em 42,69  $\delta$  (C-9); dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em 2,15  $\delta$  e 2,39  $\delta$  (H-14a e H-14b, respectivamente) com o carbono em 43,48  $\delta$  (C-14); do hidrogênio metínico em 2,20  $\delta$  (H-5) com o carbono em 44,57  $\delta$  (C-5); dos hidrogênios metilênicos em 4,72  $\delta$  (H-16) com o carbono em 64,79  $\delta$  (C-16); dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em 3,60  $\delta$  e 4,20  $\delta$  (H-20a e H-20b, respectivamente) com o carbono em 72,69  $\delta$  (C-20); do hidrogênio metínico em 4,97  $\delta$  (H-6) com o carbono em 72,78  $\delta$  (C-6) e do hidrogênio olefínico em 5,69  $\delta$  (H-7) com o carbono em 115,98  $\delta$  (C-7).

As correlações citadas acima são mostradas nas Figuras 18 (Página 85) e 19 (Página 86) e relacionadas na Tabela 8 (Página 96).

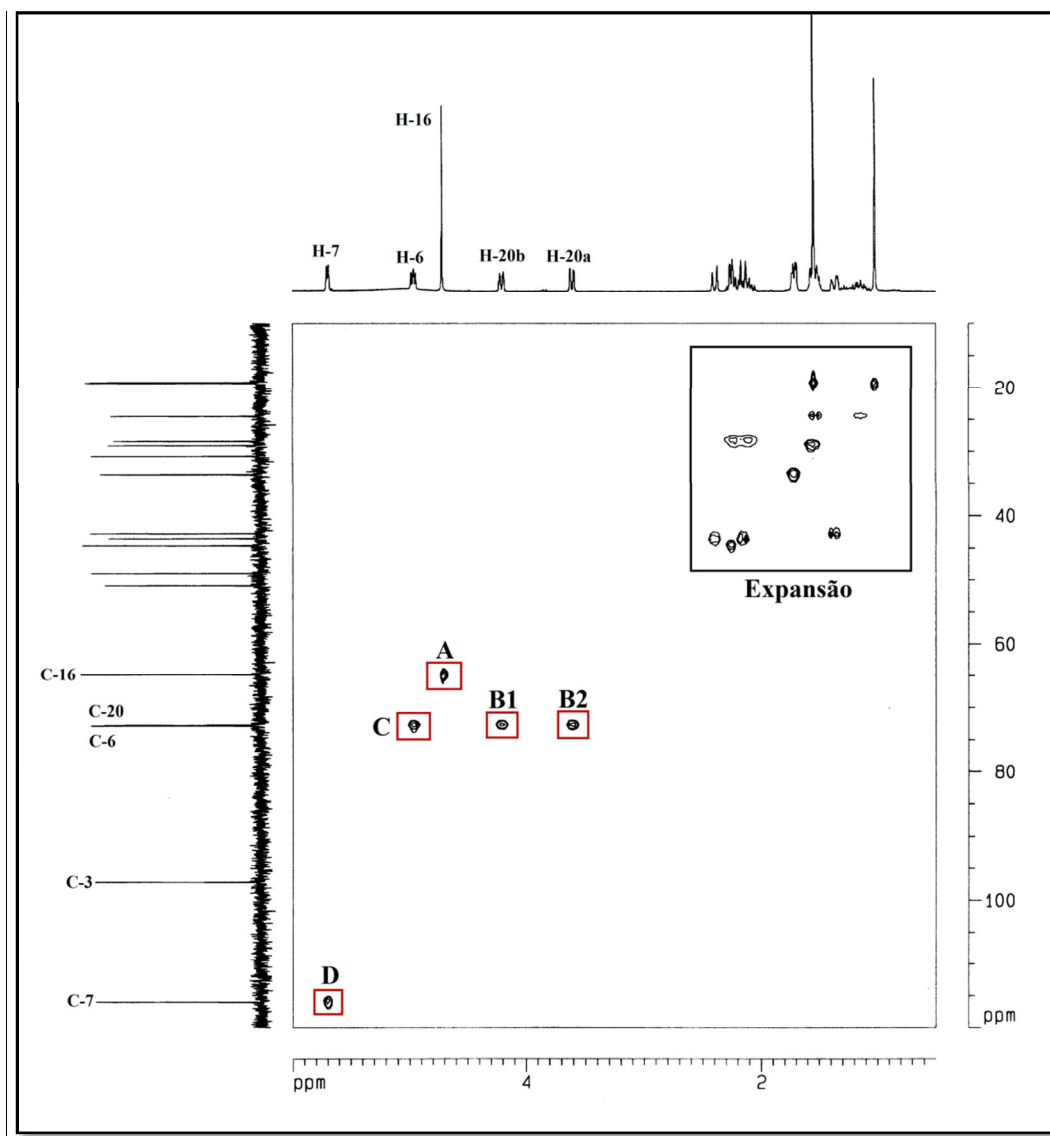
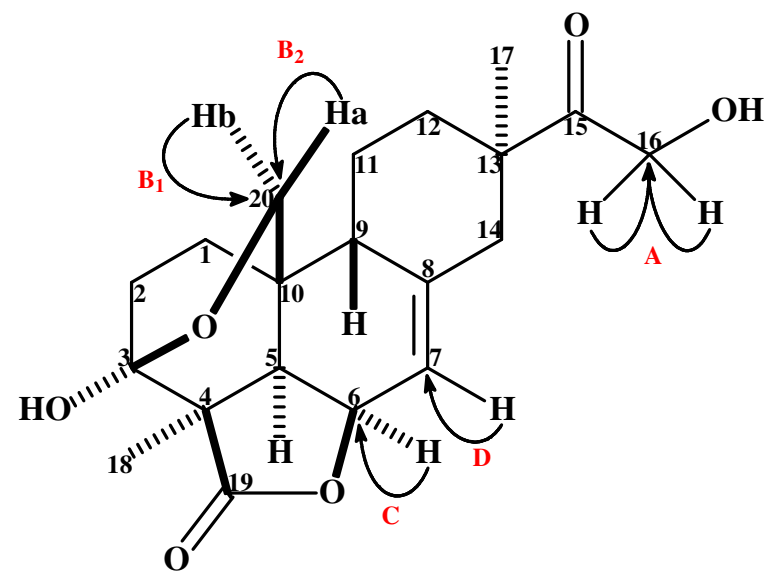


Figura 18 - Espectro de RMN-2D HMQC  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300\text{ MHz}$ ) e as respectivas correlações observadas.



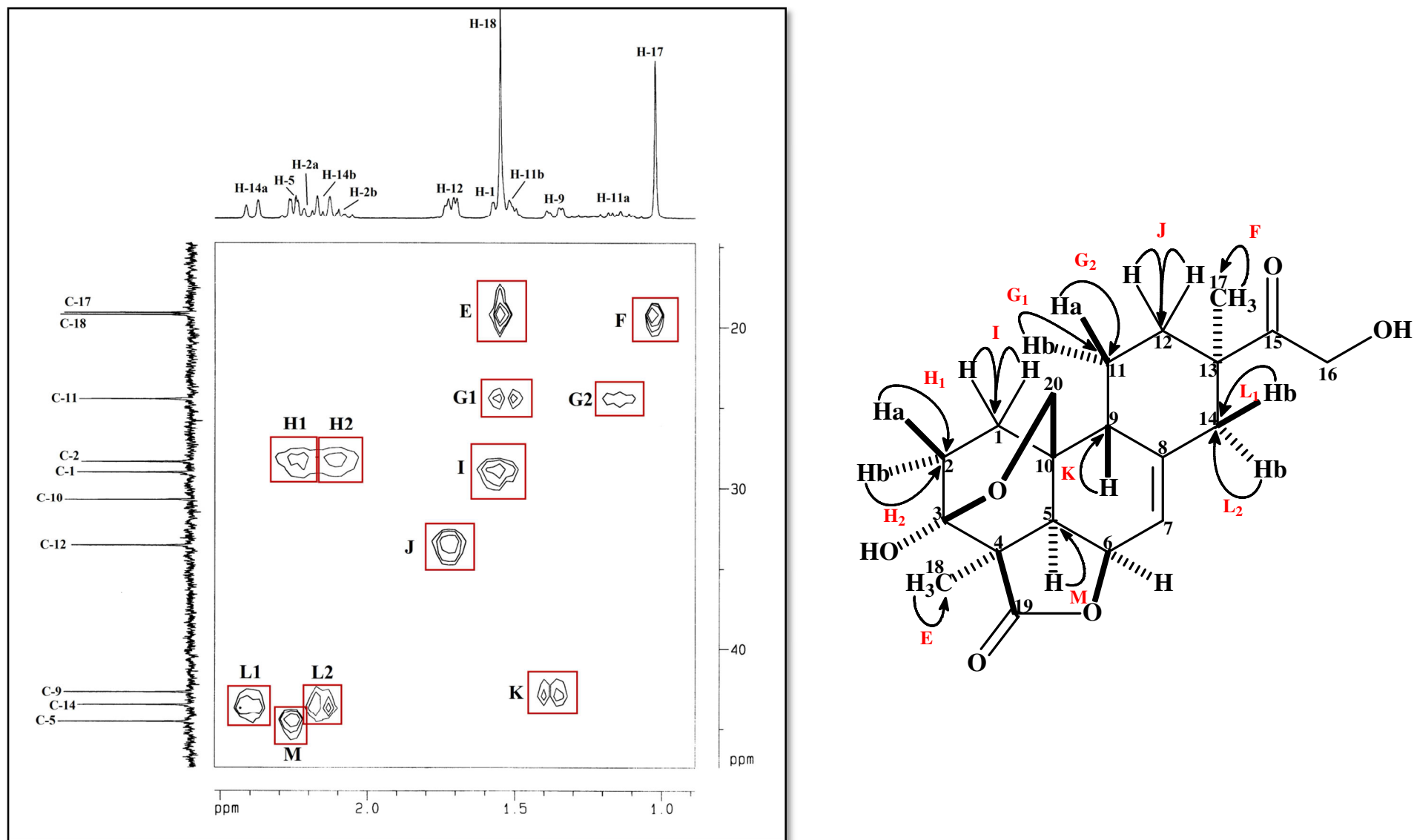


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN-2D HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.



### 6.2.5.3 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D HMBC $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ de 1-HA-AE-PT

A análise do espectro bidimensional heteronuclear HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) fornece os acoplamentos  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  a longa distância, isto é, a duas ou mais ligações. Nele, obtêm-se indiretamente as correlações carbono-carbono (embora não as correlações  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ ) e as correlações entre carbonos tetrassubstituídos e hidrogênios próximos (SILVESTEIN *et al.*, 2000).

Foram observadas no espectro HMBC as seguintes correlações: do hidrogênio H-6 com os carbonos C-7, ( $^2J$ ) e C-8, ( $^3J$ ); dos hidrogênios H-16 com o carbono C-15, ( $^2J$ ) (Figura 20, Página 88); dos hidrogênios H-17 com o carbono C-13, ( $^2J$ ) e com os carbonos C-12 e C-14, ( $^3J$ ); do hidrogênio diasterotópico H-11a com o carbono C-9, ( $^2J$ ); dos hidrogênios H-18 com o carbono C-4, ( $^2J$ ) e com o carbono C-5, ( $^3J$ ) (Figura 21, Página 89); dos hidrogênios H-12 com o carbono C-9, ( $^3J$ ); do hidrogênio diasterotópico H-14b com o carbono C-13, ( $^2J$ ) e com os carbonos C-9 e C-12, ( $^3J$ ); do hidrogênio diasterotópico H-14a com o carbono C-13, ( $^2J$ ) e com o carbono C-17, ( $^3J$ ); dos hidrogênios H-2a e H-2b com o carbono C-4, ( $^3J$ ); do hidrogênio H-5 com o carbono C-10, ( $^2J$ ) e com o carbono C-18, ( $^3J$ ) (Figura 22, Página 90); dos hidrogênios H-1 com o carbono C-20, ( $^3J$ ); do hidrogênio H-5 com o carbono C-6, ( $^2J$ ); dos hidrogênios diasterotópicos H-14a e H-14b com o carbono C-7, ( $^3J$ ); dos hidrogênios diasterotópicos H-2a e H-2b com o carbono C-3, ( $^2J$ ); dos hidrogênios H-18 com o carbono C-3, ( $^3J$ ) (Figura 23, Página 91); dos hidrogênios H-17 com o carbono C-15, ( $^3J$ ); dos hidrogênios diasterotópicos H-14a e H-14b com o carbono C-8, ( $^2J$ ); dos hidrogênios H-18 com o carbono C-19, ( $^3J$ ); do hidrogênio H-5 com o carbono C-19, ( $^3J$ ) (Figura 24, Página 92); do hidrogênio H-7 com os carbonos C-5 e C-9, ( $^3J$ ); do hidrogênio H-20a com carbono C-5 ( $^3J$ ); do hidrogênio H-6 com o carbono C-10, ( $^3J$ ) do hidrogênio H-20b com o carbono C-1, ( $^3J$ ) (Figura 25, Página 93). Todas as correlações observadas no espectro são mostradas nas figuras A, B, C, D e E e relacionadas na Tabela 8, Página 96.

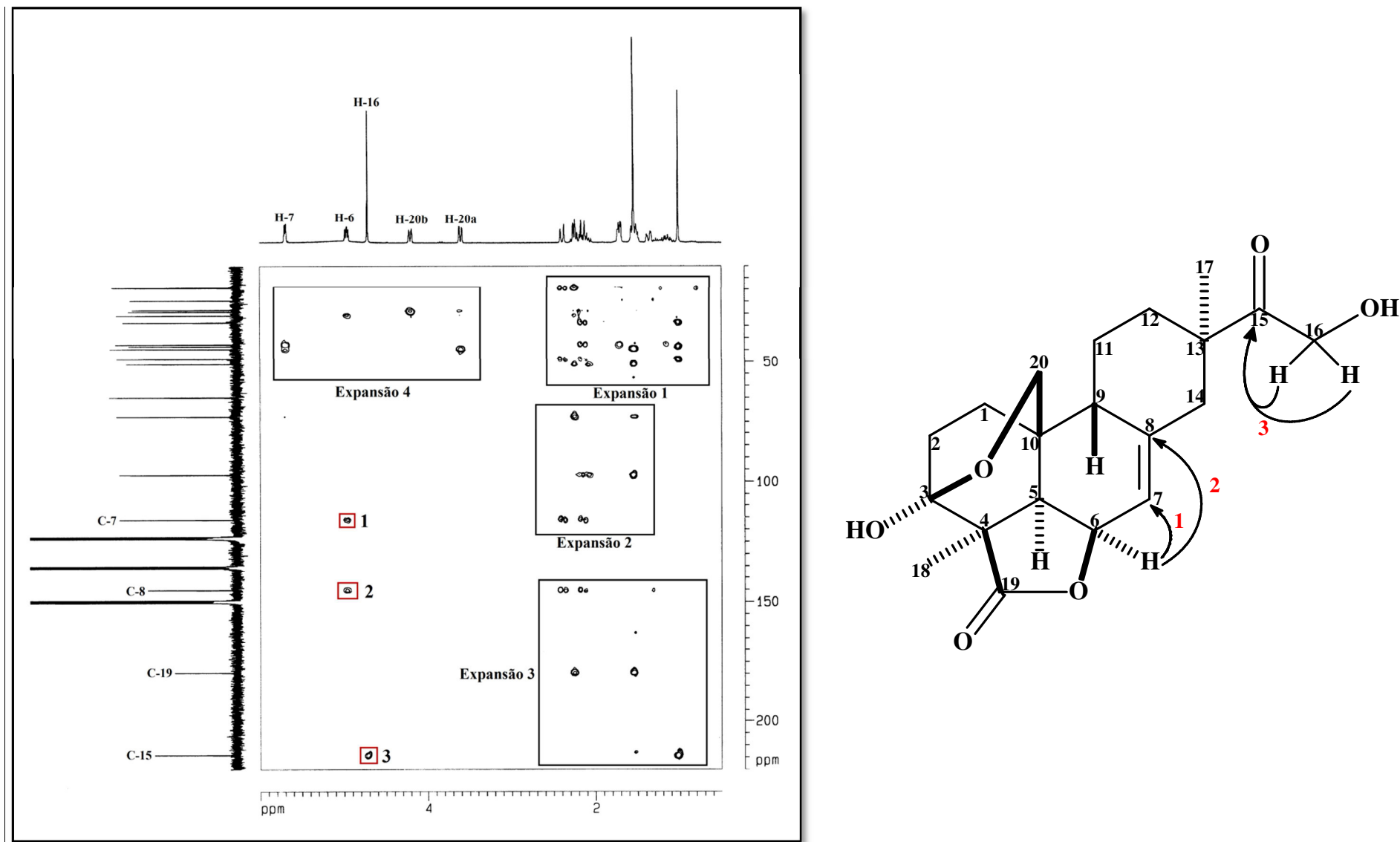


Figura 20 - Espectro de RMN-2D HMBC  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

