

**Estudo fitoquímico de *Aristolochia*
esperanzae Kuntze (Aristolochiaceae)**

Alison Geraldo Pacheco

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UFMG/ICEx-DQ 775^a.

D. 443^a

Alison Geraldo Pacheco

Estudo fitoquímico de *Aristolochia esperanzae*

Kuntze (Aristolochiaceae)

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Belo Horizonte
2009

O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob a orientação do Professor Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara e co-orientação da Professora Dra. Dorila Piló Veloso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por mais esta vitória.

À minha mãe, pelo exemplo e pela confiança; ao meu pai, pela força e pela motivação, e a ambos, por sonhar comigo.

À Aline, grande amor, que torceu por mim, auxiliou e acompanhou bem de perto toda esta minha trajetória.

À Graciele, querida irmã.

Ao professor Antônio Flávio de Carvalho Alcântara, pela orientação, amizade, dedicação, aprendizado e estímulo constante.

À professora Dorila Piló Veloso pela co-orientação.

À professora Jacqueline Aparecida Takahashi pela grande colaboração nos ensaios microbiológicos.

À professora Lucienir Pains Duarte, pela dedicação e apoio sempre presente, além da colaboração nas análises de CGMS.

À toda minha família, sempre presente e torcendo por mim.

Aos amigos, pelos numerosos momentos de alegria, trabalho, estudo e, enfim, pela amizade.

À Marilda, presença marcante, a quem serei eternamente grato pela amizade e dedicação.

Aos colegas do curso de pós-graduação, Wdeson, Viviane e Thiago pela amizade, companheirismo e troca de experiências, extremamente valiosas.

À Ivana, ao Marley e a todo pessoal técnico que auxiliou a realização deste trabalho.

À Paulete, à Kátia e à Lilian, pela prontidão com que nos auxiliam; à Sônia pelo auxílio e presteza no serviço de documentação do curso de pós-graduação do Departamento de Química.

Aos professores que fundamentaram minha formação, José Dias de Souza Filho, Fernando Carazza, Grácia Divina de Fátima Silva e, especialmente, à Rosimeire Brondi Alves, grande exemplo de sabedoria e profissionalismo, a todos pela disponibilidade sempre demonstrada.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas desta Universidade.

Lista de Abreviaturas, Acrônimos e Símbolos	8
Resumo	10
Abstract	11
Apresentação	12
Capítulo I: A espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	16
1. A família Aristolochiaceae	17
2. O Gênero <i>Aristolochia</i>	17
2.1 Constituintes Químicos isolados em espécies de <i>Aristolochia</i>	18
3. A espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	71
3.1 Características morfológicas	71
3.2 Classificação taxonômica	72
Capítulo II: Parte Experimental	73
1. Materiais	74
1.1. Equipamentos	74
1.2. Procedimentos Cromatográficos	74
1.3. Testes Microbiológicos	75
2. Métodos	76
2.1. Metodologia Fitoquímica	76
2.1.1. Material Vegetal	76
2.1.2. Obtenção dos extratos	76
2.1.3. Elaboração do extrato etanólico das cascas do caule	76
2.1.4. Fracionamento do extrato etanólico do cerne do caule	87
2.2. Metodologia Biológica	89

Capítulo III: Estudo Fitoquímico das Cascas do caule	90
1. Análise Estrutural de CA1-s	91
2. Análise estrutural de CA2	93
3. Análise estrutural de CA3-R2 (AE1)	97
4. Análise estrutural de CA3-R4-G1-R3 (AE4)	108
5. Análise estrutural de G11-R3-G4 (AE18)	112
6. Análise estrutural de AE31	122
7. Análise estrutural de AE38	125
8. Análise estrutural de G10-R14-G2 (AE50)	126
9. Análise estrutural de FM1	133
Capítulo IV: Estudo Fitoquímico do Cerne do caule	143
1. Análise estrutural de CE17 (AE2)	144
2. Análise estrutural de CE20 (AE14)	153
3. Análise estrutural de CE36 (AE15-s)	164
4. Análise estrutural de AE15-1	175
Capítulo V: Ensaios Biológicos de extratos, frações e fitoconstituintes isolados de <i>A. esperanzae</i>	179
1. Teste de atividade antibacteriana	180
Conclusões	185
Referências	192
Anexos	200

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

δ	- Deslocamento Químico
ϕ	- Diâmetro
$\bar{\nu}$	- Número de onda
AR	- Artrite Reumatóide
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCDS	- Cromatografia em camada delgada de sílica gel
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica gel
CCS/AgNO ₃	- Cromatografia em coluna de sílica gel impregnada com nitrato de prata
CG	- Cromatografia a gás
CGMS	- Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
COSY	- <i>Correlation Spectroscopy</i>
d	- Duplete
dd	- Duplete Duplo
ddd	- Duplo duplete duplo
DEPT-135°	- “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer” – ângulo 135°
EM	- Espectro de massas
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
GPC	- Cromatografia por permeação em gel ou por seleção de tamanho
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IV	- Infravermelho
J	- Constante de acoplamento escalar
m	- Multiplete

NOESY	- <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
qd	- Quarteto Duplo
RMN de ^{13}C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ^1H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
r.p.m.	- Rotações por minuto
s	- Simpleto
sl	- simpleto largo
t	- tripleto
td	- tripleto duplo
TMS	- Tetrametilsilano
t_R	- Tempo de retenção

Resumo

Muitas das doenças reumáticas ocorridas na região de Minas Gerais são popularmente tratadas com o uso de *Aristolochia esperanzae*. A literatura cita estudos fitoquímicos de folhas e raízes de *Aristolochia esperanzae* e este trabalho descreve o isolamento cromatográfico dos constituintes químicos do cerne e das cascas do caule desta planta. O extrato etanólico das cascas do caule possui hidrocarbonetos alifáticos, uma lignana, ácidos aristolóchicos e aristololactamas. O extrato etanólico do cerne possui uma cubebina, ácidos aristolóchicos e sitosterol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo. A análise estrutural destes compostos envolveu principalmente técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, HSQC, HMBC, NOESY e COSY. Os compostos asarinin, ácido populifólico, ácido 2 oxo-populifólico, aristololactamas AIa e AII e sitosterol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo foram pela primeira vez citados nesta espécie. O extrato etanólico das cascas do cerne e os fitoconstituintes asarinin (AE1) e (8R,8'R,9S)-cubebina (AE2) foram ativos frente a *Bacillus cereus*.

Abstract

Most of the rheumatic diseases in the Minas Gerais são popularmente tratadas com o uso de *Aristolochia esperanzae*.region involve the treatment using *Aristolochia esperanzae*. The literature records phytochemical studies of leaves and roots from *A. esperanzae* and this work describes the chromatographic isolation of stem bark and stem chemical constituents of this plant. The ethanolic stem bark extract presented aliphatic hydrocarbons, one lignan, two diterpenes, aristolochic acids and aristololactams. The ethanolic stem extract presented one cubebin, aristolochic acids and sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside. Their complete structures have been establish mainly based on 2D NMR spectral HSQC, HMBC, NOESY and COSY. Compounds asarinin, populifolic acid, 2 oxo-populifolic acid, aristololactams AIa and AII and sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside were first reports on these species. The ethanolic stem bark and constituents asarinin (AE1) e (8R,8'R,9S)-cubebin (AE2) were active towards *Bacillus cereus*.

Apresentação

Os produtos naturais são utilizados pelo homem desde tempos remotos. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas foi talvez uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais. Além disso, a natureza sempre despertou no ser humano um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como clima e doenças, levaram o ser humano ao atual estágio de desenvolvimento científico. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos pode ser considerado como um fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo¹.

Tendo em vista estes aspectos estabeleceu-se uma proposta de investigação fitoquímica da espécie *Aristolochia esperanzae* Kuntze, cujos exemplares foram coletados no município de Esmeralda, em Minas Gerais.

Neste trabalho realizou-se o estudo fitoquímico do caule de *Aristolochia esperanzae* kuntze, pertencente à família Aristolochiaceae, coletada na região de Esmeraldas, Minas Gerais. As informações sobre esta espécie citam o estudo de flores, folhas e raízes. Sabe-se que essa espécie é conhecida popularmente como cipó-mil-homens ou jarrinha, sendo utilizada também pela medicina tradicional principalmente no tratamento de artrite.

Como resultado deste trabalho, estes estudos poderão servir de base para uma busca sistemática de novos fármacos potencialmente anti-inflamatórios.

No Capítulo I é descrito inicialmente um levantamento, sob o ponto de vista fitoquímico, sobre família Aristolochiaceae, o gênero *Aristolochia* e sobre a espécie *A. esperanzae*. Assim, foram realizados levantamentos sobre os constituintes químicos isolados em espécies de *Aristolochia*, descrevendo a composição dos óleos essenciais, constituintes sesquiterpênicos, diterpênicos e triterpênicos, os ácidos graxos, as amidas, os constituintes lignóides, flavanoídicos, bem como os constituintes nitrogenados de natureza não-alcaloídica, os de natureza alcaloídica e aqueles de outras naturezas químicas. A partir deste levantamento foi possível elaborar a revisão ¹³C NMR data of

diterpenes isolated from *Aristolochia species*”, conforme apresentado no Anexo I, que foi submetido a publicação na revista *Molecules*. Através deste levantamento, foi possível identificar dois diterpenos isolados das cascas do cerne.

No Capítulo I é descrito também um levantamento sobre a espécie *Aristolochia esperanzae*, comentando sobre suas características morfológicas e classificação taxonômica. Essa planta é utilizada pela medicina popular em Minas Gerais no tratamento de problemas relacionados a reumatismo. Apesar dos estudos fitoquímicos das folhas e raízes terem sido realizados anteriormente, a busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento de doenças reumáticas justifica o estudo fitoquímico das cascas do caule e do cerne.

O Capítulo II descreve as características/condições dos materiais e equipamentos empregados nas análises de caracterização estrutural dos fitoconstituintes isolados. Em seguida, é descrito o procedimento experimental realizado nos testes de atividade antimicrobiana do extrato, frações e fitoconstituintes isolados. Finalmente, neste capítulo é detalhada a metodologia fitoquímica para isolamento dos fitoconstituintes tanto das cascas do cerne quanto do cerne da planta. Deve-se ressaltar que os códigos dados às frações obedeceram à ordem de isolamento dos fitoconstituintes, não obedecendo necessariamente à ordem do fracionamento cromatográfico.

O Capítulo III descreve os resultados e discussão do isolamento dos fitoconstituintes das cascas do cerne da planta. As análises estruturais dos fitoconstituintes foram realizadas a partir dos dados de análise elementar (CHN), cromatografia a gás acoplada à espectrometria de Massas (CG/EM), espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT 135°) e 2D (COSY, NOESY, HSQC e HMBC). O mesmo foi realizado para as análises estruturais dos fitoconstituintes isolados através do fracionamento cromatográfico do cerne, que é descrito no Capítulo IV.

Durante as análises estruturais dos fitoconstituintes isolados tanto das cascas do cerne (Capítulo III) quanto do cerne (Capítulo IV), os dados físico-químicos não foram suficientes para a determinação da estereoquímica de alguns desses fitoconstituintes. Assim sendo, foram realizados cálculos teóricos

de otimização de geometria e, em seguida, cálculos de deslocamento químico de hidrogênio e de carbono-13 para inferir sobre suas estereoquímicas. Apesar de ter sido empregada metodologia teórica na determinação estrutural de muitos dos fitoconstituintes isolados, a metodologia e os seus resultados não foram descritos neste trabalho. No entanto, é apresentado no Anexo II o trabalho “A new configurational analysis of 1,6,7-triacetoxy-8,13-epoxy-14-labden-11-one isolated from *Plectranthus ornatus* based on NMR and theoretical calculations” realizado como modelo para a análise estrutural de alguns dos fitoconstituintes isolados e que foi aceito para publicação na revista “The Open Natural Products Journal”.

No Capítulo V são apresentados os resultados dos ensaios biológicos realizados com os extratos, frações e fitoconstituintes isolados da planta. Através desses ensaios foi possível verificar a atividade antimicrobiana dos extratos e, através do biomonitoramento do fracionamento cromatográfico, identificar aqueles fitoconstituintes responsáveis pelas atividades antimicrobianas.

No mais, espera-se que o que foi incluído neste trabalho seja de fácil leitura, útil como exemplo de estudos fitoquímicos futuros desta e de outras espécies vegetais e que possa contribuir para a busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento de doenças reumáticas.

Capítulo I:
A Espécie *Aristolochia esperanzae*

1. A família Aristolochiaceae

A família Aristolochiaceae pertence à superordem Magnoliiflorae juntamente com famílias mais primitivas de Angiospermae e subdivididas em cinco subfamílias e cinco tribos. Essa família é constituída por sete gêneros (*Apama*, *Aristolochia*, *Asarum*, *Euglypha*, *Holostylis*, *Saruma* e *Thottea*) com cerca de 400 espécies². O interesse medicinal desta família baseia-se no alcalóide aristoloquina como a principal substância empregada em terapêutica, além de óleo etéreo, resinas amargas e aromáticas entre outras³.

A família Aristolochiaceae despertou o interesse para pesquisadores devido a suas espécies apresentarem um singular espectro de atividades biológicas: sedativa, antitérmica, estomacai, contraceptiva, abortiva, anti-inflamatória, depurativa, diurética, emenagoga, antireumática, antisséptica, antiofídica e outras^{4,5}.

2. O Gênero *Aristolochia*

O gênero *Aristolochia* é constituído por espécies exóticas. O nome do gênero provém das propriedades medicinais alegada na antiguidade como emenagogo. Dentre essas propriedades, destacam-se a ação tônica excitante, atuação direta nas contrações uterinas, neutralização de venenos ofídicos e contra emenorréia, atonia uterina e clorose. Na jardinocultura, espécies do gênero *Aristolochia* são utilizadas por apresentarem formas ornamentais de grandes proporções, por se reproduzirem através de sementes e serem facilmente cultivadas. Algumas espécies de belas flores apresentam odor nauseabundo. Muitas de suas espécies são classificadas como plantas carnívoras, devido ao fato de pequenos insetos penetrarem no bojo da flor e não conseguirem sair, morrendo, portanto, em seu interior.

O gênero *Aristolochia* compreende aproximadamente 300 espécies de ervas anuais, trepadeiras, com distribuição predominantemente tropical. No Brasil encontram-se cerca de 90 espécies desse gênero². As espécies desse gênero apresentam grande dispersão geográfica e na flora brasileira apresentam numerosos e belos representantes⁶.

2.1. Constituintes Químicos isolados em espécies de *Aristolochia*

Dentro da família Aristolochiaceae, o gênero *Aristolochia* tem sido documentado quimicamente desde 1951⁷, revelando uma química bastante variada, produzindo como principais metabólitos secundários, terpenóides, lignóides, ácidos graxos e derivados, alcalóides, ácidos aristolóquicos e aristolactamas².

2.1.1. Composição dos Óleos Essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais das espécies do gênero *Aristolochia* são basicamente monoterpenos e sesquiterpenos. A Tabela I.1 mostra os constituintes do óleo essencial de diversas espécies do gênero *Aristolochia*.

Tabela I.1. Espécies de *Aristolochia* e componentes dos seus óleos essenciais

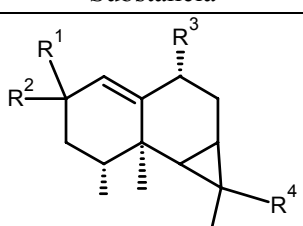
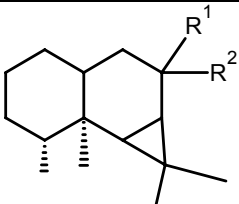
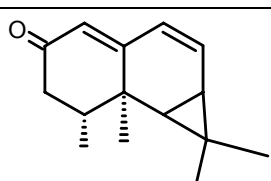
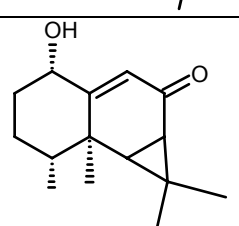
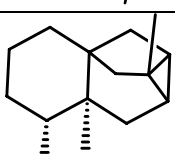
Ocorrência	Substância Identificada	Parte da Planta	Ref.
<i>A. birostris</i>	α -pineno, limoneno, σ -elemeno, β -bourboneno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno A, γ -elemeno, β -selineno, α -cadinol	Partes Aéreas	8
<i>A. cymbifera</i>	α -cubebeno, α -copaeno, β -bourboneno, β -cariofileno, <i>t</i> - α -bergamopteno, germacreno A, α -farneseno	Folhas Frescas	8
<i>A. debilis</i>	α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, limoneno, <i>t</i> - β -ocimeno, <i>p</i> -cimeno, calameno, 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetato de bornila, coriofileno, α -humuleno, β -elemeno,	Folhas e caules	9
<i>A. debilis</i>	α -pineno, canfeno, β -pineno, borneol, calameno, cânfora, 1,8-cineol, α -guaieno, α -cubebeno, β -chamigreno, σ -cadineno, α -santaleno, σ -guaieno, aromadendreno	Raízes	9
<i>A. gigantea</i>	σ -elemeno, α -copaeno, β -bourboneno, β -cariofileno, <i>t</i> - α -bergamopteno, α -cadinol, α -humuleno, germacreno D, germacreno A, γ -elemeno, σ -cadineno	Folhas	8
<i>A. gigantea</i>	Linalol, α -terpineol, α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, <i>t</i> - α -bergamopteno, α -humuleno, germacreno D, α -cadinol, α -farneseno, (E)-nerolidol	Ramos	8
<i>A. gigantea</i>	linalol, α -terpineol, geraniol, nerol, α -copaeno, β -cariofileno	Flores	8
<i>A. indica</i>	ishwarano, ishwarona, ishwarol	Raízes	10
<i>A. longa</i>	borneol, acetato de bornila, linalol, β -cariofileno, maaliol	Raízes	11
<i>A. macroura</i>	Linalol, σ -elemeno, α -cubebeno, α -copaeno, β -bourboneno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, γ -muuroleno, germacreno D, γ -elemeno, α -farneseno, σ -cadineno, (E)-nerolidol, α -cadinol	Folhas	8
<i>A. papillaris</i>	limoneno, linalol, calareno, α -copaeno, β -elemeno, α -humuleno, γ -elemeno, γ -cadineno, σ -cadineno, α -cadinol	Partes Aéreas	8
<i>A. reticulata</i>	(-)-borneol, (-)- Δ^4 -careno	-	10
<i>A. rodriguesia</i>	Linalol, 4-terpineol, α -terpineol, σ -elemeno, α -cubebeno, β -bourboneno, α -copaeno, β -elemeno, nerol, <i>t</i> - α -bergamopteno, σ -cadineno, α -cadinol, calareno	Folhas	8
<i>A. triangulares</i>	β -cariofileno, germacreno D, α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno, α -humuleno, γ -elemeno, γ -cadineno, σ -cadineno, (E)-nerolidol,	Partes Aéreas	8, 12

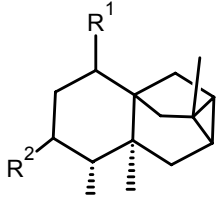
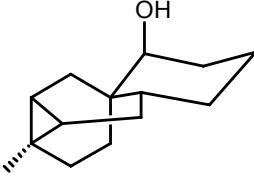
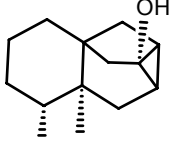
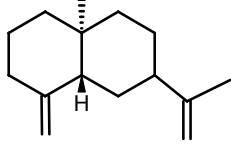
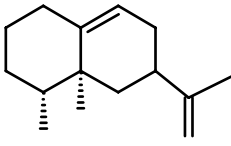
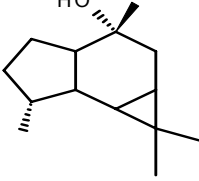
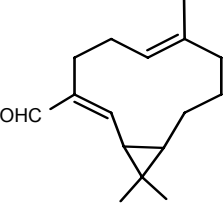
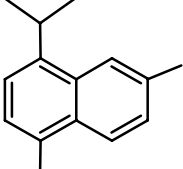
<i>A. triangulares</i>	β -bisaboleno, <i>t</i> -nerolidol, álcoois sesquiterpênicos	Ramos e Raízes	12
<i>A. zenkeri</i>	(+)-borneol, (-)-canfeno	-	10

2.1.2. Constituintes Sesquiterpênicos

A Tabela I.2 descreve os compostos sesquiterpênicos isolados de espécies do gênero *Aristolochia*.

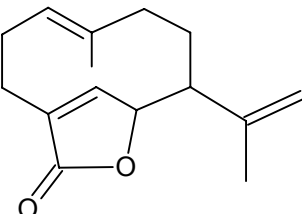
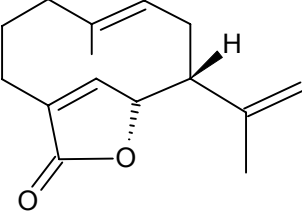
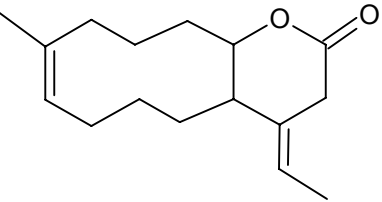
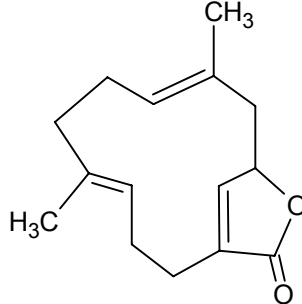
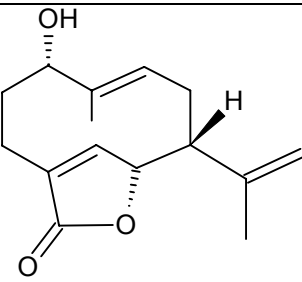
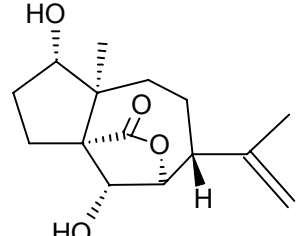
Tabela I.2. Sesquiterpenos isolados de espécies de *Aristolochia*

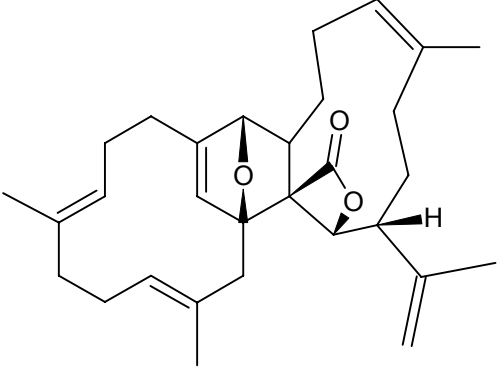
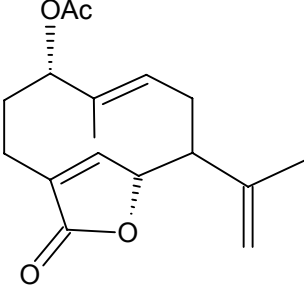
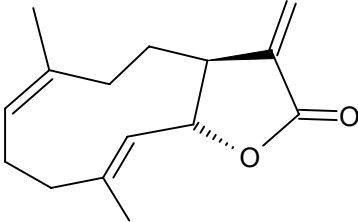
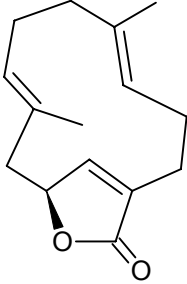
Espécie	Substância	Ref.
<i>A. debilis</i>	 <p> $R^1 = R^2 = O; R^3 = OH; R^4 = H$ $R^1 = R^2 = O; R^3 = OOH; R^4 = H$ $R^1 = R^2 = R^3 = H; R^4 = CHO$ </p>	13
<i>A. debilis</i>	 <p> $R^1 = R^2 = H$ $R^1 = R^2 = O$ </p>	13
<i>A. debilis</i>		13
<i>A. debilis</i>		13
<i>A. debilis</i> <i>A. indica</i>		13, 10, 14, 15

<p><i>A. debilis</i> <i>A. Indica</i></p>	 <p>$R^1 = O, R^2 = H$ $R^1 = H, R^2 = O$</p>	<p>13, 10, 14, 15</p>
<p><i>A. debilis</i> <i>A. Indica</i></p>		<p>13, 10, 14, 15</p>
<p><i>A. Indica</i></p>		<p>16</p>
<p><i>A. Indica</i></p>		<p>15</p>
<p><i>A. Indica</i></p>		<p>17</p>
<p><i>A. Indica</i></p>		<p>16</p>
<p><i>A. manshuriensis</i></p>		<p>18</p>
<p><i>A. constricta</i></p>		<p>19</p>

No gênero *Aristolochia*, as lactonas sesquiterpênicas são majoritariamente representadas por lactonas dos tipos germacrano e versilactonas, como mostradas na Tabela I.3.

Tabela I.3. Lactonas sesquiterpênicas isoladas de espécies de *Aristolochia*

Espécie	Substância	Referência
<i>A. reticulata</i>		10
<i>A. versicolor</i>		20
<i>A. molissima</i>		21
<i>A. versicolor</i>		22
<i>A. versicolor</i>		23
<i>A. versicolor</i>		23, 24

<i>A. versicolor</i>		25
<i>A. versicolor</i>		26
<i>A. yunnanensis</i>		27
<i>A. manshuriensis</i>		28

2.1.3. Constituintes Diterpênicos

Um grande número de compostos diterpênicos tem sido isolado de espécies do gênero *Aristolochia*. A maioria dos diterpenóides são derivados kaurânicos, clerodânicos e labdânicos (Figura I.1), além de um furanoditerpeno isolado de *A. albida* e (*E*)-fitol, isolado de três espécies do gênero. As Tabelas I.4, I.5 (p. 26) e I.6 (p. 31) apresentam diterpenóides kauranos (Tabela I.4; Figuras I.2, p. 25 e I.3, p. 26), clerodanos (Tabela I.5; Figuras I.4, p. 29 e I.5, p. 30) e labdanos (Tabela I.6; Figura I.6, p. 32) isolados das espécies desse gênero, além do furanoditerpeno (Figura I.7, p. 33). O Anexo 1 (p. 202) mostra uma compilação dos dados de RMN dos 57 diterpenos isolados de espécies do gênero *Aristolochia* que foram registrados entre 1981 e 2007. Para algumas estruturas os dados de RMN de ^{13}C não foram encontrados na literatura e, em outros casos, os dados estão em desacordo com aqueles da literatura, além de algumas estruturas diferentes serem igualmente nomeadas.

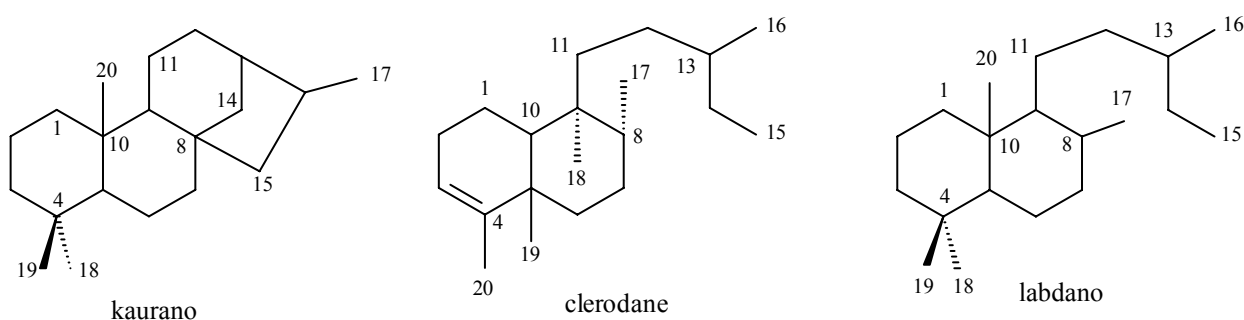


Figura I.1. Principais classes de diterpenos presentes em espécies do gênero *Aristolochia*.

Tabela I.4. Diterpenos kaurânicos isolados de espécies *Aristolochia*

Kaurano*	Espécies
(-)-Kauranol (1)	<i>A. rodriguesii</i> ²⁹
ácido <i>ent</i> -16 β (<i>H</i>)-kauran-17-óico (2)	<i>A. elegans</i> ³⁰ ; <i>A. triangulares</i> ³¹
<i>ent</i> -kauran-16 α ,17-diol (3)	<i>A. elegans</i> ³⁰ ; <i>A. pubescens</i> ³² ; <i>A. triangulares</i> ³¹
<i>ent</i> -16 β (<i>H</i>)-kaurano (4)	<i>A. elegans</i> ³⁰ ; <i>A. triangulares</i> ³¹

Tabela I.4. (Continuação)

Kaurano*	Espécies
<i>ent</i> -16 α (<i>H</i>)-kauran-17-al (5)	<i>A. elegans</i> ³⁰
<i>ent</i> -16 β ,19-diidroxikaurano (6)	<i>A. rodriguesii</i> ²⁹
Hidroxi(-)-kauran-19-al (7)	<i>A. rodriguesii</i> ²⁹ ; <i>A. triangulares</i> ³⁴
Ácido <i>ent</i> -16 β ,17-diidrox(-)-kauran-19-óico (8)	<i>A. rodriguesii</i> ²⁹
16 α (-)-kauran-16 α -hidroxi-18-al (9)	<i>A. triangulares</i> ²
<i>ent</i> -16 β ,17-epoxikaurano (10)	<i>A. elegans</i> ³⁰ ; <i>A. triangulares</i> ³⁴
Ácido 15 α ,16 α -epoxi-17-hidroxi- <i>ent</i> -kauran-19-óico (11)	
<i>ent</i> -15 β ,16 β -epoxikauran-17-ol (12)	
Ácido <i>ent</i> -16 β ,17-isopropilidenedioxi(-)-19-óico (13)	
17- <i>nor</i> (-)-kauran-16-ona (14)	<i>A. triangulares</i> ³¹
Ácido 17-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-15-en-19- óico (15)	<i>A. rodriguesii</i> ²⁹
<i>ent</i> -kaur-15-en-17-ol (16)	<i>A. elegans</i> ³⁰ ; <i>A. pubescens</i> ³² <i>A. triangulares</i> ^{31,34}
Ácido (-)-11-hidroxi-kaur-16-en-19- óico (17)	<i>A. anguicida</i> ³⁵
Ácido (-)-kaur-16-en-18- óico (ácido kaurênico; 18)	<i>A. anguicida</i> ³⁵ ; <i>A. rodriguesii</i> ²⁹ ; <i>A. triangulares</i> ³¹
(-) <i>ent</i> -kaur-16-eno (19)	<i>A. triangulares</i> ^{31,34}
(-)-kaur-16-en-18-ol (20)	<i>A. triangulares</i> ^{31,34}
(-)-kaur-16-en-18-al (21)	<i>A. triangulares</i> ^{31,34}
Ácido 7 β -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-18- óico (22)	<i>A. anguicida</i> ³³
<i>ent</i> -3 β ,18-diidroxikaur-16-eno (23)	<i>A. rodriguesii</i> ²⁹
16 α -hidroxi- <i>ent</i> -17-kauranil aristolachato I (aristoloina I; 24)	<i>A. pubescens</i> ³²
16 α -hidroxi- <i>ent</i> -17-kauranil aristolachato II (aristoloina II; 25)	<i>A. pubescens</i> ³²

Tabela I.4. (Continuação)

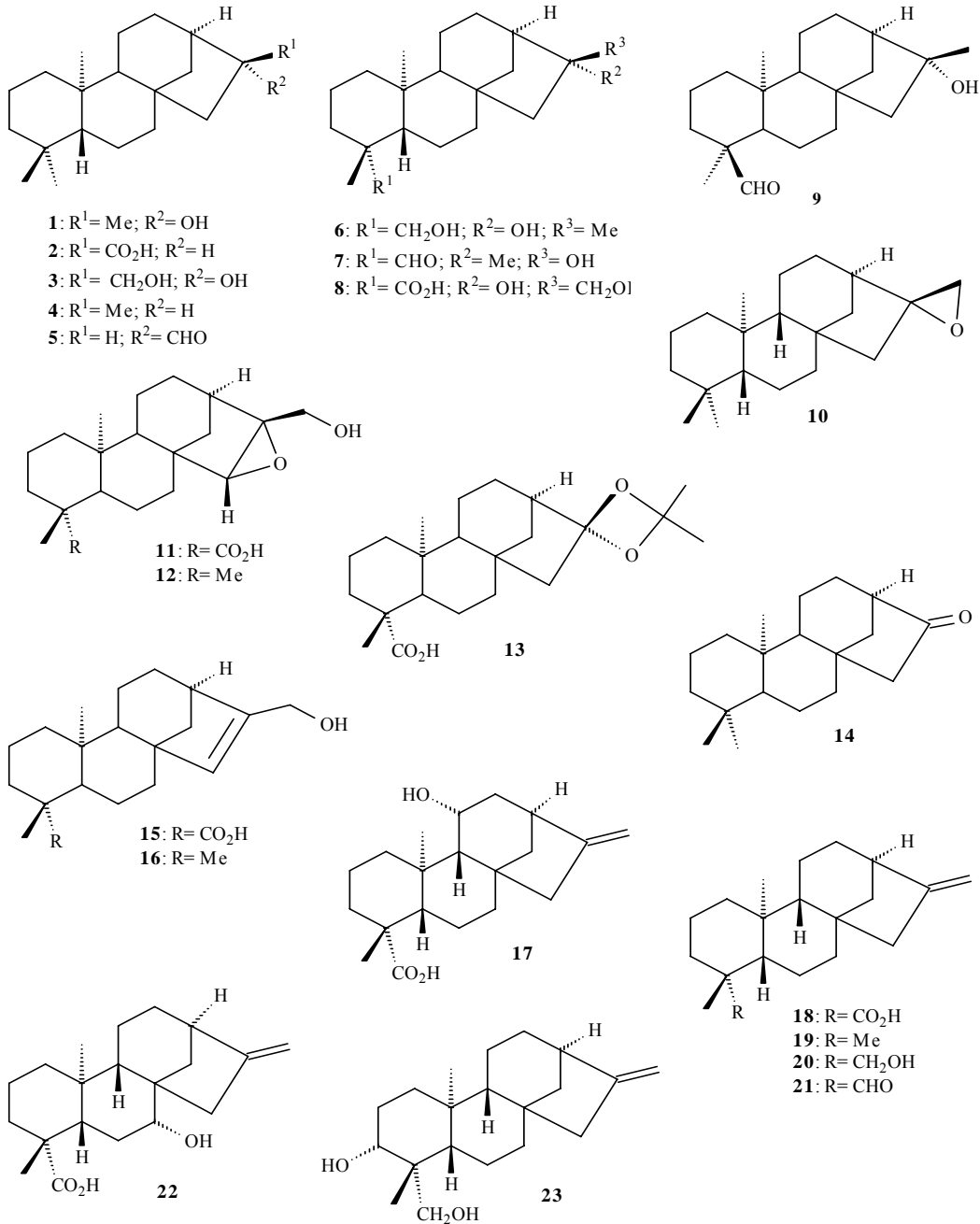
Kaurano*

Espécies

Aristolina (26)

*A. elegans*³⁶

* Ver figuras I.2 a I.3 p.25)

Figura I.2. Diterpenos kaurânicos isolados de espécies *Aristolochia*.

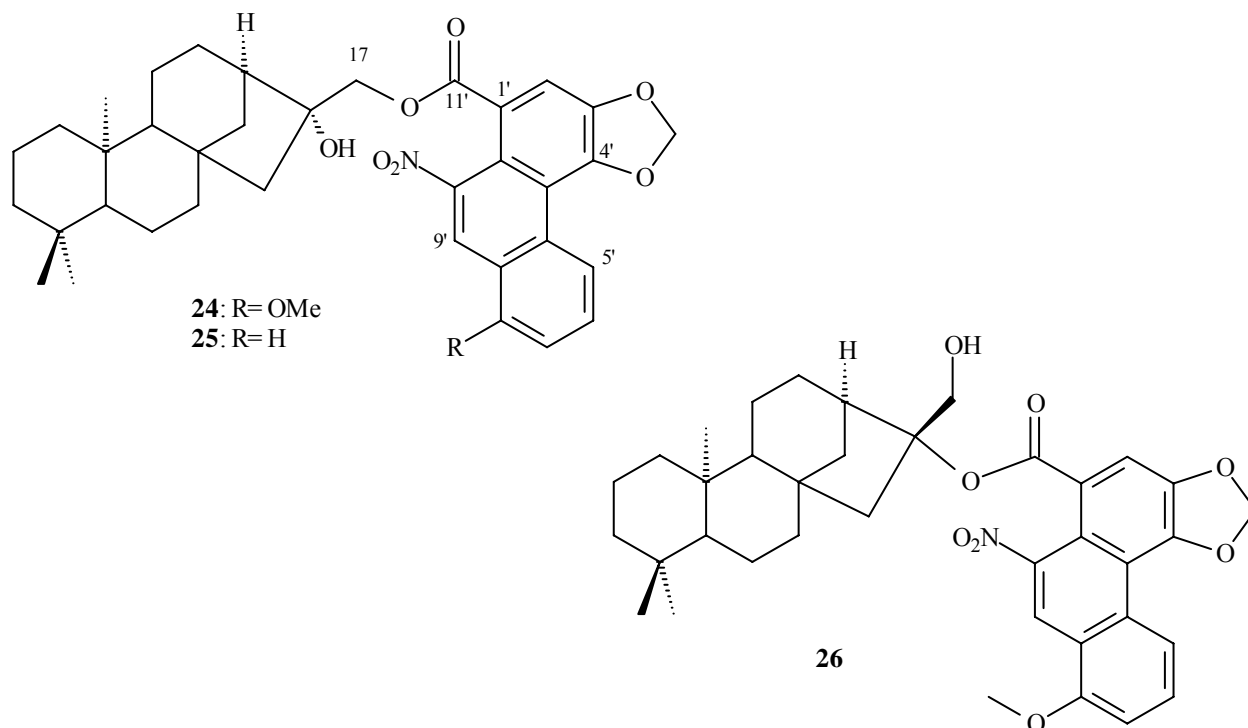


Figura I.3. Diterpenoides kaurânicos substituídos isolados de espécies *Aristolochia*.

Tabela I.5. Diterpenos clerodânicos isolados de espécies *Aristolochia*

Clerodano*	Espécies
Ácido (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-cleroden-15-óico (Ácido 13,14-diidrokolavênico; ácido populifólico; 27)	<i>A. cymbifera</i> ³⁸ ; <i>A. galeata</i> ³⁹
Diidrokolavenol (28)	<i>A. galeata</i> ³⁹
Acetato de diidrokolavenol (29)	<i>A. galeata</i> ³⁹
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oato de metila (populifoloato de metila) (30)	<i>A. esperanzae</i> ³⁷ ; <i>A. galeata</i> ³⁹

Tabela I.5. (Continuação)

Clerodano*	Espécies
Ácido (5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-cleroden-15- óico (ácido <i>epi</i> -populifólico) (31)	<i>A. cymbifera</i> ³⁸
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oato de metila (32)	<i>A. cymbifera</i> ³⁸
Ácido $\Delta^{13,14}$ -kolavênico(33)	<i>A. brasilienses</i> ³⁷ ; <i>A. galeata</i> ³⁹
clerod-3,13-dien-15-ol ($\Delta^{13,14}$ -kolavenol; 34)	<i>A. galeata</i> ³⁹
kolavenoato de acetila (35)	<i>A. galeata</i> ³⁹
kolavenoato de metila (36)	<i>A. esperanzae</i> ³⁷ ; <i>A. galeata</i> ³⁹
Ácido <i>rel</i> -(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -clerod-3,13-dien-15- óico (37)	<i>A. brasilienses</i> ³⁷
(+)-Kolavelool (38)	<i>A. galeata</i> ³⁹
Ácido (+)-(4→2)- <i>abeo</i> -kolavelool-3- óico (39)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰
(-)-3 α ,4 β -diidroxikolavelool (40)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰
(-)-Kolavelool (41)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰ ; <i>A. cymbifera</i> ³⁸ ; <i>A. galeata</i> ³⁸
(-)-2 β -Hidroxikolavelool (42)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰
(+)-13- <i>epi</i> -2 α -hidroxikolavelool (13- <i>epi</i> -roseostachenol; 43)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰
Ácido <i>rel</i> -(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-oxo- <i>ent</i> -3-cleroden-15- óico (44)	<i>A. brasilienses</i> ³⁷
Ácido 2-oxopopulifólico (45)	<i>A. brasilienses</i> ³⁸ ; <i>A. cymbifera</i> ³⁸ ; <i>A. galeata</i> ³⁹
Acetato de 2-oxodiidrokolavenol (46)	<i>A. galeata</i> ³⁹

Tabela I.5. (Continuação)

Clerodano*	Espécies
2-Oxopopulifolato de metila (47)	<i>A. esperanzae</i> ³⁷
(-)-13- <i>epi</i> -2-oxokolavelool (13- <i>epi</i> -roseostachenone; 48)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-oxo- <i>ent</i> -clerod-3,13- dien-15-oato de metila (49)	<i>A. brasilienses</i> ³⁷
Ácido $\Delta^{13,14}$ -2-oxokolavenico (50)	<i>A. brasilienses</i> ³⁷
$\Delta^{13,14}$ -2-oxokolavenoato de metila (51)	<i>A. esperanzae</i> ³⁷
Ácido <i>rel</i> -(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-oxo- <i>ent</i> -clerod-3,13- dien-15-óico (52)	<i>A. brasilienses</i> ³⁷
(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-hidroperoxi- <i>ent</i> -3- cleroden-15-oato de metila (53)	<i>A. esperanzae</i> ³⁷
(-)-2 β -hidroperoxikolavelool (54)	<i>A. chamissonis</i> ⁴⁰
(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-hidroperoxi- <i>ent</i> - clerod-3,13-dien-15-oato de metila (55)	<i>A. esperanzae</i> ³⁷

* Ver figuras I.4 (p. 29) e I.5 (p. 30)

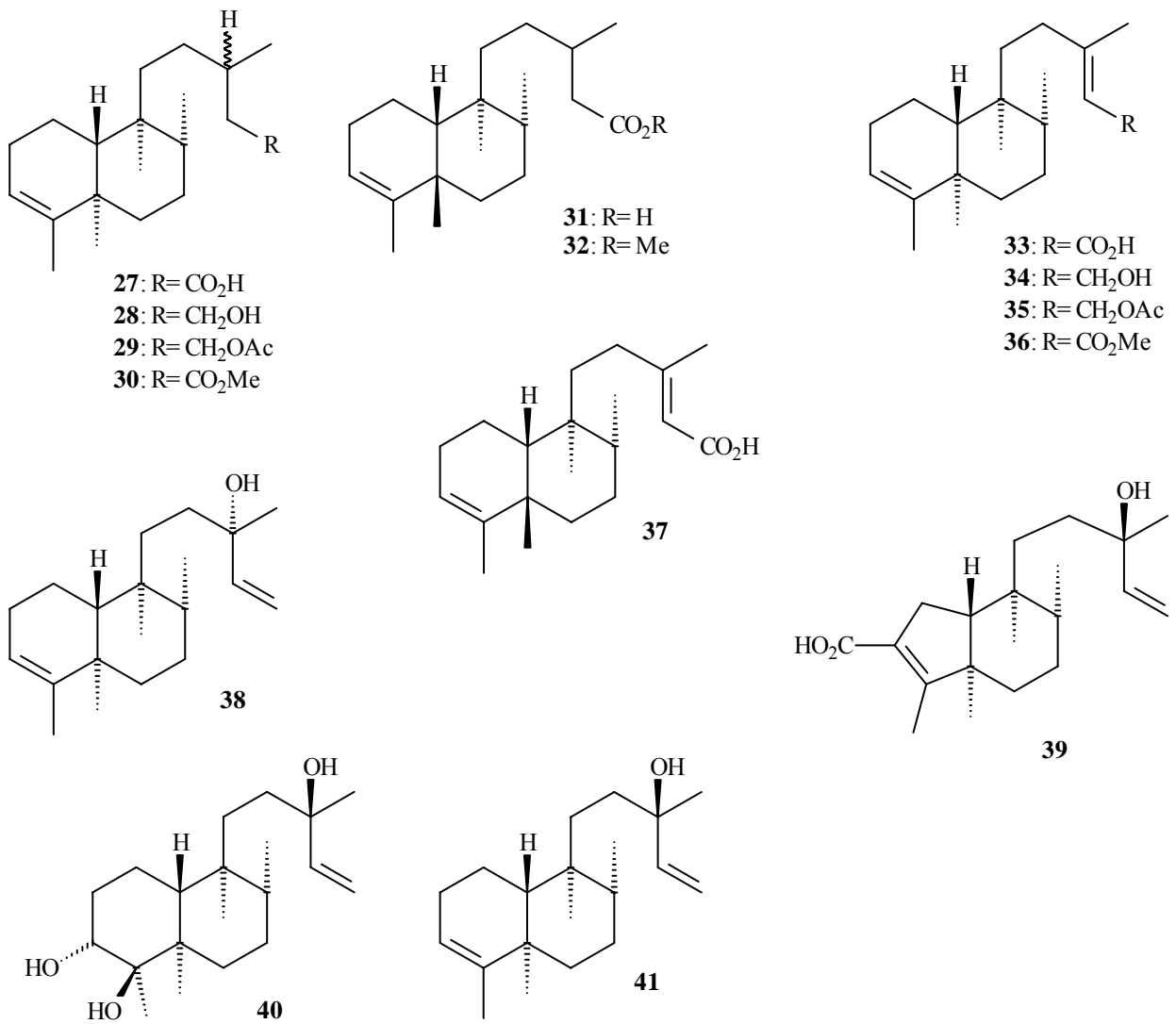


Figura I.4. Diterpenos clerodânicos isolados de espécies *Aristolochia*.

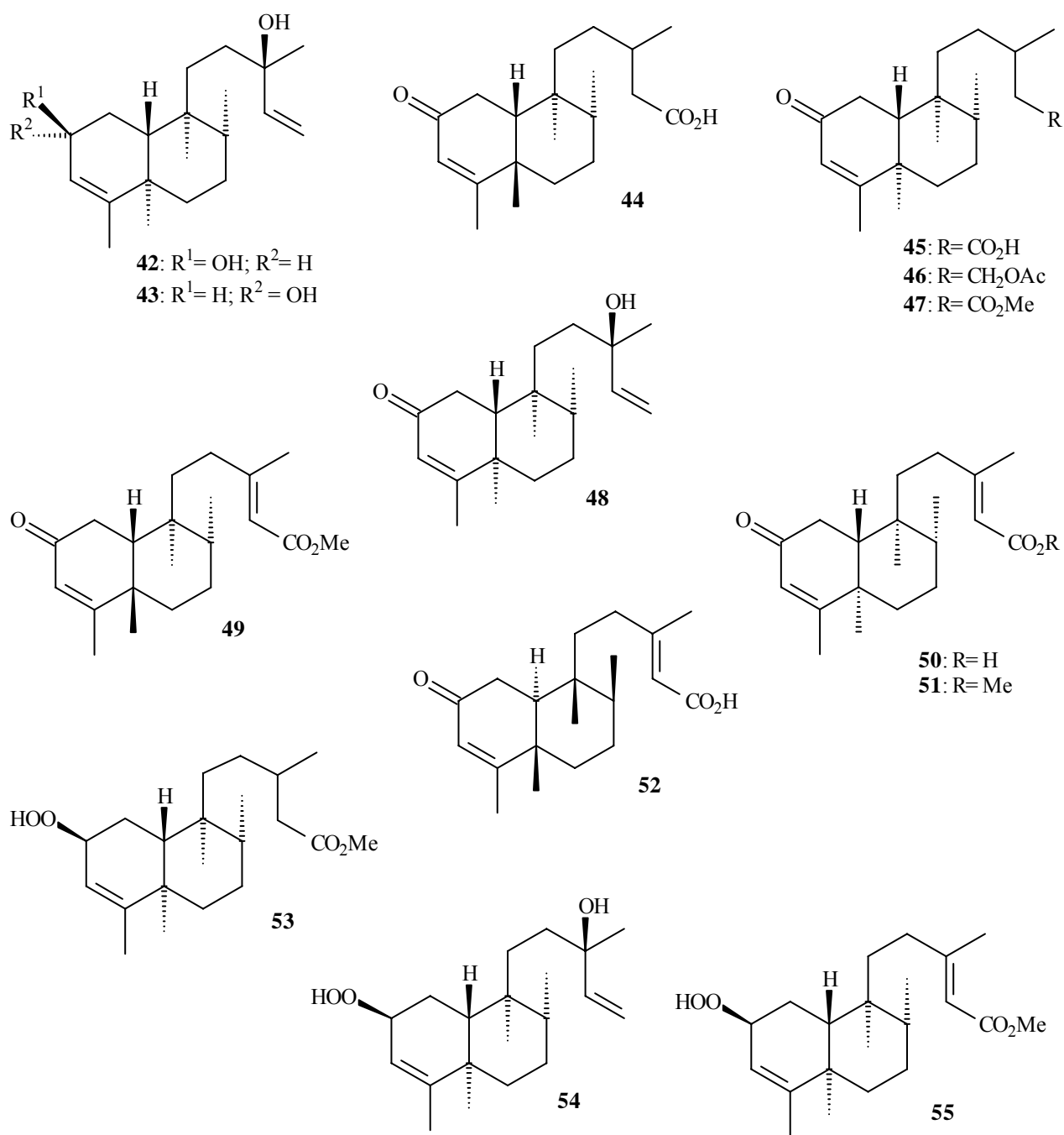


Figura I.5. Diterpenos clerodânicos oxigenados em C-2 isolados de espécies *Aristolochia*.

Tabela I.6. Diterpenos labdânicos isolados de espécies *Aristolochia*

Labdano*	Espécies
Ácido <i>ent</i> -labdan-8 β -ol-15- óico (57)	<i>A. galeata</i> ³⁹
Ácido $\Delta^{13,14}$ - <i>ent</i> -Labd-8 β -ol-15- óico (Ácido <i>ent</i> -labd-13-en-8 β -ol-15- óico; 58)	<i>A. galeata</i> ³⁹
<i>ent</i> -labd-8 β -ol-14-eno (60)	<i>A. cymbifera</i> ³⁹
Ácido <i>ent</i> -labd-8(17)-en-15- óico (62)	<i>A. ringens</i> ⁴¹
Ácido copálico (63)	<i>A. esperanzae</i> ³⁹ ; <i>A. galeata</i> ³⁹
Ácido <i>ent</i> -labd-6 β -ol-8(17),13-dien-15- óico (64)	<i>A. esperanzae</i> ³⁹
Copalato de metila (65)	<i>A. esperanzae</i> ³⁹
<i>ent</i> -Labd-6 β -ol-8(17),13-dien-15-oato de metila (66)	<i>A. esperanzae</i> ³⁹
<i>ent</i> -labd-8,14-dieno (67)	<i>A. cymbifera</i> ³⁹

* Ver figura I.6 (p. 32)

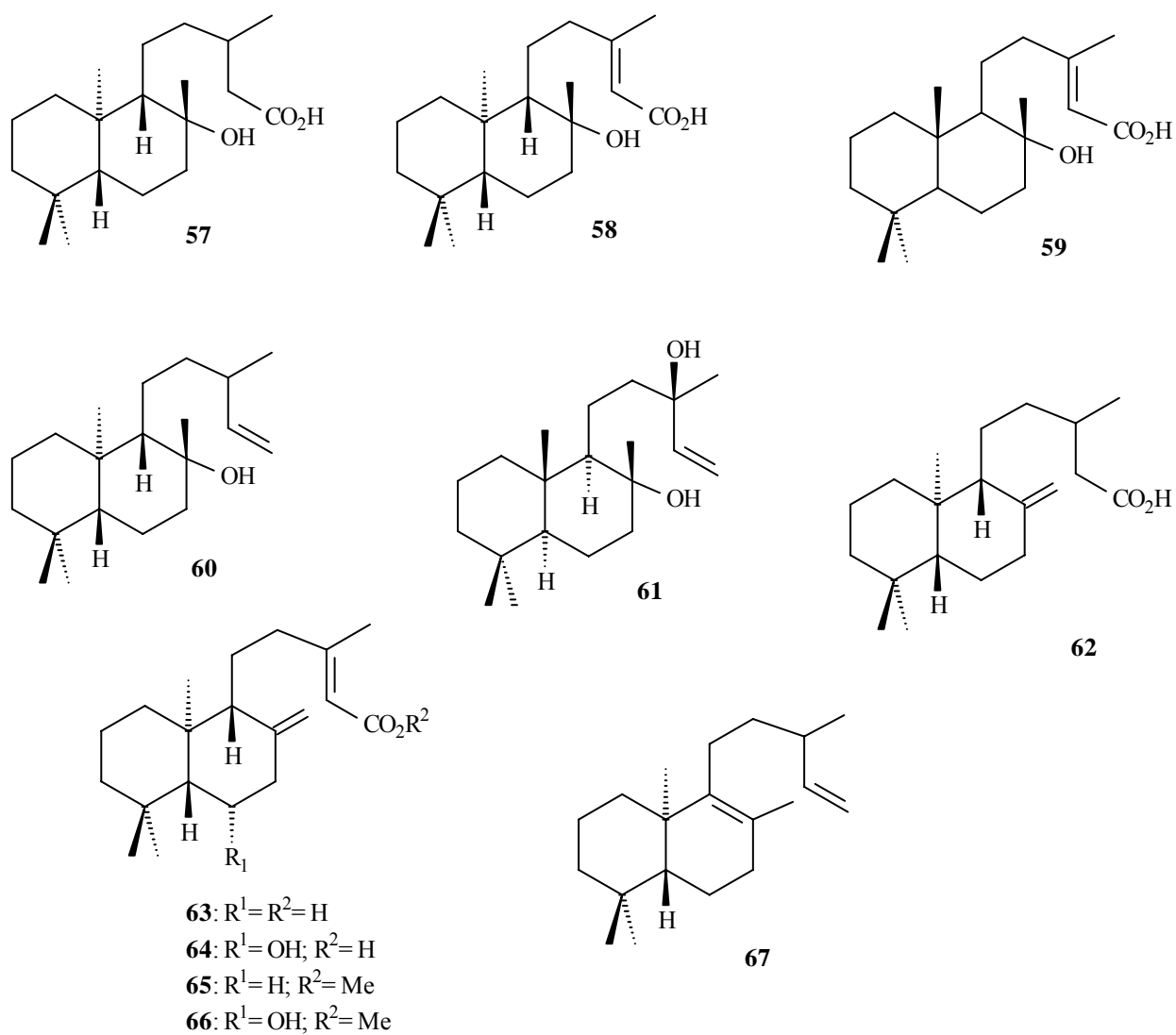


Figura I.6. Diterpenos labdânicos isolados de espécies *Aristolochia*.

O único furanoditerpeno encontrado no gênero *Aristolochia* é mostrado na Figura I.7, tratando-se de columbina e isolada de *A. albida*⁴².

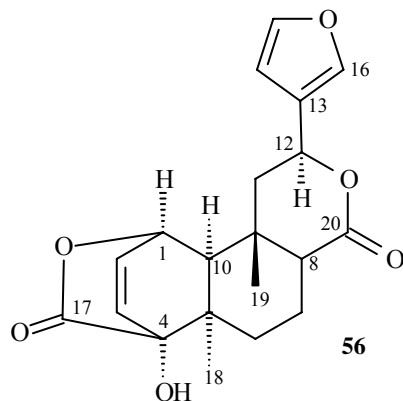


Figure I.7. Furanoditerpeno isolado de *Aristolochia albida*.

O estudo fitoquímico de *A. elegans*⁴³, *A. odoratissima*⁴⁴ e *A. peltato-deltaidea*⁴⁵ conduziu ao diterpeno (*E*)-fitol mostrado na Figura I.8.

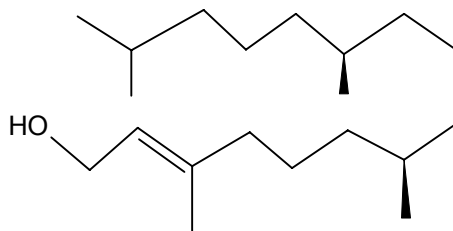


Figure I.8. (*E*)-fitol isolado de *Aristolochia elegans*, *A. peltato-deltaidea* e *A. odoratissima*.

O estudo fitoquímico de espécies do gênero *Aristolochia* revelou um único derivado tri-hidroxiado de diterpenos kaurânicos, isolado de *A. constricta*⁴⁶ cuja estrutura é mostrada na Figura I.9.

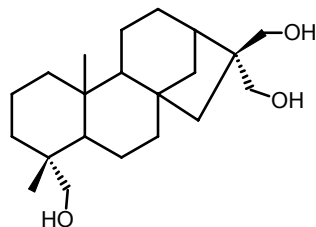
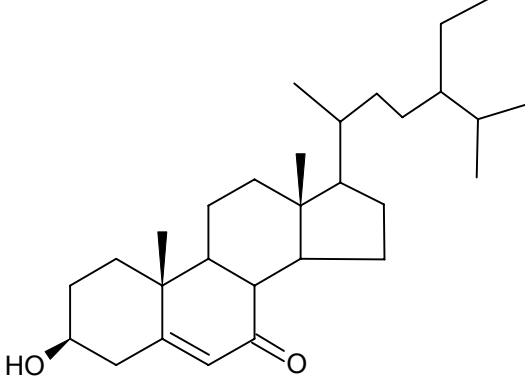
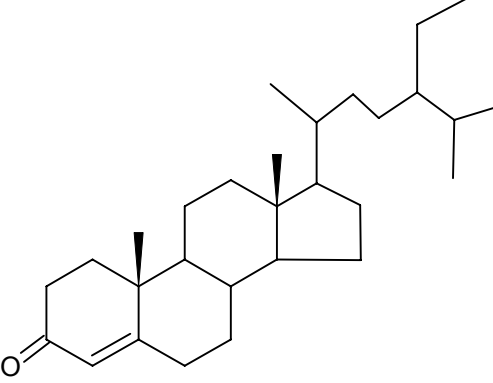
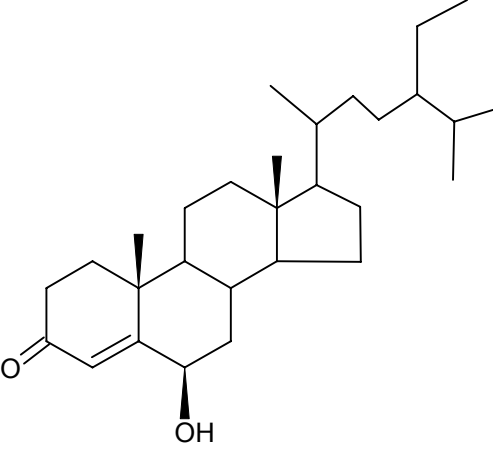


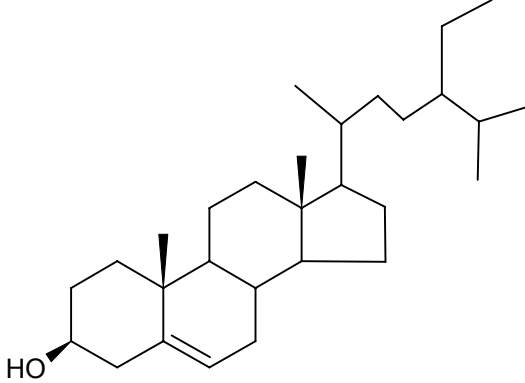
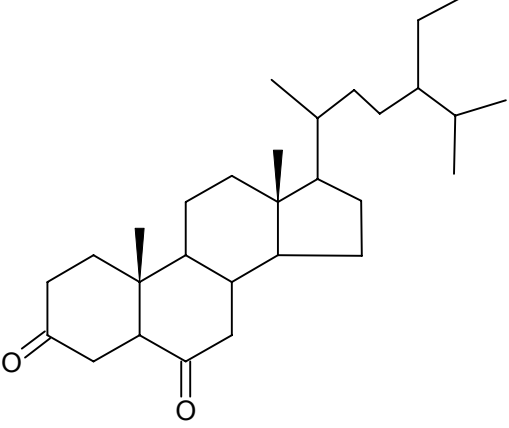
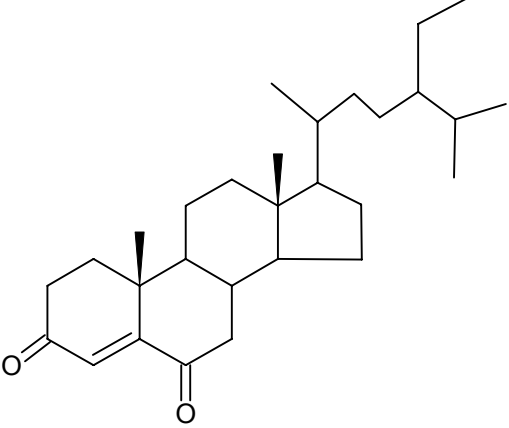
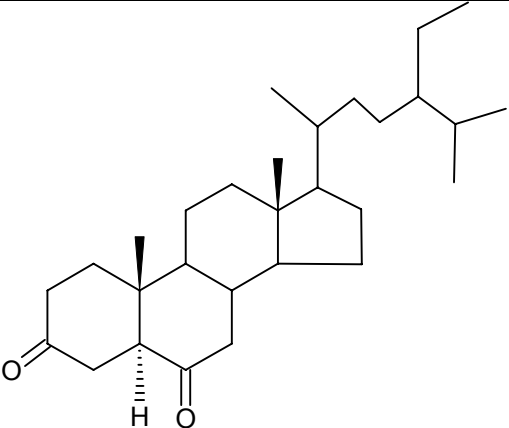
Figure I.9. (-)-Kauran-16 α ,17,18-triol isolado de *A. constricta*.

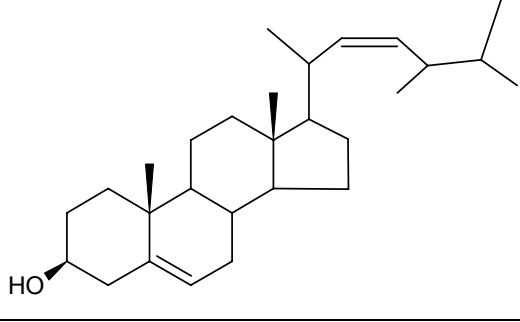
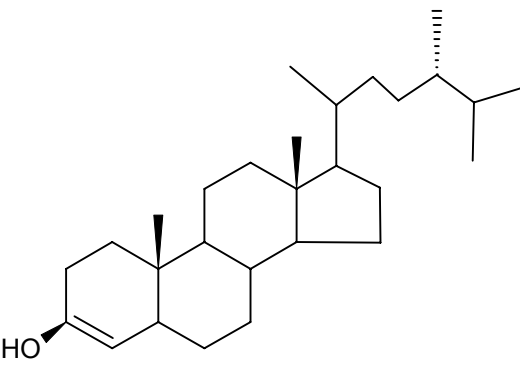
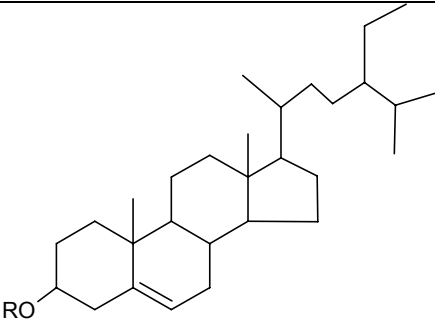
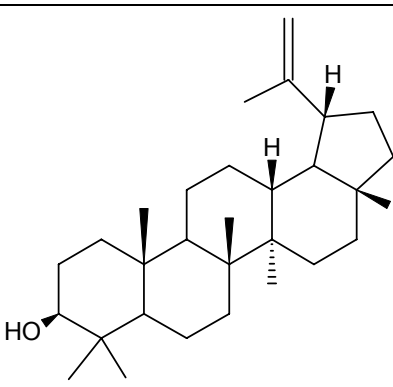
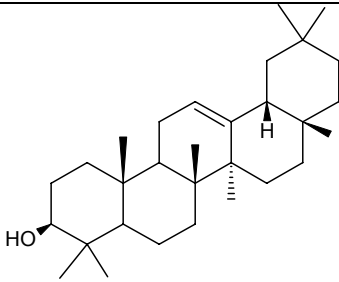
2.1.4. Constituintes Triterpênicos

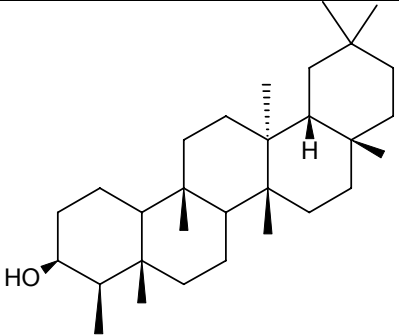
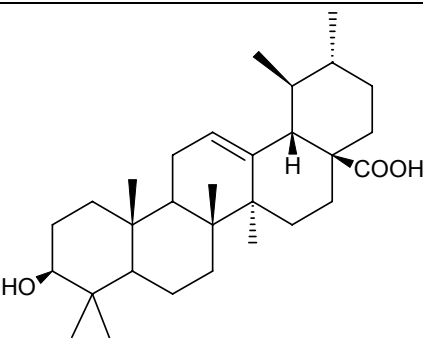
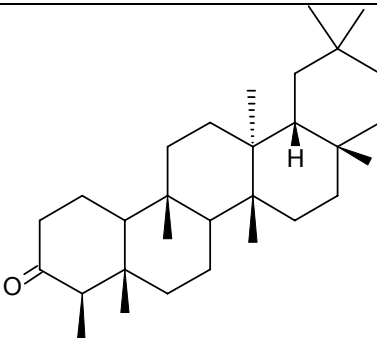
O isolamento de esteróides é freqüente em diversas espécies do gênero *Aristolochia*, sendo representados principalmente por sitosterol, estigmasterol e vários de seus derivados, como mostra a Tabela I.7.

Tabela I.7: Ocorrência de esteróides no gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>A. indica</i>		47
<i>A. indica</i>		47
<i>A. indica</i> <i>A. triangulares</i>		47

<p><i>A. galeata</i>,</p> <p><i>A. indica</i>, <i>A. serpentaria</i>,</p> <p><i>A. debilis</i>, <i>A. championii</i>,</p> <p><i>A. elegans</i>, <i>A. zenkeri</i></p> <p><i>A. longa</i></p> <p><i>A. triangulares</i></p>		<p>39</p> <p>47</p> <p>48</p> <p>49</p>
<p><i>A. triangulares</i></p>		<p>47</p>
<p><i>A. triangulares</i></p>		<p>47</p>
<p><i>A. indica</i></p>		<p>47</p>

<i>A. indica</i>		47
<i>A. indica</i>		47
<i>A. constricta</i>	 <p data-bbox="750 1220 949 1265">R = Glicosídeo</p>	54
<i>A. esperanzae</i>		55
<i>A. esperanzae</i>		55

<i>A. esperanzae</i>		55
<i>A. esperanzae</i>		55
<i>A. esperanzae</i> <i>A. indica</i>		55 56

O estudo fitoquímico de *A. gehrtii*⁵⁷ conduziu ao tetraterpenóide apocarotenóide mostrado na Figura I.9.

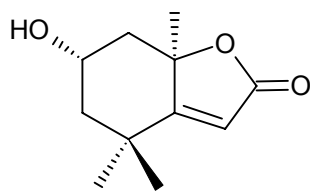


Figure I.9. Apocarotenóide isolado de *Aristolochia gehrtii*.

2.1.5. Constituintes Ácidos graxos

As espécies de *Aristolochia* são bastante ricas em substâncias graxas. A Tabela I.8 mostra os ácidos graxos isolados desse gênero.

Tabela I.8. Ácidos graxos isolados em espécies do gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>A. zenkeri</i>	Ácido butírico	10
<i>A. bracteata</i>	Ácido mirístico	10
<i>A. indica, A. zenkeri, A. bracteata</i>	Ácido palmítico	10
<i>A. longa</i>		48
<i>A. moupinensis</i>		47
<i>A. indica, A. bracteata</i>	Ácido esteárico	47
<i>A. longa</i>		48
<i>A. indica, A. bracteata</i>	Ácido oléico	47
<i>A. longa</i>		48
<i>A. indica</i>	Ácido linoléico	47
<i>A. longa</i>		48

2.1.6. Constituintes Lignóides

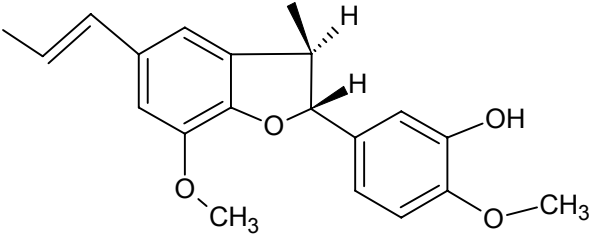
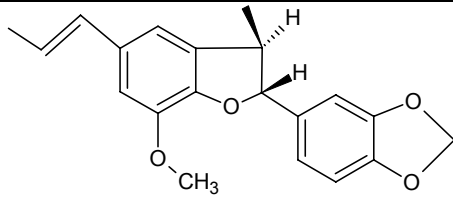
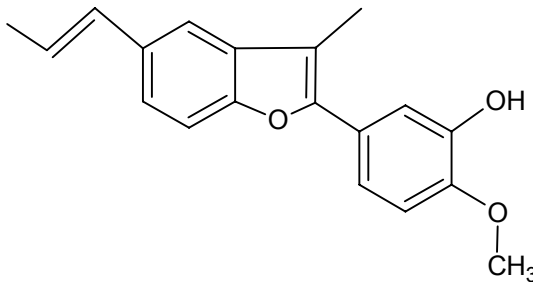
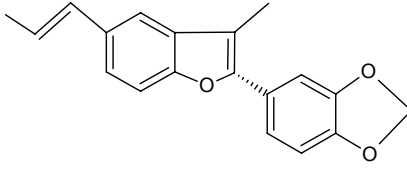
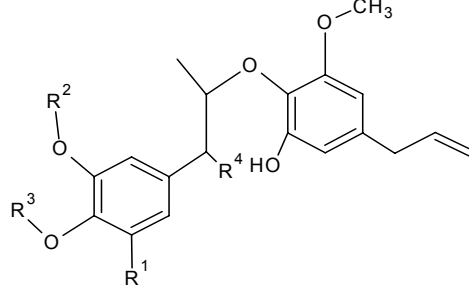
No gênero *Aristolochia* são encontrados lignóides do tipo fenilpropanóides, como descrito na Tabela I.9.

Tabela I.9. Fenilpropanóides isolados em espécies do gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>A. clematitidis</i>	Ácido <i>p</i> -cumárico	10
<i>A. indica, A. moupinensis</i>		47
<i>A. siphon</i>	Éster metílico do ácido gentísico	10
<i>A. siphon</i>	Éster metílico do ácido ferúlico	10
<i>A. clematitidis, A. siphon</i>	Ácido caféico	10
<i>A. siphon</i>	Éster metílico do ácido caféico	10
<i>A. clematitidis</i>	Ácido sinápico	10

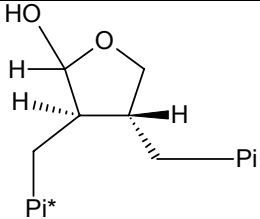
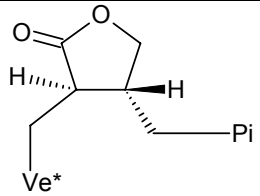
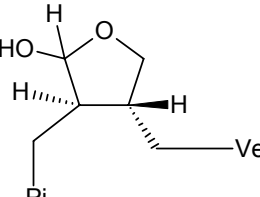
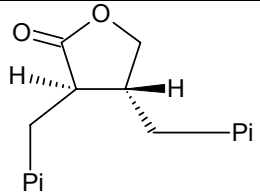
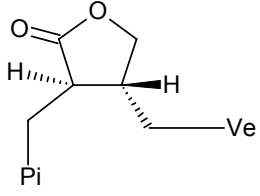
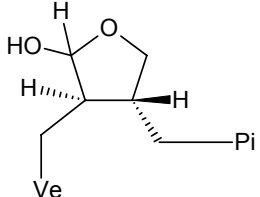
O gênero *Aristolochia* apresenta fitoconstituintes do tipo neolignan, como mostra a Tabela I.10.

Tabela 10: Ocorrência de neolignanas no gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>Aristolochia</i> sp.		58
<i>Aristolochia</i> sp.		58
<i>Aristolochia</i> sp.		58
<i>Aristolochia</i> sp.		58
<i>A. birostris</i>	 <p data-bbox="606 1792 1077 1993"> $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2, R^3 = -\text{CH}_2-$; $R^4 = \text{H}$ $R^1, R^4 = \text{H}$; $R^2, R^3 = -\text{CH}_2-$ $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2, R^3 = \text{CH}_3$; $R^4 = \text{H}$ $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2, R^3 = -\text{CH}_2-$; $R^4 = \text{OH}$ </p>	59

As lignanas do tipo dibenzilbutirolactona, furofurano, tetraidrofurano e 4-ariltetralona isoladas em espécies do gênero *Aristolochia* são mostradas nas Tabelas I.11, I.12 (p. 42), I.13 (p. 42) e I.14 (p. 44).

