

# **Introdução**

Este trabalho iniciou-se a partir do estudo fitoquímico do cerne de *Brosimum potabile*, ao ser isolado, além de um diaril-heptanóide (centrolobina) — fitoconstituente ainda não registrado em espécies do gênero *Brosimum*, um sólido cristalino branco da fração hexano do extrato hexano que foi identificado como uma mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. A literatura descreve que, principalmente no metabolismo de plantas, estigmasterol é biossintetizado a partir do  $\beta$ -sitosterol. Por isto, a partir do estudo fitoquímico de *B. potabile*, foi realizado um estudo teórico das propriedades e reatividades químicas do  $\beta$ -sitosterol para investigar o metabolismo de esteróides inferindo sobre o mecanismo de sua bioconversão em estigmasterol.

Considerando que no estudo fitoquímico das cascas do caule e da raiz *B. potabile* não foram obtidas quantidades suficientes destes esteróides, a fim de analisar o efeito da luz nessa bioconversão esteroidal, foi realizado um estudo fitoquímico tanto das cascas da raiz quanto das cascas do caule de *Brosimum acutifolium*. Nesse estudo, foram isoladas proporções esteroidais diferentes nas cascas do caule e da raiz, indicando que, apesar do  $\beta$ -sitosterol apresentar maior concentração relativa tanto no caule quanto na raiz, a concentração de estigmasterol é maior na raiz, podendo assim indicar um efeito da luz no mecanismo de bioconversão esteroidal.

Entretanto, pelo levantamento bibliográfico na literatura recente sobre o isolamento destes esteróides em diferentes partes das plantas, não foi possível inferir sobre a relação incidência de luz e concentração de estigmasterol em diferentes partes das plantas. Por outro lado, foram realizadas análises da concentração de metais nas cascas do caule e da raiz de *B. acutifolium* para justificar um efeito catalisador de metais na bioconversão esteroidal, verificando maiores concentrações relativas de cobalto e zinco nas cascas da raiz, proporcionando, desta forma, a maior probabilidade do envolvimento destes metais na biossíntese de estigmasterol.

Neste trabalho, o primeiro capítulo aborda os aspectos gerais sobre a espécie *Brosimum potabile*, descrevendo sua classificação taxonômica, nome popular, distribuição geográfica, principais características morfológicas, importância econômica, usos populares e aspectos químicos e farmacológicos. Além disto, considerando o isolamento e estudo das propriedades químicas dos esteróis, neste capítulo é descrito também um levantamento sobre esteróides, enfatizando as suas principais características químicas, biossíntese e importância biológica.

O segundo capítulo trata sobre a parte experimental. Inicialmente, na parte de materiais, são especificados os solventes e reagentes utilizados nas metodologias fitoquímicas, bem como os equipamentos empregados nos procedimentos para obtenção de dados físicos e químicos dos fitoconstituintes isolados, possibilitando assim identificações estruturais. Na segunda parte deste capítulo, é descrita a metodologia fitoquímica do cerne de *Brosimum potable*, isolando-se do extrato hexano misturas contendo  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol e, do extrato etanol, um diaril-heptanóide (centrolobina) não registrado ainda no gênero *Brosimum*. Posteriormente, é descrita a metodologia fitoquímica para isolamento de misturas de esteróides nas cascas do caule e da raiz de *Brosimum acutifolium*. Finalmente, é descrita a metodologia para os cálculos teóricos das propriedades químicas e reatividades do  $\beta$ -sitosterol e de seus derivados O-substituídos, visando inferir sobre o mecanismo de sua biotransformação em estigmasterol.

No capítulo III, são descritos os estudos termodinâmicos envolvendo  $\beta$ -sitosterol e seus derivados. Inicialmente, é descrita a sua análise conformacional, obtendo-se duas conformações relativamente mais estáveis levando em conta a ramificação esteroidal no carbono C<sub>17</sub>, sendo uma conformação denominada de alternada e a outra eclipsada. O estudo termodinâmico do processo de O-substituição no  $\beta$ -sitosterol é descrita, calculando o efeito da estrutura dos produtos O-substituídos.

O quarto capítulo trata sobre o estudo das propriedades estéricas do  $\beta$ -sitosterol e de seus derivados, descrevendo as variações das distâncias interatômicas devidas às alterações estruturais no grupo O-substituinte. Neste estudo, são analisadas principalmente as variações nos comprimentos das ligações entre os carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, sítio reativo na biotransformação para estigmasterol, e entre os carbonos C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>, ligação  $\pi$  do esqueleto esteroidal de ambos esteróis.

O capítulo V trata sobre o estudo das propriedades eletrônicas do  $\beta$ -sitosterol e de seus derivados. Assim, são descritos os cálculos das densidades de cargas eletrônicas sobre os carbonos C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> e sobre C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, bem como sobre os hidrogênios ligados à estes últimos carbonos. Além disto, são descritos também os cálculos dos momentos de dipolo elétrico, os cálculos das contribuições dos orbitais atômicos para os orbitais moleculares de fronteira e as energias destes orbitais moleculares para inferir sobre o efeito eletrônico da estrutura do grupo O-substituinte na reatividade e/ou regioselectividade do  $\beta$ -sitosterol.

No último capítulo, é descrito o estudo dos fatores que podem influenciar a proporção entre  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol em plantas para inferir principalmente sobre o efeito da

incidência de luz e/ou da presença de metais no mecanismo da biotransformação esteroidal. Inicialmente, é descrito um levantamento bibliográfico na literatura recente sobre o registro de isolamento destes esteróis em diferentes partes das plantas: folhas, vagens, sementes, frutos, caule, cascas do caule, raiz e cascas da raiz. Posteriormente, é descrito a determinação quantitativa das quantidades relativas de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol oriundas de misturas isoladas pelas metodologias fitoquímicas, calculando as proporções esteroidais tanto por integração das bandas registradas em cromatograma gasosa quanto por integração dos sinais dos hidrogênios alquênílicos em espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Finalmente, são descritos os resultados da determinação da concentração de metais nas cascas do caule e nas cascas da raiz de *Brosimum acutifolium*.

Após a conclusão deste capítulo, são apresentados dois anexos. O primeiro anexo descreve a identificação química das frações contendo misturas de esteróis das frações isoladas de *B. potabile* e *B. acutifolium*. O segundo anexo descreve a identificação química, por análises espectroscópicas e espectrométricas, do diaril-heptanóide (centrolobina) isolado do extrato etanólico de *B. potabile*.

## Capítulo I

### Aspectos Gerais sobre a Espécie *Brosimum potabile* Ducke e Esteróides

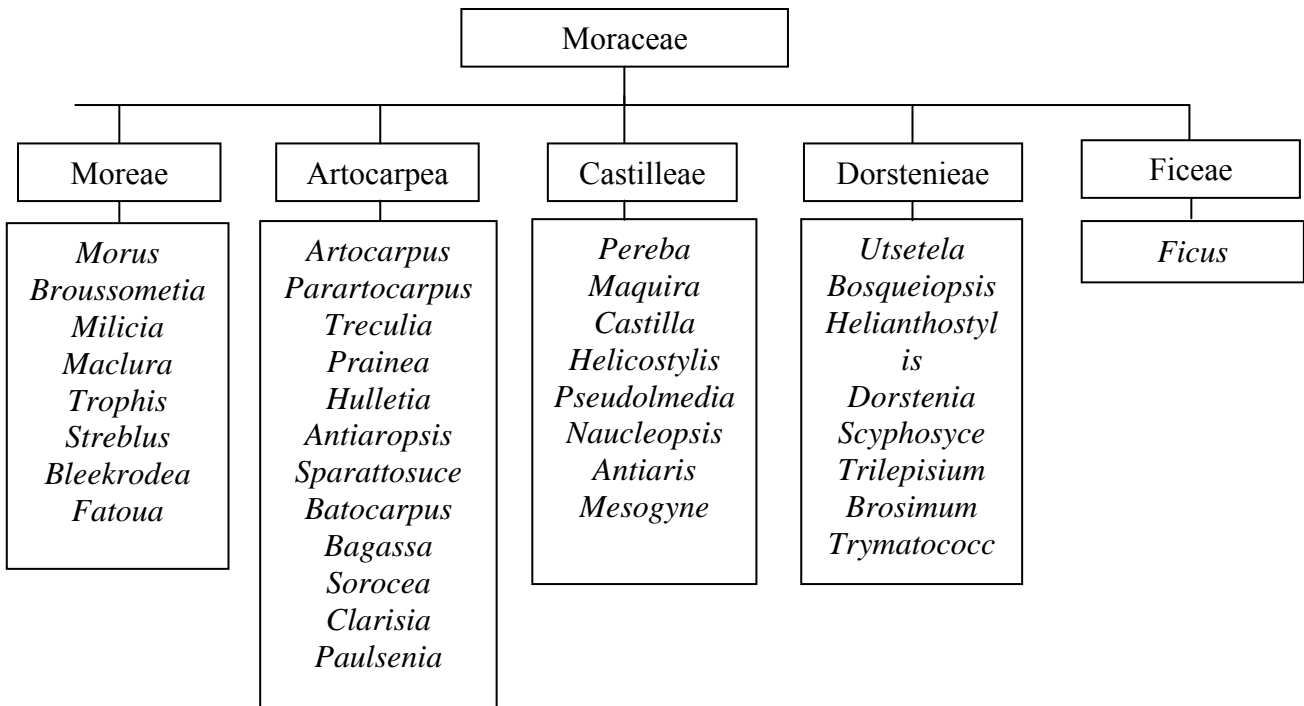
## 1. *Brosimum potabile* Ducke

### a. Classificação Taxonômica

A espécie *Brosimum potabile* Ducke é conhecida popularmente como guariúba-folha-fina e, principalmente, amapá doce ou leiteira. Esta espécie pertence à família Moraceae, que é caracterizada principalmente por apresentar dois estiletos e óvulos apicais. Apesar da maioria de suas espécies apresentar látex entre a casca e o caule, esta característica não é determinante para classificação pois espécies de alguns de seus gêneros não produzem látex.<sup>1</sup>

A família Moraceae tem sido classificada também como pertencente à família Urticaceae pois o limite entre as duas famílias não é totalmente claro, mesmo considerando que as espécies da Urticaceae apresentam normalmente um único estilete e estigma, óvulo básico e seiva clara. Além deste fato que mostra a imprecisão de classificação de espécies na família Moraceae, os gêneros *Cannabis* e *Humulus* são muitas vezes classificados numa outra família (*Cannabaceae*), diferindo mais notavelmente por suas cinco partes florais em vez de quatro.<sup>2</sup>

O mais importante esquema de classificação é baseado nos tipos de inflorescência (agrupamento de flores com disposição definida em um eixo comum), dividindo os gêneros da família em cinco tribos: Moreae, Artocarpeae, Castilleae, Dorsteneiae e Ficeae, conforme apresentado no Esquema I.1.



**Esquema I.1** – Tribos e gêneros da família Moraceae

A classificação da espécie *B. potabile*, baseada principalmente em sua inflorescência, foi proposta por Berg em 1973,<sup>3</sup> conforma apresentada na Tabela I.1.

**Tabela I.1** – Classificação taxonômica da espécie *Brosimum potabile*.

	CLASSIFICAÇÃO
<b>CLASSE</b>	Magnolitaе
<b>SUBCLASSE</b>	Hamamelidaе
<b>ORDEM</b>	Urticales
<b>FAMÍLIA</b>	Moraceae
<b>TRIBO</b>	Dorsteniaceaе
<b>GÊNERO</b>	<i>Brosimum</i>
<b>ESPÉCIE</b>	<i>B. potabile</i>

#### b. Distribuição Geográfica

A família Moraceae possui aproximadamente 1050 espécies, sendo distribuídas nos trópicos, subtropicos e algumas regiões temperadas de ambos os hemisférios, conforme apresentada na Figura I.1.<sup>4</sup> No Brasil, encontra-se muito bem representada por espécies nativas e cultivadas.



**Figura I.1** – Distribuição geográfica da família Moraceae.

Dentre os gêneros nativos no Brasil destacam-se *Ficus*, *Brosimum*, *Dorstenia* e *Cecropia*. O gênero *Cecropia*, contendo aproximadamente 50 espécies, é representado pela espécie conhecida popularmente no Nordeste como embaúba ou torém, cujos brotos servem de alimento à preguiça (*Bradipus*).

Outras espécies do gênero *Cecropia* apresentam-se em associação com certas formigas que constroem ninhos no interior do caule e alimentam-se de pêlos especiais, produzidos em uma região pulviniforme na base do pecíolo da planta, que são ricos em proteínas. Esses verdadeiros “pães de proteínas” são eliminados ativamente pela planta em resposta à estímulos externos.<sup>5</sup> Entretanto, o gênero *Cecropia* tem sido incluído recentemente na família *Cecropiaceae*.<sup>6</sup>

No gênero *Dorstenia*, que é constituído por aproximadamente 125 espécies, a espécie conhecida popularmente como caapiá ou carapiá é um exemplo de erva da família. Dentre as características deste gênero, podem-se destacar as suas inflorescências disciformes, resultantes da fusão dos pendúculos, com flores sésseis inseridas no lado superior.

O gênero *Ficus*, constituído por mais de 600 espécies, é representada por figueiras, mata-paus, gameleiras das matas e a popular hera-miúda (muito utilizada no revestimento de paredes). Certas espécies de *Ficus* são cultivadas em função de suas importâncias econômicas. No caso da seringueira (*Ficus elastica*), tem sido muito cultivada pela produção de borrachas e seus derivados. Outras espécies são cultivadas devidas às suas deliciosas infrutescências, no caso do figo-benajmim (*Ficus retusa*) e do figo (*Ficus carica*).

Dentre os gêneros com representantes exclusivamente cultivados, destacam-se: *Morus*, a amoreira cujas folhas servem de alimento à lagarta do bicho-da-seda (*Bombix mori*) e cujas infrutescências, as amoras (*Morus alba*) são comestíveis e utilizadas na confecção de geléias. O gênero *Artocarpus* é representada por muitas espécies conhecidas, tais como jacas (*Artocarpus heterophyllus*) e frutas-pães (*Artocarpus utilis*).

Em relação ao Gênero *Brosimum*, as suas espécies distribuem-se nas Américas do Sul e Central. Na Região Amazônica, são encontradas em terrenos argilosos de matas de terra firme da Venezuela, Suriname, Guiana Francesa e, do Brasil, principalmente nos estados do Pará e Amazonas. Para a espécie *Brosimum potabile*, tem sido registrada a ocorrência em terras firmes da Amazônia.<sup>7</sup>



### c. Características Morfológicas

As espécies da família Moraceae são árvores, arbustos, trepadeiras ou raramente ervas, tendo como característica mais importante a presença de látex entre a casca e o cerne. Este fato distingue-se normalmente das espécies de outras famílias. A produção de látex começa no estado embrionário, produzindo até sua idade adulta.<sup>8</sup>

As folhas são alternas, espirais ou opostas com margens inteiras ou lobuladas, apresentando geralmente estípulas grandes, livres ou concrecidas. As inflorescências, racemo simples e dicásio, espigas e capítulos bissexuais ou unissexuais, apresentam quatro segmentos de perianto distribuídos em extremidades do amentilho ou do receptáculo. A flor masculina possui geralmente quatro estames, podendo apresentar em algumas espécies um ou dois estames. A flor feminina tem dois carpelos dos quais um é eliminado normalmente. O ovário contém um único óvulo pendurado (suspenso), sendo observada uma transição de um ovário superior (em espécies do gênero *Artocarpus*) para um ovário inferior (em espécies do gênero *Castilla*).<sup>9</sup>

As infrutescências são notavelmente variáveis, com frutos normalmente carnosos ou suculentos e comestíveis quando maduros. As partes carnosas (polpas) não são produzidas pelo ovário e sim, pelo receptáculo, no qual as sementes encontram-se embebidas. Esta característica é observada principalmente em espécies dos gêneros *Ficus*, *Artocarpus* e *Morus*. Além disto, os frutos desta família são freqüentemente drupáceos (envolvidos pelo perianto ou imersos no receptáculo), sincárpicos (apresentando-se normalmente como um conjunto de inflorescência) ou raramente secos, como aquênio (que não se abre).<sup>10</sup>

Sobre o gênero *Brosimum*, as árvores são monóicas ou dióicas. As folhas são alternas, dísticas, simples e comumente inteiras. As estípulas são livres ou concrecidas, podendo ser amplexicaules. As inflorescências são bissexuais ou unissexuais, pendunculadas, variando entre (sub)globosas e discóides de formas convexas, apresentando brácteas interflorais peltadas. As flores, com estames 1-4, sépalas ausentes e estigmas 2, são estaminadas com cálice 4-lobado ou ausente, pistiladas, apresentando normalmente com uma inflorescência fusionada com o receptáculo.

As tépalas são em número de dois, três ou quatro, livres ou associadas. Entretanto, em espécies mais evoluídas deste gênero, as tépalas encontram-se ausentes ou em declínio de desenvolvimento. O número de estames varia de um a quatro, crescendo de forma erecta. Os pestilos, variando de um a vários, apresentam-se imersos na extremidade das inflorescências. Os frutos são carnudos, localizando-se na extremidade da infrutescência.<sup>11</sup>

Em relação à espécie *Brosimum potabile*, as árvores são monóicas, atingindo aproximadamente trinta metros de altura, apresentando látex branco. As folhas apresentam nervuras em volta dos aréolos levemente proeminentes e seu indumento branco e amarelado (Figura I.2).



**Figura I.2** – Amostra da folha de *B. potabile*.

#### **d. Importância Econômica e Usos Populares**

As espécies da família Moraceae são economicamente importantes na alimentação, ornamentação, produção de madeiras e látex. Assim, muitas espécies apresentam frutos comestíveis, destacando-se a jaca (*Artocarpus heterophyllus*), a fruta-pão (*Artocarpus utilis*), amora (*Morus alba*) e figo (*Ficus carica*).<sup>12</sup> Para ornamentação, muitas espécies são cultivadas, destacando-se 44 espécies do gênero *Ficus*, a espécie *Cholophora* (pau-amarelo) do gênero *Cecropia*, duas espécies do gênero *Cudrania* e uma espécie do gênero *Dorstenia*.<sup>13</sup>

Muitas espécies de Moraceae produzem madeiras úteis para construção. Dentre as mais importantes, podem-se destacar: a *Milicia excelsa* (Iroko) da África Tropical, *Brosimum guianense*, da Guiana, *B. rubescens* (satiré ou muirapiranga) das Guianas e Brasil, *Machura pomifera* da América do Norte e várias espécies do gênero *Artocarpus* na Ásia.

Na produção de papéis finos, as espécies que apresentam importância econômica são *Broussonetia papyrifera* e *Morus alba*, sendo que, desta última espécie, as folhas são muito utilizadas para alimentação de larvas do bicho da seda (*Bombix mori*).<sup>14</sup>

Em relação ao látex, muitas espécies são empregadas na produção de colas ou na preparação de flexas venenosas devido à alta toxicidade do seu látex. Por outro lado, outras espécies, principalmente *Castilla elastica* e *Ficus elastica*, fornecem matérias-primas importantes na fabricação de borracha.<sup>15</sup>

Além disto, duas espécies encontradas na região do Baixo Amazonas e conhecidas principalmente como amapá-doce, *Brosimum potable* e *Brosimum ovatifolium* Ducke, fornecem látex branco, muito usado como verdadeiro leite vegetal, sendo ingerido em doses moderadas. Este látex é considerado pela produção local como altamente nutritivo e tônico, não apresenta sabor especial, sendo, por isto, misturado ao café.<sup>16</sup>

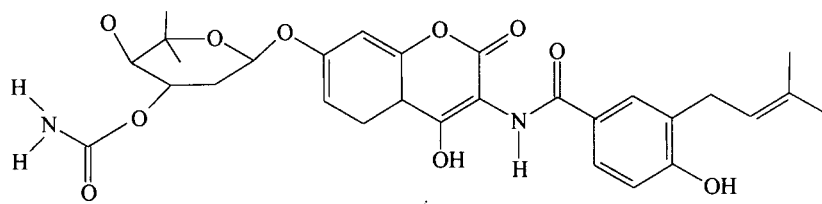
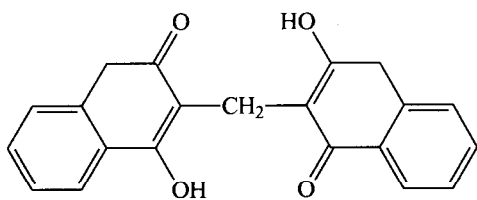
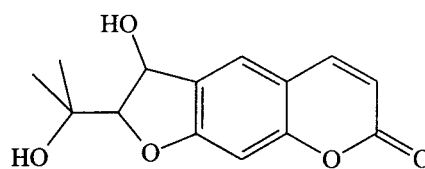
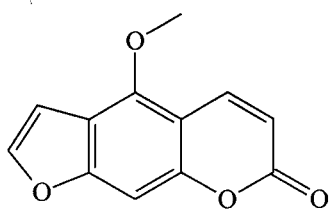
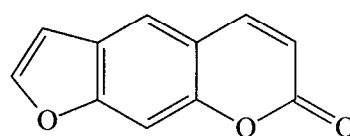
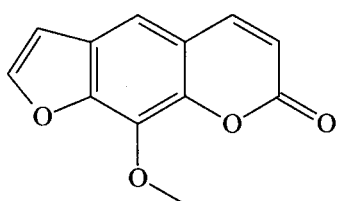
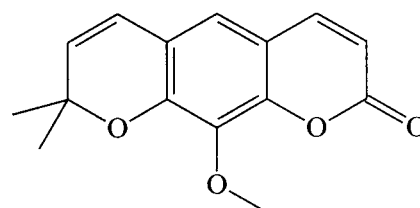
### e. Aspectos Químicos e Farmacológicos

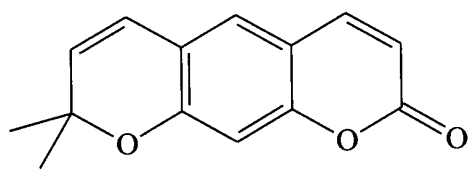
Como citado anteriormente, o látex é uma das características mais notáveis das espécies da família Moraceae, sendo, por isto, analisado extensivamente. Apesar da composição geral destes látex não seguir qualquer padrão sistemático, os resultados das análises indicam que as suas composições são pouco variáveis, verificando-se principalmente as presenças de borrachas, proteínas, ceras, resinas triterpenoidais, compostos polifenólicos e cardenólídeos.<sup>17</sup>

Vários tipos de polifenóis, principalmente derivados hidroxicinamato, cumarinas, flavonóides, benzofenonas e xantonas, têm sido isolados da madeira e de outras partes das espécies representantes da família Moraceae. Entretanto, tem sido verificado que taninos verdadeiros apresentam-se praticamente ausentes e que saponinas ou alcalóides, somente em poucas espécies de *Ficus*.

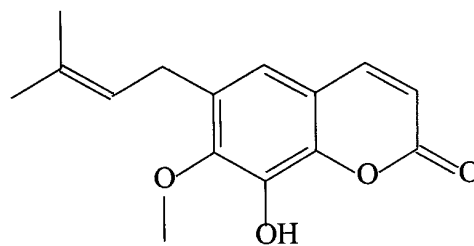
Em relação ao gênero *Brosimum*, a estrutura química de drogas alucinogênicas presentes no látex de *Brosimum acutifolium* (Takini) é ainda desconhecida. Entretanto, nas partes aéreas e subterrâneas de várias espécies foram identificadas cumarinas livres ou glicosiladas, principalmente novobiocina **I** e dicumarol **II**, que apresentam importantes atividades antibióticas.<sup>18</sup> Do estudo fitoquímico de *B. gaudichaudii* foram isoladas 3-hidroxiarmesina **III** e as furanocumarinas bergapteno **IV**, psoraleno **V** e xantotoxina **VI** e foram isoladas também as piranocumarinas luvangetina **VII** e xantiletina **VIII**.<sup>19</sup> Do estudo fitoquímico do cerne de *B. paraense* foram isoladas duas cumarinas: brosiparina **IX** e xantiletina.<sup>20</sup> Foram isoladas de *B. ovatifolium* três prenilcumarinas: brosiprenina **X**, O-prenilbrosiparina **XI** e 7-desmetil-suberosina **XII**.<sup>21</sup> Por outro lado, estudos fitoquímicos têm sido realizados recentemente, identificando três 4'-hidroxiflavanos (estruturas **XIII**, **XIV** e **XV**)<sup>22</sup> e duas chalconas<sup>23</sup>: 4-hidroxi-isocordoina **XVI** e 4-hidroxi-lonchocarpina **XVII** extraídas das cascas do caule de *B. acutifolium*.

Nas espécies do gênero *Brosimum*, têm sido identificadas também outras classes de compostos químicos tais como: esteróides, terpenóides, benzofenonas, xantonas, taninos, saponinas, alcalóides e polifenóis derivados de hidrocianamato.

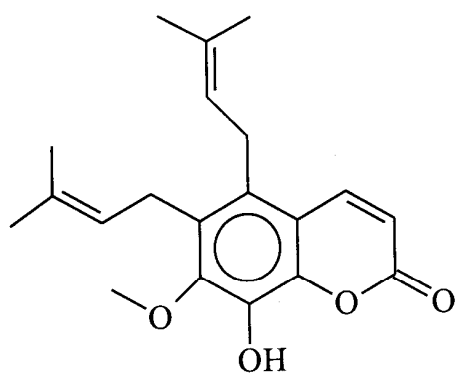
**I****II****III****IV** /**V****VI****VII**



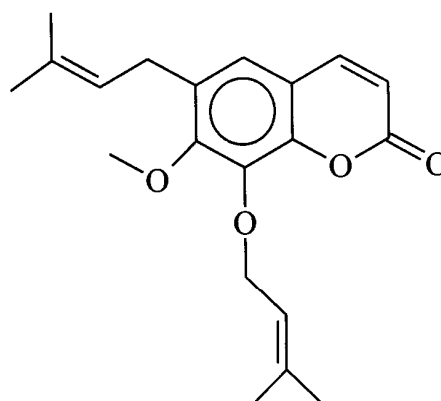
VIII /



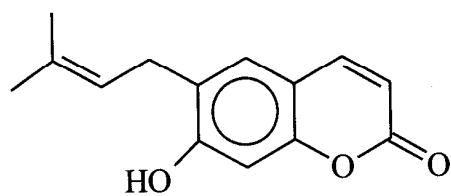
IX



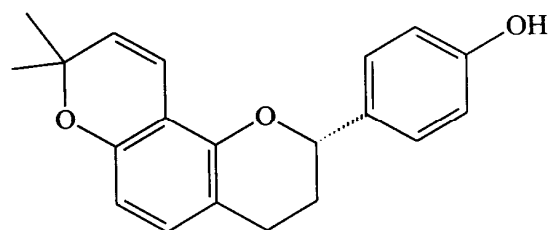
X



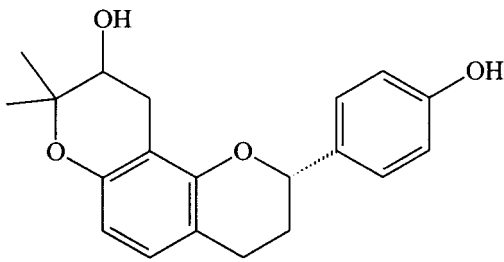
XI



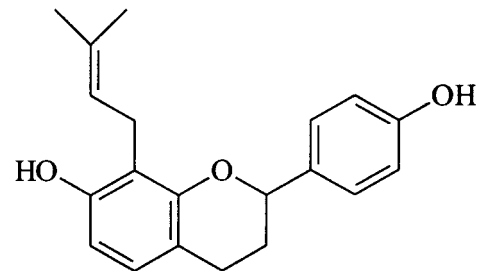
XII



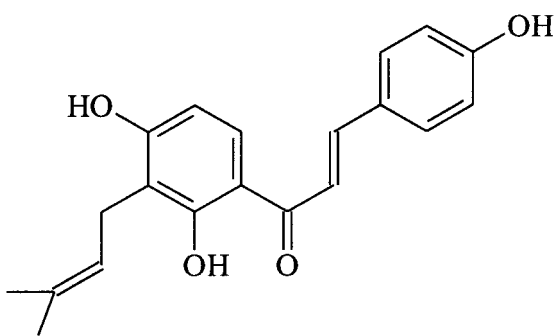
XIII /



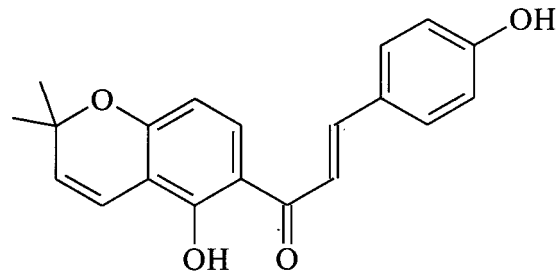
XIV /



XV /



XVI



XVII

De um modo geral, estudos farmacológicos indicaram que as cumarinas isoladas das espécies do gênero *Brosimum* apresentam atividades anticoagulantes, antibacterianas, antibióticas, hepatoxidas e estrogênicas.<sup>24</sup> Além disto, algumas apresentam ação foto-sensibilizadora no tratamento de vitiligo e podem apresentar também ação inseticida.<sup>25</sup>

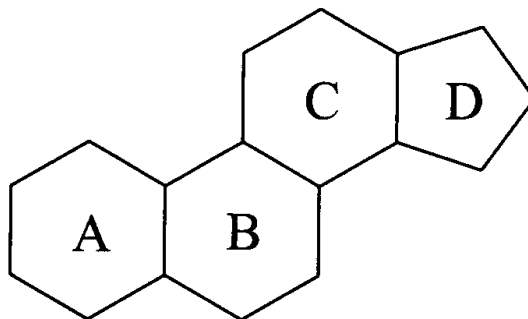
Por outro lado, além das cascas do caule serem utilizadas em tratamentos reumáticos, tem sido registrado que as seivas laticíferas são utilizadas como depurativa, anti-sifilítica, estimulante do sistema nervoso e muscular. No Suriname e na Índia, o látex de algumas espécies são utilizadas em rituais de tratamentos clínicos por apresentarem efeitos alucinógenos.<sup>26</sup>

Em relação a *Brosimum acutifolium*, levantamentos etnofarmacológicos registram que estratos hidro-alcoólicos das cascas do caule são empregados pela medicina popular no tratamento de doenças reumáticas e como um potente antiinflamatório.

## 2. Esteróides

### a. Características Químicas

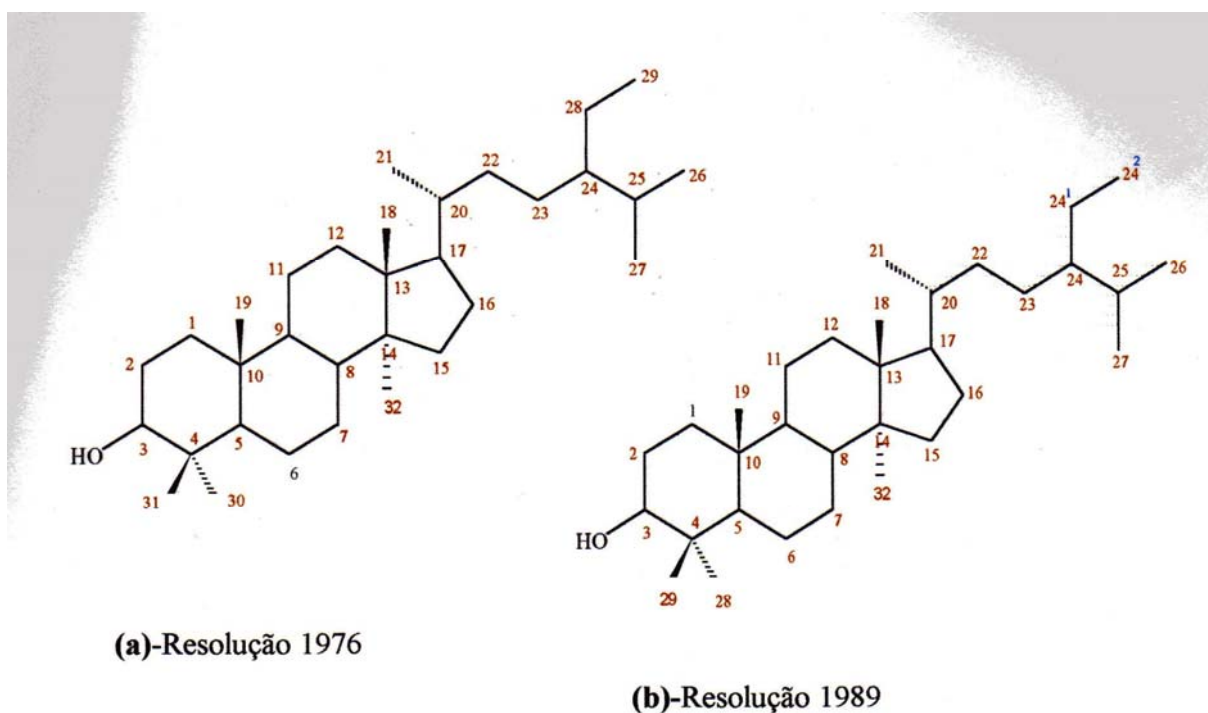
Os esteróides são substâncias policíclicas, contendo esqueleto básico do tipo peridrociclopentanofenantreno, conforme Figura I.3. Por esta figura, pode-se verificar que os quatro anéis apresentam-se identificados por **A**, **B**, **C** e **D**. Neste grupo de substâncias são incluídos os ácidos biles, hormônios sexuais, hormônios adrenocorticóides e glicogênios cardenolídeos.<sup>27</sup> Além destes, os esteróis são incluídos também entre os esteróides. Entretanto, deve-se destacar que os esteróis não apresentam grupos carbonílicos ligados aos anéis do esqueleto esteroidal e possuem normalmente oxigenação no anel A e cadeia lateral no anel D contendo de 8 a 10 átomos de carbono.<sup>28</sup>



**Figura I.3 – Esqueleto básico dos esteróides**

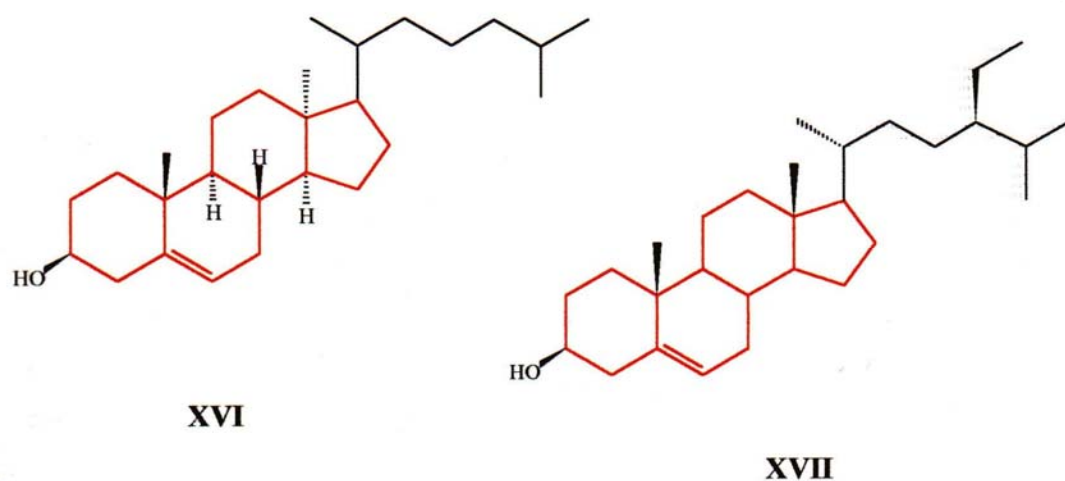
De acordo com as regras da IUPAC de 1976, a enumeração dos átomos de carbonos dos esteróis inicia-se no anel A do esqueleto básico, conforme mostrada na Figura I.4 (a). Entretanto, considerando uma revisão posterior da IUPAC, ocorreram importantes mudanças no sistema de enumeração dos átomos de carbono, conforme mostradas na Figura I.4 (b).<sup>29</sup> Apesar do sistema de enumeração anterior ser utilizada ainda em muitas publicações, a enumeração atual altera apenas a indicação dos átomos substituintes do esqueleto esteroidal.

