

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA “PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

JOSEAN FECHINE TAVARES

Estudo fitoquímico de *Xylopiya langsdorffiana* St.-Hil. & Tul e *Fusaea longifolia*
(Aubl.) Saff.: Isolamento, Caracterização Estrutural e Atividade Biológica

JOÃO PESSOA

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JOSEAN FECHINE TAVARES

Estudo fitoquímico de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul e *Fusaea longifolia*
(Aubl.) Saff.: Isolamento, Caracterização Estrutural e Atividade Biológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde, da Universidade
Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências
para a obtenção do título de Doutor em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de
concentração: Farmacoquímica

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

João Pessoa
2007

JOSEAN FECHINE TAVARES

Estudo fitoquímico de *Xylopi* *langsdorffiana* St.-Hil. & Tul e *Fusaea longifolia*
(Aubl.) Saff.: Isolamento, Caracterização Estrutural e Atividade Biológica

Tese aprovada em __/__/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Universidade Federal da Paraíba- Orientador

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Universidade Federal da Paraíba- Examinadora

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Universidade Federal da Paraíba- Examinadora

Prof. Dr. Jorge Maurício David
Universidade Federal da Bahia- Examinador

Prof. Dr. Davi Antas e Silva
Universidade Federal Rural do Pernambuco- Examinador

*“Aprendi que se aprende errando
Que crescer não significa fazer aniversário.
Que o silêncio é a melhor resposta, quando se ouve uma bobagem.
Que trabalhar significa não só ganhar dinheiro.
Que amigos a gente conquista mostrando o que somos.
Que os verdadeiros amigos sempre ficam com você até o fim.
Que a maldade se esconde atrás de uma bela face.
Que não se espera a felicidade chegar, mas se procura por ela
Que quando penso saber de tudo ainda não aprendi nada
Que a Natureza é a coisa mais bela na Vida.”*

Herman Melville

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me dado força e coragem para superar os obstáculos ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, José Adailton e Ana Maria pelo apoio, força e dedicação para que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão Jean Fachine pelo apoio, companheirismo e ajuda em todos os momentos dessa caminhada.

A minha tia Vilauba (*in memoriam*) por toda dedicação e ajuda ao longo de toda a minha vida e por sempre ter incentivado e apoiado tudo que decidi fazer. Que Deus o tenha, e onde quer que ela esteja, estará vibrando com mais essa conquista como sempre fez.

Ao meu primo João Neto peça fundamental e exemplo em toda minha formação. Um exemplo de perseverança.

A minha avó Naninha por toda criação e ensinamentos.

Aos meus avós Antônio Luiz (*in memoriam*) e Antônia por todo o apoio e conforto.

A Minha amada esposa Vanessa Messias por toda compreensão, companheirismo, amor e carinho em todos os momentos dessa caminhada.

A todos meus Familiares que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Ao professor Marcelo Sobral por ter acreditado em mim, por todos os ensinamentos e companheirismo ao longo dessa jornada. E para o meu eterno mestre deixo uma frase que marca bem essa jornada: “Se o mestre for verdadeiramente sábio, não convidará o aluno a entrar na mansão do seu saber, e sim, estimulará o aluno a encontrar o limiar da própria mente” (Khalil Gibran).

Ao professor José Maria Barbosa Filho por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as fases desse trabalho.

A professora Fátima Vanderlei pelo apoio e ensinamentos incondicionais.

Ao professor Emídio Vasconcelos pelo apoio e colaboração no desenvolvimento dos artigos científicos.

A professora Tânia Sarmiento pela realização dos ensaios moluscicidas

A amiga e colaboradora Marianna Vieira, um exemplo de companheirismo, amizade e dedicação.

A professora Maria de Fátima Agra pela identificação do material botânico.

Aos alunos de Iniciação científica, em especial Karine Formiga, pela ajuda, apoio e dedicação no laboratório.

Ao amigo, irmão, pai, enfim não tenho palavras para classificar Vicente Carlos. Presente em todos os momentos desse trabalho, não só como técnico, mas como ser humano e sempre com palavras que construíram e constroem a minha formação, a você meus sinceros agradecimentos.

Ao grande amigo Raimundo Nonato, pessoa fundamental para o desenvolvimento desse trabalho, sempre disposto e com coragem de ajudar. Nunca foi me dado um não ao longo de todo esse tempo de convivência.

Ao grande amigo e companheiro Crispim, que apesar de ser do setor da farmacologia também esteve sempre presente incentivando e estimulando a superar os obstáculos.

Ao amigo Gilmário pelo apoio e incentivo que sempre me passou.

A Fernando Antônio de Medeiros quem me ensinou os primeiros passos dentro do laboratório e caminhou sempre junto comigo. Um exemplo de pessoa que contribuiu muito para minha formação.

A todos os colegas do laboratório que contribuíram de uma forma ou de outra para o desenvolvimento desse trabalho. Prefiro não citar nomes para não ser injusto em caso de esquecimento.

Aos colegas de turma, Harlei, Irinaldo, Xirley, Marcos, Albanita, Fabiano, pelo apoio e ensinamentos enquanto cursamos as disciplinas.

A Sócrates Golzio sempre presente quando precisei.

Ao CENAUREM nas pessoas do prof. Edilberto, Daniel Esdras e Kirley pela obtenção dos espectros e companheirismo quando estive nessa unidade.

Ao seu Gilvane Góes e Seu Flaviano pelas constantes viagens e coletas.

A professora Márcia Ortiz e ao professor. José Guilherme S. Maia pela análise dos óleos essenciais.

A todos os professores do LTF que contribuíram para a minha formação

A todos os funcionários do LTF que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho

Ao CNPq pela bolsa concedida

A todos que contribuíram direto ou indiretamente para que esse trabalho pudesse ser concluído, meus sinceros agradecimentos.

A todos

Meu muito obrigado!

RESUMO

Este trabalho descreve os resultados dos estudos fitoquímicos de *Xylopi*a *langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. conhecida popularmente como “pimenteira da terra” e *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. conhecida popularmente como “envira”, ambas pertencentes à família Annonaceae. As espécies tiveram seus constituintes químicos identificados através da análise de dados obtidos por métodos espectroscópicos como Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, espectrometria de massas, além de comparação com dados obtidos na literatura. Da espécie *Xylopi*a *langsdorffiana* foram isolados, através de métodos cromatográficos, nove substâncias, sendo três diterpenóides anteriormente descritos (ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico, ácido 13-epicuprêssico e ácido 8(17)12*E*,14-labdatrien-18-óico), três diterpenóides inéditos na literatura (ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico, ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico e *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol, Xylodiol), além de um feoforbídeo o 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo, sendo este o primeiro relato numa espécie vegetal, a Quercetina 3-*O*- α -L-raminosídeo e o β -sitosterol glicosilado. Os diterpenóides ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico, ácido 8(17)12*E*,14-labdatrien-18-óico e o Xylodiol apresentaram atividade citotóxica em V79, hepatócitos de ratos e atividade moluscicida frente ao *Biomphalaria glabrata*. O óleo essencial das folhas de *X. langsdorffiana* foi extraído em aparelho de Clevenger e caracterizado com CG-EM, apresentando o espatulenol como constituinte majoritário. Esse óleo apresentou uma excelente atividade moluscicida. Da espécie *Fusaea longifolia* foram isolados dois alcalóides: a estefolidina, sendo este o primeiro relato no gênero, e a *O*-metilmoscatolina. O óleo essencial da casca do caule dessa espécie foi extraído em aparelho de Clevenger e caracterizado com CG-EM, apresentando também o espatulenol na sua constituição. Assim, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o estudo químico de espécies da família Annonaceae e atividade biológica de substâncias isoladas nos modelos de citotoxicidade e moluscicida.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of two Annonaceae species: *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. and *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. popularly known as “pimenteira-da-terra” and “envira” respectively. The isolated compounds of these species were identified by IR, Nuclear Magnetic Resonance-NMR, Mass-spectroscopy data analysis and by comparison of the obtained data with that described in the literature. From *Xylopia langsdorffiana* it was isolated nine chemical constituents, three of them were known diterpenoids (*ent*-atisan-16 α -ol-18-oic acid, 13-epicupressic acid and 8(17)12*E*,14-labdatrien-18-oic acid), three new diterpenoids (*ent*-7 α -acetoxytrachyloban-18-oic acid, *ent*-7 α -hydroxytrachyloban-18-oic acid and *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol, Xylodiol), as well as the phaeophorbide 13b (*S*)-hidroxy-17*c*-ethoxyphaeophorbide for the first time described in plant species, Quercetin 3-*O*- α -L-rhaminoside and a glucosyl β -Sytosterol. The diterpenoids *ent*-7 α -acetoxytrachyloban-18-oic acid, 8(17)12*E*,14-labdatrien-18-oic acid and Xylodiol showed citotoxic activity against V79, hepatocytes of the rats as well as molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. The essential oil from the leaves of *X. langsdorffiana* were extracted in apparatus Clevenger and characterized by GC-MS affording sphaatulenol as the main compound. Moreover the essential oil presented an excellent molluscicidal activity. From its was isolated *Fusaea longifolia* stepholidine (an alkaloid described for the first time in the genus) and the *O*-metilmoschatoline. The essential oil from the stem bark of this species was submitted to extraction in apparatus Clevenger and the obtained essential oil was characterized by GC-MS analysis affording also sphaatulenol as main compound. In summary, this results obtained in this work had a contribution to chemical study of two Annonaceae species and the biological activity of the isolated compounds in the models of citotoxicity and molluscicidal.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo (representada em vermelho).....8
- FIGURA 2:** Algumas substâncias isoladas de espécies de Annonaceae.....10
- FIGURA 3:** Alguns alcalóides isolados em espécies do gênero *Xylopi*a.....12
- FIGURA 4:** Alguns terpenóides isolados em espécies do gênero *Xylopi*a.....13
- FIGURA 5:** Fotos de *Xylopi*a *langsdo*rffiana em seu habitat. a) árvore completa, b) detalhe dos frutos e c) detalhe das folhas. Foto: Josean Fechine Tavares.....14
- FIGURA 6:** Alcalóides isolados do caule de *Xylopi*a *langsdo*rffiana.....15
- FIGURA 7:** Fotos de *F. longifolia*: a) Folhas b) Flor e Fruto.....16
- FIGURA 8:** Espectro de IV em KBr do ácido 13-epicuprêssico.....25
- FIGURA 9:** Espectro de RMN ¹³C-H BBD do ácido 13-epicuprêssico (CDCl₃, 125 MHz).26
- FIGURA 10:** Espectro de RMN ¹³C-DEPT-135 do ácido 13-epicuprêssico (CDCl₃, 125 MHz).....27
- FIGURA 11:** Espectro de RMN de ¹H do ácido 13-epicuprêssico (CDCl₃, 500 MHz).....28
- FIGURA 12:** Expansão do espectro de RMN de ¹H do ácido 13-epicuprêssico na região de 0,75 a 2,5 ppm (CDCl₃, 500 MHz).....29
- FIGURA 13:** Espectro de correlação ¹H x ¹³C-HMQC do ácido 13-epicuprêssico (CDCl₃, 500 e 125 MHz, respectivamente).....30

- FIGURA 14:** Expansão do Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido 13-epicuprêssico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....31
- FIGURA 15:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido 13-epicuprêssico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....32
- FIGURA 16:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido 13-epicuprêssico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....33
- FIGURA 17:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido 13-epicuprêssico (CDCl_3 , 500 MHz).....34
- FIGURA 18:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido 13-epicuprêssico (CDCl_3 , 500 MHz).....35
- FIGURA 19:** Espectro de IV em KBr do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico.....37
- FIGURA 20:** Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 125 MHz).....38
- FIGURA 21:** Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 125 MHz).....39
- FIGURA 22:** Espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico na região de 0,75 a 2,4 ppm (CD_3OD , 500 MHz).....40
- FIGURA 23:** Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico na região de 0,75 a 2,4 ppm (CD_3OD , 500 MHz).....41
- FIGURA 24:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz, respectivamente).....42

- FIGURA 25:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....43
- FIGURA 26:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz, respectivamente).....44
- FIGURA 27:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz, respectivamente).....45
- FIGURA 28:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 MHz).....46
- FIGURA 29:** Espectro de IV do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico em KBr.....58
- FIGURA 30:** Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz).....59
- FIGURA 31:** Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz).....60
- FIGURA 32:** Espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....61
- FIGURA 33:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....62
- FIGURA 34:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz).....63
- FIGURA 35:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....64

FIGURA 36: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido <i>ent-7α-acetoxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	65
FIGURA 37: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido <i>ent-7α-acetoxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 MHz).....	66
FIGURA 38: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido <i>ent-7α-acetoxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 MHz).....	67
FIGURA 39: Espectro de massas por IE do ácido <i>ent-7α-acetoxitrachyloban-18-óico</i>	68
FIGURA 40: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 125 MHz).....	69
FIGURA 41: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 125 MHz).....	70
FIGURA 42: Espectro de RMN de ^1H do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 MHz).....	71
FIGURA 43: Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 MHz).....	72
FIGURA 44: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	73
FIGURA 45: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	74
FIGURA 46: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido <i>ent-7α-hidroxitrachyloban-18-óico</i> (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	75

FIGURA 47: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido <i>ent-7α</i> -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....	76
FIGURA 48: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY do ácido <i>ent-7α</i> -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....	77
FIGURA 49: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY do ácido <i>ent-7α</i> -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....	78
FIGURA 50: Espectro de massas por IE do ácido <i>ent-7α</i> -hidroxitrachyloban-18-óico.....	79
FIGURA 51: Espectro de IV do xylodiol em KBr.....	91
FIGURA 52: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do xylodiol (CDCl_3 , 125 MHz).....	92
FIGURA 53: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do xylodiol (CDCl_3 , 125 MHz).....	93
FIGURA 54: Espectro de RMN de ^1H do xylodiol (CDCl_3 , 500 MHz).....	94
FIGURA 55: Expansão do espectro de RMN de ^1H do xylodiol (CDCl_3 , 500 MHz).....	95
FIGURA 56: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do xylodiol (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	96
FIGURA 57: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do xylodiol (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	97
FIGURA 58: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do xylodiol (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	98
FIGURA 59: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do xylodiol (CDCl_3 , 500 MHz).....	99
FIGURA 60: Espectro de massas por IE do xylodiol.....	100

- FIGURA 61:** Espectro de IV do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico em KBr.....101
- FIGURA 62:** Espectro de RMN ^{13}C -APT do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz).....102
- FIGURA 63:** Espectro de RMN de ^1H do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....103
- FIGURA 64:** Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico na região de 4,5 a 7,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....104
- FIGURA 65:** Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico na região de 0,5 a 2,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....105
- FIGURA 66:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....106
- FIGURA 67:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz).....107
- FIGURA 68:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....108
- FIGURA 69:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz).....109
- FIGURA 70:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....110
- FIGURA 71:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....111
- FIGURA 72:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz).....112

FIGURA 73: Espectro de massas por IE do ácido 8(17),12 <i>E</i> ,14-labdatrien-18-óico.....	113
FIGURA 74: Cromatograma dos constituintes voláteis das folhas de <i>X. langsdorffiana</i>	114
FIGURA 75: Espectro de RMN ¹³ C-APT de estefolidina (CDCl ₃ , 50 MHz).....	133
FIGURA 76: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT de estefolidina (CDCl ₃ , 50 MHz)..	134
FIGURA 77: Espectro de RMN de ¹ H de estefolidina (CDCl ₃ , 200 MHz).....	135
FIGURA 78: Expansão do espectro de RMN de ¹ H de estefolidina (CDCl ₃ , 200 MHz).....	136
FIGURA 79: Espectro de RMN ¹³ C-APT de <i>O</i> -metilmoscatolina (CDCl ₃ , 50 MHz).....	137
FIGURA 80: Espectro de RMN de ¹ H de <i>O</i> -metilmoscatolina (CDCl ₃ , 200 MHz).....	138
FIGURA 81: Expansão do espectro de RMN de ¹ H de <i>O</i> -metilmoscatolina (CDCl ₃ , 200 MHz).....	139
FIGURA 82: Espectro de RMN ¹³ C-H BBD do 13b (<i>S</i>)-hidroxi-17 <i>c</i> -etoxifeoforbídeo (CDCl ₃ , 125 MHz).....	142
FIGURA 83: Espectro de RMN ¹³ C-DEPT-135 do 13b (<i>S</i>)-hidroxi-17 <i>c</i> -etoxifeoforbídeo (CDCl ₃ , 125 MHz).....	143
FIGURA 84: Espectro de RMN de ¹ H do 13b (<i>S</i>)-hidroxi-17 <i>c</i> -etoxifeoforbídeo (CDCl ₃ , 500 MHz).....	144
FIGURA 85: Expansão do espectro de RMN de ¹ H do 13b (<i>S</i>)-hidroxi-17 <i>c</i> -etoxifeoforbídeo na região de 8,5 a 6,0 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz).....	145
FIGURA 86: Expansão do espectro de RMN de ¹ H do 13b (<i>S</i>)-hidroxi-17 <i>c</i> -etoxifeoforbídeo na região de 5,0 a 1,0 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz).....	146

- FIGURA 87:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....147
- FIGURA 88:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....148
- FIGURA 89:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....149
- FIGURA 90:** Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente).....150
- FIGURA 91:** Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 500 MHz).....151
- FIGURA 92:** Espectro de RMN de ^1H do sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz).....153
- FIGURA 93:** Expansão do espectro de RMN de ^1H do sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo na região de 5,4 a 3,6 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz).....154
- FIGURA 94:** Expansão do espectro de RMN de ^1H do sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo na região de 2,8 a 0,6 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz).....155
- FIGURA 95:** Espectro de RMN ^{13}C -APT do sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz).....156
- FIGURA 96:** Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -APT do sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo na região de 110 a 30 ppm($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz).....157
- FIGURA 97:** Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -APT do sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo na região de 35 a 10 ppm($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz).....158

- FIGURA 98:** Espectro de RMN de ^1H da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo (CD_3OD , 200 MHz).....159
- FIGURA 99:** Expansão do espectro de RMN de ^1H da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 5,4 a 7,8 ppm(CD_3OD MHz).....160
- FIGURA 100:** Expansão do espectro de RMN de ^1H da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 3,0 a 4,4 ppm (CD_3OD MHz).....161
- FIGURA 101:** Espectro de RMN ^{13}C -APT da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo (CD_3OD , 50 MHz).....147
- FIGURA 102:** Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 115 a 180 ppm (CD_3OD , 50 MHz).....148
- FIGURA 103:** Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 70 a 106 ppm (CD_3OD , 50 MHz).....149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em CDCl_3 a 500 MHz do ácido 13-epicuprêssico.....	36
Tabela 2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em CD_3OD a 500 MHz do ácido <i>ent</i> -atisan-16 α -ol-18-óico.....	47
Tabela 3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em CDCl_3 a 500 MHz do ácido 8(17)12 <i>E</i> , 14-labdatrien-18-óico.....	114
Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 13b (<i>S</i>)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo em CDCl_3 a 500 e 125 MHz, respectivamente.....	152
Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da Quercetina 3- <i>O</i> - α -L-raminosídeo em CD_3OD obtidos a 200 e 50 MHz, respectivamente.....	165
Tabela 6: Atividade moluscicida de diterpenos isolados de <i>Xylopi</i> a <i>langsdorffiana</i> em adultos de <i>B.glabrata</i> (10 caramujos por concentração), sob condições laboratoriais e após 24h de exposição, pH 6,7.....	168

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt: Acetato de etila

APT: Attached Proton Test

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

COSY: Correlation Spectroscopy

d: dubleto

dd:duplo dubleto

dt: duplo tripleto

EIMS: Eletronic Impact Mass Spectroscopy

EtOH: Etanol

FATT: Fração de Alcalóides Terciários Totais

Fig. Figura

FM: Fórmula Molecular

HBBD: High Broad Decouplet

Hex: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

m: multipleteo

mmol: milimolar

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

MTT: metilazoetetrazólio

NOESY: Nuclear Overhauser Spectroscopy

RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carboo treze

s: singleto

t: tripleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
3.1 Considerações sobre a família Annonaceae	8
3.2. Considerações sobre o Gênero <i>Xylopi</i> L	11
3.3. Considerações sobre <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i> St-Hil & Tul.	14
3.4. Considerações sobre o gênero <i>Fusaea</i> Baill. e <i>Fusaea</i> <i>longifolia</i> (Aubl.) Saff	16
3.5. Considerações sobre Atividade biológica dos constituintes químicos isolados	17
3.5.1. Atividade citotóxica	17
3.5.2. Atividade moluscicida	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Alkaloids and Diterpenoids from <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i>	21
4.2. <i>ent</i> - Trachylobane Diterpenoids from <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i>	49
4.3. Xylodiol, A New Atisane Diterpenoid from <i>Xylopi</i> <i>Langsdorffiana</i> St-Hil & Tul. (Annonaceae)	81
4.4. Composition and molluscicidal properties of essential oils from leaves of <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i> A. St. Hil. et Tul. (Annonaceae)	116
4.5. Alkaloids and Volatile Constituents from the stem of <i>Fusaea</i> <i>longifolia</i> (Aubl.) Saff. (Annonaceae)	126
4.6. Outros Constituintes Químicos de <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i>	125
4.7. Atividade Moluscicida de Diterpenos Isolados de <i>Xylopi</i> <i>Langsdorffiana</i>	167
5.CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	170

5.1. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido 13-epicuprêssico	170
5.2. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido <i>ent</i> -atisan-16 α -ol-18-óico	171
5.3. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitrachyloban-18-óico	172
5.3.1. Principais fragmentações do ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitrachyloban-18-óico	173
5.4. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxitrachyloban-18-óico	174
5.4.1. Principais fragmentações do ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxitrachyloban-18-óico	175
5.5. Constantes físicas e dados espectroscópicos do xylodiol	176
5.5.1. Principais fragmentações do xylodiol	177
5.6. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido 8(17)12 <i>E</i> -14-labdatrien-18-óico	178
5.7. Constantes físicas e dados espectroscópicos de estefolidina	179
5.8. Constantes físicas e dados espectroscópicos de <i>O</i> -metilmoscatolina	180
5.9. Constantes físicas e dados espectroscópicos de 13b(<i>S</i>)-hidroxi-17c-etoxifaeoforbídeo	181
5.10. Constantes físicas e dados espectroscópicos de Quercetina 3- <i>O</i> - α -L-raminosídeo	182
6. CONCLUSÕES	184
REFERÊNCIAS	187

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Plantas como agentes terapêuticos são utilizadas pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização das plantas. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura.

Segundo Silva (2003) a Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, e que quase 85% da medicina tradicional envolvem o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais e seus princípios ativos.

A utilização e comércio de plantas medicinais estão em contínua expansão a nível mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado, e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitoterápicos, como alternativas terapêuticas (GUERRA; NODARI, 2003).

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para a 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 a sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (VIEGAS-JUNIOR et al., 2006).

O Brasil é o país que possui a maior floresta tropical e, também, a maior diversidade vegetal do mundo. Estima-se a existência de aproximadamente dois milhões de espécies distintas entre animais, vegetais e microrganismos distribuídos em uma grande variedade de ecossistemas (RIBEIRO et al., 1999).

Além das substâncias do metabolismo primário como proteínas, vitaminas e carboidratos, as células vegetais produzem substâncias mais complexas com as quais distinguem-se os vegetais superiores, caracterizando por sua vez as famílias, gêneros ou espécies vegetais, sendo estas substâncias os alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas,

saponinas, antraquinonas, etc. Ao longo da história, as plantas são fontes de importantes fármacos como: digoxina (*Digitalis lanata*), digitoxina (*Digitalis purpurea*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*), pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*) e mais recentemente o taxol (BARREIRO, 1990).

Muitos fármacos de origem natural são obtidos hoje através da síntese química ou servem de modelo para a síntese de outros fármacos bioativos, como a cocaína, cujo esqueleto tropânico serviu de protótipo para anestésicos locais como a procaína. A papaverina, um alcalóide isoquinolínico com propriedades antiespasmódicas, que serviu de modelo para o desenvolvimento de inúmeros derivados, entre os quais compostos de cadeia aberta, resultou na descoberta do verapamil. Outros fármacos oriundos da transformação de produto vegetal da saligenina, são o ácido acetilsalicílico e os sais de amônio quaternário usados como bloqueadores neuromusculares, originários da tubocurarina (BARREIRO, 1990). O marco mais importante para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais de plantas talvez tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos da *Salix alba*. O descobrimento do ácido acetilsalicílico (AAS), pioneiro dos fármacos sintéticos, marcou de certa forma a busca por novos fármacos, visto que substâncias naturais terapeuticamente úteis eram obtidas ao acaso. Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja por si próprios, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

A descoberta de novos compostos é motivada pela busca de substâncias mais ativas e menos tóxicas, que possam ser utilizadas no tratamento de diversas patologias, ou em substituição àquelas já existentes. Fontes alternativas aos medicamentos industrializados e a implementação de um projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais, são de grande interesse para a comunidade científica.

O Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Com sua enorme biodiversidade apresenta-se com grande potencial para a descoberta de princípios ativos (GUERRA; NODARI, 2003). Dessa forma, a necessidade de estimular pesquisas sobre plantas brasileiras, com vista à descoberta de substâncias com atividades biológicas, já se tornou evidente no mundo científico brasileiro e no exterior, devido à grande variedade de espécies e, especialmente, às mais diversas propriedades farmacológicas e tóxicas que muitas delas apresentam (GOTTLIEB; MORS, 1978). Nas últimas três décadas, com o desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, mais recentemente de instrumentos analíticos hifenados, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos

especiais isolados de angiospermas, muitos desses ainda sem qualquer avaliação do seu potencial farmacológico (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Recentes análises na descoberta de novos fármacos mostram que no período entre 1981 a 2002, das 877 novas moléculas colocadas no mercado, 67% são sintéticas e que destas 16,4% tem o farmacóforo inspirado em produto natural, daí a importância desses metabólitos para a terapêutica moderna (CRAGG et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, bem como nos países desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos a base de fontes naturais aumentam a cada dia. No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes (VIEGAS-JUNIOR et al., 2005).

Diante de todas estas justificativas, constatou-se a importância das pesquisas com plantas medicinais para descobrir moléculas bioativas ou protótipos para a síntese de novos fármacos mais potentes e com menor toxicidade.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

A família Annonaceae é caracterizada quimicamente pela presença de alcalóides, terpenóides e acetogeninas. O grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica vem desenvolvendo pesquisas com espécies dessa família, tendo relatado alcalóides do tipo isoquinolínico de *Rollinia leptopetala* (SETTE et al., 2000), *Hornschuchia obliqua* (FECHINE et al., 2003), *Guateria juruensis* (LIMA et al., 2003), *Duguetia gardneriana* (ALMEIDA et al., 2007) e diterpenóides do tipo caurano de *Xylopiya cayennensis* (ANDRADE, 2004).

Dando continuidade à pesquisa por novos compostos biologicamente ativos a partir de espécies da família Annonaceae, foram utilizados como objetos de estudo *Fusaea longifolia* (Aubl) Saff. e *Xylopiya langsdorffiana* St.- Hil. & Tul, visando contribuir para o estudo químico, biológico e quimiotaxonômico de plantas do norte/nordeste brasileiro e possibilitar estudos entre estrutura química e atividade farmacológica dos constituintes isolados.

2.2. Objetivos específicos

Isolar constituintes químicos de *X. langsdorffiana* e *F. longifolia*;

Identificar e/ou elucidar constituintes químicos de *X. langsdorffiana* e *F. longifolia*;

Contribuir com a quimiotaxonomia das espécies em estudo;

Disponibilizar extratos, frações e substâncias isoladas para estudos farmacológicos;

Caracterizar os constituintes voláteis de *X. langsdorffiana* e *F. longifolia*;

Avaliar a citotoxicidade de extratos e/ou substâncias isoladas de *X. langsdorffiana* e *F. longifolia*;

Avaliar o poder moluscicida dos constituintes voláteis de *X. langsdorffiana*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Annonaceae

A família Annonaceae foi catalogada em 1789 por Jussieu (HUTCHINSON, 1973). Annonaceae constitui uma família primitiva e pertencente à ordem Magnoliales (CRONQUIST, 1981). Apresenta 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros (MAAS et al., 2001). Sua distribuição geográfica ocorre quase que exclusivamente em regiões tropicais (HEYWOOD, 1985), sendo que no neotrópico está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies (CHATROU et al., 2004). As plantas dessa família são arbóreas, sendo as trepadeiras também muito frequentes (HEGNAUER, 1964). Além de seus frutos, na maioria dos casos, serem comestíveis, também são muito usados na terapêutica popular.

Na Fig. 1 encontra-se representada a distribuição da família Annonaceae no mundo; 50 gêneros são encontrados na Ásia e Austrália, na África 34 gêneros, enquanto no continente Americano são conhecidos 39 gêneros (BRUMMITT, 1992). Dos gêneros que compõem esta família, 34 podem ser encontrados na América do Sul, com predominância dos gêneros *Annona* L., *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavan, *Rollinia* St. Hil. e *Xylopia* L. No Brasil, há relatos de 29 gêneros da família Annonaceae, compreendendo cerca de 260 espécies (BARROSO, 1978). A família apresenta considerável riqueza de espécies principalmente na região amazônica e na floresta atlântica (LOBÃO et al., 2005). Segundo Walker, a família Annonaceae é originária da Ásia e Austrália, e mais recentemente, Lê Thomas, descreveu que esta família teve origem na África ou na América do Sul (LEBOEUF et al., 1982).



Figura 1: Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo representada em vermelho (www.arbolesornamentales.com/Annonaceae.jpg)

A família Annonaceae é conhecida principalmente por seus frutos comestíveis, tais como a pinha, fruta do conde ou ata (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.). Muitas árvores desta família são cultivadas, por serem suas sementes fontes de óleos fixos utilizados como óleos comestíveis ou para o preparo de sabão. Outras espécies têm sido empregadas na produção de álcool, na perfumaria e na medicina popular para vários propósitos (LEBOEUF et al., 1982).

Em termos taxonômicos, a família Annonaceae constitui um grupo muito uniforme, seja do ponto de vista anatômico, estrutural, de hábito e hábitat, distinguindo-se por apresentarem uma combinação de características bem marcantes. São vegetais lenhosos, arbustivos ou arborescentes. Possuem folhas simples, inteiras, alternadas e sem estípulas. As flores, hermafroditas, são quase sempre vistosas e geralmente solitárias. Há muitos estames, mais ou menos sésseis, inseridos em espiral. O ovário é constituído por vários carpelos (raras vezes um só). O fruto é geralmente uma baga carnosa, muitas vezes comestível, freqüentemente é uma região de várias bagas no mesmo receptáculo (SCHULTZ, 1984).

Do ponto de vista da constituição química, a família Annonaceae é caracterizada pela presença de alcalóides derivados de benzilisoquinolinas, principalmente aporfínicos. São registradas ainda, ocorrências em quantidade significativa, de flavonóides e terpenóides, especialmente diterpenos. Na última década, as acetogeninas vem sendo muito pesquisadas em espécies desta família, consideradas muito importantes devido aos seus efeitos citotóxico, antimicrobiano e inseticida (RUPRECHT et al., 1990).

Na Figura 2 (pág. 10) encontram-se representadas as estruturas de algumas substâncias isoladas de espécies de Annonaceae.

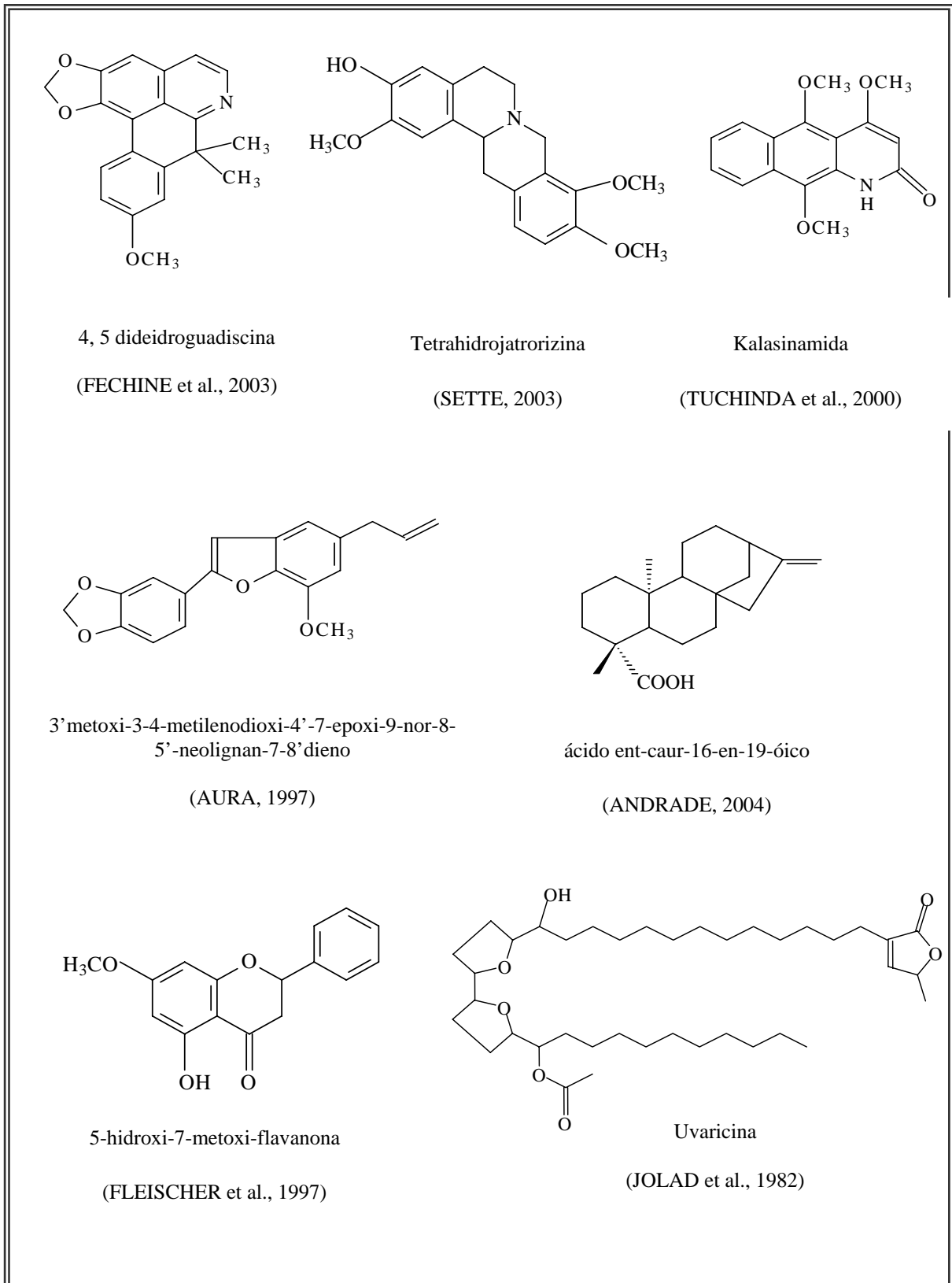


Figura 2: Algumas substâncias isoladas de espécies de Annonaceae

3.2. Considerações sobre o Gênero *Xylopi* L.

O gênero *Xylopi* é constituído de cerca de 150 espécies (BRUMMITT, 1992). Algumas são usadas como condimentos enquanto outras fornecem fibras para a cordoaria. O lenho é leve, duradouro e algumas espécies apresentam propriedades medicinais (ROCHA et al., 1979).

O fruto de algumas espécies do gênero *Xylopi* é usado popularmente como condimento por apresentar odor semelhante ao da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e é empregado, por este motivo, como seu substituto (CHADWICH, 1990). Muitos são usados também como carminativos. Várias espécies são utilizadas para diversos fins e, em especial, na medicina popular como vermífugos (THOMAS, 1989) e agentes antimicrobianos (CORREA, 1984).

Estudos etnofarmacológicos e farmacológicos já foram realizados com espécies desse gênero, por exemplo, *X. aethiopica* é utilizada para o tratamento de bronquite e desinteria, *X. aromatica* como agente diurético e para edema de pele, *X. sericeae* como antiinflamatório e *X. cayennensis* para problemas cardiovasculares (MOREIRA, 1999; MACÊDO; FERREIRA, 2004; NASCIMENTO et al., 2006).

Um grande número de componentes químicos tem sido isolado do gênero *Xylopi*, incluindo acetogeninas biologicamente ativas, dentre elas, a xylopiena e a xylomatenina com atividade citotóxica superior à adramicina para três linhagens de células tumorais (COLMAN-SAZARITORIA et al., 1994), diterpenos do tipo caurano e labdano (FELICIO; ROQUE 1989), sesquiterpenos (MOREIRA et al., 2007), alcalóides (HARRIGAN et al., 1994), lignóides (WAHI et al., 1995) e flavonóides (SANTOS; SALATINO, 2000). Dentre os alcalóides os mais comuns são os derivados do núcleo isoquinolínico (Figura 3, pág. 12) e terpenóides do tipo caurano, trachylobano, atisano, labdanos, inclusive dímeros, (Figura 4, pág.13).

Além dos constituintes acima mencionados têm sido publicado dezenas de artigos sobre óleos essenciais de espécies do gênero *Xylopi* demonstrando que o gênero é rico em monoterpenos e sesquiterpenos (LAGO et al., 2003, MAIA et al., 2005). Vários óleos apresentaram atividade antimicrobiana e citotóxica (ASEKUN; ADENIYI, 2004), e também são utilizados em cosmetologia e perfumaria e têm mostrado o espatulenol como um possível marcador quimiotaxônomico, estando presente em quase todas as espécies de *Xylopi* que foram estudadas (MAIA et al., 2005).

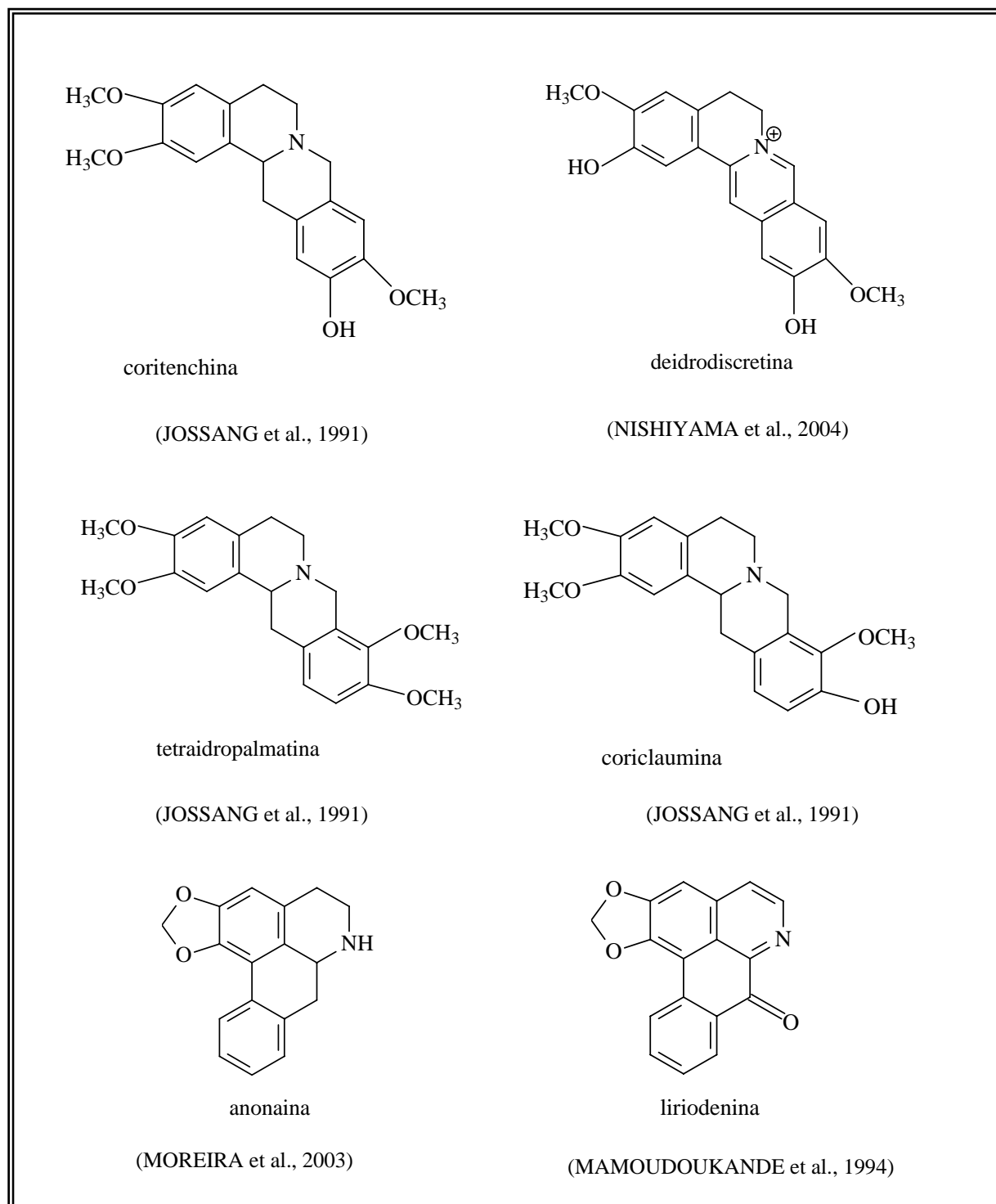


Figura 3: Alguns alcalóides isoquinolínicos isolados em espécies do gênero *Xylopi*

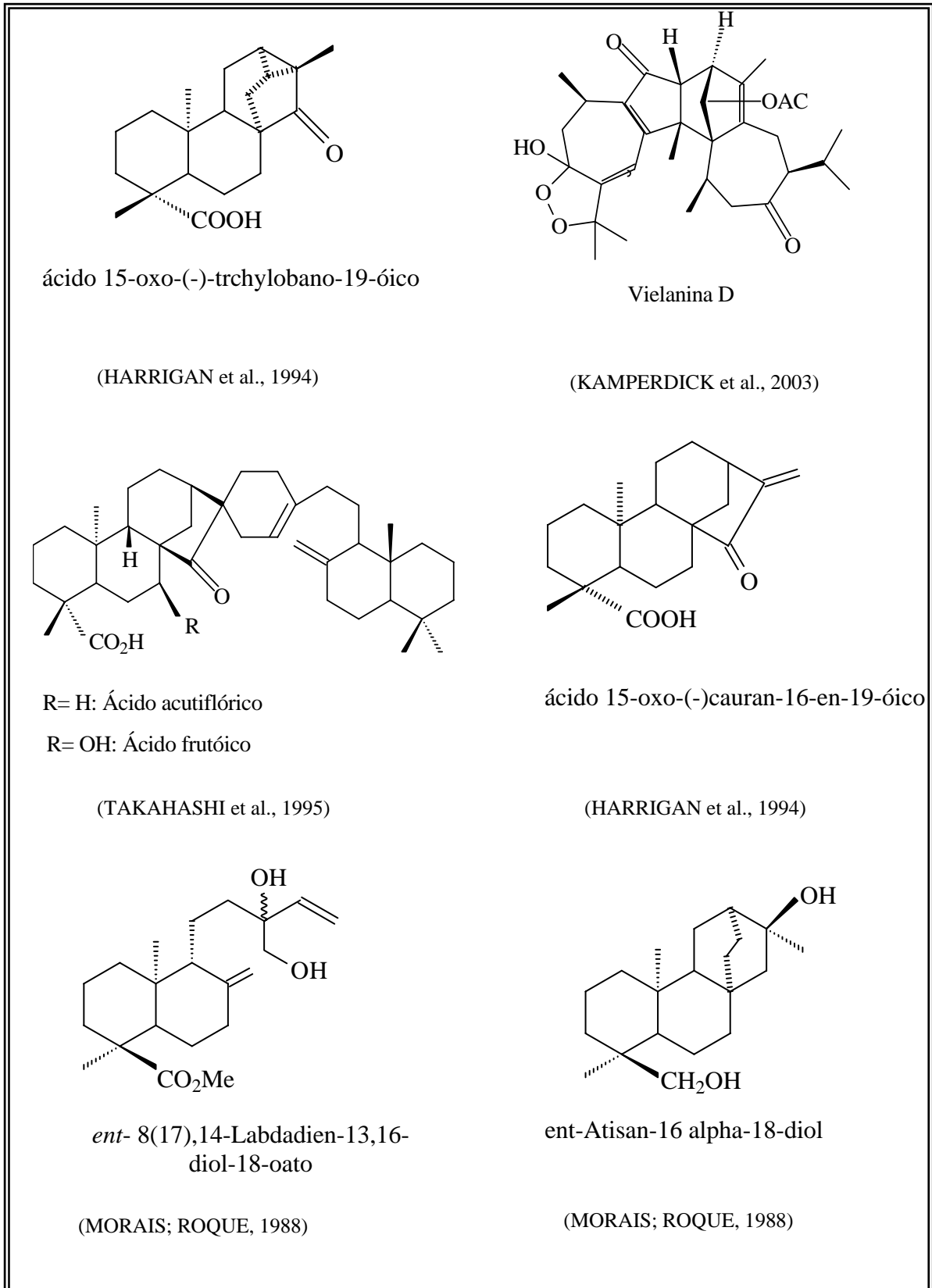


Figura 4: Alguns terpenóides isolados em espécies do gênero *Xylopi*a

3.3. Considerações sobre *Xylopia langsdorffiana* St-Hil & Tul.

Xylopia langsdorffiana é uma árvore de 5 – 7 m de altura. Possui folhas alternas, lanceoladas, inteiras, seríceas, flores roxas e pendunculadas, (Figura 5, pág.14). Fornece madeira para obras internas, carpintaria e caixotaria. A casca dá líber para cordoaria. É conhecida popularmente como pimenteira-da-terra (CORREA, 1984). Esta planta vem sendo estudada pelo LTF desde 2002 por ser considerada uma fonte promissora de substâncias bioativas. Nos estudos anteriores, foram isolados, do caule, 4 alcalóides todos derivados do núcleo isoquinolínico (TAVARES, 2004), (Figura 6, pág. 15).

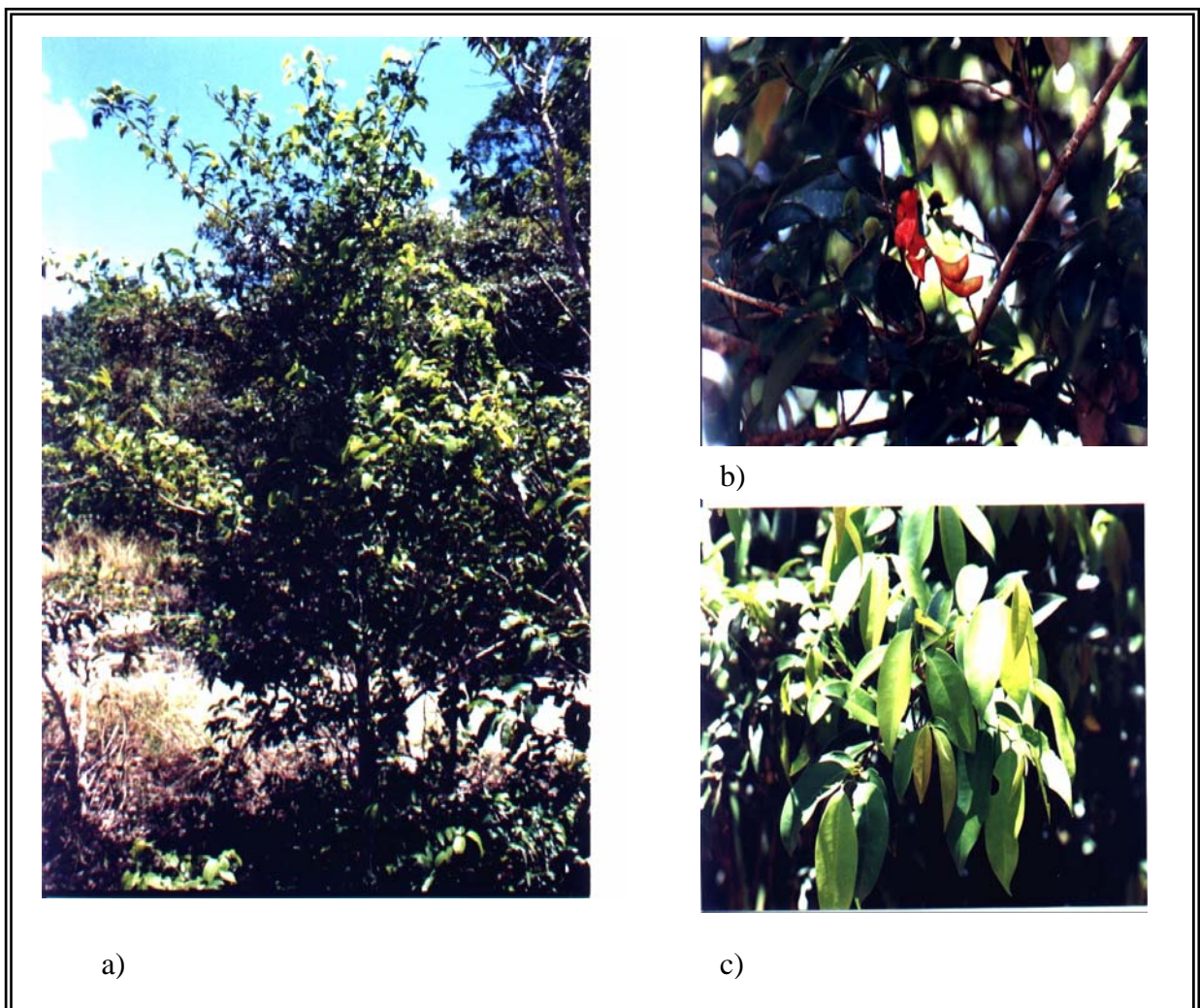


Figura 5: Fotos de *Xylopia langsdorffiana* em seu habitat. a) árvore completa, b) detalhe dos frutos e c) detalhe das folhas. Foto: Josean Fechine Tavares

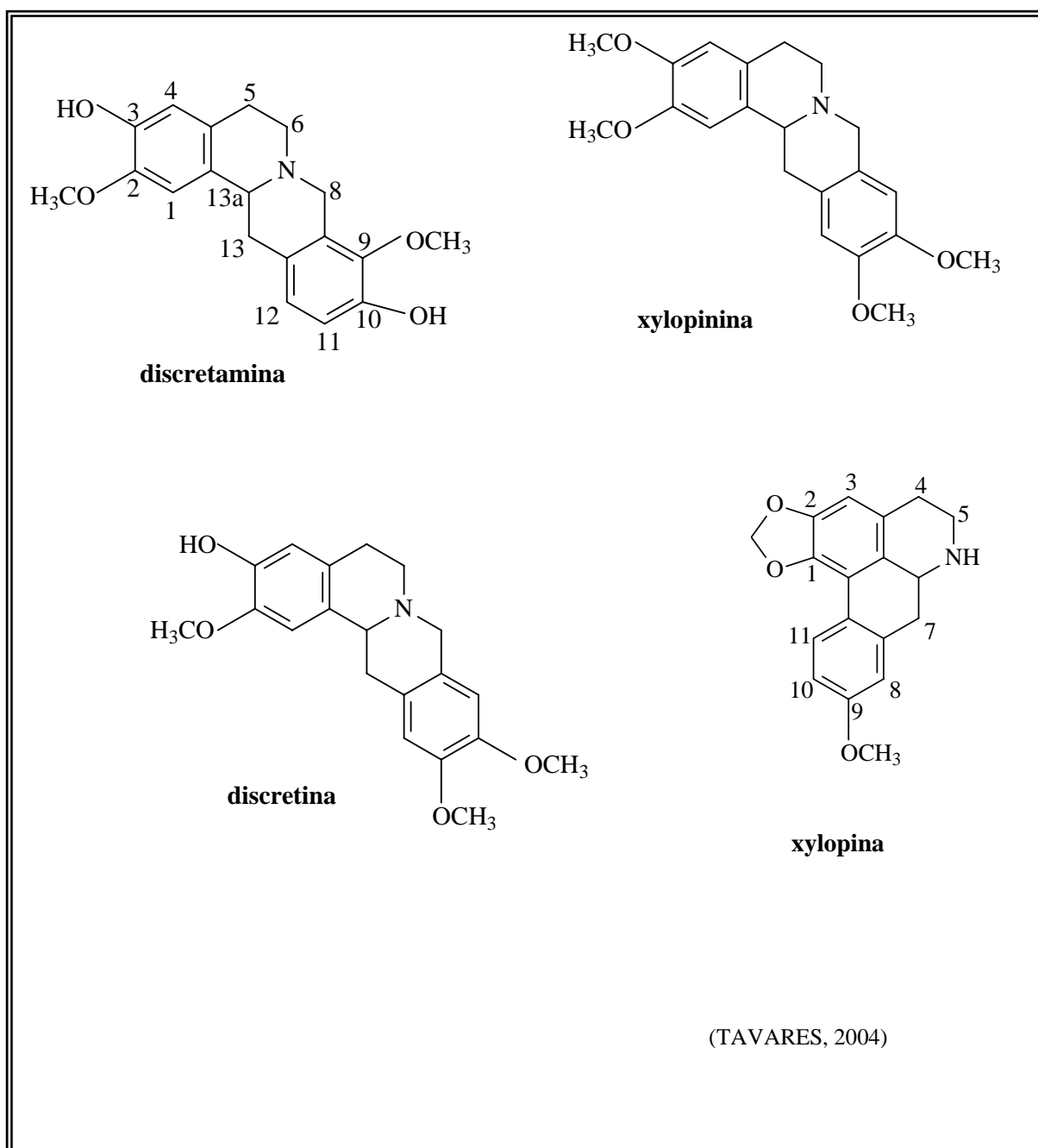


Figura 6: Alcalóides anteriormente isolados do caule de *Xylopi* *langsdorffiana*

3.4. Considerações sobre o gênero *Fusaea* Baill. E *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff.

O gênero *Fusaea* é muito pequeno, revisão anteriormente realizada por CHATROU; HE, (1999), demonstrou que em 400 coleções de herbários, o gênero é composto por apenas 2 espécies e não quatro como anteriormente se acreditava. São elas *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff e *Fusaea decurrens* R. E. Fr.

A fitoquímica desse gênero é muito pouco explorada e apenas um estudo foi encontrado na literatura mostrando a caracterização de um novo alcalóide aporfínico denominado fuseína, extraído de *Fusaea longifolia* (BRAZ-FILHO et al., 1976).

Fusaea longifolia é conhecida popularmente como envira, envireira, araticum e espitana. É uma árvore com raminhos densamente sedosos-ferrugíneos, entre nós de 2 a 3 cm de largura, folhas papiráceas, oblongas, longas e estreitamente acuminadas, fruto sincárpico, globoso, sementes pequenas e de polpa comestível. Esta espécie está distribuída nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato grosso, Pará, Rio de Janeiro, Rondônia e Roraima.

Diante de pouco conhecimento fitoquímico sobre o gênero *Fusaea*, decidiu-se investigar a fitoquímica de *F. longifolia* em um estudo voltado para o isolamento de alcalóides e caracterização de constituintes voláteis. Na Figura 7 (pág. 16) são mostradas fotos com detalhes de folhas, flores e fruto dessa espécie.



a)



b)

Figura 7: Fotos de *F. longifolia*: a) Folhas b) Flor e Fruto

Fonte: a) http://www.rbgekew.org.uk/scihort/tropamerica/cristalino/Fusaea_longifolia.htm

Fonte: b) <http://atrium.andesamazon.org/image>

3.5. Considerações sobre atividade biológica dos constituintes químicos isolados

3.5.1. Atividade citotóxica

Depois de algumas décadas do século XX, a química de produtos naturais passou a representar a principal linha de pesquisa para as descobertas de novos agentes antineoplásicos. Nos Estados Unidos, entre 1983 e 1994, 60% dos medicamentos antineoplásicos aprovados eram de origem natural (CRAGG et al., 1997) e, entre estes, muitos constituem compostos secundários do metabolismo de vegetais superiores (CORDELL, 1993). Os alcalóides bisindólicos vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae), descobertos no final dos anos 60, ainda são considerados medicamentos indispensáveis para o tratamento da leucemia. Outras substâncias obtidas de plantas estão em fase de estudo para o tratamento do câncer. Um exemplo é o caso da homoarringtonina isolada de *Cephalotaxus harringtonia* Var. Nana (Cephalotaxaceae), que se mostrou ativa contra vários tipos de leucemia (ZHOU et al., 1995). Testes biológicos *in vitro* utilizando cultura de células são, portanto, extremamente importantes na pesquisa de anticancerígenos. Diterpenos do tipo trachylobano isolados de *Croton zambesicus* apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células leucêmicas (BLOCK, et al., 2004), por isso o interesse em avaliar a atividade citotóxica das substâncias isoladas.

Várias linhagens celulares estão disponíveis nos bancos de células para estes testes. Alguns testes, como por exemplo, o ensaio de redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)], têm adquirido atenção considerável no contexto de citotoxicidade (RENZI et al., 1993). O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. Uma vez solubilizado em etanol absoluto, a quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983). Dessa forma, a redução do sal tetrazólio MTT para um produto azul (formazan), principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER et al., 1963), é muito utilizada para ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular. Somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), portanto a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

3.5.2. Atividade moluscicida

A esquistossomose é uma doença parasitária, endêmica em 74 países de três continentes: América, África e Ásia, onde algumas centenas de milhões de indivíduos estão expostos ao risco de infecção (MARSTON; HOSTETTMAN, 1985). Cerca de 200 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo com essa doença, cuja evolução pode levar, em muitos casos, a um acentuado déficit orgânico que pode resultar em invalidez ou morte (CAPRON, 1998). No Brasil, o *Schistosoma mansoni* é o agente etiológico e requer o caramujo aquático *Biomphalaria glabrata* como principal hospedeiro intermediário para transmissão da doença (LARDANS; DISSOUS, 1998). A investigação de plantas com atividade moluscicida tem se expandido, com mais de 1400 espécies já estudadas (KLOOS; MCCOLLOUGH, 1987; JURBERG et al., 1989). O aumento nas investigações de plantas ou seus constituintes com atividade moluscicida é extremamente importante haja vista que a indústria farmacêutica não tem interesse em desenvolver medicamentos para esse tipo de enfermidade, pois é típica de populações de baixa renda, sendo chamadas doenças negligenciáveis. Daí o interesse em se buscar produtos naturais como alternativas preventivas ou curativas para essas doenças.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

**ALKALOIDS AND DITERPENOIDS FROM *XYLOPIA*
*LANGSDORFFIANA***

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alkaloids and Diterpenoids from *Xylopi langsdorffiana*

RESUMO

Xylopi langsdorffiana é uma árvore de pequeno porte conhecida popularmente como pimenteira da terra, pertencente a família Annonaceae, que possui 2.300 espécies distribuídas em aproximadamente 130 gêneros com distribuição pantropical. Espécies da família Annonaceae são caracterizadas pela presença de alcalóides, principalmente os pertencentes ao núcleo isoquinolínico, terpenóides, sendo mais destacados os diterpenos e acetogeninas.

Fez-se uma marcha ácido/base para isolamento de alcalóides do caule de *X. langsdorffiana* e uma partição líquido/líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas com o objetivo de isolar terpenóides.

Após cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária alumina e como eluentes misturas de clorofórmio e metanol em gradiente crescente, foi possível isolar, a partir do caule, quatro alcalóides derivados do núcleo isoquinolínico (discretina, xylopinina, xylopina e discretamina). Todos esses alcalóides estão sendo descritos pela primeira vez na espécie em estudo e de alta importância quimiotaxonômica, pois xylopina e xylopinina são relatados em quase todas as espécies de Annonaceae estudadas. A partir do extrato hexânico das folhas foi possível isolar e identificar dois diterpenóides, um do tipo labdano e outro do tipo atisano. O diterpeno labdano denominado ácido 13-epicuprêssico está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Xylopi* e o atisano denominado ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico é o segundo relato dessa substância em espécies de Annonaceae. O espectro de RMN ^{13}C do ácido 13-epicuprêssico mostrou 20 sinais. O deslocamento químico em 107,0 ppm foi atribuído ao CH₂-17, característico de dupla terminal de diterpeno labdano. O sinal em 184,7 foi atribuído a carbonila de ácido carboxílico. Correlação no espectro de HMBC desse sinal com os hidrogênios em 1,11 ppm, confirmou as atribuições feitas para o CH₃-19 e C-18. O deslocamento químico em 16,2 ppm para C-19, confirma que essa metila está axial. As demais atribuições foram feitas em comparação com a literatura.

Os espectros dos terpenóides são mostrados nas Figuras de 8 a 18 (págs. 25 a 35) e Figuras de 19 a 28 (págs. 37 a 46) Os dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais estão compilados nas Tabelas 1 e 2 (págs. 36 e 47, respectivamente).

Alkaloids and Diterpenoids from *Xylopi langsdorffiana*

Josean Fechine Tavares ^a, Andréa L. F. de Oliveira ^a, José M. Barbosa-Filho ^a, Marcelo S. Silva ^{a*}, Maria de Fátima Agra ^a, Emídio V. L. da-Cunha ^{a,b}

^a *Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Cx. Postal 5009, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil*

^b *Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, CCBS 58100-000, Campina Grande, PB, Brazil*

Keywords: Xylopi langsdorffiana; Annonaceae; Isoquinoline alkaloids; Diterpenes

1. Subject and source

Annonaceae is a large family comprising ca. 130 genera and 2300 species. Phytogeographically it is entirely tropical, with 39 genera being represented in tropical America. In Brazil, there are 29 genera with about 260 species. They are recognized as sources of terpenoids (mainly diterpenes), alkaloids (a large number derived from the isoquinoline nucleus). Some *Xylopi* species are reported as possessing antimicrobial (Malcolm and Sofowora, 1969; Lemos et al., 1992), antifungal (Awuah, 1989; Rahalison et al., 1993), antimalarial and anticonvulsant (Etkin, 1997; Adesina, 1982) properties.

The plant stem and leaves was collected in July 2002 in Cruz do Espírito Santo, Paraíba state, Brazil. A voucher specimen (AGRA 5541) was deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

2. Previous Work

There is only previous report on the analysis of the chemical constituents of *X. langsdorffiana* A. St. Hil & Tul. (Tavares et al., 2006).

* Corresponding author. Tel./ fax: + 55-83-2167511.

E-mail address: marcelosobral@Itf.ufpb.br (Marcelo S. Silva)

3. Present study

The stems and leaves of *X. langsdorffiana* were studied in two different ways.

3.1. Study 1

The stems (4000 g) were exhaustively extracted with EtOH at room temperature. The alkaloidal fraction of the extract was obtained by a series of partitions involving acid/base separation (Barbosa-Filho et al., 1997) and subjected to column chromatography (aluminum oxide) and PTLC (silica gel 1mm) yielding the isoquinoline alkaloids discretine (0.00092 %) (Jossang et al., 1986), xylopinine (0.00054 %) (Hocquemiller et al., 1981), discretamine (0.00062%) (Hocquemiller et al., 1981) and xylopine (0.00028%) (Leboeuf et al., 1982) The alkaloids were identified through a series of spectroscopic methods such as NMR (1D and 2D techniques).

3.2. Study 2

The leaves were dried and extracted with 95% EtOH at room temperature. The extractive solution was concentrated under vacuum yielding the crude EtOH extract. The extract was suspended in MeOH:H₂O (7:3) and partitioned successively with hexane and chloroform. The hexane and CHCl₃ extracts were chromatographed on silica gel columns, eluting with hexane and EtOAc in an order of increasing polarity. This process resulted in the isolation of the labdane and atisane-type diterpenoids: 13-epicupressic acid (Carman et al., 1973) and *ent*-atisan-16 α -ol-18-oic acid (Morais and Roque, 1988). The atisane diterpenoid was isolated from the hexane extract and the labdane diterpenoid from the CHCl₃ extract. The structures of all the isolated substances were elucidated based on IR, and ¹H and ¹³C NMR (1D and 2D methods).

4. Chemotaxonomic significance

The present results confirm that *Xylopi*a *langsdorffiana* is chemically a typical species of the Annonaceae (Jumana et al., 2000). Discretine, xylopinine, xylopine and discretamine have been previously reported from other genera of the Annonaceae, but this is the first report from *X. langsdorffiana*. Terpenoids (mainly diterpenes) are commonly found in the Annonaceae family and particularly in *Xylopi*a species (Andrade et al., 2003). This is also the first report of 13-epicupressic acid from the genus *Xylopi*a.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Vicente Carlos de Oliveira LTF/UFPB, for providing the NMR spectra and CNPq for financial support. Sincere thanks are due to NAPRALERT.

References

- Adesina, S. K., 1982. *Fitoterapia* 53, 147.
- Andrade, N. C., Barbosa-Filho, J. M., Agra, M. F., Da-Cunha, E. V. L., Silva, M. S., 2003. *Recent Res. Devel. Phytochem.* 7, 1-85.
- Awuah, R. T., 1989. *Ann. Appl. Biol.* 1153, 451.
- Barbosa-Filho, J.M., Da-Cunha, E.V.L., Cornélio, M.L., Dias, C.S., Gray, A.I., 1997. *Phytochemistry* 44, 959.
- Carman, R. M., Craig, W.G. and Swaw, I. M., 1973. *Aust. J. Chem.* 26, 209.
- Etkin, N. L., 1997. *Trop. Doct.* 271, 12.
- Hocquemiller, R., Cavé, A., Rahaisololao, M., 1981. *J. Nat. Prod.* 44, 551
- Jossang, A., Leboeuf, M., Cave, A. Puset, J. 1991. *J. Nat. Prod.* 54, 466.
- Jumana, S., Asan, C.M., Rashid, M.A., 2000. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 483.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Provost, J., Forgacs, P., 1982. *Plant. Méd. Phytother.* 16, 253.
- Lemos, T. L. G., Monte, F. J. Q., Matos, F. J. A, Alencar, J. W., Craveiro, A. A., Barbosa, R. C. S. B., Lima, E. O., 1992. *Fitoterapia* 633, 266.
- Malcolm, S. A., Sofowora, E. A., 1969. *Lloydia* 32, 512.
- Morais, M. P. L. and Roque N. F., 1988. *Phytochemistry* 27, 3205.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E., Gupta, M. P., Santana, A. I., Correa, M. D., Gonzalez, A. G., 1993. *Int. J. Pharmacol.* 311, 68.
- Tavares, J. F., Keiroga, K. F., Silva, M. V. B., Diniz, M. F. F. M., Barbosa-Filho, J. M., Da-Cunha, E. V. L., De-Simone, C. A., Araújo-Júnior, J. X., Melo, P. S., Haun, M., Silva, M. S., 2006. *J. Nat. Prod.* 69, 960.

