

1 - INTRODUÇÃO

O reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON & ANDERSON, 1998).

Há um crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade e, nesse aspecto, o Brasil é privilegiado, sendo detentor de grande diversidade biológica, contando com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal. De acordo com Guarim Neto e Moraes (2003), pode-se considerar que apenas para o bioma Cerrado, ocorram mais de 600 espécies medicinais. Assim, este bioma apresenta-se como detentor de expressivo potencial para o estudo de novos fitoterápicos e requer especial atenção no que diz respeito ao financiamento de pesquisas e ao incentivo para o uso racional desses medicamentos pela população, sobretudo aquela mais carente de recursos (MYERS, 2000).

No entanto, o Cerrado brasileiro, apesar de ser considerado o segundo maior ecossistema da América do Sul, é atualmente o mais ameaçado de extinção, encontrando-se há alguns anos na lista “hot spots”, onde configuram os 25 biomas mais ameaçados (www.conservation.org). A grande variabilidade de *habitats* nos diversos tipos de cerrado propicia uma enorme diversidade de espécies de plantas e animais, constituindo-se numa importante reserva da biodiversidade e por estas razões torna-se necessário ampliar o estudo interdisciplinar deste bioma objetivando seu aproveitamento e manejo sustentável. Dentro deste contexto, a investigação química de plantas de Mato Grosso do Sul que ocorrem na região do Cerrado que vem sendo desenvolvida no laboratório LP-1 do Departamento de Química da UFMS tem como objetivos isolar e caracterizar os metabólitos secundários destas plantas, bem como identificar os constituintes que possuam atividades biológica ou farmacológica significativas. Assim, tem sido efetuado o estudo químico de espécies pertencentes a diversas famílias, algumas sendo consideradas medicinais e/ou ricas em metabólitos secundários, muitos deles bioativos. Estes estudos têm originado bons resultados, tendo sido obtidos e caracterizados metabólitos secundários

de interesse, alguns dos quais com atividades larvicida contra *Aedes aegypti*, antifúngica, antioxidante, tóxica para *A. salina*, citotóxica e/ou genotóxica (GARCEZ, 2009; GARCEZ, 2008a; GARCEZ, 2008b; GARCEZ, 2006; GARCEZ, 2005, GARCEZ, 2004, GARCEZ, 1999; GARCEZ, 1998; GARCEZ, 1997).

Em uma destas abordagens, os extratos das plantas selecionadas para estudo são submetidos ao ensaio preliminar de toxicidade para *Artemia salina* (BST), que permite avaliar se o extrato possui substâncias com potencial atividade antitumoral. Trata-se de um teste rápido e de fácil execução, que apresenta uma boa correlação com o comportamento de células cancerígenas, tais como as do tipo 9KB (nasofaringe) (MEYER, 1982). Os extratos considerados bioativos são então selecionados para um estudo fitoquímico biomonitorado posterior, com o objetivo de isolar e caracterizar os componentes responsáveis pela atividade. O extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*, uma das espécies submetidas ao ensaio BST, apresentou atividade neste, enquanto que o extrato etanólico das folhas mostrou-se inativo.

Erythroxylum suberosum St. Hil. é um arbusto de ocorrência comum no Cerrado de Mato Grosso do Sul, conhecido popularmente por “cabelo-de-negro”. Através de levantamento bibliográfico, não foram encontrados registros relativos a estudos sobre os metabólitos secundários, bioativos ou não, desta espécie. Com base nas informações acima relatadas, o presente trabalho visou contribuir para o conhecimento da composição química e das atividades biológicas de plantas da família Erythroxylaceae ocorrentes no Cerrado de Mato Grosso do Sul, através do isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários de *Erythroxylum suberosum* particularmente os bioativos no ensaio de toxicidade para *Artemia salina*.

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *ERYTHROXYLUM*

1.1.1 - FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE - GÊNERO *Erythroxylum*

Erythroxylaceae é constituída de quatro gêneros, *Aneulophus* Benth., *Erythroxylum* P. Browne, *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodiu* Exell & Mendonça (PLOWMAN 2001), com distribuição subtropical, tendo como principal centro de diversidade e endemismo a América do Sul, especialmente o Brasil e a Venezuela (DALY, 2004). A maioria das espécies desta família pertence ao gênero *Erythroxylum* (cerca de duzentas e cinquenta), que apresenta distribuição ampla, sendo encontrado nos continentes Americano, Africano, Asiático e Oceania (97% das espécies ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com a principal diversidade na América do Sul e Madagascar) (BARREIROS, 2005; BRACHET, 1997). Os demais gêneros, *Aneulophus*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*, apresentam número reduzido de espécies e distribuição restrita à África tropical (PLOWMAN, 2001).

No Brasil, um dos principais centros de diversidade de espécies de *Erythroxylum*, são encontradas cento e dezesseis espécies das cento e oitenta e sete registradas para a América tropical por Plowman & Hensold (2004). Destas, aproximadamente setenta e quatro (63,79%) possuem distribuição restrita.

Um levantamento feito na literatura mostrou que várias espécies deste gênero possuem propriedades medicinais, sendo as populares cocas (*E. coca* Lamk. e *E. novogranatense* (D. Morris Hieron), com propriedades estimulantes do sistema nervoso central e como anestésicos locais e suas variedades as mais conhecidas e estudadas devido à presença de alcaloides tropânicos em suas folhas, sendo a cocaína o mais conhecido (GRIFFIN, 2000). No entanto, somente alguns membros deste gênero acumulam estes alcaloides em quantidade (GRIFFIN, 2000).

Outros estudos farmacológicos realizados com espécies do gênero *Erythroxylum* descrevem o uso de algumas delas para o tratamento de eczema, erupção cutânea por urtiga, hemorróidas e nevralgia (CHIN, 2006).

Além de alcaloides do tipo tropano, outras classes de metabólitos secundários, tais como diterpenoides (ANSELL, 1993; DOS SANTOS, 2003; DOS SANTOS, 2006; BARREIROS, 2007; DOS SANTOS, 2005), flavonoides (JOHNSON, 2003; CHAVEZ, 1996; JOHNSON, 1998; JOHNSON, 1997; BARREIROS, 2005; BOHM, 1981; JOHNSON, 2004), taninos (KOLODZIEY, 1991; BONEFELD, 1986) e triterpenoides (BARREIROS, 2005), também são encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*.

1.1.2 – PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO GÊNERO *ERYTHROXYLUM*

1.1.2.1 - Alcaloides

As espécies de *Erythroxylum* são muito conhecidas pela produção de alcaloides tropânicos. No entanto, somente alguns membros deste gênero acumulam estes alcaloides em quantidade (GRIFFIN, 2000).

Há muitos relatos biológicos e farmacológicos sobre os alcaloides tropânicos, especialmente em relação aos efeitos neuroquímicos e fisiológicos da cocaína (FODOR, 1991; FODOR, 1993). Na figura 1, pág. 5, é apresentado o esqueleto básico deste grupo de alcaloides presentes em *Erythroxylum*.

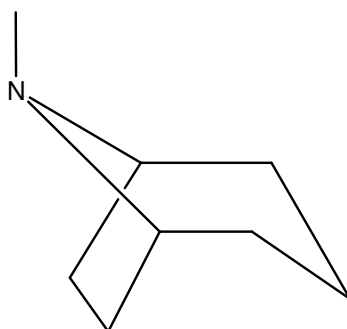


Figura 1: Esqueleto básico dos alcaloides tropanicos

Na literatura há também relatos de atividade antifúngica e citotóxica para alcaloides com esse tipo de esqueleto (KHATTAK, 2002; CHAVES, 2002).

1.1.2.2 - Flavonoides

A ocorrência de flavonoides em Erythroxylaceae é restrita ao gênero *Erythroxylum*, sendo os flavonoides quercetina e kaempferol (Fig. 2, pág. 6) e seus 3-glicosídeos correspondentes considerados marcadores quimiotaxonômicos deste gênero (INIGO & POMILIO, 1985; BOHM, 1988; GONZÁLEZ – GUEVARA, 2006; BARREIROS, 2004). A presença de flavonoides e estéres de ácido graxo de triterpenos demonstraram uma característica comum nas espécies brasileiras de *Erythroxylum* (BARREIROS & FRAGA, 2001 e CHAVES, 1996).

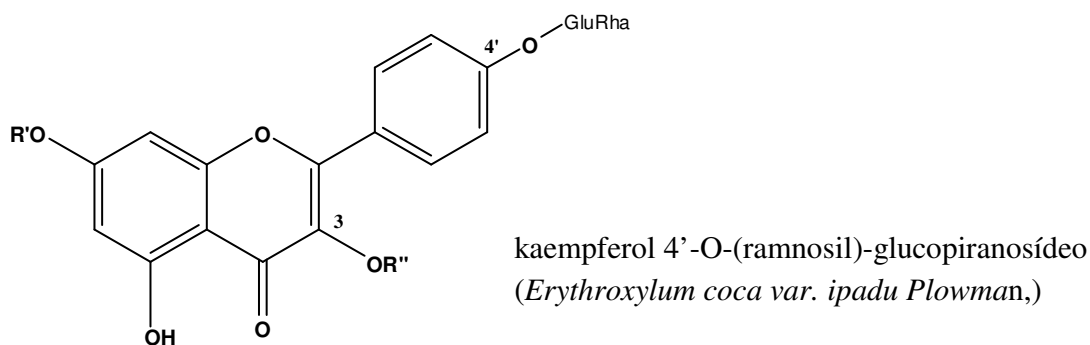
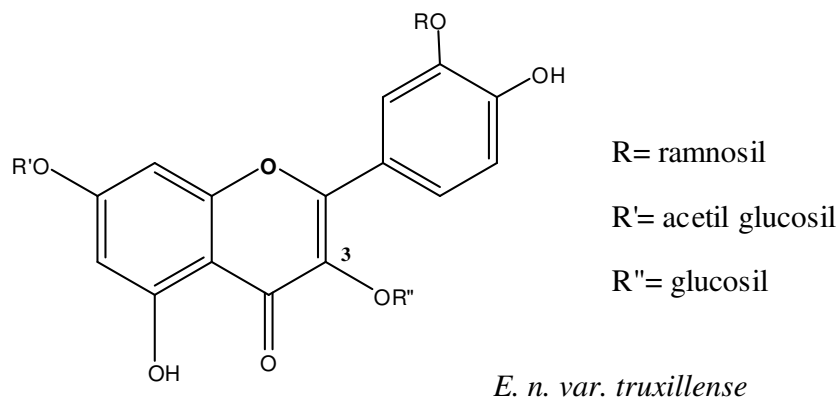


Figura 2: Flavonóides derivados de quercetina e kaempferol encontrados em *Erythroxyllum*

1.1.2.3 - Diterpenos

A maioria dos diterpenos obtidos de espécies de *Erythroxyllum* possui esqueletos dos tipos *ent*-eritroxilano, *ent*-beierano, *ent*-caurano, *ent*-devadarano e *ent*-labdano (Fig. 3, pág. 7), sendo também encontrados diterpenos do tipo *ent*-rosano, *ent*-pimarano, rianodano e outros de menor ocorrência (DOS SANTOS, 2003; BARREIROS, 2007; DOS SANTOS, 2005).

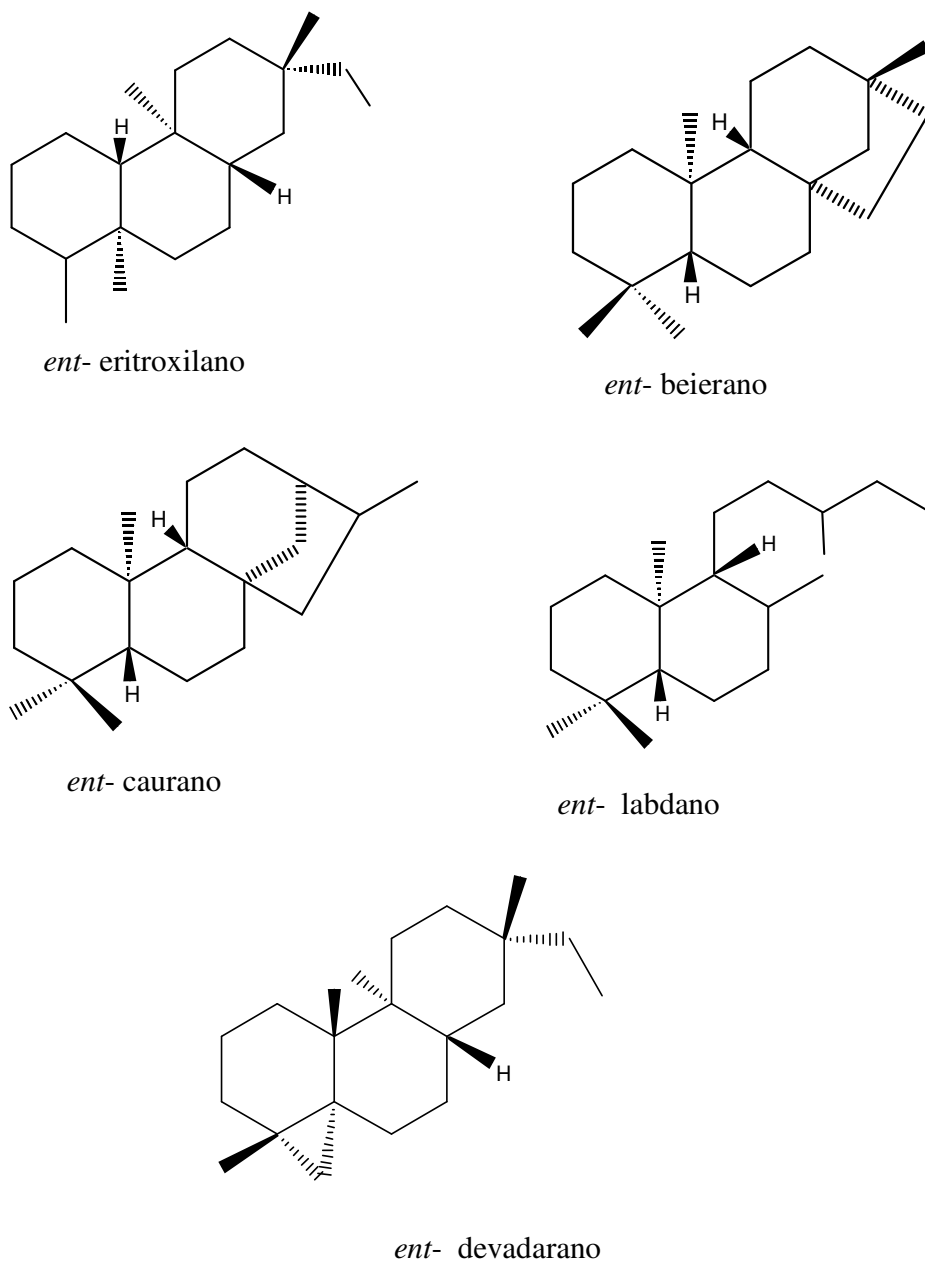


Figura 3: Diterpenos de maior ocorrência no gênero *Erythroxylum*.

Para os diterpenos com esqueletos do tipo *ent*-caurano isolados de *Erythroxylum* há relatos na literatura de atividade antibacteriana (KUBO, 2004) e atividade citotóxica

(WANG, 2009). Para os do tipo beierano há relatos de atividade antimicrobiana e espasmolítica (ZAMILPA, 2002; MCCHESENEY, 1991), enquanto que para os com esqueleto abietano são descritas atividades citotóxica (GUERRERO, 2006).

1.2 - ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO GÊNERO *ERYTHROXYLUM*

Em 2008, a IARC/OMS estimou a ocorrência de 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (WORLD CANCER REPORT, 2008).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (Figura 4, pág. 9).

Bioensaios têm sido frequentemente utilizados para monitoramento da atividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas e dentre esses ensaios encontra-se o de toxicidade para *Artemia salina*. Este teste é utilizado em estudos químicos biomonitorados de extratos vegetais como uma ferramenta para detectar a presença de substâncias com potencial atividade citotóxica (MCLAUGHLIN, 2008).

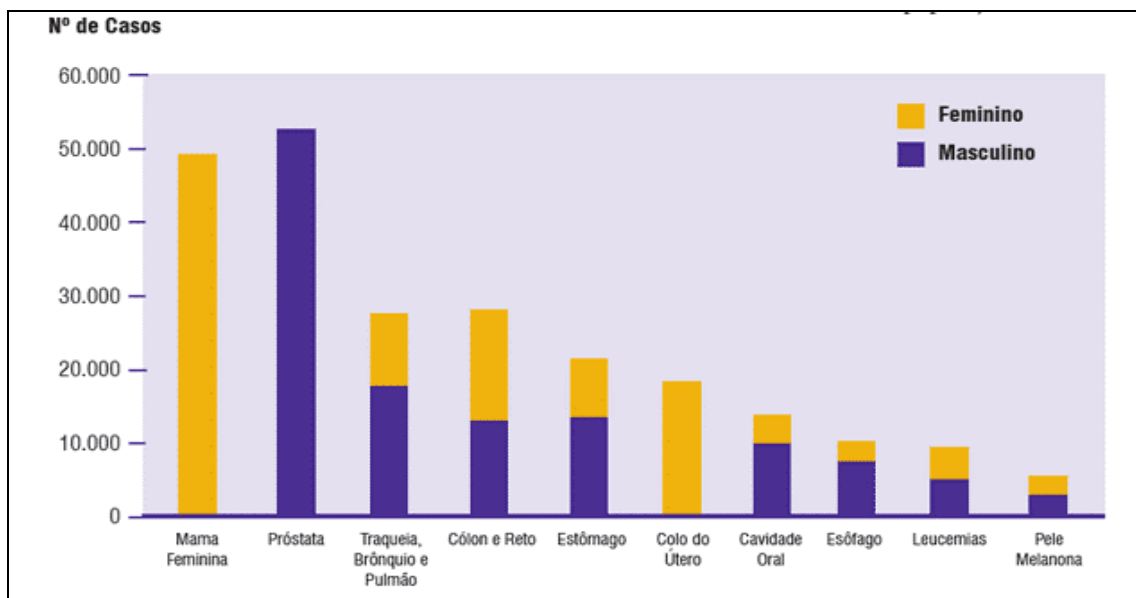


Figura 4: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira. (Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA/MS)

Na literatura há relatos de extratos e substâncias obtidas de espécies do gênero *Erythroxylum* com atividade citotóxica. As substâncias relatadas pertencem à classe dos alcaloides, como *Pervilleina* A. Este alcalóide, atualmente em fase de testes pré-clínicos, foi isolado das raízes de *Erythroxylum pervillei* Baill. e mostrou-se citotóxico frente a uma linhagem de células de câncer epidermóide oral (KB-V1) multiresistente a drogas, na presença do agente anticancerígeno vimblastina (SILVA, 2001; MI, 2001; MI, 2003). Na tabela 1, pág. 10, 11 e 12 são apresentados, além de *E. pervillei*, outros exemplos de espécies de *Erythroxylum* estudadas e suas respectivas atividades biológicas.

Tabela 1. Atividade citotóxica de alguns extratos e substâncias isoladas de espécies de *Erythroxylum*.

EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS	ATIVIDADES	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
------------------------	------------	---------	------------

	ENCONTRADAS		
<p>Extratos etanólico (Folhas)</p>	<p>Potencial atividade anticâncer frente à linhagem de células HepG2 (célula de fígado)</p>	<p><i>Erythroxylum cuneatum</i></p>	<p>SATOH, 2000.</p>
<p><i>Pervilleina A</i></p>	<p>Linhagens de células neoplásicas humanas: (BCI); (Lu1); (Col2); (KB-V1+); (KB-V1-); (LNCaP); (SW626)], multiresistência (adenocarcinoma de ovário SKOV3); (adenocarcinoma de ovário BSKVLB); (SKVLB)</p>	<p><i>Erythroxylum pervillei</i></p>	<p>KINGHORN & PEZZUTO, 2002</p>
<p>Extrato etanólico (FOLHAS)</p>	<p>Atividade citotóxica</p>	<p><i>Erythroxylum catuaba</i></p>	<p>PRAYONG, 2008.</p>

Tabela 1 - continuação

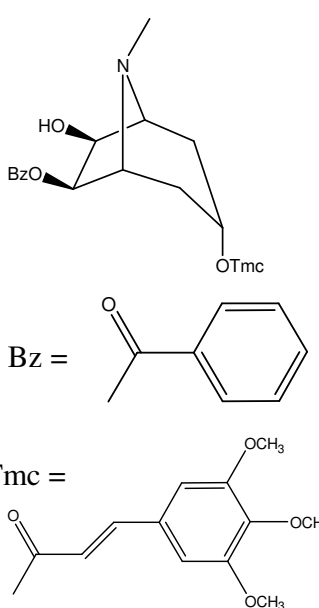
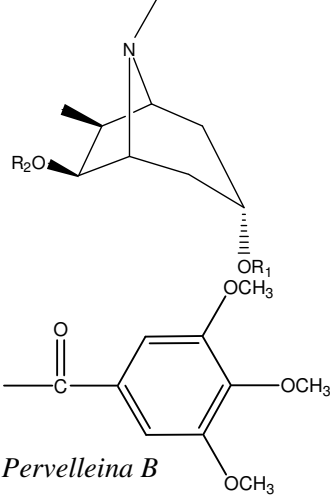
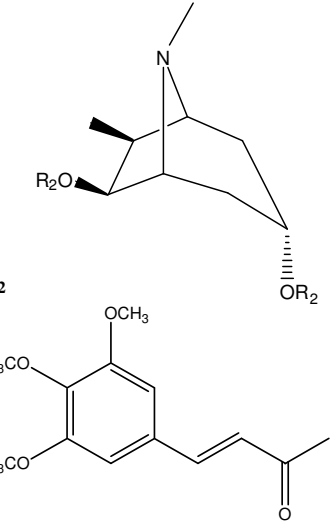
 <p>Bz =</p> <p>Tmc =</p> <p>6β-Benzoilóxi-3α-(E)- (3,4,5- trimetoxicinamoilóxi)- tropano-7β-ol</p>	<p>Potencial atividade anticâncer frente à linhagem de células KB-V1 (câncer humano/carcinoma)</p>	<p><i>Erythroxylum rotundifolium</i></p>	<p>CHAVEZ, 2002</p>
--	--	--	---------------------

Tabela 1 - continuação

 <p>R₁</p> <p><i>Pervelleina B</i></p>	<p>sensibilidade frente à cultura de células neoplásicas humanas</p> <p>KB-</p>	<p><i>Erythroxyllum pervillei</i></p>	<p>MI, 2002</p>
 <p>R₂</p> <p><i>Pervelleina C</i></p>			

1.3 - OCORRÊNCIA E ESTUDOS DE PLANTAS DO GÊNERO *ERYTHROXYLUM* NO BRASIL

Em espécies de *Erythroxylum* ocorrentes no Brasil, os alcaloides tropânicos são bastante frequentes. Em um levantamento feito na literatura sobre o estudo químico das espécies brasileiras *E. nummularia*, *E. barbatum*, *E. passerinum*, *E. argentinum*, *E. leal costae*, *E. vacciniifolium*, *E. deciduum*, *E. microphyllum*, *E. pelleterianum*, *E. caatingae* e *E. cuneifolium*, foi relatada a presença de alcaloides tropânicos em seis delas (*E. vacciniifolium*, *E. argentinum*, *E. deciduum*, *E. microphyllum*, *E. pelleterianum* e *E. cuneifolium*) [ZANOLARI, 2003; ZUANAZZI, 2001; ZANOLARI, 2005]. Nas demais espécies foi descrita a ocorrência de triterpenos pentacíclicos (BARREIROS, 2005; CHAVES, 1996), flavonoides (BARREIROS, 2005; CHAVES 1996) e diterpenos (BARREIROS, 2007; DOS SANTOS, 2005; DOS SANTOS, 2003).

1.3.1 – *ERYTHROXYLUM SUBEROSUM* ST. HIL.

A espécie denominada *E. suberosum* St. Hil. (figura 5, pág. 14) é um arbusto ou arvoreta de casca suberosa, conhecida popularmente por “cabelo-de-negro”, “mercúrio do campo” e “galinha choca”. Possui folhas simples, alternas, curto-pecioladas, glabras, opacas, coriáceas, com cerca de 8 cm de comprimento e 3,5 cm de largura, margem geralmente ondulada, nervura central fina na face superior, proeminente na base em ambas as faces. As flores são brancas ou de coloração creme, dispostas em grupos axilares de 6 a 25 cm e os frutos drupas ovóides vermelhas, com cerca de 7 mm de comprimento (DURIGAN, 2004).

No Brasil ocorre em todas as regiões, com exceção da Região Sul, sendo típica do Cerrado [www.liberherbarum.com].



Figura 5: *Erythroxylum suberosum* St. Hil.

2 – OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivos:

- Realizar o estudo químico dos galhos de *Erythroxylum suberosum* ainda não estudada quimicamente, guiado pelo ensaio de toxicidade para *Artemia salina*, visando ao isolamento e elucidação estrutural de seus metabólitos secundários, particularmente os bioativos.

- Realizar o estudo químico das folhas de *Erythroxylum suberosum*, visando ao isolamento e elucidação estrutural de seus metabólitos secundários.

3 – METODOLOGIA

3.1 – ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os galhos de *E. suberosum* foram moídos em moinho de facas da marca Willy.

Foram utilizadas para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas solventes do grau PA (Merck, Vetec, QM e Synth).

Nos processos cromatográficos foram utilizados:

- o Gel de sílica do tipo 60G e/ou 60GF₂₅₄ (de 5 a 40 µm da Merck) para CCDA.
- o Gel de sílica do tipo 60, partículas 63 a 200 µm (Merck) e 40 a 63 µm (Merck) e De Sephadex LH-20, partículas 25 a 100 µm (Sigma) para cromatografia em coluna.

A revelação dos cromatogramas em placas de camada delgada analítica foi feita empregando-se solução a 2% de sulfato cérico em H₂SO₄ 2N e através de inspeção à luz UV (monitor UV de mão, modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm) em câmara escura, utilizando-se sílica com indicador fluorescente.

Os espectros de RMN uni-e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-300, a 300 MHz e 75 MHz para RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ¹H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de ¹³C. As amostras foram solubilizadas em CDCl₃, DMSO – d₆ ou CD₃OD da marca Merck.

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin Elmer 341.

Os espectros de massas de alta resolução (HRESI-MS) foram obtidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP-SP em aparelho UltrOTOF-Q (Bruker Daltonics), com ionização por *electrospray* e operando no modo positivo.

Os espectros de IV foram registrados em aparelho Bomem MB – Série Hartmann & Braun, sendo as amostras dissolvidas em CHCl₃ e preparadas na forma de filme.

3.2 - COLETA DO MATERIAL VEGETAL, OBTENÇÃO E PARTIÇÃO DOS EXTRATOS DE *E. suberosum* (GALHOS E FOLHAS).

Os galhos e folhas de *E. suberosum* foram coletados em 30/07/2009, no município de Campo Grande/ MS, pelo Prof. Dr. Walmir Silva Garcez (Departamento de Química, UFMS) e pelo botânico Dr. Arnildo Pott (Departamento de Biologia, UFMS).

Os galhos de *E. suberosum* (6,94 kg) foram secados, triturados e submetidos à extração com etanol durante quinze dias, à temperatura ambiente. O extrato etanólico obtido foi particionado de acordo com o fluxograma presente na figura 6 (pág.18).

As folhas (345,7 g) foram secadas, trituradas e submetidas à extração com etanol durante quinze dias, à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi particionado de acordo com o fluxograma mostrado na figura 7 (pág.19).

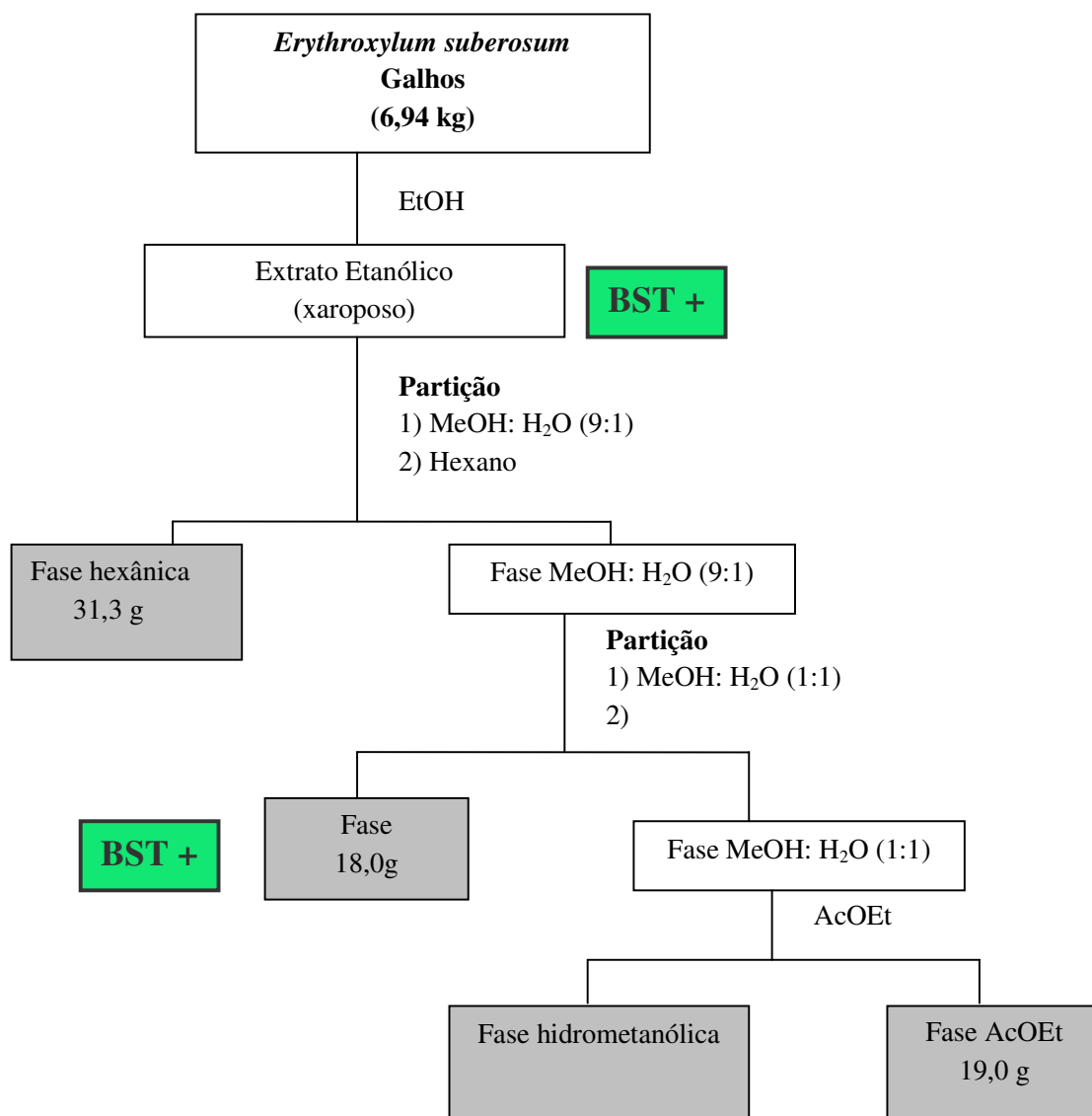


Figura 6: Obtenção e partição do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*.

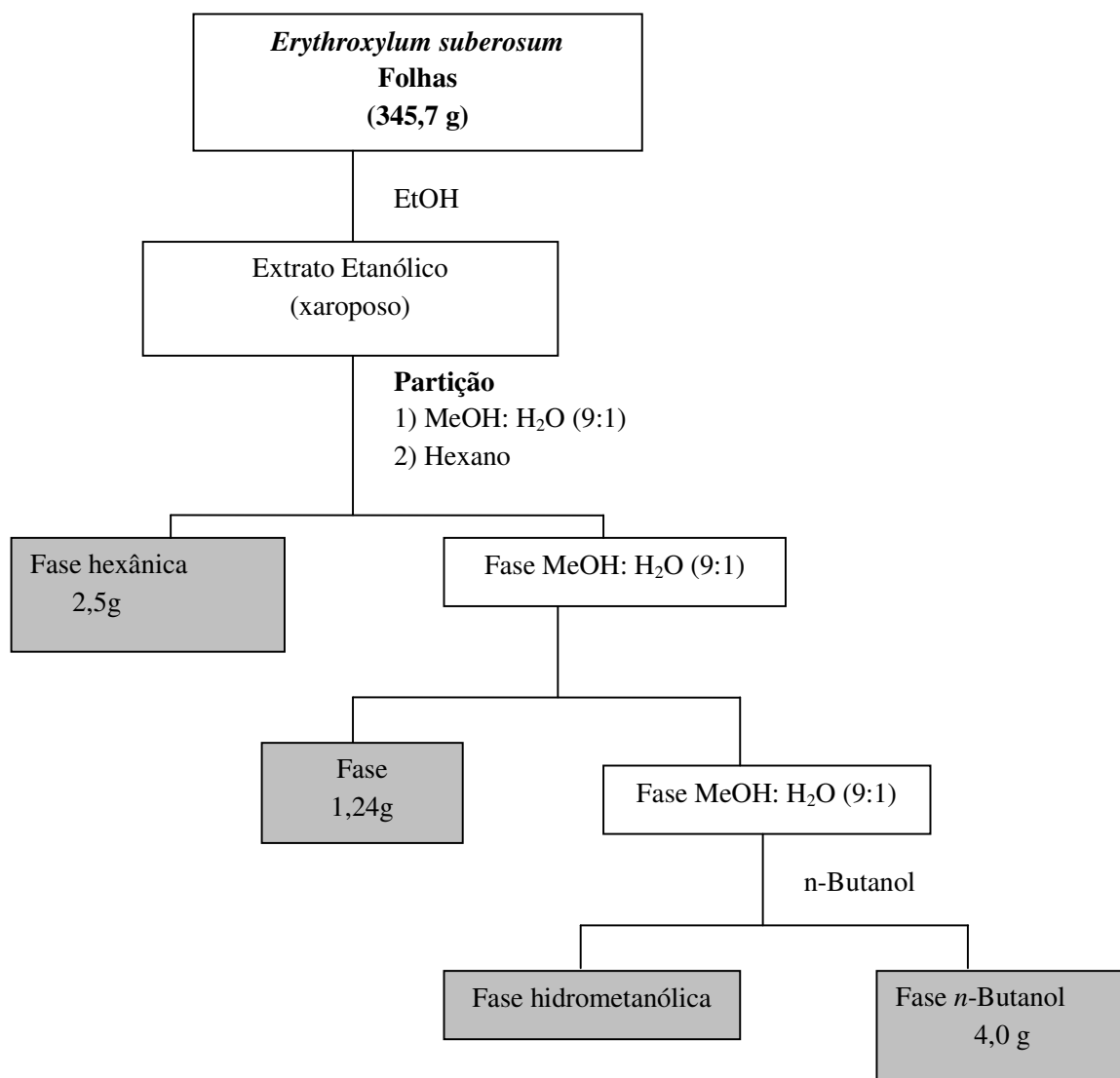


Figura 7: Obtenção e partição do extrato etanólico das folhas de *E. suberosum*.

3.3 - ESTUDO QUÍMICO DOS GALHOS DE *E. SUBEROSUM* GUIADO PELO ENSAIO DE TOXICIDADE PARA *ARTEMIA SALINA* – Fracionamento da fase clorofórmica bioativa.

Parte da fase clorofórmica (18,0 g) foi submetida a uma filtração em coluna de sílica gel (70-230 mesh). O sistema foi eluído com gradiente de polaridade crescente como mostra a tabela 2 (pág. 20). Foram coletadas 7 frações de 600 mL cada, denominadas ESC.

Tabela 2. Frações obtidas da cromatografia da fase clorofórmica do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa(g)
Hexano	ESC-1	1,3
Hexano: AcOEt (9:1)	ESC-2	1,1
Hexano: AcOEt (8:2)	ESC-3	3,7
Hexano: AcOEt (5:5)	ESC-4	1,7
AcOEt	ESC-5	2,0
AcOEt : MeOH (8:2)	ESC-6	5,9
AcOEt : MeOH (8:2)	ESC-7	1,5

Após serem submetidas ao ensaio BST e também avaliadas por CCDA e RMN de ^1H e ^{13}C , selecionou-se a fração ESC-5 bioativa para estudo. A fração ESC-6, embora inativa no ensaio BST, também foi selecionada para estudo com base nas análises por CCDA e RMN de ^1H e ^{13}C . As figuras 8 e 9, pág. 31 e 32 apresentam os fluxogramas representativo dos processos cromatográficos de separação das frações ESC-5 e ESC-6.

3.3.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ESC-5

A fração ESC-5 (1,9 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh), sendo o sistema eluído com Hex/AcOEt (85:15) e coletadas 137 frações de 10 mL cada, (Tabela 3, pág. 21). As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 9 frações denominadas como descrito na tabela 4, pág. 22.

Da fração ESC5-137 obteve-se o 3-*O*-Acil- β -sitosterol (**XIII**, 31,2 mg).

Tabela 3. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC-5 da fase clorofórmica

Eluente	Fração
HEX/AcOEt (85:15)	1 a 25
HEX/AcOEt (80:20)	26 a 35
HEX/AcOEt (70:30)	36 a 60
HEX/AcOEt (60:40)	61 a 97
HEX/AcOEt (40:60)	98 a 120
HEX/AcOEt (80:20)	121
AcOEt	121
AcOEt/MeOH (50:50)	122 a 136
MeOH	137

Tabela 4. Frações reunidas provenientes da cromatografia da fração ESC-5 da fase clorofórmica

Fração	Massa (mg)
ESC5-1 a 14	29,5
ESC5-15 a 46	23,9
ESC5-47 a 58	42,0
ESC5-59 a 92	149,3
ESC5-93 a 120	569,3
ESC5-121	280,0
ESC5-122 a 124	456,0
ESC5-125 a 136	30,2
ESC5-137	31,2

Após avaliação pelo ensaio BST e também por CCDA e RMN de ^1H e ^{13}C , foram selecionadas para estudo as frações ESC5-59 a 92, ESC5-93 a 120, ESC5-121 e ESC5-122 a 124.

3.3.1.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ESC5-59a92

A fração ESC5-59a92 (129,3 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com DCM/HEX (8:2). Foram coletadas 23 frações de 3 ml cada, denominadas ESC59/92. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 4 frações denominadas como descrito na tabela 5, pág. 23.

Tabela 5. Frações obtidas da cromatografia da fração ES5-59a92 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC59/92-1a12	33,8
ESC59/92-13a17	29,0
ESC59/92-18a22	42,6
ESC59/92-23	18,9

3.3.1.1.1 – Fracionamento cromatográfico da fração ESC59/92-13a17

A fração ESC5976-13a17 (29,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃. Foram coletadas 23 frações de 3 ml cada, denominadas ESC13/17. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 4 frações denominadas como descrito na tabela 6 (pág. 23).