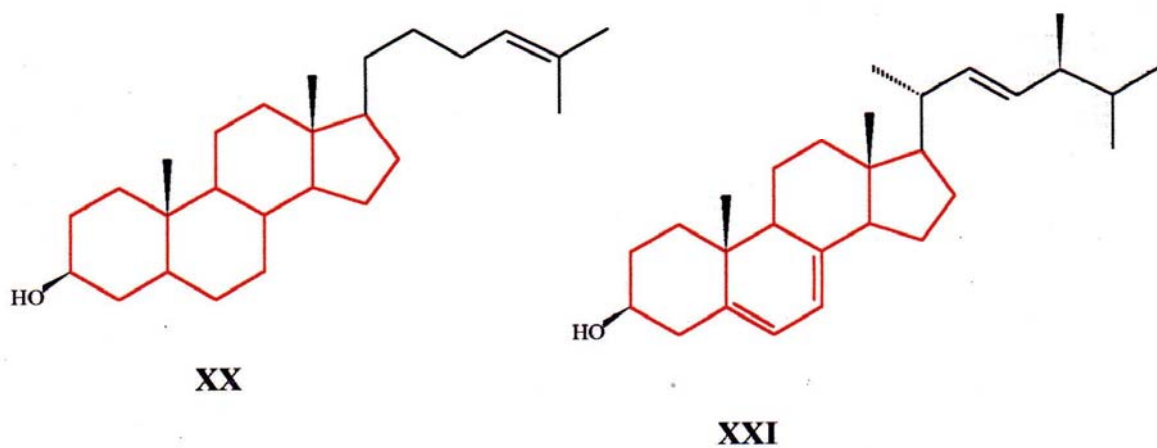
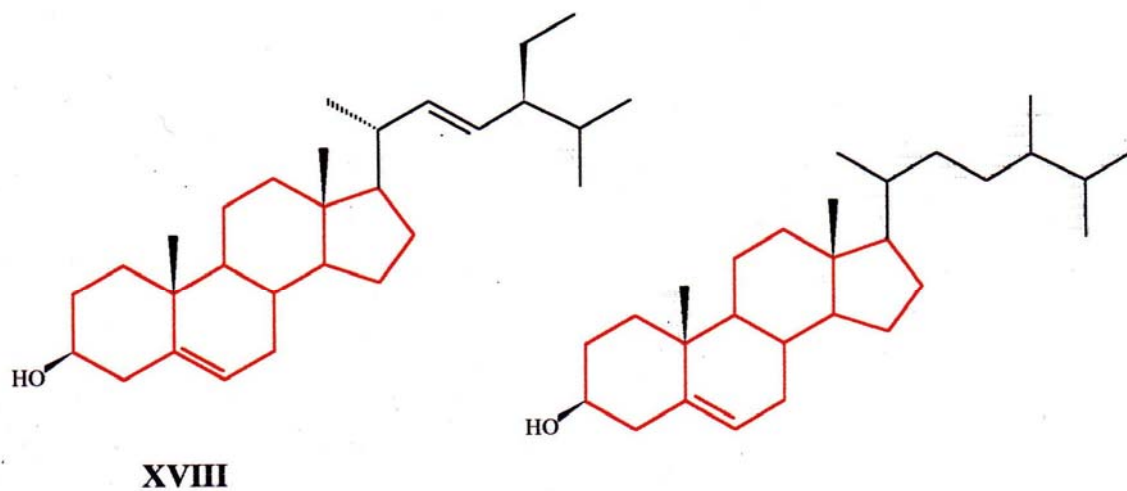




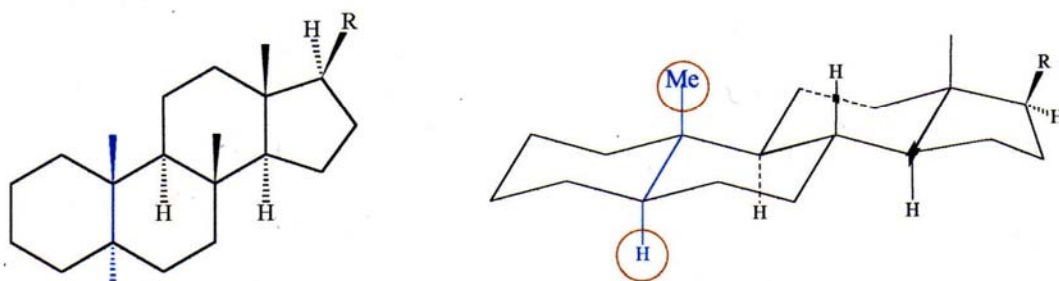
**Figura I.4** – Tipos de enumeração dos carbonos de esteróis, segundo a IUPAC.

Os esteróis são encontrados abundantemente nos meios biológicos, diferenciando em suas propriedades químicas devidas principalmente às alterações estruturais na cadeia lateral ligada ao carbono  $C_{17}$  ou no esqueleto básico. Assim, o colesterol **XVI** é encontrado praticamente em todos os organismos eucariotes,  $\beta$ -sitosterol **XVII**, estigmasterol **XVIII**, campesterol **XIX** e demosterol **XX** são encontrados em óleos vegetais e ergosterol **XXI** é encontrado em leveduras e outras fontes microbiológicas.<sup>30</sup>

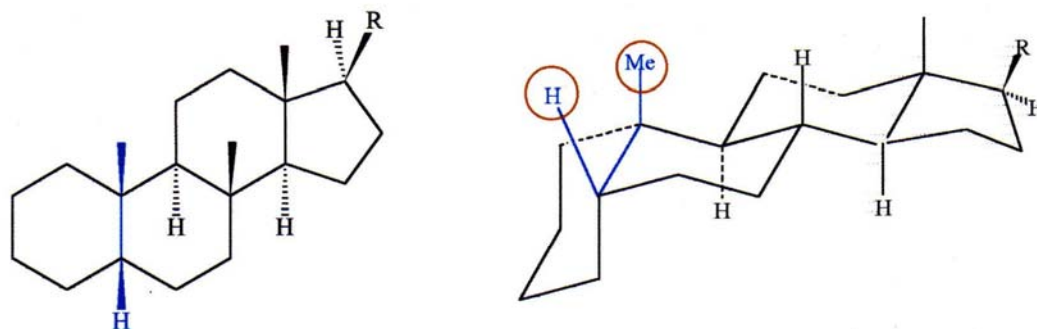




De acordo com a fusão dos anéis, a estereoquímica dos esteróides naturais pode apresentar configuração *cis* ou *trans* nas junções dos anéis A e B, conforme mostrada na Figura I.4. Por outro lado, na fusão dos demais anéis, a estereoquímica não é considerada normalmente pois estas apresentam-se predominantemente na configuração *trans*.<sup>31</sup>



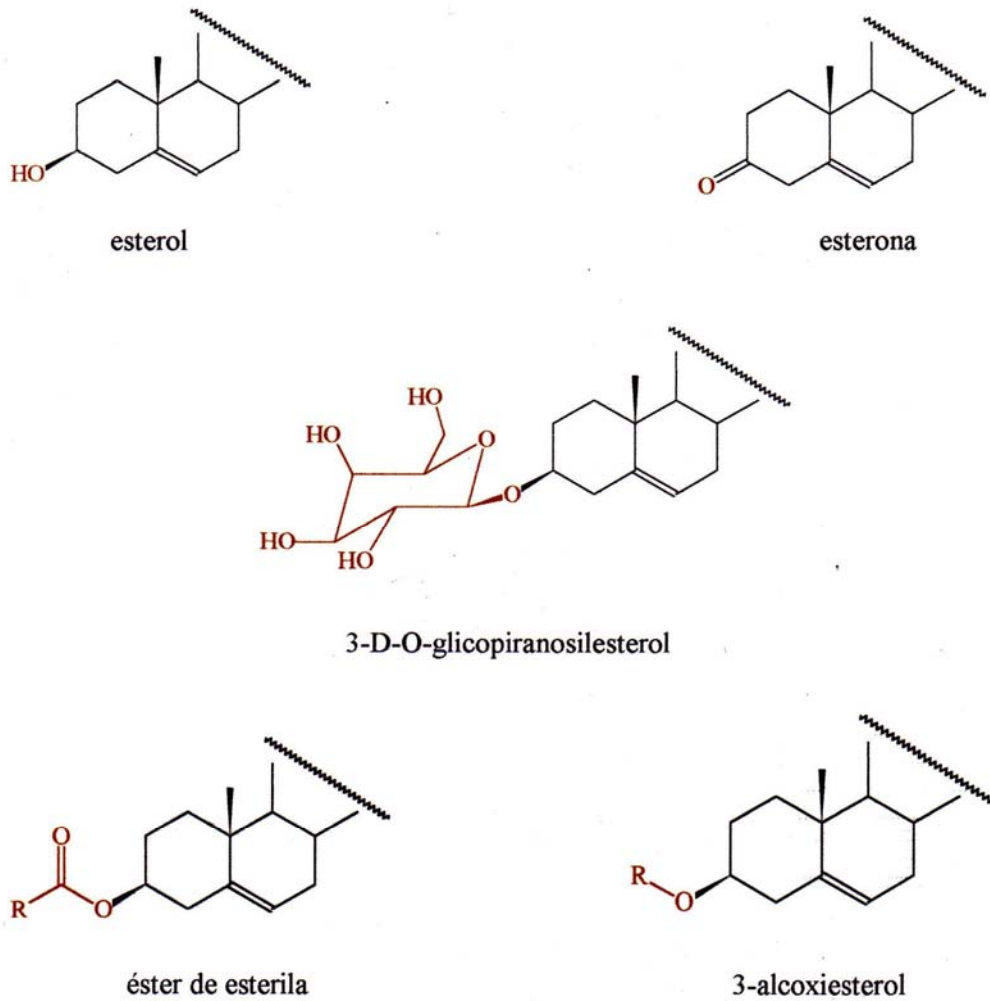
**configuração *trans***



**configuração *cis***

**Figura I.2 - Configurações *trans* e *cis* dos esteróides.**

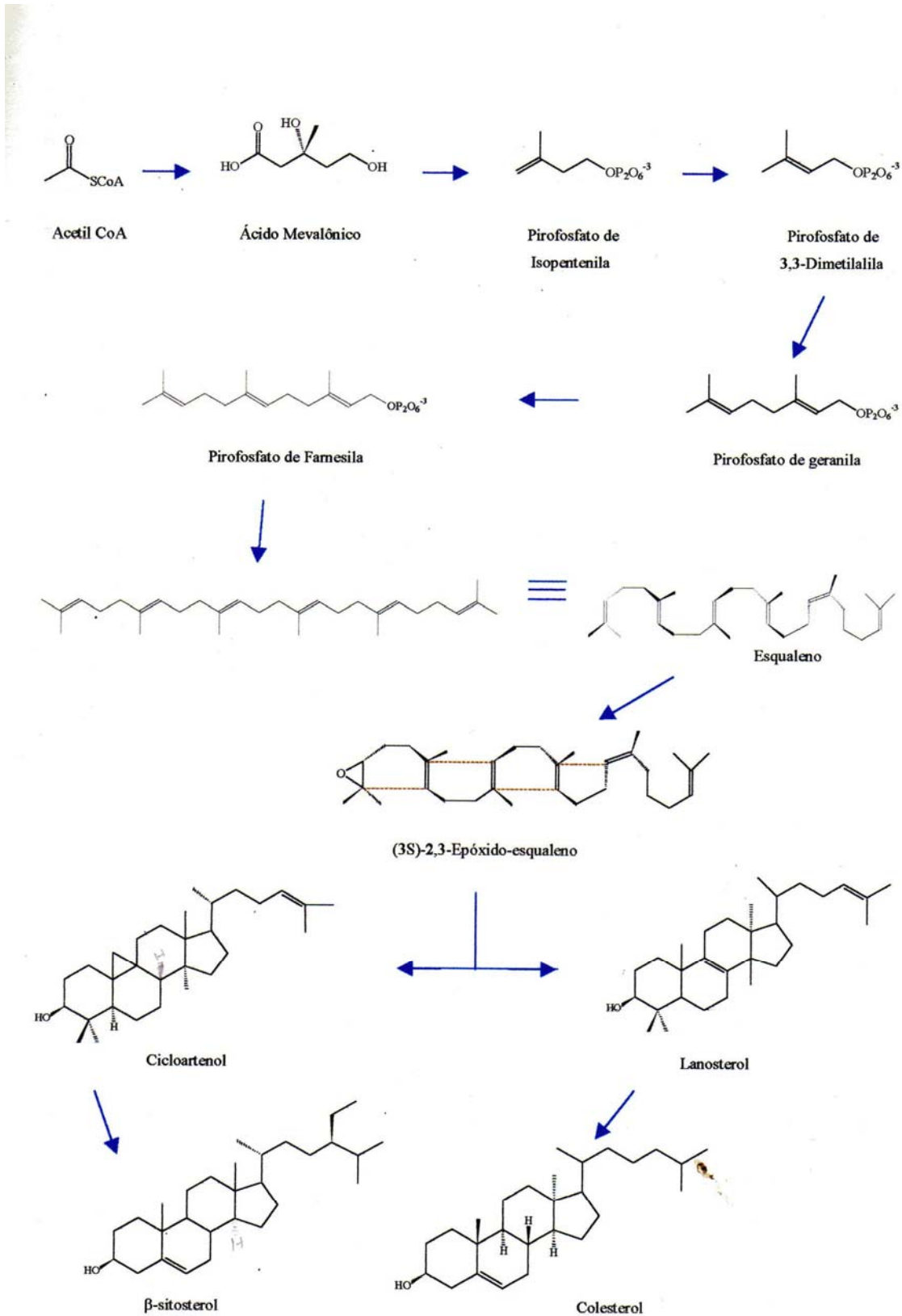
Além das alterações estruturais no esqueleto básico e cadeia lateral em C<sub>17</sub>, os esteróides podem apresentar também substituição no carbono C<sub>3</sub>. Neste caso, os substituintes apresentam normalmente grupos funcionais contendo oxigênio. Dentre os mais encontrados nos meios biológicos, podem-se destacar os grupos hidroxílicos, carbonílicos, alcoxilícos, ésteres, glicosídicos e fosfolipídicos (Figura I.5).<sup>32</sup>



**Figura I.3** – Esteróides C<sub>3</sub>-substituídos, isolados normalmente em plantas.

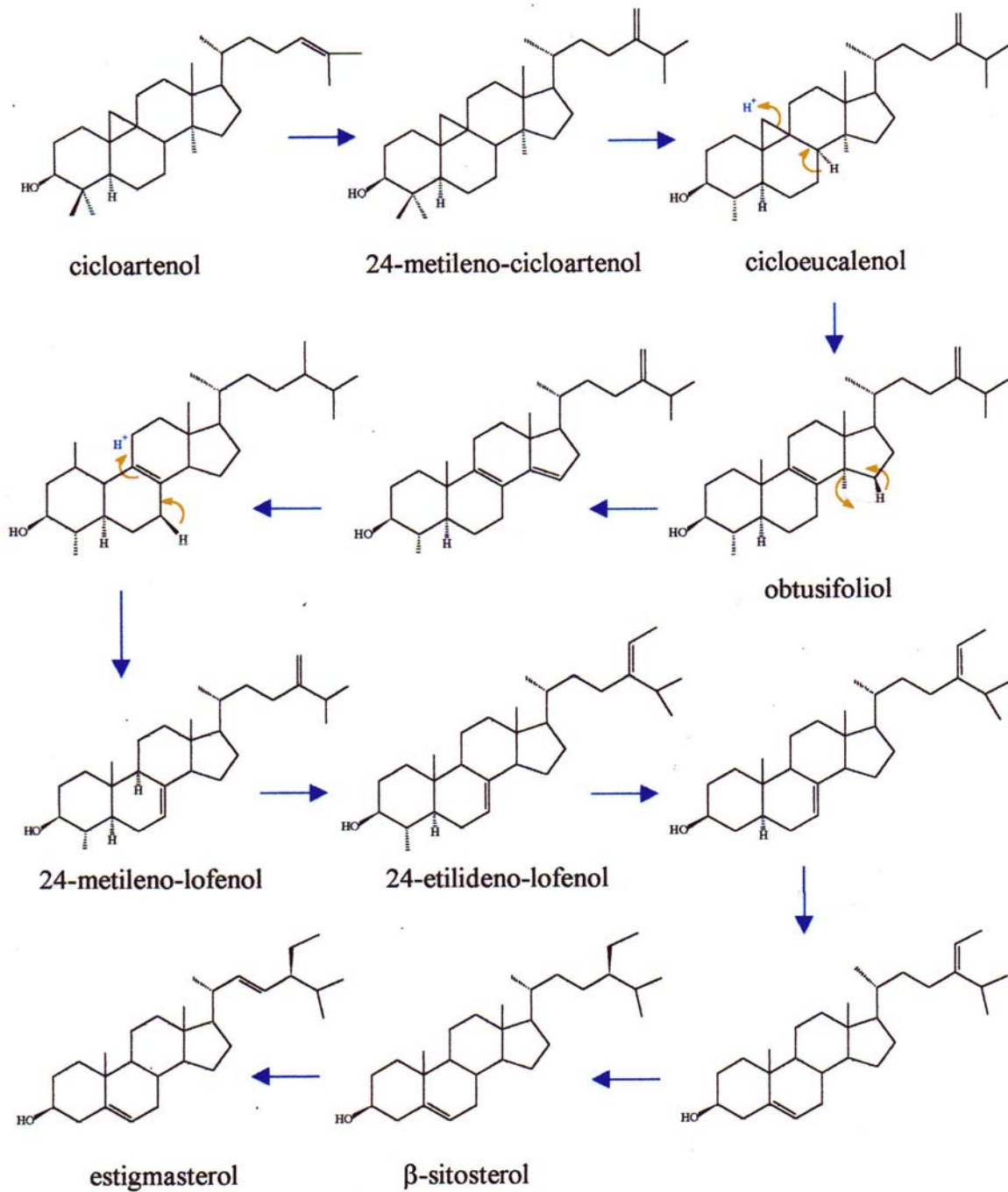
## b. Biossíntese

Os esteróides apresentam-se largamente distribuídos nos meios biológicos. Estes metabólicos secundários estão envolvidos no metabolismo de plantas e animais. De acordo com a literatura,<sup>33</sup> a biossíntese de esteróides parte de acetil-Coenzima A, tendo como intermediário o esqualeno que, por sua vez, sofre ciclizações (Esquema I.1). Em animais e fungos, esta seqüência biossintética leva à formação intermediária de lanosterol e, posteriormente, através de várias etapas enzimáticas (aproximadamente 20 etapas), forma-se o colesterol.



**Esquema I.1** - Sequência da biossíntese de esteróides em plantas.

Em algas, briófitas, gnospermas e plantas superiores, a seqüência biossintética é semelhante, levando, entretanto, à formação intermediária de cicloartenol. Por sua vez, a partir do cicloartenol, obtém-se o  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, conforme Esquema I.2. Esta biotransformação tem sido confirmada por carbono marcado.<sup>34</sup>



**Esquema I.2** - Rota geral da biossintese de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

Assim, a biossíntese de esteróis descrita no Esquema I.2 justifica a presença de grupos metílicos e etílicos no carbono C<sub>24</sub>, conforme verificado em esteróis de plantas. Esta substituição em C<sub>24</sub> origina um novo centro assimétrico e, conseqüentemente, a formação de dois isômeros oticamente ativos. Estes isômeros têm sido designados por isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ .<sup>35</sup>

### c. Importância Biológica

Os esteróides são compostos de grande importância biológica. Na medicina, são muito empregados terapêuticamente como anti-inflamatórios e anticoncepcionais, entre outras.<sup>36</sup>

Dentre as várias propriedades de  $\beta$ -sitosterol, podem ser destacadas suas atividades como: anti-cancerígena,<sup>37</sup> anti-inflamatória e antipirética,<sup>38</sup> hipotensiva,<sup>39</sup> antibacteriana e anti-hemolítica.<sup>40</sup> Além disso, estudos recentes indicam que a sua atividade analgésica é mais eficaz do que aspirina e paracetamol.<sup>41</sup> Na indústria alimentícia,  $\beta$ -sitosterol é muito empregado para aumentar a solubilidade de gorduras líquidas em meios aquosos, melhorando também a consistência de margarinas e maioneses. Na indústria de cosméticos,  $\beta$ -sitosterol tem sido incluído em fórmulas para aumentar as propriedades emulsionantes dos produtos.<sup>42</sup>

Devido à sua grande abundância natural e semelhança estrutural com os esteróides, os esteróis têm sido apontados como potenciais precursores para sínteses de esteróides hormonais.<sup>43</sup> O  $\beta$ -sitosterol é uma matéria-prima alternativa na produção desses intermediários de reação, utilizados na indústria farmacêutica. Para serem usados como intermediários esteroidais, precisam ter normalmente a cadeia lateral clivada seletivamente em C<sub>17</sub> ou C<sub>20</sub>, dando origem a outros esteróis contendo respectivamente 19 carbonos e 21 carbonos.

## **Capítulo II**

### **Parte Experimental**



## 1. Materiais

Os solventes hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol, (todos de grau de pureza p.a.) foram adquiridos de Quimex, Synth, Merck, Grupo Química, Nuclear e Quimibras, foram utilizados sem tratamento prévio.

Nos trabalhos cromatográficos foram utilizados quatro tipos de suportes cromatográficos de sílica-gel: (i) N° 60 com 0,063-0,0200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck; (ii) N° 60 (s) 0,0063-0,2 mm, pH (10% a 20 °C 70-230 mesh ASTM) da VETEC; (iii) N° 60 F<sub>254</sub> da Merck e (iv) GF<sub>254</sub> da Fluka.

Os espectros no infravermelho foram registrados em aparelho FT-IR Spectrometer Perkin Elmer modelo Spectrum 2000, empregando suporte de KBr, da Central Analítica da Universidade do Amazonas.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram registrados em aparelho da Bruker DRX 400 do Departamento de Química – ICEx da Universidade Federal de Minas Gerais e aparelho do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – IQ da Universidade Federal do Ceará, empregando CDCl<sub>3</sub>, como solvente e TMS como referência interna.

Os pontos de fusão foram determinados empregando o aparelho da METTLER Modelo FP62, do Departamento de Química-ICE da Universidade do Amazonas.

Os espectros de Massas foram registrados em Cromatógrafo Gasoso da Perkin Elmer modelo Auto System, acoplado ao Espectrômetro de Massas modelo Q-Mass 910.

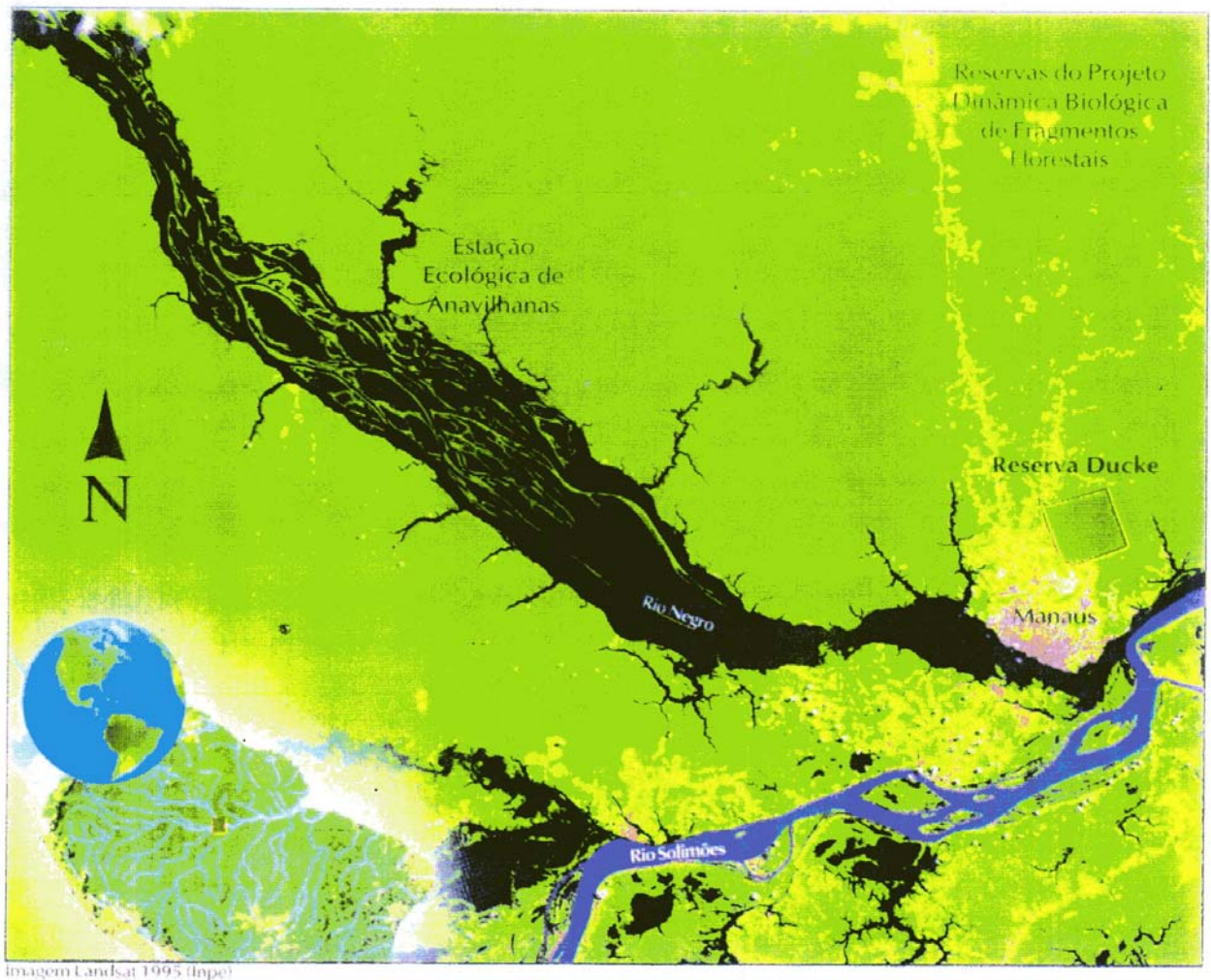
## 2. Metodologia Fitoquímica

A metodologia empregada para o isolamento e purificação dos fitoconstituintes foi baseada em procedimentos utilizados normalmente em fitoquímica.<sup>44</sup>

### a. Estudo fitoquímico do cerne de *Brosimum potabile* Ducke

#### i. Coleta do material vegetal

O cerne do caule de *B. potabile* foi coletado na estrada Manaus-Itacoatiara (AM 010), no Km 25 (conforme indicado na Figura II.1), durante o mês de maio de 1997.



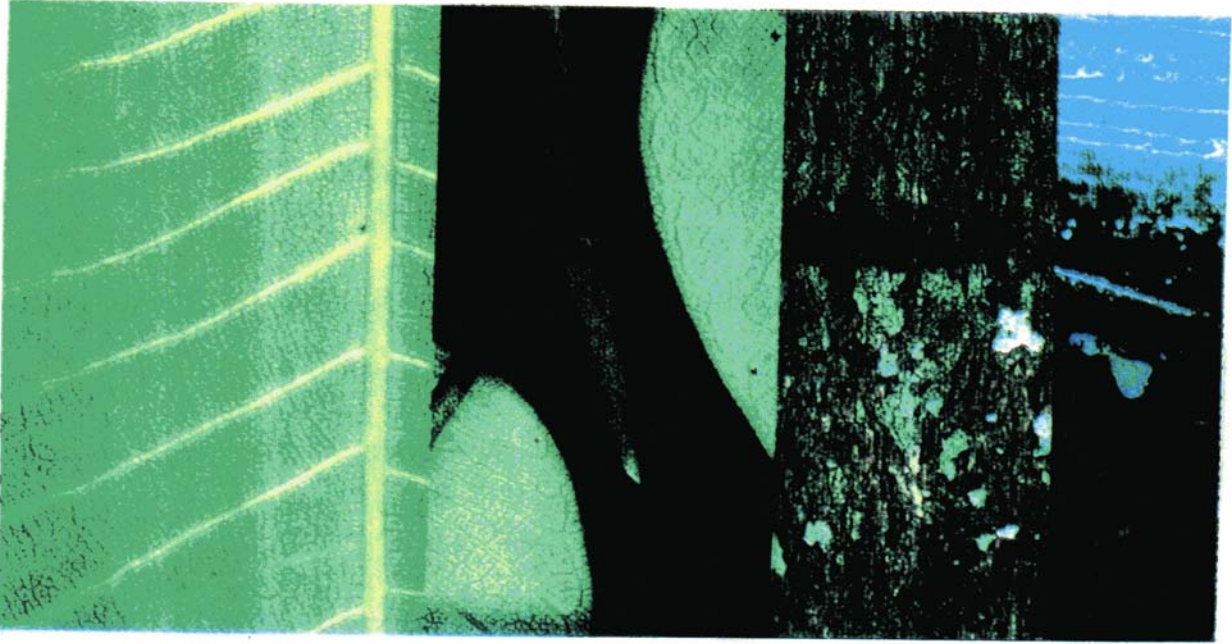
**Figura II.1** –Local de coleta do material vegetal.

A identificação da espécie foi realizada pelo Sr. Carlos Alberto Cid Ferreira – pesquisador do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus-AM, foi feita pela análise da exsicata (Figura II.2) preparada durante a coleta do material da espécie vegetal (Figura II.3).



**Figura II.2** – Exsicata preparada de *Brosimum rotabile*, coletada para o trabalho fitoquímico.





**Figura II.3** – Espécie vegetal *Brosimum rotundifolium*.

**iii. Preparo da amostra**

Após a coleta do material, o cerne do caule foi seco a temperatura ambiente, depois triturado e moído mecanicamente até sua pulverização, proporcionando uma massa de 4.2 Kg de material pulverizado.

**iv. Obtenção dos extratos brutos**

O material pulverizado foi submetido à extração sob refluxo em hexano, empregando extrator “soxhlet” de 22 L durante 72 horas. Posteriormente, foi feita também extração em etanol durante três dias. Os extratos obtidos em hexano (**EH-b**) e em etanol (**EE-b**) foram filtrados e, em seguida, concentrados utilizando evaporador rotativo, obtendo-se respectivamente 100,50 g e 430,00 g de material escuro e viscoso.

**v. Estudo cromatográfico do Extrato Hexano**

O extrato hexano bruto foi dividido em duas partes: um denominado de **EH<sub>a</sub>** e o outro, de **EH<sub>b</sub>**. Ambos foram submetidos à cromatografia em coluna de silicagel, empregando seqüências diferentes de eluentes, conforme Esquema II.1 (pág 31).

**vi. Estudo cromatográfico de EH<sub>a</sub>**

O extrato hexano **EH<sub>a</sub>** foi submetido à coluna cromatográfica de 30 cm em silicagel, empregando hexano e soluções hexano:diclorometano como eluente, obtendo-se uma fração em hexano, denominada de **EH<sub>a</sub>-F1**.

**vii. Purificação da fração EH<sub>a</sub>-F1**

Após testes de solubilidade em vários solventes, os precipitados brancos da fração resultante foram purificados por recristalização em metanol, proporcionando 0,0350 g de sólidos cristalinos. Este produto, denominado de produto **EH<sub>a</sub>-F1**, foi analisado por métodos espectroscópicos (a identificação estrutural é discutida no Anexo I), apresentando os seguintes dados:

**Ponto de Fusão:** 147,7 °C; **IV** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3431, 2937, 2868, 1651, 1558, 1459, 1381, 1133, 1058, 1023, 970, 838; **CGEM** {Tempo de Retenção — [m/z(int. rel. %)]}: 9,12 min — 414(11,6), 396(13,3), 382(10,5), 329(24,7), 303(18,8), 273(4,2), 255(4,8), 231(2,9), 207(11,0), 177(15,1), 161(7,0), 145(13,3), 135(9,5), 121(7,6), 105(15,2), 97(10,6), 81(17,1), 70(10,5), 57(39,9), 43(100), 9,80 min — 412(17,1), 394(10,3), 381(5,7), 369(6,3), 351(18,8), 327(3,8), 316(9,3), 300(19,9), 271(12,9), 255(19,4), 213(13,3), 175(9,7), 159(22,8), 146(20,9), 133(17,1), 110(13,1), 105(22,8), 95(23,8), 77(39,9), 69(40,3), 55(96,9), 43(100,0); **RMN de  $^1\text{H}$**  e **RMN de  $^{13}\text{C}$**  são apresentados nas Tabelas AI.1 e AI.2 do Anexo I.

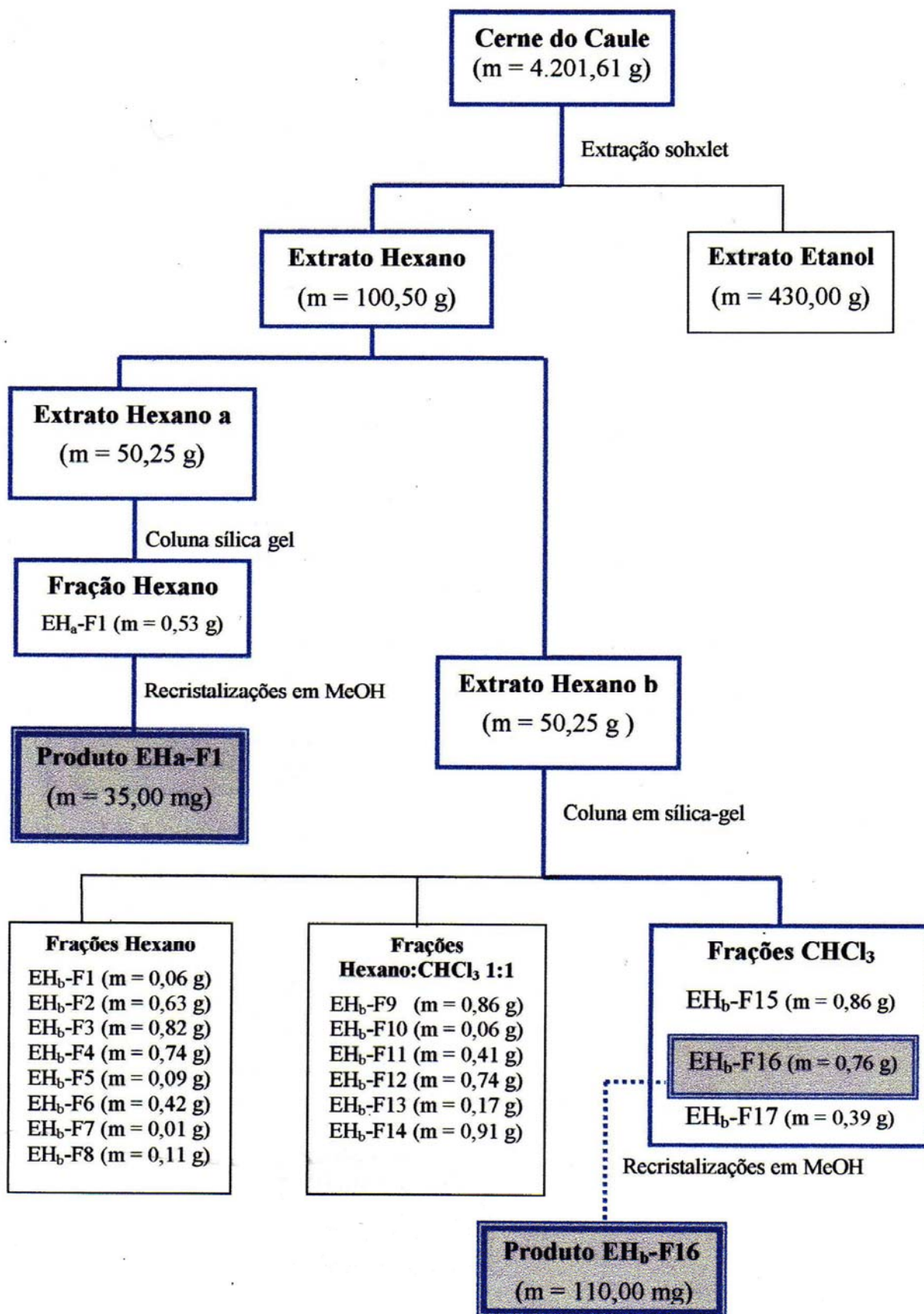
#### viii. Estudo cromatográfico do Extrato $\text{EH}_b$

O extrato hexano  $\text{EH}_b$  foi submetido à coluna cromatográfica de 2,5 m em silicagel, empregando hexano, solução hexano:clorofórmio e clorofórmio como eluentes, obtendo-se oito frações em hexano ( $\text{EH}_b\text{-F1}$  a  $\text{EH}_b\text{-F8}$ ); seis frações em hexano:clorofórmio 1:1 ( $\text{EH}_b\text{-F9}$  a  $\text{EH}_b\text{-F14}$ ); três frações em clorofórmio ( $\text{EH}_b\text{-F15}$  a  $\text{EH}_b\text{-F17}$ ).

#### ix. Purificação das frações do $\text{EH}_b$

Alíquotas das frações do  $\text{EH}_b$  foram analisadas por cromatografia em camada fina, indicando misturas contendo vários compostos sem, entretanto, permitir o isolamento e purificação de fitoconstituintes. Mesmo assim, de um modo geral, foram feitas análises espectroscópicas no Infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  destas frações. Os resultados obtidos não permitiram a caracterização estrutural de fitoconstituintes presentes nestas frações.

