

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**“ESTUDO QUÍMICO DAS ESPÉCIES *Eubrachion ambiguum*  
HOOK & ARN, LORANTHACEAE E *Cecropia catharinensis* CUATRECASAS,  
MORACEAE”.**

**Emilia Carolina Souza Machado  
1995**

**“ESTUDO QUÍMICO DAS ESPÉCIES *Eubrachion ambiguum*  
HOOK & ARN, LORANTHACEAE E *Cecropia catharinensis* CUATRECASAS,  
MORACEAE”.**

**Por  
EMILIA CAROLINA SOUZA MACHADO**

**TESE**

**Submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do  
grau de**

---

**DOUTOR EM QUÍMICA**

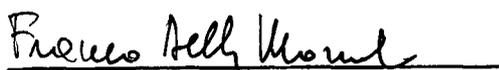
**UFSC  
julho - 1995**

**ESTUDO QUÍMICO DAS ESPÉCIES *Eubrachion ambiguum*  
HOOK & ARN, LORANTHACEAE E *Cecropia catharinensis* CUATRECASAS,  
MORACEAE.**

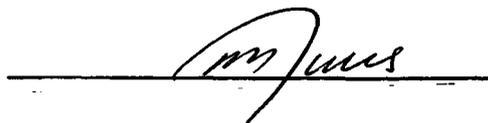
**Tese apresentada por**

**EMILIA CAROLINA SOUZA MACHADO**

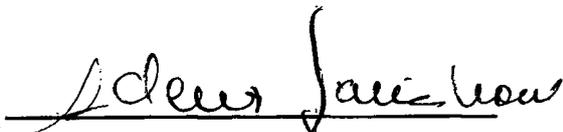
**Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador  
e membros da banca examinadora.**



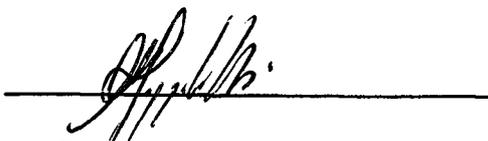
**Prof. Dr. Franco Delle Monache  
(Orientador)**



**Prof. Dr. Rosendo A. Yunes  
(Orientador)**



**Prof. Dr. Ademir Farias Morel  
(Relator)**



**Prof. Dr. Moacir Pizolatti**



**Prof. Dr. Miguel Balparda Caro**

**À minha mãe Eva (in memorian)**

**Ao meu pai Turibio e minhas irmãs Eliane e Elenise**

**Ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes e ao Prof. Dr. Franco Delle Monache meu profundo agradecimento pela oportunidade de desfrutar de seus ensinamentos, pelo constante apoio, incansável atenção, compreensão e pela confiança em mim depositada.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Universidade Federal de Roraima, pela liberação e possibilidade de realização deste Trabalho.

Aos colegas do Departamento de Química da UFRR pelo auxílio e colaborações prestadas.

Ao Prof. Dr. Franco Ferrari do Istituto di Chimica, da Università Catolica Del Sacro Cuore, pelas valiosas trocas de informações durante o desenvolvimento deste Trabalho.

Ao Prof. Dr. Giuliano Delle Monache pelo empenho no registro dos espectros de ressonância magnética nuclear, e pela valiosa oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Aos colegas e funcionários do Istituto di Chimica, da Università Catolica Del Sacro Cuore, pelo agradável convívio durante minha permanência em Roma.

Aos Profs. Dr. Adelino A. Filho e Dr<sup>a</sup>. Amélia Moema Veiga Lopes, do Departamento de Botânica, da UFSM, pela localização e identificação da espécie *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn.

Ao que gentilmente forneceu o material botânico necessário para a investigação de *Eubrachion ambiguum* Hook. & Arn.

Ao Prof. Dr. Gert G. Hatscbach, do Museu Botânico Municipal da Prefeitura Municipal de Curitiba, PR, pela localização e coleta da espécie *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas.

À Prof<sup>a</sup>. Eliane Carneiro pela preparação dos extratos brutos da espécie *Cecropia catharinensis*.

Ao Sr. Horácio Caio Chagas, que gentilmente forneceu a espécie *Eubrachion ambiguum*.

Ao Prof. Marcos Salgado Vital, do Departamento de Biologia da UFRR, pelo incansável apoio e pelas valiosas sugestões na redação deste Trabalho.

Aos colegas Jorge Manoel Costa e Souza, Silvio José Reis da Silva e Martinho Alves de Andrade Júnior do Núcleo de Pesquisas do Museu Integrado de Roraima.

Aos colegas do Laboratório de Estrutura - Reatividade, em especial ao Valdir Cechinel Filho e a Sônia Corina Hess, pelo auxílio e apoio no desenvolvimento deste Trabalho.

Ao Dr. Franco Chialva, do Centro Studi Maria Branca, em Milão, pela disponibilidade na obtenção dos cromatogramas, em CG.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da UFSC, pela atenção e dedicação, em especial à Sra. Graça Holler e ao Sr. Jadir Carminatti.

Às entidades financiadoras CAPES, CNPq e CNR (Itália).

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da UFSC, pela atenção e dedicação, em especial à Sra. Graça Holler e ao Sr. Jadir Carminatti.

A todas as pessoas que acreditaram na realização deste Trabalho.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	v
SUMÁRIO .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ESQUEMAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
ABREVIATURAS .....	xv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
1 - INTRODUÇÃO .....	01
1.1 - <i>Eubrachion ambiguum</i> Hook & Arn .....	01
1.2 - <i>Cecropia catharinensis</i> Cuatrecasas .....	02
2 - OBJETIVOS DA TESE .....	04
3 - PARTE EXPERIMENTAL .....	05
3.1 - Material e Métodos .....	05
3.2 - Investigação de <i>Eubrachion ambiguum</i> .....	05
3.2.1 - Coleta e identificação do material botânico .....	08
3.2.2 - Extração e obtenção do extrato bruto .....	06
3.2.3 - Fracionamento do extrato bruto .....	06
3.2.4 - Purificação da fração SL1 - fase sólida precipitada do extrato bruto .....	06
3.2.5 - Estudo do extrato hexânico de <i>E. ambiguum</i> - isolamento e purificação .....	08
3.2.5.1 - Isolamento da mistura de ésteres graxos - EH-21 .....	08
3.2.5.2 - Obtenção do triterpeno pentacíclico TE-23 - ácido 3-acetóxi urs-12en, 28- óico.....	09
3.2.5.3 - Isolamento do $\beta$ -sitosterol, HS-11 (6) .....	09
3.2.6 - Investigação de EI-14. Substrato hexânico .....	10
3.2.6.2 - Isolamento do triterpeno friedelina (4) - EE-12 .....	11
3.2.6.3 - Isolamento dos ésteres cinâmicos EH-32 (1) e AR-36 (2) .....	13
3.2.6.3.1 - Preparação de placas preparativas para separação dos ésteres .....	13
3.2.6.4 - Obtenção das misturas de ácidos graxos AG-9 e AH-01 .....	15
3.2.6.4.1 - Análise das misturas AG-9 e AH-01 por CG - MS .....	15
3.2.7 - Tratamento do extrato clorofórmico do extrato bruto de <i>E. ambiguum</i> - isolamento e purificação .....	15
3.2.7.1. -Obtenção do triterpeno pentacíclico EC-16A - (3) ácido hidróxi, $\Delta^{20,29}$ -lupen, 28-óico .....	16
3.2.7.2. -Fracionamento da fração 42-49 - isolamento de derivados fenólicos EC-30 (15) e EC-50A (14) .....	17

3.2.7.3. -Glicolípídeos presentes no extrato clorofórmico de <i>E. ambiguum</i> - EC-36 .....	18
3.2.7.3.1 - Acetilação de EC-36 .....	18
3.2.7.3.2 - Hidrólise alcalina de EC-36 - Obtenção da mistura de ácidos graxos livres e separação do resíduo digalactosil-glicerol .....	19
3.2.7.3 - Reação de metilação em HID-36 .....	19
3.2.7.4 - Análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos liberados na saponificação de EC-36 .....	20
3.2.7.4 - Isolamento do esteroide $\beta$ -sitosterol-2-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo de <i>E. ambiguum</i> - EA-54 (7) .....	20
3.2.8. -Fracionamento e compostos isolados do extrato em acetato de etila de <i>E. ambiguum</i> .....	21
3.2.8.1 - Isolamento de 3', 4', 5, 7, tetra-hidróxi flavonol (13) - ES-71 .....	21
3.2.9 - Fracionamento e compostos detectados no extrato butanólico de <i>E. ambiguum</i> .....	22
3.3 - Investigação Química de <i>Cecropia catharinensis</i> Cuatrecasas .....	23
3.3.1 - Coleta e identificação do material botânico .....	23
3.3.2 - Extração e obtenção dos extratos brutos de <i>C. catharinensis</i> .....	23
3.3.3 - Procedimento geral utilizado no fracionamento dos extratos brutos das folhas, caule e raízes de <i>C. catharinensis</i> .....	23
3.3.4 - Isolamento de compostos triterpênicos e esteroídicos dos extratos de <i>C. catharinensis</i> .....	26
3.3.4.1 - Isolamento do ácido $2\alpha$ -, $3\beta$ -, $19\alpha$ -,trihidróxi, urs, en-12, 28-óico, (18) - K-31 .....	26
3.3.4.1.1 - Reação de esterificação em K-31 (18) .....	26
3.3.4.1.2 - Reação de acetilação em K-31 (18) .....	27
3.3.4.2 - Obtenção do ácido $2\alpha$ -acetóxi, $3\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi,12-en,28-óico, (17) - DE-2 .....	27
3.3.4.2.1 - Reação de acetilação de DE-2 (17) .....	28
3.3.4.3 - Isolamento do ácido $2\alpha$ -, $3\alpha$ -, $19\alpha$ -trihidróxi, 12-en, 28-óico, (18) - BB-5 .....	28
3.3.4.3.1 - Reação de esterificação de BB-5 (20) .....	29
3.3.4.3.2 - Reação de acetilação de BB-5 (20) .....	29
3.3.4.4 - Isolamento do ácido $2\alpha$ -acetóxi, $3\alpha$ -, $19\alpha$ -, dihidróxi, urs, -12-eno, 28-óico, (19) - AB-6 .....	29
3.3.4.4.1 - Reação de acetilação em AB-6 (19) .....	30
3.3.4.5 - Isolamento dos ácidos $2\alpha$ -OAc, $3\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, 12-epóxi, 13-17-lactona (23) - A-33 e $3\beta$ -OAc, $2\alpha$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, 12-epóxi, 13-17-lactona, - EC-6 (24) .....	30
3.3.4.5.1 - Reação de acetilação em A-33 (23) e EC-6 (24) .....	31

3.3.4.6 - Isolamento do ácido pomólico (24) - J-14 .....	32
3.3.4.6.1 - Reação de esterificação de J-14 (24) .....	32
3.3.5.7 - Isolamento do ácido ursólico (25) - CG-01 .....	32
3.3.4.7.1 - Reação de esterificação em CG-01 (25) .....	32
3.3.4.8 - Isolamento da mistura dos ácidos ursólico (25) e oleanólico (26) .....	33
3.3.4.9 - Isolamento e identificação de esteróis dos extratos brutos de <i>C. catharinensis</i> , $\beta$ -sitosterol (6), $\beta$ -sitosterol-glicosídeo (7) e a mistura 3-O-(6'-O-n-acil- $\beta$ -D-glicosil)-sitosterol (25a'-i') .....	34
3.3.4.9.1 - Reação de saponificação em 25 a'-i' .....	34
4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	36
4.1 - Compostos isolados e identificados dos extratos brutos de <i>Eubrachion ambiguum</i> Hook & Arn .....	36
4.1.1 - Investigação dos ésteres cinâmicos EH-32 (1a'-g) e AR-36 (2a'-g') .....	36
4.1.2 - Isolamento de triterpenos dos extratos clorofórmico e hexânico de <i>E. ambiguum</i> . Ácido betulínico (3) - EC-16A, friedelina (4) EE-12 e Ácido Ursólico (5) - TE-23 .....	41
4.1.3 - Isolamento dos esteróis $\beta$ -sitosterol (6) e $\beta$ -sitosterol-glicosídeo (7), isolados dos extratos hexânico e clorofórmico de <i>E. ambiguum</i> .....	43
4.1.4 - Identificação dos tocoferóis 8 - 11, isolados de <i>E. ambiguum</i> .....	49
4.1.5 - Misturas de glicolípídeos (DGDG) isolados do extrato clorofórmico de <i>E. ambiguum</i> (12) - EC-36 .....	56
4.1.6 - Identificação de flavonóides (ES-71, e EC-50A, 14) isolados dos extratos em clorofórmio e acetato de etila de <i>E. ambiguum</i> .....	61
4.1.6.1 - Identificação do flavonol (+)-Catequina (13), ES-71 .....	61
4.1.6.2 - Identificação da flavona naringenina 14, EC-50A .....	64
4.1.7 - Análise da fração EC-30, xantoxilina (15), do extrato clorofórmico de <i>E. ambiguum</i> .....	67
4.1.8 - Investigação da fração SL1, isolamento do poliol manitol (16) .....	71
4.1.9 - Identificação de uma mistura de ácidos graxos (AG-9, EH-21 e AH-01), presentes na fração hexano de <i>E. ambiguum</i> .....	71
4.2 - Compostos isolados e identificados dos extratos brutos de <i>Cecropia catharinensis</i> .....	72
4.2.1 - Triterpenos ácidos di e tri-hidroxilados isolados de <i>C. catharinensis</i> , DE-2 (17), K-31 (18), AB-6 (19) e BB-5 (20) .....	72
4.2.1.1 - Identificação dos ácidos 2 $\alpha$ -OAc,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -dihidróxi, urs-12-eno, 28-óico (17), DE-2 e 2 $\alpha$ -,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ - trihidróxi, urs-12-eno, 28-óico (18), K-31 .....	73
4.2.1.2 - Identificação dos ácidos 2 $\alpha$ -OAc,3 $\alpha$ -,19 $\alpha$ -dihidróxi, urs-12-eno, 28-óico (19), AB-6 e 2 $\alpha$ -,3 $\alpha$ -,19 $\alpha$ -trihidróxi, urs-12-eno, 28-óico (20), BB-5 .....	78
4.2.2 - Isolamento e identificação estrutural dos ácidos 2 $\alpha$ -acetóxi, 3 $\alpha$ -19 $\alpha$ -	

dihidróxi, 11, 12-epóxi, 13-27, lactona ( <b>22</b> ), A-33 e 3 $\alpha$ -acetóxi, 2 $\alpha$ -19 $\alpha$ -	89
dihidróxi, 11,12-epóxi, 13- 17,lactona ( <b>23</b> ), EC-6 .....	
4.2.2.1 - Reação de acetilação em A-33 ( <b>22</b> ) e EC-6 ( <b>23</b> ) .....	100
4.2.3 - Isolamento e identificação dos triterpenos pentacíclicos, ácido pomólico	
( <b>24</b> ) - J-14 e ácido ursólico ( <b>25</b> ) - CG-01, isolados de <i>C. catharinensis</i> .....	100
4. 2.4 - Esteróis isolados e identificados nos extratos de <i>C. catharinensis</i> .....	102
4.2.4.1 - Identificação do esteroi $\beta$ -sitosterol( <b>6</b> ) e $\beta$ -sitosterol-glicosídeo ( <b>7</b> ) .....	102
4.2.5.2 - Isolamento e identificação da mistura de esteróides 6'-O-acil-glicosil-CC-	
5 ( <b>21 a'-i'</b> ) .....	103
4.2.5.2.1 - Ésteres metílicos obtidos da saponificação de <b>21 a'-i'</b> .....	108
5 - CONCLUSÕES .....	111
6 - BIBLIOGRAFIA .....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fracionamento e compostos isolados do extrato hexânico de <i>E. ambiguum</i> .....	08
<b>Tabela 2</b> - Cromatografia de EI-14, fração 12-14, obtida do fracionamento do extrato hexânico de <i>E. ambiguum</i> .....	10
<b>Tabela 3</b> - Fracionamento do extrato clorofórmico de <i>E. ambiguum</i> .....	16
<b>Tabela 4</b> - Fracionamento do extrato em acet. de etila de <i>E. ambiguum</i> .....	21
<b>Tabela 5</b> - Fracionamento do extrato butanólico de <i>E. ambiguum</i> .....	22
<b>Tabela 6</b> - Extratos brutos obtidos dos vários órgãos vegetais de <i>C. catharinensis</i> ..	23
<b>Tabela 7</b> - Fracionamento dos extratos brutos de <i>C. catharinensis</i> .....	24
<b>Tabela 8</b> - Concentrações relativas de ésteres alquílicos, de acordo com as proporções em <u>1</u> e <u>2</u> , sob análise em CG .....	41
<b>Tabela 9</b> - Dados de RMN de <sup>13</sup> C de triterpenos pentacíclicos isolados dos extratos brutos de <i>E. ambiguum</i> (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	42
<b>Tabela 10</b> - Principais íons obtidos do padrão de fragmentação obtido da análise dos espectros de massas dos compostos <u>8-11</u> .....	50
<b>Tabela 11</b> - Deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> a 75 Mhz, para EH-10, TO-4, HE-19 e FE-7, em comparação com dados da literatura .....	55
<b>Tabela 12</b> - Dados de RMN de <sup>13</sup> C do digalactosildiácilglicerol, EC-36 ( <u>12</u> ), isolado do extrato clorofórmico de <i>E. ambiguum</i> (75 Mhz, TMS), em comparação com dados da literatura <sup>43</sup> .....	58
<b>Tabela 13</b> - Proporções relativas de ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes em HID-36 ( <u>12</u> ) e, nas misturas EH-21, AG-01 e AH-03, em análise de CG .....	61
<b>Tabela 14</b> - Dados de RMN de <sup>13</sup> C dos flavonóides ES-71 ( <u>13</u> ) e EC-50A ( <u>14</u> ) isolados dos extratos de <i>E. ambiguum</i> (75 Mhz, TMS) .....	66
<b>Tabela 15</b> - Deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup> C para INS-165, em comparação com dados da literatura <sup>53</sup> .....	71
<b>Tabela 16</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H dos triterpenos pentacíclicos <u>17</u> , <u>18b</u> , <u>19</u> , <u>20b</u> , <u>22</u> e <u>23</u> , isolados dos extratos brutos de <i>C. catharinensis</i> .....	94
<b>Tabela 17</b> - Dados de RMN de <sup>13</sup> C dos triterpenos pentacíclicos <u>17</u> , <u>18b</u> , <u>19</u> , <u>20b</u> , <u>22</u> e <u>23</u> , isolados dos extratos brutos de <i>C. catharinensis</i> (CDCl <sub>3</sub> , a 90 Mhz, TMS) .....	95
<b>Tabela 18</b> - Dados de RMN de <sup>13</sup> C dos ésteres metílicos <u>24a</u> e <u>25a</u> , derivados dos triterpenos J-14, e CG-01, isolados de <i>C. catharinensis</i> (75 MHz, TMS, CDCl <sub>3</sub> ) .....	101
<b>Tabela 19</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H de HS-11 ( <u>6</u> ), EA-54 ( <u>7</u> ) e CC-5 ( <u>21a'-i'</u> ), 300	

MHz, em CDCl <sub>3</sub> e py-d <sub>5</sub> * .....	105
<b>Tabela 20</b> - Dados de RMN de <sup>13</sup> C para os compostos <u>6</u> , <u>7</u> e <u>21a'-i'</u> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , py-d <sub>5</sub> -EA-54, TMS) .....	108
<b>Tabela 21</b> - Ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos obtidos da saponificação de <u>21a'-i'</u> .....	109

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Fracionamento do extrato bruto de <i>E. ambiguum</i> .....	07
<b>Esquema 2</b> - Sequência de fragmentação obtida do espectro de massas de <u>1a'-g'</u> e <u>2a'-g'</u> .....	37
<b>Esquema 3</b> - Sequência de fragmentação obtida da análise dos espectros de massas de <u>17</u> , <u>18</u> , <u>19</u> e <u>20</u> .....	75
<b>Esquema 4</b> - Sequência de fragmentação obtida dos espectros de massas de <u>22</u> e <u>23</u> .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ramos com folhas de (a)- <i>Eubracion ambiguum</i> Hook & Arn e (b)- <i>Cecropia catharinensis</i> Cuatrecasas .....	03
<b>Figura 2</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de EH-32 ( <b>1a'-g'</b> ) .....	39
<b>Figura 3</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de AR-36 ( <b>2a'-g'</b> ) .....	40
<b>Figura 4</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS-11 ( <b>6</b> ), a 300 MHz, em $\text{CDCl}_3$ .....	45
<b>Figura 5</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EA-54 ( <b>7</b> ), a 300 MHz, em piridina- $d_5$ , (a) e EA-54 Acetil, região entre 2.0 - 5.20 ppm, em $\text{CDCl}_3$ (b) .....	47
<b>Figura 6</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de EH-10 ( <b>8</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	51
<b>Figura 7</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de TO-4 ( <b>9</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	52
<b>Figura 8</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de HE-19 ( <b>10</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	53
<b>Figura 9</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , de FE-7 ( <b>11</b> ), a 300 MHz, em $\text{CDCl}_3$ .....	54
<b>Figura 10</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de EC-36 ( <b>12</b> ), em piridina- $d_5$ ....	59
<b>Figura 11</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , a 75.5 MHz, do digalactosil - glicerol derivado de EC-36 ( <b>12-a</b> ) .....	60
<b>Figura 12</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de ES-71( <b>13</b> ), em acetona- $d_6$ .....	63
<b>Figura 13</b> - . Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de EC-50A ( <b>14</b> ), em acetona- $d_6$ .....	65
<b>Figura 14</b> - Espectro de massas de EC-30, <b>15</b> (EI, 70EV) .....	68
<b>Figura 15</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de EC-30 ( <b>15</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	69
<b>Figura 16</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , a 75.5 MHz, de EC-30 ( <b>15</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	70
<b>Figura 17</b> - Espectro de massas de DE-2 <b>17</b> , EI (70EV) .....	74
<b>Figura 18</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de DE-2 ( <b>17</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	82
<b>Figura 19</b> - Espectro de correlação heteronuclear-2D ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ; HETCOR), de DE-2 ( <b>17</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	83
<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, do éster metílico de - K-31 ( <b>18a</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	84
<b>Figura 21</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , a 75.5 MHz, do éster metílico de K-31 ( <b>18-a</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	85
<b>Figura 22</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de AB-6 ( <b>19</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	86
<b>Figura 23</b> - Espectro de massas de BB-5, <b>20</b> (EI70EV) .....	87
<b>Figura 24</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, do éster metílico de BB-5 ( <b>20a</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	88
<b>Figura 25</b> - Espectro de massas de A-33, <b>22</b> (EI, 70EV) .....	90
<b>Figura 26</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , a 300 MHz, de A-33 ( <b>22</b> ), em $\text{CDCl}_3$ .....	93
<b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , experimento de dupla ressonância, à 300	

MHz, de A-33 ( <u>22</u> ), em CDCl <sub>3</sub> (a) - irradiando H-2; (b) - irradiando H-3; 97	
(c) - irradiando H-11; (d) - irradiando H-12 e (e) - irradiando H-1 <sub>eq</sub> .....	
<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, de EC-6 ( <u>23</u> ), a 300 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ..... ..	98
<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (a)- de <u>22-a</u> e (b) - <u>23-a</u> , a 300 MHz, em	
CDCl <sub>3</sub> .....	99
<b>Figura 30</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, de EC-4 ( <u>26</u> e <u>27</u> ), a 75.5 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ..	104
<b>Figura 31</b> - espectro de RMN de <sup>1</sup> H, a 300 MHz, de CC-5 ( <u>21 a'-i</u> ), em CDCl <sub>3</sub> .....	107

## ABREVIATURAS

$\phi$	. diâmetro
AcOEt	. acetato de etila
Ac <sub>2</sub> OEt	. anidrido acético
BuOH	. butanol
CCD	. cromatografia em camada delgada
$\delta$	. deslocamento químico (ppm)
d	. dubleto
dd	. duplo dubleto
E.M.	. espectro de massas
EtOH	. etanol
h	. altura
HPLC	. cromatografia líquida de alta resolução
m	. multiplete
MeOD	. metanol deuterado
MeOH	. metanol
p.f.	. ponto de fusão
ppm	. partes por milhão
py	. piridina
pyD <sub>5</sub>	. piridina deuterada
q	. quarteto
RMN	. ressonância magnética nuclear
s	. singleto
sl	. singleto largo
t	. tripleto
TMS	. tetrametilsilano
DGDG	. digalactosildiácilglicerol
APT	. Attached Proton Test
BB	. Broad Band

## RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DAS ESPÉCIES *Eubrachion ambiguum* HOOK & ARN, LORANTHACEAE E *Cecropia catharinensis* CUATRECASAS, MORACEAE.

Autor: Emilia Carolina Souza Machado

Orientadores: Dr. Rosendo A. Yunes  
Dr. Franco Delle Monache

Dos extratos metanólicos da espécie *Eubrachion ambiguum* HOOK & ARN foram isolados e identificados 2 ésteres alquílicos de cadeia longa do ácido p-OH-cinâmico (**1,2-a'-g'**), sendo a mistura n-alquílica composta por álcoois contendo cadeias de C<sub>21</sub> a C<sub>27</sub>; 3 derivados terpenoídicos - ácido betulínico (**3**), ácido acetil ursólico (**4**) e friedelina (**5**); 2 esteróis: β-sitosterol (**6**) e β-sitosterol-3-β-glicopiranosídeo (**7**); 4 derivados cromanois, α-, β-, γ- e δ-tocoferóis (**8** - **11**); um digalactosil-diacil-glicerol (**12a'-i'**) sendo a mistura n-acílica composta de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido petroselinico, ácido linoleico, ácido margárico, ácido mirístico, ácido vacínico e ácido pentadecanóico, sendo que essa é a primeira ocorrência de misturas de DGDG contendo os ácidos petroselinico e pentadecanóico; dois flavonóides - 3',4',5,7-tetrahidróxi flavonol (**13**) e 5,7,4'-trihidróxi flavanona (**14**); uma cetona fenólica, 2-,6-,metóxi,4-hidróxi,acetofenona (**15**); um poliol - manitol (**16**). As substâncias **5**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12 a'-i'**, **14**, **15** e **16** estão sendo descritas pela primeira vez para a família Loranthaceae.

Dos extratos brutos das folhas, caules e raízes de *Cecropia Catharinensis* Cuatrecasas, foram isolados três esteróides - β-sitosterol (**6**), β-sitosterol-3-β-glicopiranosídeo (**7**) e um esteróide n-acilglicosilado - **21 a'-i'**, sendo a mistura n-acílica composta de ácido nonandióico, ácido dibutil pentadióico, ácido bis(2-metilpropil) hexano dióico, ácido 12-metil tridecanóico, ácido 9-metil tetradecanoato, ácido 11-hexadecenóico, ácido 14-metil pentadecanóico, ácido heptadecanóico e ácido 16-metil heptadecanóico; esteróides contendo essas cadeias alquílicas estão sendo descritos pela primeira vez; 4 derivados 2,3,19 trissubstituídos do ácido ursólico, o ácido 2α-acetóxi,3β-,19α-dihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (**17**), ácido 2α-,3β-,19α-trihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (**18**), ácido 2α-acetóxi,3α-,19α-dihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (**19**) e ácido 2α-,3α-,19α-trihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (**20**); duas lactonas triterpênicas isoméricas - 2α-acetóxi,3β-,19α-,dihidróxi, 11-12-epóxi, 13-27,lactona (**22**) e 3α-acetóxi,2β-,19α-dihidróxi, 11-12-epóxi, 13-27,lactona (**23**); um triterpeno pentacíclico dihidroxilado - ácido 3β-,19α,dihidróxi, urs-,12-eno,28-óico (**24**) e

o ácido ursólico (**25**). Os compostos **17**, **19**, **22**, **23** e os esteróides (**21a' - i'**), contendo as cadeias alquílicas **a' - i'** estão sendo descritos pela primeira vez.

Os compostos **1** a **16** foram isolados da espécie *E. ambiguum*, enquanto que **17** a **27** foram obtidos da espécie *C. catharinensis*. Obteve-se, assim, um total de 26 compostos químicos, embora deva-se considerar que os compostos **1, 2 a' - g'**, **12 a' - i'** e **21a' - i'**, constituem a soma de 25 derivados, somando um total de 48 constituintes químicos isolados dos extratos brutos das espécies estudadas.. do de *E. ambiguum* e *C. catharinensis*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Autor: Emília Carolina Souza Machado

Orientadores: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes

Prof. Dr. Franco Delle Monache

Título: "Estudo Químico das Espécies *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn, Loranthaceae, e *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas, Moraceae".

## ABSTRACT

CHEMICAL STUDY OF THE SPECIES *Eubrachion ambiguum* HOOK & ARN, LORANTHACEAE AND *Cecropia catharinensis* CUATRECASAS, MORACEAE.

Author: Emilia Carolina Souza Machado

Academic Adviser: Dr. Rosendo A. Yunes  
Dr. Franco Delle Monache

From the methanolic extracts of the species *Eubrachion ambiguum* HOOK & ARN two long chain alkylic esters derived from the *p*-OH-cinnamic acid (**1,2-a'-g'**) were isolated and identified. The n-alkylic mixture composed by alcohols containing chains of C<sub>21</sub> to C<sub>27</sub>; 3 terpenoidic derivatives - betulinic acid (**3**), acetyl ursolic acid (**4**), and friedeline (**5**); 2 steroids:  $\beta$ -sitosterol (**6**) e  $\beta$ -sitosterol-3- $\beta$ -glucopyranoside (**7**); 4 chromanols derivatives,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocopherols (**8 - 11**); one digalactosyl-diacyl-glicerol (**12a'-i'**) were the n-acylic mixture is composed by palmitic acid, stearic acid, petroselinic acid, linoleic acid, margaric acid, miristic acid, vacinic acid, and pentadecanoic acid. This is the first occurring mixture of DGDG containing the petroselinic and pentadecanoic acids; two flavonoids -3',4',5,7-tetrahydroxi flavonol (**13**) e 5,7,4'-trihydroxy flavanone (**14**); one phenolic ketone, 2-,6-,methoy,4-hydroxy, acetophenone (**15**); one poliol - manitol (**16**). The compounds **5**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12 a'- i'**, **14**, **15**, and **16** are been described for the first time for the Loranthaceae's family.

From the crude extracts of the leaves, bar, stems, and roots of *Cecropia Catharinensis* Cuatrecasas, three steroids were isolated -  $\beta$ -sitosterol (**6**),  $\beta$ -sitosterol-3- $\beta$ -glicopyranoside (**7**) and a n-acylglycosilated steroid - **21 a'-i'**, which the n-acylic mixture is composed by the nonandioic acid, dibutyl pentadioic acid, bis(2-methylpropyl) hexane dioic acid, 12-methyl tridecanoic acid, 9-methyl tetradecanoate acid, 11-hexadecanoic acid, 14-methyl pentadecanoic acid, heptadecanoic acid, and 16-methyl heptadacanoic acid; steroids containing these alkylic chains are been described for the first time; 4 derivatives of the 2,3,19 trisubstituted ursolic acid, the 2 $\alpha$ -acetoxy,3 $\beta$ -,19 $\alpha$ -dihydroxy acid, urs-,12-en, 28-oic (**17**), 2 $\alpha$ -,3 $\beta$ -,19 $\alpha$ -trihydroxy acid, urs-,12-en, 28-oic (**18**), 2 $\alpha$ -acetoxi,3 $\alpha$ -,19 $\alpha$ -dihydroxy acid, urs-,12-en, 28-oic (**19**), and 2 $\alpha$ -,3 $\alpha$ -,19 $\alpha$ -trihydroxy acid, urs-,12-en, 28-oic (**20**); two isomeric triterpenic lactones - 2 $\alpha$ -acetoxy,3 $\beta$ -,19 $\alpha$ -,dihydroxy, 11-12-epoxy, 13-27,lactone (**22**) and 3 $\alpha$ -acetoxy,2 $\beta$ -,19 $\alpha$ -dihydroxy, 11-12-epoxy, 13-27,lactone (**23**); a hydroxilated pentacyclic tetrerpene - 3 $\beta$ -

,19 $\alpha$ ,dihydroxi, urs-,12-en,28-oic acid (**24**) and the ursolic acid (**25**). The compounds **17**, **19**, **22**, **23** and the esterooids (**21a'**- **i'**), containing the alkylic chains **a'**- **i'** are been described for the first time.

The compounds **1** to **16** were isolated from the *E. ambiguum* species, while the compounds **17** to **27** were obtained from the *C. catharinensis* species. A total of 26 compounds were obtained, but if one consider that the compounds **1**, **2 a' - g'**, **12 a' - i'** e **21a' - i'**, themselves add more 25 derivatives, reaching a total of 48 chemical constituents isolated form the crude extracts of the studied *E. ambiguum* and *C. catharinensis* spices.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
GRADUATE CURSE OF CHEMISTRY

Author: : Emília Carolina Souza Machado

Academic Adviser: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes

Prof. Dr. Franco Delle Monache

Title: Chemical study of the *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn, Loranthaceae, and *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas, Moraceae species.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização tradicional de espécies vegetais na cura de moléstias, mantida ao longo dos séculos e, mais recentemente aliada ao desenvolvimento científico, tem propiciado grandes avanços no estudo terapêutico de vegetais e, em consequência, na descoberta de novas drogas. Deste modo, o trabalho fitoquímico tem se tornado de grande importância para a ciência, através da análise química orgânica de espécies vegetais, a partir da combinação de processos de separação e purificação com técnicas de análise instrumental.

As famílias Loranthaceae e Moraceae possuem gêneros, na classificação taxonômica tais como *Loranthus*, *Phrygillanthus*, *Viscum*<sup>2</sup> e *Morus*, *Ficus*, *Cecropia*<sup>1</sup>, cujas espécies são muito utilizadas na medicina popular. Por outro lado, os escassos conhecimentos científicos tornam necessário a realização de estudos químicos e farmacológicos dessas plantas. Com base nestes argumentos foram selecionadas as espécies *Eubrachion ambiguum* (Loranthaceae) e *Cecropia catharinensis* (Moraceae) como objetos de estudo e, conseqüentemente, a realização deste trabalho.

### 1.1. *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn

A família Loranthaceae compreende 40 gêneros, com cerca de 1500 espécies, que distribuem-se em todas as regiões tropicais e subtropicais, sendo pouco freqüentes nas faixas temperadas. Geralmente estas plantas apresentam-se como arbustos ou subarbustos, sempre parasitando ramos ou raízes<sup>3</sup>. O estudo químico sobre essa família é escasso, podendo-se citar, como constituintes fixos já descritos na literatura, a presença de flavonóides<sup>4</sup>, triterpenos pentacíclicos<sup>5,6</sup> e fenil-propanóides<sup>7</sup>.

O gênero *Viscum*, pertencente a família Loranthaceae, constitui-se num importante grupo de plantas difundidas largamente na medicina popular como agentes hipotensores, diuréticos e, principalmente, no tratamento de infecções renais e pneumonia<sup>8</sup>.

A espécie *Eubrachion ambiguum* (syn. *Viscum ambiguum*), é uma Loranthaceae que ocorre no Uruguai, Argentina em serras das regiões Leste e Oeste e no extremo sul do Brasil. Sobrevive como um hemiparasito nos troncos e galhos de árvores e arbustos, pertencentes a família das Mirtaceae (geralmente *Feijoa* e *Stenocalyx* sp). No estado do Rio Grande do Sul, onde é conhecida popularmente sob o nome de "erva de passarinho", desenvolve seu habitat exclusivamente sobre a espécie *Stenocalyx michelii* Berg, uma Mirtaceae conhecida com a denominação popular de "pitangueira"<sup>3</sup> (Figura 1a).

## 1.2. *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas.

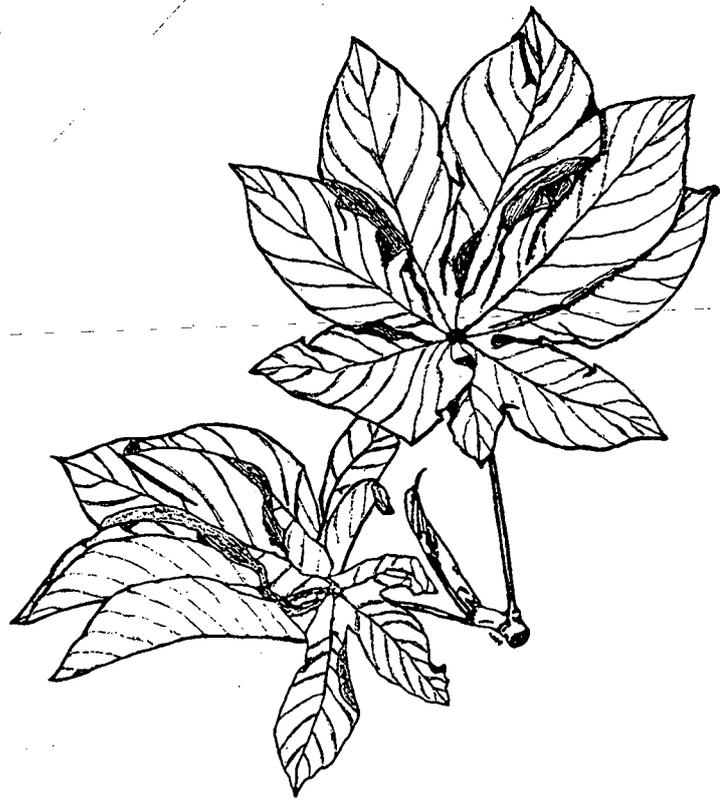
A família Moraceae possui cerca de 54 gêneros, com aproximadamente 1800 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. Em geral apresentam-se como árvores de grande porte e, menos frequentemente, sob a forma de arbustos<sup>9</sup>. Os representantes dessa família possuem folhas alternadas e pequenas e geralmente contém látex leitoso, como por exemplo no gênero *Ficus*.

O estudo químico de espécies integrantes da família Moraceae tem demonstrado a presença de várias classes de compostos, tais como, flavonóides<sup>10,11</sup>, triterpenos pentacíclicos<sup>12</sup>, cumarinas<sup>13,14</sup> e xantonas<sup>15,16</sup>.

*Cecropia catharinensis* é uma espécie de Moraceae conhecida popularmente com o nome de "embaúba" ou "umbaúba". Estas plantas são árvores de médio porte, com látex, de tronco fistuloso, ramificações candelabrifórmes e apresentam folhas grandes e palmadas (Figura 1b). Caracteriza-se pela presença de caule oco e habitado por formigas do gênero *Azteca*,<sup>17</sup>. Várias espécies de *Cecropia* são utilizadas na medicina popular, em forma de chás ou infusões, no tratamento de afecções respiratórias como bronquite, asma, tosse espasmódica, etc<sup>8</sup>. Devido a essas utilizações terapêuticas, as espécies *C. adenopus* Mart e *C. hololeuca* Miq. foram incorporadas em Farmacopéias Argentinas e Brasileiras<sup>19</sup>.

Poucos estudos químicos de espécies pertencentes ao gênero *Cecropia*, têm sido descritos, podendo-se citar a presença de triterpenos nas folhas de *C. peltata* L.<sup>18</sup>, cumarinas no caule de *C. lyratiloba* Miq.<sup>19</sup> e um flavonóide glicosídico nas folhas de *C. glaziovii*.

Sob o ponto de vista farmacológico, foram registradas em *C. catharinensis* ações colinomiméticas bloqueáveis por atropina e atividade colinolítica não competitiva<sup>21</sup>. Considerando-se que estes dados não justificam a utilização desta planta no tratamento da asma, torna-se necessário a continuação de estudos complementares.



**b**

gura 1. Ramos com folhas de (a)- *Eubracion ambiugum* Hook & Arn e (b)- *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas.

## 2. OBJETIVOS DA TESE

As espécies *Eubrachion ambiguum* (Loranthaceae) e *Cecropia catharinensis* (Moraceae), foram objetos de estudo para a realização de uma investigação química, que teve como principais objetivos:

1) Isolar os constituintes fixos, com alto grau de pureza, a partir dos extratos brutos de *C. catharinensis* e *E. ambiguum*, pela otimização e desenvolvimento de técnicas cromatográficas.

2) Identificar estruturalmente os compostos isolados através de métodos comparativos e da aplicação de métodos físicos, tais como, UV, IV, espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear.

3) Realizar modificações químicas nas estruturas dos compostos isolados para auxiliar nas caracterizações e determinações estruturais. Assim, poder-se-á fornecer modelos para novas rotas de síntese e estudos farmacológicos.

4) Contribuir para estudos farmacológicos posteriores das moléculas identificadas e de seus mecanismos de ação.

### 3- PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Material e Métodos

As filtrações em gel foram realizadas em polímero de dextrana tipo sephadex LH-20, adquiridos da Merck S.A.

Nas cromatografias em coluna utilizou-se gel de sílica Merck 60, com granulação de 35 - 70, 70 - 230 mesh ou 230 - 400 mesh (colunas Flash). Em cromatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se placas Merck 60 F254, RP-8, RP-18 e celulose, com espessuras 0.2 mm. Nas revelações utilizou-se lâmpadas UV 254 e 365 nm, solução de ácido sulfúrico:água:formol (2:3:1), seguido de aquecimento e reagentes específicos como ninidrina para aminoácidos, ácido fosfomolibdico para tocoferóis<sup>22</sup>, permanganato de potássio para açúcares e polióis e Di-fenil-amina para gluco-lipídeos<sup>23</sup>

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A., adquiridos de Merck ou Carlo Erba.

A análise da composição das misturas de ésteres metílicos dos ácidos graxos livres e álcoois alifáticos, por cromatografia em fase gasosa.

Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho Kofler com microscópio, e não foram corrigidos.

Os espectros de massas foram obtidos num espectrômetro VG 70EQ, sob impacto de feixe eletrônico à 70 ev, equipado com FAB - registro positivo (matriz de glicerol + NaCl).

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos em um espectrômetro, utilizando-se TMS como referência interna. Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos em espectrômetros Varian Gemini 300 e Varian XL 300, operando em 75 MHz.

Cromatografias gasosas foram realizadas em um cromatógrafo CG HP 5890 com detector de massa HP 5988 A. A temperatura de injeção foi de 220°C, e a temperatura da coluna de 70 a 200°C, com velocidade de 40 °C/min.

As rotações ópticas foram obtidas num polarímetro digital Perkin Elmer 243.

#### 3.2. *Eubrachion ambiguum*.

##### 3.2.1. Coleta e identificação do material botânico.

A espécie *Eubrachion ambiguum* foi coletada no mês de setembro de 1991, no município de São Vicente do Sul, RS. A identificação do material botânico foi realizada

pelo Prof. Dr. Adelino A. Filho, do Departamento de Botânica da UFSM. Uma escicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica - UFSM, sob o n. 436.

### **3.2.2. Extração e obtenção do extrato bruto.**

O material botânico foi secado a temperatura ambiente e moído a fino grão, tendo sido obtido 2800 g. Este material foi mantido em maceração com MeOH, durante 5 dias e posteriormente percolado. Após, o solvente foi destilado a pressão reduzida resultando em 250 g, 8.67 % em peso do material inicial, de um sólido escuro, denominado de extrato bruto.

### **3.2.3. Fracionamento do extrato bruto.**

O extrato bruto foi dividido em duas partes, pesando 125 g cada parte. Uma das partes do extrato bruto foi dissolvido numa solução de metanol:água (8:2) e, uma parte do material, 38.5 g, que manteve-se sólida e foi filtrada. A mistura sólida assim obtida foi denominada fração SL1 e analisada. O restante do extrato sofreu partição em vários solventes, com graus crescentes de polaridade, conforme esquema I, resultando em diferentes extratos, que foram posteriormente fracionados (Tabelas 1 a 5).

### **3.2.4. Purificação da fração SL1 - fase sólida precipitada do extrato bruto.**

A fração SL1 foi dissolvida numa mistura de água-acetona (1:3), e mantida em repouso por 20 h, sendo em seguida filtrada. Foram obtidos 23.13 g de cristais incolores, com formato de agulhas, solúveis em água, com rendimento de 0.74 % em relação ao peso de planta seca e 15%, em relação ao peso do extrato bruto. Foi codificado como INS-164 e analisado por métodos espectroscópicos.