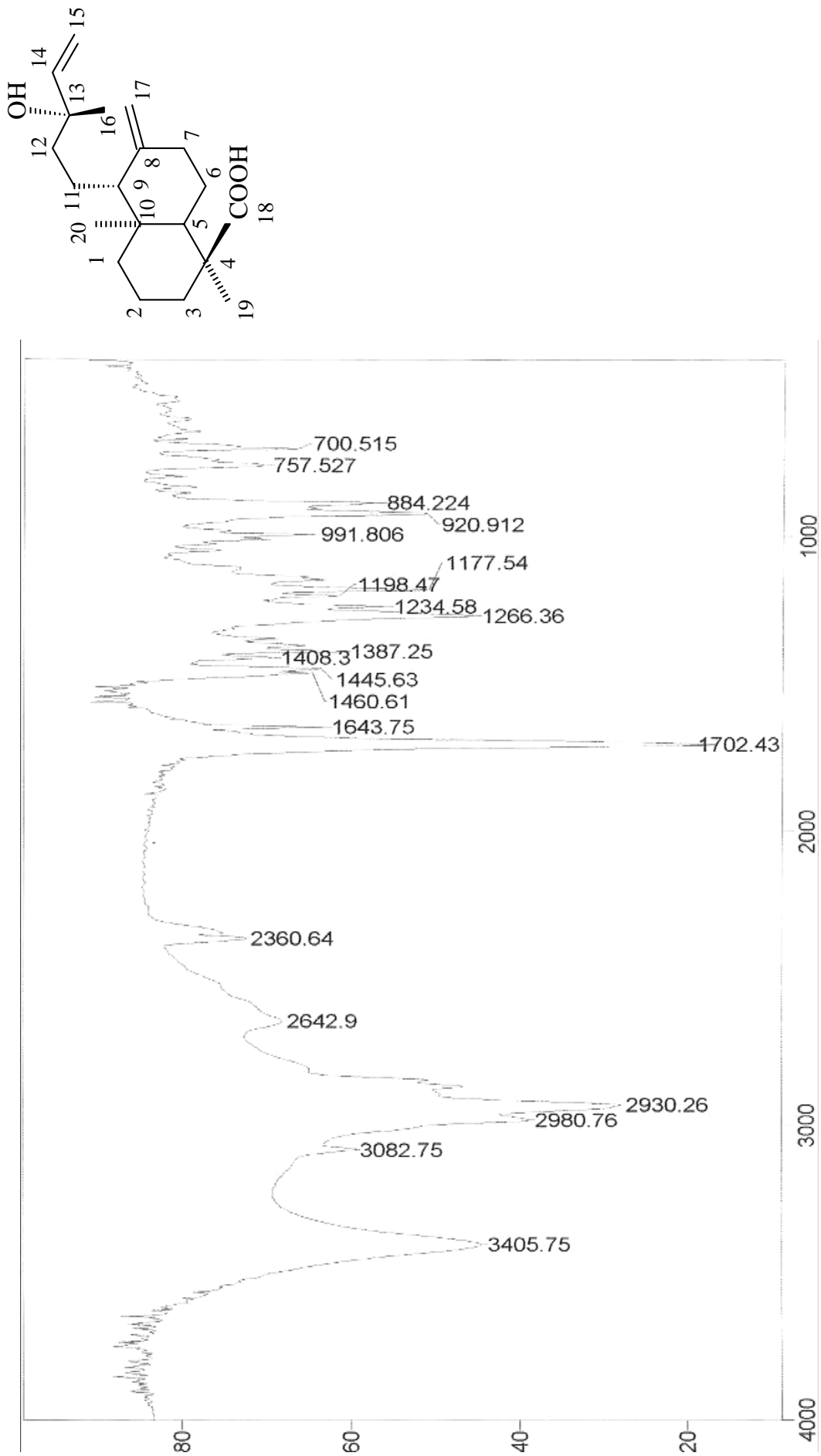


FIGURA 8: Espectro de IV em KBr do ácido 13-epicupressico

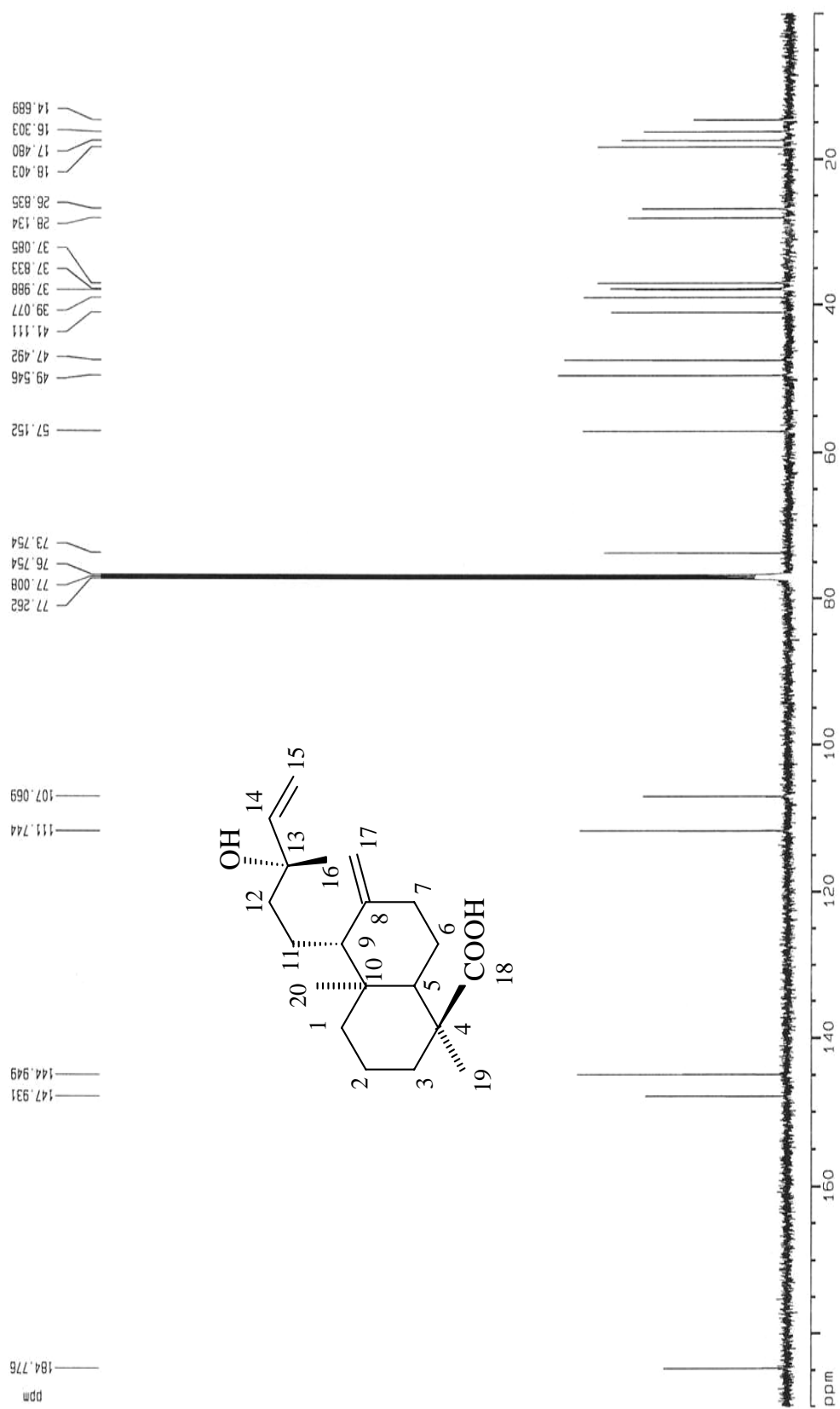
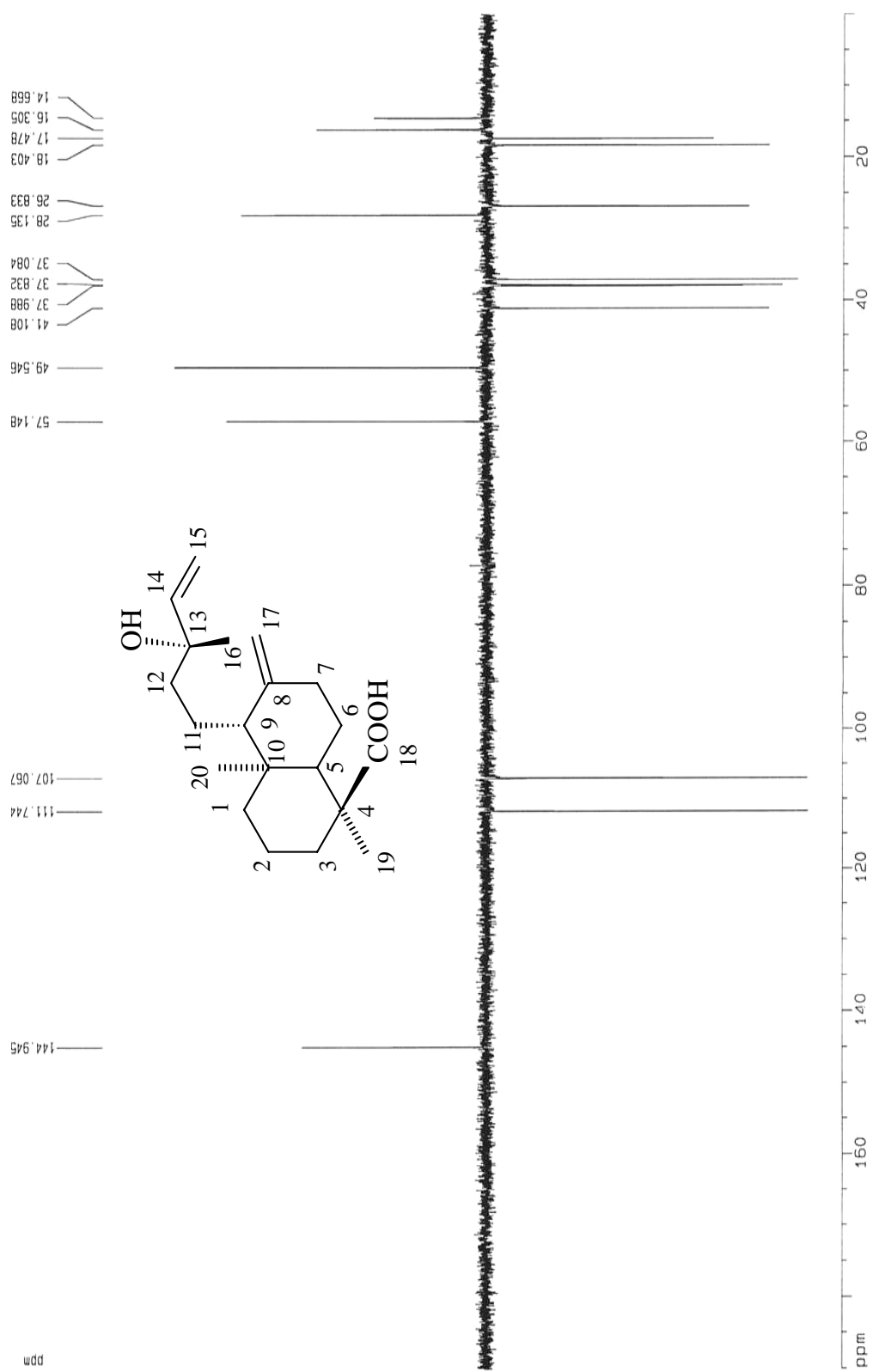
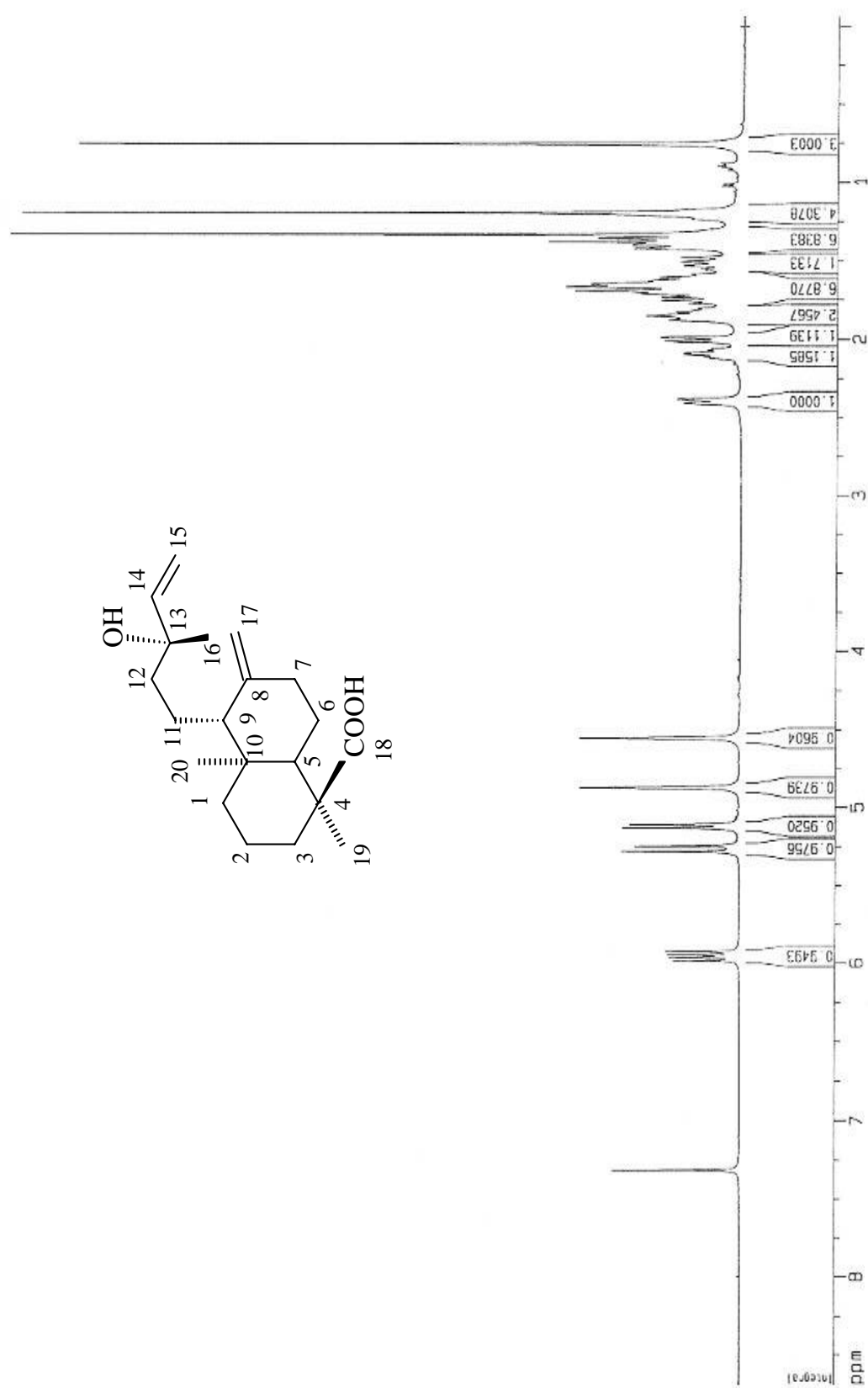


FIGURA 9: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 125 MHz)

FIGURA 10: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 125 MHz)

FIGURA 11: Espectro de RMN de ¹H do ácido 13-epicupressico (CDCl₃, 500 MHz)

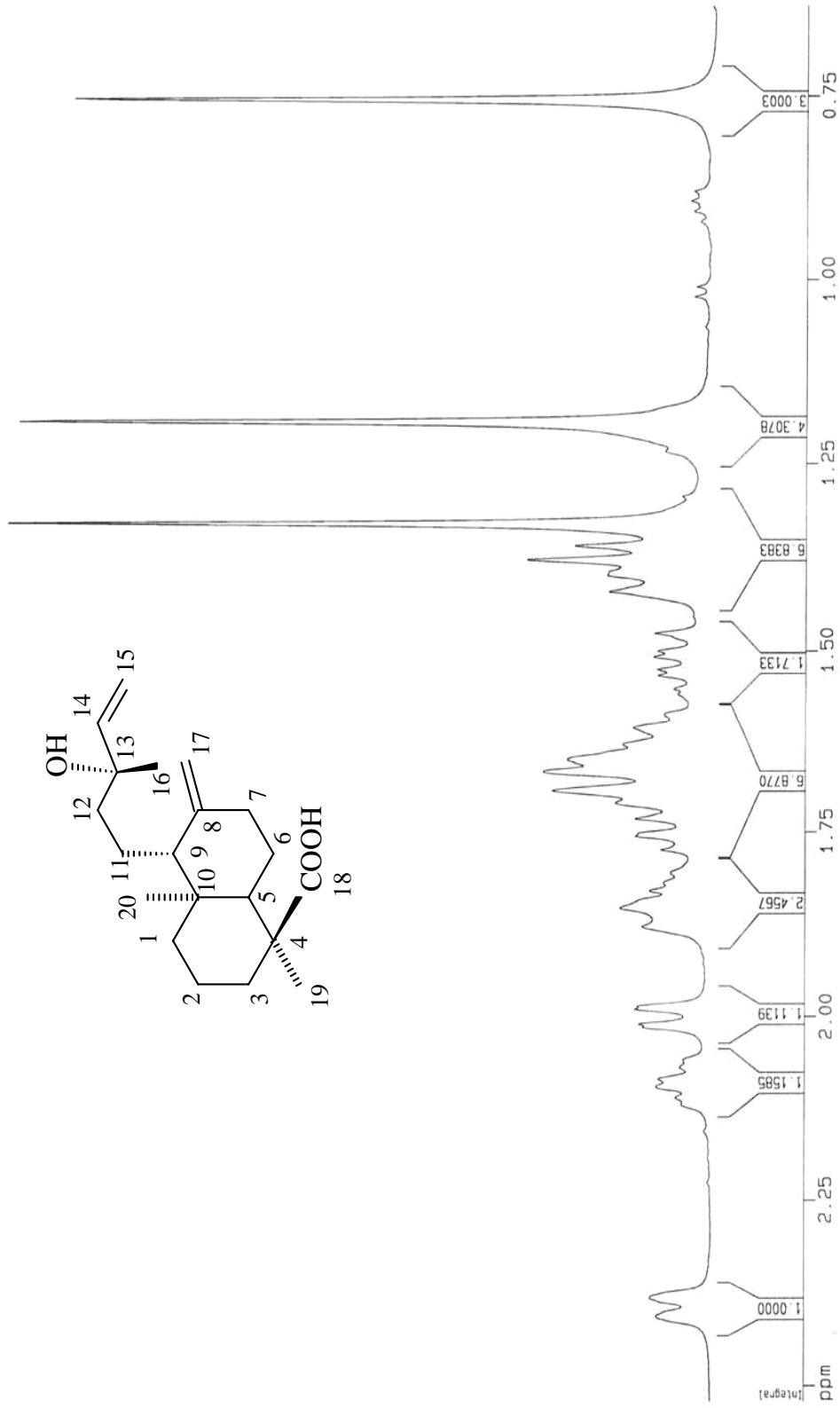


FIGURA 12: Expansão do espectro de RMN de ¹H do ácido 13-epicupressico na região de 0,75 a 2,5 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

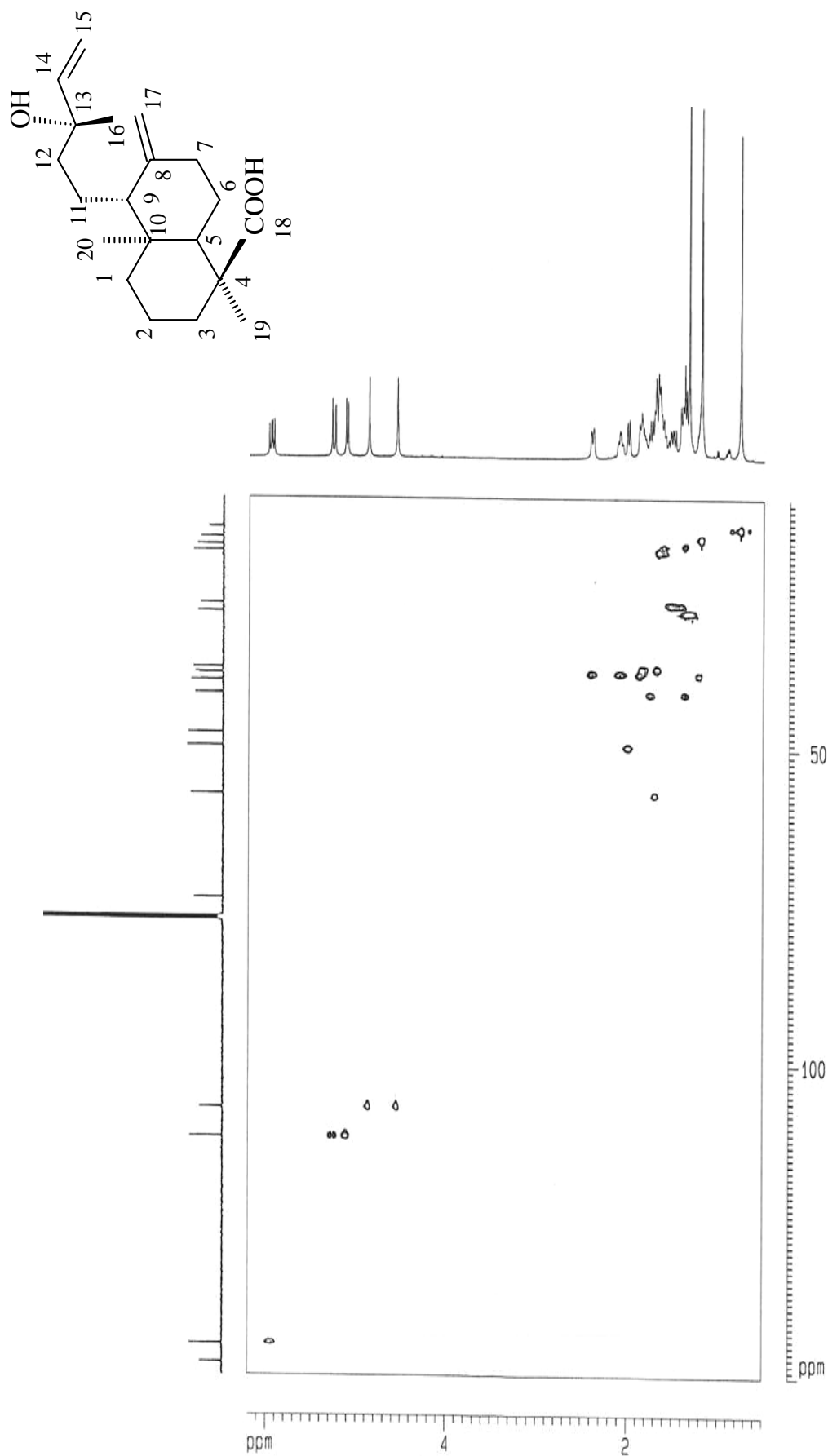


FIGURA 13: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

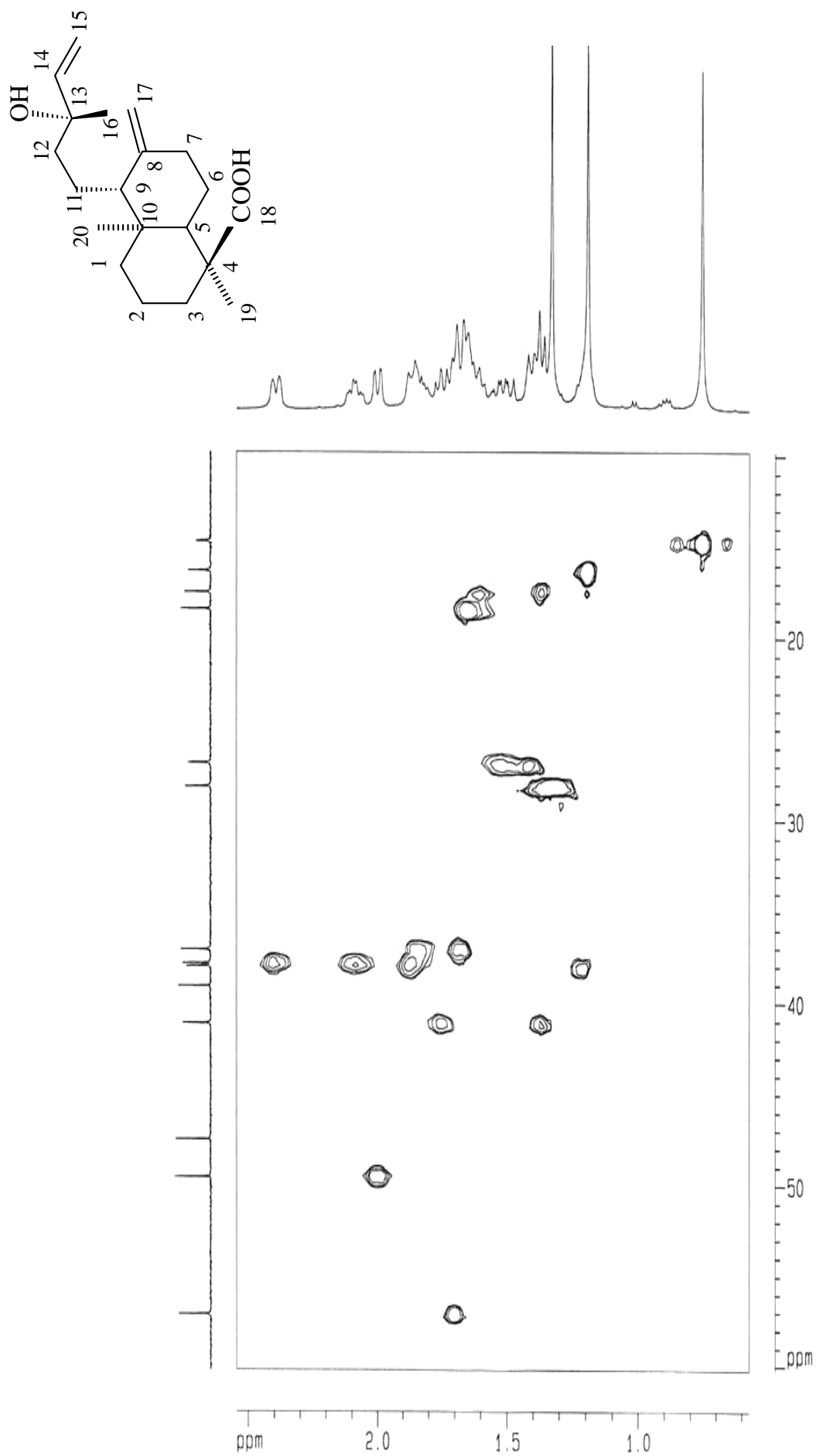


FIGURA 14: Expansão do Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMQC do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

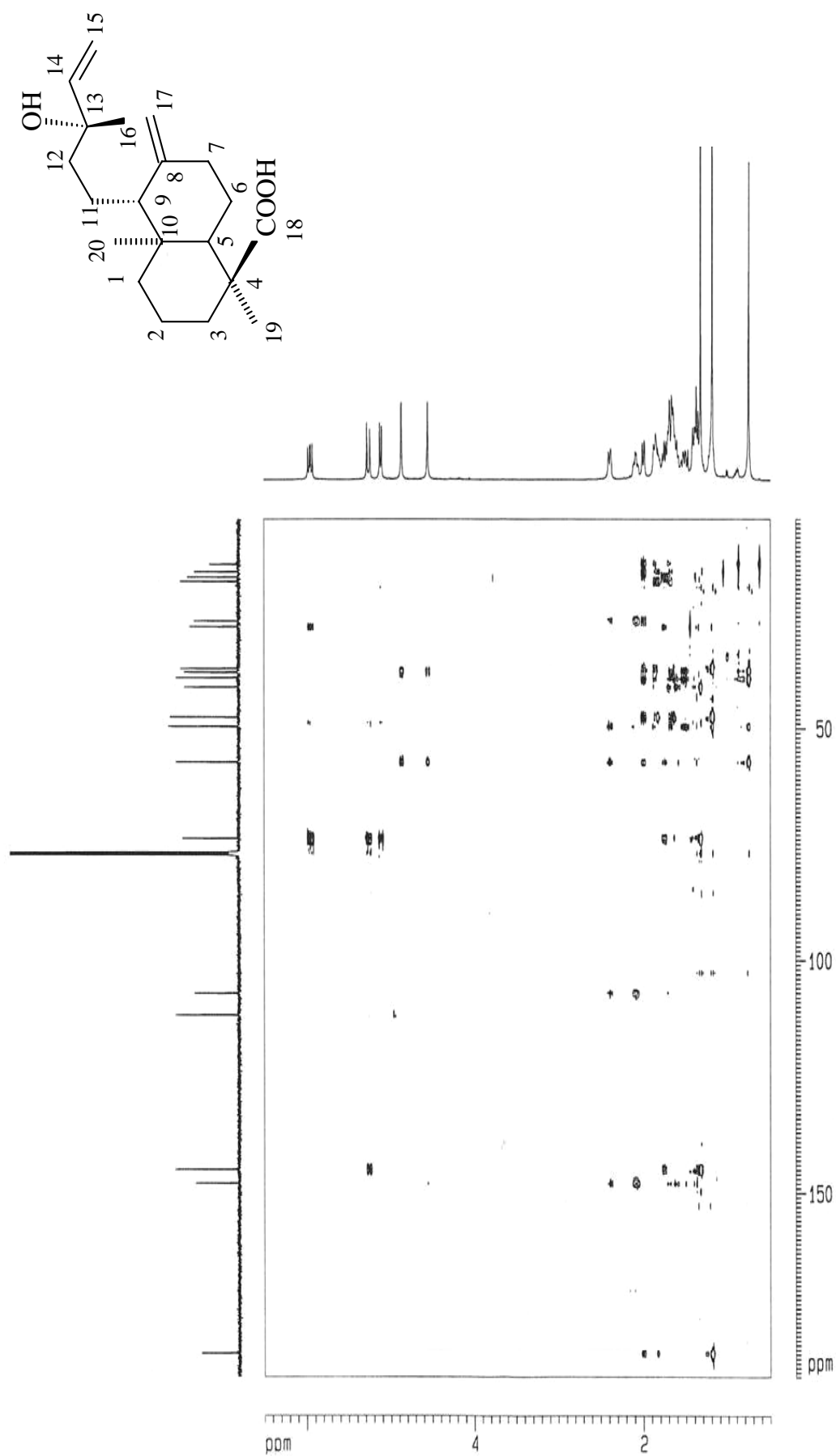


FIGURA 15: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

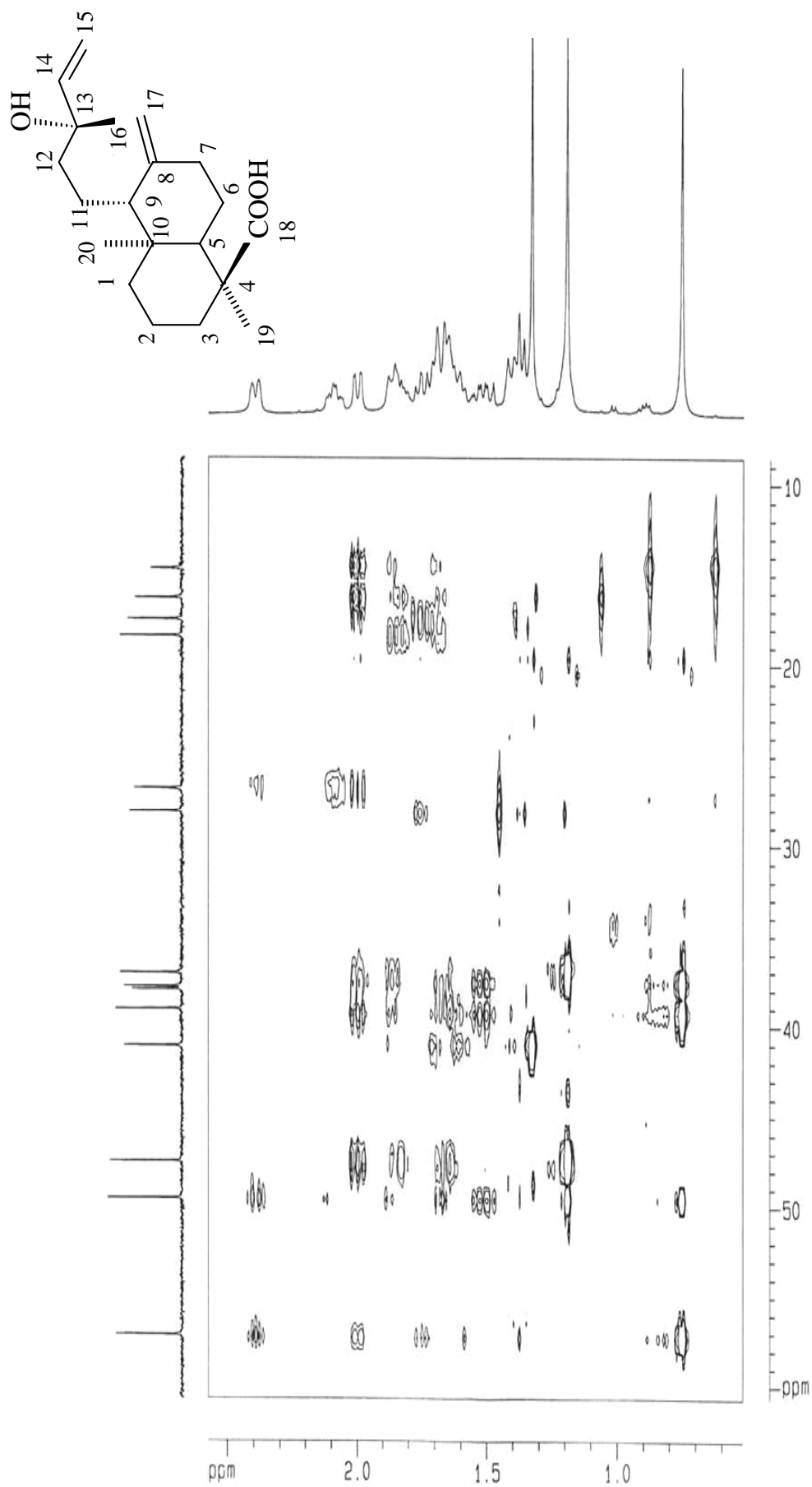


FIGURA 16: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

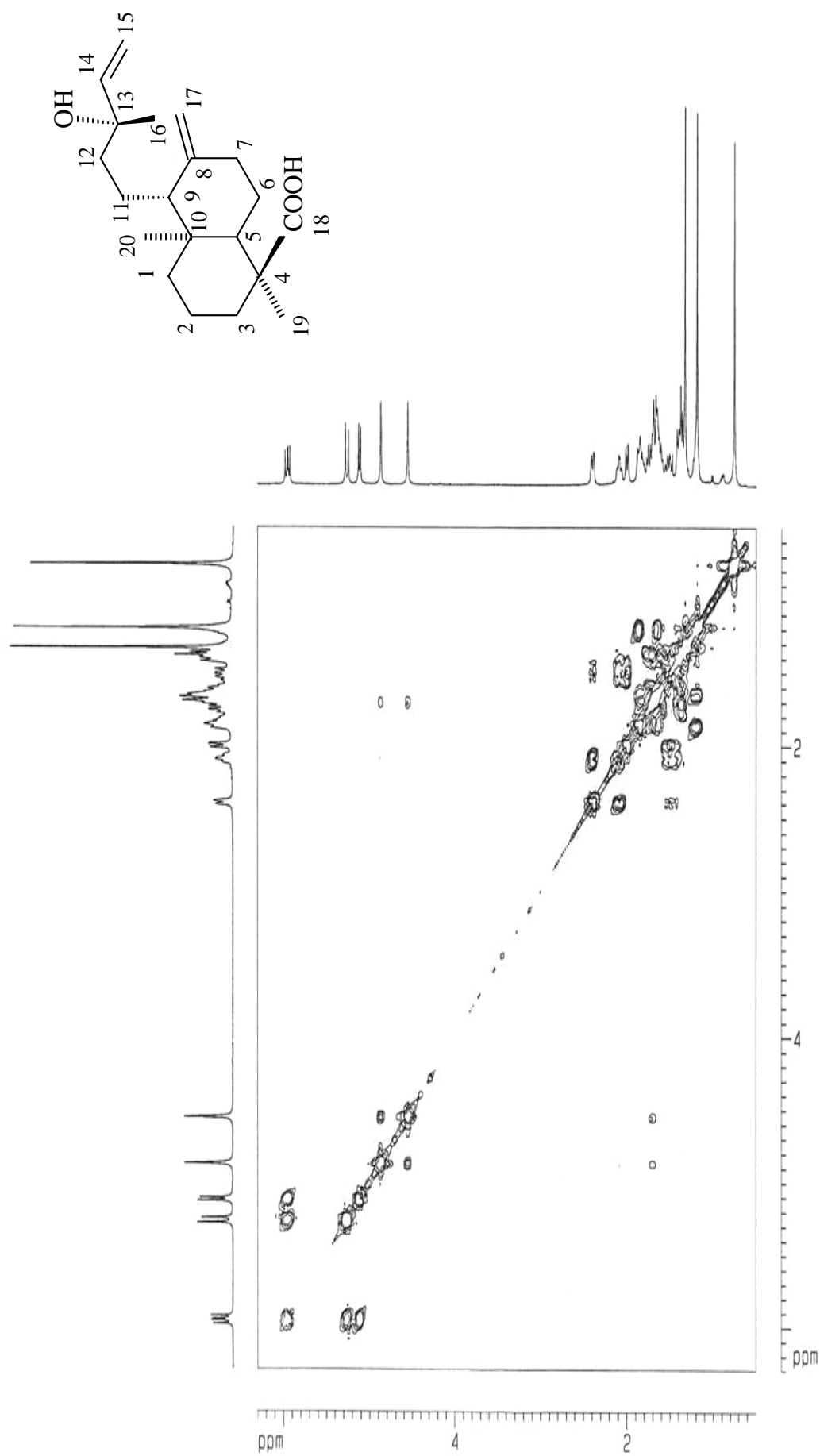


FIGURA 17: Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 500 MHz)

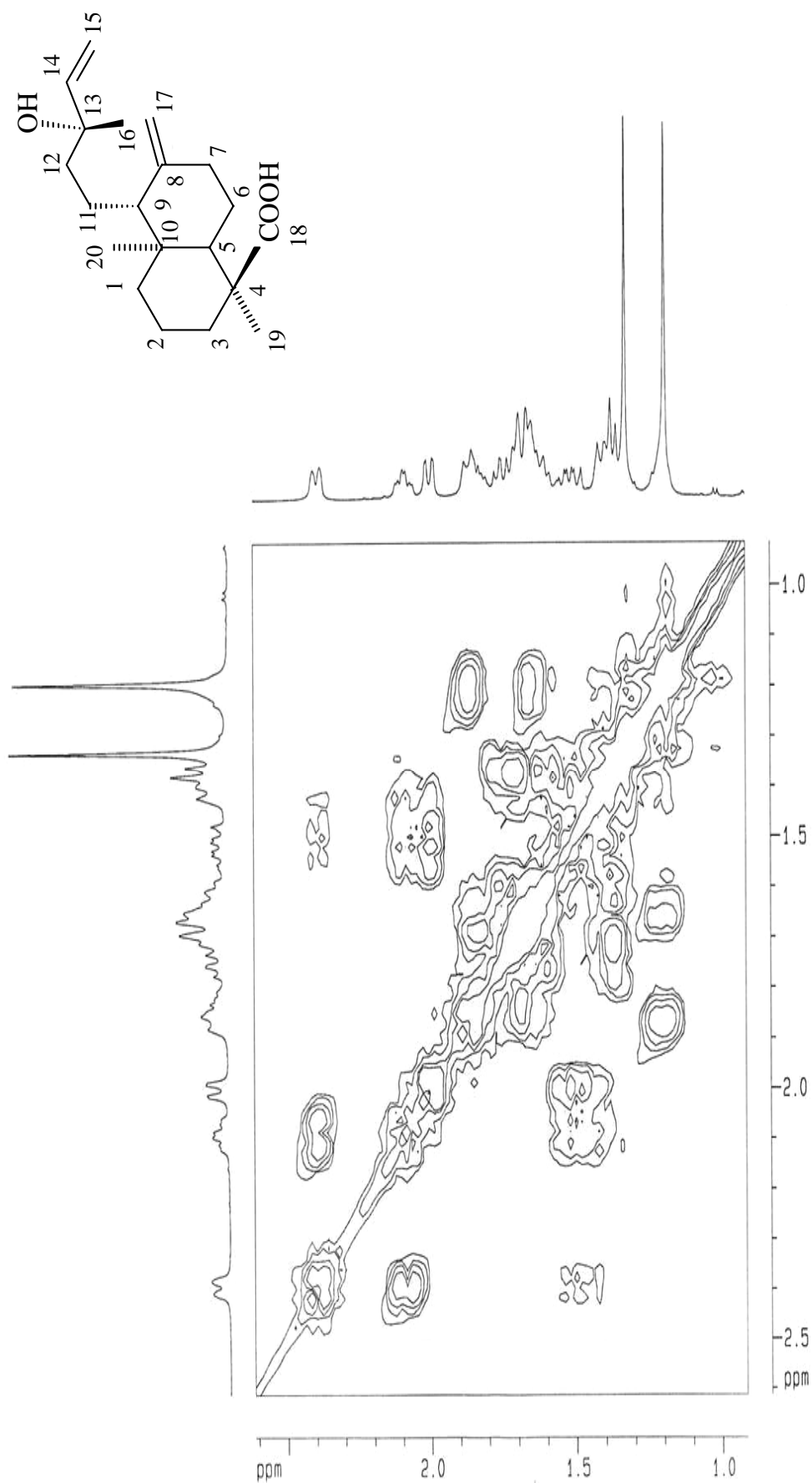
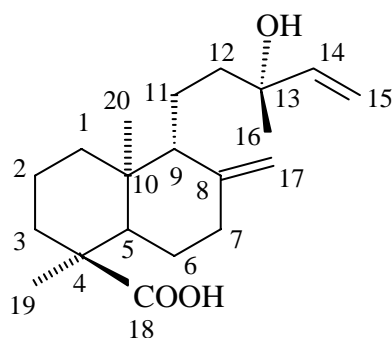
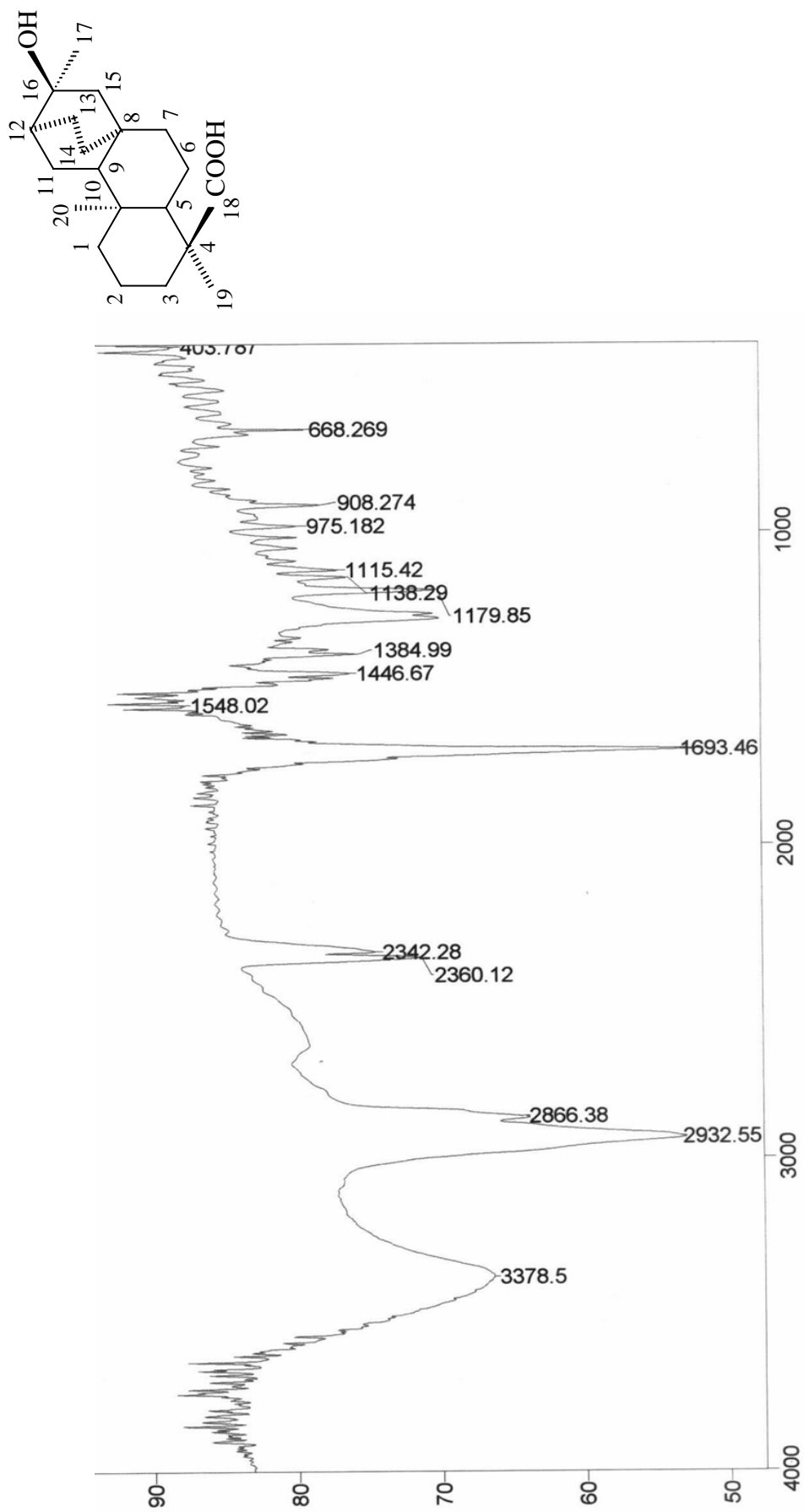


FIGURA 18: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY do ácido 13-epicupressico (CDCl_3 , 500 MHz)

Tabela 1: Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em CDCl_3 a 500 MHz do ácido 13-epicuprécico

C	HMQC		HMBC	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$	
	δ_{C}	δ_{H}		COSY	NOESY
4	47,4	-	H-5		
8	147,9	-			
10	39,0	-			
13	73,0	-	H-14, H-15		
18	184,7	-	H-19		
CH					
5	49,5	1,82 (dd)	H-19		
9	57,0	1,60	H-17		
14	144,9	5,89 (dd, $J = 17,4; 10,8$ Hz)	H-16		
CH₂					
1	37,9	1,31 (m) 1,91 (m)	H-20		
2	18,4	1,56 (m)			
3	37,8	1,62 (m) 1,84 (m)	H-19		
6	26,8	1,42 (m) 1,38 (m)			
7	37,0	1,98 (dd) 2,30 (dd)	H-17	H-7	
11	17,6	1,36 (m) 1,68 (m)			
12	41,1	1,35 (m) 1,70 (m)	H-16		
15	111,7	5,21 (dd, $J = 17,4; 1,2$ Hz, trans) 5,11 (dd, $J = 10,8; 1,4$ Hz, cis)		H-14	
17	107,0	4,86 (s) 4,53 (s)	H-9, H-7	H-17	H-7
CH₃					
16	28,1	1,25 (s)	H-14		H-14
19	16,2	1,11 (s)	H-5		
20	14,6	0,67 (s)	H-9		H-19

FIGURA 19: Espectro de IV em KBr do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-oico

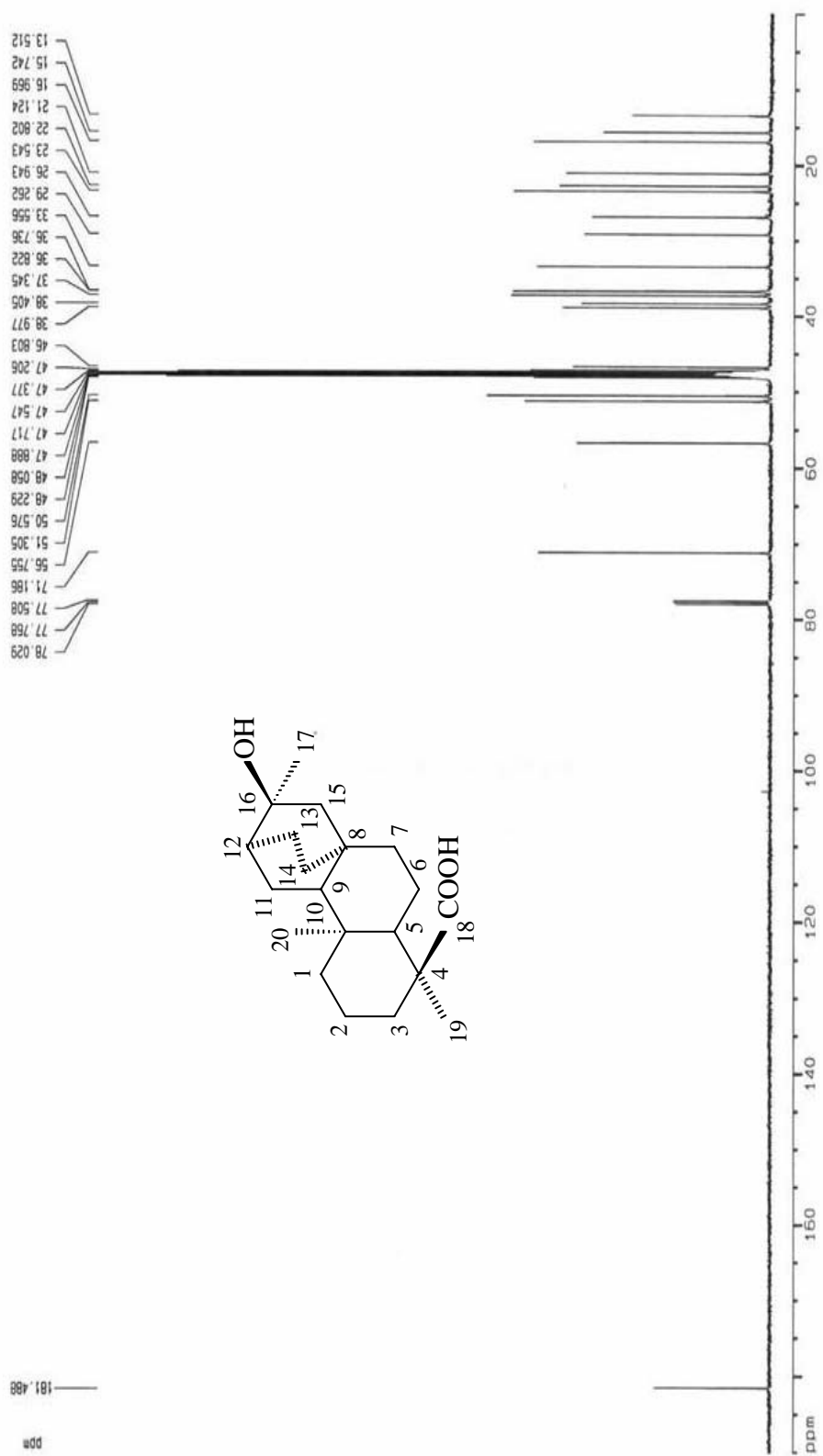


FIGURA 20: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido *ent*-atizan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 125 MHz)

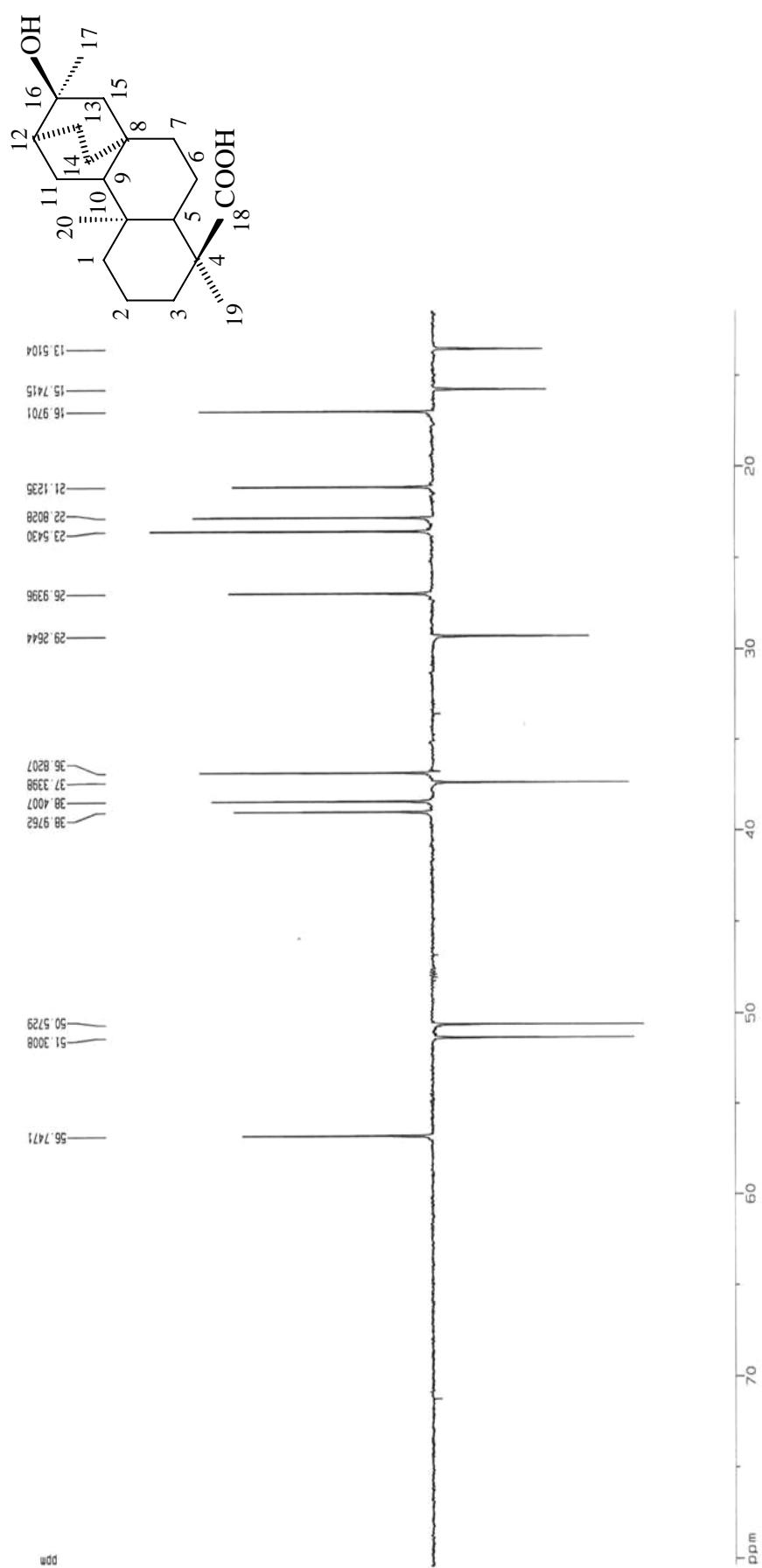


FIGURA 21: Espectro de RMN ¹³C-DEPT-135 do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD₃OD, 125 MHz)

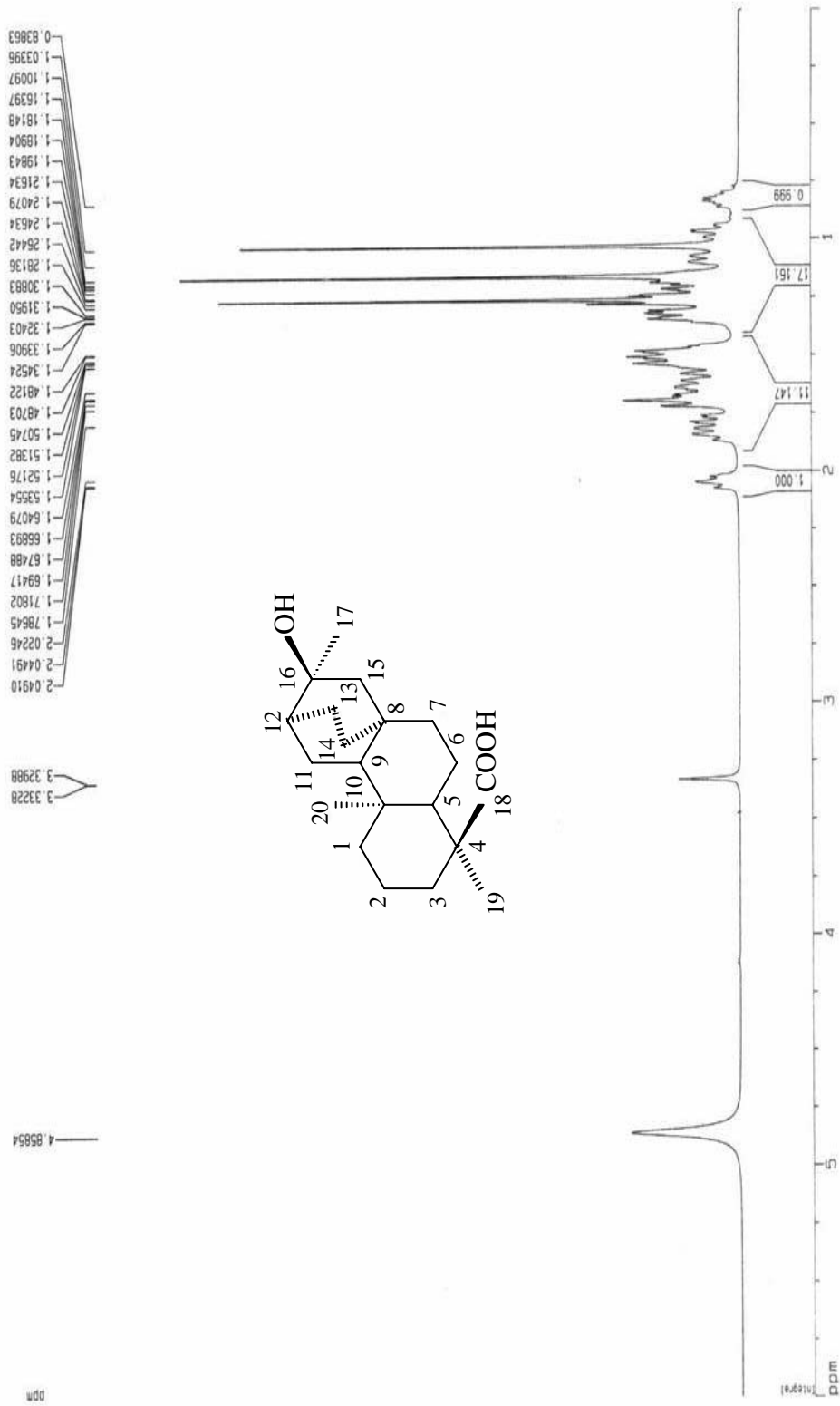


FIGURA 22: Espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 MHz)

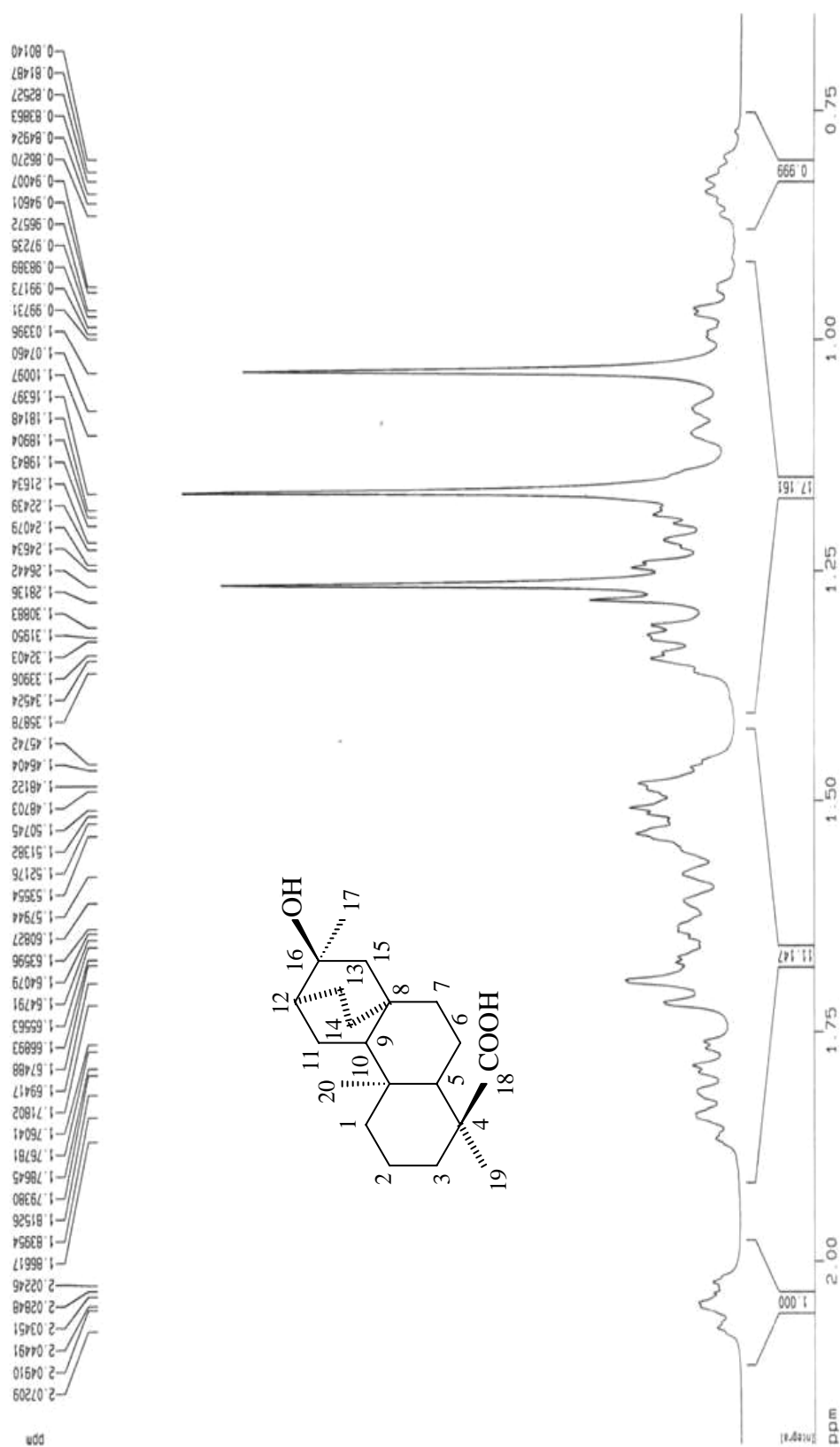


FIGURA 23: Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-*at*-*is*-16 α -ol-18-óico na região de 0,75 a 2,4 ppm (CD_3OD , 500 MHz)

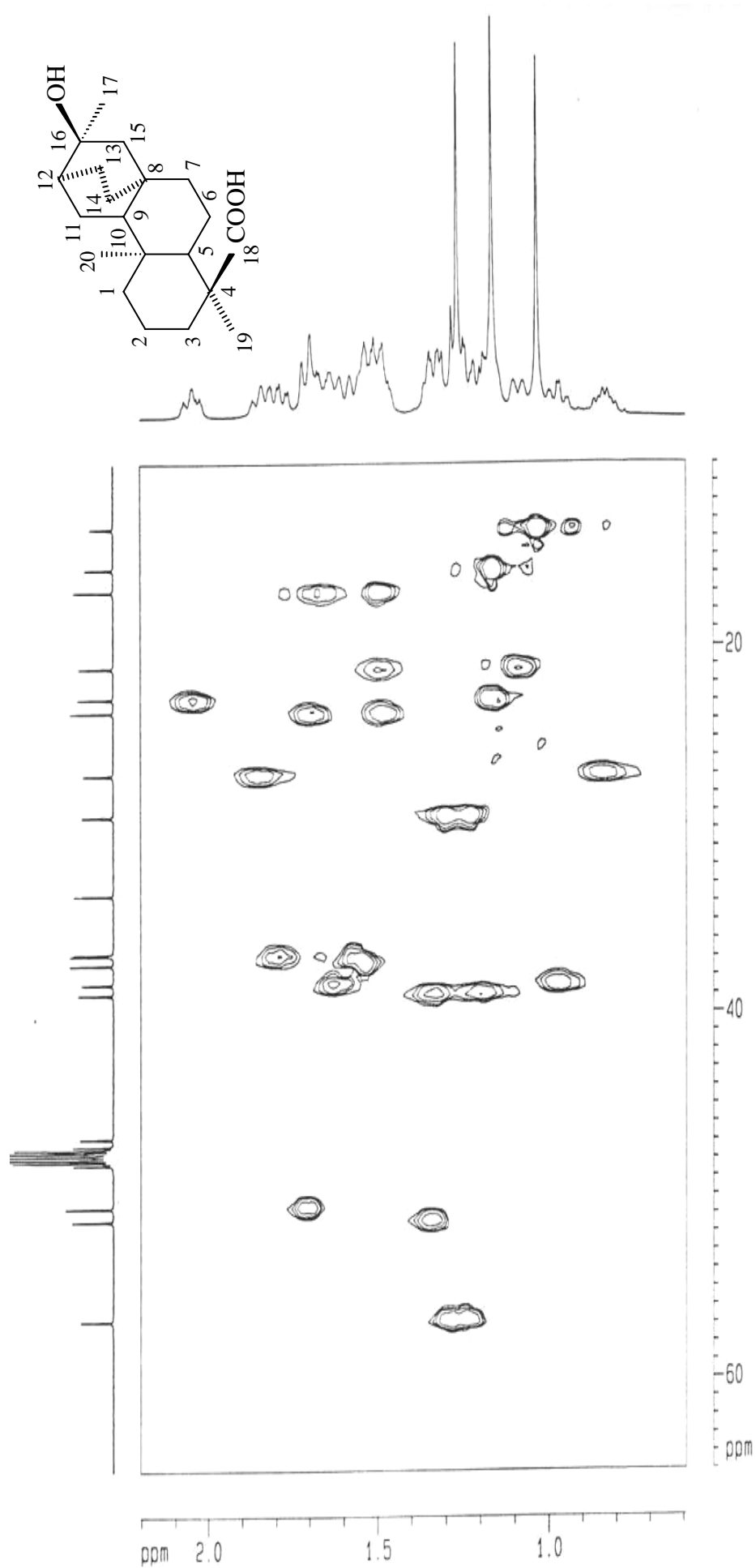


FIGURA 24: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMOC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz, respectivamente

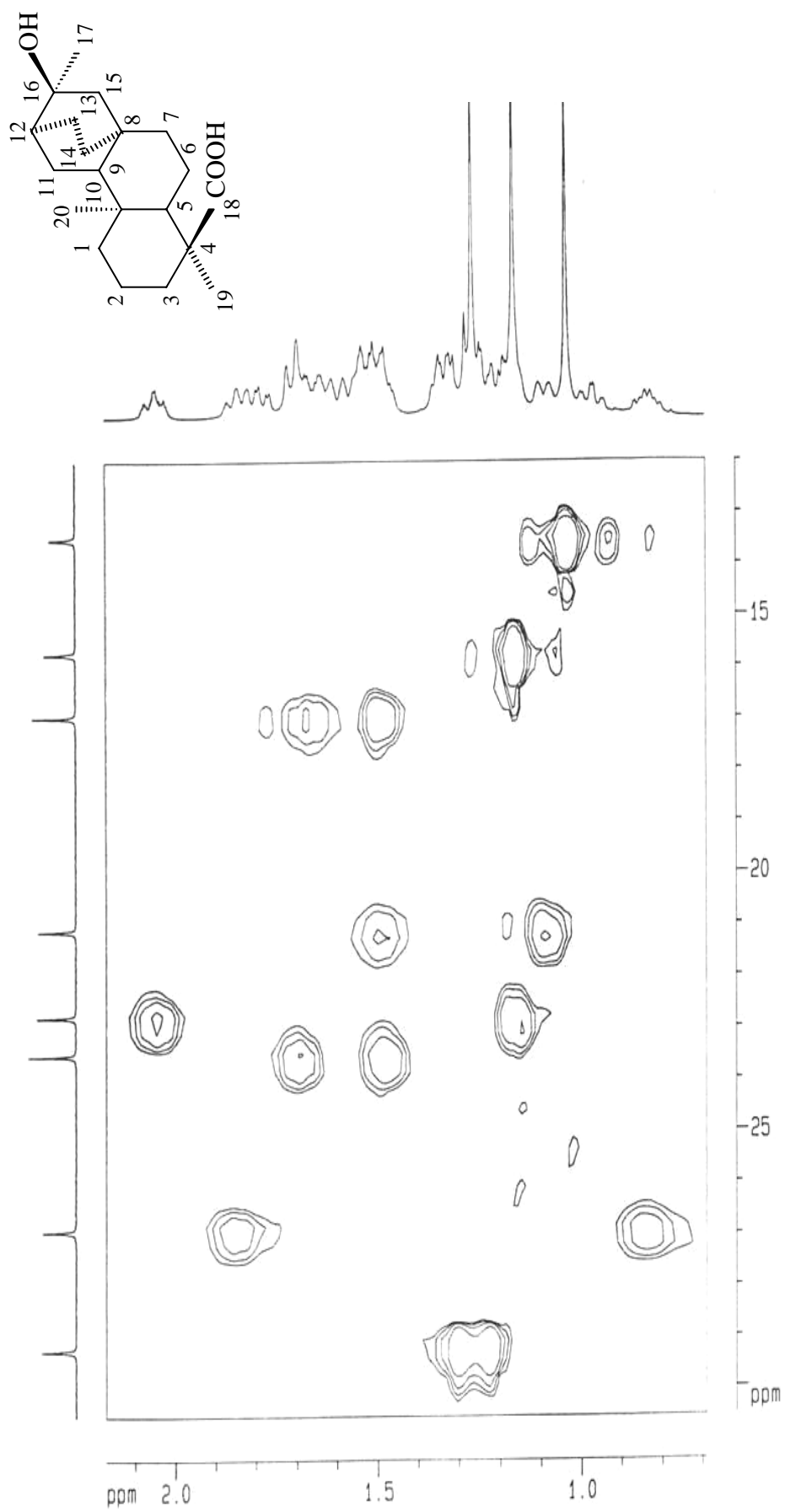


FIGURA 25: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

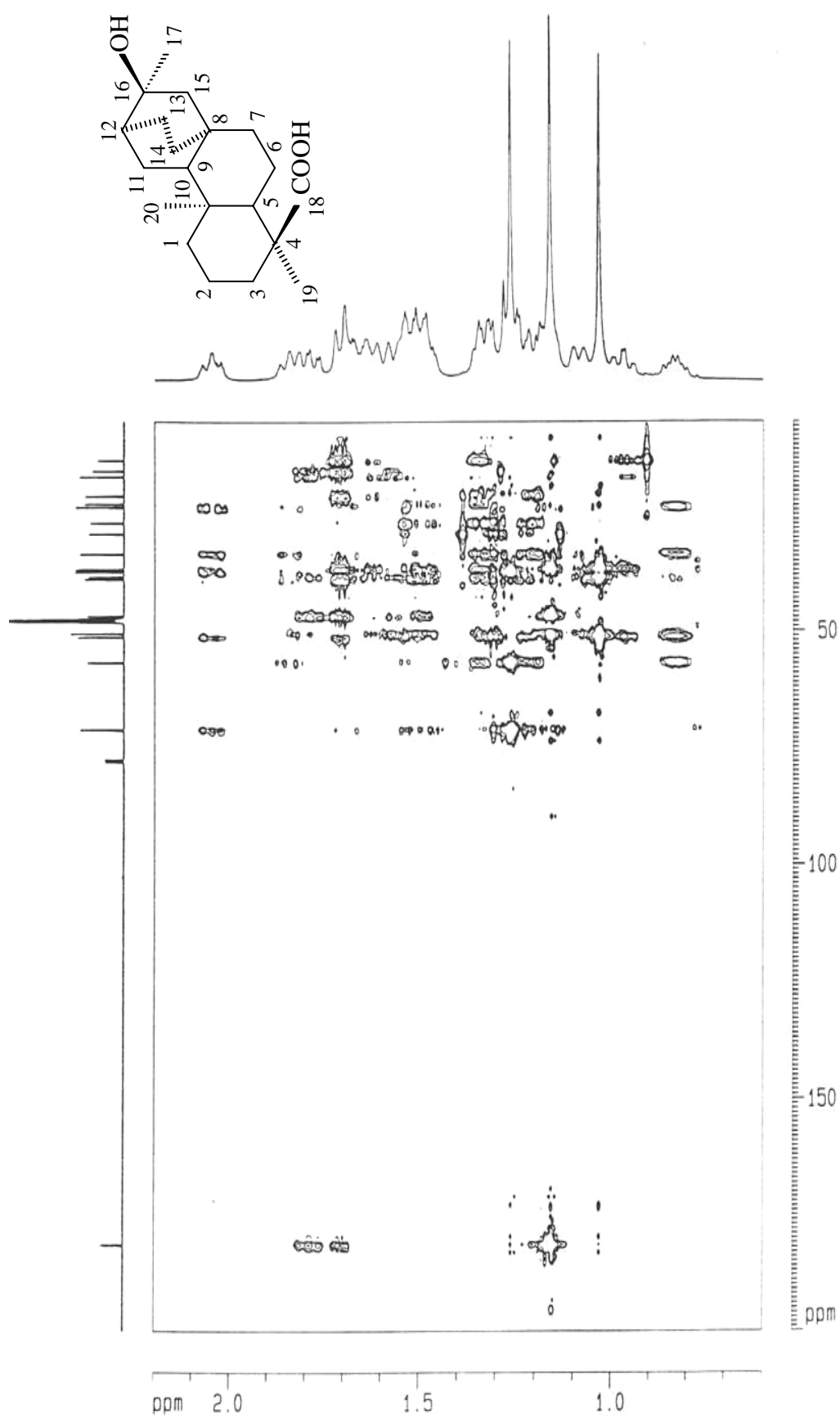


FIGURA 26: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz, respectivamente)

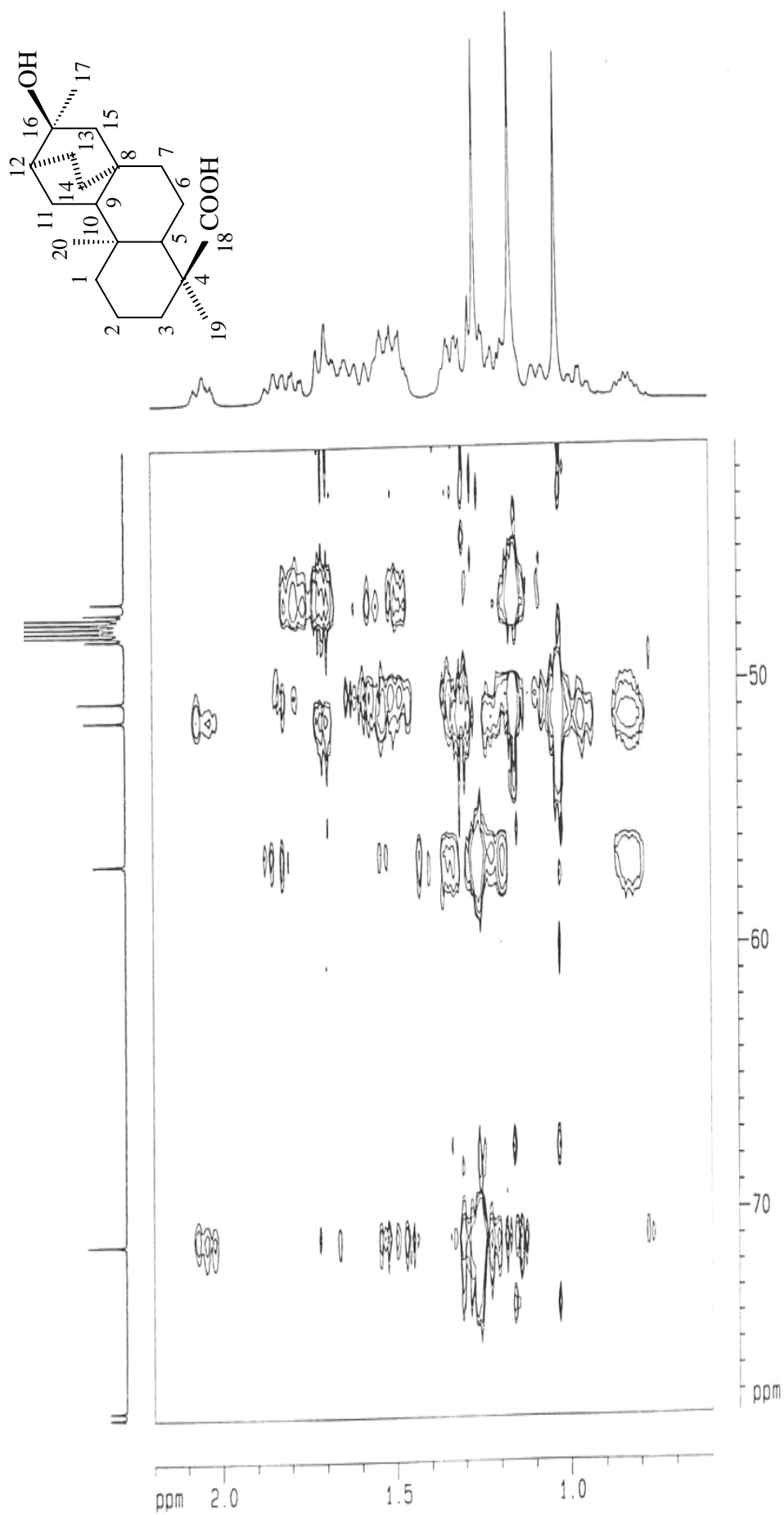


FIGURA 27: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 e 125 MHz, respectivamente)

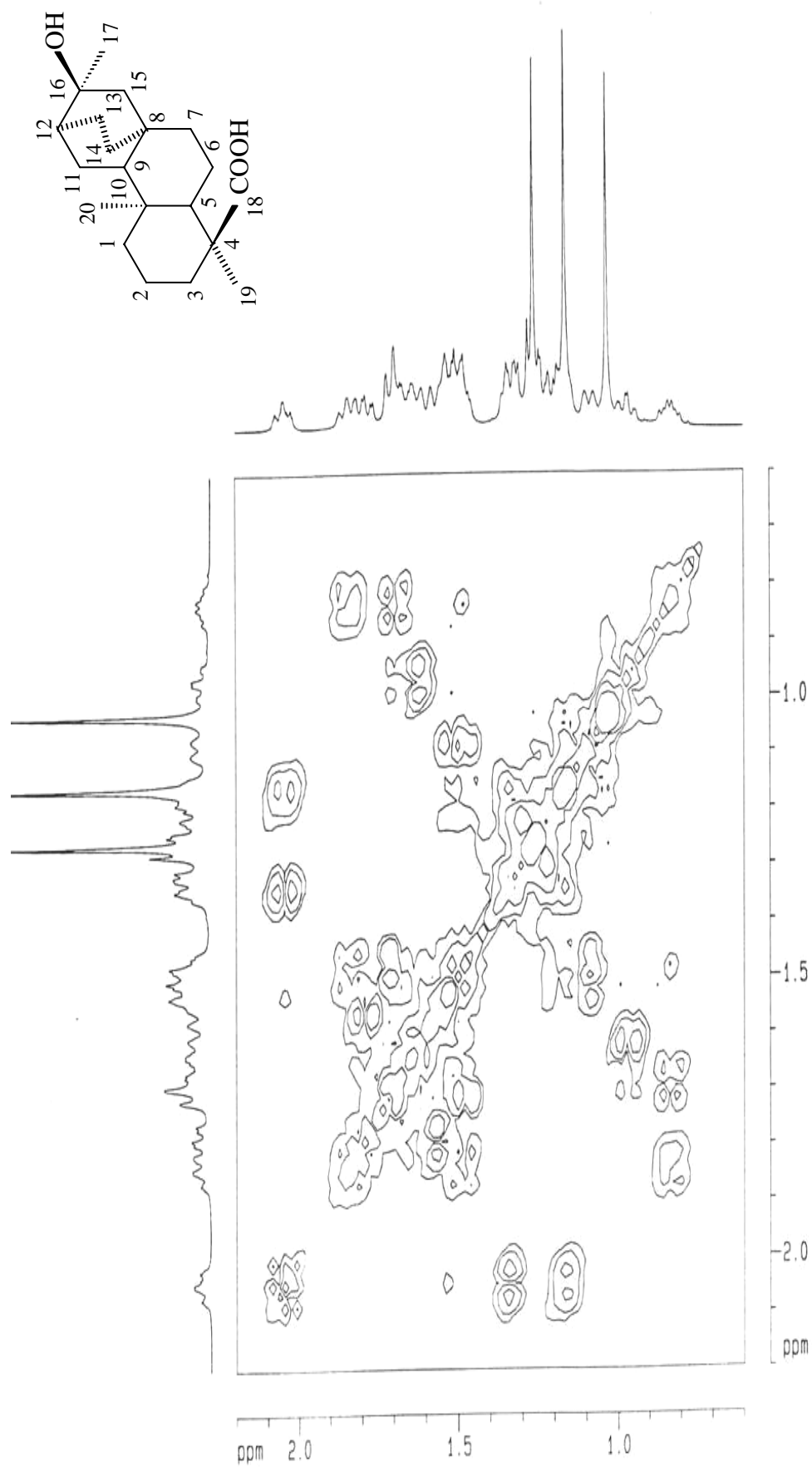
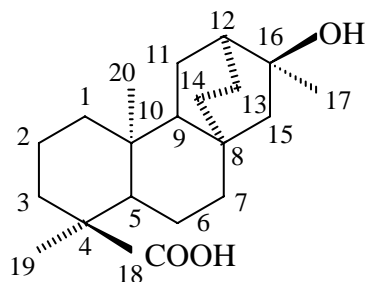


FIGURA 28: Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY do ácido *emt*-atansic-16 α -ol-18-óico (CD_3OD , 500 MHz)

Tabela 2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em CD_3OD a 500 MHz do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico

C	HMQC		HMBC	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY
	δ_{C}	δ_{H}		
4	46,8	-		
8	33,5	-		
10	36,7	-		
16	71,1	-	H-13	
18	181,4	-		
CH				
5	50,5	1,32 (m)	H-1	
9	51,3	1,71 (m)	H-13, H-14	
12	37,3	1,52 (m)	H-13	
CH₂				
1	38,9	1,33 (m) 1,18 (m)		
2	16,9	1,66 (m) 1,50 (m)	H-3	
3	38,4	1,65 (m) 0,94 (m)	H-19	H-3
6	21,1	1,45 (m) 1,07 (m)	H-7	H-6
7	36,8	1,76 (m) 1,63 (m)		
11	22,8	1,69 (m) 1,66 (m)		
13	23,5	1,19 (m) 2,07 (m)		H-13
14	26,9	1,86 (m) 0,82 (m)		H-14
15	56,7	1,32 (m) 1,22 (m)	H-14	
CH₃				
17	29,2	1,26 (s)	H-15	
19	15,7	1,16 (s)	H-3	
20	13,5	1,03 (s)	H-1	

***ent*-TRACHYLOBANE DITERPENOIDS FROM XYLOPIA
LANGSDORFFIANA**

4.2. *ent*- Trachylobane Diterpenoids from *Xylopi*a *langsdo*rffiana

RESUMO

Neste artigo relatamos o isolamento e elucidação estrutural de dois novos diterpenos *ent*-trachylobano, além da atividade citotóxica de um deles.