Tabela 6. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC59/92-13a17 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC13/17-3a14	3,0
ESC13/17-15a21	13,4
ESC13/17-22	4,4
ESC13/17-23	6,8

3.3.1.1.2 – Fracionamento cromatográfico da fração ESC13/17-15a21 – obtenção do diterpeno V e do esteroide XII

A fração ESC1317-15a21 (13,4 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃. Foram coletadas 58 frações de 3 ml cada, denominadas ESC15/21. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 4 frações denominadas como descrito na tabela 7 (pág.24).

Da fração ESC15/21-22a26 obteve-se o *ent*-12 α -hidróxi-caur-16-en-19-al (V, 4,2 mg) e da fração ES15/21-27a31 o β -sitosterol (XII, 5,7 mg).

Tabela 7. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC1317-15a21 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC1521-1a21	1,4
ESC1521-22 ^a 26	4,2
ESC1521-27 ^a 31	5,7
ESC1521-32 ^a 38	1,3
ESC1521-39 ^a 58	0,2

3.3.1.1.3 – Fracionamento cromatográfico da fração ESC59/92-18a22 – obtenção do diterpeno II

A fração ESC59/92-18a22 (42,6 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃. Foram coletadas 20 frações de 3 ml cada, denominadas ESC18/22. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 3 frações denominadas como descrito na tabela 8, pág. 25.

Da fração ES18/22-18a20 obteve-se o 16-hidroxiabiet-15(17)-en-7-ona (**II**, 20,0 mg).

Tabela 8. Frações obtidas da cromatografia da fração ES59/92-18a22 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC1822-1a13	11,9
ESC1822-14a17	8,6
ESC1822-18a20	20,0

3.3.1.2 – Fracionamento cromatográfico da fração ESC5-93a120 - obtenção do diterpeno I

A fração ESC5-93a120 (549,3 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com MeOH. Foram coletadas 36 frações, denominadas ESC93/120. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 5 frações denominadas como descrito na tabela 9.

Tabela 9. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC5-93a120 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC93/120-1 a 7	73,6
ESC93/120-8 a 16	50,0
ESC93/120-17 a 21	228,0 (oleosa)
ESC93/120-22 a 27	124,7 (oleosa)
ESC93/120-28 a 36	46,4

Da fração ESC93/120-17 a 21 foi identificado o 7-oxo-16-hidroxiabiet-15(17)-en-19-al (**I**, 228,0 mg).

Na CCDA da fração ESC93/120-8a16 (50,0 mg) foi possível observar duas manchas, após eluição em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e revelação com sulfato cérico. Esta fração foi então analisada por RMN de ^1H e ^{13}C e seus componentes foram identificados como sendo uma mistura de um diterpeno com um diglicerídeo.

3.3.1.2.1- Fracionamento cromatográfico da fração ESC93/120-8a16

A fração ESC93/120-8a16 (50,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl_3 . Foram coletadas 21 frações de 3 ml cada, denominadas ESC8/16. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 3 frações denominadas como descrito na tabela 10 (pág.26).

Tabela 10. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC93/120-8a16 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC8/16-1a12	11,6
ESC8/16-13a17	10,9
ESC8/16-18a21	20,7

3.3.1.2.2 - Fracionamento cromatográfico da fração ESC8/16-18a21 – obtenção do diterpeno IV

A fração ESC816-18a21 (20,7 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl_3 . Foram coletadas 41 frações de 3 ml cada, denominadas ESC18/21. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 5 frações denominadas como descrito na tabela 11 (pág.27).

Da fração ESC18/21-18a26 obteve-se o *ent-7 α* , 15 β -diidóxi-caur-16-en-19-oato de metila (**IV**, 6,5 mg).

Tabela 11. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC8/16-18a21 da fase clorofórmica

Fração	Massa (mg)
ESC18/21-1a7	3,1
ESC18/21-18a26	6,5
ESC18/21-27a31	4,1
ESC18/21-32a35	2,8
ESC18/21-36a41	2,5

3.3.1.3 - Fracionamento cromatográfico da fração ESC5-121 – obtenção do diterpeno I

A fração ESC5-121 (245,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com DCM/HEX (8:2). Foram coletadas 27 frações de 3 ml cada, denominadas ESC121. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 5 frações denominadas como descrito na tabela 12.

Tabela 12. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC5-121 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC121-1a7	39,0
ESC121-8a15	38,8
ESC121-16a18	47,5
ESC121-19a22	35,6
ESC121-23a25	57,9

As frações ESC121-16a18 (47,5 mg) e ESC121-19a22 (35,6 mg) foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C e seus componentes foram identificados como sendo o diterpeno 7-oxo-16-hidroxiabiet-15(17)-en-19-al (**I**).

3.3.1.4 - Fracionamento cromatográfico da fração ESC5-122a124

A fração ESC5-122a124 (436,0 mg) xaroposa foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com DCM/HEX (8:2). Foram coletadas 30 frações de 3 ml cada denominadas ESC122/124. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 6 frações denominadas como descrito na tabela 13.

Tabela 13. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC5-122a124 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC122/124-1a8	37,0
ESC122/124-9a15	88,7
ESC122/124-16a19	99,9
ESC122/124-20a26	98,7
ESC122/124-26a27	53,2
ESC122/124-28a30	42,6

3.3.1.4.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ESC122/124-20a26

A fração ESC122/124-20a26 (98,7 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl_3 . Foram coletadas 33 frações de 3 ml cada, denominadas ES20/26. As frações foram

analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 5 frações denominadas como descrito na tabela 14.

Tabela 14. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC122/124-20a26 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ES20/26- 1a11	8,8
ES20/26-12a17	19,6
ES20/26-18a25	12,3
ES20/26-26a30	29,3
ES20/26-31a34	23,1

3.3.1.4.2 - Fracionamento cromatográfico da fração ES20/26-18a25 – obtenção do diterpeno III

A fração ES20/26-18a25 (12,3 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃. Foram coletadas 37 frações de 3 ml cada, denominadas ES18/25. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 4 frações denominadas como descrito na tabela 15 (pág.30).

Da fração ES1825-22a27 obteve-se o 7 β ,16-diidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (**III**, 5,2 mg).

Tabela 15. Frações obtidas da cromatografia da fração ES20/26-18a25 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ES18/25- 1a21	1,3
ES18/25-22a27	5,2
ES18/25-28a34	2,7
ES18/25-35a37	1,1

3.3.2 – Fracionamento cromatográfico da fração ESC-6 – obtenção do flavonoide VII e do aminoácido XI

Parte da fração ESC-6 (315,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com MeOH. Foram coletadas 30 frações de 10 mL cada, denominadas ESC6. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 11 frações denominadas como descrito na tabela 16.

Da fração ESC6-10-11 obteve-se o ombuína-3-rutinosídeo (VII, 20,5 mg) e da fração ESC6-13 obteve-se o L-aspartato de etila (XI, 8,6 mg).

Tabela 16. Frações obtidas da cromatografia da fração ESC-6 da fase clorofórmica.

Fração	Massa (mg)
ESC6-2e3	4,8
ESC6-4e5	61,2
ESC6-6e7	23,8
ESC6-8e9	20,0
ESC6-10-11	20,5
ESC6-12	6,0
ESC6-13	8,6
ESC6-14	10,0
ESC6-15e16	12,0

Figura 8 – Fracionamento cromatográfico da fase cloroformica proveniente do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*.

Figura 9: (continuação) Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica proveniente do extrato etanólico da segunda coleta dos galhos de *E. suberosum*.

3.4 – ESTUDO QUÍMICO DOS GALHOS DE *E. suberosum* - Fracionamento da fase hexânica

3.4.1 – obtenção do esteróide XIV

Parte da fase hexânica (1,5g) foi submetida inicialmente a uma cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 60 (230-400 mesh). O sistema foi eluído com misturas de hexano-AcOEt em gradiente de polaridade, tendo sido coletadas 68 frações de 10 mL cada, denominadas ESH. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 15 frações. Da fração ESH-62 (eluída com AcOEt) obteve-se o composto **XIV** [(6'-*O*-Acil)-3-*O*-β-D-glucopiranosilsterol] (56,0 mg).

3.5 - ESTUDO QUÍMICO DOS GALHOS DE *E. suberosum* - Fracionamento da fase acetato de etila

Parte do material presente na fase acetato de etila (1,0g) foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna, utilizando-se sílica de fase reversa RP-18. O sistema foi eluído com um gradiente de polaridade decrescente como mostrado na tabela 17 (pág. 34). Foram coletadas 7 frações de 200 mL cada, denominadas de ESA. As frações foram analisadas por CCDA.

Tabela 17. Frações obtidas da cromatografia da fase acetato de etila do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa
MeOH/H ₂ O (1:1)	ESA-1	388,2
MeOH/H ₂ O(7:3)	ESA-2	61,6
MeOH/H ₂ O(8:2)	ESA-3	109,4
MeOH/H ₂ O(9:1)	ESA-4	59,1
MeOH	ESA-5	87,7
CHCl ₃ /AcOEt(1:1)	ESA-6	79,4
MeOH	ESA-7	69,8

3.5.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ESA-1 – obtenção dos flavonoides VIII e IX

A fração ESA-1 (388,2 mg) foi submetida inicialmente a uma coluna cromatográfica, utilizando-se Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com MeOH, tendo sido coletadas 40 frações de 10 mL cada, denominadas de ES1 e feita análise por CCDA de cada fração obtida.

As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 6 frações denominadas como descrito na tabela 18 (pág. 35).

Da fração ES1-5 obteve-se a mistura da catequina e (-)-epicatequina (**VIII e IX**, 16,8 mg).

Tabela 18. Frações obtidas da cromatografia da fração ESA-1 da fase Acetato de etila.

Fração	Massa (mg)
ES1-1	47,5
ES1-2	102,9
ES1-3	77,4
ES1-4	29,8
ES1-5	16,8
ES1-6	27,3

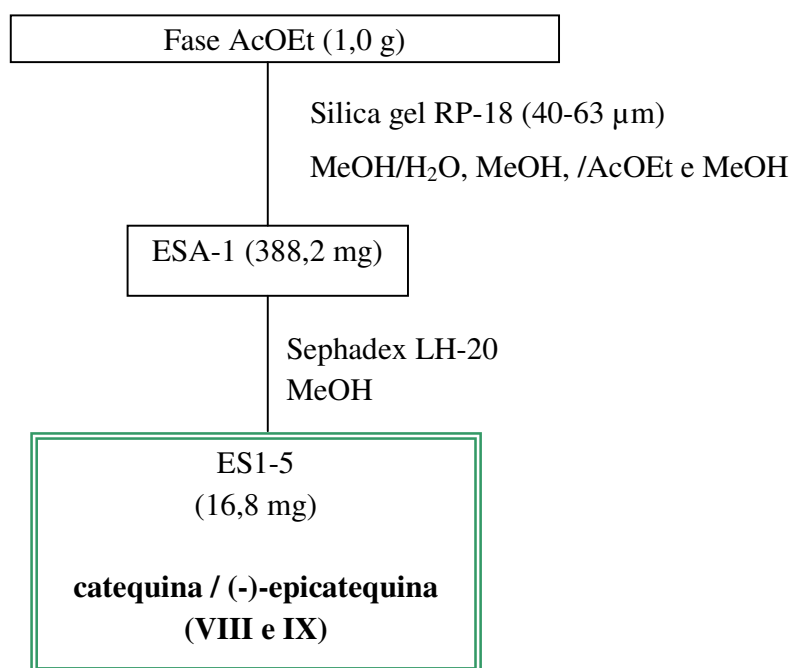


Figura 10: Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt proveniente do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*.

3.6 - ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. suberosum* – Fracionamento da fase hexânica

3.6.1 - Fracionamento da fase hexânica

O material presente na fase hexânica (2,5g), foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel (70-230 mesh). O sistema foi eluído com gradiente de polaridade crescente, como mostra a tabela 19. Foram coletadas 9 frações de 500 mL cada, denominadas de ES-HEX, e feita análise por CCDA de cada fração obtida.

Tabela 19. Frações obtidas da cromatografia da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	ES-HEX-1	567,9
Hexano: AcOEt (9:1)	ES-HEX-2	397,6
Hexano: AcOEt (8:2)	ES-HEX-3	212,0
Hexano: AcOEt (7:2)	ES-HEX-4	235,4
Hexano: AcOEt (6:4)	ES-HEX-5	97,4
Hexano: AcOEt (5:5)	ES-HEX-6	108,3
Hexano: AcOEt (3:7)	ES-HEX-7	87,5
AcOEt	ES-HEX-8	47,7
MeOH	ES-HEX-9	659,2

3.6.1.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ES-HEX-3

A fração ES-HEX-3 (212,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃:Hexano (3:7). Foram coletadas 34 frações, denominadas ES-HEX-3, e feita análise por CCDA de cada fração obtida. Após avaliação por CCDA, foram reunidas as frações, restando 4 frações denominadas como descrito na tabela 20 (pág. 37).

Tabela 20. Frações obtidas da cromatografia da fração ES-HEX-3 da fase hexânica das folhas de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa(mg)
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3-3 a 8	150,0
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3-9 a 22	44,8
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3-23 a 34	27,3
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3-35	5,1

3.6.1.1.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ES-HEX3-3 a 8

A fração ES-HEX3-3 a 8 (150,0 mg), foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃. Foram coletadas 25 frações, denominadas ES-HEX3-3 a 8, e feita análise por CCDA de cada fração obtida. Após avaliação por CCDA, foram reunidas as frações, restando 3 frações denominadas como descrito na tabela 21.

Tabela 21. Frações obtidas da cromatografia da fração da ES-HEX3-3 a 8 da fase hexânica das folhas de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa(mg)
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-1	69,8
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-2	40,3
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-3	9,8
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-4	11,6

3.6.1.1.1 - Fracionamento cromatográfico da fração ES-HEX3-3 a 8-2 – obtenção do diterpeno VI

A fração ES-HEX3 a 8-2 (40,3mg), foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com CHCl₃. Foram coletadas 25 frações, denominadas ES-HEX3 a 8-2, e feita análise por CCDA de cada fração obtida. Após avaliação por CCDA, foram reunidas as frações, restando 3 frações denominadas como descrito na tabela 22.

Da fração ES-HEX3 a 8-2-3 obteve-se o diterpeno (E)-fitol.

Tabela 22. Frações obtidas da cromatografia da fração da ES-HEX3 a 8-2 da fase hexânica das folhas de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa(mg)
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-2-1	20,3
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-2-2	5,3
CHCl ₃ :Hexano(7:3)	ES-HEX3 a 8-2-3	12,3

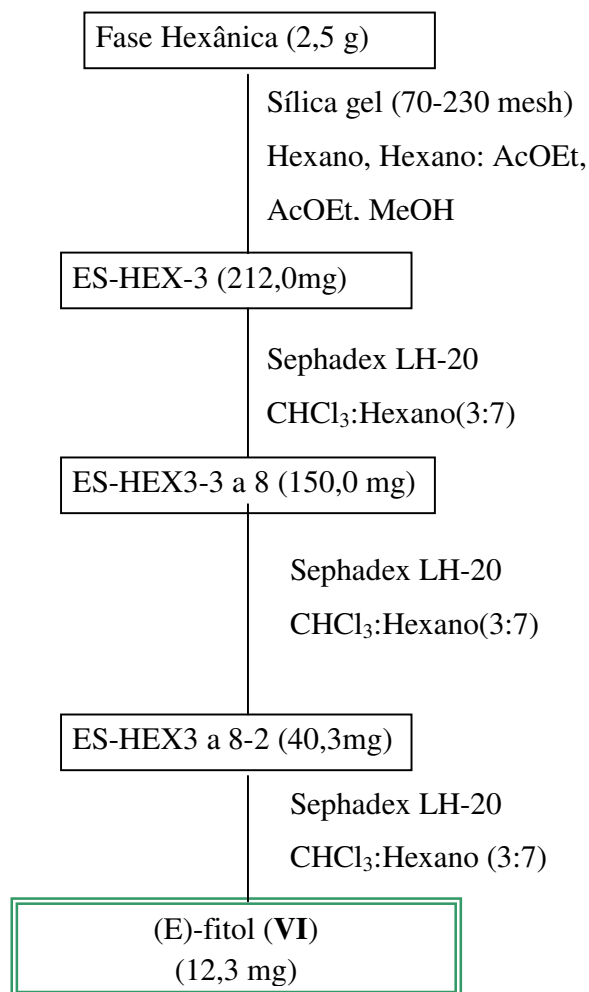


Figura 11: Fracionamento cromatográfico da fase hexânica proveniente do extrato etanólico das folhas de *E. suberosum*.

3.7 - ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. suberosum* - Fracionamento da fase *n*-Butanólica

O material presente na fase *n*-butanólica (1,0 g), foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna, utilizando-se sílica de fase reversa C-18. O sistema foi eluído com um gradiente de polaridade decrescente como mostrado na tabela 23. Foram coletadas 8 frações de 600 mL cada, denominadas de ESB. As frações foram analisadas por CCDA.

Tabela 23. Frações obtidas da cromatografia da fase *n*-butanólica do extrato etanólico da primeira coleta das folhas de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa (mg)
MeOH/H ₂ O (1:1)	ESB-1	20,0
MeOH/H ₂ O(7:3)	ESB-2	45,7
MeOH/H ₂ O(8:2)	ESB-3	176,3
MeOH/H ₂ O(9:1)	ESB-4	197,4
MeOH	ESB-5	298,7
CHCl ₃ /AcOEt(1:1)	ESB-6	97,2
CHCl ₃	ESB-7	10,0 mg
MeOH	ESB-8	103,6 mg

3.7.1 – Fracionamento cromatográfico da fração ESB-5 – obtenção do flavonóide X

A fração ESB-5 (298,7 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de Sephadex LH-20. O sistema foi eluído com MeOH. Foram coletadas 61 frações, denominadas ESB-5. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 6 frações denominadas como descrito na tabela 24 (pág.41).

Das frações ESB5-23a24, ESB5-25a28, ESB5-29a49, e ESB5-50a53 obteve-se o flavonoide denominado quercetina-3-rutinosídeo (**X**, 133,4 mg).

Tabela 24. Frações obtidas da cromatografia da fração ESB-5 da fase *n*-butanólica das folhas de *E. suberosum*.

Eluente	Fração	Massa (mg)
MeOH	ESB5-1a19	29,3
MeOH	ESB5-20a22	37,3
MeOH	ESB5-23a24	50,3
MeOH	ESB5-25a28	26,5
MeOH	ESB5-29a49	51,3
MeOH	ESB5-50a53	5,3
MeOH	ESB5-54a61	36,3

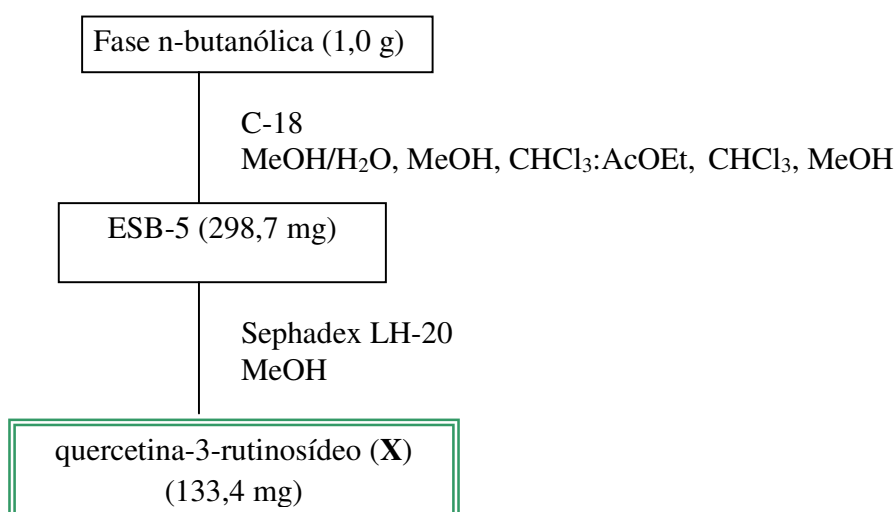


Figura 12: Fracionamento cromatográfico da fase *n*-butanólica proveniente do extrato etanólico das folhas de *E. suberosum*.

