



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Cestrum laevigatum* Schlecht
(Solanaceae).**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberta Érika de Souza Silva

FORTALEZA-CE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Cestrum laevigatum* Schlecht
(Solanaceae).**

Roberta Érika de Souza Silva

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Mary Anne Sousa Lima.

Fortaleza – Ceará

2009

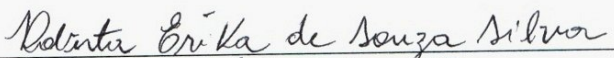
S578e Silva, Roberta Érika de Souza
Estudo químico de *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) Schlecht / Roberta
Érika de Souza Silva, 2009.
148 f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Área de concentração: Química Orgânica
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2009.

1. Saponinas esteroidais 2. Triterpeno 3. RMN¹H e ¹³C I. Lima, Mary
Anne Sousa (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-
Graduação em Química Orgânica e Inorgânica III. Título

CDD 547

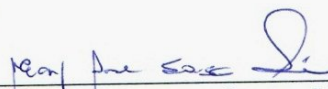
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



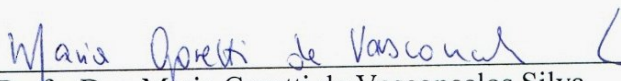
Roberta Érika de Souza Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/02/2009


EXAMINADORES:



Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Janete Eliza Soares de Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC/FFOE

*Aos meus amados pais,
Nomar e Marilene, e aos meus irmãos,
Ana Karine, Paulo Cirton e Nomar Jr.,
pelo incentivo, carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que sou e tudo que tenho.

Aos meus pais, que são um exemplo de cumplicidade em minha vida e que tanto amo.

Aos meus irmãos, que são meus eternos confidentes e amigos, e a toda minha família.

Ao meu namorado Eduardo, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

À professora Mary Anne Sousa Lima, pela acolhida no laboratório, pela orientação indispensável, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela oportunidade de trabalhar no seu grupo.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, pela coleta da planta, pela amizade, pelos conselhos e pela colaboração em diversas ocasiões.

Às professoras Vânia Maria Maciel Melo, da UFC e Laila Salmen Espindola, da UNB pela realização dos testes de atividades farmacológicas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica (UFC) e do Curso de Bacharelado em Farmácia (UFC), pela contribuição indispensável à minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, especialmente a Lana, Mundinha, Sr. Paulo e Célia, pela forma dedicada com a qual realizam seu trabalho.

Aos operadores dos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear: Daniel, Henrique, Renata e Professora Mary Anne, pela obtenção dos espectros das substâncias isoladas de *C. laevigatum*.

Aos amigos do laboratório, colegas de bancada e de estudo: Artur, Antônia, Cristiane, João Henrique, Regivaldo, Patrícia, Priscilla, Julieta, Karen, Gardênia, Hélivio, Paula, Paulo, Renata, João Vito, Mariano, Neto, Clerton, Pêrsio, e Zelina, que abrilhantam o LAFIPLAM 1.

Aos amigos da turma de mestrado 2007.1: Cláudio, Natália, Isabel, Luciana Bertini e Honório.

Em especial também às minhas amigas: Mirella, Natália e Sara.

Ao Bartholomeu, por me fazer descobrir o mundo acadêmico e pela amizade.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao FUNCAP, CNPq, CAPES, FINEP e PRONEX, pelo apoio financeiro.

“Volta teu rosto sempre na direção do sol, e então, as sombras ficarão para trás.”

Sabedoria oriental.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO 2	
CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	15
2.1 Considerações botânicas sobre a família Solanaceae.....	15
2.2 Considerações botânicas sobre o gênero <i>Cestrum</i>	15
2.3 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Cestrum laevigatum</i>	16
CAPÍTULO 3	
LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	18
3.1 Espécies Estudadas do Gênero <i>Cestrum</i> e Constituintes Químicos Isolados.....	18
CAPÍTULO 4	
DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL.....	51
4.1 Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Fixos de <i>Cestrum laevigatum</i> [CL].....	51
4.1.1 Determinação estrutural de CL-1.....	51
4.1.2 Determinação estrutural de CL-2.....	66
4.1.3 Determinação estrutural de CL-3.....	79
4.1.4 Determinação estrutural de CL-4.....	101
4.1.5 Determinação estrutural de CL-5.....	107
4.1.6 Determinação estrutural de CL-6.....	111

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL	117
5.1 Estudo dos Constituintes Não-Voláteis de <i>Cestrum laevigatum</i> Schlecht.....	117
5.1.1 Material Botânico.....	117
5.1.2 Métodos cromatográficos.....	117
5.1.2.1 Cromatografia de adsorção.....	117
5.1.2.2 Cromatografia de exclusão.....	118
5.1.3 Métodos Físicos de Análise (espectrométricos).....	118
5.1.3.1 Espectrometria na região do infravermelho (IV).....	118
5.1.3.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e de carbono-13 (RMN ¹³ C).....	118
5.1.3.3 Espectrometria de massa.....	119
5.2 Isolamento dos Constituintes Químicos do caule de <i>Cestrum laevigatum</i> Schlecht.....	120
5.2.1 Obtenção dos extratos hexânico [CLCH] e etanólico [CLCE] de <i>Cestrum laevigatum</i>	120
5.2.2 Partição líquido-líquido de CLCE.....	120
5.2.4 Tratamento cromatográfico de CLCE-dC: Isolamento de CL-2, CL-3 e CL-6.....	121
5.2.5 Tratamento cromatográfico de CLCE-dC: Isolamento de CL-1.....	122
5.2.6 Tratamento cromatográfico de CLCE-H: Isolamento de CL-4 e CL-5.....	124

CAPÍTULO 6

TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	126
6.1 Teste de Atividade Antimicrobiana de CL-1, CL-2 e CL-3.....	126
6.1.1 Resultados e discussões.....	126
6.2 Atividade Leishmanicida: Ensaios <i>in vitro</i>	127
6.2.1 Cultura de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	127
6.2.2 Efeito dos extratos sobre formas extracelulares de <i>Leishmania</i>	128

<i>(Leishmania) amazonensis</i>	
6.2.3 Resultados e discussões.....	128
6.3 Atividade Antifúngica.....	128
6.3.1 Teste de microdiluição.....	128
6.3.2 Microrganismos e período de crescimento para o teste.....	128
6.3.3 Preparo dos controles.....	129
6.3.4 Preparo do meio de cultura.....	129
6.3.5 Diluição das amostras.....	130
6.3.6 Preparo do inóculo.....	130
6.3.7 Teste.....	130
6.3.8 Leitura das placas e valor de CIM.....	131
6.3.9 Resultados e discussões.....	131
CAPÍTULO 7	
CONCLUSÕES.....	132
CAPÍTULO 8	
CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS.....	133
CAPÍTULO 9	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia de <i>Cestrum laevigatum</i> em seu <i>habitat</i> natural com destaque para os botões florais, flores e frutos	17
Figura 2	Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-1	58
Figura 3	Espectro de massa de CL-1	58
Figura 4	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1	59
Figura 5	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1	59
Figura 6	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1	60
Figura 7	Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	60
Figura 8	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	61
Figura 9	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	61
Figura 10	Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1	62
Figura 11	Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1	62
Figura 12	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	63
Figura 13	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	63
Figura 14	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	64
Figura 15	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1	64
Figura 16	Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-2	71
Figura 17	Espectro de massa de CL-2	71
Figura 18	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-2	72
Figura 19	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-2	72
Figura 20	Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	73
Figura 21	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	73
Figura 22	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	74
Figura 23	Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-2	74

Figura 24	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	75
Figura 25	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	76
Figura 26	Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	77
Figura 27	Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-2	78
Figura 28	Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-3	87
Figura 29	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	87
Figura 30	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	88
Figura 31	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	88
Figura 32	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	89
Figura 33	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	89
Figura 34	Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	90
Figura 35	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	90
Figura 36	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	91
Figura 37	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	91
Figura 38	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	92
Figura 39	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	92
Figura 40	Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	93
Figura 41	Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3	93
Figura 42	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	94
Figura 43	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-3	95
Figura 44	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de	96

	uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-3	
Figura 45	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-3	97
Figura 46	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-3	98
Figura 47	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-3	99
Figura 48	Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-3	100
Figura 49	Espectro de infravermelho (KBr) de CL-4	104
Figura 50	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CL-4	104
Figura 51	Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) de CL-4	105
Figura 52	Expansão do espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) de CL-4	105
Figura 53	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) de CL-4	106
Figura 54	Espectro de absorção na região do IV de CL-5	109
Figura 55	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CL-5	109
Figura 56	Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) de CL-5	110
Figura 57	Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-6	113
Figura 58	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-6	114
Figura 59	Espectro de RMN ¹³ C BB (125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-6	114
Figura 60	Expansão do espectro de RMN ¹³ C BB (125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-6	115
Figura 61	Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° (125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-6	115
Figura 62	Expansão do espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de CL-6	116
Figura 63	Filtração do meio RPMI 1640 tamponado com MOPS	129
Figura 64	Diluição seriada das amostras	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Levantamento bibliográfico das espécies de <i>Cestrum</i> , parte da planta estudada e os compostos químicos isolados	19
Tabela 02	Estruturas dos metabólitos secundários isolados do gênero <i>Cestrum</i> .	34
Tabela 03	Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CL-1	56
Tabela 04	Dados de RMN ^{13}C de CL-1 em comparação com dados da literatura para o 25(<i>R</i>)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol (gitogenina) [Plock, 2001]	57
Tabela 05	Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CL-2	69
Tabela 06	Dados de RMN ^{13}C de CL-2 em comparação com dados de RMN ^{13}C do estereoisômero (25 <i>R</i>) para a espécie <i>Hosta sieboldii</i> (Liliaceae) [Mimaki, 1998]	70
Tabela 07	Dados de RMN ^{13}C da porção G1 de CL-3 em comparação com dados de RMN ^{13}C do açúcar de CL-2 isolado anteriormente	82
Tabela 08	Dados de RMN ^{13}C de G1 e G2 das unidades de açúcar de CL-3 em comparação com os dados da literatura para a lactose [Breitmaier, 1973]	83
Tabela 09	Dados de RMN ^{13}C da aglicona de CL-3 em comparação com dados de RMN ^{13}C da aglicona de CL-1 isolado anteriormente	85
Tabela 10	Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CL-3	85
Tabela 11	Dados de RMN ^{13}C de CL-4 em comparação com dados da literatura para o lupeol [Mahato e Kundu, 1994]	103
Tabela 12	Dados de RMN ^{13}C de CL-5 em comparação com dados da literatura para o Estigmasterol e β -Sitosterol [MOREIRA, 2001]	108
Tabela 13	Dados de RMN ^{13}C de CL-6 em comparação com dados da literatura para o Estigmasterol e β -Sitosterol glicosilado [Kojima et al, 1990]	112
Tabela 14	Frações resultantes da partição líquido-líquido de CLCE	120
Tabela 15	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC	121
Tabela 16	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC(12-18)	122
Tabela 17	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC	123
Tabela 18	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC(3-17)	123
Tabela 19	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC-(3-17)-(16-27)	124

Tabela 20	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-H	124
Tabela 21	Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-H-(11-19)	125
Tabela 22	Atividade antimicrobiana de CL-1, CL-2 e CL-3	127
Tabela 23	Atividade antifúngica de CL-1, CL-2 e CL-3	131

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Procedimento da partição líquido-líquido de CLCE	121
---------------------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CLCE	Extrato etanólico do caule de <i>Cestrum laevigatum</i>
CLCE-H	Fração hexânica da partição líquido-líquido do extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CLCE-dC	Fração diclorometano da partição líquido-líquido do extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CLCE-Ac	Fração acetato de etila da partição líquido-líquido do extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CLCE-Aq	Fração aquosa da partição líquido-líquido do extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CL-1	Composto 1 isolado extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CL-2	Composto 2 isolado extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CL-3	Composto 3 isolado extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CL-4	Composto 4 isolado extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CL-5	Composto 5 isolado extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
CL-6	Composto 6 isolado extrato etanólico do caule de <i>C. laevigatum</i>
BB	Broad Band decoupling
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometria de Massa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
p.f.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

δ	Deslocamento químico
Φ	Diâmetro
ATCC	American Type Culture Collection
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC₅₀	Concentração inibitória para 50% de células
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]-propoanossulfônico
BHI	Brain and Heart Infusion Broth
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima

RESUMO

O presente trabalho relata o estudo químico do caule de *Cestrum laevigatum* Schlecht (Solanaceae), coletado no município de Pacoti-CE. A partir da investigação do extrato etanólico utilizando técnicas clássicas de cromatografia de adsorção (gel de sílica e sílica flash) e exclusão (Sephadex LH-20) foi possível o isolamento de esteróides e um triterpeno. Os esteróides de esqueleto espirostano foram caracterizados como uma mistura de sapogeninas 25(*S*)-5 α -espirostano-2 α ,3 β -diol e 25(*R*)-5 α -espirostano-2 α ,3 β -diol (gitogenina) (**CL-1**), a mistura de epímeros (25*R*)-5 α -espirostano-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo e (25*S*)-5 α -espirostano-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (**CL-2**), e a mistura epimérica da saponina de caráter inédito na literatura (25*R,S*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil (**CL-3**). Além destes compostos, foram isolados ainda a mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol (**CL-5**) e seus derivados glicosilados (**CL-6**), além do triterpeno pentacíclico de esqueleto do tipo lupano β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol) (**CL-4**). A caracterização estrutural dos compostos isolados foi possível através do uso de técnicas espectroscópicas, principalmente RMN, incluindo seqüências de pulso uni e bidimensionais, e comparação com dados relatados na literatura. Das saponinas investigadas quanto ao potencial antimicrobiano, apenas **CL-3** mostrou-se ativa contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes*. A atividade leishmanicida foi realizada com **CL-1**, **CL-2** e **CL-3**, porém, apenas **CL-3** mostrou-se ativa contra *Leishmania amazonensis*. Em relação à atividade antifúngica, **CL-1** mostrou-se ativa apenas contra *Microsporium canis*. **CL-2** apresentou excelentes resultados contra *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, e uma atividade relativamente boa contra *Microsporium canis*. Já **CL-3** parece revelou uma excelente atividade antifúngica contra todas as cepas testadas. Os resultados promissores obtidos até o momento a partir do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum* confirmam o grande potencial químico/farmacológico das espécies deste gênero, e justificam a importância do trabalho realizado.

Palavras-chave: RMN ¹H; RMN ¹³C; RMN 2D; *Cestrum laevigatum*; Solanaceae; saponinas esteroidais, triterpeno.

ABSTRACT

This work reports the chemical study of the stem of *Cestrum laevigatum* Schlecht (Solanaceae), collected at the Pacoti-CE. The investigation of the ethanol extract using conventional techniques of adsorption chromatography (silica gel and silica flash) and exclusion (Sephadex LH-20) was possible the isolation of steroids and triterpene. The spirostan steroids have been characterized as the mixture at the sapogenins 25(*S*)-5 α -spirostan-2 α ,3 β -diol and 25(*R*)-5 α -spirostan-2 α ,3 β -diol (gitogenin) (**CL-1**), a mixture of epimers (25*R*)-5 α -spirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopyranoside and (25*S*)-5 α -spirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopyranoside (**CL-2**), and the mixture of new epimer (25*R,S*)-5 α -spirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopyranosil (**CL-3**). Besides these compounds, were also isolated the mixture of steroids β -sitosterol and stigmasterol (**CL-5**) and its glycosides (**CL-6**), and the pentacyclic triterpene β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol) (**CL-4**). The structural characterization of the isolated compounds was possible through the use of spectroscopic techniques, mainly NMR, including sequences of uni and bidimensional pulse, and comparison with literature data. **CL-3** was shown to be active against *Bacille subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes*. The leishmanicide activity was performed with **CL-1**, **CL-2** and **CL-3**, however, only **CL-3** was shown to be active against *Leishmania amazonensis*. For the antifungal activity, **CL-1** was shown to be active only against *Microsporium canis*. **CL-2** showed excellent results against *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*, and a relatively good activity against *Microsporium canis*. **CL-3** appears with excellent activity antifungal against all strains tested. The promising results obtained so far from the ethanol extract of the stem of *C. laevigatum* confirm the great potential chemical / pharmacological species of this genus, and justify the importance of work.

Keywords: ^1H NMR; ^{13}C NMR; 2D NMR; *Cestrum laevigatum*; Solanaceae; steroidal saponins, triterpene.



UFC

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A família Solanaceae (subclasse Asteridae, ordem Solanales) é uma das maiores famílias entre as angiospermas, com cerca de 3000 espécies subordinadas a 90 gêneros. Apresenta-se como árvores pequenas, arbustos, ervas ou trepadeiras com ampla distribuição geográfica, e está concentrada principalmente na América do Sul, onde estima-se a presença de aproximadamente 50 gêneros endêmicos. De acordo com os estudos de Hunziker, no início deste século foram reconhecidos 27 gêneros para o Brasil, com base nas pesquisas bibliográficas e nos herbários visitados [Hunziker, 2001].

Várias espécies de Solanaceae possuem grande importância alimentar e condimentar para o homem, como a batata (*Solanum tuberosum*), pimentas em geral, pimentão (*Capsicum annum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*). Também é frequente a utilização para fins ornamentais como as espécies de *Datura* e *Cestrum*, e industriais, como o tabaco (*Nicotiana*). Algumas espécies se destacam ainda por apresentarem propriedades medicinais, e outras são consideradas venenosas, como nos gêneros *Solanum*, *Cestrum*, *Capsicum* e *Lycopersicon* [Ribeiro, 1999].

O gênero *Cestrum* é constituído de 300 espécies, e, desta forma, considerado o terceiro maior gênero da família Solanaceae. Do total das 257 espécies com ocorrência neotropical, 76 se encontram distribuídas nas diversas regiões do Brasil, principalmente em áreas de pastagens, ou cultivadas como ornamentais.

Estudos fitoquímicos preliminares revelam o gênero como uma fonte prolífica de saponinas esteroidais, além do registro da ocorrência de lignanas, terpenos e compostos fenólicos.

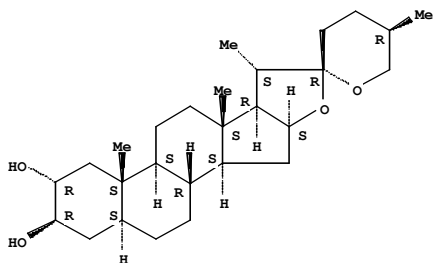
Dentre as espécies estudadas do ponto de vista químico-farmacológico, pode-se citar:

- *C. parqui*: ocorrência de sesquiterpenos [Cutillo, 2006], C₁₃ nor-isoprenóides [D'abrosca, 2005] e fenil-propanóides [D'abrosca, 2004] com atividade fitotóxica, além de lignanas [D'abrosca, 2006];
- *C. nocturnum*: glicosídeos esteroidais [Mimaki, 2002]; atividade do extrato aquoso em arritmias cardíacas [Zeng, 2002];
- *C. sendtnerianum*: presença de saponinas esteroidais [Turnock, 2001];
- *C. auriculatum*: atividade antimicrobiana do extrato etanólico contra fungos e bactérias atribuído a saponinas esteroidais [Rojas, 2003];

- *C. diurnum*: presença de ácido palmítico, esteárico e oléico em seu óleo essencial, ocorrência de vitamina D₃ e derivados nas folhas [Prema, 1994].

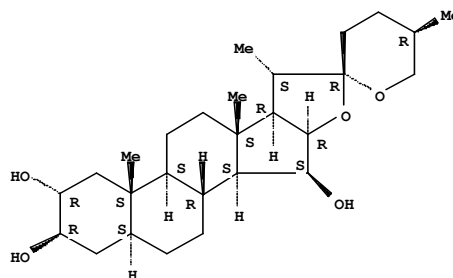
Cestrum laevigatum Schlecht (sinonímia: *Cestrum axillare*) é um arbusto com até 3 m de altura e com flores levemente amareladas, cujo *habitat* natural consiste em lugares baldios úmidos, como margens de córregos, rios, orlas de matas e brejos. Originária da América, e levada para a África do Sul como planta ornamental, esta espécie passou a ser muito usada na construção de cercas vivas em fazendas. No Brasil, a espécie é encontrada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, onde recebe a sinonímia popular de “coerana”, “corana”, “dominguinha”, “baúna”, “dama-da-noite”, “mata-boi”, “biloteiro”, “pimenteira”, “maria-preta”, “esperto” e “canema” [Pereira, 1992].

Apesar de largamente citada na literatura como a planta que mais causa morte por envenenamento de bovinos no Brasil, onde seus frutos e folhas são citados como responsáveis por lesões hepáticas, esta espécie também possui uso na medicina popular como abortiva, emoliente, sedativa, anti-espasmódica, parasiticida, inseticida e diurética. No entanto, existe apenas um estudo químico datado da década de 50, que revela o isolamento de duas sapogeninas de esqueleto tipo espirostan a partir dos frutos verdes [Canham, 1950], a gitogenina (1) com comprovada atividade cardiotônica [Iwamoto, 1947], e a digitogenina (2).



Gitogenina (1)

[Spirostan-2,3-diol, (2 α ,3 β ,5 α ,25R)]



Digitogenina (2)

[Spirostan-2,3,15-triol, (2 α ,3 β ,5 α ,15 β ,25R)]

Neste contexto, o presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de *Cestrum laevigatum*, visando o isolamento e caracterização estrutural de metabólitos secundários, e a investigação das possíveis atividades biológicas.



UFC

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1. Considerações Botânicas Sobre a Família Solanaceae

Solanaceae é uma família que compreende cerca de 3000 espécies e 90 gêneros com ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul.

A família inclui árvores pequenas, principalmente arbustos, ervas ou trepadeiras inermes ou com acúleos, glabros ou com pêlos simples, ramificados ou estrelados. As folhas são simples, alternas, às vezes também opostas ou geminadas (aos pares) de tamanhos diferentes, com margem inteira ou não, e sem estípulas. A inflorescência pode ser cimeira axilar ou reduzida a flores solitárias [Ribeiro, 1999]. As flores em geral são pequenas, de coloração predominantemente roxa. São também pentâmeras, diclamídeas, hermafroditas, de simetria radial ou fracamente zigomorfas. O androceu é formado por 5 estames, alternos com lobos da corola, às vezes se abrindo por poros. O ovário é bicarpelar, bilocular, súpero, com o septo inclinado em relação ao eixo da flor. Os lóculos do ovário às vezes são numerosos por divisão de placenta [Joly, 1976]. O fruto é geralmente caracterizado como uma baga, cápsula ou uma drupa. A polinização é feita principalmente por insetos, e a dispersão das sementes por animais [Ribeiro, 1999].

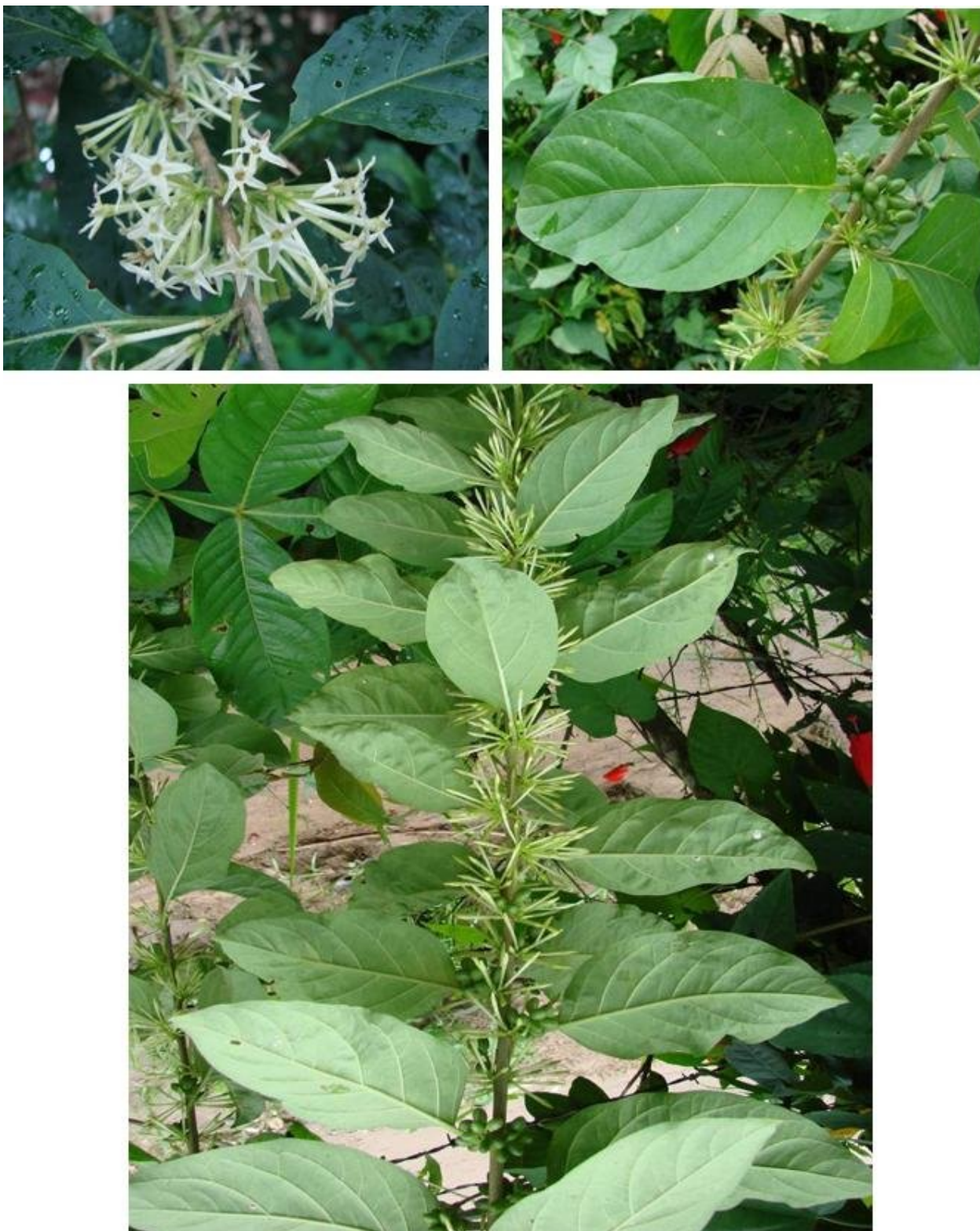
2.2. Considerações Botânicas Sobre o gênero *Cestrum*

O gênero *Cestrum* é constituído de 300 espécies, que se encontram distribuídas nas diversas regiões do Brasil. As espécies deste gênero normalmente ocorrem em áreas de pastagens, ou também são cultivadas como ornamentais, no entanto, são consideradas como plantas altamente tóxicas para o gado [Pereira, 1992].

2.3. Considerações Botânicas Sobre a Espécie *Cestrum laevigatum* Schlecht (Figura 1, p.17)

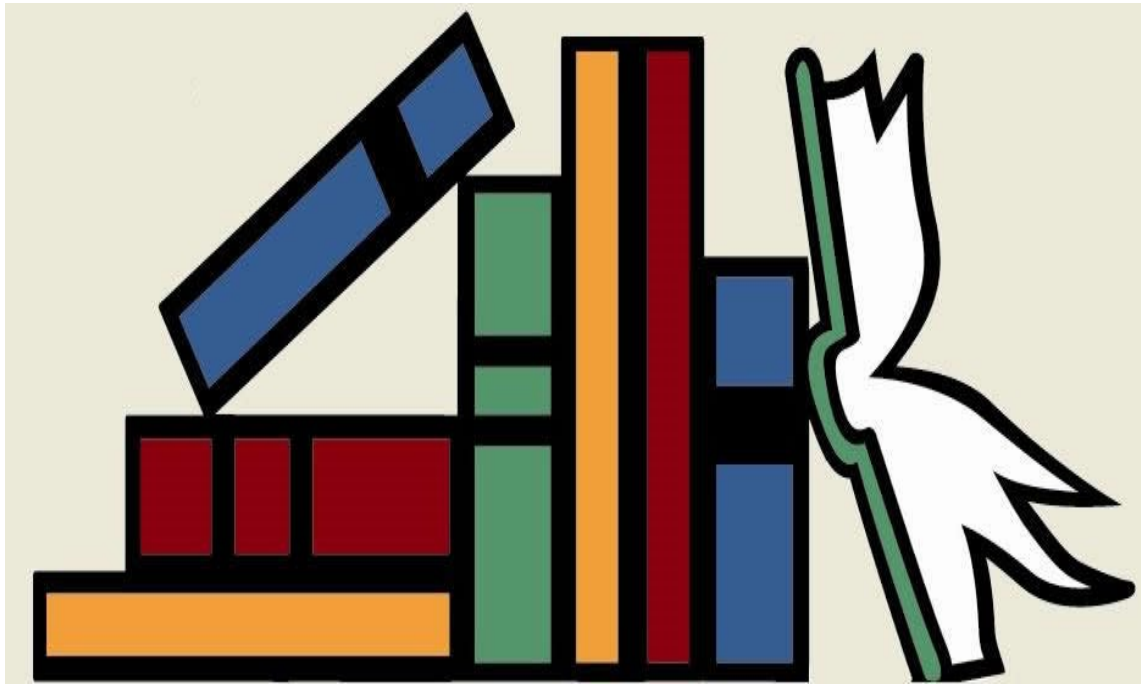
De acordo com Pio Corrêa, *Cestrum laevigatum* pode ser descrita como:

“Arbusto glabro, até 3 metros de altura, muito ramificado; folhas pecioladas, oblongo-lanceoladas, acuminadas, agudas na base, até 18 cm de comprimento e 6 cm de largura, membranosas, reticulado-nervadas, pálidas na página inferior; flores sésseis nos pedúnculos axilares, esverdeadas, de cálice oblongo-cilíndrico e tubo cilíndrico de 18-27 mm, dispostas em fascículos aglomerados; fruto baga ovóide, de 15mm; sementes grandes, linear-oblongas”.



(Foto: E. R. Silveira)

Figura 1 – *Cestrum laevigatum* em seu *habitat* natural com destaque para os botões florais, flores e frutos.



UFC

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3. Levantamento Bibliográfico

3.1. Espécies Estudadas do Gênero *Cestrum* e Constituintes Químicos Isolados

A pesquisa bibliográfica realizada no *Chemical Abstracts (Sci Finder® Scholar™)*, nos meses de novembro e dezembro de 2008, acerca do gênero *Cestrum*, detectou que há um número reduzido de estudos fitoquímicos relacionados às espécies desse gênero. Das 300 espécies descritas na literatura, apenas 21 foram investigadas quimicamente: *C. aurantiacum*, *C. auriculatum*, *C. axillare*, *C. diurnum*, *C. elegans*, *C. euanthes*, *C. fasciculatum*, *C. hediondinum*, *C. intermedium*, *C. kunthii*, *C. laevigatum*, *C. lanatum*, *C. nocturnum*, *C. pallidissimum*, *C. parqui*, *C. parvifolium*, *C. poepigii*, *C. purpureum*, *C. sendtenerianum*, *C. strigilatum* e *C. yellow*. Esta pesquisa indicou ainda que os estudos fitoquímicos acerca deste gênero tiveram início em 1909 com um relato de Peckolt TH., desde então os estudos foram sendo cada vez mais promissores. Hoje, encontram-se registrados na literatura mais de duzentos trabalhos, porém, apenas 22 relatam o isolamento de constituintes químicos. Dentre as classes de metabólitos secundários mais citados, as saponinas, alcalóides, terpenos, esteróides, óleos essenciais, lignanas, compostos fenólicos, flavonas e flavonóides e vitamina D₃ são as mais citadas (Tabela 01, p. 19), e as suas estruturas estão encontradas na tabela 02 (p. 34) [Begum, 2007].

Tabela 1: Levantamento bibliográfico das espécies de *Cestrum*, parte da planta estudada e os compostos químicos isolados

ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Cestrum parqui</i>	folhas	oxilipinas	(8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>R</i> ,14 <i>Z</i>)-heptadeca-10,14-dieno-1,8,9,12-tetraol	1	FIorentino <i>et al</i> , 2008
		“	(8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>S</i> ,14 <i>Z</i>)-heptadeca-10,14-dieno-1,8,9,12-tetraol	2	“
		“	Ácido (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>Z</i>)-9,10,13-triidróxiotadeca-11,15-dienóico	3	“
		“	Ácido (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>S</i> ,15 <i>Z</i>)-9,10,13-triidróxiotadeca-11,15-dienóico	4	“
		“	Metil-(9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>Z</i>)-9,10,13-triidróxiotadeca-11,15-dienoato	5	“
		“	Metil-(9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>S</i> ,15 <i>Z</i>)-9,10,13-triidróxiotadeca-11,15-dienoato	6	“
		“	Ácido (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>R</i>)-9,10,13-triidróxiotadec-11-enóico	7	“
		“	Ácido (9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>S</i>)-9,10,13-triidróxiotadec-11-enóico	8	“
		“	Metil-(9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>R</i>)-9,10,13-triidróxiotadec-11-	9	“

Levantamento Bibliográfico

		enoato		
	“	Metil-(9S,10R,11E,13S)-9,10,13-triidróxiotadec-11-enoato	10	“
	“	(8S,9S,10R,11Z,14Z)-heptadeca-11,14-dieno-1,8,9,10-tetraol	11	“
	“	Ácido (9S,10S,11R,12Z,15Z)-9,10,11-triidróxiotadeca-12,15-dienóico	12	“
	“	Metil-10- hidróxiotadec-12-enoato	13	“
	“	Metil-(9S,10E,12Z,15Z)octadeca-10,12,15-trien-9-ol	14	“
	Lignana	rel-(7Z,7'α,7''α,8'β,8''β)-4'',9,9',9''-tetra-hidróxi-3,3',3''-trimetóxi-4,7':4',7''-diepóxi-5,8':5',8''-sesquilign-7-eno	26	D'ABROSCA <i>et al</i> , 2006
	“	rel-(7E,7'α,7''α,8'β,8''β)-4'',9,9',9''-tetra-hidróxi-3,3',3''-trimetóxi-4,7':4',7''-diepóxi-5,8':5',8''-sesquilign-7-eno	27	“
	“	Dimetil (7'E)-3,3'-dimetóxi-4,4'-óxineolign-7'-eno-9,9'-dioato	28	“
	“	9'-nor-3',4,4'-triidróxi-3,5-dimetóxilign-7-eno-9,7'-lactona	29	“
	“	(+)-mediaresinol, (+)-siringresinol, (+)-lariciresinol, (+)-justiciresinol, (-)-simulanol, (+)-pinoresinol	-	“

Levantamento Bibliográfico

	“	5'-metóxi-lariciresinol	-	“
	“	Deidro-coniferil álcool	-	“
	“	Treo e eritro -4',4'',7'',9''-tetra-hidróxi-3,3',3'',5'- tetrametóxi-4,8''óxi-7,9':7',9- diepóxilignana (herpetotriol)	-	“
	Nor- isoprenóides	(2 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-2,9-Diidróxi-4-megastigmen-3-ona	30	D'ABROSCA <i>et al</i> , 2004
	“	(6 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-9-Hidróxi-4-megastigmen-3-ona	31	“
	“	(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i>)-3-Hidróxi-4,7-megastigmadien-9-ona	32	“
	“	(6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>R</i>)-9-Hidróxi-4,7-megastigmadien-3-ona	33	“
	“	(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>R</i>)- 3,9 -Diidróxi - 4,7 –megastigmadiene	34	“
	“	(3 <i>S</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>R</i>)-3,9-Diidróxi-5,7-megastigmadieno	35	“
	“	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>E</i>)-5,6-Epóxi-3-hidróxi-7-megastigmen-9- ona	36	“
	“	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>R</i>)-5,6-Epóxi-3,9-diidróxi-7- megastigmeno	37	“
	“	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>R</i>) - 3,5,6,9 – Tetra-hidróxi - 7 – megastigmeno	38	“
	“	(7 <i>E</i> ,9 <i>§</i>)-9-Hidróxi-5,7-megastigmadien-4-ona	39	“
	“	(6 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-9- Hidróxi -4,6-megastigmadien-3-ona	40	“
	“	(6 <i>Z</i> ,9 <i>S</i>)-9- Hidróxi -4,6-megastigmadien-3-ona	41	“

Levantamento Bibliográfico

	Saponina esteroidal	(3 β ,24S,25S)-espirost-5-eno-3,24-diol-3-O- $\{[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosídeo	53	BAGAI <i>et al</i> , 2001
	“	(3 β ,24S,25S)-espirost-5-eno-3,24-diol-3-O- $\{[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosídeo	54	“
	Glicosídeo caureno	Carboxiparquina	81	PEARCE <i>et al</i> , 1992
	“	Parquina	82	“
	Saponina esteroidal	Spirostan-3,15-diol, (3 β ,5 α ,15 β ,25R) (Digallogenina)	109	BEGUM <i>et al</i> , 2007
	“	Spirostan-3-ol, (3 β ,5 α ,25S) (Neotigogenina)	110	“
	Flavonóide	4H-1-Benzopiran-4-one, 2-(3,4-diidróxifenil)-3,5,7-triidróxi (Quercetina)	111	“
Bagas	Saponina esteroidal	[Spirostan-2,3-diol, (2 α ,3 β ,5 α ,25R)] (Gitogenina)	99	“
“	“	[Spirostan-2,3,15-triol, (2 α ,3 β ,5 α ,15 β ,25R)] (Digitogenina)	100	“
folhas	“	Spirost-5-ene-3,25-diol, (3 β ,25R) [(25R)-Isonautigenina]	112	“

Levantamento Bibliográfico

		“	Spirost-5-en-3-ol, (3 β ,25R) (Diosgenina)	113	“
		Sesquiterpeno	1,2,2 α ,3,6,7,8,8 α -octahidro-7-hidroxi-2 α ,7,8-trimetilacenaftalen-4-(4H)-ona	-	“
		Sapogenina terpênica	5 α -spirostano-3 β ,12 β ,15 α -triol	-	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum diurnum</i>	folhas	Saponina esteroidal	26-O- β -D-glucopiranosil-22 α -metóxifurosta-5,25(27)-dieno-3 β ,15 β ,26-triol 3-O- β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo (Cesdiurina I)	15	FOUAD <i>et al</i> , 2008
		“	26-O- β -D-glucopiranosil-22 α -metóxiurosta-5-eno-2 α ,3 β ,26-triol-3-O- β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo (Cesdiurina II)	16	“
		“	26-O- β -D-glucopiranosil-22 α -metóxifurosta-5-eno-2 α ,3 β ,15 β ,26-tetraol 3-O- β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo (Cesdiurina III)	17	“
		Lignana	9-norlignana-glucosídeo (Cestrumosida)	19	MOHAMED <i>et al</i> , 2007
		Lignana	berchemol-4'-O- β -glucopiranosídeo	20	“
		“	Liriodendrina	21	“
		“	dehidrodiconiferil álcool-4-O- β -glucopiranosídeo	22	“

Levantamento Bibliográfico

	“	(+)-lioniresinol 3-a-O-β-glucopiranosídeo	23	“
	“	(-)-lioniresinol 3-a-O-β-glucopiranosídeo	24	“
	“	Citrosida B	25	“
	Saponina esteroidal	(25R)-5α-spirostan-3β-il-4-O- {[2-O-(β-D-glucopiranosil)-β-D-glucopiranosil]-3-O-[β-D-xilopiranosil]-β-D-glucopiranosil}-β-D-galactopiranosídeo (Diurnosida)	80	AHMAD <i>et al</i> , 1993
	Sapogenina esteroidal	(3β,5α,25R)-Spirostan-3-ol (Tigogenina)	85	BEGUM <i>et al</i> , 2007
	Óleos voláteis	trans-2-hexenal	86	“
	“	cis-3-hexenil acetato	87	“
	“	cis-3-hexenol	90	“
	“	trans-2-hexeno.	91	“
	“	Ácido palmítico	92	“
	“	Ácido esteárico	93	“
	“	Ácido oléico	94	“
	Triterpeno	Ácido ursólico	95	“
	“	Ácido oleanóico	96	“
	Vitamina D3	1α, 25-diidróxicolecalciferol	98	“
	Saponina esteroidal	Spirostan-3-ol, (3β,5α,25R) (Tigogenina)	102	“

Levantamento Bibliográfico

		“	(25R)-5 α -Spirostan-3 β -ol, O- β -L-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo, (Tigonina)	103	“
		Alcalóide	Piridina, 3-[(2S)-1-metil-2-pirrolidinil] (Nicotina)	104	“
		“	Piridina, 3-[(2S)-2-pirrolidinil] (nor-Nicotina)	105	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum nocturnum</i>	folhas	Saponina esteroidal	β -D-Glucopiranosídeo, (3 β ,25R)-spirost-5-en-3-il O-6-deóxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-[O-6-deóxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-deóxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)] (Nocturnosídeo B)	18	ZHONG <i>et al</i> , 2008
		“	(24S,25S)-24-[(β -D-glucopiranosil)óxi]-2 α -hidróxiespirost-5-en-3 β -il- O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo	42	MIMAKI <i>et al</i> , 2002
		“	(25R)-26-[(β -D-glucopiranosil)óxi]-2 α -hidróxi-22 α -metóxifurosta-5-en-3 β -il-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil (1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -	43	“

Levantamento Bibliográfico

		D-galactopiranosídeo		
		(25 <i>R</i>)-26-[(β -D-glucopiranosil)óxi]-2 α -hidróxifurosta-5,20(22)-dien-3 β -il- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo	44	“
	Glicosídeos pregnanos	3 β -[(<i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-[<i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil)óxi]-16 β -[[<i>(4R)</i> -5-(β -D-glucopiranosil)óxi]-4-metil-1-oxopentil]óxi]-2 α -hidróxipregn-5-en-20-ona	45	“
		3 β -[(<i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil)óxi]-2 α -hidróxipregna-5,16-dien-20-ona	46	“
	Glicosídeos colestanos	(25 <i>R</i>)-3 β -[(<i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil)-óxi]-26-[(β -D-glucopiranosil)óxi]-	47	“

Levantamento Bibliográfico

		2 α -hidróxicolesta-5,17-diene-16,22-diona		
	“	(25R)-3 β -[(O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil)óxi]-26-[(β -D-glucopiranosil)óxi]-2 α -hidróxicolesta-5,17-diene-16,22-diona	48	“
	Ácido carboxílico pregnanos γ -lactona	3 β -[(O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil)óxi]-2 α ,16 β -diidróxipregn-5-ene-20-ácido carboxílico- γ -lactona	49	“
	Saponina esteroideal	(25R)-2 α -hidróxispirost-5-en-3 β -il-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo	50	“
	“	(25R)-2 α ,17 α -diidróxispirost-5-en-3 β -il-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo	51	“
	Composto fenólico	4',5-diidróxi-7-metóxi-3-O-[6-O-(E)-3,5-dimetóxi-4-hidróxicinamoil- β -D-glucopiranosil]- (1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-	60	MIMAKI <i>et al</i> , 2001

Levantamento Bibliográfico

		glucopiranosídeo		
	“	4',5-diidróxi-7-metóxi flavonol-3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→6)]-β-D-glucopiranosídeo	61	“
	Saponina esteroidal	4',5-diidróxi-7-metóxi flavonol-3-O-β-D-xilopiranosil-(1→2)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→6)]-β-D-glucopiranosídeo	62	“
	“	(25R)-2R-hidróxi spirost-5-en-3β-il-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosídeo	63	“
	“	(25R)-2R,17R-diidróxi spirost-5-en-3β-il-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosídeo	64	“
	“	(25R)-2R-hidróxi spirost-5-en-3β-il-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosídeo	65	“
	“	(25R)-2R,15β-diidróxi spirost-5-en-3β-il-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosídeo	66	“

Levantamento Bibliográfico

		“	(25R)-2R,17R-diidróxspirost-5-en-3 β -il-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo	67	“
		“	(25R)-spirost-5-en-3 β -il-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosídeo	68	“
		“	(25R)-2R-hidróxspirost-5-en-3 β -il-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosídeo	69	“
		Sapogenina esteroidal	(25R)-spirost-5-eno-2R,3 β ,15 β -triol	70	“
		Saponina esteroidal	(3 β ,25R)-spirost-5-en-3-il-O-6-deóxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-[O-6-deóxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-deóxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Glucopiranosídeo (Nocturnosídeo B)	73	AHMAD <i>et al</i> , 1995
		Sapogenina esteroidal	(3 β ,25R)-spirost-5-en-3-ol	74	“
		Composto fenólico	2-sec-butil-4,6-diidróxifenil- β -D-glucopiranosídeo (Cesternosídeo A)	75	SAHAI <i>et al</i> , 1994

Levantamento Bibliográfico

		“	2-sec-butil-4,6-diidróxifenil-6-acetil- β -D-glucopiranosídeo (Cesternosídeo B)	76	“
		“	2-sec-butil-4,6-dimetóxifenil- β -D-glucopiranosídeo	77	“
		“	4,6-diacetóxi-2-sec-butilfenil-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosídeo	78	“
		“	2-sec-butil-4,6-dimetóxifenol	79	“
		Saponina esteroidal	3- <i>O</i> -[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil{(3 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranoil}(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil](25 <i>R</i>)-spitost-5-eno-2 α ,3 β -diol (Nocturnosídeo A)	83	AHMAD <i>et al</i> , 1991
		Alcalóide	Cotina	88	BEGUM <i>et al</i> , 2007
		“	Miosmina	89	“
		Sapogenina esteroidal	Spirostan-3-ol, (3 β ,5 α ,25 <i>R</i>) (Tigogenina)	102	“
		Alcalóide	Piridina, 3-[(2 <i>S</i>)-1-metil-2-pirrolidinil] (Nicotina)	104	“
		“	Piridina, 3-[(2 <i>S</i>)-2-pirrolidinil] (nor-Nicotina)	105	“
		Sapogenina esteroidal	Spirost-5-eno-2,3-diol, (2 α ,3 β ,25 <i>R</i>) (Yucagenina)	108	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Cestrum</i>	folhas	Saponina	Dioscina	52	QIUWEN <i>et al</i> ,

Levantamento Bibliográfico

ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>pallidissimum</i>		esteroidal			2002
<i>Cestrum sendtenerianum</i>	folhas	Saponina esteroidal	1 β ,2 α -diidróxispirost-5,25(27)-dien-3 β -il-O- α -D-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -L-galactopiranosídeo	55	HARAGUCHI <i>et al</i> , 2000
		“	(25R)-1 β ,2 α -diidróxispirosta-5-en-3 β -yl-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosídeo	56	“
		“	1 β ,2 α -diidróxi-5 α -spirost-25(27)-en-3 β -il-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosídeo	57	“
		“	(25R)-1 β ,2 α -diidróxi-5 α -spirostan-3 β -il-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosídeo	58	“
		“	1 β ,2 α -diidróxispirosta-5,25(27)-dien-3 β -il-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopiranosídeo	59	“
		Sapogenina esteroidal	Spirosta-5,25(27)-dieno-1 β ,2 α ,3 β ,12 β -tetrol	71	HARAGUGHI <i>et al</i> , 1999
		Saponina esteroidal	Spirosta-5,25(27)-dieno-1 β ,2 α ,3 β ,12 β -tetrol-3-O- β -D-galactopiranosídeo	72	“
		“	Nocturnosídeo A	83	BEGUM <i>et al</i> , 2007

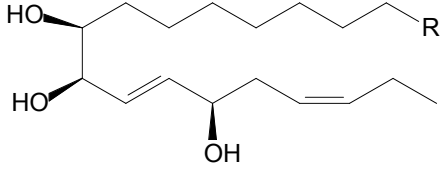
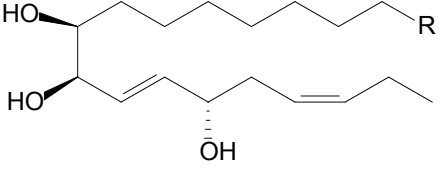
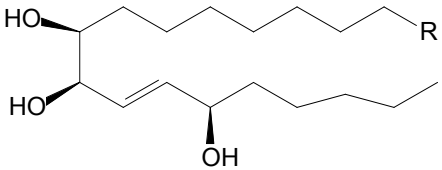
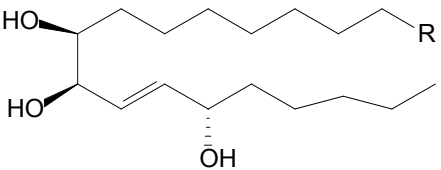
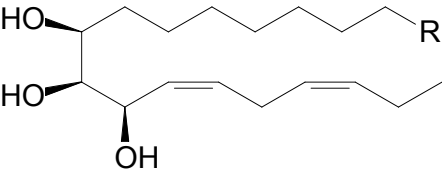
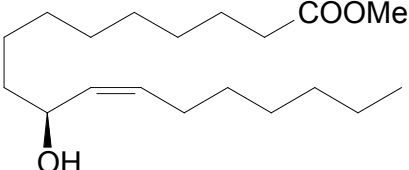
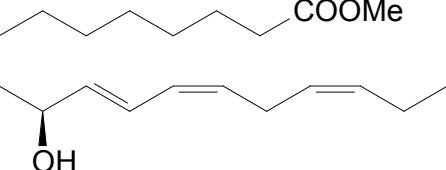
Levantamento Bibliográfico

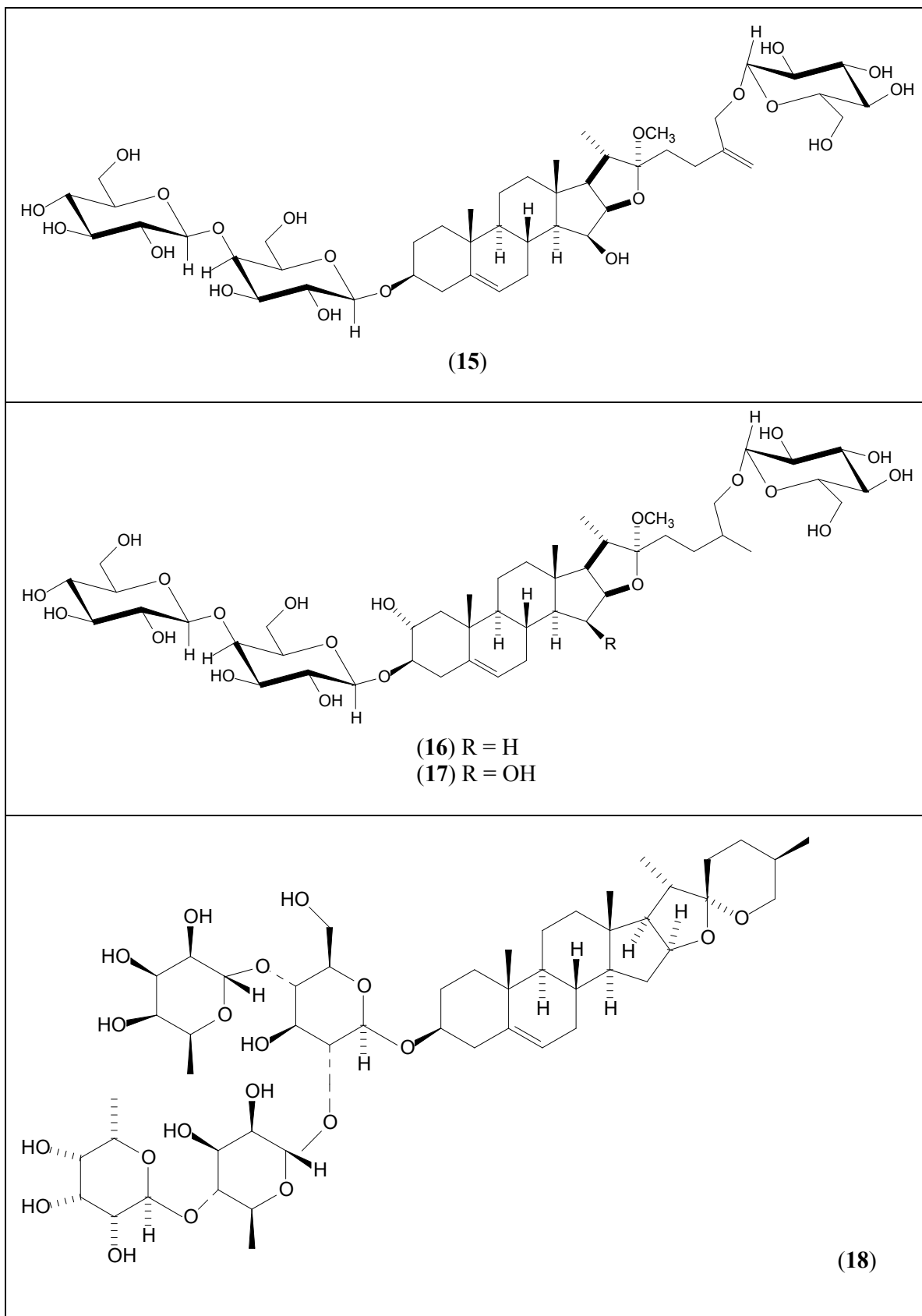
		“	Nocturnosídeo B	73	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum euanthes</i>	folhas	Compostos fenólicos	Ácido cestrídico	84	NAGELS <i>et al</i> , 1982
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum lanatum</i>	folhas	Compostos fenólicos	N-trans-feroil-tiramina	97	BEGUM <i>et al</i> , 2007
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum laevigatum</i>	bagas	Sapogenina esteroidal	[Spirostan-2,3-diol, (2 α ,3 β ,5 α ,25R)] (Gitogenina)	99	CANHAM <i>et al</i> , 1950
		“	[Spirostan-2,3,15-triol, (2 α ,3 β ,5 α ,15 β ,25R)] (Digitogenina)	100	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum poepigii</i>	folhas	Compostos fenólicos	Ácido clorogênico	101	BEGUM <i>et al</i> , 2007
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Cestrum</i>	folhas	Compostos	Ácido clorogênico	101	BEGUM <i>et al</i> , 2007

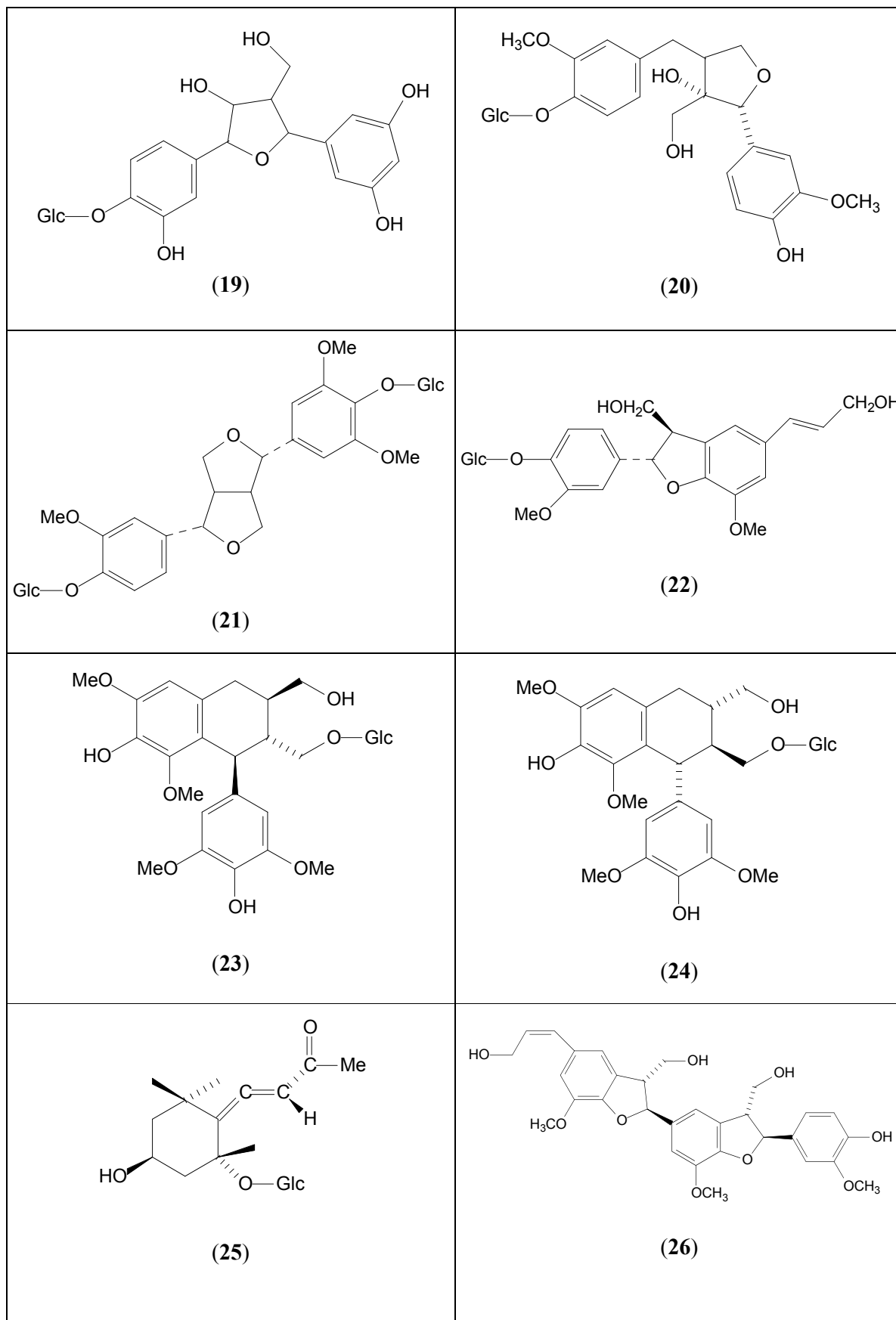
Levantamento Bibliográfico

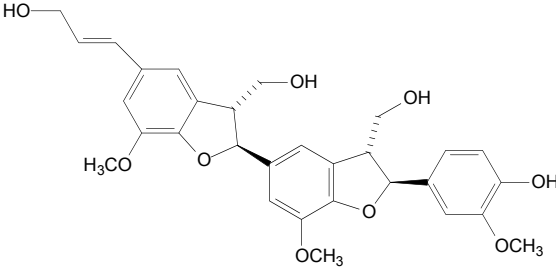
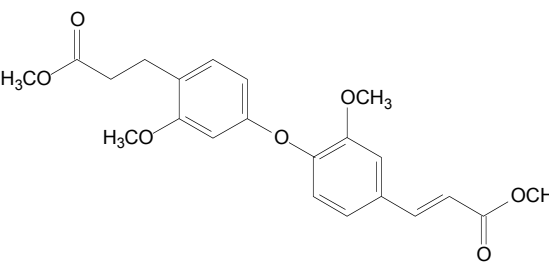
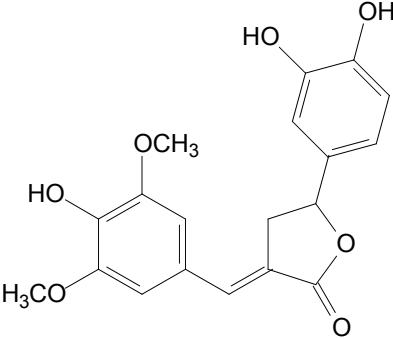
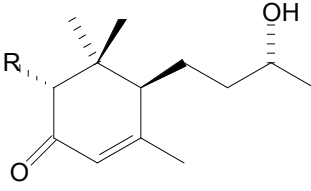
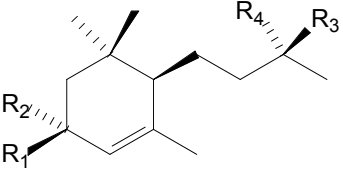
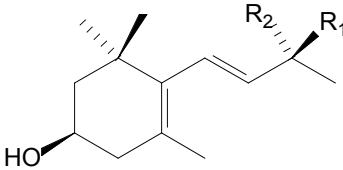
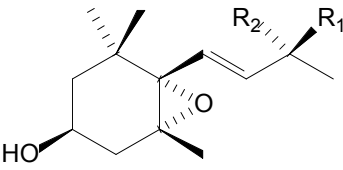
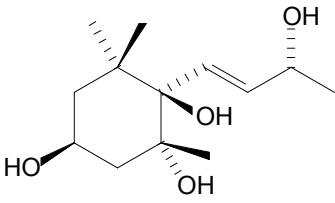
<i>elegans</i>		fenólicos			
		Sapogenina esteroidal	[Spirostan-2,3-diol, (2 α ,3 β ,5 α ,25R)] (Gitogenina)	99	“
		“	Spirostan-3-ol, (3 β ,5 α ,25R) (Tigogenina)	102	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Cestrum purpureum</i>	folhas	Alcalóide	Solanid-5-en-3-ol, (3 β) (Soladina)	106	BEGUM <i>et al</i> , 2007
		“	Spirosol-5-en-3-ol, (3 β ,22 α ,25R) (Solasodina)	107	“
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Cestrum aurantiacum</i>	folhas	Compostos fenólicos	Ácido clorogênico	101	BEGUM <i>et al</i> , 2007
ESPÉCIE	PARTE ESTUDADA	CLASSE QUÍMICA	COMPOSTO ISOLADO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Cestrum kunthii</i>	folhas	Triterpeno	Ácido ursólico	95	BEGUM <i>et al</i> , 2007

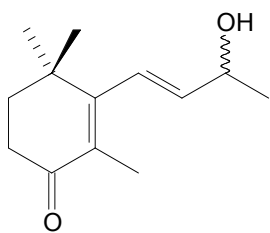
Tabela 2: Estruturas dos metabólitos secundários isolados do gênero *Cestrum*.