Tabela I.11. Lignanas do tipo dibenzilbutirolactona isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>A. birostris</i> <i>A. elegans</i> <i>A. esperanzae</i> , <i>A. galeta</i> <i>A. triangulares</i>	 <p>* Pi = 3,4-metilenodioxifenil</p>	47 60 39 34, 61
<i>A. galeata</i>	 <p>*Ve = 3,4-dimetoxifenil</p>	62
<i>A. triangulares</i>		34,61
<i>A. birostris</i> , <i>A. indica</i> <i>A. triangulares</i>		47 61
<i>A. galeata</i> <i>A. triangulares</i>		39 61
<i>A. triangulares</i>		34

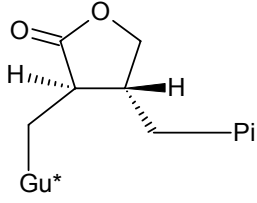
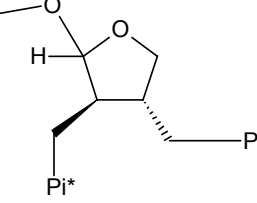
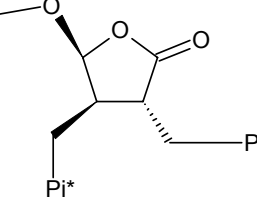
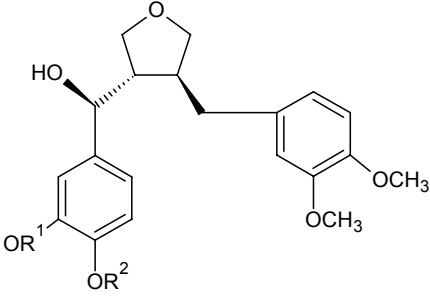
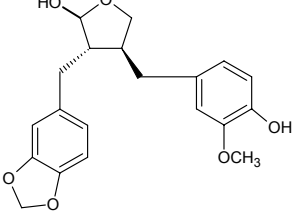
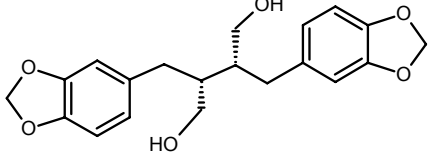
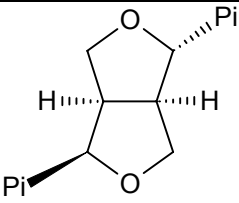
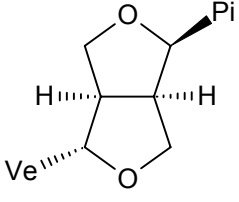
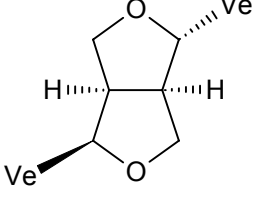
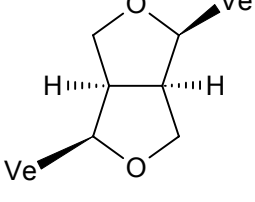
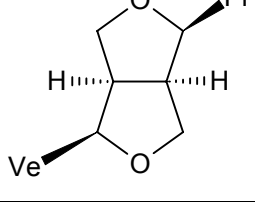
<i>A. triangulares</i>	 <p>Gu* = 3-metoxi, 4-hidroxi-fenil</p>	63
<i>A. constricta</i>		64
<i>A. elegans</i>		36
<i>A. elegans</i>	 <p>$R^1 = R^2 = OCH_3$ $R^1 = R^2 = OCH_2O$</p>	36
<i>A. constricta</i>		65
<i>A. constricta</i>		66

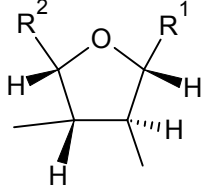
Tabela I.12. Lignanas do tipo furofurano isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

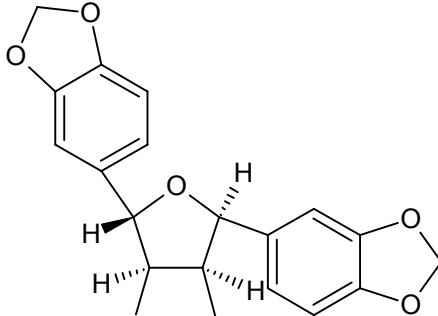
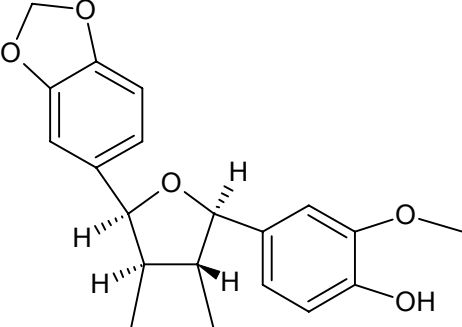
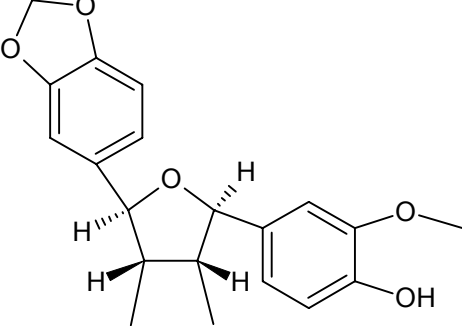
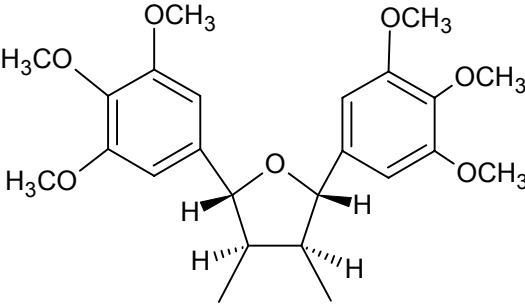
Espécie	Substância	Ref.
<i>A. galeata</i>		39,61
<i>A. galeata</i> , <i>A. brasiliensis</i> , <i>A. esperanzae</i>		39, 61, 63
<i>A. elegans</i>		30
<i>A. brasiliensis</i> , <i>A. cymbifera</i> , <i>A. esperanzae</i>		63
<i>A. elegans</i>		30

Pi = 3,4-metilenodioxifenil

Ve = 3,4-dimetoxifenil

Tabela I.13. Lignanas do tipo tetraidrofurano isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

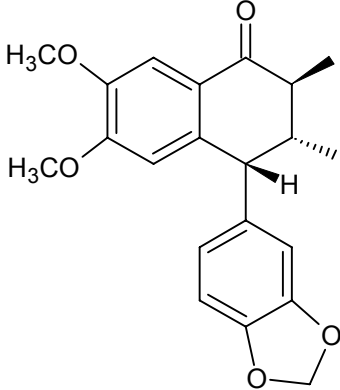
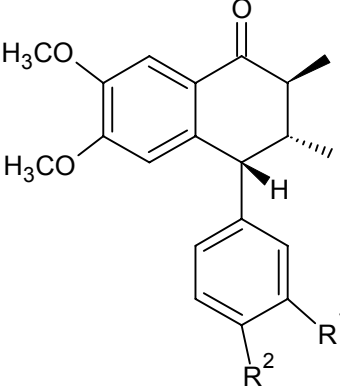
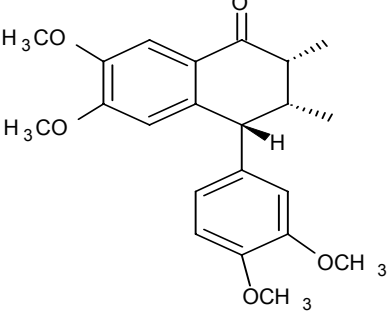
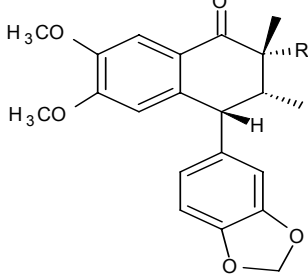
Espécie	Substância	Referência
<i>A. chilensis</i>	 <p> $R^1 = R^2 = \text{Pi}$ $R^1 = \text{Ve}, R^2 = \text{Gu}$ $R^1 = \text{Gu}, R^2 = \text{Pi}$ </p>	62
<i>A. chilensis</i>		62

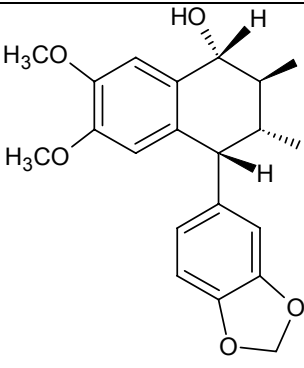
		
<i>A. taliscana</i>		67
<i>A. taliscana</i>		67
<i>A. birostris</i>		59

Gu* = 3-metoxi, 4-hidroxi-fenil

Pi = 3,4-metilenodioxifenil

Tabela I.14. Lignanas do tipo 4-ariltetralona isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

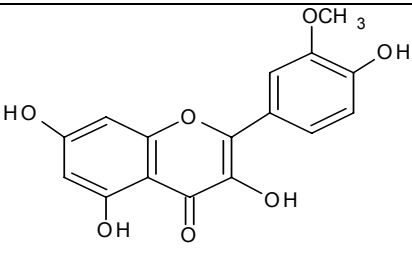
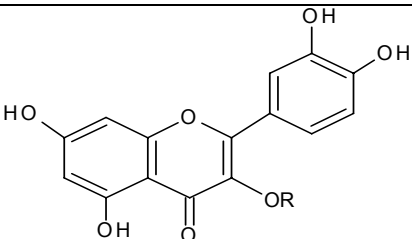
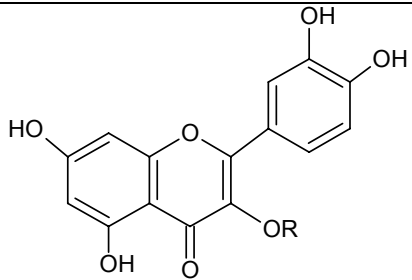
Espécie	Substância	Referência
<i>A. chilensis</i>		68,69
<i>A. chilensis</i>	 <p data-bbox="687 1115 995 1205"> $R^1 = OH, R^2 = OCH_3$ $R^1 = OCH_3, R^2 = OCH_3$ </p>	69
<i>A. chilensis</i>		69
<i>A. chilensis</i>	 <p data-bbox="783 1877 906 1966"> $R = OAC$ $R = OH$ </p>	69

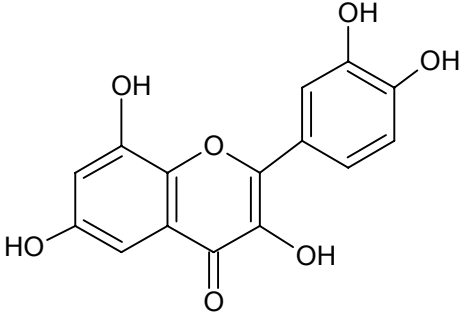
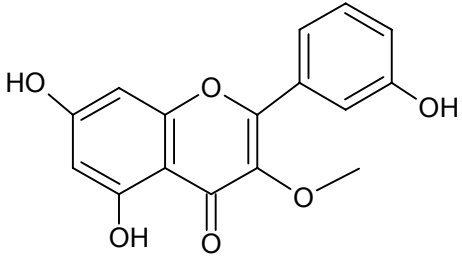
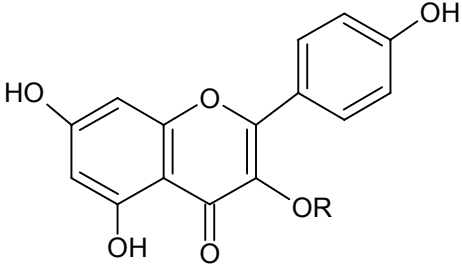
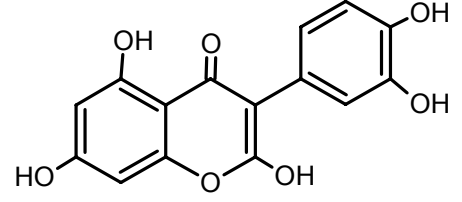
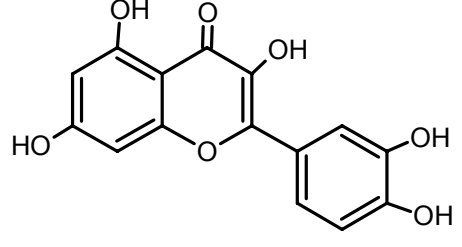
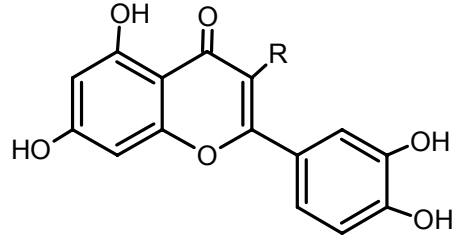
<i>A. chilensis</i>		69
---------------------	---	----

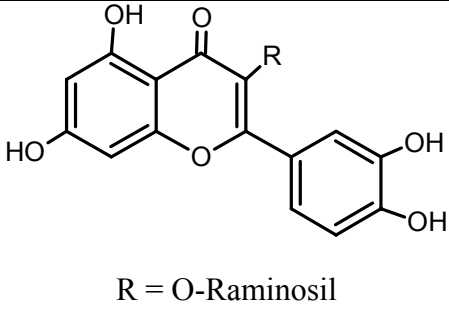
2.1.7. Constituintes Flavanoídicos

A Tabela I.15 apresenta os quatro flavonóides isolados em espécies do gênero *Aristolochia*.

Tabela I.15. Flavonóides isolados em espécies do gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>A. reticulata</i> <i>A. serpentina</i>		47
<i>A. siphon</i>	 <p data-bbox="758 1523 933 1556">R = Rutinose</p>	47
<i>A. bracteata</i> , <i>A. clematitis</i> , <i>A. elegans</i> , <i>A. heterophylla</i> , <i>A. molissima</i> , <i>A. moupinenensis</i> , <i>A. reticulata</i> , <i>A. rotunda</i> , <i>A. siphon</i>	 <p data-bbox="742 1881 949 1915">R = β-D-glicose</p>	47

<p><i>A. indica</i>, <i>A. reticulata</i>, <i>A. serpentaria</i></p> <p><i>A. liukuensis</i></p>		<p>47</p> <p>70</p>
<p><i>A. acutifolia</i></p>		<p>71</p>
<p><i>A. rigida</i></p>	 <p>R = 3-O-β-D-robinobioside</p>	<p>72</p>
<p><i>A. sipho</i></p>		<p>10</p>
<p><i>A. sipho</i></p>		<p>10</p>
<p><i>A. clematitis</i>, <i>A. sipho</i></p>		<p>10</p>

<i>A. siphon</i>	 <p style="text-align: center;">R = O-Raminosil</p>	10
------------------	---	----

2.1.8. Constituintes nitrogenados de natureza não-alcaloídica

O gênero *Aristolochia* caracteriza-se pela variedade de derivados nitrogenados encontrados em várias de suas espécies. Os diferentes ácidos aristolóquicos, de natureza nitrofenantrênica, ocorrem na maioria das vezes acompanhados pelas lactamas correspondentes, as aristolactamas. Os ácidos aristolóquicos e suas lactamas são apresentadas na Figura I.8 e os representantes dessa classe de substâncias isoladas em espécies do gênero *Aristolochia* são mostrados na Tabela I.16 (p. 48). Esses ácidos aristolóquicos e aristolactamas podem ser oxigenados nas posições 6, 7 e 8, posições 6 e 8 ou, até mesmo, posições 7 e 8, levando a uma enorme variação no padrão de oxigenação dessas substâncias. Adicionalmente, alguns derivados podem não apresentar o grupo nitro na posição 10.

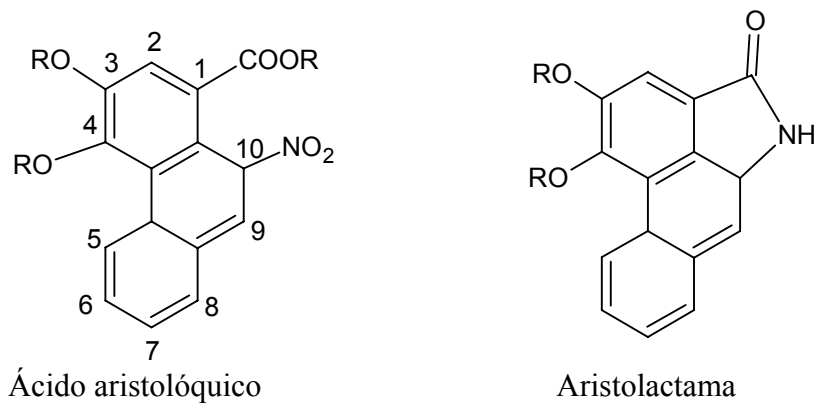
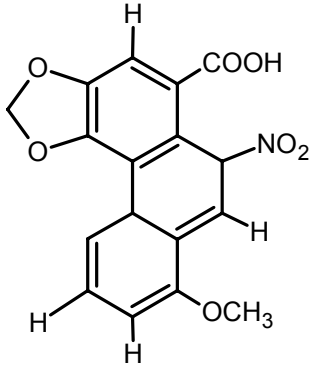
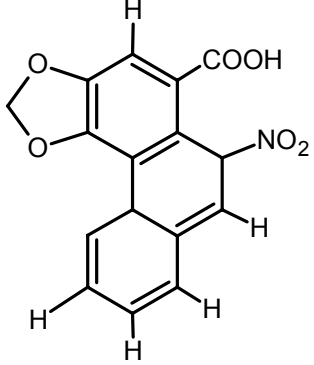
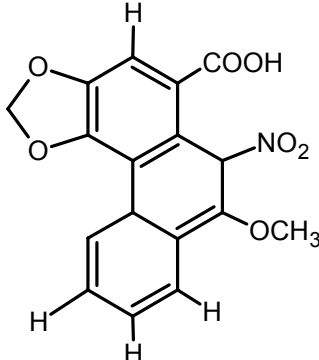
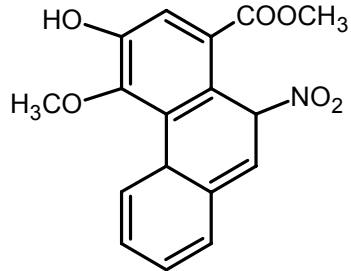
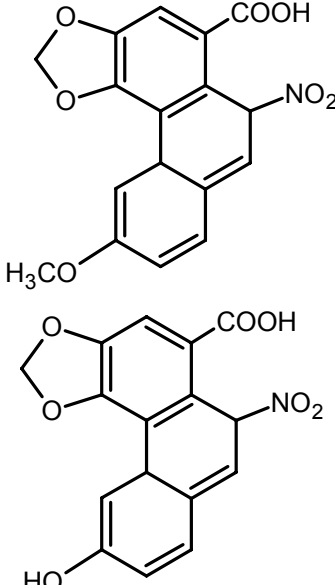
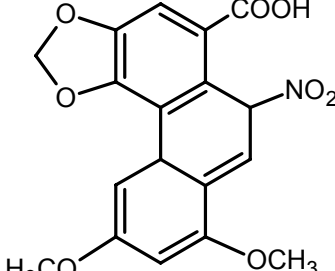
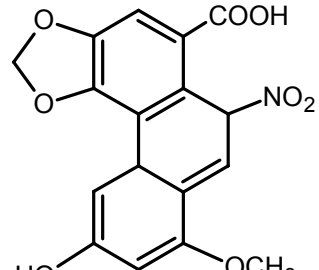
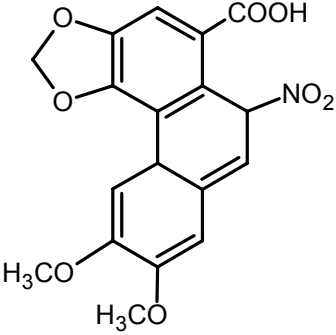
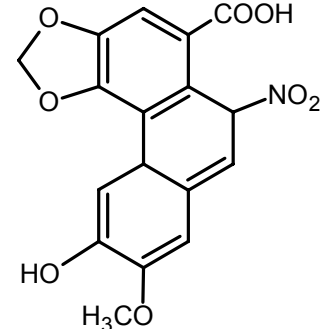
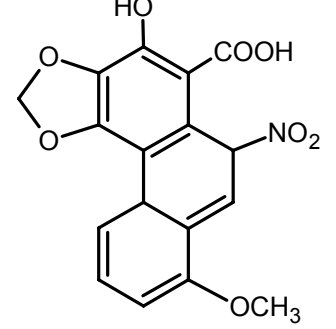
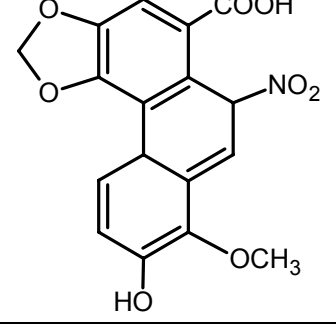
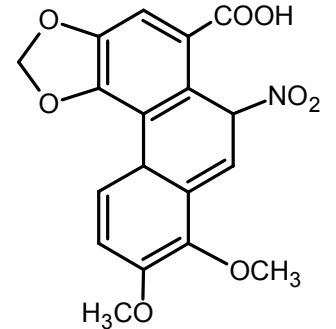


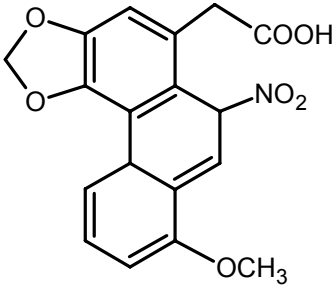
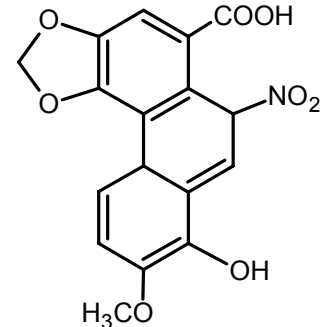
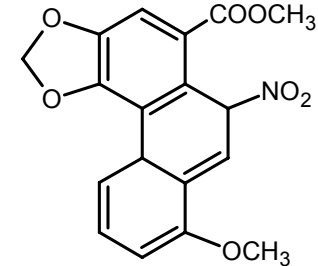
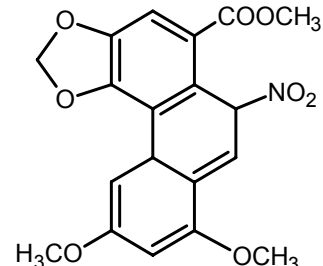
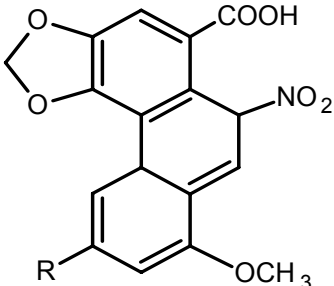
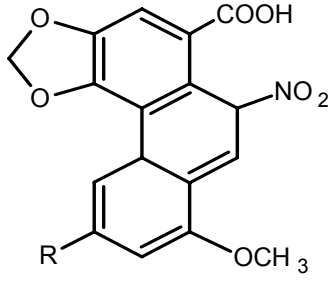
Figura I.8. Estrutura dos ácidos aristolóquicos e aristolactamas isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*.

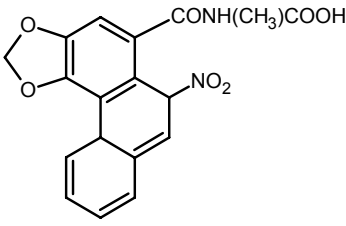
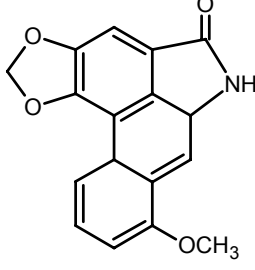
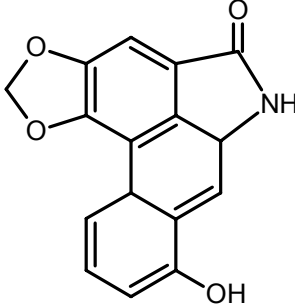
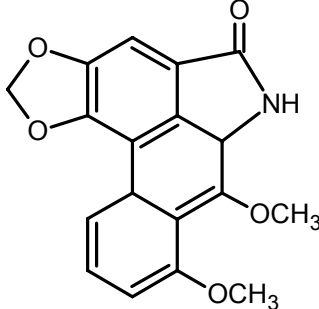
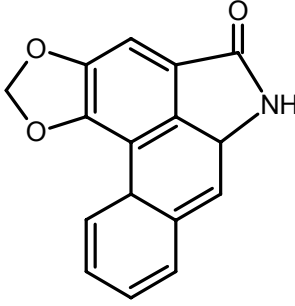
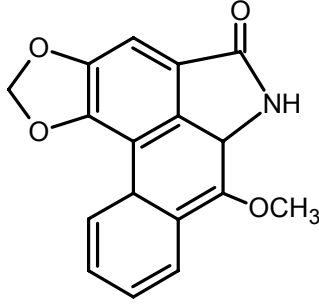
Tabela I.16. Ácidos aristolóquicos e aristolactamas isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

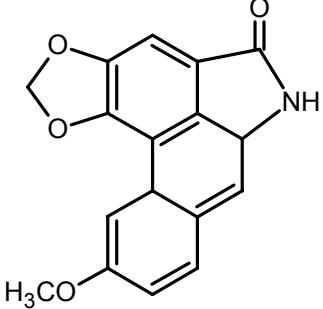
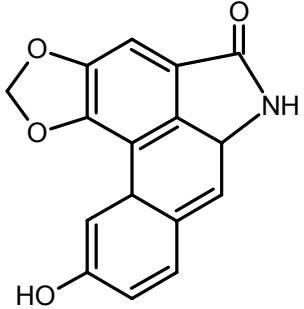
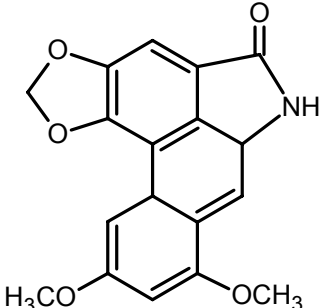
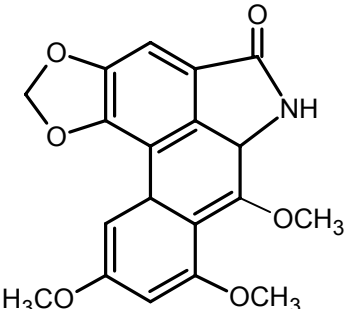
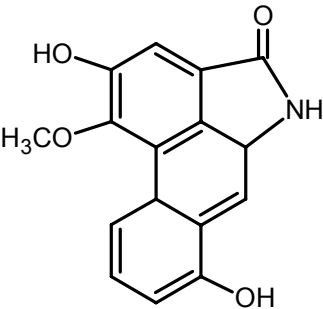
Espécie	Substância	Ref.
<i>A. acuminata</i> , <i>A. argentina</i> , <i>A. badamae</i> , <i>A. baetica</i> , <i>A. bracteata</i> , <i>A. chilensis</i> , <i>A. clematitis</i> , <i>A. debilis</i> , <i>A. elegans</i> , <i>A. esperanzae</i> , <i>A. fangchi</i> , <i>A. fimbriata</i> , <i>A. griffithii</i> , <i>A. indica</i> , <i>A. kaempferi</i> , <i>A.</i> <i>kwangsiensis</i> , <i>A. longa</i> , <i>A. manshuriensis</i> , <i>A.</i> <i>maurorum</i> , <i>A. máxima</i> , <i>A. multiflora</i> , <i>A.</i> <i>ornithocephala</i> , <i>A. pandurata</i> , <i>A. reticulata</i> , <i>A.</i> <i>rotunda</i> , <i>A. serpentaria</i> , <i>A. siphon</i> , <i>A. westandii</i>		73
<i>A. argentina</i>		74
<i>A. auricularia</i>		75
<i>A. bracteata</i> , <i>A. chilensis</i> , <i>A. clematitis</i> , <i>A.</i> <i>cymbifera</i> , <i>A. debilis</i> , <i>A. indica</i> , <i>A. kaempferi</i> , <i>A.</i> <i>longa</i> , <i>A. máxima</i> , <i>A. mollissima</i> , <i>A. pandurata</i> , <i>A.</i> <i>reticulata</i> , <i>A. rotunda</i> , <i>A. serpentaria</i> , <i>A. siphon</i>		10
<i>A. bracteata</i>		76
<i>A. chilensis</i>		77
<i>A. contorta</i>		78,79
<i>A. indica</i>		80,81
<i>A. liukuensis</i>		82
<i>A. manshuriensis</i>		83
<i>A. mollissima</i>		84
<i>A. pallida</i>		85
<i>A. ponticum</i>		86
<i>A. triangulares</i>		87
<i>A. versicolor</i>		88
<i>A. argentina</i>		74
<i>A. clematitis</i> , <i>A. debilis</i>		47
<i>A. chilensis</i>		73, 77
<i>A. argentina</i>		73, 74
<i>A. clematitis</i> , <i>A. rotunda</i> , <i>A. debilis</i> ,		10
<i>A. esperanzae</i>		10
<i>A. moupinensis</i> , <i>A. pallida</i>		47
<i>A. auricularia</i>		75
<i>A. contorta</i>		79
<i>A. ponticum</i>		86
		

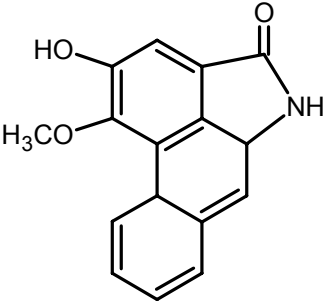
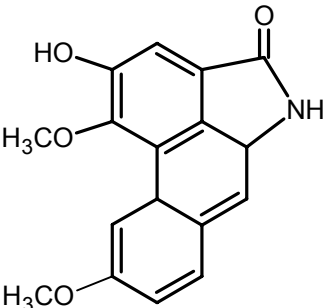
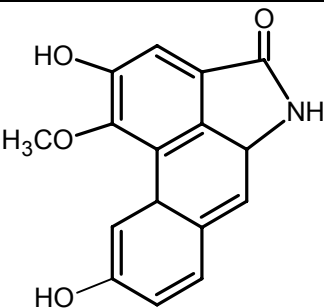
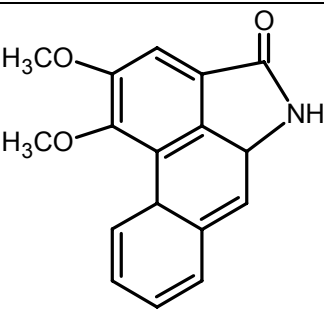
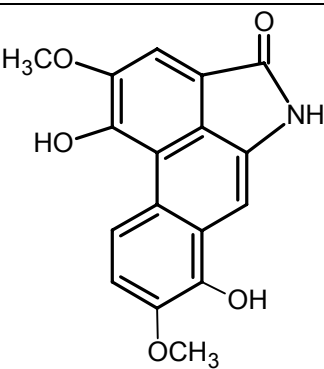
<i>A. ponticum</i>		86
<i>A. auricularia</i> <i>A. liukiensis</i>		75 70
<i>A. auricularia</i> <i>A. argentina, A. clematidis</i> <i>A. esperanzae</i> <i>A. clematidis, A. rotunda</i> <i>A. kwangsiensis</i> <i>A. longa</i> <i>A. argentina</i> <i>A. clematidis</i> <i>A. indica, A. longa, A. tagala</i> <i>A. debilis, A. fangchi, A. rotunda, A. watsonii</i>		75 73,74 73 10 47 89 74 10 47 73
<i>A. auricularia</i> <i>A. argentina, A. clematidis</i> <i>A. esperanzae</i> <i>A. clematidis</i> <i>A. kwangsiensis</i> <i>A. longa</i> <i>A. pallida</i>		75 73,74 73 10,73 47 89 85
<i>A. acuminata, A. argentina, A. clematidis,</i> <i>A. esperanzae, A. longa, A. manshuriensis,</i> <i>A. multiflora</i> <i>A. argentina</i> <i>A. clematidis</i> <i>A. indica, A. mollissima, A. longa</i> <i>A. manshuriensis</i>		73 74 10 47 83

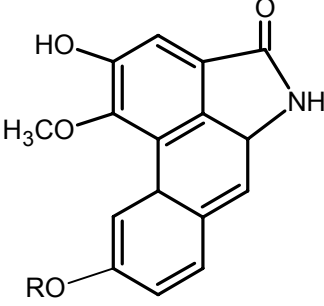
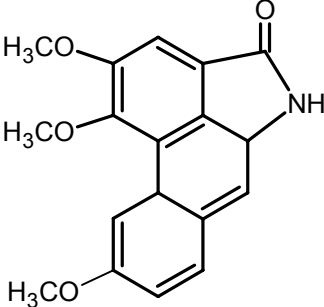
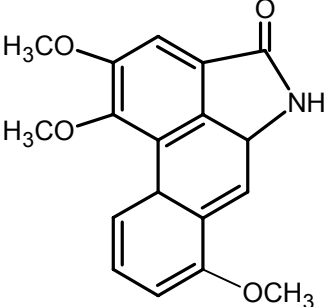
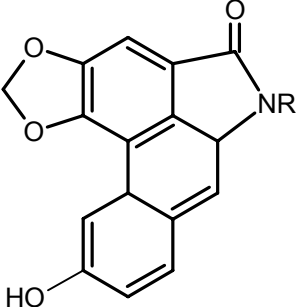
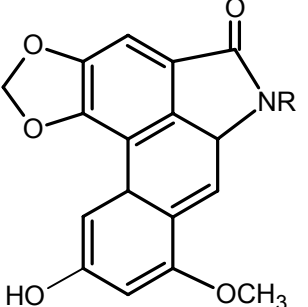
<i>A. argentina</i>		74
<i>A. argentina</i>		74
<i>A. argentina</i>		74
<i>A. argentina</i> <i>A. debilis</i> <i>A. longa, A. tagala, A. tuberosa</i>		74 73,74 47
<i>A. debilis</i> <i>A. longa</i>		73 47

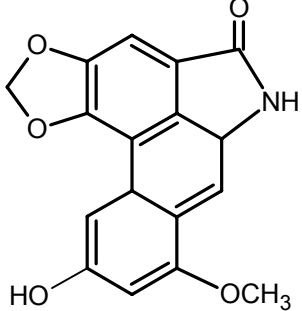
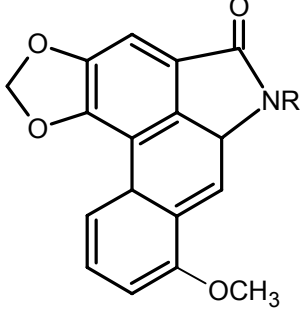
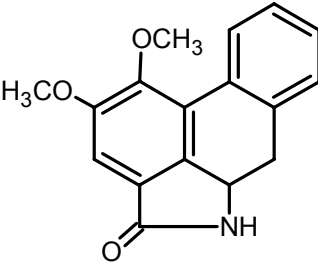
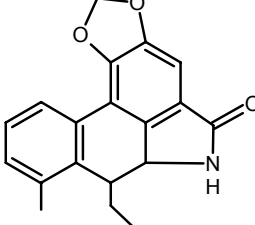
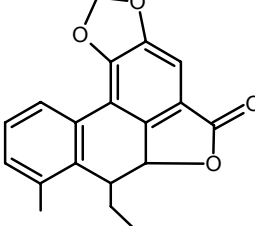
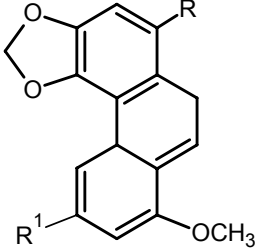
<p><i>A. debilis</i> <i>A. manshuriensis</i></p>		<p>10,73 73</p>
<p><i>A. contorta</i></p>		<p>90</p>
<p><i>A. argentina, A. versicolor</i> <i>A. indica</i></p>		<p>47 73</p>
<p><i>A. championii</i> <i>A. kwansiensis, A. moupinensis</i> <i>A. versicolor</i></p>		<p>73 47 88</p>
<p><i>A. manshuriensis</i></p>	 <p>R = β-D-glicose</p>	<p>73,83</p>
<p><i>A. argentina</i> <i>A. manshuriensis</i></p>	 <p>R = O-glicopiranosil</p>	<p>74 91,92</p>

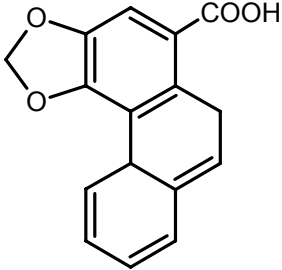
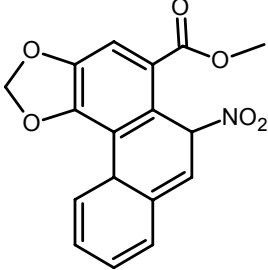
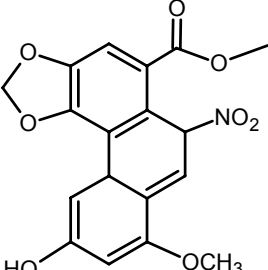
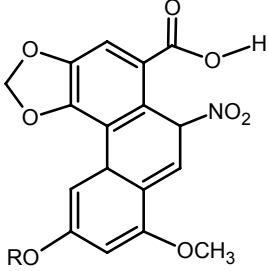
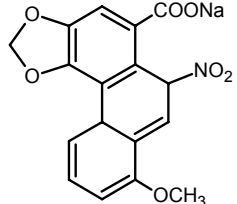
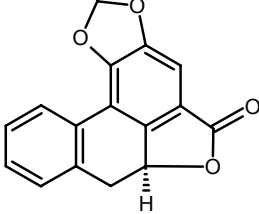
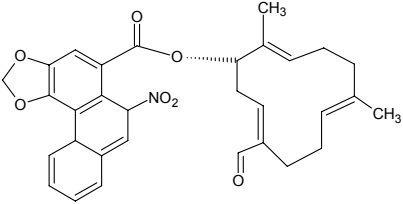
<i>A. longa</i>		11
<i>A. auricularia</i> <i>A. argentina, A. debilis, A. fangchi, A. indica</i> <i>A. argentina</i> <i>A. bracteata</i> <i>A. clematitis, A. tuberosa</i> <i>A. chilensis</i> <i>A. debilis, A. rotunda</i> <i>A. ponticum</i>		75 73 93 94 47 95 10 86
<i>A. argentina</i>		93
<i>A. auricularia</i>		75
<i>A. argentina</i> <i>A. auricularia</i>		93 75
<i>A. auricularia</i>		75

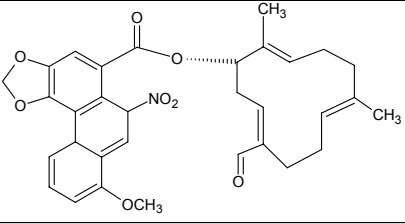
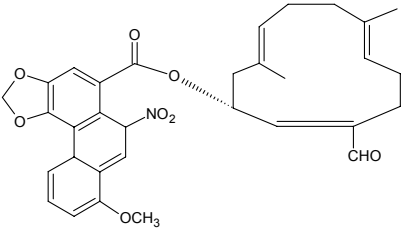
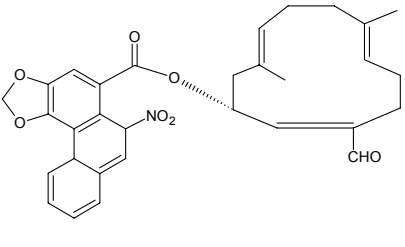
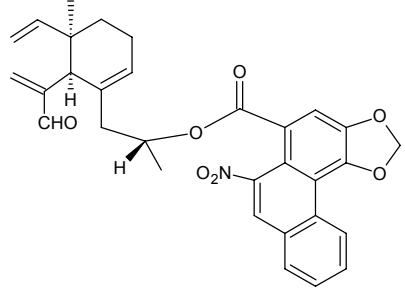
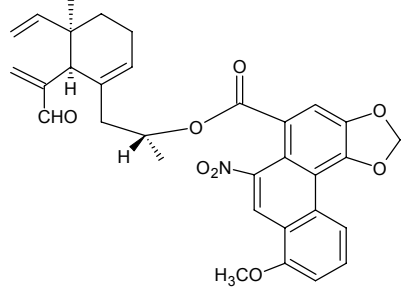
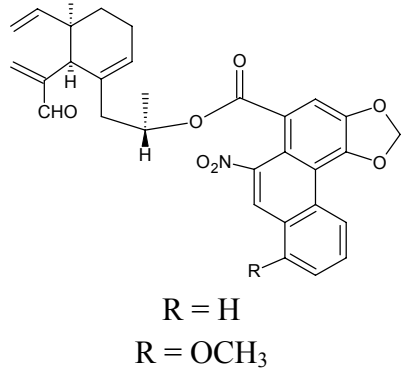
<p><i>A. argentina</i> <i>A. auricularia</i> <i>A. ponticum</i></p>		<p>93 75 86</p>
<p><i>A. argentina</i></p>		<p>93</p>
<p><i>A. argentina</i> <i>A. indica</i> <i>A. serpentaria</i></p>		<p>93 73, 96 47</p>
<p><i>A. auricularia</i></p>		<p>75</p>
<p><i>A. argentina</i></p>		<p>93</p>

<p><i>A. argentina</i> <i>A. indica</i> <i>A. liukuensis</i></p>		<p>73, 93 47 70</p>
<p><i>A. argentina</i> <i>A. liukuensis</i></p>		<p>73, 93, 97 98</p>
<p><i>A. argentina</i></p>		<p>93</p>
<p><i>A. argentina</i> <i>A. liukuensis</i></p>		<p>73, 93, 97 70</p>
<p><i>A. elegans</i></p>		<p>99</p>

<i>A. elegans</i>	 <p>R = 6-O-β-D-glucosido</p>	99
<i>A. argentina</i>		73, 93
<i>A. taliscana</i>		10, 73, 100
<i>A. indica</i>	 <p>R = β-D-glicose</p>	73
<i>A. indica</i>	 <p>R = β-D-glicosil</p>	10

<i>A. indica</i>		10
<i>A. indica</i>	 <p>R = β-D-glicose</p>	73, 96
<i>A. constricta</i>		101
<i>A. mollissima</i>		102
<i>A. mollissima</i>		102
<i>A. indica</i>	 <p>R = CO₂CH₃; R¹ = H R = CO₂H; R¹ = H R = CONH₂; R¹ = H R = CO₂CH₃; R¹ = OCH₃</p>	103

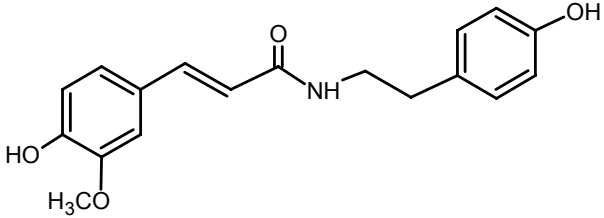
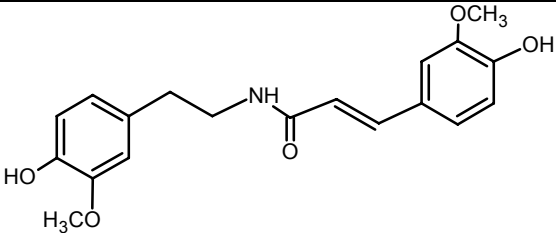
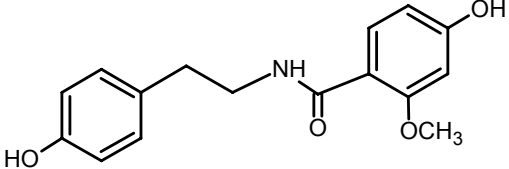
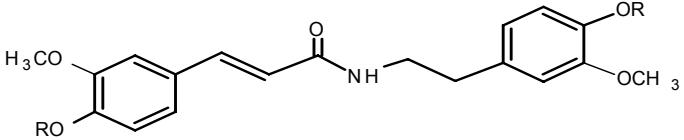
<i>A. manshuriensis</i>		104
<i>A. manshuriensis</i>		105
<i>A. manshuriensis</i>		106
<i>A. manshuriensis</i>	 <p>R = β-D-glucopiranosil</p>	83
<i>A. manshuriensis</i>		105
<i>A. manshuriensis</i>		107
<i>A. heterophylla</i>		108, 109

<p><i>A. heterophylla</i> <i>A. kaempferi</i> <i>A. mollissima</i></p>		<p>108, 109 110 111, 112</p>
<p><i>A. curcubitifolia</i> <i>A. heterophylla</i> <i>A. kaempferi</i> <i>A. mollissima</i></p>		<p>105 108,109 110 111</p>
<p><i>A. heterophylla</i></p>		<p>108, 109</p>
<p><i>A. heterophylla</i></p>		<p>108,109</p>
<p><i>A. heterophylla</i> <i>A. mollissima</i></p>		<p>108,109 111</p>
<p><i>A. heterophylla</i></p>	 <p style="text-align: center;">R = H R = OCH₃</p>	<p>108,109</p>

2.1.9. Amidas

As espécies de *Aristolochia* apresentam algumas amidas como fitoconstituintes. A Tabela I.17 mostra a ocorrência e estrutura dessas amidas no gênero.

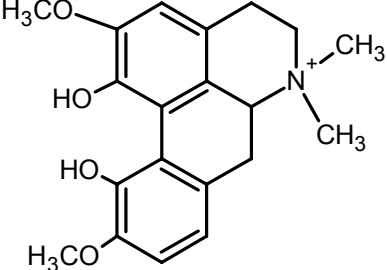
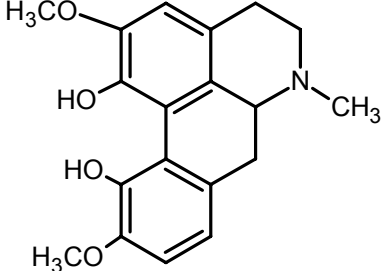
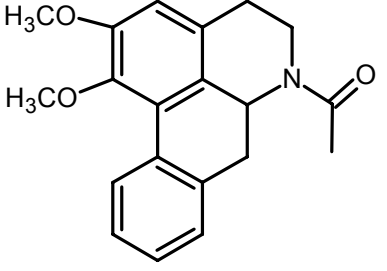
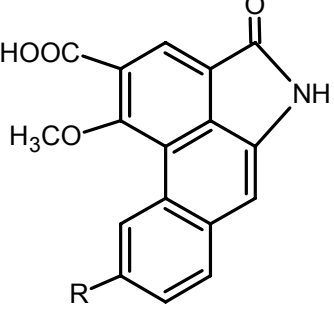
Tabela I.17. Amidas isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

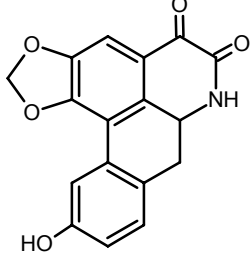
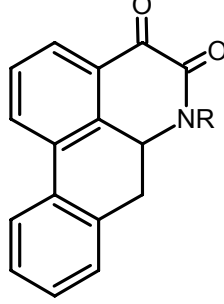
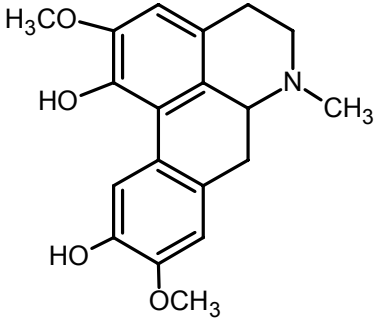
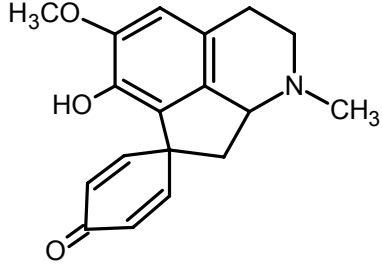
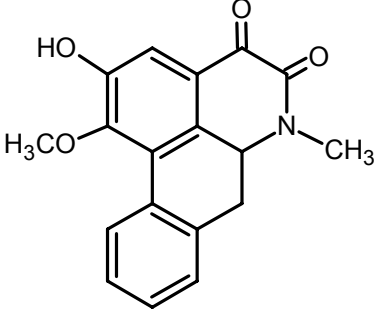
Espécie	Substância	Ref.
<i>A. moupinensis</i> <i>A. papilaris</i>		113 114
<i>A. manshuriensis</i>		115
<i>A. liukiensis</i>		70
<i>A. manshuriensis</i>	 R = Glucose	104

2.1.10. Constituintes nitrogenados de natureza alcaloídica

Espécies do gênero *Aristolochia* apresentam constituintes nitrogenados de natureza alcaloídica com um núcleo isoquinolínico e pertencentes aos grupos aporfínicos (Tabela I.18), tetraidroprotoberberínicos (Tabela I.19, p. 62), benziltetraidroisoquinolínicos (Tabela I.20, p. 63) e bisbenziltetraidroisoquinolínicos (Tabela I.21, p. 63).

Tabela I.18. Alcalóides aporfínicos isolados em espécies do gênero *Aristolochia*

Espécie	Substância	Ref.
<i>A. argentina</i> , <i>A. debilis</i> , <i>A. Kaempferi</i> <i>A. austrozechuanica</i> <i>A. baetica</i> , <i>A. Clematidis</i> , <i>A. moupinensis</i> , <i>A. rotunda</i> , <i>A. indica</i> , <i>A. heterophylla</i> <i>A. bracteata</i> <i>A. clematidis</i> <i>A. contorta</i> <i>A. macedonica</i>		10 116 47 76, 93 117 90 118
<i>A. clematidis</i>		117
<i>A. bracteata</i>		76
<i>A. argentina</i>	 <p style="text-align: center;">R = H R = OCH₃</p>	74, 90

<p><i>A. cinabarina</i> <i>A. tuberosa</i></p>		<p>120 118</p>
<p><i>A. cinabarina</i> <i>A. tuberosa</i></p>	 <p>R = β-D-Glucose</p>	<p>120 93</p>
<p><i>A. papillaris</i></p>		<p>114</p>
<p><i>A. chilensis</i></p>		<p>102</p>
<p><i>A. chilensis</i></p>		<p>121</p>

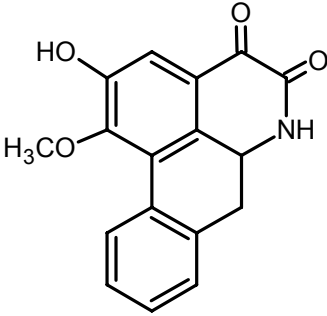
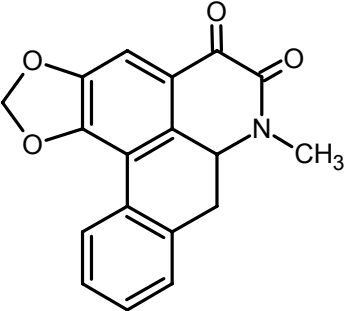
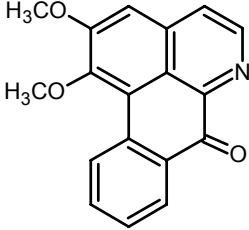
<p><i>A. chilensis</i></p> <p><i>A. contorta</i></p> <p><i>A. liukuensis</i></p>		<p>121</p> <p>122</p> <p>70</p>
<p><i>A. chilensis</i></p>		<p>121</p>
<p><i>A. contorta</i></p>		<p>122</p>

Tabela I.19. Alcalóide tetraidroprotoberberínico isolado em espécie do gênero *Aristolochia*

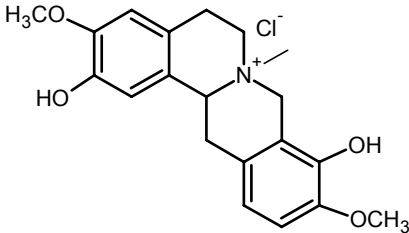
Espécie	Substância	Ref.
<p><i>A. debilis</i></p>		<p>10</p>

Tabela I.20. Alcalóides benziltetraidroisoquinólicos isolados em espécie do gênero *Aristolochia*

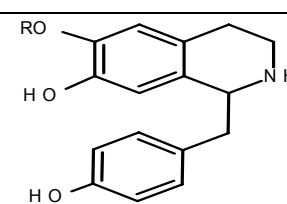
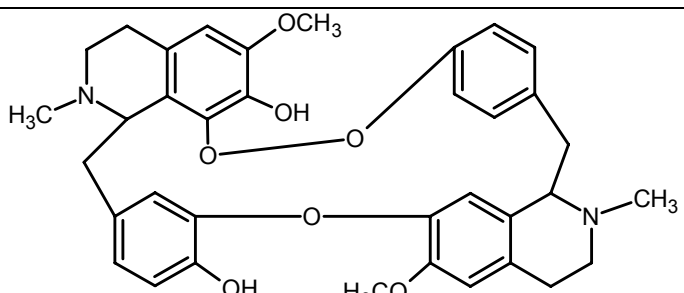
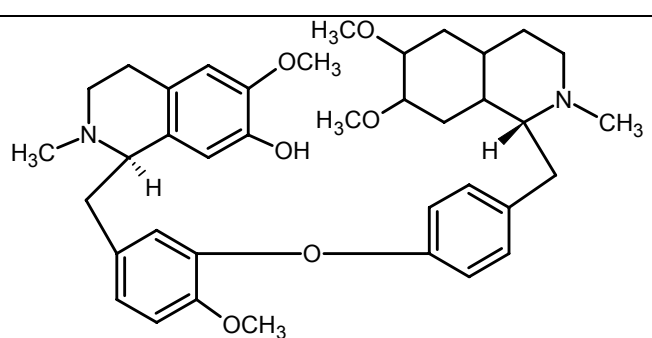
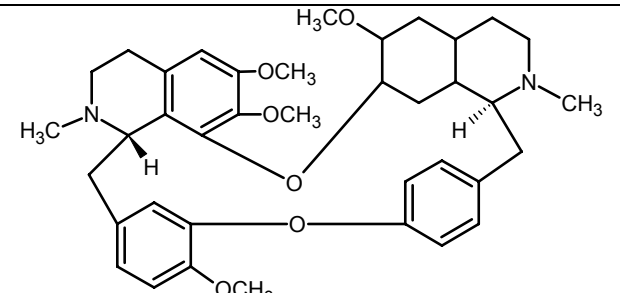
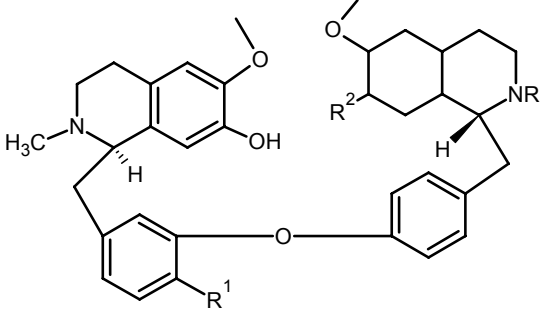
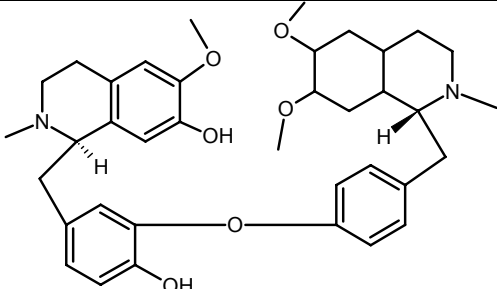
Espécie	Substância	Ref.
<i>A. debilis</i>	 <p>R = H R = CH₃</p>	10

Tabela I.21. Alcalóides bisbenziltetraidroisoquinólicos isolados em espécie do gênero *Aristolochia*

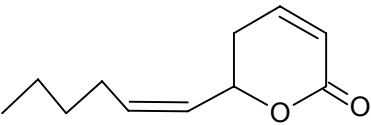
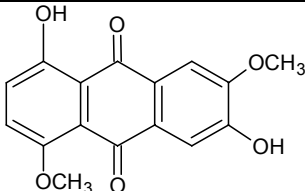
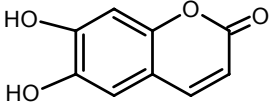
Espécie	Substância	Ref.
<i>A. indica</i>		123
<i>A. elegans</i>		123
<i>A. debilis</i>		124

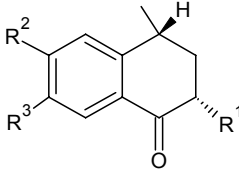
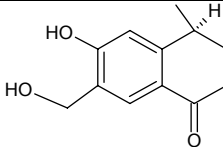
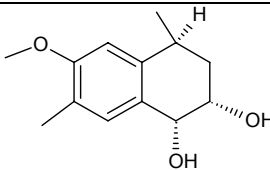
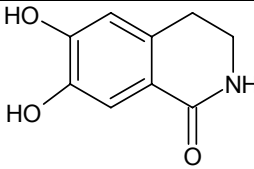
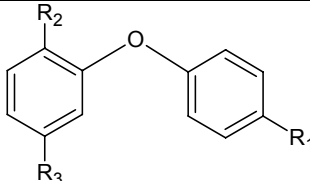
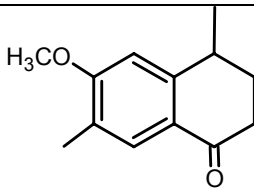
<i>A. gigantea</i>	 <p style="text-align: center;"> $R = R^1 = H, R^2 = OCH_3$ $R = H, R^1 = R^2 = OCH_3$ $R = H, R^1 = R^2 = OH$ </p>	125
<i>A. elegans</i>		126

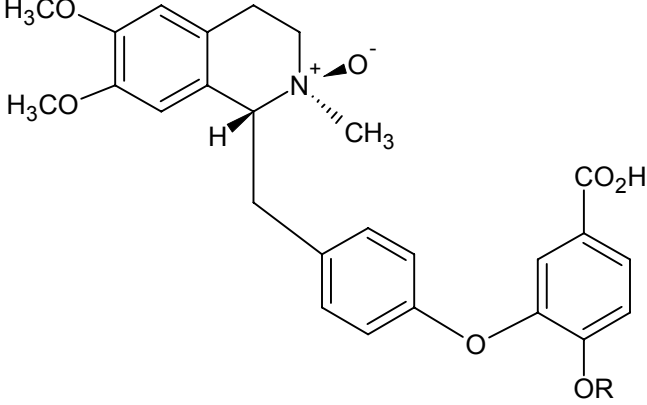
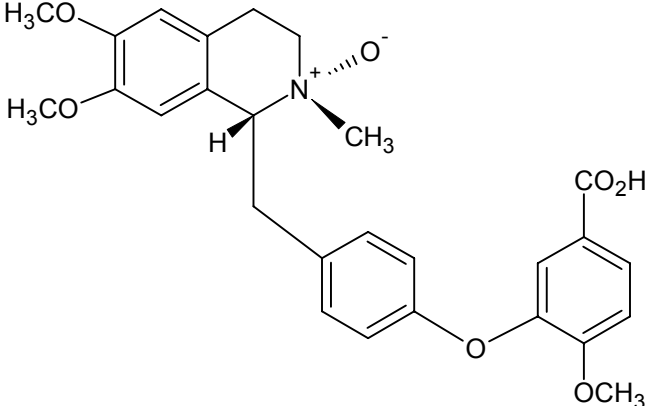
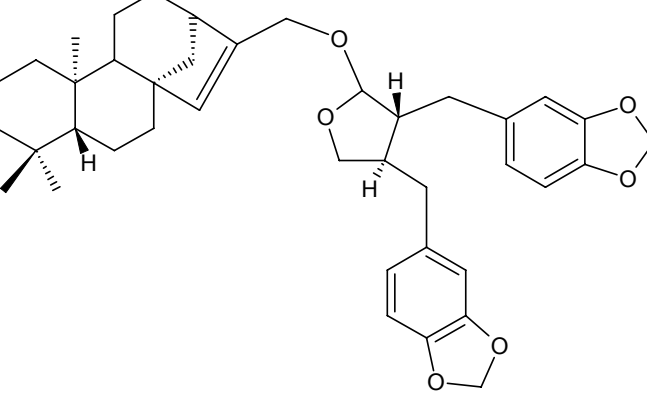
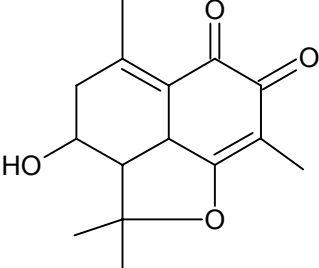
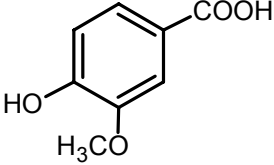
2.1.11. Constituintes de outras naturezas químicas

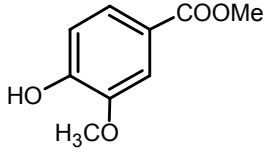
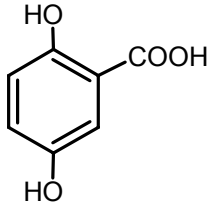
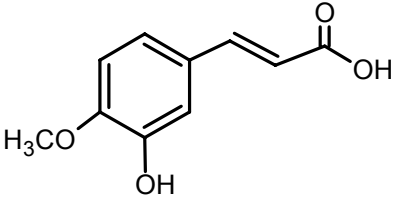
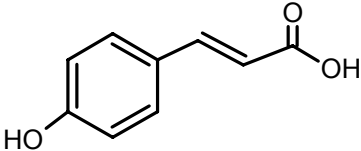
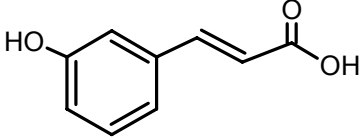
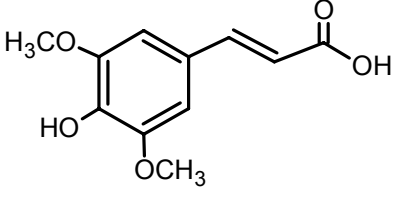
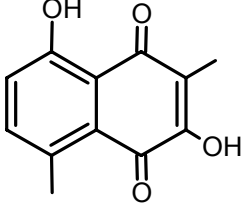
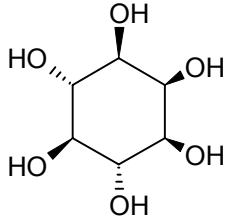
Outras substâncias foram isoladas também em espécies do gênero *Aristolochia*, conforme mostradas na Tabela I.22.

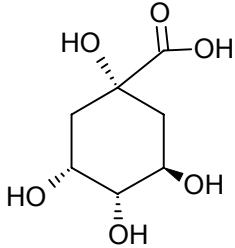
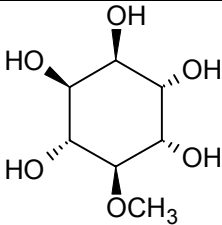
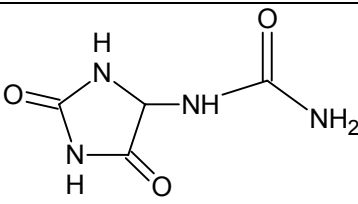
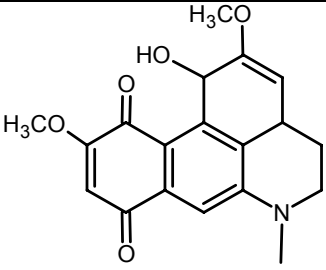
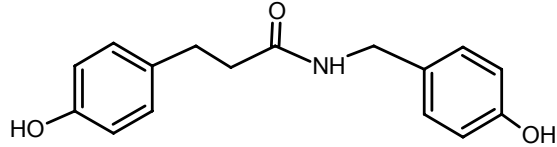
Tabela I.22. Outras substâncias isoladas em espécies do gênero *Aristolochia*

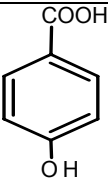
Espécie	Substância	Referência
<i>A. argentina</i>		127
<i>A. indica</i>		98,128
<i>A. siphon</i>		47

<i>A. constricta</i> , <i>A. elegans</i>	 <p style="text-align: center;"> $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = CH_3$ $R^1 = OH, R^2 = OCH_3, R^3 = CH_3$ </p>	36
<i>A. elegans</i>		36
<i>A. elegans</i>		36
<i>A. elegans</i>		36
<i>A. elegans</i>	 <p style="text-align: center;"> $R^1 = CO_2CH_3, R^2 = OCH_3, R^3 = CHO$ $R^1 = CHO, R^2 = OCH_3, R^3 = CO_2CH_3$ $R^1 = CO_2CH_3, R^2 = OH, R^3 = CO_2CH_3$ $R^1 = CH_2OH, R^2 = OCH_3, R^3 = CO_2CH_3$ $R^1 = CH_2OH, R^2 = OCH_3, R^3 = CO_2H$ </p>	36 99
<i>A. constricta</i> <i>A. tagala</i>		129 130

<i>A. elegans</i>	 <p style="text-align: center;">R = CH₃ R = H</p>	99
<i>A. elegans</i>		99
<i>A. constricta</i>		131
<i>A. manshuriensis</i>		104
<i>A. argentina</i> <i>A. manshuriensis</i> <i>A. mollissima</i>		74 132 52

<i>A. manshuriensis</i>		133
<i>A. sipho</i>		10
<i>A. argentina</i> <i>A. sipho</i> <i>A. manshuriensis</i>		74 10 105
<i>A. argentina</i> <i>A. clematitis</i> <i>A. indica</i> <i>A. manshuriensis</i>		74 10 103 133
<i>A. clematitis, A. sipho</i>		10
<i>A. clematitis</i>		10
<i>A. indica</i>		134
<i>A. liukuensis</i>		70

<i>A. clematitidis</i>		10
<i>A. clematitidis</i> , <i>A. siphon</i> , <i>A. tomentosa</i>		10
<i>A. championii</i> <i>A. clematitidis</i> <i>A. contorta</i> <i>A. cymbifera</i> <i>A. debilis</i> <i>A. fangchi</i> <i>A. heterophylla</i> <i>A. indica</i> <i>A. kwangsiensis</i> <i>A. moupinensis</i> <i>A. tagala</i> <i>A. triangulares</i> <i>A. versicolor</i> <i>A. westandii</i>		135,136 10 137,138 10 10 139 140 10 141,142 140 143 31 53 119
<i>A. manshuriensis</i>		144
<i>A. manshuriensis</i>		145

<i>A. manshuriensis</i>		133
-------------------------	---	-----

Como pôde ser verificado pelo exposto anteriormente, as espécies do gênero *Aristolochia* apresentam um amplo espectro de classes de substâncias químicas. Isso justifica tanto o estudo quanto o re-estudo fitoquímico de suas espécies para explorar ainda mais o potencial químico de seus produtos naturais. Estudos fitoquímicos foram realizados anteriormente, porém abordando as folhas e as raízes. Assim sendo, no presente trabalho é descrito o estudo fitoquímico das cascas do caule e do cerne de *Aristolochia esperanzae*, acompanhado por testes de atividade antibactericida e antifúngica de alguns de seus extratos, frações e fitoconstituintes isolados. O interesse no estudo fitoquímico dessa espécie deve-se ao uso popular em Minas Gerais no tratamento em humanos portadores de doenças reumáticas em geral.

Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia, o termo reumatismo, embora consagrado, não é adequado para denominar um grande número de diferentes doenças que têm em comum o comprometimento do sistema músculo-esquelético¹⁴⁶. O termo artrite refere-se somente à inflamação dos tendões e articulações. Os tipos de artrite englobam apenas doenças reumáticas, como osteoartrite, artrite reumática, fibromialgia, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide juvenil, espondilite anquilosante e gota. A artrite reumatóide (AR) é uma forma de artrite que atinge pessoas de qualquer faixa etária¹⁴⁷, ocorrendo no revestimento das articulações (membrana sinovial). Por ser potencialmente deformante, compromete a simetria das pequenas articulações (principalmente das mãos e dos pés), sendo de curso crônico e progressivo, com potencial de causar severa incapacitação física. As articulações afetadas apresentam-se tumefatas, dolorosas, hipersensíveis e com movimento restrito. A prevalência é elevada, atingindo cerca de 1% da população adulta¹⁴⁸. Apesar de o sistema imunológico exercer um papel importante na AR, a causa da doença é desconhecida, admitindo-se que fatores genéticos e ambientais interajam para provocar uma reação imunopática¹⁴⁹.

As drogas usadas no tratamento de AR aliviam a dor, reduzem danos às articulações ou modificam o curso da doença. Os anti-inflamatórios hormonais corticosteróides e glicocorticóides (cortisona e prednisona) e não hormonais (AAS, indometacina, ibuprofeno e diclofenaco) apresentam ações analgésicas e antipiréticas, meramente sintomáticas. As drogas imuno-modulatórias (anti-maláricos, metotrexate, sais de ouro, azatioprina e ciclosporina A) apresentam ação lenta na remissão da atividade da doença¹⁵⁰. Essas drogas promovem indisposições estomacais e até úlceras hemorrágicas. Os glicocorticóides reduzem as inflamações, porém apresentam efeitos adversos graves. Recentemente, três medicamentos surgiram como grandes inovadores no tratamento de artrite: *Vioxx*, *Bextra* e *Celebrex*. Essas drogas atuam na inibição de enzimas Cox-2 associadas a processos inflamatórios. Os dois primeiros foram retirados do mercado pelo risco de doenças cardiovasculares durante o tratamento. Estudos clínicos indicaram risco de doenças cardiovasculares pelo uso de *Celebrex*. O seu uso foi generalizado por não afetar o aparelho gastrointestinal, gerando em 2004 cerca de US\$3,3 bilhões em sua comercialização. No entanto, seu uso medicinal não é recomendado pelo FDA (*Food and Drug Administration*)¹⁵¹.

Na busca de novas alternativas medicamentosas que promovam menores efeitos colaterais ao tratamento de AR, nosso grupo de pesquisas realizou levantamentos etnofarmacológicos sobre *Aristolochia esperanzae* Kuntze (cipó mil-homens)¹⁵². Essa espécie é encontrada no cerrado de Minas Gerais, sendo muito empregada no tratamento de reumatismo pela medicina popular dessa região.

3. A espécie *Aristolochia esperanzae*

3.1. Características morfológicas

A espécie *Aristolochia esperanzae* é encontrada no Brasil, Paraguai, Bolívia e norte da Argentina⁶. É conhecida popularmente como mil-homens, papo-de-peru, papo-de-peru-do-miúdo, jarrinha, angélico, anhangá-potira, cassaú, cipó cassaú, cipó-mil-homens, jarro, milhomens, urubu-caá e ainda como papito nos países de língua espanhola⁶.

A planta apresenta caules adultos lenhosos, recobertos de camada de córtex rimuloso, alvacinzentado; pseudo-estípulas amplexicaule, de tamanho relativamente grande, 1-4 cm de diâmetro; pecíolos de 3-8 cm de comprimento; limbo, (como os ramos) completamente glabro, de 18-25 cm de diâmetro, base largamente cordado-incisa, ápice arredondado, flores axilares, solitárias, com pseudo-estípulas menores, de 4-7 cm de comprimento, completamente glabras, perianto bilabiado, externamente verde-amarelado, até alvacento-amarelado, com nervuras e venulações, além de ponto e máculas avermelhadas, bojo oblongo-obovóide, de 3-4 cm de comprimento e 1,8-2 cm de diâmetro transversal, na base arredondado e no ápice intruso; colo em ângulo agudo com o bojo, ascendente, tubuloso, levemente ampliado para a fauce, de 3-4 cm de comprimento e 5-7 cm de diâmetro transversal; lábios desiguais, distendidos como bico de ave semi-aberto, o inferior oblongado, atingindo mais ou menos um terço do comprimento do superior, que é oblongo-espatalado até lanceolado, de fundo verde-alvacento, venulado e maculado de vermelho, no centro e internamente mais escuro; coluna campanulada, estipada, de 7-8 mm de altura; cápsulas oblongadas com 6 ângulos, obtusadas na base, 5 cm de comprimento e 1,8-2 cm de diâmetro, deiscentes da base para o ápice, formando cesta; sementes oboval-oblongadas, papiráceas, triangulares, 10 mm de comprimento e 7,5 mm de largura (Fig. I.9). Desta espécie existem diversas formas que se distinguem pelo tamanho das flores (formas: *major* Hassl. e *minor* Hassl; aquela com flores maiores e esta menores que a da espécie-tipo).



Figura I.9. Fotos ilustrativas de *Aristolochia esperanzae* Kuntze.

3.2. Classificação taxonômica

A Tabela I.23 apresenta a classificação taxonômica da espécie *Aristolochia esperanzae*^{2,153}. Essa espécie apresenta como sinônimia *Aristolochia boliviensis* O. Kuntze¹⁵⁴.

Tabela I.23. Classificação taxonômica da espécie *Aristolochia esperanzae*, segundo [2,153]

Classe	Magnoliopsida (Angiospermae)
Subclasse	Magnolidae (Dicotyledonae)
Superordem	Magnoliiflorae
Família	Aristolochiaceae
Gênero	<i>Aristolochia</i>
Espécie	<i>A. esperanzae</i> Kuntze

Capítulo II:
Parte Experimental

1. Materiais

1.1. Equipamentos

As análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN 4000, acoplado ao espectrômetro de massas e coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm. O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo de 1,5 mL/min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram de 300 °C e a energia de ionização de 70 eV. As injeções foram realizadas no modo “splitless” (1/100) a 300 °C. A identificação dos componentes baseou-se na comparação eletrônica do padrão de fragmentação dos componentes nos espectros de massas com aqueles da biblioteca do banco de dados NIST (2005).

As determinações de pontos de fusão foram realizadas em aparelho Mettler FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho foram realizadas em espectrômetro Spectrum One (ATR) – Perkin Elmer.

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Bruker DPX-200 e DRX-400 linha *AVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ e as constantes de acoplamento em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ como solventes.

1.2. Procedimentos Cromatográficos

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foram empregadas placas de vidro recoberta por sílica gel 60 G Merck 0,25 mm de espessura para cromatografia analítica, ativada a 100 °C. Sílica gel 60 G Merck impregnada com AgNO_3 (5% da quantidade de sílica), de 0,25 mm de espessura, ativada a 100°C.

Na cromatografia em coluna (CC) foram empregadas colunas de vidro de diversos diâmetros e eluídas na maioria das vezes sob pressão atmosférica. A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi aproximadamente 1:30. As fases estacionárias utilizadas foram sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) e sílica gel 60 Merck impregnada com nitrato de prata (5% de AgNO_3 em relação à

massa de sílica). O nitrato de prata foi solubilizado em pequena quantidade de água e adicionado à sílica em um balão recoberto por papel de alumínio. Após evaporação da água por destilação a pressão reduzida, a sílica impregnada por AgNO_3 foi mantida em estufa por 6 h a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e empacotada em coluna de vidro recoberta por papel de alumínio.

Na cromatografia por exclusão em gel utilizando Sephadex (LH-20), o gel foi mantido em contato com o solvente a ser utilizado como fase móvel por 24 h e, em seguida, empacotado em coluna de vidro até a total sedimentação do suporte. As amostras foram dissolvidas em quantidades suficientes da fase móvel e, então, aplicadas suavemente no topo da coluna até a absorção completa no suporte, seguida por eluição no solvente escolhido¹⁵⁵.

Os reveladores cromatográficos foram irradiação no Ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm), vapores de iodo e solução vanilina/ácido perclórico. Essa solução foi preparada pela mistura de partes iguais de uma solução contendo 1,0 g de vanilina em 100,00 mL de etanol com outra solução de 3 mL de ácido perclórico (70%) em 97 mL de água. A cromatoplaça foi borrifada pela solução e aquecida em estufa por 10 min a $100\text{ }^\circ\text{C}$.

No tratamento com carvão ativo para eliminação de clorofila, a amostra foi solubilizada em metanol a quente e misturada a pequena quantidade de carvão ativo sob agitação constante. A mistura foi filtrada em coluna de sílica gel e a solução fracionada foi então destilada a pressão reduzida. O carvão ativo promove a descoloração de extratos e frações pelo fenômeno da adsorção seletiva, sendo a eficiência do procedimento favorecida pelo aquecimento¹⁵⁶.

1.3. Testes Microbiológicos

Os bioensaios foram realizados empregando-se bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus cereus* ATCC 11779) e gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25723 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Os testes foram realizados sob a orientação da profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química da UFMG.

2. Métodos

2.1. Metodologia Fitoquímica

2.1.1. Material Vegetal

Aristolochia esperanzae Kuntze foi adquirida no Mercado Central de Belo Horizonte, previamente coletada no município de Esmeraldas (MG), onde a espécie é bastante frequente. O caule da espécie foi submetido a uma separação de cascas e cerne.

2.1.2. Obtenção dos extratos

As cascas do caule (1207,16 g) previamente secas e pulverizadas foram mantidas sob extração em etanol por 7 dias. A mistura foi filtrada e o procedimento foi repetido mais duas vezes com a torta do material vegetal. O extrato etanólico das cascas (189,76 g) foi obtido após destilação a pressão reduzida do solvente. Da mesma forma, foram obtidos 328,48 g de extrato etanólico do cerne a partir de 7,0 kg de amostra.

2.1.3. Elaboração do extrato etanólico das cascas do caule

O extrato etanólico das cascas foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel (5,0 cm x 70,0 cm), sendo coletadas 181 frações de 250 mL eluídas em hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), etanol (EtOH) e metanol (MeOH). Após análise comparativa por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.1 (p. 77).

Tabela II.1. Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas

Fração	Eluente	Grupo		Fração	Eluente	Grupo
1	hexano	CA1		105 – 122	DCM	CA6
2	hexano			123	DCM:AcOEt (1:1)	CA7
3 – 20	hexano			124 – 125	DCM:AcOEt (1:1)	CA8
21 – 27	hexano	CA2		126 – 141	DCM:AcOEt (1:1)	CA9
28 – 34	hexano			142 – 145	AcOEt	CA10
35 – 36	DCM	CA3		146 – 151	AcOEt	CA11
37	DCM			152 – 163	AcOEt	CA12
38 – 39	DCM			164	EtOH	CA13
40	DCM			165	EtOH	CA14
41 – 48	DCM	CA4		166 – 168	EtOH	CA15
49 – 55	DCM			169 – 171	EtOH	CA16
56 – 57	DCM			172 – 173	EtOH	CA17
68 – 85	DCM			174 – 176	EtOH	CA18
86 – 94	DCM			177 – 178	MeOH	CA19
95 - 104	DCM	CA5		179 – 181	MeOH	CA20

2.1.3.1. Elaboração do grupo CA1

As frações desse grupo mostraram-se como materiais pastosos amarelados, com um perfil semelhante por CCD. Essas frações reunidas foram submetidas à recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco (35 mg) com faixa de fusão entre 35,9 e 48,8 °C, denominado por CA1-s, e um óleo amarelo, denominado por CA1-l.

2.1.3.2. Elaboração do grupo CA2

As frações 21 a 34 apresentaram-se com aspectos de óleo amarelo e semelhantes pela análise por CCD, sendo reunidas e denominadas por CA2.

2.1.3.3. Elaboração do grupo CA3

As frações 35 a 40 apresentaram-se como sólidos de tonalidade escura e foram reunidas após análise por CCD. Esse material (11,0868g) foi submetido a refração por CCS (coluna 3,0 cm x 40,0 cm), coletando-se 46 frações de aproximadamente 30 mL cada. Os solventes utilizados na eluição foram hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, conforme Tabela II.2. Após análise por CCD, as frações foram reunidas em grupos.

Os grupos CA3-R1, CA3-R3 e CA3-R5 a CA3-R10 não foram estudados, pois se apresentaram como misturas complexas de massas muito pequenas. O grupo CA3-R2 foi submetido a recristalização em etanol, fornecendo um sólido cristalino branco denominado de AE1 (114,8 mg; p.f. 120,2 – 121,8 °C).

Tabela II.2. Refracionamento cromatográfico do grupo CA3

Fração	Eluente	Grupo
1 – 12	Hexano:DCM (3:1)	CA3-R1
13	Hexano:DCM (1:1)	CA3-R2
14	Hexano:DCM (1:1)	CA3-R3
15 - 18	Hexano:DCM (1:1)	CA3-R4
19 - 22	Hexano:DCM (1:1)	CA3-R5
23 - 32	Hexano:DCM (1:3)	CA3-R6
33 - 35	DCM	CA3-R7
36 - 42	DCM:AcOEt (3:1)	CA3-R8
43 - 45	AcOEt	CA3-R9
46	Etanol	CA3-R10

O grupo CA3-R4 (0,78 g) foi submetido a CCS (coluna 3,0 cm x 40 cm) em eluição com hexano, DCM, AcOEt, EtOH, MeOH e água, resultando em 52 frações conforme Tabela II.3 (p. 79). As frações foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCD.

Tabela II.3. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA3-R4

Fração	Eluente	Grupo
1-3	Hexano	CA3-R4-G1
4 -6	Hexano:DCM (1:1)	
7 -12	Hexano:DCM (4:6)	CA3-R4-G2
13 – 15	Hexano:DCM (3:7)	
16 – 17	Hexano:DCM (2:8)	
18 – 22	Hexano:DCM (1:9)	CA3-R4-G3
23 – 27	DCM	
28 – 32	DCM:AcOEt (9:1)	CA3-R4-G4
33 – 37	DCM:AcOEt (3:1)	
38 – 45	DCM:AcOEt (1:1)	
46 – 48	AceOEt	CA3-R4-G5
49 – 50	EtOH	CA3-R4-G6
51	MeOH	CA3-R4-G7
52	Água	CA3-R4-G8

O grupo CA3-R4-G1 foi submetido a CCS (coluna 1,0 cm x 30 cm) impregnada com nitrato de prata e eluída com ciclohexano:AcOEt (1:1), obtendo-se 10 frações que foram reunidas em grupos após análise comparativa por CCD conforme Tabela II.4. Os grupos CA3-R4-G1-R1 (m = 12 mg) e CA3-R4-G1-R3 (m = 10 mg) apresentaram apenas uma única mancha por CCD em diferentes sistemas eluentes, sendo denominados de AE5 e AE4, respectivamente.

Tabela II.4. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA3-R4-G1

Frações Reunidas	Eluente	Grupo
1	cicloexano:AcOEt (1:1)	CA3-R4-G1-R1
2 – 3	cicloexano:AcOEt (1:1)	CA3-R4-G1-R2
5 – 10	cicloexano:AcOEt (1:1)	CA3-R4-G1-R3

O grupo CA3-R4-G1-R2 (m = 80 mg) foi submetido novamente a CCS (coluna 1,0 cm x 30 cm) impregnada com nitrato de prata e eluída com ciclohexano:AcOEt (1:1). As 19 frações obtidas foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II.5 (p. 80). A análise por CCD dos grupos CA3-R4-G1-R2-G1 (m = 15 mg) e CA3-R4-G1-R2-G2 (m = 20 mg) revelaram elevado grau de pureza, sendo denominados de AE6 e AE7, respectivamente.

Tabela II.5. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA3-R4-G1-R2

Fração	Grupo
1 – 11	CA3-R4-G1-R2-G1
13 – 19	CA3-R4-G1-R2-G2

O grupo CA3-R4-G1-R3 não foi estudado, pois apresentou-se como uma mistura complexa e em pequena quantidade.

O grupo CA3-R4-G2 (270,0 mg) apresentou-se como um sólido branco que foi recristalizado em EtOH. A água-mãe foi evaporada, obtendo-se um sólido branco (190,0 mg) que foi submetido a CC de sephadex eluída em MeOH, resultando em 15 frações. A fração 8 foi analisada por CCD, indicando-se tratar de uma substância pura e denominada de CA3-R4-G2-S (m = 18 mg) (AE3).

O sólido recristalizado de CA3-R4-G2 foi submetido a CC (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) de sephadex LH-20 eluída em MeOH, fornecendo 10 frações. Essas frações foram reunidas em grupos, conforme análise comparativa por CCD, como mostrado na Tabela II.6. O grupo CA3-R4-G2-R1 (m = 10 mg) mostrou apenas uma mancha na análise por CCD, sendo denominada de AE8. O grupo CA3-R4-G2-R2, após lavagem com acetonitrila, apresentou-se como um sólido branco (m = 20 mg) (p.f. 75,0 – 78,0 °C), sendo denominado de AE9.

