

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA



ESTUDO FITOQUÍMICO DE TRÊS ESPÉCIES DE *DASYPHYLLUM*

Márcia Maisa de Freitas Afonso
Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP
como parte das exigências para obtenção do título
de MESTRE EM CIÊNCIAS.
Área: QUÍMICA ORGÂNICA.

RIBEIRÃO PRETO

1997

Este trabalho foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Diones Ap. Dias.

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MÁRCIA
MAÍSA DE FREITAS AFONSO, APRESENTADA A FACULDADE DE FILOSOFIA,
CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, NO DIA
29 DE ABRIL DE 1997.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof^a Dr^a DIONES A RECIDA DIAS (orientadora)

Prof. Dr. ÁLVARO CABRERA

Prof^a Dr^a ELENICE MOURO VARANDA

A DEUS.....

À minha mãe, Dalva, por estar
sempre presente.

Aos meus irmãos Marta, Marcos
(in memoriam) e Márcio.

Aos demais parentes que de
alguma forma colaboraram.

MÃE;

Não sei precisar as noites que a luz do meu quarto não lhe deixou dormir, ou as preocupações que a minha ausência lhe causou.

Não sei quantas vezes minhas provas de amor foram suas provas de amor.

Não sei se ao me dar a vida, me imaginou capaz de um dia lidar com outras vidas.

Mas sei que só você, mãe por natureza, por opção e amor representa a verdadeira heroína dessa vida.

AOS MESTRES;

Aos meus mestres e orientadora dedico o resultado de um esforço comum, consciente e honesto em prol do desenvolvimento e valorização de minha atividade profissional.

Minha homenagem aqueles que dedicam suas vidas ao ensino, pois é deles o mérito de moldar as vocações e incentivar o raciocínio dos estudantes, transformando seus ideais em realizações.

Minha gratidão aqueles que repartiram comigo seus conhecimentos, colocando em minhas mãos as ferramentas com as quais abrirei novos horizontes, rumo à satisfação plena de meus ideais profissionais e humanos.

AOS COLEGAS;

“A todos colegas que compartilharam comigo os anos de estudo e expectativa no cotidiano da vida, sabendo cultivar uma amizade que o tempo amadureceu, os meus sinceros agradecimentos.

E que, mesmo agora quando eu partir para um novo caminho, não se apague ou esmaça o brilho do respeito mútuo e do companherismo.”

À minha grande amiga **ANA CLAUDIA BARRACHI COSTA**
SACILOTTO, que nunca mediu esforços para auxiliar alguém.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Diones Aparecida Dias pela amizade e orientação.

A Profa. Dionéia Camilo R. de Oliveira pela colaboração.

Aos Profs. João Luís C. Lopes e Walter Vichnewski pela contribuição.

A Profa. Pierina Sueli Bonato por toda ajuda prestada.

Ao Djalma, Virginia (Dep. Química) e Nivaldo (IQ-UNESP) pelos espectros e amizade.

Ao Tomaz, Diogênes, Leonardo, Gilberto e Cristina pelos favores prestados.

A grande amiga Selma, *in memorian*, pelos momentos.

As secretárias Rosana e Irani pelos favores e simpatia.

Ao Prof. Dr. Hermogenes de F. Leitão Filho (Dep. de Botânica do Instituto de Biologia - UNICAMP) , *in memorian*.

A Ieda e José Orestes pelos auxílios prestados.

A Profa. Dra. Elenice Mouro Varanda (Dep. de Biologia - USP- Ribeirão Preto).

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

No presente trabalho foram estudados os extratos em hexano e acetato de etila das partes aéreas (caule, folhas e flores) de *Dasyphyllum brasiliensis* (Spreng) Cabrera; o extrato em hexano/acetato de etila 8:2 das raízes de *Dasyphyllum cryptocephallum* (Baker) Cabrera e o extrato em acetato de etila das partes aéreas (caule, folhas e flores) de *Dasyphyllum synacanthum* (Baker) Cabrera.

Através de técnicas cromatográficas de isolamento e purificação, foram obtidas as seguintes substâncias:

De *D. brasiliensis* o éster: 3,4 dihidroxi-cinamato de etila, o esteróide: estigmasterol e os triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol.

De *D. cryptocephallum* o esteróide glicosilado: 3-O- β -D-glicopiranositosterol.

De *D. synacanthum*: o ácido salicílico e um triterpeno acilado: 3- β -Lup20(29)-eno.

Todas as substâncias foram isoladas pela primeira vez no gênero *Dasyphyllum*.

As estruturas das substâncias, foram propostas à partir da comparação dos dados obtidos através dos métodos espectroscópicos IV, UV, RMN- ^1H e de ^{13}C , com os dados da literatura.

SUMÁRIO

Abreviaturas utilizadas.....	iii
I - Introdução.....	01
II - Objetivos.....	11
III - Especificações dos materiais e instrumentos utilizados.....	12
IV - Parte Experimental.....	14
IV.1 - Coleta e identificação dos vegetais.....	14
IV.2 - Obtenção dos extratos brutos.....	15
IV.3 - Partição do extrato bruto em acetato de etila de <i>D. brasiliensis</i>	16
IV.4 - Fracionamento do extrato em diclorometano (2).....	17
IV.4.1 - Isolamento dos constituintes químicos da fração VII.....	19
IV.5 - Partição do extrato bruto em hexano de <i>D. brasiliensis</i>	22
IV.5.1 - Fracionamento do extrato em clorofórmio (5).....	23
IV.5.2 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.....	24
IV.5.3 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.1.....	26
IV.5.4 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.3 e III.5....	28
IV.6- Fracionamento do extrato em hexano/acetato de etila 8:2 de <i>D. cryptocephallum</i>	30
IV.7-Fracionamento do extrato em acetato de etila de <i>D. synacanthum</i>	33
IV.7.1 -Isolamento dos constituintes químicos da fração X, XV	35

V - Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	37
V.1 - Identificação de Db.1.....	37
V.2 - Identificação de Db.2.....	44
V.3 - Identificação de Db.3.....	51
V.4 - Identificação de Db.4.....	59
V.5 - Identificação de Dc.1.....	64
V.6 - Identificação de Ds.1.....	71
V.7 - Identificação de Ds.2.....	77
VI - Conclusão.....	82
VII - Apêndice.....	84
VII.1 - Biossíntese.....	84
VII.2 - Ensaio Biológico.....	93
VIII - Referências Bibliográficas.....	97

SÍMBOLOS E SIGLAS

CLV : Cromatografia Líquida à vácuo

CCDC : Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP : Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

UV : Espectroscopia no Ultravioleta

IV : Espectroscopia no Infravermelho

RMN-¹H e de ¹³C : Ressonância Magnética Nuclear de próton e de carbono

DEPT : Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer

s : singleto, sl : singleto largo

d : dubleto

dd : duplo dubleto

ddd : duplo duplo dubleto

t : tripleto

q : quarteto

m : multipleto

ppm : deslocamento químico

J : constante de acoplamento

I - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

A parte da química orgânica que trata do estudo das estruturas moleculares e da química dos compostos produzidos pela atividade celular dos seres vivos é extremamente ampla e diversificada. As substâncias resultantes do metabolismo primário, glicídios, protídios e lipídios, são estudadas principalmente no âmbito da bioquímica, enquanto que os produtos do metabolismo secundário das plantas, as micromoléculas como terpenóides, alcalóides, glicosídios, entre outras são estudadas no âmbito do que se chama química produtos naturais [01,02].

Esta ciência tem por objetivo imediato, o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, através de seu isolamento e elucidação estrutural [03].

A importância científica das pesquisas desenvolvidas nesta área se traduz tanto pelos resultados obtidos com a consecução de seus objetivos, bem como pela aplicação imediata ou mediata destes resultados à outras áreas científicas correlatas.

O isolamento e a caracterização destas substâncias podem constituir-se em tarefas relativamente simples, mas muitas vezes exigem do pesquisador além dos conhecimentos específicos, boa dose de imaginação, raciocínio e paciente esforço.

O estudo químico das plantas pode ser realizado em algumas etapas, entre elas, a escolha da planta a ser estudada, sua identificação, o conhecimento prévio sobre a espécie identificada e suas congêneres, o

isolamento, purificação e a identificação de seus principais constituintes químicos.

Os produtos naturais são importantes também em Botânica, pois determinadas classes de substâncias podem caracterizar certas famílias vegetais, como por exemplo as lactonas sesquiterpênicas presentes na família Asteraceae [04-06].

Constam em relatos mais recentes [07,08] que esta família contém 3 subfamílias com 17 tribos, 82 subtribos, distribuídas em 1535 gêneros e cerca de 23.000 espécies [04,09].

A família Asteraceae, além de numerosa, é reconhecidamente rica em metabólitos secundários. Entre os constituintes químicos mais frequentes nesta família, devem ser destacados além das lactonas sesquiterpênicas, os triterpenóides, diterpenóides, flavonóides e acetilenos. São atribuídas a essas substâncias uma grande diversidade de atividades biológicas e/ou farmacológicas [04,10,11].

A subfamília Barnadesioideae, contém 92 espécies em 9 gêneros que são exclusivos da América do Sul, com a maior parte de suas espécies distribuídas nos Andes. Estas não representam ou lembram mais os ancestrais da tribo primitiva Mutisieae [08].

Os gêneros de Barnadesioideae são variáveis e especializados em muitos caracteres: *Doniophyton* e *Duseniella* são anuais; *Schlechtendahlia* e *Huarpea*

são ervas perenes; *Arnaldoa*, *Barnadesia*, *Dasyphyllum* e *Fulcaldea* incluem arbustos bem como pequenas árvores e *Chuquiraga* é o gênero com espécies de caules mais ramificado, com folhas xeromórficas, duras e pungentes.

A subfamília Barnadesioideae foi primeiro reorganizada como um grupo por Cassini (1827). Os gêneros conhecidos nesta época (*Barnadesia*, *Chuquiraga*, *Dasyphyllum* e *Fulcadea*, embora por outros nomes) foram agrupados como uma subtribo na Carlineae. Na época Cassini não incluiu os gêneros de Barnadesioideae em Mutisieae. Ele observou que os gêneros pertencentes a subfamília Barnadesioideae podiam ser diagnosticados por flores vilosas, papus plumosos duros e corolas diferentes das do tipo bilabiada mutisioide.

Mais tarde os gêneros de Barnadesioideae foram separados em diferentes subtribos dentro da tribo Mutiseae (Bentham 1837a, Hoffman 1890 apud. 8), mas reunidos numa única subtribo por Cabrera (1959, 1961, 1977 apud. 8), que usou como caracteres distintivos as corolas vilosas, o papus plumoso, estiletos curtamente bilobados e glabro ou papiloso mas não pilosos, e a frequente presença de espinhos axilares. Cabrera (1977) reconheceu oito gêneros na subfamília, classificando *Dusenilla* em Mutisieae-Gochnatiinae, embora ela já tivesse sido referida como sendo da tribo Barnadesiinae por Jeffrey (1967).

Um significativo passo para o entendimento da Mutisieae e a filogenia da família foi dado quando Jansen & Palmer (1987) descobriram que uma grande inversão do DNA do cloroplasto em toda família Asteraceae era ausente em

Barnadesia. Mais tarde foi demonstrado que também não havia inversão nos gêneros *Chuquiraga* e *Dasyphyllum*.

A estreita relação entre estes gêneros e o restante dos gêneros que compõem a família Asteraceae, recebeu futuros suportes da morfologia (Bremer 1987) e, mais tarde, Barnadessiinae foi elevada a nível de subfamília, Barnadesioideae (Bremer e Jansen, apud. 8).

A maioria das Barnadesioideae tem como peculiaridade, os espinhos axilares não encontrados em outras Asteraceae. Os espinhos aparecem aos pares, algumas vezes solitários ou unidos de 3-5 entre a folha e a gema axilar. A homologia dos espinhos é desconhecida. Cabrera (1959) interpretou os espinhos simples como apêndices ou expansões do nó. Goebel (1932), Chung (1965) e outros consideraram os espinhos como homólogos a folhas e caules. De acordo com estas interpretações, há duas séries de gemas axilares, a inferior desenvolvendo espinhos e a superior em brotos comuns.

A principal característica distintiva de Barnadesioideae é a pubescência de longos tricomas, presentes na corola, cipsela e papus da maioria das espécies. Os tricomas são unicelulares e ligados por células basais mais ou menos alargadas (Bremer 1987, Hansen 1991). Este tipo de pubescência floral não é conhecida em outra Asteraceae. Pela presença de tricomas, o papus é geralmente descrito como plumoso; entretanto tricomas de papus plumoso em outras Asteraceae tem células alongadas que são idênticas a outras células do papus exceto por seu comprimento.

Barnadesioideae foi inicialmente incluída em Mutisieae por suas corolas bilabiadas. Entretanto o termo bilabiada tem sido usado indiscriminadamente para estruturas não homólogas como discutido por Small (apud. 8) e Hansen (apud. 8).

Realmente, Barnadesioideae tem uma corola pseudobilabiada com um limbo 4-lobado e um lobo adaxial único, enquanto que a corola mutisioide bilabiada é composta de limbo 3-lobado e 2 lobos adaxiais. Em Barnadesioideae cada corola verdadeiramente bilabiada está presente somente nas flores do disco de algumas espécies de *Barnadesia* peculiares, e a morfologia desses discos é altamente variável. Igualmente, a corola pseudobilabiada de Barnadesioideae está ausente na Mutiseae, **sensu stricto**, exceto no disco de flores de algumas espécies peculiares de *Onoseri* (possivelmente também algumas de outros gêneros) cuja morfologia das flores do disco é altamente variável. As corolas bilabiadas em algumas *Barnadesia* evoluíram independentemente de corolas bilabiadas em Mutisieae, e as corolas pseudobilabiadas em algumas *Onoseris* evoluíram independentemente das corolas pseudobilabiadas de Barnadesioideae. Os dois grupos tem fundamentalmente diferentes tipos de corolas zigomorfas.

As corolas de Barnadesioideae não são sempre zigomorfas e pseudobilabiadas. Frequentemente a corola é actinomorfa e mais ou menos profundamente 5-lobada. Algumas vezes um lobo é separado por divisões mais profundas havendo uma gradual transição para o tipo pseudobilabiada. Em algumas corolas pseudobilabiadas, os limbos 4-lobado e o lobo adaxial são

iguais em comprimento, em outros, o membro é mais longo e expandido. Há também espécies nas quais somente uma das divisões entre 5 lobos é mais profunda e há uma transição gradual entre corolas actinomorfas e liguladas, a última com uma lígula 5-lobada. As lígulas não são longas e expandidas, todavia, como em Lactuceae, as corolas liguladas em Barnadesioideae são morfologicamente próximas a actinomorfas. As espécies Barnadesioideae são variáveis nas estruturas das anteras. Em *Barnadesia*, *Fulcadea*, *Huarpea* e *Schlechtendahlia* as anteras são tanto não calcaradas e não caudadas, como somente curtamente caudada. Os outros gêneros tem tanto calcaradas como também anteras caudadas. *Dasyphyllum* está circunscrito por suas anteras peculiares, com apêndices apicais profundamente bilobados (em algumas espécies truncado a emarginado), diferentemente da maioria das demais Barnadesioideae e também das Asteraceae em geral (Cabrera 1959).

O pólen de muitos gêneros na Barnadesioideae é semelhante aos de muitos gêneros de Mutiseae. Ele é liso a granular sem espinhos, embora alguns autores (ex. Parra & Marticorena 1972) tenham descrito a superfície granular como tendo espínulas ou espinhos vestigiais. Em alguns gêneros o pólen tem depressões ou concavidades entre os colpos (Wodehouse 1929b, Hansen 1991b). Estas depressões intercolpares têm sido mencionadas como um carácter potencial unindo Calyceraceae e Asteraceae (Skvarla *et al.* 1977, Hansen 1991a). Em *Barnadesia* o pólen tem um sistema regular de cume liso (psilolofado), que lembra um favo de mel em sua superfície o que ocorre também em *Huarpea*. Wodehouse (1928 a) especulou que pólen com muitas

depressões intercolpar poderia ser ancestral de pólen psilolofado da *Barnadesia*.

Estiletes em Barnadesioideae são curtamente bilobados, algumas vezes mais profundamente bilobados mas não com ramos de estiletes longos, e glabros ou somente papilosos. Os estiletes nunca são pilosos como na maioria das outras Asteraceae, todavia Hansen (1991) se referiu as papilas de Barnadesioideae como estiletes pilosos

1.2 - Cladística de Barnadesioideae.

Cabrera (1959) considerou *Dasyphyllum*, e especialmente o subgênero *Archidasyphyllum*, como primitivo e ancestral dos outros gêneros. *Dasyphyllum* é o gênero mais amplo de Barnadesioideae, com aproximadamente 40 espécies de árvores e arbustos, muitas delas ocorrendo no Brasil. Cabrera derivou *Chuquiraga*, *Barnadesia*, *Schlechtendahlia*, e *Fulcaldea* diretamente de *Dasyphyllum*. Os gêneros *Chuquiraga* e *Barnadesia*, cada um com mais ou menos a metade do número de espécies de *Dasyphyllum*, são arbustos e raramente, pequenas árvores principalmente distribuídas ao longo dos Andes.

Arnaldoa é um arbusto que ocorre no Peru e Cabrera o coloca como intermediário entre *Dasyphyllum* e *Chuquiraga*.

A análise cladística de Barnadesioideae foi tentada por Hansen (1991), mas resultou em uma árvore de consenso estrito. Os nove gêneros foram aceitos como taxa na análise. O grupo correlacionado a Barnadesioideae é vasto e variável em todas as Asteraceae. Na comparação das várias tribos desta família com Barnadesioideae, a tribo Mutisieae é a mais relacionada a

elas por seus caracteres. Mutisieae também contém muitos gêneros e grupos genéricos na base da árvore desta família (Kaus *et al.* 1992). Ainda, Mutisieae, excluindo a apomórfica Nassauviinae, foi usada como um grupo externo para análise.

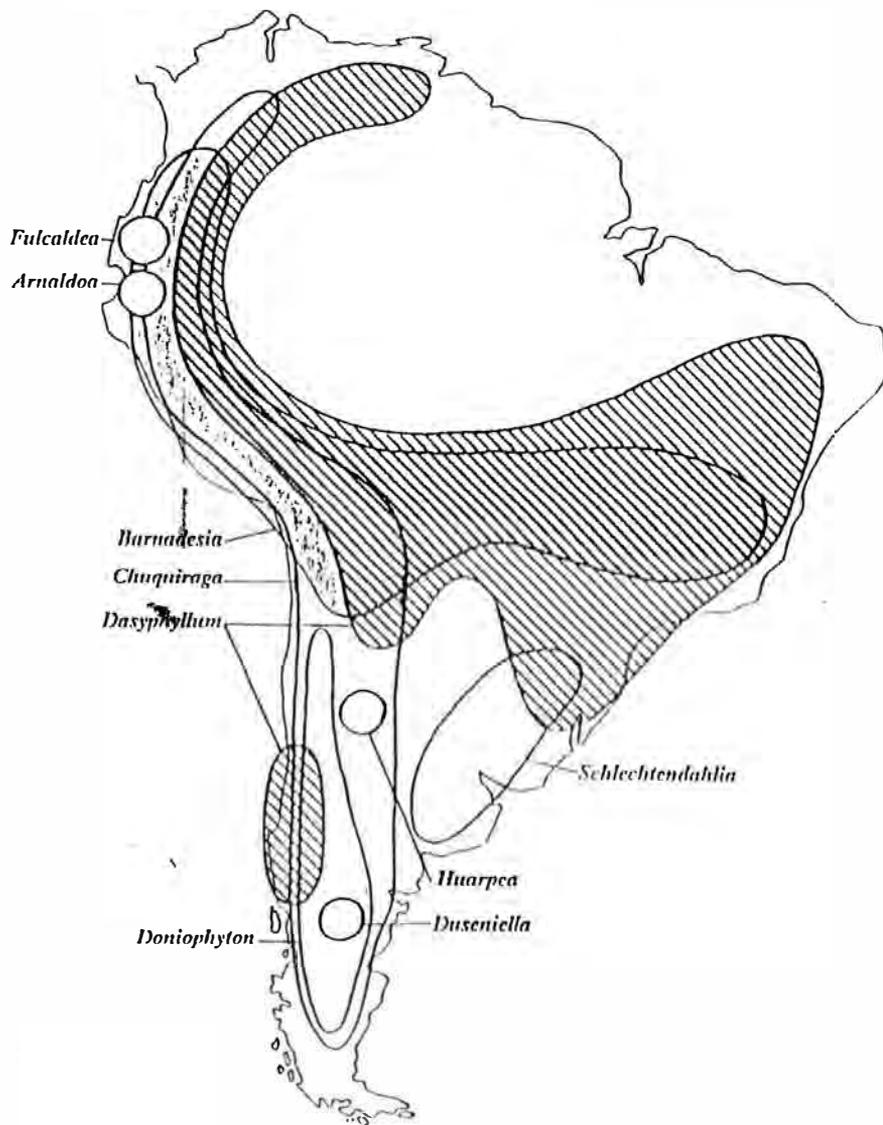


Figura 1: Distribuição geográfica dos gêneros de Barnadesioideae [08].

1.3 - O gênero *Dasyphyllum*.

Arbusto ou pequenas árvores geralmente com espinhos axilares e folhas inteiras coriáceas, frequentemente pungentes e trinervadas. Capítulo solitário, corimboso ou em panícula, homogâmico. Flores hermafroditas, raramente funcionam como masculinas ou femininas. Actinomorfas e profundamente 5-lobadas, às vezes com um lobo mais interno separado por fendas profundas, com corola pseudobilabiada mas, sem um limbo expandido, ou ligulado, branca, violeta ou avermelhada. Corola de lobos vilosos, tubo geralmente viloso. Anteras bilobadas apicalmente ou emarginada, raramente truncada, curtamente caudada na base. Estiletes curtamente bilobados, glabros ou papilosos na parte superior. Cipselas oblonga-obovoides, pubescentes ou raramente glabras. Pappus de muitas cerdas, vilosos. Possui 40 espécies localizadas na América do Sul, especialmente no Sul do Brasil e ao longo dos Andes, e no Sul do Chile (figura 01).

Os vegetais escolhidos para o presente estudo, foram três espécies brasileiras deste gênero: *D. brasiliensis*, *D. cryptocephallum* e *D. synacanthum*, dos quais não há na literatura relatos sobre estudos da sua composição química.

II - OBJETIVOS

A partir da coleta do vegetal e obtenção de seus extratos, o estudo de espécies de *Dasyphyllum*, nativos do Brasil, visa:

a) extração, isolamento e purificação de metabólitos secundários neles presentes, através de métodos cromatográficos de fracionamento, os quais poderão variar em função da peculiaridade dos extratos.

b) elucidação estrutural das substâncias naturais puras, através de análise espectrométrica: espectroscopia de UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C .

c) avaliação da atividade biológica .

d) contribuir para a química de mais algumas espécies brasileiras da família Asteraceae.

**III - ESPECIFICAÇÕES DOS
MATERIAIS E INSTRUMENTOS
UTILIZADOS.**

a. CC clássica: foram utilizadas colunas de vidro, de diferentes capacidades, como adsorvente usou-se Sephadex-LH 20 (Sigma, 25-100 μ) e sílica gel 60 Art. 7734 (70-230 mesh ASTM).

b. CLV: foram utilizadas colunas contendo placa de vidro sinterizado na base, com juntas e adaptadores especiais. Foi empregado, como adsorvente, sílica gel D (Riedel-de-Häen), 400 mesh ASTM).

c. CCDC: As placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel GF₂₅₄ (Merck, 7730) em água destilada, sobre placas de vidro , com espessura de 0,25 mm para a camada de sílica gel, empregando-se espalhador. Foram utilizados como reveladores das placas cromatográficas:

- * radiação ultravioleta (lâmpada Mineralight, modelo UV-GL-25, multiband UV-254/366);

- * vapores de iodo (Merck) ressublimado;

- * nebulização com ácido sulfúrico concentrado, seguido de aquecimento em chapa (100°C), até o aparecimento das manchas correspondentes às substâncias presentes.

d. CCDP: foram empregadas placas de vidro , sendo que a camada de sílica gel (PF₂₅₄ Merck, 7747) foi de 1 mm, aplicada através de espalhador.

e. Determinação dos pontos de fusão: foram realizadas em bancada de Köfler, montado em microscópio.

f. Espectros no IV: foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1420, utilizando pastilha de KBr anidro para substâncias sólidas ou filme em

CHCl_3 , depositado em placa de NaCl , para extratos brutos, frações ou substâncias puras, em forma de óleo ou goma. Como referência, foi empregado filme de poliestireno.

g. Espectros de RMN- ^1H e de ^{13}C : foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos AC-80 (operando a 80 MHz para ^1H e 20 MHz para ^{13}C), AC-200 (IQ - Unesp Araraquara, operando a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C) e AC-300 (operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).

h. Espectros de massas: foram obtidos em espectrômetro de baixa resolução, da marca Hewlett-Packard, por impacto eletrônico a 70 eV.

i. Solventes: para as colunas cromatográficas clássicas e CLV foram utilizados solventes orgânicos comerciais destilados, para CCDP e recristalizações, solventes PA.

j. Evaporação de solventes: foram utilizados evaporadores rotativos.

