

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Alison Geraldo Pacheco

**Estudo Químico de Constituintes das Cascas do Caule de *Aristolochia esperanzae*
Kuntze (Aristolochiaceae), Empregando Métodos Espectroscópicos e Teóricos.**

UFMG-ICEx/DQ.939^a

T. 420^a

Alison Geraldo Pacheco

**Estudo Químico de Constituintes das Cascas do Caule de *Aristolochia esperanzae*
Kuntze (Aristolochiaceae), Empregando Métodos Espectroscópicos e Teóricos.**

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

Belo Horizonte
2013

P116

2013

T

Pacheco, Alison Geraldo
Estudo químico de constituintes das cascas do caule de *Aristolochia esperanzae* kuntze (Aristolochiaceae) empregando métodos espectroscópicos e teóricos. Alison Geraldo Pacheco. 2013.

IV, 121 p. : il.

Orientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara

Co-Orientadora: Dorila Piló Veloso

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química.

Bibliografia

1. Química orgânica - Teses 2. Química de produtos naturais - Teses 3. Aristolochiaceae - Métodos espectroscópicos e teóricos - Teses I. Alcântara, Antônio Flávio, Orientador II. Veloso, Dorila Piló, Co-Orientadora II. Título

CDU 043

UFMG


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br




"Estudo Químico de Constituintes de Cascas do Caule de *Aristolochia
esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae), Empregando Métodos Espectroscópicos e
Teóricos"

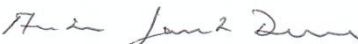
Alison Geraldo Pacheco


Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador
UFMG


Profa. Dorila Piló Veloso - Co-Orientadora
UFMG


Prof. Mário Geraldo de Carvalho
UFRRJ


Prof. Antônio Jacinto Demuner
UEV


Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
UFMG


Prof. Adão Aparecido Sabino
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

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

Agradecimentos

À Deus, por mais esta vitória.

Aos meus pais, pela confiança e motivação, e por acreditar comigo neste objetivo e à Graciele, querida irmã.

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

À professora Dorila Piló Veloso pela co-orientação.

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

Aos professores que fundamentaram e possibilitaram minha formação.

À Universidade Federal de Minas Gerais onde, com muito orgulho, me formei profissionalmente.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – campus Inconfidentes, onde exerço minhas atividades profissionais e aos recentes amigos deste Instituto Federal que me receberam de braços abertos.

A todos que em algum momento sentiram a minha ausência em função da dedicação necessária para realização deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

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

Lista de Figuras	3
Lista de Tabelas	7
Lista de Esquemas	9
Lista de abreviaturas, acrônimos e símbolos	10
Resumo	12
Abstract	13
Objetivos	14
Capítulo I: A espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	15
I.1. A família Aristolochiaceae	16
I.2. O Gênero <i>Aristolochia</i>	16
I.3. Sobre doenças reumáticas	17
I.4. A espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	19
I.5. Estudos químicos sobre <i>Aristolochia esperanzae</i>	20
Capítulo II: Modelagem molecular e química computacional	25
II.1. Introdução	26
II.2. Métodos clássicos	28
II.3. Métodos Quânticos	29
II.4. A interação soluto-solvente	39

Capítulo III: Parte experimental	42
III.1. Materiais	43
III.2. Metodologia fitoquímica	44
III.3. Metodologia teórica	52
Capítulo IV: Elucidação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados	54
VI.1. Análise estrutural de CA5-CA6-R2 (AED1)	55
VI.2. Análise estrutural de grupo CA5-CA6-R4-G3 (AED3)	74
VI.3. Análise estrutural de AEY	83
VI.4. Análise estrutural de CA7-2-R2 (AED2)	89
Capítulo V. Aplicação dos métodos computacionais no estudo estrutural de triterpenos pentacíclicos	97
Considerações finais e perspectivas	108
Referências	113
Anexos	120

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Esqueleto básico de ácidos aristolóchicos e aristolactamas isolados de espécies do gênero <i>Aristolochia</i> .	17
Figura I.2. Fotos ilustrativas de <i>Aristolochia esperanzae</i> Kuntze.	19
Figura I.3. Estruturas básicas de diterpenos isolados de <i>Aristolochia esperanzae</i> .	20
Figura I.4. Diterpenos isolados da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	21
Figura I.5. Triterpenos isolados da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i> .	22
Figura I.6. Lignanas isoladas da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i> .	22
Figura I.7. Ácidos aristolóchicos isolados da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i> .	23
Figura I.8. Fitoconstituintes isolados recentemente da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i> .	24
Figura IV.1. Espectro de RMN de ^1H de AED1 (400 MHz, CDCl_3).	55
Figura IV.2. Expansões do espectro de RMN de ^1H de AED1 (400 MHz, CDCl_3).	56
Figura IV.3. Espectro de RMN de ^{13}C de AED1 (100 MHz; CDCl_3).	57
Figura IV.4. Subespectro DEPT-135° (100 MHz; CDCl_3) de AED1 (a) e expansão correspondente (b).	58
Figura IV.5. Mapa de contornos HSQC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).	60
Figura IV.6a. Expansão do mapa de contornos HSQC de AED1 de δ_{H} 4,50 a 1,00 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).	60

Figura IV.6b. Expansão do mapa de contornos HSQC de AED1 de δ_H 7,10 a 5,00 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).	61
Figura IV.7. Mapas de contornos COSY de AED1 (400 MHz; CDCl_3).	62
Figura IV.8. Mapa de contornos HMBC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).	64
Figura IV.9a. Expansão do mapa de contornos HMBC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).	64
Figura IV.9b. Expansão do mapa de contornos HMBC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).	65
Figura IV.10. Mapa de contornos NOESY de AED1 (400 MHz; CDCl_3).	66
Figura IV.11. Ampliação do mapa de contornos NOESY de AED1 (400 MHz; CDCl_3).	66
Figura IV.12. Estereoisômeros da cubebina.	68
Figura IV.13. Diferentes sítios de interação propostos entre a molécula de 8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i> -cubebina e uma molécula de solvente.	71
Figura IV.14. Sítios de interação preferencial entre a molécula de 8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i> -cubebina e os solventes acetona (1), piridina (2) e dimetilsulfóxido (3).	73
Figura IV.15. Espectro de RMN de ^1H de AED3 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).	74
Figura IV.16. Expansões do espectro de RMN de ^1H de AED3 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), na região entre: (a) δ_H 11,0 a 9,0 e (b) δ_H 8,5 a 7,0.	75
Figura IV.17. Espectro de RMN de ^{13}C (superior) e subespectro DEPT 135° (inferior) de AED3 (100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	76
Figura IV.18. Mapa de contornos HSQC de AED3 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) e expansão de δ_H 7,0 a 9,2 e δ_C 100 a 132.	77
Figura IV.19. Mapa de contornos COSY de AED3 e expansão correspondente (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	78
Figura IV.20. Mapa de contornos HMBC de AED3 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).	79

Figura IV.21. Expansões do mapa de contornos HMBC de AED3 na região entre: (a) δ_H 11,0 a 6,8 e δ_C 175,0 a 100,0 e (b) de δ_H 8,0 a 7,0 e δ_C 137,0 a 120,0 (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).	80
Figura IV.22. Mapa de contornos NOESY de AED3 e expansão correspondente (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).	81
Figura IV.23. Espectro de absorção na região do Infravermelho de AEY (KBr; cm^{-1}).	83
Figura IV.24. Espectro de RMN de 1H e expansões correspondentes de AEY (200 MHz, $CDCl_3$).	84
Figura IV.25. Espectro de RMN de ^{13}C de AEY (50 MHz; $CDCl_3$).	85
Figura IV.26. Espectro de RMN de DEPT-135° de AEY (50 MHz; $CDCl_3$).	85
Figura IV.27. Mapa de contornos HSQC de AEY (1H : 200 MHz; ^{13}C : 50 MHz; $CDCl_3$).	86
Figura IV.28. Mapa de contornos HMBC de AEY (1H : 200 MHz; ^{13}C : 50 MHz; $CDCl_3$).	87
Figura IV.29. Mapa de contornos NOESY de AEY (200 MHz; $CDCl_3$).	87
Figura IV.30. Espectro de RMN de 1H (a) e expansões correspondentes de AED2/AED4 (400 MHz, DMSO- d_6).	89
Figura IV.31. Espectro de RMN de ^{13}C (a) e expansões de AED2/AED4 (100 MHz; DMSO- d_6).	90
Figura IV.32. Espectro de RMN de DEPT-135° de AED2/AED4 (100 MHz; DMSO- d_6).	91
Figura IV.33. Mapa de contornos HSQC de AED2/AED4 (a) e expansão (b) correspondente (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).	92
Figura IV.34. Mapa de contornos COSY de AED2/AED4 e expansão correspondente (400 MHz; DMSO- d_6).	93
Figura IV.35. Mapa de contornos HMBC de AED2/AED4 (a) e ampliação correspondente (b) (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).	94
Figura IV.36. Mapa de contornos NOESY de AED2/AED4 (a) e expansão correspondente (b), (400 MHz; DMSO- d_6).	95

Figura V.1. Estrutura básica de triterpenos pentacíclicos do tipo olenano, ursano, fernano e lupano.	99
Figura V.2. Estrutura proposta para triterpenos pentacíclicos do tipo ursano isolados de <i>Myricaria elegans</i> .	101
Figura V.3. Possibilidades configuracionais consideradas na análise estrutural de eleganene-A - triterpeno pentacíclico do tipo ursano isolado de <i>Myricaria elegans</i> .	103
Figura V.4. Possibilidades configuracionais consideradas na análise estrutural de eleganene-B - triterpeno pentacíclico do tipo ursano isolado de <i>Myricaria elegans</i> .	103
Figura V.5. Estruturas de eleganene-A (1) e eleganene-B (2) obtidas por correlações de dados teóricos (δ_C^{Calc}) e experimentais de ^{13}C (δ_C^{Lit}).	104
Figura V.6. Estrutura representativa das possibilidades configuracionais consideradas na análise estrutural de eleganene A – triterpeno pentacíclico do tipo ursano isolado de <i>Myricaria elegans</i> .	106
Figura V.7. Estrutura de eleganene-A obtida por correlações de dados teóricos e experimentais de ^{13}C .	107
Figura VI.1. Fitoconstituintes isolados do extrato de cascas de <i>A. esperanzae</i> (1 = (8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-Cubebina, 2 = (8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-Cubebina, 3 = ácido 3-hidroxi-4-metoxi-10-nitrofenantreno 1-carboxílico, 4 = 2,2',6,6'-tetra- <i>terc</i> -butil-4,4'-etilenodifenol, 5 = 5,5'-dihidroxi-1 <i>H</i> ,1 <i>H</i> '-2,2'-biindeno - 1,1'-diona).	109
Figura VI.2. Sítios de interação preferencial entre a molécula de 8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i> -cubebina e os solventes acetona (1), piridina (2) e dimetilsulfóxido (3).	111
Figura VI.3. Estruturas de eleganene-A (1) e eleganene-B (2) obtidas por correlações de dados teóricos e experimentais de deslocamento químico de carbono.	112

LISTA DE TABELAS

.....

Tabela I.1. Classificação taxonômica da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	20
Tabela I.2. Diterpenos isolados da espécie <i>Aristolochia esperanzae</i>	21
Tabela III.1. Fracionamento cromatográfico do extrato CA (180,0000 g)	45
Tabela III.2. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA5 e CA6 (350,3 mg)	46
Tabela III.3. Fracionamento cromatográfico do grupo CA5-CA6-R4 (98,5 mg)	47
Tabela III.4. Fracionamento cromatográfico de CA7 (130,0 mg)	47
Tabela III.5. Fracionamento cromatográfico do grupo CA7-R2 (48,4 mg)	48
Tabela III.6. Fracionamento cromatográfico do grupo CA8 e CA9 (1.130,8 mg)	48
Tabela III.7. Refracionamento cromatográfico de CA8-CA9-R6 (570,6 mg)	49
Tabela III.8: Refracionamento cromatográfico de CA8-CA9-R6-R1 a CA8-CA9-R6-R3 (71,2 mg)	50
Tabela III.9. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA10 a CA12 (641,1 mg)	51
Tabela III.10. Fracionamento cromatográfico do grupo CA10-CA11-CA12-R6 (79,6 mg)	52
Tabela IV.1. Dados de RMN de ^{13}C registrados na literatura para os isômeros (8 <i>S</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-cubebina, (8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-cubebina e (8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-cubebina e os dados de RMN de ^{13}C atribuídos a AED1-1 e AED1-2	67
Tabela IV.2. Valores de deslocamento químico de ^{13}C calculados ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}$) para tetrametilsilano a partir de cálculos HF, BLYP, B3LYP, e PBE com conjunto de base 6-31G* para estruturas no estado gasoso e sem considerar interações intermoleculares	69

Tabela IV.3. Coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado e experimental ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{C}}^{\text{Lit}}$) obtidas para (8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-cubebina e (8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-cubebina em diferentes níveis de cálculo para estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares	70
Tabela IV.4. Coeficientes de correlação dos dados de RMN de ^{13}C de estereoisômeros da cubebina com os valores calculados (B3LYP/6-31G*) atribuídos a AED1-1 e AED1-2 isômeros da cubebina em nível de cálculo para estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares	71
Tabela IV.5. Dados de deslocamento químico experimental de ^{13}C de 8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i> -cubebina obtidos nos solventes acetona- <i>d</i> ₆ , dimetilsulfóxido- <i>d</i> ₆ e piridina- <i>d</i> ₆	72
Tabela IV.6. Coeficientes de correlação das curvas de deslocamento experimental de ^{13}C dos fitoconstituintes isolados (δ_{C}) e deslocamento químico calculado ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}$) para os sistemas 8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i> -cubebina – solvente (acetona, dimetilsulfóxido e piridina) utilizando o nível de cálculo B3LYP/6-31G*	73
Tabela IV.7. Atribuição dos sinais de RMN experimentais e calculados ($^{\text{calc}}\delta_{\text{C}}$) de ^1H e de ^{13}C de AED3	82
Tabela IV.8. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AEY	88
Tabela IV.9. Resultado de análise elementar de AEY	88
Tabela IV.10. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AED2/AED4	96
Tabela V.1. Energia eletro-nuclear e coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado e experimental ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{C}}^{\text{Lit}}$) obtidos para as estruturas dos estereoisômeros de eleganene-A (1) e eleganene-B (2) para estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares	104
Tabela V.2. Energia eletro-nuclear e coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado e experimental ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{C}}^{\text{Lit}}$) obtidos para as estruturas dos estereoisômeros de eleganene-A (1) com estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares	107

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema II.1. Métodos aplicados à modelagem molecular.	27
Esquema III.1. Obtenção dos extratos etanólicos das cascas e do cerne de <i>A. esperanzae</i> .	45
Esquema V.1. Biossíntese do esqualeno, precursor de triterpenos, a partir de isopentilpirofosfato.	100
Esquema V.2. Biossíntese de triterpenos pentacíclicos do tipo olenano e ursano a partir do óxido de esqualeno.	100

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

AR	- Artrite reumatóide
AcOEt	- Acetato de Etila
CA	- Extrato etanólico das cascas <i>de A. esperanzae</i>
CC	-Cromatografia em coluna
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica em gel
CCDS	- Cromatografia em camada delgada de sílica em gel
CE	- Extrato etanólico do cerne <i>de A. esperanzae</i>
COSY	- <i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	- Duplete
<i>dd</i>	- Duplete duplo
<i>ddd</i>	- Duplo duplete duplo
DCM	- Diclorometano
DEPT-135°	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> – ângulo 135°
DFT	- Teoria do Funcional de Densidade (<i>Density Functional Theory</i>)
EtOH	- Etanol
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
GPC	- Cromatografia por permeação em gel ou por seleção de tamanho
HEX	- Hexano
HF	- Hartree Fock
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>

IV	- Infravermelho
J	- Constante de acoplamento escalar
m	- Multipleteo
MeOH	- Metanol
NOESY	- <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
PES	- Potential energy surface
RMN de ^{13}C	- Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	- Simpleto
sl	- Simpleto largo
t	- Tripleto
td	- Tripleto duplo
T_f	- Temperatura de Fusão
TMS	- Tetrametilsilano

RESUMO

A espécie *Aristolochia esperanzae* é utilizada amplamente para o tratamento de doenças reumáticas. Este trabalho descreve o isolamento por técnicas cromatográficas e caracterização de metabólitos secundários de cascas do caule desta planta e a determinação estrutural dos fitoconstituintes isolados. Das frações menos polares, obtidas após refracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule, foram isoladas lignanas, ácidos aristolóchicos, aristolactamas, diterpenos e triterpenos, relatados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho, deu-se continuidade ao estudo, sendo que, das frações de média polaridade, foram isoladas duas lignanas (α -cubebina e β -cubebina), um ácido aristolóchico (ácido 3-hidróxi-4-metóxi-10-nitrofenantreno-1-carboxílico) e dois derivados fenólicos diméricos (2,2',6,6'-tetra-*terc*-butil-4,4'-etilenodifenol e 5,5'-di-hidróxi-1H,1H'-2,2'-biindeno-1,1'-diona). A análise estrutural dos compostos envolveu principalmente técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13, HSQC, HMBC, NOESY e COSY. O ácido aristolóchico e a cetona dimérica não apresentam registros de isolamento na literatura, sendo, portanto, inéditos. A análise estrutural destes compostos e de triterpenos pentacíclicos foi realizada também por técnicas de modelagem molecular e química computacional.

ABSTRACT

The species *Aristolochia esperanzae* is widely used for the treatment of rheumatic diseases. This work describes the chromatographic isolation of the chemical constituents of the stem bark of this plant and structural analysis of the obtained phytochemicals. Chromatographic fractionation of less polar fractions of the ethanolic extract provides lignans, aristolochic acids, aristolactams, diterpenes, and triterpenes which were previously reported by the our research group. In this present work, the phytochemical study of medium polarity fractions was carried out, providing lignans (α - and β -cubebin), aristolochic acid (3-hydroxy-4-methoxy-10-nitrofenantreno 1 - carboxylic) and phenol derivatives dimer (2,2', 6,6'-tetra-*tert*-butyl-4,4'-etilenodifenol and 5,5'-dihydroxy-1H, 1H'-2, 2'-biindeno-1,1'-dione). Structural analysis of these compounds was mainly based on nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon-13, HSQC, HMBC, NOESY, and COSY techniques. Aristolochic acid and ketone dimer have not been recorded in the literature, being then new compounds. Structural analysis of these compounds and pentacyclic triterpenes was also performed by molecular modeling techniques.

OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo principal realizar o estudo fitoquímico das frações de média polaridade obtidas do extrato etanólico das cascas de *Aristolochia esperanzae*. Para a análise estrutural dos fitoconstituintes foi proposto o uso das técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, HSQC, HMBC, NOESY e COSY, além de técnicas de modelagem molecular.

O uso de metodologia teórica foi proposto para determinação configuracional e conformacional das estruturas dos fitoconstituintes isolados. Neste estudo, correlações entre dados experimentais de RMN de ^{13}C e valores calculados de deslocamento químico foram consideradas. Otimizações de geometria e cálculos de deslocamento químico foram realizados usando métodos HF e DFT.

Capítulo I:
A espécie *Aristolochia esperanzae*

I. 1. A família Aristolochiaceae

A família Aristolochiaceae, uma das famílias mais primitivas de Angiospermae, pertence à superordem Magnoliiflorae. Essa família é subdividida em duas subfamílias e cinco tribos, sendo constituída por sete gêneros (*Apama*, *Aristolochia*, *Asarum*, *Euglypha*, *Holostylis*, *Saruma* e *Thottea*) com cerca de 400 espécies.¹ A família Aristolochiaceae tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido a suas espécies apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais pode-se citar as atividades sedativa, antitérmica, estomacal, contraceptiva, abortiva, anti-inflamatória, depurativa, diurética, emenagoga, antirreumática, antisséptica e antiofídica.²⁻⁵

I.2. O Gênero *Aristolochia*

O gênero *Aristolochia* é constituído por espécies exóticas, cujo relato de propriedades medicinais é observado desde os povos da antiguidade. Dentre essas propriedades, destacam-se a ação tônica excitante, atuação direta nas contrações uterinas, neutralização de venenos ofídicos e contra amenorréia.⁶ Na jardinocultura, espécies do gênero *Aristolochia* são utilizadas para ornamentação apresentando características desejáveis como reprodução através de sementes e fácil cultivo. Algumas espécies apresentam flores belas e outras, odores nauseabundos. Muitas de suas espécies são classificadas como plantas carnívoras, devido ao fato de pequenos insetos penetrarem no bojo da flor e não conseguirem sair, morrendo, portanto, em seu interior.⁷

O gênero *Aristolochia* compreende aproximadamente 300 espécies de ervas anuais e trepadeiras, com distribuição predominantemente tropical. Cerca de 90 espécies desse gênero são encontradas no Brasil¹. As espécies desse gênero apresentam grande dispersão geográfica e, na flora brasileira, apresentam numerosos e belos representantes.⁷

O gênero *Aristolochia* tem sido documentado quimicamente desde 1951,⁸ revelando uma química bastante variada. Os principais metabólitos secundários isolados de espécies desse gênero são terpenoides, lignoides, alcaloides e ácidos graxos e seus derivados.¹ O gênero *Aristolochia* caracteriza-se também pela variedade de derivados nitrogenados encontrados em várias de suas espécies. Os diferentes ácidos aristolóchicos, de natureza nitrofenantrênica, ocorrem na maioria das vezes acompanhados pelas lactamas correspondentes, as aristolactamas.^{9,10} Esses ácidos aristolóchicos e aristolactamas, cujas estruturas básicas são mostradas na Fig. I.1, podem ser oxigenados em diferentes posições, levando a uma enorme variação no padrão de substituição

dessas substâncias. Adicionalmente, alguns derivados podem não apresentar o grupo nitro na posição C-10.¹

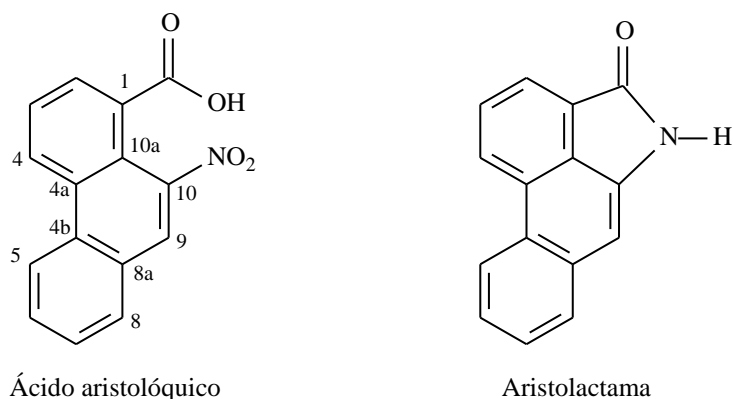


Figura I.1. Esqueleto básico de ácidos aristolóquicos e aristolactamas isolados de espécies do gênero *Aristolochia*.

Em função do amplo espectro de classes de substâncias biologicamente importantes encontradas em espécies do gênero *Aristolochia*, justifica-se o estudo fitoquímico de suas espécies para explorar ainda mais o potencial químico de seus produtos naturais.

I.3. Sobre doenças reumáticas

As várias definições de Artrite Reumatóide (AR) são unânimes em considerá-la como uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, ocorrendo em todas as idades e apresentando, como manifestação predominante, o envolvimento repetido e habitualmente crônico das estruturas articulares e periarticulares. Contudo, pode afetar o tecido conjuntivo em qualquer parte do organismo e originar as mais variadas manifestações sistêmicas.⁷

A AR tem na maioria das vezes um início insidioso, lento e progressivo e, apesar de ser de etiologia desconhecida, acredita-se que exista uma contribuição de vários fatores para o seu aparecimento, nomeadamente genéticos, imunológicos, ambientais e hormonais.¹² O envolvimento articular é geralmente simétrico, acompanhando-se por limitação progressiva da mobilidade articular e atrofia dos grupos musculares relacionados com as articulações atingidas.

A dor articular está associada à rigidez articular matinal, outro dos sintomas frequentemente presentes, geralmente com uma duração superior a 30 min, afetando todas as articulações.¹³ Assim, o impacto da AR como doença crônica é extremamente abrangente. A sua progressão leva à destruição articular e resultante incapacidade, interferindo não só nas atividades diárias do

indivíduo afetado.^{14,15} Além disso, também ocasiona perturbações psicológicas e sociais e altera o bem estar e a qualidade de vida, que são modificados em função dos sintomas, dos tratamentos e das limitações que a doença acarreta.¹⁶

As drogas usadas no tratamento de AR aliviam a dor, reduzem os danos às articulações ou modificam o curso da doença. Os anti-inflamatórios hormonais corticosteróides e glicocorticóides (cortisona e prednisona) e não hormonais (AAS, indometacina, ibuprofeno e diclofenaco) apresentam ações analgésicas e antipiréticas, meramente sintomáticas. As drogas imunomodulatórias (anti-maláricos, metotrexate, sais de ouro, azatioprina e ciclosporina A) apresentam ação lenta na remissão da atividade da doença.^{17,18} Essas drogas promovem indisposições estomacais e até úlceras hemorrágicas. Os glicocorticóides reduzem as inflamações, porém apresentam efeitos adversos graves. Historicamente, três medicamentos surgiram como grandes inovadores no tratamento de artrite: *Vioxx*, *Bextra* e *Celebra*.¹⁹ Essas drogas seletivas atuam na inibição de enzimas Cox-2 associadas a processos inflamatórios e apresentam o benefício de não afetar o aparelho digestivo. Entretanto, estudos demonstraram elevada incidência de doenças cardiovasculares em decorrência do uso do medicamento *Vioxx*. Assim, o FDA (*Food and Drug Administration*) determinou a retirada deste medicamento do mercado. Os medicamentos *Celebra* e *Bextra* são disponibilizados no mercado farmacêutico. Recentemente, surgiram novas opções medicamentosas como *Arcoxia* e *Prexige* que apresentam também gastroproteção. Entretanto, estudos clínicos indicaram risco de doenças cardiovasculares pelo uso das alternativas medicamentosas disponíveis no mercado farmacêutico para o tratamento de AR. Em função disso, órgãos de controle e regulação estabelecem rigorosos critérios para formulação, indicação e consumo de tais medicamentos.¹⁹

Na busca de novas alternativas medicamentosas que promovam menores efeitos colaterais ao tratamento de AR, nosso grupo de pesquisas tem realizado levantamentos etnofarmacológicos sobre *Aristolochia esperanzae* Kuntze (cipó mil-homens). Essa espécie é encontrada no cerrado de Minas Gerais, sendo muito empregada no tratamento de reumatismo na medicina popular desta região.¹¹

I.4. A espécie *Aristolochia esperanzae*

A planta apresenta caules adultos lenhosos, recobertos de camada de córtex rimuloso, flores axilares e solitárias, de coloração verde-amarelado até alvacento-amarelado, com nervuras, venulações e máculas avermelhadas, conforme mostrados na Figura I.2.



Figura I.2. Fotos ilustrativas de *Aristolochia esperanzae* Kuntze.

A espécie *Aristolochia esperanzae* é encontrada no Brasil, Paraguai, Bolívia e Norte da Argentina.⁷ A Tabela I.1 (p. 20) apresenta a classificação taxonômica da espécie *Aristolochia esperanzae*.^{1,20} Essa espécie apresenta como sinônímia *Aristolochia boliviensis* O. Kuntze²¹, sendo conhecida popularmente como mil-homens, papo-de-peru, papo-de-peru-do-miúdo, jarrinha, angélico, anhangá-potira, cassauí, cipó cassauí, cipó-mil-homens, jarro, milhomens, urubu-caá e, ainda, como papito nos países de língua espanhola.⁷

Tabela I.1. Classificação taxonômica da espécie *Aristolochia esperanzae*

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

I.5. Estudos químicos sobre *Aristolochia esperanzae*

O interesse no estudo fitoquímico dessa espécie deve-se ao uso popular em Minas Gerais no tratamento de doenças reumáticas em geral, justificando-se por registros em literatura do uso popular de muitas espécies do gênero *Aristolochia* no tratamento de doenças tanto reumáticas quanto inflamatórias.^{2,11} Diterpenos, triterpenos, lignoides e constituintes nitrogenados de natureza não alcaloídica foram isolados anteriormente das folhas e raízes de *A. esperanzae*.¹

I.5.1. Constituintes diterpênicos

Vários compostos diterpênicos foram isolados de *Aristolochia esperanzae*. A maioria dos diterpenoides deriva-se dos esqueletos clerodânicos e labdânicos (Figura I.3). A Tabela I.2 (p.21) e a Figura I.4 (p. 21) apresentam os diterpenoides isolados de *A. esperanzae*.

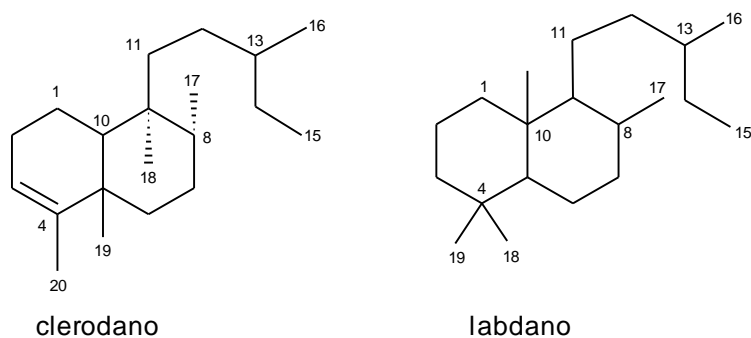


Figura I.3. Estrutura básica das classes de diterpenos isolados de *Aristolochia esperanzae*.

Tabela I.2. Diterpenos isolados da espécie *Aristolochia esperanzae*

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-*ent*-3-Cleroden-15-oato de metila (populifolato de metila) (**1**)²²

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-*ent*-clerod-3,13-dien-15-oato de metila (**2**)²²

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-2-oxo-*ent*-3-cleroden-15-oato de metila (**3**)²²

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-2-oxo-*ent*-clerod-3,13-dien-15-oato de metila(**4**)²²

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-*ent*-2α-hidroperoxi- 3-cleroden-15-oato de metila (**5**)²²

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-*ent*-2α-hidroperoxi-clerod-3,13-dien-15-oato de metila (**6**)²²

Ácido (5*R*,9*S*,10*S*)-*ent*-labd-8(17),13-dien-15-óico (**7**)²³

Ácido (5*R*,9*S*,10*S*)-*ent*-labd-6β-hidroxi-8(17),13-dien-15-óico (**8**)²³

(5*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-*ent*-labd-8(17),13-dien-15-oato de metila (**9**)²³

(5*R*,9*S*,10*S*)-*ent*-labd-6β-hidroxi-8(17),13-dien-15-oato de metila (**10**)²³

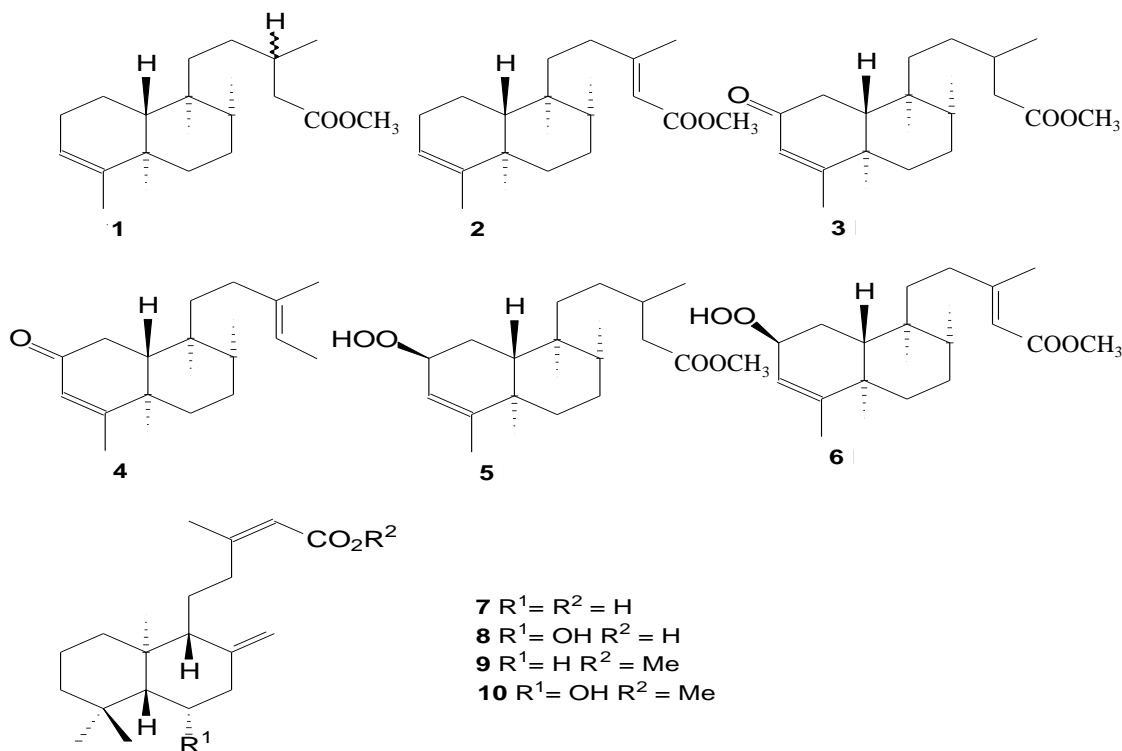


Figura I.4. Diterpenos isolados da espécie *Aristolochia esperanzae*.

I.5.2. Constituintes triterpênicos

O isolamento de triterpenos é frequente na espécie *Aristolochia esperanzae*,²⁴ sendo representados pelos compostos mostrados na Figura I.5.

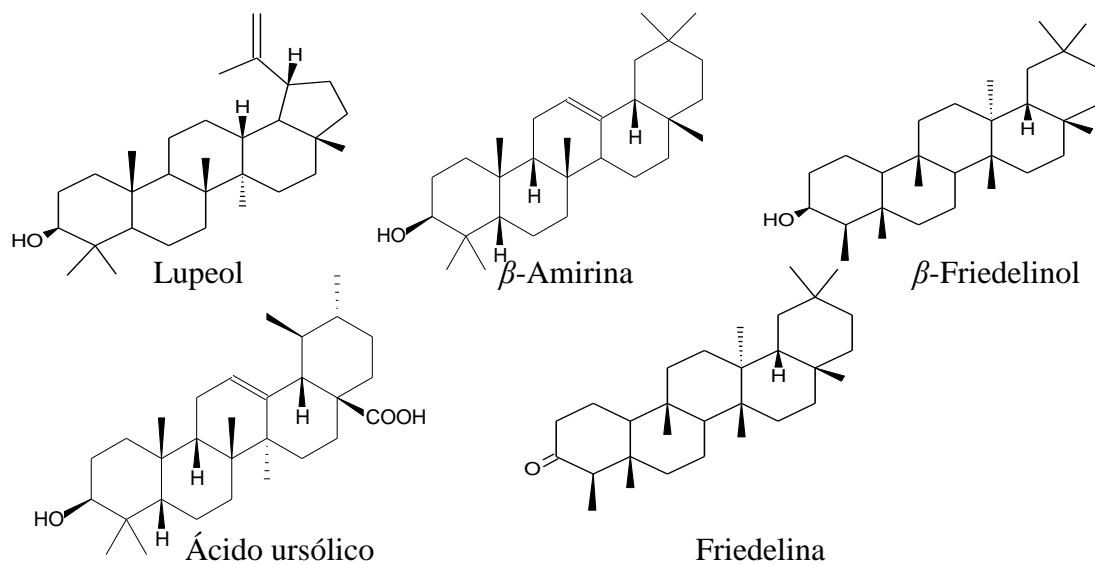


Figura I.5. Triterpenos isolados da espécie *Aristolochia esperanzae*.

I.5.3. Constituintes Lignoides

Na espécie *Aristolochia esperanzae* são encontrados lignoides dos tipos dibenzilbutirolactona e furofurano,^{22,23,25} como descritos na Figura I.6.

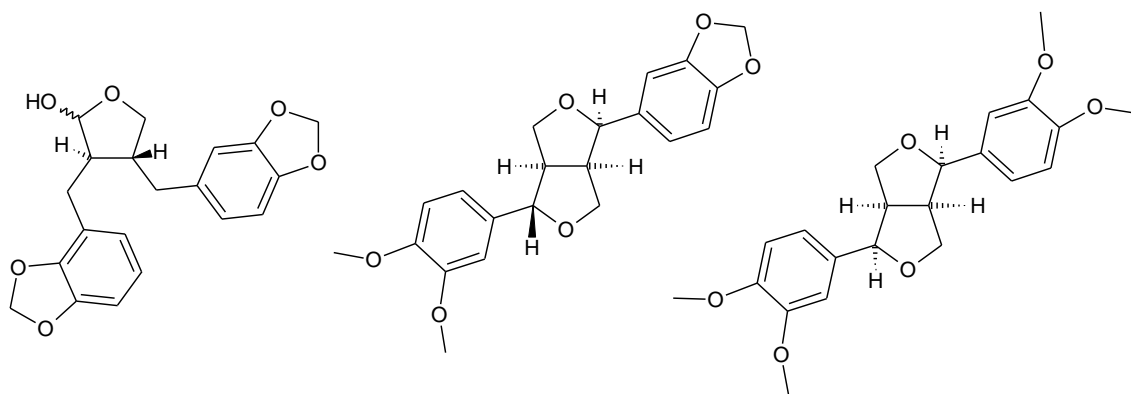


Figura I.6. Lignanas isoladas da espécie *Aristolochia esperanzae*.

I.5.4 Constituintes nitrogenados de natureza não-alcaloídica

O gênero *Aristolochia* caracteriza-se pela variedade de derivados nitrogenados encontrados em várias de suas espécies. Os diferentes ácidos aristolóchicos, de natureza nitrofenantrênica, ocorrem na maioria das vezes acompanhados pelas lactamas correspondentes, as aristolactamas. As estruturas dos ácidos aristolóchicos isolados de *A. esperanzae* são apresentados na Figura I.7.^{1,26,27}

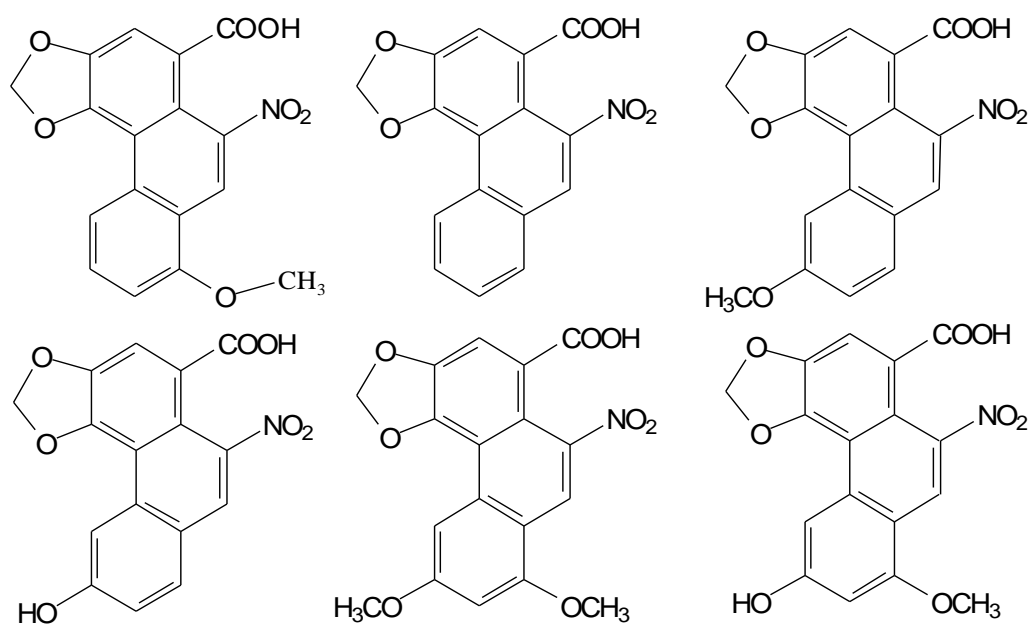


Figura I.7. Ácidos aristolóchicos isolados da espécie *Aristolochia esperanzae*.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa estudou as frações pouco polares obtidas após fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule dessa espécie,²⁸ resultando no isolamento dos fitoconstituintes mostrados na Figura I.8 (p. 24).

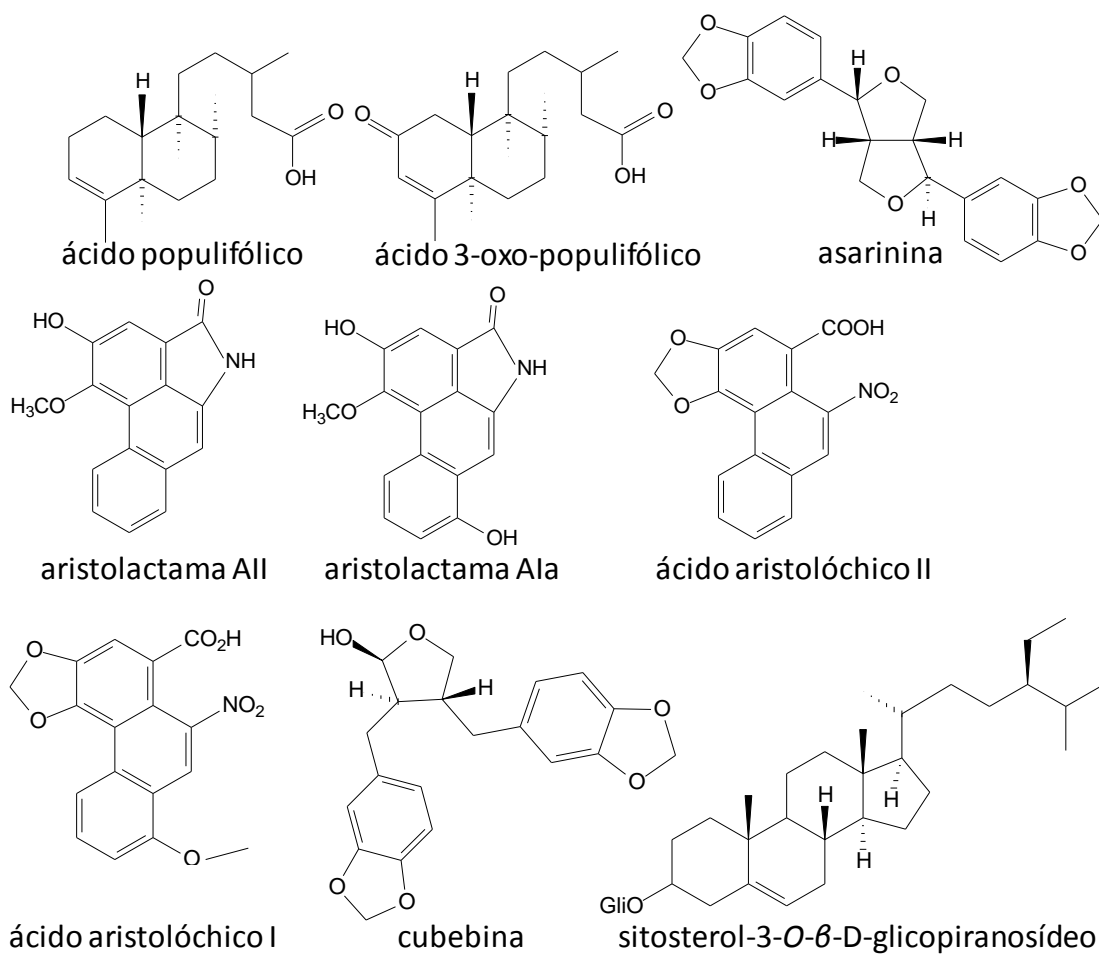


Figura I.8. Fitoconstituintes isolados recentemente da espécie *Aristolochia esperanzae*.²⁸

Capítulo II:
Modelagem molecular e química computacional

II.1 Introdução

Sob o nome de Química Computacional entende-se, de um modo geral, o domínio dos métodos computacionais aplicados à Química. Nos últimos 25 anos, muitas das áreas de aplicação da Química Computacional apresentaram um desenvolvimento significativo devido ao aparecimento de novos computadores, de softwares sofisticados e de uma melhor compreensão dos princípios básicos da ciência. O potencial oferecido pela tecnologia recente de hardware e software teve como consequência o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas para cálculos numéricos e simbólicos.³⁴

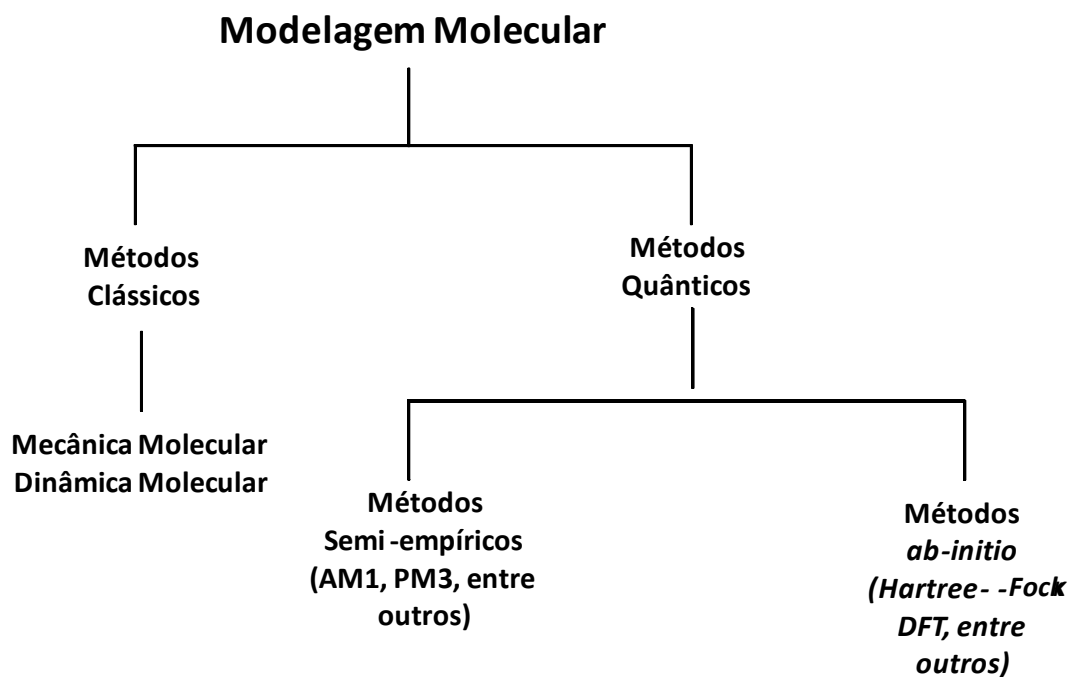
A modelagem molecular trata do comportamento e da representação de sistemas moleculares, sendo de fundamental importância o estabelecimento da disposição dos átomos e moléculas objetivando uma descrição das propriedades da matéria. Assim, a modelagem molecular compreende um conjunto de métodos que visam entender e prever o comportamento de sistemas reais,³¹ abrangendo estudos de minimização de energia, análise conformacional e simulações de dinâmica molecular,³² dentre outros,³³ que objetivam relacionar as propriedades moleculares com a estrutura molecular.

O estudo de um sistema pela modelagem molecular deve considerar variáveis tais como o tamanho do sistema, a precisão dos resultados, bem como hardware e software disponíveis para realização dos cálculos cujo avanço determinou o desenvolvimento da modelagem molecular.

Dois aproximações têm sido utilizadas em estudos de modelagem molecular, a saber, a aproximação clássica, que inclui métodos de dinâmica molecular e de mecânica molecular, e a aproximação quântica, que inclui métodos *ab-initio* e semi-empíricos.

As bases da interpretação de todos os fenômenos químicos residem nos princípios unificadores das Mecânicas Quântica, Clássica e Estatística. Essas bases estão atualmente bem estabelecidas e conduzem a cálculos que englobam problemas consideravelmente importantes como reatividade química, espectroscopia, mecânica e dinâmica moleculares. O enorme progresso da Química Computacional nas duas últimas décadas foi um fator crucial para o desenvolvimento de diversas áreas da química.^{35,36} Como consequência, a Química Computacional tornou-se uma técnica complementar que pode ser utilizada por diferentes pesquisadores nas mais diferentes áreas da ciência.³⁷

A modelagem computacional de problemas físicos e químicos tem se intensificado gradativamente nas últimas décadas. Os métodos de Química Computacional³⁸ aplicados à modelagem molecular^{39,40} podem ser divididos em dois grandes grupos mostrados no Esquema II.1.



Esquema II.1. Métodos aplicados à modelagem molecular.

Os métodos quânticos fazem uso da equação de Schrödinger e tratam os elétrons explicitamente. Constituem os métodos mais exatos e mais custosos computacionalmente. Seu uso é restrito para sistemas com poucos átomos e podem ser sub-divididos em métodos *ab-initio*, semi-empíricos e aqueles originários da Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory* - DFT). Os métodos clássicos não tratam os elétrons explicitamente e fazem uso de parâmetros atômicos e multi-atômicos e de equações da física clássica para simular a interação entre os átomos. Estes métodos representam pequeno custo computacional, o que permite o tratamento de muitos átomos.

II.2 Métodos Clássicos

Como exemplo de metodologia clássica, na mecânica molecular as moléculas são descritas simplesmente como uma conexão de átomos. A metodologia da mecânica molecular baseia-se na aproximação de que os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente, em função da velocidade dos núcleos ser consideravelmente menor que a velocidade dos elétrons. Assim, a mecânica molecular caracteriza-se por considerar os movimentos nucleares e por tratar os elétrons como causa do campo potencial que age sobre os núcleos. Na mecânica molecular supõe-se que a densidade eletrônica ajusta-se instantaneamente a qualquer alteração na configuração geométrica dos núcleos, considerando que os núcleos possuem movimento livre e que todas as interações nucleares são aditivas. A superfície de energia potencial descreve a energia de uma molécula em termos de posições nucleares e apresenta mínimos locais em relação a uma ou algumas conformações moleculares estáveis, sendo a molécula descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície de energia potencial.³⁸ Cálculos de mecânica molecular utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de energia potencial, cujo formalismo matemático baseia-se em um modelo clássico de estrutura molecular. Assim, considera-se que as moléculas correspondem a um conjunto de átomos ligados entre si, por forças elásticas ou harmônicas. Tais forças derivam de funções de energia potencial associadas às contribuições estruturais como, por exemplo, comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos diedros (φ) e interações não ligantes (d). O conjunto dessas funções é conhecido como campo de força e representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas.

As expressões de energia potencial, desenvolvidas para cálculos de mecânica molecular, são derivadas de três tipos básicos de campos de força,⁴⁰ chamados de campo de força central, campo de força de valência geral e campo de força de Urey-Bradley. No campo de força central, consideram-se apenas as distâncias interatômicas incluindo comprimentos de ligação. Nos campos de força de valência geral, consideram-se comprimentos, ângulos de ligação e ângulos diedros. No campo de força de Urey-Bradley, são considerados comprimentos, ângulos de ligação, ângulos diedros, coordenadas de deformação fora do plano e as interações entre átomos ligados por um centro comum.

A energia potencial, U , de uma molécula com N átomos é definida em termos das coordenadas espaciais de cada núcleo, x_i . Dada uma configuração com energia U_0 , quando as coordenadas

sofrem pequenas variações Δx_i , a energia associada a este novo arranjo espacial pode ser determinada a partir de U_0 .

Vários métodos são aplicados em mecânica molecular para a localização do mínimo da função de energia potencial utilizando coordenadas atômicas cartesianas. Estes métodos podem ser agrupados em duas classes.

Os métodos de primeira ordem calculam apenas as primeiras derivadas da função de energia potencial. Os métodos de segunda ordem calculam as primeiras e segundas derivadas da função de energia potencial. O objetivo desses métodos consiste em encontrar a coordenada x , onde a energia ($f(x)$) é um mínimo, partindo de uma coordenada inicial, x_0 .

A energia potencial assim obtida pode ser utilizada para calcular os números de onda vibracionais. Os números de onda em conjunto com momentos de inércia, calculados a partir da geometria final, podem ser usados para calcular as contribuições rotacionais, translacionais e vibracionais, que são utilizadas na avaliação das funções termodinâmicas para a substância em estudo no estado gasoso.

Dentre as razões pelas quais se justifica o emprego de cálculos de mecânica molecular, destaca-se a velocidade com que os cálculos são realizados. Além disso, a geometria otimizada por este método é um bom ponto de partida para a realização de cálculos quânticos de orbitais moleculares. Como desvantagem, as técnicas de mecânica molecular apresentam limitações na determinação de propriedades onde os efeitos eletrônicos predominam.

II.3 Métodos Quânticos

II.3.1 Fundamentos de Mecânica Quântica

A matéria constitui-se por uma coleção de átomos interagentes, sujeitos ou não a campos externos. Esse conjunto de átomos pode estar em fase gasosa ou em fase condensada. O tratamento quântico é o mesmo independente da fase, pois todos os sistemas são conjuntos de elétrons e núcleos interagindo através de forças Coulombianas eletrostáticas.

O entendimento do comportamento da matéria em escala atômica é auxiliado por métodos de Química Computacional baseados no formalismo da Mecânica Quântica, que busca representar a estrutura da matéria através da formulação em termos da função de onda representada pela equação

de Schrödinger.⁴¹ Neste contexto, utilizam-se métodos matemáticos apropriados para lidar com a dualidade onda-partícula dos elétrons.

Um conceito fundamental para o desenvolvimento da mecânica quântica foi postulado por Niels Bohr no início do século XX: a existência de estados estacionários quantizados para sistemas atômicos. Reunindo os conceitos de quantização de energia e de comportamento ondulatório da matéria, Schrödinger propôs a equação capaz de descrever a dinâmica dos sistemas eletrônicos. A interpretação probabilística das soluções da equação de Schrödinger permitiu conhecer as “formas” geométricas do que hoje se conhece por orbitais atômicos. A solução da equação de Schrödinger é uma função denominada de função de onda, podendo ser obtida para um conjunto restrito de casos. Para sistemas que contêm mais de um elétron, tratamentos mais sofisticados se fazem necessários. Diversos métodos de aproximação foram propostos com o objetivo de se encontrarem os orbitais eletrônicos para átomos de muitos elétrons. Dentre eles estão o método de Hartree-Fock e a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Estes métodos estão em constante desenvolvimento e são aplicados rotineiramente no estudo da modelagem molecular.

A equação de Schrödinger pode ser escrita na forma independente do tempo, passando a ser assim uma equação de operadores, autovalores e autovetores. Do ponto de vista quântico, a determinação de estrutura e propriedades de moléculas se resume à resolução da equação de Schrödinger ($\hat{H}\psi = E\psi$), sendo \hat{H} o operador Hamiltoniano do sistema e ψ a função de onda do sistema em análise. O valor da energia que o sistema fornece quando o operador \hat{H} é aplicado sobre a função de onda que descreve o sistema, é simbolizado por E . O termo \hat{H} representa, matematicamente, o movimento e a interação das partículas do sistema.⁴⁰

Toda a mecânica quântica está baseada na solução da equação de Schrödinger, a função de onda. Assim, faz-se necessário definir quais são as condições para que uma função seja considerada aceitável como solução de um problema de mecânica quântica. Alguns postulados são utilizados como critérios para tal definição.

O postulado I estabelece que qualquer estado de um sistema dinâmico contendo N partículas pode ser descrito por uma função de onda $\Psi(x,t)$ onde x é o vetor de coordenadas dos vários elétrons que constituem o sistema e t é o tempo.

O postulado II estabelece que a função de onda $\Psi(x,t)$ e suas primeira e segunda derivadas devem ser contínuas, finitas e unívocas para todos os valores de x .

O postulado III estabelece que qualquer quantidade que seja fisicamente observável pode ser representada na mecânica quântica por um operador *hermitiano*. Um operador *hermitiano* é um operador F que satisfaz a seguinte condição:

$\int \Psi_1^* F \Psi_2 dx = \int \Psi_2 (F \Psi_1^*) dx$ onde * indica o conjugado complexo da função de onda.

O postulado IV estabelece que se Ψ_i é uma autofunção de F com o valor f_i , então uma medida de F certamente fornecerá o valor de f_i ($F\Psi = f_i \Psi_i$).

O postulado V estabelece que a média ou valor esperado $\langle F \rangle$ de qualquer observável correspondente a um operador F, é calculada através da fórmula $\langle F \rangle = \int \Psi^* F \Psi dx = 1$.

O postulado VI estabelece que em sistemas finitos, com condição de contorno, a função de onda deve ser nula para funções de onda tendendo ao infinito e, em sistemas infinitos (sem condições de contorno), ela deve ser periódica.

Dado que a função de onda satisfaz a todas as restrições anteriormente apresentadas, então o módulo do quadrado dessa função de onda define a probabilidade da referida partícula ser encontrada em uma dada região.

Uma função de onda descreve o comportamento de um sistema eletrônico. No entanto, ainda não é possível obter a solução exata analítica da equação de Schrödinger para um sistema eletrônico. Neste sentido, várias aproximações são utilizadas para inferir informações sobre sistemas dos quais não se é possível obter soluções exatas. O operador Hamiltoniano que aparece na equação de Schrödinger é uma das entidades que mais contém aproximações. Muitos problemas em química quântica podem ser resolvidos desconsiderando os efeitos relativísticos e considerando que a equação de Schrödinger é independente do tempo. Em sua forma independente do tempo, a equação de Schrödinger pode ser escrita na seguinte forma:

$\hat{H}\Psi = E\Psi$, onde \hat{H} é o operador hamiltoniano, Ψ é a função de onda e E é a energia total do sistema. Na resolução da equação de Schrödinger apenas espécies hidrogenóides apresentam solução analítica. Para sistema de muitos átomos, o Hamiltoniano não-relativístico pode ser escrito da seguinte forma:

$$\hat{H} = \hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{NN} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee} + \hat{H}_{mp}, \text{ onde}$$

\hat{T}_N é o termo que trata da energia cinética dos núcleos;

\hat{T}_e é o termo que trata da energia cinética dos elétrons;

\hat{V}_{NN} é o termo que trata da repulsão entre núcleos;

\hat{V}_{Ne} é o termo que trata da atração entre elétrons e núcleos;

\hat{V}_{ee} é o termo que trata da repulsão entre elétrons;

\hat{H}_{mp} é o termo que representa a polarização de massa.

Em geral, o termo de polarização de massa é desprezível e não costuma ser contabilizado na maioria dos cálculos.

A função de onda consiste, portanto, no produto de uma função de onda eletrônica por uma função de onda nuclear, ambas dependentes das posições dos núcleos. Otimizando as coordenadas dos núcleos, é possível obter a configuração de menor energia, ou seja, a geometria de equilíbrio. As metodologias para resolução da equação de Schrödinger estacionária para a função de onda dos elétrons consistem na denominada teoria de estrutura eletrônica. Assim, o problema é tratado por métodos que aproximam termos do Hamiltoniano, $\hat{H} = \hat{T} + \hat{U} + \hat{V}$, como a aproximação de elétrons não interagentes ($\hat{U} = 0$), e métodos que aproximam a função de onda de muitos elétrons.

Como a equação de Schrödinger não possui solução analítica para sistemas multieletrônicos, torna-se necessário o uso de aproximações para torná-la solucionável para sistemas mais complexos.⁴² Hartree propôs que a função de onda de um átomo multieletrônico poderia ser escrita como um produto de funções de onda de um elétron:

$$\Psi = \psi_1 \psi_2 \psi_3 \dots \psi_n$$

Essas funções seriam soluções de um problema de campo central, assim cada elétron estaria submetido a um campo médio produzido pelos demais elétrons. A função de onda seria melhorada até que não houvesse alteração entre duas interações consecutivas.

O método de Hartree não inclui explicitamente o spin na função de onda e não obedece ao princípio da antissimetria da função de onda e indistinguibilidade dos elétrons. A construção adequada da função de onda, considerando sua antissimetria, pode ser feita através do uso do determinante de Slater que corresponde a um produto antissimetrizado das funções de um elétron (os spins-orbitais). Tal função obedece, simultaneamente, ao Princípio de exclusão de Pauli e à antissimetria da função de onda.

Outra consideração utilizada na equação de Schrödinger é de que, em função da grande diferença entre as massas de núcleos e elétrons, as velocidades de movimento de núcleos são muito menores que as velocidades dos elétrons, o que indica que a incerteza nas posições dos núcleos seja muito menor. Assim, obtém-se uma simplificação da equação de Schrödinger através da chamada aproximação de Born-Oppenheimer. Nesta, ocorre a separação dos movimentos nuclear e eletrônico na qual as posições espaciais de todos os núcleos são fixas e a equação de Schrödinger é resolvida para os elétrons na presença do potencial produzido pelos núcleos congelados. Como consequência, a energia cinética dos núcleos é considerada desprezível e a energia potencial de repulsão núcleo-núcleo é constante. Então, o Hamiltoniano do sistema, considerando-se a aproximação de Born-Oppenheimer é dado por $\hat{H} = \hat{H}_{\text{ele}} + \hat{V}_{\text{nn}}$ onde $\hat{H}_{\text{ele}} = \hat{T}_{\text{e}} + \hat{V}_{\text{Ne}} + \hat{V}_{\text{ee}}$. A equação de Schrödinger

toma a forma ($\hat{H}_{el}\psi_{el} = E_{el}\psi_{el}$), onde as funções de onda (ψ_{el}) dependem somente das coordenadas dos elétrons e as coordenadas dos núcleos entram como parâmetros externos à equação. Para cada arranjo espacial dos núcleos, existe uma função de onda eletrônica diferente. A energia total para cada um desses arranjos é obtida adicionando-se a energia de repulsão internuclear à energia eletrônica.

Se os núcleos estão submetidos a um potencial gerado pelos elétrons, é possível gerar uma superfície de energia potencial resolvendo a equação de Schrödinger para cada configuração nuclear. O procedimento numérico da busca de um mínimo nessa superfície de energia potencial é usualmente chamado de otimização de geometria. Apesar da aproximação de Born-Oppenheimer introduzir simplificações no cálculo do Hamiltoniano, ainda assim não é possível, com tal ferramenta, calcular exatamente o efeito deste operador em um sistema polieletrônico. Assim, outra aproximação é realizada, a aproximação de campo central, que consiste em definir um potencial de campo médio. Dessa forma, o potencial percebido pelo *i*-ésimo elétron é resultante da distribuição média das cargas dos outros *N-1* elétrons, combinada à carga nuclear. Portanto, o termo de repulsão para *i* não envolve mais um somatório sobre os demais elétrons individualmente, mas sim um único termo que considera a densidade de probabilidade de encontrar a nuvem eletrônica de *N-1* elétrons em determinada região. Esta densidade é estimada em ciclos iterativos para cada elétron do sistema. Neste cálculo utiliza-se o método do campo auto consistente, (SCF, do inglês, *Self-Consistent Field*).