Tabela II.6. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA3-R4-G2

Fração	Grupo
1-4	CA3-R4-G2-R1
5 – 10	CA3-R4-G2-R2

O grupo CA3-R4-G3 não foi estudado, pois apresentou-se como uma mistura complexa e em pequena quantidade.

O grupo CA3-R4-G4 (Tabela II.7) foi submetido a filtração com carvão ativo em EtOH a quente. Após destilação a pressão reduzida do EtOH, o sólido branco foi submetido a CCS (coluna 3,0 cm x 40,0 cm) empregando DCM, AcOEt e EtOH como eluentes. As 96 frações obtidas foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme mostrado na Tabela II.7.

Tabela II.7. Fracionamento cromatográfico do grupo CA3-R4-G4

Fração	Eluente	Grupo
1 – 2	DCM	CA3-R4-G4-R1
3 – 10	DCM:AcOEt (95:5)	CA3-R4-G4-R2
11 – 18	DCM:AcOEt (9:1)	CA3-R4-G4-R3
19 – 24	DCM:AcOEt (85:15)	CA3-R4-G4-R4
25 – 31	DCM:AcOEt (4:1)	CA3-R4-G4-R5
32 – 35	DCM:AcOEt (3:1)	CA3-R4-G4-R6
36 – 39	DCM:AcOEt (7:3)	CA3-R4-G4-R7
40 – 43	DCM:AcOEt (65:35)	CA3-R4-G4-R8
44 – 49	DCM:AcOEt (3:2)	CA3-R4-G4-R9
50 – 55	DCM:AcOEt (55:45)	CA3-R4-G4-R10
56 – 64	DCM:AcOEt (1:1)	CA3-R4-G4-R11
65 – 67	DCM:AcOEt (2:3)	CA3-R4-G4-R12
68 – 71	DCM:AcOEt (3:7)	
72 – 77	DCM:AcOEt (1:4)	
78 – 82	DCM:AcOEt (15:85)	
83 – 85	DCM:AcOEt (1:9)	CA3-R4-G4-R13
86 – 90	AcOEt	CA3-R4-G4-R14
91 – 93	AcOEt:EtOH (3:1)	CA3-R4-G4-R15
94 – 96	EtOH	CA3-R4-G4-R16

Os grupos CA3-R4-G4-R12 (7,0 mg), CA3-R4-G4-R13 (34,0 mg), CA3-R4-G4-R14 (2 mg) e CA3-R4-G4-R15 (5 mg) apresentaram-se como sólidos com apenas uma mancha em suas análises por CCD, sendo denominados de AE10, AE12, AE11 e AE13, respectivamente. Os demais grupos obtidos do fracionamento cromatográfico de CA3-R4-G4 não foram estudados, pois apresentaram-se como misturas complexas.

Os grupos CA3-R4-G5 a CA3-R4-G8 obtidos do fracionamento cromatográfico de CA3-R4 não foram estudados, pois apresentaram-se como misturas complexas e em pequena quantidade.

2.1.3.4. Elaboração do grupo CA4

O grupo CA4 (ver Tabela II.1, pág. 67) forneceu um sólido em DCM durante o fracionamento cromatográfico que após filtração conduziu a um sólido e á água-mãe. O sólido obtido (0,3188 g) foi submetido a CCS (3,0 cm x 40,0 cm) no modo isocrático com eluição em DCM:AcOEt (9:1). As 74 frações obtidas foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II.8. Os grupos CA4-s-R1 (22,0 mg) e CA4-s-R2 (8 mg) apresentaram apenas uma mancha por CCD em diferentes sistemas eluentes, sendo denominados de AE17 e AE18, respectivamente.

Tabela II.8. Fracionamento cromatográfico do sólido CA4-s

Fração		Grupo
1-3		CA4-s-R1
7 – 32		CA4-s-R2
34 – 54		CA4-s-R3
55 - 61		CA4-s-R4
62 - 74		CA4-s-R5

O grupo CA4-s-R3 foi submetido a CC (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) de sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente, resultando em 9 frações que foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCD, conforme Tabela II.9. Os grupos CA4-s-R3-G1 e CA4-s-R3-G3 foram descartados por apresentaram-se em pequenas quantidades. O grupo CA4-s-R3-G2 (3 mg) apresentou apenas uma mancha pela análise por CCD, tendo sido denominada por AE19. O grupo CA4-s-R3-G4 (m = 50 mg) foi denominada por AE18.

Os grupos CA4-s-R4 e CA4-s-R5 foram descartados por apresentaram-se como misturas complexas e em pequenas quantidades.

Tabela II.9. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-s-R3

Fração		Grupo
1-3		CA4-s-R3-G1
4		CA4-s-R3-G2
5		CA4-s-R3-G3
6 – 9		CA4-s-R3-G4

2.1.3.5. Elaboração da água-mãe do grupo CA4

A água-mãe obtida após filtração do grupo CA4 (frações 41 a 94, Tabela II.1, p. 67) foi submetida a filtração em carvão ativo empregando EtOH quente. Após evaporação do solvente, o sólido branco obtido (1,5655 g) foi submetido a fracionamento por CCS (coluna 3,0 cm x 40,0 cm), empregando DCM e AcOEt como eluentes em gradiente crescente de polaridade. As 88 frações obtidas foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II.10.

Tabela II.10. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4

Frações		Grupo		Frações		Grupos
1		CA4-R1		56 – 59		CA4-R12
2		CA4-R2		60 -62		CA4-R13
3 – 8		CA4-R3		63 - 71		CA4-R14
9 – 12		CA4-R4		72 – 76		CA4-R15
13		CA4-R5		77 – 81		CA4-R16
14 – 19		CA4-R6		82 – 84		CA4-R17
20 – 24		CA4-R7		85		CA4-R18
25 – 39		CA4-R8		86		CA4-R19
40 – 49		CA4-R9		87		CA4-R20
50 – 52		CA4-R10		88		CA4-R21
53 – 55		CA4-R11				

O grupo CA4-R1 (20,0 mg) foi submetido a refracionamento por CC de sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) utilizando metanol como eluente, resultando em 22 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II.11.

Tabela II.11. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R1

Frações		Grupo
1-6		CA4-R1-G1
7		CA4-R1-G2
8		CA4-R1-G3
9		CA4-R1-G4
15 – 18		CA4-R1-G5
19-22		CA4-R1-G6

Os grupos CA4-R1-G1 (8 mg), CA4-R1-G2 (3 mg), CA4-R1-G3 (4 mg), CA4-R1-G4 (1 mg) e CA4-R1-G5 (2 mg) apresentaram apenas uma mancha em suas análises por CCD, sendo denominados por AE30, AE31, AE32, AE33 e AE34, respectivamente. O grupo CA4-R1-G6 foi descartado por apresenta-se em pequena quantidade.

O grupo CA4-R3 (118,0 mg) foi submetido a CC de sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluída em MeOH, resultando em 20 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD. Os grupos CA4-R3-G1 (m = 20 mg) e CA4-R3-G2 (m = 18 mg) mostraram apenas uma mancha em suas análises por CCD, tendo sido denominadas de AE35 e AE36, respectivamente, conforme mostrado na Tabela II-12.

Tabela II.12. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R3

Fração	Grupo	Massa /mg	Identificação
4 – 8	CA4-R3-G1	20,0	AE35
11 – 20	CA4-R3-G2	85,0	AE36

O grupo CA4-R8 (65 mg) foi submetido a refracionamento por CC de sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluída com MeOH, resultando em 25 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II-13. Destes materiais isolados, percebeu-se grande semelhança entre AE28 e AE4.

Tabela II.13. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R8

Fração	Grupo	Massa /mg	Identificação
3	CA4-R8-G1	2,0	AE25
4	CA4-R8-G2	1,0	AE26
5	CA4-R8-G3	12	AE27
6	CA4-R8-G4	5,0	AE28
7	CA4-R8-G5	2,1	AE20
8 – 9	CA4-R8-G6	2,8	AE21
10	CA4-R8-G7	2,0	AE29
11 – 14	CA4-R8-G8	28,4	AE22
19 – 21	CA4-R8-G9	1,3	AE23
24 – 25	CA4-R8-G10	1,8	AE24

O grupo CA4-R9 (50 mg) foi submetido a refraçãoamento por CC de sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluído em MeOH, resultando em 8 frações. Essas frações foram reunidas após análise por CCD, conforme mostrado na Tabela II.14.

Tabela II.14. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R9

Fração	Grupo	Massa /mg	Identificação
1 – 3	CA4-R9-G1	2,0	AE47
4 – 5	CA4-R9-G2	---	AE46
6 – 8	CA4-R9-G3	8,0	AE48

O grupo CA4-R10 (37,0 mg) foi submetido a CC de Sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluída em MeOH, resultando em 8 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme mostrado na Tabela II.15.

Tabela II.15. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R10

Fração	Grupo	Massa /mg	Identificação
2 – 3	CA4-R10-G1	12,0	AE38
4 – 5	CA4-R10-G2	15,0	AE39
7 – 8	CA4-R10-G3	2,0	AE40

O grupo CA4-R12 (104,0 mg) apresentou-se como um sólido que foi submetido a refração cromatográfico por CC de Sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluída em MeOH, resultando em 18 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II.16.

Tabela II.16. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R12

Fração	Grupo	Massa /mg	Identificação
5 – 8	CA4-R12-G1	25,0	AE41
9 -11	CA4-R12-G2	18,0	AE42
12 – 135	CA4-R12-G3	23,0	AE43
15	CA4-R12-G4	16,0	AE44
16 – 18	CA4-R12-G5	19,0	AE45

O grupo CA4-R14 foi recristalizado em MeOH, fornecendo um sólido branco (CA4-R14-S; 40 mg; p.f. 85,0 – 87,0 °C) que foi denominado por AE37. A fase em MeOH forneceu também um sólido branco após a evaporação do solvente (112,0 mg). Esse sólido foi submetido a refração cromatográfico por CC de Sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluído em MeOH, fornecendo 16 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme Tabela II-17.

Tabela II.17. Fracionamento cromatográfico do grupo CA4-R14

Fração	Grupo	Massa /mg	Identificação
9 – 12	CA4-R14-G1	13,0	AE49
14 – 16	CA4-R14-G2	45,0	AE50

Os grupos CA4-R2, CA4-R4 a CA4-R7, CA4-R11, CA4-R13 e CA4-R15 a CA4-R21 não foram estudados por apresentarem-se como misturas complexas.

2.1.3.6. Grupos ainda não estudados

Algumas frações isoladas e purificadas foram submetidas a análise estrutural, porém os dados correspondentes não são ainda conclusivos. Os grupos CA-5 a CA-20 mostrados na Tabela II.1 (p. 77) não foram ainda submetidos a procedimentos fitoquímicos para isolamento de seus constituintes.

2.1.4. Fracionamento do extrato etanólico do cerne

Parte do extrato etanólico do cerne (328,48 g) foi submetido a fracionamento por CCS (coluna 9,0 cm x 150 cm) com eluição em hexano, DCM, AcOEt e EtOH em gradiente crescente de polaridade, resultando em 461 frações. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCD, conforme mostrado na Tabela II.18 (p. 88). Durante o fracionamento cromatográfico, a fração 168 (0,1196 g) sofreu oxidação, adquirindo aspecto muito diferente em relação as frações consecutivas. O grupo CE17 foi recristalizado em hexano, resultando em um sólido branco (p.f. 122,7 a 128,0 °C), denominado por AE2. O grupo CE20 foi recristalizado em MeOH, resultando em um sólido amarelo (192,9 mg) com decomposição a temperaturas acima de 290 °C, denominado por AE14. O grupo CE36 foi recristalizado em MeOH, fornecendo um sólido (345,8 mg; p.f. 279,9 a 292,8 °C), denominado por AE15. Os demais grupos e frações não foram ainda submetidos a fracionamento cromatográfico para isolamento e purificação de seus constituintes.

Tabela II.18. Fracionamento cromatográfico do extrato em etanol do cerne

Frações	Eluente	Grupo	Massa (g)
1 - 4	Hexano	CE1	0,1106
5	Hexano	CE2	0,2772
6	Hexano	CE3	9,4165
7 - 10	Hexano	CE4	50,0047
11 - 13	Hexano	CE5	9,9590
14 - 16	Hexano	CE6	5,5567
17 - 20	Hexano	CE7	5,1350
21 - 54	Hexano	CE8	17,8569
55 - 97	Hexano	CE9	10,5224
98 - 112	Hexano:DCM (9:1)	CE10	15,1544
113 - 137	Hexano:DCM (9:1)	CE11	12,6424
139 - 144	Hexano:DCM (4:1)	CE12	-----
145 - 152	Hexano:DCM (4:1)	CE13	-----
153 - 165	Hexano:DCM (4:1)	CE14	-----
166 - 219	Hexano:DCM (3:2)	CE15	4,2653
220 - 229	DCM	CE16	10,0837
230	DCM	CE17	
231 - 244	DCM	CE18	0,9675
245 - 247	DCM	CE19	0,3055
248 - 259	DCM:AcOEt (9:1)	CE20	-----
260 - 262	DCM:AcOEt (9:1)	CE21	0,7870
263 - 266	DCM:AcOEt (9:1)	CE22	0,7079
267 - 288	DCM:AcOEt (4:1)	CE23	4,8744
289 - 300	DCM:AcOEt (4:1)	CE24	1,9519
301 - 304	DCM:AcOEt (4:1)	CE25	0,2429
305 - 318	DCM:AcOEt (4:1)	CE26	0,7890
319 - 352	DCM:AcOEt (4:1)	CE27	1,5055
353 - 378	DCM:AcOEt (7:3)	CE28	0,8719
379 - 386	DCM:AcOEt (3:2)	CE29	0,6948
387 - 396	DCM:AcOEt (3:2)	CE30	0,4343
397 - 400	DCM:AcOEt (2:3)	CE31	1,1600
401 - 408	DCM:AcOEt (2:3)	CE32	1,1493
409 - 410	DCM:AcOEt (2:3)	CE33	0,1905
411 - 414	DCM:AcOEt (1:4)	CE34	0,5477
415 - 419	DCM:AcOEt (1:4)	CE35	0,5730
420 - 439	DCM:AcOEt (1:4)	CE36	0,7724
440 - 461	AcOEt	CE37	

2.2. Metodologia Biológica

No teste de difusão em ágar,¹⁵⁷ as bactérias foram individualmente inoculadas em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio infuso de cérebro e coração (BHI, 37,0 g/L) e, posteriormente, incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 0,5 mL deste material foi transferida a um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril constituída por soluções aquosas de NaCl (9,0 g/L) e MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L). Foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura antibiótico nº 1 (27,0 g/L) e 0,4 mL do inóculo bacteriano. Discos contendo 100 µg da amostra foram colocados nas placas com o auxílio de uma pinça estéril. Um disco contendo o controle positivo (disco impregnado com o antibiótico cloranfenicol) ou o controle negativo (disco impregnado com o solvente utilizado para solubilizar a amostra) foi colocado no centro de cada placa. Foi feita a leitura dos halos de inibição após 24 h de incubação.

No teste de concentração inibitória mínima,¹⁵¹ as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo o meio BHI (2,0 mL) e, posteriormente, incubadas em estufa a 37 °C, durante 18 horas. Após este período, 0,5 mL desta suspensão bacteriana foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma suspensão compatível com a escala 5 de McFarland (inóculo). Para cada amostra a ser testada, foram usados 10 tubos de ensaio, contendo 1,8 mL do meio de cultura BHI no tubo 1 e 1,0 mL nos demais tubos (tubos 2-10). Uma alíquota de 200 µL da solução teste (contendo 1,025 mg de cada amostra dissolvidos em 200 µL de DMSO) foi colocada no tubo 1. Seqüencialmente, transferiu-se 1 mL do tubo 1 para o tubo 2, depois 1 mL do tubo 2 para o tubo 3 e, assim, sucessivamente. Desprezou-se 1 mL do tubo 10. Adicionaram-se 100 µL do inóculo em cada tubo de ensaio. Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 18 h. A leitura foi realizada após 18 h de incubação. Observou-se a partir de qual tubo a mistura tornara-se turva. A concentração inibitória mínima (CIM) foi atribuída àquela concentração do tubo com a menor diluição e que não apresentou turbidez sendo, portanto, a menor concentração que inibe, visualmente, o crescimento da bactéria teste.

Capítulo III:
Estudo Fitoquímico das Cascas
- Resultados e Discussão

1. Análise Estrutural de CA1-s

O sólido branco recristalizado em MeOH das frações em hexano do extrato etanólico das cascas de *A. esperanzae* (CA1-s) apresentou uma larga faixa de fusão (35,9 a 48,8 °C). O espectro no IV de CA1-s (Fig. III.1) mostra bandas entre 2900 a 2850 cm^{-1} atribuídas a estiramentos C-H alifáticos, uma banda intensa em 1699 cm^{-1} atribuída a estiramento C=O conjugado, uma absorção pouco intensa em 1639 cm^{-1} atribuída a estiramentos C=C, bandas em 1462, 1536 e 1381 cm^{-1} atribuídas a estiramentos C-C e deformações angulares de C-H de cadeias alifáticas. As bandas em 1248 e 1171 cm^{-1} podem ser atribuídas respectivamente a estiramentos C-O assimétrico e simétrico. Esses dados estão de acordo com a estrutura de um éster alifático insaturado.

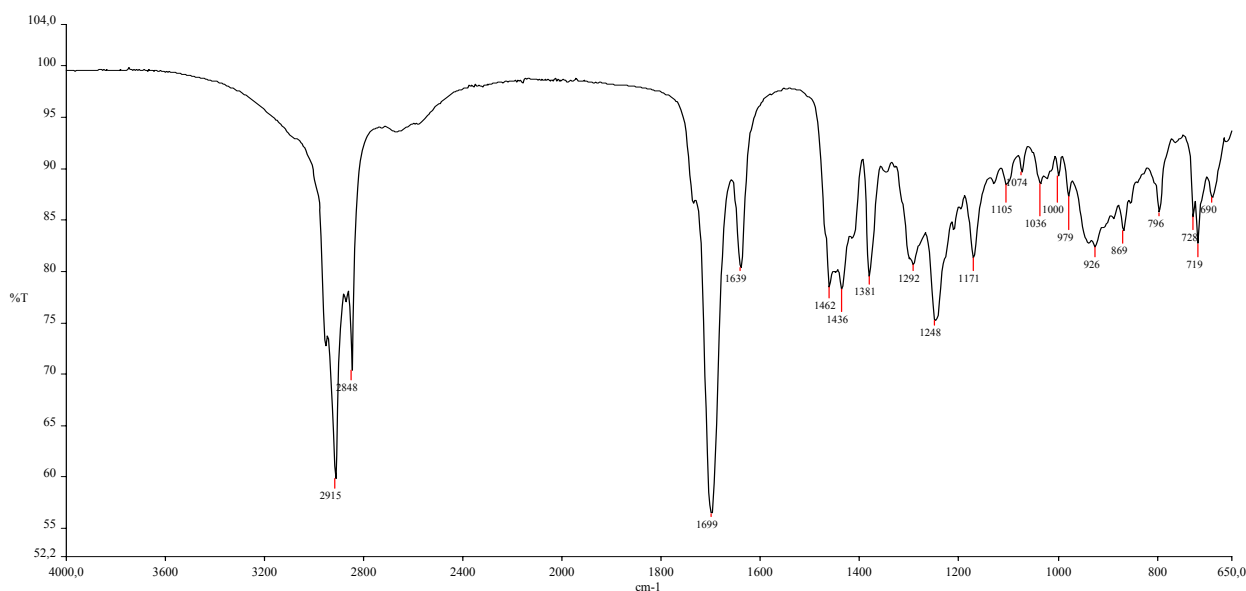


Figura III-1. Espectro de absorção na região do Infravermelho de CA1-s.

A Figura III-2 apresenta o cromatograma de CG de CA1-s. Vários picos são observados no cromatograma, indicando tratar-se de uma mistura complexa. Os picos predominantes são aqueles de $t_R = 35,636$; 41,047; 41,524; 41,955 e 42,894 min.

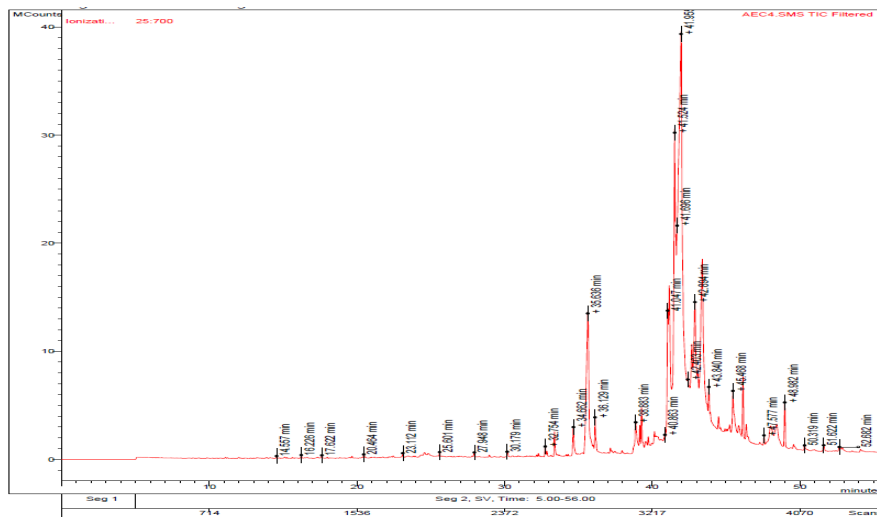


Figura III-2. Cromatograma de CG de CA1-s (coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 50 °C por 3 min, seguido por aquecimento a 5 °C/min, 300 °C; injetor: 300 °C; split 1:15; fluxo: 1 mL/min/He; detector: 300 °C).

O espectro de massas do constituinte com $t_R = 35,654$ min bem como a estrutura proposta após consulta ao banco de dados NIST (2005) do próprio equipamento são apresentados na Figura III-3. Estes resultados estão de acordo com o espectro na região do IV de CA1 (Figura III-1, p. 80).

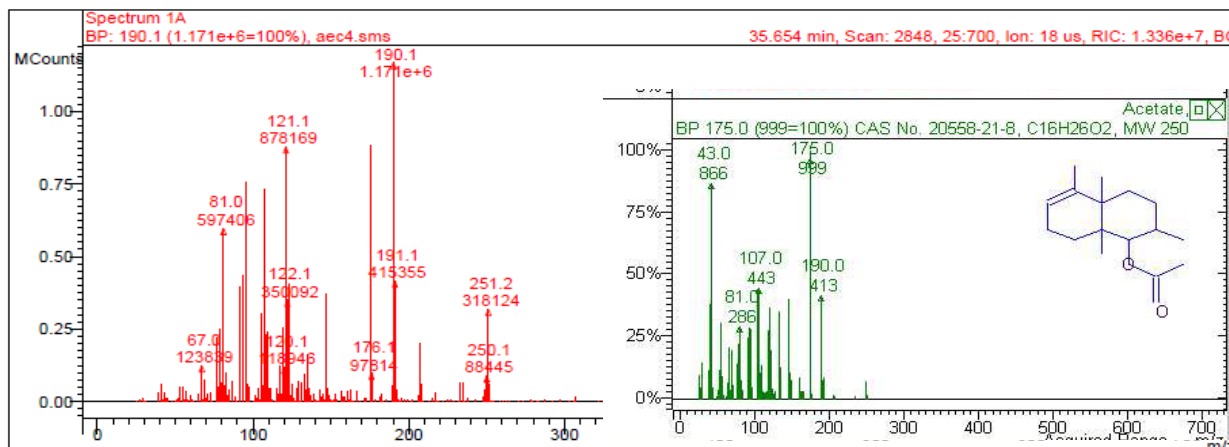


Figura III-3. Espectro de Massas do constituinte com $t_R = 35,654$ min do cromatograma de CA1-s (GC/MS VARIAN 4000 - coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 180 °C por 10 min seguido por aquecimento a 8 °C/min, 310 °C; injetor: 310 °C; split 1:15; fluxo: 1 mL/min/He; detector: 300 °C. Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg; eletromultiplicadora a 1500 V; corrente do filamento de 10 uAmps; vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).

2. Análise estrutural de CA2

O grupo CA2 apresentou-se como um óleo amarelo que foi submetido a análise por CG/EM. A Figura III-4 apresenta o cromatograma de CA2. Dois picos apresentam-se em maiores proporções relativas.

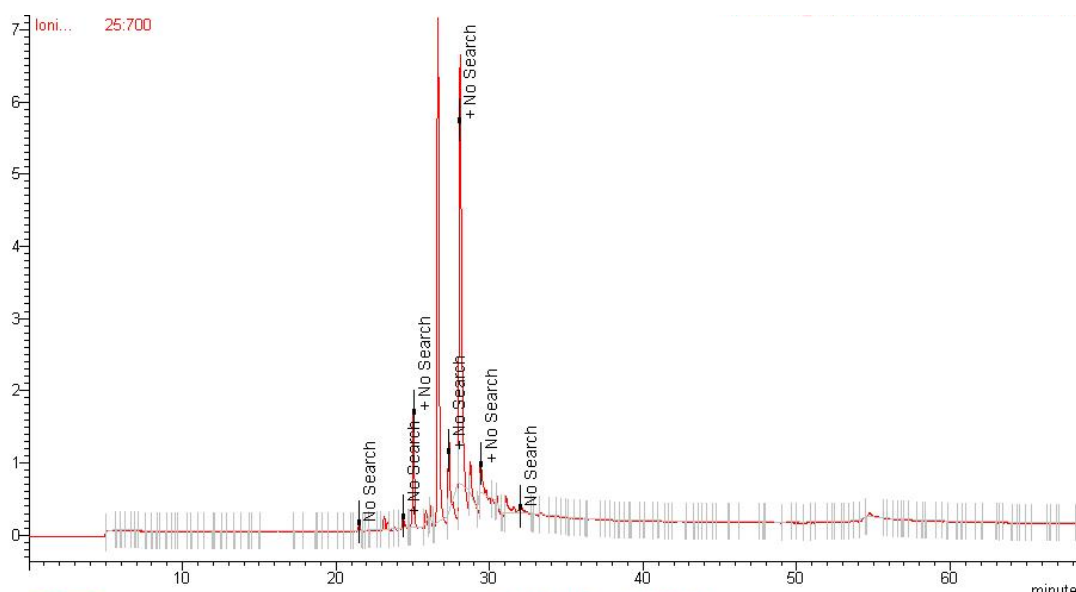


Figura III-4. Cromatograma de CG de CA2 (GC/MS VARIAN 4000 - coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 180°C por 10 min seguido de aquecimento a 8°C/min, 310°C, injetor: 310°C, split 1:15, fluxo:1 mL/min/He, detector: 300°C).

As Figuras III-5 a III-8 apresentam os espectros de massas dos principais constituintes cujos picos são apresentados no cromatograma de CG de CA2, com sugestões de estrutura a partir do banco de dados NIST (2005). Esses resultados indicam que CA2 apresenta-se como uma mistura complexa, contendo: éster metílico do ácido (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il-) octadecanóico ($t_R = 27,376$ min); éster *terc*-butildimetilsilil do ácido docosanóico ($t_R = 28,097$ min); éster etílico do ácido octadecanóico ($t_R = 28,756$ min); éster metílico do ácido 2-metil-hexacosanóico ($t_R = 29,452$ min); (7a-isopropenil-4,5-dimetildroinden-4-il) metanol ($t_R = 54,835$ min); hexadecanoato de etila ($t_R = 21,522$ min); oleato de etila ($t_R = 23,154$ min); 5-(7a-isopropenil-4,5-dimetildroinden-4-il)-3-metil-3-pentenol ($t_R = 24,334$ min); 15-metil-heptadecanoato de etila ($t_R = 23,383$ min); ácido docosanóico ($t_R = 25,034$ min); ácido tricosanóico ($t_R = 25,875$ min); docosanoato de metila ($t_R = 26,151$ min) e 1-tripropilsililoxi-heptadecano ($t_R = 26,642$ min).

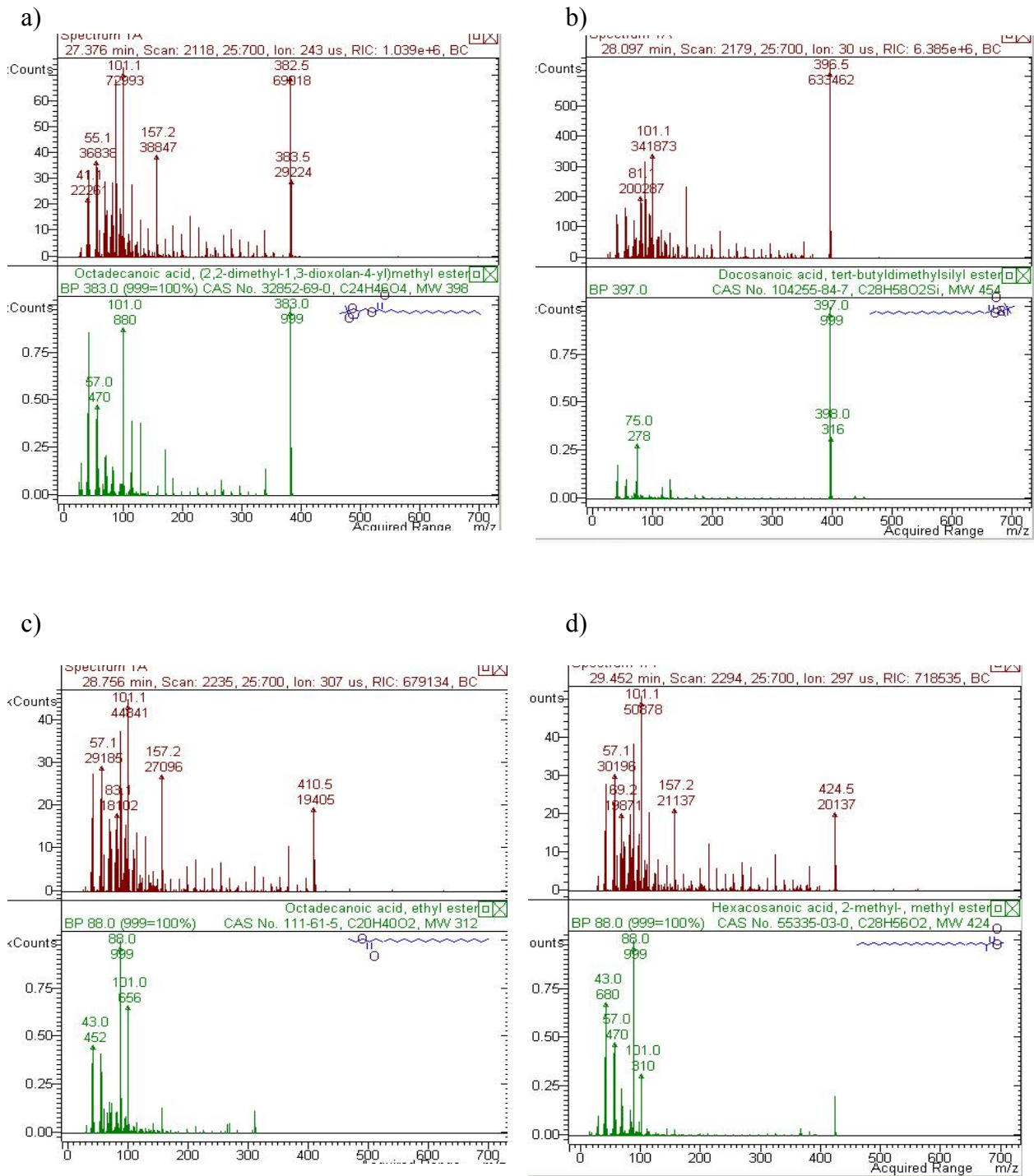


Figura III-5. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 27,376$ (a), $28,097$ (b), $28,756$ (c) e $29,452$ (d) min no cromatograma de CA-2 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr. Interface: 300 °C, ion trap: 150 °C, manifold: 45°C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).

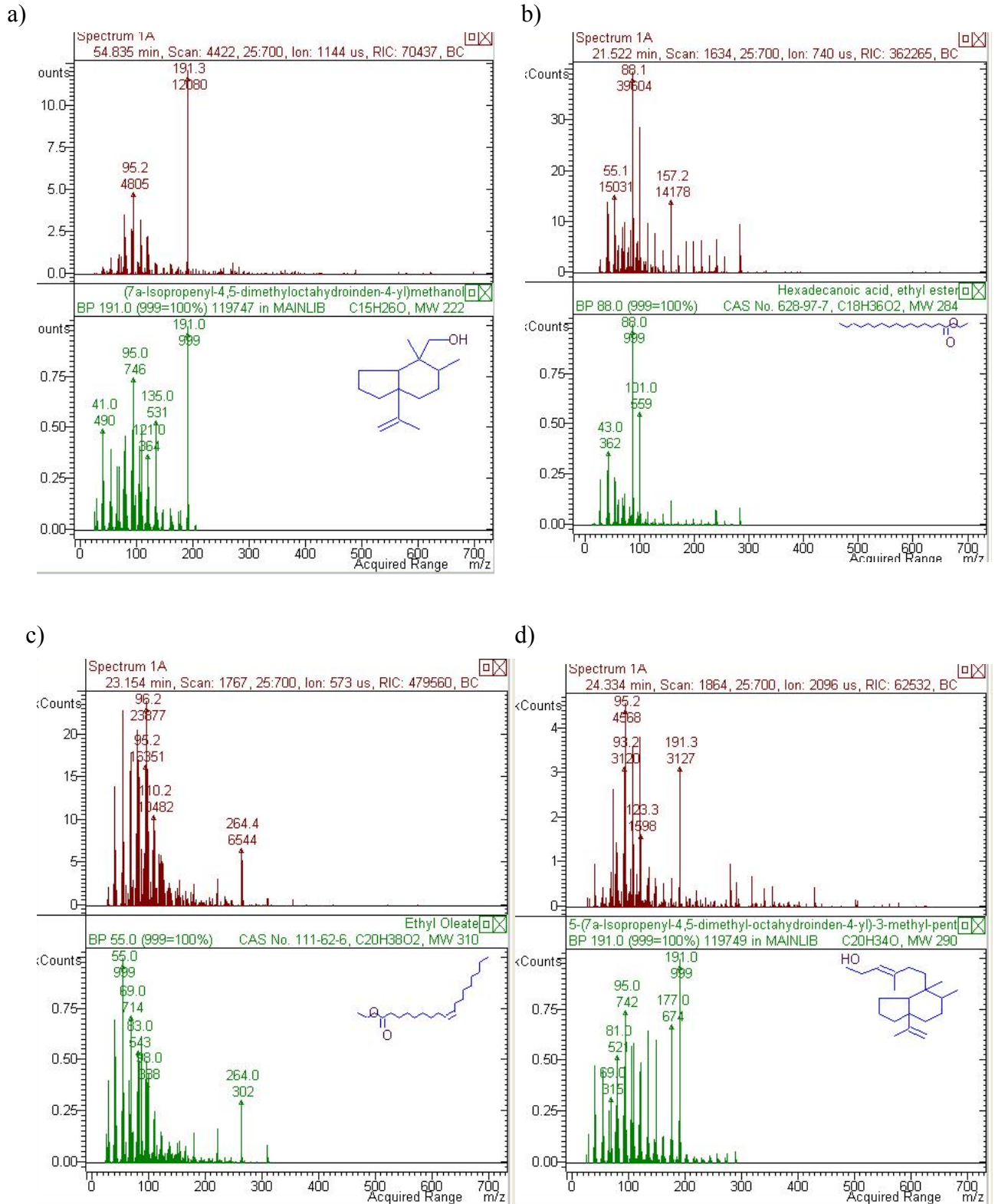


Figura III-6. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 54,835$ (a), $21,522$ (b), $23,154$ (c) e $24,334$ (d) min no cromatograma de CA-2 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Target TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr. Interface: 300 °C, ion trap: 150 °C, manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).

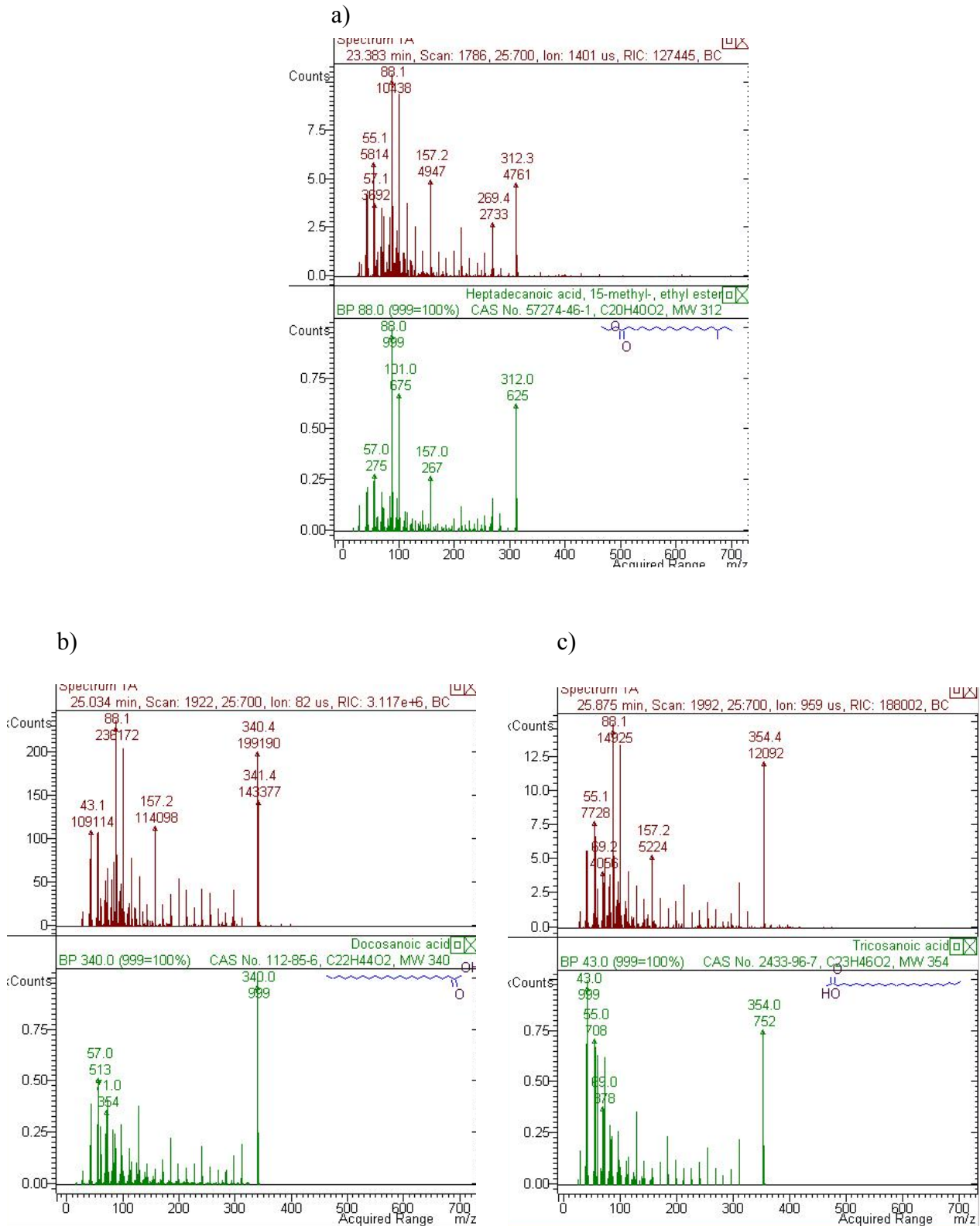


Figura III-7. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 23,383$ (a), $25,034$ (b) e $25,875$ (c) min do cromatograma de CA-2 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300°C, ion trap: 150°C, manifold: 45°C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).

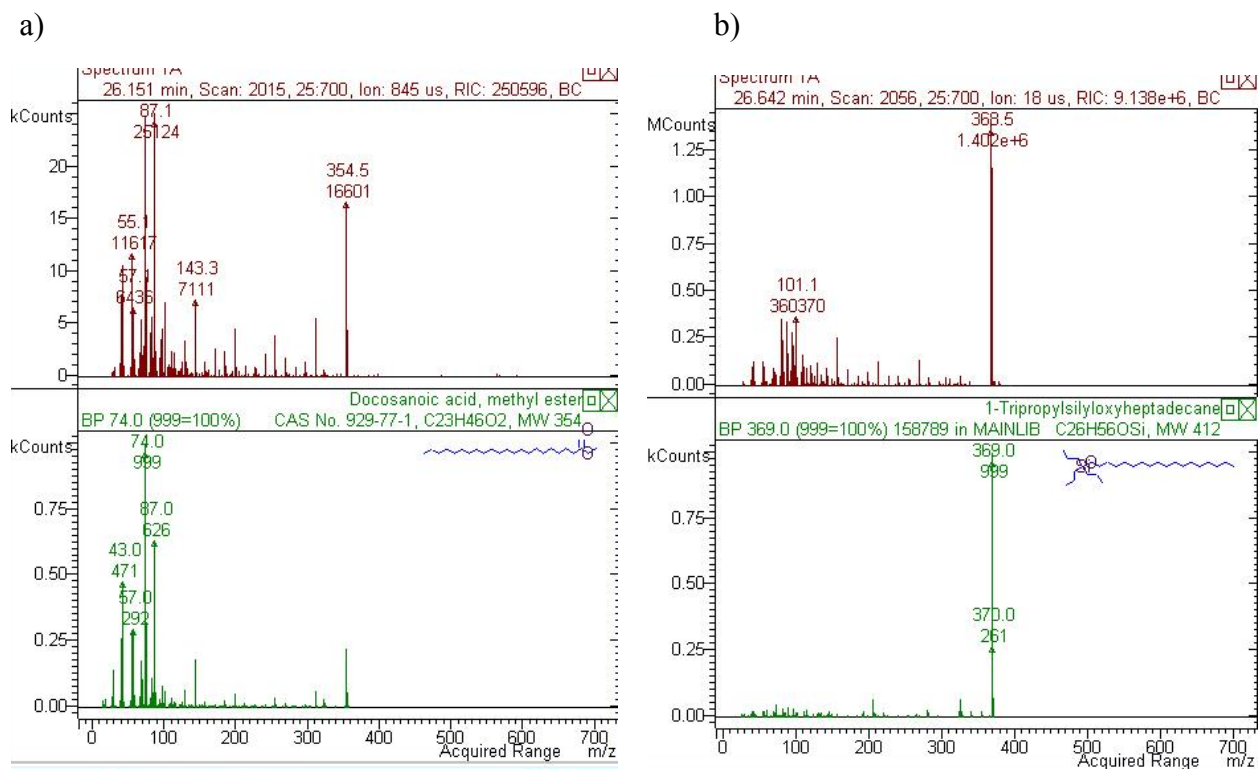


Figura III-8. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 26,151$ (a) e $26,642$ (b) min no cromatograma de CA-2 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr. Interface: 300 °C, ion trap: 150 °C, manifold: 45°C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).

3. Análise estrutural de CA3-R2 (AE1).

O grupo CA3-R2 apresentou uma faixa pequena de fusão (120,2 – 121,8 °C), indicando tratar-se de uma substância com elevado grau de pureza. A Figura III-9 apresenta o cromatograma de CG de CA3-R2. Os picos em $t_R = 27,794$, 41,371 e 53,916 min são aqueles de maiores intensidades relativas com alta proporção relativa do último. A Figura III-10 mostra os espectros de massas dos constituintes com $t_R = 24,794$ e 53,916 min. A consulta ao banco de dados NIST (2005) indicou tratar-se de triciclo[5.1.0.02,4]oct-5-eno, 3,3,5,6,8,8-hexametil e asarinin, respectivamente.

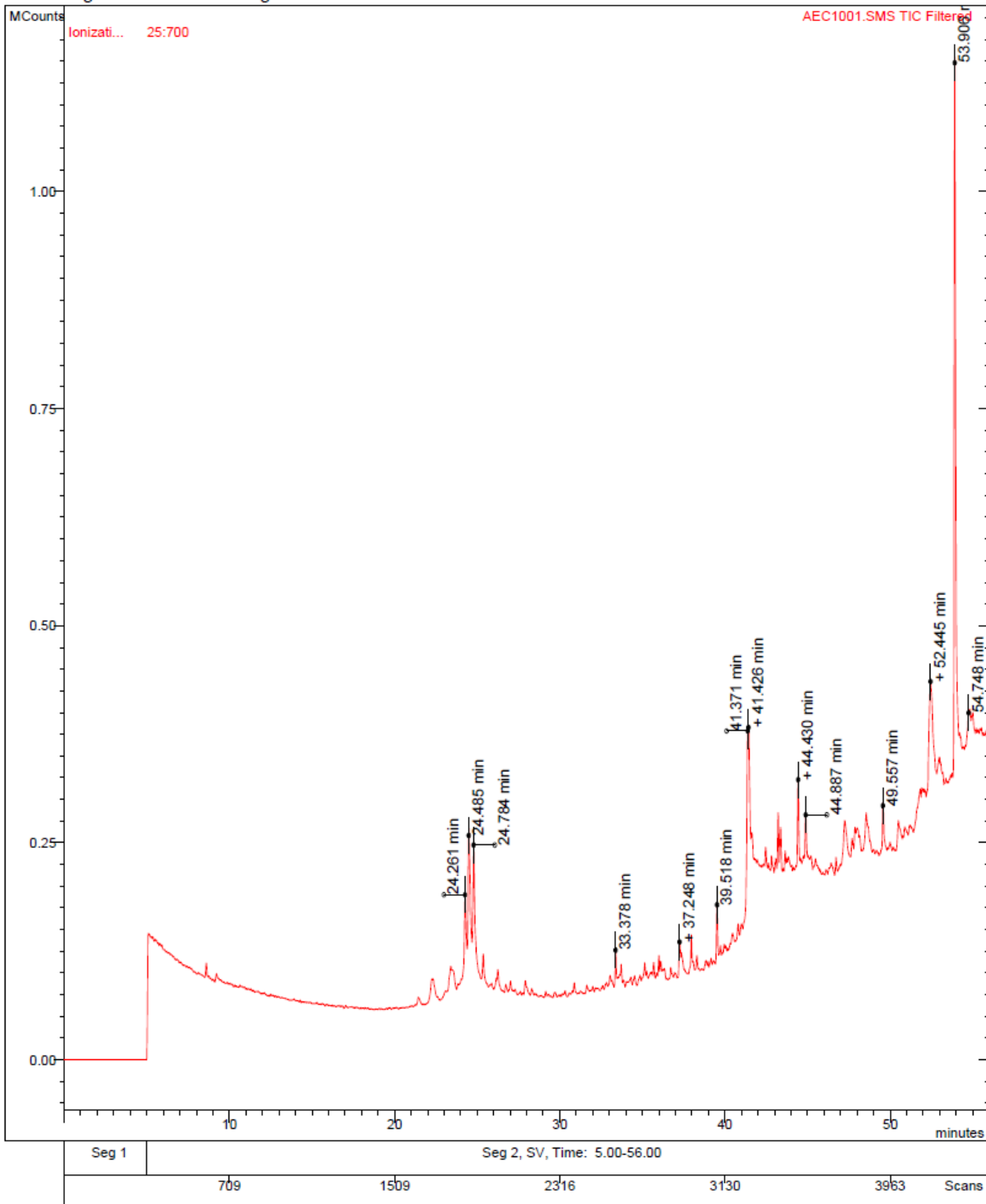


Figura III-9. Cromatograma de CG de AE1 (GC/MS VARIAN 4000 - coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 180 °C por 10 min seguido por aquecimento a 8 °C/min, 310 °C; injetor: 310 °C; split 1:15; fluxo: 1 mL/min/He; detector: 300 °C).

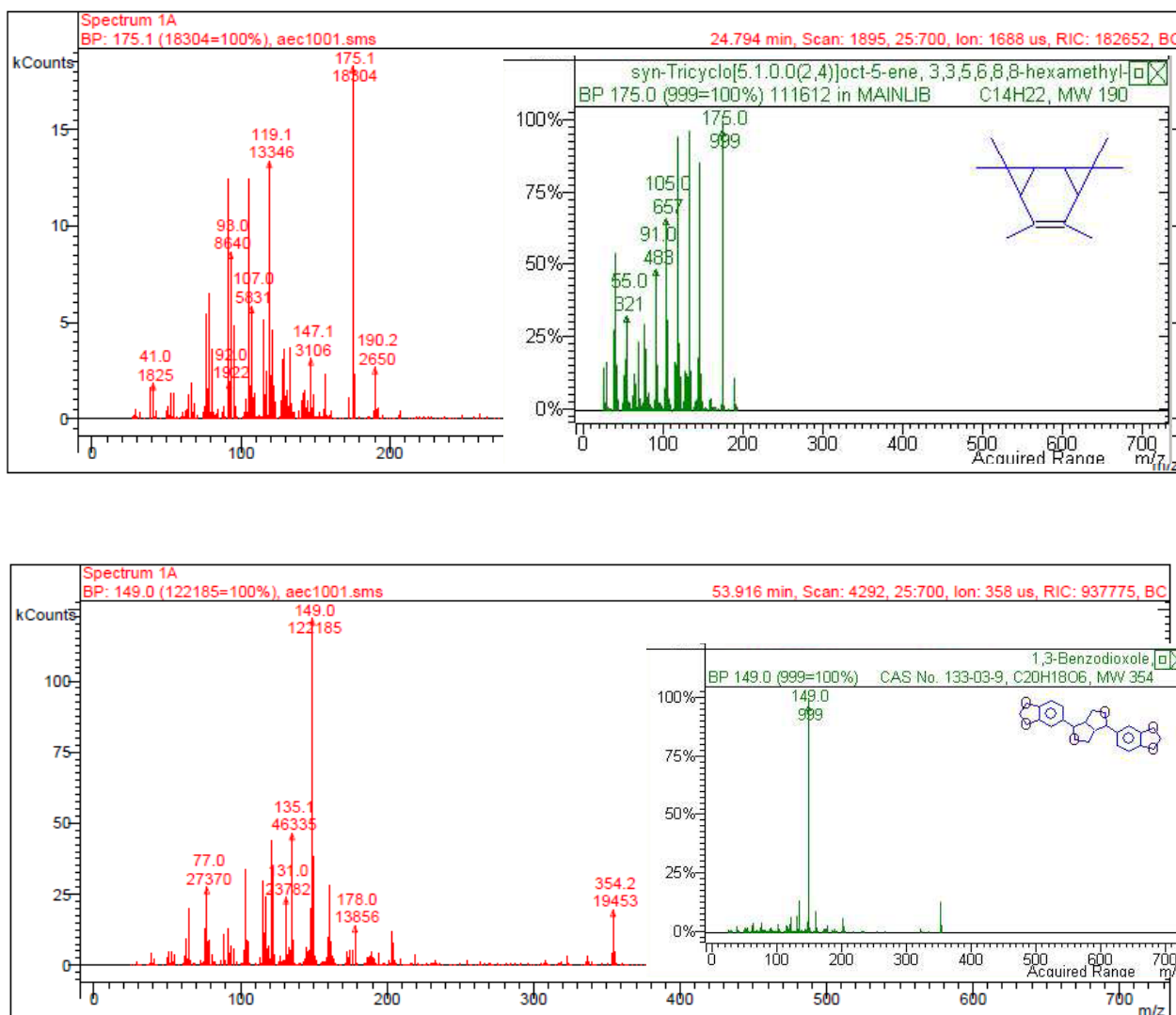


Figura III-10. Espectros de Massas dos constituintes com $t_R = 24,794$ e $53,916$ min no cromatograma de AE1 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Target TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr. Interface: 300°C , ion trap: 150°C , manifold: 45°C , Faixa de massas: 45 a 700 uma).

A Figura III.11 apresenta o espectro no IV de AE1. As bandas pouco intensas entre 3100 e 3000 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–H aromático. As bandas entre 2950 e 2800 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–H de grupos alifáticos. As bandas na região entre 1650 e 1550 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C=C de grupos alquênlicos. As bandas intensas entre 1500 e 1400 cm^{-1} podem ser atribuídos a vibrações de anel aromático. As bandas intensas próximas a 1250 e 1050 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–O assimétrico e simétrico, respectivamente. As bandas intensas

próximas a 750 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformação angular fora do plano de C–H de grupos alquênílicos. Essas bandas estão de acordo com a estrutura de asarinin.

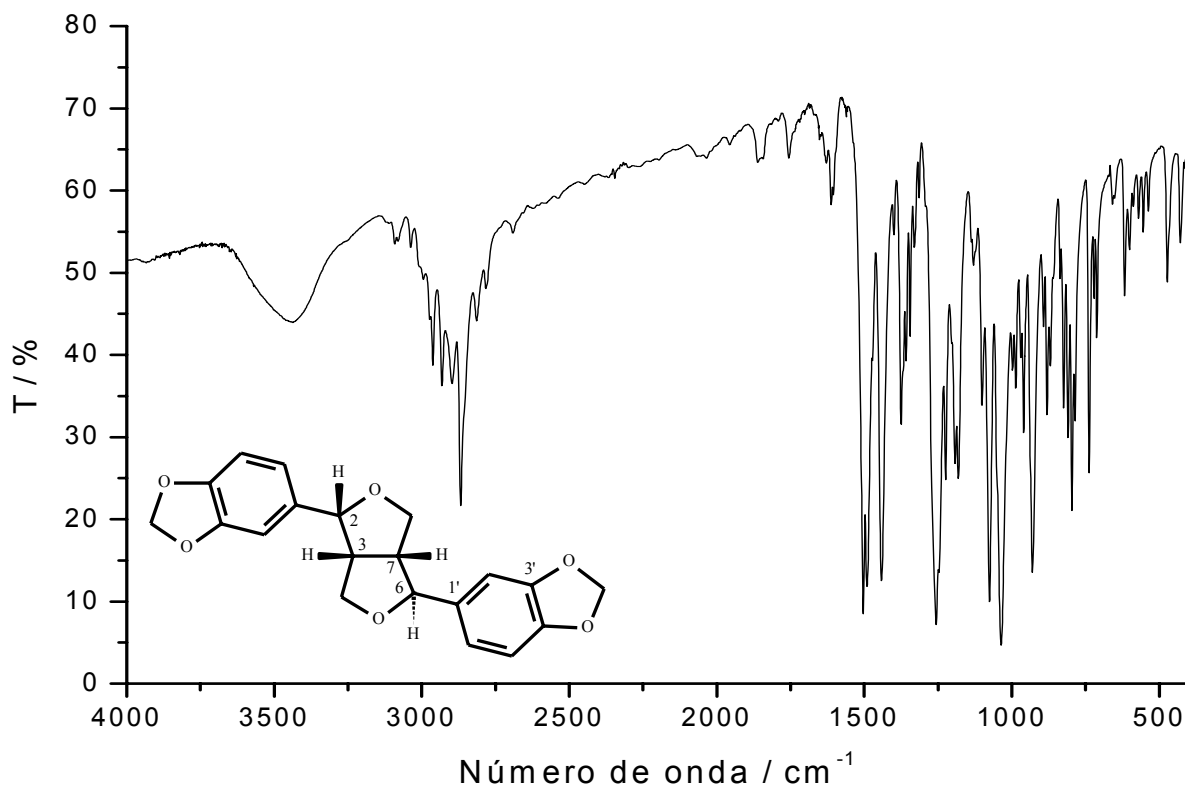


Figura III-12. Espectro de absorção na região do Infravermelho do grupo AE1 (KBr; cm^{-1}).

A Figura III.13 mostra o espectro de RMN de ^1H de AE1. Nesse espectro são registrados sinais de hidrogênios aromáticos na região entre δ_{H} 7,0 e 6,0, bem como sinais entre δ_{H} 5,0 e 3,0 relativos a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados e hidrogênios metínicos. A Tabela III-1 apresenta a atribuição desses sinais correspondente à estrutura da asarinin.



Figura III-13. Espectro de RMN de ¹H de AE1 (400 MHz, CDCl₃).

A Figura III.14 mostra o espectro de RMN de ¹³C de AE1. Esse espectro mostra sinais de carbonos aromáticos oxigenados C3'/3'' e C4'/4'' (δ_c 147,7/148,0 e 147,2/147,6, respectivamente), alquilsubstituídos C1'/1'' (δ_c 132,3/135,1) e hidrogenados C2'/2'', C5'/5'' e C6'/6'' (118,7/119,6, 108,2/108,2 e 106,4/106,6, respectivamente). A atribuição dos demais sinais de carbono é apresentada na Tabela III-1 (p. 103).

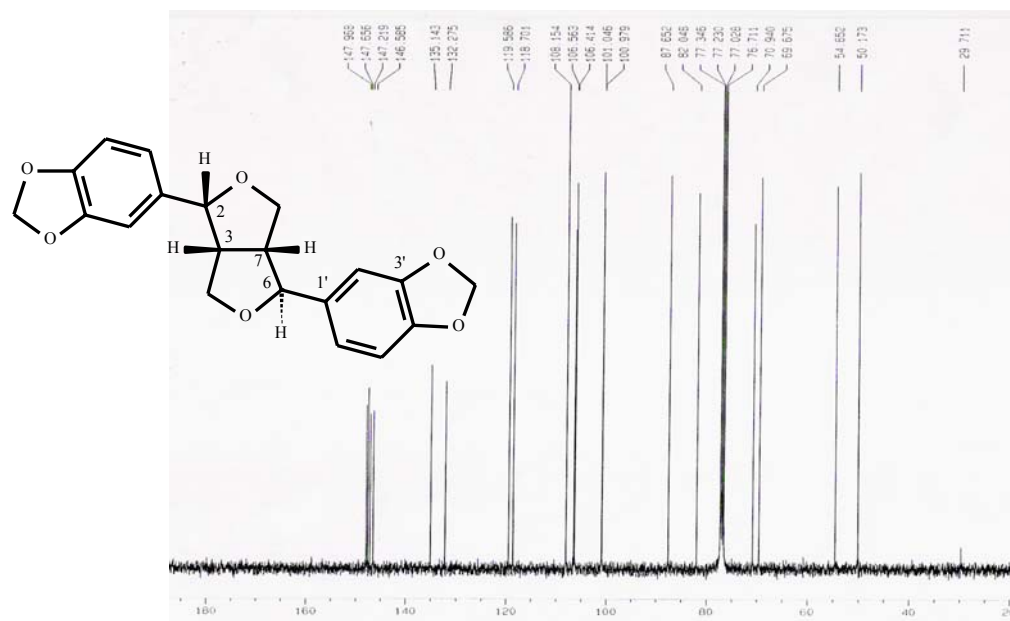
 δ

Figura III-14. Espectro de RMN de ^{13}C de AE1 (100 MHz; CDCl_3).

A Figura III-15 mostra o subspectro DEPT 135° de AE1. No espectro são registrados dez carbonos metínicos e quatro metilênicos, estando de acordo com a estrutura da asarinin. A Figura III-16 mostra o mapa de contornos HSQC de AE1. As correlações $^1J_{\text{C-H}}$ observadas no mapa de contornos são indicadas na Tabela III-1.

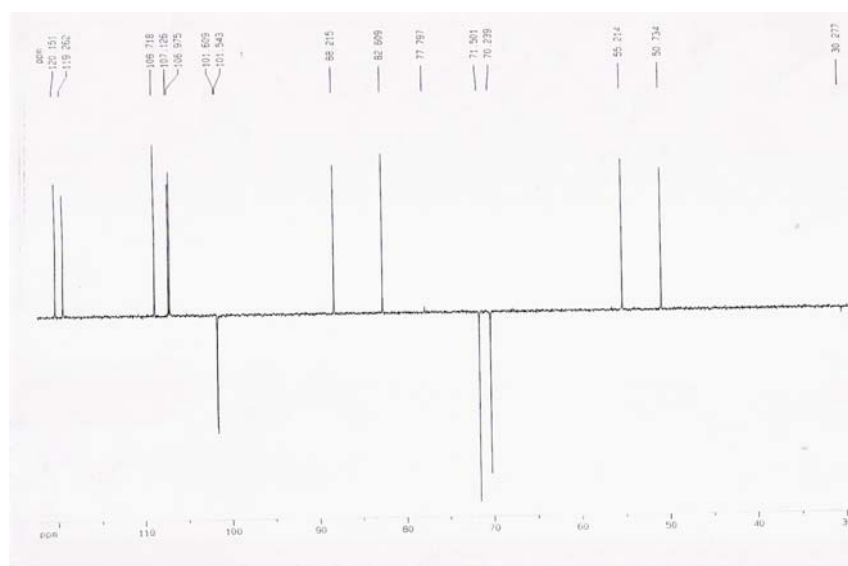
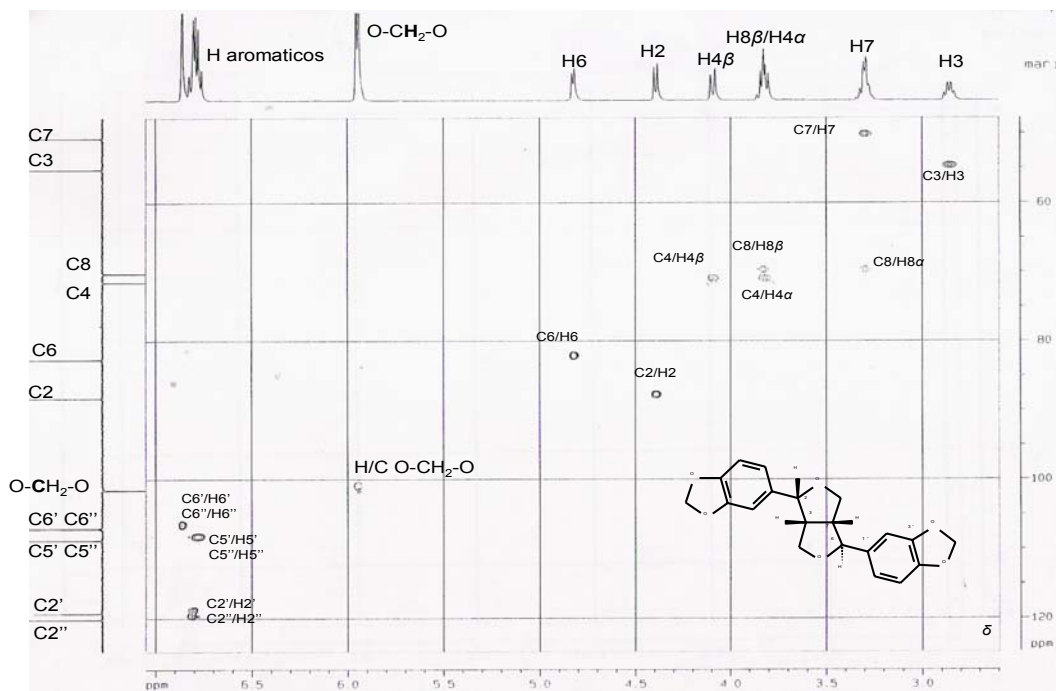
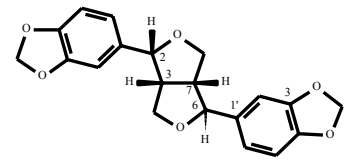
 δ

Figura III-15. Espectro de RMN de DEPT- 135° de AE1 (100 MHz; CDCl_3).

Tabela III-1. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AE1

Átomo	Literatura ¹⁵⁸	Carbono (δ_{C})	Hidrogênio (δ_{H})
2	87,6	87,7	4,39
3	54,6	54,7	2,86
4	70,9	70,9	3,82 (H α); 4,09 (H β)
6	82,0	82,0	4,82
7	50,1	50,2	3,31
8	69,6	69,7	3,29 (H α); 3,84 (H β)
1'	132,3	132,3	
2'	118,7	118,7	6,84
3'	147,6	147,7	
4'	146,5	146,6	
5'	108,1	108,2	6,77
6'	106,3	106,4	6,80
1''	135,3	135,1	
2''	119,5	119,6	6,84
3''	147,9	148,0	
4''	147,2	147,2	
5''	108,1	108,2	6,77
6''	106,5	106,6	6,80
O-CH ₂ -O	101,0	101,1	5,95
O-CH ₂ -O	101,0	100,9	5,95

**Figura III.16.** Mapa de contornos HSQC de AE1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).

A Figura III-17 mostra o mapa de contornos ^1H - ^1H COSY de AE1. O sinal em δ_{H} 4,82 (H-6) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 3,31 (H-7). O sinal em δ_{H} 3,82 (H-4 α) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 4,09 (H-4 β). O sinal em δ_{H} 4,82 (H-6) correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 3,31 (H-7) e 3,82 (H-4 α). As correlações do sinal em δ_{H} 2,86 (H-3) com os sinais em δ_{H} 4,39 (H-2), 3,31 (H-7), 3,82 (H-4 α) e 4,09 (H-4 β) e as correlações anteriormente citadas estão de acordo com a estrutura de asarinin.

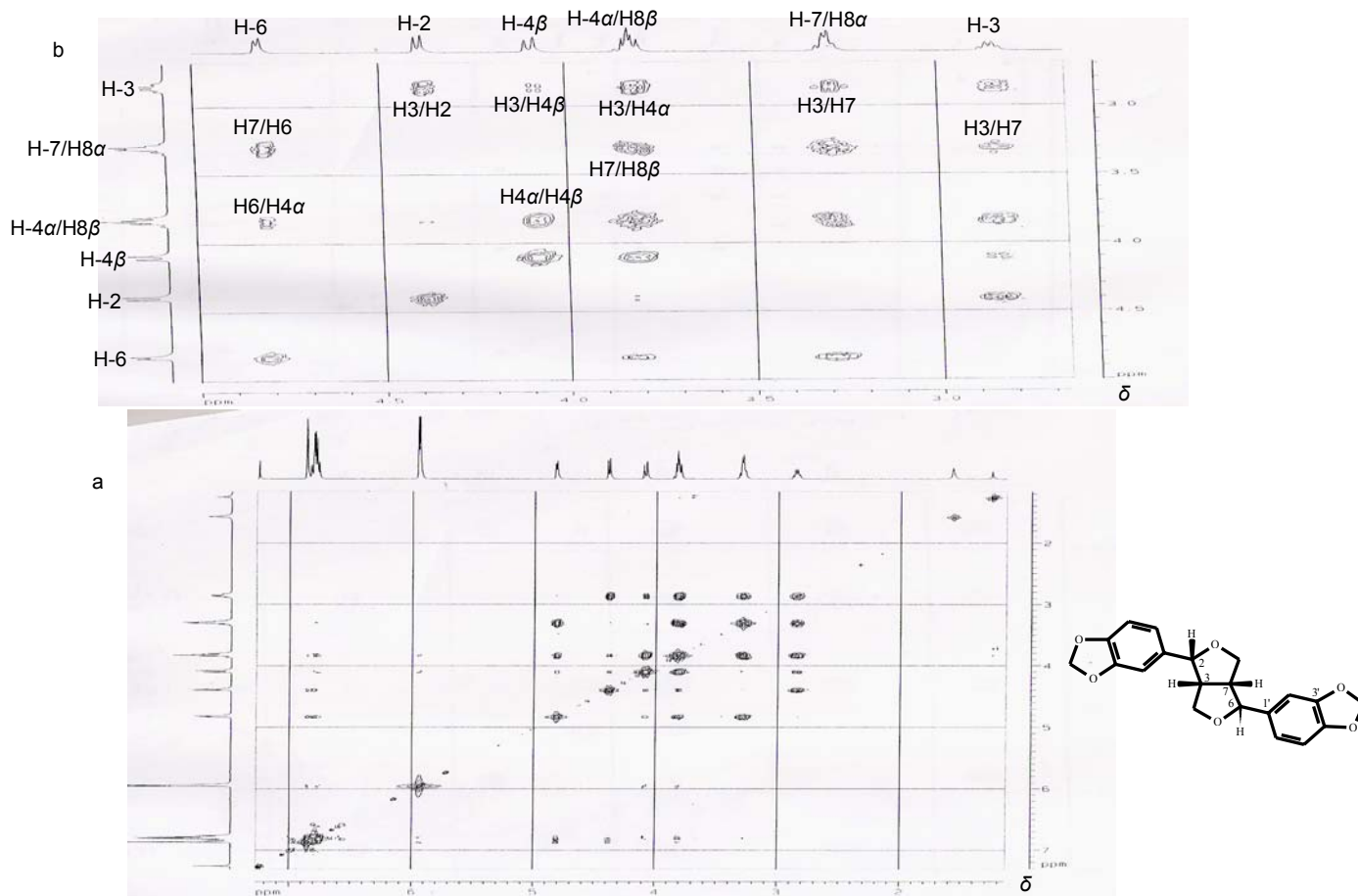


Figura III.17. Mapa de contornos COSY de AE1 (a) e sua ampliação (b) (400 MHz; CDCl_3).

O mapa de contornos ^1H - ^{13}C HMBC de AE1 (Figura III-18, p. 96) mostra correlações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,86 (H-3) com os sinais de carbono em δ_{C} 50,2 (C-7), 82,0 (C-6) e 87,7 (C-2). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,29 (H-8ax) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 82,0 (C-6), 54,7 (C-3) e 87,7 (C-2). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,31 (H-7) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 70,9 (C-4) e 87,7 (C-2). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,82 (H-4ax) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 82,0 (C-6), 87,7 (C-2), e 50,2 (C-7). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,84 (H-8eq) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 54,7 (C-3), 82,0 (C-6), e 87,7 (C-2). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,09 (H-4eq) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 50,2 (C-7), 82,0 (C-6) e 87,7 (C-2). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,39 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 50,2 (C-7), e 70,9 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,82 (H-6) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 69,7 (C-8), 50,2 (C-7), 106,4 (C-6'), 118,7 (C-2'), 132,3 (C-1'), 146,6 (C-4') e 147,7 (C-3'). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,95 (-O-CH₂-O-) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 146,6 (C-4''), 147,7 (C-3''), 148,0 (C-3') e 147,2 (C-4'). Os sinais de hidrogênio aromático em δ_{H} 6,77 – 6,84 correlacionam-se com os sinais de carbono em δ_{C} 82,0 (C-6) e 87,7 (C-2).

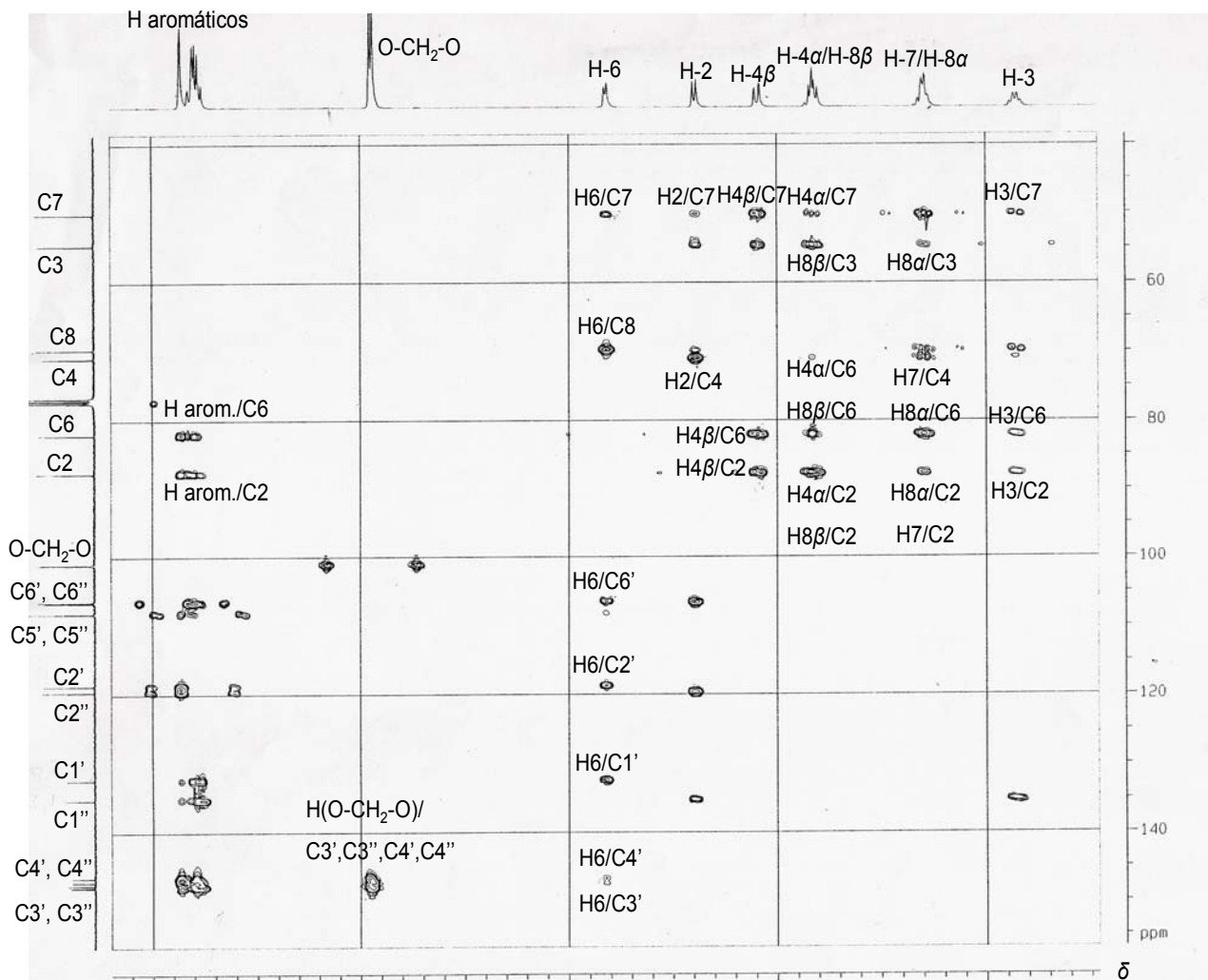


Figura III.18. Mapa de contornos HMBC de AE1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).

O mapa de contornos ^1H - ^1H NOESY de AE1 (Figura III-19, p. 97) mostra correlações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,86 (H-3) com os sinais de hidrogênio em δ_{H} 3,29 (H-8 α), 3,31 (H-7), e 3,82 (H-4 α). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,29 (H-8 α) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_{H} 4,39 (H-2) e 3,31 (H-7). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,09 (H-4 β) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_{H} 2,86 (H-3) e 4,39 (H-2). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,39 (H-2) correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,86 (H-3), 3,29 (H-8 α), 3,31 (H-7) e 4,09 (H-4 β). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,82 (H-6) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_{H} 3,84 (H-8) e 2,86 (H-3). Essas

correlações NOESY determinam a configuração relativa da estrutura, confirmando tratar-se de asarinin.

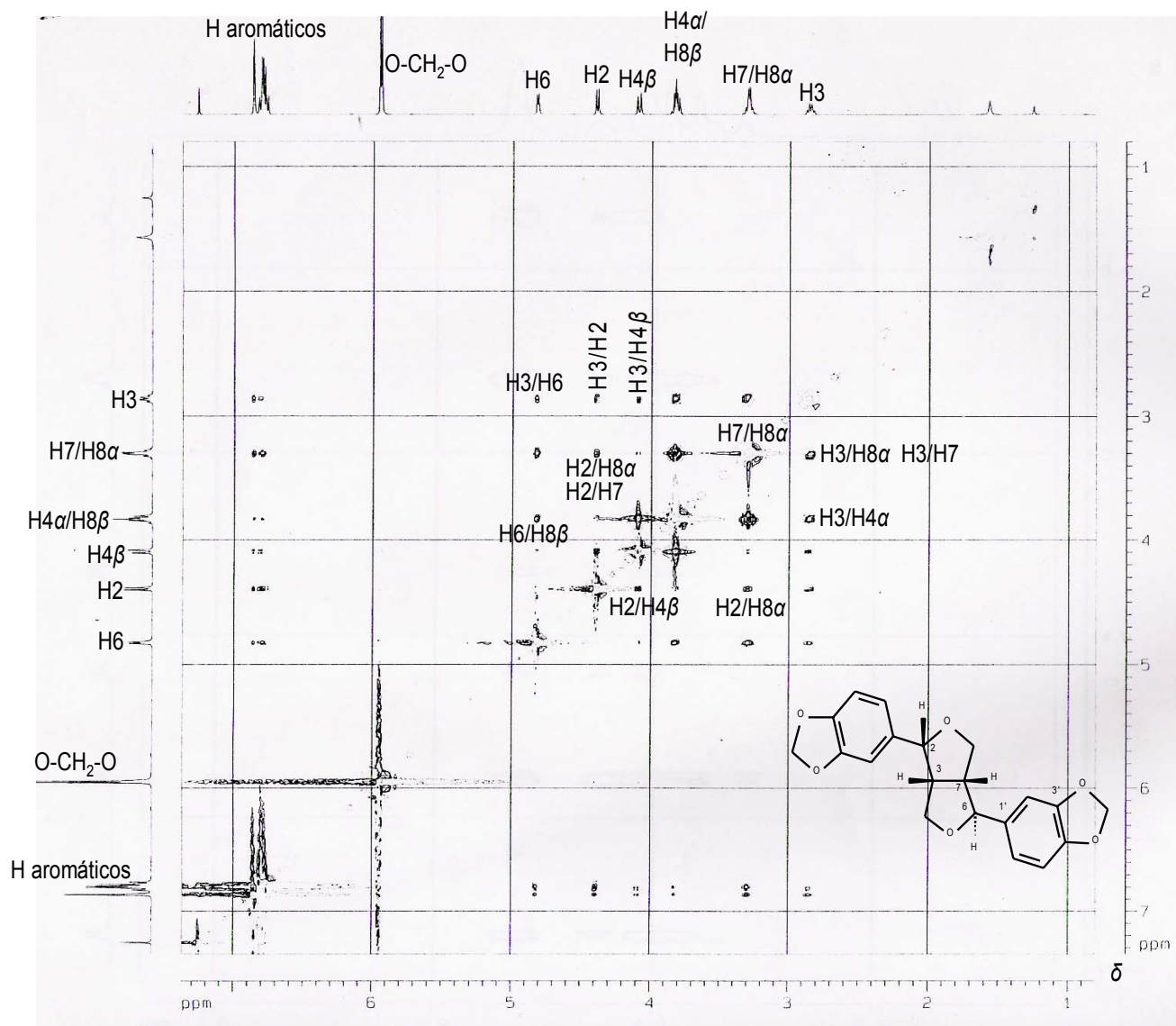


Figura III.19. Mapa de contornos NOESY de AE1 (400 MHz; CDCl_3).