IV - PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 - Coleta e identificação dos vegetais

Dasyphyllum brasiliensis (Spreng) Cabrera (voucher 48.979) e *Dasyphyllum synacanthum* (Baker) Cabrera (voucher 30.905) , foram coletados no Mirante do Paranapanema, município de Teodoro Sampaio, *Dasyphyllum cryptocephallum* (Baker) Cabrera, foi coletado na região de Furnas - MG , em seu habitat natural, todos durante a floração.

A identificação destes vegetais foi feita pelo Prof. Dr. Hermógenes de Freitas Leitão Filho (in memorian), do Instituto de Biologia da UNICAMP.

IV.2 - Obtenção dos extratos brutos

Todas as partes dos vegetais foram secadas em estufa com ar circulante à 40°C e em seguida pulverizadas em moinho, em seguida foram extraídas com solventes orgânicos (maceração), para obtenção dos extratos brutos.

a) *Dasyphyllum brasiliensis* (Partes aéreas 11,4Kg)

Os solventes utilizados nas extrações exaustivas foram: hexano, acetato de etila e etanol. Após a evaporação dos mesmos foram obtidos os extratos brutos das partes aéreas.

EXTRATO 1 - hexano - 160,02g

EXTRATO 2 - acetato de etila - 99,60g

EXTRATO 3 - etanol - 77,10g

b) *Dasyphyllum cryptocephallum* (Raízes 3,5kg)

Os solventes empregados nas extrações exaustivas foram: hexano/acetato de etila 8:2 e etanol, que após a evaporação dos solventes foram obtidos os extratos brutos das raízes:

EXTRATO 1 - hexano/acetato de etila 8:2 : 40,32g

EXTRATO 2 - etanol : 90g

c) *Dasyphyllum synacanthum* (Partes aéreas 8,5kg)

Os solventes usados nas extrações exaustivas foram: acetato de etila e etanol, sendo obtidos:

EXTRATO 1 - acetato de etila : 30,20g

EXTRATO 2 - etanol : 88,8g

IV.3 - *Dasyphyllum brasiliensis*

IV.3.1 - Partição dos extratos brutos

Com o intuito de eliminar matéria graxa e alguns pigmentos, estes foram submetidos à processos de partição, como os apresentados na figura 2 e 4.

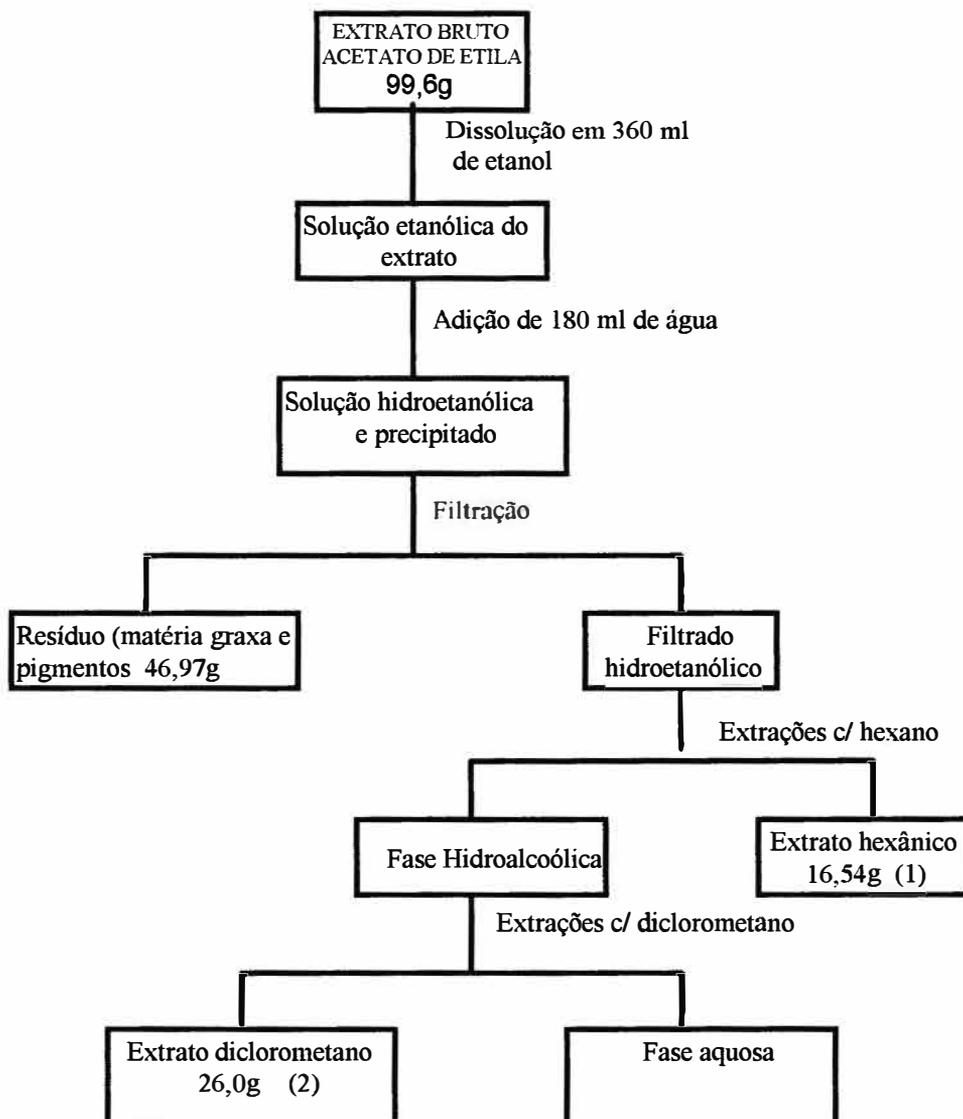


Figura 2: Esquema de partição do extrato bruto em acetato de etila.

IV.4- Fracionamento do extrato em diclorometano

(2).

O fracionamento deste extrato (26g) foi realizado em coluna cromatográfica sob pressão reduzida, segundo a técnica denominada CLV [12,13]. Utilizou-se 320g de sílicagel D/31690/Riedel-de-Haen.

A eluição foi feita através de um gradiente de polaridade, (em ordem crescente), utilizando hexano, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 230 frações de 500ml.

As frações coletadas foram analisadas por CCDC [14], utilizando como reveladores, radiação UV 254/366 nm, vapores de iodo e de ácido sulfúrico, sendo que as frações que apresentaram comportamento cromatográfico semelhante foram reunidas, conforme a tabela 01.

TABELA 01 : Frações obtidas à partir do extrato em diclorometano de *D.****brasiliensis.***

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA/g
01	I	0,0150
02-09	II	0,0028
10-17	III	0,0672
18-23	IV	0,0082
24-53	V	0,2700
54	VI	0,0139
55-61	VII	1,1153
62-65	VIII	1,0953
66	IX	0,3753
67-69	X	1,8445
70-75	XI	1,4260
76-85	XII	1,0180
86-89	XIII	0,3111
90-97	XIV	1,1416
98	XV	0,1635
99-104	XVI	0,5508
105-119	XVII	1,9674
120	XVIII	0,1298
121-132	XIX	0,9283
133-135	XX	0,8796
136	XXI	0,1484
137-147	XXII	0,9399
148-167	XXIII	1,6963
168-175	XXIV	0,1263
176-185	XXV	0,2014
186-189	XXVI	0,1751
190-193	XXVII	1,6269
194-201	XXVIII	0,6209
202-215	XXIX	5,5953
216-230	XXX	0,5275

As frações ímpares foram submetidas à análises por espectroscopia no IV e a fração VII mostrou absorções indicativas da presença de substâncias aromáticas, por essa razão optou-se pelo seu fracionamento.

IV.4.1 - Isolamento dos constituintes químicos da fração VII.

A fração VII (1,1153g) foi submetida a fracionamento utilizando-se coluna clássica [14], empacotada com 20g de silicagel 60 e como fase móvel misturas de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). Foram coletadas 373 frações de 100ml.

As frações obtidas foram submetidas a um estudo cromatográfico por CCDC, podendo então serem reunidas de acordo com o R_f, como mostra a tabela 02.

TABELA 02 : Reunião das frações de VII.

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA/g
01-55	VII.1	0,0391
56-111	VII.2	0,0330
112-135	VII.3	0,0017
136-184	VII.4	0,0658
185-207	VII.5	0,1754
208-227	VII.6	0,2192
228-242	VII.7	0,0438
243-250	VII.8	0,0097
251-261	VII.9	0,0058
262-272	VII.10	0,0593
273-288	VII.11	0,0331
289-300	VII.12	0,0033
301-313	VII.13	0,0043
314-342	VII.14	0,0236
343	VII.15	0,0086
344-373	VII.16	0,2263

A fração VII.5, por ter apresentado a formação de cristais (PF 193-197 °C), foi estudada mais detalhadamente através de espectroscopia.

A análise dos dados fornecidos pelo espectro no IV, RMN de ^1H e ^{13}C nos levou a concluir que **Db.1** (figura 3) é um derivado do ácido cafeico.

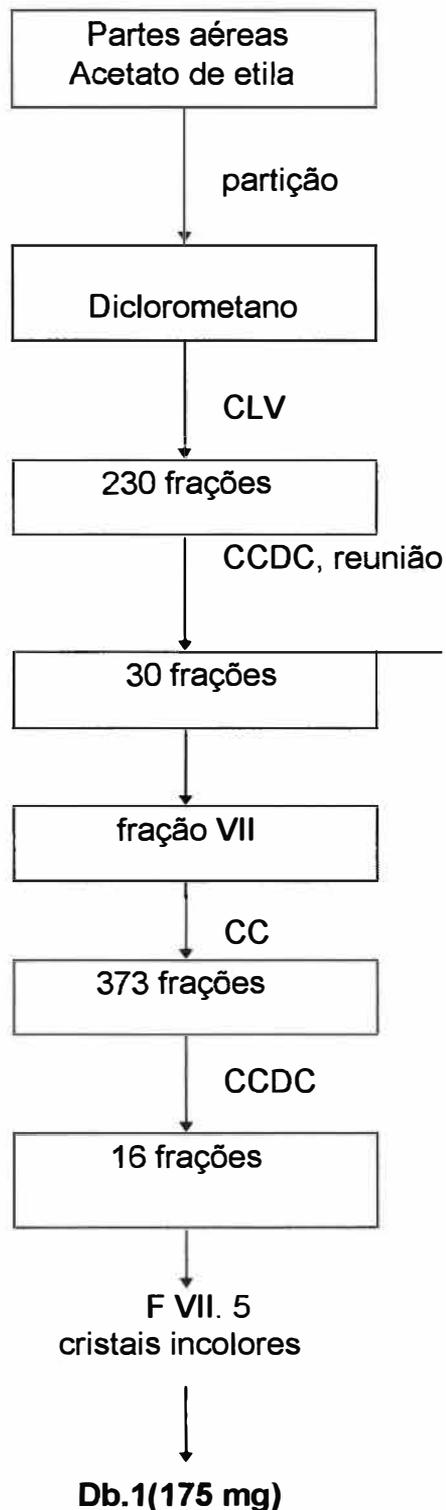


Figura 3: Esquema de isolamento da substância Db.1 a partir do extrato em acetato de etila das partes aéreas de *D. brasiliensis*.

IV.5 - Partição do extrato bruto em hexano.

Este extrato passou por um processo de partição conforme figura 4.

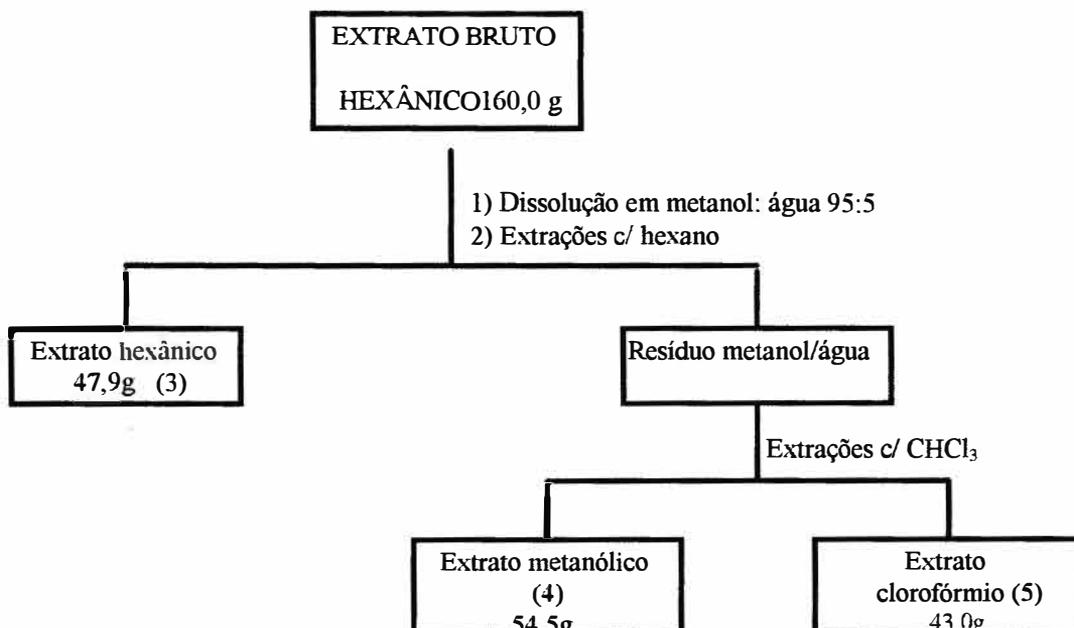


Figura 4: Esquema de partição do extrato em hexano de *D. brasiliensis*.

IV.5.1 - Fracionamento do extrato em clorofórmio (5).

O fracionamento desse extrato (43g) foi realizado em coluna sob pressão reduzida, segundo a técnica denominada CLV. Utilizou-se 400g de silicagel D (31690/Riedel-de-Häen).

A eluição foi feita através de gradiente de polaridade,(em ordem crescente), utilizando hexano, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 382 frações de 500ml.

As frações coletadas foram analisadas por CCDC, utilizando como reveladores, radiação UV 254/366nm, vapores de iodo e de ácido sulfúrico, sendo que as frações que apresentaram comportamento cromatográfico semelhante foram reunidas conforme a tabela 03.

TABELA 03 : Reunião das frações do extrato em clorofórmio de *D.*

brasilensis.

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA/g
01-39	I	13,63
40-103	II	2,34
104-172	III	5,81
173-204	IV	4,00
205-285	V	8,79
286-304	VI	2,10
305-333	VII	1,36
334-382	VIII	0,56

Após reunião, as frações de mesmo R_f, foram enviadas para exames mais detalhados por espectroscopia no IV e RMN ¹H. A análise dos dados fornecidos pelos espectros mostrou que a fração III poderia conter triterpenóides, por essa razão optou-se pelo seu fracionamento.

IV.5.2 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.

A fração III (5,81g) foi submetida a fracionamento em CLV com 100g de silicagel D (31690/Riedel-de-Häen) e sua eluição foi realizada em gradiente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol).

Foram coletadas 110 frações de 200ml, reunidas por CCDC, após serem reveladas com radiação UV 254/366 nm, vapores de iodo, ácido sulfúrico (tabela 04).

TABELA 04: Reunião das frações III.

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA/g
01-04	III.1	2,640
05-07	III.2	0,066
08	III.3	0,099
09	III.4	0,244
10-11	III.5	0,251
12	III.6	0,085
13-16	III.7	0,132
17-20	III.8	0,017
21-24	III.9	0,044
25-33	III.10	0,044
34-39	III.11	0,017
40-47	III.12	0,071
48-59	III.13	0,090
60-65	III.14	0,038
66-77	III.15	0,130
78-80	III.16	0,132
81-90	III.17	0,181
91-93	III.18	0,036
94-95	III.19	0,089
96-100	III.20	0,051
101-106	III.21	0,026
107-110	III.22	0,014

Através da análise dos dados dos espectros de IV e de RMN ^1H verificou-se que as III.1 e III.5 correspondiam a triterpenos, pela quantidade de metilas e por sinais no espectro de RMN ^{13}C característicos e III.3 a um esteróide.

IV.5.3 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.1.

A fração III.1 (2,640g) foi submetida a fracionamento utilizando-se CLV com 60g de silicagel D(31690/Riedel-de-Häen) e sua eluição foi realizada em gradiente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol).

Foram coletadas 246 frações de 50ml , reunidas por CCDC, pelo mesmo método citado anteriormente, conforme a tabela 05.

TABELA 05 : Reunião das frações III.1.

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES RUNIDAS	MASSA/g
01-05	III.1.1	0,0159
06-64	III.1.2	0,0082
65-79	III.1.3	0,0154
80-84	III.1.4	0,0495
85-87	III.1.5	0,0364
88-92	III.1.6	0,0219
93-99	III.1.7	0,0206
100-105	III.1.8	0,0105
106-109	III.1.9	0,1788
110	III.1.10	0,1264
111-112	III.1.11	0,2137
113-114	III.1.12	0,0776
115-123	III.1.13	0,0899
124-126	III.1.14	0,1450
127-132	III.1.15	0,1736
133-135	III.1.16	0,0231
136-140	III.1.17	0,0922
141-143	III.1.18	0,0558
144-148	III.1.19	0,0869
149-151	III.1.20	0,0600
152-156	III.1.21	0,0574
157-161	III.1.22	0,0654
162-164	III.1.23	0,0098
165-168	III.1.24	0,0106
169-172	III.1.25	0,0270
173-178	III.1.26	0,0286
179-184	III.1.27	0,0153
185-192	III.1.28	0,0238
193-198	III.1.29	0,0123
199-205	III.1.30	0,0051
206-212	III.1.31	0,0060
213-217	III.1.32	0,0037
218-222	III.1.33	0,0068
223-230	III.1.34	0,0112
231-246	III.1.35	0,0098

Todas as frações foram levadas a uma análise no IV e RMN ^1H , os dados fornecidos pelos espectros sugeriram que a fração III.1.19 (86,9mg) continha triterpeno.

Esta fração codificada como **Db.2** foi lavada várias vezes com hexano, e purificada através de CCDP, utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 8:2. O que resultou em apenas uma mancha em CCDC, mas no espectro de ^{13}C , sugeriu-se uma mistura de triterpenóides [15,16].

IV.5.4 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.3 (99mg).

Foram feitas recristalizações com metanol, até que se conseguiu purificar a substância, possibilitando a obtenção de espectros. Através dos dados espectroscópicos foi confirmado o esqueleto de um esteróide codificado como **Db.3**.

IV.5.5 - Isolamento dos constituintes químicos da fração III.5.

A fração III.5 (251mg) apresentou um sólido branco que foi lavado várias vezes com hexano, até tornar-se puro, obtendo-se espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , através dos quais confirmou-se a presença de um triterpeno codificado como **Db.4**.

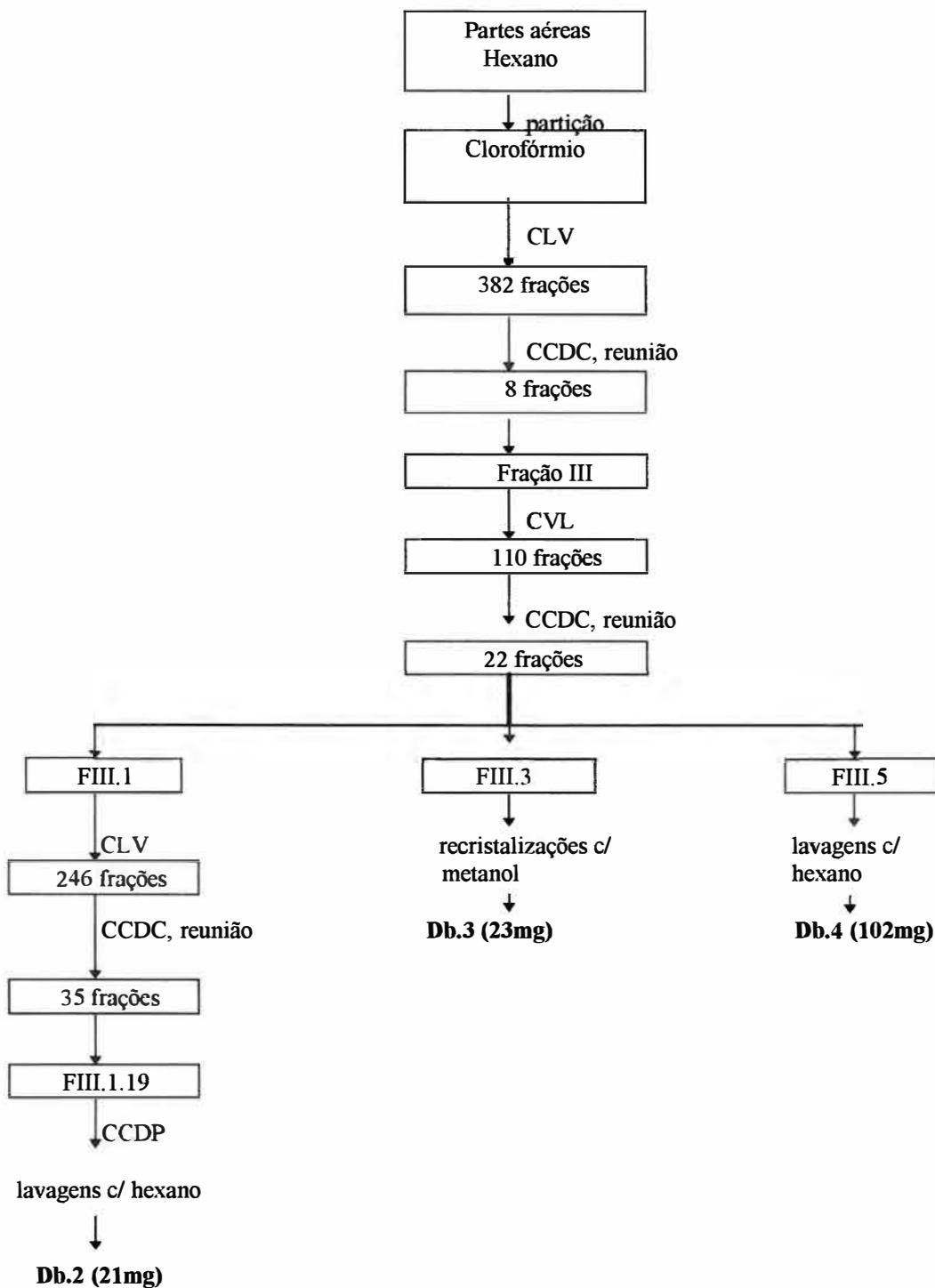


Figura 5: Esquema das substâncias isoladas a partir do extrato em hexano de *D. brasiliensis*.

IV.6 - Fracionamento do extrato em hexano/acetato de etila 8:2 de *D. cryptocephallum*.

O fracionamento deste extrato (40,32g) sem purificação prévia, foi realizado em CLV, empacotada com 450g de silicagel D (31690/ Riedel-de-Häen). A eluição foi feita em gradiente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). Foram coletadas 72 frações de 500ml, reunidas por CCDC, conforme a tabela 06.

TABELA 06 :Reunião das frações obtidas à partir do extrato em hexano/acetato de etila 8:2.