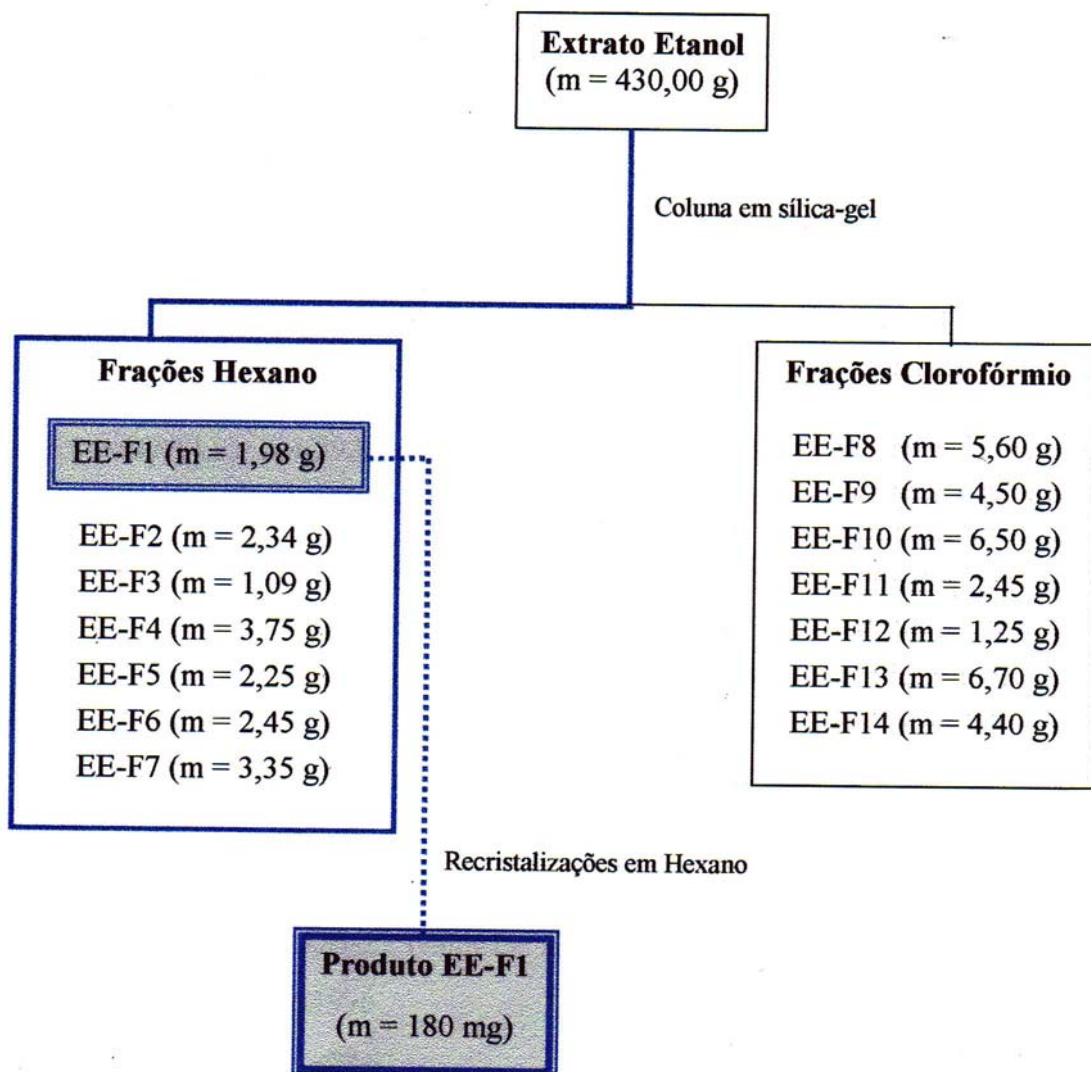
Entretanto, para a fração  $\text{EH}_b\text{-F16}$ , após testes de solubilidades em vários solventes, foram obtidos precipitados brancos desta fração que foram purificados por recristalização em metanol, proporcionando 0,1100 g de sólidos cristalinos, denominados de produto  $\text{EH}_b\text{-F16}$ . Este produto foi analisado por métodos espectroscópicos (a identificação estrutural é discutida no Anexo I, pg. 101) apresentando os mesmos dados descritos para o produto  $\text{EH}_a\text{-F1}$ .



**Esquema II.1** – Procedimento de isolamento e purificação de fitoconstituintes do Extrato Hexano.

x. **Estudo cromatográfico do Extrato Etanol**

O extrato etanol bruto (**EE-b**) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, empregando hexano e clorofórmio como eluentes, obtendo-se sete frações em hexano, denominadas de **EE-F1** a **EE-F7**, e sete frações em clorofórmio, denominadas de **EE-F8** a **EE-F14**. A metodologia fitoquímica é apresentada no Esquema II.2.



**Esquema II.2** – Procedimento de isolamento e purificação do fitoconstituente do Extrato Etanol.



## xi. Isolamento e Purificação das Frações do Extrato Etanol

Alíquotas das frações do extrato etanol **EE-b** foram analisadas por cromatografia em camada fina, indicando misturas contendo vários compostos, não permitindo o isolamento de fitoconstituintes. Mesmo assim, foram feitas análises espectroscópicas no Infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  destas frações, não permitindo a caracterização estrutural de fitoconstituintes presentes nestas frações.

Entretanto, para a fração **EE-F1**, após testes de solubilidades em vários solventes, foram obtidos precipitados brancos desta fração. Os precipitados foram purificados por recristalização em hexano, proporcionando 0,018 g de sólidos cristalinos, denominados de produto **EE-F1**. Este produto foi analisado por métodos espectroscópicos (a análise para identificação estrutural é discutida no Anexo II), apresentando os seguintes dados: **Ponto de fusão:** 83,7 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}$  – 92,15 ( $\text{CHCl}_3$ , C = O, 1005 M); **IV** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3391, 3060, 3027, 2947, 2927, 2861, 2833, 1887, 1611, 1511, 1449, 1370, 1347, 1300, 1243, 1180, 1111, 1086, 1035, 937, 916, 901, 835, 819, 807, 771, 569, 540,; **CGEM** {Tempo de Retenção — [m/z(int. rel. %)]}: 4,90 min — 312(64,8), 294(13,3), 251(3,7), 226(10,4), 218(7,4), 213(5,9), 206(6,3), 200(5,6), 191(14,8), 189(14,8), 174(39,8), 160(23,1), 147(50,9), 135(53,7), 121(80,1), 115(21,8), 107(100,0), 103(22,2); **RMN de  $^1\text{H}$** , **RMN de  $^{13}\text{C}$** , **DEPT-35°**, **COSY**, **NOESY**, **HMBC** e **HMQC** são apresentados nas Tabelas AII.1 e AII.2 do Anexo II.

### b. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Brosimum acutifolium* Huber

#### i. Coleta do Material Vegetal

O material vegetal, *Brosimum acutifolium*, foi coletado na estrada Manaus-Itacoatiara (AM 010), Km 25, conforme indicado na Figura II.1, durante os meses de abril, junho e setembro de 1996.

#### ii. Preparo da Amostra

Após a coleta do material, as cascas do caule foram secas a temperatura ambiente, depois trituradas e moídas mecanicamente até sua pulverização, proporcionando 2,5 Kg de material pulverizado.

### iii. Obtenção do Extrato Etanol Bruto

O material pulverizado foi submetido à extração em repouso, empregando “mariote” de 10 L durante 72 horas. A solução foi filtrada e, em seguida, foi concentrada utilizando evaporador rotativo, sendo obtidos 269,90 g de um produto escuro altamente viscoso, denominado de extrato etanol bruto (**CC<sub>EE</sub>-b**).

### iv. Estudo Cromatográfico do **CC<sub>EE</sub>-b**

O extrato etanol bruto foi submetido inicialmente a uma coluna filtrante do silicagel, utilizando os seguintes eluentes: hexano e acetato de etila. As soluções obtidas foram filtradas e, posteriormente, concentradas a pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo. Foram obtidos respectivamente o Extrato Hexano (**CC<sub>EH</sub>**) com uma massa de 3,5367 g e o Extrato Acetato de Etila (**CC<sub>EAE</sub>**) com uma massa de 12,1379 g. Posteriormente foram realizados os estudos cromatográficos destes extratos, conforme Esquema II.3.

### v. Estudo Cromatográfico do **CC<sub>EH</sub>**

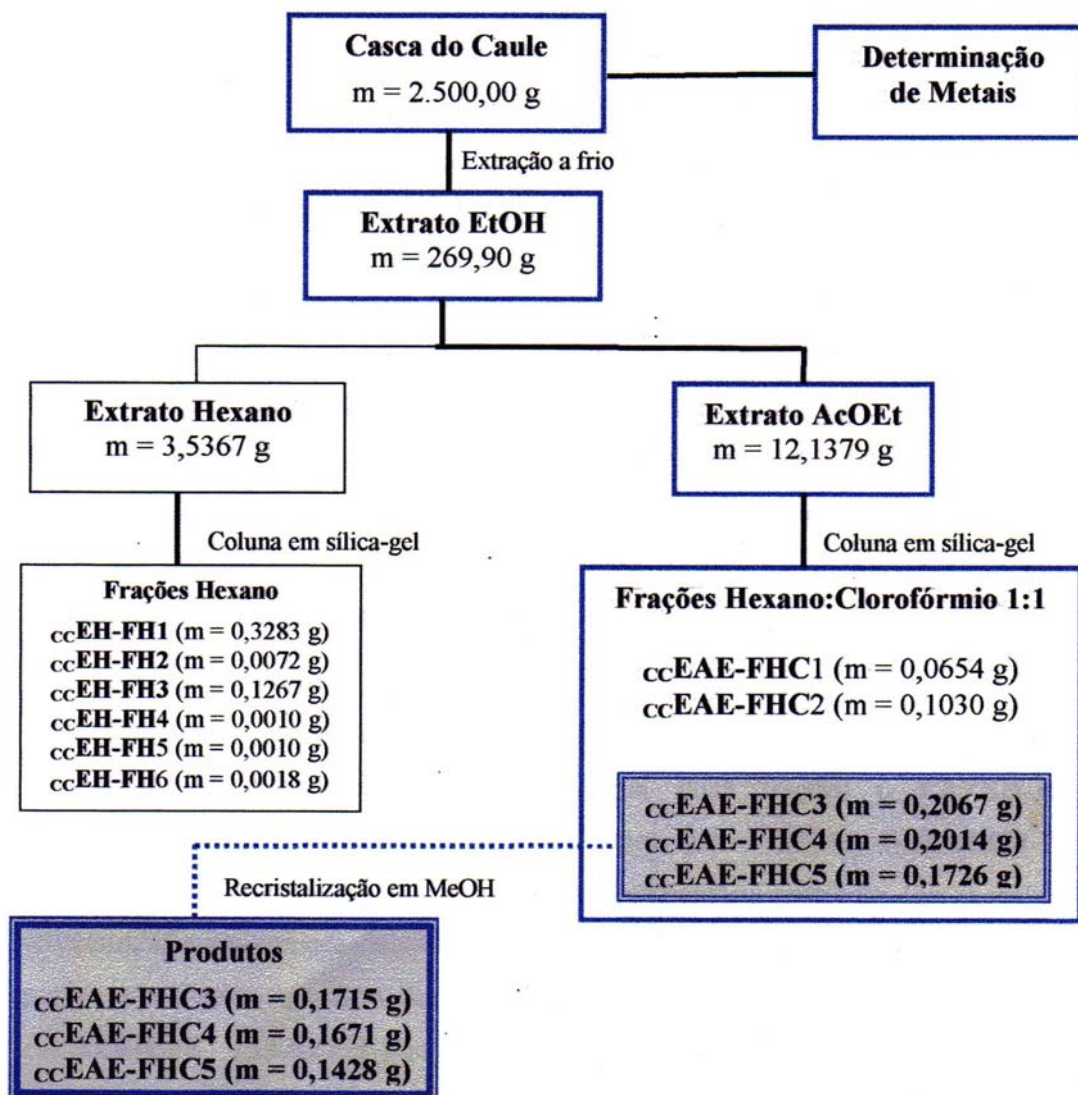
O extrato hexano foi submetido à coluna cromatográfica em silicagel, empregando hexano como solvente. Pelo fracionamento foram obtidas seis frações, denominadas de **CC<sub>EH</sub>-FH1** a **CC<sub>EH</sub>-FH6**. Estas frações foram analisadas por cromatografia em camada fina, indicando misturas contendo vários compostos sem, entretanto, permitir o isolamento e purificação de fitoconstituintes. Mesmo assim, de um modo geral, foram feitas análises espectroscópicas no Infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C destas frações. Os resultados obtidos não permitiriam a caracterização estrutural de fitoconstituintes presentes nestas frações.

### vi. Estudo Cromatográfico do **CC<sub>EAE</sub>**

O extrato acetato de etila foi submetido à cromatografia em coluna de silicagel, empregando como eluente hexano:clorofórmio 1:1, obtendo-se cinco frações, denominadas de **CC<sub>EAE</sub>-FHC1** a **CC<sub>EAE</sub>-FHC5**.

vii. Análise das Frações  ${}_{CC}EAE-FHC3$  a  ${}_{CC}EAE-FHC5$

Por cromatografia em camada delgada em sílica empregando várias misturas de eluentes, todas as frações  ${}_{CC}EAEFHC$  apresentaram-se como misturas de compostos de diferentes  $R_f$ 's. Entretanto, para as frações  ${}_{CC}EAE-FHC3$  a  ${}_{CC}EAE-FHC5$ , após testes de solubilidades em vários solventes, foram obtidos precipitados brancos que foram purificados por recristalização em metanol. Após serem analisados por métodos espectroscópicos, estes produtos foram reunidos e denominados de  ${}_{CC}EAE-FHC$  (a identificação estrutural é discutida no Anexo I), apresentando os mesmos dados descritos para o produto  $EH_a-F1$ .



Esquema II.3 – Metodologia fitoquímica da casca do caule de *B. acutifolium*.

### **c. Estudo fitoquímico da raiz de *Brosimum acutifolium* Huber**

#### **i. Preparo da Amostra**

As cascas da raiz foram secas a temperatura ambiente, depois trituradas e moídas mecanicamente até sua pulverização, proporcionando 139,60 g de material pulverizado.

#### **ii. Obtenção dos Extratos Brutos da Casca da Raiz**

O material pulverizado foi submetido sucessivamente à extração em aparelho “soxhlet” com acetato de etila por 72 horas. A mistura resultante foi filtrada e posteriormente, concentrada a pressão reduzida, utilizando evaporador-rotativo. O Extrato Acetato de Etila – bruto (**CR<sub>EAE</sub>-b**) obtido proporcionou 1,7485 g.

#### **iii. Estudo Cromatográfico de CR<sub>EAE</sub>-b**

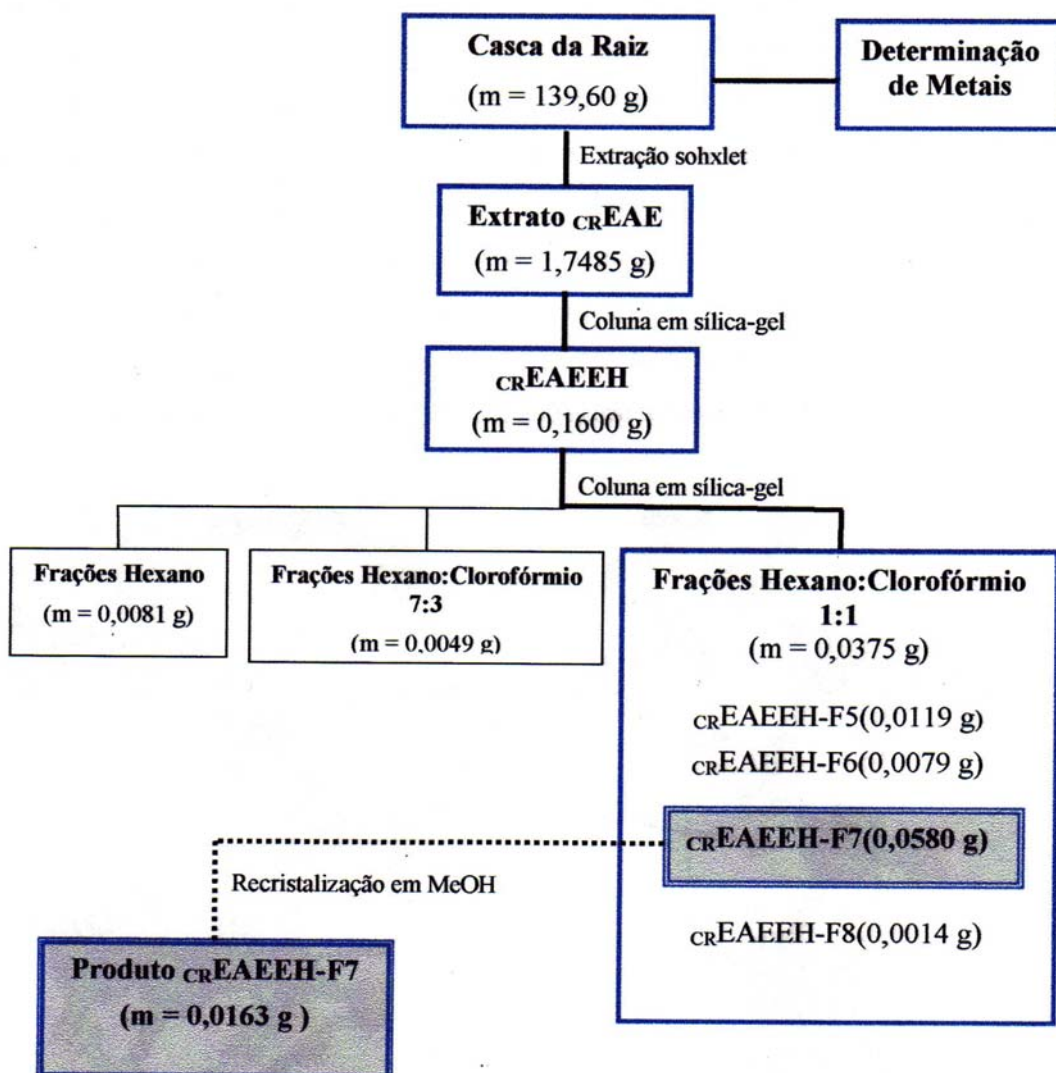
O extrato acetato de etila bruto foi submetido inicialmente a uma coluna filtrante de silicagel, utilizando hexano como eluente. A solução obtida foi filtrada e, posteriormente, concentrada a pressão reduzida, utilizando evaporador-rotativo. Foi obtido o Extrato Hexano (**CR<sub>EAE</sub>EH**) com uma massa de 1,7485 g. Posteriormente foram realizados os estudos cromatográficos deste extrato, conforme Esquema II.4.

#### **iv. Estudo Cromatográfico de CR<sub>EAE</sub>EH**

O extrato hexano foi submetido a uma coluna cromatográfica de silicagel, utilizando os seguintes eluentes: hexano, com duas frações (**CR<sub>EAE</sub>EH-F1** e **CR<sub>EAE</sub>EH-F2**); hexano:clorofórmio 7:3, com duas frações (**CR<sub>EAE</sub>EH-F3** e **CR<sub>EAE</sub>EH-F4**); e hexano:clorofórmio 1:1, com quatro frações (**CR<sub>EAE</sub>EH-F5** a **CR<sub>EAE</sub>EH-F8**). Após terem sido evaporadas a temperatura ambiente, foram realizadas cromatografia em camada delgada de sílica para determinação qualitativa do grau de pureza e análise comparativa das frações. As frações **CR<sub>EAE</sub>EH-F1** a **CR<sub>EAE</sub>EH-F4**, **CR<sub>EAE</sub>EH-F5**, **CR<sub>EAE</sub>EH-F6** e **CR<sub>EAE</sub>EH-F8** apresentaram-se como misturas complexas e em pequenas quantidades relativas, não permitindo isolamento e identificação de seus constituintes.

v. **Análise da Fração  $_{CR}EAEFH-F7$**

Para a fração  $_{CR}EAEFH-F7$ , após testes de solubilidades em vários solventes, foram obtidos precipitados brancos que foram purificados por recristalização em metanol. Este produto foi analisado por métodos espectroscópicos (a identificação estrutural é discutida no Anexo I), apresentando os mesmos dados descritos para o produto  $EH_a-F1$ .



**Esquema II.4.** Metodologia do estudo fitoquímico da casca da raiz da *B. acutifolium*.

Figura 104

### 3. Metodologia Teórica

A fim de estudar as propriedades termodinâmicas, eletrônicas e estéricas do  $\beta$ -sitosterol, foi realizada inicialmente uma análise conformacional empregando método da mecânica molecular para diferentes geometrias obtidas pela rotação das ligações simples envolvendo os carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  localizados na cadeia lateral em  $C-17$ . As estruturas correspondentes às conformações obtidas foram minimizadas por cálculos semi-empíricos AM1, empregando o pacote computacional.<sup>46</sup> Posteriormente, foram realizados cálculos ab initio, empregando o pacote computacional Gaussian<sup>47</sup> para as estruturas geradas pelos métodos semi-empíricos. As estruturas foram totalmente otimizadas em fase gasosa, sendo todos os pontos estacionários caracterizados como mínimos verdadeiros através da análise das frequências harmônicas.

Pela análise conformacional do  $\beta$ -sitosterol **1**, foram obtidas duas conformações mais estáveis: conformação **a**, contendo os hidrogênios substituintes de  $C_{22}$  e  $C_{23}$  em posições alternadas, e a conformação **b**, apresentando estes substituintes em posições eclipsadas. Estas duas conformações são apresentadas na Figura II.4.

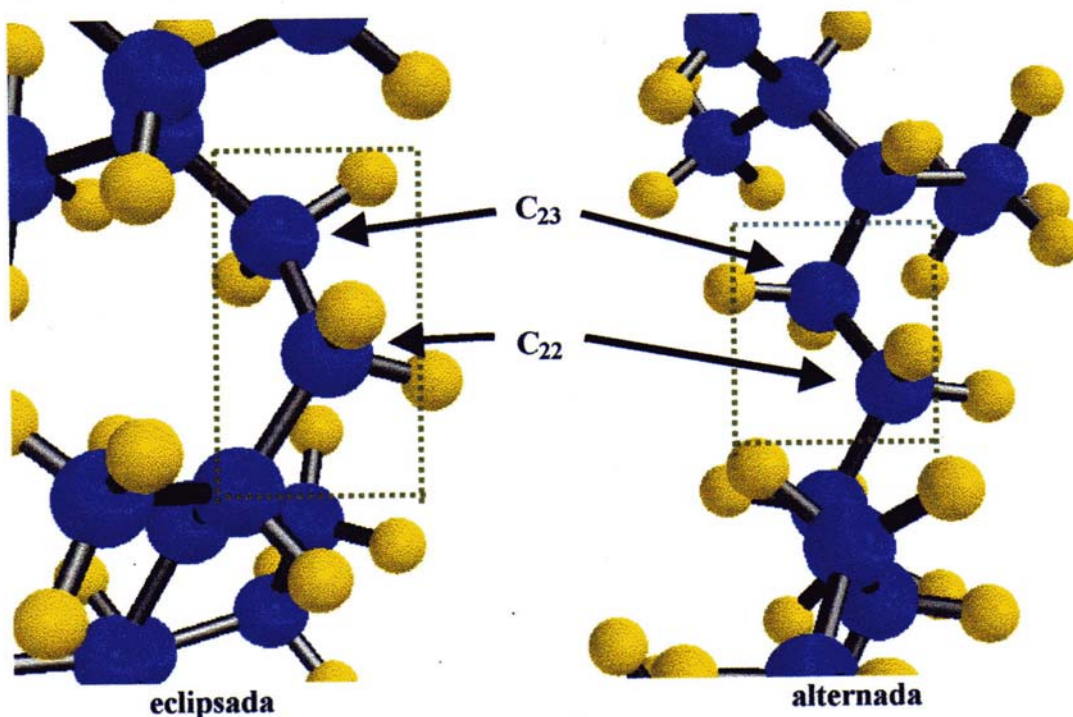
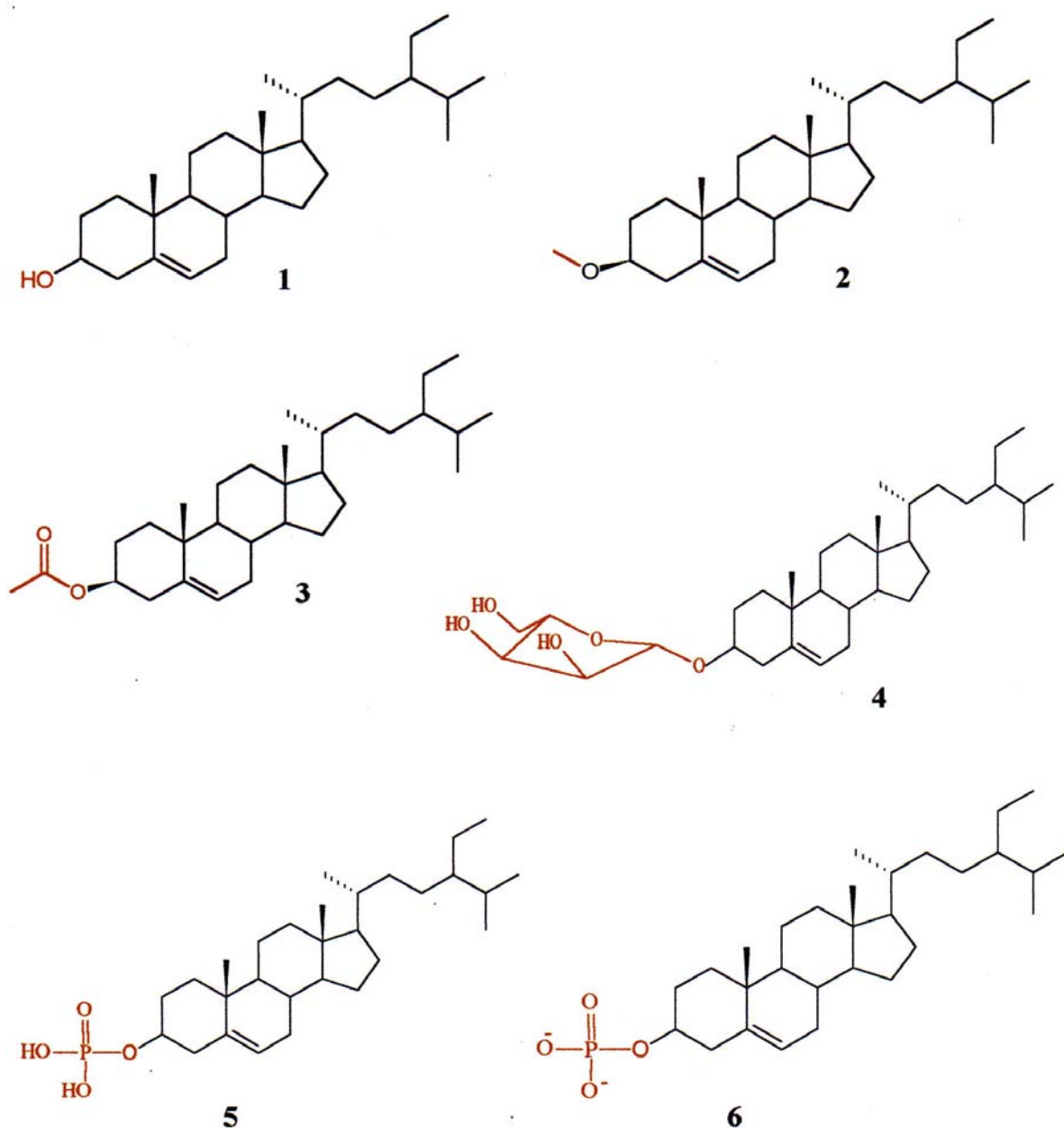


Figura II.4 – Conformações obtidas pela rotação da ligação  $C_{22}$ - $C_{23}$  do  $\beta$ -sitosterol.



No estudo do efeito do grupo substituinte no oxigênio do  $\beta$ -sitosterol, foram considerados os grupos metila **2**, acetila **3**, ribofuranose **4**, ácido fosfórico **5** e fosfato **6** (Figura II.5). Da mesma forma, as estruturas foram geradas considerando as conformações alternada (**a**) e eclipsada (**b**), obtidas a partir das correspondentes conformações do  $\beta$ -sitosterol **1**. A representação numérica dos átomos nas estruturas corresponde à nomenclatura usual para o  $\beta$ -sitosterol, conforme Figura I.4 (**a**) – pág. 17.



**Figura II.5** – Estruturas consideradas para estudo do efeito estrutural da O-substituição nas propriedades químicas do  $\beta$ -sitosterol.

## Capítulo III

### Estudos Termodinâmicos Envolvendo $\beta$ -sitosterol e seus Derivados



## 1. Análise Conformacional do $\beta$ -sitosterol

Considerando que os carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  estão envolvidos no mecanismo de formação de estigmasterol a partir de  $\beta$ -sitosterol, foram realizadas análises conformacionais de  $\beta$ -sitosterol, considerando a possibilidade de rotação da ligação  $C_{22} - C_{23}$ . A partir dos cálculos da barreira rotacional, foram obtidas duas conformações mais favorecidas energeticamente. Uma conformação que apresenta os substituintes no  $C_{22}$  e  $C_{23}$  em posição anti e com hidrogênios alternados, denominada de conformação alternada **a** (Figura III.1), com  $\Delta H_f = -142,96$  kcal/mol. A outra conformação apresenta os substituintes no  $C_{22}$  e  $C_{23}$  em posição sin e com hidrogênios eclipsados, denominada de conformação eclipsada **b** (Figura III.2), com  $\Delta H_f = -133,81$  kcal/mol.

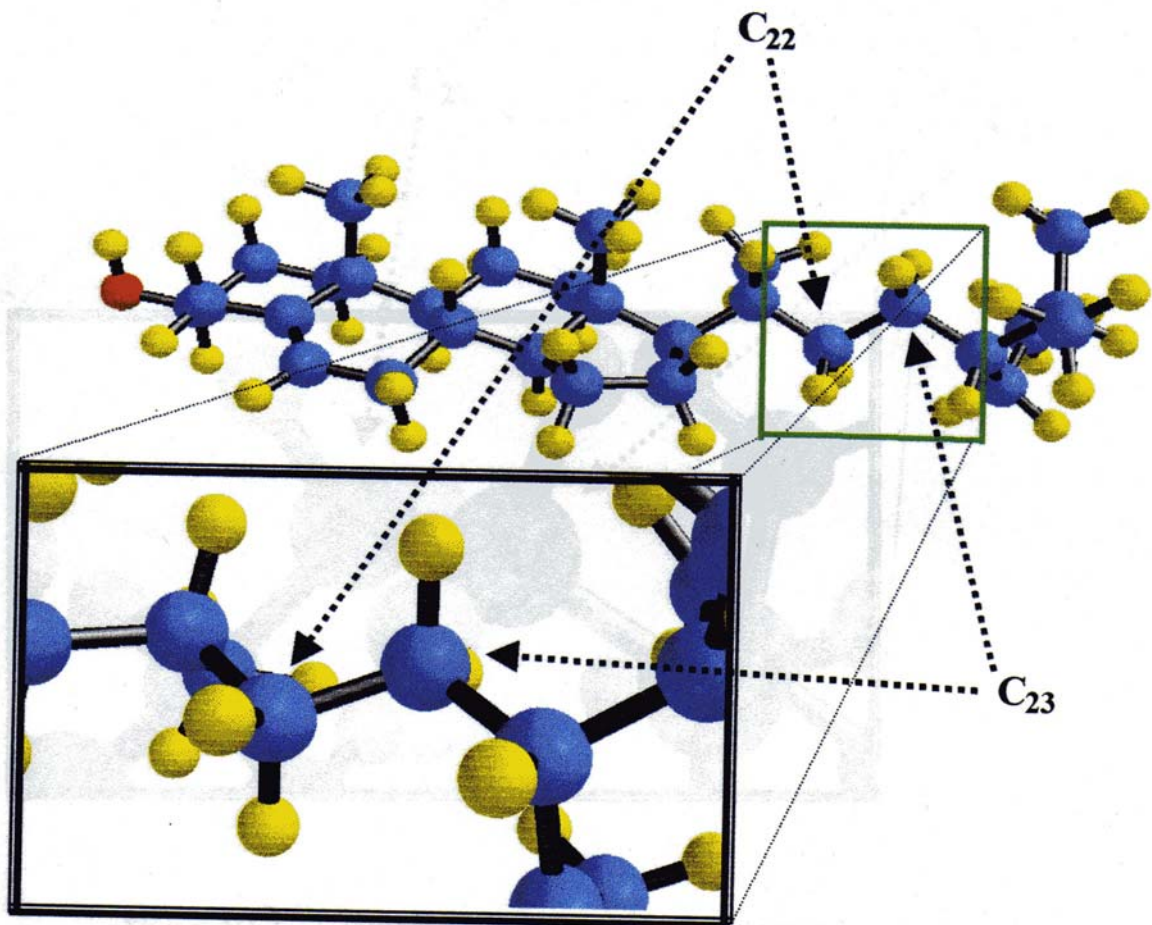


Figura III.1 – Geometria do  $\beta$ -Sitosterol na conformação alternada (**a**).

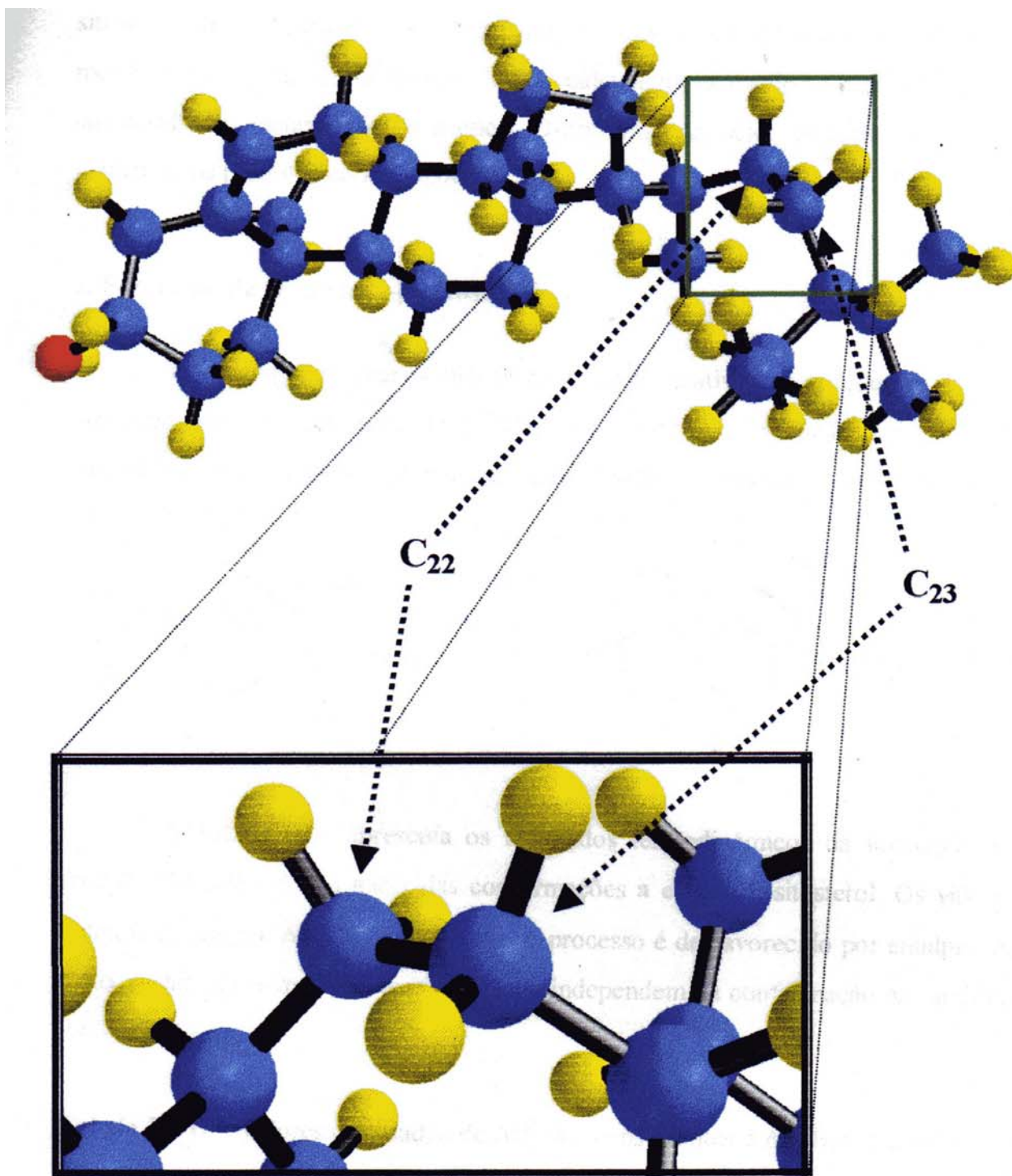


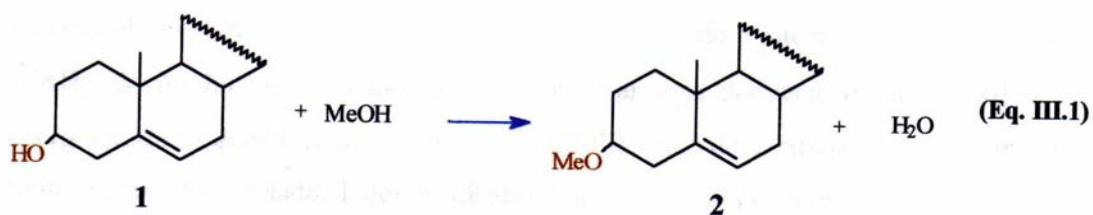
Figura III.2 – Geometria do  $\beta$ -Sitosterol na conformação eclipsada (b).

## 2. Estudo termodinâmico de O-substituição no $\beta$ -sitosterol

A fim de analisar tanto a espontaneidade na formação de derivados de  $\beta$ -sitosterol nas conformações **a** e **b** quanto a influência dessas alterações estruturais no metabolismo em meios biológicos, foram calculadas as entalpias para a reação de  $\beta$ -sitosterol com metanol, ácido acético, D-ribofuranose, ácido fosfórico e íon fosfato, formando os produtos correspondentes.

### a. Formação de O-(metila)- $\beta$ -sitosterol

O oxigênio de grupos hidroxilas é muito reativo em reações envolvendo a formação de éteres correspondentes.<sup>48</sup> Para o  $\beta$ -sitosterol, a formação enzimática do seu correspondente éter pode ser proposta pela reação de metilação, conforme Equação III.1.