II.3.2 Métodos *ab-initio*

Os métodos *ab-initio* objetivam a determinação de funções associadas ao Hamiltoniano fundamental, sem qualquer parametrização,⁴³ sendo, por isso, considerados teoricamente puros. A realização de cálculos baseados nestes métodos consome, na maioria dos casos, muito tempo. Entretanto tais métodos conduzem a resultados com alto índice de confiabilidade. Nos métodos *ab-initio* os orbitais são representados por conjuntos de base através de funções necessárias para acomodar os elétrons de um átomo. Em função da possibilidade de contração ou expansão de orbitais, utilizam-se mais frequentemente os conjuntos de base de valência dividida, nos quais as funções que representam os elétrons de valência são divididas em dois componentes, um mais interno e compacto e outro mais externo e difuso. A introdução de funções de número quântico

maior nos chamados conjuntos de base de polarização permite que pequenos deslocamentos do centro de carga eletrônica em relação às posições nucleares sejam possíveis. Os conjuntos de base contendo funções difusas representam uma melhor descrição de sistemas aniônicos e estados excitados. Estes conjuntos são obtidos pela adição de orbitais s e p muito difusos para melhorar a descrição de pares de elétrons de alta energia.

Os métodos *ab-initio* objetivam resolver a equação de Schrödinger sem fazer uso de quaisquer parâmetros além das constantes físicas fundamentais. A equação de Schrödinger independente do tempo é o pilar da química quântica. A partir de sua resolução pode-se encontrar a função de onda e a energia associadas a determinado sistema molecular. A função de onda contém toda a informação que se pode obter para um determinado sistema.

A equação de Schrödinger para um sistema de N -elétrons cuja função de onda é escrita na forma de determinante de Slater origina um sistema de N equações monoelétrônicas, conhecidas como equações de Hartree-Fock, assim descritas:

$$\hat{F}u_i = \varepsilon_i u_i, \text{ onde}$$

u_i são os spins orbitais, ε_i é a energia do spin-orbital u_i , \hat{F} é o operador de Fock.

Para a resolução das equações de Hartree-Fock torna-se necessário o uso de aproximações adicionais. A mais importante delas é a de Born-Oppenheimer, com a qual se escreve a função de onda como um produto de uma função eletrônica com uma função nuclear, $\Psi = \Psi_{\text{nuc}}(\mathbf{R})\Psi_{\text{elet}}(\mathbf{r};\mathbf{R})$.

Dessa forma, a função de onda depende das coordenadas nucleares, enquanto a função de onda eletrônica tem uma dependência explícita das coordenadas eletrônicas e uma dependência paramétrica das coordenadas nucleares. A aproximação de Born-Oppenheimer consiste em considerar que as funções Ψ_{nuc} e Ψ_{elet} são soluções de duas equações de Schrödinger separadas (uma nuclear e outra eletrônica), o que implica em desconsiderar quaisquer termos de acoplamento dos estados eletrônicos com o movimento nuclear. O Hamiltoniano pode ser escrito como a soma de uma parcela eletrônica e outra nuclear ($\hat{H} = \hat{H}_{\text{nuc}} + \hat{H}_{\text{elet}}$).

II.3.2.1 Método de Hartree-Fock

A função de onda $\Psi(x)$ de um sistema multieletrônico pertence a um espaço de dimensão $3N$, uma vez que x é o vetor de coordenadas de cada elétron no espaço, o que evidencia a complexidade computacional exigida em cálculos de mecânica quântica. Uma aproximação utilizada para diminuir os dados a serem computados é o determinante de Slater que reduz uma

função de onda no espaço dimensional $3N$ a um conjunto de N funções no espaço tridimensional, o que é computacionalmente mais acessível. Este método tem por objetivo determinar, de forma aproximada, o estado de menor energia de um sistema de elétrons. Para obter a solução aproximada da equação de Schrödinger do estado fundamental do sistema eletrônico, busca-se a função de onda (ψ) que minimiza o funcional de energia. A energia mínima, conhecida também como energia de Hartree-Fock (E_{HF}), representa um funcional de orbitais moleculares expressos pela equação de Hartree-Fock, que indica quais orbitais correspondem a valores mínimos de E_{HF} .

A aplicação do método de Hartree-Fock parte da premissa que os elétrons interagem uns com os outros ignorando a correlação eletrônica, o que conduz a consequências drásticas nas interpretações das funções de onda. Em alguns casos de átomos e moléculas diatômicas, a solução das equações de Hartree-Fock pode ser obtida por técnicas numéricas. A solução sem aproximações conduz ao limite de Hartree-Fock, podendo-se assim calcular o desvio proveniente da utilização do determinante de Slater, chamado de *Energia de Correlação* e definido por $E_{corr} = E - E_{HF}$. A energia E será maior ou igual à energia exata E_0 , que é a energia que seria produzida caso fosse conhecida a função de onda Ψ .

O valor exato da energia E_0 é desconhecido. Criando-se diferentes funções de onda aproximadas, a melhor função de onda será aquela que produz a menor energia e que, certamente, está mais próxima do valor de E_0 . Dessa forma, para um sistema de N elétrons que não interagem entre si, mas estão sob influência de um potencial efetivo, os autovalores de menor energia, correspondem aos estados ocupados e descrevem o estado fundamental eletrônico de uma molécula. Nos cálculos de E_{HF} , utiliza-se o método de campo-auto consistente – SCF (*Self Consistent Field*) que busca os orbitais que minimizem a energia do sistema. Neste processo, as equações são resolvidas até que a energia se estabilize e a melhor função de onda é obtida de tal forma que a energia seja um mínimo. Esta energia eletrônica do sistema é calculada através das equações de Hartree-Fock, nas quais se substituem as repulsões eletrônicas sofridas por cada elétron por um campo médio criado pelos outros elétrons do sistema. Entretanto, em sistemas reais, os movimentos eletrônicos são correlacionados de modo a minimizar a repulsão eletrônica. A energia eletrônica obtida, somada à energia de repulsão internuclear, produz a energia total do sistema. Na prática, as posições nucleares são modificadas por algoritmo adequado. A seguir, a equação de Schrödinger é resolvida para os elétrons a cada conjunto de posições nucleares. As energias totais correspondentes a cada conjunto são comparadas até que a energia não varie entre duas estruturas consecutivas, dentro de um limite pré-determinado.

Neste modelo, cada elétron é descrito por uma função de onda Ψ , denominada spin-orbital, fazendo-se necessário no método de Hartree-Fock que as funções spin-orbitais sejam ortogonais umas às outras, restrição esta que deve ser considerada na minimização de energia.

A eficiência do método Hartree-Fock depende inicialmente da complexidade do sistema sob investigação e do nível de aproximações realizadas. Um procedimento utilizado para aumento das velocidades de cálculo das integrais de campo auto-consistente corresponde ao emprego de conjuntos de funções de base que representam os orbitais através de combinação linear. Como exemplo de funções de base utilizadas frequentemente, têm-se as funções Gaussianas (GTO). A combinação de GTO's conduz às GTO's contraídas. Um conjunto de base mínimo usa uma única GTO contraída para cada orbital atômico ocupado – seja de caroço ou de valência. Um conjunto é de valência desdobrada quando utiliza mais de uma GTO contraída para representar os orbitais da camada de valência. Na formação de moléculas, a forma dos orbitais atômicos é distorcida e o centro de carga deslocado. Para permitir esta polarização, incluem-se funções adicionais provenientes de orbitais oriundos de camadas mais externas que a camada de valência.

II.3.3 Métodos semi-empíricos

Na determinação da energia e da função de onda do estado fundamental de um sistema através de métodos *ab-initio*, envolve-se um grande número de integrais, o que traz um alto custo computacional, sobretudo para sistemas moleculares grandes.

Para contornar estas dificuldades, foram feitas aproximações e parametrizações subsequentes originando os métodos semi-empíricos, cuja importância está relacionada à capacidade de prever as propriedades físicas e químicas de um sistema. Nestes métodos, a exatidão dos resultados depende dos dados experimentais fornecidos, destacando-se o ganho na velocidade dos cálculos. O potencial dos métodos semi-empíricos não reside no rigor teórico, e sim no fato de que parâmetros são ajustados de forma a reproduzirem propriedades químicas.

O principal objetivo dos métodos semi-empíricos é o desenvolvimento de um tratamento quantitativo de propriedades moleculares com precisão, confiabilidade e custo computacional suficiente que lhe confira valor prático. Estes métodos representam uma abordagem à solução das equações de Schrödinger usando simulação numérica e computacional.

O método semi-empírico conhecido como método de Huckel ignora a repulsão entre os elétrons. Este método foi desenvolvido na década de 30 com o objetivo de estudar moléculas orgânicas, para

as quais a informação química está ligada, sobretudo, aos elétrons de valência. O Hamiltoniano é descrito como $\hat{H} = \hat{H}_{\text{caroço}} + \hat{H}^{\pi}$, onde o Hamiltoniano do sistema é a soma dos Hamiltonianos dos elétrons de Huckel (os elétrons de valência) e o Hamiltoniano do caroço (núcleo e elétrons internos do sistema). O Hamiltoniano dos elétrons π escreve-se aproximadamente como a soma dos Hamiltonianos de cada elétron π em um campo efetivo de núcleo e elétrons. Todos os métodos semi-empíricos negligenciam várias integrais de repulsão inter-eletrônicas tendo outras parametrizadas para reproduzir cálculos *ab-initio*.

A determinação dos parâmetros que definem as várias formas de interação inter-eletrônicas e dos elétrons com os “caroços” atômicos deve ser realizada com base em valores obtidos por métodos *ab-initio*.

Em 1985 foi apresentado o método AM1 (Austin Model 1) no qual foram parametrizadas integrais para os átomos de H, B, C, Si, N, O, S, F, Cl, Br, I, Hg e Zn. Em 1989 foi apresentado o método PM3, no qual se incluíam parametrizações do método AM1 (com exceção do átomo de B, não parametrizado no método PM3) e parametrizações para os átomos de Ge, Sn, P, As, Se, Te, Bi, Al, Mg e Cd. Atualmente, os métodos AM1 e PM3 são os mais utilizados entre todos os métodos semi-empíricos, sendo que ambos incorporam aproximações semelhantes, mas diferem nas suas parametrizações. Dentre os vários pacotes computacionais que usam os métodos semi-empíricos pode-se citar *Hyperchem* e *Spartan*.

II.3.4 Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory* - DFT)

Um modelo alternativo ao baseado em orbitais moleculares é o modelo do funcional de densidade (DFT), no qual se considera que a energia de um conjunto de elétrons sob influência de um campo externo é funcional único da densidade eletrônica. Nesta teoria usa-se a densidade eletrônica (ρ) para a descrição do sistema e a busca por um mínimo de energia se faz a partir da otimização da densidade eletrônica. Esta dependência aparece em dois termos da energia eletrônica, chamados de funcional de troca e funcional de correlação. Atualmente, um dos modelos mais utilizados é o modelo do funcional de troca híbrido de Becke e do funcional de correlação de Lee-Yang-Parr (B3LYP), devido à qualidade dos resultados, especialmente para moléculas orgânicas.

A densidade eletrônica tem sido usada como uma maneira de se extrair informações de interesse em sistemas químicos e apresenta uma interpretação física bem estabelecida. A densidade eletrônica é uma função que fornece a densidade de probabilidade de se encontrar qualquer um dos N elétrons

de um dado sistema em um volume infinitesimal de espaço. A integral da função densidade eletrônica por todo o espaço fornece o número de elétrons N de um sistema.

A teoria do funcional de densidade⁴⁴ está baseada em dois teoremas. O teorema de Hohenberg-Kohn estabelece que para moléculas cujo estado fundamental seja não degenerado, a energia do estado fundamental, a função de onda e todas as propriedades eletrônicas podem ser determinadas através da densidade eletrônica do estado fundamental.

O teorema Variacional de Hohenberg-Kohn estabelece que a energia obtida para uma densidade eletrônica é sempre igual ou maior do que a energia do estado fundamental, ou seja, a densidade eletrônica do estado fundamental minimiza o funcional de energia.

Com estes teoremas, torna-se possível calcular todas as propriedades moleculares do estado fundamental a partir de ρ_0 sem usar a função de onda molecular. O cálculo de ρ_0 e de E_0 , a partir da densidade, fornece resultados exatos. Entretanto, o uso de um funcional desconhecido torna necessário o uso de aproximações. Considerando um sistema com N elétrons não interagentes submetidos a um potencial externo v_s , a densidade eletrônica associada a este potencial (ρ_s) é função da densidade do estado fundamental, ρ_0 . As autofunções monoelétrônicas para esse Hamiltoniano são os orbitais construídos por um procedimento autoconsistente similar ao método Hartree-Fock. Para um estado fundamental de camada fechada, os elétrons são emparelhados nos orbitais com dois elétrons de spins opostos em cada orbital espacial. Obtidos os orbitais, determina-se a densidade eletrônica. A soma de funcionais relativos às energias cinética e potencial de repulsão elétron-elétron resulta na energia de troca e correlação. As diferentes formas de estimar a parcela da energia de troca e correlação em relação à energia total diferenciam os vários métodos DFT.

O funcional de troca e correlação costuma ser arbitrariamente separado em uma parcela de troca e outra de correlação, assim descrito matematicamente: $E_{xc}[\rho] = E_x[\rho] + E_c[\rho]$. O termo $E_{xc}[\rho]$ corresponde à energia de troca e correlação de cada elétron, que é dividida também nas parcelas de troca e correlação.

Para uma descrição mais adequada da densidade eletrônica, é necessário considerar como sua variação espacial afeta o funcional de troca e correlação. Assim, vários métodos são propostos incluindo uma dependência do gradiente da densidade eletrônica na expressão deste funcional. Nessa classe de aproximações destaca-se a aproximação do gradiente generalizado (GGA – *generalized gradient approximation*). As diferentes aproximações de GGA diferem uma das outras pela forma da função que trata do gradiente da densidade eletrônica e são construídas ajustando parâmetros a partir de um conjunto de moléculas teste.

Um cálculo DFT pode ser feito a partir de qualquer combinação de um funcional de troca com um funcional de correlação. Um cálculo BLYP, por exemplo, usa o funcional de troca chamado B88 e o funcional de correlação LYP. Um dos funcionais mais usados atualmente é o B3LYP que possui contribuições dos funcionais de troca B88, da energia de troca calculada pelo método Hartree-Fock, e dos funcionais de correlação VWN e LYP. A teoria do funcional de densidade difere do método Hartree-Fock em diversos aspectos, dentre eles:

- a minimização de energia é realizada em relação à densidade, enquanto no método HF a minimização é orbital;
- melhor incorporação dos efeitos de troca e correlação, pois o método HF é aproximado por definição e contém apenas os efeitos de troca;
- o custo computacional em cálculos de DFT, com potencial efetivo local, é inferior aqueles executados em métodos HF, pois o potencial de Fock depende de orbitais em posições distintas.

II.4 Modelos contínuos do solvente: a interação soluto-solvente.

O forte desenvolvimento de cálculos de estrutura eletrônica *ab-initio* tornou possível a investigação de inúmeras propriedades eletrônicas⁴⁵⁻⁴⁸ e o forte crescimento da atividade de pesquisa de modelos para descrever o efeito do solvente.⁴⁹ O interesse na modelagem computacional do fenômeno de solvatação atinge importantes áreas como a química sintética, a bioquímica e o desenvolvimento de fármacos. Na descrição termodinâmica da solvatação, os modelos em que o solvente é descrito como um contínuo dielétrico são os mais utilizados,⁵⁰⁻⁵² em função da facilidade de utilização, da disponibilidade e do relativo sucesso destes modelos.

Considerando que o soluto se encontra em equilíbrio entre as fases gasosa e líquida, a afinidade do soluto com o solvente, medida pela chamada energia-livre de solvatação, pode ser determinada diretamente por medidas experimentais. Para relacionar a interação soluto-solvente com a energia-livre de solvatação, considera-se uma molécula de soluto imersa em solvente. As moléculas do solvente movimentam-se em torno da molécula de soluto e a interação entre as espécies ocorre através de forças intermoleculares, destacando-se as interações eletrostáticas como as mais importantes para descrição do efeito do solvente. Nos modelos em que o solvente é representado como um contínuo dielétrico, as forças intermoleculares do tipo eletrostáticas são representadas por este contínuo.

Ao representar o solvente por um contínuo dielétrico, substituem-se as moléculas explícitas do solvente por dipolos pontuais. Considera-se que cada molécula do solvente tem um momento de

dipolo e a contribuição eletrostática surge da interação do dipolo do solvente com a distribuição de carga do soluto. Na representação discreta do solvente, as moléculas explícitas do solvente e do soluto têm seu volume próprio e, no modelo contínuo, é necessário definir uma cavidade para acomodar o soluto em torno do qual fica o contínuo dielétrico. Para definir a cavidade usam-se esferas centradas sobre os átomos. O contínuo dielétrico é delimitado pelas superfícies S_1 , que contém o soluto, e S_2 , que delimita o contínuo e o meio exterior.

A integral de superfície deste sistema corresponde à densidade de carga superficial, com contribuições de S_1 e S_2 . A densidade volumétrica de cargas representa o potencial eletrostático gerado pelas cargas localizadas no interior do dielétrico. Assim, o potencial eletrostático produzido por dipolos é uma função da densidade de carga, de volume e de superfície. Em modelos implementados para cálculos de estrutura eletrônica *ab-initio*, a deformação da nuvem eletrônica deve ser considerada no cálculo da energia-livre de solvatação.

Portanto, a solvatação envolve duas etapas, que devem ser consideradas para o cálculo da energia-livre de solvatação:

- deformação da molécula de soluto;
- solvatação da molécula polarizada no solvente (dielétrico).

O modelo contínuo mais conhecido é o PCM (*Polarizable Continuum Model*), no qual a cavidade molecular é representada por esferas sobrepostas, uma para cada átomo, cujo raio depende da natureza do átomo. Para obtenção do potencial eletrostático gerado pelo dielétrico utiliza-se o método das cargas aparentes de superfície. A densidade eletrônica é determinada por cálculos de estrutura eletrônica *ab-initio*, de tal forma que a polarização do soluto seja incluída. Um problema que surge em métodos como o PCM relaciona-se à possibilidade da nuvem eletrônica expandir-se para além da cavidade. Entretanto, no método PCM inclui-se uma correção devido às possíveis fugas de cargas da cavidade. Recentemente foi mostrado que o método PCM seria capaz de incluir parcialmente esta polarização de volume, de forma que, ao se utilizar este método em rotina computacional, nenhuma correção precisa ser feita.^{53,54}

Alternativamente, tratamentos totalmente quanto-mecânicos da interação soluto-solvente e solvente-solvente vêm crescendo rapidamente.⁵⁵

II.5 Considerações Importantes sobre química computacional

O tratamento quântico considera que o elétron é muito mais leve do que o núcleo e que, por isso, na Mecânica Molecular são praticamente descartados efeitos de interação eletrônica.⁵⁶ Através de cálculos de orbitais moleculares, são obtidas soluções aproximadas para a equação de Schrödinger do estado fundamental e outros estados energéticos, a partir dos quais as propriedades moleculares de interesse são calculadas. Diversos pacotes computacionais são utilizados na modelagem molecular como Gaussian, Gamess, Ampac, Spartan, Mopac e Hyperchem.⁵⁷ Tais pacotes contêm métodos de química quântica para a aproximação da equação de Schrödinger.

A escolha do método de cálculo a ser utilizado depende da consideração de três fatores principais: as quantidades que se deseja determinar, a precisão necessária e a capacidade de “hardware” disponível. Dentre as opções de métodos quânticos, a escolha deve ser feita com base na precisão necessária. Métodos semi-empíricos, em geral, produzem resultados menos precisos do que métodos *ab-initio*. O uso de métodos mais sofisticados, computacionalmente mais custosos, pode ser inviável, dependendo do tamanho do sistema molecular e das características do equipamento disponível.

O emprego de modelos teóricos fornece informações ao nível molecular que contribuem para uma melhor interpretação e refinamento de resultados experimentais. Adicionalmente, é importante se estabelecerem comparações entre os resultados teóricos e experimentais para os vários sistemas químicos, pois o desempenho de um dado modelo pode não ser uniforme para diferentes classes de substâncias.^{58,59}

Capítulo III:
Parte Experimental

III.1. Materiais

As determinações dos pontos de fusão foram realizadas em aparelho Mettler FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do IV foram realizadas em espectrômetro Spectrum One – Perkin Elmer com uso de pastilhas de KBr.

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Bruker DPX-200 e DRX-400 linha *AVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (δ) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna.

Placas de vidro recobertas por sílica em gel 60 G (Merck) de 0,25 mm de espessura, ativadas a 100 °C, foram empregadas nas técnicas analíticas em cromatografia em camada delgada de sílica em gel (CCDS). Os reveladores cromatográficos foram radiação no ultravioleta (UV, $\lambda = 254$ e 366 nm), vapores de iodo e solução de vanilina/ácido perclórico. Essa solução foi preparada pela mistura de partes iguais de uma solução contendo 1,0 g de vanilina em 100,00 mL de etanol com outra solução de 3 mL de ácido perclórico (70%) em 97 mL de água. A cromatoplaça foi borrifada pela solução de vanilina/ácido perclórico e aquecida em estufa por 10 min a 100 °C.

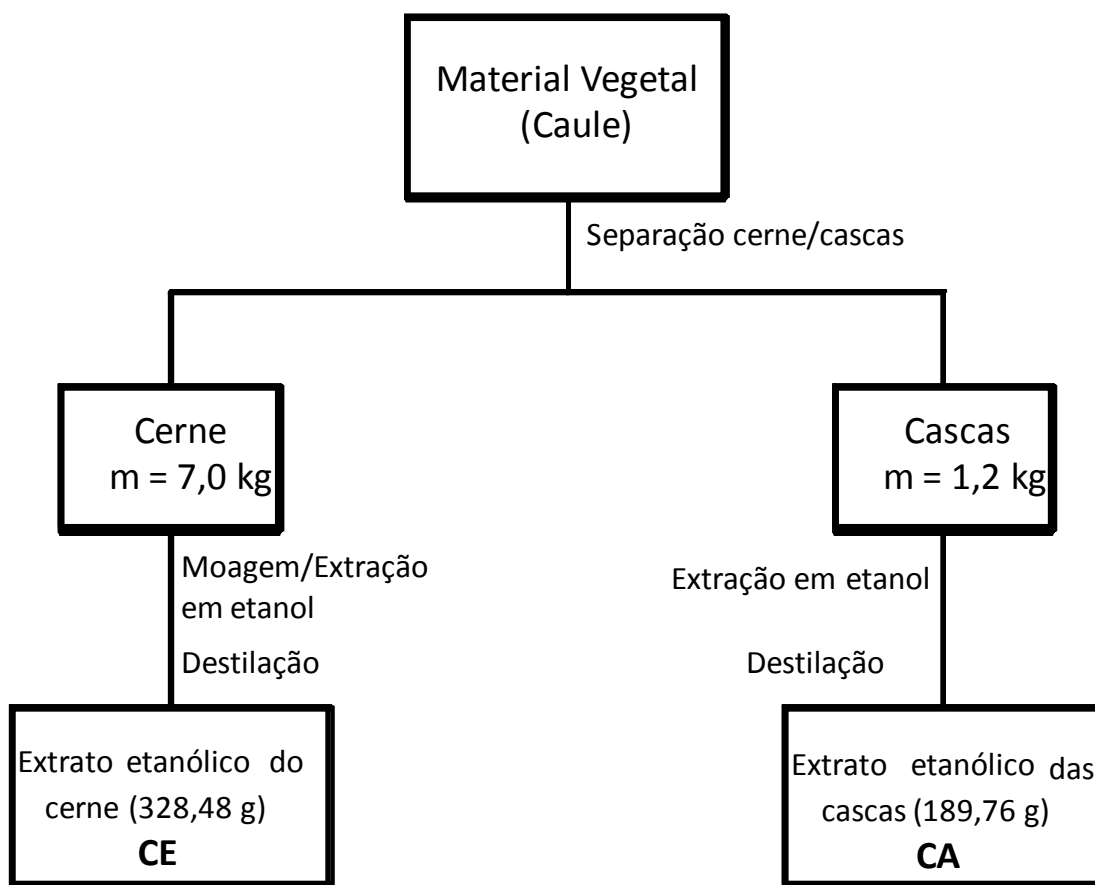
Colunas de vidro de diversos diâmetros com eluição sob pressão atmosférica foram empregadas nos procedimentos de cromatografia em coluna (CC). A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi de aproximadamente 1:30. As fases estacionárias utilizadas foram sílica em gel 60 (Merck) de 70-230 Mesh. Os solventes utilizados nos fracionamentos cromatográficos foram de grau P.A e adquiridos da empresa VETEC.

Sephadex LH-20 foi empregado como suporte nos procedimentos de cromatografia por exclusão em gel (GPC). O gel foi mantido em contato com o solvente a ser utilizado como fase móvel por 24 h e, em seguida, empacotado em coluna de vidro até a total sedimentação do suporte. As amostras foram dissolvidas em quantidades suficientes da fase móvel e aplicadas suavemente no topo da coluna até a absorção completa no suporte, seguido por eluição com o solvente apropriado.³⁶

III.2. Metodologia fitoquímica

Aristolochia esperanzae Kuntze foi adquirida no Mercado Central de Belo Horizonte sendo coletada no Município de Esmeraldas (MG), onde a espécie é muito frequente. Amostras deste material obtido foram comparadas com uma exsicata que se encontra depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o código BHCB 61743. O caule da espécie foi submetido à separação manual de cascas e cerne.

O cerne do caule (7.000 g) previamente seco por 10 dias, sob temperatura ambiente e em local abeto. Após pulverização em moinho de facas foi mantido sob extração em etanol (10 litros) por sete dias e a mistura foi filtrada. O procedimento de extração foi repetido mais duas vezes com a torta do material vegetal. O extrato etanólico do cerne (CE; 328,48 g) foi obtido após destilação a pressão reduzida do solvente. Da mesma forma, as cascas do caule (1.200 g) forneceram 189,76 g de extrato etanólico das cascas (CA). O procedimento de obtenção dos extratos é apresentado no Esquema III.1.²⁸



Esquema III.1. Obtenção dos extratos etanólicos das cascas e do cerne de *A. esperanzae*.²⁸

III.2.1. Elaboração do extrato etanólico das cascas do caule

O extrato CA (180 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (5,0 cm x 70,0 cm), sendo coletadas 181 frações de 250 mL que foram eluídas em hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), etanol (EtOH) e metanol (MeOH). Após análise comparativa por CCDS, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela III.1. Os grupos CA1 a CA4 foram estudados previamente,²⁸ levando ao isolamento e caracterização de diversos fitoconstituintes como terpenos, lignanas, ácidos aristolóchicos I e II e aristolactamas AII e AIa, cujas estruturas são apresentadas na Figura I.8 (p. 24).

Tabela III.1. Fracionamento cromatográfico do extrato CA (180 g)

Fração(ões)	Eluente	Grupo (massa/mg)	Fração(ões)	Eluente	Grupo (massa/mg)
1	HEX	CA1 (84,1)	105 – 122	DCM	CA6 (226,1)
2	HEX		123	DCM:AcOEt (1:1)	CA7 (130,0)
3 – 20	HEX		124 – 125	DCM:AcOEt (1:1)	CA8 (425,7)
21 – 27	HEX	CA2 (55,5)	126 – 141	DCM:AcOEt (1:1)	CA9 (705,1)
28 – 34	HEX		142 – 145	AcOEt	CA10 (190,6)
35 – 36	DCM	CA3 (42,9)	146 – 151	AcOEt	CA11 (152,2)
37	DCM		152 – 163	AcOEt	CA12 (298,3)
38 – 39	DCM		164	EtOH	CA13 (67,8)
40	DCM		165	EtOH	CA14 (54,5)
41 – 48	DCM	CA4 (179,3)	166 – 168	EtOH	CA15 (117,0)
49 – 55	DCM		169 – 171	EtOH	CA16 (83,1)
56 – 57	DCM		172 – 173	EtOH	CA17 (79,3)
68 – 85	DCM		174 – 176	EtOH	CA18 (110,4)
86 – 94	DCM		177 – 178	MeOH	CA19 (220,9)
95 – 104	DCM	CA5 (124,2)	179 – 181	MeOH	CA20 (323,2)

III.2.2. Elaboração dos grupos CA5 e CA6

As frações dos grupos CA5 e CA6, obtidas após fracionamento cromatográfico com DCM, mostraram um perfil semelhante quando submetidas a análise por CCDS. Esses grupos foram reunidos (350,3 mg) e submetidos à CCS (coluna 3,0 cm x 40 cm) e eluição com HEX, DCM e AcOEt, em ordem crescente de polaridade resultando em 50 frações de 20 mL conforme Tabela III.2. As frações foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCDS.

Tabela III.2. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA5 e CA6 (350,3 mg)

Fração(ões)	Eluente	Grupo	Massa (mg)
1-3	HEX	CA5-CA6-R1	12,0
4 -6	HEX:DCM (1:1)		
7 -12	HEX:DCM (4:6)		25,2
13 – 15	HEX:DCM (3:7)	CA5-CA6-R2	
16 – 17	HEX:DCM (2:8)		
18 – 22	HEX:DCM (1:9)	CA5-CA6-R3	18,1
23 – 27	DCM		
28 – 32	DCM:AcOEt (9:1)		98,5
33 – 37	DCM:AcOEt (3:1)	CA5-CA6-R4	
38 – 45	DCM:AcOEt (1:1)		
46 – 48	AcOEt	CA5-CA6-R5	20,3
49 – 50	AcOEt	CA5-CA6-R6	15,2

O grupo CA5-CA6-R2 (25,2 mg), após lavagem com MeOH, apresentou-se como um sólido branco (8 mg). Análise por CCDS em diferentes eluentes apresentou apenas uma mancha, indicando tratar-se de uma substância pura, denominada de AED1 ($T_{.f}$ 109,0 – 118,0 °C).

O grupo CA5-CA6-R4 (98,5 mg) apresentou-se como um sólido e foi submetido a refração cromatográfico por CC de Sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) e eluída com MeOH, resultando em 21 frações de 3 mL. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCDS, conforme Tabela III.3 (p. 47). O grupo CA5-CA6-R4-G3 (8,5 mg) apresentou uma única mancha por CCDS em diferentes sistemas eluentes, sendo denominado de AED3 ($T_{.f}$ 273,0 – 276,0 °C).

Tabela III.3. Fracionamento cromatográfico do grupo CA5-CA6-R4 (98,5 mg)

Fração(ões)	Grupo	Massa (mg)
1-5	CA5-CA6-R4-G1	25,1
6 -13	CA5-CA6-R4-G2	18,4
13 – 15	CA5-CA6-R4-G3	8,5
16	CA5-CA6-R4-G4	16,3
17 – 21	CA5-CA6-R4-G5	19,7

III.2.3. Elaboração do grupo CA7 (130,0 mg)

O grupo CA7, obtido após fracionamento cromatográfico com DCM:AcOEt 1:1, (130,0 mg, ver Tabela III.1, p. 46), após análise por CCDS, foi submetido à CCS (3,0 cm x 40,0 cm) eluída com HEX, DCM e AcOEt, em ordem crescente de polaridade obtendo-se 67 frações de 20 mL que foram reunidas em grupos após análise por CCDS, conforme Tabela III.4.

Tabela III.4. Fracionamento cromatográfico de CA7 (130,0 mg)

Fração(ões)	Eluente	Grupo	Massa (mg)
1-3	HEX	CA7-R1	8,1
4 -10	HEX:DCM (7:3)		
11 -16	HEX:DCM (6:4)	CA7-R2	48,4
17 – 23	HEX:DCM (1:1)		
24 – 30	HEX:DCM (3:7)		
31 – 37	HEX:DCM (1:9)	CA7-R3	10,3
38 – 45	DCM	CA7-R4	15,2
46 – 51	DCM:AcOEt (9:1)	CA7-R5	20,6
52 – 58	DCM:AcOEt (3:1)		
59 – 63	DCM:AcOEt (1:1)	CA7-R6	7,3
64 – 65	AcOEt	CA7-R7	18,5
66 – 67	AcOEt		

O grupo CA7-R2 (48,4 mg) foi submetido à CC (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) de Sephadex LH-20 eluída com MeOH, resultando em 10 frações de 2 mL que foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCDS, conforme Tabela III.5 (p. 48). O grupo CA7-R2-R2 (7,4 mg) apresentou apenas uma mancha pela análise por CCDS, indicando tratar-se de uma substância pura, denominada de AED2 que apresentou-se como um sólido de coloração vermelha.

Tabela III.5. Fracionamento cromatográfico do grupo CA7-R2 (48,4 mg)

Fração(ões)	Grupo	Massa (mg)
1-2	CA7-R2-R1	5,2
3	CA7-R2-R2	7,4
4-5	CA7-R2-R3	10,8
6 – 10	CA7-R2-R4	13,2

III.2.4. Elaboração dos grupos CA8 e CA9 (1.130,8 mg)

As frações dos grupos CA8 e CA9, obtidas após fracionamento cromatográfico com DCM:AcOEt 1:1, mostraram um perfil semelhante quando submetidas à análise por CCDS, sendo reunidas (1.130,8 mg) e submetidas à CCS (coluna 3,0 cm x 40 cm), empregando DCM e AcOEt como eluentes em ordem crescente de polaridade. Esse fracionamento resultou em 236 frações de 50 mL, conforme Tabela III.6. As frações foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCDS.

Tabela III.6. Fracionamento cromatográfico do grupo CA8 e CA9 (1.130,8 mg)

Fração(ões)	Eluente	Grupo	Massa (mg)
1-3	DCM	CA8-CA9-R1	20,2
4	DCM	CA8-CA9-R2	75,4
5-13	DCM	CA8-CA9-R3	35,8
14-42	DCM:AcOEt (9:1)	CA8-CA9-R4	20,7
43-59	DCM:AcOEt (8:2)	CA8-CA9-R5	14,5
60-197	DCM: AcOEt (7:3)	CA8-CA9-R6	570,6
198	DCM:AcOEt (6:4)	CA8-CA9-R7	44,4
199-209	DCM:AcOEt (1:1)	CA8-CA9-R8	26,8
210	DCM:AcOEt (4:6)	CA8-CA9-R9	14,7
211-216	DCM:AcOEt (4:6)	CA8-CA9-R10	18,3
217	DCM:AcOEt (4:6)	CA8-CA9-R11	51,2
218	DCM:AcOEt (3:7)	CA8-CA9-R12	35,1
219-223	DCM:AcOEt (3:7)	CA8-CA9-R13	87,3
224	DCM:AcOEt (2:8)	CA8-CA9-R14	21,8
225	DCM:AcOEt (2:8)	CA8-CA9-R15	12,7
226	DCM:AcOEt (1:9)	CA8-CA9-R16	9,6
227-229	DCM:AcOEt (1:9)	CA8-CA9-R17	22,5
230	AcOEt	CA8-CA9-R18	10,5
231-236	AcOEt	CA8-CA9-R19	31,4

O grupo CA8-CA9-R6 (570,6 mg) foi submetido à CC de alumina neutra (coluna 3,0 cm x 40 cm) empregando solução THF:CHCl₃ (1:5) como eluente, resultando em 105 frações de 20 mL.

Essas frações foram reunidas em grupos após análise comparativa por CCDS, conforme mostrado na Tabela III.7.

Tabela III.7. Refracionamento cromatográfico de CA8-CA9-R6 (570,6 mg)

Grupo	Frações Reunidas	Massa (mg)
CA8-CA9-R6-R1	1	20,3
CA8-CA9-R6-R2	2 e 3	44,7
CA8-CA9-R6-R3	4-6	66,2
CA8-CA9-R6-R4	12	30,5
CA8-CA9-R6-R5	7-17	42,3
CA8-CA9-R6-R6	18	38,9
CA8-CA9-R6-R7	19 – 90	198,2
CA8-CA9-R6-R8	91-93	8,5
CA8-CA9-R6-R9	94-104	32,4
CA8-CA9-R6-R10	105	7,8

Os grupos CA8-CA9-R6-R1 a CA8-CA9-R6-R3 mostraram um perfil semelhante quando submetidos a análise por CCDS. As frações foram reunidas (131,2 mg) e submetidas a CCS (coluna 3,0 cm x 40 cm) com eluição em HEX e DCM, obtendo-se 17 frações de 20 mL, conforme Tabela III.8 (p. 50). As frações foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCDS. As frações de 1 a 8 foram reunidas e lavadas com MeOH, apresentando-se como um sólido amarelo (23,6 mg). A análise por CCDS mostrou apenas uma mancha, indicando tratar-se de uma substância pura que foi denominada de AEY.

Tabela III.8: Refracionamento cromatográfico de CA8-CA9-R6-R1 a CA8-CA9-R6-R3 (71,2 mg)

Fração(ões)	Eluente	Massa (mg)
1-2	HEX	7,1
3	HEX/DCM 3:1	8,0
4-8	HEX/DCM 1:1	8,5
9-14	HEX/DCM 1:3	2,0
15	HEX/DCM 1:9	8,6
16-17	DCM	20,3

III.2.5. Elaboração dos grupos CA10 a CA12 (641,1 mg)

Os grupos CA10, CA11 e CA12, obtidos após fracionamento cromatográfico com AcOEt, mostraram um perfil semelhante quando submetidos à análise por CCDS. Esses grupos foram reunidos (641,1 mg) e submetidos à CCS (coluna 3,0 cm x 40 cm) e eluição com DCM, AcOEt e EtOH, resultando em 65 frações de 20 mL conforme Tabela III.9 (p. 51). As frações foram reunidas em grupos de acordo com análise por CCDS.

Tabela III.9. Refracionamento cromatográfico dos grupos CA10 a CA12 (641,1 mg)

Fração(ões)	Eluente	Grupo	Massa (mg)
1-4	DCM	CA10-CA11-CA12-R1	42,1
4 -5	DCM: AcOEt (2:1)		
6 -13	DCM: AcOEt (2:1)	CA10-CA11-CA12-R2	13,4
14 – 15	DCM: AcOEt (1:1)		
16 – 17	DCM: AcOEt (1:1)	CA10-CA11-CA12-R3	22,7
18 – 21	DCM: AcOEt (1:2)		
22 – 26	DCM: AcOEt (1:3)	CA10-CA11-CA12-R4	18,9
27 – 31	DCM: AcOEt (1:3)	CA10-CA11-CA12-R5	15,7
32 – 35	AcOEt	CA10-CA11-CA12-R6	79,6
36 – 42	AcOEt		
43 – 46	AcOEt: EtOH (3:1)	CA10-CA11-CA12-R7	12,4
47 – 50	AcOEt: EtOH (2:1)		
51 – 55	AcOEt: EtOH (1:1)	CA10-CA11-CA12-R8	75,9
56 – 58	AcOEt: EtOH (1:2)		
59 – 62	AcOEt: EtOH (1:3)	CA10-CA11-CA12-R9	10,6
63 – 65	EtOH	CA10-CA11-CA12-R10	51,6

O grupo CA10-CA11-CA12-R6 (79,6 mg) apresentou-se como um sólido e foi submetido a refração cromatográfico por CC de Sephadex LH-20 (coluna 1,0 cm x 60,0 cm) eluída com MeOH:DCM (9:1), resultando em 33 frações de 2 mL. Essas frações foram reunidas em grupos após análise por CCDS, conforme Tabela III.10 (p.52). O grupo CA10-CA11-CA12-R6-R4 (15,6 mg) apresentou apenas uma única mancha por CCDS em diferentes sistemas eluentes, sendo denominado de AED4. Este grupo apresentou-se como um sólido de coloração vermelha, cujas análises para elucidação estrutural indicaram equivalência com o sólido denominado AED2.

Tabela III.10. Fracionamento cromatográfico do grupo CA10-CA11-CA12-R6 (79,6 mg)

Fração(ões)	Grupo	Massa (mg)
1-6	CA10-CA11-CA12-R6-R1	4,7
7 -11	CA10-CA11-CA12-R6-R2	3,8
12 – 16	CA10-CA11-CA12-R6-R3	4,5
17 – 21	CA10-CA11-CA12-R6-R4	15,6
22 – 25	CA10-CA11-CA12-R6-R5	6,7
25 – 29	CA10-CA11-CA12-R6-R6	4,9
30 –32	CA10-CA11-CA12-R6-R7	3,8
33	CA10-CA11-CA12-R6-R8	2,7

III.3. Metodologia teórica

Estudos teóricos foram realizados utilizando o software Gaussian 03.²⁷ As geometrias obtidas previamente a partir de cálculos semi-empíricos PM3 foram usadas como modelos iniciais nas otimizações de geometria empregando cálculos HF, DFT e MP2²⁸, com conjuntos de base 6-31G*, 6-31G**, 6-311G*, 6-311G**, 6-311+G** e 6-311++G**. Funcionais de troca e correlação BLYP, B3LYP e PBE foram utilizados nos cálculos DFT.²⁹⁻³⁴ As geometrias otimizadas foram caracterizadas como mínimos verdadeiros sobre a superfície de energia potencial (PES), quando todas as frequências harmônicas são reais.

A energia eletrônica nuclear (E) das geometrias otimizadas foi dada em unidades atômicas (*Hartree*). As densidades de elétrons calculadas pelo método de Mulliken foram dadas em unidades de elétrons (e). A investigação dos efeitos do solvente na geometria foi feita utilizando o modelo PCM - *Polarizable Continuum Model* - usando o nível de cálculo BLYP/6-31G*.³⁵ Os efeitos do solvente foram investigados também pelo uso de um modelo de solvente explícito. Neste caso, a molécula de solvente foi aleatoriamente colocada próximo à molécula objeto de cálculo. As geometrias dos sistemas correspondentes foram obtidas anteriormente por cálculos semi-empíricos PM3 e usadas como modelos iniciais para as otimizações de geometria.

As geometrias otimizadas foram utilizadas para o cálculo de deslocamento químico de carbono nos mesmos níveis da teoria. Valores calculados de deslocamento químico de carbono

$(^{Calc}\delta_C)$ foram determinados em relação aos valores correspondentes calculados para tetrametilsilano, usado como padrão de referência. Correlações entre os valores de $^{Calc}\delta_C$ e os deslocamentos químicos de carbono determinados experimentalmente (δ_C) foram obtidos utilizando o software Origin TM Standard 7.5. Os valores de $^{Calc}\delta_C$ e δ_C foram plotados nos eixos x e y, respectivamente. As curvas de correlação - $^{Calc}\delta_C/\delta_C$ - foram submetidas a um ajuste linear, obtendo-se coeficientes de correlação (R^2) e inclinação da curva de $R^2(\alpha)$, fornecidos pelo próprio programa.

CAPÍTULO IV

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS

CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS

IV.1. Análise estrutural de CA5-CA6-R2 (AED1)

As Figuras IV.1 e IV.2 (p. 56) mostram respectivamente o espectro de RMN de ^1H de AED1 e ampliações. A região de ressonância de núcleo de hidrogênio de sistema aromático registra sinais entre δ_{H} 6,80 e 6,40 (multipletos). Os sinais em δ_{H} 5,92 e 5,22 podem ser atribuídos a núcleos de hidrogênio ligados a átomos de carbono sp^3 dioxigenado. Os tripletos entre δ_{H} 4,20 e 3,50 podem ser atribuídos a núcleos de hidrogênio metilênico ligados a carbono sp^3 mono-oxigenado. A região compreendida entre δ_{H} 3,00 e 1,80 apresenta sinais que podem ser atribuídos a núcleos de hidrogênio de grupos alifáticos e sinais relativos a núcleos de hidrogênio característico de grupos hidroxila sobrepostos aos sinais relativos aos núcleos de hidrogênio de grupos alifáticos.

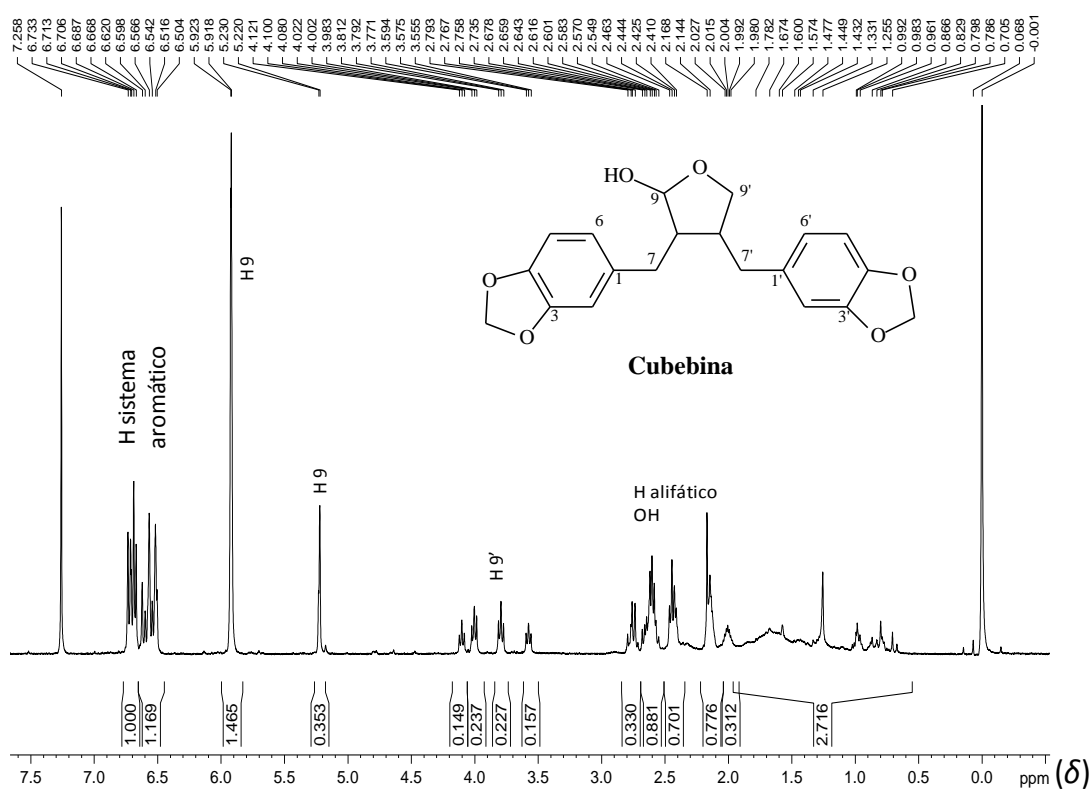


Figura IV.1. Espectro de RMN de ^1H de AED1 (400 MHz, CDCl_3).

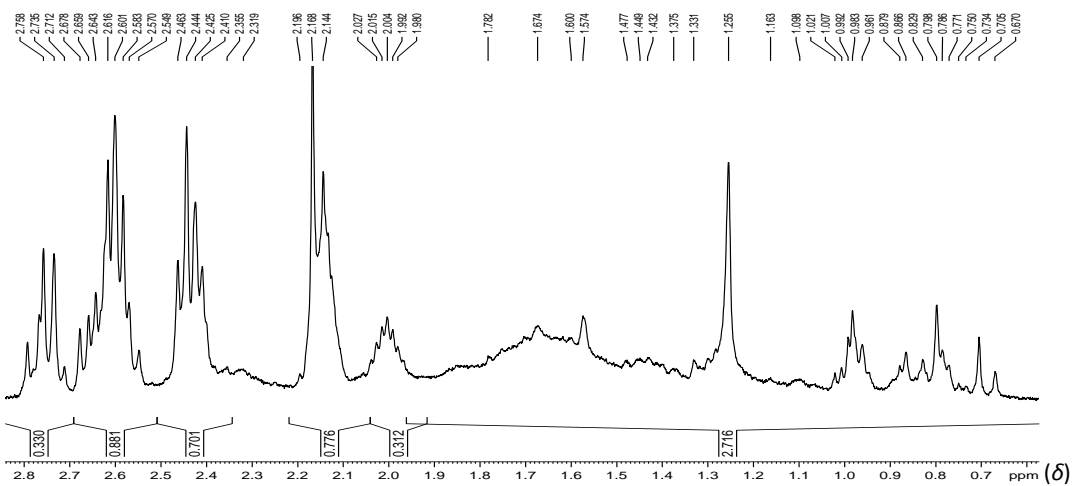
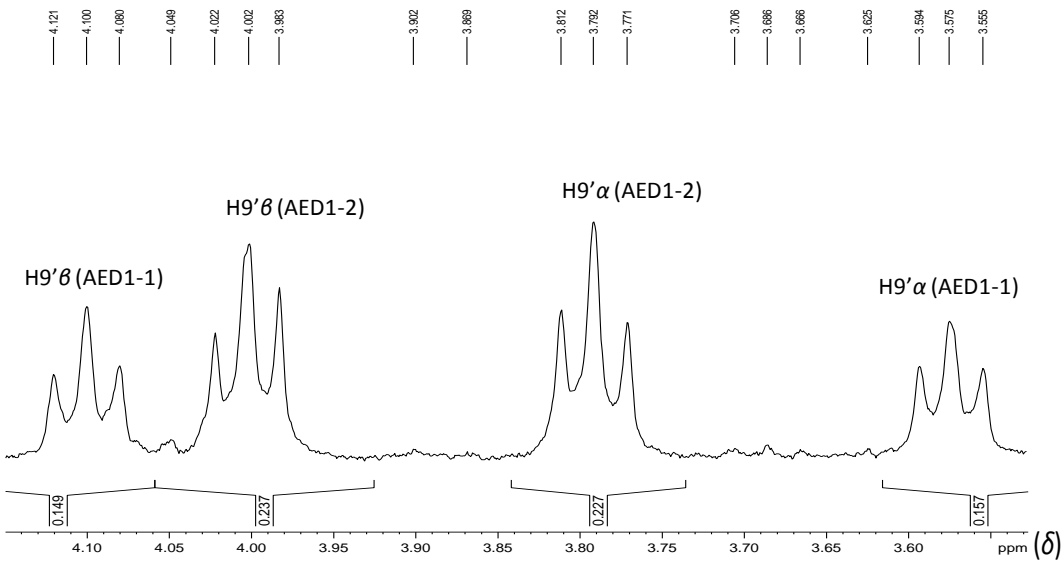
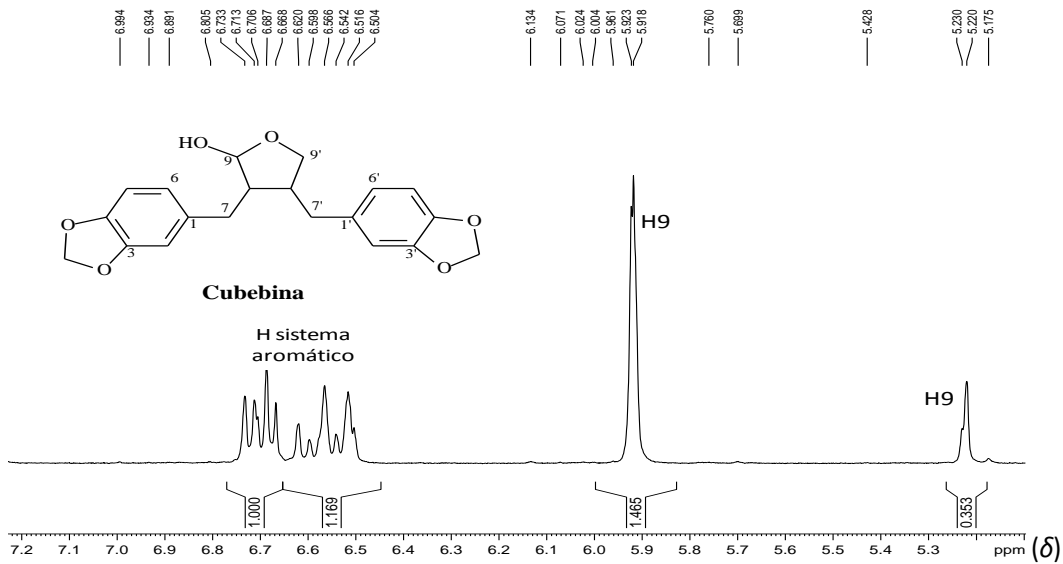


Figura IV.2. Expansões do espectro de RMN de ^1H de AED1 (400 MHz, CDCl_3).

As Figuras IV.3 e IV.4 (p. 58) apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de AED1. Os sinais em δ_{C} 147,7, 147,6, 145,9 e 145,8 podem ser atribuídos a núcleos de carbono de anel aromático oxigenado e os sinais em δ_{C} 134,5, 134,1, 133,8 e 133,3 podem ser atribuídos a núcleos de carbono de anel aromático não hidrogenado. Os sinais entre δ_{C} 121,7 e 108,1 podem ser atribuídos a núcleos de carbono de anel aromático hidrogenado. O sinal em δ_{C} 100,8 pode ser atribuído a núcleo de carbono metilênico dioxigenado. Os sinais em δ_{C} 98,8 e 103,4 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metínico dioxigenado. Os sinais em δ_{C} 52,1, 53,1, 45,9 e 42,9 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metínico e os sinais em δ_{C} 72,7, 72,3, 39,2, 38,9, 38,5 e 33,6 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metilênico. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentam sinais indicativos de uma mistura de estereoisômeros da cubebina (sobretudo aqueles relativos a $\text{H}9^\alpha$, $\text{H}9^\beta$, $\text{C}7/7'$, $\text{C}8/8'$ e $\text{C}9/9'$), denominados por AED1-1 (grupo de sinais mais intensos) e AED1-2 (grupo de sinais menos intensos).

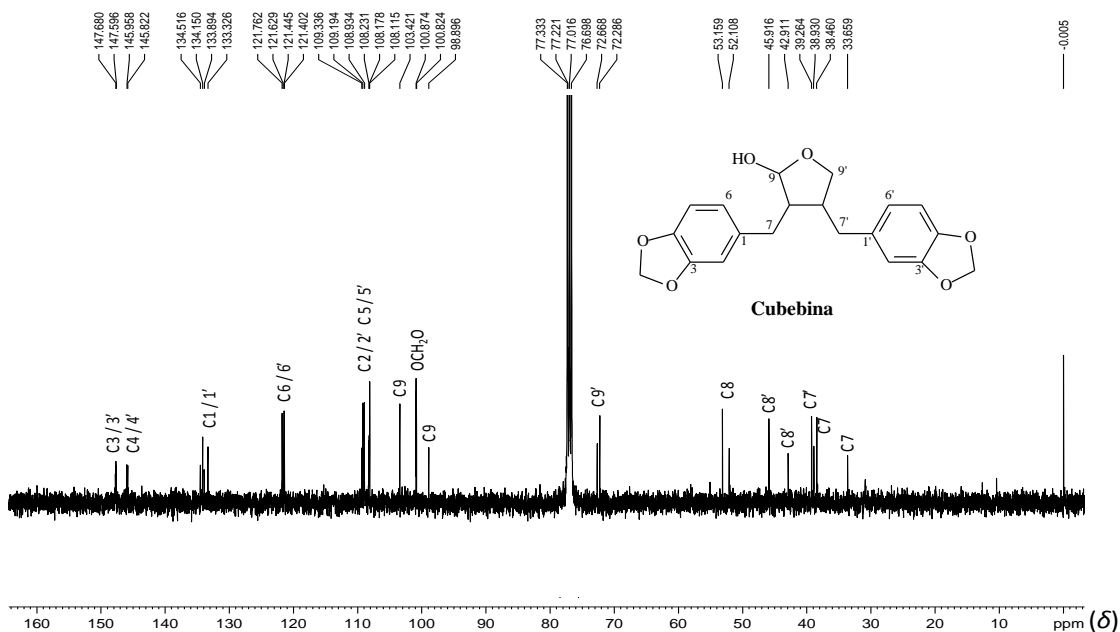


Figura IV.3. Espectro de RMN de ^{13}C de AED1 (100 MHz; CDCl_3).

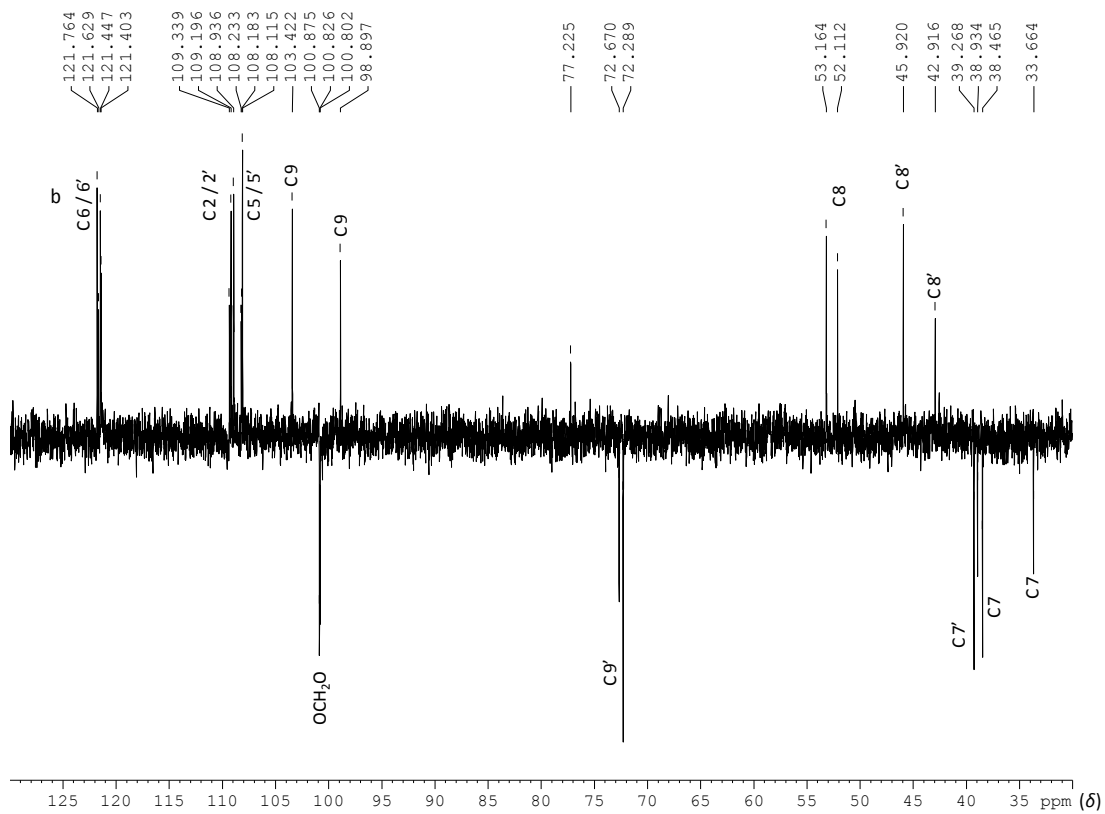
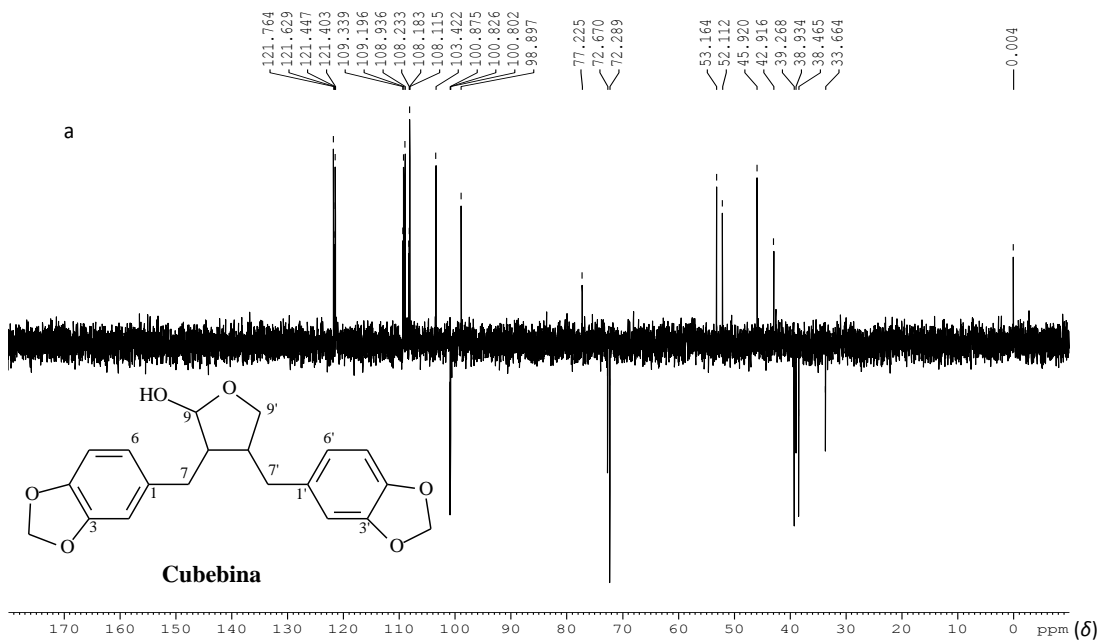


Figura IV.4. Subespectro DEPT-135° (100 MHz; CDCl₃) de: AED1 (a) e de expansão correspondente (b).

As Figuras IV.5 e IV.6 (p. 60 e 61) mostram o mapa de contornos HSQC de AED1 e suas expansões correspondentes, respectivamente. O sinal em δ_H 6,70 (H-2, H-2' e H-5') correlaciona-se com os sinais em δ_C 109,3 (C-2'), 108,9 (C-2) e 108,1 (C-5'). O sinal em δ_H 6,65 (H-6') correlaciona-se com o sinal em δ_C 121,6 (C-6'). O sinal em δ_H 6,50 (H-5 e H-6) correlaciona-se com os sinais em δ_C 108,2 (C-5) e 121,4 (C-6). O sinal em δ_H 5,90 (OCH₂O) correlaciona-se com o sinal em δ_C 100,8 (OCH₂O). O sinal em δ_H 5,20 (H-9) correlaciona-se com o sinal em δ_C 98,9 (C-9). Os sinais em δ_H 4,10 (H-9' β) e 3,60 (H-9' α) correlacionam-se com o sinal em δ_C 72,6 (C-9'). Os sinais em δ_H 2,70 (H-7 β e H-7' β) e 2,6 (H-7 α e H-7' α) correlacionam-se com os sinais em δ_C 33,6 (C-7) e 38,9 (C-7'). O sinal em δ_H 2,40 (H-8') correlaciona-se com o sinal em δ_C 42,9 (C-8'). O sinal em δ_H 2,00 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_C 52,1 (C-8). Estas correlações são coerentes para AED1-1.

Tem-se também que o sinal em δ_H 6,70 (H-2 e H-5') correlaciona-se com os sinais em δ_C 109,1 (C-2) e 108,1 (C-5'). O sinal em δ_H 6,60 (H-5 e H-2') correlaciona-se com os sinais em δ_C 108,2 (C-5) e 109,1 (C-2'). O sinal em δ_H 6,55 (H-6') correlaciona-se com o sinal em δ_C 121,8 (C-6'). O sinal em δ_H 6,50 (H-6) correlaciona-se com o sinal em δ_C 121,4 (C-6). O sinal em δ_H 5,90 (OCH₂O) correlaciona-se com o sinal em δ_C 100,8 (OCH₂O). O sinal em δ_H 5,20 (H-9) correlaciona-se com o sinal em δ_C 103,4 (C-9). Os sinais em δ_H 4,00 (H-9' β) e 3,80 (H-9' α) correlacionam-se com o sinal em δ_C 72,2 (C-9'). Os sinais em δ_H 2,70 (H-7' β) e 2,60 (H-7' α) correlacionam-se com o sinal em δ_C 39,2 (C-7'). Os sinais em δ_H 2,70 (H-7 β) e 2,4 (H-7 α) correlacionam-se com o sinal em δ_C 38,5 (C-7). O sinal em δ_H 2,20 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_C 53,1 (C-8). O sinal em δ_H 2,15 (H-8') correlaciona-se com o sinal em δ_C 45,9 (C-8'). Estas correlações são coerentes para AED1-2.