 <p>(1) R = OH (3) R = COOH (5) R = COOMe</p>	 <p>(2) R = OH (4) R = COOH (6) R = COOMe</p>
 <p>(7) R = COOH (9) R = COOMe</p>	 <p>(8) R = COOH (10) R = COOMe</p>
 <p>(11) R = OH (12) R = COOH</p>	 <p>(13)</p>
 <p>(14)</p>	

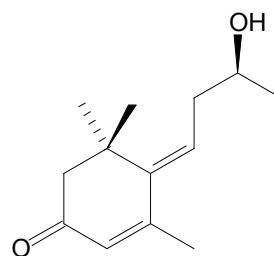




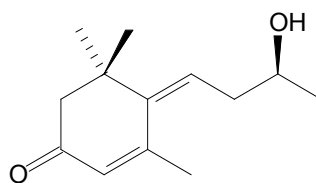
 <p style="text-align: center;">(27)</p>	 <p style="text-align: center;">(28)</p>
 <p style="text-align: center;">(29)</p>	 <p style="text-align: center;">(30) R = OH (31) R = H</p>
 <p style="text-align: center;">(32) R₁ = H, R₂ = OH, R₃, R₄ = O (33) R₁, R₂ = O, R₃ = H, R₄ = OH (34) R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH</p>	 <p style="text-align: center;">(35) R₁ = H, R₂ = OH</p>
 <p style="text-align: center;">(36) R₁, R₂ = O (37) R₁ = H, R₂ = OH</p>	 <p style="text-align: center;">(38)</p>



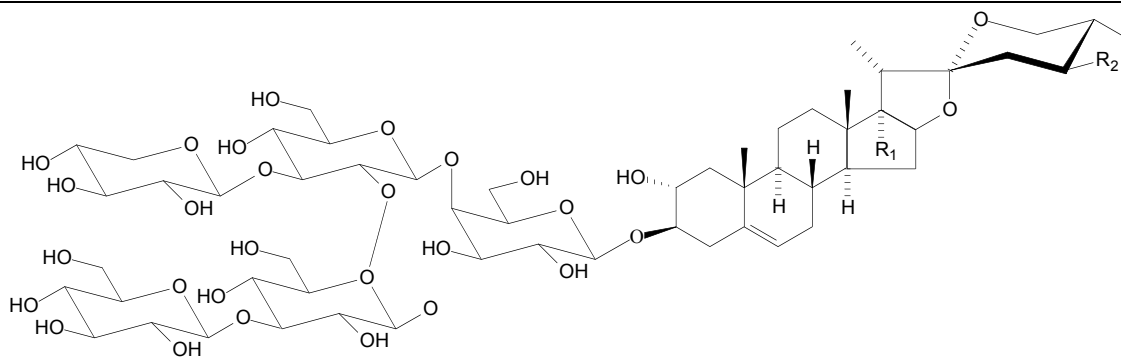
(39)

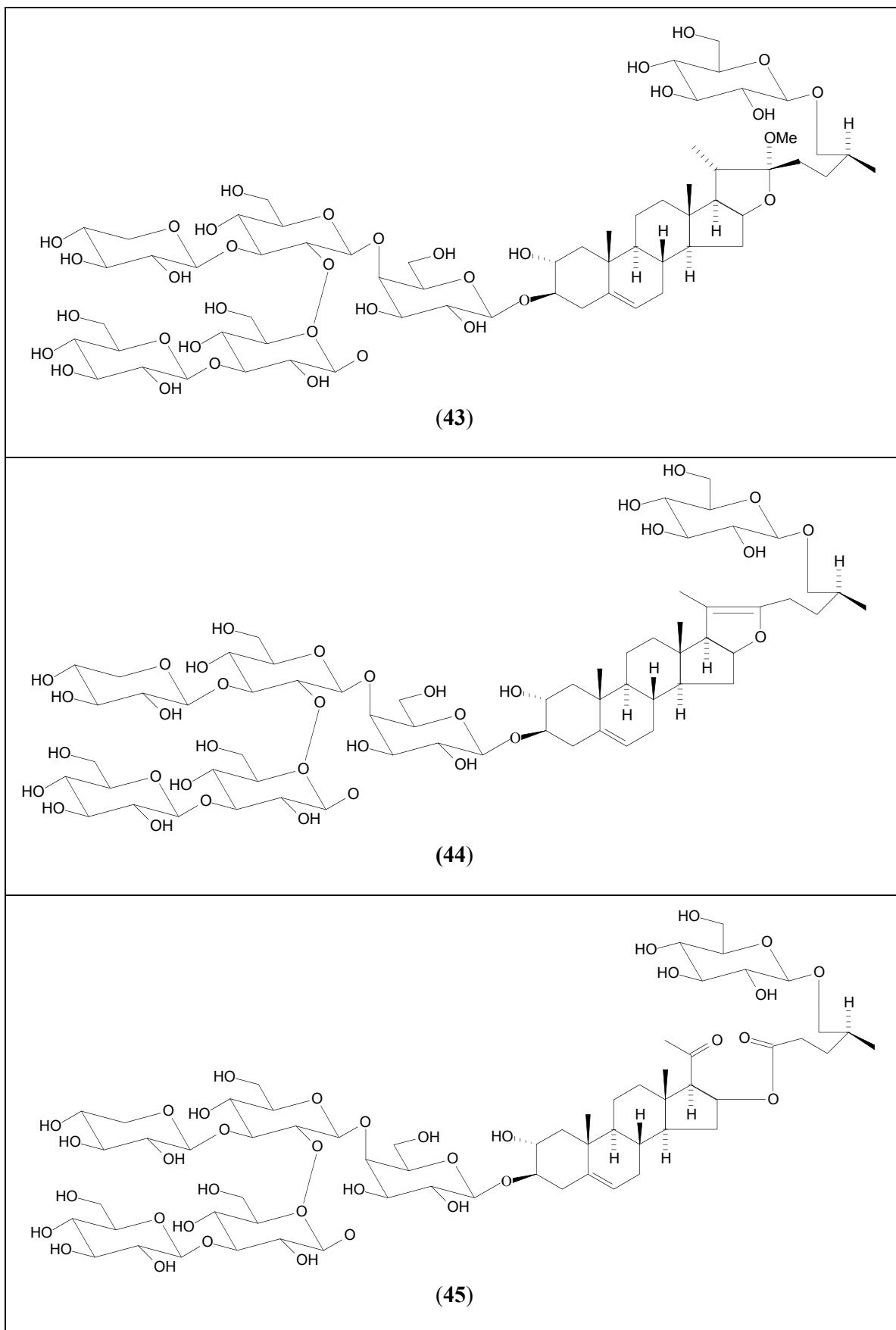


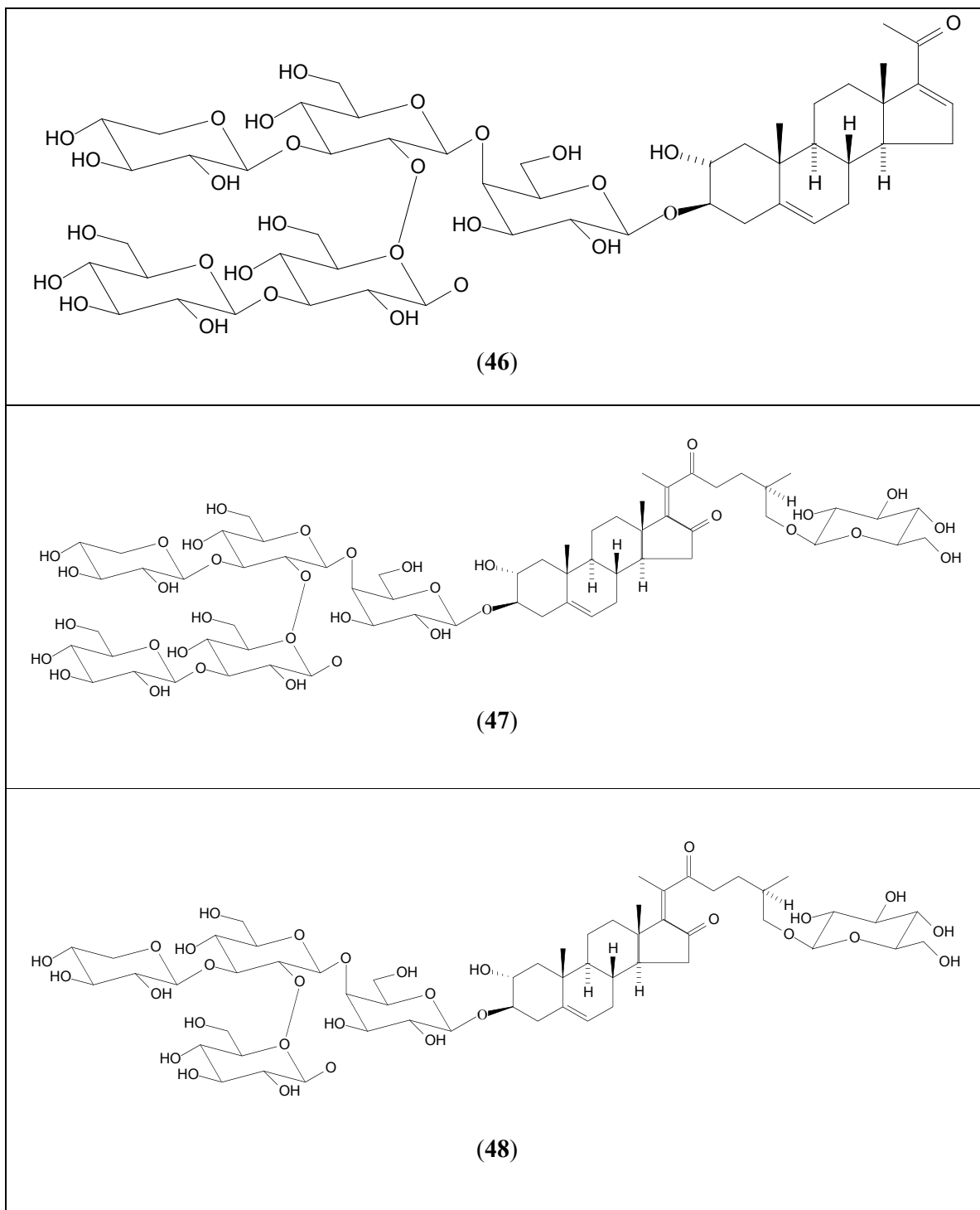
(40)

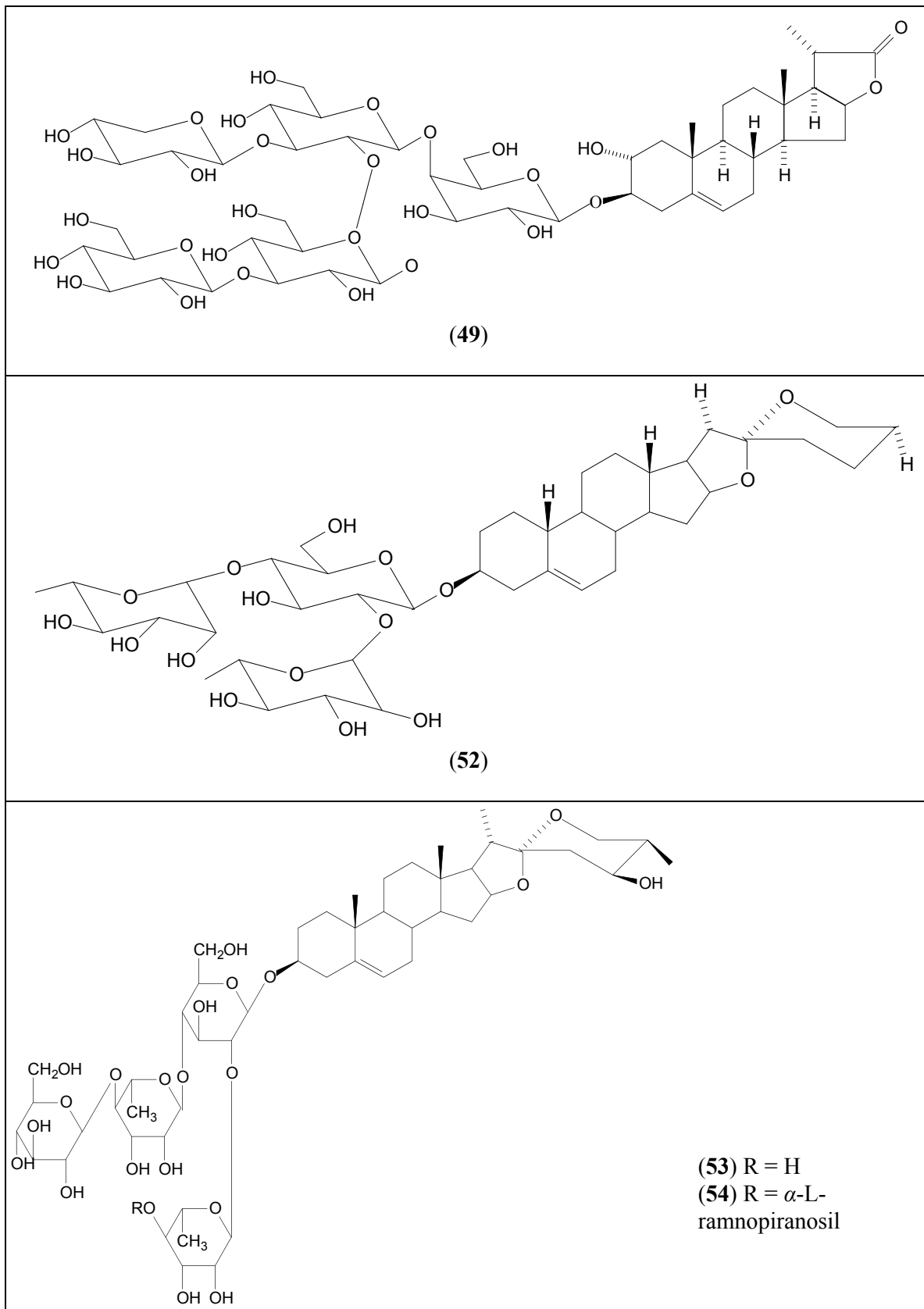


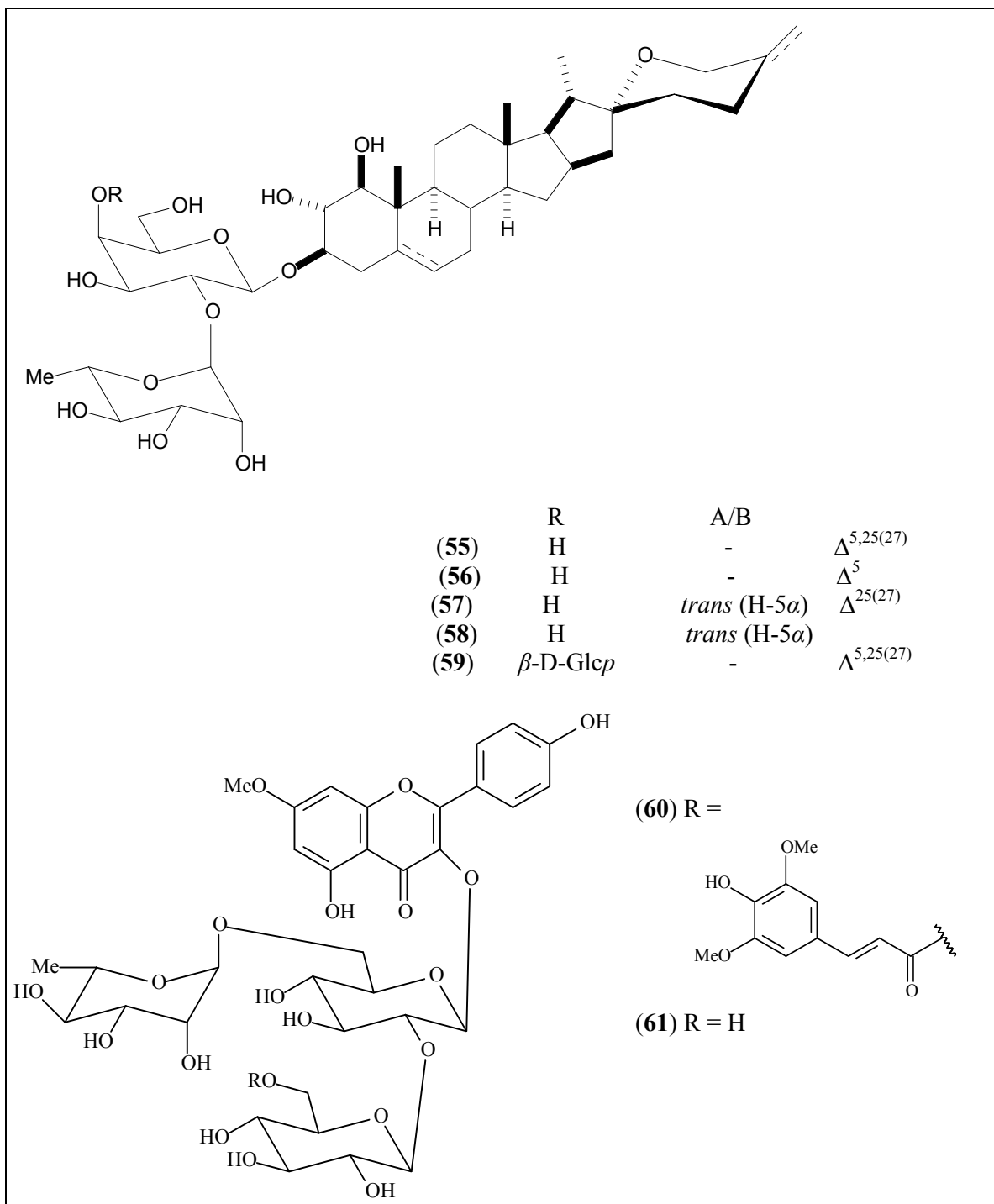
(41)

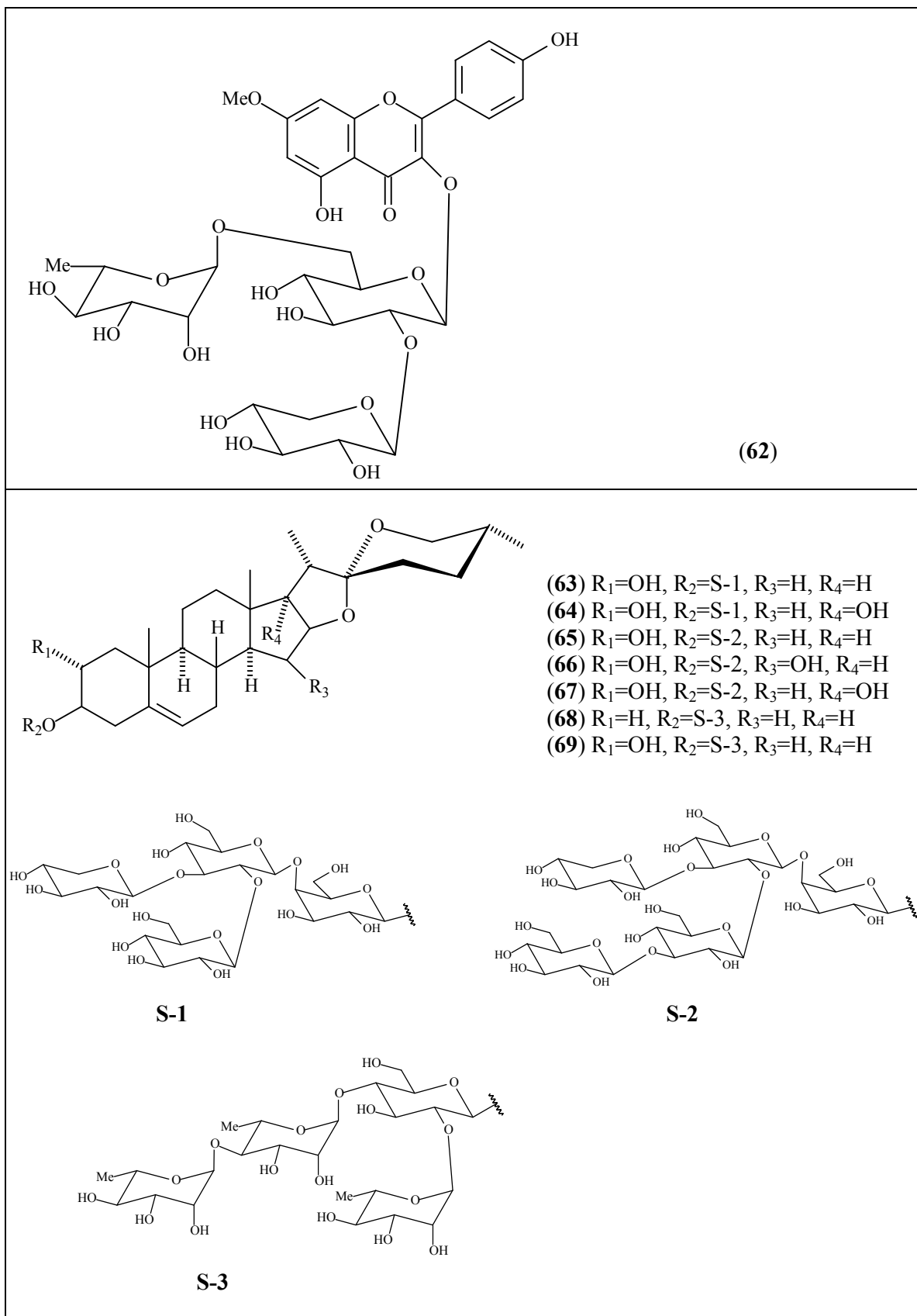
(42) $R_1 = H$, $R_2 = O\text{-}\beta\text{-D-Glcp}$ (50) $R_1 = H$, $R_2 = H$ (51) $R_1 = OH$, $R_2 = H$

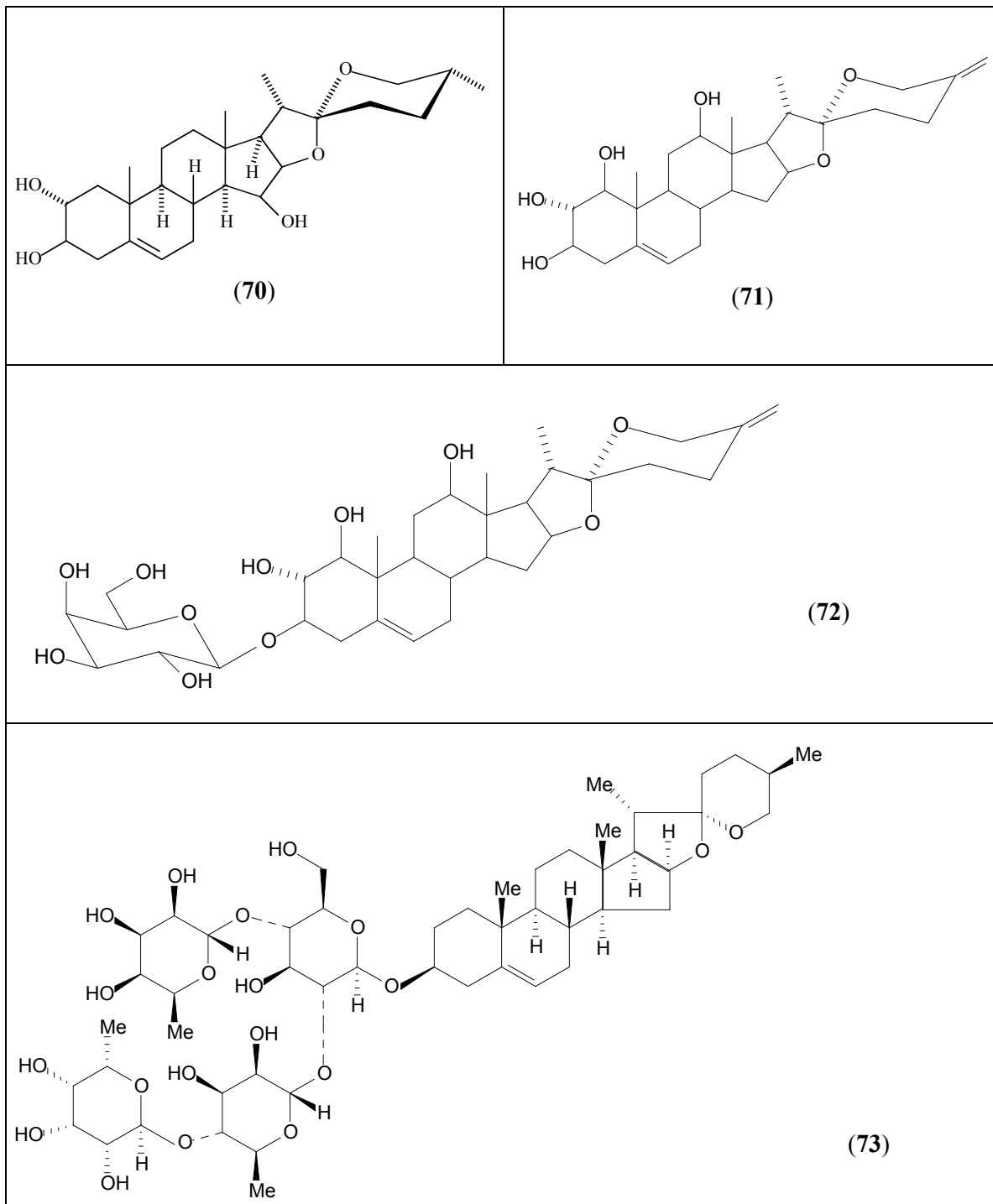


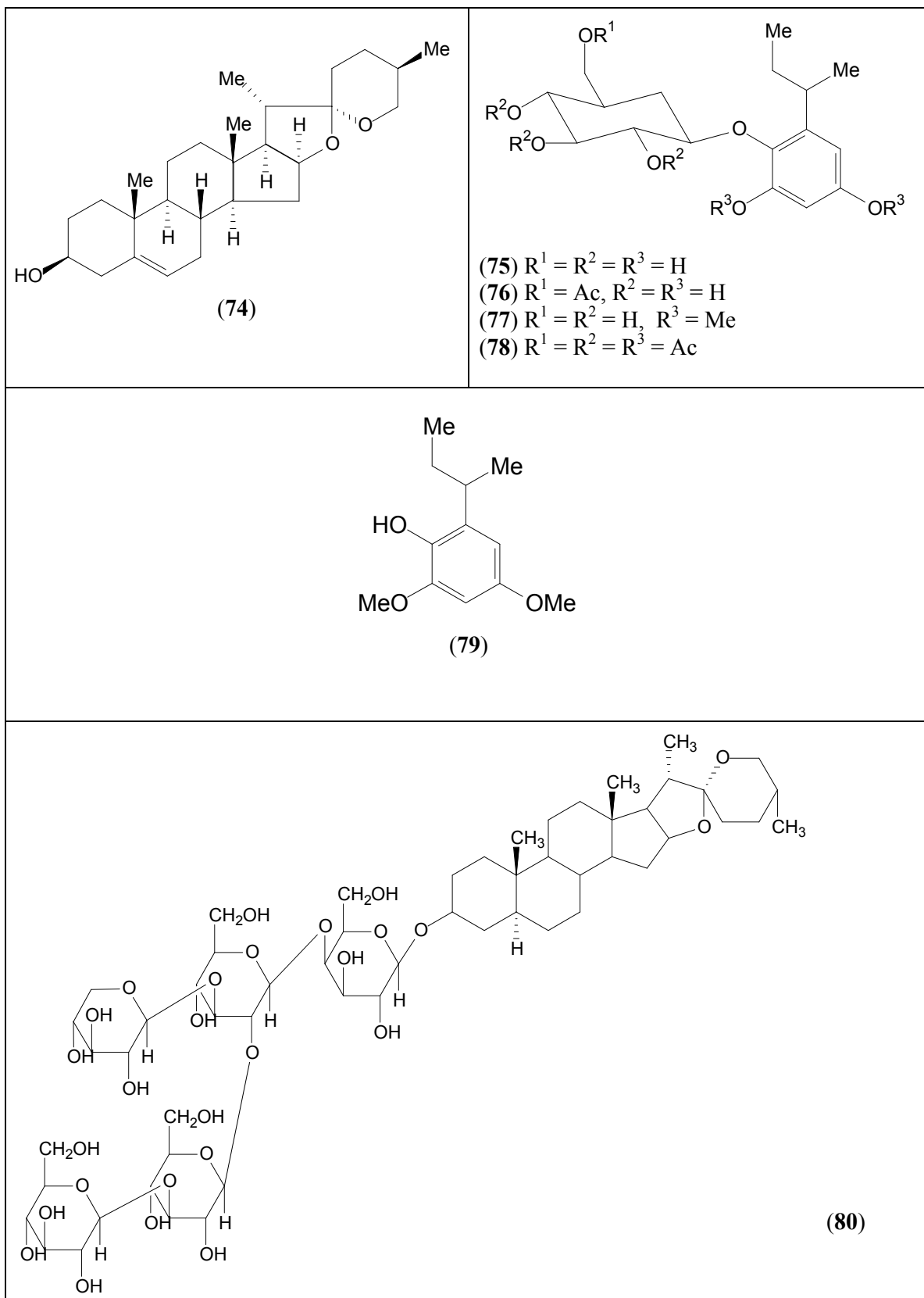


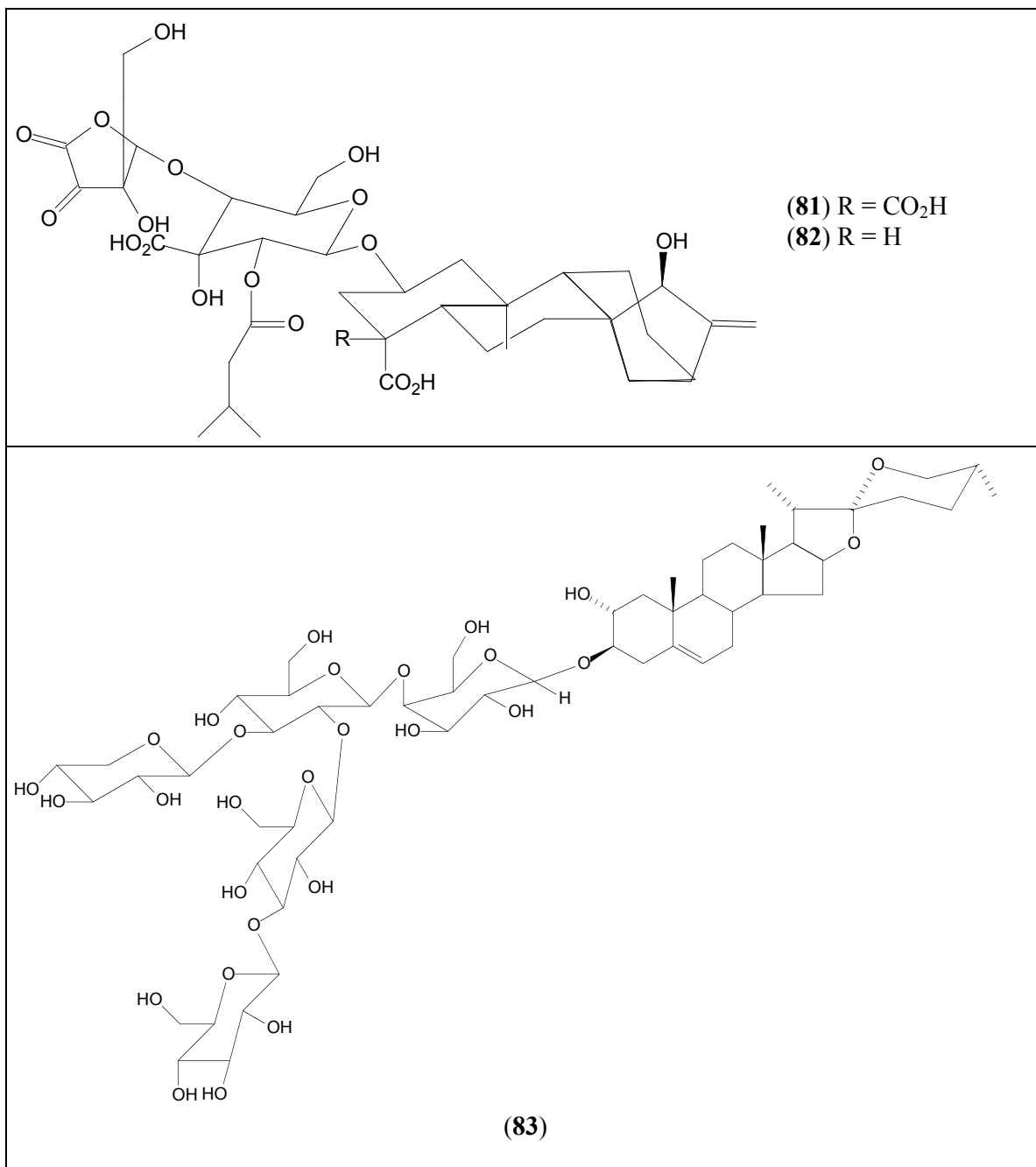


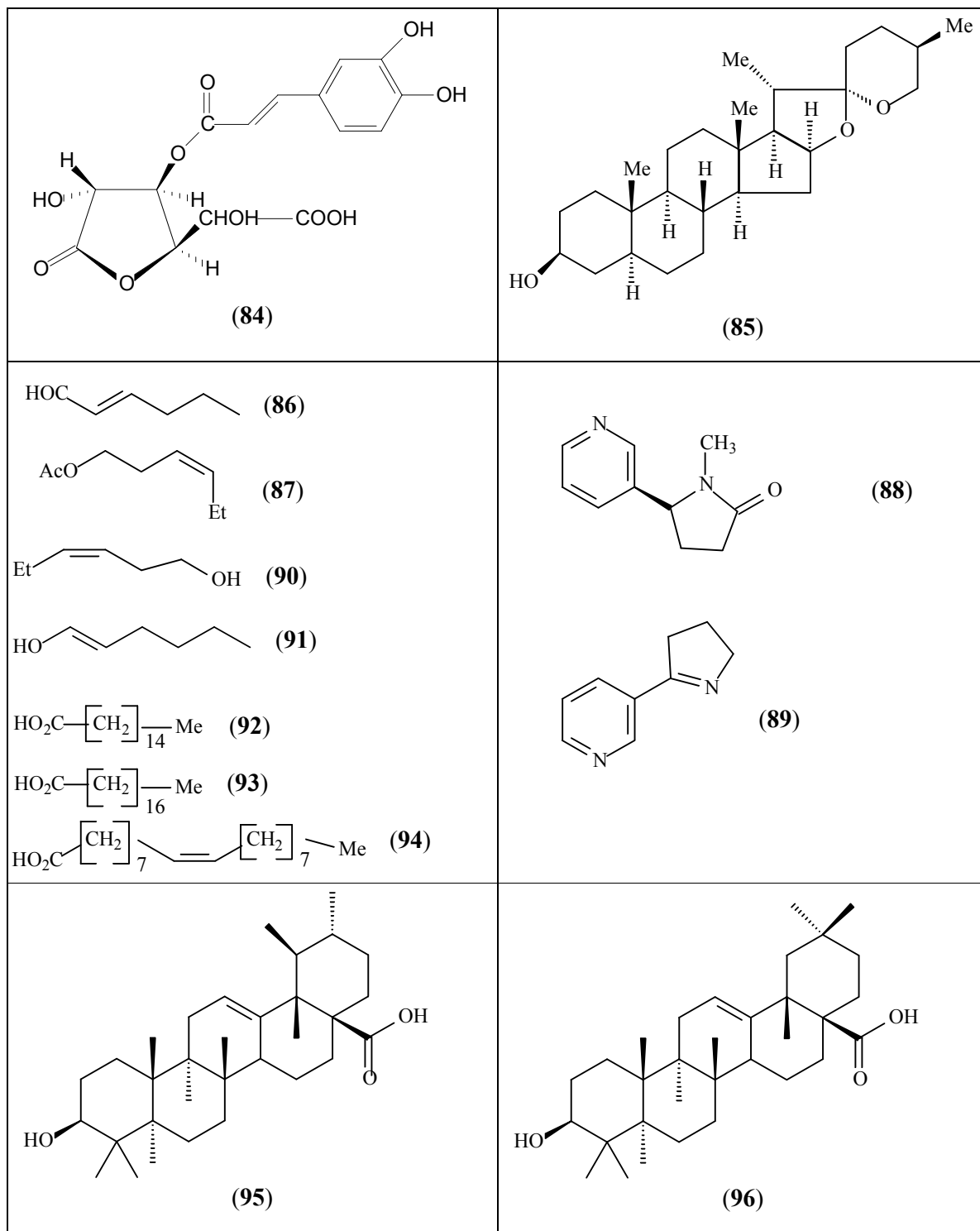


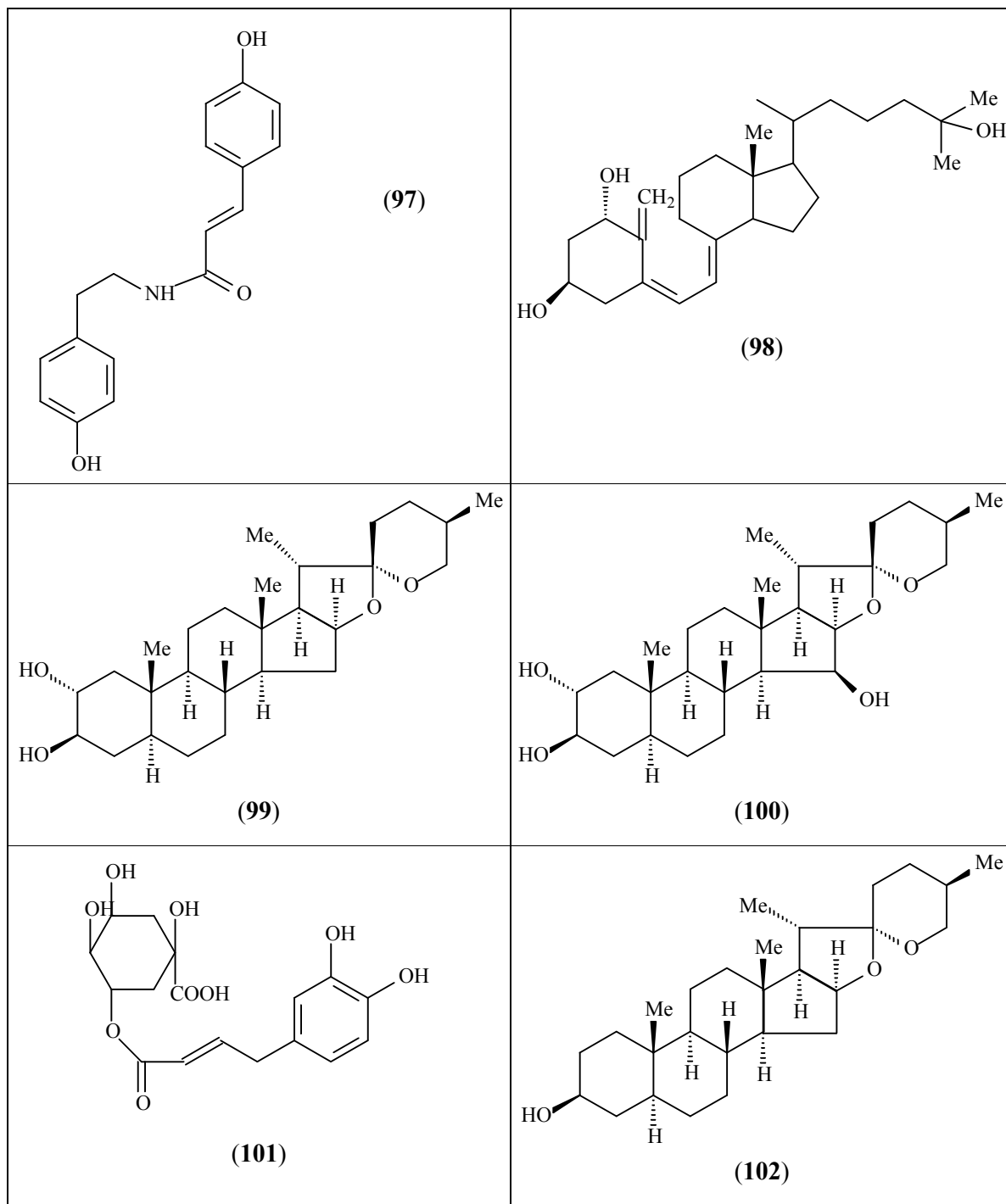


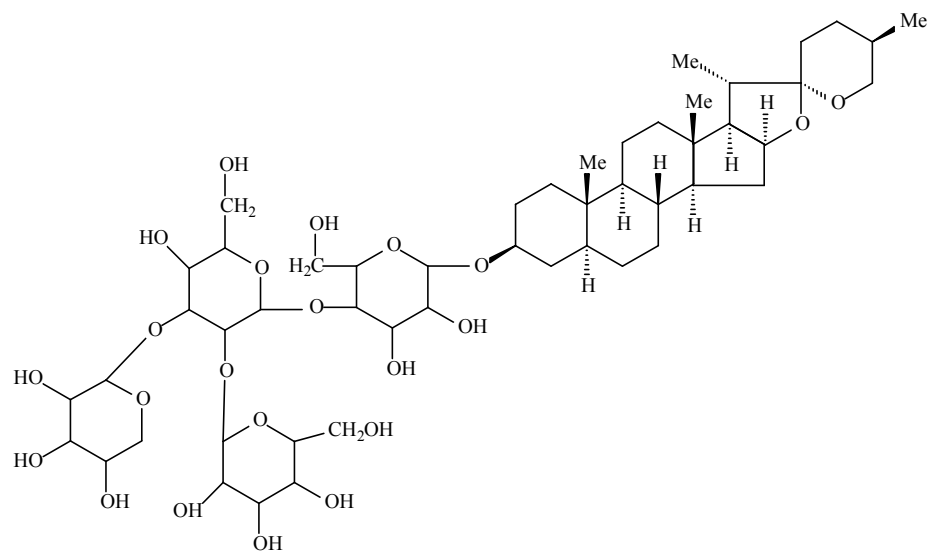




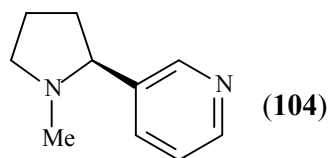




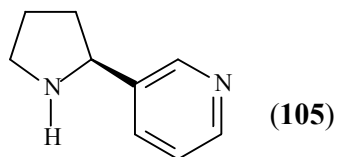




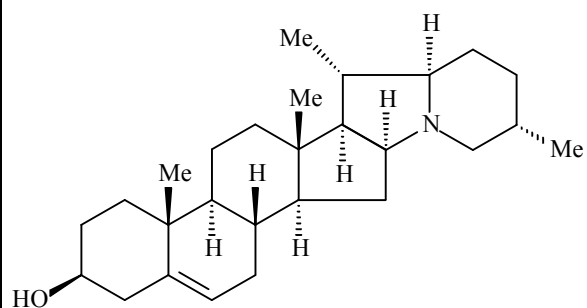
(103)



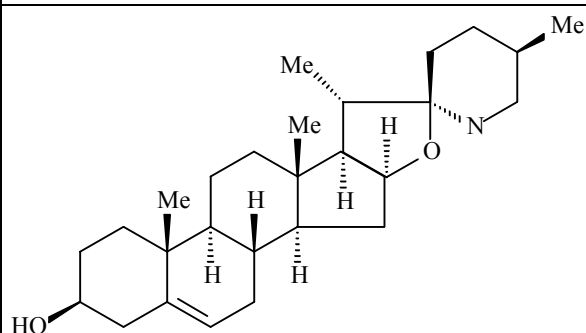
(104)



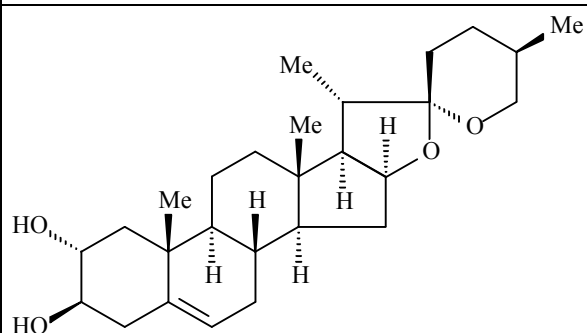
(105)



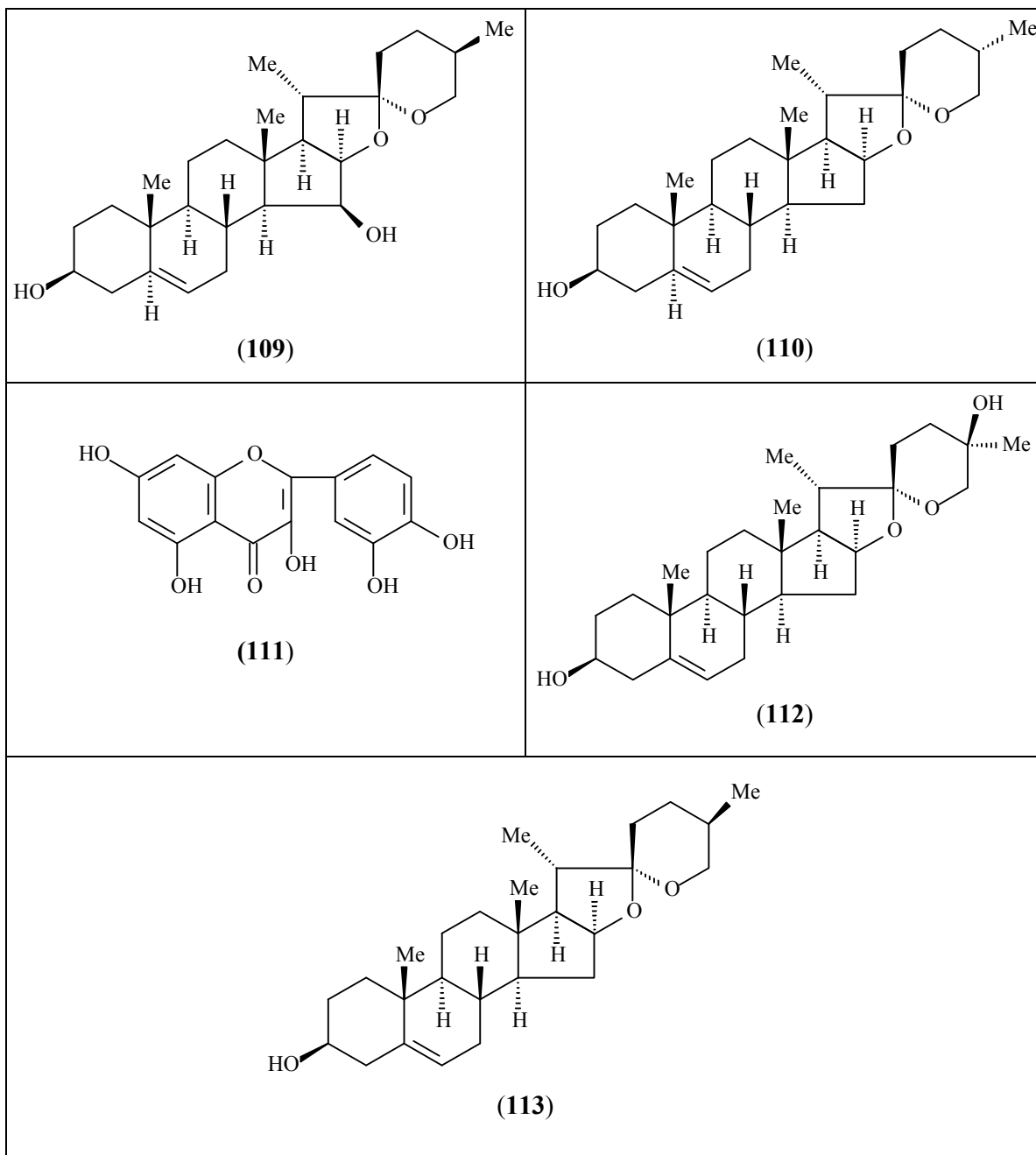
(106)

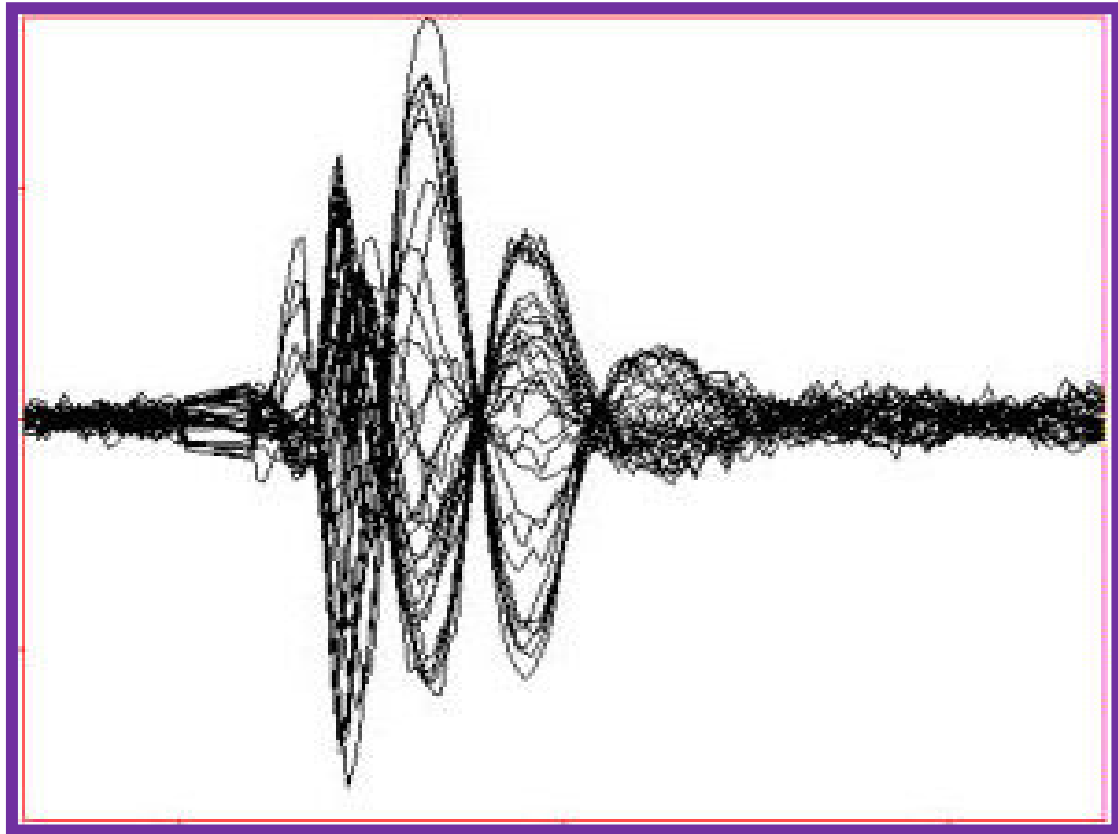


(107)



(108)





UFC

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Fixos de *Cestrum laevigatum* [CL]

4.1.1. Determinação estrutural de CL-1

A fração CLCE-dC, proveniente da partição do extrato etanólico do caule de *Cestrum laevigatum* (CLCE) foi recromatografada em gel de dextrana Sephadex LH-20, utilizando metanol puro como fase móvel, seguido de cromatografia “flash”, para levar ao isolamento de 5,0 mg de um sólido branco amorfo, com ponto de fusão 273-275 °C, denominado **CL-1**.