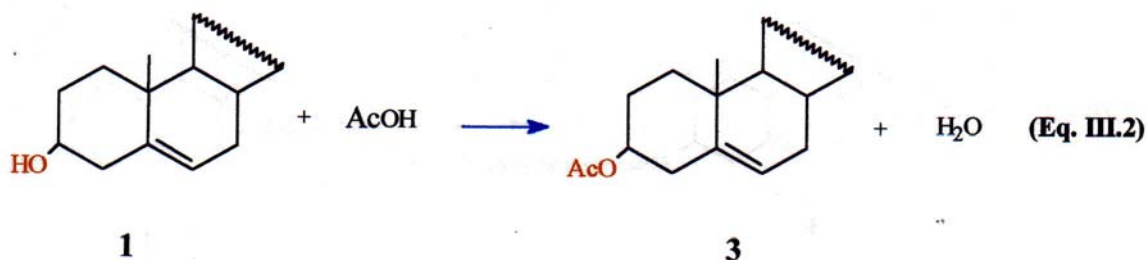
O Quadro III.1 apresenta os resultados termodinâmicos da formação de O-(metila)- $\beta$ -sitosterol **2**, a partir das conformações **a** e **b** do  $\beta$ -sitosterol. Os valores de entalpia de reação,  $\Delta(\Delta H_f)$ , indicam que o processo é desfavorecido por entalpia. Além disto, os fatores termodinâmicos da reação independem da conformação na ramificação esteroidal.

**Quadro III.1** – Valores calculados de  $\Delta H_f$  dos constituintes e  $\Delta(\Delta H_f)$  para formação de O-(metila)- $\beta$ -sitosterol **2**. Valores em Kcal/mol, empregando método AM1.

Conformação	$\Delta H_f$				$\Delta(\Delta H_f)$
	1	Metanol	2	Água	
<b>a</b>	-142,96	-57,03	-136,25	-59,24	<b>4,50</b>
<b>b</b>	-133,81	-57,03	-126,81	-59,24	<b>4,79</b>

### b. Formação de O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol

A formação enzimática de O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol **3** pode ser proposta a partir da reação de acetilação envolvendo  $\beta$ -sitosterol e ácido acético, conforme Equação III.2.<sup>49</sup>



O Quadro III. 2 apresenta resultados termodinâmicos para a formação de O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol **3**, a partir das conformações **a** e **b** do  $\beta$ -sitosterol. Pelos valores de  $\Delta(\Delta H_f)$  do produto O-acetilado, pode-se verificar uma pequena variação relativa de energia entre as duas formas conformacionais, diferente do verificado para os produtos hidroxilado e O-metilado. Estes resultados indicam conseqüentemente que o grupo O-acetila não influencia as propriedades termodinâmicas relacionadas aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> e/ou à ramificação esteroidal.

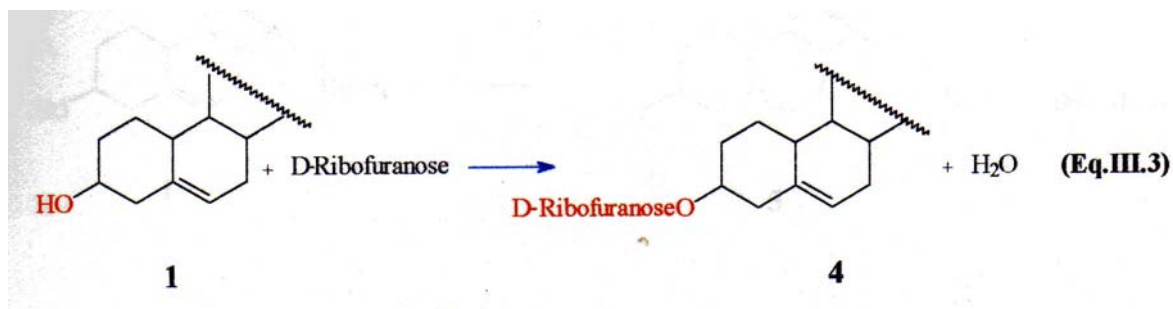
Por outro lado, da mesma forma verificada para a O-metilação, os valores de entalpia de reação para O-acetilação indicam que o processo é desfavorecido por entalpia. Além disto, os fatores termodinâmicos da reação dependem também da conformação, apresentando maior desfavorecimento para  $\beta$ -sitosterol na conformação **a**.

**Quadro III.2** – Valores calculados de  $\Delta H_f$  dos constituintes e  $\Delta(\Delta H_f)$  para formação de O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol **3**. Valores em Kcal/mol, empregando método AM1.

Conformação	$\Delta H_f$				$\Delta(\Delta H_f)$
	<b>1</b>	Ácido acético	<b>3</b>	Água	
<b>A</b>	-142,96	-102,98	-171,16	-59,24	<b>15,54</b>
<b>b</b>	-133,81	-102,98	-170,06	-59,24	<b>7,49</b>

### c. Formação de O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol

De acordo com a literatura,<sup>50</sup> a formação enzimática de O-(ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol **4** pode ser proposta a partir da reação entre  $\beta$ -sitosterol e D-ribofuranose, conforme Equação III.3.



O Quadro III.3 apresenta resultados termodinâmicos da formação de O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol **4**, a partir das conformações **a** e **b** do  $\beta$ -sitosterol. Pelos resultados dos  $\Delta(\Delta H_f)$  do produto O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol, verifica-se uma estabilidade relativamente muito maior para a conformação **a**, indicando um efeito significativo das alterações conformacionais da ramificação esteroidal na entalpia do produto O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol.

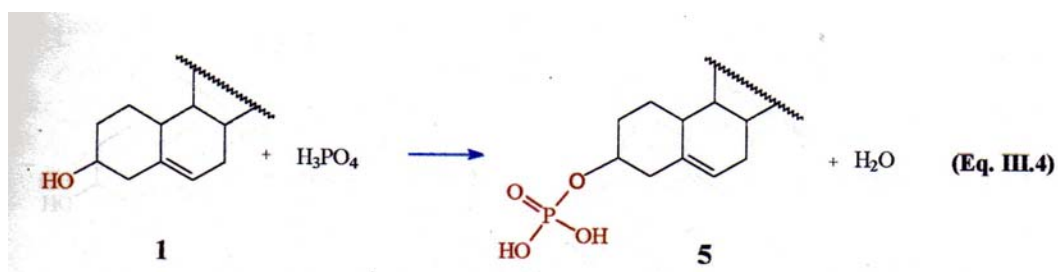
Além disto, diferente dos resultados termodinâmicos verificados para a O-metilação e O-acetilação, os valores de entalpia de formação do produto O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol indicam que o processo é favorecido termodinamicamente para a conformação alternada **a**.

**Quadro III.3** – Valores calculados de  $\Delta H_f$  dos constituintes e  $\Delta(\Delta H_f)$  para formação de O-(D-ribofuranose)-  $\beta$ -sitosterol. Valores em Kcal/mol, empregando método AM1.

Conformação	$\Delta H_f$				$\Delta(\Delta H_f)$
	<b>1</b>	<b>D-ribose</b>	<b>4</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	
<b>A</b>	-142,96	-241,64	-328,83	-59,24	<b>-3,47</b>
<b>b</b>	-133,81	-241,64	-303,82	-59,24	<b>12,39</b>

#### d. Formação de ácido $\beta$ -sitosterol-fosfórico

A formação enzimática de ácido  $\beta$ -sitosterol-fosfórico **5** pode ser proposta a partir da reação entre  $\beta$ -sitosterol e ácido fosfórico,<sup>51</sup> conforme Equação III.4.



O Quadro III.4 apresenta resultados termodinâmicos da formação de ácido  $\beta$ -sitosterol-fosfórico **5**, a partir das conformações **a** e **b** do  $\beta$ -sitosterol. Da mesma forma verificada para os outros produtos, o ácido  $\beta$ -sitosterol-fosfórico na conformação **5a** é relativamente mais estável.

Por outro lado, os valores de  $\Delta(\Delta H_f)$  são próximos para ambas as conformações, indicando que as alterações conformacionais na ramificação esteroidal não influencia os fatores de entalpia na fosforilação do  $\beta$ -sitosterol. Além disto, considerando os valores positivos para  $\Delta(\Delta H_f)$ , pode-se propor que o processo é desfavorável por entalpia.

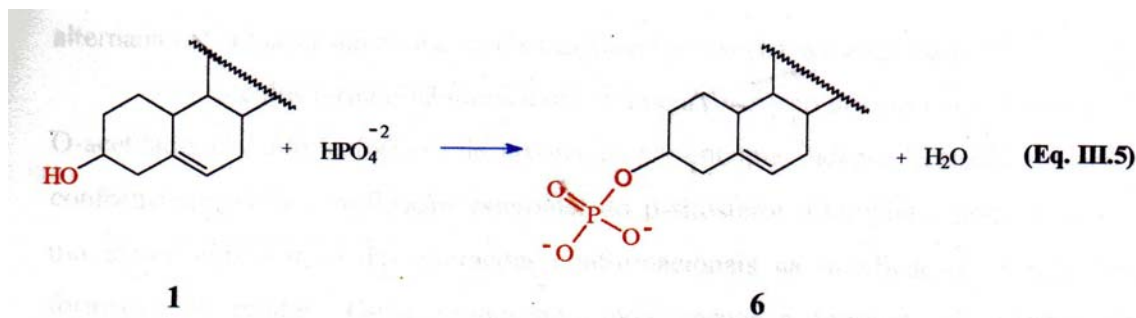
**Quadro III.4** – Valores calculados de  $\Delta H_f$  dos constituintes e  $\Delta(\Delta H_f)$  para formação de ácido  $\beta$ -sitosterol-fosfórico **5**. Valores em Kcal/mol, empregando método AM1.

Conformação	$\Delta H_f$				$\Delta(\Delta H_f)$
	<b>1</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>5</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	
<b>a</b>	-142,96	-287,37	-362,65	-59,24	<b>8,44</b>
<b>b</b>	-133,81	-287,37	-353,21	-59,24	<b>8,73</b>



### e. Formação de O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol

A formação enzimática de O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol **6** pode ser proposta a partir da reação entre  $\beta$ -sitosterol e hidrogênio fosfato,<sup>52</sup> conforme Equação III.5.



O Quadro III.5 apresenta resultados termodinâmicos da formação de O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol **6**, a partir das conformações **a** e **b** do  $\beta$ -sitosterol. Pelos resultados dos  $\Delta H_f$  das conformações do produto fosfatado, verifica-se também uma maior estabilidade relativa para o produto na conformação **6a**.

Além disto, diferente dos resultados termodinâmicos verificados para os produtos O-metilado, o-acetilado, O-fosforilado e do produto O-ribofuranosilado, para a conformação **4b**, os resultados de valores de  $\Delta(\Delta H_f)$  indicam que a formação do produto O-fosfatado é um processo favorecido por entalpia, sendo independente da conformação na ramificação esteroidal.

**Quadro III.5** – Valores calculados de  $\Delta H_f$  dos constituintes e  $\Delta(\Delta H_f)$  para formação de O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol. Valores em Kcal/mol, empregando método AM1.

Conformação	$\Delta H_f$				$\Delta(\Delta H_f)$
	<b>1</b>	$\text{HPO}_4^{-2}$	<b>6</b>	$\text{H}_2\text{O}$	
<b>A</b>	-142,96	-205,05	-292,57	-59,24	<b>-3,80</b>
<b>b</b>	-133,81	-205,05	-283,07	-59,24	<b>-3,45</b>

### 3. Análise dos Resultados Termodinâmicos

Considerando que o cálculo da barreira rotacional da ligação C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> determina uma variação de calor de formação muito significativa para o  $\beta$ -sitosterol, duas conformações apresentaram-se relativamente muito estáveis: a conformação alternada (**a**), a mais estável, e a conformação eclipsada (**b**), a menos estável.

Os cálculos termodinâmicos indicam que a formação dos produtos O-metilado, O-acetilado, O-ácido fosfórico é desfavorecida por entalpia, independente das alterações conformacionais na ramificação esteroidal do  $\beta$ -sitosterol. Entretanto, pode-se propor um efeito significativo das alterações conformacionais na ramificação esteroidal na formação do produto O-ribofuranosilado, pois apenas a formação do produto O-(ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol na conformação **4a** é favorecida por entalpia.

Por outro lado, somente para a formação do produto O-fosfatado torna-se favorecida por entalpia, independente das alterações conformacionais na ramificação esteroidal.

Assim, apesar da distância intramolecular entre o grupo O-substituinte e os carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> do  $\beta$ -sitosterol, os resultados termodinâmicos permitem propor uma relação entre os grupos substituintes em C<sub>3</sub> e as alterações conformacionais na ramificação esteroidal em C<sub>17</sub>, apesar de localizarem-se nas extremidades opostas do  $\beta$ -sitosterol.



## **Capítulo IV**

# **Estudos das Propriedades Estéricas do $\beta$ -sitosterol e de seus Derivados**

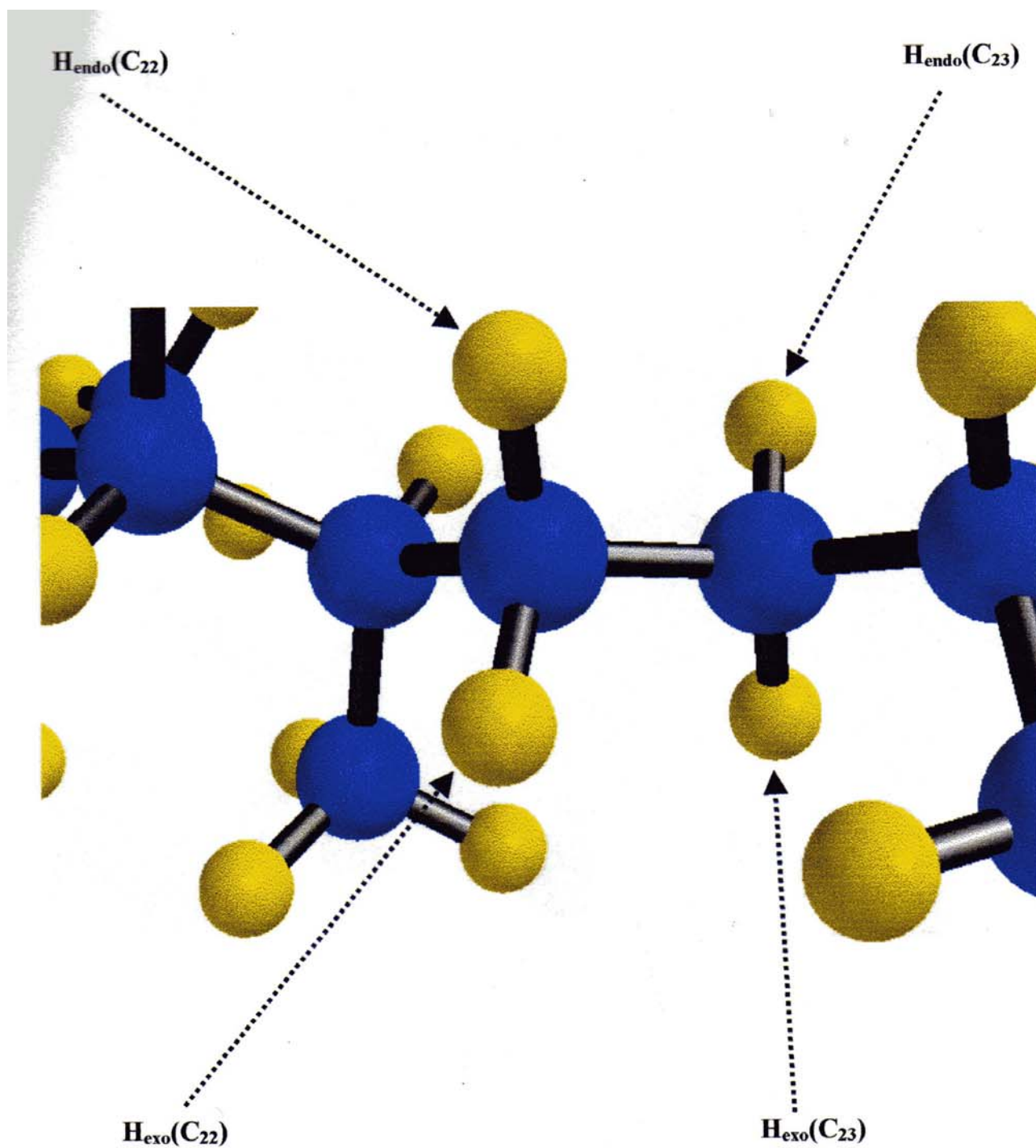
## 1. Distâncias Interatômicas no $\beta$ -sitosterol 1

A fim de estudar as variações das propriedades químicas nos carbonos do  $\beta$ -sitosterol que sofrem desodrogenação para formação de estigmasterol, foram realizados cálculos das propriedades estéricas do  $\beta$ -sitosterol nas conformações alternada (**a**) e eclipsada (**b**). Para distinguir entre os dois hidrogênios ligados tanto ao carbono C<sub>22</sub> quanto do carbono C<sub>23</sub>, foram denominados de hidrogênios endo àqueles cujas disposições espaciais apresentaram-se no sentido (próximo) ao esqueleto anular esteroidal e hidrogênios exo, àqueles no sentido contrário (afastado) deste esqueleto. A Figura IV.1 ilustra a distinção entre estes hidrogênios para a conformação alternada (**a**) e a Figura IV.2, para a conformação eclipsada (**b**).

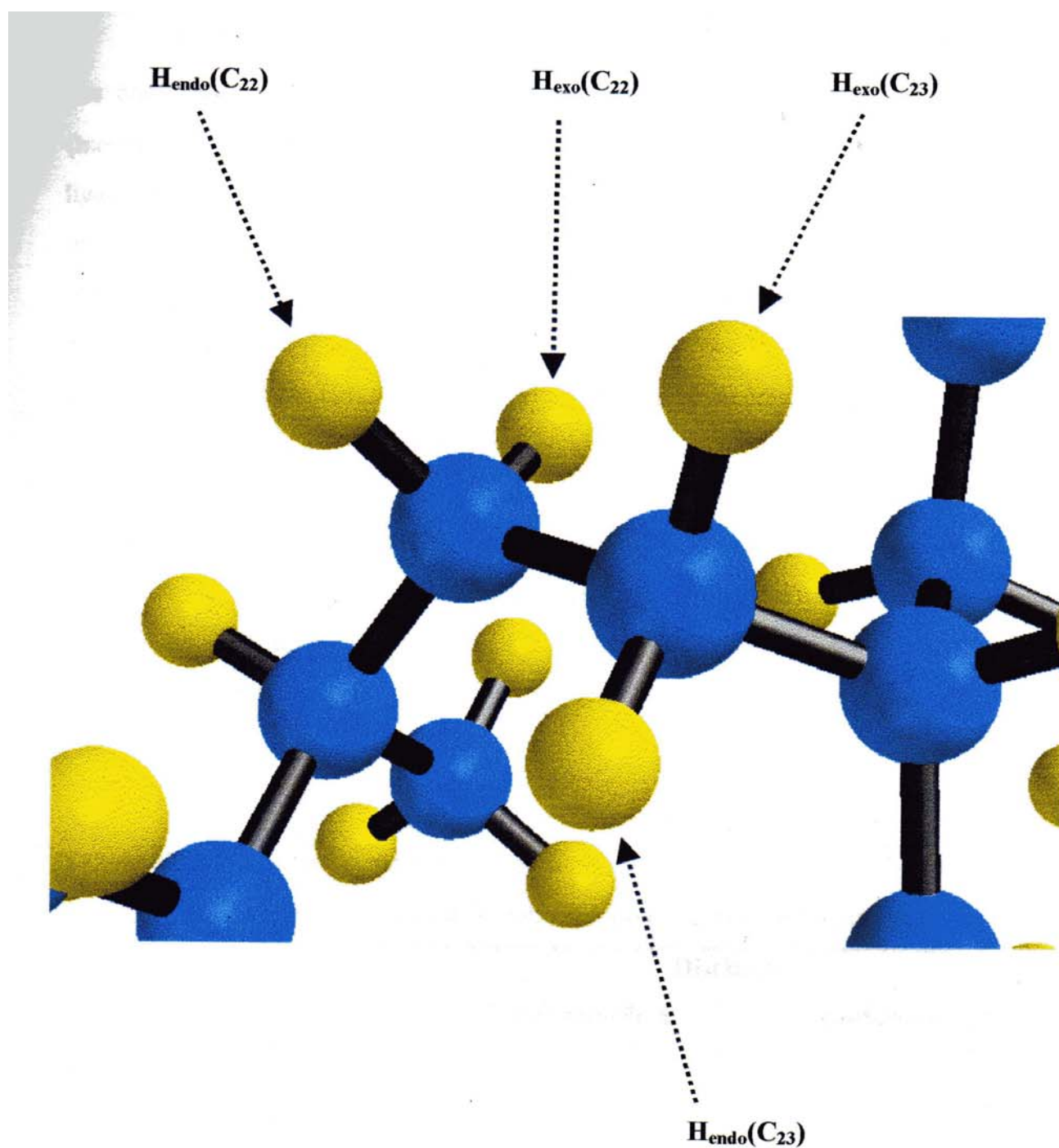
A Tabela IV.1 apresenta as distâncias interatômicas calculadas entre átomos do  $\beta$ -sitosterol nas conformações **1a** e **1b**. Pelos dados apresentados nesta tabela, verificam-se variações pouco significativas dos comprimentos das ligações C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> e C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>, indicando que as reatividade destes átomos ou destas ligações não são influenciadas pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal. Por outro lado, verifica-se uma maior distância entre os hidrogênios H<sub>endo</sub>(C<sub>22</sub>) e H<sub>exo</sub>(C<sub>23</sub>) na conformação **a** (Figura IV.1) em relação à conformação **b** (Figura IV.2). A maior aproximação entre estes dois hidrogênios na conformação **b** permite menores restrições estéricas no  $\beta$ -sitosterol para desidrogenação com eliminação sin, proporcionando consequentemente a formação de estigmasterol.

**Tabela IV.1** – Distâncias interatômicas calculadas para o  $\beta$ -sitosterol nas conformações **1a** e **1b**. Valores em Å, empregando método semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub> -C <sub>23</sub>	1,516	1,516
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,511	2,558
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,095	2,241
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,098	3,093
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,521	2,570
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,341	1,339



**Figura IV.1** – Disposição dos hidrogênios *endo* e *exo* nos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> do β-sitosterol na conformação **a**.



**Figura IV.2** – Disposição dos hidrogênios *endo* e *exo* nos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  no  $\beta$ -sitosterol na conformação **b**.

## 2. Distâncias Interatômicas no O-(metila)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela IV.2 apresenta distâncias interatômicas em o-(metila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **2a** e **2b**. Da mesma forma verificada para o  $\beta$ -sitosterol, no O-(metila)- $\beta$ -sitosterol não ocorre variações significativas das distâncias envolvendo as ligações C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> e C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> em relação às duas formas conformacionais. Além disto, a O-metilação não proporciona também variações nos comprimentos destas ligações em relação ao  $\beta$ -sitosterol. Conseqüentemente, estes resultados indicam que tanto a O-metilação quanto as alterações conformacionais no O-(metila)- $\beta$ -sitosterol não alteram as reatividades relacionadas com as propriedades de ligação envolvendo estes carbonos.

Para as distâncias interatômicas entre os hidrogênios ligados aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, os valores calculados são semelhantes aos verificados no  $\beta$ -sitosterol. Assim, pode-se propor que as reatividades proporcionadas pelos efeitos estéricos envolvendo estes hidrogênios não são alteradas quando ocorre a O-metilação. Além disto, pode-se propor que o produto O-(metila)- $\beta$ -sitosterol apresenta também melhores condições estéricas para eliminação (des-hidrogenação) sin na conformação eclipsada.

**Tabela IV.2** – Distâncias interatômicas calculadas para o  $\beta$ -sitosterol nas conformações **2a** e **2b**. Valores em Å, empregando método semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub> -C <sub>23</sub>	1,516	1,516
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,536	2,559
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,093	2,241
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,097	3,093
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,503	2,571
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,341	1,339

### 3. Distâncias Interatômicas no O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela IV.3 apresenta distâncias interatômicas em O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **3a** e **3b**. Da mesma forma verificada para os produtos  $\beta$ -sitosterol e O-metilado, a O-acetilação não proporciona variações significativas das distâncias interatômicas. Desta forma pode-se propor que as reatividades relacionadas tanto com as propriedades de ligação C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> e C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> quanto proporcionadas pelos efeitos estéricos envolvendo estes hidrogênios não são alteradas quando ocorre O-acetilação do  $\beta$ -sitosterol.

**Tabela IV.3** – Distâncias interatômicas calculadas para o O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **3a** e **3b**. Valores em Å, empregando método semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub> -C <sub>23</sub>	1,516	1,516
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,506	2,560
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,095	2,240
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,098	3,093
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,566	2,572
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,341	1,339

### 4. Distâncias interatômicas no O-(d-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela IV.4 apresenta distâncias interatômicas em O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **4a** e **4b**. Pelos dados apresentados, verifica-se também que não ocorrem variações significativas das distâncias interatômicas em relação ao  $\beta$ -sitosterol ou aos produtos O-metilado e O-acetilado.

**Tabela IV.4** – Distâncias interatômicas calculadas para o O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **4a** e **4b**. Valores em Å, empregando método semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub> -C <sub>23</sub>	1,516	1,516
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,531	2,558
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,094	2,241
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,097	3,093
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,503	2,570
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,341	1,339

### 5. Distância Interatômicas no ácido- $\beta$ -sitosterol fosfórico

A Tabela IV.5 apresenta distâncias interatômicas para o ácido- $\beta$ -sitosterol fosfórico nas conformações **5a** e **5b**. Pelos dados apresentados, verifica-se que os comprimentos das ligações C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> e C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> não sofrem variações significativas, indicando que O-fosforilação do  $\beta$ -sitosterol não altera as reatividades envolvendo as propriedades destas ligações.

Em relação aos hidrogênios da ramificação esteroidal, verifica-se, de um modo geral, um aumento relativo das distâncias interatômicas no produto O-fosforilado. Estes resultados indicam menores interações que podem favorecer des-hidrogenação do  $\beta$ -sitosterol para formação de estigmasterol.

Entretanto, para a distância interatômica envolvendo os hidrogênios H<sub>endo</sub>(C<sub>22</sub>)-H<sub>exo</sub>(C<sub>23</sub>), verifica-se uma diminuição mais significativa na conformação **b** do produto O-fosforilado, em relação tanto à sua conformação **a** quanto aos outros produtos descritos anteriormente. Assim, pode-se propor que o ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico apresenta melhores condições estéricas e, conseqüentemente, reatividade mais favorecida para eliminação (des-hidrogenação) sin na conformação eclipsada.

**Tabela IV.5** – Distâncias interatômicas calculadas para o ácido- $\beta$ -sitosterol fosfórico nas conformações **5a** e **5b**. Valores em Å, empregando método semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub> -C <sub>23</sub>	1,516	1,515
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,516	2,656
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,094	2,221
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,097	3,080
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,517	2,661
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,341	1,339

## 6. Distâncias Interatômicas no O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela IV.6 apresenta distâncias interatômicas no O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **6a** e **6b**. Pelos dados apresentados, verifica-se que não ocorrem variações significativas no comprimento da ligação C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>. Da mesma forma, a variação pouco significativa da ligação C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> em ambas as conformações não permite sugerir a ocorrência de interações atômicas para a formação em função das alterações conformacionais.

Em relação aos hidrogênios da ramificação esteroidal, pode-se verificar um aumento das distâncias interatômicas, indicando também desfavorecimento para des-hidrogenação para formação do estigmasterol. Isto não é verificado apenas para a distância interatômica entre H<sub>exo</sub>(C<sub>22</sub>) e H<sub>endo</sub>(C<sub>23</sub>) que, na conformação **b**, não é influenciada pela estrutura do grupo O-substituinte, indicando também condições estéricas favoráveis para des-hidrogenação sin para formação de estigmasterol.



**Tabela IV.6** – Distâncias interatômicas calculadas para O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **6a** e **6b**. Valores em Å, empregando método semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub> -C <sub>23</sub>	1,559	1,516
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,588	2,553
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,039	2,242
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	3,064	3,092
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )-H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	2,422	2,573
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,344	1,345

## 7. Análises dos Resultados das Propriedades Estéricas

Considerando que a variação estrutural do grupo O-substituinte não altera as distâncias interatômicas entre C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> no  $\beta$ -sitosterol e seus derivados, pode-se propor que a reatividade envolvendo estes carbonos não é influenciada para des-hidrogenação, independente da conformação da ramificação esteroidal.

Entretanto, as distâncias interatômicas entre os hidrogênios ligados aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> apresentam variações significativas quando ocorrem alterações conformacionais na ramificação esteroidal, independente da estrutura do grupo O-substituinte. Na conformação **b** verifica-se uma aproximação maior entre hidrogênios ligados aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>. Considerando que estes carbonos do  $\beta$ -sitosterol sofrem des-hidrogenação para formação de estigmasterol, pode-se propor que, por fatores estéricos, o mecanismo desta transformação esteroidal envolva o  $\beta$ -sitosterol na conformação **b**.

Em relação aos sistema  $\pi$  envolvendo os carbonos C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>, pode-se propor que as alterações conformacionais na ramificação esteroidal e a estrutura do grupo O-substituinte não influencia a reatividade proporcionada pelas propriedades químicas relacionadas com as interações entre estes carbonos.

## **Capítulo V**

### **Estudo das Propriedades do $\beta$ -sitosterol e de seus Derivados**

## 1. Cálculo das Densidades de Cargas

### a. Densidades de cargas sobre os átomos do $\beta$ -sitosterol

A Tabela de V.1 apresenta os valores de densidades de cargas eletrônicas ( $\delta_e$ ) sobre átomos do  $\beta$ -sitosterol nas conformações **1a** e **1b**. Por esta tabela, os valores de  $\delta_e$  sobre os carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> apresentam uma variação pouco significativa entre as duas conformações. Estes resultados indicam que as reatividades do  $\beta$ -sitosterol envolvendo estes carbonos não são influenciadas pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal.

Os mesmos resultados podem ser verificados para os carbonos C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>. Entretanto, o maior valor de  $\delta_e$  sobre C<sub>6</sub> sugere sua maior reatividade relativa a ataques nucleofílicos. Por sua vez, o menor valor de  $\delta_e$  sobre C<sub>5</sub> sugere sua maior reatividade relativa em ataques eletrofílicos. Assim, pode-se propor uma regioseletividade em interações eletrostáticas nestes carbonos, independentes da conformação do  $\beta$ -sitosterol.

**Tabela V.1** – Os valores de  $\delta_e$  sobre átomos de  $\beta$ -sitosterol nas conformações **1a** e **1b** empregando métodos semi-empírico AM1.

Átomos	Distância	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub>	-0,159	-0,151
C <sub>23</sub>	-0,153	-0,150
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,070
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,084
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,079	0,084
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,083	0,070
C <sub>5</sub>	-0,100	-0,103
C <sub>6</sub>	-0,161	-0,160

Para os hidrogênios ligados à C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, não se verificam variações significativas dos valores de  $\delta_e$  na conformação **1a**. Entretanto, na conformação **1b**, as variações de  $\delta_e$  são maiores, indicando conseqüentemente alterações em suas propriedades químicas. Desta forma, somente na conformação **1b** pode-se propor um regioselectividade em mecanismos envolvendo inicialmente interações eletrostáticas. As menores densidades eletrônicas sobre os hidrogênios  $H_{exo}(C_{22})$  e  $H_{endo}(C_{23})$  sugerem maiores reatividades em interações nucleofílicas. Por outro lado, as maiores densidades eletrônicas sobre  $H_{endo}(C_{22})$  e  $H_{exo}(C_{22})$  sugerem maiores reatividades destes hidrogênios em interações eletrofílicas.

### b. Densidades de cargas sobre os átomos do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela V.2 apresenta os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **2a** e **2b**. Os valores de  $\delta_e$  são muito próximos aos calculados para o  $\beta$ -sitosterol, indicando que as propriedades químicas e as reatividades nos átomos tanto da ligação C<sub>5</sub> – C<sub>6</sub> quanto na ramificação esteroidal não são influenciadas pela O-metilação do  $\beta$ -sitosterol.

**Tabela V.2** – Os valores de  $\delta_e$  sobre átomos de O-(metila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **2a** e **2b** empregando métodos semi-empírico AM1.

Átomos	$\delta_e$	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub>	-0,159	-0,151
C <sub>23</sub>	-0,153	-0,150
$H_{endo}(C_{22})$	0,081	0,070
$H_{exo}(C_{22})$	0,081	0,084
$H_{endo}(C_{23})$	0,079	0,084
$H_{exo}(C_{23})$	0,083	0,070
C <sub>5</sub>	-0,100	-0,103
C <sub>6</sub>	-0,161	-0,160

### c. Densidades de cargas sobre os átomos do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela V.3 apresenta os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **3a** e **3b**. Os valores de  $\delta_e$  sobre os carbonos C<sub>22</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub> não apresentam variações significativas em relação ao  $\beta$ -sitosterol e ao produto O-metilado. Entretanto, para os hidrogênios ligados aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, verificam-se variações poucos significativas dos valores calculados de  $\delta_e$ , independente das alterações conformacionais na ramificação esteroidal do produto O-acetilado. Assim, diferente do  $\beta$ -sitosterol e do produto O-metilado, a O-acetilação diminui a reatividade desses hidrogênios em interações eletrostáticas tanto para ataques eletrofílicos quanto para ataques nucleofílicos.

**Tabela V.3** – Os valores de  $\delta_e$  sobre átomos de O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **3a** e **3b** empregando métodos semi-empírico AM1.

Átomos	$\delta_e$	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub>	-0,159	-0,156
C <sub>23</sub>	-0,153	-0,154
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,082
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,079
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,083	0,079
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,079	0,081
C <sub>5</sub>	-0,100	-0,103
C <sub>6</sub>	-0,161	-0,160

#### d. Densidades de cargas sobre átomos do O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela V.4 apresenta os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **4a** e **4b**. Considerando que os valores de  $\delta_e$  descritos nesta tabela são semelhantes aos verificados para o  $\beta$ -sitosterol e o produto O-metilado, pode-se propor que o produto O-(D-ribofuranosilado) apresenta também propriedades químicas e reatividades que dependem também das alterações conformacionais na ramificação estereoidal.

**Tabela V.4** – Os valores de  $\delta_e$  sobre átomos de O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **4a** e **4b** empregando métodos semi-empírico AM1.

Átomos	$\delta_e$	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub>	-0,159	-0,151
C <sub>23</sub>	-0,153	-0,150
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,070
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,084
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,079	0,084
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,083	0,070
C <sub>5</sub>	-0,105	-0,110
C <sub>6</sub>	-0,155	-0,155

#### e. Densidades de cargas sobre átomos do ácido $\beta$ -sitosterol fosfórico

A Tabela V.5 apresenta os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico nas conformações **5a** e **5b**. Os valores de  $\delta_e$  descritos nesta tabela são semelhantes aos verificados para o  $\beta$ -sitosterol e aos produtos O-metilado e O-ribofuranose, indicando conseqüentemente as mesmas reatividades.

**Tabela V.5** – Os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do ácido  $\beta$ -sitosterol nas conformações **5a** e **5b** empregando métodos semi-empírico AM1.

Átomos	$\delta_e$	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub>	-0,159	-0,151
C <sub>23</sub>	-0,153	-0,150
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,071
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,081	0,084
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,079	0,083
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,083	0,071
C <sub>5</sub>	-0,105	-0,105
C <sub>6</sub>	-0,155	-0,156

#### f. Densidades de cargas sobre átomos do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol

A Tabela V.6 apresenta os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **6a** e **6b**. Apesar dos valores de  $\delta_e$  sobre C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> não sofrerem variações significativas em relação aos demais produtos, os valores sobre C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub> apresentam-se significativamente diferentes. Neste caso, a densidade eletrônica sobre C<sub>6</sub> torna-se maior, aumentando sua reatividade em ataques nucleofílicos. Por sua vez, a maior deficiência eletrônica sobre C<sub>5</sub> aumenta relativamente sua reatividade em ataques eletrofílicos. Desta forma, a O-fosfatação do  $\beta$ -sitosterol aumenta a reatividade envolvendo interações eletrostáticas e a regioseletividade na ligação  $\pi$  entre C<sub>5</sub> – C<sub>6</sub>.

Em relação aos hidrogênios da ramificação esteroidal, verifica-se uma variação significativa de  $\delta_e$  apenas na conformação **b**. Entretanto, esta variação torna-se mais acentuada quando comparada com os outros produtos, indicando maior reatividade envolvendo estes hidrogênios. Além disto, a O-fosfatação altera regioseletivamente as reatividades destes hidrogênios pois, somente neste caso, H<sub>endo</sub>(C<sub>22</sub>) e H<sub>exo</sub>(C<sub>23</sub>) apresentam-se mais reativos em interações nucleofílicas e H<sub>exo</sub>(C<sub>22</sub>) e H<sub>endo</sub>(C<sub>23</sub>), em interações eletrofílicas.

**Tabela V.6** – Os valores de  $\delta_e$  sobre átomos do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **6a** e **6b** empregando métodos semi-empírico AM1.