3.8 – TESTE DE TOXICIDADE PARA ARTEMIA SALINA

O ensaio de toxicidade para *Artemia salina* foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da UFMS, de acordo com a metodologia descrita na literatura [MEYER, 1982].

Preparou-se uma solução salina (3,8 g/L) e a ela foram adicionados ovos de *A. salina*. Após 48 horas os ovos eclodiram. As amostras foram preparadas nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL (Fases e extrato), e de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL (substâncias puras) todas em triplicata. A cada amostra foram adicionados 5mL da solução salina contendo 10 larvas dos microcrustáceos (*A. salina*). Após 24 horas registrou-se o número de sobreviventes. Os dados obtidos foram analisados no programa Probitos e calculada a DL₅₀ (dose necessária para provocar a morte de 50% dos indivíduos submetidos à análise).

3.9 – TESTE DE ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES (ENSAIO COM DPPH)

A avaliação quantitativa da capacidade antioxidante de substâncias puras foi determinada utilizando-se o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) pelo método da microdiluição com algumas modificações [MATSUKAWA, 1997; XUE ZHANG, 2007]. A solução de DPPH foi preparada em etanol com a concentração de 200µM. As substâncias puras foram preparadas em etanol nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25µM. Primeiramente, em uma placa de 96 poços foram adicionados em triplicata 100µl das substâncias puras nas várias concentrações, o controle positivo (BHT) e o controle negativo (etanol). Em seguida, foram adicionados 100µl da solução de DPPH. Em cada poço a concentração das substâncias foi diluída 1:1 assim como a concentração do DPPH. A placa foi incubada por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, efetuou-se a leitura em 517nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate – TP-Reader. A atividade sequestradora de radical (RSA) foi determinada de acordo com a fórmula $RSA (\%) = [(absorbância\ do\ controle\ negativo - absorbância\ da\ amostra) / absorbância\ do\ controle\ negativo] / 100$. A CI₅₀ foi determinada de acordo com o método de regressão linear.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias isoladas neste trabalho (Fig. 13, pág. 44; Fig. 14, pág. 45) foram obtidas das fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica, resultantes da partição do extrato etanólico das folhas e dos galhos de *E. suberosum*, através da utilização de técnicas cromatográficas descritas na parte experimental (item 3.2, pág. 17).

A determinação estrutural das substâncias foi efetuada com base em dados espectroscópicos de IV, RMN ^1H e ^{13}C (DEPT 135°), incluindo técnicas bidimensionais homo e heteronucleares (COSY ^1H - ^1H , NOESY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC), dados de EM e valores de rotação óptica; no caso das substâncias conhecidas a identificação também foi confirmada por comparação dos dados espectrais obtidos com os disponíveis na literatura.

Será discutida a elucidação estrutural das substâncias obtidas e para facilitar o entendimento, as mesmas foram reunidas em grupos de acordo com a sua classificação, independente da parte vegetal da qual foram extraídas.

Também serão apresentados os resultados obtidos das avaliações das atividades biológicas realizadas com os extratos, fases e/ou substâncias puras.

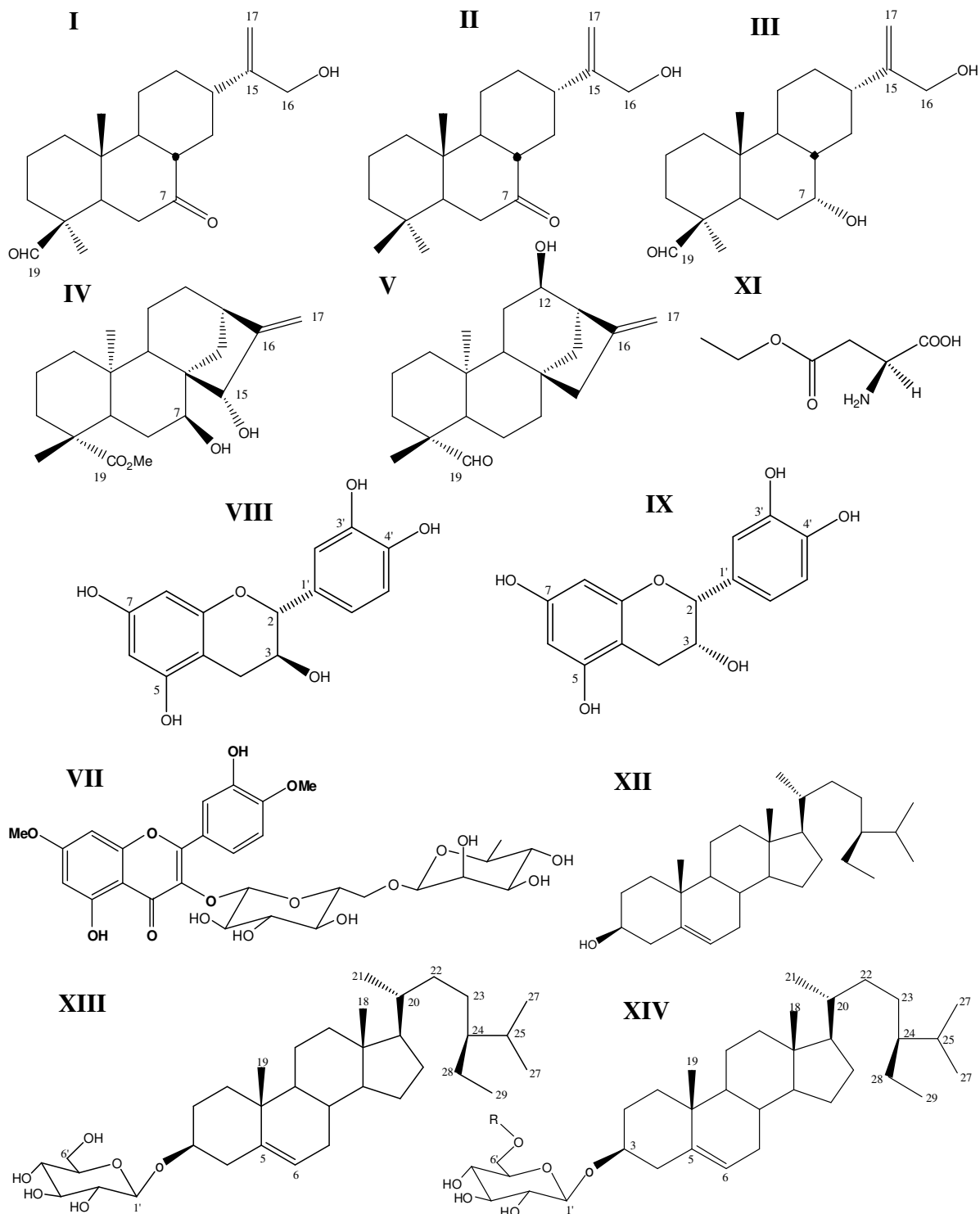


Figura 13 – Substâncias obtidas dos galhos de *Erythroxylum suberosum*

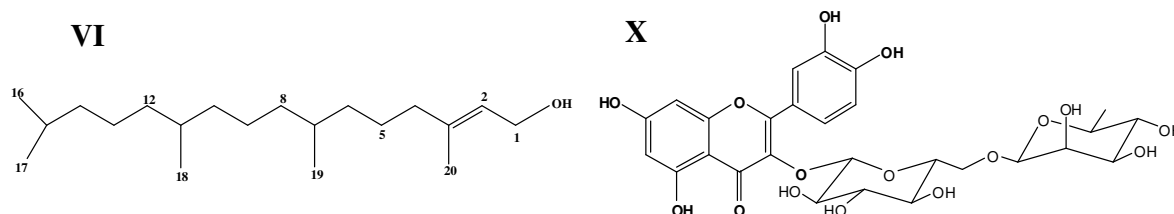


Figura 14 – Substâncias obtidas das folhas de *Erythroxylum suberosum*

4.1 – Estudo químico biomonitorado pelo ensaio BST da fase clorofórmica proveniente do extrato etanólico dos galhos

O extrato etanólico bioativo dos galhos (item 3.2 pág. 18) foi submetido a partições sucessivas entre MeOH/H₂O (9:1) e hexano, MeOH: H₂O (1:1) e e MeOH: H₂O (1:1) e AcOEt e verificou-se que a toxicidade para *A. salina* ficou concentrada na fase clorofórmica. Fracionamentos desta fase guiados pelo ensaio BST (item 3.2, pág.18) levaram ao isolamento a partir das frações bioativas de cinco diterpenos, responsáveis pela toxicidade para *A. salina* apresentada pelo extrato etanólico dos galhos.

4.1.1 – Diterpenos do tipo abietano e *ent*-caur-16-eno presentes nos galhos de *E. suberosum*

O estudo realizado com a fase clorofórmica proveniente do extrato etanólico dos galhos levou ao isolamento de diterpenos bioativos com esqueletos dos tipos abietano e *ent*-caur-16-eno.

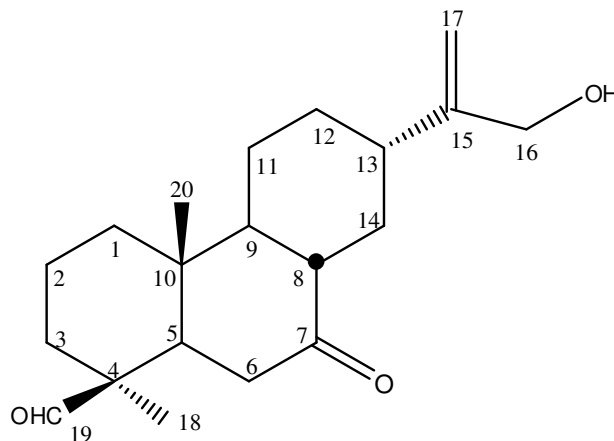
O esqueleto do tipo abietano pode surgir de pimaranos pela migração do grupo metila em C-13 (figura 15, pág. 47). O grupo dos diterpenos abietanos é dividido em sub-grupos,

incluindo furanoabietanos, *seco*-abietanos e *seco*-friedoabietanos, *nor*- e *homo*-abietanos, abeoabietanos e dímeros de abietano (BUCKINGHARES, 1994).

O esqueleto diterpênico do tipo caur-16-eno, por sua vez, surge da ciclização do cátion intermediário pimarano seguido do rearranjo (BUCKINGHARES, 1994). A maioria dos caur-16-enos ocorrentes na natureza pertence à série *ent* (Figura 15, pág.47).

Figura 15: Rota biossintética dos diterpenos com esqueletos abietano e *ent*-caur-16-eno.

4.1.1.1 – Elucidação estrutural do 7-oxo-16-hidroxiabiet-15(17)-en-19-al (I)



A substância **I** foi obtida das frações ESC93/120-17 a 21, ES5121-16a18 e ES5121-19a22, (parte experimental, itens 3.3.1.2 e 3.3.1.3, pág. 25 e 27).

No espectro de IV de I foram observados a 3460 cm^{-1} e 1704 cm^{-1} sugestivos de grupos hidroxila e de carbonila respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 17 e 18; pág. 53 e 54, e tabela 25) de **I** mostrou dois singletos largos a $4,88\ \delta$ e $5,01\ \delta$ referentes a hidrogênios olefínicos, um singlete a $4,09\ \delta$ proporcional a dois hidrogênios e sugestivo de hidrogênios carbinólicos, dois singletos relativos a duas metilas a $0,90$ e $0,98\ \delta$, além de um singlete a $9,75\delta$ indicativo de um hidrogênio de aldeído.

No espectro de RMN ^{13}C foram observados 20 sinais, os quais, com auxílio dos dados obtidos dos espectro de RMN de ^1H e das informações presentes no espectro DEPT-135°, sugeriram que **I** tratava-se de um diterpeno com fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, o que foi confirmado pelo íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ no espectro de massas de alta resolução de **I** (Fig. 31, pág. 61) a m/z 319,2268 (valor calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_3$: 319,2273), assim como o íon $[\text{M} + \text{Na}]$ a m/z 341,2110. Dentre os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C , destacaram-se os atribuídos a metilas a $13,1\ \delta$ e $23,7\ \delta$, dois carbonos quaternários a $47,5\ \delta$ e a $36,9\ \delta$, 2 carbonos olefínicos a $107,9\ \delta$ (CH_2) e $152,9\ \delta$ (C), um carbono metilênico carbinólico a $64,6\ \delta$,

uma carbonila cetônica a 210,5 δ e também uma carbonila de aldeído a 204,6 δ . Desta forma, o espectro de **I** foi caracterizado como sendo de um diterpeno tricíclico.

Com base nas correlações presentes no espectro foi feita a correspondência entre os hidrogênios e os seus respectivos carbonos, assim o espectro mostrou correlações entre as metilas a 0,90 δ e 0,98 δ e os carbonos a 13,3 δ e 23,7 δ , respectivamente. Também foram observadas correlações entre os hidrogênios olefínicos a 4,88 δ e 5,01 δ e o carbono metilênico a 107,9 δ e entre os hidrogênios relativos ao singlete a 4,09 δ e o carbono metilênico carbinólico a 64,6 δ .

Estes dados indicaram que **I** tratava-se de um diterpeno do tipo abietano, no qual três das cinco metilas foram oxidadas a uma carbonila aldeídica, um grupo hidroximetilênico e um carbono metilênico olefínico.

Através do experimento HMBC foi possível observar correlações entre os hidrogênios da metila a 0,98 δ com o carbono da carbonila aldeídica a 204,6 δ e ainda com os carbonos a 45,5 δ (C), 54,7 δ (CH) e 34,4 δ (CH₂). No espectro HSQC, esta metila apresentou uma correlação com o carbono a 23,7 δ .

O hidrogênio aldeídico a 9,75 δ também apresentou correlações no espectro HMBC com os carbonos a 47,5 δ e 34,4 δ .

Estes dados indicaram que o sinal da metila a δ_H 0,98/ δ_C 23,7 seria, portanto, referentes á metila-18, estando o grupo aldeído localizado em C-19. Em diterpenos com esqueletos do tipo abietano, com ausência de substituição no anel A, as metilas-18 e 19 são observadas na região de 33 a 34 ppm e 21 a 22 ppm, respectivamente, enquanto que a ressonância de C-4 é em torno de 33 ppm (Fig. 16, pág. 50).

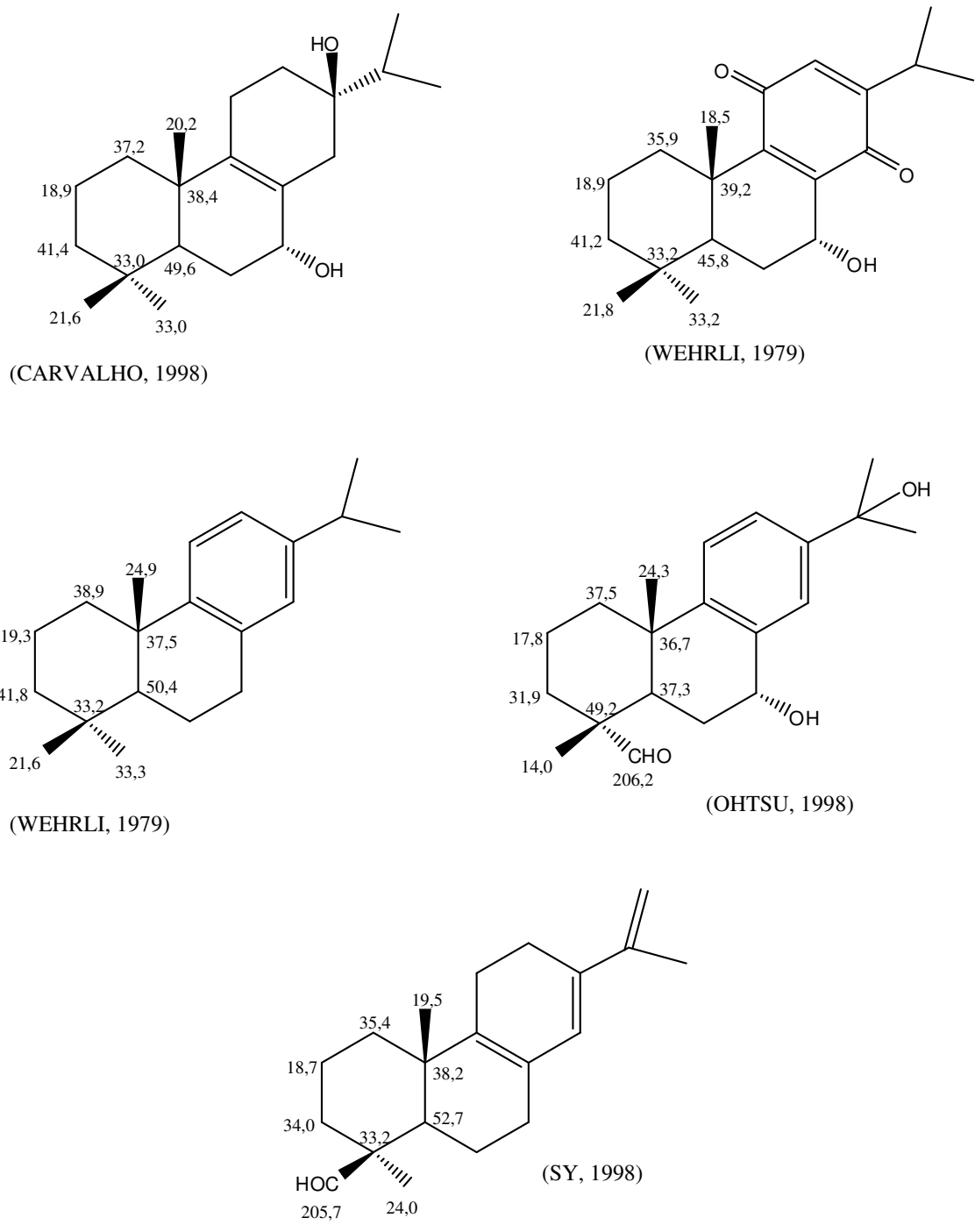


Figura 16: Exemplos de valores de deslocamento químico dos carbonos do anel A, e C-20 de diterpenos do tipo abietano.

Assim, a localização do grupo aldeído em C-19 no diterpeno **I** seria responsável pela desproteção de C-4 (47,5 δ) e pela proteção de C-3 (34,4 δ) e C-18 (23,7 δ). As correlações entre os hidrogênios da metila remanescente a 0,90 δ ($\delta_C=13,1$ ppm) e o carbono tetrassubstituído atribuído a C-10 (36,9 δ) e os carbonos metínicos atribuídos a C-5 (54,7 δ) e C-9 (54,3 δ) confirmaram a presença da metila-20 na estrutura de **I**.

No espectro de HMBC foram observados picos cruzados entre o multipletto a 2,66-2,69 δ e os sinais da carbonila cetônica a 210,5 δ , de C-5 (54,7 δ) e de C-10 (36,9 δ). Esta informação foi compatível com a localização da carbonila cetônica em C-7, sendo o multipletto 2,66-2,69 δ atribuídos aos hidrogênios H-6. No espectro COSY a correlação entre este multipletto e o sinal a 1,55 δ (H-5) confirmam a atribuição de H-6. A presença da carboxila em C-7 foi também confirmada pelas correlações adicionais no espectro HMBC entre C-7 e H-8 (2,14 δ), H-9 (2,10 δ).