Diterpenos trachylobano são raros e ainda existe um pequeno número de relatos na literatura. Quanto as suas atividades biológicas ainda existem poucos estudos, onde os principais destacam atividade citotóxica.

Para isolamento desses diterpenos foi preparado o extrato etanólico bruto do caule de *X. langsdo*rffiana e particionado com hexano, clorofórmio e acetato de etila. O extrato hexânico foi submetido a cromatografia em coluna com sílica gel, obtendo-se 95 frações que, após monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), forneceu 12 grupos (F-1-F-12). O grupo F-1 foi recristalizado com metanol obtendo-se o ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico. A fração F-4 foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída com acetato de etila: hexano (9:1), obtendo-se o ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico.

A análise do espectro de IV evidenciou as absorções em 3200 cm⁻¹ característico de OH de ácido carboxílico, uma absorção na região de 1700 cm⁻¹, característico de estiramento de carbonila de ácido carboxílico, além de uma absorção na região de 1725 cm⁻¹ característica de estiramento de carbonila de ester. Os dois diterpenos pertencem a série *ent*. As metilas C-19 e C-20 estão em axial o que fornece um deslocamento químico característico em 16,4 ppm para a metila C-19. Está metila quando em equatorial apresenta deslocamento químico em 28,9 ppm. A análise desses deslocamentos químicos corroboraram com a cristalografia de raio-x do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico que mostrou as metilas C-19 e C-20 na mesma configuração. Analisando os dados de RMN ¹³C do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico podemos observar uma diferença significativa no deslocamento químico da metila C-19 comparado ao seu epímero isolado de uma espécie de *Xylopi*a. Com essas diferenças foi possível propor a estrutura de duas novas moléculas.

O ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico teve sua citotoxicidade avaliada em células V79 e hepatócitos de rato pelo método MTT, obtendo-se uma CI-50 de 224 e 231 μ M.

Os espectros uni e bidimensionais dessas duas substâncias são mostrados nas Figuras de 29 a 50 (págs. 58 a 79).

ent-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*

Josean Fechine Tavares,[†] Karine F. Queiroga,[†] Marianna Vieira B. Silva,[†] Margareth F. F. M. Diniz,[†] José M. B. Filho,[†] Emidio V. L. da-Cunha,^{†‡} Carlos Alberto de Simone,[§] João X. de Araújo Júnior,^{§[⊥]} Patrícia S. Melo,[∇] Marcela Haun,[∇] and Marcelo Sobral da Silva^{*†}

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Cx. Postal 5009, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, CCBS, 58100-000, Campina Grande, PB, Brazil, Departamento de Química, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil, Curso de Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil, and Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil

Two new diterpenes of the *ent*-trachylobane type were isolated from the stems of *Xylopia langsdorffiana*, *ent*-7 α -acetoxytrachyloban-18-oic acid (**1**) and *ent*-7 α -hydroxytrachyloban-18-oic acid (**2**). The structures of these isolates were deduced by spectroscopic data interpretation. X-ray crystallography of **1** was used to confirm its structure. The cytotoxic activity of **1** against V79 fibroblasts and rat hepatocytes was investigated.

* Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: (55 21) 83 3216 7177. Fax: (55 21) 83 3216 7570.

E-mail: marcelosobral@prpg.ufpb.br

[†]Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

[‡]Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba.

[§]Departamento de Química, Universidade Federal de Alagoas.

[⊥]Curso de Farmácia, Universidade Federal de Alagoas.

[∇]Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

The genus *Xylopia* (Annonaceae) comprises about 160 species.¹ Various species of this genus are used in folk medicine for rheumatism² and as antimicrobial agents.³ *ent*-Kaurane and *ent*-trachylobane diterpenes are encountered in this genus,^{4,5} with the latter group of compounds being rare and little-studied biologically thus far.⁶⁻⁸

Xylopia langsdorffiana St-Hil. & Tul. is a tree, 5-7 meters high and popularly known in Northeast Brazil as “pimenteira da terra”.³ Vasorelaxant and hypotensive activities were reported recently for 8(17), 12*E*-labdatrien-18-oic acid, a labdane-type diterpene isolated from this plant.⁹ As part of our continuing investigations of new bioactive molecules from plants of Brazil, we report herein the isolation and structure elucidation of two new *ent*-trachylobanes, **1** and **2**, from *X. langsdorffiana* stems as well as their cytotoxicity assay against V79 fibroblasts and hepatocytes.

Compound **1** was obtained as a crystalline solid, mp 230-233 °C, $[\alpha]_D^{26} + 25$ (*c* 1.01, CHCl₃). The HREIMS of **1** showed a molecular ion peak at *m/z* 360.2309, compatible with the molecular formula, C₂₂H₃₂O₄, having 7 degrees of unsaturation in the molecule. The IR spectrum showed absorptions at 3200, 1700, and 1725 cm⁻¹, characteristic of COOH and ester groups. The presence of two CO groups was supported by the ¹³C NMR spectrum which shows signals at δ_C 185.1 and 171.4 ppm. The latter was assigned to a OCOCH₃ group as a result of the appearance of a typically deshielded CH₃ group at δ_H 2.04 (s, 3H) ppm in the ¹H NMR spectrum which exhibited a characteristic cross-peak with the CO signal at δ_C 171.4 in the HMBC spectrum. With two CO groups accounting for 2 degrees of unsaturation and in the absence of any other signals at sp² regions of the NMR spectra, the possibility of a trachylobane ring system with 5 degrees of unsaturation was considered. Evidence for a cyclopropane ring was provided by the ¹H and ¹³C NMR spectroscopic correlations at δ_H/δ_C 0.64/20.7, 0.90/24.2 (H/C-12 and H/C-13, respectively).¹⁰ Furthermore, by comparison of the NMR data of **1** with those of similar structures,¹¹ we concluded that it belongs to the *ent*-trachylobane diterpene compound class.

The carbonyl signal of the COOH group at δ_C 185.1 showed cross-peaks with resonance at δ_H 2.18 (H-5) and 1.15 (CH₃-19) in the HMBC spectrum, suggesting the position of this carboxylic acid unit at C-4. The location of the OCOCH₃ group at C-7 was also deduced from the HMBC correlations between the protons at δ_H 2.18 (H-5), 1.60 (H-9), 1.45 (H-14), and 1.35 (H-15), and the oxygenated carbon at δ_C 78.9.

The ¹³C NMR spectroscopic data comparison of compound **1** with *ent*-7β-acetoxytrachyloban-18-oic acid¹² shows differences in the chemical shifts of C-5, C-6, C-9,

C-15, and C-19. The chemical shift of the C-19 methyl group at δ_C 16.4 was compatible with the *ent*-trachylobane-18-oic acid^{11,13} structure of compound **1**. Similarly, ¹³C NMR chemical shifts at δ_C 27.8 (C-6) and 45.5 (C-15) ppm of compound **1** were consistent with those of 7 α -hydroxytrachyloban-19-oic.¹⁴ Moreover, long-range correlations in the HMBC spectrum between the H-7 signal at δ_H 4.65 ppm and the methine carbons at δ_C 42.8 and 48.9, along with the cross-peaks between H-12 and H-14 protons at δ_H 0.64 and 1.45, respectively, with the carbon at δ_C 48.9, confirmed unambiguously the assignments of the signals at δ_C 42.8 and 48.9 ppm to C-5 and C-9, respectively. The one and two dimensional ¹H / ¹³C NMR data are shown in Table 1. Based on the above evidence, the relative stereochemistry of the carbons at C-4 and C-7 is established. Therefore, the structure of compound **1**, a new diterpene, was proposed as *ent*-7 α -acetoxytrachyloban-18-oic acid. This was confirmed from a single-crystal X-ray diffraction study on this isolate.

Compound **2** was also obtained as a crystalline solid with mp 130-134 °C, $[\alpha]_D^{26} + 16$ (c 1.01 CHCl₃). The HREIMS of **2** showed a molecular ion peak at m/z 318.2129, compatible with the molecular formula, C₂₀H₃₀O₃, with 6 degrees of unsaturation. The IR spectrum showed absorptions at 3500, 3150, and 1695 cm⁻¹, indicating the presence of OH and COOH groups. The presence of only one CO group and the absence of any other sp² carbon in the molecule (NMR) along with signals at δ_H/δ_C 0.64/20.7 and 1.11/24.1 (H/C-12 and H/C-13 respectively), consistent with the presence of a cyclopropane ring, again suggested an *ent*-trachylobane skeleton. The presence of a secondary OH group is supported by the ¹H / ¹³C NMR signals at δ_H/δ_C 3.60/76.0. The locations of the polar groups at C-4 and C-7 in compound **2** were determined from HMBC correlations as in **1** (*vide supra*). Moreover, the C-5 and C-9 chemical shifts in **2** were virtually identical to those of compound **1**. All the other ¹³C NMR chemical shifts were practically identical to those of 7 α -hydroxytrachyloban-19 β -oic acid.¹⁴ However, the chemical shift of the CH₃ at C-4 (Table 1) was significantly different and consistent with the inverted stereochemistry in this center of compound **2**. Thus, the structure of **2** was assigned as *ent*-7 α -hydroxytrachyloban-18-oic acid, a new natural product that is an epimer of an analog reported by Ngouela and associates.¹⁴

The *in vitro* cytotoxicity of **1** was tested against a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79) and rat hepatocytes, using the MTT method,¹⁵ and gave IC₅₀ values of 224 μ M and 231 μ M, respectively. In a previous investigation, compound **1** exhibited an IC₅₀ value of 200 μ M against K562 human leukemia cell line.¹⁶

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were measured in a Geahaka model PF1500 version 1.0 apparatus and are uncorrected. Optical rotations were determined on a ADP 220 Polarimeter, Bellingham-Stanley Ltd. IR spectra were obtained in KBr disks in a Bomem model MB 100M series spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained with a Bruker DRX-500 spectrometer, using CDCl_3 as solvent. HRMS were recorded in a VG-AutoSpec spectrometer, using a direct insertion probe and electron impact at 70 eV. Silica gel 60 (Merck) was used for column chromatography.

Plant Material. The stems of *Xylopia langsdorffiana* were collected in the municipality of Cruz do Espírito Santo, State of Paraíba, in July 2002. The plant material was identified by Prof. Maria de Fátima Agra, Head of the Botany Section of the Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF). A voucher specimen (AGRA 5541) is deposited at the Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), of the Universidade Federal da Paraíba.

Extraction and Isolation. Dried stems of *X. langsdorffiana* (4 kg) was exhaustively extracted with 95% EtOH. The solvent was evaporated to yield a dark syrup (60 g), which was partitioned successively with hexane, chloroform, and ethyl acetate to yield 20, 16 and 12 g, of crude residues, respectively. The hexane fraction was subjected to column chromatographic separation, using hexane and hexane with increasing amounts of ethyl acetate as eluents, and monitored by TLC. Altogether, 95 fractions of 100 mL each were collected and posted into 12 fractions (F1-F12). Fraction F-1 was recrystallized from methanol yielding **1** (300 mg). Fraction F-4 was purified by preparative TLC with AcOEt-hexane (9:1) as developer to afford compound **2** (56 mg).

ent-7 α -Acetoxytrachyloban-18-oic Acid (1): crystalline solid; mp 230-233 °C; $[\alpha]_D^{26} + 25$ (*c* 1.01 in CHCl_3); IR (KBr) 3200, 1700, 1725, 1239, 1133; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HREIMS *m/z* 360.2309 (calcd 360.2300 for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$).

Crystallographic Data for 1: $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$; $M = 359.47$; orthorhombic, space group $P2_12_12_1$; $a = 6.1359(2)$ Å, $b = 16.9665(8)$ Å, $c = 19.0101(8)$ Å; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; $V = 1979.04(1)$ Å³; $Z = 4$; $D_c = 1.21$ g.cm⁻³; λ (M_α K_α) = 0.71013 Å; $F(000) = 780$; $T = 293$ K; colorless sheet, size 0.15 x 0.10 x 0.08 mm; 4505 independent measured reflections, refinement based on F^2 to give $R_1 [F^2 > 4\sigma(F^2)] = 0.064$; $w_2 = 0.148$ for 3250 observed reflections, and 239 parameters. The Flack absolute structure parameter was determined to be 1.08(2) and the refinement of

the opposite enantiomer resulted in a value of 0.85(2). Unfortunately, the weak distinguishing value of the Flack parameter (which should be 0.0 for the correct enantiomer) could not be used to assign definitively the absolute stereochemistry. The positions of H atoms bonded to C were determined based on stereochemical parameters, while those on O were determined directly from a difference map. Hydrogen atoms on O were refined isotropically, while those on C rode on the carbon atom and Uiso was set to 1.5 (methyl) or 1.2 (other) times the value of the equivalent isotropic displacement parameter of the attached atom. X-ray data collection were accomplished on an Enraf- Nonius KappaCCD area-detector diffractometer. The programs used in crystallographic study were: data collection, COLLECT;¹⁷ cell refinement, DENZO¹⁸ and COLLECT; data reduction, DENZO and COLLECT; program used to solve structure, SHELXS97;¹⁹ program used to refine structure, SHELXL97;¹⁹ molecular graphics, ORTEP-3;²⁰ software used to prepare material for publication, WinGX-Routine.²¹ The CCDC reference number is 270970. Copies of the available material can be obtained, free of charge on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CH21EZ, UK (fax: +44-1223-336-033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or <http://www.ccdc.cam.ac.uk>).

ent-7 α -Hydroxytrachyloban-18-oic Acid (2): crystalline solid; mp 130-134 °C; $[\alpha]_D^{26} +16$ (c 1.01 in CHCl₃); IR (KBr) 3500, 3150, 1695, 1232; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HREIMS *m/z* 318.2129 (calcd 318.2194 for C₂₀H₃₀O₃).

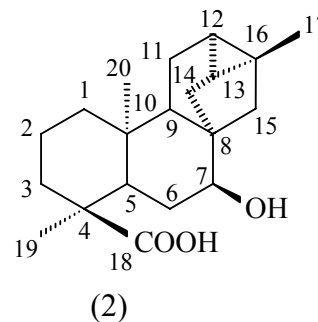
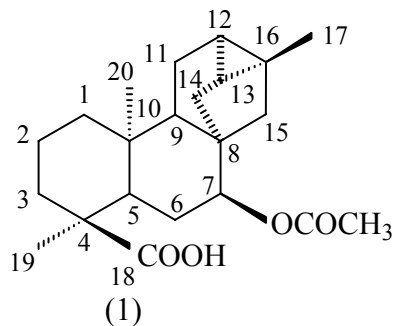
Cytotoxicity Bioassay. Cytotoxic activity of compound **1** was evaluated against V79 cells and rat hepatocytes using the MTT method, according to a previously described procedure.¹⁵ Hepatocytes were isolated from two-month-old Wistar male rats (200-250 g) by a two-step collagenase perfusion method.²²

Acknowledgement. This work was supported by CNPq, CAPES, CENAUREM/UFC, and IMSEAR (Brazil). We thank to Prof. Jnanabrata Bhattacharyya, Visiting Professor (CAPES) at LTF for revising the manuscript in English.

References and Notes

- (1) Maas, P. J. M.; Kamer, H. M. V.; Junikka, L.; Silva, R. M.; Rainer, H. *Rodriguésia* **2001**, *80*, 65-98.
- (2) Agelita, C. M.; Betânia, B. C.; Alaíde, B. O.; Fernão, C. B. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 40-45.

- (3) Correa, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*; Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, 1984; p 315.
- (4) Faulkner, D. F.; Leiby, V.; Waterman, P. G. *Planta Med.* **1985**, *4*, 354-355.
- (5) Andrade, N. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, M. S.; Da-Cunha, E. V. L.; Maia, J. G. S. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 1055-1058.
- (6) Block, S.; Stevigny, C.; De Pauw-Gillet, M. C.; de Hoffman, E.; Llabres, G.; Adjakidje, V.; Quetin-Leclercq, J. *Planta Med.* **2002**, *68*, 647-649.
- (7) Block, S.; Gerkens, P.; Peulen, O.; Jolois, O.; Mingeot-Leclercq, M. P.; De Pauw-Gillet, M. C.; Quetin-Leclercq, J. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 363-368.
- (8) Li, C.; Lee, D.; Graf, T. N.; Phifer, S. S.; Nakanishi, Y.; Burgess, J. P.; Riwan, S.; Setyowati, F. M.; Sarib, A. M.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R.; Falkinham, J. O.; Kroll, D. J.; Kinghorn, A. D.; Wani, M. C.; Oberlies, N. H. *Organic Lett.* **2005**, *7*, 5709-5712.
- (9) Oliveira, A. P.; Furtado, F. F.; Silva, M. S.; Tavares, J. F.; Mafra, R. A.; Araújo, D. A. M.; Cruz, J. S.; Medeiros, I. A. *Vasc. Pharmacol.* **2006**, *44*, 338-344.
- (10) Fraga, B. M. *Phytochem. Anal.* **1994**, *5*, 49-56.
- (11) Leong, Y. W.; Harrison, L. J. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1457-1459.
- (12) Hasan, C. M.; Healey, T. M.; Waterman, P. G. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 177-179.
- (13) Takahashi, J.A.; Vieira, H. S.; Boaventura, M. A. D.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Oliveira, A. B. *Quím. Nova* **2001**, *24*, 616-618.
- (14) Ngouela, S.; Niassé, B.; Tsamo, E.; Brochier, M. C.; Morin, C. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 264-266.
- (15) Melo, P. S.; Durán, N.; Haun, M. *Human Exp. Toxicol.* **2002**, *21*, 281-288.
- (16) Silva, M. V. B.; Anazetti, M. C.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Diniz, M. F. F. M.; Melo, P. S.; Haun, M. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2005**, *41*, 481.
- (17) Enraf-Nonius. *COLLECT*; Nonius BV, Delft, The Netherlands, **1997-2000**.
- (18) Otwinowski, Z.; Minor, W. *Meth. Enzymol.*; Academic Press: New York, **1997**, *276*, 307-326.
- (19) Sheldrick, G. M. SHELXS97 and SHELXL97; University of Göttingen, Germany 1997.
- (20) Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1997**, *30*, 565.
- (21) Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 837-838.
- (22) Guillouzo, A.; Guguen-Guillouzo, C. *Research in Isolated and Cultured Hepatocytes*; Les Editions INSERM and Libbey Eurotext: Paris, 1986.

Table 1. NMR data for Compounds **1** and **2**.^a

position	1		2		HMBC		COSY		NOESY	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	1	2	1	2	1	2
1	38.6	0.90 (m), 1.55 (m)	38.6	0.93 (m), 1.55 (m)		Me-20	H-1	H-1		
2	17.6	1.45 (m), 1.55 (m)	17.5	1.52 (m), 1.62 (m)						
3	37.2	1.65 (m), 1.70 (m)	37.0	1.65 (m), 1.75 (m)	H-5, Me-18					
4	46.9	-	45.7	-						
5	42.8	2.18 (d, $J = 4.5$ Hz)	42.1	2.23 (d, $J = 4.6$ Hz)	H-7, Me-20, Me-18	H-7, Me-20	H-6	H-6		
6	27.8	1.40 (m), 1.60 (m)	30.8	1.36 (m), 1.76 (m)	H-5		H-7, H-5	H-7		
7	78.9	4.65 (broad t, $J = 4.0$ Hz)	76.0	3.60 (broad t, $J = 4.1$ Hz)	H-5, H-14, H-6	H-5, H-14	H-6	H-6		
8	44.5	-	44.5	-						
9	48.9	1.60 (m)	48.0	1.52 (m)	H-7, Me-20, H-14	H-7, H-12				
10	37.9	-	37.9	-	H-11					
11	19.5	1.70 (m), 1.90 (m)	19.5	1.69 (m), 1.64 (m)						
12	20.7	0.64 (m)	20.7	0.64 (m)	Me-17	Me-17	H-13	H-13		
13	24.2	0.90 (m)	24.1	1.11 (m)	H-15, Me-17	H-14, Me-17	H-12	H-12		
14	32.8	1.45 (d, $J = 4.8$ Hz), 1.95 (m)	33.1	1.39 (d, $J = 4.9$ Hz), 1.99 (m)	H-7	H-7	H-14	H-14		
15	45.5	1.35 (m), 1.55 (m)	45.5	1.32 (m), 1.49 (m)	H-7, H-14	H-14			H-7	H-7
16	23.3	-	23.3	-	H-14, H-11	H-11, H-14				
17	20.7	1.18 (s)	20.9	1.20 (s)	H-12, H-13				H-12	H-12
18	185.1	-	184.3	-	H-5, Me-18					
19	16.4	1.15 (s)	16.6	1.23 (s)	H-5					
20	15.2	1.01 (s)	15.3	1.02 (s)	H-5	H-5			H-1	
COMe	171.4	-	-	-						
COMe	21.6	2.06 (s)	-	-					H-15	H-15

^a In CDCl₃, at 500 MHz for ¹H NMR and 125 MHz for ¹³C NMR.

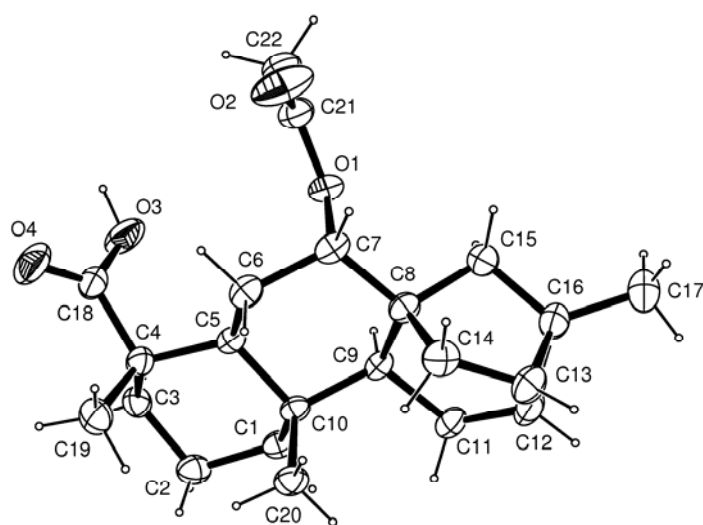


Figure 1: ORTEP diagram (50% probability ellipsoids) showing crystallographic atom numbering and solid-state conformation for compound **1**.

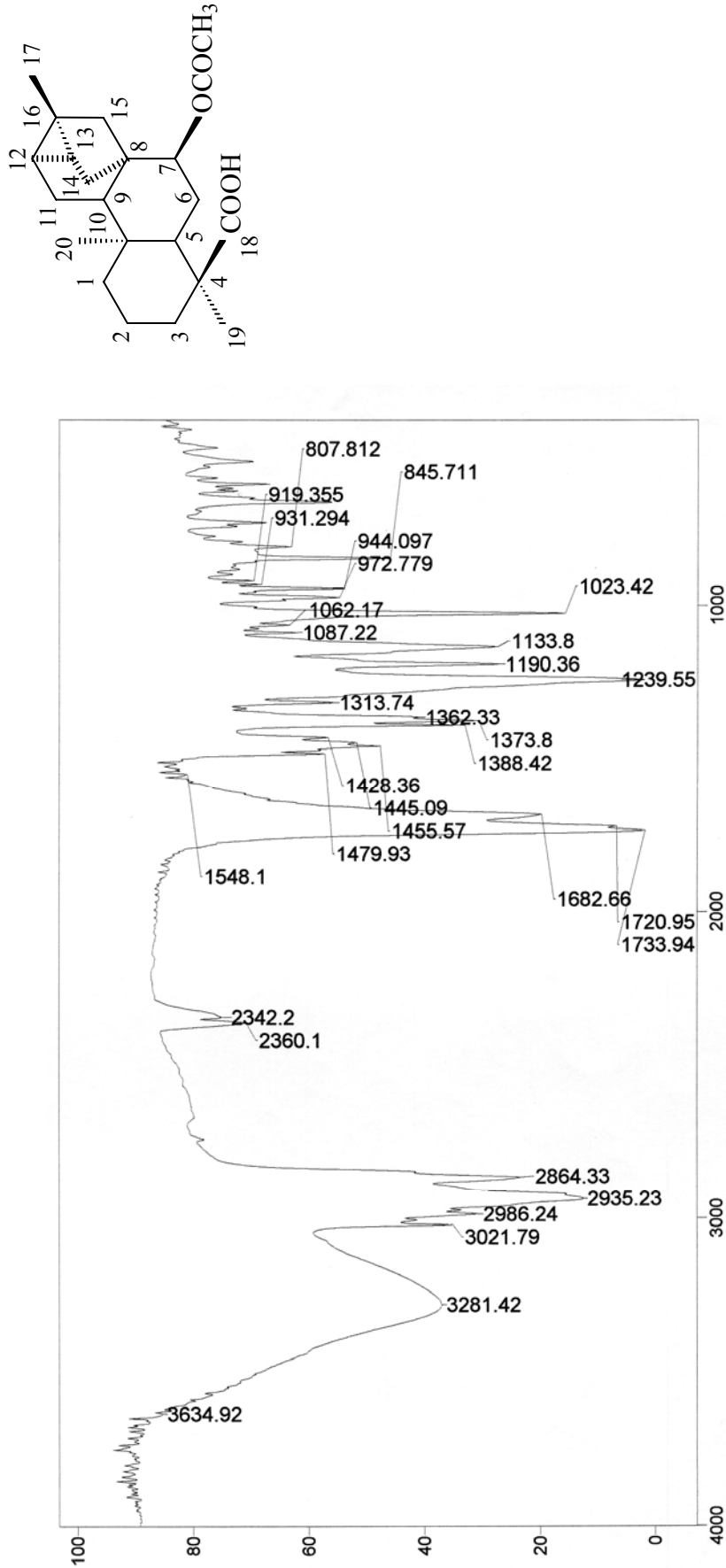


Figura 29: Espectro de IV do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico em KBr

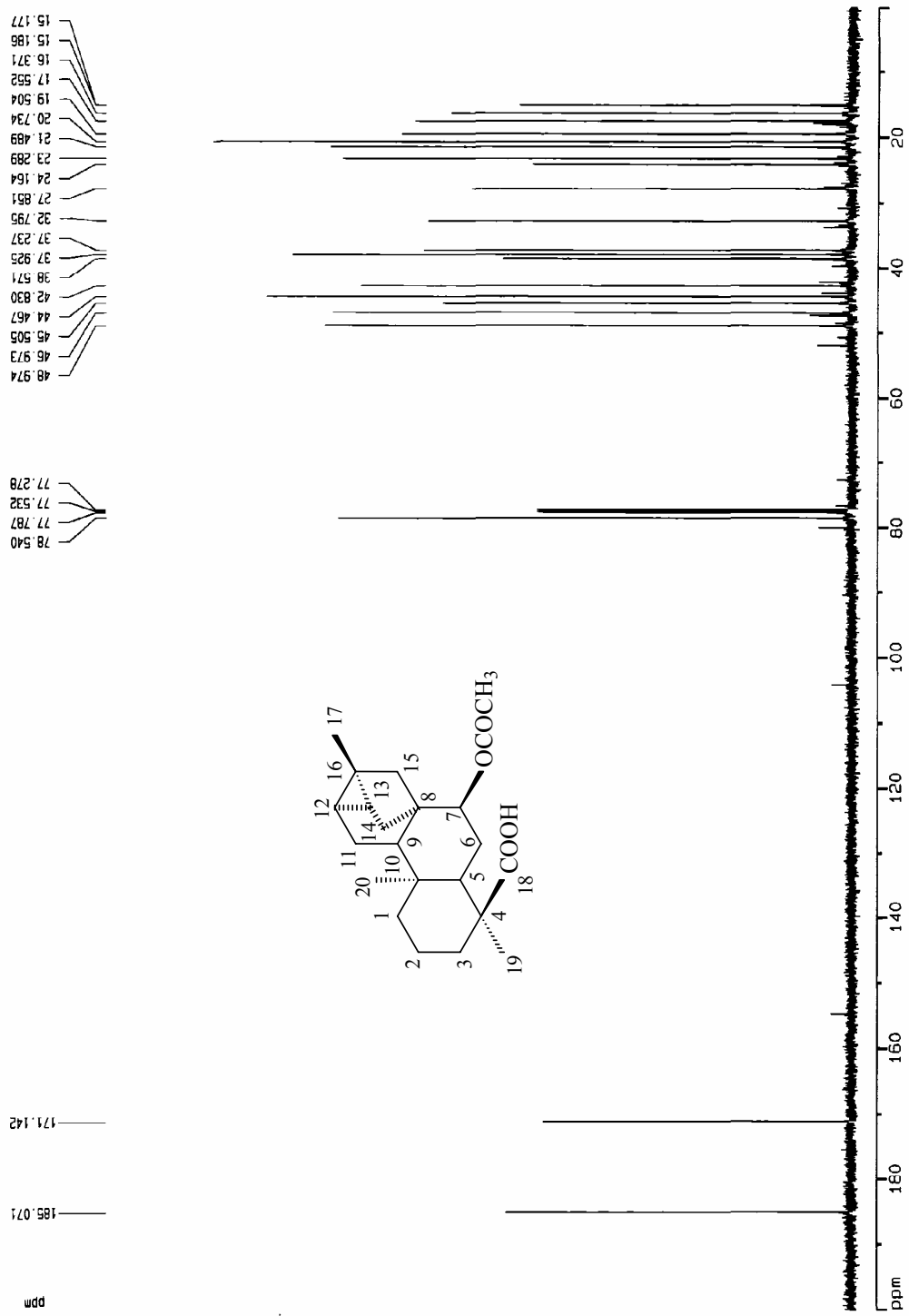
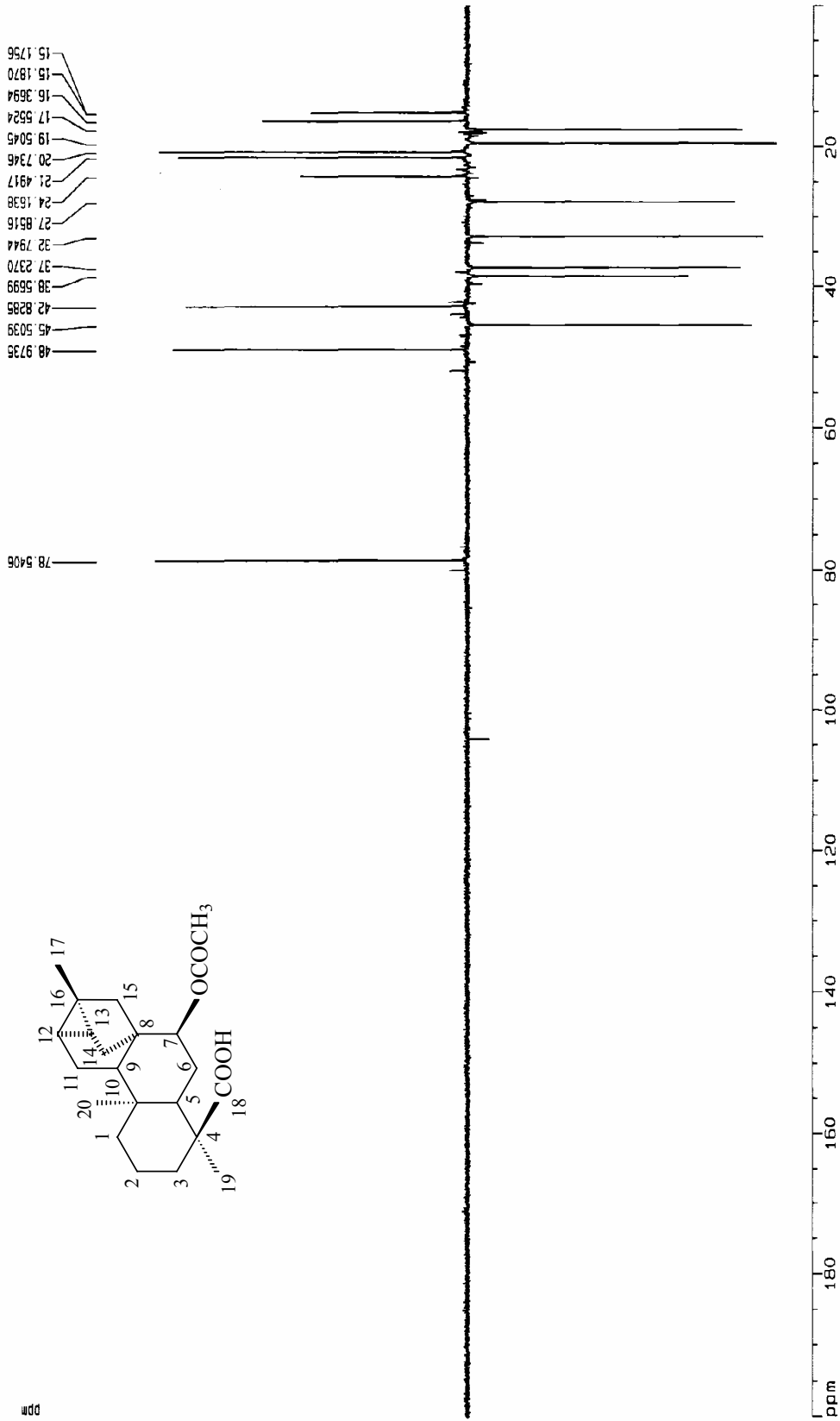


FIGURA 30: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz)

FIGURA 31: Espectro de RMN ¹³C-DEPT-135 do ácido *em*-7 α -acetoxitrichyloban-18-óico (CDCl₃, 125 MHz)

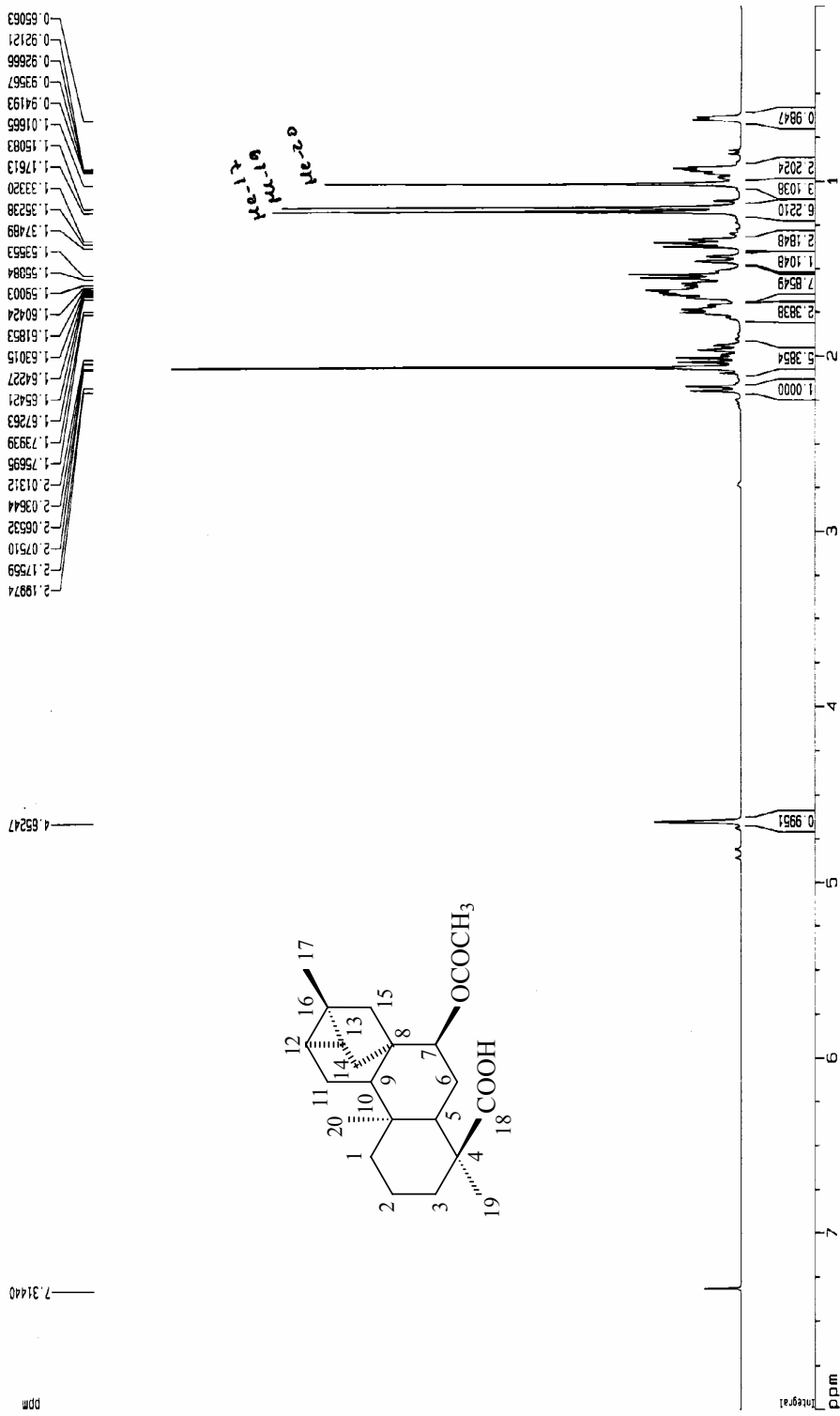


FIGURA 32: Espectro de RMN de ¹H do ácido *ent*-7α-acetoxitrichyloban-18-óico (CDCl₃, 500 MHz)

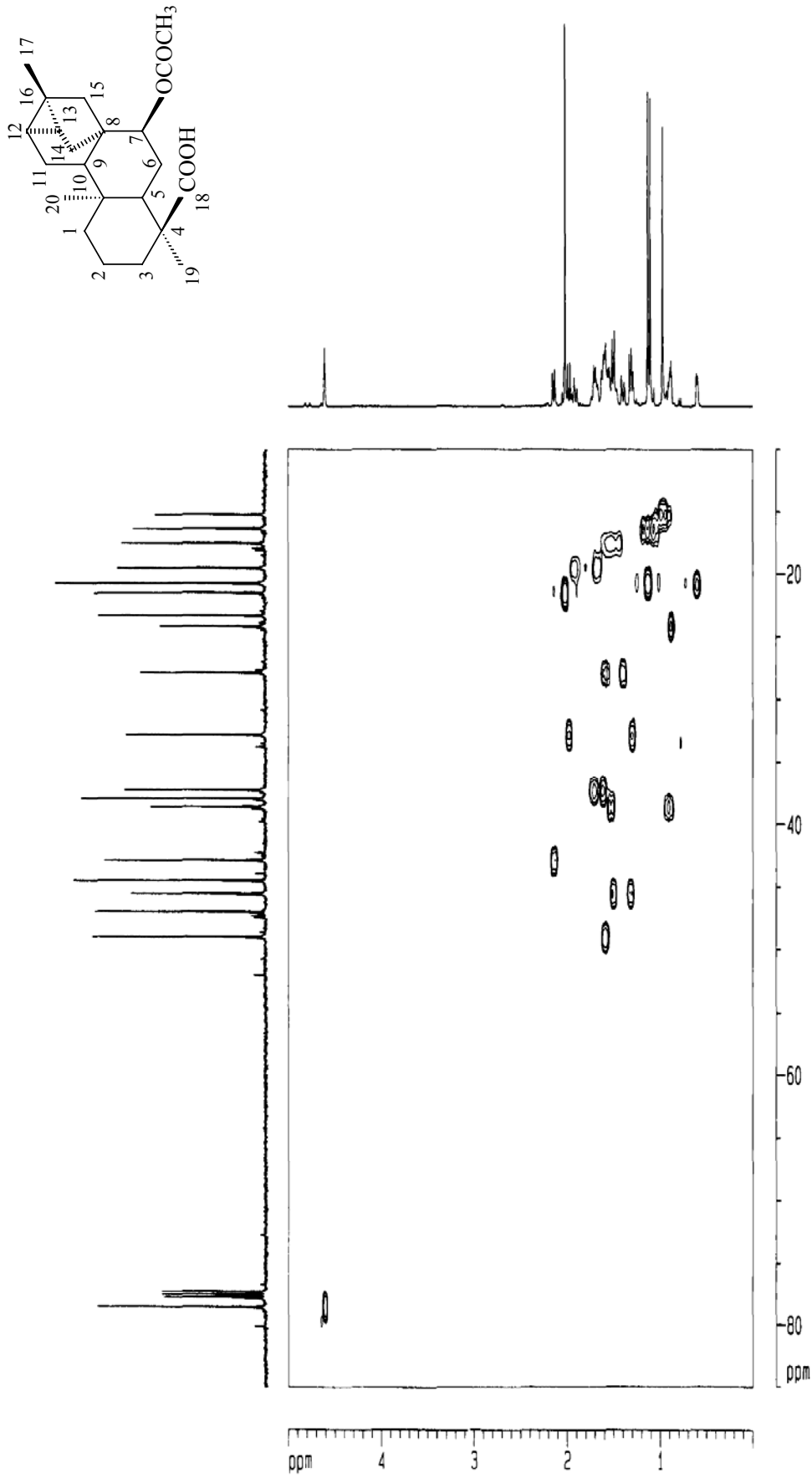


FIGURA 33: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMQC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

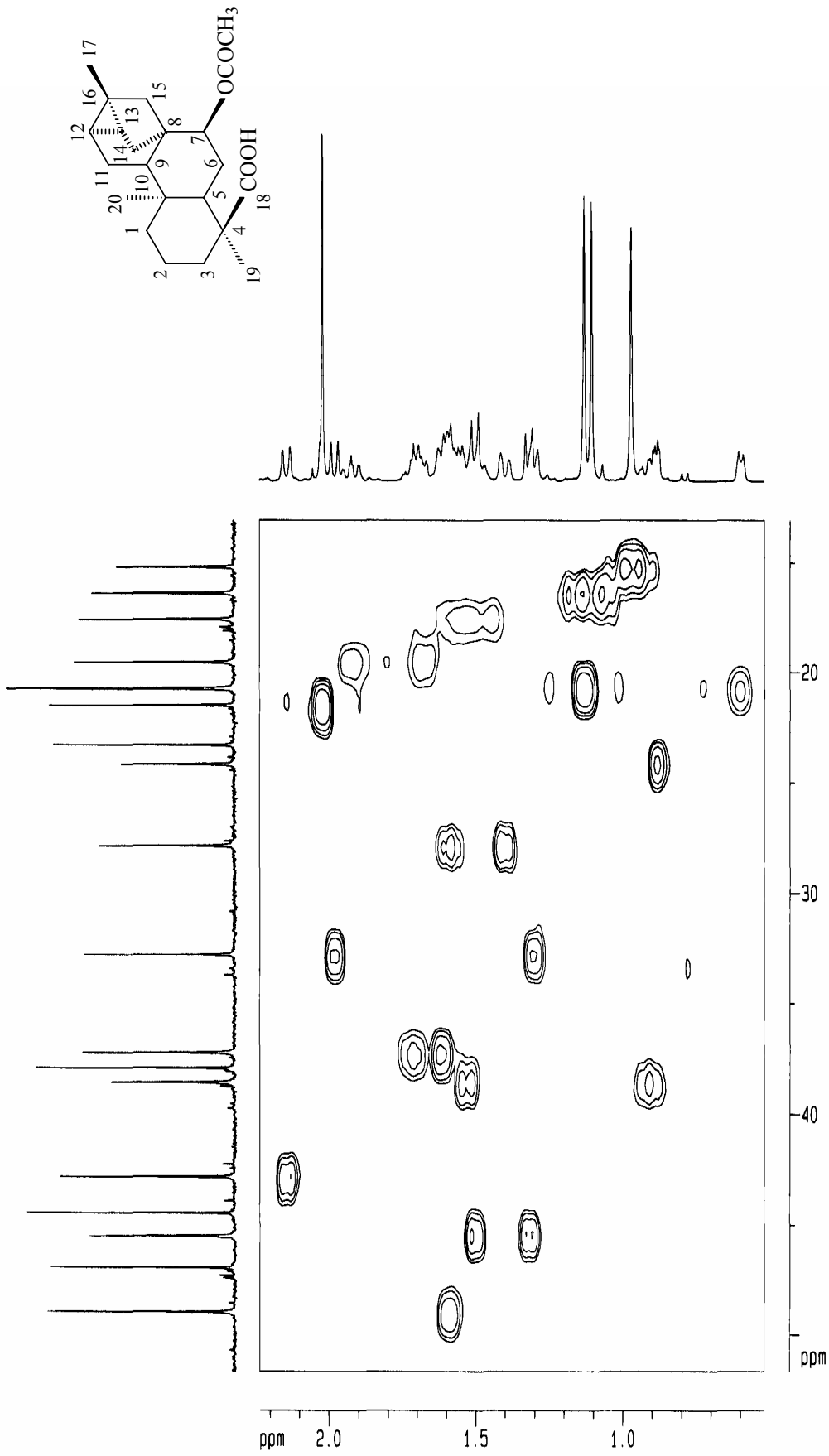


FIGURA 34: Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C -HMOC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

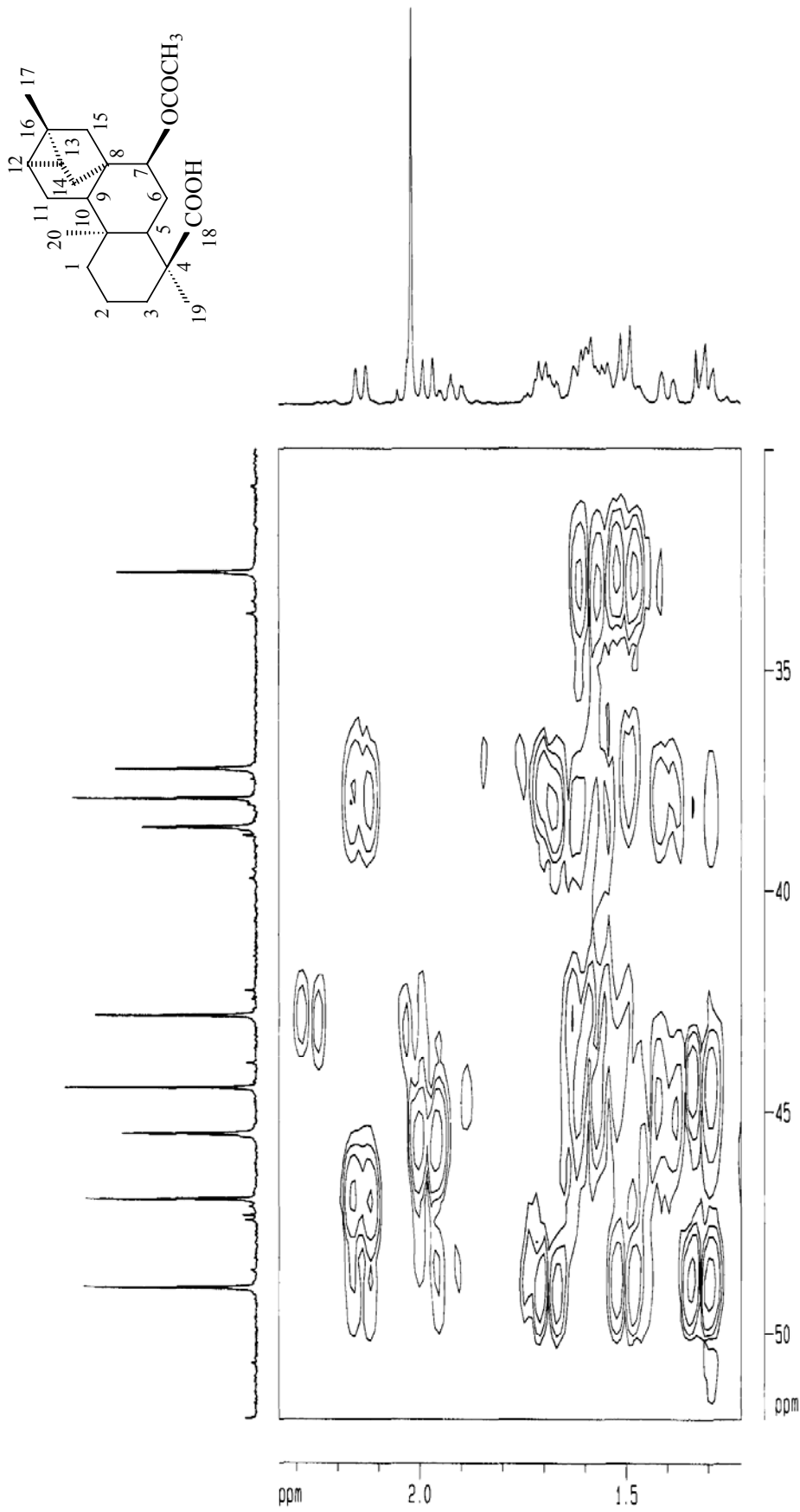


FIGURA 35: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

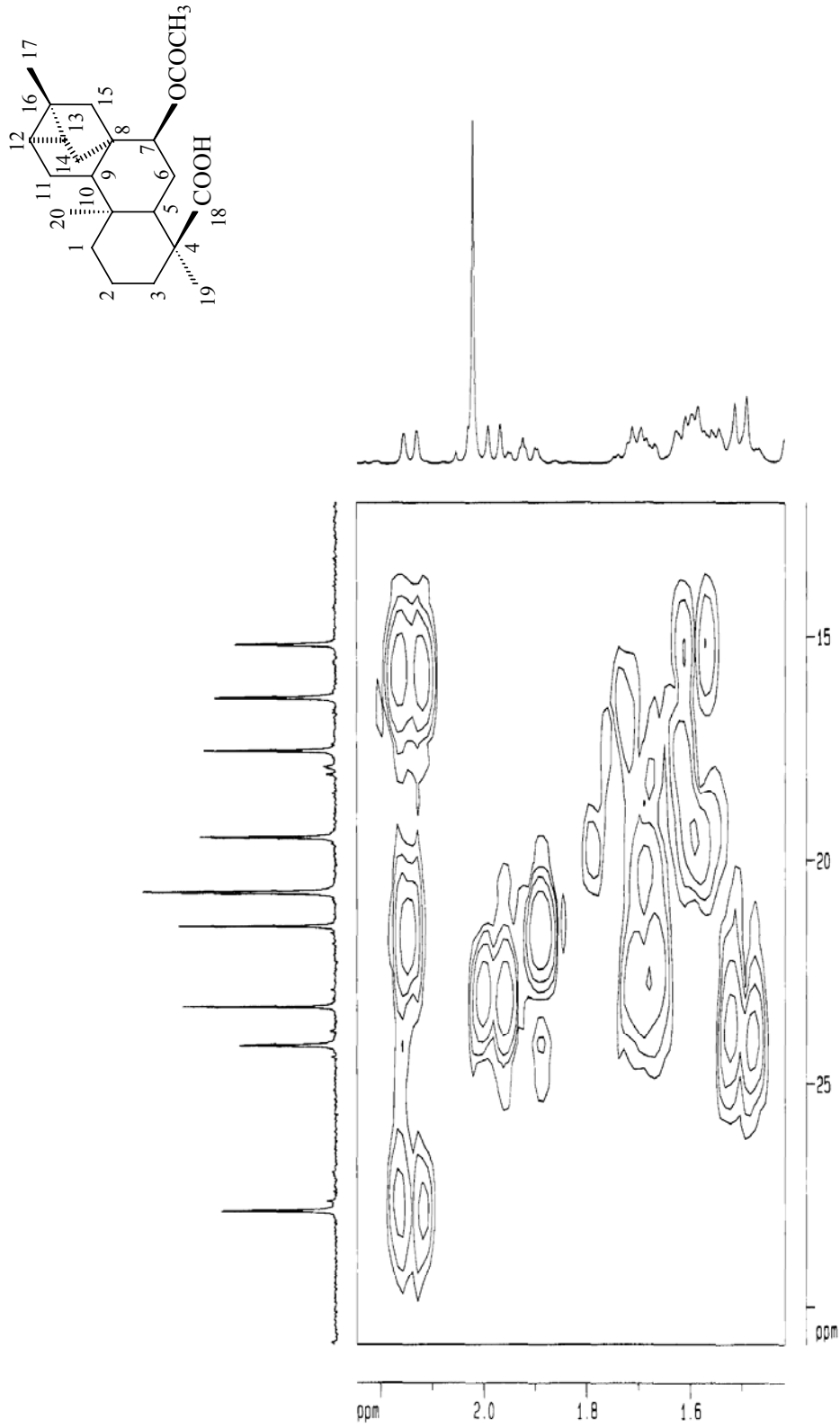


FIGURA 36: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

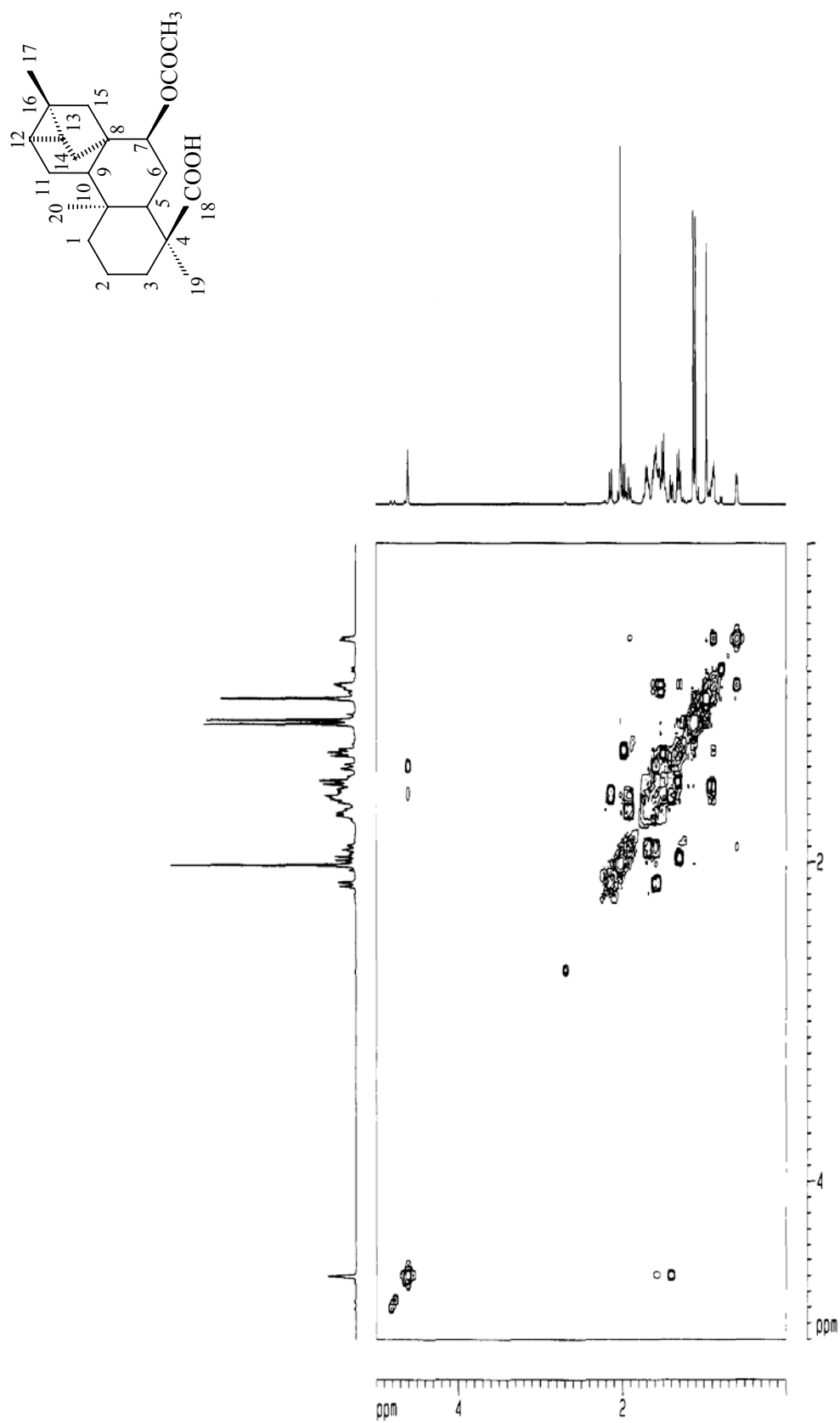


FIGURA 37: Espectro de correlação ¹H x ¹H-COSY do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl₃, 500 MHz)

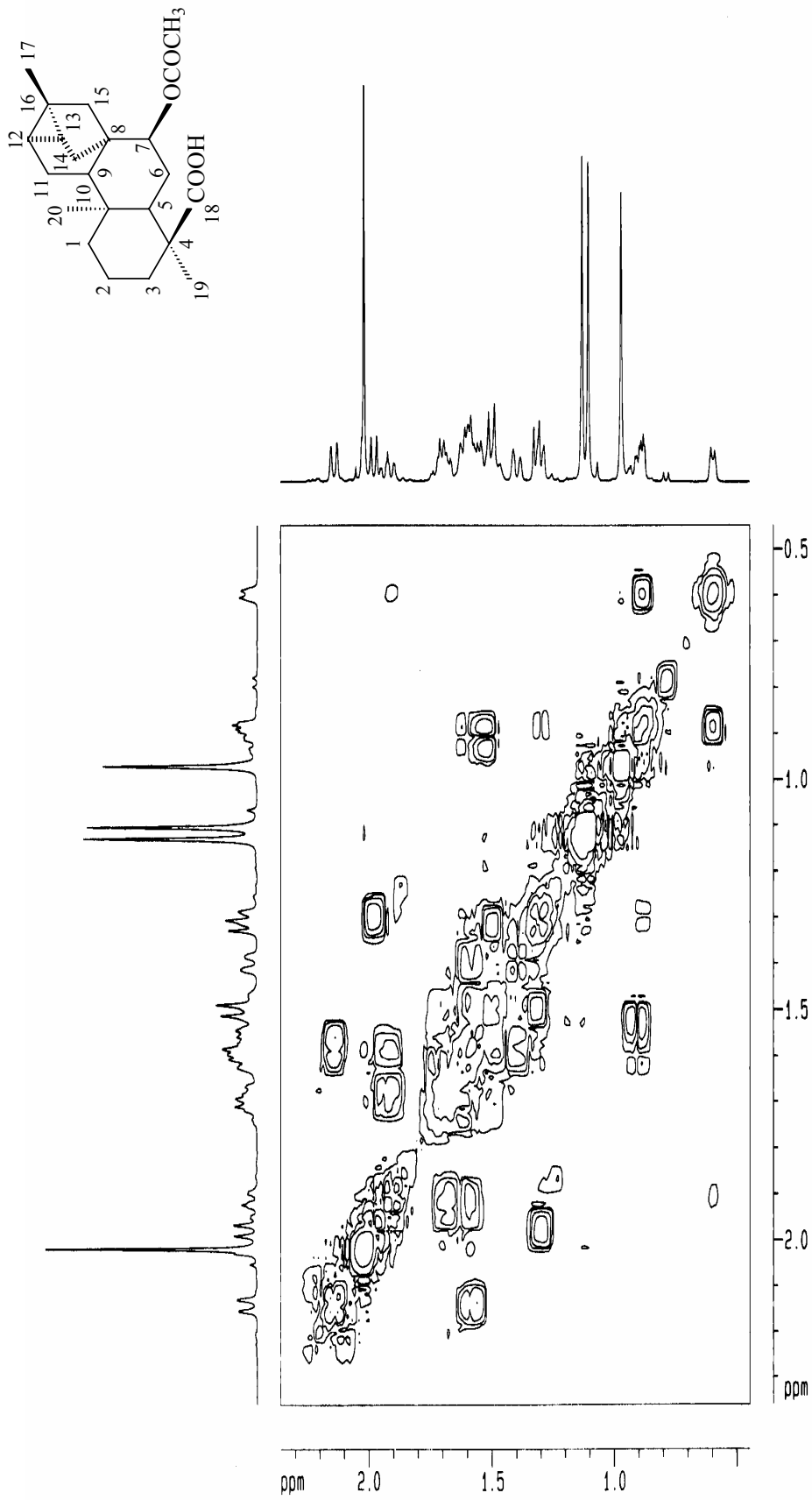
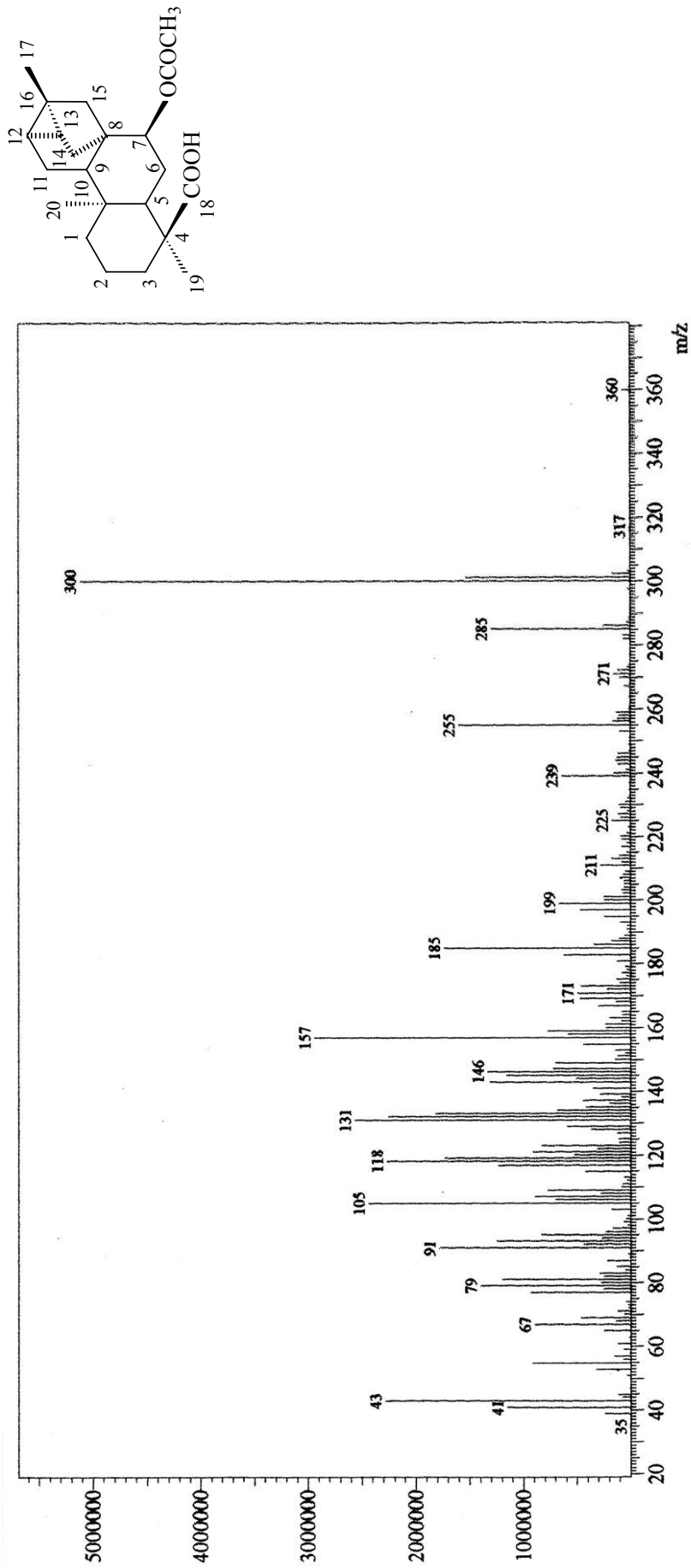