Átomos	$\delta_e$	
	Conformação a	Conformação b
C <sub>22</sub>	-0,160	-0,148
C <sub>23</sub>	-0,152	-0,149
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,082	0,065
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,077	0,070
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,079	0,094
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,080	0,057
C <sub>5</sub>	-0,018	+0,028
C <sub>6</sub>	-0,257	-0,304

## 2. Cálculo do Momento de Dipolo

A Tabela V.5 apresenta os valores de  $\mu$  para  $\beta$ -sitosterol e seus derivados O-substituídos nas conformações **a** e **b**. Para o  $\beta$ -sitosterol e os produtos O-metila e O-(D-ribofuranose), os valores de  $\mu$  e, conseqüentemente, as estabilidades relativas em diferentes meios (polares ou apolares) não são influenciados pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal. Entretanto, quando ocorre O-acetilação, verifica-se um maior valor de  $\mu$  na conformação **a**, indicando sua maior estabilidade relativa em meios mais polares.

**Tabela V.5** – Valores de momento de dipolo  $\mu$  para  $\beta$ -sitosterol **1** e seus derivados nas conformações **a** e **b**. Valores em Debye, empregando método semi-empírico AM1.

Conformação	$\mu$					
	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	1,91	1,65	5,12	3,70	-	-
<b>B</b>	1,96	1,65	1,39	3,64	-	-



### 3. Cálculo das Contribuições dos Orbitais Atômicos para os Orbitais moleculares de Fronteira

A fim de inferir sobre as reatividades em ataques tanto eletrofílicos quanto nucleofílicos do  $\beta$ -sitosterol e de seus derivados O-substituídos, foram calculadas as contribuições dos orbitais atômicos (OA's) para os orbitais moleculares de fronteira (OM<sub>f</sub>'s). Estas contribuições foram calculadas pelo somatório, em módulo, da contribuição de cada um dos orbitais de valência dos átomos. Desta forma, não foi considerada a fase para o cálculo das contribuições dos OA's.

#### a. Contribuições dos orbitais atômicos do $\beta$ -sitosterol

##### i. $\beta$ -sitosterol na conformação 1a

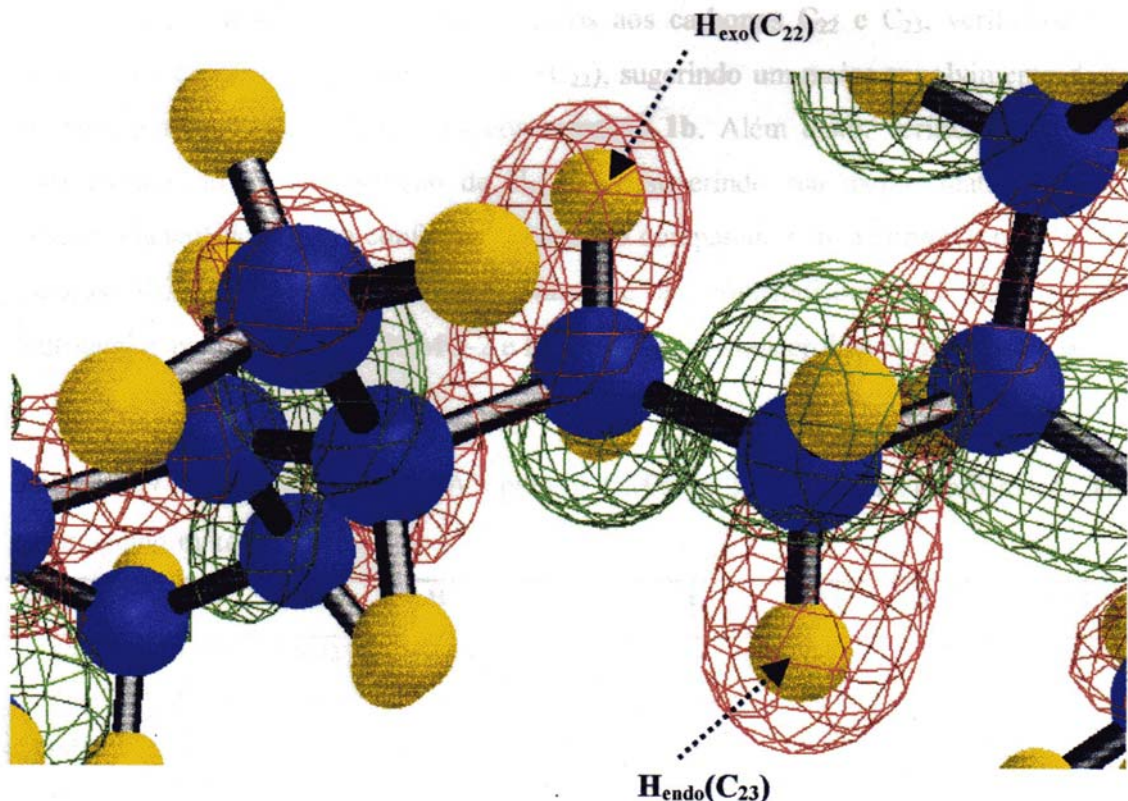
A Tabela V.8 apresenta os valores calculados das contribuições dos orbitais atômicos (OA's) para os orbitais moleculares de fronteira (OM<sub>f</sub>'s) do  $\beta$ -sitosterol na conformação 1a. Para os carbonos C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>, verifica-se que as contribuições dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s vazios ou ocupados são significativamente maiores em relação aos átomos da ramificação esteroidal. Desta forma, pode-se propor que a ligação C<sub>5</sub> – C<sub>6</sub>, em relação à ramificação esteroidal, apresenta-se muito mais reativa em ataques tanto eletrofílicos quanto nucleofílicos.

**Tabela V.8** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do  $\beta$ -sitosterol na conformação 1a, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,049	0,015	0,027	-	-	0,019	0,020	0,016
C <sub>23</sub>	0,088	-	-	-	-	0,010	0,013	0,017
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,023	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,023	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,035	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>5</sub>	0,113	0,246	0,275	0,887	0,995	0,197	0,230	0,355
C <sub>6</sub>	0,113	0,208	0,257	0,927	1,025	0,134	0,435	0,141

Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$ , os resultados mostram contribuições mais significativas do carbono  $C_{22}$  para os  $OM_f$ 's vazios, podendo indicar sua maior reatividade em ataques eletrofílicos. Para os  $OM_f$ 's ocupados, apesar da maior contribuição do carbono  $C_{23}$  para o orbital HOMO-3, o carbono  $C_{22}$  apresenta contribuições mais significativas para orbitais mais reativos em ataques nucleofílicos. Estes resultados não permitem conseqüentemente propor uma regisseletividade em ataques nucleofílicos entre esses carbonos.

Em relação aos hidrôgenios ligados aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$ , verifica-se que estes hidrôgenios não contribuem para os  $OM_f$ 's vazios, não sendo reativos conseqüentemente em interações envolvendo ataques eletrofílicos. Por outro lado, os hidrogênios  $H_{exo}(C_{22})$ , e  $H_{exo}(C_{23})$  e  $H_{endo}(C_{23})$  contribuem somente para o HOMO-3, indicando que estes átomos são mais reativos em interações envolvendo ataques nucleofílicos. A Figura V.1 ilustra as contribuições dos OA's desses hidrôgenios para o orbital HOMO-3.



**Figura V.1** – Contribuição dos OA's para o HOMO-3 do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1a**, empregando método AM1.

## ii. $\beta$ -sitosterol na conformação **1b**

A Tabela V.9 apresenta os valores calculados das OA's para os  $OM_f$ 's do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1b**. Em relação aos carbonos  $C_5$  e  $C_6$ , verifica-se que as contribuições para os  $OM_f$ 's, tanto vazios quanto ocupados, são maiores quando comparados com os átomos da ramificação esteroidal. Além disto, pela comparação entre os valores descritos nas Tabelas V.8 e V.9, pode-se propor que as alterações conformacionais na ramificação esteroidal do  $\beta$ -sitosterol na alteram significativamente as contribuições para os  $OM_f$ 's.

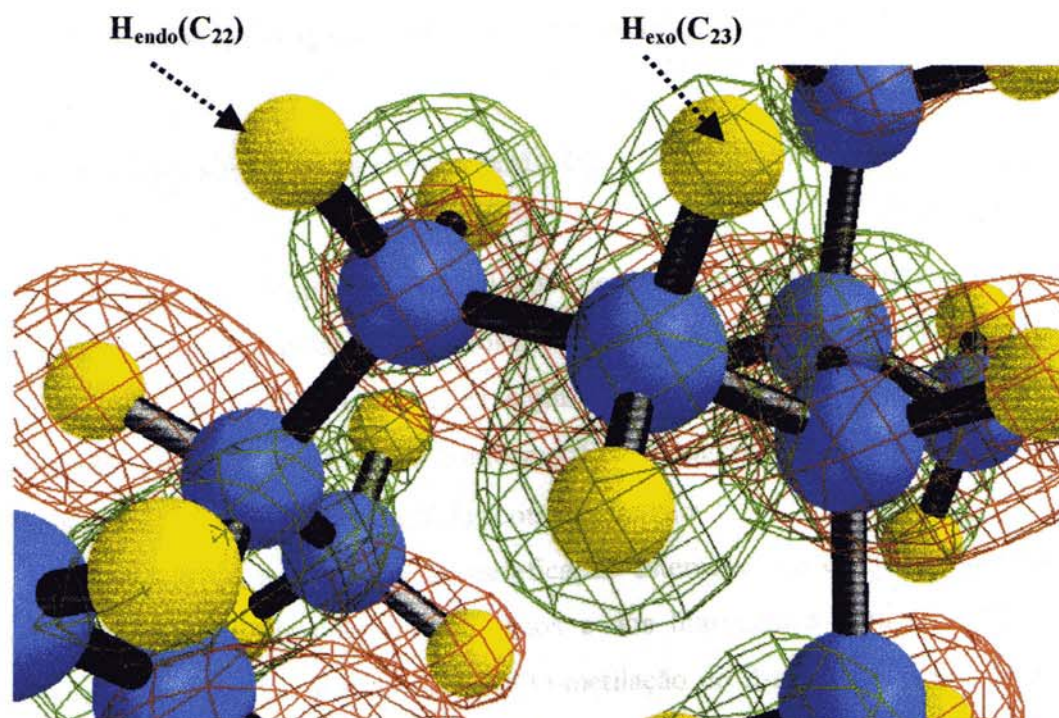
Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$ , para os  $OM_f$ 's vazios, verifica-se uma diminuição nas contribuições dos OA's, indicando menor reatividade em ataques eletrofilicos envolvendo a ramificação esteroidal na conformação **1b**. Para os  $OM_f$ 's ocupados, verifica-se um aumento das contribuições dos OA's de  $C_{22}$  na conformação **1b**, sugerindo uma maior reatividade em ataques nucleofilicos envolvendo este carbono.

Em relação aos hidrogênios ligados aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$ , verifica-se um aumento da contribuição atômica de  $H_{exo}(C_{22})$ , sugerindo um maior envolvimento deste átomo em ataques nucleofilicos na conformação **1b**. Além disto, verifica-se também uma diminuição da contribuição de  $H_{exo}(C_{23})$ , sugerindo sua menor reatividade em ataques nucleofilicos nesta conformação quando comparada com a conformação **1a**. As Figuras V.2 e V.3 ilustram respectivamente as contribuições dos OA's desses hidrogênios para os orbitais HOMO-2 e HOMO-3 do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1b**.

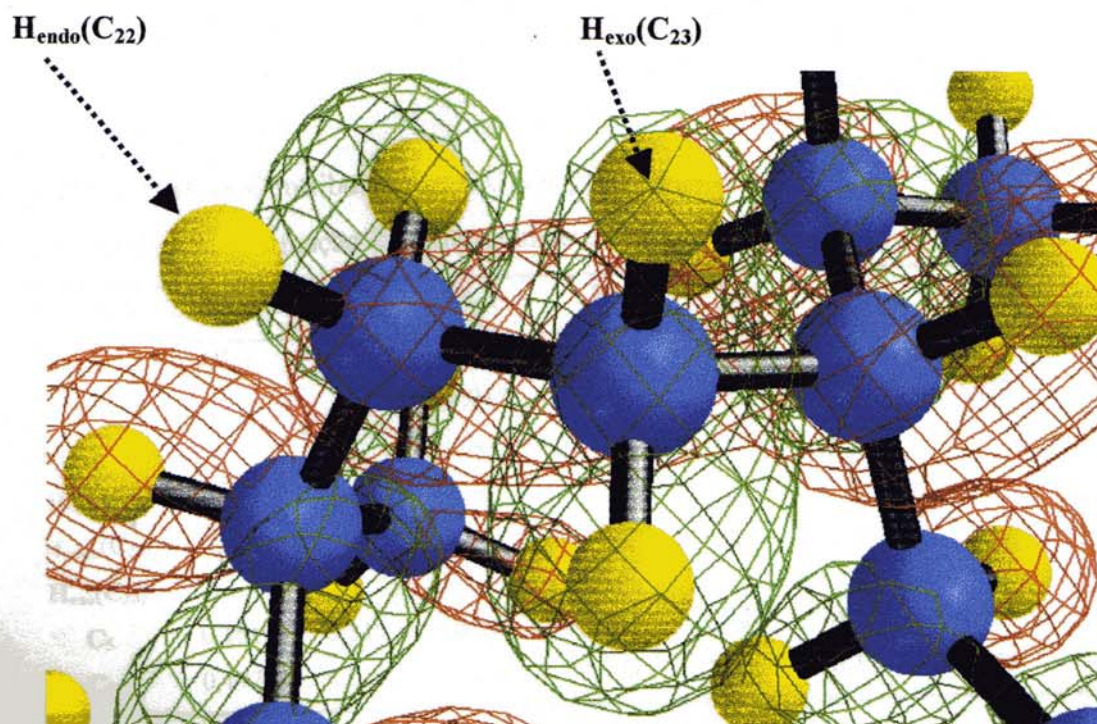
**Tabela V.9** – Contribuição dos OA's para os  $OM_f$ 's do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1b**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
$C_{22}$	0,055	0,023	0,027	-	-	-	-	0,011
$C_{23}$	0,066	0,014	-	-	-	-	-	0,011
$H_{endo}(C_{22})$	-	-	-	-	-	-	-	-
$H_{exo}(C_{22})$	0,032	-	-	-	-	-	-	-
$H_{endo}(C_{23})$	0,025	-	-	-	-	-	-	-
$H_{exo}(C_{23})$	0,010	0,011	-	-	-	-	-	-
$C_5$	0,064	0,213	0,277	0,949	1,084	0,177	0,394	0,301
$C_6$	0,068	0,215	0,233	0,983	1,109	0,098	0,209	0,131





**Figura V.2** – Contribuição dos OA's para o HOMO-2 do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1b**, empregando método AM1.



**Figura V.3** – Contribuição dos OA's para o HOMO-3 do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1b**, empregando método AM1.

## b. Contribuições dos orbitais do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol

### i. O-(metila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2a**

A Tabela V.10 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2a**. Em relação aos carbonos C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>, não se verificam variações significativas em suas contribuições quando comparadas com o  $\beta$ -sitosterol na conformação **1a**, sugerindo que a O-metilação não influencia nas reatividades relacionadas com o sistema  $\pi$ .

Em relação aos átomos da ramificação esteroidal, os cálculos indicam uma diminuição das contribuições dos carbonos e dos hidrogênios para os OM<sub>f</sub>'s tanto vazios quanto ocupados quando ocorre a O-metilação do  $\beta$ -sitosterol. Estes resultados indicam uma menor reatividade da ramificação esteroidal do O-(metoxi)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2a**.

**Tabela V.10** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s de fronteira do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2a**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,011	-	0,023	-	-	-	0,025	0,023
C <sub>23</sub>	-	-	0,012	-	-	-	0,015	0,016
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>5</sub>	0,161	0,319	0,296	0,854	0,987	0,379	0,069	0,404
C <sub>6</sub>	0,197	0,289	0,252	0,906	1,013	0,154	0,056	0,221

## ii. O-(metila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2b**

A Tabela V.11 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os  $OM_f$ 's do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2b**. Para os carbonos  $C_5$  e  $C_6$ , verifica-se que a O-metilação do  $\beta$ -sitosterol não proporciona variações significativas nas reatividades do sistema  $\pi$ , independente das alterações conformacionais.

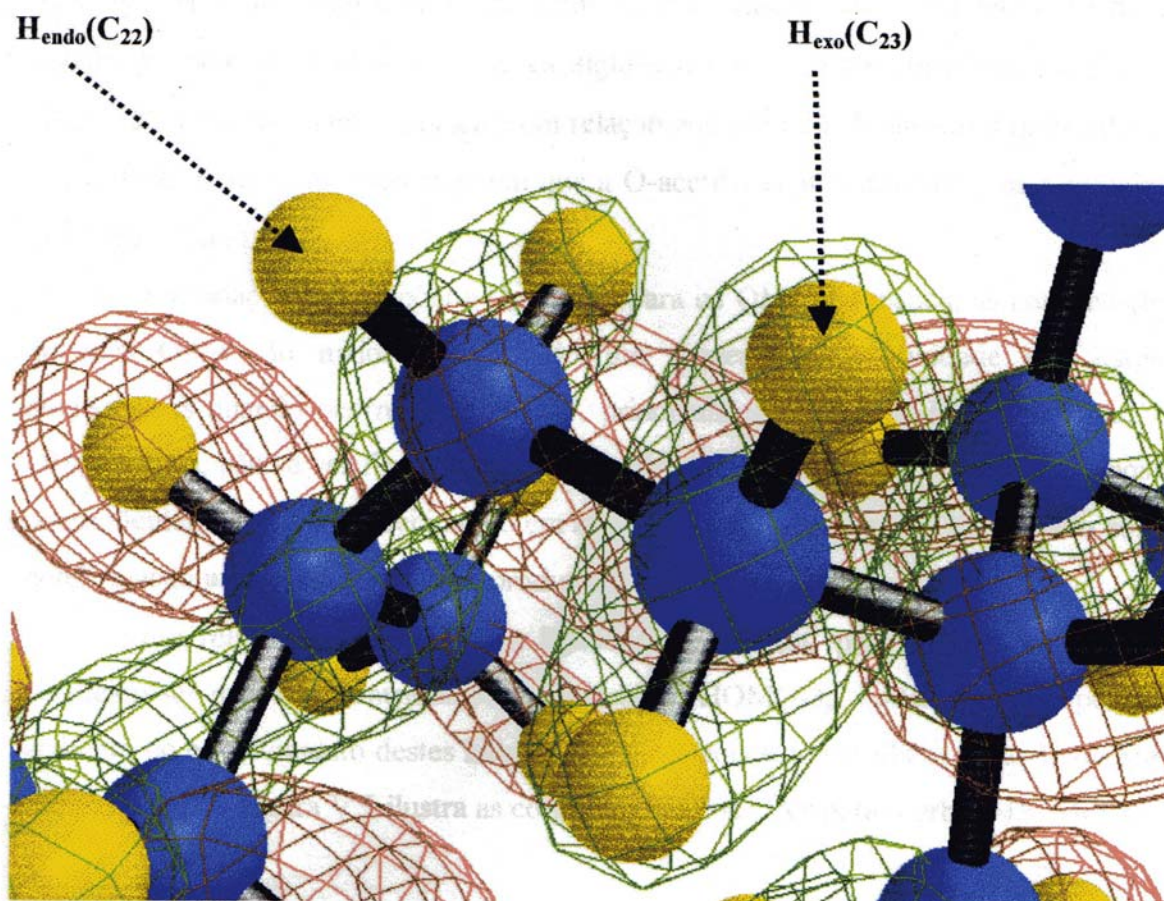
Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$ , para os  $OM_f$ 's ocupados, verifica-se aumento das suas contribuições na conformação **2b**. Estes resultados indicam que nesta conformação a reatividade em ataques nucleofílicos torna-se relativamente maior, sendo, entretanto, menor do que nas duas conformações do  $\beta$ -sitosterol. Para os  $OM_f$ 's vazios, verificam-se menores contribuições destes carbonos, indicando que, nesta conformação, a reatividade torna-se também menor em ataques eletrofílicos.

Em relação aos hidrogênios da ramificação esteroidal, para os  $OM_f$ 's ocupados, verificam-se contribuições de  $H_{exo}(C_{22})$ ,  $H_{endo}(C_{23})$  e  $H_{exo}(C_{23})$ , indicando que, nesta conformação, as reatividades em ataques nucleofílicos envolvendo estes hidrogênios torna-se maior. Entretanto esta reatividade apresenta-se relativamente menor em relação ao  $\beta$ -sitosterol, independente da sua conformação. A Figura V.4 ilustra as contribuições dos OA's dos átomos da ramificação esteroidal.

**Tabela V.11** – Contribuição dos OA's para os  $OM_f$ 's de fronteira do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **2b**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
$C_{22}$	0,037	-	0,025	-	-	-	0,010	0,012
$C_{23}$	0,045	-	-	-	-	-	-	-
$H_{endo}(C_{22})$	-	-	-	-	-	-	-	-
$H_{exo}(C_{22})$	0,010	-	-	-	-	-	-	-
$H_{endo}(C_{23})$	0,010	-	-	-	-	-	-	-
$H_{exo}(C_{23})$	0,013	-	-	-	-	-	-	-
$C_5$	0,099	0,333	0,283	0,915	1,078	0,369	0,136	0,354
$C_6$	0,118	0,186	0,237	0,962	1,103	0,113	0,079	0,207





**Figura V.4** – Contribuição dos OA's para o HOMO-3 do O-(metila)-β-sitosterol na conformação **2b**, empregando método AM1.

### c. Contribuições dos orbitais atômicos do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol

#### i. O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **3a**

A Tabela V.12 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **3a**. Para os carbonos do sistema  $\pi$ , não se verificam variações significativas em suas contribuições para os OM<sub>f</sub>'s tanto vazios quanto ocupados em relação aos produtos  $\beta$ -sitosterol hidroxilado e O-metilado. Estes resultados sugerem que a O-acetilação não influencia na reatividade do sistema  $\pi$  do  $\beta$ -sitosterol.

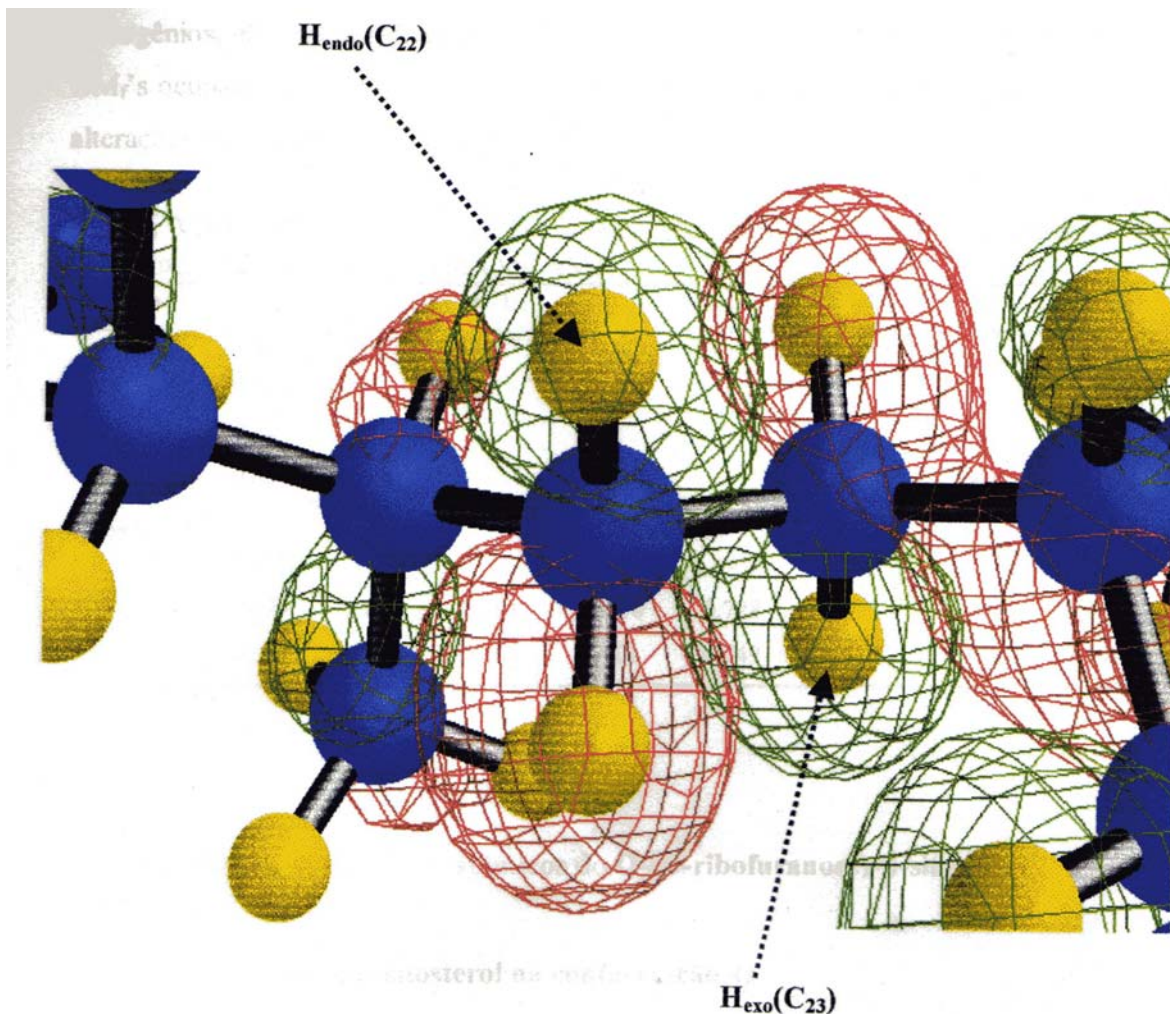
Em relação aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, para os OM<sub>f</sub>'s ocupados, as contribuições de seus OA's são maiores, indicando um aumento da reatividade em ataques nucleofílicos quando ocorre O-acetilação, principalmente em C<sub>22</sub>. Entretanto, para os OM<sub>f</sub>'s vazios, não se verificam contribuições significativas dos OA's destes carbonos e, conseqüentemente, desfavorecimento em ataques eletrofílicos quando comparados com a conformação **a** do  $\beta$ -sitosterol e do produto O-metilado.

Em relação aos hidrogênios ligados a C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, para os OM<sub>f</sub>'s ocupados, verificam-se maiores contribuições no orbital HOMO-3, podendo-se propor um aumento de envolvimento destes hidrogênios em ataques nucleofílicos, quando ocorre a O-acetilação. A Figura V.5 ilustra as contribuições dos OA's para o orbital HOMO-3.

**Tabela V.12** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **3a**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,064	0,018	0,107	-	-	-	-	-
C <sub>23</sub>	0,101	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,043	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,034	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,045	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>5</sub>	0,064	0,237	0,231	0,881	0,943	0,248	0,222	0,293
C <sub>6</sub>	0,083	0,164	0,245	0,897	0,988	0,232	0,061	0,122





**Figura V.5** – Contribuição dos OA's para o orbital HOMO-3 do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **3a**, empregando método AM1.

## ii. O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **3b**

A Tabela V.13 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os  $OM_f$ 's do O-(acetila)- $\beta$ -sitosterol na conformação **3b**. Para os carbonos do sistema  $\pi$ , verificam-se variações pouco significativas das contribuições dos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  para os  $OM_f$ 's ocupados e vazios, indicando que a O-acetilação não influencia na reatividade para ataques tanto nucleofílicos quanto eletrofílicos, independente da conformação na ramificação esteroidal. Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  e aos seus hidrogênios, não são verificadas também alterações significativas nas contribuições dos  $OM_f$ 's ocupados ou vazios e, conseqüentemente, em suas reatividades quando ocorrem alterações conformacionais na ramificação esteroidal.

**Tabela V.13** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(acetila)-β-sitosterol na conformação **3b**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,064	0,018	0,107	-	-	-	-	-
C <sub>23</sub>	0,101	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,043	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,034	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,045	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>5</sub>	0,029	0,196	0,301	0,970	0,728	0,832	0,249	0,125
C <sub>6</sub>	0,035	0,206	0,268	1,001	0,749	0,833	0,146	0,090

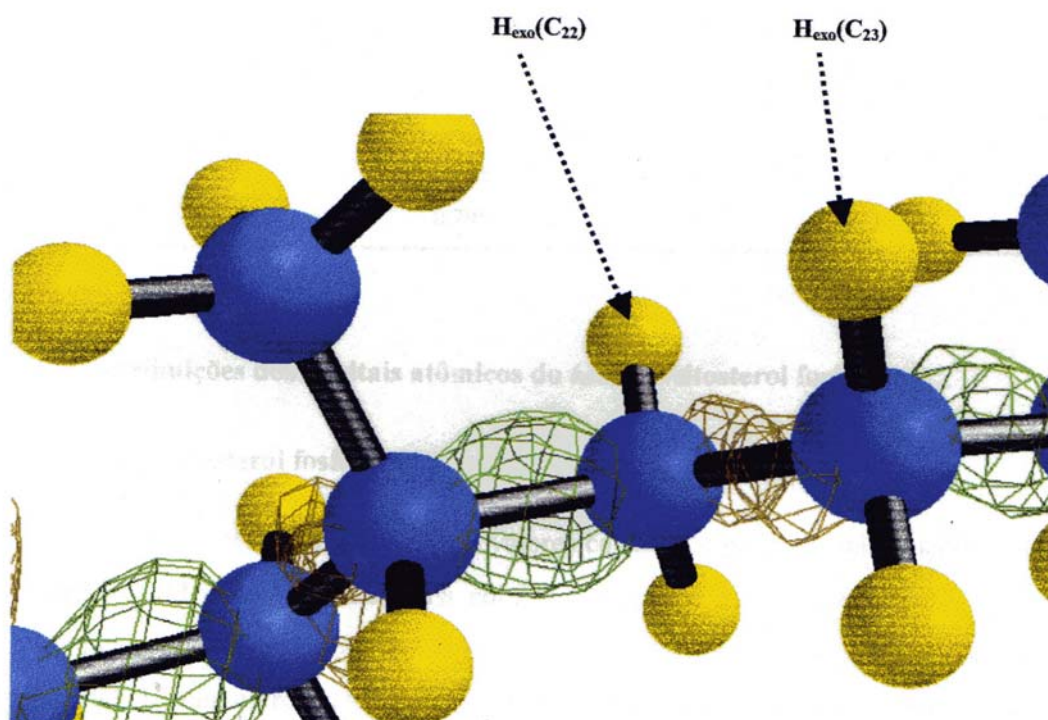
#### d. Contribuições dos orbitais atômicos do O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol

##### i. O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol na conformação **4a**

A Tabela V.14 apresenta os valores calculados das contribuições dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol na conformação **4a**. Em relação aos carbonos do sistema π, verificam-se contribuições relativamente menores, indicando conseqüentemente menos reativos para ataques tanto nucleofílicos quanto eletrofílicos quando ocorre O-(D-ribofuranosilação) do β-sitosterol. Em relação aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, para os OM<sub>f</sub>'s ocupados, pode-se observar pouca variação nas contribuições destes carbonos quando comparado com o β-sitosterol. Em relação aos hidrogênios ligados à C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, para os OM<sub>f</sub>'s ocupados, verificam-se contribuições significativas somente de H<sub>exo</sub>(C<sub>22</sub>) e H<sub>endo</sub>(C<sub>23</sub>). Estas contribuições são maiores, indicando maiores envolvimentos destes hidrogênios em ataques nucleofílicos na conformação **a** do produto O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol. A Figura V.6 ilustra as contribuições dos OA's desses hidrogênios para o orbital HOMO-3.

**Tabela V.14** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol na conformação **4a**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,039	0,013	0,019	-	-	-	-	-
C <sub>23</sub>	0,071	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,036	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,039	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>5</sub>	0,196	0,089	0,232	0,803	0,880	0,225	0,075	0,013
C <sub>6</sub>	0,158	0,109	0,255	0,815	0,910	0,064	0,037	0,006



**Figura V.6** – Contribuição dos OA's para o orbital HOMO-3 do O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol na conformação **4a**, empregando método AM1.

## ii. O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol na conformação **4b**

A Tabela V.15 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os  $OM_f$ 's do  $\beta$ -sitosterol na conformação **4b**. Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  e seus hidrogênios, verificam-se menores contribuições dos  $OM_f$ 's ocupados e vazios. Desta forma, pode-se propor que a reatividade do produto O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol é influenciada significativamente pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal, diminuindo sua reatividade na conformação **4b**.

**Tabela V.15** – Contribuição dos OA's para os  $OM_f$ 's do O-(D-ribofuranose)- $\beta$ -sitosterol na conformação **4b**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
$C_{22}$	-	0,025	0,012	-	-	-	-	-
$C_{23}$	-	-	-	-	-	-	-	-
$H_{endo}(C_{22})$	-	-	-	-	-	-	-	-
$H_{exo}(C_{22})$	-	-	-	-	-	-	-	-
$H_{endo}(C_{23})$	-	-	-	-	-	-	-	-
$H_{exo}(C_{23})$	-	-	-	-	-	-	-	-
$C_5$	0,162	0,069	0,281	0,962	1,092	0,138	0,184	0,077
$C_6$	0,168	0,165	0,205	0,987	1,125	0,204	0,063	0,044

## e. Contribuições dos orbitais atômicos do ácido $\beta$ -sitosterol fosfórico

### i. Ácido $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5a**

A Tabela V.16 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os  $OM_f$ 's do  $\beta$ -sitosterol na conformação **5a**. Para os carbonos do sistema  $\pi$ , verificam-se menores contribuições para o LUMO e maiores contribuições para o LUMO+1, sem, entretanto, indicar alterações significativas nas reatividades em ataques eletrofílicos em  $C_5$  e  $C_6$  quando ocorre O-fosforilação do  $\beta$ -sitosterol.

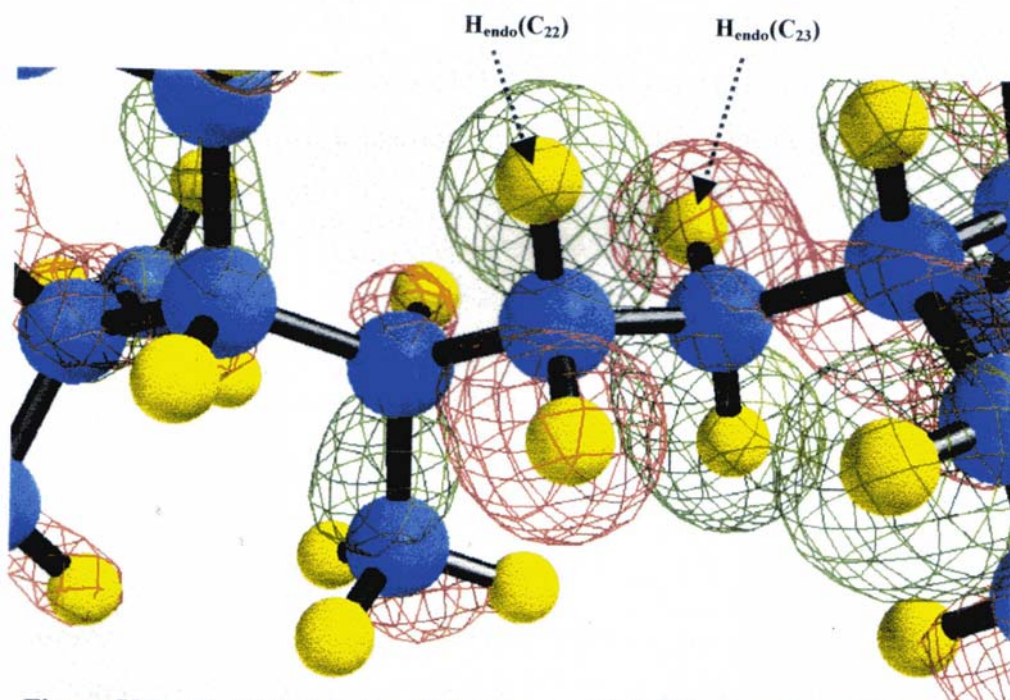
Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  e aos seus hidrogênios, verificam-se alterações significativas das contribuições no produto ácido  $\beta$ -sitosterol O-(fosfórico) para  $OM_f$ 's tanto



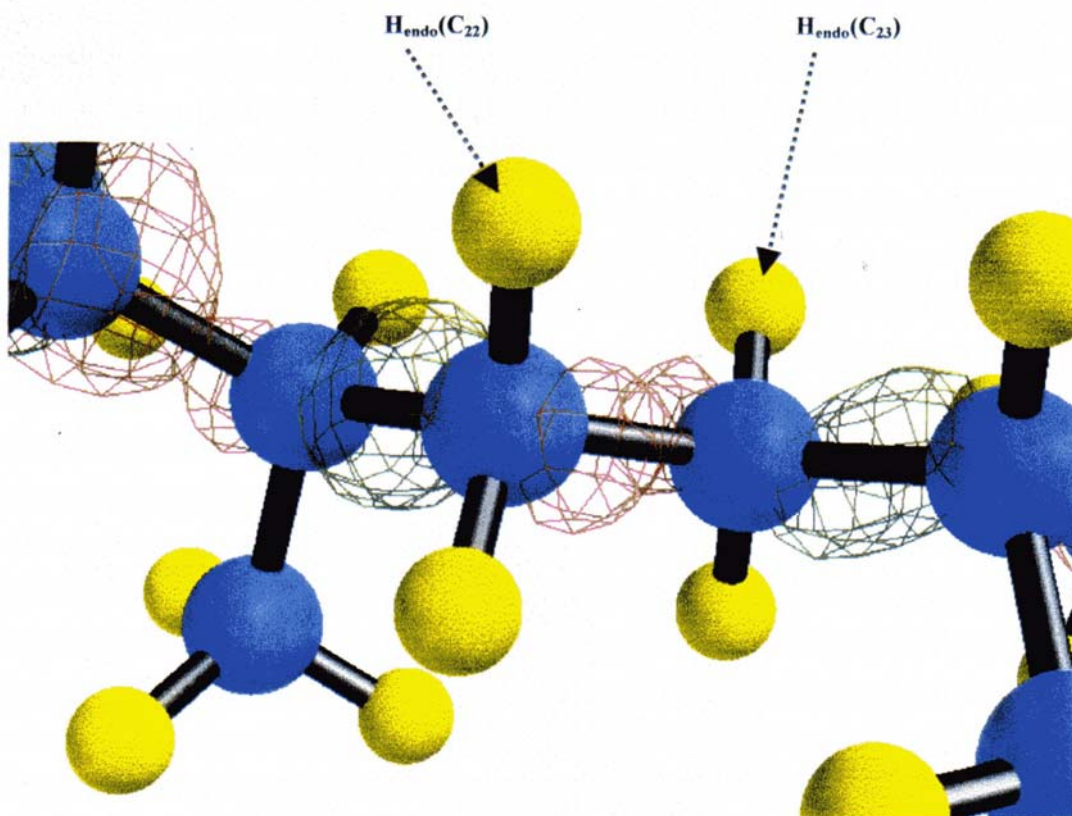
vazios quanto ocupados. Desta forma, por estes resultados, as reatividades tanto em ataques nucleofílicos quanto eletrofílicos tornam-se maiores quando ocorre a O-fosforilação do  $\beta$ -sitosterol. Além disto, pode-se propor também uma maior regioseletividade em ataques nucleofílicos no carbono  $C_{22}$  e os hidrogênios  $H_{\text{exo}}(C_{22})$  e  $H_{\text{endo}}(C_{23})$  e  $H_{\text{exo}}(C_{23})$ . As Figuras V.7 e V.8 ilustram respectivamente as contribuições para os orbitais HOMO-3 e HOMO-2 do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5a**.