4. Análise estrutural de CA3-R4-G1-R3 (AE4)

A Figura III-20 apresenta o espectro de RMN de ^1H de AE4. Na região de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios alifáticos (δ_{H} 2,5 a 0,8) são verificados muitos sinais sobrepostos. Os sinais em δ_{H} 5,68 e 5,14 podem ser atribuídos a hidrogênios alquênlicos.

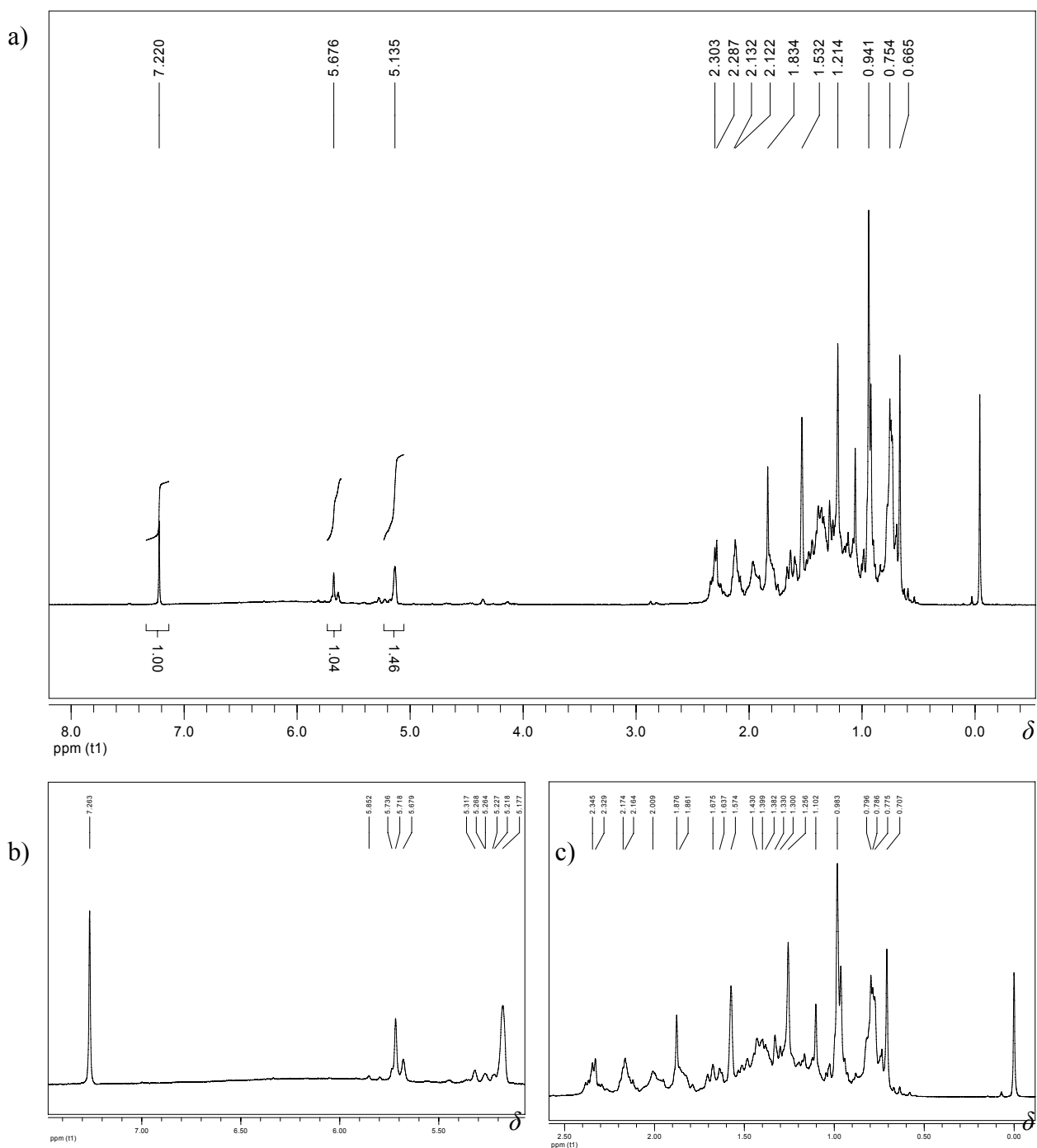


Figura III-20. Espectro de RMN de ^1H de AE4 (400 MHz; CDCl_3), (a); expansão δ 5 a 8 (b); expansão δ 0 a 2.50 (c).

A Figura III-21 (p. 110) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° de AE4. O sinal em δ_{C} 200,4 pode ser atribuído a carbonila de cetonas, pois é devido a um carbono não hidrogenado. Os sinais em δ_{C} 178,2, 177,3 e 172,5 podem ser atribuídos a carbonos não hidrogenados de grupos carboxila e/ou alquenílicos conjugados a grupos cetona. O sinal em δ_{C} 144,0 pode ser atribuído a carbono alquenílico não hidrogenado. Verificam-se dois conjuntos de sinais de intensidades diferentes, o que indica mistura de substâncias. No subespectro DEPT 135° podem também ser observados dois grupos de sinais de carbonos metilênicos, sendo estes sinais de maiores intensidades relativas e outros seis pouco intensos. Os sinais na região entre δ_{C} 20,0 – 14,0 podem ser atribuídos a carbonos metílicos. Pela quantidade de sinais no espectro de RMN de ^{13}C , pode-se propor que AE4 seja uma mistura contendo dois diterpenos, classe de compostos muito abundante no gênero *Aristolochia* (ver introdução).

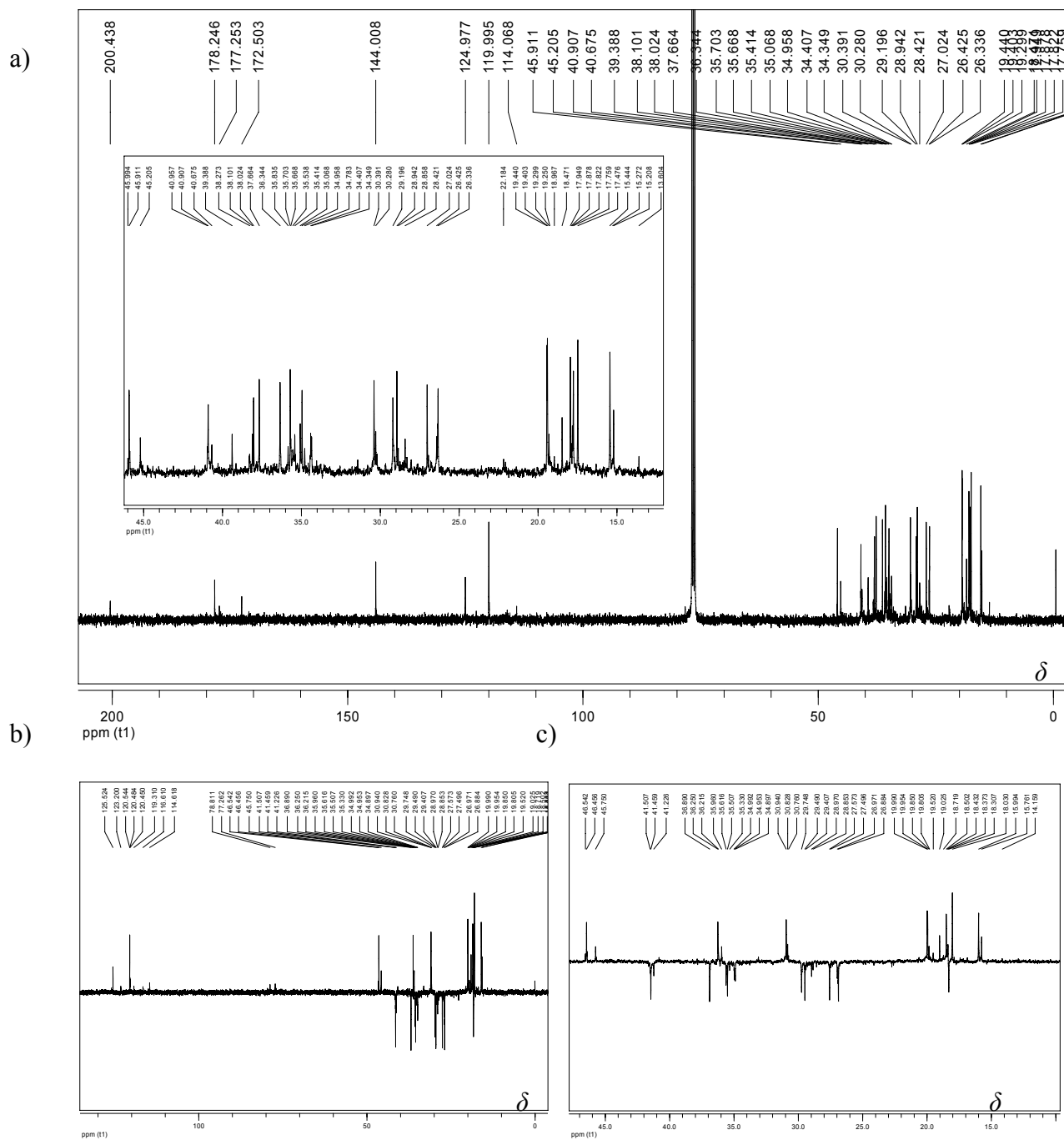
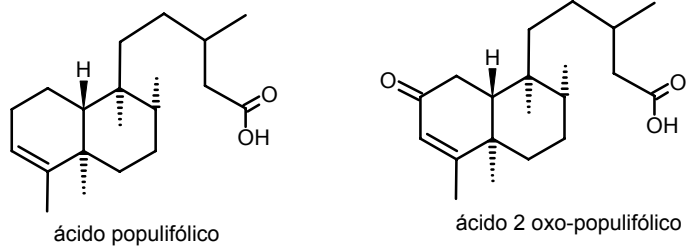


Figura III-21. Espectro de RMN de ^{13}C (superior) e subspectro DEPT 135° de AE4 (400 MHz; CDCl_3).

A comparação com dados da literatura permitiu inferir que AE4 trata-se de uma mistura composta principalmente de ácido 13,14-diidrokolavênico (ácido populifólico) e ácido 2-oxo-populifólico como mostrado na Tabela III-2.

Tabela III-2. Comparação de dados de deslocamento químico de AE4 com estruturas de ácido 13,14-diidrokolavênico (ácido populifólico) e ácido 2-oxo-populifólico



Carbono	Ácido populifólico		Ácido 2-oxo-populifólico	
	δ_c literatura	δ_c experimental	δ_c literatura	δ_c experimental
1	18,3	18,3	35,6	35,6
2	26,8	26,8	201,2	200,9
3	120,5	120,5	125,5	125,5
4	144,5	144,5	173,4	173,0
5	38,2	38,2	40,0	39,9
6	36,9	36,8	36,0	35,3
7	27,6	27,5	27,0	26,9
8	36,2	36,3	36,1	36,2
9	40,0	38,6	38,6	38,5
10	46,4	46,5	45,7	45,7
11	35,5	35,5	34,9	34,9
12	29,5	29,7	36,0	35,9
13	30,9	30,9	30,8	30,8
14	41,6	41,4	41,5	41,2
15	179,4	177,8	178,9	178,8
16	19,9	19,9	19,9	19,8
17	16,0	16,0	15,7	15,7
18	19,9	19,9	18,4	18,4
19	18,0	18,0	18,9	18,9
20	18,5	18,5	17,9	18,4

5. Análise estrutural de G11-R3-G4 (AE18)

A análise elementar de AE18 forneceu os dados mostrados na tabela III-3. As porcentagens relativas dos elementos correspondem a uma fórmula mínima próxima a $C_{15}H_{14}NO$.

Tabela III-3. Resultados de análise elementar de AE18

	% C	% H	% N	% O
Valores Experimentais	64,01	4,92	4,24	26,83
Valores Calculados	61,74	2,90	4,50	30,87

A Figura III-22 apresenta o espectro de absorção na região do IV de AE18. A banda larga entre 3200 e 2700 cm^{-1} indica a presença de hidrogênio em ligação de hidrogênio, com várias bandas pouco intensas sobrepostas que podem ser atribuídas a estiramento C-H de grupos aromáticos e alifáticos. A banda larga entre 1700 e 1650 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento C=O de grupos ácido carboxílico. As bandas em 1593, 1524 e 1415 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–C característicos do anel aromático. As bandas em 1478 e 1376 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramento de grupos nitro aromáticos. As bandas largas em 1263, 1166 e 1039 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos assimétricos e simétricos de C–O. A banda em 944 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento C–N de grupos nitro aromáticos. As bandas em 1006, 843 e 724 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformações angulares no plano e fora do plano de C–H aromático. Todas essas bandas estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio II.

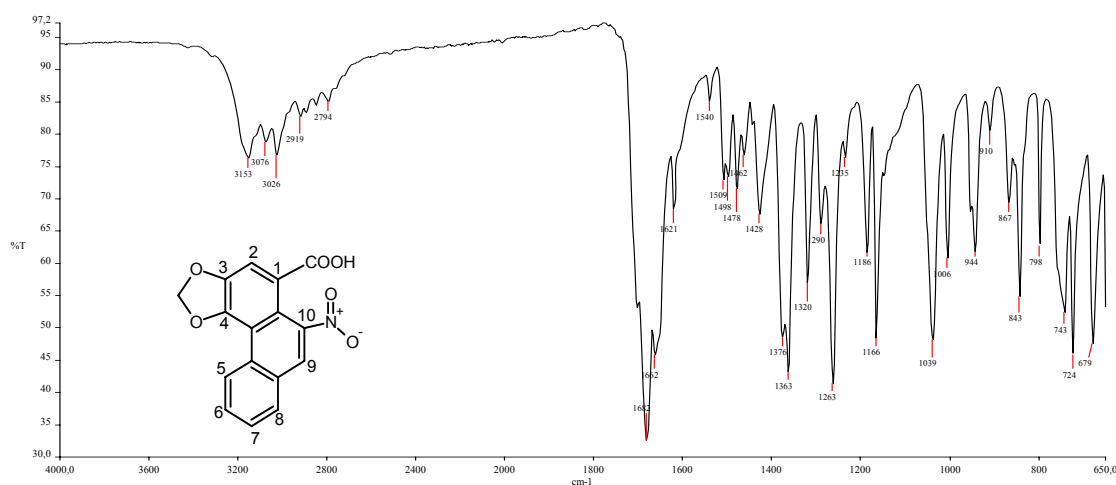


Figura III-22. Espectro de absorção na região do IV de AE18.

A Figura III-23 apresenta o espectro de massas de AE18 e o esquema III-1 mostra os fragmentos propostos para os picos mais importantes segundo Pristap⁷⁴, que está de acordo com a estrutura proposta para AE18.

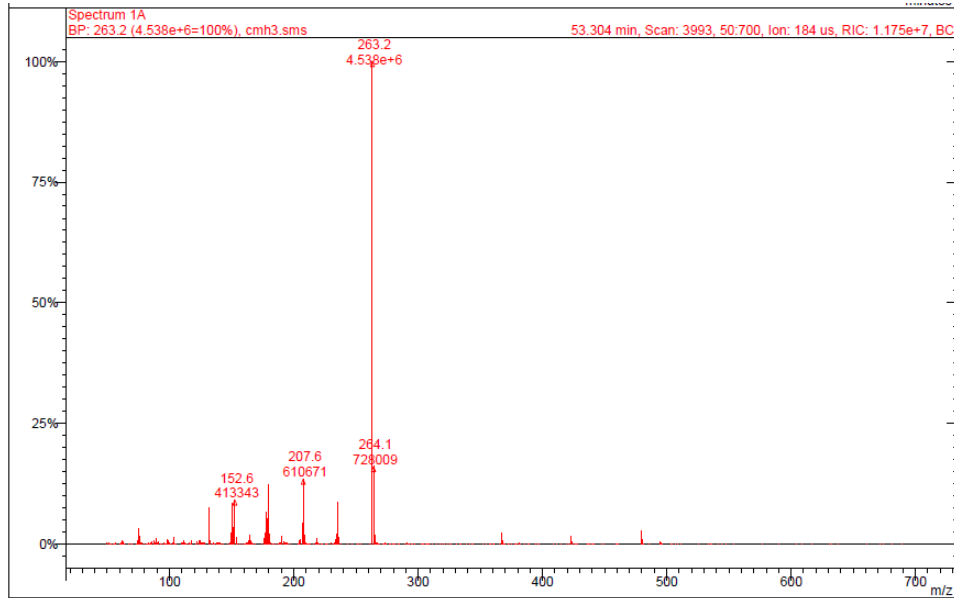
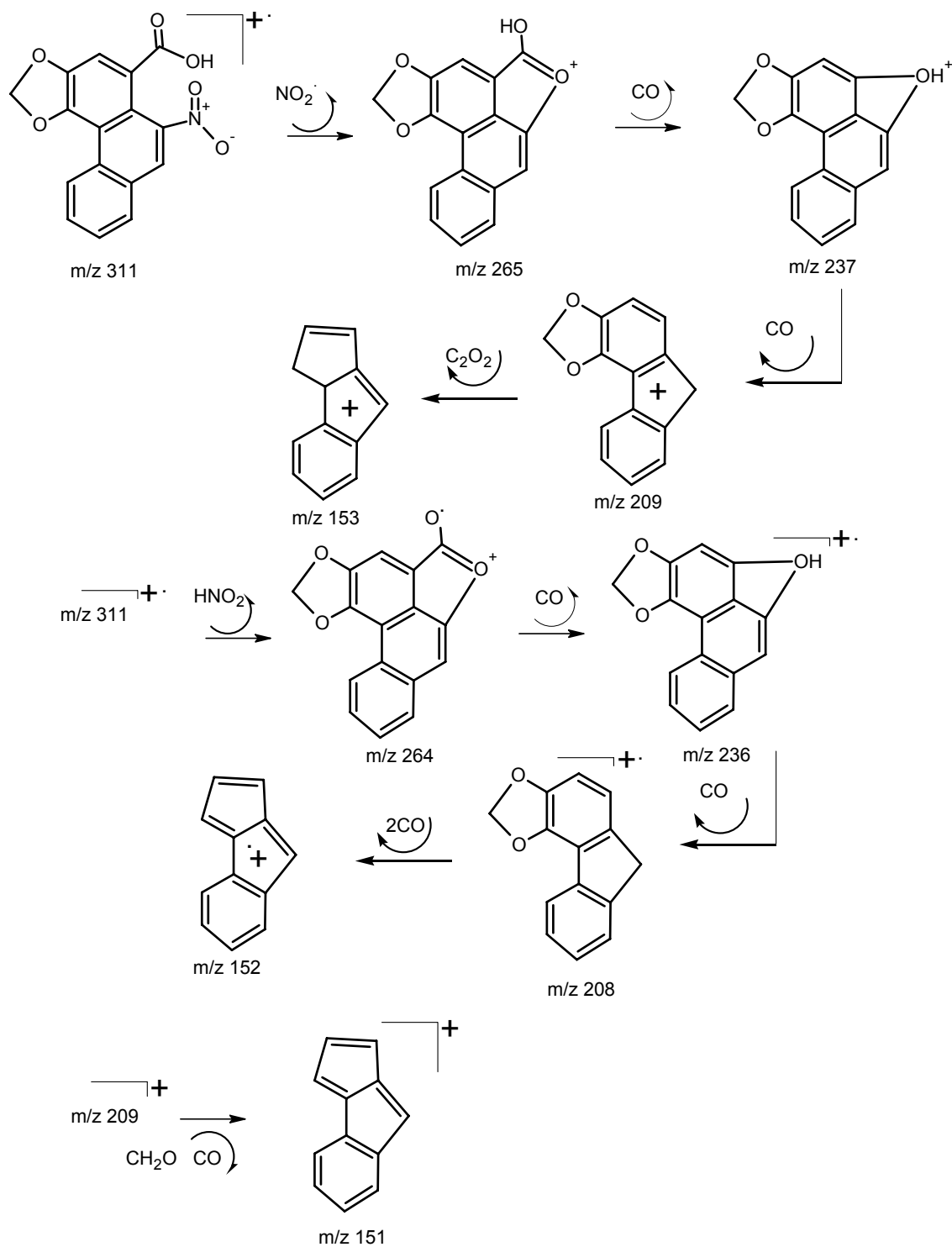


Figura III-23. Espectro de massas de AE18. (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; "Targat TIC" 20000 counts; "Max ion time" 25000 useg; eletromultiplicadora a 1500 V; corrente do filamento de 10 uAmps; vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).



Esquema III-1. Fragmentos propostos para AE18 para os picos mais importantes segundo Pristap⁷⁴.

A Figura III-24 apresenta o espectro de RMN de ^1H de AE18. O simpleto largo registrado em δ_{H} 10,79 (correspondente a um hidrogênio) pode ser atribuído a hidrogênio de ácido carboxílico. O simpleto registrado em δ_{H} 6,48 (correspondente a dois hidrogênios) pode ser atribuído ao grupo metileno ligado a dois átomos de oxigênio. Os sinais registrados em δ_{H} 8,51 (duplete), 7,95 (duplete), 7,62 (simpleto), 7,59 (duplo-duplete), 7,55 (duplo-duplete) e 7,12 (simpleto) podem ser atribuídos a hidrogênios metínicos aromáticos. Todos os sinais de RMN de ^1H estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio II. As atribuições são descritas na Tabela III-4.

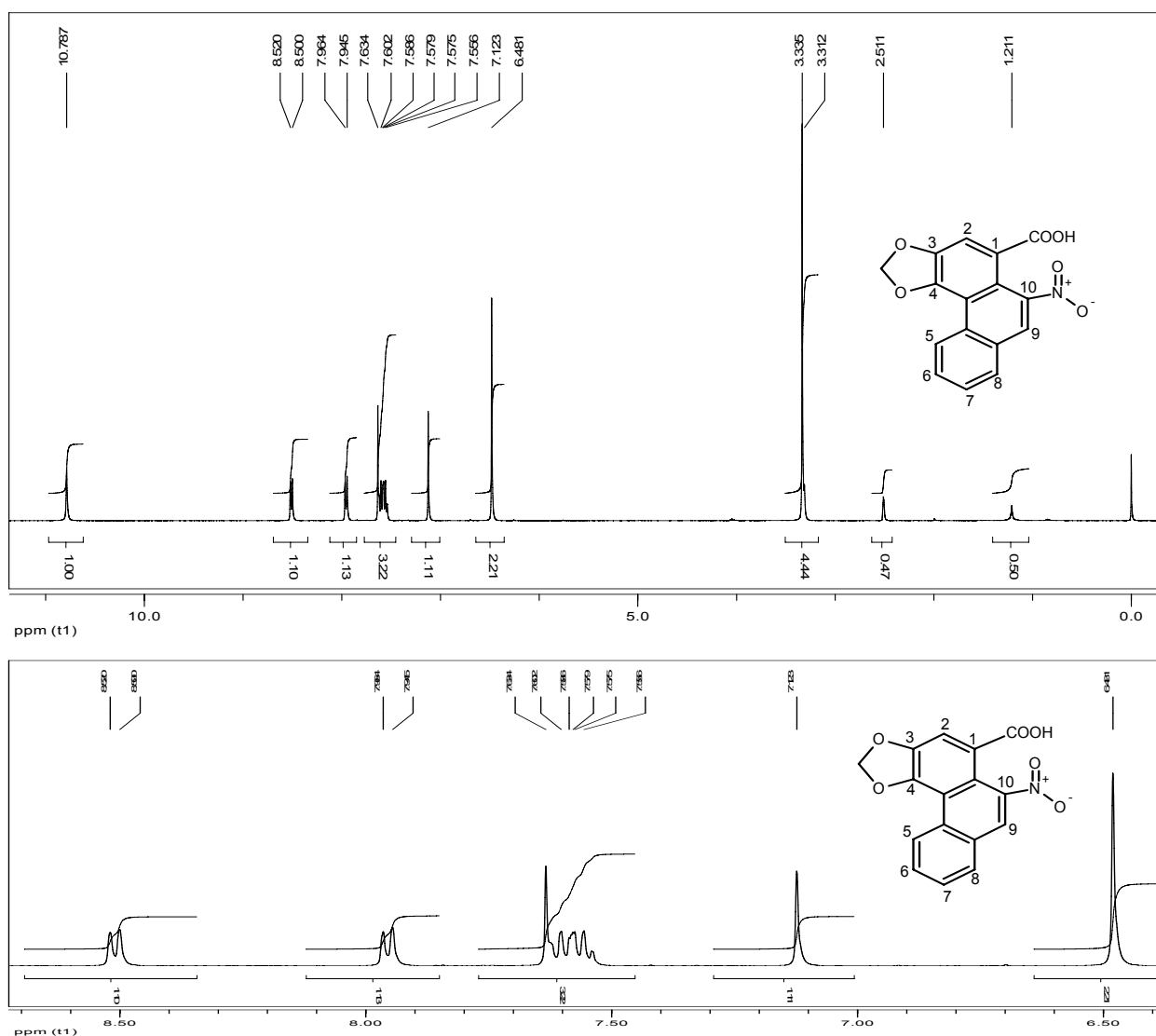
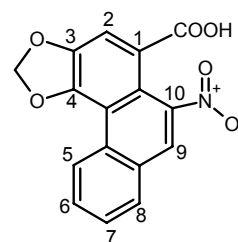


Figura III-24. Espectro de RMN de ^1H de AE18 e expansão correspondente (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

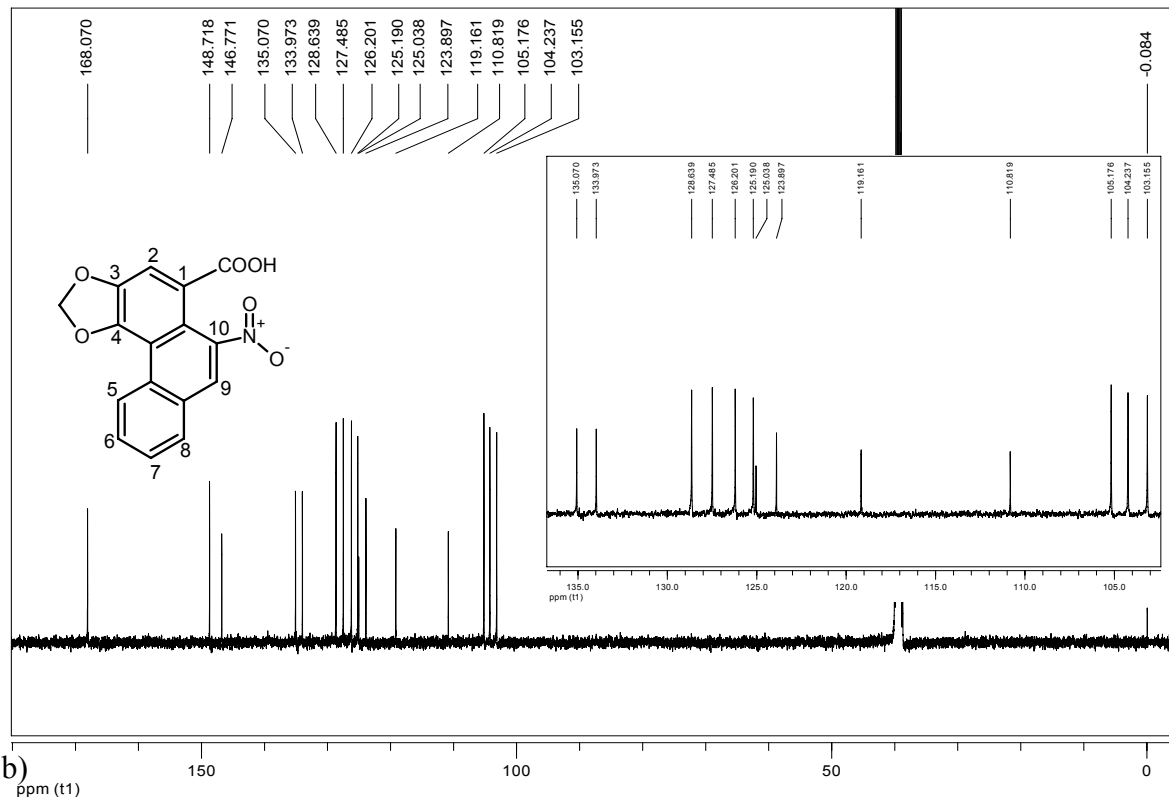
Tabela III-4. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AE18

Átomo	Carbono (δ_{C})	Hidrogênio (δ_{H})
1	119,1	-
2	105,1	7,62
3	148,7	-
4	146,7	-
4a	110,8	-
4b	125,0	-
5	126,2	8,51
6	127,4	7,59
7	125,1	7,55
8	128,6	7,95
8a	123,8	-
9	104,2	7,12
10	135,0	-
10a	133,9	-
CO ₂ H	168,0	10,79
O-CH ₂ -O	103,1	6,48



A Figura III-25 apresenta o espectro RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de AE18. O sinal em δ_{C} 168,0, correspondente a carbono não hidrogenado, pode ser atribuído ao carbono do grupo ácido carboxílico. Os sinais em δ_{C} 148,7 e 146,7, correspondentes a carbonos não hidrogenados, podem ser atribuídos a átomos de carbono aromáticos ligados a oxigênio. O sinal em δ_{C} 135,0, correspondente a carbono não hidrogenado, pode ser atribuído ao carbono aromático ligado ao grupo nitro. Os sinais em δ_{C} 133,9, 125,0, 123,8, 119,1 e 110,8 correspondem a carbonos aromáticos não hidrogenados. Os sinais em δ_{C} 128,6, 127,4, 126,2, 125,1 e 105,1 correspondem a carbonos hidrogenados aromáticos. O sinal em δ_{C} 103,1 corresponde a um átomo de carbono metilênico ligado a dois átomos de oxigênio. Todos os sinais de RMN de ^{13}C de AE18 estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio II, cujas atribuições são descritas na Tabela III-4 e baseadas no mapa de contornos HSQC (Figura III-26) e na literatura¹⁵⁸.

a)



b)

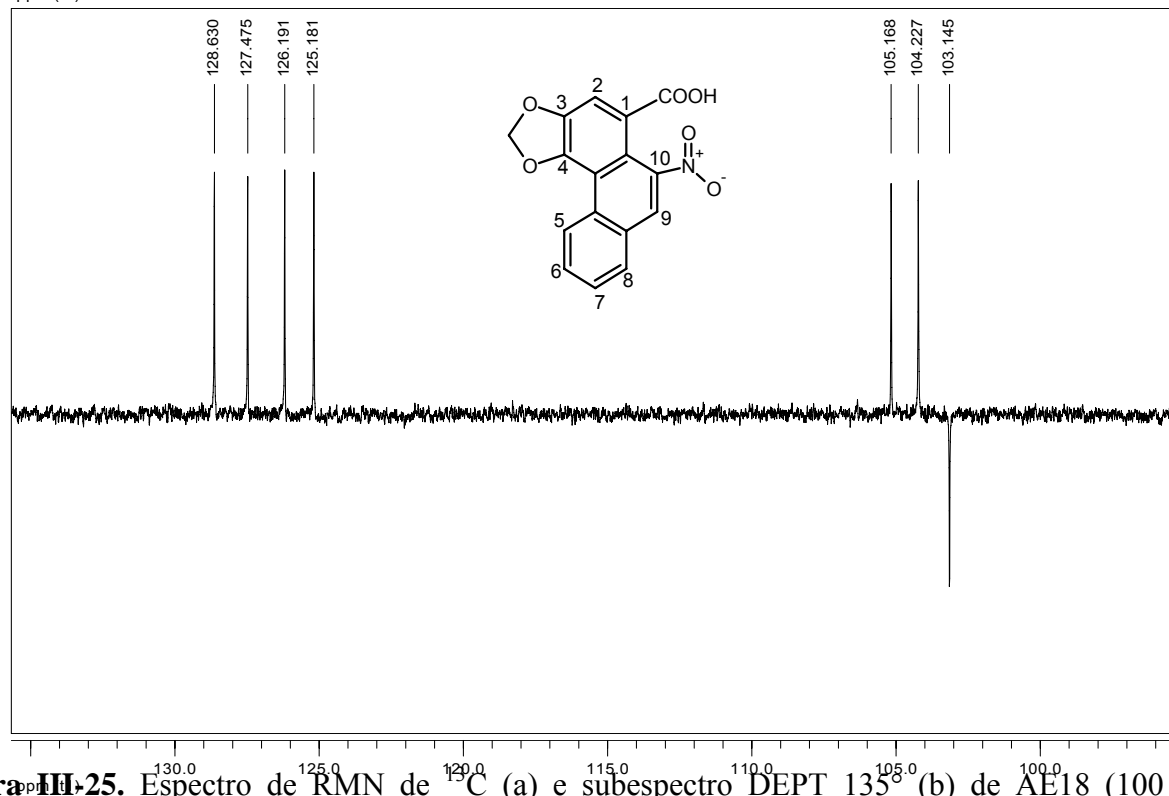


Figura III-25. Espectro de RMN de ^{13}C (a) e subspectro DEPT 135 $^{\circ}$ (b) de AE18 (100 MHz; DMSO- d_6).

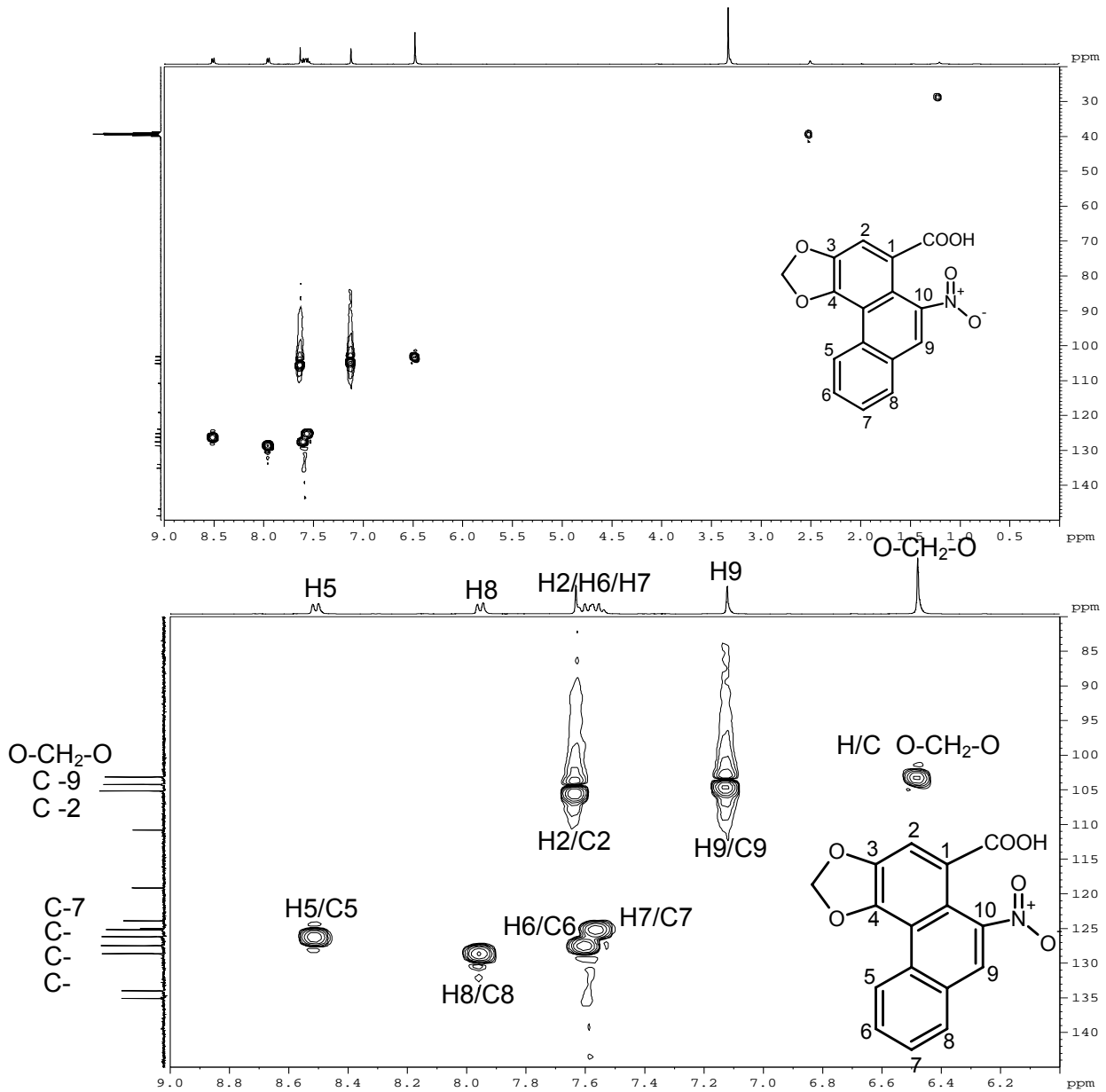


Figura III-26. Mapas de contornos HSQC de AE18 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6) e expansão de δ_{H} 6.1 a 9.0 e δ_{C} 80 a 145..

A Figura III.27 apresenta o mapa de contornos COSY de AE18. O sinal em δ_H 7,59 (H-6) correlaciona-se com os sinais em δ_H 8,51 (H-5) e 7,55 (H-7). Este último correlaciona-se também com o sinal em δ_H 7,95 (H-8). Esses resultados indicam que esses sinais correspondem a átomos de hidrogênios presentes no mesmo anel aromático. Nenhuma outra correlação é observada no mapa de contornos, o que está de acordo com a estrutura do ácido aristolóchico II.

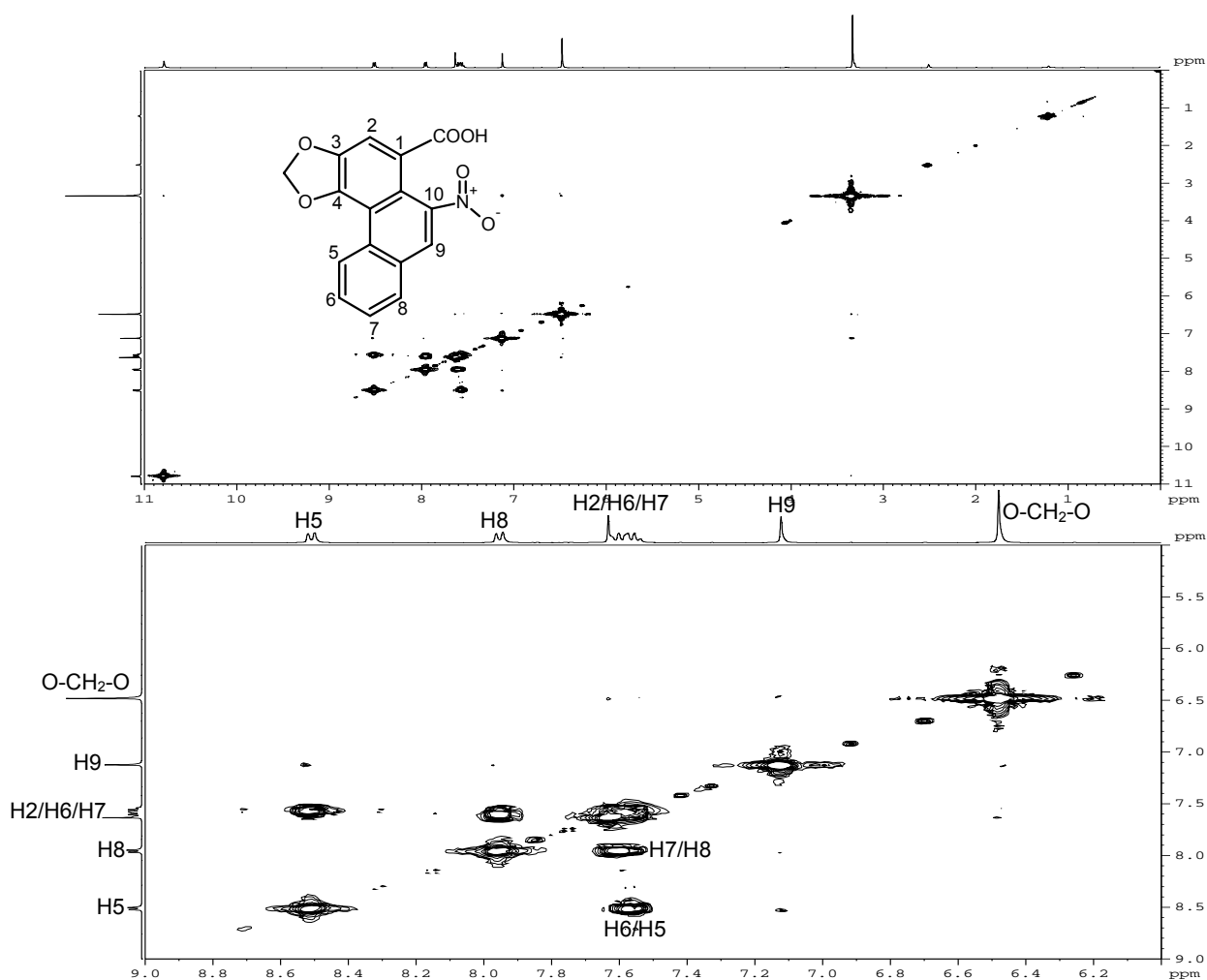


Figura III-27. Mapa de contornos COSY de AE18 (400 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura III-28 apresenta o mapa de contornos HMBC de AE18. O sinal de hidrogênio em δ_H 6,48 (O-CH₂-O) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 146,7 (C-4) e 148,7 (C-3), estabelecendo a posição do carbono metilênico. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,12 (H-9) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 125,0 (C-4b), 128,6 (C-8) e 133,9 (C-10a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,55 (H-7) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 123,8 (C-8a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,62 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 133,9 (C-10a) e 146,7 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,95 (H-8) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 104,2 (C-9) e 125,0 (C-4b). O sinal de hidrogênio em δ_H 8,51 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 110,8 (C-4a), 127,4 (C-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 10,79 correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 119,1 (C-1). Essas correlações estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóxico II.

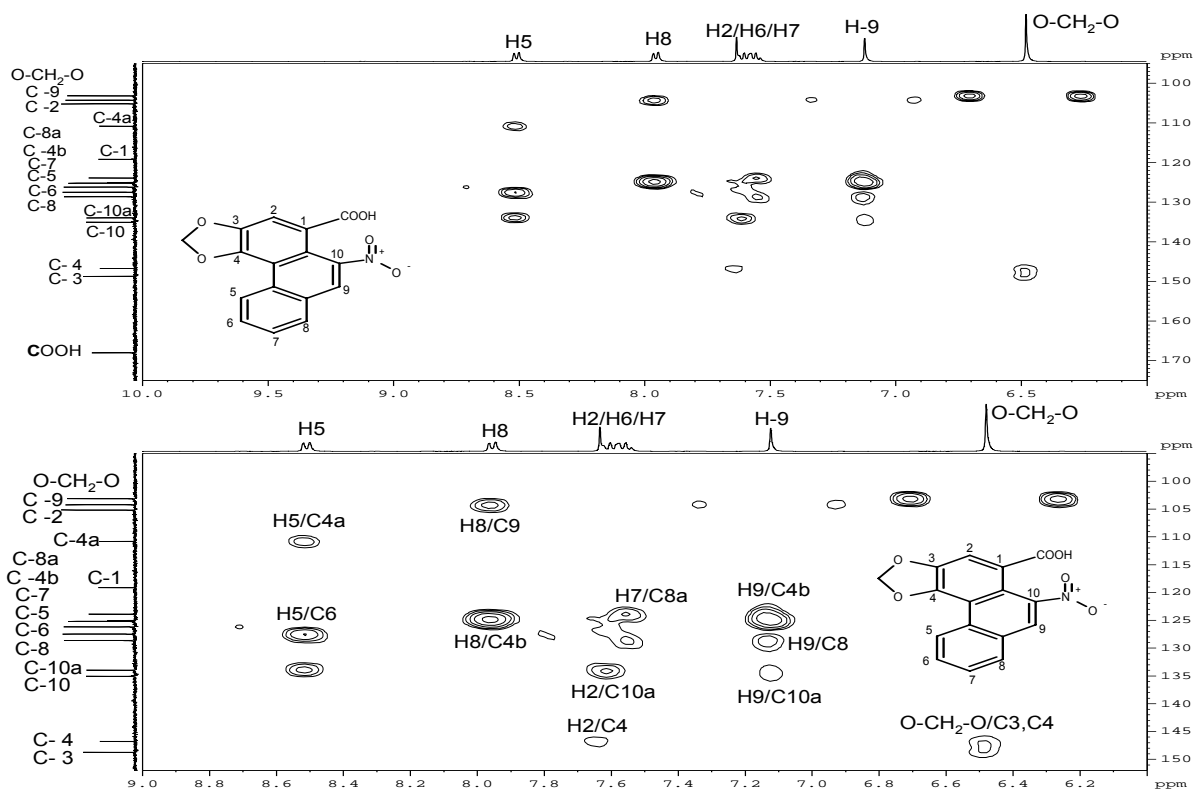


Figura III-28. Mapas de contornos HMBC de AE18 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura III.29 apresenta o mapa de contornos NOESY de AE18. O sinal em δ_H 6,48 (O-CH₂-O) correlaciona-se com o sinal em δ_H 8,50 (H-5). O sinal em δ_H 7,12 (H-9) correlaciona-se com o sinal em δ_H 7,95 (H-8). O sinal em δ_H 7,59 (H-6) correlaciona-se com os sinais em δ_H 7,95 (H-8) e 8,50 (H-5).

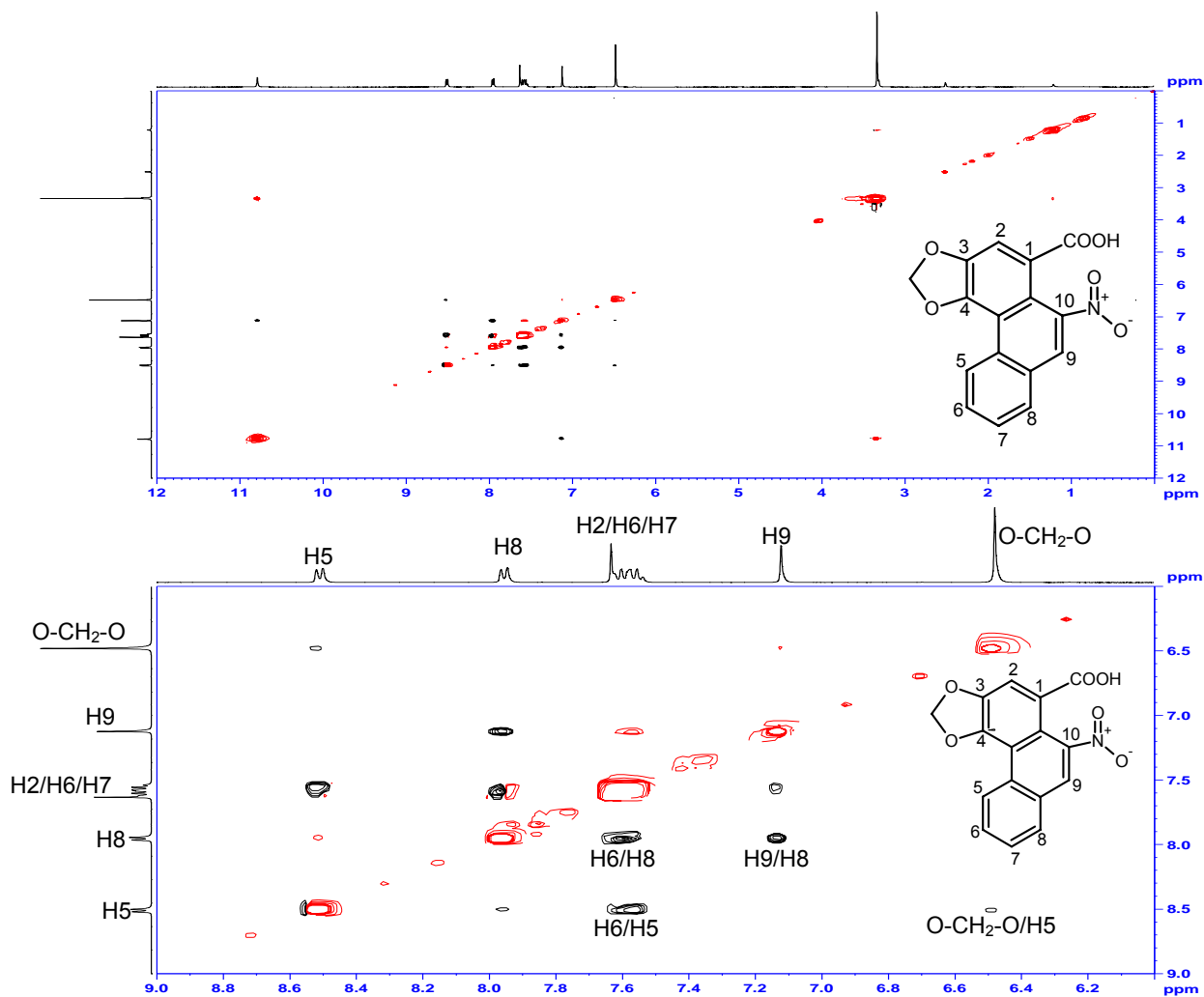


Figura III-29. Mapas de contornos NOESY de AE18 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*₆).

6. Análise estrutural de AE31

O grupo AE31 foi submetido a análise por CG/EM. A Figura III-30 apresenta o cromatograma de AE31. Seis picos apresentam-se em maiores proporções relativas ($t_R = 11,991$; $13,678$; $14,584$; $16,057$; $16,600$ e $18,416$ min).

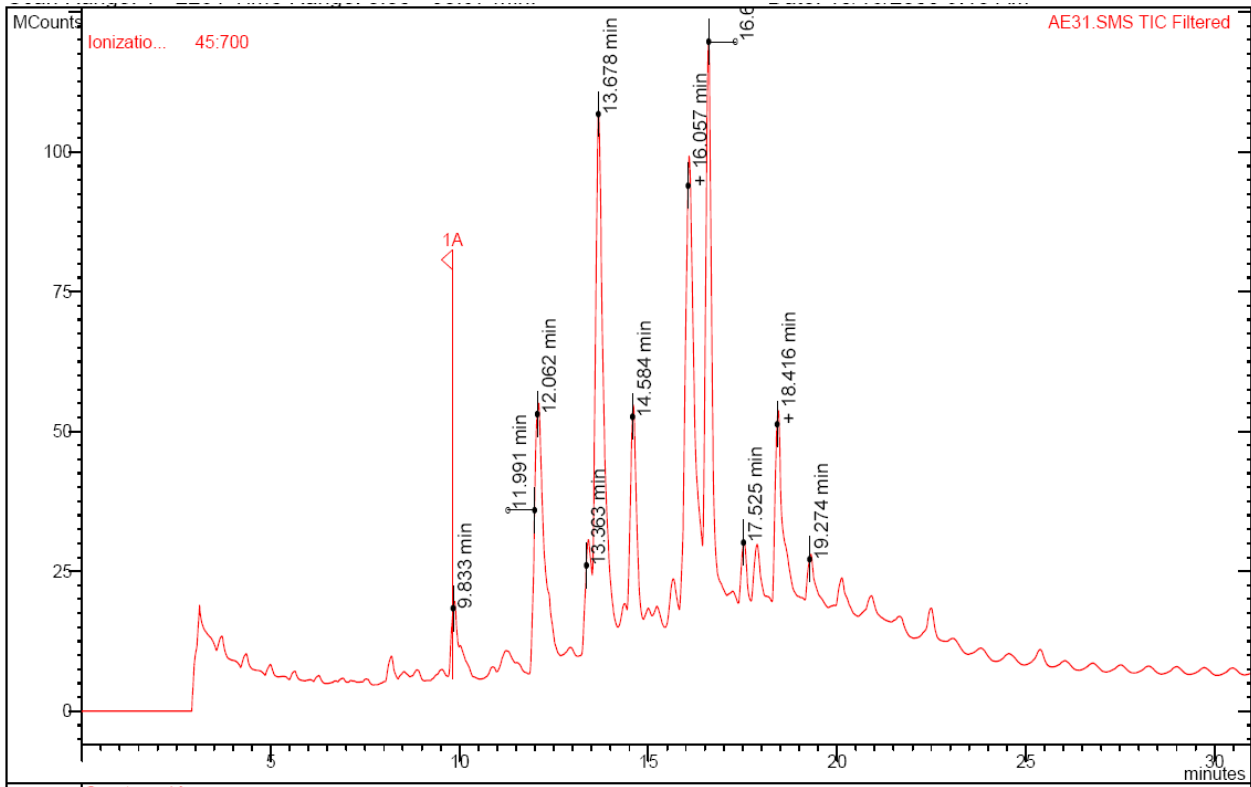


Figura III-30. Cromatograma de CG/EM de AE31 (GC/MS VARIAN 4000 - coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 180 °C por 10 min seguido por aquecimento a 8 °C/min, 310°C; injetor: 310 °C; split 1:15, fluxo: 1 mL/min/He; detector: 300 °C).

As Figuras III-31 e III-32 apresentam os espectros de massas dos principais constituintes do cromatograma de CG de AE31, com sugestões de estrutura a partir do banco de dados NIST (2005). Esses resultados indicam que AE31 apresenta-se como uma mistura complexa, contendo: éster etílico do ácido hexadecanóico ($t_R = 9,810$ min), éster etílico do ácido linoléico ($t_R = 12,105$ min), (7a-isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol ($t_R = 13,693$ min), quinazolin-2-(3H)-tiona ($t_R = 16,083$ min) e éster *terc*-butildimetilsilílico do ácido docosanóico ($t_R = 19,467$ min).

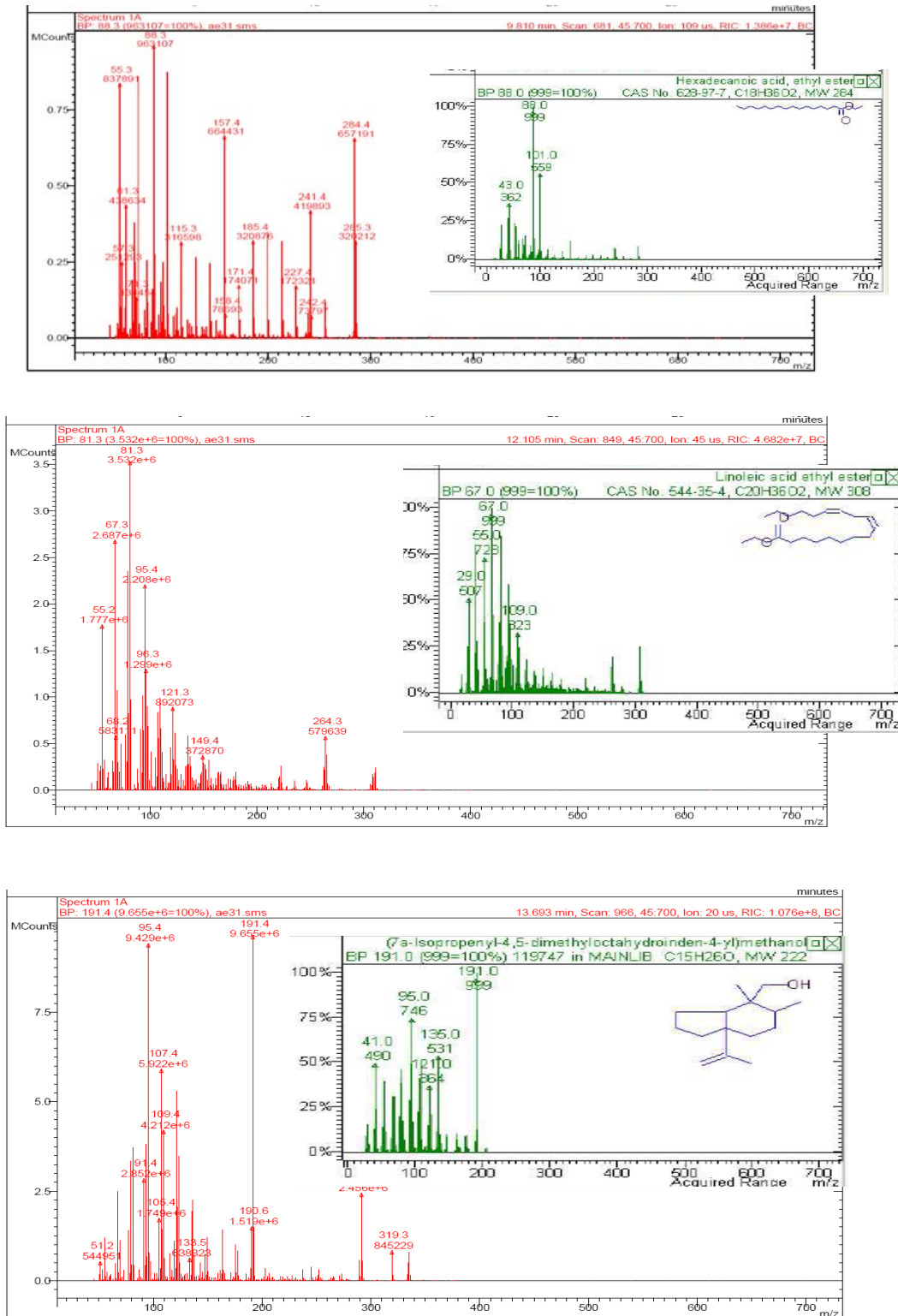


Figura III-31. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 9,810, 12,105$ e $13,693$ min do cromatograma de AE31. (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; "Targat TIC" 20000 counts; "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).

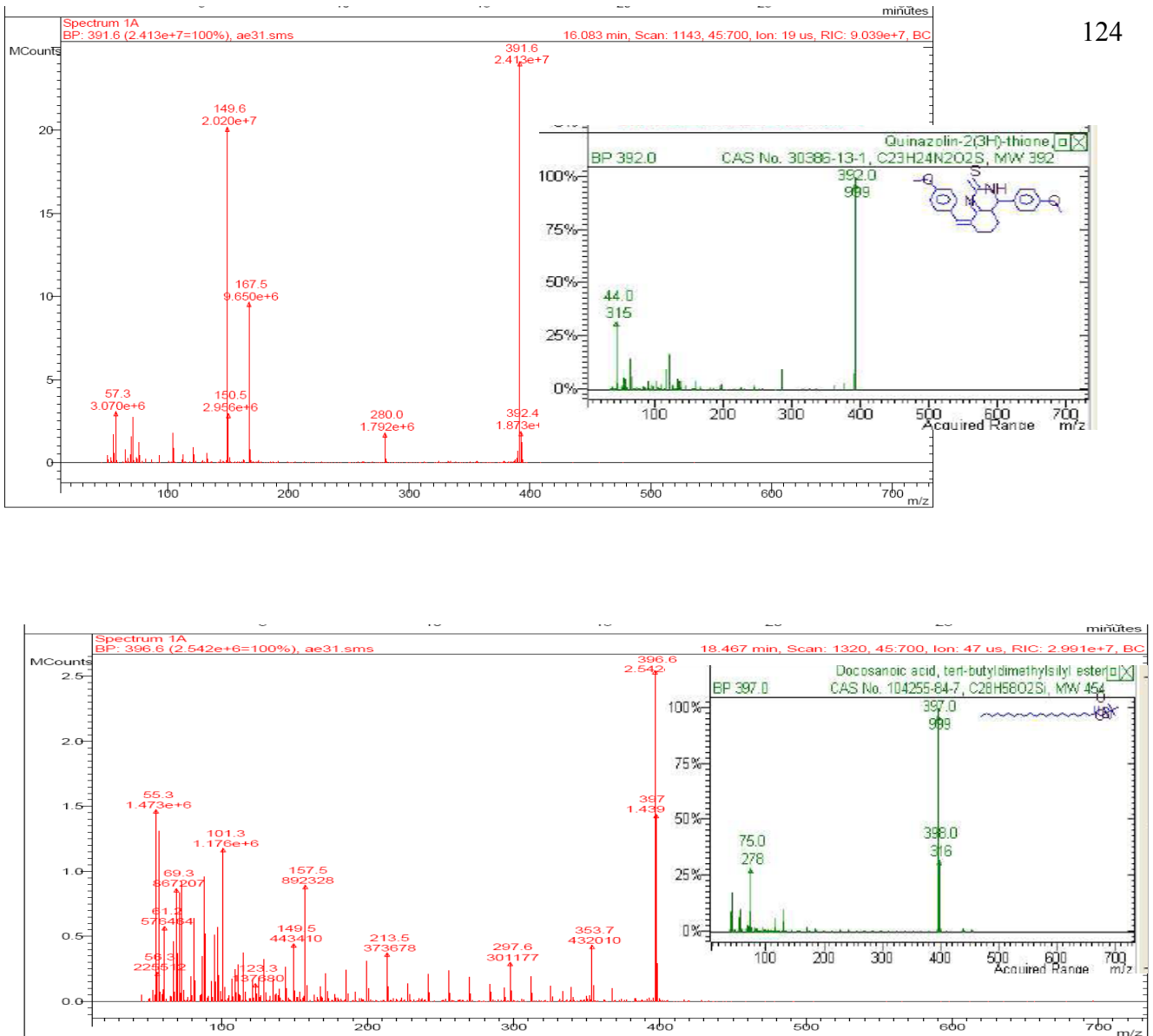


Figura III-32. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R=16,083$ e $18,467$ min do cromatograma de AE31. (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; "Targat TIC" 20000 counts; "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).

7. Análise estrutural de AE38

O grupo AE38 foi submetido a análise por CG/EM. A Figura III-33 apresenta o espectro de massas de AE31. O pico em $t_R = 20,690$ min apresenta-se em maior proporção relativa. A pesquisa na literatura do banco de dados NIST (2005) sugere que a estrutura seja aspidospermatina.

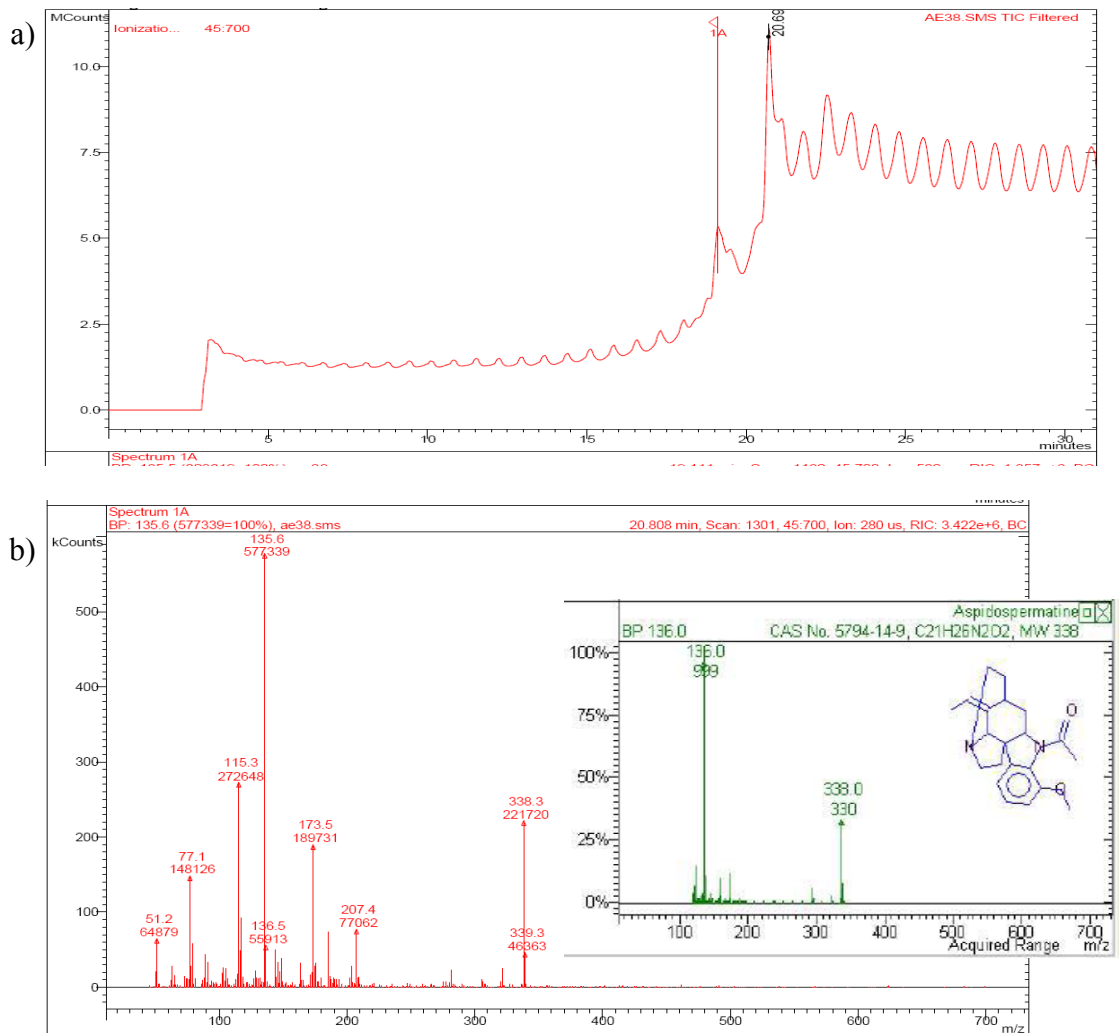


Figura III-33. Cromatograma de CG/EM de AE38 (a) e espectro de massas (b) do constituinte com $t_R = 20,808$ min (inferior). (GC/MS VARIAN 4000 - coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 180 °C por 10 min seguido por aquecimento a 8 °C/min, 310 °C; injetor: 310°C; split 1:15; fluxo: 1 mL/min/He; detector: 300 °C. Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; “Targat TIC” 20000 counts; “Max ion time” 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).

8. Análise estrutural de G10-R14-G2 (AE50)

A Figura III.34 apresenta o cromatograma CG de AE50. Dois picos preponderam no cromatograma, sendo o pico de maior proporção relativa registrado a 7,051 min e o outro, a 7,427 min.

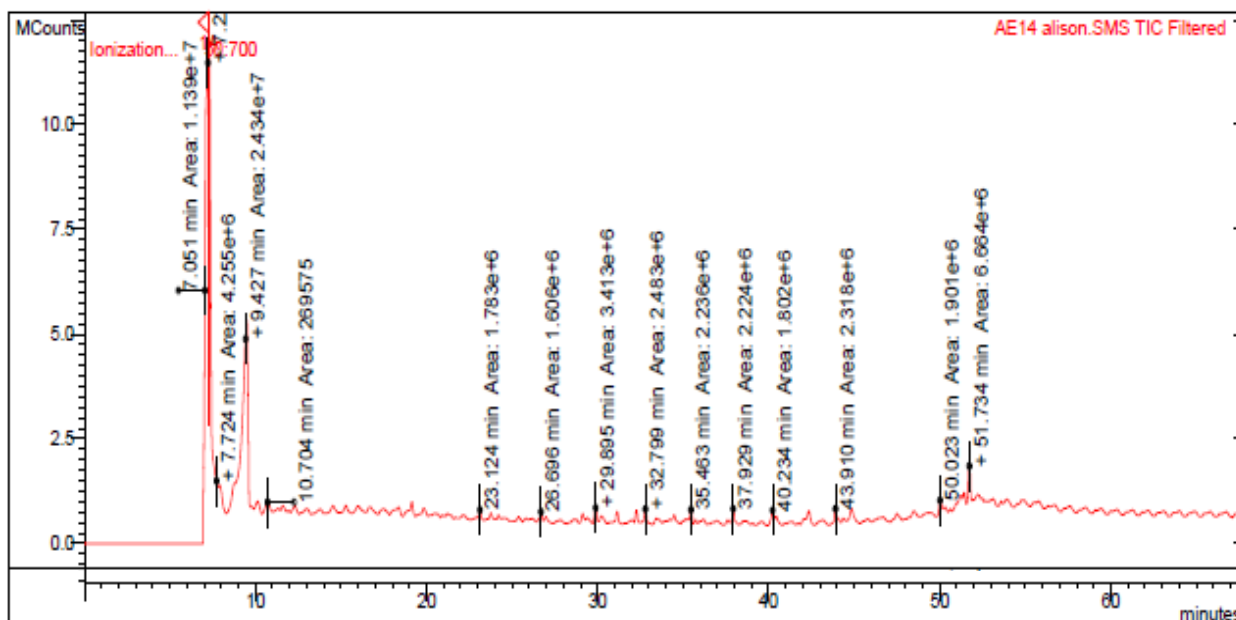


Figura III-34. Cromatograma de CG de AE50. (Coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a 50 °C por 3 min seguido por aquecimento a 5 °C/min, 300 °C; injetor: 300 °C; split 1:15; fluxo: 1 mL/min/He; detector: 300 °C).

A Figura III.35 mostra o espectro de RMN de ^1H de AE50. O simpleto registrado em δ_{H} 10,49, correspondente a um átomo de hidrogênio, pode ser atribuído ao hidrogênio N-H do grupo lactama. Os simpletos registrados em δ_{H} 9,90 e 7,94, cada sinal correspondente a um átomo de hidrogênio, podem ser atribuídos a hidrogênios fenólicos. Os sinais registrados em δ_{H} 9,14 (duplete), 7,80 (duplete), 7,67 (simpleto), 7,51 (duplete-duplo) e 7,01 (simpleto), cada sinal correspondente a um hidrogênio, podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos. O simpleto em δ_{H} 4,07, correspondente a três átomos de hidrogênio, pode ser atribuído a hidrogênios do grupo metoxila. Todos os sinais de RMN de ^1H estão de acordo com a estrutura da aristolactama A1a, cujas atribuições são apresentadas na Tabela III-5 (p.128).

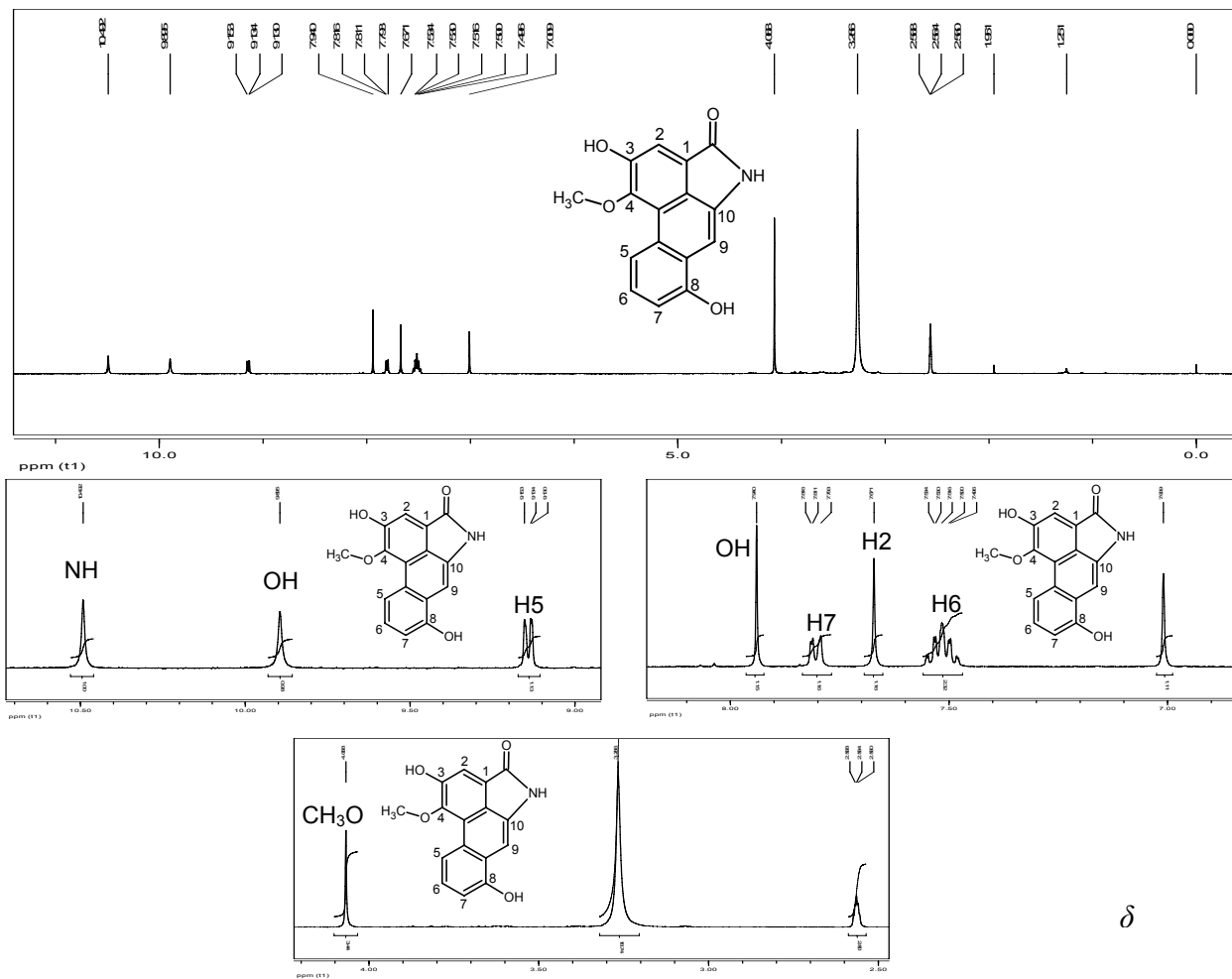
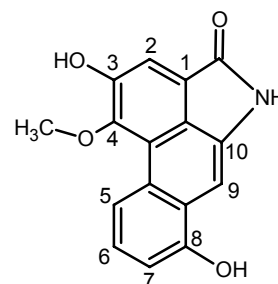


Figura III-35. Espectro de RMN de ^1H de AE50 e expansões correspondentes (400 MHz; CDCl_3).

Tabela III-5. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AE50

Átomo	Literatura ¹⁵⁹	Carbono (δ_{C})	Hidrogênio (δ_{H})
1	120,6	120,7	-
2	112,0	112,2	7,67
3	152,1	150,7	-
4	149,0	147,4	-
4a	118,0	119,1	-
4b	121,9	124,9	-
5	125,5	125,6	9,10
6	124,1	123,6	7,51
7	127,2	127,2	7,80
8		133,4	-
8a		134,1	-
9	98,2	102,5	7,01
10	134,1	134,1	-
10a	113,5	121,4	-
C-3 – OH		-	9,89
C-8 – OH	153,7	-	7,90
C(=O)NH-	168,4	167,6	10,49
CH ₃ O	59,4	58,1	4,07



A Figura III-36 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de AE50. O sinal registrado em δ_{C} 167,6, correspondente a carbono não hidrogenado que pode ser atribuído ao carbono carbonílico do grupo lactama. O sinal registrado em δ_{C} 134,1, correspondente a carbono não hidrogenado, pode ser atribuído ao carbono aromático ligado ao nitrogênio da lactama. Os sinais registrados em δ_{C} 150,7, 147,4 e 134,1 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos não hidrogenados ligados a oxigênio. Os sinais registrados em δ_{C} 133,4, 124,9, 121,4 e 119,1 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos não hidrogenados. Os sinais registrados em δ_{C} 127,2, 125,6, 123,6, 112,2 e 102,5 podem ser atribuídos a carbonos hidrogenados aromáticos. O sinal registrado em δ_{C} 58,1, correspondente a carbono metílico, pode ser atribuído ao carbono do grupo metoxila. Na Tabela III-5 são apresentadas as atribuições dos átomos de carbono de AE50 baseadas nas correlações observadas no mapa de contornos HSQC mostrado na Figura III-37 (p.130).