RF: 0.85 (acetonitrila-água, 30%)

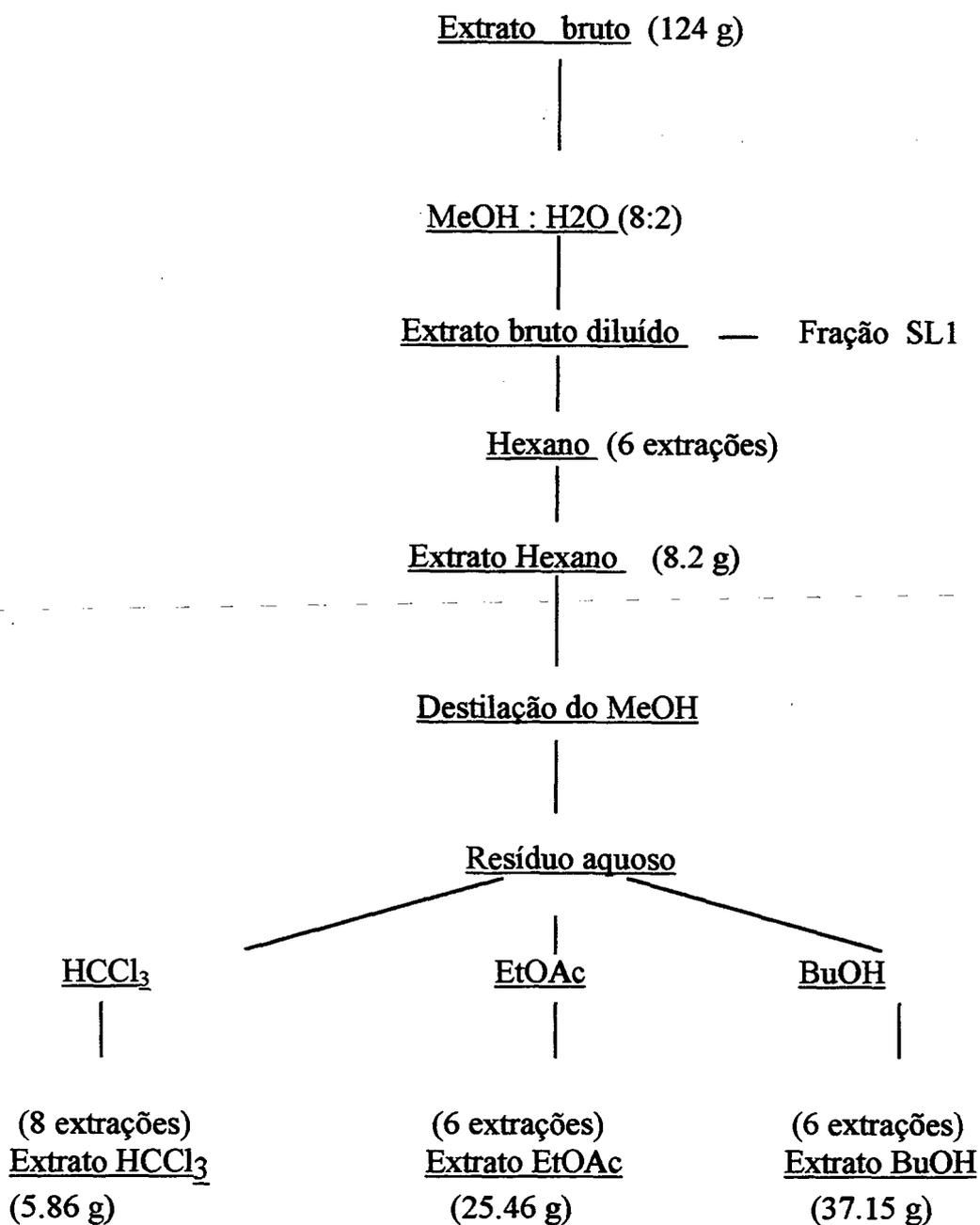
P.F.: 164-165 °C; Lit. (167-169°C)<sup>24</sup>

$[\alpha]_D = +23$  (20 °C; c=0.5); Lit ( +20)<sup>25</sup>

RMN de <sup>1</sup>H, (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm)= 3.62 (1H, dd, J=5.5 e 11.4 Hz); 3.69 (1H, dd, J=2.4 e 8.6 Hz); 3.72 (1H, m); 3.75 (2H, d, J=8.6 Hz); 3.82 (1H, dd; J=2.4 e 11.4 Hz).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT; 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ; Tabela 17):  $\delta$  (ppm)= 66.02 ( $2\text{CH}_2$ ); 72.05 ( $2\text{CH}$ ) e 73.61 ( $2\text{CH}$ ).

**Esquema I. Fracionamento do extrato bruto.**



### 3.2.5. Estudo do extrato hexânico de *E. ambiguum* - isolamento e purificação.

Uma alíquota de 0.5 g do extrato hexânico foi analisada em CCD, com diferentes solventes, a fim de otimizar os sistemas de eluição para determinar os eluentes mais apropriados, para colunas cromatográficas. Assim, 8.3 g de extrato hexânico foi aplicado em coluna de sílica gel ( $\phi=70$  cm;  $h=3$  cm) empacotada com benzeno. As frações foram reunidas de acordo com monitoramento em CCD, concentradas a pressão reduzida e, então analisadas (Tabela 1). As frações sólidas obtidas foram purificadas por recristalização ou refracionamento em colunas cromatográficas e/ou placas preparativas.

**Tabela 1.** Fracionamento e compostos isolados do extrato hexânico de *E. ambiguum*.

eluente*	frações (mg)	Comp. isolados	Análise**
B	1-4 (251)		
B	5-9 (354)		
B	10-11 (340)	EH-21 (75) EH-10	4.1.9 4.1.4
B+A (9:1)	12-14 (2321) (EI-14-Tabela 2)		
B+A (9:1)	15-22 (827)	HS-11 (57)	4.1.3
B+A (9:1)	23-30 (639)	TE-23 (44)	4.1.2
B+A (9:1)	31-44 (535)		
B+A (8:2)	45-49 (399)		
B+A (1:1)	50-60 (275)		

B= benzeno

\*A= acetato de etila

\*\* - Os números indicados referem-se aos itens do capítulo "Apresentação e discussão dos resultados", onde cada composto será analisado.

#### 3.2.5.1. Isolamento da mistura de ésteres graxos - EH-21

A fração 10-11 (340 mg, Tabela 1), obtida do fracionamento do extrato hexânico, foi recromatografada em coluna de sílica gel ( $\phi=1.5$ cm;  $h=25$ cm), com hexano : benzeno, 3:2, como eluente. Foram obtidos 75 mg de óleo amarelado, com absorção em UV 254 nm e bastante solúvel em clorofórmio. Foi submetido a análise em cromatografia gasosa,

em coluna dbwax 50. A Tabela 15 (p. 60) apresenta a composição percentual das misturas de ésteres graxos em EH-21.

### 3.2.5.2. Obtenção do triterpeno pentacíclico TE-23 - ácido 3-acetóxi, urs-12en, 28-óico.

A fração 23-30 (639 mg; Tabela 3) foi filtrada em gel de Sephadex LH-20 ( $\phi=1.5\text{cm}$ ;  $h=35\text{cm}$ ) com uma mistura de  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ , 85:15, para retirar parcialmente a clorofila e outros pigmentos. As frações assim purificadas (139 mg) foram reunidas e cromatografadas em coluna de gel de sílica ( $\phi=1.2\text{cm}$ ;  $h=20\text{cm}$ ), eluída com hexano-acetato 20%, rendendo 44mg de TE-23 puro. Sólido cristalino. PF: 210-213°C.

RF: 0.5 (em hexano-acetato, 8:2)

PF: 215-218 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm)= 0.75 (3H, s); 0.84 (3H, s); 0.85 (3H, d); 0.85 (3H, d); 0.95 (3H, s); 1.06 (3H, s); 2.04 (3H, s); 4.49 (1H, m); 5.22 (1H, m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 9 (p. 41).

E.M. m/z (%): 498 ( $\text{M}^+$ ); 452 (18); 438 (10); 248 (100); 203 (55); 133 (48); 109 (22); 87 (72).

### 3.2.5.3. Isolamento do $\beta$ -sitosterol, HS-11 (6)

HS-11 foi obtido da fração 15-22 por recristalizações sucessivas em metanol, sendo identificado como o esterol  $\beta$ -sitosterol (6).

PF: 138-142 °C (Lit. 136-138°C)<sup>30</sup>

RF: 0.42 (diclorometano-metanol, 95:5)

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$ (ppm)= 0.67 (3H, s); 0.82 (3H, t,  $J=7.0$  Hz); 0.84 (3H, d,  $J=7.0$  Hz); 0.92 (3H, d,  $J=7.0$  Hz); 1.00 (3H, s); 5.35 (2H, m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz, Tabela 20):  $\delta(\text{ppm})= 11.78; 11.91; 18.71; 18.97; 19.32; 19.76; 21.00; 22.97; 24.22; 25.96; 28.18; 29.04; 31.49; 31.81; 33.84; 36.07; 36.40; 37.19; 39.69; 42.16; 42.22; 45.71; 50.03; 55.97; 56.67; 71.59; 121.54; 140.69$ .

E.M. m/z (%): 414 ( $\text{M}^+$ ); 415 ( $\text{M} + 1$ ); 396 (52); 361 (40); 329 (45); 303 (60); 255 (35); 213 (45); 159 (45); 145 (55); 107 (65).

### 3.2.6. Investigação de EI-14 - Substrato hexânico

Um total de 2321 mg, do resíduo que constituiu a fração 12-14 (denominada EI-14), foi cromatografada em coluna de vidro ( $\phi=2.2$  cm;  $h=53$  cm), com 50 g de sílica gel, eluída com proporções crescentes de benzeno em hexano segundo a Tabela 2. Purificações de frações dessa coluna possibilitou o isolamento de uma série de tocoferóis conhecidos,  $\alpha$ - (8),  $\beta$ - (9),  $\gamma$ - (9) e  $\delta$ - (10) tocoferol, o triterpeno pentacíclico friedelina (EE-12, 4), os ésteres cinâmicos EH-32 (1) e AR-36 (2) e as misturas de ácidos graxos AG-9 e AH-01.

**Tabela 2.** Cromatografia de EI-14, fração 12-14, obtida do fracionamento do extrato hexânico de *E. ambiguum*.

Eluente	Frações (mg)	Compostos Isolados (mg)	Análise**
B+H (2:1)	1 - 12- (135)		
B+H (2:1)	13 - 20 (141)	EH-10 (107)	4.1.4
B+H (2:1)	21 - 27 (99)	EE-12 (121) HE-19 (119) TO-4 (17)	4.1.2 4.1.4 4.1.4
B+H (2:1)	28 - 44 (134)	FE-7 (33)	4.1.4
B+A (1:1)	45 - 67 (378)	AG-9 (158) AH-01 (83)	4.1.9 4.1.9
B	68 - 85 (280)		
B+A (95:5.0)	86 - 94 (364)	EH-32 (18) AR-36 (25)	4.1.1 4.1.1

\* B= benzeno A= acetato de etila\*\* Os números indicados referem-se aos itens do capítulo "Apresentação e discussão dos resultados", onde cada composto será analisado.

### 3.2.6.1. Isolamento de derivados cromanois (tocoferois) de EI-14. EH-10; TO-4; HE-19; FE-7.

#### EH-10.

O resíduo do eluato 10-11 (310 mg; Tabela 1) foi reunido com a fração 13-20 (141 mg, Tabela 2) e cromatografado através de coluna de sílica gel, empacotada com hexano e eluída com benzeno-hexano (2:3-1:0). As frações menos polares (benzeno-hexano; 2:3) forneceram 159 mg de um óleo amarelo intenso, bastante solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , que foi denominado de EH-10. As análises físicas desse composto permitiram identificá-lo como sendo o 2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12',-trimetiltridecil)-6-cromanol ( $\alpha$ -tocoferol, **8**). Esse e outros compostos da série foram revelados, em CCD, utilizando-se ácido fosfomolibdico e lâmpada UV<sub>254</sub> nm.

RF: 0.37 (hexano)

RMN de  $^1\text{H}$ , (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 6):  $\delta(\text{ppm}) = 0.84-0.87$  (12H, 6d,  $J=6.5$  Hz); 1.22 (3H, s); 2.10 (6H, s); 2.14 (3H, s); 2.6 (2H, m); 4.32 (1H, s).

RMN de  $^{13}\text{C}$ , (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): tabela 13 (54).

E.M. m/z (%): 430 ( $\text{M}^+$ ); 431 ( $\text{M}+1$ ); 432 ( $\text{M}+2$ ); 250 (15); 205 (15); 165 (100); 137 (12); 109 (18).

#### TO-4 e HE-19.

As frações 21-27 que foram resultantes do fracionamento de EI-14 (Tabela 2), foram eluídas com benzeno : hexano (2:1) e apresentaram em CCD a presença de três compostos: dois mais abundantes, com RF muito próximos, e um terceiro em menor quantidade relativa. A recristalização desta mistura possibilitou a separação do terceiro componente, que cristalizou-se em forma de agulhas incolores (EE-12; 3.3.5.1.c). Os outros dois compostos permaneceram na água mãe e foram separados por placas preparativas de sílica gel, eluídas com hexano-acetato de etila, 95:5. Ambos apresentaram absorção intensa em luz UV 254 nm e reação positiva com ácido fosfomolibdico. Apresentaram aspecto oleoso e forte coloração amarelo-laranja. Foram denominados HE-19 e TO-4 e identificados como 2,5,8-tetrametil-2-(4',8',12',-

trimetiltridecil)-6-cromanol ( $\beta$ -tocoferol, **9**) e 2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12',-trimetiltridecil)-6-cromanol ( $\gamma$ -tocoferol, **10**), respectivamente.

**HE-19:**

RF: 0.34 (hexano).

RMN de  $^1\text{H}$ , (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 8):  $\delta(\text{ppm})= 0.83 - 0.87$  (12 H, 6d,  $J=6.5$  Hz); 1.23 (3H,s); 2.10 (3H, s); 2.13 (3H, s); 2.65 (2H, t,  $J=7.0$  Hz); 4.75 (1H, s); 6.37 (1H, s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 11 (p. 54).

E.M. m/z (%): 418 (M+2); 417 (M+1); 416 (100,  $\text{M}^+$ ); 191 (28); 167 (32); 151 (98); 111 (34).

**TO-4:**

R.F: 0.25 (hexano)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 7):  $\delta(\text{ppm})= 0.75 - 0.87$  (12 H, 6d,  $J=6.5$  Hz); 1.22 (3H, s); 2.08 (3H, s); 2.10 (3H, s); 2.60 (2H, t,  $J=6.8$  Hz); 4.21 (1 H, s); 6.48 (1 H, s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 11(p. 54).

E.M. m/z (%): 418 (M+2); 417 (M+1); 416 ( $\text{M}^+$ ; 100); 279 (15); 191 (30); 167 (30); 151 (92); 85 (40).

**FE-7**

Este composto foi também obtido do refractionamento de EI-14 (Tabela 2), em coluna de sílica gel, das frações 28-44, eluídas com benzeno-hexano (3:1). Foi purificado através de filtração em sílica gel, utilizando-se hexano-acetato de etila (4:1), como sistema eluente. Composto oleoso, de forte coloração alaranjada e bastante solúvel em  $\text{CHCl}_3$ . Foi identificado através de métodos físicos como sendo 7-metil-2-(4',8',12',-trimetiltridecil)-6-cromanol ( $\delta$ -tocoferol, **11**).

RF: 0.18 (hexano).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 9):  $\delta$  (ppm): 0.78 - 0.95 (12 H, 6d,  $J=6.5$  Hz); 1.25 (3 H, s); 2.12 (3H, s); 2.68 (2 H, m); 6.38 (1H, d,  $J=2$  Hz); 6.51 (1H, d,  $J=2$  Hz).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm)= Tabela 11 (p. 54).

E.M. m/z (%): 430 ( $\text{M}^+$ ); 416 ( $\text{M}^+$ ); 402 ( $\text{M}^+$ ); 388 ( $\text{M}^+$ ); 374 ( $\text{M}^+$ ); 360 ( $\text{M}^+$ ); 164 (100); 147 (65); 120 (36); 107 (28).

### 3.2.6.2. Isolamento do triterpeno friedelina (4) - EE-12.

O composto EE-12 foi obtido puro através de sucessivas recristalizações em benzeno, das frações 21-27, provenientes do refractionamento de EI-14, em coluna sílica gel (Tabela 2). Obteve-se 35 mg de EE-12, que recristalizou em acetato de etila, formando cristais incolores, com formato de agulhas, solúveis em  $\text{CHCl}_3$ . Apresentou  $\text{RF}=0.75$ , em benzeno-acetato de etila (9:1). Foi detectado em CCD através de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e vapores de iodo. A estrutura de EE-12 foi correspondente ao triterpeno denominado friedel,3-ona (4).

P.F. 295 °C (Lit 287 °C)<sup>27</sup>.

RF: 0.75, em benzeno-acetato (9:1)

E.M. m/z (%): 426 ( $\text{M}^+$ ); 411 ( $\text{M}-\text{Me}$ , 25), 302 (48), 273 (70), 259 (20), 246 (45), 232 (48), 218 (55), 205 (68), 179 (63), 125 (87), 109 (78).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm)= 0.72 (3H, s); 0.86 (3H, s); 0.87 (3H, d,  $J=6.0$  Hz); 0.95 (3H, s); 1.00 (3H, s); 1.05 (3H, s); 1.18 (3H, s); 1.25 (3H, s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 9.

### 3.2.6.3. Isolamento dos ésteres cinâmicos EH-32 (1) e AR-36 (2).

A mistura de EH-32 e AR-36 foi obtida das frações 86-94, eluídas em hexano-benzeno (1:1), provenientes do fracionamento de 12-14 (EI-14, Tabela 2). Em CCD esses compostos apresentaram RF muito próximos e foram separados por placas preparativas de sílica gel, impregnadas com parafina líquida, em fase reversa, preparadas conforme abaixo descrito.

### 3.2.6.3.1. Preparação de placas preparativas, em fase reversa, para separação de ésteres cinâmicos.

Seis placas de sílica gel, 0.5 mm, foram mergulhadas em uma mistura de parafina líquida, em éter de petróleo (15 %). O solvente foi removido em corrente de ar e as misturas dos ésteres EH-32 e AR-36 aplicadas. As placas foram eluídas com uma mistura de metanol-água (3:2). Foram obtidas 29 mg de EH-32 (1) e 35 mg de AR-36 (2). Os compostos EH-12 e AR-36 apresentaram comportamento físico e químico bastante similar: solúveis em  $\text{CHCl}_3$ , recristalizaram em acetona, formando cristais incolores, aciculares, que fundiram a 212 (EH-32) e 178 °C (AR-36), aroma característico de éster e RF 0.65 (EH-32) e 0.55 (AR-36), em benzeno-acetato, à 5%.

#### **EH-32**

P.F. 212 °C.

R.F.: 0.6, em benzeno-acetato (95:5).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 1-a):  $\delta(\text{ppm}) = 0.85$  (w- $\text{CH}_3$ , t), 1.25 (w- $\text{CH}_2$ ); 1.70 (2H, m); 4.20 (2H, t,  $J=6.5$  Hz); 6.30 (1H, d,  $J=16$  Hz); 6.85 (2H, d,  $J=8.5$  Hz); 7.45 (2H, d,  $J=8.5$  Hz); 7.65 (1H, d,  $J=16$  Hz).

---

#### **AR-36:**

P.F. 176 °C.

RF:0.45, em benzeno-acetato (95:5).

UV:  $\lambda_{\text{max}}$  228; 307 nm.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 1-b):  $\delta(\text{ppm}) = 0.85$  (w- $\text{CH}_3$ ; t), 1.25 (w- $\text{CH}_2$ ); 1.70 (2H, m); 4.11 (2H, t,  $J=6.5$  Hz); 5.83 (1H, d,  $J=11$  Hz); 6.80 1H, d, 8.5 Hz); 6.83 (1H, d,  $J=16$  Hz); 7.63 (1H, d,  $J=8.5$  Hz).

### 3.2.6.3.2. Reação de hidrólise básica<sup>20</sup> em EH-32 e AR-36

Os ésteres EH-32 (10 mg) e AR-36 (10 mg) foram adicionados a uma solução de MeOH-NaOH (5%) à temperatura ambiente. Após o término da reação a mistura foi resfriada e os álcoois alifáticos liberados através da adição de HCl (0.1 N), até pH ~1.0, e

sucessivas extrações com hexano. A remoção do solvente, sob pressão reduzida, forneceu dois resíduos que foram purificados, separadamente, em coluna cromatográfica de sílica gel (em  $\text{CHCl}_3$ ), rendendo 6 e 4 mg de misturas, de álcoois alifáticos, derivadas respectivamente de EH-32 e AR-36.

#### **3.2.6.4. Obtenção das misturas de ácidos graxos - AG-9 e AH-01.**

A mistura de ácidos graxos AG-9 e AH-01 foi isolada das frações 45-47, eluídas em benzeno e provenientes do fracionamento de EI-14 (Tabela 2). Foram obtidos 158 mg de AG-9 e 83 mg de AH-01. As misturas (AG-9 e AH-01) foram metiladas com diazometano, conforme abaixo descrito, e então analisadas por CG, para identificação e determinação das proporções relativas dos respectivos ácidos graxos presentes em AG-9 e AH-01 (Tabela 13, p. 60)

##### **3.2.6.4.1. Análise das misturas AG-9 e AH-01 por CG.**

As misturas de ácidos graxos AG-9 e AH-01 foram metiladas com uma solução de  $\text{CH}_2\text{N}_2$  em éter etílico. Os produtos obtidos (264 mg de AG-9 e 179 mg de AH-01) foram submetidos, respectivamente, a análise por cromatografia em fase gasosa, em coluna dbwax 50. A Tabela 13 (p. 60) apresenta a composição percentual das misturas de ésteres metílicos.

#### **3.2.7. Tratamento do extrato clorofórmico obtido do extrato bruto de *E. ambiguum* - isolamento e purificação.**

O extrato clorofórmico seco (5.8 g) foi adsorvido em sílica (1:1) e aplicada sob uma coluna de sílica gel ( $\phi= 3.5$  cm;  $h=90$  cm), empacotada com clorofórmio. Como solvente de eluição inicial utilizou-se clorofórmio que foi posteriormente substituído por misturas de clorofórmio-metanol, com aumento relativo de polaridade. As frações foram reunidas conforme suas semelhanças em RF e os solventes evaporados por pressão reduzida. As purificações das frações foram realizadas por refrações, em colunas de gel de sílica ou através de placas preparativas. A Tabela 3 apresenta os procedimentos e resultados do fracionamento do extrato clorofórmico, as frações estudadas, os compostos isolados, bem como as seções, do capítulo Discussão e Resultados, onde os produtos são analisados.

**Tabela 3.** Fracionamento do extrato clorofórmico de *E. ambiguum*.

<i>Eluente *</i>	<i>Frações (mg)</i>	<i>Comp. Estud. (mg)</i>	<i>Análise ** (Disc. e Res.)</i>
C	1 - 6 (59)		
C	7-11 (25)	MAC-7 (25)	
C	12-15 (258)	HS-11(86)	4.1.3
C-M (5 %)	16-41 (217)	EC-16A (48)	4.1.2
C-M (5 %)	42-49 (229)	EC-30 (56) EC-50A (18)	4.1.7 4.1.6
C-M (10 %)	50-53 (737)		
C-M (10 %)	54-65 (923)	EA-54 (175)	4.1.3
C-M (10 %)	66-79 (521)		
C-M (10 %)	80-81 (114)		
C-M (15 %)	82-83 (1570)	EC-36 (135)	4.1.5
C-M (30 %)	84-89 (438)		

\* C -clorofórmio; M - metanol

\*\* -os números indicados referem-se aos itens do capítulo "Apresentação e discussão dos resultados", onde cada composto será analisado.

### 3.2.7.1. Obtenção do triterpeno pentacíclico EC-16A - (3) ácido 3-hidróxi, $\Delta^{20,29}$ -lupen, 28-óico.

A purificação da fração 16-41 (217mg; Tabela 3) em coluna de gel de sílica ( $\phi=1.2\text{cm}$ ;  $h=25\text{cm}$ ), eluída com clorofórmio-metanol (95:5), proporcionou a obtenção de 48 mg de EC-16A. Este composto foi recristalizado em clorofórmio-metanol e apresentou-se como um sólido cristalino.

RF: 0.60 (em clorofórmio-metanol, a 95:5)

PF: 275 °C (Lit. 280 °C)<sup>28</sup>.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm)= 0.81 (3H, s); 1.01 (3H, s); 1.05 (3H, s); 1.07 (3H, s); 1.23 (3H, s); 1.80 (3H, s); 2.65 (1H, dd); 4.80 (2H, dd).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 9 (p. 41).

E.M. m/s (%): 456 ( $\text{M}^+$ ); 411 (23); 395 (20); 302 (25); 287 (18); 248 (70); 234 (50); 219 (40); 207 (78); 203 (50); 189 (100); 187 (30).

### 3.2.7.2. Fracionamento da fração 42-49 - isolamento de derivados fenólicos EC-30 (15) e EC-50A (14) .

A fração 42-49 (229 mg; Tabela 3) foi cromatografada em coluna de gel de sílica ( $\phi=1.2$  cm;  $h=25$  cm), eluída com benzeno-acetato de etila, com aumento relativo de concentração. As frações eluídas com benzeno-acetato (95:5), foram reunidas e evaporadas a pressão reduzida resultando em 56 mg de um sólido incolor, que foi denominado EC-30 e identificado como 2,4-hidróxi, 6-metóxi, acetofenona (15, denominada de xantoxilina)<sup>29</sup>.

PF: 104 °C.

RF: 0.4 (em hexano-acetato, 9:1)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ; Figura 15):  $\delta$ (ppm)= 2.61 (3H, s); 3.02 (6H, s); 3.85 (3H, s); 5.91 (1H, d,  $J=2.4$ ); 6.06 (1H, d,  $J=2.4$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ): 32.91; 55.51 (x 2); 90.71; 93.43; 105.96; 162.87; 166.05; 167.56; 203.14 (Figura 16, p. 70). E.M. m/z (%): 196 ( $\text{M}^+$ ); 197 ( $\text{M} + 1$ ); 181 (100); 149 (20); 138 (10); 123 (10).

Das frações subsequentes (eluídas com benzeno-acetato de etila, 9:1) foi possível o isolamento de 18 mg de um composto de coloração amarelo-laranja, que apresentou absorção intensa em luz UV254 nm. Foi codificado como EC-50A e sua estrutura correspondeu ao composto 5,7,4',trihidróxi-flavanona, 14 (naringenina)

PF: 249 °C.

RF: 0.85 (em benzeno-acetona de etila, 1 : 1)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ; Figura 13):  $\delta$ : 2.73 (1H, dd, 2.95 e 16 Hz); 3.18 (1H, dd; 13 e 16 Hz); 5.45 (1H, dd, 2.95 e 13 Hz); 5.96 (2H, d, 2.3 Hz); 6.90 (2H, d, 8.7 Hz) e 7.39 (2H, d, 8.7 Hz).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ; Tabela 14):  $\delta(\text{ppm})= 43.12; 79.13; 95.67$  (2C); 96.53; 115.66 (2C); 127.90 (2C); 129.55; 157.42; 161.80; 163.33; 163.50; 196.11 (Tabela 14, p. 65).

### 3.2.7.3. Glicolípídeos presentes no extrato clorofórmico de *Eubracion ambiguum*. EC-36 (12).

A fração 82-83 (1570 mg; Tabela 3) foi filtrada em uma coluna de sephadex LH-20, eluída com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 30%, com o intuito de eliminar o excesso de pigmentos presentes. As frações semi-purificadas foram reunidas (890 mg) e cromatografadas em coluna de sílica gel ( $\phi=1.5$  cm;  $h=55$ cm) utilizando-se  $\text{CHCl}_3$  : MeOH, 9:1. Obteve-se, dessa maneira, 135 mg de um resíduo oleoso, de coloração amarela, pouco solúvel nos solventes orgânicos usuais. Em CCD, o composto EC-36 foi detectado com solução de difenilamina, reagente específico para glicolípídeos, e foi identificado como sendo uma mistura de digalactosil-diacil-glicerois, 12.

$[\alpha]_{\text{D}} = -3.2$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c=0.5$ )

RF: 0.7 (em clorofórmio-metanol, 7 : 3).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, piridina- $\text{d}_5$ ):  $\delta= 0.95$  (t, 6.8 Hz); 1.25 (sl); 1.63 (m); 2.10 (m); 2.36 (t, 7.0 Hz); 2.92 (m); 3.58 (d, 9.7 Hz); 4.02 (dd, 9.7 e 4.9 Hz); 4.14 - 4.76 (m); 5.1 - 5.7 (m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, piridina- $\text{d}_5$ ): Tabela 14.

FAB-EM  $m/z$ : 909 ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ .

#### 3.2.7.3.1. Acetilação de EC-36

Noventa e três mg de EC-36 foram tratados com 0.8 ml de piridina e 1.3 ml de anidrido acético. A solução permaneceu sob agitação durante dez horas, à temperatura ambiente. Os produtos da reação foram extraídos com clorofórmio, lavados com água e concentrados sob pressão reduzida. Após cromatografia em coluna de sílica gel,

utilizando-se benzeno : clorofórmio (1:1), como sistema de eluição, obteve-se um total de 58 mg de EC-36 acetilado. As análises de RMN de  $^1\text{H}$  comprovam o inserimento de grupos -OAc em 12, através dos sinais entre 2.0 e 2.2 ppm.

### **3.2.7.3.2. Hidrólise alcalina de EC-36 - Obtenção da mistura de ácidos graxos livres e separação do resíduo digalactosil-glicerol:**

Uma solução de EC-36 (249 mg) em MeOH (10 ml) foi tratada com 10 ml de NaOMe-MeOH, (95:5), à temperatura ambiente. Após o término da reação a mistura foi resfriada e os ácidos graxos liberados através da adição de HCl (0.1 N), até pH ~1.0, e sucessivas extrações com hexano. A remoção do solvente, sob pressão reduzida, forneceu 159 mg de um resíduo, que foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (em  $\text{CHCl}_3$ ), rendendo 72 mg de um produto, que foi denominado **HID-36**.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})= 0.87$  (3H, t,  $J=6.8$  Hz);  $0.97$  (3H, t,  $J=6.8$  Hz);  $1.60$  (2H, m);  $2.15$  (2H, m);  $2.34$  (2H, t,  $J=7.4$  Hz);  $2.80$  (2H, t,  $J=5.37$  Hz);  $5.35$  (6H, m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})= 14.28$ ;  $20.56$ ;  $24.66$ ;  $25.53$ ;  $25.62$ ;  $27.20$ ;  $29.03$ - $29.70$ ;  $34.06$ ;  $127.11$ ;  $127.74$ ;  $128.24$ ;  $128.28$ ;  $130.24$ ;  $131.95$ ;  $180.13$ .

Após remoção dos ácidos livres por extração com hexano, o hidrolisado foi desionizado através da passagem da solução aquosa, sob uma coluna contendo resina Amberlite IR 120, na fase hidrogênio, e então através de uma IR 400, na fase hidróxido. A solução aquosa neutra foi então liofilizada fornecendo um resíduo sólido, que foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O, 6:4:1). O rendimento foi 35 mg de um óleo incolor, identificado como o glicerol ligado à um digalactosídeo em sn-1.

RF: 0.35; em clorofórmio-metanol, 70:30.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ; Figura 10):  $\delta(\text{ppm})= 3.4 - 4.5$

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ; Figura 11):  $64.00$ ;  $65.14$ ;  $69.12$ ;  $71.04$ ;  $71.48$ ;  $72.03$ ;  $72.22$ ;  $73.23$ ;  $73.58$ ;  $73.65$ ;  $73.82$ ;  $75.41$ ;  $75.80$ ;  $101.05$ ;  $105.87$ .

### **3.2.7.3. Reação de metilação em HID-36**

Uma solução de 5 ml de  $\text{CH}_2\text{N}_2$ , em éter etílico, foi adicionada à 72 mg de HID-36, à temperatura ambiente. A mistura permaneceu em repouso por duas horas e então o

solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto metilado obtido foi purificado através de coluna de sílica gel, eluída com clorofórmio-hexano (6:4), rendendo 78 mg de HID-36Me.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})= 3.1$  ppm (COOMe).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})= 51.45$  (COOMe); 174.22 (COOMe).

#### 3.2.7.4. Análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos liberados na saponificação de EC-36.

Os ésteres metílicos liberados na saponificação de EC-36, foram esterificados e então sujeitos a análise por cromatografia em fase gasosa, utilizando coluna dbwax 60. Identificou-se, dessa maneira, as composições relativas das respectivas cadeias acílicas presentes em EC-36 (Tabela 15, p.60).

#### 3.2.7.5. Isolamento do esteroide $\beta$ -sitosterol-2-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo de *E. ambiguum* - EA-54 (7).

A fração 54-65 (923 mg; Tabela 3) foi filtrada em coluna de sephadex, eluída com clorofórmio-metanol (8:2), para eliminar o excesso de clorofila. As frações semi-purificadas foram reunidas e diluídas em uma mistura de clorofórmio-metanol para precipitar 175 mg de um sólido incolor, de baixa solubilidade nos solventes orgânicos usuais e que foi identificado como o esteroide  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo<sup>31</sup>, 7, (EA-54).

P.F. 295-298°C.

RF: 0.71 (clorofórmio-metanol, 90:10)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 5; Tabela 19):  $\delta(\text{ppm})= 0.67$  (3H,s); 0.88 (3H, t,  $J=7.3$  Hz); 0.89 (3H, d,  $J=7.0$  Hz); 0.93 (3H, s); 1.00 (3H, d,  $J=6.5$  Hz); 2.11 (1H, m); 2.72 (1H, dd,  $J=6$  e 12 Hz); 3.95 (1H, m); 4.04 (1H, t, 7.8 Hz); 4.27 (2H, m); 4.39 (1H, dd,  $J=5.2$  e 11.5 Hz); 4.54 (1H, dd,  $J=2.0$  e 11.5 Hz); 5.21(m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})=$  Tabela 20, p. 107).

### 3.2.8. Fracionamento e compostos isolados do extrato em acetato de etila de *E. ambiguum*.

Uma alíquota de 0.2 g, do extrato em acetato de etila, foi diluída em metanol e analisada em CCD, em diferentes sistemas de solvente, com vários reagentes de detecção. Esta análise fitoquímica preliminar foi realizada com o intuito de identificar algumas classes de compostos presentes neste extrato. Detectou-se dessa forma, a presença de fenóis ou polifenóis, através da coloração rosa desenvolvida com vanilina. Assim, 3.5 g de extrato acetato de etila foi fracionado em coluna de gel de sílica, desativada com 5 % de H<sub>2</sub>O. Como sistema de eluição utilizou-se acetato de etila-metanol, com aumento relativo de polaridade. As frações foram reunidas conforme semelhanças em CCD e então concentradas sob pressão reduzida. A Tabela 4 apresenta o procedimento utilizado no fracionamento do extrato em acetato de etila, listando os compostos isolados.

**Tabela 4.** Fracionamento do extrato em acetato de etila de *E. ambiguum*.

<i>Eluente*</i>	<i>Fração (mg)</i>	<i>Comp. Estudados</i>	<i>Discussão**</i>
A	1-2 (105)		
A	3 (808)		
A	4-5 (351)		
A+M (5%)	6-14 (597)	ES-71 (190)	4.1.6.2
A+M (5%)	15-25 (108)	IG-14	leucoanto- cianidinas

\* A= acetato

\* M= metanol

\*\* Refere-se a secção do capítulo "Apresentação e discussão dos resultados", onde os itens serão discutidos.

#### 3.2.8.1. Isolamento de 3', 4', 5, 7, tetrahidróxi flavonol (13) - ES-71

Purificação da fração 6-14 (597 mg; Tabela 4) em coluna de sílica gel ( $\phi=1,5\text{cm}$ ;  $h=45\text{cm}$ ) eluída com acetato de etila:metanol (95:5), possibilitou o isolamento de um composto sólido, de coloração vermelha, bastante solúvel em acetona, que foi identificado como o flavonol (+)- catequina<sup>32</sup>.

PF= 124 °C.

R.F.= 0.65 (acetato-metanol).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz , acetona- $\text{d}_6$ , Figura 13):  $\delta$  (ppm)= 2.53 (1H, dd, J=8.25 e 16 Hz); 2.91 (1H, dd, J=5.0 e 16 Hz); 4.02 (1H, m); 4.56 (1H, d, J=7.5 Hz); 5.87 (2H, d, J=2.3 Hz); 6.02 (2H, d, J=2.3 Hz); 6.75 (1H, dd, J=2.0 e 8.1 Hz); 6.80 (1H, d, J=8.1); 6.90 (1H, d, J=2.0 Hz).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz , em acetona- $\text{d}_6$  , Tabela 14):  $\delta$  (ppm)= 27.74; 67.28; 81.63; 94.37; 95.08; 99.56; 114.20; 114.68; 118.98; 131.09; 144.57; 144.65; 155.83; 156.15; 156.67.

### 3.2.9. Fracionamento e compostos detectados no extrato butanólico de *E. ambiguum*.

Tomou-se 0.5 g do extrato butanólico seco de *E. ambiguum* e diluiu-se em metanol, realizando-se várias análises em CCD, com diferentes sistemas de solvente. Essa análise fitoquímica preliminar permitiu identificar as diferentes classes de compostos, presentes neste extrato. Para detecção dos compostos em CCD, usou-se lâmpada UV,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e reagentes específicos como: vanilina para fenóis, permanganato de potássio, para açúcares e polióis e ninidrina, para aminoácidos e peptídeos. Após, adicionou-se 8 g do extrato butanólico, no topo de uma coluna de sephadex LH-20, empacotada com metanol e eluída com metanol:água (8:2). As frações de 50 ml, cada, eram concentradas a pressão reduzida e reunidas conforme semelhanças de RF, de acordo com a Tabela 5.

**Tabela 5.** Fracionamento do extrato butanólico de *E. ambiguum*.

Eluente*	Fração (mg)	Comp. Detectados**
M+ $\text{H}_2\text{O}$ (8:2)	1-4 (3400)	aminoácidos peptídeos
M+ $\text{H}_2\text{O}$ (8:2)	5-6 (354)	açúcares ou polióis
M+ $\text{H}_2\text{O}$ (1.1)	7-8 (1400)	polióis ou açúcares poli-fenóis
$\text{H}_2\text{O}$	9-16 (609)	poli-fenóis

\*M=metanol

\*\*= compostos detectados através de reagentes específicos, em CCD.

### 3.3. Investigação química de *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas.

#### 3.3.1. Coleta e identificação do material botânico.

A espécie *Cecropia catharinensis* foi coletada no mês de maio, no município de Curitiba, PR. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Gert G. Hatscbach, do Depto de botânica da UFPR. A espécie de referência foi depositada no museu horto botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba, sob o n. 477.

#### 3.3.2. Extração e obtenção dos extratos brutos de *C. catharinensis*.

Folhas, caule e raízes de *C. catharinensis* foram secos à temperatura ambiente, moídos a finos grãos e deixados, separadamente, em maceração nos devidos solventes, em ordem crescente de polaridade. Após, foram percolados e o solvente eliminado a pressão reduzida, obtendo-se vários extratos brutos, conforme demonstra a Tabela 6.

Tabela 6. Extratos brutos obtidos dos vários órgãos vegetais de *C. catharinensis*.

<i>Extrato - solvente</i>	<i>Folhas - peso (g)</i>	<i>Caule - peso (g)</i>	<i>Raízes - peso (g)</i>
<b>Extr. hexânico</b>	23.1	2.3	1.2
<b>Extr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	8.2	2.5	2.2
<b>Extr. AcOEt</b>	8.9	1.2	2.8
<b>Extr. BuOH</b>	40.0	27.0	2.8

#### 3.3.3. Procedimento geral utilizado no fracionamento dos extratos brutos das folhas, caule e raízes de *C. catharinensis*.

Alíquotas dos extratos em hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt das folhas, raízes e caule de *C. catharinensis*, foram analisadas em CCD, com o intuito de otimizar sistemas de solvente, para análises cromatográficas. Os extratos foram, então, fracionados em colunas de gel de sílica, empacotadas e eluídas nos sistemas de solvente apropriados. As frações (50 ml, cada) foram coletadas em coletores automáticos, programados segundo a velocidade de gotejamento da coluna. Após minuciosas análises em CCD, as frações foram reunidas conforme semelhanças de RF e concentradas a pressão reduzida. Algumas frações foram recromatografadas através de colunas ou TLC preparativas,

enquanto outras, contendo sólidos em razoáveis graus de pureza foram recristalizadas. Os extratos em diclorometano e acetato de etila, das folhas de *C. catharinensis*, foram inicialmente filtrados em Sephadex LH-20, utilizando-se metanol-água, 2:8, como sistema de eluição, para eliminar o excesso de clorofila. A Tabela 7 mostra o fracionamento dos extratos brutos, dos vários órgãos da espécie *C. catharinensis*, bem como os compostos isolados e analisados.

**Tabela 7.** Fracionamento dos extratos brutos de *C. catharinensis*.

<i>órgão da planta</i>	<i>extrato (g)</i>	<i>coluna: φ(cm); h(cm); sílica(g)</i>	<i>sistema de eluição*</i>	<i>Frações (mg)</i>	<i>comp. isol. (mg)</i>	<i>PF °C</i>	<i>**análise</i>	
<b>RAÍZE S</b>	acet. etila (2.0 g)	2.2; 53; 42	H+A (6:4)	1-7(178)				
			H+A (4:6)	8-11(63)				
			H+A(4:6)	12-13(146)	BB-5 (36)	255-260	4.2.1.2	
			H+A(4:6)	14-18(51)				
			H+A(3:7)	19-30(170)	CC-5 (53)	-	4.2.4	
			H+A(2:8)	31-37(83)	K-31 (83)	280-285	4.2.1.1	
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2.2)	2.2; 53; 20	H+A(2:8)	38-40(58)	EA-4 (26)	282-286	-	
			A	41-45(237)	DI-3 (28)	275-278	4.2.4	
			D	1-3(138)				
			D+M(5%)	4-6(70)	EG-1(16)	138-140	4.2.4	
					CG-01(24)	157-159	4.2.3	
			D+M(5%)	7-15(660)	AB-6 (27)	126-130	4.2.1.2	
Hexano (1.3)	2.2; 53; 10			CC-5(pres)		4.2.4.2.		
				BB-5(pres)				
				A-33(20)	110-115			
		D+M(5%)	16-23(146)	EC-6(17)	130-135	4.2.2.		
		D+M(9:1)	24-26(129)			4.2.2.		
		D+M(8:2)	27-31(242)	DI-3(43)				
	M	31-40(85)						
	B	1-7(290)						
	B+A(9:1)	8-10(318)	EG-1(130)					
	B+A(8:2)	11-14(130)	CG-01(12)					
	B+A(7:3)	15-17(182)	DE-2(32)	125-128				
	A	18-20(66)						

<b>CAULE</b>	Acet. etila (1.5)	2.0; 35; 15	C C+M(5%)  C+M(5%) C+M(9:1) C+M(9:1) C+M(8:2) C+M(1:1) M	1-8(160) 9-10(49)  11-12(214) 13-15(105) 16-19(108) 20-21(129) 22-25(78) 26-30(187)	AB-6(12) J-14(16) CC-5(32) BB-5(59)  DI-3(61)	277-280	4.2.4.
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2.5)	2.5; 55; 40	C C C C+M(5%)  C+M(5%) C+M(8:2) C+M(1:1)	1-8(124) 9-19(127) 20-24(100) 25-28(73)  29-32(39) 33-41(224) 42-50(195)	EG-1(32) EC-4(72) CG-01(18) J-14(39)		
<b>FOLHAS</b>	Acet. etila (5.0)	3.0; 64;115	H+A(9:1) H+A(8:2) H+A(8:2)  H+A(7:3) H+A(6:4)  H+A(3:7) A	1-4(266) 5-6(56) 7-12(548)  13-22(135) 23-31(620)  32-35(860) 36-40(489)	EC4(pres) J-14(pres)  BB-5(17) K-31(18) DI-3(30)		
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5.0)	3.0; 64;100	D D D+M(5%) D+M(5%) D+M(5%)  D+M(5%) D+M(9:1) D+M(7:3)	1-3(770) 4(93) 5-8(507) 9-13(430) 14-18 (1430)  19-20(107) 21-25(87) 26(584)	J-14(20) EG-1(22) EC-4(76) CC-5(19) DI-3(60)		
	Hexano (2.0)	2.2; 53; 25	H+A(5%) H+A(9:1) H+A(8:2) H+A(7:3) H+A(6:4) A	1-6(729) 7-8(160) 9-14(358) 15-20(434) 21-25(498) 26-28(130)	EG-1(129)		

\*A:acetato de etila

H:hexano

C:clorofórmio

M:metanol

D:diclorometano

B:benzeno

\*\*.-Os números referem-se aos itens do capítulo "Apresentação e discussão dos resultados", onde cada composto será analisado.

### 3.3.4. Isolamento de compostos triterpênicos dos extratos de *Cecropia catharinensis*.

#### 3.3.4.1. Isolamento do ácido 2 $\alpha$ -,3 $\beta$ -,19 $\alpha$ -,trihidróxi, urs, en-12, 28-óico (18) - K-31.

Este composto foi purificado através de coluna cromatográfica em sílica-gel, das frações 31-37 (183 mg, eluídas com benzeno:acetato de etila, 4:6) e 23-31 (620 mg, eluídas com hexano:acetato de etila, 2:8) dos extratos em acetato de etila das raízes e folhas de *C. catharinensis*. Obteve-se, dessa maneira, um total de 101 mg de um composto sólido, cristalino, de coloração amarela, pouco solúvel nos solventes orgânicos usuais. Foi identificado como o ácido 2 $\alpha$ -, 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -,trihidróxi, urs, en-12, 28-óico, **18** (ácido tormêntico).

PF: 280-281 °C (Lit. 276-278) <sup>33</sup>.

RF: 0.28, em hexano-acetato (4:6)

$[\alpha]_D^{20} = -14$  (c=1.0; py)

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, em py-d<sub>5</sub>):  $\delta$ (ppm)= 1.00 (3Me,s); 1.07 (3Me, s); 1.08 (3Me, d, J=6.5 Hz); 1.12 (3Me, s); 1.26 (3Me, s); 1.43 (3Me, s); 1.71 (3Me, s); 3.04 (1H, s); 3.13 (1H; dt, J=4.3 e 11.4 Hz); 4.10 (1H; td, J=4.0, 10 e 13 Hz); 5.58 (1H; t, J=2.7 Hz).

RMN de <sup>13</sup>C (75.5 MHz, em py-d<sub>5</sub>, BB e APT -):  $\delta$ (ppm)= 180.86; 140.15; 128.13; 84.01; 72.87; 68.80; 56.14; 54.76; 48.45; 48.01; 42.57; 42.32; 40.60; 40.03; 38.68; 33.71; 30.19; 29.55; 29.46; 27.32; 27.14; 26.57; 24.90; 24.32; 19.21; 17.86; 17.44; 17.08; 17.00 (Tabela 17, p. 94).

E.M. m/z (%): 488 (M<sup>+</sup>, 3); 442 (18); 370 (4); 303 (6); 246 (22); 218 (22); 201 (30); 187 (25); 173 (20); 146 (100); 133 (30); 119 (38).

#### 3.3.4.1.1. Esterificação de K-31

Uma solução de K-31 (75 mg) em MeOH (8 ml) foi tratada com CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> em éter etílico a temperatura ambiente, por 20 min. A evaporação do solvente seguida por

purificação em CCD preparativa (eluída com benzeno-acetato de etila, 95:5) forneceu 38 mg de K-31Me, **18-a**.

PF: 167 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 20):  $\delta(\text{ppm})= 0.67$  (3H; s); 0.82 (3H; s); 0.93 (3H; d,  $J=7.0$  Hz); 0.95 (3H; s); 0.97 (3H; s); 1.02 (3H; s); 1.21 (3H; s); 1.25 (3H; s); 2.00 (1H; m); 2.50 (2H; m); 2.59 (1H; s); 3.01 (1H; d,  $J=9.5$  Hz); 3.60 (3H; s); 3.70 (1H; td,  $J=4.0, 10$  e 12 Hz); 5.35 (1H; t,  $J=3.5$  Hz).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ; Figura 21, Tabela 17, p. 94):  $\delta(\text{ppm})$

E.M.  $m/z$  (%)= 502 ( $\text{M}^+$ ).