FIGURA 38: Expansão do espectro de correlação ¹H x ¹H-COSY do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico (CDCl₃, 500 MHz)

FIGURA 39: Espectro de massas por IE do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico

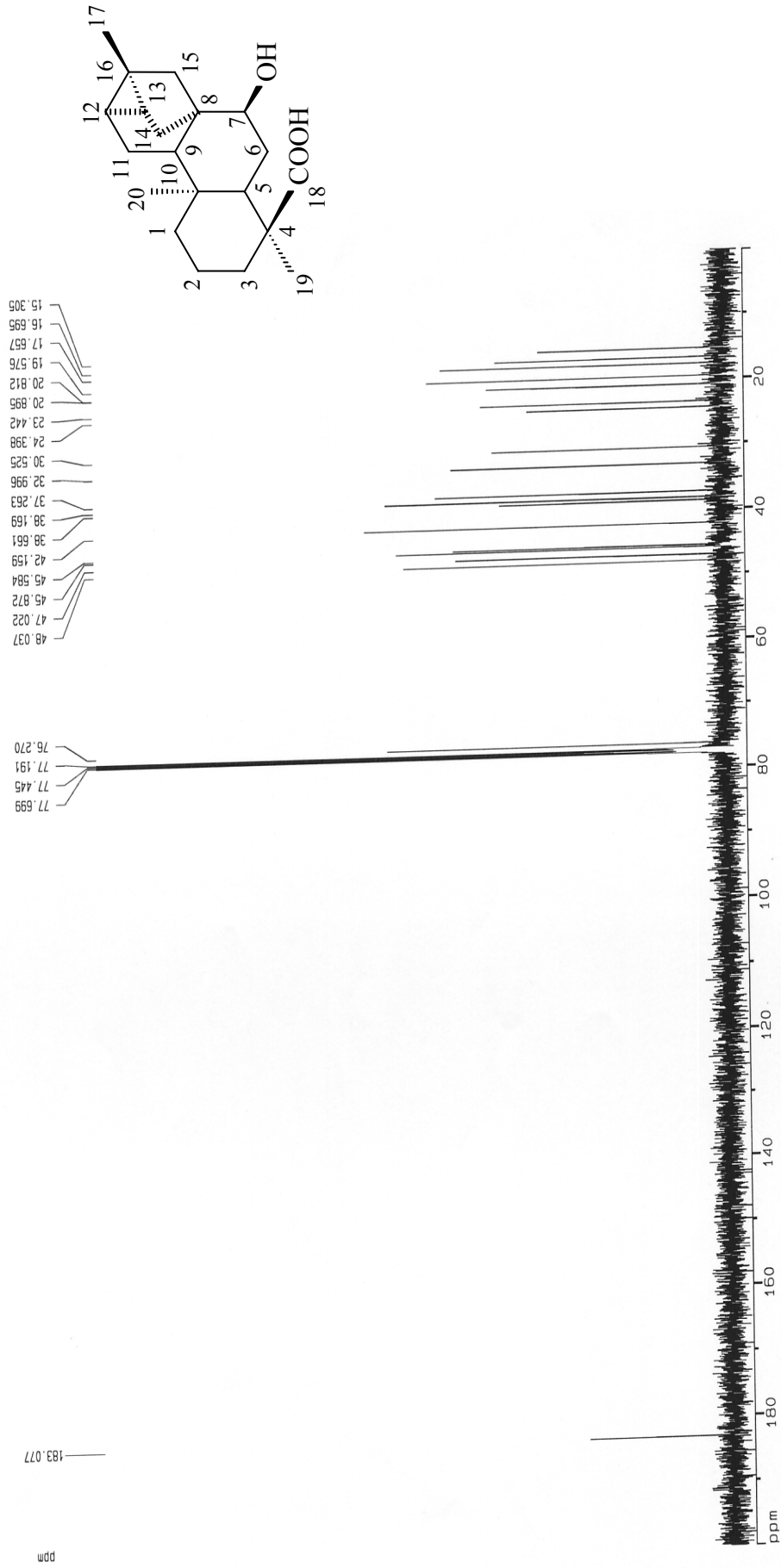


FIGURA 40: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do ácido *ent*-7 α -hidroxitraciloban-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz)

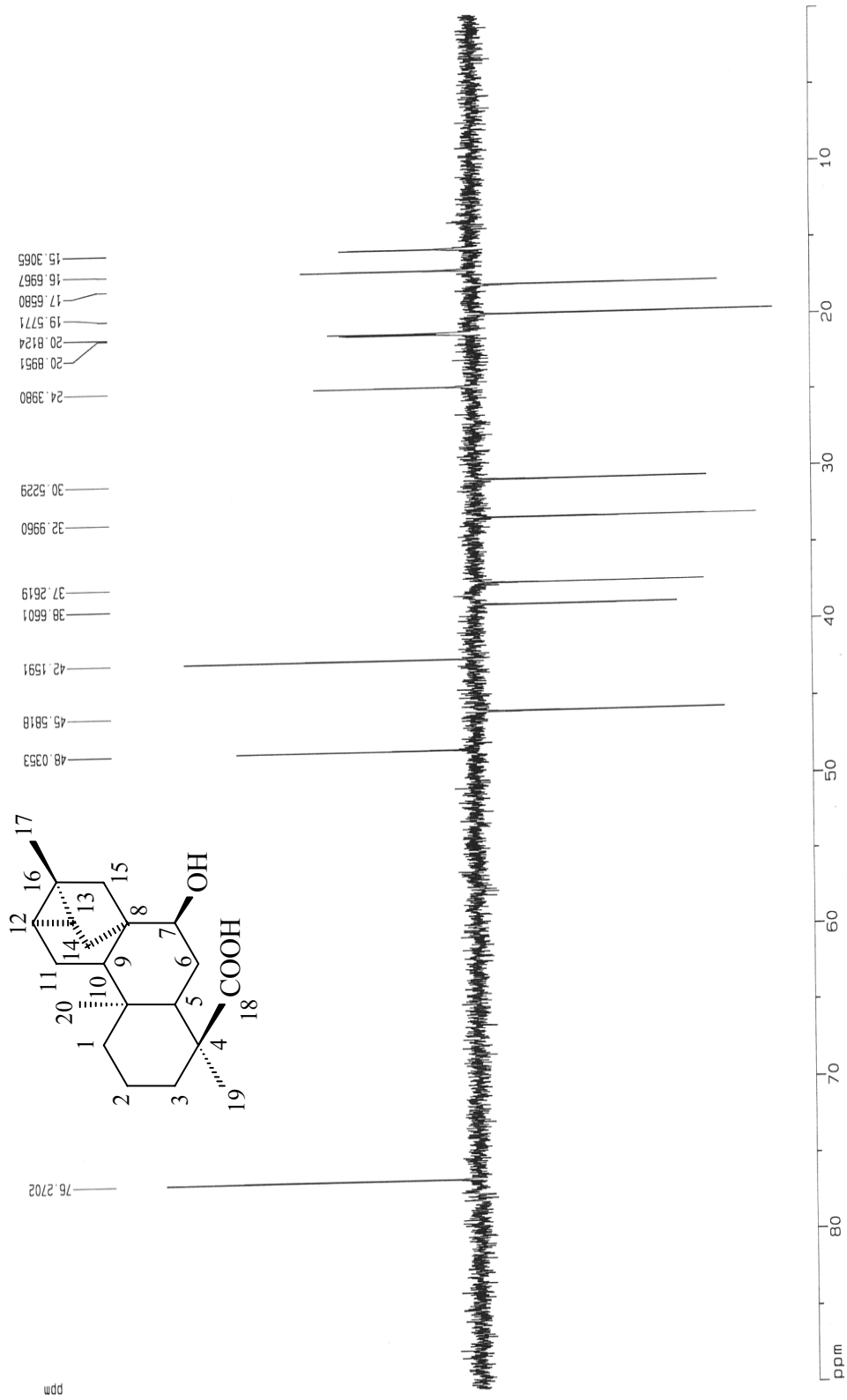


FIGURA 41: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do ácido *ent*-7 α -hidroxitraciloban-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz)

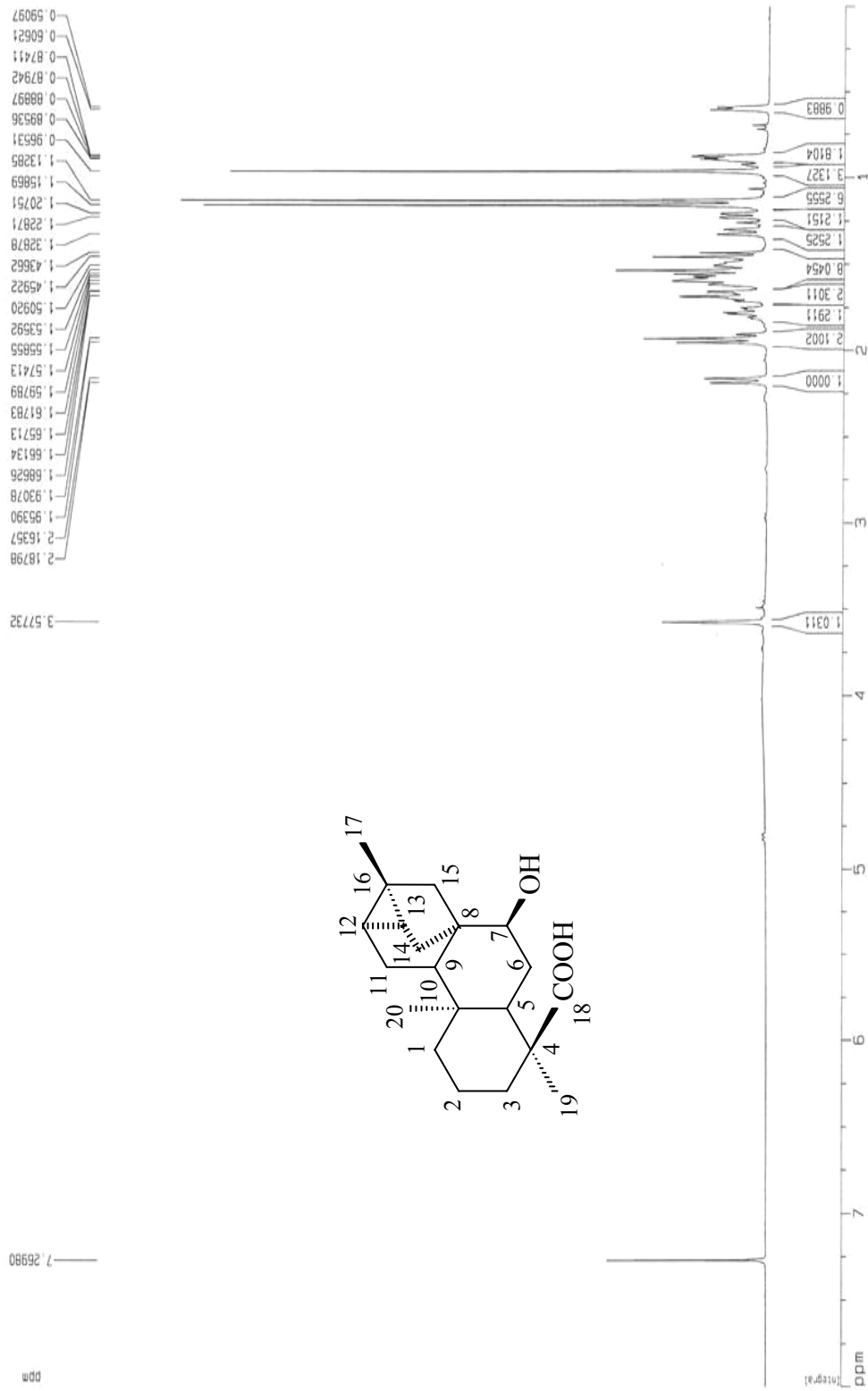


FIGURA 42: Espectro de RMN de ¹H do ácido *ent*-7αhidroxitrachyloban-18-óico (CDCl₃, 500 MHz)

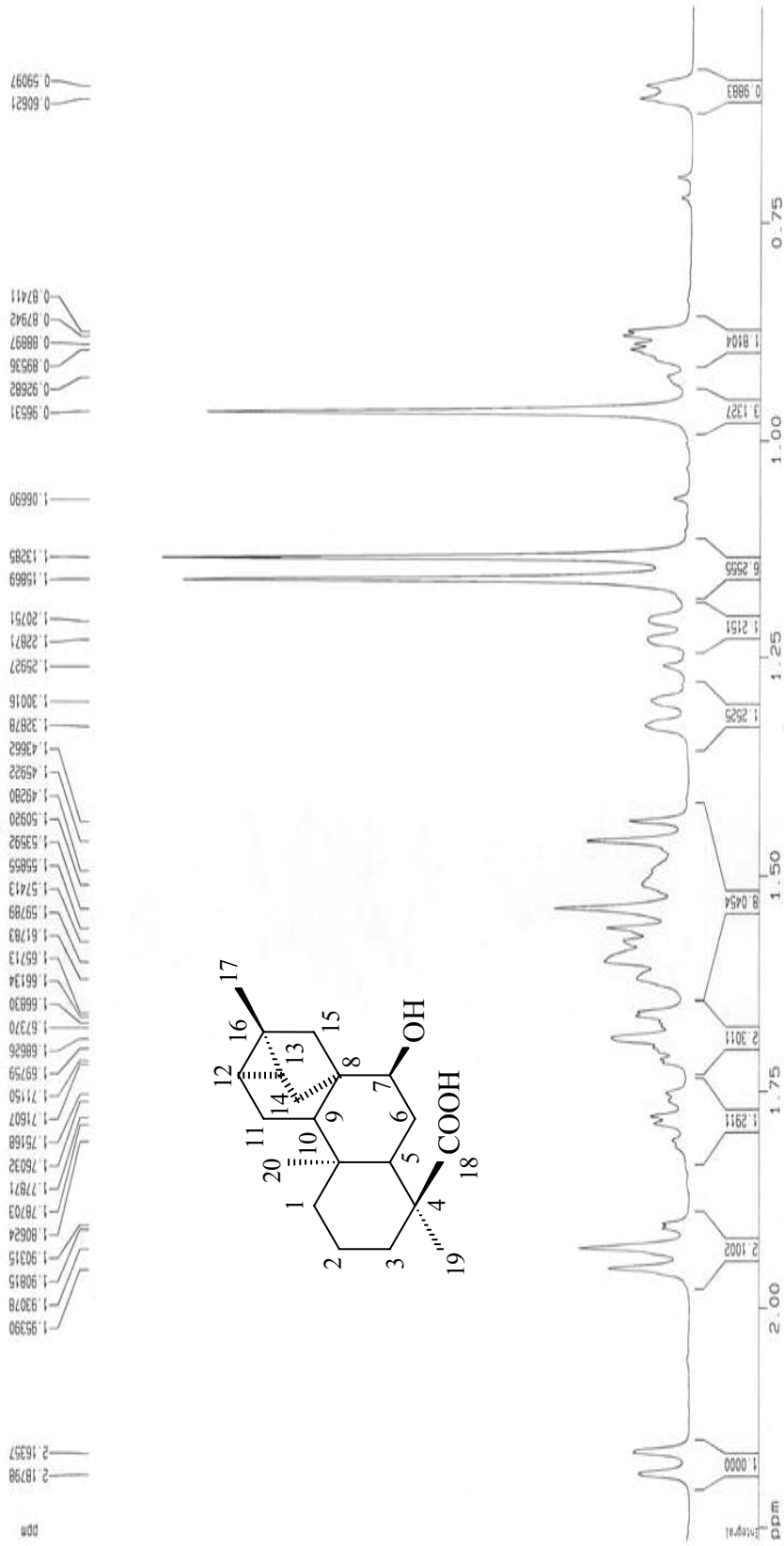


FIGURA 43: Expansão do espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-7-hidroxitrichyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz)

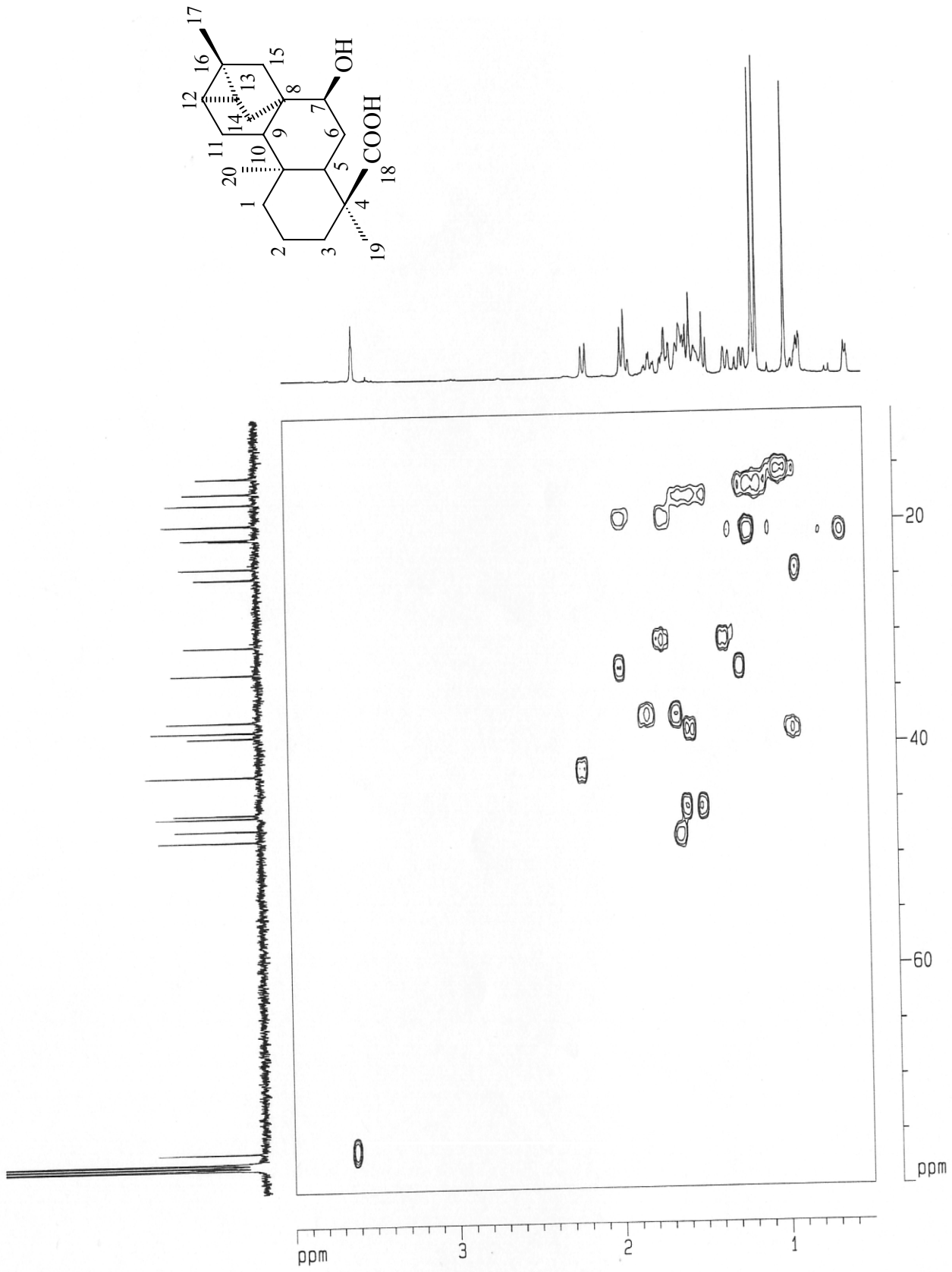


FIGURA 44: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMOC do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

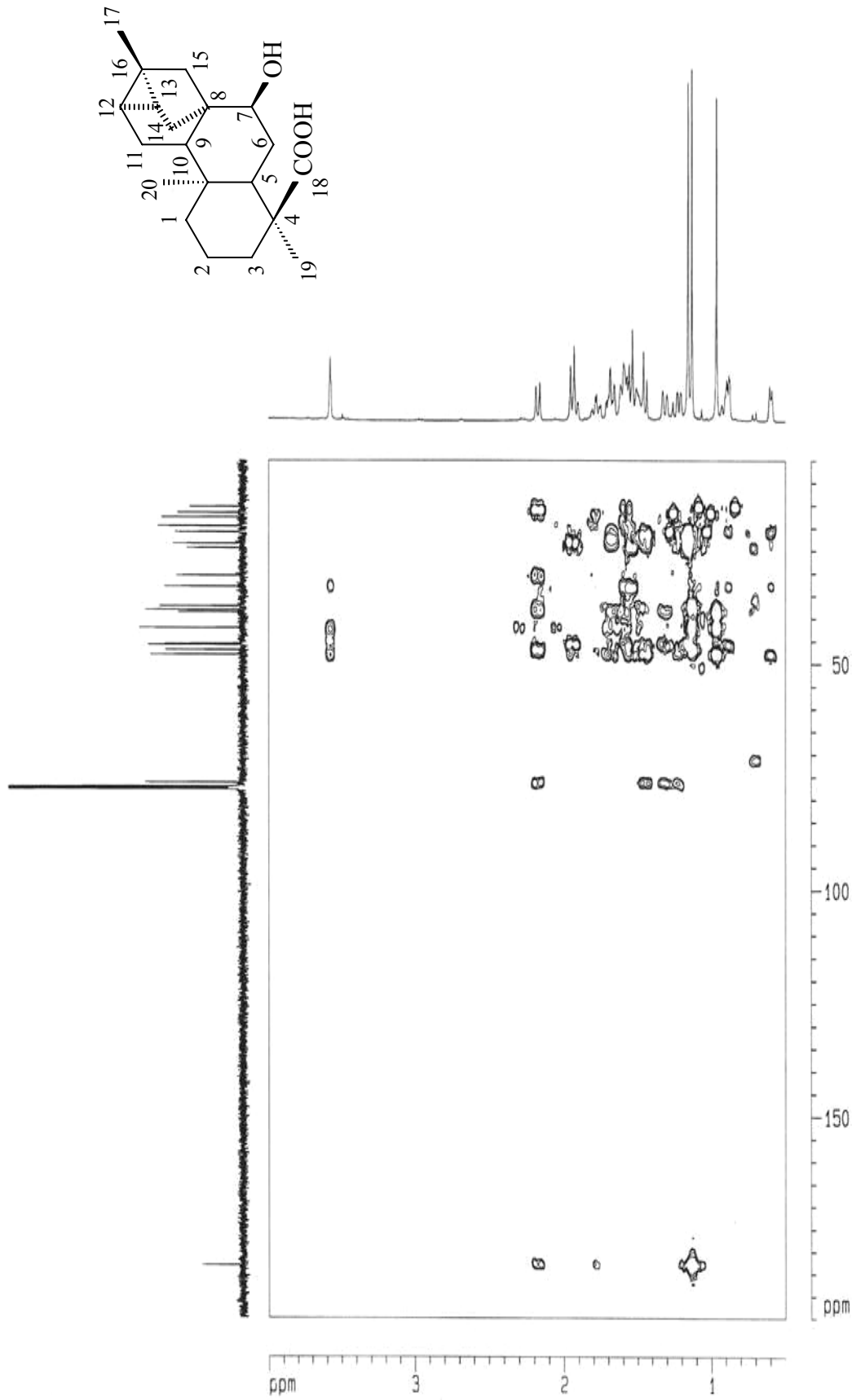


FIGURA 45: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

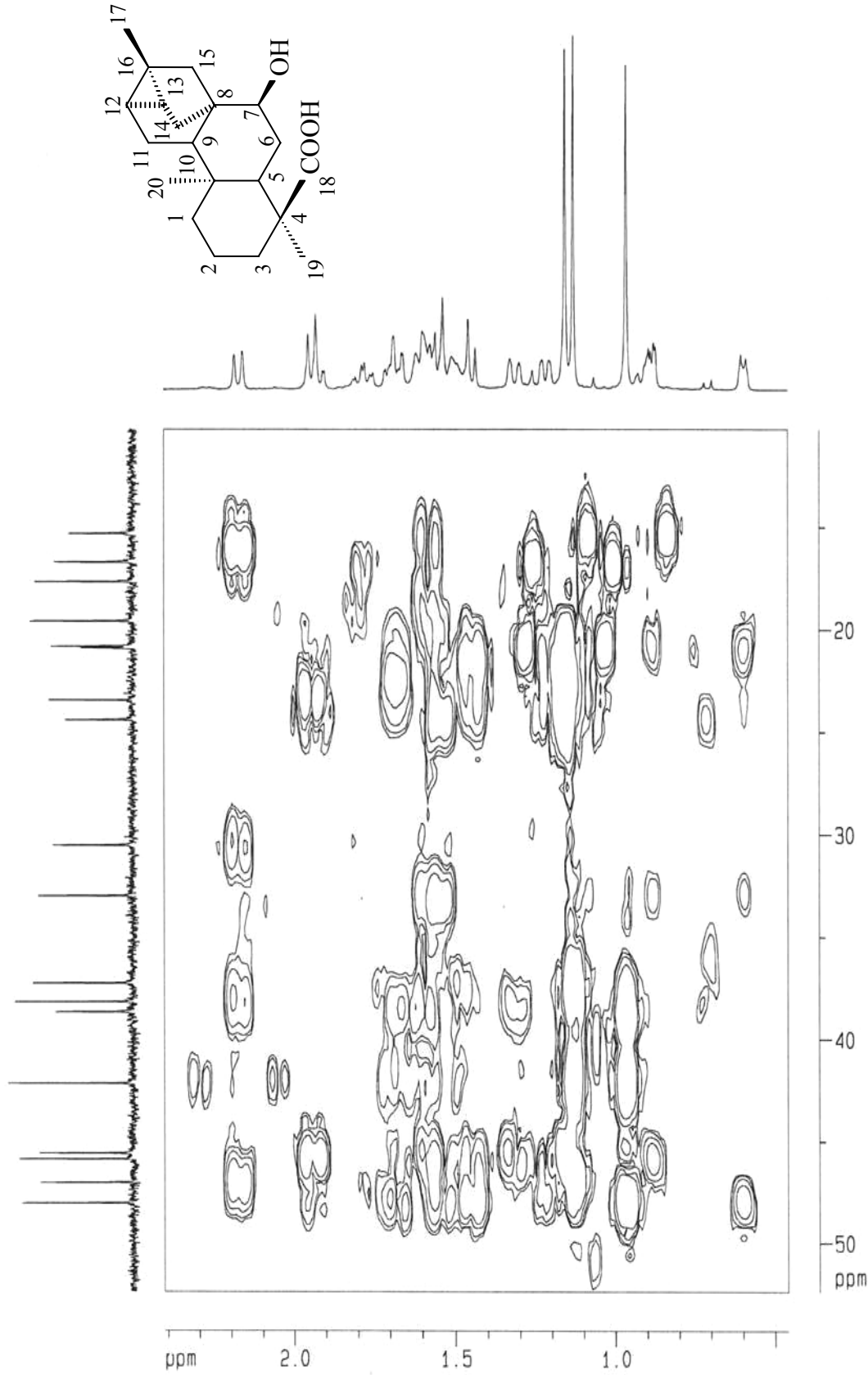


FIGURA 46: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

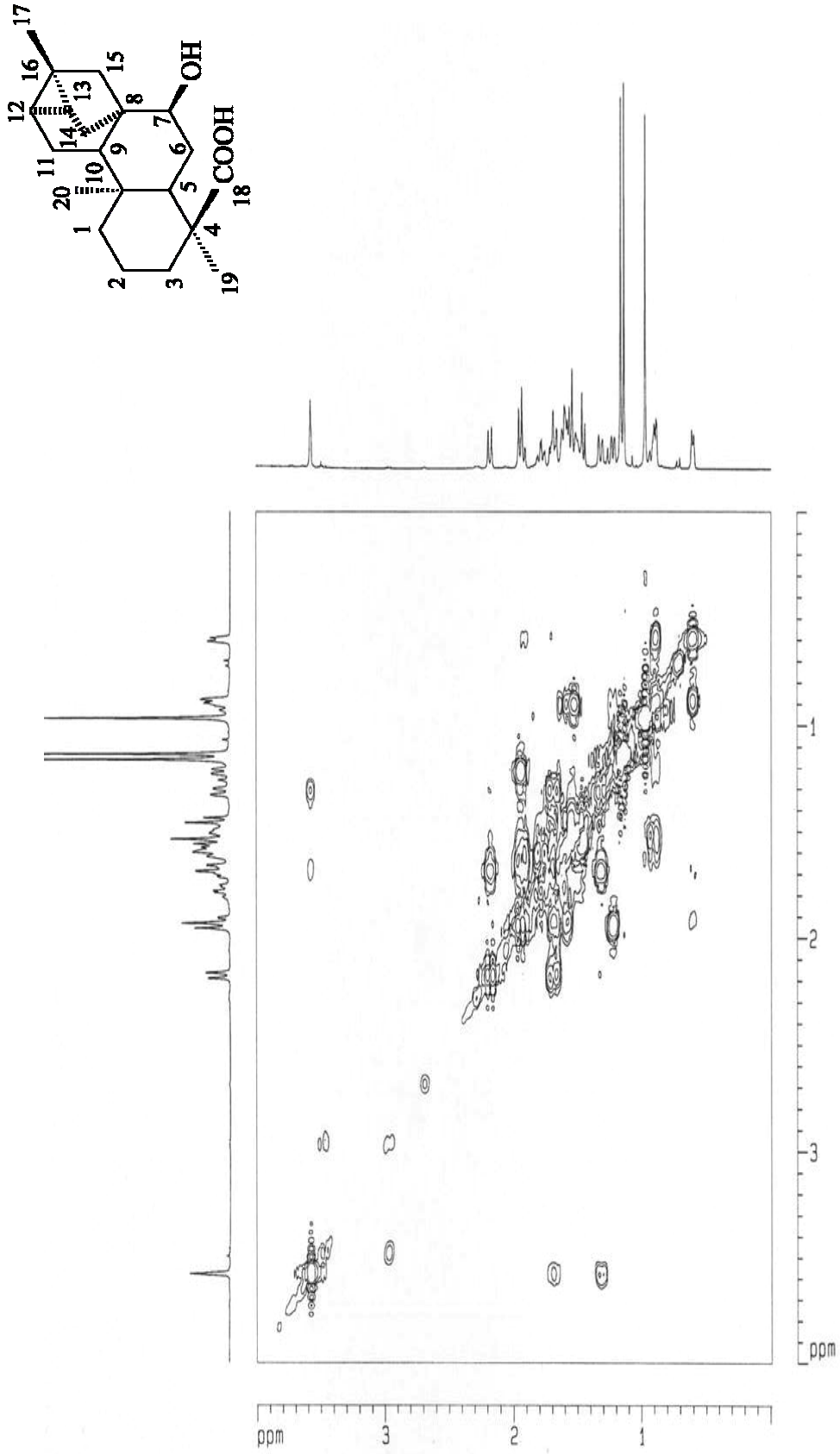


FIGURA 47: Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz)

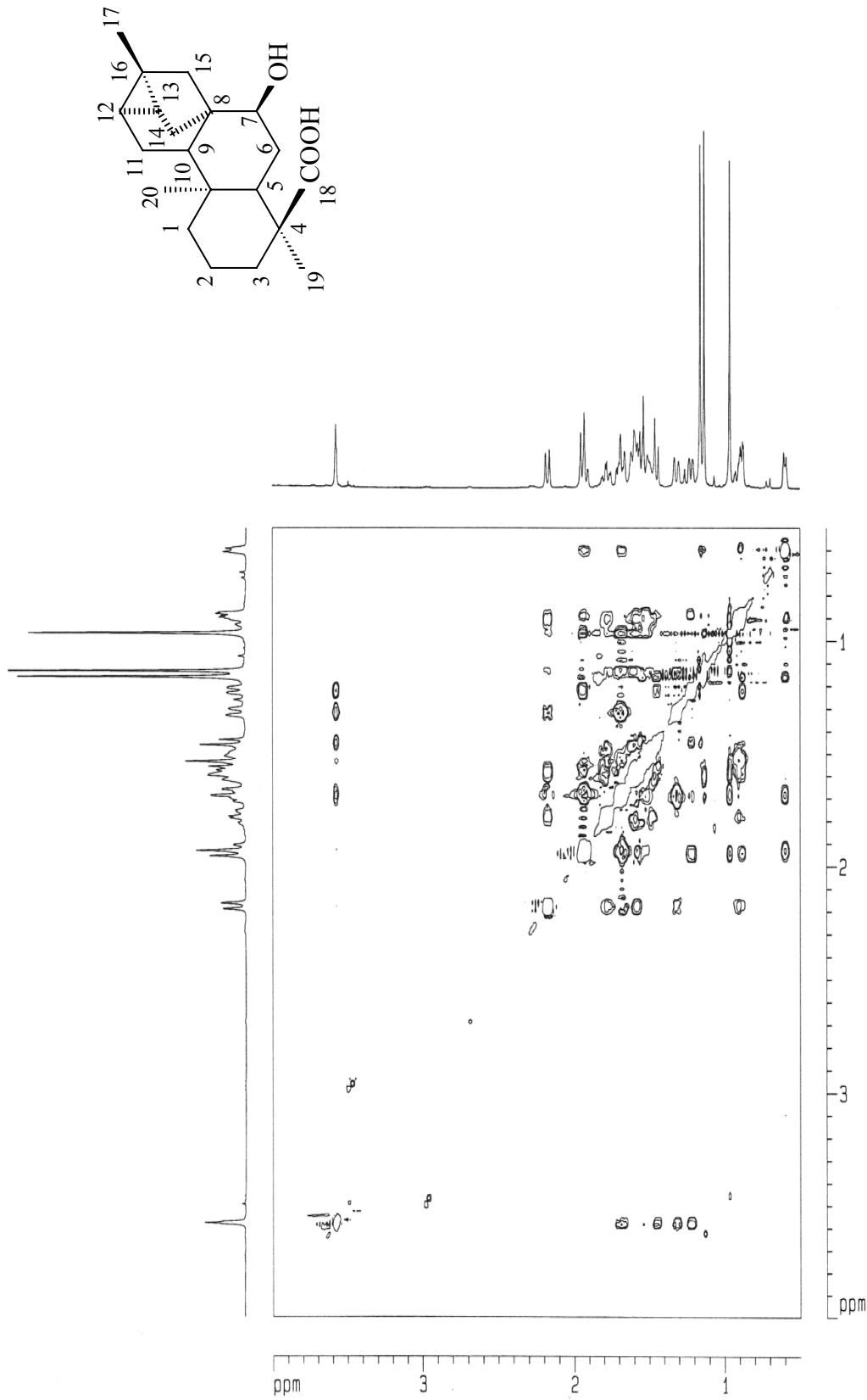


FIGURA 48: Espectro de correlação ¹H x ¹H-NOESY do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl₃, 500 MHz)

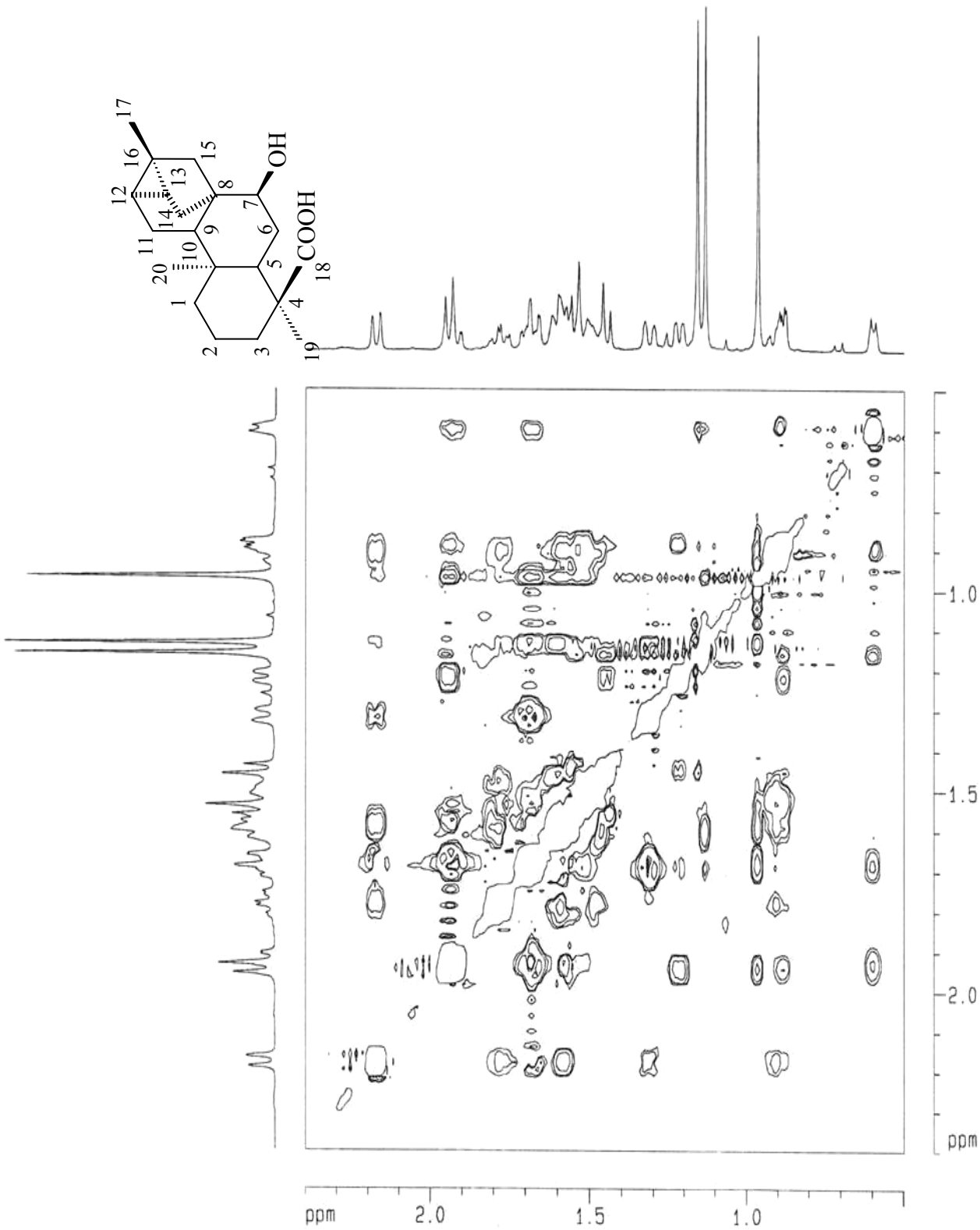
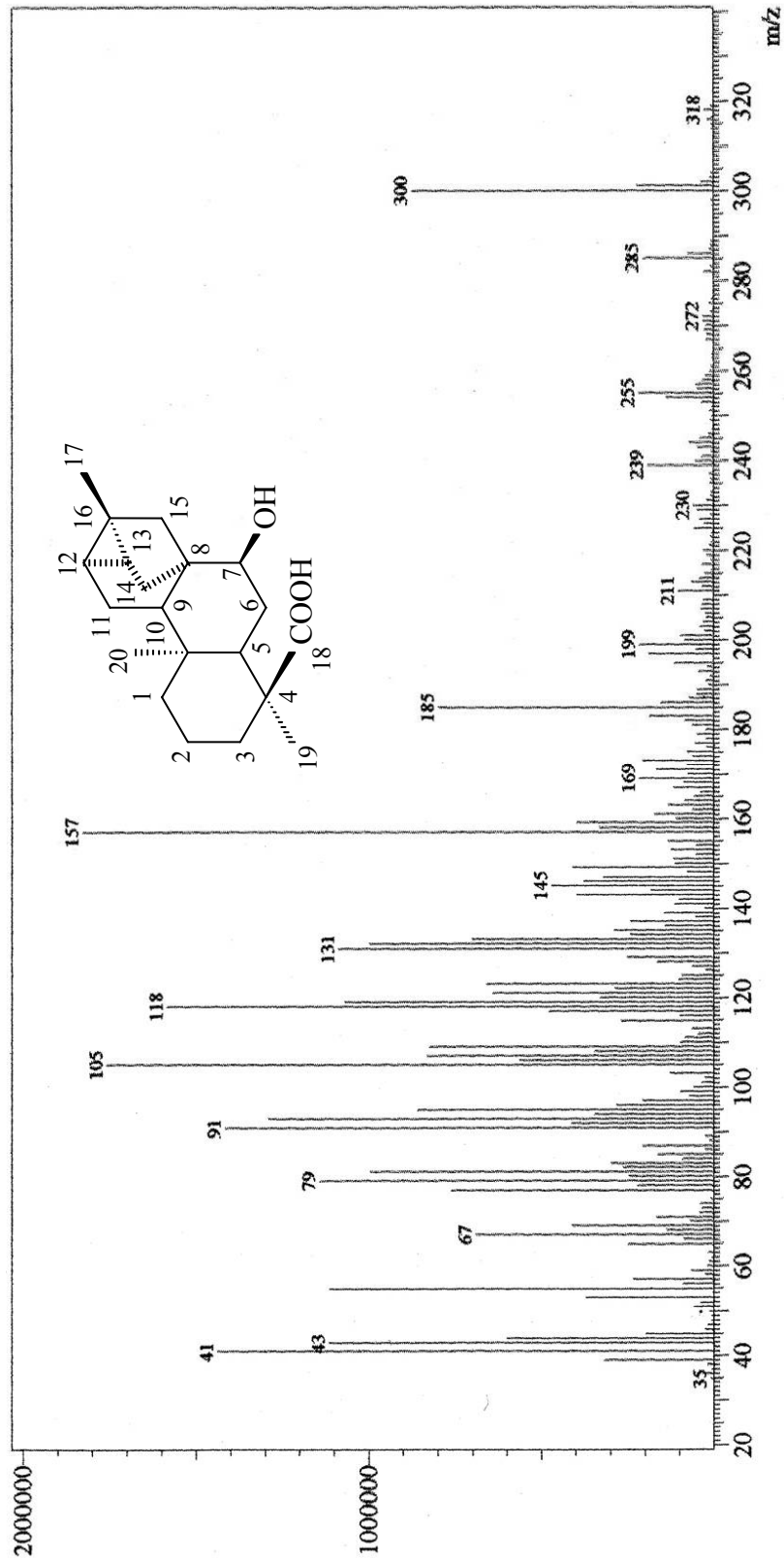


FIGURA 49: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^1H -NOESY do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz)

FIGURA 50: Espectro de massas por IE do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico

**XYLODIOL, A NEW ATISANE DITERPENOID FROM *XYLOPIA*
LANGSDORFFIANA ST-HIL & TUL. (ANNONACEAE)**

4.3. Xylodiol, A New Atisane Diterpenoid from *Xylopi* *langsdorffiana* St-Hil & Tul. (Annonaceae)

RESUMO

A presença de terpenóides, principalmente diterpenos, tem sido marcante no gênero *Xylopi*. Dentre os diterpenos encontram-se os do tipo atisano e labdano. Neste artigo relatamos o isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica de um diterpeno atisano e um labdano.

O extrato etanólico das folhas de *Xylopi langsdorffiana* foi submetido a partição entre hexano, clorofórmio e acetato de etila. O extrato hexânico foi cromatografado em coluna com sílica gel com hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. As frações resultantes foram reunidas após análise em CCDA. O grupo de frações 13-28 foi submetido a uma CCDP com sistema de solvente hexano/acetato de etila (8:2) obtendo-se a substância (1). O grupo de frações 29-40 foi submetido a uma CCDP com sistema de solvente hexano/acetato de etila (7:3) obtendo-se a substância (2).

Comparando os dados de RMN ^{13}C de (1) com diterpenos atisano isolados de outras espécies percebeu-se que os carbonos C-5, C-9 e C-15 sofriam um efeito de proteção. Portanto a hidroxila estava localizada em C-7, pois nessa posição os carbonos C-5, C-9 e C-15 sofrem um efeito gama. Essa hipótese foi confirmada pela análise do espectro de HMBC e a substância foi definida como sendo um novo diterpeno o *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol à qual atribuímos o nome trivial de xylodiol. A outra substância após comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com a literatura concluiu-se ser um diterpeno do tipo labdano o ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico. Esse diterpeno tem sido estudado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e tem mostrado excelente atividade hipotensora e relaxante da musculatura lisa.

As duas substâncias foram submetidas a ensaios de citotoxicidade em hepatócitos de ratos e células V79 usando os métodos do NAC, MTT e NRU. Em V79 o Xylodiol apresentou uma CI-50 de 56 μM pelo método NRU e o labdano uma CI-50 de 138 μM . O xylodiol não apresentou citotoxicidade pelos métodos NRU e NAC em hepatócitos. Os espectros uni e bidimensionais dessas substâncias são mostrados nas Figuras de 51 a 73 (págs. 91 a 100) e os dados de RMN ^1H e ^{13}C do ácido 8(17)12*E*, 14-labdatrien-18-óico estão compilados na Tabela 3 (pág. 114).

**Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopi* langsdorffiana St.-Hil. & Tul.
(Annonaceae)**

Josean Fechine Tavares^a, Marianna Vieira B. Silva^a, Karine F. Queiroga^a, Margareth F. F. Melo Diniz^a, José M. Barbosa Filho^a, Marcela Haun^b, Patrícia S. Melo^{b,c}, and Marcelo Sobral da Silva^a

^aLaboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, CP 5009, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil

^cFaculdades Integradas Metropolitanas de Campinas, Rua Abolição, nº 1827, Swift, Campinas, SP, Brazil

Reprint requests to Tel. + 55 83 3216 7177. E-mail address: marcelosobral@ltf.ufpb.br.

Key words: *Xylopi* langsdorffiana, Annonaceae, Atisane, Labdane, Cytotoxicity

Two diterpenes were isolated from the leaves of *Xylopi* langsdorffiana, the new ent-atisane-7 α ,16 α diol named xylodiol (**1**) and the known 8 (17),12*E*,14-labdatrien-18-oic acid (**2**). The structures of these isolates were deduced by spectroscopic data interpretation. Compound (**2**) was less toxic than xylodiol on V79 cells and hepatocytes.

Introduction

The genus *Xylopia* (Annonaceae) comprises about 160 species [1]. Various species of this genus are used in folk medicine for rheumatism [2] and as antimicrobial agents [3]. Kaurane, labdane and trachylobane-type diterpenes are encountered in this genus [4, 5, 6]. Atisane diterpenes are rare in the Annonaceae family, having been recorded only in *Xylopia aromatica* [6]. In addition, this group of compounds is little-studied biologically thus far. However, other atisane-type diterpenes isolated from different species show anti-HIV [7], and insecticidal activities and are cytotoxic to mouse P388 leukemia cells [8].

Xylopia langsdorffiana St-Hil. & Tul. is a tree, 5-7 meters high and popularly known in Northeast Brazil as “pimenteira da terra” [3]. As part of our continuing investigations of bioactive molecules from plants of Brazil, we now report on the isolation from the *X. langsdorffiana* leaves and characterisation of a new atisane named xyloidiol (**1**) and the known labdane (**2**) diterpene as well as their cytotoxicity assays against V79 fibroblasts and hepatocytes. Vasorelaxant and hypotensive activities were reported recently for **2** [9].

In vitro systems provide important tools to enhance our understanding of the hazardous effects of novel pharmacological agents. Most of the researcher attention has been focused on cytochrome P450s (CYPs), the primary enzyme superfamily involved in the metabolism of a broad range of drugs in different species, including man [10]. The cytotoxicity of metabolites produced by hepatic biotransformation is frequently assessed in cultured fibroblasts and hepatocytes [11].

Experimental

General procedures

Melting points were measured in a Geahaka model PF1500 version 1.0 apparatus and are uncorrected. Optical rotations were determined on a ADP 220 Polarimeter, Bellingham-Stanley Ltd. IR spectra were obtained in KBr disks in a Bomem model MB 100M series

spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained with a Bruker DRX-500 spectrometer, using CDCl_3 as solvent. HREIMS were recorded in a VG-AutoSpec spectrometer, using a direct insertion probe and electron impact at 70 eV. The mass spectra were obtained on a Hewlett-Packard 5971 mass spectrometer by electron impact ionization at 70 eV.

Plant material

The leaves of *Xylopia langsdorffiana* were collected in the municipality of Cruz do Espírito Santo, State of Paraíba, in July 2002. The plant material was identified by Prof. Maria de Fátima Agra, Head of the Botany Section of the Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF). A voucher specimen (AGRA 5541) is deposited at the Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) of the Universidade Federal da Paraíba.

Extraction and isolation

Dried leaves of *X. langsdorffiana* (2 kg) was exhaustively extracted with 95 % EtOH at room temperature. Removal of the solvent under reduced pressure in a rotary evaporator yielded a dark green extract (140 g), which was partitioned successively with hexane, CHCl_3 and EtOAc to yield 20, 16 and 12 g, of crude residues, respectively. The hexane fraction was subjected to column chromatographic separation with silica gel and eluted with hexane/ethyl acetate in an increasing polarity gradient. Fractions with similar TLC were combined. The fractions 13-28 was purified by preparative TLC over silica gel using hexane/EtOAc (8:2) to afford diterpenoid (**1**) (72 mg) and the fraction 29-40 was purified in the same way using hexane/EtOAc (7:3) to afford diterpenoid (**2**) (81 mg).

Biological assay

Xylodiol (**1**) and compound (**2**) were tested for *in vitro* cytotoxic activity against V79 cells and rat hepatocytes using the nucleic acid content (NAC), tetrazolium reduction (MTT) and

neutral red uptake (NRU) assays, as described previously [17]. Hepatocytes were isolated from 2-month-old Wistar male rats (200-250 g) by a two-step collagenase perfusion method [18].

Ent-atisan-7 α ,16 α -diol or xylodiol

Obtained as a crystalline solid, M.p. 108-111 °C, $[\alpha]_D^{25} = + 46$ ($c = 0.19$, CHCl₃). - IR (KBr): $\nu = 3372, 3325, 2985, 1130$. - HREIMS: $m/z = 306.2017$ [M⁺], compatible with the molecular formula C₂₀H₃₄O₂.

8 (17),12E,14-labdatrien-18-oic acid

Obtained as a crystalline solid, M.p. 139-141 °C, $[\alpha]_D^{27} = - 43$ ($c = 0.19$, CHCl₃). - IR (KBr): $\nu = 3.083, 2.934, 2.870, 1.692, 1.643, 1.276, 901$. - EIMS (EI): m/z (%) = 302.6 [M⁺] 119 (100), 122 (48), 147 (78), 159 (45), 161 (29), 176 (55), 242 (10), compatible with the molecular formula C₂₀H₂₈O₂.

Results and Discussion

Compound (**1**) was obtained as a crystalline solid M.p. 108-111 °C, $[\alpha]_D^{25} = + 46$ ($c = 0.19$, CHCl₃). The HREIMS of (**1**) showed a molecular ion peak at $m/z = 306.2017$, compatible with the molecular formula C₂₀H₃₄O₂, having 4 degrees of unsaturation in the molecule. The IR spectrum showed absorptions at 3372 and 3325 cm⁻¹, characteristic of hydroxyl groups. The presence of four methyl, eight methylene and four methine groups and four quaternary carbons was supported by the DEPT and HMQC (Table 1). Furthermore, by comparison of the NMR data of (**1**) with those of similar structures [12, 13] we concluded that it belongs to the *ent*-atisane diterpene compound class. The location of the hydroxyl groups at C-7 and C-16 were deduced from the HMBC. Correlations between the protons at $\delta_H = 1.42$

(H-5), 1.59 (H-9), and 1.78 (H-15), and the oxygenated carbon at $\delta_C = 73.8$ allowed the location of one hydroxyl at C-7. The other hydroxyl group was located at C-16 due to the correlations between $\delta_H = 1.77$ (H-11), $\delta_H = 1.30$ (H-15), and the carbon at $\delta_C = 72.2$. The α -orientation of the hydroxyl group at C-7 was deduced by the presence of a broad signal for H-7 and comparison with literature data [14]. The NOESY spectrum was also used to establish the relative stereochemistry at this center. The one and two dimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR data are shown in Table 1. Based on the above evidence, the relative stereochemistry of the carbons at C-7 and C-16 is established. Although we have not determined the absolute stereochemistry, the molecule is represented with α -orientation for the hydroxyl groups at C-7 and C-16. Therefore, the structure of compound (**1**), a new diterpene, was proposed as *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol, named xylodiol.

Compound (**2**) was obtained as a crystalline solid (M.p. 139-141 °C). The EIMS of (**2**) showed a molecular ion peak at $m/z = 302.26$, compatible with the molecular formula $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$, with 7 degrees of unsaturation. The molecular structure of (**2**) was confirmed by the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR 1D and 2D spectra, and agreed with previously reported for 8 (17),12*E*,14-labdatrien-18-oic acid [15].

The biological activities of (**1**) and (**2**) are summarized in (Table 2). Compound (**2**) induced no significant suppression on the viability of hepatocytes at concentrations up to 300 μmol . No cytotoxicity was detected in hepatocytes after treatment with up to 300 μmol of xylodiol evaluated by NRU and NAC assays, however it was determined an IC_{50} value of 139 μmol evaluated by MTT reduction assay. These results indicate that this compound is more toxic to mitochondria than the others endpoints measured (NRU and NAC). The different effects observed on V79 cells and rat hepatocytes, especially for xylodiol in the NRU and NAC tests, suggest that P450-mediated biotransformation of such diterpene may lead to the

formation of less toxic metabolites. In a previous investigation, xyloidiol exhibited IC₅₀ value of 40 μ mol against the K562 human leukemia cell line [16].

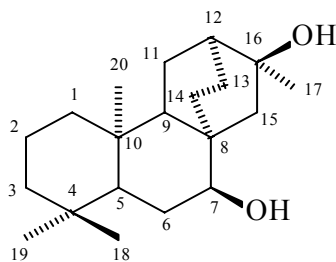
Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CNPq, CAPES and CENAUREM / UFC.

References

- [1] P. J. M. Maas, H. M. V. Kamer, L. Junikka, R. M. Silva, H. Rainer, *Rodriguésia*. **2001**, 80, 65 - 98.
- [2] C. M. Agelita, B. C. Betânia, B. O. Alaíde, C. B. Fernão, *Fitoterapia*. **2001**, 72, 40 - 45.
- [3] M. P. Corrêa in Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Vol. 4, IBDF, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, **1984**, p. 315.
- [4] D. F. Faulkner, V. Lebbby, P. G. Waterman, *Planta Med.* **1985**, 4, 354.
- [5] N. C. Andrade, J. M. Barbosa-Filho, M. S. Silva, E. V. L. da-Cunha, J. G. S. Maia, *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, 32, 1055 - 1058.
- [6] M. P. L. Morais, N. F. Roque, *Phytochemistry*. **1988**, 27, 3205 - 3208.
- [7] I. C. Sun, Y. Kashiwada, S. L. Morris-Natschke, K. H. Lee, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 155 - 169.
- [8] N. B. Perry, E. J. Burgess, S-H. Baek, R. T. Weavers, *Org. Lett.* **2001**, 3, 4243 - 4245 .
- [9] A. P. Oliveira, F. F. Furtado, M. S. Silva, J. F. Tavares, R. A. Mafra, D. A. M. Araújo, J. S. Cruz, I. A. Medeiros, *Vasc. Pharmacol.* **2006**, 44, 338 - 344.
- [10] F. Zucco, I. de Angelis, E. Testai, A. Stamatii, *Toxicol. in Vitro.* **2004**, 18, 153 - 163.
- [11] P. S. Melo, H. M. M. Cavalcante, J. M. Barbosa-Filho, M. F. F. M. Diniz, I. A. Medeiros, M. Haun, *Toxicol. Lett.* **2003**, 142, 143 - 151.

- [12] T. Konishi, K. Yamazoe, M. Kanzato, T. Konoshima, Y. Fujiwara, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1142 - 1146.
- [13] J. ST. Pirek, *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 822 - 827.
- [14] J. F. Tavares, K. F. Queiroga, M. V. B. Silva, M. F. F. M. Diniz, J. M. Barbosa-Filho, E. V. L. da-Cunha, C. A. Simone, J. X. Araújo-Júnior, P. S. Melo, M. Haun, M. S. Silva, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 960 - 962.
- [15] F. Bohlmann, J. Jakupovic, R. M. King, H. Robinson, *Phytochemistry.* **1980**, *19*, 863.
- [16] M. V. B. Silva, M. C. Anazetti, J. F. Tavares, M. S. Silva, M. F. F. M. Diniz, P. S. Melo, M. Haun, *Braz. J. Pharm. Sci.* **2005**, *41*, 481.
- [17] P. S. Melo, N. Durán, M. Haun, *Hum. Exp. Toxicol.* **2002**, *21*, 281 - 288.
- [18] C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo, Isolated and Cultured Hepatocytes, in: A. Guillouzo, C. Guguen-Guillouzo, Les Editions INSERM and John Libbey, Eurotext, Paris, **1986**, pp. 1-12.

Table 1. NMR data for xylodiol (**1**).**(1)**

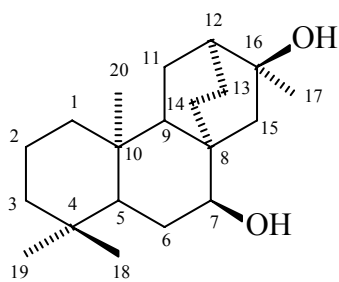
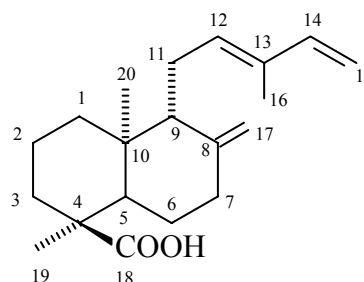
Carbon	HMQC		HMBC	¹ H x ¹ H	
	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}^a$		COSY	NOESY
1	42.0	1.45 (m) 1.25 (m)			
2	18.1	1.68 (m) 1.45 (m)			
3	39.1	1.66 (m) 0.94 (m)		H-3	
4	37.7	-			
5	47.3	1.42 (m)	H-1		
6	26.8	1.71 (m) 1.67 (m)	H-7	H-6	
7	73.8	3.43 (broad)	H-5 / H-9 / H-15		H-14
8	32.5	-			
9	46.0	1.59 (m)	H-13 / H-11		
10	37.7	-			
11	22.4	1.77 (m) 1.53 (m)			
12	38.1	1.63 (m)	H-13 / H-11		
13	23.5	2.02 (m) 1.19 (m)		H-13	
14	26.7	1.70 (m) 0.99 (m)		H-14	
15	51.3	1.78 (m) 1.30 (m)	H-14		
16	72.2	-	H-11 / H-15		
17	30.5	1.35 (s)			H-7
18	33.1	0.91 (s)			
19	21.6	0.86 (s)			
20	13.4	0.99 (s)	H-5		

^aIn CDCl₃, at 500 MHz for ¹H NMR and 125 MHz for ¹³C NMR.

Table 2. Cytotoxicity of Xylodiol (1) and compound 2 on V79 cells and rat hepatocytes

Compound	IC ₅₀ (μmol)					
	V79			Hepatocytes		
	MTT	NRU	NAC	MTT	NRU	NAC
Xylodiol	112	56	70	139	-	-
2	250	138	220	-	-	-

^(c) Viability similar to control cells until 300 μmol.