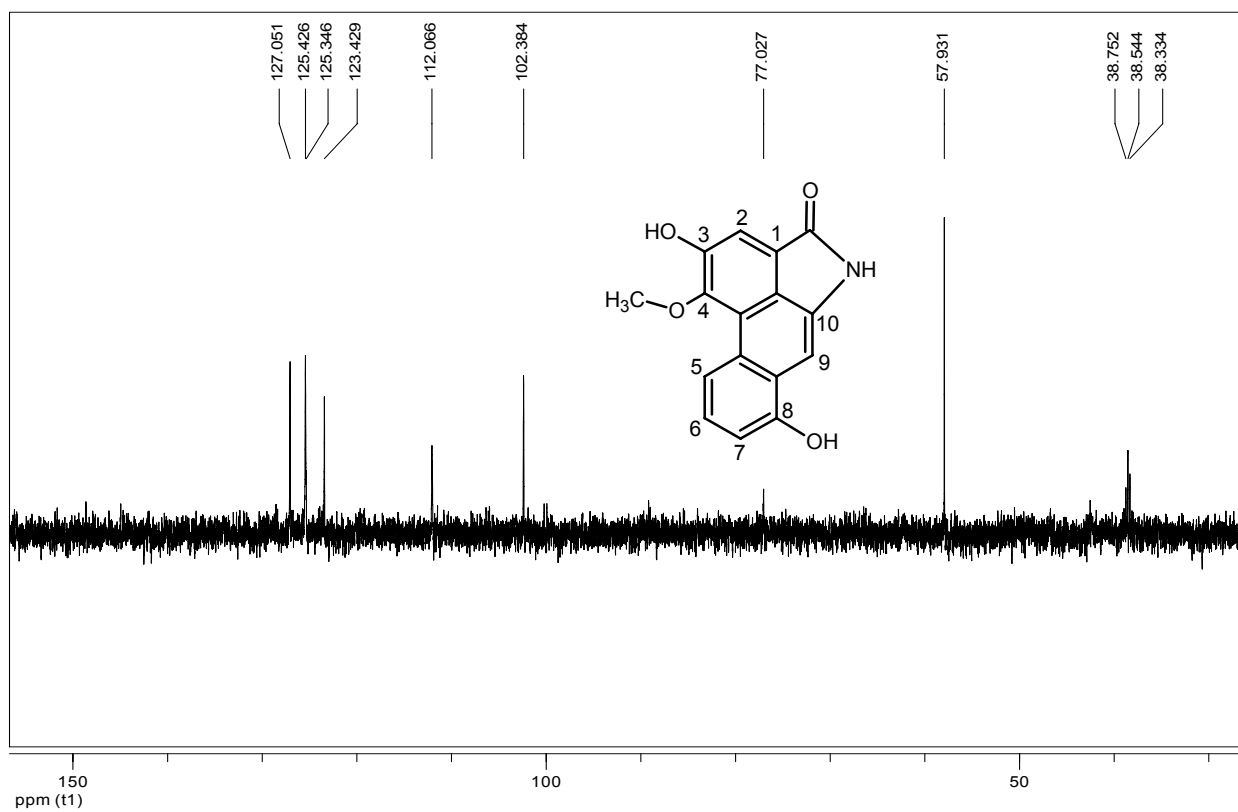
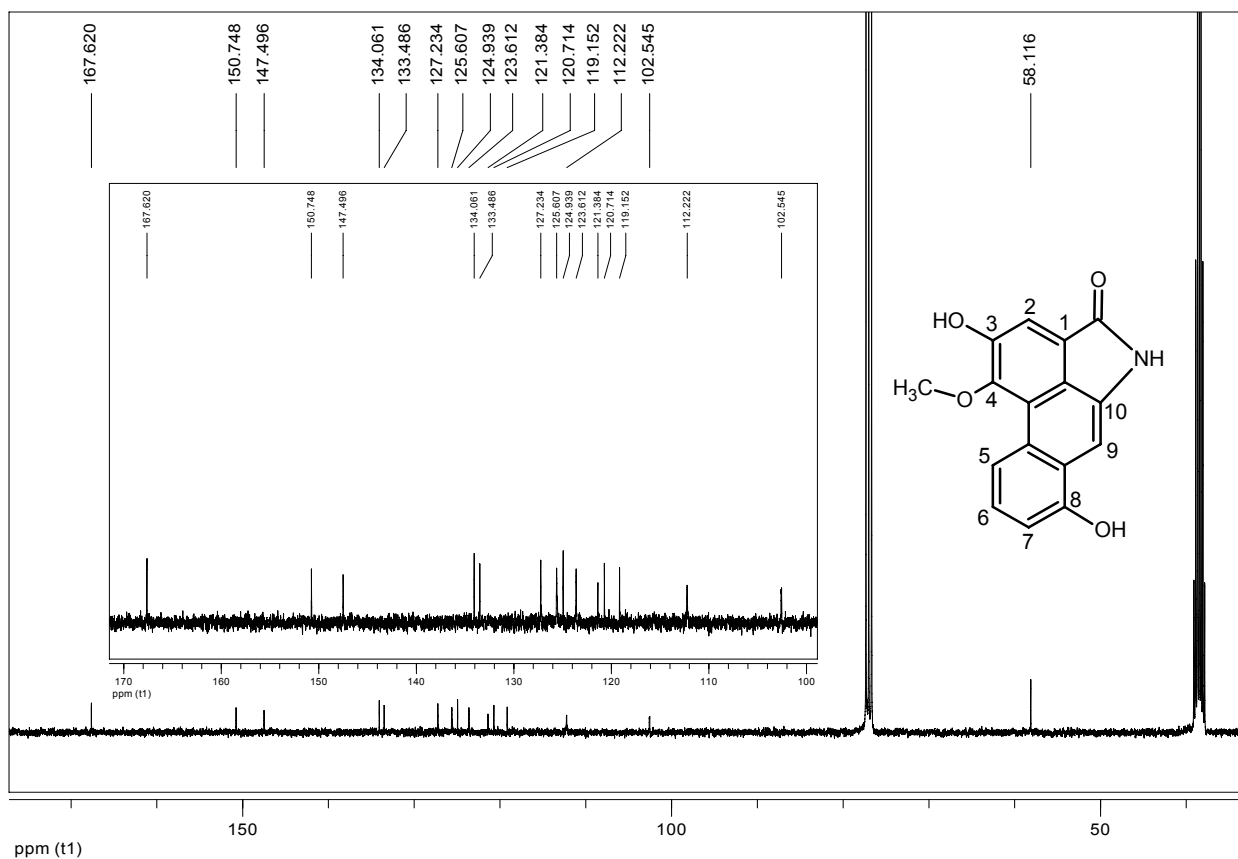


Figura III-36. Espectro de RMN de ^{13}C (superior) e subspectro DEPT 135° (inferior) de AE50 e expansões correspondentes (100 MHz; CDCl_3).

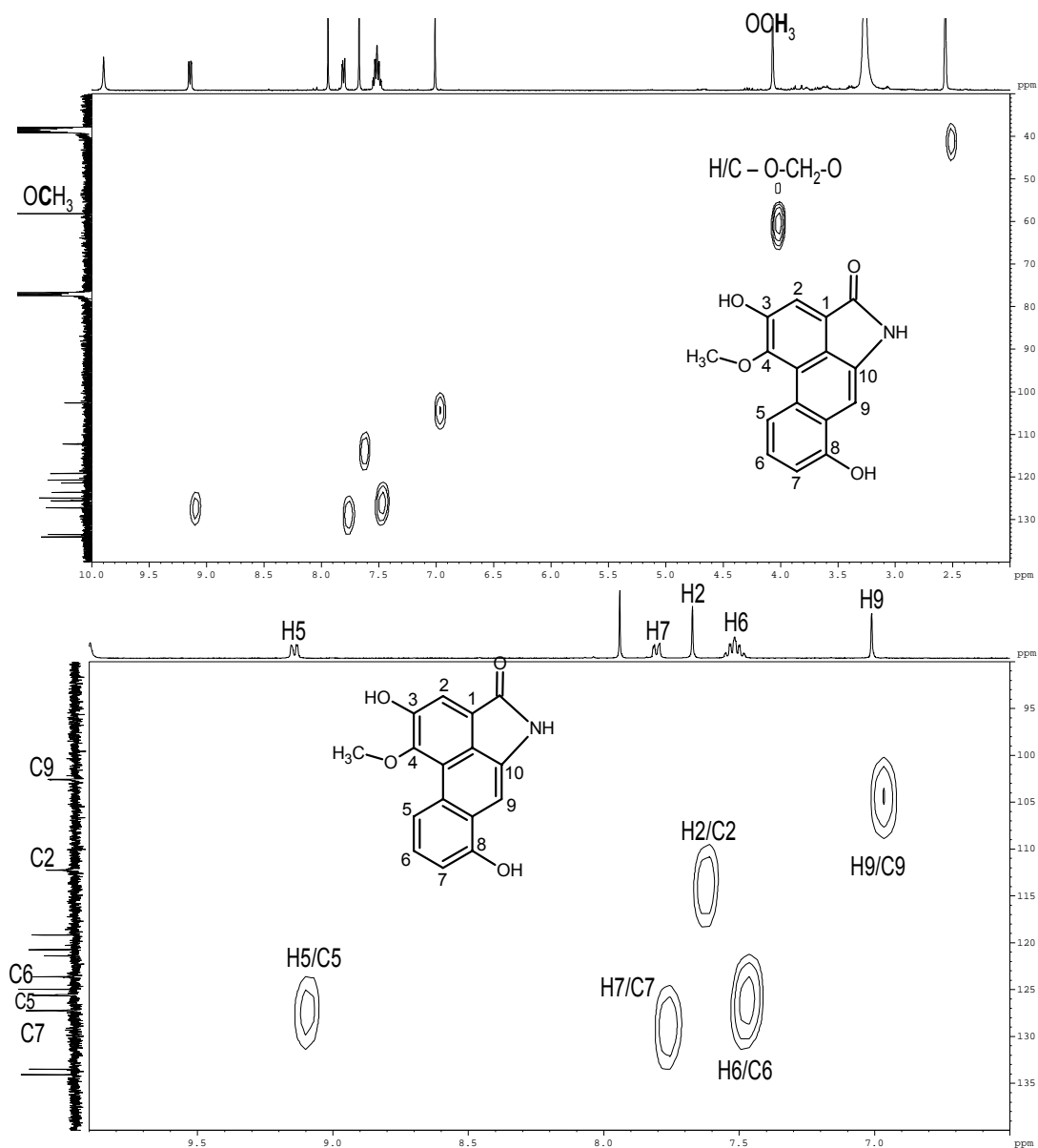


Figura III-37. Mapa de contornos HSQC de AE50 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100MHz; CDCl_3).

A Figura III-38 apresenta o mapa de contornos COSY de AE50. Os sinais de hidrogênio em δ_{H} 9,14 (H-5) e 7,80 (H-7) correlacionam-se apenas com o sinal em δ_{H} 7,51 (H-6). Nenhuma outra correlação COSY é observada no mapa de contorno. Esses dados estão de acordo com a estrutura da aristolactama A1a.

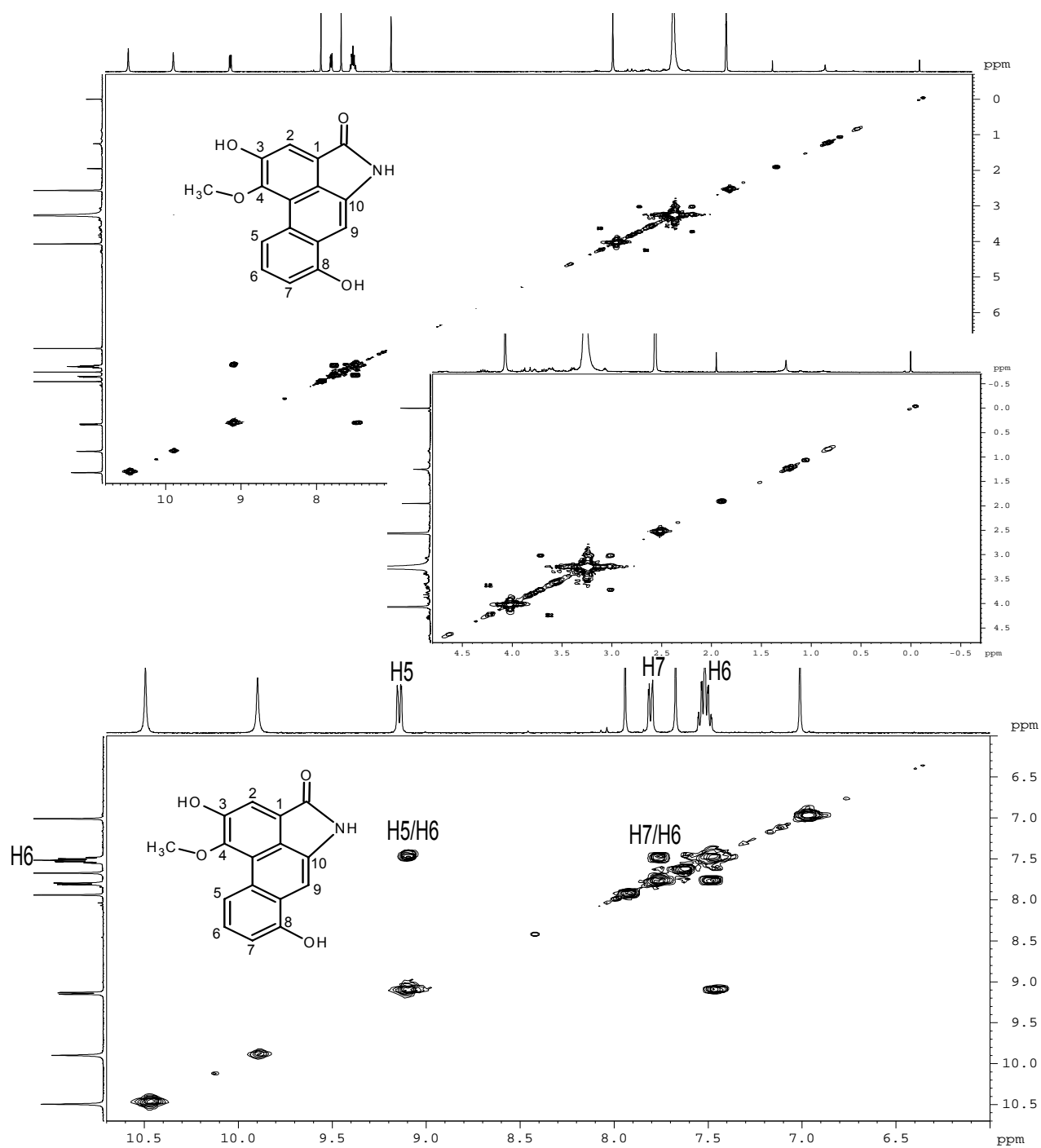


Figura III-38. Mapas de contornos COSY de AE50 (400 MHz; CDCl₃).

A Figura III-39 apresenta o mapa de contornos HMBC de AE50. O sinal de hidrogênio em δ_H 10,49 (N–H) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 120,7 (C-1) e 121,4 (C-10a). O sinal de hidrogênio em δ_H 9,14 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 119,1 (C-4a) e 134,1 (C-8a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,80 (H-7) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 102,5 (C-9), 123,6 (C-6) e 124,9 (C-4b). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,67 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 147,4 (C-4) e 121,4 (C-10a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,51 (H-6) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 124,9 (C-4b) e 127,2 (C-7). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,01 (H-9) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 121,4 (C-10a) e 124,9 (C-4b). O sinal de hidrogênio em δ_H 4,05 (OCH₃) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 147,4 (C-4). Essas correlações estão de acordo com a estrutura da Aristololactama A1a.

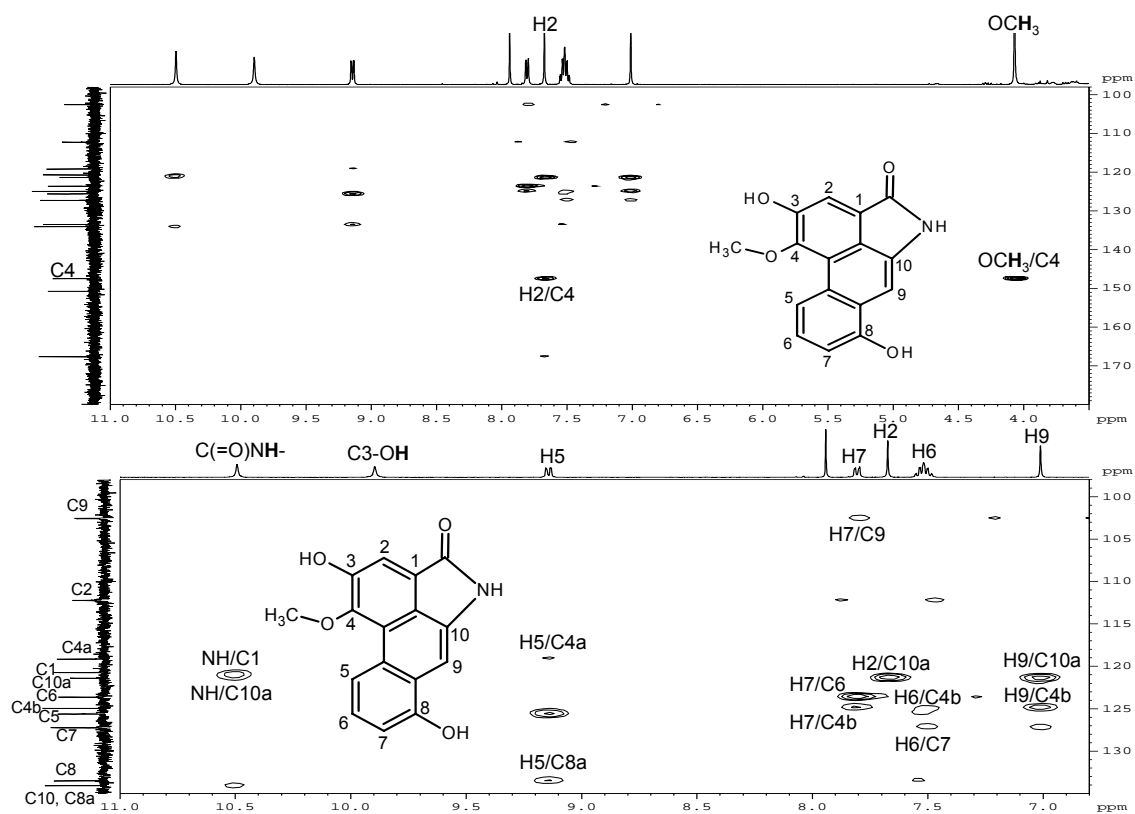


Figura III-39. Mapas de contornos HMBC de AE50 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).

9. Análise estrutural de FM1

A análise elementar de FM1 forneceu os dados mostrados na tabela III-6. As porcentagens relativas dos elementos correspondem a uma fórmula mínima próxima a $C_{17}H_{15}NO_4$.

Tabela III-6. Resultados de análise elementar de FM1

	% C	% H	% N	% O
Valores Experimentais	69,21	5,12	4,61	21,06
Valores Calculados	72,45	4,15	5,28	18,11

A Figura III-40 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FM1. A absorção larga entre 3300 e 3100 cm^{-1} indica a presença de hidrogênio ligado a heteroátomo em ligação de hidrogênio. A absorção próxima a 2900 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento C–H de grupos alifáticos. A absorção larga em 1699 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento C=O do grupo lactama. A absorção em 1422 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação angular de C–O–H de grupos fenólicos. A absorção larga e intensa em 1292 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento C–O de grupos fenólicos e metoxilas. As bandas em 984, 875 e 848 cm^{-1} podem ser atribuídas à deformação angular C–H no plano e fora do plano de C–H aromático. A absorção intensa em 755 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação angular de N–H do grupo lactama. Todas essas bandas estão de acordo com a estrutura do aristolactama AII.

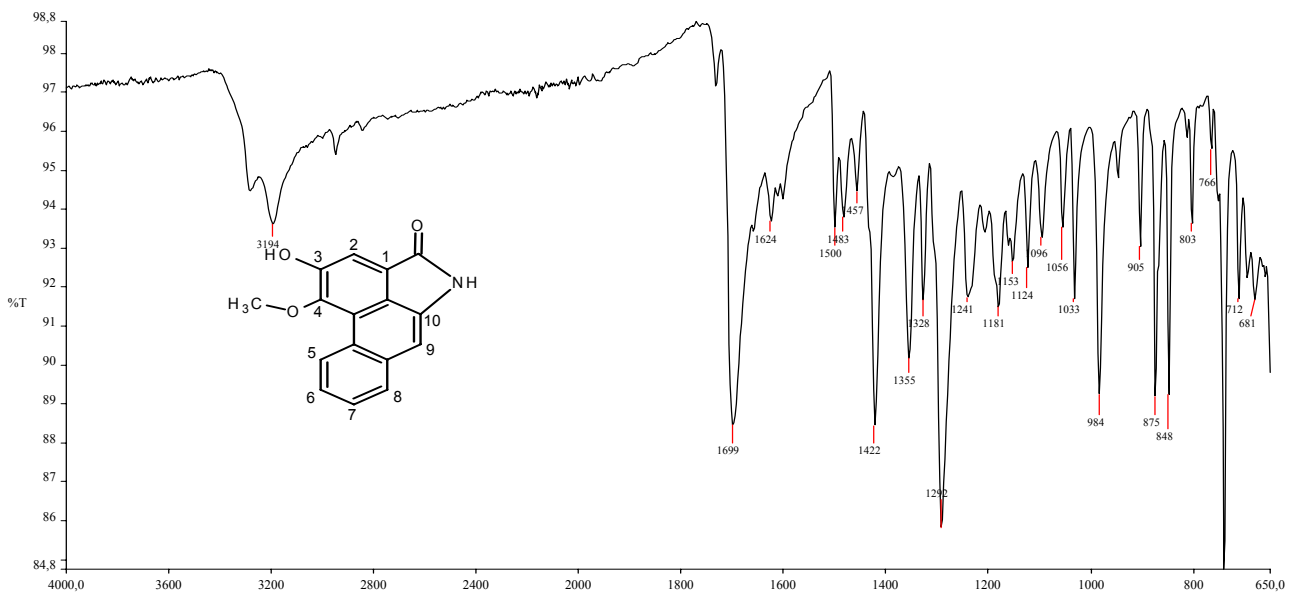


Figura III-40. Espectro de absorção na região do IV de FM1.

A Figura III-41 apresenta o espectro de massas de FM1 e o esquema III-2 mostra os fragmentos propostos para os picos mais importantes segundo Pristap⁷⁴, que confirma a estrutura proposta para FM1.

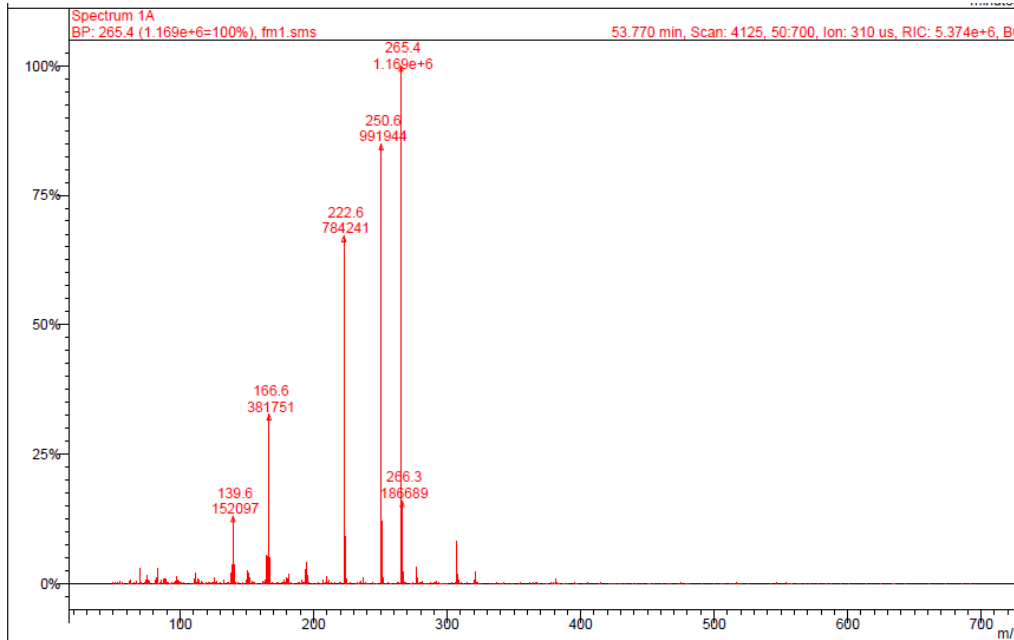
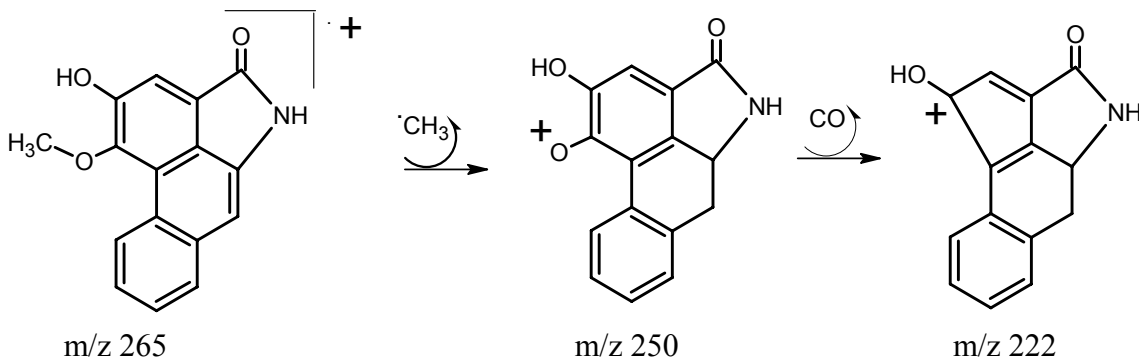


Figura III-41. Espectro de massas de FM1. (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; "Targat TIC" 20000 counts; "Max ion time" 25000 useg; eletromultiplicadora a 1500 V; corrente do filamento de 10 uAmps; vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C; Faixa de massas: 45 a 700 uma).



Esquema III-2. Fragmentos propostos para FM1 para os picos mais importantes segundo Pristap⁷⁴.

As Figuras III-42 e III-43 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^1H de FM1 e expansões correspondentes. O simpleto registrado em δ_{H} 10,66, correspondente a um átomo de hidrogênio, pode ser atribuído ao hidrogênio N-H do grupo lactama. O simpleto registrado em δ_{H} 10,14, correspondente a um átomo de hidrogênio, pode ser atribuído a hidrogênio fenólico. Os sinais registrados em δ_{H} 9,15 (duplete), 7,86 (duplete), 7,66 (simpleto) e 7,06 (simpleto), cada sinal correspondente a um hidrogênio, e 7,52 (multiplete correspondente a dois hidrogênios) podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos. O simpleto em δ_{H} 4,07, correspondente a três átomos de hidrogênio, pode ser atribuído a hidrogênio do grupo metoxila. Todos os sinais de RMN de ^1H estão de acordo com a estrutura da aristolactama AII, cujas atribuições são apresentadas na Tabela III-7 (p. 137).

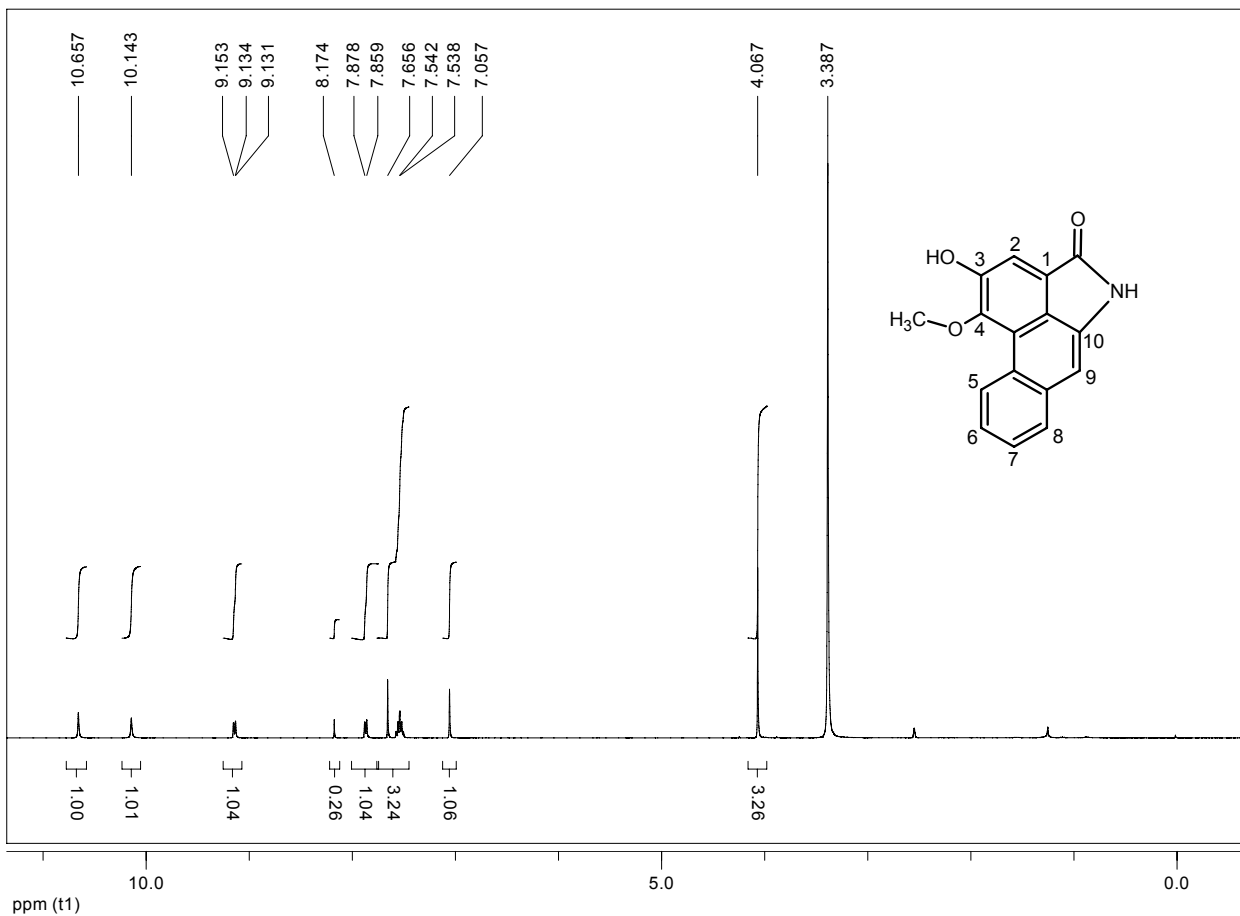


Figura III-42. Espectro de ^1H de FM1 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

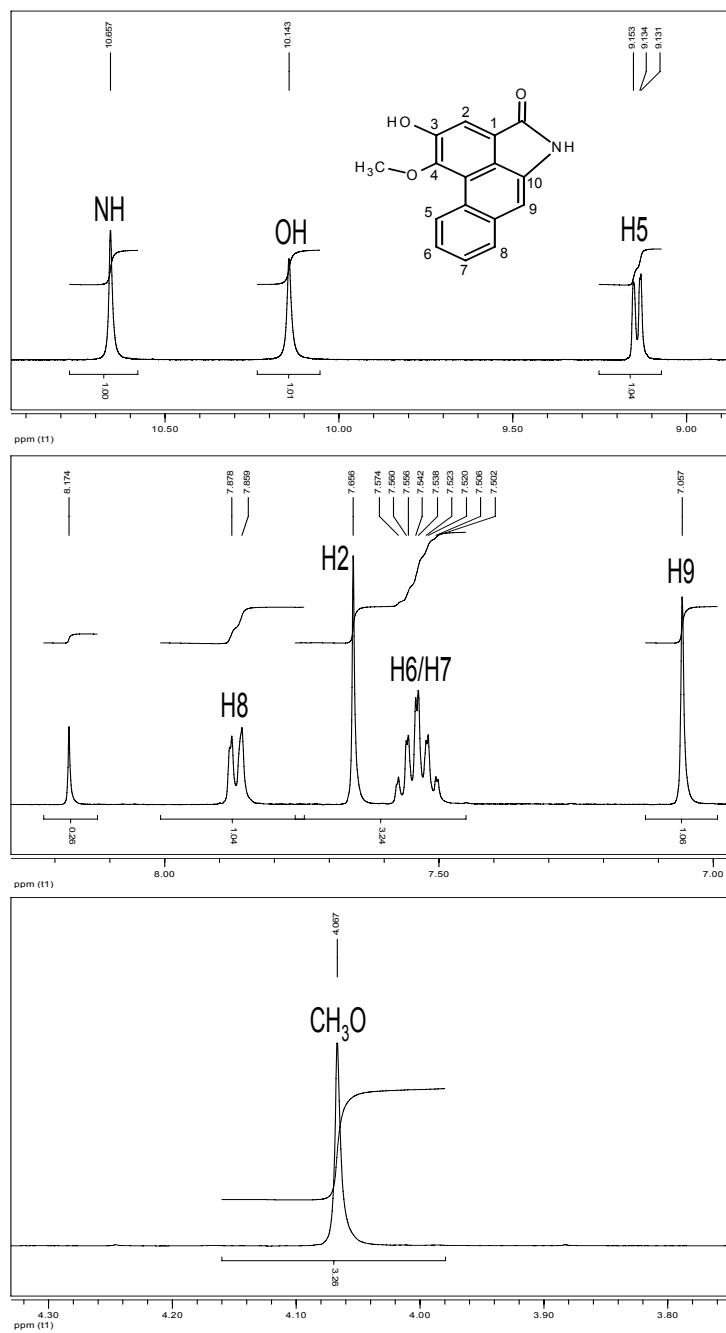
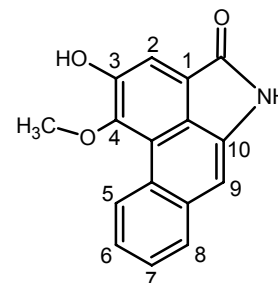


Figura III-43. Expansões do espectro de ^1H de FM1 (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$).

Tabela III-7. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de FM1

Átomo	Literatura ¹⁵⁹	Carbono (δ_{C})	Hidrogênio (δ_{H})
1	120,4	121,7	-
2	113,5	113,3	7,66
3	152,2	151,9	-
4	148,9	148,6	-
4a	121,9	120,3	-
4b	126,1	126,0	-
5	126,9	126,6	9,15
6	125,3	124,8	7,52
7	127,3	126,8	7,52
8	129,0	128,5	7,86
8a	134,9	134,6	-
9	104,0	103,6	7,06
10	135,4	135,2	-
10a	122,4	122,4	-
C-3 – OH		-	10,14
C(=O)NH	168,5	168,5	10,66
CH ₃ O	59,5	59,2	4,07



A Figura III-44 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135° de FM1. O sinal registrado em δ_{C} 168,5, correspondente a carbono não hidrogenado, pode ser atribuído ao carbono carbonílico do grupo lactama. O sinal registrado em δ_{C} 135,2, correspondente a carbono não hidrogenado, pode ser atribuído ao carbono aromático ligado ao nitrogênio do grupo lactama. Os sinais registrados em δ_{C} 151,9 e 148,6 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos não hidrogenados ligados a oxigênio. Os sinais registrados em δ_{C} 134,6, 126,0, 122,4 e 120,3 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos não hidrogenados. Os sinais registrados em δ_{C} 128,5, 126,8, 126,6, 124,8, 113,3 e 103,6 podem ser atribuídos a carbonos hidrogenados aromáticos. O sinal registrado em δ_{C} 59,2, correspondente a carbono metílico, pode ser atribuído ao carbono do grupo metoxila. Na Tabela III-7 são apresentadas as atribuições dos átomos de carbono de FM1 baseadas nas correlações observadas no mapa de contornos HSQC mostrado na Figura III-45 (p. 139).

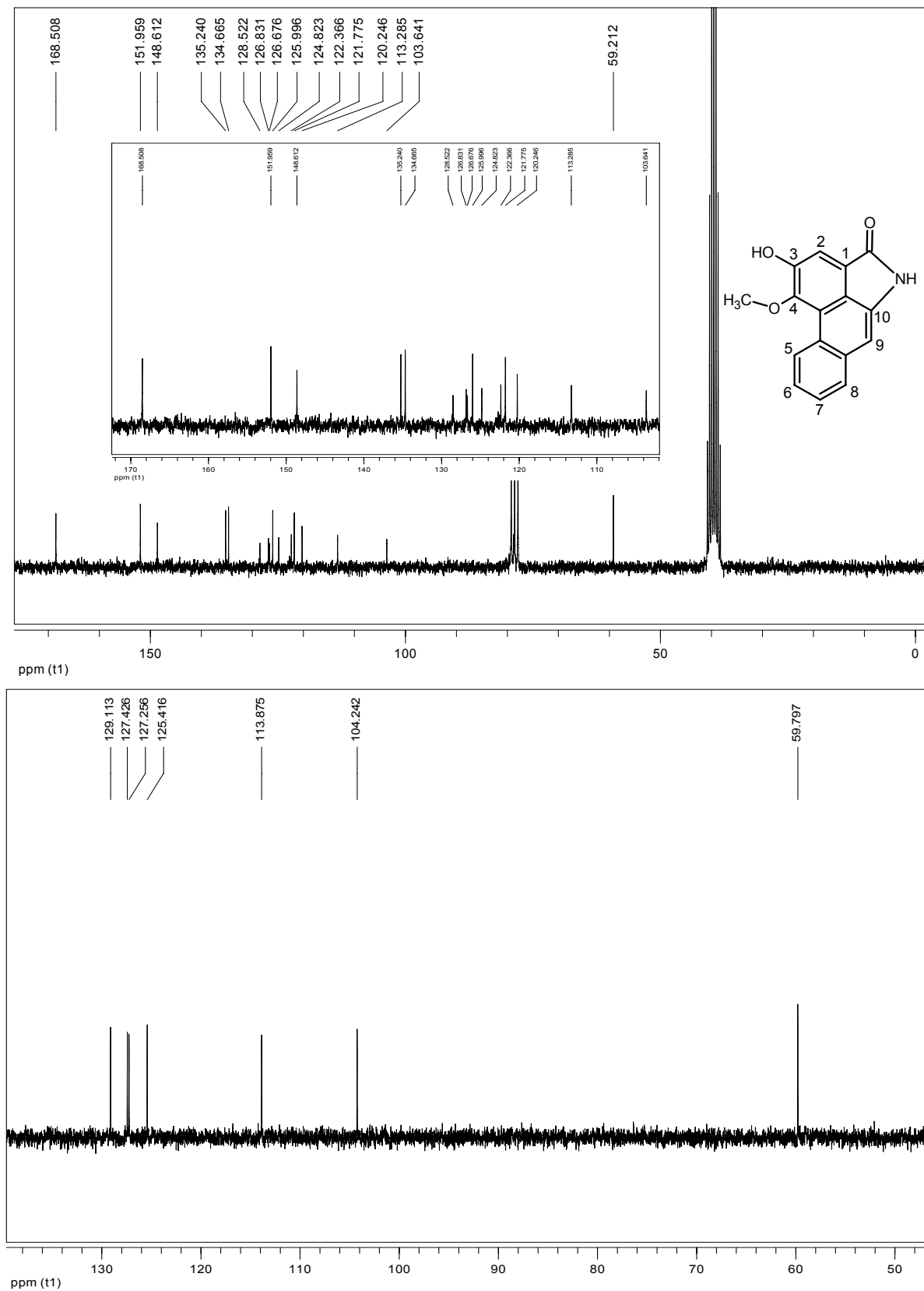


Figura III-44. Espectro de ^{13}C (superior) e subespectro DEPT 135° (inferior) de FM1 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

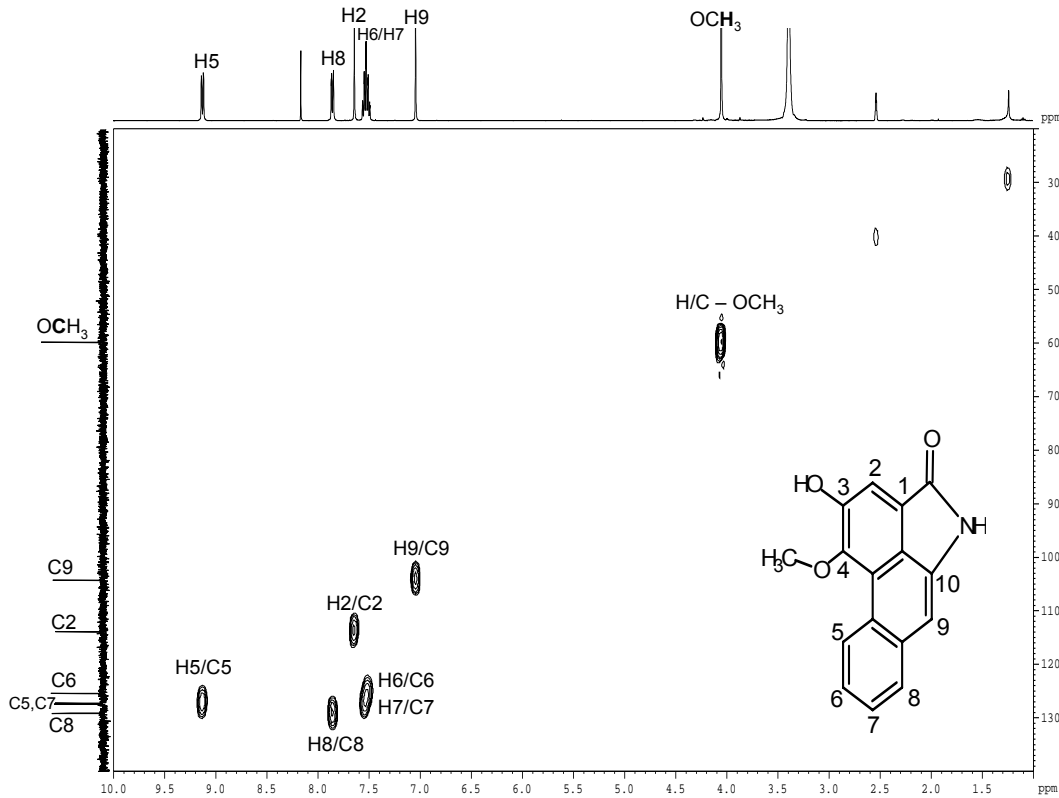
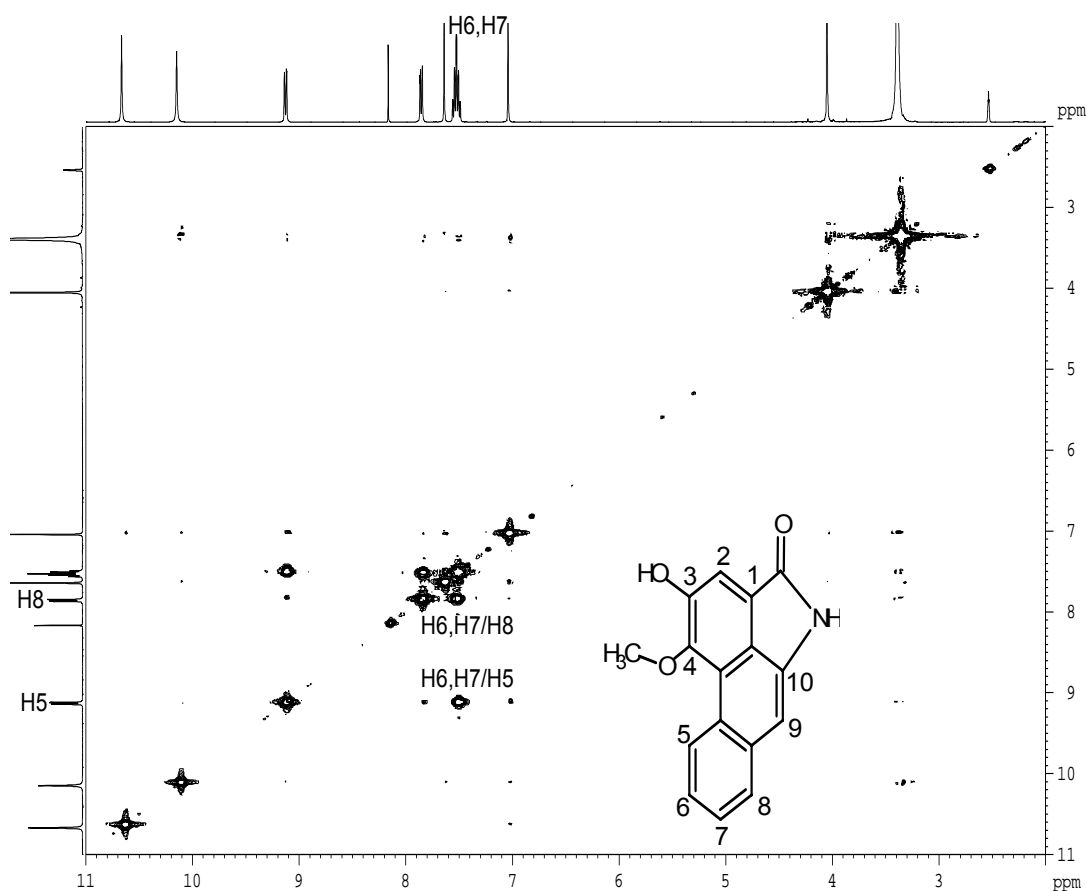


Figura III-45. Mapa de contornos HSQC de FM1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).

A Figura III-46 apresenta o mapa de contornos COSY de FM1. Os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 7,52 (H-6 e H-7) observam-se apenas correlações com os sinais em δ_{H} 9,15 (H-5) e 7,86 (H-8). Nenhuma outra correlação COSY é observada no mapa de contorno. Esses dados estão de acordo com a estrutura da aristololactama AII.



Fig

ura III-46. Mapa de contornos COSY de FM1 (400 MHz; DMSO- d_6).

A Figura III-47 apresenta o mapa de contornos HMBC de FM1. O sinal de hidrogênio em δ_H 10,66 (N–H) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 121,7 (C-1), 122,3 (C-10a), 135,2 (C-10) e 168,5 (C=O). O sinal de hidrogênio em δ_H 10,14 (O–H) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 113,3 (C-2) e 148,6 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_H 9,15 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 120,2 (C-4a), 126,8 (C-7) e 134,6 (C-8a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,86 (H-8) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 103,6 (C-9), 124,8 (C-6) e 126,0 (C-4b). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,66 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 168,5 (C=O), 151,9 (C-3), 148,6 (C-4) e 122,3 (C-10a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,52 (H-6/H-7) correlaciona-se com os

sinais de carbono em δ_C 126,0 (C-4b), 126,6 (C-5) e 128,5 (C-8). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,06 (H-9) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 122,3 (C-10a), 126,0 (C-4b) e 128,5 (C-8). O sinal de hidrogênio em δ_H 4,07 (OCH₃) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 148,6 (C-4). Esses dados estão de acordo com a estrutura da aristololactama AII.

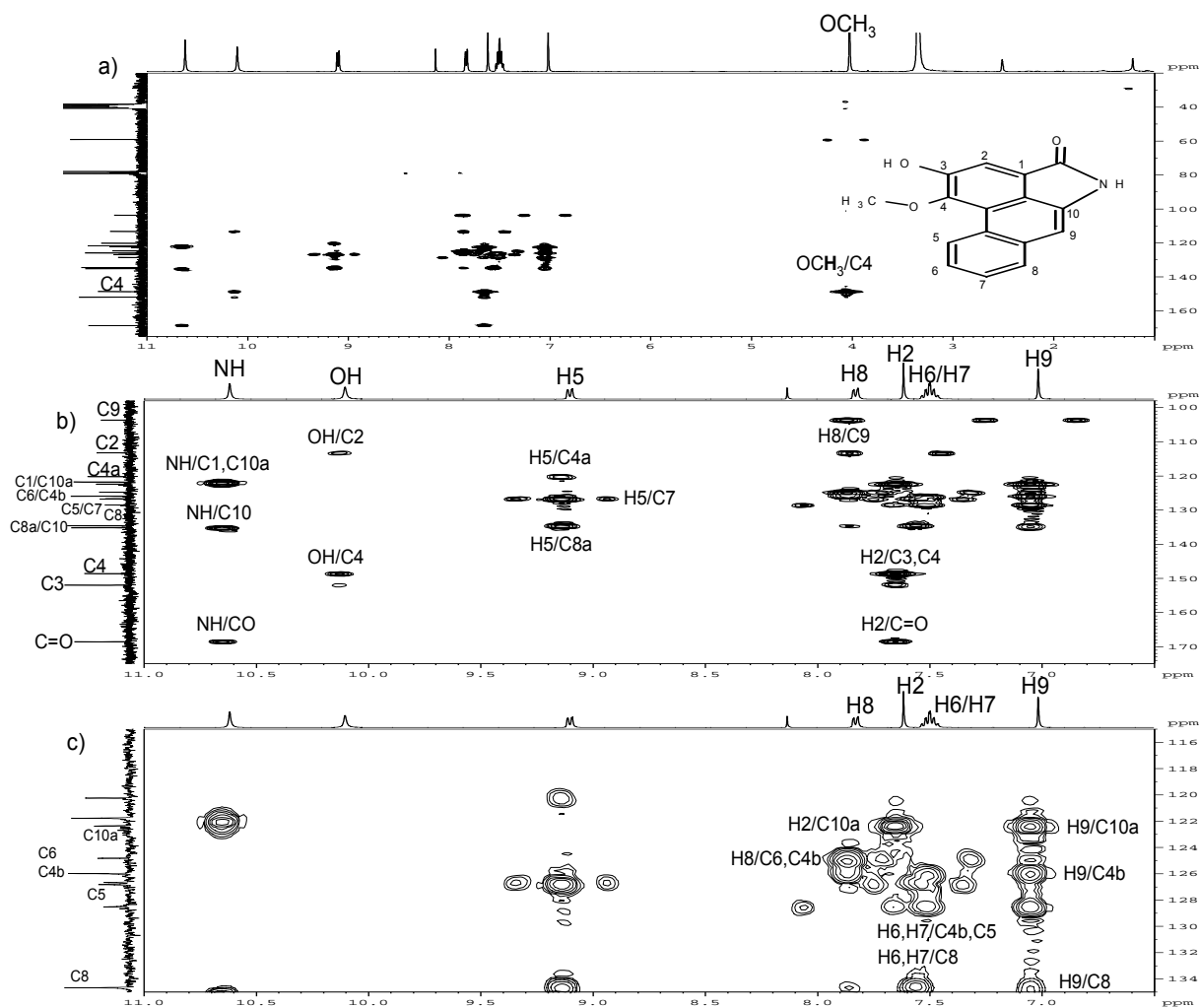


Figura III-47. Mapa de contornos HMBC de FM1 (a) e expansões (b e c) (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura III-48 apresenta o mapa de contornos NOESY de FM1. O sinal de hidrogênio em δ_H 10,14 (O–H) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_H 4,07 (CH₃O) e 7,66 (H-2). O sinal de hidrogênio em δ_H 10,66 (N–H) correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em δ_H 7,06 (H-9). O sinal de hidrogênio em δ_H 9,15 (H-5) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_H 4,07 (CH₃O) e 7,52

(H-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,86 (H-8) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_H 7,06 (H-9) e 7,52 (H-7). Esses dados estão de acordo com a estrutura da aristololactama AII.

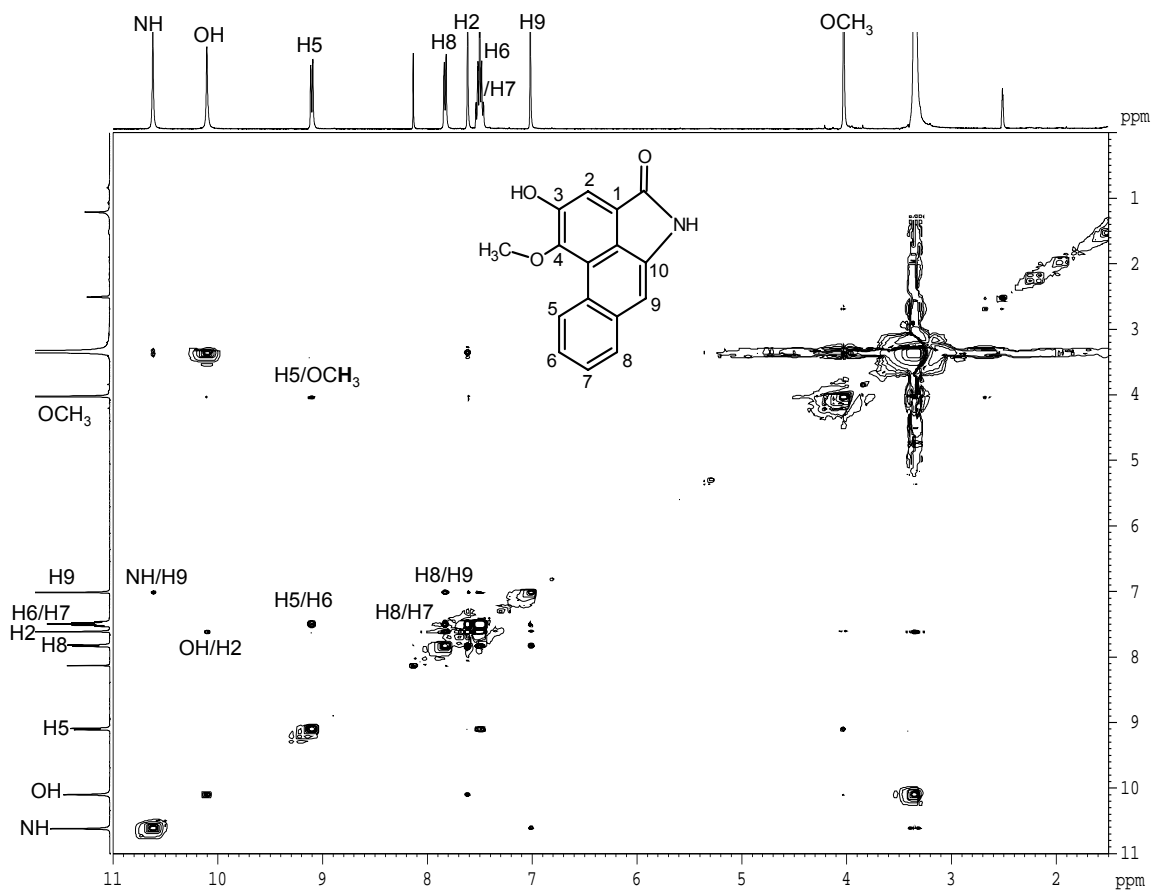


Figura III-48. Mapa de contornos NOESY de FM1 (400 MHz; DMSO-*d*₆).

Capítulo IV:
Estudo Fitoquímico do Cerne
- Resultados e Discussão

1. Análise estrutural de CE17 (AE2)

O grupo CE17 apresentou-se como um sólido branco (p.f. 122,7 – 128,0 °C). A Figura III-30 mostra o espectro no IV de CE17. A banda em 3332 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento de O–H. As bandas entre 3020 a 2870 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos de C–H de grupos aromáticos e alifáticos, respectivamente. As bandas observadas em 1495 , 1484 e 1439 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações do esqueleto aromático C–C. As bandas em 1238 e 1055 cm^{-1} podem ser atribuídas à estiramentos C–O assimétrico e simétrico, respectivamente. As bandas em 922 e 806 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformação angular de C–H aromático. Essas atribuições estão de acordo com a estrutura de AE2 (8R,8'R,9S)-cubebina.

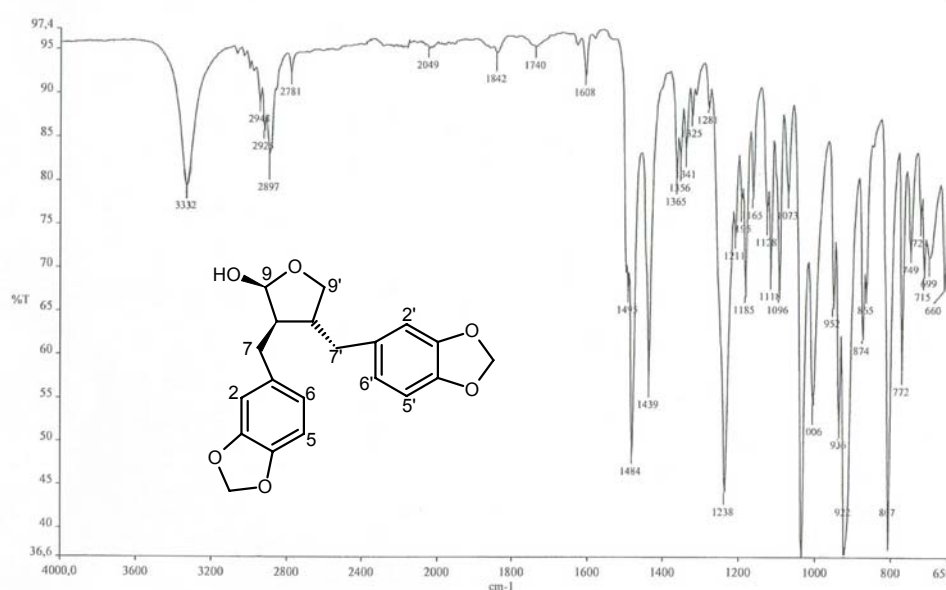


Figura IV.1. Espectro de absorção na região do IV de CE17.

A Figura IV-2 (p. 145) mostra o espectro de RMN de ^1H de AE2. A região de hidrogênios aromáticos registra seis sinais entre δ_{H} 6,7 e 6,5, atribuídos a H-2/2', H-5/5' e H-6/6'. Os simpletos em δ_{H} 5,87 e 5,85, bem como o duplete em 5,15 (H9), podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos sp^3 dioxigenados, enquanto que os sinais em δ_{H} 4,03 e 3,50, a hidrogênios metilênicos

ligados a carbono sp^3 mono-oxigenado (H-9'). Os sinais em δ_H 2,70 e 2,50, bem como em δ_H 2,52 e 2,37 (este último sobreposto a outro sinal) podem ser atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos. Finalmente, os sinais em δ_H 2,37 e 1,93 podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos metínicos do anel tetra-hidrofurano. Todos os sinais de RMN de 1H estão de acordo com a estrutura de (8R,8'R,9S)-cubebina, cujas atribuições são apresentadas na Tabela IV-1.

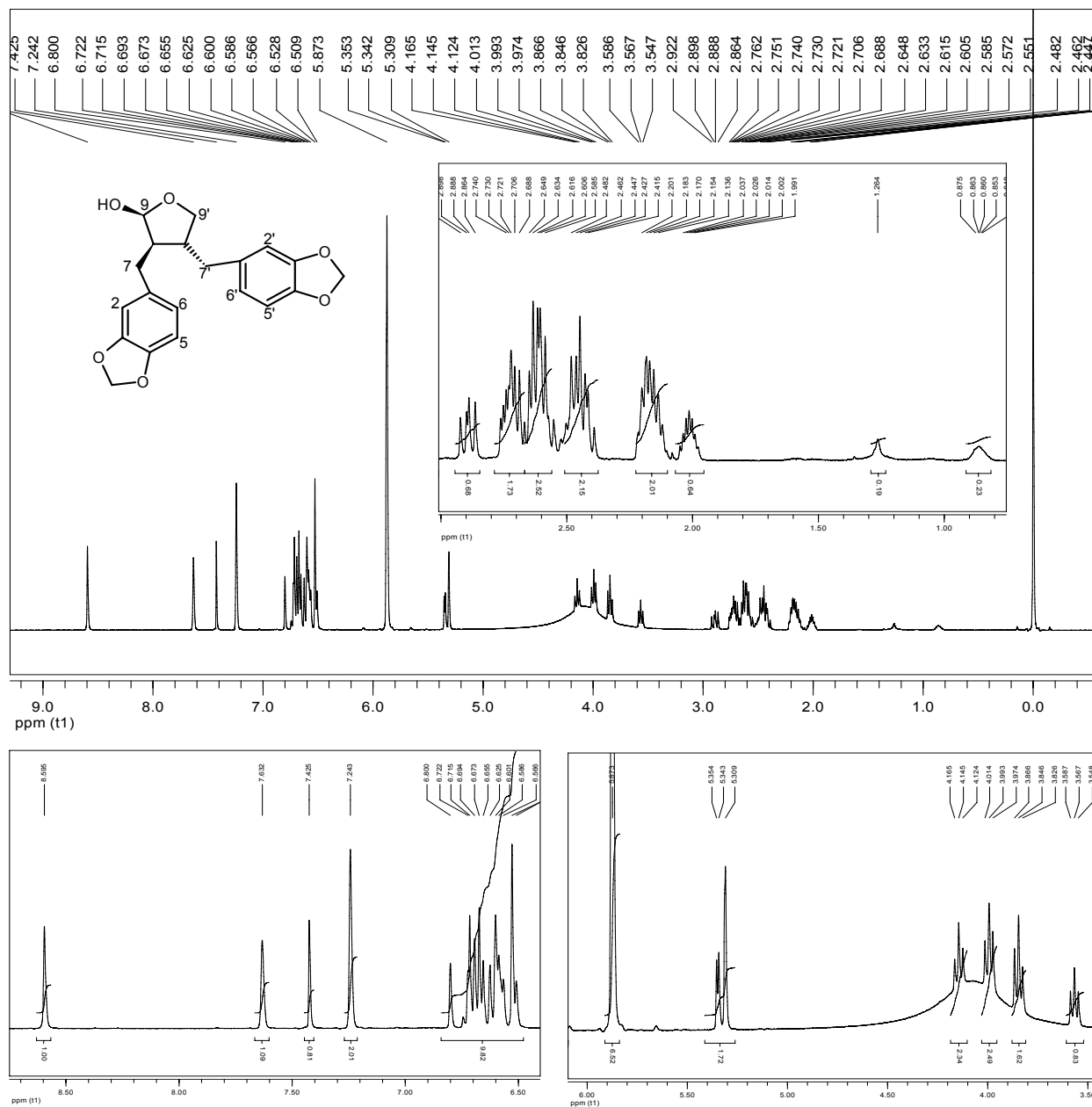
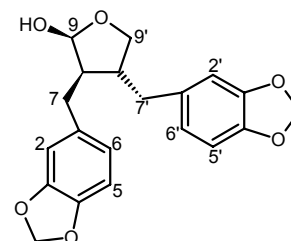


Figura IV-2. Espectro de RMN de 1H de AE2 (CDCl₃; 400 MHz).

Tabela IV-1. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AE2

Átomo	Literatura ¹⁶⁰	Carbono (δ_{C})	Hidrogênio (δ_{H})
1	133,8	133,8	-
2	108,9	108,9	6,56
3	147,7	147,7	-
4	145,7	145,7	-
5	108,2	108,2	6,66
6	121,3	121,3	6,52
7	33,6	33,6	2,90; 2,62
8	51,9	51,9	1,93
9	98,8	98,8	5,15
1'	134,5	134,5	-
2'	109,3	109,3	6,67
3'	147,5	147,5	-
4'	145,9	145,9	-
5'	108,1	108,1	6,66
6'	121,6	121,6	6,62
7'	38,8	38,8	2,70 β ; 2,50 α
8'	45,9	42,9	2,37
9'	72,5	72,5	4,03 β ; 3,50 α
O-CH ₂ -O	100,8	100,8	5,87
O-CH ₂ -O'	100,8	100,8	5,85
OH		2,86	



A Figura IV-3 (p. 147) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C de AE2. Os sinais em δ_{C} 147,7, 147,5, 145,9 e 145,7 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos oxigenados e os sinais em δ_{C} 134,5 e 133,8 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos não hidrogenados. Os sinais em δ_{C} 121,6, 121,3, 109,3, 108,9, 108,2 e 108,1 podem ser atribuídos a carbonos aromáticos hidrogenados, conforme análise do subespectro DEPT 135°. O sinal em δ_{C} 100,8 pode ser atribuído a dois carbonos metilênicos dioxigenados e o sinal em δ_{C} 98,8 pode ser atribuído a um carbono metínico também dioxigenado. Os sinais em δ_{C} 51,9 e 42,9 podem ser atribuídos a carbonos metínicos e os sinais em δ_{C} 38,8 e 33,6, a dois carbonos metilênicos. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentam um maior número de sinais que aqueles correspondentes a estrutura de AE2, portanto a amostra deve se tratar de uma mistura em que a estrutura proposta é predominante. Na Tabela IV-1 são apresentadas as atribuições dos carbonos

de AE2 baseadas nas correlações observadas no mapa de contornos HSQC mostrado na Figura IV-4 (p. 148), bem como os dados constantes na literatura que confirmaram a estrutura proposta.

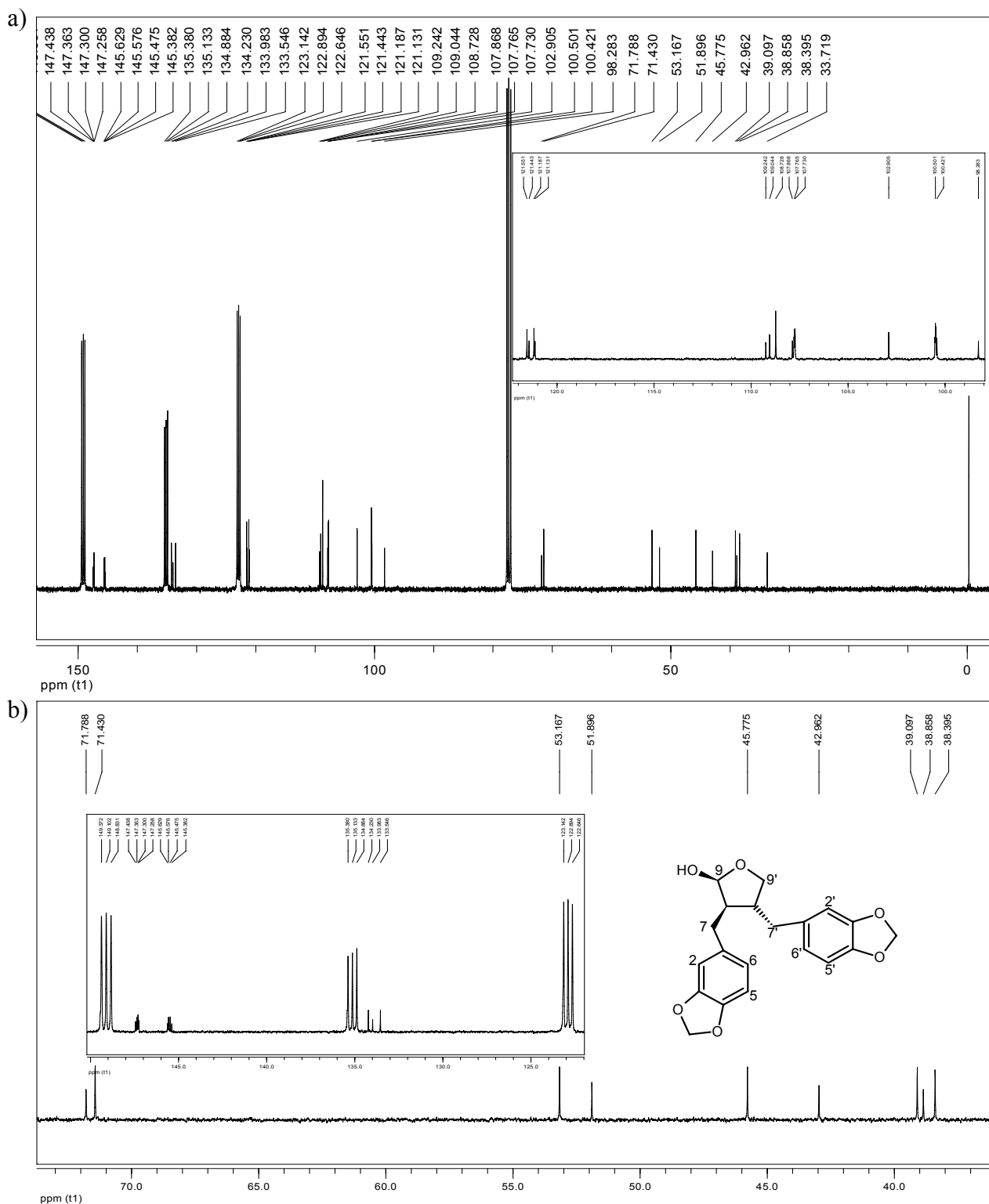


Figura IV-3. Espectro de RMN de ^{13}C de AE2 (a) e expansão de δ_{C} 36,0 a 73,0 (b) (100 MHz; CDCl_3 com gotas de piridina).

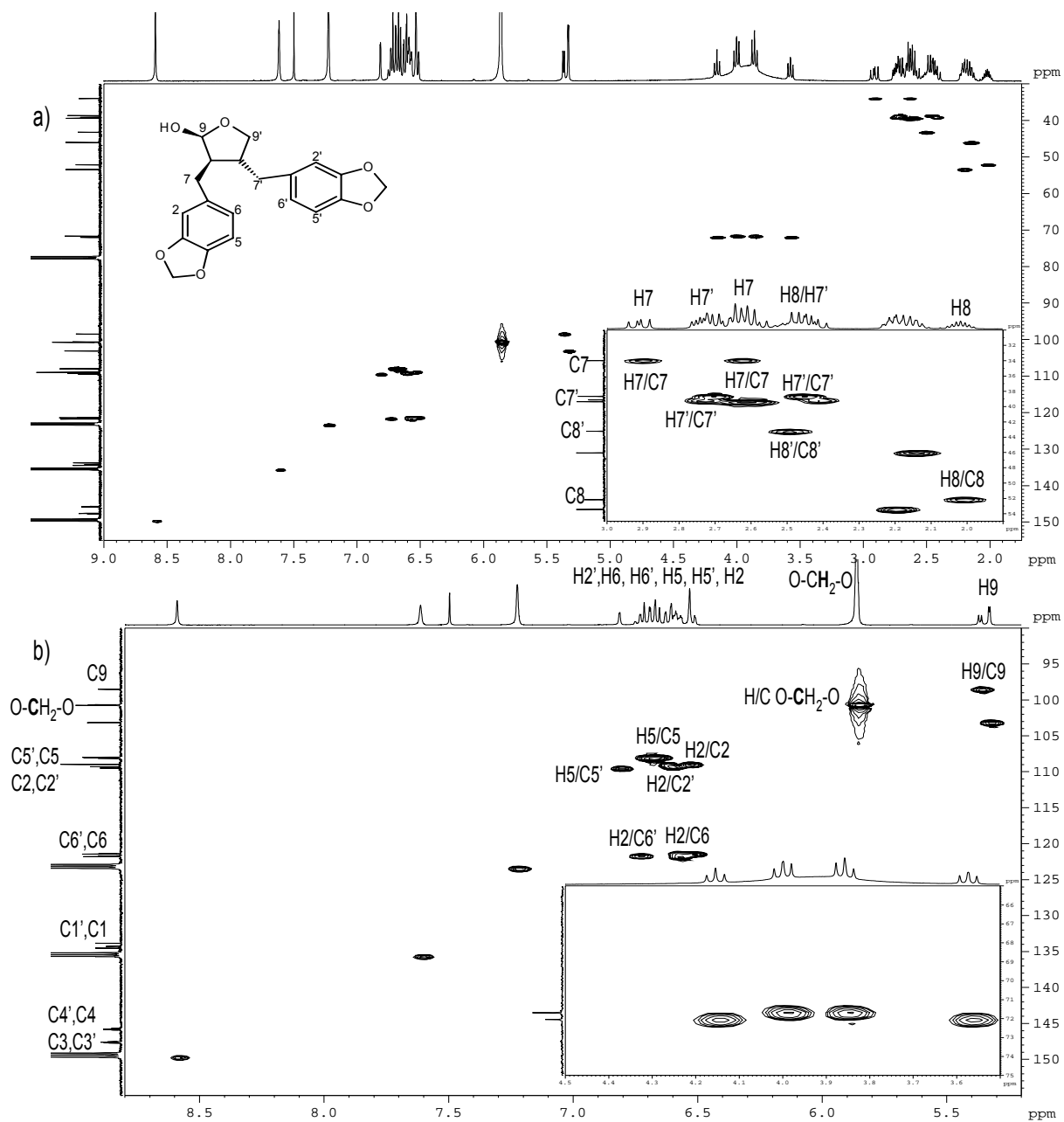


Figura IV-4. Mapas de contornos HSQC de AE2 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).

A Figura IV-5 (p. 150) mostra o mapa de contornos COSY de AE2. O sinal em δ_{H} 6,66 (H-5/5') (correspondente a dois átomos de hidrogênio) correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 6,62 (H-6') e 6,52 (H-6). O sinal em δ_{H} 1,93 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 2,90 (H-7). O sinal em δ_{H} 4,03 (H-9' β) correlaciona-se com os sinais em δ_{H} em 3,50 (H-9' α) e 2,37 (H-8'). O sinal em δ_{H} 2,70 (H-7') correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 2,50 (H-7') e 2,37 (H-8'). Todas essas correlações estão de acordo com a estrutura de (8R,8'R,9S)-cubebina.

A Figura IV-6 (p. 151) mostra o mapa de contornos HMBC de AE2. O sinal em δ_{H} 6,67 (H-2') correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 145,9 (C-4'), 121,6 (C-6') e 38,8 (C-7') e o sinal em 6,56 (H-2) correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 145,7 (C-4), 121,3 (C-6) e 33,6 (C-7). Os sinais em δ_{H} 4,03 (H-9') e 3,50 (H-9'') correlacionam-se com os sinais em δ_{C} 38,8 (C-7') e 51,9 (C-8). O sinal em δ_{H} 5,15 (H-9) correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 33,6 (C-7) e 42,9 (C-8'). O sinal em δ_{H} 1,93 (H-8) correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 72,5 (C-9'), 38,8 (C-7') e 133,8 (C-1). O sinal em δ_{H} 5,87 (O-CH₂-O) correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 147,7 (C-3) e 145,7 (C-4) e o sinal em δ_{H} 5,85 (O-CH₂-O') correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 147,5 (C-3') e 145,9 (C-4'). Essas correlações HMBC estão de acordo com a estrutura de (8R,8'R,9S)-cubebina.

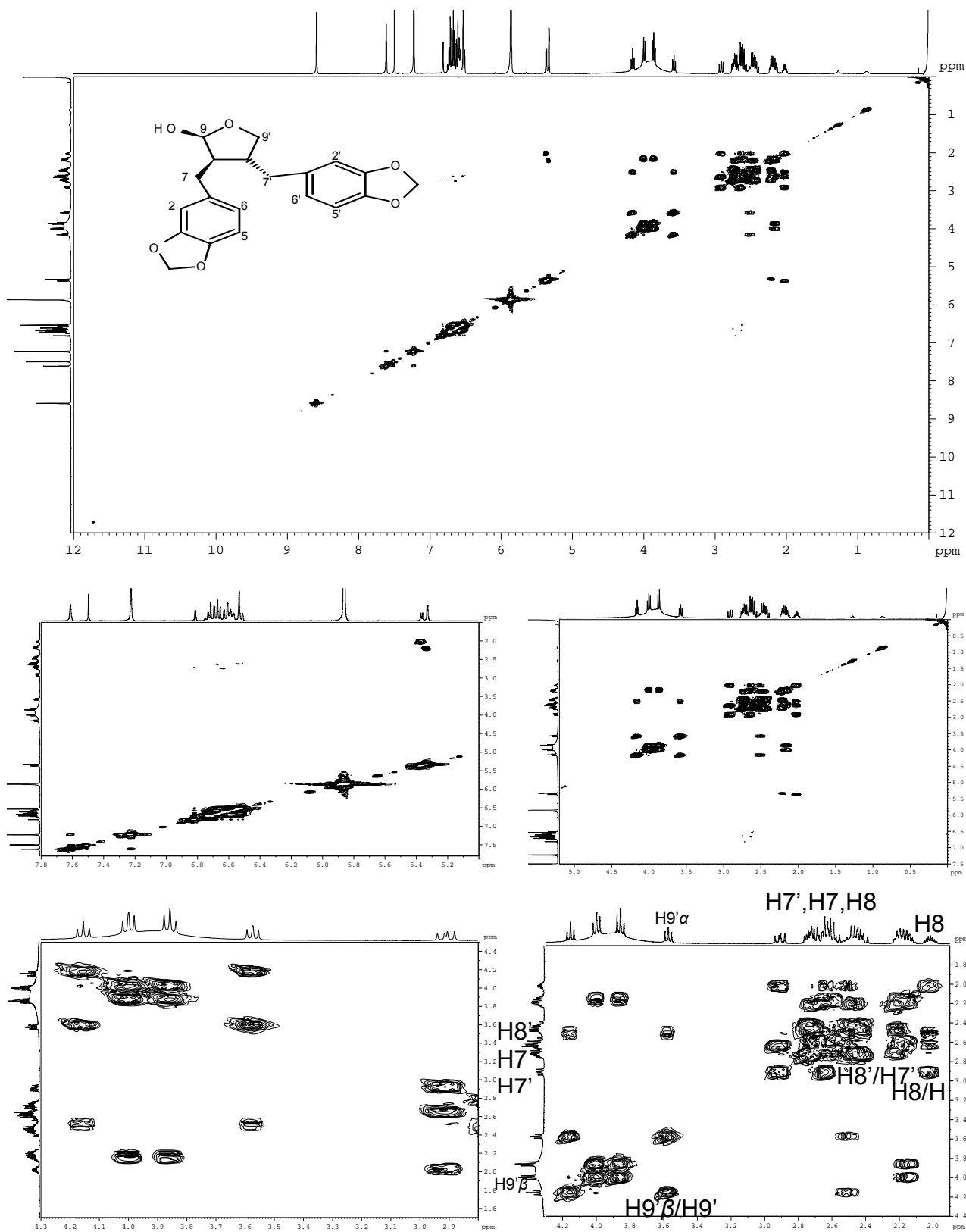


Figura IV-5. Mapas de contornos COSY de AE2 (400 MHz; CDCl_3).

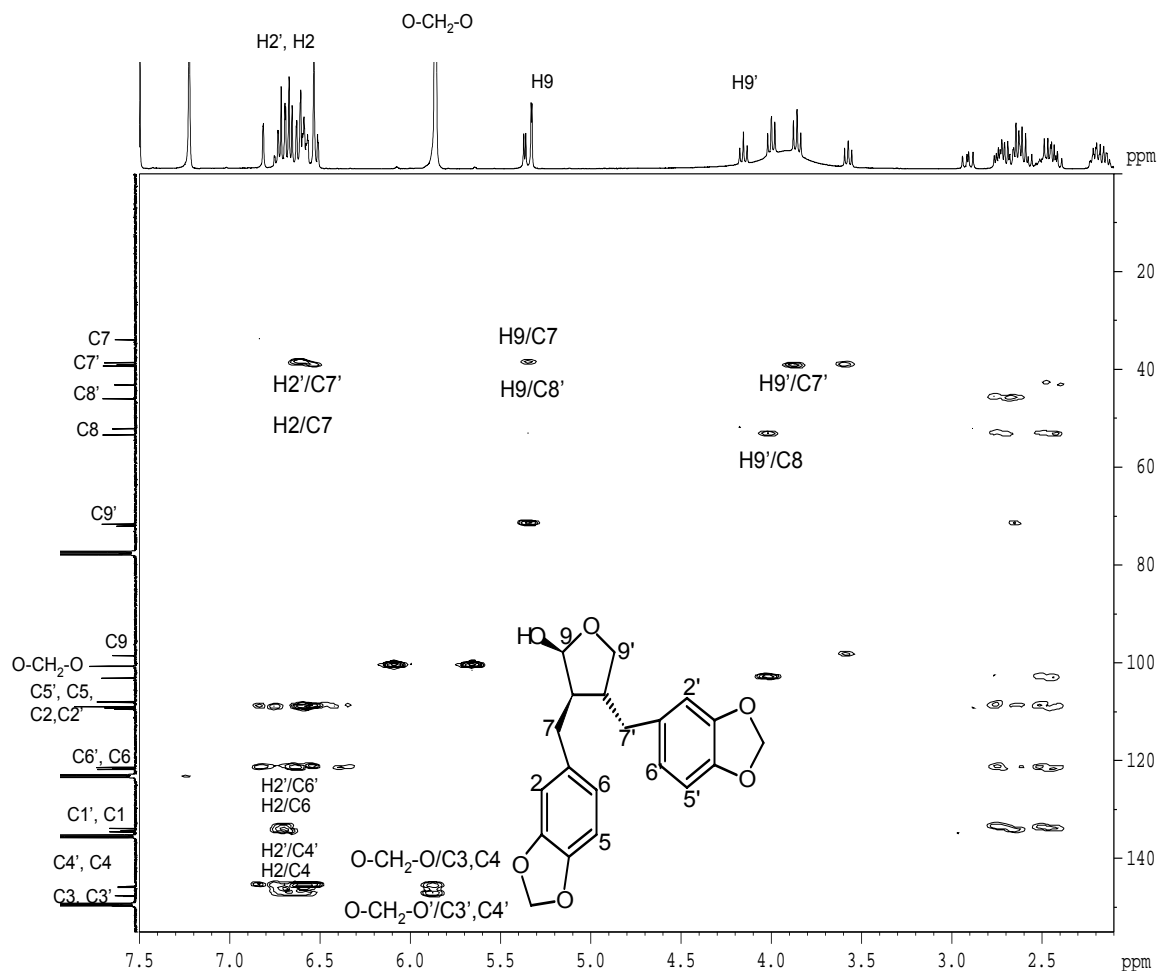


Figura IV-6. Mapas de contornos HMBC de AE2 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).