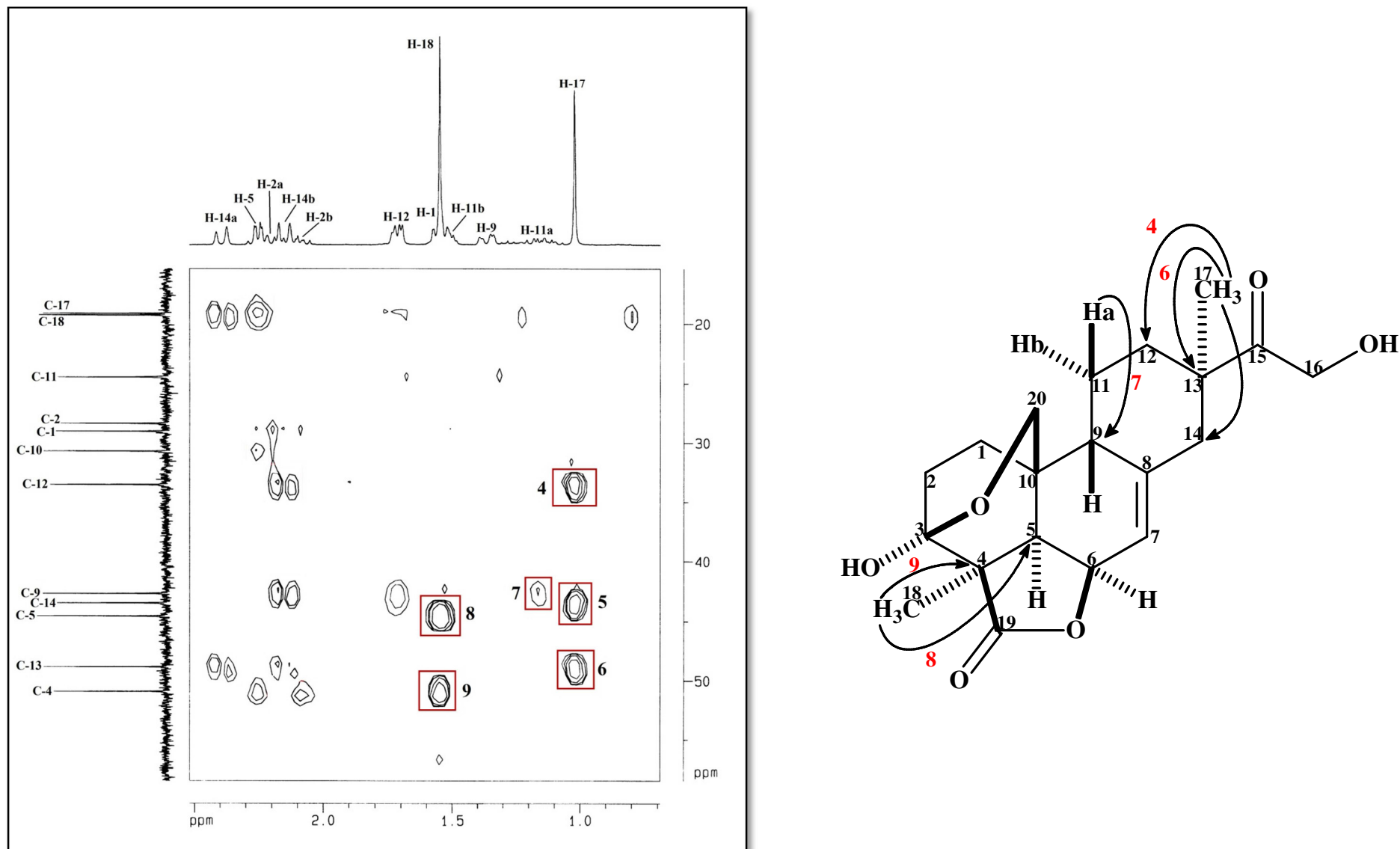


Figura 21 – Expansão 1(A) do espectro de RMN-2D HMBC  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

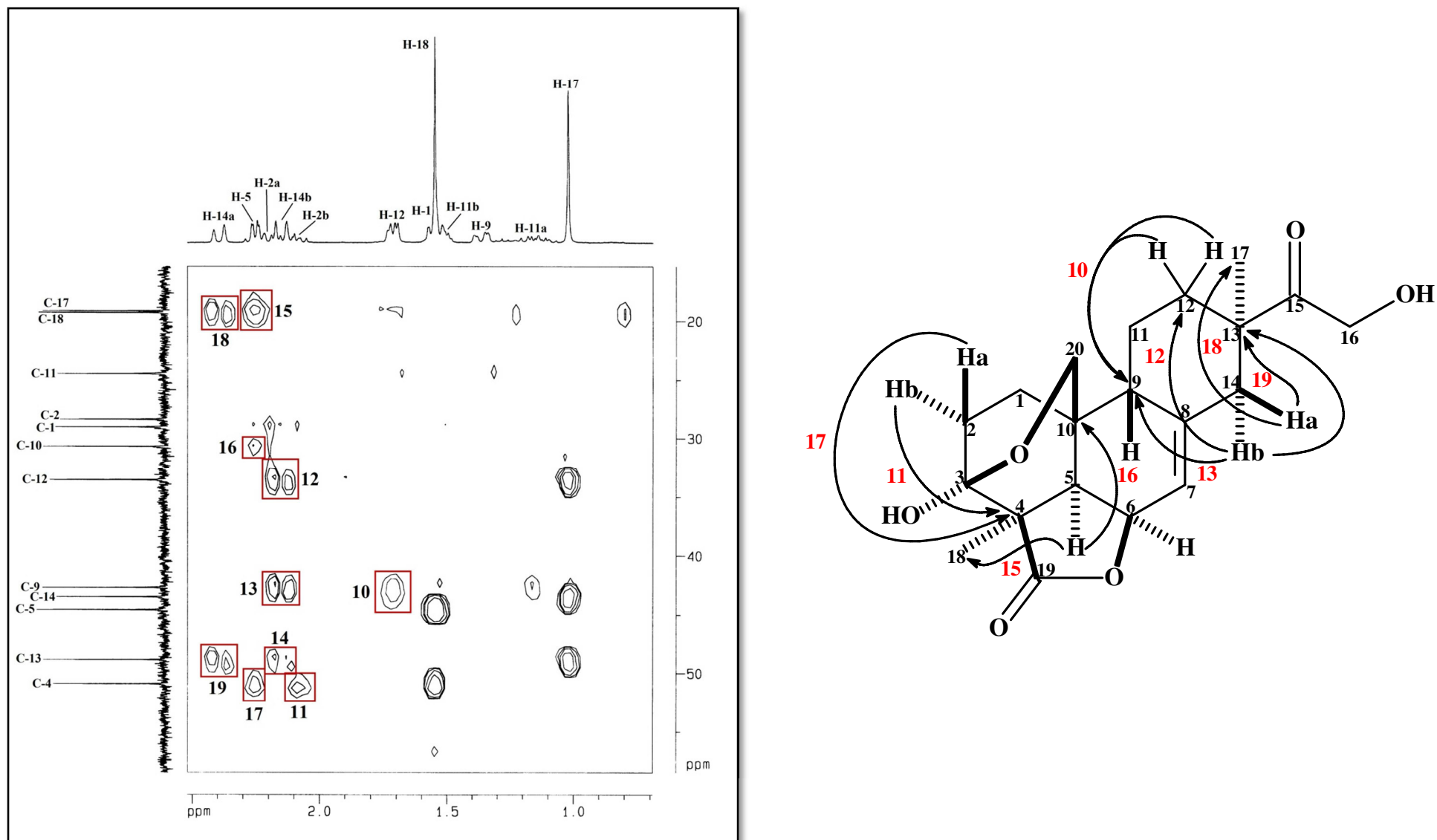


Figura 22 - Expansão 1(B) do espectro de RMN-2D HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

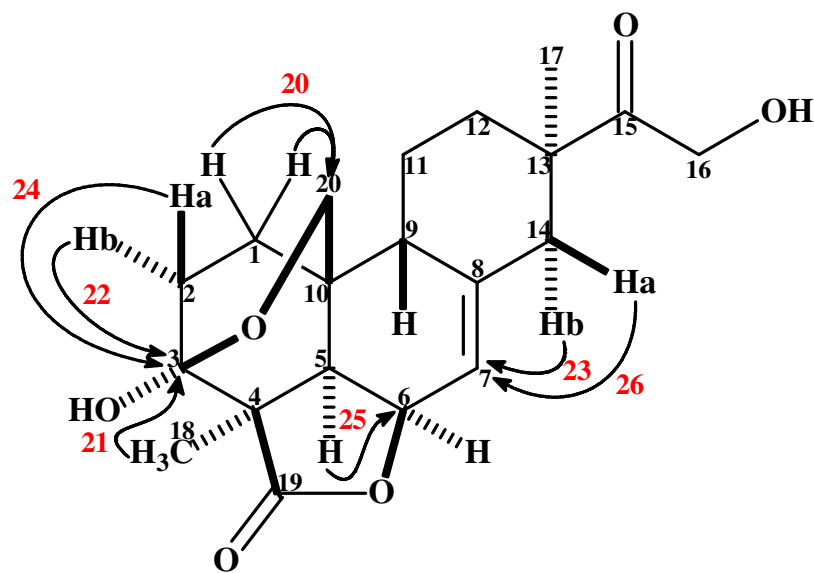
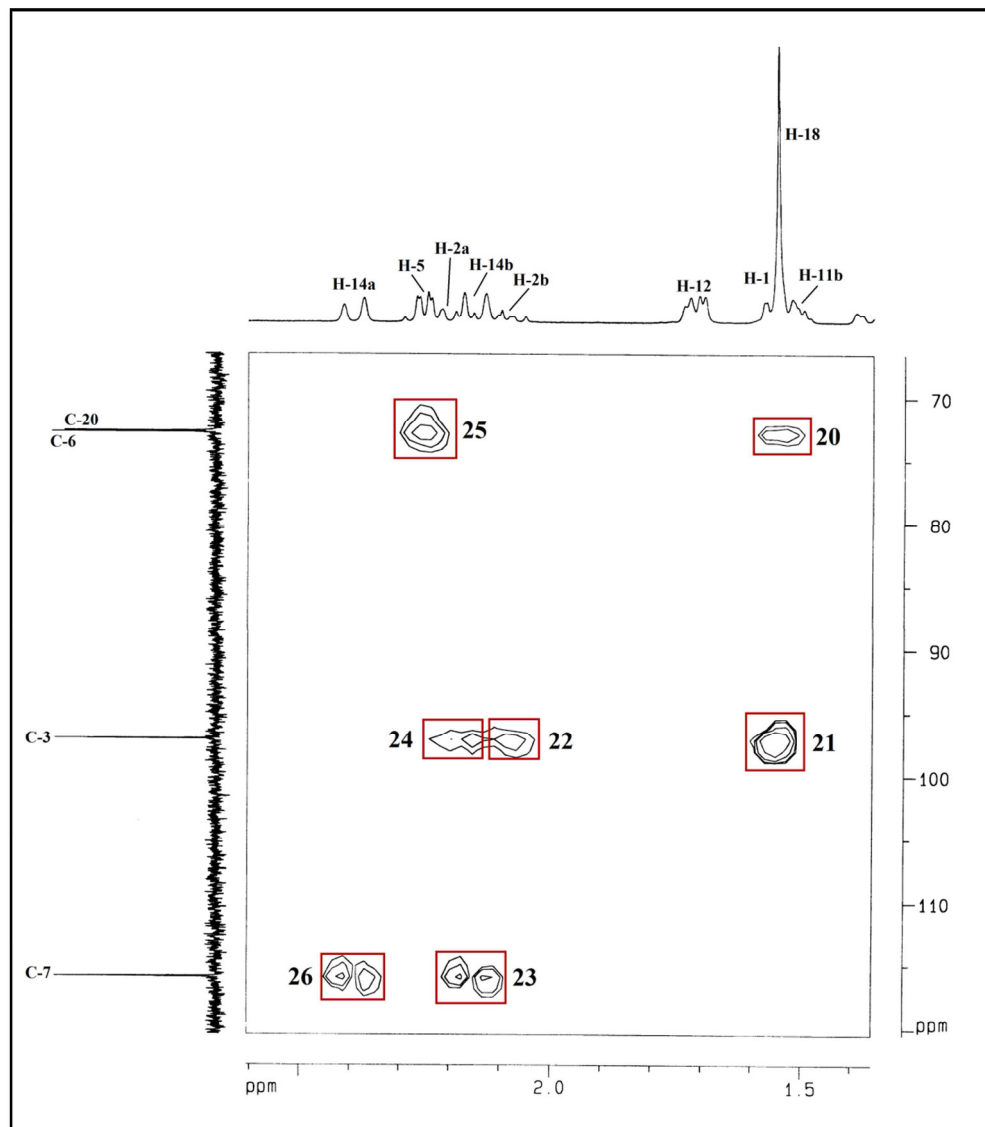


Figura 23 - Expansão 2 do espectro de RMN-2D HMBC  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300\text{ MHz}$ ) e as respectivas correlações observadas.

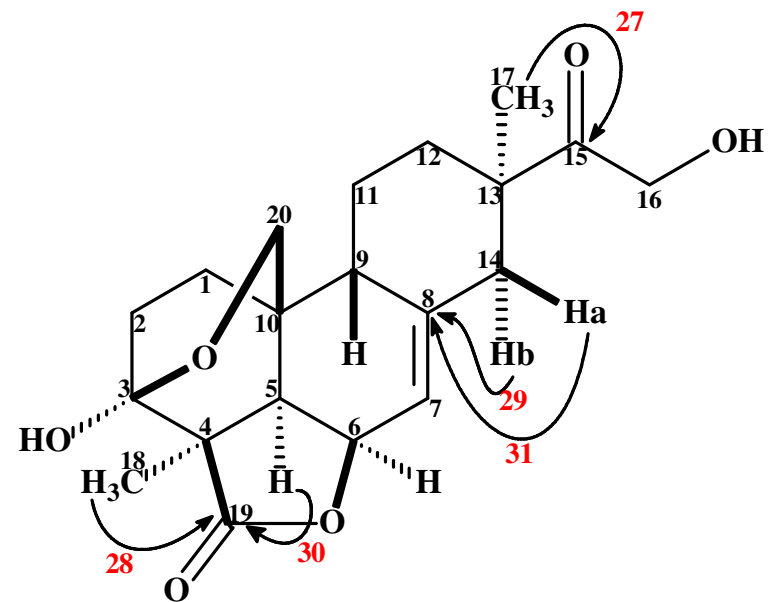
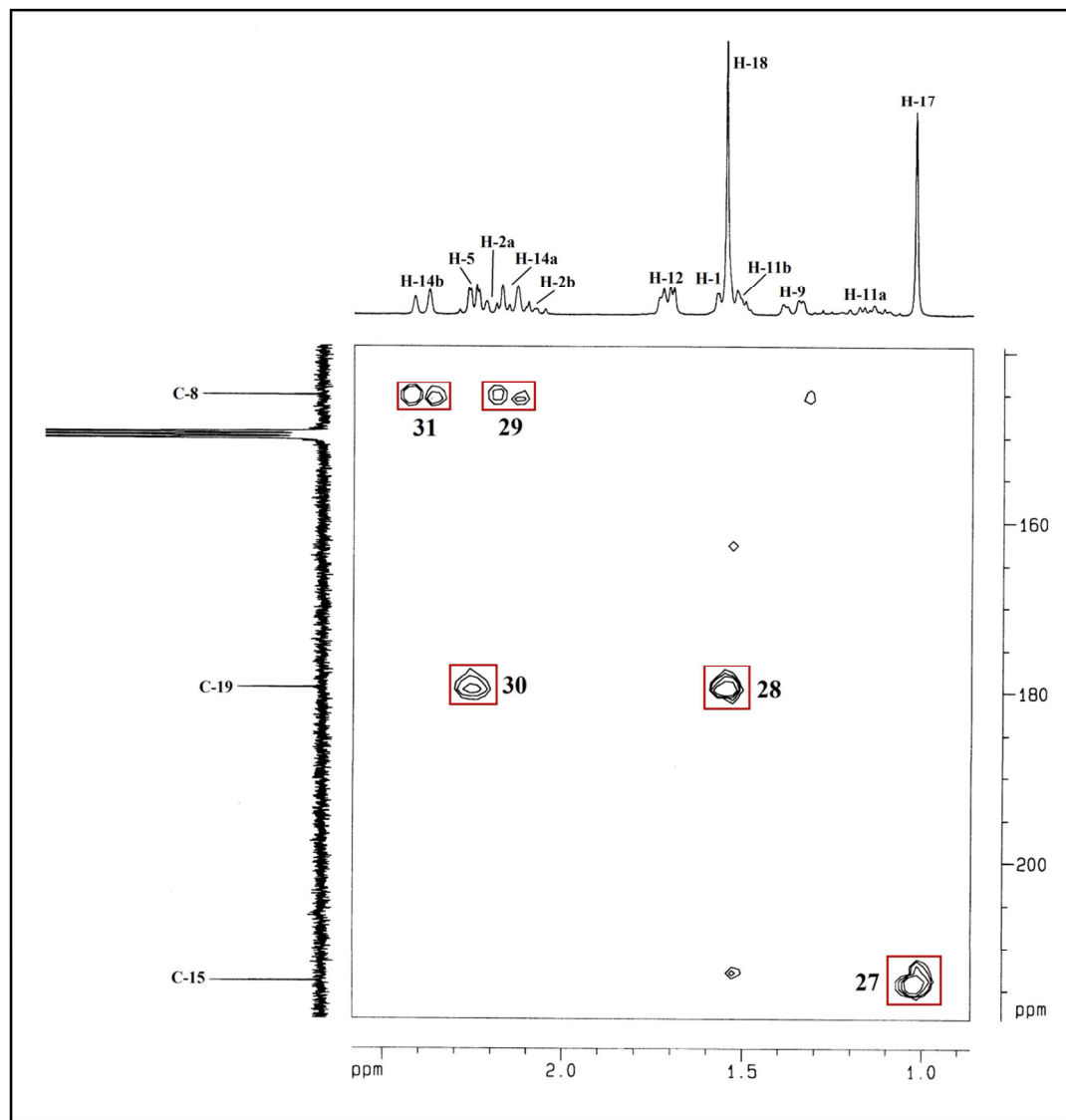


Figura 24 - Expansão 3 do espectro de RMN-2D HMBC  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300\text{ MHz}$ ) e as respectivas correlações observadas.