#### 3.3.4.1.2. Acetilação de K-31

O composto K-31 (15 mg) foram tratados com piridina-anidrido acético (2:1), a temperatura ambiente por 12 horas. Após eliminação da piridina e evaporação sob pressão reduzida, o produto da reação foi purificado em coluna de sílica gel, eluída com clorofórmio, resultando em 11 mg de K-31, **18-b** ( $2\alpha$ -,  $3\beta$ -diacetóxi,  $19\alpha$ -, trihidróxi, urs, en-12, 28-óico). RF=0.55, em hexano-acetato de etila 5%. RMN de  $^1\text{H}$ .

#### 3.3.4.2. Obtenção do ácido $2\alpha$ -acetóxi, $3\beta$ -, $19\alpha$ - dihidróxi, 12-en, 28-óico, (17) DE-2

Esse composto foi isolado através de cromatografia em coluna de sílica gel ( $\phi=1.5$  cm;  $h=22$  cm) da fração 15-17 (182 mg), do extrato hexânico das raízes de *C. catharinensis* (Tabela 7). Reunião das frações com maior grau de pureza possibilitou a obtenção de 32 mg de um sólido incolor, denominado DE-2, **17**, que correspondeu ao ácido  $2\alpha$ -acetóxi,  $3\beta$ -,  $19\alpha$ - dihidróxi, 12-en, 28-óico, **17**.

PF: 125-128 °C.

$[\alpha]_D^{20}$ : -9.0 ( $c=1.0$ ; em MeOH)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , Figura 18, Tabela 16):  $\delta(\text{ppm})= 0.75$  (3H; s); 0.86 (3H; s); 0.94 (3H; d,  $J=7.0$  Hz); 1.03 (3H; s); 1.05 (3H; s); 1.19 (3H; s); 1.26 (3H; s); 1.55 - 1.75 (6H; m); 2.0 (2H; m); 2.07 (3H; s;  $\text{CH}_3\text{COO}$ -); 2.48 (1H, m); 2.55 (1H; s); 3.20 (1H; d,  $J=10$  Hz); 4.95 (1H; dt,  $J=3.7, 10$  e 11 Hz); 5.35 (1H; t,  $J=3.5$  Hz).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , BB e APT, Tabela 17, p. 94))

E.M. (Figura 17) m/z (%): 530 ( $\text{M}^+$ ); 512 (5); 484 (18); 470 (5); 452 (5); 424 (6); 412 (9); 352 (3); 264 (5); 246 (18); 218 (22); 205 (34); 187 (22); 173 (22); 146 (100); 133 (30); 119 (38).

### 3.3.4.2. Acetilação de DE-2 (17)

Uma mistura de piridina-anidrido acético (2:1) foi adicionada a 4 mg de DE-2, a temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. Após evaporação a pressão reduzida o resíduo foi filtrado em coluna de sílica gel (eluída com clorofórmio), resultando em 4 mg de DE-2acetil, **17a** ( $2\alpha$ - $3\beta$ -diacetóxi,  $19\alpha$ -hidróxi, urs, en-12, 28-óico). RF=0.55, em hexano-acetato de etila 95:5). RMN de  $^1\text{H}$ .

### 3.3.4.3. Isolamento do ácido $2\alpha$ - $3\alpha$ - $19\alpha$ -trihidróxi, 12-en, 28-óico, BB-5, (20).

Os resíduos obtidos das frações 12-13 (146 mg), 13-15 (105 mg) e 23-31 (620 mg), do extrato em cetato de etila das raízes, caule e folhas de *C. catharinensis* (Tabela 7) foram fracionados, separadamente, em colunas de sílica gel, com hexano:acetato de etila (4:6). A eluição dessas três colunas possibilitou o isolamento de um sólido cristalino, de coloração amarela, recristalizado em clorofórmio, que foi identificado como o ácido  $2\alpha$ - $3\alpha$ - $19\alpha$ -trihidróxi, 12-en, 28-óico, **20** (ácido euscaphico).

PF: 255-260 °C (Lit. 258-260)<sup>34</sup>.

RF: 0.38; em hexano-acetato (4:6)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : +12 (c=1.0; em MeOH)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{py-d}_5$ ):  $\delta(\text{ppm})$ = 0.75 (3H; s); 0.86 (3H; s); 0.92 (3H; d, J=6.6 Hz); 0.96 (3H; s); 1.00 (3H; s); 1.21 (3H; s); 1.27 (3H; s); 2.50 (1H; m); 2.55 (1H; s); 3.35 (1H; d, J=2.0 Hz); 3.95 (1H; dt, J=2.0, 4.0 e 12 Hz); 5.35 (1H, m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, em  $\text{py-d}_5\text{CDCl}_3$ , BB e APT):  $\delta(\text{ppm})$ = 180.71; 138.00; 128.65; 78.49; 72.73; 65.91; 52.99; 48.02; 47.72; 47.31; 46.59; 41.06; 40.97; 39.80; 37.93; 37.34; 32.36; 31.62; 29.38; 28.13; 27.91; 26.68; 25.75; 25.19; 24.11; 23.35; 21.53; 17.85; 16.28; 15.87; 15.73.

E.M. (Figura 23) m/z (%): 488 ( $M^+$ ); 470 (5); 455 (5); 442 (18); 424 (8); 409 (4); 391 (3); 370 (5); 303 (6); 246 (20); 218 (22); 187 (24); 146 (100); 133 (23); 119 (38).

#### 3.3.4.3.1. Esterificação de BB-5 (20)

Aliquotas de  $CH_2N_2$ , em éter etílico, foram adicionadas a um total de 45 mg de BB-5, até consumo total dos reagentes. Após evaporação do solvente, a pressão reduzida, o produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com clorofórmio:metanol (95:5). Obteve-se 35 mg de um sólido cristalino, identificado como o éster metílico de BB-5, 20-a (metil  $2\alpha$ -,  $3\alpha$ -,  $19\alpha$ -trihidróxi, urs, 12-en, 28-oato).

P.F. 215-217 °C

RF: 0.65, em hexano-acetato de etila (4:6)

RMN de  $^1H$  (em  $CDCl_3$ , Figura 24, Tabela 16, p. 94):  $\delta$ (ppm)= 0.66 (3H; s); 0.86 (3H; s); 0.94 (3H; d,  $J=6.5$  Hz); 0.95 (3H; s); 1.01 (3H; s); 1.21 (3H; s); 1.25 (3H; s); 2.50 (1H; dt,  $J=2.5, 12.3$  e  $14.0$  Hz); 2.59 (1H; s); 3.42 (1H; d,  $J=3.0$  Hz); (3.60 (3H; s; - $COOCH_3$ ) 4.05 (1H; dt,  $J=3.0, 4.5$  e  $12$  Hz); 5.38 (1H; t,  $J=3.5$  Hz).

RMN de  $^{13}C$  (75.5 MHz, em  $CDCl_3$ , BB e APT - Tabela 17, p. 95).

E.M. m/z (%): 502 ( $M^+$ ).

#### 3.3.4.3.2. Acetilação de BB-5 (20)

O composto BB-5 (10 mg) foi tratado com anidrido-acético-piridina (1:2) a temperatura ambiente, por 3 hs. Após eliminação da piridina, o resíduo foi purificado por CCD em escala preparativa (eluída com benzeno), para resultar em 13 mg de BB-5acetil, 20b, ( $2\alpha$ -,  $3\beta$ -diacetóxi,  $19\alpha$ -hidróxi, urs, en-12, 28-óico). PF: 87-88°C. RF: 0.70, em hexano-acetato de etila 10%. RMN de  $^1H$ .

#### 3.3.4.4. Isolamento do ácido $2\alpha$ -acetóxi, $3\alpha$ -, $19\alpha$ -, dihidróxi, urs-, 12-eno, 28-óico, (19), AB-6

As frações 7-15 (660 mg) e 25-28 (173 mg) dos extratos em diclorometano do caule e raízes de *C. catharinensis*, foram recromatografadas, separadamente, em colunas de sílica gel, eluídas com hexano-acetato de etila, em graus crescentes de polaridade. Das frações eluídas com hexano-acetato de etila (9:1), obteve-se um composto, que foi purificado por CCD em escala preparativa (eluídas com benzeno:acetato de etila, 95:5),

resultando em 39 mg de um sólido incolor, cristalino, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , identificado como o ácido  $2\alpha$ -acetóxi,  $3\alpha$ -,  $19\alpha$ -dihidróxi, 12-en, 28-óico (**19**).

PF: 126-130 °C.

$[\alpha]_D^{20}$ : -18.0 (c=1.0; em MeOH)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , Figura 22, Tabela 16):  $\delta(\text{ppm})$  = 0.71 (3H; s); 0.89 (3H; s); 0.91 (3H; d, J=6.5 Hz); 1.02 (3H; s); 1.19 (3H; s); 1.25 (6H; s); 2.07 (3H; s,  $\text{CH}_3\text{COO}$ -); 2.55 (1H; s); 3.50 (1H; d, J=2.5 Hz); 5.23 (1H; dt, J=2.5, 4.0 e 12.0 Hz); 5.35 (1H; t, J=3:3 Hz), Tabela 16, p. 84).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , BB e APT - Tabela 17, p.94).

E.M. m/z (%): 530 ( $\text{M}^+$ ); 512 (3); 484 (18); 470 (3); 455 (5); 428 (14); 412 (5); 352 (8); 264 (10); 265 (12); 246 (22); 218 (24); 205 (38); 200 (28); 187 (36); 173 (24); 146 (100); 133 (44).

#### 3.3.4.4.1. Reação de acetilação em AB-6 (**19**)

Uma mistura de anidrido acético e piridina (1:2) foram adicionados a 3 mg de AB-6, sob agitação, a temperatura ambiente, por aproximadamente 1 dia. Após efetiva eliminação da piridina o produto de reação foi purificado em coluna de sílica gel (eluída com clorofórmio) para render 4 mg de AB-6 acetilado, **19a** ( $2\alpha$ -,  $3\beta$ - acetóxi,  $19\alpha$ -hidróxi, urs, en-12, 28-óico). PF: 91-93°C. RF: 0.70, em hexano-acetato de etila 10%. RMN de  $^1\text{H}$ .

#### 3.3.4.5. Isolamento dos ácidos $2\alpha$ -OAc, $3\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, 12-epóxi, 13-17-lactona (**22**) - A-33 e $3\beta$ -OAc, $2\alpha$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, 12-epóxi, 13-17-lactona, - EC-6 (**23**).

A fração 7-12 (668 mg, Tabela 7) foi fracionada em coluna de sílica gel ( $\phi$ =2.0 cm; h=34 cm), eluída com proporções crescentes de acetato de etila em hexano. Purificação por cromatografia em coluna Flash, das frações eluídas com hexano:acetato de etila (9:1), permitiu o isolamento de dois sólidos de coloração amarela, que apresentaram valores de RF muito próximos. Foram denominados como A-33 e EC-6.

### A-33

RF: 0.48, em clorofórmio-metanol (95:5)

PF: 110-115 °C.

$[\alpha]_D^{20}$ : -26 (c=1.0; em  $\text{CHCl}_3$ )

M.S. (Figura 25), m/z (%): 544 ( $\text{M}^+$ ); 526 ( $\text{M}^+-18$ ); 511 ( $\text{M}^+-33$ ); 484 ( $\text{M}^+-60$ ); 401 (18); 340 (10); 293 (10); 249 (38); 203 (38); 187 (44); 173 (22); 159 (24); 147 (16); 133 (38); 107(50).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , Figura 26, Tabela 16, p. 84):  $\delta(\text{ppm})=$  0.88 (3H, s, Me-27); 0.93 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, Me-30); 1.06 (3H, s, Me-24); 1.09 (3H, s, Me-23); 1.15 (3H, s, Me-25); 1.35 (3H, s, Me-27); 1.50 (3H, s, Me-29); 1.86 (1H, s, H-18); 2.07 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COO-}$ ); 2.30 (1H, dd,  $J=5.0$  e 12.3 Hz, H-2); 2.70 (1H, dt,  $J=6.0$ , 10 e 17.5 Hz, H-21); 2.97 (1H, d,  $J=3.8$  Hz, H-12); 3.18 (1H, dd,  $J=2.0$  e 3.8 Hz, H-11); 3.24 (1H, d,  $J=10$  Hz, H-3).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , BB e APT - Tabela 17, p.94).

---

### EC-6

PF: 135-138 °C.

RF: 0.31, em clorofórmio-metanol (95:5).

$[\alpha]_D^{20}$ : -13 (c=1.0; em  $\text{CHCl}_3$ )

M.S. m/z (%): 544 ( $\text{M}^+$ ); 526 ( $\text{M}^+-18$ ); 484 ( $\text{M}^+-60$ ); 401 (18); 293 (28); 249 (40); 203 (50); 187 (85); 173 (53); 159 (46); 147 (58); 133 (80); 119 (90); 105 (92)

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , Figura 28):  $\delta(\text{ppm})=$  0.89 (6H, s, Me-24 e 26); 0.93 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, Me-30); 1.09 (3H, s, Me-23); 1.11 (3H, s, Me-25); 1.35 (3H, s, Me-27); 1.51 (3H, s, Me-29); 2.15 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COO-}$ ); 1.93 (1H, s, H-18); 2.34 (1H, dd,  $J=4.5$  e 12 Hz, H-1'); 2.96 (1H, d,  $J=3.8$ , H-12); 3.18 (1H, dd,  $J=2.0$  e 3.8 Hz, H-11); 4.53 (1H, d,  $J=10.5$ , H-3).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , BB e APT - Tabela 17, p. 94).

### 3.3.4.5.1. -Reação de acetilação em A-33 (23) e EC-6 (24)

Uma mistura de anidrido acético e piridina (1:2) foram adicionados a 5 mg de EC-6 (23) e A-33 (22), sob agitação, a temperatura ambiente, por aproximadamente 15 horas. Após efetiva eliminação da piridina o produto de reação foi purificado em coluna de sílica gel (eluída com clorofórmio) para render 6mg de A-33 e 3 mg de EC-6 acetilados (2 $\alpha$ -,3 $\beta$ -acetóxi, 19 $\alpha$ -hidróxi, urs,11-12,epóxi,13-17lactona - 22a e 23a). P.F.80-83°C. RF: 0.85, em hexano-acetato de etila 10%. RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$ =2.07 e 2.0.8).

### 3.3.4.6. Isolamento do ácido pomólico (24) - J-14 .

O composto J-14 (16 mg) foi isolado das frações 14-18 (1430 mg) e 25-28 (173 mg) dos extratos em diclorometano, das folhas e caule de *C. catharinensis* (Tabela 7), através de cromatografia em colunas de sílica gel ( $\phi$ =2.5 cm; h=45 cm e  $\phi$ =1.5 cm; h=25 cm), eluídas com clorofórmio. Também detectou-se e isolou-se 16 mg de J-14, da fração 9-10 (48 mg), do extrato em acetato de etila do caule de *C. catharinensis*, através de sucessivas recristalizações em metanol. Obteve-se um total de 36 mg de um composto cristalino, incolor, que foi identificado como o ácido 3 $\alpha$ -, 19 $\alpha$ -, dihidróxi, 12-en, 28-óico, denominado ácido pomólico (24).

PF: 295-298 °C.

RF: 0.85, em clorofórmio-metanol (95:5).

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, em py-d<sub>5</sub>):  $\delta$ (ppm)= 0.92 (3H, s, Me-26); 1.04 (3H, s, Me-25 ); 1.12 (3H, s, Me-23); 1.12 (3H, d, J=6.5 Hz, Me-30); 1.25 (3H, s, Me-25); 1.47 (3H, s, Me-27); 1.75 (3H, s, Me-29); 2.35 (1H, m, H-1'); 3.08 (1H, s, H-18); 3.45 (1H, dd, J=6.0 e 10.5 Hz); 5.63 (1H, t, H-12).

M.S. m/z (%): 472 ((M<sup>+</sup>); 454 (8); ~~426 (23)~~; 354 (10); 264 (10); 246 (28); 218 (25); 207 (42); 201 (27); 190 (45); 146 (100); 133 (30); 119 (32).

#### 3.3.4.6.1. Esterificação de J-14 (24a)

Um total de 30 mg de J-14 foi adicionado a uma mistura de CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> , em éter etílico, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Após o término da reação o produto foi

filtrado em coluna de sílica gel, eluída com clorofórmio para resultar em 35 mg de um produto cristalino, que fundiu a 178 °C. RMN de <sup>13</sup>C, Tabela 18, p. 100.

### 3.3.4.7. Isolamento do ácido ursólico - CG-01, (25).

As frações 25-28 (173 mg), do extrato em diclorometano do caule, 11-14 (130 mg) e 4-6 (70 mg), dos extratos em diclorometano e hexano das raízes de *C. catharinensis*, foram cromatografadas, separadamente, em colunas de sílica gel ( $\phi=1.0$  cm; 20 cm;  $\phi=1.5$  cm; h=25 cm e  $\phi=1.0$  cm; h=20 cm), eluídas com clorofórmio, benzeno-acetato de etila (5%) e hexano-acetato de etila (10%), respectivamente. As frações de baixa polaridade, que continham material puro, foram reunidas para resultar num total de 54 mg de um sólido incolor, denominado CG-0, pouco solúvel nos solventes orgânicos usuais e que foi identificado como o ácido ursólico (25)<sup>28</sup>

PF: 294-297°C

RF: 0.31, em clorofórmio-metanol (95:5).

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, em CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ (ppm)= 0.89 (3H, s); 0.97 (3H, s); 1.02 (3H, d); 1.04 (3H, d); 1.24 (3H, s); 1.25 (3H, s); 2.63 (1H, d, J=10.74 Hz); 3.47 (1H, dd, J=6.0 e 9.5 Hz); 5.50 (1H, m).

M.S. m/z (%): 456 (7.3), 438 (1.7), 248 (100), 207 (23.1) e 203 (23.5).

### 3.3.4.7.I. Reação de esterificação em CG-01 (25).

Um total de 42 mg de CG-01 foi adicionado a uma mistura de CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, em éter etílico, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Após o término da reação o produto foi concentrado a pressão reduzida e filtrado em coluna de sílica gel, eluída com hexano-acetato de etila (10%) para resultar em 40 mg de um produto cristalino, que fundiu a 165 °C que correspondeu ao éstermetílico de CG-01 (25a) RMN de <sup>13</sup>C, Tabela 18, p. 100.

### 3.3.4.8. Isolamento da mistura dos ácidos ursólico (25) e oleanólico (27)-EC-4

Foram isolados um total de 76 mg de EC-4, das frações menos polares obtidas das colunas cromatográficas em sílica gel, eluídas com clorofórmio, das frações 20-24 (100 mg) e 14-18 (1430 mg) dos extratos em diclorometano do caule e das folhas de *C. catharinensis*. EC-4 foi identificado como uma mistura inseparável dos ácidos ursólico,

**25** (maior proporção, intensidade dos picos em RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e oleanólico, **27**<sup>35</sup>. RMN de  $^{13}\text{C}$ , Figura 30.

PF: 267-269 °C.

RF: 0.75, em clorofórmio-metanol (95:5).

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm}) = 0.77$  (9H, s); 0.81 (3H, s), 0.85 (3H, d,  $J=6.8$  Hz); 0.90 (3H, s); 0.92 (3H, s); 0.93 (3H, d,  $J=6.8$  Hz); 0.95 (3H, s); 0.98 (6H, s); 1.09 (3H, s); 1.26 (6H, s); 3.20 (1H, m); 3.36 (1H, m); 5.24 (1H, m); 5.35 (1H, m).

M.S. m/z (%): 428 ( $\text{M}^+$ ); 248 (100); 219 (10); 208 (25); 203 (50); 189 (14); 175 (12); 146 (14); 133 (35); 119 (22).

**3.3.9. Isolamento e identificação de esteróis dos extratos brutos de *C. catharinensis*,  $\beta$ -sitosterol (6),  $\beta$ -sitosterol-glicosídeo (7) e a mistura 3-O-(6'-O-n-acil- $\beta$ -D-glicosil) - sitosterol - 5 - eno, CC-5 (21 a'-i').**

Os esteróis  $\beta$ -sitosterol (6) e  $\beta$ -sitosterol-glicosídeo (7), foram isolados dos extratos das raízes, caule e folhas de *C. catharinensis* e foram codificados como EG-1 e DI-3, respectivamente. RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabelas 19, p. 104 e 20, p. 107).

A mistura de esteróis n-acil-glicosilados, CC-5, foi isolada por cromatografia em coluna de sílica-gel, das frações 19-30 (170 mg;  $\phi=1.2$  cm;  $h=27$  cm) e 11-12 (214 mg;  $\phi=1.2$  cm;  $h=27$  cm), dos extratos em acetato de etila das raízes e caule de *C. catharinensis*, respectivamente (Tabela 7). As frações eluídas com uma mistura de clorofórmio:metanol (95:5), foram reunidas e purificadas através de CCD preparativas (em sílica-gel, em hexano:acetato de etila, 1:1), fornecendo 85 mg de um sólido incolor, que foi identificado como 3-O-(6'-O-n-acil- $\beta$ -D-glicosil) - sitosterol - 5 - eno, **21 a'-i'**.

RF: 105-108°C

RF: 0.12, em hexano-acetato de etila (1:1).

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 Mhz; Figura 29; Tabela 19):  $\delta(\text{ppm}) = 0.68$  (w- $\text{CH}_3$ ); 0.68 (3H, s, Me-18); 0.82 (3H, t,  $J=7.0$  Hz, Me-29); 0.84 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, Me-26); 0.87 (3H, d, 7.0 Hz, Me-27); 0.92 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, Me-21); 1.00 (3H, s, Me-19); 1.25 (w- $\text{CH}_2$ -); 3.26-4.38 (Glc); 5.35 (2H, m, H-5), Figura 31, Tabela 19, p.104.

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz; Tabela 20, p. 108)

#### **3.3.4.9.1. Reação de saponificação em 21 a'-i'.**

Uma suspensão de 50 mg de **21 a'-i'** em MeOH-NaOH á 5%, foi refluxada á 100°C, por aproximadamente 30 minutos. Após o término da reação, o solvente foi eliminado sob pressão reduzida e o resíduo sofreu partição entre  $\text{H}_2\text{O}$  e éter etílico. A fase orgânica, após seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrada, foi purificada através de filtração em sílica gel, eluída com clorofórmio:metanol, (9:1), para render 14 mg de um resíduo identificado por RMN de  $^{13}\text{C}$  e por comparação com amostra autêntica, em CCD, como o esterol  $\beta$ -3-O (glicopiranosídeo) - sitosterol, **7**. A solução aquosa foi acidificada com HCl (~2 N) até pH 1.5, e extraída exaustivamente com  $\text{HCCl}_3$  até completa remoção dos ácidos livres. Após eliminação do solvente, sob pressão reduzida, a mistura residual foi esterificada com  $\text{CH}_2\text{N}_2$ , em éter etílico, para resultar em 21 mg de uma mistura de ácidos graxos, que foram identificados sob análise em CG (Tabela 21, p. ).

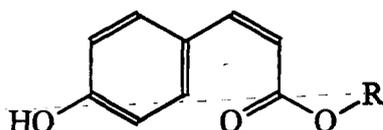
## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.

### 4.1. Compostos isolados de *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn.

Do extrato bruto de *E. ambiguum* obteve-se quatro sub-extratos (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol), que foram posteriormente investigados. Do estudo desses extratos foi possível o isolamento e a determinação estrutural de vários compostos, os quais são abaixo descritos.

#### 4.1.1. Investigação dos compostos EH-32 (1a'-g') e AR-36 (2a'-g'), obtidos no extrato hexano de *E. ambiguum*.

Os compostos EH-32 e AR-36 foram isolados das frações menos polares do extrato hexânico de *E. ambiguum* (Tabela 1, p. 10). Foram separados através de TLC preparativa, em sílica gel impregnada com parafina líquida (p.14), resultando em 18 mg de EH-32 e 20 mg AR-36. Apresentaram comportamento físico e químico bastante similar, formando cristais incolores. As análises espectroscópicas permitiram deduzir que esses compostos tratam-se de ésteres n-alquílicos derivados dos ácidos cis e trans p-hidróxi-cinâmico.



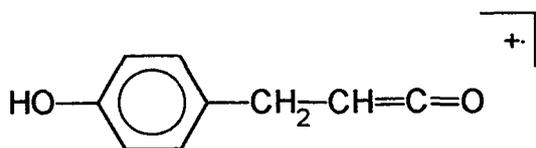
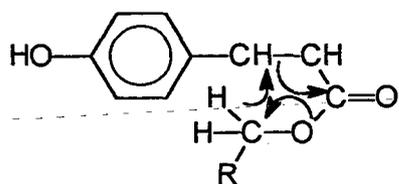
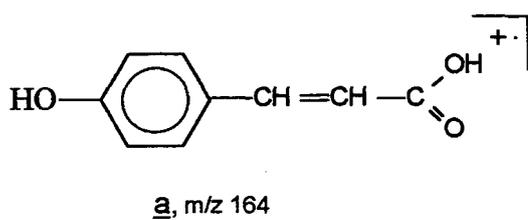
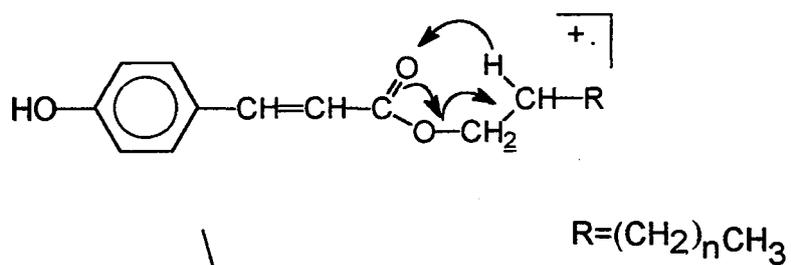
(1a'-g) - trans  
(2a'-g) - cis

R=

a'	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub>
b'	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub>
c'	C <sub>24</sub> H <sub>49</sub>
d'	C <sub>25</sub> H <sub>51</sub>
e'	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub>
f'	C <sub>27</sub> H <sub>55</sub>
g'	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub>

No UV, EH-32 e AR-36 apresentaram absorção aromática terminal, em torno de 230 nm, e absorção de carbonila conjugada, em 310 nm. Os espectros de massas de baixa resolução, de 1 e 2 (Esquema 2), mostraram praticamente os mesmos fragmentos iônicos, mostrando uma sequência de picos moleculares que diferem entre si por 14 u.m.a

**Esquema 2.** Principais íons obtidos da sequência de fragmentação do espectro de massas de EH-32 (1) e AR-36 (2)



unidades de massa ( $m/z$  416, 402, 388, 374, 360), sugerindo cadeias alifáticas longas ou vários íons moleculares ( $M^+$ ). Nesse caso, as substâncias tanto poderiam apresentar contaminações por ácidos graxos saturados quanto tratar-se de compostos esterificados com álcoois de cadeia longa. O pico  $m/z$  164 (**a**, 100%), bem como os picos **b** (148; 65%), **c** (120; 36%) e **d** (147; 28%), podem corresponder a fragmentos oriundos de ácido hidróxi-cinâmico.

Os espectros de RMN de  $^1H$  de **1a'-g** e **2a'-g'**, à 300 MHz, são apresentados na Figura 2. Na região de hidrogênios ligados a carbonos  $sp^3$ , os dois espectros apresentam sinais com deslocamentos químicos semelhantes, permitindo a identificação dos sinais relativos as cadeias n-alquílicas, através dos sinais em  $\delta$  0.85 (t, W-CH<sub>3</sub>), o intenso sinal em 1.25 ppm (W-CH<sub>2</sub>-), e ainda em 1.70 e 4.20 ppm, referentes aos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática, em posições  $\beta$  e  $\alpha$  ao grupo carboxilato, respectivamente. Na região dos hidrogênios olefínicos e aromáticos os espectros de EH-32 e AR-36 apresentam-se muito distintos. Assim, para EH-32 (**1a'-g'**) observa-se dois dubletes, em 6.30 e em 7.65 ppm, os quais referem-se aos hidrogênios olefínicos H2 e H3 (calculado: H2 à 6.35 e H3 à 7.78 ppm), com constante de acoplamento típica de sistema olefínico trans,  $J=16$  Hz. Já os hidrogênios aromáticos correspondem aos dois dubletes à  $\delta=6.85$  (H3' ; H5') e à 7.45 ppm (H2' ; H6'), com  $J=8.5$  Hz, cujo valor indica sistema aromático di-substituído. No espectro de prótons de AR-36 (**2**), também é possível caracterizar-se todo o sistema cinamato. Neste caso, a dupla ligação é identificada através dos dubletes em 5.83 (H2) e em 6.82 ppm (H3), com  $J=11$  Hz, indicando a presença de um sistema olefínico cis (calc: 6.02 para H2 e 7.19 para H3). O anel aromático dissustituído é caracterizado através dos sinais à  $\delta=6.80$  (d) e à 7.63 ppm (d), com  $J=8$  Hz, que correspondem, respectivamente, a H3' ; H5' e H2' ; H6'.

As estruturas **1a'-g'** e **2a'-g**, determinadas através de análises espectroscópicas, referem-se à misturas de ésteres alifáticos dos ácidos cis e trans p-OH-cinâmico, sendo que os homólogos dentro de uma série cis ou trans, são inseparáveis por técnicas cromatográficas convencionais. Além disso, técnicas de ressonância magnética nuclear não permitiram a identificação dos grupos alquil-carboxilatos, devido à sobreposição de sinais em determinadas regiões, como aquelas relativas à hidrogênios e carbonos metilênicos (W-CH<sub>2</sub>).

Para identificação da natureza das cadeias alifáticas, foram realizadas reações de hidrólise alcalina, nas misturas de ésteres EH-32 e AR-36, resultando nos correspondentes ácidos e numa série de álcoois homólogos, que foram sujeitos à análises por CG (Tabela 8). Dessa forma identificou-se não só a natureza das cadeias alquílicas dos álcoois substituintes, mas também suas proporções relativas nos respectivos ésteres (EH-32 e AR-36).

Ésteres n-alquílicos derivados dos ácidos cis e trans OH-cinâmicos têm sido raramente isolados de plantas, e ainda não foram descritos para espécies da família Loranthaceae. Entretanto, há na literatura evidências consideráveis para a existência de

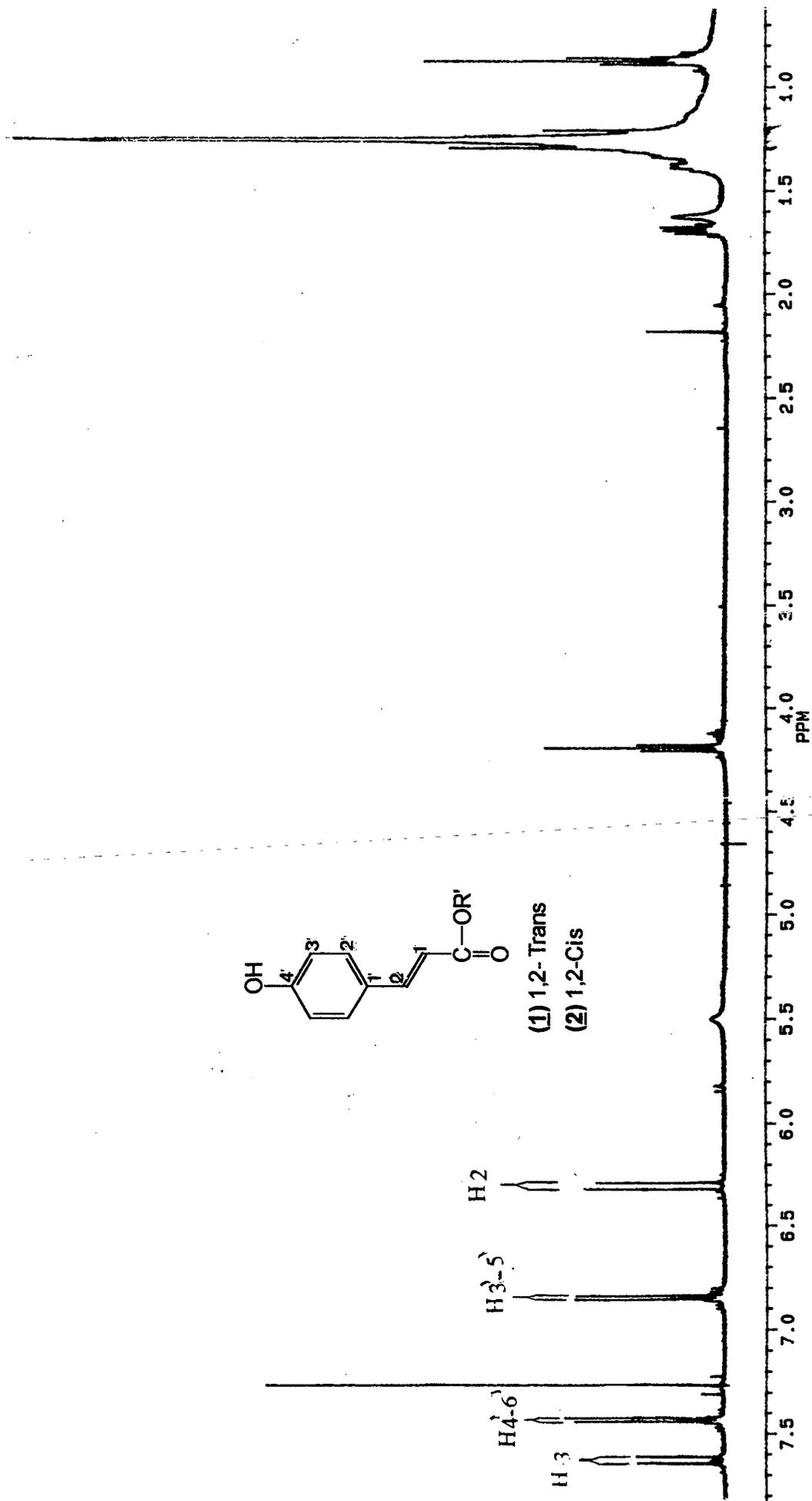


Figura 2. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de EH-32 (1), em CDCl<sub>3</sub>.

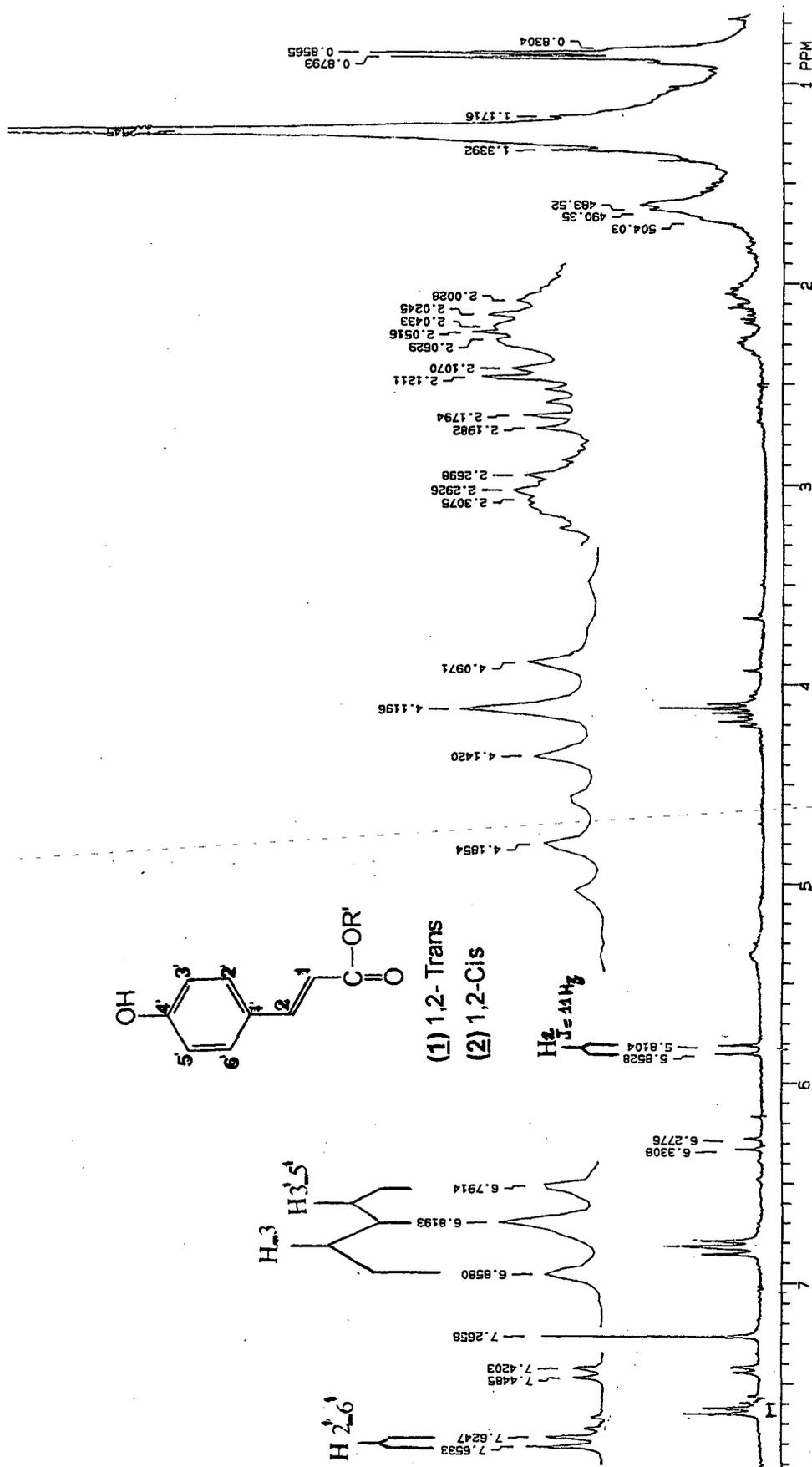


Figura 3. Espectro de RMN de  $^1H$ , à 300 MHz, de AR-36 (2), em  $CDCl_3$ .

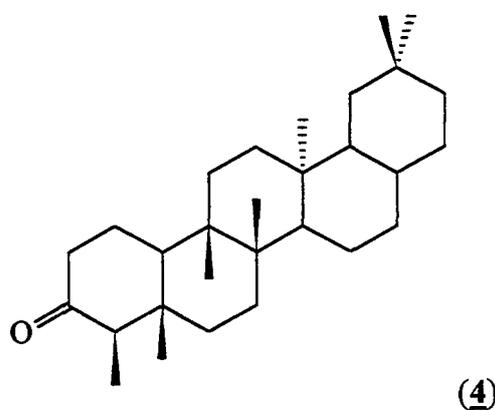
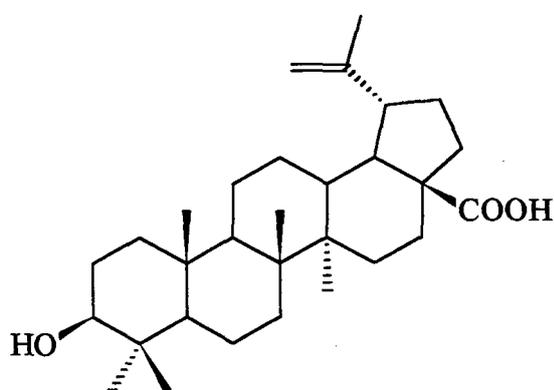
tais compostos, como unidades constituintes dos complexos materiais poliméricos denominados suberinas<sup>36,37,38</sup>.

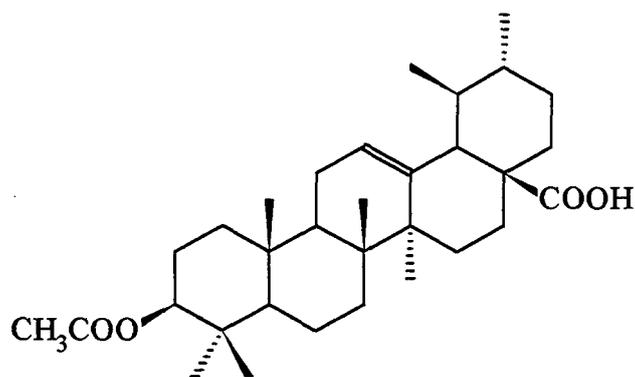
**Tabela 8.** Concentrações relativas de ésteres alquílicos, de acordo com as proporções dos respectivos álcoois, presentes em **1** e **2**, sob análise em CG.

álcool	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>49</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>51</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>55</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub>
<b>EH-32</b>	13.06	4.26	58.92	1.79	19.05	3.08	0.45
<b>AR-36</b>	12.12	2.68	54.51	4.89	13.90	3.56	1.45

**4.1.2. Isolamento de triterpenos dos extratos clorofórmico e hexânico de *E. ambiguum*. Ácido betulínico (3), EC-16A. Friedelina (4), EE-12 e Ácido acetil Ursólico (5), TE-23.**

O fracionamento da fração 16-41 do extrato clorofórmico (Tabela 3; p.15) e, das frações 15-22 e 12-14 do extrato hexânico (Tabelas 1 e 2; p. 8 e 10) possibilitou o isolamento e a caracterização de três compostos denominados de EC-16A, EE-12 e TE-23, que correspondem, respectivamente, aos triterpenos pentacíclicos conhecidos como ácido betulínico (**3**, ácido  $\Delta^{20,29}$ , lupen, 28-óico, 3-hidróxi), friedelina (**4**, friedelan, 3-ona) e ácido acetil ursólico (**5**, ácido 3-acetóxi, urs-12en, 28-óico).





A determinação estrutural dos triterpenos foi realizada com base na comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de EC-16A, TE-23 e EE-12 (Tabela 9) com os dados apresentados na literatura<sup>26,27,28</sup>, e também por co-cromatografia em camada delgada com amostras autênticas.

**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de triterpenos pentacíclicos isolados dos extratos brutos de *E. ambiguum* (75 Mhz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

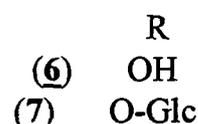
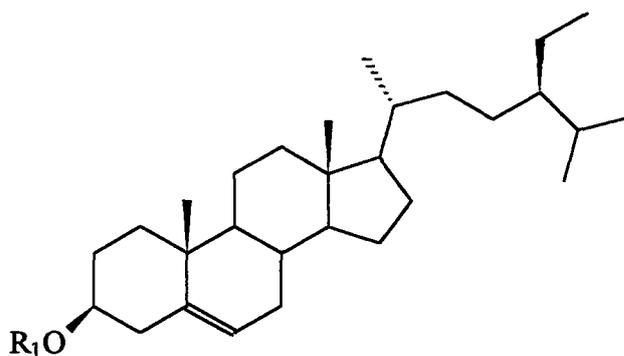
<i>C</i>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
1	38.02	22.31	38.17
2	27.61	41.53	27.99
3	78.15	213.21	80.95
4	39.02	58.25	36.81
5	55.54	42.10	55.19
6	18.45	41.32	18.09
7	34.47	18.24	32.77
8	40.78	53.12	39.39
9	50.65	37.42	47.37
10	37.24	59.46	36.81
11	20.96	35.62	23.20
12	25.72	30.50	125.51
13	38.27	39.73	137.98
14	42.47	38.34	41.86

15	29.87	32.43	27.99
16	32.59	36.00	24.01
17	56.27	30.00	47.82
18	49.38	42.86	52.51
19	47.10	35.32	38.95
20	150.70	28.13	38.76
21	30.84	32.77	30.54
22	37.24	39.21	36.66
23	28.24	6.89	16.63
24	15.74	14.64	16.96
25	16.16	17.92	15.45
26	15.74	20.21	16.96
27	14.72	18.60	16.96
28	178.72	32.10	182.61
29	109.32	35.00	23.47
30	19.42	31.83	21.24
COOCH <sub>3</sub>	-	-	-
CH <sub>3</sub> COO	-	-	21.11
CH <sub>3</sub> COO	-	-	171.13

#### 4.1.3. Análise de esteróis isolados dos extratos hexânico e clorofórmico de *E. ambiguum*.

##### HS-11 ( $\beta$ -sitosterol)

Sucessivas recristalizações em acetona das frações 15-22 (Tabela 1; p. 8), do extrato hexânico, e 12-15 (Tabela 3; p. 16), do extrato clorofórmico, forneceram um sólido incolor, cristalino, que fundiu à 138-140°C e foi denominado HS-11. As análises espectroscópicas permitiram atribuir a estrutura 6, para esse composto, a qual corresponde ao esterol  $\beta$ -sitosterol, largamente isolado de espécies vegetais<sup>31</sup>.



O espectro de massas de HS-11 apresentou um pico íon molecular [M<sup>+</sup>], à m/z 414, em concordância com a fórmula C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS-11, à 300 MHz, em CDCl<sub>3</sub> (Figura 4), pode-se observar vários sinais característicos. Os dubletes em 0.83 (6 H) e 0.92 (3 H) ppm, com J=6.5 Hz, correspondem às metilas em C-26, C-27, e C-21, respectivamente. O triplete em 0.82 ppm (J=6.5 Hz) é atribuído à metila em C-29, e os singletes à 0.67 e 1.00 ppm correspondem às metilas em C-18 e C-19, identificando-se assim os seis grupos metílicos em 6. O próton olefínico em C-6, é identificado através do sinal à δ 5.35 ppm, enquanto a função hidroxila, em C-3, corresponde ao sinal em 3.5 ppm. Esses sinais estão listados na Tabela 19, p. 105.

Os dados obtidos da análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS-11, à 75.5 MHz, em CDCl<sub>3</sub>, estão relacionados na Tabela 20 (p. 108). A atribuição dos sinais foi realizada em comparação com dados da literatura<sup>39</sup> permitindo a confirmação da estrutura 6, proposta.