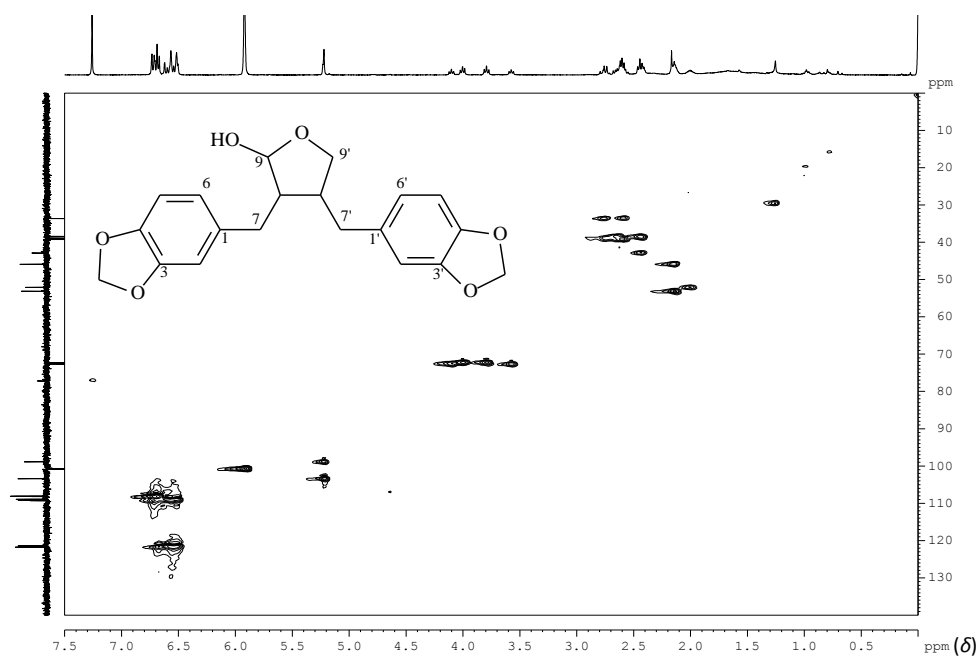


Figura IV.5. Mapa de contornos HSQC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).

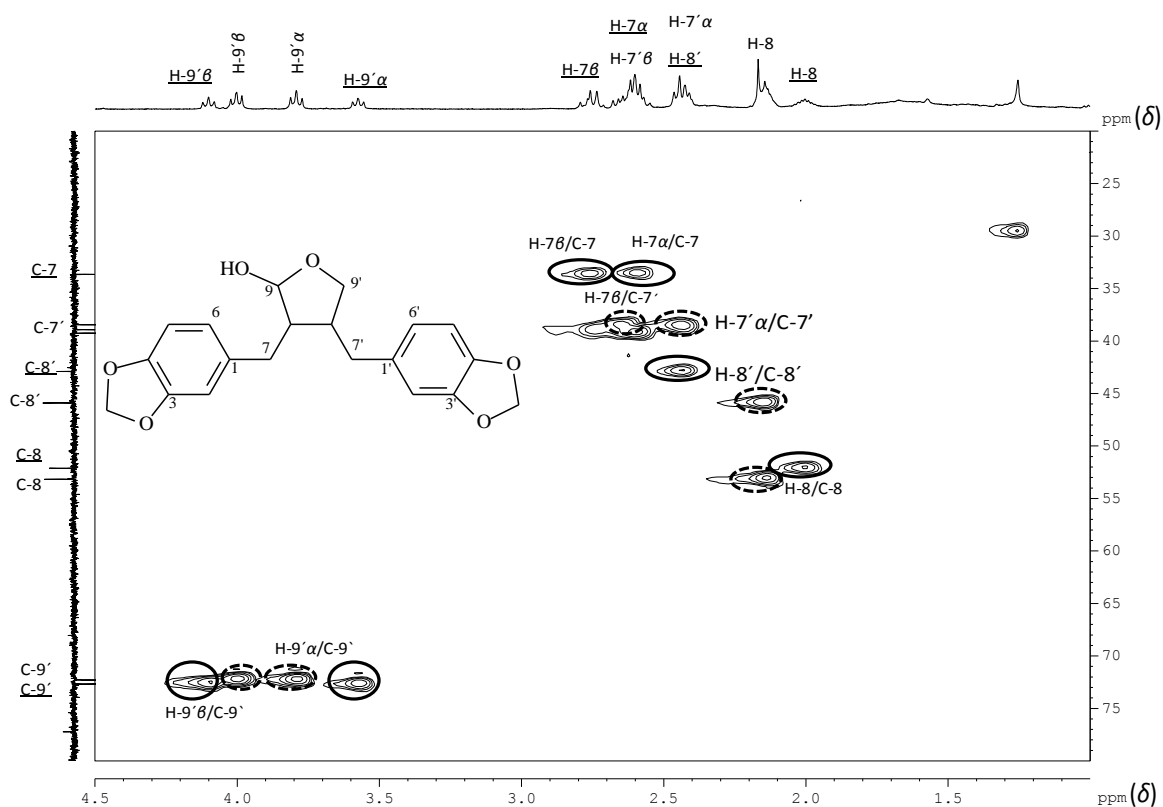


Figura IV.6a. Expansão do mapa de contornos HSQC de AED1 de δ_{H} 4,50 a 1,00 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , \bigcirc indica correlações de AED1-1, \odot indica correlações de AED1-2).

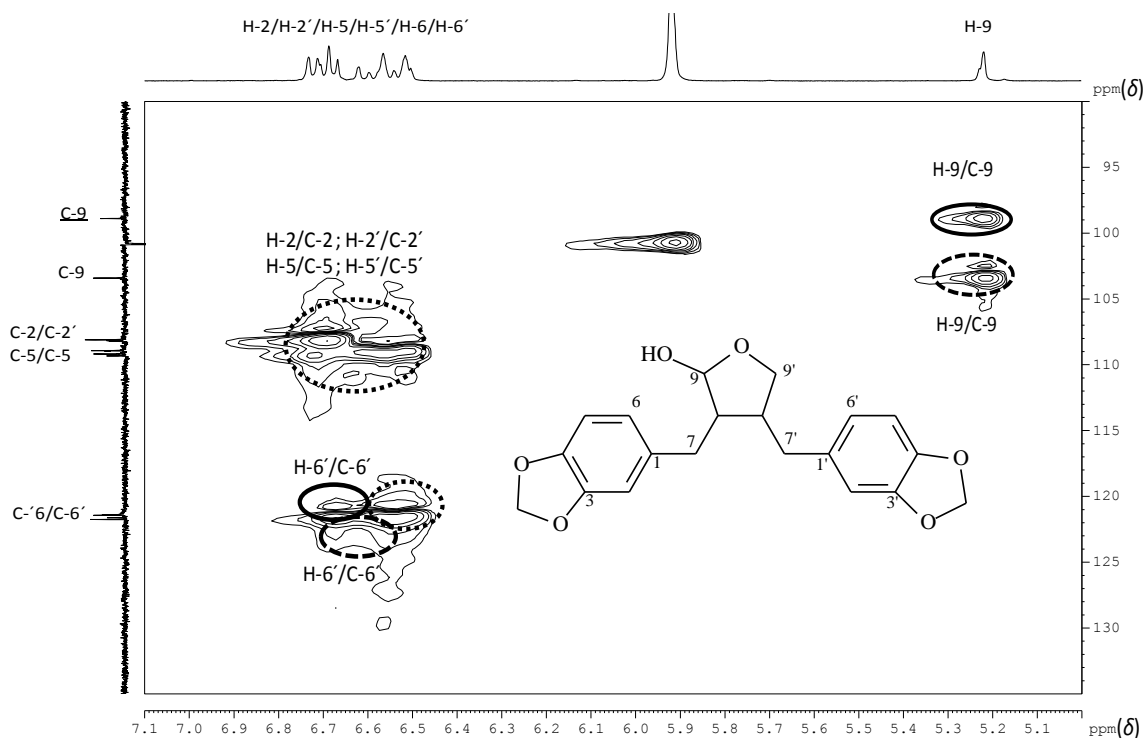


Figura IV.6b. Expansão do mapa de contornos HSQC de AED1 de δ_H 7,10 a 5,00 (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $CDCl_3$, \bigcirc indica correlações de AED1-1; \bigcirc indica correlações de AED1-2 e \bigcirc indica correlações de AED1-3).

A Figura IV.7 (p. 62) mostra o mapa de contornos COSY de AED1 e sua expansão. O sinal em δ_H 2,00 (H-8) correlaciona-se com os sinais em δ_H 2,70 (H-7), 2,40 (H-8') e 5,20 (H-9). O sinal em δ_H 2,10 (H-8') correlaciona-se com os sinais em δ_H em 4,00 (H-9' β), 3,80 (H-9' α), 2,60 (H-7' β) e 2,40 (H-7' α). O sinal em δ_H 2,40 (H-8') correlaciona-se com os sinais em δ_H 4,10 e 3,60 (H-9'). Todas essas correlações estão de acordo com a estrutura da cubebina.

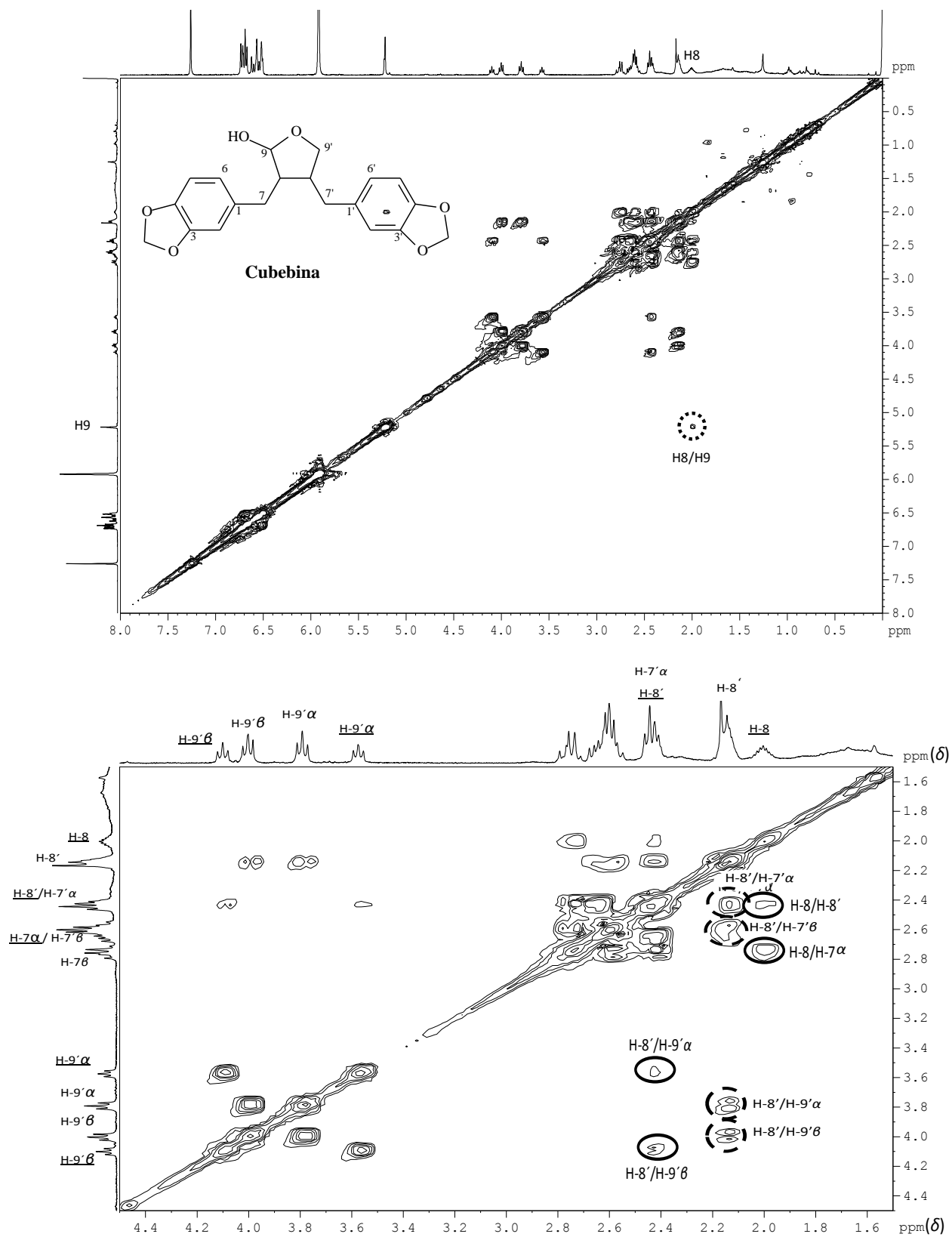


Figura IV.7. Mapas de contornos COSY de AED1 (400 MHz; CDCl_3 , \odot indica correlações de AED1-1; \ominus indica correlações de AED1-2 e \odot indica correlações de AED1).

As Figuras IV.8 (p. 64), IV.9a (p. 64) e IV.9b (p. 65) mostram o mapa de contornos HMBC e ampliações de AED1, respectivamente. Considerando o estereoisômero AED1-1, os sinais entre δ_H 6,70 e 6,50 (H-2, H-5, H-6, H-2', H-5' e H-6') correlacionam-se com os sinais em δ_C 147,7 (C-3 e C-3'), 145,9 (C-4 e C-4'), 121,6 (C-6'), 121,4 (C-6), 38,9 (C-7') e 33,6 (C-7). O sinal em δ_H 3,60 (H-9' α) correlaciona-se com o sinal em δ_C 38,9 (C-7'). O sinal em δ_H 5,20 (H-9) correlaciona-se com o sinal em δ_C 72,7 (C-9'). O sinal em δ_H 2,60 (H-7' α) correlaciona-se com o sinal em δ_C 72,6 (C-9'). O sinal em δ_H 2,00 (H-8) correlaciona-se com os sinais em δ_C 72,6 (C-9'), 38,9 (C-7') e 133,8 (C-1). O sinal em δ_H 5,90 (O-CH₂-O e O-CH₂-O') correlaciona-se com os sinais em δ_C 147,7 (C-3 e C-3') e 145,9 (C-4 e C-4'). Essas correlações HMBC estão de acordo com a estrutura proposta para AED1-1.

Considerando o estereoisômero AED1-2, os sinais entre δ_H 6,70 e δ_H 6,60 (H-2, H-5, H-6, H-2', H-5' e H-6') correlacionam-se com os sinais em δ_C 147,6 (C-3 e C-3'), 145,9 (C-4 e C-4'), 121,8 (C-6'), 121,4 (C-6), 38,5 (C-7) e 39,2 (C-7'). O sinal em δ_H 5,20 (H-9) correlaciona-se com os sinais em δ_C 38,5 (C-7) e 45,9 (C-8'). Os sinais em δ_H 4,00 (H-9' β) e 3,80 (H-9' α) correlacionam-se com os sinais em δ_C 39,2 (C-7') e 53,1 (C-8). O sinal em δ_H 2,70 (H-7' β) correlaciona-se com o sinal em 45,9 (C-8'). O sinal em δ_H 2,60 (H-7' α) correlaciona-se com os sinais em δ_C 53,1 (C-8) e 72,2 (C-9'). O sinal em δ_H 2,40 (H-7' α) correlaciona-se com o sinal em δ_C 121,4 (C-6). O sinal em δ_H 5,90 (O-CH₂-O e O-CH₂-O') correlaciona-se com os sinais em δ_C 147,6 (C-3 e C-3') e 145,8 (C-4 e C-4'). Essas correlações HMBC também estão de acordo com a estrutura proposta para AED1-2.

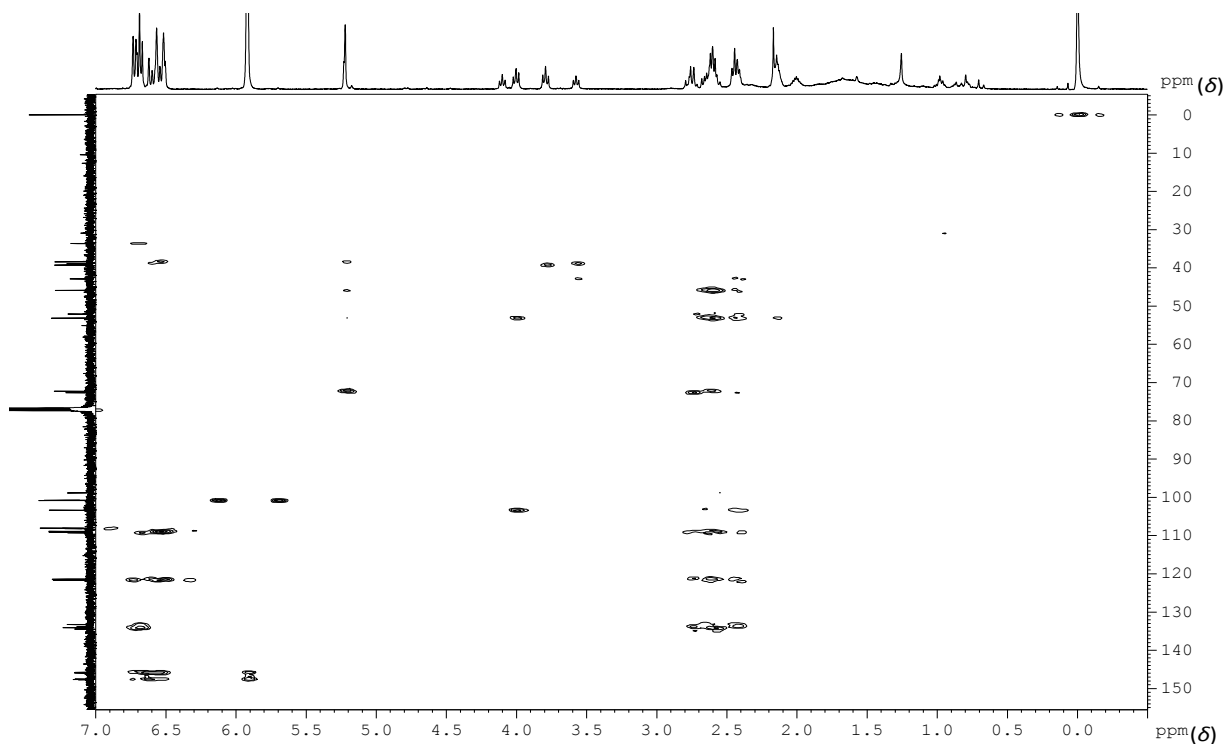


Figura IV.8. Mapa de contornos HMBC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).

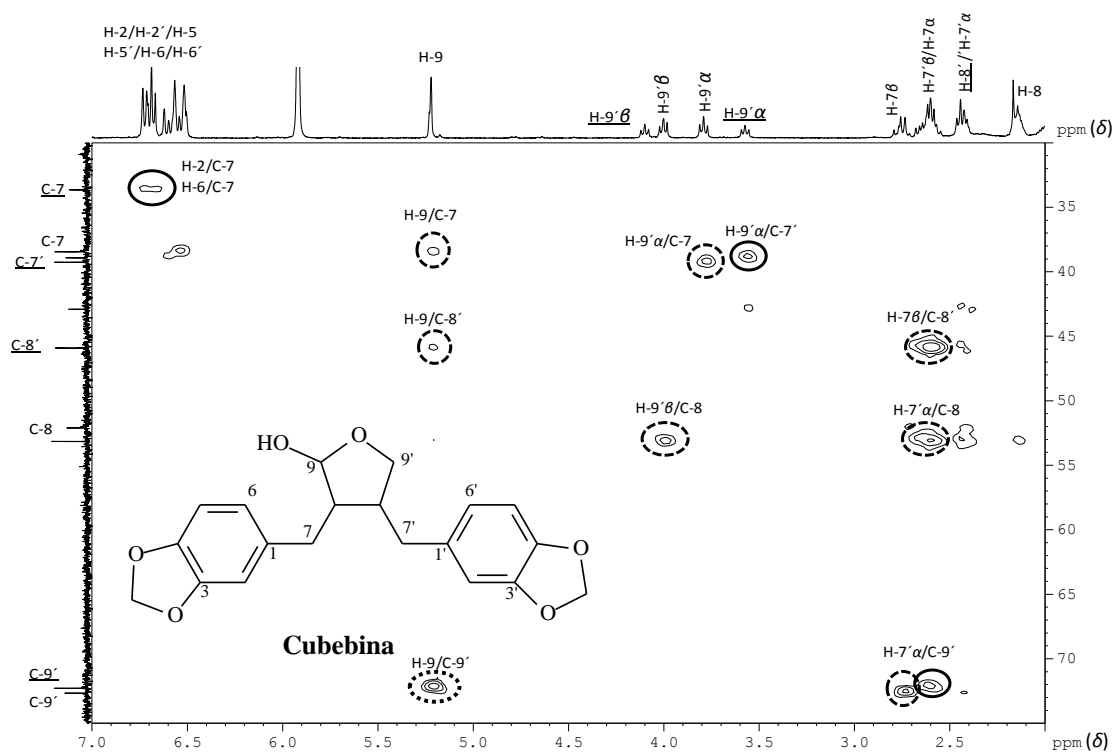


Figura IV.9a. Expansão do mapa de contornos HMBC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , indica correlações de AED1-1, \odot indica correlações de AED1-2 e \odot indica correlação de AED1-1 e AED1-2).

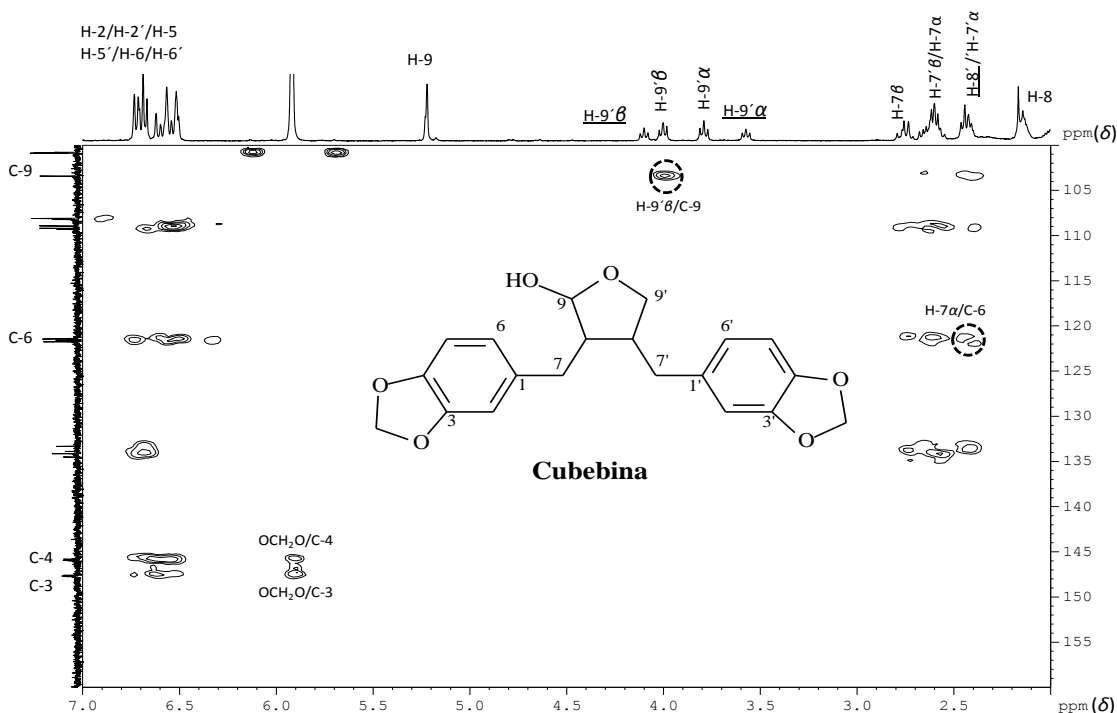


Figura IV.9b. Expansão do mapa de contornos HMBC de AED1 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , \odot indica correlações de AED1-2).

As Figuras IV.10 (p. 66) e IV.11 (p. 66) apresentam respectivamente o mapa de contornos NOESY de AED1 e sua expansão correspondente. Considerando o fitoconstituente AED1-1, o sinal em δ_{H} 2,00 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 5,20 (H-9). O sinal em δ_{H} 2,40 (H-8') correlaciona-se com os sinais em δ_{H} 6,70 (H-6' e H-2') e 4,10 (H-9' β). O sinal em δ_{H} 2,60 (H-7' α) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 3,60 (H-9' α). Essas correlações NOESY estão de acordo com a estrutura da cubebina, não determinando, porém, sua estereoquímica.

Considerando o fitoconstituente AED1-2, o sinal em δ_{H} 2,20 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 5,20 (H-9). O sinal em δ_{H} 2,15 (H-8') correlaciona-se com os sinais entre δ_{H} 6,60 e 6,55 (H-2' e H-6') e 4,00 (H-9' β). O sinal em δ_{H} 2,60 (H-7' α) correlaciona-se com o sinal em δ_{H} 3,80 (H-9' α). Essas correlações NOESY também estão de acordo com a estrutura de cubebina, não determinando, porém, sua estereoquímica.

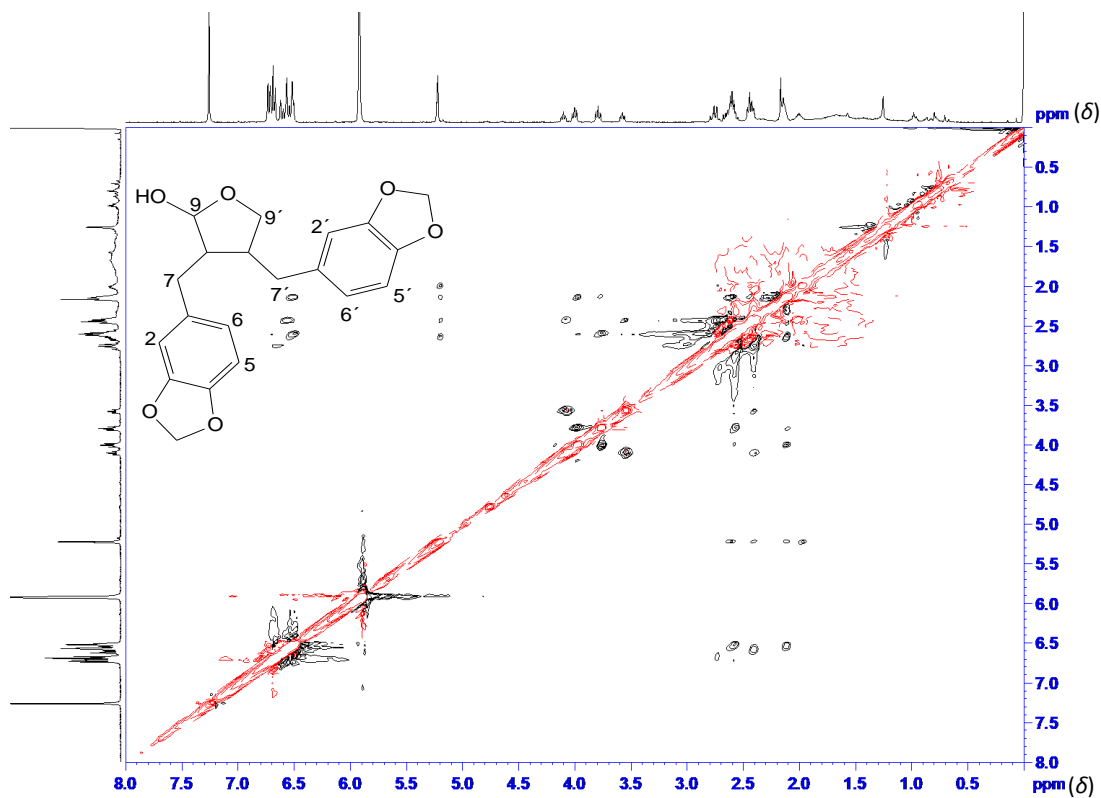


Figura IV.10. Mapa de contornos NOESY de AED1 (400 MHz; CDCl_3).

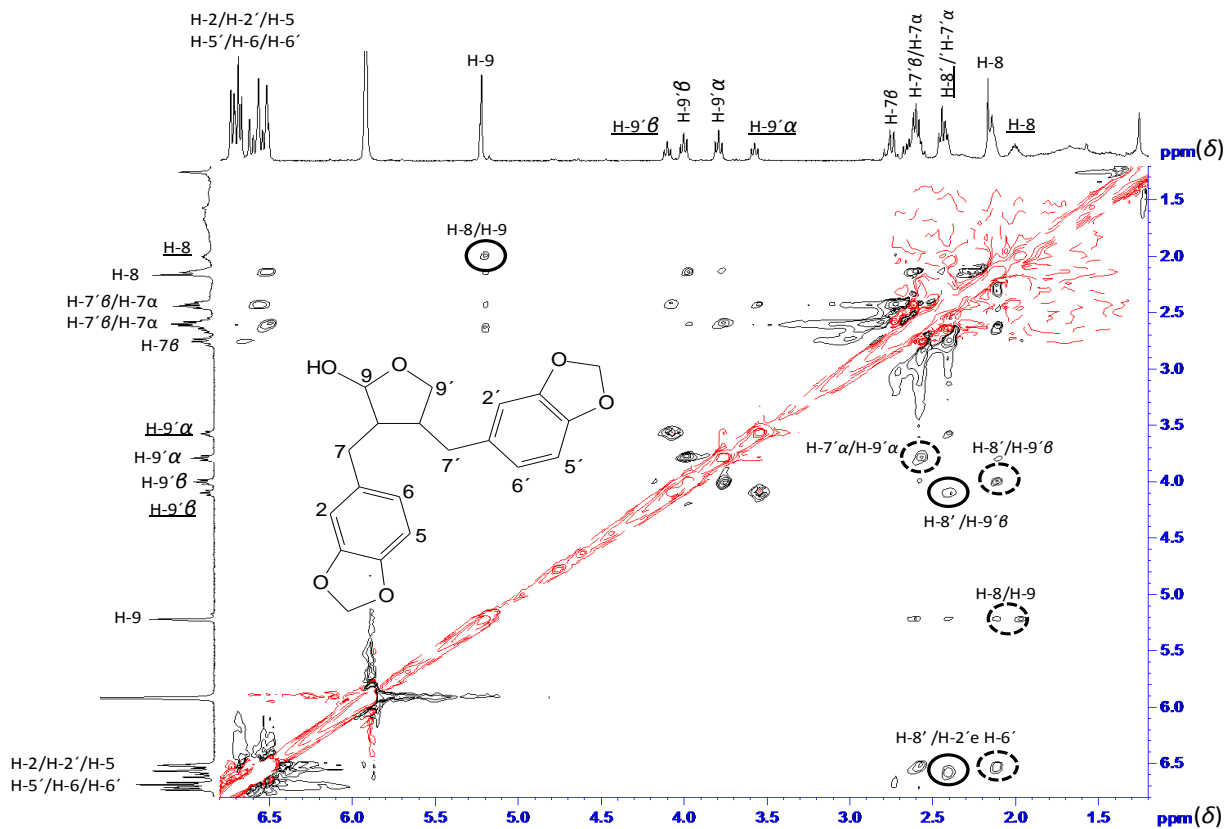
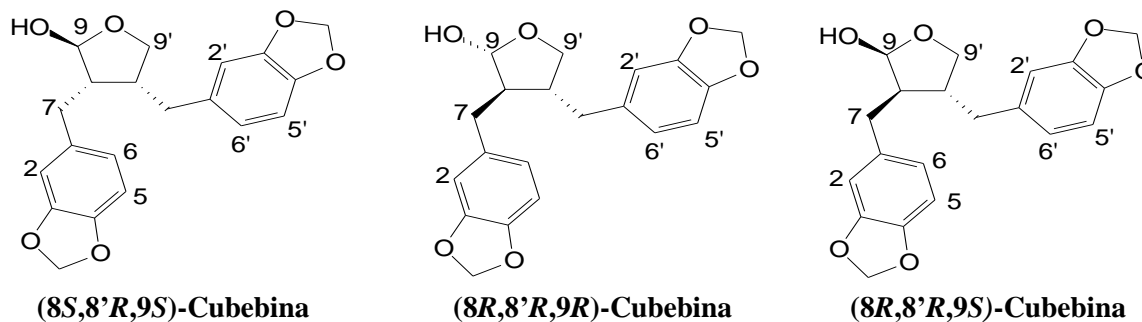


Figura IV.11. Ampliação do mapa de contornos NOESY de AED1 (400 MHz; CDCl_3 , ○ indica correlações de AED1-1 e ⊖ indica correlações de AED1-2).

A Tabela IV.1 mostra os dados registrados na literatura para os estereoisômeros (8*S*,8'*R*,9*S*)-cubebina, (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina e (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina,⁶⁰ bem como as atribuições dos sinais de RMN de ¹³C de AED1-1 e AED1-2. A comparação dos dados apresentados na Tabela IV.1 sugere que AED1-1 corresponde a (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina e AED1-2 corresponde a (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina.

Tabela IV.1. Dados de RMN de ¹³C registrados na literatura⁶⁰ para os isômeros (8*S*,8'*R*,9*S*)-cubebina, (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina e (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina e os dados de RMN de ¹³C atribuídos a AED1-1 e AED1-2



Carbono	(8 <i>S</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)	(8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i>)	(8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)	AED1-1	AED1-2
C-1	133,5	133,3	133,8	133,8	133,3
C-2	109,2	108,9	108,9	108,9	109,1
C-3	147,6	147,6	147,7	147,7	147,6
C-4	145,8	145,7	145,7	145,9	145,8
C-5	108,1	108,0	108,2	108,2	108,2
C-6	121,8	121,4	121,3	121,4	121,4
C-7	38,4	38,4	33,6	33,6	38,5
C-8	52,3	53,0	51,9	52,1	53,1
C-9	104,3	103,3	98,8	98,9	103,4
C-1'	134,4	134,1	134,5	134,5	134,1
C-2'	108,9	109,1	109,3	109,3	109,1
C-3'	147,6	147,5	147,5	147,7	147,6
C-4'	145,8	145,9	145,9	145,9	145,8
C-5'	108,0	108,0	108,1	108,1	108,1
C-6'	121,4	121,7	121,6	121,6	121,8
C-7'	39,0	39,2	38,8	38,9	39,2
C-8'	45,7	45,8	42,9	42,9	45,9
C-9'	72,1	72,1	72,5	72,6	72,2
O-CH ₂ -O	100,8	100,8	100,8	100,8	100,8

Entretanto, a literatura fornece dados de RMN de ¹³C (Tab. IV.1, pag. 68) apenas de três estereoisômeros dentre as possíveis estruturas da cubebina mostradas na Figura IV.12. Como esses

estereoisômeros são quatro pares de enantiômeros, foram estudados apenas um de cada par de enantiômeros da cubebina, ou seja, os diastereoisômeros ($8R,8'S,9S$), ($8R,8'S,9R$), ($8R,8'R,9R$) e ($8R,8'R,9S$) da cubebina. A estereoquímica de AED1-1 e AED1-2 foi investigada pelas correlações dos deslocamentos químicos de carbono calculados por métodos teóricos com os dados experimentais de RMN de ^{13}C . Os cálculos foram realizados em níveis HF, DFT (BLYP, B3LYP, e PBE), com conjunto de base e funções difusas 6-31G* através do software Gaussian03.⁶¹

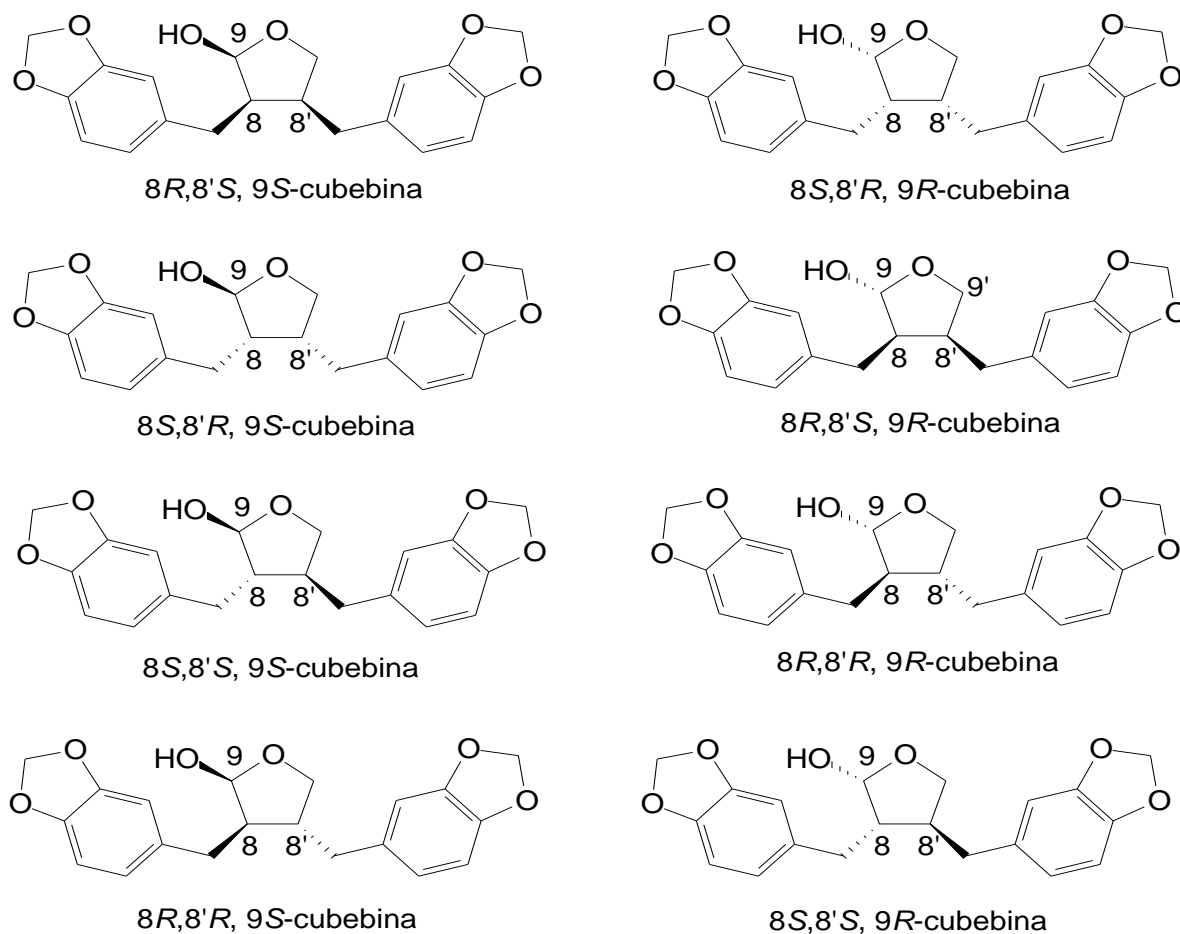


Figura IV.12. Estereoisômeros da cubebina.

Inicialmente, os dados de RMN de ^{13}C de ($8R,8'R,9R$)-cubebina e ($8R,8'R,9S$)-cubebina descritos na literatura⁶⁰ (Tabela IV.1, p.68) foram utilizados para estabelecer o nível de cálculo mais apropriado para as correlações entre valores calculados e experimentais de deslocamento químico. As geometrias

otimizadas foram usadas para o cálculo de deslocamento químico de carbono no mesmo nível de teoria. Os valores de deslocamento químico calculado ($^{Calc}\delta_C$) foram determinados em relação aos valores correspondentes calculados para tetrametilsilano, conforme mostrados na Tabela IV.2. A diferença entre o valor de deslocamento químico de carbono obtido pelo cálculo teórico para as diferentes estruturas consideradas e o valor de deslocamento químico de carbono obtido pelo cálculo teórico para o tetrametilsilano (TMS) indica o valor de deslocamento químico de carbono calculado para estas estruturas ($^{Calc}\delta_C$).

Tabela IV.2. Valores de deslocamento químico de ^{13}C calculados para tetrametilsilano a partir de cálculos HF, BLYP, B3LYP, e PBE com conjunto de base 6-31G* para estruturas no estado gasoso e sem considerar interações intermoleculares

Estrutura	Método			
	HF/6-31G*	BLYP/6-31G*	B3LYP/6-31G*	PBE/6-31G*
TMS	201,73	187,97	191,58	188,53

Cálculos de deslocamento químico de ^{13}C foram obtidos a partir das geometrias otimizadas de (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina e (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina usando os mesmos níveis de teoria para estruturas na fase gasosa sem considerar interações intermoleculares. Correlações entre valores calculados de deslocamento químico de carbono ($^{Calc}\delta_C$) e valores experimentais descritos na literatura⁶⁰ (δ_C^{Lit}) são mostrados na Tabela IV.3 (p. 70). Os cálculos teóricos mostram altos coeficientes de correlação em todos os níveis de cálculo. Menores coeficientes de correlação foram obtidos em nível HF/6-31G* ($R^2 = 0,984$) e maiores coeficientes de correlação foram obtidos em nível B3LYP/6-31G* ($R^2 = 0,997$). Sendo assim, o nível de cálculo B3LYP/6-31G* foi empregado para análise da geometria de AED1-1 e AED1-2.

Tabela IV.3. Coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado e experimental ($\delta_C^{\text{Calc}}/\delta_C^{\text{Lit}}$) obtidas para (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina e (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina em diferentes níveis de cálculo para estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares

Estrutura	Método			
	HF/6-31G*	BLYP/6-31G*	B3LYP/6-31G*	PBE/6-31G*
(8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-cubebina	0,98437	0,98521	0,99667	0,98665
(8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-cubebina	0,98449	0,98676	0,99739	0,99119

Os valores de deslocamento químico dos quatro diferentes estereoisômeros da cubebina estudados, calculados em nível B3LYP/6-31G*, foram correlacionados com os dados de RMN de ^{13}C dos fitoconstituintes AED1-1 e AED1-2, conforme mostrado na Tabela IV.4 (p. 71). Melhores correlações foram obtidas quando AED1-1 e AED1-2 correspondem, respectivamente, aos estereoisômeros (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina e (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina, corroborando as estruturas propostas por comparação com os dados de deslocamentos químicos registrados na literatura.⁶⁰

O efeito do solvente nas correlações ($\delta_C^{\text{Calc}}/\delta_C$) de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina foi investigado pelo uso de um modelo de solvente explícito e utilizando cálculos B3LYP/6-31G*. Para esse objetivo, uma molécula dos solventes acetona, dimetilsulfóxido ou piridina foi posicionada em diferentes sítios de interação com a molécula de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina. Seis sistemas 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina - solvente foram propostos e são apresentados na Figura IV.13.

Tabela IV.4. Coeficientes de correlação dos dados de RMN de ^{13}C de estereoisômeros da cubebina com os valores calculados (B3LYP/6-31G*) atribuídos a AED1-1 e AED1-2 isômeros da cubebina em nível de cálculo para estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares

Estereoisômero	Coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado	
	Com dados de RMN de ^{13}C de AED1-1	Com dados de RMN de ^{13}C de AED1-2
8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>R</i> -cubebina	0,99526	0,99897
8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> ,9 <i>S</i> -cubebina	0,99911	0,99455
8 <i>R</i> ,8' <i>S</i> ,9 <i>R</i> -cubebina	0,99791	0,99805
8 <i>R</i> ,8' <i>S</i> ,9 <i>S</i> -cubebina	0,99666	0,99853

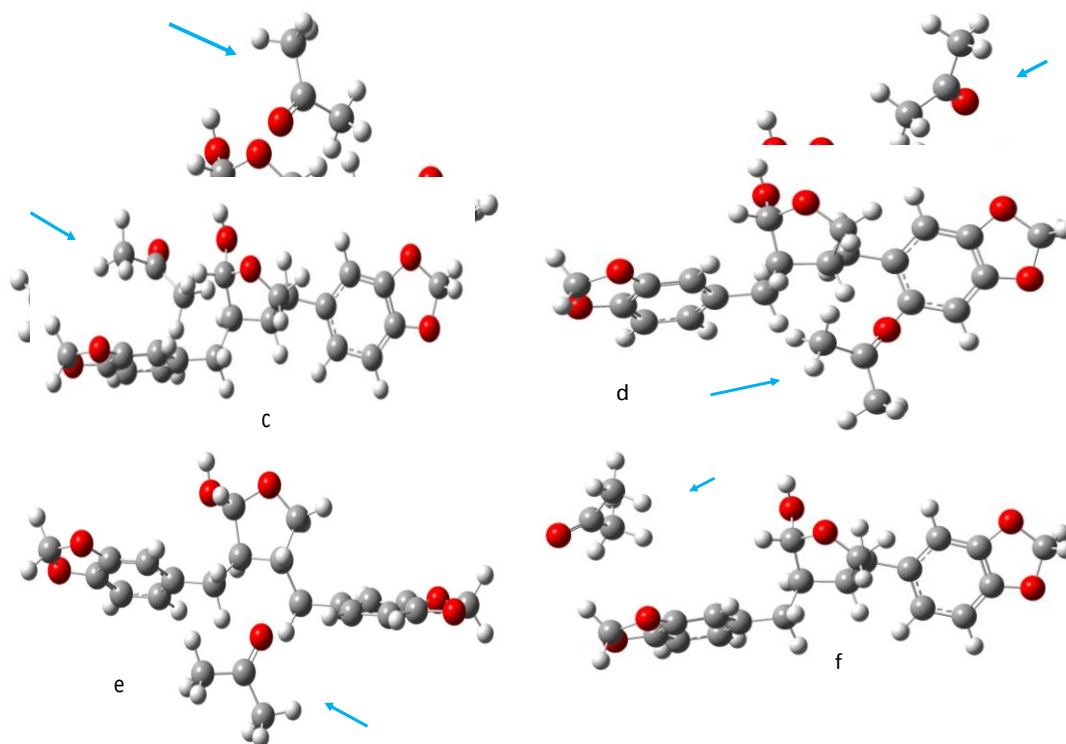


Figura IV.13. Diferentes sítios de interação propostos entre a molécula de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina e uma molécula de solvente.

Assim como a molécula de acetona, uma molécula de piridina ou uma molécula de dimetilsulfóxido foi adicionada nas mesmas posições que aquelas mostradas na Figura IV.13. Cálculos de deslocamento químico de carbono foram realizados utilizando geometrias otimizadas

de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina – solvente-a a 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina – solvente-f em nível B3LYP/6-31G*. Os valores de deslocamento químico calculados foram correlacionados com dados de deslocamento químico experimental de ¹³C obtidos nos solventes acetona, dimetilsulfóxido e piridina e apresentados na Tabela IV.5. Todos os sistemas 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina – solvente mostraram elevados coeficientes de correlação, que são mostrados na Tabela IV.6 (p. 73).

Tabela IV.5. Dados de deslocamento químico experimental de ¹³C de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina obtidos nos solventes acetona-*d*₆, dimetilsulfóxido-*d*₆ e piridina- *d*₆

Átomo/ $\delta_C^{\text{experim}}$	δ_C (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ_C (Acetona- <i>d</i> ₆)	δ_C (Piridina- <i>d</i> ₆)
1	134,3	135,6	135,9
2	108,9	109,9	109,6
3	147,2	148,7	148,3
4	145,1	146,6	146,2
5	108,1	108,9	108,5
6	121,4	122,4	121,9
7	33,4	34,6	34,5
8	51,4	53,3	52,8
9	97,7	99,3	98,0
1'	135,0	136,3	135,9
2'	109,1	110,2	110,1
3'	147,1	148,6	148,2
4'	145,4	146,9	146,4
5'	108,0	108,8	108,6
6'	121,5	122,7	122,3
7'	38,2	39,7	39,3
8'	42,8	44,2	43,8
9'	70,8	72,5	72,3
OCH ₂ O	100,6	101,7	101,3
OCH ₂ O'	100,6	101,8	101,3

Tabela IV.6. Coeficientes de correlação das curvas de deslocamento experimental de ^{13}C dos fitoconstituintes isolados (δ_{C}) e deslocamento químico calculado ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}$) para os sistemas $8R,8'R,9R$ -cubebina – solvente (acetona, dimetilsulfóxido e piridina, Fig. IV.13 p. 72) utilizando o nível de cálculo B3LYP/6-31G*

Solvente/Posição	a	B	C	d	e	f
DMSO	0,99738	0,99725	0,99789	0,99751	0,99673	0,99799
Piridina	0,99722	0,99769	0,99749	0,99721	0,99711	0,99711
Acetona	0,99747	0,99811	0,99828	0,99772	0,99903	0,99706

As melhores correlações indicam sítios de interação preferencial entre a molécula do solvente e a molécula de $8R,8'R,9R$ -cubebina. Tais interações são mostradas na Figura IV.14 para cada solvente.

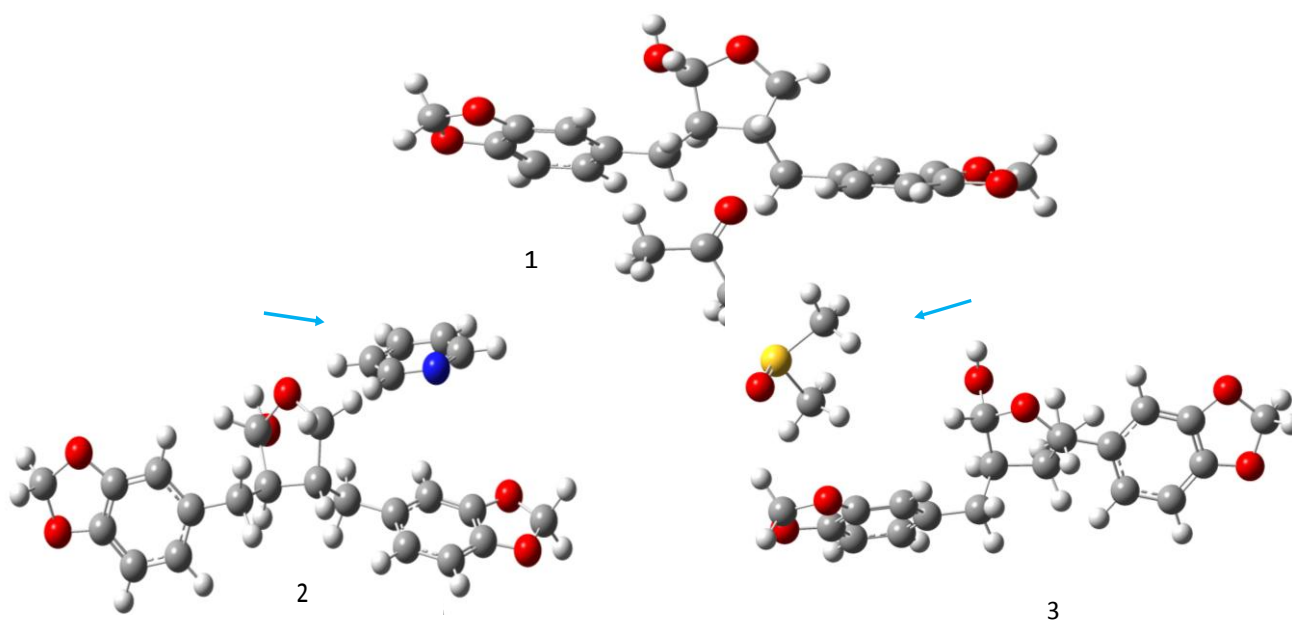


Figura IV.14. Sítios de interação preferencial entre a molécula de $8R,8'R,9R$ -cubebina e os solventes acetona (1), piridina (2) e dimetilsulfóxido (3).

IV.2. Análise Estrutural de CA5-CA6-R4-G3 (AED3)

As Figuras IV.15 e IV.16 (p. 75) apresentam o espectro de RMN de ^1H de AED3 e suas expansões, respectivamente. O simpleto largo observado em δ_{H} 10,84 (correspondente a um núcleo de hidrogênio) pode ser atribuído a hidrogênio de um grupo ácido carboxílico. O sinal observado em δ_{H} 8,15 (simpleto) pode ser atribuído a núcleo de hidrogênio de hidroxila fenólica. Os sinais observados em δ_{H} 9,11 (multipletto), 7,93 (multipletto), 7,69 (simpleto), 7,62 (multipletto) e 7,18 (simpleto) podem ser atribuídos a núcleos de hidrogênio em anel aromático aromático. O sinal observado em δ_{H} 4,07 (simpleto) pode ser atribuído a três núcleos de hidrogênio de grupo metoxila.

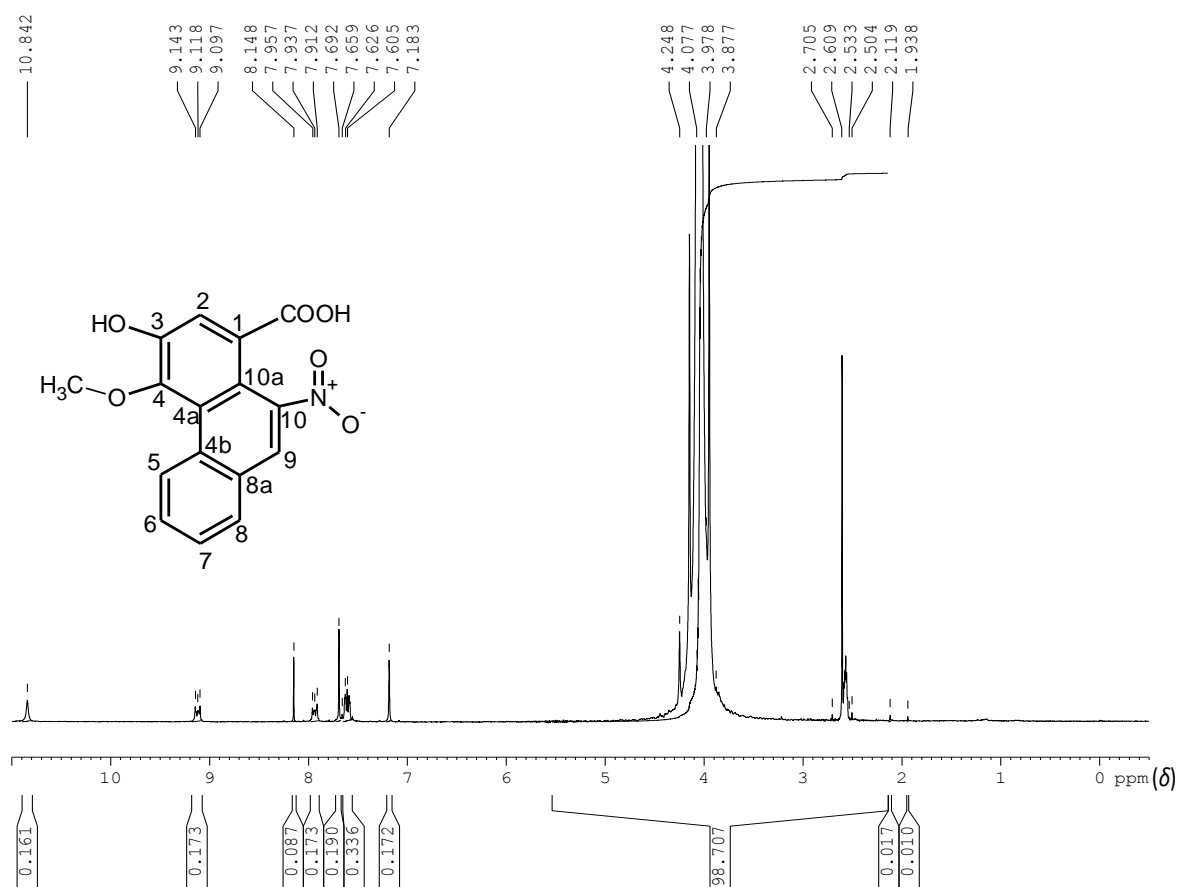


Figura IV.15. Espectro de RMN de ^1H de AED3 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

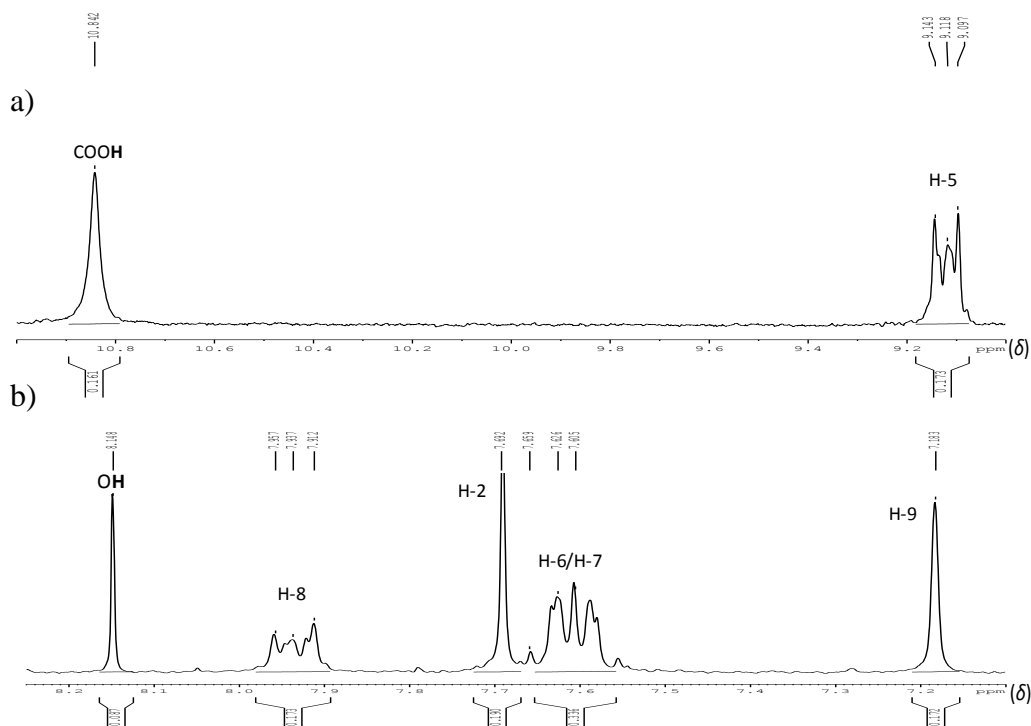


Figura IV.16. Expansões do espectro de RMN de ^1H de AED3 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), na região entre: (a) δ_{H} 11,0 a 9,0 e (b) δ_{H} 8,5 a 7,0.

A Figura IV.17 (p. 76) apresenta o espectro RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de AED3. O sinal em δ_{C} 169,7 corresponde a núcleo de átomo de carbono não hidrogenado do grupo ácido carboxílico. Os sinais em δ_{C} 152,8 e 149,7 correspondem a núcleos de carbono não hidrogenado em anel aromático e ligados a oxigênio. O sinal em δ_{C} 135,4 corresponde a núcleo de átomo de carbono não hidrogenado e ligado a grupo nitro de sistema aromático. Os sinais em δ_{C} 135,6, 121,1, 126,6, 122,9 e 122,2 correspondem a núcleos de átomo de carbono não hidrogenado de sistema aromático. Os sinais em δ_{C} 129,8, 128,3, 127,5, 126,5, 114,2 e 105,4 correspondem a núcleos de átomo de carbono hidrogenado em anel aromático. O sinal em δ_{C} 60,3 corresponde a núcleo de átomo de carbono de grupo metoxila. Os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C estão de acordo com a estrutura de um ácido aristolóchico contendo uma hidroxila e uma metoxila, ambas fenólicas.

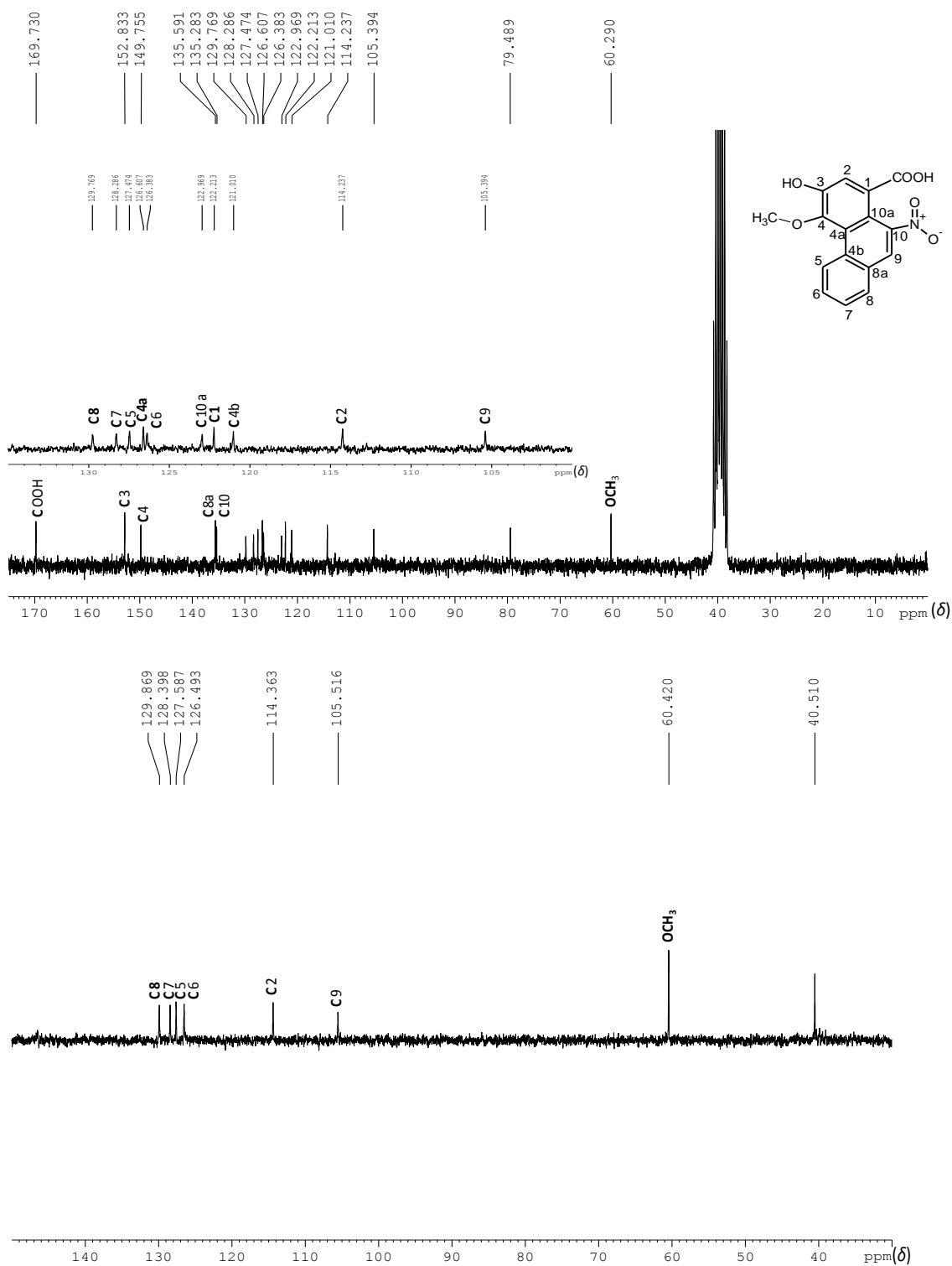


Figura IV.17. Espectro de RMN de ^{13}C (superior) e subspectro DEPT 135° (inferior) de AED3 (100 MHz; DMSO- d_6).