A Figura IV-7 (p. 152) apresenta o mapa de contornos NOESY de AE2. O sinal em δ_{H} 1,93 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 5,15 (H-9). O sinal em δ_{H} 2,37 (H-8') correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 6,62 (H-6'), 6,66 (H-5) e 6,67 (H-2') e 4,03 (H-9' β). O sinal em δ_{H} 2,50 (H-7' α) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 3,50 (H-9' α). Essas correlações NOESY estão de acordo com a estrutura de (8R,8'R,9S)-cubebina.

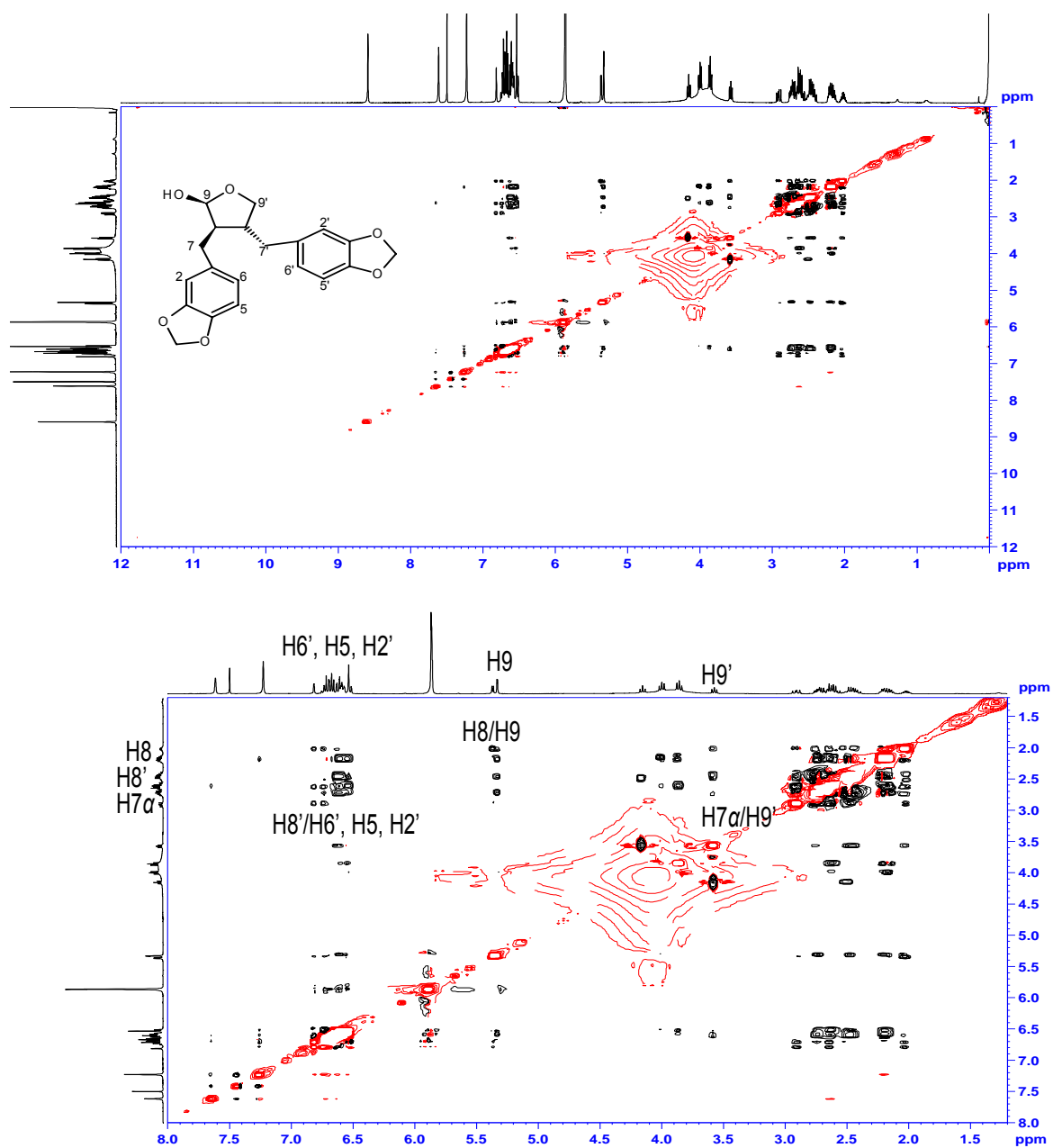


Figura IV-7. Mapas de contornos NOESY de AE2 (400 MHz; CDCl_3).

2. Análise estrutural de CE20 (AE14)

O grupo CE20 apresentou-se como um sólido amarelo com decomposição a temperaturas acima de 290 °C. A Figura IV-8 apresenta o cromatograma de CG de AE14. Esse cromatograma apresenta um pico em 8,776 min de alta proporção relativa, indicando tratar-se de um produto com alto grau de pureza.

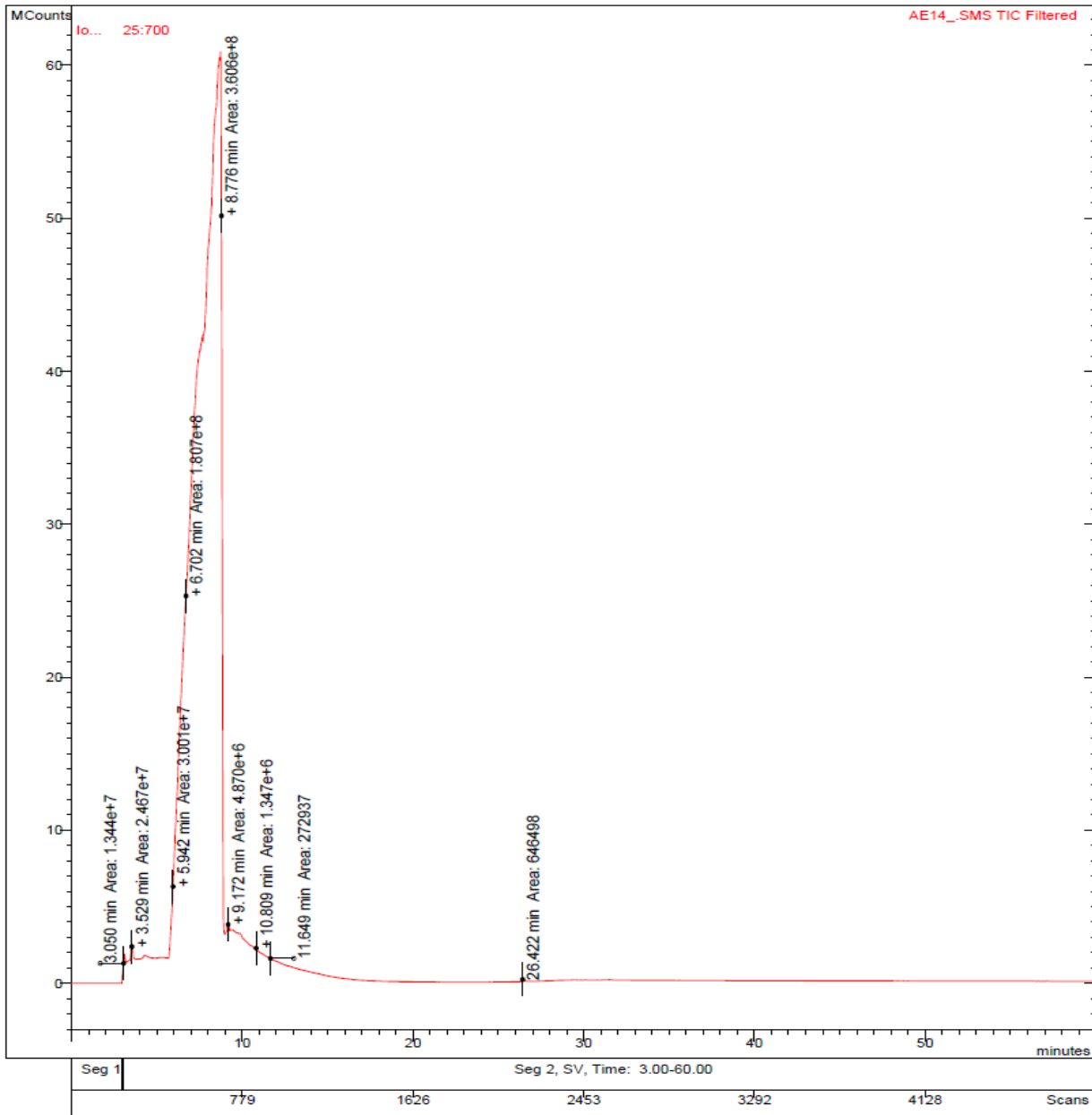


Figura IV-8. Cromatograma de CG de AE14 (coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 50 °C por 3 min seguido de aquecimento a 5 °C/min, 300°C, injetor: 300°C, split 1:15, fluxo:1 mL/min/He, detector:300°C).

A análise elementar de AE14 forneceu os dados mostrados na tabela IV-2. As porcentagens relativas dos elementos correspondem a uma fórmula mínima próxima a $C_{16}H_{11}NO_7$.

Tabela IV-2. Resultados da análise elementar de AE14

	% C	% H	% N	% O
Valores Experimentais	58,85	3,16	4,17	33,82
Valores calculados	59,82	3,23	4,11	32,84

A Figura IV-9 apresenta o espectro de absorção na região do IV de CE20. A banda larga entre 3200 e 2700 cm^{-1} indica a presença de hidrogênio em ligação de hidrogênio, com várias bandas pouco intensas sobrepostas que podem ser atribuídas a estiramentos C–H de grupos aromáticos e alifáticos. A banda larga na região entre 2600 e 2400 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramentos característicos de grupo nitro. A banda em 1682 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento C=O de grupos ácido carboxílico conjugado. As bandas em 1593, 1524, 1468 e 1415 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–C característicos do anel aromático. A banda em 1370 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação angular característica de grupo metila. As bandas largas em 1345, 1265, 1267 e 1147 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos assimétricos e simétricos de C–O. As bandas em 945, 900, 804 e 742 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformações angulares no plano e fora do plano de C–H aromático. Todas essas bandas estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio I.

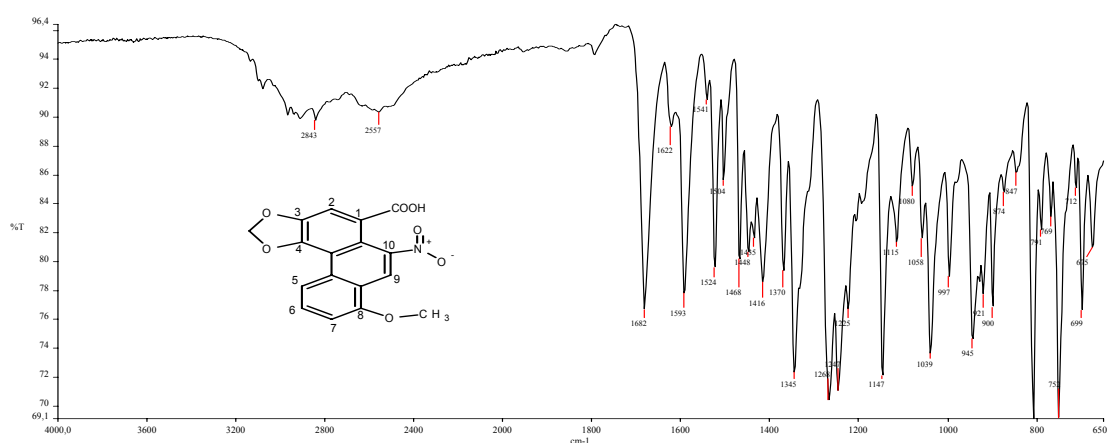


Figura IV-9. Espectro de absorção na região do IV de AE14.

A Figura IV-10 apresenta o espectro de massas de AE14 e o esquema IV-1 mostra os fragmentos propostos para os picos mais importantes segundo Pristap⁷⁴, que confirma a estrutura proposta para AE14.

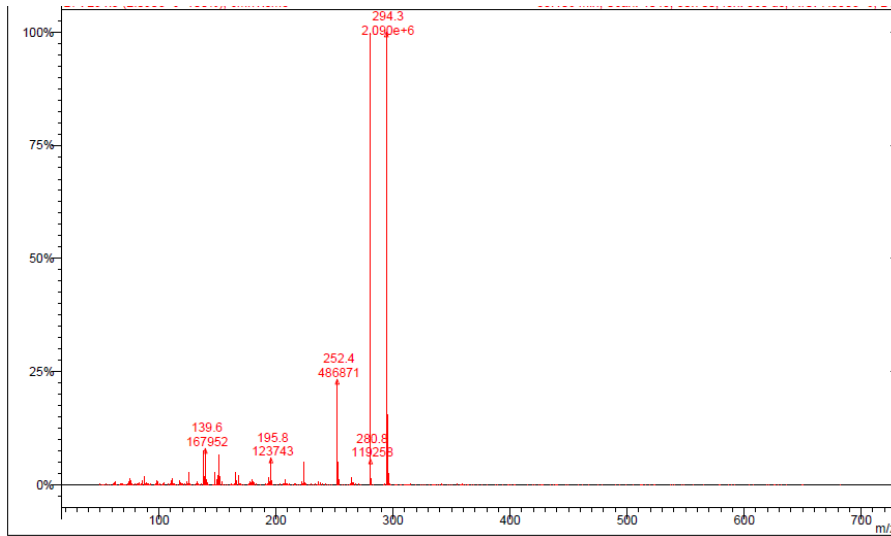
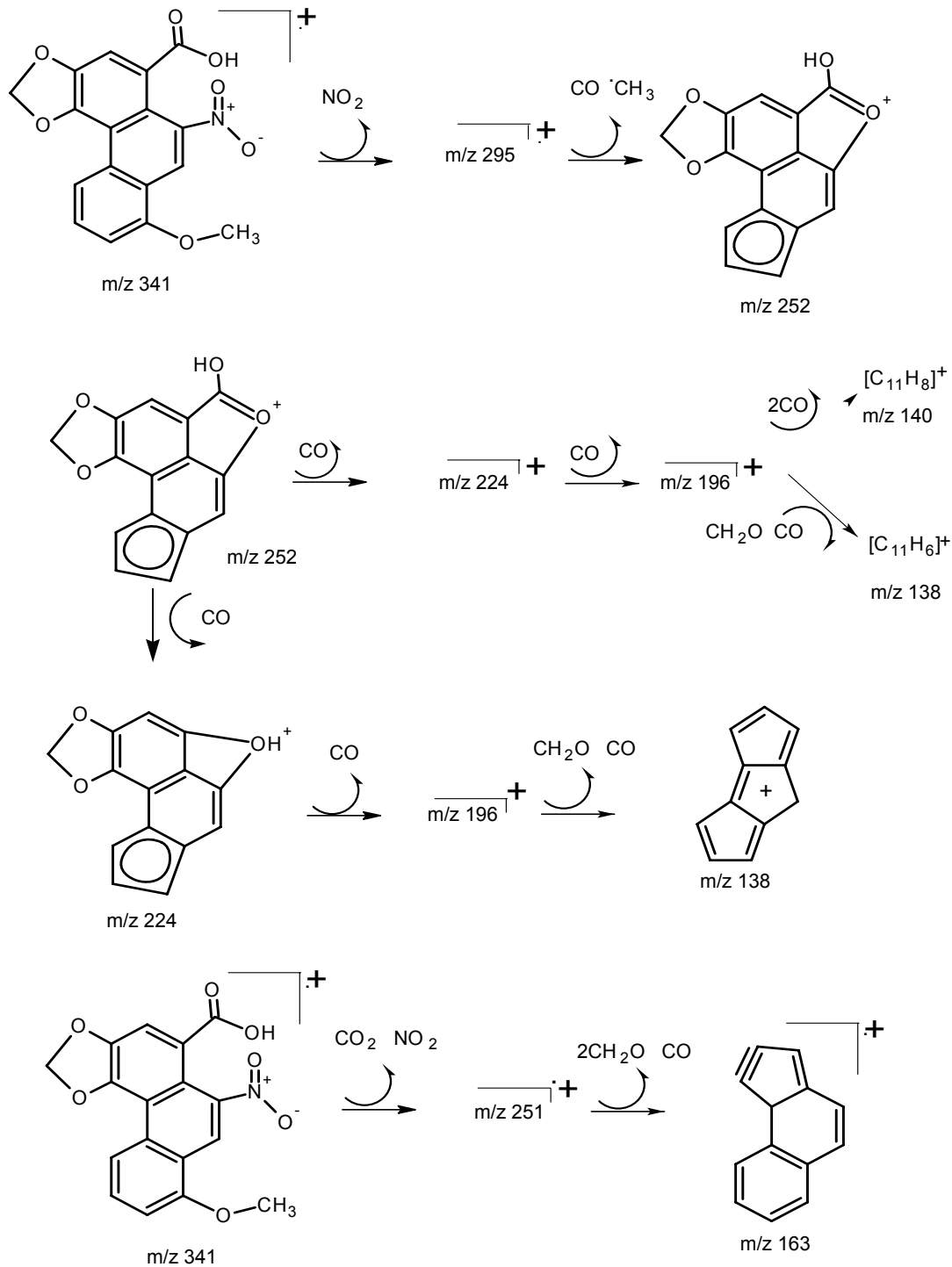


Figura IV- 10. Espectro de massas de AE14. (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV; "Targat TIC" 20000 counts; "Max ion time" 25000 useg; eletromultiplicadora a 1500 V; corrente do filamento de 10 uAmps; vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300 °C; ion trap: 150 °C; manifold: 45 °C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).



Esquema III-1. Fragmentos propostos para os picos mais importantes segundo Priestap⁷⁴.

A Figura IV-11 apresenta o espectro de RMN de ^1H de AE14. O simpleto largo registrado em δ_{H} 13,32 (correspondente a um átomo de hidrogênio) pode ser atribuído a hidrogênio de ácido carboxílico. O simpleto registrado em δ_{H} 6,48 (correspondente a dois átomos de hidrogênios) pode ser atribuído ao grupo metileno ligado a dois átomos de oxigênio. O sinal registrado em δ_{H} 4,05 (correspondente a três átomos de hidrogênio) pode ser atribuído a hidrogênio do grupo metoxila. Os

sinais registrados em δ_H 8,61 (duplete), 8,56 (simpleto), 7,83 (duplete-duplo), 7,80 (simpleto) e 7,34 (duplete) podem ser atribuídos a hidrogênios metínicos aromáticos. Todos os sinais de RMN de 1H estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio I, cujas atribuições são descritas na Tabela IV-3 (p. 159).

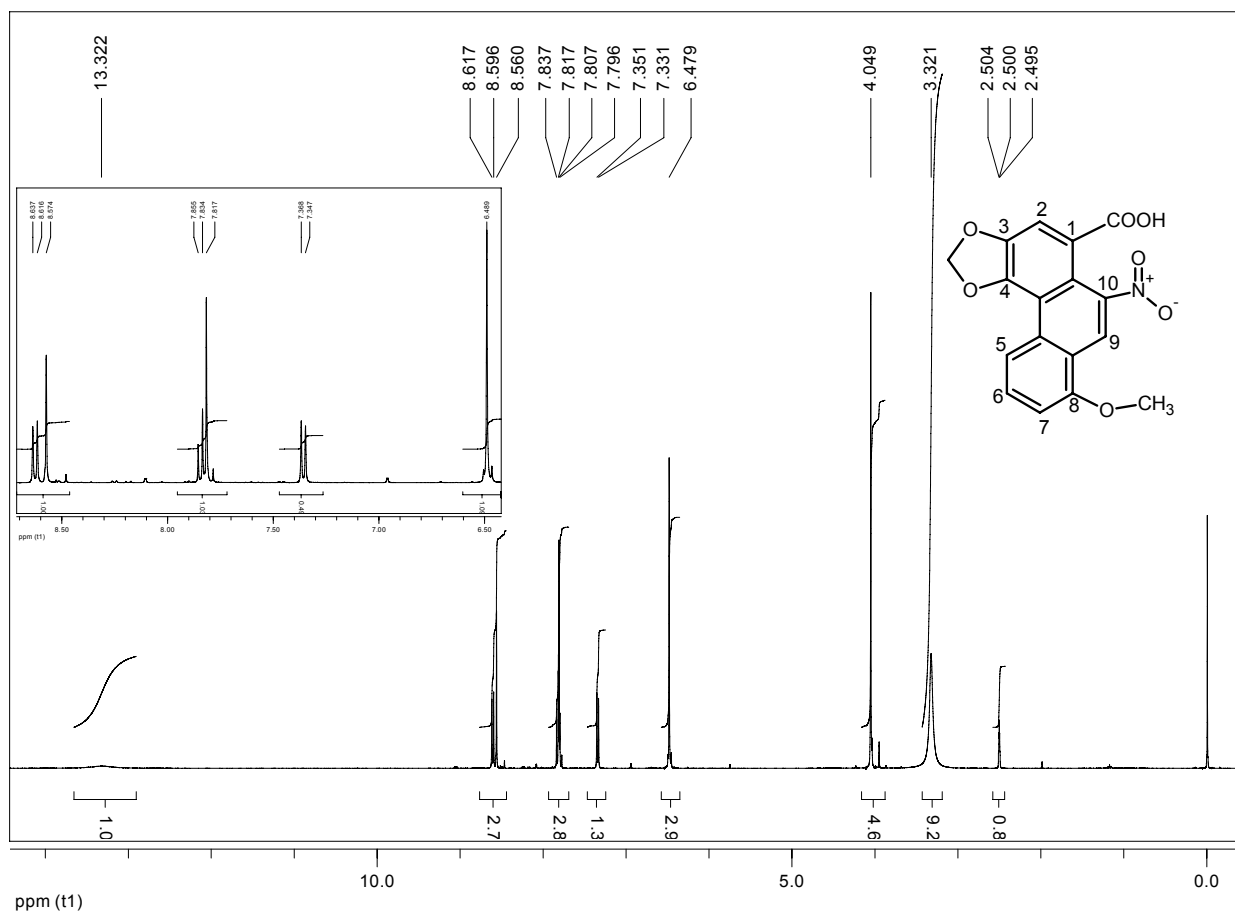


Figura IV-11. Espectro de RMN de 1H de AE14 (400 MHz; DMSO- d_6).

As Figuras IV-12 e IV-13 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° de CE20. O sinal em δ_{C} 167,5, correspondente a carbono não hidrogenado, pode ser atribuído ao grupo ácido carboxílico. Os sinais em δ_{C} 156,1, 145,9 e 145,6, correspondentes a carbonos não hidrogenados, podem ser atribuídos a carbonos aromáticos ligados a heteroátomos. Os sinais em δ_{C} 129,7, 124,0, 118,7, 117,1 e 116,7 correspondem a carbonos aromáticos não hidrogenados. Os sinais em δ_{C} 131,4, 119,4, 118,3, 112,0 e 108,7 correspondem a carbonos hidrogenados aromáticos. O sinal em δ_{C} 102,8 corresponde a um átomo de carbono metilênico. O sinal em δ_{C} 56,1 corresponde ao carbono do grupo metoxila. Todos os sinais de RMN de ^{13}C estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio I, cujas atribuições são descritas na Tabela IV-3 (p. 159) e baseadas no mapa de contornos HSQC mostrado na Figura IV-14 (p. 160).

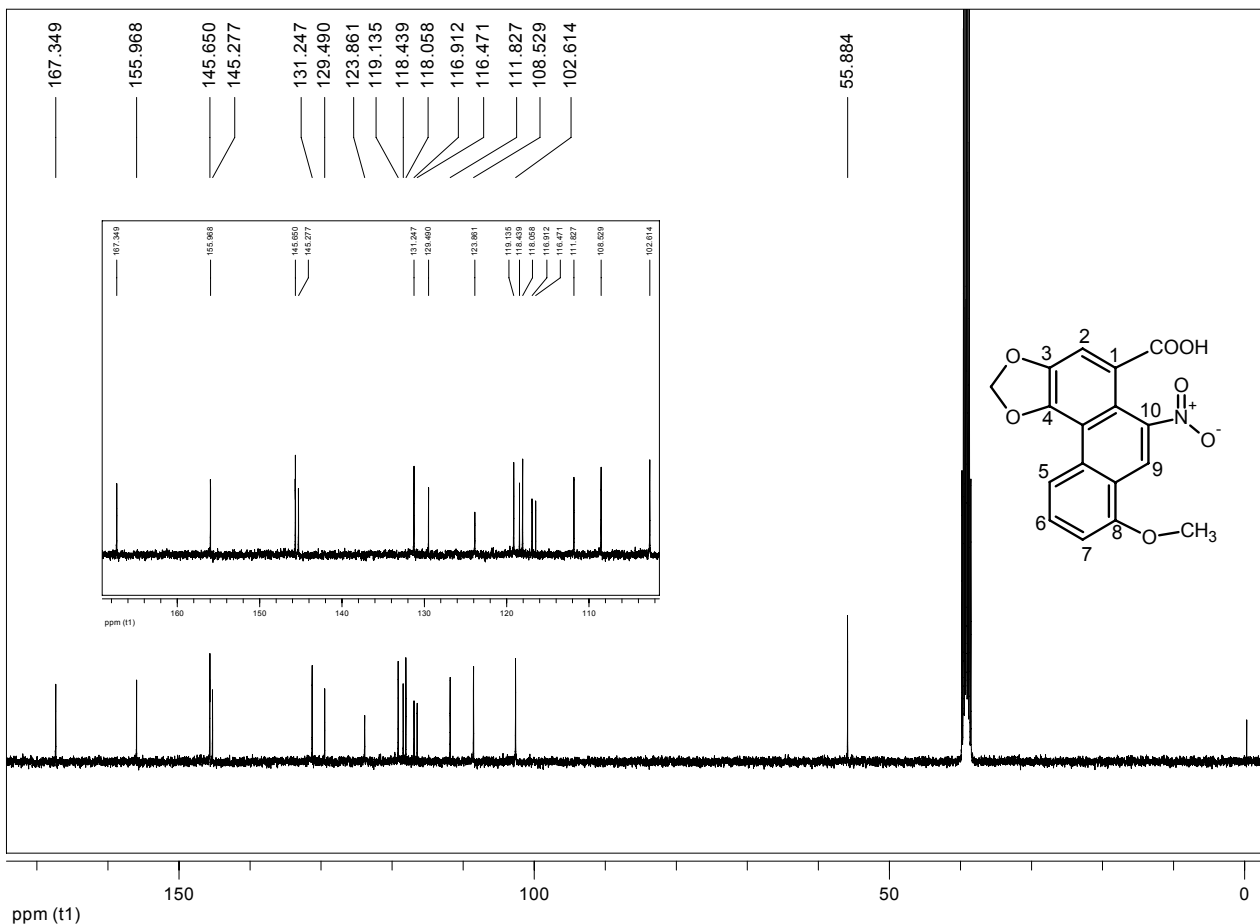


Figura IV-12. Espectro de RMN de ^{13}C de AE14 (100 MHz; DMSO- d_6).

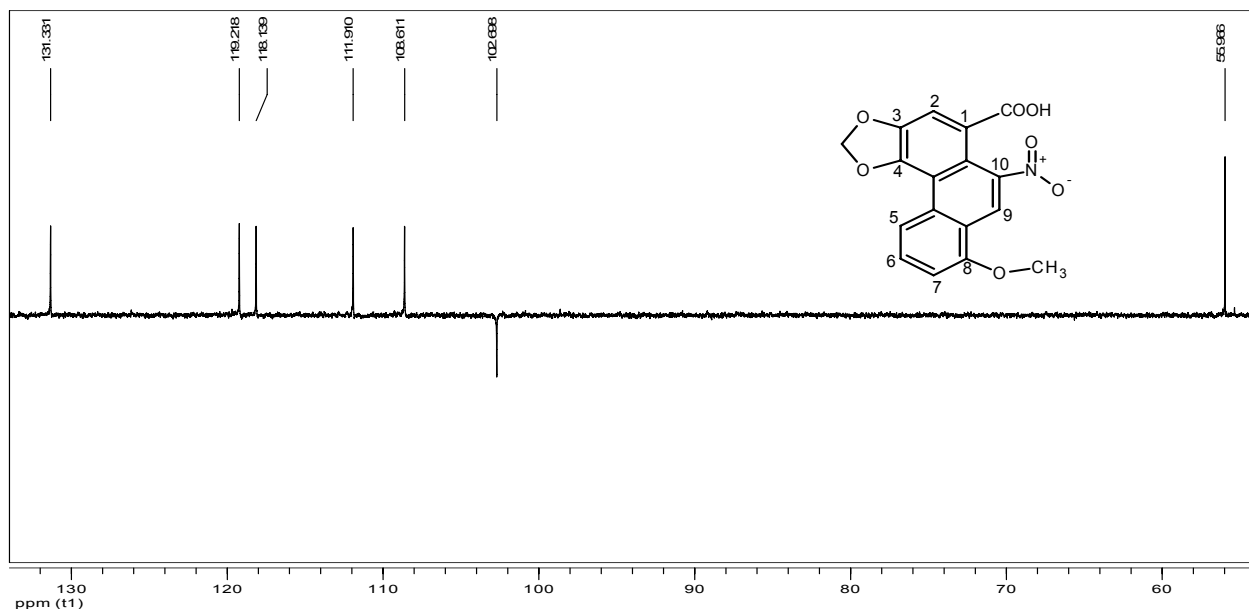


Figura IV-13. Subespectro DEPT-135° de AE14 (100 MHz; DMSO-*d*₆).

Tabela IV-3. Atribuição dos sinais de RMN de ¹H e de ¹³C de AE14.

Átomo	Literatura ¹⁵⁹	Carbono (δ_C)	Hidrogênio (δ_H)
1	116,9	116,7	-
2	112,2	112,0	7,80
3	146,0	145,9	-
4	145,7	145,6	-
4a	124,5	124,0	-
4b	117,3	117,1	-
5	118,4	118,3	8,61
6	131,5	131,4	7,83
7	108,7	108,7	7,34
8	156,3	156,1	-
8a	118,8	118,7	-
9	119,5	119,4	8,56
10	146,2	146,4	-
10a	129,8	129,7	-
CO ₂ H	167,9	167,5	13,32
CH ₃ O	56,2	56,1	4,05
O-CH ₂ -O	103,0	102,8	6,48

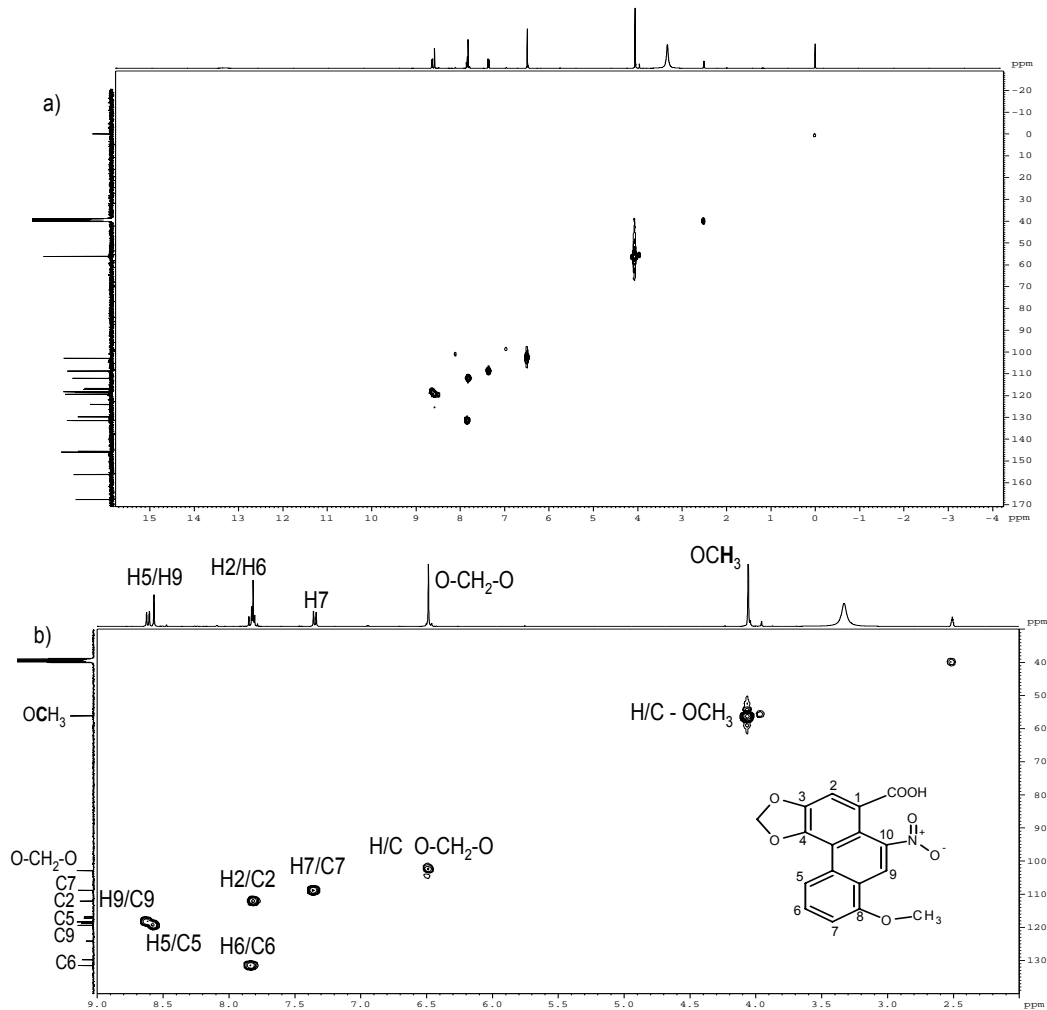


Figura IV-14. Mapa de contornos HSQC (a) e expansão correspondente (b) de AE14 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV-15 apresenta o mapa de contornos COSY de CE20. Os sinais em δ_{H} 8,61 (H-5) e 7,34 (H-7) correlacionam-se apenas com o sinal em δ_{H} 7,83 (H-6). No mapa de contornos COSY não é observada nenhuma outra correlação, fato este que está de acordo com a estrutura do ácido aristolóchio I.

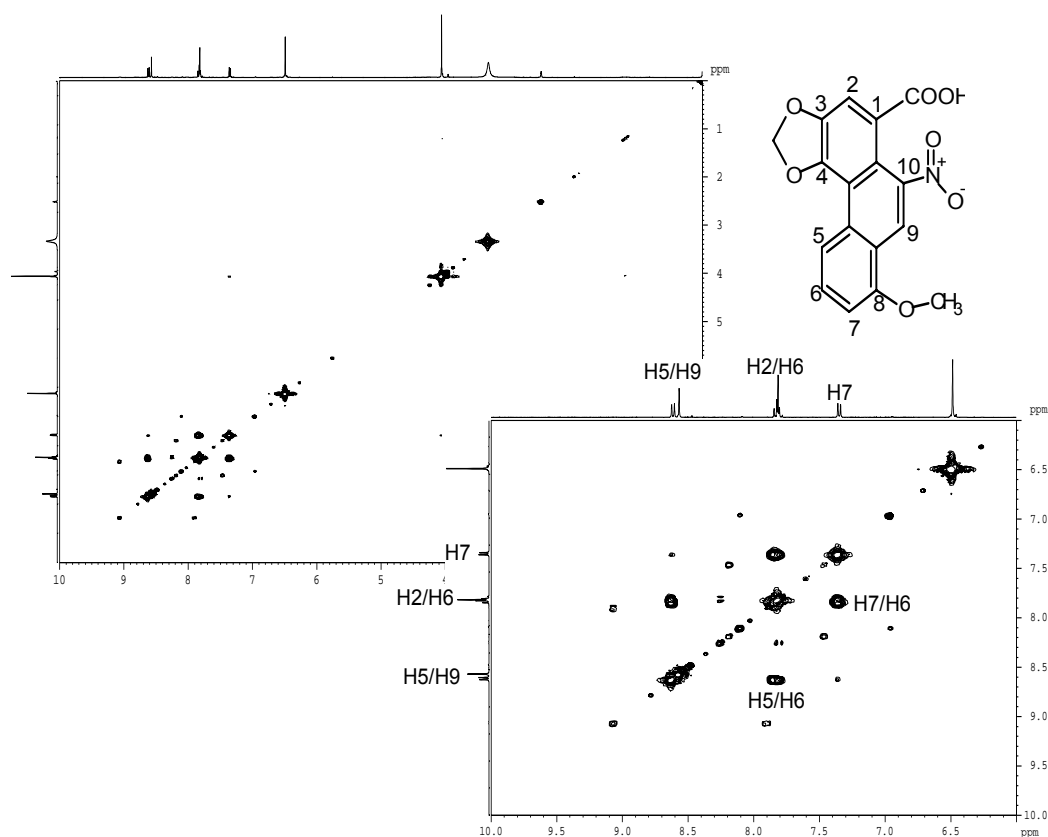


Figura IV-15. Mapa de contornos COSY de AE14 (400 MHz; DMSO- d_6).

A Figura IV-16 apresenta o mapa de contornos HMBC de AE14. O sinal de hidrogênio em δ_H 4,05 (CH₃O) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 156,1 (C-8). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,48 (O-CH₂-O) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 145,9 (C-3) e 145,6 (C-4). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,34 (H-7) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 118,3 (C-5) e 118,7 (C-8a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,80 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 116,7 (C-1), 145,9 (C-3), 145,6 (C-4) e 167,5 (CO₂H). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,83 (H-6) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 156,1 (C-8). O sinal de hidrogênio em δ_H 8,56 (H-9) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 156,1 (C-8), 145,6 (C-4), 129,7 (C-10a) e 117,1 (C-4b). O sinal de hidrogênio em δ_H 8,61 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 118,7 (C-5) e 108,7 (C-7). Essas correlações HMBC estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóxico I.

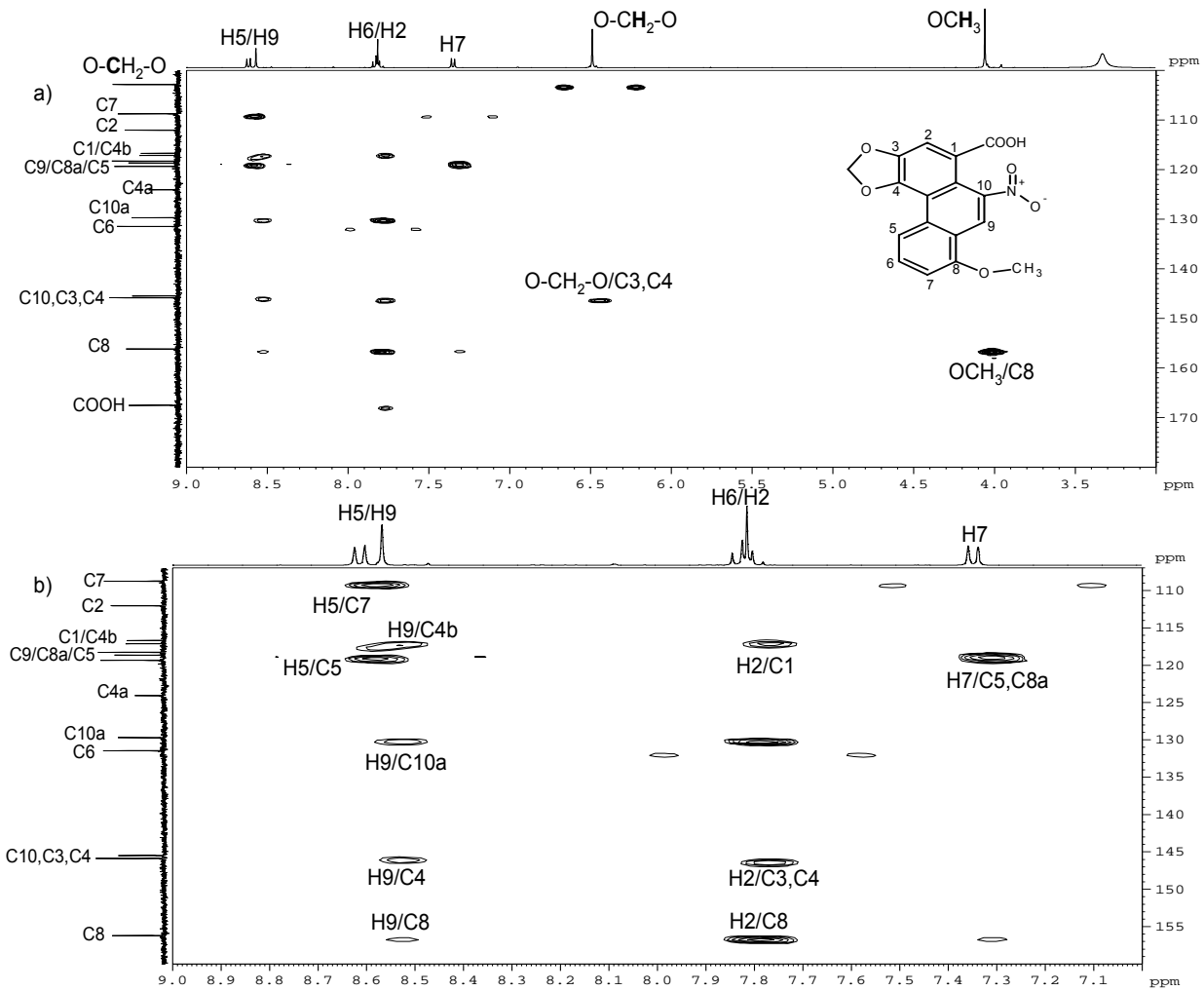


Figura IV-16. Mapa de contornos HMBC (a) e expansão correspondente (b) de AE14 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, DMSO- d_6).

A Figura IV-17 apresenta o mapa de contornos NOESY de CE20. O sinal em δ_{H} 4,05 (-OCH₃) correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 8,56 (H-9) e 7,34 (H-7). O sinal em δ_{H} 7,83 (H-6) correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 7,34 (H-7) e 8,61 (H-5). Essas correlações NOESY estão de acordo com a estrutura do Ácido Aristolóchico I.

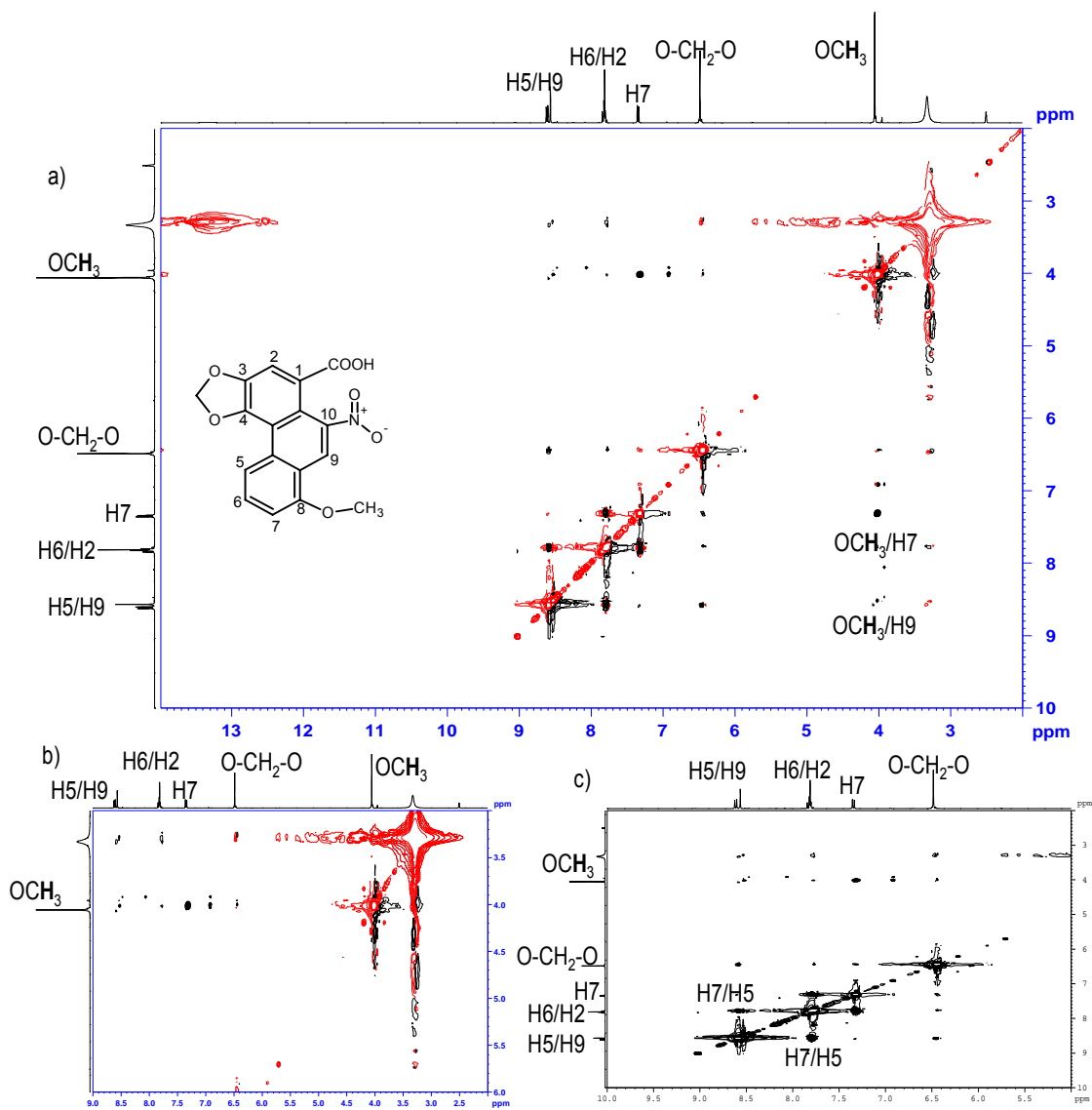


Figura IV-17. Mapa de contornos NOESY (a) e expansões (b) e (c) de AE14 (400 MHz; DMSO- d_6).

3. Análise estrutural de CE36 (AE15-s)

O grupo CE36 foi recristalizado em MeOH, fornecendo um sólido (345,8 mg; p.f. 279,9 a 292,8 °C), denominado por AE15-s e a água-mãe AE15-l.

A análise elementar de AE15-s forneceu os dados mostrados na tabela IV-4. As porcentagens relativas dos elementos correspondem a uma fórmula mínima próxima a C_5H_9O .

Tabela IV. Resultados de análise elementar de AE15-s

	% C	% H	% O
Valores Experimentais	70,55	10,36	19,09
Valores Calculados	72,91	10,41	16,67

A Figura IV-18 apresenta o espectro de absorção na região do IV de AE15-s (CE36-s). A banda larga em 3377 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento de O–H apresentando ligação de hidrogênio. As bandas entre 2950 e 2867 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–H de grupos alifáticos. As bandas registradas em 1461 e 1366 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–C e deformações angulares de C–H de grupos alquilas. As bandas entre 1100 e 1000 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–O. Estas bandas estão de acordo com a estrutura do β -sitosterol-D-glicopiranosídeo.

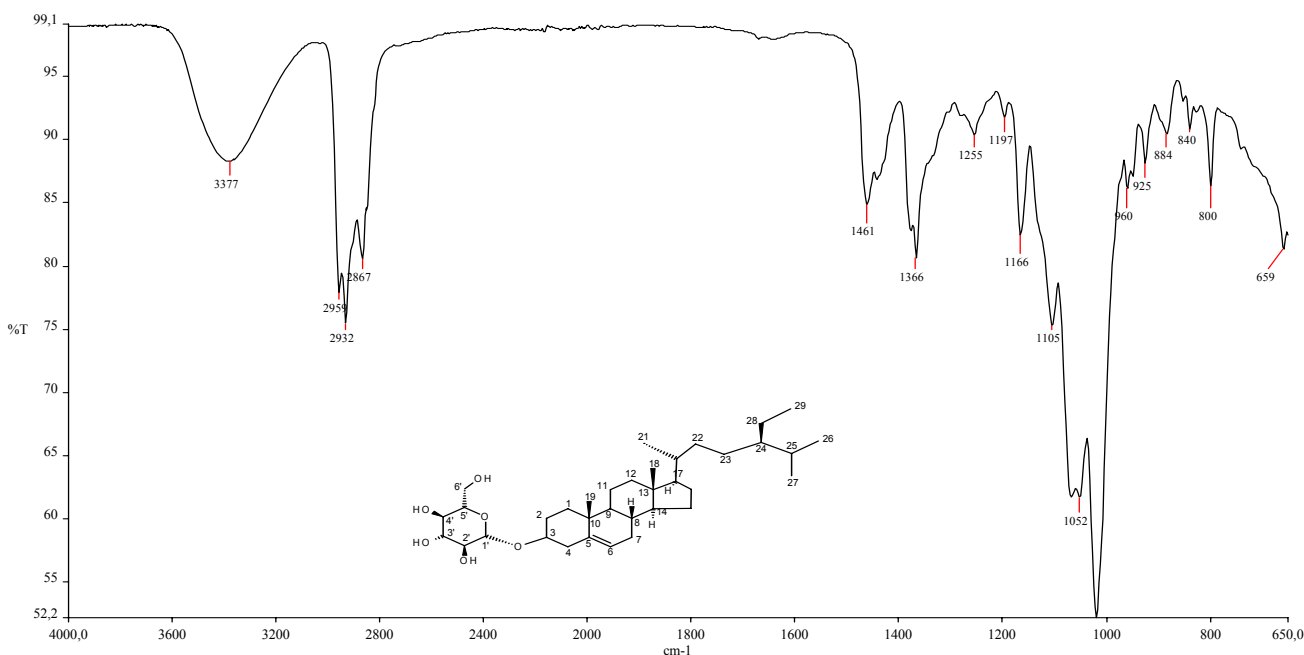


Figura IV-18. Espectro de absorção na região do IV de CE36-s.

As Figuras IV-19 e IV-20 mostram respectivamente o espectro de RMN de ^1H e ampliações correspondentes de AE15-s. O sinal largo em δ_{H} 5,20, correspondente a um hidrogênio, pode ser atribuído a H-5 do esqueleto do β -sitosterol. Os sinais entre δ_{H} 4,8 e 4,2 podem ser atribuídos aos hidrogênios hidroxílicos e os sinais entre δ_{H} 3,7 e 2,8 podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos hidroxilados, todos do anel D-glicopiranosídeo. Os demais sinais, registrados entre δ_{H} 2,5 e 0,6, podem ser atribuídos aos átomos de hidrogênio do β -sitosterol. Todos os sinais de RMN de ^1H estão de acordo com a estrutura de β -sitosterol-D-glicopiranosídeo, cujas atribuições são apresentadas na tabela IV-5.

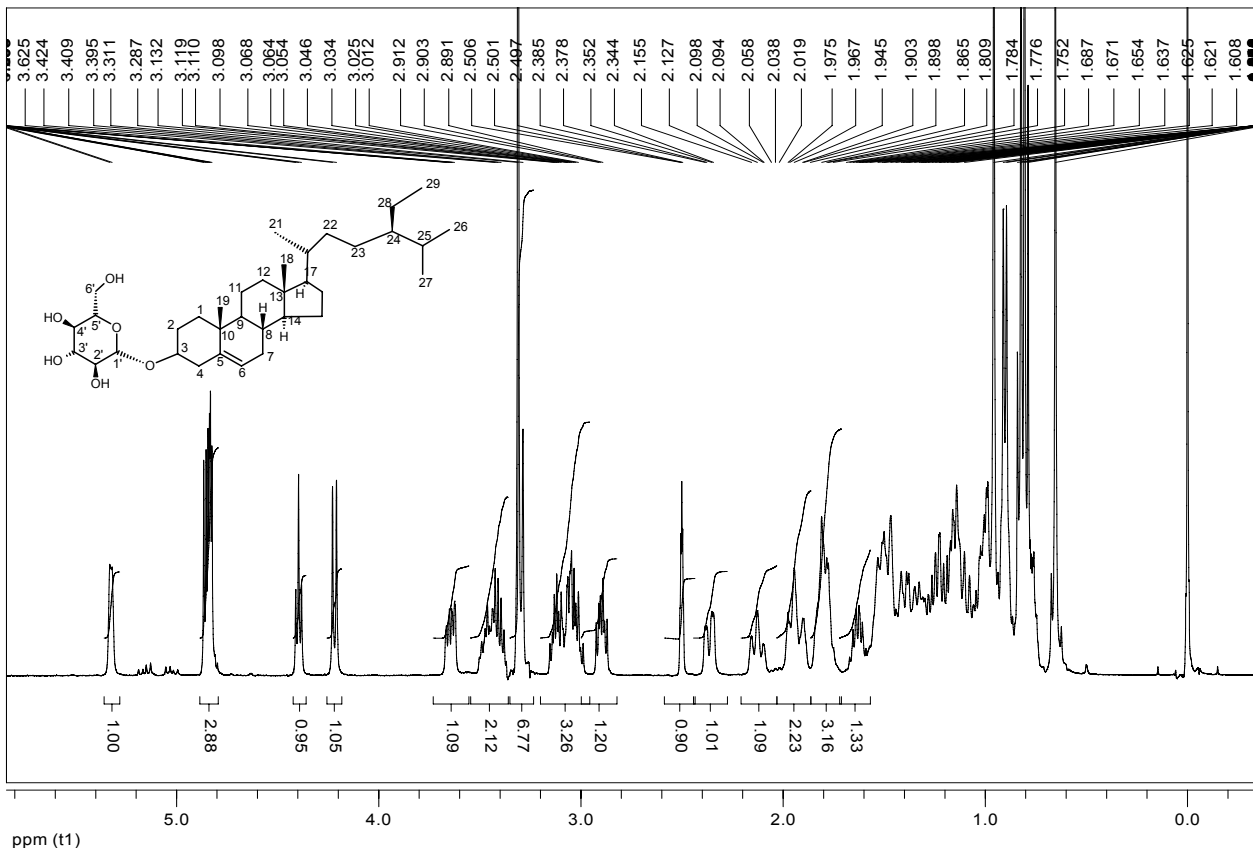


Figura IV-19. Espectro de RMN de ^1H de CE36 (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

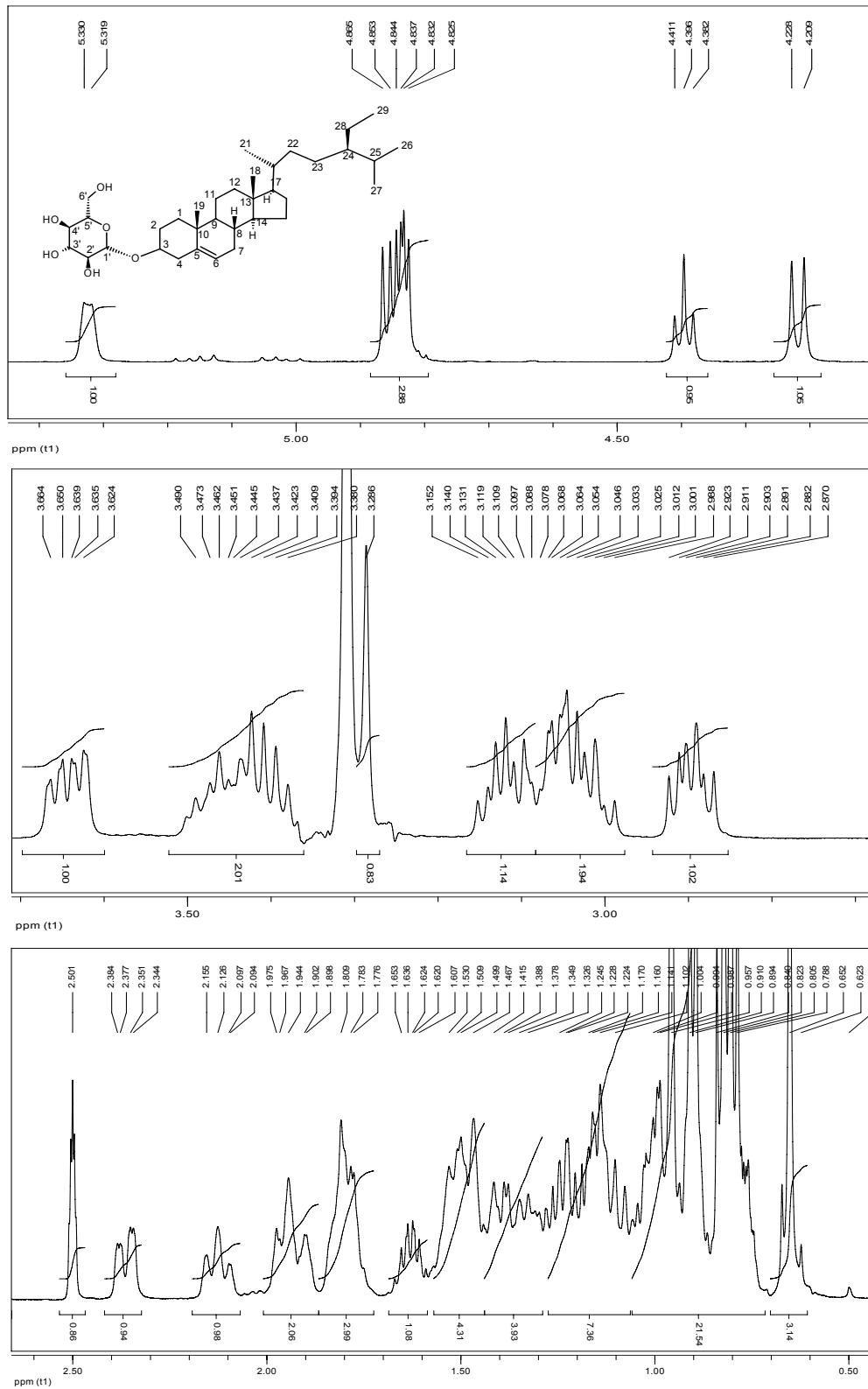


Figura IV-20. Ampliações do espectro de RMN de ^1H de CE36 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV-21 mostra o espectro de RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de AE15-s. Os sinais em δ_{C} 140,5 e 121,2 são respectivamente característicos dos carbonos C-5 e C-6 do β -sitosterol. A Tabela IV-5 apresenta as atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de AE15-s, corroboradas pelas correlações HSQC apresentadas na Figura IV-22.

Tabela IV-2. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de AE15-s

Carbono	AE15-s (δ_{C})	Literatura ¹⁶¹ (δ_{C})	Hidrogênio (δ_{H})
1	36,8	37,0	0,95/1,79
2	31,3	29,4	
3	76,5	76,9	
4	41,8	39,8	-----
5	140,5	140,3	-----
6	121,2	121,3	5,32
7	31,3	31,5	
8	31,4	31,6	
9	49,6	49,8	0,89
10	36,2	36,1	-----
11	20,6	20,7	
12	39,2	38,5	2,12/2,36
13	41,8	41,7	-----
14	56,3	56,3	0,95
15	24,9	24,1	
16	27,8	27,9	1,22/1,78
17	55,3	55,6	
18	11,7	11,8	0,65
19	19,1	19,1	
20	35,5	35,6	
21	18,6	19,2	
22	33,4	33,5	
23	25,5	25,6	
24	45,2	45,3	
25	28,7	28,9	1,63
26	19,8	19,8	
27	18,6	18,8	
28	22,6	22,8	
29	11,9	11,9	
30			
1'	100,8	101,0	4,21
2'	76,8	77,0	
3'	76,9	77,1	
4'	70,1	70,3	3,03
5'	73,5	73,7	2,90
6'	61,1	61,3	

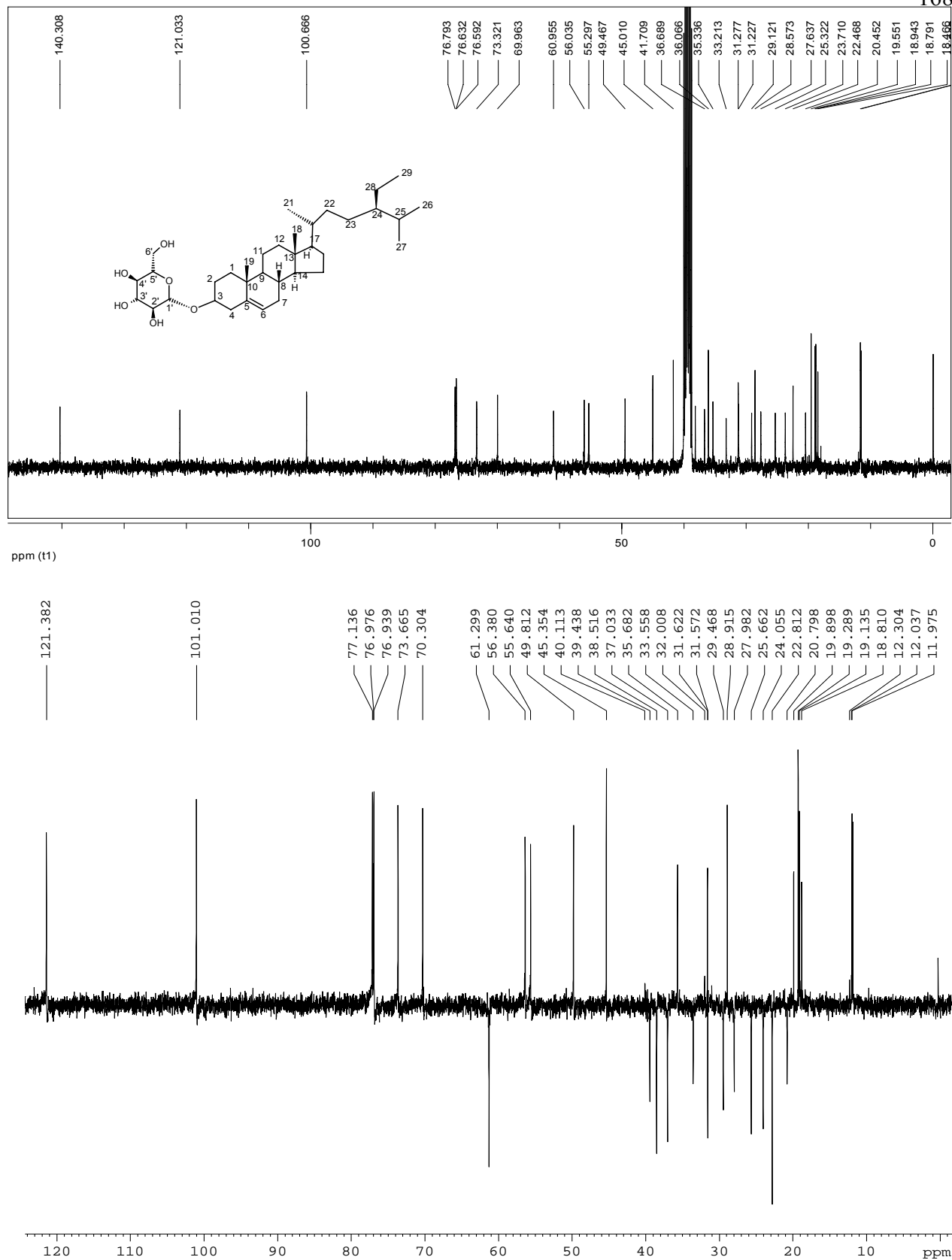


Figura IV-21. Espectro de RMN de ^{13}C (superior) e subespectro DEPT 135° (inferior) de CE36 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

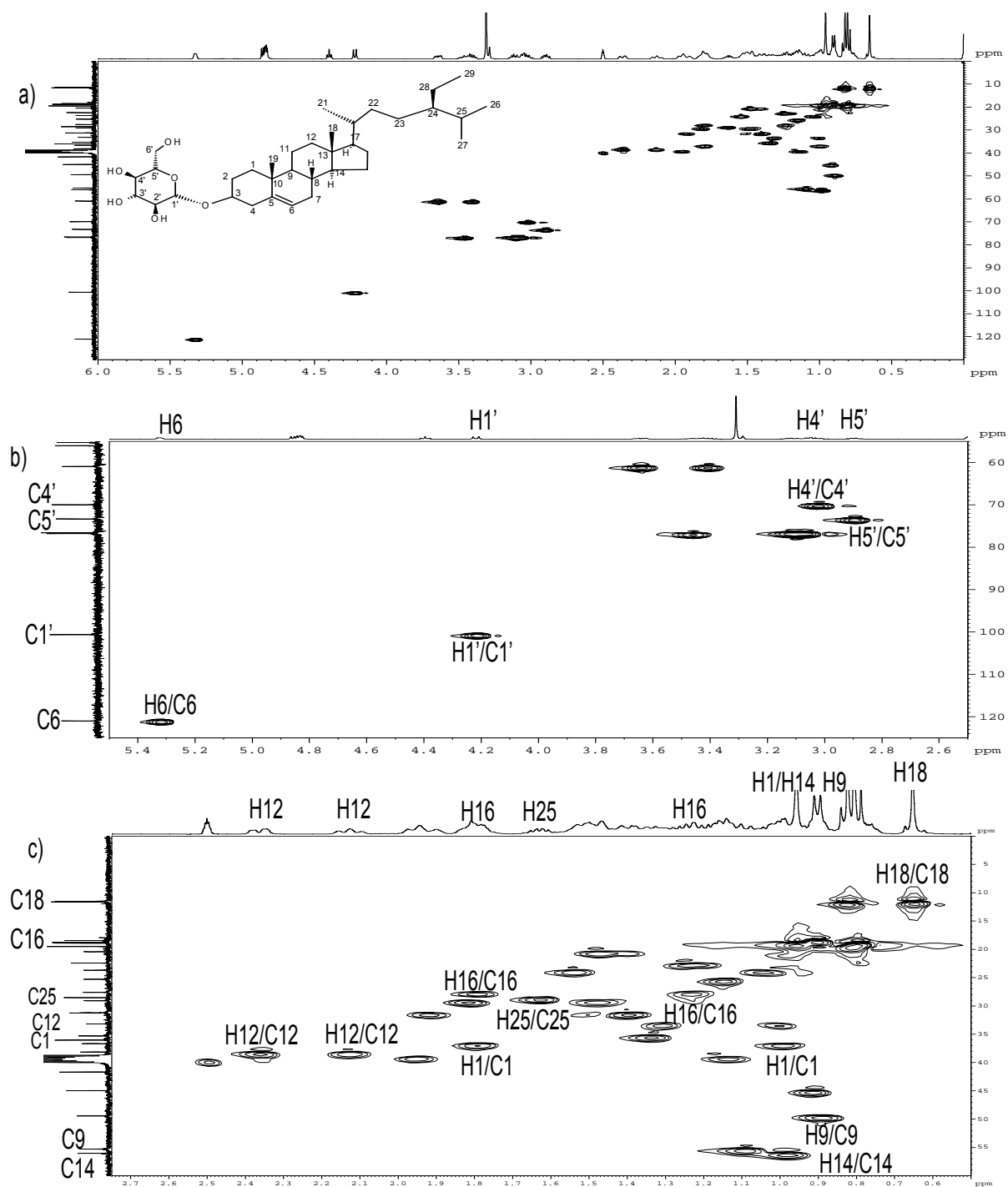


Figura IV-22. Mapa de contornos HSQC (a) e expansões (b) e (c) de CE36 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV-23 apresenta o mapa de contornos COSY de CE36-s. O sinal em δ_H 4,21 (H-1') correlaciona-se com o sinal em δ_H 2,90 (H-5'). O sinal em δ_H 4,40 correlaciona-se com o sinal em δ_H 3,40. O sinal em δ_H 1,94 correlaciona-se com o sinal em δ_H 5,32 (H-6). O sinal em δ_H 5,32 (H-6) correlaciona-se com o sinal em δ_H 1,90.

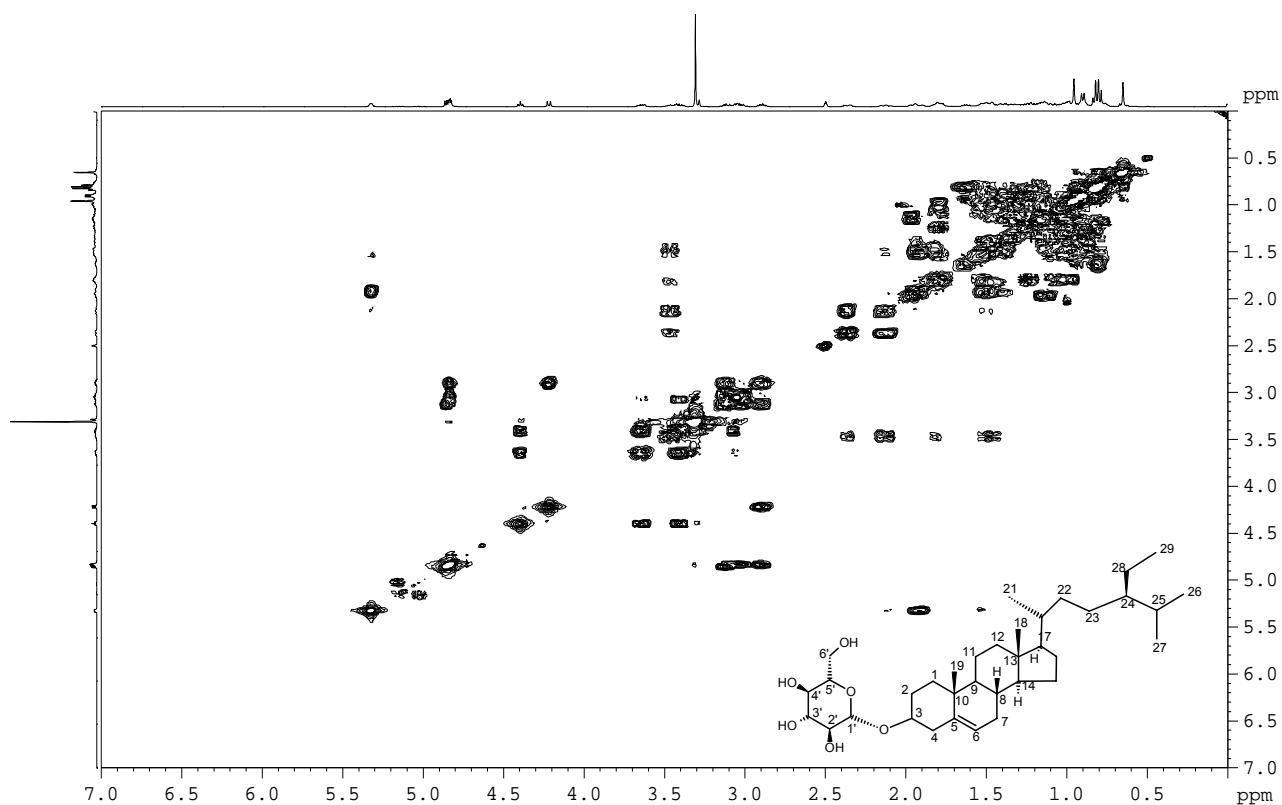


Figura IV-23. Mapa de contornos COSY de CE36 (400 MHz, DMSO- d_6).

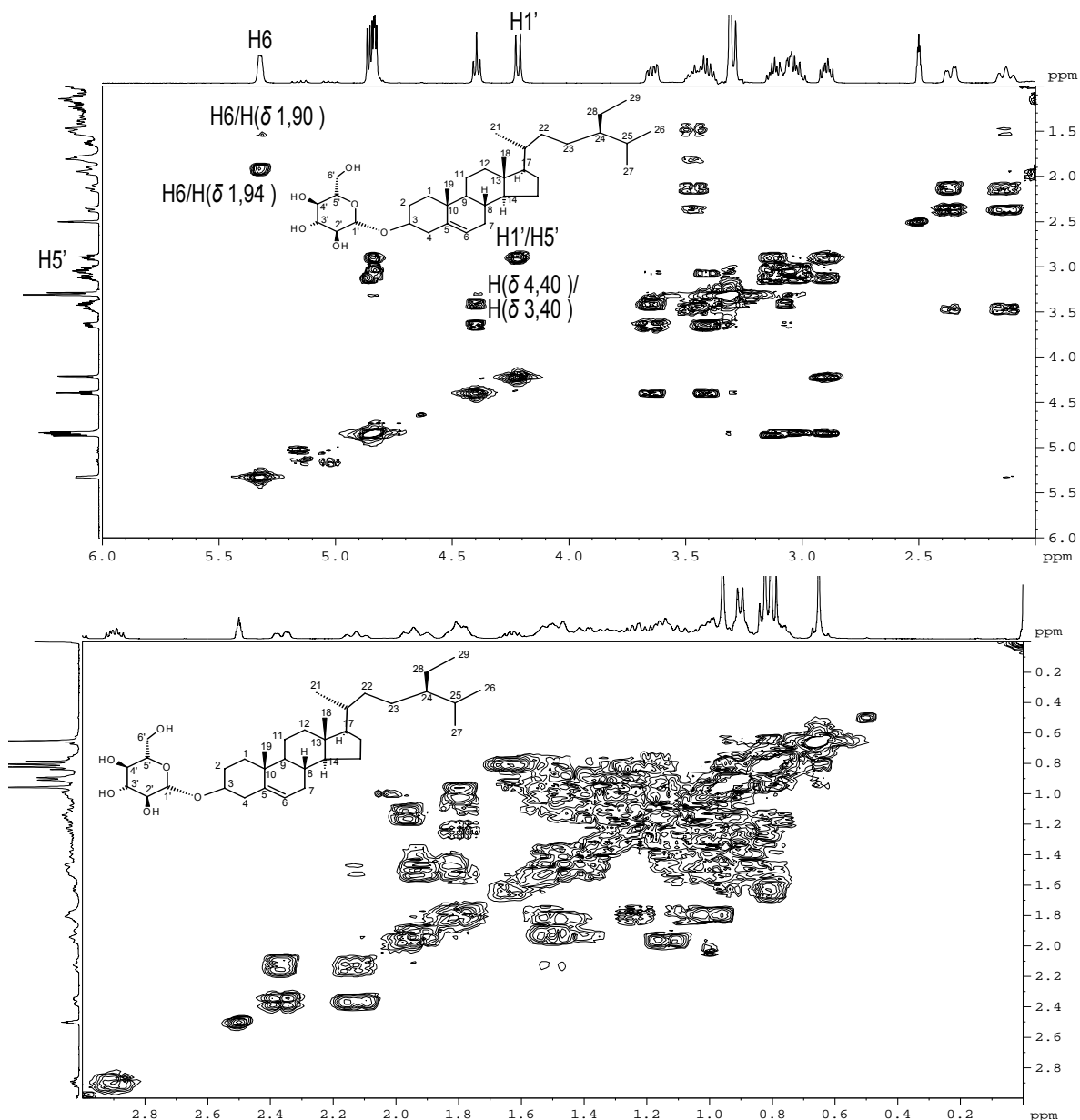


Figura IV-24. Ampliações do mapa de contornos COSY de CE36-s (400 MHz, DMSO- d_6).

As Figuras IV-25 e IV-26 apresentam o mapa de contornos HMBC de CE36-s. O sinal de hidrogênio em δ_H 4,21 (H-1') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 76,9 (C-3'). O sinal de hidrogênio em δ_H 0,95 (H-1) correlaciona-se com os sinal de carbono em δ_C 49,6 (C-9). O sinal de hidrogênio em δ_H 0,65 (H-18) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 55,3 (C-17) e 56,3 (C-14). O sinal de hidrogênio em δ_H 5,32 (H-6) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 31,4 (C-8) e 36,2 (C-10). Essas correlações HMBC estão de acordo com a estrutura de AE15.