#### EA-54 (β-sitosterol-glicosídeo)

A fração 54-65 (Capítulo 3, Tabela 3; p. 16) obtida do refractionamento do extrato clorofórmico de *E. ambiguum*, foi filtrada em Sephadex LH-20, com a finalidade de eliminar-se o excesso de clorofila presente. Após, o filtrado sofreu recristalização em uma mistura de clorofórmio-metanol, para resultar na purificação de cristais granulares, incolores, que fundiram entre 295-298 °C e foi denominado EA-54. Esse composto apresentou significativa polaridade (RF= 0.5, em CHCl<sub>3</sub>.MeOH, 85:15), quando comparado com HS-11 (RF=0.7, em hexano-acetato de etila, 8:2). Foi identificado como o composto β-sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo, 7<sup>40</sup>.

O espectro de massas de EA-54 (FAB) apresentou um íon molecular de 599 (M<sup>+</sup> + Na), de acordo com a fórmula molecular C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>.

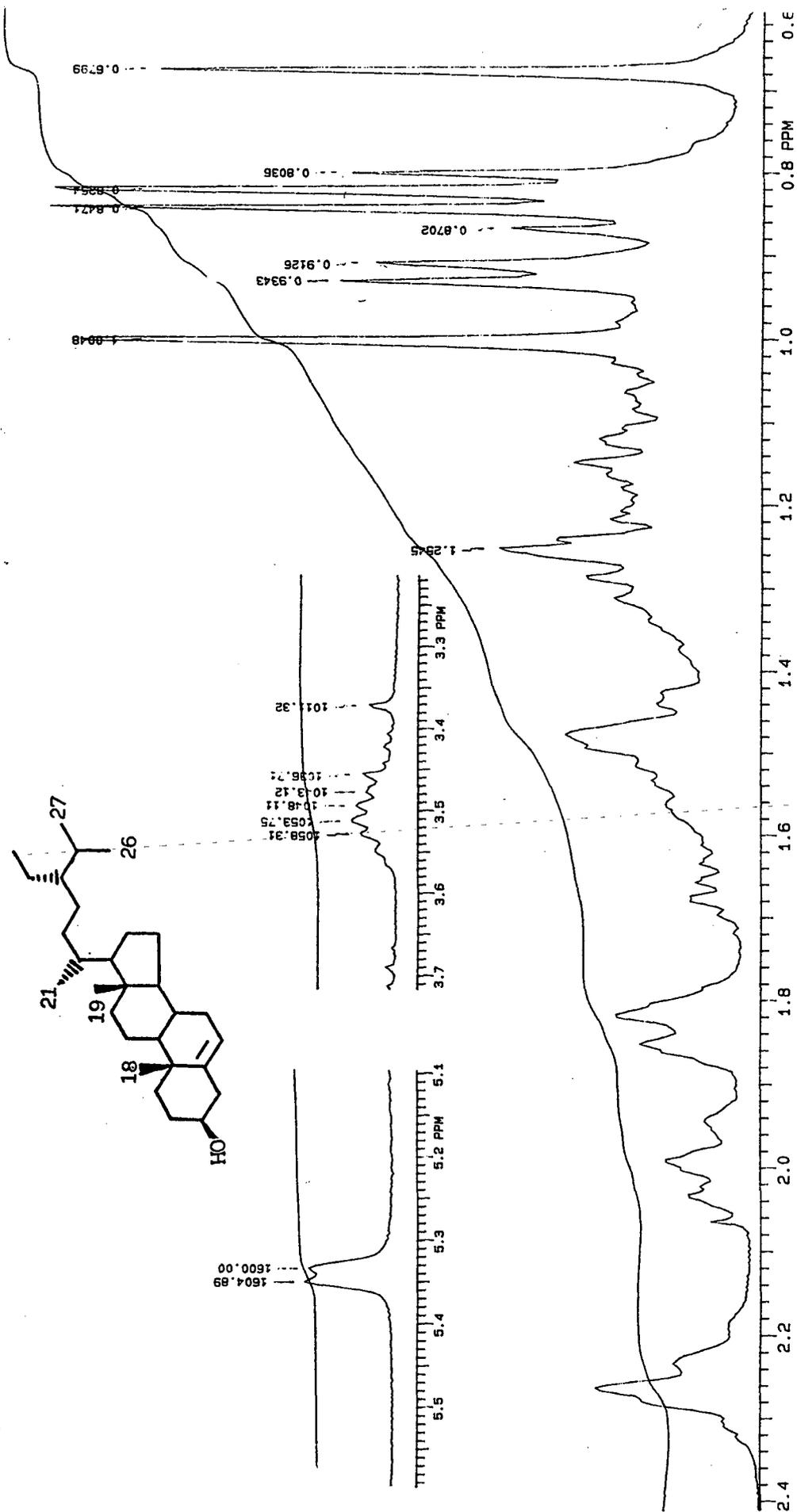


Figura 4. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS-11 (**6**), à 300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EA-54, **7**, (Figura 5; Tabela 19, p.105), apresentou vários sinais característicos de um esqueleto esteroídico. A região de metilas mostrou a presença de sinais relativos à seis metilas, em 0.67 (s,  $\text{CH}_3$  -18); 0.88 (t,  $J=6.5$  Hz;  $\text{CH}_3$  -29); 0.89 (2d,  $J=6.5$  Hz;  $\text{CH}_3$  -26 e 27); 0.93 (s,  $\text{CH}_3$  -19) e 1.01 ppm (d,  $J=6.5$  Hz;  $\text{CH}_3$  -21), com deslocamentos químicos e multiplicidades bastante similares aquelas observadas, nessa mesma região, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS-11 (**6**). O próton carbinólico em C-3, observado em 3.5 ppm, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS-11 (**6**) é substituído, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EA-54, pelo multiplete centrado em 3.95 ppm, com blindagem de 0.5 ppm, com relação a HS-11, sugerindo glicose em posição C-3, para EA-54. Isto é caracterizado pelos sinais observados na região entre  $\delta$  3.94 e 4.56 ppm, que são característicos de prótons em fragmento gluco-piranosídeo. Os dois prótons diastereotópicos, H-6'A e H-6'B, são representados pelos duplos dubletes à  $\delta$  4.39 ( $J=5.02$  e 11.6 Hz) e 4.50 ppm ( $J=2.0$  e 11 Hz). O próton anomérico (H-1') foi identificado através do dublete a  $\delta$  5.03 ppm, com  $J=7.5$  Hz. A presença da ligação  $\beta$ -glicosídica foi reconhecida pelo valor da constante de acoplamento do próton anomérico (7.5 Hz), que permite uma geometria axial-equatorial, para H-1' e H-2'<sup>30</sup>. Esses e os demais sinais da unidade  $\beta$ -glicosídica foram atribuídos com auxílio do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , do composto EA-54 tetracetilado (Figura 5b), realizado em  $\text{CDCl}_3$ , onde os sinais mostraram-se menos sobrepostos, devido a eliminação do efeito do solvente (piridina)<sup>31</sup>. O próton olefínico em C-6 é identificado pelo sinal em 5.30 ppm (Tabela 19; p. 105).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **7**, totalmente desacoplado (BB e APT, Tabela 20; p. 108), à 75 MHz, em piridina- $d_5$ , apresentou um total de sinais, sendo 29 pertencentes ao esqueleto esteroídico e 6 à unidade glicosídica. A atribuição desses sinais foi realizada com o auxílio do espectro APT e em comparação com dados da literatura, para o mesmo composto<sup>40</sup>, permitindo a confirmação da estrutura (**7**) proposta. Uma análise comparativa do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de EA-54 com o de HS-11, demonstrou que quando uma glicose é inserida na posição  $3\beta$  de um esterosídeo ocorre blindagem nas posições em C-2 ( $\delta = -5.4$  ppm) e C-4 ( $\delta = -2.3$  ppm) e, uma significativa desblindagem em C-3 ( $\delta = 5.4$ ).

Posteriormente, durante a investigação química de *C. catharinensis*, foi possível isolar **6**, **7** e um derivado n-acil- $\beta$ -glicosil-sitosterol, **21a'-i'**, (Capítulo 4, p. 102).

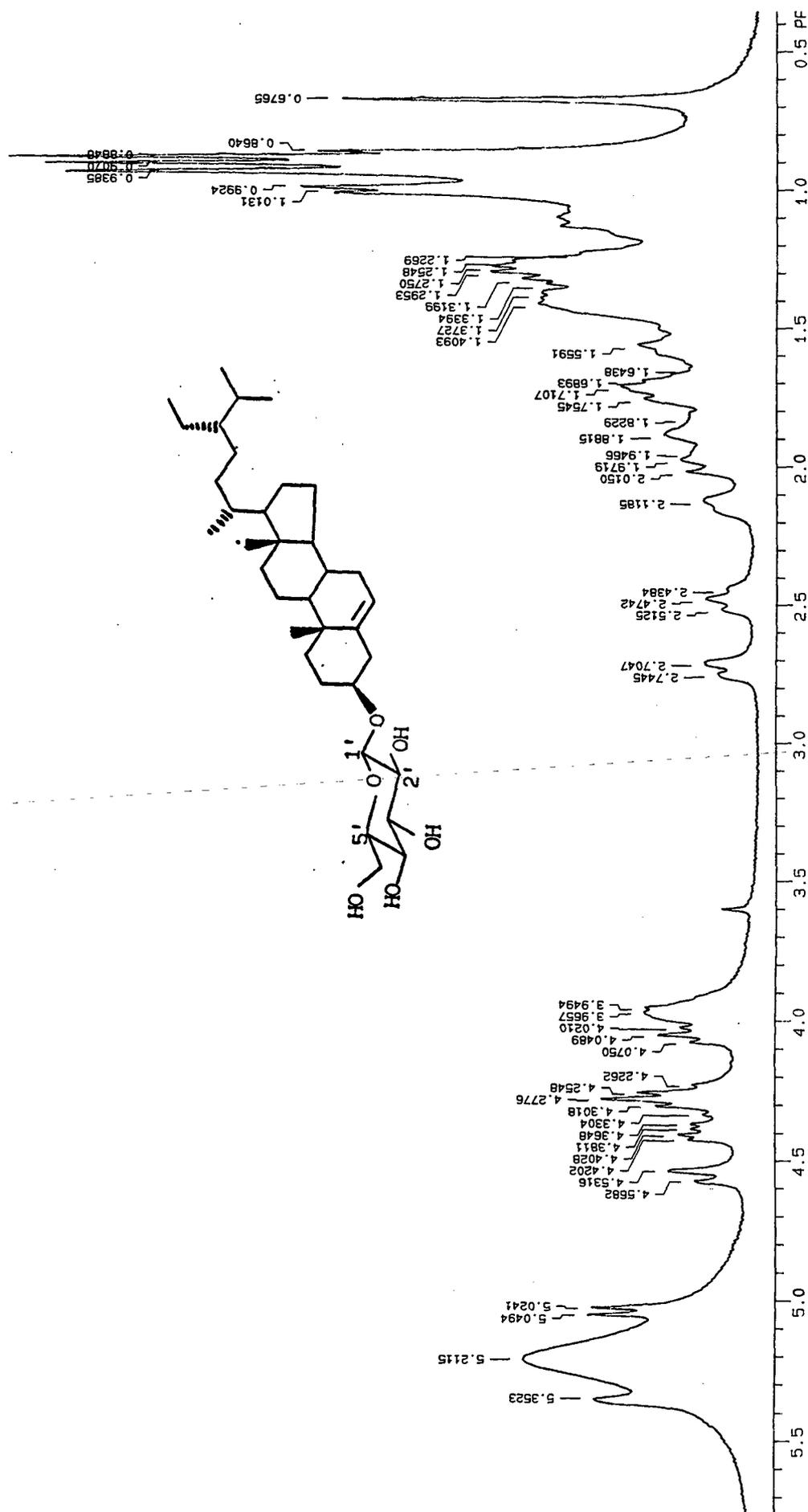
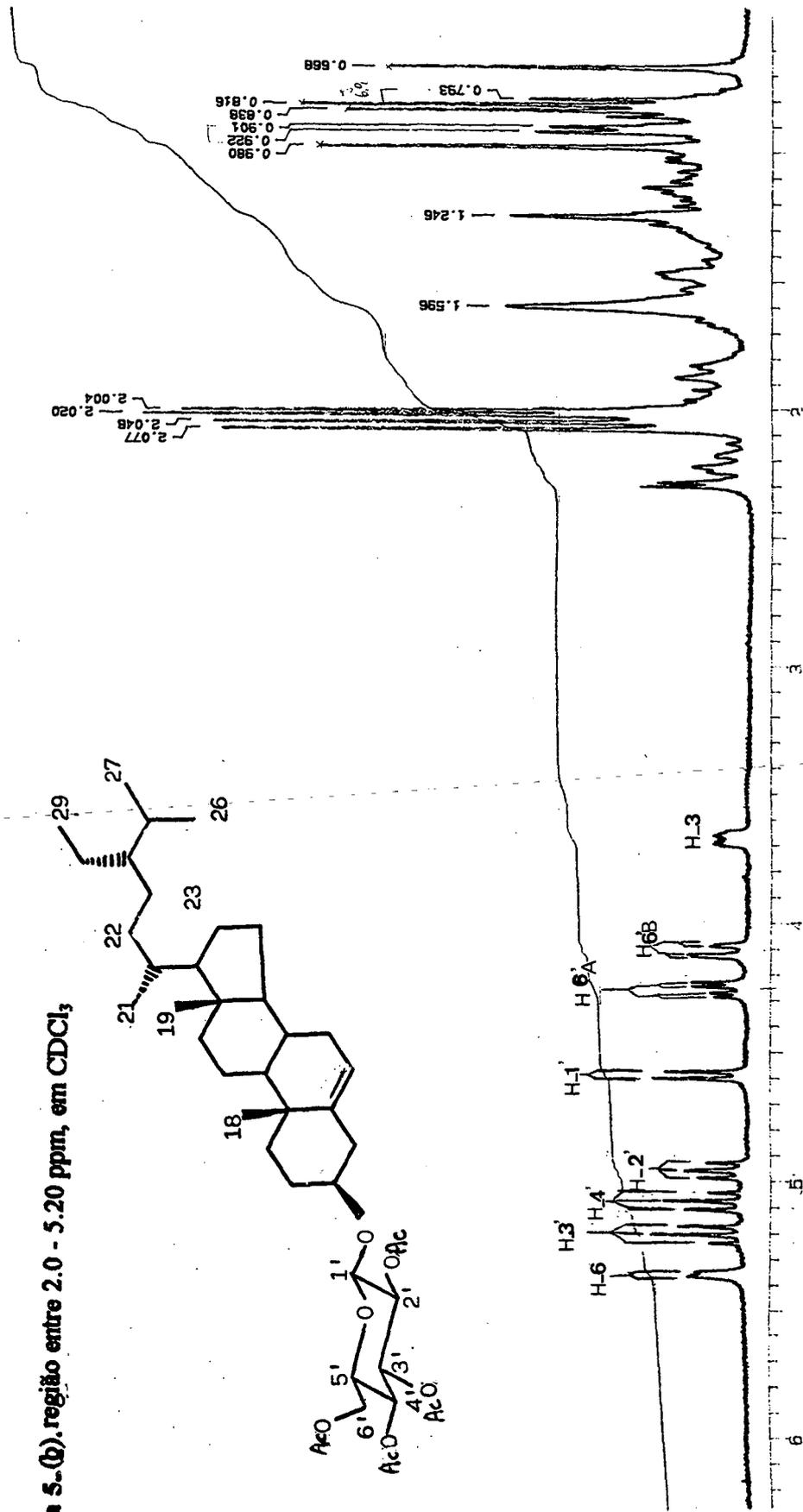


Figura 5. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de (a)- EA-54 (Z), em piridina-d<sub>5</sub> e (b)- do derivado tetra

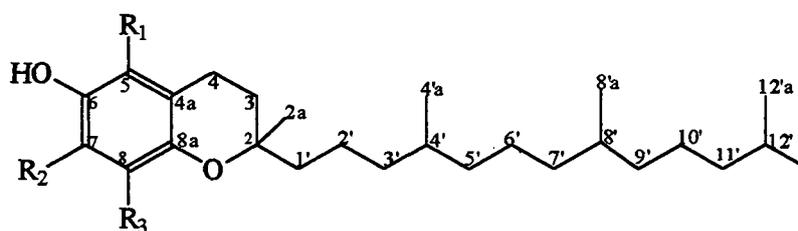
acetilado de EA-54, região entre 2.0 - 5.20 ppm, em CDCl<sub>3</sub>

Figura 5. (b). região entre 2.0 - 5.20 ppm, em CDCl<sub>3</sub>



#### 4.1.4. Identificação de tocoferóis 8, 9, 10 e 11, em *Eubrachion ambiguum*.

As frações 10-11 e 12-14 (Capítulo 3; Tabela 2, p. 10), obtidas do fracionamento do extrato hexânico de *E. ambiguum*, após serem recromatografadas, forneceram misturas oleosas, com colorações do amarelo ao laranja e, bastante solúveis em CHCl<sub>3</sub>. Tais compostos foram detectados em CCD através de forte absorção em UV254 nm e em presença do ácido fosfomolibdico (coloração azul) <sup>41</sup>. A separação dessas misturas, através de cromatografia em coluna ou TLC preparativa, resultou no isolamento e na determinação estrutural de quatro compostos desse tipo, os quais receberam a denominação de EH-10, TO-4, HE-19 e FE-7. Os dados obtidos através das análises dos espectros de massas (Tabela 10), RMN de <sup>1</sup>H (Figuras 6 - 9) e <sup>13</sup>C (Tabela 11), permitiram sugerir as estruturas 8 - 11, para EH-10, TO-4, HE-19 e FE-7, que correspondem, respectivamente, aos esqueletos moleculares dos anti-oxidantes naturais  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocoferóis <sup>42</sup>.

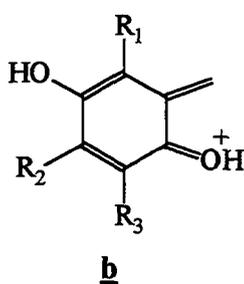
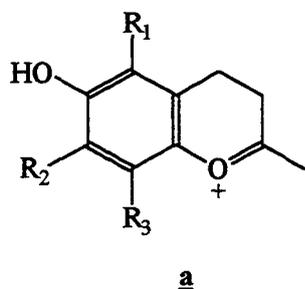


TIPO	<u>8</u> ( $\alpha$ -)	<u>9</u> ( $\beta$ -)	<u>10</u> ( $\gamma$ -)	<u>11</u> ( $\delta$ -)
<b>R<sub>1</sub></b>	Me	Me	H	H
<b>R<sub>2</sub></b>	Me	H	Me	H
<b>R<sub>3</sub></b>	Me	Me	Me	Me

Os espectros de massas desses compostos, apresentaram picos íons moleculares [M<sup>+</sup>], à m/z 430, para EH-10; à 416, para TO-4 e HE-19 e à 402, para FE-7 (Tabela 10). A comparação dos íons moleculares, permitiu concluir que estes compostos diferem entre si, basicamente por uma unidade -CH<sub>2</sub> (número de grupos metílicos substituintes). Essa mesma característica foi observada também para os picos a e b (100%), confirmando esse perfil similar entre as estruturas. Esses picos sugeriram sistemas aromáticos condensados em um heterociclo, constituindo uma série mono-, di- ou trimetilada. Os fragmentos iônicos à m/z (M<sup>+</sup> -225), que resultam nos fragmentos a, provavelmente originam-se da ruptura da ligação C-C, entre a cadeia lateral alquílica (m/z 225) e o sistema heterocíclico, originando o esqueleto cromanol.

**Tabela 10.** Principais íons obtidos do padrão de fragmentação obtido da análise dos espectros de massas dos compostos 8-11.

composto	padrão de metilação	$\underline{a}$ (m/z)	$\underline{b}$ (m/z)	$[M^+]$ (m/z)
<b>EH-10</b>	tri-Me	205	165	430
<b>HE-19</b>	di-Me	191	151	416
<b>TO-4</b>	di-Me	191	151	416
<b>FE-7</b>	mono-Me	163	137	402



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 6 - 9) mostraram, na região de metilas, a presença de dubletes bastante sobrepostos (12 prótons), entre 0.84 e 0.87 ppm, referentes aos grupos metílicos em 4'a, 8'a, 12'a e 13'. O singlete em torno de 1.3 ppm é atribuído à metila quaternária em C-2a, presente nas quatro estruturas. Na região entre 2.0 e 2.2 ppm (deslocamentos químicos característicos de grupos metílicos ligados em anéis aromáticos) todos os espectros apresentaram intensos singletes, embora com diferença significativa quanto ao número de grupos metílicos a que se referem, em cada espectro (3 Me, para EH-10; 2 Me, para TO-4 e HE-19; 1 Me para FE-7). Isso é confirmado através de uma análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , dos quatro compostos, das regiões relativas a hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$ , onde, comparando-se essas regiões observa-se: ausência total de sinais no espectro de EH-10, um singlete nos espectros de TO-4 e HE-19 (6.37 e 6.45 ppm, respectivamente) e, dois dubletes no espectro de FE-7, em 6.38 e 6.51 ppm (constantes de acoplamento típicas de substituições meta, de 2.4 Hz).

A atribuição de sinais em RMN de  $^{13}\text{C}$  de **8** a **11** (Tabela 11), foi realizada através de espectros BB, APT e com auxílio de dados da literatura <sup>42</sup>. De um modo geral esses 4 espectros apresentaram deslocamentos químicos similares, sendo que significativas diferenças foram observadas nas regiões referentes a carbonos  $\text{sp}^2$  e metilas aromáticas. Substituições de grupos metílicos em carbonos C-5 e C-7, provocam um pequeno efeito de blindagem (efeito +I, como em EH-10), que não se observa em compostos onde essas posições são livres (C-5 em HE-19, C-7 em TO-4 e C-5, C-7 em FE-7). Já os carbonos aromáticos substituídos absorvem em região a campo mais baixo que aqueles não substituídos, como C-5 em **9**, C-7 em **10** e C-5 e C-7 em **11**.

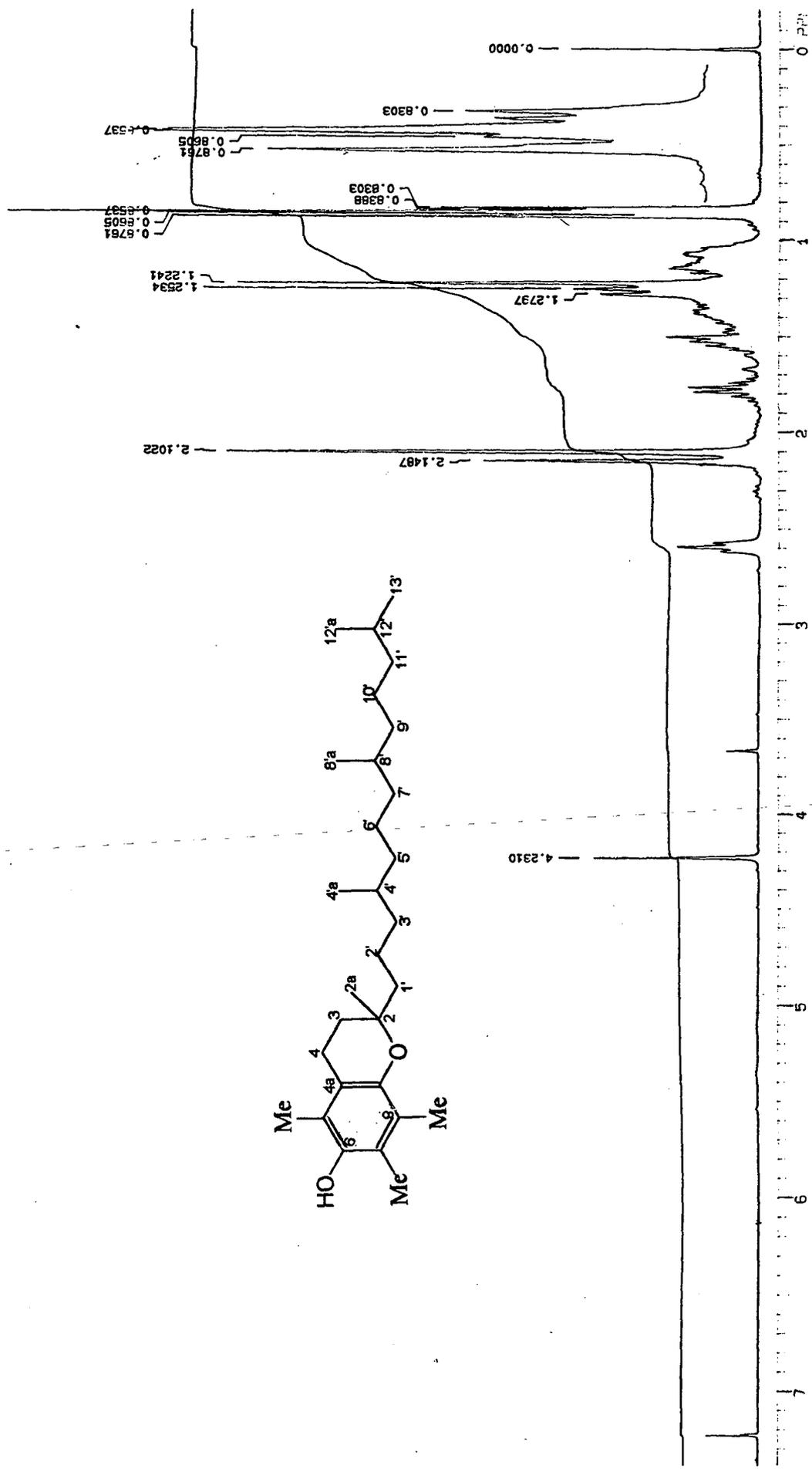


Figura 6. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, de EH-10 (**8**), em  $\text{CDCl}_3$ .

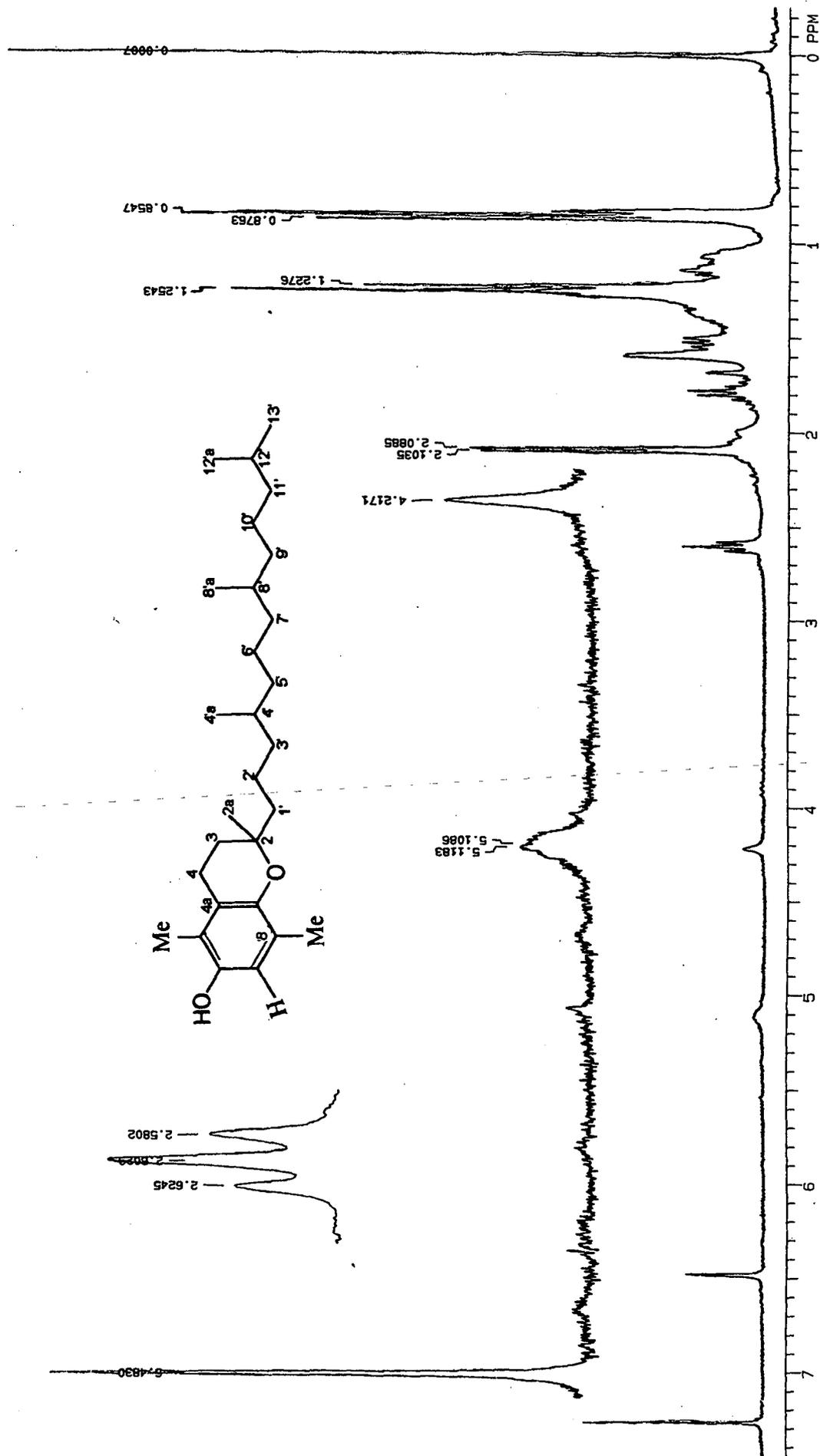


Figura 7. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de TO-4 (9), em CDCl<sub>3</sub>.

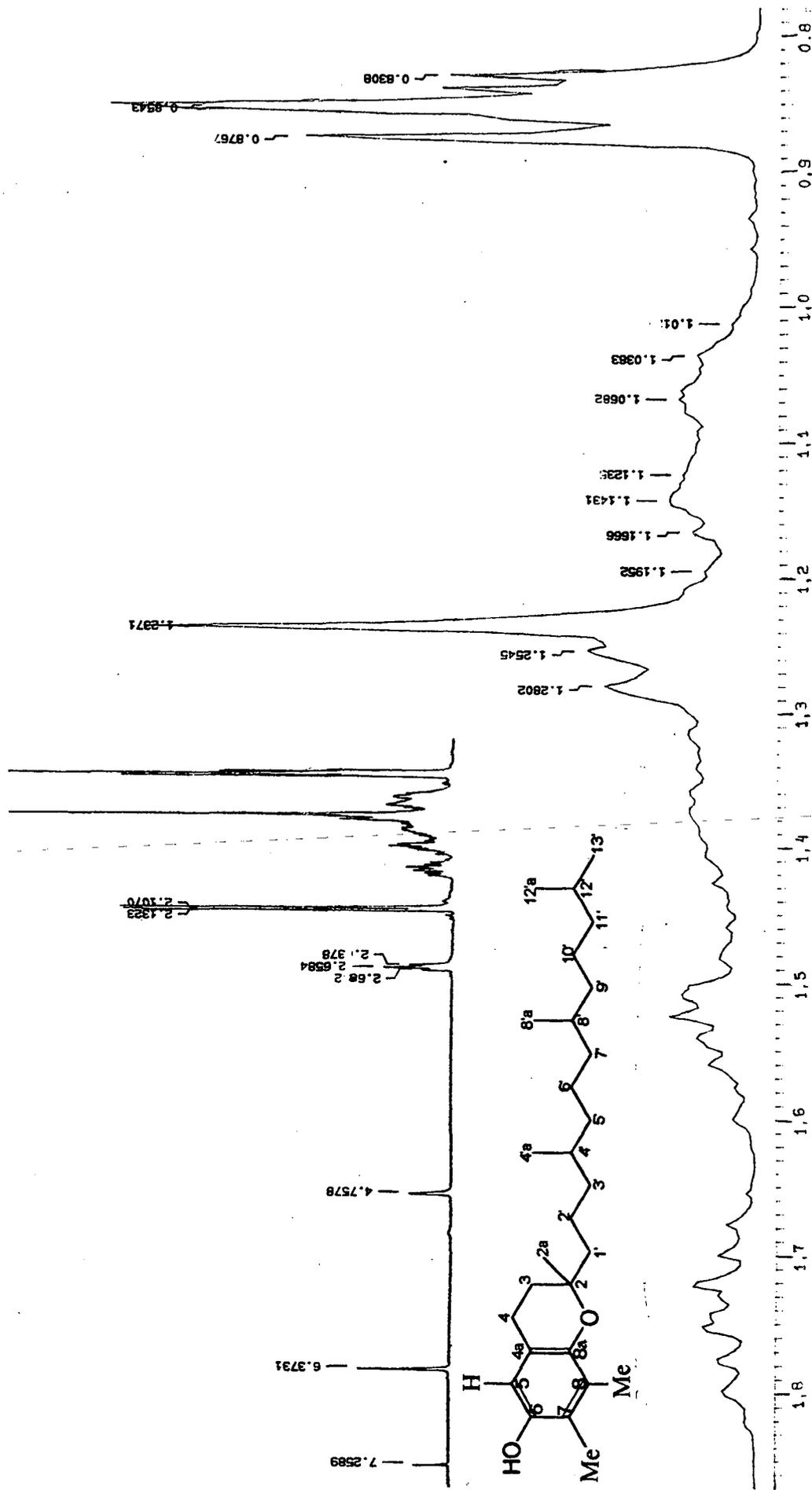


Figura 8. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de HE-19 (10), em CDCl<sub>3</sub>.

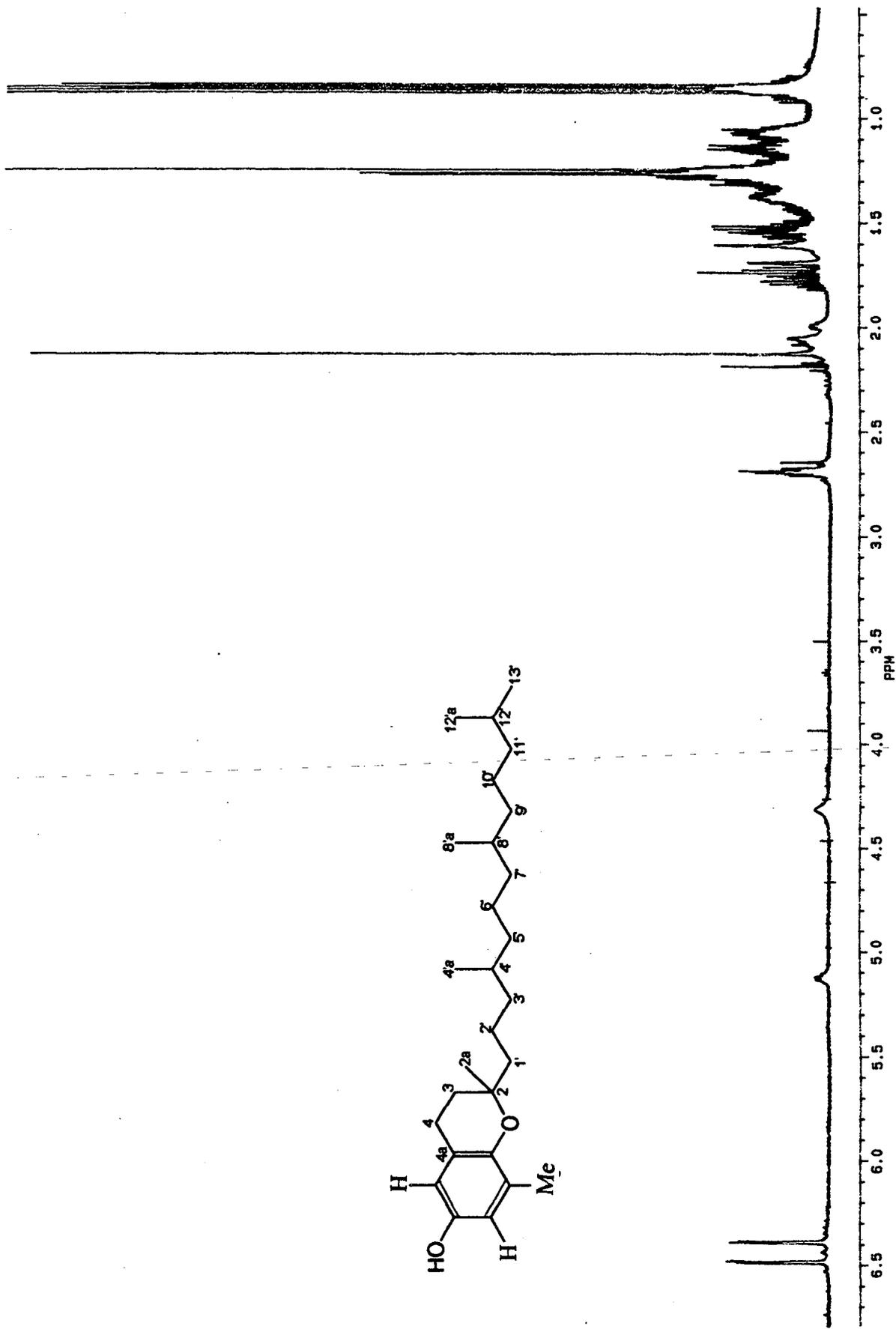
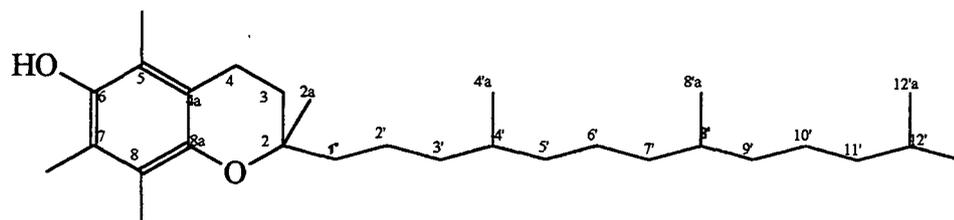


Figura 9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , de FE-7 (**11**), à 300 MHz, em

$\text{CDCl}_3$ .

As análises espectroscópicas confirmam que esses compostos se distinguem somente pelo número e posições de grupos metílicos nos anéis aromáticos, sendo que essa pequena modificação estrutural resulta em alterações nas atividades biológicas. Assim, embora o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E) seja o composto mais ativo, é o  $\gamma$ -tocoferol que apresenta maior eficácia como antioxidante <sup>41</sup>. Embora compostos desse tipo sejam bastante conhecidos na literatura, ainda não foram descritos para espécies da família Loranthaceae.



TIPO	<u>8</u> ( $\alpha$ -)	<u>9</u> ( $\beta$ -)	<u>10</u> ( $\gamma$ -)	<u>11</u> ( $\delta$ -)
R <sub>1</sub>	Me	Me	H	H
R <sub>2</sub>	Me	H	Me	H
R <sub>3</sub>	Me	Me	Me	Me

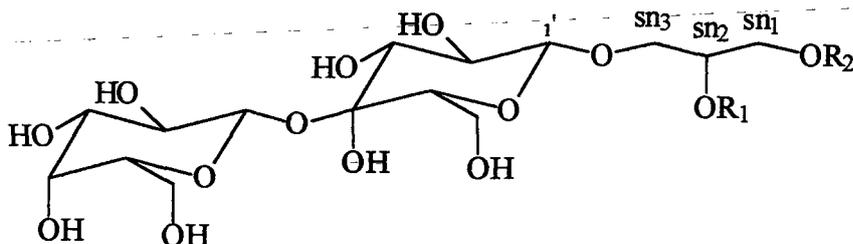
**Tabela 11.** Deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup>C, em CDCl<sub>3</sub> a 75 MHz, para EH-10, TO-4, HE-19 e FE-7, em comparação com dados da literatura <sup>42</sup>.

C	$\alpha$ -toc.	EH-10 (8)	$\beta$ -toc.	TO-40 (9)	$\gamma$ -toc.	HE-19 (10)	$\delta$ -toc.	FE-70(11)
8a	145.4	145.5	145.7	145.8	145.5	145.9	145.8	146.0
6	144.4	144.5	145.5	145.6	145.5	146.3	147.5	147.6
8	122.3	122.5	123.8	123.9	125.5	125.5	127.1	127.3
7	121.0	121.0	115.4	115.3	121.5	121.6	115.8	115.6
5	118.5	118.5	119.2	119.2	112.0	112.1	112.7	112.5
4a	117.0	117.3	120.1	120.2	118.0	118.2	121.1	121.2
2	74.3	74.4	74.4	74.4	75.3	75.4	75.5	75.6
1'	39.8	39.8	39.8	39.6	40.0	40.0	40.0	39.9
11'	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.3	39.4	39.4
3'	37.5	37.4	37.4	37.5	37.4	37.4	37.5	37.5
5'	37.5	37.4	37.4	37.5	37.4	37.4	37.5	37.5
7'	37.5	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.5	37.3
9'	37.5	37.4	37.4	37.4	37.5	37.4	37.5	37.3
4'	32.7	32.8	32.7	32.8	32.8	32.7	32.7	32.7
8'	32.7	32.7	32.7	32.7	32.8	32.6	32.7	32.8
3	31.6	31.5	31.5	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
12'	28.0	27.9	27.8	27.9	27.9	27.9	28.0	27.9

10'	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.7	24.8	24.8
6'	24.5	24.4	24.5	24.4	24.4	24.4	24.5	24.4
2a	23.8	23.7	23.8	23.8	24.0	24.0	24.0	24.1
12'a	22.6	22.7	22.7	22.7	22.6	22.7	22.7	22.7
13'	22.6	22.7	22.7	22.7	22.6	22.7	22.7	22.7
2'	21.0	21.0	21.0	20.9	21.0	20.9	21.0	20.9
4	20.8	20.7	20.8	22.6	22.3	22.3	22.6	22.7
4'a	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.6
8'a	19.7	19.6	19.7	19.6	19.7	19.6	-	-
7a	12.1	12.2	-	-	11.9	11.9	16.0	16.0
8b	11.8	11.8	15.8	15.8	11.9	11.9	16.0	16.0
5a	11.2	11.3	11.0	10.9	-	-	-	-

#### 4.1.5. Misturas de glicolípídeos (DGDG) isolados do extrato clorofórmico de *E. ambiguum* - EC-36 .

A mistura lipídica EC-36 foi isolada através de cromatografia em coluna do extrato clorofórmio, de *E. ambiguum* (Capítulo 3, Tabela 3, p. 16). Essa mistura possui um aspecto oleoso, coloração amarelo-escuro e é pouco solúvel nos solventes orgânicos usuais. As análises espectroscópicas permitiram identificá-lo como um digalactosil-diacil-glicerol.



(12)

R <sub>1</sub> ; R <sub>2</sub> =
palmitoil
palmitoleil
estearil
petroselinoil
miristoil
pentadecanoil
margaroil
vacinoil
linoleil

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , de EC-36 (Figura 10) permitiu constatar a presença de grupos metilas terminais, em 0.95 (w- $\text{CH}_3$ ), de um sinal em 1.25 ppm (w- $\text{CH}_2$ , sinal intenso) e sinais entre 2.08 e 2.94 ppm, relativos à prótons metilênicos  $\beta$  e  $\alpha$ -carbonílicos, indicando cadeias alquílicas de ácidos graxos. Já a presença de ressonâncias entre 3.5 e 4.7 ppm, são indicativos de fragmento glicosídico e um resíduo glicerol, no esqueleto molecular. Ainda, na região de prótons olefínicos, detectou-se sinais entre 5.1 e 5.7 ppm, incluindo, provavelmente o próton anomérico e prótons olefínicos, sugerindo a presença de insaturações nos respectivos ácidos graxos.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB e APT, Tabela 12), foi analisado com auxílio de dados da literatura<sup>43,44</sup>, e permitiu confirmar todos os grupos funcionais detectados no espectro de prótons. Os sinais sobrepostos entre 14.35 e 14.51 ppm (w- $\text{CH}_3$ ), os sinais em torno de 29 ppm (w- $\text{CH}_2$ ), os carbonos olefínicos entre 127.58 e 132.16 ppm, e as carbonilas entre 173.27 e 173.43, indicam a presença de ácidos graxos esterificados. Os sinais compreendidos entre 62.9 e 74.6 ppm (13 carbonos), apresentaram grau de protonação (9 CH e 4  $\text{CH}_2$ , no espectro APT) e posições de ressonância esperadas para um fragmento digalactosil e uma porção glicerol. Os carbonos anoméricos foram identificados em 100.7 e 105.3 ppm. A atribuição desses e de outros sinais em RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 12), permitiu a confirmação da estrutura **12** proposta para EC-36.

Com o objetivo de identificar-se quais os ácidos graxos que fazem parte da mistura de ésteres, foi realizada uma hidrólise básica em EC-36. Os ácidos graxos liberados, HID a'-i', foram metilados com uma solução de diazometano em éter etílico e, submetidos a análise por cromatografia gasosa. Identificou-se, dessa forma, as composições qualitativas e as proporções relativas nas misturas (Tabela 13). Observando essa Tabela, pode-se concluir que os componentes principais da mistura são palmitato (66.97%) e estearato de metila (10.99%). Também detectou-se a presença de dois derivados com número ímpar de carbonos - os ésteres metílicos dos ácidos pentadecanóico ( $\text{C}_{15}$ ) e margárico ( $\text{C}_{17}$ ). Ésteres metílicos de ácidos graxos insaturados, palmitoleanato (3.91) e linoleato (2.74), também foram identificados, embora em menor proporção. Essa análise (CG) permitiu, finalmente, identificar-se totalmente a estrutura de EC-36, incluindo as cadeias de ácidos graxos presentes, onde o ácido petroselínico foi detectado pela primeira vez, como participante de moléculas de MGDG ou DGDG.

O resíduo originado pela reação de hidrólise básica, após eliminação dos ácidos graxos livres, foi tratado com resina de troca iônica (IR-120 e IRA-400) e então analisado em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura 11). Assim, confirmou-se a presença de um fragmento glicerol ligado a um digalactosídeo, na posição sn-1 do glicerol.

Compostos tipo digalactosil diacilglicerol (DGDG), consistem de um fragmento dissacarídeo ligado a uma porção glicosídica, raramente têm sido isolados de plantas superiores, através de métodos convencionais de análises fitoquímicas, com excessão à algas e algumas bactérias, onde aparecem como componentes majoritários<sup>45-46</sup>.