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA/g
01	I	0,3552
02	II	9,0468
03	III	2,2090
04	IV	0,7688
05	V	7,2783
06	VI	1,4272
07	VII	0,6200
08-13	VIII	0,0149
14	IX	0,0530
15-27	X	0,3306
28	XI	0,1775
29-31	XII	0,3591
32	XIII	0,2325
33-37	XIV	4,2856
38-48	XV	5,7351
49-59	XVI	0,7421
60-72	XVII	0,5437

A presença de sólido na fração XVII, levou-nos a obtenção de espectro no IV, no qual podemos verificar a presença de absorções indicativas da presença de substâncias bastante hidroxiladas. A purificação da mesma foi feita lavando-a com acetato de etila e em seguida recristalizando-a com CHCl_3 /MeOH 4:6. Após filtração e secagem obteve-se 112,5 mg de um sólido branco com intervalo de fusão 298-300⁰C. Este sólido foi identificado através de RMN ¹H e ¹³C, confirmando um esteróide glicosilado codificado como **Dc.1**.

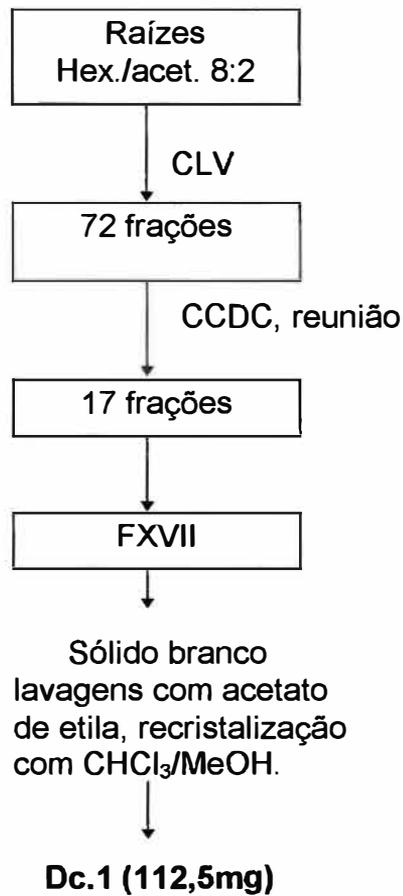


Figura 6: Esquema da substância isolada a partir do extrato hexano/acetato de etila 8:2 das raízes de *D. cryptocephalum*.

IV.7 - Fracionamento do extrato em acetato de etila de *D. synacanthum*.

O fracionamento deste extrato (30,2g) foi realizado em CLV com 350g de silicagel D, utilizando como eluentes, um gradiente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). Foram coletadas 175 frações de 500ml, reunidas conforme a tabela 07.

TABELA 07 : Reunião das frações obtidas a partir do extrato em acetato de etila.

FRAÇÕES COLETADAS	FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA/g
01-14	I	0,0084
15	II	0,0701
16	III	0,0309
17	IV	0,4408
18-21	V	1,1303
22-27	VI	3,1830
28-30	VII	0,7927
31-32	VIII	0,3387
33-36	IX	0,8836
37-39	X	0,7144
40-44	XI	0,7569
45-49	XII	0,5610
50-52	XIII	0,5927
53-57	XIV	1,3135
58-61	XV	0,0891
62-66	XVI	2,2203
67-71	XVII	0,9826
72-76	XVIII	0,7341
77-81	XIX	0,5610
82-89	XX	11,4426
90-95	XXI	0,9525
96-119	XXII	0,0003
120	XXIII	0,0027
121-122	XXIV	0,0019
123-128	XXV	0,0125
129-136	XXVI	0,0305
137-145	XXVII	0,0395
146-152	XXVIII	0,0102
153-161	XXIX	0,0067
162-168	XXX	0,0089
169-175	XXXI	0,0053

IV.7.1 - Isolamento dos constituintes químicos da fração X.

A fração X (0,7144g) foi subfracionada por CCDP em hexano/acetato de etila 9:1, obtendo-se uma substância pura (62,4mg), que foi levada a análises por espectroscopia no IV, RMN ^1H e ^{13}C e identificada como sendo um triterpeno acilado codificado como **Ds.1**.

IV.7.2 - Isolamento dos constituintes químicos da fração XV.

O sólido contido na fração XV (89,1mg) foi recristalizado em água e obteve-se 33,7 mg de cristais incolores que foram identificados por IV, RMN ^1H e ^{13}C , como sendo um ácido carboxílico codificado como **Ds.2**.

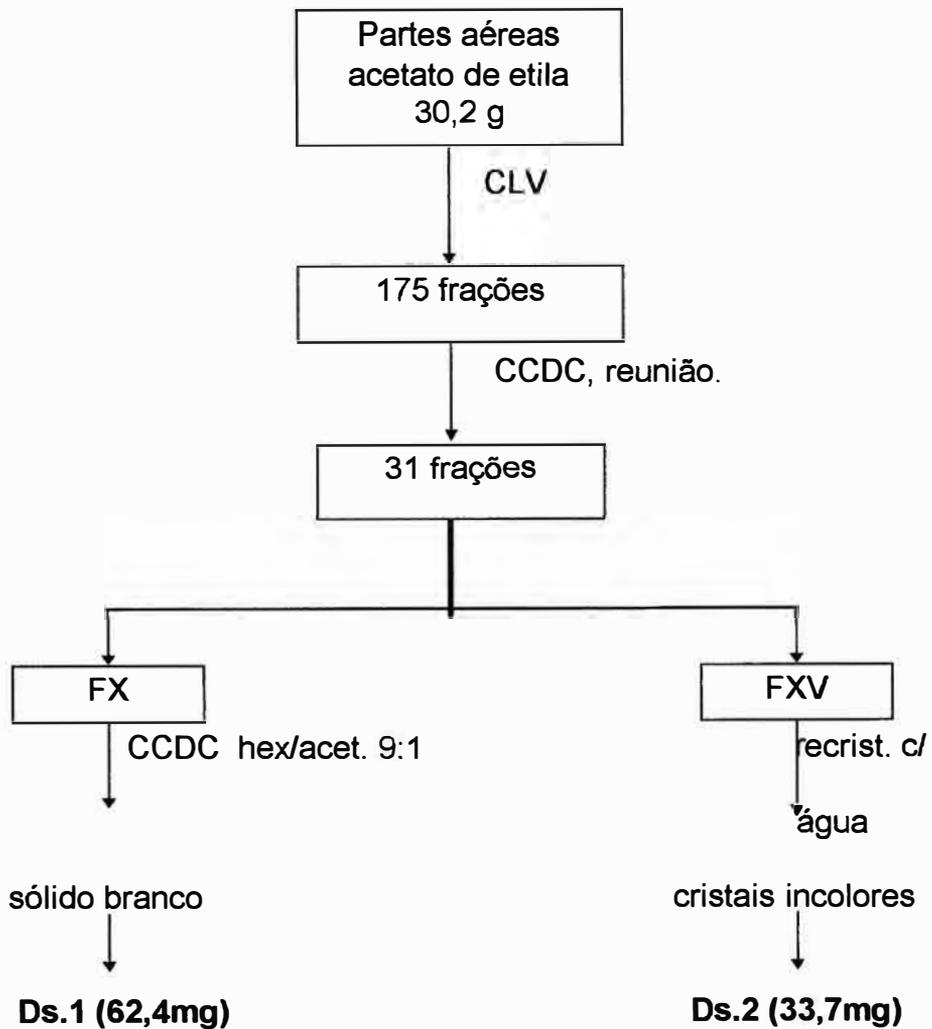
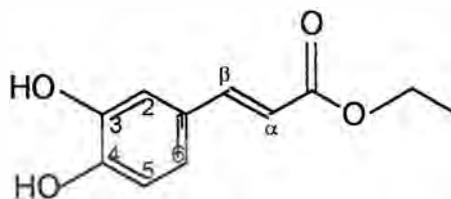


Figura 7: Esquema das substâncias isoladas a partir do extrato acetato de etila das partes aéreas de *D. synacanthum*.

V - ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL DAS
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.

V.1 - Identificação de Db.1.



Db.1

A análise do espectro no IV (figura 08) mostrou absorções indicativas da presença de hidroxila entre $3.500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, de carbonila em 1.710 cm^{-1} atribuída a carbonila de éster α,β insaturado [17,18]. A região de absorção de carbonos sp^2 apresentou os sinais em $1.620, 1.600, 1.510$ e 1.450 cm^{-1} atribuídos a ligação dupla e ao anel aromático. As bandas fracas em 2.900 e 2.980 cm^{-1} indicam a presença de cadeia alifática.

As presenças de metila e metileno podem ser observadas no espectro de RMN ^1H (figura 09) pelo tripleto em $1,3 \text{ ppm}$ e o quarteto em $4,2 \text{ ppm}$ atribuídos ao grupo etila ligado ao oxigênio. O que pode ser confirmado pelos respectivos sinais em $14,6$ e $60,4 \text{ ppm}$ no espectro de RMN ^{13}C (figura 10).

Através dos dados fornecidos pelo RMN ^1H (tabela 10) podemos verificar também em campo baixo, dois dubletos em $6,2$ e $7,6 \text{ ppm}$ com constante de acoplamento de $15,5 \text{ Hz}$ referente a prótons olefínicos de configuração *trans* e ainda sinais correspondentes a três prótons aromáticos. Um dubleto em $7,0 \text{ ppm}$ ($1,8\text{Hz}$) atribuído ao próton do carbono 2, um duplo dubleto em $6,9$ ($1,8$ e $7,8 \text{ Hz}$) atribuído ao H-6 e outro dubleto em $6,8 \text{ ppm}$ ($7,8\text{Hz}$) que representa o H-5.

Podemos confirmar essas atribuições pelos dados do espectro de RMN ^{13}C (tabela 11) onde são observados sinais correspondentes a 11 carbonos . Aos carbonos olefínicos podem ser atribuídos aos sinais em 122,4 e 145,5 ppm.

Através do espectro de RMN- ^{13}C e do DEPT 135^o os sinais em 146,3; 148,7 e 167,9 ppm foram atribuídos aos carbonos quaternários do anel aromático, outros sinais em 114,9; 115,8 e 116,2 ppm, foram conferidos a carbonos contendo hidrogênio e o singlete em 206,4 ppm atribuído a carbonila.

Esses dados comparados com aqueles fornecido pela literatura [19,20] confirma que **Db.1** trata-se do **cafeato de etila**

TABELA 10 : Dados do espectro de RMN ^1H de Db.1 (CDCl_3 + gotas de CD_3OD , 300 MHz, ppm, J em Hz).

PRÓTON	ppm, multiplicidade, J
H- α	6,2 , d , (15,5)
H- β	7,5 , d , (15,5)
H-2	7,0 , d , (1,8)
H-5	6,8 , d , (7,8)
H-6	6,9 , dd , (1,8 e 7,8)
H ₂ '	4,2 , q
H ₃ '	1,3 , t

TABELA 11 : Dados do espectro de RMN ^{13}C de Db.1 (CDCl_3 + gotas de CD_3OD , 75 MHz, ppm)

CARBONO	ppm, multiplicidade
1	127,4; s
2	115,5 ;d
3	146,3;s
4	148,7; s
5	114,9; d
6	116,2; d
C- α	122,4; d
C- β	145,5; d
<u>C=O</u>	167,4; s
C'	60,4 ; t
C''	14,6 ;q

OBS : Multiplicidade foi atribuída por DEPT 135 $^{\circ}$ e 90 $^{\circ}$.

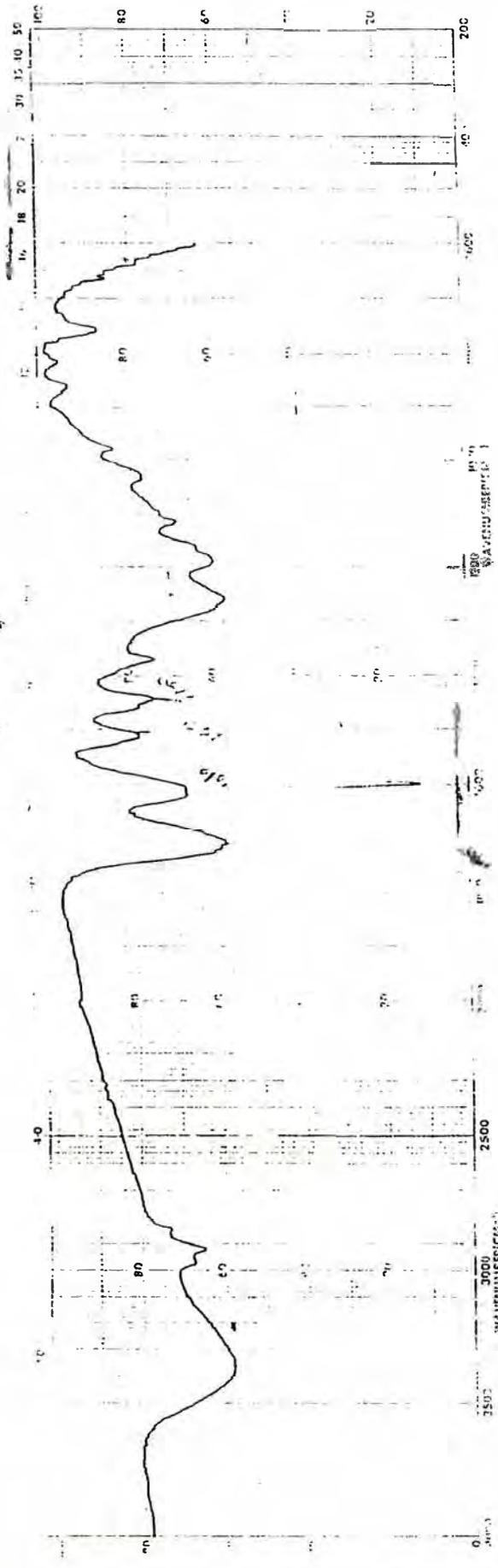
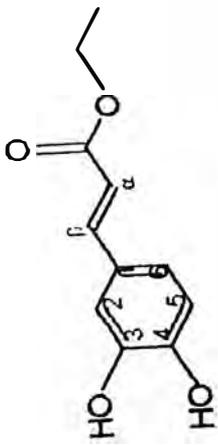


FIGURA 8: Espectro no IV da substância Db.1

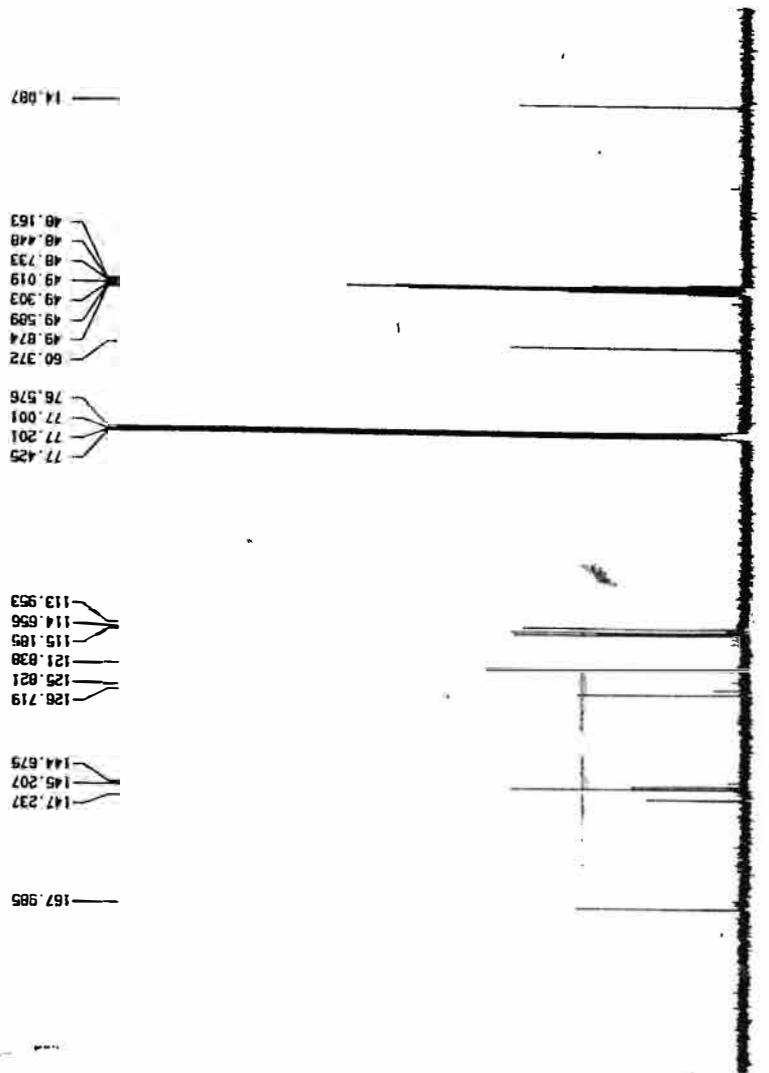
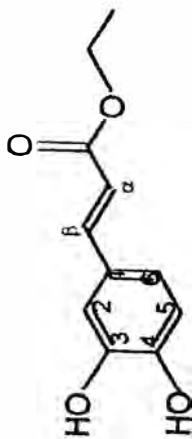


FIGURA 10: Espectro de RMN ^{13}C da substância Db.1, CDCl_3 + $^{40}\text{CD}_3\text{OD}$, 75 MHz.

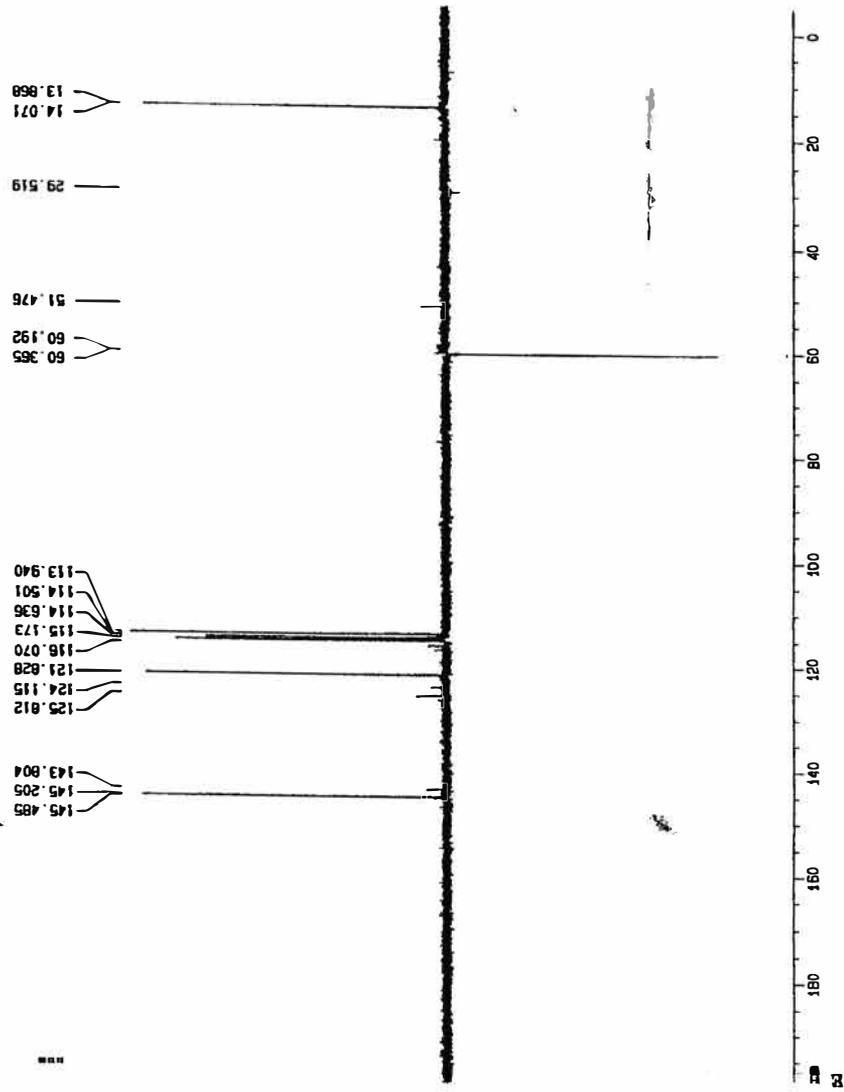
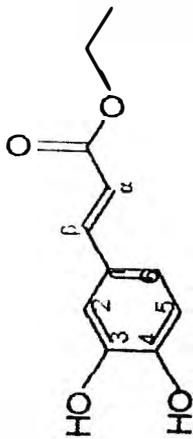
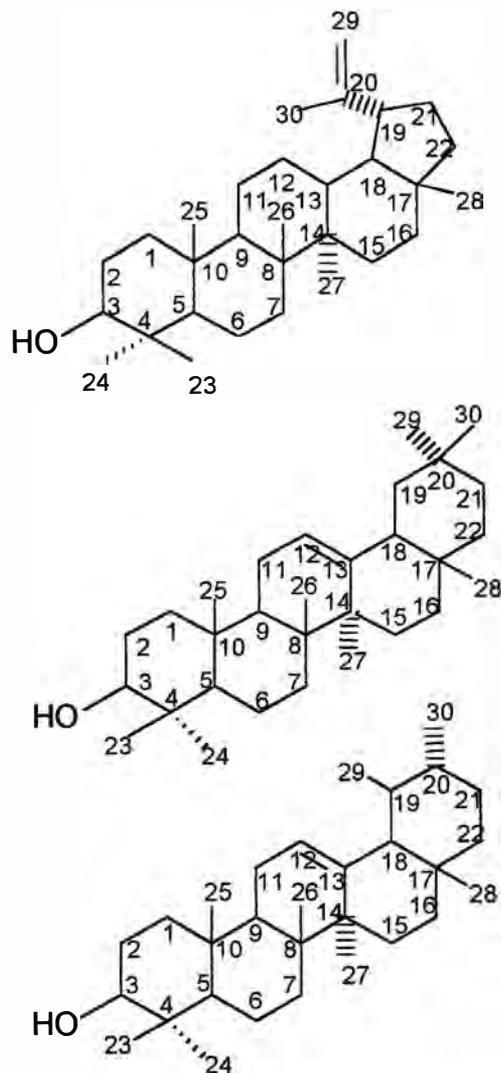


FIGURA 10a: Espectro de RMN-¹³C-DEPT 135° da substância Db.1, CDCl₃ + gotas de CD₃OD, 75MHz.

V.2 - Identificação de Db.2.



Db.2

O emprego de técnicas de RMN ^{13}C e das sequências DEPT 135 e 90° , permitiram a identificação dos componentes da mistura de triterpenos simples com a mesma funcionalização, através da confrontação do valor de deslocamento químico de RMN ^{13}C obtido, com o descrito na literatura.

Principalmente dos átomos de carbonos que sustentam a ligação dupla, por serem característicos em alguns tipo de esqueletos.

O espectro de RMN ^{13}C (tabela 12 e figura 11) de Db.2 apresentou um dubleto em 124,0 ppm referente ao esqueleto Urs-12-eno (α -amirina); um singleto em 145,0 ppm e um dubleto em 121,0 ppm referentes ao esqueleto Olean-12-eno (β -amirina) e um singleto em 150,0 ppm e um tripleto em 109,0 ppm referentes ao esqueleto Lup-20(29)-eno (Lupeol). Notamos a presença de 89 sinais de carbono.

Esta mistura apresentou vários sinais metílicos no RMN ^1H (tabela 13 e figura 12), um multipletto em 3,2 ppm, outro multipletto em 4,5-4,7 ppm referente ao H-29 e um duplo dubleto em 5,2 ppm referente ao H-12.

TABELA 12: Dados do espectro de RMN ¹³C de D.b.2 (20 MHz, CDCl₃, ppm)

CARBONO	ppm, Multiplicidade α- amirina	ppm, Multiplicidade β- amirina	ppm, Multiplicidade lupeol
01	38,6; t	38,6; t	38,7; t
02	26,9; t	27,2; t	27,3; t
03	78,0; d	78,0; d	78,0; d
04	38,8; s	38,7; s	38,8; s
05	55,2; d	55,2; d	55,3; d
06	18,3; t	18,3; t	18,3; t
07	36,6; t	32,6; t	34,3; t
08	40,8; s	39,7; s	40,8; s
09	47,6; d	47,6; d	50,4; d
10	36,9; s	36,9; s	37,1; s
11	23,5; t	23,5; t	20,9; t
12	124,0; d	121,0; d	25,1; t
13	-	145,0; s	38,0; d
14	42,0; s	41,7; s	42,8; s
15	29,3; t	27,9; t	27,3; t
16	26,6; t	26,1; t	35,5; t
17	37,7; s	32,6; s	42,9; s
18	59,0; d	47,2; d	48,3; d
19	39,5; d	46,6; t	47,9; d
20	39,5; d	29,8; s	150,0; t
21	31,0; t	35,5; t	29,8; t
22	45,5; t	37,1; t	39,9; q
23	28,3; q	28,3; q	28,1; q
24	15,6; q	14,4; q	15,4; q
25	15,6; q	15,4; q	16,0; q
26	16,6; q	16,6; q	15,9; q
27	23,4; q	26,1; q	14,5; q
28	28,1; q	28,1; q	17,9; q
29	17,4; q	29,8; q	109,0; t
30	23,6; q	21,3; q	19,3; q

Tabela 13: Dados do espectro de RMN ¹H de Db.2 (80 MHz, CDCl₃, ppm)

PRÓTON	ppm, multiplicidade
H-3	3,2 ; dd
H-12	5,2 ; dd
H-29	4,5 - 4,7 ; m

Utilizamos ainda a cromatografia de fase gasosa (tabela 14 e figura 13) na separação e identificação de triterpenóides. Todas as análises foram efetuadas utilizando as seguintes condições:

* coluna 3% OV-17 em Chromossorb WAP 100-120;

* temperatura da coluna 270 °C;

* temperatura do vaporizador 275 °C;

* temperatura do detector 290 °C;

* fluxo de N₂ igual a 30 ml/min.