**Tabela V.16** – Contribuição dos OA's para os  $OM_f$ 's do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5a**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
$C_{22}$	0,342	0,228	0,286	0,010	-	-	0,037	0,186
$C_{23}$	0,408	0,185	0,216	-	-	-	0,023	0,133
$H_{\text{endo}}(C_{22})$	0,184	-	0,013	-	-	-	-	0,013
$H_{\text{exo}}(C_{22})$	0,184	0,028	0,013	-	-	-	-	0,025
$H_{\text{endo}}(C_{23})$	0,188	0,033	0,026	-	-	-	-	0,023
$H_{\text{exo}}(C_{23})$	0,213	0,011	0,013	-	-	-	-	0,011
$C_5$	0,089	0,229	0,249	0,930	0,332	0,991	0,331	0,250
$C_6$	0,099	0,165	0,251	0,950	0,325	1,015	0,136	0,129



**Figura V.7** – Contribuição dos OA's para o orbital HOMO-3 do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5a**, empregando método AM1.



**Figura V.8** – Contribuição dos OA's para o orbital HOMO-2 do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5a**, empregando método AM1.

## ii. Ácido $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5b**

A Tabela V.17 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os  $OM_f$ 's do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5b**. Em relação aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$ , verifica-se um aumento da contribuição de  $C_{23}$  para os  $OM_f$ 's ocupados, indicando sua maior reatividade em ataques nucleofílicos nesta conformação. Em relação aos hidrogênios, verificam-se maiores contribuições relativas de  $H_{exo}(C_{22})$  e  $H_{endo}(C_{23})$ , indicando maior regioseletividade destes hidrogênios em ataques nucleofílicos. Assim, pode-se propor que a reatividade e regioseletividade do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico é influenciada significativamente pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal.

**Tabela V.17** – Contribuição dos OA's para os  $OM_f$ 's do ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico na conformação **5b**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,259	0,394	0,274	0,010	-	-	-	0,162
C <sub>23</sub>	0,151	0,364	0,105	-	-	-	-	0,061
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,015	0,008	0,052	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	0,105	0,132	0,075	-	-	-	-	0,048
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,091	0,136	0,058	-	-	-	-	-
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	0,023	0,094	0,056	-	-	-	-	0,024
C <sub>5</sub>	0,179	0,045	0,284	1,001	0,287	1,083	0,313	0,190
C <sub>6</sub>	0,210	0,058	0,252	1,014	0,301	1,106	0,105	0,106

#### f. Contribuições dos orbitais atômicos do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol

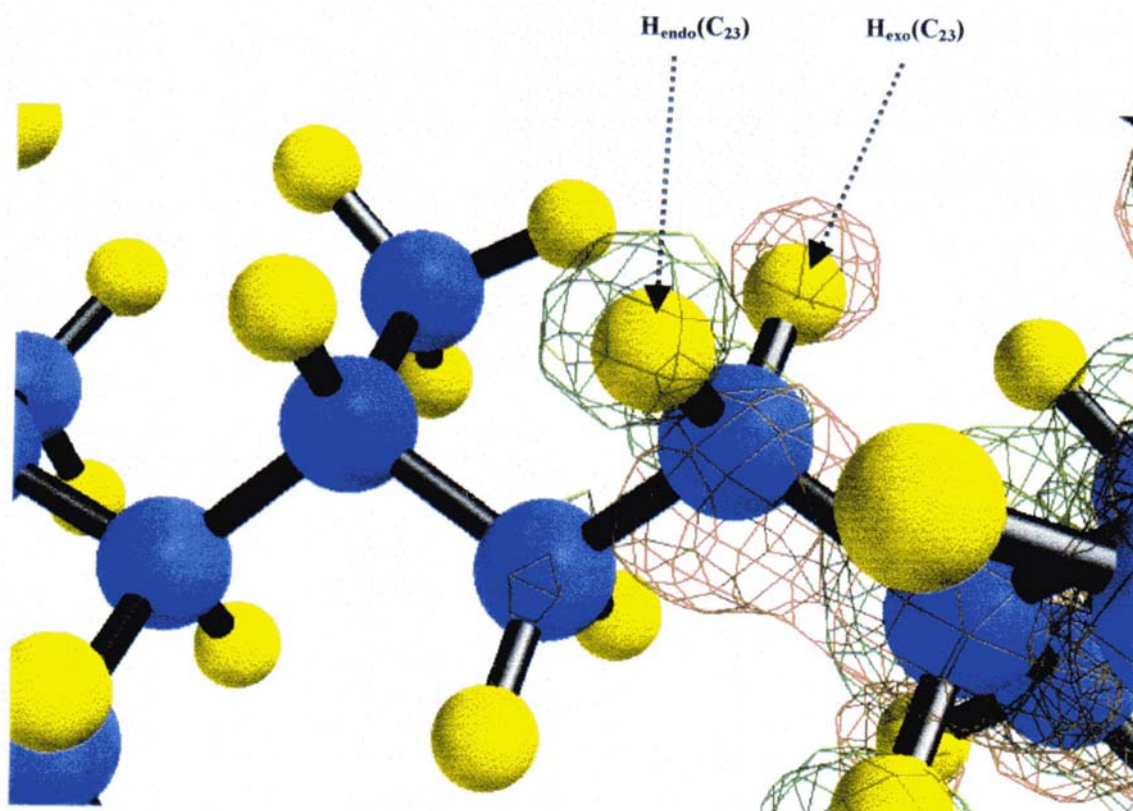
##### i. O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**

A Tabela V.18 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os  $OM_f$ 's do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**. Em relação aos carbonos do sistema  $\pi$ , verifica-se que as suas contribuições não são significativas para os  $OM_f$ 's tanto ocupados quanto vazios, indicando que estes carbonos são pouco reativos quando ocorre a O-fosfatação do  $\beta$ -sitosterol na conformação **a**.

Em relação aos átomos da ramificação esteroidal, verificam-se contribuições apenas para os  $OM_f$ 's vazios, indicando reatividades somente em ataques eletrofílicos quando ocorre O-fosfatação do  $\beta$ -sitosterol. Além disto, considerando as maiores contribuições do carbono C<sub>23</sub> e de seus hidrogênios, pode-se propor maior regioselectividade em ataques eletrofílicos nestes átomos. A Figura V.9 ilustra as contribuições para o orbital LUMO+2 do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**.

**Tabela V.18** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	-	-	-	-	0,154	0,366	0,161	0,113
C <sub>23</sub>	-	-	-	-	0,239	0,623	0,423	0,143
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	0,011	0,067	0,098	0,012
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	-	0,063	0,088	0,020
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	0,019	0,111	0,194	0,055
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	0,055	0,089	0,191	0,012
C <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>6</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-



**Figura V.9** – Contribuição dos OA's para o orbital LUMO+2 do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**, empregando método AM1.



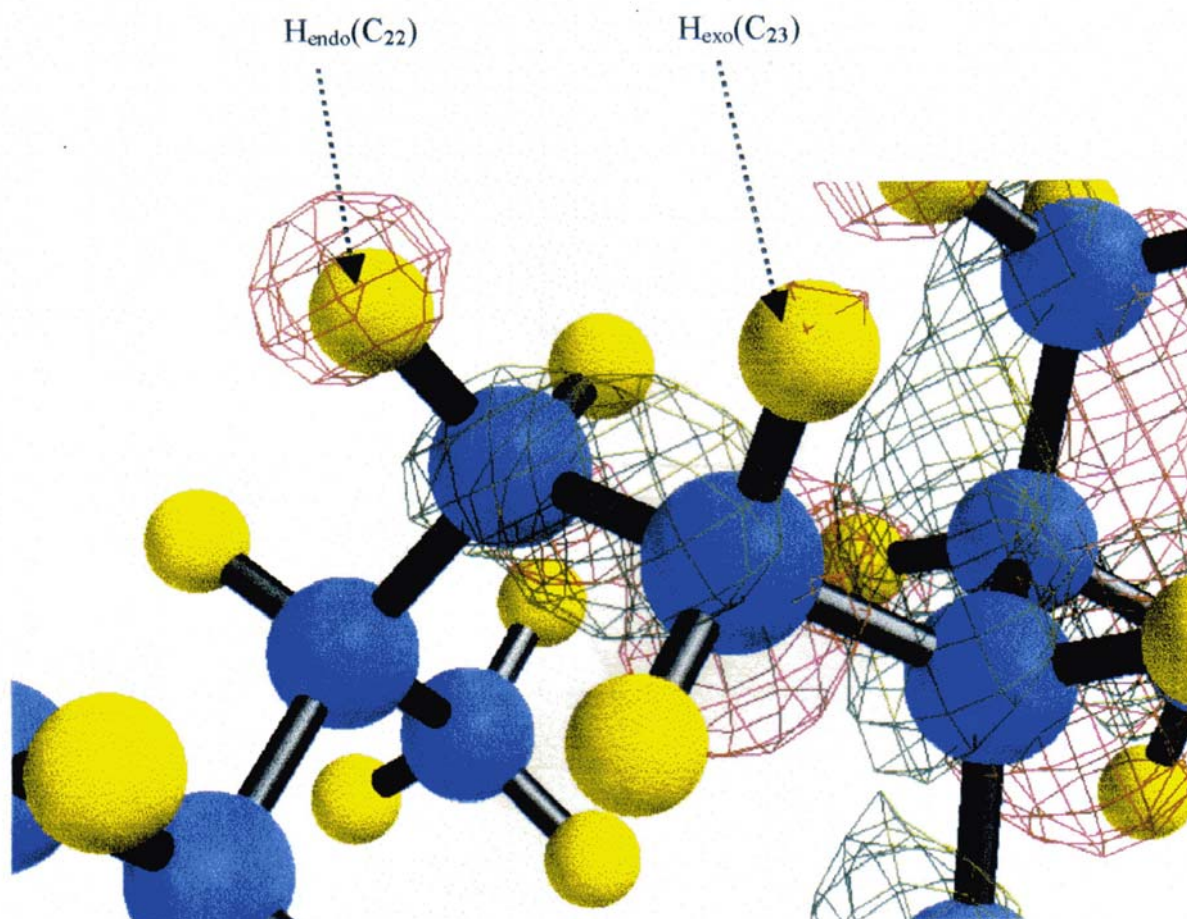
## ii. O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação 6b

A Tabela V.19 apresenta os valores calculados para as contribuições dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**. Em relação aos carbonos do sistema  $\pi$ , as contribuições pouco significativas dos carbonos C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub> para os OM<sub>f</sub>'s ocupados sugerem uma maior reatividade em ataques nucleofílicos nesta conformação.

Em relação aos carbonos C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub>, as maiores contribuições para os OM<sub>f</sub>'s vazios sugerem regioseletividade de C<sub>23</sub> em ataques eletrofílicos no produto O-fosfatado na conformação **6b**. Por outro lado, os hidrogênios ligados ao carbono C<sub>23</sub> mostram maiores contribuições reativas, indicando maiores reatividades e regioseletividade em ataques eletrofílicos nestes hidrogênios quando comparados com o produto O-fosfatado na conformação **6a**. A Figura V.10 ilustra as contribuições para o orbital do LUMO + 2 do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**.

**Tabela V.19** – Contribuição dos OA's para os OM<sub>f</sub>'s do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6b**, empregando método AM1.

Átomo	H-3	H-2	H-1	H	L	L+1	L+2	L+3
C <sub>22</sub>	0,037	-	-	-	0,292	0,296	0,249	0,353
C <sub>23</sub>	0,119	-	-	-	0,278	0,632	0,456	0,528
H <sub>endo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	0,036	0,102	0,079	0,198
H <sub>exo</sub> (C <sub>22</sub> )	-	-	-	-	-	0,197	0,041	0,060
H <sub>endo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	0,094	0,008	0,219	0,164
H <sub>exo</sub> (C <sub>23</sub> )	-	-	-	-	0,095	0,123	0,207	0,183
C <sub>5</sub>	-	-	0,011	0,023	-	-	-	-
C <sub>6</sub>	-	0,011	-	0,062	-	-	-	-



**Figura V.11** – Contribuição dos OA's para o orbital LUMO+2 do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol na conformação **6a**, empregando método AM1.

#### 4. Cálculo dos diagramas dos níveis de energia dos orbitais moleculares

No estudo dos efeitos das alterações conformacionais na ramificação esteroidal e da estrutura do grupo O-substituinte nas propriedades eletrônicas e reatividade do  $\beta$ -sitosterol, foram calculadas também as energias dos  $OM_f$ 's.

##### a. Diagrama dos níveis de energia dos $OM_f$ 's do $\beta$ -sitosterol

O Gráfico V.1 apresenta o cálculo das energias dos  $OM_f$ 's para o  $\beta$ -sitosterol nas conformações **1a** e **1b**. Para os  $OM_f$ 's vazios, verifica-se que as alterações conformacionais na ramificação esteroidal não alteram os valores das energias destes orbitais. Além disto, a energia do LUMO é muito menor do que os demais orbitais, contribuindo significativamente para a reatividade em ataques eletrofílicos.

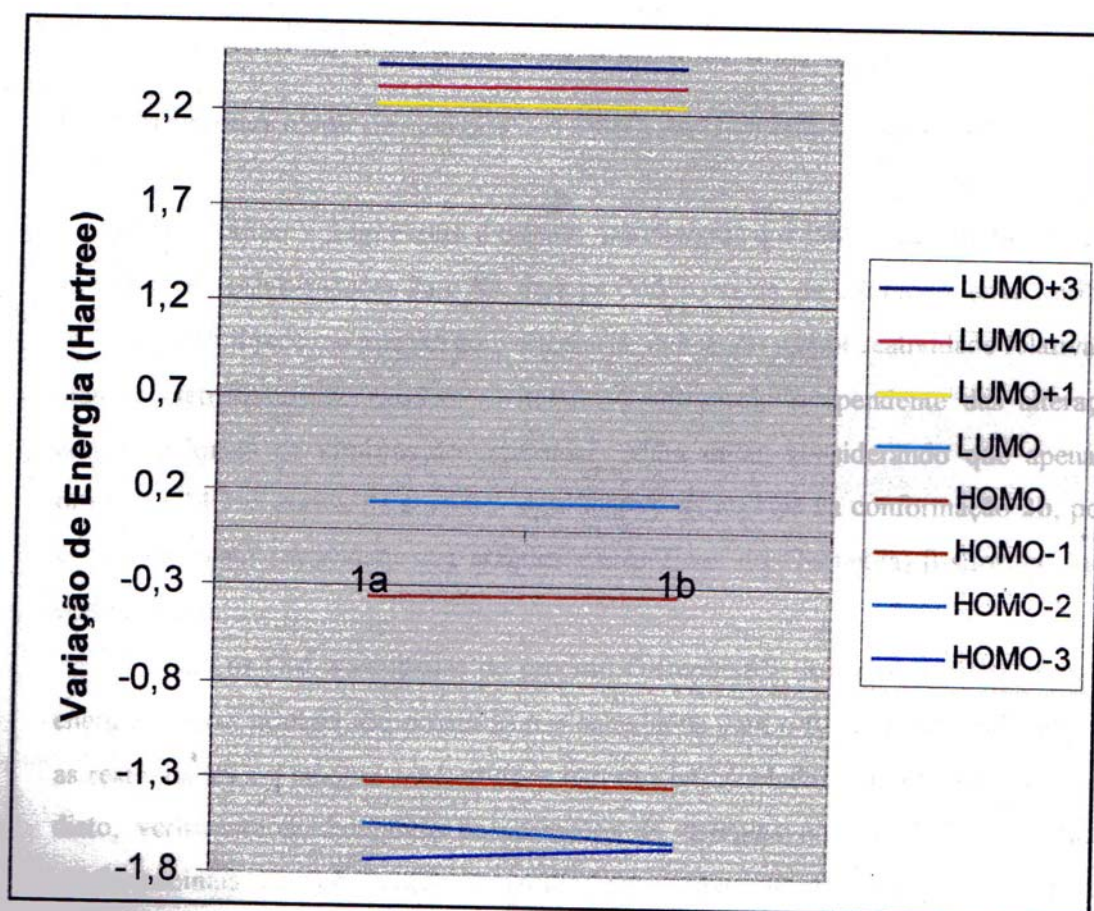


Gráfico V.1 – Energias dos  $OM_f$ 's para o  $\beta$ -sitosterol nas conformações **1a** e **1b**.

Valores em Hartree, empregando método ab initio.

Para os  $OM_f$ 's ocupados, as variações de energias em relação à conformação são maiores porém, pouco significativas para proporcionarem variações em reatividades. Além disto, considerando a menor diferença de energia entre estes orbitais, pode-se propor contribuições significativas destes  $OM_f$ 's ocupados na reatividade em ataques nucleofílicos.

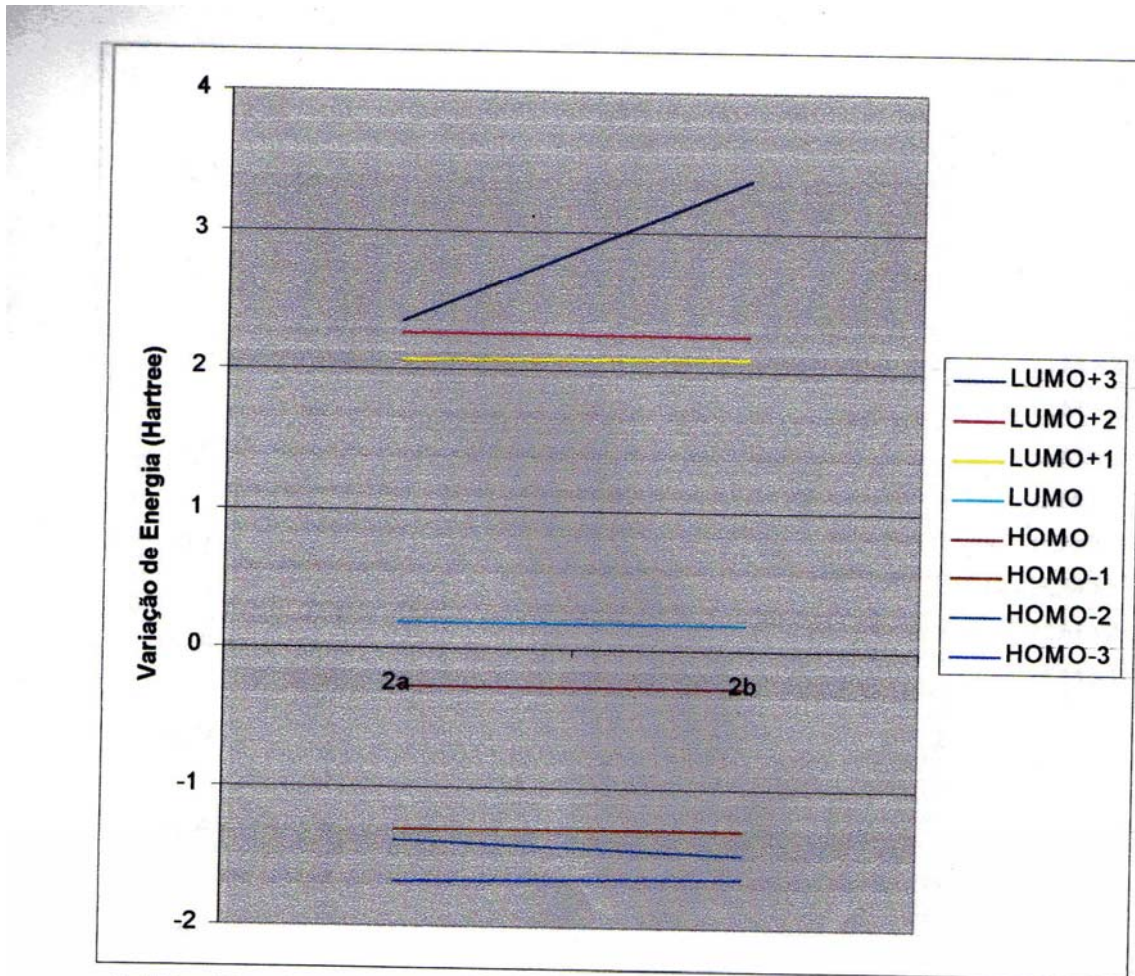
Por outro lado, considerando que o orbital HOMO-3 é aquele que apresenta contribuições mais significativas dos OA's dos hidrogênios ligados aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  (conforme apresentado nas Tabelas V.8 e V.9, páginas: 65 e 67), pode-se propor uma maior reatividade em ataques nucleofílicos na ramificação esteroidal do  $\beta$ -sitosterol na conformação **1b** pois, nesta conformação, o orbital **HOMO-3** apresenta-se menos estável.

### **b. Diagrama dos níveis de energias dos $OM_f$ 's do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol**

O Gráfico V.2 apresenta o cálculo das energias dos  $OM_f$ 's para o O-(metila)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **2a** e **2b**. Para os  $OM_f$ 's vazios, de um modo geral, verifica-se uma instabilidade em relação ao  $\beta$ -sitosterol, indicando menor reatividade relativa em ataques eletrofílicos do produto O-(metila)- $\beta$ -sitosterol, independente das alterações conformacionais na ramificação esteroidal. Além disto, considerando que apenas o orbital LUMO + 3 apresenta número significativo de energia na conformação **2b**, pode-se propor menor reatividade em ataques eletrofílicos do O-(metila)- $\beta$ -sitosterol nesta conformação.

Para os  $OM_f$ 's ocupados do produto O-(metila)- $\beta$ -sitosterol, verifica-se que as energias destes orbitais são próximas aos calculados para o  $\beta$ -sitosterol, indicando que as reatividades em ataques nucleofílicos não são influenciadas pela O-metilação. Além disto, verifica-se também que as variações de energias em função das alterações conformacionais na ramificação esteroidal apresentam menos comportamentos quando comparados com as variações de energia no produto  $\beta$ -sitosterol. Assim, pelos valores de energia dos  $OM_f$ 's pode-se concluir que a O-metilação não proporciona variações nas reatividades em ataques nucleofílicos.





**Gráfico V.2** – Energias dos OM<sub>f</sub>'s para o O-(metila)-β-sitosterol nas conformações **2a** e **2b**. Valores em Hartree, empregando método ab initio.

### c. Diagrama dos níveis de energias dos OM<sub>f</sub>'s do O-(acetila)-β-sitosterol

O Gráfico V.3 apresenta o cálculo das energias dos OM<sub>f</sub>'s para o O-(acetila)-β-sitosterol nas conformações **3a** e **3b**. De um modo geral, tanto para os OM<sub>f</sub>'s vazios quanto para os OM<sub>f</sub>'s ocupados, verifica-se que suas energias são influenciadas pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal pois todos os orbitais apresentam-se mais estáveis na conformação **3b**.

Estes resultados indicam uma maior reatividade em ataques eletrofílicos na conformação **3a** e maior reatividade em ataques nucleofílicos na conformação **3b**. Por outro lado, considerando maior estabilidade relativa dos orbitais LUMO + 1 e LUMO + 2 quando ocorre O-acetilação, pode-se propor uma maior reatividade em ataques eletrofílicos no produto O-(acetila)-β-sitosterol.

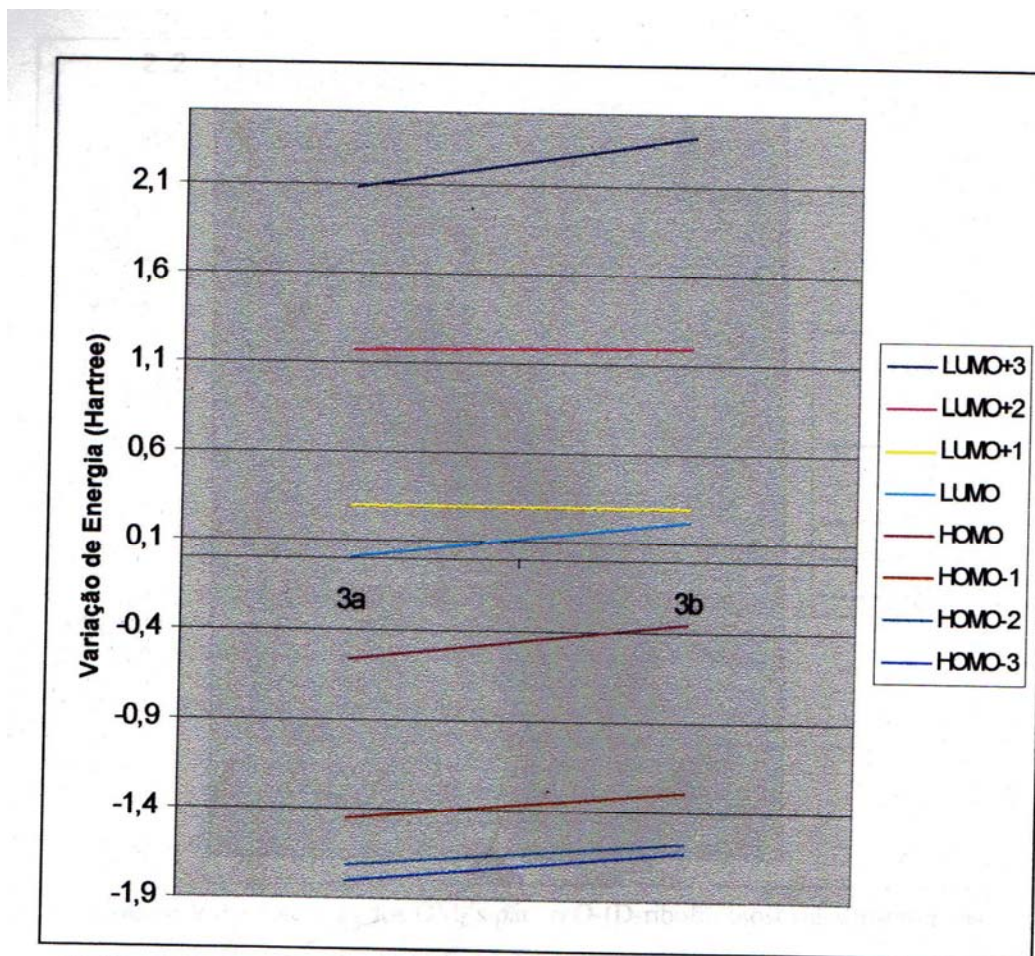
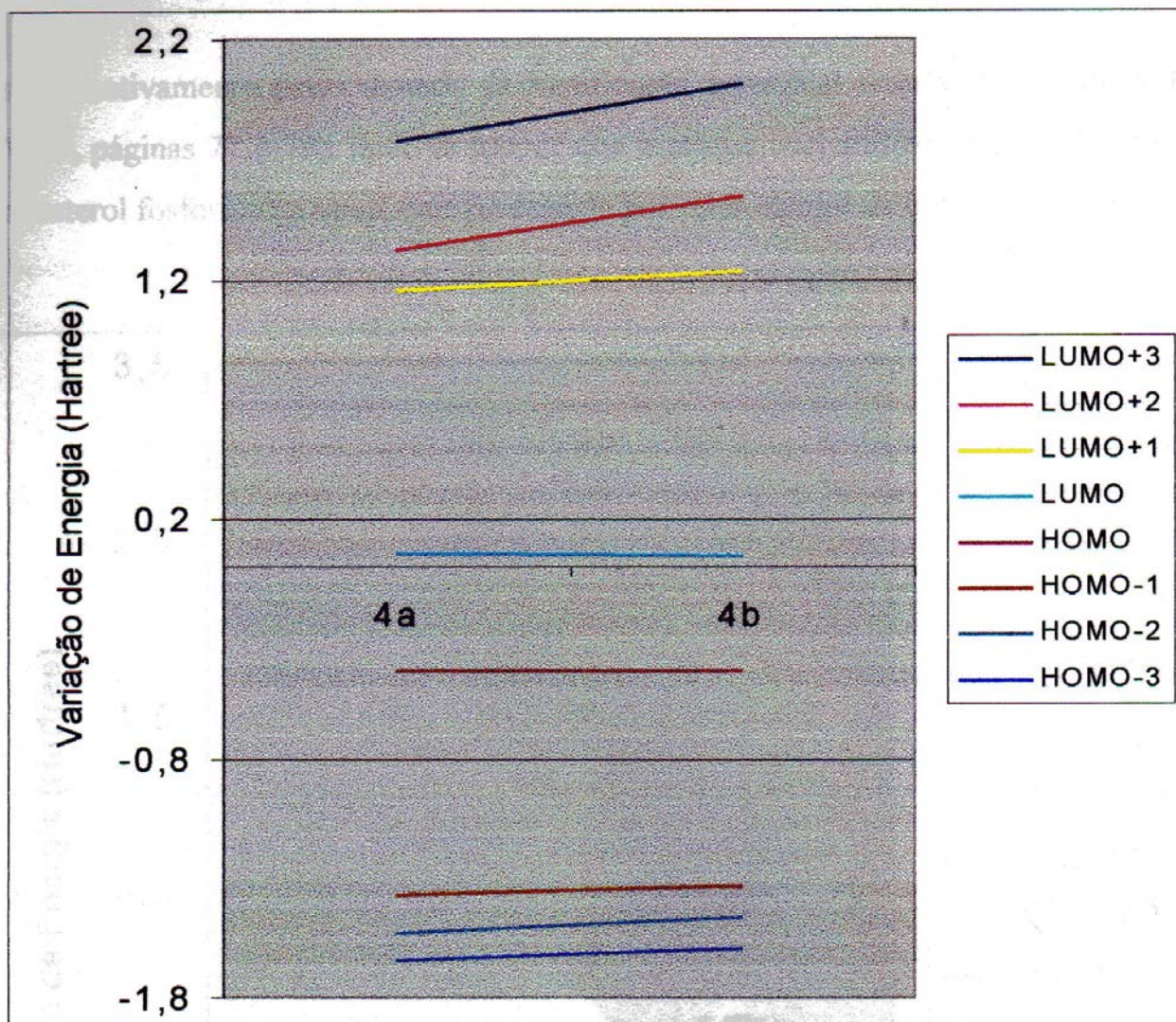


Gráfico V.3 – Energias dos OM<sub>f</sub>'s para o O-(acetila)-β-sitosterol nas conformações 3a e 3b. Valores em Hartree, empregando método ab initio.

#### d. Diagrama dos níveis de energias dos OM<sub>f</sub>'s do O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol

O Gráfico V.4 apresenta o cálculo das energias dos OM<sub>f</sub>'s para o O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol nas conformações 4a e 4b. De um modo geral, as energias dos OM<sub>f</sub>'s para este produto são semelhantes àqueles verificados para o produto O-(acetila)-β-sitosterol. Entretanto, considerando que as variações de energias dos OM<sub>f</sub>'s ocupados são mais significativas no produto O-acetilado, pode-se propor que o produto O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol apresenta relativamente um menor defeito sobre a reatividade em ataques nucleofílicos devido às alterações conformacionais da ramificação esteroidal.





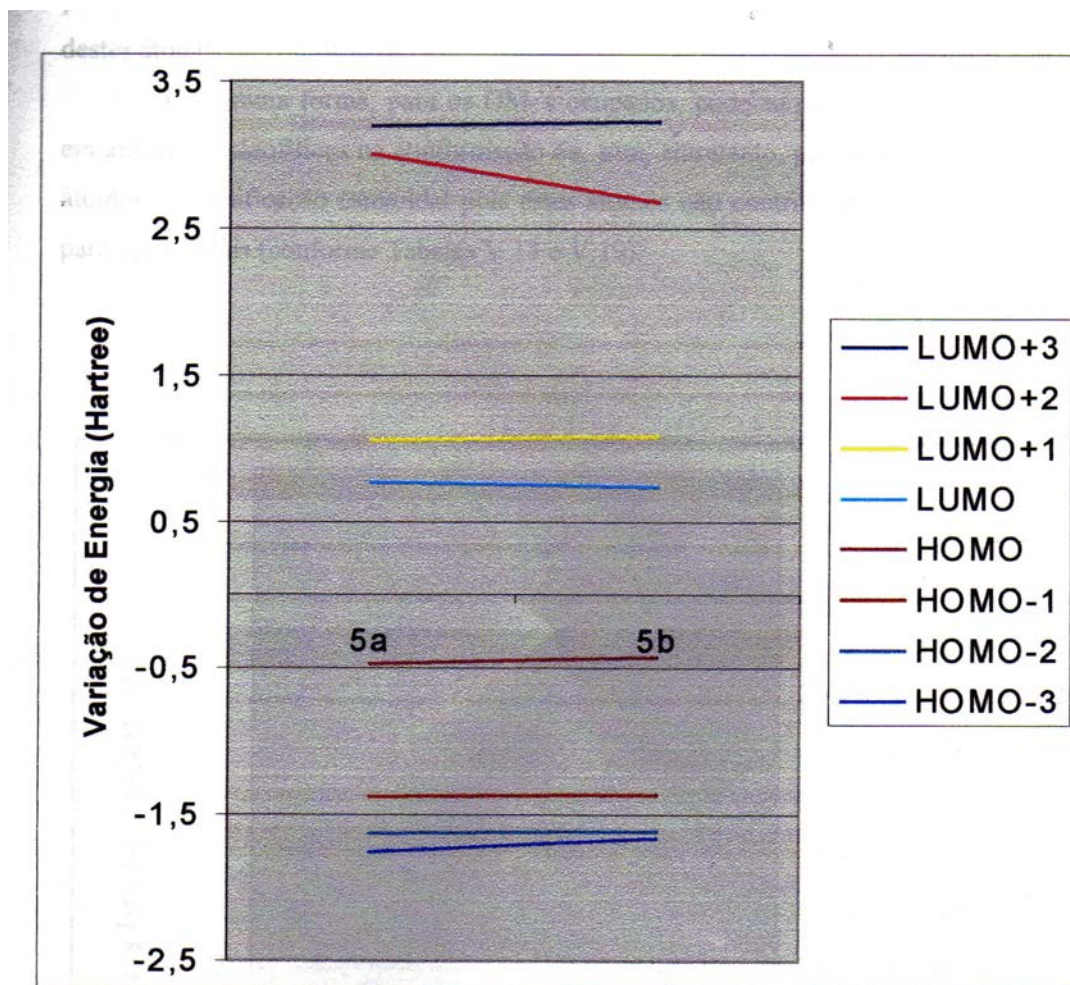
**Gráfico V.4 – Energias dos OM<sub>f</sub>'s para o O-(D-ribofuranose)-β-sitosterol nas conformações 4a e 4b. Valores em Hartree, empregando método ab initio.**

**e. Diagrama dos níveis de energias dos OM<sub>f</sub>'s do ácido β-sitosterol fosfórico**

O Gráfico V.5 apresenta o cálculo das energias dos OM<sub>f</sub>'s para o ácido β-sitosterol fosfórico nas conformações 5a e 5b. Para os OM<sub>f</sub>'s vazios, verifica-se uma estabilidade relativa apenas do orbital LUMO + 2 na conformação 5b quando ocorre alteração conformacional na ramificação esteroidal. Estes resultados indicam maior reatividade em ataques eletrofílicos nesta conformação, sem, entretanto, envolver a participação dos átomos da ramificação esteroidal pois estes átomos não proporcionam contribuição significativa para o orbital LUMO+2 (conforme Tabela V.16, página 77).

Por outro lado, para os OM<sub>f</sub>'s ocupados, verifica-se uma instabilidade relativa dos orbitais na conformação 5b, indicando maior reatividade em ataques nucleofílicos. Considerando que os orbitais HOMO-3, HOMO-2 e HOMO-1 são contribuídos mais

significativamente pelos átomos da ramificação esteroidal (conforme Tabela V.16 e V.17, páginas 77 e 79), pode-se propor que o ataque nucleofílico do produto ácido  $\beta$ -sitosterol fosfórico torna-se mais favorecido por estes átomos na conformação **5b**.