A Figura IV.18 mostra o mapa de contornos HSQC de AED3 e sua expansão correspondente. O sinal em δ_H 9,11 (H-5) correlaciona-se com o sinal em δ_C 127,5 (C-5). O sinal em δ_H 7,93 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_C 129,8 (C-8). O sinal em δ_H 7,69 (H-2) correlaciona-se com o sinal em δ_C 114,2 (C-2). O sinal em δ_H 7,62 (H-6 e H-7) correlaciona-se com os sinais em δ_C 126,5 (C-6) e 128,4 (C-7). O sinal em δ_H 7,18 (H-9) correlaciona-se com o sinal em δ_C 105,4 (C-9). O sinal em δ_H 4,07 (OCH₃) correlaciona-se com o sinal em δ_C 60,3 (OCH₃).

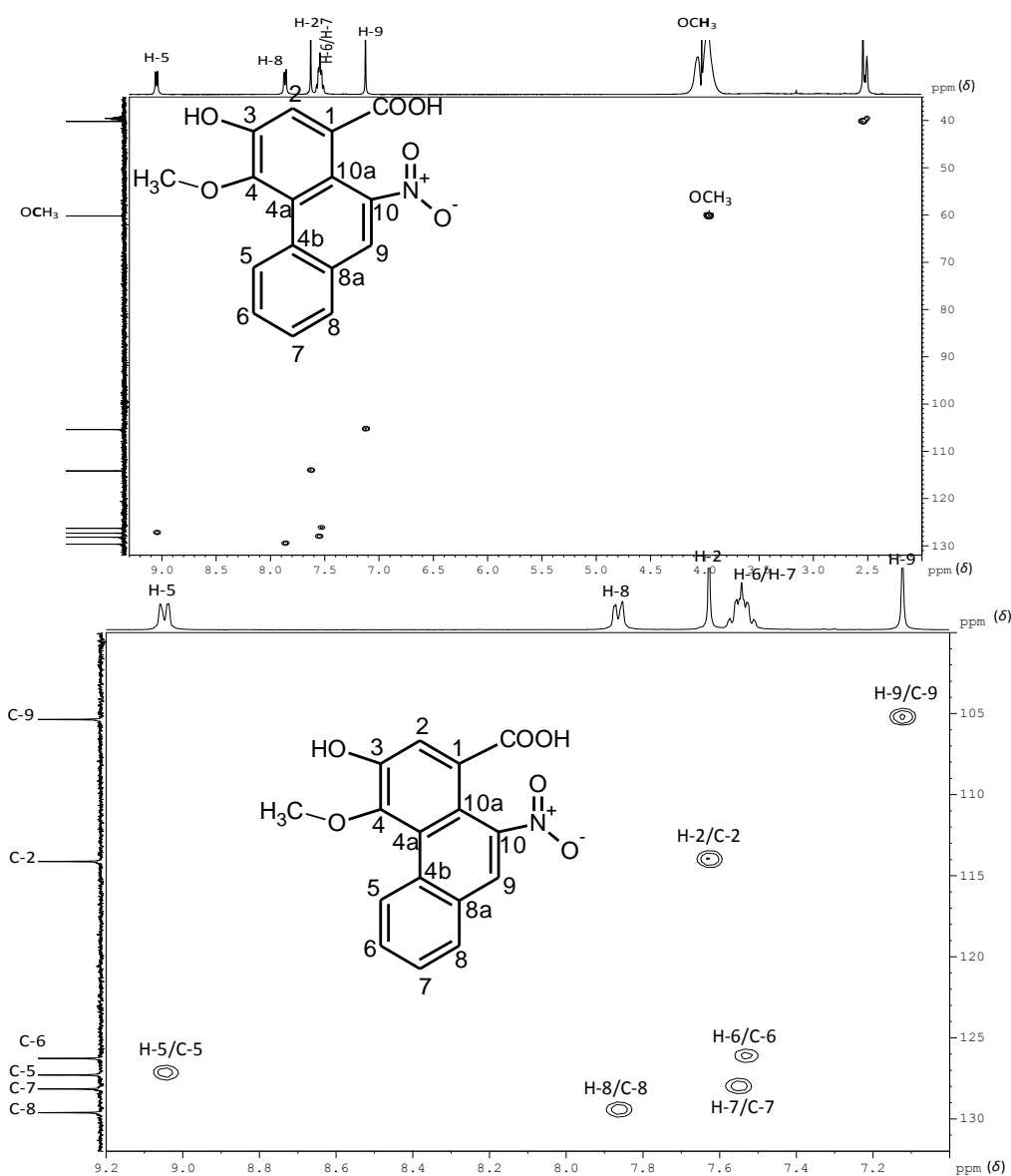


Figura IV.18. Mapa de contornos HSQC de AED3 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*₆) e expansão de δ_H 7,0 a 9,2 e δ_C 100 a 132.

A Figura IV.19 apresenta o mapa de contornos COSY de AED3. O sinal em δ_H 7,62 (H-6 e H-7) correlaciona-se com os sinais em δ_H 9,11 (H-5) e 7,93 (H-8). Esses resultados indicam que tais sinais correspondem a núcleos de hidrogênio presentes no mesmo anel aromático. As correlações observadas estão de acordo com a estrutura de um ácido aristolóxico contendo quatro núcleos de hidrogênio aromáticos adjacentes.

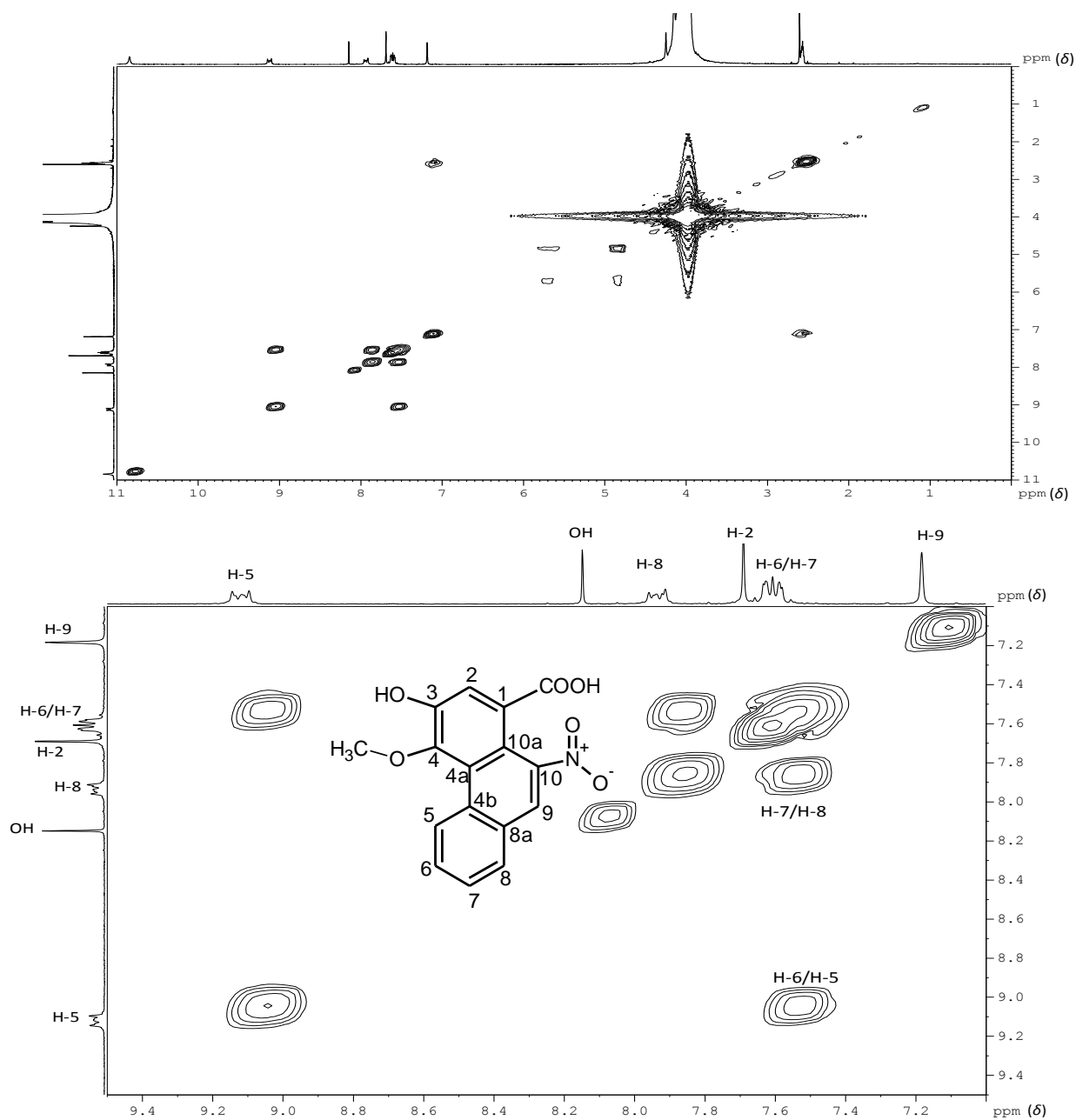


Figura IV.19. Mapa de contornos COSY de AED3 e expansão correspondente (400 MHz; DMSO- d_6).

As Figuras IV.20 e IV.21 (p. 80) apresentam respectivamente o mapa de contornos HMBC de AED3 e suas expansões correspondentes. O sinal de hidrogênio em δ_H 4,07 (O-CH₃) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 149,7 (C-4), estabelecendo a conexão do grupo metoxila. O sinal de hidrogênio em δ_H 7,18 (H-9) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 122,9 (C-10a), 126,6 (C-4a), 129,8 (C-8) e 135,6 (C-8a). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,69 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 122,9 (C-10a), 149,7 (C-4), 135,4 (C10) e 169,7 (COOH). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,93 (H-8) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 105,4 (C-9) e 126,4 (C-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 9,11 (H-5) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 135,6 (C-8a) e 128,3 (C-7). O sinal de hidrogênio em δ_H 10,84 (COOH) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 122,2 (C-1) e 169,7 (CO₂H), estabelecendo a posição do grupo carboxila no anel aromático.

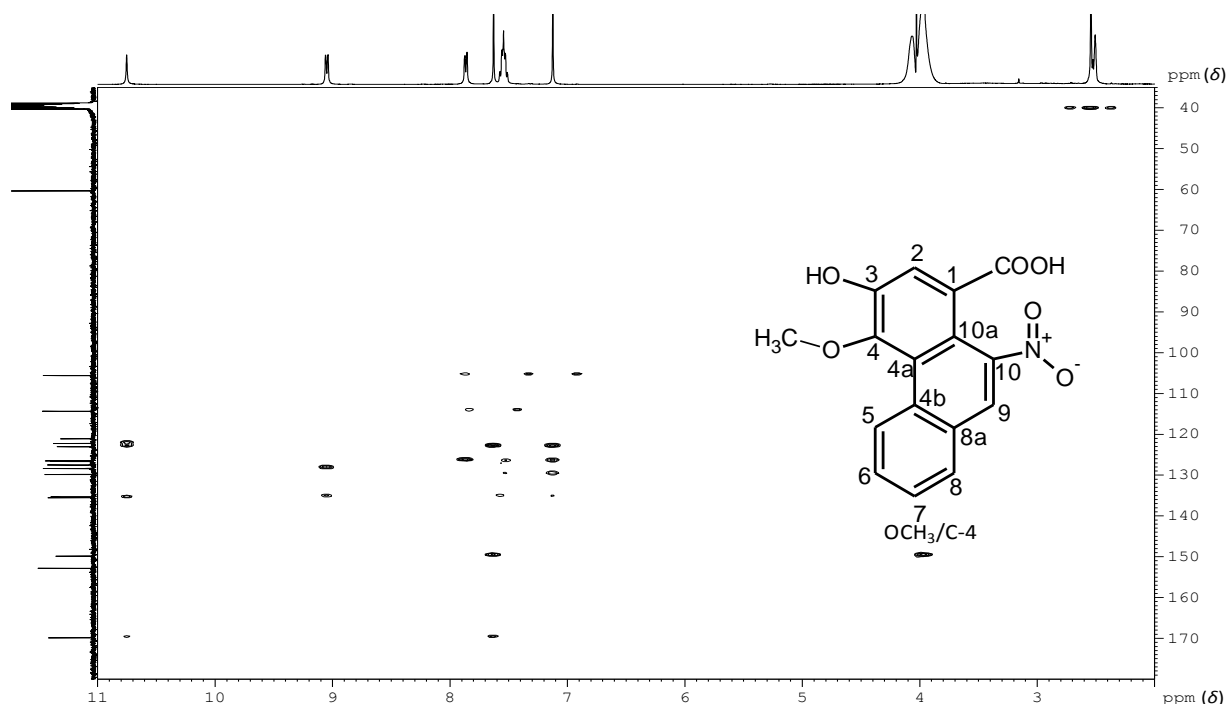


Figura IV.20. Mapa de contornos HMBC de AED3 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz; DMSO-*d*₆).

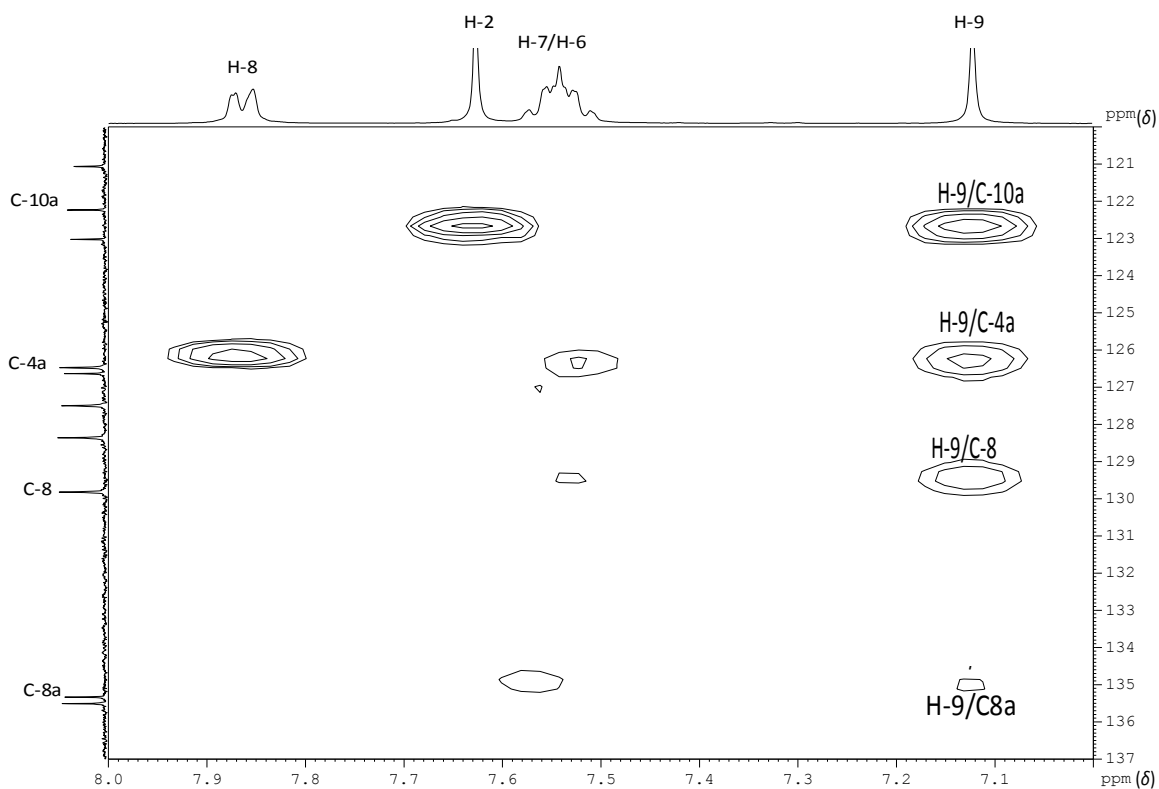
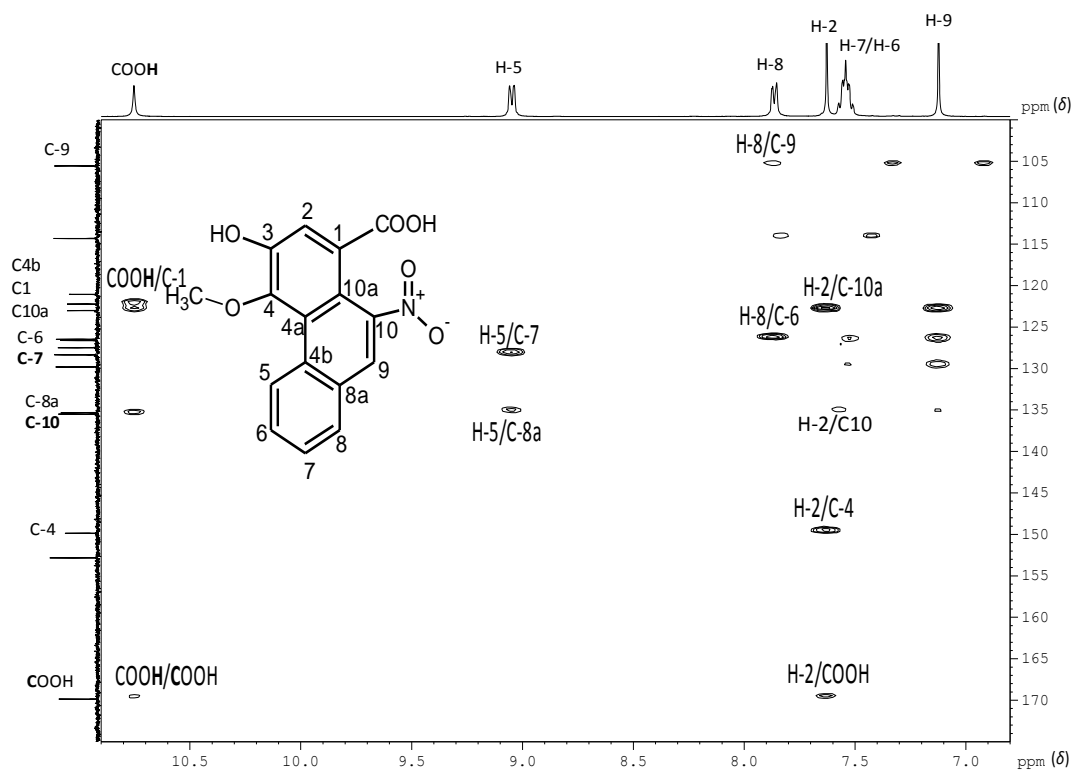


Figura IV.21. Expansões do mapa de contornos HMBC de AED3 na região entre: (a) δ_H 11,0 a 6,8 e δ_C 175,0 a 100,0 e (b) de δ_H 8,0 a 7,0 e δ_C 137,0 a 120,0 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV.22 apresenta o mapa de contornos NOESY de AED3. O sinal em δ_H 7,93 (H-8) correlaciona-se com os sinais em δ_H 7,18 (H-9) e 7,62 (H-7). O sinal em δ_H 9,11 (H-5) correlaciona-se com o sinal em δ_H 7,62 (H-6).

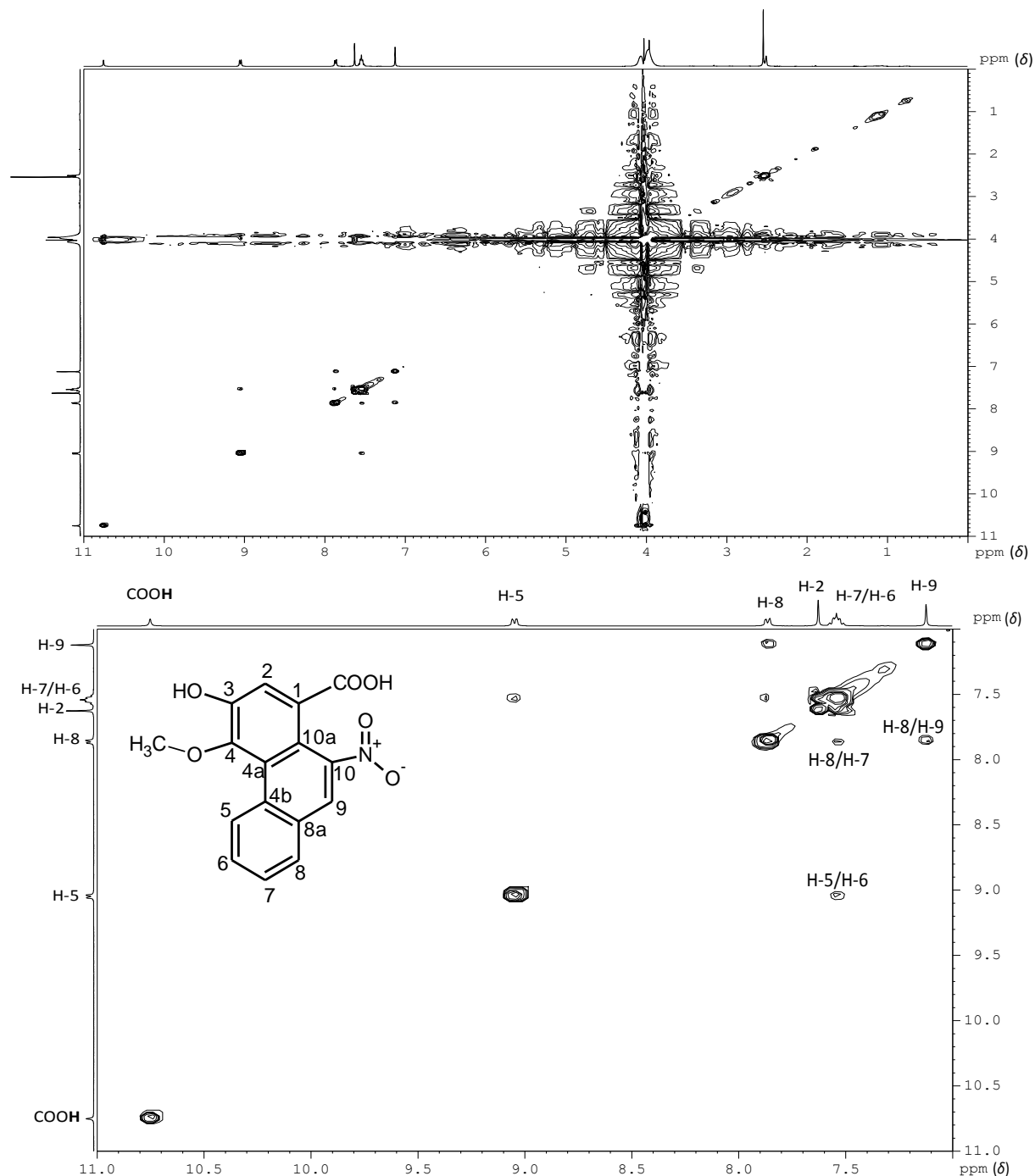
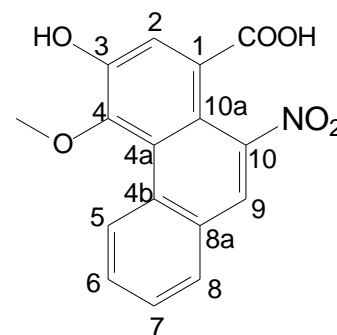


Figura IV.22. Mapa de contornos NOESY de AED3 e expansão correspondente (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).

Os dados de RMN obtidos para AED3 sugerem a estrutura do ácido 3-hidroxi-4-metoxi-10-nitrofenantreno-1-carboxílico. Foram realizados cálculos teóricos para confirmação das atribuições efetuadas na elucidação estrutural de AED3. Os cálculos foram realizados em nível PBE/6-311G* para a estrutura na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares. Os valores calculados de deslocamento químico de carbono ($^{calc}\delta_C$) foram correlacionados com os dados de RMN de ^{13}C de AED3 (δ_C). O valor do coeficiente de correlação foi $R^2 = 0,9083$. Este valor do coeficiente de correlação foi o mais alto considerando tais valores para diferentes isômeros de posição do grupo metoxila. Os resultados obtidos indicam a atribuição estrutural proposta para AED3 como sendo um ácido aristolóchico inédito (ácido 3-hidroxi-4-metoxi-10-nitrofenantreno-1-carboxílico) isolado das cascas do cerne de *Aristolochia esperanzae*, cuja atribuição dos sinais de RMN de 1H e de ^{13}C de AED3 estão descritas na Tabela IV.7.

Tabela IV.7. Atribuição dos sinais de RMN experimentais e calculados ($^{calc}\delta_C$) de 1H e de ^{13}C de AED3

Átomo	δ_C	δ_H	$^{calc}\delta_C$
1	122,2	-	125,6
2	114,2	7,69 (1H, <i>s</i>)	120,6
3	152,8	-	153,3
4	149,7	-	152,5
4a	126,6	-	130,0
4b	121,1	-	133,6
5	127,5	9,11(1H, <i>m</i>)	130,8
6	126,5	7,62 (1H, <i>m</i>)	131,4
7	128,4	7,62 (1H, <i>m</i>)	129,5
8	129,8	7,93 (1H, <i>m</i>)	132,5
8a	135,6	-	131,8
9	105,4	7,18 (1H, <i>s</i>)	127,4
10	135,4	-	152,5
10a	122,9	-	120,5
CO ₂ H	169,7	10,84 (1H, <i>s</i>)	166,4
O-CH ₃	60,3	4,07 (1H, <i>s</i>)	59,8
O-H	-	8,15 (1H, <i>s</i>)	



IV.3. Análise estrutural de AEY

O sólido amarelo denominado AEY apresentou decomposição a 210 °C quando submetido à análise de ponto de fusão. O espectro no IV de AEY (Fig. IV.23) mostra uma banda em 3650 cm^{-1} atribuída a estiramento O-H de hidroxila livre, uma banda entre 2900 a 2850 cm^{-1} atribuída a estiramentos C-H alifático, uma banda intensa em 1450 cm^{-1} atribuída a deformação angular assimétrica de alcanos. As bandas entre 1390 e 1350 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformação angular simétrica de alcanos e a banda em 1310 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação angular de ligação O-H de fenóis. A banda intensa em 1250 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações de esqueleto *terc*-butila. A banda em 1150 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento de ligação C-O de fenóis e as bandas entre 880 e 780 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformação angular característica de anel benzeno tetrassubstituído.

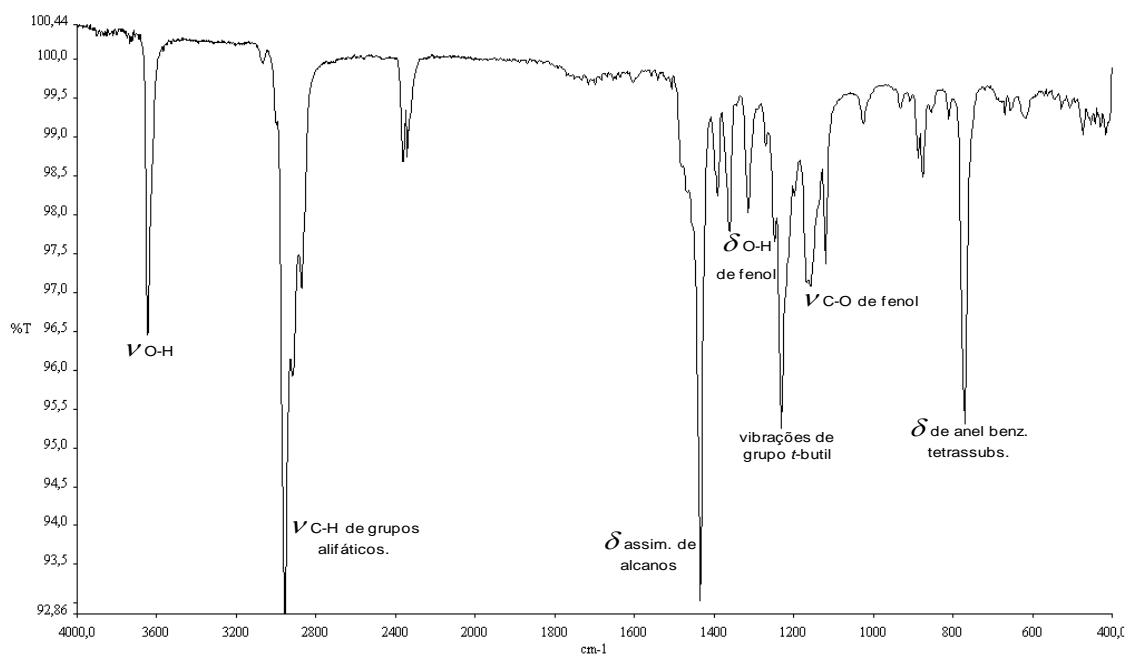


Figura IV.23. Espectro de absorção na região do Infravermelho de AEY (KBr; cm^{-1}).

A Figura IV.24 mostra o espectro de RMN de ^1H de AEY. Nesse espectro é registrado sinal relativo a núcleos de hidrogênio aromático em δ_{H} 6,96, bem como sinal em δ_{H} 4,99 relativo a núcleos de hidrogênio ligado a oxigênio, como sugerido pelo espectro de IV. O sinal em δ_{H} 2,77 pode ser atribuído a núcleos de hidrogênio metilênico e o sinal em δ_{H} 1,41 pode ser atribuído a núcleos de hidrogênio metílico.

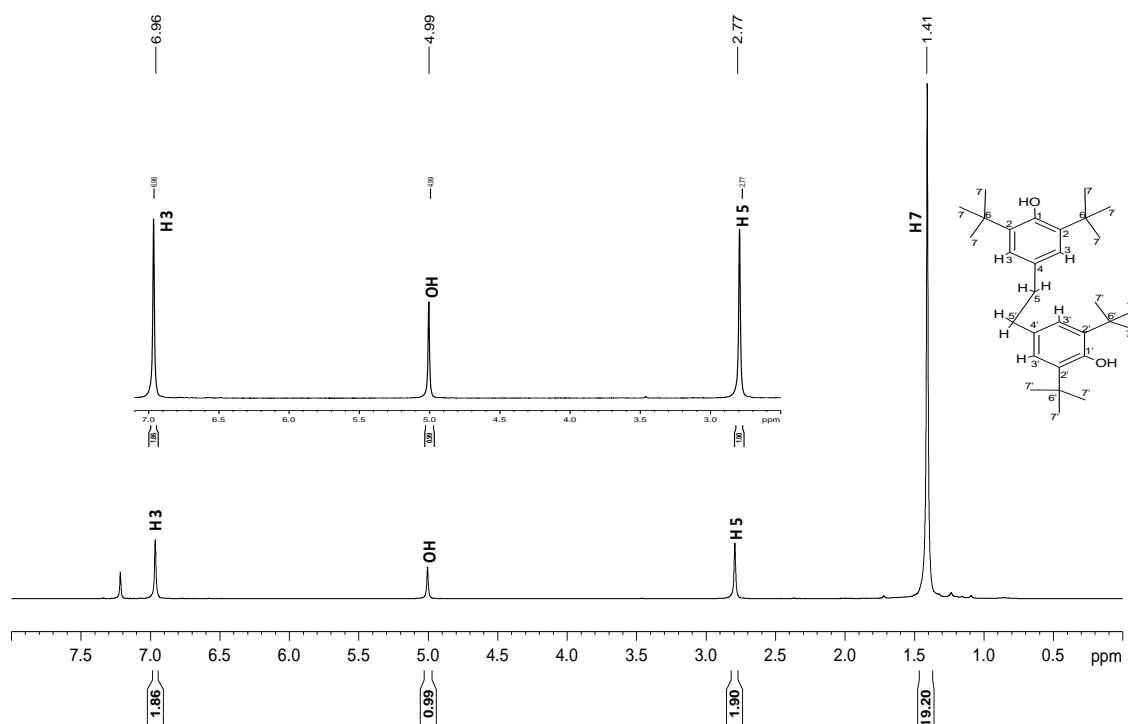


Figura IV.24. Espectro de RMN de ^1H e expansões correspondentes de AEY (200 MHz, CDCl_3).

As Figuras IV.25 (p.85) e IV.26 (p. 85) mostram respectivamente o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de AEY. O sinal em δ_{C} 151,7 pode ser atribuído a núcleo de átomo de carbono oxigenado de sistema aromático. Os sinais em δ_{C} 135,6 e 132,6 podem ser atribuídos a núcleos de átomo de carbono substituído de sistema aromático. O sinal em δ_{C} 124,8 pode ser atribuído a núcleo de átomo de carbono hidrogenado de sistema aromático. O sinal em δ_{C} 37,9 pode ser atribuído a núcleo de átomo de carbono alifático metilênico. O sinal em δ_{C} 34,2 pode ser

atribuído a núcleo de átomo de carbono alifático quaternário. O sinal intenso em δ_C 30,3 pode ser atribuído a núcleo de átomo de carbono alifático metílico.

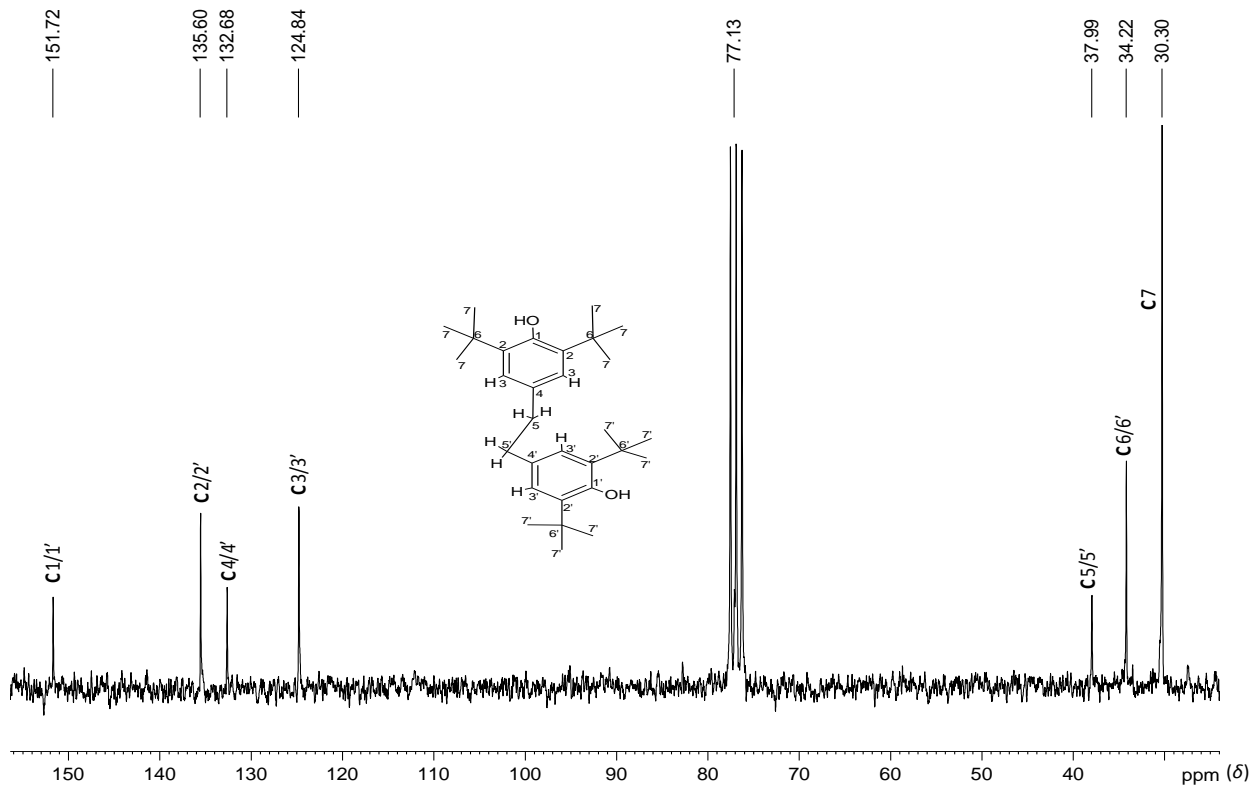


Figura IV.25. Espectro de RMN de ^{13}C de AEY (50 MHz; CDCl_3).

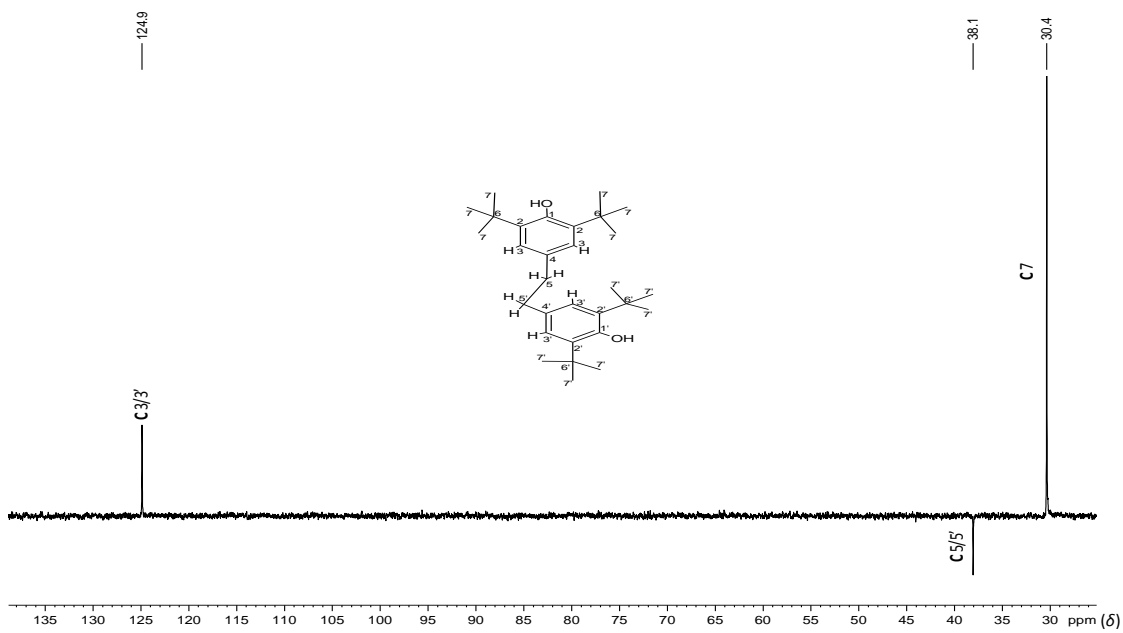


Figura IV.26. Espectro de RMN de DEPT-135° de AEY (50 MHz; CDCl_3).

A Figura IV.27 mostra o mapa de contornos HSQC de AEY. O sinal em δ_H 6,96 (H-3 e H-3') correlaciona-se com o sinal em δ_C 124,8 (C-3 e C-3'). O sinal em δ_H 2,77 (H-5 e H-5') correlaciona-se com o sinal em δ_C 37,9 (C-5 e C-5') e o sinal em δ_H 1,41 (H-7 e H-7') correlaciona-se com o sinal em δ_C 30,3 (C-7 e C-7').

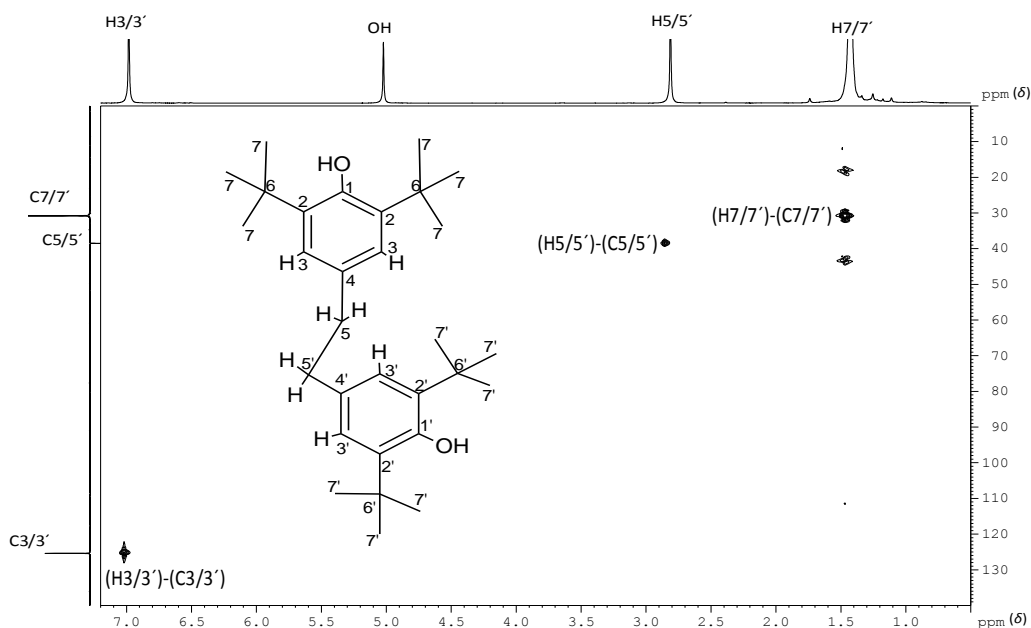


Figura IV.27. Mapa de contornos HSQC de AEY (^1H : 200 MHz; ^{13}C : 50 MHz; CDCl_3).

A Figura IV.28 (p. 87) mostra o mapa de contornos ^1H - ^{13}C HMBC de AEY. O sinal de hidrogênio em δ_H 2,77 (H-5/5') correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 124,8 (C-3/3'). O sinal de hidrogênio em δ_H 4,99 (O-H) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 135,6 (C-2/2'). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,96 (H-3/3') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 34,2 (C-6/6'), 37,9 (C-5/5') e 151,7 (C-1/1').

A Figura IV.29 (p. 87) mostra o mapa de contornos ^1H - ^1H NOESY de AEY. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,41 (H-7) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_H 4,99 (O-H) e 6,96 (H-3). O sinal de hidrogênio em δ_H 2,77 (H-5) correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em δ_H 6,96 (H-3).

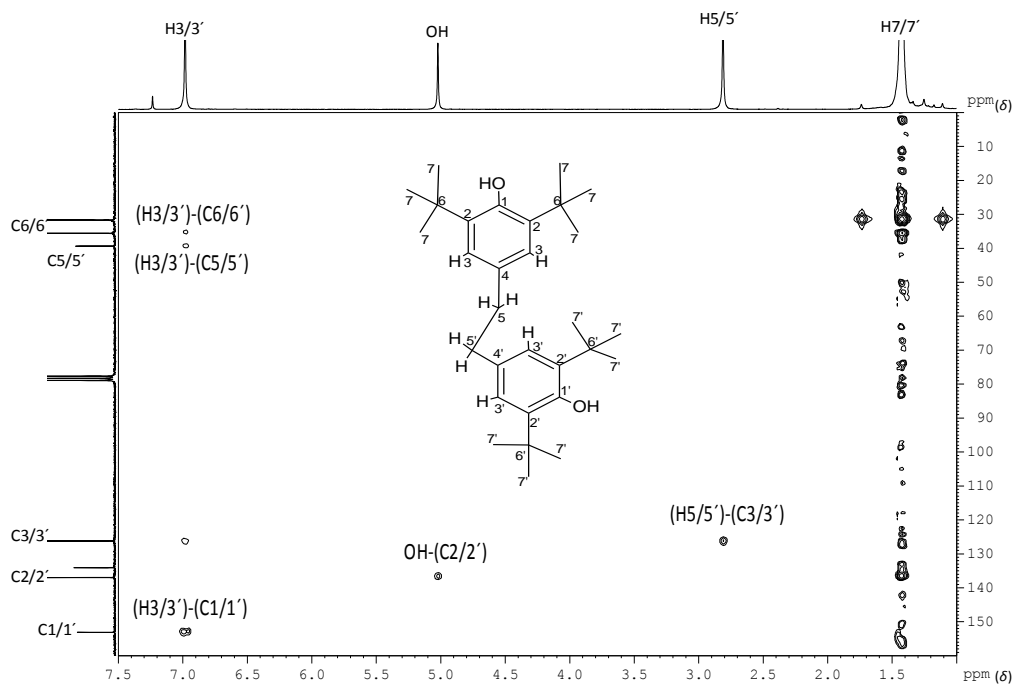


Figura IV.28. Mapa de contornos HMBC de AEY (^1H : 200 MHz; ^{13}C : 50 MHz; CDCl_3).

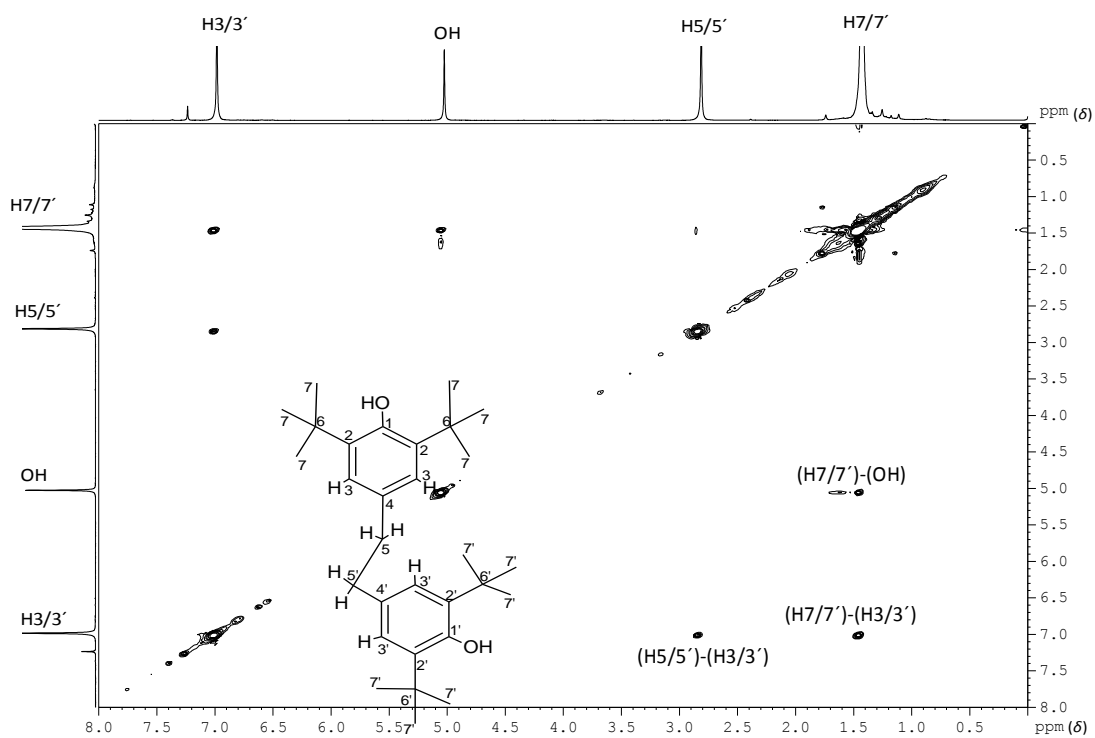


Figura IV.29. Mapa de contornos NOESY de AEY (200 MHz; CDCl_3).

A Tabela IV.8 mostra os dados de δ_C e δ_H (ppm) obtidos para AEY, bem como a estrutura proposta com base nos dados de RMN.

Tabela IV.8. Atribuição dos sinais de RMN de 1H e de ^{13}C de AEY

Átomo	Carbono (δ_C)	Hidrogênio (δ_H)	
1/1'	151,7	-	
2/2'	135,6	-	
3/3'	124,8	6,96 (1H, s)	
4/4'	132,6	-	
5/5'	37,9	2,77 (1H, s)	
6/6'	34,2	-	
7/7'	30,3	1,41 (1H, s)	
O-H	-	4,99 (1H, s)	

O sólido AEY foi submetido à análise elementar, obtendo-se os dados mostrados na Tabela IV.9. A porcentagem relativa dos elementos corresponde a uma fórmula mínima próxima a $C_{15}H_{23}O$, condizente com a estrutura proposta. A literatura não apresenta registros de isolamento deste composto, denominado de 2,2',6,6'-tetra-*tert*-butil-4,4'-etilenodifenol, em espécies do reino vegetal, entretanto aponta o uso do monômero (conhecido como BHT) como um antioxidante desde 1950 para preservar e estabilizar o valor nutritivo, sabor e cor de produtos alimentares. Cerca de 40 países permitem o uso do monômero BHT como um aditivo alimentar sendo que a presença desta substância no solo e em ambiente aquático tem sido demonstrada em vários estudos.⁶²⁻⁶⁴ Estas evidências apontam para a possibilidade de que o dímero AEY não seja um metabólito secundário de *A. esperanzae*, podendo ser originário do ambiente no qual a espécie se encontra.

Tabela IV.9. Resultado de análise elementar de AEY

	%C	%H	%O
Resultados calculados	82,11	10,48	7,29
Resultados experimentais	82,44	10,32	7,24
Diferença percentual entre resultados calculados e experimental	0,33	0,16	0,05

IV.4. Análise estrutural de AED2/AED4

O sólido de coloração vermelha, identificado como AED2/AED4 foi submetido á análise de ponto de fusão e apresentou decomposição na faixa de temperatura de 110-120°C. O sólido foi submetido à análise espectroscópica de RMN para determinação estrutural. A Figura IV.30 mostra o espectro de RMN de ^1H e expansões de AED2/AED4. Nesse espectro é registrado um sinal em δ_{H} 9,18 (simpleto largo) relativo a núcleo de átomo de hidrogênio de hidroxila fenólica e sinais em δ_{H} 8,02 (simpleto); δ_{H} 7,65 (duplete); δ_{H} 7,32 (duplete) e δ_{H} 6,75 (duplo duplete) relativos a núcleos de átomos de hidrogênio de sistema aromático.

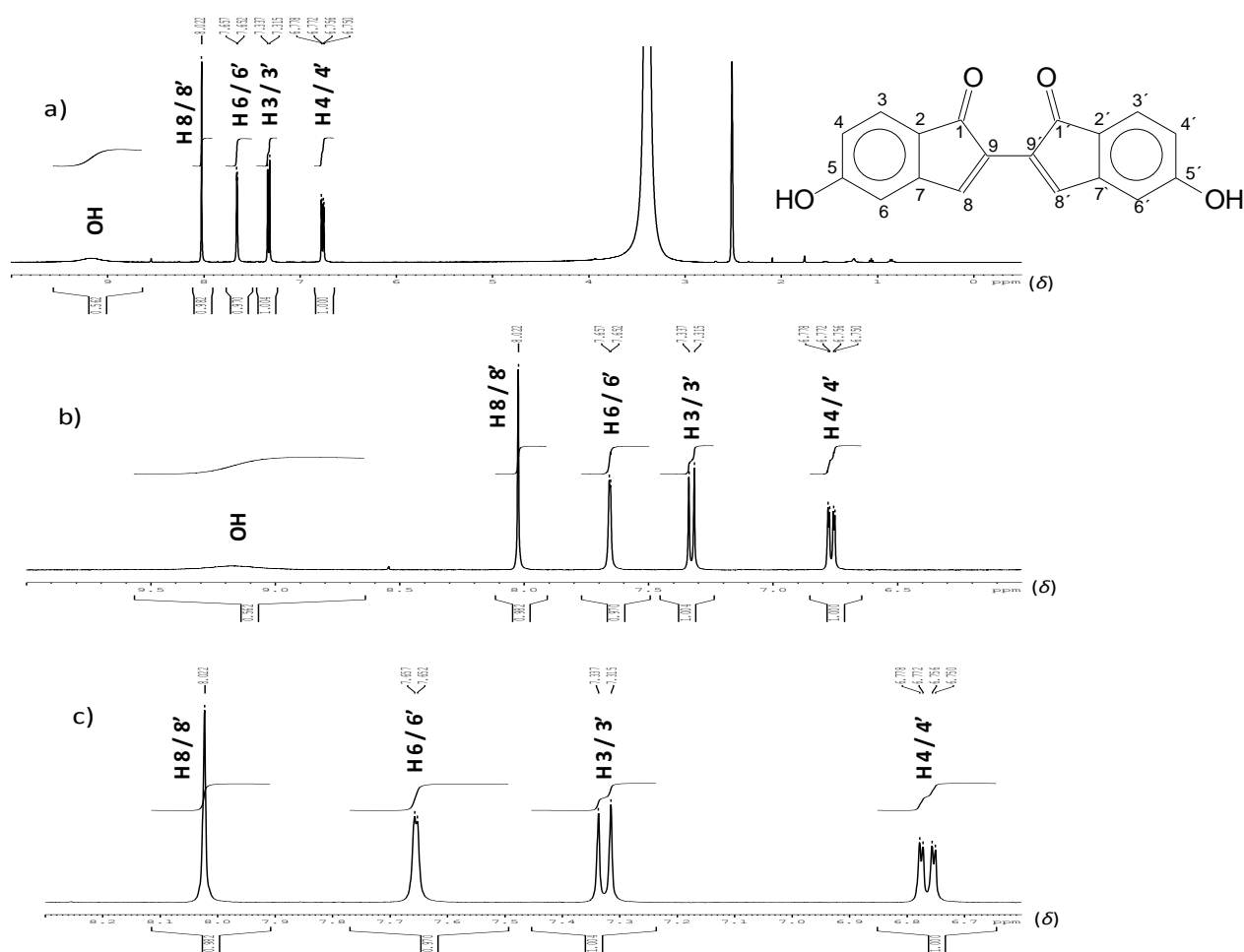


Figura IV.30. Espectro de RMN de ^1H (a) e expansões correspondentes (b,c) de AED2/AED4 (400 MHz, DMSO- d_6).

As Figuras IV.31 e IV.32 (p. 91) mostram respectivamente o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de AED2/AED4. O sinal em δ_{C} 188,9 pode ser atribuído a núcleos de átomo de carbono de uma enona em anel de cinco membros conjugada com anel aromático. O sinal em δ_{C} 153,2 corresponde a núcleo de átomo de carbono não hidrogenado aromático e ligado a oxigênio. Os sinais em δ_{C} 130,8, 126,8 e 112,2 podem ser atribuídos a núcleos de átomos de carbono substituído em sistema aromático. Os sinais em δ_{C} 136,9, 113,2, 113,0 e 105,9 podem ser atribuídos a núcleos de átomos de carbono hidrogenado em sistema aromático, de acordo com a análise do subespectro DEPT- 135° .

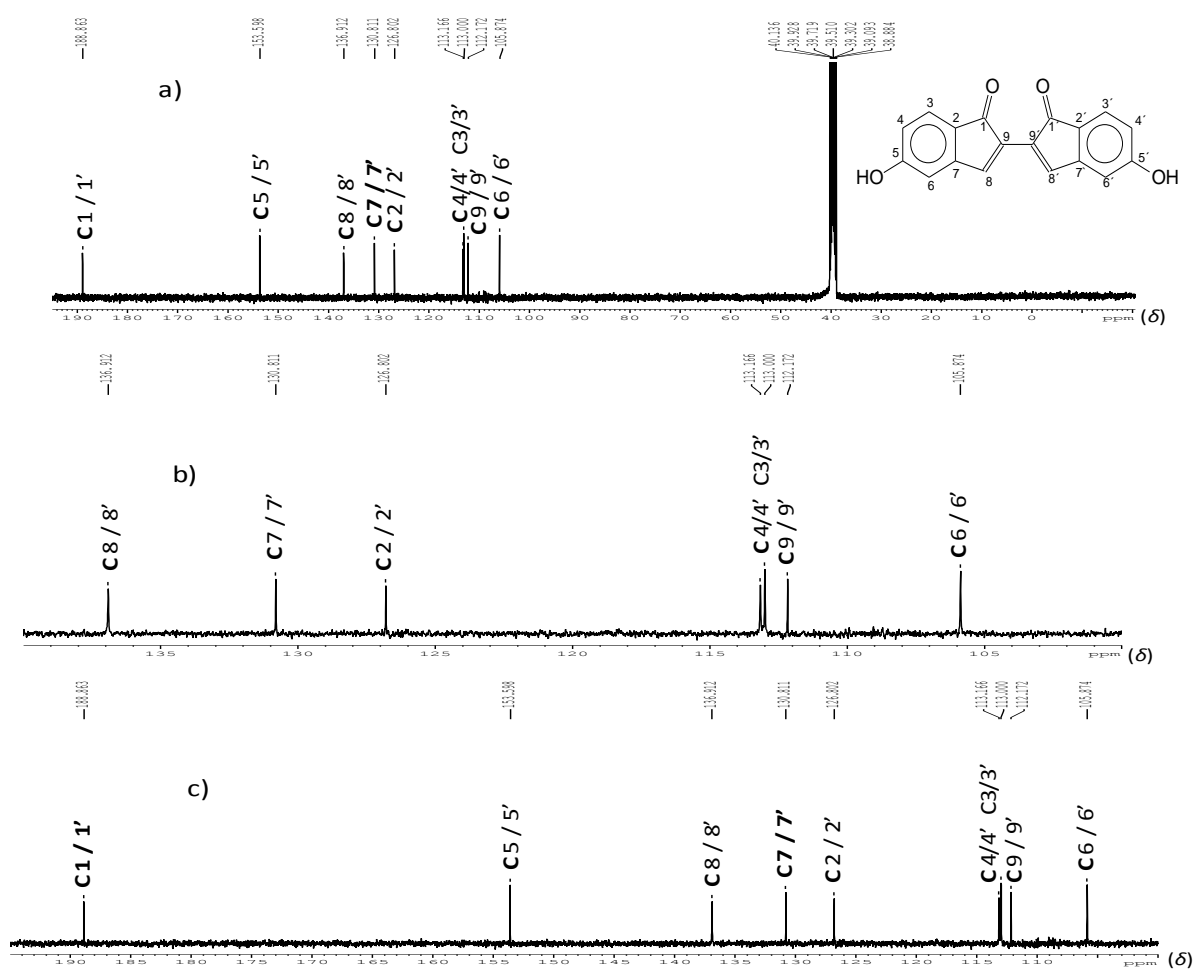


Figura IV.31. Espectro de RMN de ^{13}C (a) e expansões (b,c) de AED2/AED4 (100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

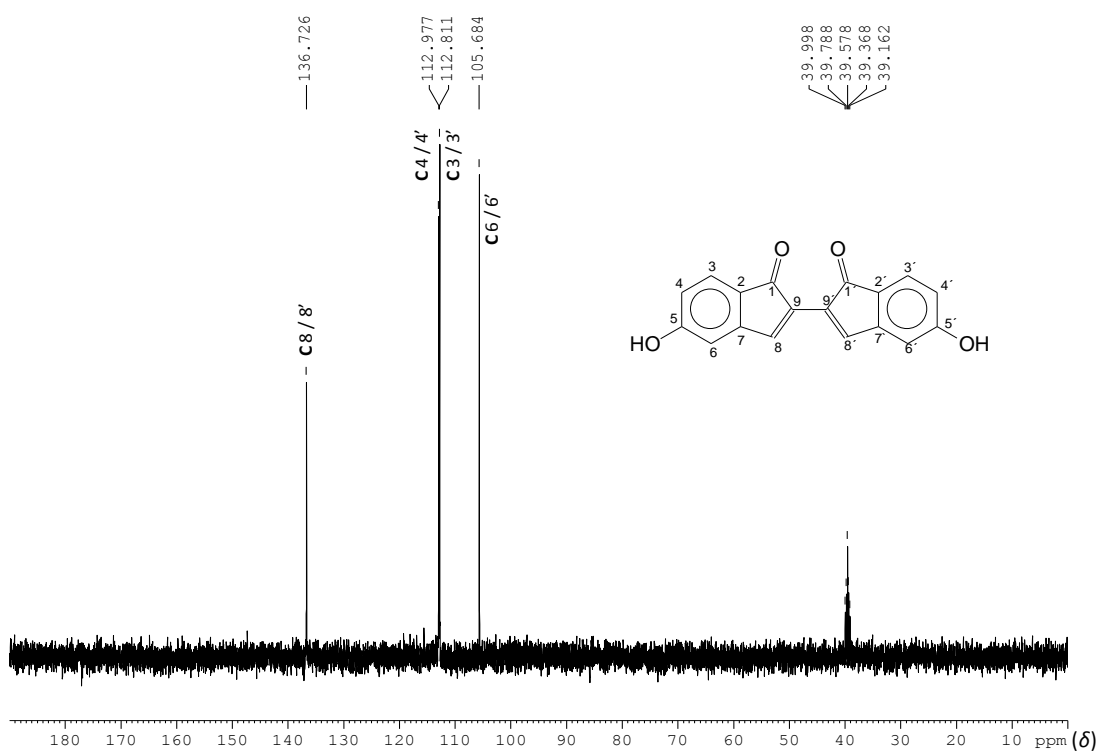


Figura IV.32. Espectro de RMN de DEPT-135° de AED2/AED4 (100 MHz; DMSO-*d*₆).

A Figura IV.33 (p. 92) mostra o mapa de contornos HSQC (a) de AED2/AED4 e expansão (b). O sinal em δ_{H} 8,02 (H-8 e H-8') correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 136,9 (C-8 e C-8'). O sinal em δ_{H} 7,65 (H-6 e H-6') correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 105,9 (C-5 e C-5'). O sinal em δ_{H} 7,32 (H-3 e H-3') correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 113,0 (C-3 e C-3'). O sinal em δ_{H} 6,75 (H-4 e H-4') correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 113,2 (C-4 e C-4').