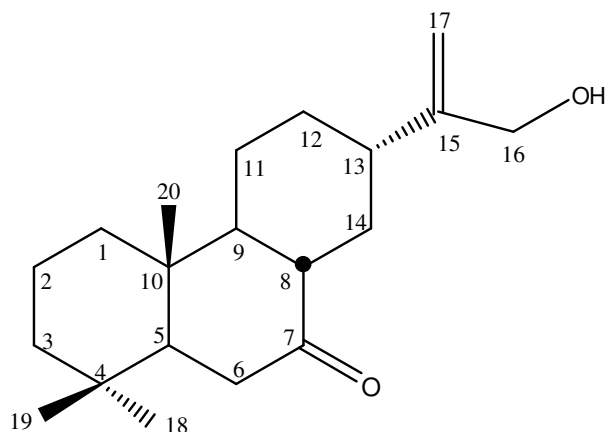
A oxidação do grupo isopropila em C-13 do esqueleto abietano foi indicada pela presença de carbonos olefínicos a 152,9 δ (C) e 107,9 δ (CH₂) e de um carbono oximetilênico a 64,6 δ , os quais foram atribuídos a C-15, C-17 e C-16, respectivamente e referentes, portanto, a uma ligação dupla entre C-15 e C-17 e uma hidroxila em C-16. No espectro HMBC, as correlações entre os hidrogênios carbinólicos a 4,09 δ e C-15, C-17 e o carbono metínico relativo a C-13 (39,1 δ), assim como as correlações entre os hidrogênios olefínicos (4,88 e 5,01 δ) e C-13, C-15 e C-16, corroboraram a proposta.

A orientação α da cadeia em C-13 foi definida com base nas correlações observadas no espectro NOESY entre H-9 (1,01 δ) e H-17 a (4,88 δ – forte), H-17b (5,01 δ – fraco) e H-16 (4,09 δ).

Assim, a estrutura do diterpeno **I**, com valor de rotação óptica $[\alpha]_D = -17,56$ (, 0,25), foi definida como sendo 7-oxo-16-hidroxiabiet-15(17)-en-19-al, inédita na literatura.

Conforme já mencionado, diterpenos obtidos de espécies de *Erythroxyllum* possuem esqueletos do tipo eritroxilano e baierano, principalmente. Portanto, trata-se do primeiro relato da ocorrência de diterpenos com esqueleto abietano numa espécie do gênero *Erythroxyllum*.

4.1.1.2 - Elucidação estrutural do 16-hidroxiabiet-15(17)-en7-ona (II)



A substância foi obtida da fração ES18/22-18 a 20 (parte experimental, item 3.3.1.1.3, pág. 24).

No espectro IV de II foram observadas bandas atribuíveis a grupos hidroxila (3417 cm^{-1}) e carbonila cetônica (1697 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H de II mostrou-se bastante semelhante ao do diterpeno I, dois singletos largos a $5,00\ \delta$ e $4,88\ \delta$ referentes a hidrogênios olefínicos, e um singlete a $4,09\ \delta$ referente a hidrogênio carbinólico. No entanto, foram observados singletos referentes a três metilas a $0,82\ \delta$; $0,85\ \delta$ e $1,02\ \delta$, assim como a ausência do sinal referente ao hidrogênio aldeídico (presentes no espectro de I). No espectro de massas de alta resolução de II, o íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ a $m/z\ 305,2471$ foi compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ para este diterpeno (valor calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_2$: $305,2480$).

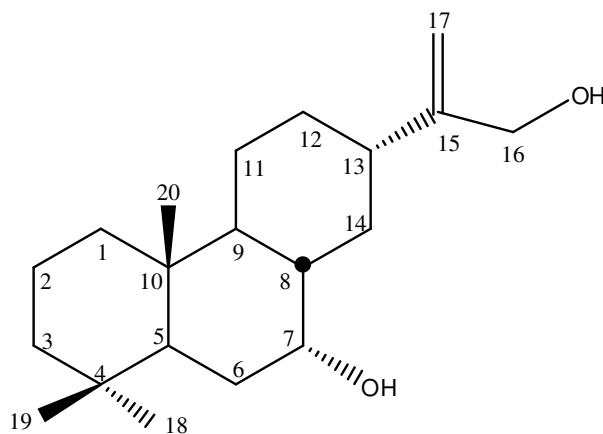
O espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135° mostraram-se semelhantes aos de I, indicando a presença dos carbonos olefínicos C-15, C-17 a $153,3\ \delta$ e $108,4\ \delta$, respectivamente e do carbono hidroximetilênico C-16 a $65,3\ \delta$. A presença de sinais de três grupos metílicos a $13,6\ \delta$, aliados à ausência de um sinal na região de carbono carbonílico e as informações acima

mencionadas, indicaram que **II** diferia de **I** apenas pela ausência do grupo aldeídico em C-19. Os valores de deslocamento químico das metilas C-18 (32,9 δ), C-19 (21,2 δ), além da proteção de C-3 (33,6 δ) e desproteção de C-4 (41,7 δ), em comparação com os dos carbonos correspondentes de **I** (47,5 δ e 34,4 δ , respectivamente) e de modelos da literatura (Fig.16, Pág. 50) confirmaram a proposta, assim como as correlações presentes nos espectros HSQC e HMBC.

Desta forma, a estrutura de **II** foi definida como sendo a de 16-hidroxiabiet-15(17)-en-7-ona, diterpeno que está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

Este diterpeno também apresentou um valor negativo de rotação óptica $[\alpha]_D = -12,25$ (CHCl_3 , 0,25).

4.1.1.3 – Elucidação estrutural do 7 β ,16-diidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (**III**)



A substância **III** foi obtida da fração ES1825-22a27 (parte experimental, item 3.3.1.4.2, pág. 29).

No espectro IV de **III** apresentou bandas relativas a grupos hidroxila (3386 cm^{-1}) e carbonila (1798 cm^{-1}).

Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT-135° de **III** mostraram-se bastante semelhantes ao de **I**, no que se refere á presença da mesma cadeia lateral em C-13 (sinais de H-16/C-16 e H-17/C-17 a 4,07 δ /65,1 δ e 4,85 δ ; 4,17 δ /108,1 δ , respectivamente e sinal de C-15 a 153,7 δ) e da carbonila aldeídica em C-19 (9,72 δ / 206,2 δ). No entanto, o espectro de RMN de ^{13}C de **III** não mostrou o sinal referente à carbonila cetônica em C-7, mas sim um sinal sugestivo de um segundo carbono carbinólico a 70,1 δ . No espectro de RMN de ^1H , um singlete largo a 3,84 δ reforçou esta proposta.

Estes dados sugeriram a localização desta hidroxila em C-7 e possuindo orientação axial, uma vez que o sinal H-7 (3,84 δ) foi observado como um singlete largo. A proteção de C-5 (47,7 δ) e C-9 (46,6 δ) em comparação com os deslocamentos químicos de C-5 e C-9 de **I** 54,7 δ e 54,3 δ , respectivamente) reforçou a proposta de uma hidroxila em C-7 com orientação axial (α). No espectro NOESY, foram observados correlações entre o hidrogênio aldeídico (H-9) e a metila-20 (0,65 δ) e o multiplete a 2,00 δ , relativos H-6 β . Este hidrogênio, por sua vez, mostrou correlação com H-7, confirmando a orientação equatorial (β) de H-7.

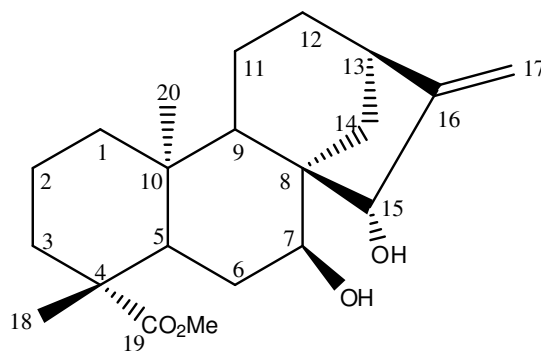
No espectro de massas de alta resolução de **III**, um íon a m/z 303,2302 indicou a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ para este diterpeno (valor calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$: 303,2324), compatível com um íon molecular $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ e, portanto, com a presença de uma hidroxila adicional na estrutura do diterpeno **III** em comparação com a de **I**.

Assim, a estrutura de **III** foi definida como 7 β ,16-diidróxiabiet-15(17)-en-19-al.

As correlações presentes nos espectros HSQC e HMBC confirmaram a proposta estrutural.

Este diterpeno, com valor de rotação $[\alpha]_{\text{D}} = -14,8$ (CHCl_3 , 0,25), também está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

4.1.1.4 – Identificação do *ent*-7 α ,15 β -diidróxi-caur-16-en-19-oato de metila (IV)



A substância **IV** foi obtida como o composto majoritário da fração ESC18/21-18a26 (item 3.3.1.2.2, pág. 26).

No espectro IV de **IV** apresentou bandas relativas a grupos hidroxila (3475 cm^{-1}) e carbonila (1708 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H de **IV** mostrou dois singletos largos a $5,08\ \delta$ e $5,19\ \delta$ referentes a hidrogênios olefínicos, dois singletos relativos a duas metilas a $0,79\ \delta$ e $1,17\ \delta$, um singlete a $3,62\ \delta$ atribuível a uma metoxila, um singletos largo a $3,92\ \delta$ e um singlete $4,07\ \delta$ sugestivos de hidrogênios carbinólicos.

No espectro de RMN ^{13}C foram observados 21 sinais, os quais, com auxílio dos dados obtidos do espectro de RMN ^1H e das informações presentes no espectro DEPT-135 $^\circ$ sugeriram que **IV** tratava-se também de um diterpeno. Dentre os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C destacam-se os atribuídos a duas metilas a $15,2\ \delta$ e $28,48\ \delta$, três carbonos quaternários a $39,1\ \delta$, $43,3\ \delta$ e $51,3\ \delta$, e dois carbonos oximetínicos a $72,6\ \delta$ e $81,0\ \delta$, dois carbonos olefínicos a $108,6\ \delta$ (CH_2) e $158,9\ \delta$ (C) sugestivo de uma ligação dupla exo-cíclica, além de um sinal de uma carbonila de éster a $178,2\ \delta$, e de uma metoxila a $51,2\ \delta$.

Com base nestas e nas demais informações fornecidas pelos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135°, chegou-se a conclusão que **IV** trata-se de um diterpeno tetracíclico possuindo os grupos funcionais acima mencionados. No espectro de massas de alta resolução (Fig. 65, pág. 96), o íon a m/z 331,2276 foi atribuído à $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$, sendo compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_3$ (calculado: m/z 331,2273) e indicando, portanto, a fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$ para o diterpeno **IV**.

Considerando-se os esqueletos de diterpenos comumente encontrados no gênero *Erythroxyllum* (item 1.1.2.3, pág. 7), estes dados permitiram propor um esqueleto do tipo caur-16-eno para **IV**, também evidenciado pelo sinal na região de 2,66 δ a 2,78 δ no espectro de RMN de ^1H , o qual apresentou correlação com o sinal a 42,8 δ no espectro HSQC, sendo atribuído ao H-13 deste esqueleto e pelos carbonos da ligação dupla exocíclica C-16 (158,9 δ) e C-17 (108,6 δ) e os hidrogênios correspondentes H-17a (5,08 δ ;sl) e H-17b (5,19 δ ; sl).

O valor negativo da rotação óptica apresentado pelo diterpeno **IV**, $[\alpha]_{\text{D}} = -43,05$ (CHCl_3 , 0,25) sugeriu que o mesmo deve pertencer à série *ent*, de maneira semelhante a outros diterpenos caurenóides análogos (GARCEZ, 2004; CANNOLY, 1991; FUKUYAMA, 1988; BUCHANAN, 1996).

A localização do grupo carbometóxi no anel A, em C-19 foi definida com base nos valores de deslocamento químico atribuídos a C-4 (43,3 δ) e à metila-18 (28,5 δ), quando comparados com os efeitos exercidos por este grupo sobre a ressonância de C-4 e C-18 o mesmo tipo (Fig. 17, pág. 57) em diterpenos com este esqueleto.

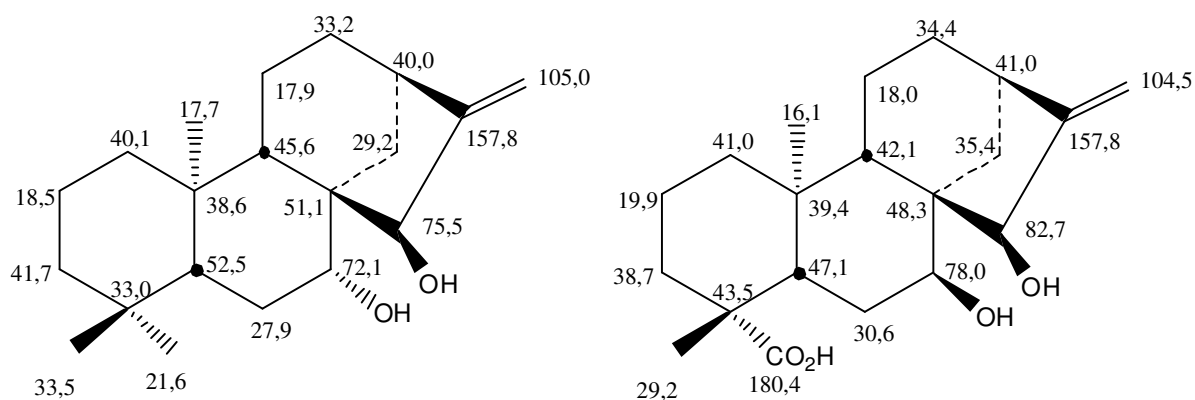


Figura 17: Valores de deslocamento químico dos carbonos do anel A, C-18, C-19 e C-20 de diterpenos do tipo *ent*-caur-16-eno.

As correlações observadas no espectro HMBC entre a metila-18 (1,17 δ) e C-3 (37,9 δ), C-4 (43,3 δ) e C-19 (178,2 δ) corroboraram a proposta. Conseqüentemente, foi atribuída para a metila-20 os sinais a δ_H 0,79 ppm e δ_C 15,3 ppm, o que pode ser confirmado pelas correlações no espectro HMBC entre estes hidrogênios e os carbonos C-5 (47,2 δ) e C-10 (39,1 δ).

Com bases nos picos cruzados presentes no espectro HSQC, os singletos largos a 3,92 δ e 4,07 δ atribuíveis a hidrogênios carbinólicos foram correlacionados com os espectros sinais de carbonos a 72,6 δ e 81,0 δ .

As correlações presentes no espectro HMBC entre os dois hidrogênios olefínicos H-17 (5,08 e 5,19 δ), H-13 (2,66 – 2,78 δ), 2H-14 (1,37 – 1,47 δ e 1,67 – 1,75 δ) e o carbono a 81,0 δ permitiram localizar um dos grupos hidroxila em C-15.

O outro grupo hidroxila foi posicionado em C-7 com base na correlação à longa distância entre o hidrogênio carbinólico (3,92 δ) e C-5 no espectro HMBC. A orientação equatorial de H-7 (*ent*-7 β) foi definida com base na multiplicidade do sinal deste hidrogênio

(singlete largo) e conseqüentemente, estabeleceu a disposição axial (*ent-7 α*) de OH-7. Esta proposta pode ser confirmada com base na maior proteção de C-5 (47,2 δ) e de C-9 (47,9 δ) exercida pelo grupo OH axial em C-7 quando comparada com o mesmo efeito exercido por este grupo sobre C-5 em diterpenos análogos, quando se encontra em posição equatorial (*ent-7 β*) [Fig. 18, pág. 58, compostos A e B].

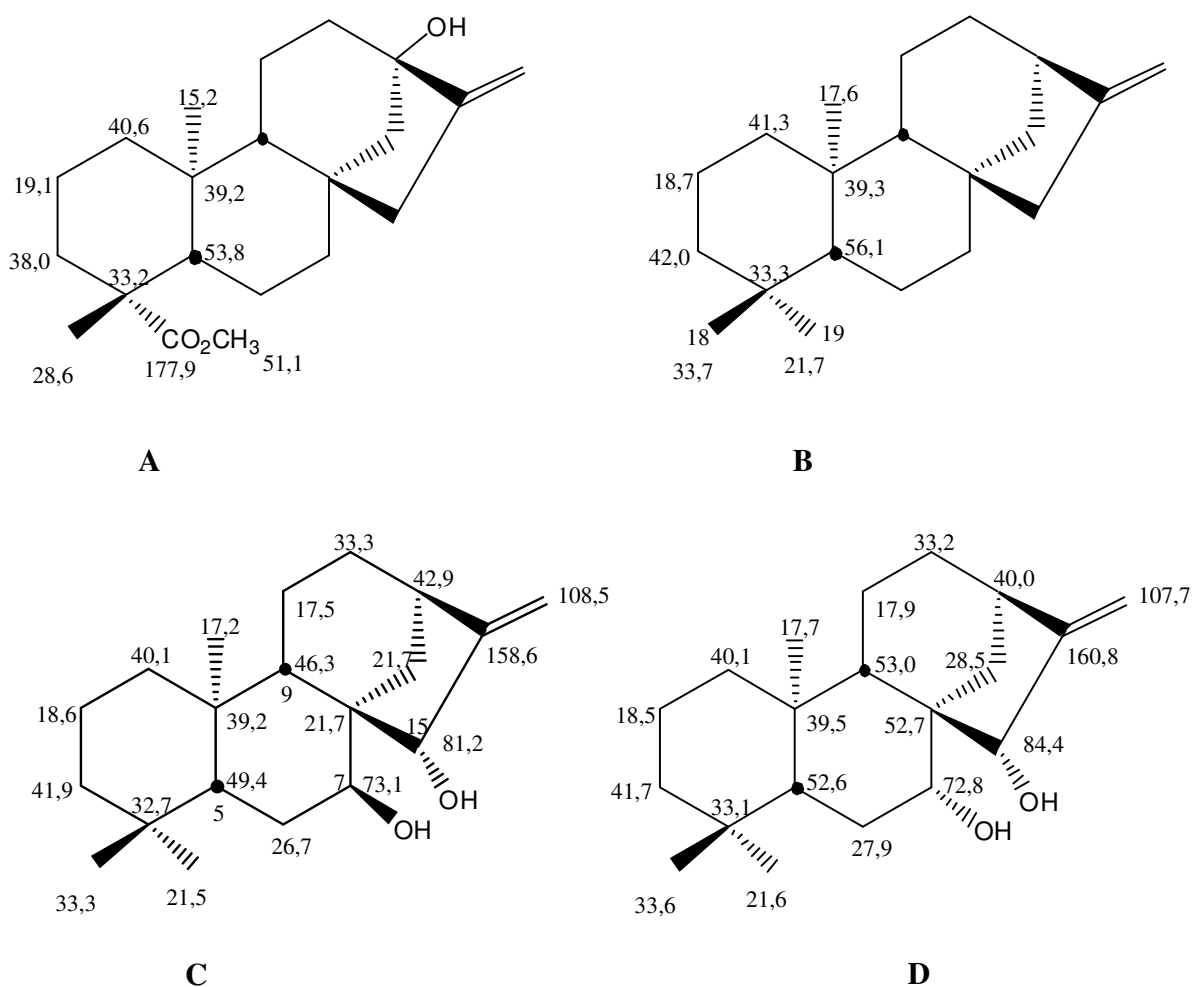


Figura 18: Exemplos de diterpenos do tipo *ent-caur-16-eno* com substituintes hidroxilados em C-7 e C-15 possuindo diferentes orientações (FUKUYAMAR, 1988; BUCHANAN, 1996; HUTCHISON, 1984).