#### f. Diagrama dos níveis de energias dos OM<sub>f</sub>'s do O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol

O Gráfico V.6 apresenta o cálculo das energias dos OM<sub>f</sub>'s para o O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **6a** e **6b**. Para os OM<sub>f</sub>'s vazios, verifica-se uma maior estabilidade relativa destes orbitais na conformação **6a**, indicando que, nesta conformação, a reatividade em ataques eletrofílicos torna-se mais favorecida. Além disto, considerando que estes orbitais



são contribuídos mais significativamente pelos átomos da ramificação esteroidal (conforme Tabela V.18 e V.19), páginas 80 e 81), pode-se propor conseqüentemente uma regioseletividade em ataques eletrofilicos destes átomos na conformação **6a**.

Da mesma forma, para os  $OM_f$ 's ocupados, pode-se propor maior reatividade em ataques nucleofílicos na conformação **6a**, sem, entretanto, propor envolvimento dos átomos da ramificação esteroidal, pois estes átomos não contribuem significativamente para tais orbitais (conforme Tabela V.18 e V.19).

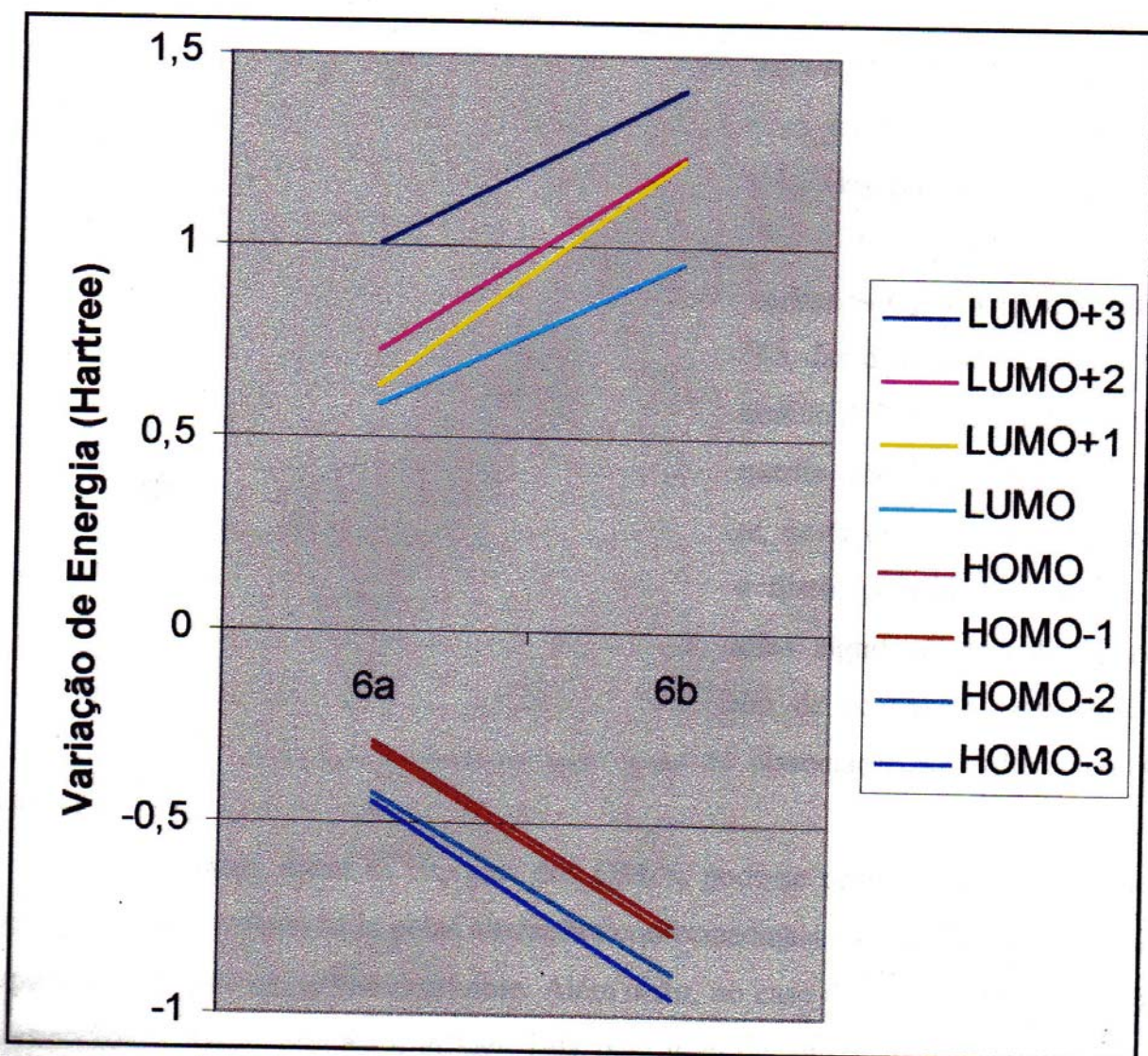


Gráfico V.6 – Energias dos  $OM_f$ 's para o O-(fosfato)- $\beta$ -sitosterol nas conformações **6a** e **6b**. Valores em Hartree, empregando método ab initio

## 5. Análises das propriedades eletrônicas

Pelos resultados obtidos para as densidades de cargas eletrônicas sobre os átomos do  $\beta$ -sitosterol e dos seus derivados, pode-se propor que a maior variação de  $\delta_e$  para os hidrogênios ligados aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  favorece uma regiosseletividade na reatividade em ataques nucleofílicos com participação de  $H_{endo}(C_{22})$  e  $H_{exo}(C_{23})$  que apresentam maiores valores de  $\delta_e$ . Apesar desta reatividade e regiosseletividade serem favorecidas na conformação **b** (*eclipsada*) da ramificação esteroidal dos produtos contendo os grupos hidroxila O-metila e D-ribose, não são verificadas para o grupo substituintes O-acetila.

Em relação ao momento de dipolo elétrico, pode-se propor que, exceto para o produto O-acetila, as alterações conformacionais na ramificação esteroidal não influencia os valores de  $\mu$ . Pelos maiores valores de  $\mu$  para o produto **3a** e os produtos **4a** e **4b**, pode-se propor que estas conformações, com estes grupos O-substituintes, são relativamente mais estáveis em meios polares, similares àqueles encontrados em meios biológicos (em plantas).

Sobre os  $OM_f$ 's, os hidrogênios ligados aos carbonos  $C_{22}$  e  $C_{23}$  apresentam contribuições mais significativas para o orbital HOMO-3 das duas conformações dos produtos **1** e **3** para a conformação alternada (**a**) do produto **4**. Por outro lado, para as duas conformações do produto O-metilado, as contribuições dos OA's destes hidrogênios são insignificantes, podendo-se propor que, neste caso, estes hidrogênios não estão envolvidos em ataques nucleofílicos. Além disto, pode-se propor que a reatividades na ramificação esteroidal são influenciadas significativamente quando ocorre O-fosforilação, sendo muito importante o efeito da acidez do meio pois as reatividades são influenciadas também pelo grau de dissociação no substituinte O-fosfórico.

Finalmente, sobre as energias dos  $OM_f$ 's, pode-se propor que a estabilidade destes orbitais é influenciada pelas alterações conformacionais na ramificação esteroidal e pela estrutura do grupo O-substituinte. Além disto, no caso do produto O-fosforilado, a estabilidade destes orbitais é influenciada pelo grau de ionização. Em conseqüência disto, pode-se propor que a reatividade e a regiosseletividade em ataques eletrofílicos e nucleofílicos são influenciadas também pelos mesmos fatores.

## Capítulo VI

### **Avaliação de Fatores Determinantes na Proporção entre $\beta$ -Sitosterol e Estigmasterol em Plantas**

## 1. Levantamento Bibliográfico sobre Isolamento de $\beta$ -sitosterol e Estigmasterol em Plantas

De acordo com a literatura, o isolamento de  $\beta$ -sitosterol e/ ou de estigmasterol tem sido descrito vastamente em estudos fitoquímicos de espécies vegetais de diversos gêneros e famílias. Muitos trabalhos têm registrados a proporção relativa entre estes esteróis. Desta forma, para inferir sobre o efeito da luz sobre a bioconversão de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol, neste levantamento são descritos os resultados registrados recentemente na literatura sobre a relação entre estes esteróis em diferentes partes das plantas.

Nas partes aéreas das plantas,  **$\beta$ -sitosterol** tem sido isolado de *Solanum ligustrinum*,<sup>53</sup> de *Trevoa trinervis Miers*<sup>54</sup> e *Guatteria veloziani*.<sup>55</sup> **Estigmasterol** tem sido isolado de *Mikania lindleyana*.<sup>56</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e  **$\beta$ -sitosterol glicosilado** foram isolados de *Trema micrantha Blume*<sup>57</sup> e *Siegesbeckia orientalis*.<sup>58</sup> e *Herreria montevidensis*.<sup>60</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol** têm sido isolados de *Lychnophora trichocarpa*.<sup>61</sup>

Nas vagens e sementes das plantas,  $\beta$ -sitosterol tem sido isolado de *Moringa oleifera*.<sup>62</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **Estigmasterol** têm sido isolados de *Anarcadium occidentale*.<sup>63</sup> Formas esterificadas de  **$\beta$ -sitosterol** (60%) e **estigmasterol** (4,94%) têm sido isolados de *Leuza carthamotides*.<sup>64</sup>  **$\beta$ -sitosterol** (47,10%) e **estigmasterol** (17,40%) foram isolados de *Moringaoleirera Malawi*.<sup>65</sup>  **$\beta$ -sitosterol** (em maior proporção) e **estigmasterol** foram isolados de *Cannabis sativa*.<sup>66</sup> Nas frutas das plantas,  **$\beta$ -sitosterol** tem sido isolado de *Vaccinium myrtillus*.<sup>67</sup>

Nas folhas das plantas,  **$\beta$ -sitosterol** tem sido isolado de *Cenostigma macrophyllum*,<sup>68</sup> *Simira glaziovii*<sup>69</sup> e *Vochysia ferruginea*.<sup>70</sup> **Estigmasterol** tem sido isolado de *Trichospira menthoides*.<sup>71</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **Estigmasterol** têm sido isolados de *Aleurites moluccana*,<sup>72</sup> *Brassica napus*,<sup>73</sup> *Mikania sessilifolia*,<sup>74</sup> *Protinum hebetatum*,<sup>75</sup> *Mikania glomerata*,<sup>76</sup> *Diodia brasiliensis*,<sup>77</sup> *Poiretia bahiana*<sup>78</sup> e *Kielmeyera marauensis*.<sup>79</sup>  **$\beta$ -sitosterol** (3,56%) e **estigmasterol** (6,69%) foram

isolados de *Averroha carambola* L.<sup>80</sup>  **$\beta$ -sitosterol**,  **$\beta$ -sitosterol glicosado** e **estigmasterol** foram isolados de *Toona ciliata*.<sup>81</sup>

Nas cascas do caule,  **$\beta$ -sitosterol**,  **$\beta$ -sitosterol glicosado** e **estigmasterol** têm sido isolados de *Cróton urucurana*.<sup>82</sup>  **$\beta$ -sitosterol** foi isolado de *Simira viridiflora*,<sup>83</sup> *Lafoensia densiflora*,<sup>84</sup> *Kielmeyera guttiferæ*<sup>85</sup> e *Citrus sinensis*.<sup>86</sup> Éter do  **$\beta$ -sitosterol** foi isolado de *Cróton pullei*.<sup>87</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol** foram isolados de *Tapirira obtusa*.<sup>88</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e  **$\beta$ -sitosterol glicosilados** foram isolados de *Terminalia catappa*.<sup>89</sup>

No caule das plantas, uma mistura de  **$\beta$ -sitosterol** (77,10%), **estigmasterol** (19,98%) e **campesterol** (2,92%) têm sido isolados de *Epidendrum mosenti*.<sup>90</sup>  **$\beta$ -sitosterol** (70,10%) e **estigmasterol** (19,98%) foram isolados de *Boschniakia rossica*.<sup>91</sup>  **$\beta$ -sitosterol** (69,9%) e **estigmasterol** (18,9%) foram isolados de *Caesalpinia sappan*.<sup>92</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e tem sido isolado de *Raulinoa echinata*<sup>93</sup> e *Aristolochia acutifolia*.<sup>94</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol D-glicosilados** foram isolados de *Muuna cinérea*.<sup>95</sup> Éter do  **$\beta$ -sitosterol** foi isolado de *Croton pullei*.<sup>87</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol** têm sido isolados de *Spathelia excelsia*,<sup>96</sup> *Ficus aripuanensis*<sup>97</sup> e *Eremanthus veadeiroensis*.<sup>98</sup>

Nas cascas das raízes das plantas,  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol glicosilados** têm sido isolados de *Alangium platanifolium*.<sup>99</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol** foram isolados de *Brassica napus*,<sup>73</sup> *Salacia distinta*<sup>100</sup> e *Kielmeyera marauensis*.<sup>75</sup>  **$\beta$ -sitosterol** tem sido isolado de *Tabernaemontana laeta*.<sup>101</sup>  **$\beta$ -sitosterol**,  **$\beta$ -sitosterol glicosilado** e **estigmasterol** têm sido isolados de *Caesalpinia bonducella*.<sup>102</sup>

Nas raízes das plantas,  **$\beta$ -sitosterol**,  **$\beta$ -sitosterol glicosilado** e **estigmasterol** têm sido isolados de *Toona ciliata* e *cedrela adorata*.<sup>103</sup>  **$\beta$ -sitosterol glicosilado** tem sido isolado de *Kielmeyera marauensis*,<sup>104</sup>  **$\beta$ -sitosterol** tem sido isolado de *Salvia multicaulis*,<sup>105</sup> *Gentiana tibetica*<sup>106</sup> e *Holoptelea integrifolia*.<sup>107</sup>  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol glicosilados** foram isolados de *Blutaparon portulacoides*.<sup>59</sup> **Estigmasterol** tem sido isolado de *Dioscorea olfersiana*.<sup>108</sup>

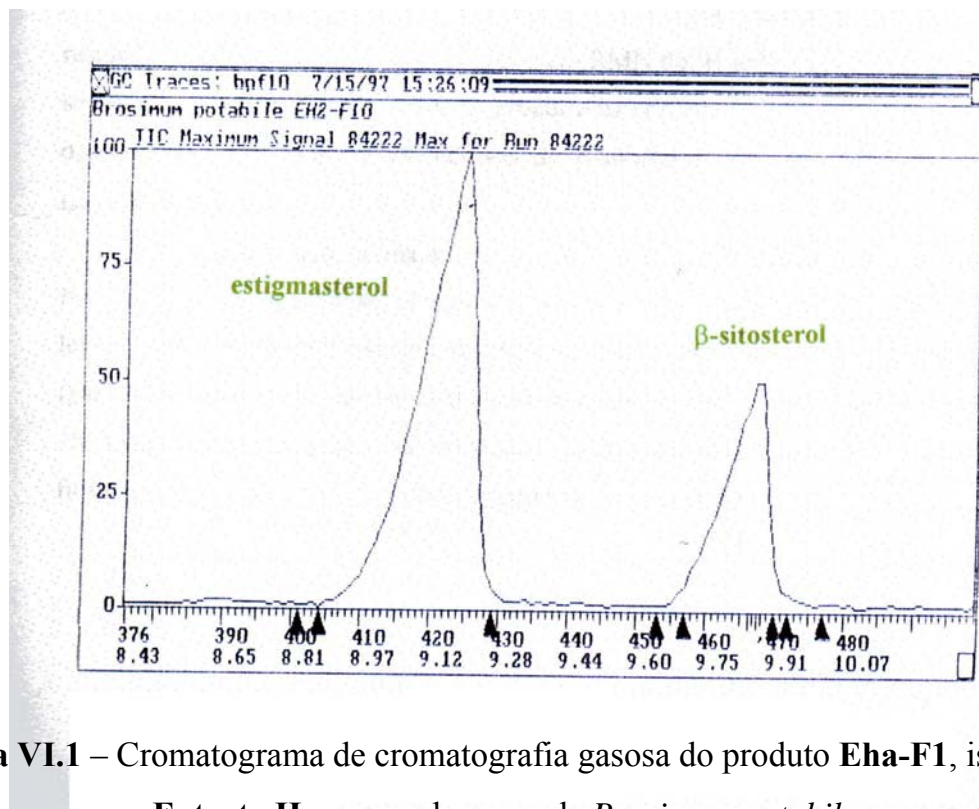
Neste levantamento, pode-se verificar que os trabalhos não descrevem normalmente análises quantitativas sobre a proporção entre os esteróis isolados nas diferentes partes das plantas. Entretanto, pode-se propor que o  $\beta$ -sitosterol apresenta-se

distribuído em todas as partes das plantas e, normalmente, em maior proporção do que estigmasterol. Assim, considerando que a absorção de luz é mais significativa nas partes aéreas das plantas, por estes resultados, não é possível inferir sobre os efeitos da luz absorvida na variação relativa das concentrações de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol e, conseqüentemente, nessa biotransformação esteroidal.

## 2. Determinação da Proporção entre $\beta$ -sitosterol:Estigmasterol em Espécies do Gênero *Brosimum*

### a. Determinação da proporção esteroidal no cerne de *Brosimum potabile* Ducke

A Figura VI.1 apresenta o cromatograma obtido pro cromatografia gasosa do produto **EHa-F1** isolado do **Extrato Hexano a** do cerne de *B. potabile* (conforme Esquema II.1, pág. 31). O cálculo da integração das bandas indicam uma maior quantidade relativa de estigmasterol, com um proporção  $\beta$ -sitosterol:estigmasterol igual a 0,42.



**Figura VI.1** – Cromatograma de cromatografia gasosa do produto **Eha-F1**, isolado do **Extrato Hexano a** do cerne de *Brosimum potabile*.

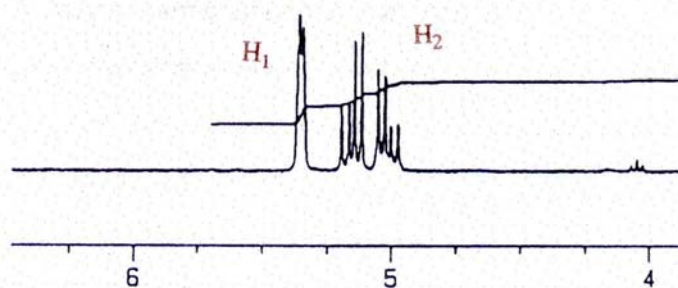
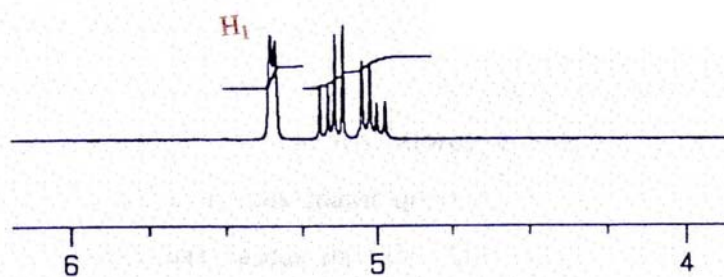
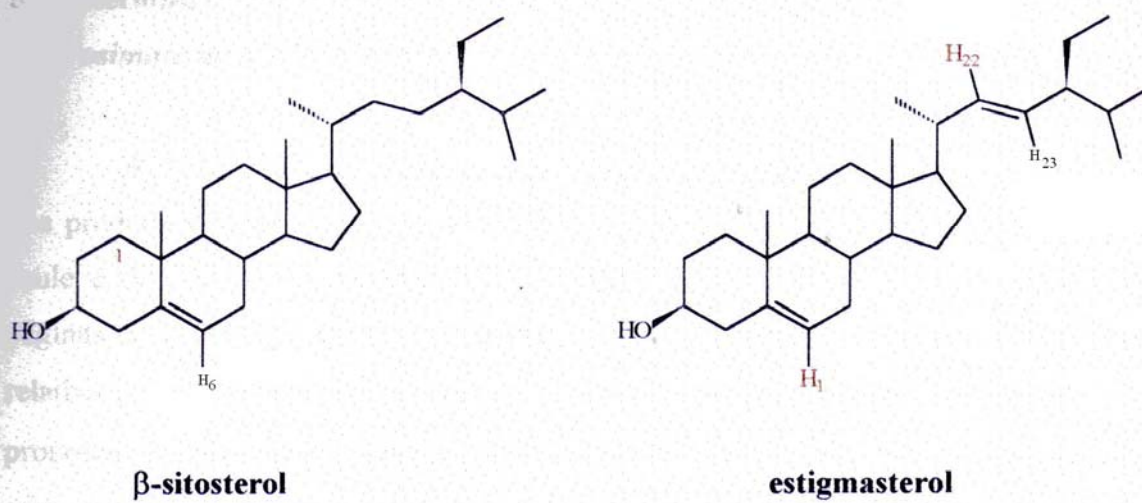
A Figura VI.2 apresenta os espectros parciais, na região de hidrogênios alquênílicos, de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos **EHa-F1** e **EHb-F16**, sendo este último isolado do **Extrato Hexano b** (Esquema II.1, pág. 31). A determinação das proporções entre  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foi baseada na relação do valor da integração dos sinais em  $\delta$  maiores ( $\delta$  centrado em 5,84), atribuídos ao hidrogênio de  $\text{C}_6$  de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, com os sinais em  $\delta$  menores ( $\delta$  centrado em 5,14), atribuídos aos hidrogênios de  $\text{C}_{22}$  e  $\text{C}_{23}$  do estigmasterol.

Os cálculos das relações das integrações dos sinais desses hidrogênios em cada produto indicaram maiores quantidades relativas de estigmasterol, com uma proporção  $\beta$ -sitosterol:estigmasterol igual a 0,46 para **EHa-F1** e 0,40 para **EHb-F16**. As proporções determinadas para ambas as frações são relativamente próximas, indicando que as duas metodologias fitoquímicas descritas no Esquema II.1 para isolamento dos produtos **EHa-F1** e **EHb-F16** não foram específicas para isolamento e purificação de fitoconstituintes presentes em misturas contendo  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

A comparação entre os resultados obtidos por cromatografia gasosa e os resultados obtidos por integração de sinais em RMN de  $^1\text{H}$  indica que estes apresentam-se semelhantes. Desta forma, pode-se propor uma confiabilidade nos dois métodos para determinação de quantidades relativas de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol em misturas isoladas de plantas.

Por outro lado, a maior quantidade relativa de estigmasterol no cerne de *Brosimum potable*, não se apresenta concordante com os resultados obtidos descritos nos levantamentos bibliográficos para misturas isoladas no cerne de outras espécies vegetais (pág. 93). Assim, pode-se propor que, no cerne de *B. potable*, as condições químicas são mais favorecidas para essa biotransformação esteroide e/ou as suas necessidades fisiológicas requerem maior concentração relativa de estigmasterol.





**Figura VI.2** – Espectros parciais de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos **EHa-F1** (espectro superior) e **Ehb-F16** (espectro inferior), isolados do cerne de *Brosimum potabile*.



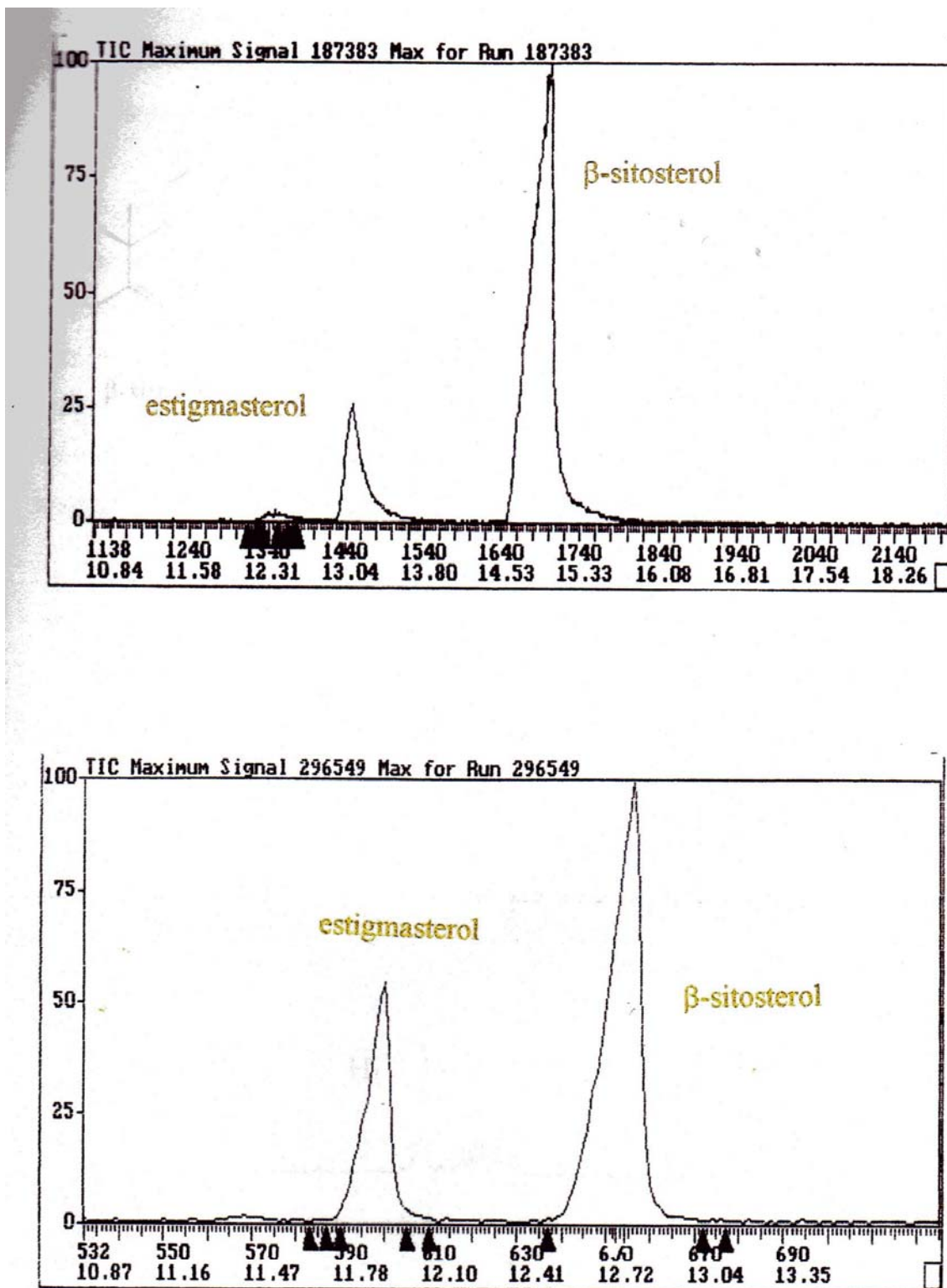
## **b. Determinação da proporção esteroidal nas cascas do caule e da raiz de *Brosimum acutifolium* Huber**

A Figura VI.3 apresenta os espectrogramas obtidos por cromatografia gasosa dos produtos **CC**EAE-FHC e **CR**EAEFH-F7, isolados respectivamente das cascas do caule e da raiz de *B. acutifolium* (conforme Esquema II.3 e II.4, respectivamente páginas 35 e 37). O cálculo da integração das bandas indica uma maior quantidade relativa de  $\beta$ -sitosterol em ambas as misturas esteroidais, sendo determinada uma proporção de  $\beta$ -sitosterol:estigmasterol igual a 3,96 nas cascas do caule e, nas cascas da raiz, uma proporção igual a 2,39. Por estes resultados pode-se verificar uma diminuição de  $\beta$ -sitosterol nas cascas da raiz em relação às do caule.

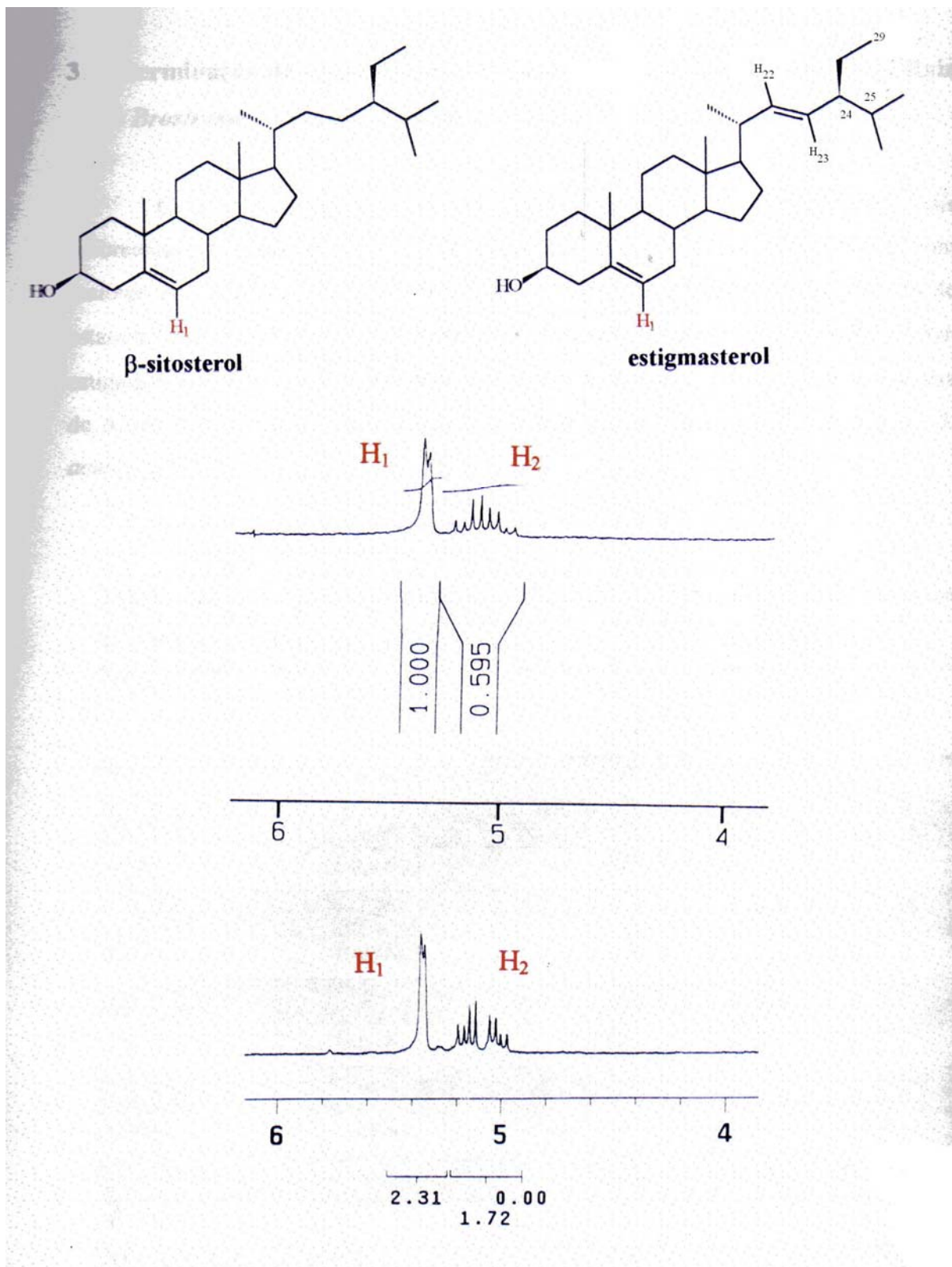
A Figura VI.4 apresenta os espectros parciais de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos **CC**EAE-FHC e **CR**EAEFH-F7, isolados respectivamente das cascas do caule e da raiz de *B. acutifolium*. Os cálculos das integrações dos sinais dos hidrogênios alquênílicos apresentam nas cascas do caule proporção de  $\beta$ -sitosterol:estigmasterol igual a 2,57 e, nas cascas da raiz, uma proporção igual a 1,69. Apesar dos valores obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  serem pouco concordantes em relação aos valores obtidos por cromatografia gasosa, estes resultados mostram também uma maior quantidade relativa de  $\beta$ -sitosterol tanto nas cascas do caule quanto nas cascas da raiz. Além disto, verifica-se também um aumento relativo de estigmasterol nas cascas da raiz em relação às cascas do caule.

Assim, pode-se propor que, na raiz de *Brosimum acutifolium*, as condições químicas ou biológicas são mais favorecidas para essa biotransformação esteroidal e/ou as suas necessidades fisiológicas requerem maior concentração relativa de estigmasterol nesta parte da planta quando comparada com o seu caule.

Além disto, considerando a pouca incidência relativa de luz nas cascas da raiz, poderia ser proposto que este efeito torna-se mais significativo no processo de biotransformação de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol. Entretanto, considerando que no levantamento bibliográfico não foi possível relacionar o efeito da luz e proporção relativa entre estes esteróis em várias partes das plantas, as diferenças nas proporções esteroidais verificadas para as cascas do caule e da raiz não são suficientes para afirmar este efeito da incidência de luz.



**Figura VI.3** – Espectrogramas de cromatografia gasosa dos produtos **ccEAE-FHC** (espectrograma superior) e **CR EAEFH-F7** (espectrograma inferior), isolados respectivamente das cascas do caule e da raiz de *B. acutifolium*.



**Figura VI.4** – Espectros parciais de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos  ${}_{\text{CC}}\text{EAE-FHC}$  (espectro superior) e  ${}_{\text{CR}}\text{EAEH-F7}$  (espectro inferior), isolados respectivamente das cascas do caule e da raiz de *Brosimum acutifolium*.

### 3. Determinação da Concentração de Metais nas Cascas do Caule e da Raiz de *Brosimum acutifolium* Huber

Considerando que nas cascas da raiz as condições químicas são mais favorecidas para essa biotransformação esteroidal, pode-se propor que os metais com maiores concentrações relativas nas cascas da raiz tenham maiores probabilidades de estarem envolvidos no mecanismo de biotransformação de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol. A Tabela VI.1 apresenta os valores determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica da concentração de metais nas cascas do caule e da raiz de *B. acutifolium*.

**Tabela VI.1** – Valores determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica da concentração de metais nas cascas do caule e da raiz de *B. acutifolium*.

Elemento	Concentração	Cascas do Caule	Cascas da Raiz
<b>Boro</b>	(mg/kg)	19,00	17,00
<b>Cobalto</b>	(mg/kg)	0,00	10,00
<b>Cobre</b>	(mg/kg)	4,67	0,00
<b>Cromo</b>	(mg/kg)	5,78	3,77
<b>Ferro</b>	(mg/kg)	156,00	45,67
<b>Manganês</b>	(mg/kg)	14,00	10,33
<b>Zinco</b>	(mg/kg)	11,67	21,67
<b>Cálcio</b>	(g/kg)	12,14	12,72
<b>Cloro</b>	(g/kg)	1,30	1,56
<b>Enxofre</b>	(g/kg)	0,83	0,79
<b>Fósforo</b>	(g/kg)	0,25	0,17
<b>Magnésio</b>	(g/kg)	1,16	1,72
<b>Nitrogênio</b>	(g/kg)	9,50	9,45
<b>Potássio</b>	(g/kg)	5,50	3,95
<b>Sódio</b>	(g/kg)	0,83	0,55

Pelas concentrações de metais descritos nessa tabela, verifica-se que as concentrações de cobalto e zinco são relativamente maiores nas cascas da raiz. Por estes resultados, poderia ser inferido uma importância destes metais na bioconversão de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol. Entretanto, estes resultados não são suficientes para concluir esta proposição.