**(1)****(2)**

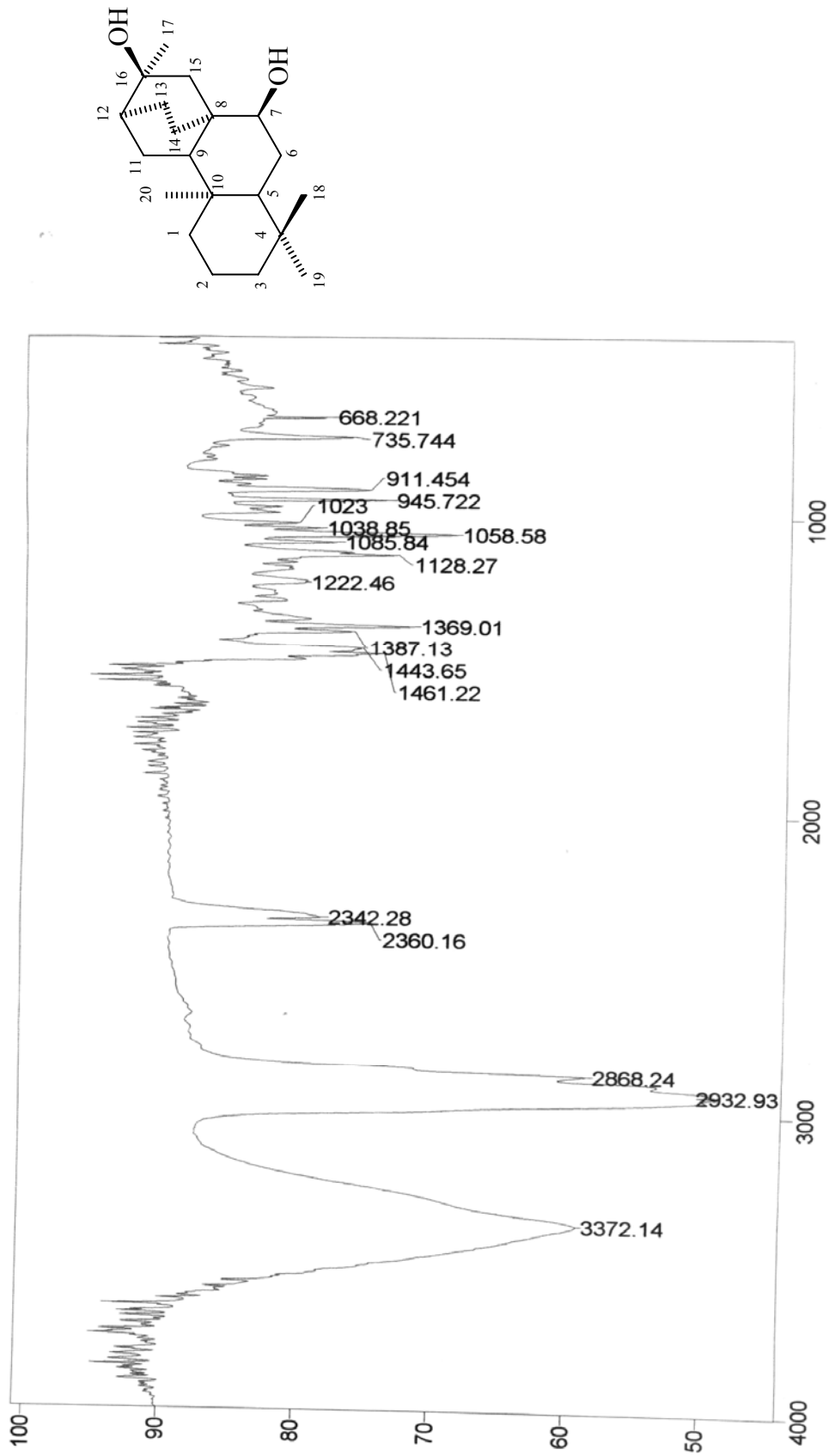


Figura 51: Espectro de IV do xyliodiol em KBr

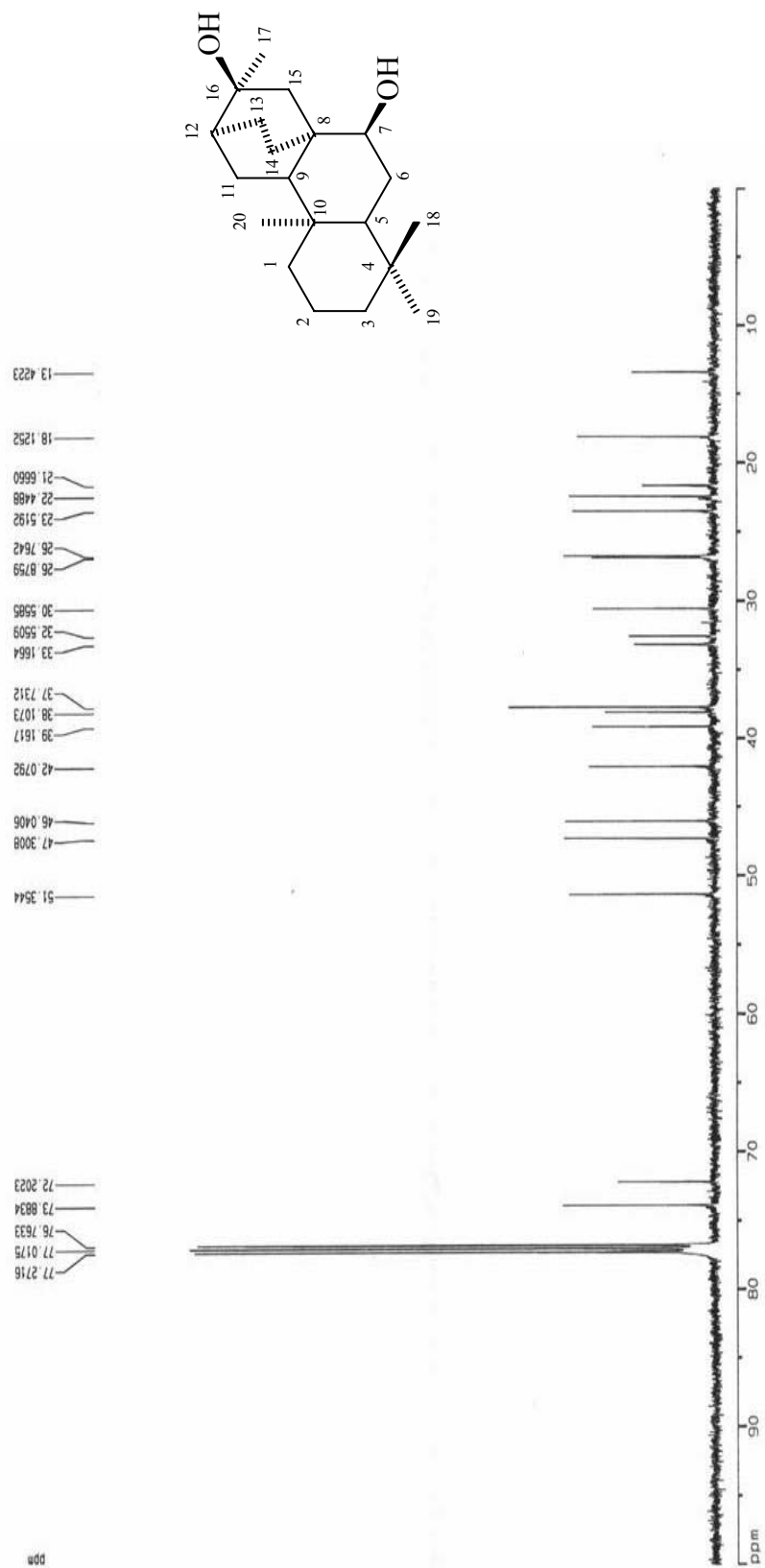
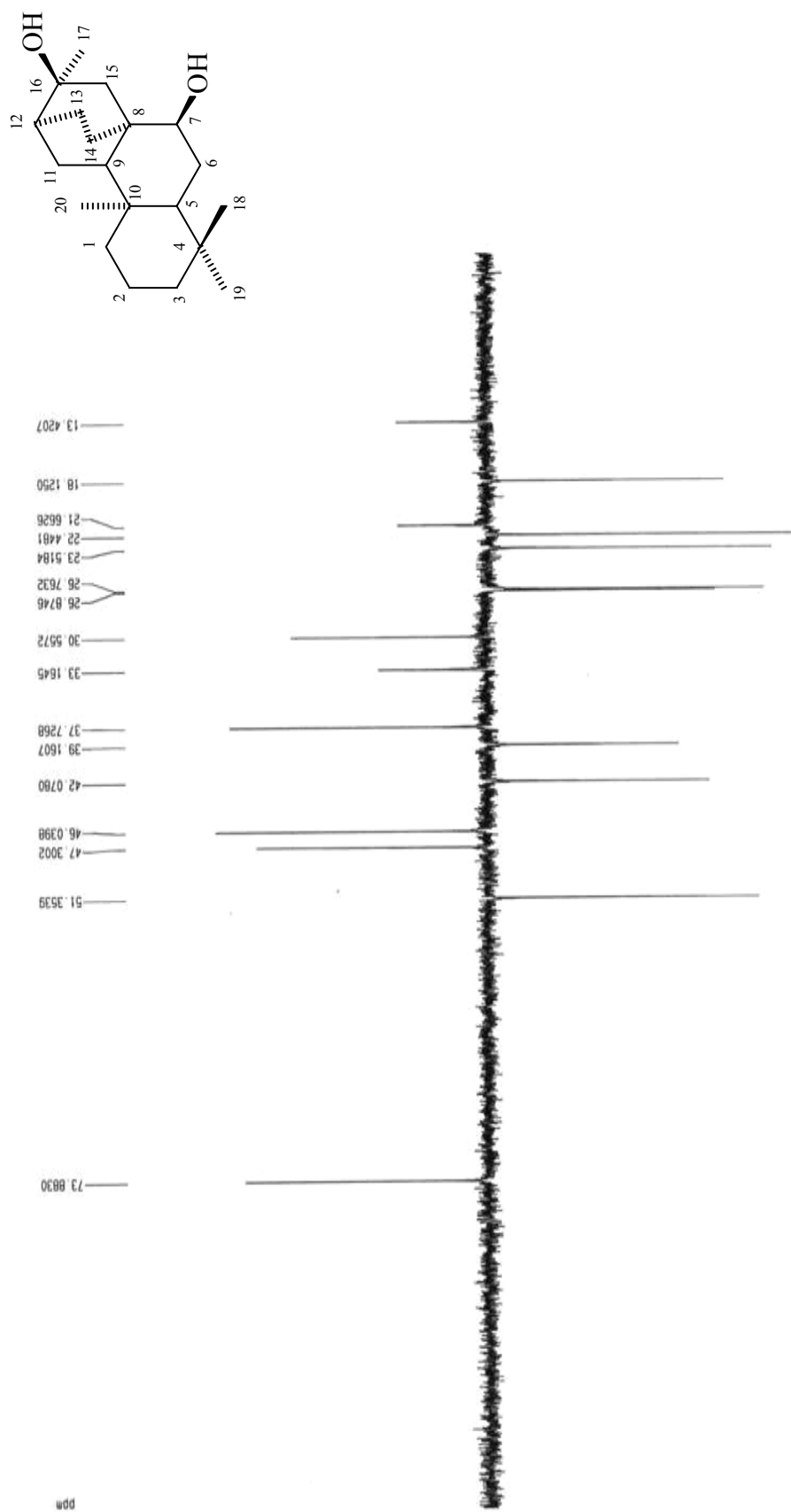


FIGURA 52: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do xylodiol (CDCl_3 , 125 MHz)

FIGURA 53: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 do xyloidiol (CDCl_3 , 125 MHz)

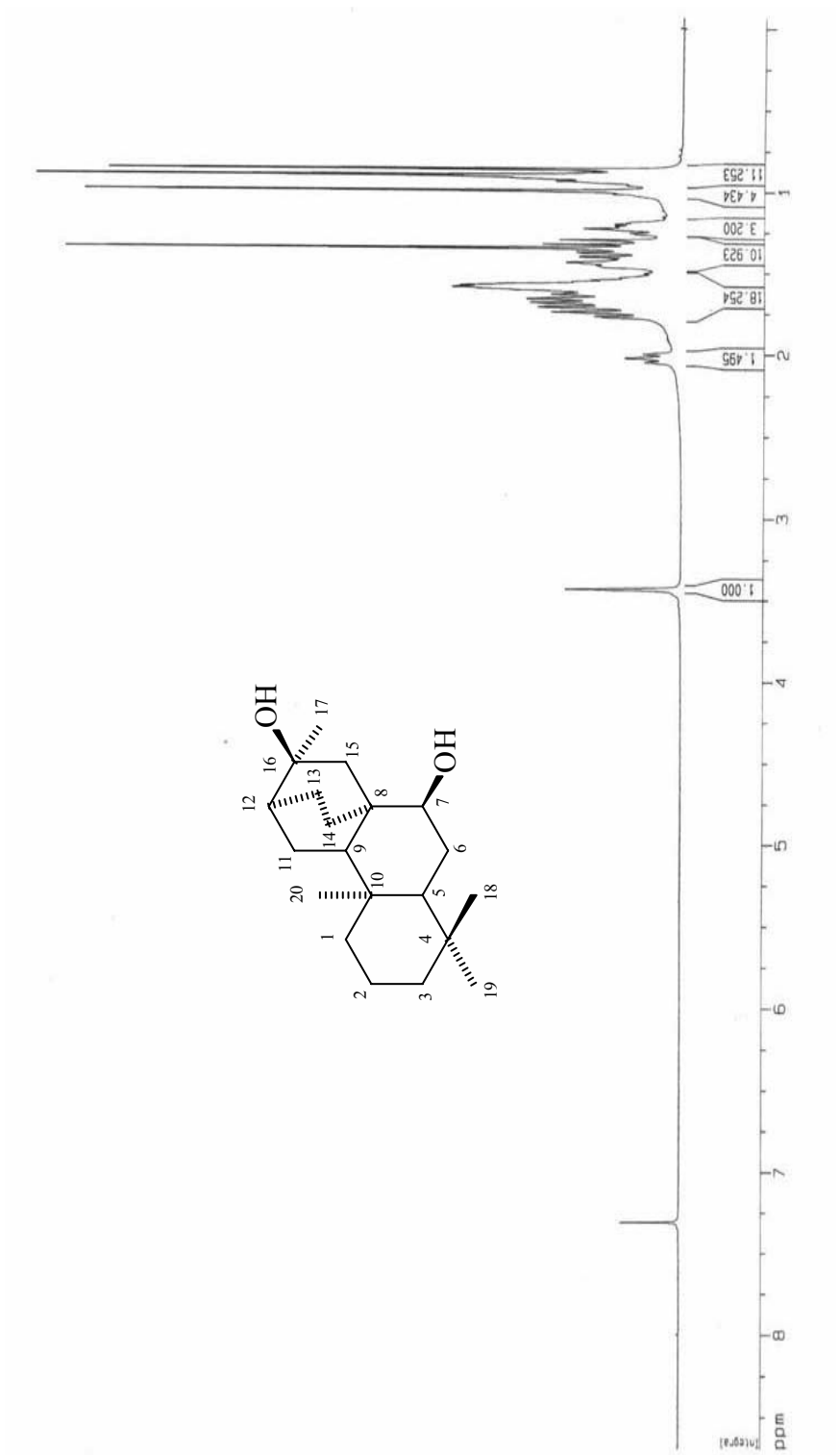


FIGURA 54: Espectro de RMN de ^1H do xyloidiol (CDCl_3 , 500 MHz)

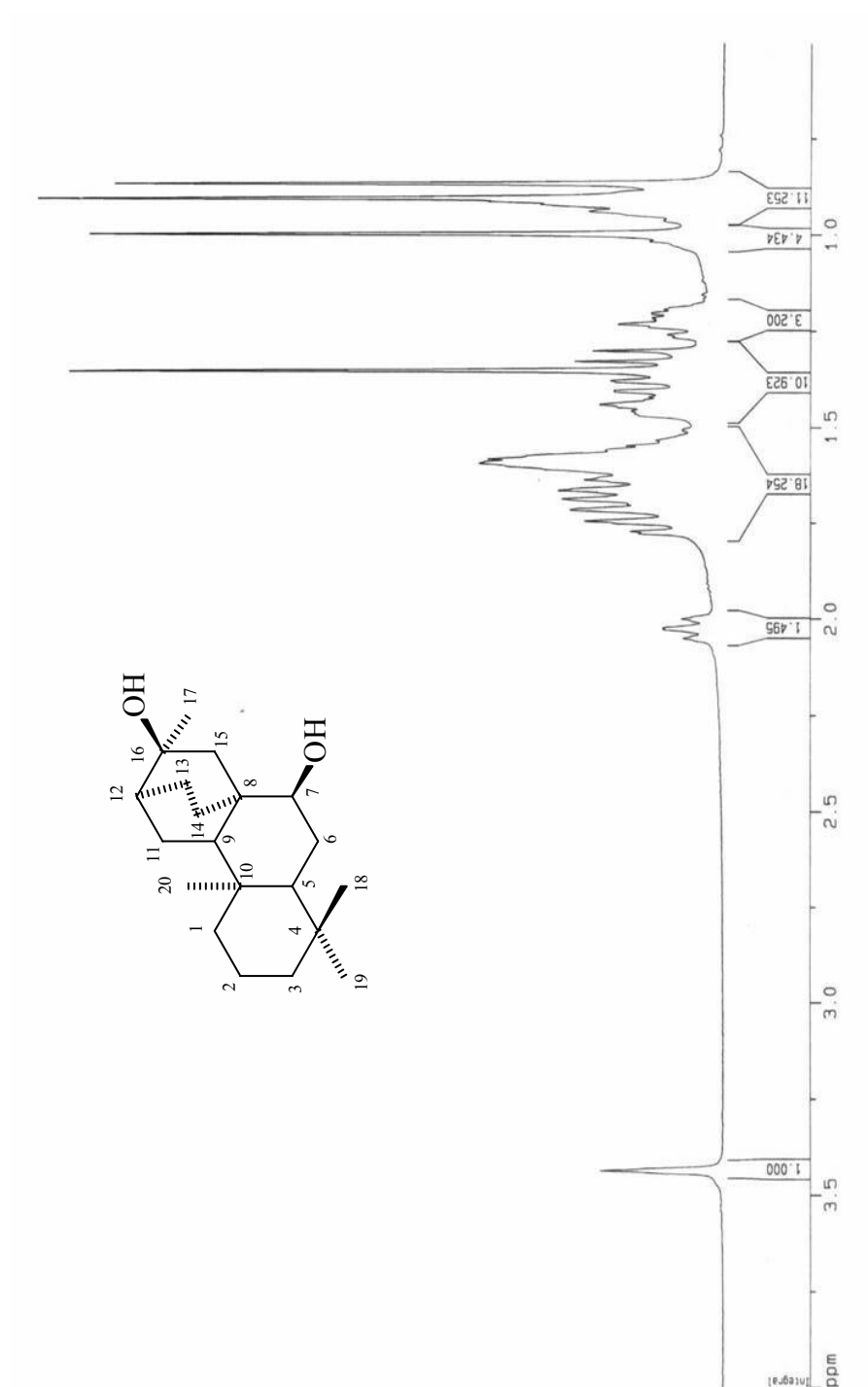


FIGURA 55: Expansão do espectro de RMN de ^1H do xyloidiol (CDCl_3 , 500 MHz)

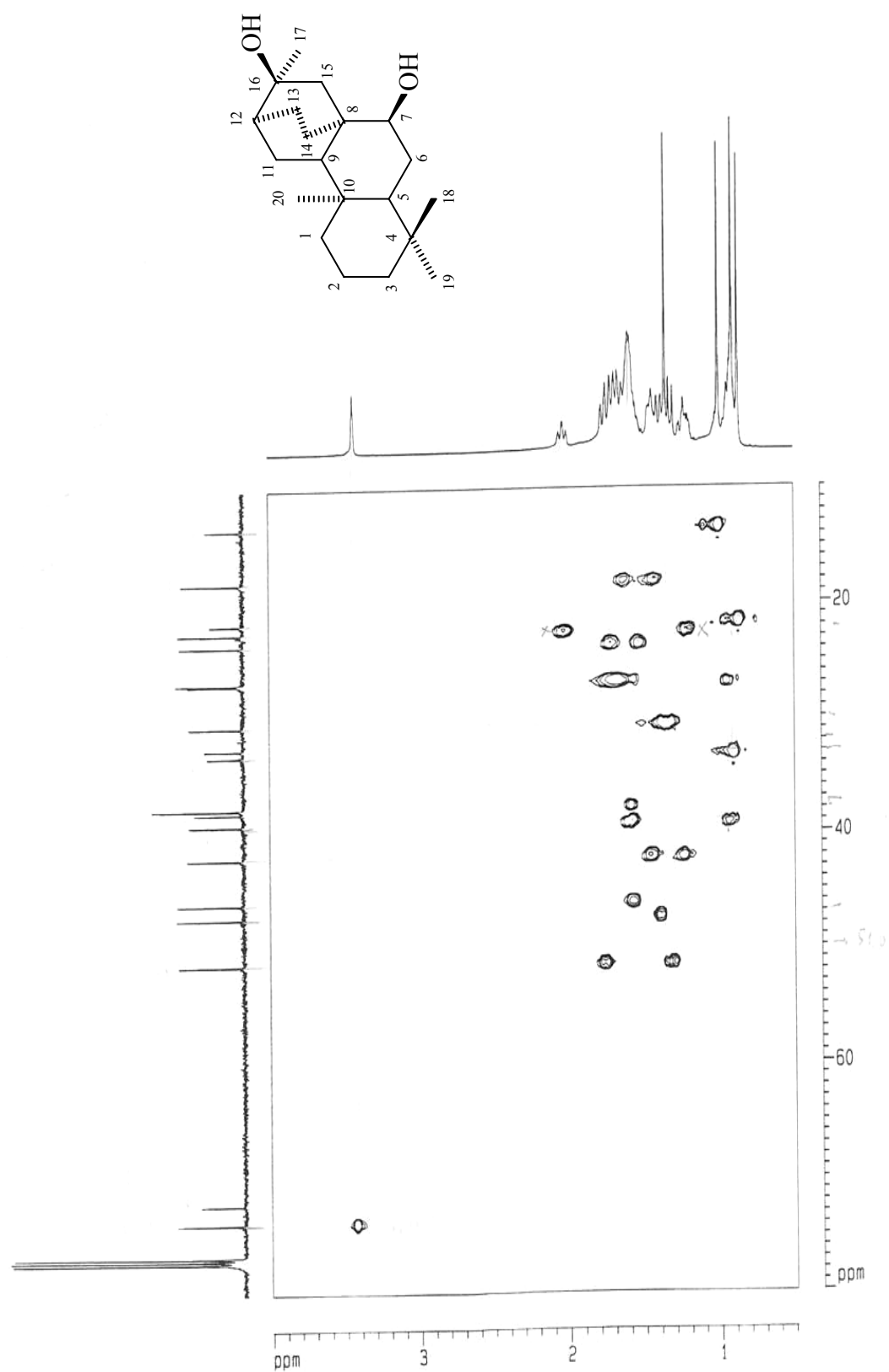


FIGURA 56: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMOC do xyliodiol (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

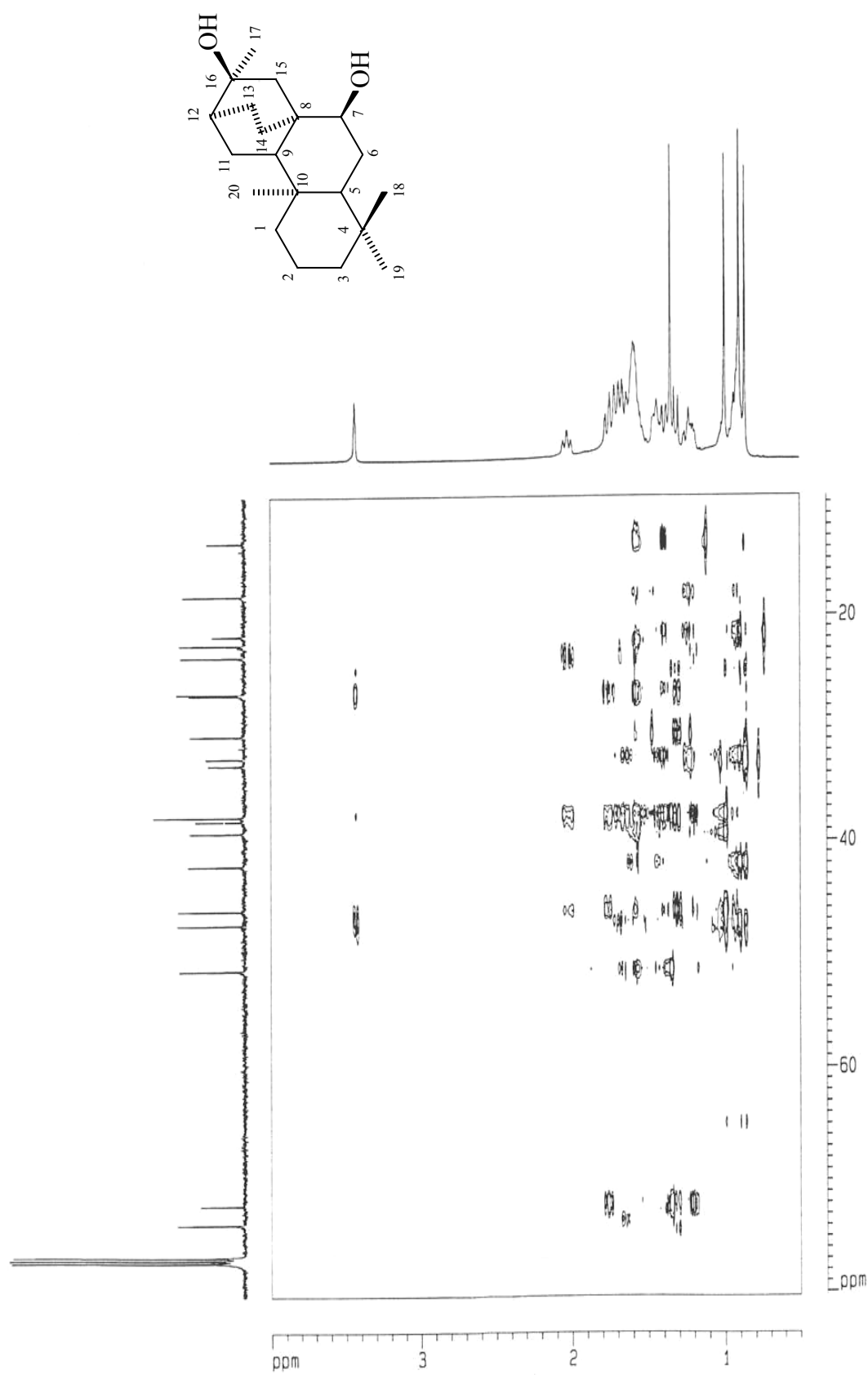


FIGURA 57: Espectro de correlação ¹H x ¹³C-HMBC do xyloidiol (CDCl₃, 500 e 125 MHz, respectivamente)

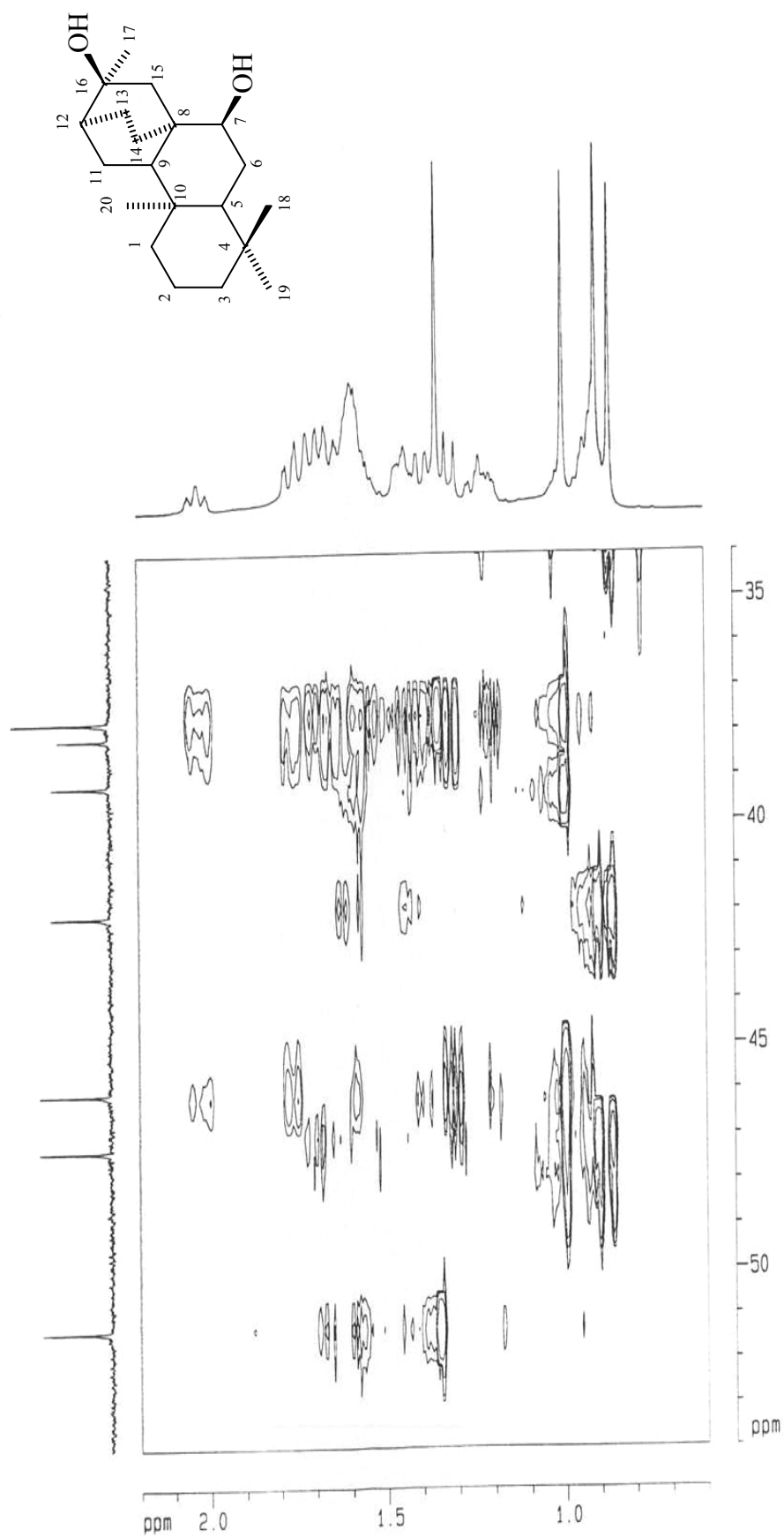


FIGURA 58: Expansão do espectro de correlação ${}^1\text{H}$ x ${}^{13}\text{C}$ -HMBC do xyloidiol (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

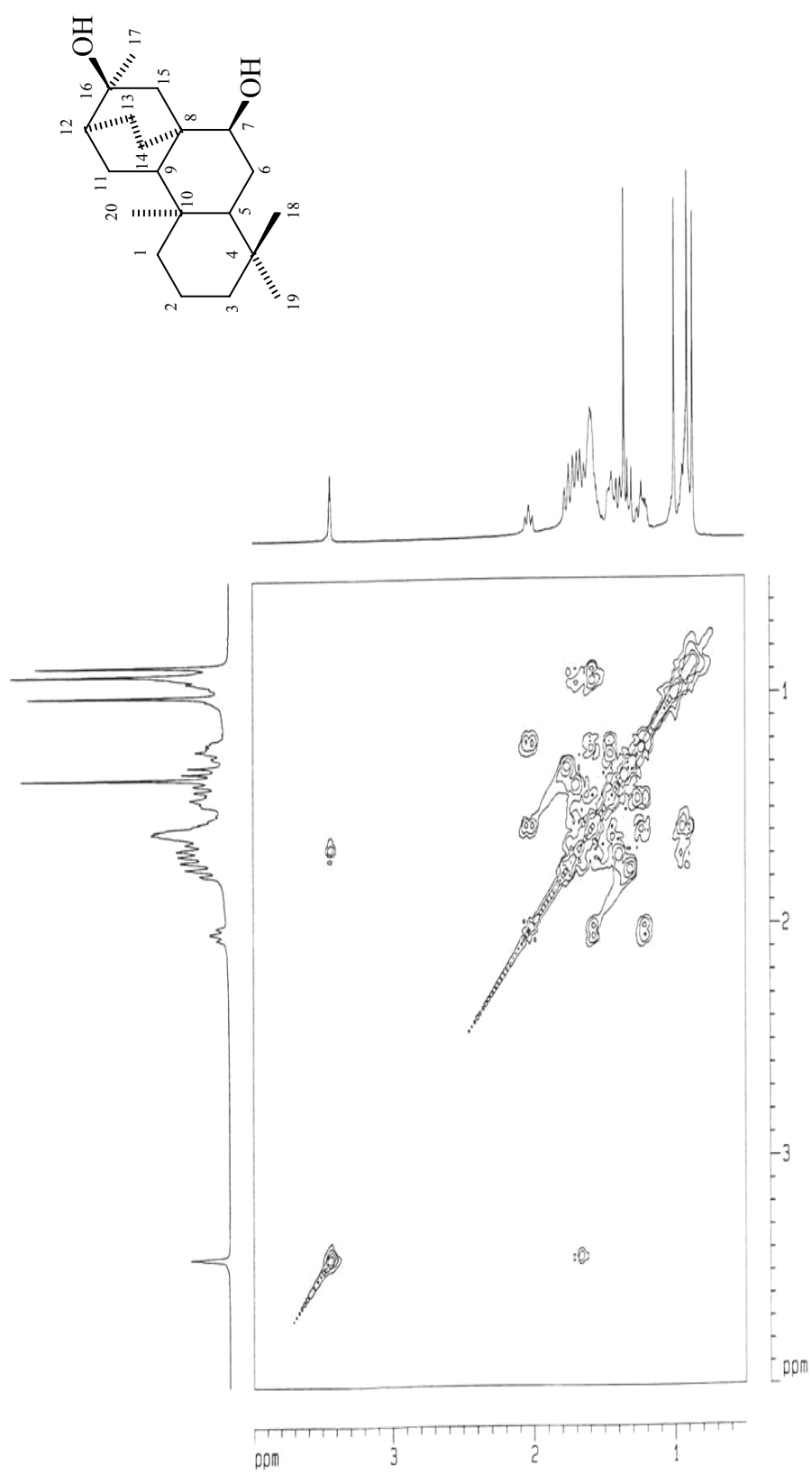


FIGURA 59: Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY do xyliodiol (CDCl_3 , 500 MHz)

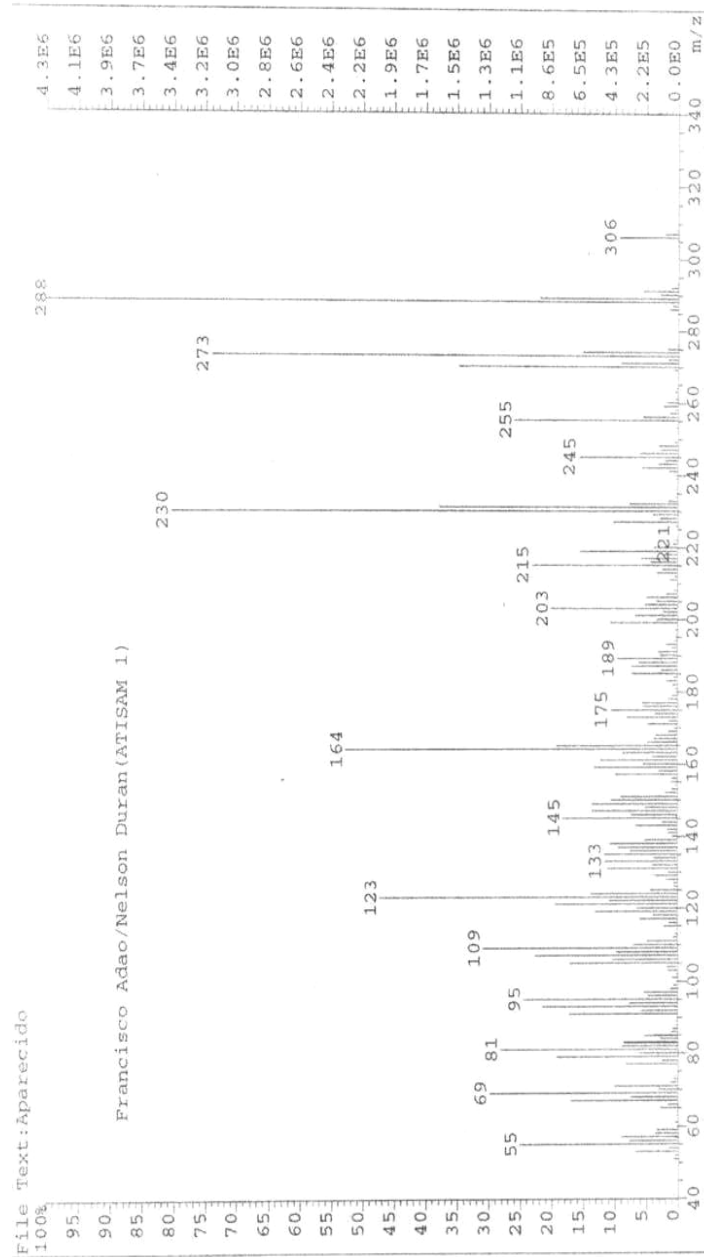
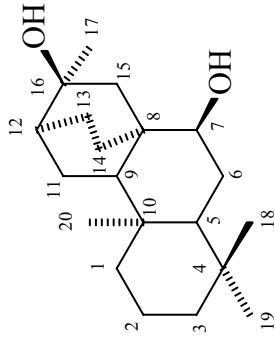


FIGURA 60: Espectro de massas por IE do xylodiol

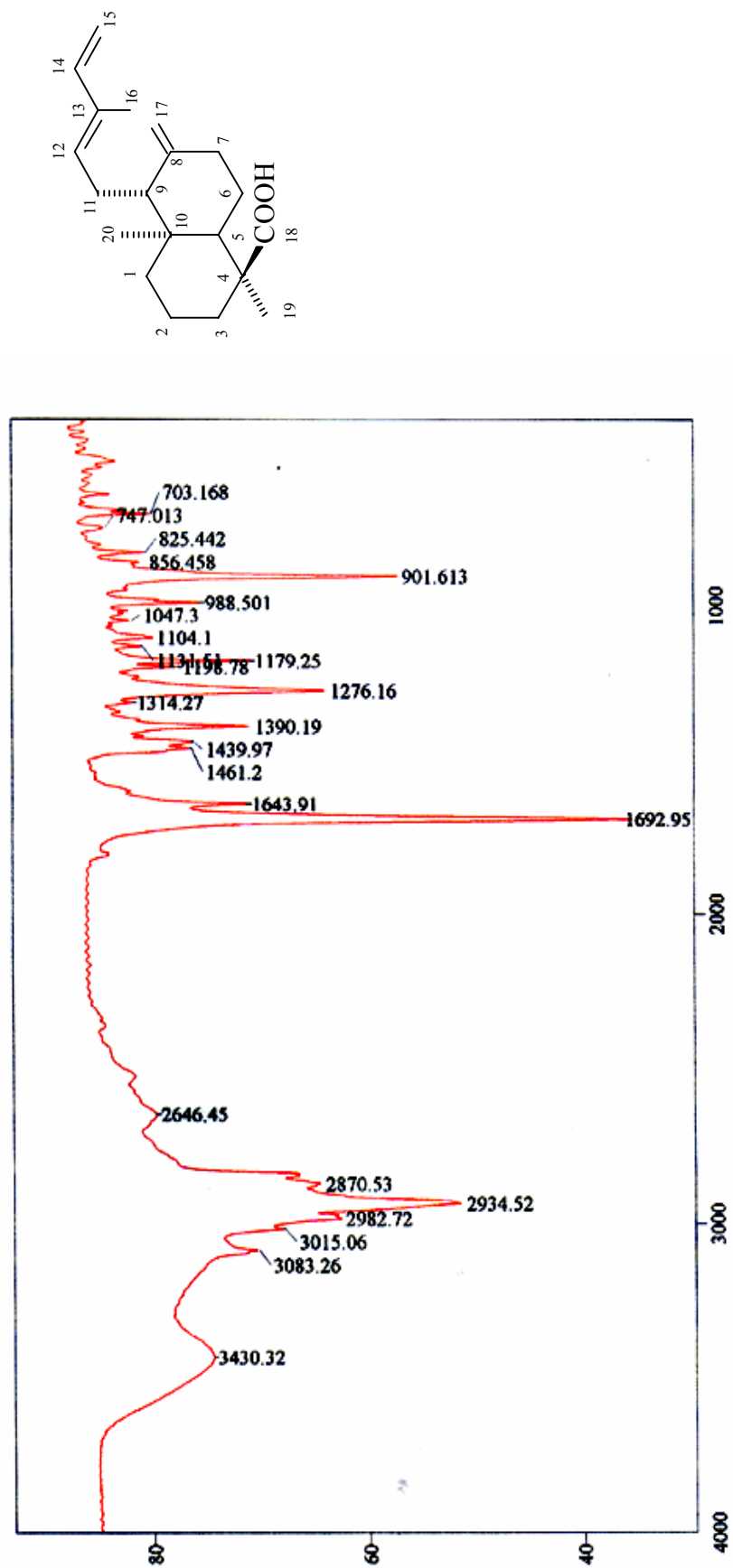


Figura 61: Espectro de IV do ácido 8(17),12E,14-labdatrien-18-óico em KBr

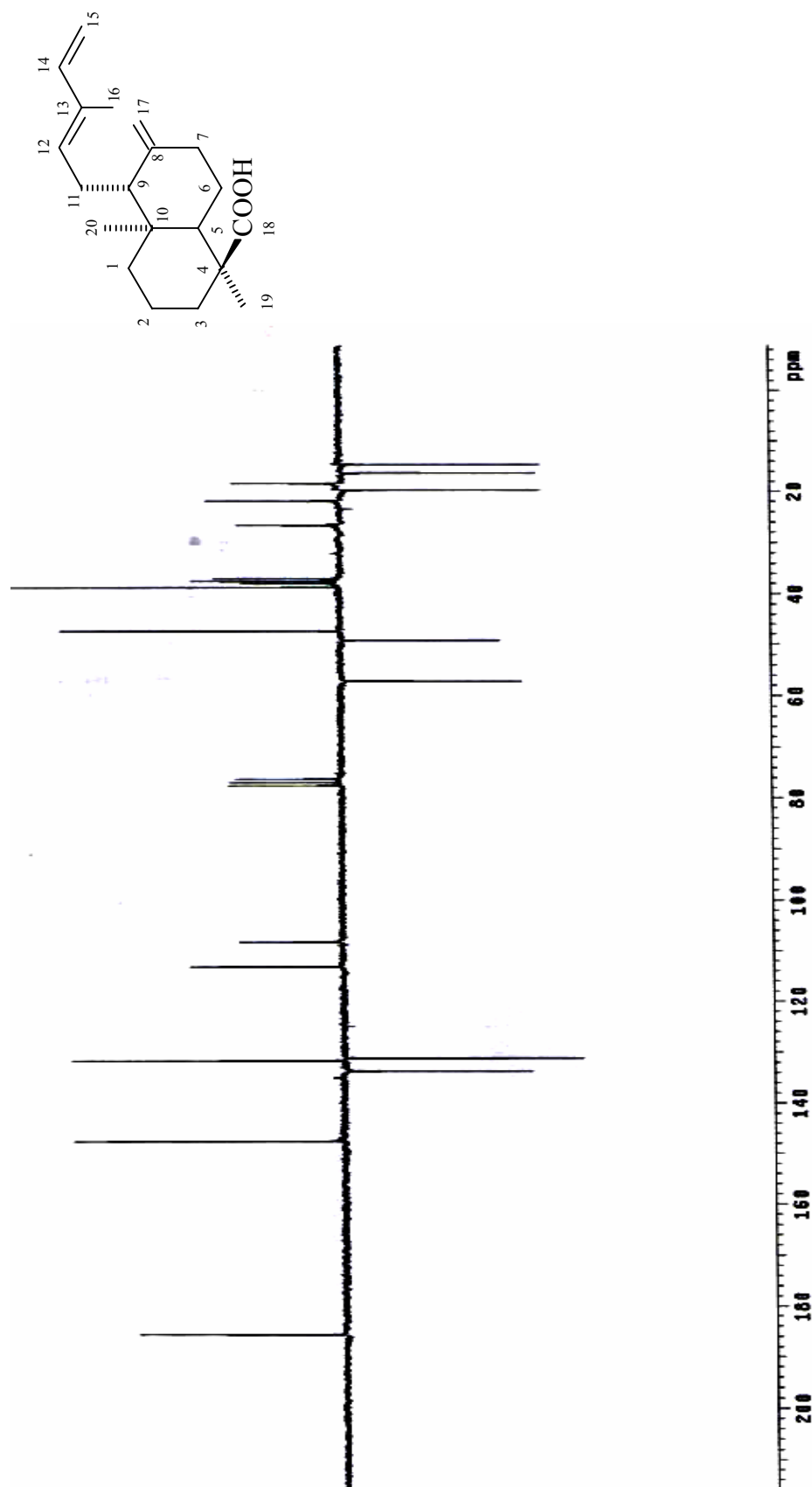


FIGURA 62: Espectro de RMN ^{13}C -APT do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 125 MHz)

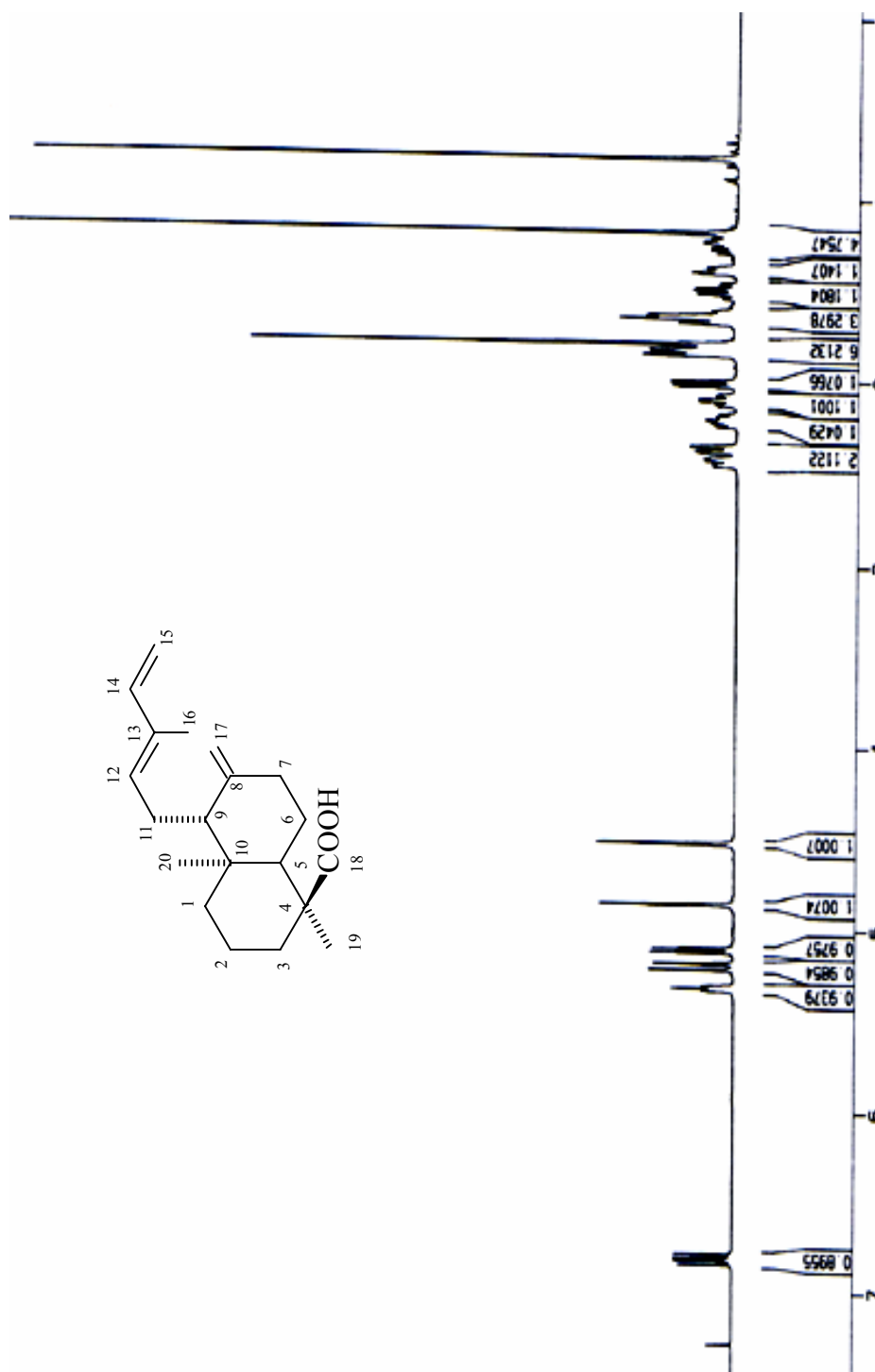


FIGURA 63: Espectro de RMN de ¹H do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl₃, 500 MHz)

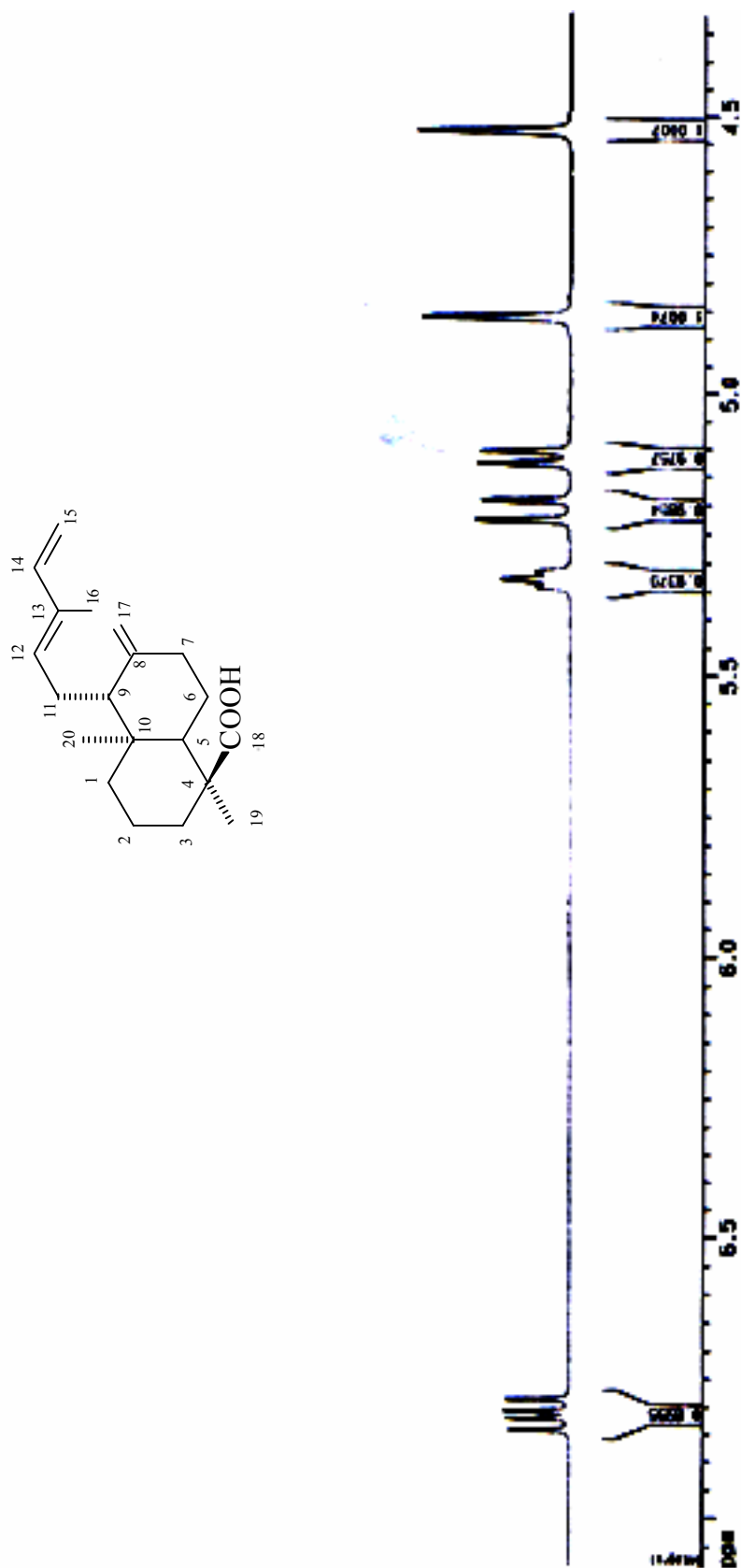


FIGURA 64: Expansão do espectro de RMN de ¹H do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico na região de 4,5 a 7,0 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

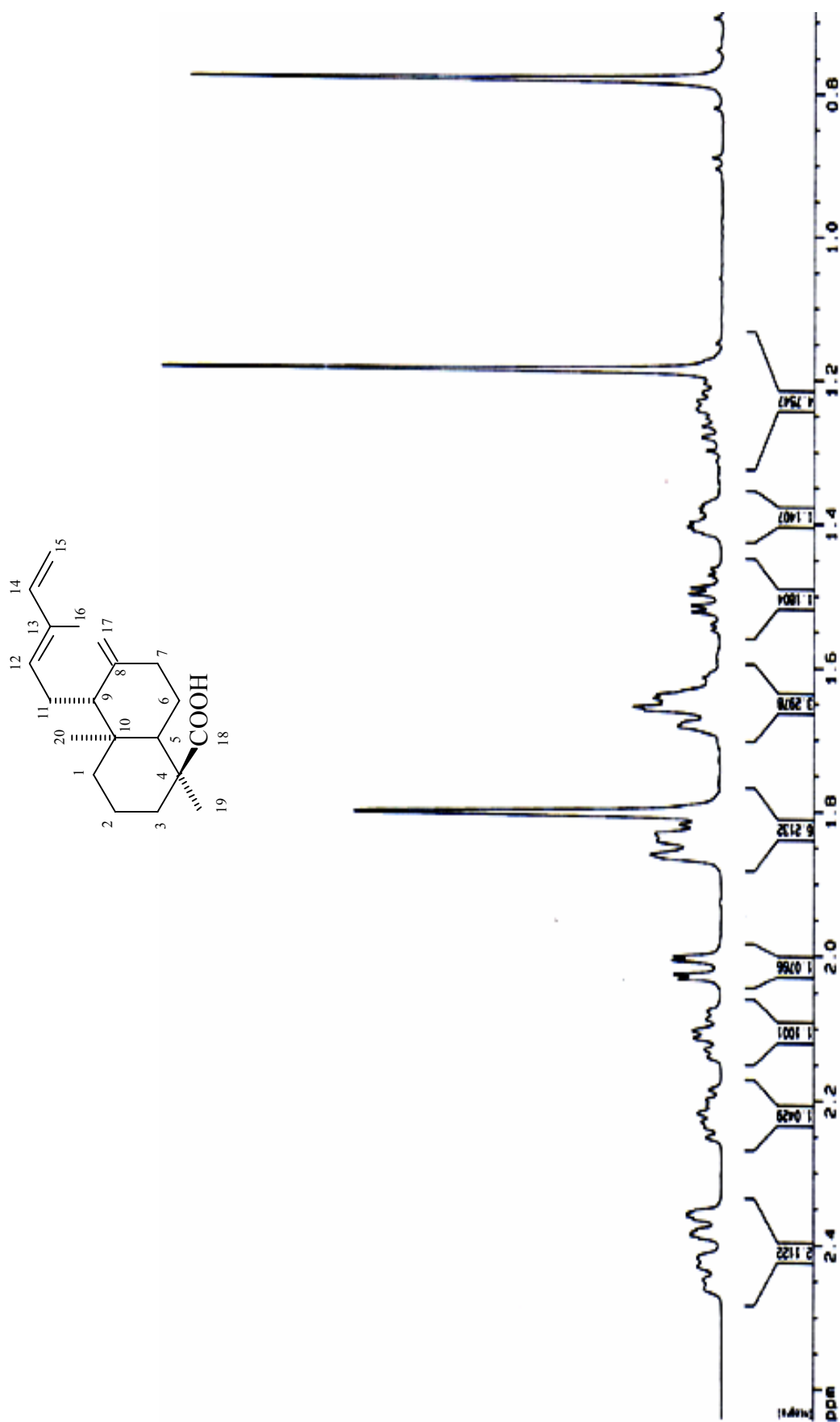


FIGURA 65: Expansão do espectro de RMN de ¹H do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico na região de 0,5 a 2,5 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

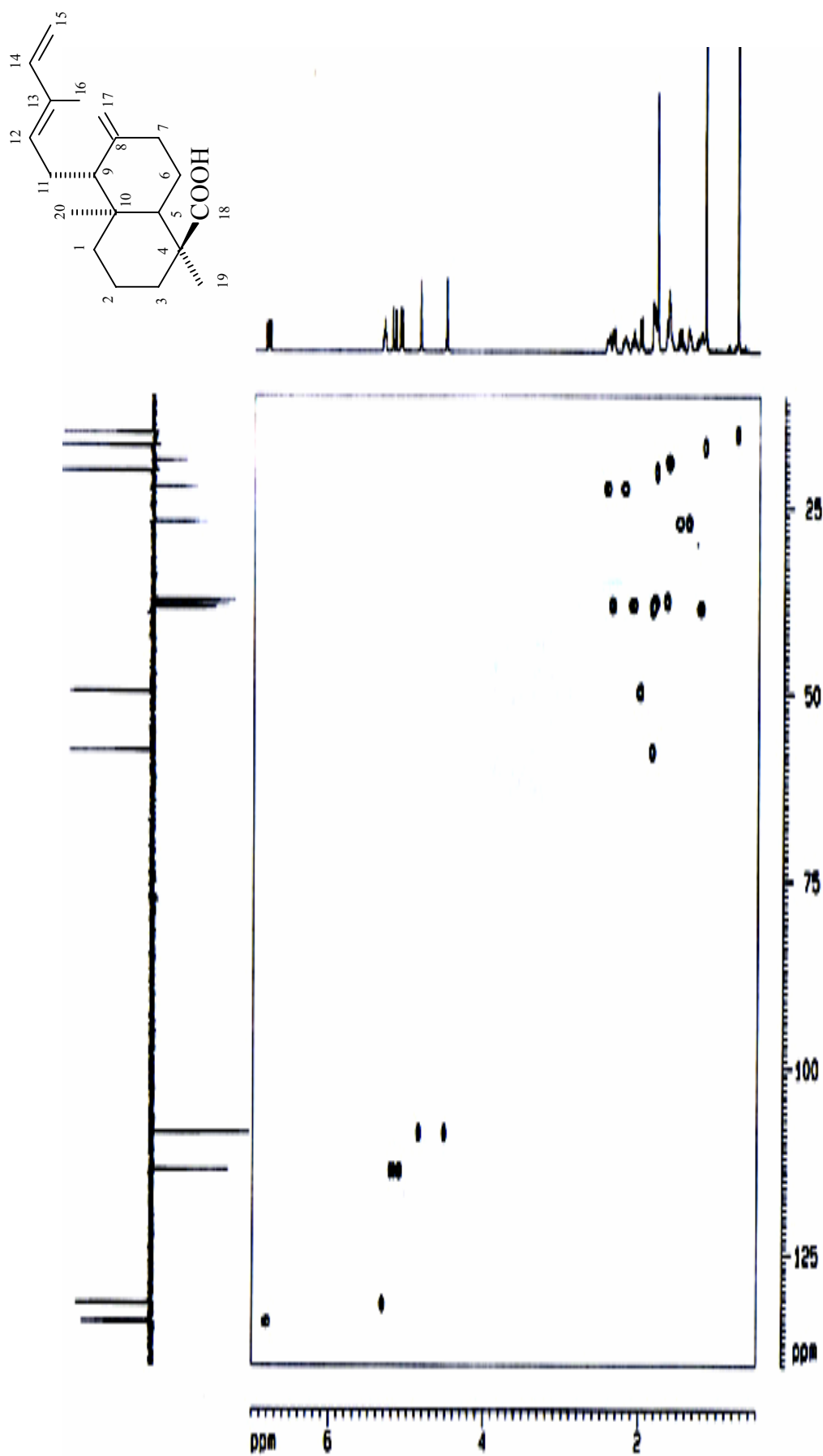
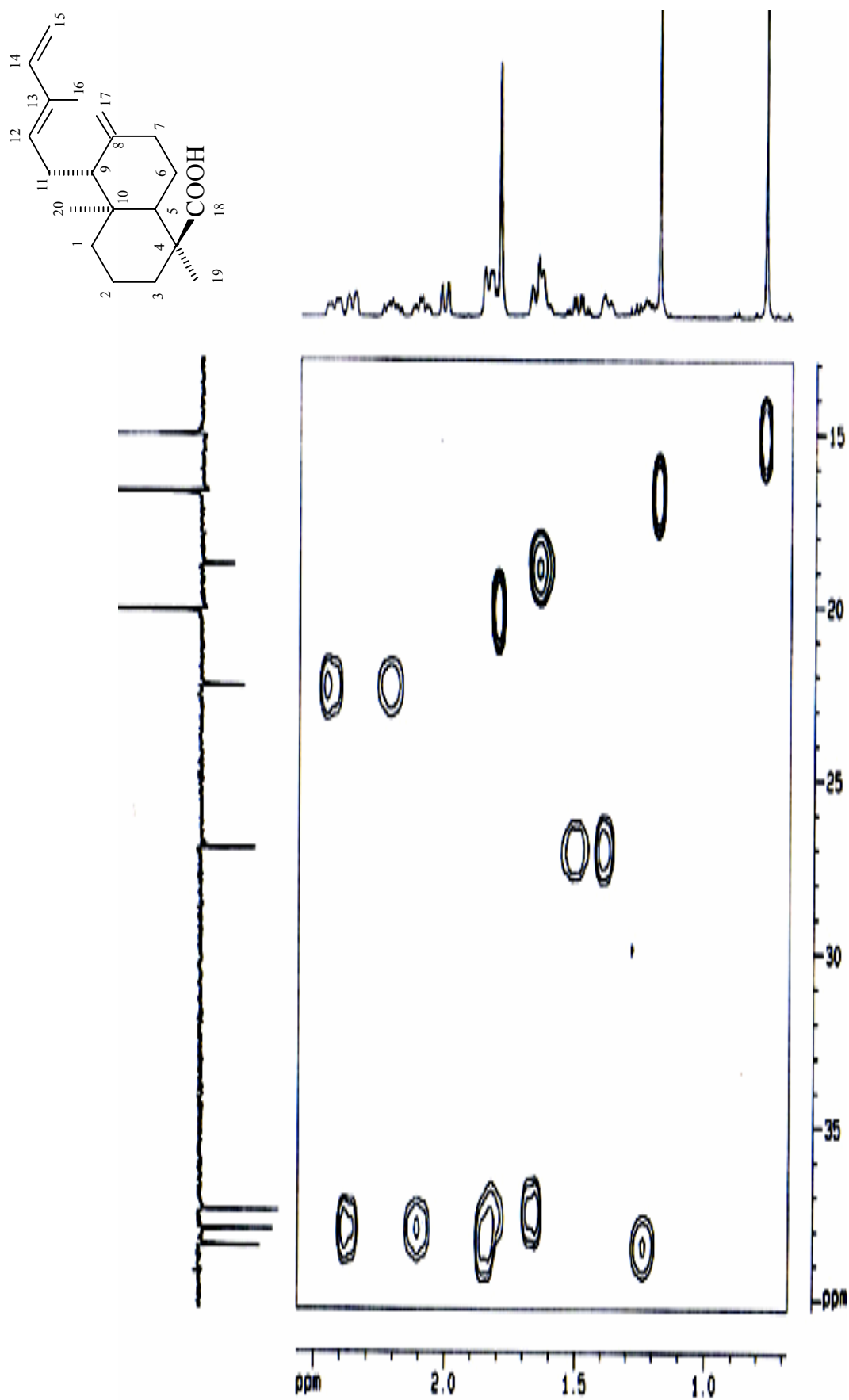


FIGURA 66: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMQC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

FIGURA 67: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC do ácido 8(17),12E,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

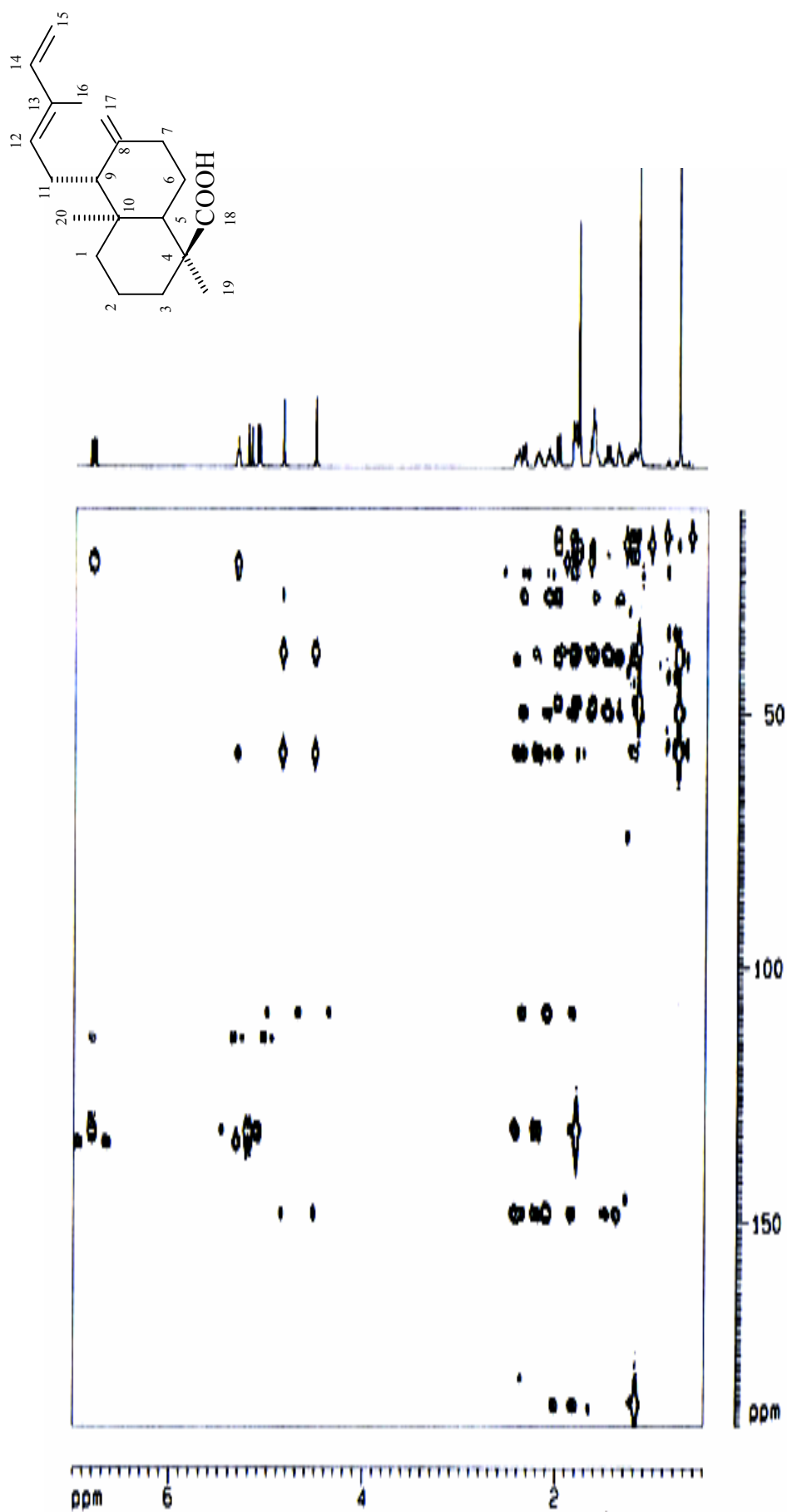
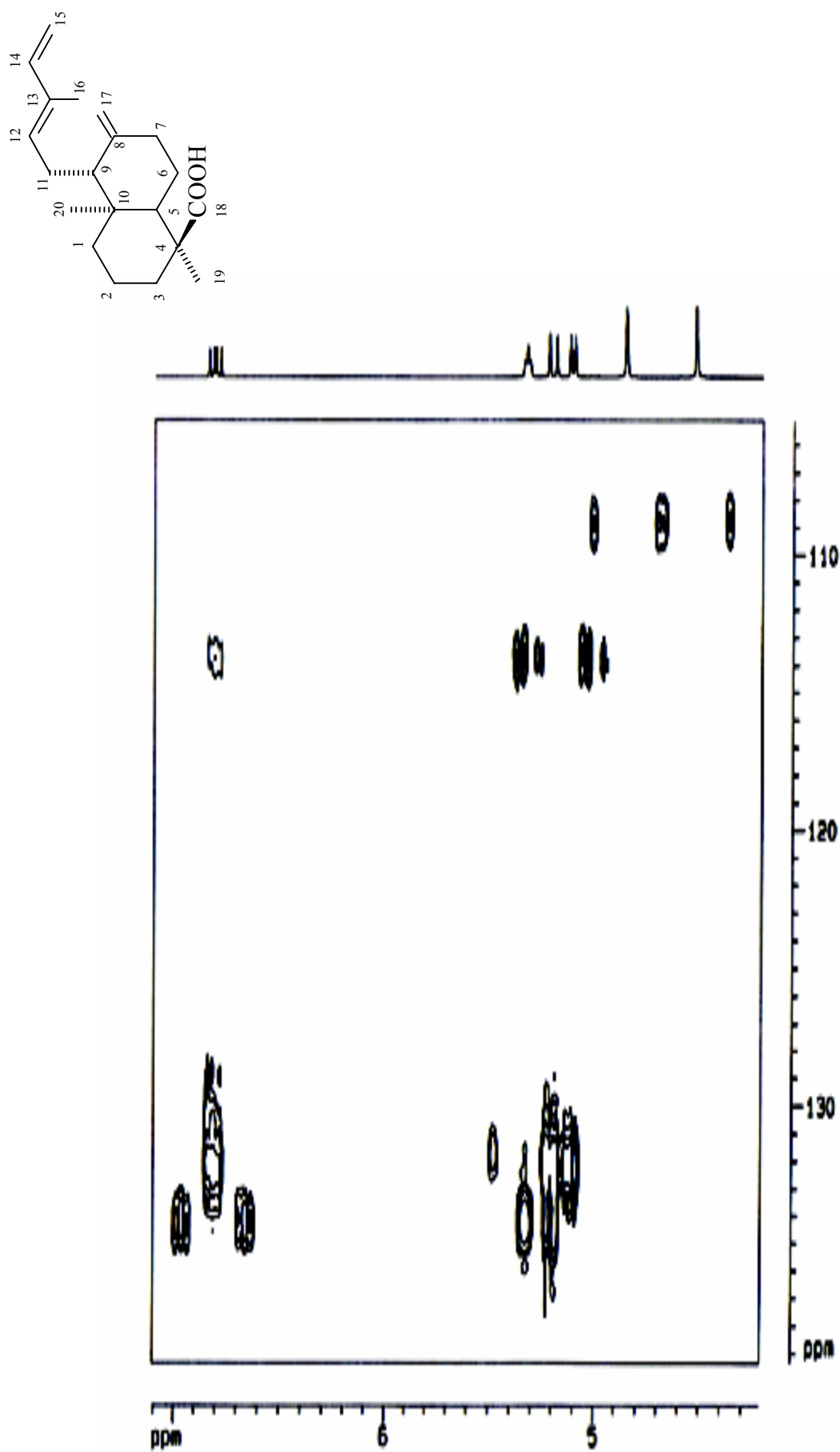
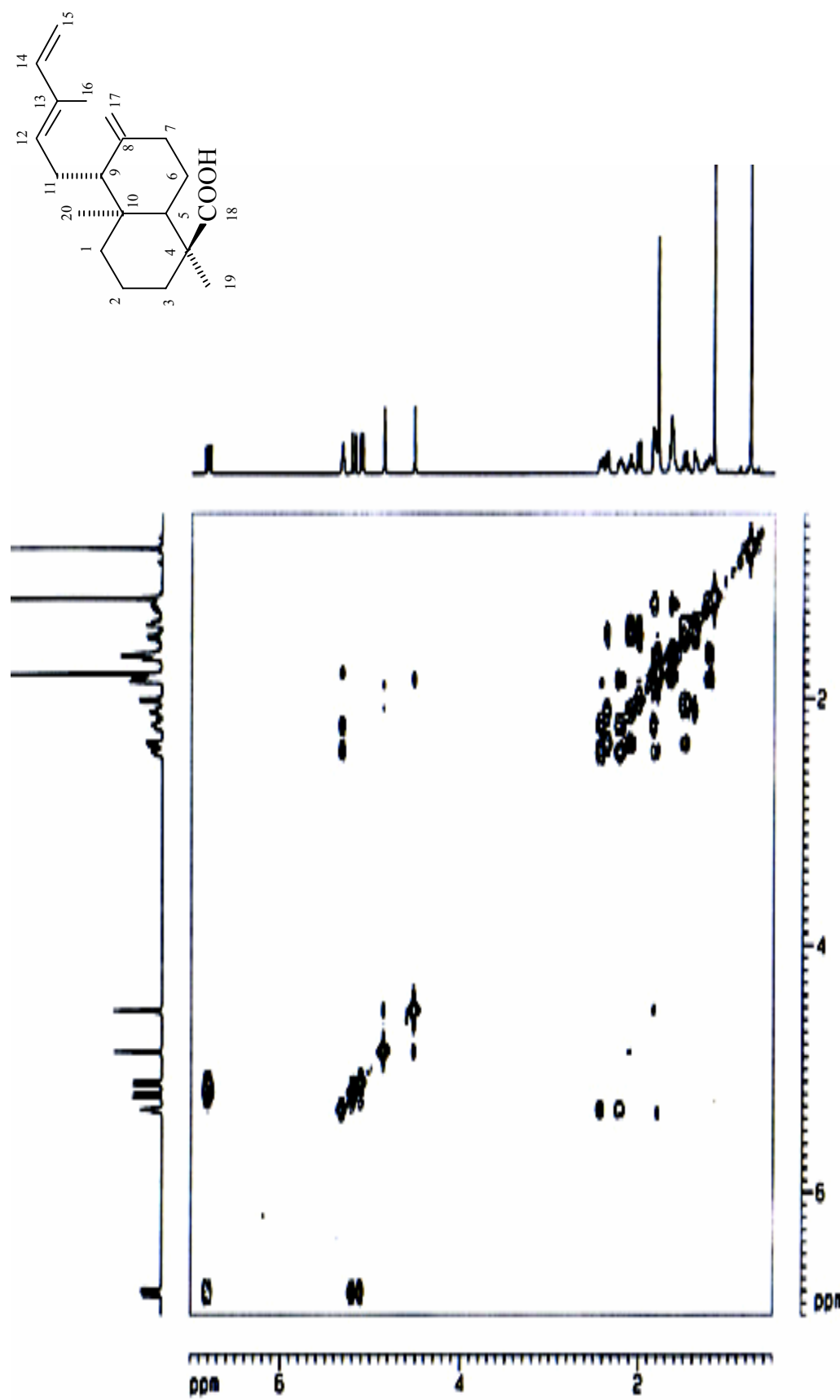


FIGURA 68: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

FIGURA 69: Expansão do espectro de correlação ¹H x ¹³C-HMBC do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl₃, 500 e 125 MHz)

FIGURA 70: Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz)

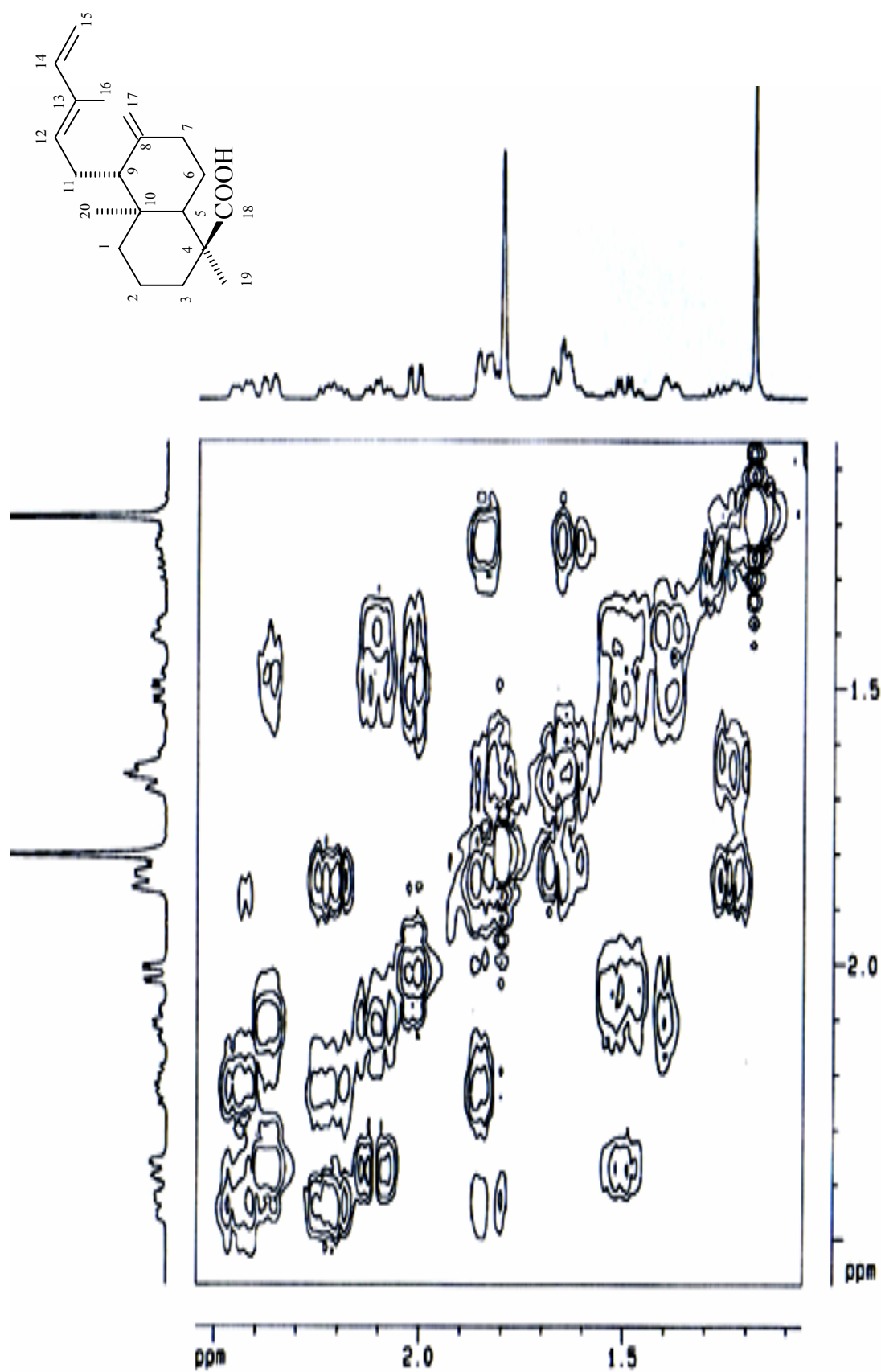


FIGURA 71: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY do ácido 8(17),12E,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz)

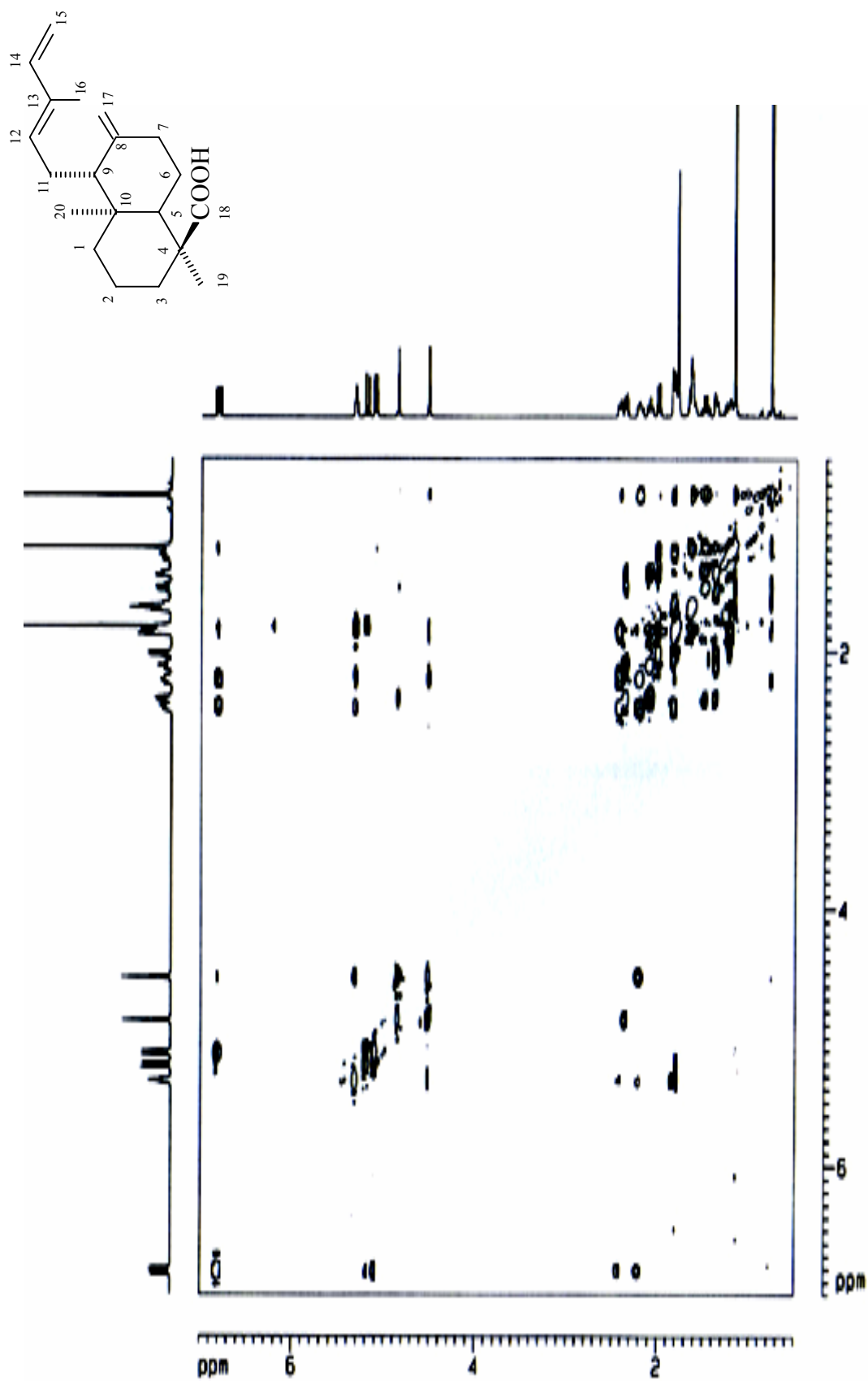


FIGURA 72: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY do ácido 8(17),12E,14-labdatrien-18-óico (CDCl_3 , 500 MHz)

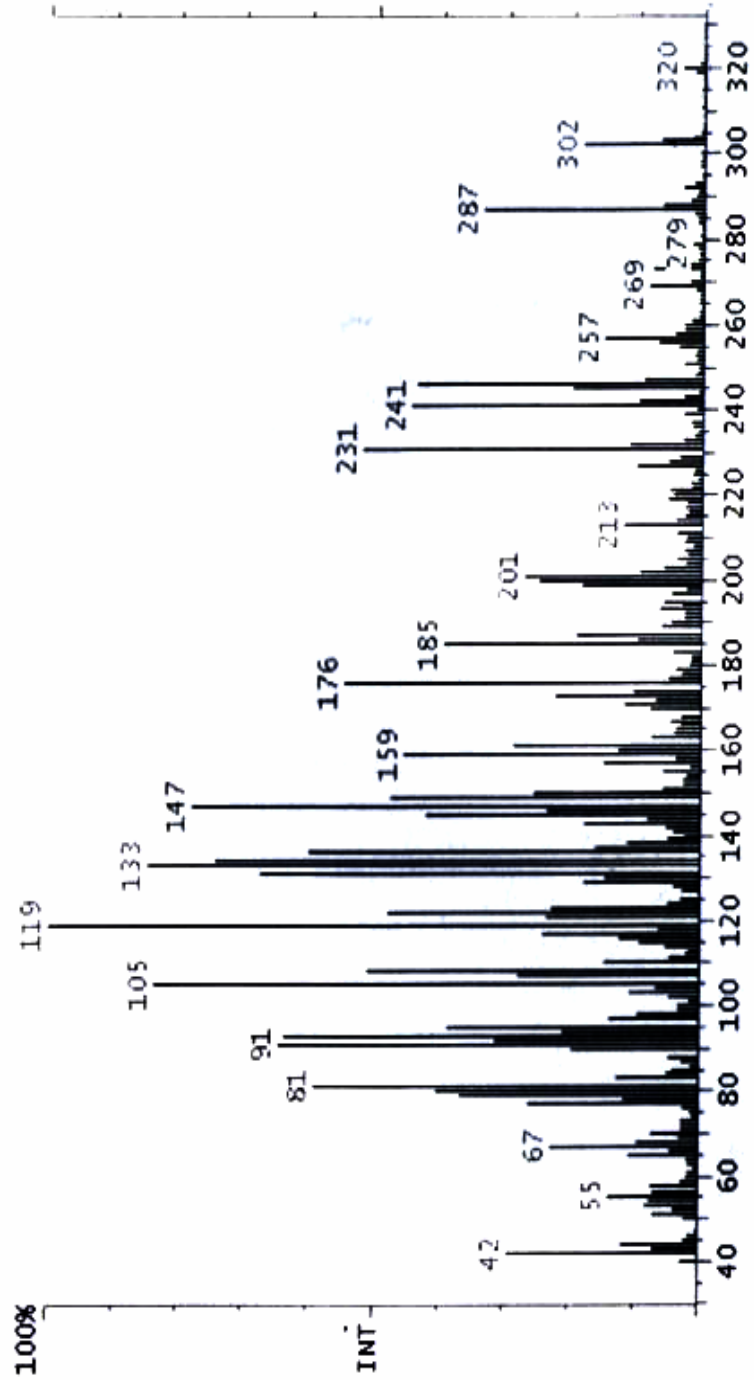
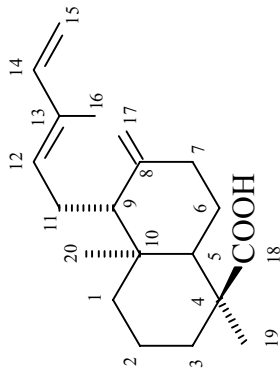
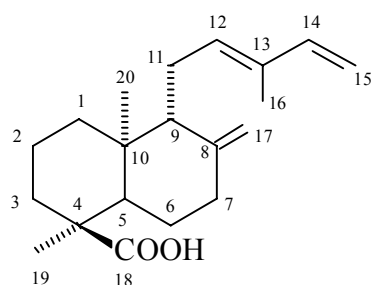
FIGURA 73: Espectro de massas por IE do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico

Tabela 3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em CDCl_3 a 500 MHz do ácido 8(17)12*E*, 14-labdatrien-18-óico



	$\delta\text{ C}$	HMQC	HMBC		COSY
		$\delta\text{ H}$	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ 2J	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ 3J	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$
C					
4	47,5	-	-	-	-
8	147,6	-	-	-	-
10	38,8	-	-	-	-
13	131,6	-	-	-	-
18	185,8	-	-	-	-
CH					
5	49,7	2,01 (dd, $J = 12,4, 2,7$ Hz)	C-4, C-6, C-10	C-9, C-18, C-19, C-20	H-6
9	57,7	1,82 (s)	C-11	-	-
12	131,7	5,33 (t)	-	C-9, C-14, C-16	H-11
14	134,2	6,81 (dd, $J = 17,2, 10,8$ Hz)	-	C-12, C-16	H-15
CH₂					
1	38,5	1,24 (m)	-	C-5	-
	-	1,86 (sl)	-	-	-
2	18,8	1,64 (m)	C-1	C-4	-
	-	1,64 (m)	-	-	-
3	37,5	1,65 (d, $J = 4,7$ Hz)	C-2, C-4	C-5, C-18	H-2
	-	1,84 (s)	-	-	-
6	27,0	1,40 (m)	C-5, C-7	C-8, C-10	-
	-	1,50 (m)	-	-	-
7	38,0	2,11 (m)	C-6, C-8	C-5, C-9, C-17	-
	-	2,38 (m)	-	-	-
11	22,3	2,22 (m)	C-9, C-12	C-8, C-13	H-12
	-	2,41 (m)	-	-	-
15	113,7	5,11 (d, $J = 10,8$ Hz)	C-14	-	H-14
	-	5,21 (d, $J = 17,3$ Hz)	-	-	-
17	108,7	4,53 (s)	-	C-7, C-9	-
	-	4,86 (s)	-	-	-
CH₃					
16	20,1	1,80 (s)	C-13	C-12	-
19	16,2	1,18 (s)	C-4	C-3, C-5, C-18	-
20	15,1	0,76 (s)	C-10	C-5, C-9	-

**COMPOSITION AND MOLLUSCICIDAL PROPERTIES OF
ESSENTIAL OILS FROM LEAVES OF *XYLOPIA*
LANGSDORFFIANA A. ST. HIL. ET TUL. (ANNONACEAE)**

4.4. Composition and molluscicidal properties of essential oils from leaves of *Xylopi langsdorffiana* A. St. Hil. et Tul. (Annonaceae)

RESUMO

A família Annonaceae também é caracterizada por apresentar espécies ricas em óleos essenciais com algumas utilizadas em perfumaria e cosmetologia. Tem o sesquiterpeno espatulenol como seu principal marcador. O gênero *Xylopi* apresenta espécies cujos constituintes voláteis já foram bem caracterizados, dentre elas *X. aethiopica* e *X. aromatica*. Algumas atividades farmacológicas foram descritas, como por exemplo, citotoxicidade e antimicrobiana.