TABELA 14: Tempos de retenção do esteróide e dos triterpenos padrões e de Db.2.

PADRÕES	T.R (Min)
Friedelina	35,51
Fridelanol	32,42
Lupeol	26,07
β- amirina	22,34
Taraxerol	20,28
Estigmasterol	17,45
SUBSTÂNCIA Db.2	21,74 e 26,08

Através de valores já discutidos e de atribuições feita pela literatura [15,16] , comprovou-se que se tratava de misturas de α -amirina, β -amirina e lupeol.

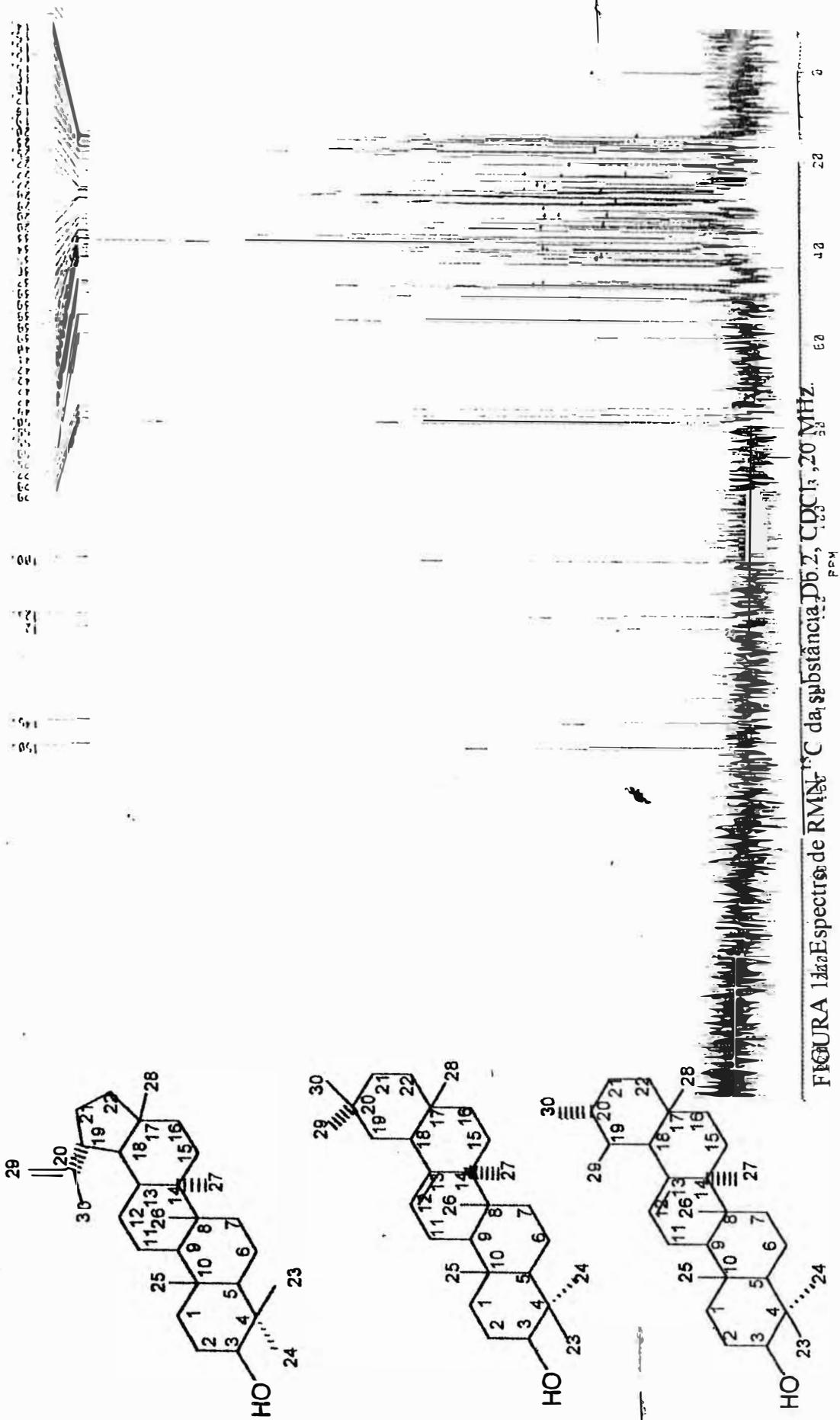
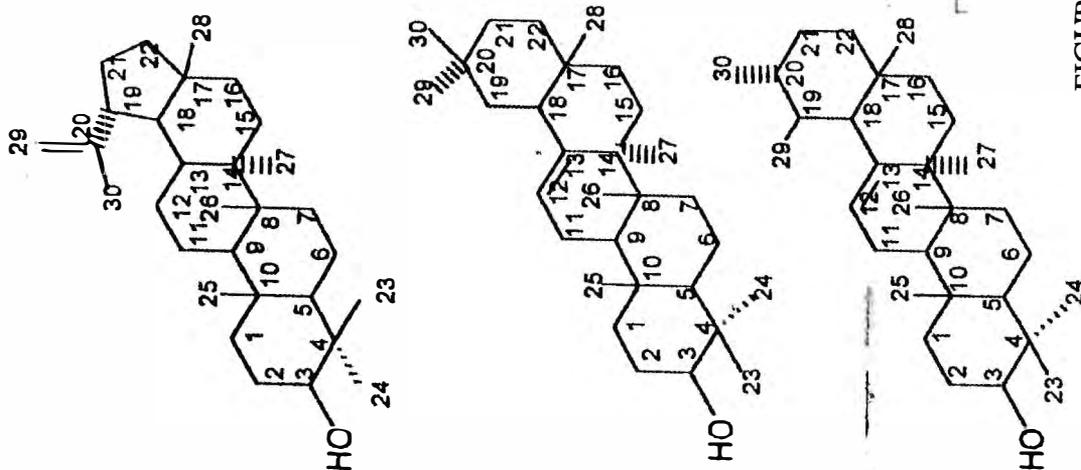


FIGURA 1.122 Espectro de RMN ¹³C da substância D6.2, CDCl₃, 20 MHz.



0608141
 DATE 10-8-93
 SF 90.131
 ST 90.130000
 DI 1660.000
 S1 9192
 ID 8192
 SW 1293 781
 HZ/M 5.13
 PW 2.9
 KD 8 P.
 QU 3
 VS 55
 TE 38
 FM 1.00
 UP 284
 LB 0 N
 LR 0 0
 LX 2.00
 LY 14.00
 F1 9.0027
 F2 --521
 HZ/M 26.679
 PPM/M 535
 SA 1.00 12

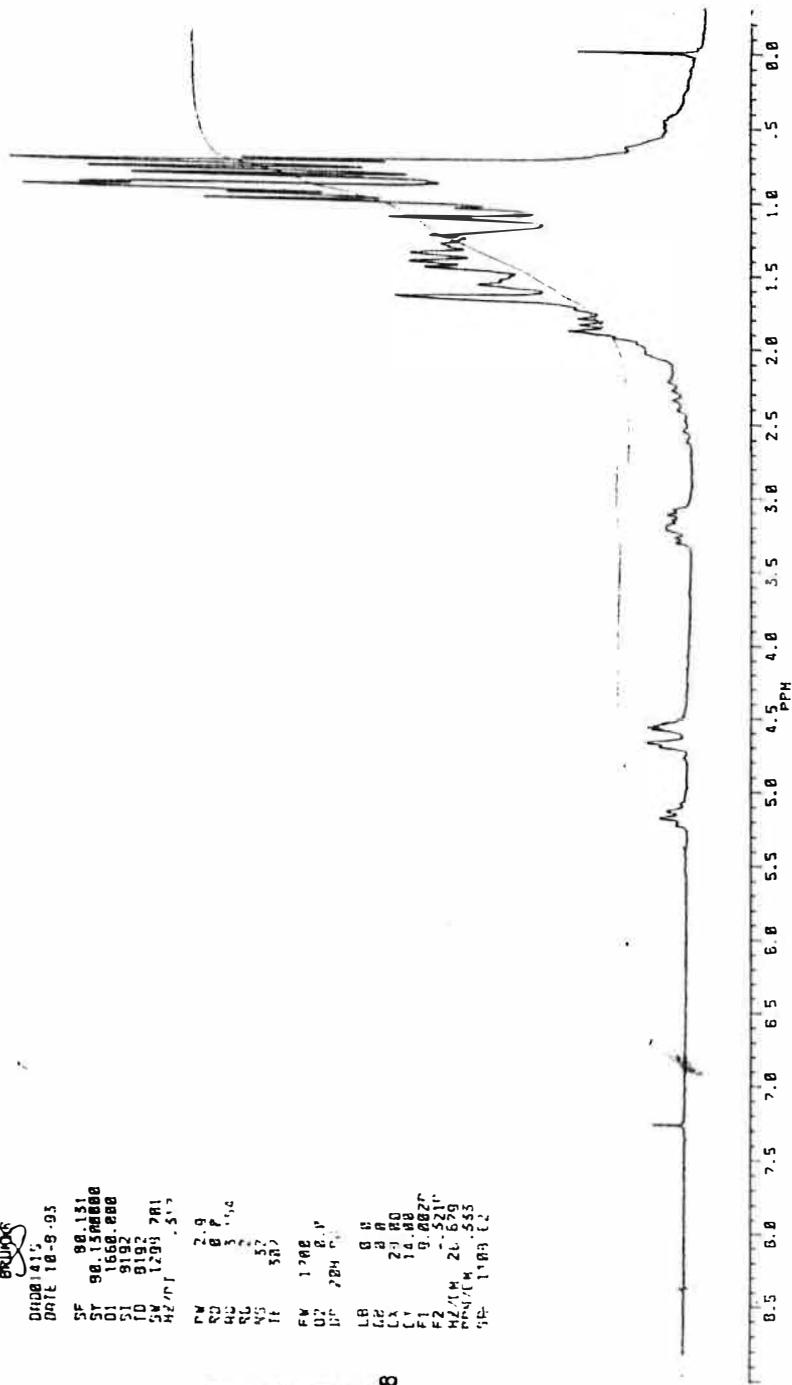
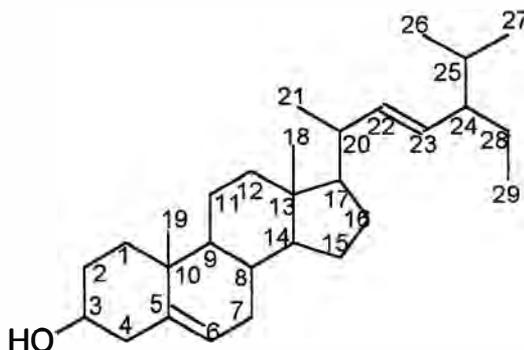


FIGURA 12: Espectro de RMN-¹H da substância Db.2, CDCl₃, 80 MHz.

V.3 - Identificação de Db.3



Db.3

O espectro de IV (figura 14) permitiu detectar a banda forte em 3.410 cm^{-1} correspondente ao estiramento de hidroxila associada [21]. A banda de absorção a 1.030 cm^{-1} , foi relacionada ao estiramento C-O de álcoois, sendo usual para hidróxi-esteróis, quando a hidroxila está ligada ao carbono três [22].

Jones et. al. [23] determinaram que a frequência do estiramento da ligação olefínica em esteróis, depende da posição da insaturação e quando estas ligações estão isoladas, encontramos absorções na faixa de 1.680 a 1.620 cm^{-1} . Pode ser observado no espectro de Db.2 que ocorrem absorções nesta região, embora mal resolvidas.

Entre 1.970 - 2.840 cm^{-1} , observa-se a presença de bandas de forte intensidade, que foram atribuídas ao estiramento de ligações C-H em carbonos saturados, sendo que deformações relacionadas também ocorrem a 1.460 ; 1.440 ; 1.380 e 1.360 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^{13}C (figura 15 e tabela 15) mostra valores de deslocamentos característicos de carbonos olefínicos em 138,3 e 129,2 ppm da ligação dupla entre os carbonos 22 e 23 da cadeia lateral;, em 140,0 e 121,6 ppm da dupla entre C-5 e C-6. Já o espectro de RMN ^1H (figura 16 e tabela 16) apresenta sinais entre 0,7 e 1,0 ppm referentes a metilas, multipletos entre 4,8 e 5,2 ppm atribuídos aos prótons sobre o carbono 22 e 23 e um duplo dubleto em 5,3 ppm referente ao H-6.

TABELA 15: Dados do espectro de RMN ¹³C de Db.3 (CDCl₃ , 50 MHz , ppm)

CARBONO	ppm, multiplicidade
01	37,2 ; t
02	31,6 ; t
03	71,7 ; d
04	42,2 ; t
05	140,7 ; s
06	121,6 ; d
07	31,8 ; t
08	31,8 ; d
09	50,0 ; d
10	36,4 ; s
11	21,0 ; t
12	39,7 ; t
13	42,0 ; s
14	56,7 ; d
15	24,2 ; t
16	28,9 ; t
17	55,9 ; d
18	11,9 ; q
19	19,3 ; q
20	40,4 ; d
21	21,1 ; q
22	138,3 ; d
23	129,2 ; d
24	51,2 , d
25	31,8 ; d
26	19,8 , q
27	19,8 , q
28	25,3 , t
29	12,2 , q

*Mutiplicidade obtidas através do DEPT 135^o e 90^o.

TABELA 16: Dados do espectro de espectro de RMN ¹H de Db.3 (CDCl₃ , 200 MHz , ppm).

PRÓTON	ppm, multiplicidade
H-3	3,5 , m
H-6	4,8 - 5,5 , dd
H-22	4,8 - 5,5 , m
H-23	4,8 - 5,5 , m

De acordo com os dados obtidos, concluímos que trata-se do **estigmasterol** . As atribuições foram realizadas e comparadas com as descritas na literatura[24-27].

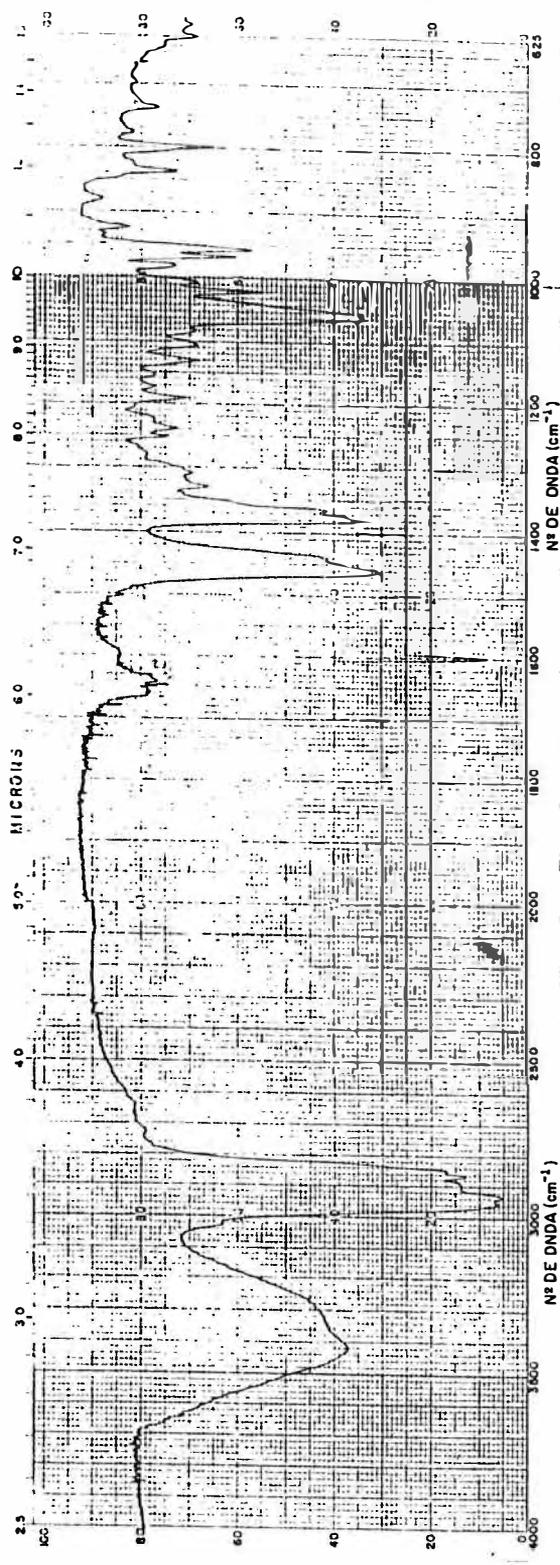
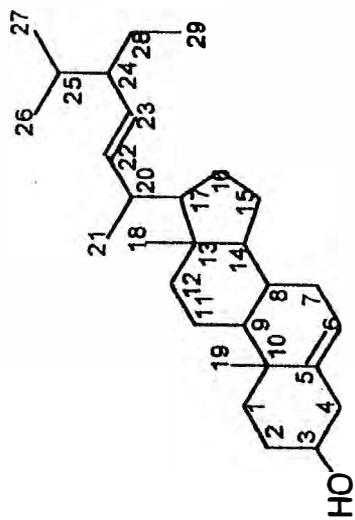


FIGURA 14: Espectro no IV da substância Db.3.

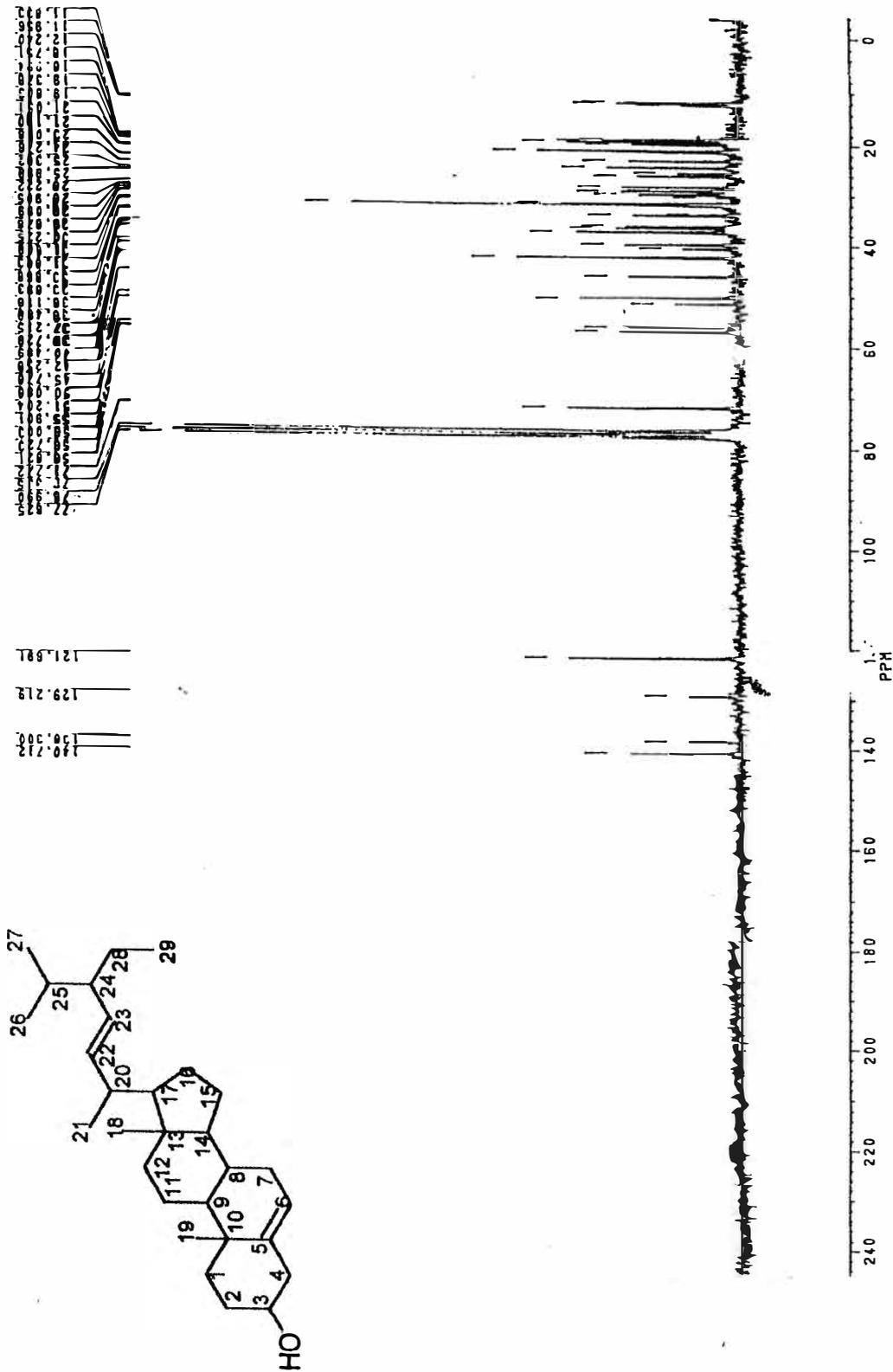


FIGURA 15: Espectro de RMN- ^{13}C da substância Db.3, CDCl_3 , 50 MHz.