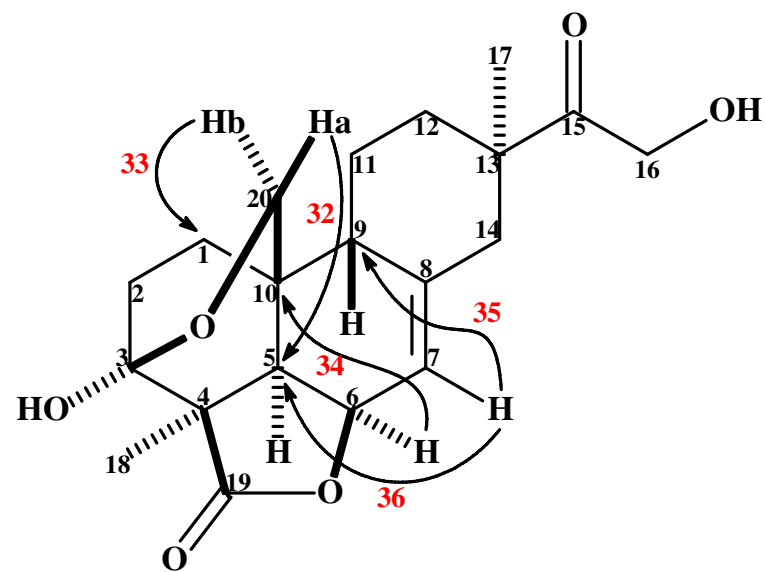
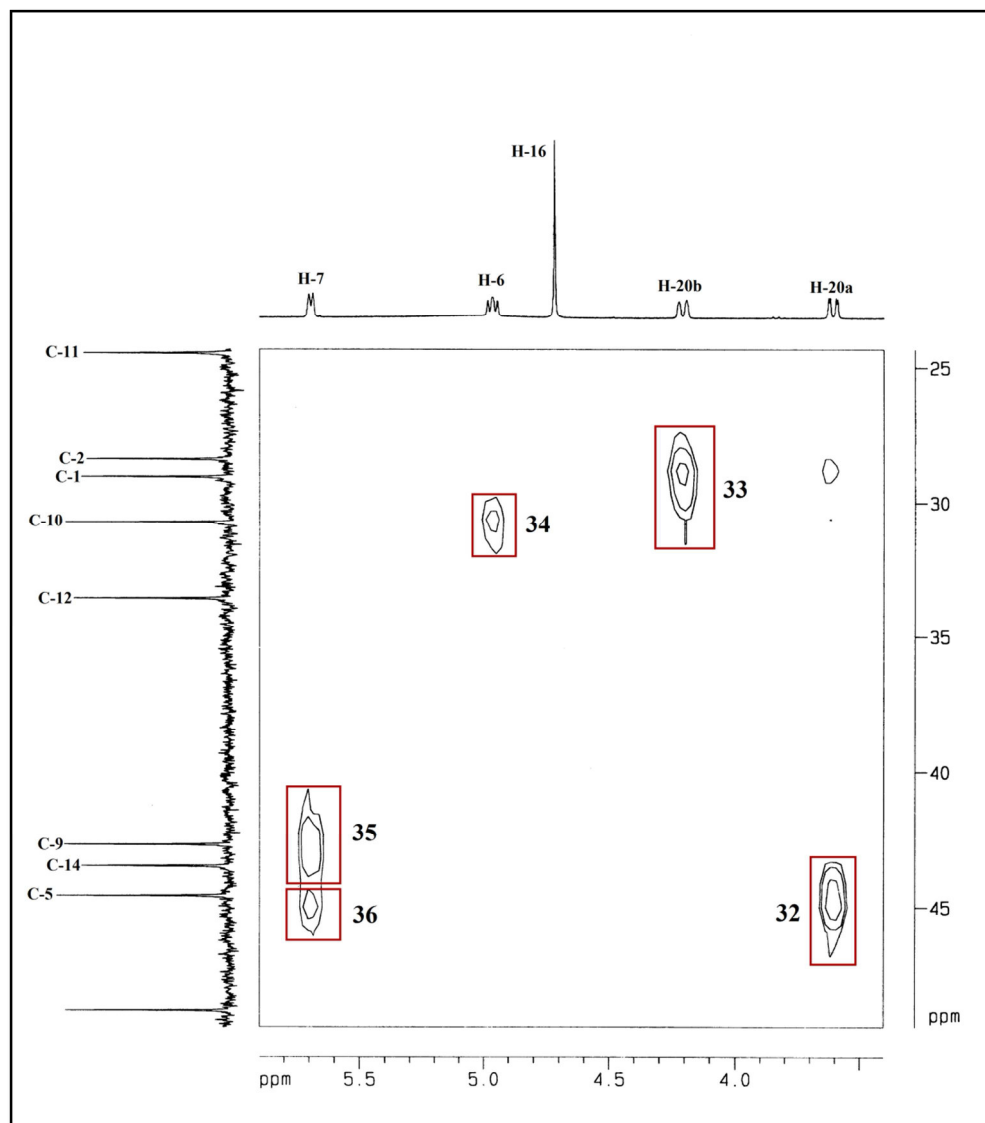


Figura 25 - Expansão 4 do espectro de RMN-2D HMBC  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

#### 6.2.5.4 Espectro de Ressonância Magnética Nuclear 2-D NOESY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de 1-AE-PT-HA

O espectro NOESY (Nuclear Overhauser Effect Espectroscopy) fornece, como principal informação, as interações espaciais homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . A análise destas interações fornece dados importantes quanto à configuração dos centros quirais existentes na molécula.

O experimento de RMN 2-D NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  foi realizado com o propósito de se obterem algumas informações importantes sobre a estereoquímica da molécula.

Para a análise deste espectro (Figuras 26, Página 95) partiu-se do hidrogênio em 4,97  $\delta$ , sinal correspondente ao hidrogênio metínico H-6. Este mostrou uma correlação espacial com H-5, centrado em 2,16  $\delta$ , indicando a existência de uma relação *cis* entre os mesmos. Outro dado importante observado no espectro foi a não existência de interação entre H-5 e H-9 (1,36  $\delta$ ), indicando uma relação *trans* entre os mesmos. H-9, por sua vez, mostrou correlação com o hidrogênio metilênico diasterotópico H-20a, em 3,60  $\delta$ . H-5 mostrou, ainda, uma correlação espacial com os hidrogênios metílicos em 1,55  $\delta$  (H-18), demonstrando uma relação *cis* entre a metila 18 e o hidrogênio H-5. Outra correlação importante observada foi entre os hidrogênios metílicos em 1,02  $\delta$  e um dos hidrogênios diasterotópicos em 1,19  $\delta$  (H-14b), indicando uma relação *cis* entre a metila 17 e o hidrogênio H-14b.

Estas observações permitiram a determinação das posições relativas entre os grupos ligados aos centros quirais da molécula. Estas e outras correlações NOESY importantes observadas são mostradas na Figura 26, Página 95.



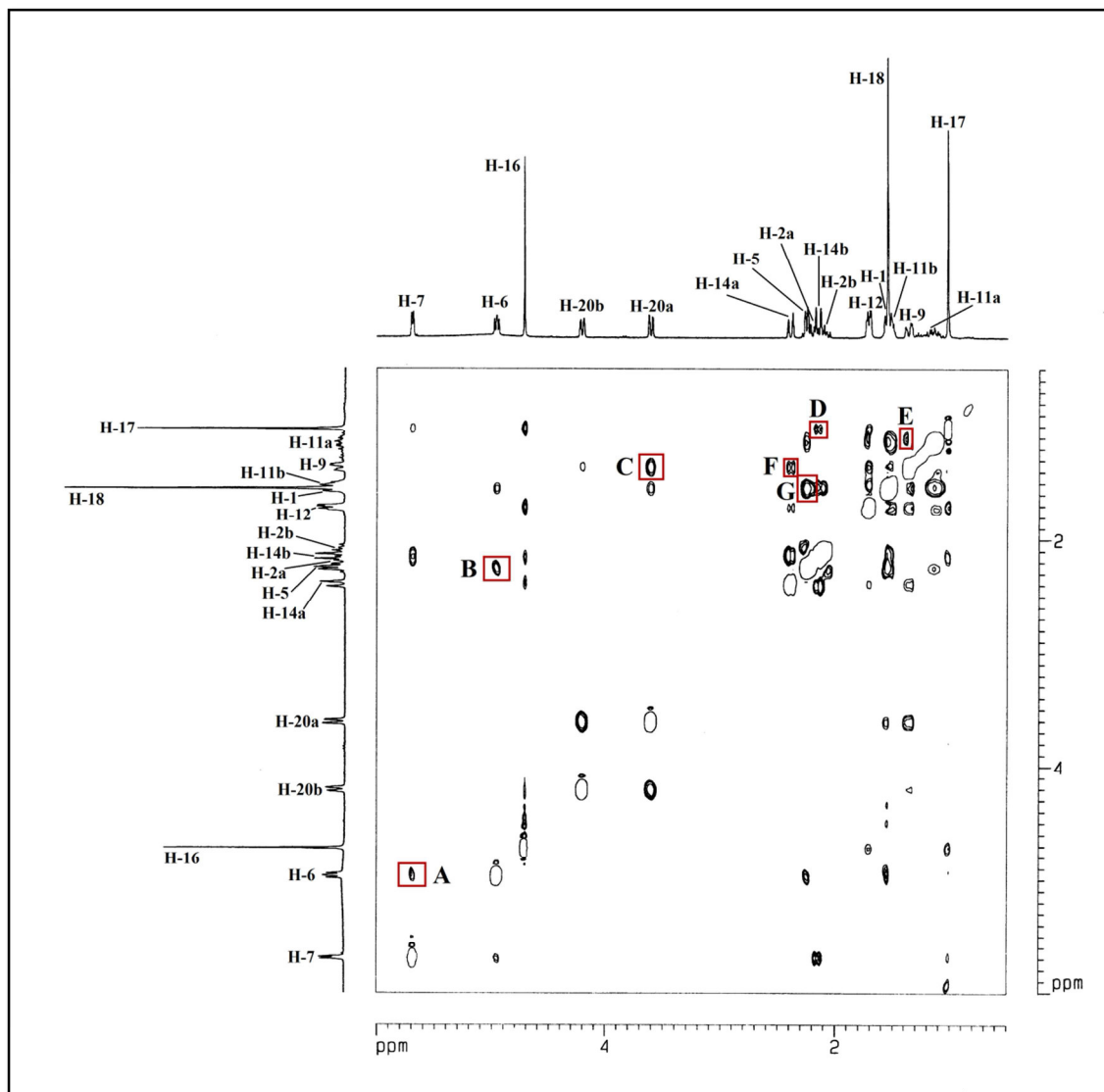


Figura 26 - Espectro de RMN-2D NOESY  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  de 1-HA-AE-PT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) e as respectivas correlações observadas.

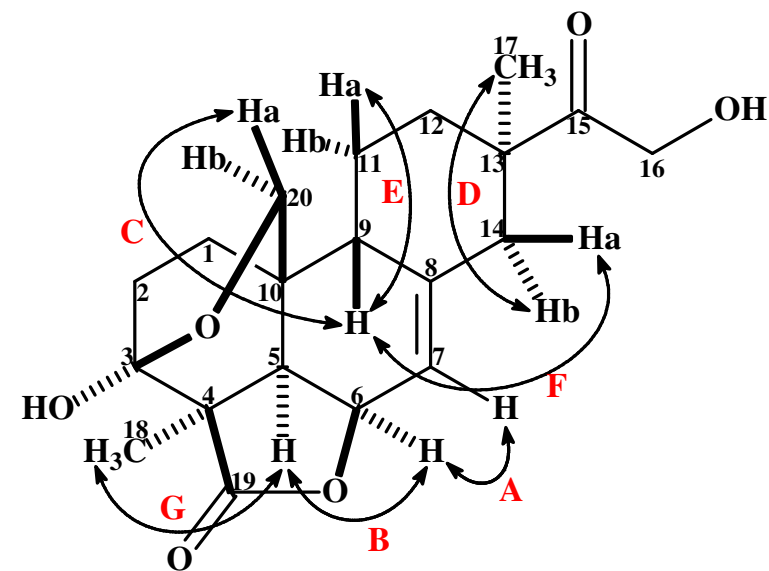


Tabela 8 - Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de 1-AE-PT-HA ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300/75 MHz)\*

Atribuições de H e C				HMBC	
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	Tipo de C	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	29,04	-H <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -C-	1,50 m	—	H20a, H20b
2	28,39	-O-C-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -	2,09 d ( $^3J_{\text{H2b}, \text{H2a}} = 8,0$ ) 2,20 d ( $^3J_{\text{H2a}, \text{H2b}} = 8,0$ )	—	—
3	97,11	HO-C-O	—	H2a, H2b	H18
4	50,91	H <sub>3</sub> C-C-C=O	—	H5, H18	H2a, H2b
5	44,57	-C-CH-CH--	2,25 m ( $^3J_{\text{H5}, \text{H6}} = 5,8$ )	—	H7, H18, H-20a
6	72,78	-O-CH-CH=	4,97 dd ( $^3J_{\text{H6}, \text{H7}} = 4,8$ ) ( $^3J_{\text{H6}, \text{H5}} = 5,8$ )	H5	—
7	115,98	-HC-CH=C-	5,69 d ( $^3J_{\text{H7}, \text{H6}} = 4,8$ )	H6	H14a, H14b
8	145,15	-HC-C-CH <sub>2</sub> -	—	H14a, H14b	H6
9	42,69	-H <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -	1,36 dd ( $^3J_{\text{H9}, \text{H11a}} = 12,7$ ) ( $^3J_{\text{H9}, \text{H11b}} = 2,9$ )	H11a	H7, H12, H14b
10	30,71	-H <sub>2</sub> C-C-CH-	—	H5	H6
11	24,46	-HC-CH <sub>2</sub> -C-	1,14 m ( $^3J_{\text{H11a}, \text{H12}} = 12,3$ ) 1,57 m ( $^3J_{\text{H11b}, \text{H12}} = 12,3$ )	—	—
12	33,57	-H <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -C-	1,72 dd ( $^3J_{\text{H12}, \text{H11a}} = 12,3$ ) ( $^3J_{\text{H12}, \text{H11b}} = 12,3$ )	—	H14b, H17
13	48,86	-H <sub>2</sub> C-C-C=O	—	H14a, H14b, H17	—
14	43,48	-C-CH <sub>2</sub> -C=	2,15 d ( $^2J_{\text{H14b}, \text{H14a}} = 12,3$ ) 2,39 d ( $^2J_{\text{H14a}, \text{H14b}} = 12,3$ )	—	H17
15	214,02	-C=O	—	H16	H17
16	64,79	O=C-CH <sub>2</sub> -OH	4,72 s	—	—
17	19,09	H <sub>3</sub> C-C-	1,02 s	—	H12, H14a
18	19,22	H <sub>3</sub> C-C-	1,55 s	—	H5
19	179,53	-C-COO-	—	—	H5, H18
20	72,69	-O-CH <sub>2</sub> -C	3,60 dd ( $^2J_{\text{H20a}, \text{H20b}} = 8,9$ ) 4,20 d ( $^2J_{\text{H20b}, \text{H20a}} = 8,9$ )	—	H1

\*As atribuições foram obtidas por experimentos COSY, NOESY, DEPT 135°, HMQC e HMBC.

Com os dados obtidos na análise dos espectros e comparação dos mesmos com a literatura (MUSSINI *et al.*, 1973), foi possível concluir que a substância em que questão se tratava do diterpenóide com esqueleto pimarano conhecido como annonalida (Tabela 9). A sua presença nas raízes de *H. ampla* já havia sido relatada por Graebner (2000).

Tabela 9 - Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) para o diterpeno annonalida isolado (1-AE-PT-HA)\* e da literatura (MUSSINI *et al.*, 1973)\*\*.

Nº do carbono	Tipo de C	Isolado	Literatura
1	CH <sub>2</sub>	29,0	28,6
2	CH <sub>2</sub>	28,4	28,0
3	C	97,1	96,7
4	C	50,9	50,5
5	CH	44,6	44,1
6	CH	72,8	72,4
7	CH	116,0	115,7
8	C	145,2	144,7
9	CH	42,7	42,3
10	C	30,7	30,3
11	CH <sub>2</sub>	24,5	24,0
12	CH <sub>2</sub>	33,6	33,1
13	C	48,9	48,4
14	CH <sub>2</sub>	43,5	43,1
15	C	214,0	213,6
16	CH <sub>2</sub>	64,8	64,4
17	CH <sub>3</sub>	19,1	18,7
18	CH <sub>3</sub>	19,2	18,8
19	C	179,5	179,1
20	CH <sub>2</sub>	72,7	72,3

\* Em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N a 75 MHz.

\*\* Em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N a 25 MHz.

### 6.3 Isolamento e determinação estrutural de 1-HA-AE-FT

A substância 1-HA-AE-FT apresentou-se como um sólido cristalino incolor solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão na faixa de 178-180 °C. Através de análise em CCD, a substância 1-HA-AE-FT apresentou uma única macha de coloração laranja quando revelada com vanilina. Esta substância foi isolada da fração diclorometânica do extrato acetoetílico (HA-AE-FT/DM) das raízes de *H. ampla* (Fluxograma 4, Página 61).

#### 6.3.1 Espectrometria de Massas de 1-HA-AE-FT

O espectro de massas (EI/70 eV) de 1-HA-AE-FT mostrou pico base em  $m/z = 68$  e pico íon molecular intenso em  $m/z = 426$ , sugerindo a fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$  (Figura 27, Página 99).