A esquistossomose é uma doença parasitídica, endêmica em 74 países de três continentes: América, África e Ásia, onde algumas centenas de milhões de indivíduos estão expostos ao risco de infecção. Existem hoje poucos esforços por parte da indústria farmacêutica em produzir medicamentos para doenças tropicais, as chamadas doenças negligenciáveis, por exemplo, a esquistossomose. Partindo desse pressuposto, decidimos caracterizar quimicamente os constituintes voláteis das folhas de *X. langsdorffiana* e investigar sua ação moluscicida frente ao *Biomphalaria glabrata*, na tentativa de se descobrir um meio alternativo para prevenir a esquistossomose.

As folhas de *X. langsdorffiana* (1600 g) foram submetidas a uma hidrodestilação em aparelho de Clevenger obtendo-se 640 mg do óleo essencial (0,04 %). A análise desse óleo foi feita em aparelho de CG e CG-EM.

Desta forma pode-se caracterizar 19 componentes voláteis o que corresponde a 91,6% dos metabólitos presentes. Os constituintes majoritários foram o germacreno D (22,9 %), tran- β -guaieno (22,6 %), β -cariofileno (15,7 %) e α -pineno (7,3 %). O óleo essencial apresentou uma CL₅₀ frente ao *B. glabrata* de 3,72 μ g/mL, concentração muito inferior a estabelecida pela Organização Mundial de Saúde, que considera uma substância moluscicida a que apresentar uma CL₅₀ de até 100 μ g/mL. Parte da atividade desse óleo pode ser atribuída ao α -pineno. A CL₅₀ dessa substância isolada foi de 0,49 ppm. Esse é o primeiro relato de atividade moluscicida de constituintes voláteis de espécies do gênero *Xylopi*. O cromatograma feito em CG dos constituintes voláteis é mostrado na Figura 74 (pág. 124).

Composition and molluscicidal properties of essential oils from leaves of *Xylopia langsdorffiana* A. ST. HIL. & TUL. (Annonaceae)

**Josean F. Tavares, Marianna V. B. Silva, Karine F. Queiroga, Rodrigo M. Martins,
Tania M. S. Silva*, Celso A. Camara, Maria de F. Agra, José M. Barbosa-Filho and
Marcelo S. da Silva**

*Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa,
Paraíba*

Márcia O. M. Marques

*Instituto Agronômico, Centro de P & D Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual
de Campinas, Campinas, São Paulo*

Abstract

The volatile fraction of *Xylopia langsdorffiana* leaves was analyzed by capillary gas chromatography-mass spectrometry and tested for molluscicidal activity. With this methodology 19 different components were identified in the oil. Among them germacrene D (22.91%), (*E*)-beta-guaiene (22.59%), (*E*)-caryophyllene (15.7%), and alpha-pinene (7.3%) were found to be the major constituents. The essential oil shown significant molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*, with an LC₉₀ value of 5.6 µg/mL, which falls below the threshold of 100 µg/mL, set for potential molluscicide activity by the World Health Organization.

Key word Index

Xylopia langsdorffiana, Annonaceae, essential oil composition, germacrene D, (*E*)-beta-guaiene, (*E*)-caryophyllene molluscicidal activity

Introduction

Human schistosomiasis is estimated to affect 200 million people around the world, causing high levels of morbidity and mortality in 74 countries in tropical and subtropical areas. Aquatic snails – the intermediate hosts in which asexual reproduction of the parasites occurs – play a major role in the transmission of the schistosomes that cause the disease. Snail control strategies are considered a priority in the reduction of such transmission (1).

In Brazil, the worm *Schistosoma mansoni* is the ethiological agent, and it requires the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* as the major intermediate host for transmission (2). The use of molluscicidal, from plant extracts or through synthesis, can form a useful part of an integrated strategy for schistosomiasis control (3,4). In the search for molluscicidal natural products, Hostettmann identified several active saponins against the snails that carry schistosomes and others important parasites (5). In the current decade, several species of aromatic plants have been found to have significant and potentially useful molluscicidal activity (6-9).

Apart from the molluscicidal activities, several others biological activities have been reported, including antimicrobial activities (10-13). These properties are likely due to multiple components of these complex mixtures and facilitated by their prompt diffusion across cell membranes. Individual oils may have hundreds of constituents, with terpenes (monoterpenes and sesquiterpenes) and their oxygenated derivatives as the major components. Other compounds include phenylpropenes and specific compounds containing sulfur or nitrogen.

Annonaceae is one of the largest Magnoliid families, with ca. 128 genera and 2300 species, mostly pantropical (14). In Brazil, the Annonaceae comprise 26 genera (seven endemic) and ca. 260 species (Mello-Silva, pers comm.), the majority of them occurring in forests, with few representatives in open areas. The members of this family play a significant role in the composition of Brazilian vegetation and represent a subject of great interest. The Annonaceae is known for their edible fruit and medicinal species (15). The genus *Xylopia* contains approximately 150 species (16).

The aim of the present study was to explore the molluscicidal activities of the essential oil from *Xylopia langsdorffiana*, using *Biomphalaria glabrata* as the target snail.

Experimental

Plant material: The leaves of *X. langsdorffiana* were collected in Brazil, State of Paraíba, at the town of Cruz do Espírito Santo, on July 2002. Voucher specimens (Agra 5541) were deposited at the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), Universidade Federal da Paraíba.

Oil isolation: The fresh leaves of *X. langsdorffiana* (1600g) were subjected to steam distillation in a Cleavenger-type apparatus for 8h yielding 640 mg of the oil (0.04%).

GC: GC analysis was performed in a Shimadzu GC-17A chromatograph equipped with a Shimadzu GC 10 software, using a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm, coated with DB-5/J & W Scientific 25 μ m film thickness) and helium as carrier gas. The temperature programming was 60°-240°C at 1°C/min. The FID injector and detector temperatures were 240°C and 230°C, respectively. The percentage compositions were obtained from electronic integration measurements using flame ionization detection without taking into account response factors.

GC/MS: Analyses were carried out in a capillary GC-quadrupole MS system (QP 5000) operating at 70 eV in the same conditions as describe above. The identification of the compounds was performed by comparison of retention indices (determined relative to the retention times of a series of n-alkanes) and mass spectra with those of authentic samples.

Molluscicidal test: The bioassay was carried out as described by Silva et al. (3,4) by dissolving the sample first in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then adding dechlorinated water, to give a 0.1% solution in DMSO. For the preliminary bio-assays, each stock solution (100 μ g/mL) was left undiluted or further diluted with dechlorinated water to give test solutions containing 100, 50, and 10 μ g/mL. Subsequently, five different test solutions, ranging in concentration from 1 to 10 μ g/mL, were prepared. For the assay, 10 adult snails (measuring 8–12 mm diameter) were exposed to 250 mL test solution in a glass beaker, for 48 h at room temperature. After 48 h of exposure, each test solution was replaced with dechlorinated water. Snail mortality was then recorded over the following 48 h, and compared with the positive controls (with cupric carbonate at 50 μ g/ml) and negative controls (with extract-free dechlorinated water containing the same amount of DMSO as the stock solutions). The assay was run in duplicate. The concentrations that kill 90% (LC₉₀), 50% (LC₅₀) and 10% (LC₁₀) of the exposed snails (that would have survived in the negative-control cultures) was estimated by probit analysis, using the Origin 6.0 software package (Microcal Software, Northampton, MA).

Results and Discussion

The species of *Xylopi* genus produce a wide variety of metabolites including alkaloids, amides, lignoids, acetogenins and terpenoids (17-22).

The chemical analysis of the volatile fraction from *Xylopi langsdorffiana* leaves showed the presence of 19 components (91.58%), consisting mainly of germacrene D (22.91 %), (*E*)-beta-guaiene (22.59 %), (*E*)-caryophyllene (15.71 %), alpha-pinene (7.30 %) and many oxygenated sesquiterpenes (Table 1).

Several oils obtained from *Xylopi* species were previously investigated, mainly isolated from fruits (23-30). The major components reported were monoterpenes and sesquiterpenes in all cases.

The essential oil from *X. langsdorffiana* leaves exhibited potent molluscicidal activity with $LC_{10}=1.83$, $LC_{50}=3.72$ and $LC_{90}=5.61$ $\mu\text{g/mL}$, respectively. This activity may be attributed in part to alpha-pinene ($LC_{50}=0.49$ ppm) and beta-pinene ($LC_{50}=0.54$ ppm) with established molluscicidal activity (6).

Some others essential oils from *Xylopi spp* showed biological activities as the one essential oil from the fruits of *Xylopi aethiopica* with activity demonstrated against four microorganisms and cytotoxicity to carcinoma cells (Hep-2 cell line) (27). The essential oil from *Xylopi phloiodora* stem bark was active against *Plasmodium falciparum*, and the essential oil from *X. pynaertii*, *X. sericea* root bark, *X. frutescens* stem bark exhibited moderate bacteriostatic and fungistatic activities (23). This is, however, the first report of molluscicidal activity for the essential oil from *Xylopi* genus.

Thus, our data suggest that this oil offer new possibilities for molluscicidal chemotherapy. Although essential oils are often difficult to study and also to utilize as drugs, they may offer a unique means of discovering new effective molluscicidal drugs from plants with medicinal uses in endemic countries. An important effort will have to be implemented to identify the active components of essential oils with molluscicidal activity. These findings may have important implications for the use of natural products to fight schistosomiasis.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Instituto do Milênio do Semi-Árido) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for support. T.M.S.S., C.A.C. and M.F.A. are grateful to D. Gonçalves de Oliveira for technical assistance. T.M.S.S. also thanks Professor F. Fernandes Amancio (Universidade Federal de Pernambuco), for providing the *B. glabrata* used to set up the laboratory colony and Prof. Eduardo J. Oliveira (LTF-UFPB) for useful suggestions.

References

1. V. Lardans and C. Dissous, Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. *Parasitol Today*, 14, 413–417 (1998).
2. X. Shuhua, J. Chollet, N. A. Weiss, R. N. Bergquist and M. Tanner, Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int*, 49, 19 (2000).
3. T. M. S. Silva, M. M. Batista, C. A. Câmara and M. F. Agra, Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum spp.* (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Ann Trop Med Parasitol*, 99, *in press* (2005a).
4. T. M. S. Silva, C. A. Camara, T. P. Barbosa, A. Z. Soares, L. C. Cunha, A. C. Pinto and M. D. Vargas, Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. *Bioorg Med Chem*, 13, 193–196 (2005b).
5. K. Hostettmann, Saponins with molluscicidal activity from *Hedera helix* L. *Helv Chim Acta*, 63, 606–609 (1980).
6. M. Lahlou, Composition and molluscicidal properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *Pharmac Biol*, 41, 207–210 (2003).
7. A. Singh and D. K. Singh, Molluscicidal activity of *Lawsonia inermis* and its binary and tertiary combinations with other plant derived molluscicides. *Ind J Exp Biol*, 39, 263–8 (2001).
8. P. Bezerra, A. G. Fernandes, A. A. Craveiro, C. H. S. Andrade, F. J. A. Matos, J. W. Alencar, M. I. L. Machado, G. S. B. Viana, F. F. Matos and M. Z. Rouquayrol, Chemical composition and biological activity of essential oils of plants from Northeast Brazil - genus *Lippia*. *Ciencia e Cultura* 33:Supl., Simp. Plant. Med. Bras., 6th, 1980 (1981).
9. K. Singh and D. K. Singh, Toxicity to the snail *Limnaea acuminata* of plant-derived molluscicides in combination with synergists. *Pest Manage Sci*, 56, 889–898 (2000).
10. R. R. Carlton, P. G. Waterman, A. I. Gray and S. G. Deans, The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (*Myricagale*) (*Myrtaceae*). *Chemoecology*, 3, 55–59 (1992).
11. R. Piccaglia, M. Marotti, E. Giovanelli, S. G. Deans and E. Eaglesham, Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Ind Crop Prod*, 2, 47–50 (1993).
12. G. Buchbauer and L. Jirovetz, Aromatherapy—uses of fragrances and essential oils as medicaments. *Flav Fragr J*, 9, 217–222 (1994).
13. K. Aruna and V. M. Sivaramakrishnan, Anticarcinogenic effects of the essential oils from cumin, poppy and basil. *Phytother Res*, 10, 577–580 (1996).

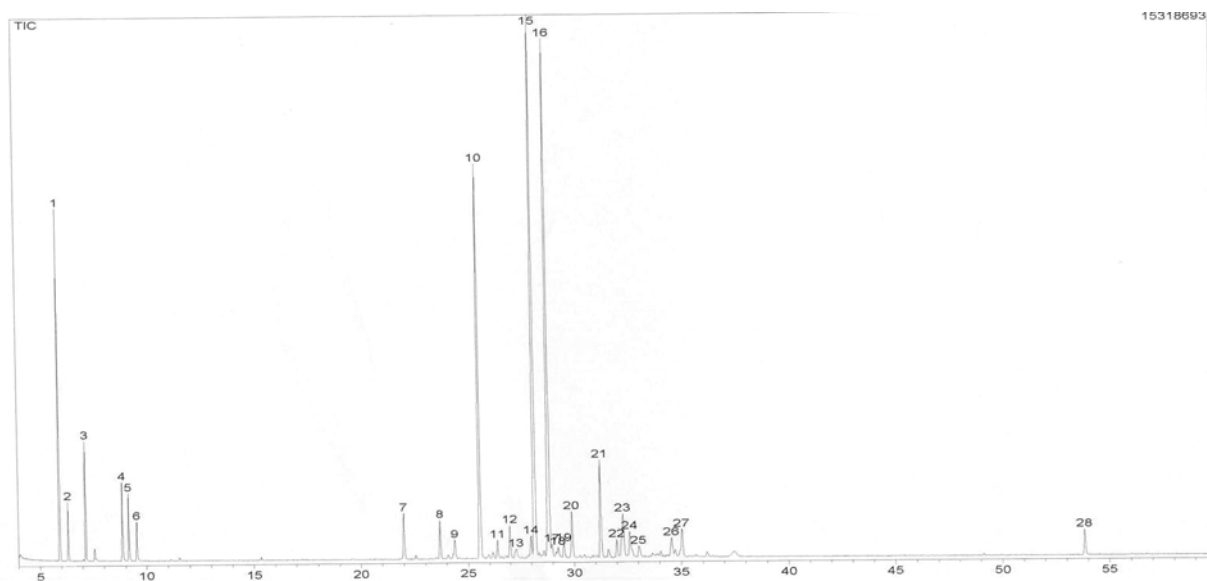
14. P. J. A. Kessler. Annonaceae. The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. In: Kubitzki, K. Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (eds.), Berlin. Springer Verlag 2: pp. 93-129 (1993).
15. M. P. Correa, Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Ministério da agricultura, RJ, pp. 315 (1984).
16. R. K. Brummitt, *Vascular Plant - Families and Genera*, Royal Botanic Garden, Kew, pp. 491 (1992).
17. D. Martins, M. A. Alvarenga, N. F. Roque and J. D. Felicio, Diterpenes and alkaloids from Brazilian *Xylopi*a species. Quim Nova, 18, 14-16 (1995).
18. L. Lajide, P. Escoubas and J. Mizutani, Termite antifeedant activity in *Xylopi*a *aethiopi*ca. Phytochemistry 40:1105-1211 (1995).
19. A. Wahl, F. Roblot and A. Cave, Isolation and structure elucidation of *Xylobuxin*, a new neolignan from *Xylopi*a *buxifolia*. J Nat Prod, 58, 786-789 (1995).
20. T. Colman-Saizarbitoria, Z. M. Gu and G. X. Zhao, Venezenin: a new bioactive annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopi*a *aromatica*. J Nat Prod, 58, 532-539 (1995).
21. J. A. Takahashi, M. A. D. Boaventura, J. C. Bayma and A. B. Oliveira, Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopi*a *frutescens*. Phytochemistry, 40, 607-609 (1995).
22. N. C. de Andrade, J. M. Barbosa-Filho, M. S. da-Silva, E. V. L. da-Cunha and J. G. S. Maia, Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopi*a *cayennensis* Maas. Biochem System Ecol, 32,1055-1058 (2004).
23. G. Fournier, A. Hadjiakhoondi, M. Leboeuf, A. Cave, B. Charles and J. Fourniat, Essential oils of Annonaceae .3. volatile constituents of *Xylopi*a *frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea* - chemical and biological study. Phytother Res, 8, 166-169 (1994).
24. J. H. G. Lago, I. C. Moreira, T. M. T. Tanizaki, P. R. H. Moreno and N. F. Roque, Mono and sesquiterpenes from the leaf essential oil of *Xylopi*a *brasiliensis* Spreng (Annonaceae). J Essent Oil Res, 15, 406-407 (2003).
25. B. Keita, L. Sidibe, G. Figueredo and J-C Chalchat, Chemical composition of the essential oil of *Xylopi*a *aethiopi*ca (Dunal) A.ch. from Mali. J Essent Oil Res, 15, 267-269 (2003).
26. F. F. Boyom, V. Ngouana, P. H. A. Zollo, C. Menut, J. M. Bessiere, J. Gut and P. J. Rosenthal, Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. Phytochemistry, 64,1269-1275 (2003).
27. O. T. Asekun and B. A. Adeniyi, Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopi*a *aethiopi*ca from Nigeria. Fitoterapia, 75, 368-370 (2004).

28. J. A. Pino, A. Bello, A. Urquiola et al, Leaf oil of *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. from Cuba. J Essent Oil Res, 12, 751-752 (2000).
29. A. A. Craveiro, J. W. Alencar and O. Vostrowsky, Essential oil of *Xylopia sericea* - a comparative-analysis. J Nat Prod, 49, 1146-1148 (1986).
30. M. S. Karawya, S. M. A. Wahab and M. S. Hifnawy, Essential oil of *Xylopia aethiopica* fruit. Planta Med, 37, 57-59 (1979).

Table 1. Chemical composition of *Xylopia langsdorffiana* leaves essential oil (GC-MS)

N°	Rt (min)	Compound	RI ^a	Area%
1	5,92	alpha-pinene	931	7,30
2	6,33	Camphene	946	1,30
3	7,15	beta-pinene	974	2,77
4	8,87	Limonene	1025	2,04
5	9,16	(Z)-beta-ocimene	1033	1,78
6	9,56	(E)-beta-ocimene	1044	0,99
7	22,02	Delta-elemene	1336	1,69
8	23,70	alpha-copaene	1374	1,39
9	25,58	(E)-caryophyllene	1418	15,71
10	26,39	aromadendrene	1439	0,67
11	26,99	alpha-humulene	1451	1,19
12	27,99	Gama-gurjunene	1473	0,78
15	28,19	Germacrene D	1480	22,91
16	28,85	(E)-beta-guaiene	1498	22,59
20	29,53	Gama-cadinene	1511	0,57
21	29,91	Delta-cadinene	1521	2,01
22	31,27	Germacrene B	1554	4,07
23	32,01	espathulenol	1573	0,69
26	34,57	<i>epi</i> -alpha-cadinol	1637	1,13

^a(Retention indices=Kovats indices); components were identified based on RI and GC-MS and listed according to their order of elution on DB-5/J (30m); %=percent peak area of essential oil constituents.

**FIGURA 74:** Cromatograma dos constituintes voláteis das folhas de *X. langsdorffiana*

**ALKALOIDS AND VOLATILE CONSTITUENTS FROM THE
STEM OF *FUSAEA LONGIFOLIA* (AUBL.) SAFF.
(ANNONACEAE)**

4.5. Alkaloids and Volatile Constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae)

RESUMO

A família Annonaceae é caracterizada pela presença de alcalóides. Cerca de 170 alcalóides, dentre eles os do tipo isoquinolínico, protoberberínico e aporfínico já foram isolados em diferentes espécies dessa família. O gênero *Fusaea* possui quatro espécies e apenas um estudo fitoquímico foi relatado na literatura. Como o grupo já vinha trabalhando com outras espécies de Annonaceae na tentativa de se isolar alcalóides bioativos, decidiu-se investigar fitoquimicamente *Fusaea longifolia* e fazer uma caracterização dos seus constituintes voláteis.

Fusaea longifolia foi coletada em Belém-PA em uma parceria do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e o Museu Emílio Goeldi. O caule foi submetido a uma marcha clássica ácido/ base para isolamento de alcalóides. A fração resultante foi cromatografada com alumina e eluída com hexano, clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade obtendo-se as substâncias (1) e (2). Outra parte do material foi submetido a uma hidrodestilação em aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais.

Após análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura concluiu-se que a substância (1) era o alcalóide estefolidina, sendo este o primeiro relato no gênero *Fusaea* e a substância (2) o alcalóide *O*-metilmoscatolina, relatado pela primeira vez nessa espécie e conhecido por suas propriedades antifúngicas.

A análise do óleo essencial por CG e CG-EM revelou que a maioria dos componentes eram sesquiterpenos dentre eles: α -cadinol (12,5 %), espatulenol (12,0 %), δ -elemeno (4,2 %), β -elemeno (3,8 %), germacreno D (3,7 %) e Germacreno B (2,9 %).

Os resultados confirmam *Fusaea longifolia* como uma espécie típica da família Annonaceae com a presença de alcalóides isoquinolínicos e o sesquiterpeno espatulenol nos constituintes voláteis. Portanto trata-se de um estudo de grande importância quimiotaxonômica para um gênero ainda pouco explorado tanto fitoquímico quanto farmacologicamente. Os espectros dos alcalóides são mostrados nas Figuras de 75 a 81, (pág. 133 a 139).

**Alcalóides e constituintes voláteis do caule de *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff.
(Annonaceae)**

J. F. Tavares¹, J. M. Barbosa-Filho¹, M. S. da Silva*¹, J. G. S. Maia², E. V. L. da-Cunha^{1,3}

¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, 58051-970, João Pessoa, PB, Brasil.

² Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-900 Belém, PA, Brasil.

³ Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, CCBS, 58100-000, Campina Grande, PB, Brasil.

RESUMO

O estudo fitoquímico do extrato em etanol do caule de *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae) e a extração por destilação em aparelho de Clevenger dos constituintes voláteis resultou no isolamento dos alcalóides estefolidina e *O*-metilmoscatolina, ambos relatados pela primeira vez nesta espécie e estefolidina no gênero, e na identificação, através de CG e CG-EM, dos sesquiterpenóides α -cadinol (12,5%) e espatulenol (12,0%) como componentes majoritários. As estruturas dos alcalóides foram identificadas com base na análise dos dados de RMN.

Unitermos: *Fusaea longifolia*, Annonaceae, alcalóides, constituintes voláteis.

ABSTRACT: Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). A phytochemical study was accomplished with the ethanolic extract of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). The extraction of the volatile compounds was performed by means of Clevenger apparatus yielding *O*-methylmoschatoline, isolated for the first time in this species, and stepholidine, reported for the first time in genus *Fusaea*. Through GC and GC-MS, two sesquiterpenoids, α -cadinol (12,5%) and espatulenol (12,0%) were identified as major constituents. The structural identification of the alkaloids was made based on the analysis of NMR spectra.

Key words: *Fusaea longifolia*, Annonaceae, alkaloids, volatile constituents.

INTRODUÇÃO

A família Annonaceae, catalogada por Jussieu em 1789 (Hutchinson, 1973), apresenta 2.300 espécies distribuídas em aproximadamente 130 gêneros pantropicais (Maas et al., 2001). As plantas dessa família são arbóreas, sendo as trepadeiras também muito freqüentes (Hegnauer, 1964). Além de seus frutos serem na maioria comestíveis são também muito usados na medicina popular (Correa, 1984, p. 315).

Cerca de 170 alcalóides dos tipos isoquinolínicos, protoberberínicos, aporfínicos e outros foram isolados em diferentes gêneros de Annonaceae (Leboeuf et al., 1982). Do gênero *Fusaea*, composto por quatro espécies de ocorrência freqüente na região amazônica (Brummitt, 1992), foram isolados alcalóides dos tipos aporfínico e oxoaporfínico. A espécie *Fusaea longifolia* (sinonímia: *Annona longifolia* Aubl., *A. rhombipetala* Ruiz & Pav. Ex G. Don, *Duguetia longifolia* (Aubl.) Baill., *Fusaea decurrens* R. E. Fr.), conhecida popularmente como “envira”, “envireira” é um arbusto ou árvore de pequeno porte distribuída nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso e Pará (Chatrou, 1998). Estudo fitoquímico prévio com esta espécie revelou a ocorrência de uma mistura constituída por β -sitosterol e estigmasterol e dos alcalóides fuseina e liriodenina (Braz-Filho et al., 1976). No presente trabalho reportamos o isolamento dos alcalóides estefolidina (**1**) e *O*-metilmoscatolina (**2**), bem como a análise química do óleo essencial do caule dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material botânico foi coletado na reserva Mocambo em Belém, estado do Pará, em Agosto de 2002. Foi identificado por Jorge Oliveira, do Museu Paraense Emilio Goeldi. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário (MPEG) em Belém, Pará, Brasil sob n° 165435.

Extração e isolamento dos alcalóides

O caule foi dessecado em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 3 dias. Após secagem, foi pulverizado em moinho mecânico obtendo-se 1800 g de pó. Este foi umidificado com hidróxido de amônia a 5% e submetido à maceração com etanol a 95% durante 72 horas. A solução extrativa foi concentrada em rotavapor sob pressão reduzida e a uma temperatura de 45 °C obtendo-se 200 g do extrato bruto em etanol (EEB). Este foi

tratado, sob agitação mecânica, com solução de ácido clorídrico a 3% e filtrado em celite para fornecer um precipitado que foi descartado e uma solução ácida (SA). A SA foi alcalinizada com hidróxido de amônio (a pH 9-10) e extraída com clorofórmio até reação negativa com o reagente de Dragendorff. A fase em clorofórmio, depois de concentrada sob pressão reduzida, forneceu um resíduo pesando 2,0 g que foi denominado de Fração dos Alcalóides Terciários Totais (FAT). A FAT foi fracionada em coluna de alumina utilizando-se como eluentes hexano, clorofórmio e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade obtendo-se os alcalóides estefolidina (0,00034%) (1) e *O*-metilmoscatolina (0,00080%) (2) (FIGURA 1).

Obtenção e análise do óleo essencial

O óleo essencial do caule foi obtido por destilação em aparelho de Clevenger (Andrade et al., 2003), e em seguida analisado por CG e CG-EM. Os componentes voláteis foram identificados de acordo com seus índices de retenção (Kovats index) e espectros de massas em comparação com o banco de dados da system library (Adams, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se no espectro de RMN ^{13}C –APT (50 MHz) em CDCl_3 de estefolidina um total de 19 sinais que permitiram reconhecer o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono (8 não hidrogenados, 4 metilênicos, 5 metínicos e 2 metoxílicos). Estes dados sugerem esqueleto carbônico de alcalóides tetrahidroprotoberberínico. No espectro de RMN ^1H (200 MHz) em CDCl_3 observou-se um sinal em δ 4,20 compatível com o hidrogênio H-8 equatorial deste tipo de alcalóides. Esses dados comparados com os da literatura (Brakuni; Gupta, 1975) permitiram propor a estrutura da estefolidina, a qual está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Fusaea*. Todos os dados de RMN ^1H e ^{13}C de estefolidina estão sumarizados na Tabela 1.

Observou-se no espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) em CDCl_3 de *O*-metilmoscatolina um total de 19 sinais. Destes, 9 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 6 a carbonos metínicos, 3 a carbonos metoxílicos e um sinal em δ 182,4 atribuído a carbono carbonílico. Esses dados estão compatíveis com alcalóides oxoaporfínico. No espectro de RMN ^1H (200 MHz) em CDCl_3 obsevou-se um sinal em δ 9,12, compatível com o H-11 desse tipo de alcalóide. Esses dados em comparação com os da literatura

(Harrigan et al., 1994) permitiram propor a estrutura da *O*-metilmoscatolina, a qual está sendo relatada pela primeira vez em *F. longifolia*. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de *O*-metilmoscatolina estão sumarizados na Tabela 1.

A análise do óleo essencial, através de CG-EM, revelou como principais componentes sesquiterpenóides: [α -cadinol (12,5%), espatulenol (12,0%), δ -elemeno (4,2%), β -elemeno (3,8%), germacreno D (3,7%) e germacreno B (2,9%)].

Os resultados confirmam que *Fusaea longifolia* é uma espécie típica da família Annonaceae (Jumana et al., 2000) e são de grande importância quimiotaxônomica para o gênero *Fusaea*, pois é a primeira vez que o alcalóide estefolidina está sendo relatado no mesmo.

AGRADECIMENTOS

À Vicente Carlos de Oliveira Costa, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba pela obtenção dos espectros, ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Adams RP 2001. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
- Andrade EHA, Zoghbi MGB, Maia JGS 2003. Volatiles from *Aniba terminalis* Ducke. *J. Essent. Oil Res.* 15: 81-82.
- Brakuni DS, Gupta S 1975. Opium alkaloids XV: Isolation of stepholidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64: 1040.
- Braz-Filho R, Gabriel SJ, Gomes CMR, Gottlieb OR, Bichara MDGA, Maia JGS 1976. Oxoaporphine alkaloids from *Fusaea longifolia* and *Siparuna guianensis*. *Phytochemistry*, 15: 1187-1188.
- Brummitt RK 1992. *Vascular Plant - Families and Genera*, Royal Botanic Garden, Kew.
- Chatrou LW 1998. *Changing genera. Systematic studies in Neotropical and West African Annonaceae*. Herbarium division, Utrecht University.
- Correa MP 1984. *Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Ministério da Agricultura, RJ, p. 315

Harrigan GG, Gunatilaka AAL, Kingston DGI, Chan GW, Johnson RK 1994. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two Annonaceous plants, *Xylopiya aethiopica* and *X. miliusa* cf. Banacea. *J. Nat. Prod.*, 57: 68-73.

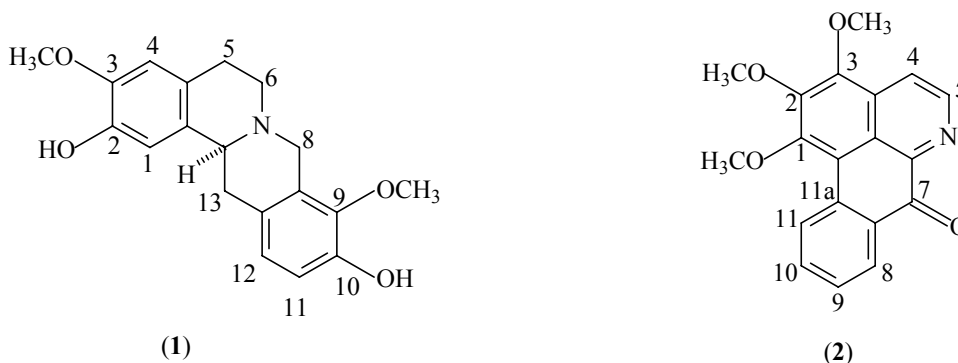
Hegnauer R 1964. *Chemotaxonomie der Pflanzen. Basileia e Suttgart*, Birkhauser Verlag.

Hutchinson J 1973. *The Families of Flowering Plants*, Oxford, Clarendon Press.

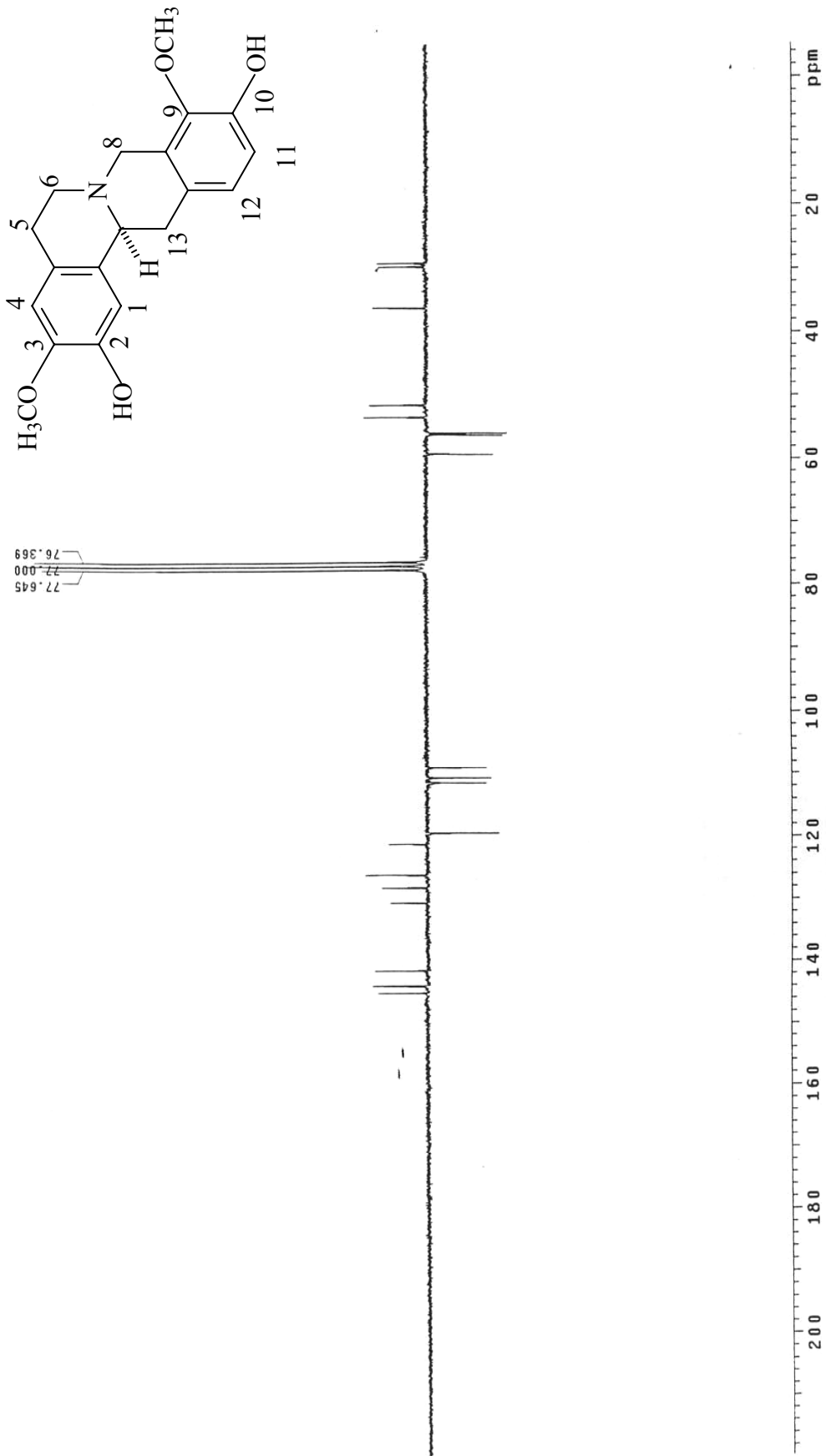
Jumana S, Asan CM, Rashid MA 2000. Alkaloids from *Miliusa velutina*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 483-485.

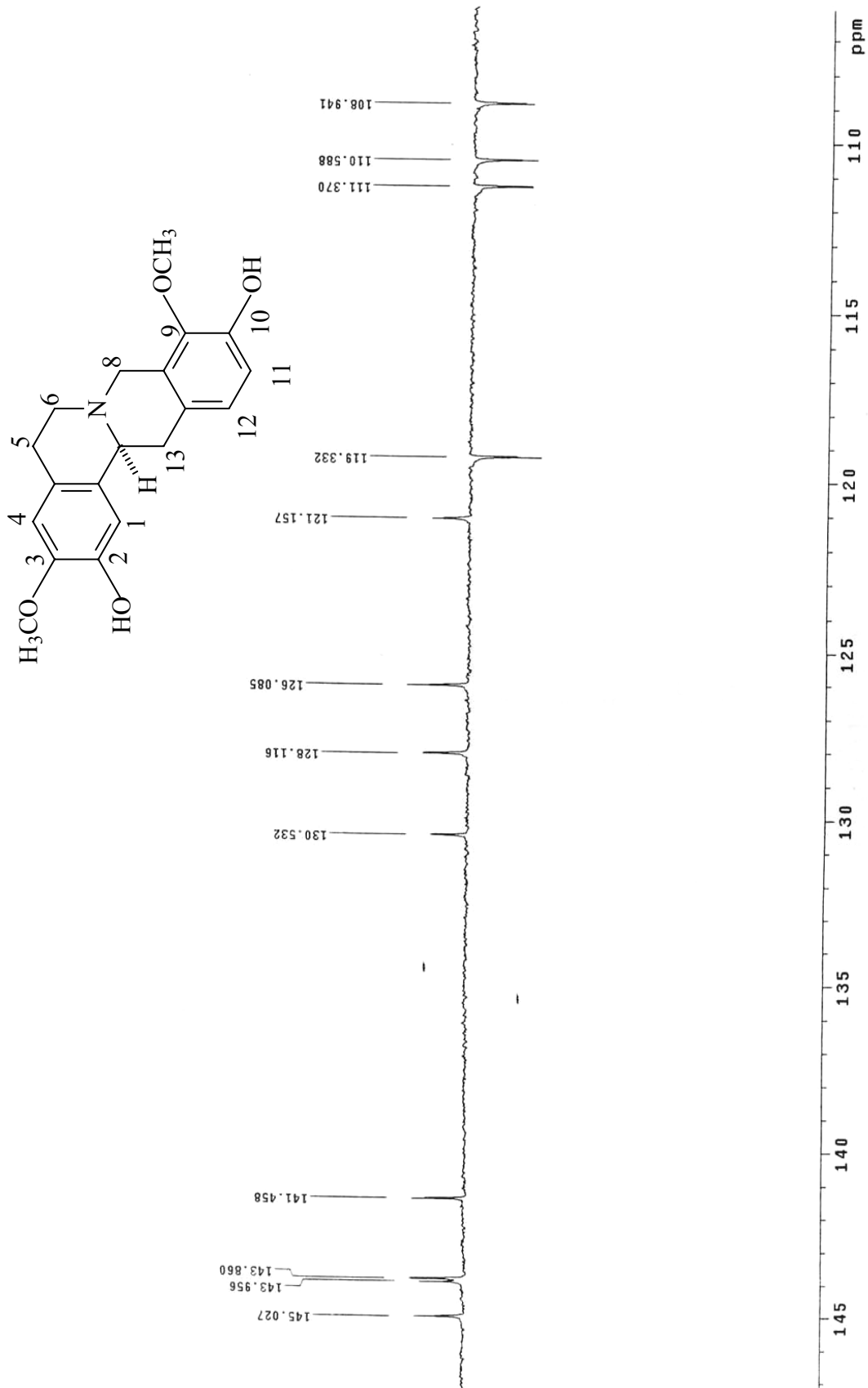
Leboeuf M, Cave A, Bhaaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21: 2783-2813.

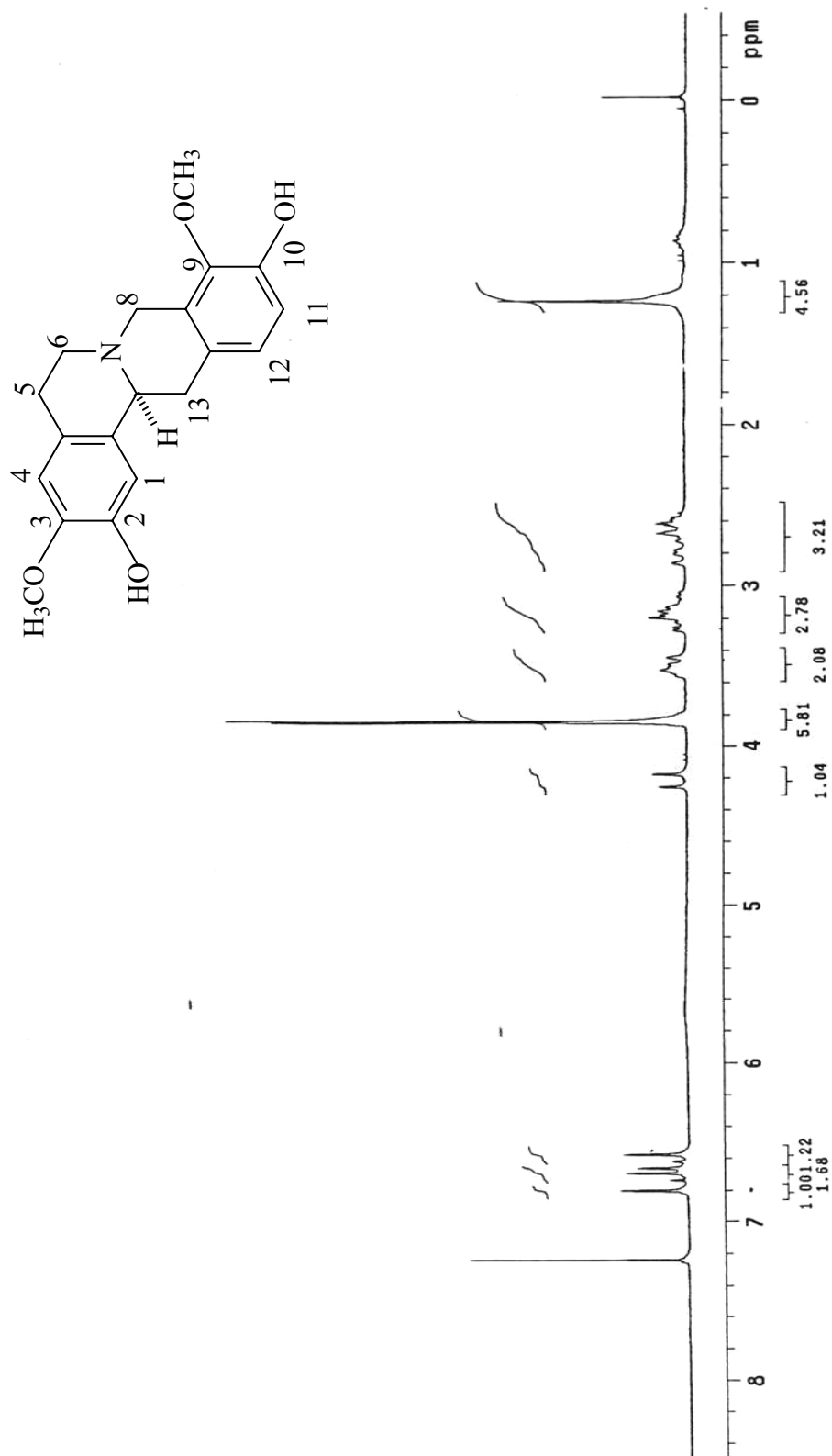
Maas PJM, Kamer HMV, Junikka L, Mello-Silva R. and Rainer H 2001. Annonaceae from Central-eastern Brazil, *Rodriguésia* 52: 65-98.

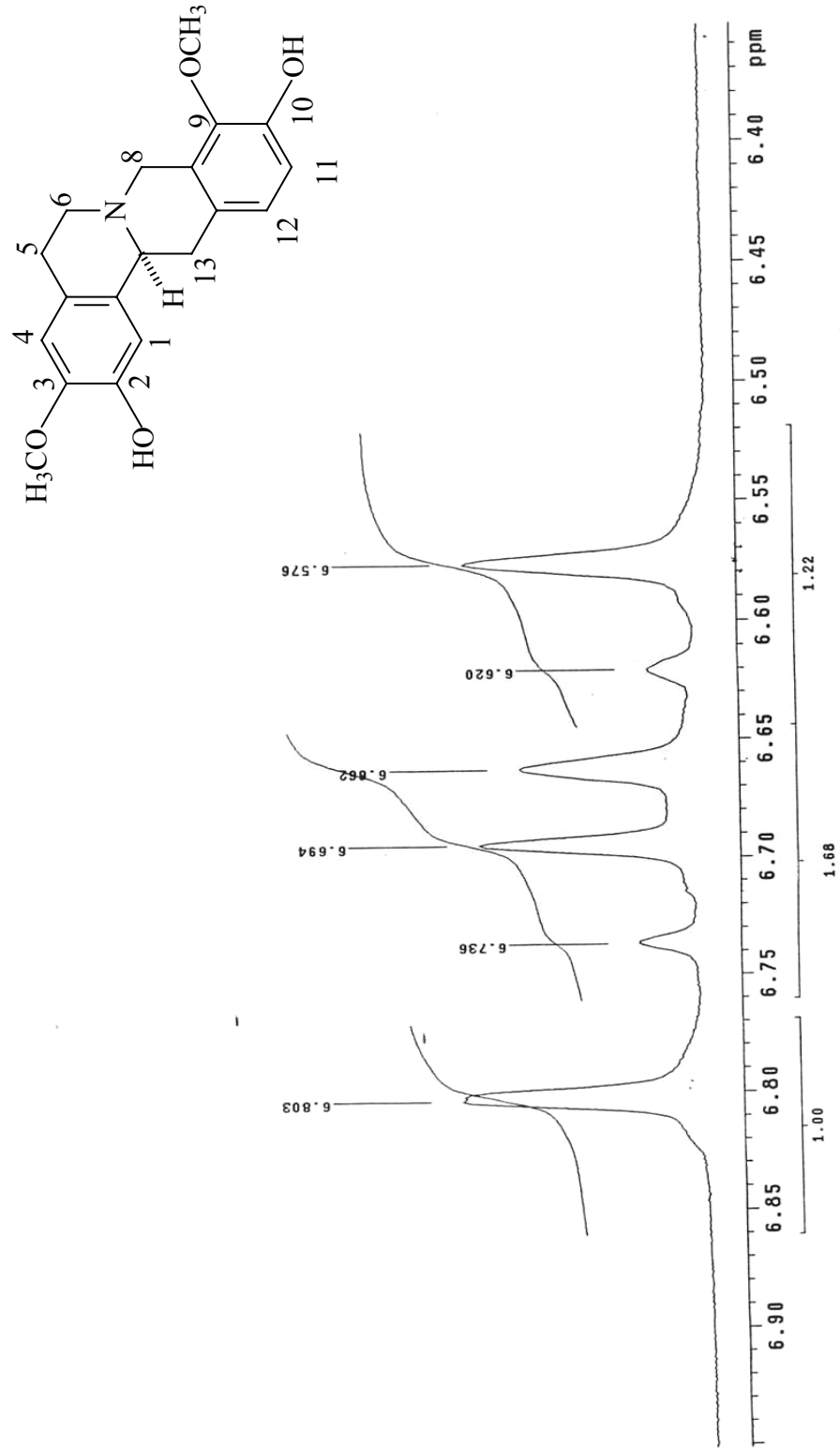
Tabela 1. Dados de RMN (^1H : 200 MHz; ^{13}C : 50 MHz, CDCl_3 , δ) dos alcalóides **1** e **2**

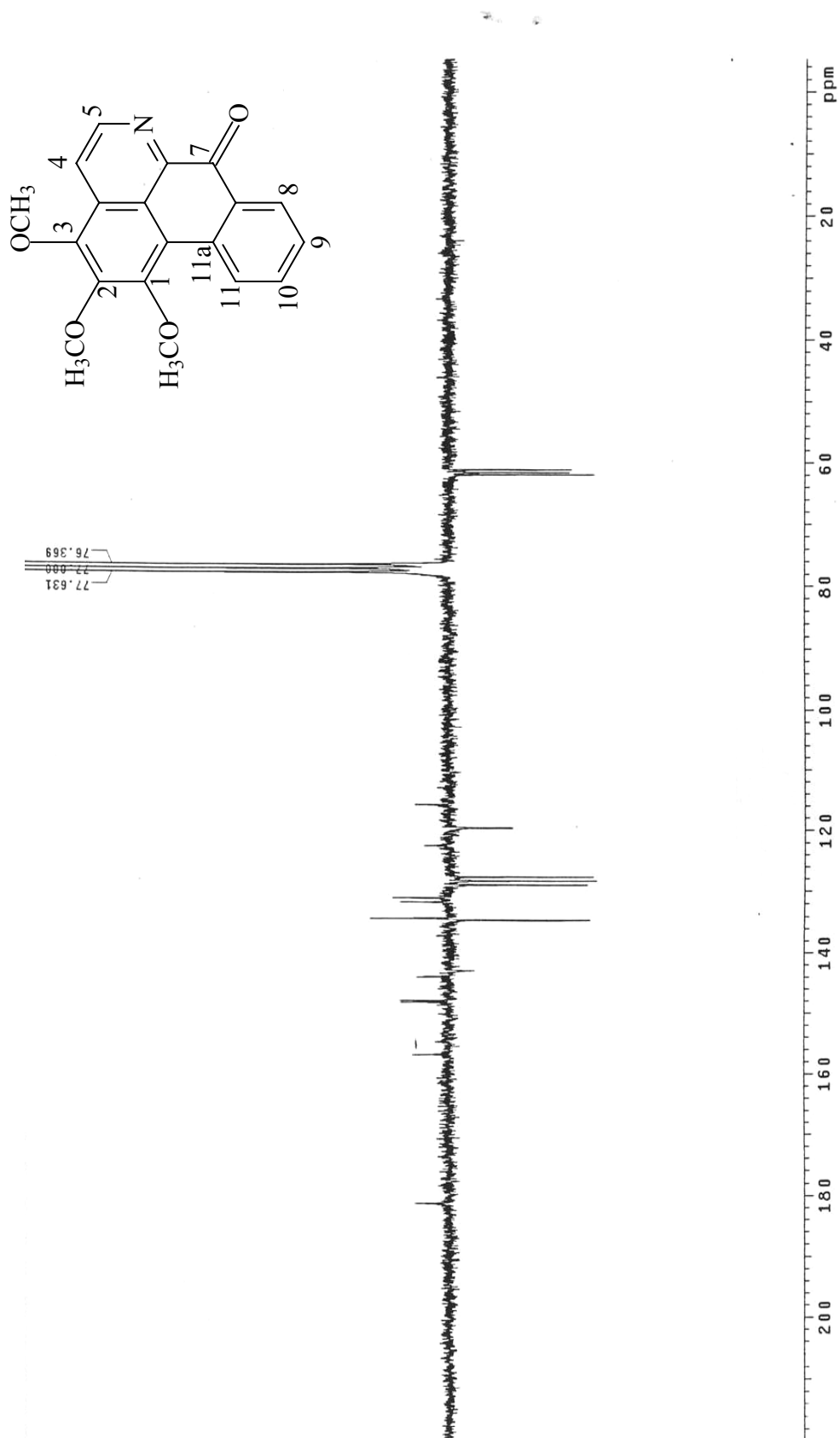
Carbonos	Substâncias			
	$\delta_{\text{C}} 1$	$\delta_{\text{C}} 2$	$\delta_{\text{H}} 1$	$\delta_{\text{H}} 2$
C				
1	-	156,6	-	-
2	145,0	147,5	-	-
3	143,8	148,6	-	-
3a	-	131,3	-	-
4a	130,5	-	-	-
6a	-	145,7	-	-
7	-	182,4	-	-
7a	-	131,6	-	-
8a	128,1	-	-	-
9	141,4	-	-	-
10	143,9	-	-	-
11a	-	134,7	-	-
11b	-	115,9	-	-
11c	-	123,0	-	-
12a	121,1	-	-	-
13b	126,0	-	-	-
CH				
1	110,5	-	6,80 (<i>s</i>)	-
4	111,4	119,3	6,57 (<i>s</i>)	8,21 (<i>d</i> , $J = 5,2$ Hz)
5	-	144,8	-	8,99 (<i>d</i> , $J = 5,2$ Hz)
8	-	129,1	-	8,56 (<i>dd</i> , $J = 7,7; 1,6$ Hz)
9	-	128,4	-	7,55 (<i>dt</i> , $J = 7,7; 0,8$ Hz)
10	-	134,5	-	7,76 (<i>dt</i> , $J = 7,7; 2,8$ Hz)
11	108,9	127,8	6,70 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	9,12 (<i>dd</i> , $J = 7,7; 0,6$ Hz)
12	119,3	-	6,62 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	-
13a	59,1	-	3,25 (<i>m</i>)	-
CH₂				
5	29,1	-	3,15; 2,58 (<i>m</i>)	-
6	51,5	-	3,17; 2,65 (<i>m</i>)	-
8	53,5	-	4,20; 3,48 (<i>d</i> , $J = 15,6$ Hz)	-
13	36,2	-	3,47; 2,57 (<i>m</i>)	-
OCH₃				
1	-	61,2	-	4,02 (<i>s</i>)
2	-	61,6	-	4,09 (<i>s</i>)
3	56,1	62,0	3,85 (<i>s</i>)	4,12 (<i>s</i>)
9	55,0	-	3,84 (<i>s</i>)	-

FIGURA 75: Espectro de RMN ^{13}C -APT de estefolidina (CDCl_3 , 50 MHz)

FIGURA 76: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de estefolidina (CDCl_3 , 50 MHz)

FIGURA 77: Espectro de RMN de ^1H de estefolidina (CDCl_3 , 200 MHz)

FIGURA 78: Expansão do espectro de RMN de ^1H de estefolidina (CDCl_3 , 200 MHz)

FIGURA 79: Espectro de RMN ^{13}C -APT de O-metilinoscatolina (CDCl_3 , 50 MHz)

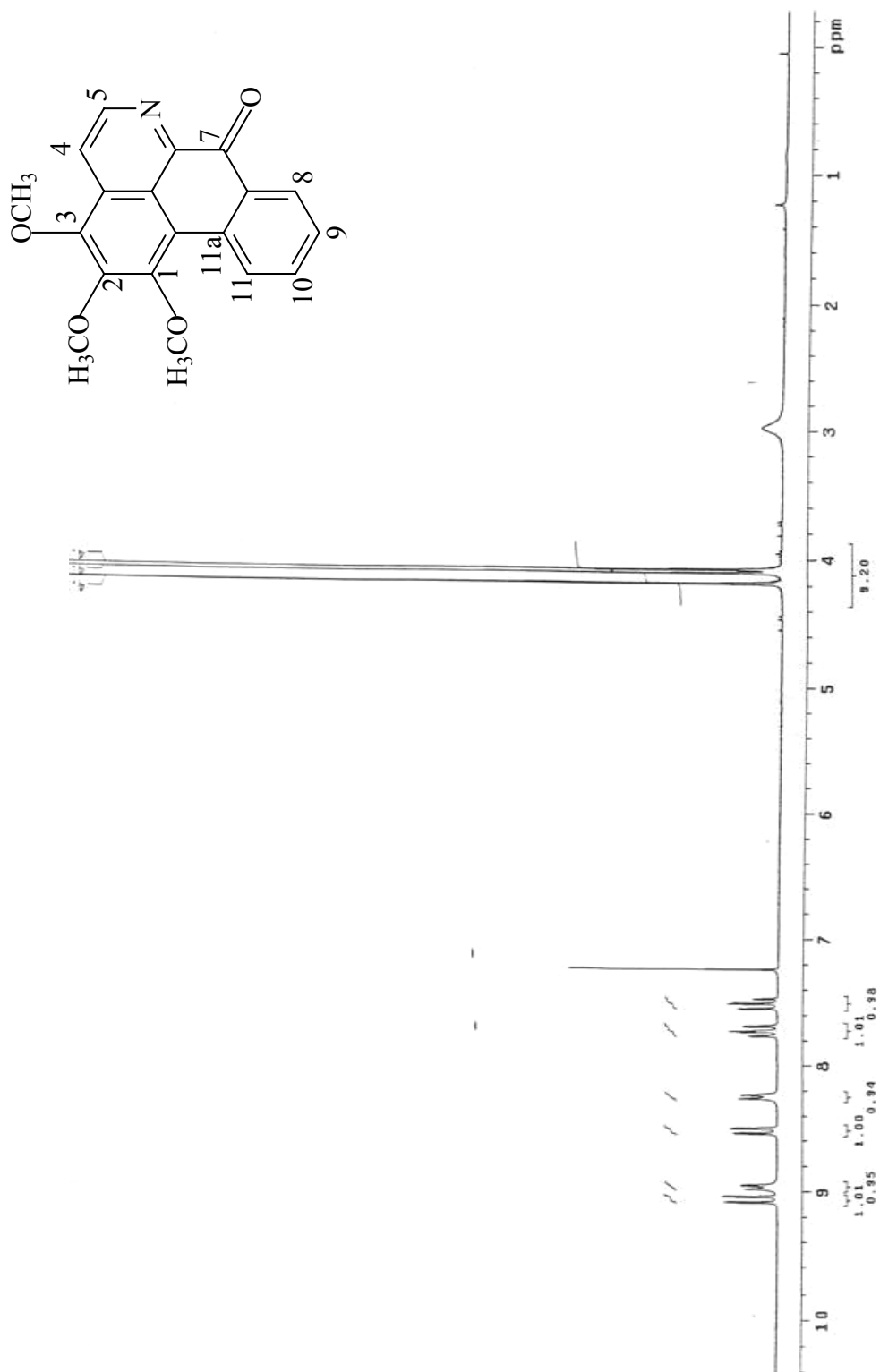
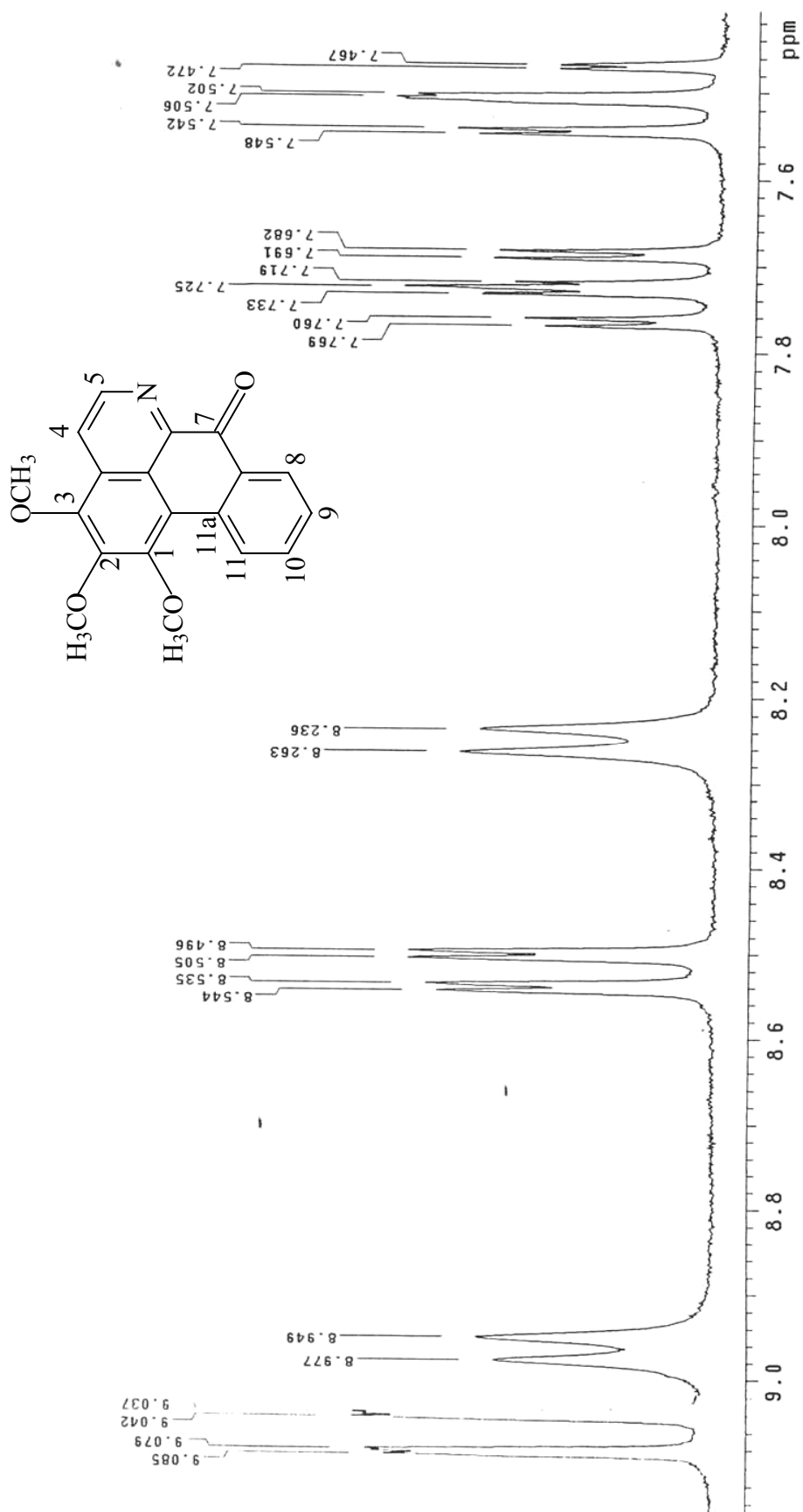


FIGURA 80: Espectro de RMN de ¹H de O-metilmoscatoлина (CDCl₃, 200 MHz)

FIGURA 81: Expansão do espectro de RMN de ^1H de *O*-metilmuscatoлина (CDCl_3 , 200 MHz)

**OUTROS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *XYLOPIA*
LANGSDORFFIANA ST-Hil. & TUL.**

4.6. Outros Constituintes Químicos de *Xylopi langsdorffiana*

RESUMO

Xylopi langsdorffiana St-Hil & Tul é conhecida popularmente como pimenteira-da-terra. Pertence à família Annonaceae que é constituída por 2.300 espécies e 130 gêneros com distribuição pantropical. Dessa espécie já foram isolados alcalóides e diterpenos. Neste trabalho reportamos o isolamento e identificação estrutural do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo, um feoforbideo que está sendo relatado pela primeira vez no reino vegetal, o flavonóide glicosilado quercetina 3-*O*- α -L-raminosídeo e o beta sitosterol glicosilado (ambos relatados pela primeira vez na espécie).