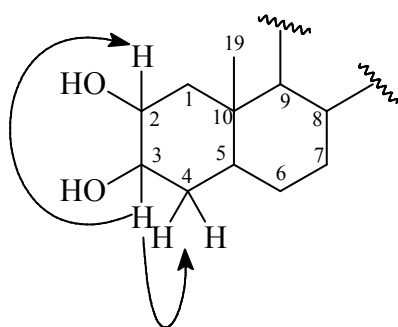
O espectro de absorção na região do IV de **CL-1** (Figura 2, p.58), apresentou banda larga em 3413 cm⁻¹ típica de estiramento O-H de hidroxila (ν_{O-H}) e absorções em 2933 e 2868 cm⁻¹ características dos estiramentos assimétrico e simétrico C-H de carbono sp³ (ν_{C-H}), respectivamente. As bandas em 1455 e 1380 cm⁻¹ foram características de deformação angular de ligação C-H (δ_{C-H}); enquanto que as absorções em 1225 e 1170 cm⁻¹ foram relacionadas a estiramento de ligação C-O (ν_{C-O}) [Silverstein e Webster, 2000].

O espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) (Figura 4, p.59) de **CL-1** apresentou seis sinais múltiplos em δ 4,56 (m, H-16); 4,07 (m, H-2); 3,87 (m, H-3); 3,60 (dd, $J= 11,1$ e 2,0 Hz H-26) e 3,36 (d, $J= 10,7$, H-26), que foram relacionados a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Foram ainda visualizados um sinal em δ 2,27 (1H, dd, $J= 14,5$ e 4,5 Hz, H-1), além dos sinais relativos a grupamentos metilas em δ 0,69 (d, $J= 5,3$ Hz, H-27); 0,82 (d, $J= 4,3$ Hz, H-27); 0,85 (s, H-19); 1,07 (s, H-18) e 1.14 (d, $J= 6,5$ Hz, H-21).

O espectro de RMN ¹³C-BB (125 MHz) (Figura 7, p. 60) apresentou trinta e seis linhas espectrais. Dentre estas, pôde-se destacar dois sinais em δ 110,0 (C-22) e 109,6 (C-22) relacionados a carbono acetálicos, além de oito sinais na faixa de δ 81,5 a 63,2, que foram atribuídos a carbonos sp³ oxigenados. A posterior análise comparativa destes dados com aqueles observados no espectro de RMN ¹³C – DEPT 135 (Figura 9, p.61), permitiu identificar o padrão de hidrogenação de cada carbono e, desta forma, foi possível a atribuição de 4 carbonos metílicos, 10 carbonos metilênicos, 10 carbonos mono-hidrogenados e, por exclusão, 3 carbonos não-hidrogenados, como observado na Tabela 03 (p.56). O número de sinais observados nos espectros de RMN ¹³C, bem como a distribuição dos carbonos por padrão de hidrogenação, levou a proposição de que **CL-1** trata-se de um esteróide.

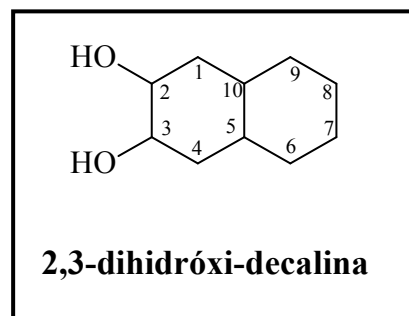
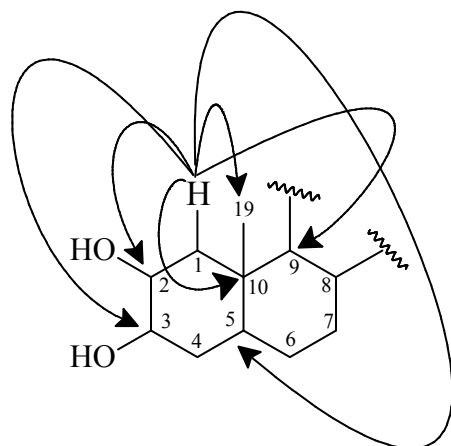
O espectro de massas (Figura 3, p. 58) revelou o sinal relativo do pico molecular em $m/z = 432$ daltons, e permitiu aferir para **CL-1** a fórmula molecular $C_{27}H_{44}O_4$.

No espectro de correlação homonuclear $^1H-^1H - COSY$ (500 MHz, piridina- d_5) (Figura 10, p. 62) foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ 3,89 (H-3) com os sinais em δ 4,07 (H-2) e δ 1,80/1,50 (2H-4); e, desta forma, foi possível a construção do fragmento abaixo.

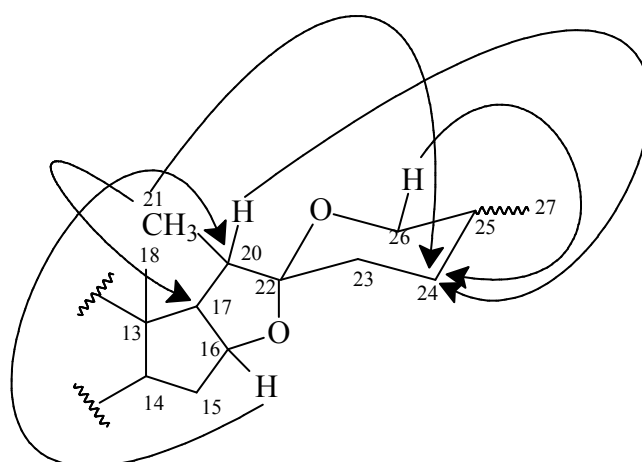
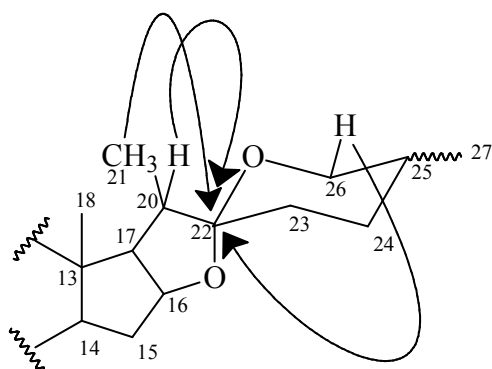


A análise detalhada no espectro de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C - HSQC$ (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) (Figura 12, p. 63) permitiu a inequívoca correlação das absorções dos sinais de carbonos aos seus respectivos hidrogênios, como mostrado na Tabela 03 (p.56).

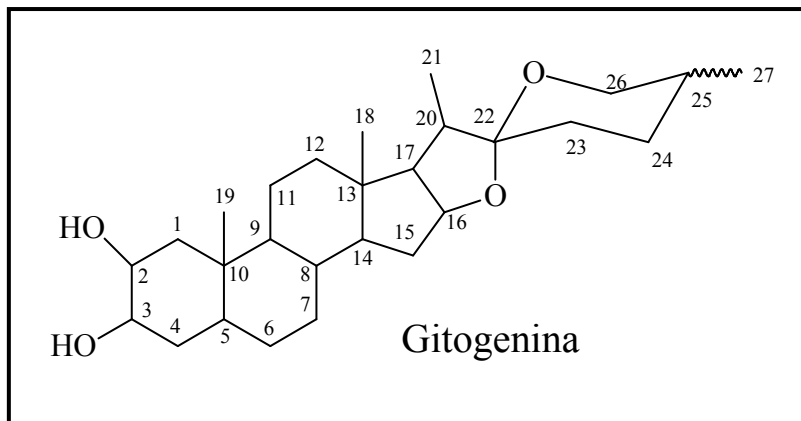
Em contrapartida, os dados observados no espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1H \times ^{13}C - HMBC$ (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) (Figura 15, p. 64) foram decisivos na determinação da exata localização dos grupamentos funcionais na estrutura. Desta forma, a análise deste espectro determinou a correlação do hidrogênio em δ 2,27 (H-1) com os carbonos oxigenados em δ 73,45 (C-2) e δ 77,07 (C-3), com o grupo metila em δ 14,09 (C-19), e com os carbonos monohidrogenados em δ 45,61 (C-5) e δ 54,99 (C-9), o que revelou o fragmento 2,3-di-hidroxi-decalina, e corroborou os dados já sugeridos no espectro de COSY (Figura 10, p. 62).



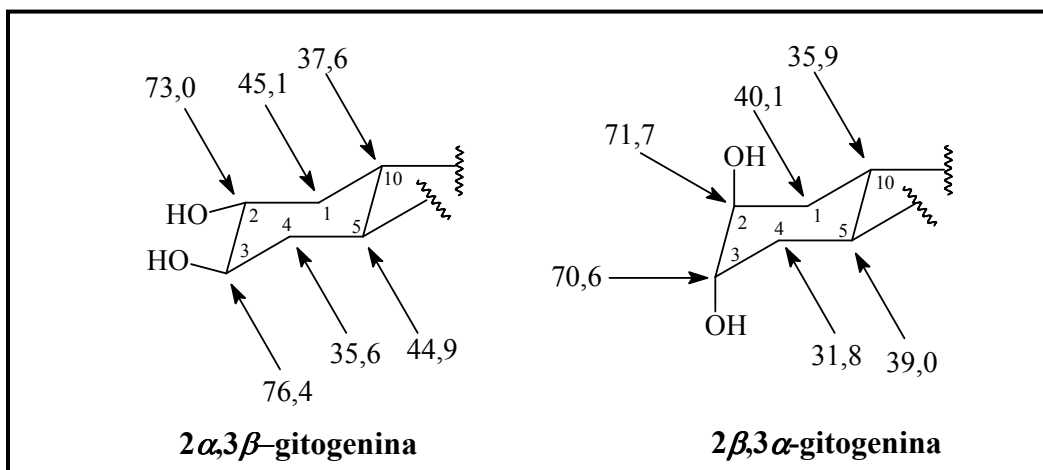
Foram observados ainda importantes acoplamentos dos hidrogênios oxi-metilênicos em δ 3,37 (H-26), metílico em δ 1,14 (3H-21), e ainda do hidrogênio metínico em δ 1,90 (H-20) com o carbono acetálico em δ 109,60/110,06 (C-22) (Figura 15, p. 64). Em adição, o hidrogênio oxi-metilênico em δ 3,60 (dd, $J= 11,1$ e $2,0$ Hz H-26); o metínico em δ 1,90 (H-20) e o metílico em δ 1,14 (H-21) mostraram ainda correlações com o carbono metilênico em δ 28,71/26,56 (C-24) (Figura 15, pág. 64). O hidrogênio oxi-metínico em δ 4,53 (H-16) também se correlacionou com o carbono metínico em δ 42,84 (C-20), e o grupamento metila em δ 1,14 (3H-21) mostrou correlação com o carbono metínico em δ 63,21 (C-17) (Figura 15, p. 64). Desta forma, a junção de todos dados apresentados possibilitou a construção dos fragmentos abaixo:



Por fim, a reunião de todos os dados descritos, possibilitou atribuir para **CL-1** a estrutura de uma sapogenina di-hidroxilada com esqueleto esteroidal tipo espirostanos, a qual recebe o nome genérico de gitogenina (Tabela.04, p. 57)

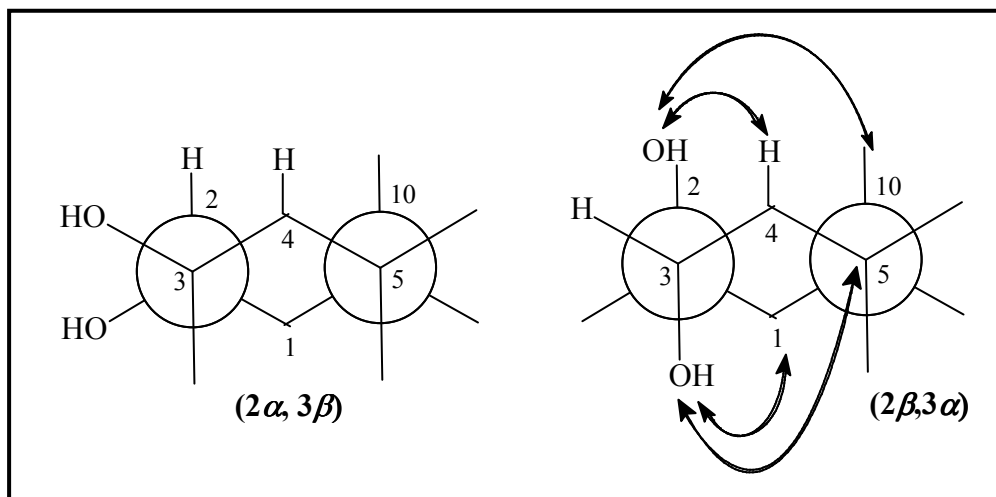


A configuração relativa dos dois grupos hidroxilas em δ 4,07 (C-2) e δ 3,89 (C-3) foi inicialmente determinada a partir da análise comparativa dos dados de RMN ^{13}C de **CL-1**, com aqueles descritos na literatura para os estereoisômeros $2\alpha,3\beta$ -gitogenina e $2\beta,3\alpha$ -gitogenina, como mostrado no fragmento abaixo [Agrawal, 1985].



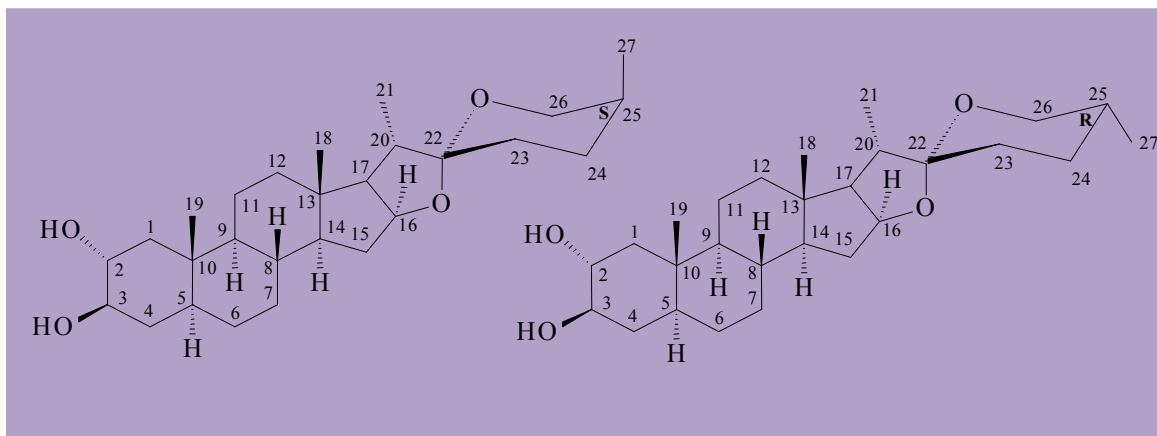
Baseando-se nos deslocamentos químicos referentes aos carbonos C-1 e C-5 no estereoisômero ($2\beta, 3\alpha$) foi observado que estes valores encontram-se deslocados para ambiente de maior proteção por cerca de 5-6 ppm em relação ao estereoisômero ($2\alpha, 3\beta$). Esta constatação pode ser explicada através das interações γ -gauche de proteção exercida pelo grupamento hidroxila na posição C-3 axial. Da mesma forma o outro grupo hidroxila na posição 2β , causa proteção nos carbonos em C-4 e C-10. Desta forma, os valores

apresentados em **CL-1** para os carbonos C-1, C-4, C-5 e C-10 em δ 46,8, 34,24, 45,6, 37,93, respectivamente, estabeleceram definitivamente a estereoquímica 2α , 3β para estas posições.



A co-ocorrência de saponinas esteroidais com esqueletos 5α -espirostanos em espécies de *Cestrum*, determinou para **CL-1** a presença de um sistema do tipo *trans*-decalina, baseados na sugestão de que tais compostos seguem a mesma rota biossintética no gênero. Dentro deste contexto, os dados da literatura demonstram ainda que a série 5α -espirostanos pode ser sub-dividida em $25R$ - 5α -espirostanos e $25S$ - 5α -espirostanos, dependendo da posição do grupamento metila em C-25 [Agrawal, 1985].

Diante destes dados, e de que o espectro de RMN ^{13}C de **CL-1** apresentou um total de 36 sinais, ficou estabelecido que **CL-1** trata-se da mistura de epímeros $25(S)$ - 5α -espirostanos- $2\alpha,3\beta$ -diol e $25(R)$ - 5α -espirostanos- $2\alpha,3\beta$ -diol, mostrada na figura abaixo.



O composto 25(*R*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol (gitogenina) já foi relatado como constituinte químico dos frutos de *C. laevigatum* [Canham, 1950], e também relatado no gênero *Cestrum* para as espécies *C. parqui* e *C. elegans* [Begum, 2007], porém, o epímero 25(*S*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol é de caráter inédito no gênero.

Tabela 03– Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CL-1

#C	^{13}C -BB	HSQC	HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
10	37,93	-	2H-1; 3H-19	H-4
13	41,19	-		H-20
22	109,60/110,06	-	H-20	3H-21; H-26
CH				
2	73,44	4,07 (m)	2H-1; H-3	H-4
3	85,21	3,87 (m)	H-2; 2H-4	2H-1
5	45,60	1,22 (m)	2H-4	H-1a; 3H-19
8	35,04	1,43 (m)		
9	54,99	0,70 (d, $J=5,4$ Hz)		H-1b; 3H-19
14	56,78	1,07 (d, $J=7,1$ Hz)	H-8; H-15	3H-18
16	81,59/81,52	4,53 (m)	2H-15; H-17	H-15; 3H-18; 3H-21
17	63,21/62,39	1,88 (m)		H-21
20	42,36/42,84	1,90 (m)		H-16
25	30,98	1,42 (m)	3H-27	
CH₂				
1	46,88	2,27 (dd, $J=14,55/4,55$) / 1,25 (m)		3H-19
4	34,24	1,80/1,50		
6	28,70	1,57 (m)		
7	32,19	1,57/0,85		
11	21,90	1,57/1,28		
12	40,53	1,72 (m) / 1,07 (d, $J=7,1$)		H-14; H-17; 3H-18
15	32,48	2,04 (m)/1,57(m) / 0,85 (m)		
23	32,51/26,75	2,04 (m)/1,57(m) / 0,85 (m)		
24	28,71/26,56	1,27 (m)	H-26	H-20; H-21
26	67,23/65,44	3,58 (dd, $J=11,1/2,0$ Hz)/4,06 (d, $J=10,7$ Hz)/3,51(t, $J=11,1$ Hz)/3,37 (d, $J=10,7$ Hz)		3H-27
CH₃				
18	16,67	1,07 (d, $J=7,1$ Hz)		H-14
19	14,09	0,85 (s)		H-1; H-9
21	15,39/15,23	1,14 (m) / 1,14 (m)		
27	17,69/17,01	0,69 (d, $J=5,3$ Hz)/0,82 (d, $J=4,3$ Hz)		

Tabela 04– Dados de RMN ^{13}C de CL-1 em comparação com dados da literatura para o 25(R)-5 α -espirostano-2 α ,3 β -diol (gitogenina) [Plock, 2001].

	CL-1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz)	25(R)-5 α -espirostano-2 α ,3 β -diol (gitogenina) (CDCl ₃ , 75 MHz), [Plock, 2001]
C	δ_{C}	δ_{C}
1	46,88	45,0
2	73,44	73,0
3	85,21	76,4
4	34,24	35,6
5	45,60	44,8
6	28,70	27,8
7	32,19	31,8
8	35,04	34,4
9	54,99	54,3
10	37,93	37,6
11	21,90	21,2
12	40,53	39,9
13	41,19	40,6
14	56,78	56,1
15	32,48	31,4
16	81,59/81,52	80,8
17	63,21/62,39	62,1
18	16,67	16,5
19	14,09	13,6
20	42,36/42,84	41,5
21	15,39/15,23	14,5
22	109,60/110,06	109,2
23	32,51/26,75	32,0
24	28,71/26,56	28,8
25	30,98	30,3
26	67,23/65,44	66,8
27	17,69/17,01	17,1

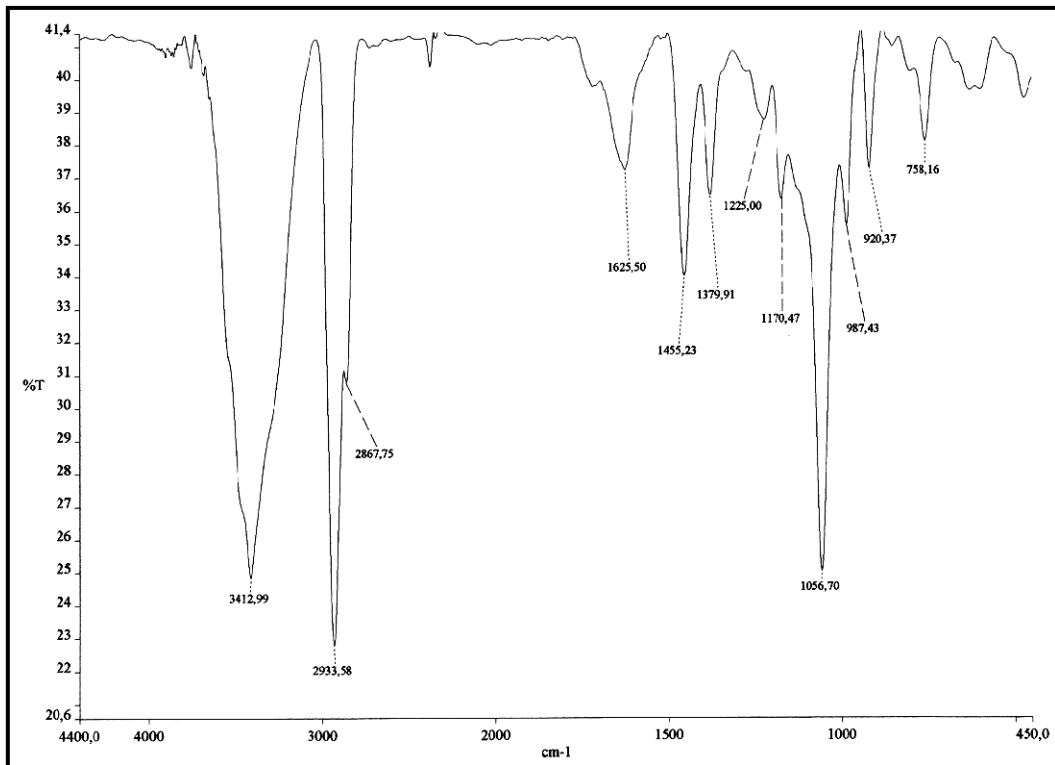


Figura 2: Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-1

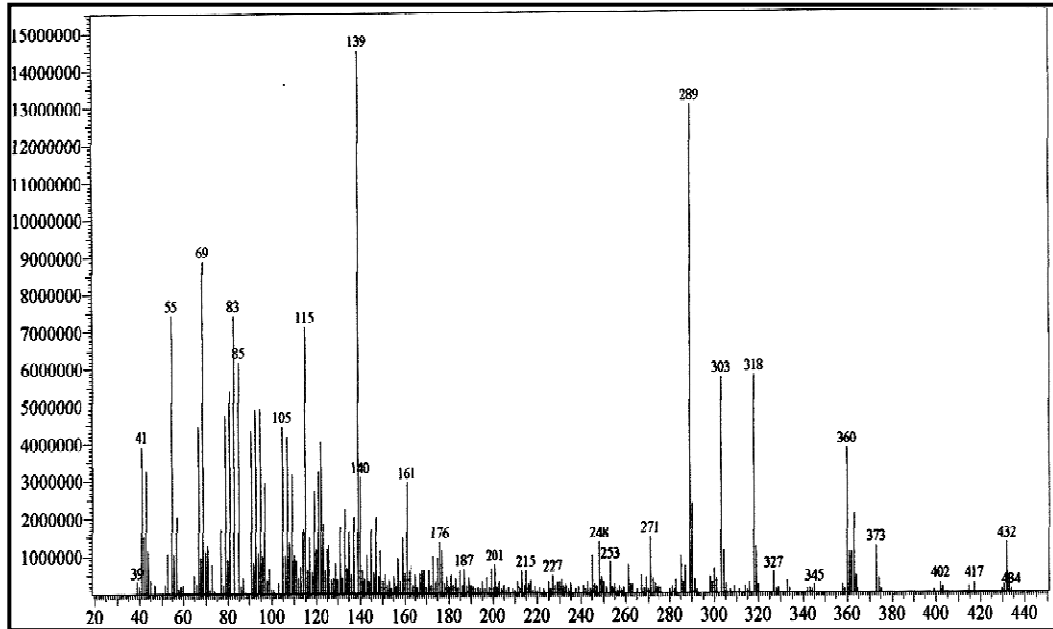


Figura 3: Espectro de massas de CL-1 (IE, 70eV)