#### 6.3.2 Espectrometria no Infravermelho de 1-HA-AE-FT

No espectro de absorção na região do infravermelho ( $KBr/cm^{-1}$ ) de 1-HA-AE-FT (Figura 28, Página 100) foram observadas algumas absorções importantes como: 2942 e 2870  $cm^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação C-H de alcanos; 1640  $cm^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação C=C; 3070  $cm^{-1}$ , referente à deformação axial da ligação  $C_{sp^2}-H$ ; 1381 e 1456  $cm^{-1}$  referente às deformações angulares simétricas e assimétricas de grupamentos metila, respectivamente; 3408  $cm^{-1}$  referente à deformação axial da ligação O-H; e 1039  $cm^{-1}$ , referente à deformação axial da ligação C-O.

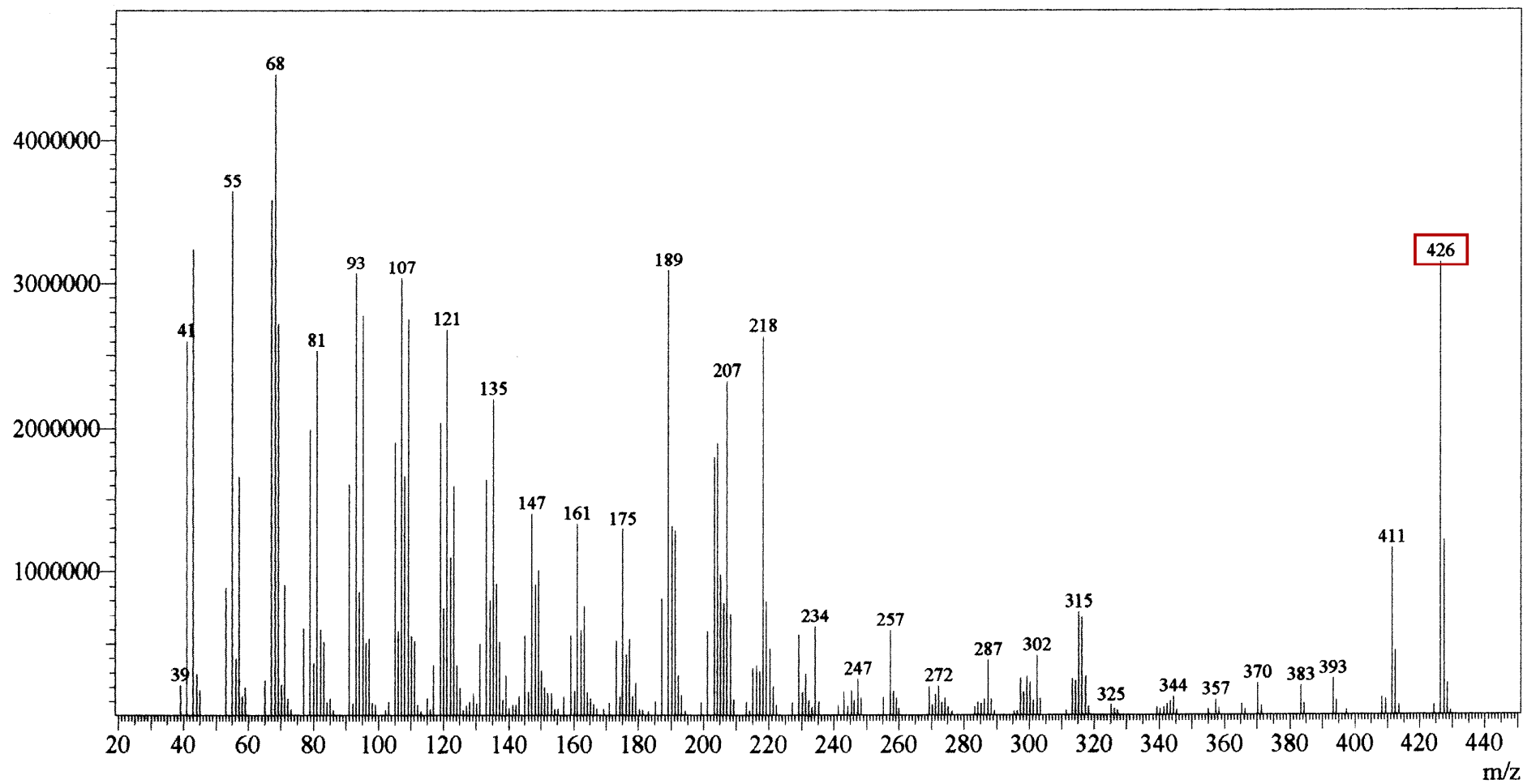


Figura 27 - Espectro de massas de 1-HA-AE-FT (IE/70 eV). (M) = 426 D.

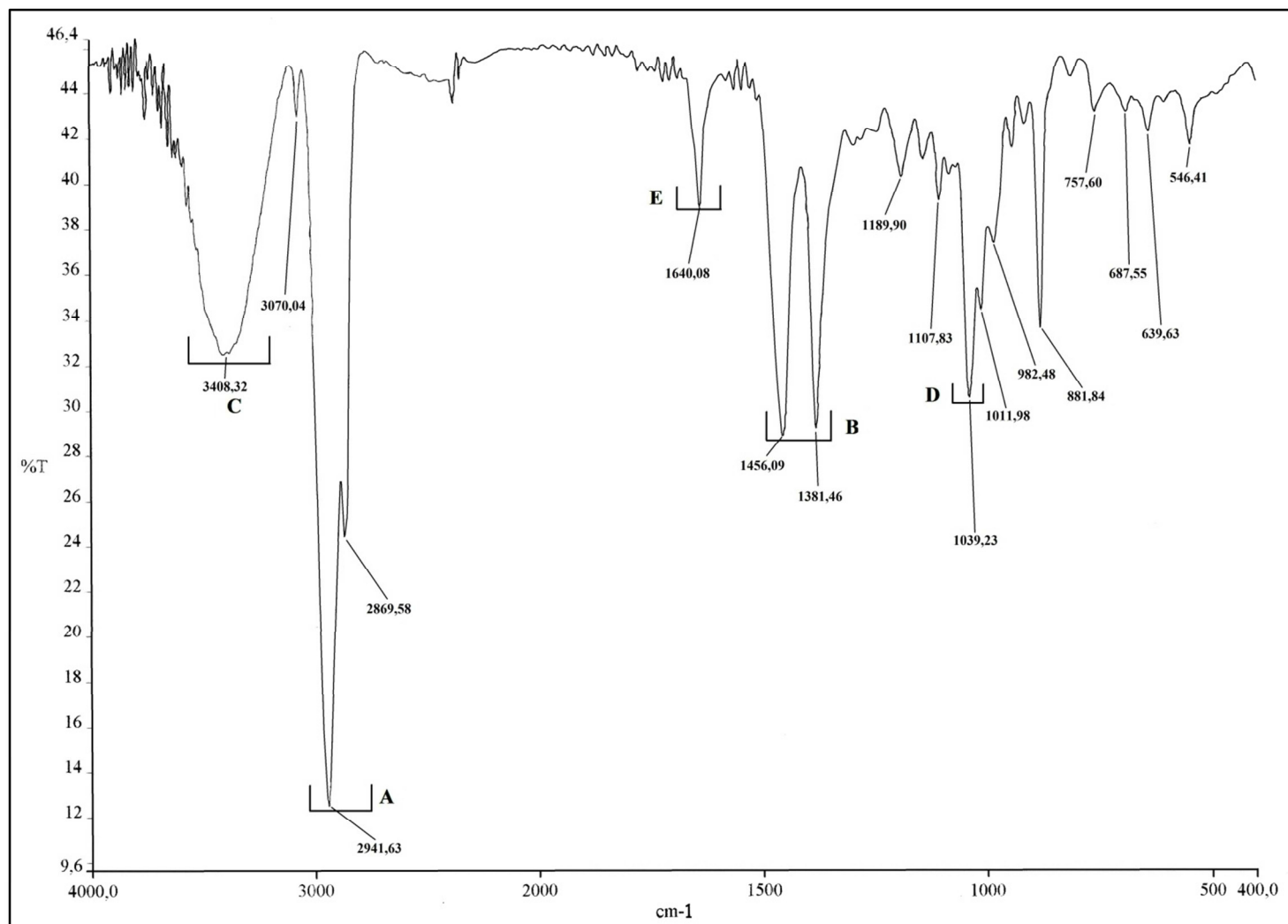


Figura 28 - Espectro de absorção na região do infravermelho de 1-HA-AE-FT (KBr/cm<sup>-1</sup>). A. Deformação axial de C-H, 2941 e 2869 cm<sup>-1</sup>. B. Deformação angular simétrica e assimétrica de -CH<sub>3</sub>, 1381 e 1456 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Deformação axial de O-H, 3408 cm<sup>-1</sup>. D. Deformação axial de C-O, 1039 cm<sup>-1</sup>. E. Deformação axial de C=C, 1640 cm<sup>-1</sup>.

### 6.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 1-HA-AE-FT

No espectro de RMH  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/500\text{ MHz}$ ) de 1-HA-AE-FT (Figuras 29 e 30, Páginas 102 e 103, respectivamente), foram observados sinais correspondentes a sete grupos metilas em 1,70  $\delta$ , 1,05  $\delta$ , 0,99  $\delta$ , 0,97  $\delta$ , 0,85  $\delta$ , 0,81  $\delta$  e 0,78  $\delta$ , todos os sinais se apresentando como singletos. Também foram observados sinais referentes a dois hidrogênios olefínicos em 4,71  $\delta$  (sl, 1H) e 4,59  $\delta$  (sl, 1H), característicos dos hidrogênios da ligação dupla terminal do triterpeno Lupeol, (H-29a e H-29b). Esses sinais, juntamente com os sinais observados em 3,21  $\delta$  (dd,  $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2''} = 11,4\text{ Hz}$  e  $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2'} = 5,0\text{ Hz}$ , 1H, H-3), 2,40  $\delta$  (td, 1H, H-19) e entre 0,60-1,70  $\delta$  referentes a hidrogênios metínicos e metilênicos, se equiparam aos sinais gerados pelo esqueleto lupano do Lupeol (PINHEIRO *et al.*, 2004).

### 6.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 1-HA-AE-FT

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CDCl}_3/125\text{ MHz}$ ) de 1-HA-AE-FT (Figuras 31 e 32, Páginas 104 e 105, respectivamente) apresentou trinta sinais espectrais referentes a ressonâncias de átomos de carbono. Os sinais em 151,4  $\delta$  e 109,73  $\delta$  caracterizam a ligação dupla exocíclica entre os carbonos C-20 e C-29 do lupeol, respectivamente, e ainda observou-se o sinal em 79,4  $\delta$  atribuído ao carbono carbinólico C-3. Os sinais referentes aos carbonos metílicos ressonaram em 28,4  $\delta$  (C-23), 15,8  $\delta$  (C-24), 16,5  $\delta$  (C-25), 16,4  $\delta$  (C-26), 15,0  $\delta$  (C-27), 18,4  $\delta$  (C-28) e 19,7  $\delta$  (C-30). A análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° de 1-HA-AE-FT (Figura 33, Página 106), revelou a presença de treze sinais com amplitude positiva e onze sinais de carbonos metilênicos com amplitude negativa. Dos treze sinais com amplitude positiva, sete são referentes a carbonos metílicos e os seis sinais restantes referentes a carbonos metínicos. A comparação do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° com o espectro totalmente desacoplado, indica a presença de seis carbonos não hydrogenados na estrutura (Tabela 10, Página 107).

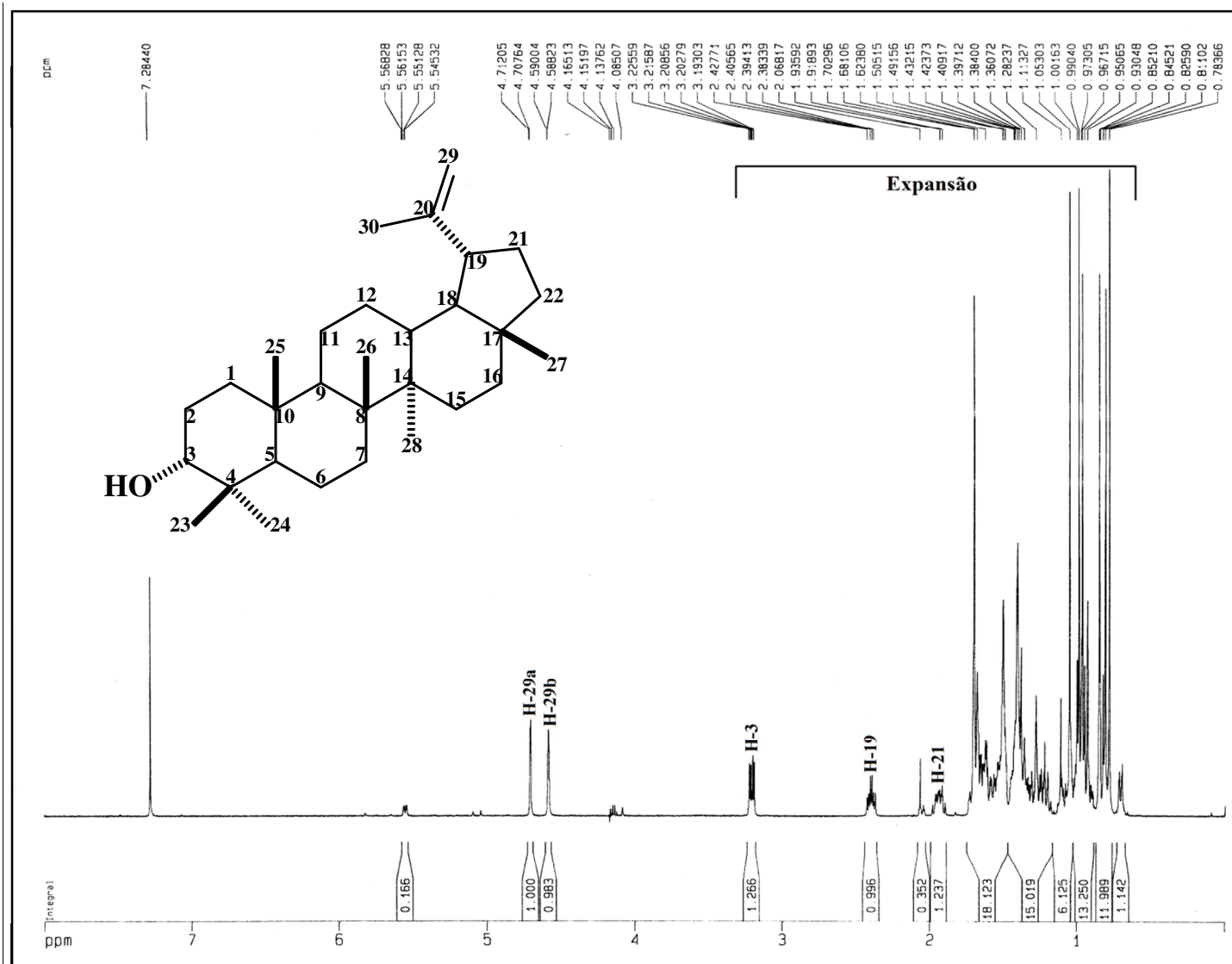


Figura 29 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 1-HA-AE-FT (CDCl<sub>3</sub>/500 MHz).