Dando continuidade ao fracionamento do extrato hexânico, este foi cromatografado em coluna de sílica gel utilizando-se como fase móvel hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade fornecendo 98 frações de 125mL cada. Estas frações foram reunidas após análise usual por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

O grupo de frações 08-27 foi recromatografado da mesma forma fornecendo a substância **1**. Após análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, IV e EM foi possível identificar **1** como sendo 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo, relatado pela primeira vez em uma esponja do gênero *Dysidea*, sendo este o primeiro relato como produto de planta. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais dessa substância estão compilados na Tabela 4 (pág. 152) e os espectros são mostrados nas figuras de 82 a 91 (págs. 127 a 133). A fração clorofórmica foi cromatografada em coluna de sílica gel utilizando-se como fase móvel hexano, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade fornecendo 95 frações de 125mL cada. Estas frações foram reunidas após análise usual por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). O grupo de frações 19-24 apresentou um precipitado que, após recristalização com metanol a quente, forneceu a substância **2**. O grupo de frações 58-60 foi submetido a uma filtração em gel de Sephadex LH-20, utilizando-se uma mistura de CHCl_3 -MeOH (1:1), obtendo-se 10 frações de 5mL cada. A fração 5 apresentou precipitado que, após lavagem com clorofórmio, forneceu a substância **3**. Após análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foi possível identificar **2** como sendo o sitosterol-3-*O*- β -D-glicosídeo e **3** o flavonoide Quercetina-3-*O*- α -L-raminosídeo. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **3** estão compilados na Tabela 5 (pág. 165). Os espectros das três substâncias são mostrados nas Figuras de 82 a 103 (págs. de 142 a 158 e 159 a 164).

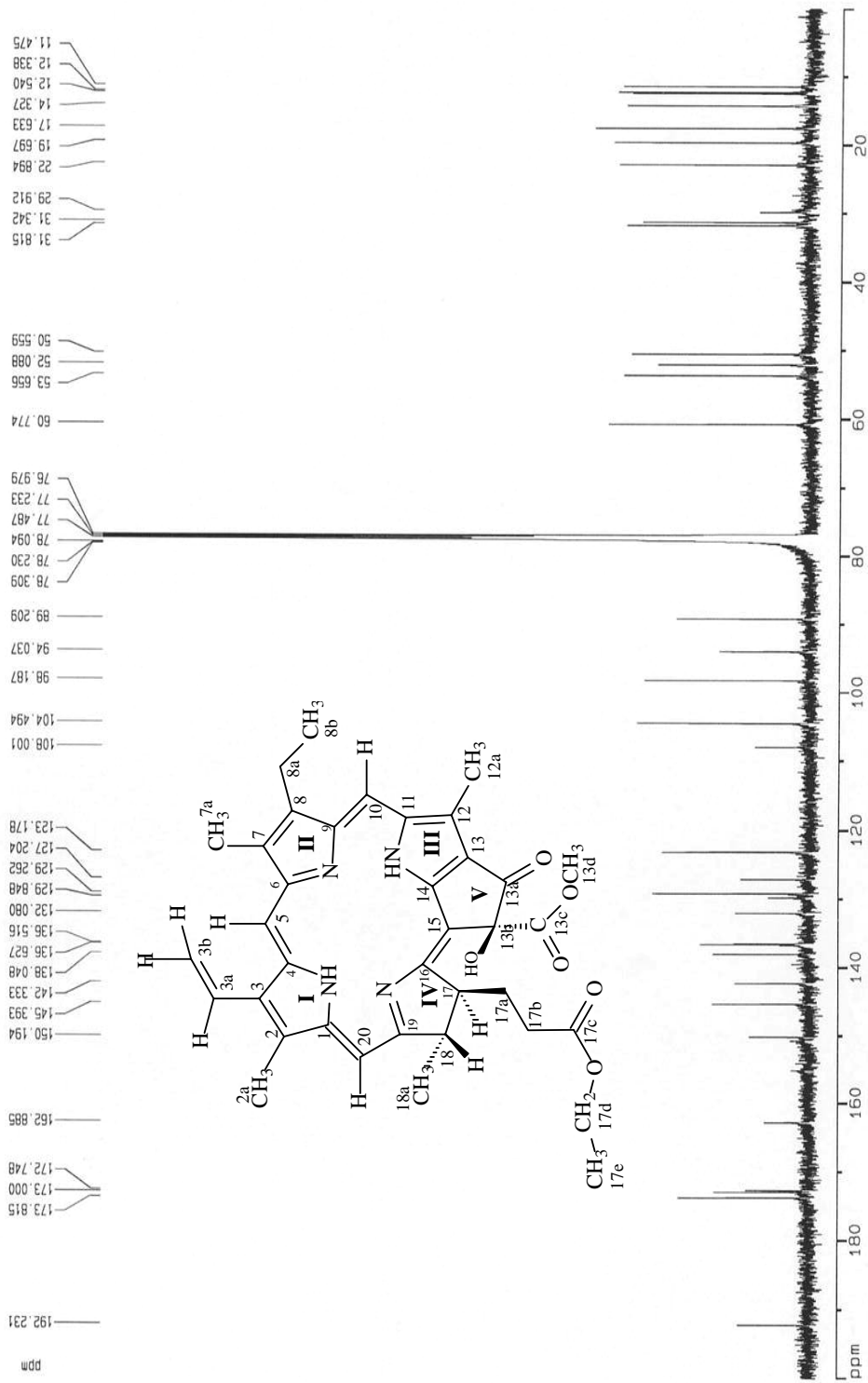


FIGURA 82: Espectro de RMN ^{13}C -H BBD do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 125 MHz)

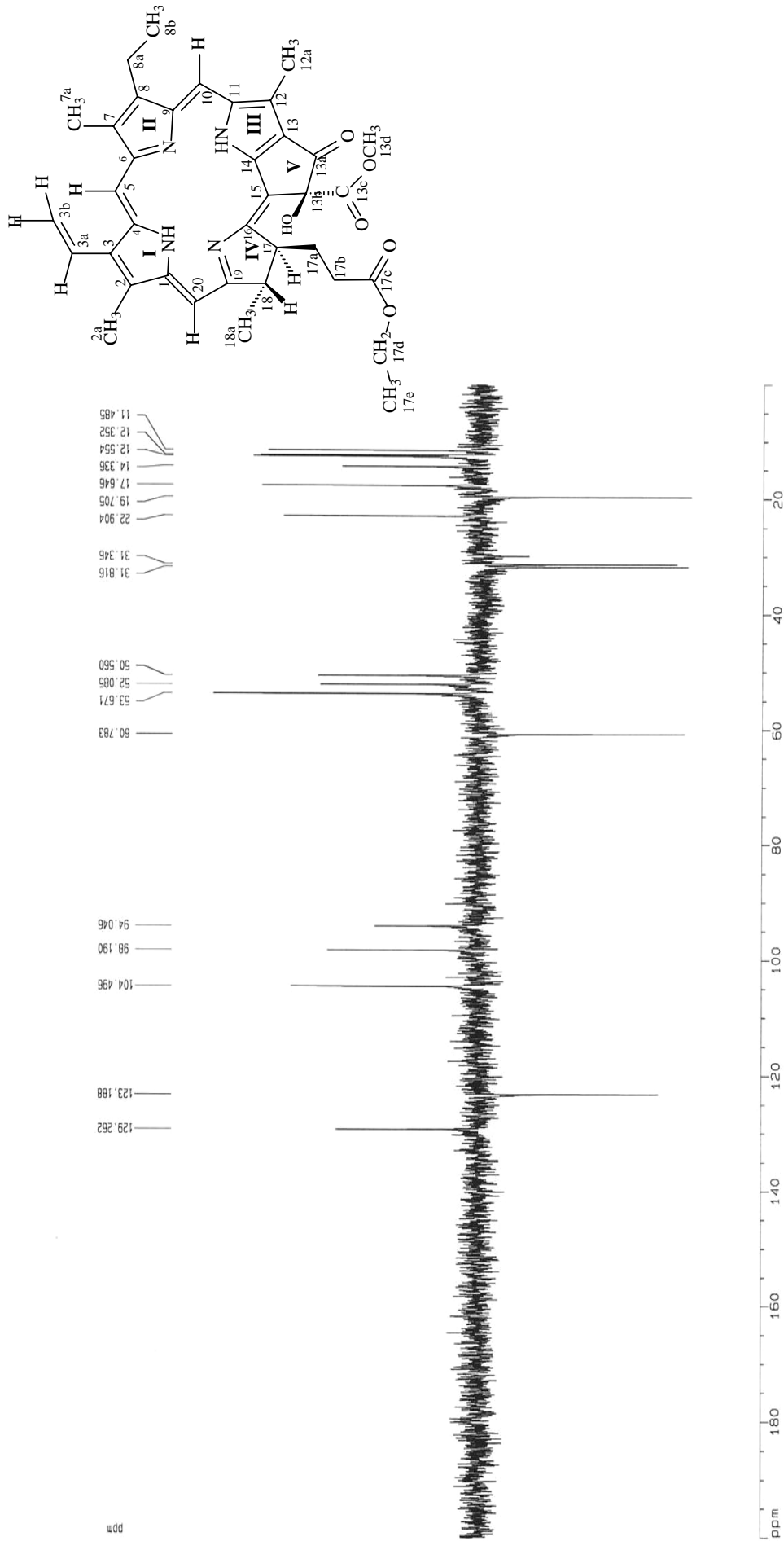


FIGURA 83: Espectro de RMN ¹³C-DEPT-135 do 13b (S)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl₃, 125 MHz)

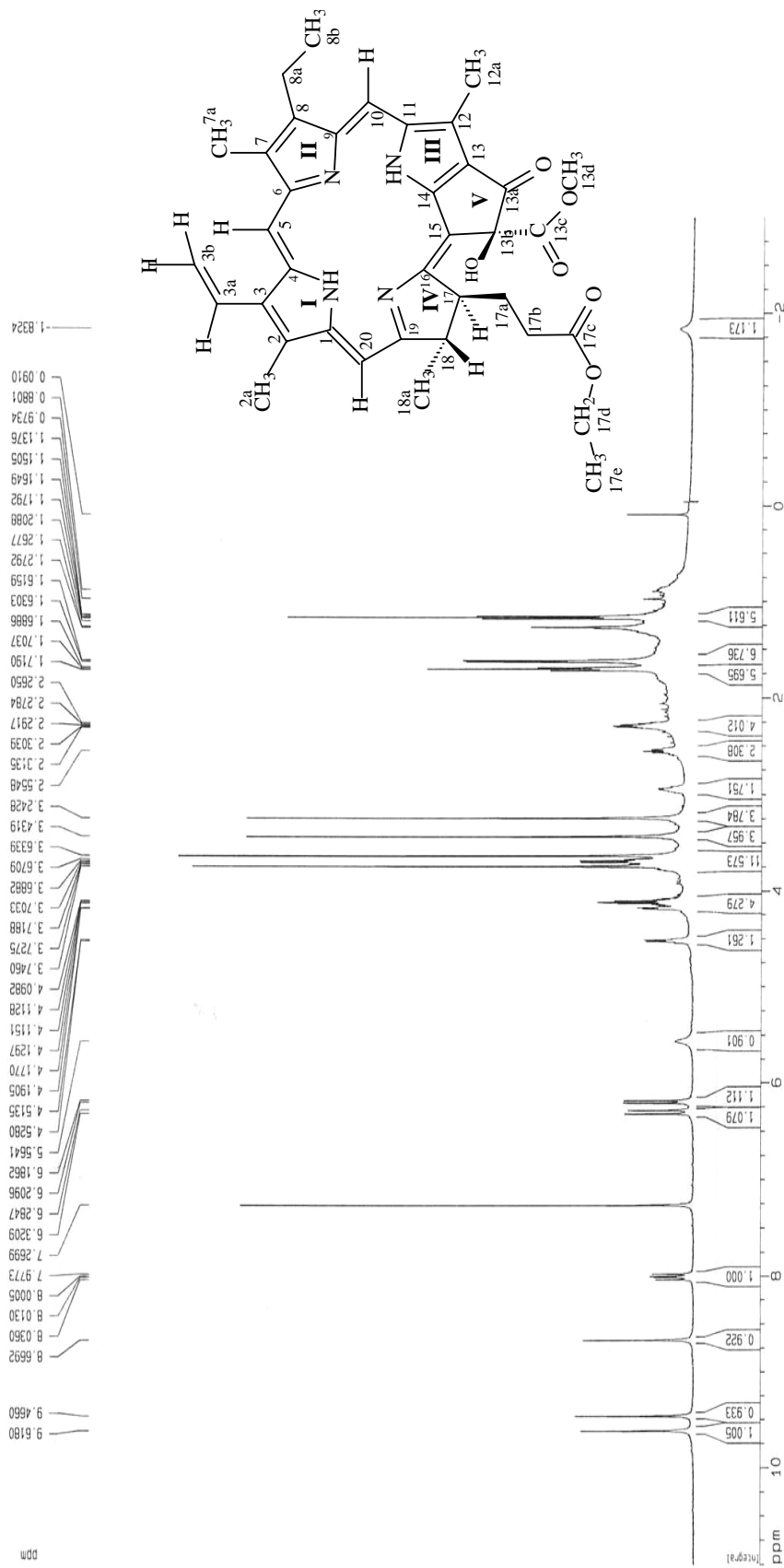


FIGURA 84: Espectro de RMN de ¹H do 13b (S)-hidroxi-17c-etoxiforbideo (CDCl₃, 500 MHz)

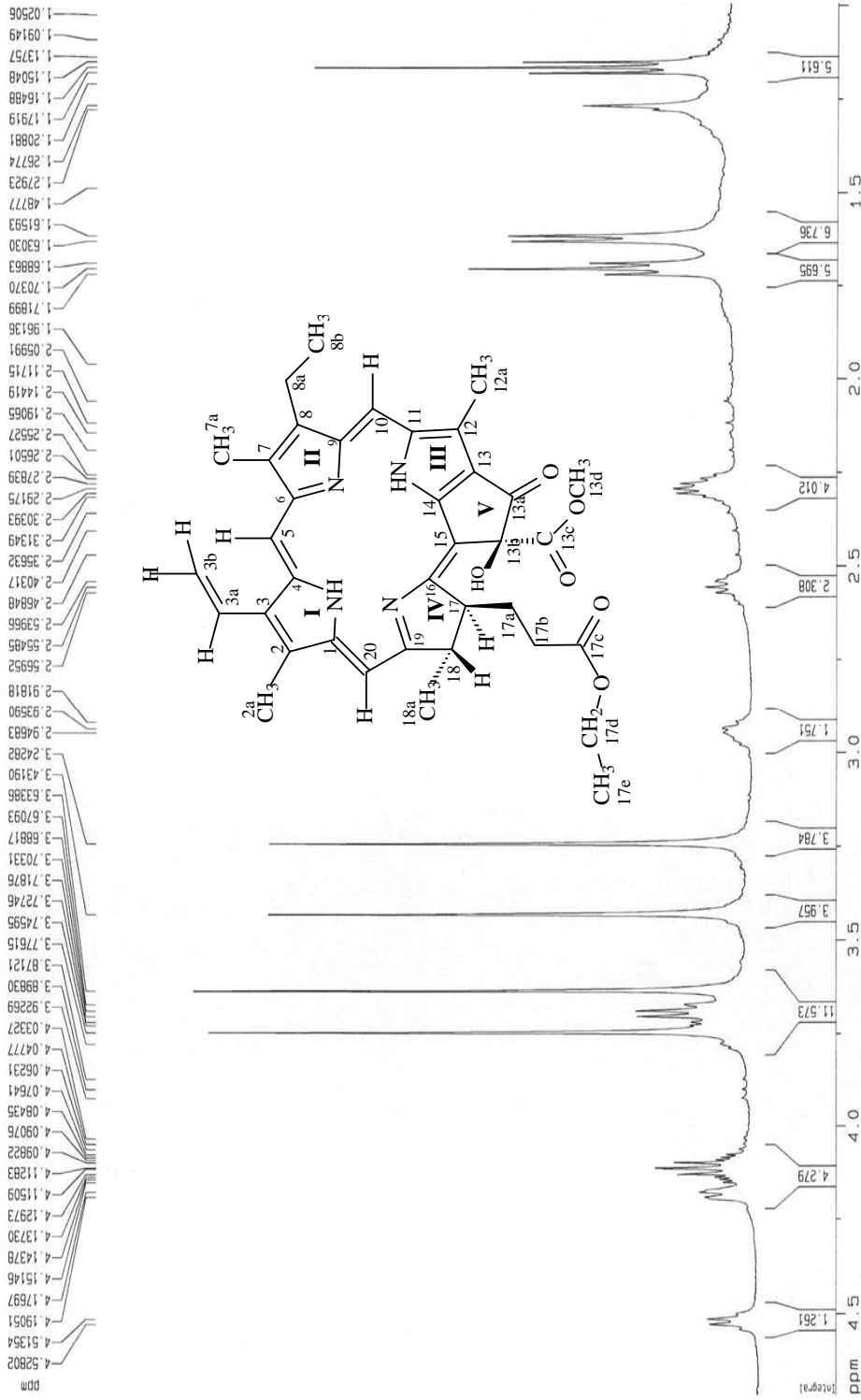


FIGURA 86: Expansão do espectro de RMN de ^1H do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo na região de 1,0 a 5,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

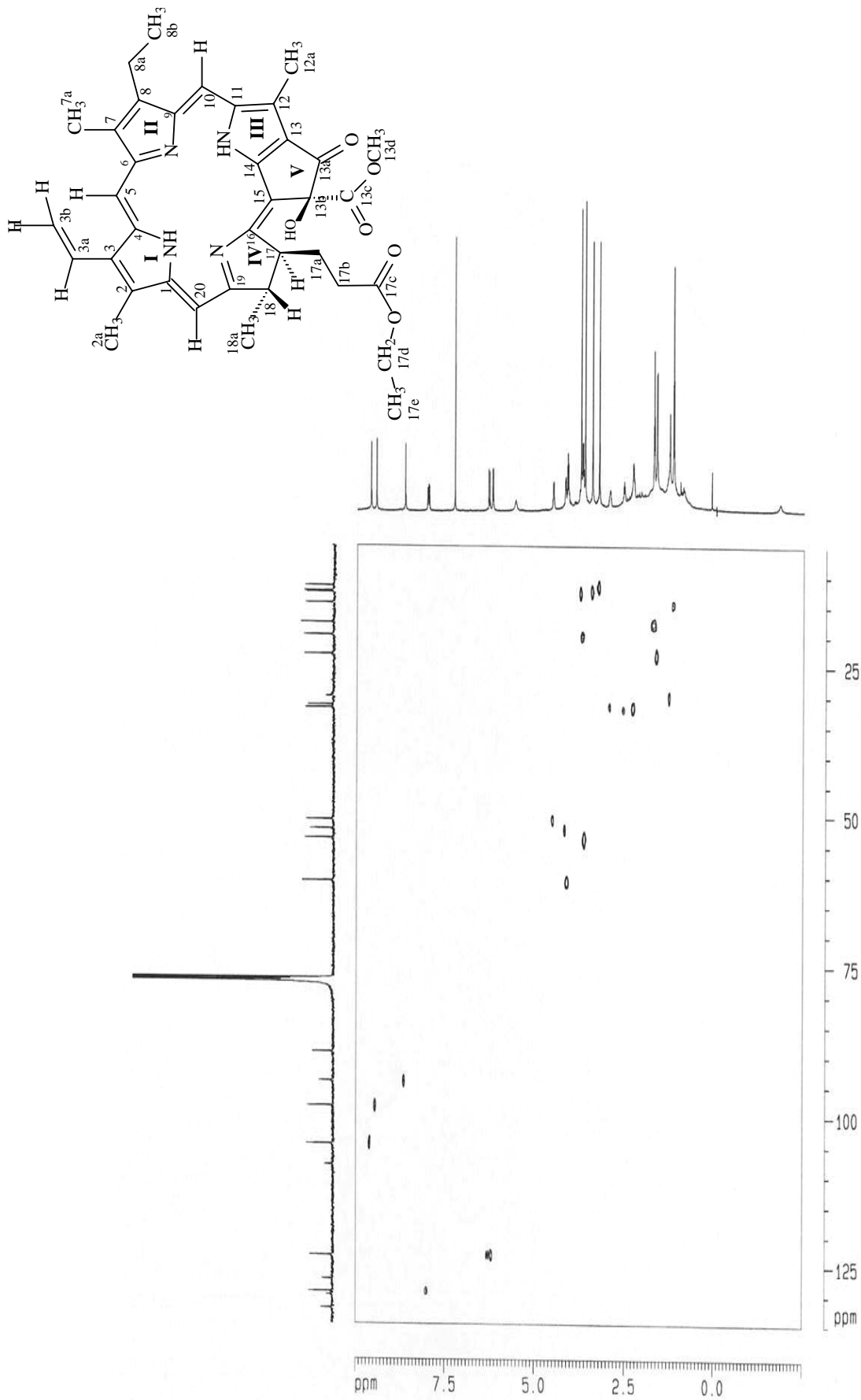


FIGURA 87: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMQC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

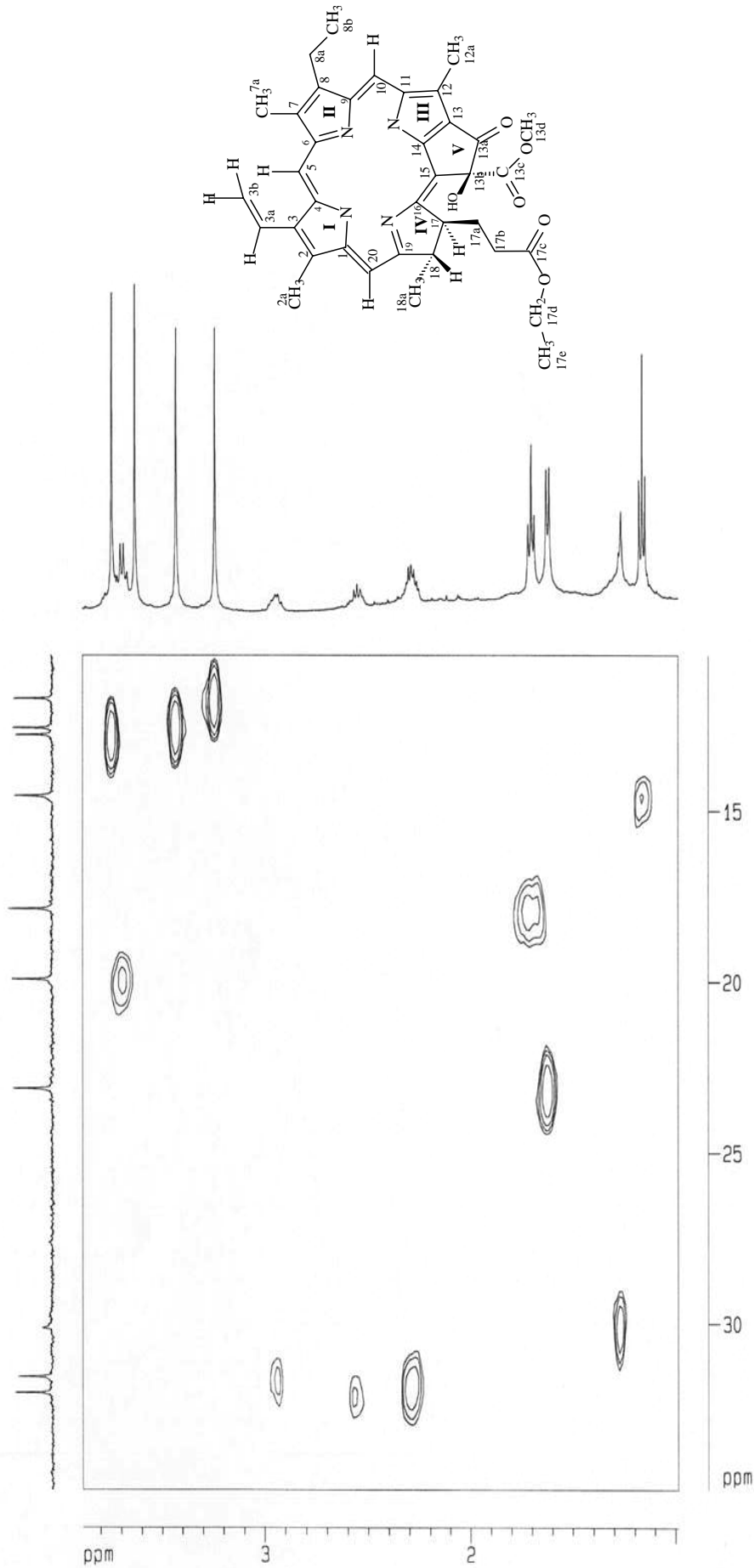


FIGURA 88: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMQC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

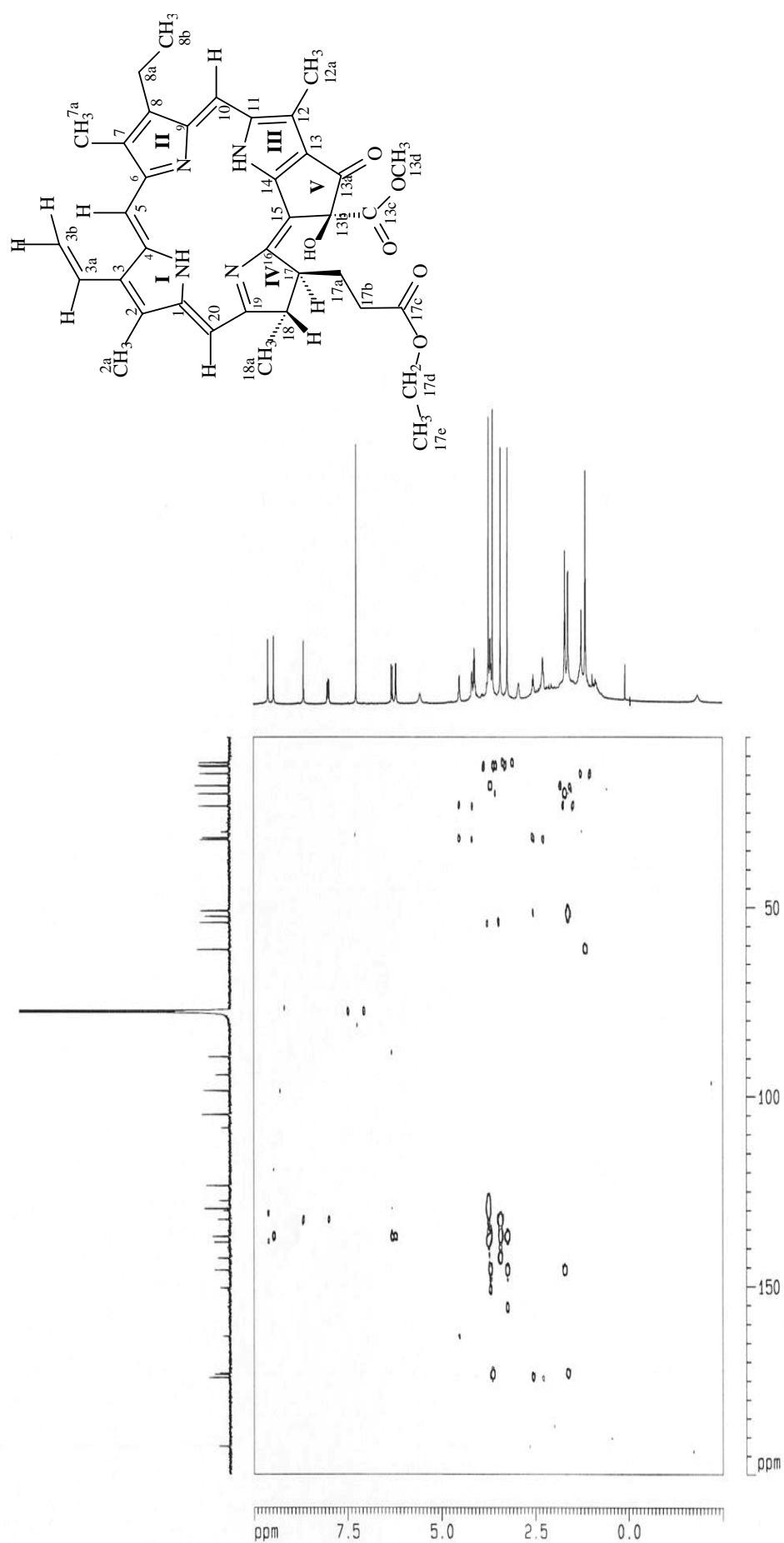


FIGURA 89: Espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

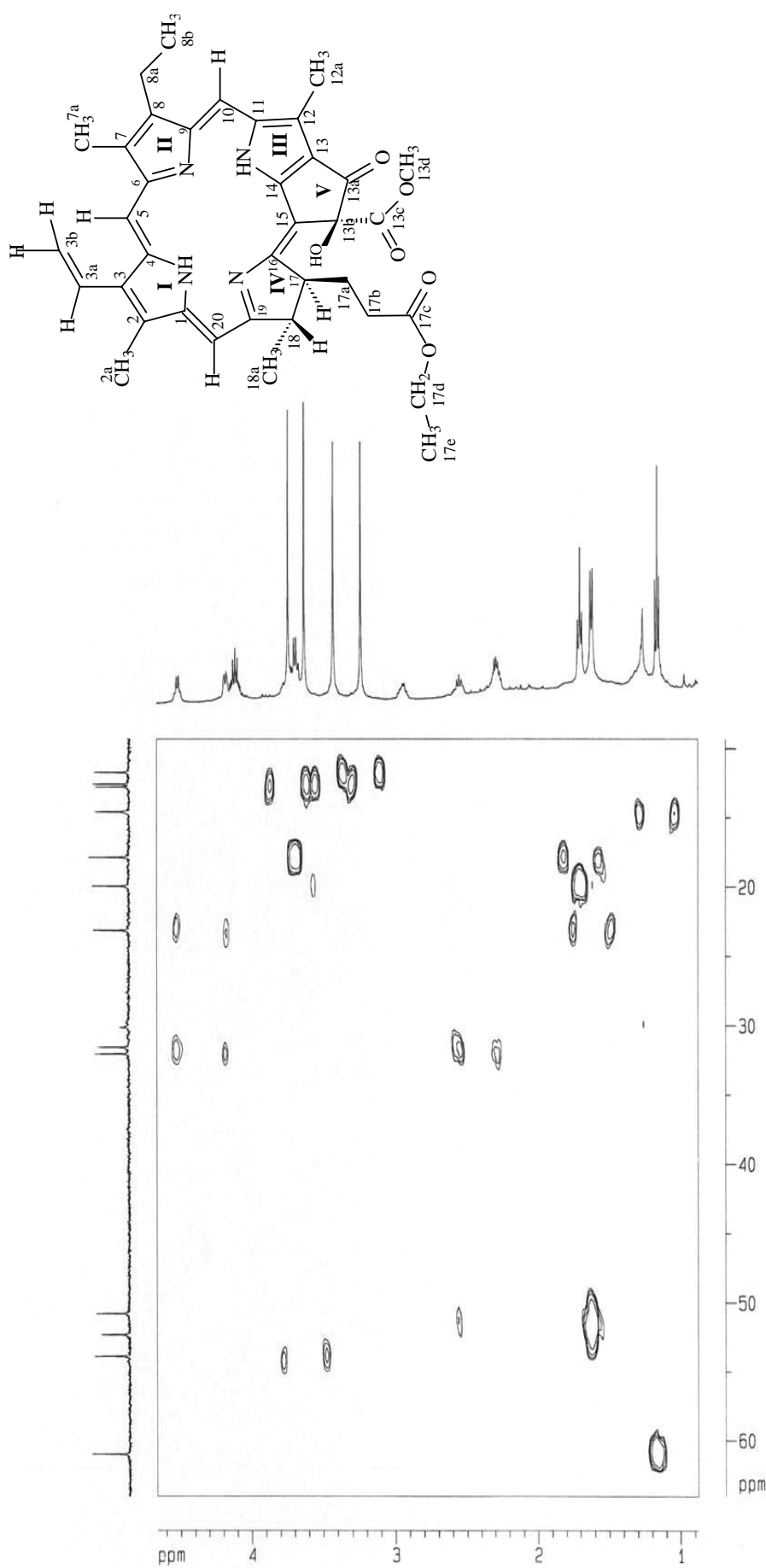


FIGURA 90: Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C -HMBC do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo (CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente)

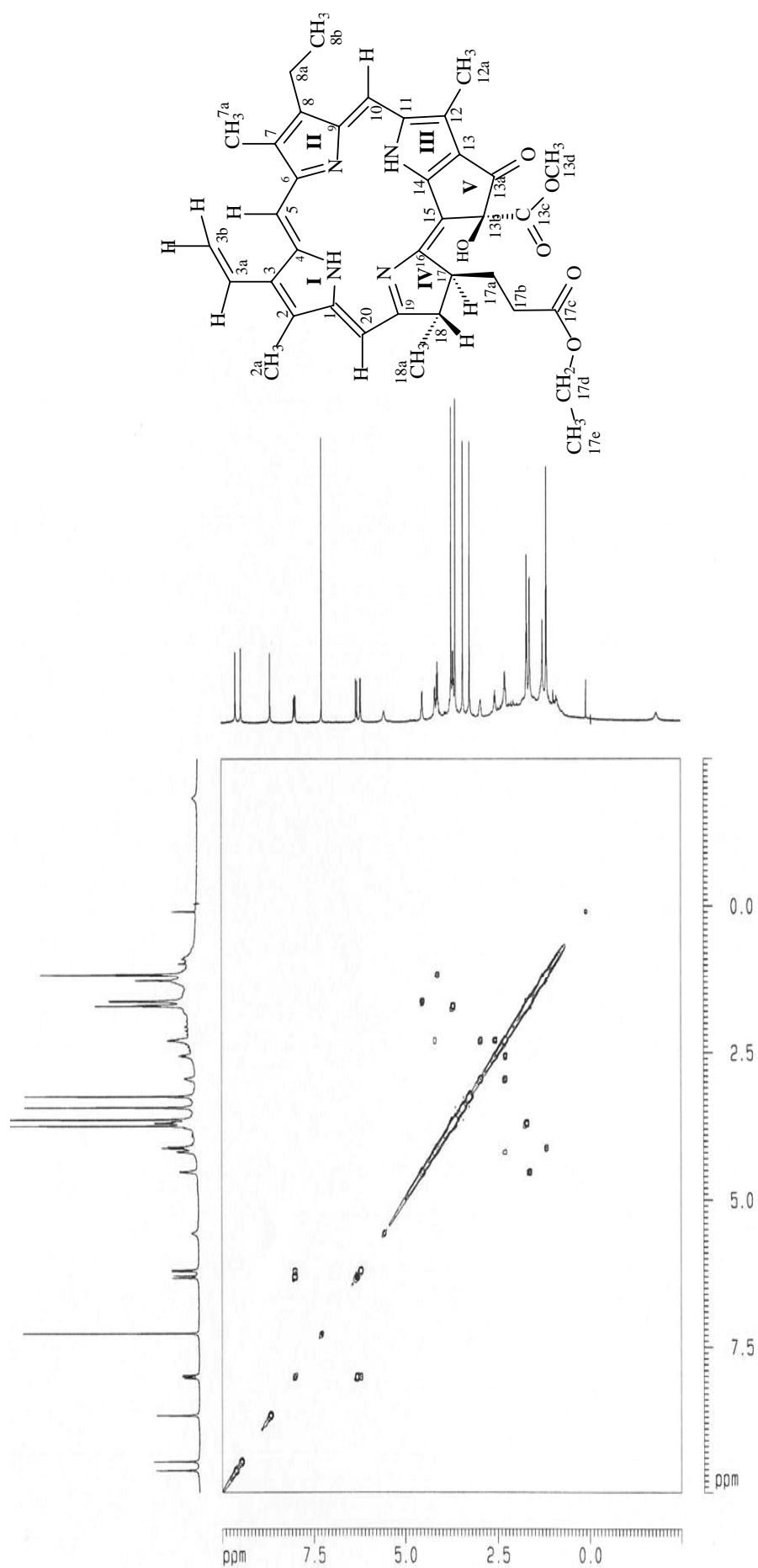
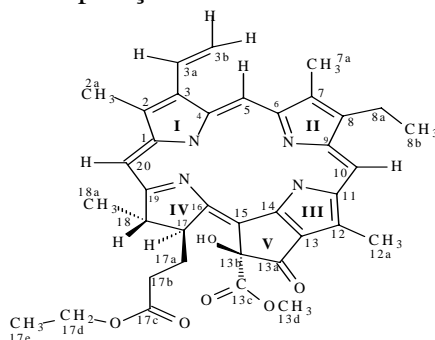


FIGURA 91: Espectro de correlação ¹H x ¹H-NOESY do 13b (S)-hidroxi-17c-etoxifeoforbideo (CDCl₃, 500 MHz)

Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 13b (*S*)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo em CDCl_3 a 500 e 125 MHz, respectivamente e comparação com a literatura



N ^o	13b (<i>S</i>)-hidroxi-17c-etoxifaeoforbideo,		M0-1/ CDCl_3 / JIN et al., 2005	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	142,3		144,8
2	-	132,0		131,9
2a	3,44 (s)	12,3	3,45 (s)	12,5
3	-	136,5		137,3
3a	8,00 (dd, 17,7, 11,4)	129,2	8,06 (dd, 17,5, 11,5)	129,4
3b1	6,30 (dl, 17,7)	123,1	6,31 (dl, 17,5)	123,8
3b2	6,19 (dl, 11,4)		6,20 (dl, 11,5)	
4	-	136,6		137,2
5	9,46 (s)	98,1	9,51 (s)	98,4
6	-	155,0		155,6
7	-	136,6		137,2
7a	3,24 (s)	11,4	3,30 (s)	11,7
8	-	145,3		145,4
8a	3,72 (q, 7,2)	19,7	3,72 (m)	20,0
8b	1,70 (t, 7,7)	17,6	1,71 (t, 7,5)	17,7
9	-	150,1		151,9
10	9,61 (s)	104,4	9,65 (s)	104,8
11	-	138,0		138,4
12	-	129,8		129,4
12a	3,63 (s)	12,6	3,66 (s)	12,8
13	-	127,2		127,1
13a	-	192,2		192,2
13b	-	89,2		89,5
13c	-	172,7		173,9
13d	3,74 (s)	53,6	3,76 (s)	53,9
14	-	150,1		150,0
15	-	104,4		104,9
16	-	162,8		163,1
17	4,18 (m)	52,0	4,16 (m)	52,5
17a	2,29 (m)	31,8	2,29 (m)	31,6
17b	2,94, 2,53 (m)	31,3	2,92, 2,52 (m)	32,0
17c	-	173,8		173,9
17d	4,11 (q, 7,2)	60,7	4,10 (q, 7,0)	63,3
17e	1,16 (t, 7,2)	14,3	1,14 (t, 7,0)	14,5
18	4,52 (m)	50,5	4,50 (m)	50,9
18a	1,62 (d, 7,2)	22,9	1,63 (d, 7,0)	23,1
19	-	173,0		173,3
20	8,66 (s)	94,0	8,66 (s)	95,1
13b-OH	5,56 (sl)		5,55 (sl)	

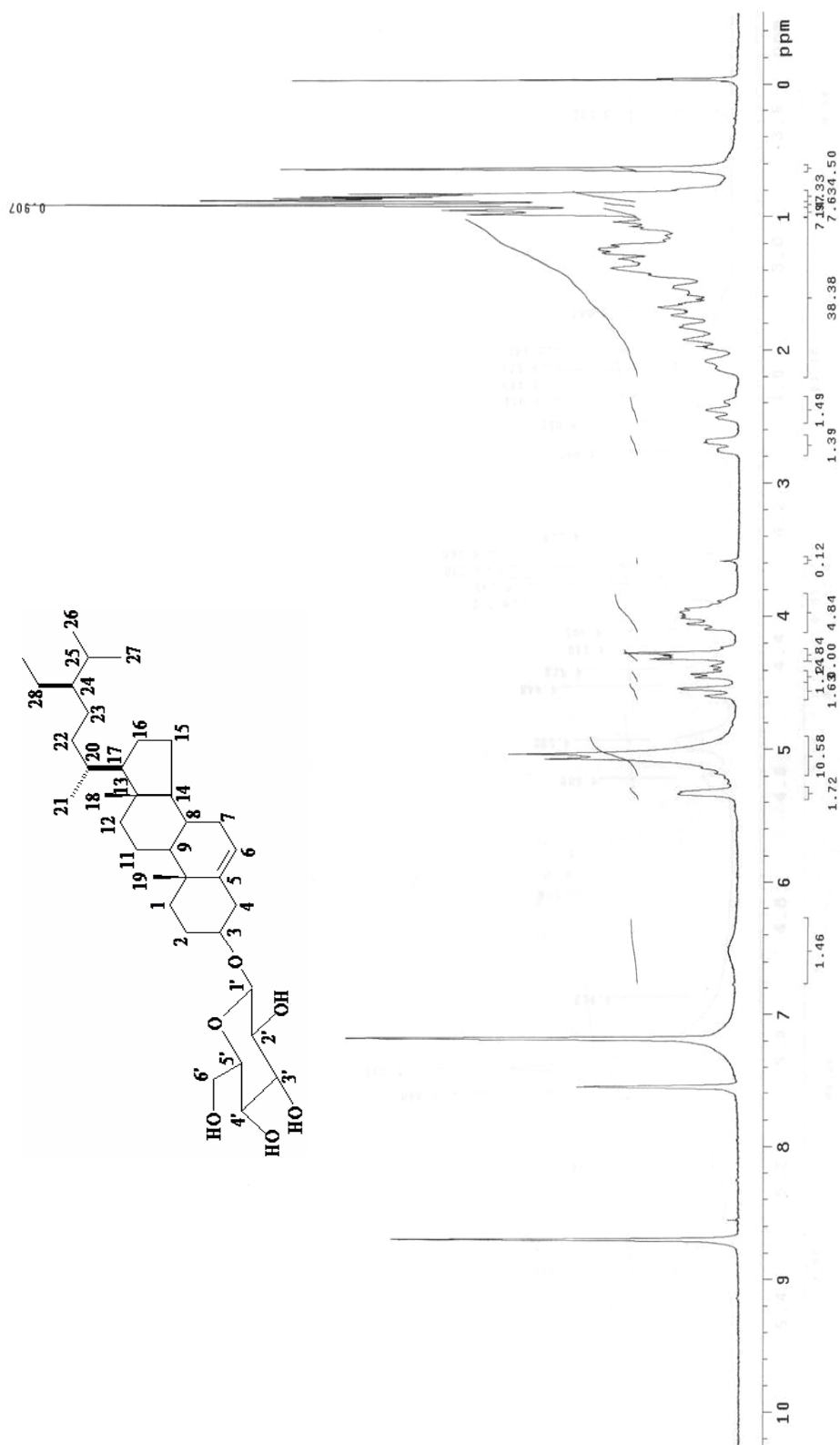


FIGURA 92: Espectro de RMN de ^1H do sitosterol-3-O- β -D-glicosido ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz)

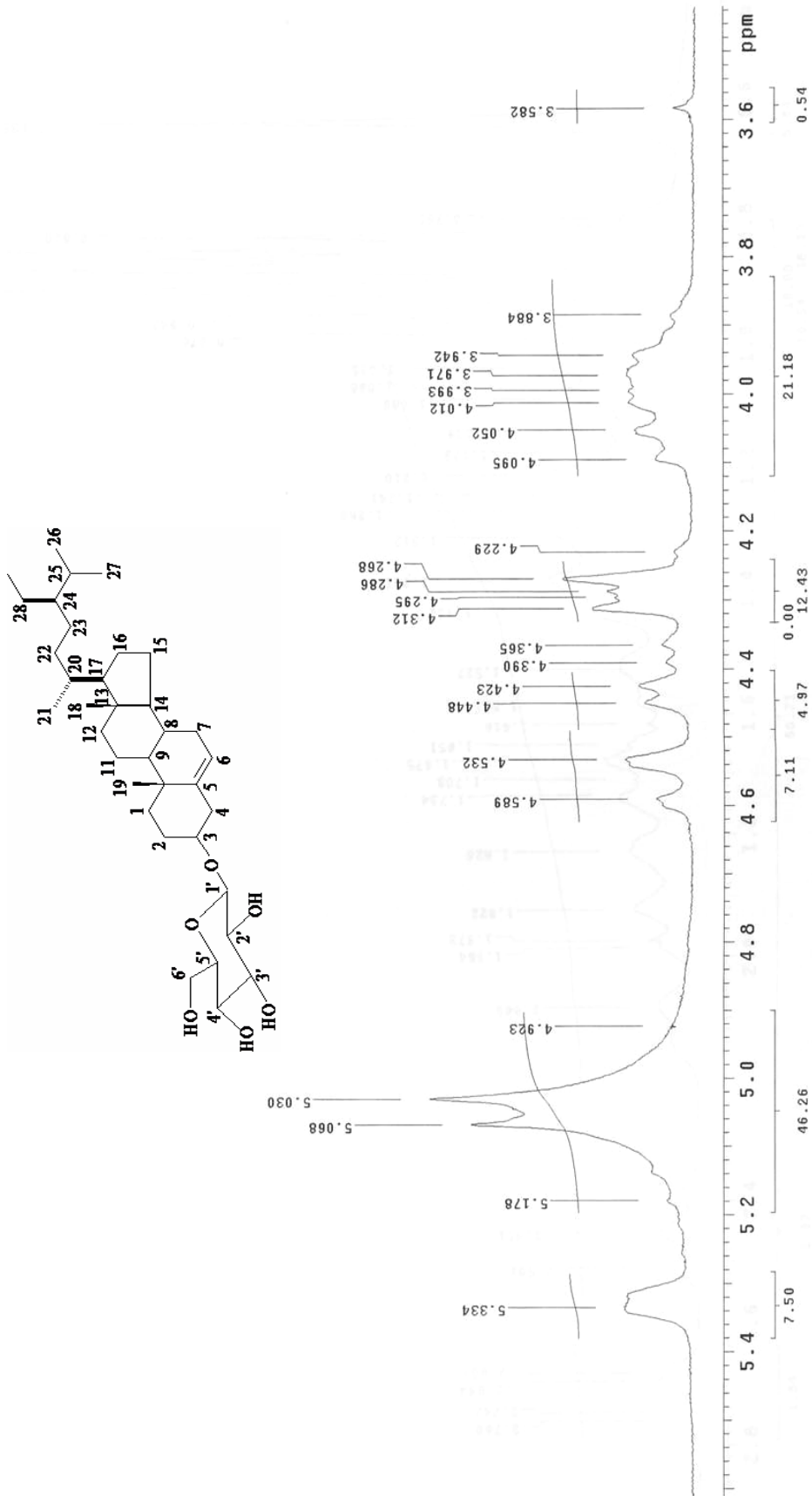


FIGURA 93: Expansão do espectro de RMN de ¹H do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo na região de 3,6 a 5,4 ppm (C₅D₅N, 200 MHz)

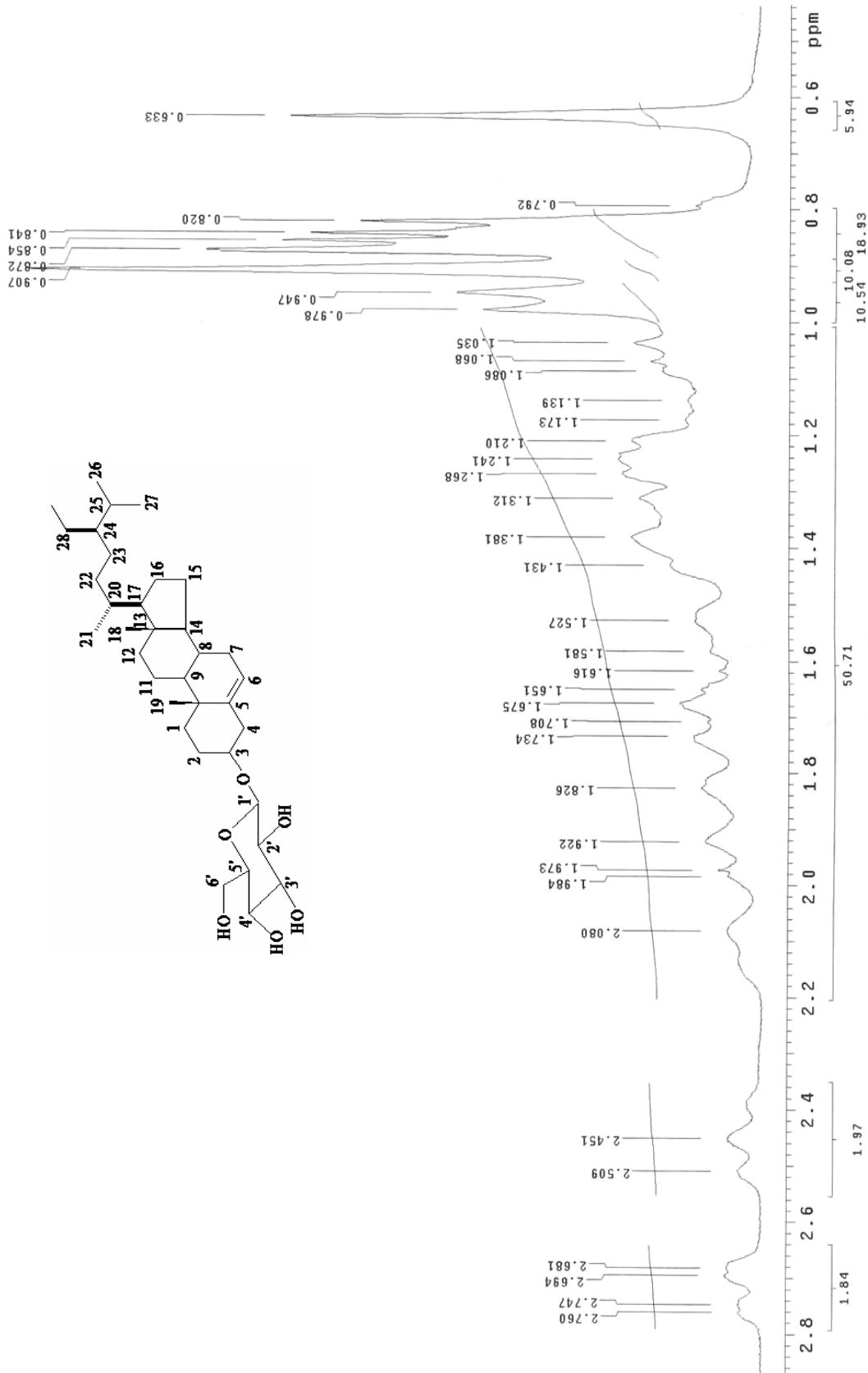


FIGURA 94: Expansão do espectro de RMN de ¹H do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo na região de 0,6 a 2,8 ppm (C₃D₃N, 200 MHz)

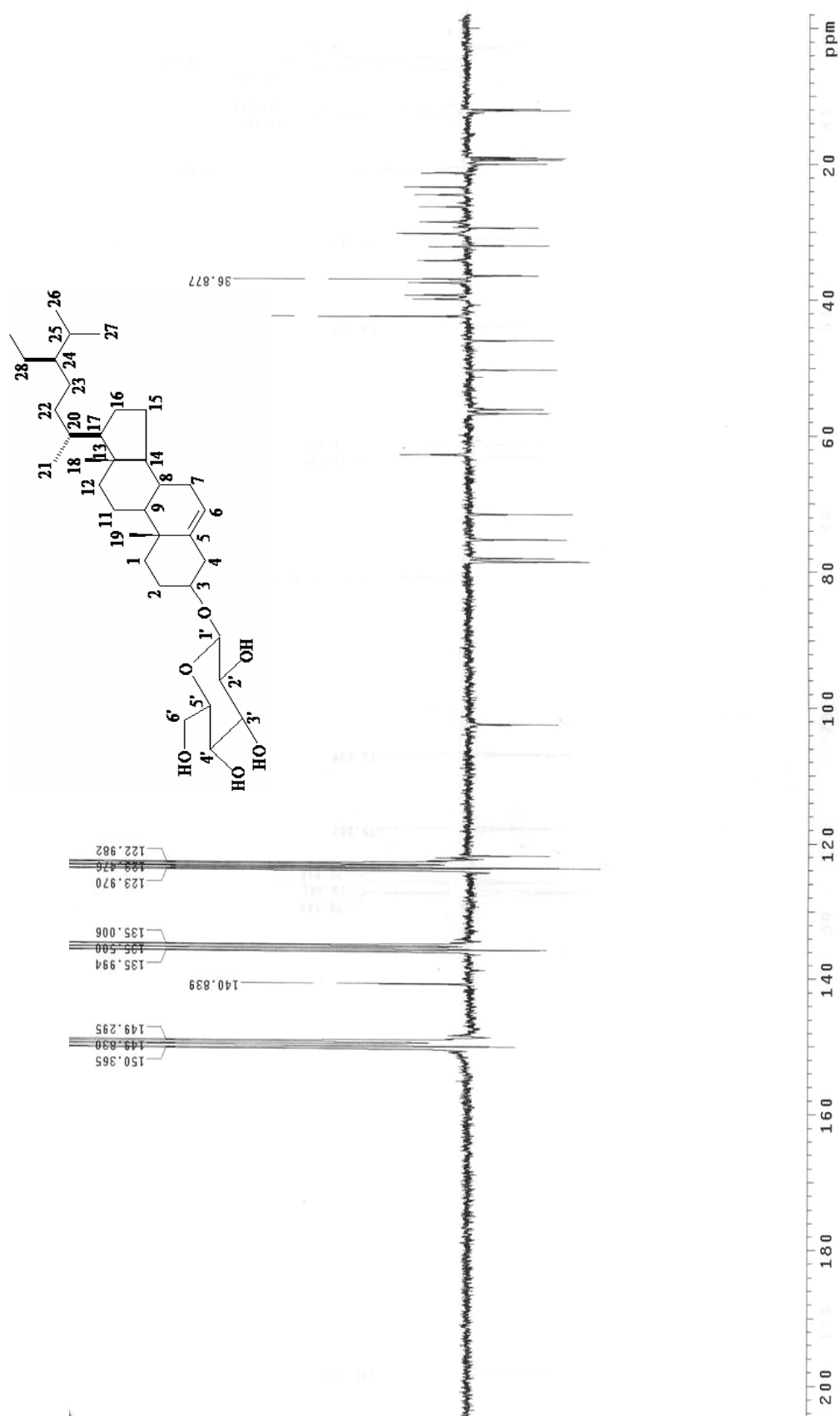


FIGURA 95: Espectro de RMN ¹³C-APT do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo (C₅D₅N, 50 MHz)

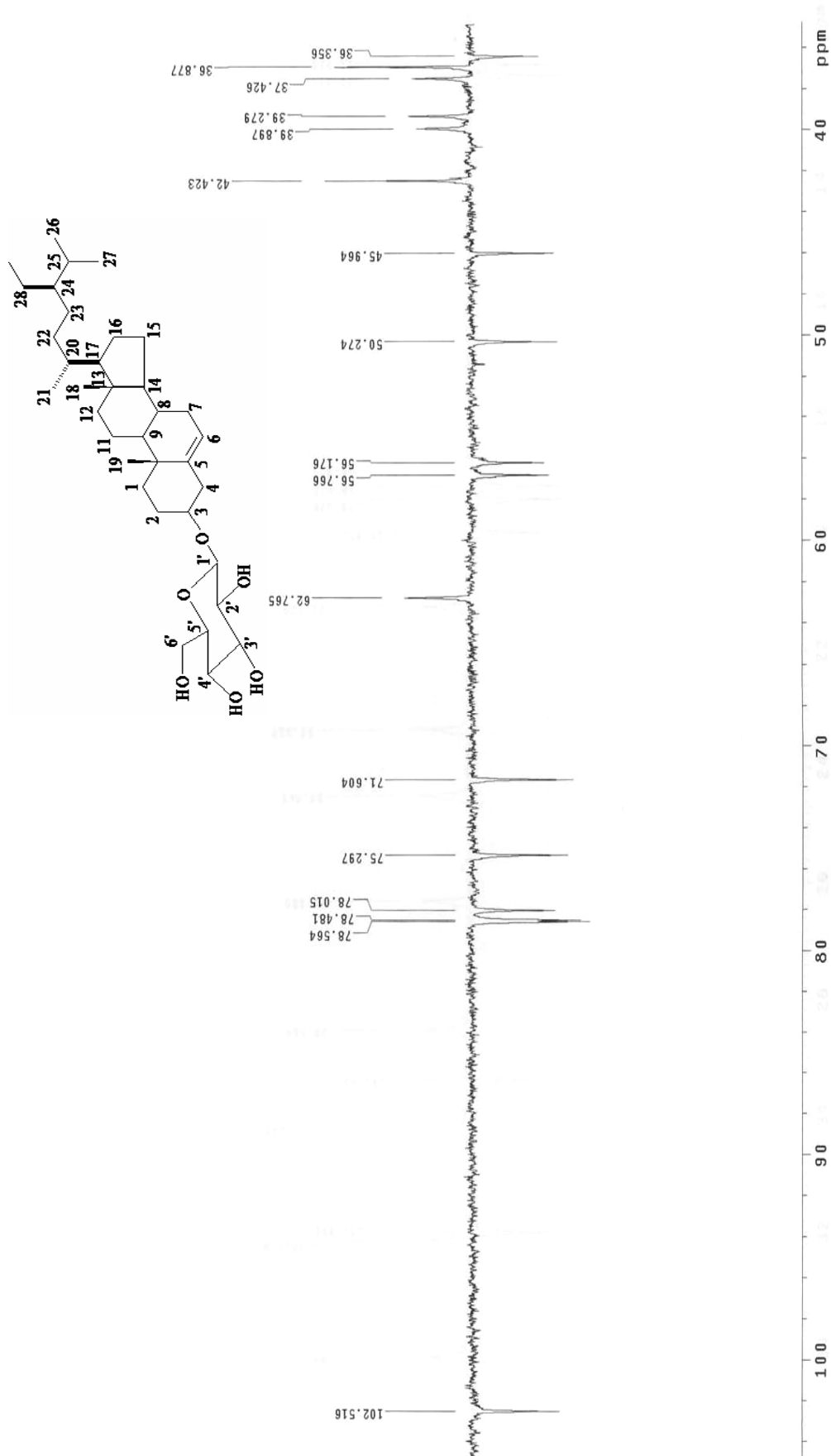


FIGURA 96: Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -APT do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo na região de 110 a 30 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz)

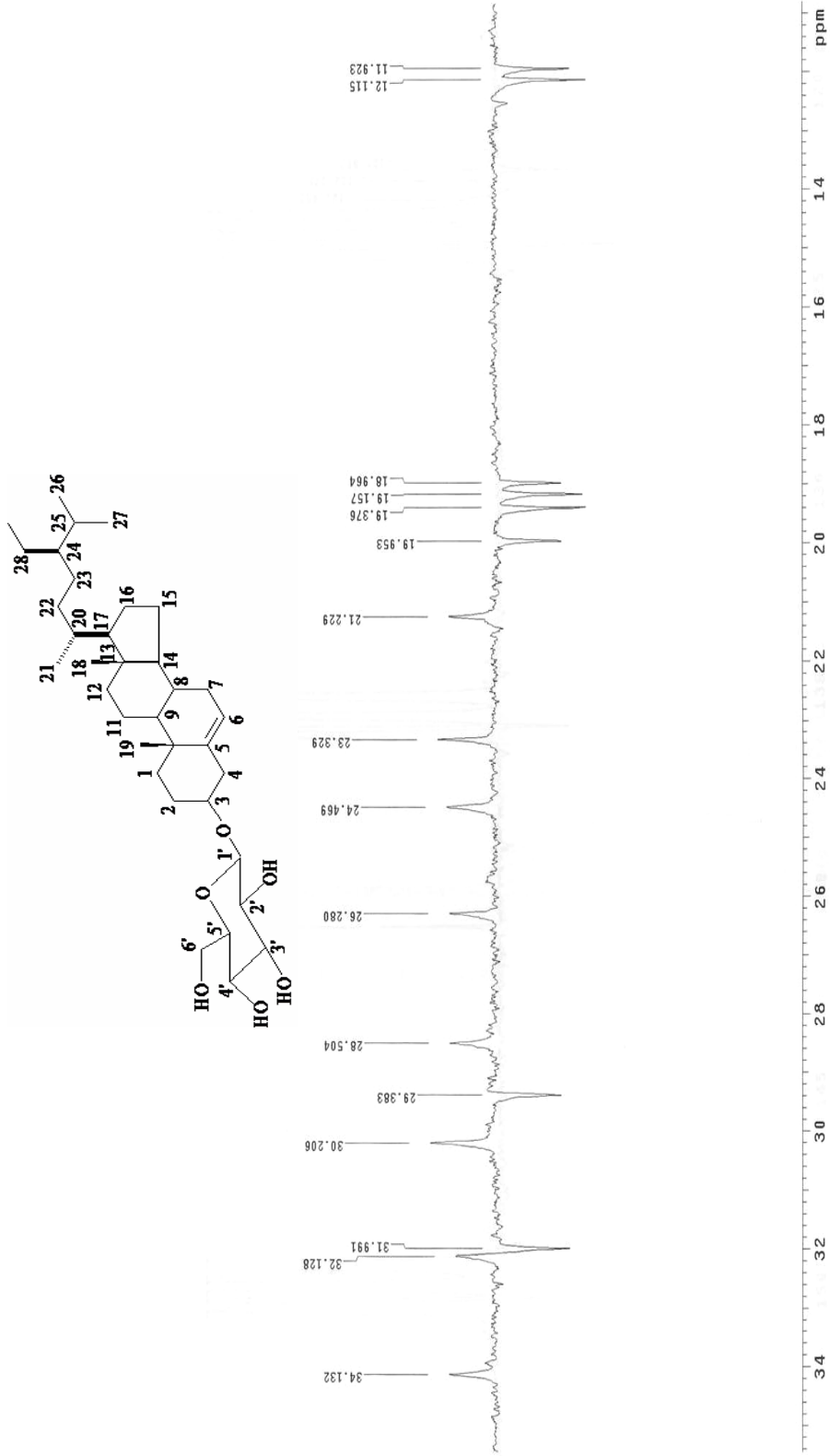


FIGURA 97: Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -APT do sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo na região de 35 a 10 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz)

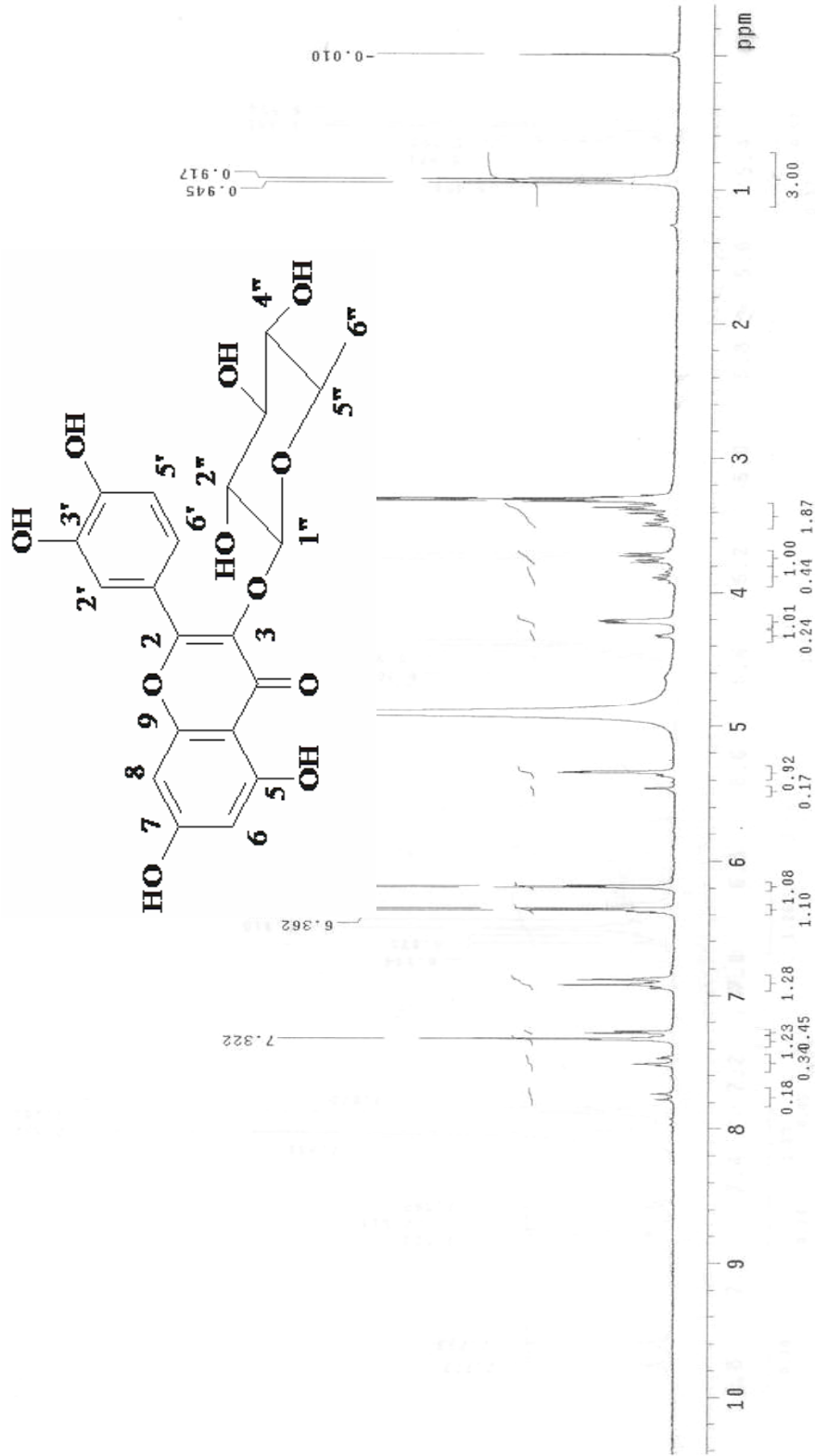


FIGURA 98: Espectro de RMN de ^1H da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo (CD_3OD , 200 MHz)

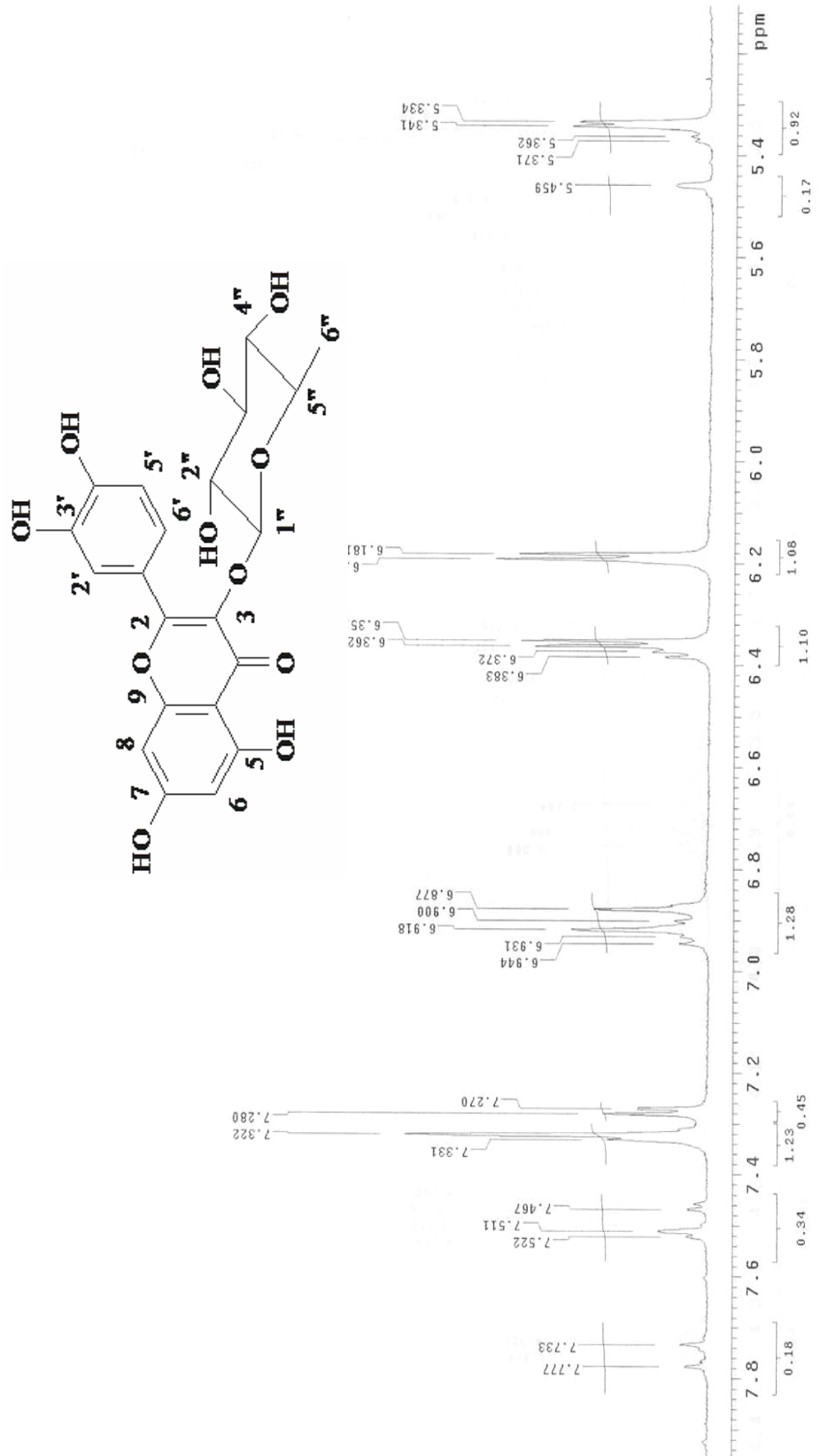


FIGURA 99: Expansão do espectro de RMN de ^1H de Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 5,4 a 7,8,4 ppm (CD_3OD , 200 MHz)