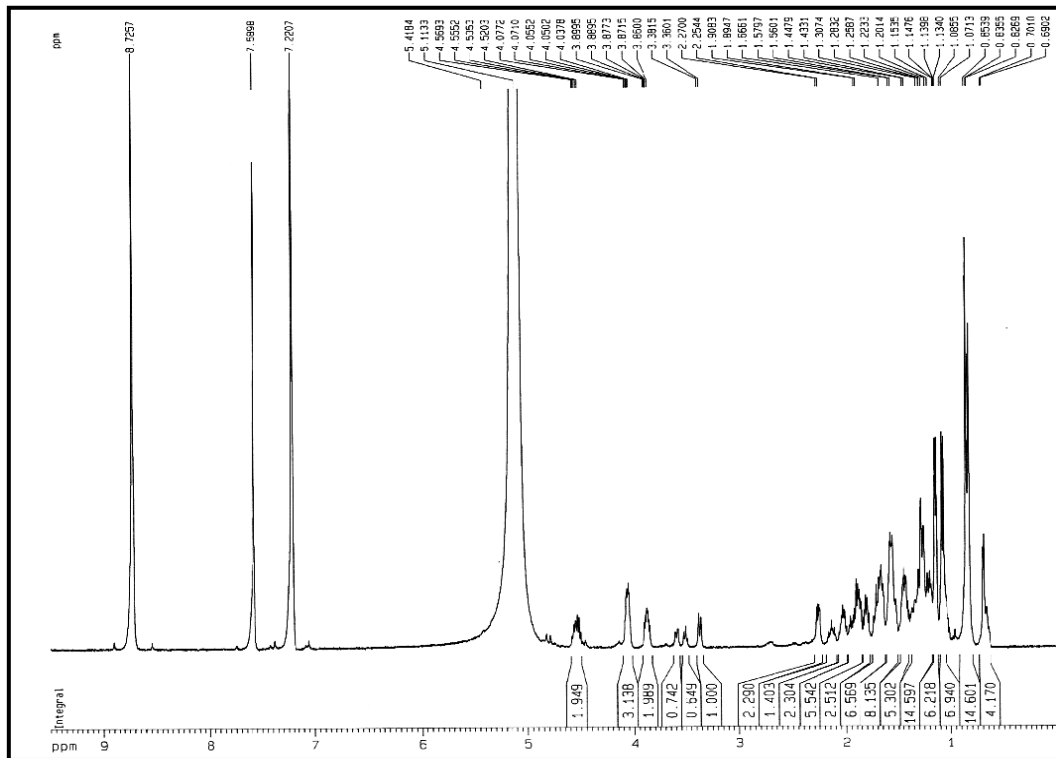


Figura 4: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1

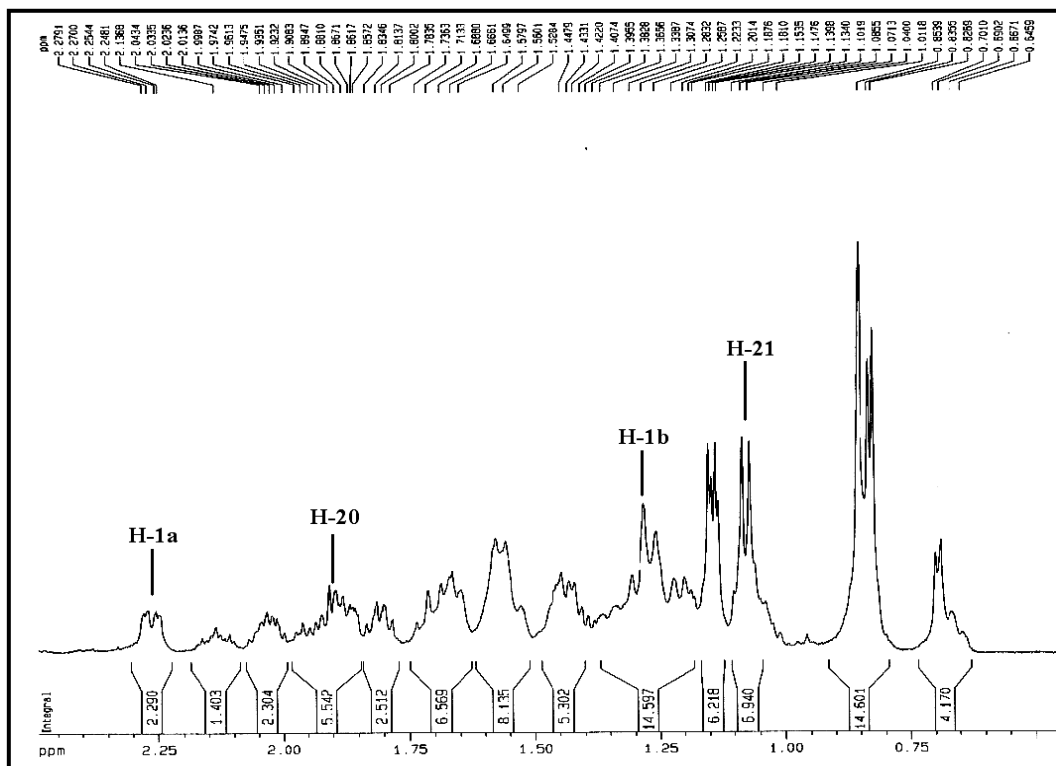


Figura 5: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1

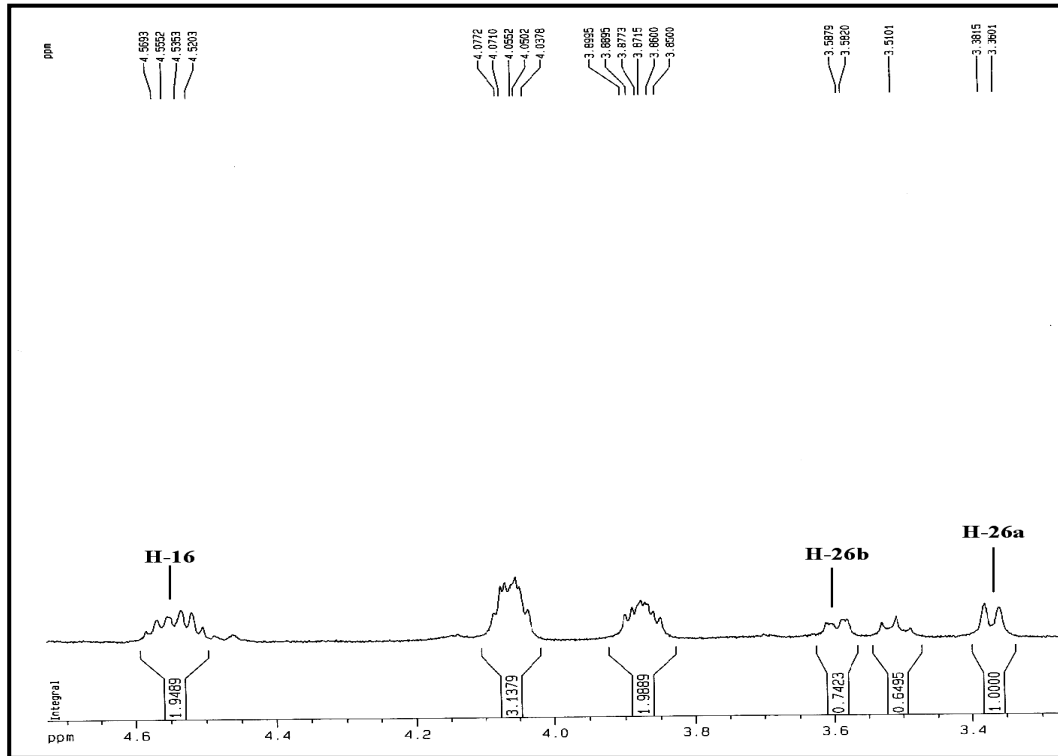


Figura 6: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1

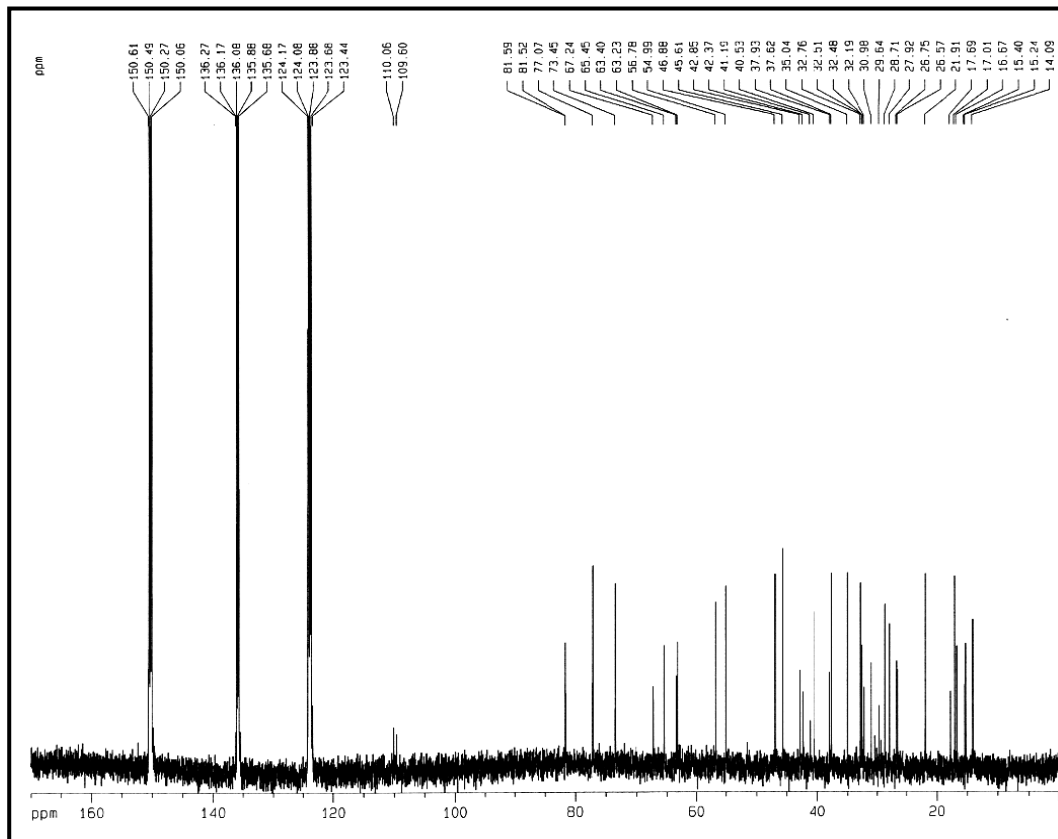


Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-1

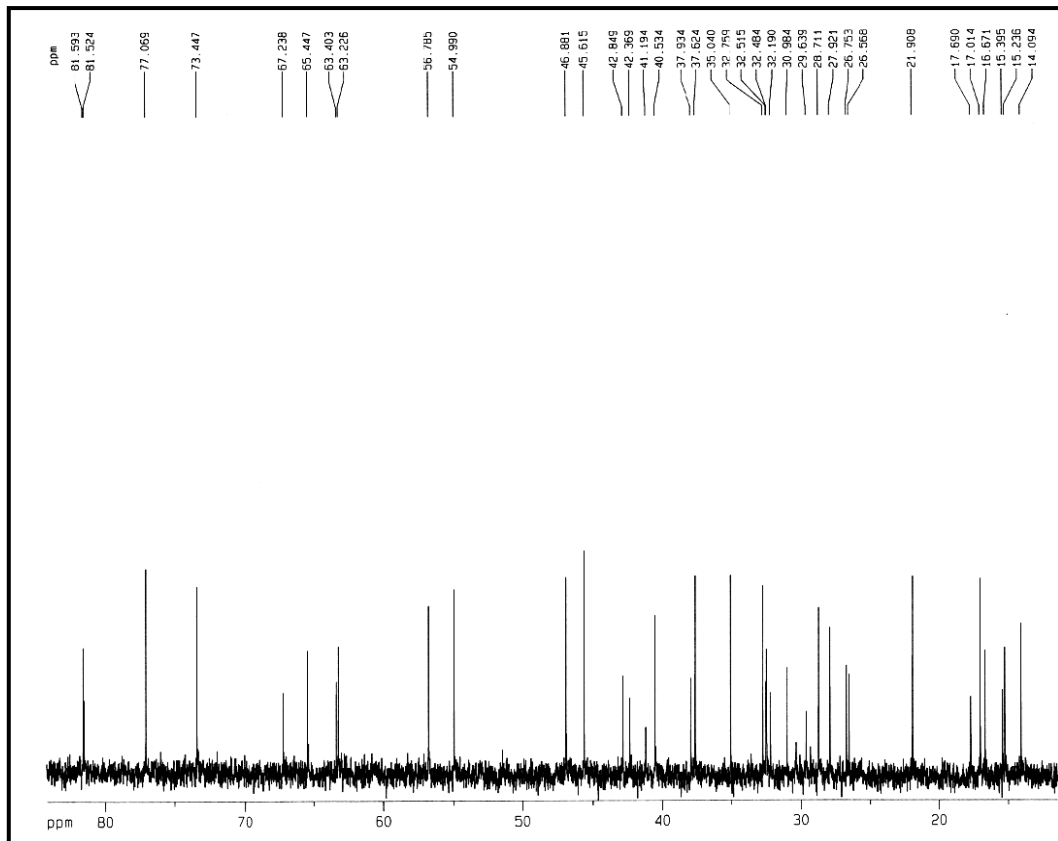


Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-1

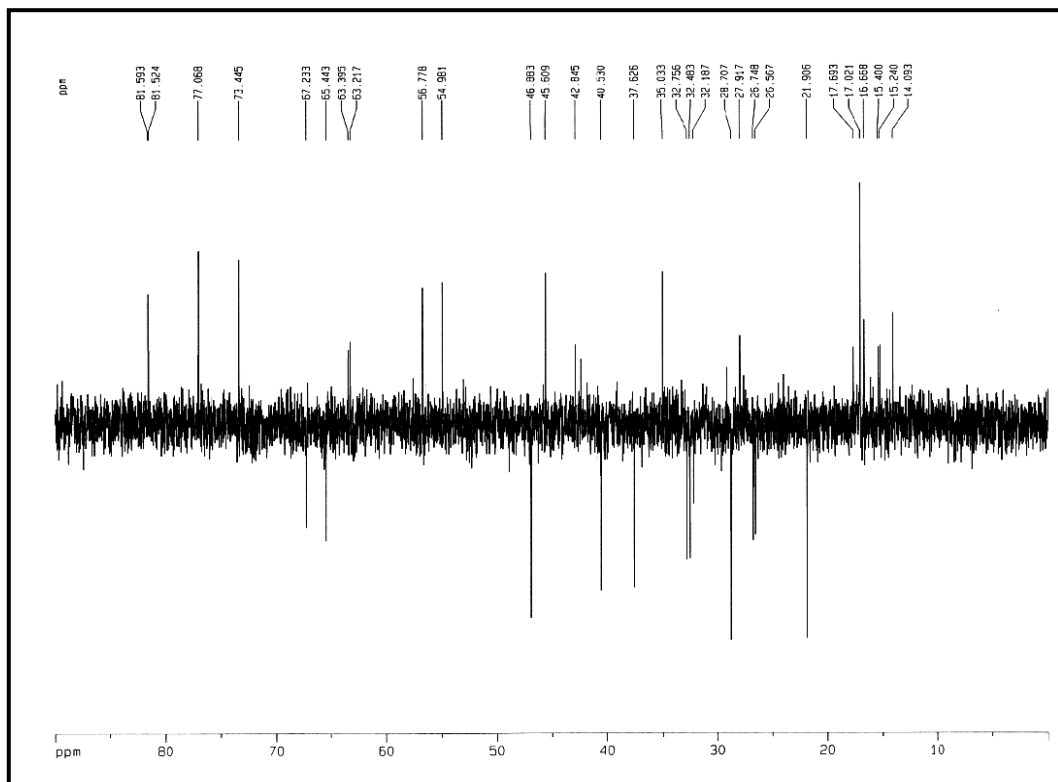


Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-1

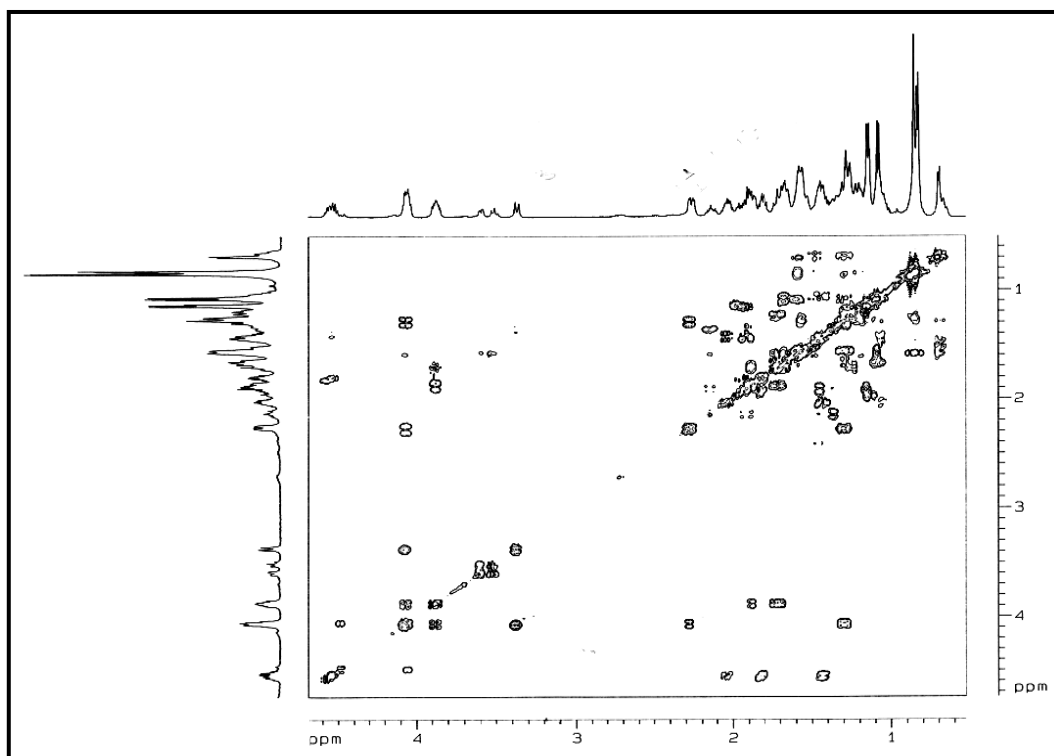


Figura 10: Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1

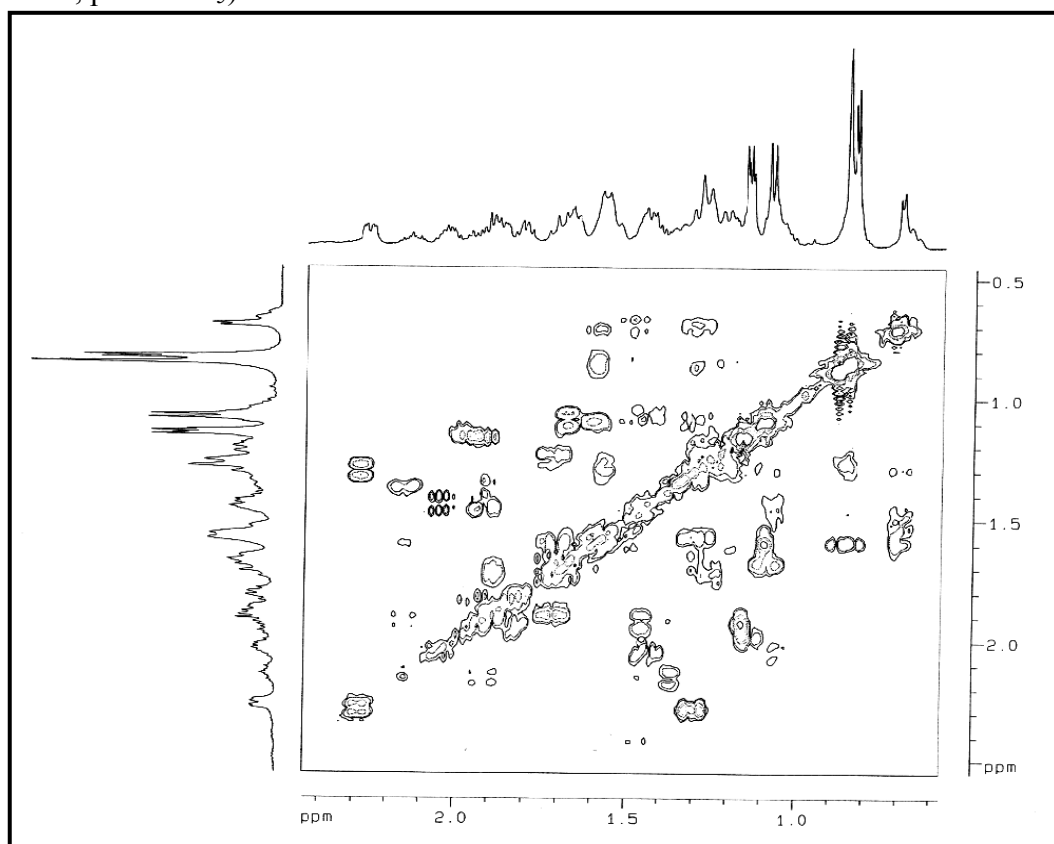


Figura 11: Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-1

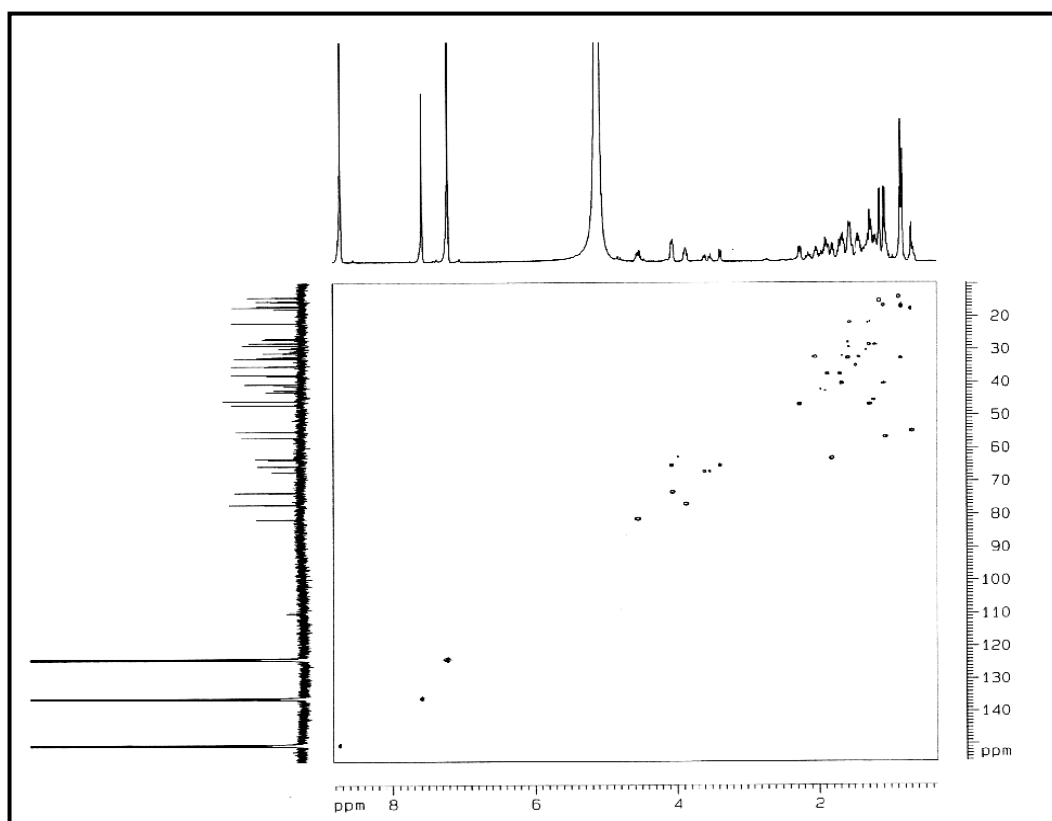


Figura 12: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1

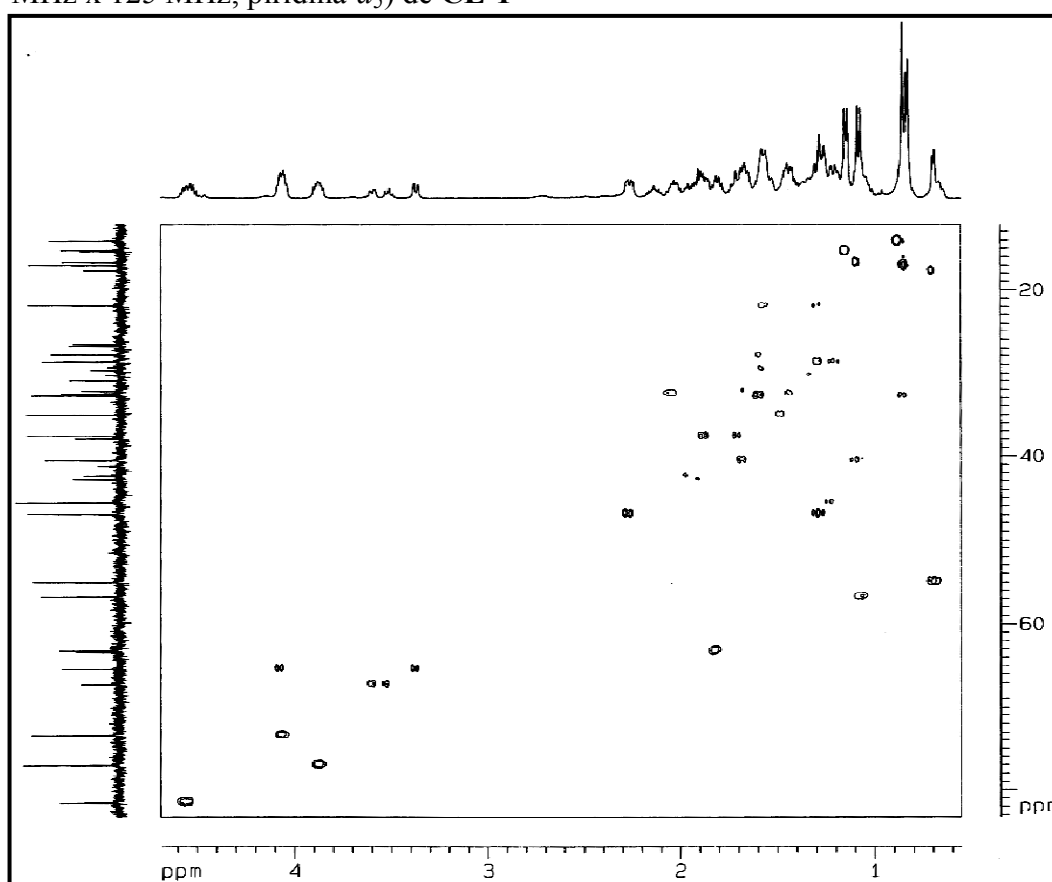


Figura 13: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1

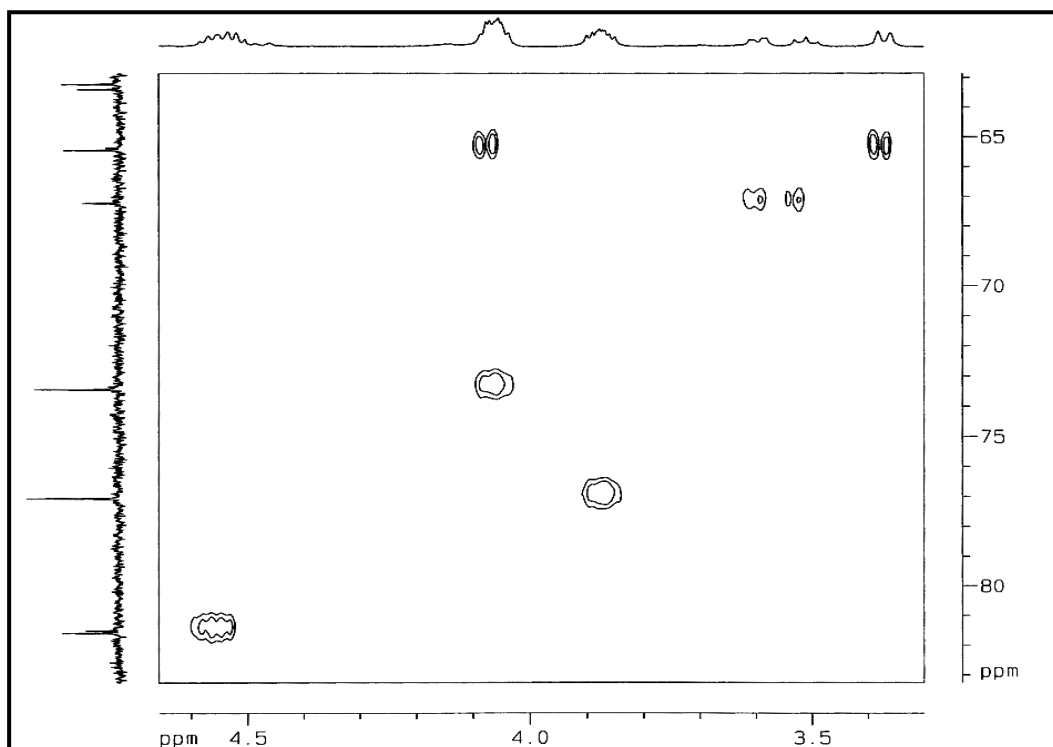


Figura 14: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1

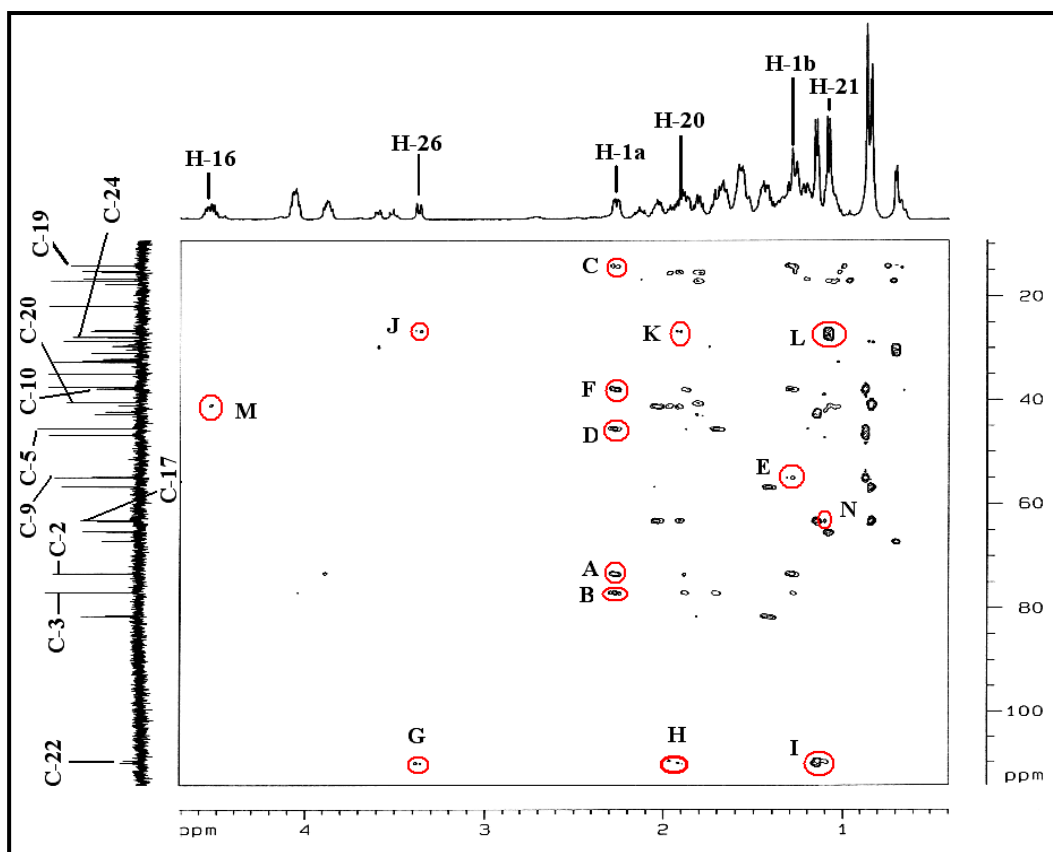
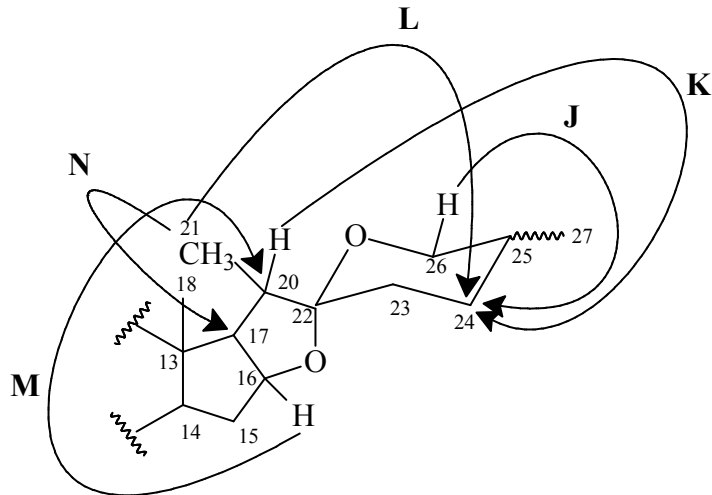
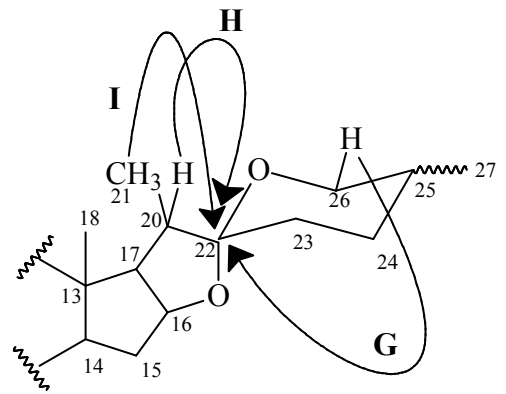
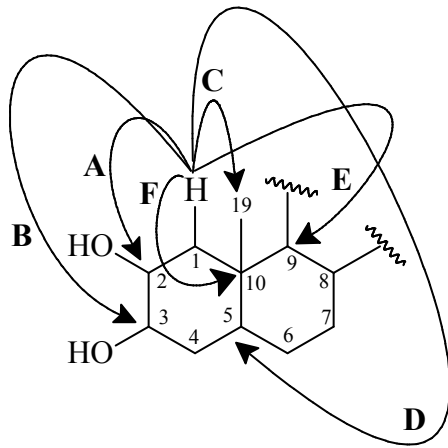


Figura 15: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-1



4.1.2. Determinação estrutural de CL-2

O fracionamento por cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” da fração CLCE-dC, obtida da partição do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum*, forneceu 13,4 mg de um sólido branco amorfo, com pico do íon molecular em $m/z = 594$ daltons (Figura 17, p. 71), que foi denominado **CL-2**.

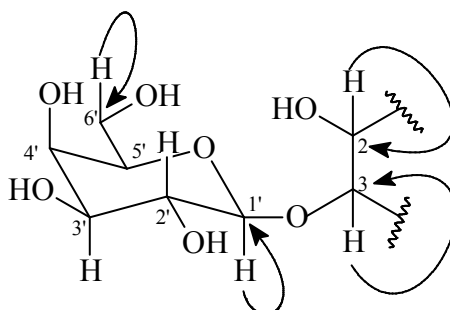
O espectro de absorção na região do IV de **CL-2** (Figura 16, p. 71), apresentou banda larga em 3414 cm^{-1} típica de estiramento O-H de hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$); absorções em 2937 e 2867 cm^{-1} características dos estiramentos assimétrico e simétrico C-H de carbono sp^3 ($\nu_{\text{C-H}}$), respectivamente; além das bandas em 1454 e 1380 cm^{-1} características de deformação angular de C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) e em 1123 e 1077 cm^{-1} características de estiramento C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) [Silverstein e Webster, 2000].

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 18, p. 72), de **CL-2** apresentou-se semelhante ao espectro de **CL-1**, porém com sinais múltiplos adicionais na faixa de δ 5,01 e δ 3,36 relativos a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Dentre os sinais observados, o dubleto centrado em δ 5,00 (1H, $J = 7,7$ Hz, H-1') foi relacionado a um hidrogênio ligado a carbono anomérico de um provável glicosídeo, cujo valor da constante de acoplamento sugeriu uma configuração “ β ”. Pôde-se destacar ainda, o sinal em δ 2,22 (1H, dd, $J = 12,6$ e $4,3$ Hz, H-1), além dos sinais relativos a grupamentos metilas em: δ 1,15 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H-21) e δ 1,14 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H-21); δ 1,08 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H-27); δ 0,82 (s, 3H-18), δ 0,81 (s, 3H-18), δ 0,74 (s, H-19), δ 0,70 (d, $J = 5,1$ Hz, 3H-27).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) de **CL-2** (Figura 20, p. 73) apresentou quarenta e quatro linhas espectrais, das quais se destacaram os sinais localizados em δ 110,0 (C-22); 109,5 (C-22) e 104,5 (C-1') relacionados a carbonos acetálicos, como já observados para **CL-1**. No entanto, apenas o último em δ 104,5 (C-1') apresentou-se mono-hidrogenado em comparação com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz) (Figura 22, p. 74), sugerindo que o mesmo se tratava do carbono anomérico da unidade de açúcar, em concordância com o espectro de RMN ^1H .

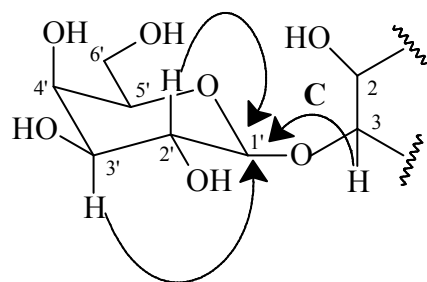
A análise do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz) (Figura 22, p. 74) possibilitou ainda a determinação do padrão de hidrogenação dos demais carbonos como: 4 metílicos, 11 metilênicos, 15 metínicos e 3 carbonos não-hidrogenados (Tabela 05, p. 69). A reunião destes dados permitiu sugerir para **CL-2** um esqueleto esteroidal monodesmosídico.

A unidade glicosídica foi caracterizada através da observação de alguns sinais característicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -BB, além das associações observadas no diagrama de contorno do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear direta (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figuras 24 e p. 75). Foram mostradas as correlações do carbono em δ 70,67 (C-2) com o sinal do hidrogênio em δ 3,99 (H-2); a correlação do carbono em δ 104,5 (C-1') com o hidrogênio em δ 5,00 (H-1'), além da correlação do carbono carbinólico em δ 85,21 (C-3) com o hidrogênio em δ 3,99 (H-3). A correlação dos hidrogênios em δ 4,52 (H-6'a) e 4,46 (H-6') com o carbono em δ 62,43 (C-6') corroborou a presença do grupamento metilênico da unidade de açúcar.

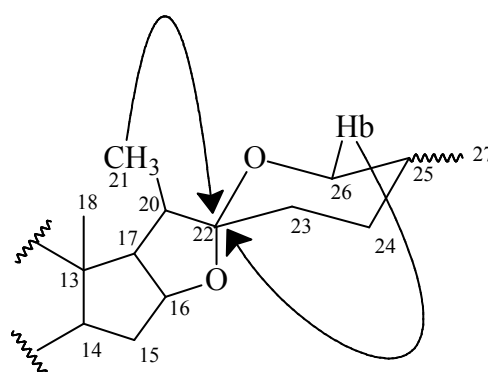


A análise detalhada no espectro de correlação heteronuclear a uma ligação (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 24, p. 75), possibilitou a correlação de todos os carbonos aos seus respectivos hidrogênios de forma inequívoca. Desta forma, os dados referentes à aglicona mostraram-se bastante semelhantes à estrutura de **CL-1**, enquanto que a unidade glicosídica foi caracterizada como sendo a galactose, através da observação da multiplicidade e valores das constantes de acoplamento para o hidrogênio em δ 4,24 (dd, $J = 9,4$ e $3,1$ Hz, H-3'), e comparação dos deslocamentos químicos de alguns sinais característicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -BB com dados da literatura. (Tabela 6, p. 70) [Mimaki, 1998].

No espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figuras 25, p. 76) foi possível observar as importantes correlações dos hidrogênios em δ 4,54 (H-2'), δ 4,24 (H-3') e δ 3,89 (H-3) com o carbono anomérico em δ 104,5 (C-1') (Figuras 25, p. 76), o que definiu a posição da unidade glicosídica em C-3. Esta sugestão foi corroborada também pela observação do alto valor do deslocamento químico de C-3 (δ 85, 2) em **CL-2**, quando comparado com a estrutura de **CL-1** (δ 77,0), que pôde ser justificado através do efeito de desproteção β que o carbono anomérico exerce sobre C-3.



Neste espectro foram visualizados ainda os acoplamentos dos hidrogênios em δ 1,14 (H-21) e δ 3,37 (H-26) com o carbono acetálico não-hidrogenado em δ 109,57/110,04 (C-22), o que confirmou o esqueleto do tipo espirostanos (Figura 25, p. 76).



A reunião dos dados obtidos nos espectros de RMN uni e bidimensional de ^1H e ^{13}C e a posterior comparação com dados descritos na literatura para saponinas esteroidais (Tabela 06, p. 70), aliado ao fato de que os sinais relativos aos carbonos 16-17 e 20-27 encontram-se dobrados, determinou para **CL-2** a estrutura da mistura de epímeros denominadas (25*R*)-5 α -espirostanos-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo e (25*S*)-5 α -espirostanos-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo. Mimaki et al. descreveram o isolamento do estereoisômero (25*R*) para a espécie *Hosta sieboldii* (Liliaceae) [Mimaki, 1998], no entanto este é o primeiro relato do isolamento destas substâncias no gênero *Cestrum*.

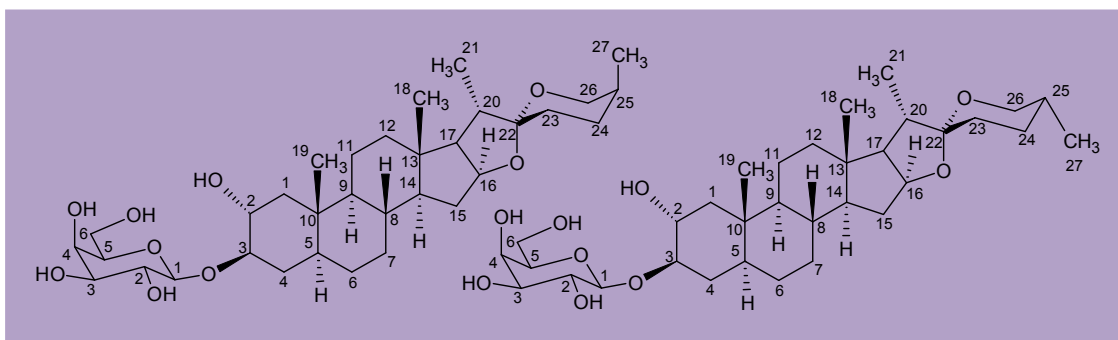


Tabela 05– Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CL-2

#C	$^{13}\text{C-BB}$	HSQC	HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
10	37,22	-	2H-1; 3H-19	H-4 ^a
13	41,14	-		H-15a; H-20
22	109,57/110,04	-		3H-21; H-26b
CH				
2	70,67	3,99 (m)	2H-1; H-3	H-4 ^a
3	85,21	3,89 (m)	H-2; 2H-4	2H-1; H-1 ⁷
5	44,70	1,05	2H-4	H-1a; 3H-19
8	34,66	1,40		
9	54,46	0,61 (tl, $J=9,7$ Hz)		H-1b; 3H-19
14	56,40	1,05	H-8; H-15a	3H-18
16	81,26/81,19	4,58	2H-15; H-17	H-15b; 3H-18; 3H-21
17	63,06/62,88	1,80/1,80	H-20	
20	42,05/42,53	1,95/1,90	3H-21	
25	30,66/27,90	1,60/1,62	3H-27	
CH₂				
1	45,78	2,22 (dd, $J=12,6/4,3$) / 1.20		3H-19
4	34,24	1,80/1,50		
6	28,16	1,20/1,05		
7	32,19	1,58/0,85		
11	21,51	1,55/1,28		
12	40,13	1,64/1,08		H-14; H-17; 3H-18
15	32,16	2,04 (m)/1,40		
23	31,88/26,74	1,75/1,64		
24	29,33/26,55	1,48		
26	66,93/65,14	3,58 (dd, $J=11,1/2,0$ Hz)/4,06 (dl, $J=10,7$ Hz)/3,51(t, $J=11,1$ Hz)/3,37 ($J=10,7$ Hz)		3H-27
CH₃				
18	16,66	0,82 (s)/0,81 (s)		H-14
19	13,47	0,74 (s)/0,74(s)		H-1b; H-9
21	15,07/14,91	1,14 (d, $J=6,6$ Hz)/1,15 (d, $J=6,3$ Hz)		
27	17,38/16,35	0,70 (d, $J=5,1$ Hz)/1,08 (d, $J=7,1$ Hz)		
Açúcar				
1 ⁷	104,50	5,00 (d, $J=7,7$ Hz)	H-2 ⁷	H-3 ⁷ ; H-3
2 ⁷	72,44	4,54	H-3 ⁷	H-4 ⁷
3 ⁷	75,41	4,24 (dd, $J=9,4/3,1$ Hz)	H-2 ⁷ ; H-4 ⁷	
4 ⁷	70,30	4,59 (d, $J=3,1$ Hz)	H-5 ⁷	2H-6 ⁷
5 ⁷	77,33	4,20	2H-6 ⁷	
6 ⁷	62,43	4,52 (dd, $J=10,9/6,6$ Hz) / 4,46 (dd, $J=10,9/5,3$ Hz)		

Tabela 06– Dados de RMN ^{13}C de **CL-2** em comparação com dados de RMN ^{13}C do estereoisômero $(25R)$ - 5α -espiroetano- $2\alpha,3\beta$ -diol- $3-O-\beta$ -D-galactopiranosídeo [Mimaki, 1998].

	CL-2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	$(25R)$-5α-espiroetano-$2\alpha,3\beta$-diol-$3-O-\beta$-D-galactopiranosídeo ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) [Mimaki, 1998]
C	δ_{C}	δ_{C}
1	45,78	45,7
2	70,67	70,6
3	85,21	85,1
4	34,24	34,2
5	44,70	44,6
6	28,16	28,1
7	32,19	32,1
8	34,66	34,6
9	54,46	54,4
10	37,22	36,8
11	21,51	21,4
12	40,13	40,1
13	41,14	40,8
14	56,40	56,3
15	32,16	32,2
16	81,26/81,19	81,1
17	63,06/62,88	63,0
18	16,66	16,6
19	13,47	13,4
20	42,05/42,53	42,0
21	15,07/14,91	15,0
22	109,57/110,04	109,2
23	31,88/26,74	31,8
24	29,33/26,55	29,2
25	30,66/27,90	30,6
26	66,93/65,14	66,8
27	17,38/16,35	17,3
Galactose		
1'	104,50	104,1
2'	72,44	72,3
3'	75,41	75,3
4'	70,30	70,2
5'	77,33	77,2
6'	62,43	62,3

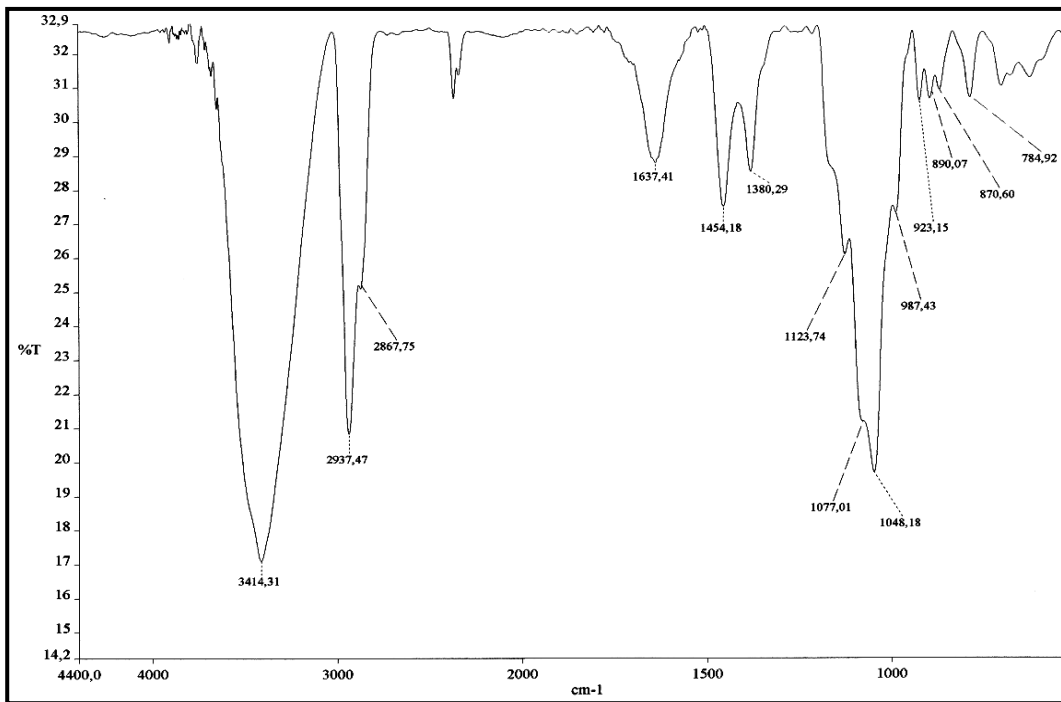


Figura 16: Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-2

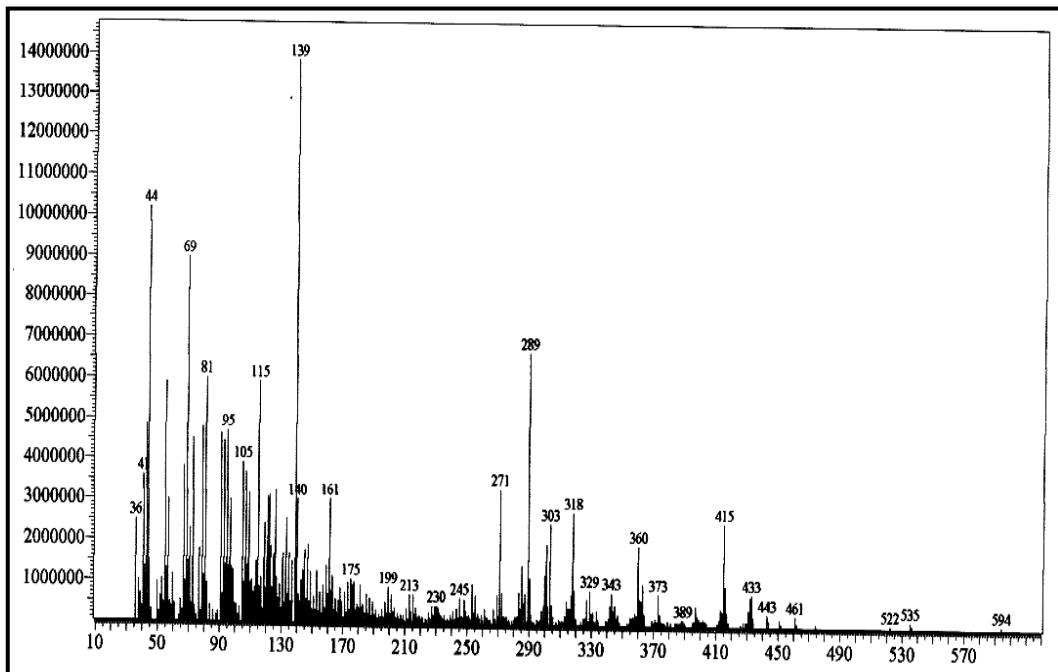


Figura 17: Espectro de massas de CL-2 (IE 70eV)

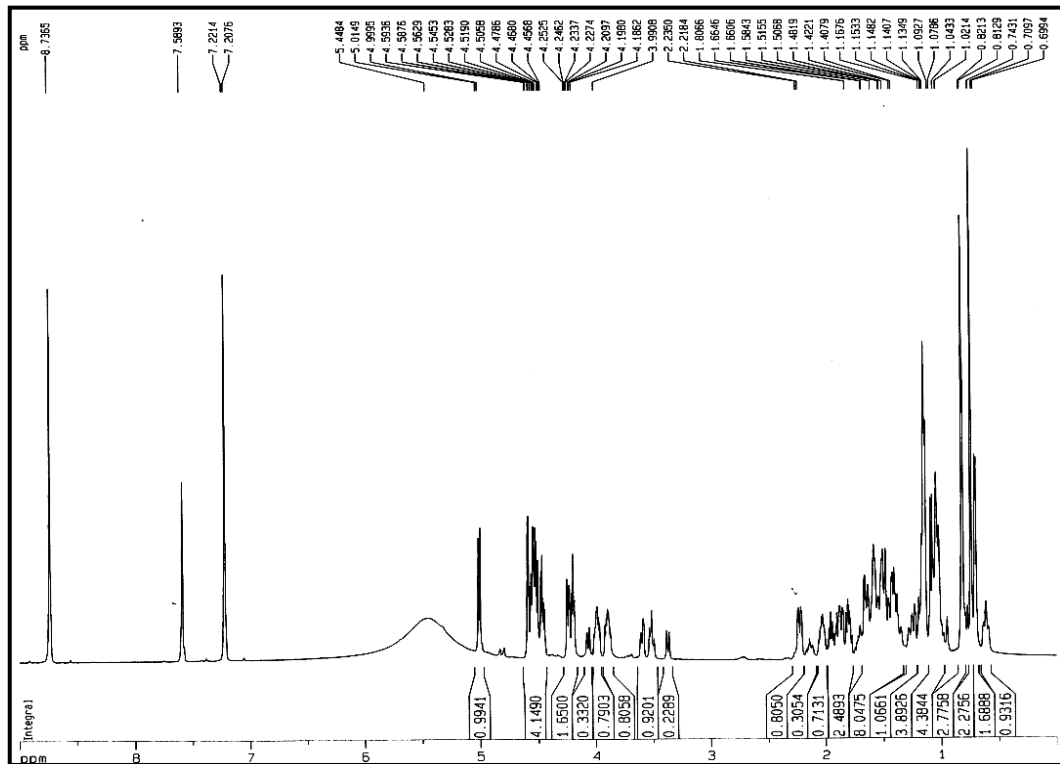


Figura 18: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-2

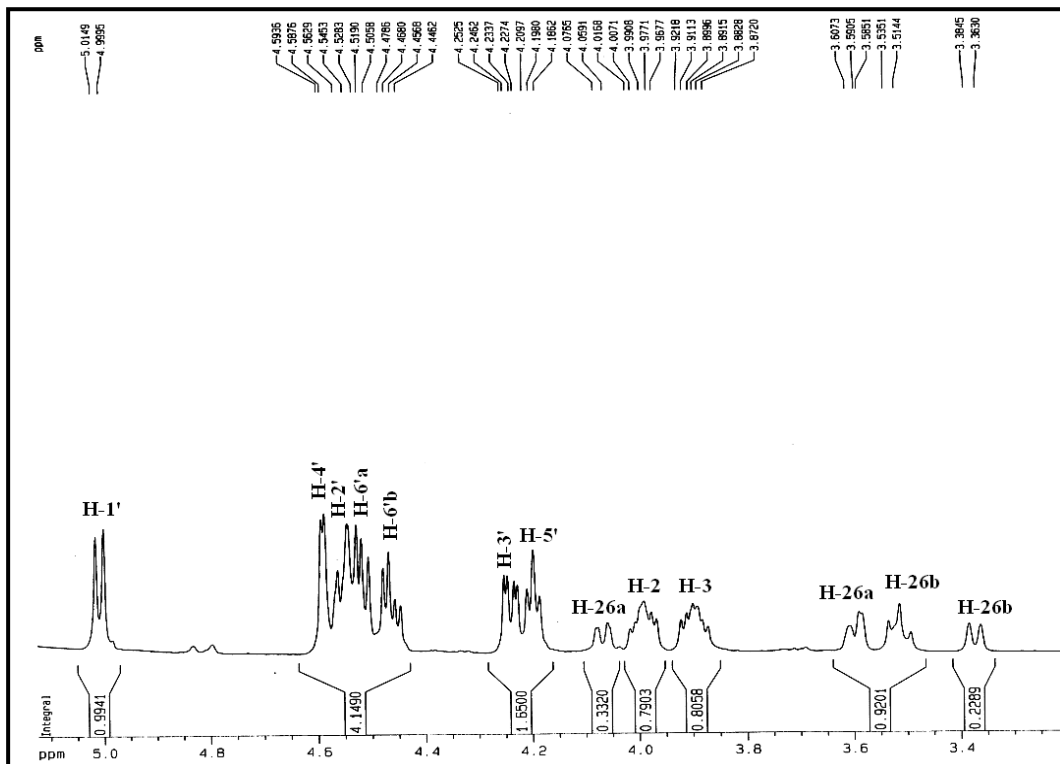


Figura 19: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-2

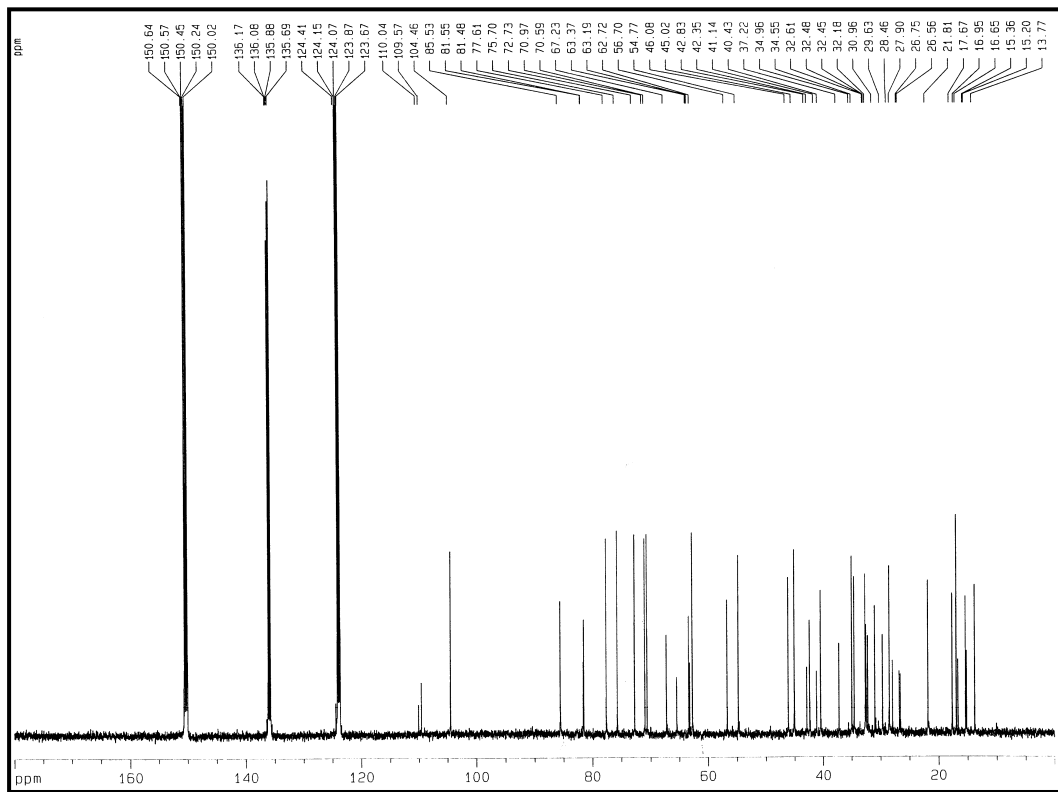


Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-2

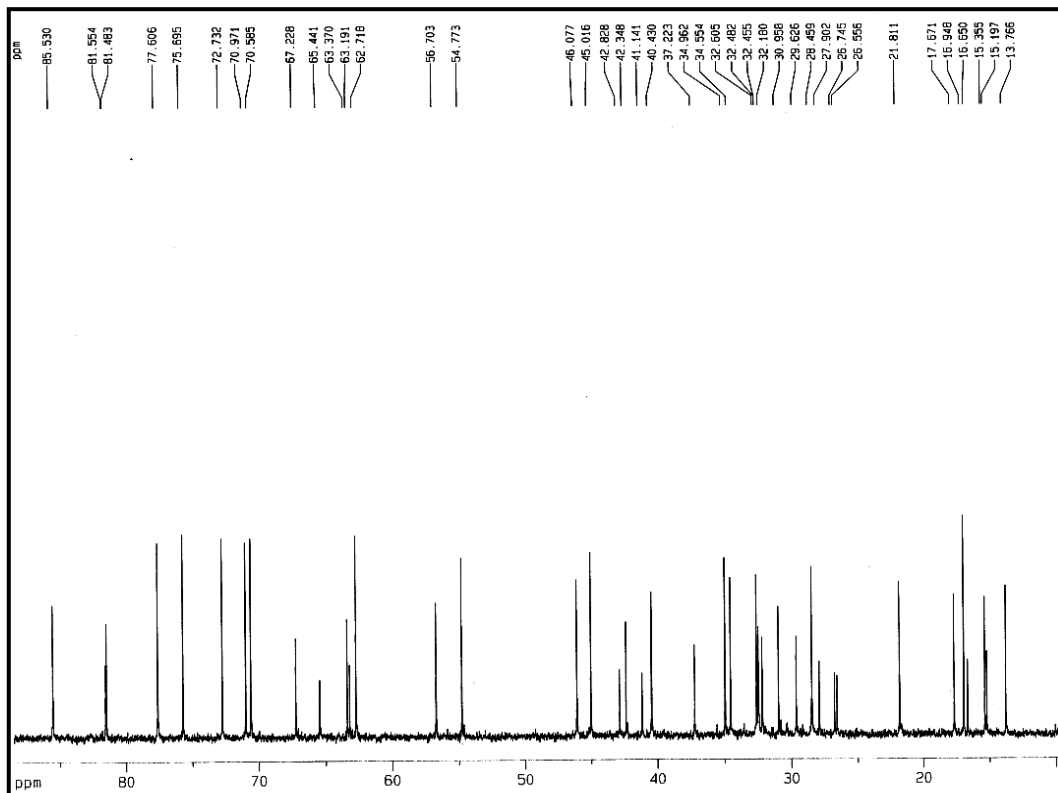


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-2

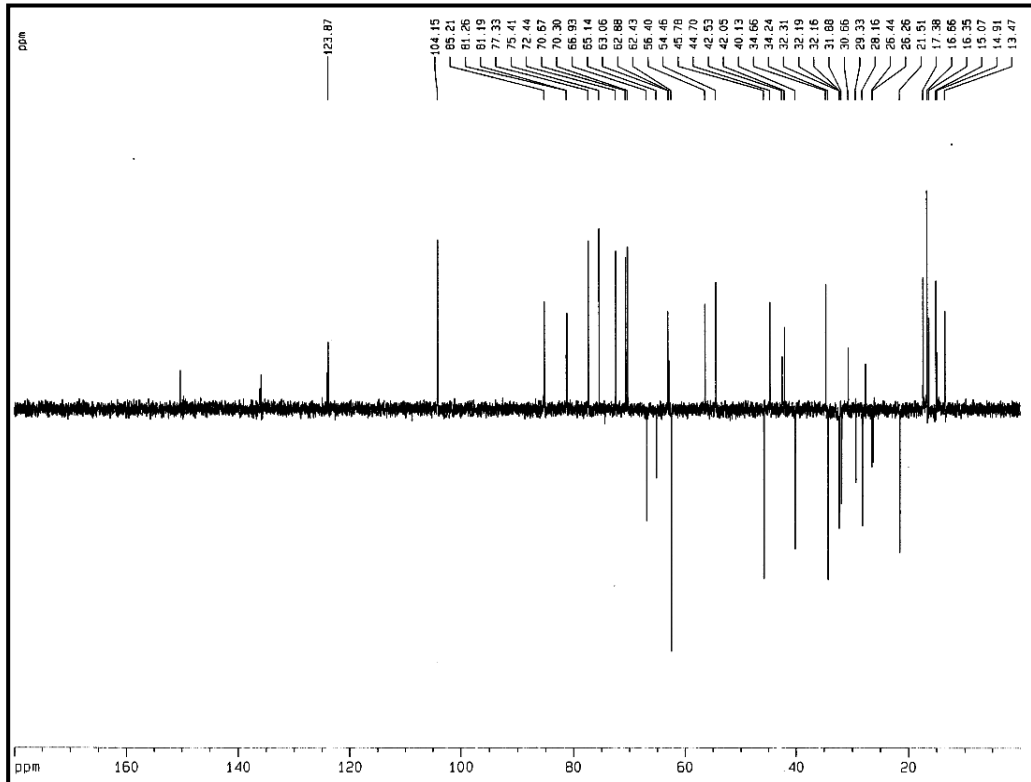


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-2

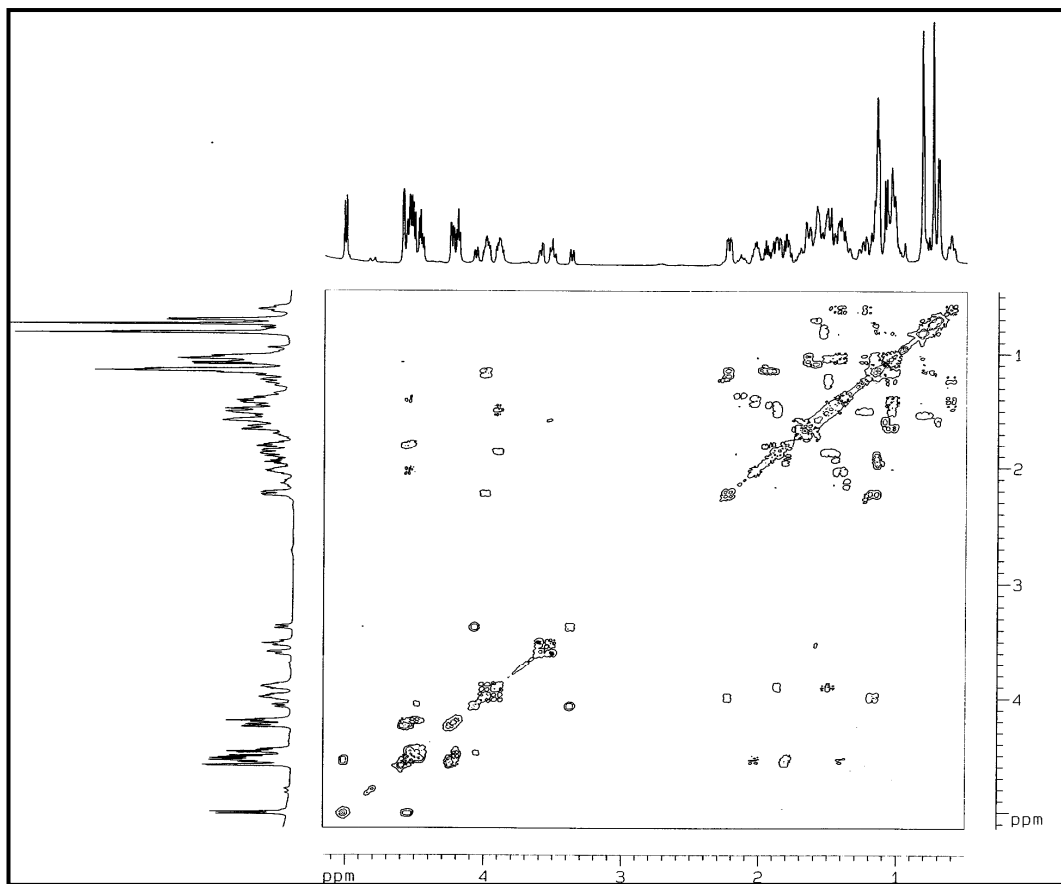


Figura 23: Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-2

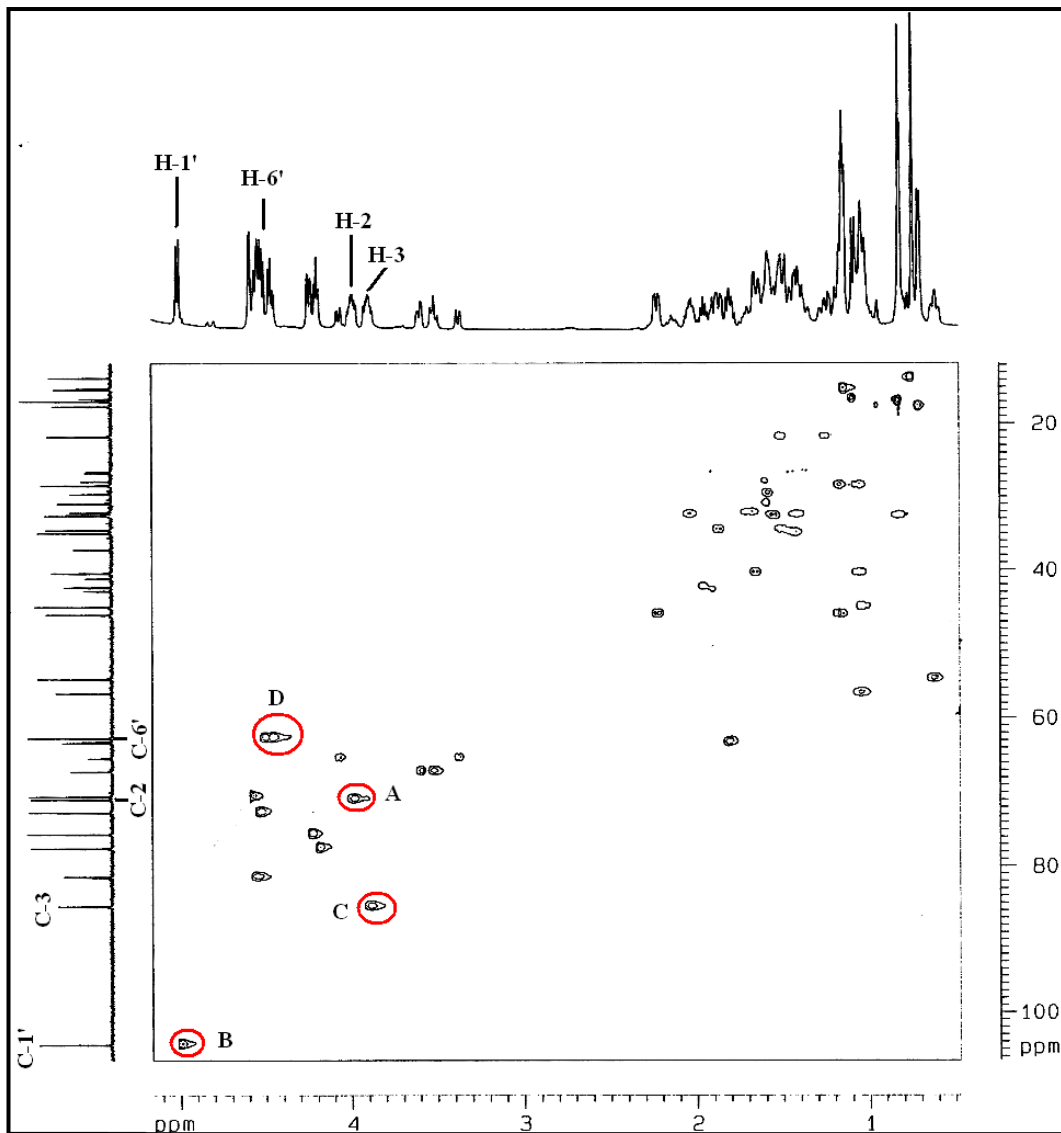
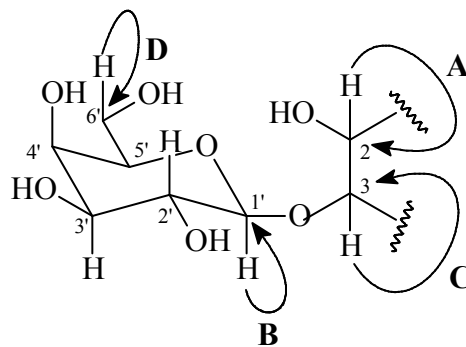


Figura 24: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-2



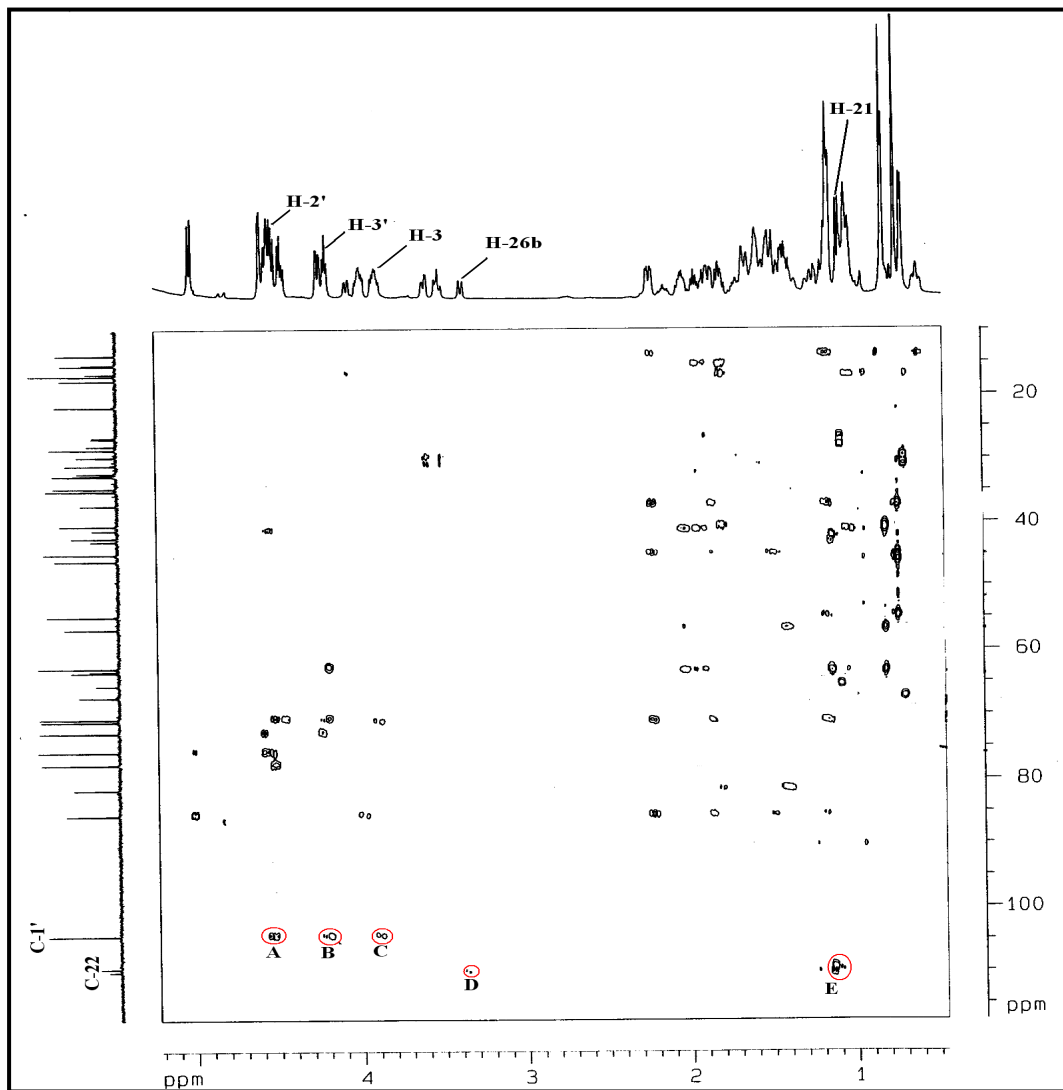
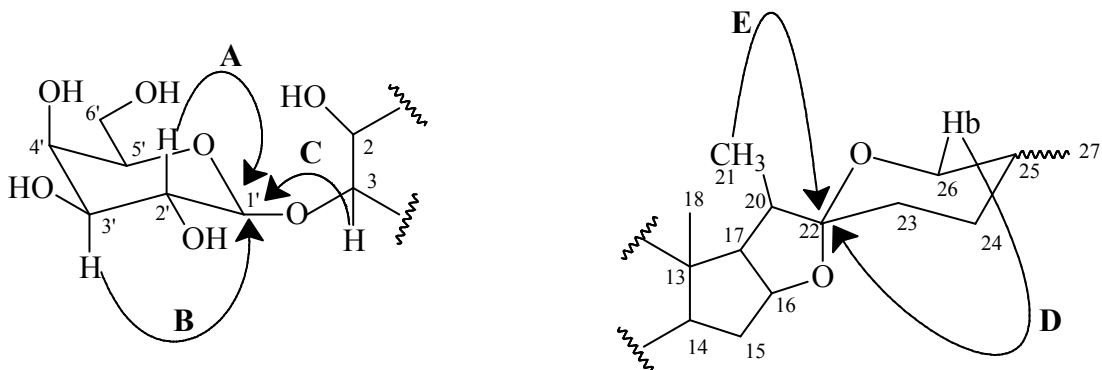