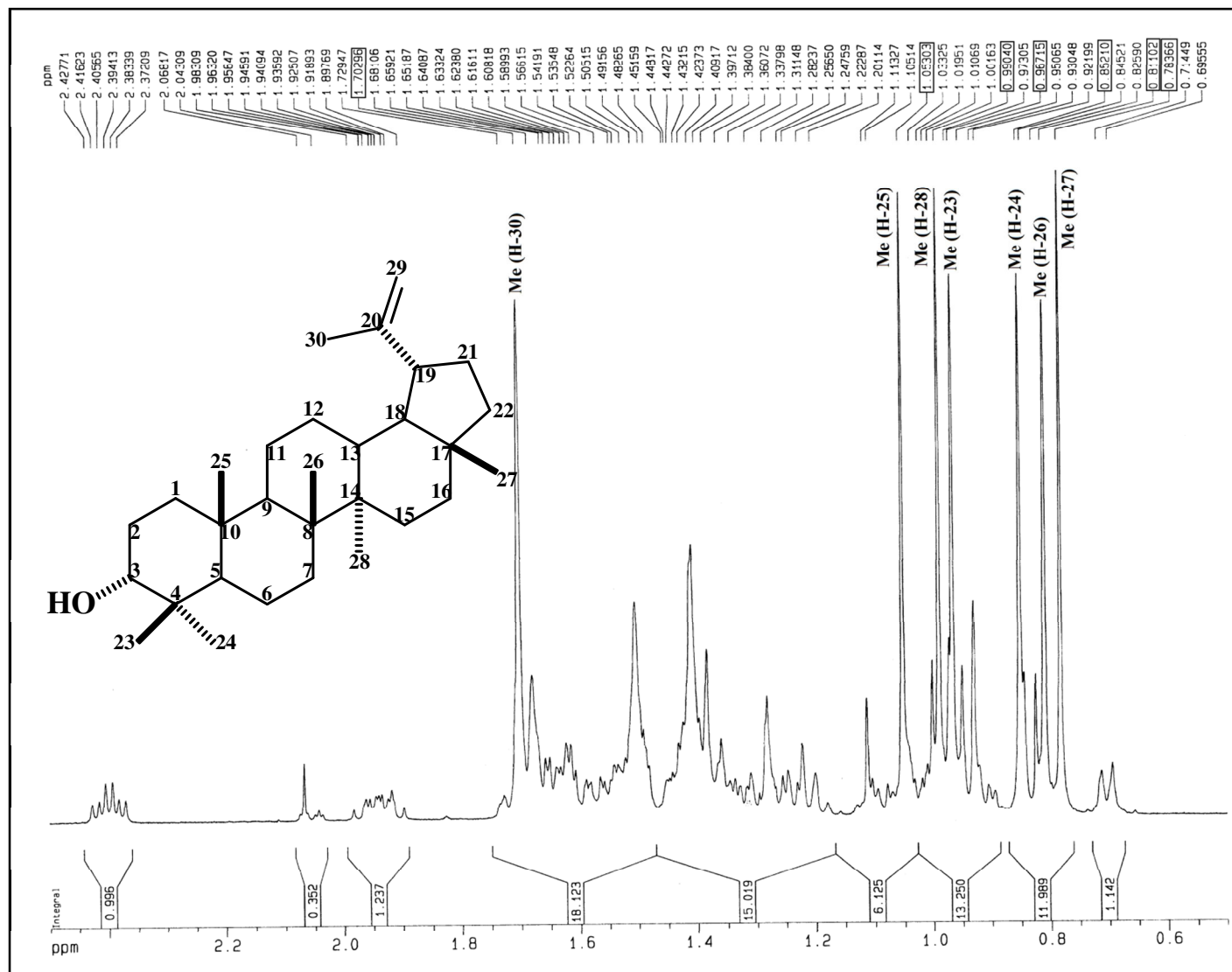
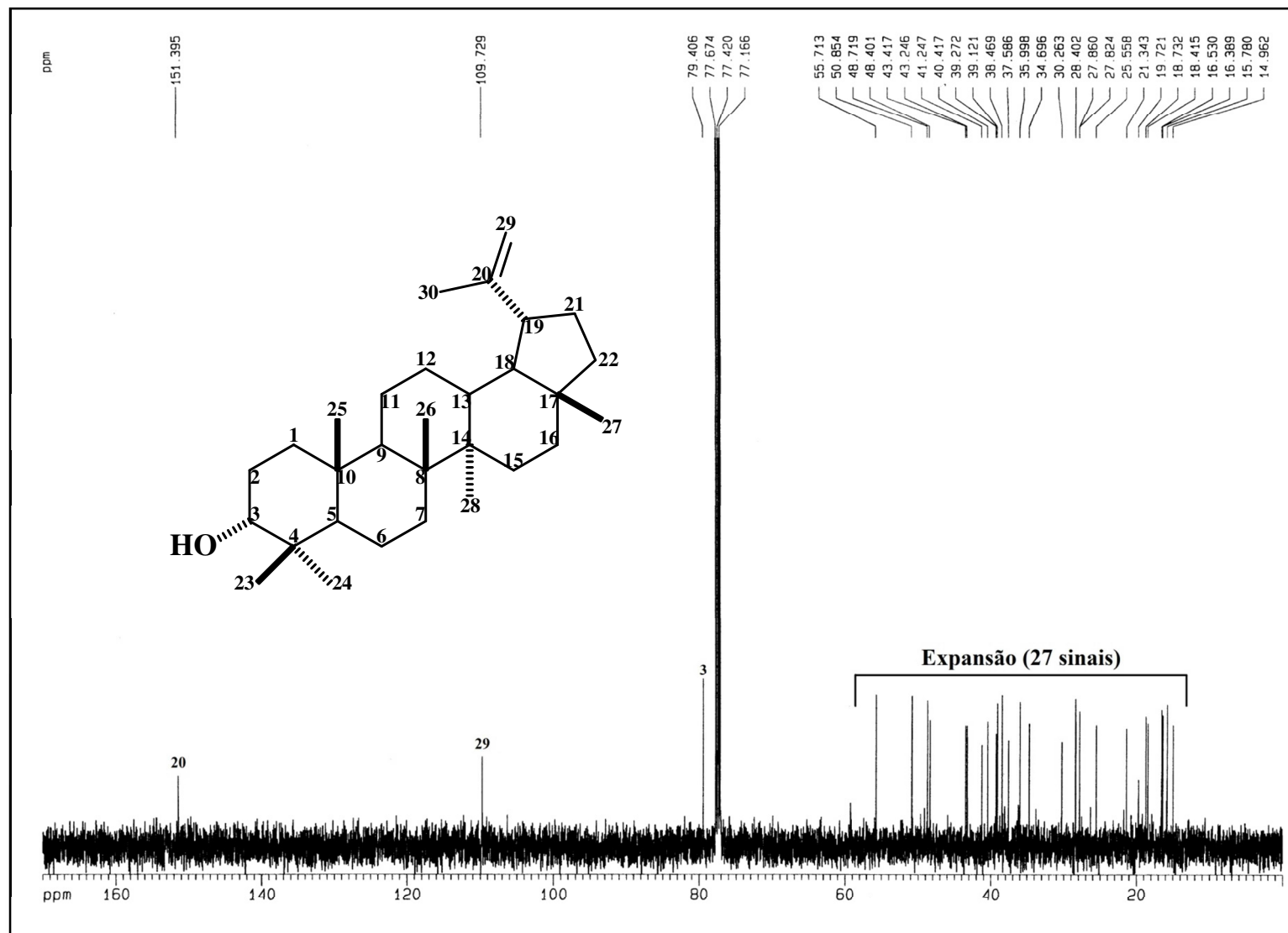


Figura 30 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/500$  MHz).

Figura 31 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/125\text{ MHz}$ ).

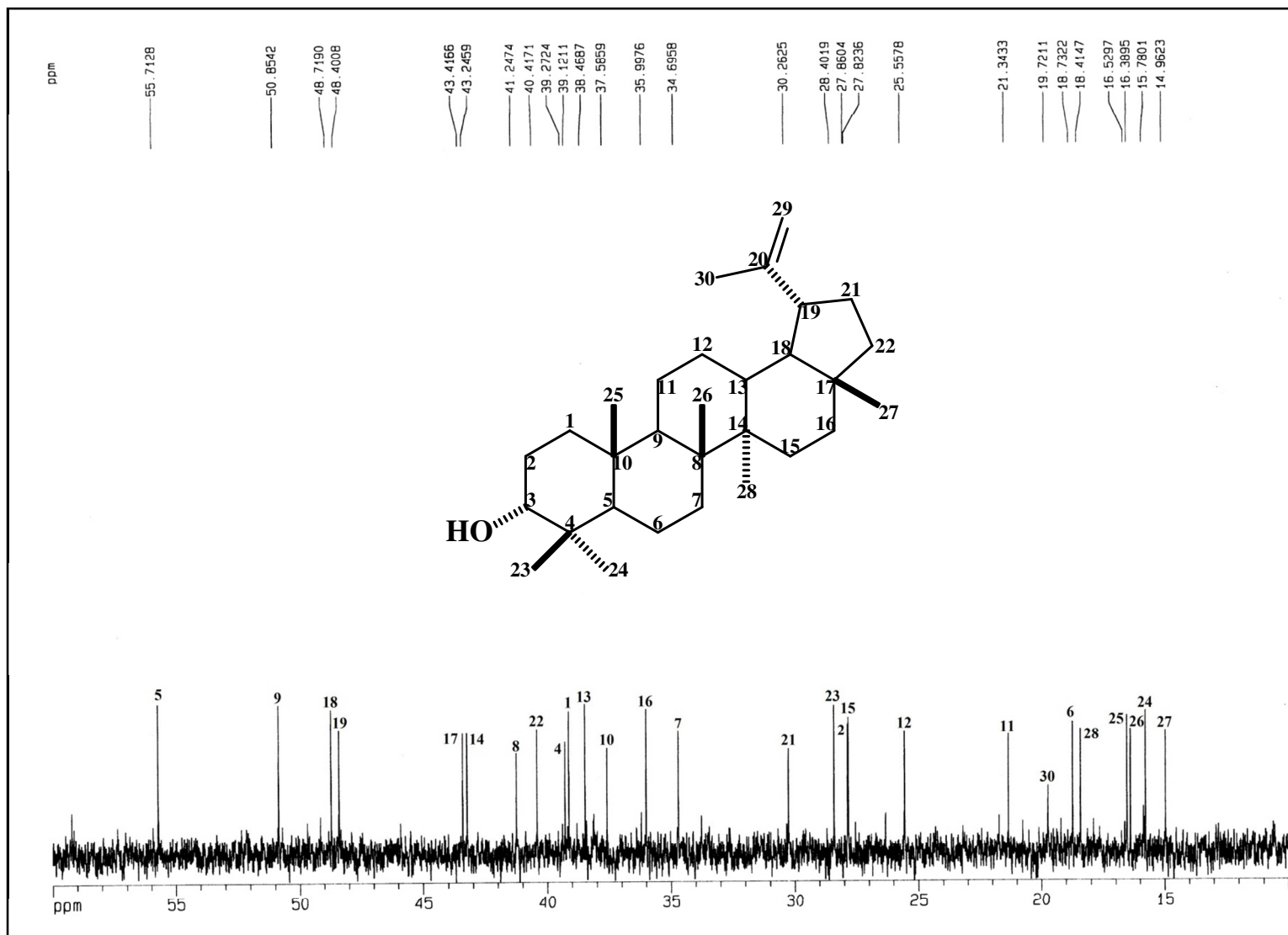


Figura 32 – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/125\text{ MHz}$ ).

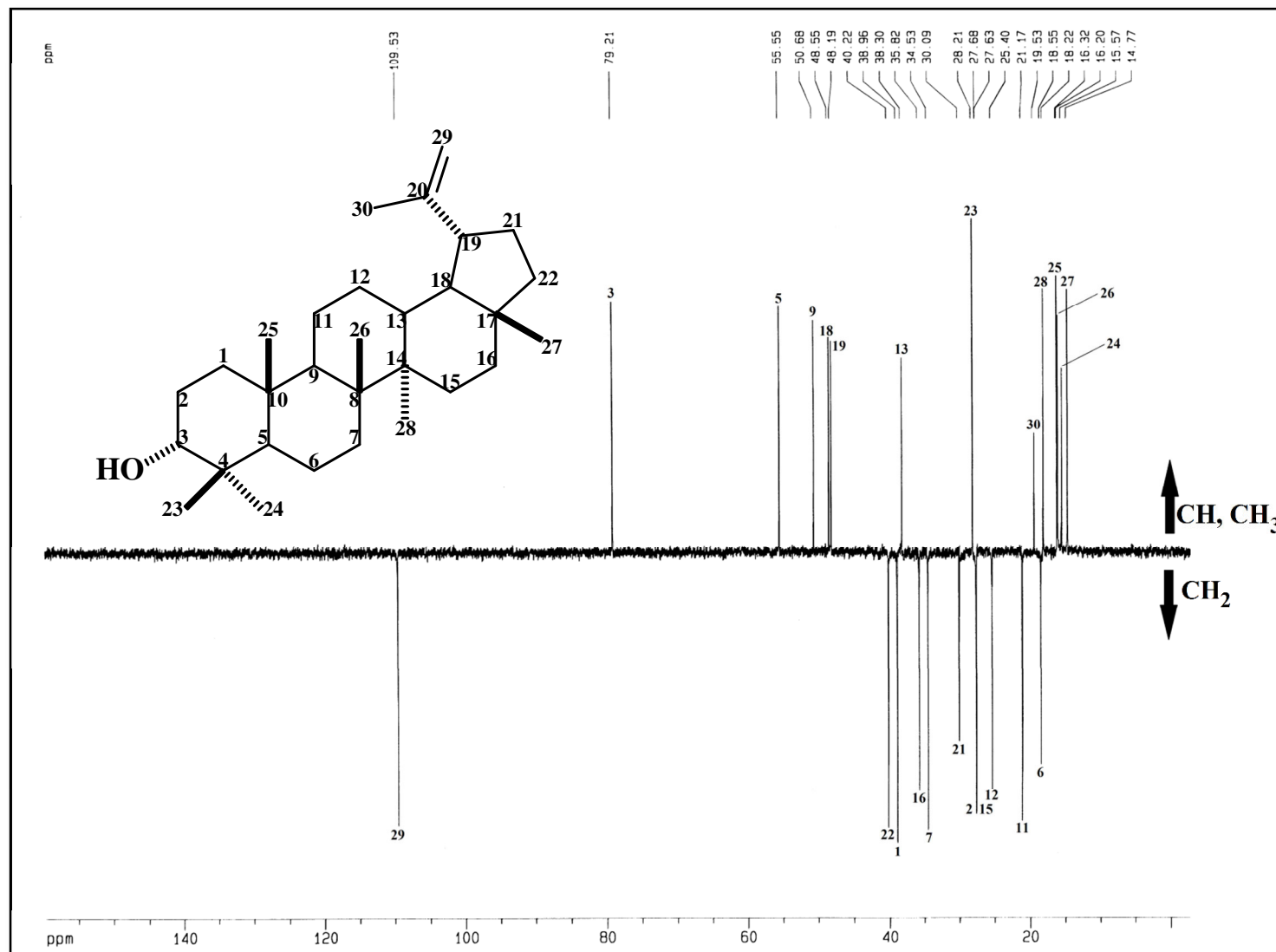


Figura 33 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135 ° de 1-HA-AE-FT ( $\text{CDCl}_3/125\text{ MHz}$ ).

A comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 1-AE-FT-HA com os encontrados na literatura para o Lupeol (PINHEIRO *et al.*, 2004), permitiu a sua elucidação estrutural (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) para o triterpeno Lupeol isolado (1-AE-FT-HA)\* e da literatura (PINHEIRO *et al.*, 2004)\*\*.

Nº do carbono	Tipo de C	Isolado	Literatura
1	CH <sub>2</sub>	39,12	38,78
2	CH <sub>2</sub>	27,86	27,78
<b>3</b>	<b>CH</b>	<b>79,41</b>	<b>79,05</b>
4	C	39,27	38,91
5	CH	55,71	55,37
6	CH <sub>2</sub>	18,73	18,36
7	CH <sub>2</sub>	34,70	34,36
8	C	41,23	40,91
9	CH	50,85	50,51
10	C	37,58	37,26
11	CH <sub>2</sub>	21,34	20,99
12	CH <sub>2</sub>	25,56	25,22
13	CH	38,47	38,13
14	C	43,24	42,90
15	CH <sub>2</sub>	27,82	27,51
16	CH <sub>2</sub>	36,00	35,64
17	C	43,42	43,04
18	CH	48,72	48,38
19	CH	48,40	48,03
<b>20</b>	<b>C</b>	<b>151,40</b>	<b>150,96</b>
21	CH <sub>2</sub>	30,26	29,92
22	CH <sub>2</sub>	40,42	40,06
<b>23</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>28,40</b>	<b>28,04</b>
<b>24</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>15,78</b>	<b>15,40</b>
<b>25</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>16,53</b>	<b>16,15</b>
<b>26</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>16,39</b>	<b>16,03</b>
<b>27</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>14,96</b>	<b>14,60</b>
<b>28</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>18,41</b>	<b>18,05</b>
<b>29</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>109,73</b>	<b>109,36</b>
<b>30</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>19,72</b>	<b>19,36</b>

\* Em CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz

\*\* Em CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz

## 4.4 Isolamento e determinação estrutural de 2-HA-AE-FT

A substância 2-HA-AE-FT apresentou-se como um sólido amorfo branco, solúvel em piridina e com PF 288-290 °C. Análise em CCD, 2-Ha-AE-FT apresentou coloração laranja escura após revelação com vanilina. Esta substância foi isolada da fração metanólica do extrato acetato de etila filtrado das raízes de *H. ampla* (Fluxograma 5, Página 63).

### 4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de 2-HA-AE-FT

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz) de 2-HA-AE-FT (Figura 34, Página. 109), apresentou, além de sinais referentes aos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de sistema esteroidal entre 0,7-2,8  $\delta$ , sinais entre 4,0-5,1  $\delta$  característicos de hidrogênios de natureza glicosídica. Estes dados, além do sinal em 5,38  $\delta$  referente ao hidrogênio olefínico H-6, estão de acordo com aqueles da literatura para o 3- $\beta$ -*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol. A atribuição da configuração  $\beta$  da glicose foi baseada na observação de um dubleto em 5,07  $\delta$  com constante de acoplamento de 9,7 Hz, diaxial entre H-1' e H-2'.

### 4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de 2-HA-AE-FT

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$  MHz) de 2-HA-AE-FT (Figuras 35 e 36, Páginas 110 e 111, respectivamente), apresentou 35 sinais espectrais. O sinal do carbono anomérico C-1' ressonou em 103,7  $\delta$  e os sinais referentes aos carbonos da dupla ligação endocíclica entre C-5 e C-6 ressonaram em 141,45  $\delta$  e 122,32  $\delta$ , respectivamente. O sinal em campo baixo do carbono C-3 da aglicona em 79,0  $\delta$ , mostrou a ligação da molécula de açúcar neste ponto. Os carbonos da porção glicosídica ressonaram em 103,7  $\delta$  (C-1'), 75,8  $\delta$  (C-2'), 78,7  $\delta$  (C-3'), 72,3  $\delta$  (C-4'), 78,8  $\delta$  (C-5') e 63,4  $\delta$  (C-6'). A comparação do espectro totalmente desacoplado (BB) com o espectro DEPT 135° (Figuras 37 e 38, p. 112 e 113, respectivamente), revelou o padrão de hidrogenação dos 35 átomos de carbono (Tabela 11).