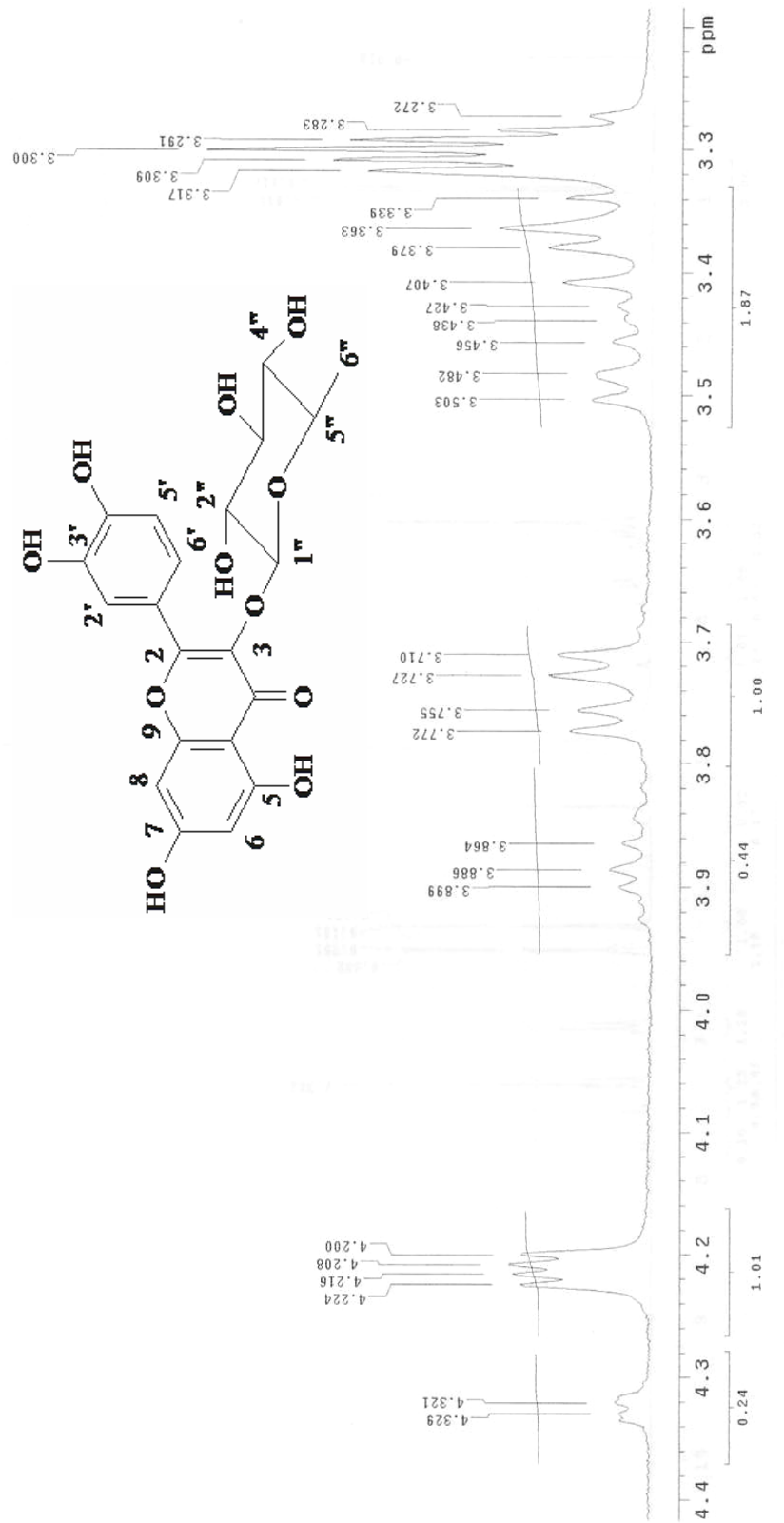
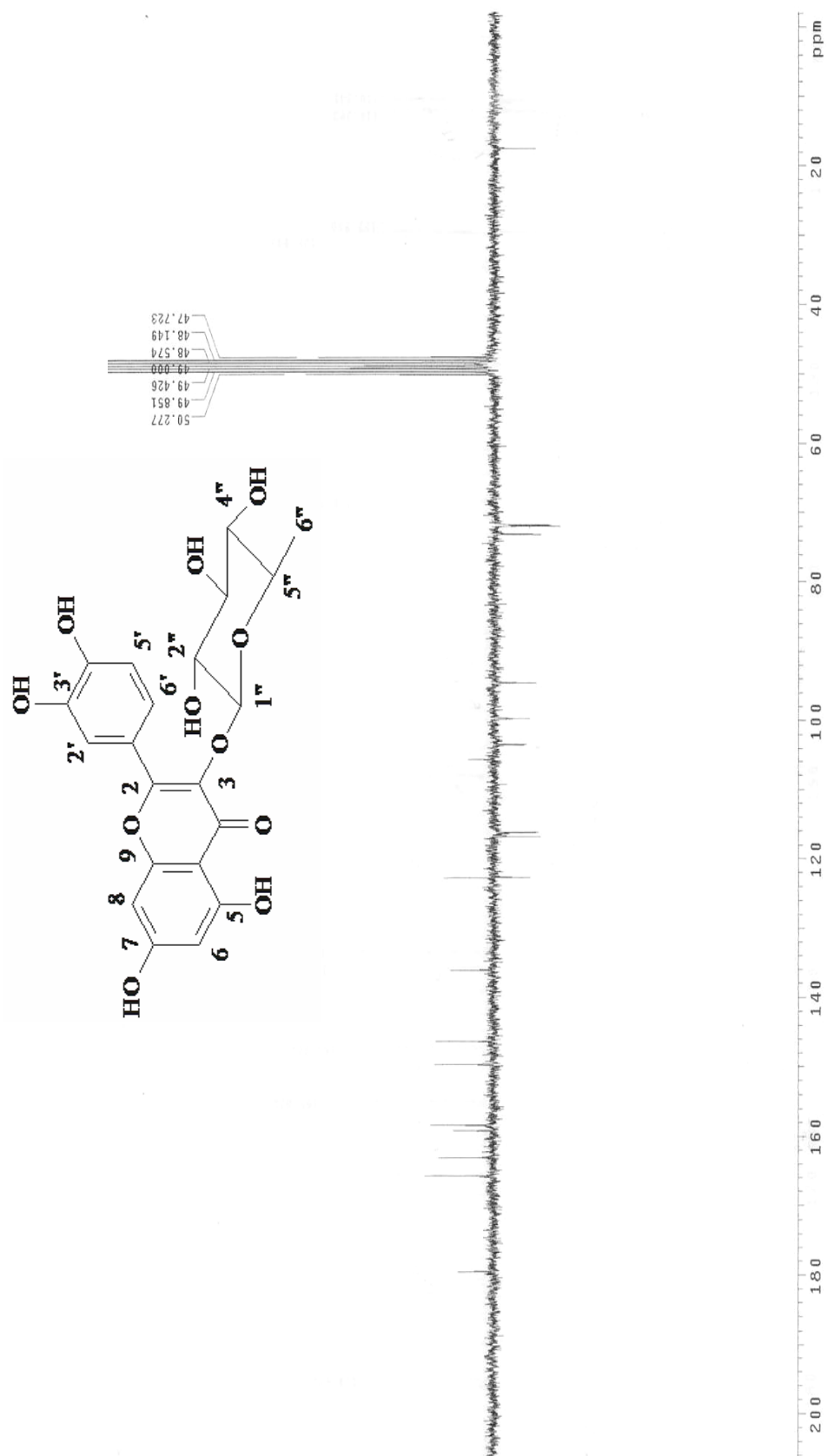


FIGURA 100: Expansão do espectro de RMN de ^1H da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 3,0 a 4,4 ppm (CD_3OD , 200 MHz)

FIGURA 101: Espectro de RMN ^{13}C -APT da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo (CD_3OD , 50 MHz)

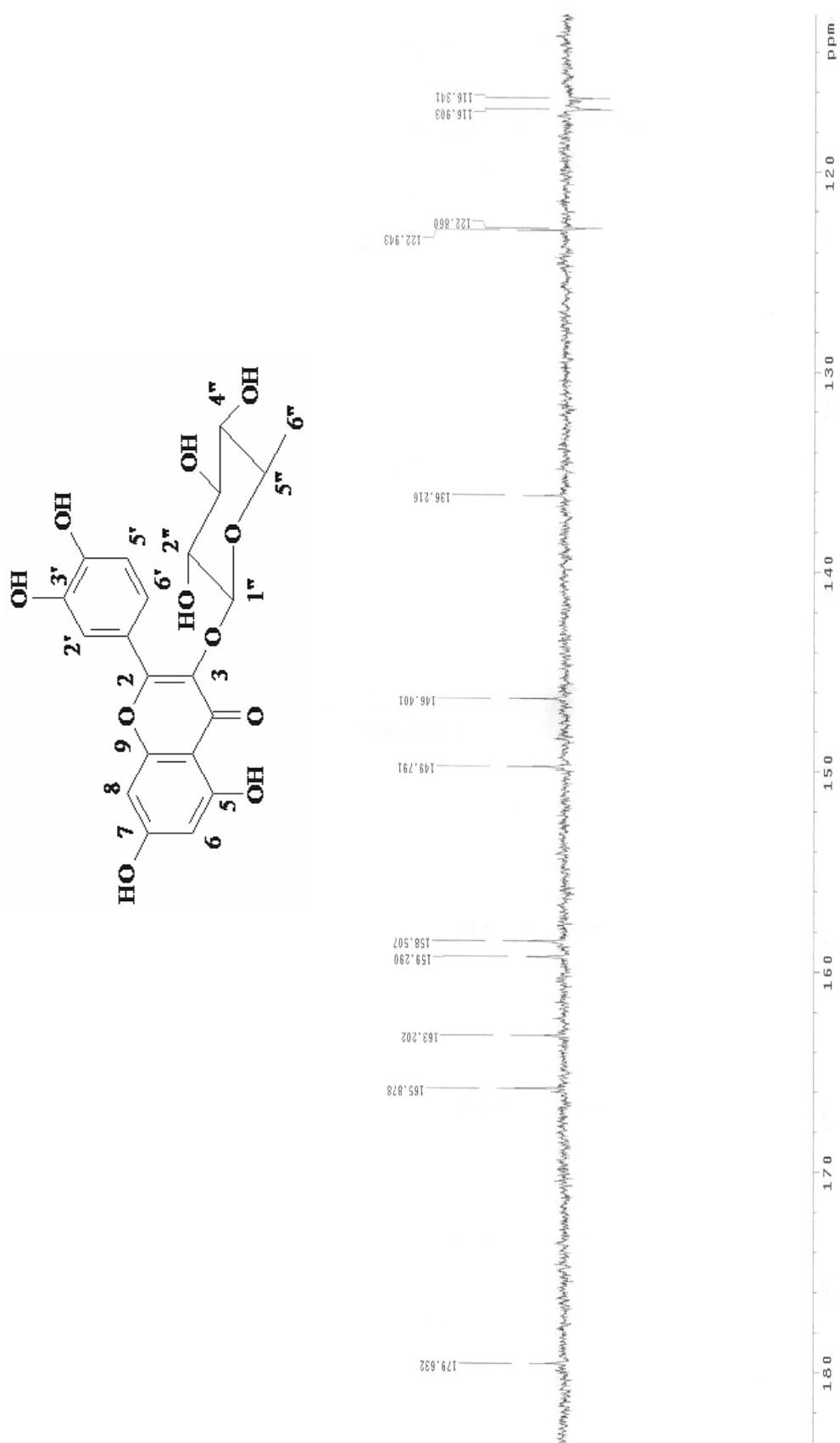


FIGURA 102: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 115 a 180 ppm (CD_3OD , 50 MHz)

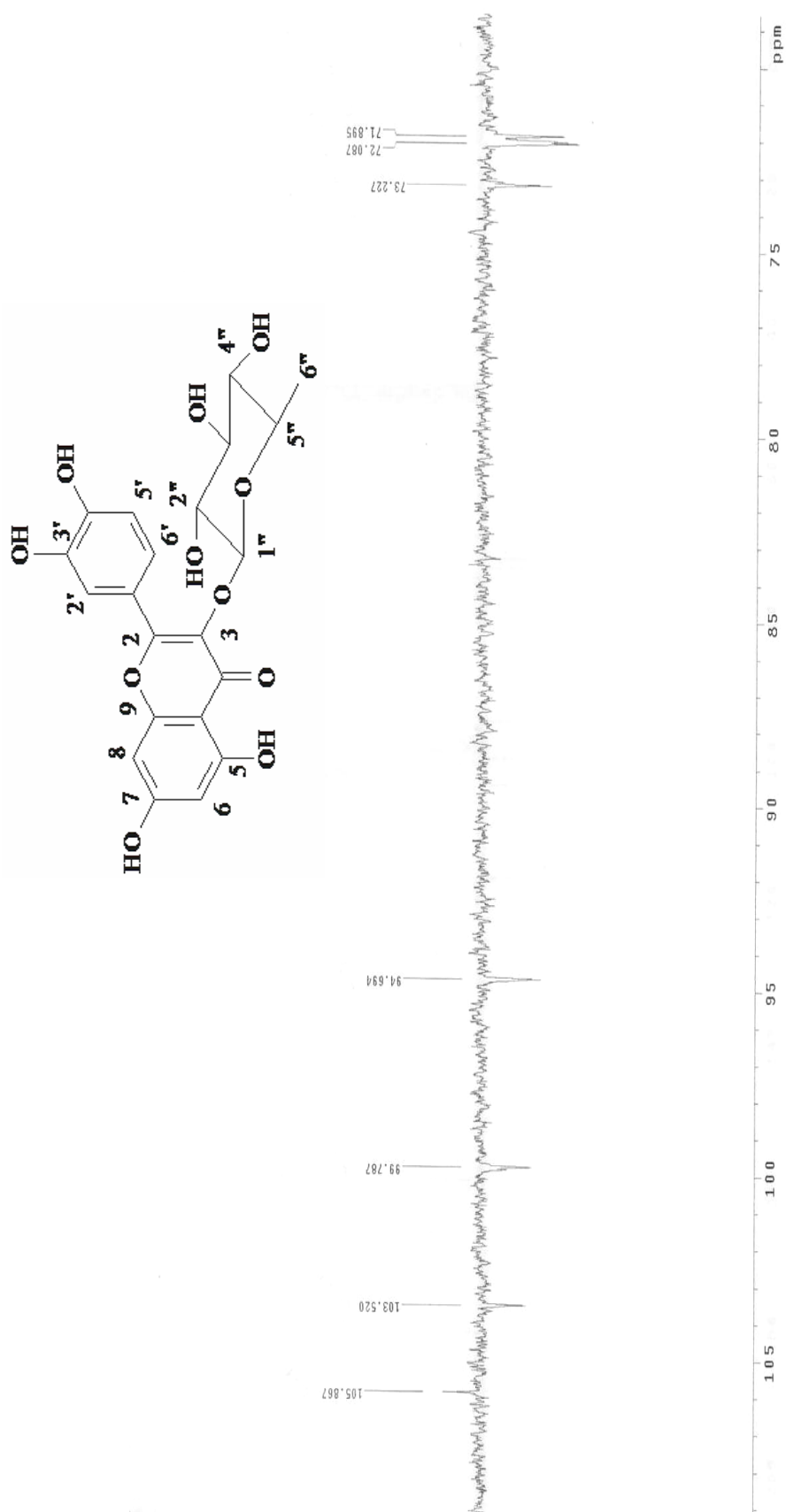
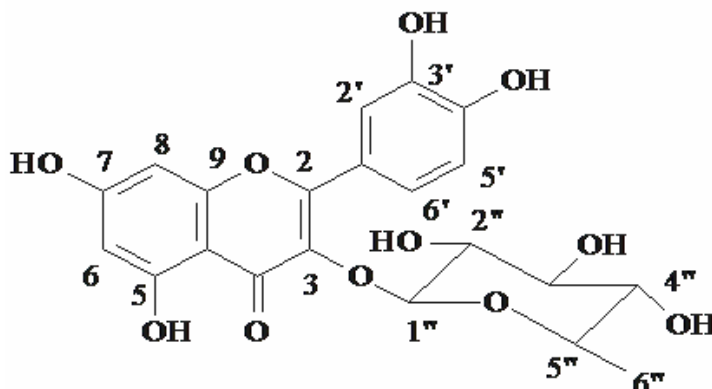


FIGURA 103: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT da Quercetina-3-O- α -L-raminosídeo na região de 70 a 106 ppm (CD_3OD , 50 MHz)

Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da Quercetina 3-*O*- α -L-raminosídeo em CD_3OD obtidos a 200 e 50 MHz, respectivamente e comparação com a literatura



	Quercetina 3- <i>O</i> - α -L-raminosídeo		M0-1/ CD_3OD / BELTRAME et al. 2001	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	159,2		158,8
3	-	136,2		136,4
4	-	179,6		179,9
5	-	163,2		163,5
6	6,18 (d, $J = 1,8$ Hz)	99,7	6,27 (d, $J = 1,8$ Hz)	99,9
7	-	165,8		166,1
8	6,35 (d, $J = 1,8$ Hz)	94,6	6,48 (d, $J = 1,8$ Hz)	94,8
9	-	158,5		158,0
10	-	105,8		106,0
1'	-	122,9		123,1
2'	7,50 (d, $J = 2,2$ Hz)	119,9	7,50 (d, $J = 2,4$ Hz)	117,0
3'	-	146,4		144,6
4'	-	149,7		150,0
5'	6,93 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,3	6,99 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,5
6'	7,32 (dd, $J = 8,4; 2,0$ Hz)	122,8	7,39 (dd, $J = 8,4; 1,0$ Hz)	123,1
1''	5,32 (d, $J = 1,5$ Hz)	103,5	5,51 (d, $J = 1,5$ Hz)	103,7
2''	4,21 (dd, $J = 3,3; 8,0$ Hz)	71,8	4,21 (dd, $J = 3,3; 8,0$ Hz)	72,1
3''	3,73 (dd, $J = 9,0; 3,0$ Hz)	72,0	3,73 (dd, $J = 9,0; 3,0$ Hz)	72,2
4''	3,35 (m)	73,2	3,35 (m)	73,3
5''	3,42 (m)	71,8	3,42 (m)	72,0
6''	0,94 (d, $J = 5,6$ Hz)	18,2	0,91 (d, $J = 1,5$ Hz)	17,6

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE DITERPENOS ISOLADOS DE *XYLOPIA*
*LANGSDORFFIANA***

4.7. Atividade Moluscicida de Diterpenos Isolados de *Xylopi* langsdorffiana

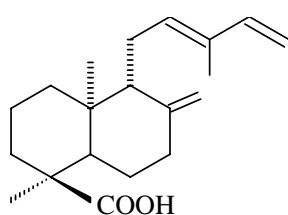
RESUMO

Continuando nossas pesquisas buscando moléculas bioativas, avaliamos a atividade moluscicida de três diterpenos isolados de *Xylopi langsdorffiana* o ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (1), o ácido *ent*-7 α -acetoxyrachyloban-18-óico (2) e o xylodiol (3), com a perspectiva de se encontrar o método mais adequado e efetivo de controle dos caramujos, potenciais transmissores da esquistossomose. O bioensaio foi realizado como descrito por Santos et al., (2000). Iniciou-se com a dissolução da amostra em dimetilsulfóxido (DMSO) e então adição de água desclorada, obtendo-se uma solução 0,1% de DMSO. Dez caramujos foram imersos em um Becker, contendo 250 mL da solução moluscicida em quatro concentrações apropriadas. Cada concentração teste foi realizada em duplicata. Os caramujos ficaram expostos ao potente moluscicida por 24 horas a temperatura ambiente e sob condições normais de luminosidade. Após 24 horas, a solução decantou; os caramujos foram lavados com água e alimentados com alface. Os caramujos testados permaneceram em água por mais 24 horas, e no final deste período foram examinados para avaliação da mortalidade. Foram considerados mortos aqueles com ausência de movimentos, de resposta à presença de alimento, ou se apresentavam com descoloração. Para verificar a susceptibilidade dos caramujos, dois grupos controle foram usados: um com carbonato cúprico à 50 ppm e outro contendo água desclorada 0,1% de DMSO. Os dados coletados foram computadorizados, e os valores de CL-10, CL-50, e CL-90 determinados pelo método estatístico de probitos.

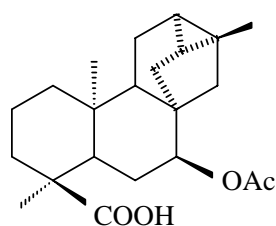
Os três diterpenos avaliados mostraram-se como excelentes moluscicidas, haja vista que a CL-50 de todos foi bem abaixo da preconizada pela Organização Mundial de Saúde que é de 50 μ g/mL, portanto as três substâncias testadas surgem como alternativa viável na profilaxia da esquistossomose, uma doença que acomete milhares de pessoas principalmente em países de terceiro mundo. Os dados com as CL-10, CL-50 e CL-90 estão compilados na Tabela 6 (pág. 168).

Tabela 6: Atividade moluscicida de diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana* em adultos de *B.glabrata* (10 caramujos por concentração), sob condições laboratoriais e após 24h de exposição, pH 6,7.

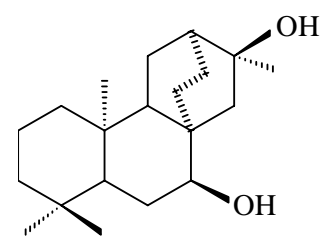
Substâncias	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)	CL ₁₀ (ppm)	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₀ (ppm)
2	25	91,67	12,52	18,95	25,38
	20	54,05			
	15	18,18			
	10	0			
3	20	100	11,08	14,93	18,79
	15	58,33			
	12	13,33			
	10	0			
1	10	100	1,94	4,45	6,97
	5	71,43			
	3	26,67			
	2	4,76			



(1)



(2)

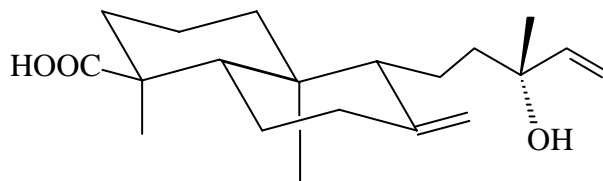
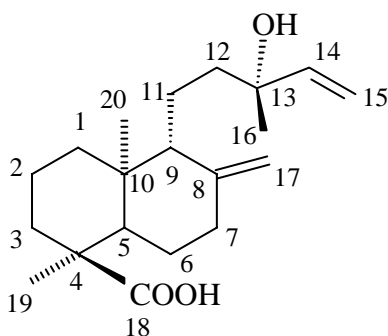


(3)

CONSTANTES FÍSICAS

5. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

5.1. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido 13-epicupressíco



FM. C₂₀H₃₂O₃

PM. 320 uma

P.F. 137-138 °C

Aspecto. Cristais brancos

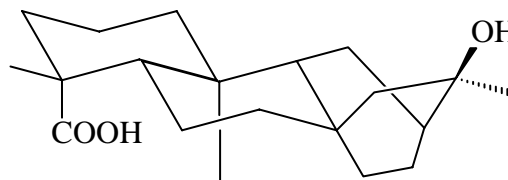
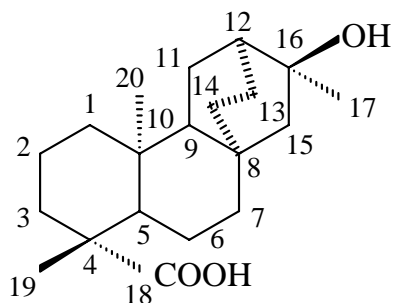
Solubilidade. Clorofórmio

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm⁻¹). 3405, 3082, 2980, 1702, 1266, 1177, 920.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). 1,44; 1,35 (m, 2H-1), 1,56; 1,30 (m, 2H-2), 1,62; 0,92 (m, 2H-3), 1,82 (m, H-5), 1,42; 1,38 (m, 2H-6), 1,98; 2,30 (m, 2H-7), 1,60 (m, H-9), 1,36; 1,40 (m, 2H-11), 1,35; 1,70 (m, 2H-12), 5,89 (dd, *J* = 17,4; 10,8 Hz, H-14), 5,21 (dd, *J* = 17,4; 1,2 Hz, 1H-15), 5,11 (dd, *J* = 10,8; 1,2 Hz, 1H-15), 1,25 (s, 3H-16), 4,86 (sl, 1H-17), 4,53 (sl, 1H-17), 1,11 (s, 3H-19), 0,67 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃). 47,4 (C, C-4), 147,9 (C, C-8), 39,0 (C, C-10), 73,0 (C, C-13), 184,7 (C, C-18), 49,5 (CH, C-5), 57,0 (CH, C-9), 144,9 (CH, C-14), 37,8 (CH₂, C-1), 18,4 (CH₂, C-2), 37,0 (CH₂, C-3), 26,8 (CH₂, C-6), 37,9 (CH₂, C-7), 17,6 (CH₂, C-11), 41,1 (CH₂, C-12), 111,7 (CH₂, C-15), 107,0 (CH₂, C-17), 28,1 (CH₃, C-16), 16,2 (CH₃, C-19), 14,6 (CH₃, C-20).

5.2. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido *ent*-atisan-16 α -ol-18-óico



FM. C₂₀H₃₂O₃

PM. 320 uma

P.F. 200-201 °C

Aspecto. Cristais brancos

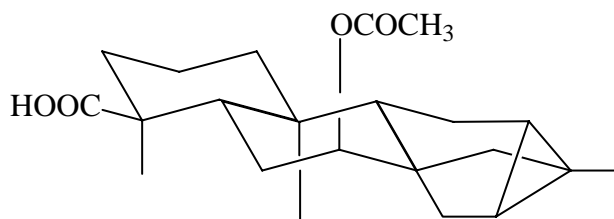
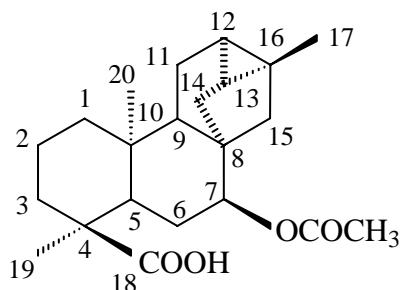
Solubilidade. Metanol

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm⁻¹). 3378, 2932, 1693, 1179.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD). 1,33; 1,18 (m, 2H-1), 1,66; 1,50 (m, 2H-2), 1,65; 0,94 (m, 2H-3), 1,32 (m, H-5), 1,45; 1,07 (m, 2H-6), 1,76; 1,63 (m, 2H-7), 1,71 (m, H-9), 1,69; 1,66 (m, 2H-11), 1,52 (m, H-12), 2,07; 1,19 (m, 2H-13), 1,86; 0,82 (m, 2H-14), 1,32; 1,22 (m, 2H-15), 1,16 (s, 3H-17), 1,26 (s, 3H-19), 1,03 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD). 46,8 (C, C-4), 33,5 (C, C-8), 36,7 (C, C-10), 71,1 (C, C-16), 181,4 (C, C-18), 50,5 (CH, C-5), 51,3 (CH, C-9), 37,3 (CH, C-12), 38,9 (CH₂, C-1), 16,9 (CH₂, C-2), 38,4 (CH₂, C-3), 21,1 (CH₂, C-6), 36,8 (CH₂, C-7), 22,8 (CH₂, C-11), 23,5 (CH₂, C-13), 26,9 (CH₂, C-14), 56,7 (CH₂, C-15), 15,7 (CH₃, C-17), 29,2 (CH₃, C-19), 13,5 (CH₃, C-20).

5.3. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido *ent*-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico



FM. C₂₂H₃₂O₄

PM. 360,2309 uma

P.F. 230-233 °C

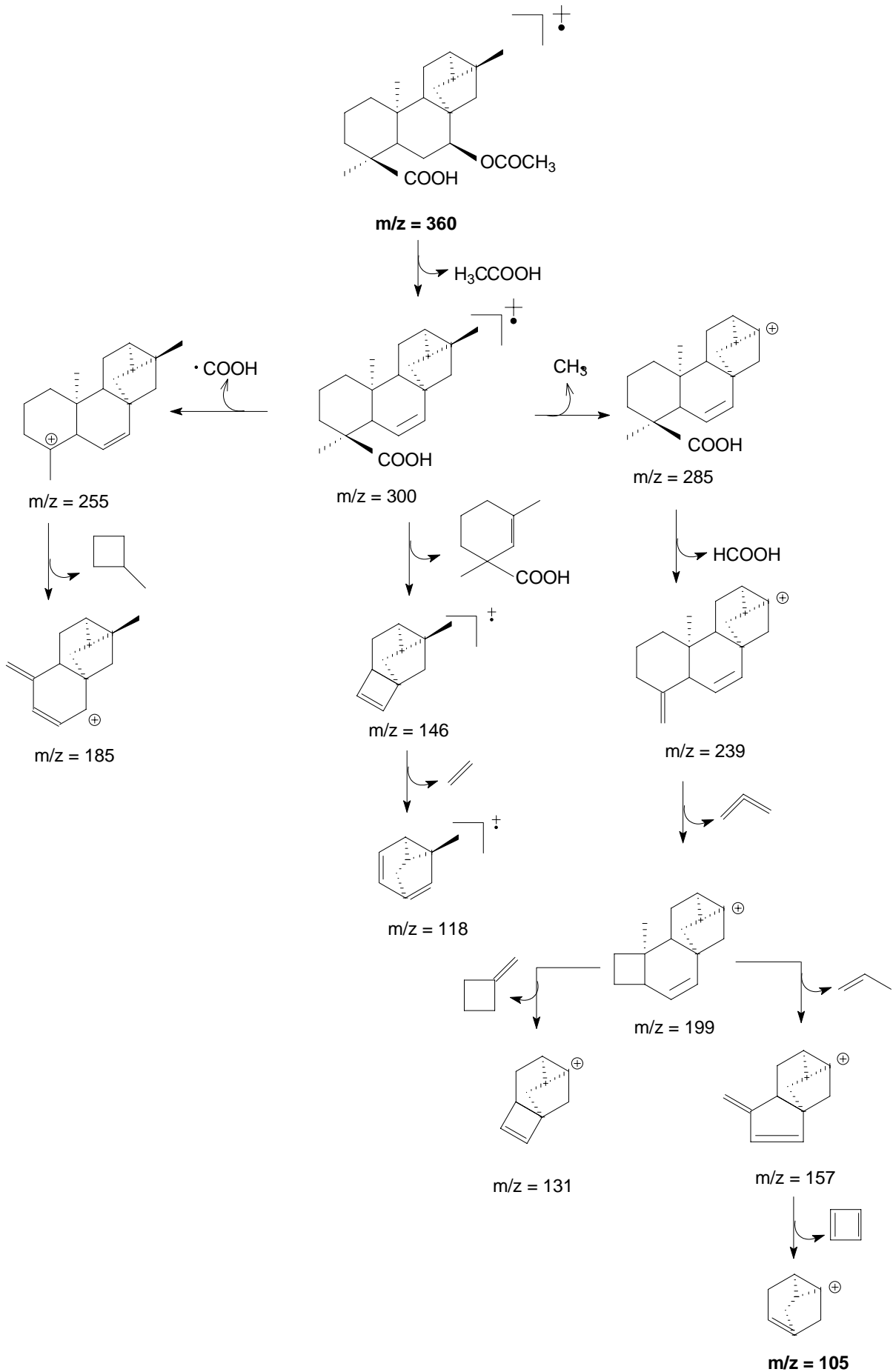
Aspecto. Cristais brancos

Solubilidade. Clorofórmio

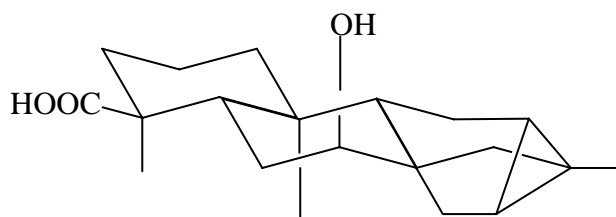
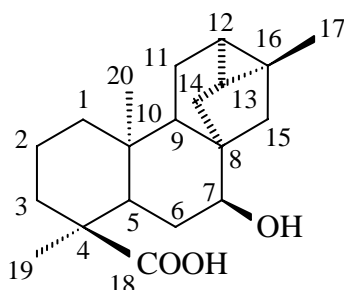
Espectroscopia na região do IV (KBr, cm⁻¹). 3200, 1725, 1700.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). 0,90; 1,55 (m, 2H-1), 1,45; 1,55 (m, 2H-2), 1,65; 1,70 (m, 2H-3), 2,18 (d, *J* = 4,5 Hz, H-5), 1,40; 1,60 (m, 2H-6), 4,65 (tl, H-7), 1,60 (m, H-9), 1,70; 1,90 (m, 2H-11), 0,64 (m, H-12), 0,90 (m, H-13), 1,45; 1,95 (m, 2H-14), 1,35; 1,55 (m, 2H-15), 1,18 (s, 3H-17), 1,15 (s, 3H-19), 1,01 (s, 3H-20), 2,06 (s, COMe)

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃). 46,9 (C, C-4), 44,5 (C, C-8), 37,9 (C, C-10), 23,3 (C, C-16), 185,1 (C, C-18), 42,8 (CH, C-5), 78,9 (CH, C-7), 48,9 (CH, C-9), 20,7 (CH, C-12), 24,2 (CH, C-13), 38,6 (CH₂, C-1), 17,6 (CH₂, C-2), 37,2 (CH₂, C-3), 27,8 (CH₂, C-6), 19,5 (CH₂, C-11), 32,8 (CH₂, C-14), 45,5 (CH₂, C-15), 20,7 (CH₃, C-17), 16,4 (CH₃, C-19), 15,2 (CH₃, C-20), 171,4 (COMe), 21,6 (COMe).

5.3.1. Principais fragmentações do ácido *ent*-7 α -acetoxitrichyloban-18-óico

5.4. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico



FM. C₂₀H₃₀O₃

PM. 318,2129 uma

P.F. 130-134 °C

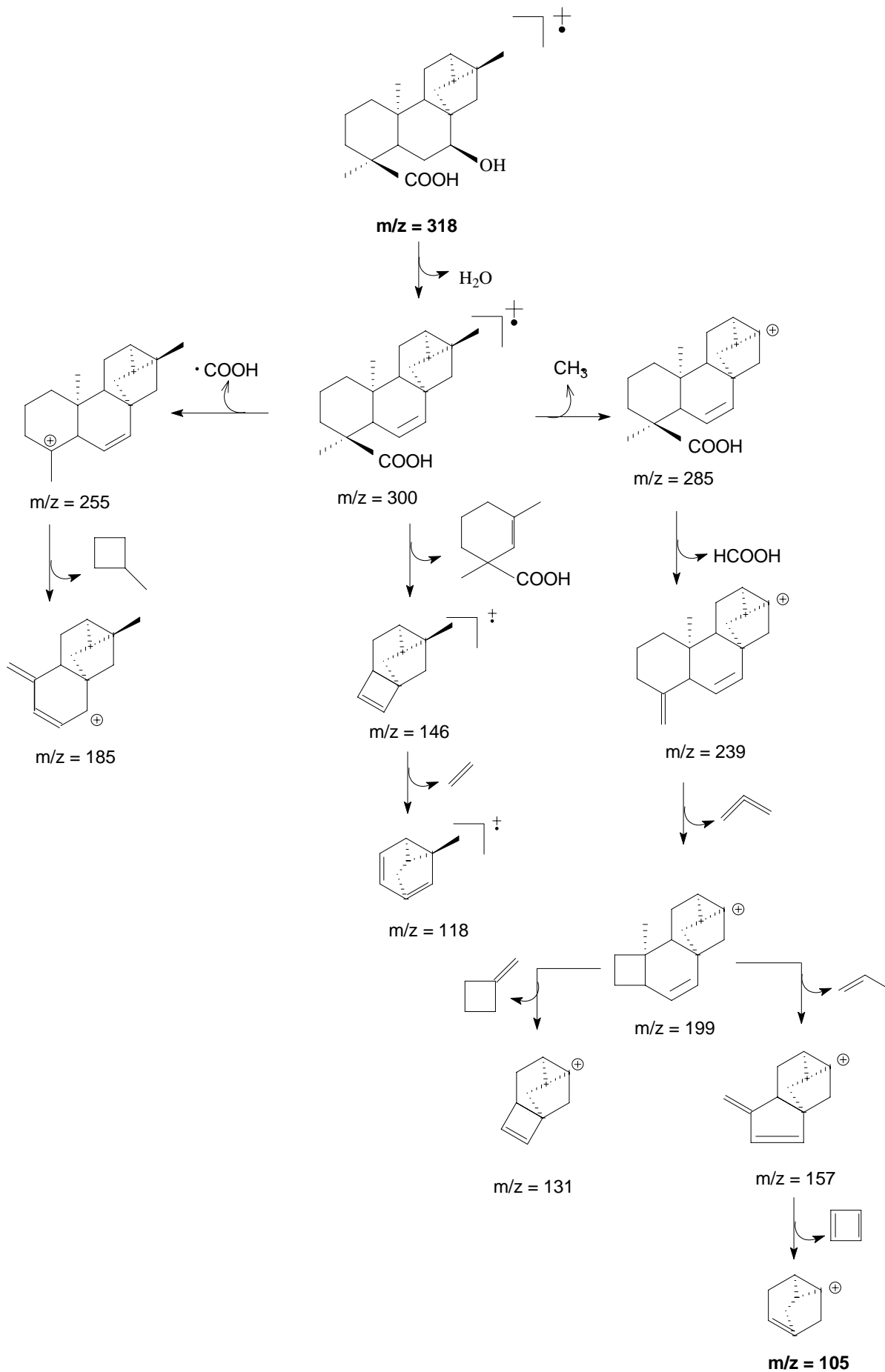
Aspecto. Cristais brancos

Solubilidade. Clorofórmio

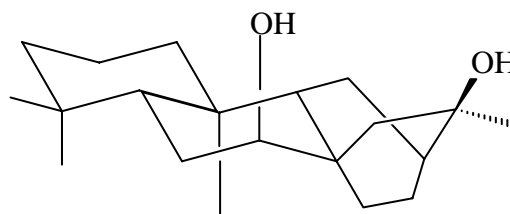
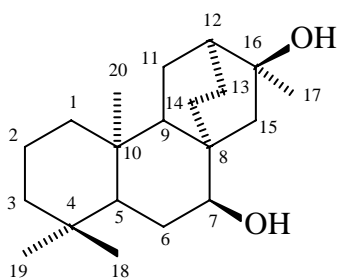
Espectroscopia na região do IV (KBr, cm⁻¹). 3500, 3150, 1695, 1232.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). 0,93; 1,55 (m, 2H-1), 1,52; 1,62 (m, 2H-2), 1,65; 1,75 (m, 2H-3), 2,23 (d, *J* = 4,6 Hz, H-5), 1,36; 1,76 (m, 2H-6), 3,60 (tl, H-7), 1,52 (m, H-9), 1,69; 1,64 (m, 2H-11), 0,64 (m, H-12), 1,11 (m, H-13), 1,39; 1,99 (m, 2H-14), 1,32; 1,49 (m, 2H-15), 1,20 (s, 3H-17), 1,23 (s, 3H-19), 1,02 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃). 45,7 (C, C-4), 44,5 (C, C-8), 37,9 (C, C-10), 23,3 (C, C-16), 184,3 (C, C-18), 42,1 (CH, C-5), 76,0 (CH, C-7), 48,0 (CH, C-9), 20,7 (CH, C-12), 24,1 (CH, C-13), 38,6 (CH₂, C-1), 17,5 (CH₂, C-2), 37,0 (CH₂, C-3), 30,8 (CH₂, C-6), 19,5 (CH₂, C-11), 33,1 (CH₂, C-14), 45,5 (CH₂, C-15), 20,9 (CH₃, C-17), 16,6 (CH₃, C-19), 15,3 (CH₃, C-20).

5.4.1. Principais fragmentações do ácido *ent*-7 α -hidroxitrichyloban-18-óico

5.5. Constantes físicas e dados espectroscópicos do Xylodiol



FM. C₂₀H₃₄O₂

PM. 306.2017 uma

P.F. 108-111 °C

Aspecto. Cristais brancos

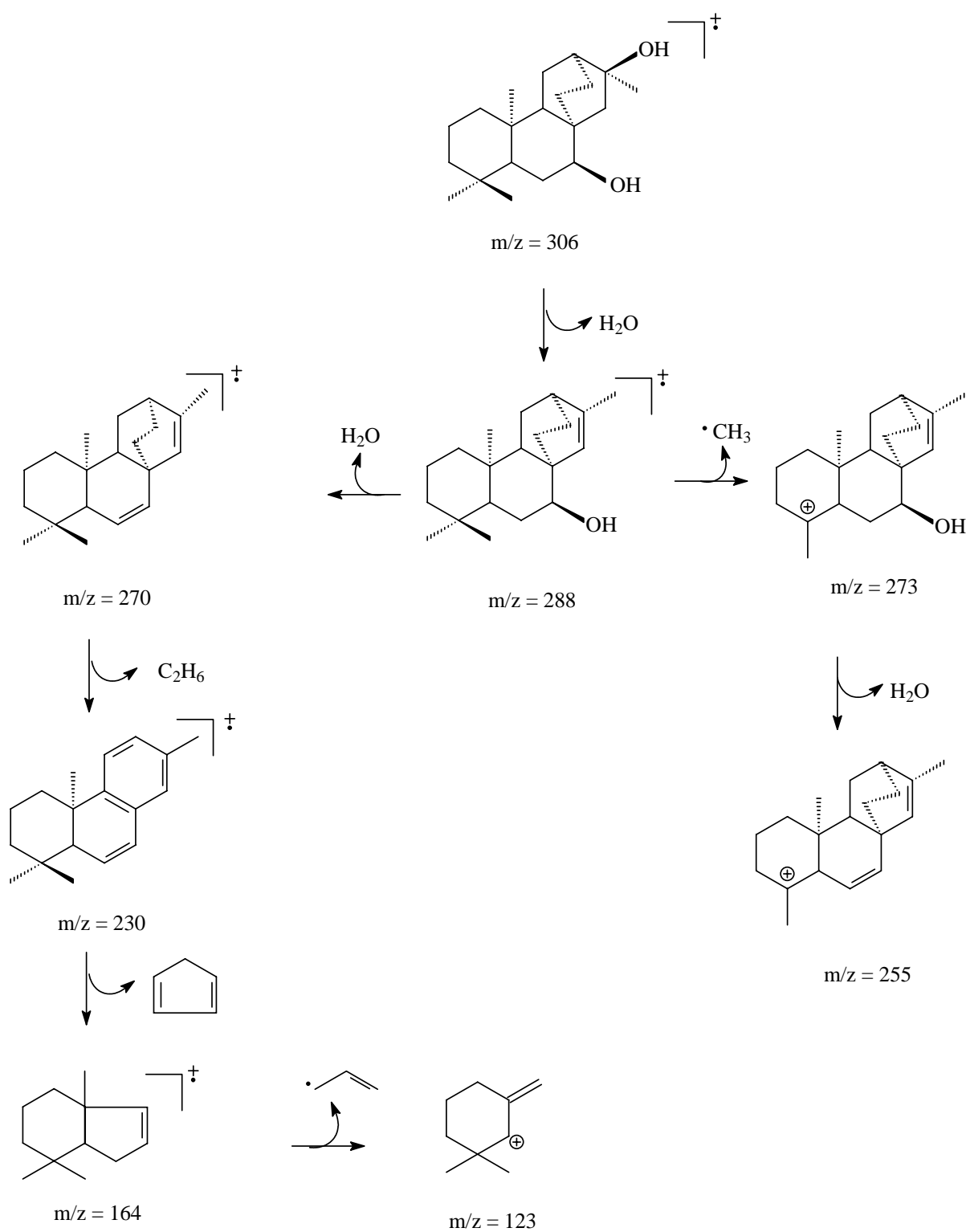
Solubilidade. Clorofórmio

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm⁻¹). 3372, 3325, 2985, 1130.

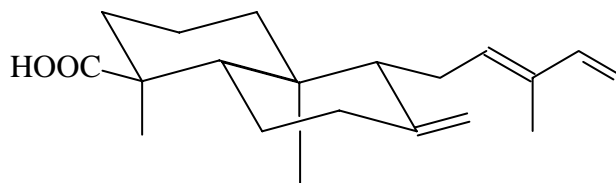
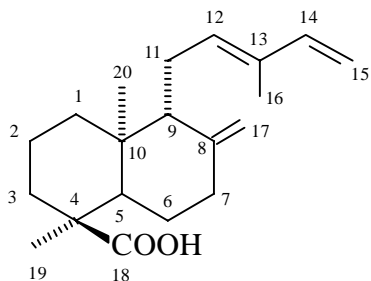
Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). 1,45; 1,25 (m, 2H-1), 1,68; 1,45 (m, 2H-2), 1,66; 0,94 (m, 2H-3), 1,42 (m, H-5), 1,71; 1,67 (m, 2H-6), 3,43 (tl, H-7), 1,59 (m, H-9), 1,77; 1,53 (m, 2H-11), 1,63 (m, H-12), 2,02; 1,19 (m, 2H-13), 1,70; 0,99 (m, 2H-14), 1,78; 1,30 (m, 2H-15), 1,35 (s, 3H-17), 0,91 (s, 3H-18), 0,86 (s, 3H-19) 0,99 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃). 37,7 (C, C-4), 32,5 (C, C-8), 37,3 (C, C-10), 72,2 (C, C-16) 47,3 (CH, C-5), 73,8 (CH, C-7), 46,0 (CH, C-9), 38,1 (CH, C-12), 42,0 (CH₂, C-1), 18,1 (CH₂, C-2), 39,1 (CH₂, C-3), 26,8 (CH₂, C-6), 22,4 (CH₂, C-11), 23,5 (CH₂, C-13), 26,7 (CH₂, C-14), 51,3 (CH₂, C-15), 30,5 (CH₃, C-17), 33,1 (CH₃, C-18), 21,6 (CH₃, C-19), 13,4 (CH₃-20).

5.5.1. Principais fragmentações do Xylodiol



5.6. Constantes físicas e dados espectroscópicos do ácido 8(17)12*E*-14-labdatrien-18-óico



FM. C₂₀H₂₈O₂

PM. 302 uma

P.F. 125-130 °C

Aspecto. Cristais brancos

Solubilidade. Clorofórmio

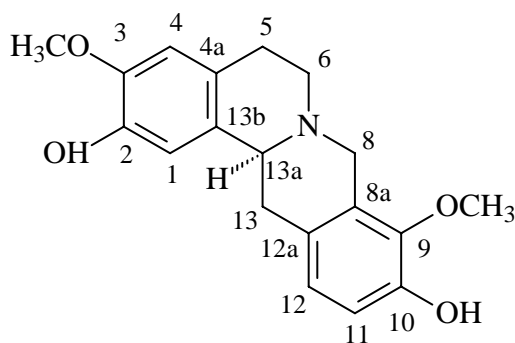
Espectroscopia na região do IV (KBr, cm⁻¹). 3083, 2934, 2870, 1692, 1643, 1276, 901.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). 1,24; 1,86 (m, 2H-1), 1,64, (m, 2H-2), 1,65, (d, 2H-3), 2,01 (dd, *J* = 12,4; 2,7 Hz, H-5), 1,40; 1,50 (m, 2H-6), 2,11; 2,38 (m, 2H-7), 1,82 (sl, H-9), 2,22; 2,41 (m, 2H-11), 5,33 (t, H-12), 6,81 (dd, *J* = 17,2; 10,8 Hz, H-14), 5,11 (d, *J* = 10,8; 1H-15), 5,21 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H-15), 1,80 (s, 3H-16), 4,86 (sl, 1H-17), 4,53 (sl, 1H-17), 1,18 (s, 3H-19), 0,76 (s, 3H-20).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃). 47,5 (C, C-4), 147,6 (C, C-8), 38,8 (C, C-10), 131,6 (C, C-13), 185,8 (C, C-18), 49,7 (CH, C-5), 57,7 (CH, C-9), 131,7 (CH, C-12), 134,2 (CH, C-14), 38,5 (CH₂, C-1), 18,8 (CH₂, C-2), 37,5 (CH₂, C-3), 27,0 (CH₂, C-6), 38,0 (CH₂, C-7), 22,3 (CH₂, C-11), 113,7 (CH₂, C-15), 108,7 (CH₂, C-17), 20,1 (CH₃, C-16), 16,2 (CH₃, C-19), 15,1 (CH₃, C-20).

Espectrometria de massas (EI) m/z: 119, 122, 147, 159, 161, 176, 242, 257, 287, 302

5.7. Constantes físicas e dados espectroscópicos de estefolidina



FM. C₁₉H₂₁NO₄

PM. 327 uma

P.F. °C

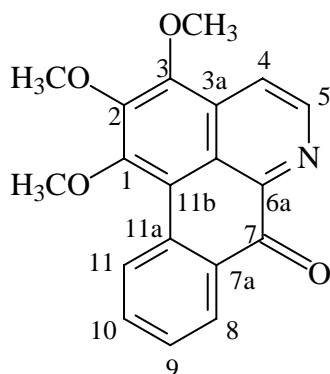
Aspecto. Pó amorfo

Solubilidade. Clorofórmio

Espectroscopia de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃). 6,80 (s, H-1), 6,57, (s, H-4), 6,70, (d, *J* = 8,4 Hz H-11), 6,72 (d, *J* = 8,4 Hz, H-12), 3,25 (m, H-13a), 3,15; 2,58 (m, 2H-5), 3,17;2,65 (m, 2H-6), 4,20; 3,48 (d, *J* = 15,8 2H-8), 3,47; 2,57 (m, 2H-13), 3,85 (s, OCH₃-3), 3,84 (s, OCH₃-9).

Espectroscopia de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃). 145,0 (C, C-2), 143,8 (C, C-3), 130,5 (C, C-4a), 128,1 (C, C-8a), 141,4 (C, C-9), 143,9 (C, C-10), 121,1 (C, C-12a), 126,0 (C, C-13b), 110,5 (CH, C-1), 111,4 (CH, C-4), 108,9 (CH, C-11), 119,3 (CH, C-12), 59,1 (CH, C-13a), 29,1 (CH₂, C-5), 51,5 (CH₂, C-6), 53,5 (CH₂, C-8), 36,2 (CH₂, C-13), 56,1 (OCH₃-3), 55,0 (OCH₃-9).

5.8. Constantes físicas e dados espectroscópicos de *O*-metilmoscatolina



FM. C₁₉H₁₅NO₄

PM. 321 uma

P.F. °C

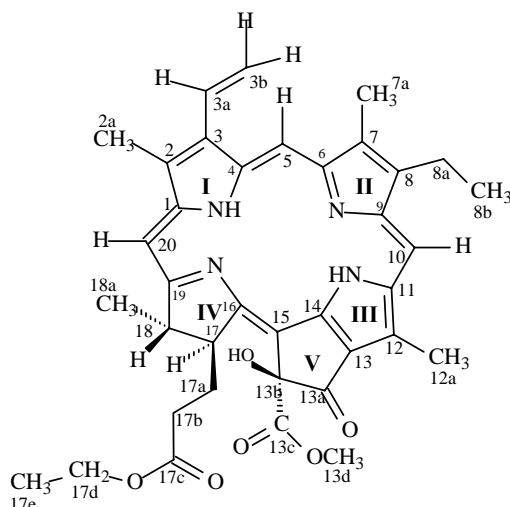
Aspecto. Pó amorfo

Solubilidade. Clorofórmio

Espectroscopia de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃). 8,21 (d, *J* = 5,2 Hz, H-4), 8,99 (d, *J* = 5,2 Hz, H-5), 8,56 (dd, *J* = 7,7; 1,6 Hz H-8), 7,55 (dt, *J* = 7,7; 0,8 Hz, H-9), 7,76 (dt, *J* = 7,7; 1,8 Hz, H-10), 9,12 (dd, *J* = 7,7; 0,6 Hz, H-12), 4,02 (s, OCH₃-1), 4,09 (s, OCH₃-2), 4,12 (s, OCH₃-3).

Espectroscopia de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃). 156,6 (C, C-1), 147,5 (C, C-2), 148,6 (C, C-3), 131,3 (C, C-3a), 145,7 (C, C-6a), 182,4 (C, C-7), 131,6 (C, C-7a), 134,7 (C, C-11a), 115,9 (C, C-11b), 123,0 (C, C-11c), 119,3 (CH, C-4), 144,8 (CH, C-5), 129,1 (CH, C-8), 128,4 (CH, C-9), 134,5 (CH, C-10), 127,8 (CH, C-11), 61,2 (OCH₃-1), 61,6 (OCH₃-2), 62,0 (OCH₃-3).

5.9. Constantes físicas e dados espectroscópicos de 13b(S)-hidroxi-17c-etoxifaeoforbídeo a



FM. C₃₇H₄₀N₄O₆

PM. 636 uma

P.F. °C

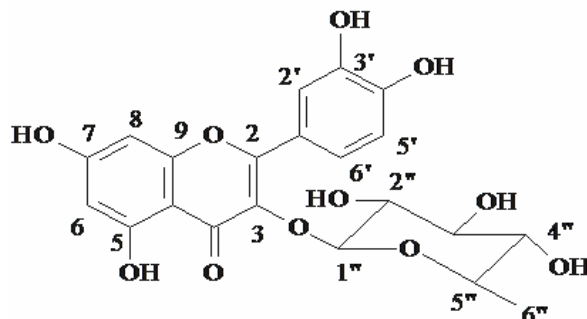
Aspecto. Pó verde escuro

Solubilidade. Clorofórmio

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃). 8,0 (dd, *J* = 17,7; 11,4 Hz, H-3a), 9,46 (s, H-5), 9,61 (s, H-10), 4,18 (m, H-17), 4,52 (m, H-18), 8,66 (s, H-20), 6,30 (dd, *J* = 17,7 Hz 1H-3b), 6,19 (dd, *J* = 11,4 Hz 1H-3b), 3,72 (q, *J* = 7,2 Hz 2H-8a), 2,94; 2,53 (m, 2H-17a), 2,29 (m, 2H-17b), 4,11 (q, *J* = 7,2 Hz 2H-17d), 3,24 (s, 3H-7a), 1,71 (t, *J* = 7,7 Hz 3H-8b), 3,63 (s, 3H-12a), 1,16 (t, *J* = 7,2 Hz 3H-17e), 1,62 (d, *J* = 7,2 Hz 3H-18a), 3,74 (s, OCH₃-13d).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125MHz, CDCl₃). 142,3 (C, C-1), 132,0 (C, C-2), 136,5 (C, C-3), 136,6 (C, C-4), 155,0 (C, C-6), 136,6 (C, C-7), 145,3 (C, C-8), 150,1 (C, C-9), 138,0 (C, C-11), 129,8 (C, C-12), 127,2 (C, C-13), 192,2 (C, C-13a), 89,2 (C, C-13b), 172,7 (C, C-13c), 150,1 (C, C-14), 104,4 (C, C-15), 162,8 (C, C-16), 173,8 (C, C-17c), 173,0 (C, C-19), 129,2 (CH, C-3a), 98,1 (CH, C-5), 104,4 (CH, C-10), 52,0 (CH, C-17), 50,5 9CH, C-18), 94,0 (CH, C-20), 123,1 (CH₂, C-3b), 19,7 (CH₂, C-8a), 31,8 (CH₂, C-17a), 31,3 (CH₂, C-17b), 60,7 (CH₂, C-17d), 17,6 (CH₃, C-8b), 14,3 (CH₃, C-17e), 22,9 (CH₃, C-18a), 12,3 (CH₃, C-2a), 11,4 (CH₃, C-7a), 12,6 (CH₃, C-12a), 53,6 (OCH₃-13d).

5.10. Constantes físicas e dados espectroscópicos de Quercetina 3-O- α -L-raminosídeo



FM. C₂₁H₂₀O₁₁

PM. 448 uma

P.F. °C

Aspecto. Pó amarelo

Solubilidade. Metanol

Espectroscopia de RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD). 6,18 (d, *J* = 1,8 Hz H-6), 6,35 (d, *J* = 1,8 Hz H-8), 7,50 (d, *J* = 2,4 Hz H-2'), 6,99 (d, *J* = 8,4 Hz H-5'), 7,39 (dd, *J* = 8,4; 1,0 Hz H-6'), 5,32 (d, *J* = 1,5 Hz H-1''), 4,21 (dd, *J* = 3,3; 8,0 Hz H-2''), 3,73 (dd, *J* = 9,0; 3,0 Hz H-3''), 3,35 (m, H-4''), 3,42 (m, H-5''), 0,94 (d, *J* = 1,5 Hz CH₃-6'').

Espectroscopia de RMN ¹³C (50MHz, CD₃OD). 159,2 (C, C-2), 136,2 (C, C-3), 179,6 (C, C-4), 163,2 (C, C-5), 165,8 (C, C-7), 158,5 (C, C-9), 105,8 (C, C-10), 122,9 (C, C-1'), 146,4 (C, C-3'), 149,7 (C, C-4'), 99,7 (CH, C-6), 94,6 (CH, C-8), 119,9 (CH, C-2'), 116,3 (CH, C-5'), 122,8 (CH, C-6'), 103,3 (CH, C-1''), 71,8 (CH, C-2''), 72,0 (CH, C-3''), 73,2 (CH, C-4''), 71,8 (CH, C-5''), 18,2 (CH₃, C-6'').

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com o estudo fitoquímico de *X. langsdorffiana* e *F. longifolia*, concluímos que:

A espécie *X. langsdorffiana* apresentou em sua constituição química alcalóides do tipo protoberberínicos e diterpenos do tipo atisano e labdano. Esses tipos de constituintes corroboram com a quimiotaxonomia de Annonaceae, em especial do gênero *Xylopi*a.

Do caule de *X. langsdorffiana* foram isolados dois novos diterpenos trachylobanos, o ácido *ent-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico* e o ácido *ent-7 α -hidroxitrachyloban-18-óico*. O primeiro apresentou citotoxicidade em células V79 e hepatócitos de ratos com CI-50 de 224 e 231 μ M. Esses dois diterpenos também apresentam importância quimiotaxonômica para o gênero, pois são raros e poucos estudos farmacológicos são descritos.

Das folhas de *X. langsdorffiana* foi isolado o *ent-7 α ,16 α* diol ao qual foi dado o nome comum de Xylodiol. Trata-se de um novo diterpeno atisano que apresentou atividade citotóxica em células V79 e hepatócitos de ratos com CI-50 de 56 μ M além do já conhecido ácido 8(17)12*E*,14-labdatrien-18-óico que apresentou uma CI-50 de 138 μ M nos mesmos modelos acima. Esse diterpeno possui várias atividades farmacológicas já comprovadas pelo grupo de pesquisa do LTF, por exemplo, atividade relaxante da musculatura lisa e hipotensora.

A caracterização dos constituintes voláteis das folhas de *X. langsdorffiana* mostrou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos sendo espatulenol o constituinte majoritário. Essa informação corrobora com dados da literatura que mostram o espatulenol como um marcador para o gênero *Xylopi*a. O óleo essencial das folhas de *X. langsdorffiana* apresentou excelente atividade moluscicida com uma CI-50 de 3,72 μ g/mL, podendo então ser utilizado na profilaxia da esquistossomose.

Ainda foram isolados de *X. langsdorffiana* um esteróide, um flavonóide glicosilado e um feoforbídeo 13b (S)-hidroxi-17c-etoxifeoforbídeo, sendo este o primeiro relato numa espécie vegetal.

Os diterpenos ácido *ent-7 α -acetoxitrachyloban-18-óico*, ácido 8(17)12*E*,14-labdatrien-18-óico e Xylodiol apresentaram excelente atividade moluscicida frente ao *Biomphalaria glabrata* com as respectivas CI-50 de 18,95, 4,45 e 14,93 ppm. Esses valores estão bem abaixo daqueles preconizados pela OMS, indicando que esses terpenóides são potentes moluscicidas.

Da espécie *F. longifolia* foram isolados dois alcalóides, estefolidina, primeiro relato no gênero e *O*-metilmoscatolina. O gênero *Fusaea* possui apenas duas espécies sendo o relato desses alcalóides de importância quimiotaxonômica para o mesmo. A caracterização do óleo essencial das suas cascas do caule apresentou o espatulenol como constituinte majoritário.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. G. S.; LUCIO, A. S. S. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; SILVA, M. S.; Da-CUNHA, E. V. L.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. **Biochem. System. and Ecol.** v. 35, p. 456-458, 2007.

ANDRADE, N. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; Da-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. Terpenoids of the Annonaceae: Compilation and Distribution of data NMR ¹³C. **Recent. Res. Devel. Phytochem.**, v.7, p. 1-85, 2003.

ANDRADE, N. C. Terpenóides de Annonaceae: Distribuição e compilação de dados de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C e Estudo fitoquímico de três espécies de *Xylopi*: *Xylopi caynnensis* Maas, *Xylopi langsdorffiana* e *Xylopi involucrata*. Tese de Doutorado, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), UFPB, João Pessoa, 2004.

ASEKUN, O. T.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopi aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v. 75, p. 368-370, 2004.

AURA, M. P. D. de. Neolignans from *Anaxagorea clavata*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 345-346, 1997.

BARREIRO, E. J. Produtos Naturais e Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Quím. Nova**, v.13, p. 29-39, 1990.

BARROSO, G. M.; **Sistemática das angiospermas do Brasil**. LTC – Livros Técnicos e Científicos Ed. S. A./ Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 1, p. 28-33, 1978.

BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, L. C.; TCHAIKOVSKI. Estudo Fitoquímico e Avaliação do Potencial Antidiabético do *Cissus sicyoides* L. **Quím. Nova**, v. 24, p. 783-785, 2001.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; POLO, M. C. Z.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, p. 269-303, 2005.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. V.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. L. H.; LLABRÈS, G.; PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLEREQ, J. Diterpenes from leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, p.1165-1171, 2004.

BRAZ-FILHO, R.; GABRIEL, S. J.; GOMES, C. M. R.; GOTTLIEB, O. R.; BICHARA, M. D. G. A.; MAIA, J. G. S. Oxoaporphine Alkaloids from *Fusaea longifolia* and *Siparuna guianensis*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1187-1188, 1976.

BRUMMITT, R. K. **Vascular Plant - Families and Genera**, p. 491, 1992.

CAPRON, A. Forty Years' War on the Worm. **Parasitology Today**, v. 14, p. 379, 1998.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (ed.). Chapecó: Argos Ed. Universitária, 2001.

CHADWICK, D. J.; Mrsh, J. (Editors). **Bioactive Compounds from Plants**. John Wiley, New York, 1990.

CHATROU, L. W.; HE, P. Studies in Annonaceae XXXIII. A revision of *Fusaea longifolia* (Baill) Saff., **Brittonia**, v. 51, p. 181-203, 1999.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N. et al. (eds.). **Flowering Plants of Neotropics**. New York: New York Botanical Garden, p. 18-20, 2004.

COLMAN-SAZARITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N. R. Bioactive Annonaceous Acetogenins From The Bark of *Xylopiia aromatica*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 486-493, 1994.

CORDELL, G. A. The discovery of plant anticancer agents. **Chemistry and Industry**, Nov., 841, 1993.

CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**, p. 315, 1984.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52, 1997.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., YANG, S. S., Natural Product Extracts of Plant and Marine Origin Having Antileukemia Potential. The NCI Experience. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 488-498, 2006

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**, New York: Columbia University Press, p. XIII- XVIII, 1981.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth.**, v. 89, p. 271-277, 1986.

FECHINE, I. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V.L. Two new alkaloids from *Hornschurchia obliqua*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 29-33, 2003.

FELÍCIO, J.D.; ROQUE, N.F. Constituição Química dos Frutos de *Xylopia amazonica* In: 41º Reunião Anual da SBPC, p. 519, 1989.

FLEISCHER T. C., ROGER D. WAIGH and PETER G. WATERMAN. Bisabolene sesquiterpenes and flavonoids from *Friesodielsia enghiana*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 315-318, 1997.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. A. Fitoquímica Amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**, n. 34, p. 252, 1978.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo I, p. 14, 5° ed. Ver. Ampl. Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 2003.

HARRIGAN, G. G.; BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. Kaurane and trachylobane diterpenes from *Xylopi aethiopica*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 109-113, 1994.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflazen**. Basileia e Suttgart, Birkhause Verlag, v.3, p. 116, 1964.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs N. S., 1985.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**, Oxford, Clarendon Press, p. 22-168, 1973.

JIN, P. F.; DENG, Z. W.; PEI, Y. H.; LIN, W. H. Two Phaeophytin Type Analogues from Marine Sponge *Dysidea sp.* **Chin. Chem. Lett.**, v. 16, p. 209-211, 2005.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R.; TEMPESTA, M. S.; KRIEK, G. R.; BATES, R. B. **J. Org. Chem.**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

JOSSANG, A.; LEBOEUF, M.; CAVE, A.; PUSSET, J. Alkaloids of Annonaceae, 96. **J. Nat. Prod.**, v. 54, p. 466-472, 1991.

JURBERG, P.; VASCONCELIOS, M. C.; MENDES, N. M. Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 84 (suppl I), p. 76-86, 1989.

KAMPERDICK, C.; PHUONG, N. M.; ADAM, G.; SUNG, T. V. Guanine dimmers from *Xylopi aethiopica*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 811-816, 2003.

KLOOS, H.; McCOLLOUGH, F. S. **Plants with recognized molluscicidal activity**. MOOT, K. E., ed. Plant Molluscicides. Chicester: John Wiley & Sons and Geneva: UNDP/World Bank/WHO, p. 45-108, 1987.

- LAGO, J. H. G.; MOREIRA, I. C.; TANIZAKI, T. M.; MORENO, P. R. H.; ROQUE, N. F.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Mono and Sesquiterpenes from the Leaf Essential Oil of *Xylopia brasiliensis* Spreng. (Annonaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 15, p. 406-407, 2003
- LARDANS, V.; DISSOUS, C. Snail Control Strategies for Reduction of Schistosomiasis Transmission. **Parasitology Today**, v. 14, p. 413, 1998.
- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae . **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783, 1982.
- LIMA, M. A.; FECHINE, I. M.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria juruensis* **Biochem. System. and Ecol.** v. 31, p. 423-425, 2003.
- LOBÃO, A. Q.; ARAÚJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.
- MAAS P. J. M.; H.M.-V.D. KAMER, L. JUNIKKA, R. D. MELLO-SILVA and H. RAINER: Annonaceae from Central-eastern Brazil, **Rodriguésia**, v. 52, p. 65, 2001.
- MACÊDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais utilizadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da bacia do alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14 (supl. 1) p. 40-44, 2004.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, A. C. M.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L. M. M.; ARAÚJO, J. S. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopia* species. **Flavour Fragr. J.**, v. 20, p. 474-477, 2005.
- MAMOUDOUKANDE, K.; PHILIPPOV, S.; DUTSCHEWSKA, H. Alkaloids of *Xylopia aethiopica*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 89-90, 1994.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant Molluscicides. **Phytochemistry**, v. 24, p. 639-652, 1985.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S., Planejamento racional de Fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MORAIS, M. P. L.; ROQUE, N. F., Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*, **Phytochemistry**, v. 27, p. 3205-3208, 1988.

MOREIRA, I. C. Estudo químico de *Xylopia emarginata* e *Xylopia brasiliensis* São Paulo, 203p. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1999.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K. LAGO, J. H. G., Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 55-58, 2007.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G. e ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochem. System. and ecol.**, v. 31, p. 535-537, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO A. A.; RIBEIRO, E. A. N.; OLIVEIRA, J. M.; MDEIROS, F. A.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopia cayennensis* in rats. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 17-21, 2006.

NISHYIAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; MUTISO, P. B. C. E JUMA, F. D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 939-944, 2004.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO,

L. C. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 1, 2 p.

ROCHA, B. A., SILVA, J. B. e PANNIZA, S. Anatomy and Essential Oil of *Xylopia frutescens* Aublet, Fruit. **Rev. Cienc. Farm.**, v. 2, p. 101,1979.

RUPRECHT, J. K.; HUI, Y. H. MC LAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **J. Nat. Prod.**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1984.

SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Tetrahydroprotoberberine and aporphine alkaloids from *Rollinia leptopetala*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 318-320, 2000.

SETTE, I. M. F. Contribuição ao estudo fitoquímico de annonaceae e revisão de alcalóides protoberberínicos. Tese de Doutorado, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), UFPB, João Pessoa, 2003.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H. O.; MARTINS, M. V. **Plantas Medicinais no Brasil: aspectos Gerais sobre legislação e comércio**. Disponível em: http://www.traffic.org/publications/trafficc_portu.pdf. Acesso em 17 dez de 2006.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. D. Studies on succinate-tetrazolio reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolio salts. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Rev. Bras. Bot**, v. 26, p. 175-184, 2003.

TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; BAYMA, J. C. E OLIVEIRA, A. B. Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopi frutescens*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 607-609, 1995.

TAVARES, J. F. Alcalóides de *Xylopi langsdorffiana* A. St. Hil & Tul (Annonaceae). Dissertação de mestrado, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), UFPB, João Pessoa, 2004.

THOMAS, O. O. **Fitoterapia**, v. LX, p. 147-155, 1989.

TUCHINDA, P.; POHMAKOTR.; M.; MUNYOO, B.; REUTRAKUL, V.; SANTISUK, T. An azaanthracene alkaloid from *Polyalthia suberosa*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 1079-1082, 2000.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARRERO, E. J.; Os Produtos Naturais e a química Medicinal Moderna, **Quím. Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VIEGAS-JUNIOR, V. F.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. Plantas Medicinais: Cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

WAHI, A.; ROBLOT, F.; CAVE, A. Isolation and Structure Elucidation of Xylobuxin, A New Neolignan from *Xylopi buxifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 54, p. 786-789, 1995.

ZHOU, D. C.; ZITTOUN, R.; MARIE, J. P. Homoharringtonine: An effective new natural product in cancer chemotherapy. **Bulletin du Cancer**, v. 82, p. 987, 1995.

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](#)