Figura 25: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de **CL-2**



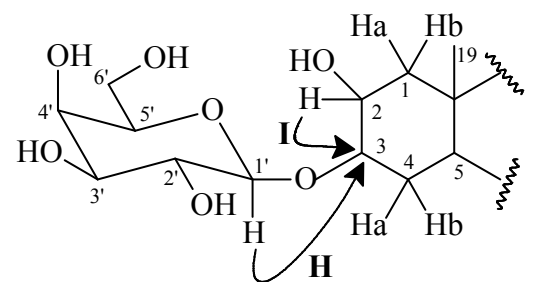
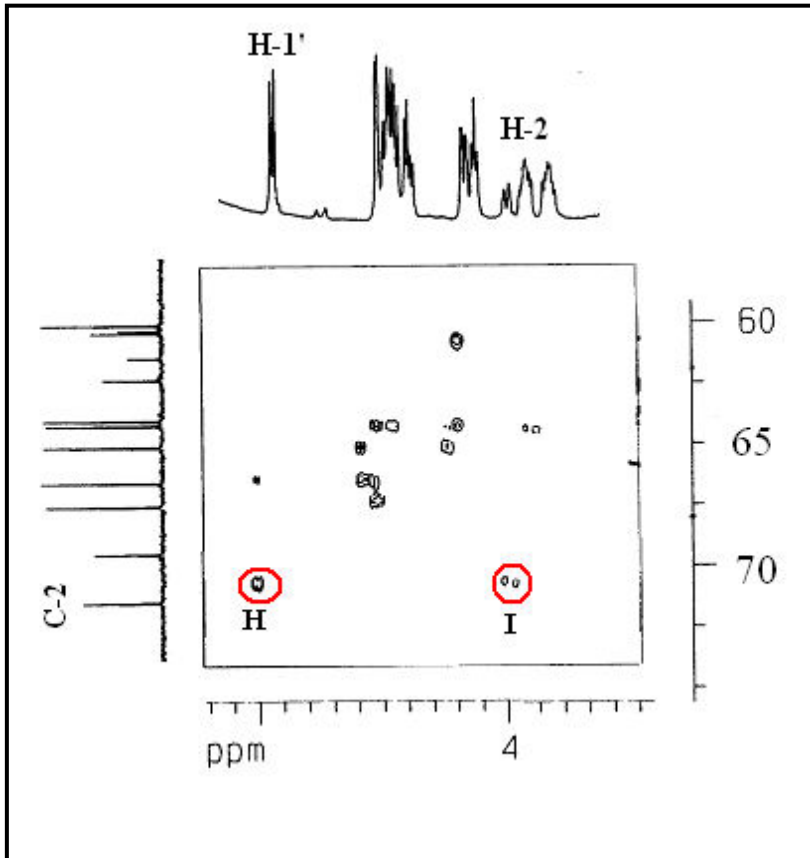
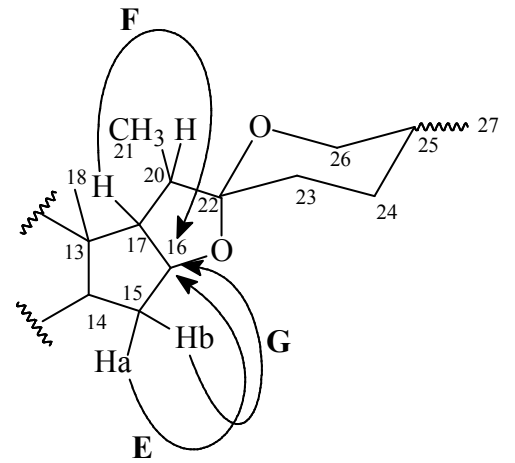
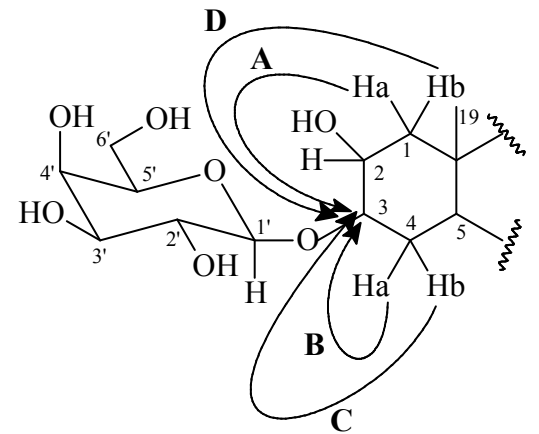
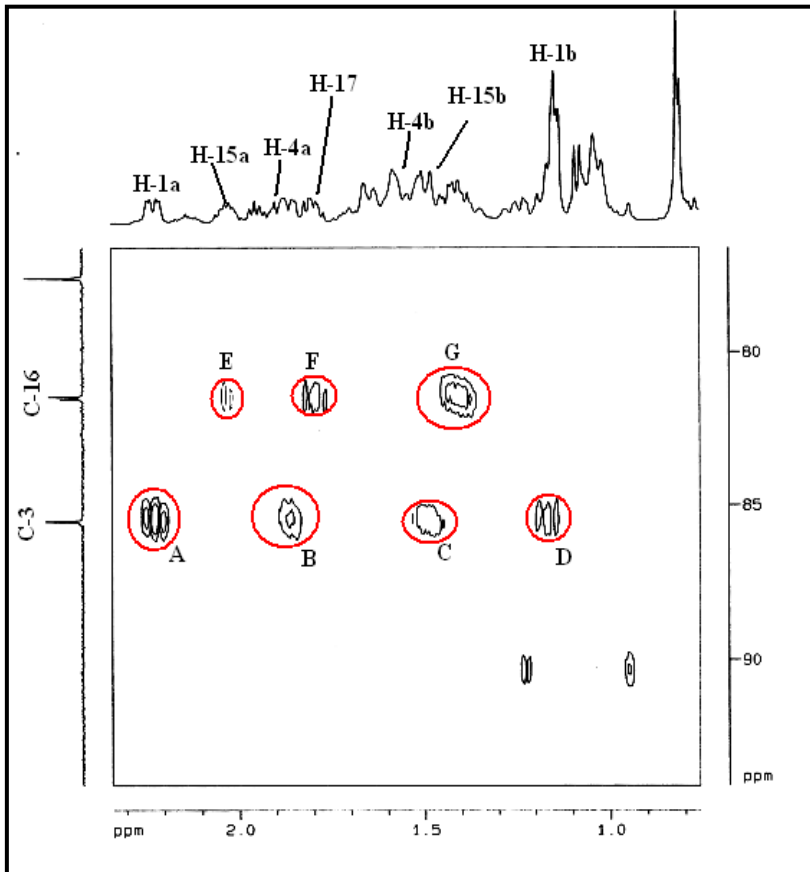


Figura 26: Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de **CL-2**

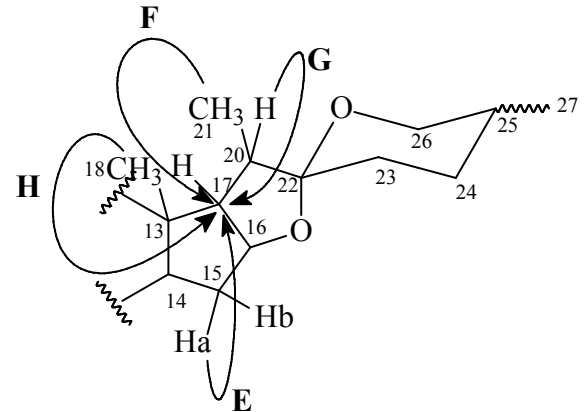
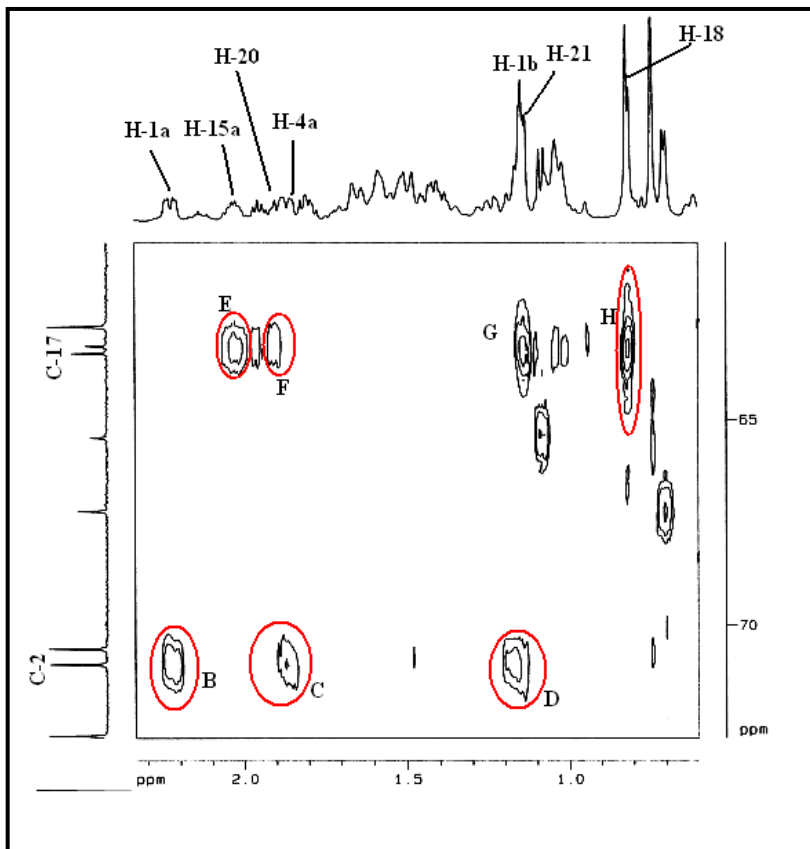
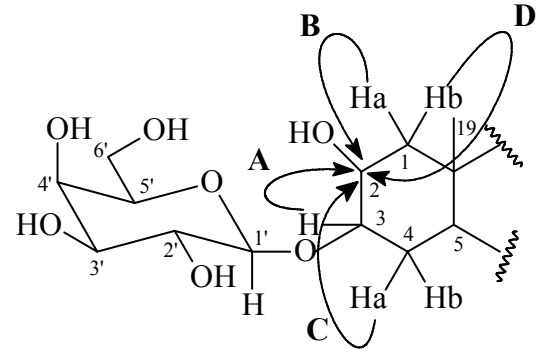
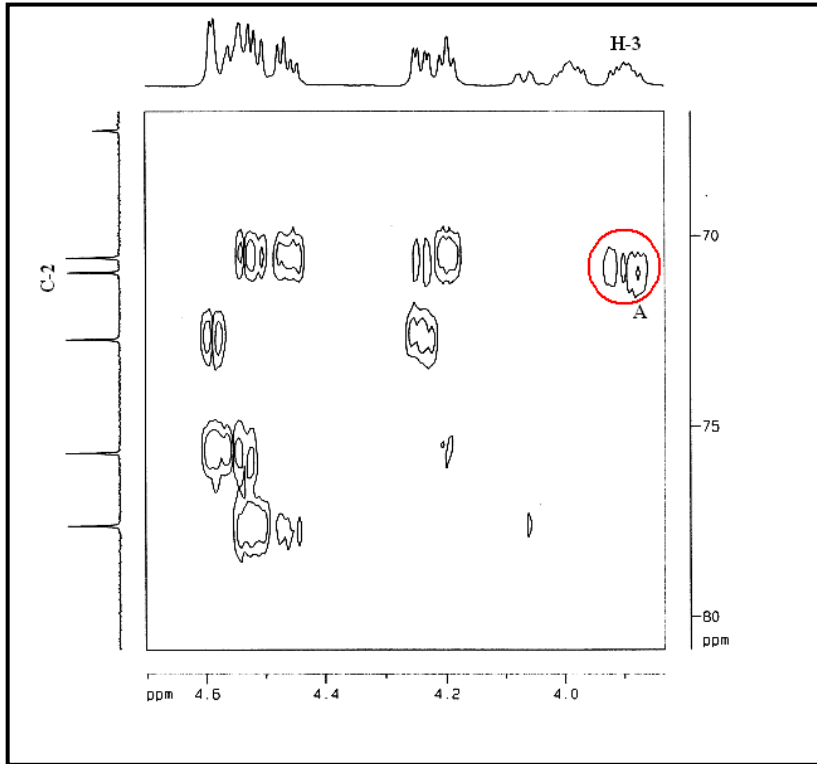


Figura 27: Expansões do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-2

4.1.3. Determinação estrutural de CL-3

O fracionamento por cromatografia de exclusão efetuada em gel de dextrana Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” da fração CLCE-dC, obtida a partir da partição do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum*, forneceu 14,0 mg de um sólido branco amorfo denominado **CL-3**.

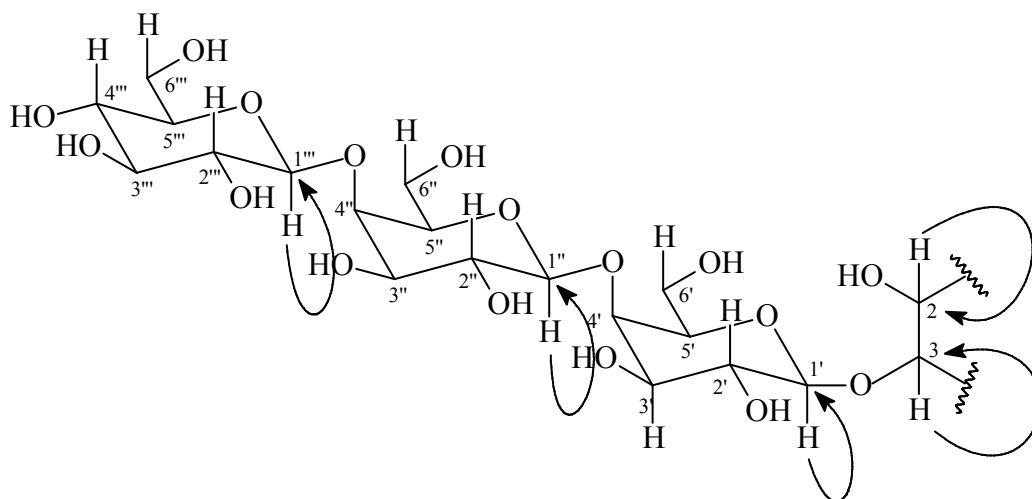
O espectro de absorção na região do IV de **CL-3** (Figura 28, p. 87), apresentou banda larga em 3405 cm^{-1} típica de estiramento O-H de hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$); absorções em 2931 e 2868 cm^{-1} características dos estiramentos assimétrico e simétrico C-H de carbono sp^3 ($\nu_{\text{C-H}}$), respectivamente; além de bandas em 1454 e 1380 cm^{-1} relativas a deformação angular de C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) e em 1159 cm^{-1} típica de estiramento C-O ($\nu_{\text{C-O}}$), respectivamente [Silverstein e Webster, 2000].

A determinação estrutural de **CL-3** baseou-se inicialmente na análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 29, p. 87). Neste espectro foram visualizados vários sinais na faixa de δ 5,71 a δ 3,36, relacionados a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Destes, os dubletos centrados em δ 5,71 (1H, $J= 7,9\text{ Hz}$, H-1’), δ 5,29 (1H, $J= 7,8\text{ Hz}$, H-1’’) e δ 4,99 (1H, $J= 6,2\text{ Hz}$, H-1’) foram caracterizados como hidrogênios anoméricos de três unidades de açúcar. Foram visualizados ainda sinais na faixa de δ 4,95 a 4,02 atribuídos aos demais hidrogênios das unidades de açúcar, além dos sinais de δ 2,23 a δ 0,60 que se mostraram idênticos àqueles observados para a estrutura da aglicona gitogenina em **CL-1** e **CL-2**.

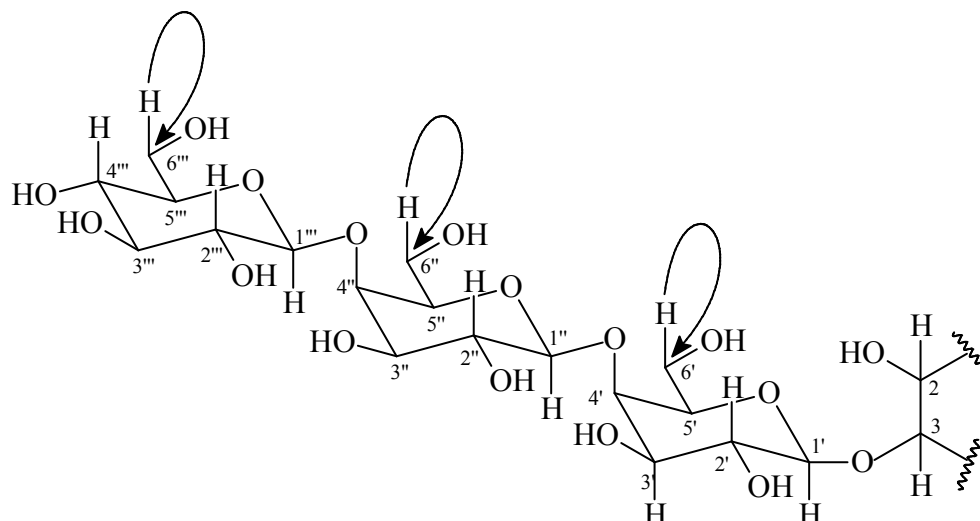
O espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) de **CL-3** (Figura 34, p. 90) mostrou-se bastante complexo e com total de aproximadamente setenta linhas espectrais, das quais se destacam os sinais em δ 110,02 (C-22); 109,55 (C-22); 107,49 (C-1’’’); 105,33 (C-1’’) e 103,79 (C-1’) relacionados a carbonos acetálicos. Apenas os três últimos em δ 103,79 (C-1’), δ 105,33 (C-1’’) e δ 107,49 (C-1’’’), apresentaram-se como mono-hidrogenados em comparação com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz) (Figura 37, p. 91), e foram atribuídos a carbonos anoméricos de três unidades de açúcar, respectivamente [Morita, 1988]. Em adição, os sinais na faixa δ 85,01 a δ 61,24 foram atribuídos a carbonos sp^3 oxigenados. Dentre estes, os cinco sinais em δ 67,19 (C-26); 65,40 (C-26); 63,67 (C-6’); 63,43 (C-6’’) e 61,24 (C-6’’’) foram relacionados a carbonos metilênicos, e os demais sinais foram relacionados a 10 carbonos metínicos, 10 metilênicos e 4 metílicos relativos à estrutura da

aglicona (Tabela 10, p. 85). A quantidade de sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C , bem como a distribuição dos carbonos por padrão de hidrogenação, corroborou a proposição de que a aglicona de **CL-3** possui esqueleto idêntico a **CL-1**, como mostra a Tabela 09 (p. 85).

A unidade glicosídica de **CL-3** foi caracterizada através da observação de alguns sinais característicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -BB, além das associações observadas no diagrama de contorno do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear direta (^1H , ^{13}C – HSQC) (Figura 42 e p. 94). Neste espectro, foram mostradas as correlações do carbono em δ 70,48 (C-2) com o sinal do hidrogênio em δ 3,96 (H-2), e do outro carbono carbinólico em δ 84,72 (C-3) com o hidrogênio em δ 3,86 (H-3). As importantes conectividades dos carbonos anoméricos aos seus respectivos hidrogênios, através das correlações do carbono em δ 103,79 (C-1') com o hidrogênio em δ 4,99 (H-1'); a correlação do carbono em δ 105,33 (C-1'') com o hidrogênio em 5,71 (H-1''); e do carbono em δ 107,49 (C-1''') com o hidrogênio em δ 5,29 (H-1'''), confirmaram a sugestão da estrutura de uma saponina esteroidal para **CL-3**.

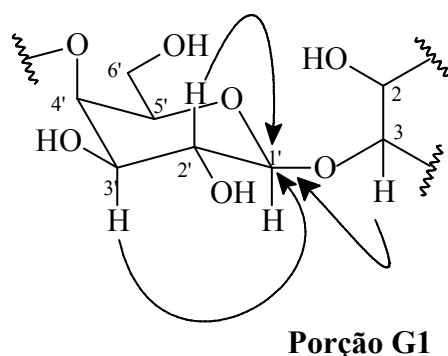


A associação dos hidrogênios em δ 4,62 e 4,22 (H-6''); δ 4,68 e 4,30 (H-6'''); δ 4,55 e 4,22 (H-6') com os carbonos em δ 63,43 (C-6''); 61,24 (C-6'''); 63,67 (C-6'), respectivamente, corroboraram com a presença dos grupamentos metilênicos das três unidades glicosídicas.



Diante dos valores obtidos, e a posterior comparação com dados de RMN ^{13}C de carbonos anoméricos de carboidratos descritos na literatura, foi possível atribuir para estrutura de **CL-3** a presença de duas unidades de galactose (G1 e G2) (δ 103,79; C-1' e δ 105,33; C-1'') e uma unidade de glicose (G3) (δ 107,49; C-1''') [Breitmaier, 1973].

A análise detalhada no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (^1H , ^{13}C – HMBC) (Figura 44, p. 96) foi imprescindível para a determinação do padrão de substituição das ligações interglicosídicas, e a posição relativa da porção glicosídica na aglicona. A partir desta análise, foi possível observar a correlação entre os hidrogênios em δ 4,48 (H-2'), δ 4,28 (H-3') e 3,86 (H-3) com o carbono anomérico em δ 103,79 (C-1'), o que determinou definitivamente a posição de substituição da unidade de galactose (G1) no carbono C-3 da aglicona. (Figura 45, p. 97).

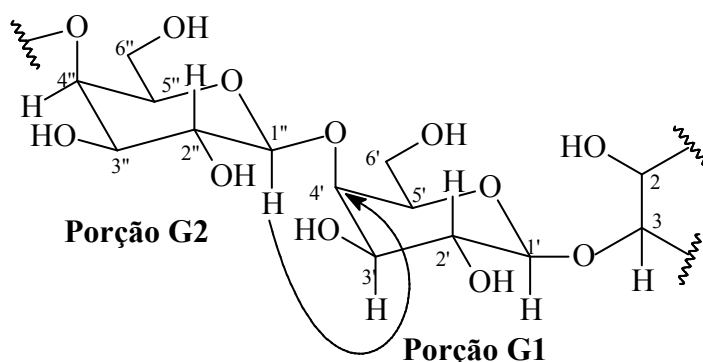


Esta sugestão pode ser confirmada através da comparação dos dados de RMN ^{13}C da unidade glicosídica de **CL-2** com aqueles descritos para **CL-3**, segundo a tabela abaixo (Tabela 07, p. 82):

Tabela 07– Dados de RMN ^{13}C da porção G1 de **CL-3** em comparação com dados de RMN ^{13}C do açúcar de **CL-2** isolado anteriormente.

	CL-2 (piridina)	G1 de CL-3 (piridina)
Galactose	δ_{C}	δ_{C}
1'	104,50	103,79
2'	72,44	73,15
3'	75,41	75,01
4'	70,30	80,49
5'	77,33	76,01
6'	62,43	63,67

Estes dados foram conclusivos também para a sugestão de que a posição C-4' da unidade (G1) encontra-se substituída, uma vez que o valor do deslocamento químico deste carbono (δ 80,49) encontra-se deslocado para ambiente desprotegido em aproximadamente 10,0 ppm em relação a **CL-2** (δ 70,30) (Tabela 07, p. 82). Esta sugestão é evidenciada pela observação da correlação à longa distância do outro hidrogênio anomérico da segunda unidade de galactose em δ 5,71 (H-1'') com este carbono, o que permitiu definir a seqüência estrutural galactose(1→4)galactose-*O*-aglicona.



A ligação interglicosídica entre a galactose (G2) e a unidade de glicose (G3) foi confirmada através de análise comparativa do deslocamento químico dos átomos de carbono das unidades (G1) e (G2) de **CL-3** com o dissacarídeo lactose (galactose(1→4)glicose) [Breitmaier, 1973] (Tabela 08, p. 83). Nesta análise foi observado que o deslocamento

químico do carbono C-4'' (δ 80.51) encontra-se mais uma vez deslocado para campo baixo devido ao efeito β - de desproteção, quando relacionado à molécula do açúcar não-substituído (δ 68,00), o que determinou a seqüência das ligações glicosídicas como sendo glicose(1 \rightarrow 4)galactose(1 \rightarrow 4)galactose-*O*-aglicona.

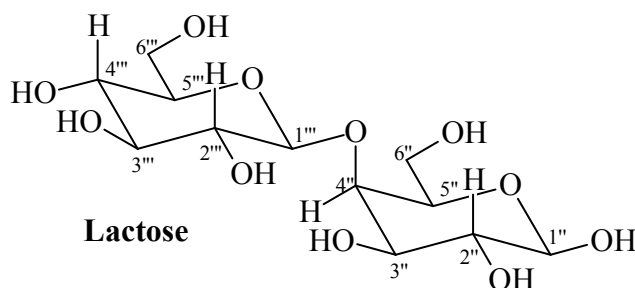
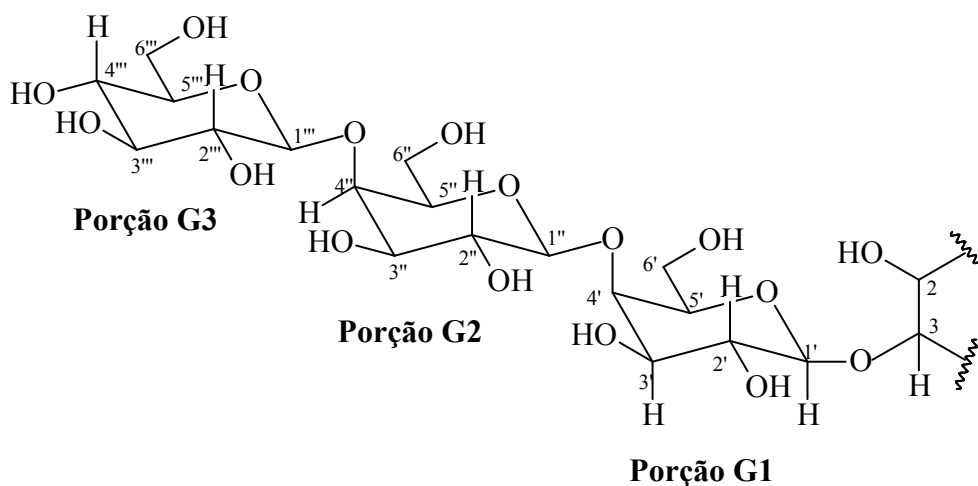
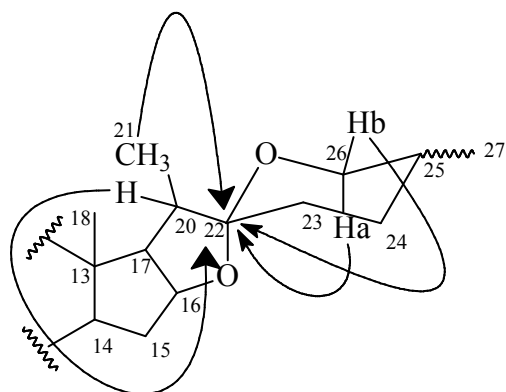


Tabela 08– Dados de RMN ^{13}C de G1 e G2 das unidades de açúcar de **CL-3** em comparação com os dados da literatura para a lactose [Breitmaier, 1973].

	Lactose (D₂O)	CL-3 (piridina)
Galactose (G2)	δ_{C}	δ_{C}
1''	96,0	105,33
2''	73,5	73,43
3''	74,0	75,23
4''	78,0	80,51
5''	74,5	75,83
6''	61,0	63,43
Glicose (G3)		
1'''	103,0	107,49
2'''	75,5	76,01
3'''	76,0	78,81
4'''	68,0	69,68
5'''	75,0	78,59
6'''	61,5	61,24



A presença do esqueleto do tipo esteroide da aglicona ficou evidente através dos acoplamentos dos hidrogênios em δ 1,14 (H-21), δ 1,95 (H-20) e δ 3,37 (H-26), com o carbono em δ 109,57 e δ 110,04 (C-22).



A conjugação de todos os dados espectroscópicos descritos, determinou para **CL-3** a estrutura de uma mistura epimérica da saponina esteroidal de esqueleto esteroide e de caráter inédito na literatura, chamada de (25*R*)-5 α -estirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil e (25*S*)-5 α -estirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil.

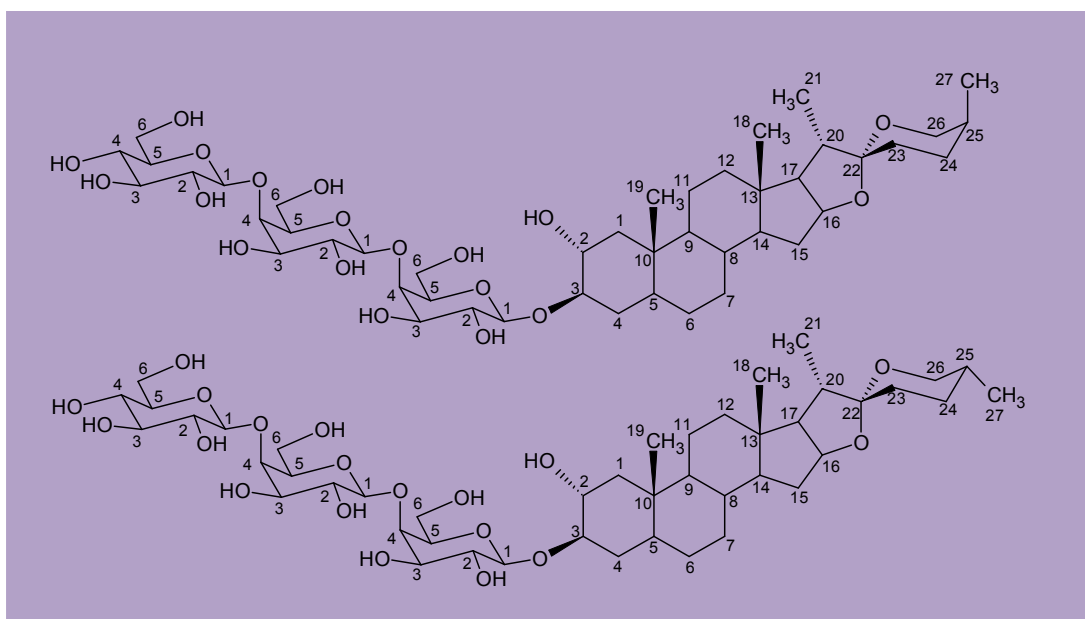


Tabela 09– Dados de RMN ^{13}C da aglicona de **CL-3** em comparação com dados de RMN ^{13}C da aglicona de **CL-1** isolado anteriormente.

	CL-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	CL-3 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)
C	δ_{C}	δ_{C}
1	46,88	46,00
2	73,44	70,48
3	85,21	84,72
4	34,24	34,33
5	45,60	44,94
6	28,70	28,41
7	32,19	32,27
8	35,04	34,61
9	54,99	54,70
10	37,93	37,18
11	21,90	21,36
12	40,53	40,09
13	41,19	41,09/41,07
14	56,78	56,63
15	32,48	32,46
16	81,59/81,52	81,45/81,52
17	63,21/62,39	63,31/63,13
18	16,67	16,69
19	14,09	13,70
20	42,36/42,84	42,03/45,50
21	15,39/15,23	15,34/15,18
22	109,60/110,06	109,55/110,02
23	32,51/26,75	31,85/26,69
24	28,71/26,56	29,58/26,51
25	30,98	30,65/27,81
26	67,23/65,44	67,19/65,40
27	17,69/17,01	17,69/16,61

Tabela 10– Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de **CL-3**

	^{13}C -BB	HSQC	HMBC	
#C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
10	37,18		2H-1; 3H-19	H-4 ^a
13	41,09/41,07	-	3H-18; H-17	H-16; H-15 ^a
22	109,55/110,02	-		3H-21; H-17; H-26b
CH				
2	70,48	3,96 (m)	H-3; 2H-1	H-4 ^a
3	84,72	3,86 (m)	H-2; 2H-4	2H-1
5	44,94	1,05	2H-4	H-1a; 3H-19

Determinação Estrutural

8	34,61	1,40		
9	54,70	0,62 (tl)		2H-1; 3H-19
14	56,63	1,05	H-8	3H-18
16	81,45/81,52	4,60/4,50	2H-15; H-17	
17	63,31/63,13	1,80	H-20	3H-18; 3H-21; H-15a
20	42,03/45,50	1,95/1,90		
25	30,65/27,81	1,60/1,60	2H-26; 3H-27	
CH₂				
1	46,00	2,21 (dl, $J=12,1$ Hz) / 1.15		
4	34,33	1,85/1,45		
6	28,41	1,15/1,03		
7	32,27	1,53/0,80		
11	21,36	1,50/1,34		
12	40,09	1,65/1,05		3H-18
15	32,46	2,05/1,40		
23	31,85/26,69	1,70/1,38		
24	29,58/26,51	1,58/1,45		H-26b
26	67,19/65,40	3,59 (dl, $J=10,7$ Hz)/3,58 (t, $J=10,7$ Hz)/4,02 /3,37 ($J=10,8$ Hz)		3H-27; 3H-27
CH₃				
18	16,69	0,82 (s)/0,81 (s)		H-17
19	13,70	0,72 (s)		
21	15,34/15,18	1,14 (d)/1,13 (d)		H-17
27	17,69/16,61	0,70 (d, $J=5,3$ Hz)/1,09 (d, $J=6,8$ Hz)		2H-26
Açúcar				
1'	103,79	4,99 (d, $J=6,2$ Hz)/4,93 (d, $J=6,5$)	H-2'	H-3'; H-3
2'	73,15	4,48 (d)		
3'	75,01	4,28	H-4'; H-2'	
4'	80,49	4,71		H-1''; 2H-6'
5'	76,01	4,12		
6'	63,67	4,55/4,22		
1''	105,33	5,71 (d, $J=7,9$ Hz)	H-2''	H-4''
2''	73,43	4,10		
3''	75,23	4,28	H-4''	
4''	80,51	4,65		H-1'''; 2H-6''; H-2''
5''	75,83	4,10		
6''	63,43	4,62/4,22		
1'''	107,49	5,29 (d, $J=7,8$ Hz)	H-2'''	H-4'''
2'''	76,01	4,28		
3'''	78,81	4,25		
4'''	69,68	4,12		
5'''	78,59	4,03		
6'''	61,24	4,68/4,30		