A correlação *ent*-15 β do grupo hidroxila em C-15 no diterpeno **IV** foi também definida com base na multiplicidade do sinal do hidrogênio carbinólico H-15.

De acordo com a literatura, em diterpenos do tipo *ent*-caur-16-eno contendo o grupo hidroxila em C-15 com orientação *ent*-15 β , como o composto B (Fig. 51) o hidrogênio H-15 é observado como um singlete largo a 4,07 δ , enquanto que quando a orientação é *ent*-15 α , como a do composto C (Fig. 18, pág. 58), apresenta-se como um tripleto largo a 4,45 δ (J=2,5 Hz) [BUCHANAN, 1996].

No caso do diterpeno **IV**, H-15 foi observado como um singlete largo a 4,07 δ , o que indica a orientação *ent*-15 β da hidroxila.

O valor do deslocamento químico de C-9 (47,9 δ) também confirmou a orientação *ent*-15 β da hidroxila em **IV**, pois este valor é menor em diterpenos análogos com configuração oposta de OH-15 (por exemplo, composto D na fig. 18, pág. 58), pelo maior efeito γ exercido sobre C-9 por esta hidroxila.

No espectro NOESY foi observada uma correlação entre H-15 e H-9, o que indica a mesma orientação espacial destes hidrogênios, assim como uma correlação entre H-7 e um dos hidrogênios em C-14. Estes dados reforçaram a proposta das configurações de C-7 e C-15.

Desta forma, a estrutura de **IV** foi determinada como sendo *ent*-7 α ,15 β -diidróxi-caur-16-en-19-ato de metila.

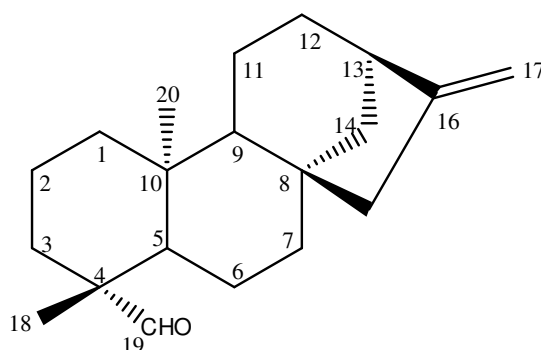
Este diterpeno foi isolado anteriormente como produto de metilação do ácido carboxílico correspondente, o qual foi obtido como produto de biotransformação do ácido *ent*-15 β -hidroxicaurenoico pela Cepa mutante SG138 do fungo *Gibberella fujikuroi* (BARRERO, 2001).

Portanto trata-se o primeiro relato do isolamento deste diterpeno como produto natural.

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de **IV** apresentaram uma excelente correlação com os do produto de biotransformação, com exceção dos valores de deslocamento químico C-4, C-8, C-19 e do carbono da metoxila. Os autores do artigo em questão atribuíram erroneamente o valor de 43,5 δ para C-8, uma vez que este valor deve se referir a C-4, conforme demonstrado no presente trabalho com relação aos valores atribuídos ao grupo

carbometóxi (170,0 e 57,5 δ) assim como o valor de 41,9 δ , deve ter ocorrido erro de impressão, pois estes não estão de acordo com a estrutura proposta pelos autores.

4.1.1.5 - Identificação do *ent*-12 α -hidróxi-caur-16-en-19-al (V)



A substância V foi obtida da fração ESC15/21-22a26 (item 3.3.1.1.2, pág. 24).

No espectro IV de V apresentou bandas atribuíveis a grupos hidroxila (3448 cm^{-1}) e carbonila (1716 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H de V mostrou-se semelhante ao de IV, quanto a presença de dois singletos largos a 4,89 δ e 4,90 δ referentes a hidrogênios olefínicos, dois singletos relativos a duas metilas a 0,82 δ e 0,98 δ , e um multipletto na região de 2,55 δ a 2,75 δ .

Estes dados, aliados ao valor negativo de sua rotação óptica, $[\alpha]_{\text{D}} = -6,5$ (CHCl_3 , 0,25) sugeriram que V tratava-se também de um díterpeno do tipo *ent*-caur-16-eno. No espectro de RMN de ^1H de V destacaram-se também um singletto a 9,70 δ característico de hidrogênio aldeídico e um multipletto na região de 3,62 a 3,64 δ atribuível a um hidrogênio carbinólico.

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135°, aliados as informações fornecidas pelo espectro HSQC, confirmaram a presença da ligação dupla exometilênica em C-16, do grupo

aldeídico em C-19 e do carbono carbinólico em C-12, pelos sinais a 106,1 δ e 150,8 δ , 205,6 δ e 70,5 δ , respectivamente.

Assim, foi proposta para o diterpeno **V** a fórmula molecular $C_{20}H_{31}O_2$, a qual foi confirmada pela presença do íon $[M + H]^+$ a m/z 303,2311 no espectro de massas de alta resolução [valor calculado para $C_{20}H_{31}O_2 = 303,2324$].

Com base nos valores de deslocamento químico atribuídos aos carbonos do anel A de **V** particularmente os referentes a C-4, C-5, e às metilas ligadas em C-4 e C-10, chegou-se a conclusão que a carbonila aldeídica estaria localizada em C-19 e que o anel A não possuía substituintes (CHANG,1998; WU, 1996, WEHRLI, 1979). Esta proposta foi confirmada pelas correlações observadas no espectro HMBC entre: o hidrogênio aldeídico (9,70 δ) e C-3; metila-18 (0,82 δ) e C-3, C-4 (48,4 δ), C-5 (56,3 δ), C-19 (205,6 δ); metila-20 (0,65 δ) e C-5, C-10 (38,9 δ).

Considerando-se os carbonos remanescente no espectro de **V** onde o grupo hidroxila poderia estar ligado e com base nos valores de deslocamento químico encontrados para os carbonos metínicos, metilênicos e tetrassubstituídos de **V**, foi proposta a localização da hidroxila em C-12. Esta proposta foi confirmada pela desproteção sofrida pelos carbonos C-11 e C-13 de **V** em comparação com os carbonos correspondentes de *ent*-caur-16-eno (18,1 e 44,2 δ) [Fig. 19], a qual exclui as demais possibilidades.

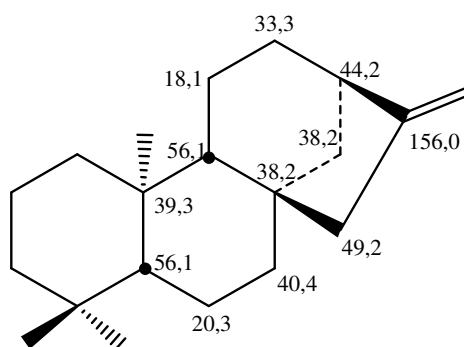


Figura 19: valores de deslocamento químico dos carbonos C-5 a C-16 do *ent*-caur-16-eno (WEHRLI, 1979).

Além disso, as correlações presentes no espectro HMBC entre os hidrogênios H-9 e C-11, C-12 e C-14, assim como entre H-17 e C-13, C-15, H-15 e C-16, H-13 e C-15 também auxiliaram na definição da localização daquele substituinte em C-12.

A configuração da hidroxila foi definida como *ent-α* com base no valor do deslocamento químico de C-4 (38,4 δ), pois, de acordo com a literatura, verificou-se que, embora não haja diferença significativa na ressonância de C-12 em derivados caurênicos *ent-12α* e *ent-12β* hidroxilados, o efeito γ da hidroxila sobre C-14 é maior no segundo caso (derivados *ent-12β* hidroxilados), conforme ilustrado na figura 20.

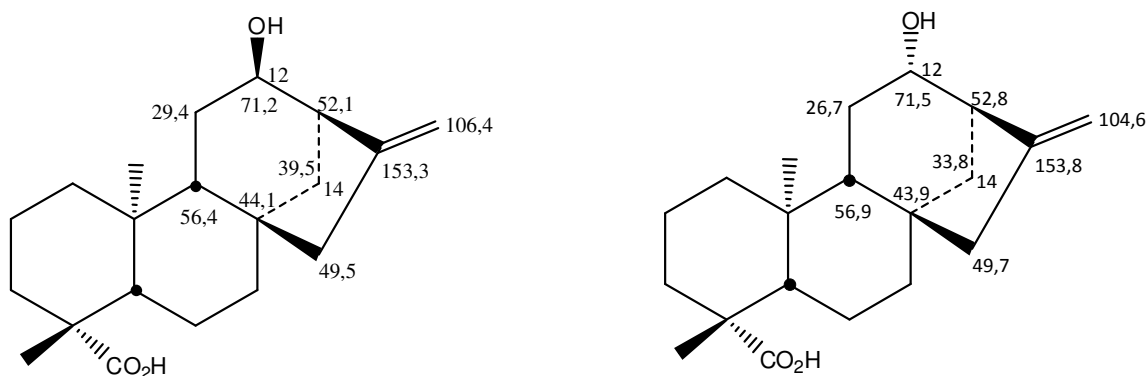
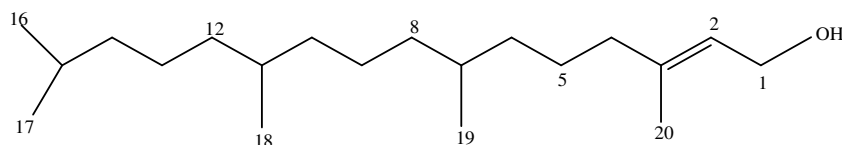


Figura 20: valores de deslocamento químico de C-9 e C-11 a C-17 dos ácidos *ent-12α* e *ent-12β* – caurenóicos (HUTCHISON, 1984).

Com base nestas informações, a estrutura de **V** foi caracterizada como sendo a do *ent-12α*-hidróxi-caur-16-en-19-al, inédita na literatura.

4.1.1.6 - Identificação do (E)-fitol (VI)



A substância **VI** foi obtida como o composto majoritário a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração ES-HEX3a8-2-3 (item 3.6.1.1.1.1, pág.38).

O espectro de RMN de ^1H apresentou uma feição característica de substância terpenoídica para o composto majoritário, evidenciada pelos sinais atribuíveis a metilas na região de 0,85 a 1,64 δ . Além destes sinais, foram observados um tripleto largo (5,46 δ ; 6,6 Hz), um dubleto (4,14 δ ; 6,9 Hz) e um tripleto (1,98 δ ; 6,6 Hz) este característico de grupo metilênico α à ligação dupla. Os sinais predominantes no espectro de RMN ^{13}C e atribuídos a **VI** permitiram caracterizá-lo, em conjunto com os dados de RMN de ^1H , como o diterpeno de cadeia linear (E)-fitol, constituinte encontrado em folhas de diversas espécies vegetais.

4.2 – Identificação dos flavonoides presentes nos galhos e folhas de *E. suberosum*

Os flavonoides são uma das classes de produtos naturais bastante ampla e diversificada, ocupando uma posição importante entre os fenóis naturais [HARBONE, 1975; SIMÕES, 2000].

O termo flavonoide engloba um grupo de compostos que apresenta uma estrutura comum caracterizada por 15 átomos de carbono ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$), em dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos (acíclica ou heterocíclica). Esta classe é formada por mais de

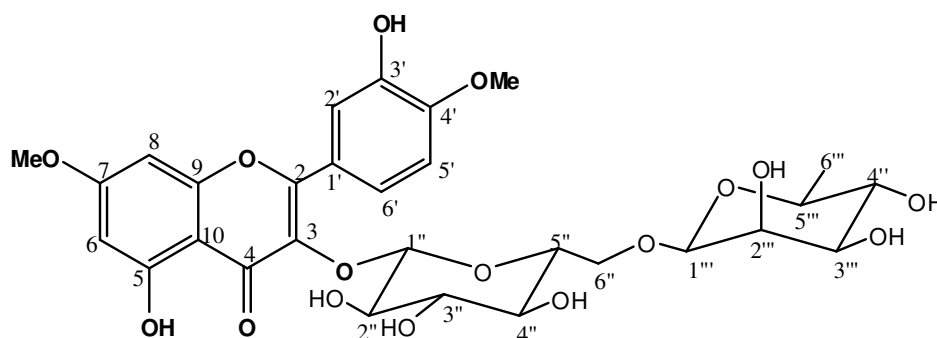
4000 compostos fenólicos, e inclui vários subgrupos como flavanonas, flavanonois, flavonas, flavonois, flavanas, chalconas, auronas, diarilpropanoídes e outros [HARBONE, 1975].

As diferenças entre os subgrupos resultam em modificações na cadeia de três carbonos (entre dois anéis aromáticos) que podem ser: acíclica ou heterocíclica, saturada ou insaturada, podendo ou não apresentar grupos funcionais, tais como hidroxila ou carbonila. Já as diferenças individuais dentro de cada subgrupo resultam de uma variação no número e posição de substituintes, tais como grupos hidroxila, como também pelo grau de metilação, glicosilação e prenilação.

Os flavonoides são considerados benéficos para a saúde, podendo atuar como antioxidantes [RATTY & DAS, 1988], protegendo contra doenças cardiovasculares e certas formas de câncer [DEWICK, 2002; RAMANATHAN, 1992].

Na família Erythroxylaceae, a ocorrência de flavonóides é restrita às espécies de *Erythroxylum*, sendo quercetina e kaempferol e seus derivados 3-glicosilados considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero (INIGO & POMILIO, 1985, JOHNSON & SCHMIDT, 2004).

4.2.1 - Identificação da ombuína-3-rutinosídeo (VII)



A substância **VII** foi obtida da fração ESC6-10e11 (item 3.3.2, pág. 30), proveniente do extrato etanólico dos galhos. O espectro de RMN de ^1H do composto **VII** apresentou sinais na região de hidrogênios de anel aromático com um padrão sugestivo do flavonoide quercetina, ou seja, dois singletos largos em 6,36 δ e 6,68 δ , atribuíveis a hidrogênios de um anel A 5,7-dioxigenado, um singleto largo em δ 7,54 indicativo de acoplamento *meta*, um dubleto em 7,03 δ ($J = 9,0$ Hz) e um dubleto largo em 7,72 δ ($J = 9,0$ Hz) atribuíveis aos hidrogênios de um anel B 3',4'-dioxigenado. Foram também observados neste espectro sinais na região de 3 a 4 ppm, um singleto em δ 4,34, um dubleto em 5,32 δ ($J = 6,0$ Hz), sugestivos de hidrogênios de açúcares, um dubleto em 0,96 δ ($J = 6,0$ Hz) atribuível à metila da ramnose, além de um singleto em 3,85 δ atribuível a duas metoxilas.

No espectro de RMN ^{13}C de **VII** foram observados vinte e nove sinais, os quais, com o auxílio das informações obtidas do espectro DEPT-135⁰, foram atribuídos aos quinze carbonos da aglicona, a duas metoxilas e a doze carbonos correspondentes a dois resíduos de açúcar. Os valores de deslocamento químico apresentados pelos sinais correspondentes aos resíduos de açúcar confirmaram a presença de uma unidade de β -D-glucose e uma de α -L-ramnose na estrutura de **VII** (AGRAWAL, 1992).

A localização dos grupos metoxila, bem como dos resíduos dos açúcares no esqueleto do flavonoide **VII** foi definida com base nas informações fornecidas pelos espectros de RMN ^{13}C , HSQC e HMBC, conforme descrito a seguir:

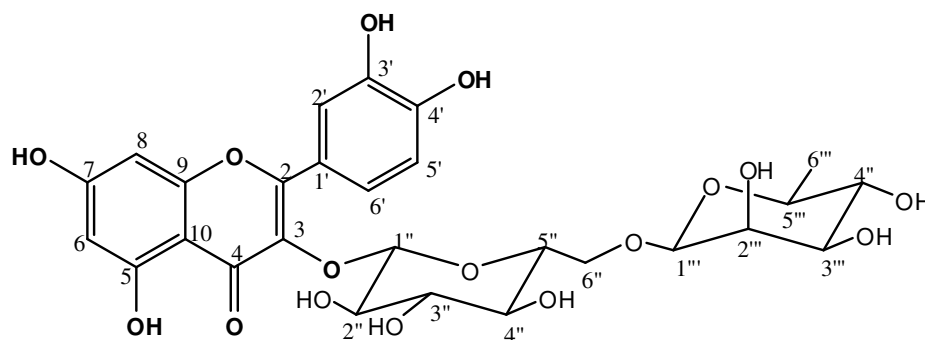
As duas metoxilas representadas pelo singleto a 3,85 δ mostraram estar associadas aos sinais dos carbonos a 56,1 e 56,5 δ , através do espectro de HSQC. Através do experimento HMBC, estas metoxilas mostraram correlações com os carbonos a 165,6 δ e 151,2 δ . Estas correlações sugeriram, portanto, que uma das metoxilas estaria localizada no anel A e a outra no anel B, em C-7 e C-4', o que pode ser definido através das correlações observadas entre o carbono a 165,6 δ (C-7) e os hidrogênios atribuídos a H-6 e H-8 e das observadas entre o carbono a 151,2 δ (C-4') e o sinal atribuído a H-6' no espectro HMBC. A definição da localização do resíduo de glucose no esqueleto do flavonoide em C-3 foi obtida através da correlação observada no espectro HMBC entre H-1''(5,36 δ) e C-3 (134,2 δ), enquanto que a

ligação do resíduo de ramnose em C-6'' foi estabelecida com base na correlação entre H-1''' (4,34 δ) e C-6'' (68,6 δ).

As configurações β e α dos açúcares no flavonoide **VII** foram definidas com base nos valores das constantes de acoplamento dos sinais dos hidrogênios anoméricos [AGRAWAL, 1992]. Observou-se que H-1'' apareceu como dubleto a 5,32 δ com $J = 6,0$ Hz característico do acoplamento diaxial com H-2'', indicando a configuração β para o resíduo de glicopiranosose no flavonoide **VII**. Já para o resíduo da ramnopiranosose foi estabelecida a configuração α , uma vez que H-1''' foi observado como um singlete largo a 4,34 δ , característico do acoplamento diequatorial entre H-1''' e H-2'''.

Os dados espectrais de **VII** foram compatíveis com os relatados na literatura para ombuína-3-rutinosídeo (CHAVES, 2004), flavonoide já descrito em algumas espécies do gênero *Erythroxylum* entre elas *E. minutifolium*, *E. minutifolium* Griseb. Var., *E. areolatum* Linn, *E. confusum* Britt e *E. suave* Lunan (GONZALEZ-GUEVARA, 2006).

4.2.2 – Identificação da quercetina-3-rutinosídeo (X) presente nas folhas



A substância **X** foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da ESB5-23a24, ESB5-25a28, ESB5-29a49, e ESB5-50a53, provenientes do extrato etanólico das folhas (item 3.7.1, pág. 40).