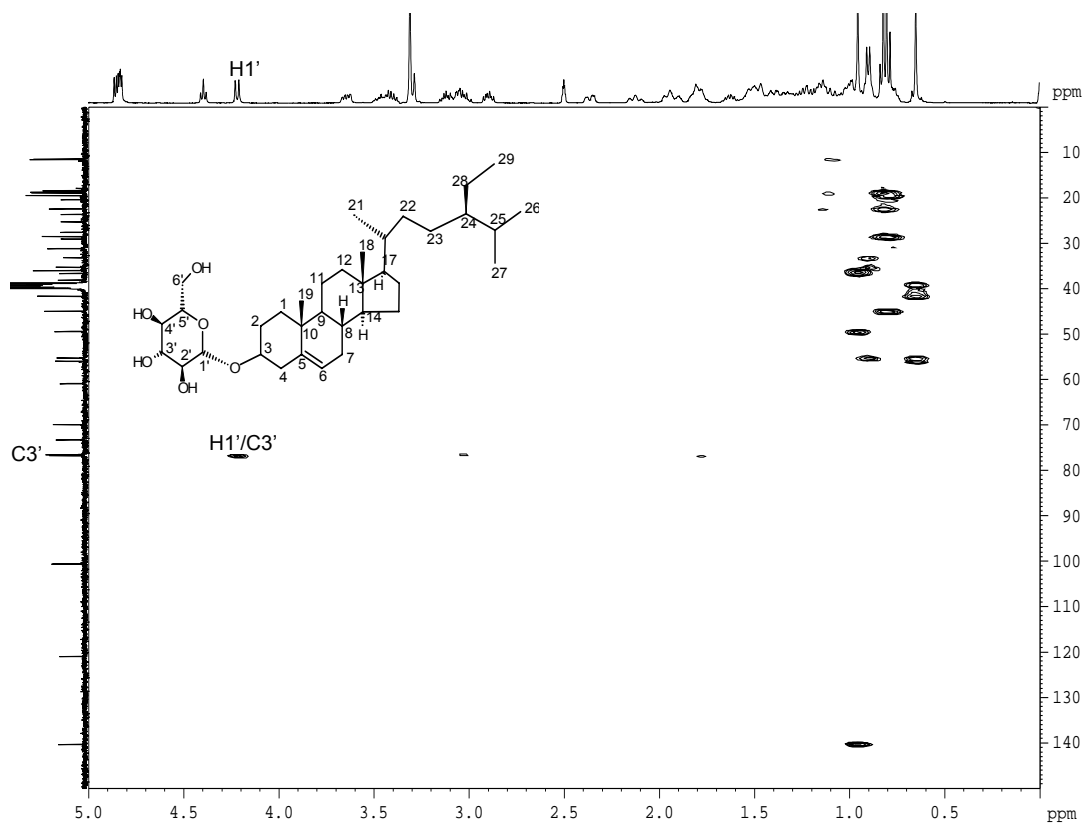


Figura IV-25. Mapa de contornos HMBC de CE36 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

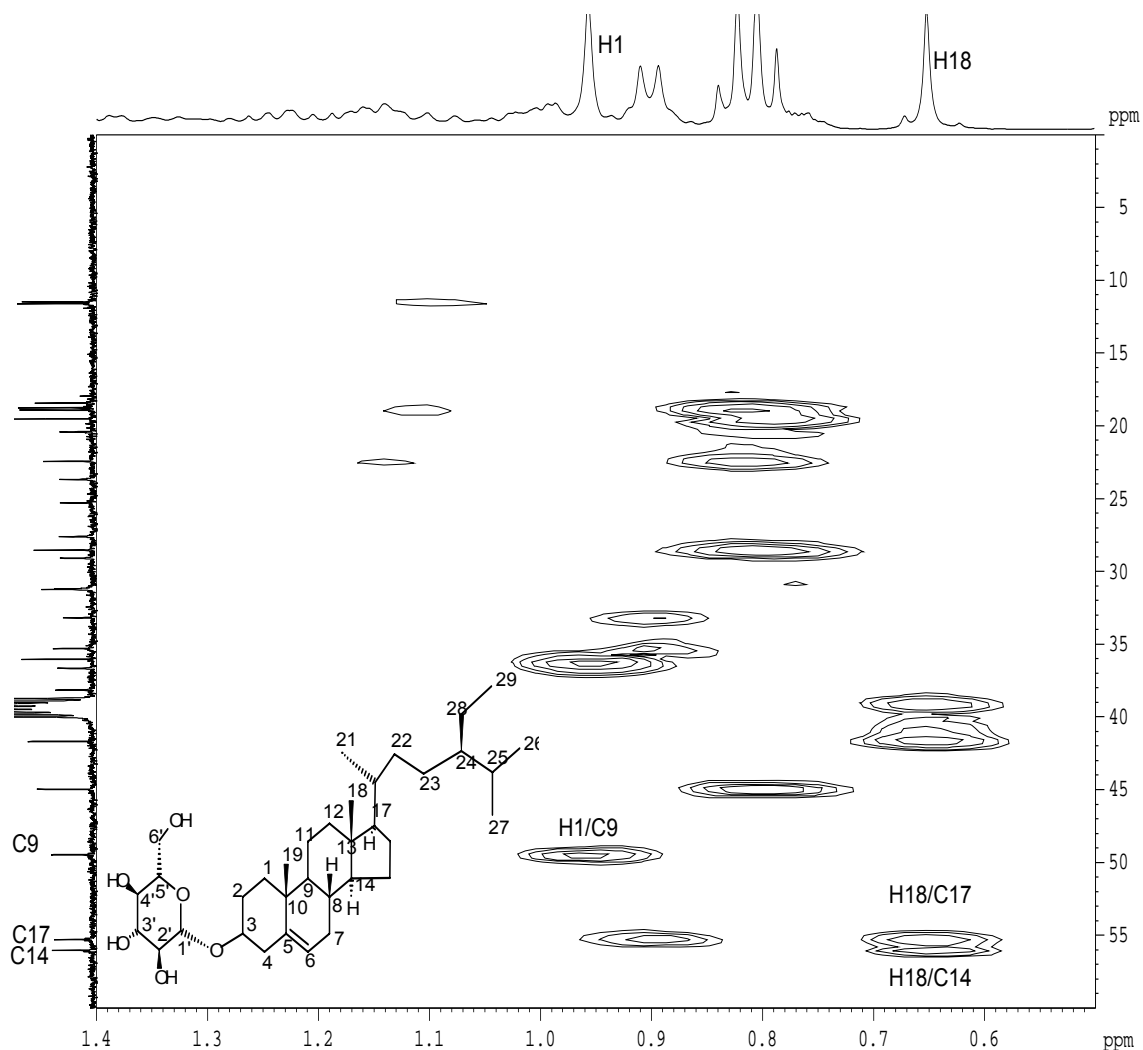


Figura IV-26. Ampliação do mapa de contornos HMBC de CE36 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).

As Figuras IV-27 e IV-28 (p. 174) apresentam o mapa de contornos NOESY de CE36-s. O sinal em δ_{H} 1,90 correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 5,32 (H-6). O sinal em δ_{H} 3,40 correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 4,21 (H-1') e 4,40. O sinal em δ_{H} 3,10 correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 4,40. Essas correlações NOESY estão de acordo com a estrutura de AE15.

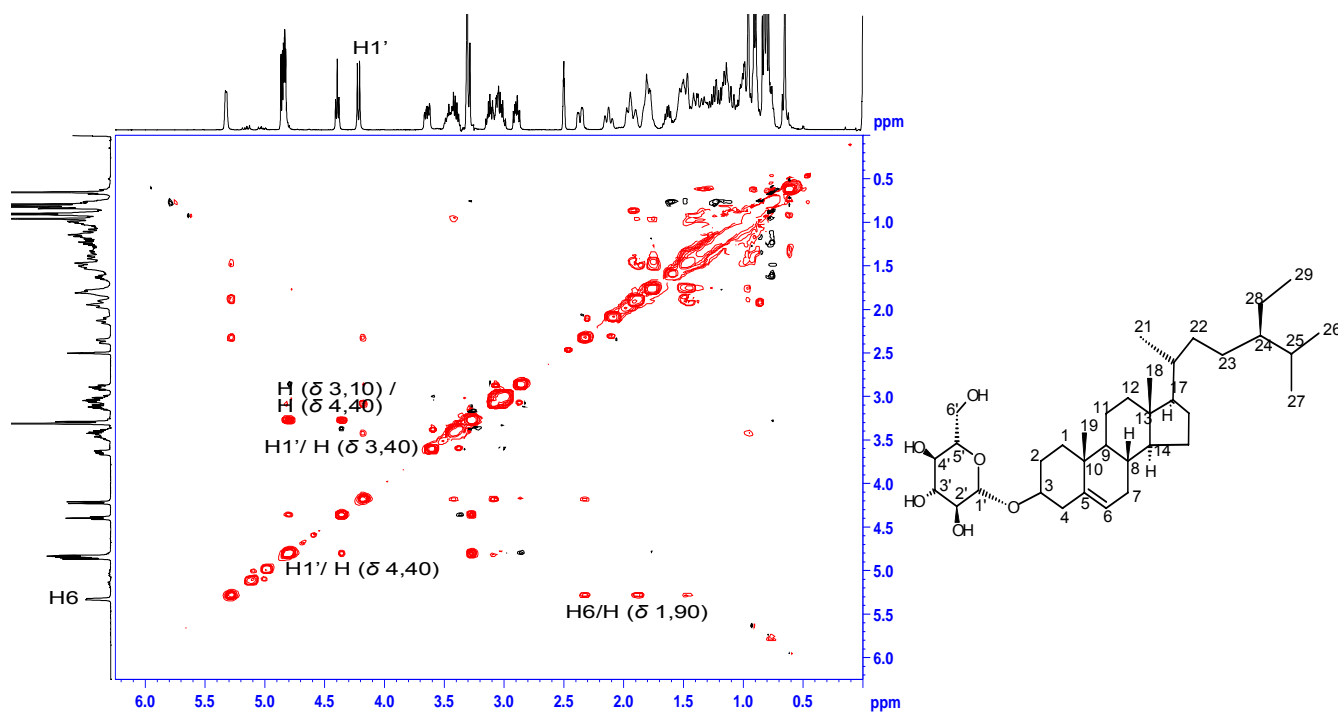


Figura IV-27. Mapa de contornos NOESY de CE36-s (^1H : 400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

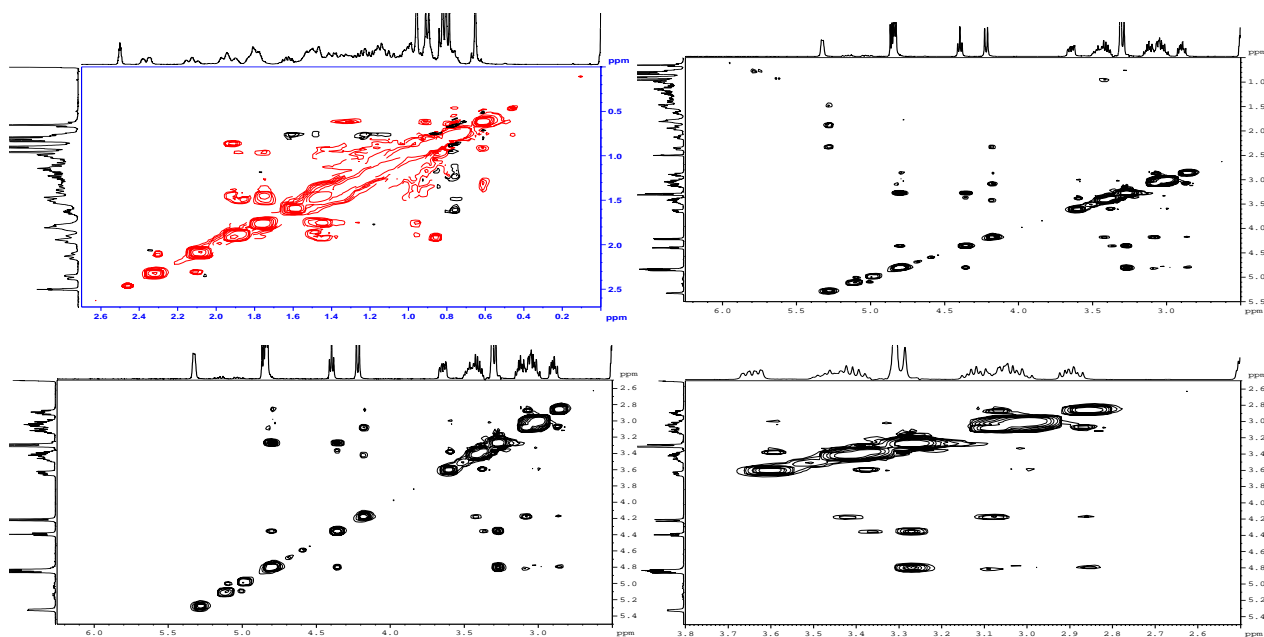


Figura IV-28. Ampliações do mapa de contornos NOESY de CE36-s (^1H : 400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

4. Análise estrutural de AE15-1

O grupo AE15-1 foi submetido a análise por CG/EM. A Figura IV-29 apresenta o cromatograma de AE15-1. Dois picos em $t_R = 50,033$ e $51,449$ min apresentam-se em maiores proporções relativas.

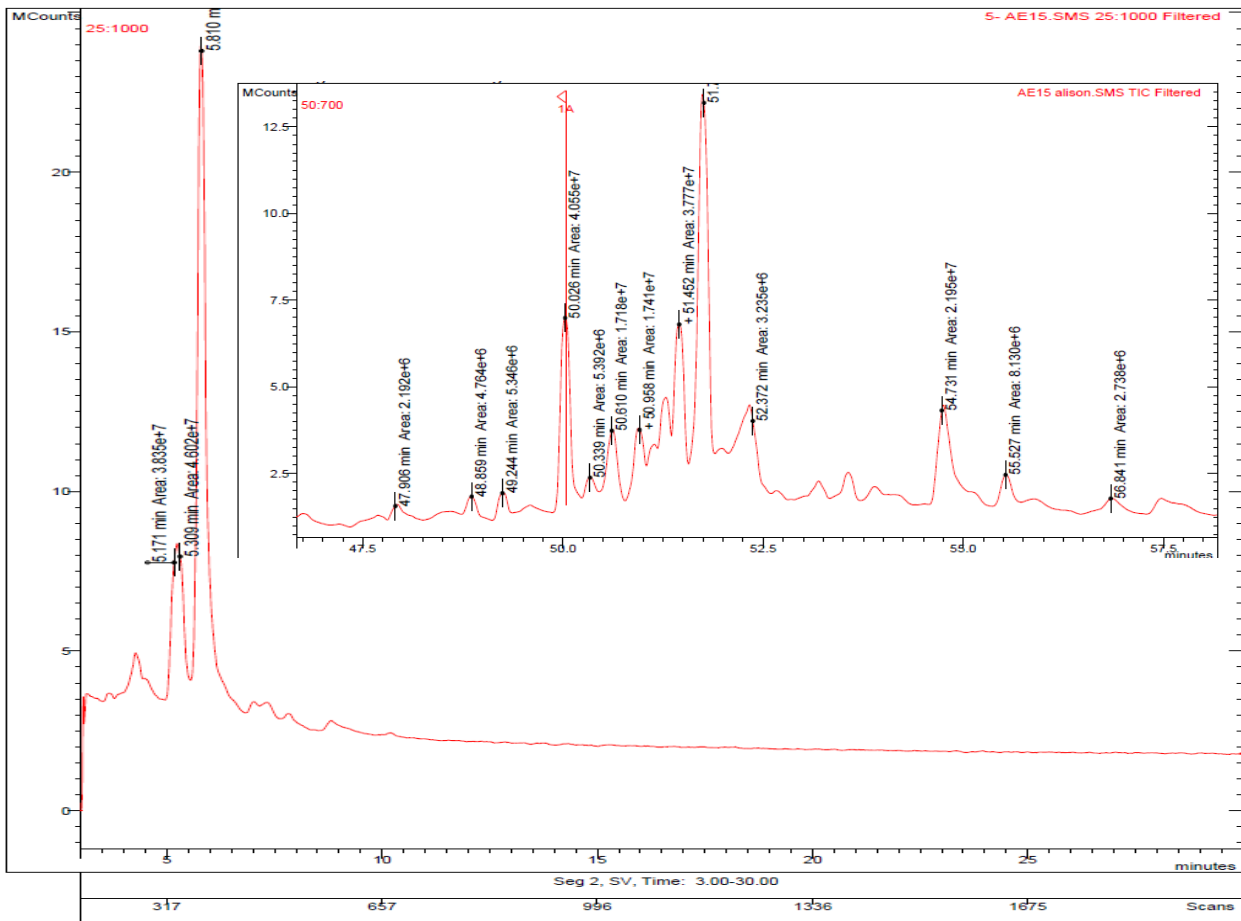


Figura IV-29. Cromatograma de CG de AE15-1 (coluna 100% polidimetilsiloxano – crosslink 30 m x 0,25 mm, a temperatura de 50 °C por 3 min seguido de aquecimento a 5 °C/min, 300°C, injetor: 300°C, split 1:15, fluxo:1 mL/min/He, detector:300°C)

As Figuras III-30 a III-32 apresentam os espectros de massas dos principais constituintes representados nos picos do cromatograma de CG de AE15-1, com sugestões de estrutura a partir do banco de dados NIST (2005). Esses resultados indicam que AE15-1 apresenta-se como uma mistura complexa, contendo: acetato de β -sitosterol ($t_R = 4,320$ min), 24-metil-5-colestene-3-ol ($t_R = 5,232$ min), γ -sitosterol ($t_R = 5,821$ min), estigmastan-3,5-dieno ($t_R = 50,033$ min), acetato de (3 β ,24R)-ergost-5-en-

3-ol ($t_R = 50,625$ min), estigman-3,5,22-trieno ($t_R = 50,936$ min) e 7-deidridiosgenin ($t_R = 51,449$ min).

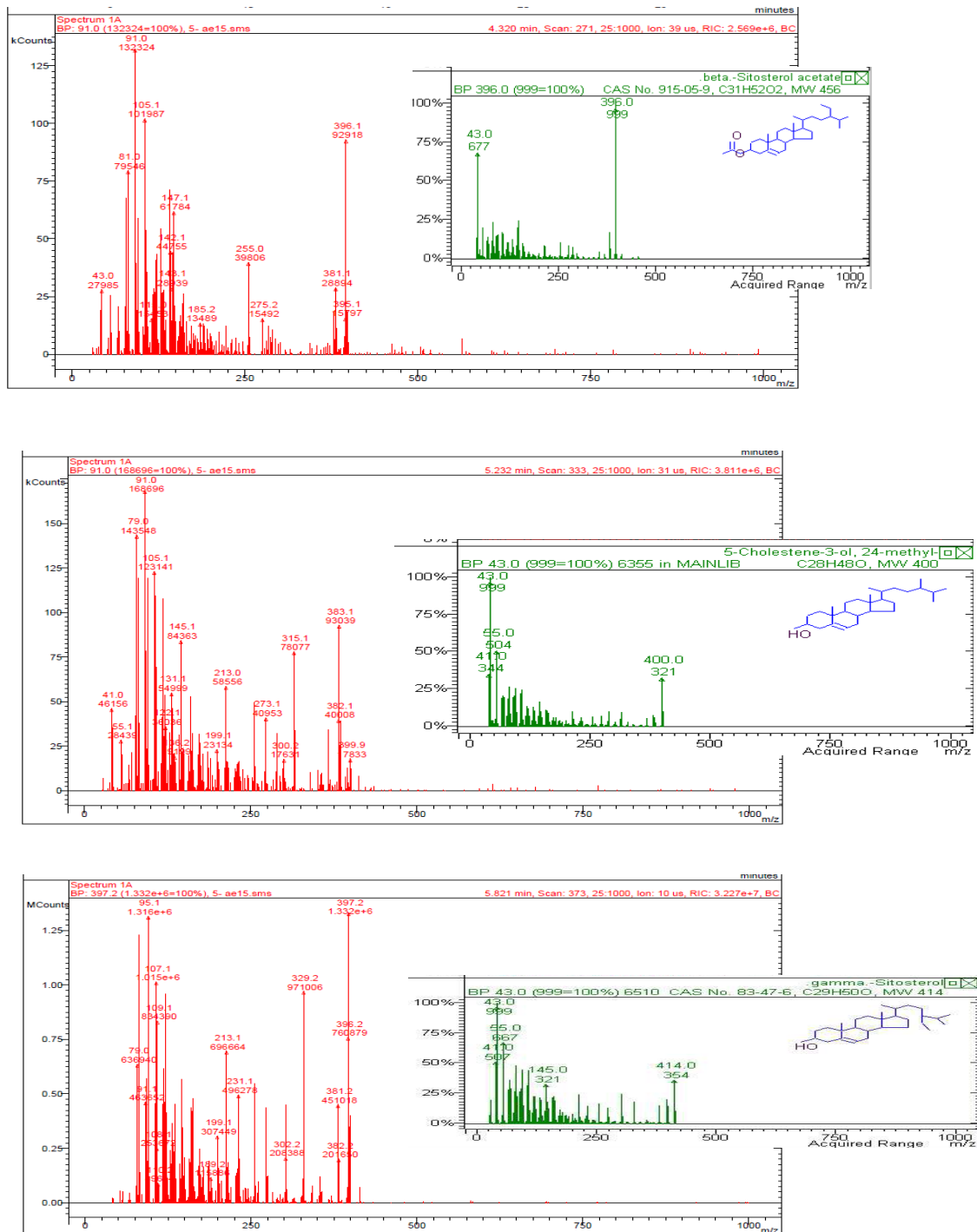


Figura IV-30. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 4,320$; $5,232$; e $5,821$ min do cromatograma de AE15-l (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V; corrente do filamento de 10 uAmps; vácuo interno de 8 uTorr; Interface: 300°C, ion trap: 150°C, manifold: 45°C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).

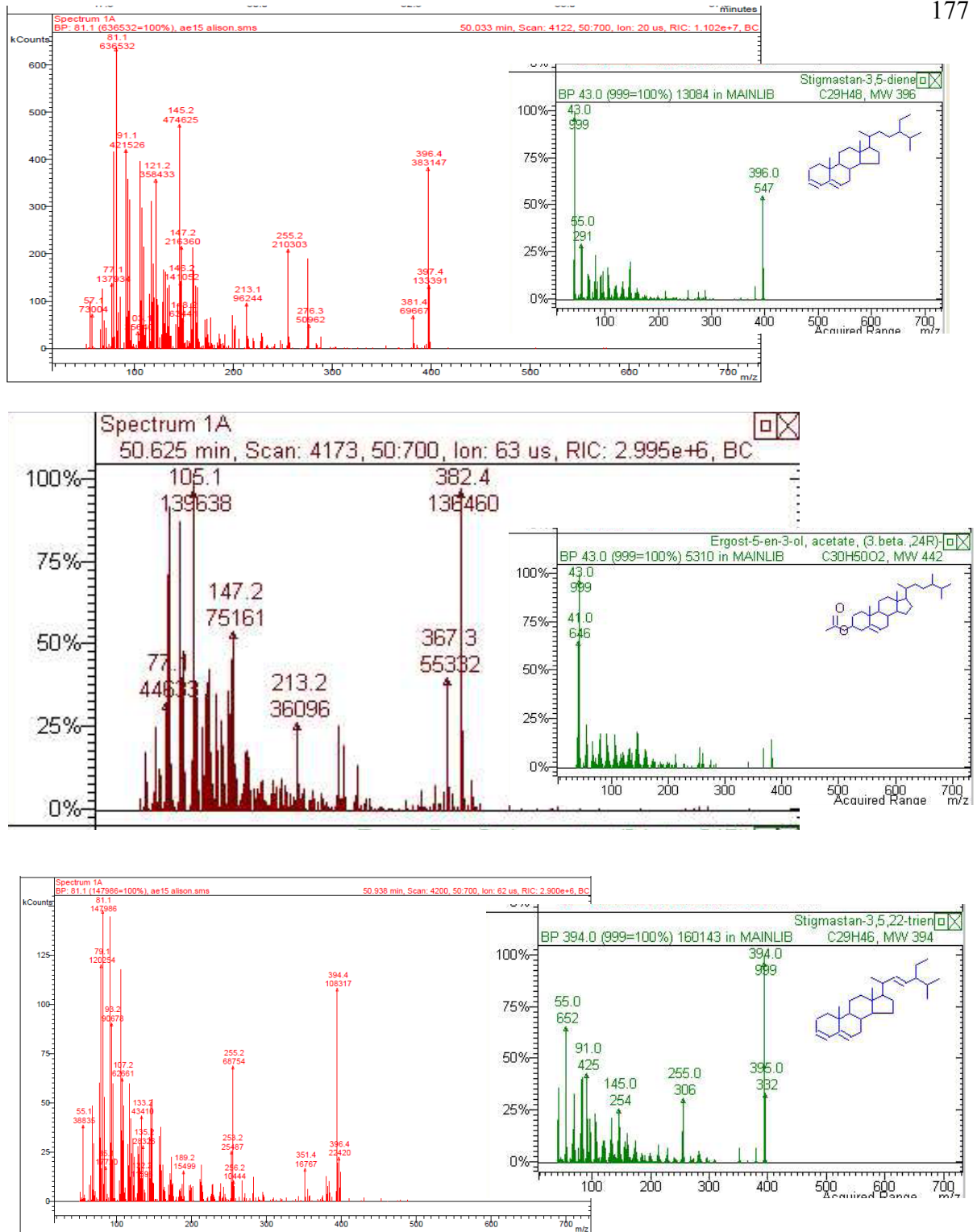


Figura IV-31. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 50,033$; $50,625$; e $50,936$ min do cromatograma de AE15-1 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr. Interface: 300°C, ion trap: 150°C, manifold: 45°C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).

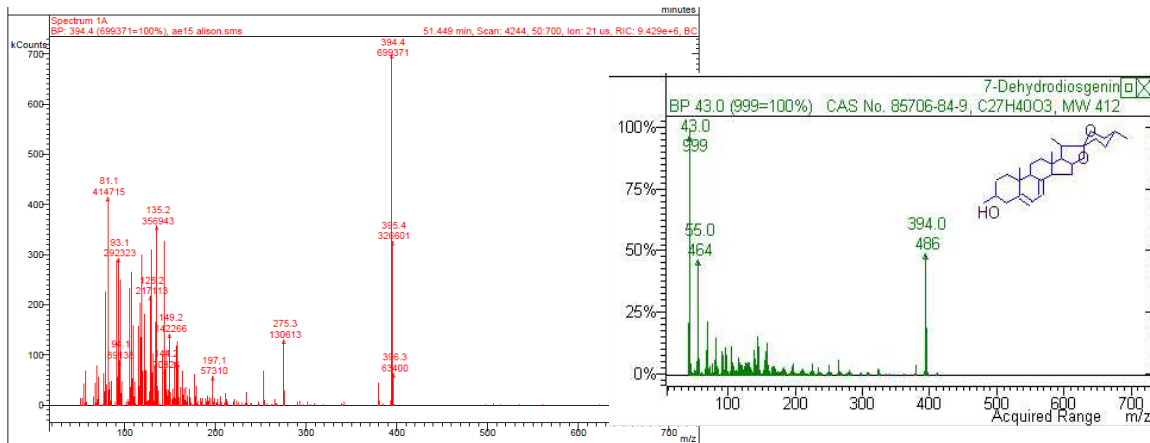


Figura IV-32. Espectro de Massas dos constituintes com $t_R = 51,449$ min do cromatograma de AE15-1 (Espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, "Targat TIC" 20000 counts, "Max ion time" 25000 useg, eletromultiplicadora a 1500 V e corrente do filamento de 10 uAmps e vácuo interno de 8 uTorr. Interface: 300°C, ion trap: 150°C, manifold: 45°C, Faixa de massas: 45 a 700 uma).

Capítulo V:

Ensaio Biológico de Extratos, Frações e

Fitoconstituintes Isolados de *A. esperanzae*

1. Teste de atividade antibacteriana

O extrato etanólico bruto das cascas do caule de *A. esperanzae* foi submetido aos testes de difusão em ágar e de concentração inibitória mínima, como descrito na parte experimental. A Tabela V-1 apresenta os resultados de testes de atividade antimicrobiana com diferentes espécies de bactérias para o extrato etanólico das cascas do caule. Os testes não indicaram atividade bactericida do extrato etanólico das cascas do caule frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Porém, esse extrato apresentou uma atividade antibacteriana significativamente expressiva frente a *Bacillus cereus*.

Tabela V-1. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição e concentração inibitória mínima do extrato etanólico das cascas do caule de *A. esperanzae* frente a diferentes espécies de bactérias

Bactéria utilizada	Halo de Inibição	CIM/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	---
<i>Bacillus cereus</i>	Positivo	256
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	---
<i>Salmonella typhimurium</i>	Negativo	---

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule foi biomonitorado por testes de atividade antibacteriana. Assim, as frações obtidas pelo fracionamento cromatográfico do extrato etanólico empregando diferentes sistemas eluentes com gradiente crescente de polaridade foram submetidas aos testes de difusão em ágar e de concentração inibitória mínima. A Tabela V-2 apresenta os resultados dos testes de atividade antibacteriana das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule empregando gradiente crescente de polaridade do eluente frente a *Bacillus cereus*.

Tabela V-2. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição e concentração inibitória mínima de frações do extrato etanólico das cascas do caule de *A. esperanzae* frente a *Bacillus cereus*

Grupos	Eluente	Halo de Inibição	CIM/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
1	Hexano	Negativo	---
2	Hexano:Diclorometano (9:1)	Negativo	---
3	Hexano:Diclorometano (3:1)	Negativo	---
4	Hexano:Diclorometano (1:1)	Positivo	512
5	Diclorometano	Positivo	512
6	Diclorometano:Acetato de Etila (1:1)	Negativo	---
7	Diclorometano:Acetato de Etila (1:3)	Negativo	---
8	Acetato de Etila	Negativo	---
9	Acetato de Etila:Etanol (1:1)	Negativo	---
10	Etanol	Negativo	---
11	Metanol	Negativo	---

Os resultados dos testes de atividade bactericida indicam que apenas as frações obtidas do fracionamento cromatográfico das cascas do caule eluídas em hexano:diclorometano (1:1) e diclorometano apresentaram atividade frente a *Bacillus cereus*. No estudo fitoquímico das cascas do caule e do cerne descrito na Parte Experimental, os fitoconstituintes AE1 e AE2 foram isolados a partir dos fracionamentos cromatográficos eluídos em hexano e diclorometano das cascas do caule e do cerne, respectivamente. Assim, esses fitoconstituintes foram submetidos aos testes de difusão em ágar e de concentração inibitória mínima de atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies de bactérias, conforme mostrado na Tabela V-3.

Tabela V-3. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição e concentração inibitória mínima de AE1 e AE2 frente a diferentes espécies de bactérias

AE1		
Bactéria utilizada	Halo de Inibição	CIM/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	---
<i>Bacillus cereus</i>	Positivo	256
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	---
<i>Salmonela typhimurium</i>	Negativo	---
AE2		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	---
<i>Bacillus cereus</i>	Positivo	512
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	---
<i>Salmonela typhimurium</i>	Negativo	---

O extrato das cascas do caule e as amostras AE1 e AE2 foram ativos seletivamente frente a *Bacillus cereus*, o que pode indicar uma pequena atividade de AE1 e AE2 ou que as mesmas apresentem uma seletividade frente aos microorganismos testados. Pode-se inferir que o mecanismo de ação não é por toxicidade mas é determinado por fatores que afetam somente o *Bacillus cereus*. Este resultado é muito importante sob o ponto de vista biológico para o desenvolvimento de antibióticos de curto espectro de ação e mais seletivos.

O extrato das cascas do caule e as duas substâncias foram ativos contra a mesma bactéria. Como ambas as substâncias foram isoladas dos extratos, pode-se propor que o extrato foi muito mais ativo do que as substâncias. Além disso, pode-se inferir que a atividade esteja relacionada ao conjunto de substâncias presentes no extrato (fenômeno chamado de sinergismo) e não somente a uma delas em especial, ou ainda que AE1 e AE2 não seriam as substâncias mais ativas presentes no extrato. Para avaliar a possibilidade de sinergismo entre AE1 e AE2, preparou-se misturas de composições variadas destas substâncias que foram submetidas aos testes de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a bactéria *Bacillus cereus*. A Tabela V-4 apresenta os resultados dos testes de atividade antimicrobiana de misturas de AE1 e AE2 frente a *Bacillus cereus*. Como resultado, pode-se verificar a maior atividade de AE1 frente a *Bacillus cereus*, do que AE2.

Tabela V-4. Resultados de testes microbiológicos de inibição e concentração inibitória mínima de misturas contendo diferentes proporções de AE1 e AE2 frente a *Bacillus cereus*

Proporção AE1/AE2	0,4	1,1	1,9
CIM/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256	512	512

Outras frações e fitoconstituintes isolados no fracionamento cromatográfico eluído em diclorometano foram submetidas também aos testes de difusão em Agar e de concentração inibitória mínima de atividade antimicrobiana. As frações AE15, AE18 e AE37 não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Listeria monocytogenes*, *Candida glabrata* e *Candida albicans*.

A substância AE14 foi submetida aos testes biológicos de halo de inibição e concentração inibitória mínima frente a diferentes espécies de bactérias e fungos. Os resultados são mostrados na Tabela V-5. O fitoconstituente AE14 apresenta atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e principalmente frente a *Listeria monocytogenes*.

Tabela V-5. Resultados de testes microbiológicos de inibição e concentração inibitória mínima de AE14 frente a diferentes espécies de bactérias e fungos

Bactéria utilizada	Halo de Inibição	CIM/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo (23 mm)	256
<i>Bacillus cereus</i>	Negativo	---
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	---
<i>Salmonella typhimurium</i>	Negativo	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	---
<i>Citrobacter freundii</i>	Negativo	---
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positivo (22 mm)	128
<i>Cândida glabrata</i>	Negativo	---
<i>Cândida albicans</i>	Negativo	---

Conclusões

O estudo fitoquímico das cascas do caule de *Aristolochia esperanzae* possibilitou o isolamento e caracterização de um ácido carboxílico alifático (1) e ésteres derivados de ácidos carboxílicos alifáticos saturados e insaturados 2 a 9 mostrados na Figura C-1. Nessa figura é também mostrada a estrutura 10. Todas essas substâncias tiveram suas estruturas sugeridas pela consulta a banco de dados de espectros de massas.

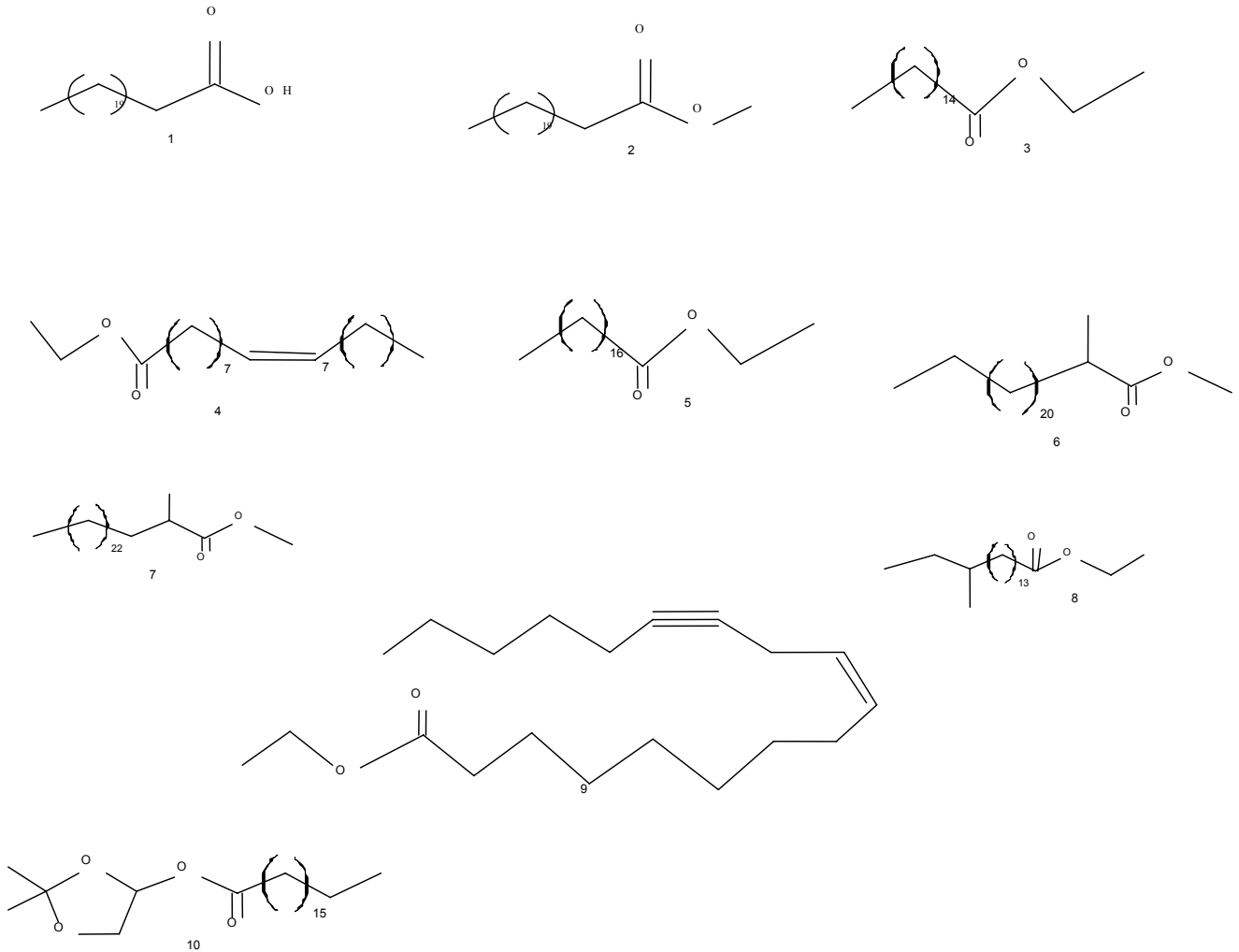


Figura C-1. Fitoconstituintes isolados do extrato das cascas de *A. esperanzae*: ácido carboxílico alifático e ésteres derivados de ácidos carboxílicos alifáticos saturados e insaturados, cujas estruturas foram sugeridas pela consulta a banco de dados de espectros de massas.

Como observado para espécies do gênero *Aristolochia* que apresentam frequentemente compostos terpenoídicos, no caso de *A. esperanzae*, também foram verificados compostos desse tipo. Assim, quatro sesquiterpenos e dois diterpenos foram identificados (Figura C-2). Nessa figura são mostradas também uma amida (16) e uma tioamida (17). Todas essas substâncias foram identificadas pela sugestão do banco de dados de espectros de massas.

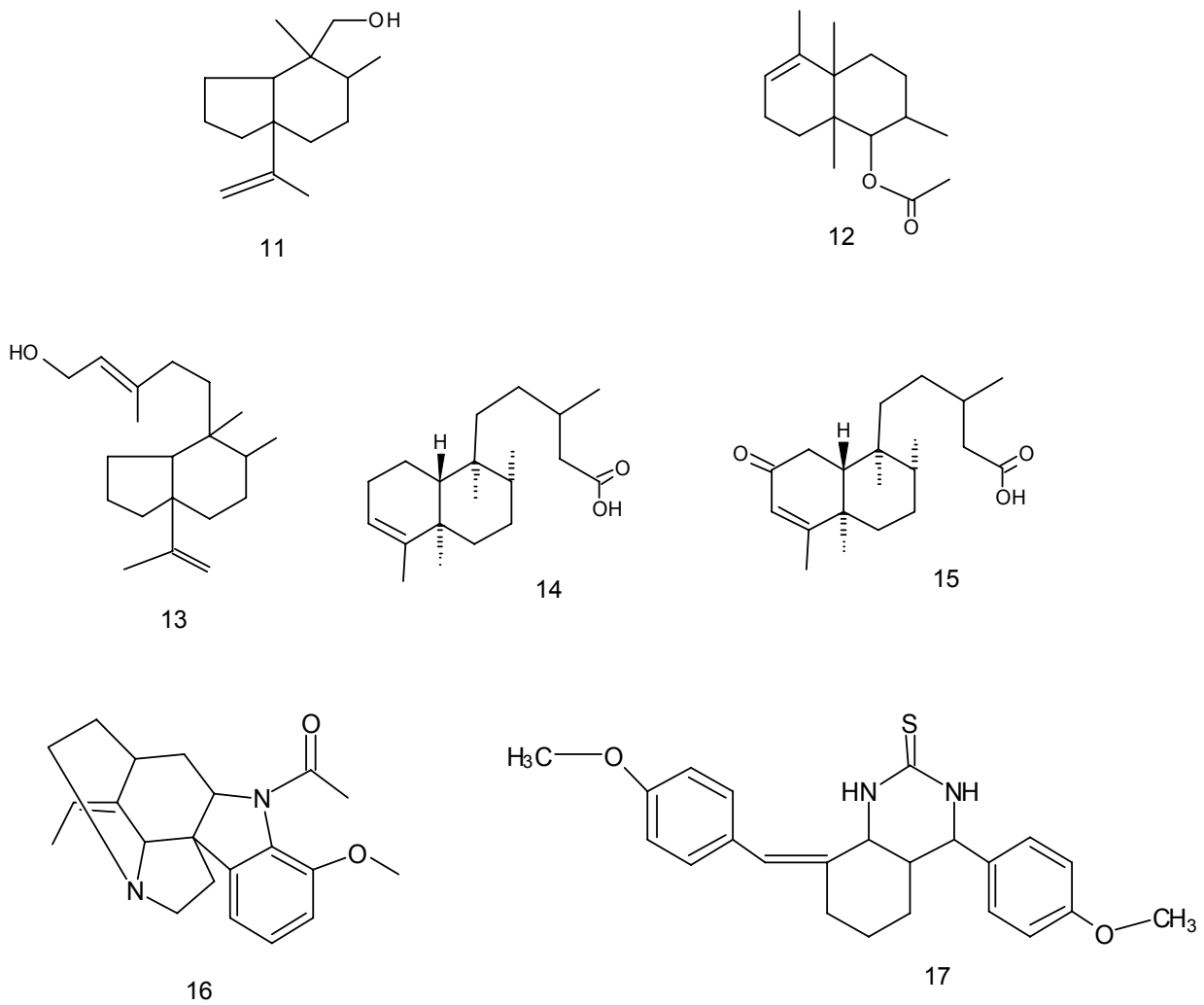


Figura C-2. Fitoconstituintes isolados do extrato das cascas de *A. esperanzae*: quatro sesquiterpenos, dois diterpenos, bem como uma amida e uma tioamida sugeridas pela consulta a banco de dados de espectros de massas.

Além das substâncias apresentadas nas Figuras C-1 e C-2, este trabalho possibilitou a identificação no extrato das cascas do caule de um lignóide (18), um ácido aristolóchico (22) e duas aristolactamas (20 e 21), conforme mostrado na Figura C-3.

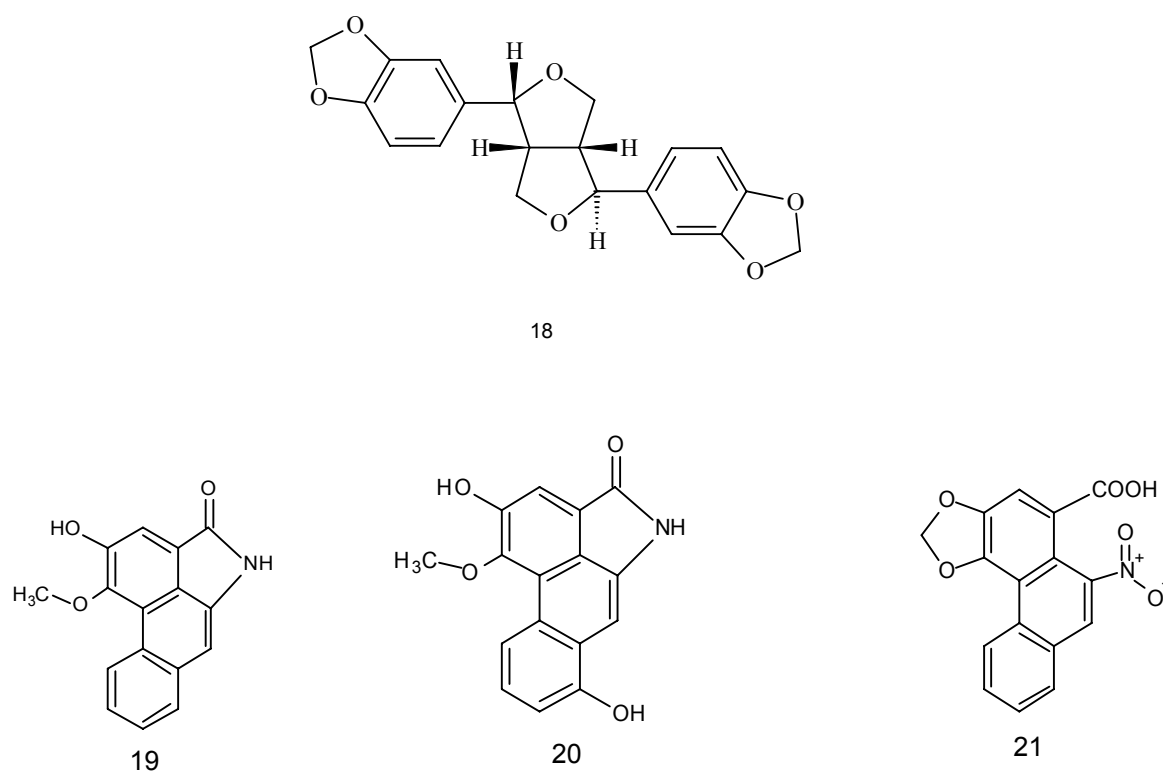


Figura C-3. Fitoconstituintes isolados do extrato das cascas de *A. esperanzae*: um lignóide, um ácido aristolóchico e duas aristolactamas.

O estudo fitoquímico do cerne do caule de *Aristolochia esperanzae* possibilitou o isolamento de um ácido carboxílico alifático e do éster correspondente cujas estruturas foram sugeridas pela consulta a banco de dados de espectros de massas, conforme mostrado na Figura C-4. Nessa figura são mostrados também um lignóide e um ácido aristolóchico isolados no extrato do cerne dessa planta.

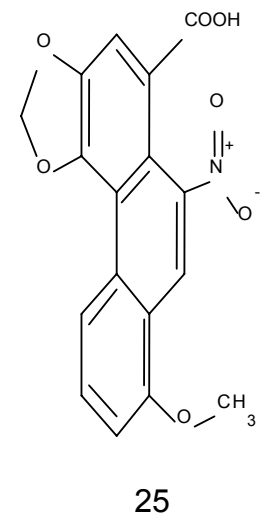
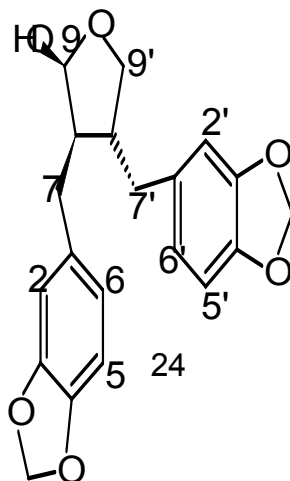
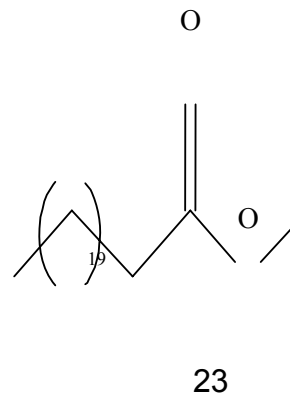
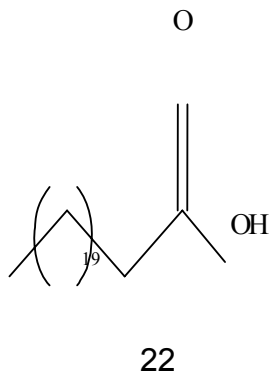


Figura C-4. Fitoconstituintes isolados do extrato do cerne de *A. esperanzae*: um ácido carboxílico alifático e o éster metílico correspondente, além de um lignóide e um ácido aristolóchico.

A Figura C-5 mostra os esteróides isolados do cerne de *A. esperanzae*. Muitos apresentam O-substituição em C-3.

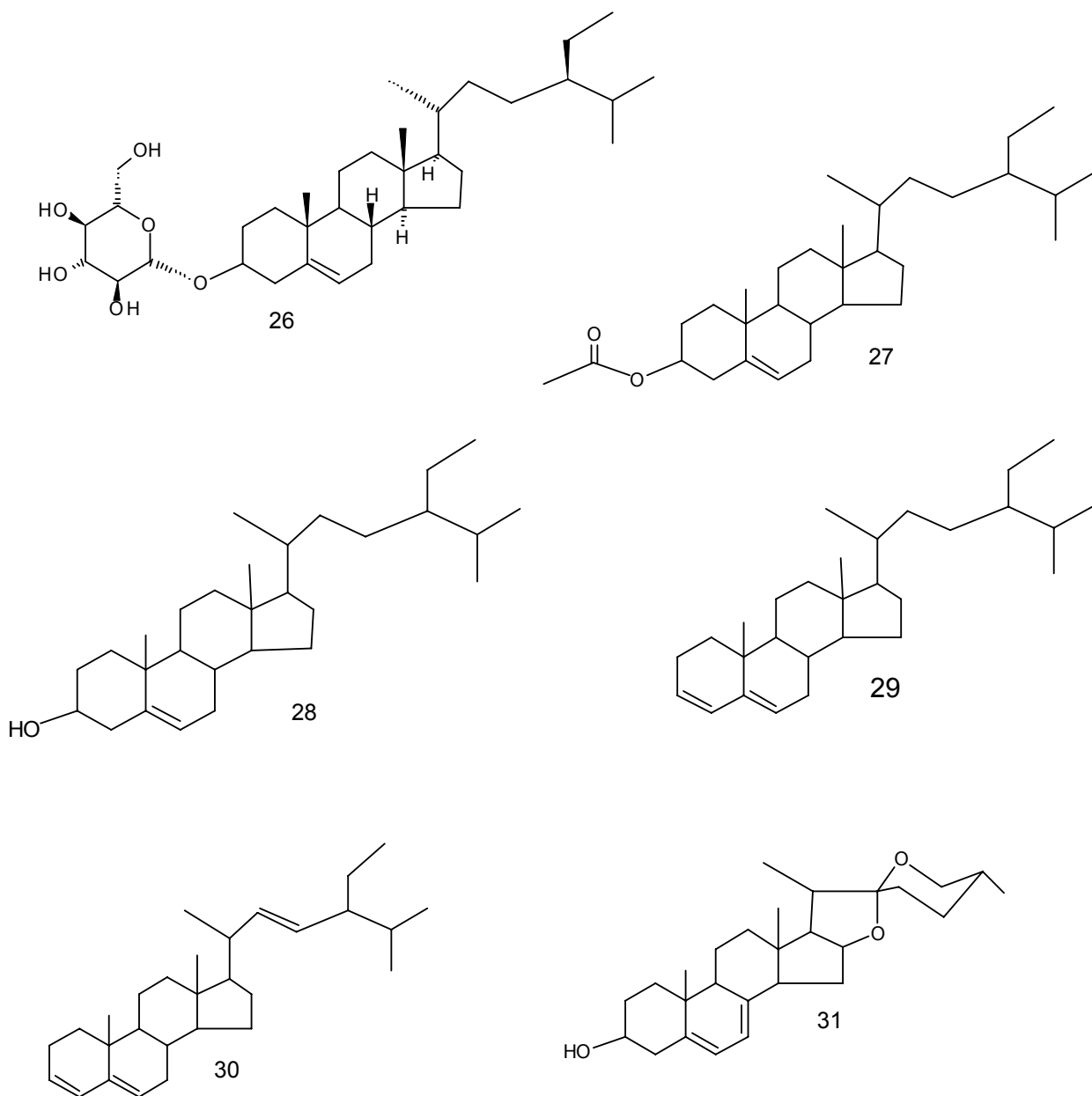


Figura C-5. Fitoconstituintes isolados do extrato do cerne de *A. esperanzae*: triterpenos esteroidais.

Dentre esses compostos, asarinin (18), ácido populifólico (14), ácido 2 oxo-populifólico (15), aristololactamas AII (19) e AIa (20) e sitosterol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (26) foram pela primeira vez citados nesta espécie. Os testes de atividade antimicrobiana mostraram que o extrato das cascas do cerne é ativo frente a *Bacillus cereus*. Da mesma forma, os fitoconstituintes asarinin (18) e (8R,8'R,9S)-cubebina (24) apresentam também a mesma especificidade na atividade antimicrobiana, porém com maiores concentrações inibitórias mínimas (CIM) em relação ao extrato. Esses resultados podem indicar a presença de um fitoconstituente com maior atividade biológica presente no extrato das cascas do cerne ou um sinergismo envolvendo 18 e 24.

Como perspectiva, pretende-se continuar o isolamento de fitoconstituintes das frações ainda não estudadas, bem como avaliar a atividade biológica *in-vivo* e *in-vitro* de extratos, frações e fitoconstituintes ainda não isolados, além de avaliar mais criteriosamente a atividade biológica dos fitoconstituintes isolados.

Referências

1. Junior, C. V.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 326.
2. Leitão, G. G.; Kaplan, M. A. C. *Rev. Bras. Farm.* **1992**, *73*, 65.
3. Costa, E. L.; Hime, N. C. *Rodriguesia* **1981**, *XXXIII*, 23.
4. Stasi, D.; Cláudio, L. *Plantas Medicinais na Amazônia I*, Ed. UNESP, São Paulo, **1989**.
5. Balbach, A. *A Flora Nacional na Medicina Doméstica*, 11. ed., EDEL, São Paulo, **1979**.
6. Correa, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Ministério da Agricultura, 3.ed.; volume IV.
7. Schindler, H. *Arzneimittel-Forschung* **1951**, *1*, 7.
8. Leitão, G. G.; Lopes, D.; Menezes, F. S.; Kaplan, M. A. C.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W. *J. Ess. Oil. Res.* **1991**, *3*, 403.
9. Hayashi, N.; Sugiyama, Y.; Komae, H.; Sakao, T. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 769.
10. Munavalli, S.; Viel, C. *Annales Pharm. Fr.* **1969**, *27*, 449.
11. Teresa, J. P.; Urones, J. G.; Fernandez, A. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2753.
12. *Chemical Abstracts* **1990**, *113*, 120596.
13. Rücker, G.; Breitmeyer, E.; Nill, G.; Kirfel, A.; El Korody, M. *Phytochemistry* **1984**, *24*, 1647.
14. Govindarachi, T. R.; Mohamed, P. A.; Parthasarathy, P. C. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 615.
15. Govindarachi, T. R.; Parthasarathy, P. C.; Desai, H. K.; Mohamed, P. A. *Indian J. Chem.* **1973** *11*, 973.
16. Pakrashi, S. C.; Dastidar, P. P. G.; Chakrabarty, S.; Achari, B. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4765.
17. Govindarachi, T. R.; Parthasarathy, P. C. *Indian J. Chem.* **1971**, *9*, 1310.
18. Rücker, G.; Mayer, R.; Wiedenfeld, H.; Chung, B. B.; Gullman, A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1529.
19. Lorenzo, S. N.; John, P. B.; Griselda, E. B.; Jorge, A. D.; Julia, V. S. *Flavour Frag. J.* **1997**, *12*, 401.

20. *Chemical Abstracts* **1987**, 107, 20754.
21. *Chemical Abstracts* **1984**, 100, 48579.
22. *Chemical Abstracts* **1991**, 115, 155055.
23. *Chemical Abstracts* **1986**, 105, 149709.
24. *Chemical Abstracts* **1989**, 110, 154598.
25. *Chemical Abstracts* **1990**, 112, 1952327.
26. *Chemical Abstracts* **1986**, 105, 112030.
27. Ming, C. W.; Mayer, R.; Zimmermann, H.; Rücker, G. *Phytochemistry* **1989**, 28, 3233.
28. Rücker, G.; Ming, C. W.; Mayer, R.; Will, G.; Guellmann, A. *Phytochemistry* **1990**, 29, 983.
29. Correa, M. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Conserva, L. M. *Fitoterapia* **1998**, 69, 277.
30. Luiz, V.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Lopes, L. M. X. *Quím. Nova* **1990**, 13, 250.
31. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Grigolli, T. M. *Phytochemistry* **1990**, 29, 660.
32. Lopes, L. M. X.; Nascimento, I. R. *Phytochemistry* **2003**, 63, 953.
33. Fraga, B. M. *Rev. Latinoamer. Quim.* **2004**, 32, 76.
34. Rücker, G.; Langmann, B.; Siqueira, N. S. *Planta Med.* **1981**, 41, 143.
35. Gaitan, R.; Gómez, H. A.; Tapia, S.; Villadiego, A. M.; Méndez, D. *Rev. Latinoamer. Quim.* **2002**, 30, 83.
36. Wu, T. S.; Tsai, Y. L.; Damu, A. G.; Kuo, P. C.; Wu, P. L. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1522.
37. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V. *Phytochemistry* **1987**, 26, 2781.
38. Leitão, G. G.; Kaplan, M. A. C.; Galeffi, C. *Phytochemistry* **1992**, 31, 3277.
39. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S. *Phytochemistry* **1988**, 27, 2265.
40. Bomm, M. D.; Zukerman-Schpector J.; Lopes, L. M. X. *Phytochemistry* **1999**, 50, 455.
41. Larrahondo, J. E.; Acevedo, C. *An. Asoc. Quim. Argent.* **1990**, 78, 355.
42. Choudhury, M. K.; Haruna, A. K.; Johnson, E. C.; Houghton, P. J. *Indian J. Pharm. Sci.* **1997**, 59, 34.

43. Vila, R.; Mundina, M.; Muschietti, L.; Priestap, H. A.; Bandoni, A. L.; Adzet, T.; Canigueral, S.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1127.
44. Usubillaga, A.; Khouri, N.; Rojas, L. B. *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 128.
45. Silva, A. P. F.; Júnior, S. F. P.; Conserva, L. M.; Guilhon, G. M. S. P. *Braz. J. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 122.
46. Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2035.
47. Conserva, L. M. *Constituintes Químicos e Ensaio Farmacológicos de Aristolochia birostris Duchtre*. Tese de Mestrado, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, LTF, UFPB, 1985.
48. Tereza, J. P.; Urones, J. G.; Fernandez, A.; Alvarez, M. D. V. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 461.
49. Bolzani, F. S.; Lopes, L. M. X.; Trevisan, L. M. V. *Ciência e Cultura* **1987**, *39*, 515, (43.D.2.5) Supl.
50. Achari, B.; Chakrabarty, S.; Basu, K.; Pakrashi, S. C. *Heterocycles* **1982**, *19*, 1203.
51. Tada, A.; Sase, K.; Ohmura, I.; Shoji, J.; Tanaka, O. *Shoyakugaku Zasshi* **1969**, *23*, 99.
52. He, L.; Xue, H.; Xu, Y.; Weng, J. *Zhiwu Xuebao* **1984**, *26*, 527.
53. He, L.; Zhang, J.; Xué, H. *Zhiwu Xuebao* **1987**, *29*, 197.
54. Chang, I. M.; Yun, H. S.; Yamasaki, K. *Kor. J. Pharmacog.* **1981**, *12*, 12.
55. Connolly, J. D., Ed. Newman, A. A., *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*, Academic Press, London, **1972**.
56. Mahesh, V. K.; Bhaumik, H. L. *Indian J. Chem. Sect. B* **1987**, *26*, 86.
57. Navickiene, H. M. D.; Lopes, L. M. X. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 467.
58. Enriquez, R. G.; Chaves, M. A.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 896.
59. Conserva, L. M.; Silva, M. S.; Braz Filho, R. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 257.
60. Habib, M. A. A.; El-Sebaky, N. *Pharmazie* **1981**, *36*, 291.
61. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V. *Ciência e Cultura* **1987**, *39*, 515 (44.D.2.5) Supl.
62. Úrzua, A.; Freyer, A. J.; Shamma, M. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1509.

63. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1988**, *19*, 113.
64. Blumenthal, E. E.; Silva, A.; Yoshida, M. S. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 745.
65. Gozler, B.; Rentsch, D.; Gozler, T.; Unver, N.; Hesse, M. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 695.
66. (a) Tillekeratne, L. M. V.; Jayamanne, D. T.; Weerasuria, K. D. V.; Gunatilaka, A. A. L. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 476. (b) Koul, S. K.; Taneia, S. C.; Pushpangadan, P.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1479.
67. Abe, F.; Ngafuji, S.; Yamauchi, T.; Okabe, H.; Maki, J.; Higo, H.; Hiroshige, A.; Aguilar, A.; Estrada, M. J.; Reyes-Chilpa, R. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1188.
68. Úrzua, A.; Freyer, A. J.; Shamma, M. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2414.
69. Úrzua, A.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 117.
70. Mizuno, M.; Oka, M.; Inum, M.; Tanaka, T. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 179.
71. Palmeira Junior, S. F.; Conserva, L. M.; Correa, M. S. S.; Guilhon, G. M. S. P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 701.
72. Pistelli, L.; Nieri, E.; Bilia, A. R.; Marsili, A.; Scarpato, R. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1605.
73. Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 657.
74. Priestap, H. A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 519.
75. Houghton, P. J.; Ogutveren, M. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 253.
76. Hussein, F. T. *Planta Med.* **1969**, *18*, 30.
77. Úrzua, A.; Salgado, G.; Cassels, B. K.; Eckhardt, G. *Planta Med.* **1982**, *45*, 51.
78. *Chemical Abstracts* **1987**, *106*, 15792.
79. *Chemical Abstracts* **1989**, *111*, 130771.
80. Kupchan, S. M.; Doskotch, R. W. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 657.
81. Achari, B.; Charkravarty, S.; Pakrashi, S. C. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1444.
82. *Chemical Abstracts* **1987**, *107*, 161482.
83. Nakanishi, F.; Irvasaki, K.; Nasu, M.; Miura, I.; Yoneda, K. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1759.
84. *Chemical Abstracts* **1984**, *103*, 16819.

85. Podolesov, B.; Zdravkovski, Z. *Acta Pharm. Yugosl.* **1981**, *31*, 249.
86. Houghton, P. J.; Ogutveren, M. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 717.
87. Siqueira, N. S.; Ambros, M. L. *Rev. Bras. Farm.* **1971**, *52*, 61.
88. *Chemical Abstracts* **1984**, *103*, 211177.
89. Teresa, J. P.; Urones, J. G.; Fernandez, A. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2745.
90. Priestap, H.A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 849.
91. Ding, L.; Lou, F.; Cao, M.; Wang, Y.; He, C. *Zhongcaoyao* **1986**, *17*, 347.
92. Govindachari, T. R.; Viswanathan, N. *Indian J. Chem.* **1967**, *5*, 655.
93. *Chemical Abstracts* **1987**, *106*, 135229.
94. Charkravarty, M.; Chaudhuri, C.; Achari, B.; Pakrashi, S. C. *Planta Med.* **1988**, *54*, 467.
95. *Chemical Abstracts* **1991**, *114*, 58861.
96. Kupchan, S. M.; Merianos, J. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3735.
97. Chrohare, R.; Priestap, H. A.; Farina, M.; Cedola, M.; Rúveda, E. A. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1957.
98. *Chemical Abstracts* **1987**, *107*, 39492.
99. Shi, L. S.; Kuo, P. C.; Tsai, Y. L.; Damu, A. G.; Wu, T. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 439.
100. Maldonado, L. A., Herrán, J.; Romo, J. *Ciência, México* **1966**, *XXIV*, 237.
101. Junior, J. X. A.; Chaves, M. C. O.; Cunha, E. V. L.; Gray, A. I. *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 325.
102. *Chemical Abstracts* **1989**, *111*, 130763.
103. Pakrashi, S. C.; Ghosh-Dastidar, P.; Basei, S.; Achari, B. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1103.
104. Wu, P. L.; Su, G. C.; Wu, T. S. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 996.
105. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Leu, Y. L. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1006.
106. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Leu, Y. L. *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 957.
107. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Leu, Y. L. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 370.
108. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Leu, Y. L. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 357.

109. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Leu, Y. L.; Chen, Z. T. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 415.
110. Wu, T. S.; Leu, Y. L.; Chan, Y. Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 1216.
111. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Lin, F.W. *J. Chin. Chem. Soc.* **2001**, *48*, 817.
112. Peng, G. P.; Lou, F. C.; Wang, Y.; Zhao, S. X.; Chen, D. J. *Acta Pharm. Sin.* **1996**, *31*, 446.
113. *Chemical Abstracts* **1984**, *101*, 7360.
114. Lemos, V. S.; Paulo, M. Q.; George, T.; Barbosa Filho, J. M. *Ciência e Cultura* **1989**, *41*, 515.
115. Chen, K. S.; Chang, F. R.; Chia, Y. C.; Wu, T. S.; Wu, Y. C. *J. Chin. Chem. Soc.* **1998**, *45*, 103.
116. *Chemical Abstracts* **1986**, *104*, 165411.
117. *Chemical Abstracts* **1987**, *107*, 55794.
118. Dayan, Z.; Baode, W.; Boshan, H.; Rensheng, X.; Yunping, Q.; Xiuzhen, C. *Heterocycles* **1982**, *17*, 345.
119. Zhang, C.; Lao, J.; Wang, Z. *Yaowu Fenxi Zashi* **1986**, *6*, 220.
120. *Chemical Abstracts* **1986**, *105*, 168937.
121. Úrzua, A. J.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 305.
122. *Chemical Abstracts* **1991**, *114*, 3438.
123. El-Sabaky, N.; Waterman, D. G. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2706
124. Rücker, G.; Mayer, R. *Planta Med.* **1985**, *2*, 183.
125. Cortes, D.; Dadoun, H.; Paiva, R. L. R.; Oliveira, A. B. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 910.
126. El-Sabaky, N.; Richomme, P.; Taaina, S.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1374.
127. Priestap, H. A.; Bonafede, J. D.; Rúveda, E. A. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1579.
128. Che, C. T.; Cordell, G. A.; Fong, H. H. S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1333.
129. Yun, J.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 767.
130. Yu, Z.; Huang, B. *Zhongcaoyao* **1984**, *15*, 13.
131. Zhang, G.; Shimokawa, S.; Mochizuki, M.; Kumamoto, T.; Nakanishi, W.; Watanabe, T.; Ishikawa, T.; Matsumoto, K.; Tashima, K.; Horie, S.; Higuchi, Y.; Dominguez, O. P. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1167.

132. Wu, T. S.; Tsang, Z. J.; Wu, P. L.; Lin, F. W.; Li, C. Y.; Teng, C. M.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 77.
133. Wu, T. S.; Tsai, Y. L.; Wu, P. L.; Lin, F. W.; Lin, J. K. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 692.
134. Achari, B.; Bandyopadhyay, S.; Basu, K.; Pakrashi, S. C. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 107.
135. Zhou, F.; Wen, J.; Liang, P.; Ma, Y. *Zhongcaoyao* **1982**, *13*, 3.
136. Zhou, F.; Wen, J.; Liang, P.; Ma, Y. *Yaoxue Tongbao* **1982**, *17*, 243.
137. Lou, F.; Ding, L.; Li, L.; Wu, M. *Zhongcaoyao* **1986**, *17*, 390.
138. Lou, F.; Ding, L.; Li, L.; Wu, M. *Yaoxue Xuebao* **1986**, *21*, 702.
139. Chou, L. T.; Chen, C. M. *Yao Hsueh Tung Pao* **1981**, *16*, 51.
140. Tian, B.; Zou, W.; Huang, S.; Tan, T.; Lu, L. *Zhongcaoyao* **1982**, *13*, 10.
141. Chou, F. H.; Ling, P. Y.; Chu, S. C.; Wen, C. *Yao Hsueh Tung Pao* **1981**, *16*, 56.
142. Zhou, F.; Liang, P.; Qu, C.; Wen, J. *Yaoxue Huebao* **1981**, *16*, 638.
143. Ding, L.; Zeng, Q.; Lou, F. *Zhongcaoyao* **1981**, *12*, 436.
144. Chen, I. S.; Chen, J. J.; Tsai, I. L.; Chang, Y. L.; Teng, C. M. *Planta Med.* **1995**, *61*, 537.
145. Wu, T. S.; Kao, M. S.; Wu, P. L.; Lin F. W.; Shi, L. S.; Teng, C. M. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 121.
146. Araújo, R. L.; *Rheumatoid Arthritis. Am. College of Rheumatology-Arthritis Foundation*, **2000**.
147. (a) Foye, W. O.; Lemke; T. L.; Willians, D. A.; *Principles of Medicinal Chemistry. Willians & Wilkins, Philadelphia*, **1990**. (b) www.arthritis.org (acessado em fevereiro de 2005)
148. Chandrasoma, P.; *Patologia Básica*, Prentice Hall do Brasil, **1993**.
149. 4. (a) Houri, J. M.; O'Sullivan, F. X.; *Curr. Opin. Rheumatol.* **1995**, *7*, 201.
(b) Garrett, R. H.; Grisham, C. M.; *Biochemistry*, Saunders College Publishing, Orlando, **1995**.
150. (a) Boletim da Sociedade Brasileira de Reumatologia Rio de Janeiro **2004**, *32*, 16. (b) American College of Rheumatology ad hoc Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* **1996**, *39*, 713.

- 151.a) <http://br.news.yahoo.com/050218/31/ru6t.html> (acessado em fevereiro de 2005) b) Lana, E. J. L.; Carazza, F.; Takahashi, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2053.
152. Andrade, K. V. S. A.; Rodal, M. J. N.; *Rev. Bras. Bot.* **2004**, *7*, 463.
153. Dahlgren, R. M. T. *Bot. J. Linn. Soc.* **1980**, *80*, 91.
154. Hoene F. C. *Flora Brasílica* 15-II (6) *Aristolochiaceas*.
155. Salituro, G. M.; Dufresne, C. *Natural Products Isolation*, Humana Press: Totowa, NJ **1998**, 111.
156. Silva, G. L.; Lee, I. S.; Kinghorn, D. *Natural Products Isolation*, Humana Press: Totowa, NJ **1988**, 343.
157. Takahashi, J. A.; Pereira, C. R.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D.; Silva, L. G. F. E. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 21.
158. Agrawal, P. K.; Thakur, R. S. *Mag. Res. Chem.* **1985**, *23*, 389.
159. Priestap, H. A. *Mag. Res. Chem.* **1989**, *27*, 460.
160. Pascoli, I. C.; Nascimento, I. R.; Lopes, L. M. X. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 735.
161. Costa, H. N. R.; Santos, M. C.; Alcântara, A. F. C.; Silva M. C.; França, R. C.; Veloso, D. P. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 744.

Anexos

Anexo 1

Review

 ^{13}C NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species

A.G. Pacheco, P.M. Oliveira, D. Piló-Veloso, A.F.C. Alcântara *

Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: aalcantara@zeus.qui.ufmg.br; Tel: +55 31 3409 5728; Fax: +55 31 3409 5700.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The genus *Aristolochia* is an important source of physiologically active compounds that belong to different chemical classes, being the subject of research in numerous pharmacological and chemical studies. This genus contains a large number of terpenoid compounds, particularly diterpenes. This work presents a compilation of the ^{13}C NMR data of 57 diterpenoids described between 1981 and 2007 which were isolated from *Aristolochia* species. The compounds are arranged skeletonwise in each section, according to their structures, i.e., clerodane, labdane, and kaurane derivatives. A brief discussion on the ^{13}C chemical shifts of these diterpenes is also included.

Keywords: *Aristolochia*, Aristolochiaceae, clerodanes, furanoditerpenes, kauranes, labdanes, ^{13}C NMR data.

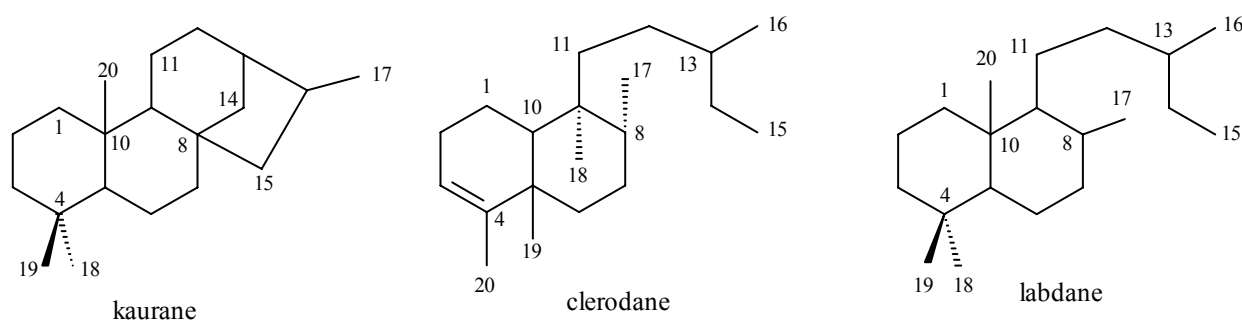
Introduction

The genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae) consists of about 500 species mostly distributed along tropical, subtropical, and mediterranean regions of the world [1-3]. The species of *Aristolochia* are cultivated as ornamental [4] and popularly used as abortifacient, emmenagogue [5,6], sedative [7], analgesic, anticancer, anti-inflammatory, antifeedant [8], muscle relaxant [9], antihistaminic, and antiallergic [10] drugs, for intestinal worms, in the treatment of cholera, stomach ache, abdominal pain,

rheumatism [11], malaria [12], wounds and skin diseases [13], and is also useful in different types of poisonous bites and stings [14,15]. Several other biological properties have been described [16]. On the other hand, plants of the genus have led to progressive nephropathy and urothelial cancer in humans [17,18]. As consequence, the distribution of herbal medicines containing *Aristolochia* extracts are prohibited in many countries due to their nephrotoxic, carcinogenic, and mutagenic properties [1].

Aristolochic acids have been frequently found in *Aristolochia* species [19]. These compounds show toxic effects at renal level and carcinogenic properties [20,21]. Phytochemical investigations of these species revealed both the presence of aporphinic, tetrahydroprotoberberinic, benzyltetrahydroisoquinolinic, and bisbenzyltetrahydroisoquinolinic alkaloids [22] and other nitrogenated derivatives (phenantrenoids, aristolactams, and porphyrins) [23-25]. Quinones, coumarins, flavanoids, lignoids (phenylpropanoids, neolignans, and lignans), and fatty acids are frequently isolated from plants of the genus [26]. However, the most prominent compounds in *Aristolochia* are terpenoids, constituents of essential oils isolated from the plant species. The majority of the identified terpenoids are kaurane, clerodane, and labdane diterpene derivatives (Fig. 1).

Figure 1. Diterpene classes present in *Aristolochia* species.



The review “Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities”, which covered the literature up to 2003, lists 52 diterpenoids isolated from the genus and their pharmacological properties [16]. In the present review a new comprehensive coverage of diterpenes isolated from *Aristolochia* species up to this moment (Tables 1 to 3) is described, in the gross 26 kauranes (Fig. 2 and 3), 29 clerodanes (Fig. 4 and 5), one furanoditerpene derivative (Fig. 6), and 9 labdanes (Fig. 7). Moreover, the ^{13}C NMR data of these compounds are also compiled (Tables 4 and 5). For some structures ^{13}C NMR data were not found in the investigated literature and the ^{13}C NMR data are in disagreement for (-)-11-Hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid. Sometimes different structures were equally named.

Kaurane derivatives isolated from *Aristolochia* species

Kaurane diterpenoids show several biological properties such as antioxidative, antityrosinase [27], abortifacient, and anti-inflammatory activities, they are used against snake bite poisoning [28], and present cytotoxicity against tumor cell of human prostate, colon, and breast [29]. Table 1 lists the kaurane derivatives isolated from *Aristolochia* species (1 to 26 in Figures 2 and 3) and their respective

plant source. Acetonide **13** and kaurane derivative **14** were isolated from *A. rodriguesii* and *A. triangularis*, respectively. Both compounds were also prepared from **3** [30].