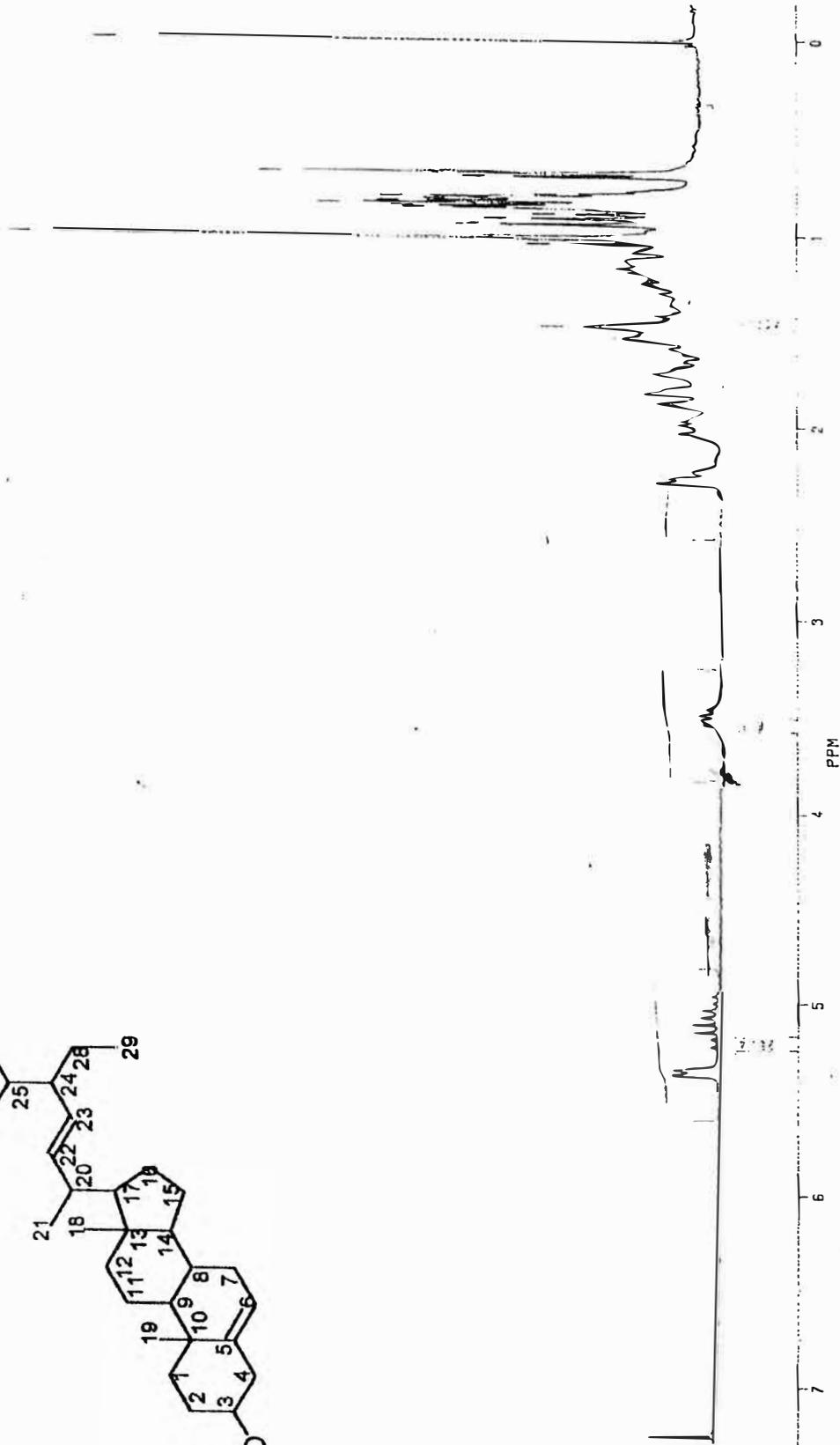
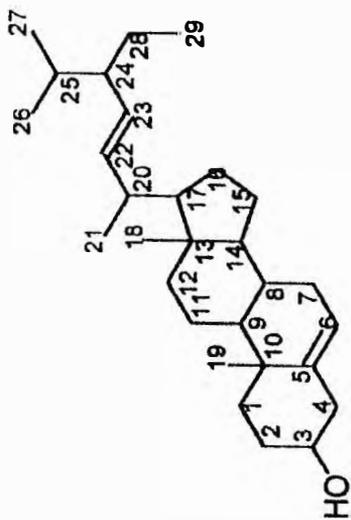
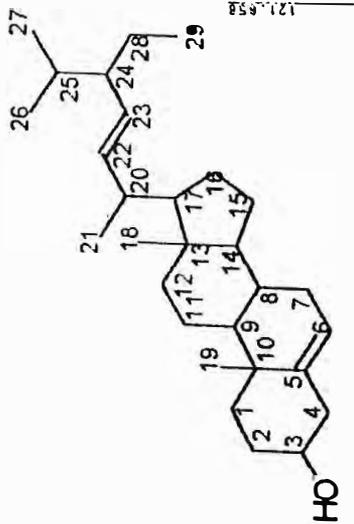


FIGURA 16: Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ da substância Db.3, CDCl_3 , 200 MHz.



121.58

71.74

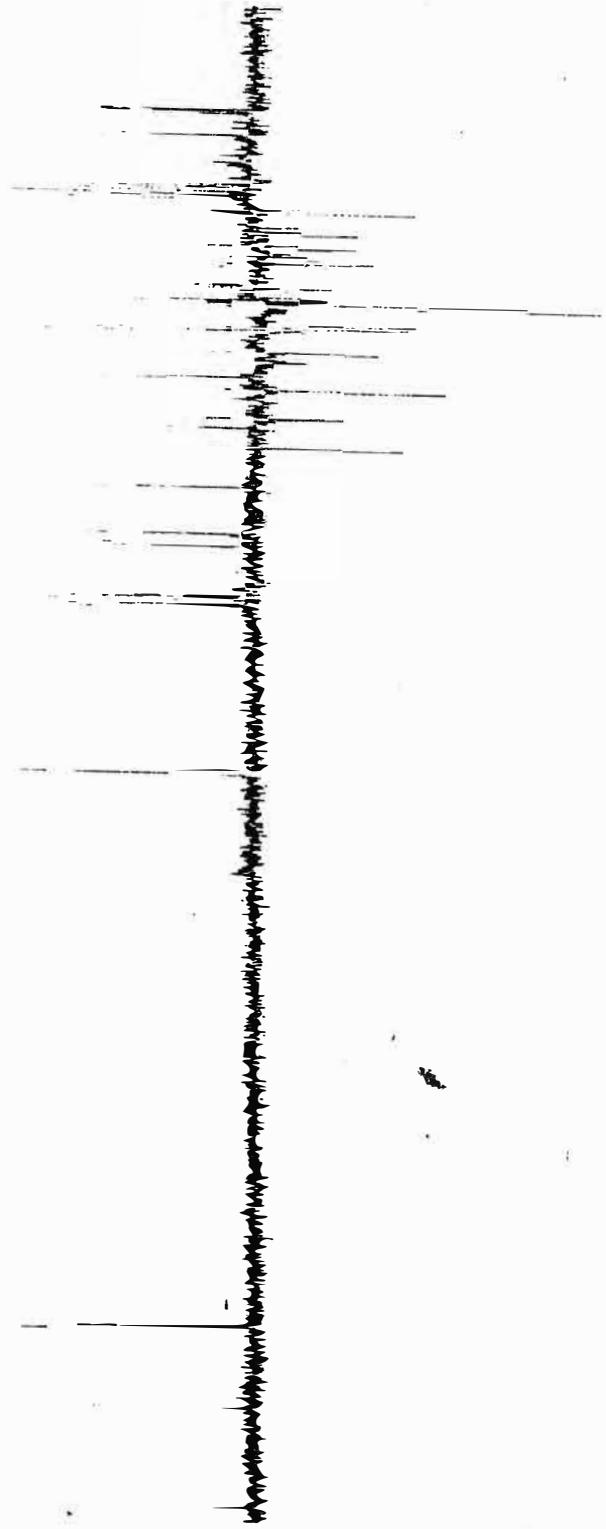
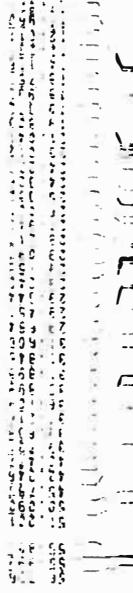
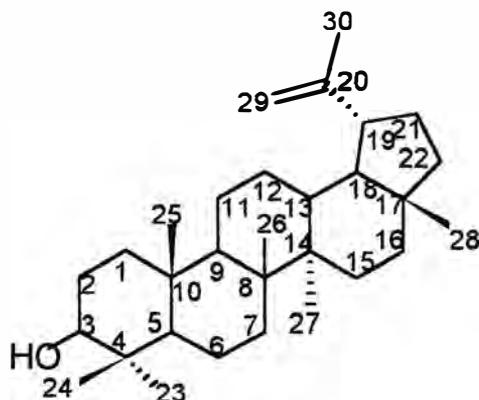


FIGURA 15a: Espectro de RMN-¹³C-DEPT 135° - da substância Db.3, CDCl₃, 50 MHz.

V.4 - Identificação de Db.4.



Db.4

A análise do espectro de RMN ^1H (figura 17) de Db.4 indicou tratar-se de uma substância polimetilênica do tipo terpênica, possivelmente um triterpenóide, em face aos sinais das metilas entre 0,7-1,0 ppm e um multipletto em 3,2 ppm referente ao próton carbinólico.

A utilidade da RMN ^1H no estudo de triterpenóides tem sido severamente limitada pela concentração de sinais na região de campo alto. Embora esta deficiência tenha sido superada pelo desenvolvimento de espectrômetro de alto campo, a situação ainda permanece insatisfatória pois consideráveis informações estruturais usualmente ficam encoberta.

Uma técnica muito útil na identificação de triterpenos é a RMN ^{13}C , pois os deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 são característicos para cada esqueleto, pelo menos no caso de triterpenos oxigenados apenas no C-3. No espectro de RMN ^{13}C de Db.4 (figura 18) temos sinais em 109,7 ppm e 150,47 ppm ambos característicos do lupeol [28], conforme a tabela 17.

TABELA 17: Dados do espectro de RMN ¹³C de Db.4 (20MHz, CDCl₃, ppm).

CARBONO	ppm, multiplicidade
01	38,7; t
02	27,3; t
03	79,0; d
04	38,8; s
05	55,2; d
06	18,3; t
07	34,2; t
08	42,7; s
09	50,4; d
10	37,1; s
11	20,8; t
12	25,2; t
13	37,3; d
14	42,7; s
15	27,0; t
16	35,3; t
17	42,7; s
18	48,7; d
19	47,8; d
20	150,4; s
21	29,7; t
22	39,7; t
23	27,9; q
24	15,3; q
25	16,7; q
26	15,6; q
27	14,7; q
28	18,3; q
29	109,7; t
30	19,0; q

* Multiplicidades atribuidas através de DEPT 135 e 90^o

Comparando-se esses dados com os da literatura [28-30], observou que se tratava de um triterpeno, o **lupeol** .

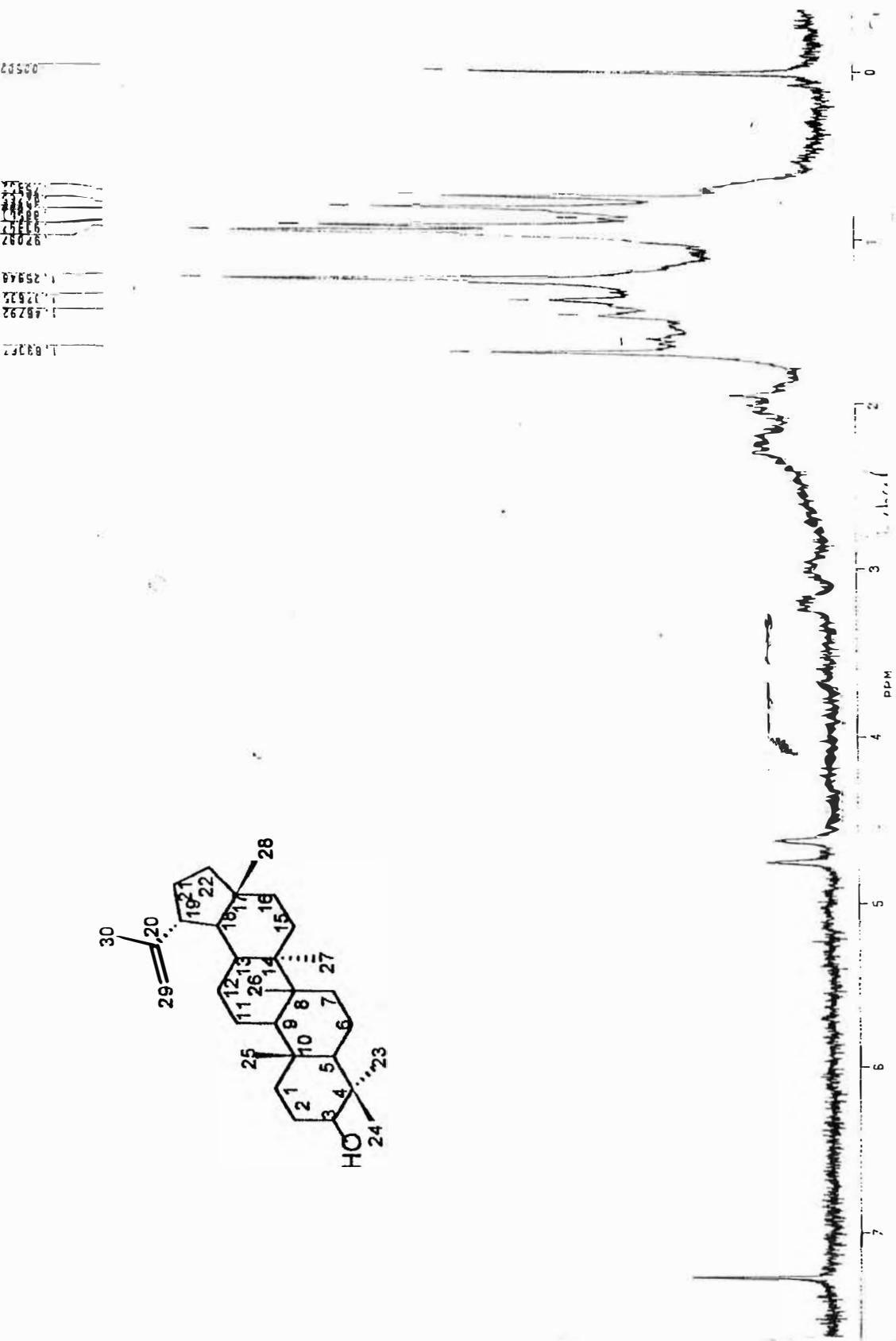
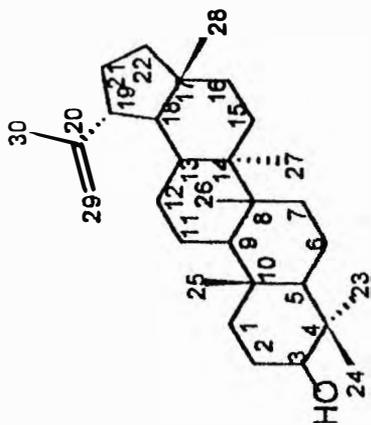


FIGURA 17: Espectro de RMN-¹H da substância Db.4, CDCl₃, 80 MHz.

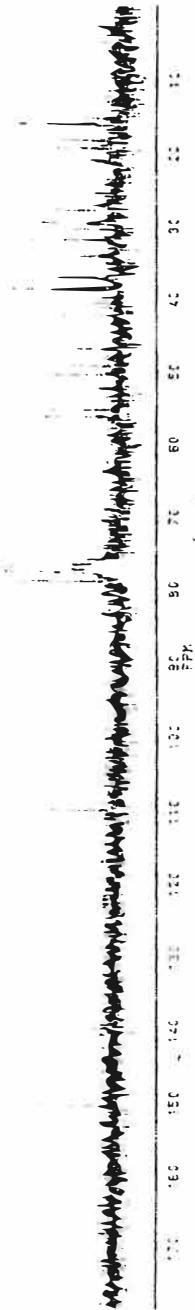
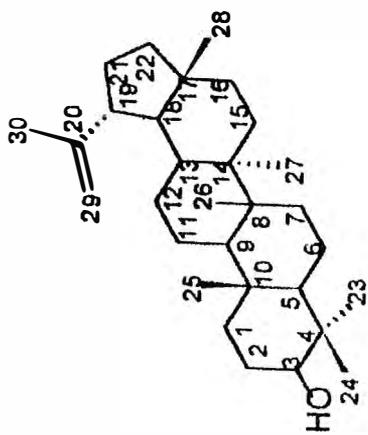


FIGURA 18: Espectro de RMN-¹³C da substância Db.4, CDCl₃, 20 MHz.

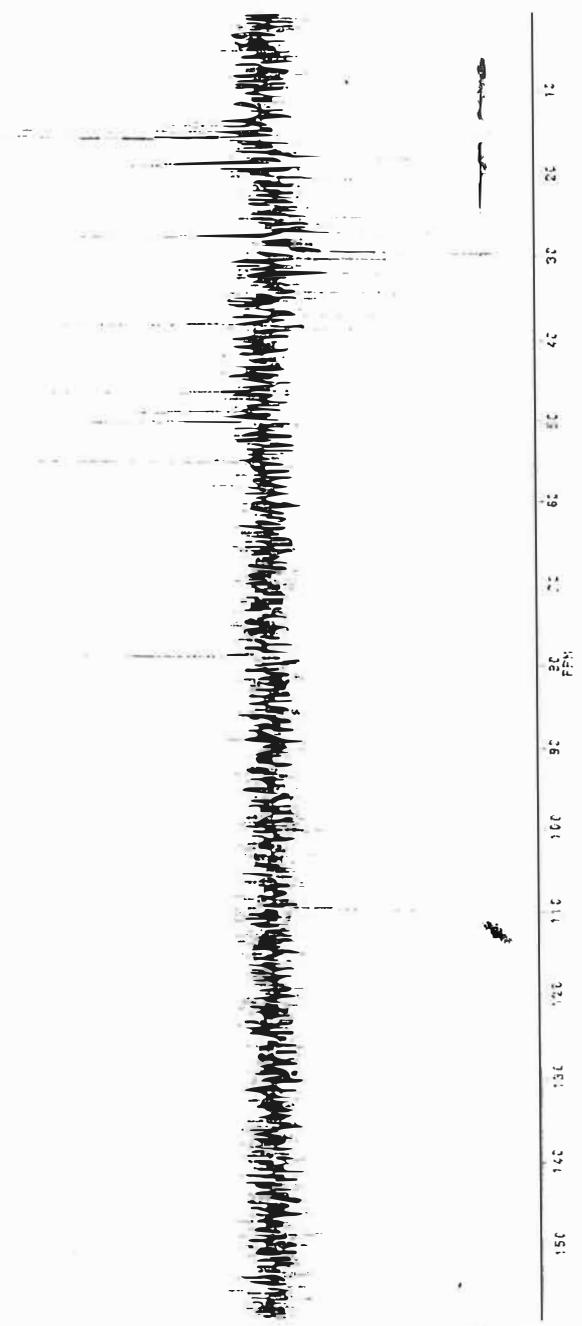
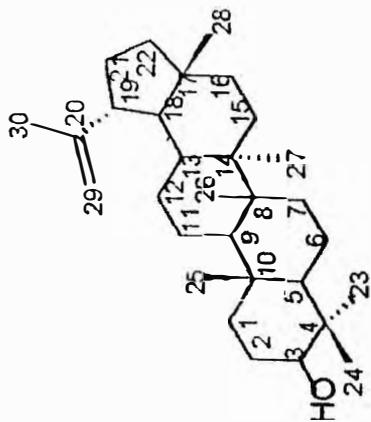
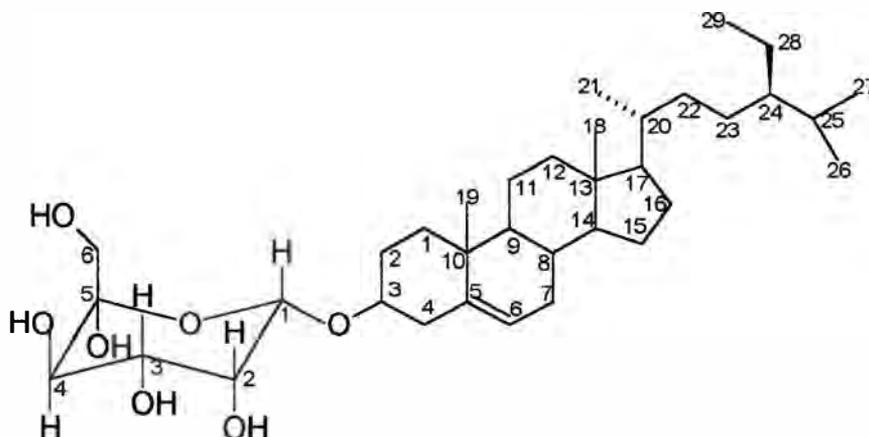


FIGURA 18a: Espectro de RMN- $^{13}\text{C-DEPT } 135^\circ$ - da substância Db.4, CDCl_3 , 20 MHz.

V.5 - Identificação de Dc.1.



Dc.1

O espectro de RMN ^{13}C (figura 19) mostra a presença de 35 carbonos para substância codificada como Dc.1 (tabela 18), sendo que seis destes sinais aparecem na região de absorção de carbonos glicosídicos, correspondendo a uma unidade de hexose.

O carbono secundário em 62,8 ppm no referido espectro de RMN ^{13}C restringe a escolha da unidade glicosídica entre glicose e galactose. A comparação dos deslocamentos químicos dos outros sinais referentes à unidade de açúcar com dados da literatura [31] confirmam a presença de glicose. Os dados do espectro de RMN ^1H (tabela 19) mostram o sinal referente ao próton anomérico H-1' em 5,3 ppm; influenciado pela insaturação no carbono 5; como um dubleto (mal resolvido).

A desproteção observada no C-3 da aglicona 78,2 ppm no espectro de RMN ^{13}C evidencia a ligação da glicose a este carbono e a ocorrência de sinais

para carbonos olefínicos em 122,0 ppm e 141,0 ppm indicam a presença de ligação dupla endocíclica entre C-5 e C-6 . Este espectro mostra ainda absorções para seis grupos metílicos em 12,0 ppm até 20,0 ppm, que podem ser correlacionados com os sinais para prótons metílicos observados entre 0,5 e 0,9 ppm no espectro de RMN ^1H (figura 20).

Estes dados permitiram a identificação da substância Dc.1 com 3-O- β -D glicopiranositosterol [31].

TABELA 18 : Dados do espectro de RMN ¹³C de Dc.1 (50 MHz, C₅D₅N, ppm).

CARBONO	ppm, multiplicidade
01	37,5 ; t
02	30,3 ; t
03	78,1 ; d
04	39,3 ; t
05	141,0 ; s
06	122,0 ; d
07	32,2 ; t
08	32,1 ; d
09	50,4 ; d
10	37,0 ; s
11	21,3 ; t
12	40,0 ; t
13	42,5 ; s
14	56,9 ; d
15	24,5 ; t
16	28,6 ; t
17	56,3 ; d
18	12,0 ; q
19	19,2 ; q
20	36,4 ; d
21	19,0 ; q
22	34,2 ; t
23	26,4 ; t
24	46,1 ; d
25	29,5 ; d
26	19,5 ; q
27	20,0 ; q
28	23,4 ; t
29	12,2 ; q
01'	102,6 ; d
02'	75,4 ; d
03'	78,6 ; d
04'	72,7 ; d
05'	78,5 ; d
06'	62,8 ; t

TABELA 19: Dados do espectro de RMN ¹H de Dc.1 (200MHz, C₅D₅N, ppm).

PRÓTON	ppm, multiplicidade
H-3	2,3-2,9; m
CH ₃ e CH ₂	0,6-2,2; m
H-1'	5,3; sl
H-2' à H-6'	4,0-4,7; m

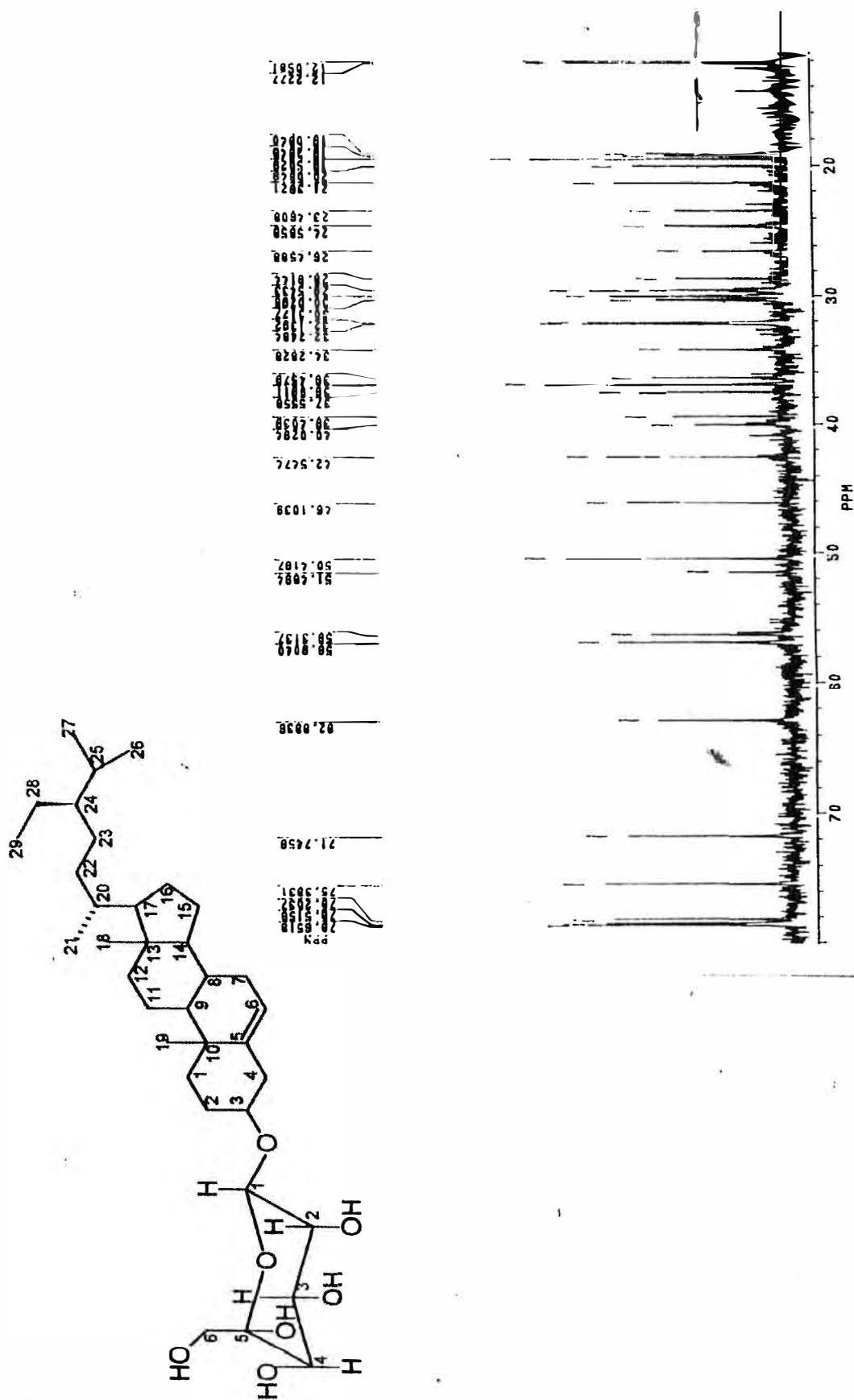
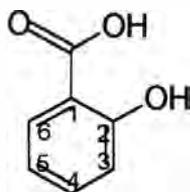


FIGURA 19: Espectro de RMN- ^{13}C da substância Dc.1, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz.