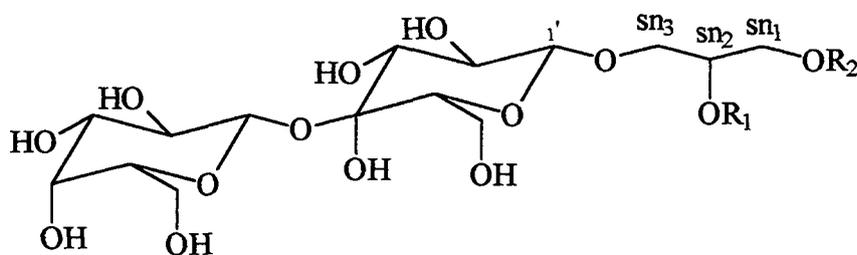
Glicolídeos ocorrem no reino vegetal, especificamente associados à tecidos fotossintéticos onde fazem parte das membranas dos cloroplastos. Em geral são descritos como compostos contendo atividades antiinflamatórias ou analgésicas<sup>45,47,48</sup>.

**Tabela 12.** Dados de RMN de <sup>13</sup>C do digalactosildiácilglicerol, EC-36 (**12**), isolado do extrato clorofórmico de *E. ambiguum* (75 MHz, TMS), em comparação com dados da literatura<sup>43</sup>.

C <sup>a</sup>	EC-36	DGDG <sup>43</sup>
sn-1	63.4	64.0
sn-2	71.6	71.8
sn-3	68.0	68.8
1'	105.4	105.3
2'	72.7	72.6
3'	75.0*	74.7*
4'	69.7	70.1
5'	74.4*	74.6*
6'	67.9	67.9
1''	101.2	100.7
2''	70.4	70.3
3''	71.0	71.5
4''	70.9	71.2
5''	72.1	72.5
6''	62.5	62.9

<sup>a</sup> não contém sinais relativos ao fragmento aciloil.

\* intercambiáveis



(**12**) R<sub>1</sub>; R<sub>2</sub> (Tabela 13)

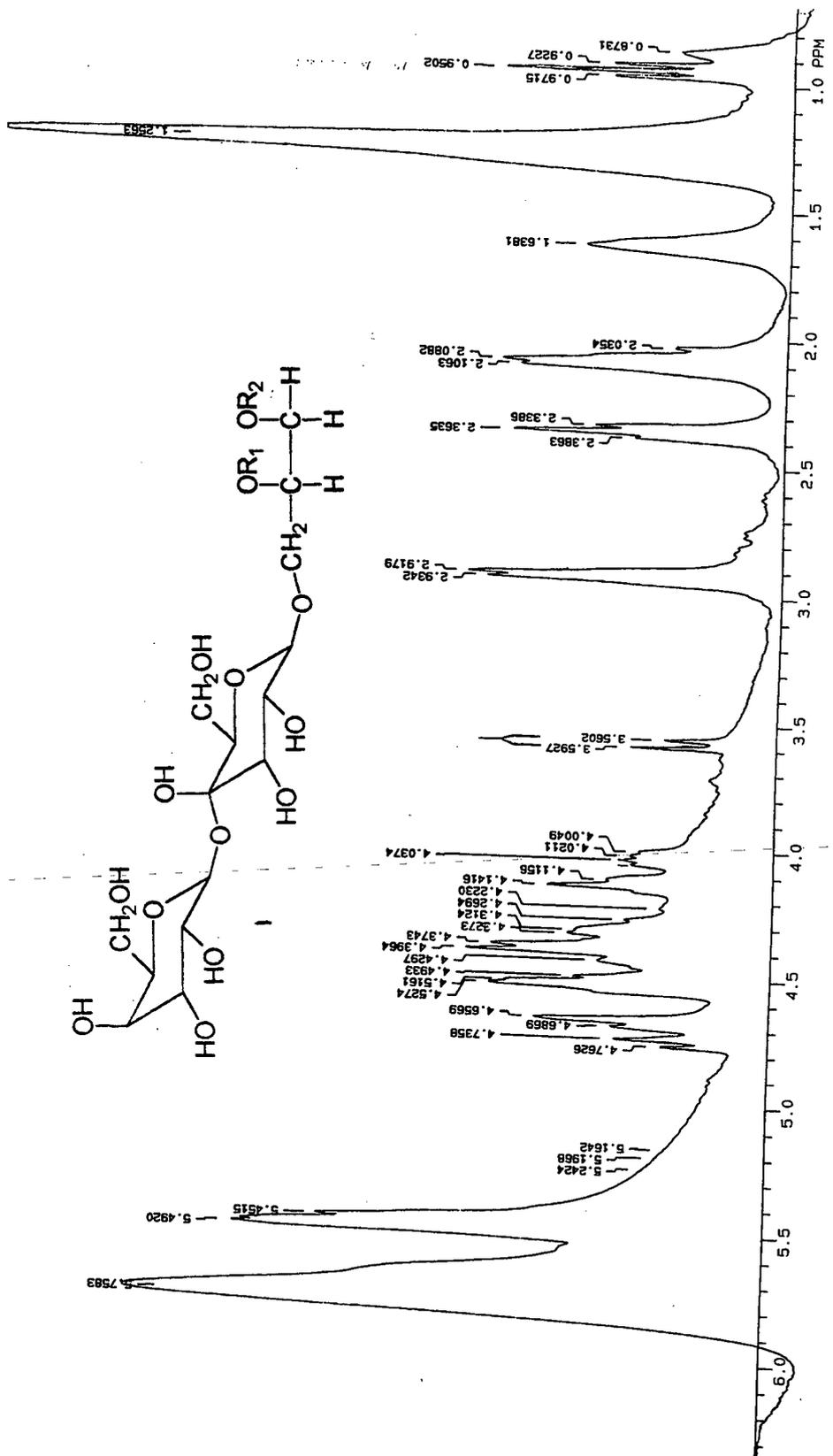


Figura 10. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de EC-36 (12), em piridina-d<sub>5</sub>.

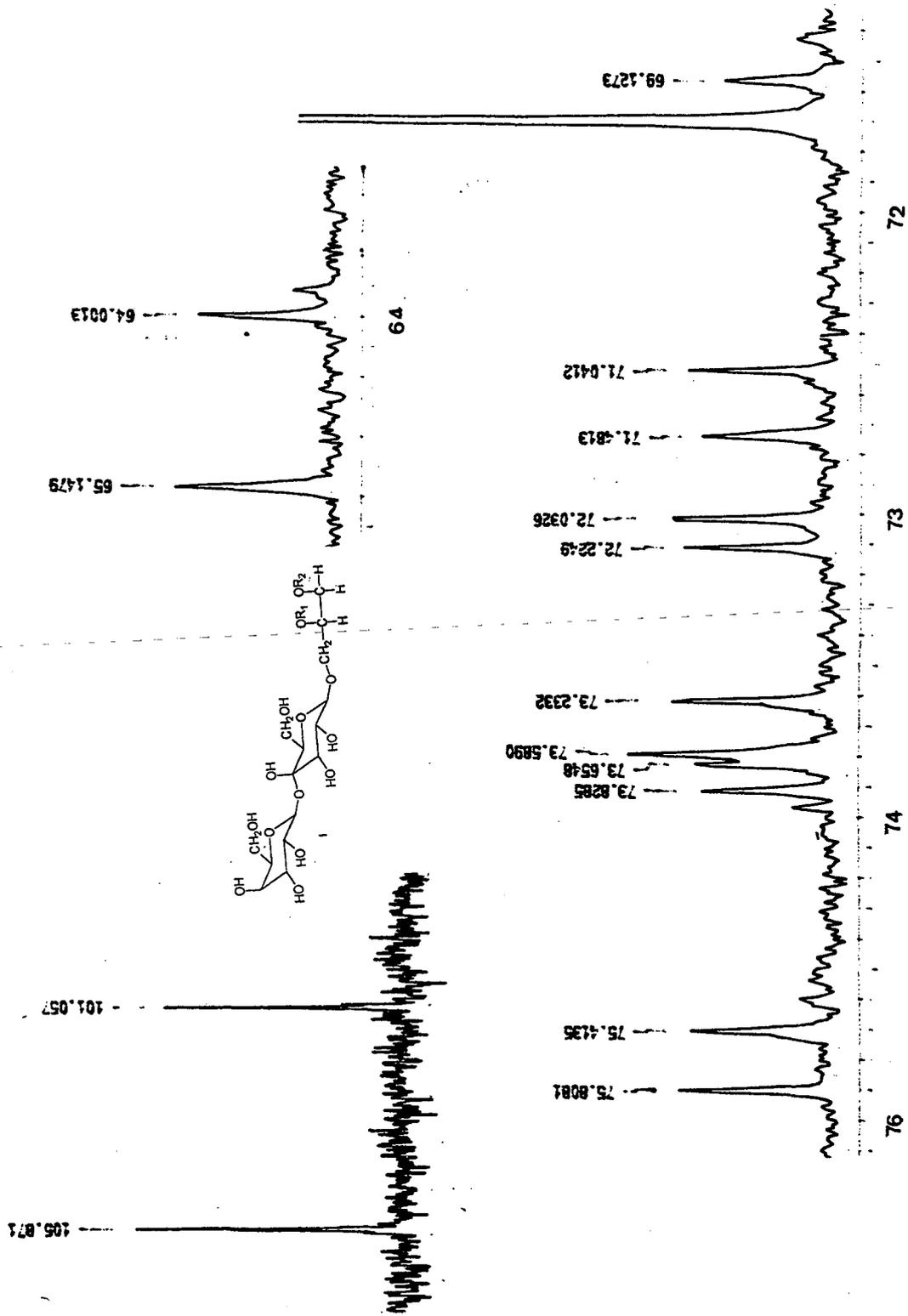


Figura 11. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , à 75.5 MHz, do digalactosil-glicerol derivado de EC-36 (12), em piridina- $\text{d}_5$ .

**Tabela 13.** Proporções relativas de ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes em HID-36 (12) e, nas misturas EH-21, AG-01 e AH-03, em análise de CG.

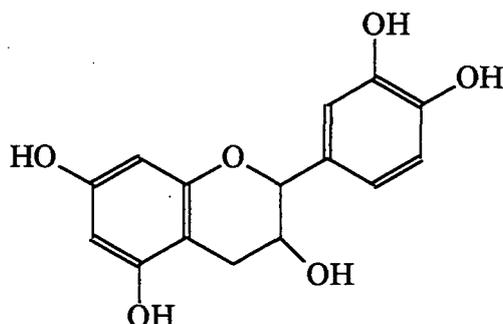
<b>ÁCIDO</b>	<b>HID-36</b>	<b>EH-21</b>	<b>AG-01</b>	<b>AH-03</b>
<b>mirístico C<sub>14</sub></b>	1.33	1.96	1.54	-
<b>pentadecanóico C<sub>15</sub></b>	0.61	0.37	0.74	-
<b>palmítico C<sub>16</sub></b>	66.97	61.59	50.27	-
<b>palmitoleico C<sub>16</sub></b>	3.91	0.99	0.26	presente
<b>margárico C<sub>17</sub></b>	2.46	0.68	1.72	-
<b>esteárico C<sub>18</sub></b>	20.99	3.60	10.72	-
<b>petroselinico C<sub>24</sub></b>	9.35	15.08	13.92	-
<b>linoleico C<sub>22</sub></b>	2.74	10.27	5.68	-
<b>linilênico C<sub>18</sub></b>	-	0.34	1.72	-
<b>aráquico C<sub>20</sub></b>	-	-	3.42	-
<b>vacínico C<sub>18</sub></b>	1.16	1.27	-	-

#### 4.1.6. Identificação dos flavonóides ES-71, 13 e EC-50A, 14, presentes nos extratos em clorofórmio e acetato de etila de *E. ambiguum*.

##### 4.1.6.1. Identificação do flavonol (+)-Catequina (13), ES-71

O extrato em acetato de etila de *E. ambiguum*, após vários fracionamentos (Capítulo 3, Tabela 4, p. 21) proporcionou o isolamento de um composto abundante (4.5% em relação a massa de extrato bruto e 0.31% em relação a massa de planta seca) que recristalizou em metanol, formando cristais de coloração branco-avermelhada. Fundiu na faixa de 120-124 °C e, apresentou  $[\alpha]_D^{25}$ , em acetona, de + 18 (c= 0.5).

As análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitiram sugerir que ES-71 trata-se de (+)-catequina (3',4', 5,7, tetrahidróxi flavonol), 13<sup>49</sup>. Este composto é um dos principais monômeros na formação dos polímeros fenólicos denominados leucoantocianidinas<sup>50,51</sup>.



(13)

O espectro de RMN de prótons (Figura 12), em acetona- $d_6$ , forneceu dados que possibilitaram atribuir a estrutura **13**, para ES-71. O anel C é caracterizado pelos sinais em 4.02 ppm (1H, m), para H-3 e 4.56 ppm (1 H, d,  $J=7.5$  Hz), para H-2. A estereoquímica em C-2 e -3 é indicada através da constante de acoplamento,  $J_{2,3}=7.5$  Hz, que indica um ângulo diedro ( $\phi$ ) em torno de  $180^\circ$ , para esses prótons, permitindo uma configuração trans para os prótons metínicos H-2 e H-3. Isso indica a presença de uma catequina, já que a epicatequina (cis, para H-2 e H-3) apresenta  $J_{2,3}=2$  Hz. Os duplos dubletes à  $\delta$  2.92 (1 H;  $J_{a,e}=5.3$  e  $J_{gem}=16$  Hz) e 2.53 ppm (1 H;  $J_{a,a}=8.2$  Hz e  $J_{gem}=16$  Hz) referem-se aos prótons diastereotópicos  $H_{4b}$  e  $H_{4a}$ , respectivamente. O anel A, com uma substituição OH-5,7 é caracterizado pelos dois dubletes em 5.97 e 6.07 ppm ( $J_{6,8}=2.5$  Hz), referentes aos prótons H-6 e H-8. Entretanto, os sinais observados na região entre  $\delta=6.7$  e 7.1 ppm, apresentam multiplicidades indicativas de uma substituição OH-3',4', conforme esperado para o anel B. Os prótons H-6' e H-5', aparecem à  $\delta=6.75$  (1 H; dd,  $J_{6,5'}=8.2$  Hz e  $J_{6,2'}=1.9$  Hz) e a 6.80 ppm (1 H; d,  $J_{5,6'}=8.2$  Hz). O dublete em 6.89 ppm, corresponde ao próton H-2', com  $J_{2,6'}=1.9$  Hz, característico de acoplamento de prótons meta.

O espectro de RMN de  $^{13}C$ , à 75.5 MHz, em acetona- $d_6$  (Tabela 14), de ES-71, permitiu confirmar a estrutura **13** proposta, através da identificação dos três sistemas de anéis da molécula. Na região espectral relativa a carbonos  $sp^3$ , caracterizou-se o anel C, através dos sinais à 27.7 ppm, referente ao carbono metilênico C-4, à 67.30 e 81.63 ppm, relativos aos carbonos metínicos C-2 e C-3, respectivamente. O anel A, que apresenta substituição 5,7-dihidróxi, foi identificado através das ressonâncias em 156.15, para C-5 e 156.67 ppm, para C-7, com desblindagem típica para carbonos  $sp^2$  contendo substituintes com efeito mesomérico (+M). Em consequência, C-6 e C-8, corresponderam aos sinais em 95.08 e 94.37 ppm, demonstrando aumento de densidades eletrônicas para os carbonos em posições orto aos grupos fenólicos. Essa característica também foi observada para o anel B, que apresenta substituição 3',4'-dihidróxi.

O flavonol catequina (**13**) é um composto que tem sido isolado de várias espécies vegetais <sup>51</sup>, embora não tenha sido ainda descrita para membros da família Loranthaceae. Recentes estudos farmacológicos, desse composto, têm indicado relevantes resultados como agente antibacteriano <sup>52</sup>.

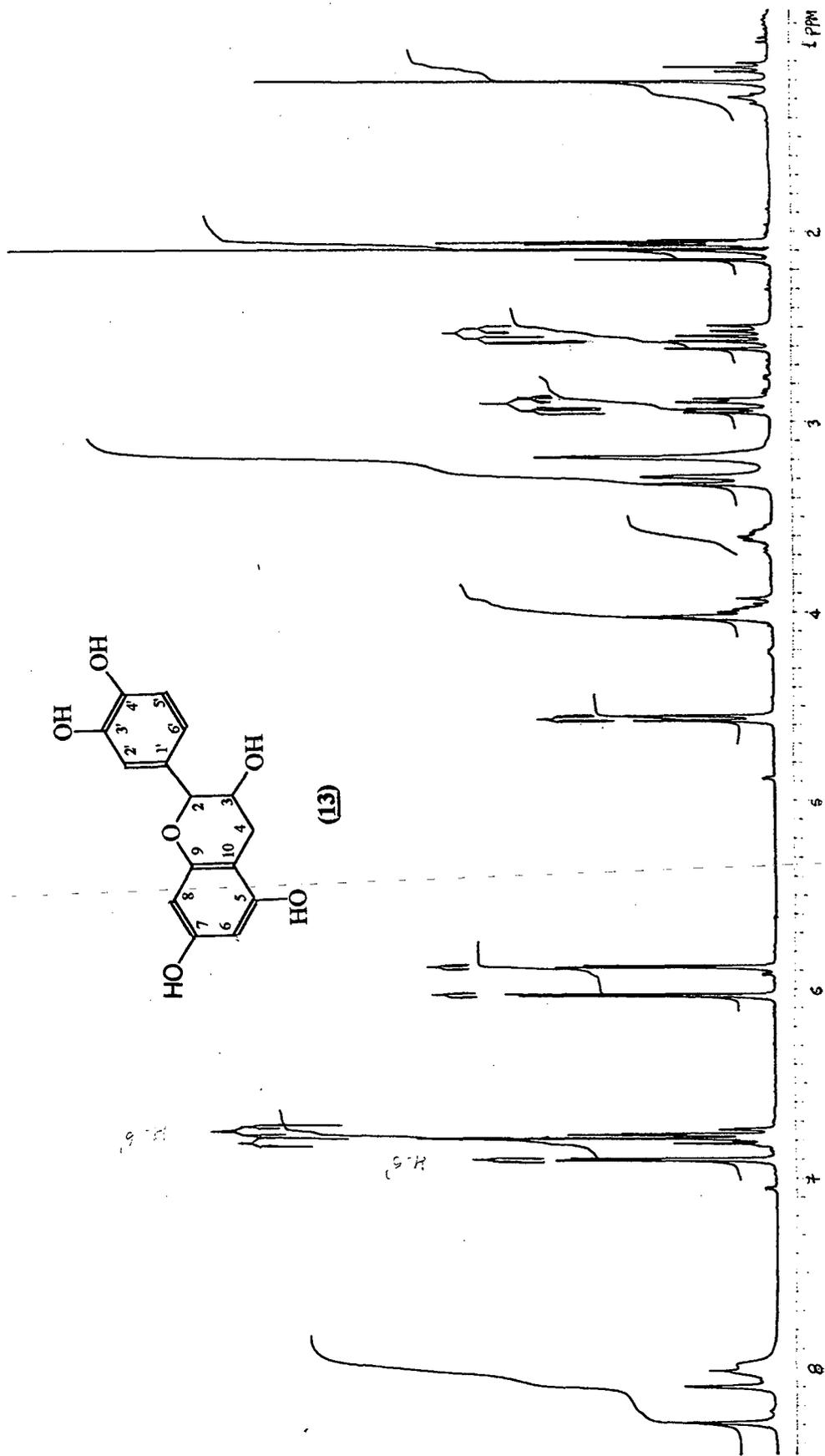
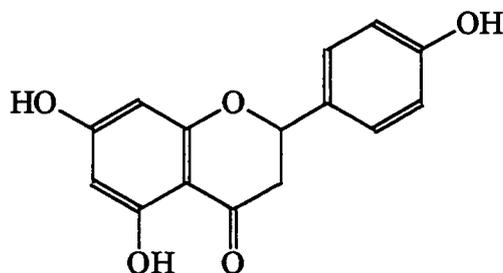


Figura 12. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, de ES-71 (13), em acetona- $d_6$ .

#### 4.1.6.2. Identificação da flavona naringenina, EC-50A.

O composto EC-50A foi obtido das frações menos polares, oriundas do refractionamento do extrato em clorofórmio (Capítulo 3, Tabela 3, p. 16). Esse composto foi recristalizado em benzeno, formando cristais aciculares, de coloração vermelha, que fundiram à 249 °C. Através da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  concluiu-se que EC-50A corresponde ao flavonóide 5,7,4'-trihidróxiflavanona (**14**), denominado naringenina .



(14)

A análise dos dados obtidos, em RMN de prótons (Figura 13), de EC-50A, indicou vários sinais característicos de flavanonas. Assim, os duplos dubletes centrados à  $\delta=2.73$  e  $3.18$  ppm, referem-se, respectivamente, aos prótons diastereotópicos H-3B ( $J_{3B,2}=2.95$  Hz; acoplamento axial-equatorial, e  $J_{3B,3A}=16$  Hz; acoplamento geminal) e H-3A ( $J_{3A,2}=13.0$  Hz; acoplamento axial-axial). Já o próton H-2 é identificado pelos picos centrados à  $\delta=5.45$  ppm (dd;  $J_{2,3B}=2.95$  Hz e  $J_{2,3A}=13.0$  Hz). Na região de aromáticos, atribuiu-se o dublete em  $5.96$  ppm aos prótons isotópicos H-6 e H-8, com constantes de acoplamento de  $2.3$  Hz, cujo valor é característico de prótons com acoplamento meta. O anel B, que apresenta uma substituição 4'-OH, foi identificado através dos dubletes em  $6.90$  ppm ( $J=8.7$  Hz), para H-3',5' e a  $7.4$  ppm ( $J=8.7$  Hz), para H-2',6'. Essas medidas de constantes de acoplamento são típicas de prótons com acoplamento orto. As multiplicidades apresentadas, bem como as posições de ressonância também são perfeitamente condizentes com uma substituição tipo 4'-OH, no anel B. O sinal à  $12.20$  ppm, caracteriza o próton hidroxílico, em C-5, que forma ponte de hidrogênio com o grupo carbonílico vizinho.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , BB e APT (Tabela 14), foi realizada com auxílio de dados da literatura<sup>53</sup>, fornecendo respaldo suficiente para confirmar o esqueleto molecular **14** (5,7,4'-trihidróxiflavanona). O sinal em  $43.12$  ppm refere-se ao único carbono metilênico presente na molécula (C-3; fase +, espectro APT), com desblindagem provocada pela presença de um grupo carbonílico vizinho (C-4,  $\delta$  à  $196.11$  ppm, típico de cetona). O carbono metínico em C-2 aparece em  $79.13$  ppm,

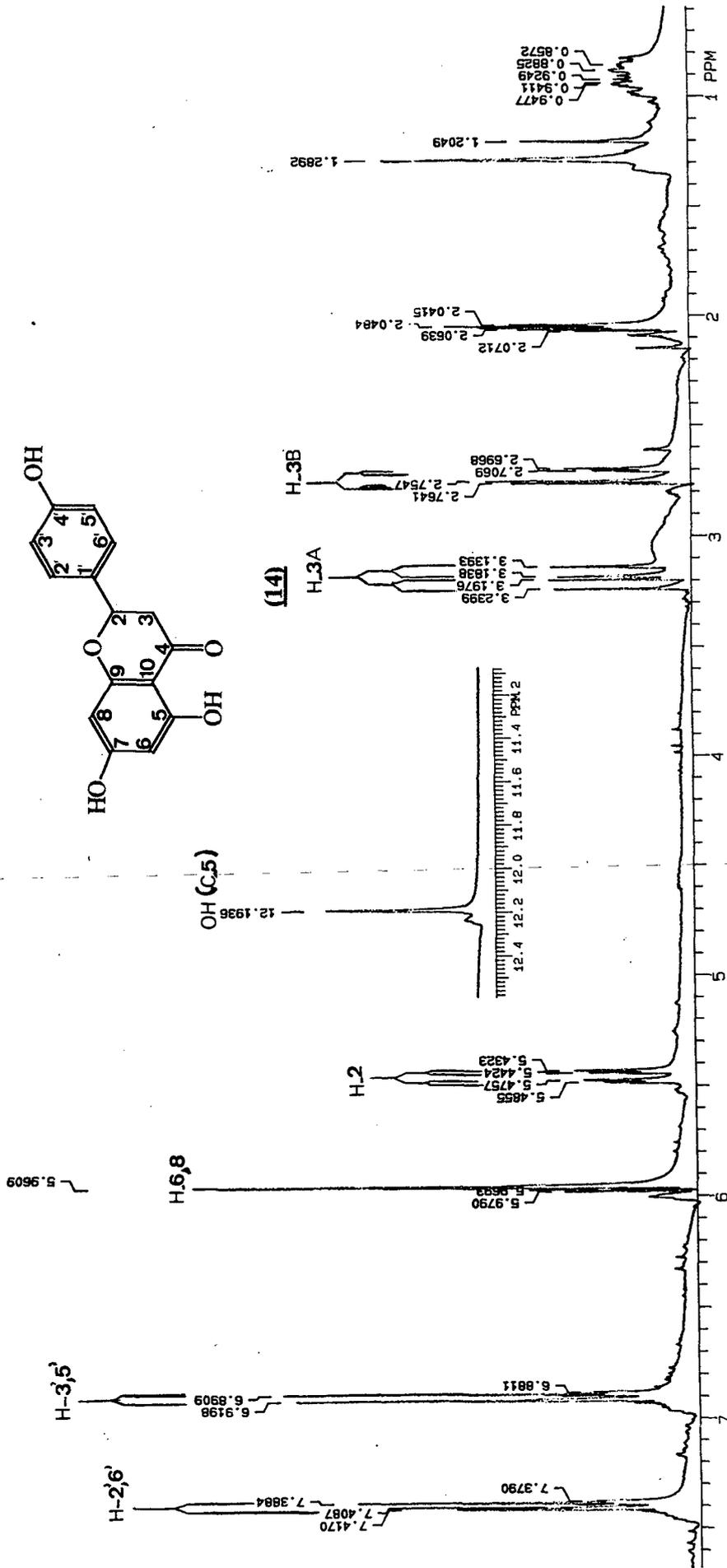


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, de EC-50A (14), em acetona- $\text{d}_6$ .

concluindo a atribuição de sinais para o anel C. Os seis carbonos metínicos dos anéis A e B foram identificados através dos sinais com fase negativa, no espectro APT, em 115.66, para C-3'e C-5' e 127.95 ppm, para C-2'e C-6', no anel B e os sinais em 95.67 e 96.53 ppm, para os carbonos em C-6 e C-8, no anel A.

A flavona naringenina, citada na literatura como antioxidante e antiinflamatório<sup>54</sup>, tem sido isolado principalmente de *Citrus* sp, sendo esta a primeira descrição deste composto constituinte de uma espécie da família Loranthaceae.

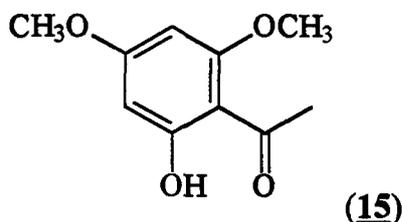
**Tabela 14.** Dados de RMN de <sup>13</sup>C dos flavonóides ES-71 (**13**) e EC-50A (**14**) isolados dos extratos de *E. ambiguum* (75 MHz, TMS)

<i>C</i>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	81.63	79.13
<b>3</b>	67.28	43.12
<b>4</b>	28.60	196.11
<b>5</b>	155.83*	157.42
<b>6</b>	95.08	95.61*
<b>7</b>	156.15*	161,50
<b>8</b>	94.37	96.53*
<b>9</b>	-156.67	163.33
<b>10</b>	99.56	112.30
<b>1'</b>	131.09	120.55
<b>2'</b>	114.20**	127.95
<b>3'</b>	144.65	115.66
<b>4'</b>	144.67	163.33
<b>5'</b>	114.68**	115.66
<b>6'</b>	118.98	127.95

\*, \*\* intercambiáveis

#### 4.1.7. Análise da fração EC-30, xantoxilina (15), do extrato clorofórmico de *E. ambiguum*.

Do refração do extrato clorofórmico (Capítulo 3, Tabela 3, p. 16), obteve-se um composto incolor, solúvel em clorofórmio, que foi denominado EC-30. As análises espectroscópicas permitiram identificá-lo como sendo a 2,4,-OMe,6 -OH-acetofenona (15).



O espectro de massas de EC-30 apresentou pico íon molecular  $[M^+]$  à  $m/z$  196 (80%), de acordo com a fórmula molecular  $C_{10}H_{12}O_4$ . A análise do espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 15) indicou a presença de grupos metílicos, através dos singletes à 2.61, 3.82 e 3.85 ppm (3 H, cada). Essas posições de ressonância sugerem, respectivamente, a presença de uma metila ligada a grupo carbóxi e duas metoxilas. Na região correspondente a hidrogênios ligados am carbonos  $sp^2$ , observa-se somente dois sinais à  $\delta$  5.91 e 6.05 ( $J=2.4$  Hz) relativos a um sistema AB, com típico acoplamento de prótons em posições meta, indicando anel aromático tetra-substituído. Essa proposição foi corroborada pela análise do espectro de RMN de  $^{13}C$  (Figura 16), que apresentou sinais para 6 carbonos  $sp^2$ , com deslocamentos químicos em perfeita concordância com os dados acima sugeridos ( $\delta$  162.92 e 166.1 e 167.6, para os carbonos contendo funções oxigenadas e 90.74 e 93.02, para os carbonos protonados C-3 e C-5). Ainda, no espectro de RMN de  $^{13}C$ , confirma-se a presença de duas metoxilas, através do sinal em 55.5 ppm. O grupo metílico em posição  $\alpha$  à carbonila é observado, em 32.9 ppm. Enfim, um sinal em 203.1 ppm indicou a presença de um grupo cetona, com típica posição de ressonância. Essas análises espectroscópicas permitiram atribuir-se a estrutura 15, para o composto EC-30, que corresponde a 2-,6-, OMe, 4-,OH-acetofenona (xantoxilina)<sup>29</sup>. Esse composto, bem como alguns derivados, tem demonstrado relevante atividade antiespasmódica<sup>55</sup>.

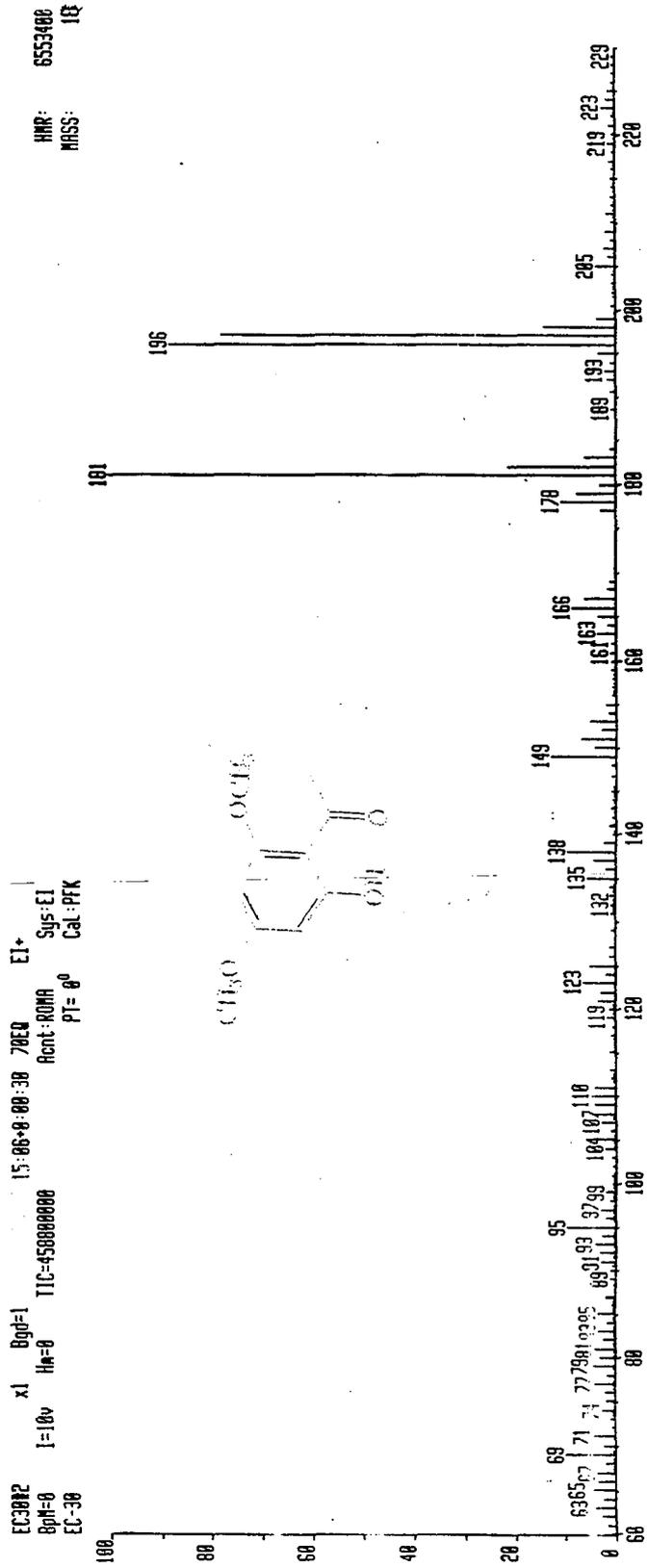


Figura 14. Espectro de massas de EC-30, 15 (EI, 70eV)

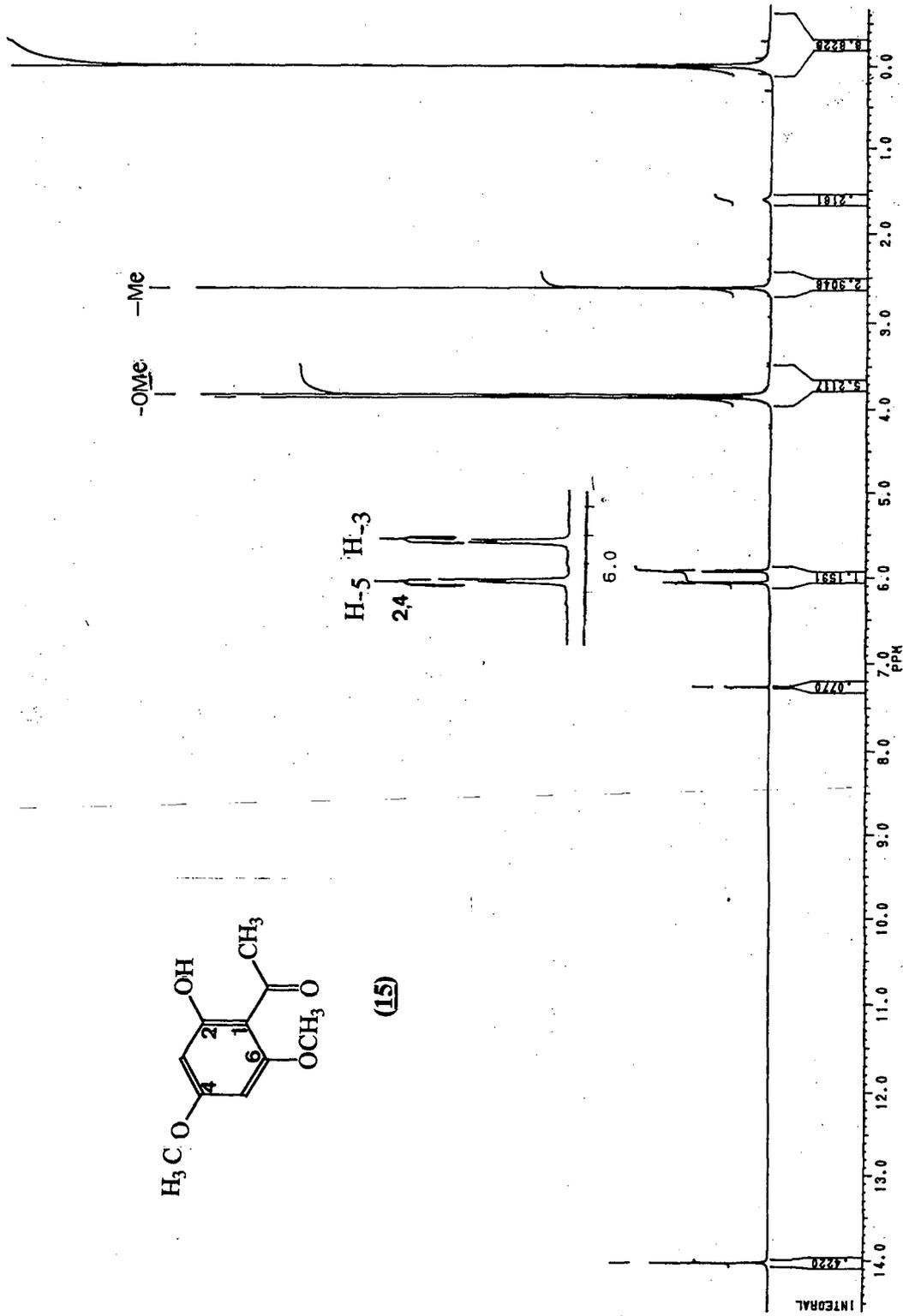
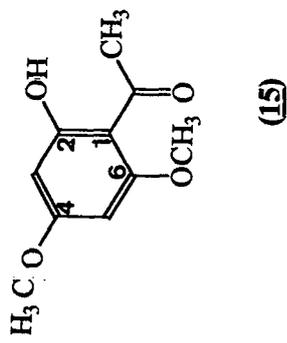


Figura 15. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de EC-30 (15), em CDCl<sub>3</sub>.

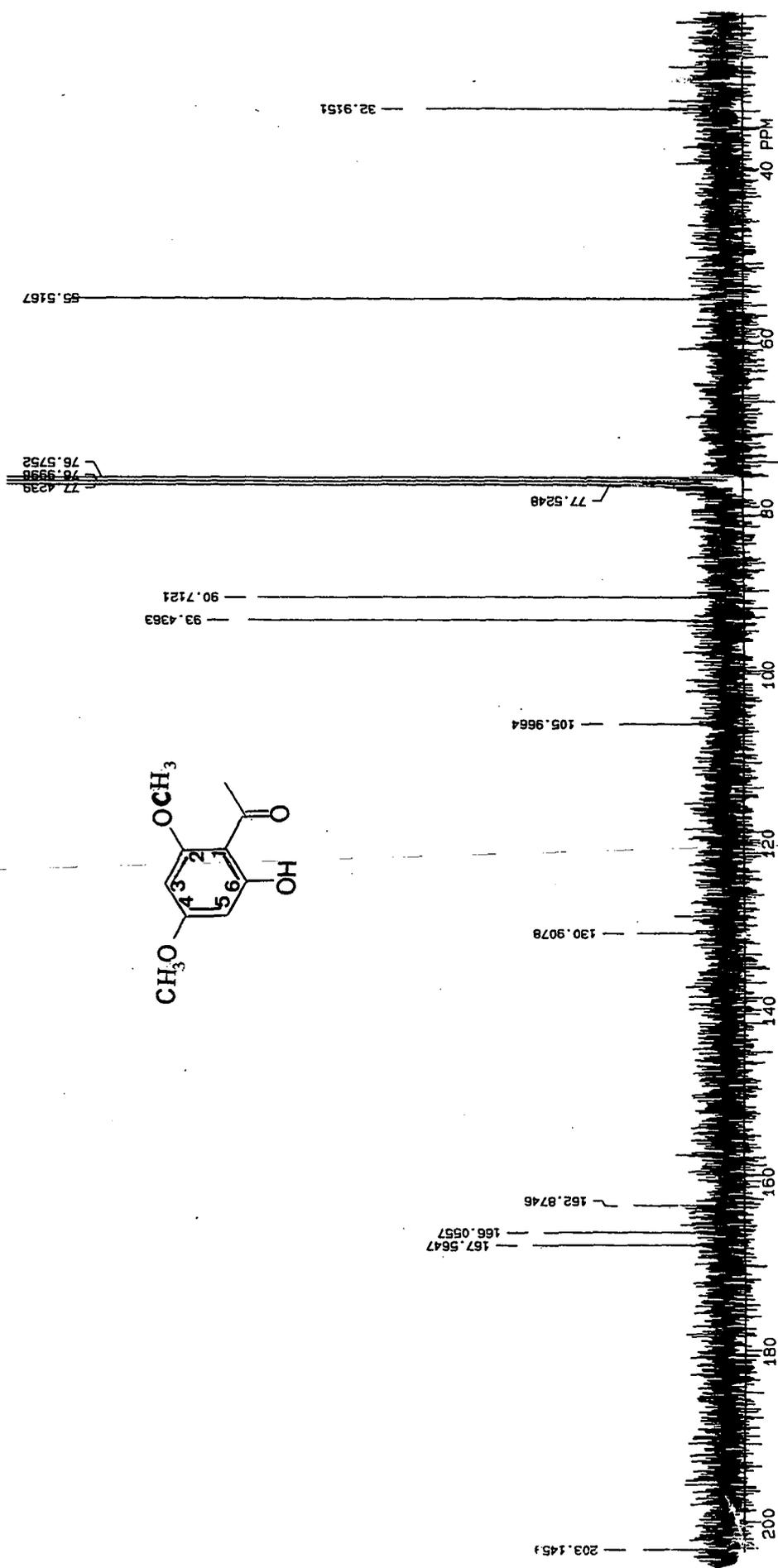
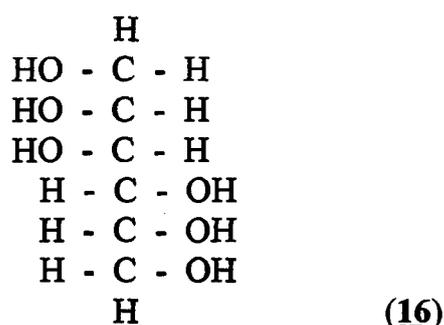


Figura 16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , à 75.5 MHz, de EC-30 (**15**), em  $\text{CDCl}_3$

**4.1.8. Investigação da fração SL1, isolamento do poliol manitol (16) - precipitado do extrato metanólico (extrato bruto) de *E. ambiguum*.**

A fração SL1, obtida do extrato bruto de *E. ambiguum*, (Capítulo 3, p. 6), foi tratada com acetona-água, diversas vezes, até recristalização de um composto incolor, cujos cristais apresentaram-se com formatos aciculares e fundiram a 165 °C. Foi denominado INS-164 e o rendimento obtido foi de 18.6 %, com relação ao peso do extrato bruto e 0.8 %, em relação ao peso de planta seca.

A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 15), permitiram deduzir-se que INS-164 trata-se do poliol denominado MANITOL <sup>56</sup> (16).



**Tabela 15.** Deslocamentos químicos em RMN de  $^{13}\text{C}$  para INS-165, em comparação com dados da literatura <sup>53</sup>.

<i>C</i>	<i>INS-164</i> (75 MHz; em $D_2O$ )	<i>Manitol</i> (em DMSO)
<b>C-1; C-6</b>	66.03	64.60
<b>C-3; C-4</b>	72.05	70.07
<b>C-2; C-5</b>	73.60	72.20

**4.1.9. Identificação de uma mistura de ácidos graxos (AG-9, EH-21 e AH-01), presentes na fração hexano de *E. ambiguum*.**

A mistura de ácidos graxos, obtida através de sucessivos fracionamentos do extrato hexano (Capítulo 3, Tabelas 1 e 2, p.8 e 10), foi metilada em uma solução de diazometano em éter etílico, e seus ésteres derivados analisados através de cromatografia gasosa. Assim, determinou-se qualitativamente a natureza dos compostos, bem como

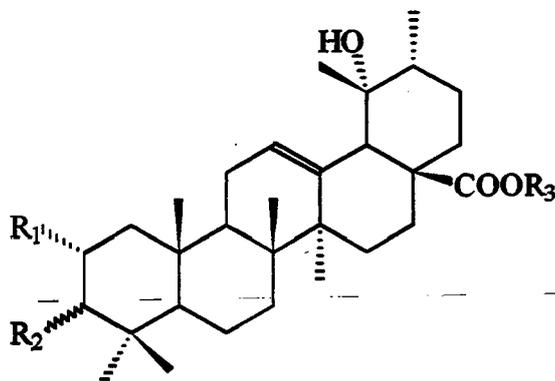
identificou-se suas proporções relativas. Estes dados estão relacionados na Tabela 13 (p. 61).

## 4.2. Compostos isolados dos extratos de *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas.

Os extratos brutos obtidos das folhas, caule e raízes de *C. catharinensis*, sofreram vários fracionamentos em colunas de sílica gel, permitindo o isolamento e a determinação estrutural de vários compostos puros, que são descritos a seguir.

### 4.2.1. Triterpenos ácidos di- ou tri-hidroxilados isolados de *C. catharinensis*

Dos extratos brutos de *C. catharinensis* isolou-se e identificou-se uma série de quatro triterpenos pentacíclicos derivados do ácido ursólico (**25**), que constituem dois pares de isômeros configuracionais, DE-2, K-31, AB-6 e BB-5. As estruturas **17** - **20** propostas, para esses compostos, foram determinadas com base em estudos espectroscópicos e reações químicas.



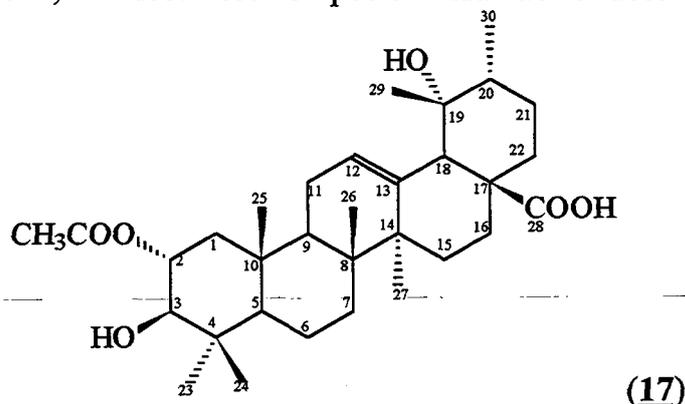
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>(17)</b>	α-OAc	β-OH	H
<b>(17a)</b>	α-OAc	β-OAc	H
<b>(18)</b>	α-OH	β-OH	H
<b>(18a)</b>	α-OH	β-OH	Me
<b>(18b)</b>	α-OAc	β-OAc	H
<b>(19)</b>	α-OAc	α-OH	H
<b>(19a)</b>	α-OAc	α-OAc	H
<b>(20)</b>	α-OH	α-OH	H
<b>(20a)</b>	α-OH	α-OH	Me
<b>(20b)</b>	α-OAc	α-OAc	H

#### 4.2.1.1. Identificação dos ácidos 2 $\alpha$ -OAc,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -dihidróxi, urs-12-eno, 28-óico (17), DE-2 e 2 $\alpha$ -,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -trihidróxi, urs-12-eno, 28-óico (18), K-31

Os compostos DE-2 e K-31 formam um par de derivados trissubstituídos (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ) do ácido ursólico (25)<sup>57</sup>. Em K-31 (17), temos a presença de três grupos OH ( em posições C-2, C-3 e C-19), ao passo que DE-2 (18) apresenta dois grupos hidróxi (em posições C-3 e C-19), e um grupo acetóxi (C-2), constituindo-se portanto, num derivado acetilado do composto K-31.