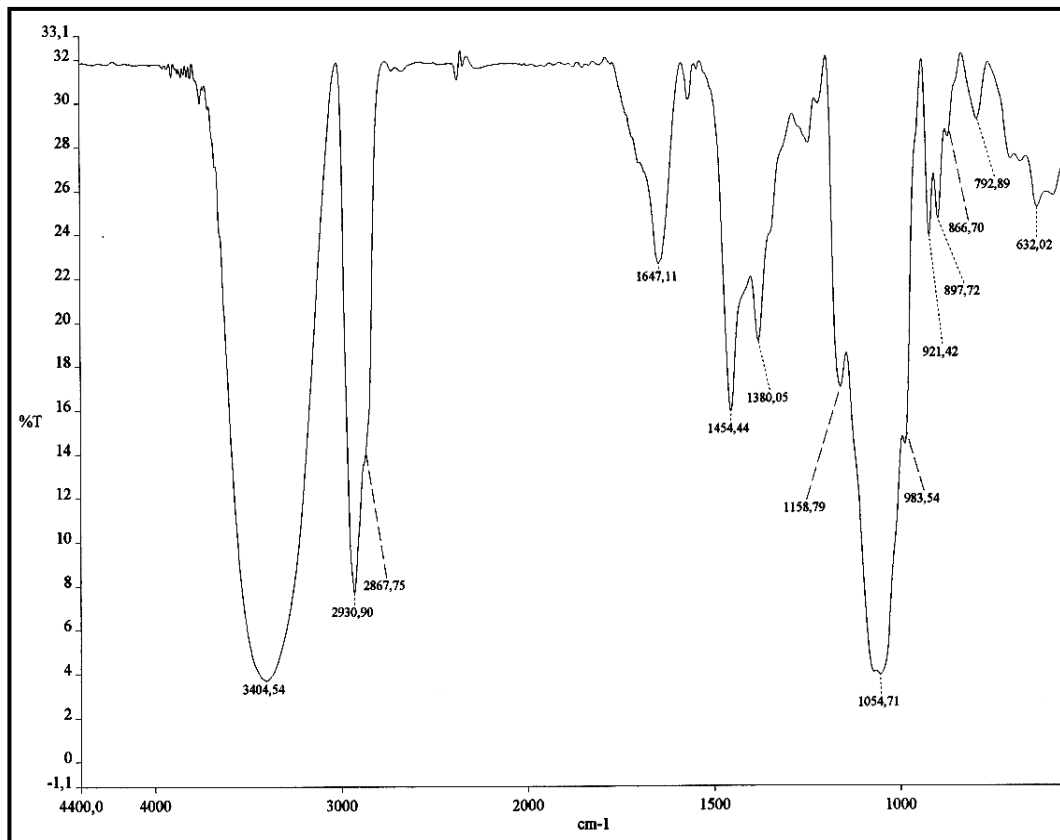


Figura 28: Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-3

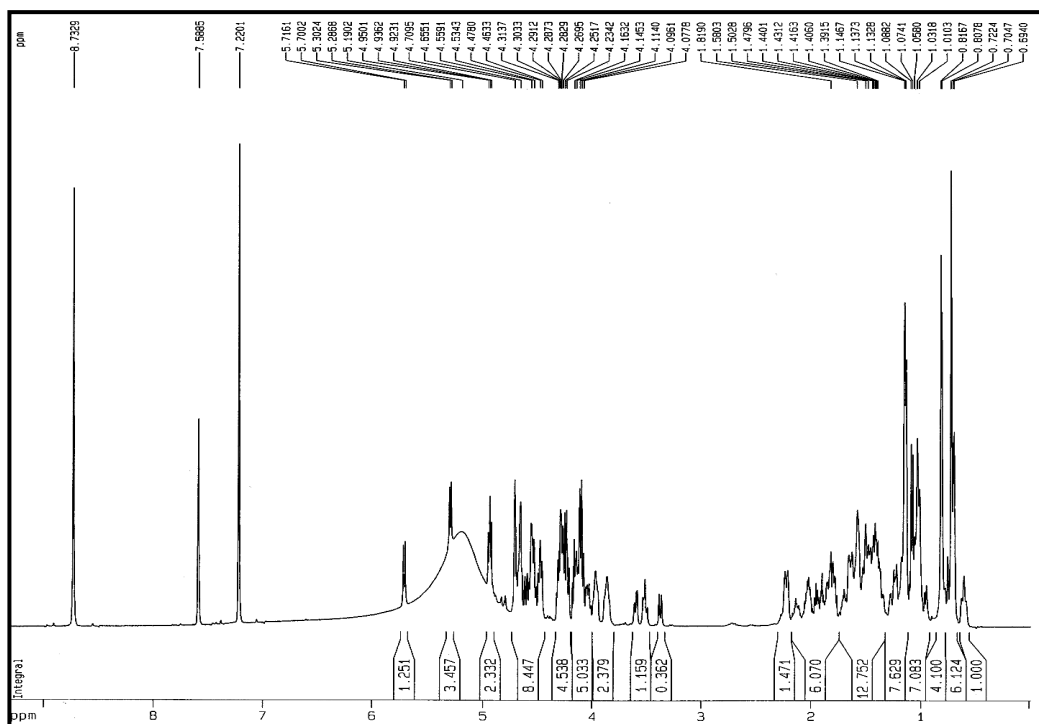


Figura 29: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

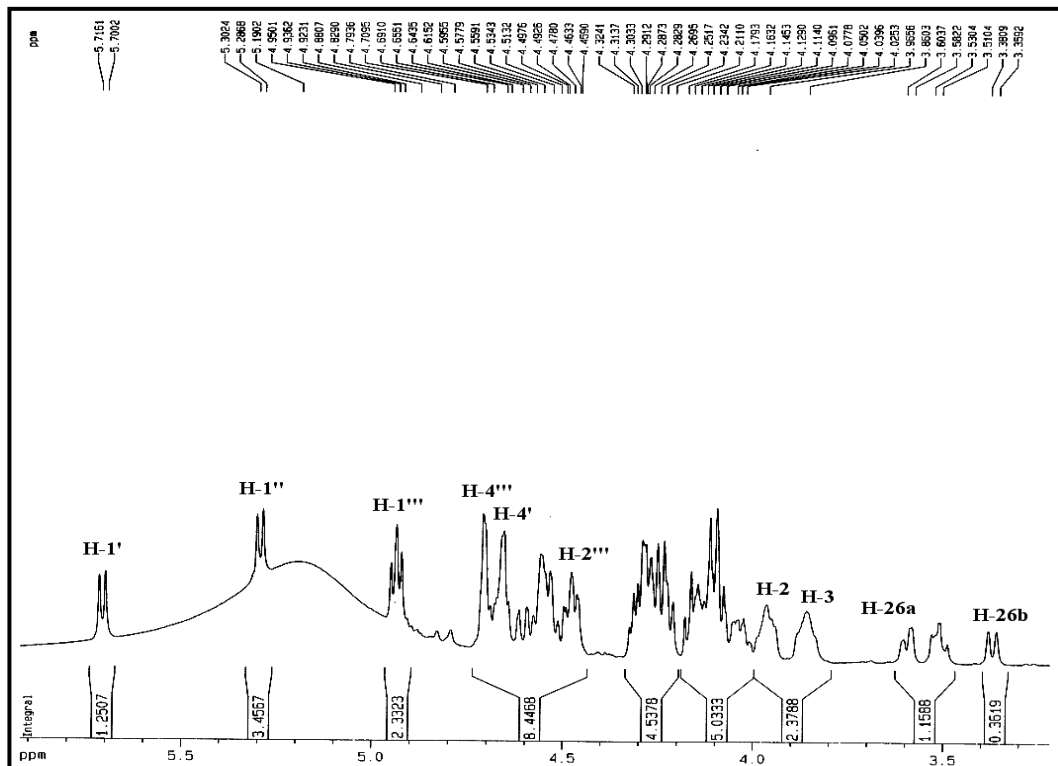


Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

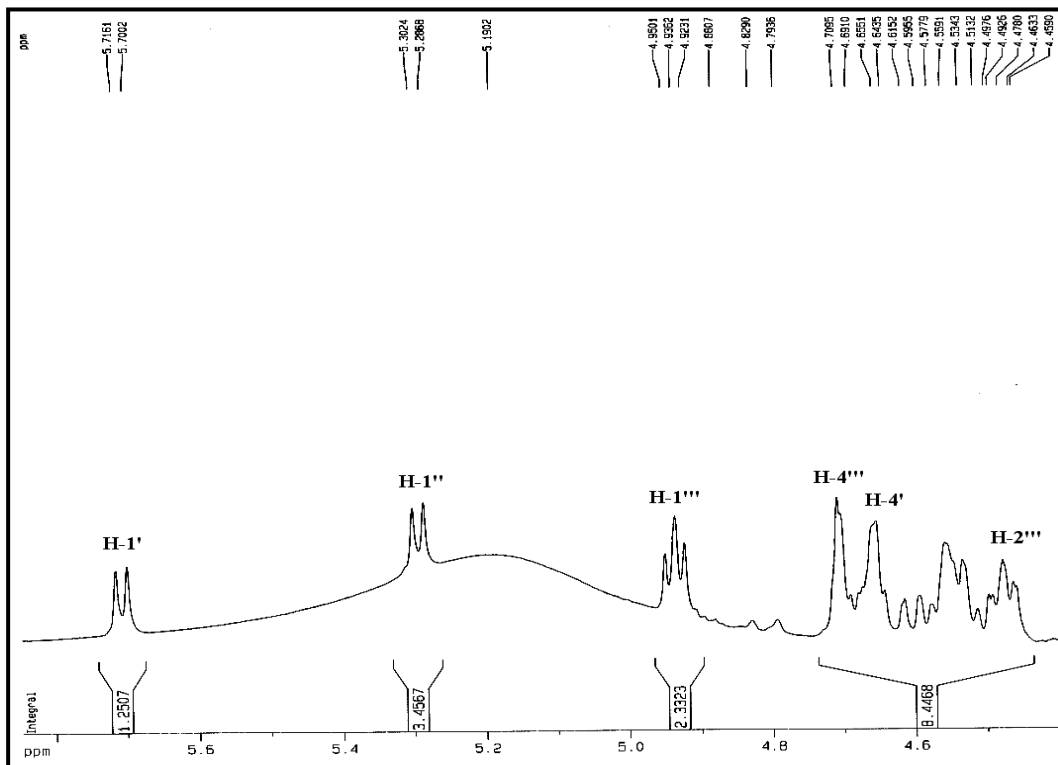


Figura 31: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

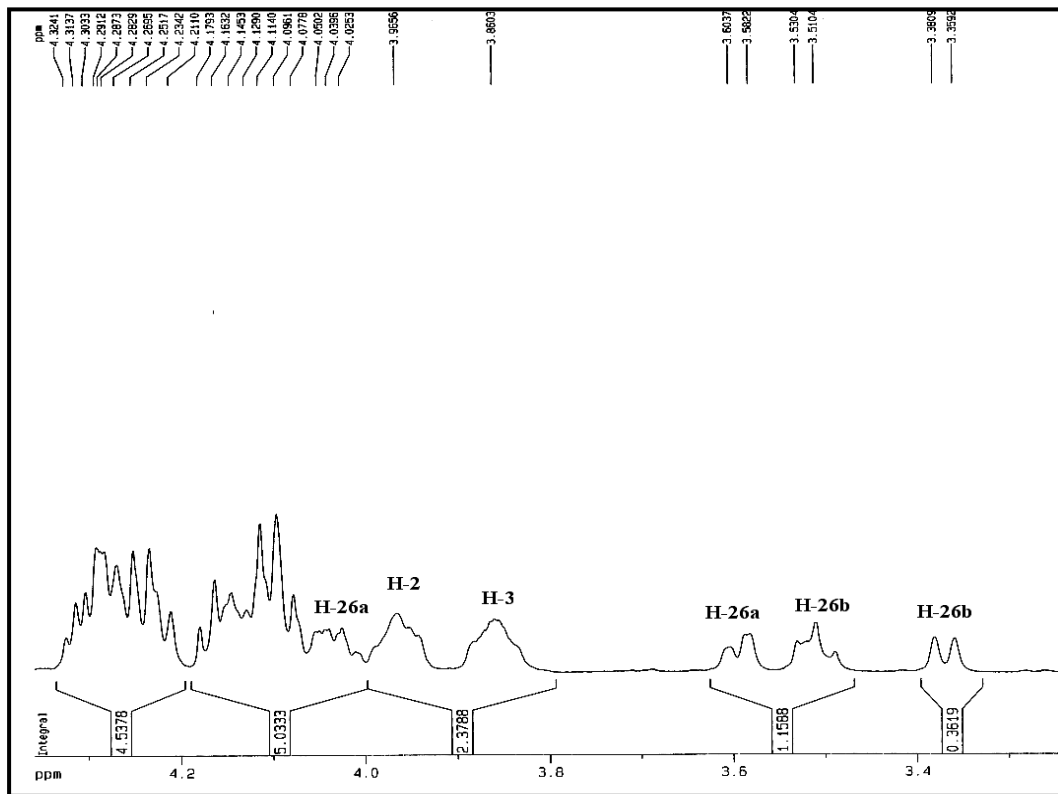


Figura 32: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

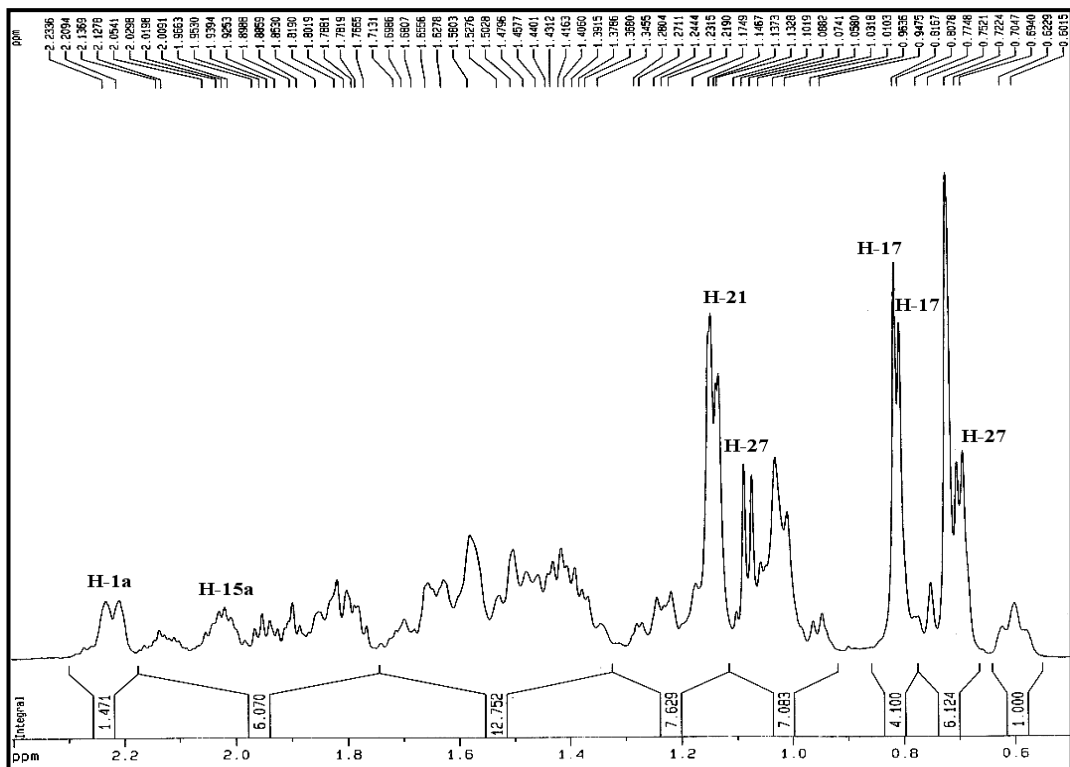


Figura 33: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

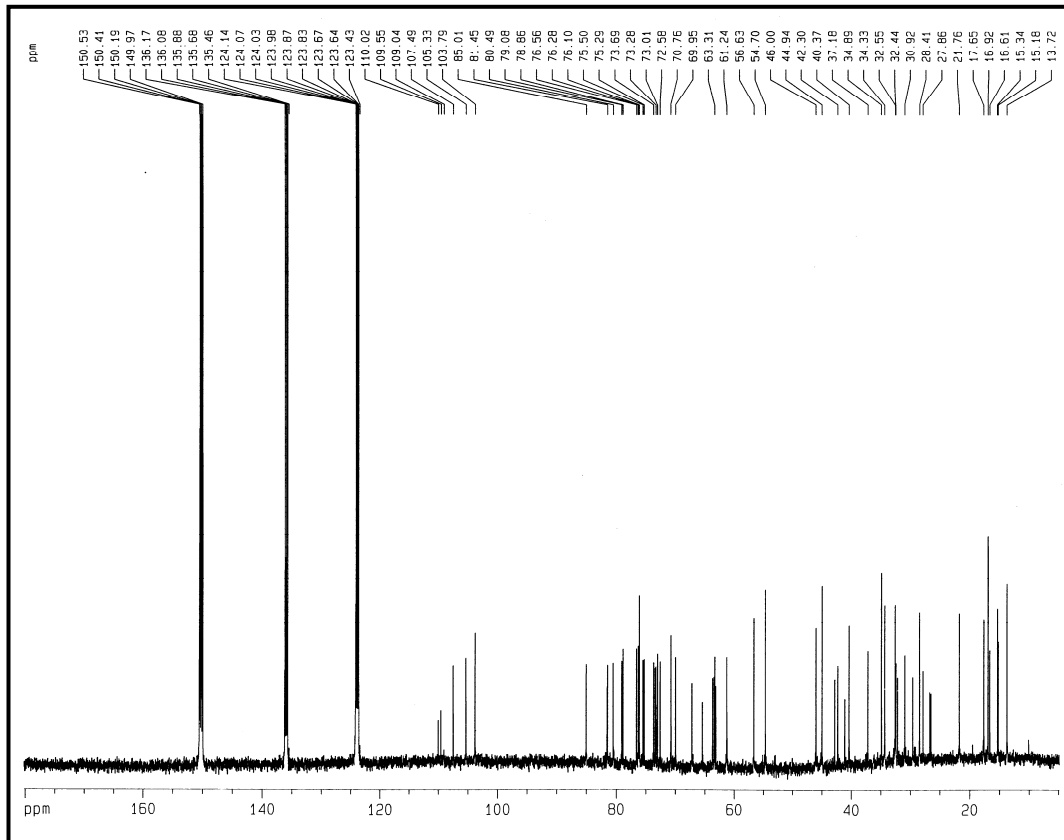


Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

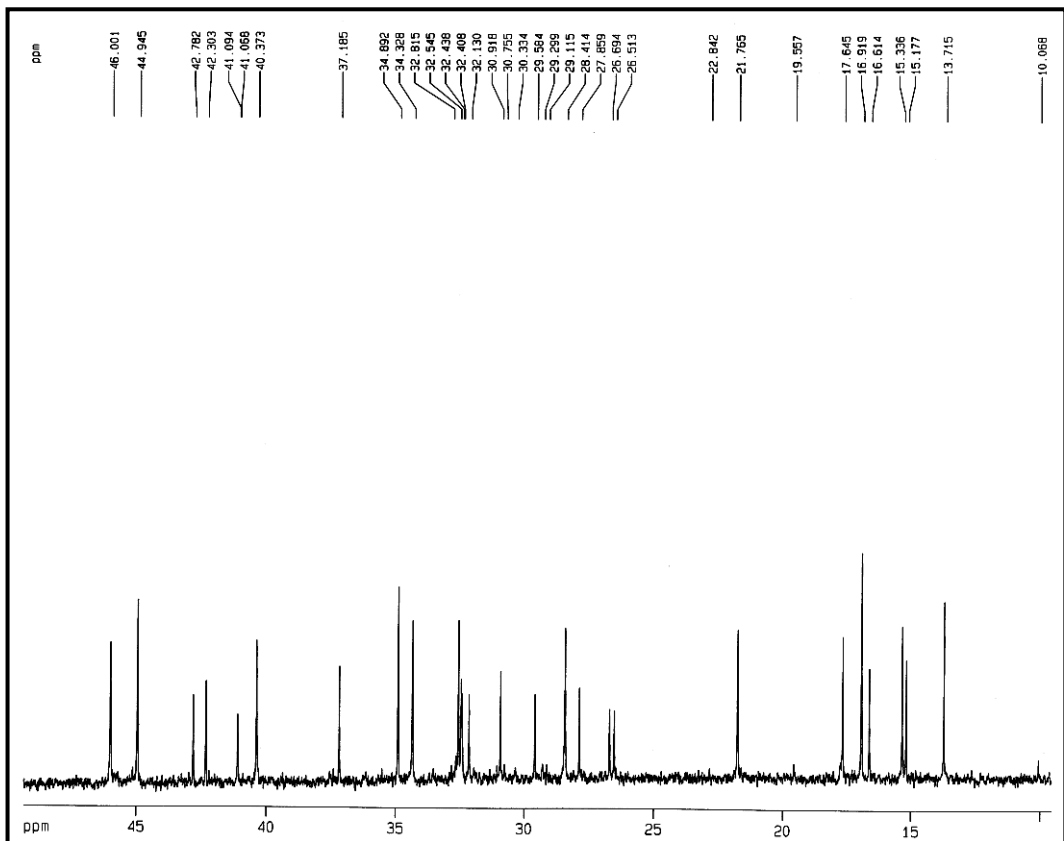


Figura 35: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

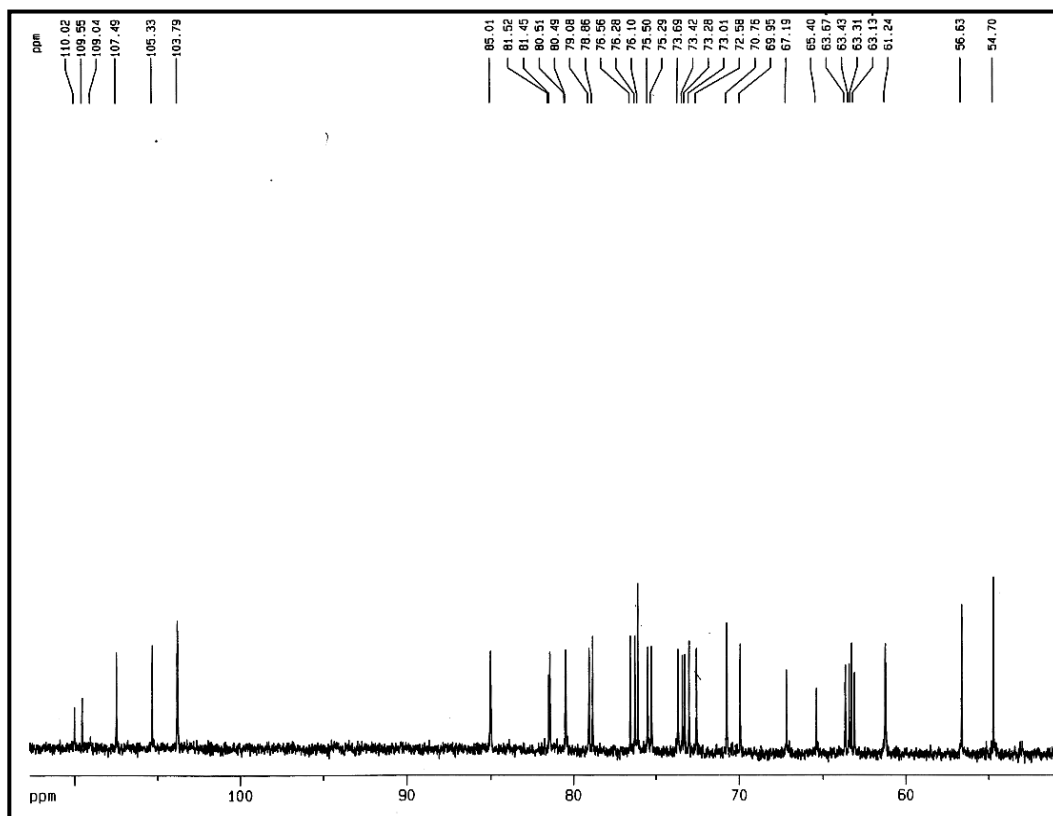


Figura 36: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

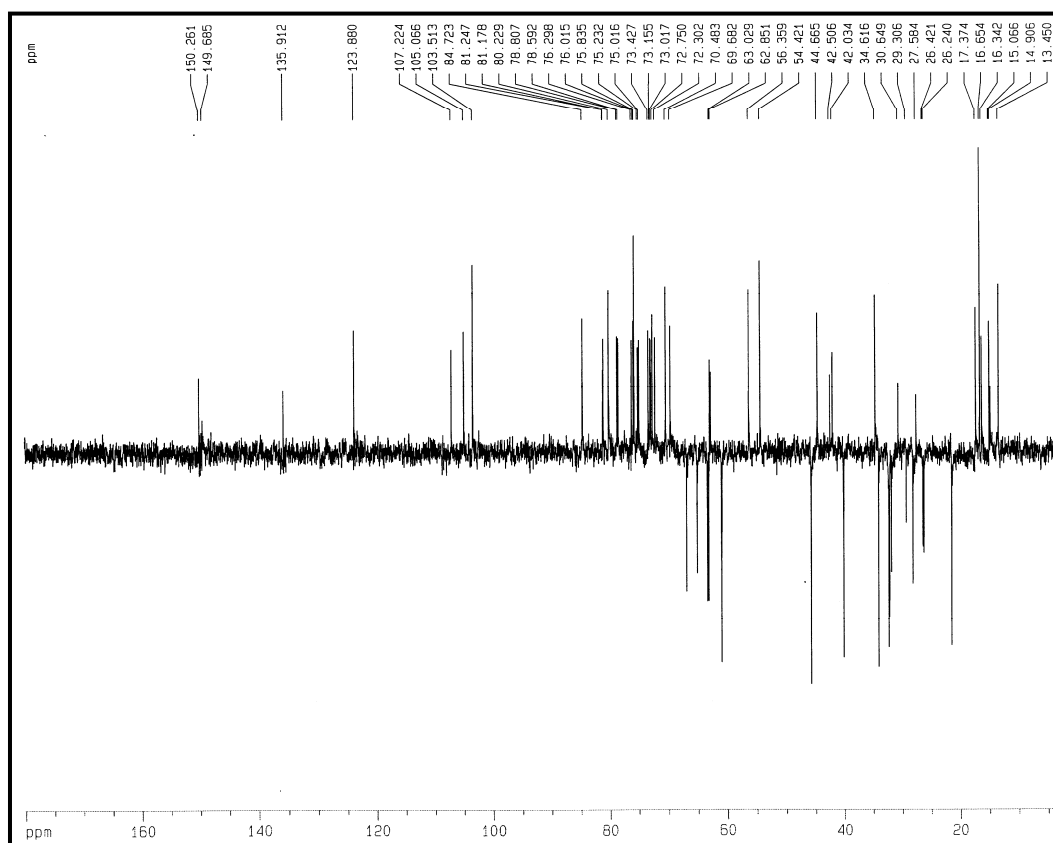


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

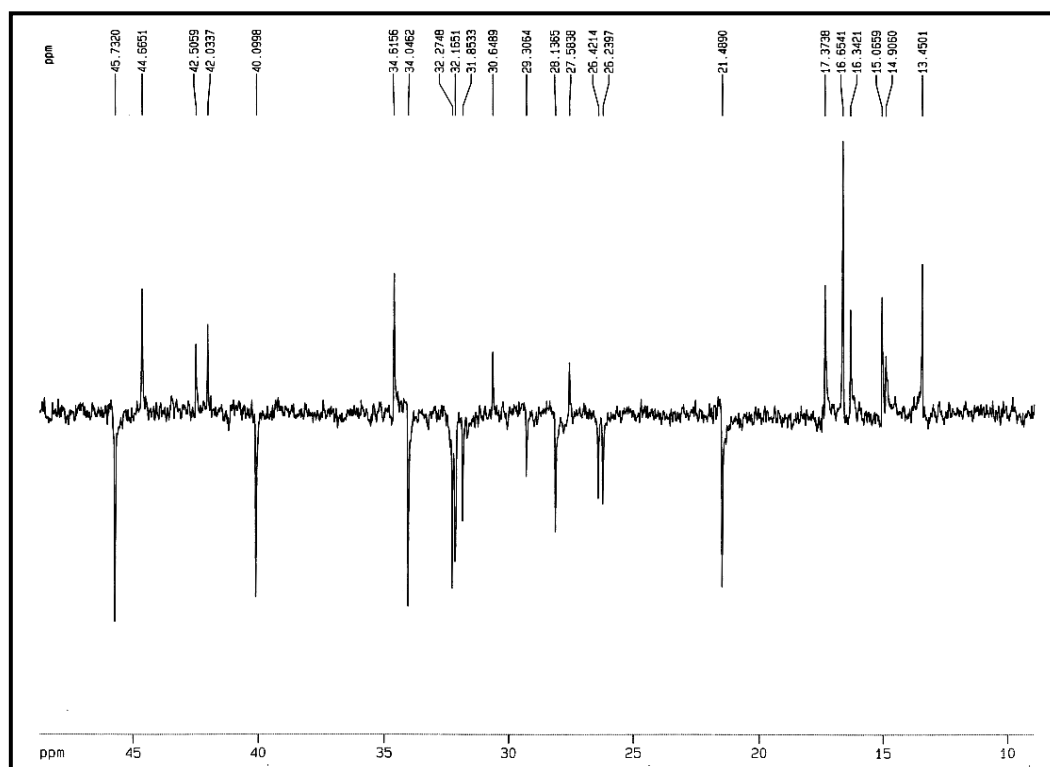


Figura 38: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

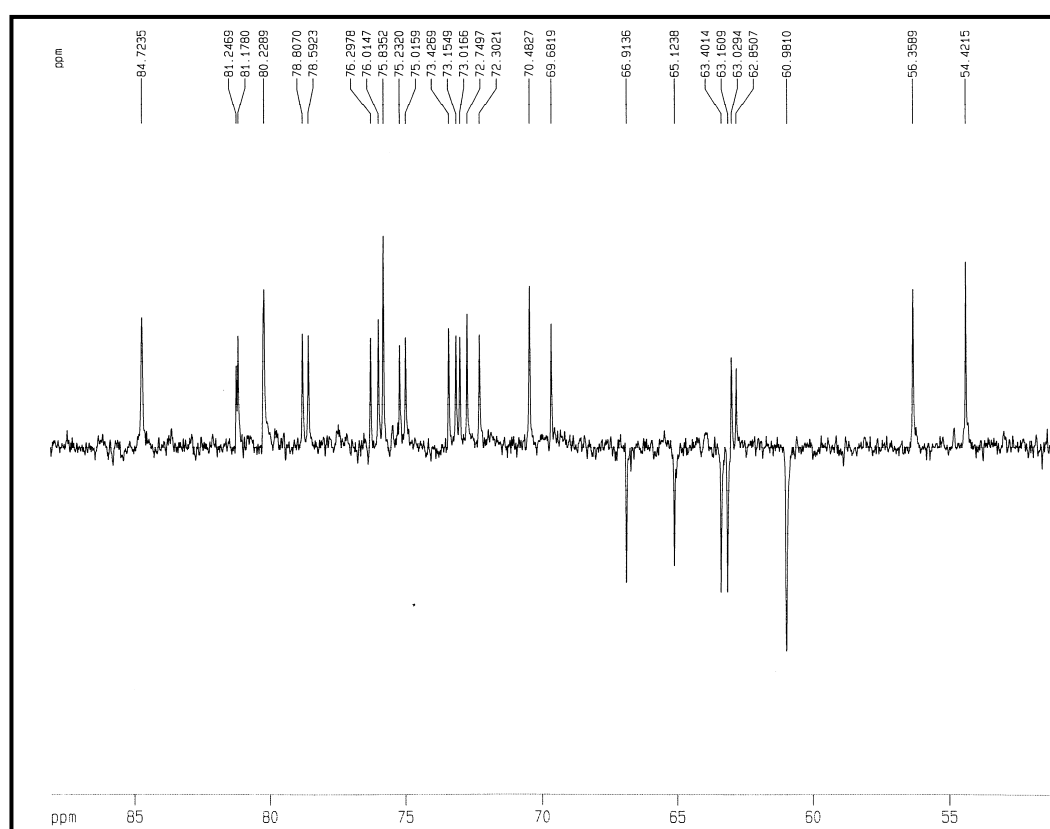


Figura 39: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

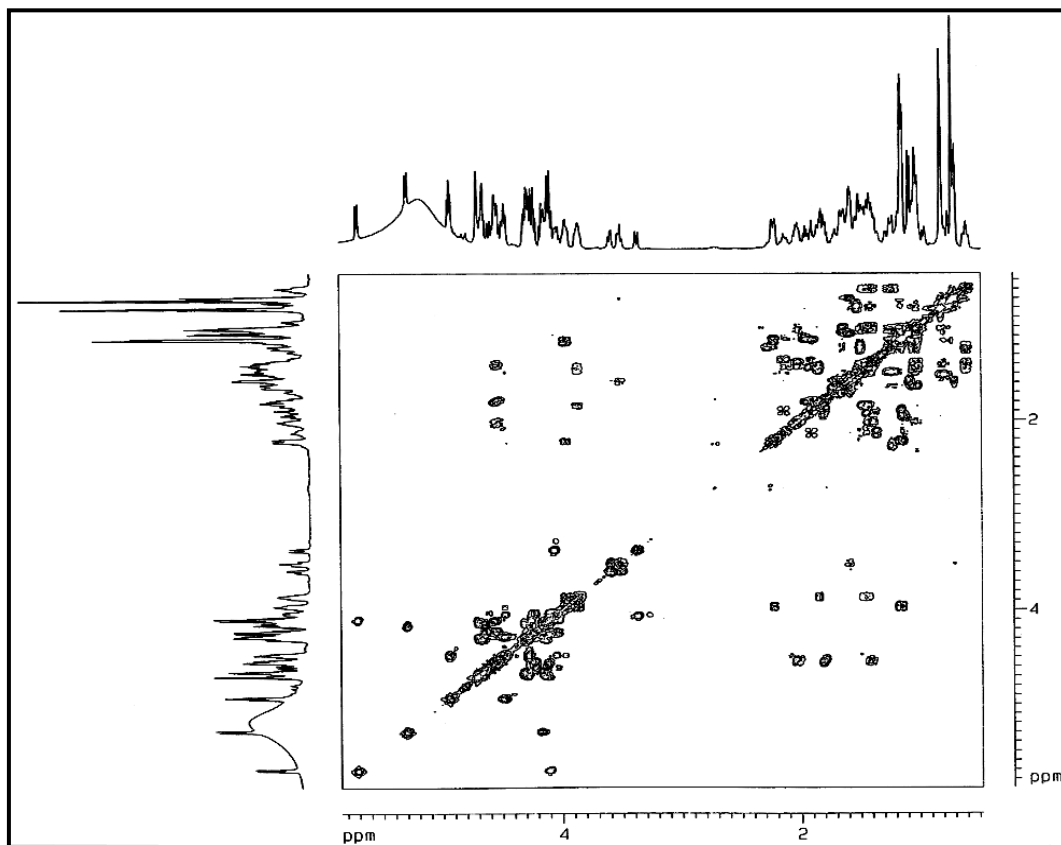


Figura 40: Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

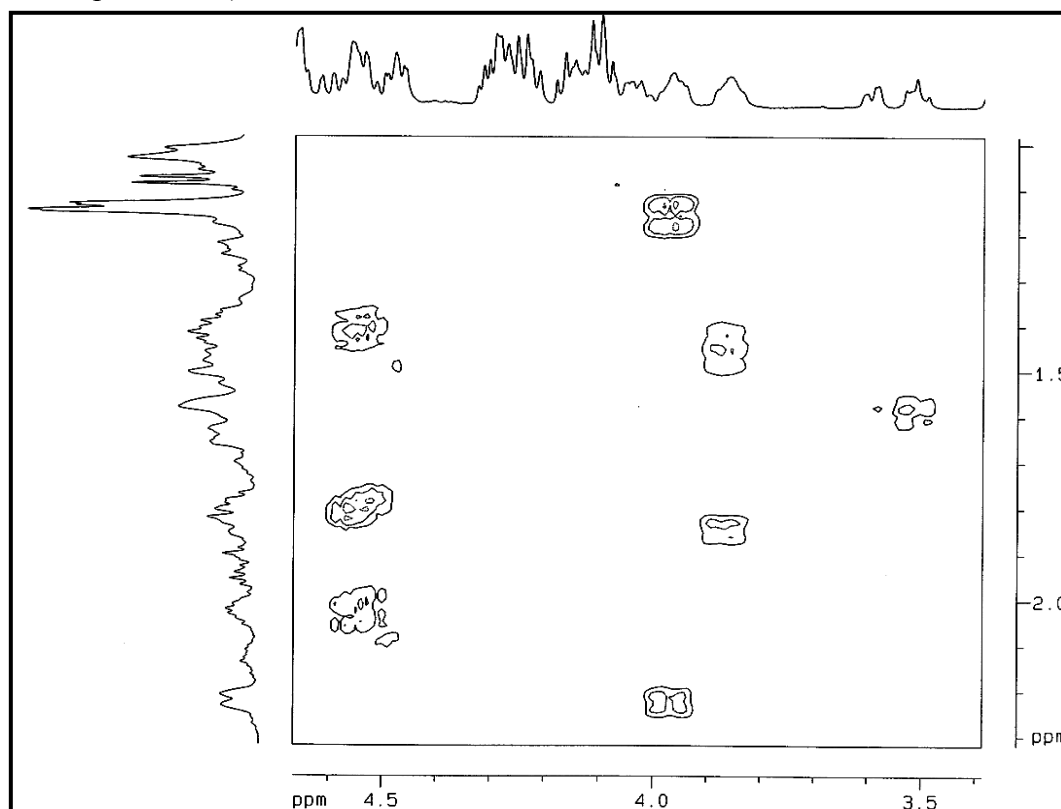


Figura 41: Expansão do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de CL-3

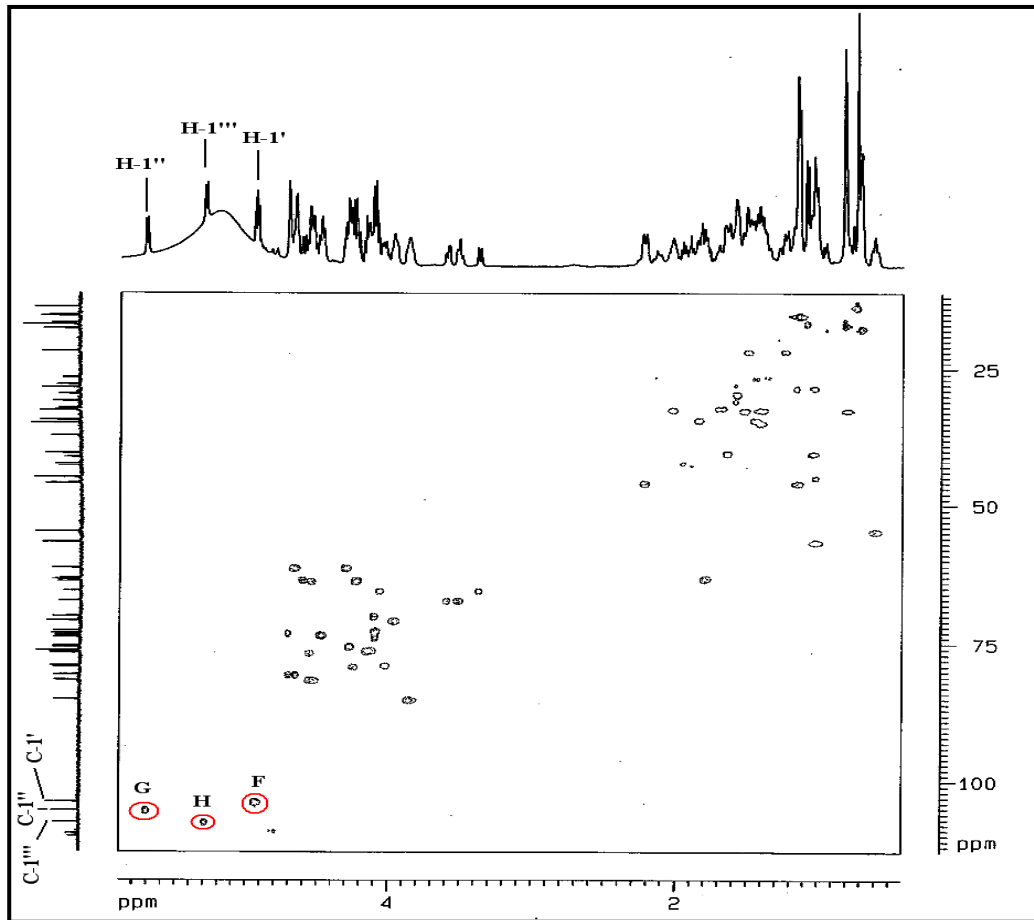
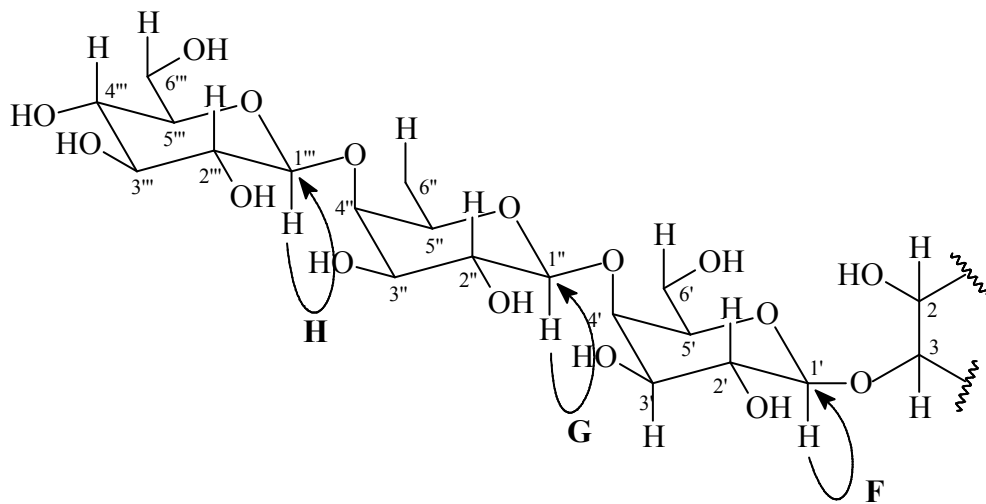


Figura 42: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-3



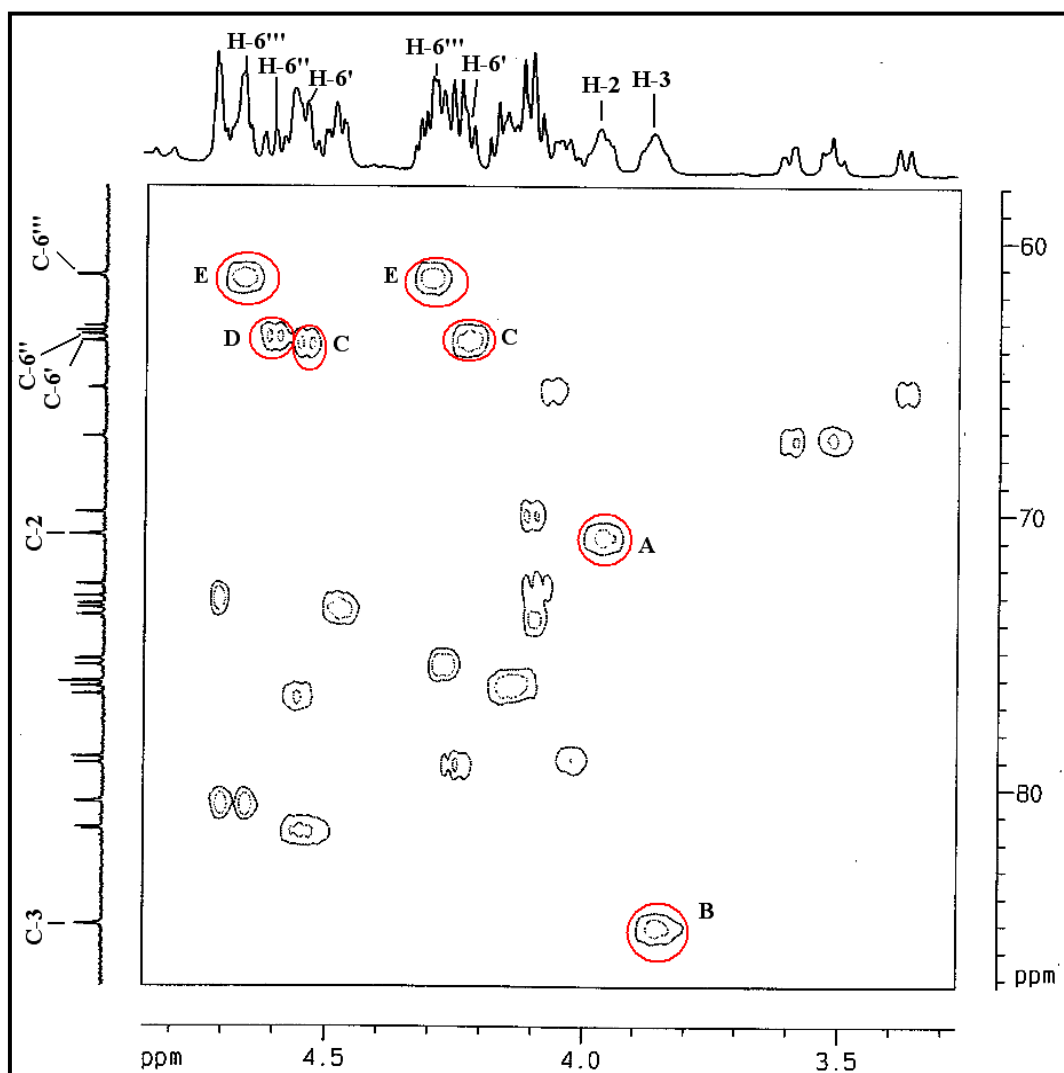
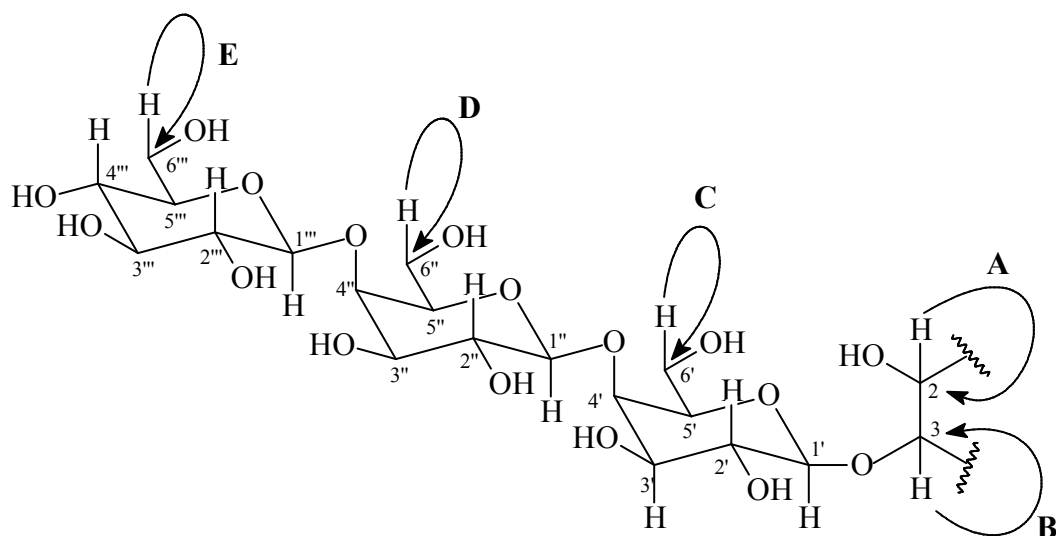


Figura 43: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de **CL-3**



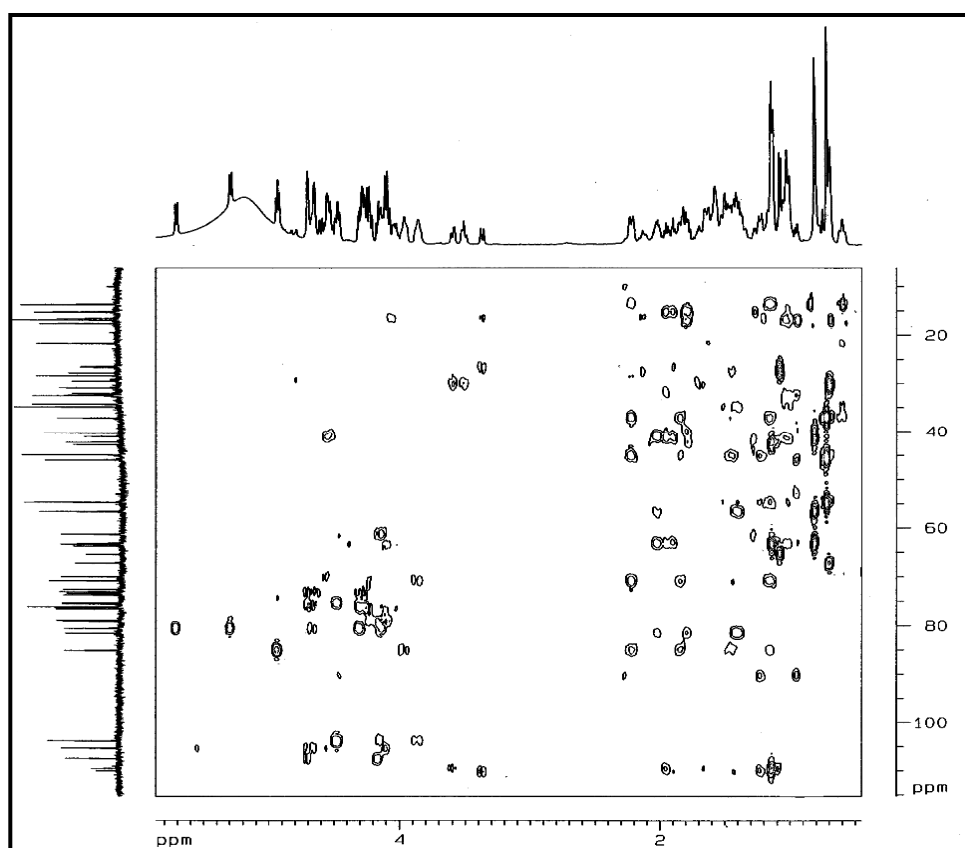


Figura 44: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de **CL-3**

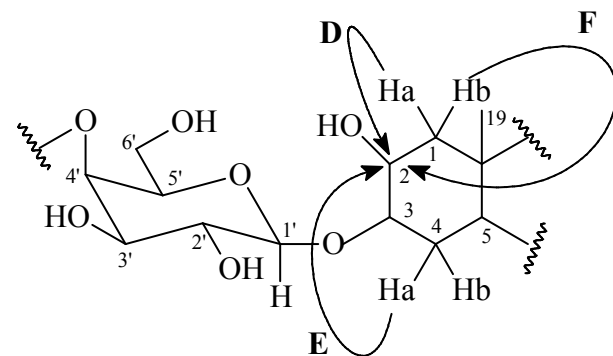
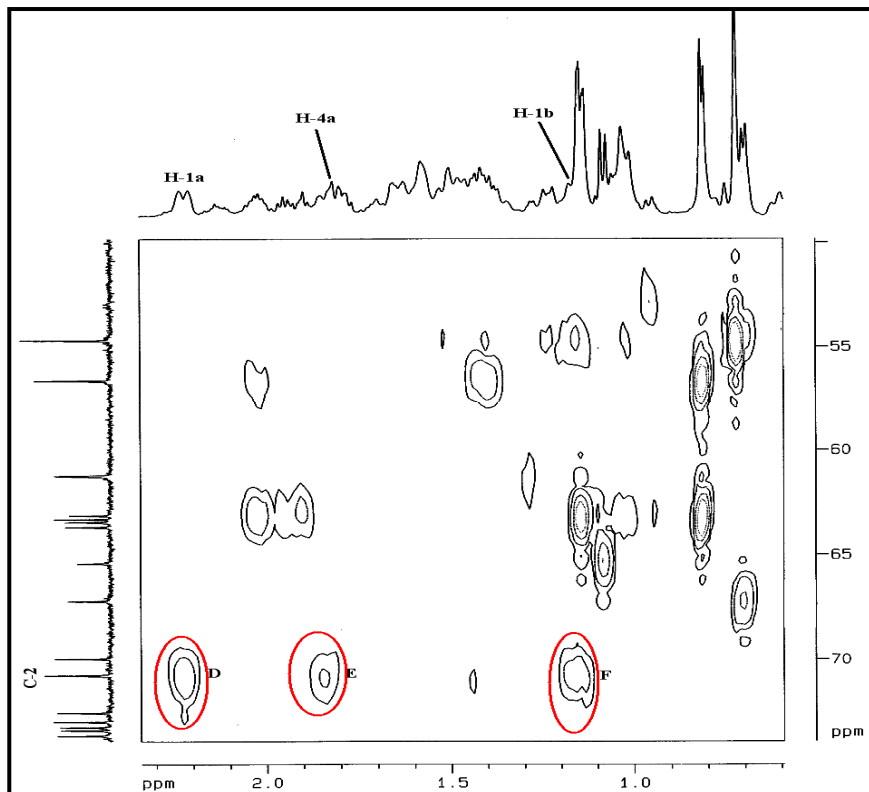
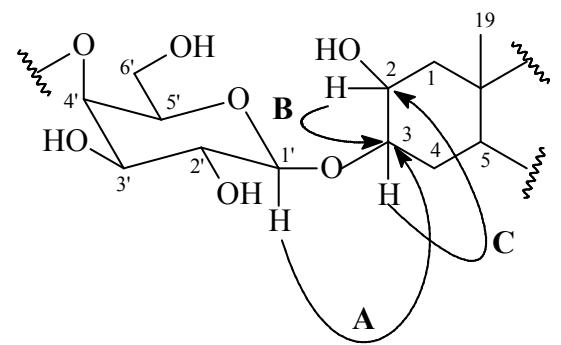
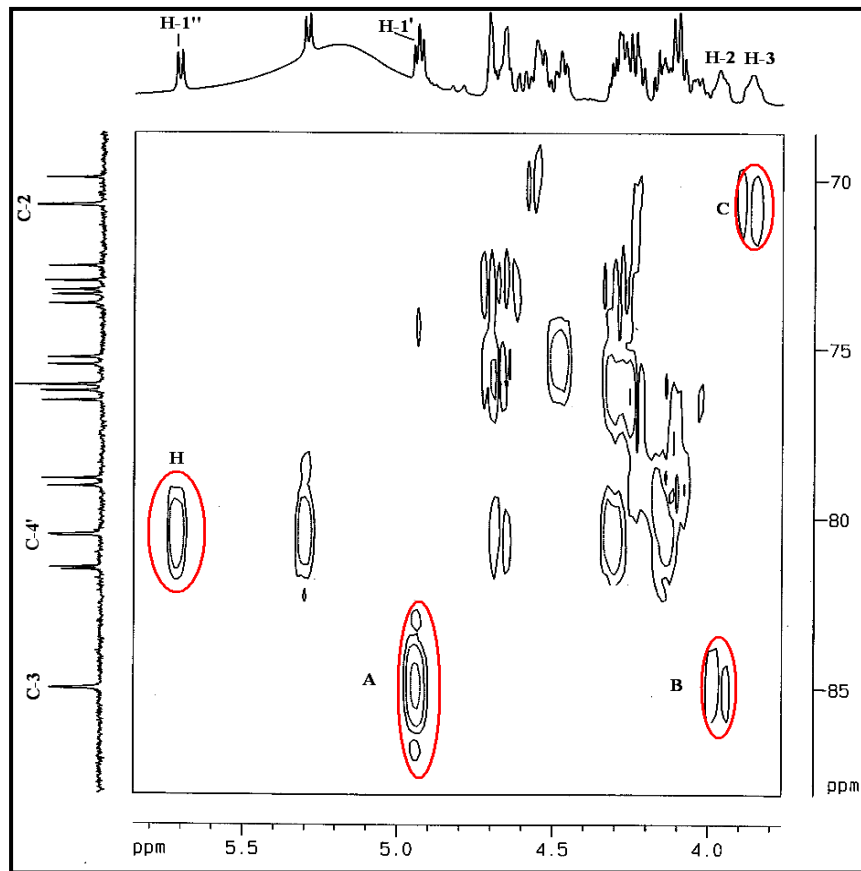


Figura 46: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-3

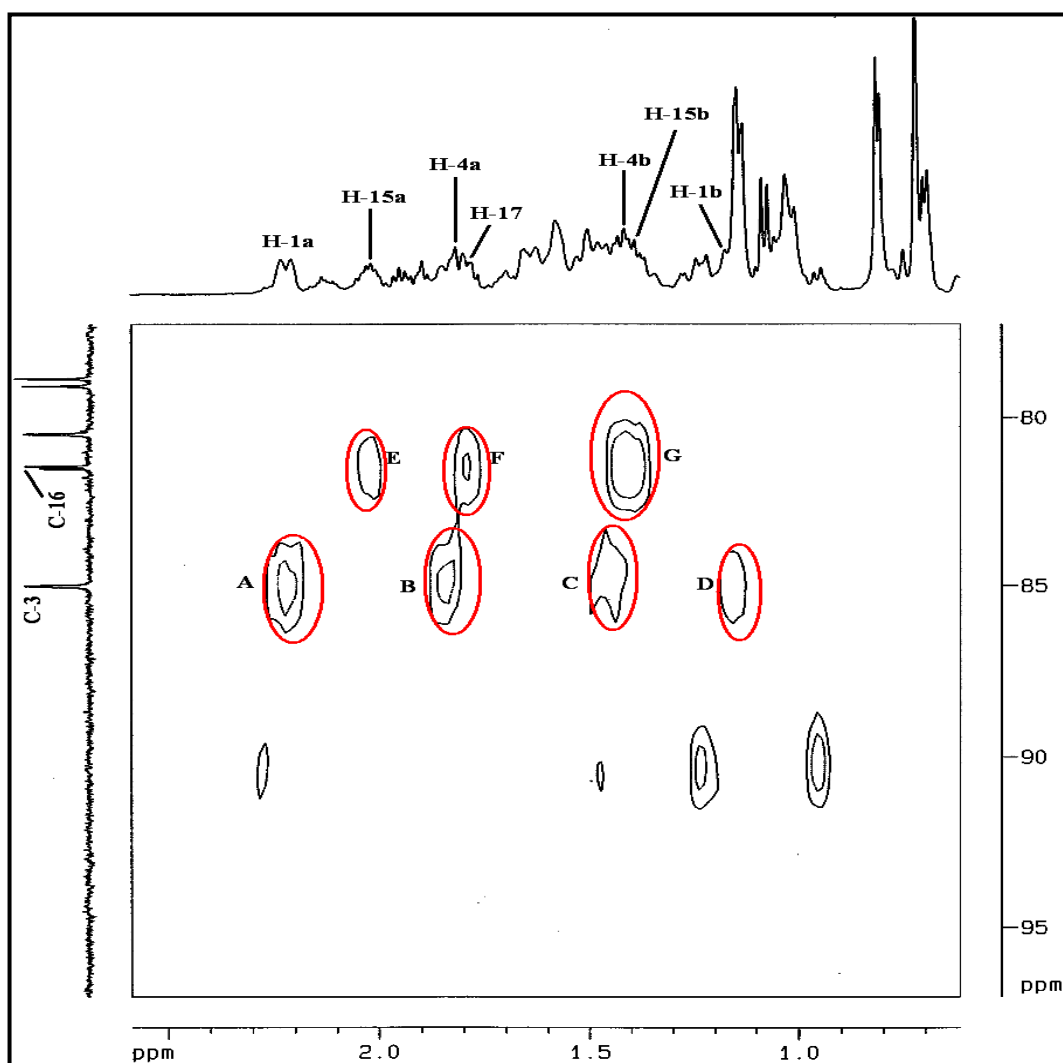
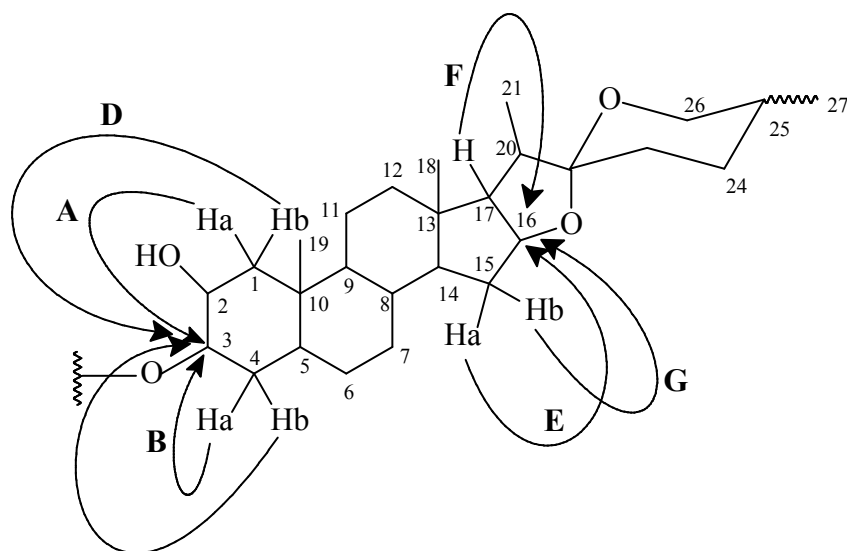


Figura 47: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de **CL-3**



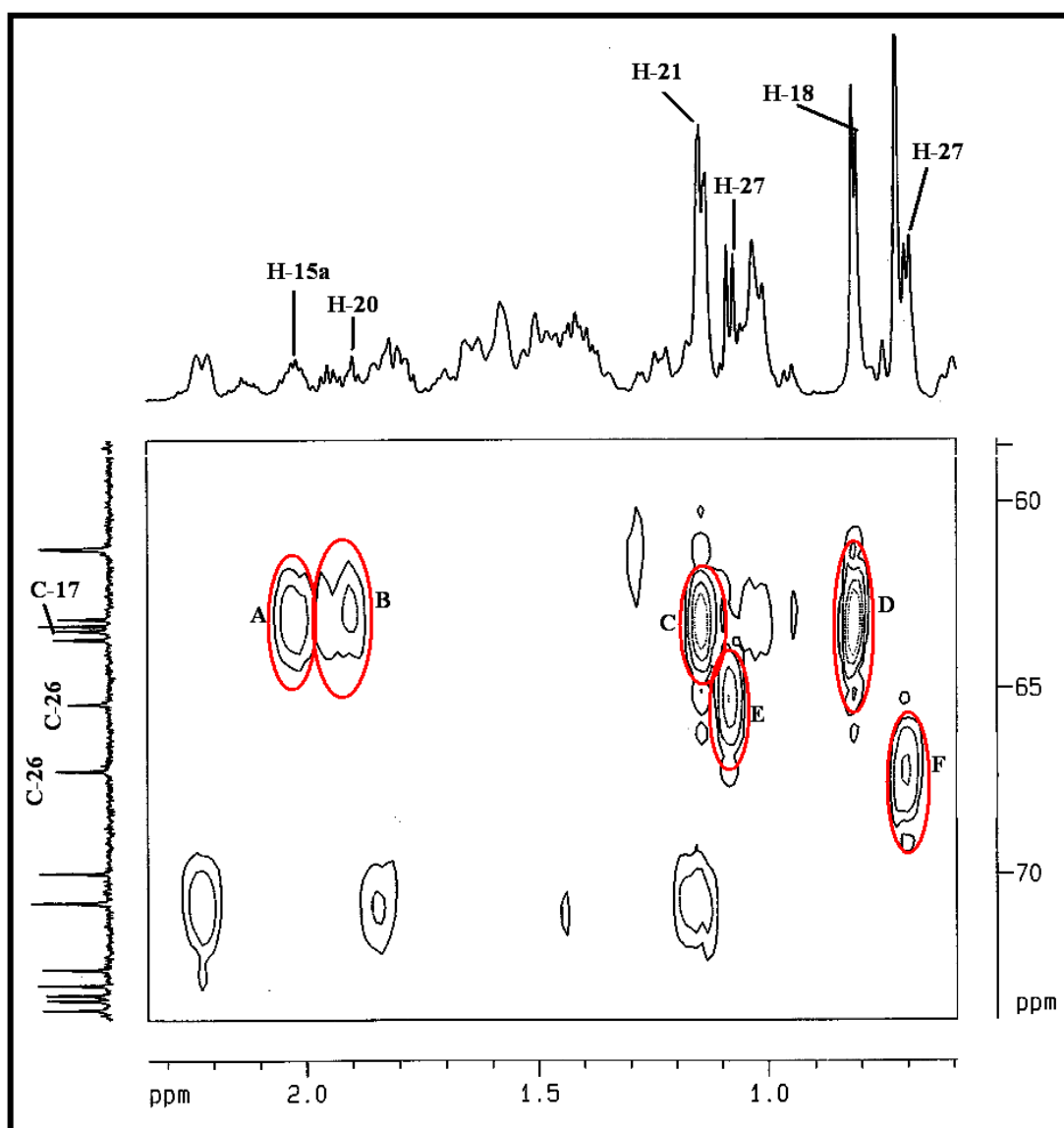
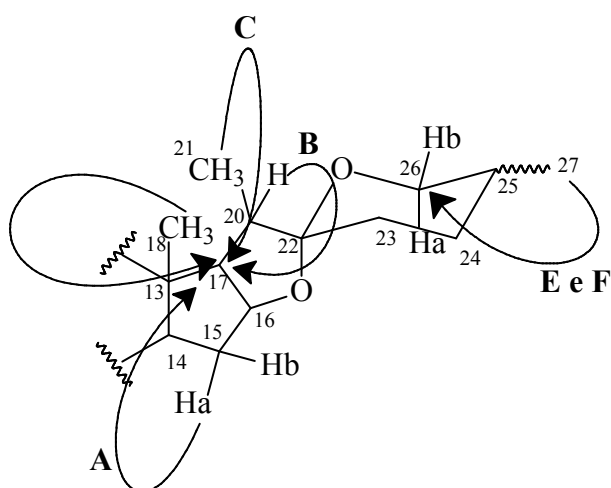


Figura 48: Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação – HMBC (500 MHz x 125 MHz, piridina- d_5) de CL-3



4.1.4. Determinação estrutural de CL-4

O fracionamento por cromatografia de exclusão efetuada em gel de dextrana Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” da fração CLCE-H, obtida a partir da partição do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum*, forneceu 7,7 mg de um composto que se apresentou como cristal em forma de agulha, de ponto de fusão 172-174 °C, solúvel em clorofórmio, denominado **CL-4**.

O espectro de absorção na região no infravermelho (IV) (Figura 49, p. 104) apresentou uma absorção intensa em 3415 cm⁻¹, característico do estiramento da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H}}$); uma absorção em 2949 cm⁻¹ correspondente ao estiramento da ligação C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) de carbono sp³, uma absorção em 1624 cm⁻¹ de estiramento da ligação C=C ($\nu_{\text{C=C}}$), além de absorção em 1039 cm⁻¹, representativa de ligação C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) [Silverstein e Webster, 2000].

No espectro de RMN ¹H (500 MHz) (Figura 50, p. 104) foram observados sete singletos em δ 0,76; 0,79; 0,83; 0,95; 0,97; 1,03 e 1,68 correspondentes a grupamentos metilas ligados a carbono não-hidrogenados, sendo que a última encontra-se na região mais desblindada, sugerindo estar ligada a um carbono sp². Os sinais em δ 4,57 e δ 4,69 cada um com integração para um hidrogênio, e o multipeto centrado em δ 3,19 caracterizaram hidrogênios em uma dupla ligação terminal e ligado a um carbono carbinólico, respectivamente.

O espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz) (Figura 51, p. 105) apresentou trinta linhas espectrais referentes a carbonos em um esqueleto triterpênico. A análise do espectro RMN ¹³C-DEPT 135° (125 MHz), (Figura 53, p. 106) possibilitou reconhecer sete carbonos metílicos (CH₃), onze metilênicos (CH₂) e seis metínicos (CH), e, por exclusão, seis carbonos não-hidrogenados.

Em particular, o sinal em δ 79,2 (C-3) foi relacionado a um carbono metínico oxigenado (HC-OH), e os dois sinais em δ 109,5 (C-29) e 151,2 (C-20), foram condizentes com a presença de uma dupla ligação terminal, corroborando os dados observados no espectro de RMN ¹H.

A posterior comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C obtidos com aqueles relatados na literatura para triterpenos pentacíclicos (Tabela 11, p. 103), foi possível sugerir para **CL-4** a estrutura do triterpeno de esqueleto do tipo lupano, possuindo uma ligação dupla entre os carbonos 20 e 29 e de nomenclatura usual lupeol (β -lup-20(29)-en-3-ol).

Apesar da larga ocorrência do lupeol no reino vegetal, este é o primeiro relato do seu isolamento no gênero *Cestrum*.

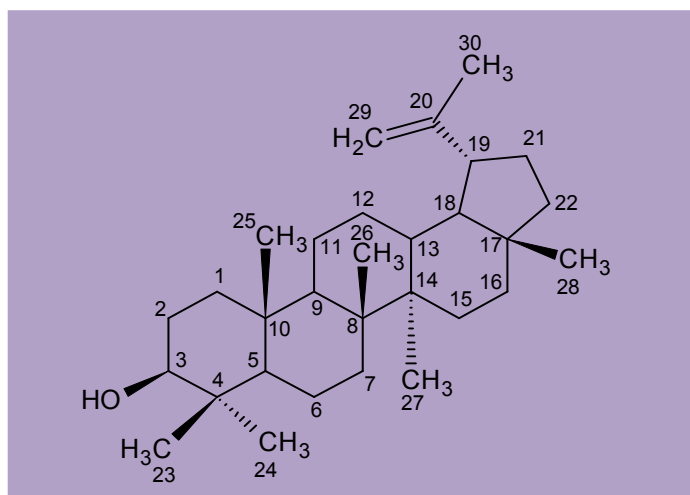


Tabela 11– Dados de RMN ^{13}C de **CL-4** em comparação com dados da literatura para o Lupeol [Mahato e Kundu, 1994].