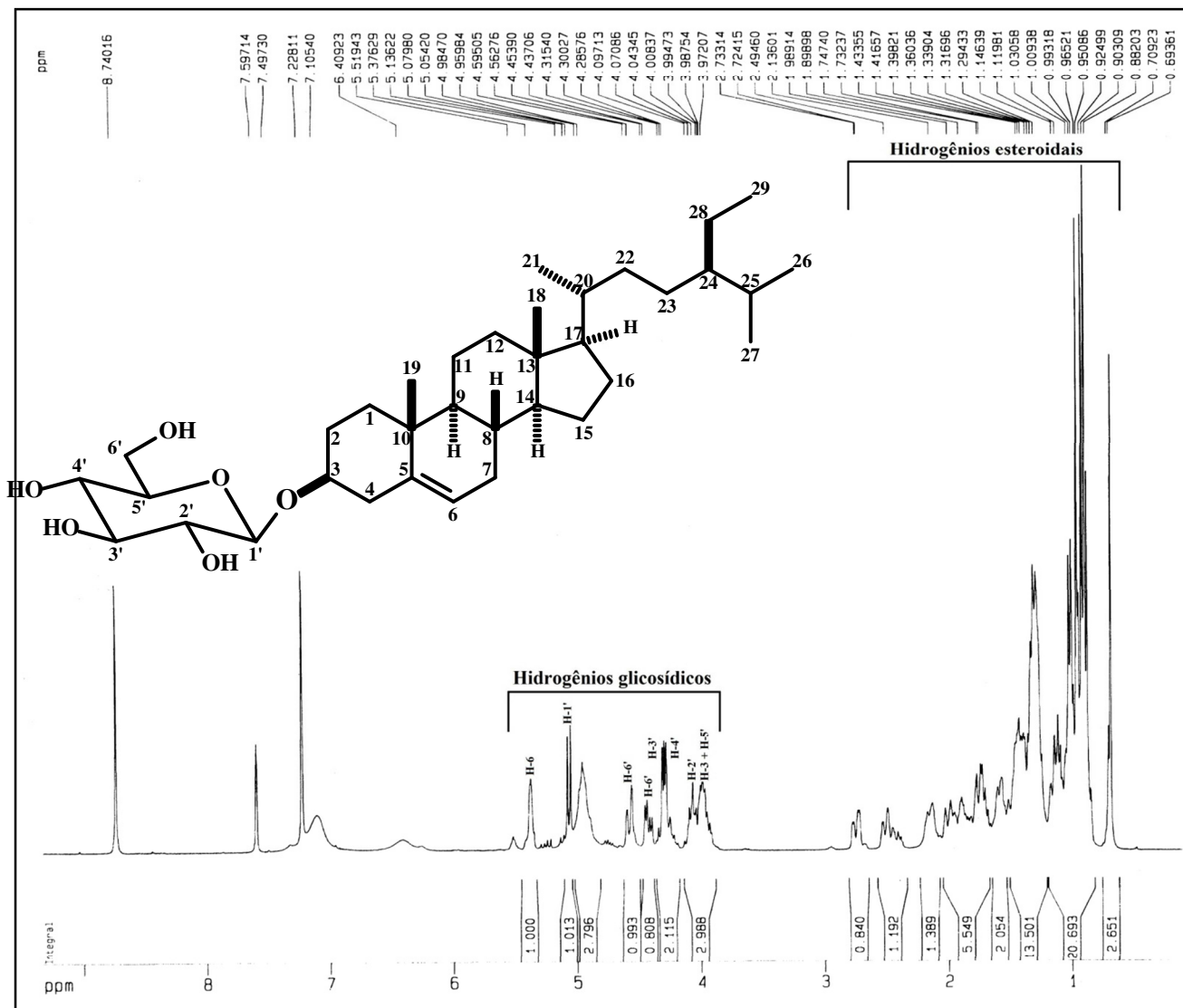


Figura 34 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/300$  MHz).

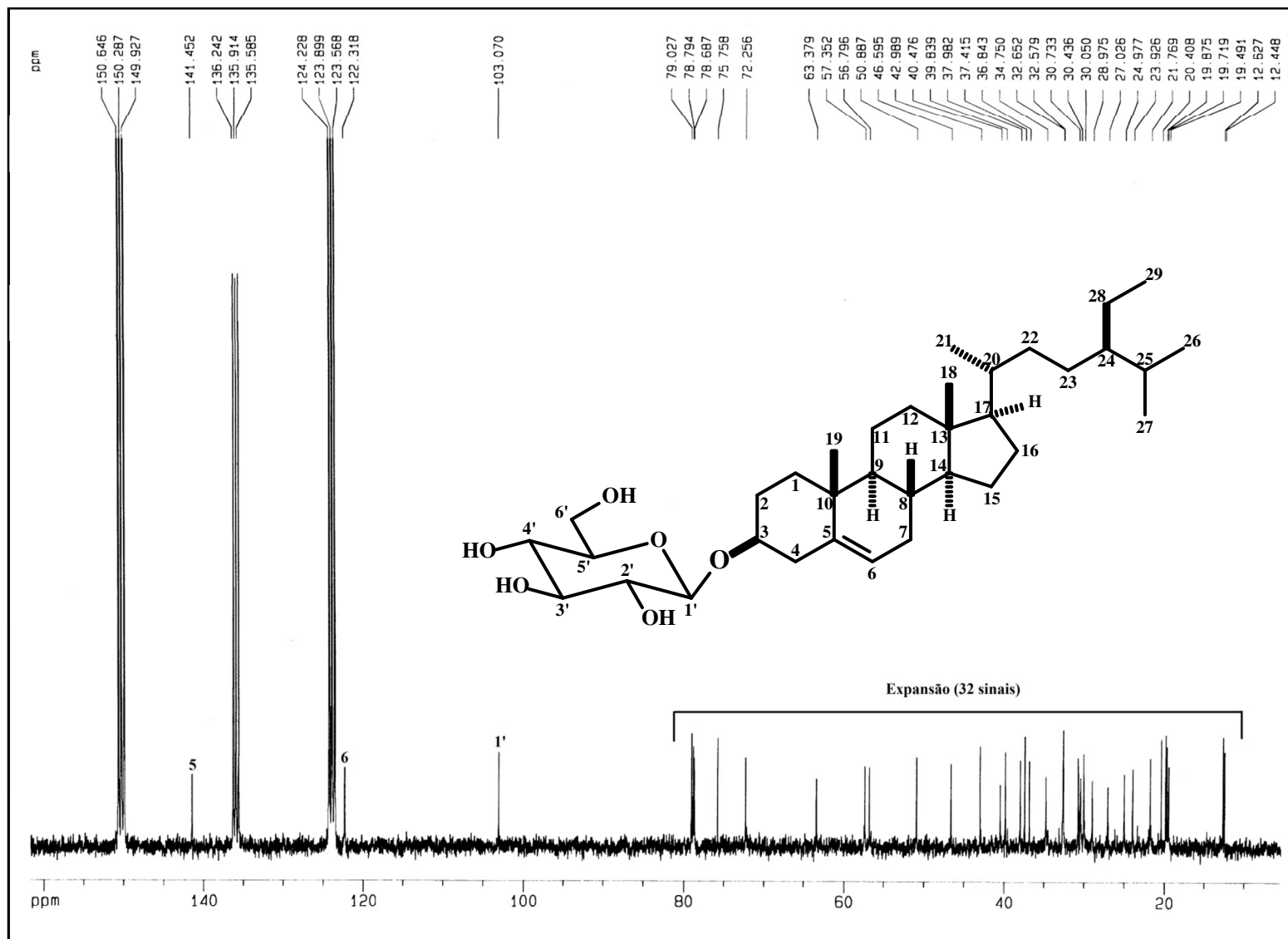


Figura 35 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de 2-HA-AE-FT/ME ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75\text{ MHz}$ ).



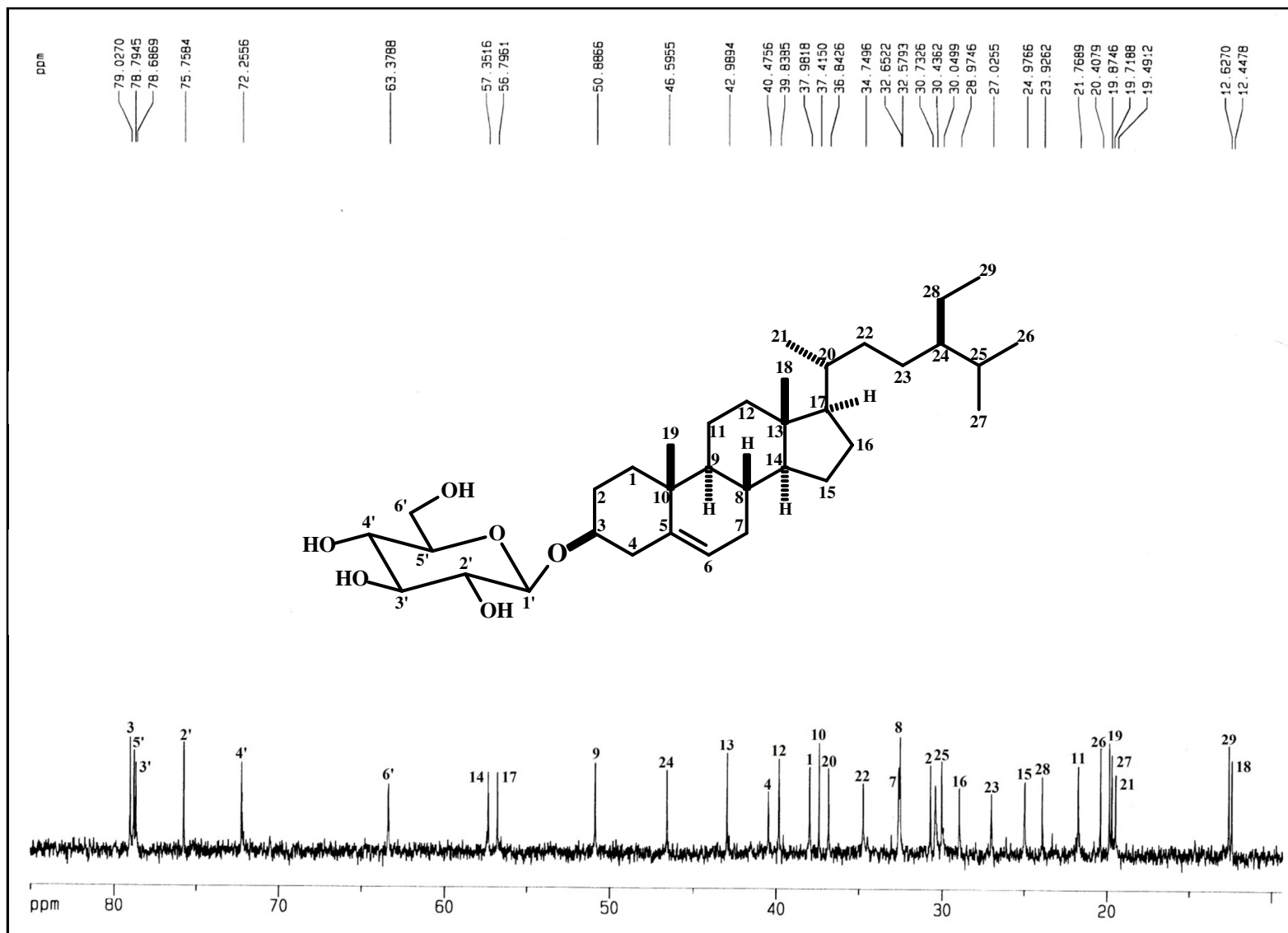
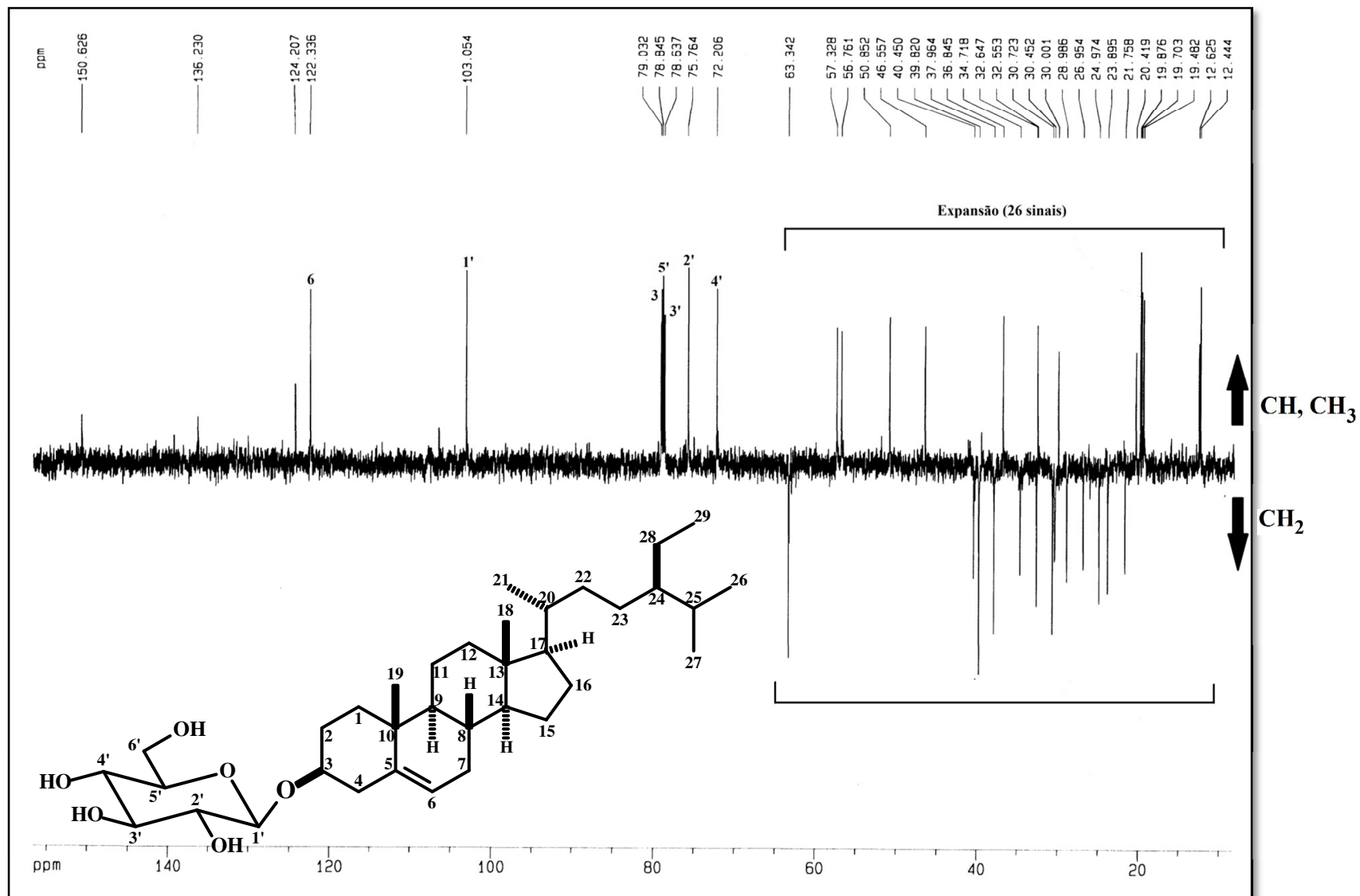


Figura 36 – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75\text{ MHz}$ ).

Figura 37 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135 ° de 2-HA-AE-FT (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N /75 MHz).

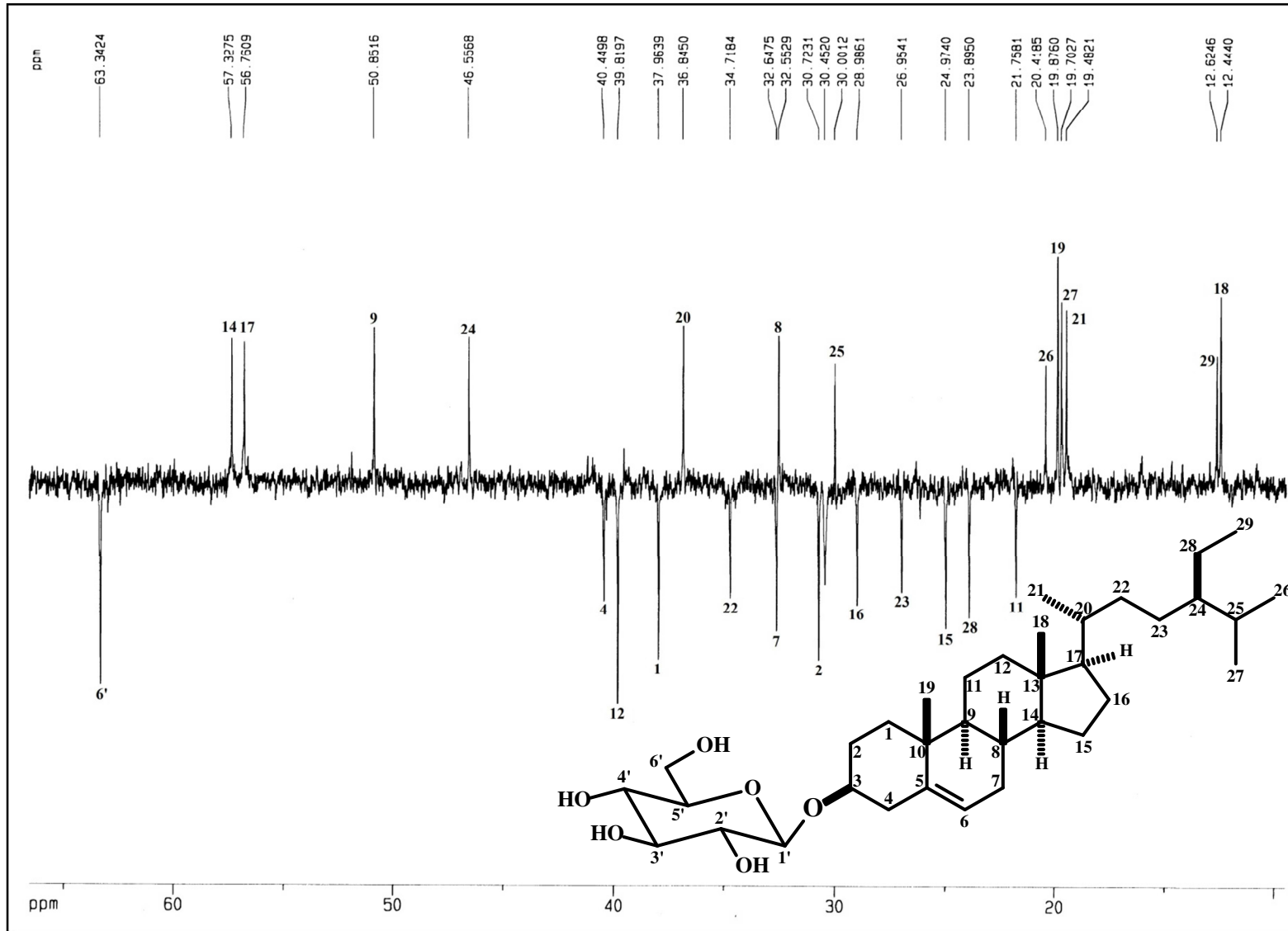


Figura 38 – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° de 2-HA-AE-FT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/75$  MHz).