#### DE-2 - ácido 2 $\alpha$ -OAc, 3 $\beta$ , 19 $\alpha$ -dihidróxi, urs-12-eno, 28-óico.

O composto DE-2, isolado dos extratos em hexano das raízes de *C. catharinensis* (Tabela 7; p. 24) foi purificado através de recristalização em acetona, formando cristais aciculares, incolores, que fundiram a 125-128°C. As análises espectroscópicas de DE-2 possibilitaram a atribuição da estrutura 17, que corresponde ao ácido 2 $\alpha$ -OAc, 3 $\beta$ , 19 $\alpha$ -dihidróxi, urs-12-eno, 28-óico. Esse composto ainda não foi descrito na literatura<sup>57</sup>.



O espectro de massas de DE-2, 17, (Figura 17; Esquema 3) mostrou um pico íon molecular [M<sup>+</sup>] à m/z 530, em concordância com a fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub>. Comparando o íon molecular desse composto com aquele de K-31(M<sup>+</sup> a m/z 488), observa-se um incremento de 42 u.m.a., indicando a presença de uma unidade acetil, em DE-2. O íon molecular, após impacto eletrônico, perde grupos CH<sub>3</sub>COOH (presença de grupo acetila, na molécula), H<sub>2</sub>O e HCOOH, originando fragmentos a m/z 470 (a), m/z 512 (b) e m/z 484 (c), respectivamente. A fragmentação descrita (Esquema 3) para DE-2 (17) é típica de cisão de anel C, para derivados da  $\alpha$ -amirina (26)<sup>58,59</sup>, através de reação retro Diels-Alder, para dar origem aos picos e e f, a m/z 265 e 264. O íon e é derivado dos anéis A e B, enquanto que o íon f, é resultante dos anéis D e E, que contém uma função hidroxila não acetilável (o íon b apresenta um acréscimo de 16 u.m.a., com relação a esse mesmo íon, em compostos análogos<sup>58</sup>, sem substituição 19-OH).

CCE21832 x1 80d=31 1-JUL-93 08:22:08:02:31 70-EO EI+  
 S01=8 I=610kv M=0 TIC=65331000 S15:EI  
 C2-2 Cal:PTK PI=0°

HMR: 3999000  
 MASS: 71

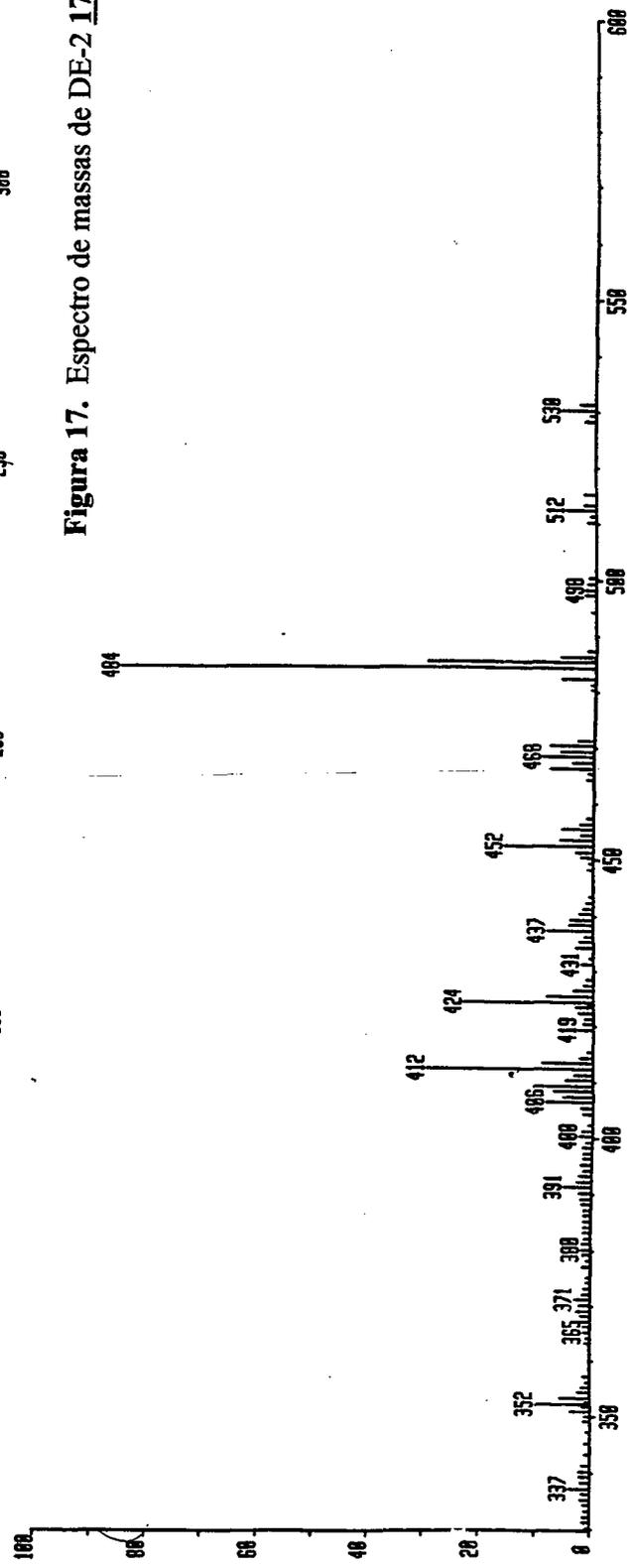
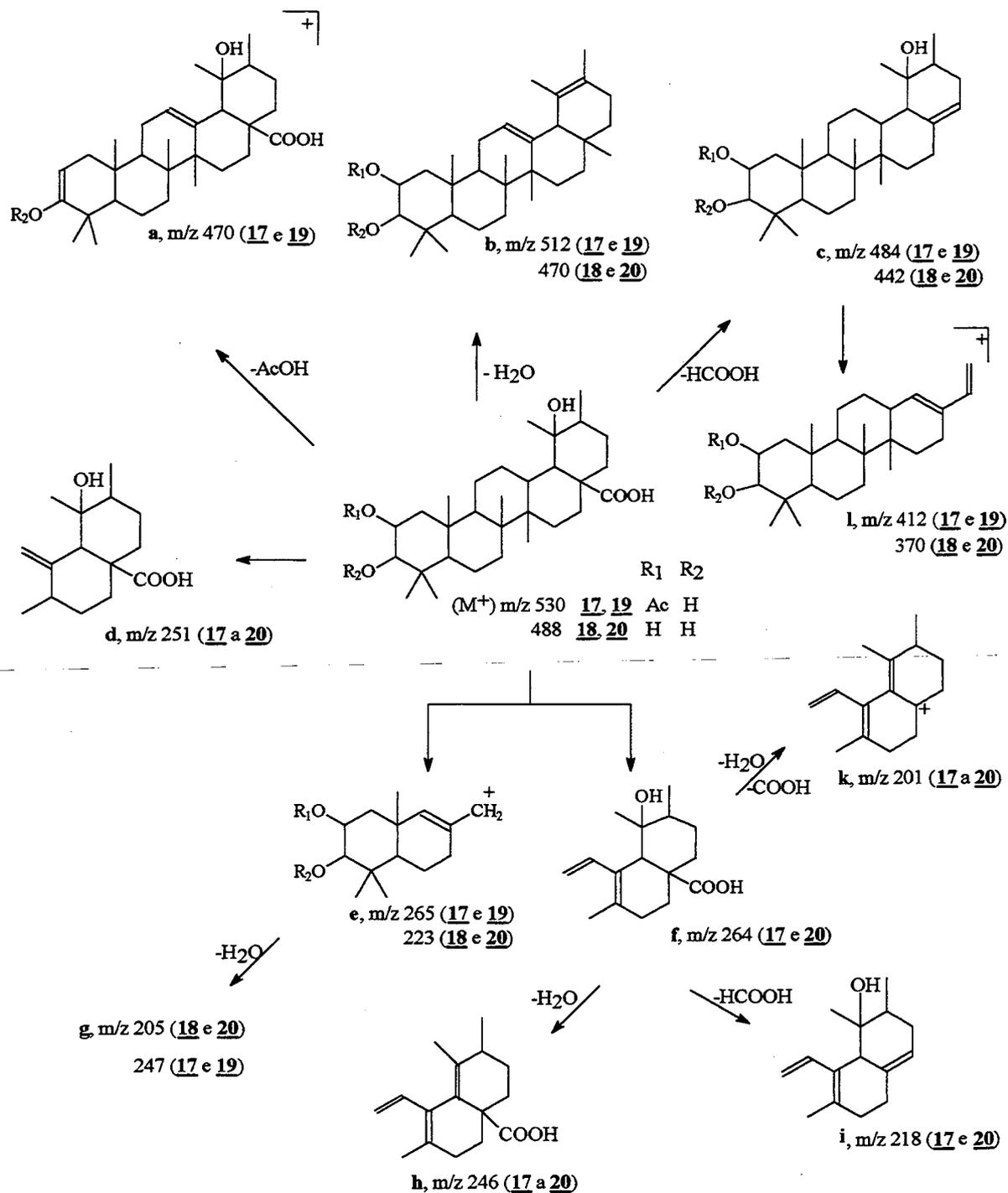


Figura 17. Espectro de massas de DE-2 17, EI (70EV).

**Esquema 3.** Sequência de fragmentação obtida da análise dos espectros de massas de DE-2 (**17**), K-31 (**18**), AB-6 (**19**) e BB-5 (**20**).



Essa funcionalidade (-OH) deve ser atribuída a C-19 ou C-20. A posição em C-20 deve ser eliminada como possibilidade pela observação de um singlete à 2.58 ppm, no espectro de RMN de prótons, que é atribuído ao próton em C-18 ( $\beta$ ). Esses e os demais íons relacionados no esquema 3, permitiram delinear o esqueleto molecular 17, para DE-2 (embora sem permitir a determinação das posições dos grupos OH e OAc).

O espectro de RMN de prótons de DE-2, à 300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , é mostrado na figura 18 (Tabela 16). Na região entre 0.7 e 2.1 ppm, observou-se sinais para seis grupos metilas terciários ( $\delta$  à 0.76, Me-26; 0.86, Me-23; 1.03, Me-24; 1.01, Me-25; 1.21, Me-27 e 1.26 ppm, Me-29) e um grupo metila secundário (0.95 ppm, d,  $J=6.2$  Hz, Me-30). O singlete em 2.07 ppm indicou grupo  $\text{CH}_3$  de sistema acetil. Também observa-se dois prótons carbinólicos à  $\delta$  3.2 (H-3, d,  $J=10.0$  Hz) e 4.95 ppm (H-2, ddd,  $J=3.7, 10$  e  $11.0$  Hz). O último, provavelmente, deve ser ligado em carbono contendo grupo OAc, devido desblindagem característica<sup>60</sup>. As configurações relativas para os prótons metínicos, H-2 (td, d, 4.95;  $J=3.7, 10$  e  $11$  Hz) e H-3 (d,  $\delta=3.2$  ppm;  $J=10$  Hz), foram determinadas de acordo com as medidas das constantes de acoplamento desses prótons<sup>61</sup>. Para esqueletos contendo substituintes em posições 2- $\alpha$ ,3- $\beta$ , espera-se constantes de acoplamento entre 10 e 11 Hz, para o próton H-3, enquanto que para H-2, ocorrem valores de aproximadamente 11, 10 e 4.0 Hz. Assim, foram atribuídas as configuração  $\beta$ -, para OH em C-3, e  $\alpha$ - para OAc em C-2. A posição do segundo grupo hidroxila foi deduzida através do singlete relativo ao grupo Me em C-29 ou C-30 (espera-se dois dubletes para as respectivas metilas, em esqueletos ursanos comuns). Logo, a presença deste singlete confirma que a hidroxila localiza-se em C-19 ou C-20. A posição do grupo OH em C-19 é a escolhida devido a multiplicidade do próton em C-18, um singlete em 2.58 ppm. Outro indicativo dessa posição é que a localização e a configuração  $\alpha$ - de um grupo hidroxila em C-19, induz à deslocamentos com efeito paramagnético nas metilas C-29 e C-27 (vicinal,  $\Delta\delta=0.14$ ; geminal,  $\Delta\delta=0.36$ ; em relação à estruturas análogas)<sup>65</sup>. Também confirma-se através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , onde C-19 aparece como um carbono quaternário (experimento APT), à 72.8 ppm em não em torno de 40 ppm (posição típica em sistemas ursanos sem substituição 19-OH). O sinal, à 5.33 ppm, típico de um próton vinílico, é relativo ao próton em C-12. Os dados acima descritos permitem atribuir um esqueleto do tipo urs-12-en para DE-2, o qual deve conter dois grupos hidróxi e um acetóxi.

A atribuição de sinais em RMN de  $^{13}\text{C}$ , de 17 (Tabela 17), foi realizada através de recursos como espectro totalmente desacoplado (BB), utilizando experimento de sequência de pulso spin-eco (APT), subspectro de correlação heteronuclear (HETCOR, Figura 19) e em comparação com dados da literatura, para compostos semelhantes<sup>62,63</sup>. O espectro APT mostrou um total de 32 carbonos, sendo 17 sinais para carbonos metínicos ou metílicos, e 15 sinais referentes a carbonos secundários ou quaternários.

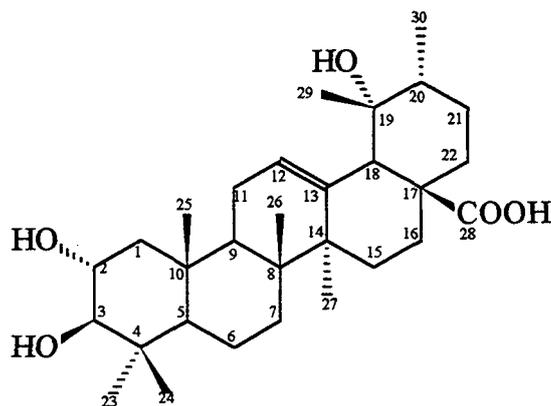
Os três carbonos contendo substituintes -OH, foram identificados no espectro APT, sendo dois terciários (à  $\delta$  73.0 e 80.3 ppm), e um quaternário, em 72.80 ppm (C-19).

Os deslocamentos químicos de C-2 e C-3, foram estabelecidos através de um espectro de correlação heteronuclear (HETCOR; Figura 19), onde os sinais à  $\delta$  3.2 (H-3) e 4.95 ppm (H-2), em RMN de  $^1\text{H}$ , correlacionam respectivamente, com os sinais à 80.36 (C-3) e 73.01 ppm (C-2). Também o dublete à 0.95 ppm, relativo a metila em C-30, teve seu deslocamento químico, em RMN de  $^{13}\text{C}$ , confirmado através da conectividade com o sinal à 15.87 ppm (comprovando blindagem de aproximadamente 5.0 ppm com relação à esqueletos tipo  $\beta$ -amirina<sup>26</sup>). Essas e outras conexões entre os sinais dos carbonos e os respectivos prótons produzem evidências inequívocas para atribuição da estrutura **17**.

Os deslocamentos químicos em RMN de  $^{13}\text{C}$ , para DE-2, estão listados na Tabela 17.

### K-31 - ácido $2\alpha$ -, $3\beta$ , $19\alpha$ -trihidróxi, urs-12-eno, 28-óico.

O composto K-31 foi obtido através do fracionamento do extratos em diclorometano e acetato de etila, do caule e raízes de *C. catharinensis* (Capítulo 3, Tabela 7, p. 24). Apresentou-se como um composto cristalino, de coloração amarelo-claro, que fundiu entre 270-275 °C. As análises espectroscópicas sugeriram a estrutura **18**, para K-31, que corresponde ao ácido  $2\alpha$ -,  $3\beta$ ,  $19\alpha$ -trihidróxi, urs-12-eno, 28-óico, isolado anteriormente da espécie *Tormentilla potentilla*, com a denominação de ácido tormêntico<sup>64,65,82</sup>.



O espectro de massas de K-31 apresentou íon  $[\text{M}^+]$  à  $m/z$  488, condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ , e indicativo da presença de um grupo acetil quando comparado ao composto DE-2 ( $\text{M}^+$ ,  $m/z$  530). A sequência de ionização delineada para K-31 demonstra uma fragmentação característica para triterpenos tipo ursano, conforme proposto por Djerassi<sup>58</sup>, onde uma clivagem no anel C, conduz ao íon  $\underline{e}$ , a  $m/z$  223, que

identifica os anéis A e B (perde uma molécula de H<sub>2</sub>O e libera o íon **g** a m/z 205), e ao íon **f**, a m/z 264, que retém a estrutura dos anéis D e E. Entretanto, o íon **f** sujeitou-se ainda a subsequentes decomposições com perdas de grupos COOH e H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O e HCOOH, para resultar nos picos à m/z 201 (**k**), m/z 246 (**h**), e m/z 218 (**i**), respectivamente. A perda do um grupo carboxílico angular, em C-28, levou a formação do íon à m/z 442 (**c**), que através de uma ruptura suplementar no anel E, conduz ao íon a m/z 370 (**l**). Esses e outros íons estão relacionados no Esquema 3, p. 75.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do éster metílico de K-31, à 300 MHz, em CDCl<sub>3</sub> é mostrado na Figura 20 (Tabela 16). As atribuições de sinais foram realizadas com auxílio dos espectros de DE-2 (Figuras 18 e 19) e dados da literatura<sup>63,64</sup>. Na região espectral referente à grupos metílicos observou-se sinais à δ 0.67 (3H, s, Me-26); 0.82 (3H, s, Me-24); 0.93 (3H, d, J=6.6 Hz, Me 30); 0.95 (3H, s, Me-23); 1.02 (3H, s, Me-25); 1.21 (3H, s, Me-27) e 1.25 (3H, s, Me-29). O singlete à δ 2.60 ppm (1H), foi atribuído ao próton metínico H-18, sugerindo uma função hidroxila em C-19, e não em C-20, pois nesse caso a multiplicidade de H-18 seria um dublete. Isto é ainda confirmado pela presença de um singlete, atribuído à Me-29, que apresenta-se como um dublete em ursanos análogos. Os sinais à δ 3.01 (d, J=10 Hz) e à 3.7 ppm (dt, J=4.0, 10 e 13 Hz) indicaram substituições de grupos OH em C-3 e C-2, respectivamente. Constantes de acoplamento com essas grandezas observadas, sugerem uma relação trans, para os dois grupos OH, determinando que a estereoquímica do diol deve ser 2α-,3β-. O sinal em 5.35 ppm (t, 3.5 Hz) refere-se ao próton vinílico em C-12, que acopla com os prótons metilênicos em C-11.

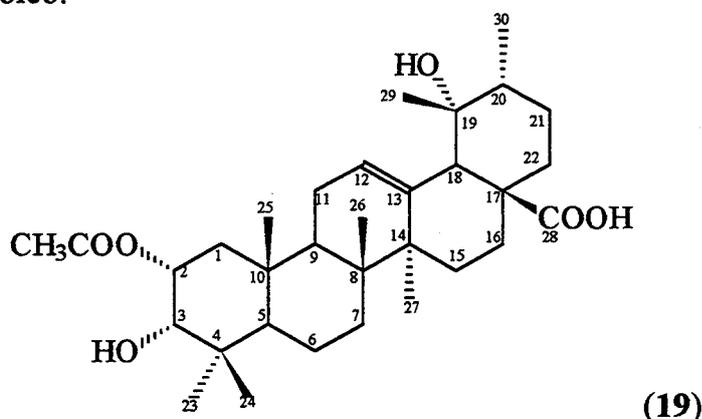
Os dados obtidos da análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (BB e APT; Figura 18, p. 82) do éster metílico de K-31(**18-a**), à 75.5 MHz, em CDCl<sub>3</sub>, são mostrados na Tabela 17. Os sinais foram atribuídos com base em dados da literatura<sup>62</sup> e em comparação com compostos modelo (DE-2). O espectro APT de K-31Me (Figura 21) mostrou um total de 31 carbonos sendo 16 carbonos secundários ou quaternários (fase positiva) e 15 primários ou terciários (fase negativa). Os deslocamentos químicos de todos os carbonos presentes na estrutura **18** (Tabela 17, p.95).

#### 4.2.1.2. Identificação dos ácidos 2α-OAc,3α-, 19α-dihidróxi,urs-12-eno,28-óico (**19**), AB-6 e 2α-,3α-, 19α-trihidróxi,urs-12-eno,28-óico (**20**), BB-5.

AB-6 e BB-5 são dois triterpenos pentacíclicos 2-α,3-α,19-α tri-substituídos, derivados do ácido ursólico (**25**)<sup>67</sup>. A diferença entre esses dois compostos está na substituição de um grupo hidróxi, em BB-5 (**20**), por um grupo acetil, em AB-6 (**19**). Portanto, formam um par de isômeros (2α-,3α-,19α-) dos compostos K-31, **18** e DE-2, **17** (2α-,3β-,19α-).

### AB-6 - ácido 2 $\alpha$ -OAc, 3 $\alpha$ , 19 $\alpha$ -dihidróxi,urs-12-eno,28-óico.

O composto AB-6 foi obtido do fracionamento dos extratos em diclorometano e em acetato de etila, respectivamente, das raízes e do caule, de *C. catharinensis* (Capítulo 3, Tabela 7, p.24 ). Após recristalizado em acetato de etila, apresentou-se como cristais incolores, que fundiram a 126-130 °C. As análises físicas realizadas em AB-6 indicaram a estrutura **19**, que corresponde ao ácido 2 $\alpha$ -OAc, 3 $\alpha$ , 19 $\alpha$ -dihidróxi,urs-12-eno,28-óico.



O espectro de massas de AB-6 (Esquema 3, p. 75) mostrou um pico íon molecular ( $M^+$ ) à  $m/z$  530, sugerindo a fórmula molecular  $C_{32}H_{50}O_6$ . O mecanismo de fragmentação delineado para AB-6, é típico de triterpenos pentacíclicos com esqueleto tipo ursano, de acordo com o padrão sugerido por Djerassi<sup>58,59</sup>. Esse espectro apresentou uma sequência de fragmentação praticamente idêntica ao espectro de massas de DE-2 (**17**), sugerindo que esses compostos possam tratar-se de dois isômeros.

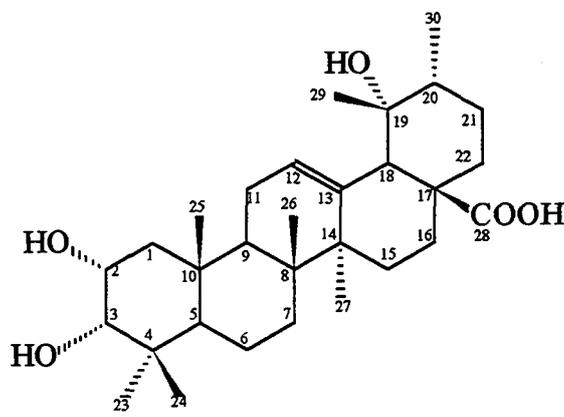
O espectro de RMN de prótons de AB-6 (Figura 22; Tabela 16, p. 94), apresentou valores de deslocamentos químicos muito similares com os de DE-2. Na região de metilas observou-se seis sinais característicos de metilas terciárias à  $\delta$  0.71 (3H, s, Me-26); 0.89 (3H, s, Me-23); 1.03 (3H, s, Me-24); 1.19 (3H, s, Me-25); 1.25 (6H, s, Me-27 e 29) e um sinal de metila secundária à 0.94 ppm (3H, d,  $J=6.6$  Hz). o sinal à 2.07 ppm (3H, s,  $CH_3COO-$ ), identifica uma função -OAc, no esqueleto molecular **19**. Como em DE-2 (**17**) e K-31 (**18**), a presença de um único dublete (em 0.94 ppm), indica sistema triterpênico tipo ursano com uma função hidroxila em C-19 ou C-20. Essa hipótese é confirmada pelo singlete em 2.53 ppm, cuja multiplicidade permite definir a posição C-19, para o substituinte -OH. O sinal à 73.0 ppm (C quaternário, espectro APT), no espectro de RMN de  $^{13}C$ , também corrobora para essa afirmação. Os sinais à  $\delta$  3.48 (1H, d,  $J=2.5$  Hz) e 5.22 ppm (1H, dt,  $J=2.5, 4.0$  e 12 Hz) foram atribuídos aos prótons carbinólicos H-3 e H-2, respectivamente. A principal diferença entre os espectros de RMN de  $^1H$  de AB-6 (**19**) e DE-2 (**17**) está numa pequena blindagem para os sinais referentes aos prótons metínicos H-2 e H-3 (Tabela 16), e principalmente nos valores das constantes de acoplamento desses prótons. Esses dados foram coerentes com a conclusão

de que os compostos DE-2 e AB-6 formam um par de isômeros, que apresentam diferentes configurações para os substituintes em C-3 ( $\beta$ -, para DE-2 e  $\alpha$ -, para AB-6). As configurações relativas em C-2 e C-3, em AB-6, foram atribuídas de acordo com as medidas das constantes de acoplamento. Assim, o próton metínico em C-2 ( $\delta=5.22$  ppm) exibe  $J= 2.5, 4.0$  e  $12$  Hz, enquanto o secundo próton metínico, em C-3 ( $\delta=3.48$  ppm), apresenta uma constante de acoplamento de  $2.5$  Hz. Esses valores são característicos de substituições em posições  $\alpha$ -,  $\alpha$ -, para prótons em C-2 e C-3, respectivamente. O grupo olefínico em C-12 foi identificado pelo sinal à  $5.35$  ppm ( $1H,t, J=3.5$  Hz) atribuído ao próton H-12.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  de AB-6, à  $75.5$  MHz, em  $CDCl_3$ , (BB e APT; Tabela 17, p. 95) mostrou um total de 32 carbonos, que foram atribuídos com auxílio de espectros de compostos análogos (DE-2, BB-5 e K-31). As funções -OAc e -OH, ligadas aos átomos de carbonos terciários C-2 e C-3, foram confirmadas através dos sinais em  $71.1$  e  $76.8$  ppm, respectivamente (fase negativa, espectro APT). O grupo OH, presente em C-19 foi caracterizado pelo sinal em  $73.0$  ppm (fase positiva; APT; carbono quaternário). Os sinais à  $\delta$   $167.43$  (MeCOO-) e  $170.2$  ppm (C-28) confirmaram os grupos carbonílicos do grupo acetóxi e da função ácido carboxílico, respectivamente. A Tabela 17, mostra os deslocamentos químicos em RMN de  $^{13}C$ , para todos os carbonos presentes na estrutura (19) proposta, ainda não descrita na literatura .

#### BB-5 - ácido $2\alpha$ -, $3\alpha$ -, $19\alpha$ -trihidróxi,urs-12-eno,28-óico (20).

O composto BB-5 foi isolado dos extratos em acetato de etila, do caule, folhas e raízes de *C. catharinensis* (Tabela 7, p 24). Foi recristalizado em clorofórmio, formando cristais aciculares, de coloração amarelo-claro, que fundiram a  $255-260$  °C. As análises espectroscópicas e reações de derivatização realizadas em BB-5, permitiram identificá-lo como o ácido  $2\alpha$ -,  $3\alpha$ -,  $19\alpha$ -trihidróxi,urs-12-eno,28-óico (20), já isolado anteriormente, da espécie *Euscaphis japonica*, com a denominação de ácido euscaphico<sup>60</sup>.



Seu espectro de massas (Figura 23, p. 87; Esquema 3, p. 75) mostrou um pico íon molecular [ $M^+$ ] à  $m/z$  488, sugerindo a fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_5$ . A sequência de fragmentação observada, indicou um mecanismo de formação de íons praticamente

idêntico aquele proposto para K-31. Esse foi um indicativo de que esses dois compostos poderiam tratar-se de um par de isômeros configuracionais.

O espectro de RMN de  $^1H$  do éster metílico de BB-5 (**20a**), à 300 MHz, em  $CDCl_3$ , é mostrado na figura 24 (Tabela 16, p. 94). Os seis singletes a  $\delta$  0.66 (3H, Me-26); 0.86 (3H, Me-24); 0.95 (3H, Me-25); 1.02 (3H, Me-23), 1.21 (3H, Me-27) e 1.25 ppm (3H, Me-29), foram atribuídos aos grupos metílicos terciários presentes em **20** e **20a**. O dublete em 0.94 ppm (3H,  $J=6.6$  Hz, Me-29) indicou sistema ursano substituído em C-19, que foi confirmado pelo singlete à 2.53 ppm (H-18). Esse espectro mostrou-se bastante semelhante aquele de K-31 (Figura 20; Tabela 16), sendo que a principal diferença foi observada para os sinais referentes a função diol, onde os prótons metínicos H-3 e H-2 foram atribuídos à  $\delta$  3.42 (1H, d,  $J=3.0$  Hz) e 4.02 ppm (1H, dt,  $J=3.0, 4.3$  e 11.8 Hz), respectivamente, com  $\Delta\delta = 0.4$ , comparando com os mesmos prótons em K-31. A estereoquímica do diol,  $2\alpha-$ ,  $3\alpha-$ , foi atribuída com base nas medidas das constantes de acoplamento, cujos valores (3.0, 4.3 e 11.8 Hz) indicaram uma relação *cis*, para esses dois grupos em BB-5, **20**, (para K-31,  $2\alpha-$  e  $3\beta-$ ;  $J=4.0, 11$  e 13 Hz).

Os dados obtidos da análise dos espectros de RMN de  $^{13}C$  (BB e APT) do éster metílico de BB-5(**20a**), possibilitaram a atribuição de todos os sinais, (Tabela 17), confirmando a estrutura **20** (e **20a**) proposta, que corresponde ao derivado  $2\alpha-OH$  de AB-6 e ao isômero configuracional de K-31 (**18**).

Todos os compostos pertencentes a esta série de derivados di- e tri-hidroxilados, foram metilados com solução de diazometano, em éter etílico, comprovando-se a presença das funções ácidos carboxílicos, nas posições em C-28<sup>69</sup>. Também realizou-se reações de acetilação, nos quatro compostos da série, obtendo-se os derivados **17a**, **18b**, **19a** e **20b**. As análises comparativas entre esses compostos tiveram as seguintes finalidades: -comprovar-se a substituição de um grupo OH em C-19, através da impossibilidade de acetilar-se a função álcool nessa posição estericamente impedida -a acetilação dos pares BB-5 - AB-6 e K-31 - DE-2, comprovou que dentro de cada par os compostos apresentam as mesmas configurações relativas, diferindo entre si somente pela presença de um grupo acetil, pois após a reação, cada par apresentou o mesmo RF, em CCD (0.75, clorofórmio; para BB-5 e AB-6; 0.55, clorofórmio, para K-31 e DE-2).



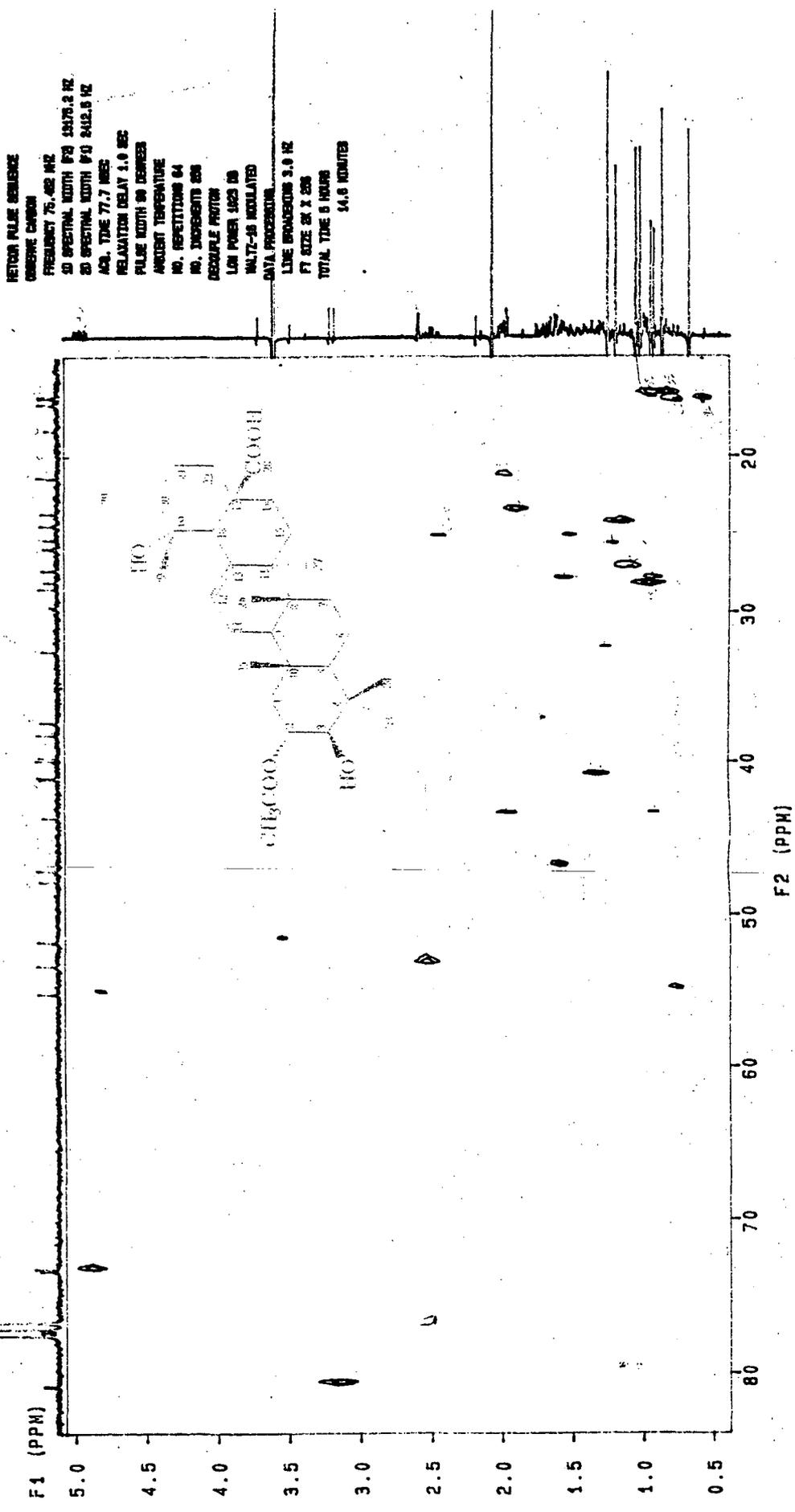


Figura 19. Espectro de correlação heteronuclear-2D ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ; HETCOR), de DE-2 (**17**), em

$\text{CDCl}_3$ .



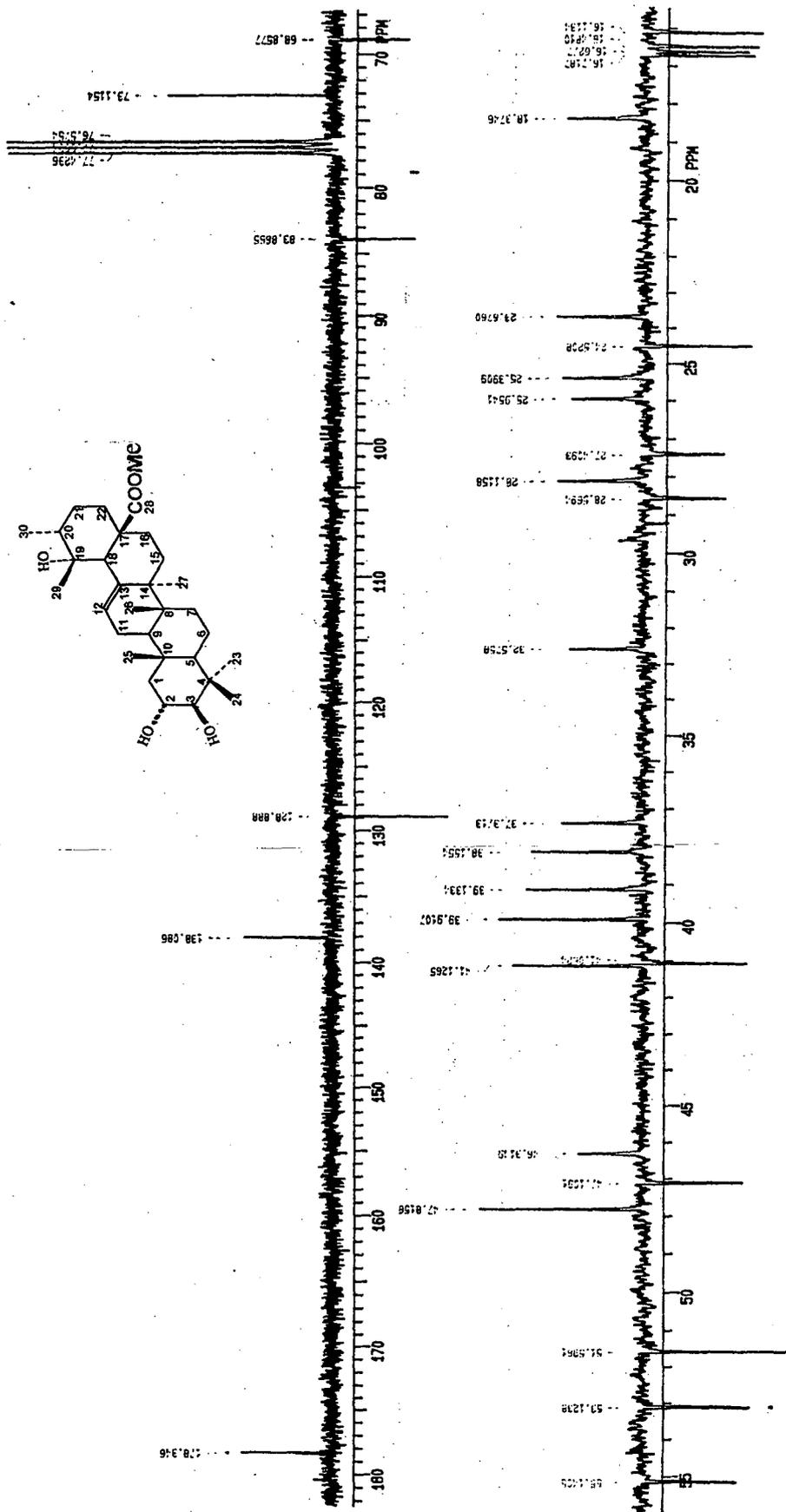


Figura 21. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , à 75.5 MHz, do éster metílico de K-31 (18-a), em  $\text{CDCl}_3$ .

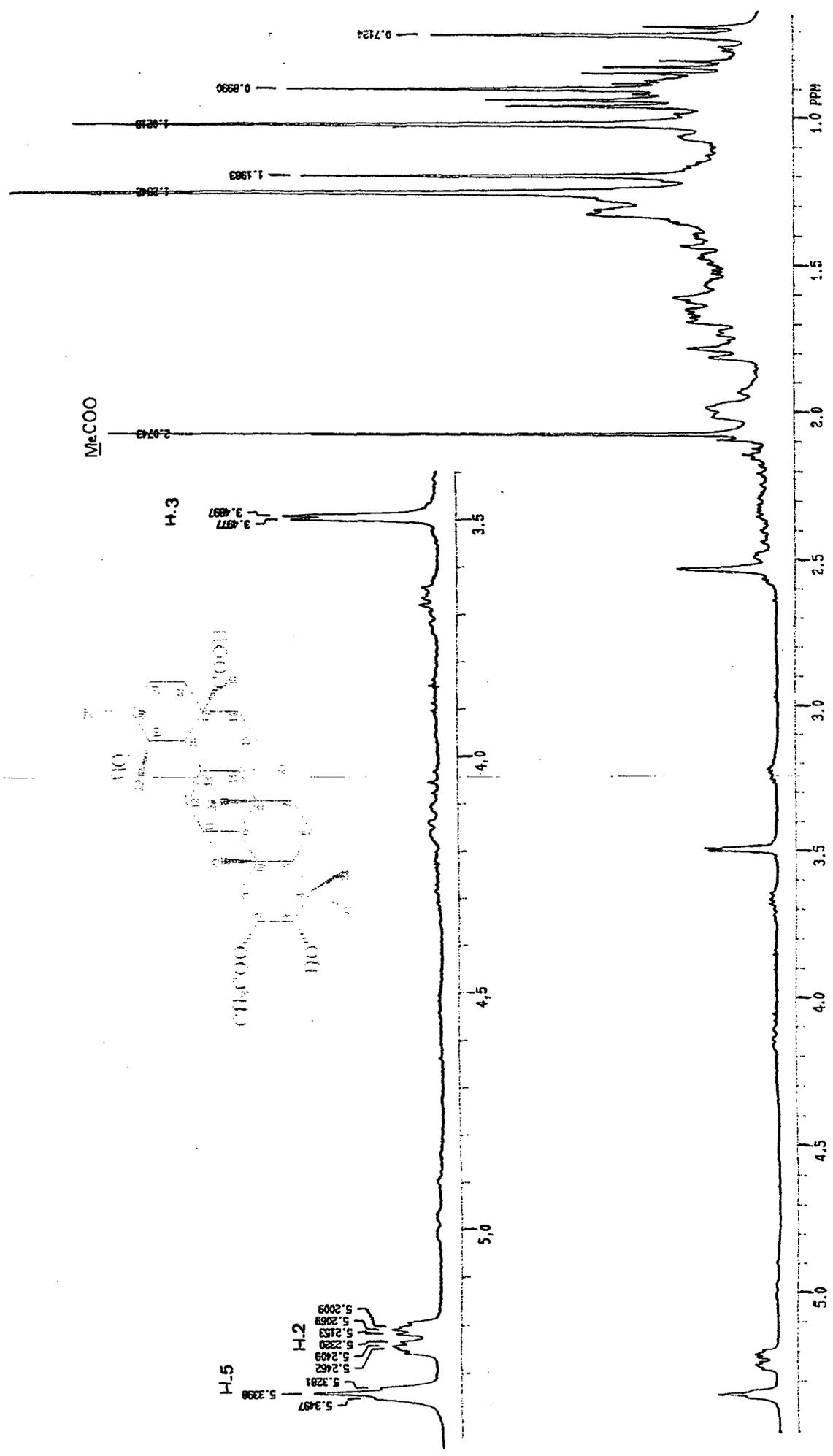


Figura 22. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, à 300 MHz, de AB-6 (19), em CDCl<sub>3</sub>.