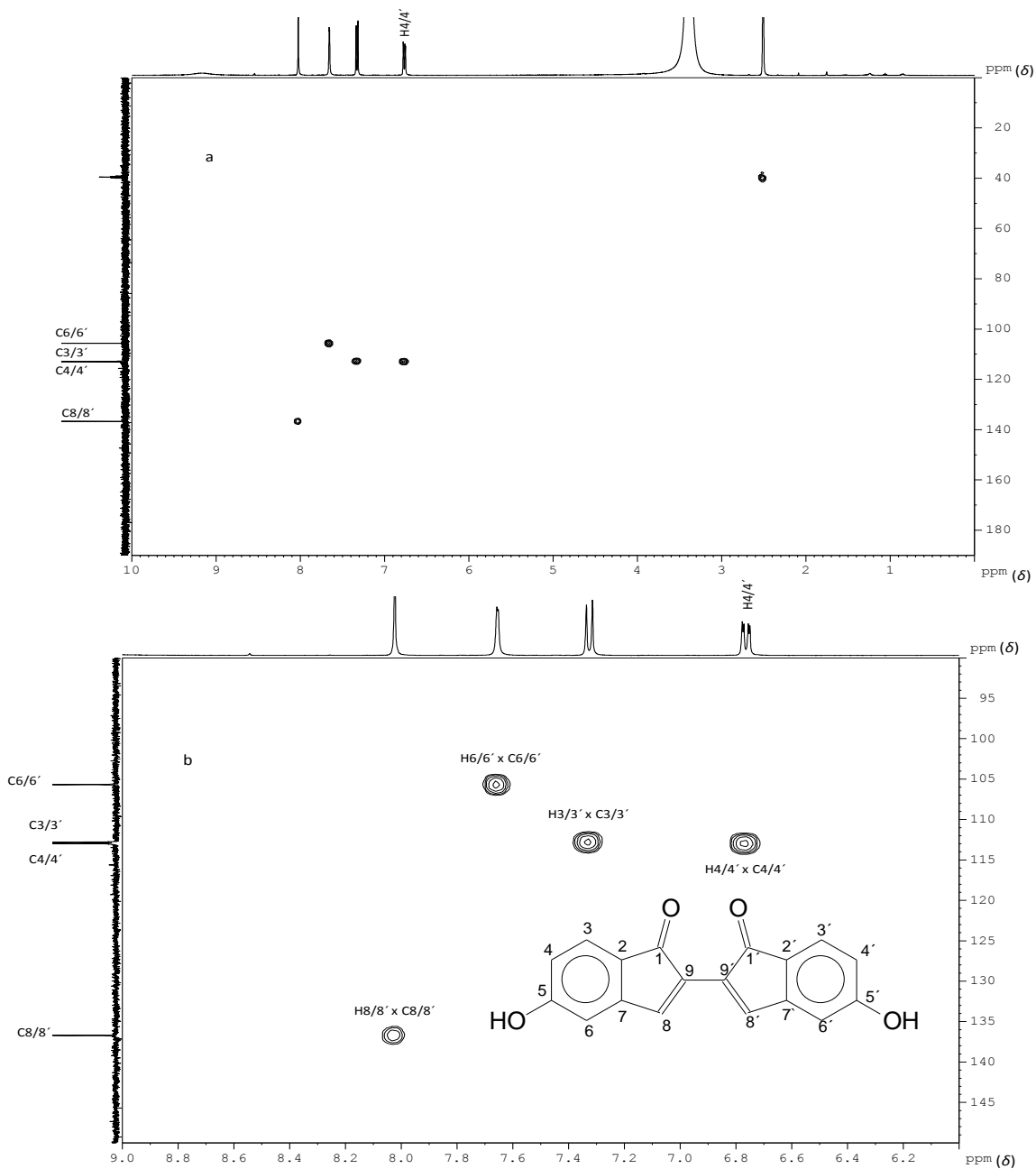


Figura IV.33. Mapa de contornos HSQC de AED2/AED4 (a) e expansão (b) correspondente (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

A Figura IV.34 apresenta o mapa de contornos COSY de AED2/AED4 (a) e expansão correspondente (b), nos quais pode-se observar correlação do sinal em δ_H 7,32 (H-3/3') com o sinal em δ_H 6,75 (H-4/4'). Esses resultados indicam que esses sinais correspondem a núcleos de hidrogênio presentes no mesmo anel aromático.

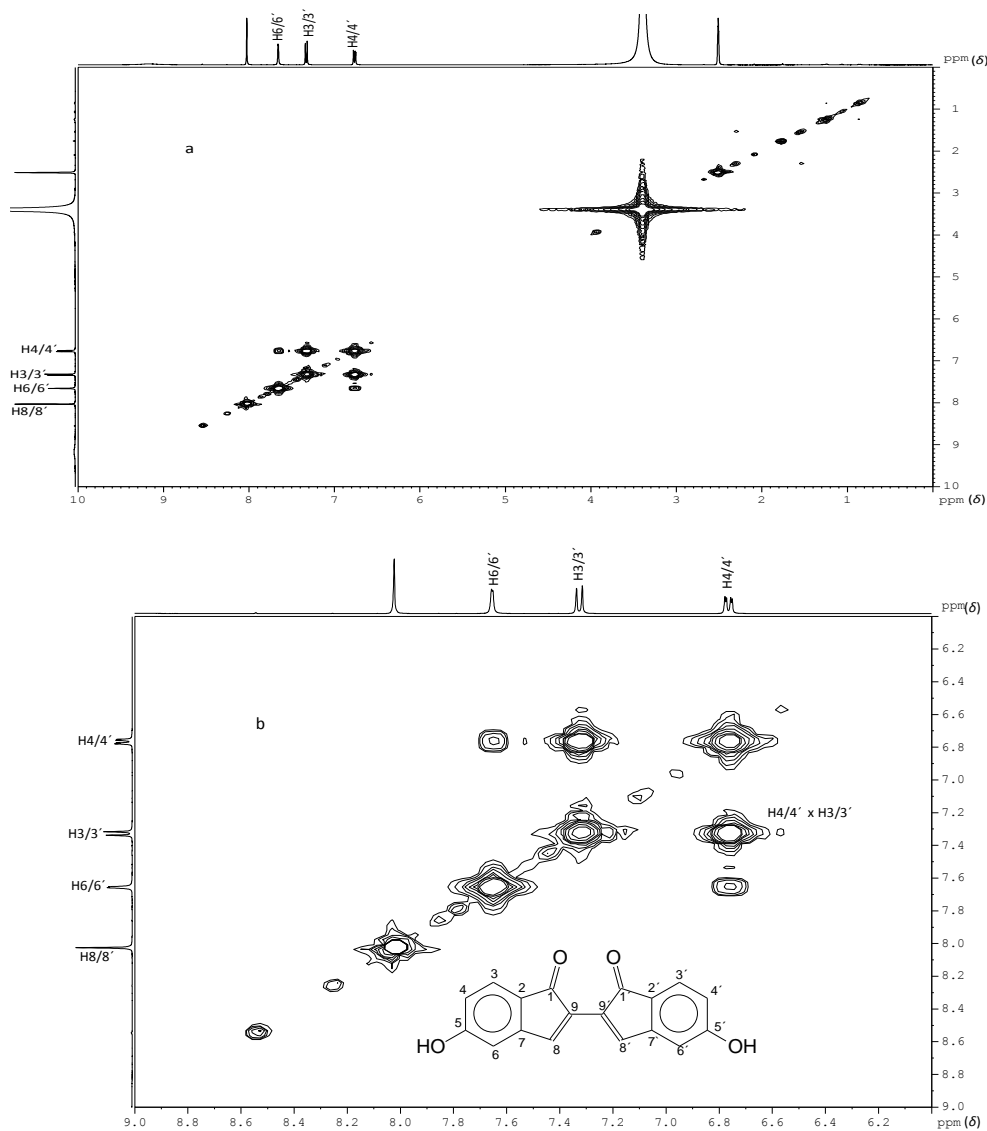


Figura IV.34. Mapa de contornos COSY de AED2/AED4 e expansão correspondente (400 MHz; DMSO- d_6).

A Figura IV.35 (p. 94) mostra o mapa de contornos 1H - ^{13}C HMBC de AED2/AED4 (a) e ampliação correspondente (b). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,75 (H-4/4') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 105,9 (C-6/6'), 130,8 (C-7/7') e 153,2 (C-5/5'). O sinal de hidrogênio em

δ_H 7,32 (H-3/3') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 126,8 (C-2/2') e 153,2 (C-5/5'). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,65 (H-6/6') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 113,2 (C-4/4'), 130,8 (C-7/7') e 153,2 (C-5/5'). O sinal de hidrogênio em δ_H 8,02 (H-8/8') correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 112,2 (C-9/9'), 126,8 (C-2/2') e 130,8 (C-7/7').

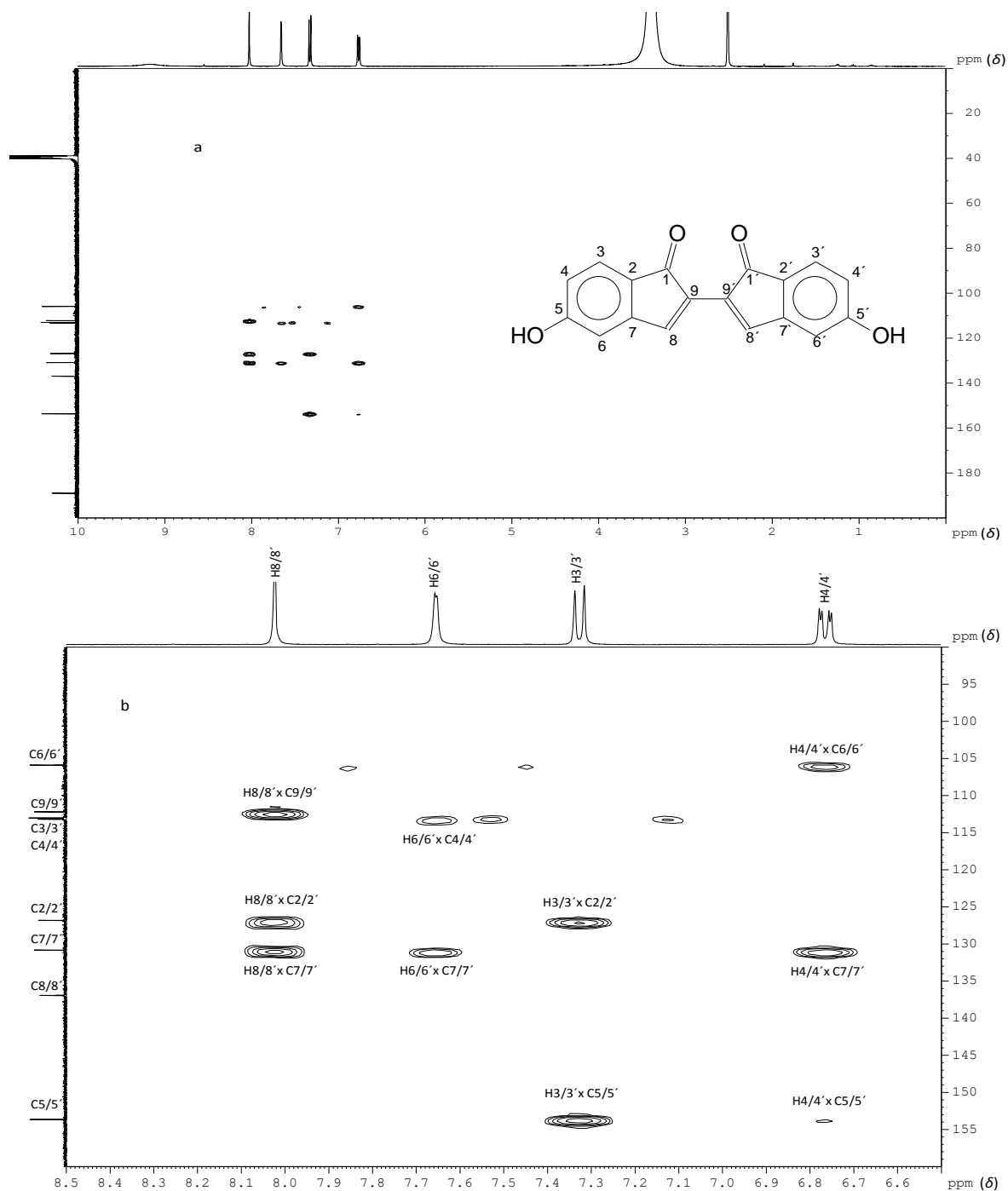


Figura IV.35. Mapa de contornos HMBC de AED2/AED4 (a) e ampliação correspondente (b) (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; DMSO- d_6).

A Figura IV.36 mostra o mapa de contornos ^1H - ^1H NOESY de AED2/AED4 (a) e expansão correspondente (b), nos quais observa-se correlação do sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,32 (H-3/3') com o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,75 (H-4/4').

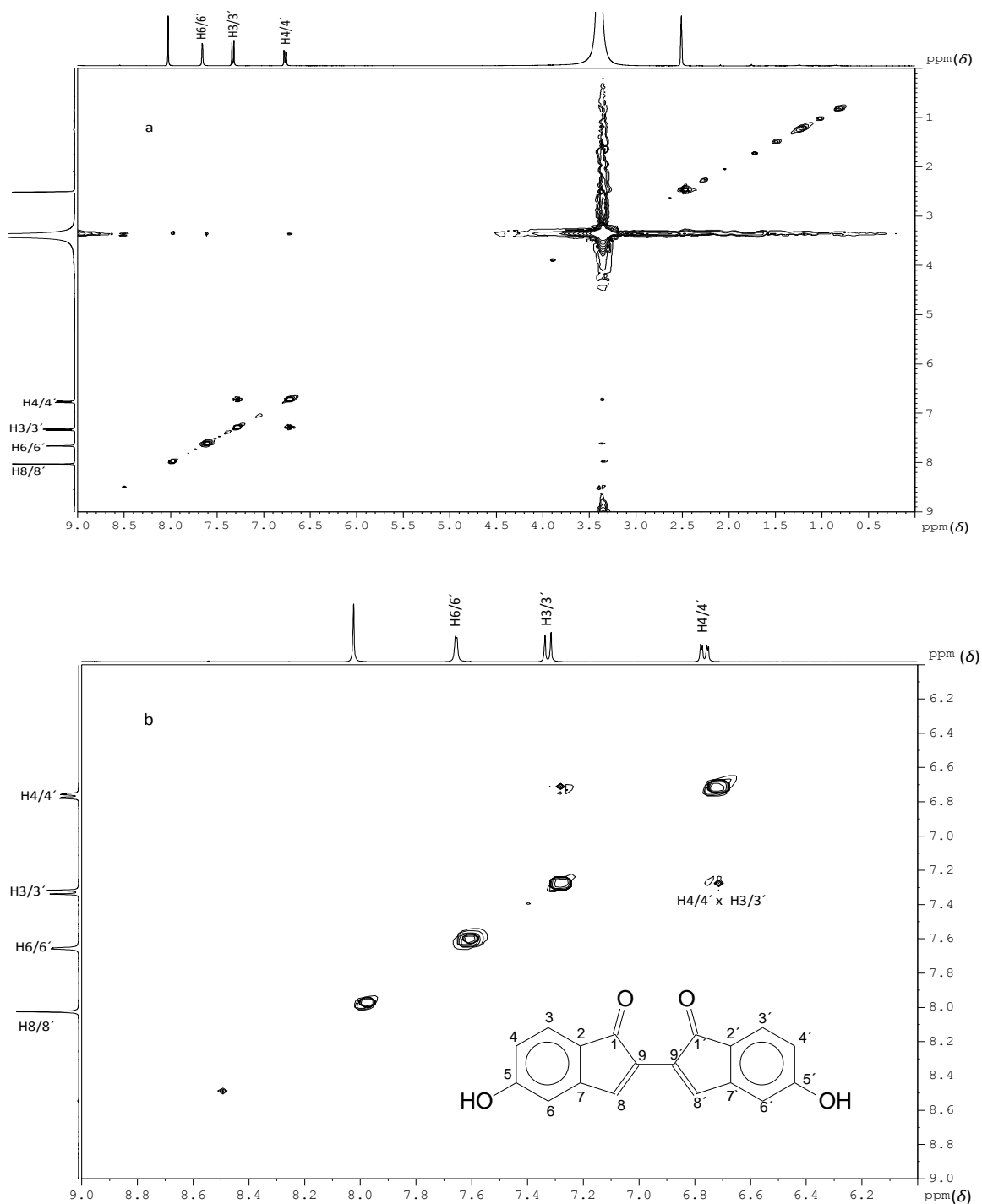
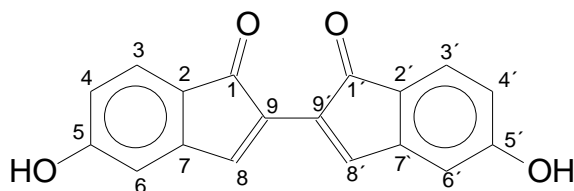


Figura IV.36. Mapa de contornos NOESY de AED2/AED4 (a) e expansão correspondente (b), (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).

De acordo com as análises de RMN realizadas, o fitoconstituente isolado pode ser identificado como 5,5'-di-hidroxi-1H,1H'-2,2'-biindeno-1,1'-diona e não apresenta registros de isolamento em espécies do reino vegetal. A Tabela IV.10 mostra os dados de δ_C e δ_H (ppm) e a estrutura proposta para AED2/AED4 com base nos dados de RMN.

Tabela IV.10. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C de AED2/AED4

Átomo	Carbono (δ_C)	Hidrogênio (δ_H)
1/1'	188,9	-
2/2'	126,8	-
3/3'	113,0	7,32 (1H, <i>dd</i> , $^3J_{4,3} = 8,8$ Hz, $^4J_{4,6} = 2$ Hz)
4/4'	113,2	6,75 (1H, <i>d</i> , $^3J_{3,4} = 8,8$ Hz,)
5/5'	153,2	-
6/6'	105,9	7,65 (1H, <i>s</i>)
7/7'	130,8	-
8/8'	136,9	8,02 (1H, <i>s</i>)
9/9'	112,2	-
O-H	-	9,18 (1H, <i>s</i>)



Capítulo V

Aplicação dos métodos computacionais no estudo estrutural de triterpenos pentacíclicos

V.1 ANÁLISE CONFIGURACIONAL E CONFORMACIONAL DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

Considerando o isolamento de triterpenos pentacíclicos nas cascas de *Aristolochia esperanzae*, conforme descrito na literatura,²³ estudos teóricos similares aos aplicados na elucidação estrutural de ácidos aristolóchicos e aristolactamas foram realizados também para triterpenos pentacíclicos. Para tanto, cálculos de deslocamento químico foram realizados para dois triterpenos pentacíclicos isolados de *Myricaria elegans*, conforme descrito na literatura⁶⁵. A escolha desses triterpenos pentacíclicos no presente estudo foi baseada na incoerência de suas estruturas em relação à biossíntese destes compostos, verificada durante o levantamento bibliográfico para a redação do capítulo de livro sobre relações entre estrutura química e atividade de triterpenos contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas.⁸¹

Os triterpenos formam um vasto grupo de produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. Extratos de plantas contendo triterpenos pentacíclicos exibem uma diversidade de atividades farmacológicas, como atividade anti-microbiana,^{66,67} citotóxica,⁶⁸ hepatoprotetora^{69,70} e anti-inflamatória.⁷¹⁻⁷³ A substituição no esqueleto lipofílico de triterpenos pentacíclicos representa uma possibilidade de aumento de seletividade e de potência para determinada ação, o que indica que os triterpenos pentacíclicos são um recurso natural de elevada importância para o desenvolvimento de novas drogas.⁷⁴

Segundo a biossíntese, os triterpenos podem ser classificados em uma ampla variedade de grupos em função do esqueleto carbônico. Atualmente relatam-se aproximadamente 40 tipos de esqueleto carbônico básico de triterpenos⁷⁵. Estes grupos estão exemplificados na Fig. V.1 que mostra a estrutura do esqueleto carbônico dos grupos fernano, lupano, oleanano e ursano.

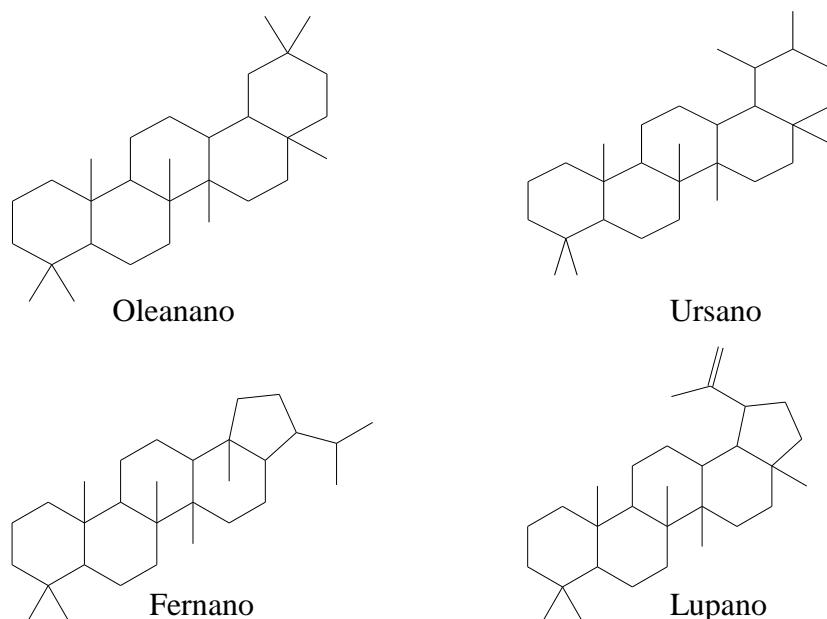
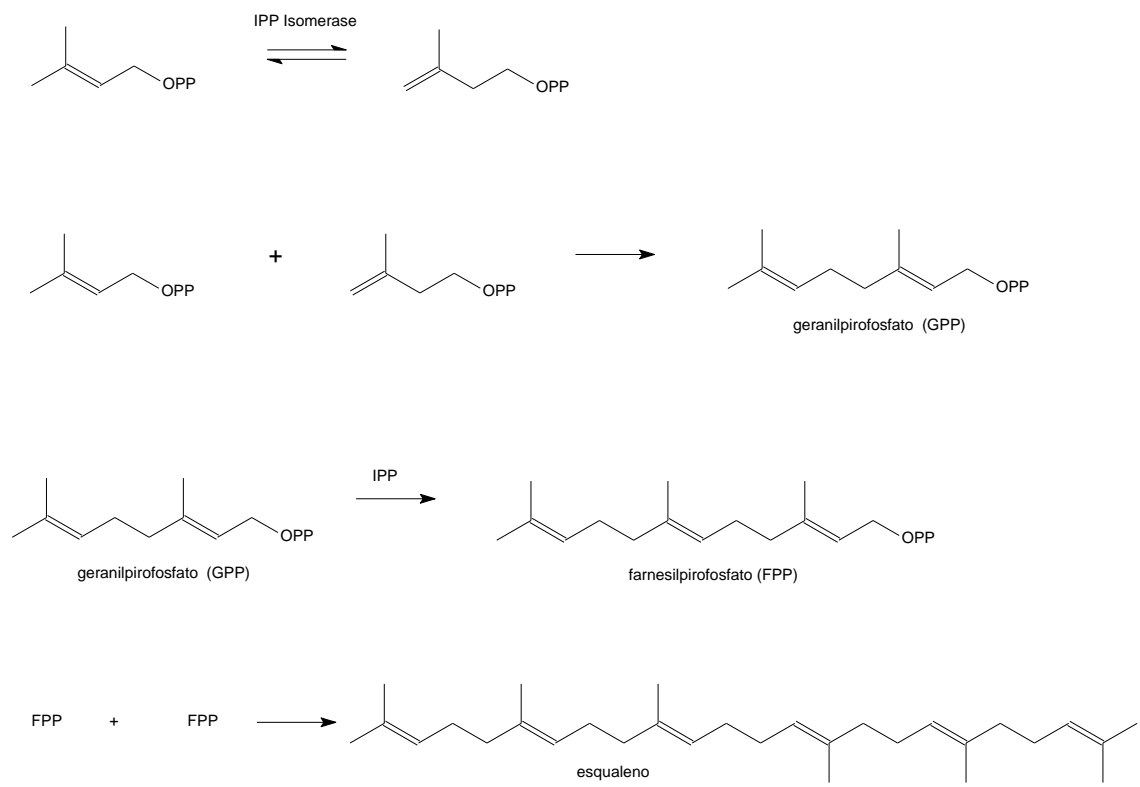
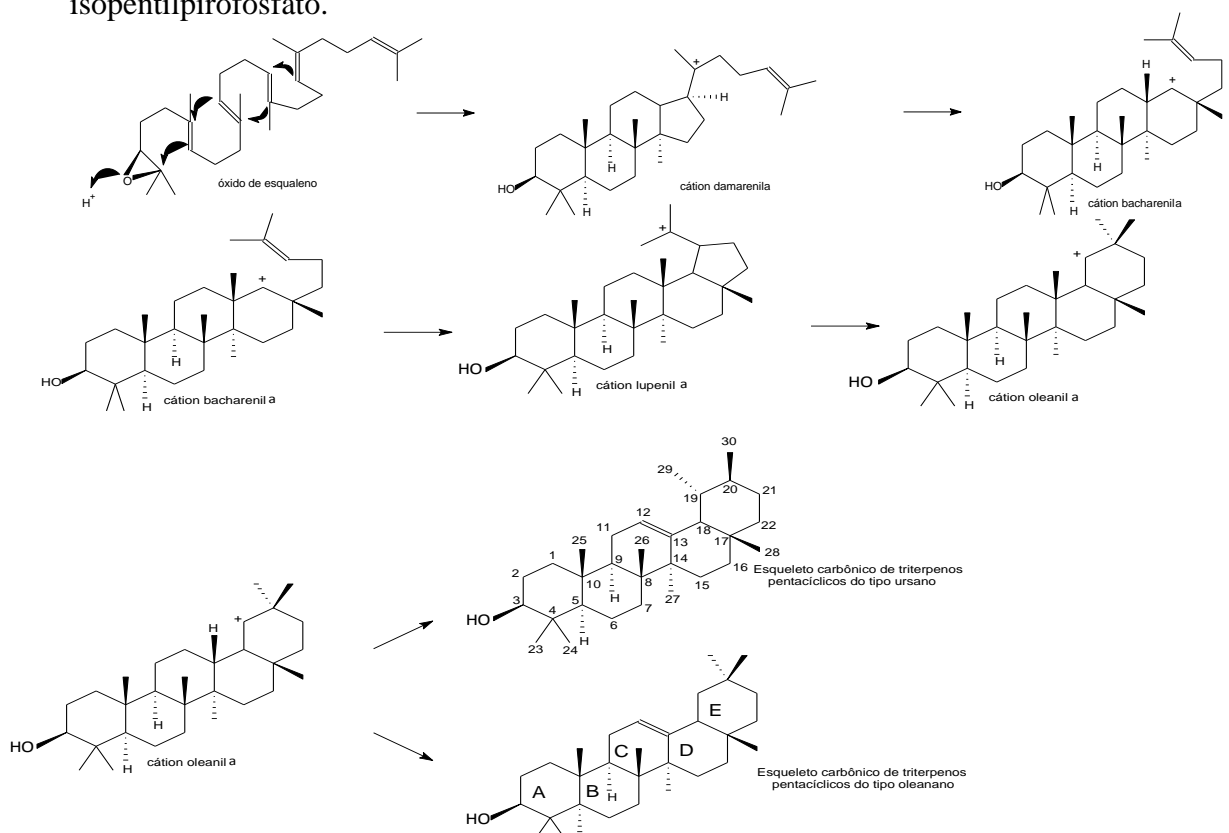


Figura V.1. Estrutura básica de triterpenos pentacíclicos do tipo olenano, ursano, fernano e lupano.

De acordo com a biossíntese de triterpenos,⁷⁶ a formação de tais esqueletos carbônicos passa pela condensação do dimetilalilpirofosfato (DMAPP) com o isoprenilpirofosfato (IPP) formando o geranylpirofosfato que posteriormente forma o farnesilpirofosfato. Duas unidades de farnesilpirofosfato se condensam e, após oxidação, chega-se ao óxido de esqualeno que é um intermediário biossintético comum aos triterpenos. A ciclização do óxido de esqualeno a triterpenos pentacíclicos passa por uma conformação pré-cadeira do oxiesqualeno. A etapa de ciclização produz o cátion tetracíclico damarenila. Após rearranjos subsequentes ocorre a formação do cátion pentacíclico oleanila. Finalmente, deslocamentos 1,2 de hidreto resultam na estrutura do triterpeno pentacíclico insaturado. Esta sequência de reações é mostrada nos Esquemas V.1 (p. 100) e V.2 (p. 100).



Esquema V.1. Biossíntese do esqualeno, precursor de triterpenos, a partir de isopentilpirofosfato.



Esquema V.2. Biossíntese de triterpenos pentacíclicos do tipo olenano e ursano a partir do óxido de esqualeno.

Como anteriormente relatado, recentemente dois novos triterpenos pentacíclicos foram isolados de partes aéreas de *Myricaria elegans* Royle (tamariscineae).⁶⁵ Esta espécie apresenta-se como um arbusto encontrado no Himalaya e no Tibet e suas folhas são usadas externamente como cataplasma em contusões, apresentando atividade anti-inflamatória.

A estrutura destes triterpenos foi proposta através de dados espectroscópicos de absorção na região do Infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C, além de espectrometria de massas. A estrutura destes triterpenos pentacíclicos inéditos é mostrada na Figura V.2.

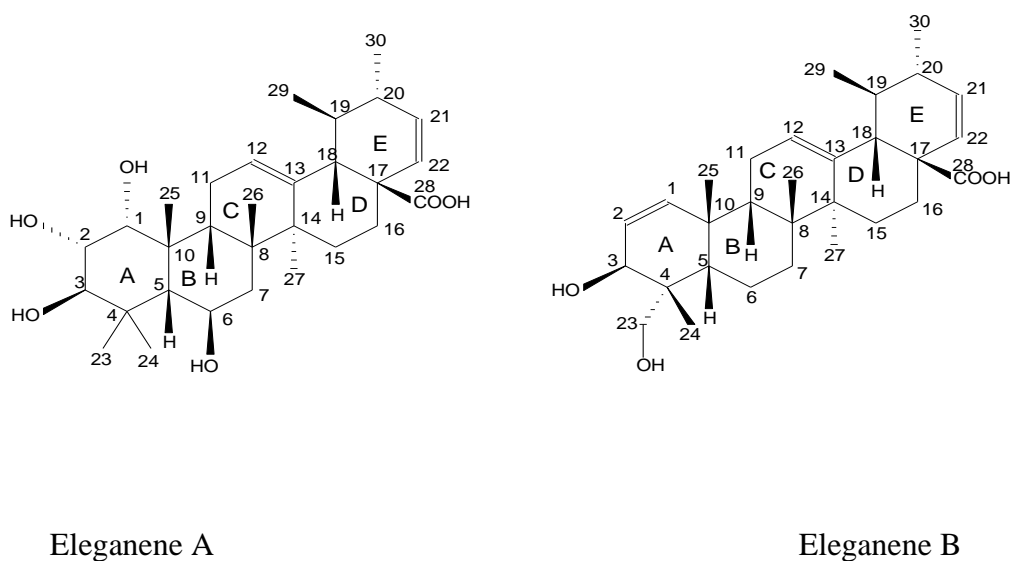


Figura V.2. Estrutura proposta para triterpenos pentacíclicos do tipo ursano isolados de *Myricaria elegans*.⁶⁵

A estereoquímica de moléculas é geralmente deduzida de experimentos NOESY (¹H-¹H). A estrutura proposta para os fitoconstituintes isolados de *M. elegans* indica a configuração *R* para ambos os centros quirais C5 e C9 de eleganene-A e a configuração *5S,9R* para eleganene-B, apresentando as junções anelares A/B e B/C na forma *cis*. Esta configuração está em desacordo

com a biossíntese de triterpenos. Assim, a análise configuracional e conformacional dos triterpenos isolados de *M. elegans* foi realizada através de correlações entre valores calculados de deslocamento químico de carbono ($^{Calc}\delta_C$) e dados de ^{13}C experimentais (δ_C).⁶⁵ Otimizações de geometria e cálculos de deslocamento químico de carbono foram realizados usando método DFT.^{40,43,48,77} Correlações entre deslocamentos químicos calculados ($^{Calc}\delta_C$) e dados experimentais de ^{13}C (δ_C) têm sido eficientemente utilizados na análise estrutural de compostos orgânicos.⁷⁸⁻⁸⁰

Os estudos teóricos foram realizados usando o software GAUSSIAN03.⁶¹ Os quatro isômeros possíveis para cada estrutura foram usados como modelos iniciais para os cálculos de otimização de geometria. As otimizações de geometria em nível DFT foram realizadas utilizando as geometrias anteriormente obtidas por método semi-empírico PM3.⁴⁵ Utilizou-se o funcional B3LYP com conjunto de base de valência expandida 6-31G* nos cálculos DFT. As geometrias otimizadas foram caracterizadas como mínimos verdadeiros na superfície de energia potencial (PES), quando todas as frequências harmônicas são reais. As geometrias otimizadas foram utilizadas em cálculos de deslocamento químico de carbono nos mesmos níveis de teoria. A energia eletrônica-nuclear (E) foi calculada em método DFT/B3LYP/6-31G*. Deslocamentos químicos de carbono calculados ($^{Calc}\delta_C$) foram obtidos em relação aos correspondentes valores calculados em DFT/B3LYP/6-31G* para tetrametilsilano ($\sigma_C = 191,58$ ppm).

Correlações entre os valores de $^{Calc}\delta_C$ e deslocamentos químicos de carbono experimentais (δ_C^{Lit}) foram obtidos utilizando-se o pacote de software OriginTM Standard 7.5, sendo os valores de δ_C^{Lit} e $^{Calc}\delta_C$ plotados nos eixos x e y, respectivamente. Curvas de correlação foram obtidas com ajustes lineares com coeficiente de correlação (R^2) fornecido pelo próprio programa.

Inicialmente, otimizações de geometria em nível DFT/B3LYP/6-31G* para estruturas na fase gasosa foram realizadas para as quatro possibilidades configuracionais derivadas de C-5 e C-9 para eleganene-A (Figura V.3) e eleganene-B (Figura V.4).

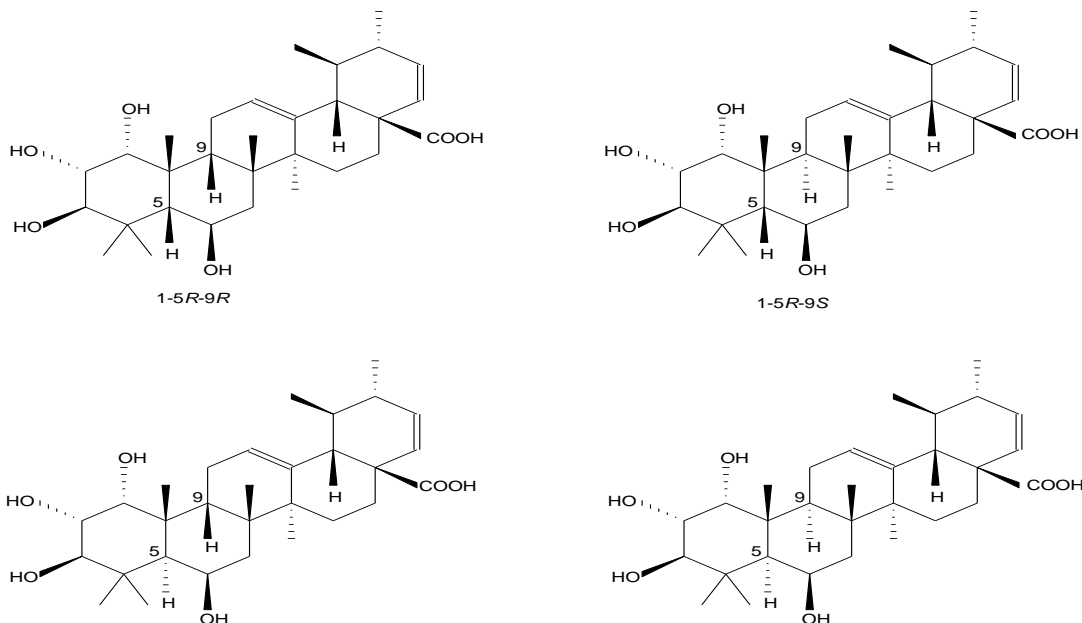


Figura V.3. Possibilidades configuracionais consideradas na análise estrutural de eleganene-A - triterpeno pentacíclico do tipo ursano isolado de *Myricaria elegans*.

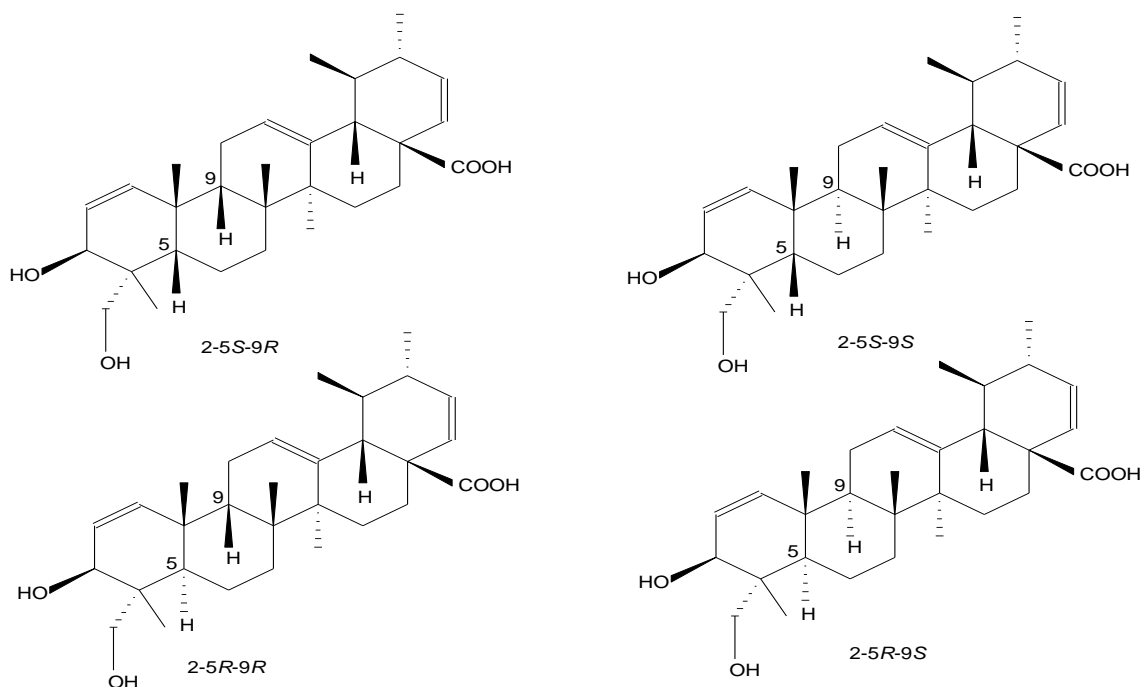


Figura V.4. Possibilidades configuracionais consideradas na análise estrutural de eleganene-B - triterpeno pentacíclico do tipo ursano isolado de *Myricaria elegans*.

A Tabela V.1 mostra a energia eletrônica-nuclear e os coeficientes de correlação obtidos para a estrutura dos estereoisômeros em C5 e C9 de eleganene-A e eleganene-B. Melhores correlações foram obtidas quando eleganene-A (**1**) e eleganene-B (**2**) apresentam, respectivamente, as configurações *5S-9S* e *5R-9S*, cuja formação é favorecida termodinamicamente em função do menor valor de energia eletrônica-nuclear. As estruturas 1-*5S-9S* e 2-*5R-9S* apresentam junções anelares A/B e B/C na forma *trans* e estão representadas na Figura V.5.

Tabela V.1. Energia eletrônica-nuclear e coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado e experimental ($\delta_C^{\text{Calc}} / \delta_C^{\text{Lit}}$) obtidos para as estruturas dos estereoisômeros de eleganene-A (**1**) e eleganene-B (**2**) para estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares

Estrutura	R ²	<i>E</i> (Hartree)
1 <i>5R-9S</i>	0,9294	-1622.05607027
1 <i>5R-9R</i>	0,9271	-1622.03858986
1 <i>5S-9S</i>	0,9851	-1622.15297740
1 <i>5S-9R</i>	0,9698	-1622.12902909
2 <i>5R-9S</i>	0,9846	-1471.73059522
2 <i>5S-9S</i>	0,9814	-1471.72289046
2 <i>5R-9R</i>	0,9814	-1471.71695398
2 <i>5S-9R</i>	0,9806	-1471.72316750

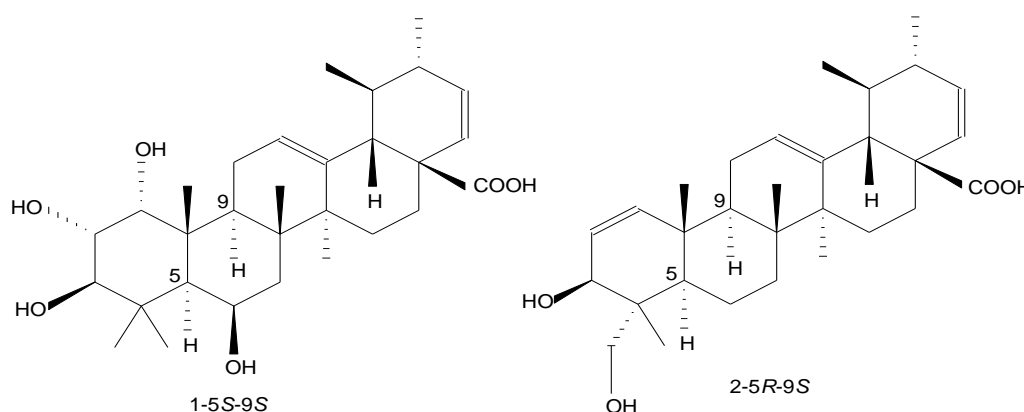


Figura V.5. Estruturas de eleganene-A (**1**) e eleganene-B (**2**) obtidas por correlações de dados teóricos (δ_C^{Calc}) e experimentais de ¹³C (δ_C^{Lit}).

As estruturas indicadas pelos cálculos teóricos apresentam os menores valores de energia eletrônica-nuclear dentre todas as possibilidades estereoquímicas consideradas e concordam com a rota biossintética relatada na literatura para triterpenos pentacíclicos.⁷⁵ Dessa forma, correlações de dados teóricos e experimentais de RMN de ¹³C NMR de eleganene-A isolado de *Myricaria elegans* indicaram inversão configuracional em C5 (configuração *S*) e C9 (configuração *S*) em relação a estrutura anteriormente proposta na literatura. De forma semelhante, correlações de dados teóricos e experimentais de RMN de ¹³C de eleganene-B isolado de *Myricaria elegans* indicaram inversão configuracional em C5 (configuração *R*) e C9 (configuração *S*) em relação à estrutura anteriormente proposta na literatura. Assim, a estereoquímica correta dos centros quirais C5 e C9 dos triterpenos pentacíclicos eleganene-A e eleganene-B isolados de *Myricaria elegans* é mostrada na Figura V.5 (p. 104).

A estrutura de eleganene-A foi estudada quanto à estereoquímica de C1, C2, C3 e C6, posições nas quais ocorre a substituição por grupo hidroxila. Otimizações de geometria em nível DFT/B3LYP/6-31G* para estruturas na fase gasosa foram realizadas para as dezesseis possibilidades configuracionais para a estrutura de eleganene-A (Figura V.6, p. 107) utilizando as geometrias anteriormente obtidas por método semi-empírico PM3. Utilizou-se o funcional B3LYP com conjunto de base de valência expandida 6-31G* em cálculos utilizando nível DFT. As geometrias otimizadas foram caracterizadas como mínimos verdadeiros na superfície de energia potencial (PES), quando todas as frequências harmônicas são reais. As geometrias otimizadas foram utilizadas em cálculos de deslocamento químico de carbono nos mesmos níveis de teoria. A energia eletrônica-nuclear (*E*) foi calculada em método DFT/B3LYP/6-31G*. Deslocamentos químicos de carbono calculados ($^{\text{Calc}}\delta_{\text{C}}$) foram obtidos em relação aos correspondentes valores calculados em DFT/B3LYP/6-31G* para tetrametilsilano ($\sigma_{\text{C}} = 191,58$ ppm).

Correlações entre os valores de $^{Calc}\delta_C$ e deslocamentos químico de carbono experimentais⁶⁵ (δ_C^{Lit}) foram obtidos utilizando-se o pacote de software OriginTM Standard 7.5. Os valores de δ_C^{Lit} e $^{Calc}\delta_C$ foram plotados nos eixos x e y, respectivamente. Curvas de correlação foram obtidas com ajustes lineares com coeficiente de correlação (R^2) fornecido pelo próprio programa.

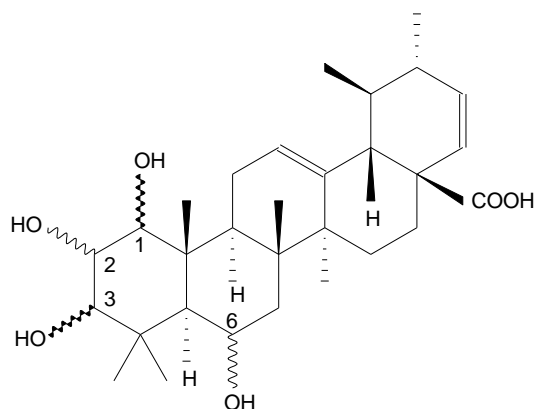


Figura V.6. Estrutura representativa das possibilidades configuracionais consideradas na análise estrutural de elegantene A - triterpeno pentacíclico do tipo ursano isolado de *Myricaria elegans*.

A Tabela V.2 (p. 107) mostra a energia eletrônica-nuclear e os coeficientes de correlação obtidos para os estereoisômeros considerados. A melhor correlação foi obtida para configuração 1*R*-2*S*-3*S*-6*S*. A estrutura com esta configuração (Figura V.7, p. 108) apresenta formação favorecida termodinamicamente em função do menor valor de energia eletrônica-nuclear. Então, de acordo com a análise estrutural, a estereoquímica correta do triterpeno pentacíclico elegantene-A isolado de *Myricaria elegans* é mostrada na Figura V.7 (p. 107).

Tabela V.2. Energia eletrônica-nuclear e coeficientes de correlação das curvas de deslocamento químico calculado e experimental ($^{Calc}\delta_C/\delta_C^{Lit}$) obtidos para as estruturas dos estereoisômeros de eleganene-A (**1**) com estruturas na fase gasosa e sem considerar interações intermoleculares

Estereoisômero	R ²	E (Hartree)	Estereoisômero	R ²	E (Hartree)
1R-2S-3R-6R	0,9851	-1622.15297740	1S-2R-3R-6R	0,9835	-1622.14124145
1S-2R-3S-6S	0,9852	-1622.14028416	1R-2S-3S-6S	0,9864	-1622.16290924
1R-2R-3R-6R	0,9823	-1622.13747812	1R-2R-3S-6S	0,9802	-1622.14754180
1S-2S-3S-6S	0,9827	-1622.1556301	1S-2S-3R-6R	0,9803	-1622.13466682
1R-2R-3R-6S	0,9813	-1622.14088756	1R-2S-3S-6R	0,9666	-1622.13846653
1S-2S-3S-6R	0,9787	-1622.14276235	1S-2R-3R-6S	0,9814	-1622.14321718
1R-2R-3S-6R	0,9852	-1622.15800861	1R-2S-3R-6S	0,9823	-1622.14467136
1S-2S-3R-6S	0,9828	-1622.15683115	1S-2R-3S-6R	0,9835	-1622.14898133

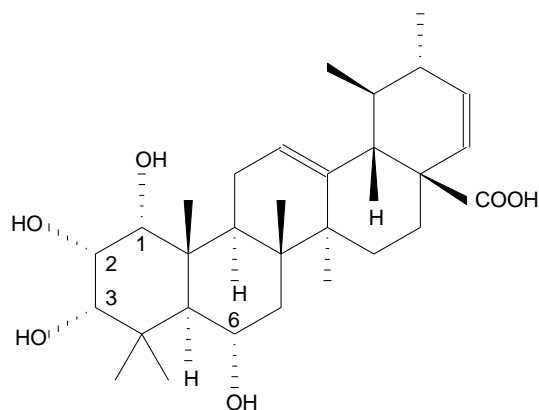


Figura V.7. Estrutura de eleganene-A obtida por correlações de dados teóricos e experimentais de ^{13}C .

Considerações Finais e Perspectivas

O estudo fitoquímico das cascas do caule de *Aristolochia esperanzae* possibilitou o isolamento e caracterização de um ácido aristolóchico, duas lignanas e dois derivados fenólicos diméricos, cujas estruturas são mostradas na Figura VI.1. Como observado para espécies do gênero *Aristolochia* que apresentam frequentemente ácidos aristolóchicos e lignanas, no caso de *A. esperanzae*, também foram verificados compostos desse tipo. Todas essas substâncias foram identificadas por técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, HSQC, HMBC, NOESY e COSY.

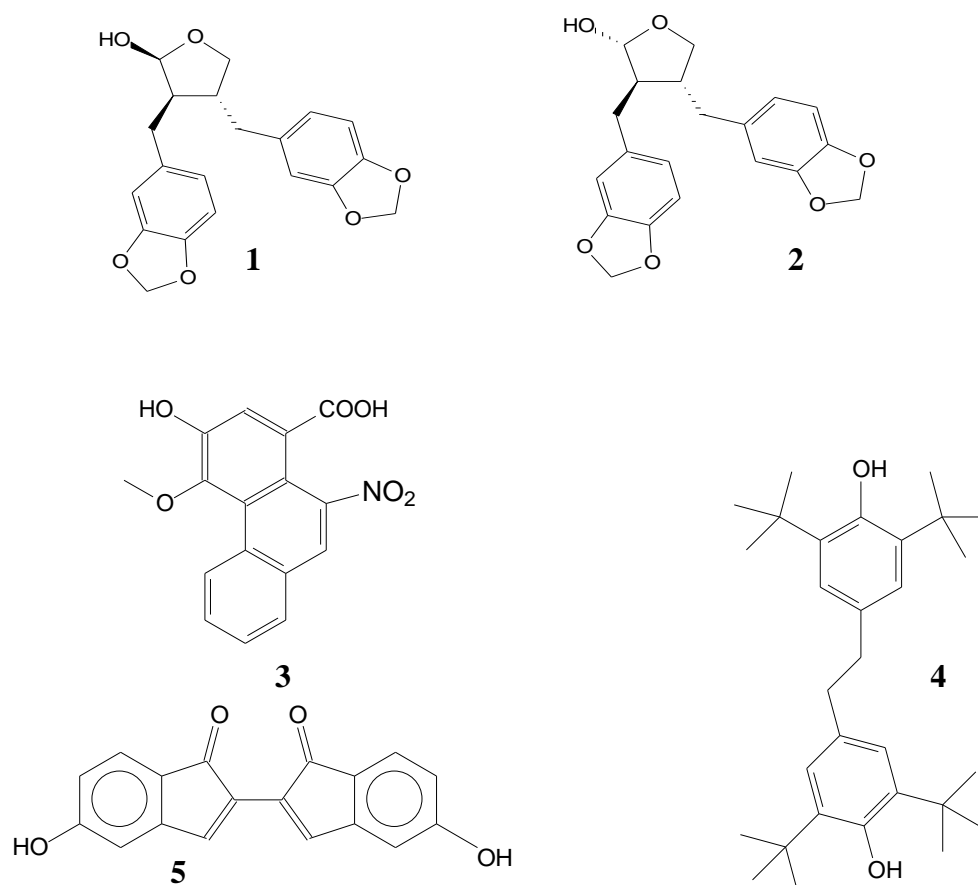


Figura VI.1. Fitoconstituintes isolados do extrato das cascas de *A. esperanzae* (**1** = (8*R*,8'*R*,9*S*)-Cubebina, **2** = (8*R*,8'*R*,9*R*)-Cubebina, **3** = ácido 3-hidroxi-4-metoxi-10-nitrofenantreno 1-carboxílico, **4** = 2,2',6,6'-tetra-*tert*-butil-4,4'-etilenodifenol, **5** = 5,5'-dihidroxi-1*H*,1*H*'-2,2'-biindeno-1,1'-diona).

Dentre os compostos isolados, ácido aristolóchico (**3**), 2,2',6,6'-tetra-*terc*-butil-4,4'-etilenodifenol (**4**) e 5,5'-di-hidroxi-1H,1H'-2,2' biindeno -1,1'-diona (**5**) foram pela primeira vez isolados no reino vegetal.

A estereoquímica de (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina e (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina foi investigada pelas correlações dos deslocamentos químicos de carbono calculados por métodos teóricos com os dados experimentais de RMN de ¹³C. Os cálculos foram realizados em níveis HF e DFT (BLYP, B3LYP, e PBE), com conjunto de base e funções difusas 6-31G*. Os cálculos teóricos mostram altos coeficientes de correlação em todos os níveis de cálculo. O efeito do solvente nas correlações de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina foi investigado pelo uso de um modelo de solvente explícito e utilizando cálculos B3LYP/6-31G* envolvendo uma molécula dos solventes acetona, dimetilsulfóxido e piridina.

As melhores correlações indicaram sítios de interação preferencial entre a molécula do solvente e a molécula de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina. Tais interações são mostradas na Figura VI.2 (p. 111).

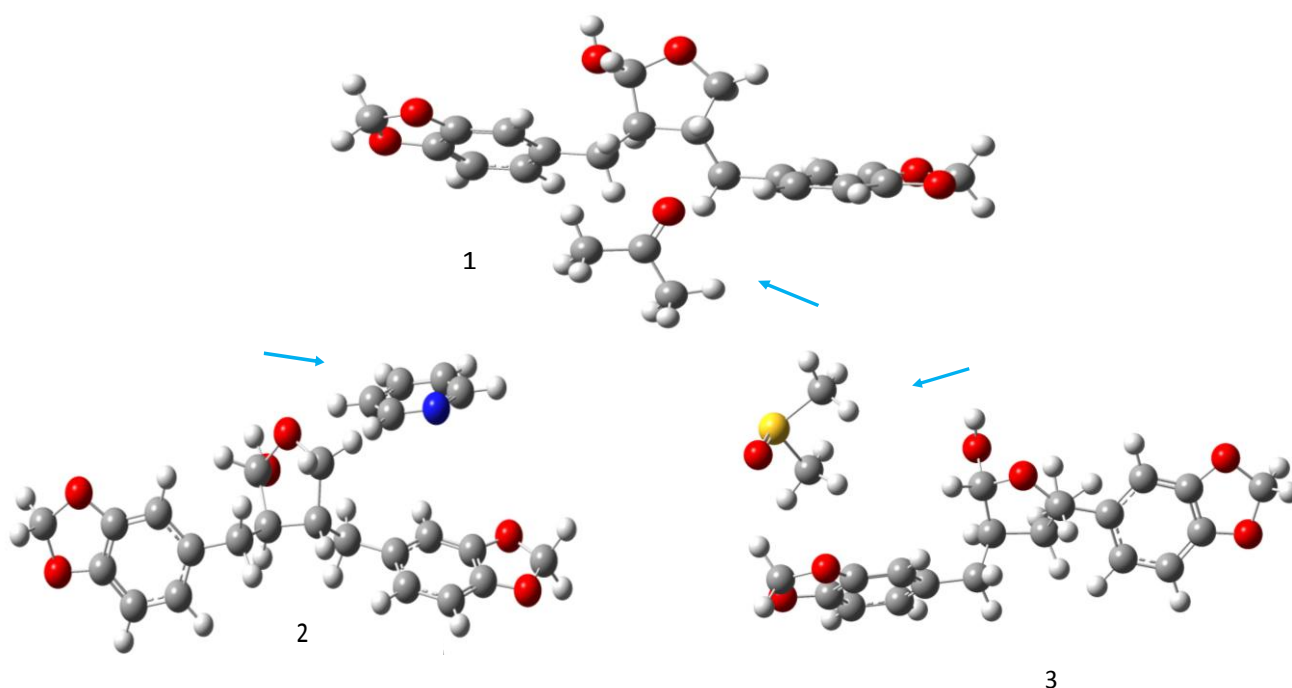


Figura VI.2. Sítios de interação preferencial entre a molécula de 8*R*,8'*R*,9*R*-cubebina e os solventes acetona (1), piridina (2) e dimetilsulfóxido (3).

A análise configuracional e conformacional dos triterpenos *eleganene-A* e *eleganene-B* isolados de *Myricaria elegans* foi realizada através de correlações entre valores calculados de deslocamento químico de carbono e dados de RMN de ^{13}C experimentais reportados na literatura.

Valores de energia eletrônica-nuclear e coeficientes de correlação indicaram as configurações 3*S*-5*S*-6*S*-9*S* e 5*R*-9*S* para *eleganene-A* e *eleganene-B*, respectivamente. As estruturas 1-5*S*-9*S* e 2-5*R*-9*S* apresentam junções anelares A/B e B/C na configuração *trans*. Dessa forma, correlações de dados teóricos e experimentais de RMN de ^{13}C de *eleganene-A* isolada de *Myricaria elegans* indicaram inversão configuracional em C3 (configuração *S*), em C5 (configuração *S*), em C6 (configuração *S*) e em C9 (configuração *S*) em relação a estrutura anteriormente proposta na literatura.⁷⁶ De forma semelhante, correlações de dados teóricos e experimentais de RMN de ^{13}C de *eleganene-B* isolado de *Myricaria elegans* indicaram inversão configuracional em C5 (configuração *R*) e C9 (configuração *S*) em relação à estrutura anteriormente

proposta na literatura. Assim, a estereoquímica correta dos triterpenos pentacíclicos isolados de *Myricaria elegans* é mostrada na Figura VI.3.

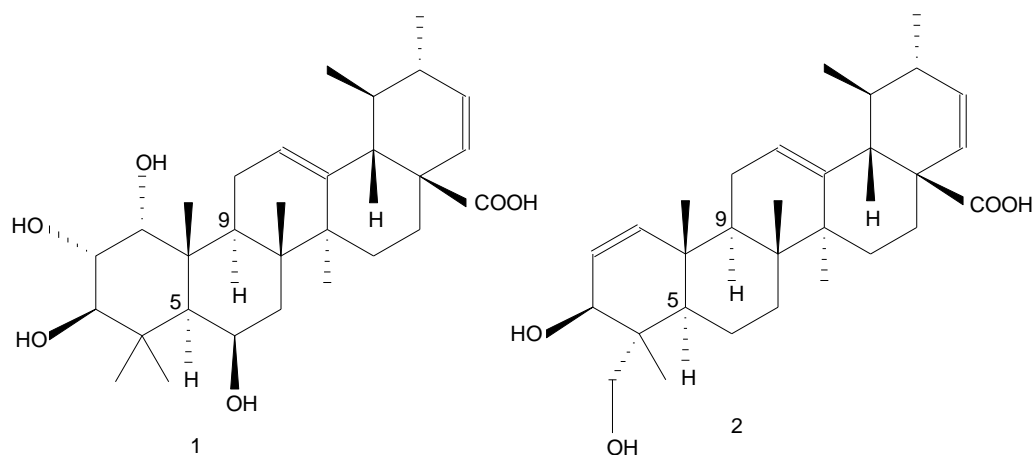


Figura VI.3. Estruturas de eleganene-A (1) e eleganene-B (2) obtidas por correlações de dados teóricos e experimentais de deslocamento químico de carbono.

A presença de derivados adutos de ácido aristolóchico-DNA no córtex renal de humanos é um indicativo da toxicidade de ácidos aristolóchicos. Estes adutos foram identificados como derivados metabólicos de ácido aristolóchico I e ácido aristolóchico II.⁸³ Neste sentido, o ácido aristolóchico inédito obtido neste trabalho, bem como aristolactamas, extratos e frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de cascas e cerne de *Aristolochia esperanzae* Kuntze serão submetidos a testes antitumorais e de indução tumoral para avaliar a carcinogenicidade relatada na literatura.

O estudo fitoquímico das cascas de *Aristolochia esperanzae* será continuado utilizando os métodos convencionais como extração por solvente, cromatografia em coluna e/ou por HPLC.

Referências

1. Leitão, G. G.; Kaplan, M. A. C. *Rev. Bras. Farm.* **1992**, 73, 65.
2. Stasi, D.; Cláudio, L. *Plantas Medicinais na Amazônia I*, Ed. UNESP, São Paulo, **1989**.
3. Scalon, S.P.Q.; Sene, P.A.L.; Zatti, D.A.; Mussury, R.M.; Scalon Filho, H. *Rev. Bras. Plana Med.* **2007**, 9, 32.
4. Fenner, R.; Betti, A. H.; Mentz, L. A.; Rates, S. M. K. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2006**, 42, 369.
5. Bevilaqua, G. A. P.; Schiedeck, G.; Schwengber, J. E. *Circular Técnica*, n. 61. **2007**.
6. Balbach, A. *A Flora Nacional na Medicina Doméstica*, 11. ed. EDEL, São Paulo, **1979**.
7. Correa, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Ministério da Agricultura, 3.ed.; volume IV.
8. Schindler, H. *Arzn.-Fors.* **1951**, 1, 7.
9. Kumar, V.; Poonam, P. A. K.; Parmar, V. S. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 565.
10. Chung-Hsin, C.; Kathleen, G. D.; Masaaki, M., Jiri, Z.; Viktoriya, S. S.; Karen, L. D.; Dmitri, V. G.; Lin, W.; Robert, J. T.; Xue-Ru, W.; Yeong-Shiau, P.; Grollman, A. P. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **2012**, 109, 8241.
11. Andrade, K. V. S. A.; Rodal, M. J. N. *Rev. Bras. Bot.* **2004**, 7, 463.
12. Queirós, M. V. – *Artrite Reumatóide*. 1ªed Lisboa, **2003**.
13. Firestein, G. S. – *Rheumatoid arthritis – etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis* IN: Harris, Edward D Philadelphia: Elsevier Saunders, **2005**.
14. Cunha, V. R.; Brenol, C. V.; Brenol, J. C. T.; Xavier, R. M. *Rev. Bras. Reumatol.* **2011**, 51, 264.
15. Mota, L. M. H.; Cruz, Bo. A.; Brenol, C. V.; Pereira, I. A.; Fronza, L. S. R.; Bertolo, M. B.; Freitas, M. V. C.; Silva, N. A.; Louzada-Junior, P.; Giorgi, R. D. N.; Lima, R. A. C.; Pinheiro, G. R. *Rev. Bras. Reumatol.* **2011**, 51, 199.

16. SCHNEIDERS, R. E. *Caracterização dos gastos do Ministério da Saúde com medicamentos para artrite reumatoide, no âmbito do componente especializado da assistência farmacêutica no período de 2008 a 2009*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade de Brasília, Brasília, **2012**.
17. Boletim da Sociedade Brasileira de Reumatologia Rio de Janeiro **2004**, 32, 16.
18. American College of Rheumatology ad hoc Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* **1996**, 39, 713.
19. Hamerschlak, N.; Nishioka, S. A. *Mort. Shein. Einst.* **2005**, 3, 56.
20. Dahlgren, R. M. T. *Bot. J. Linn. Soc.* **1980**, 80, 91.
21. Hoene F. C. *Flora Brasílica 15-II (6) Aristolochiaceas* **1942**.
22. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V. *Ciênc. Cult.* **1987**, 39, 515 (44.D.2.5) Supl.
23. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S. *Phytochem.* **1988**, 27, 2265.
24. Connolly, J. D. *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*, Academic Press, London, **1972**.
25. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1988**, 19, 113.
26. Munavalli, S.; Viel, C. *Ann. Pharm. Fr.* **1969**, 27, 449.
27. Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1982**, 45, 657.
28. Pacheco, A. G.; Silva, T. M.; Manfrini, R. M., Sallum, W. S. T.; Duarte, L. P.; Piló-Veloso, D.; Alcantara, A. F. C. *Quim. Nova*, **2010**, 33, 91.
29. Alcântara, A. F. C.; Piló-Veloso, D.; Almeida, W. B.; Maltha, C. R. A.; Barbosa, L. C. A. *J. Mol. Struct.* **2006**, 791, 180.
30. Pérez-Rebolledo, A.; Mendes, I. C.; Speziali, N. L.; Bertani, P.; Resende, J. M.; Alcântara, A. F. C.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2007**, 26, 1449.
31. Rodrigues, C. R. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* **2001**, 3, 43.
32. Custódio, R.; Custódio, M. R.; Creatto, E. J. *Quim. Nova*, **2012**, 35, 2076.