V.6 - Identificação de Ds.1.



Ds.1

Ao analisar o espectro no IV (figura 21), nota-se absorções características de estiramento de O-H de ácido carboxílico (devido a forte ligação de hidrogênio) na região entre 3.300 e 2.500 cm^{-1} e carbonila em 1.700 cm^{-1} . O caráter aromático pode ser observado pelas bandas em 1.440 ; 1.480 e 1.600 cm^{-1} .

Analisando-se o espectro de RMN ^1H (figura 22 e tabela 20), foi possível verificar a existência de um sistema do tipo ABMN representada pelos sinais: ddd em $6,9\text{ ppm}$, atribuído ao H-5, um dd em $6,9\text{ ppm}$ representando o H-3, ao H-4 o ddd em $7,5\text{ ppm}$ e ao H-6 o dd centrado em $7,8\text{ ppm}$.

No espectro de RMN ^{13}C (figura 23 e tabela 21) verificam-se sinais de 7 carbonos, sendo 3 quaternários, um correspondente a carbonila do ácido em $172,6\text{ ppm}$ e dois outros atribuídos aos carbonos aromáticos, C-1 em $113,3\text{ ppm}$ e o C-2 em $163,0\text{ ppm}$ sobre o qual se encontra a hidroxila. Os outros carbonos não substituídos são representados pelos outros sinais: $131,2$; $119,9$; $136,6$ e $116,0\text{ ppm}$ atribuídos a C-6; C-5; C-4 e C-3 respectivamente.

Atribuições realizadas através das multiplicidades obtidas do DEPT 135 e 90° e comparadas com os dados da literatura [32] permitiu comprovar que se tratava do **ácido salicílico**.

TABELA 20: Dados do espectro de RMN ¹H de Ds.1 ((CD₃)₂CO, 80MHz, ppm)

PRÓTON	ppm, multiplicidade, (J)
H - 3	6,9; dd; (1,5 e 7,5)
H - 4	7,5; ddd; (2,0; 8,0 e 7,5)
H - 5	6,9; ddd; (1,5; 8,0 e 7,5)
H - 6	7,8; dd; (2,0 e 8,0)

TABELA 21: Dados do espectro de RMN¹³C de Ds.1 ((CD₃)₂CO, 20MHz, ppm)

CARBONO	ppm, multiplicidade
01	113,3; s
02	163,0; s
03	116,0; d
04	136,6; d
05	119,9; d
06	131,2; d
1'	172,6; s

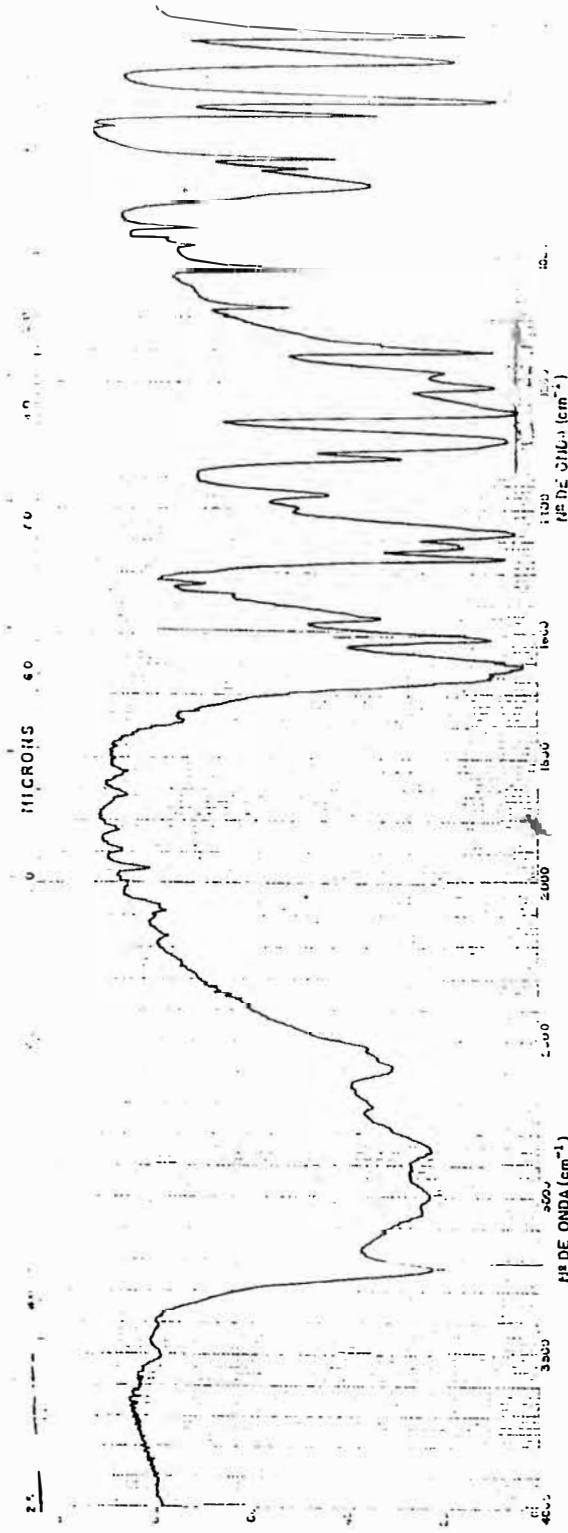
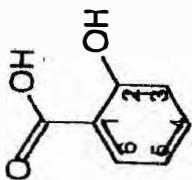


FIGURA 21: Espectro no IV da substância Ds.1.

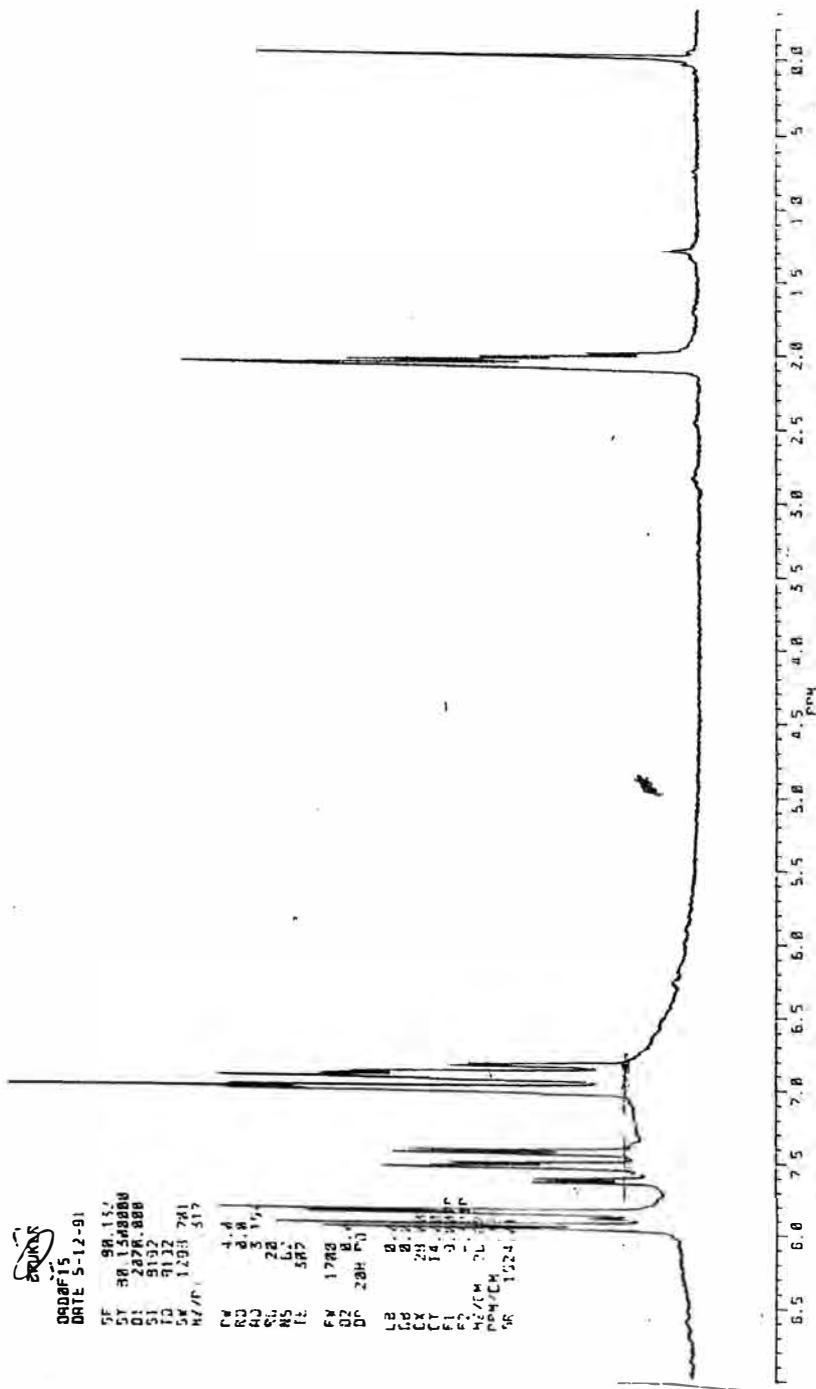
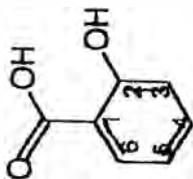


FIGURA 22: Espectro de RMN-¹H da substância Ds.1, (CD₃)₂CO, 80 MHz.

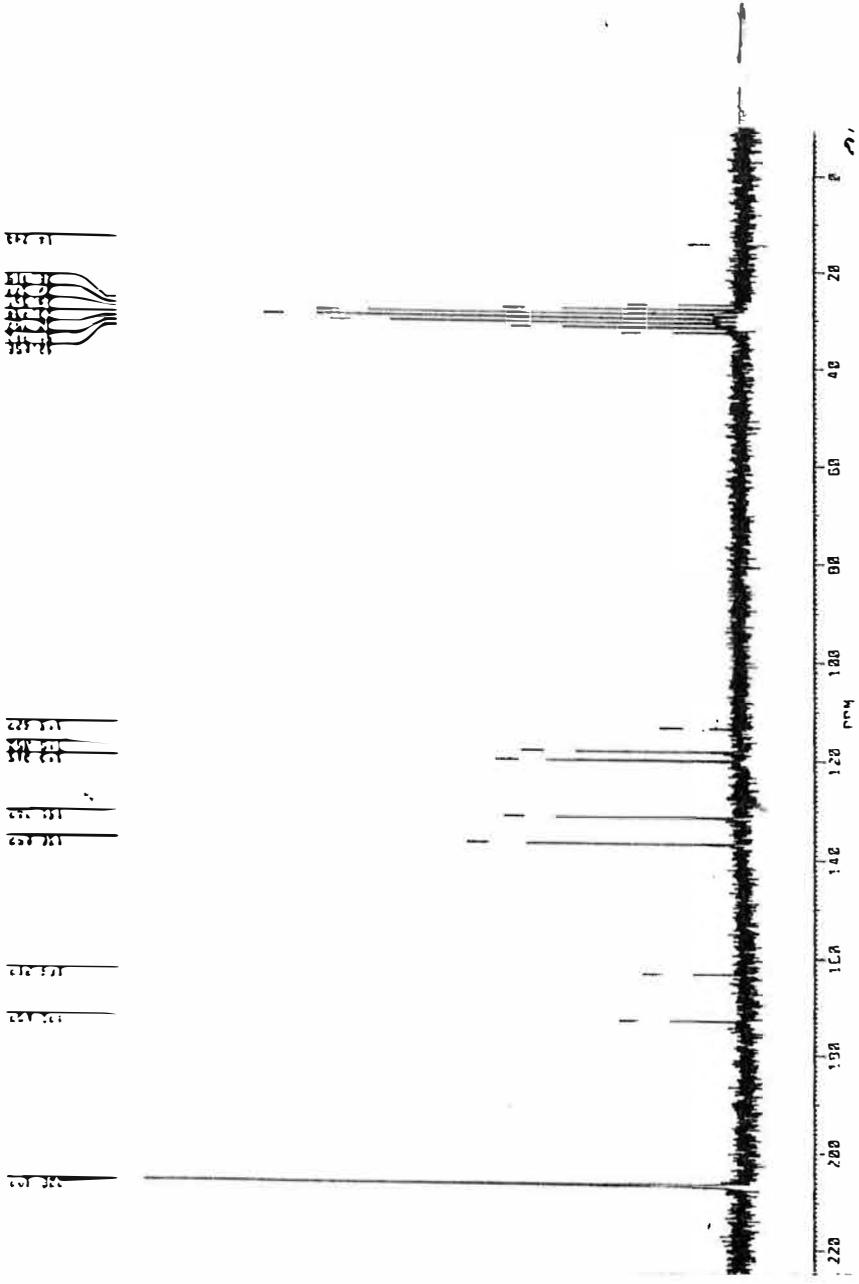
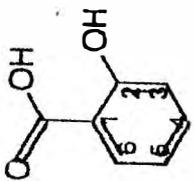


FIGURA 23: Espectro de RMN-¹³C da substância Ds. 1, (CD₃)₂CO, 20 MHz.

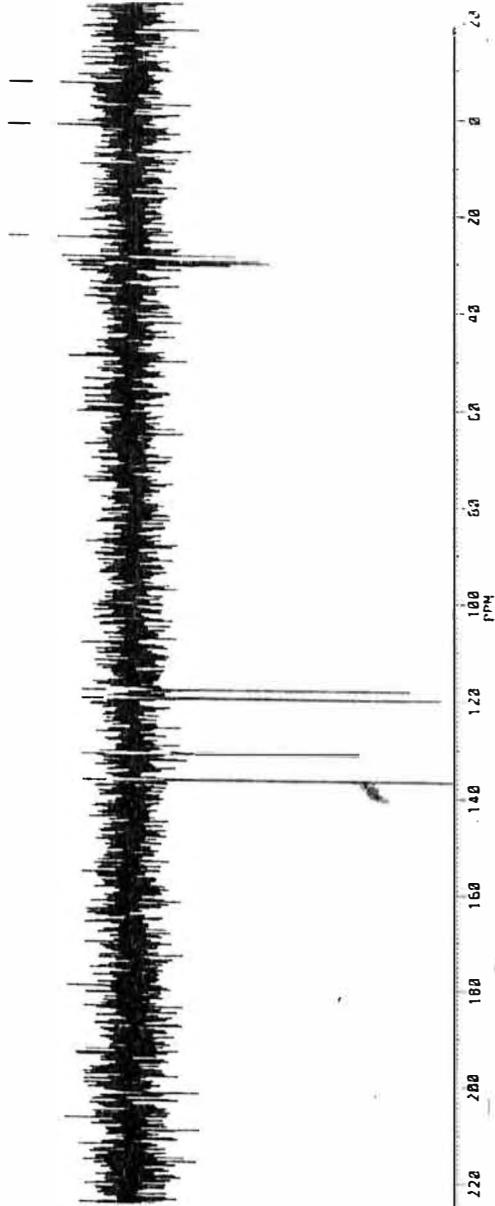
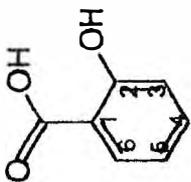
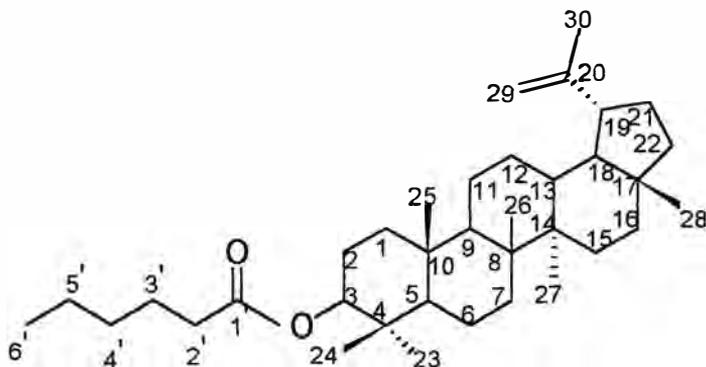


FIGURA 23a: Espectro de RMN-¹³C-DEPT 135° - da substância Ds.1, (CD₃)₂CO, 20 MHz.

V.7 - Identificação de Ds.2.



Ds.2

A elucidação estrutural dessa substância foi proposta por comparação de dados do RMN ^1H (figura 24) desta com os de Db.4, ocorrendo diferença no deslocamento químico do próton sobre o C-3, que neste caso absorve em 4,4 ppm e não em 3,2 ppm como em Db.4. Esta desproteção é também confirmada pelos dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C , onde o C-3 está representado pelo sinal em 80,6 ppm, enquanto que em Db.4 o deslocamento ocorre em 79,0 ppm. Outra confirmação é o fato de que o espectro de RMN ^{13}C (figura 25) apresenta seis sinais a mais que Db.4 sendo um deles referente a carbonila de um éster, propondo uma acilação com ácido hexanóico. A tabela 22, mostra dados que foram comparados com a literatura [28-30] confirmando a substância lupeol acilado com ácido hexanóico.

TABELA 22: Dados do espectro de RMN ¹³C de Ds.2 (20MHz, CDCl₃, ppm).

CARBONO	ppm, multiplicidade
01	38,2; t
02	27,3; t
03	80,6; d
04	38,3; s
05	55,3; d
06	18,2; t
07	34,1; t
08	42,8; s
09	50,3; d
10	37,0; s
11	20,9; t
12	25,1; t
13	37,8; d
14	42,8; s
15	27,3; t
16	35,5; t
17	42,9; s
18	48,2; d
19	48,0; d
20	150,9; s
21	29,6; t
22	39,9; t
23	27,9; q
24	14,4; q
25	16,1; q
26	15,9; q
27	14,5; q
28	18,0; q
29	109,3; t
30	19,2; q
01'	173,7; s
02'	34,8; t
03'	25,1; t
04'	31,8; t
05'	22,6; t
06'	14,4; q

* Multiplicidades atribuidas através de DEPT 135 e 90°

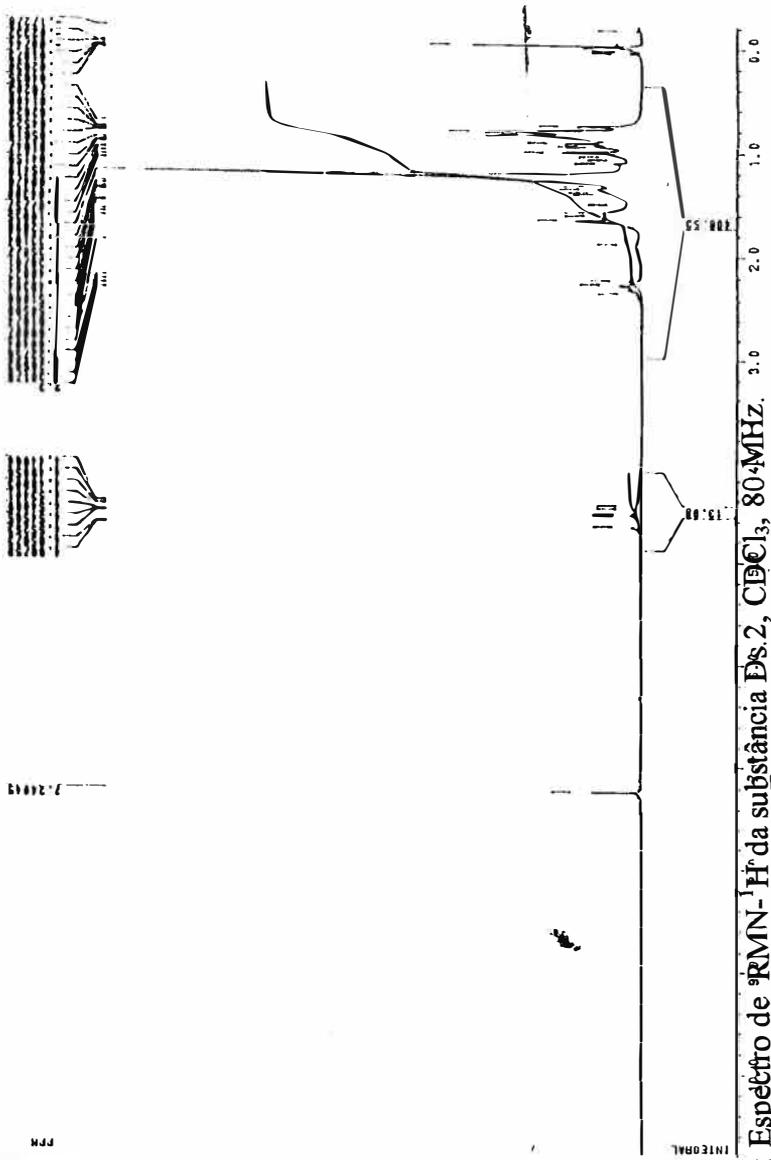
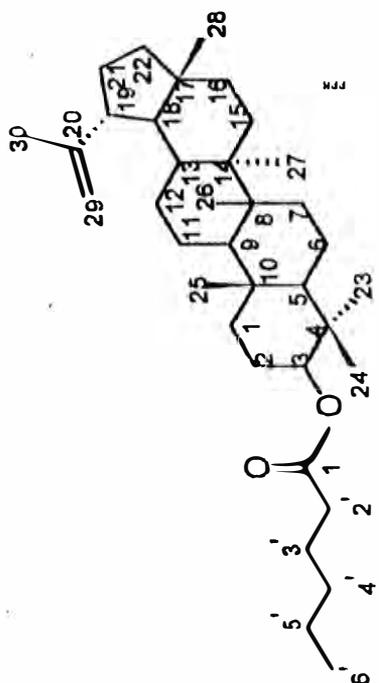


FIGURA 24: Espectro de $^1\text{RMN}-\text{H}$ da substância Ds.2, C_2Cl_3 , 80-MHz.