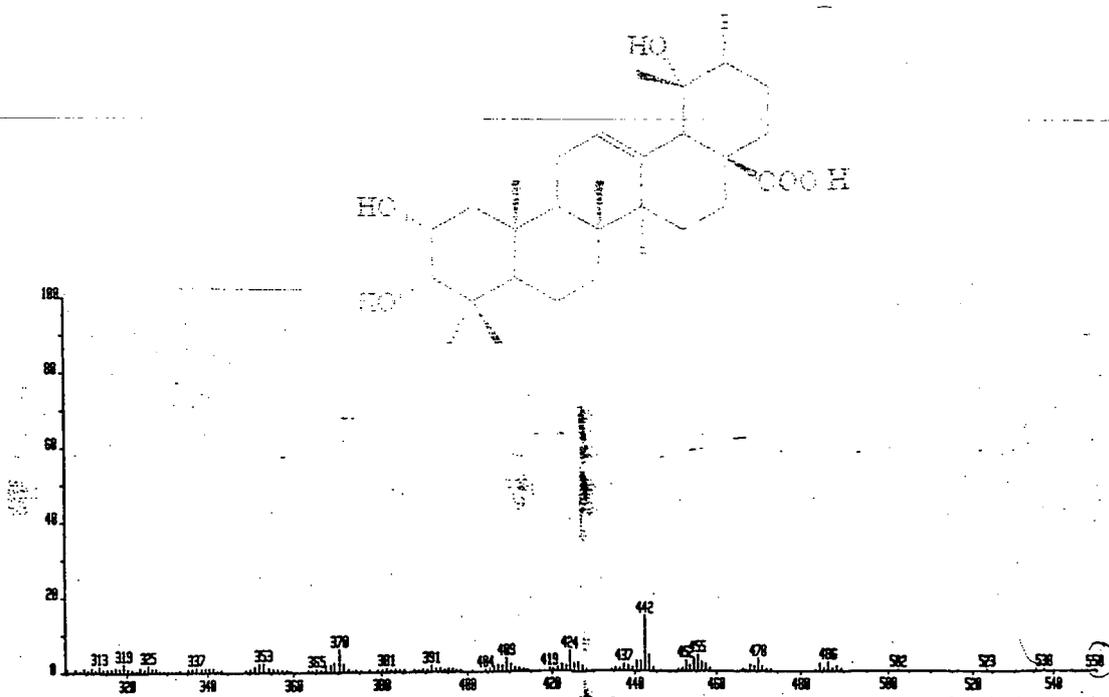
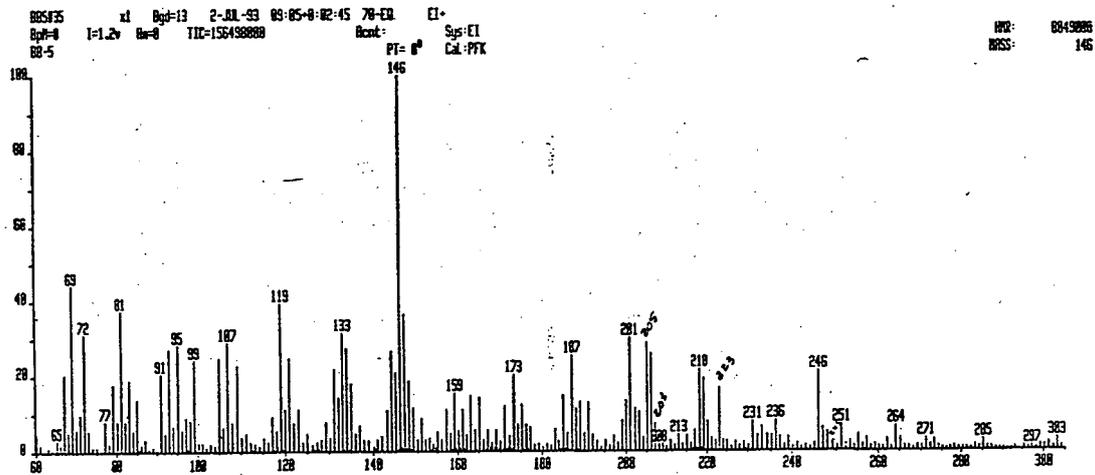


Figura 23. Espectro de massas de BB-5, 20 (EI70EV)

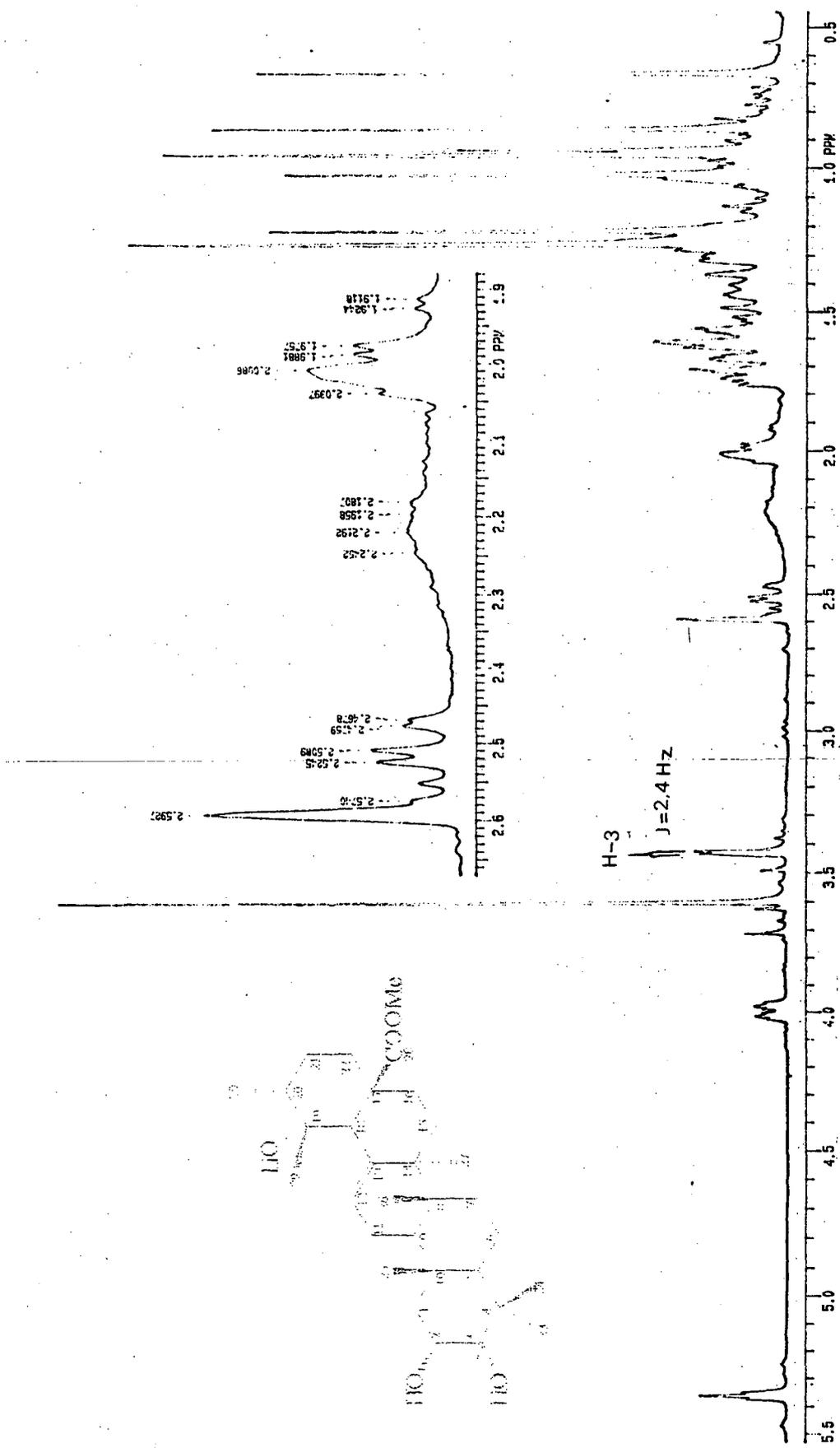
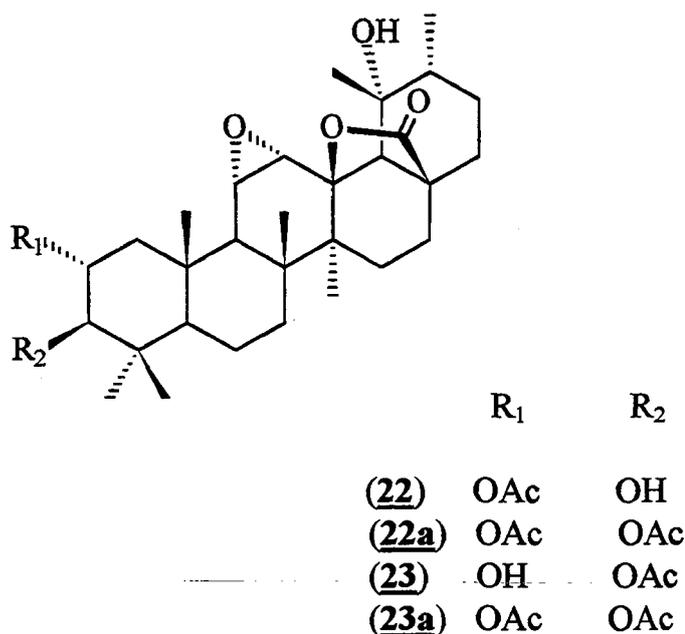


Figura 24. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, do éster metílico de BB-5 (20a), em  $\text{CDCl}_3$

**4.2.2. Isolamento e identificação estrutural dos ácidos 2 $\alpha$ -acetóxi, 3 $\alpha$ -19 $\alpha$ -dihidróxi, 11,12-epóxi, 13-17,lactona (22), A-33 e 3 $\alpha$ -acetóxi,2 $\alpha$ -19 $\alpha$ -,dihidróxi, 11,12-epóxi, 13-17,lactona (23), EC-6.**

A fração 7-15 (Tabela 7; p. 24), obtida por fracionamento do extrato em diclorometano das raízes de *C. catharinensis*, foi putificada através de coluna de sílica gel, eluída com hexano-acetato de etila, permitindo o isolamento e a identificação de duas substâncias isoméricas, representadas estruturalmente pelas fórmulas 22 e 23.



Os espectros de massas de EC-6 e A-33 (A-33, Figura 25, p. 90; Esquema 4, p. 91) apresentaram o mesmo pico íon molecular, de baixa intensidade, à  $m/z$  544, correspondendo a fórmula molecular  $C_{32}H_{48}O_6$ . Os dois espectros mostraram mecanismos de fragmentação praticamente idênticos, sugerindo a presença de compostos isoméricos. A análise desses espectros mostrou inicialmente perdas de  $H_2O$  ( $m/z$  526,  $M^+ - 18$ ) e  $HOAc$  ( $m/z$  484,  $M^+ - 60$ ), comuns em triterpenos pentacíclicos contendo funções  $-OH$  e  $-OAc$ , respectivamente. Os demais íons permitiram delinear uma sequência de fragmentação com prováveis rupturas no anel C<sup>70</sup>, que podem ocorrer através dos caminhos a, b, c, d ou e. Os íons a, a  $m/z$  293 e b, a  $m/z$  233 e c, a  $m/z$  265 caracterizam os anéis A e B, que podem originar-se via a ou d. Os anéis D e E, que sustentam as funções epóxi e  $\gamma$ -lactona, foram identificados pelos íons e, a  $m/z$  279, f a  $m/z$  265, m, a  $m/z$  205 e h, a  $m/z$  219. Os principais fragmentos iônicos observados nesse espectro, são mostrados no esquema 4.

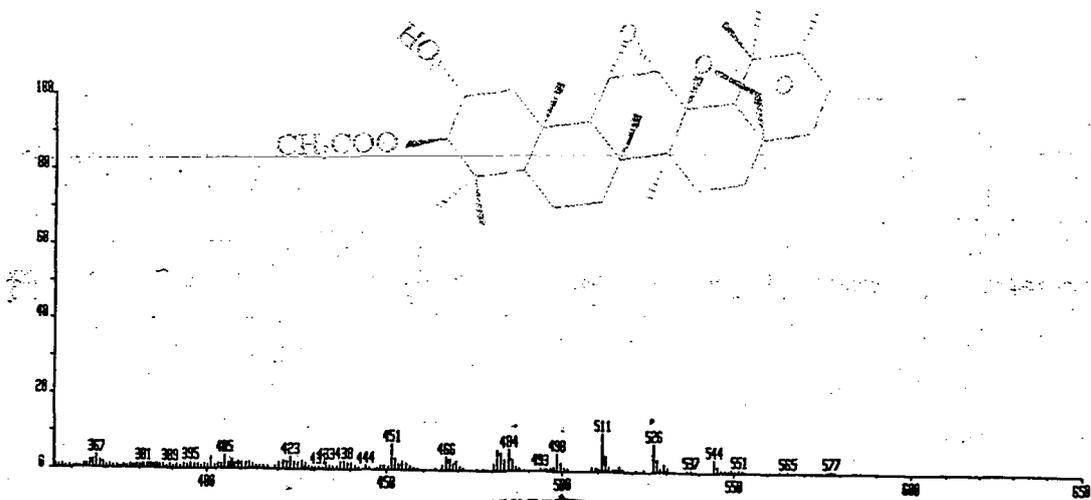
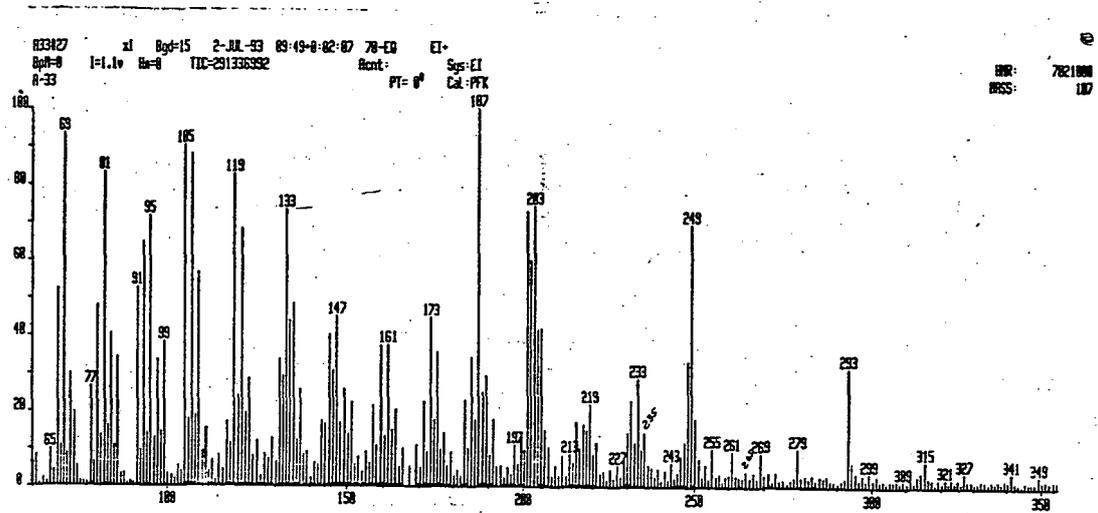
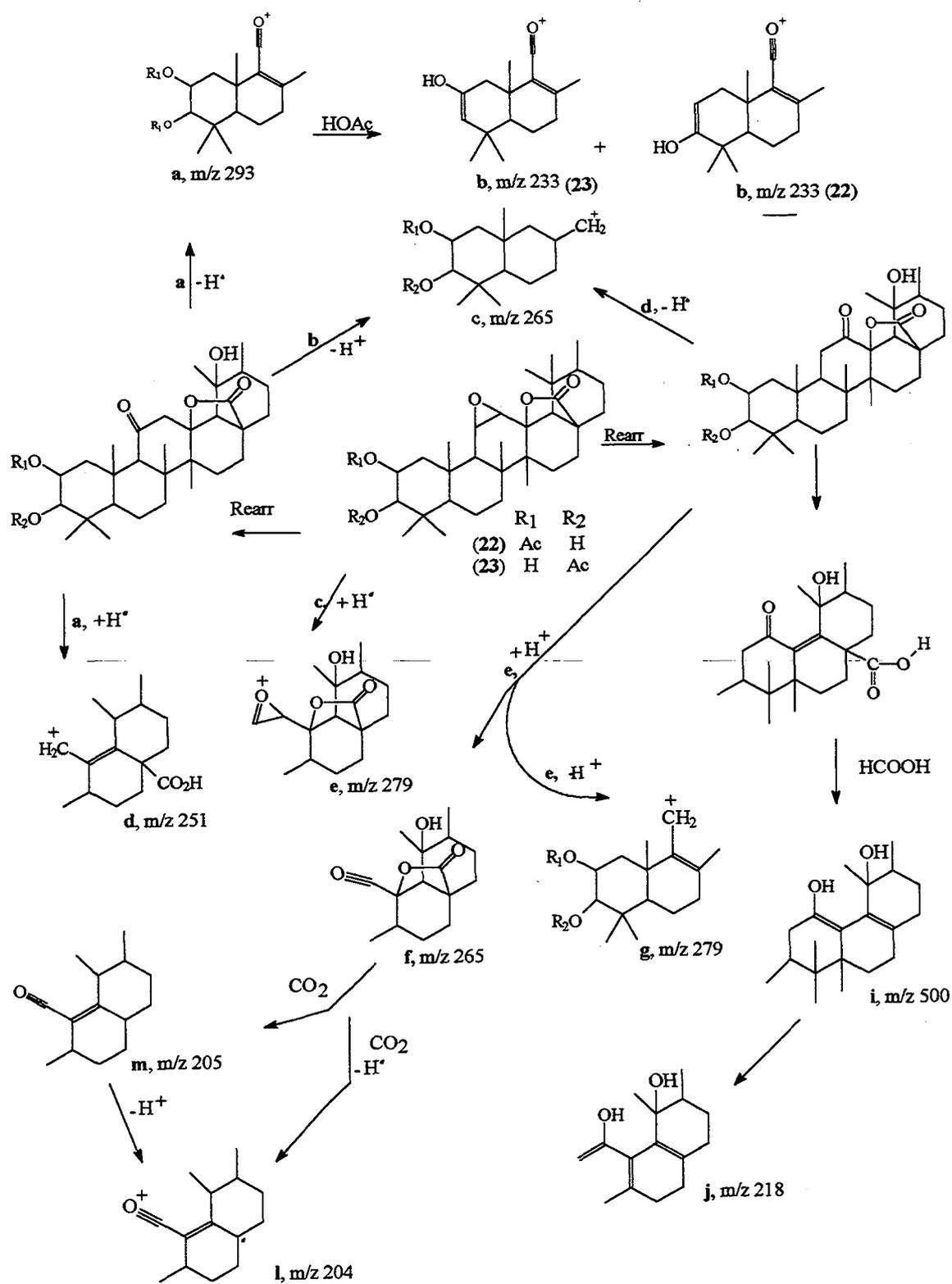


Figura 25. Espectro de massas de A-33, 22 (EI, 70EV)

**Esquema 4.** Sequência de fragmentação obtida da análise dos espectros de massas de A-33 (**22**) e EC-6 (**23**).



### A-33, ácido 2 $\alpha$ -acetóxi, 3 $\alpha$ -19 $\alpha$ -dihidróxi, 11,12-epóxi, 13-17,lactona (22)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 22 (Figura 26, p. 93, Tabela 16, 94) detectou-se a presença de seis grupos metílicos terciários à  $\delta$  0.88 (3H, s, Me-26); 1.06 (3H, s, Me-24); 1.09 (3H, s, Me-23); 1.15 (3H, s, Me-25); 1.35 (3H, s, Me-27); 1.50 ppm (3H, s, Me-29) e uma metila secundária, a 0.93 ppm (3H, d,  $J=6.6$  Hz, Me-30), sugerindo esqueleto tipo ursano com uma função -OH, em C-19. O próton metínico H-18 foi identificado pelo sinal à 1.86 ppm (1H, s). O singlete à 2.07 ppm (3H,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ) indicou um grupo -OAc, ligado ao átomo de carbono C-2. Esse grupo carbonílico foi também identificado através do sinal em 171.00 ppm, típico de carbonila de éster, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . O próton metínico H-2 é atribuído ao sinal em 5.15 ppm (1H, dt,  $J=5, 10$  e 11 Hz), com desblindagem característica<sup>60</sup>. O próton carbinólico H-3 foi atribuído ao dublete à  $\delta$  3.24 ppm ( $J=10$  Hz). Os valores medidos para as constantes de acoplamento em H-2 e H-3 são característicos de sistemas contendo substituintes em posições 2 $\alpha$ -, 3 $\beta$ -. Os deslocamentos químicos de H-2 e H-3 foram confirmados, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado acetilado de A-33 (22a), através de um experimento de dupla ressonância<sup>70</sup>. Irradiando-se o dublete em 4.79 ppm (H-3, Figura 27-b, p. 97) o duplo triplete, em 5.15 ppm (H-2), passa a ser observado como um duplo dublete ( $J_{\text{H}_2;\text{H}_1}$  e  $J_{\text{H}_2;\text{H}_1'}$ ). Quando irradiou-se o sinal em 5.15 ppm (H-2; Figura 27-a), obteve-se a simplificação do sinal relativo a H-3 (em 4.79 ppm) e também do sinal em 2.31 ppm (H-1<sub>eq</sub>, dd), que passa a ser observado como um dublete ( $J_{\text{H}_1\text{eq};\text{H}_1\text{ax}}=12$  Hz).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-33, não foi identificado o sinal referente ao próton vinílico H-12, comum em estruturas análogas que contém dupla ligação em C-12, C-13 (17 - 20), entretanto, surgiram dois sinais adicionais, um dublete à  $\delta$  2.97 ( $J=3.8$  Hz) e um duplo dublete 3.18 ppm (1H,  $J=2.0$  e 3.8 Hz), que devem ser referentes aos prótons H-12 e H-11, respectivamente, do sistema epóxi no anel C. Esses deslocamentos químicos são coerentes com prótons ligados à carbonos contendo oxigênio<sup>71</sup>. A Figura 27-c (p. 98) mostra o efeito causado pela irradiação do sinal em 3.17 ppm (dd, H-11), que simplifica o sinal do próton H-12, em 2.97 ppm e passa a ser observado como um singlete. Quando o dublete em 2.97 ppm foi irradiado (Figura 27-d, p. 98), observou-se que o duplo dublete, à  $\delta$  3.17 ppm (H-11), passa a ser observado como um singlete. Esse sistema foi identificado também no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , através dos sinais à  $\delta$  56.61 (C-11) e 62.05 ppm (C-12), com deslocamentos químicos característicos<sup>72</sup>. A estereoquímica da função epóxi foi estabelecida pela constante de acoplamento,  $J_{\text{H}_11;\text{H}_12}=3.8$  Hz, que sugere uma orientação  $\alpha$ -para a função epóxido a qual é preferencial também devido a fatores estéricos<sup>72,73</sup> (prótons vicinais cis, sistema epóxi originado a partir de uma olefina cis). Os sinais atribuídos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , para A-33, estão listados na Tabela 16, p. 94.

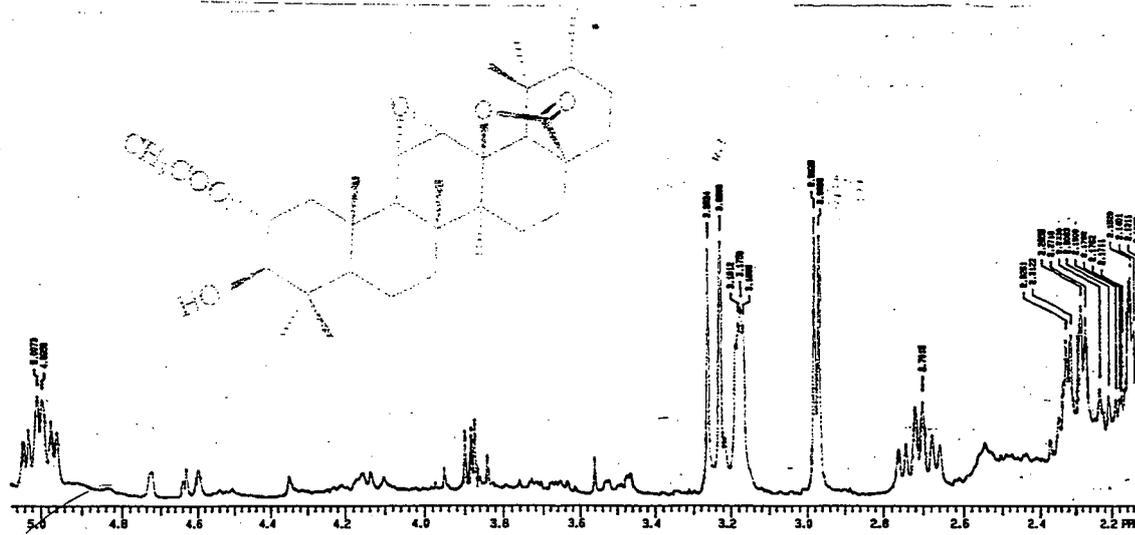
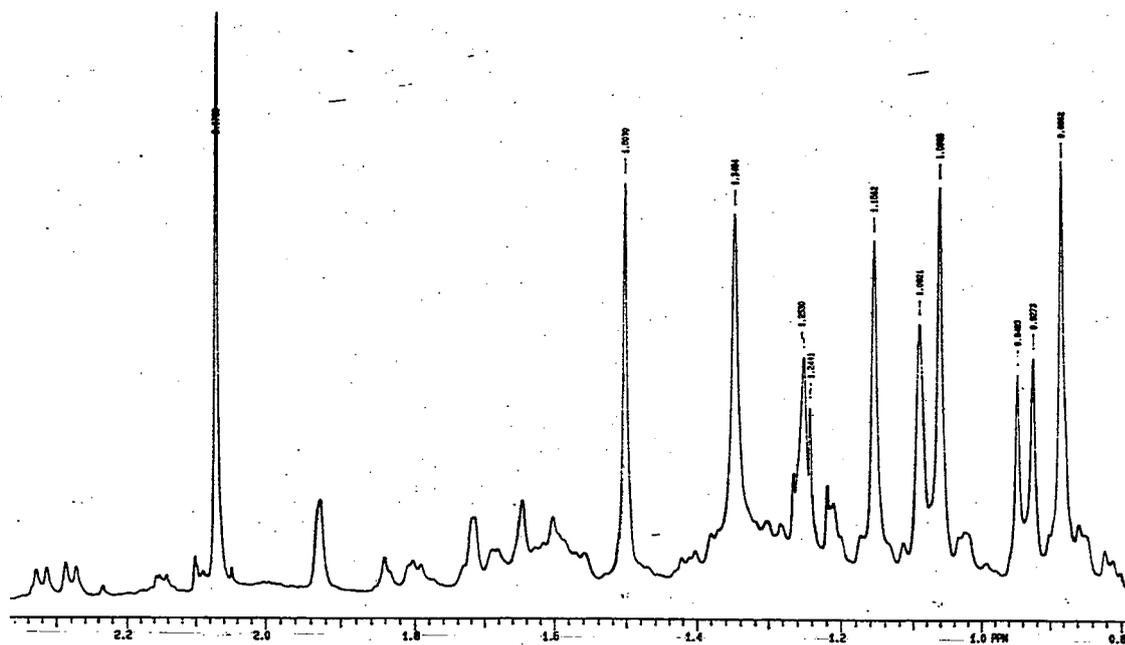


Figura 26.. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, de A-33 (22), em  $\text{CDCl}_3$

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A-33, à 75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , totalmente desacoplado (BB) e spin-eco (APT), permitiram confirmar a estrutura **22** proposta, através da atribuição dos sinais aos respectivos carbonos (Tabela 17, p. 95). O espectro APT mostrou um total de 16 sinais de carbonos secundários ou quaternários e 16 sinais de carbonos primários ou terciários. O sistema epóxi foi identificado através dos sinais à 56.61 (C-11) e 62.05 (C-12), em concordância com absorções típicas <sup>73</sup>. A localização do epóxido no anel C, foi indicada também pela blindagem de H-18 e pela ausência dos sinais referentes a carbonos olefinicos (~ 128 e 138 ppm), em triterpenos tipo  $\alpha$ -amirina (**26**) <sup>26</sup>. A presença da  $\gamma$ -lactona, primeiramente sugerida pelo espectro de massas (esquema 4, p. 91), foi identificada no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  pelos sinais à  $\delta$  90.18 ppm (C-13), com deslocamento químico característico <sup>74-76</sup>. A carbonila foi atribuída ao sinal à  $\delta$  179.40 ppm. A identificação desses e outros sinais, em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitiram atribuir a estrutura **22**, para A-33, que corresponde ao ácido  $2\alpha$ -acetóxi,  $3\alpha$ -,  $19\alpha$ -, dihidróxi, 11,12-epóxi, 13-17,lactona. Esse composto ainda não foi descrito na literatura <sup>57</sup>.

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos triterpenos pentacíclicos **17**, **18b**, **19**, **20b**, **22** e **23**, isolados dos extratos brutos de *C. catharinensis*.

<i>H</i>	<b>17</b>	<b>18b</b>	<b>19</b>	<b>20b</b>	<b>22</b>	<b>23</b>
<b>1</b>	1.02m	1.03m	-	-	-	-
<b>1'</b>	1.98m	2.00m	2.00m	2.00m	2.30dd (5 e 12)	2.34dd (5 e 12)
<b>2</b>	4.95td (3.7,10,11)	3.70dt (4,11,13)	5.22td (2.5,4,12)	4.02td (3,4.3,12)	4.99td (5, 10,12)	3.88td (5,10,12)
<b>3</b>	3.2d (10)	3.01d (9.5)	3.48d (2.5)	3.42d (3)	3.25d (10)	4.53d (10)
<b>11</b>	1.95m	1.98m	2.00m	2.00m	3.18dd (2 e 4)	3.18dd (2 e 4)
<b>12</b>	5.35 t (3.6)	5.35t (3.6)	5.33t (4)	5.33t (4)	2.97d (4)	2.96d (4)
<b>16</b>	1.65m	1.65m	-	-		
<b>16'</b>	2.48td (3, 13, 15)	2.51td (3, 12, 15)	2.48td (3.5,11,14)	2.51td (3,12,15)	2.70dt (6,10,17)	2.75dt (6,10,17)
<b>18</b>	2.58s	2.59s	2.53s	2.59s	1.86s	1.93s
<b>23</b>	0.86s	0.95s	0.89s	1.02s	1.09s	1.09s

<b>24</b>	1.03s	0.82s	1.03s	0.86	1.06s	0.89
<b>25</b>	1.01s	1.02s	1.19s	0.95s	1.15s	1.11s
<b>26</b>	0.76s	0.67s	0.71s	0.66s	0.88s	0.89s
<b>27</b>	1.21s	1.21s	1.25s	1.21s	1.35s	1.35s
<b>29</b>	1.26s	1.25s	1.25s	1.25s	1.50s	1.51s
<b>30</b>	0.95d	0.93d	0.94d	0.94d	0.93d	0.94d
	(6.2)	(6.6)	(6.6)	(6.6)	(6.6)	(6.8)
<b>MeCOO</b>	2.07s	-	2.07s	-	2.07s	2.15s
<b>COOMe</b>	-	3.60s	-	3.60s	-	-

**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos titerpenos pentacíclicos **17**, **18b**, **19**, **20b**, **22** e **23**, isolados dos extratos brutos de *C. catharinensis* ( $\text{CDCl}_3$ , à 90 MHz, TMS)

<i>C</i>	<b>17</b>	<b>18b</b>	<b>19</b>	<b>20b</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
<b>1</b>	43.64	46.31	37.50	41.12	40.47	40.46
<b>2</b>	73.01	68.85	71.12	68.85	72.66	67.14
<b>3</b>	80.36	83.86	76.82	83.86	80.62	84.66
<b>4</b>	39.59	38.15	37.86	37.37	39.72	39.27
<b>5</b>	54.87	55.14	52.82	47.10	54.97	54.97
<b>6</b>	18.23	18.37	17.98	18.37	17.58	17.63
<b>7</b>	32.47	32.57	32.45	32.57	31.84	31.86
<b>8</b>	39.73	40.00	38.46	38.15	43.32	43.82
<b>9</b>	46.95	47.10	45.90	47.81	50.98	50.92
<b>10</b>	38.00	39.13	38.46	39.13	37.51	37.47
<b>11</b>	23.53	23.53	23.66	23.67	56.61	56.50
<b>12</b>	128.46	128.88	129.07	128.88	62.05	62.08
<b>13</b>	138.06	138.08	138.00	138.08	90.18	90.28
<b>14</b>	41.07	41.12	41.19	39.91	41.78	41.81
<b>15</b>	28.29	28.11	28.11	28.11	26.54	26.54
<b>16</b>	25.26	25.39	25.31	25.39	23.54	23.54
<b>17</b>	47.38	47.81	47.68	47.81	45.00	45.03
<b>18</b>	52.96	53.12	47.96	53.12	54.50	54.49
<b>19</b>	72.85	73.11	73.05	73.11	72.24	72.25
<b>20</b>	40.97	41.09	40.14	41.06	43.80	43.82
<b>21</b>	25.82	25.95	25.96	25.95	27.59	27.60
<b>22</b>	37.32	37.37	38.46	38.15	31.55	31.55

<b>23</b>	28.30	28.56	28.31	28.56	28.16	28.18
<b>24</b>	16.42	16.71	21.81	16.71	17.81	17.79
<b>25</b>	16.02	16.48	16.97	16.48	21.26	21.10
<b>26</b>	16.35	16.62	16.17	16.62	14.70	14.71
<b>27</b>	24.20	24.52	24.65	24.52	18.30	18.30
<b>28</b>	180.91	178.89	180.70	178.34	179.40	179.40
<b>29</b>	26.90	27.40	27.36	27.40	16.12	17.10
<b>30</b>	15.87	16.11	16.13	16.11	26.31	26.30
<b>CH<sub>3</sub>COO</b>	171.81	-	167.43	-	171.00	171.45
<b>CH<sub>3</sub>-COO</b>	21.06	-	21.37	-	20.61	20.68
<b>COO-CH<sub>3</sub></b>	-	51.58	-	51.59	-	-

**EC-6 - ácido 3 $\alpha$ -acetóxi, 2 $\alpha$ -, 19 $\alpha$ -, dihidróxi, 11,12-epóxi, 13-17,lactona (23).**

Como foi descrito acima, o íon molecular ( $m/z$  544, fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>) e o mecanismo de fragmentação (Esquema 4), observados, no espectro de massas de EC-6, foram idênticos ao de A-33 (22), indicando a presença de prováveis estruturas isoméricas.

Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C de 22 e 23 (Tabelas 16, p. 94 e 17, p. 95) permitiram deduzir que ambos possuem estruturas semelhantes. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 23 (Figura 29), à 300 MHz, em CDCl<sub>3</sub>, exibe sinais característicos de grupos metílicos terciários entre 0.70 e 1.80 ppm, bem como um metila secundário à  $\delta$  0.94 ppm (d, 6.8 Hz), em posições praticamente idênticas aquelas observadas para A-33. Estão presentes nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de EC-6 e A-33 os mesmos sinais relativos a uma metila de grupo acetil ( $\delta$  2.15, s, 23, Figura 29;  $\delta$  2.07 ppm, s, 22, Figura 26, p. 93). O fragmentos iônicos a  $m/z$  249 (Esquema 4; íon a e b) no espectro de massas, indicam que para ambas as substâncias, o grupo acetila deve estar presente no anel A.

As únicas diferenças observadas nos espectros de prótons de EC-6 (Figura 29, p. 98) e A-33 (Figura 26, p. 93), foram com relação aos deslocamentos químicos dos prótons metínicos H-2 e H-3. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H de EC-6 (Figura 28, Tabela 16) é possível identificar os sinais desses prótons carbinólicos, H-2 e H-3, à  $\delta$  3.88 (1H, dt, J=4.5, 10 e 12 Hz) e 4.53 ppm (1H, d, J=10 Hz), respectivamente, enquanto que para A-33 são observados a  $\delta$  4.99 (dt, J=5.0, 10 e 12 Hz) e 3.25 ppm (d, J=10 Hz). Essas diferenças sugerem que as duas estruturas suportam um grupo acetila (provoca desblindagem em torno de 1.5 ppm no próton metínico) e uma função álcool em posições C-2 e C-3, para A-33 e C-3 e C-2, para EC-6, respectivamente, indicando tratar-se de compostos isoméricos. As medidas das constantes de acoplamento observadas para os

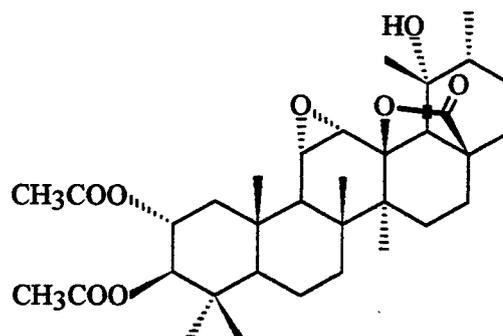
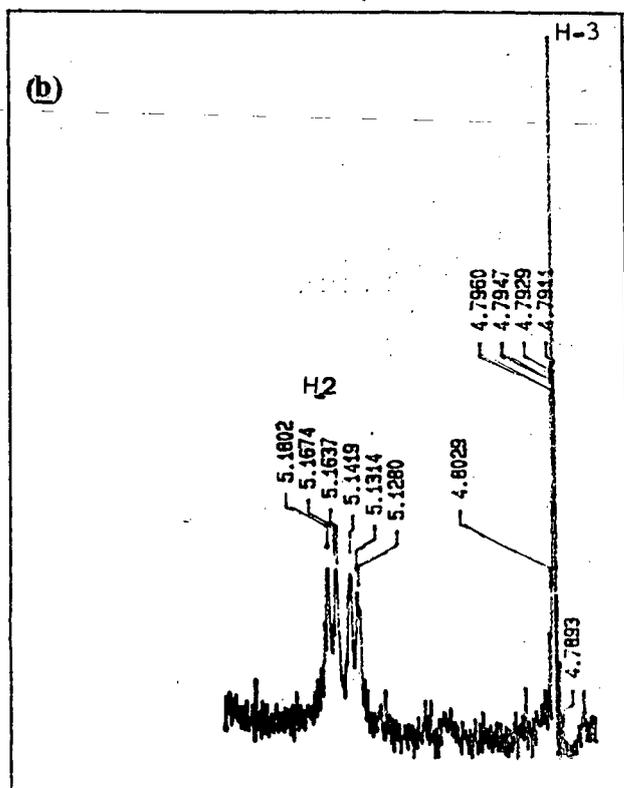
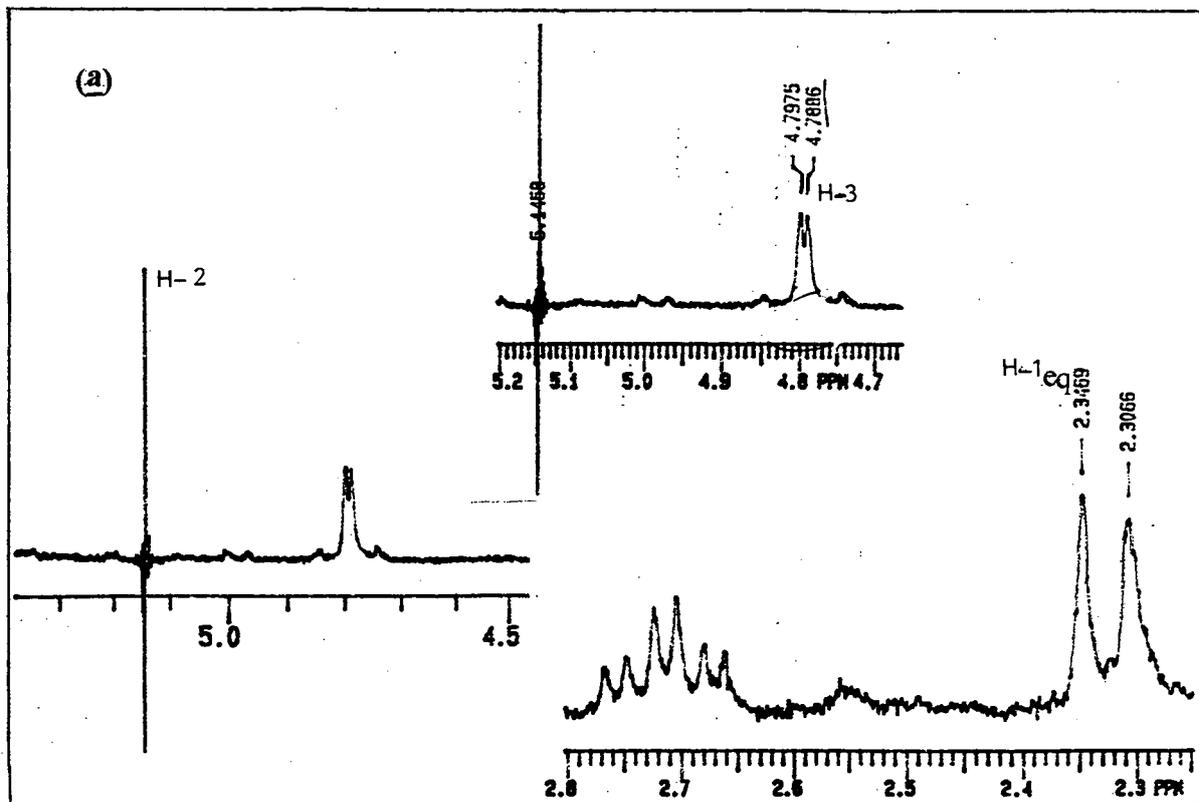
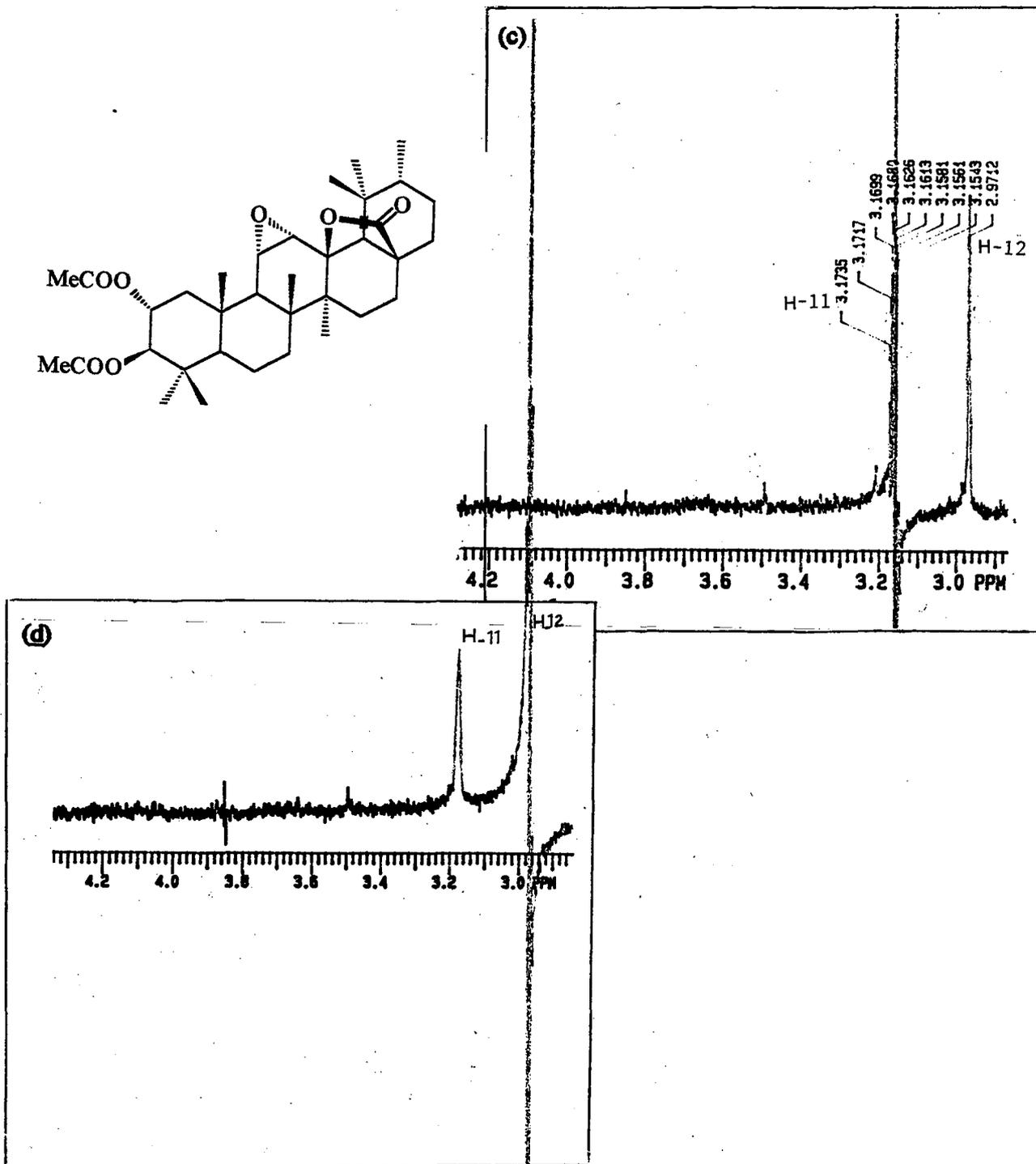


Figura 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , experimento de dupla ressonância, à 300 Mhz, de A-33 (22-a), a) - irradiando H-2; b) - irradiando H-3;

Figura 27. **c)** -irradiando H-11 e **d)** - irradiando H-12.



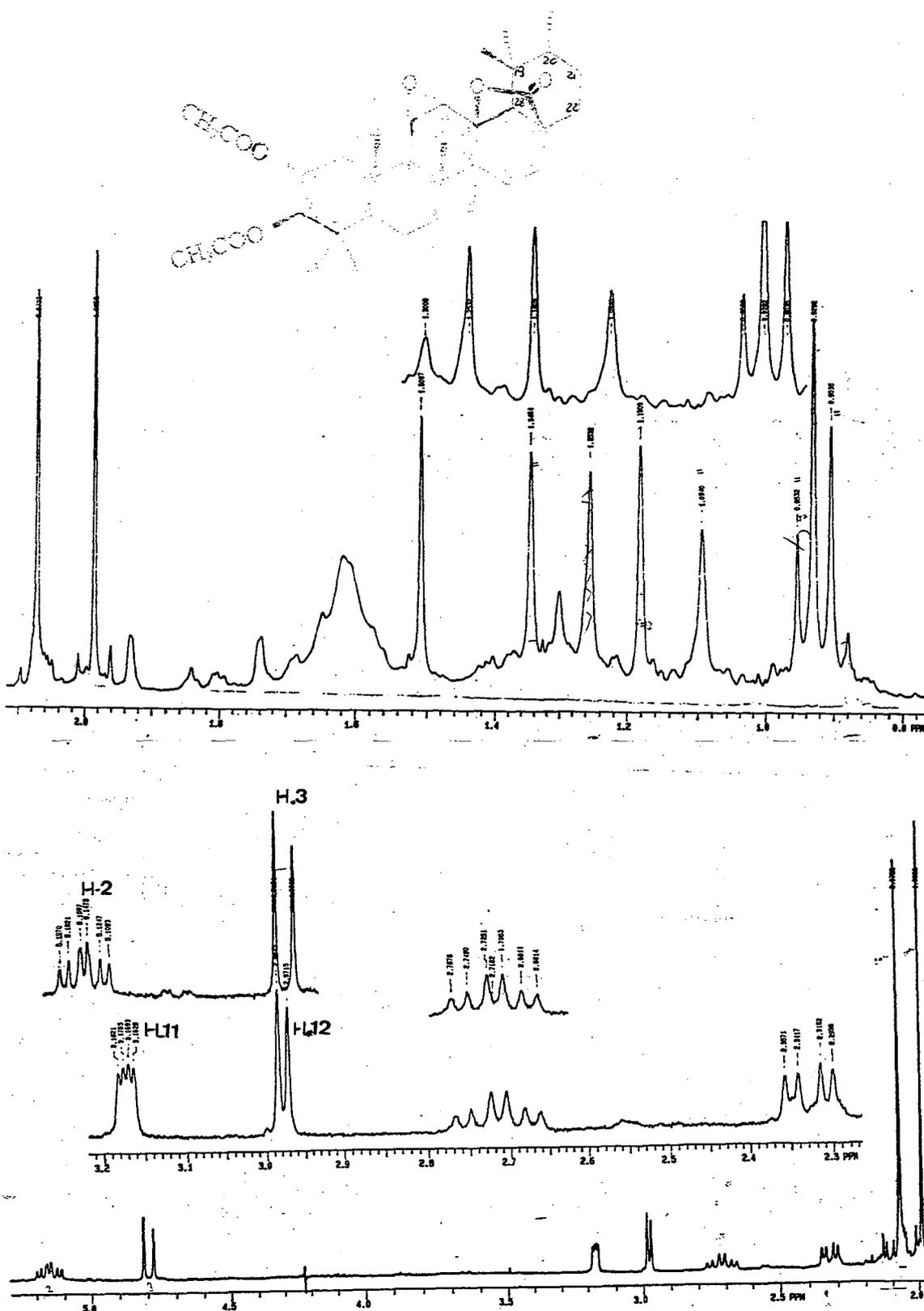


Figura 28. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (a)- de **22-a** e (b)- **23-a**, a 300 MHz,

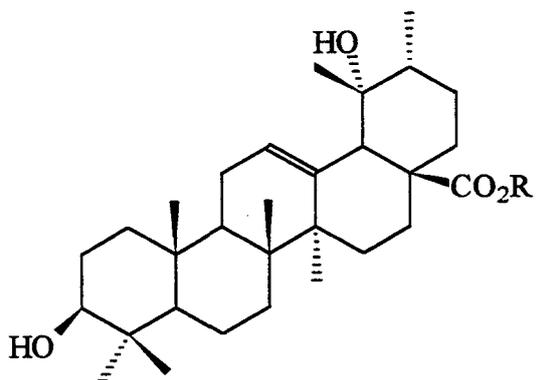
prótons H-2 e H-3 possibilitaram atribuir configurações  $2\alpha-$ ,  $3\beta-$  para os substituintes em posições C-2 e C-3, tanto em EC-6, como em A-33. Os valores dos sinais relativos aos átomos de carbono de **23**, obtidos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 17, p. 95), foram atribuídos por comparação com os dados de A-33. As diferenças nos deslocamentos químicos entre **22** e **23** (4.04 ppm (C-2) e 5.52 ppm (C-3) indicam ligação de grupo acetila em C-2 de A-33 e C-3 de EC-6. Como se pode ver na Tabela 17, os sinais relativos aos átomos de carbono dos anéis B, C, D e E mostram-se praticamente inalterados quando comparados com **22**. Essas afirmações permitem concluir que EC-6 corresponde ao ácido  $3\alpha$ -acetóxi,  $2\alpha-$   $19\alpha-$ , dihidróxi, 11,12-epóxi, 13-27, lactona, **23**, isômero de posição de A-33, **22**. Esse composto ainda não foi descrito na literatura <sup>57</sup>.