33. Freire, J. A. Desenvolvimento de um Visualizador/Editor 3D de Moléculas, Monografia de Graduação, **2002**, Departamento de Ciências da Computação Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.
34. Robbiano, L. *Cálculo numérico e cálculo simbólico*, Ed. Springer Milan **2011**.
35. Mo, O.; Yanez, M.; Salpin, J. Y.; Tortajada, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, 26 474.
36. McLuckey, S. A.; Wells, J. M. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 571.
37. Moraes, L. A. B.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Vainiolato, P. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5096.
38. Young, D. C. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*, **2001**.
39. Santos, H. F. *Quím. Nova na Escola* **2001**, 4, 4.
40. Sant'Anna, C. M. R. *Rev. Virtual Quím.* **2009**, 1, 49.
41. Ramachandran, K. I.; Deepa, G.; Namboori, K. *Computational Chemistry and Molecular Modeling Principles and Applications* Ed. Berlin : Springer **2008**.
42. Konstantinova, E. Novas Fases de Carbono: Abordagem computacional, **2005**, Tese (Doutorado) – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, Brasil.
43. Gund, P.; Andose, J.D.; Rhodes, J.B.; Smith, G. M. *Science* **1980**, 208, 1425.
44. Heerdt, G.; Morgon, N. H. *Quim. Nova*, **2011**, 34, 868.
45. Dewar, M. J. S.; Zoebish, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 902.
46. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models* Ed. John Wiley **2002**.
47. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry* John Wiley: **1999**.
48. Yarkony, D. R. *Modern Electronic Structure Theory* Ed. World Scientific, Singapore, **1995**.
49. Levine, I. N. *Quantum Chemistry*, Prentice Hall: New Jersey, **1991**.
50. Claverie, P.; Daudey, J. P.; Langlet, J.; Pullman, B.; Piazzola, D.; Huron, M. J. *J. Phys. Chem.* **1978**, 82, 405.

51. Luque, F. J.; Curutchet, C.; Munoz-Muriedas, J.; Bidon-Chanal, A.; Soteras, I.; Morreale, A.; Gelpi, J. L.; Orozco, M. *Chem. Phys.* **2003**, *5*, 3827.
52. Tomasi, J.; Persico, M.; *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027.
53. Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2161.
54. Chipman, D. M. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 10129.
55. Cancès, E.; Mennucci, B. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 4744.
56. Tse, J. S. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2002**, *53*, 249.
57. Manual HyperChem Release 7, January **2002**.
58. Camargo, A. J.; Napolitano, H. B.; Oliveira, S. S. *Estudos Tecnológicos Gerais* **2006**, *32*, 1923.
59. Alcamí, M.; Mo, O.; Yanez, M. *Mass Spectrom. Review* **2001**, *20*, 195.
60. Pascoli, I. C.; Nascimento, I. R.; Lopes, L. M. X. *Phytochem.* **2006**, *67*, 735.
61. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. GAUSSIAN 2003, Revision B.04; Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, 2003.

62. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *International Agency of Research on Cancer*, Lyon, **1986**, 161.
63. Butylated hydroxytoluene (BHT). International Life Science Institute, Washington, A monograph, **2011**.
64. Goodley, P. C.; Gordon, M. *Kentucky Acad. Sci.* **1976**, 37, 11.
65. Manzoor, A.; Waqar A.; Salim, U.; Mhammad, Z.; Obai, D., Muhammad, N.; Farzanas S.; Mansoor, A. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2008**, 23, 1023.
66. Oveden, S. P.; Yu, J.; Bernays, J.; Wan, S. S.; Christophidis, L. J.; Sberna, G.; Tait, R. M.; Wildman, H. G.; Lebeller, D.; Platel, D.; May, T. W.; Meurer-Grimes, B. M. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 409.
67. El-Seedi, H. R. *Nat. Prod. Res.* **2005**, 19, 197.
68. Puapairoj, P.; Naengchomnong, W.; Kijja, A.; Pinto, M.M.; Pedro, M.; Nascimento, M. S.; Silva, A. M.; Herz, W. *Planta Med.* **2005**, 71, 208.
69. Kim, J.Y.; Lee, K.J.; Kim, D. H.; Jeong, T. C.; Lee, E. S.; Choi, Y. M.; Jeong, H. G. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, 325, 792.
70. Jeong, H. G.; Kim, H. G.; Hwang, Y. P. *Toxicol Lett* **2005**, 155, 369.
71. Ammon, H. P. *Wien Med. Wochenschr*, **2002**, 152, 373.
72. Singh, G. B.; Singh, S.; Bani, S.; Gupta, B. D.; Banerjee, S. K. *J. Pharmacol.* **1992**, 44, 456.
73. Recio, M. C.; Giner, R. M.; Manez, S.; Rios, J. L. *Planta Med.* **1995**, 61, 182.
74. Safayhi, H.; Sailer, E. R. *Planta Med.* **1997**, 63, 487.
75. Nes, W. D.; Zhou, W. *Terpenoids: Higher*, **2001**. In: Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing Group.
76. Paul M Dewick *Medicinal Natural Products Ed.* John Wiley & Sons, **2002**.
77. Vessecchi, R. *Quim. Nova* **2008**, 31, 840.

78. Alcântara, A.F.C.; Piló-Veloso, D.; Almeida, W.B.; Maltha, C.R.A.; Barbosa, L.C.A. *J. Mol. Struct.* **2006**, *791*, 180.
79. Pérez-Rebolledo, A.; Mendes, I.C.; Speziali, N.L.; Bertani, P.; Resende, J.M.; Alcântara, A.F.C.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2007**, *26*, 1449
80. Oliveira, P. M.; Pacheco, A. G.; Alves, R. B.; Piló-Veloso, D.; Raslan, D. S.; Alcantara, A. F. C. *Open Nat. Prod. J.* **2009**, *2*, 1.
81. A Search for Antibacterial Agents Pacheco, A. G.; Alcântara, A. F. C.; Abreu, V. G. C.; Corrêa, G. M. Edited by Varaprasad Bobbarala, **2012**.
82. Ikan, R. *Natural Products. A Laboratory Guide*. Academic Press, New York, **1991**.
83. Sivaprasad A.; Radha R. B.; In-Young Y.; Mark A. L.; Yujing W.; Arthur P. G.; Masaaki M.; Charles R. I.; Francis J. *Nuc. Acids Res.* **2010**, *38*, 339.

Anexos

Anexo I

Estudo fitoquímico e teste antimicrobiano do caule de *Aristolochia esperanzae*

Kuntze (Aristolochiaceae)

Vagner F. Knupp

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Av. José Cândido da Silveira, 2000, Horto, CEP 31170-000, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Alison G. Pacheco, Thiago M. Silva, Rozângela M. Manfrini, William S. T. Sallum, Lucienir Pains Duarte, Dorila Piló-Veloso e Antônio F. de C. Alcântara*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, 31260-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIMICROBIANE TEST OF THE STEM OF *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae). This work describes the studies of isolation of the chemical constituents and antimicrobian activity of the species *Aristolochia esperanzae*, which is used in the treatment of rheumatic diseases in the Brazil. IR, GC/MS and NMR (1D and 2D) analyses were employed to structural characterization of the isolated compounds from stem bark and heartwood extracts of the plant. Aristolochic acids I and II and α -cubebin were identified as previously isolated from its leaves and root extracts. Moreover, asarinin, populifolic and 2-oxo-populifolic acids, aristolactams AIa and AII, and sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranoside were firstly described in the species. Agar diffusion method and minimal inhibitory concentration test indicate positive results of asarinin and α -cubebin against *Bacillus cereus* and aristolochic acid I against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocitogenes*. These results confirm the popular use of the plant to treatment of infections related to rheumatic diseases as well as are important to develop selective antibiotics and antifungals with restricted spectrum of action.

Keywords: *Aristolochia esperanzae*, aristolochic acids, aristolactams, lignoids, diterpenes, *Bacillus cereus*.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) apresenta alta prevalência, atingindo cerca de 1% da população adulta.¹⁻³ Por ser potencialmente deformante, compromete a simetria das pequenas articulações, sendo de curso crônico e progressivo, com potencial de causar severa incapacitação física. A causa da doença é desconhecida ainda, admitindo-se que fatores genéticos e ambientais interajam para provocar uma reação imunopática.⁴⁻⁷ As drogas usadas no tratamento de AR aliviam a dor, reduzem danos às articulações ou modificam o curso da doença, porém provocam diferentes efeitos adversos e apresentam raramente remissão da doença.⁸⁻¹¹

Levantamentos etnofarmacológicos indicam o uso de extratos de *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae) no tratamento de AR.¹²⁻¹⁴ Extratos aquosos das folhas, caule e raiz dessa espécie são muito utilizados também no tratamento de diversas outras doenças.¹⁵ No entanto, o consumo de muitas plantas do gênero *Aristolochia* pode levar a nefropatia progressiva e ao câncer urotelial em humanos.¹⁶⁻¹⁸ Em razão de suas propriedades nefrotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas, a comercialização de ervas medicinais contendo extratos de *Aristolochia* são proibidos em muitos países.¹⁹ Além disso, extratos dessa planta afetam a germinação e o crescimento de sementes de *Lactuca sativa* L (alface) e *Raphanus sativus* L. (rabanete).²⁰ Essa espécie apresenta como sinonímia *Aristolochia boliviensis* O. Kuntze,²¹ é encontrada na América do Sul e conhecida popularmente no Brasil como cipó-mil-homens.²²

O gênero *Aristolochia* tem sido documentado quimicamente desde 1951,²³ apresentando terpenóides, lignóides, ácidos graxos, alcalóides, ácidos aristolóquicos e aristolactamas.²⁴⁻²⁶ A literatura registra estudos fitoquímicos das folhas e raízes de *Aristolochia esperanzae*,²⁷⁻³¹ das quais foram isolados os compostos apresentados na Figura 1. O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico do caule (cerne e cascas) de *A. esperanzae*, acompanhado por testes de atividade antimicrobiana e antifúngica de seus extratos, frações e fitoconstituintes isolados.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

Os pontos de fusão (p.f.) não corrigidos foram determinados em aparelho Mettler FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum One (ATR). As análises por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas em um cromatógrafo CG Varian 3800, acoplado a um espectrometro de massas Varian Saturno 4000. As condições de análises foram: coluna 5% fenil 95% polidimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de filme); hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min; Injetor com programação de temperatura a 250 °C com rampa de 200 °C/min até 300 °C; injeções em modo *split* de 1:15; interface operou a 300°C com energia de ionização de 70 eV. Para a amostra **ECE-3** a programação de temperatura foi: isotérmica a 300 °C por 40 min; para **ECE-4**: 50 °C por 5 min, 10 °C/min até 300 °C durante 30 min. Para as demais amostras: 80 °C, 7 min, 10 °C/min até 300 °C durante 40 min. A identificação dos componentes por CG/EM baseou-se na comparação eletrônica do padrão de fragmentação dos componentes nos espectros de massas com aqueles da biblioteca do banco de dados NIST (2005).

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Bruker DPX-200 e DRX-400 linha *AVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ (em ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo CDCl_3 como solvente.

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foram empregadas placas de vidro recobertas por sílica gel 60 G Merck com 0,25 mm de espessura e ativadas a 100 °C. Na cromatografia em coluna (CC) foram empregadas colunas de vidro de diversos diâmetros e eluição na maioria das vezes sob pressão atmosférica. As fases estacionárias utilizadas foram sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh), sílica gel 60 Merck impregnada com 5% de AgNO_3 e Sephadex LH-20.³² As frações

contendo clorofila foram tratadas com carvão ativo.³³ Luz Ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm), vapores de iodo e solução vanilina/ácido perclórico foram empregados como reveladores na CCD.

Os bioensaios foram realizados empregando-se bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus cereus* ATCC 11779) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25723 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Os fungos empregados foram *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Candida glabrata* ATCC2001 e *Candida albicans* ATCC18804.

2.2. Metodologia fitoquímica

O material vegetal de *Aristolochia esperanzae* Kutze foi coletado no Município de Esmeraldas (MG). Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número BHC B 61743. Após secagem em estufa a 50 °C e pulverização, cascas (1,21 kg) e cerne (7,00 kg) do caule foram submetidos separadamente à extração a temperatura ambiente com EtOH por 7 dias, obtendo-se os extratos concentrados das cascas (**ECA**; 189,76 g) e do cerne (**ECE**; 328,48 g).

Fracionamento de ECA

ECA foi submetido a CC de sílica gel, sendo coletadas frações eluídas em hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), EtOH e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. As frações foram reunidas em grupos após análises por CCD. As frações eluídas em hexano:DCM 9:1 (**ECA-1**) apresentaram-se como um óleo amarelo (17 mg), identificado como uma mistura de substâncias. Hexadecanoato de etila: CG/EM $t_R = 21,522$ min, m/z 284,3 [M^+], 239,3, 157,2, 101,1, 88,1, 73,1, 55,1 e 43,1. Oleato de etila: $t_R = 23,154$ min, m/z 310,4 [M^+], 264,4, 211,3, 110,2, 96,2, 83,1, 69,1 e 55,1. 15-Metil-heptadecanoato de etila: $t_R = 23,383$ min, m/z 312,3

[M⁺], 269,4, 157,2, 101,1, 88,1, 57,1 e 55,1. Ácido docosanóico: t_R = 25,034 min, m/z 340,4 [M⁺], 295,4, 157,2, 88,1, 71,1, 57,1 e 43,1. Ácido tricosanóico: t_R = 25,875 min, m/z 354,4 [M⁺], 309,3, 157,2, 88,1, 69,2, 55,1 e 43,1. (2,2-Dimetil-1,3-dioxolan-4-il)octadecanoato de metila: t_R = 27,376 min, m/z 382,5, 157,2, 101,1, 57,1, 55,1 e 41,1. 2-Metil-hexacosanoato de metila: t_R = 29,452 min, m/z 424,5 [M⁺], 157,2, 101,1, 87,1, 69,2, 57,1, 47,1 e 43,1.

As frações eluídas em hexano:DCM 1:1 (**ECA-2**) foram submetidas a refração por CC de sílica gel, sendo coletadas frações eluídas em hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações eluídas em hexano:DCM 3:1 foram submetidas a recristalização em etanol, fornecendo um sólido cristalino branco (114 mg). Asarinin (**24**)³⁷: p.f. 120,2–121,8 °C; CG/EM t_R = 53,916 min, m/z 354,2 [M⁺], 178,0, 149,0 (pico base), 135,1, 131,0 e 77,0; IV (ν_{máx}/cm⁻¹) 3090, 3025, 3010, 2950, 2910, 2890, 2835, 1650, 1630, 1610, 1515, 1505, 1480, 1405, 1265, 1280, 1050, 1030, 970, 775 e 755; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ_H 6,84 (s; H-2' e H-2''), 6,80 (m; H-6' e H-6''), 6,77 (m; H-5' e H-5''), 5,95 (s; O-CH₂-O), 4,82 (d, J=5,2 Hz; H-6), 4,39 (d, J=7,1 Hz; H-2), 4,09 (d, J=10,2 Hz; H-4β), 3,84 (m; H-8α) 3,82 (m; H-4α), 3,31 (m; H-7), 3,29 (m, H-8β) e 2,86 (m; H-3); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ_C 148,0 (C-3''), 147,7 (C-3'), 147,2 (C-4''), 146,6 (C-4'), 135,1 (C-1''), 132,3 (C-1'), 119,6 (C-2''), 118,7 (C-2'), 108,2 (C-5' e C-5''), 106,6 (C-6''), 106,4 (C-6'), 101,1 (O-CH₂-O''), 100,9 (O-CH₂-O'), 87,7 (C-2), 82,0 (C-6), 70,9 (C-4), 69,7 (C-8), 54,7 (C-3) e 50,2 (C-7).

As frações eluídas em hexano:DCM 1:3 (**ECA-3**) foram submetidas a refração por CC de sílica gel, sendo coletadas frações em hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações em hexano e hexano:DCM 1:1 foram reunidas e submetidas a fracionamento por CC de sílica impregnada com AgNO₃ (5%) e eluição em ciclohexano:AcOEt 1:1, obtendo-se um sólido branco (10 mg) constituído por dois diterpenos. Ácido pupolifólico (**25**)¹⁵: RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃) δ_C 177,8 (C-15), 144,5 (C-4), 120,5 (C-3), 46,5 (C-10), 41,4 (C-14), 38,6 (C-9), 38,2 (C-5), 36,8 (C-6), 36,3 (C-8), 35,5 (C-11), 30,9 (C-13), 29,7 (C-12), 27,5 (C-7), 26,8 (C-2), 19,9

(C-16 e C-18), 18,5 (C-20), 18,3 (C-1), 18,0 (C-19) e 16,0 (C-17). Ácido 2-oxo-pupolifólico (**26**)¹⁵: RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃) δ_C 200,9 (C-2), 178,8 (C-15), 173,0 (C-4), 125,5 (C-3), 45,7 (C-10), 41,2 (C-14), 39,9 (C-5), 38,5 (C-9), 36,2 (C-8), 35,9 (C-12), 35,6 (C-1), 35,3 (C-6), 34,9 (C-11), 30,8 (C-13), 26,9 (C-7), 19,8 (C-16) e 18,9 (C-19), 18,4 (C-18 e C-20) e 15,7 (C-17).

As frações eluídas em DCM (**ECA-4**) forneceram um sólido branco que foi submetido a refração por CC de sílica gel e eluição em DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações em DCM forneceram um sólido (8 mg). Ácido aristolóquico II (**19**)³⁷: IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) 3200-2600 (banda larga), 3153, 3056, 3026, 2919, 2794, 1682, 1662, 1621, 1509, 1478, 1428, 1375, 1363, 1320, 1263, 1186, 1166, 1039, 1004, 944, 843 e 724; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ_H 10,79 (s; CO₂H), 8,51 (d; *J*= 8,0 Hz; H-5), 7,95 (d; *J*= 7,6 Hz; H-8), 7,62 (s; H-2), 7,59-7,55 (m; H-6 e H-7); 7,12 (s; H-9) e 6,48 (s; O-CH₂-O); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ_C 168,0 (CO₂H), 148,7 (C-3), 146,7 (C-4), 135,0 (C-10), 133,9 (C-10a), 128,6 (C-8), 127,4 (C-6), 126,2 (C-5), 125,1 (C-7), 125,0 (C-4b), 123,8 (C-8a), 119,1 (C-1), 110,8 (C-4a), 105,1 (C-2), 104,2 (C-9) e 103,1 (O-CH₂-O); CG/EM t_R = 53,304 min, *m/z* 264,1, 263,2 (pico base), 237,2, 236,1, 208,9, 207,8, 178,2, 152,6, 151,2 e 131,1.

As frações eluídas em DCM:AcOEt 1:1 forneceram um sólido branco que foi submetido a refração por CC de Sephadex e eluição em MeOH, obtendo-se sucessivamente dois sólidos brancos (45 mg; **ECA-5**) e (13 mg; **ECA-6**), respectivamente. Aristolactama AII (**27**)³⁸: IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) 3300-2750 (banda larga), 3255, 3194, 2979, 1699, 1624, 1500, 1422, 1355, 1328, 1292, 1241, 1181, 1153, 1124, 1096, 1056, 1033, 984, 905, 875, 848, 803 e 753; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ_H 10,66 (s; NH), 10,14 (s; OH), 9,15 (d; *J*=8,8 Hz; H-5), 7,86 (d; *J*=7,6 Hz; H-8), 7,66 (s; H-2), 7,57-7,50 (m; H-6 e H-7), 7,06 (s; H-9) e 4,07 (s; CH₃O); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ_C 168,5 (HNC=O), 151,9 (C-3), 148,6 (C-4), 135,2 (C-10), 134,6 (C-8a), 128,5 (C-8), 126,8 (C-7), 126,6 (C-5), 126,0 (C-4b), 124,8 (C-6), 122,4 (C-10a), 121,7 (C-1), 120,3 (C-4a), 113,3 (C-2), 103,6 (C-9) e 59,2 (CH₃O); CG/EM t_R = 53,770 min, *m/z* 266,3 [M+1]⁺, 265,4 [M]⁺ (pico base),

250,6, 222,6, 166,6 e 139,6. Aristolactama AIa (**28**)³⁸: IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) 3300-2750 (banda larga), 3255, 3197, 2977, 1690, 1619, 1503, 1422, 1355, 1328, 1292, 1240, 1181, 1153, 1124, 1104, 1055, 1037, 984, 901, 868, 846, 803 e 755; RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ_{H} 10,49 (s; NH), 9,89 (s; C-3-OH), 9,10 (d, $J=9,2$ Hz; H-5), 7,90 (s; C-8-OH), 7,80 (d, $J=7,2$ Hz; H-7), 7,67 (s; H-2), 7,51 (dd, $J=9,2$ e $7,2$ Hz; H-6), 7,01 (s; H-9) e 4,07 (s; CH_3O); RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) δ_{C} 167,6 (C=O), 150,7 (C-3), 147,4 (C-4), 134,1 (C-8a e C-10), 133,4 (C-8), 127,2 (C-7), 125,6 (C-5), 124,9 (C-4b), 123,6 (C-6), 121,4 (C-10a), 120,7 (C-1), 119,1 (C-4a), 112,2 (C-2), 102,5 (C-9) e 58,1 (CH_3O).

Fracionamento de ECE

ECE foi submetido a CC de sílica gel, sendo coletadas frações eluídas em hexano, DCM, EtOH e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. As frações eluídas em DCM (**ECE-1**) foram submetidas a refractionamento por CC de sílica e eluição em hexano, DCM e AcOEt em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se um sólido cristalino branco (12 mg). (*8R*, *8'R*, *9S*)-Cubenina (**16**)³⁹: p.f. 122,7–128,0 °C; IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) 3332 (banda larga), 2948, 2926, 2897, 2781, 1608, 1495, 1484, 1439, 1365, 1356, 1238, 1185, 1118, 1096, 1037, 1006, 922 e 807; RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ_{H} 6,67 (s; H-2'), 6,66 (m; H-5 e H-5'), 6,62 (m; H-6'), 6,56 (m; H-2), 6,52 (m; H-6), 5,87 (s; O- CH_2 -O), 5,85 (s; O- CH_2 -O'), 5,15 (d, $J=13,2$ Hz; H-9), 4,03 (dd, $J=8,4$ e $4,3$ Hz; H-9' β), 3,50 (dd, $J=8,4$ e $6,1$; H-9' α), 2,90 (m; H-7a), 2,86 (sl; OH), 2,70 (m; H-7'a), 2,62 (m; H-7b), 2,50 (m; H-7'b), 2,37 (m; H-8') e 1,93 (m; H-8); RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) δ_{C} 147,7 (C-3), 147,5 (C-3'), 145,9 (C-4'), 145,7 (C-4), 134,5 (C-1'), 133,8 (C-1), 121,6 (C-6'), 121,3 (C-6), 109,3 (C-2'), 108,9 (C-2), 108,2 (C-5), 108,1 (C-5'), 108,8 (O- CH_2 -O e O- CH_2 -O'), 98,8 (C-9), 72,5 (C-9'), 51,9 (C-8), 42,9 (C-8'), 38,8 (C-7') e 33,6 (C-7).

As frações eluídas em DCM:AcOEt 9:1 (**ECE-2**) foram submetidas a refração por CC de sílica e eluição em DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se um sólido amarelo, recristalizado em MeOH (59 mg). Ácido aristolóquico I (**20**)³⁸: IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) 3200-2600 (banda larga), 1684, 1622, 1593, 1524, 1504, 1468, 1448, 1416, 1370, 1345, 1265, 1247, 1147, 1115, 1039, 997, 945, 921, 900, 803 e 722; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ_{H} 13,32 (sl; CO₂H), 8,61 (d, $J=8,4$ Hz; H-5), 8,56 (s; H-9), 7,83 (t, $J=8,4$ Hz; H-6), 7,80 (s; H-2), 7,34 (d, $J=8,4$ Hz; H-7), 6,48 (s; O-CH₂-O) e 4,05 (s; OCH₃); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ_{C} 167,5 (CO₂H), 156,1 (C-8), 146,4 (C-10), 145,9 (C-3), 145,6 (C-4), 131,4 (C-6), 129,7 (C-10a), 124,0 (C-4a), 119,4 (C-9), 118,7 (C-8a), 118,3 (C-5), 117,1 (C-4b), 116,7 (C-1), 112,0 (C-2), 108,7 (C-7), 102,8 (O-CH₂-O) e 56,1 (OCH₃); CG/EM $t_{\text{R}} = 59,980$ min, m/z 294,3, 280,8 (pico base), 252,4, 251,2, 224,3, 195,8, 163,3, 139,6 e 137,8.

As frações eluídas em DCM:AcOEt 1:4 (**ECE-3**) foram submetidas a fracionamento cromatográfico por Sephadex e eluição em MeOH, fornecendo um sólido amarelo (77 mg). Sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**29**):⁴⁰ p.f. 279,9–292,8 °C; IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) 3377 (larga), 2959, 2932, 2867, 1461, 1366, 1255, 1197, 1166, 1105, 1052, 1018 e 800; RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃) δ_{C} 140,5 (C-5), 121,2 (C-6), 100,8 (C-1'), 76,9 (C-3'), 76,8 (C-2'), 76,5 (C-3), 73,5 (C-5'), 70,1 (C-4'), 61,1 (C-6'), 56,3 (C-14), 55,3 (C-17), 49,6 (C-9), 45,2 (C-24), 41,8 (C-4 e C-13), 39,2 (C-12), 36,8 (C-1), 36,2 (C-10), 35,5 (C-20), 33,4 (C-22), 31,4 (C-8), 31,3 (C-2 e C-7), 28,7 (C-25), 27,8 (C-16), 25,5 (C-23), 24,9 (C-15), 22,6 (C-28), 20,6 (C-11), 19,8 (C-26), 19,1 (C-19), 18,6 (C-21 e C-27), 11,9 (C-29) e 11,7 (C-18); CG/EM $t_{\text{R}} = 29,980$ min, m/z 576,2 [M]⁺, 396,1, 381,1, 275,2, 255,0, 185,2, 148,1, 147,1, 142,1, 105,1, 91,0 (pico base), 81,0 e 43,0.

As frações eluídas em AcOEt (**ECE-4**) foram recristalizadas em MeOH, fornecendo um sólido branco (34 mg). Estigmastan-3,5,22-trieno (**30**): CG/EM $t_{\text{R}} = 50,936$ min, m/z 394,4 [M]⁺, 351,4, 255,2, 189,2, 145,2, 133,2, 107,2, 96,2, 93,2, 81,1 (pico base), 55.

2.3. Metodologia biológica

No teste de difusão em agar,^{34,35} as bactérias foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio infuso de cérebro e coração (BHI; 37,0 g/L) e, posteriormente, incubadas em estufa a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 0,5 mL deste material foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril constituída por soluções aquosas de NaCl (9,0 g/L) e MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L). Foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura antibiótico nº 1 (27,0 g/L) e 0,4 mL do inóculo bacteriano. Discos contendo 100 µg da amostra foram colocados nas placas com o auxílio de uma pinça estéril. Um disco contendo o controle positivo (disco impregnado com o antibiótico cloranfenicol) ou o controle negativo (disco impregnado com o solvente utilizado para solubilizar a amostra) foi colocado no centro de cada placa. As leituras dos halos de inibição foram feitas após 24 h de incubação.

No teste de concentração inibitória mínima,³⁶ as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio BHI (2,0 mL) e incubadas em estufa a 37 °C por 18 h. Em seguida, 0,5 mL desta suspensão bacteriana foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma suspensão compatível com a escala 5 de McFarland (inóculo). Para cada amostra a ser testada, foram usados 10 tubos de ensaio contendo 1,8 mL do meio de cultura BHI no tubo 1 e 1,0 mL nos demais tubos (tubos 2-10). Um volume de 200 µL da solução teste (1,025 mg de cada amostra dissolvidos em 200 µL de DMSO) foi colocado no tubo 1. Seqüencialmente, transferiu-se 1 mL do tubo 1 para o tubo 2, depois 1 mL do tubo 2 para o tubo 3 e, assim, sucessivamente. Desprezou-se 1 mL do tubo 10. Adicionaram-se 100 µL do inóculo em cada tubo de ensaio. Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 18 h. A leitura foi realizada após 18 h de incubação. Observou-se a partir de qual tubo a mistura tornara-se turva. A concentração inibitória mínima (CIM) foi atribuída àquela do tubo que não apresentou turbidez com a menor diluição, sendo, portanto, a menor concentração que inibe o crescimento da bactéria teste.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise estrutural dos fitoconstituintes isolados

O cromatograma de CG/EM de **ECA-1** revelou picos registrados em $t_R = 21,522, 23,154, 23,383, 25,034, 25,875, 27,376$ e $29,452$ min, com espectros de massas comparados ao padrões de fragmentação (banco de dados NIST) de hexadecanoato de etila, oleato de etila, 15-metil-heptadecanoato de etila, ácido docosanóico, ácido tricosanóico, (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)octadecanoato de metila e 2-metil-hexacosanoato de metila, respectivamente.

O cromatograma de CG/EM de **ECA-2** apresentou um pico registrado em $t_R = 53,916$ min, com espectro de massas comparado ao padrão de fragmentação do lignóide asarinin³⁷ (**24**, Fig. 2). O espectro de absorção na região do IV apresentou absorções pouco intensas entre 3100 e 3000 cm^{-1} atribuídas a estiramentos C–H aromático. As absorções entre 2950 e 2800 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos C–H de grupos alifáticos. As absorções nas regiões entre $1650\text{--}1610$ e $1515\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a estiramentos C=C e vibrações de anel aromático, respectivamente. As absorções intensas próximas a 1250 e 1050 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos C–O assimétricos e simétricos, respectivamente. As absorções intensas próximas a 750 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular fora do plano de C–H de grupos aromáticos. O mapa de contornos COSY revelou correlações do sinal em $\delta_H 4,82$ (H-6) com os sinais em $\delta_H 3,82$ (H-4 α) e $3,31$ (H-7) e do sinal em $\delta_H 4,09$ (H-4 β) com o sinal em $\delta_H 3,82$ (H-4 α). Além disso, correlações do sinal em $\delta_H 2,86$ (H-3) foram verificadas com os sinais em $\delta_H 4,39$ (H-2), $4,09$ (H-4 β), $3,82$ (H-4 α) e $3,31$ (H-7). O mapa de contornos HMBC revelou correlações dos sinais em $\delta_H 2,86$ (H-3), $3,82$ (H-4 α) e $4,09$ (H-4 β) com os sinais em $\delta_C 87,7$ (C-2), $82,0$ (C-6) e $50,2$ (C-7). Os sinais em $\delta_H 3,29$ (H-8 β) e $3,84$ (H-8 α) correlacionaram-se com os sinais em $\delta_C 87,7$ (C-2), $82,0$ (C-6) e $54,7$ (C-3) e o sinal em $\delta_H 3,31$ (H-7) com os sinais em $\delta_C 87,7$ (C-2) e $70,9$ (C-4). O sinal em $\delta_H 4,39$ (H-2) correlacionou-se com os sinais em $\delta_C 70,9$ (C-4) e $50,2$ (C-7) e o sinal em $\delta_H 4,82$ (H-6) com os

sinais em δ_C 69,7 (C-8), 50,2 (C-7), 106,4 (C-6'), 118,7 (C-2'), 132,3 (C-1'), 146,6 (C-4') e 147,7 (C-3'). O sinal em δ_H 5,95 (O-CH₂-O) correlacionou-se com os sinais em δ_C 146,6 (C-4''), 147,7 (C-3''), 148,0 (C-3') e 147,2 (C-4') e os sinais entre δ_H 6,84 – 6,77 (hidrogênios aromáticos) com os sinais em δ_C 87,7 (C-2) e 82,0 (C-6). O mapa de correlações NOESY apresentou correlações do sinal em δ_H 2,86 (H-3) com os sinais em δ_H 3,29 (H-8 β), 3,31 (H-7) e 3,82 (H-4 α) e o sinal em δ_H 3,29 (H-8 β) com os sinais em δ_H 4,39 (H-2) e 3,31 (H-7). O sinal em δ_H 4,09 (H-4 β) correlacionou-se com os sinais em δ_H 2,86 (H-3) e 4,39 (H-2) e o sinal em δ_H 4,39 (H-2) com os sinais em δ_H 2,86 (H-3), 3,29 (H-8 β), 3,31 (H-7) e 4,09 (H-4 β). O sinal em δ_H 4,82 (H-6) correlacionou-se com os sinais em δ_H 3,84 (H-8 α) e 2,86 (H-3). Essas correlações NOESY determinaram a configuração relativa de (+)-asarinin.³⁷

O espectro de RMN de ¹H de **ECA-3** apresentou sinais em δ_H 5,68 e 5,14 que foram atribuídos a hidrogênios alquênílicos e os sinais em δ_H 2,30 e 0,67 foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos saturados. O espectro de RMN de ¹³C e subespectro DEPT 135° revelaram dois conjuntos de sinais de intensidades diferentes: três sinais de carbonos não-hidrogenados em δ_C 200,9, atribuído a carbonila de cetona, e em δ_C 178,8 e 177,8, atribuídos a grupos carboxílicos, bem como sinais em δ_C 173,0 e 144,5 de carbonos não-hidrogenados e sinais em 125,5 e 120,5 de carbonos alquênílicos mono-hidrogenados e mais 31 sinais entre δ_C 46,5 e 15,7. O número de sinais no espectro de RMN de ¹³C e os seus valores de deslocamentos químicos sugeriram uma mistura de diterpenos, classe de compostos muito abundante no gênero *Aristolochia*.¹⁵ A comparação com dados de RMN da literatura indicou uma mistura de ácido pupolifólico¹⁵ (**25**) e ácido 2-oxo-pupolifólico¹⁵ (**26**), Figura 2.

O espectro de absorção na região do IV de **ECA-4** apresentou uma banda larga entre 3200 e 2600 cm⁻¹ característica de ácido carboxílico na forma de dímero, com várias absorções pouco intensas sobrepostas que foram atribuídas a estiramento C-H de grupos aromáticos (ν 3153, 3056 e

3026 cm^{-1}) e de grupos alifáticos (ν 2919 e 2794 cm^{-1}). A absorção em 1682 cm^{-1} foi atribuída a estiramento C=O de ácido carboxílico conjugado. As absorções em 1662 e 1621 cm^{-1} são características de estiramentos de ligação C=C aromática. As absorções em 1478 e 1320 cm^{-1} foram características de estiramentos NO_2 em nitro-compostos aromáticos. As absorções em 1263 e 1039 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos C-O-C de éteres. O espectro de massas revelou picos característicos de fragmentos do ácido aristolóquico II (**19**).^{37,45} Os picos em m/z 264,1, 237,2, 208,9 e 152,6 corresponderam aos fragmentos que perdem sucessivamente NO_2 , CO, CO e C_2O_2 . Os picos em m/z 263,2, 236,1, 207,8 e 151,2 corresponderam aos fragmentos que perdem sucessivamente HNO_2 , CO, CO, 2CO .³⁸ O mapa de contornos COSY apresentou correlações do sinal em δ_{H} 7,59-7,55 (H-6 e H-7) com os sinais em δ_{H} 8,51 (H-5) e 7,95 (H-8). O mapa de contornos HMBC revelou correlações do sinal em δ_{H} 7,12 (H-9) com os sinais em δ_{C} 125,0 (C-4b), 128,6 (C-8) e 133,9 (C-10a) e do sinal em δ_{H} 7,55 (H-7) com o sinal em δ_{C} 123,8 (C-8a). O sinal em δ_{H} 7,62 (H-2) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 133,9 (C-10a) e 146,7 (C-4) e do sinal em δ_{H} 7,95 (H-8) com os sinais em δ_{C} 104,2 (C-9) e 125,0 (C-4b). O sinal em δ_{H} 8,51 (H-5) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 110,8 (C-4a), 127,4 (C-6) e 133,9 (C-10a) e o sinal em δ_{H} 10,79 (CO_2H) correlacionou-se com o sinal em δ_{C} 119,1 (C-1). O sinal em δ_{H} 6,48 (O- CH_2 -O) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 146,7 (C-4) e 148,7 (C-3), estabelecendo a posição do carbono metilênico. O mapa de contornos NOESY apresentou correlação do sinal em δ_{H} 6,48 (O- CH_2 -O) com o sinal em δ_{H} 8,51 (H-5). O sinal em δ_{H} 7,12 (H-9) correlacionou-se com o sinal em δ_{H} 7,95 (H-8) e o sinal em δ_{H} 7,59-7,55 (H-6 e H-7), com os sinais em δ_{H} 7,95 (H-8) e 8,51 (H-5). Todas essas correlações nos mapas de contornos 2D RMN estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóquico II (**19**).³⁷

O espectro de absorção na região do IV de **ECA-5** apresentou absorções largas em 3255 e 3194 cm^{-1} características de N-H em ligação de hidrogênio. A absorção em 2979 cm^{-1} foi atribuída

a estiramento C–H de grupos alifáticos. A absorção intensa em 1699 cm^{-1} foi atribuída a estiramento C=O de lactamas. As absorções entre 1292 e 1033 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos C–O–C de grupos éteres aromáticos e alifáticos. As absorções em 984 , 875 , 848 e 803 cm^{-1} foram atribuídas a deformação angular C–C–H no plano e fora do plano de sistemas aromáticos. A absorção intensa em 753 cm^{-1} é característica de deformação angular de N–H de lactamas. O espectro de Massas revelou fragmentos propostos para os picos mais importantes da aristolactama AII (**27**).³⁸ O pico em m/z 265 correspondeu ao íon molecular e os picos em m/z 250 e 222 corresponderam aos fragmentos que perdem sucessivamente radical metila e CO.³⁷ O mapa de contornos COSY apresentou correlações do sinal em δ_{H} 7,57-7,50 (H-6 e H-7) com os sinais em δ_{H} 9,15 (H-5) e 7,86 (H-8). O mapa de contornos HMBC apresentou correlações do sinal em δ_{H} 10,66 (N-H) com os sinais em δ_{C} 121,7 (C-1), 122,4 (C-10a), 135,2 (C-10) e 168,5 (HNC=O) e do sinal em δ_{H} 10,14 (O-H) com os sinais em δ_{C} 113,3 (C-2) 148,6 (C-4). O sinal em δ_{H} 9,15 (H-5) correlacionou-se com sinais em δ_{C} 120,3 (C-4a), 126,8 (C-7) e 134,6 (C-8a). O sinal em δ_{H} 7,86 (H-8) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 103,6 (C-9), 124,8 (C-6) e 126,0 (C-4b). O sinal em δ_{H} 7,66 (H-2) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 168,5 (HNC=O), 151,9 (C-3), 148,6 (C-4) e 122,4 (C-10a) e o sinal em δ_{H} 7,57-7,50 (H-6 e H-7) com os sinais em δ_{H} 126,0 (C-4b), 126,6 (C-5) e 128,5 (C-8). O sinal em δ_{H} 7,06 (H-9) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 122,4 (C-10a), 126,0 (C-4b) e 128,5 (C-8) e o sinal em δ_{H} 4,07 (OCH₃) com o sinal em δ_{C} 148,6 (C-4). O mapa de contornos NOESY apresentou correlação do sinal em δ_{H} 10,14 (OH) com os sinais em δ_{H} 7,66 (H-2) e 4,07 (OCH₃) e do sinal em δ_{H} 10,66 (N-H) com o sinal em δ_{H} 7,06 (H-9). O sinal em δ_{H} 9,15 (H-5) correlacionou-se com os sinais em δ_{H} 7,57-7,50 (H-6 e H-7) e 4,07 (CH₃O) e do sinal em δ_{H} 7,86 (H-8) com os sinais em δ_{H} 7,57-7,50 (H-6 e H-7) e 7,06 (H-9). Todas essas correlações nos mapas de contornos 2D RMN estão de acordo com a estrutura da aristolactama AII (**27**).³⁸

O espectro de absorção na região do IV de **ECA-6** apresentou-se muito similar ao espectro correspondente de **ECA-5**. O mapa de contornos COSY de **ECA-6** revelou correlações do sinal em δ_{H} 7,51 (H-6) com os sinais em δ_{H} 9,10 (H-5) e 7,80 (H-7). O mapa de contornos HMBC apresentou correlações do sinal em δ_{H} 10,49 (N-H) com os sinais em δ_{C} 120,7 (C-1) e 121,4 (C-10a) e o sinal em δ_{H} 9,10 (H-5) com os sinais em δ_{C} 119,1 (C-4a) e 134,1 (C-8a). O sinal em δ_{H} 7,80 (H-7) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 102,5 (C-9), 123,6 (C-6) e 124,9 (C-4b) e o sinal em δ_{H} 7,67 (H-2) com os sinais em δ_{C} 147,4 (C-4) e 121,4 (C-10a). O sinal em δ_{H} 7,51 (H-6) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 124,9 (C-4b) e 127,2 (C-7) e o sinal em δ_{H} 7,01 (H-9) com os sinais em δ_{C} 121,4 (C-10a) e 124,9 (C-4b). O sinal em δ_{H} 4,07 (CH₃O) correlacionou-se com o sinal em δ_{H} 147,4 (C-4). Todas essas correlações nos mapas de contornos 2D RMN estão de acordo com a estrutura da aristolactama AIa (**28**).³⁸

O espectro de absorção na região do IV de **ECE-1** revelou uma absorção em 3332 cm⁻¹ característica de estiramento O-H. As absorções entre 3020 e 2780 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramentos de C-H de grupos aromáticos e alifáticos, respectivamente. As absorções em 1608, 1495, 1484 e 1439 cm⁻¹ foram atribuídas a vibrações C=C do esqueleto aromático. As absorções intensas entre 1238 e 1037 cm⁻¹ foram características de estiramentos C-O de éteres. As absorções em 922 e 807 cm⁻¹ foram atribuídas a deformação angular C-C-H de sistemas aromáticos. O mapa de contornos COSY apresentou correlações do sinal em δ_{H} 6,66 (H-5 e H-5') com os sinais em δ_{H} 6,62 (H-6') e 6,52 (H-6). O sinal em δ_{H} 1,93 (H-8) correlacionou-se com o sinal em δ_{H} 2,90 (H-7a) e o sinal em 4,03 (H-9' β) com os sinais em δ_{H} 3,50 (H-9' α) e 2,37 (H-8'). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,70 (H-7'a) correlacionou-se com os sinais em δ_{H} 2,50 (H-7'b) e 2,37 (H-8'). O mapa de contornos HMBC apresentou correlações do sinal em δ_{H} 6,67 (H-2') com os sinais em δ_{C} 145,9 (C-4'), 121,6 (C-6') e 38,8 (C-7') e do sinal em δ_{H} 6,56 (H-2) com os sinais em δ_{C} 145,7 (C-4), 121,3 (C-6) e 33,6 (C-7). Os sinais em δ_{H} 4,03 (H-9' β) e 3,50 (H-9' α) correlacionaram-se com os sinais

em δ_C 38,8 (C-7') e 51,9 (C-8) e o sinal em δ_H 5,15 (H-9) com os sinais em δ_C 33,6 (C-7) e 42,9 (C-8'). O sinal em δ_H 1,93 (H-8) correlacionou-se com os sinais em δ_C 72,5 (C-9'), 38,8 (C-7') e 133,8 (C-1) e o sinal em δ_H 5,87 (O-CH₂-O) com os sinais em δ_C 147,7 (C-3) e 145,7 (C-4). O sinal em δ_H 5,85 (O-CH₂-O') correlacionou-se com os sinais em δ_C 147,5 (C-3') e 145,9 (C-4'). O mapa de contornos NOESY revelou correlação entre os sinais em 1,93 (H-8) e 5,15 (H-9) e do sinal em δ_H 2,37 (H-8') com os sinais em δ_H 6,67 (H-2'), 6,66 (H-5 e H-5'), 6,62 (H-6') e 4,03 (H-9' β). O sinal em δ_H 2,50 (H-7'b) correlacionou-se com o sinal em δ_H 3,50 (H-9' α). Essas correlações estão de acordo com a estrutura de (8*R*, 8'*R*, 9*S*)-cubebina (**16**), isolada anteriormente das raízes e folhas de *A. esperanzae*.³⁹

O espectro na região do IV de **ECE-2** apresentou uma absorção larga entre 3200-2600 cm⁻¹ característica de ligação de hidrogênio de ácido carboxílico na forma dimérica. A absorção intensa em 1684 cm⁻¹ foi atribuída a estiramento C=O de ácido carboxílico em sistemas α,β -insaturados. As absorções em 1622, 1593, 1524 e 1504 cm⁻¹ são características de sistemas aromáticos. As absorções em 1468 e 1345 cm⁻¹ são características de estiramentos NO₂ em nitro-compostos aromáticos. A absorção em 1370 cm⁻¹ foi atribuída à deformação angular característica de grupos metila e as absorções entre 1268 e 1039 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramentos C-O de éteres. As absorções em 945, 921, 900, 803 e 722 cm⁻¹ foram atribuídas a deformações angulares no plano e fora do plano de C=C-H aromático. O espectro de Massas apresentou fragmentos propostos para os picos mais importantes do ácido aristolóquico I (**20**). Os picos em m/z 294,3, 252,4, 224,3, 195,8 e 137,8 corresponderam aos fragmentos que perdem sucessivamente NO₂, CO + radical metila, CO, CO, CH₂O + CO. Os picos em m/z 251,2 e 163,3 corresponderam aos fragmentos que perdem sucessivamente CO₂ + NO₂ e 2CH₂O + CO.^{38,45} O mapa de contornos COSY revelou apenas correlações do sinal em δ_H 7,83 (H-6) com os sinais em δ_H 8,61 (H-5) e 7,34 (H-7). O mapa de contornos HMBC apresentou correlação entre os sinais em δ_H 4,05 (OCH₃) e δ_C 156,1 (C-8). O

sinal em δ_H 6,48 (O-CH₂-O) correlacionou-se com os sinais em δ_C 145,9 (C-3) e 145,6 (C-4) e o sinal em δ_H 7,34 (H-7) com os sinais em δ_C 118,3 (C-5) e 118,7 (C-8a). O sinal em δ_H 7,80 (H-2) correlacionou-se com os sinais em δ_C 116,7 (C-1), 145,6 (C-4), 145,9 (C-3) e 167,5 (CO₂H) e o sinal em δ_H 7,83 (H-6) com o sinal em δ_C 156,1 (C-8). O sinal em δ_H 8,56 (H-9) correlacionou-se com os sinais em δ_C 156,1 (C-8), 146,4 (C-10), 129,7 (C-10a) e 117,1 (C-4b) e o sinal em δ_H 8,61 (H-5) com os sinais em δ_C 118,7 (C-8a) e 108,7 (C-7). O mapa de contornos NOESY revelou correlações do sinal em δ_H 4,05 (OCH₃) com os sinais em δ_H 8,56 (H-9) e 7,34 (H-7) e o sinal em δ_H 7,83 (H-6) com os sinais em δ_H 7,34 (H-7) e 8,61 (H-5). Essas correlações estão de acordo com a estrutura do ácido aristolóquico I (**20**), isolada anteriormente das raízes e folhas de *A. esperanzae*.³⁹

O espectro na região do IV de **ECE-3** apresentou uma absorção larga em 3377 cm⁻¹ característica de estiramento de grupo O-H apresentando ligação hidrogênio. As absorções em 2959, 2932 e 2867 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramentos C-H de grupos alifáticos. As absorções em 1461 e 1366 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramentos C-C e deformações angulares C-C-H de grupos alquilas. As absorções intensas em 1255, 1197, 1166, 1105 e 1052 cm⁻¹ foram características de estiramentos C-O de éteres e álcoois. A análise elementar foi realizada e os valores encontrados (C: 70,55%; H: 10,36%; O: 19,09%) apresentaram-se próximos aos valores calculados para o sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**29**) (C: 70,58%; H: 10,58%; O: 18,82%). O espectro de RMN de ¹H revelou um sinal característico em δ_H 5,20 de hidrogênio alquênico. Vários sinais foram registrados entre δ_H 4,8 e 4,20, característicos de átomos de hidrogênios de grupos hidroxila, e vários sinais entre δ_H 3,7 e 2,8, característicos de átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono carbinólicos. Os sinais sobrepostos na região entre δ_H 2,5 e 0,8 indicaram um alto conteúdo de átomos de hidrogênio alifáticos. Os dados de RMN de ¹³C são semelhantes aos descritos na literatura para sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**31**).⁴⁰

A identificação estrutural de **ECE-4** baseou-se na comparação eletrônica do padrão de fragmentação dos componentes nos espectros de massas com aqueles da biblioteca do banco de dados NIST (2005). O espectro de massas apresentou picos característicos de fragmentos relativos à estigmastan-3,5,22-trieno (**30**),^[Ref] sendo o pico do íon molecular registrado em m/z 394,4.

Atividade Antimicrobiana

Testes de difusão em ágar e de concentração inibitória mínima (CIM) de **ECA** e **ECE** foram realizados frente a diferentes espécies de bactérias e fungos. Esses extratos não apresentaram atividade bactericida frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Por outro lado, os extratos apresentaram atividades bactericidas significativamente expressivas frente a *Bacillus cereus* (CIM = 256 µg/mL), contaminante comum do solo, água e alimentos, sendo sua toxina a causa de infecção gastrointestinal e desidratação.⁴¹ Uma variedade de infecções, tal como as infecções hospitalares, pode ser causada por *S. aureus*, sabendo-se que a resistência às drogas utilizadas aumenta sua virulência, transformando os quadros em ainda mais graves, como a pneumonia necrosal e toxicidade neonatal, nos casos de resistência a oxacilina.^{42,43}

O fracionamento cromatográfico dos extratos foi biomonitorado por testes de atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, empregando os sistemas eluentes: hexano, hexano:DCM (9:1), hexano:DCM (3:1), hexano:DCM (1:1), DCM, DCM:AcOEt (1:1), DCM:AcOEt (1:3), AcOEt, AcOEt:EtOH (1:1), EtOH e MeOH. Os testes de halo de inibição apresentaram-se positivos apenas para as respectivas frações dos dois extratos eluídas em hexano:DCM (1:1) e DCM, ambas com CIM = 512 µg/mL. Asarinin (**24**) e cubenina (**16**) foram isoladas nessas frações do estudo fitoquímico de **ECA** e **ECE**, respectivamente.

Os testes microbiológicos de halo de inibição de **24** e **16** foram negativos contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*. De forma semelhante ao observado para os extratos, **24** e **16** apresentaram atividades bactericidas significativamente expressivas e seletivas contra *B. cereus* (CIM = 256 e

512 µg/mL, respectivamente). Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação não é por toxicidade, mas envolve fatores que afetam somente o *B. cereus*, apresentando-se muito importante para o desenvolvimento de antibióticos seletivos e de curto espectro de ação.

Com exceção do ácido aristolóquico I (**20**), as outras substâncias isoladas a partir do estudo fitoquímico de **ECA** e **ECE** não apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *Citrobacter freundii* e *Listeria monocytogenes* e nem atividade antifúngica contra *Candida glabrata* e *Candida albicans*. O ácido aristolóquico I (**20**) apresentou resultados positivos contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* (CIM = 256 e 128 µg/mL, respectivamente). A *L. monocytogenes*, um microorganismo patogênico, também classificado como um problema de saúde pública pelo difícil diagnóstico, pode conduzir a pneumonia, encefalite e meningite, adulta e neonatal, sendo de grande risco aos grupos de imunocomprometidos como aidéticos, diabéticos e transplantados.⁴⁴

Para avaliar a possibilidade de sinergismo entre **24** e **16**, foram realizados testes de concentração inibitória mínima de misturas constituídas por diferentes proporções dessas substâncias frente a *B. cereus*. As misturas de **24:16** nas proporções 0,4, 1,1 e 1,9 resultaram em CIM = 256, 512 e 512 µg/mL, respectivamente. Esses resultados indicam ausência de sinergismo e maior atividade de **24** frente a *B. cereus*. Os resultados de atividade antimicrobiana dos extratos, frações e fitoconstituintes de *A. esperanzae* estão de acordo com o uso da espécie pela população nos casos de AR.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro. Os autores agradecem a profa. Dra. Jacqueline Takahashi do Departamento de Química da UFMG pelas sugestões e comentários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Foye, W. O.; Lemke; T. L.; Willians, D. A.; *Principles of Medicinal Chemistry*, Willians & Wilkins, Philadelphia, 1990.
2. Chandrasoma, P.; *Patologia Básica*, Prentice Hall do Brasil, 1993.
3. Hemminki, K.; Li, X.; Sundquist, J.; Sundquist, K.; *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 661.
4. Houri, J. M.; O'Sullivan, F. X.; *Curr. Opin. Rheumatol.* **1995**, *7*, 201.
5. Alarcón, G. S.; *The Am. J. Med.* **1997**, *103*, 19S.
6. Edwards, C.; *Medicine* **2005**, *33*, 1.
7. Garrett, R. H.; Grisham, C. M.; *Biochemistry*, Saunders College Publishing, Orlando, 1995.
8. Britton, C. A.; Wasko, M. C.; *Semin. Roentgenol.* **1996**, *31*, 198.
9. Bernatsky, S.; Hudson, M.; Suissa, S.; *Rheumatology* **2007**, *46*, 1157.
10. Brooks, P. M.; Rheumatoid Arthritis; *Medicine* **2006**, *34*, 379.
11. American College of Rheumatology ad hoc Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis; *Arthritis Rheum.* **1996**, *39*, 713.
12. Stasi, D.; Cláudio, L.; *Plantas Medicinais na Amazônia I*, UNESP, São Paulo, 1989.
13. Marc, E. B.; Nelly, A.; Annick, D. D.; Frederich, D.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 315.
14. Adams, M.; Berset, C.; Kessler, M.; Hamburger.; *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *121*, 343.
15. Pacheco, A. G.; Oliveira, P. M.; Piló-Veloso, D.; Alcântara, A. F. C.; *Molecules* **2009**, *14*, 1245.

16. Meinl, W.; Pabel, U.; Osterloh-Quiroz, M.; Hengstler, J. G.; Glatt, H.; *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 1090.
17. Martinez, M. -C. M.; Nortier, J.; Vereerstraeten, P.; Vanherweghem, J. -L.; *Nephrol Dial. Transplant.* **2002**, *17*, 408.
18. Cheng, C. L.; Chen, K. J.; Shih, P. H.; Lu, L. Y.; Hung, C. F.; Lin, W. C.; Gu, J. Y.; *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 236.
19. Poon, W. T.; Lai, C. K.; Chan, A. Y. W.; *Hong Kong J. Nephrol.* **2007**, *9*, 7.
20. Gatti, A. B.; Perez, S. C. J. G. A.; Lima, M. I. S.; *Acta Bot. Bras.* **2004**, *18*, 459.
21. Hoene, F. C.; *Flora Brasílica: Aristolochiaceas* **1942**, *15*, 6.
22. Correa, M. P.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978.
23. Schindler, H.; *Arzneim. Forsch.*; **1951**, *1*, 7.
24. Wu, K. M.; Farrelly, J. G.; Upton, R.; Chen, J.; *Phytomedicine* **2007**, *14*, 273.
25. Palmeira Júnior, S. F.; Conserva, L. M.; Corrêa, M. S. S.; Guilhon, G. M. S. P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 701.
26. Silva-Brandão, K. L.; Solferini, V. N.; Trigo, J. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 291.
27. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2781.
28. Francisco, C. S.; Messiano, G. B.; Lopes, L. M. X.; Aristeu G. Tininis, A. G.; Oliveira, J. E.; Capellari Jr., L.; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 168.
29. Wu, T. S.; Damu, A. G.; Su, C. R.; Kuo, P. C.; *Nat. Prod. Red.* **2004**, *21*, 594.
30. Connolly, J. D., Ed.; Newman, A. A.; *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*, Academic Press, London, 1972.
31. Lopes, L. M. X.; Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M.; *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 657.
32. Reid, R. G.; Sarker, S. D.; In *Natural Products Isolation*; Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A. I., eds.; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, 2006, cap. 5.

33. Jones, W. P.; Kinghorn, A. D.; In *Natural Products Isolation*; Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A. I., eds.; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, 2006, cap. 13.
34. Takahashi, J. A.; Pereira, C. R.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D.; Silva, L. G. F. E.; *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 21
35. Gavin, J. J.; *Appl. Microbiol.* **1957**, *5*, 25.
36. Lana, E. J. L.; Carazza, F.; Takahashi, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2053.
37. Agrawal, P. K.; Thakur, R. S.; *Magn. Reson. Chem.* **1985**, *23*, 389.
38. Priestap, H. A.; *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 460.
39. Pascoli, I. C.; Nascimento, I. R.; Lopes, L. M. X.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 735.
40. Costa, H. N. R.; Santos, M. C.; Alcântara, A. F. C.; Silva M. C.; França, R. C.; Piló-Veloso, D.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 744.
41. Kotiranta, A.; Kari Lounatmaa, K.; Markus Haapasalo, M.; *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 189.
42. Deurenberg, R. H.; Stobberingh, E. E.; *Infect. Genetics Evol.* **2008**, *8*, 747.
43. Mee-Marquet, N. V.; Blanchard, M.; Domelier, A. -S.; Quentin, R.; *Pathol. Biologie* **2004**, *52*, 579.
44. McLauchlin, J.; Mitchell, R. T.; Smerdon, W. J.; Jewell, K.; *Int. J. Food Microbiol.*, **2004**, *92*, 15.
45. Priestap, H. A.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 519.

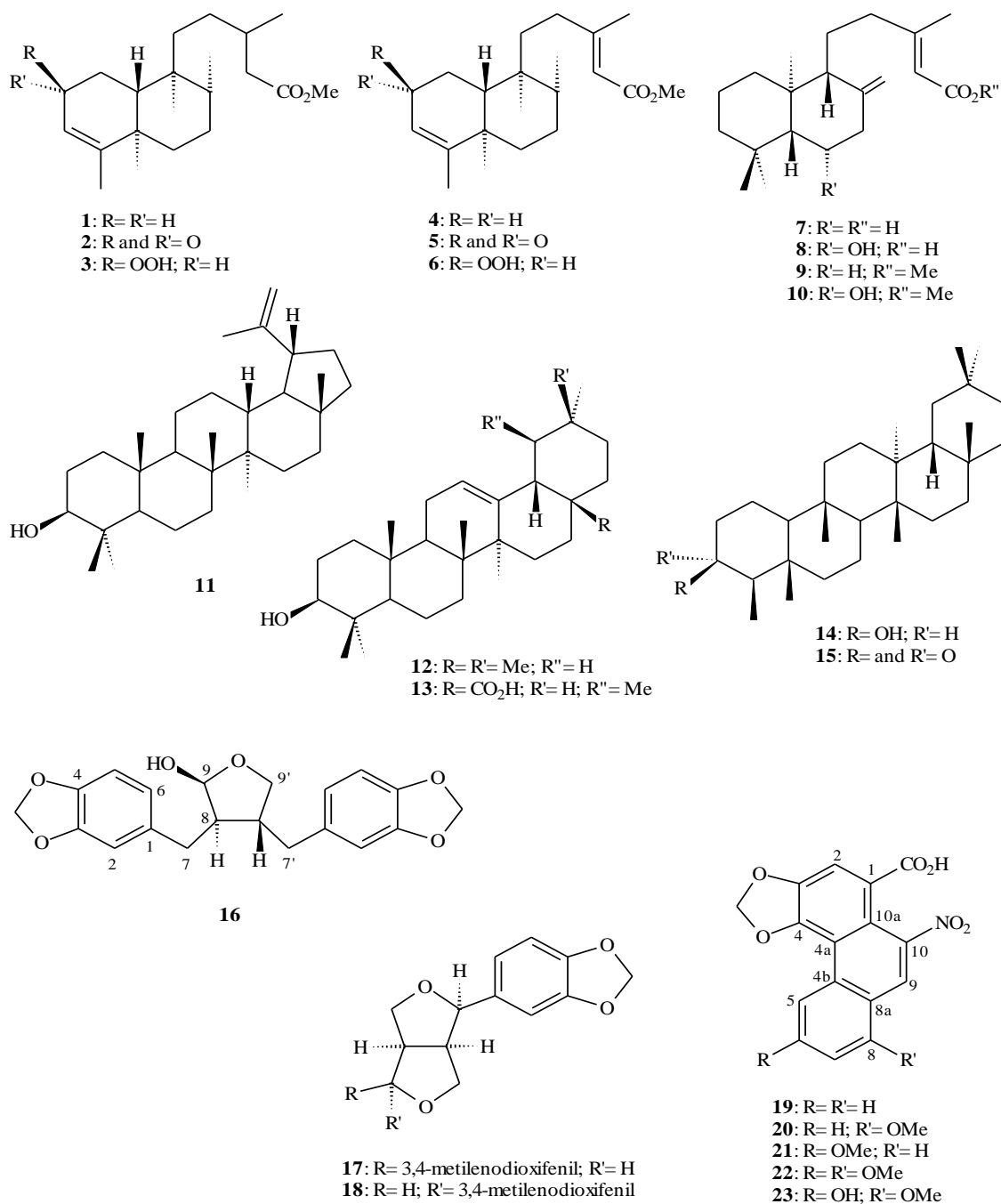


Figura 1. Diterpenos (1–10), triterpenos (11–15), lignóides (16–18) e ácidos aristolóquicos (19–23) isolados previamente das folhas e raízes de *Aristolochia esperanzae*.