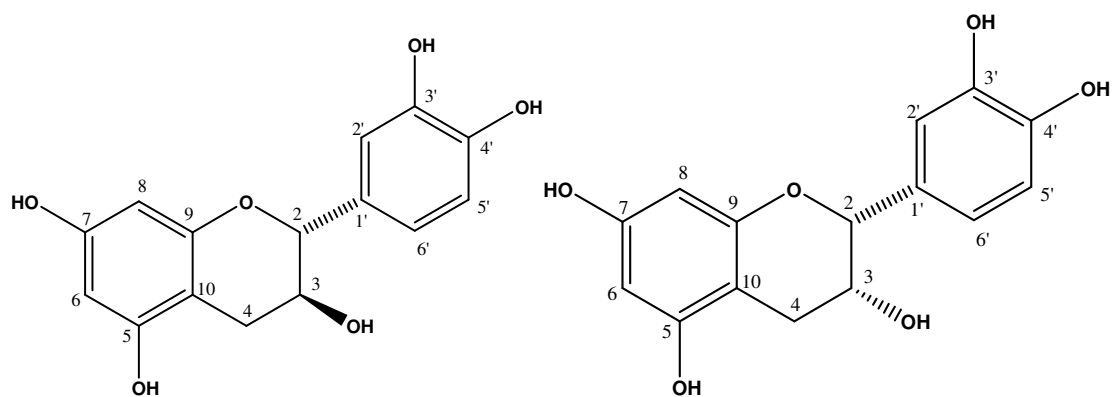
O espectro de RMN ^1H de **X** apresentou cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos com um padrão semelhante ao observado para o flavonoide **VII** (item 4.1.1), ou seja, dois singletos em 6,19 e 6,38 δ atribuíveis a hidrogênios do anel A, além de um dubleto em 7,67 δ ($J = 2,03$ Hz) um dubleto em 6,82 δ e um em 7,62 δ ($J = 9$ e 3,0Hz) atribuíveis aos hidrogênios do anel B. No entanto, não foram observados os sinais característicos de grupos metoxila presentes no espectro de **VII**.

Da mesma forma que em **VII**, também foram observados no espectro de **X** sinais na região entre 3,25 e 5,20 δ característicos de hidrogênios de açúcares, além de um dubleto em 1,12 δ ($J = 6$ Hz) atribuíveis à metila da ramnose.

O espectro de RMN ^{13}C mostrou-se também muito semelhante ao de **VII**, com vinte e sete sinais, sendo quinze atribuíveis aos carbonos da aglicona e doze aos dos açúcares. Ao serem comparados os valores de deslocamento químico, verificou-se que a única diferença estrutural entre **VII** e **X** seria a presença neste flavonoide de grupos hidroxila em C-7 e C-4', ao invés de grupos metoxila. Assim, a substância **X** foi caracterizada como sendo quercetina-3-rutinosídeo, também conhecida como rutina. Os dados espectroscópicos de **X** apresentaram boa correlação com os da rutina descrita na literatura (BECK, 1999).

Este flavonoide já foi descrito em algumas espécies do gênero *Erythroxyllum* entre elas *E. novogranatense* (Morris) Hieron, *E. var novogranatense*, *E. novogranatense var truxillense* (Rusby) Plowman (BOHM, 1981), *E. engleri*, *E. subracemosum*, *E. pruinsum* (BOHM, 1988)

4.2.3 – Identificação da mistura da catequina (VIII) e (-) - epicatequina (IX)

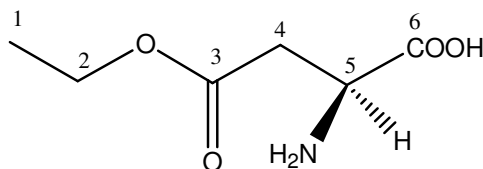


A mistura das substâncias **VIII** e **IX** foi isolada na fração ES1-5, proveniente de fracionamentos da fase acetato de etila da partição do extrato etanólico dos galhos (item 3.5.1, pág. 34).

No espectro de RMN ^1H foram observados sinais característicos de hidrogênios de anel aromático entre 5,87 δ e 6,98 δ e de hidrogênios na região de 2,5 δ a 4,8 δ atribuíveis ao anel C de 3-hidroxi flavanas, os quais foram compatíveis com a presença de catequina e (-) - epicatequina, sendo este o composto majoritário na mistura (TANAKA & DA SILVA, 2005). Para a catequina, H₂ e H₃ foram caracterizados como um dubleto na região de 4,59 δ ($J = 7,5$ Hz) e um multipletto na região de δ 4,0 respectivamente, enquanto que H₂ e H₃ da (-) - epicatequina foram identificados como um singlete largo na região de 4,81 δ e um singlete largo na região de 4,17 δ , respectivamente. Isso ocorreu em consequência da mudança da estereoquímica de C-3 (-OH β) na catequina para (-OH α) na (-) - epicatequina.

No espectro de RMN ^{13}C , além dos sinais dos carbonos na região de 94,4 δ a 157,9 δ , foram observados quatro sinais atribuíveis aos carbonos oximetínicos C-2 e C-3 da catequina (82,7 δ e 68,7 δ) e da epicatequina (67,4 δ e 79,7 δ) e dois sinais de carbonos metilênicos a δ 28,4 e δ 29,2. (TANAKA & DA SILVA, 2005).

4.3 – Identificação do aminoácido L-Aspartato de etila (XI), obtido da fase clorofórmica dos galhos



A substância foi obtida da fração ESC6-13 (item 3.3.2, pág. 30). O espectro de RMN de ^1H (Fig. 89, pág. 129; Tabela 34, pág. 128) apresentou um tripleto a 1,28 δ (7,1 Hz), um mutipletto na região de 2,59 δ e 2,78 δ , um quarteto na região de 4,14 δ a 4,21 δ , e um duplo dubletto na região de 4,43 δ a 4,47 δ (7,1 e 5,0).

O espectro de RMN ^{13}C evidenciou sinais para cinco carbonos. Com base nas correlações presentes no espectro HSQC foi feita a correspondência entre os hidrogênios e os seus respectivos carbonos, sendo que a definição da localização dos carbonos na cadeia foi obtida através das correlações observadas no espectro HMBC.

A definição da localização dos carbonos na cadeia foi obtida através da correlação observada no espectro HMBC:

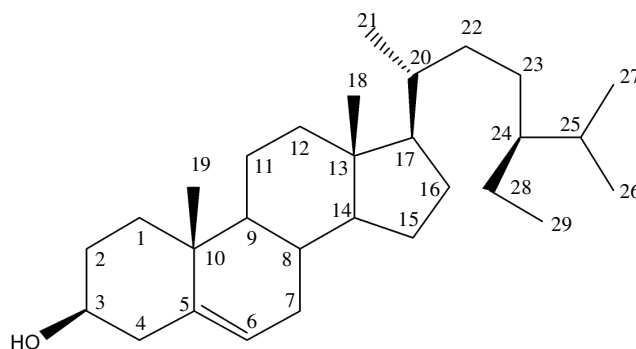
- dos hidrogênios a 4,14 - 4,21 δ (H-2) com o carbono a 14,4 δ (C-1),
- dos hidrogênios a 1,28 δ (H-1) com o carbono a 62,3 δ (C-2),
- dos hidrogênios a 2,59 - 2,78 δ (H-4) com os carbonos a 68,7 δ (C-5), e a 174,2 δ (C-3),
- do hidrogênio a 4,43 - 4,47 δ (H-5) com o carbono a 174,19 δ (C-3).

A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **XI** com os descritos na literatura (WILLIAMS, 1988) para o aminoácido L-aspartato de etila indicou a identidade entre as substâncias. Não há relatos na literatura do isolamento desse aminoácido em plantas, tratando portanto, do primeiro relato em família de plantas. No entanto, uma vez que **XI** foi

obtido a partir do extrato etanólico dos galhos, a possibilidade deste composto tratar-se de um artefato não pode ser descartada e assim, o produto natural seria o ácido aspártico.

4.4 – Esteróides presentes nos galhos de *E. suberosum*

4.4.1 – Identificação do β -sitosterol (XII)

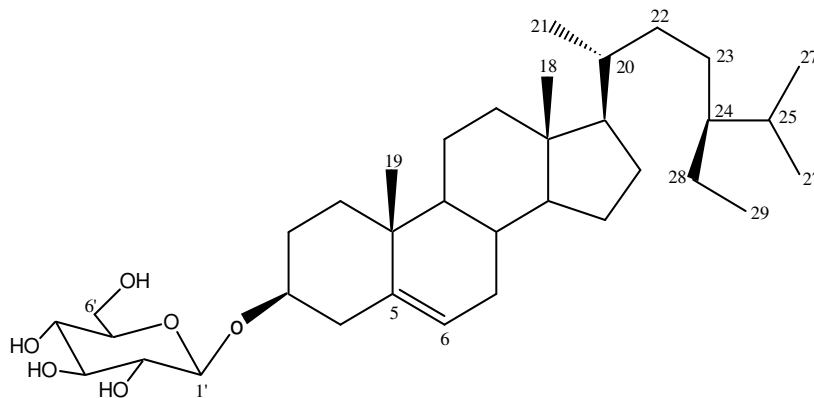


A substância **XII** foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração ES1521-27a31 (item 3.3.1.1.2, pág. 24).

O espectro de RMN ^1H apresentou um conjunto de sinais entre 0,65 e 1,12 δ , além de um dubleto em 5,34 δ (4,0 Hz). No espectro de RMN ^{13}C foram observados sinais na região de carbonos alifáticos, incluindo os sinais em 11,9 e 12,0 δ (referentes a metilas) e em 140,8 e 121,7 δ (relativos a carbonos de ligação dupla trissubstituída), além de um sinal atribuído a um carbono carbinólico a 71,8 δ .

A comparação dos dados de RMN ^{13}C dos carbonos de **XII** com os dados da literatura permitiram caracterizar a substância **XII** como sendo β -sitosterol, cuja identificação foi confirmada através de comparação por cromatografia em camada delgada com amostra autêntica.

4.4.2 - Identificação de 3-*O*- β -D-glucopiranosil-sitosterol (**XIII**)



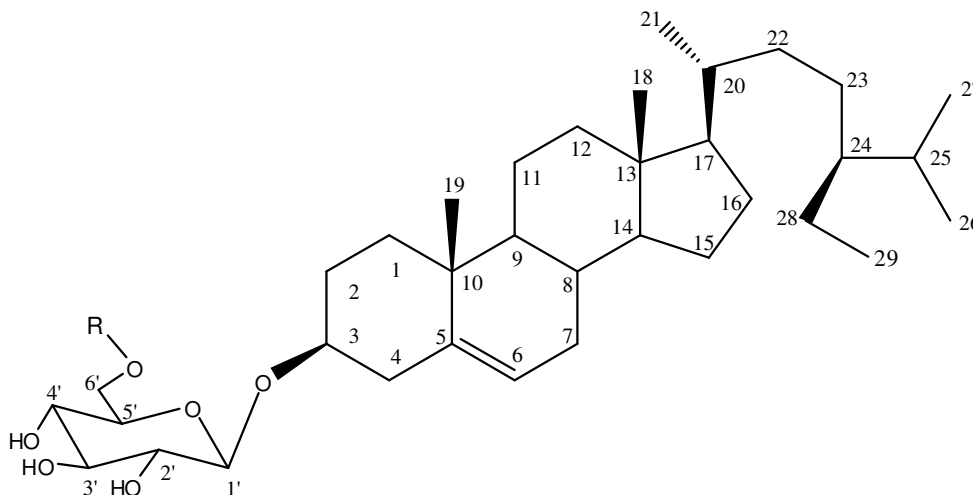
A substância **XIII** foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração ESC5-137 (Parte experimental, item 3.3.1, pág. 21).

O espectro de RMN ^1H de **XIII**, ao ser comparado com o de **XII**, indicou a semelhança entre os dois compostos, sendo que no espectro de **XIII** foram observados sinais na região de 3,00 a 5,30 δ , sugerindo a presença de um resíduo de açúcar.

A comparação dos dados de RMN ^{13}C dos carbonos da aglicona de **XIII** com os do β -sitosterol (**XII**) mostrou uma boa correlação, diferindo significativamente apenas no valor de C-3. A existência de um sinal de carbono oximetínico em 78,4 δ no espectro de **XIII**, no lugar do sinal a 71,8 δ relativo a C-3 do sitosterol, além dos sinais observados na região de 62,7 a 102,4 δ e a proteção observada para os carbonos C-2 e C-4, indicaram que o resíduo de açúcar seria de β -D-glucose (AGRAWAL,1992) e que o mesmo estaria localizado em C-3 no esqueleto do sitosterol. O valor de 101,2 δ para o C-1' da unidade de glucose pôde ainda evidenciar a ligação entre o carbono anomérico do açúcar e C-3, uma vez que carbonos anomérios de *O*-glucosídeos são observados na região de 100,0 δ , independentemente da natureza do resíduo de açúcar (BOYD & TURVEY, 1978).

Portanto, a substância **XIII** foi caracterizada como sendo 3-*O*- β -D-glucopiranosil-sitosterol, cuja identificação foi confirmada através de comparação por cromatografia em camada delgada em amostra autêntica.

4.4.3 - Identificação do 3(6'-*O*-Acil)-*O*- β -D-glucopiranosil-sitosterol (XIV)



Onde: **R** resíduo de ácido graxo insaturado

A substância **XIV** foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração ESH-62, esta proveniente de ESA-1 (item 3.4.1, pág. 33).

Este composto apresentou dados espectrais semelhantes aos de **XIII**, com exceção da presença dos sinais no espectro de RMN ^1H característicos de uma cadeia graxa, como por exemplo, um singlete largo a 1,29 δ . No espectro de RMN ^{13}C de **XIV**, foram observados sinais compatíveis com a presença de um resíduo de ácido graxo insaturado esterificado, tais como os de uma carbonila a 173,7 δ , carbonos olefínicos a 127,9 δ e 130,2 δ , carbonos metilênicos na região de 29, 6 δ a 29, 97 δ

Estes dados sugeriram para **XIV** a estrutura de um β -sitosterol glicosilado em C-3, estando o açúcar esterificado com uma unidade de ácido graxo. No espectro de RMN ^{13}C o valor de deslocamento químico do carbono carbinólico (79,5 δ) foi compatível com a presença do açúcar em C-3. A localização do resíduo de ácido graxo esterificado na posição 6' foi evidenciada pela desproteção de C-6' (64,8 δ) e proteção de C-5' (75,2 δ) em relação a C-6' e C-5' de **XIII** (62,7 δ e 78,0 δ , respectivamente).

Com base nos dados espectroscópicos obtidos, pôde-se concluir que **XIV** tratava-se do 3(6'-*O*-Acil)-*O*-β-D-glucopiranosil-sitosterol.

Para estes tipos de compostos são atribuídos importantes atividades biológicas, tais como antitumoral (KIRIAKIDIS, 1997) e piscicida (HASHIMOTO, 1991).

5 – Avaliação de toxicidade para *A. salina* (BST) e da atividade sequestradora de radicais livres

No presente trabalho, os ensaios de toxicidade para *Artemia salina* e de avaliação do potencial antioxidante frente ao DPPH foram realizados com extratos, fases resultantes dos processos de partição e/ou substâncias puras obtidos de *E. Suberosum*.

5.1 – Ensaio BST

O teste de toxicidade para *Artemia salina* é um ensaio preliminar para avaliação de uma potencial atividade citotóxica da amostra testada [MEYER e FERRIGNI, 1982].

Os resultados obtidos neste ensaio com os extratos etanólicos dos galhos e folhas e com as fases obtidas dos processos de partição do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum* são apresentados na Tabela 38.

Tabela 25: Toxicidade para *Artemia salina* do extrato bruto e fases obtidas da partição dos galhos de *E. suberosum*.

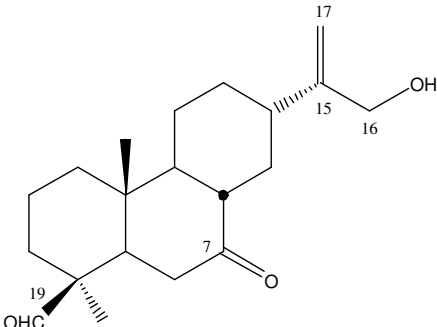
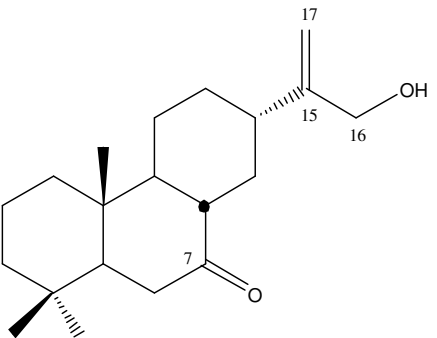
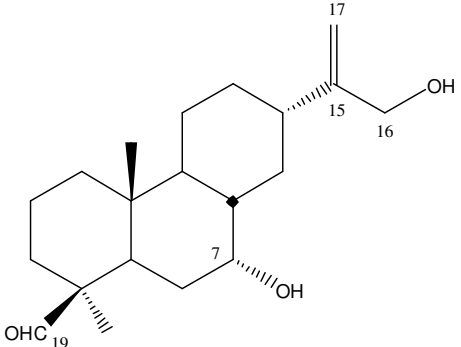
Amostras	DL₅₀ (µg/mL)
Extrato EtOH	549,2
Fase hexânica	>1000
Fase CHCl ₃	69,8
Fase AcOEt	>1000
Fase hidrometanólica	>1000
Controle positivo (sulfato de quinidina)	337.3

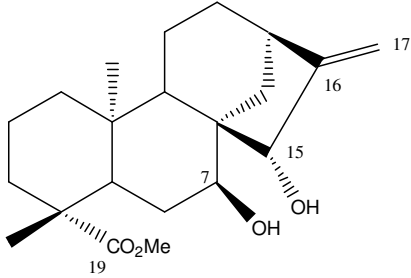
As setes frações obtidas após o fracionamento da fase clorofórmica (parte experimental, item 3.3, pág. 18) foram submetidas ao ensaio BST e verificou-se que a atividade ficou concentrada na fração 5. Esta fração foi então submetida a novos fracionamentos (parte experimental, item 3.3.1, pág. 21), realizando-se o ensaio BST com as frações obtidas. As frações 1 a 14, 15 a 46, 47 a 58, 77 a 85, 106 a 111 apresentaram valores de DL₅₀ superiores a 1000 µg/mL, indicativos de ausência de toxicidade, porém quatro frações (59 a 92, 93 a 120, 121 e 122 a 124) apresentaram valores de DL₅₀ significativos, como mostrados na Tabela 39). As substâncias isoladas destas frações bioativas, os diterpenos 7-oxo-16-hidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (I), 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (II), 7β,16-diidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (III), *ent*-7α,15β-diidróxi-caur-16-en-19-ato de metila (IV), *ent*-12α-hidróxi-caur-16-en-19-al (V) foram submetidas ao ensaio BST e os resultados encontram-se na tabela 40, pág. 145 e 146.

Tabela 26: Valores de DL₅₀ (µg/mL) obtidos no ensaio BST para as frações ativas, resultantes do fracionamento da fase clorofórmica dos galhos de *E. suberosum*

Amostra	DL₅₀ (µg/mL)
Fração 5	72,9
Frações resultantes da fração 5:	
F5 – 59-92	89,7
F5 –93-120	82,7
F5 –121	137,8
F5-122-124	129,7
Controle positivo (sulfato de quinidina)	168,6

Tabela 27. Valores de DL₅₀ (µg/mL) obtidos no ensaio BST para os diterpenos 7-oxo-16-hidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (I), 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (II), 7β,16-diidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (III), ent-7α,15β-diidroxi-caur-16-en-19-ato de metila (IV), ent-12α-hidroxi-caur-16-en-19-al (V), isolados da fração bioativa ESC-5, resultante do fracionamento da fase clorofórmica dos galhos de *E. suberosum*.