	CL-4 (125 MHz, CDCl_3)	Lupeol (CDCl_3, 125 MHz) [Mahato e Kundu, 1994]
C	δ_{C}	δ_{C}
1	38,9	38,7
2	27,6	27,4
3	79,2	78,9
4	39,0	38,8
5	55,5	55,5
6	18,5	18,3
7	34,5	34,3
8	41,0	40,8
9	50,6	50,4
10	37,4	37,1
11	21,1	20,9
12	25,3	25,1
13	38,3	38,0
14	43,0	42,8
15	27,6	27,4
16	35,8	35,5
17	43,2	43,0
18	48,5	48,0
19	48,2	47,9
20	151,2	150,9
21	30,0	29,8
22	40,2	40,0
23	28,2	28,0
24	15,5	15,4
25	16,3	16,1
26	16,2	15,9
27	14,7	14,5
28	18,2	18,0
29	109,5	109,3
30	19,5	19,3

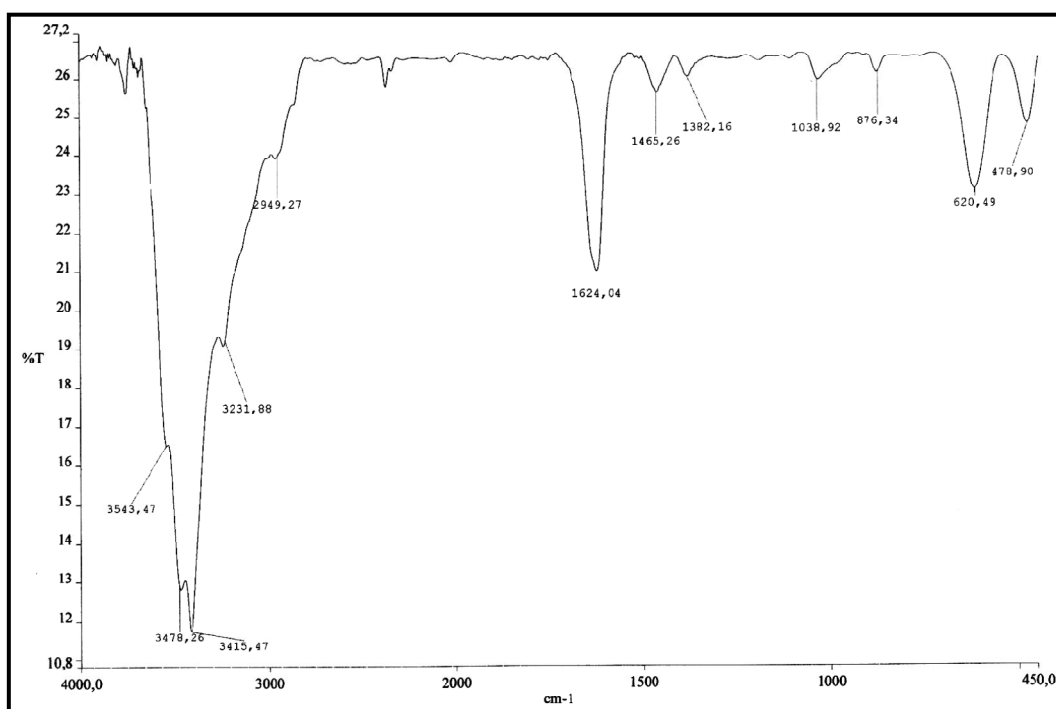


Figura 49: Espectro de infravermelho (KBr) de CL-4

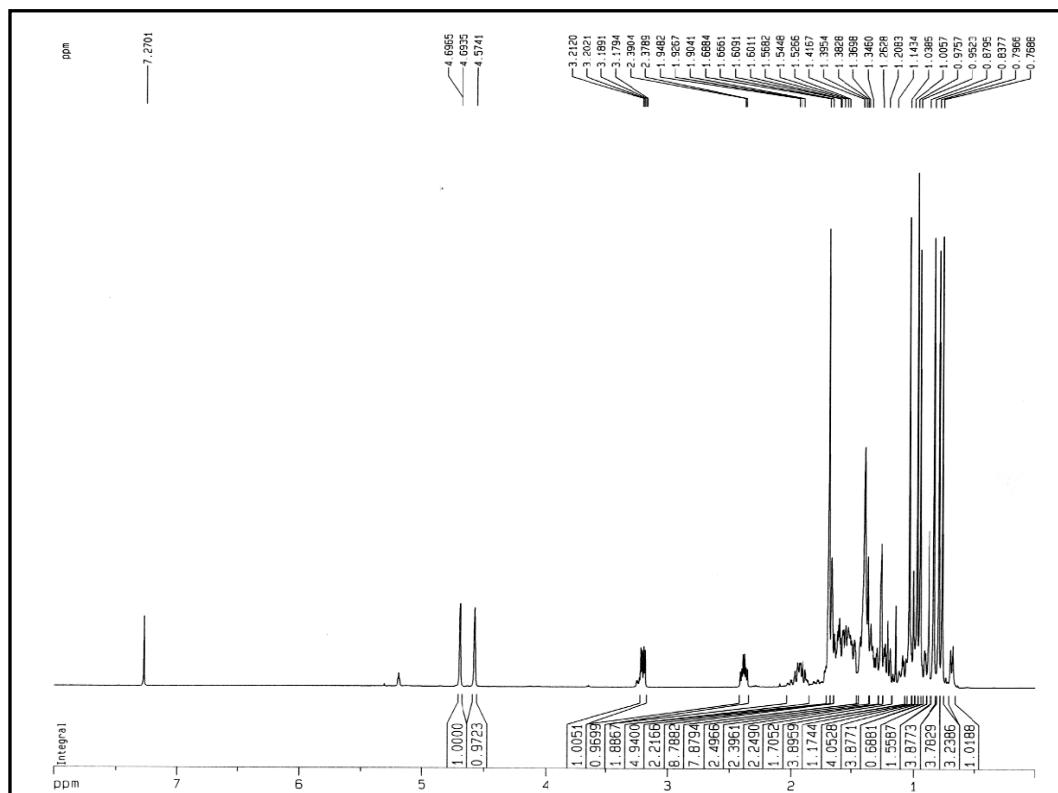


Figura 50: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CL-4

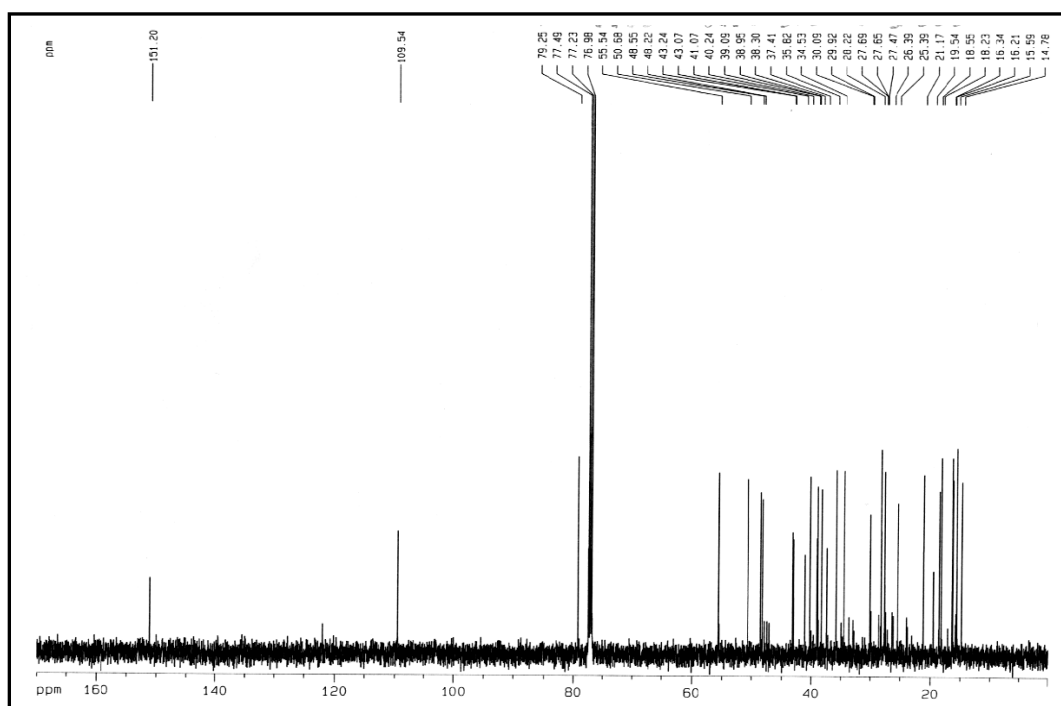


Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de CL-4

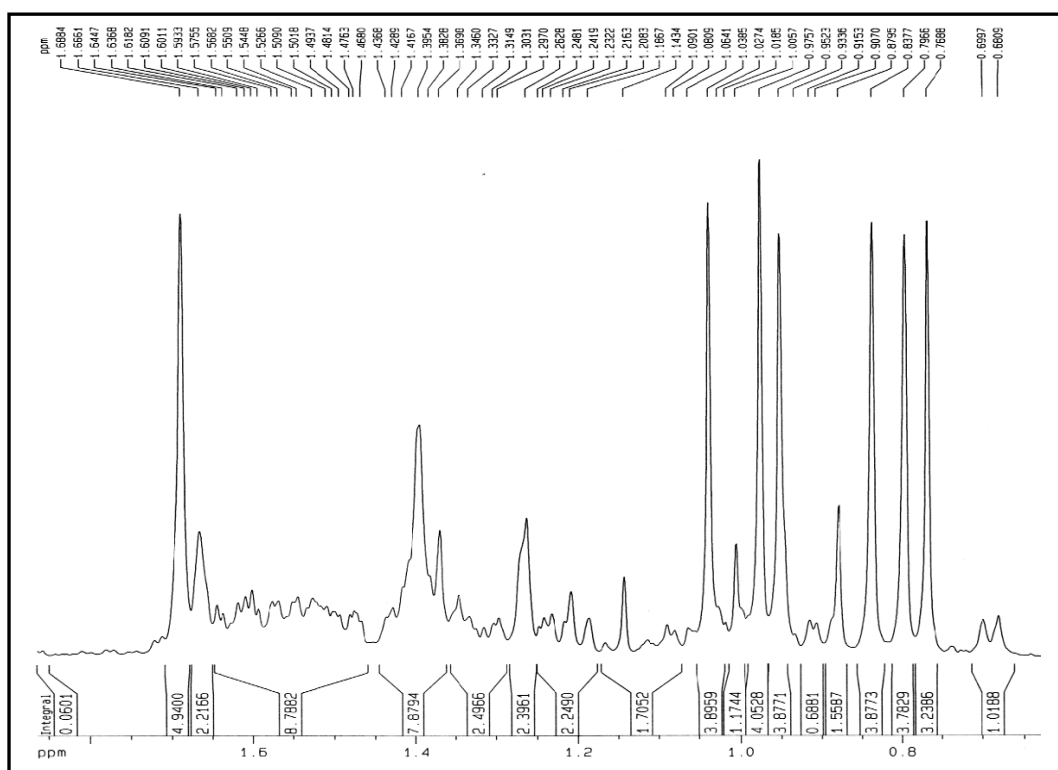


Figura 52: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de CL-4

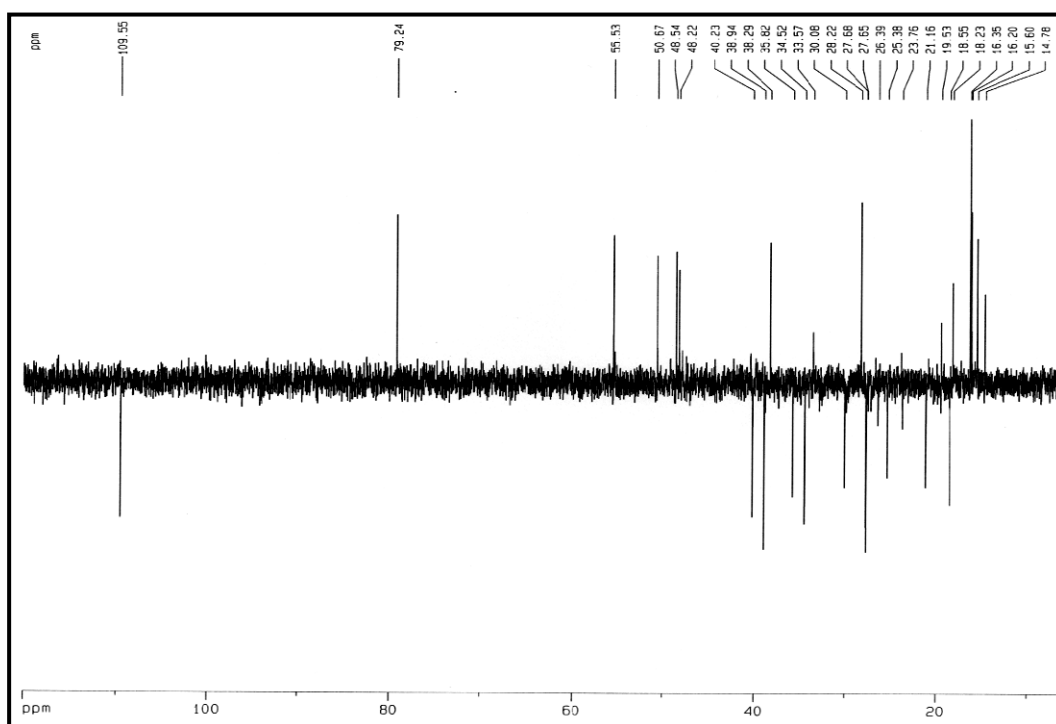


Figura 53: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de CL-4

4.1.5. Determinação estrutural de CL-5

O fracionamento por cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20 seguido de cromatografia “flash” da fração CLCE-H, obtida a partir da partição do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum*, forneceu 8,0 mg de um sólido branco amorfo de ponto de fusão 141,7-145,9 °C, solúvel em clorofórmio, denominado **CL-5**.

No espectro de absorção na região do IV de **CL-5** (Figura 54, p. 109), foram observadas bandas em 2940 e 2868 cm^{-1} relacionadas a estiramento C-H de carbonos sp^3 ($\nu_{\text{C-H}}$) de carbonos metilênicos e metílicos; uma banda larga e pouco intensa em 3432 cm^{-1} típica do estiramento O-H de hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$); outra banda em 1053 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) característica de deformação axial de ligação C-O; além de uma banda de absorção fraca em 1636 cm^{-1} associada a estiramento de ligação C=C de carbono sp^2 ($\nu_{\text{C=C}}$) [Silverstein e Webster, 2000].

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 55, p. 109) apresentou vários sinais na faixa de δ 0,69 a δ 2,35, representativos de grupos metila, metilênicos e metínicos existentes na estrutura de esteróides. Foram visualizados também sinais múltiplos característicos de hidrogênios olefínicos em δ 5,36, 5,15 e 5,04, e um multiplete em δ 3,54, referente a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) (Figura 56, p. 110) apresentou quarenta e cinco linhas espectrais, onde se destacam os sinais em δ 71,42 (C-3) referente ao carbono carbinólico, além dos sinais do carbono olefínico não-hidrogenado em δ 140,98 (C-5) e mono-hidrogenados em δ 129,40 (C-23), e 138,45 (C-22) e 121,63 (C-6), o que determinou a presença de duas duplas ligações monossubstituída e trissubstituída.

A partir dos dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para **CL-5** e a posterior comparação com dados descritos na literatura para esteróides [Moreira, 2001], foi possível determinar que **CL-5** trata-se da mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol, cujo isolamento possui caráter inédito no gênero *Cestrum* (Tabela 12, p. 108).

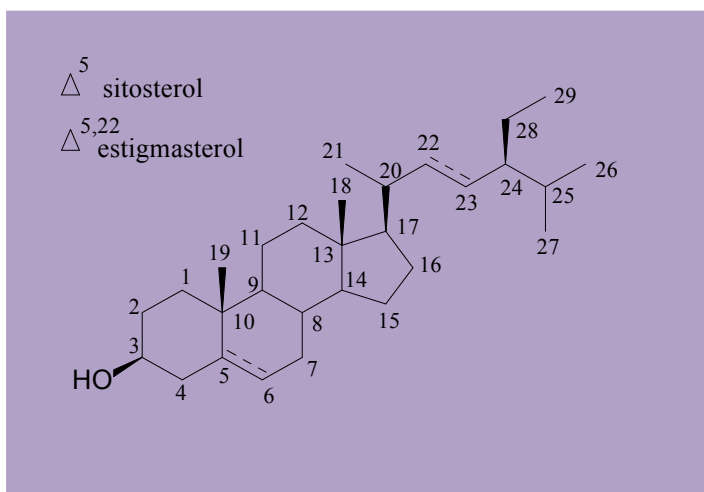


Tabela 12– Dados de RMN ^{13}C de **CL-5** em comparação com dados da literatura para o Estigmasterol e β -Sitosterol [Moreira, 2001].

	Estigmasterol (CDCl_3 , 125 MHz)	CL-5 (CDCl_3 , 125 MHz)	β-Sitosterol (CDCl_3 , 125 MHz)
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,4	37,42; 37,41	37,2
2	31,7	31,30	31,6
3	74,1	71,72; 71,42	71,7
4	39,92	42,43	38,9
5	139,8	140,98	140,7
6	122,8	121,63	121,6
7	32,0	31,30	31,8
8	32,0	32,02	31,8
9	50,3	50,32	50,1
10	36,7	36,62	36,4
11	21,1	21,19	21,1
12	39,8	39,92	39,7
13	42,3	42,43	42,3
14	56,9	56,91	56,7
15	24,5	24,30; 24,40	24,2
16	28,9	28,35	28,1
17	56,1	56,13; 56,23	56,1
18	12,1	11,91	11,9
19	19,3	19,40	19,3
20	40,6	36,27	36,0
21	21,1	19,09; 19,83	21,1
22	138,5	138,45; 34,07	33,9
23	129,5	129,40; 26,23	26,1
24	51,4	45,97	45,8
25	32,0	29,29	29,1
26	19,0	18,85	19,6
27	21,1	19,83	18,9
28	25,5	23,18	23,0
29	12,2	11,91	11,9

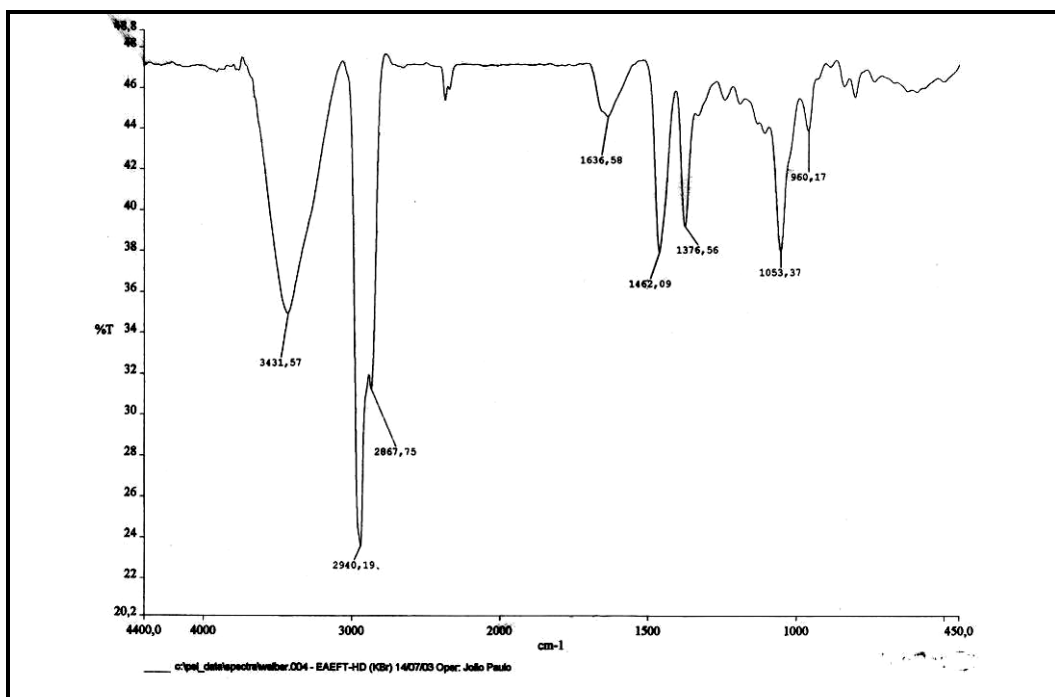


Figura 54: Espectro de absorção na região do IV de CL-5

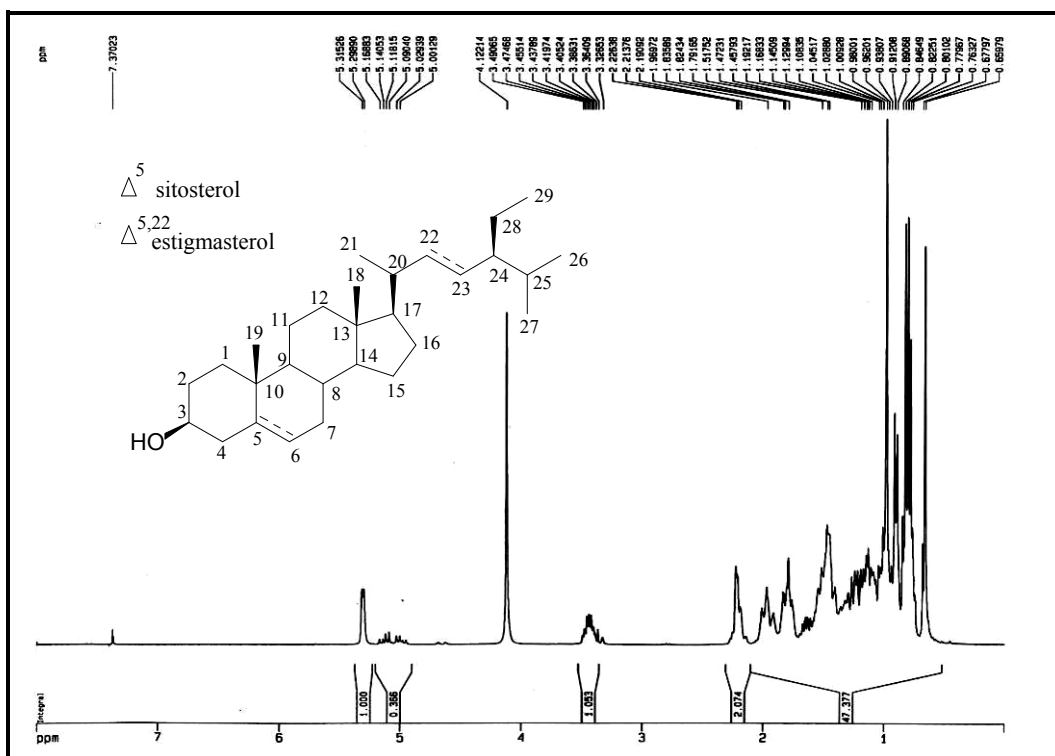


Figura 55: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CL-5

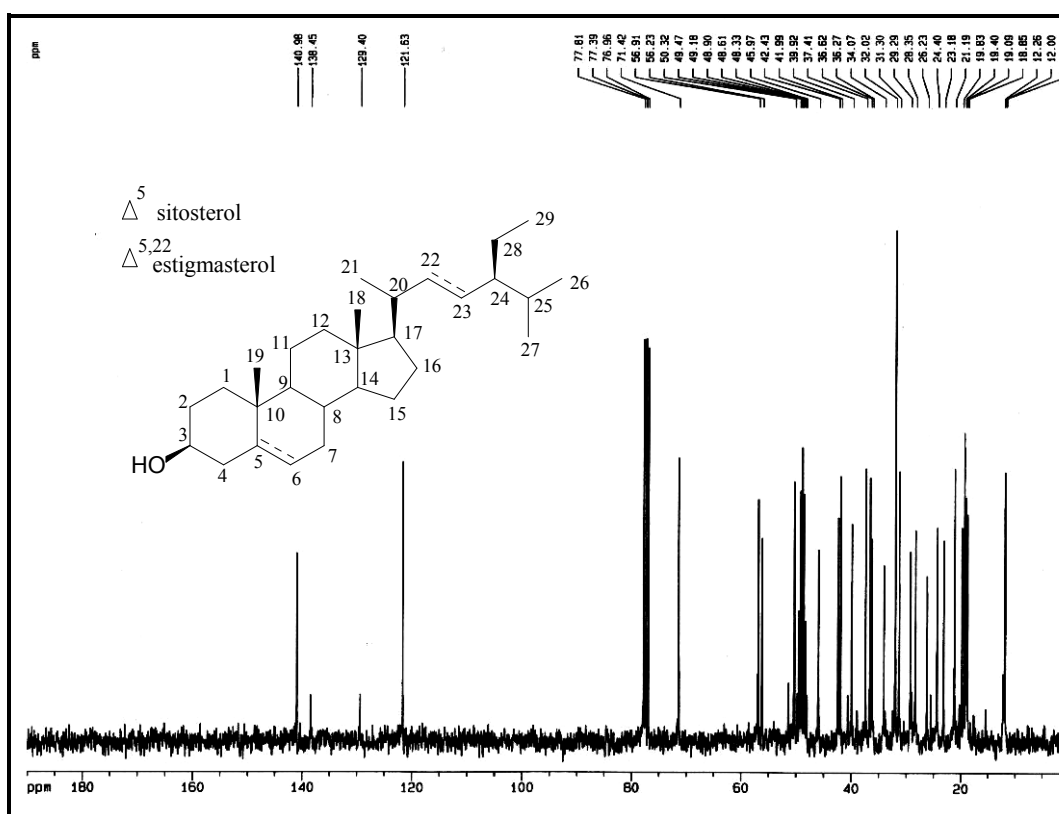


Figura 56: Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de CL-5

4.1.6. Determinação estrutural de CL-6

O fracionamento por cromatografia de exclusão efetuada em gel de dextrana Sephadex LH-20 seguido de cromatografia “flash” da fração CLCE-dC, obtida a partir da partição do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum*, forneceu 5,0 mg de um sólido branco amorfo, de p.f. 268-271 °C, denominado **CL-6**.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 57, p. 113), apresentou uma banda em 3410 cm⁻¹ típica de estiramento O-H de hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$); absorções em 2936 e 2868 cm⁻¹ características dos estiramentos assimétrico e simétrico C-H de carbono sp³ ($\nu_{\text{C-H}}$), respectivamente; além de duas absorções em 1720 e 1640 cm⁻¹ condizentes com o estiramento de carbono sp² ($\nu_{\text{C=C}}$); e uma banda em 1460 cm⁻¹ característica de estiramento C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) [Silverstein e Webster, 2000].

Na análise do espectro de RMN ¹H de **CL-6** (500 MHz, C₅D₅N) (Figura 58, p. 114), foram observados sinais de hidrogênios olefinicos na região de δ 5,36 a δ 5,05. Hidrogênios osídicos foram revelados através do dubleto centrado em δ 5,07 (1H, d, J = 7,8 Hz) referente a um hidrogênio anomérico, que, pelo valor da constante de acoplamento, se encontra β -substituído, além dos sinais na região entre δ 4,58 a δ 3,99. Em adição, também foram visualizados sinais com diferentes multiplicidades na região entre δ 1,75 a δ 0,68, que foram relacionadas a hidrogênios de esqueleto terpênico ou esteroidal.

O espectro de RMN ¹³C-BB (125 MHz) de **CL-6** (Figura 59, p. 114) exibiu trinta e cinco linhas espectrais, das quais quatro foram compatíveis com carbonos sp² (δ 141,37; 139,23; 129,93; 122,32). A absorção relativa a um carbono anomérico em δ 103,02 (C-1'), juntamente com as absorções referentes a carbonos oxigenados na faixa de δ 79,03 a δ 63,30, aliado aos dados descritos na literatura para carboidratos [Breitmeir, 1973], corroboraram a presença de uma unidade β -glicopiranosídica, como já observado no espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) (Figura 58, p. 114).

A posterior comparação entre os espectros de RMN ¹³C-BB e ¹³C-DEPT 135° (Figura 61, p. 115) possibilitou a constatação de que as absorções dos carbonos insaturados em δ 139,23; 129,93 e 122,32 eram referentes a carbonos monohidrogenados e, por diferença, que a absorção em δ 141,37 era relativa a um carbono não-hidrogenado, o que determinou a presença de duas duplas ligações trissubstituída e dissustituída, como já observado para **CL-5**.

A partir dos dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para **CL-6**, e a posterior comparação com dados descritos na literatura para esteróide glicosilados [Kojima et al, 1990], foi possível determinar que **CL-6** trata-se da mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol glicosilados (Tabela 13 pág. 112), cujo isolamento possui caráter inédito no gênero.

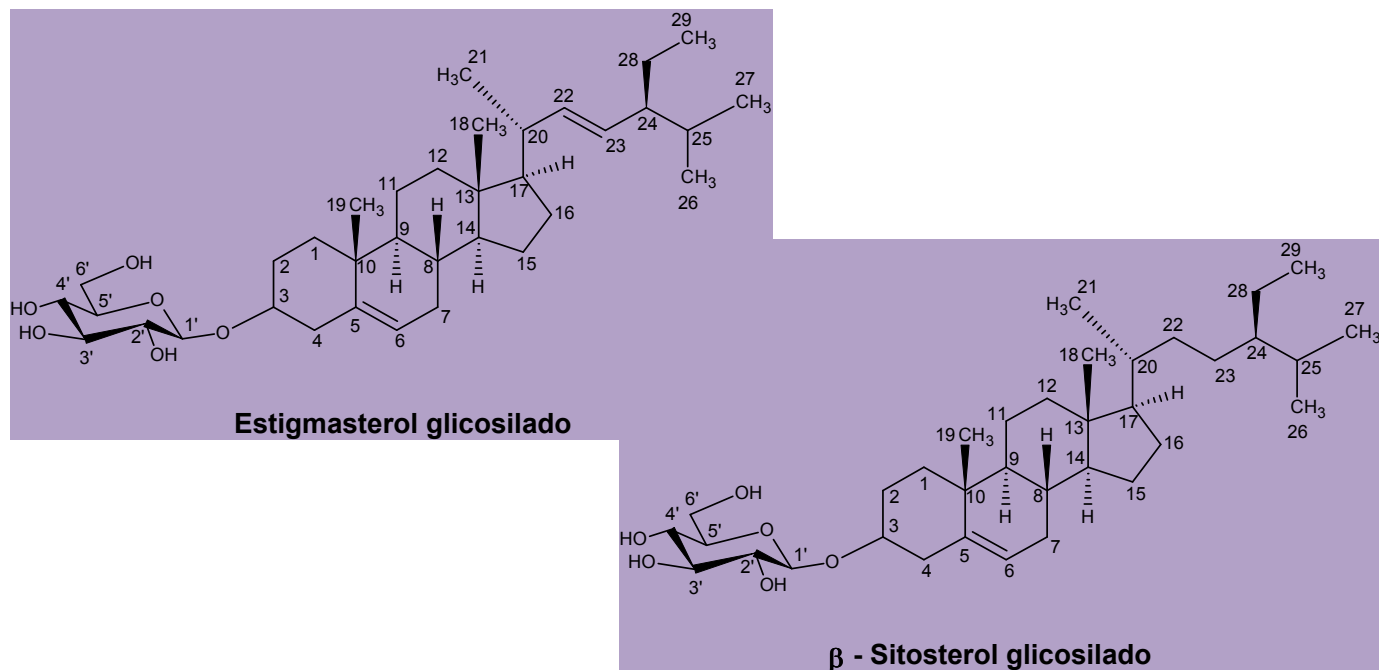


Tabela 13– Dados de RMN de ^{13}C de **CL-6** em comparação com dados da literatura para o Estigmasterol e β -Sitosterol glicosilado [Kojima et al, 1990].

	Estigmasterol (CDCl_3)	CL-6 (piridina-d_5)	β-Sitosterol (CDCl_3)
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,4	37,31	37,2
2	31,7	30,07	31,6
3	74,1	75,12; 71,55	71,7
4	36,8	37,31	38,9
5	139,8	140,76	140,7
6	122,8	123,58; 121,72	121,6
7	32,0	31,97; 31,89	31,8
8	32,0	31,99	31,8
9	50,3	50,19	50,1
10	36,7	36,20	36,4
11	21,1	24,32	21,1
12	39,8	39,79	39,7
13	42,3	42,40	42,3
14	56,9	56,67	56,7
15	24,5	24,32	24,2

Determinação Estrutural

16	28,9	29,33	28,1
17	56,1	56,10	56,1
18	12,1	11,96; 11,78	11,9
19	19,3	19,23	19,3
20	40,6	40,55	36,0
21	21,1	21,08	21,1
22	138,5	135,59; 31,97	33,9
23	129,5	129,5; 25,49	26,1
24	51,4	51,40; 45,90	45,8
25	32,0	32,10	29,1
26	19,0	19,23; 19,40	19,6
27	21,1	19,40; 19,03	18,9
28	25,5	25,49; 23,23	23,0
29	12,2	12,30; 11,96	11,9
Glicose			
1'	102,6	102,39	102,6
2'	75,4	77,96	75,4
3'	78,7	78,23	78,7
4'	71,7	71,55	71,7
5'	78,5	78,39	78,5
6'	62,9	62,68	62,9

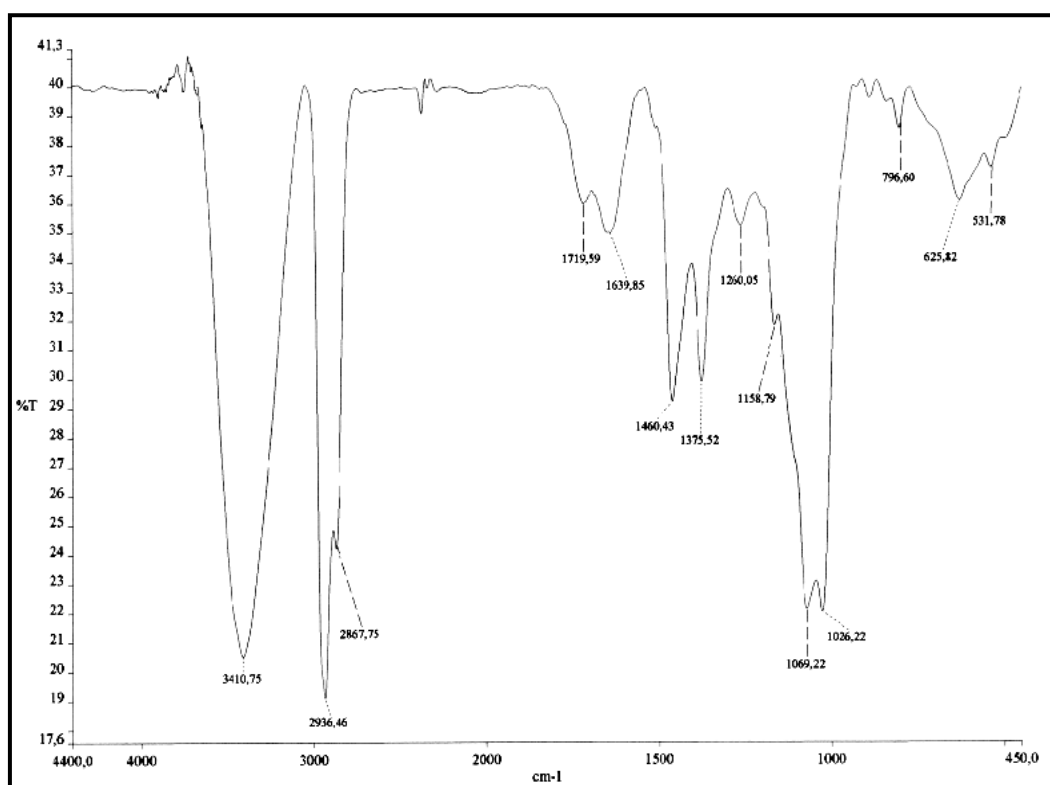


Figura 57: Espectro de Infravermelho (KBr) de CL-6

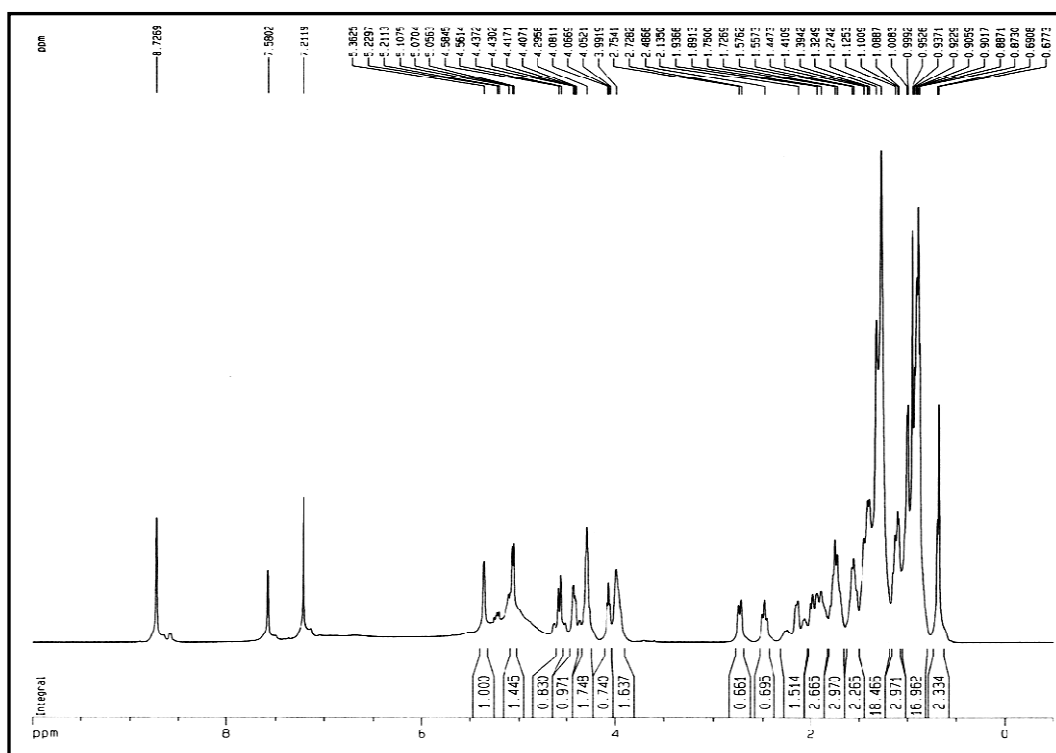


Figura 58: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de CL-6

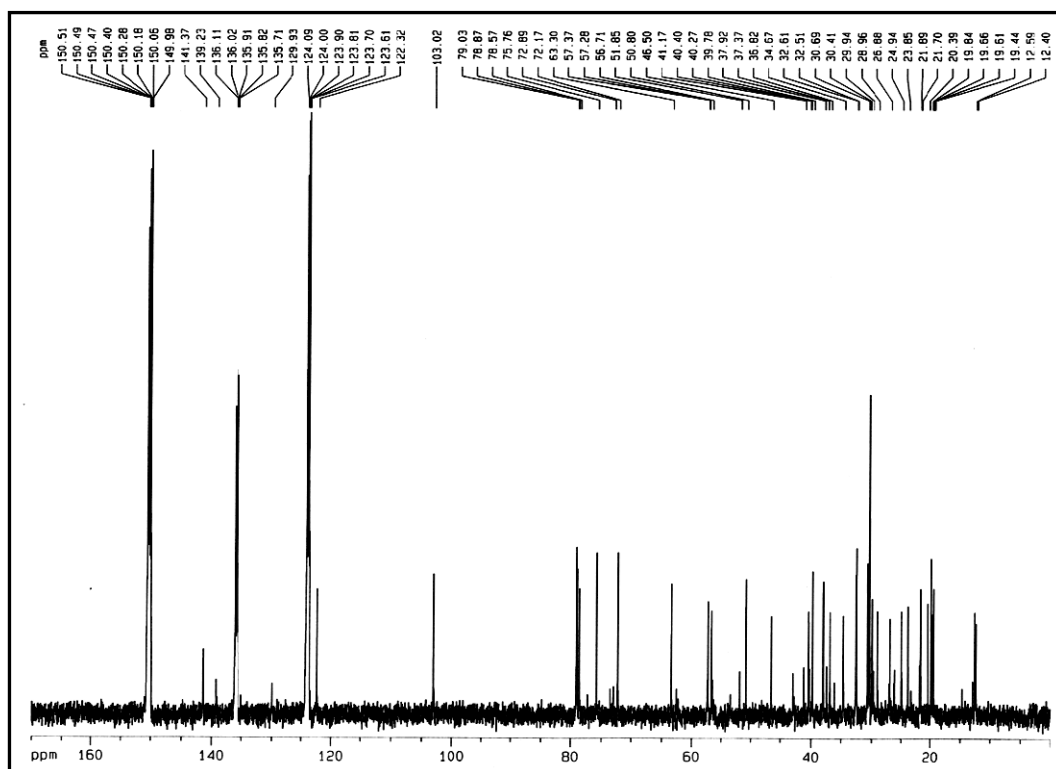


Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-6

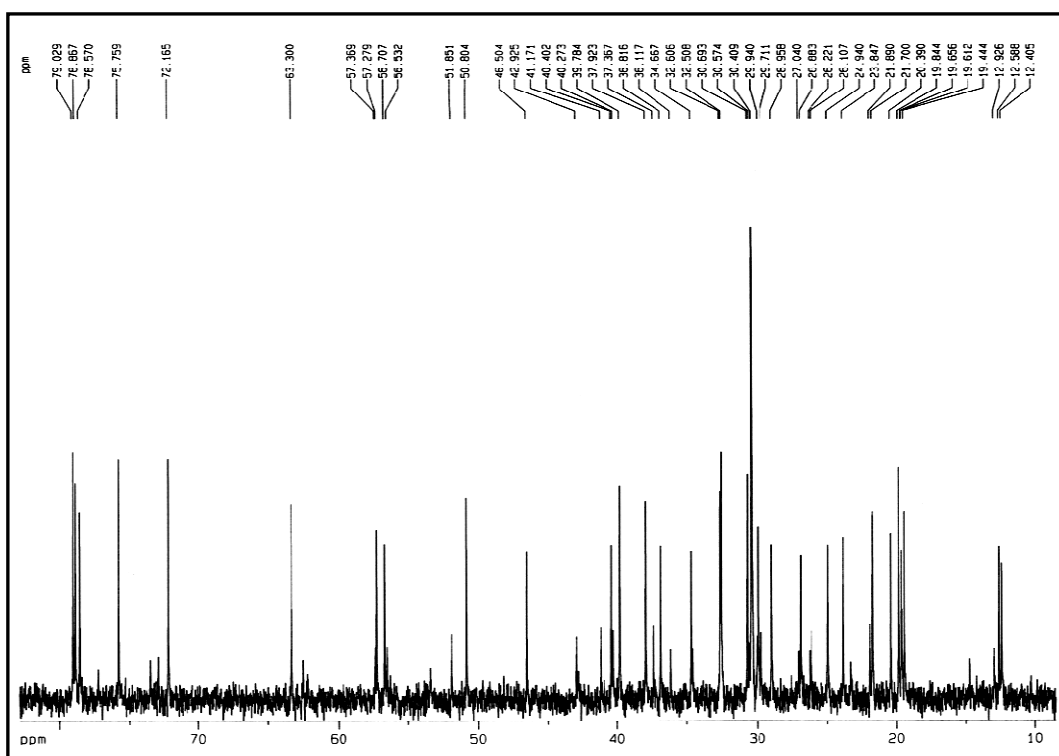


Figura 60: Expansão do espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, piridina- d_5) de CL-6

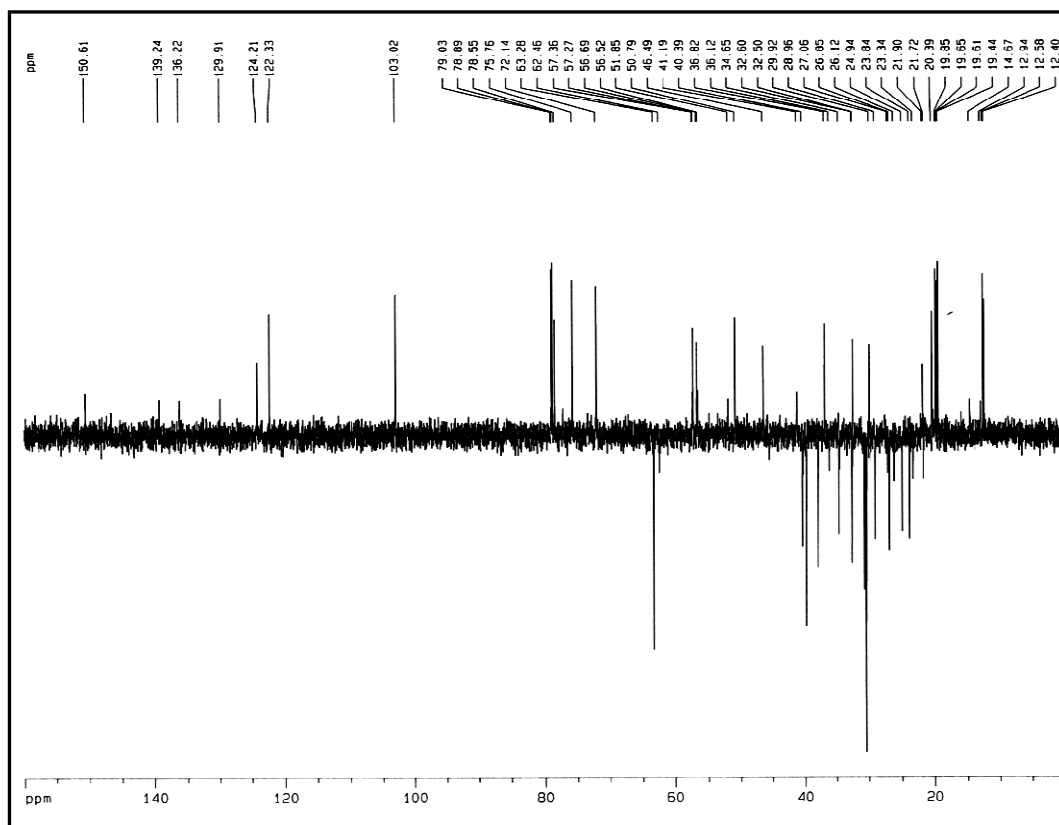


Figura 61: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de CL-6

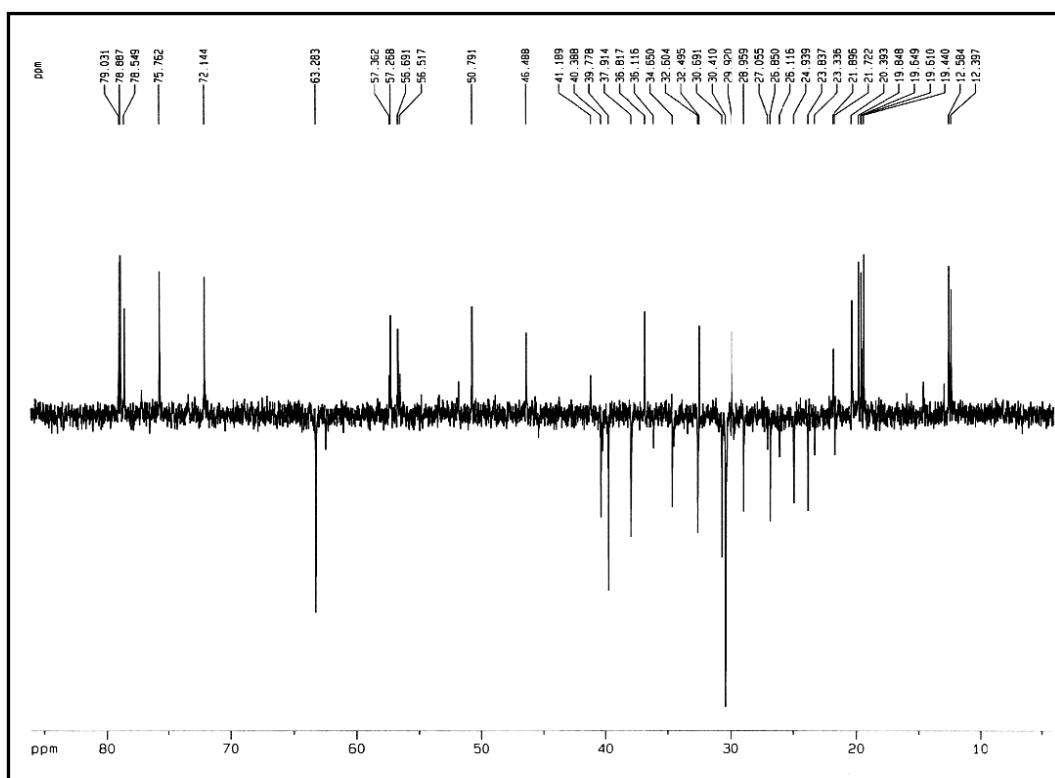


Figura 62: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_3) de CL-6



UFC

PARTE EXPERIMENTAL



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Estudo dos Constituintes Não-Voláteis de *Cestrum laevigatum* Schlecht

5.1.1. Material botânico

O caule de *Cestrum laevigatum* foi coletado no município de Pacoti-CE, pelo Professor Edilberto Rocha Silveira, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica da espécie foi realizada pelo Professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A exsicata relativa à coleta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, no Departamento de Biologia/UFC, sob o número de registro 38643.

5.1.2. Métodos cromatográficos

5.1.2.1. Cromatografia de adsorção

As frações obtidas através da partição do extrato etanólico do caule de *Cestrum laevigatum* foram cromatografadas em coluna sobre gel de sílica 60 (\varnothing μ m 63-200) e de sílica 60 para cromatografia “flash” (\varnothing μ m 40-63), da Merck. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob pressão média (cromatografia flash) eram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Foi empregada, nesta técnica, bomba de ar comprimido modelo Inalatec Plus (Ref.: 6600) da Nevoni.

Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplaças de gel de sílica 60 (\varnothing μ m 2-25) sobre alumínio da Merck (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm).

Os eluentes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados, de forma isocrática ou em proporções crescentes de polaridade. Os eluentes utilizados nos tratamentos cromatográficos de adsorção sob pressão média foram escolhidos após análise prévia das

frações por CCD, a fim de permitir ao constituinte desejado (ou àquele de menor Rf) um Rf próximo de 0,3.

A revelação das substâncias nas cromatoplas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), em aparelho Spectroline modelo ENF 240 C/F; por contato com vapores de iodo (I₂), e por aspersion com solução de vanilina (C₈H₈O₃) e ácido perclórico (HClO₄) em etanol (C₂H₅OH), seguida de aquecimento em chapa aquecedora a 100°C por aproximadamente 3 minutos.

5.1.2.2. Cromatografia de exclusão

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro como fase móvel.

5.1.3. Métodos Físicos de Análise (espectrométricos)

5.1.3.1. Espectrometria na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando pastilhas de KBr para análises das amostras.

5.1.3.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Advance DPX-300 e/ou modelo Advance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz e a 500,13 MHz, e a frequência do carbono a 75,47 MHz a 125,75 MHz.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado (CDCl_3) e piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pela companhias Cambridge Isotope Laboratories, Merck, Acros Organics e Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm). Para os espectros de RMN de hidrogênio, os sinais referenciados foram os dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27 ppm) e piridina (δ 7,22; 7,58 e 8,74). Para os espectros de carbono-13 os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos-13 dos solventes clorofórmio (δ 77,2 ppm) e piridina (δ 123,8; 135,9 e 150,3).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto) e m (multiplete).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Foram utilizadas ainda as técnicas de RMN bidimensionais: espectroscopia de correlação homonuclear (^1H - ^1H -COSY), espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (NOESY). Os métodos de detecção inversa utilizados foram a coerência quântica múltipla heteronuclear (HSQC) e correlação de ligações múltiplas heteronuclear (HMBC).

5.1.3.3. Espectrometria de massas

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos em Espectrômetro de Massa Hewlett-Packard, modelo HP-5791 A, acoplado a Cromatógrafo Gás-Líquido modelo HP A série II (CGL/EM), provido de coluna capilar DB-5 (dimetilpolisiloxano) com 30,0 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,1 μm . A razão de aquecimento do injetor foi de 35-180°C/4°C/min. e 180-280°C/35°C/min, sendo hélio o gás de arraste.

5.2. Isolamento dos Constituintes Químicos do caule de *Cestrum laevigatum* Schlecht

5.2.1. Obtenção dos extratos hexânico [CLCH] e etanólico [CLCE] de *Cestrum laevigatum*

O caule de *Cestrum laevigatum* (3,03 kg) foi triturado mecanicamente e extraído com hexano à temperatura ambiente. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 327,3 mg de uma resina amarelada, denominada CLCH, que não foi utilizado devido ao baixíssimo poder de extrativos.

A “torta” remanescente, após a obtenção do extrato hexânico, foi submetida a extração exaustiva com etanol à temperatura ambiente. O solvente foi destilado sob pressão reduzida para fornecer 50,1 g de um extrato sólido de coloração marrom-avermelhada denominado CLCE.