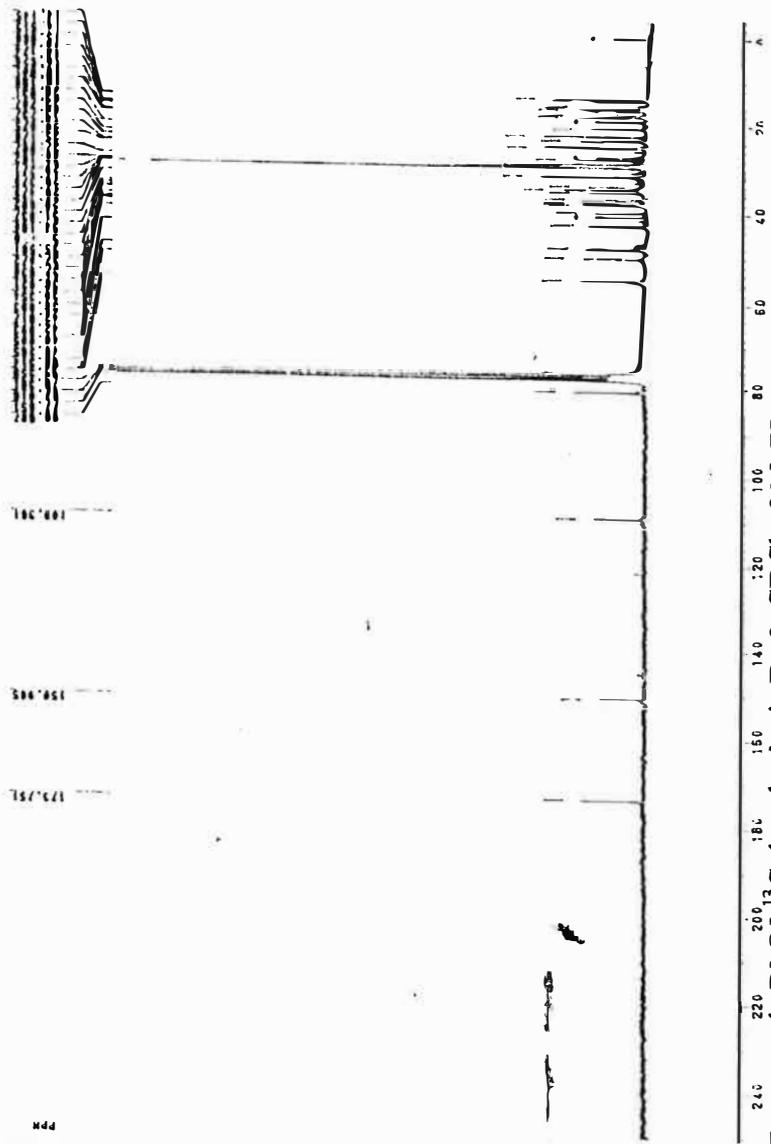
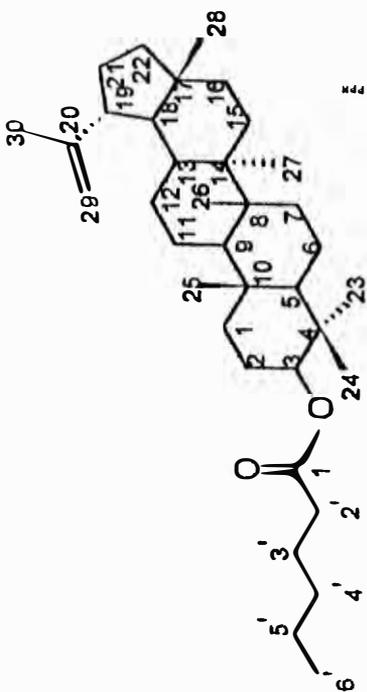


FIGURA 25: Espectro de RMN- ^{13}C da substância Ds.2, CDCl_3 , 20 MHz.

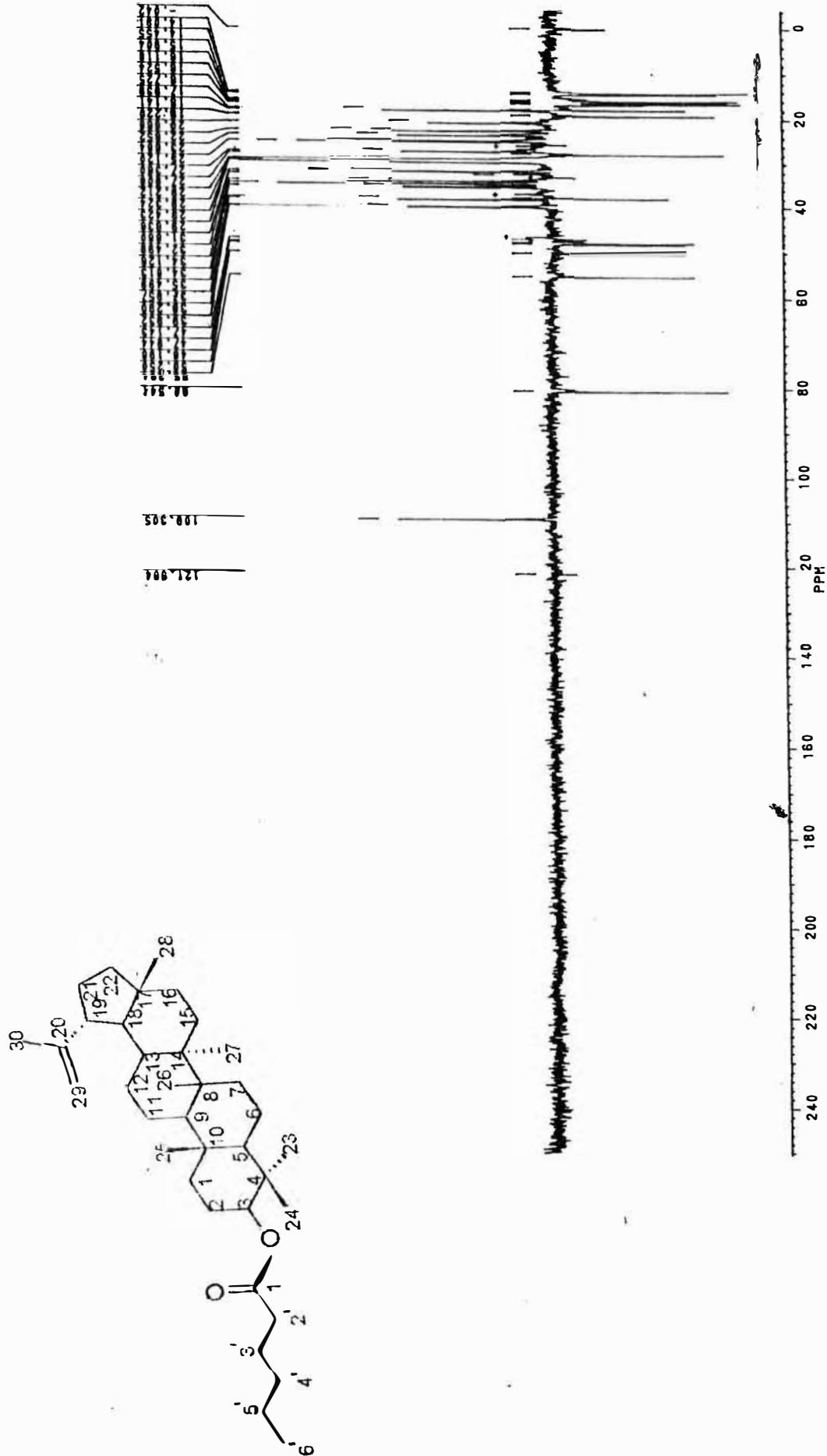


FIGURA 25a: Espectro de RMN- ^{13}C -DEPT 135 $^{\circ}$ da substância Ds.2, CDCl_3 , 20 MHz.

VI - CONCLUSÃO

O presente trabalho, contribui com dados químicos para o conhecimento da subfamília Barnadesioideae, uma vez que apenas uma espécie da mesma foi estudada quimicamente.

De *D. brasiliensis*, foram isolados o éster 3,4 dihidroxi cinamato de etila, do qual nenhuma referência foi encontrada, entretanto na literatura outros derivados dessa substância são citados [33]. Os triterpenos α -amirina, β -amirina, lupeol e o esteróide estigmasterol; os quais são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal [15].

De *D. cryptocephallum* foi isolado um glicosídeo do esteróide mais amplamente distribuído no reino vegetal, o sitosteril 3- β -D-glicopiranosídeo, o qual já foi isolado de *Prunella vulgaris* [31].

De *D. synacanthum* foi isolado um derivado do lupeol, o hexanoato 3 β -lup-20(29)-eno, substância anteriormente isolada na subfamília, em *Doniophyton anomalum* que ocorre no Chile [34]. Também isolou-se o ácido salicílico, metabólito que assim como outros ácidos hidroxibenzoicos, tem uma pequena distribuição, ocorrendo em quantidades menores do que os outros derivados do ácido cinâmico [35]. A questão da ocorrência do ácido salicílico livre em plantas tem recebido uma nova importância em vista de suas prováveis funções, como um sinal metabólito para a produção de energia em *Arum lilies* [36] e com resistência induzida para patógenos [37].

Trabalhos recentes indicam que a resistência de plantas de fumo contra infecções de origem bacteriana e fúngica, requer a presença de ácido salicílico. Nesses estudos verificou-se que na presença da enzima salicilato hidrolase,

que degrada o ácido salicílico, as plantas são incapazes de resistir a esses agentes patogênicos, mas esse quadro pode ser revertido com aplicação deste ácido [37].

Em relação a atividade biológica [38] alguns extratos mostraram-se ativos ou parcialmente ativos, estes resultados podem ser visto no apêndice.

VII - APÊNDICE

VII.1- BIOSÍNTESE

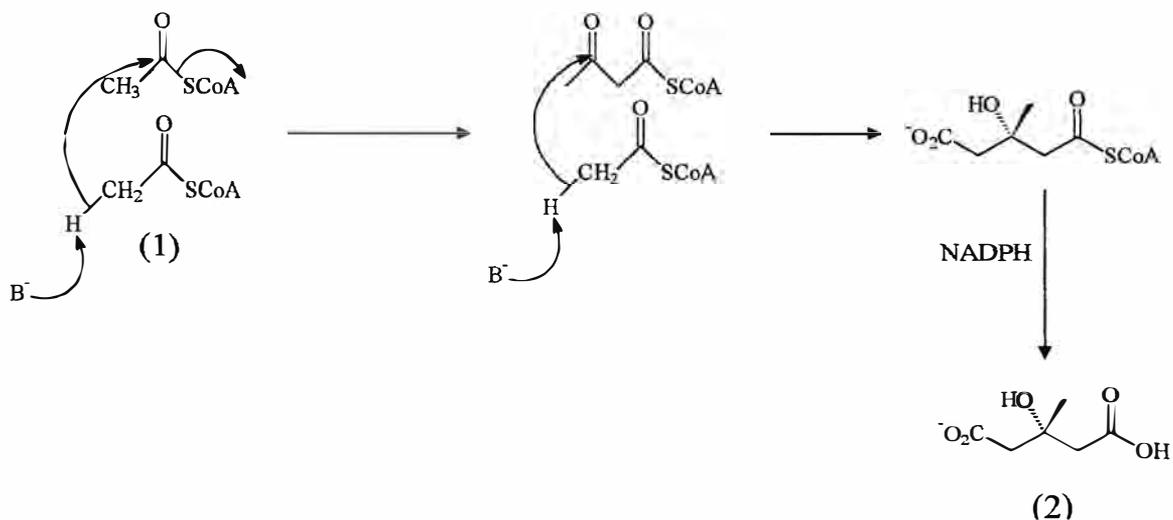
VII.1.1 - TERPENÓIDES [02]

O acetil-S coenzima A (1), é o iniciador na biossíntese do ácido mevalônico, que leva ao isopreno, unidade estrutural básica dos terpenóides e esteróides (substâncias como **Db.3** e **Dc.1**). Esta grande classe de produtos naturais inclui substâncias como o α -pineno (do óleo do pinho), a tujona (maior constituinte do absinto), a artemisinina (ativo contra a malária), o colesterol, o β -caroteno e também o grupo fitol que faz parte da molécula de clorofila.

Quando as estruturas de substâncias contendo dez carbonos (monoterpenos) foram estabelecidas no século XIX, observou-se que estas deviam conter números inteiros de unidades de cinco carbonos; além disto, quando os monoterpenos eram pirolisados, produziam isopreno (2-metilbutadieno), como maior produto de decomposição.

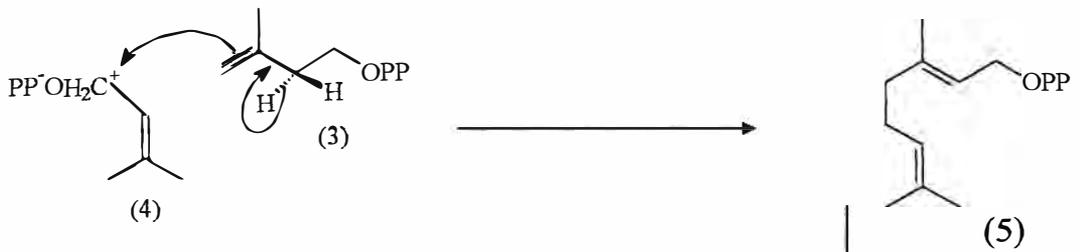
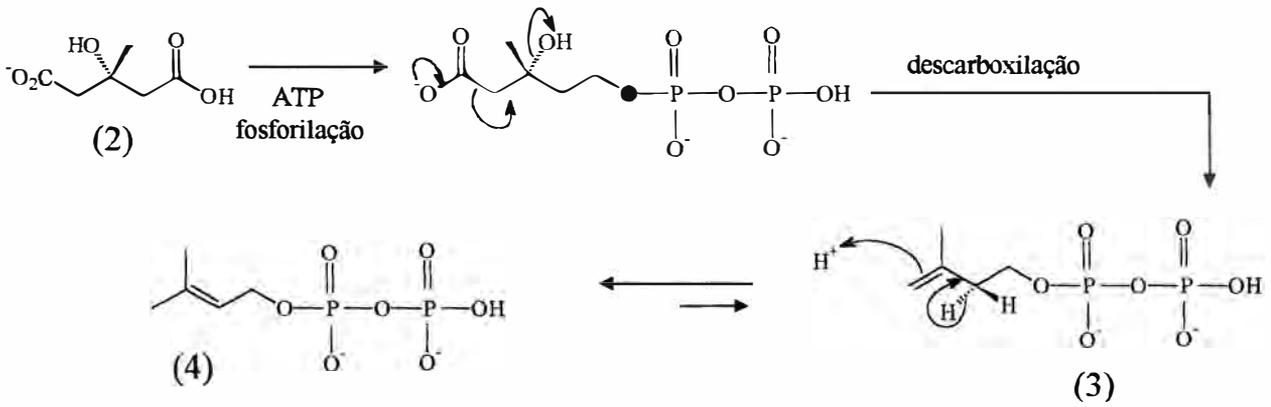
Foi então que especulações biogenéticas descreveram o isopreno como unidade básica e surgiu a "Regra do Isopreno", onde os terpenóides eram derivados de um número inteiro de unidades de isopreno, unidos de um modo, cabeça-cauda, com posteriores modificações devido a rearranjos e mudanças de grupos funcionais.

Mais tarde, com estudos utilizando marcação isotópica, descobriu-se que o precursor do isopreno é o 3-R-ácido mevalônico (2) e o precursor deste é o acetil-SCoA, como no esquema a seguir:



Os monoterpenos são formados a partir da combinação de duas unidades de cinco carbonos. Atualmente, está bem estabelecido que pirofosfato de dimetilalila (4) é ionizado e sofre um ataque nucleofílico do pirofosfato de isopentenila (3), para produzir o pirofosfato de geranila (5).

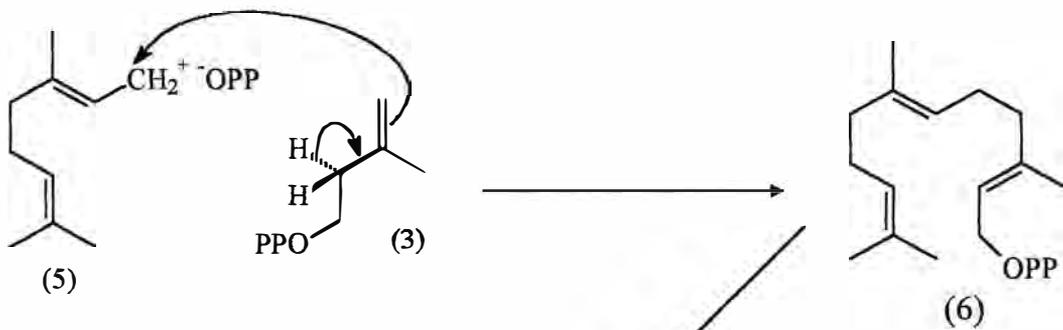
O pirofosfato de geranila (5), pode participar de dois processos. Ele pode sofrer ataque de enzimas ciclase, as quais catalisam a formação de monoterpenos cíclicos, ou pode ser substrato para a feniltransferase, que catalisa a formação do pirofosfato de farnesila (6), que é o precursor dos sesquiterpenóides (C_{15}), como ilustra o esquema a seguir.



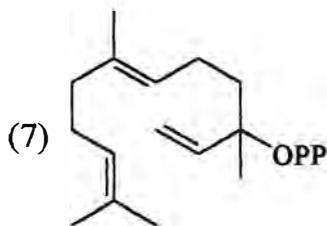
monoterpenos
cíclicos

ciclases

sesquiterpenos



isomerização

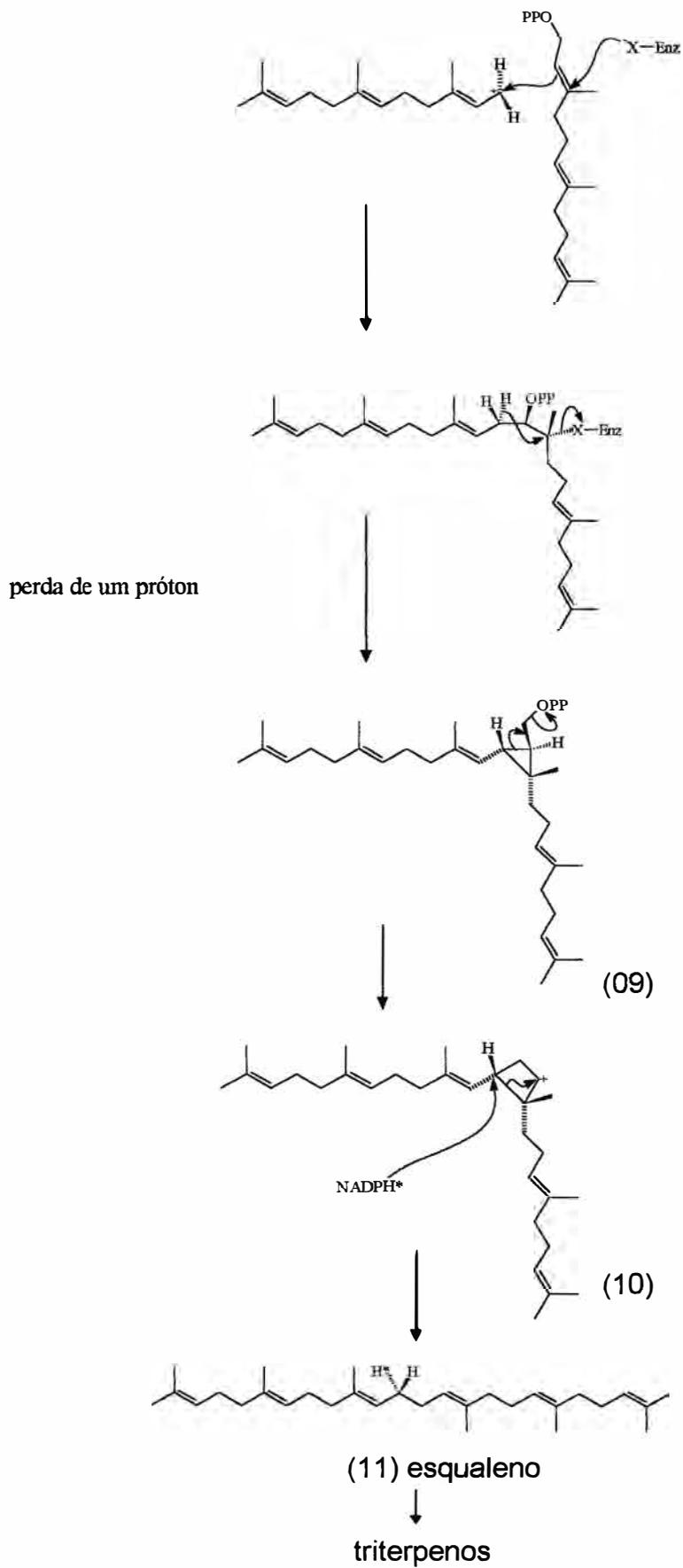


VII.1.2 - TRITERPENÓIDES [02]

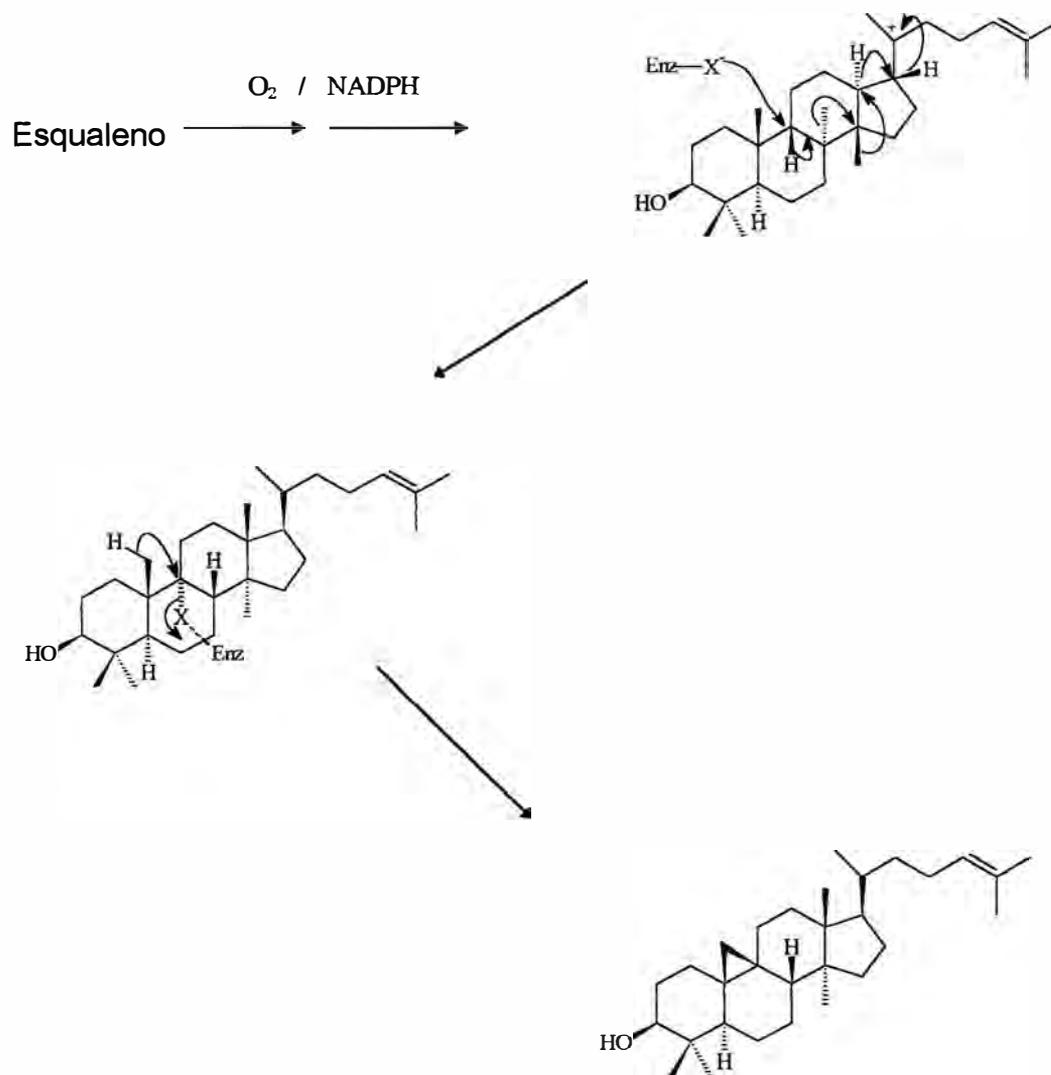
Os sesterpenos (C_{25}) são formados pelo mesmo mecanismo descrito anteriormente, ou seja, o pirofosfato de geranila geranila condensa com o pirofosfato de isopentenila (3), completando 25 átomos de carbono.

Os triterpenos (C_{30})(substâncias como **Db.2**, **Db.4** e **Ds.2**), são formados por um caminho diferente. A chave para o entendimento da biossíntese destas substâncias, surgiu, a partir da descoberta de grandes quantidades da substância esqualeno (11) no óleo do fígado de tubarão.

Duas unidades de pirofosfato de farnesila (6) se condensam, mas de maneira cauda-cauda, diferente do modo cabeça-cauda observado para os terpenóides menores. O mecanismo atual, indica a formação de um intermediário, (que possui um anel ciclopropano), o pirofosfato do presqualeno (09).