Diterpenos	DL ₅₀ (µg/mL)
	34,56
	43,70
	53,53

	49,54
V	nt
Controle positivo (sulfato de quinidina)	56,20

nt: não testado

5.2 – Ensaio de atividade antioxidante

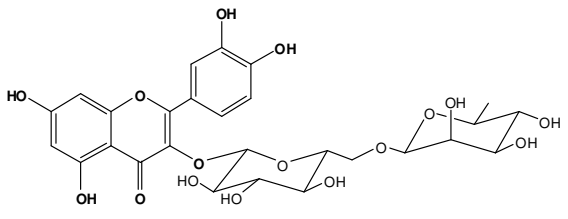
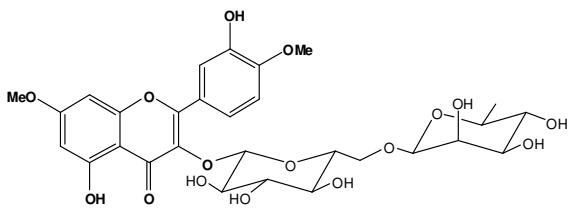
Para avaliação do potencial antioxidante de algumas substâncias obtidas neste trabalho, foi realizado o ensaio com DPPH.

No ensaio com DPPH é avaliada a capacidade de uma substância em sequestrar o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila. As substâncias com atividade antioxidante frente a este reagente são em geral compostos fenólicos, como os flavonóides [BRAHMACHARI, 2006].

Assim, o flavonoide isolado da fase *n*-butanólica das folhas (quercetina-3-rutinosídeo, **X**) e também o obtido da fase clorofórmica dos galhos (ombuina-3-rutinosídeo, **VII**) foram submetidos ao ensaio com DPPH e seus respectivos valores de CI_{50} são mostrados na Tabela 40. Ambos apresentaram atividade neste ensaio, porém a mais significativa foi a correspondente ao flavonoide ombuina-3-rutinosídeo, cujo valor de CI_{50} foi próximo ao obtido

para o controle positivo (Tabela 41). A atividade antioxidante destas substâncias já era esperada, pelo fato de apresentarem hidroxilas fenólicas.

Tabela 28: Valores de CI_{50} (μM) obtidos no ensaio com DPPH para os flavonoides isolados das folhas de *E.suberosum*

Flavonoides	CI_{50} (μM)	Desvio Padrão (\pm)
 <p>quercetina-3-rutinosídeo (Rutina)</p>	21,44	0,22
 <p>ombuína-3-rutinosídeo</p>	12,67	0,23
Acido caféico	13,35	0,72

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico biomonitorado pelo ensaio BST dos galhos de *Erythroxyllum suberosum* resultou no isolamento e caracterização de cinco diterpenos presentes nas frações bioativas, possuindo esqueletos dos tipos abietano e *ent*-caurano. Destes, quatro são inéditos 7-oxo-16-hidroxiabiet-15(17)-en-19-al (**I**), 16-hidroxiabiet-15(17)-en-7-ona (**II**), 7 β ,16-diidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (**III**), *ent*-12 α -hidróxi-caur-16-en-19-al (**V**), enquanto *ent*-7 α ,15 β -diidróxi-caur-16-en-19-oato de metila (**IV**) só foi relatado como derivado metilado do ácido correspondente obtido por biotransformação do ácido *ent*-15 β -hidroxicaurenoico pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. Trata-se também do primeiro relato da ocorrência de diterpenos com esqueleto abietano no gênero *Erythroxyllum*. Dos cinco diterpenos obtidos das frações bioativas, quatro foram submetidos ao ensaio BST (**I**, **II**, **III**, **IV**) e apresentaram toxicidade significativa para *A. salina*, com valores DL₅₀ na faixa de 34,5 a 53,5 μ g/mL.

Foram ainda obtidos dos galhos (das frações destituídas de atividade no ensaio BST) os flavonoides catequina (**VIII**), (-) epicatequina (**IX**) e ombuína-3-rutinosídeo (**VII**), um aminoácido, L-aspartato de etila (**XI**), além de β -sitosterol (**XII**), 3-O- β -D-glucopiranosil sitosterol (**XIII**) e 3 (6'-O-Acil)-3-O- β -D-glucopiranosil-sitosterol (**XIV**).

O estudo químico das folhas de *E. suberosum* resultou no isolamento e caracterização do flavonoide quercetina-3-rutinosídeo (**X**) e do diterpeno E-fitol (**VI**).

Foi também avaliada neste trabalho a capacidade sequestradora de radicais livres dos flavonoides **VII** e **X** frente ao DPPH. Embora ambos tenham apresentado atividade neste ensaio, pode-se destacar a de **VII**, com um valor de CI₅₀ próximo ao do controle positivo ácido caféico.

Além da relevância dos resultados obtidos, pode-se ressaltar ainda neste trabalho a contribuição dada para o conhecimento da composição química de espécies de Erythroxyllaceae, particularmente as do gênero *Erythroxyllum*, que ocorrem em Mato Grosso do Sul, bem como o fornecimento de dados que poderão facilitar futuramente a execução de novos trabalhos relativos ao isolamento e elucidação estrutural de substâncias afins.

7 – BIBLIOGRAFIA

- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31, 3307-3330, 1992.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 32, 953-959, 1993.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of *Erythroxylum pictum*. Dep. Chem., Univ. Natal, Durban, S. Afr. *Phytochemistry* 32, 945-52, 1993.
- BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; CERDÁ-OLMEDO, E.; AVALOS, J.; JUSTICIA, J. Microbial transformation of ent-kaurenoic acid and its 15-hydroxy derivatives by the SG138 mutant of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Natural Products*, 64, 222-5, 2001.
- BARREIROS, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 1. ed., Ed. Artmed: Porto Alegre, 2001.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; DAVID, J. P. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33, 537, 2005.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O.; ALMEIDA M. Z.; QUEIROZ, L. P.; SANTANA, A. E. G. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 68, 1735-1739, 2007.
- BECK, M.; HABERLEIN, H. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia California*. *Phytochemistry*, 50, 329-332, 1999.
- BOHM, B. A.; LOO, T.; NICHOLLS, K. W.; PLOWMAN, T. Flavonoid variation in *Erythroxylum*, *Phytochemistry*, 27, 833-837, 1988.
- BOHM, B. A.; PHILLIPS, D.W.; GANDERS, F. R. Flavonoides of *Erythroxylum rufum* and *Erythroxylum ulei*, 44, 676-679, 1981.
- BONEFELD, M.; FRIEDRICH, H.; KOLODZIEJ, H. (+)-catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. *Phytochemistry*. 25, 1205-1207, 1986.
- BOYD, J.; TURVEY, J. R. Identification by N.M.R.-C-13 spectroscopy of oligosaccharides derived from alginic acid. *Carbohydrate Research* 61, 223, 1978.

- BRAHMACHARI, G.; GORAL, D.; *Current Organic Chemistry* **10**, 873, 2006.
- BRACHET, A; MUNOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J.L.; CHRISTEN, P. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. *Phytochemistry*, **46**, 1439, 1997.
- BUCHANAN, M. S.; CANNOLLY, J. D. KADIR, A. A.; RYCROFT, D. S. Sesquiterpenoids and diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncate*. *Phytochemistry*, **42**, 1641-1646, 1996.
- BUCKINGHARES, J. B. *Dictionary of natural products*. London, Champman and Hall, 1994.
- CANNOLLY, J. D.; HILL, R. A. *Dictionary of terpenoids*. London, Chapman & Hall: 2, 1991.
- CHAVES, M. H. *Tese de Doutorado*, Instituto de Química USP, São Paulo, 1996.
- CHAVES, J.P.; DOS SANTOS, I.D.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. *Phytochemistry*, **41**, 941, 1996.
- CHAVES, D.; CUI, B.; CHAI, H. B.; GRACIA, R.; MEJIA, M.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G., A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. *Journal of Natural Products*, **65**, 606-610, 2002.
- CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, **61**, 437-439, 1998.
- CHIN, Y. M.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J.; ROSOANAIVO, P.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M; KINGHORN, A. D. *Journal Natural products*. **69**, 414, 2006.
- DALY, D. Erythroxylaceae. In: N. Smith; S.A. Mori, A. Henderson *et al.* (eds.). *Flowering Plants of Neotropics*. USA, The New York Botanical Garden. Princeton University Press. 143-145, 2004.
- DEWICK, P. M. *Medicinal natural products, a biosynthetic approach*, 2^a ed. Baffins Lane, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- DOS SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; BRAZ FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17**, 1304-1308, 2006.

DOS SANTOS, C. C.; LIMA, M. A.S.; BRAZ-FILHO; SIMONE, C. A.; SILVEIRA, E. R. NMR assignments and X-ray diffraction spectra for two unusual kaurene diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. *Magnetic resonance in chemistry*, **43**, 1012-1015, 2005.

DOS SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Micromolecular secondary metabolites of *Erythroxylum barbatum*. *Biochemical Systematics and Ecology* , **31**, 661-664, 2003.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. CORRÊA, D.; SIQUEIRA, M. F. Plantas do cerrado paulista: Imagem de uma paisagem ameaçada. São Paulo: *Páginas & Letras editora e gráfica*, 2004.

FODOR, G.; DHARANIPRAGADA, L. Tropane alkaloids. *Journal of Natural products*, **8**, 603-612, 1991.

FODOR, G.; DHARANIPRAGADA, L. Tropane alkaloids. *Journal of Natural products*, **10**, 199-206, 1993.

FUKUYAMA, Y.; TOYOTA, M.; ASAKAWA, Y. Ent-kaurene diterpene from the liverwort *Plagiochila pulcherrima*. *Phytochemistry*, **27**, 1425, 1988.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; PELLICCIARI, I.; HARA, S. M.; FERREIRA, F. C.; NAKASSE, L. Y.; SIQUEIRA, J. M. A bioactive naringenin coumaroyl glucoside from *Mabeae fistulifera subsp. robusta*. *Planta Medica*, **63**, 386, 1997a.

GARCEZ, F. R.; NUNEZ, C. V.; GARCEZ, W. S.; ALMEIDA, R. M.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, limonoid and coumarin from the wood bark of *Guarea guidonia*. *Planta Medica*, **64**, 79, 1998.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; CRUZ, A. C. A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Medica*, **65**, 775, 1999.

GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., SILVA, A. F. G.; BAZZO, R. C.; RESENDE, U. M. Terpenoid constituents from leaves of *Guarea kunthiana*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **15**, 767-772, 2004.

GARCEZ F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C., GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis* (Lauraceae). *Planta Medica*, **71**, 923, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA, A. L. B. D; ALVES, M. M. MATOS, M. F. C.; SCALIANTE, A. M. *Bioactive flavonoids and Triterpenes from Terminalia fagifolia (Combretaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17**, 1223, 2006.

GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., SOARES, L. R. *16,17-Seco- and 2,3:16,17-di-Seco-pregnanes from Guarea guidonia. Journal of the Brazilian Chemical Society*, **19**, 1073 - 1077, 2008a.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. ; BISOLI, E. ; HAMERSKI, L. ; TIEPPO, C. *Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of Combretum laxum. Molecules*, **13**, 2717-2728, 2008b.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L. ; MIGUITA, C. H. *Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de Nectandra megapotamica. Química Nova*, **32**, 407-411, 2009.

GONZALEZ-GUEVARA, J. L.; VELEZ-CASTRO, H.; GONZALEZ-GARCIA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZALEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZALEZ, S. *Flavonoid glycosides from Cuban Erythroxyllum species. Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 539-542, 2006.

GRIFFIN, W. J.; LIN, G. D. Chemotaxonomy and geographica Distribution of tropane alkaloids *Phytochemistry*, **53**, 623-637, 2000.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica*, **17**, 561-584, 2003.

GUERRERO, I. C.; ANDRES, L. S.; LEON, L. G.; MACHIN, R. P.; PADRON, J. M.; LUIS, J. G.; DELGADILLO, J. Abietane Diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with Cytotoxic Activity against Human Cancer Cell Lines. *Journal of Natural Products*, **69**, 1803-1805, 2006.

HASHIMOTO, T.; TORI, M.; ASAKAWA, Y. Piscidal sterol acylglucosides from *edgeworthia-chrysantha*. *Phytochemistry* **30**, 2927, 1991.

HARBORNE, J.B. Biochemical systematics of flavonoids. In: HARBORNE, J.B. (Ed.), *The Flavonoids*. London, Chapman and Hall, 1084–1086, 1975.

HUTCHISON, M.; LEWER, P.; MACMILLAN, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of eighteen derivatives of *ent*-kaur-16en-19oic acid. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans. I*, 2363, 1984.

INIGO, R. P. A.; POMILIO, A. B. Flavonoids from *Erythroxyllum argentinu*. *Phytochemistry*, **24**, 347, 1985.

JOHNSON, E. L., SCHMIDT W. F. Flavonoids as Chemotaxonomic Markers for *Erythroxyllum australe*. *Z. Naturforschung* **59c**, 769-776, 2004.

JOHNSON, E. L., SCHMIDT W. F.; EMCHE, S. D.; MOSSOBA, M. M.; MUSSER, S. M. Kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxyllum coca*. var. *ipadu*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **31**, 59–67, 2003.

JOHNSON, E. L.; SCHMIDT, W. F.; NORMAN, H. A. Leaf flavonoids as chemotaxonomic markers for two *Erythroxyllum* taxa. *Z. Naturforschung* **52c**, 577-585, 1997.

JOHNSON, E. L.; SCHMIDT, W. F.; NORMAN, H. A. Flavonoids as markers for *Erythroxyllum* taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 743-759, 1998.

KOŁODZIEJ, H.; BONEFELD, M. BURGER, J.F.W.; BRANDT, E.V.; FERREIRA, D. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxyllum nummularia*. *Phytochemistry*, **30**, 1255, 1991.

KHATTAK, K. F.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, I. M.; HAMALAL, K.D; TILLEKERATNE, L. M. New tropane alkaloids from *Erythroxyllum moonii*. *Journal of Natural Products*, **65**, 929-931, 2002.

KIRIAKIDIS, S.; STATHI, S.; JHA, H.C.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; Fatty acid esters of sitosterol 3 β -glucoside from soybeans and tempe (fermented soybeans) as antiproliferative substances. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **22**, 139, 1997.

KINGHORN, D.; PEZZUTO, J.M. Isolation of tropane alkaloid multidrug resistance inhibitors from *Erythroxyllum pervillei* and their use for treatment of cancer and infections. *PCT Int.* 108, 2002.

KUBO, I.; Xu, Y.; SHIMIZU K. Antibacterial Activity of *ent*-Kaurene Diterpenoids from *Rabdosia rosthornii*. *Phytotherapy Research*. **18**, 180–183, 2004.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. *Journal of Applied Phycology*, **9**, 29, 1997.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. *Planta Medica*, **45**, 679–686, 1982.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858, 2000.

MC LAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. *Journal Natural Products*, **71**, 1311–1321, 2008.

MICCHESNEY, J. D., CLARK, A., SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus* II. ent-beyer-15-en-18-oic acid. *Pharmazie*. **8**, 1243–1247, 1991.

MI Q, CUI B, SILVA GL, LANTVIT D, LIM E, CHAI H, You M, HOLLINGSHEAD MG, MAYO JG, KINGHORN AD, PEZZUTO JM. Pervilleine A, a novel tropane alkaloid that reverses the multidrug-resistance phenotype. *Anticancer Research*, **61**, 842-50, 2001.

MI Q, CUI B, SILVA GL, LANTVIT D, REYES-LIM E, CHAI H, PEZZUTO JM, KINGHORN AD, SWANSON SM. Pervilleine F, a new tropane alkaloid aromatic ester that reverses the multidrug-resistance phenotype. *Anticancer Research*, **23**, 3607-16, 2003.

MI Q, CUI B.; CHAVES, D.; CHAI, H.; ZHU, H.; CORDELL, G. A.; HEDAYAT, S.; MAYO J. G, KINGHORN A. D; PEZZUTO J. M. *Characterization of tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance phenotype. Anticancer Research*, **22**, 1385-1397, 2002.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C. *Journal of Ethnopharmacology*, **25**, 61, 1998.

PLOWMAN, T. C. Erythroxylaceae Kunth. In: STEVENS, W. D.; ULLOA, C.; POOL, A.; MONTIEL, O. M. (eds.). *Flora de Nicaragua. Monographs Systematic Botany Missouri Botanical Garden*, **85**, 834-838, 2001.

PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Brittonia*. **56**, 1–53, 2004.

PRAYONG, P.; BARUSRUXB, S.; WEERAPREEYAKULC, N, Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, **79**, 598-601, 2008.

SATOH, M.; SATOH, Y.; FUJIMOTO, Y. Cytotoxic constituents from *Erythroxylum catuaba*. isolation and cytotoxic activities of *cinchonain*. *Natural Medicine*, **54**, 97-100, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 2ª ed. Ver. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.

RAMANATHAN, R.; TAN, C. H.; DAS, N. P. Cytotoxic effects of plants polyphenos and fat-soluble vitamins on malignant human cultures cells, *Cancer Letters*, **62**, 217, 1992.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzimic lipidic peroxidation structure activity relationship. *Biochemical medicine and metabolic biology*, **39**, 69-79, 1988.

SILVA, G. L.; CUI, B.; CHAVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H. B.; RASOANAIVE, P.; LYNN, S. M.; O'NEILL, M. J.; LEWIS, J. A.; BESTERMAN, J. M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloids aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. *Journal of Natural Products*, **64**, 1514-1520, 2001.

SILVA, L. M. G. E. Estudo Químico dos frutos, cascas do caule e cerne de um espécime de *Ocotea Minarum* (Meissn.) Mez. (Lauraceae). Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2005.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; DIAS FILHO, B.P. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*, **28**, 834-837, 2005.

SHUE ZHANG; JIE-KUN XU; WANG, J.; WANG, N.; KURIHARA, H.; KITANAKA, S.; YAO, X. Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. *Journal of Natural Products*, **70**, 24, 2007.

ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; NAVARRO, V.; DELGADO, G.; ALVAREZ, L. Antispasmodic diterpenic acids from *Viguiera hypargyrea roots*. *Planta Medica*, **68**, 281-283, 2002.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; DE PAULO, M.; HOSTETTMAN, K. Methylpyrrole Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *Journal of Natural Products*, **68**, 1153-1158, 2005.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMAN, K. M. On-line identification of Tropane alkaloids from the *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020, 75-89, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R.; SOBRL, M.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxilaceae) species from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*. **29**, 819-825, 2001.

WANG, R.; CHEN, Wen-Hao; SHI, Yan-Ping. ent-Kaurane and ent-Pimarane Diterpenoids from *Siegesbeckia pubescens*. *Journal of Natural Products*, **73**, 17–21, 2009.

WEHRLI, F. W.; NISHIDA, T. The use of carbon-13 nuclear resonance spectroscopy in natural products chemistry. In progress in the chemistry of organic natural products; HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G. W. eds. *Wien.*; Springer-Verlag, **36**, 1-229, 1979.

WILLIAMS, R. M.; SINCLAIR, P. J.; ZHAI, D.; CHEN, D. Practical asymmetric syntheses of .alpha.-amino acids through carbon-carbon bond constructions on electrophilic glycine templates. *Journal of the American Chemical Society*, **110**, 1547–1557, 1988.

WRIGHT, J. L. C.; McINNES, A. G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D. G.; WALTER, J. A.; IDLER, D.; KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry* **56**, 1898, 1978.

WU, Y. C.; HUNG, Y. C.; CHANG, F. R.; COSENTINO, M.; WANG, H. K.; LEE, K. H. Identification of ent-16 β ,17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *Journal of Natural products*, **59**, 635-637, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.

<http://www.conservation.org> [acessado em agosto de 2005].

<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010> [acessado em março de 2010].

<http://www.liberherbarum.com> [acessado em agosto de 2009].