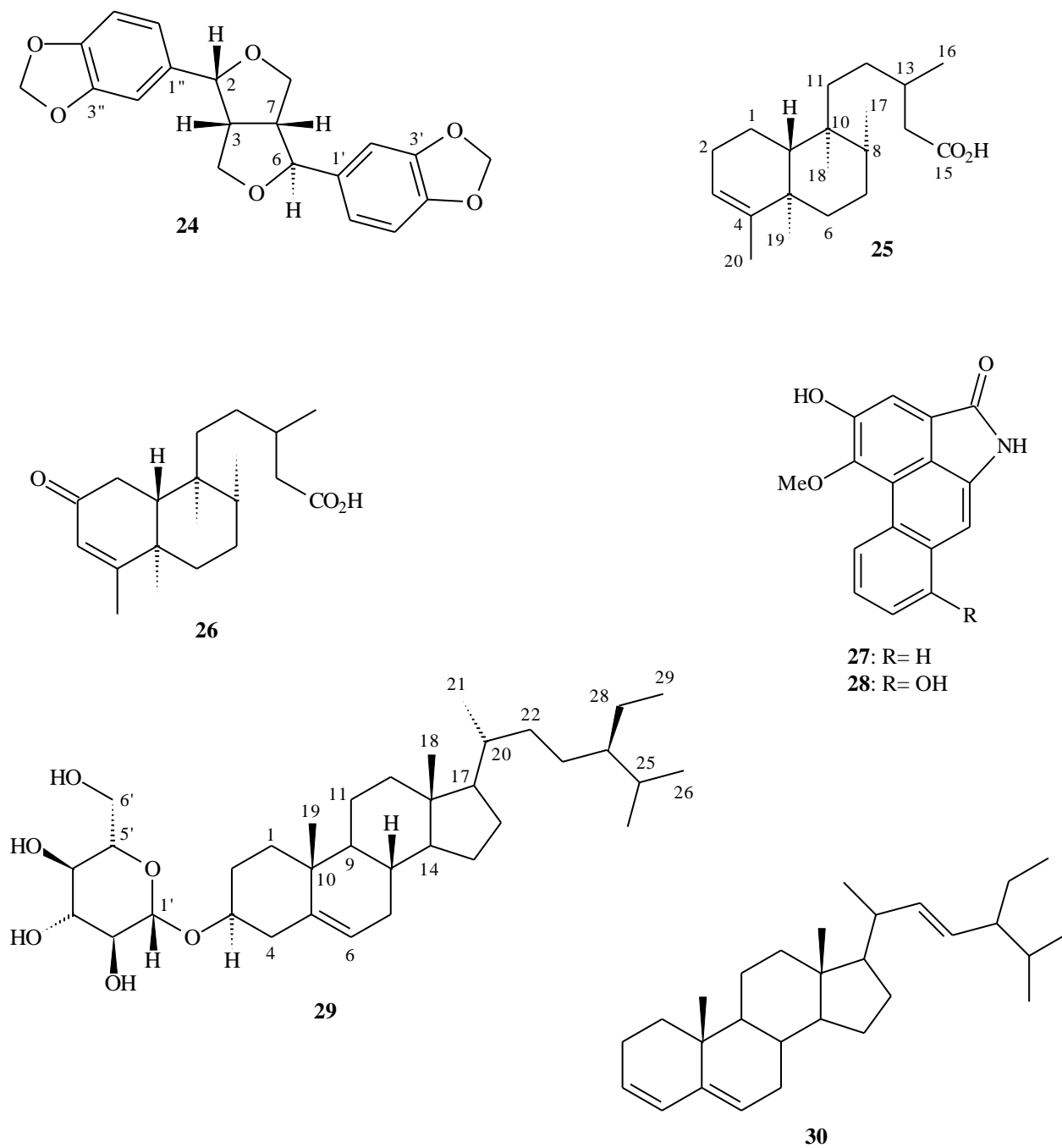


Figura 2. Lignóide (**24**), diterpenos (**25** e **26**), aristolactamas (**27** e **28**) e esteróides (**29** e **30**) isolados pela primeira vez nas cascas e cerne do caule de *Aristolochia esperanzae*.

Anexo II

Structural analysis of aristolochic acids and aristolactams by correlations between calculated carbon chemical shift and ^{13}C NMR data

Alison G. Pacheco¹, Viviane C. Abreu, Heitor A. De Abreu, Dorila Piló-Veloso, Antônio F. de C.

Alcântara

Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

¹ Mail address: Departamento de Química, ICEx, UFMG. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte - MG. E-mail: alisonpacheco@qui.mest.ufmg.br

Abstract

Aristolactam AII (**1**) and aristolochic acid I (**2**) were employed as examples to choose the most suitable theoretical methodology for computing calculated carbon chemical shifts (σ_C) and structural elucidations of these classes of natural products. HF and DFT (BLYP, B3LYP, and PBE)/6-311++G** optimized geometries of **1** and **2** were submitted to σ_C calculations and correlated to their ^{13}C NMR data. Different possibilities were considered (in the gaseous phase, model PCM (DMSO), and for dimeric systems **1-1** and **2-2**), but an explicit solvent (DMSO) model employing BLYP/6-31G* calculations was more efficient ($R^2 = 0.99631$ and 0.97713 , respectively).

Keywords: *Aristolochia esperanzae*, aristolochic acids, aristolactams, ^{13}C NMR data, carbon chemical shift calculations.

1. Introduction

Aristolochia, a genus of the Aristolochiaceae family, consists of about 400 species mostly distributed along tropical and subtropical regions of Asia, Africa, and South America [1]. In spite of the fact that extracts of some *Aristolochia* species conduce to progressive nephrophathy and urothelial cancer in humans [2,3], these species show a large popular use to treatment of several diseases [4,5]. Alkaloids, quinones, coumarins, flavanoids, lignoids, and terpene derivatives have been usually isolated from *Aristolochia* species [6]. However, the most characteristic compounds in this genus are aristolactams and aristolochic acids [7], which are structurally represented by aristolactam AII (**1**) and aristolochic acid I (**2**) in Figure 1. The literature describes a large amount of different structures of aristolactam and aristolochic acid derivatives because all positions on the phenanthrene skeleton may be substituted by hydroxyl and methoxyl groups. These structures may be also glycosylated for different carbohydrates on C-3. Moreover, C-5 and C-6 may be bonded to methyl or ethyl group [8].

The ^{13}C NMR spectra of aristolactams and aristolochic acids show several superposed signals at δ_{C} 155–145 and 130–120, characteristic of oxygenated aromatic and hydrogenated aromatic carbon atoms, respectively [9]. As consequence, their structural identifications often become quite uneasy. In these cases, the structural elucidations have been usually based on 1D and 2D NMR spectroscopy, followed by comparison with NMR data of aristolactams and aristolochic acids described in the literature [10]. However, there are not compilations of ^{13}C NMR data of these compounds such as described to pentacyclic triterpenes [11] and terpenes [12].

Alternatively an increasing amount of studies correlating calculated and experimental NMR data has substantially contributed to structural elucidation and investigation of the chemical properties of several organic compounds [13-15]. In same case, chemical shift calculations may provide better informations about conformational analysis than geometry optimization calculations

[16]. However, it is not described in the literature a methodological systematization for the choice of the most suitable theoretical method for computing calculated carbon chemical shifts of aristolactams and aristolochic acids. The choice of the theoretical method is usually based on the disposed amounts of computer CPU time, memory, and disk space. Hartree Fock calculations (HF) are the most used theoretical method in which the net effect of the Coulombic electron-electron repulsion is included in the calculation. The energies from HF calculations are always greater than the exact energy and tend to a limiting value called the Hartree Fock limit. The Möller-Plesset perturbation theory (MP n , where n is the order of correction) considers further corrections for the explicit electron-electron repulsion, but requires high-performance computers. An alternative *ab initio* method is the Density Functional Theory (DFT), in which the total energy is expressed in terms of the total electron density, rather than the wavefunction.

The present work describes the use of carbon chemical shift calculations to structural elucidation of aristolactams and aristolochic acids. Different levels of theory were employed and the solvent effects were also considered to geometry optimizations and carbon chemical shift calculations of **1** and **2**. These compounds were isolated by us from the ethanol extract of the stem of *Aristolochia esperanzae* and their structures were identified by 1D and 2D NMR [17].

2. Computational details

Theoretical studies were carried out using software package Gaussian 03 [18]. The geometries previously obtained from PM3 semi-empirical calculations were used as initial models in geometry optimizations employing HF, DFT, and MP2 calculations [19] with the Pople's split valence base sets 6-31G*, 6-31G**, 6-311G*, 6-311G**, 6-311+G**, and 6-311++G**. BLYP, B3LYP, and PBE functionals were used in DFT calculations [20-25]. The optimized geometries were characterized as true minima on the potential energy surface (PES) when all harmonic frequencies

were real. Structural analyses of **1** and **2** were based on optimized geometries from HF, DFT (BLYP, B3LYP, and PBE), and MP2 calculations with a larger basis set comprising polarization and diffuse functions, i.e., 6-311++G**. This basis set leads to bond lengths that are in much better accord with experiment than all other smaller basis sets [26,27]. MP2 calculations usually give more satisfactory geometries than DFT calculations [28] and, consequently, the geometries obtained from MP2/6-311++G** calculations were considered in the present work as reference to structural analyses of **1** and **2**. HF calculations usually overestimate bond lengths in relation to DFT and MP2 calculations [29-31]. On the contrary, HF calculations may underestimate bond lengths for some organic or inorganic molecules [32].

The electronic-nuclear energy (E) of the optimized geometries was given in atomic unit (Hartree). The Mulliken electron densities were given in electron unit (e). The Polarizable Continuum Model (PCM) as implemented in the package Gaussian 03 was taken into account to investigate solvent effects (DMSO, $\epsilon = 46.7$) on the geometry optimizations using BLYP/6-31G* calculations [33]. The solvent effect was also investigated by use of an explicit solvent model. In this case the DMSO molecule was randomly placed close to the functionalized sites of **1** and **2**. The geometries of the corresponding systems were previously obtained by PM3 semi-empirical calculations and used as initial models to further BLYP/6-31G* geometry optimizations [34].

The optimized geometries were used to carbon chemical shift calculations at the same levels of theory. Values of calculated carbon chemical shift (σ_C) were determined in relation to corresponding calculated values for tetramethylsilane, as shown in Table 1. The ^{13}C NMR data were previously described in the literature [17]. Correlations between σ_C values and experimental carbon chemical shifts (δ_C) were obtained using software package OriginTM Standard 7.5. The σ_C and δ_C values were plotted on the x and y axes, respectively. The σ_C/δ_C correlation curves were

given as linear fits with correlation coefficients (R^2) and slope of the R^2 curve (α) furnished by the program.

Results and Discussion

Geometry optimizations of aristolactam **1** were carried out using HF and DFT (BLYP, B3LYP, and PBE) calculations with the basis set 6-311++G** and compared to corresponding structural parameters obtained from MP2/6-311++G** calculations. The optimized geometries of **1** show completely planar structures, indicating π -electron delocalization on the phenanthrene skeleton that also involves the lactam group and oxygen atoms at C-3 and C-4. The literature describes that B3LYP and MP2 calculations provide results in good agreement for other organic structures [35]. In fact B3LYP/6-311++G** and MP2/6-311++G** optimized geometries of **1** show high bond length correlations ($R^2 = 0.98687$; $\alpha = 0.92870$). However, the best correlation coefficient of **1** was verified between PBE and MP2 calculations ($R^2 = 0.99101$; $\alpha = 0.98133$).

The HF calculations show that the main bond length (MBL) of the ring A (MBL = 1.389 Å) is lower than corresponding values obtained from BLYP, B3LYP, PBE, and MP2/6-311++G** calculations (MBL = 1.413, 1.401, 1.409, and 1.406 Å, respectively) †

‡. Similar results are verified to MBL values of the ring C (MBL = 1.394, 1.415, 1.404, 1.411, and 1.410 Å) and ring B (MBL = 1.415, 1.432, 1.421, 1.427, and 1.423 Å), values obtained from HF, BLYP, B3LYP, PBE, and MP2/6-311++G** calculations, respectively. HF calculations underestimate the bond lengths and, as consequence, the aromaticity of **1** is overestimated, mainly on the rings A and C. The MBL values of the ring B are significantly higher than corresponding values of the rings A and C. The lower aromaticity of the ring B in all theoretical calculations is also supported by the bond length alternations in this ring [36]. Some bond lengths (ℓ) in the ring B are contracted ($\ell_{C-9,C-10} = 1.367$ Å, by MP2/6-311++G** calculations) and others are expanded (ℓ_{C-

$l_{4a,C-4b} = 1.457 \text{ \AA}$ and $l_{C-8a,C-9} = 1.445 \text{ \AA}$, by MP2/6-311++G** calculations). In fact phenanthrene undergoes additions on the ring B better than ring A and C. This regiospecific reactivity of the ring B has been associated with its lower aromaticity.

All the geometries optimized with 6-311++G** basis set showed that the Mulliken electron density (q) on the ring A ($q = -0.03, +0.196, +0.151, \text{ and } +0.162, \text{ and } +0.058 \text{ e}$, respectively) is lower in relation to the ring C ($q = -0.235, -0.468, -0.324, -0.350, \text{ and } -0.453 \text{ e}$, respectively). Both the rings are significantly more electron rich compared to the ring B ($q = +1.914, +1.447, +1.610, +1.547, \text{ and } +2.040 \text{ e}$, respectively). Thus, the structure of **1** presents the rings A and C (electron rich regions) as two π -systems isolated from each other by the ring B (electron-poor region). These results also suggest higher aromaticity on the rings A and C in relation to the ring B. However, BLYP/6-31G* orbital population calculations of **1** (Figure 2) show that all frontier occupied molecular orbitals (except HOMO-3) present concomitant contributions of atoms of the rings A, B and C. As consequence the electron circulations involving the three rings at the same time may be related to the aromaticity over the entire skeleton of **1**. Another detail in Figure 2 is the expressive contribution of atoms in the lactam group on all frontier occupied molecular orbitals which is in agreement with the completely planar structure of **1**.

Carbon chemical shift calculations were carried out to optimized geometries of **1** using the same levels of theory, for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions. Table 2 shows the σ_C/δ_C correlation coefficients of **1** using different levels of theory. The theoretical calculations provided high correlation coefficients which were not significantly affected by the basis set employed. The lowest correlation coefficient was obtained from HF/6-311G** calculations ($R^2 = 0.97564$) and the highest one from B3LYP/6-31G* calculations ($R^2 = 0.99376$). Thus, B3LYP/6-31G* calculations without considering polarization and diffuse functions can be adequately employed to carbon chemical shift calculations of **1**.

The BLYP/6-31G* provided the lowest correlation coefficient among the DFT calculations ($R^2 = 0.98316$, as seen in Table 2). So, further theoretical investigations were performed for **1** using the same level of theory. The solvent effect (DMSO) on the chemical properties of **1** was assessed using the model PCM and BLYP/6-31G* calculations. PCM(DMSO)/BLYP/6-31G* optimized geometry of **1** was employed to BLYP/6-31G* carbon chemical shift calculations. In spite of this compound to show low dielectric constant ($\mu = 2.5305$ Debye, by MP2/6-311++G** calculations), the corresponding σ_C/δ_C correlation coefficient of **1** from PCM calculations ($R^2 = 0.99553$) was higher in relation to obtained results at the same level of theory for structure in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions ($R^2 = 0.98316$), see Table 2. As consequence, the PCM(DMSO)/BLYP/6-31G* calculations induce small structural alterations in relation to BLYP/6-31G* optimized geometry of **1**, but have significant effect on the σ_C/δ_C correlations.

The solvent effect was also investigated by use of an explicit solvent model employing BLYP/6-31G* calculations. Two systems **1**-DMSO were investigated: **1-DMSO-a** (with the DMSO molecule placed close to oxygen atoms at C-3 and C-4) and **1-DMSO-b** (with the DMSO molecule closer to the nitrogen and oxygen atoms of the lactam group). BLYP/6-31G* optimized geometries of **1-DMSO-a** and **1-DMSO-b** show lower energies ($\Delta E = -12.74$ and -12.05 kcal/mol, respectively) in relation to isolated components, i.e., **1** ($E = -896.46017841$ a.u.) and DMSO ($E = -553.10250336$ a.u.).

BLYP/6-31G* carbon chemical shift calculations were carried out to **1-DMSO-a** and **1-DMSO-b**. Both the systems showed higher σ_C/δ_C correlation coefficients ($R^2 = 0.99626$ and 0.99631) in relation to correlation coefficient obtained from geometry of **1** optimized in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions ($R^2 = 0.98316$), see Table 2. As consequence the explicit solvent model was more efficient in relation to PCM model to carbon chemical shift calculations.

BLYP/6-31G* geometry optimizations were carried out to the dimeric system of **1** which considers interactions between the lactam group of a molecule of **1** with the hydroxyl group of another molecule. The BLYP/6-31G* optimized geometry of **1-1** shows an energy ($E = -1792.94846371$ a.u.) which is lower than the energy from two isolated molecules of **1** ($\Delta E = -17.64$ kcal/mol). The σ_C/δ_C correlation coefficient of **1-1** ($R^2 = 0.99616$) is higher than the corresponding correlation coefficient at the same level of theory which was obtained for the monomer of **1** ($R^2 = 0.98316$), as shown in Table 3.

Similarly, geometry optimizations of the aristolochic acid **2** were carried out using HF, DFT (BLYP, B3LYP, and PBE), and MP2 calculations with the basis set 6-311++G**. The best bond length correlations of **2** were also verified between values obtained from PBE and MP2 calculations ($R^2 = 0.98854$; $\alpha = 0.95808$). The optimized geometries of **2** show a planar structure of the phenanthrene skeleton and oxygen atoms at C-3, C-4 and C-8. However, the MP2/6-311++G** calculations show that the dihedral angles H-9, C-9, C-10, N (angle ϕ) and H-2, C-2, C-1, C-1' (angle ϕ) are 6.43 and 7.40 degrees, respectively. As consequence the carboxylic acid and nitro groups in **2** may present lower contributions to π -electron delocalization on the aromatic skeleton than the lactam group in **1**. In fact the BLYP/6-31G* calculated orbital populations of **2** show small contributions of atoms in the acid and nitro groups on the frontier occupied molecular orbitals which have contributions of atoms in the phenanthrene skeleton.

The HF, DFT (BLYP, B3LYP, and PBE), and MP2/6-311++G** optimized geometries of **2** show similar structural parameters in relation to **1**. Thus, HF calculations overestimate the aromaticity of **2**. The MBL values suggest higher aromaticity of the ring A (MBL = 1.391, 1.416, 1.404, 1.411, and 1.409 Å, respectively) and ring C (MBL = 1.393, 1.415, 1.404, 1.411, and 1.409 Å, respectively) in relation to the ring B (MBL = 1.418, 1.435, 1.424, 1.429, and 1.425 Å, respectively). The ring B of **2** also shows bond length alternations ($\ell_{C9,C10} = 1.365$ Å, $\ell_{C4a,C4b} =$

1.452 Å, and $\ell_{C4a,C10a} = 1.446$ Å, by MP2/6-311++G** calculations). The theoretical calculations show that the electron rich regions are the ring A ($q = +0.401, -0.123, -0.147,$ and $-0.170,$ and $+0.389$ e, respectively) and ring C ($q = -0.714, -0.484, -0.518, -0.708,$ and -0.797 e, respectively), while the ring B ($q = +0.349, +1.012, +1.092, +1.083,$ and $+0.844$ e, respectively) is an electron-poor region. These results also indicate higher aromaticity on the rings A and C in relation to the ring B of **2**.

Table 3 shows the σ_C/δ_C correlation coefficients of **2** using different levels of theory, for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions. The theoretical calculations did not provide high σ_C/δ_C correlation coefficients and were not significantly affected by the employed basis set. The HF calculations provided low correlation coefficients ($R^2 \sim 0.90$) in relation to the other calculations ($R^2 \sim 0.95$). The lowest correlation coefficient was obtained from HF/6-311++G** calculations ($R^2 = 0.89429$). The higher correlation coefficient for **2** was obtained from PBE/6-311G* calculations ($R^2 = 0.95393$). As consequence the HF and DFT methods were not appropriate to carbon chemical shift calculations of **1**, for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions.

The PCM(DMSO)/BLYP/6-31G* optimized geometry of **1** was submitted to BLYP/6-31G* carbon chemical shift calculations. The σ_C/δ_C correlation coefficient of **2** ($R^2 = 0.94838$) was also very similar to **2** obtained from the same level of theory for the structure in the gaseous phase without considering intermolecular interactions ($R^2 = 0.94783$), see Table 3. In spite of the higher dielectric constant of **2** in relation to **1** ($\mu = 8.6015$ and 2.5305 Debye, respectively, by MP2/6-311++G** calculations), the former did not show a significant solvent effect on the σ_C/δ_C correlations using the PCM model.

The solvent effect on the σ_C/δ_C correlations of **2** was investigated by use of an explicit solvent model employing BLYP/6-31G* calculations. Four systems **2**-DMSO were proposed: **2**-DMSO-a

(with the DMSO molecule placed close to carboxylic acid and nitro groups), **2-DMSO-b** (with the DMSO molecule closer to methoxyl group at C-8), **2-DMSO-c** (with the DMSO molecule closer to oxygen at C-4), and **2-DMSO-d** (with the DMSO molecule closer to oxygen at C-3). BLYP/6-31G* geometry optimizations indicated that **2-DMSO-a** shows lower energy in relation to **2-DMSO-b**, **2-DMSO-c**, and **2-DMSO-d** ($\Delta E = -9.34$, -10.96 , and -8.89 kcal/mol, respectively). All systems show lower energies ($\Delta E = -14.25$, -4.91 , -3.29 , and -5.36 kcal/mol, respectively) in relation to their isolated components, i.e., **2** ($E = -1235.31373336$ a.u.) and DMSO ($E = -553.10250336$ a.u.).

BLYP/6-31G* carbon chemical shift calculations were carried out to the previous optimized geometries of **2-DMSO-a** to **2-DMSO-d**. All systems showed higher σ_C/δ_C correlation coefficients ($R^2 = 0.96872$, 0.9744 , 0.97774 , and 0.97713 , respectively) in relation to correlation coefficient of **2** obtained from BLYP/6-31G* for structure in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions ($R^2 = 0.94783$) using BLYP/6-31G*, see Table 3. In spite of **2-DMSO-a** show the strongest intermolecular interactions (DMSO molecule closer to carboxylic acid and nitro groups of **2**), the position of the DMSO molecule in **2-DMSO-c** (closer to oxygen at C-4) provides more expressive effect on the calculated carbon chemical shift.

The BLYP/6-31G* orbital population calculations performed to **2** and **2-DMSO-c** show concomitant contributions of atoms of the rings A, B and C, in spite of the higher aromaticity on the rings A and C in relation to the ring B. Moreover, each molecular orbital of **2** presents different orbital populations when compared to the corresponding molecular orbital of **2-DMSO-c**. As consequence the higher σ_C/δ_C correlation coefficient of **2-DMSO-c** in relation to **2** may be not attributed to orbital population alterations on the aromatic skeleton of these structures.

BLYP/6-31G* geometry optimizations were also carried out to dimeric systems of **2** in which both the molecules present intermolecular interactions between their carboxylic acid groups, named system **2-2**. This system shows lower energy ($E = -18.49$ kcal/mol) in relation to two isolated

molecules of **2** ($E = -1235.31373336$ a.u., for each molecule). BLYP/6-31G* carbon chemical shift calculations were carried out to optimized geometry of the system **2-2**. The σ_C/δ_C correlation coefficient of **2-2** ($R^2 = 0.95065$) is similar to correlation coefficient obtained from BLYP/6-31G* calculations for an isolated molecule of **2** ($R^2 = 0.94783$), as shown in Table 3.

As a final point there is an important question to resolve: it is left to know if the choice of the level of theory to obtain the best optimized geometry can be the most important factor to good agreements between calculated carbon chemical shifts and experimental ^{13}C NMR data. Or yet, if the choice of the level of theory could directly influence the carbon chemical shift calculations. Thus, the HF/6-311++G** optimized geometry of **2** was employed to HF/6-311++G** carbon chemical shift calculations, providing a low σ_C/δ_C correlation coefficient ($R^2 = 0.89429$, as seen in Table 3). On the other hand, the HF/6-311++G** optimized geometry of **2** was employed to carbon chemical shift calculations using the level of theory B3LYP/6-31G*. As result the σ_C/δ_C correlation coefficient of these last calculation was $R^2 = 0.94204$, which is very closer to the correlation coefficient obtained from B3LYP/6-31G* carbon chemical shift calculation of the B3LYP/6-31G* optimized geometry of **2** ($R^2 = 0.95257$).

Moreover, BLYP/6-31G* geometry optimizations of **2** in four different situations were performed to investigate relationships between structure and carbon chemical shift calculations. The optimized geometries **A** (**2** in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions), **B** (**2** using PCM), **C** (dimeric system **2-2**), and **D** (**2-DMSO-c**) show high bond length correlation coefficients ($R^2 > 0.990$). All optimized geometries of **2** were submitted to BLYP/6-31G* carbon chemical shift calculations, showing different σ_C/δ_C correlation coefficients ($R^2 = 0.94783, 0.94838, 0.95065, \text{ and } 0.97774$, respectively). Thus, small variations on their bond lengths can be also sufficient to affect the carbon chemical shift calculations.

Conclusion

The theoretical investigation for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions shows that B3LYP/6-31G* ($R^2 = 0.99376$) and PBE/6-311G* ($R^2 = 0.95393$) calculations are the most appropriated levels of theory to carbon chemical shift calculations of **1** and **2**, respectively.

The solvent effect (DMSO) is an important factor on carbon chemical shift calculations. BLYP/6-31G* calculations show that optimized geometries using the continuum PCM provides better σ_C/δ_C correlation coefficients ($R^2 = 0.99553$ and 0.94838 , respectively for **1** and **2**) in relation to optimized geometries in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions ($R^2 = 0.98316$ and 0.94783). However, optimized geometries using the explicit solvent model show the best results ($R^2 = 0.99631$ and 0.97774 , by BLYP/6-31G* calculations). Moreover, the σ_C/δ_C correlation coefficients based on the explicit solvent effect allow appoint the more effective sites of intermolecular interactions between studied compounds and the solvent molecule.

Dimeric systems **1-1** and **2-2** were also considered using BLYP/6-31G* calculations. The σ_C/δ_C correlation coefficients ($R^2 = 0.99616$ and 0.95065 , respectively) shows that these interactions for the studied compounds are not important to carbon chemical shift calculations. But the interaction energies in both the cases are significant ($\Delta E = -17.64$ and -18.49 kcal/mol, respectively).

The choice of the level of theory to obtain the best optimized geometry is important factor to good agreements between calculated carbon chemical shifts and experimental ^{13}C NMR data. Small variations on their bond lengths can be sufficient to affect the carbon chemical shift calculations.

However, the choice of the level of theory is the most important factor to carbon chemical shift calculations.

Finally, this study showed that carbon chemical shift calculations may be an efficient alternative for structural analyses of organic compounds, mainly when experimental data are insufficient or do not exist.

Acknowledgements

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

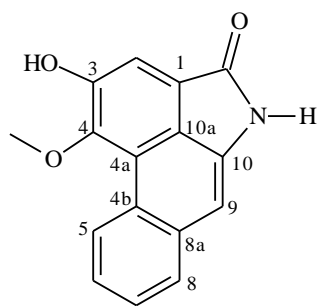
References

- [1] G.G. Leitão, M.A.C. Kaplan, *Rev. Bras. Farm.* 73 (1992) 65.
- [2] W. Meinl, U. Pabel, M. Osterloh-Quiroz, J.G. Hengstler, H. Glatt, *Intern. J. Cancer* 118 (2006) 1090.
- [3] M.C. Martinez, J. Nortier, P. Vereerstraeten, J.L. Vanherweghem, *Nephrol Dial. Transplant* 17 (2002) 408.
- [4] Đ. Stasi, L. Cláudio, *Plantas Medicinai na Amazônia I*, Unesp, São Paulo, 1989; M. Heinrich, J. Chan, S. Wankeb, C. Neinhuisb, M.S.J. Simmonds, *J. Ethnopharmacol.* 125 (2009) 108.
- [5] A. Balbach, *A Flora Nacional na Medicina Doméstica*, Edel, São Paulo, 1979. D.L. Kang, H.L. Zhang, X.G. Wang, H. Liu, C. Wang, *Chem. Nat. Compd.* 46 (2011) 957.
- [6] E.L. Costa, N.C. Hime, *Rodriguesia* 23 (1981) 23.
- [7] D.B. Mix, H. Guinaudeau, M. Shamma, *J. Nat Prod.* 45 (1982) 657.

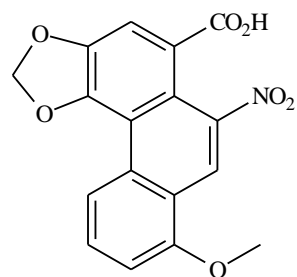
- [8] V.K. Poonam, A.K. Prasad, V.S. Parmar, *Nat. Prod. Rep.* 20 (2003) 565.
- [9] P.K. Agrawal, R.S. Thakur, *Magn. Reson. Chem. Mag. Res. Chem.* 23 (1985) 389.
- [10] A. Sivaprasad, R.R. Bonala, Y. In-Young, M.A. Lukin, W. Yujing, A.P. Grollman, M. Masaaki, C.R. Iden, J. Francis, *Nucleic Acids Research* 38 (2010) 339.
- [11] S.B. Mahato, A.P. Kundu, *Phytochemistry* 37 (1994) 6.
- [12] A.G. Pacheco, P.M. Oliveira, D. Piló-Veloso, A.F.C. Alcântara, *Molecules* 14 (2009) 1245.
- [13] K.K. Baldrige, J.S. Siegel, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 4038.
- [14] A. Pérez-Rebolledo, I.C. Mendes, N.L. Speziali, P. Bertani, J.M. Resende, A.F.C. Alcântara, H. Beraldo, *Polyhedron* 26 (2007) 1449.
- [15] F.J.L. Santos, A.F.C. Alcântara, D.L. Ferreira-Alves, D. Piló-Veloso, *Struct. Chem.* 19 (2008) 625.
- [16] A.F.C. Alcântara, D. Piló-Veloso, W.B. Almeida, C.R.A. Maltha, L.C.A. Barbosa, *J. Mol. Struct.* 791 (2006) 180.
- [17] A.G. Pacheco, T.M. Silva, R.M. Manfrini, W.S.T. Sallum, L.P. Duarte, D. Piló-Veloso, A.F.C. Alcântara, *Quim. Nova* 33 (2010) 1649.
- [18] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham,

C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, GAUSSIAN 2003, Revision B.04; Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, 2003.

- [19] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebish, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902.
- [20] B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, *Chem. Phys. Lett.* 157 (1989) 200.
- [21] A.D. Becke, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098.
- [22] J.P. Perdew, *Phys. Rev. B* 33 (1986) 8822.
- [23] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [24] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [25] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865.
- [26] K.B. Wiberg, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1342.
- [27] J.R. Durig, K.W. Ng, C. Zheng, S. Shen, *Struct. Chem.* 15 (2004) 149.
- [28] K. B. Wiberg, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 9322.
- [29] J.W. Song, M.A. Watson, H. Sekino, K. Hirao, *J. Chem Phys.* 129 (2008) 024117.
- [30] D. Jacquemin, J.M. André, E.A. Perpète, *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 4389.
- [31] A. Neugebauer, G. Häfeli, *J. Mol. Struct. (Theochem)* 585 (2002) 35.
- [32] A.C. Alguno, W.C. Chung, R.V. Bantaculo, R.M. Vequizo, H. Miyata, E.W. Ignacio, A.M. Bacala, *NECTEC Tech. J.* 2 (2000) 215.
- [33] PCM
- [34] A.F.C. Alcântara, A.F. Teixeira, I.F. Silva, W.B. Almeida, D. Piló-Veloso, *Quim. Nova* 27 (2004) 371.
- [35] D. Jacquemin, A. Femenias, H. Chermette, I. Ciofini, C. Adamo, J.M. André, E.A. Perpète, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 5952.
- [36] M.K. Cyrański, T.M. Krygowski, *Tetrahedron* 55 (1999) 6205.



Aristolactam AII (1)



Aristolochic acid I (2)

Figure 1. Chemical structure of aristolactam (1) and aristolochic acid (2) isolated from *Aristolochia esperanzae*.

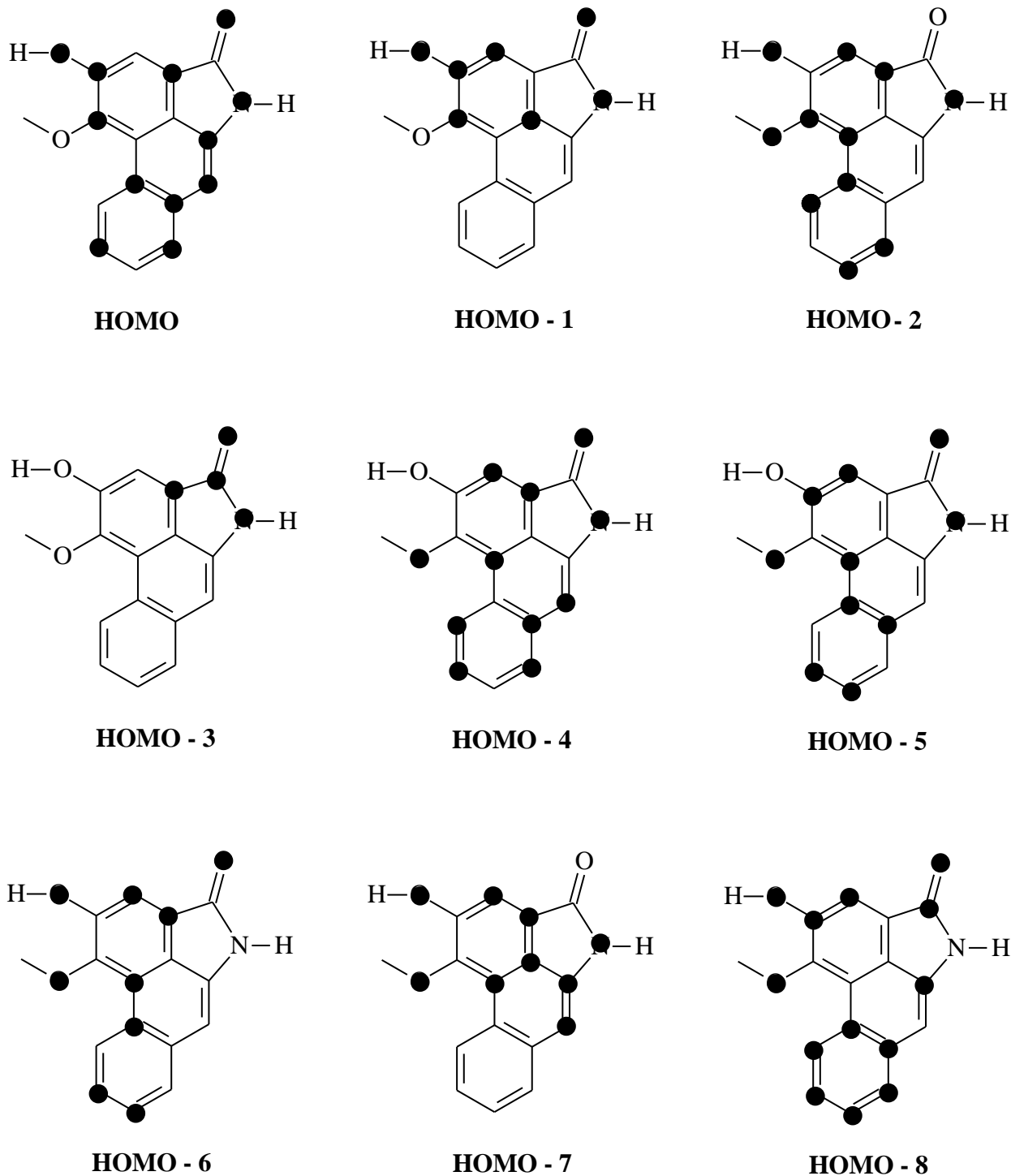


Figure 2. More significant atomic contributions to frontier occupied molecular orbitals of **1**, by BLYP/6-31G* for structure in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions.

Table 1. Carbon chemical shift values (σ_C) calculated to tetramethylsilane from HF, BLYP, B3LYP, and PBE calculations with 6-31G*, 6-31G**, 6-311G*, 6-311G**, 6-311+G**, and 6-311++G** base sets, for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions

Base set	Method			
	HF	BLYP	B3LYP	PBE
6-31G*	201.73	187.97	189.69	188.53
6-31G**	203.24	186.46	191.77	190.65
6-311G*	195.98	179.11	184.28	183.59
6-311G**	196.21	179.23	184.43	183.67
6-311+G**	196.17	178.73	183.98	183.17
6-311++G**	196.17	178.68	184.02	183.11

Table 2. R^2 values of σ_C/δ_C correlations of **1** from HF, BLYP, B3LYP, and PBE calculations with 6-31G*, 6-31G**, 6-311G*, 6-311G**, 6-311+G**, and 6-311++G** base sets, for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions

Base set	Method			
	HF	BLYP	B3LYP	PBE
6-31G*	0.97981	0.98316	0.99376	0.99141
6-31G**	0.97871	0.98751	0.99087	0.99094
6-311G*	0.97654	0.98456	0.98941	0.98691
6-311G**	0.97564	0.98613	0.99022	0.98947
6-311+G**	0.97741	0.98847	0.99226	0.99143
6-311++G**	0.97736	0.98961	0.99241	0.99237

Table 3. R^2 values of σ_C/δ_C correlations of **2** from HF, BLYP, B3LYP, and PBE calculations with 6-31G*, 6-31G**, 6-311G*, 6-311G**, 6-311+G**, and 6-311++G** base sets, for structures in the gaseous phase and without considering intermolecular interactions

Base set	Method			
	HF	BLYP	B3LYP	PBE
6-31G*	0.89883	0.94783	0.95257	0.95142
6-31G**	0.90018	0.94729	0.95180	0.95141
6-311G*	0.89729	0.95060	0.93811	0.95393
6-311G**	0.89567	0.95020	0.95315	0.95311
6-311+G**	0.89556	0.95023	0.95202	0.95279
6-311++G**	0.89429	0.95022	0.95144	0.95252

Anexo III

Relationships between chemical structure and activity of triterpenes against Gram-positive and Gram-negative bacteria

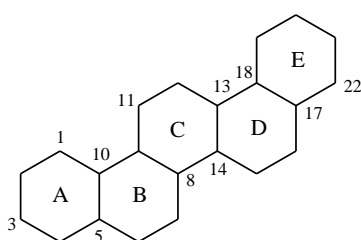
Pacheco*, A. G.; Alcântara, A. F. C.; Abreu, V. G. C.; Corrêa, G. M.

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

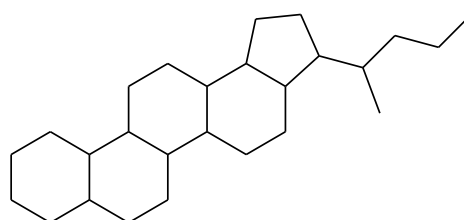
Bacteria are non-chlorophyllated unicellular organisms that reproduce by fission and do not present nuclear envelope. Gram's stain is a staining technique used to classify bacteria based on the different characteristic of their cell walls. Gram-positive or Gram-negative bacteria are determined by the amount and location of peptidoglycan in the cell wall, exhibiting different chemical compositions and structures, cell-wall permeabilities, physiologies, metabolisms, and pathogenicities.

Microbial diseases present a significant clinical interest because some species of bacteria are more virulent than other ones and show alteration in sensibility to the conventional antimicrobial drugs, mainly species of the genera *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, and *Pneumococcus*. The extensive use of the penicillin since the Second World War promoted the appearance of the first strains of penicillin-resistant Gram-positive bacteria (Silveira et al., 2006). Vancomycin and methicillin showed a large spectrum of bactericidal actions against many Gram-positive bacteria. However, some strains also presented resistance to these compounds, as observed to the drugs vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), respectively. As a consequence, the resistance that pathogenic microorganisms build against antibiotics has stimulated the search of new antimicrobial drugs (Al-Fatimi et al., 2007; Rahman et al., 2002).

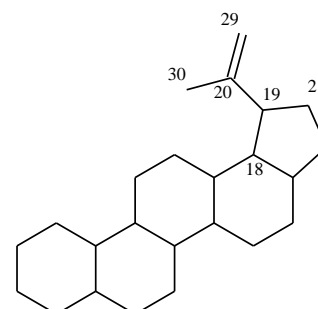
In the last few decades, the ethnobotanical search has been the subject of very intense pharmacological studies about drug discovery as potential sources of new compounds of therapeutic value in the treatment of bacterial diseases (Matu & Staden, 2003). The importance of secondary metabolites for the antimicrobial activity has been observed to triterpenoid compounds (Geyid et al., 2005). The triterpenes are widely distributed in the plant and animal kingdoms and occur in either a free state or in a combined form, mainly in the form of esters and glycosides (Ikan, 1991). Triterpenes present a carbon skeleton based on six isoprene units, being biosynthetically derived from the squalene, which may usually yield the pentacyclic triterpenes with six-membered rings. These pentacyclic triterpenes (PCTTs) present a basic skeleton which provides a large amount of derivative structures because different positions on their skeleton may be substituted. As result, there are at least 4000 known PCTTs (Dzubak et al., 2006), exhibiting a large spectrum of biological activities (James & Dubery, 2009). Some classes of triterpenes present other skeleton, such as fernane- and lupane-type triterpenes.



Basic skeleton of PCTT



Basic skeleton of fernane-type triterpenes



Basic skeleton of lupane-type triterpenes

The literature describes the isolation of triterpenes from the vegetal species which exhibit bactericidal activity (Katerere et al., 2003; Sunitha et al., 2001; Ryu et al., 2000; Yun et al., 1999). Table 1 shows the most recent studies relating plant that exhibit bactericidal activity and contain triterpenes. The activity against Gram-negative bacteria has been few studied in relation to Gram-positive ones. The Gram-positive bacteria more studied are *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, and *S. faecalis* (24, 11, 7, and 6 occurrences, respectively). On the other hand, the Gram-negative bacteria more studied are *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *S. typhi* (15, 13, 9, and 6 occurrences, respectively).

Table 1. Vegetal species that exhibit bactericidal activity and contain triterpenes

<i>Species</i>	Isolated compound	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
<i>Abies sachalinensis</i>	Triterpenes	<i>Bacillus subtilis</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Gao et al., 2008
<i>Acacia mellifera</i>	Triterpenes	<i>S. aureus</i>	-	Mutai et al., 2009
<i>Alstonia macrophylla</i>	Triterpenes and steroids	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , and <i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> and <i>Proteus mirabilis</i>	Chattopadhyay et al., 2001
<i>Austroplenckia populnea</i>	Triterpenes	<i>S. aureus</i>	-	Miranda et al., 2009
<i>Aquilaria agallocha</i>	Triterpenes, alkaloids, anthraquinones, and tannins	<i>Bacillus brevis</i> and <i>B. subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Shigella flexneri</i>	Dash et al., 2008
<i>Azadirachta indica</i>	Triterpenes, glycosides, and fatty acids	<i>Micrococcus luteus</i> and <i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i> and <i>Proteus vulgaris</i>	Khan et al., 2010
<i>Azima tetraantha</i>	Triterpenes, steroids, and tannins	<i>S. aureus</i> and <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i>	Ekbote et al., 2010
<i>Calophyllum inophyllum</i>	Triterpenes	<i>S. aureus</i>	-	Yimdjo et al., 2004
<i>Cardiospermum helicacabum</i>	Triterpenes, steroids, sugars, alkaloids, phenols, saponins, aminoacids, and tannins	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i> and <i>Salmonella typhi</i>	Viji et al., 2010
<i>Cedrus deodara</i>	Triterpenes, alkaloids, steroids, flavonoids, tannins, phenolic compounds, and	<i>Bacillus cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i>	Devmurari, 2010
<i>Commiphora glandulosa</i>	Triterpenes	<i>B. subtilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , and <i>S. aureus</i>	-	Motlhanka et al., 2010
<i>Dendrophthoe falcata</i>	Triterpenes, steroids, tannins, and glycosides	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , and <i>Streptococcus pneumoniae</i> ,	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , and <i>S. typhi</i>	Pattanayak et al., 2008
<i>Dichrostachys cinerea</i>	Triterpenes and steroids	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Eisa et al., 2000
<i>Drynaria quercifolia</i>	Triterpenes, coumarins, flavones, lignans, saponins, and steroids	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Ramesh et al., 2001
<i>Elaeodendron schlechteranum</i>	Triterpenes	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. aureus</i>	-	Maregesi et al., 2010
<i>Ficus ovata</i>	Triterpenes	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>S. faecalis</i>	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Kuete et al., 2009

Table 1. (Cont.)

<i>Species</i>	Isolated compound	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
<i>Finlaysonia obovata</i>	Triterpenes	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Mishra & Sree, 2007
<i>Galium mexicanum</i>	Triterpenes, saponins, flavonoids, sesquiterpene lactones, and glucosides	<i>S. aureus</i> methicillin-resistant (MRSA)	-	Bolivar et al., 2011
<i>Garcinia gummicutia</i>	Triterpenes, alkaloids, steroids, oils, catechins, and phenolics	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Maridass et al., 2010
<i>Leucas aspera</i>	Triterpenes	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	Mangathayaru et al., 2005
<i>Miconia ligustroides</i>	Triterpenes	<i>B. cereus</i>	-	Cunha et al., 2010
<i>Mirabilis jalapa</i>	Terpenes and flavonoids	<i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i>	Hajji et al., 2010
<i>Moringa oleifera</i>	Triterpenes, alkaloids, flavonoids, sesquiterpenes, lactones, diterpenes, and naphthoquinones	<i>E. faecalis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>Aeromonas caviae</i> and <i>Vibrio arahaemolyticus</i>	Peixoto et al., 2011
<i>Mussaenda macrophylla</i>	Triterpenes	-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Kim et al., 1999
<i>Phyllanthus simplex</i>	Triterpenes, steroids, lignans, flavonoids, glycosides, and phenolic compounds	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. flexneri</i>	Chouhan & Singh, 2010
<i>Psidium guajava</i>	Triterpenes, tannins, and flavonoids	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Sanches et al., 2005
<i>Pulicaria dysenterica</i>	Triterpenes and steroids	<i>B. cereus</i> and <i>S. aureus</i>	<i>Vibrio cholera</i>	Nickavar & Mojab, 2003
<i>Tridesmostemon omphalocarpoides</i>	Triterpenes	<i>S. aureus</i> and <i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , and <i>S. typhi</i>	Kuete et al., 2006
<i>Triumfetta rhomboidea</i>	Triterpenes, steroids, flavonoids, tannin, and phenolic compounds	<i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i>	Devmurari et al., 2010
<i>Vochysia divergens</i>	Triterpenes	<i>S. aureus</i>	-	Hess et al., 1995

Some plants exhibit a broad spectrum of activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and contain other chemical classes, such as coumarins, flavonoids, phenolic compounds, and alkaloids. However, there is an expressive quantity of vegetal species that only triterpenes were isolated, suggesting an intrinsic relationship between this chemical class and the bactericidal activity of these plants. Thus, the present work provides an extensive search in original and review articles addressing the bactericidal activity of triterpenes, which may inspire new biomedical applications, considering atom economy, the synthesis of environmentally benign products without producing toxic by-products, the use of renewable sources of raw materials, and the search for processes with maximal efficiency of energy. To systematization of the results, it was considered that the biological activities are related to the presence of functionalized sites on the chemical structure of each triterpene. Obviously the obtained data do not make them possible the comparison of the intensity of bactericidal activities among the active triterpenes. Moreover, many triterpenes were tested against few species of bacteria, and as a consequence this work only records biological positive test.

Table 2 shows the bactericidal activity of oleanane-type triterpenes isolated from vegetal species and fungi (Compounds **1** to **43** shown in Figure 1). In the case of Gram-positive bacteria, oleananes with different functionalizations exhibit activity against *S. aureus* and a relationship between chemical structure and bactericidal activity could not be established. The oleananes **6**, **20**, **21**, **35**, and **36** exhibit activity against *E. faecalis*. All these compounds present functional groups on the alpha side of the triterpene skeleton (hydroxyl group at C-1 and oxygenated group at C-20 or C-16). Compounds **1** to **5**, and **42** exhibit activity against *M. luteus* and present carboxyl group at C-17 or C-20 and oxygenated group at C-3. The presence of a functional group at C-17 is an important criterion to the activity against *B. subtilis*, except compounds **29** and **43**, which are carboxyl group functionalized at other positions (i.e. C-3 and C-20, respectively). The activity against *S. mutans* is exhibited by the compounds **14**, **15**, **17**, **18**, and **24**, which present oxygenated group at C-3 and carboxyl group at C-17. Few oleanane-type triterpenes were tested against *S. pneumoniae* and *B. pumilus*, and as a consequence, relationships between chemical structure and activity against these Gram-positive bacteria were not possible.

Considering the Gram-negative bacteria, Table 2 shows many oleananes active against *E. coli*. These compounds present different functional groups at the oleanane skeleton, but all of them present oxygenated group at C-3. Compounds **13-16**, **19**, **26**, **28-38**, and **43** exhibit activities against *S. typhi* and only present oxygenated group at C-3 in common. The activity against *S. sonnei* is registered for the compounds **7**, **8**, **10**, and **13**, which present carboxyl group at C-17 and oxygenated group at C-3. Similarly, the activity against *P. gingivalis* is registered for the compounds **14**, **15**, **18**, **24**, and **25**, which present carboxyl group at C-17 and oxygenated group at C-3. Only two compounds exhibited activity against *P. fluorescens* (**11** and **12**) and both the oleananes present hydroxyl group at C-19 on the alpha-side of the skeleton. Few oleananes were tested against *V. cholera*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *P. aeruginosa*, and *C. pneumoniae* and relationships between chemical structure and activity against these Gram-negative bacteria were not possible.

Figure 2 shows the ursane-type triterpenes with bactericidal activity isolated from vegetal species. For the Gram-positive bacteria, the ursanes active against *S. aureus* and *B. subtilis* present oxygenated group at C-3 in common. Few compounds exhibited positive tests against *S. epidermidis*, *A. viscosus*, *M. luteus*, *S. mutans*, *C. perfringens*, *S. faecalis*, and *B. cereus*. In the case of Gram-negative bacteria, the ursanes active against *E. coli* present an oxygenated group at C-3 in common. The ursanes active against *S. sonnei*, *S. flexneri*, *B. typhi*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* concomitantly present oxygenated groups at C-3 and C-17.

Figure 3 shows the lupane-, friedelane-, and fernane-type triterpenes with bactericidal activity isolated from vegetal species. Friedelin (compound **68**) exhibits the largest spectrum of activities against Gram-positive bacteria (*Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *S. aureus*, and *S. faecalis*) and Gram-negative bacteria (*C. freundii*, *E. aerogenes*, *Enterococcus cloacae*, *K. pneumoniae*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, and *S. typhi*, *Salmonella typhimurium*). This compound only presents functionalization at C-3 (carbonyl group at position C-3 on the triterpene skeleton). As a consequence, the position C-3 could be considered as a strategic position to bactericidal activity of all triterpenes above-mentioned. However, the fernanes **82-84** do not present functional groups at C-3, but exhibit activity against *M. tuberculosis*.

The compounds shown in the Figures 4 and 5 are miscellaneous-types of triterpenes isolated from vegetal species or obtained from hemi-synthesis which exhibit bactericidal activity. The variety of their chemical structures does not permit to establish relationships with the bactericidal activities showed in the Tables 2 and 3. However, among the triterpenes shown in the Figures 1 to 5 and Tables 2 and 3, 90% of them exhibit activity against Gram-positive bacteria and 60% of them exhibit activity against Gram-negative bacteria. These results indicate higher resistance of Gram-negative Bacteria to the triterpenes.

Table 2. Bactericidal activity of triterpenes isolated from vegetal species and fungi

Compound	Vegetal species	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
2a-Hydroxy-3-oxoolean-12-en-30-oic acid (1)	<i>Dillenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
Oleana-1,12-dien-29-oic acid, 3-oxo (2)	<i>Dillenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
1a-Hydroxy-3-oxoolean-12-en-30-oic acid (3)	<i>Dillenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
2-Oxo-3 β -hydroxyolean-12-en-30-oic acid (4)	<i>Dillenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
Olean-12-en-1,3-dihydroxy (5)	<i>Dillenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
3,30-Dihydroxyl-12-oleanen-22-one (6)	<i>Cambretum imberbe</i>	<i>E. faecalis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Angeh et al., 2007; Katerere et al., 2003
Arjulonic acid (7)	<i>Syzygium guineense</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> and <i>Shigella sonnei</i>	Djoukeng et al., 2005
Terminolic acid (8)	<i>Syzygium guineense</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. sonnei</i>	Djoukeng et al., 2005
2a,3 β ,24-Trihydroxyolean-12-en-28-oic acid (9)	<i>Planchonia careya</i>	MRSA	<i>Enterococcus vancomycin-resistant</i> (VRE)	McRae et al., 2008
2,3,23-Trihydroxy-(2a,3 β ,4a) olean-11-en-28 oic acid (10)	<i>Syzygium guineense</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. sonnei</i>	Djoukeng et al., 2005
Arjungenin (11)	<i>Planchonia careya</i>		<i>Pseudomonas fluorencens</i>	McRae et al., 2008
Arjunic acid (12)	<i>Terminalia arjuna</i>		<i>P. fluorencens</i>	Sun et al., 2008
3-Acetyl aleuritolic acid (13)	<i>Spirostachys africana</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. typhi</i> , and <i>V. cholera</i>	Mathabe et al., 2008
Oleanolic acid (14)	<i>Periplaca laevigata</i>	<i>Spretococcus mutans</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. gingivalis</i> , and <i>S. typhi</i>	Hichri et al., 2003
Oleanolic acid acetate (15)	<i>Periplaca laevigata</i>	<i>S. mutans</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. gingivalis</i> , and <i>S. typhi</i>	Hichri et al., 2003
Maslinic acid acetate (16)	<i>Periplaca laevigata</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Hichri et al., 2003
Methyl 3-acetyloleanolic acid (17)	<i>Vitis vinifera</i>	<i>S. mutans</i>		Rivero-Cruz et al., 2008
Methyl oleanolic acid (18)	<i>Vitis vinifera</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. gingivalis</i>	Rivero-Cruz et al., 2008
Oleanolic acid 28-O-[β -D-glucopyranosyl] Ester (19)	<i>Drypetes paxii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. typhi</i>	Chiozem et al., 2009
1a,3 β -Dihydroxyolean-12-en-29-oic acid (20)	<i>Cambretum imberbe</i>	<i>E. faecalis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Angeh et al., 2007; Katerere et al., 2003
1a,3 β -Hydroxyimberbic-acid-23-O- β -l-4-acetyl-rhamnopyranoside (21)	<i>Cambretum imberbe</i>	<i>E. faecalis</i> and <i>S. aureus</i>	-	Angeh et al., 2007; Katerere et al., 2003

Table 2. (Cont.)

Compound	Vegetal species	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
1,3,24-Trihydroxyl-12-olean-29-oic acid (22)	<i>Cambretum imberbe</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Angeh et al., 2007; Katerere et al., 2003
1 α ,23-Dihydroxy-12-oleanen-29-oic acid-3 β -O-2,4-diacetyl-l-rhamnopyranoside (23)	<i>Cambretum imberbe</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Angeh et al., 2007; Katerere et al., 2003
3-O-(30,30-dimethylsuccinyl)-oleanolic acid (24)	<i>Vitis vinifera</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. gingivalis</i>	Rivero-Cruz et al., 2008
3-O-(20,20-dimethylsuccinyl)oleanolic acids (25)	<i>Vitis vinifera</i>	-	<i>P. gingivalis</i>	Rivero-Cruz et al., 2008
3 β ,6R,13 β -Trihydroxyolean-7-one (26)	<i>Camellia sinensis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. dysenteriae</i> , and <i>S. typhi</i>	Ling et al., 2010
18 α -Oleanane-3 β -ol,19 β ,28-epoxy (27)		-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Dehaen et al., 2011
9 β ,25-cyclo-3 β -O-(β -D-glucopyranosyl)-echynocystic acid (28)	<i>Syniplocos panicrelata</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Semwal et al., 2011
3-Oxoolean-1,12-dien-30-oic acid (29)	<i>Dellenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
3R-Hydroxyolean-12-en-27-oic acid (30)	<i>Aceriphyllum rossii</i>	MRSA, quinolone resistance <i>S. aureus</i> (QRSA), and <i>S. aureus</i>	-	Zheng et al., 2008
3 β -Hydroxyolean-12-en-27-oic acid (31)	<i>Aceriphyllum rossii</i>	MRSA, QRSA, and <i>S. aureus</i>	-	Zheng et al., 2008
Aceriphylllic acid A (32)	<i>Aceriphyllum rossii</i>	MRSA, QRSA, and <i>S. aureus</i>	-	Zheng et al., 2008
Methyl ester of aceriphylllic acid A (33)	<i>Aceriphyllum rossii</i>	MRSA, QRSA, and <i>S. aureus</i>	-	Zheng et al., 2008
22 α -Acetyl-16 α ,21 β -dihydroxyoleanane-13 β :28-olide-3-O- $[\beta$ -glucopyranosyl-(1 $'''$ →6 $'$)] $[\beta$ -O-coumaroylglucopyranosyl-(1 $''$ →2 $'$)]- β -glucopyranoside (34)	<i>Maesa lanceolata</i>	<i>S. aureus</i>	-	Manguero et al., 2011
16 α ,22 α -Diacetyl-21 β -angeloyloleanane-13 β :28-olide-3 β -O- $[\beta$ -glucopyranosyl-(1 $''$ →2 $'$)] $[\beta$ -glucopyranosyl-(1 $'''$ →4 $'$)]- β -glucopyranoside (35)	<i>Maesa lanceolata</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>V. cholera</i>	Manguero et al., 2011
16 α ,22 α ,28-Trihydroxy-21 β -angeloylolean-12-ene-3 β -O- $[\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $'''$ →6 $'$)] $[\beta$ -glucopyranosyl-(1 $''$ →2 $'$)]- β -xylopyranoside(36)	<i>Maesa lanceolata</i>	<i>E. faecalis</i> and <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i> and <i>V. cholera</i>	Manguero et al., 2011
16 α ,28-dihydroxy-22 α -acetyl-21 β -angeloylolean-12-ene-3-O- $[\beta$ -galactopyranosyl-(1 $''$ →2 $'$)] $[\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $'''$ →4 $'$)]- α -arabinopyranoside (37)	<i>Maesa lanceolata</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i> and <i>V. cholera</i>	Manguero et al., 2011
Chikusetsusaponin IVa methyl Ester (38)	<i>Drypetes laciniata</i>	-	<i>E. coli</i> and <i>S. typhi</i>	Fannang et al., 2011

Table 2. (Cont.)

Compound	Vegetal species	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
3 β -[(<i>a</i> -l-Arabinopyranosyl)-oxy]olean-12-en-28-oic acid (39)	<i>Clematis ganpiniana</i>	<i>B. subtilis</i>	-	Ding et al., 2009
Hederagenin-3 β -O- <i>a</i> -l-arabinopyranoside (40)	<i>Clematis ganpiniana</i>	<i>Bacillus pumilus</i> and <i>B. subtilis</i>	-	Ding et al., 2009
3 β -O- <i>a</i> -l-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>a</i> -l-arabinopyranosyl oleanolic acid (41)	<i>Clematis ganpiniana</i>	<i>B. pumilus</i> and <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Ding et al., 2009
<i>a</i> -Hederin (42)	<i>Clematis ganpiniana</i>	<i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. dysenteriae</i>	Ding et al., 2009
5,6(11)-Oleanadien-3 β -ethan-3-oate (43)	<i>Rhododendron campanulatum</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>S. typhi</i>	Tantry et al., 2011
Asiatic acid (44)	<i>Syzygium guineense</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. sonnei</i>	Djoukeng et al., 2005
Hydroxyasiatic acid (45)	<i>Syzygium guineense</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. sonnei</i>	Djoukeng et al., 2005
Eleganene-A (46)	<i>Myricana elegans</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>S. flexneri</i> and <i>S. typhi</i>	Ahmad et al., 2008
Eleganene-B (47)	<i>Myricana elegans</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. flexneri</i> , and <i>S. typhi</i>	Ahmad et al., 2008
(2 α ,3 β)-2,3,23-Trihydroxy-13,28-epoxyurs-11-en-28-one (48)	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i>	Tsiri et al., 2008
Ilexgenin A (49)	<i>Ilex hainanensis</i>	<i>Actinomyces viscosus</i> and <i>S. mutans</i>	-	Chen et al., 2011
Rotundic acid (50)	<i>Ilex integra</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Haraguchi et al., 1999
Ursolic acid (51)	<i>Geum rivale</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Panizzi et al., 2000
1 β ,2 β ,3 β -Trihydroxy-urs-12-ene-23-oic-rhamnoside (52)	<i>Commiphora glandulosa</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>C. perfringens</i> , and <i>S. aureus</i>	-	Montlhanka et al., 2010
Erythrodiol (53)	<i>Myricana elegans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. flexneri</i>	Ahmad et al., 2008
Corosolic acid (54)	<i>Myricana elegans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. flexneri</i>	Ahmad et al., 2008
1 β ,3 β -Dihydroxyurs-12-en-27-oic acid (55)	<i>Carophora coronata</i>	<i>B. subtilis</i> and MRSA	-	Khera et al., 2003
22 β -Acetyl lantoic acid (56)	<i>Lantana camara</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Barre et al., 1997
Lantic acid (57)	<i>Lantana camara</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	Saleh et al., 1999

Table 2. (Cont.)

Compound	Vegetal species	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
22 β -Acetoxylantic acid (58)	<i>Lantana Camara</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Barre et al., 1997
Taraxast-20-ene-3 β -ol (59)	<i>Saussurea petrovii</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Daí et al., 2001
Taraxast-20(30)ene-3 β ,21 α -diol (60)	<i>Saussurea petrovii</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Daí et al., 2001
20 α ,21 α -Epoxy-taraxastane-3 β ,22 α -diol (61)	<i>Saussurea petrovii</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Daí et al., 2001
Taraxast-20-ene-3 β -ol (62)	<i>Saussurea petrovii</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Daí et al., 2001
Taraxast-20-ene-3 β ,30-diols (63)	<i>Saussurea petrovii</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Daí et al., 2001
20(29)-Lupene-3 β -isoferulate (64)	<i>Euclea natalensis</i>	<i>B. pumilus</i>	-	Weigenand et al., 2004
Lupeol (65)	<i>Curtisia dentata</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Shai et al., 2008
Betulinic acid (66)	<i>Curtisia dentata</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Shai et al., 2008
Betulin (67)	<i>Myricana elegans</i>	-	<i>C. pneumoniae</i>	Dehaen et al., 2011; Ahmad et al., 2008
Friedelin (68)	<i>Visnia rubescens</i>	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>S. faecalis</i>	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>Enterococcus cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , and <i>S. typhi</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Tamokou et al., 2009; Kuete et al., 2009, 2007, 2006
3-Oxo-friedelan-20 α -oic acid (69)	<i>Maytenus sinegalensis</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>S. flexneri</i>	Lindsey et al., 2003; Lindsey et al., 2006
3 β -Hydroxyfriedelane-7,12,22-trione (70)	<i>Drypetes laciniata</i>	-	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhi</i>	Fannang et al., 2011
12 α -Hydroxyfriedelane-3,15-dione (71)	<i>Drypetes paxii</i>	<i>S. aureus</i>		Chiozem et al., 2009
Friedelanol (72)	<i>Visnia rubescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. typhi</i>	Angeh et al., 2007; Katerere et al., 2003
3 β -Hydroxyfriedelan-25-al (73)	<i>Drypetes paxii</i>	<i>S. aureus</i>	-	Chiozem et al., 2009
3-Hydroxy-2,24-dioxo-3-friedelen-29-oic acid (74)	<i>Elaeodendron schlechteranum</i>	<i>B. cereus</i> and <i>S. aureus</i>	-	Maregesi et al., 2010

Table 2. (Cont.)