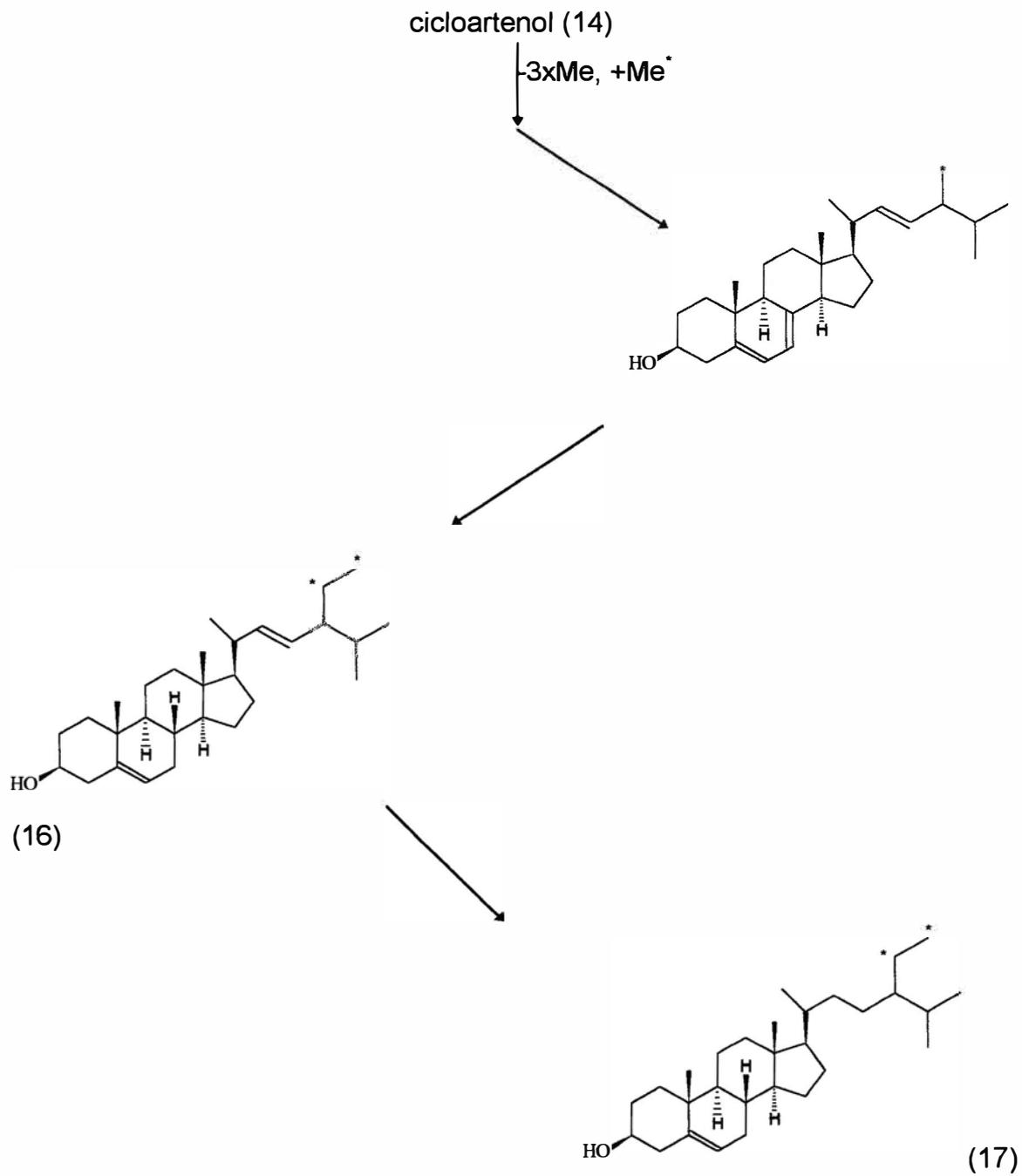


A formação de triterpenos do tipo cicloartenol (14), ocorre a partir da oxidação do esqualeno e alguns rearranjos, como esquematizado abaixo.

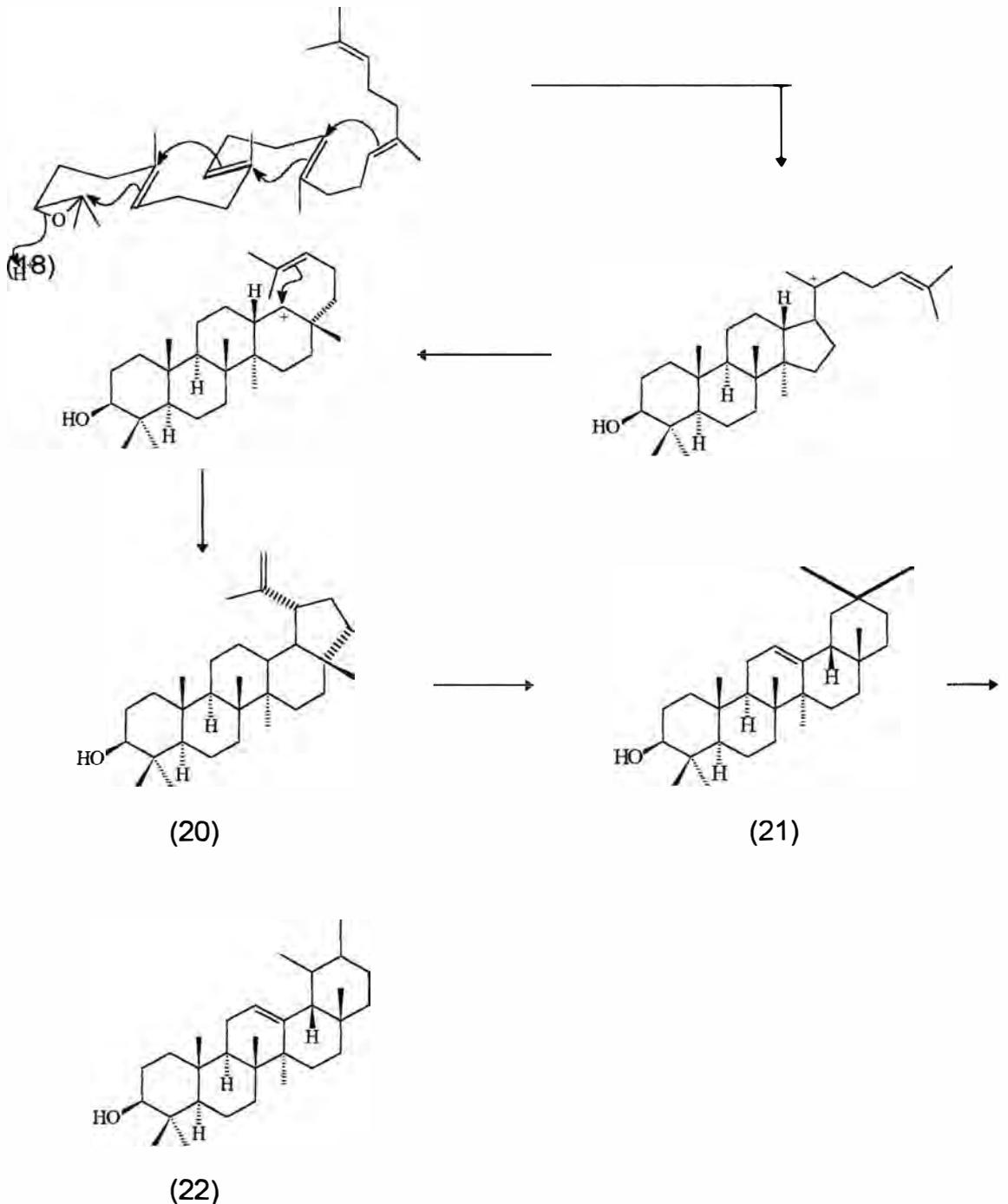


(14)

A formação de esteróides [Db.3 (16) e Dc.1 (17)] ocorre a partir da perda de três grupos metilas do cicloartenol, seguida do ganho de um grupo metila da metionina [39].

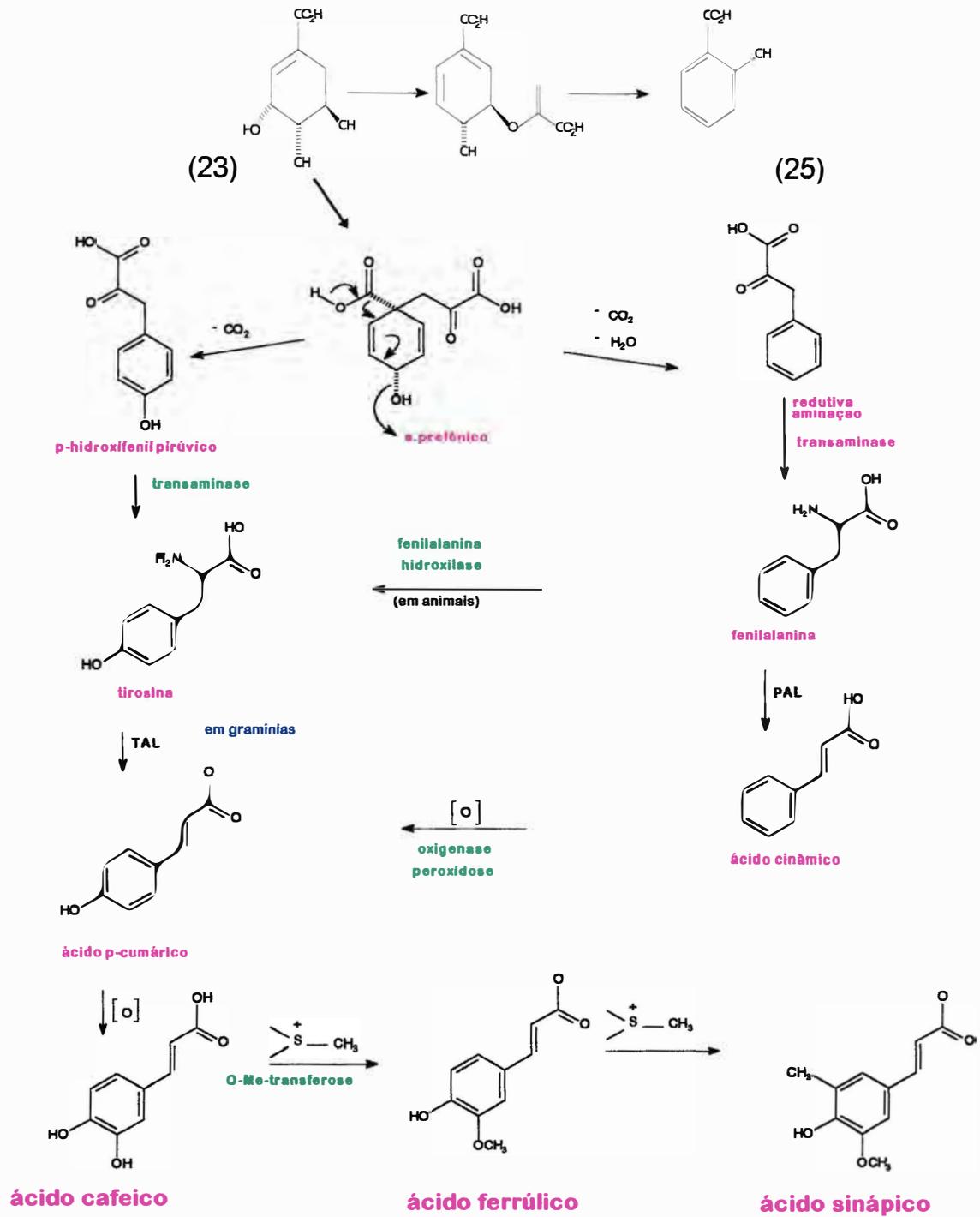


Triterpenos pentacíclicos, como o lupeol (20), α -amirina (22) e β -amirina (21)[40], são formados a partir da epoxidação seletiva do esqualeno, que resulta no 2,3-oxidoesqualeno (18), em uma conformação do tipo cadeira-cadeira-bote.



VII.1.3 - ÁCIDOS

A formação dos ácidos cafeico (o qual a substância **Db.1** é derivada) e o salicílico (Ds.1) ocorrem a partir do ácido chiquímico (23).



VII.2 - ENSAIO BIOLÓGICO

VII.2.1 - Atividade sobre *Tripanossoma cruzi*.

Ensaio realizado no Instituto de Microbiologia do Rio de Janeiro UFRJ, por gentileza do prof. Fernando Steele da Cruz.

A doença de Chagas se constitui em um dos principais problemas brasileiros na área de saúde pública, dado a sua alta incidência em nosso território. Ela atinge não só o nosso país, mas também vários países da América do Sul, América Central e Sul da América do Norte [38].

Várias providências seriam necessárias para a debelação da doença, tais como:

- * diminuição de vetores;
- * a urbanização;
- * o saneamento;
- * o controle do sangue transfusional, etc.

Todos os extratos brutos desse trabalho foram testados, sendo que nenhum deles mostrou ser ativo contra o *T. cruzi*.

VII.2.2 - Ensaio de ação quimioprolática da esquistossomose.

A esquistossomose, devido aos enormes prejuízos sócio-econômicos que acarreta, ocupa lugar de destaque entre as helmintíases assinaladas no Brasil. A sua incidência continua alta em várias regiões do país, devido a persistência da higiene precária e ao comportamento humano; pois o frequente contato com as águas infectadas torna difícil o controle e, conseqüentemente, facilita a expansão da endemia [41].

Para combater o *Schistosoma mansoni*, trematódeo causador da enfermidade, é necessário interromper seu ciclo evolutivo (Figura 26) [42].

Devido às restrições ao uso de moluscidas sintéticos já conhecidas, como toxicidade para os peixes e outros animais, biodegradação lenta, alto custo e desenvolvimento de resistência [43,44] tem aumentado o interesse por produtos naturais, principalmente extraídos de plantas.

Os ensaios para avaliação da atividade moluscida foram realizados por gentileza da Profa. Dra. Cecília Pereira de Souza do Centro de Pesquisa "René Racou" da FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG.

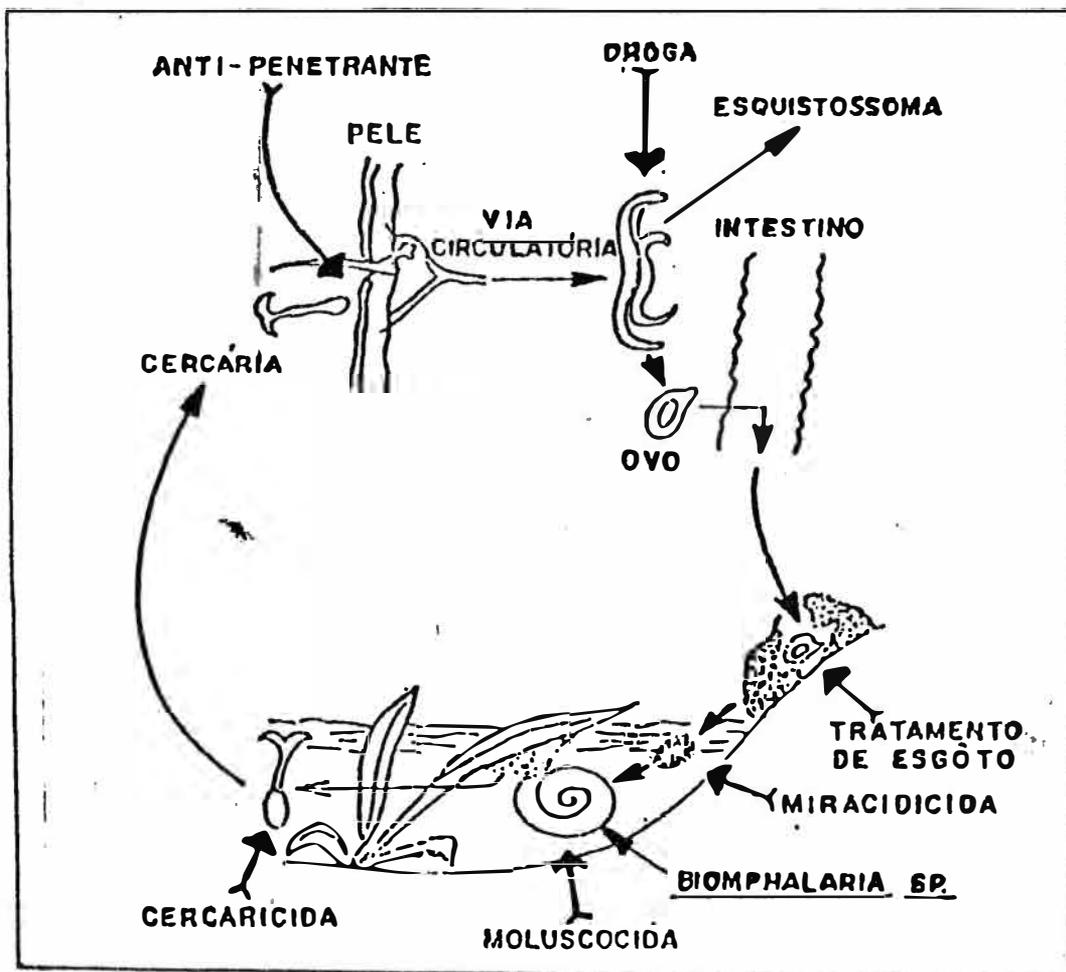


FIGURA 26: Ciclo do *Schistosoma mansoni* e pontos de ataque.

VII.2.2.a - Avaliação da atividade moluscicida sobre caramujos adultos.

A eliminação dos caramujos, por meio de moluscicidas, em coleções de águas naturais ou artificiais, seria uma forma de bloquear o ciclo evolutivo no ponto de aparecimento das cercárias.

Assim os extratos brutos desse trabalho foram ensaiados contra caramujos adultos de **Biomphalaria glabrata**, onde obtivemos resultados positivos para todos extratos do **D. brasiliensis**, à 100 ppm de concentração.

VII.2.2.b - Avaliação da atividade moluscicida sobre desovas de caramujos.

Uma outra prática profilática seria a destruição dos ovos dos caramujos antes da eclosão, o que ocorre, em média, 10 dias após a postura [45].

Os extratos brutos desses vegetais foram testados para verificação de suas atividades sobre desovas de **B. glabrata**, sendo que o extrato etanólico do **D. brasiliensis** foi o único que se mostrou parcialmente ativo à 100 ppm.

VIII-Referências bibliográficas.

- 1 - MANN, J. *Secondary metabolism*. Oxford, Oxford University Press, 1978, pp.06-07.
- 2 - MANN, J. *Chemical aspects of biosynthesis*, Oxford University Press, Oxford,1994, pp. 02-05.
- 3 - MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza, UFC, 1988, pp. 07-08.
- 4 - HARBONE, J.B.; HEYWOOD, V.H.; TURNER, B.L. *The biology and chemistry of the Compositae*. London, Academic Press Inc., 1977,1, p.283-357.
- 5 - SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Bot. Rev.*, 48 (2), 121-595, 1982.
- 6 - HEGNAUER, R. The chemistry of the Compositae. In: *The Biology and Chemistry of Compositae*. "Heywood, V.H.; Harbone, J.B.; Turner, B.L., (eds.), Academic Press, London
- 7 - KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e Nocivas*. São Paulo, BASF Brasileira, 2, pp.131-134, 1993.
- 8 - BREMER, K. *Asteraceae Cladistics & Classification*. Timber Press. Portland, Oregon. pp 49-60. 1996.
- 9 - BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Systematic and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Pl. Syst. Evol.* 171: 1-14, 1990.

- 10 - HARBONE, J.B. *Introduction to ecological biochemistry*. London Acad. Press, 3rd ed., 1988.
- 11 - HOSTETTMANN, K.; LEA, P.J. (eds.) *Biologically active natural products*. Oxford, Oxford Univ. Press, 1987.
- 12 - COLL, J.C.; BOWDEN, B.F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.*, 49, 934-936, 1986.
- 13 - PELLETIER, S.W. et al. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.*, 49, 892-900, 1986.
- 14 - COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. UNICAMP, 6^o ed., 1995.
- 15 - OLEA, R.S.G. Metodologia para identificação dos compostos de misturas de triterpenos por RMN ¹³C. *Química Nova*, 13 (4) 1990.
- 16 - DAS, M.C.; MAHATO, S.B. Triterpenoids. *Phytochemistry*, 22, 1071-1095, 1983.
- 17 - SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. L. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 3rd ed., 1979, p.40-41.

- 18 - NAKANISHI, K.; SALOMON, P. M. *Infrared absorption spectroscopy*. San Francisco, Holden Day Inc., 1977, p.40-41.
- 19 - POUCHERT, C.J.; CAMPBELL, J.R. *The Aldrich Library of NMR Spectra. VI., 140D*.
- 20 - BREITMAIER, E. VOELTER, W. *Carbon-13 NMR spectroscopy*. 3rd, VCH, Wuzburg, Germany, 1987.
- 21 - ROSEWRANTS, H.; ZABLOW, L. The 9-10 region of infrared absorption spectra on steroids in relation to chemical structure. *J. Am. Society*, 75, 903, 1953.
- 22 - NAKANISHI, K. *Infrared absorption spectroscopy*. San Francisco. Holden-Day, 1962, p.65-69.
- 23 - JONES, R.N.; HURIPHRIES, P.; PACKARD, E. & DOBRINER, K. Studies in steroid metabolis VIII. The detection and location ethylenic double bonds in steroids by infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 72: 86-91, 1950.
- 24 - KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella Vulgaris*. *Phytochemistry*, 29, 2351-2355, 1990.
- 25 - CUNHA, W.R. Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora rupestris* Semir e Leitão Filho (Vernonieae, Compositae). *Tese de Doutoramento*. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1994.

- 26 - BOLHMANN, F. et al. α - humulene derivative including a sesquiterpene acid with rearranged carbon skeleton from *Lychnophora salicifolia*. *Liebigs Annuls Chem.*, 13, 1455-1458, 1993.
- 27 - BOHLMANN, F. et al. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry* 19: 2381-2385, 1980.
- 28 - MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37(6), 1517-1575.
- 29 - JOHNSON, L.F.; JANKOWSKI, W.C. *Carbon-13 NMR Spectra* vol.3, 1972, p.487.
- 30 - WENKERT, E.; BADDELEY, V.; BURFITT, I. R.; MORENO, L.N. Carbon-13 NMR spectroscopy of naturally-occurring substances. *Organic Magnetic resonance*, vol.11, n:7, 1978, pp. 337-343.
- 31 - HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. Saponins in: *Methods in plants biochemistry*, vol. 7, p.436-471, 1991.
- 32 - POUCHERT, C.J.; CAMPBELL, J. R. *The Aldrich Library of NMR Spectra*. VI., 143C.
- 33 - ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 41, 153-156, 1993.

- 34 - BOLHMANN, F. et.al. Lupeol and lupeyl fatty acid esters from *Dcniophyton anomalum*. *Phytochemistry* 27(9) , 2953-2959, 1988.
- 35 - PIERPOINT, W. S. Salicylic Acid and its Derivates in Plants: Medicines, Metabolites and Messenger Molecules. *Advances in Botanical Research*, 20,pp 164-235, 1994.
- 36 - RASKIN, I., TURNER, I. M. and MELANDER, W. R. (1989). Regulationof heat production in the inflorescences of Arum lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86, 2214-2218.
- 37 - TSUNODA, M. ÁCIDO SALICÍLICO E Plantas. *Science* 266, 1247,1994.
- 38 - SAMPAIO, M.C.R. Testes in vitro da atividade de drogas em *Crithidia fasciculata* e *Trypanossoma cruzi*. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978.
- 39 - MANN, J. *Secondary metabolism*.Oxford, Oxford University Press, 1978, p. 141.
- 40 - GEISSMAN, T. A . ; CROUT, D. H. G. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. Freeman, Cooper & Company. p. 318, 1969.

- 41 - CUNHA, W.R. Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de três espécies da tribo Vernonieae. *Tese de Mestrado*, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, p. 123-124, 1990.
- 42 - NAGAMITI, K. Contribuição ao estudo químico e ensaios biológicos de três espécies nativas da Asteraceae. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, p. 140, 1987.
- 43 - KLOOS, H. & McCULLOUGH, F. *Who. Shisto.* 81, 59, 1981.
- 44 - McCULLOUGH, F. *Bull. Wed. Hith. Org.* 59, 17, 1981.
- 45 - MORAES, R.G.; LEITE, J.C. & GOULART, E.G. *Parasitologia Médica*, Rio de Janeiro, Atheneu, 1971.