Table 1. Kaurane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species

Kaurane	Species
<i>ent</i> -Kauran-16 β -ol [(-)-kauranol] (1)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
<i>ent</i> -16 β (<i>H</i>)-Kauran-17-oic acid (2)	<i>A. elegans</i> [7]; <i>A. triangularis</i> [13]
<i>ent</i> -Kauran-16 β ,17-diol (3)	<i>A. elegans</i> [7]; <i>A. pubescens</i> [31]; <i>A. triangularis</i> [13]
<i>ent</i> -16 β (<i>H</i>)-Kaurane (4)	<i>A. elegans</i> [7]; <i>A. triangularis</i> [13]
<i>ent</i> -16 α (<i>H</i>)-Kauran-17-al (5)	<i>A. elegans</i> [7]
<i>ent</i> -Kauran-16 β ,19-diol [<i>ent</i> -16 β ,19-dihydroxykaurane] (6)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
<i>ent</i> -16 α -Hydroxy-kauran-19-al [16 α -hydroxy-(-)-kauran-19-al] (7)	<i>A. rodriguesii</i> [28]; <i>A. triangularis</i> [32]
<i>ent</i> -16 β ,17-Dihydroxy-(-)-kauran-19-oic acid (8)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
<i>ent</i> -16 β -Hydroxy-kauran-18-al [(-)-kauran-16 α -hydroxy-18-al] (9)	<i>A. triangularis</i> [26]
<i>ent</i> -16 β ,17-Epoxykaurane (10)	<i>A. elegans</i> [7]; <i>A. triangularis</i> [32]
<i>ent</i> -15 β ,16 β -Epoxy-17-hydroxy- kauran-19-oic acid (11)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
<i>ent</i> -15 β ,16 β -Epoxykauran-17-ol (12)	<i>A. triangularis</i> [13]
<i>ent</i> -16 β ,17-isopropylidenedioxy-(-)-19-oic acid (13)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
17- <i>nor</i> -(-)-Kauran-16-one (14)	<i>A. triangularis</i> [13]
<i>ent</i> -17-Hydroxy-kaur-15-en-19-oic acid (15)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
<i>ent</i> -Kaur-15-en-17-ol (16)	<i>A. elegans</i> [7]; <i>A. pubescens</i> [31] <i>A. triangularis</i> [13,32]
<i>ent</i> -11 β -Hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid [(-)-11-Hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid] (17)	<i>A. anguicida</i> [33]
<i>ent</i> -Kaur-16-en-19-oic acid [(-)-Kaur-16-en-18-oic acid; kaurenic acid] (18)	<i>A. anguicida</i> [33]; <i>A. rodriguesii</i> [28]; <i>A. triangularis</i> [13]
(-)- <i>ent</i> -Kaur-16-ene (19)	<i>A. triangularis</i> [13,32]
(-)- <i>ent</i> -Kaur-16-en-19-ol (20)	<i>A. triangularis</i> [13,32]
(-)- <i>ent</i> -Kaur-16-en-19-al (21)	<i>A. triangularis</i> [13,32]
<i>ent</i> -7 β -Hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (22)	<i>A. anguicida</i> [34]
<i>ent</i> -Kaur-16-en-3 β ,19-diol [<i>ent</i> -3 β ,18-dihydroxykaur-16-ene] (23)	<i>A. rodriguesii</i> [28]
<i>ent</i> -16 β -Hydroxy-17-kauranyl aristolachate I [aristoloin I] (24)	<i>A. pubescens</i> [31]
<i>ent</i> -16 β -Hydroxy-17-kauranyl aristolachate II [aristoloin II] (25)	<i>A. pubescens</i> [31]

ent-17-Hydroxy-16 β -kauranyl aristolachate I

[Aristolin] (26)

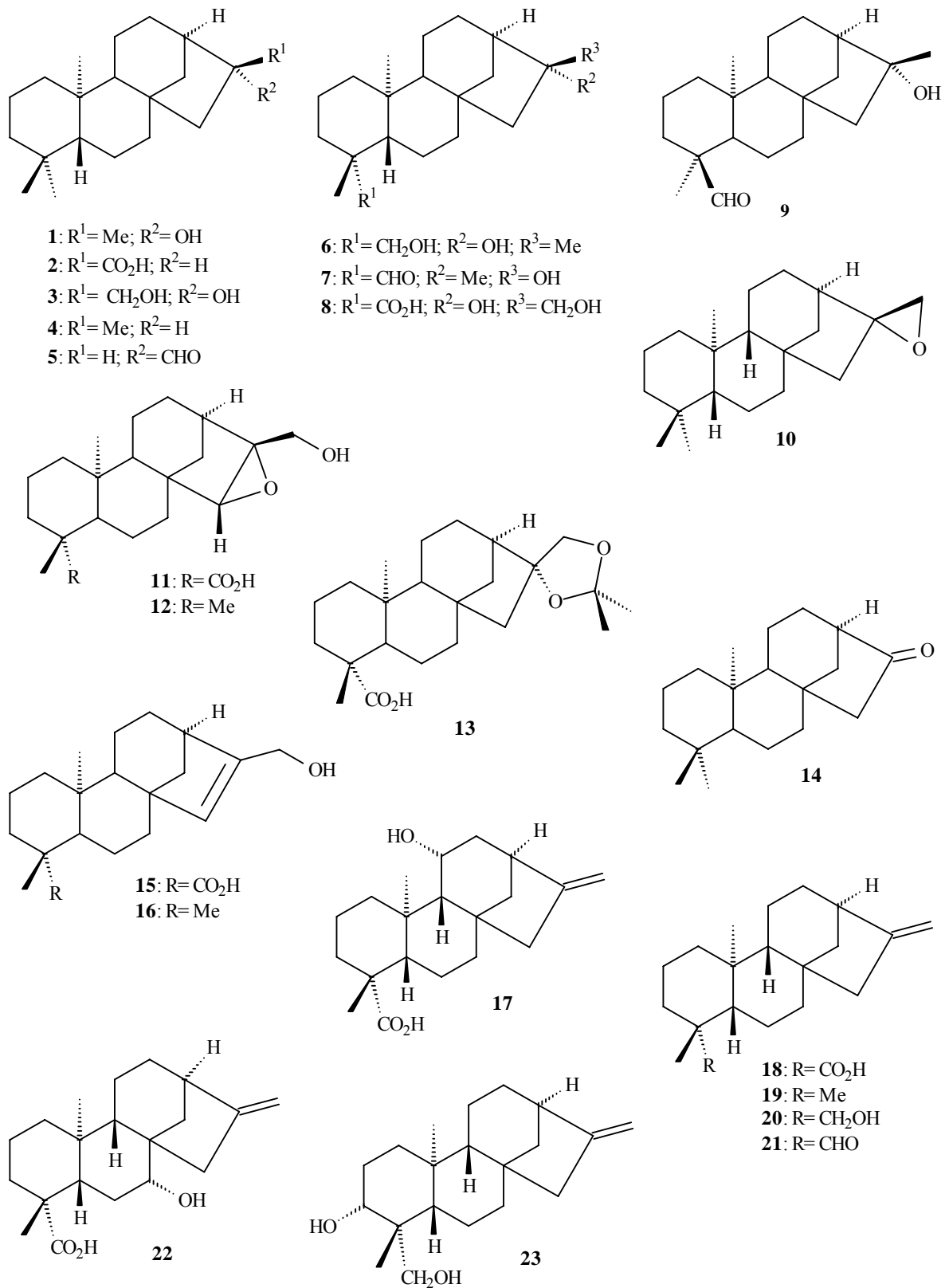
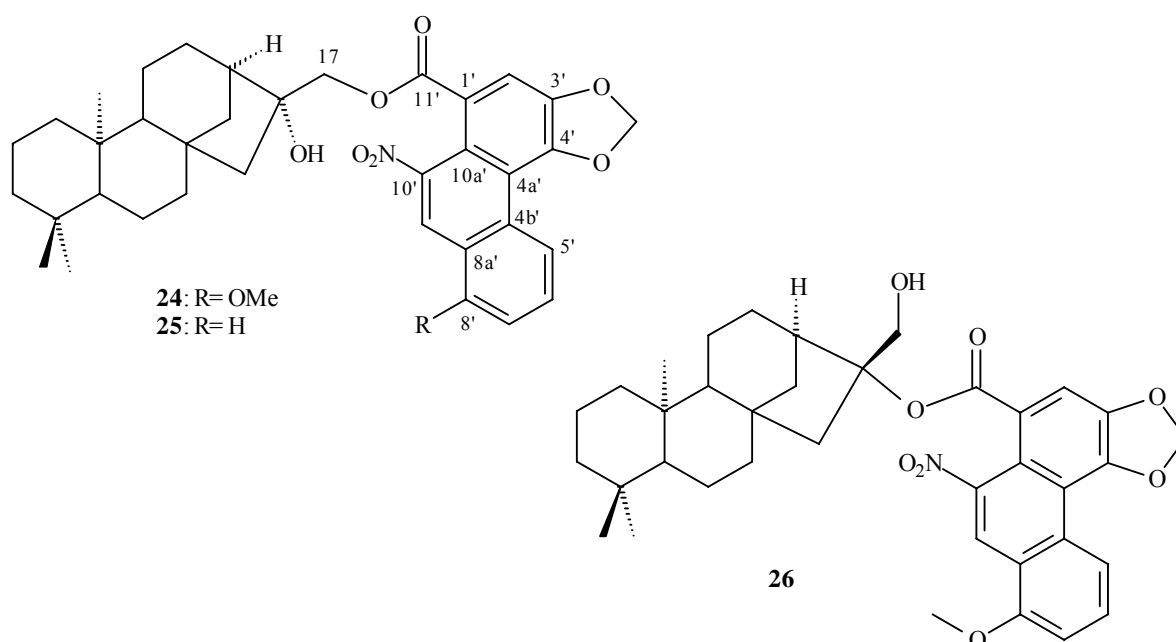
A. elegans [4]**Figure 2.** Kaurane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species.

Figure 3. Substituted kaurane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species.

Clerodane derivatives isolated from *Aristolochia* species

Clerodane diterpenoids show a broad spectrum of biological properties [35,36] including insecticidal activity [37]. Table 2 shows the clerodane diterpenoids isolated from genus *Aristolochia* (**27** to **55** in Figures 4 and 5) and their respective plant source. Structure **52** has been also named as 2-oxokolavenic acid (**50**). The corresponding acid of **49** has been described by Wu et al. [16]

Table 2. Clerodane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species

Clerodane	Species
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-Cleroden-15-oic acid [13,14-dihydrokolavenic acid; populifolic acid] (27)	<i>A. brasilienses</i> [38]; <i>A. cymbifera</i> [39]; <i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-Cleroden-15-ol [Dihydrokolavenol] (28)	<i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -15-Ethanoyl-3-clerodene [dihydrokolavenol acetate] (29)	<i>A. galeata</i> [40]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oate	

[methyl populifoloate] (**30**)*A. esperanzae* [38]; *A. galeata* [40]**Table 2.** Cont.

Clerodane	Species
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-Cleroden-15-oic acid [<i>epi</i> -populifolic acid] (31)	<i>A. cymbifera</i> [39]
Methyl (5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oate (32)	<i>A. cymbifera</i> [39]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,13-dien-15-oic acid [$\Delta^{13,14}$ -Kolavenic acid] (33)	<i>A. brasilienses</i> [38]; <i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,13-dien-15-ol [$\Delta^{13,14}$ -kolavenol] (34)	<i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -15-Ethanoyl-clerod-3,13-diene [Acetyl kolavenoate] (35)	<i>A. galeata</i> [40]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -clerod-3,13-dien-15-oate [methyl kolavenoate] (36)	<i>A. esperanzae</i> [38]; <i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,13-dien-15-oic acid (37)	<i>A. brasilienses</i> [38]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,14-dien-13 β -ol [(+)-Kolavelool] (38)	<i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-(4 \rightarrow 2)- <i>abeo</i> -Clerod-13 β -hydroxy-2,14- dien-3-oic acid [(+)-(4 \rightarrow 2)- <i>abeo</i> -Kolavelool-3-oic acid] (39)	<i>A. chamissonis</i> [41]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-14-en-3 β ,4 α ,13 α -triol [(-)-3 α ,4 β -dihydroxykolavelool] (40)	<i>A. chamissonis</i> [41]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,14-dien-13 α -ol [(-)-kolavelool] (41)	<i>A. chamissonis</i> [41]; <i>A. cymbifera</i> [38]; <i>A. galeata</i> [38]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,14-dien-2 α ,13 α -diol [(-)-2 β -hydroxykolavelool] (42)	<i>A. chamissonis</i> [41]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Clerod-3,14-dien-2 β ,13 α -diol [(+)-13- <i>epi</i> -2 α -Hydroxykolavelool; 13- <i>epi</i> -roseostachenol] (43)	<i>A. chamissonis</i> [41]
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-Oxo- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oic acid (44)	<i>A. brasilienses</i> [38]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-Oxo- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oic acid [2-Oxopopulifolic acid] (45)	<i>A. brasilienses</i> [39]; <i>A. cymbifera</i> [39]; <i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 2-Oxo- <i>ent</i> -15-ethanoyl-3-clerodene [2-oxodihydrokolavenol acetate] (46)	<i>A. galeata</i> [40]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-oxo- <i>ent</i> -3-cleroden-15-oate [methyl 2-oxopopulifoloate] (47)	<i>A. esperanzae</i> [38]

Table 2. Cont.

Clerodane	Species
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-Oxo- <i>ent</i> -clerod-3,14-dien-13 α -ol [(-)-13- <i>epi</i> -2-Oxokolavelool; 13- <i>epi</i> -roseostachenone] (48)	<i>A. chamissonis</i> [41]
Methyl (5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-oxo- <i>ent</i> -clerod-3,13- dien-15-oate (49)	<i>A. brasilienses</i> [38]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-Oxo- <i>ent</i> -clerod 3,13-dien-15-oic acid [$\Delta^{13,14}$ -2-Oxokolavenic acid] (50)	<i>A. brasilienses</i> [38]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-oxo- <i>ent</i> -clerod-3,13-dien- 15-oate [methyl $\Delta^{13,14}$ -2-oxokolavenoate] (51)	<i>A. esperanzae</i> [38]
(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-2-Oxo- <i>ent</i> -clerod-3,13- dien-15-oic acid (52)	<i>A. brasilienses</i> [38]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -2 α -hydroperoxy-3- cleroden-15-oate (53)	<i>A. esperanzae</i> [38]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -2 α -Hydroperoxy-clerod-3,14-dien -13 α -ol [(-)-2 β -hydroperoxykolavelool] (54)	<i>A. chamissonis</i> [41]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -2 α -hydroperoxy- clerod-3,13-dien-15-oate (55)	<i>A. esperanzae</i> [38]

Figure 4. Clerodane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species.

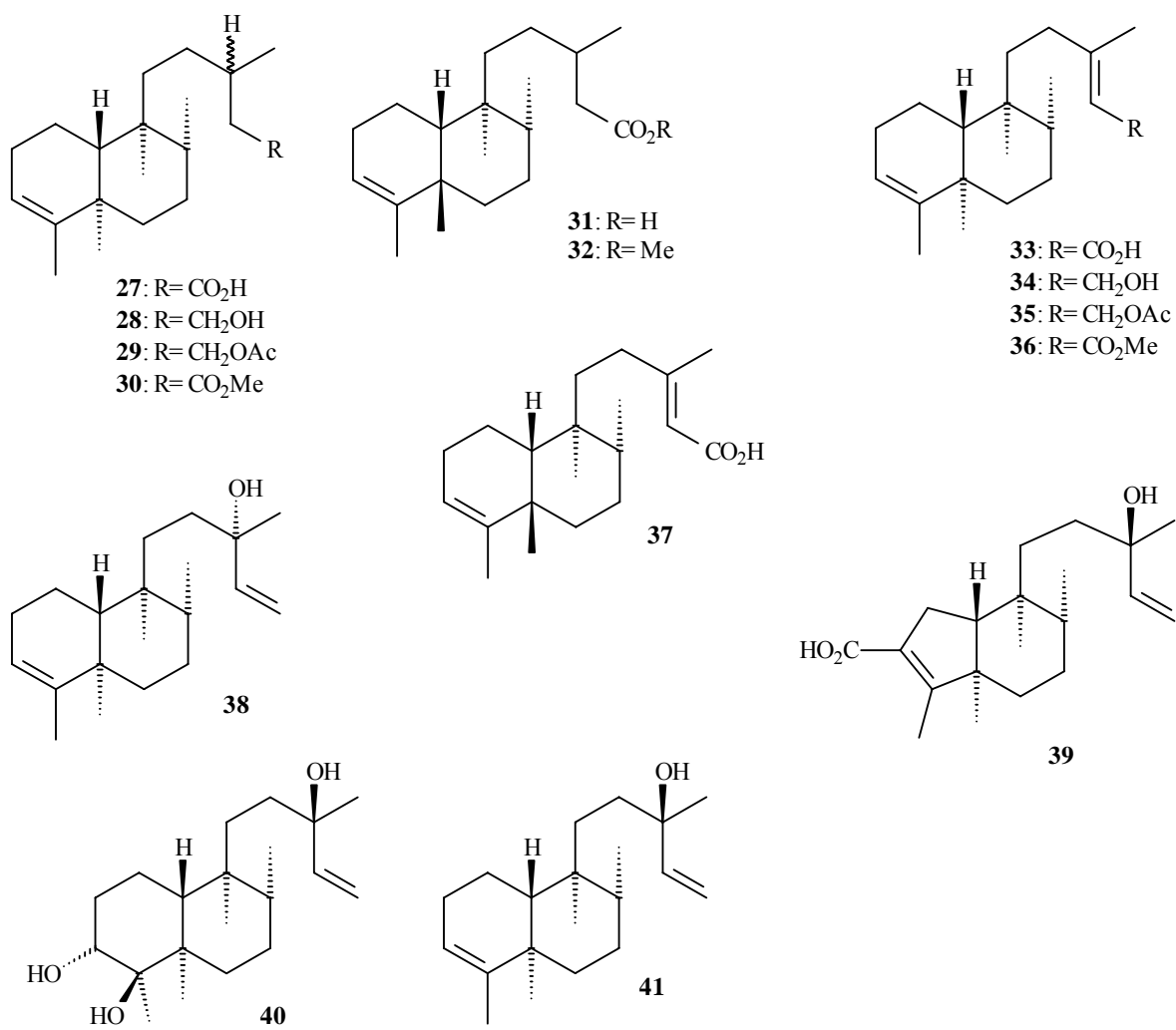
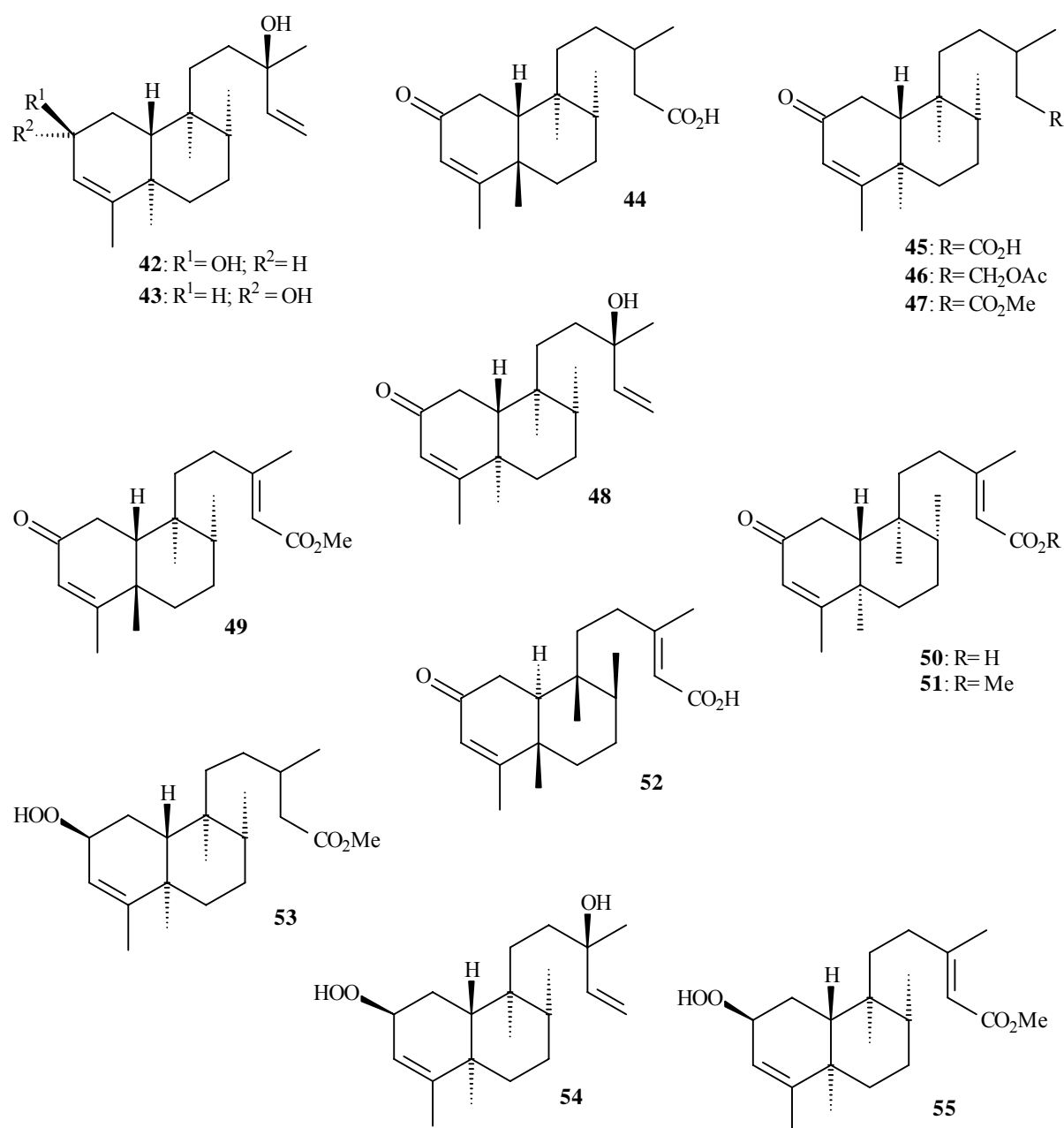
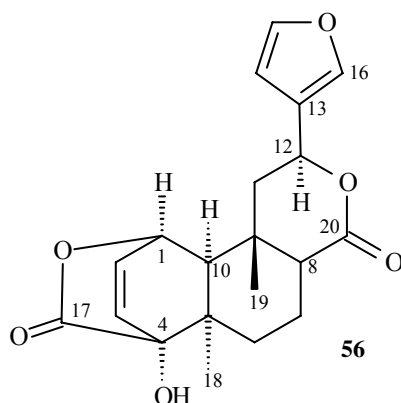


Figure 5. Clerodane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species, showing oxygenated C-2.



Furanoditerpene isolated from *Aristolochia* species

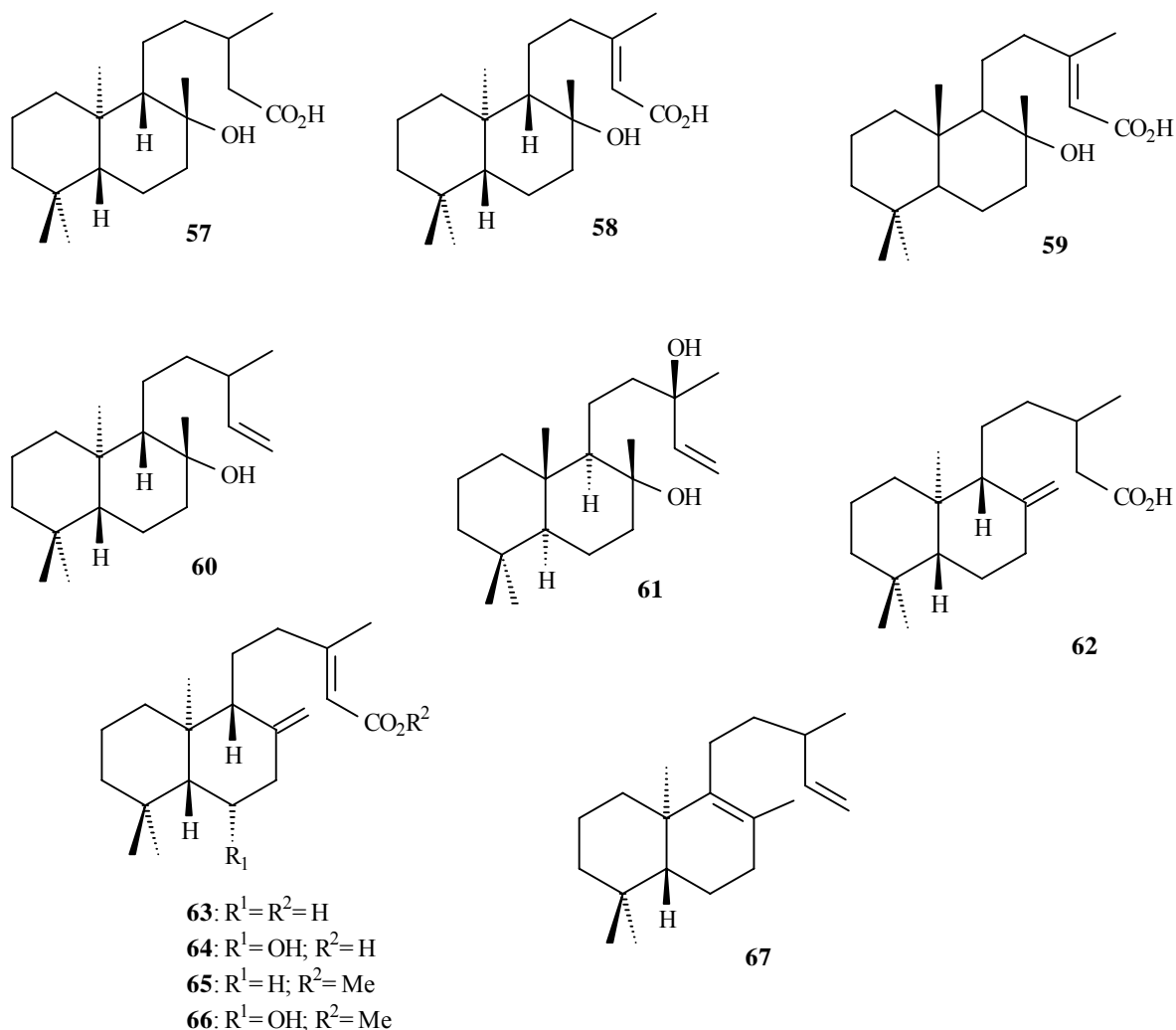
Analgesic and anti-inflammatory activities have been observed for furanoditerpenes [42,43], and their derivatives also show sedative [42], anticonvulsant [44], and plant growth regulatory activities [45]. Columbin (**56**) was isolated from *A. albida* [46] (Fig. 6). The furane group is not fused to other rings as is commonly found in several furanoditerpenes from natural products or synthesis [47]. It is the only furanoditerpene found in the genus *Aristolochia*.

Figure 6. Furanoditerpene isolated from *Aristolochia* species.**Labdane derivatives isolated from *Aristolochia* species**

Labdane diterpenoids are fungal growth regulator and plant growth inhibitor [48-50], showing high antibacterial activity [51]. Commercially, labdanes are used as natural fixatives, modifiers, and lotions by the perfume industry, and as a flavouring agent in the tobacco industry [52]. Table 3 shows the labdane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species (**57** to **67** in Figure 7). Structures **58** and **59** have been equally named as *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-oic acid [53].

Table 3. Labdane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species.

Labdane	Species
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labdan-8 β -hydroxy-15-oic acid (57)	<i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labd-13-en-8 β -hydroxy-15-oic acid [$\Delta^{13,14}$ - <i>ent</i> -labd-8 β -ol-15-oic acid] (58)	<i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labd-14-en-8 β -ol (60)	<i>A. cymbifera</i> [40]
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)- <i>ent</i> -Labd-14-en-8 β ,13 α -diol (61)	not isolated from <i>Aristolochia</i> species [54]
(5 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labd-8(17)-en-15-oic acid (62)	<i>A. ringens</i> [55]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labd-8(17),13-dien-15-oic acid [Copalic acid] (63)	<i>A. esperanzae</i> [40]; <i>A. galeata</i> [40]
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labd-6 β -hydroxy-8(17),13-dien- 15-oic acid (64)	<i>A. esperanzae</i> [40]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -labd-8(17),13-dien-15-oate [Methyl copalate] (65)	<i>A. esperanzae</i> [40]
Methyl (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -labd-6 β -hydroxy- 8(17),13-dien-15-oate (66)	<i>A. esperanzae</i> [40]
(5 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- <i>ent</i> -Labd-8,14-diene (67)	<i>A. cymbifera</i> [40]

Figure 7. Labdane diterpenoids isolated from *Aristolochia* species.

^{13}C NMR data of diterpenes

Tables 4 and 5 show the ^{13}C NMR data of the diterpenoids **1** to **67**. In Table 4 the ^{13}C NMR data of **17** (in $CDCl_3$) were reassigned and it was proposed a new structure **22** according to ^{13}C NMR data in $CDCl_3$, C_5D_5N , and $DMSO-d_6$ [34] (see Figure 2). The carbon chemical shifts of the kaurane diterpenoids **1** to **23** are characteristic only at region between δ_C 38.0 and 42.0 assigned to C-1 and C-10. The other carbon chemical shifts do not show a characteristic standard for this skeleton type. In diterpenes **15** and **16** containing double bond between C-15 and C-16, the carbon chemical shifts are registered near δ_C 135.0 and 145.0, respectively. On the other hand, the double bond is located between C-16 and C-17 of **17** to **23** and their carbon chemical shifts are registered near δ_C 156.0 and 103.0, respectively.

Table 4. ^{13}C NMR data (in CDCl_3) of diterpenes from *Aristolochia* species.

Carbon	Compound / δ_c (in ppm)														
	1 [56]	2 [13]	3 [31]	4 [13]	6 [28]	8 [57,58]	10 [59]	11 [28]	12 [13]	13 [28]	14 [56]	15 [28]	16 [13]	17 [33]	18 [33]
1	42.0	39.2	40.3	40.9	40.35	41.1	40.4	39.82	40.4	40.66	41.0	40.73	42.0	39.10	41.13
2	18.6	18.2	18.6	18.6	17.97 ^a	19.8	18.6	18.39 ^a	18.7	19.06	18.5	19.05 ^a	18.6	20.07	19.52
3	42.0	42.0	41.9	42.0	35.55	38.7	42.0	34.33	42.1	38.39	41.9	38.03	43.8	35.00	38.23
4	33.2	33.1	33.2	33.6	38.50	43.9	33.2	48.47	33.3	43.66	33.2	43.55	33.2	43.60	44.66
5	56.2	56.1 ^a	56.2	56.1 ^a	56.90 ^b	57.0	56.2	56.68 ^b	55.9	56.96	56.1	56.65	55.8	49.80	57.49
6	20.4	20.6	20.4	20.7	20.49	23.0	20.2	20.10	19.3	22.00	19.2	20.70	19.2	19.51	22.28
7	40.3	40.3	42.0	40.4	42.31	42.8	41.1	42.02	32.5	41.52	40.3	39.24	39.2	40.84	41.71
8	45.3	45.3	44.7	45.1	45.17	45.0	45.4	45.20	43.4	44.51	42.5	48.81	48.8	47.63	44.17
9	56.8	56.0 ^a	56.7	56.0 ^a	56.70 ^b	56.3	55.9	55.20 ^b	50.8	55.40	55.0	47.57	48.3	47.89	55.55
10	39.3	38.0	39.4	39.2	39.15	40.1	39.3	39.44	39.2	39.64	39.4	39.72	39.4	40.00	40.09
11	18.0	18.5	18.3	18.3	17.93 ^a	19.0	19.3	18.13 ^a	18.2	19.06	18.5	18.75 ^a	18.6	77.52	18.43
12	26.9	31.2	26.3	31.3	26.06	26.8	29.2	26.90	27.0	27.06	29.7	25.31	25.6	33.97	33.53
13	49.0	44.7	45.5	41.4	48.64	45.9	42.7	48.93	36.0	45.64	47.9	40.92	41.1	44.41	44.28
14	37.7	40.8	37.3	38.1	37.36	37.8	38.6	37.81	36.0	37.88	37.5	43.71	40.4	39.79	40.13
15	58.0	45.0	53.4	44.7	57.66	53.9	48.9	57.80	65.7	55.54	55.2	135.39	135.7	47.41	49.39
16	79.4	55.9	81.9	45.9	79.16	81.7	66.4	79.29	69.5	89.16	222.5	145.82	145.6	155.24	156.32
17	24.5	182.5	66.4	14.8	24.05	66.5	50.4	24.47 ^c	59.9	70.05	-	60.63	61.1	104.09	103.69
18	33.5	33.5	33.5	33.2	26.89	29.3	33.6	24.26 ^c	33.6	28.93	33.6	28.87	35.5	30.08	29.38
19	21.6	21.5	21.5	21.6	64.98	180.1	21.6	205.80	21.6	182.64	21.7	180.90	21.5	184.05	184.00
20	18.0	17.3	17.8	17.4	18.11	16.0	17.8	16.40	17.5	15.74	18.0	15.25	17.6	15.93	16.02
1'					-			-		108.39		-			-
2'										26.81					
3'										26.91					

Table 4. Cont.

Carbon	Compound / δ_C (in ppm)														
	19 [56]	20 (?) [57]	22 [34]	22 (P) [34]	22 (D) [34]	23 [60]	27 [26]	27 [34]	29 [61]	30 [38]	30 [38]	31 [39]	32 [39]	33 [38]	33 [39]
1	41.3	40.5	39.79	40.9	40.3	38.7	18.3	17.4	17.3	17.5	18.2	17.7	17.6	17.3	18.3
2	18.7	18.3	20.07	19.7	19.0	27.6	26.8	27.6	27.5	27.1	26.8	24.1	24.0	27.5	26.9
3	42.0	35.7	40.84	38.5	37.9	80.6	120.5	120.6	120.4	120.0	120.4	123.2	123.1	120.5	120.4
4	33.3	39.3	43.60	43.7	42.5	42.7	144.5	144.4	144.4	143.7	144.4	139.9	139.9	144.5	144.4
5	56.1	56.9	49.80	49.5	46.3	55.8	38.2	38.3 ^a	38.3	38.0 ^a	38.4	38.5	38.2	38.3 ^a	38.2
6	20.3	20.5	35.00	30.4	29.3	20.1	36.9	36.5	35.9	36.4	36.8	37.8	37.7	36.4 ^b	36.8
7	40.4	41.7	77.52	76.2	75.0	41.3	27.6	27.0	26.8	26.4	27.5	28.8	28.7	26.9	27.5
8	44.2	44.0	47.63	48.9	48.0	43.9	36.2	36.3	36.1	36.0	36.1	37.3	37.2	36.4 ^b	36.3
9	56.1	56.2	47.89	47.4	48.6	55.8	40.0	38.7 ^a	38.1	38.3 ^a	39.9	39.9	39.9	38.4 ^a	38.3
10	39.3	38.7	40.00	39.5	38.8	39.6	46.4	46.6	46.4	46.1	46.3	44.5	44.5	46.6	46.5
11	18.1	18.2	19.51	18.5	17.7	18.3	35.5	35.1 ^b	35.5	35.0 ^b	35.4	35.1	35.0	35.0	36.3
12	33.3	33.2	33.97	34.0	33.3	33.0	29.5	35.6 ^b	35.4	35.8 ^b	29.4	29.4	29.3	36.9 ^a	35.0
13	44.2	44.2	44.41	44.3	43.4	43.9	30.9	31.0	30.6	30.6	31.0	30.9	31.1	164.4	164.6
14	39.9	39.7	39.10	39.1	38.4	38.5	41.6	41.7	36.5	41.0	41.5	41.6	41.5	114.9	114.8
15	49.2	49.1	47.41	46.6	45.6	48.8	179.4	179.8	62.8	172.8	173.8	179.4	173.8	172.0	172.1
16	156.0	155.9	155.24	156.2	155.4	155.4	19.9	19.9	19.6	19.5	19.9	19.8	19.8	19.5	19.5
17	102.8	103.0	104.09	103.6	103.2	103.1	16.0	16.1	15.7	15.5	15.9	16.0	15.9	15.9	16.0
18	33.7	27.1	30.08	28.6	28.5	22.8	19.9	18.4	18.3	18.0	19.9	33.0	33.0	18.3	20.0
19	21.7	65.6	184.05	178.2	179.0	64.3	18.0	20.0	19.3	19.5	18.0	20.1	19.9	20.0	18.0
20	17.6	18.1	15.93	15.7	15.4	18.3	18.5	18.1	17.8	17.8	18.4	17.4	17.3	17.9	18.3
C=O									178.6						
MeCO									20.8						
OMe										50.6	51.3		51.3		

Table 4. Cont.

Carbon	Compound / δ_c (in ppm)													
	49 [38]	50 [38]	51 [38]	54 [41]	56 [46]	57 [40]	58 [64]	60 [40]	61 (A) [54]	62 [55]	63 [65]	65 (?) [66]	66 [40]	67 [40]
1	35.4 ^a	35.4 ^a	35.6 ^a	22.0	74.18	39.1	39.8	39.0	40.4	33.1	39.1	19.45	43.9	36.9
2	200.3	200.0	200.2	79.2	128.68	18.2	-	18.2	19.0	21.7	19.4	22.36	19.5	19.0
3	128.5	125.3	125.4	116.7	136.84	42.1	41.9	41.9	42.7	35.4	42.1	24.51	42.0	41.2
4	167.5	172.3	172.7	155.0	80.48	33.1	-	33.3	33.7	39.1	33.6	33.64	34.5	33.2
5	38.6 ^b	39.8 ^b	39.9 ^b	37.8	37.16	55.9	56.1	55.8	56.9	36.6	55.5	55.59	57.5	51.8
6	36.7 ^a	34.8 ^a	34.9 ^a	33.2	25.59	18.1	23.5	18.1	21.1	28.6	24.5	32.75	69.4	19.0
7	28.9	26.7	26.9	27.1	17.33	41.3	44.7	40.5	45.1	37.4	38.3	38.41	47.7	33.5
8	36.6	36.1	36.1	36.4	47.58	73.3	74.4	73.3	73.9	160.6	148.3	148.17	144.0	125.4
9	39.9 ^b	38.7	38.7 ^b	39.1	35.28	59.3	61.3	58.2	62.3	48.6	56.2	57.20	56.7	140.4
10	45.7	45.6	45.8	40.4	44.49	38.9	39.2	38.8	39.8	40.0	39.7	39.80	40.9	37.2
11	34.0	34.2 ^a	34.0 ^a	30.7	41.90	22.3	20.5	22.4	20.0	27.5	21.5	38.96	21.6	25.3
12	36.8 ^a	35.9 ^a	35.9 ^a	36.1	70.66	42.1	44.5	41.9	46.2	29.8	40.1	42.21	39.5	41.7
13	160.3	162.6	160.3	73.9	124.79	30.9	163.9	30.9	73.3	30.8	164.3	160.69	160.7	31.1
14	115.2	115.1	115.3	146.3	108.40	40.5	114.7	144.7	147.5	41.4	114.6	115.73	115.2	145.9
15	167.0	171.2	167.1	111.2	139.66	177.9	171.5	111.8	110.7	179.8	171.8	166.40	167.3	112.0
16	19.1	19.3	19.1	25.0	143.96	19.5	19.4	19.5	27.8	19.8	19.2	14.51	19.0	20.0
17	15.9	15.5	15.7	15.6	175.48	30.5	24.0	30.4	24.5	102.5	106.4	21.73	110.3	19.4
18	20.5	18.2	18.4	18.3	172.37	21.5	21.5	21.5	33.7	18.2	33.6	25.26	23.6	21.5
19	32.1	18.7	18.9	18.1	27.00	33.3	33.4	33.1	21.8	20.8	21.7	33.64	33.7	33.2
20	17.8	17.6	17.9	18.4	24.31		15.4	-	15.8	15.9	14.5	106.53	17.1	19.3
1'			50.8											-
2'														
3'	50.7											50.56	50.8	

a, b, and c may be interchanged for the same structure; (*) reassigned ^{13}C NMR data in CDCl_3 ; (P) ^{13}C NMR data in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; (D) ^{13}C NMR data in DMSO-d_6 ; (A) ^{13}C NMR data in Acetone- d_6 ; (?) solvent not informed.

Table 5. ^{13}C NMR data (in CDCl_3) of substituted diterpenes isolated from *Aristolochia* species

(-) Date not observed

Carbon	Compound / δ_{C} (in ppm)			Carbon	Compound / δ_{C} (in ppm)		
	24 [31]	25 [31]	26 [31]		24	25	26
1	40.3	40.4	40.4	1'	-	-	-
2	18.6	-	-	2'	112.7	112.8	112.5
3	41.9	42.0	42.0	3'	143.1	-	-
4	33.3	-	-	4'	147.5	146.8	146.2
5	56.0	56.1	56.2	4a'	-	-	-
6	20.5	-	20.5	4b'	131.0	-	131.0
7	42.1	42.0	42.0	5'	119.2	127.4	119.2
8	44.9	-	-	6'	131.0	130.5	-
9	56.7	56.6	56.5	7'	108.0	-	108.0
10	39.4	-	-	8'	156.9	130.2	156.9
11	18.3	-	-	8a'	120.2	128.5	120.2
12	26.3	27.1	27.4	9'	121.2	126.5	121.1
13	46.3	46.5	43.5	10'	145.9	-	-
14	37.2	37.5	38.1	10a'	-	118.3	119.2
15	53.3	53.4	51.0	11'	167.2	167.5	167.2
16	80.1	80.0	-	OCH ₂ O	102.4	103.0	102.4
17	69.6	70.2	63.7	OMe	56.2		56.2
18	33.6	33.6	33.6				
19	21.5	22.0	21.6				
20	17.8	18.0	17.8				

The characteristic carbon chemical shifts for clerodane derivatives (except for **39** and **40**) are observed around δ_C 120.0–123.0 and 139.0–145.0, which are assigned to C-3 and C-4, respectively, as shown in Table 4 (see Figures 4 and 5). However, the carbon chemical shift ranges show higher values when C-2 is oxygenated, as is the case of **42** to **55** (Fig. 5). The carbon chemical shifts around δ_C 38.0–40.0 (assigned to C-5 and C-9) and δ_C 36.0–38.0 (assigned to C-6 and C-8) are registered in the ^{13}C NMR spectra of these compounds. Values close to δ_C 145.0 and 112.0 are assigned to double bond between C-14 and C-15 in clerodane diterpenoids, as shown in **38-43**, **48**, and **54**. Besides, the values close to δ_C 160.0 and 115.0 were assigned to double bond between C-13 and C-14, respectively, and δ_C 73.0 for hydroxylated C-13 of these compounds.

Structure of furanoditerpenes (Figure 6) can be confirmed by carbon chemical shifts at δ_C 124.79, 108.40, 139.66, and 143.96 assigned to C-13, C-14, C-15, and C-16, respectively for **56**.

Despite the fact that **61** was not isolated from *Aristolochia* species its stereochemistry is close to the one of **59** (see Figure 7). Thus, ^{13}C NMR data of **61** were included in Table 4 to provide insights about the corresponding data of **59**. The carbon chemical shifts close to δ_C 145.0 and 112.0 are assigned to double bond between C-14 and C-15 in labdanes, as shown in Table 4 for **60**, **61**, and **67**. Values close to δ_C 160.0 and 115.0 can be assigned to double bond between C-13 and C-14 in **58** and **63-66**.

Table 5 shows the ^{13}C NMR data of the substituted kaurane diterpenoids **24** to **26** (see Figure 3). These compounds present an aristolochic acid derivative bound to a kaurane diterpenoids at O-16 (for **24** and **25**) and O-17 (for **26**). Some carbon chemical shifts were not observed in the ^{13}C NMR data of **25** and **26**. As it would be expected only the carbon chemical shifts of C-13 to C-17 of **26** are different when comparing to **24** and **25**.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support.

References

1. Neinhuis, C.; Wanke, S.; Hilu, K. W.; Müller, K.; Borsch, T. Phylogeny of Aristolochiaceae based on parsimony, likelihood and Bayesian analyses of *trnL-trnF* sequences. *Plant Syst. Evol.* **2005**, *250*, 7-26.
2. Wanke, S.; Gonzales, F.; Neinhuis, C. Systematics of Pipevines: Combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). *Inter. J. Plant Sci.* **2006**, *167*, 1215-1227.
3. Wanke, S.; Jaramillo, M. A.; Borsch, T.; Samain, M.-S.; Quandt, D.; Neinhuis, C. Evolution of Piperales – *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2007**, *42*, 477-497.

4. Wu, T. S.; Tsai, Y. L.; Damu, A. G.; Kuo, P. C.; Wu, P. L. Constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1522-1525.
5. Che, C.- T.; Almed, M. S.; Kang, S. S.; Waller, D. P.; Bengel, A. S.; Martin, A.; Rajamahendran, P.; Bunyapraphatsara, J.; Lankin, D. C.; Cordell, G. A.; Soejarto, D. D.; Wijesekera, R. O. B.; Fong, H. H. S. Studies on *Aristolochia* III. Isolation and biological evaluation of constituents of *Aristolochia indica* roots for fertility-regulation activity. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 331-341.
6. Corrêa, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*; Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978.
7. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Luiz, V. *ent*-Cauranos e lignanas de *Aristolochia elegans*. *Quím. Nova* **1990**, *13*, 250-251.
8. Lajide, L.; Escoubas, P.; Mizutani, J. Antifeedant activity of metabolites of *Aristolochia albida* against the Tobacco cutworm *Spodoptera litura*. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 669-673.
9. Lemos, V. S.; Thomas, G.; Barbosa Filho, J. M. Pharmacological studies on *Aristolochia papillaris* Mast (Aristolochiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *40*, 141-145.
10. Terada, S.; Motomiya, T.; Yoshioka, K.; Narita, T.; Yasui, S.; Takase, M. Antiallergic substance from *Assarum sagittarioides* and synthesis of some analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2437-2442.
11. Yu, J. Q.; Liao, Z. X.; Cai, X. Q.; Lei, J. C.; Zou, G. L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environm. Toxic. Pharm.* **2007**, *23*, 162-167.
12. Kubmarawa, D.; Ajoku, G. A.; Enwerem, N. M.; Okorie, D. A. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria. *Afric. J. Biotech.* **2007**, *6*, 1690-1696.
13. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Grigolli, T. M. Terpenes from *Aristolochia triangularis*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 660-662.
14. Shafi, P. M.; Rosamma, M. K.; Jamil, K.; Reddy, P. S. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 439-441.
15. Nok, A. J. A novel nonhemorrhagic protease from the Africa puff adder (*Bitis arietans*) venom. *J. Biochem. Molec. Toxic.* **2001**, *15*, 215-220.
16. Wu, T.- S.; Damu, A. G.; Su, C.- R.; Kuo, P.- C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Nat. Prod. Report.* **2004**, *21*, 594-624.
17. Meinel, W.; Pabel, U.; Osterloh-Quiroz, M.; Hengstler, J. G.; Glatt, H. Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. *Intern. J. Cancer* **2006**, *118*, 1090-1097.

18. Martinez, M.-C. M.; Nortier, J.; Vereerstraeten, P.; Vanherweghem, J.-L. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. *Nephrol Dial. Transplant.* **2002**, *17*, 408-412.
19. Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. The aristolochic acid and aristolactams. *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 657-666.
20. Stiborova, M.; Frei, E.; Breuer, A.; Bieler, C. A.; Schmeiser, H. H. Aristolactam I a metabolite of aristolochic acid I upon activation forms and adduct found in DNA of patients with chinese herts nephropathy. *Experim. Toxic. Pathol.* **1999**, *51*, 421-427.
21. Grollman, A. P.; Shibutani, S.; Moriya, M.; Miller, F.; Wu, L.; Moll, U.; Suzuki, N.; Fernandes, A.; Rosenquist, T.; Medverec, Z.; Jakovina, K.; Brdar, B.; Slade, N.; Turesky, R. J.; Goodenough, A. K.; Rieger, R.; Vukelić, M.; Jelaković, B. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *PNAS* **2007**, *104*, 12129-12134.
22. Rastrelli, L.; Capasso, A.; Pizza, C.; De Tommasi, N.; Sorrentino, L. New protopine and benzyltetrahydroprotoberberine alkaloids from *Aristolochia constricta* and their activity on isolated *Guinea-Pig ileum*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1065-1069.
23. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Leu, Y. L. The constituents of the root and stem of *Aristolochia cucurbitifolia* hayata and their biological activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1006-1009.
24. Wu, T. S.; Chan, Y. Y.; Wu, P. L.; Li, C. Y.; Mori, Y. Four aristolochic acid esters of rearranged *ent*-elemene sesquiterpenes from *Aristolochia heterophylla*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 348-351.
25. Wu, T. S.; Tsai, Y. L.; Wu, P. L.; Leu, Y. L.; Lin, F. W.; Lin, J. K. Constituents from the leaves of *Aristolochia elegans*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 692-693.
26. Leitão, G. G.; Kaplan, M. A. C. Chemistry of the genus *Aristolochia*. *Rev. Bras. Farm.* **1992**, *73*, 65-75.
27. Shi, L.- S.; Kuo, P.- C.; Tsai, Y.- L.; Damu, A. G.; Wu, T.- S. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 439-446.
28. Correa, M. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Conserva, L. M. Kauranoids from *Aristolochia rodriguesii*. *Fitoterapia* **1998**, *69*, 277-278.
29. Henry, G. E.; Adams, L. S.; Rosales, J. C.; Jacobs, H.; Heber, D.; Seeram, N. P. Kaurene diterpenes from *Laetia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett.* **2006**, *244*, 190-194.
30. Habib, A. A. M.; El-Sebakhy, N. A. *ent*-Kaurane-16 α ,17-diol and (-)-cubebin as natural products from *Aristolochia elegans*. *Pharmazie* **1981**, *36*, 291-294.
31. Lopes, L. M. X.; Nascimento, I. R. Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 953-957

32. Rucker, G.; Langmann, B.; Siqueira, N. S. Constituents of *Aristolochia triangularis*. *Planta Med.* **1981**, *41*, 143-149.
33. Gaitan, R.; Gómez, H. A.; Tapia, S.; Villadiego, A. M.; Méndez, D. (-)-Acido-II-hidroxi-kaur-16-en-19-óico, um nuevo kaureno aislado de *Aristolochia anguicida* Jacq. *Rev. Latinoamer. Quim.* **2002**, *30*, 83-86.
34. Fraga, B. M. On the structure of an *ent*-kaurene diterpene from *Aristolochia anguicida*. *Rev. Latinoamer. Quim.* **2004**, *32*, 76-79
35. Lajide, L.; Escoubas, P.; Mizutani, J. Termite antifeedant activity in *Detarium microcarpum*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1101-1104.
36. Salah, M. A.; Bedir, E.; Toyang, N. J.; Khan, I. A.; Harries, M. D.; Wedge, D. E. Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L.) Muell et Arg. (Euphorbiaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7607-7610.
37. Messiano, G. B.; Vieira, L.; Machado, M. B.; Lopes, L. M. X.; Bortoli, S. A.; Zukerman-Schpector, J. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatilis*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2655-2659.
38. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V. Clerodane diterpenes from *Aristolochia* species. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2781-2784.
39. Leitão, G. G.; Kaplan, M. A. C.; Galeffi, C. *epi*-Populifolic acid from *Aristolochia cymbifera*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3277-3279.
40. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2265-2268
41. Bomm, M. D.; Zukerman-Schpector J.; Lopes, L. M. X. Rearranged (4→2) *-abeo*-clerodane and clerodane diterpenes from *Aristolochia chamissonis*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 455-461.
42. Duarte, I. D.; Ferreira-Alves, D. L.; Piló-Veloso, D.; Nakamura-Craig, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinoceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *J. Ethnopharm.* **1996**, *55*, 13-18.
43. Ruggiero, S. G.; Rodrigues, B. L.; Fernandes, N. G.; Stefani, G. M.; Piló-Veloso, D. Structure of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid. *Acta Crystallogr.* **1997**, *C53*, 982-984.
44. Belinelo, V. J.; Reis, G. T.; Stefani, G. M.; Ferreira-Alves, D. L.; Piló-Veloso, D. Synthesis of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid derivatives. Part IV: Mannich base derivatives and its activities on the electrically stimulated guinea-pig ileum preparation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 830-836.

45. King-Díaz, B.; Pérez-Reyes, A.; Santos, F. J. L.; Ferreira-Alves, D. L.; Piló-Veloso, D.; Carvajal, S. U.; Lotina-Hennsen, B. Natural diterpene derivative β -lactone as photosystem II inhibitor on spinach chloroplast. *Pest. Biochem. Physiol.* **2006**, *84*, 109-115.
46. Choudhury, M. K.; Haruna, A. K.; Johnson, E. C.; Houghton, P. J. Structural elucidation of columbin, a diterpene isolated from the rhizomes of *Aristolochia albida*. *Indian J. Pharm. Sci.* **1997**, *59*, 34-37.
47. Santos, F. J. L.; Alcântara, A. F. C.; Ferreira-Alves, D.; Piló-Veloso, D. Theoretical and experimental NMR studies of the Swern oxidation of methyl $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapan- 17β -oate. *Struct. Chem.* **2008**, *19*, 624-631.
48. Bailey, J. A.; Vincent, G. G.; Burden, R. S. Diterpenes from *Nicotiana glutinosa* and their effect on fungal growth. *J. Gen. Microbiol.* **1974**, *85*, 57-64.
49. Cutler, H. G.; Reid, W. W.; Deletang, J. Plant growth inhibiting properties of diterpenes from tobacco. *Plant Cell Physiol.* **1977**, *18*, 711-714.
50. Bailey, J. A.; Carter, G. A.; Burden, R. S.; Wain, R. L. Control of rust diseases by diterpenes from *Nicotiana glutinosa*. *Nature* **1975**, *255*, 328-329.
51. Ulubelen, A.; Miski, M.; Johansson, C.; Lee, E.; Mabry, T. J.; Matlin, S. A. Terpenoids from *Salvia palaestina*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1386-1387.
52. Decorzant, R.; Vial, C.; Naef, F.; Whitesides, G. M. A short synthesis of ambrox from sclareol. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1871-1879.
53. Baratta, M. T.; Ruberto, G.; Tringali, C. Constituents of the pods of *Piliostigma thonningii*. *Fitoterapia* **1999**, *70*, 205-208.
54. Kouzi, S. A.; McChesney, J. D. Microbial models of mammalian metabolism: fungal metabolism of the diterpene sclareol by *Cunninghamella* species. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 483-490.
55. Larrahondo, J. E.; Acevedo, C. Terpenoides de *Aristolochia ringens*. *An. Asoc. Quim. Argent.* **1990**, *78*, 355-358.
56. Hanson, J. R.; Siverns, M.; Piozzi, F.; Savona, G. The ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of kauranoid diterpenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1976**, 114-117.
57. Wu, Y.-C.; Hung, Y.-C.; Chang, F.-R.; Cosentino, M.; Wang, H.-K.; Lee, K.-H. Identification of *ent*- $16\beta,17$ -dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids Annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 635-637.
58. Etse, J. T.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. Chemistry in the Annonaceae - XXIV. Kaurane and kaur-16-ene diterpenes from the stem bark of *Annona riticulata*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 979-983.

59. Aljančić, I.; Macura, S.; Juranić, N.; Andjelković, S.; Randjelović, N.; Milosavljević, S. Diterpenes from *Achillea clypeolata*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 169-171.
60. Piozzi, F.; Savona, G.; Hanson, J. R. Kaurenoid diterpenes from *Satchys lanata*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1237-1238.
61. Misra, R.; Pandey, R. C.; Dev. S. Higher isoprenoids – IX. Diterpenoids from the oleoresin of *Hardwickia pinnata* Part 2: Kolavic, kolavenic, kolavenolic and kolavonic acids. *Tetrahedron* **1979**, *35*, 979-984.
62. Monti, H.; Tiliacos, N.; Faure, R. Copaiba oil: isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 1013-1015.
63. Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Cubillo, L.; Monje, V. A.; Hernández, J. M.; Basade, P. Derivatives of malonic acid in *Parentucellia latifolia*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 651-653.
64. Caputo, R.; Mangoni, L. Diterpenes from *Araucaria bidwilli*. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 467-470.
65. Cavin, A.- L.; Hay, A.- E.; Marston, A.; Stoeckli-Evans, H.; Scopelliti, R.; Diallo, D.; Hostettmann, K. Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 768-773.
66. Dey, A. K.; Wolf, H. R. Synthesis of ethers of the enantio-14,15-dinorlabdane series from eperuic acid. *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 1004-1010.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from authors (or from MDPI).

© 2008 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Anexo II

A new configurational analysis of 1,6,7-triacetoxy-8,13-epoxy-14-labden-11-one isolated from *Plectranthus ornatus* based on NMR and theoretical calculations.

Patrícia M. Oliveira, Alison G. Pacheco, Rosemeire B. Alves, Dorila Piló-Veloso, Délio S. Raslan, Antônio F. de Carvalho Alcântara*

Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901 – MG, Brazil

*Mail address: Departamento de Química, ICEx, UFMG. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil. E-mail: aalcantara@zeus.qui.ufmg.br

Abstract: This work describes the configurational and conformational analyses of 1,6,7-triacetoxy-8,13-epoxy-14-labden-11-one, a labdane diterpenoid isolated from *Plectranthus ornatus*. Its relative stereochemistry was previously proposed by comparison with ^1H and ^{13}C NMR data of forskolin (**2**); however, the configurations of C-8 and C-13 have not been confirmed. Correlations between ^{13}C NMR experimental data and HF/6-31G* calculated values of carbon chemical shifts were performed for configurational and conformational analyses. This procedure was formerly applied to the configurational analysis of **2**. Among the seven different forskolin-type structures investigated, the ^{13}C NMR data of **2** correlated best with those with the same stereochemistry of **2** described in the literature. Thus, the same procedure was considered valid for configurational analysis of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*. The relative stereochemistry of this compound based on theoretical calculations was similar to the structure previously proposed, but the best results were obtained considering configurational inversion at C-13.

Keywords: *Plectranthus ornatus*, labdane diterpenoid, configurational analysis by NMR data, HF and DFT theoretical calculations, carbon chemical shift calculations.

1. Introduction

Plectranthus ornatus Codd. (Lamiaceae) is popularly used in Brazil to treat digestive problems as a substitute of species *P. barbatus* [1]. Previous studies on the secondary metabolites of *P. ornatus* Codd. (*syn.*: *Coleus comosus* Hochst. Ex Gürke) reported the isolation of labdane and clerodane derivatives [2,3]. A labdane diterpenoid structure belonging to the *normal*-labdane series according to NMR analyses was previously isolated from *P. ornatus* [2]. Structure **1** was proposed for this labdane diterpenoid considering the stereochemistry of forskolin (**2**) and related diterpenoids (Figure 1) [4]. The last compound was isolated from *P. barbatus* Andr. (*syn.*: *Coleus barbatus* and *Coleus forskohlii* Briq.), which shows a diversity of pharmacological properties related to the activation of adenylyl cyclase, thus, modulating cAMP levels [5]. For example, the activation of adenylyl cyclase can stimulate gastric secretions and the presence of **2** in *P. barbatus* may explain its use in the popular treatment of digestive disorders.

Although the 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, and ^1H - ^{13}C HMBC) NMR analyses of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* are in agreement for **1**, the configurations of C-8 and C-13 have not been confirmed. The stereochemistry of the forskolin derivatives is normally deduced by NOESY experiment [6-9] and the exciton chirality circular dichroism method [6]. The *R* configuration of C-13 in these forskolin-type skeletons was

confirmed by NOESY experiments based on correlations between the signals attributed to H-16 and H-17. However, in the case of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*, NOESY correlations between H-16 and H-17 were not observed. The signal at δ_{H} 1.52 (H-17) shows NOESY correlations only with the signal at δ_{H} 2.66–2.60 (H-12 $_{\alpha}$ /H-12 $_{\beta}$). The signal at δ_{H} 1.23 (H-16) shows NOESY correlations only with the signals at δ_{H} 2.66–2.60 and 5.95 (H-14) [2].

Therefore, the present work describes the configurational and conformational analyses of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* based on correlations between ^{13}C NMR data and calculated carbon chemical shift values. Geometry optimizations and carbon chemical shift calculations were performed using HF [10] and DFT [11] methods. This procedure has been efficiently employed in the structural determination of diterpenoids [12] and other organic compounds [13,14]. Correlations between calculated and experimental chemical shifts from ^{13}C NMR data of **2** were considered a validation criterion of this procedure in the configurational determination of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*.

2. Materials and Methodology

Theoretical studies were carried out using software package GAUSSIAN03 [15]. Spatial arrangements determined by NMR data were used as initial models in geometry optimization calculations. HF and DFT geometry optimizations were performed using the geometries previously obtained by the PM3 semi-empirical method [16]. BLYP functional with standard Pople's split valence 6-31G* base set [17-21] was used in DFT calculations. The optimized geometries were characterized as true minima on the potential energy surface (PES) when all harmonic frequencies were real. The electronic-nuclear energies (E) were calculated by HF and DFT methods. HF/6-31G* and DFT/BLYP/6-31G* optimized geometries were used in carbon

chemical shift calculations at the same levels of theory. Calculated carbon chemical shifts (σ_C) were obtained in relation to the corresponding HF/6-31G* and DFT/BLYP/6-31G* calculated values for tetramethylsilane (σ_C 208.21 and 186.8, respectively).

Correlations between σ_C values and experimental carbon chemical shifts (δ_C) were obtained using software package Origin™ Standard 7.5; σ_C and δ_C values were plotted on the x and y axes, respectively. Correlation curves were given as linear fits with correlation coefficients (R^2) and standard deviations (SD) furnished by the program.

3. Results and Discussion

Initially, HF/6-31G* and DFT/BLYP/6-31G* geometry optimizations for structures in the gaseous phase were carried out for **2** and its six configurational derivatives at C-7, C-8, and C-13 (Figure 2). Structures **2(C7,C8,C13)** and **2(C8,C13)** have the highest and lowest energies, respectively (Table 1). The energy difference between these structures ($\Delta E = 8.50$ kcal/mol) is very small and all structures are thermodynamically probable. All structures present rings A and B in the chair conformation, ring conjunction as *trans*-form for A/B, and stabilized by a hydrogen bond between the hydrogen of the hydroxyl group at C-9 and the oxygen at C-1.

Structures **2**, **2(C7)**, **2(C7,C13)**, and **2(C13)** show ring C as a chair conformation with lower energy in relation to the boat conformation ($\Delta E = E_{(\text{chair})} - E_{(\text{boat})} < -1.0$ kcal/mol). On the other hand, **2(C8)**, **2(C8,C13)**, and **2(C7,C8,C13)** show ring C in a boat conformation and present a higher energy difference in relation to the one in chair conformation ($\Delta E = E_{(\text{boat})} - E_{(\text{chair})} \sim -4.5$ kcal/mol). As a result, the structures with configurational inversion of C-8 show ring C in a boat conformation, ring conjunction as *cis*-form for B/C, and C-17 is in the equatorial

position on ring B. There is a hydrogen bond between the hydroxyl group at C-6 and the oxygen atoms of the acetate group at C-7 in **2**, **2(C8)**, **2(C13)**, and **2(C8,C13)**. As **2(C8)** and **2(C8,C13)** show the highest energy values in Table 1, this hydrogen bond is not a significant interaction in their conformational analyses.

Table 1 also shows the linear fits (R^2) and standard deviations (SD) obtained from the correlations between the ^{13}C NMR data of **2** and HF/6-31G* calculated carbon chemical shifts of **2** and its configurational derivatives for optimized geometries in the same level of theory. Correlations for **2** show the highest R^2 (0.9971) and lowest SD (3.89) values (see Figure 3). The plots of the carbonyl (δ_{C} 205.0; C-11) and alkenyl (δ_{C} 146.3 and 112.8, for C-14 and C-15, respectively) groups show higher deviations in relation to a linear fit curve. These deviations may be attributed to interactions between the solvent and π -systems that were not considered in the theoretical calculations [22].

Thus, the best correlations are verified between the experimental ^{13}C NMR data of **2** and HF/6-31G* calculated carbon chemical shifts of **2**, which agree with the structure proposed in the literature. As a consequence, this procedure may also be considered valid to determine the configuration of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*. Similar theoretical investigations were performed for **1** and its six corresponding configurational derivatives, i.e. **1(C7)**, **1(C8)**, **1(C13)**, **1(C7,C13)**, **1(C8,C13)**, and **1(C7,C8,C13)**, as shown in Figure 2.

HF/6-31G* geometry optimizations and carbon chemical shift calculations were performed for **1** and its configurational derivatives. The conformational analyses of these structures are similar to those of **2** and its derivatives. Ring A and B are in chair conformations in all structures. The energy difference between the chair and the boat conformations of ring A is high ($\Delta E = E_{(\text{chair})} - E_{(\text{boat})} \sim -14.0$ kcal/mol). Structures **1**, **1(C7)**, **1(C13)**, and **1(C7,C13)** present ring C in a chair conformation. For these structures, the energy difference between the chair and the boat conformations of ring C is small ($\Delta E = E_{(\text{chair})} - E_{(\text{boat})} < -1.0$ kcal/mol). On the other

hand, ring C of **1(C8)**, **1(C8,C13)**, and **1(C7,C8,C13)** is in a boat conformation. The energy difference between the chair and the boat conformations of ring C of the latter is high ($\Delta E = E_{(\text{boat})} - E_{(\text{chair})} \sim -22.0$ kcal/mol).

Table 2 shows HF/6-31G* calculated energies (E) of the optimized geometries of **1** and its configurational derivatives. **1(C8,C13)** and **1(C8)** show the lowest and the highest energies, respectively. The energy difference between these structures ($\Delta E = E_{1(\text{C8,C13})} - E_{1(\text{C8})} = -25.88$ kcal/mol) is sufficiently high to favor mainly the formation of **1(C8,C13)**. However this structure shows *cis*-fusion for rings B/C with C-17 and C-14 on opposite sides of ring C plane (α - and β -positions, respectively). This geometry does not allow the NOESY correlation to be observed between H-17 and H-14, which has been experimentally observed for the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*.

Correlations between the experimental ^{13}C NMR data of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* and HF/6-31G* calculated carbon chemical shifts of **1** and its configurational derivatives were obtained for optimized geometries in the same level of theory (Table 2). Correlations for **1(C13)** show the highest R^2 (0.9993) and the lowest SD (2.09) values (as shown in Figure 4). The stereochemistry of **1(C13)** shows C-13 in the *S* configuration and agrees with the NOESY correlation between the signal of H-16 only with the signal of H-14 observed for the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* [2].

Moreover, this compound also shows a correlation between the signals of H-12 and H-17 in the NOESY contour map. The boat conformation of ring C was previously proposed to justify this NOESY correlation for the forskolin-type skeleton [9]. However, the crystal structure of forskolin derivatives indicates that ring C [9] is in the chair conformation. In the case of **1(C13)**, the calculated distances between H-17 and H-12 $_{\beta}$ are 1.759 and 3.415 Å for the boat and chair conformations, respectively. Therefore, both conformations of ring C of **1(C13)** allow NOESY correlations involving H-17 and H-12 $_{\beta}$. In addition, these conformations of ring C may equally

exist for **1(C13)** in solution, considering the low calculated energy difference ($\Delta E = E_{(\text{chair})} - E_{(\text{boat})} < -1.0$ kcal/mol). Thus, the correct relative stereochemistry of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* is **1(C-13)**, as shown in Figure 2.

The DFT/BLYP/6-31G* method was also employed in geometry optimizations and calculations of carbon chemical shifts. The energy and chemical shift values calculated by the DFT/BLYP/6-31G* method agree with the HF/6-31G* calculated values. These values are shown as supplementary material.

4. Conclusion

Theoretical investigations on the chemical properties of organic compounds have grown quickly in the last years. However, relatively few works have employed theoretical calculations of NMR data to investigate configurational analysis of organic compounds. Initially, correlations between ^{13}C NMR data of forskolin and calculated carbon chemical shifts of forskolin (**2**) and six different forskolin-type structures were performed. The best correlations were verified between ^{13}C NMR data of **2** and HF/6-31G* calculated carbon chemical shifts of **2**. Thus, this procedure was considered valid to determine the relative configuration of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*.

Among the different structures investigated, the ^{13}C NMR data of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* showed the best correlation with **1(C13)**. The stereochemistry of this structure is an epimer of the structure previously proposed (**1**). In contrast, **1(C13)** shows configurational inversion at C-13 (*S* configuration) in relation to **1** (with *R* configuration of C-13). Thus, carbon chemical shift calculations may be an efficient alternative for the

configurational and conformational analyses of organic compounds, mainly when experimental data are insufficient or do not exist.

Supplementary Material

Tables with the geometric parameters, figures with liner fit curves, and other results of all the optimized structures considered in this work are available from the authors upon request.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support.

References

- [1] Albuquerque, R.L.; Kentopff, M.R.; Machado, M.I.; Silva, M.G.V.; Matos, F.J.A. Diterpenos Tipo Abietanos Isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews. *Quim. Nova*, **2007**, *30*(8), 1882-1886.
- [2] Oliveira, P.M.; Ferreira, A.A.; Silveira, D.; Alves, R.B.; Rodrigues, G.V.; Raslan, D.S. Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*(4), 588-91.
- [3] Rijo, P.; Simões, M.F.; Rodríguez, **B.** Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*. *Magn. Res. Chem.* **2005**, *43*(7), 595-8.

- [4] Rijo, P.; Gaspar-Marques, C.; Simões, M.F.; Duarte, A.; Rodríguez, B. Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*(10), 1387-90.
- [5] Lukhoba, C.W.; Simmonds, M.S.J.; Paton, A.J. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *103*, 1-24.
- [6] Shan, Y.; Xu, L.; Lu, Y.; Wang, X.; Zheng, Q.; Kong, L.; Niwa, M. Diterpenes from *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq. (Labiatae). *Chem. Pharm. Bull.*, **2008**, *56*(1), 52-56.
- [7] Shan, Y.; Wang, X.; Zhou, X.; Kong, L.; Niwa, M. Two Minor Diterpene Glycosides (I) and an Eudesmane Sesquiterpene (II) from *Coleus forskohlii*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, *55*(3), 376-381.
- [8] Xu, L.-L.; Kong, L.-Y. Labdane Diterpenoids from *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq. *J. Integr. Plant Biol.*, **2006**, *48*(4), 478-81.
- [9] Roy, R.; Misitra, A.; Varma, N.; Tandon, J.S.; Saux, M.; Carpy, A. Minor diterpenes from *Coleus forskohlii*. *Phytochemistry*, **1993**, *34*(6), 1577-80.
- [10] Binkley, J.S.; Pope, J.A.; Hehre, W.J. Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*(3), 939-47.
- [11] Parr, R.G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford: New York, **1989**.
- [12] Santos, F.J.L.; Alcântara, A.F.C.; Piló-Veloso, D. Theoretical and experimental NMR studies of the Swern oxidation of methyl 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate. *Struct. Chem.*, **2008**, *19*, 625-31.
- [13] Alcântara, A.F.C.; Piló-Veloso, D.; Almeida, W.B.; Maltha, C.R.A.; Barbosa, L.C.A. Conformational analysis of 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one derivatives by NMR and theoretical calculations. *J. Mol. Struct.*, **2006**, *791*, 180-5.
- [14] Pérez-Rebolledo, A.; Mendes, I.C.; Speziali, N.L.; Bertani, P.; Resende, J.M.; Alcântara, A.F.C.; Beraldo, H. N(4)-methyl-4-nitroacetophenone thiosemicarbazone and its nickel(II) complex: experimental and theoretical structural studies. *Polyhedron*, **2007**, *26*, 1449-58.

- [15] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; Pople, J.A. GAUSSIAN 2003, Revision B.04; Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, **2003**.
- [16] Dewar, M.J.S.; Zoebish, E.G.; Healy, E.F.; Stewart, J.J.P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*(13), 3902-9.
- [17] Ditchfield, R.; Hehre, W.J.; Pople, J.A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.*, **1971**, *54*(2), 724-8.
- [18] Hehre, W.J.; Ditchfield, R.; Pople, J.A. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.*, **1972**, *56*(5), 2257-61.
- [19] Hariharan, P.C.; Pople, J.A. Accuracy of AH_n equilibrium geometries by single determinant molecular orbital theory. *Mol. Phys.*, **1974**, *27*(1), 209-14.

- [20] Gordon, M.S. The isomers of silacyclopropane. *Chem. Phys. Lett.*, **1980**, 76(1), 163-8.
- [21] Hariharan, P.C.; Pople, J.A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta*, **1973**, 28(3), 213-22.
- [22] Alcântara, A.F.C.; Teixeira, A.F.; Silva, I.F.; Piló-Veloso, D.; Almeida, W.B.; NMR Investigation and Calculation of the effect of solvent on the conformational analysis of 4',7-di-hydroxy-8-prenylflavan. *Quim. Nova*, **2004**, 27(3), 371-7.

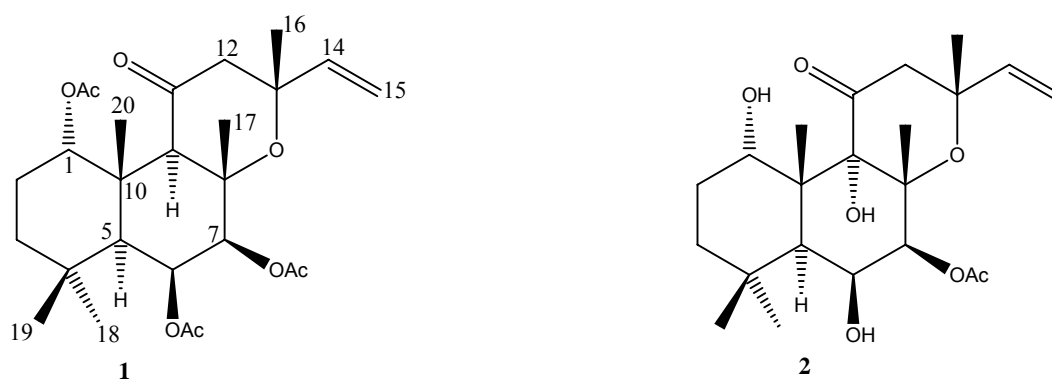


Figure 1. Chemical structure previously proposed to the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* (**1**) based on the stereochemistry of forskolin (**2**).

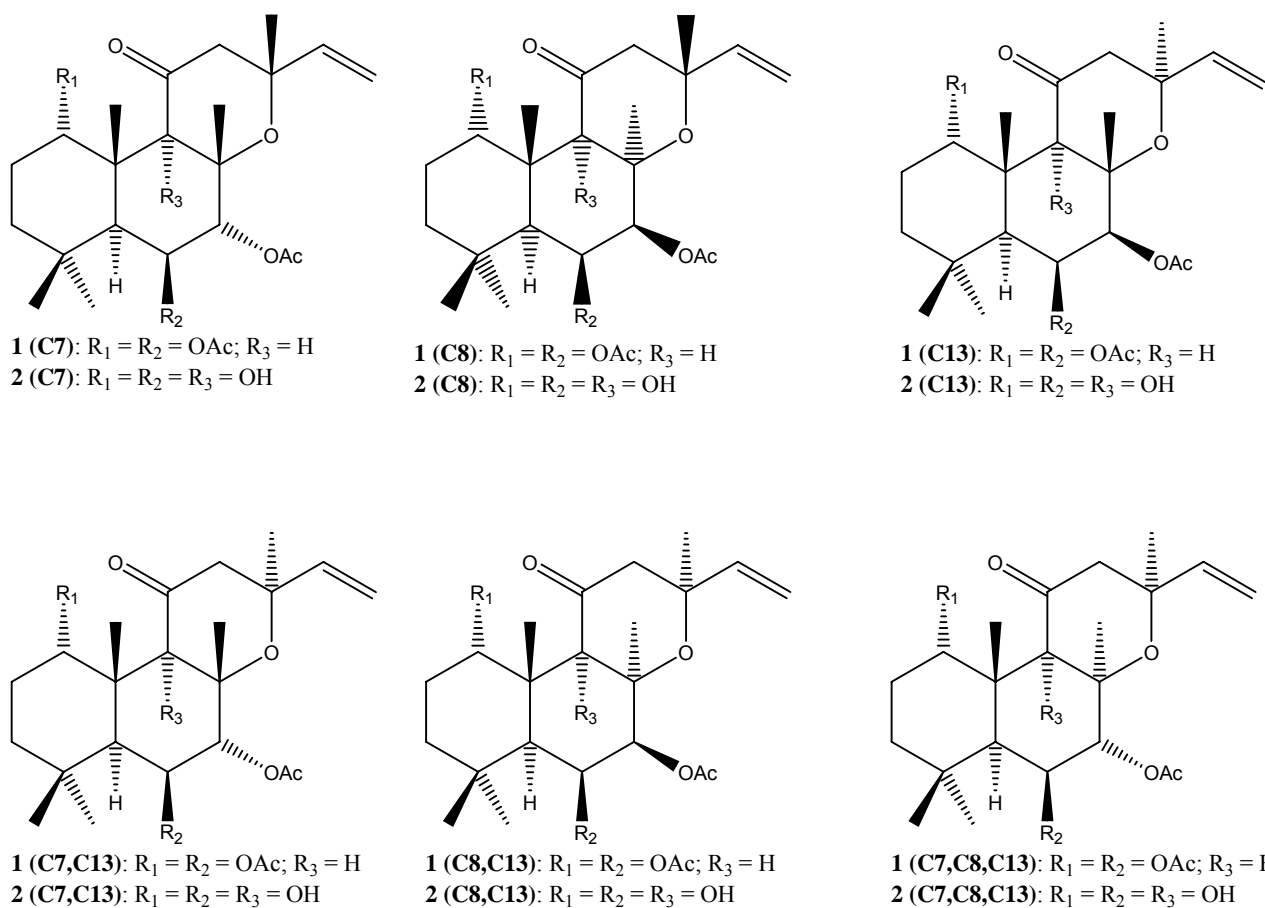


Figure 2. Chemical structure of derivatives of **1** and **2**, including the new relative configuration determined for labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus*, **1(C13)**.

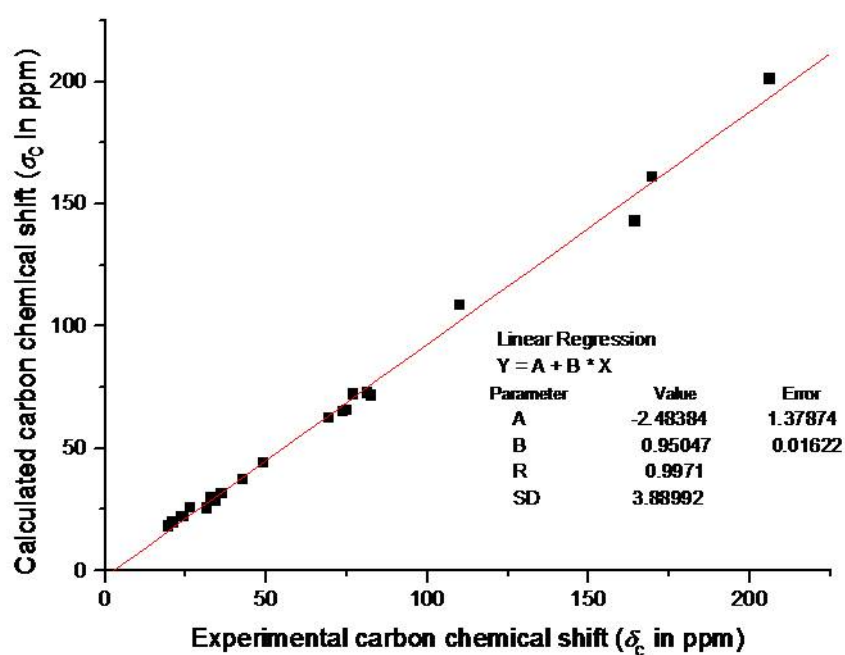


Figure 3. Correlations between ^{13}C NMR data of **2** and HF/6-31G* calculated carbon chemical shifts of **2** (structure in the gaseous phase).

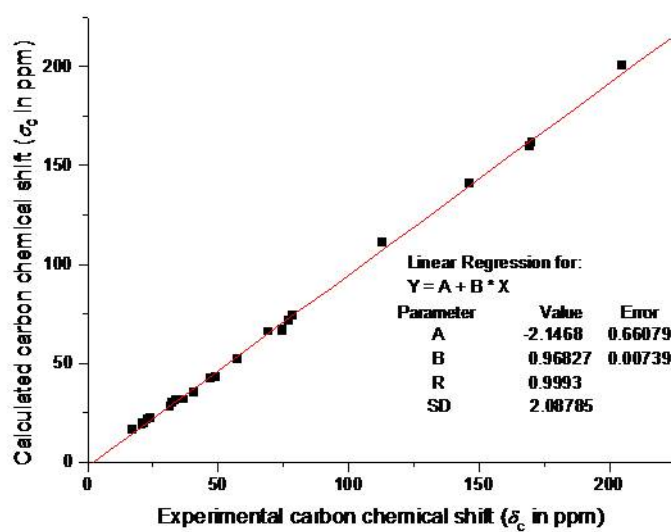


Figure 4. Correlations between ^{13}C NMR data of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* and HF/6-31G* calculated carbon chemical shifts of **1(C13)** (structure in the gaseous phase).

Table 1. Electronic-nuclear energies (E) of the optimized geometries of **2** and its configurational derivatives, including values of linear fit (R^2) and standard deviation (SD) obtained for the correlations between ^{13}C NMR data of **2** and their calculated carbon chemical shifts (HF/6-31G* calculations performed for structures in the gaseous phase)

Structure	E (in Hartree)	R^2	SD
2	-1376.87459459	0.9971	3.89
2(C7)	-1376.87303568	0.9963	4.41
2(C8)	-1376.86957667	0.9969	4.06
2(C13)	-1376.87732036	0.9966	4.19
2(C7,C13)	-1376.87550541	0.9957	4.76
2(C8,C13)	-1376.86391870	0.9951	5.08
2(C7,C8,C13)	-1376.87746603	0.9953	5.08

Table 2. Electronic-nuclear energies (E) of the optimized geometries of **1** and its configurational derivatives, including values of linear fit (R^2) and standard deviation (SD) obtained for the correlations between ^{13}C NMR data of the labdane diterpenoid isolated from *P. ornatus* and their calculated carbon chemical shifts (HF/6-31G* calculations performed for structures in the gaseous phase)

Structure	E (in Hartree)	R^2	SD
1	-1605.59146801	0.9990	2.48
1(C7)	-1605.60387157	0.9983	3.33
1(C8)	-1605.58344451	0.9977	3.82
1(C13)	-1605.59510402	0.9993	2.09
1(C7,C13)	-1605.60784949	0.9984	3.19
1(C8,C13)	-1605.62468041	0.9973	4.13
1(C7,C8,C13)	-1605.62211270	0.9969	4.40

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)