Compound	Vegetal species	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
22 β -Hydroxytingenone (75)	<i>Elaeodendron schlechteranum</i>	<i>B. cereus</i> and <i>S. aureus</i>	-	Maregesi et al., 2010
2,3,7-Trihydroxy-6-oxo-1,3,5(10),7-tetraene-24-norfriedelane-29-oic acid methyl ester (76)	<i>Crossopetalum gaumeri</i>	<i>B. cereus</i> , <i>M. luteus</i> , and <i>S. epidermidis</i>	-	Ankli et al., 2000
Zeylasterone (77)	<i>Maytenus blepharodes</i>	<i>S. aureus</i>	-	Léon et al., 2010
Dimethylzeylasterone (78)	<i>Maytenus blepharodes</i>	<i>S. aureus</i>	-	Léon et al., 2010
Zeylasteral (79)	<i>Maytenus blepharodes</i>	<i>S. aureus</i>	-	Léon et al., 2010
Dimethylzeylasteral (80)	<i>Maytenus blepharodes</i>	<i>S. aureus</i>	-	Léon et al., 2010
30-Ethyl-2 α ,16 α -dihydroxy-3 β -O-(β -D-glucopyranosyl)-hopan-24-oic acid (81)	<i>Syniplotoc panirelata</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Semwal et al., 2011
Hopan-27- α -6 β ,11R,22-triol (82)	<i>Conoideocrella tenuis</i> (fungus)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Isaka et al., 2011
A'-Neogammacerane-6,11,22,27-tetrol (83)	<i>Conoideocrella tenuis</i> (fungus)	-	<i>M. tuberculosis</i>	Isaka et al., 2011
Hopane-6 β ,7 β ,22-triol (84)	<i>Conoideocrella tenuis</i> (fungus)	-	<i>M. tuberculosis</i>	Isaka et al., 2011
Dysoxyhainic acid G (85)	<i>Dysoxylum hainanense</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , and <i>S. epidermidis</i>	-	He et al., 2011
20-Epikoetjapic acid (86)	<i>Osyris lanceolata</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Yeboah et al., 2010
Dysoxyhainic acid J (87)	<i>Dysoxylum hainanense</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. epidermidis</i>	-	He et al., 2011
(9,11), (18,19)-Disecoolean-12-en-28-oic acid (88)	<i>Ficus benjamina</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>S. typhimurium</i>	Parveen et al., 2009
2-Chrysene acetic acid, 9-carboxy-1,2,3,4,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,10,10a,12,12a-hexadecahydro-a,a,1,4a,4b,6a,9-heptamethyl-1-(2-oxoethyl),2-methyl ester (89)	<i>Dillenia papuana</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	Nick et al., 1994
Polyporenic acid C (90)	<i>Fomitopsis rosea</i> (fungus)	<i>S. aureus</i>	-	Popova et al., 2009
Dysoxyhainic acid I (91)	<i>Dysoxylum hainanense</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>S. epidermidis</i>	-	He et al., 2011
3 α -Hydroxy-24-methylene-23-oxolanost-8-en-26-carboxylic acid (92)	<i>Fomitopsis rosea</i> (fungus)	<i>S. aureus</i>	-	Popova et al., 2009
3 α -Carboxyacetoxyquercinic acid (93)	<i>Fomitopsis rosea</i> (fungus)	<i>S. aureus</i>	-	Popova et al., 2009

Table 2. (Cont.)

Compound	Vegetal species	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
3 <i>a</i> -Oxepanoquercinic acid C (94)	<i>Fomitopsis rosea</i> (fungus)	<i>S. aureus</i>	-	Popova et al., 2009
Lamesticum F (95)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> and <i>B. subtilis</i>	-	Dong et al., 2011
3 <i>a</i> -(3'Butylcarboxyacetoxyl)oxepanoquercinic acid C (96)	<i>Fomitopsis rosea</i> (fungus)	<i>S. aureus</i>	-	Popova et al., 2009
Helvolic acid (97)	<i>Pichia guilliermondii</i> (fungus)	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas lachrymans</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , and <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Zhao et al., 2010
5 <i>a</i> ,8 <i>a</i> -Epidioxi-24(ξ)-methylcholesta-6,22-diene-3β-ol (98)	<i>Fomitopsis rosea</i> (fungus)	<i>S. aureus</i>	-	Popova et al., 2009
1,3,16β-yl-Phenypropylacetate-lanostan-5,11,14,16,23,25-hexen-22-one (99)	<i>Stachyterphita jamaicensis</i>	<i>S. aureus</i> and <i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Maregesi et al., 2010
Dysoxyhainic acid H (100)	<i>Dysoxylum hainanense</i>	<i>B. subtilis</i> and <i>M. luteus</i>	-	He et al., 2011
3β- <i>O</i> - <i>cis</i> - <i>p</i> -Coumaroyltormentic acid (101)	<i>Planchonia careya</i>	<i>S. aureus</i>	VRE	McRae et al., 2008
3β- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaroyltormentic acid (102)	<i>Planchonia careya</i>	<i>S. aureus</i>	VRE	McRae et al., 2008
Lamesticum C (103)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>Streptococcus pyogenes</i>	-	Dong et al., 2011
Lamesticum D (104)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> and <i>B. subtilis</i>	-	Dong et al., 2011
Lamesticum B (105)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , and <i>S. pyogenes</i>	-	Dong et al., 2011
Lamesticum E (106)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> and <i>B. subtilis</i>	-	Dong et al., 2011
Lansic acid 3-ethyl Ester (107)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , and <i>S. pyogenes</i>	-	Dong et al., 2011
Ethyl lansiolate (108)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , and <i>S. pyogenes</i>	-	Dong et al., 2011
Lamesticum A (109)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , and <i>S. pyogenes</i>	-	Dong et al., 2011
3-Cyclohexene-1-propanoic acid,2-[2-[(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-3-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-methyl-6-methylenecyclohexyl]ethyl]-1,3-dimethyl-6-(1-methylethenyl) (110)	<i>Lansium domesticum</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , and <i>S. pyogenes</i>	-	Dong et al., 2011

Table 3. Bactericidal activity of triterpene derivatives

Compound	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
β -D-Galactosideo methyl oleanolate (111)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1992
β -D-Xilosideo methyl oleanolate (112)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1992
β -D-Fucosideo methyl oleanolate (113)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1992
β -L-Fucosideo methyl oleanolate (114)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1992
β -Maltosideo methyl oleanolate (115)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1992
β -Maltotriosideo methyl oleanolate (116)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1992
Oleanolic acid acetate (117)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Hichri et al., 2003
3 β -O-Acetate β -amyrin (118)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Hichri et al., 2003
2 β ,3 β -Dihydroxy-11-oxooleana-12,18-dien-30-oic acid (119)	<i>B. subtilis</i>	<i>Erwinia</i> sp.	Pitzele, 1974
2 β ,3 α -Dihydroxy-11-oxooleana-12,18-dien-30-oic acid (120)	-	<i>Erwinia</i> sp.	Pitzele, 1974
2 β ,3 α -Dihydroxy-11-oxo-18 β -olean-12-en-30-oic acid (121)	<i>B. subtilis</i>	-	Pitzele, 1974
2 β ,3 β -Dihydroxy-11-oxo-18 β -olean-12-en-30-oic acid (122)	-	<i>Erwinia</i> sp.	Pitzele, 1974
2 β ,3 β -Diacetoxy-11-oxo-18 β -olean-12-en-30-oic acid (123)	-	<i>Erwinia</i> sp.	Pitzele, 1974
3 β -Acetyl-11-oxooleanolic acid (124)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhimurium</i>	Hichri et al., 2003
Methyl 2 β ,3 α -dihydroxy-18 β -olean-12-en-30-oate (125)	-	<i>Erwinia</i> sp.	Pitzele, 1974
1 α -Bromo-2,3-dioxo-18 β -olean-12-en-30-oic acid (126)	-	<i>Erwinia</i> sp.	Pitzele, 1974
3 β -O-Nicotinoyl-20-(4-methylpiperazin-1-yl)carbonyl-11-oxoolean-12(13)-ene (127)	<i>S. aureus</i>	-	Kazakovaa et al., 2010
N-3-pyridinacetyloleanolic amide (128)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhimurium</i>	Hichri et al., 2003
3 β -Hydroxyolean-12-en-28-carboxydiethylphosphonate (129)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhimurium</i>	Hichri et al., 2003
3 β -Acetoxy-12 α -hydroxyoleanan-13 β ,28-olide (130)	-	<i>S. typhimurium</i>	Hichri et al., 2003
Oleanan-28-oic acid, 3 β ,13-dihydroxy-12-oxo-, γ -lactone, acetate (131)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. typhimurium</i>	Hichri et al., 2003
β -Gentiobiosideo methyl ursolate (132)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1993

Table 3. (Cont.)

Compound	Activity against Gram-positive bacteria	Activity against Gram-negative bacteria	Ref.
β -Maltotriosídeo methyl ursolate (133)	<i>S. aureus</i>	-	Takechi & Tanaka, 1993
Urs-12-ene-28-carboxy-3 β -dodecanoate (134)	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Mallavadhani et al., 2004
Urs-12-ene-28-carboxy-3 β -tetradecanoate (135)	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>P. syringae</i>	Mallavadhani et al., 2004
Urs-12-ene-28-carboxy-3 β -hexadecanoate (136)	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. syringae</i>	Mallavadhani et al., 2004
Urs-12-ene-28-carboxy-3 β -octadecanoate (137)	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> and <i>P. syringae</i>	Mallavadhani et al., 2004
3-Oxo-17-(4-methylpiperazin-1-yl)carbonyloursan-12(13)-ene (138)	<i>S. aureus</i>	-	Kazakovaa et al., 2010
2-Furfurylidenebetulonic acid (139)	<i>S. aureus</i>	-	Kazakovaa et al., 2010
(4-Methylpiperazin-1-yl)amide betulonic (140)	<i>S. aureus</i>	-	Kloos & Zein, 1993
Betulin dioxime (141)	-	<i>C. pneumoniae</i>	Kloos & Zein, 1993
Umbellatin <i>a</i> (142)	<i>B. cereus</i> and <i>B. subtilis</i>	-	Gonzalez et al., 1992

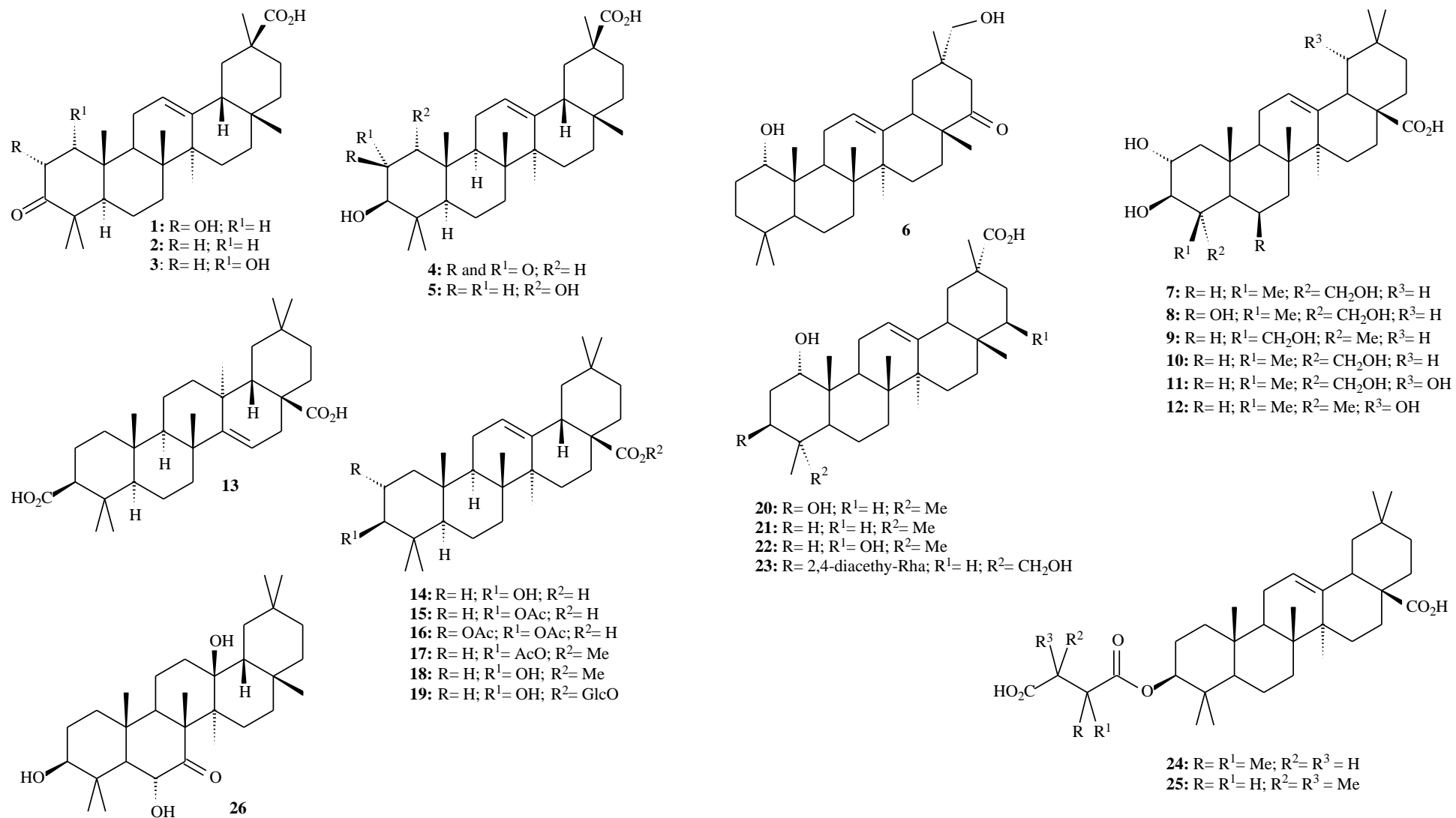


Figure 1. Oleanane-type triterpenes with bactericidal activity isolated from vegetal species.

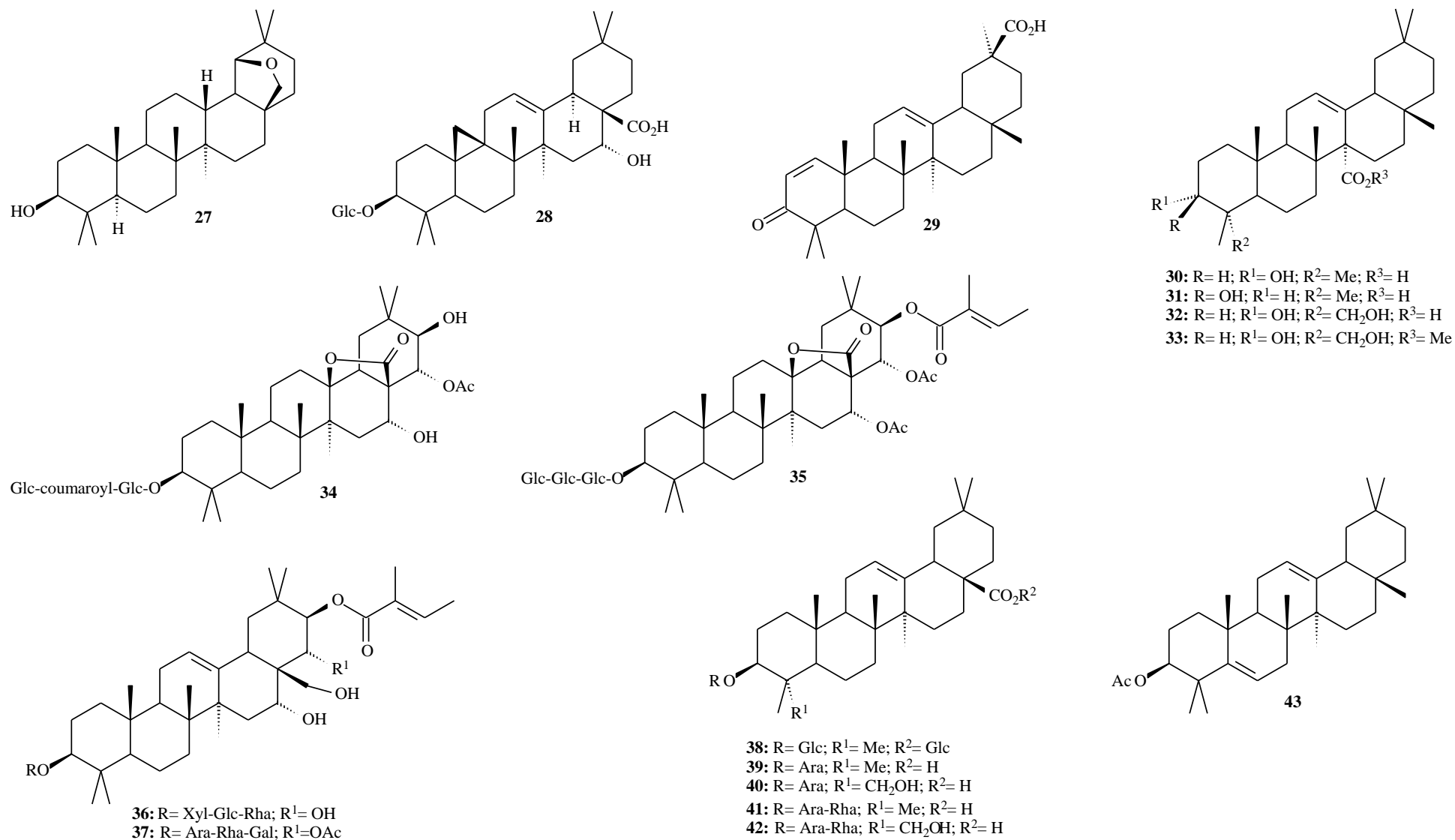


Figure 1. (Contd.)

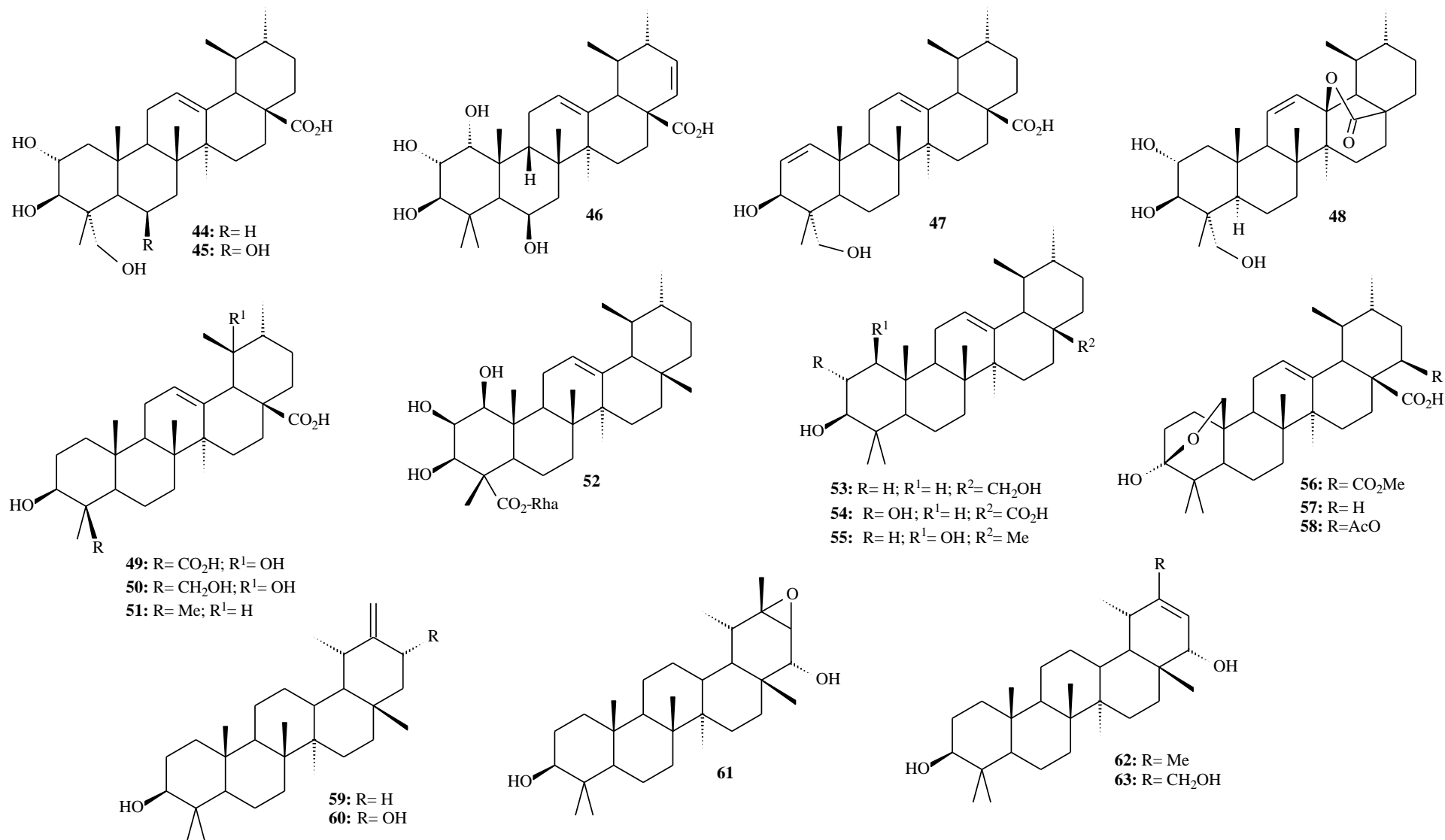


Figure 2. Ursane-type triterpenes with bactericidal activity isolated from vegetal species.

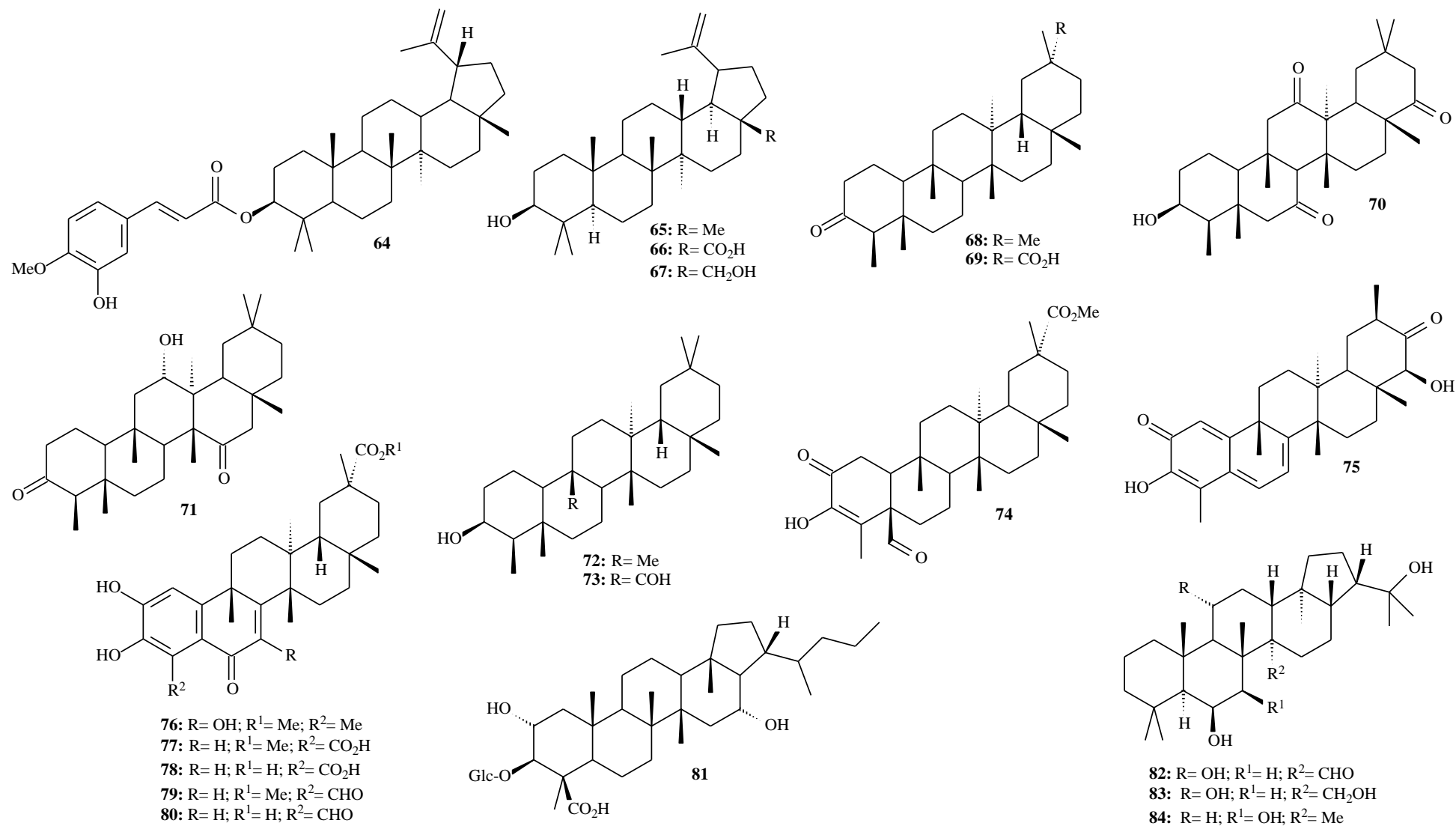


Figure 3. Lupane-, friedelane-, and fernane-type triterpenes with bactericidal activity isolated from vegetal species.

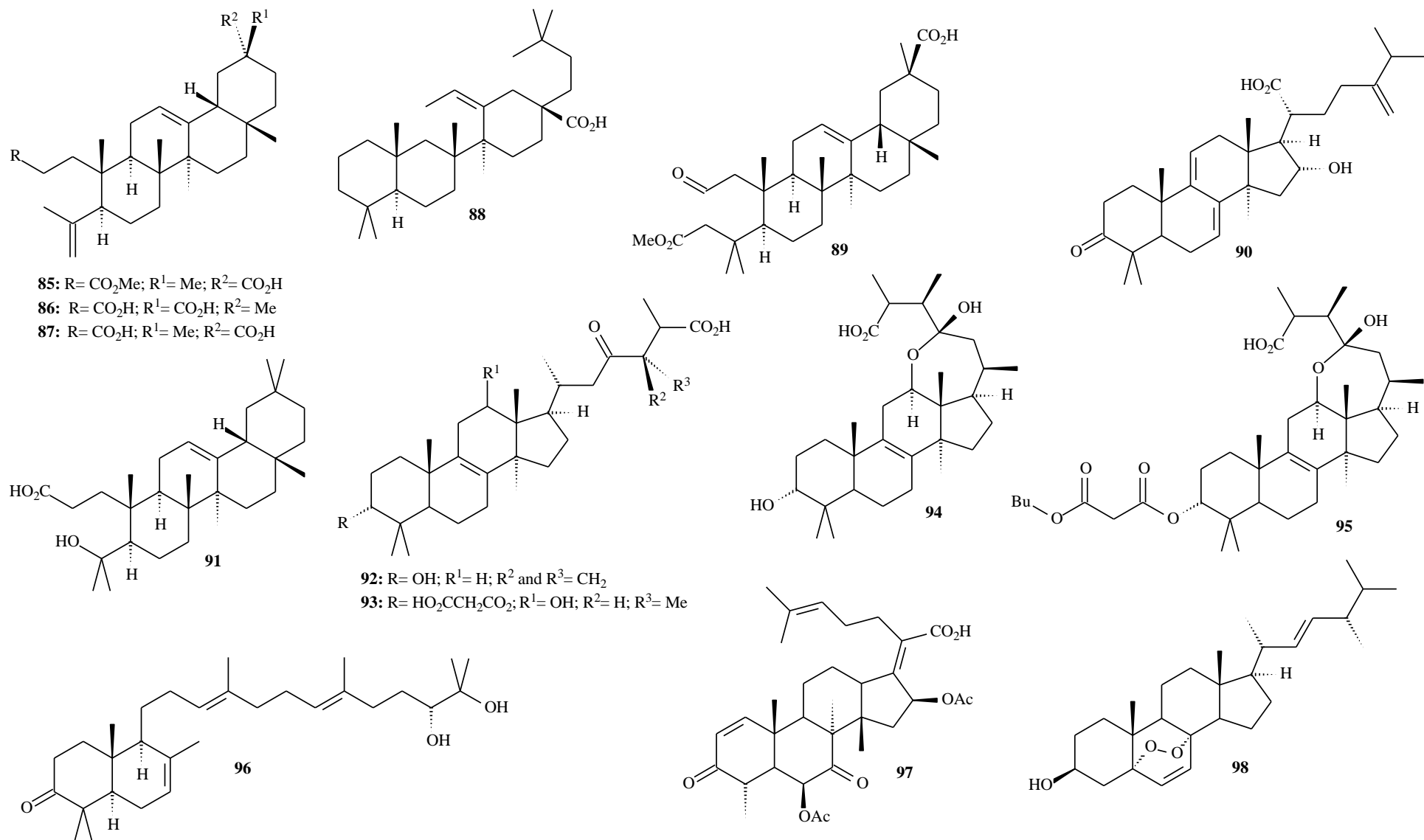


Figure 4. Miscellaneous types of triterpenes with bactericidal activity isolated from vegetal species.

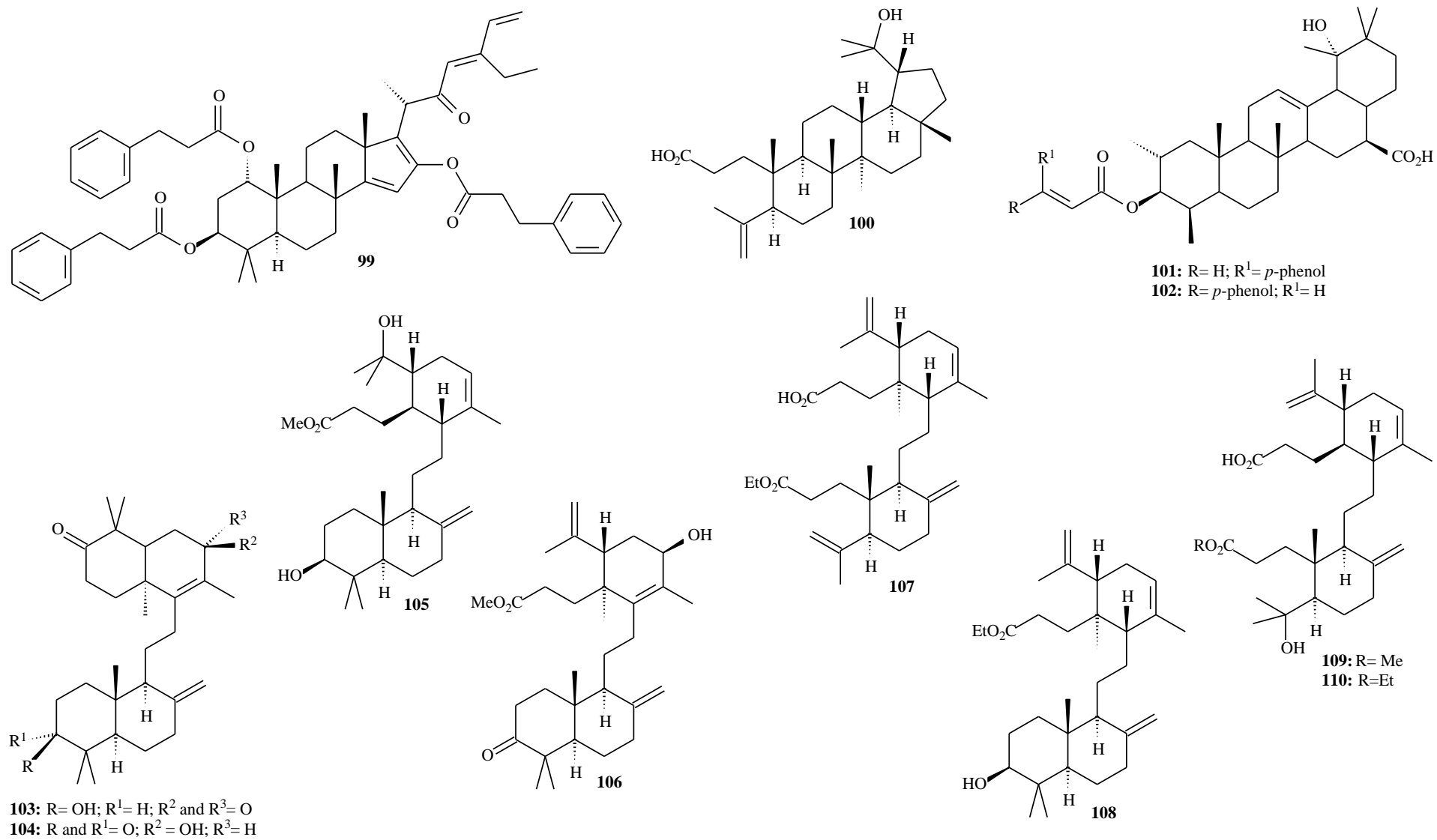


Figure 4. (Contd.)

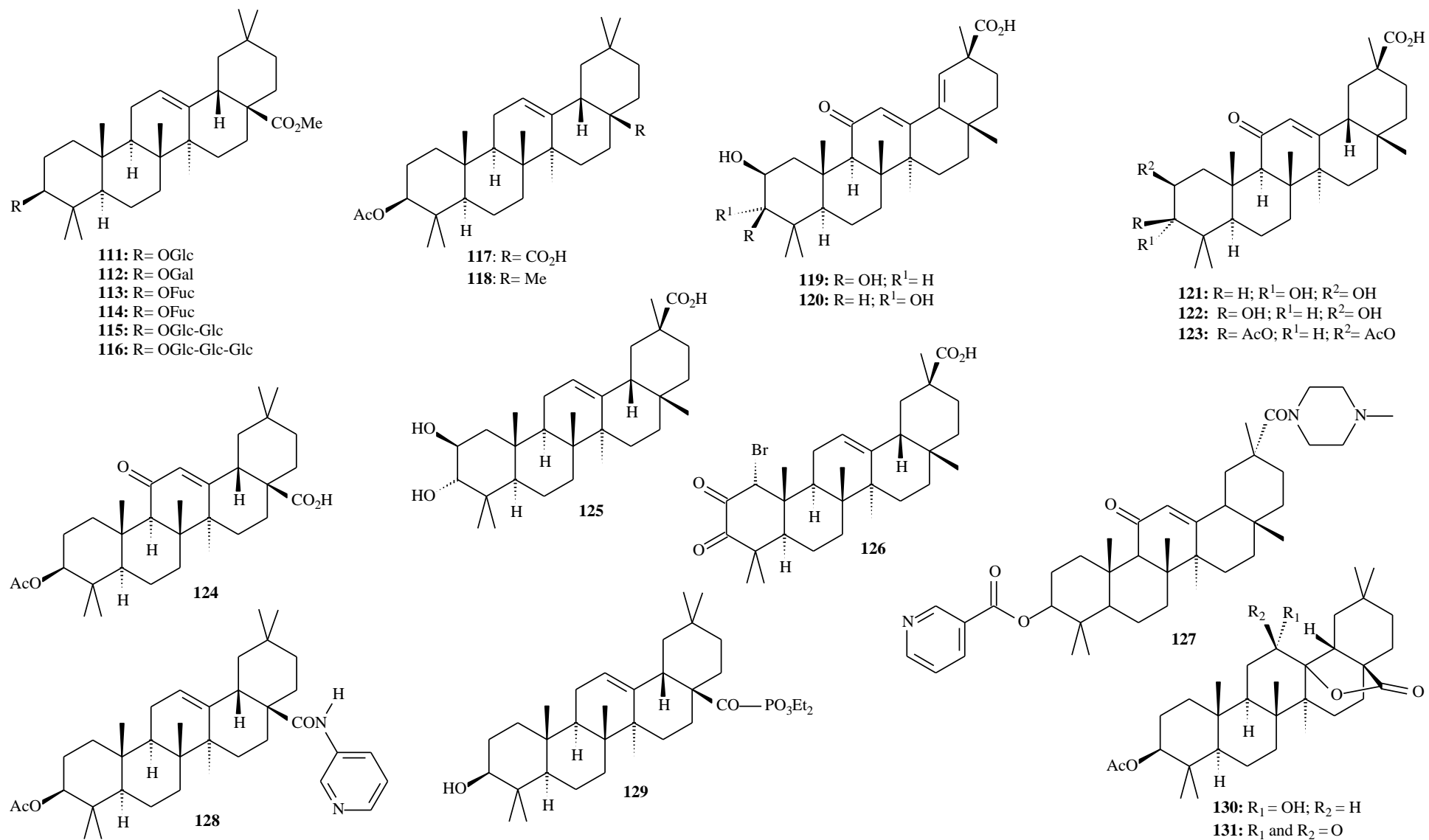


Figure 5. Various types of triterpene derivatives obtained from synthesis with bactericidal activity.

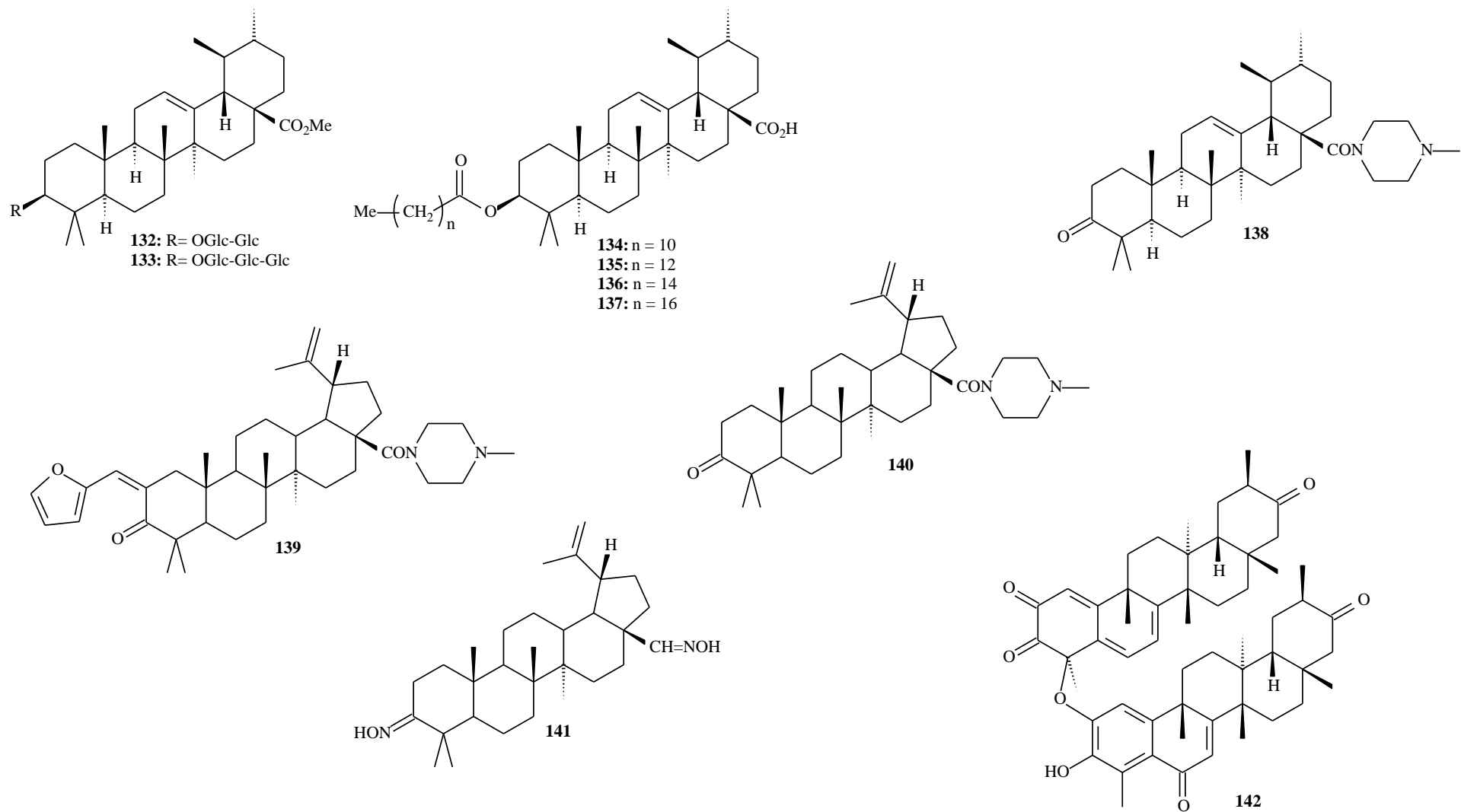


Figure 5. (Contd.)

In conclusion, the general analysis of the relationships between chemical structure and activity of triterpenes against Gram-positive and Gram-negative bacteria indicates that the antibacterial activity of the triterpene may be related to the presence of an oxygenated group at C-3, since 95% of the bactericidal triterpenes present this functionality. This site is represented by hydroxyl, carbonyl, glycoside, ester (mainly acetyl), or hydroxylimine (compound **141**). The bactericidal activity is also influenced by the chemical structure of the substituent group. Glycoside derivatives usually exhibit higher activity, mainly for 1→6 type bonding in relation to 1→4 type one (Takechi & Tanaka, 1993). The activity is increased for the triterpenes containing free hydroxyl group at C-3, mainly on the beta-side. In fact, the activity usually decreased when the position C-3 is an ester derivative (Abreu et al., 2011). The conversion of the carboxyl group at C-17 on the beta-side to a lactone at C-13 and C-17 increases the bactericidal activity (Hichri et al., 2003).

Moreover, the bactericidal activity attributed to the C-3 site is not influenced by the steric effects, because very active compounds contain groups that present large volumes at C-3, such as compounds **23-25, 28, 36-42, 64, 81, 99, 101, 102, 111-116, 127, and 134-137**. A carboxyl group at C-17 on the beta side is also important — 78% and 81% of the triterpenes active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively, present this functional group. The same analysis can be made for the compounds containing functionality at C-20 on the alpha- or beta-side.

The majority of the active triterpenes presents π -bonding at positions C-5, C-6, C-9, C-11, C-12, and C-13 (i.e., $\Delta^{5,6}$, $\Delta^{9,11}$, and $\Delta^{12,13}$, respectively), few of them present $\Delta^{20,30}$ and $\Delta^{20,21}$, and π -bondings are absent in few active triterpenes. The bactericidal activities are mainly related to functional groups at the rings A and E of the triterpene skeleton. Considering a great quantity of active triterpenes containing π -bonding at the ring C, it may be proposed that this functionalization is also important to the bactericidal activity.

References

- Abreu, V.G.C.; Takahashi, J.A.; Duarte, L.P.; Piló-Veloso, D.; Junior, P.A.S.; Alves, R.O.; Romanha, A.J.; Alcântara, A.F. C. (2011). Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Vol. 21, No. 4, pp. 615-621.
- Ahmad, W.; Ahkhan, S.; Muhammadzeeshan; Obaidullah; Nisar, M.; Shaheen, F. & Ahamad, M. (2008). New antibacterial pentacyclic triterpenes from *Myricaria elegans* Royle. (tamariscineae). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 2, pp. 1023-1027.
- Al-Fatimi, M.; Wurster, M.; Schroder, G.; Lindequist, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 111, No. 3, pp. 657-666.
- Angeh, J.E.; Huang, X.; Sattler, I.; Swan, G.E.; Dahse, H.; Hartl, A.; Eloff, J.N. (2007). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 110, pp. 56-60.
- Ankli, A.; Heilmanna, J.; Heinrich, M.; Sticher, O. (2000). Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. *Phytochemistry*, Vol. 54, pp. 531-537.
- Barre, J.T.; Bowden, B.F.; Coll, J.; Jesus, J.; La Fuente, V.E.; Janairo, G.; Ragasa, C.Y. (1997). Bioactive Triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 2, pp. 321-324.
- Bolivar, P.; Cruz-Paredesa, C.; Hernández, L.R.; Juárez, Z.N.; Sánchez-Arreola, E.; Av-Gay, Y.; Bach, H. (2011). Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 137, No. 1, pp. 141-147.
- Chattopadhyay, D.; Maiti, K.; Kundu, A.P.; Chakraborty, M.S.; Bhadra, R.; Mandal, C.; Mandal, A.B. (2001). Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 77, No. 1, pp. 49-55.
- Chen, X.Q.; Zan, K.; Yang, J.; Liu, X.X.; Mao, Q.; Zhang, L.; Lai, M.X.; Wang, Q. (2011). Quantitative analysis of triterpenoids in different parts of *Ilex hainanensis*, *Ilex stewardii* and *Ilex pubescens* using HPLC-ELSD and HPLC-MSn and antibacterial activity. *Food Chemistry*, Vol. 126, pp. 1454-1459.
- Chiozem, D.D.; Trinh-Van-Dufat, H.; Wansi, J.D.; Mbazona Djama, C.; Fannang, V.S.; Seguin, E.; Tillequin, F.; Wandji, J. (2009). New Friedelane Triterpenoids with Antimicrobial Activity from the Stems of *Drypetes paxii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 57, No. 10, pp. 1119-1122.
- Chouhan, H.; Singh, S.K. (2010). Antibacterial activity of *phyllanthus simplex* linn. *Pharmacologyonline*, Vol. 3, pp. 169-172.
- Cunha, W.R.; Matos, G.X.; Souza, M.G.M.; Tozatti, M.G.; Silva, M.L.A.; Martins, C.H.G.; Silva, R.; Filho A.A.S. (2010). Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 48 No. 2, pp. 166-169.

- Daí, J.; Zhao, C.; Zhang, Q.; Liu, Z.; Zheng, R.; Yang, L. (2001). Taraxastane-type triterpenoids from *Saussurea petrovii*. *Phytochemistry*, Vol. 58, No. 7, pp. 1107-1111.
- Dash, M.; Patra, J.K.; Panda, P.P. (2008). Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of *Aquilaria agallocha* Roxb. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, No. 20, pp. 3531-3534.
- Dehaen, W.; Mashentseva, A.A.; Seitembetov, T.S. (2011). Allobetulin and Its Derivatives: Synthesis and Biological Activity. *Molecules*, Vol. 16, pp. 2443-2466.
- Devmurari, V.P. (2010). Antibacterial evaluation of ethanolic extract of *Cedrus deodara* Wood. *Archives of Applied Science Research*, Vol. 2, No. 2, pp. 179-183.
- Devmurari, V.P.; Ghodasara, T.J.; Jivani, N.P. (2010). Antibacterial Activity and Phytochemical Study of Ethanolic Extract of *Triumfetta rhomboidea* Jacq. *International Journal of PharmTech Research*. Vol. 2 No. 1, pp. 1182-186.
- Djoukeng, J.D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A.L.; Boudab, H.; Lontsi, D. (2005). Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 101, pp. 283-286.
- Ding, Q.; Yang, L.X.; Yang, H.W.; Jianga, C.; Wang, Y.F.; Wang, S. (2009). Cytotoxic and antibacterial triterpenoids derivatives from *Clematis ganpiniana*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 126, pp. 382-385
- Dong, S.H.; Zhang, C.R.; Dong, L.; Wu, Y.; Yue, J.M. (2011). Onoceranoïd-Type Triterpenoids from *Lansium domesticum*. *Journal Natural Products*, Vol. 74, pp. 1042-1048.
- Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Products Reports*, Vol. 23, pp. 394-411.
- Eisa, M.M.; Almagboul, A.Z.; Omer, M.E.A.; Elegami, A.A. (2000). Antibacterial activity of *Dichrostachys Cinérea* *Fitoterapia* Vol. 71, No. 3, pp. 324-327.
- Ekbote, M.T.; Ramesh, C.K.; Mahmood, R. (2010). Evaluation of Anthelmintic and Antimicrobial activities of *Azima tetracantha* Lam. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 2, No. 1 pp. 375-381.
- Fannang, S.V.; Kuete, V.; Djama, C.M.; Dongfack, M.D.J.; Wansi, J.D.; Tillequin, F.; Seguin, E.; Chosson, E.; Wandji, J. (2011). A new friedelane triterpenoid and saponin with moderate antimicrobial activity from the stems of *Drypetes laciniata*. *Chinese Chemical Letters*, Vol. 22, pp. 171-174.
- Gao, H.Y.; Wu, L.J.; Nakane, T.; Shiota, O.; Kuroyanagi, M. (2008). Novel Lanostane and Rearranged Lanostane-Type Triterpenoids from *Abies sachalinensis*—II— *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 56, No. 4, pp. 554-558.
- Geyid, A.; Abebe, D.; Debella, A.; Makonnen, Z.; Abera, F.; Teka, F.; Kebede, T.; Urga, K.; Yersaw, K.; Biza, T.; Mariam, B.H.; Guta, M. (2005). Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 97, No. 3, pp. 421-427.
- Gonzalez, A.G.; Jimenez, J.S.; Moujir, L.; Ravelo, A.G.; Luis, J.G.; Bazzochi, I.L.; Gutierrez, A. M. (1992) Two new triterpene dimers from Celastraceae, their partial synthesis and antimicrobial activity. *Tetrahedron*, Vol. 48, No. 4, pp. 769-774.
- Hajji, M.; Jarraya, R.; Lassoued, I.; Masmoudi, O.; Damak, M.; Nasri, M. (2010). GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochemistry*, Vol. 45, No. 9, pp. 1486-1493.
- Haraguchi, H.; Kataoka, S.; Okamoto, S.; Hanafi, M.; Shibata, K. (1999). Antimicrobial Triterpenes from *Ilex integra* and the Mechanism of Antifungal Action. *Phytotherapy research*, Vol. 13, pp. 151-156.
- He, X.F.; Wang, X.N.; Yin, S.; Dong, L.; Yue, J.M. (2011). Ring A-seco triterpenoids with antibacterial activity from *Dysoxylum hainanense*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 21, pp. 125-129.
- Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Cruz, A.B.; Moretto, E.; Cruz, R.B.; Messana, I.; Ferrari, F.; Filho, V.C.; Yunes, R.A. (1995). Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae) *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 47, No. 2, pp. 97-100.
- Hichri, F.; Ben Jannet, H.; Cheriaa, J.; Jegham, S.; Mighri, Z. (2003). Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 6, pp. 473-483.
- Ikan, R. 1991. *Natural Products. A Laboratory Guide*. Academic Press, New York.
- Isaka, M.; Palasarn, S.; Supothina, S.; Komwijit, S.; Luangsa-ard, J.J. (2011). Bioactive Compounds from the Scale Insect Pathogenic Fungus *Conoideocrella tenuis* BCC 18627. *Journal Natural Products*, Vol. 74, pp. 782-789
- James, U.J.T.; Dubery, I.A. (2009). Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban *Molecules*, Vol. 14, pp. 3922-3941.
- Katerere, D.R.; Grev, A.I.; Nash, R.J.; Waigh, R.D. (2003). Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*, Vol. 63, No. 1, pp. 81-88.
- Kazakovaa, O.B.; Giniyatullinaa, G.V.; Tolstikova, G.A.; Medvedevaa, N.I.; Utkinab, T.M.; Kartashovab, O.L. (2010). Synthesis, Modification, and Antimicrobial Activity of the N-Methylpiperazinyl

- Amides of Triterpenic Acids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, Vol. 36, No. 3, pp. 383-38915.
- Khan, I.; Srikakolupu, S.R.; Darsipudi, S.; Gotteti S.D.; Amaranadh, H. (2010). Phytochemical studies and screening of leaf extracts of *Azadirachta indica* for its anti-microbial activity against dental pathogens. *Archives of Applied Science Research*, Vol. 2 No. 2, PP. 246-250.
- Khan, I.; Srikakolupu, S.R.; Darsipudi, S.; Gotteti S.D.; Amaranadh, H. (2010). Phytochemical studies and screening of leaf extracts of *Azadirachta indica* for its anti-microbial activity against dental pathogens. *Archives of Applied Science Research*, Vol. 2 No. 2, PP. 246-250.
- Khera, S.; Woldemichael, G.M.; Singh, M.P.; Suarez, E.; Timmermann, B. N. (2003). A Novel Antibacterial Iridoid and Triterpene from *Caiophora coronata*. *Journal Natural Products*, Vol. 66, pp. 1628-1631.
- Kim, N.C, Desjardins, A.E, Wu, C.D, Kinghorn, A.D. (1999). Activity of Triterpenoid Glycosides from the Root Bark of *Mussaenda macrophylla* against Two Oral Pathogens. *Journal of Natural Products*, Vol. 62, No. 10, pp. 1379-1384.
- Kloos, H.; Zein, A.H. 1993. *The Ecology of Health and Diseases in Ethiopia*. West View Press Inc., Washington DC.
- Kuete, V.; Nana, F.; Ngameni, B.; Mbaveng, A.T.; Keumedjio, F.; Ngadjui, B.T. (2009). Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 124, No. 3, pp. 556-561.
- Kuete, V.; Nguemaving, J. R.; Beng, V. P.; Azebaze, A. G. B.; Etoa, F. X.; Meyer, M.; Bodo, B.; Nkengfack, A. E. (2007). Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 109, pp. 372-379.
- Kuete, V.; Tangmouo, J.G.; Beng, V.P.; Ngounou, F.N.; Lontsi, D. (2006). Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of tridesmostemon omphalocarpoides (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 104, No. 1, pp. 5-11.
- Léon, L.; López, M.R.; Moujir, L. (2010). Antibacterial properties of zylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, Vol. 165, pp. 617–626.
- Lindsey, K.L.; Budesinsky, M.; Kohout, L. & Staden, J.V. (2003). Antibacterial activity of maytenonic acid isolated from the root-bark of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany*, Vol. 72, pp. 473-477.
- Ling, T.J.; Wan, X.C.; Ling, W.W.; Zhang, Z.Z.; Xia, T.; Li, D.X.; Hou, R.Y. (2010). New Triterpenoids and Other Constituents from a Special Microbial-Fermented Tea; Fuzhuan Brick Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 58, pp. 4945-4950.
- Mallavadhani, U.V.; Mahapatra, A.; Jamil, K.; Srinivasa, P. (2004) Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 27, No. 10, pp. 1576-1579.
- Mangathayaru, K.; Lakshmikanth, J.; Sundar, N.S.; Swapna, R.; Grace, X.F.; Vasantha, J. (2005). Antimicrobial activity of *Leucas aspera* flowers. *Fitoterapia*, Vol. 76, No. 7, pp. 752-754.
- Manguro, L.O.A.; Midiwo, J.O.; Tietze, L.F.; Haod, P. (2011). Triterpene saponins of *Maesa lanceolata* leaves. *Arkivoc*, Vol. ii, pp. 172-198.
- McRae, J.M.; Yang, Q.; Crawford, R.J.; Palombo, E.A. (2008). Antibacterial compounds from *Planchonia careya* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 116, pp. 554-560.
- Maregesi, S.M.; Hermans, N.; Dhooghe, L.; Cimanga, K.; Ferreira, D.; Pannecouque, C.; Berghe, D.A.V.; Cos, P.; Maes, L.; Vlietinck, A.J.; Apers, S.; Pieters, L. (2010). Phytochemical and biological investigations of *Elaeodendron schlechteranum*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.129, pp. 319-326.
- Maridass, M.; Ramesh, U.; Raju, G. (2010). Evaluation of Phytochemical, Pharmacognostical and Antibacterial Activity of *Garcinia Gummicutta* Leaves. *Pharmacologyonline*, Vol. 1, pp. 832-837.
- Mathabe, M.C.; Hussein, A.A.; Nikolova, R.V.; Basson, A.E.; Meyer, J.J.M.; Lall, N. (2008). Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys Africana*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 116, pp. 194-197.
- Matu, E.N.; Staden, J.V. (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. Vol. 87, pp. 35-41.
- Miranda, R.R.S.; Duarte, L.P.; Silva, G.D.F.; Vieira Filho, A.S.; Carvalho, P.B.; Messas, A.C. (2009). Evaluation of antibacterial activity of "Mangabarana" *Austroplenckia populnea* Reissek (Celastraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Vol. 19, No. 2a, pp. 370-375.
- Mishra, P.M.; Sree, A. (2007). Antibacterial activity and GCMS analysis of the extract of the leaves of *Finlaysonia obovata* (A Mangrove Plant). *Asian journal of Plant Sciences*, Vol. 6, pp. 168-172.
- Motlhanka, D.; Houghton, P.; Miljkovic-Brake, A.; Habtemariam, S. (2010). A novel pentacyclic triterpene glycoside from a resin of *Commiphora glandulosa* from Botswana. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 4, No. 8, pp. 549-554.
- Mutai, C.; Bii, C.; Vagias, C.; Abatis, D.; Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 123, No. 1, pp. 143-148.

- Nick, A.; Wright, O.; Sticher, O. (1994). Antibacterial Triterpenoid Acids from *Dillenia papuana*. *Journal of Natural Products*, Vol. 57, pp. 1245-1250.
- Nickavar, B.; Mojab, F. (2003). Antibacterial activity of *Pulicaria dysenterica* Extracts. *Fitoterapia*, Vol. 74, No. 4, pp. 390-393.
- Panizzi, L.; Catalano, S.; Miarelli, C.; Cioni, P.L.; Campeol, E. (2000). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Geum rivale*. *Phytotherapy Research*, Vol. **14**, No. 7, pp. **561-563**.
- Parveen, M.; Ghalib, R.M.; Mehdi, S.H.; Rehman, S.Z.; Ali, M. (2009). A new triterpenoid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. *comosa*). *Natural Products Research*, Vol. 23, No. 8, pp. 729-736.
- Pattanayak, S.P.; Sunita, P. (2008). Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 120, No. 2, pp. 241-247.
- Peixoto, J.R.O.; Silva, G.C.; Costa, R.A.; Fontenelle, J.L.S.; Vieira, G.H.F.; Filho, A.A.F.; Vieira, R.H.S.F. (2011). In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol. 4, No. 3, pp. 201-204.
- Pitzele, B.S. (1974) Synthesis of 2-Oxygenated Glycyrrhetic Acid Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 17, No. 2, pp. 191-194.
- Popova, M.; Trusheva, B.; Gyosheva, M.; Tsvetkova, I.; Bankova, V. (2009). Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia*, Vol. 80, pp. 263-266.
- Ramesh, N.; Viswanathan, M.B.; Saraswathy, A.; Balakrishna, K.; Brindha, P.; Lakshmanaperumalsamy P. (2001). Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. *Fitoterapia* Vol. 72, No. 8, pp. 934-936.
- Rahman, A.U.; Zareen, S.; Choudhary, M.I.; Ngounou, F.N.; Yasin, A.; Parvez, M. (2002). Terminalin A, a novel triterpenoid from *Terminalia glaucescens*. *Tetrahedron Letters*, Vol. 43, No. 35, pp. 6233-6236.
- Rivero-Cruz, J.F.; Zhu, M.; Kinghorn, A.D.; Wua, C.D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, Vol. 1, pp.151-154.
- Ryu, S.Y.; Oak, M.H.; Yoon, S.K.; Cho, D.I.; Yoo, G.S.; Kim, T.S. (2000). Antiallergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Medica*, Vol. 66, No. 4, pp. 358- 360.
- Saleh, M.; Kamel, A.; Li, X.; Swaray, J. (1999). Antibacterial Triterpenoids isolated from *Lantana camara*. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 37, pp. 63-66.
- Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Schiavini, M.S.; Nakamura, C.V.; Dias-Filho, B.P. (2005). An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.) *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 48, No. 3, pp. 429-436.
- Semwal, R.B.; Semwal, D.K.; Semwal, R.; Singh, R.; Rawat, M.S.M. (2011). Chemical constituents from the stem bark of *Symplocos paniculata* Thunb. with antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 135, pp. 78-87.
- Shai, L.J.; McGaw, L.J.; Aderogba, M.A.; Mdee, L.K.; Eloff, J.N. (2008). Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 119, pp. 238-244.
- Silveira, G.P.; Nome, F.; Gesser, J.C.; Sá, M.M.; Terenzi, H. (2006). Recent achievements to combat bacterial resistance. *Quimica Nova*, Vol. 29, No. 4, pp. 844-855.
- Sun, F.Y.; Chen, X.P.; Wang, J.H. L.Q.; Yang, S.R.; Du, G.H. (2008). Arjunic Acid, a Strong Free Radical Scavenger from *Terminalia arjuna*. *American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 36, No. 1, pp. 197-207.
- Sunitha, S.; Nagaraj, M.; Varalakshmi, P. (2001). Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*, Vol. 72, No. 5, pp. 516- 523.
- Takechi, M.; Tanaka, Y. (1992). Structure-activity relationships of synthetic methyl oleanolate glycosides. *Phytochemistry*, Vol.31, No.11, pp. 3789-3791.
- Takechi, M.; Tanaka, Y. (1993) Structure-activity relationships of synthetic methyl ursolate glycosides. *Phytochemistry*, Vol. 34, No.3, pp. 675-677.
- Tamokou, J.D.D.; Tala, M.F.; Wabo, H.K.; Kuate, J.R.; Tane, P. (2009). Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 124, pp. 571-575.
- Tantry, M.A.; Khan, R.; Akbar, S.; Dar, A.R.; Shawl, A.S.; Alam, M.S. (2011). An unusual bioactive oleanane triterpenoid from *Rhododendron campanulatum* D. Don. *Chinese Chemical Letters*, Vol. 22, No. 5, pp. 575-579.
- Tsiri, D.; Aligiannis, N.; Graikoub, K.; Spyropoulos, C.; Chinou, I. (2008). Triterpenoids from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Tissue Cultures. *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 91, pp. 2110-2114.
- Viji, M.; Sathiya, M.; Murugesan, S. (2010). Phytochemical analysis and antibacterial activity of medicinal plant *Cardiospermum helicacabum* linn. *Pharmacologyonline*, Vol. 2, pp. 445-456.

- Yeboah, E.M.O.; Majinda, R.R.T.; Kadziola, A.; Muller, A. (2010). Dihydro-*a*-agarofuran Sesquiterpenes and Pentacyclic Triterpenoids from the Root Bark of *Osyris lanceolata*. *Journal Natural Products*, Vol.73, pp. 1151-1155.
- Yimdjo, M.C.; Azebaze, A.G.; Nkengfack, A.E.; Meyer A.M, Bodo, B.; Fomum Z.T. (2004). Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*, Vol. 65, No. 20, pp. 2789-2795.
- Yun, B.S.; Ryoo, I.J.; Lee, I.K.; Park, K.H.; Choung, D.H, Han, K.H. (1999). Two bioactive pentacyclic triterpene esters from the root bark of *Hibiscus syriacus*. *Journal of Natural Products*, Vol. 62, No. 5, pp. 764- 766.
- Weigenand, O.; Hussein, A.A.; Lall, N.; Meyer, J.J.M. (2004). Antibacterial Activity of Naphthoquinones and Triterpenoids from *Euclea natalensis* Root Bark. *Journal Natural Products*, Vol. 67, pp. 1936-1938.
- Zhao, J.; Mou, Y.; Shan, T.; Li, S.; Zhou, L. Wang, M.; Wang, J. (2010). Antimicrobial Metabolites from the Endophytic Fungus *Pichia guilliermondii* Isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, Vol. 15, pp. 7961-7970.
- Zheng, C.J.; Sohn, M.J.; Kim, D.Y.; Yu, H.E.; Kim, W.G. (2008). Olean-27-carboxylic Acid-Type Triterpenes with Potent Antibacterial Activity from *Aceriphyllum rossii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, pp. 11752-11756.