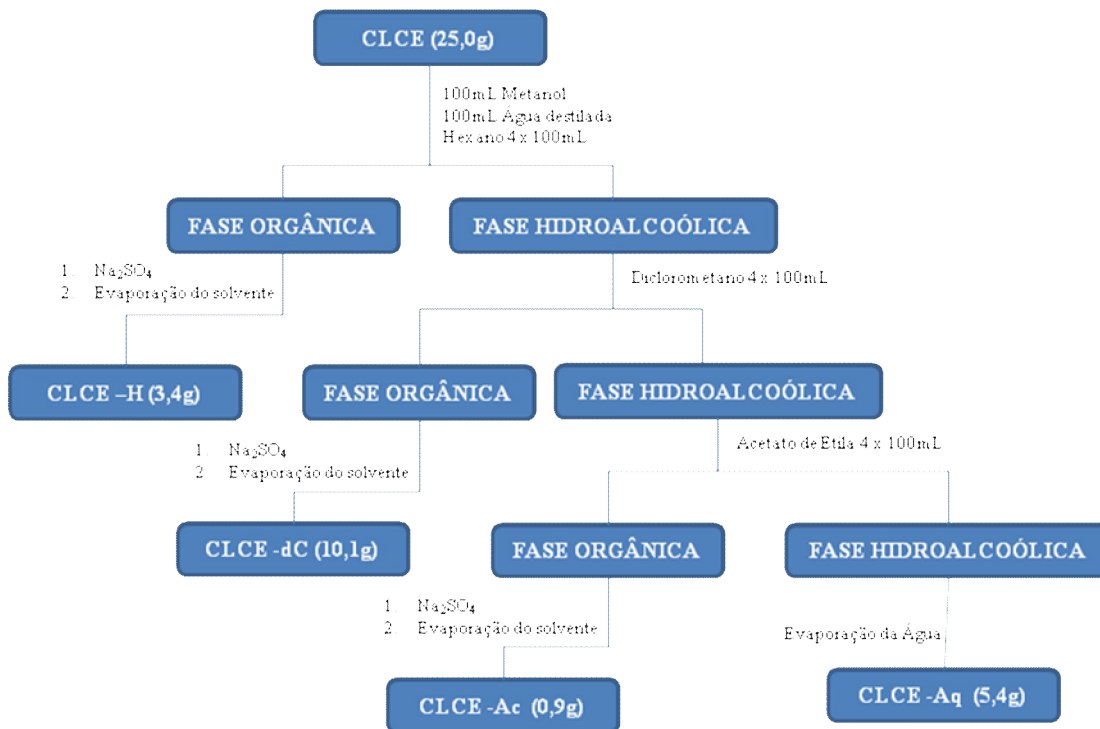
5.2.2. Partição líquido-líquido de CLCE

Particionamento líquido-líquido de uma alíquota de 25,0 g de CLCE, dissolvida em 100 mL de água destilada e 100 mL de metanol, foi realizado utilizando os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila (Fluxograma 1, p. 121). A partir deste procedimento, foram obtidas quatro frações resultantes de acordo com os dados descritos na Tabela 14 abaixo:

Tabela 14 – Frações resultantes da Partição líquido-líquido de CLCE

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (g)</i>
CLCE-H	Resina amarela-esverdeada	3,4
CLCE-dC	Resina marrom escura	10,1
CLCE-Ac	Resina marrom escura	0,9
CLCE-Aq	Resina marrom escura	5,4

Fluxograma 1 – Procedimento da partição líquido-líquido de CLCE



5.2.3. Tratamento cromatográfico de CLCE-dC: Isolamento de CL-2, CL-3 e CL-6

3,1 g da fração CLCE-dC foram dissolvidas em metanol e depositadas sobre uma coluna comum de 4,0 cm de diâmetro e 50,0 cm de altura, empacotada com Sephadex LH-20 (30 cm de altura). MeOH foi utilizado como fase móvel (700 mL), numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. As 41 frações coletadas foram analisadas em CCD, e posteriormente reunidas em 4 frações resultantes de acordo com as similaridades observadas (Tabela 15).

Tabela 15 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-11	Resina vermelha	777,1
12-18	Resina vermelha	1319,0

19-29	Resina vermelha	616,2
30-41	Resina vermelha	21,9

A fração CLCE-dC (12-18) (1319,0 mg) foi recromatografada em 45,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, em coluna cromatográfica de 3,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura. Foram coletadas 61 frações de 20 mL, utilizando como eluentes misturas binárias dos solventes CH₂Cl₂/MeOH, seguindo uma ordem crescente de polaridade. A análise por CCD permitiu a reunião de frações idênticas, cujas frações resultantes estão distribuídas na Tabela 16.

Tabela 16 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC(12-18)

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-16	Resina amarela-esverdeada	54,6
17-28	Resina amarela clara	194,4
29-30	Resina amarela clara	27,9
31-34	Resina amarela clara	54,1
35-37	Resina amarela clara	176,1
38	Resina amarela clara	38,7
39-43	Resina amarela clara	193,0
44-45	Resina escura	145,3
46-61	Resina escura	303,8

As frações CLCE-dC(12-18)(29-30); CLCE-dC(12-18)(35-37) e CLCE-dC(12-18)(39-43) apresentaram-se na forma de resinas amareladas, os quais foram lavados com metanol. A partir desse procedimento para as três amostras foram obtidos três sólidos brancos, amorfos e homogêneos em CCD, os quais foram denominados **CL-6 (5,0 mg)**, **CL-2 (13,4 mg)** e **CL-3 (14,0 mg)**, respectivamente.

5.2.4. Tratamento cromatográfico de CLCE-dC: Isolamento de CL-1

Uma alíquota de 2,1 g de CLCE-dC foi dissolvida em metanol e depositada sobre uma coluna de 3,5 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura, a qual foi preliminarmente empacotada com Sephadex LH-20 (22 cm de altura). A partir da eluição utilizando metanol como fase móvel (400 mL) numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min, foram coletadas 34 frações de

10,0 mL. A análise por CCD permitiu a reunião de frações idênticas em somente 3 frações resultantes, como mostrado na Tabela 17, p. 123.

Tabela 17 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-2	Resina vermelha	144,2
3-17	Resina vermelha	1698,0
18-34	Resina vermelha	44,5

A fração CLCE-dC(3-17) (1698,0 mg), foi recromatografada, utilizando 53,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash” em uma coluna cromatográfica de 3,5 cm de diâmetro e 45,0 cm de altura. Misturas binárias dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram usados como eluentes, seguindo uma ordem crescente de polaridade.

As 110 frações coletadas foram submetidas à análise comparativa por CCD, que permitiu agrupá-las em 9 frações resultantes de acordo com as similaridades observadas (Tabela 18).

Tabela 18 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC(3-17)

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-15	Resina verde clara	79,8
16-27	Resina amarela clara	37,0
28-36	Resina laranja	54,6
37-51	Resina amarelada	61,0
52-55	Resina vermelha	233,9
56-68	Resina vermelha	213,4
69-80	Resina escura	428,3
81-88	Resina escura	115,8
89-110	Resina escura	64,8

A fração CLCE-dC(3-17)(16-27) (37,0 mg) mostrou a presença de uma substância amarela em CCD, quando revelada com solução de vanilina.

Desta forma, esta fração foi acondicionada sobre 23,0 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 2,0 cm de diâmetro e 25,0 cm de altura e submetida à eluição isocrática

com o eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5% (100mL). A análise por CCD permitiu a reunião das 25 frações coletadas em 5 frações resultantes, cujos dados estão distribuídos na Tabela 19.

Tabela 19 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-dC-(3-17)-(16-27)

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-4	Resina branca	1,3
5-10	Resina amarela clara	30,0
11-13	Resina amarela clara	7,5
14-20	Resina branca	3,9
21-25	Resina amarela clara	6,6

Recromatografia da fração CLCE-dC(3-17)(16-27)(5-10) (30,0 mg) sobre 12,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash” em uma coluna cromatográfica de 1,5 cm de diâmetro e 25,0 cm de altura, por eluição com a mistura isocrática dos solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3% (100mL) forneceu 15 frações.

A fração CLCE-dC(3-17)(16-27)(5-10)(7) (5,0 mg) mostrou-se como um sólido branco, amorfo e homogêneo em CCD, e foi denominado **CL-1**.

5.3.5. Tratamento cromatográfico de CLCE-H: Isolamento de CL-4 e CL-5

A fração CLCE-H (3,4 g) (p. 120) foi dissolvida em metanol e depositada sobre uma coluna comum de 4,0 cm de diâmetro e 50,0 cm de altura, empacotada com Sephadex LH-20 (25 cm de altura). O material foi cromatografado utilizando metanol como fase móvel (600 mL), numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Neste procedimento foram coletadas 30 frações de 10 mL. A análise comparativa por CCD permitiu a reunião de frações idênticas, e as frações resultantes estão distribuídas na Tabela 20.

Tabela 20 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-H

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-5	Resina amarela	77,0
6-9	Resina amarela	349,2
10	Resina amarela	204,2
11-19	Resina verde clara	2530,0

Parte Experimental

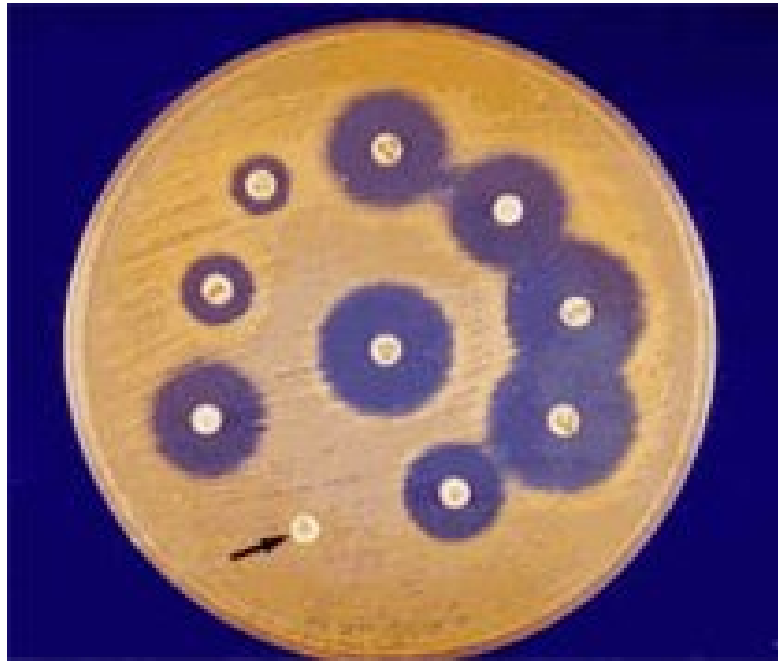
20-30	Resina amarela	122,3
-------	----------------	-------

A fração CLCE-H (11-19) (2,5 g) foi acondicionada sobre 92,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, em coluna cromatográfica de 3,5 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura. Foram coletadas 150 frações de 10 mL, utilizando como eluentes misturas binárias dos solventes hexano, acetato de etila e metanol, seguindo uma ordem crescente de polaridade. A análise por CCD permitiu a reunião de frações idênticas em 11 frações resultantes, as quais se encontram distribuídas na Tabela 21.

Tabela 21 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de CLCE-H-(11-19)

<i>Fração</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Massa (mg)</i>
1-2	Óleo viscoso incolor	623,8
3-12	Sólido branco	45,0
13-31	Resina amarela clara	52,7
32-42	Sólido amarelo claro	50,5
43-55	Sólido amarelo claro	268,9
56-60	Sólido branco	77,2
61-87	Sólido verde	375,6
88-101	Resina verde clara	67,9
102-115	Resina amarela-esverdeada	159,6
116-130	Resina amarela clara	47,3
131-150	Resina amarela	319,0

As frações CLCE-H(11-19)(32-42) (50,5 mg) e CLCE-H(11-19)(56-60) (77,2 mg), apresentaram-se como sólidos brancos amorfos e foram recristalizados em MeOH. A análise por CCD dos sólidos resultantes revelou que os compostos mostravam-se homogêneos, e, desta forma, foram denominados de **CL-4** (7,7 mg) e **CL-5** (8,0 mg), respectivamente.



UFC

TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

6. TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

6.1. Teste de Atividade Antimicrobiana de CL-1, CL-2 e CL-3

As substâncias **CL-1**, **CL-2** e **CL-3**, isoladas a partir do caule de *Cestrum laevigatum*, foram submetidas a testes para avaliação do seu potencial antimicrobiano. Para o ensaio de medida da atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em discos conforme descrito por Bauer *et al.* (1966). Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Entre as bactérias Gram-negativas testadas estavam *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 12472), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Culturas de bactérias crescidas em ágar nutritivo por cerca de 18 horas tiveram de 2-4 colônias coletadas e diluídas em salina, com densidades ajustadas à turvação do tubo com 0,5 da escala de McFarland (10^{-8} UFC/ml), sendo semeadas na superfície de placas de Agar Muller-Hinton, com auxílio de “swab” estéril de modo a obter-se um crescimento uniforme e confluyente. Em seguida, discos de papel de filtro esterilizados (com 6 mm de diâmetro), embebidos com 30 µl da amostra de cada substância, foram colocados sobre o Agar, bem como o controle negativo (discos com 30 µL de salina fisiológica) e positivo (discos contendo o antibiótico Nitrofurantoína), sendo as placas então incubadas a 37 °C por 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pela formação de halos de inibição ao redor dos discos com a leitura dos halos de inibição feita com paquímetro, através do fundo da placa, com iluminação contra um fundo escuro. Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

6.1.1. Resultados e discussões

De acordo com a Tabela 22 (p. 127), que mostra o halo de inibição em milímetros das substâncias **CL-1**, **CL-2** e **CL-3** frente às bactérias testadas, não se apresentaram resultados significativos em relação à atividade antimicrobiana de nenhuma das cepas usadas, pois a comparação do tamanho do halo de inibição da substância com o tamanho do halo de inibição do controle positivo foi muito menor. Mesmo assim, não se deve deixar de mencionar que algumas substâncias mostraram-se eficazes contra alguns microorganismos, por exemplo: **CL-3**, que se destacou contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*

aerogenes. Contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, muito utilizada em antibiogramas, nenhuma das substâncias testadas apresentou resultado significativo, assim como contra a bactéria gram-negativa *Salmonella choleraesuis*.

Tabela 22 – Atividade antimicrobiana de CL-1, CL-2 e CL-3

HALO DE INIBIÇÃO (mm)					
BACTÉRIAS	SUBSTÂNCIAS				
Gram-positivas	CL-1	CL-2	CL-3	CP	CN
<i>Bacillus subtilis</i>	10,3	9,5	12	22,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	7,0	7,5	49,0	-
Gram-negativas	CL-1	CL-2	CL-3	CP	CN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9,0	9,5	9,5	31,0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,0	9,5	10,5	28,0	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9,0	9,5	11,0	26,0	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	29,0	-

*CP = Controle Positivo (Nitrofurantoína), CN = Controle Negativo

*Halo de inibição da média de três experimentos.

*Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2. Atividade Leishmanicida: Ensaio *in vitro*

Os ensaios de atividade leishmanicida e fungicida foram realizados no laboratório de Farmacognosia da UNB, coordenado pela professora Laila Salmen Espindola.

6.2.1. Cultura de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Foi utilizada cepa MHOM/BR/87/BA125 isolada de um paciente com leishmaniose cutânea do estado da Bahia, fornecida pelo Instituto Gonçalo Muniz/Fiocruz/Salvador. Os promastigotas foram mantidos em meio Schneider (Sigma) suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 10% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies, Rockville, MD) e 2% urina humana estéril.

6.2.2. Efeito dos extratos sobre formas extracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Inicialmente, em uma placa de cultura celular de 96 escavações foi colocado, em cada poço, meio de cultura estéril seguido de uma suspensão de 10^6 formas promastigotas dos parasitos. Em seguida, foram adicionados 100 mg/ml dos extratos nos primeiros poços. Foi realizada uma diluição seriada e a placa foi incubada por 48 h. Após este período, 10 ml de uma solução de MTT de 5 mg/ml foram adicionados a todos os poços e a placa foi novamente incubada por 4h à 22 °C protegida da luz. Depois deste período, foram adicionados 100 mL de DMSO para liberação dos cristais de formazan. A placa foi lida em leitor de placa de Elisa no comprimento de 570 nm. Estes experimentos foram realizados em quintuplicata. O IC₅₀ foi determinado pelo programa Prisma GraphPad [Zhai *et al.*, 1999].

6.2.3. Resultados e discussões

O ensaio de atividade leishmancida foi realizado com **CL-1**, **CL-2** e **CL-3**, porém apenas **CL-3** mostrou-se ativa contra *Leishmania amazonensis*, e seu IC₅₀ ainda não foi calculado.

6.3. Atividade Antifúngica

6.3.1. Teste de microdiluição

Adotou-se a metodologia utilizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para teste de diluição em caldo para fungos filamentosos (CLSI, M38-A) e para leveduras (CLSI, M27-A2).

6.3.2. Microrganismos e período de crescimento para o teste

Para o teste de microdiluição foram utilizadas duas espécies de leveduras: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida albicans* (ATCC 10231), ambas da American Type Culture Collection e quatro isolados clínicos de dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. Todas as cepas foram fornecidas pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal do Goiás. Os microrganismos foram mantidos em Agar Batata Dextrose inclinado à temperatura ambiente.

6.3.3. Preparo dos controles

O controle positivo empregado no teste foi o antifúngico Itraconazol utilizando uma solução estoque preparada a partir de Itraconazol diluído em DMSO, filtrado com filtro Millipore de 0,22 μm e mantida em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (concentração de 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A solução estoque foi, então, diluída em meio RPMI para alcançar uma concentração de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.3.4. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado no teste foi o meio RPMI 1640, preparado a partir da base desidratada disponível comercialmente (4,16 g para 400 mL de água deionizada). Com auxílio de um potenciômetro previamente calibrado, o meio foi tamponado com ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até alcançar pH 7,0. O meio de cultura ajustado foi esterilizado em cabine de fluxo laminar com auxílio de um sistema de filtração a vácuo com membrana em éster de celulose e 0,22 μm de poro. O meio foi mantido a 4°C até o momento do uso (Figura 63).



Figura 63 - Filtração do meio RPMI 1640 tamponado com MOPS.

Para controle de esterilidade do meio RPMI, foram retiradas duas alíquotas de aproximadamente 100 μL do meio recém-preparado, transferidas para tubo de ensaio contendo caldo BHI. Os tubos foram colocados em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48h. Após esse período, caso não se verificasse crescimento de microrganismo, o meio era liberado para uso.

6.3.5. Diluição das amostras

Os extratos foram diluídos em DMSO e, em seguida, foram novamente diluídos em meio RPMI até alcançarem uma concentração de 4 mg/mL e DMSO < 5%.

6.3.6. Preparo do inóculo

Solução salina (0,9%) esterilizada em autoclave foi utilizada para preparar os inóculos. No caso do fungo leveduriforme, uma porção da massa celular foi transferida para tubo com solução salina até a turbidez coincidir com a da solução padrão de Mc Farland 0,5. Em seguida esse inóculo foi diluído em meio RPMI em uma diluição 1:100, seguida de outra diluição de 1:20, resultando em uma concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL. No caso dos fungos filamentosos, a solução salina foi vertida para o tubo contendo o meio inoculado, a superfície fúngica foi raspada até a turbidez coincidir com a solução padrão de Mc Farland 0,5 e o inóculo foi transferido para o tubo original. Esse inóculo é diluído em meio RPMI em uma diluição de 1:5, resultando em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ células/mL.

6.3.7. Teste

Em cabine de fluxo laminar, foram distribuídos 100 μ L do meio RPMI em todos os poços de uma microplaca de 96 poços e fundo redondo. Em seguida, foram distribuídos 100 μ L das amostras (extratos e controle positivo) apenas nos primeiros poços da placa. Foram feitas diluições seriadas com auxílio de uma pipeta multicanal em escala 1:2 até o antepenúltimo poço de cada coluna (Figura 64). Os 100 μ L residuais foram descartados.

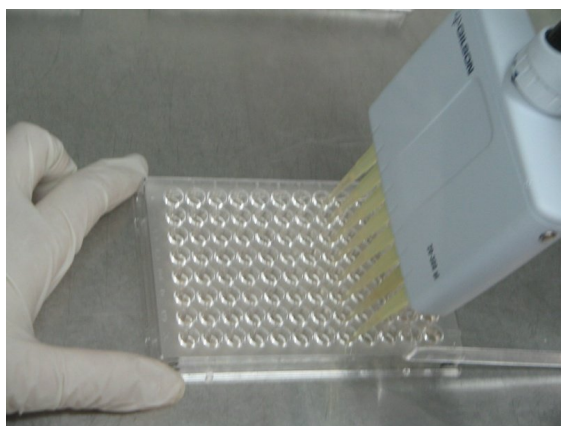


Figura 64 - Diluição seriada das amostras.

Por fim, 100 µL da suspensão fúngica foram distribuídos em todos os poços, com exceção do último poço que continha apenas meio de cultura e foi destinado para o controle de esterilidade do meio RPMI. O antepenúltimo poço apenas com meio e microrganismo foi destinado para controle de crescimento fúngico. As placas foram tampadas, seladas com filme PVC e incubadas em estufa a 37 °C.

6.3.8. Leitura das placas e valor de CIM

A leitura foi feita verificando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) visualmente, ou seja, verificar a olho nu a menor concentração das amostras capaz de inibir 100% do crescimento do microrganismo.

6.3.9. Resultados e discussões

A Tabela 23 (p.131) apresenta os resultados das CIMs (µg/mL) de **CL-1**, **CL-2** e **CL-3** frente às seguintes espécies de leveduras: *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*; e quatro isolados clínicos de dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. Das substâncias testadas, **CL-1** mostrou-se ativa apenas contra *Microsporum canis*; **CL-2** apresentou excelentes resultados contra *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, e uma atividade relativamente boa contra *Microsporum canis* e **CL-3** aparece com excelente atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, mostrando-se a mais promissora das três substâncias testadas.

Tabela 23 – Atividade antifúngica de CL-1, CL-2 e CL-3

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM, µg/mL)			
BACTÉRIAS	SUBSTÂNCIAS		
Leveduras	CL-1	CL-2	CL-3
<i>Candida albicans</i>	125,0	15,6	15,6
<i>Candida parapsilosis</i>	125,0	125,0	31,2
Isolados clínicos de dermatófilos	CL-1	CL-2	CL-3
<i>Trichophyton rubrum</i>	125,0	7,8	7,8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	125,0	7,8	15,6
<i>Microsporum canis</i>	62,5	65,2	7,8
<i>Microsporum gypseum</i>	125,0	125,0	15,6

*Os experimentos foram realizados em duplicata.

*Controle Positivo = Itraconazol.



UFC

CONCLUSÕES

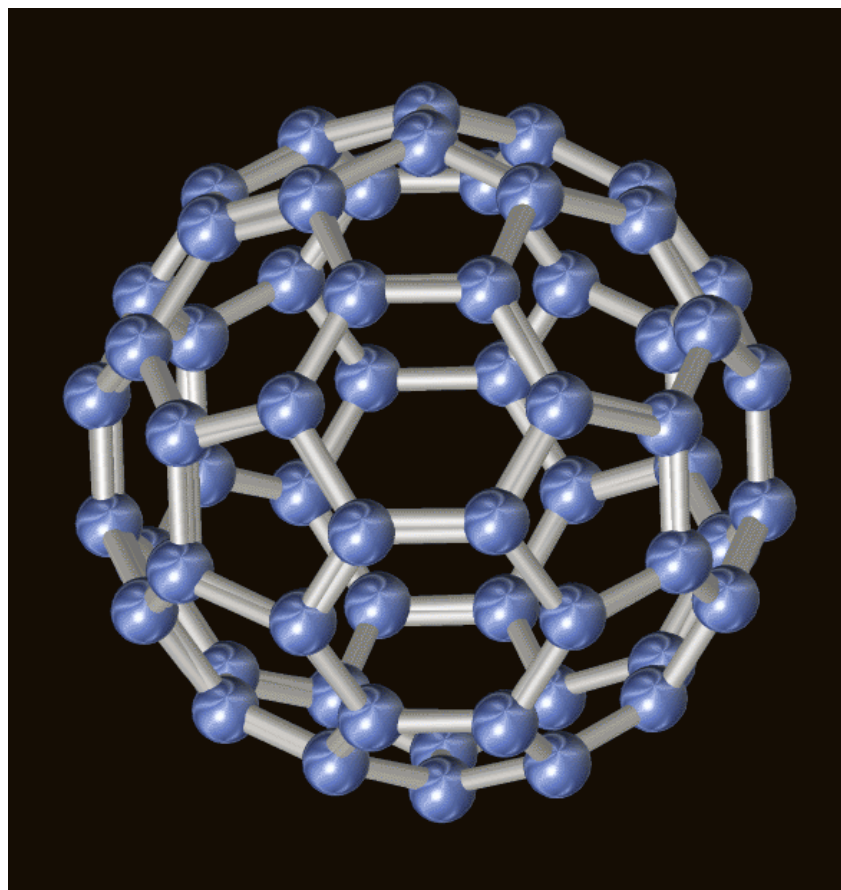
7. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato etanólico do caule de *Cestrum laevigatum*, conduziu ao isolamento de seis substâncias, das quais seis destas foram caracterizadas como a mistura de epímeros de 25(*S*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol e 25(*R*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol (gitogenina) (**CL-1**); a mistura de epímeros (25*R*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo e (25*S*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (**CL-2**); a mistura epimérica da saponina esteroideal (25*R*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil e (25*S*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil (**CL-3**); o triterpeno pentacíclico de esqueleto do tipo lupano β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol) (**CL-4**); a mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol (**CL-5**) e seus respectivos glicosídeos (**CL-6**).

A mistura epimérica das saponinas de esqueleto espirostan-25(*R,S*)-5 α -espirostan-2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil (**CL-3**) possui caráter inédito na literatura. A gitogenina já foi isolada anteriormente dos frutos de *Cestrum laevigatum* [Canham, 1950] e também para as espécies *C. parqui* e *C. elegans*; enquanto que as demais substâncias possuem caráter inédito no gênero *Cestrum*.

Das saponinas investigadas quanto ao potencial antimicrobiano, apenas **CL-3** mostrou-se ativa contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes*. A atividade leishmanicida foi realizada com **CL-1**, **CL-2** e **CL-3**, porém, apenas **CL-3** mostrou-se ativa contra *Leishmania amazonensis*. Em relação à atividade antifúngica, **CL-1** mostrou-se ativa apenas contra *Microsporum canis*; **CL-2** apresentou excelentes resultados contra *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, e uma atividade relativamente boa contra *Microsporum canis* e **CL-3** aparece com excelente atividade antifúngica contra todas as cepas testadas.

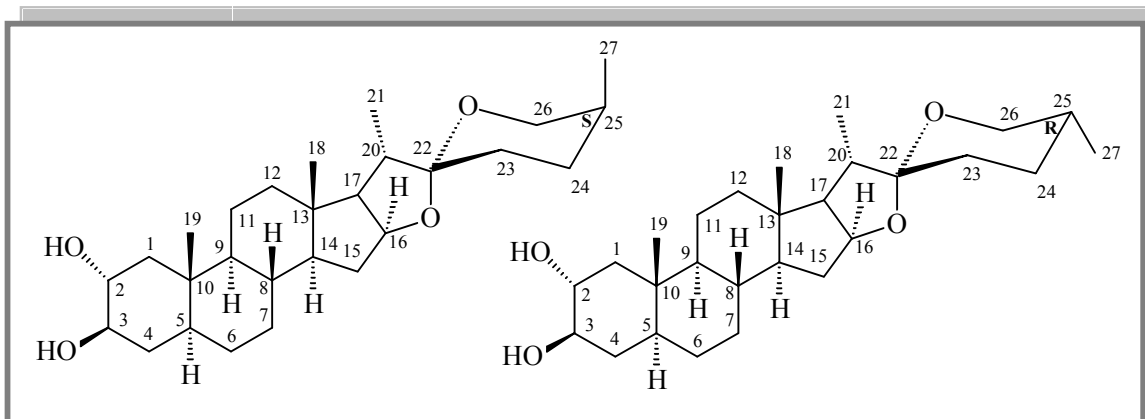
Os resultados promissores obtidos até o momento a partir do extrato etanólico do caule de *C. laevigatum* confirmam o grande potencial químico/farmacológico das espécies deste gênero, e justificam a importância do trabalho realizado.



UFC

**CONSTANTES
FÍSICAS E DADOS
ESPECTROSCÓPICOS**

8.1 CL-1



F.M.: C₂₇H₄₄O₄.

P.M.: 432 daltons.

f.f.: 273-275 °C.

Aspecto: sólido amorfo branco.

Solubilidade: Piridina.

Nome IUPAC: 25(*S*)-5 α -epirostano-2 α ,3 β -diol e 25(*R*)-5 α -epirostano-2 α ,3 β -diol.

Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm⁻¹): 3413, 2933, 2868, 1455, 1380, 1125, 1170.

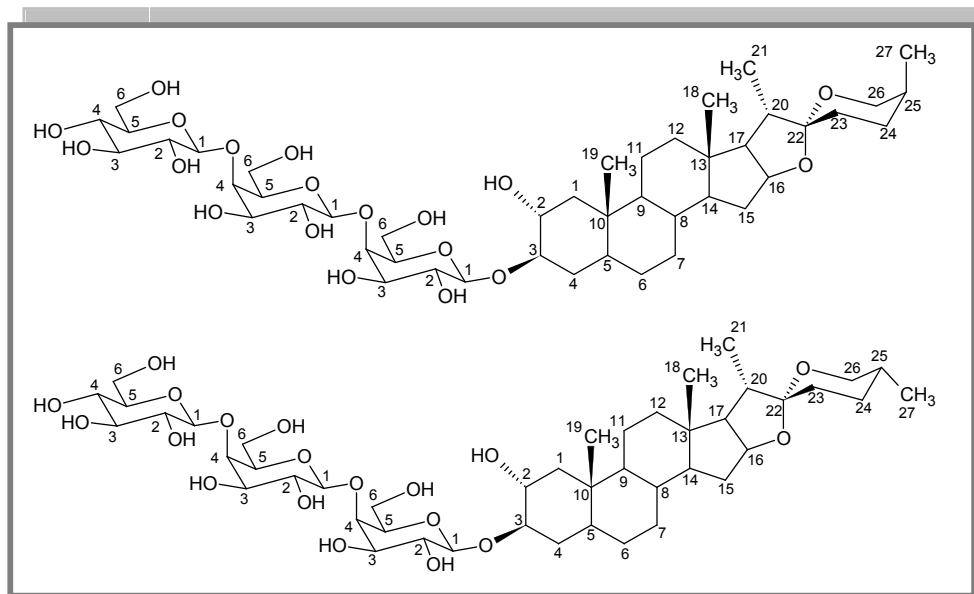
Espectrometria de RMN¹H (500MHz, piridina-*d*₅) – δ (integração, multiplicidade e constante de acoplamento): δ_{H} 4,56 (m, 1H); δ_{H} 4,07 (m, 1H); δ_{H} 3,87 (m, 1H); δ_{H} 3,60 (dd, J = 11,1 e 2,0 Hz, 1H); δ_{H} 3,36 (d, J = 10,7, 1H); δ_{H} 2,27 (dd, J = 14,5 e 4,5 Hz, 1H); δ_{H} 1,14 (d, J = 6,5 Hz, 3H); δ_{H} 1,07 (s, 3H); δ_{H} 0,85 (s, 1H); δ_{H} 0,82 (d, J = 4,3 Hz, 3H) e δ_{H} 0,69 (d, J = 5,3 Hz, 3H).

Espectrometria de RMN¹³C (125MHz, piridina-*d*₅) – δ (correlação estrutural):

46,8 (CH₂, C1); 73,4 (CH, C2); 85,2 (CH, C3); 34,2 (CH₂, C4); 45,6 (CH, C5); 28,7 (CH₂, C6); 32,1 (CH₂, C7); 35,0 (CH, C8); 54,9 (CH, C9); 37,9 (C, C10); 21,9 (CH₂, C11); 40,5 (CH₂, C12); 41,1 (C, C13); 56,7 (CH, C14); 32,4 (CH₂, C15); 81,59/81,52 (CH, C16); 63,2/62,3 (CH, C17); 16,6 (CH₃, C18); 14,0 (CH₃, C19); 42,3/42,8 (CH, C20); 15,3/15,2 (CH₃, C21); 109,6/110,0 (CH₃, C22); 32,5/26,7 (CH₂, C23); 28,7/26,5 (CH₂, C24); 30,9 (CH, C25); 67,2/65,4 (CH₂, C26); 17,6/17,0 (CH₃, C27).

66,9/65,1 (CH₂, C26); 17,3/16,3 (CH₃, C27); 104,5 (CH, C1'); 72,4 (CH, C2'); 75,4 (CH, C3'); 70,3 (CH, C4'); 77,3 (CH, C5') e 62,4 (CH₂, C6').

8.3 CL-3



F.M.: C₄₅H₇₄O₁₉.

P.M.: 918 daltons.

Aspecto: sólido amorfo branco.

Solubilidade: Piridina.

Nome IUPAC: (25*R*)-5α-epirostan-2α,3β-diol-3-*O*-β-D-galactopiranosil(1→4)-β-D-galactopiranosil(1→4)-β-D-glicopiranosil e (25*S*)-5α-epirostan-2α,3β-diol-3-*O*-β-D-galactopiranosil(1→4)-β-D-galactopiranosil(1→4)-β-D-glicopiranosil.

Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm⁻¹): 3405, 2931, 2868, 1454, 1380, 1159.

Espectrometria de RMN¹H (500MHz, piridina-*d*₅) – δ (integração, multiplicidade e constante de acoplamento): δ_H 5,71 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); δ_H 5,29 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); δ_H 4,99 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H); δ_H 4,93 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H); δ_H 4,02 (d, *J* = 10,8 Hz); δ_H 3,96 (m, 1H); δ_H 3,86 (m, 1H); δ_H 3,37 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H); δ_H 2,21 (dl, *J* = 12,1 Hz, 1H); δ_H 1,14 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H); δ_H 1,13 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); δ_H 1,09 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); δ_H 0,82 (s, 3H); δ_H 0,81 (s, 3H); δ_H 0,72 (s, 1H) e δ_H 0,70 (d, *J* = 5,3 Hz, 3H).

Espectrometria de RMN¹³C (125MHz, piridina-d₅) – δ (correlação estrutural):

46,0 (CH₂, C1); 70,4 (CH, C2); 84,7 (CH, C3); 34,3 (CH₂, C4); 44,9 (CH, C5); 28,4 (CH₂, C6); 32,2 (CH₂, C7); 34,6 (CH, C8); 54,7 (CH, C9); 37,1 (C, C10); 21,3 (CH₂, C11); 40,0 (CH₂, C12); 41,0/41,0 (C, C13); 56,6 (CH, C14); 32,4 (CH₂, C15); 81,4/81,5 (CH, C16); 63,3/63,1 (CH, C17); 16,6 (CH₃, C18); 13,7 (CH₃, C19); 42,0/45,5 (CH, C20); 15,3/15,1 (CH₃, C21); 109,5/110,0 (CH₃, C22); 31,8/26,6 (CH₂, C23); 29,5/26,5 (CH₂, C24); 30,6/27,8 (CH, C25); 67,1/65,4 (CH₂, C26); 17,6/16,6 (CH₃, C27); 103,7 (CH, C1''); 73,1 (CH, C2''); 75,0 (CH, C3''); 80,4 (CH, C4''); 76,0 (CH, C5''); 63,6 (CH₂, C6''); 105,3 (CH, C1'''); 73,4 (CH, C2'''); 75,2 (CH, C3'''); 80,5 (CH, C4'''); 75,8 (CH, C5'''); 63,4 (CH₂, C6'''); 107,4 (CH, C1'''); 76,0 (CH, C2'''); 78,8 (CH, C3'''); 69,6 (CH, C4'''); 78,5 (CH, C5'''); 61,2 (CH₂, C6''').

8.4 CL-4

F.M.: C₃₀H₅₀O.

P.M.: 426 daltons.

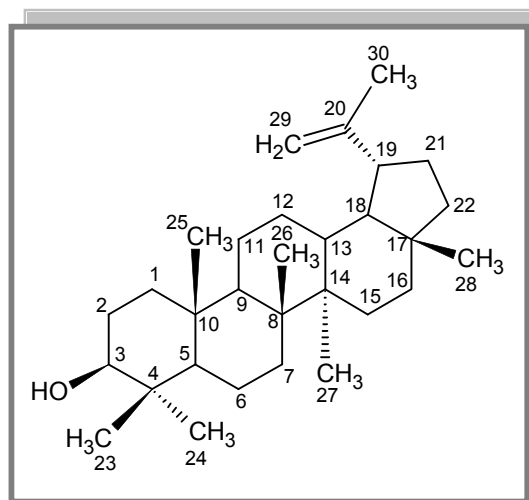
f.f.: 172 - 174 °C.

Aspecto: sólido amorfo branco.

Solubilidade: CHCl₃.

Nome IUPAC: β-lup-20(29)-en-3-ol

(lupeol).



Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm⁻¹): 3415, 2949, 1624, 1039.

Espectrometria de RMN¹H (500MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade e constante de acoplamento): δ_H 4,69 (s,1H); δ_H 4,57 (s,1H); δ_H 1,68 (s,3H); δ_H 1,03 (s,3H); δ_H 0,97 (s,3H); δ_H 0,95 (s,3H); δ_H 0,83 (s,3H); δ_H 0,79 (s,3H) e δ_H 0,76 (s,3H).

Espectrometria de RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) – δ (correlação estrutural):

38,9 (CH₂, C1); 27,6 (CH₂, C2); 79,2 (CH, C3); 39,0 (C, C4); 55,5 (CH, C5); 18,5 (CH₂, C6); 34,5 (CH₂, C7); 41,0 (C, C8); 50,6 (CH, C9); 37,4 (C, C10); 21,1 (CH₂, C11); 25,3 (CH₂,

C12); 38,3 (CH, C13); 43,0 (C, C14); 27,6 (CH₂, C15); 35,8 (CH₂, C16); 43,2 (C, C17); 48,5 (CH, C18); 48,2 (CH, C19); 151,2 (C, C20); 30,0 (CH₂, C21); 40,2 (CH₂, C22); 28,2 (CH₃, C23); 15,5 (CH₃, C24); 16,3 (CH₃, C25); 16,2 (CH₃, C26); 14,7 (CH₃, C27); 18,2 (CH₃, C28); 109,5 (CH₂, C29) e 19,5 (CH₃, C30).

8.5 CL-5

F.M.: C₂₉H₅₀O e C₂₉H₄₈O.

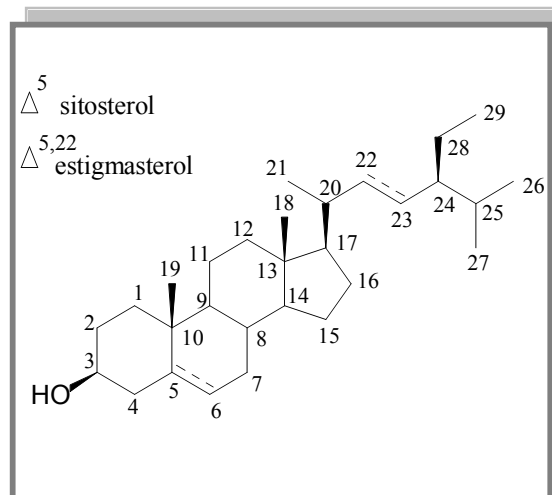
P.M.: 414 e 412 daltons.

f.f.: 141,7-145,9 °C.

Aspecto: sólido amorfo branco.

Solubilidade: CHCl₃.

Nome IUPAC: β -sitosterol e estigmasterol



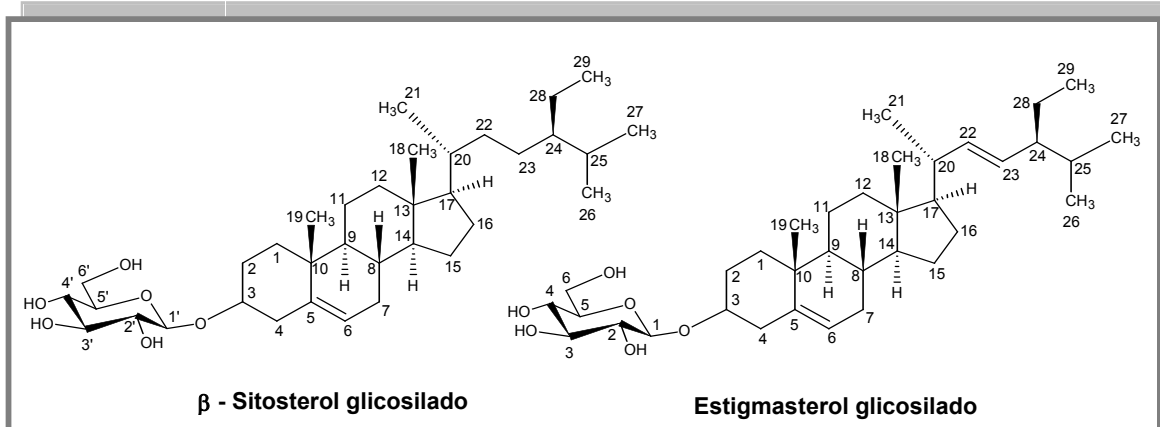
Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm⁻¹): 3432, 2940, 2868, 1636, 1053.

Espectrometria de RMN¹H (500MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade e constante de acoplamento): δ_H 5,36 (d, $J = 7,68$ Hz, 1H); δ_H 5,15 (m, 1H); δ_H 5,04 (m, 1H); δ_H 3,54 (m, 1H); δ_H 0,69-2,35 sinais referentes a grupos metílicos, metilênicos e metínicos.

Espectrometria de RMN¹³C (125MHz, CDCl₃) – δ (correlação estrutural):

37,42; 37,41 (CH₂, C1); 31,30 (CH₂, C2); 71,7; 71,4 (CH, C3); 42,4 (CH₂, C4); 140,9 (CH, C5); 121,6 (CH, C6); 31,3 (CH₂, C7); 32,0 (CH, C8); 50,3 (CH, C9); 36,6 (C, C10); 21,1 (CH₂, C11); 39,9 (CH₂, C12); 42,4 (C, C13); 56,9 (CH, C14); 24,3; 24,4 (CH₂, C15); 28,3 (CH₂, C16); 56,1; 56,2 (CH, C17); 11,9 (CH₃, C18); 19,4 (CH₃, C19); 36,2 (CH, C20); 19,0; 19,8 (CH₃, C21); 138,4 (CH, C22); 34,0 (CH₂, C22); 129,4 (CH, C23); 26,2 (CH₂, C23); 45,9 (CH, C24); 29,2 (CH, C25); 18,8 (CH₃, C26); 19,8 (CH₃, C27); 23,1 (CH₂, C28) e 11,9 (CH₃, C29).

8.6 CL-6



F.M.: $C_{35}H_{60}O_6$ e $C_{35}H_{58}O_6$.

P.M.: 576 e 574 daltons.

f.f.: 268-271 °C.

Aspecto: sólido amorfo branco. 5,07 (1H, d, $J = 7,8$ Hz)

Solubilidade: $CHCl_3$

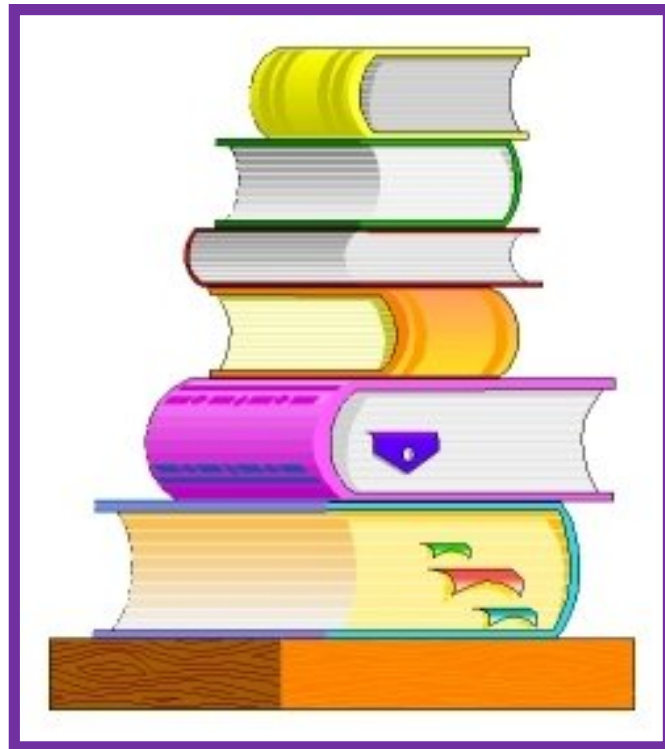
Nome IUPAC: β -sitosterol e stigmasterol glicosilados.

Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm^{-1}): 3410, 2936, 2868, 1720, 1640, 1460.

Espectrometria de RMN¹H (500MHz, $CDCl_3$) – δ (integração, multiplicidade e constante de acoplamento): δ_H 5,36 (d, $J = 7,68$ Hz, 1H); δ_H 5,21 (m, 1H); δ_H 5,05 (m, 1H); δ_H 5,07 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ_H 3,99 (m, 1H); δ_H 0,68-2,75 sinais referentes a grupos metílicos, metilênicos e metínicos.

Espectrometria de RMN¹³C (125MHz, $CDCl_3$) – δ (correlação estrutural):

37,31 (CH_2 , C1); 30,0 (CH_2 , C2); 75,1; 71,5 (CH, C3); 37,3 (CH_2 , C4); 140,7 (CH, C5); 123,5; 121,7 (CH, C6); 31,9; 31,8 (CH_2 , C7); 31,9 (CH, C8); 50,1 (CH, C9); 36,2 (C, C10); 24,3 (CH_2 , C11); 39,7 (CH_2 , C12); 42,4 (C, C13); 56,6 (CH, C14); 24,3 (CH_2 , C15); 29,3 (CH_2 , C16); 56,1 (CH, C17); 11,9; 11,7 (CH_3 , C18); 19,2 (CH_3 , C19); 40,5 (CH, C20); 21,0 (CH_3 , C21); 135,5 (CH, C22); 31,9 (CH_2 , C22); 129,5 (CH, C23); 25,4 (CH_2 , C23); 51,4; 45,9 (CH, C24); 32,1 (CH, C25); 19,2; 19,4 (CH_3 , C26); 19,4; 19,0 (CH_3 , C27); 25,4; 23,2 (CH_2 , C28); 12,3; 11,9 (CH_3 , C29); 102,3 (CH, C1'); 77,9 (CH, C2'); 78,2 (CH, C3'); 71,5 (CH, C4'); 78,3 (CH, C5') e 62,6 (CH_2 , C6').



UFC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.K. *et al.*, Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins. **Phytochemistry**, v.24 (11), 2479-2496, 1985.

AHAMD, V. U.; BAQAI, F. T.; AHMAD, R. A diosgenin tetrasaccharide from *Cestrum nocturnum*. **Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences** (1995), 50(7), 1104-10.

AHAMD, V. U.; BAQAI, F. T.; AHMAD, R. A tigogenin pentasaccharide from *Cestrum diurnum*. **Phytochemistry** (1993), 34(2), 511-15.

AHMAD, V. U.; BAQAI, F. T.; FATIMA, I.; AHMAD, R. A spirostanol glycoside from *Cestrum nocturnum*. **Phytochemistry** (1991), 30(9), 3057-61.

BAQAI, F. T.; ALI, A.; AHMAD, V. U. Two new spirostanol glycosides from *Cestrum parqui*. **Helvetica Chimica Acta** (2001), 84(11), 3350-3356.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** (1966), 45, 493-495.

BEGUM, A. S.; GOYAL, M. Research and Medicinal Potential of the genus *Cestrum* (Solanaceae) – a Review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, (2), 320-332, 2007.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. Carbon-13 NMR spectroscopy, 1nd Ed.; VCH, Weinheim, Germany, 1973.

CANHAM, P. A. S.; WARREN, F. L. Saponins. I. Isolation of gitogenin and digitogenin from *Cestrum laevigatum*. **Journal of the South African Chemical**, v.4, 9-12, 1950.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984, v. 2, 341.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press, 1981.

CUTILLO, F.; D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; ZARRELLI, A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. **Phytochemistry**, v. 67 (5), 481-485, 2006.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; GOLINO, A.; MONACO, P.; ZARRELLI, A. Isolation and characterization of new lignans from the leaves of *Cestrum parqui*. **Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis** (2006), 20(3), 293-298.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; GOLINO, A.; MONACO, P.; ZARRELLI, A. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products, **Natural Product Research**, v. 20 (3), 293-298, 2006.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; NATALE, A.; ORIANO, P.; ZARRELLI, A. Structural characterization of phytotoxic terpenoids from *Cestrum parqui*. **Phytochemistry**, v. 66 (22), 2681-2688, 2005.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; ORIANO, P.; TEMUSSI, F. Structure elucidation and phytotoxicity of C13 nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*. **Phytochemistry** (Elsevier), (2004), 65(4), 497-505.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; ZARRELLI, A. Low Molecular Weight Phenols from the Bioactive Aqueous Fraction of *Cestrum parqui*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(13), 4101-4108, 2004.

FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; IZZO, A.; NATALE, A.; PASCARELLA, M. T.; PACIFICO, S.; ZARRELLI, A.; MONACO, P. Chemical Characterization of New Oxylipins from *Cestrum parqui*, and Their Effects on Seed Germination and Early Seedling Growth. **Chemistry & Biodiversity**, (2008), v.5, 1780-1791.

FOUAD, M. A.; MOHAMED, K. M.; KAMEL, M. S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H. Cesdiurins I-III, steroidal saponins from *Cestrum diurnum* L. **Journal of Natural Medicines**, (2008), 62(2), 168-173.

HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y.; MOTIDOME, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. Steroidal saponins from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*. **Phytochemistry**, (2000), 55(7), 715-720.

HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y.; MOTIDOME, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. New polyhydroxylated steroidal sapogenin and saponin from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, (1999), 47(4), 582-584.

HUNZIKER, A. T. Estudios sobre Solanaceae XXII. Revision sinoptica de *Acnistus*. Kurtziana, 2001, v.5, 8-102.

IWAMOTO, H. K.; BELL, F. K.; LAQUER, F. O.; CARR, C. J.; KRANTZ, J. C. JR. DIGITALIS. VI. Pharmacodynamic studies on gitogenin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1947, (91), 130-2.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução á taxonomia vegetal**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1976, 3ª ed., 586-590.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol Glucosides from *Prunella Vulgaris*, **Phytochemistry**, 1990, v. 29, n° 7, 2351-2355.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYBERB, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, **Química Nova**, 2002, v. 25 (3), 429-438.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: EUFC, 1997, 141.

MI, Q.; LANTVIT, D.; REYES-LIM, E.; CHAI, H.; ZHAO, W.; LEE, I.; PERAZA-SANCHEZ, S.; NGASSAPA, O.; KARDONO, L. B. S.; RISWAN, S.; HOLLINGSHEAD, M. G.; MAYO, J. G.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Evaluation of the Potential Cancer Chemotherapeutic Efficacy of Natural Product Isolates Employing in Vivo Hollow Fiber Tests. **Journal of Natural Products**, 2002, 65(6), 842-850.

MIMAKI, Y.; KURODA, M.; KAMEYAMA, A.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. Steroidal saponins from the rhizomes of *Hosta sieboldii* and their cytostatic activity on HL-60 cells. **Phytochemistry**, 1998, v. 48 (8), 1361-1369.

MIMAKI, Y.; WATANABE, K.; SAKAGAMI, H.; SASHIDA, Y. Steroidal Glycosides from the Leaves of *Cestrum nocturnum*. **Journal of Natural Products**, 2002, v. 65 (12), 1863-1868.

MIMAKI, Y.; WATANABE, K.; ANDO, Y.; SAKUMA, C.; SASHIDA, Y.; FURUYA, S.; SAKAGAMI, H. Flavonol glycosides and steroidal saponins from the leaves of *Cestrum nocturnum* and their cytotoxicity. **Journal of Natural Products**, 2001, 64(1), 17-22.

MOHAMED, K. M.; FOUAD, M. A.; MATSUNAMI, K.; KAMEL, M. S.; OTSUKA, H. A new norlignan glycoside from *Cestrum diurnum* L. **ARKIVOC (Gainesville, FL, United States)**, 2007, (13), 63-70.

MORITA, T.; USHIROGUCHI, T.; HAYASHI, N.; MATSUURA, H.; ITAKURA, Y.; FUWA, T. Steroidal saponins from elephant garlic, bulbs of *Allium ampeloprasum* L., **Chemical-Pharmacy**, 1988, v. 36, (9), 3480-3486.

NAGELS, L.; VAN DONGEN, W.; PARMENTIER, F. Cestric acid, a caffeic acid ester from *Cestrum euanthes*. **Phytochemistry** (Elsevier), 1982, 21(3), 743-6.

PEARCE, C. M.; SKELTON, N. J.; NAYLOR, S.; KANAAN, R.; KELLAND, J.; OELRICHS, P. B.; SANDERS, J. K. M.; WILLIAMS, D. H. Parquin and carboxyparquin, toxic kaurene glycosides from the shrub *Cestrum parqui*. **Journal of the Chemical Society**,

Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999) (1992), (5), 593-600.

PEREIRA, C. A. **Plantas Tóxicas e Intoxicações na Veterinária**. UFG: Goiânia, 1992, 279.

PLOCK, A.; BEYER, G.; HILLER, K.; GRUNDEMANN, E.; KRAUSE, E.; NIMTZ, M. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. **Phytochemistry**, 2001, v. 57 (3), 489-496.

PREMA, T. P.; RAGHURAMULU, N.; Free vitamin D3 metabolites in *Cestrum diurnum* leaves, **Phytochemistry**, 1994, v. 37 (3), 677-681.

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNÁNDEZ, I.; ALBÁN, J.; LOCK, O. **Journal of Ethnopharmacology**, 2003, v. 88 (2-3), 199-204.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: Inpa, 1999, 800p.

RIBEIRO, M. R. J. C. Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste – *Tocoyena sellowiana* SCHUM. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (1997).

SAHAI, M.; SINGH, M.; SIMGH, A. K.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Cesternosides A and B, novel glucosides from the leaves of *Cestrum nocturnum*. **Journal of Chemical Research, Synopses**, 1994, (1), 22-3.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos, 6ª Ed., Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2000.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, Information Retrieval, 1992.

WRAY, V. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moities of natural produtcs: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L., **Phytochemistry**, 2001, v. 57, 489-496.

ZHAI, L.; CHEN. M.; BLOM. J.; THEANDER. T. G.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **J Antimicrob Chemother**. 1999, 43, 793-803.

ZHONG, Z.; ZHAO, S. Extraction of nocturnoside B from *Cestrum nocturnum* and its medical application. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, (2008), 6pp.