A comparação dos dados obtidos nos espectros com os dados encontrados na literatura (BANDEIRA, 2002), confirmaram a identidade de 2-HA-AE-FT como sendo o 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol (Tabela X). A presença deste esteróide glicosilado já foi relatada nas raízes de *H. ampla* (GRAEBNER *et al.*, 2002).

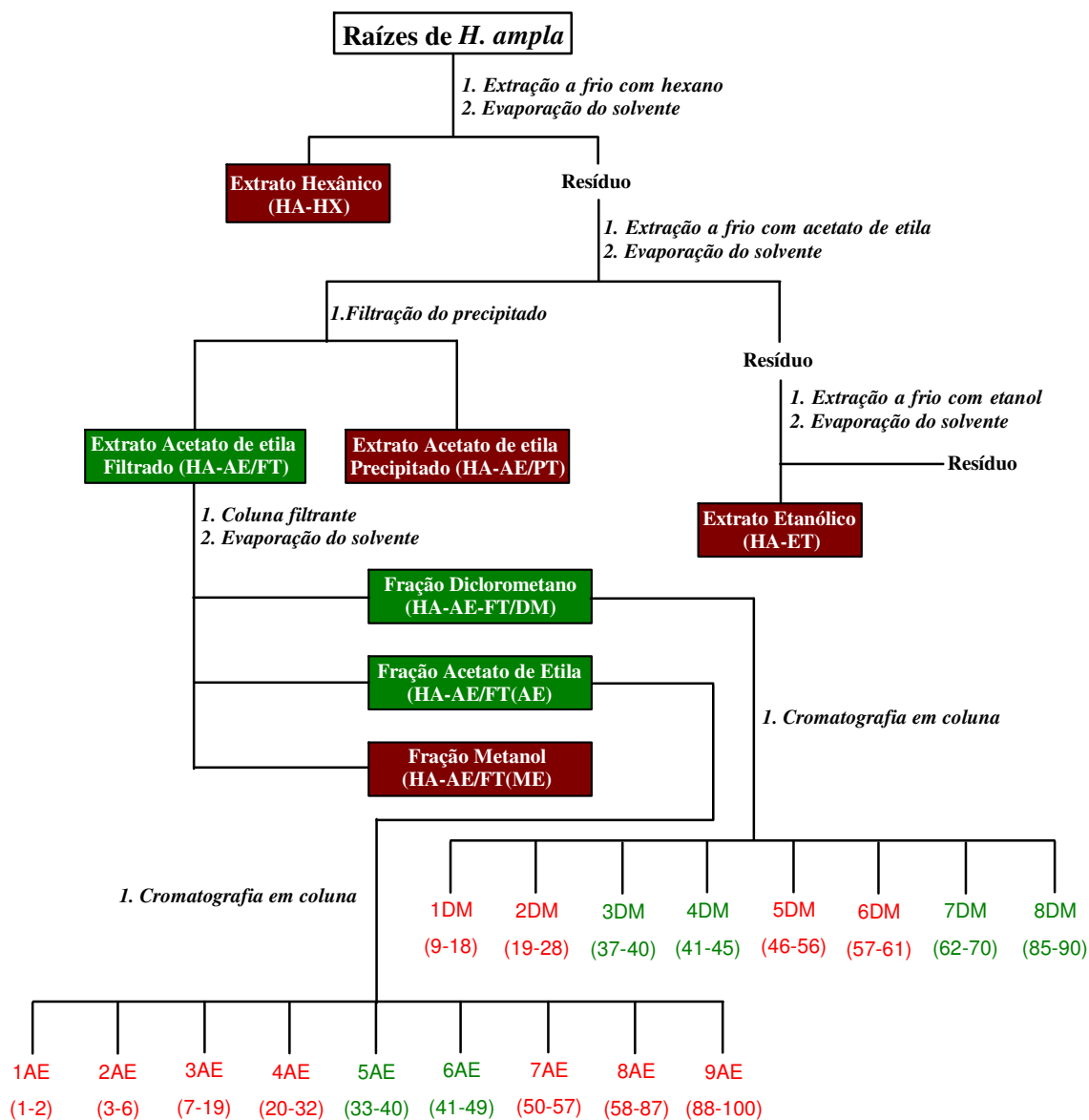
Tabela 11 - Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) para o 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol isolado (2-HA-AE-FT)\* e da literatura (BANDEIRA, 2002)\*\*.

Nº do carbono	Tipo de carbono	Isolado	Literatura
1	CH <sub>2</sub>	38,0	37,9
2	CH <sub>2</sub>	30,7	30,7
<b>3</b>	<b>CH</b>	79,0	<b>79,0</b>
4	CH <sub>2</sub>	40,5	40,4
<b>5</b>	<b>C</b>	141,4	<b>141,4</b>
<b>6</b>	<b>CH</b>	122,3	<b>122,2</b>
7	CH <sub>2</sub>	32,6	32,5
8	CH	32,6	32,5
9	CH	50,9	50,8
10	C	37,4	37,3
11	CH <sub>2</sub>	21,8	21,7
12	CH <sub>2</sub>	39,8	39,8
13	C	43,0	42,9
14	CH	57,4	57,3
15	CH <sub>2</sub>	25,0	24,9
16	CH <sub>2</sub>	29,0	28,9
17	CH	56,8	56,7
18	CH <sub>3</sub>	12,4	12,3
19	CH <sub>3</sub>	19,9	19,7
20	CH	36,8	36,8
21	CH <sub>3</sub>	19,5	19,4
22	CH <sub>2</sub>	34,8	34,7
23	CH <sub>2</sub>	27,0	27,0
24	CH	46,6	46,5
25	CH	30,0	30,0
26	CH <sub>3</sub>	20,4	19,8
27	CH <sub>3</sub>	19,7	19,6
28	CH <sub>2</sub>	23,9	23,9
29	CH <sub>3</sub>	12,6	12,4
<b>1'</b>	<b>CH</b>	103,7	<b>103,0</b>
<b>2'</b>	<b>CH</b>	75,8	<b>75,7</b>
<b>3'</b>	<b>CH</b>	78,7	<b>78,6</b>
<b>4'</b>	<b>CH</b>	72,3	<b>72,2</b>
<b>5'</b>	<b>CH</b>	78,8	<b>78,7</b>
<b>6'</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	63,4	<b>63,3</b>

## **6.5 Resultados do estudo da atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e substâncias isoladas das raízes de *Humirianthera ampla***

Foram detectados nos extratos das raízes de *H. ampla*, através do ensaio de Ellman adaptado para CCD, compostos químicos capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase. As sub-frações 3DM, 4DM, 7DM e 8DM da fração diclorometano e as sub-frações 5AE e 6AE da fração acetato de etila, ambas derivadas do extrato acetato de etila filtrado, mostraram-se ativas (Fluxograma 6, Página. 116). Entretanto, devido à reduzida quantidade de material, a técnica cromatográfica disponível (Cromatografia em coluna) e pela complexidade química demonstrada pelas frações ativas após análise por CCD, não foi possível promover o isolamento dos compostos responsáveis pela atividade anticolinesterásica. As substâncias químicas isoladas e identificadas (misturas dos esteroides beta-sitosterol e estigmasterol, o diterpeno Annonalida, o triterpeno Lupeol e o esteróide glicosilado 3- $\beta$ -*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol ) também foram avaliadas, porém nenhuma das mesmas demonstrou-se ativa.

Portanto, foi possível concluir que as raízes de *H. ampla* são uma promissora fonte de novas moléculas naturais anticolinesterásicas, o que estimula um estudo futuro mais criterioso, partindo-se de uma maior quantidade de material e utilizando-se de técnicas modernas de cromatografia (CLAE) para se determinar a identidade das substâncias responsáveis por essa atividade.



Fluxograma 6 - Fracionamento bioguiado dos extratos das raízes de *Humirianthera ampla* (os extratos, frações e sub-frações ativas estão demonstradas em verde e as inativas em vermelho).

## 6.6 Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos e do diterpenoannonalida das raízes de *H. ampla*

### 6.6.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos das raízes de *H. ampla*

Os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das raízes de *H. ampla* foram avaliados pelo método HX/XO. Somente os extratos acetato de etila e etanólico apresentaram atividade antioxidante moderada, promovendo um máximo de inibição da formação dos ADHBs de 48 e 45%, respectivamente. A moderada atividade antioxidante era de certa forma esperada, pois o estudo fitoquímico realizado neste trabalho e os dados disponíveis na literatura (GRAEBNER *et al.*, 2000), demonstraram que a composição química das raízes de *H. ampla* é composta basicamente de terpenóides. Estudos demonstram que os compostos fenólicos e polifenólicos normalmente apresentam maiores potenciais como substâncias antioxidantes. O resultado completo dos testes estão relacionados na Tabela 12 e demonstrados no Gráfico 1 (Página 118).

Tabela 12 - Porcentagem de inibição dos extratos das raízes de *H. ampla* na formação dos ADHBs.

Concentração do extrato mg/mL	<i>Humirianthera ampla</i> , raízes (Porcentagem de inibição)		
	Hexano	Acetato de etila	Etanol
0,05	*	*	5
0,1	*	7	5
0,2	*	10	17
0,5	3	48	30
1,0	18	**	45

\* Concentrações onde os extratos se comportaram como pro-oxidantes.

\*\* Concentração onde os compostos químicos presentes no extrato começaram a atuar sobre a enzima.

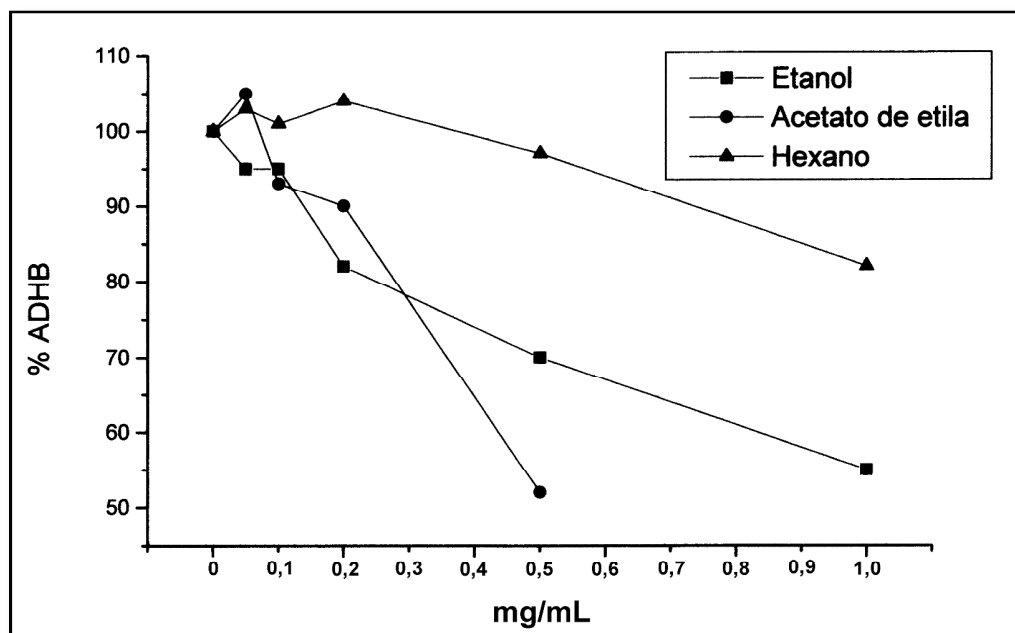


Gráfico 1 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos das raízes de *Humirianthera ampla* pelo método HX/XO.

#### 6.6.1 Avaliação da atividade antioxidante do diterpeno Annonalida das raízes de *H. ampla*

A atividade antioxidante da Annonalida também foi avaliada pelo método HX/XO, porém a mesma demonstrou-se fracamente ativa, inibindo a formação dos ADHBs em somente 25% na maior concentração testada, 1 mg/mL (Tabela 9 e Gráfico 2, Página 119).

Tabela 13 - Porcentagem de inibição da annonalida na formação dos DHBA's.

Concentração da annonalida (mg/mL)	Porcentagem de inibição
0,05	6
0,1	9
0,2	7
0,5	13
1,0	25



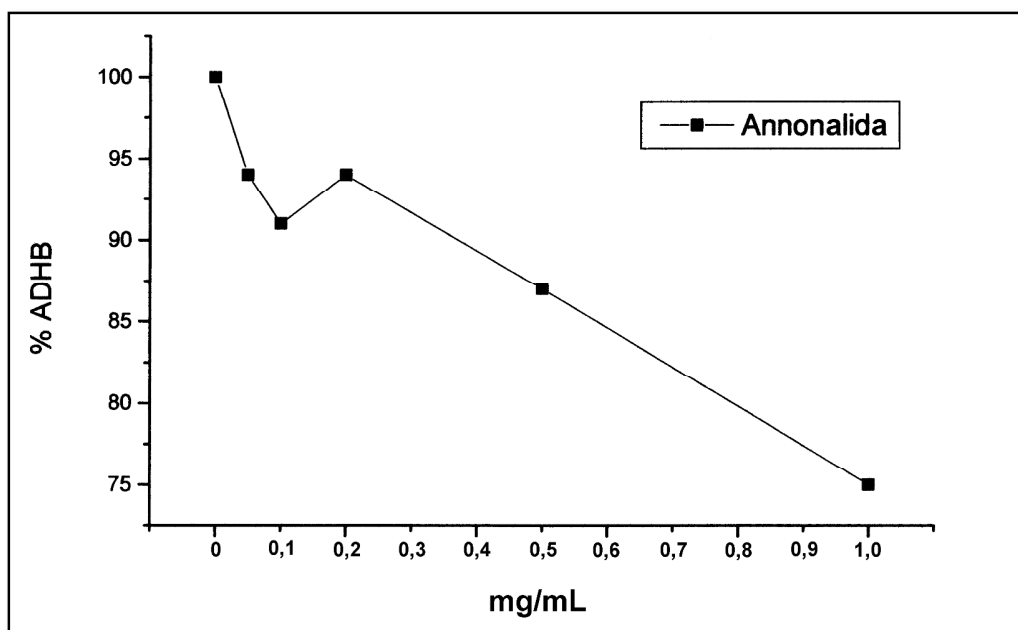


Gráfico 2 - Avaliação da atividade antioxidante da annonalida pelo método HX/XO.

# ***CAPÍTULO 7***

## ***CONCLUSÕES***

## 7 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das raízes de *Humirianthera ampla* levou ao isolamento de cinco substâncias conhecidas na literatura, sendo estas uma mistura de esteróides constituída de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, o diterpenóide pimarano Annonalida, o triterpeno lupano Lupeol e o esteróide glicosilado 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol. Todas as substâncias isoladas já tiveram suas presenças relatadas nas raízes de *H. ampla*

No estudo da atividade anticolinesterásica, algumas sub-frações das frações diclorometano e acetato de etila do extrato acetato de etila filtrado foram ativas no ensaio de Ellman em CCD. Portanto, concluiu-se que, nas raízes de *H. ampla*, existem substâncias químicas capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, o que estimula um estudo mais criterioso no futuro.

No estudo de atividade antioxidante, os extratos acetato de etila e etanólico de *H. ampla* apresentaram potenciais promissores quando analisados pelo método DHBA. O extrato acetato de etila ainda mostrou inibição da enzima xantina oxidase.

***REFERÊNCIAS***  
***BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, J. S. and RASTOGI, R. P. Chemical constituents of *Mappia foetida* Miers. **Indian j. Chem.**, v.11, n. 9, p. 969-972, 1973.
- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ARISAWA, M.; GUNASEKERA, S. P.; CORDELL, G. A. and FARNSWORTH, N. R.; Plant anticancer agents XXI. Constituents of *Merrilliodendron megacarpum*. **Planta Med.**, v. 43, n. 4, p. 404-407, 1981.
- BAEHNI, C. Revision des genres *Neoleretia*, *Mappia* et *Humirianthera*. **Candollea**, v. 7, p. 166-1983, 1936.
- BANDEIRA, M. A. M. MYRACRODUON URUNDEUVA ALLEMÃO: Constituintes Químicos Ativos da Planta em Desenvolvimento e Adulta. 2002. 280 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; **Química medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 243p.
- BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1984. v. 2, 377p.
- BENSON, L. D. **Plant Classification**. 2.ed.. Lexington: DC Heath & Co., 1979. 901p.
- BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of higher plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

DAHLGREN, R. A revised system of classification of angiosperms. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 80, p. 91-124, 1980.

DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação Experimental por *Humirianthera ampla* e *H. rupestris* (Icacinaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 61-67, 1982.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; Jr, V. A.; FEATHERSTONE, R. M. A new colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

Engler A. Icacinaceae. In Engler A., Prantl K. [eds.], **Die natürlichen Pflanzenfamilien**, Leipzig: Engelmann, v. 3, parte 5, p. 233– 257, 1986.

GOAD, L. J. **Methods in plant biochemistry**. Liverpool: Academic Press Limited, 1991.

GOLDBERG, A. **Classification, Evolution, and Phylogeny of the families of Dicotyledons**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1986.

GOTTLIEB, O. R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology**: an essay into a novel botanical discipline. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 170p.

GOVINDACHARI, T. R.; RAVINDRANATH, K. R.; VISWANATHAN, N. Mappicine, a minor alkaloid from *Mappia foetida* miers. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 1215-1217, 1974.

GRAEBNER, I. B.; MOSTARDEIRO, M. A.; ETHUR, E. M.; BURROW, R. A.; DESSOY, E. C. S.; MOREL, A. F. Diterpenoids from *Humirianthera ampla*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 955-959, 2000.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. vol. 4. Switzerland: Birkhäuser Verlag, Basel, 1966. 556p.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Oxford: Oxford Univ. Press, 1978. 336p.

HOWARD, R. A. A revision of *Casimirella*, including *Humirianthera* (Icacinaceae). **Brittonia**, v. 44, n. 2, p. 166-172, 1992.

HOWARD, R. A. Studies of the Icacinaceae IV: Consideration of the New World Genera. **Contribution from the Gray Herbarium of Harvard University. CXLII.**, p. 3-60, 1942.

KAPLAN, M. A. C; RIBEIRO, J.; GOTTLIEB, O. R. Chemogeographical evolution of terpenoids in Icacinaceae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2671-2676, 1991.

KOOIMAN, P. **Österr. Bot. Z.**, v. 119, p. 395-398, 1971.

KOROLKOVAS, A; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988. 783p.

MABBERLEY, D. J. **The plant book**: a portable dictionary of the higher plants. New York: Cambridge University Press, 1987. 720p.

MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Editora Ulbra, 2002. 189p.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2<sup>a</sup> ed., Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MENEGHINI, R. A. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 57-62, 1987.

MING, L. C.; GAUDÊNCIO, P.; SANTOS, V. P. **Plantas medicinais**: uso popular na reserva extrativista Chico Mendes – Acre. Botucatu: CEPLAN/UNESP, 1997. 165p.

MUSSINI P.; ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; BUCKWALTER, B. L.; WENKERT, E. The C-13 configuration of annonalide. **Tetrahedron Letters**, v. 14, n. 49, p. 4849-4851, 1973.

MUSSINI, P.; PELIZZONI, F. The structure of annonalide. **Tetraedron Letters**, n. 12, p. 1085-1088, 1977.

OLIVEIRA, A. B. de; OLIVEIRA, G. G. de; MAIA, J. G. S.; GOULART, M. O. F e ALVES, R. J.; **Cienc. Cult.** (São Paulo). 33, 461, 1981.

OLIVEIRA, A. B. de; OLIVEIRA, G. G. de; SANT'ANA, A. E. G.; **Cienc. Cult.** (São Paulo). 37, 495, 1985.

ON'OKOKO, P.; HANS, M. COLAU, B.; HOOTELE, C; DECLERCQ, J. P.; GERMAIN, G.; VAN MEERSSCHE, M. L'icacine, nouvel alcaloide diterpenique de *Icacina gussfeldtii*. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 86, n. 9, p. 655-661, 1977.

(A) ON'OKOKO, P.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; DECLERCQ, J. P.; VAN MEERSSCHE, M. The constitution of icacinol, a new diterpene with a pimarane skeleton from *Icacina claessensis*. **Tetrahedron**, v. 41, n. 4, p. 745-748, 1985.

(B) ON'OKOKO, P.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; DECLERCQ, J. P.; VAN MEERSSCHE, M. Icacenone, a furanoditerpene with a pimarane skeleton from *Icacina mannii*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2452-2453, 1985.

ON'OKOKO, P.; VANHAELEN, M. Two new diterpene-based alkaloids from *Icacina gussfeldtii*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 2, p. 303-305, 1980.

OWEN, R. W.; GIACOSA A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER ,B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**. v. 36, n. 10, p. 1235-1247, 2000.

PHILIPSON, W. R. Ovular morphology and the classification of dicotyledons. **Plant Syst Evol.**, (Suppl 1), p. 123-140, 1977.

PINHEIRO, M. L. B.; ROCHA, A. F. I.; FERNANDES, M. A. N.; MONTE, F. J. Q.; VILLAR, J. D. F.; CRUZ, E. R. Lignanas de *Strychnos guianensis* (AUBLET) MART. **Quim. Nova**. v. 27, n. 2, p. 188-192, 2004.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, 2001.



ROULEAU, E. **Guide to the generic names appearing in the index kewensis and its fifteen supplements.** Cowans- ville: Publishing House Jules Chätelain, 1981.

SCHOLZ, H. **Engler's syllabus der pflanzenfamilien.** 12.ed. Berlin: Gebriider Borntrager, 1964.

SÉVENET, T.; THAL, C.; POTIER, P. Isolement et structure du cantleyoside: Nouveau glucoside terpénique de *Cantleya corniculata* (Becc.) Howard, (Icacinacées) **Tetrahedron**, v. 27, n. 3, p. 663-668, 1971.

SILVESTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000. 460p.

STEBBINS, G. L. **Flowering plants:** evolution above the species level. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 1974. 399p.

THORNE, R. I. Proposed new realignments in the angiosperms. **Nord. J. Botany.** n.3, p.85-113, 1983.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

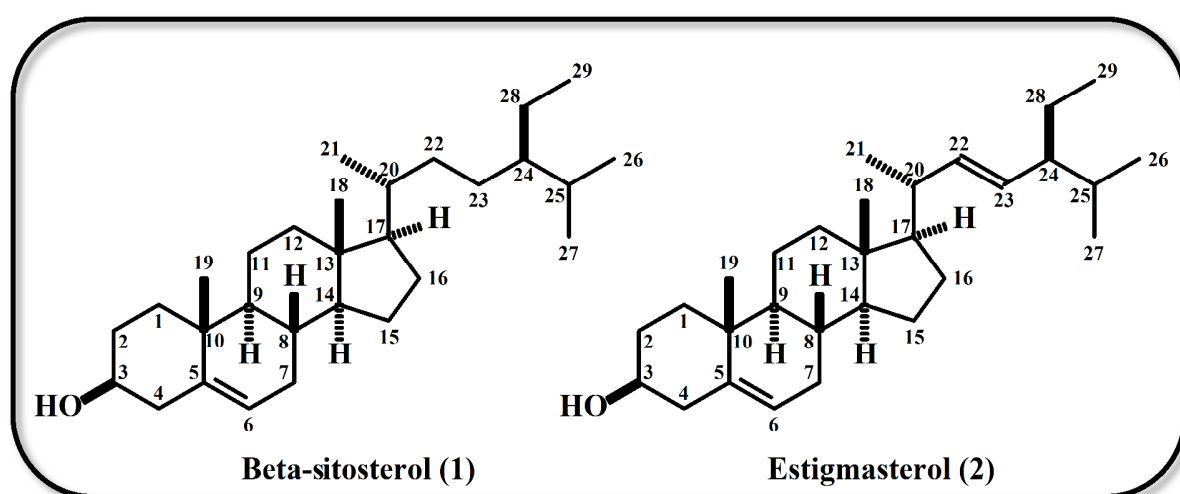
ZOGHBI, M. das G. B.; ROQUE, N. F.; GOTTLIEB, H. E. Humirianthenolides, new degraded diterpenoids from *Humirianthera rupestris*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1669-1673, 1981.

# *APÊNDICE*

## APÊNDICE

Constantes físicas e dados espectrométricos dos constituintes químicos isolados das raízes de *H. ampla*

### A) 1-HA-HX



**Nome:**  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

**Fórmula molecular:**  $C_{29}H_{50}O$  (1) e  $C_{29}H_{48}O$  (2)

**Ponto de fusão:** 132-134 °C

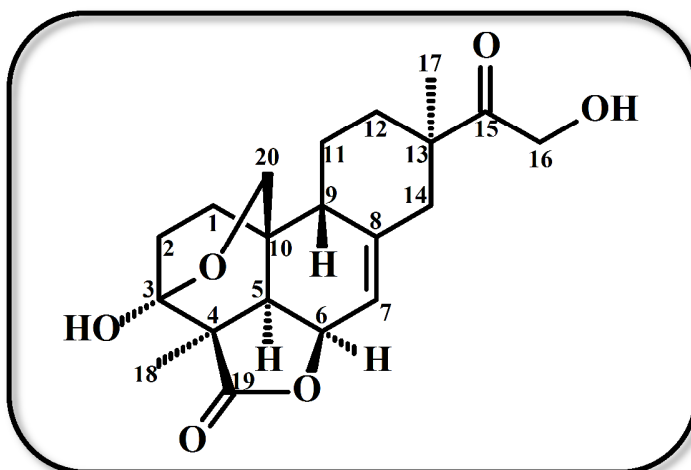
**Aspecto:** sólido cristalino incolor em forma de agulhas

**Solubilidade:** clorofórmio e diclorometano

**Espectrometria de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)**  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol: 5,38  $\delta$  (d,  $^3J_{H-6,H-7} = 5,1$  Hz, 1H) e 3,55  $\delta$  (m, 1H). Estigmasterol: 5,18  $\delta$  (dd,  $^3J_{H-22,H-23 trans} = 15,0$  Hz e  $^3J_{H-22,H-20} = 8,6$  Hz, 1H) e 5,04  $\delta$  (dd,  $^3J_{H-23,H-22 trans} = 15,1$  Hz e  $^3J_{H-23,H-24} = 8,6$  Hz, 1H) - Figura 6, Página 68.

**Espectrometria de RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz)**  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol: 71,8  $\delta$  (CH, C-3); 140,8  $\delta$  (C, C-5) e 121,7  $\delta$  (CH, C-6). Estigmasterol: 138,3  $\delta$  (CH, C-22) e 129,3  $\delta$  (CH, C-23) - Figura 7, Página 69 e Tabela 7, Página 71.

## B) 1-HA-AE-PT



**Nome:** annonalida

**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>

**Ponto de fusão:** 263 °C

**Aspecto:** sólido cristalino incolor em forma de agulhas

**Solubilidade:** piridina e dimetilsulfóxido

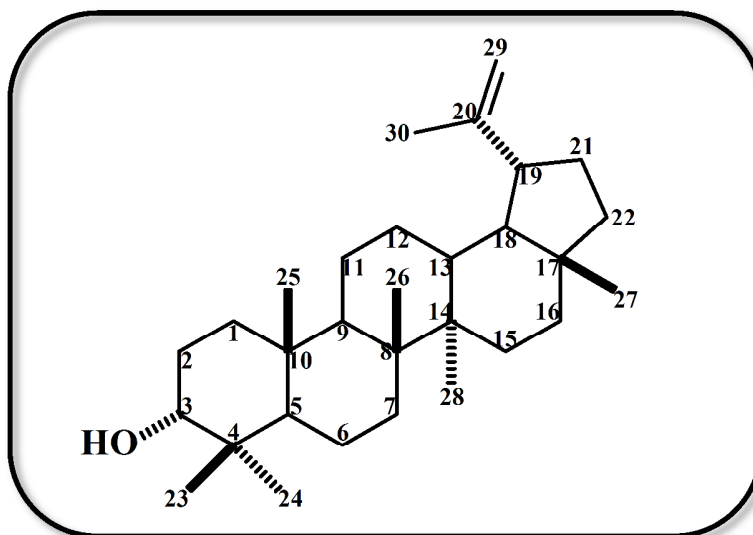
**Espectrometria de massas (IE, 70ev, m/z):** 362 [M<sup>+</sup>], 43 (pico base) – Figura 9, Página.73.

**Espectrometria no infravermelho (KBr/cm<sup>-1</sup>):** 1704, 1742, 3470 – Figura 10, Página 74.

**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 300 MHz):** 1,02 δ (s, 3H); 1,55 δ (s, 3H); 4,72 δ (s, 2H); 3,60 δ (dd, 1H); 4,20 δ (dd, 1H); 2,39 δ (d, 1H); 2,15 δ (d, 1H); 2,20 δ (d, 1H); 2,09 δ (d, 1H); 1,72 δ (dd, 2H); 1,14 δ (m, 1H); 1,57 δ (m, 1H); 1,50 δ (m, 2H); 5,69 δ (d, 1H); 4,96 δ (dd, 1H); 2,25 δ (dd, 1H) e 1,36 δ (dd, 1H) – Figura 11, Página 76 e Tabela 8, Página 96.

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 75MHz):** 19,09 δ (CH<sub>3</sub>, C-17); 19,22 δ (CH<sub>3</sub>, C-18); 72,69 δ (CH<sub>2</sub>, C-20); 115,98 δ (CH, C-7); 97,11 δ (C, C-3); 179,53 δ (C, C-19) e 214,02 δ (C, C-15) – Figura 14, Página 79 e Tabelas 8 e 9, Páginas 96 e 97, respectivamente.

## C) 1-HA-AE-FT



**Nome:** lupeol

**Fórmula molecular:** C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O

**Ponto de fusão:** 178-180 °C

**Aspecto:** sólido cristalino incolor em forma de agulhas

**Solubilidade:** clorofórmio e diclorometano

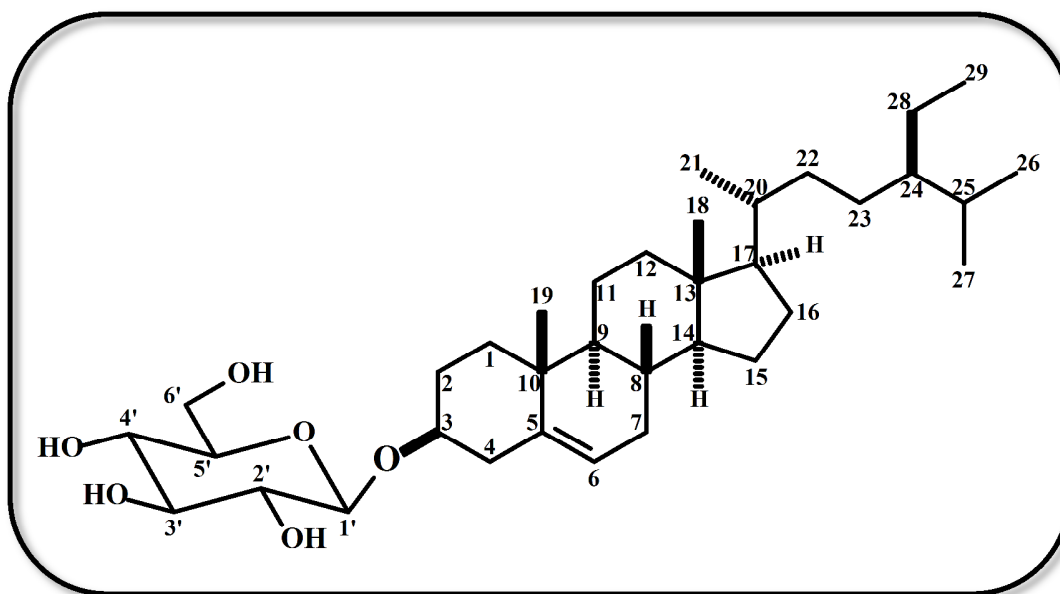
**Espectrometria de massas (IE, 70ev, m/z):** 426 [M<sup>+</sup>], 68 (pico base) – Figura 27, Página 99.

**Espectrometria no infravermelho (KBr/cm<sup>-1</sup>):** 1456, 1640, 3070, 3408 - Figura 28, Página 100.

**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):** 1,70 δ (s, 3H); 1,05 δ (s, 3H); 0,99 δ (s, 3H); 0,97 δ (s, 3H); 0,85 δ (s, 3H); 0,81 δ (s, 3H); 0,78 δ (s, 3H); 4,71 δ (d, <sup>2</sup>J = 2,2 Hz, 1H); 4,59 δ (d, <sup>2</sup>J = 2,2 Hz, 1H); 3,21 δ (dd, <sup>3</sup>J = 11,4 Hz e <sup>3</sup>J = 5,0 Hz, 1H); 2,40 δ (triplete de dubletos, <sup>3</sup>J = 11 Hz e <sup>3</sup>J = 5,77 Hz, 1H); 1,94 δ (m, 1H) – Figura 29, Página 102.

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz):** 28,4 δ (C-23), 15,8 δ (C-24), 16,5 δ (C-25), 16,4 δ (C-26), 15,0 δ (C-27), 18,4 δ (C-28) e 19,7 δ (C-30); 151,4 δ (C, C-20); 109,73 δ (CH<sub>2</sub>, C-29); 79,4 δ (CH, C-3) – Figura 31, Página 104 e Tabela 10, Página 107.

## D) 2-HA-AE-FT



**Nome:** 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol

**Fórmula molecular:** C<sub>35</sub>H<sub>59</sub>O<sub>3</sub>

**Ponto de fusão:** 288-290 °C

**Aspecto:** sólido amorfo esbranquiçado

**Solubilidade:** piridina

**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 300 MHz):** 5,07  $\delta$  (d, <sup>3</sup>J = 9,7 Hz, 1H, H-1'); 5,38  $\delta$  (s, 1H, H-6) – Figura 34, Página 109.

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 75MHz):** 141,45  $\delta$  (C, C-5); 122,32  $\delta$  (CH, C-6); 103,1  $\delta$  (CH, C-1') – Figura 35, Página 110 e Tabela 11, Página 114.