#### 4.2.2.I. Reação de acetilação em A-33 (**22**) e EC-6 (**23**)

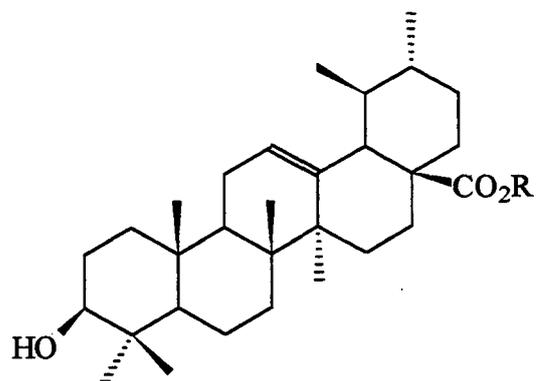
A confirmação de que os compostos A-33(**22**) e EC-6 (**23**) formam um par de isômeros de posição, foi obtida através da acetilação desses compostos (Parte experimental; p. 31), pois os produtos resultantes foram comparados por cromatografia em camada delgada e, pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 28) e  $^{13}\text{C}$ , indicando que A-33Ac (**22a**) e EC-6Ac (**23a**) tratam-se de compostos idênticos.

#### 4.2.3. Isolamento dos triterpenos pentacíclicos, ácido pomólico (**24**), J-14 e ácido ursólico (**25**), CG-01 isolados de *C. catharinensis*.

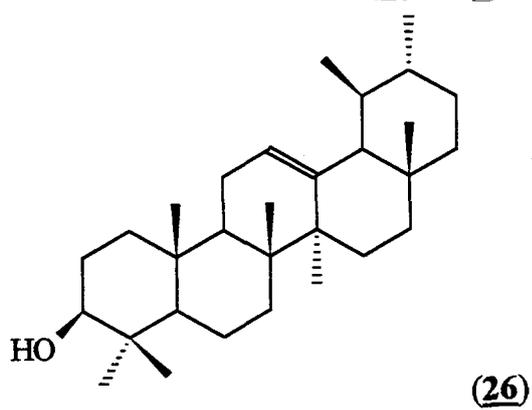
Além dos compostos citados anteriormente, foram isolados dos extratos brutos de *C. catharinensis* (Parte experimental, Tabela 7, p. 24) dois triterpenos pentacíclicos conhecidos, o ácido pomólico, J-14 ( $3\beta-$ ,  $19\alpha-$ , dihidróxi, urs-12-eno, 28-óico, **24**)<sup>77</sup> e o ácido ursólico ( $3\beta$ -hidróxi, urs-12-eno, 28-óico **25**)<sup>35</sup>. A identificação dessas substâncias, que apresentam esqueleto básico tipo  $\alpha$ -amirina (**26**), foi realizada com base na comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com aqueles publicados na literatura <sup>26,62,77</sup> (Tabela 18), e também por cromatografia em camada delgada com amostras autênticas. Os compostos foram transformados nos respectivos ésteres metílicos derivados, **24a** e **25a**, para a confecção dos espectros, em  $\text{CDCl}_3$ . Além do ácido pomólico e do ácido ursólico, obteve-se dos extratos de *C. catharinensis*, uma mistura que foi identificada como os ácidos ursólico (**25**) e oleanólico (**27**). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , da mistura, é mostrado na Figura 30.



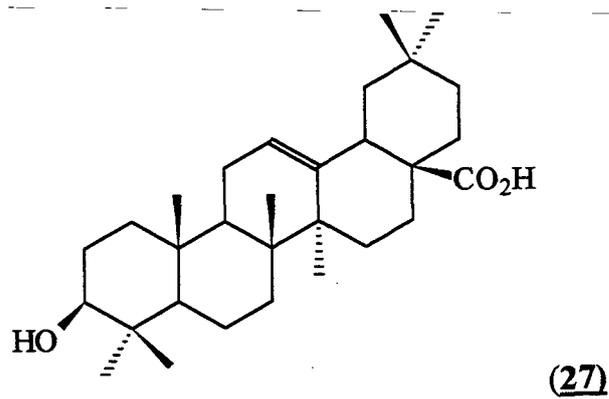
R  
 (24) H  
 (24-a) Me



R  
 (25) H  
 (25a) Me



(26)



(27)

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos ésteres metílicos **24a** e **25a**, derivados dos triterpenos J-14, e CG-01, isolados de *C. catharinensis* (75 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ )

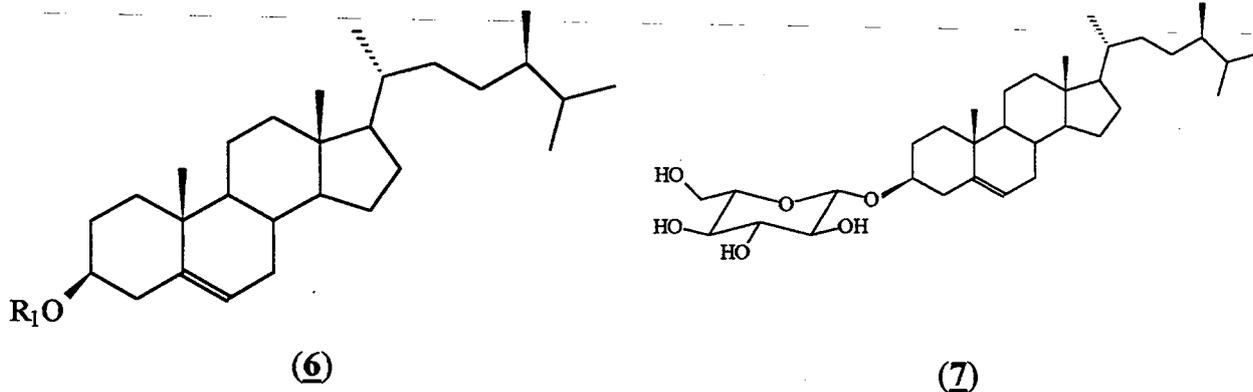
<i>C</i>	<b>24</b>	<b>25</b>
<b>1</b>	39.11	38.62*
<b>2</b>	28.34	27.23
<b>3</b>	78.30	79.05
<b>4</b>	39.52	38.88*
<b>5</b>	56.00	55.24
<b>6</b>	19.18	18.33
<b>7</b>	33.78	32.99
<b>8</b>	40.52	39.50
<b>9</b>	47.90	47.58
<b>10</b>	37.53	36.98
<b>11</b>	24.21	17.04
<b>12</b>	128.26	125.58
<b>13</b>	140.13	138.15
<b>14</b>	42.31	42.01
<b>15</b>	29.44	28.04
<b>16</b>	26.57	24.25
<b>17</b>	48.50	48.11
<b>18</b>	54.70	52.90
<b>19</b>	72.83	39.06
<b>20</b>	42.01	38.75*
<b>21</b>	27.17	30.67
<b>22</b>	38.69	36.67
<b>23</b>	28.93	28.04
<b>24</b>	16.96	15.45
<b>25</b>	15.72	15.63
<b>26</b>	17.38	16.93
<b>27</b>	24.83	23.31
<b>28</b>	176.84	178.09
<b>29</b>	16.75	23.62
<b>30</b>	27.34	21.19
<b>COOCH<sub>3</sub></b>	51.50	51.46

\* intercambiáveis

#### 4.2.4. Esteróis isolados e identificados nos extratos de *C. catharinensis*.

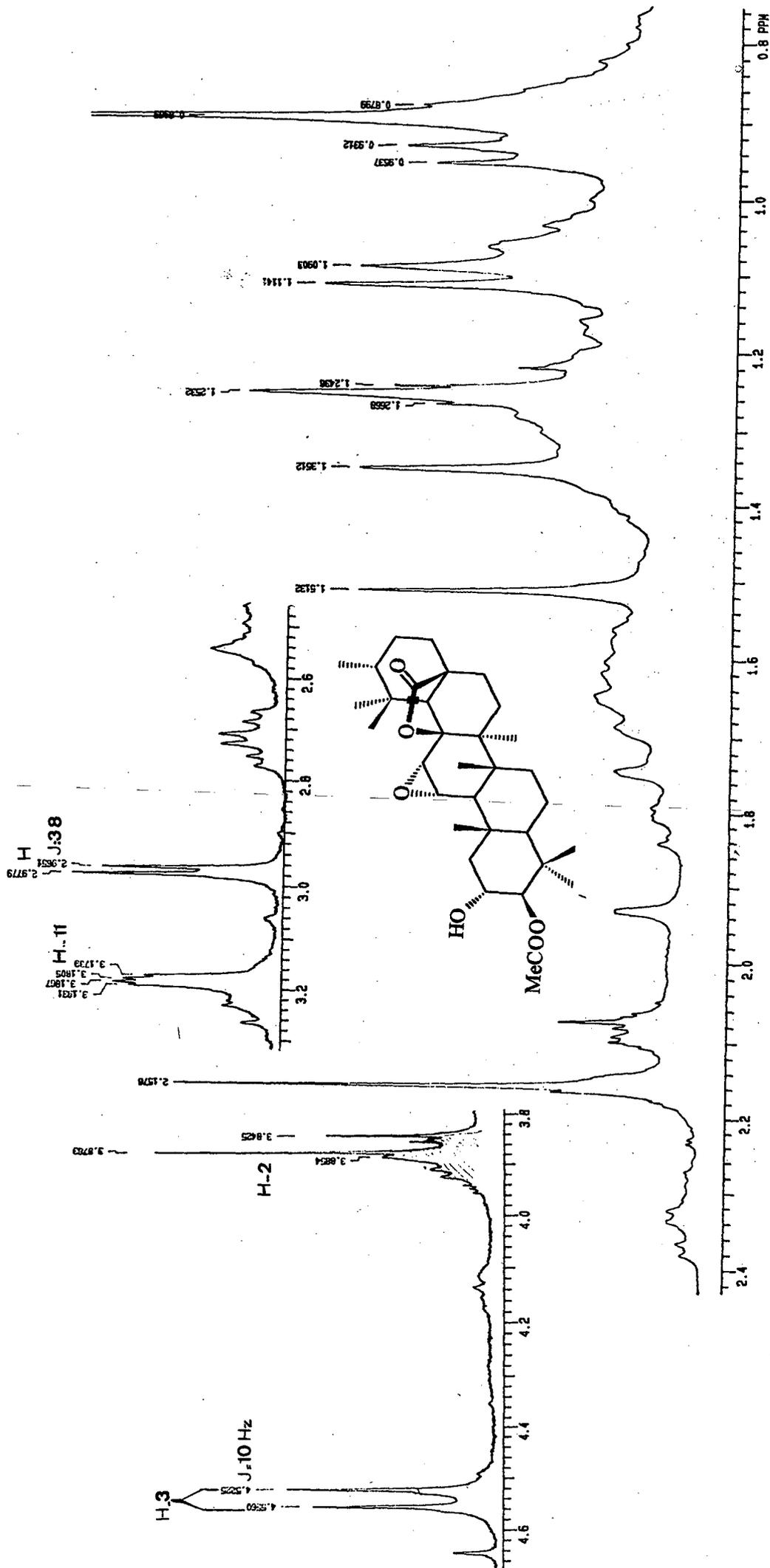
##### 4.2.4.1. Identificação do esteroil $\beta$ -sitosterol (6) e $\beta$ -sitosterol-glicosídeo (7)

Dos extratos hexano das folhas, caule e raízes de *C. catharinensis* (Capítulo 3; Tabela 7, p. 24), isolou-se o composto EG-1, que trata-se do  $\beta$ -sitosterol<sup>30</sup> (6), já isolado para a espécie *E. ambiguum* (p. 43). Este foi o componente majoritário presente nos extratos brutos de *C. catharinensis*. A identificação estrutural de HS-11 foi realizada por comparação em CCD, com uma amostra autêntica, e através de análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 20, p. 108). Além do  $\beta$ -sitosterol, os extratos de *C. catharinensis* apresentaram também seu derivado glicosilado ( $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 7)<sup>40</sup>, codificado como DI-3, foi isolado das frações mais polares dos extratos em acetato de etila e diclorometano. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de DI-3 são perfeitamente coerentes com aqueles obtidos para o composto EA-54 (7,  $\beta$ -sitosterol-glicosídeo), descrito na p. 43 (RMN de <sup>13</sup>C; Tabela 20, p. 108). Esses dois esteróis foram comparados por cromatografia em camada delgada com amostras autênticas. Nos extratos de *C. catharinensis* foi possível o isolamento e a determinação estrutural de um terceiro esteroil, um acil derivado do  $\beta$ -sitosterol-glicosídeo, 21a'-i'.



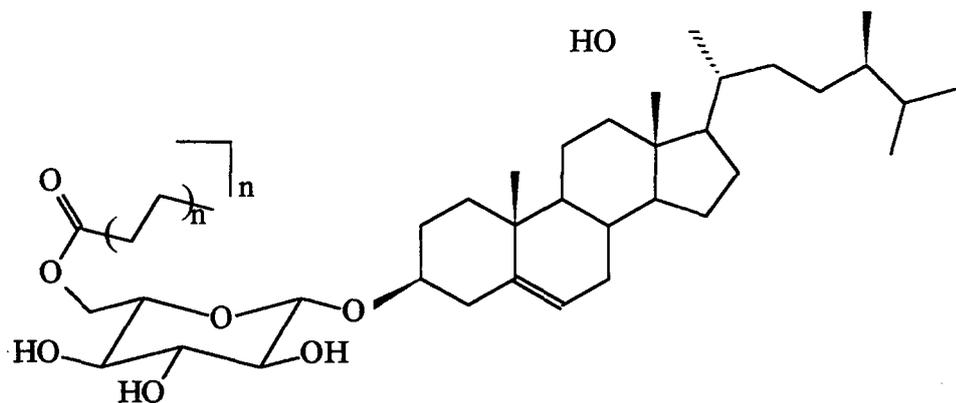
##### 4.2.4.2. Isolamento da mistura de esteróides 6'-O-acil glicosilados, CC-5 (21 a'-i')

A mistura CC-5 foi isolada através do refractionamento, em colunas de sílica gel (Tabela 7; p. 24), dos extratos em acetato de etila do caule e das raízes de *C. catharinensis*. As análises físico-químicas dessa mistura de esteróis, permitiram sugerir as estruturas 21 a'-i', revelando que a aglicona é formada pelo esteróide  $\beta$ -sitosterol,



**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , de EC-6 (**23**), à 300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$

isolado na forma livre (6) e glicosilada (7) de *C. catharinensis* e também de *E. ambiguum*.



(21a'-i')

R= n-acila (Tabela 21)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **21 a'-i'** (Figura 31, p. 110, Tabela 19, p. 105), à 300 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , pouco difere daquele de EA-54 (Figura 5a; p. 47). Comparando com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , de EA-54, observou-se sinais adicionais na região espectral de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$ , relativos a uma porção alquílica: um intenso singlete à  $\delta$  1.26 (w- $\text{CH}_2$ -) e um triplete à 0.90 ppm (w- $\text{CH}_3$ ). Isso poderia levar a conclusão de que a substância encontrava-se impurificada com ácido graxo saturado. No entanto, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou um sinal à 174.28 ppm, consoante com um grupo carbonílico de éster. Na região entre 3.2 e 4.5 ppm (Figura 30, p. 107), encontram-se os sinais referentes ao fragmento glicosídico, incluindo o multiplete relativo ao próton carbinólico em C-3, à 3.48 ppm. Essa região apresenta pequenas diferenças quando comparada com EA-54 (7), embora deva-se considerar o efeito causado pela mudança de solvente (py, em EA-54 e  $\text{CDCl}_3$ , em CC-5). O próton anomérico é atribuído à 4.37 ppm, com constante de acoplamento medindo 7.5 Hz, o que caracterizou a presença da ligação  $\beta$ -glicosídica<sup>78</sup>, em CC-5. O grupo vinílico, em C-5\_C-6, foi identificado através do sinal a 5.36 ppm.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB e APT) à 75.5 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , foi analisado em conjunto com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS-11 (6) e EA-54 (7). A atribuição dos sinais (Tabela 20) permitiu confirmar que a mistura CC-5 corresponde a um  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -glicosil, esterificado com ácidos graxos, na posição C-6', da glicose, **21 a'-i'**. A unidade acila foi identificada através dos sinais à  $\delta$  13.75 ( $\text{CH}_3$ -w); 22.83 (w- $\text{CH}_2$ ); 28.94-29.87 (w- $\text{CH}_2$ ); 31.68 ( $\text{COOCH}_2$ ) e 174.28 ppm ( $\text{COO}$ -). Além da inclusão desses sinais, as principais diferenças observadas entre os valores dos deslocamentos químicos de CC-5 (**21 a'-i'**) e EA-54 (7), foram em relação aos carbonos C-2, C-3 e C-4,

demonstrando pequenas variações na ordem de  $\Delta\delta= 2,9$  (C-2) e 3 ppm (C-3). Os deslocamentos químicos dos carbonos presentes na estrutura de CC-5 foram atribuídos e estão listados na Tabela 20, com exceção aqueles referentes as cadeias alquílicas, devido a sobreposição de sinais na região entre 29.0 e 30.0 ppm (-CH<sub>2</sub>-w).

**Tabela 19.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H de HS-11 (**6**), EA-54 (**7**) e CC-5 (**21a'-i'**) (300 MHz, em CDCl<sub>3</sub> e py-d<sub>5</sub> \*)

<i>H</i>	<b>6</b>	<b>7*</b>	<b>21a'-i'</b>
3	3.49m	3.95m	3.92m
6	5.34d (4.89)	5.33m	5.36m
18	0.67s	0.67s	0.68s
19	1.00s	0.93s	1.00s
21	0.92d (6)	1.01d (6)	0.92d (6.3)
26	0.86d (6.5)	0.88d (6)	0.87d (6.7)
27	0.83d (6.5)	0.89 (6)	0.83d (6.7)
29	0.82 (6.5)	0.88t (6)	0.82t (6.7)
1'	-	4.59d (7.5)	4.37d (7.5)
2'	-	4.05t	
3'	-	4.27m	
4'	-	4.30m	
5'	-	3.97m	
6' <sub>A</sub>	-	4.50dd (2 e 11)	
6' <sub>B</sub>	-	4.39dd (5 e 11)	4.25dd (5 e 10)
<b>CH<sub>3</sub>-w</b>	-	-	0.68m
<b>-CH<sub>2</sub>-w</b>	-	-	1.25sl
<b>-CH<sub>2</sub>COO-</b>	-	-	2.32m



Tabela 20. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **6**, **7** e **21a'-i'** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , py-d<sub>5</sub>-EA-54, TMS)

C	6	7	21a'-i
1	37.2	37.5	37.3
2	31.7	26.3	29.3
3	71.7	77.1	74.0
4	42.2	39.9	38.9
5	140.7	140.9	140.3
6	121.6	121.9	122.2
7	31.9	32.0	32.0
8	31.8	32.1	31.9
9	50.1	50.3	50.2
10	36.5	36.9	36.7
11	21.0	21.2	21.8
12	39.7	39.3	39.8
13	42.2	42.4	42.2
14	56.7	56.8	56.8
15	24.3	24.5	24.0
16	28.2	28.5	28.2
17	56.0	56.2	56.1
18	11.8	12.1	11.8
19	18.5	19.0	19.4
20	36.1	36.3	36.3
21	19.3	20.0	18.7
22	29.7	30.0	33.7
23	33.9	34.2	29.2
24	45.8	46.0	49.5
25	29.1	29.4	29.5
26	19.0	19.2	19.8
27	19.3	19.4	18.7
28	23.0	23.3	22.8
29	11.8	11.9	11.9
1'	-	102.5	101.3
2'	-	78.5	73.9
3'	-	78.3	76.3
4'	-	78.1	70.5
5'	-	75.2	76.3
6'	-	62.7	63.4
-CH <sub>2</sub> -COO-	-	-	174.6
-CH <sub>2</sub> -COO-	-	-	32.0
-CH <sub>2</sub> -w	-	-	29.7-29.3
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	-	22.7
w-CH <sub>3</sub>	-	-	14.1

#### 4.2.5.2.1. Ésteres metílicos obtidos da saponificação de 21 a'-i'.

Com o objetivo de identificar a natureza dos ácidos, que fazem parte da mistura de ésteres de **21 a'-i'**, foi realizada uma reação de hidrólise alcalina do acil-glicosil-esteróide. Os ácidos graxos liberados foram esterificados com uma solução de diazometano em éter etílico e submetidos a análise em CG-MS, identificando-se, assim, as proporções relativas dos ácidos graxos presentes na mistura **21 a'-i'**. Observando a Tabela 21, pode-se notar que os principais componentes da mistura são os ésteres metílicos derivados dos ácidos 14-metil pentadecanóico ( $M^+$ 270; 100%) e 16-metil heptadecanóico ( $M^+$ 298; 72%). Embora esteróis acil glicosilados tenham sido anteriormente isolados, essa é a primeira ocorrência desses compostos, contendo esses ésteres alquílicos<sup>79,80</sup>.

**Tabela 21.** Ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos obtidos da saponificação de **21a'-i'**.

<i>Mistura a'-i'</i>	<i>éster metílico (do ácido)</i>	$M^+$	<i>intensidade (%)</i>
<b>a'</b>	nonandióico (dimetil éster)	156	18
<b>b'</b>	3, butil-4, metil-pentanodióico (dimetil éster)	168	22
<b>c'</b>	bis(2-metil propil) hexanodióico (dimetil éster)	185	54
<b>d'</b>	12-metil tridecanóico	242	38
<b>e'</b>	9-metiltetra decanóico	256	24
<b>f'</b>	11-hexa decenóico	268	26
<b>g'</b>	14-metil penta decanóico	270	100
<b>h'</b>	hepta decanóico	284	24
<b>i'</b>	16-metil hepta decanóico	298	74

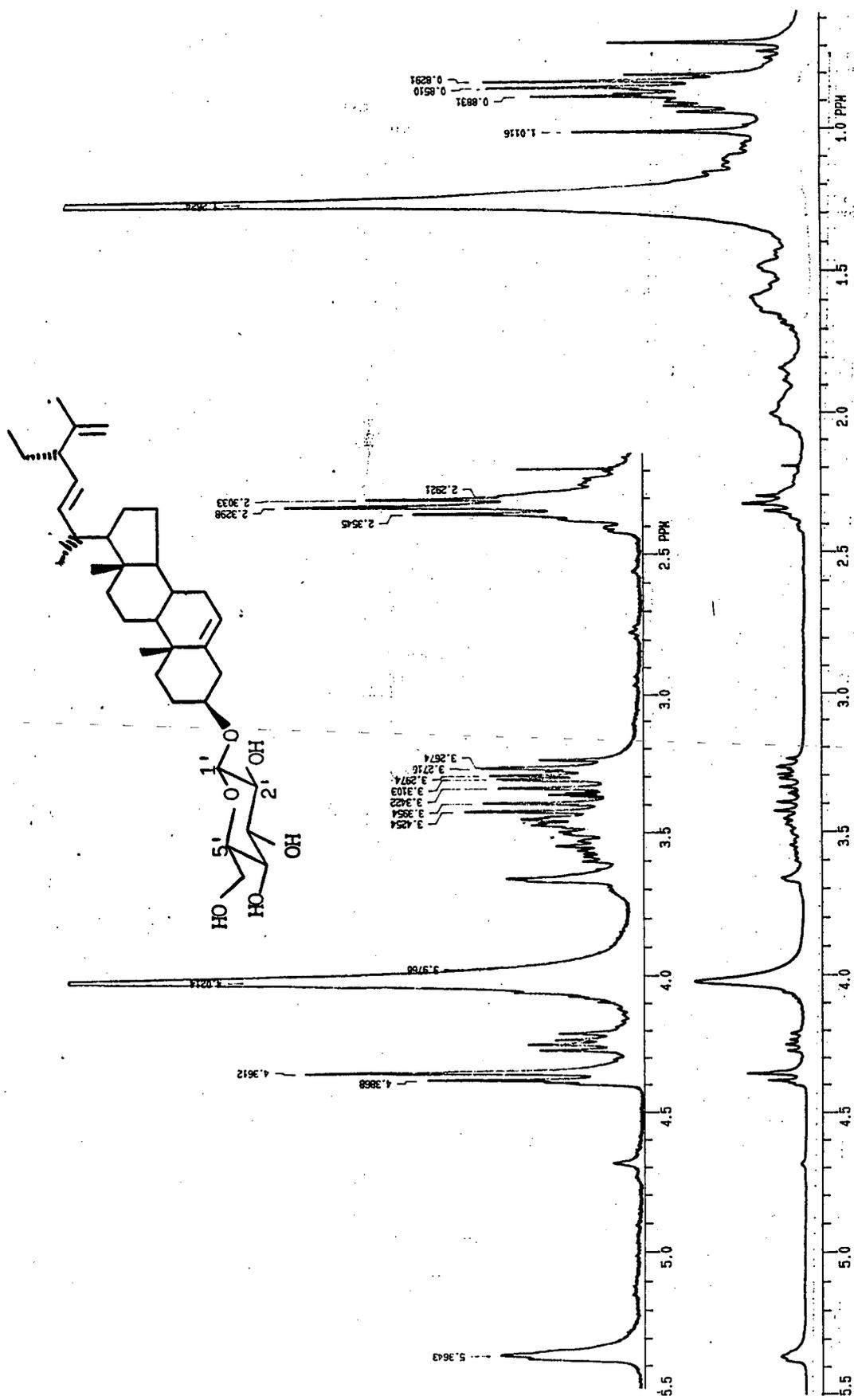


Figura 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , à 300 MHz, de **CC-5 (21a'-i)**, em  $\text{CDCl}_3$ .

#### IV. CONCLUSÕES

O estudo químico das espécies *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn e *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas permitiu concluir que:

- A espécie *Eubrachion ambiguum* Hook & Arn apresentou constituintes químicos de diferentes classes de compostos, permitindo isolar e identificar dezesseis substâncias.

- A investigação química da espécie *Eubrachion ambiguum*, permitiu detectar-se a presença de constituintes pertencentes ao grupo dos fenóis e poli-fenóis (leucoantocianidinas) característicos da família Loranthaceae, embora a flavona naringenina (14) e a cetona xantoxilina (15) estejam sendo isolados pela primeira vez nesse gênero.

- A mistura de DGDG (12), ésteres alquílicos derivados do ácido cinâmico (1 e 2) e tocoferóis (8 - 11) são compostos isolados pela primeira vez na família Loranthaceae.

- A espécie *E. ambiguum* apresentou em sua constituição três triterpenos pentacíclicos conhecidos: ácido betulínico (3), ácido acetil ursólico (4) e friedelina (5); dois esteróis: o  $\beta$ -sitosterol (6) e o  $\beta$ -sitosterol glicosilado (7). Todos são constituintes químicos comumente encontrados em plantas, entretanto 4, 5 e 7 estão sendo descritos pela primeira vez para espécies pertencentes a esse gênero.

- Os compostos mais abundantes presentes nos extratos metanólicos de *E. ambiguum* foram manitol (16), a mistura de DGDG (12a' - i') e (+)-catequina (13), perfazendo um total de 0.8, 0.13 e 0.24 % em relação ao peso de planta seca, respectivamente.

- Os extratos brutos das raízes, caule e folhas de *C. catharinensis* permitiram o isolamento e a determinação estrutural de uma série de derivados triterpênicos di e trihidroxilados, todos derivados do ácido ursólico - sendo quatro desses com estruturas inéditas ácido  $2\alpha$ -acetóxi, $3\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico 17, ácido  $2\alpha$ -acetóxi, $3\alpha$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (19),  $2\alpha$ -acetóxi, $3\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi,11-12-epóxi,13-27,lactona 22 e  $3\alpha$ -acetóxi, $2\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, 11-12-epóxi,13-27,lactona 23 e quatro triterpenos já conhecidos na literatura - ácido  $2\alpha$ -, $3\beta$ -, $19\alpha$ -trihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (18), ácido  $2\alpha$ -, $3\alpha$ -, $19\alpha$ -trihidróxi, urs-,12-eno, 28-óico (20),  $3\beta$ -, $19\alpha$ -dihidróxi, urs-,12-eno,28-óico 24 e ácido ursólico 25.

-A aplicação de técnicas de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , possibilitaram elucidar as estruturas triterpênicas acima citadas, atribuindo as estereoquímicas de alguns centros assimétricos das moléculas e diferenciando assim estruturas isoméricas.

-Dos extratos de *C. catharinensis* isolou-se e identificou-se também o esterol  $\beta$ -sitosterol (**6**) e seus derivados - $\beta$ -sitosterolglucopiranosídeo (**7**) e  $\beta$ -sitosterol acil glucopiranosídeo (**21 a' - i'**), sendo que na mistura de ésteres foram detectadas cadeias n-acílicas ainda não descritas para compostos desse tipo.

-O isolamento e a identificação estrutural dos constituintes químicos, detectados nos extratos brutos de *E. ambiguum* e *C. catharinensis*, constituem parâmetros quimiotaxômicos no estudo das referidas espécies.

## V. BIBLIOGRAFIA

- 1) BERG, C. C. Espécies de *Cecropia* da Amazônia Brasileira. Acta Amazônica 8 (2), 149 (1978).
- 2) LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, p. 302 (1991).
- 3) RIZZINI, C. T. Flora Ilustrada Catarinense . (Fasc. Loranthaceae). Ed. Raulino Reitz; Parte I; SC, pg. 3 (1968).
- 4) FUKUNAGA, T., KAJIKAWA, I., NISHIYA, K., WATANABE, Y., SUZUKI, N., TAKEYA, K. & ITOKAWA, H. Studies on the Constituents of the European Mistletoe, *Viscum album* L. II. Chem Pharm Bull. 36 (3), 1185 (1988).
- 5) RAHMAN, A. U., KHAN, M. A. & KHAN, H. N. Loranthol: A New Pentacyclic Triterpenoid From *Loranthus grewii*. Phytochemistry. 12, 3004 (1973).
- 6) KHAN, N. H., AMEEM, M. & SIDDIQUI, S. Pakistan J. Sci. and Ind. Res. 1 (3), 191 (1958).
- 7) BECKER, H., I. KAJIKAWA, K. & NISHIYA, Y. Chem. Pharm Bull., 35, 3292 (1987).
- 8) SIMÕES, C. M. O., MENTZ, L. A., SCHENAEL, E. P., IRGANA, B. E. & STEHMANN, J. R. Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul. Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, p. 96 (1986).
- 9) BIGLARKE, H. Cystoliten bei den Ulmaceae, Moraceae und Urticaceae. Beitr. Biol. Pflanzen. 21, 1 (1933).
- 10) LEBRETON, P. Contribution à l'étude des flavonoïdes chez *Humulus lupulus* L. Bull. Soc. Botan. France. 111, 80 (1956) ; 87, 80 (1964).
- 11) NAIR, P. Flavonoids of *Artocarpus heterophyllus* Lamk. Tetrahedron letters. 125 (1965).
- 12) ULTÈE, A. J., TUBANGUI, M. A. & TAUCHICO, S. S. Stickstoffreich Milchsäften. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 6, 264 (1924).

- 13) ABU-MUSTAFA, E. A. A new cumarins from *Ficus carica* and *F. sycomorus*. Phytochemistry. 3, 701 (1964).
- 14) MOLISCH, H. Ueber orangefarbene Hydathoden bei *Ficus japonica*. Ber. Deut. Botan. Ges. 34, 66 (1916); 49, 138 (1931).
- 15) WOLFROM, M. L. & BHAT, H. B. Osage orange pigments. XIII. Isolation of three new pigments from the root bark of *Maclura pomifera*. Tetrahedron letters 749, (1963).
- 16) WOLFROM, M. L. Osage orange pigments XIV. The structure of macuraxanthone of *Maclura affinis*. J. Org. Chem. 29, 689, 692 (1964).
- 17) WILSON, E. O. Diversidade da vida. São Paulo: Companhia das Letras, p. 177 (1994).
- 18) NOGUEIRA PRISTA, L. & CORREIA ALVES, A. Análise Fitoquímica de *Cecropia peltata*. Anais Fac. Farm. - UFRGS, Porto Alegre. 19, 100 (1959).
- 19) KERBER, V. A. & SCHENKEL, E. P. Caracterização de Cumarinas em *Cecropia lyratiloba*. IX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos. Faculdade de Farmácia. UFRGS, 1983.
- 20) ACHNBACH, H., STOCKER, M. & CONSTENLA, M. A. Chemical Investigations of Tropical Medicinal Plants, XXI (1) Long Chain Alkyl Esters of Ferulic and p-Coumaric Acid from *Bauhinia manca*. Z. Natur Forsch. 41c, 164 (1986).
- 21) DALLA COSTA, T. C. T. & RATES, S. M. K. Investigação da Atividade Farmacológica de *Cecropia catharinensis*. VI Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica. Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, (1985).
- 22) MORITA, T. Manual de Soluções, Reagentes & Solventes. Ed. Edgard Blucker LTDA, 3 ed. (1986)
- 23) MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Universidade Federal do Ceará (1988).
- 24) ALDRICH CHEMICAL Co. Inc. Catalog Handbook of Fine Chemicals. (1994).
- 25) AUTERHOFF, H. Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart. 1976.

- 26) ARRIAGA-GINER, F. J., WOLLENWEBER, E., SCHOBBER, I., DOSTAL, P. & BRAUN, S. 2 $\beta$ -Hydroxyhawtriwaic Acid, a Clerodane Type Diterpenoid and Others Terpenoids from Three *Bacharis* species. Phytochemistry. 25 (3), 719 (1986).
- 27) PRATA, A. & CHAUDURI, S. K. Triterpenoid Acids from *Quercus suber* (Fagaceae). Indian J. Chem. Sect. B. 27, 1152 (1988).
- 28) LEITÃO, S. Estudo Químico das Espécies *Aegiphila lhotzkyana* e *A. obducta*, Verbenaceae. Tese de Doutorado. UFRJ. 1992.
- 29) MIGUEL, O. G. Estudo Químico e Farmacológico de *Sebastiania selottiana*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (1987).
- 30) OGURA, M., CORDELL, G. A. & FARNSWORTH, N. Potential Anticancer Agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier. Lloydia 40 (2), 158 (1977).
- 31) AKIHISA, T., THAKUR, S., ROSENSTEIN, F. e MATSUMOTO, T. Sterols composition of the seeds from *Momordica charantia*, Cucurbitaceae. Lipids 21, 39 (1986).
- 32) KEINDS, K. Flavonoids from *Ribes sanguineum* leaf. Chem Comm. 220 (1965).
- 33) PEREDA-MIRANDA, R & GASCÓN-FIGUEROA, M. Studies on the Constituents of Mexican Plants. J. Nat. Prod. (51), 996 (1988).
- 34) CHEUNG, H. T. & WILLIAMSON, D. G. Constituents of the Root Barks *Euscaphis* sp. Tetrahedron. 25, 119 (1979).
- 35) HISASHI, K. & OGURA, O. Triterpenoids from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry. 25(3), 729 (1986)
- 36) RILEY, G. R. & KOLATTUKUDY, P. E. The Polimeric Material in Plants. Structural Units and Molecular Weight. Plant Physiol. 56, 650 (1975).
- 37) CHATTERJEE, A., DHARA, K. P., REJ, R. N. & GHOSH, P. C. Hexacosylferulato, a Phenolic Constituent of *Pinus rox-burghii*. Phytochemistry. 16, 397 (1977).

- 38) HOUGHTON, P.J. Phenolic Fatty Acids Esters from *Budjca globosa* Stem Bark. Phytochemistry. 28(10), 2693 (1975).
- 39) FANG, J. M., WANG, K. C. & CHENG, Y. S. Steroids and Triterpenoids from *Rosa laevigata*. Phytochemistry. 30, 3383 (1991).
- 40) CARNEIRO, E. Estudo Químico e Farmacológico de *Hymeneae martiana*. Dissertação de Mestrado. UFSC. (1989).
- 41) RANDERATH, K. Cromatografia su Strato Sottile. 169p. (1972).
- 42) MATSUO, M. & URANO, S. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Tocopherols and 2,2-Dimethylchromanols. Tetrahedron. 32, 229 (1976).
- 43) MURAKAMI, N., MORIMOTO, T., IMAMURA, H., UEDA, T., NAGAI, S., SAKAKIBARA, J. & YAMADA, N. Studies on Glycolipids. III. Glyceroglycolipids from an Axenically Cultured Cyanobacterium, *Phormidium tenue*. Chem Pharm Bull. 39(9), 2277 (1991).
- 44) MURAKAMI, N., IMAMURA, H., SAKAKIBARA, J. & YAMADA, M. Seven New Monogalactosyl Diacylglycerols Isolated from the Axenic Cyanobacterium *Phormidium tenue*. Chem Pharm Bull. 12 (38), 3497 (1990).
- 45) JIANG, Z. D. & GERWICK, H. Galactolipids from the Temperate Red Marine Alga *Gracilaria lemaneiformis*. Phytochemistry 29(5), 1433 (1990)
- 46) SCHERER, O. W., BUDZIKIEWICZ, H., HARTMANN, R., KLEIN, R. A. & EGGE, H. The Elucidation of the two positional isomers of a Mono-Glucopiranosyl Mono-Acyl Glycerol derivative from *Cystobacter fuscus*. Bioph. Acta. 1117, 42 (1992).
- 47) KRAUT, L. & MUES, R. Acylated Flavone and Glycerol Glucosides from Two *Frullania* species. Phytochemistry 34 (1), 211 (1993).
- 48) SASTRY, S. Glycosil Glycerols. Advances in Lipids Research. 12, 251 (1974).
- 49) DELLE MONACHE, F., FERRARI, F., POCE-TUCCI, A. & MARINI-BETTOLO, G. B. Catequins with (+)-Epi-Configuration in Nature. Phytochemistry. 11, 2333 (1972).
- 50) FOO, L. Y. & PORTER, L. J. Prodelphinidin Polymers: Definition of Structural Units. J. C. S. Perkin I. 1186 (1978).

- 51) CZOCHANSKA, Z., FOO, L. Y., NEWMAN, R. H. & PORTER, J. Polimeric Proanthocyanidins. Stereochemistry, Structural Units, and Molecular Weight. J. C. S. Perkin I. 2278 (1980).
- 52) SCALBERT, A. Antimicrobial Properties of Tannins. Phytochemistry. 30 (12), 3883 (1991).
- 53) BREITMAIER, E. & VOELTER, W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. New York, N.Y.:VCH (1987).
- 54) HASLAM, E. The Flavonoids. ed. T. J. Mabry e J. B. Harborne, Chapman and Hall (1975).
- 55) CECHINEL FILHO, V., MIGUEL, O. G., NUNES, R. J., CALIXTO, J. B. & YUNES, R. A. Antiespasmotic Activity of Xanthoxyline derivatives: Structure - Activity Relationships. J. of Pharm. Sciences. 1995 (in Press).
- 56) ATTA-UR-RAHMAN, CHOUDHARY, M., I. Solving Problems with NMR Spectroscopy Academic Press, New York, 1994
- 57) MAHATO, S., NANDY, A. K., & ROY, G. Review Article Number 67. Triterpenoids. Phytochemistry. 31 (7), 2199 (1992).
- 58) BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J. M. & DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. J. Am. Chem. Soc. 85(20), 3688 (1963).
- 59) OHASHI, J. M., WILSON, J. M., BUDZIKIEWICZ, H., SHAMMA, M., SLUSARCHYK, A. & DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXI. J. Am. Chem. Soc. 85, 2807 (1963).
- 60) KOJIMA, K. & OGURA, H. Configurational Studies on Hydroxy Groups at C-2, 3 and 23 or 24 of Oleaneno and Urseno-Type Triterpenes by NMR Spectroscopy. Phytochemistry. 28(6),1703 (1989).
- 61) KOJIMA, H & OGURA, H. Triterpenoids from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry 25 (3), 729 (1986).
- 62) SEO, S., TOMITA, Y. & TORI, K. Carbon-13 NMR Spectra of Urs-12-enes and Application to Structural Assignments of Compounds of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. Tetrahedron letters 1, 7 (1975).

- 63) PISTELLI, L., BILIA, A. N. & MARCILI, A. Triterpenoids Saponins from *Buplurum fruticosum*. J. of Nact. Prod. 56 (2), 240 (1993).
- 64) TAKAHASHI, K., OGURA, M. & TANABE, Y. Studies on Constituents of Medicinal Plants. IX. A Constituent of the Roots of *Rosa multiflora* Thumb. Chem Pharm Bull. 17(11), 2223 (1969)
- 65) DELGADO, G., HERNANDEZ, J. & MIRANDA, R. P. Triterpenoids Acids from *Cunilla lythrifolia*. Phytochemistry. 28(5), 1483 (1989).
- 66) DIJOUX, M. G., LAVAUD, C., MASSIOT, G., OLIVIER, L. & SHEELEY, D. Studies on Constituents from Leaves of *Aphloia madagascariensis*. Phytochemistry 34 (2), 497 (1993).
- 67) TAKAHASHI, K., KAWAGUCHI, S., NISHIMURA, K., KUBOTA, K., TANABE, Y. & TAKANE, M. Studies on Constituents of Medicinal Plants. XIII. Constituents of the Pericarps of the Capsules of *Euscaphis japonica* Pax. Chem Pharm Bull. 22(3), 650 (1974).
- 68) SOBRINHO, D. C., HUPTLI, M. B., APPOLINÁRIO, E. V., KOLLENS, C. L. M., CARVALHO, M. G. & BRAS-FILHO, R. Triterpenoids Isolated from *Paranhancornia amapa*. J. Braz. Chem. Soc. 2 (1), 1991.
- 69) MAJUNDER, P. L. & CHAKRABORTY, M. Reinvestigation of the Action of Hydrogen Peroxide on Ursolic Acid Acetate. Tetrahedron 35, 2397 (1979).
- 70) MOREL, A. F. Alcalóides Ciclopeptídicos isolados de *Scutia buxifolia* Reiss. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 1983.
- 71) MORRIS, G. A. Modern NMR techniques for Structure Elucidation. Magn. Reson. Chem. 24: 371 (1986).
- 72) SOUCEK, M., HEROUT, V. & SORM, F. Terpenes. Part CXVIII. Constitution of Parthenolide. Collect. Czech. Chem. Commun. 26, 803 (1989).
- 73) KITAGAWA, I., KITAGAWA, K. & YOSIOKA, I. Investigation of the Action of Hydrogen Peroxide on Oleanolic Acid Acetate. Tetrahedron 28, 907 (1972).
- 74) FISCHER, N. H., OLIVIER, E. J. & FISCHER, H. D. The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. In: Prog. Chem. Org. Nat. Prod. Ed. W. Herz, Springer, Wien, 38, 47 (1979).

- 75) YOSHIOKA, H., MABRY, T. J. & TIMMERMANN, B. N. Sesquiterpene lactones: Chemistry, NMR, and Plant Distribution. Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 544 (1973).
- 76) KROHN, K., LUDEWIG, K., JONES, P. G., DORING, D., AUST, H., DRAEGER, S. & SCHULZ, B. Biologically Active Metabolites from Fungi. An Antifungal and Herbicidal Lanostane Lactone from *Sporormiella australis*. Nat. Prod. Letters. 1(1), 29 (1992).
- 77) HATA, C., CACUNO, M., YOSHIKAWA, K. & ARIHARA, S. Triterpenoids saponins of Aquifoliaceous Plants. V. Ilexosides XV-XIX. From the Barks of *Ilex crenata* Thumb. Chem. Pharm. Bull. 40 (8), 1990 (1992).
- 78) PEI-WU, G., FUKUYAMA, Y., REI, W., JINXIAN, B. & NAKAGAWA, K. An Acylated Sitosterol Glucoside from *Alisma plantago-aquatica*. Phytochemistry. 27(6), 1895 (1988).
- 79) GUEVARA, A. P., LIM-SYLIANCO, C. Y., DAYRIT, F. M. & FINCH, P. Acylglucosyl Sterols from *Momordica charantia*. Phytochemistry 28 (6), 1721 (1989).
- 80) HASHIMOTO, T., TORI, M. & ASAKAWA, Y. Piscicidal Sterol Acylglucosides from *Edgeworthia chrysantha*. Phytochemistry 30 (9), 2927 (1991).
- 81) SIDDIQUI, S., SIDDIQUI, B., NAEED, A. & BEGUM, S. Pentacyclic Triterpenoids from the Leaves of *Plumeria obtusa*. Phytochemistry 4279 (1992).
- 82) POTIER, P., DAS, B. C., BUI, A. M., JANOT, M. M., POURRAT, A. & POURRAT, H. Acide Triterpénique Pentacyclique Isolé des Racines de *Potentilla tormentilla* Neck. (Rosacées). Bull. de la Soc. Chim. de France. 11, 3458 (1966).