## Anexo I

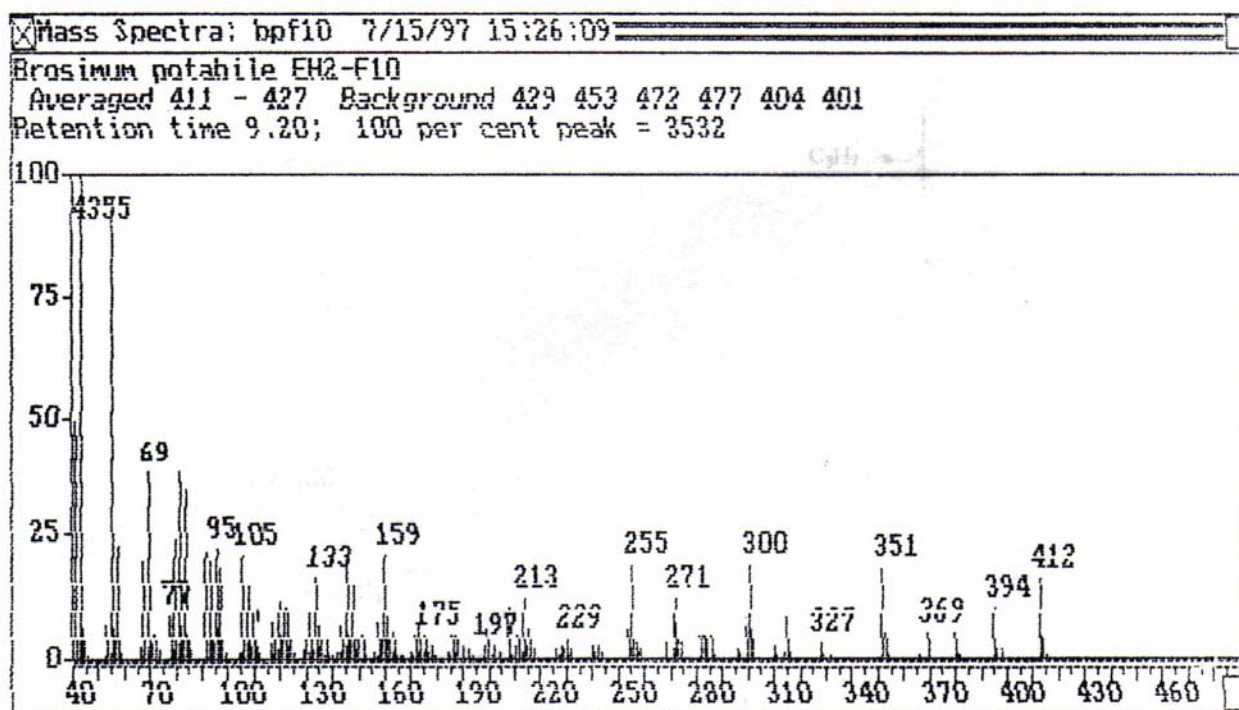
Identificação Estrutural dos Produtos EH<sub>a</sub>-F1 e EH<sub>b</sub>-F16,  
Isolados de *B. potabile*

e

dos Produtos <sub>CC</sub>EAE-FHC e <sub>CR</sub>EAEFH-F7,  
Isolados de *B. acutifolium*

## 1. Análises por Espectrometria de Massas Acoplada à Cromatografia Gasosa

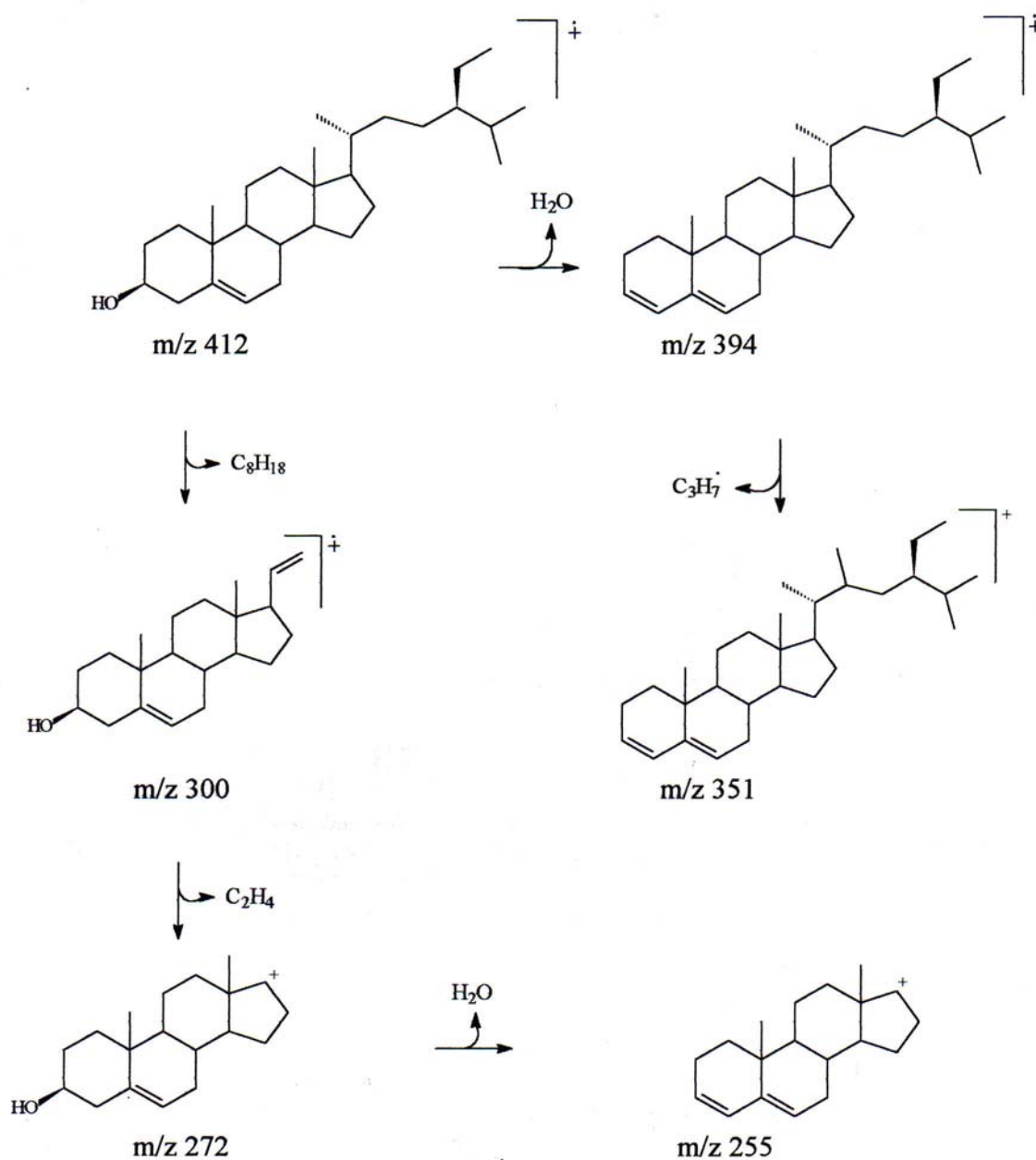
A Figura AI.1 apresenta o espectro de Massas de fitoconstituintes da fração **EHa-F1**, separado por Cromatografia Gasosa com tempo de retenção de 9,15 minutos, conforme Cromatografia da Figura VI.1 (página 94). A consulta comparativa entre espectros de Massas da biblioteca do aparelho forneceu uma percentagem de 82% de probabilidade para estigmasterol.



**Figura AI.1** – Espectro de Massas do fitoconstituente da fração **EHa-F1**, com tempo de retenção de 9,15 minutos, separado por Cromatografia Gasosa.

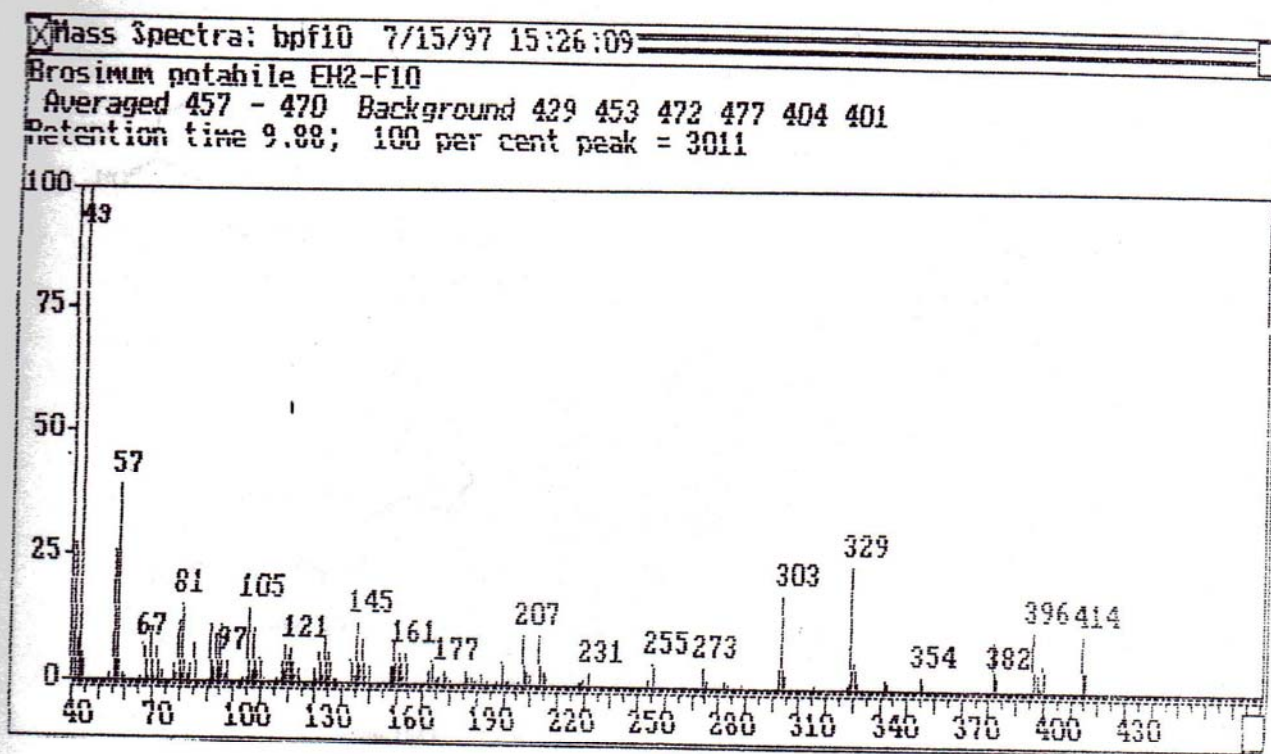


O Esquema AI.1 apresenta as principais fragmentações para estigmasterol descritas na literatura.<sup>109</sup> Considerando que os valores de  $m/z$  para os fragmentos propostos nos mecanismos de fragmentação do estigmasterol são coincidentes com os verificados no espectro de Massas da Figura AI.1, pode-se sugerir a estrutura do estigmasterol para este fitoconstituente.



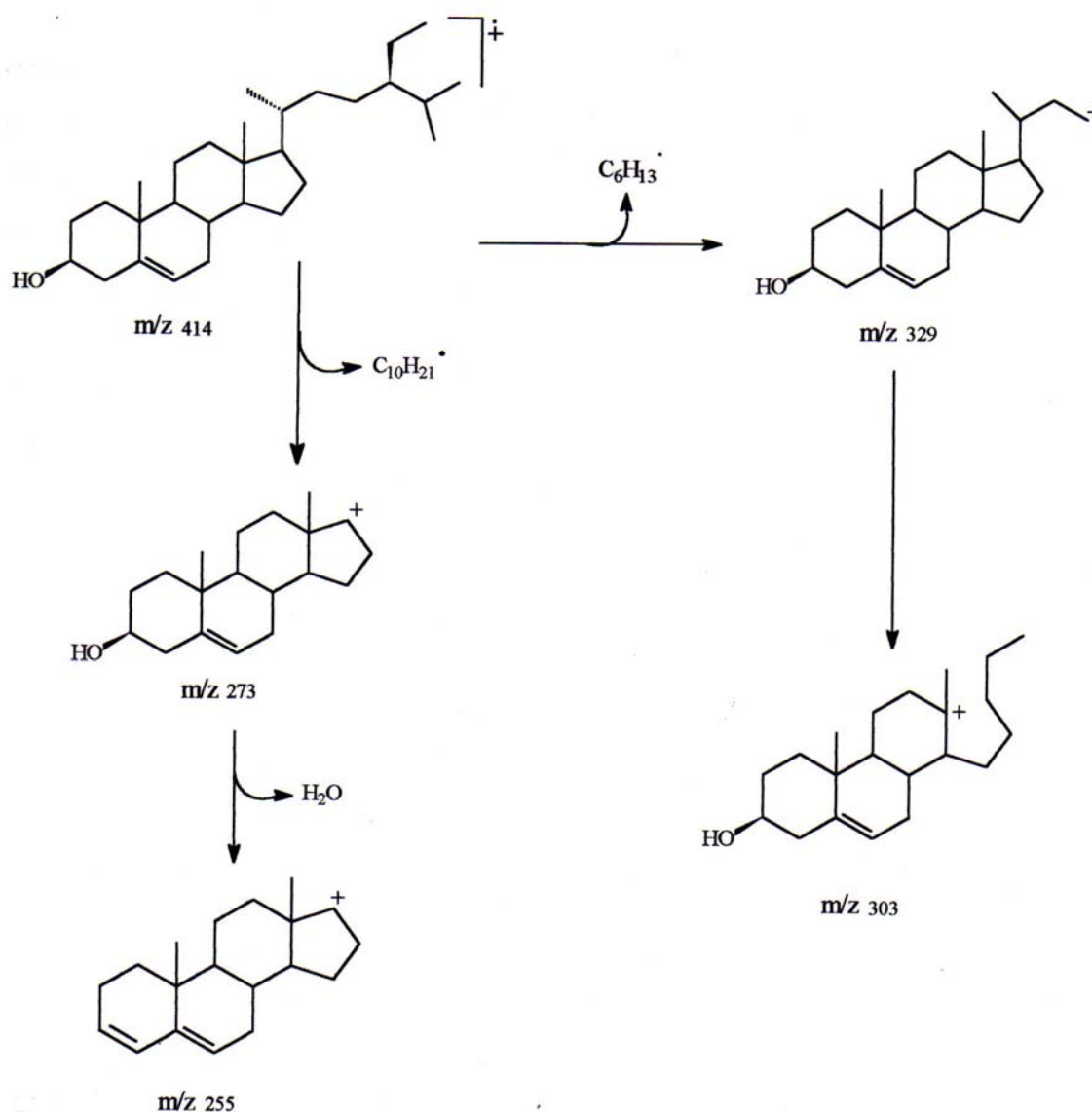
**Esquema AI.1** – Processos de fragmentação propostos para estigmasterol.

A Figura AI.2 apresenta o espectro de Massas do fitoconstituinte da fração EHa-F1, separado por Cromatografia Gasosa com tempo de retenção de 9,82 minutos, conforme Figura VI.1 – pág. 94). A consulta comparativa entre espectros de Massas da biblioteca do aparelho forneceu uma porcentagem de 79% de probabilidade para  $\beta$ -sitosterol.



**Figura AI.2** – Espectro de Massas do fitoconstituinte da fração EHa-F1, com tempo de retenção de 9,82 minutos, separado por Cromatografia Gasosa.

O Esquema AI.2 apresenta as principais fragmentações para estigmasterol descritas na literatura.<sup>110</sup> Considerando que os valores de  $m/z$  para os fragmentos propostos nos mecanismos de fragmentação do  $\beta$ -sitosterol são coincidentes com os verificados no espectro de Massas da Figura AI.2, pode-se sugerir a estrutura do  $\beta$ -sitosterol para este fitoconstituente.

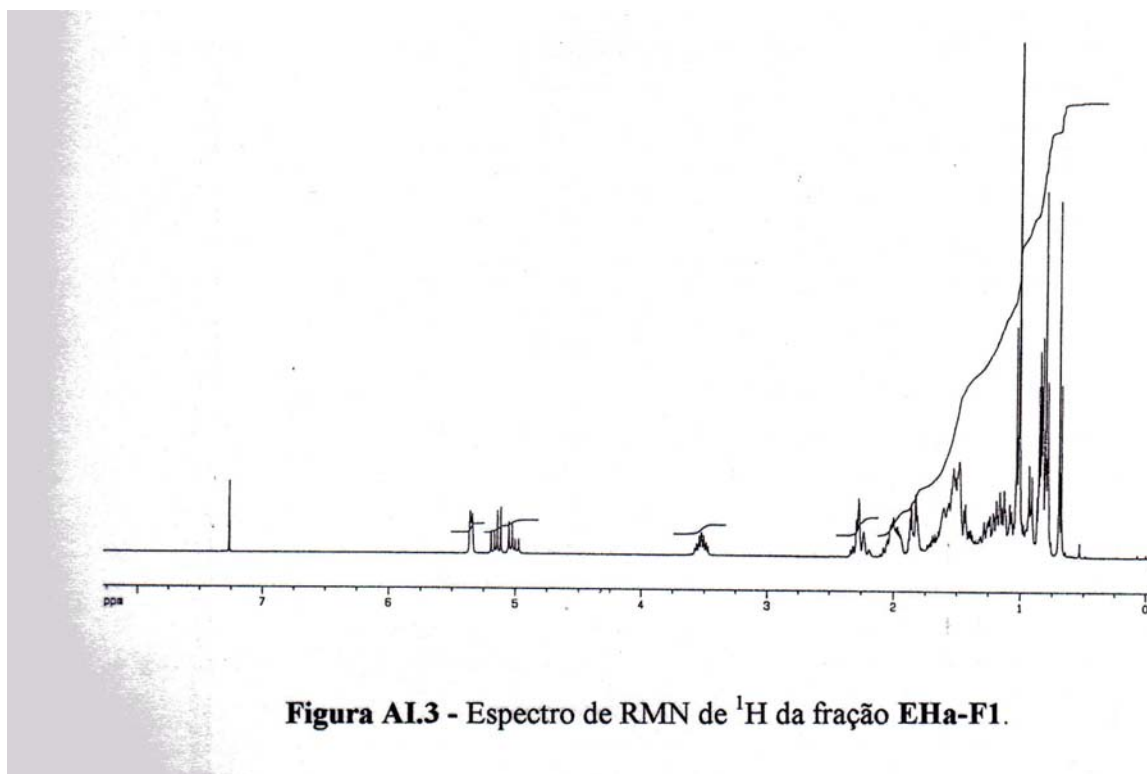


**Esquema AI.2** – Processos de fragmentação propostos para  $\beta$ -sitosterol.

Assim, por estes resultados, pode-se propor que a fração **EHa-F1** é constituído por dois fitoconstituintes: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Considerando que os mesmos resultados por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas foram obtidos também para as frações **EHb-F16** e **CC EAE-FHC** e **CR EAEFH-F7**, pode-se propor também que estas frações são misturas de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

## 2. Análises por Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$

A Figura AI.3 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração **EHa-F1**. O espectro mostra absorções na região próxima de  $\delta$  5,0 que podem ser atribuídos à hidrogênios aqüenólicos. Além disto, são registrados também sinais na região entre  $\delta$  2,5 a 0,8 que podem ser atribuídos à hidrogênios metilenos e metílicos. De um modo geral, estes resultados estão em concordância com o espectro esperado tanto para estigmasterol quanto para  $\beta$ -sitosterol. Da mesma forma, os espectros das frações **EHb-F16**, **CC EAE-FHC** e **CR EAEFH-F7** são semelhantes ao espectro da Figura AI.3, indicando também que estas frações podem ser constituídos por misturas de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

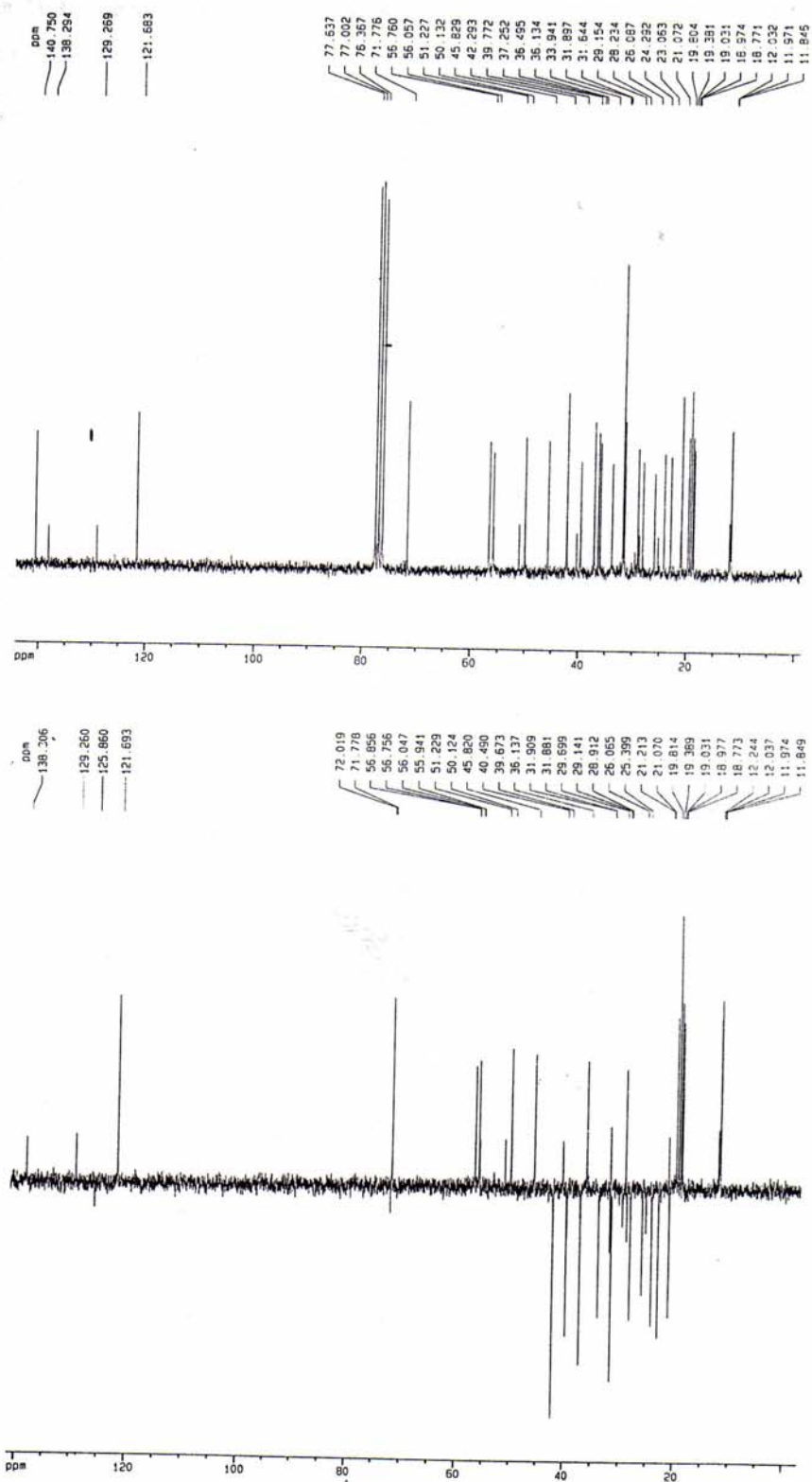


**Figura AI.3** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração **EHa-F1**.

## 3. Análises por Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$

A Figura AI.4 apresenta os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135° da fração **EHa-F1**. Pela combinação dos dois espectros de RMN, podem ser verificados: um sinal registrado em  $\delta$  140,8, atribuído ao carbono alquênico quartenário; três sinais registrados na região entre  $\delta$  138,3 e 121,7, atribuídos à carbonos alquênicos terciários, um sinal registrado em  $\delta$  71,7, atribuído ao carbono ligado à hidroxila; 11 sinais registrados na região entre  $\delta$  56,8 e 28,2, atribuídos a carbonos metínicos (terciários); 12 sinais registrados na região entre  $\delta$  40,5 e 21,1, atribuídos a carbonos metílenos (secundários); e nove sinais registrados na região entre  $\delta$  21,2 e 11,8, atribuídos a carbonos metílicos (primários). Estes resultados apresentam-se concordantes com os valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  registrados na literatura para  $\beta$ -sitosterol estigmasterol, conforme Tabela AI.1.<sup>111</sup>

Da mesma forma verificada para EM-CG e RMN de  $^1\text{H}$ , o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração **EHa-F1** é semelhante aos espectros registrados para as frações **EHa-F16**, **CC**EAE-FHC e **CR**EAEFH-F7, confirmando serem estes produtos constituídos por misturas de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.



**Figura A1.4** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (superior) e DEPT-135° (inferior) do produto EHa-F1. [125 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , TMS como referência interna].



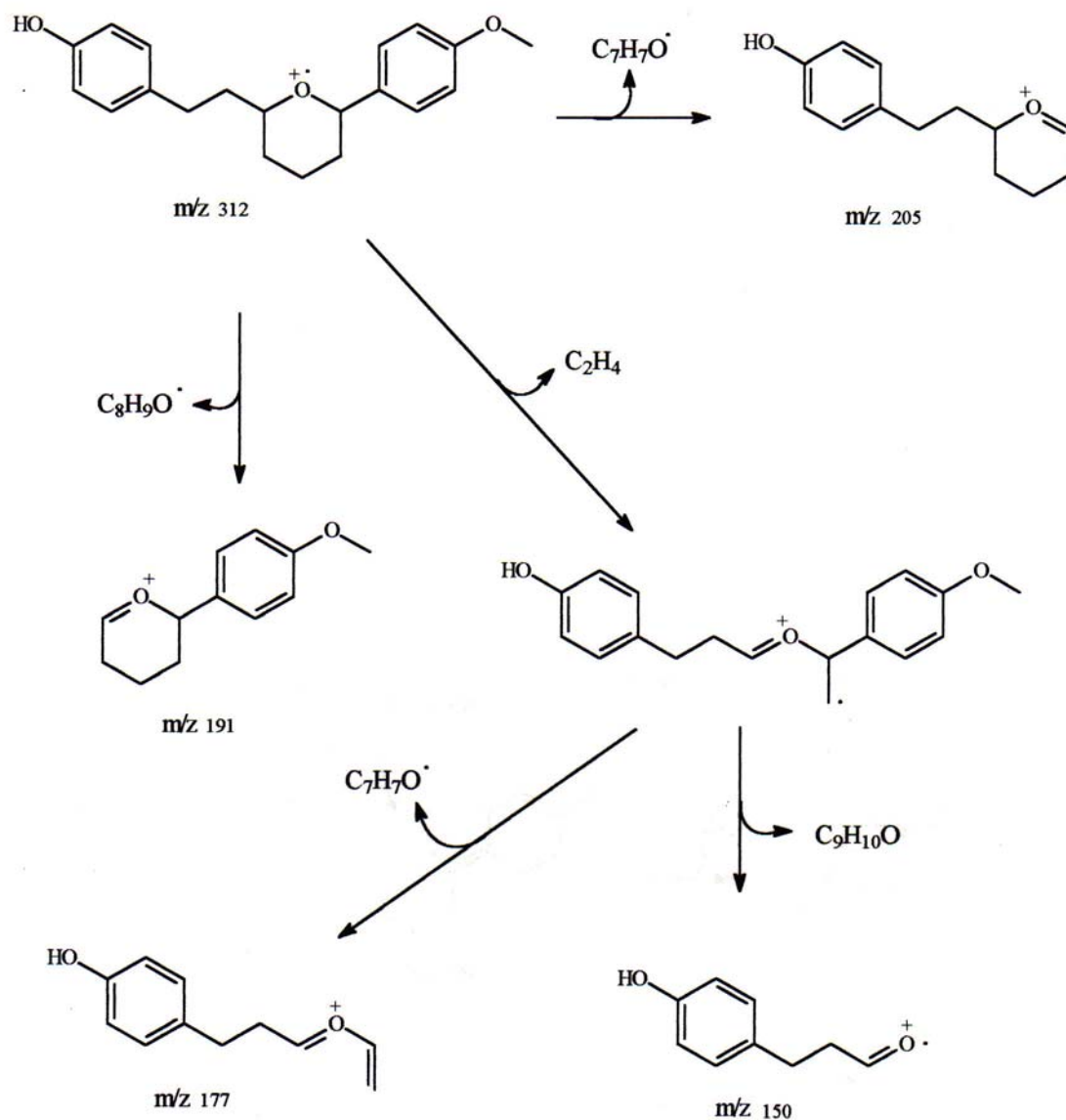
**Tabela II.1** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$  (em Hertz)] de alíquota da fração **EHa-F1** registrado em  $\text{CDCl}_3$ , [125 MHz, TMS como referência interna].

Átomo	$\delta_{\text{C}}$	$\beta$ -sitosterol	$\delta_{\text{C}}$	Estigmasterol
C-1	37,3	37,3	37,3	37,3
C-2	31,6	31,6	31,7	31,7
C-3	71,8	71,7	71,8	71,8
C-4	42,3	42,3	42,3	42,4
C-5	140,7	140,8	140,7	140,8
C-6	121,7	121,6	121,7	121,6
C-7	31,9	31,9	31,9	31,9
C-8	31,9	31,9	31,9	31,9
C-9	50,2	50,2	50,2	50,2
C-10	36,5	36,5	36,5	36,6
C-11	21,1	21,1	21,1	21,1
C-12	39,8	39,8	39,7	39,7
C-13	42,3	42,3	42,3	42,4
C-14	56,9	56,8	56,9	56,9
C-15	24,3	24,3	24,4	24,4
C-16	28,9	28,3	29,1	29,0
C-17	56,1	56,1	56,1	56,1
C-18	11,9	11,9	12,0	12,1
C-19	19,4	19,4	19,4	19,4
C-20	36,1	36,2	40,5	40,5
C-21	18,8	18,8	21,1	21,1
C-22	33,9	33,9	138,3	138,4
C-23	26,1	26,1	129,3	129,3
C-24	45,8	45,9	51,2	51,3
C-25	29,2	29,2	31,9	31,9
C-26	19,8	19,8	21,2	21,3
C-27	19,0	19,1	19,0	19,0
C-28	23,1	23,1	25,4	25,4
C-29	12,2	12,3	12,2	12,3

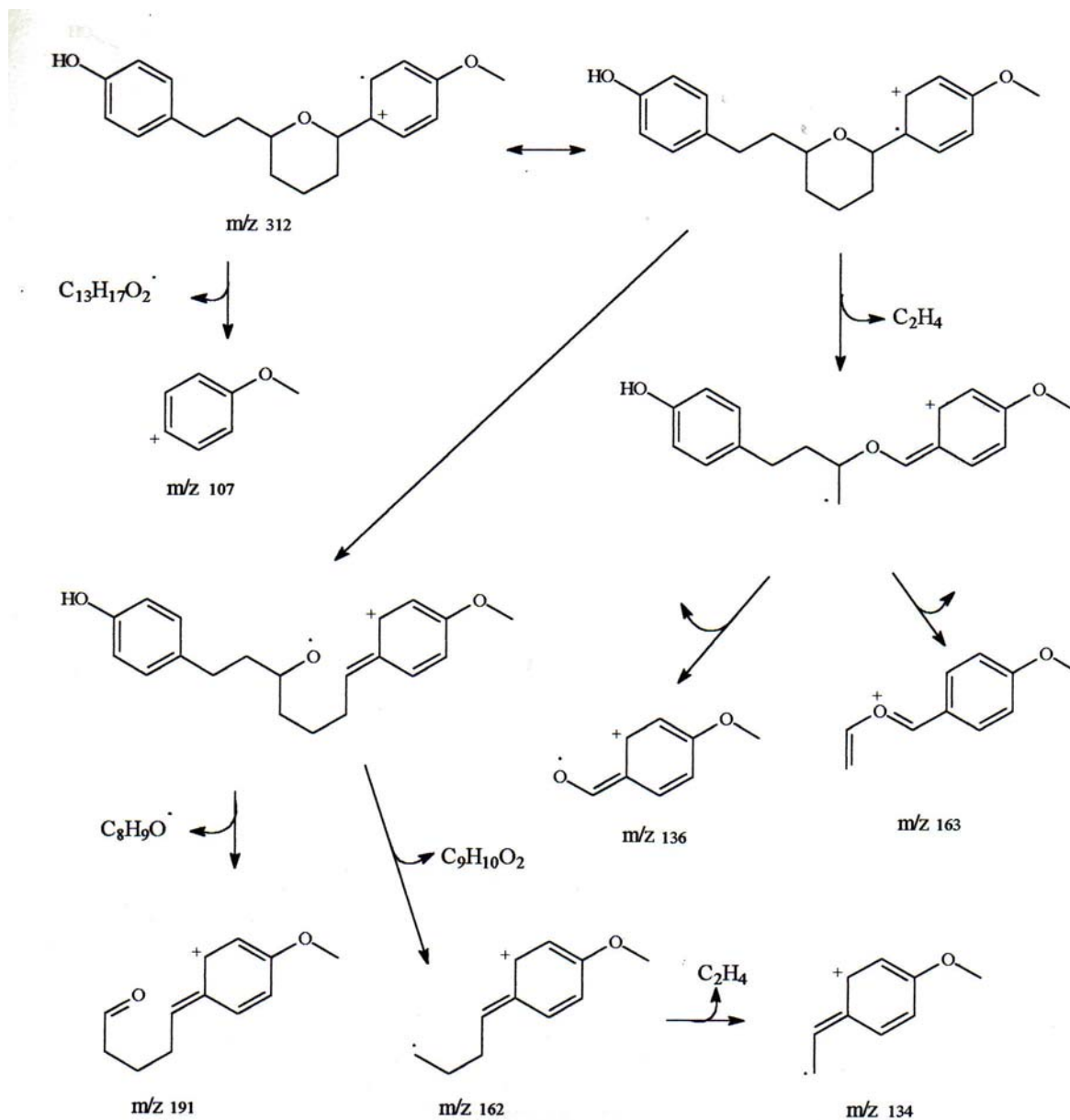
## Anexo II

### Identificação Estrutural da Fração EE-F1, Isolada de *B. potabile*

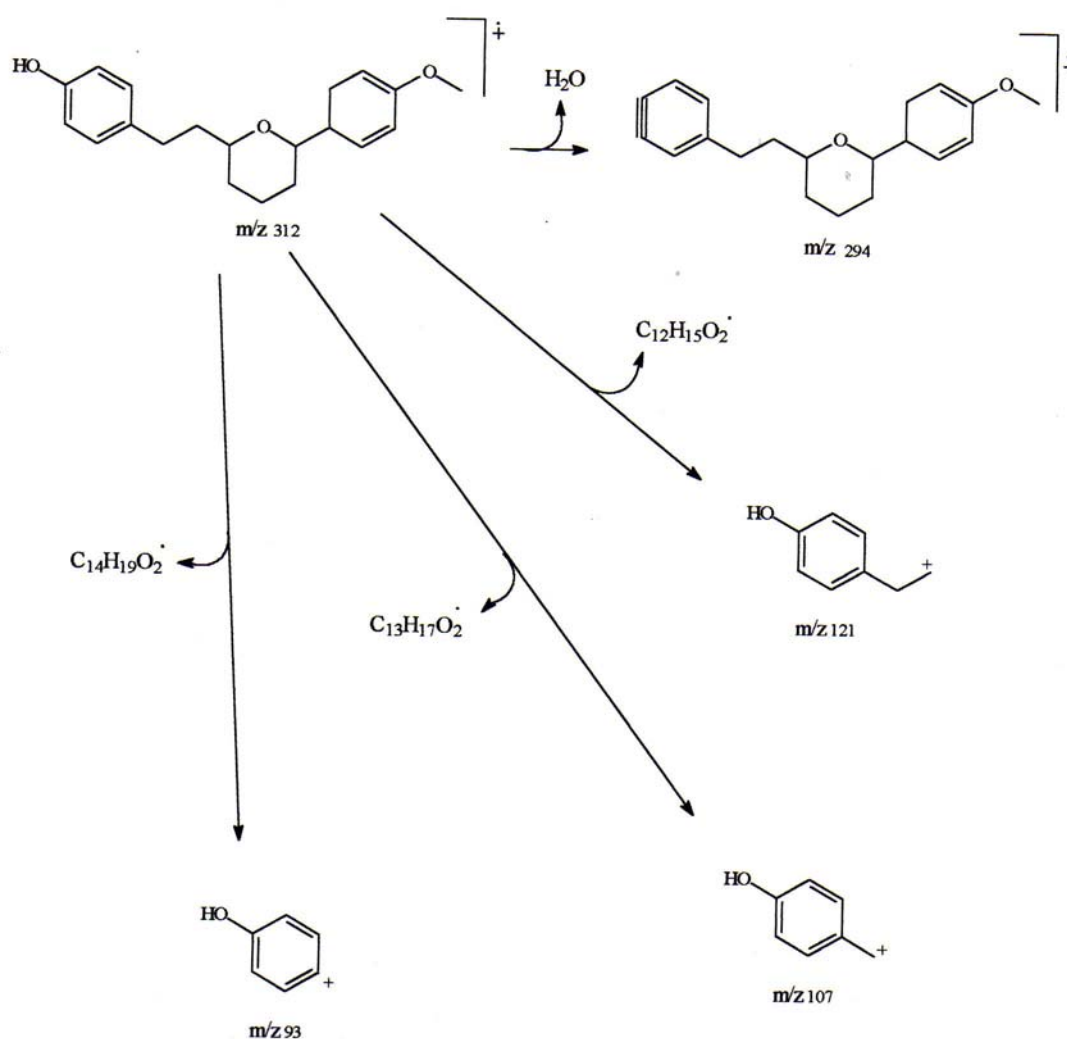
O pico do íon molecular é registrado em  $m/z$  312, com uma intensidade relativamente alta. O pico em  $m/z$  294 sugere a perda de água, indicando a presença de hidroxila. Os esquemas AII.1, AII.2 e AII.3 mostram as principais fragmentações propostas para os picos registrados no espectro de Massas do fitoconstituente **EE-F1**.



**Esquema AII.1** – Principais fragmentações propostas para os picos registrados no espectro de Massas do fitoconstituente **EE-F1**.

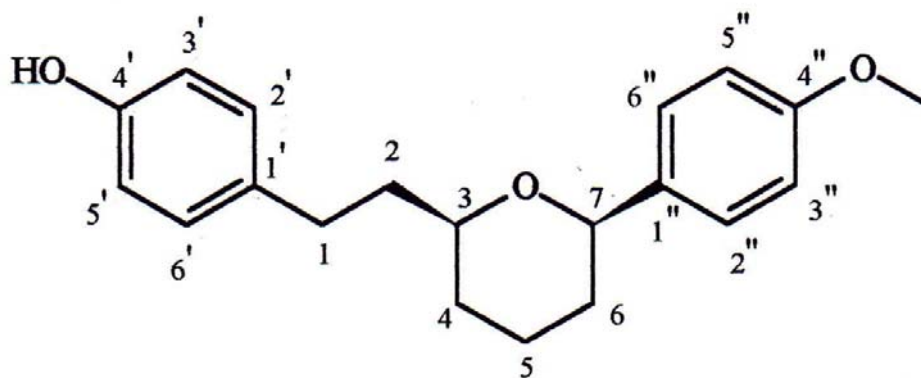


**Esquema AII.2** – Principais fragmentações propostas para os picos registrados no espectro de Massas do fitoconstituente EE-F1.



**Esquema AII.3** – Principais fragmentações propostas para os picos registrados no espectro de Massas do fitoconstituente **EE-F1**.

Considerando a similaridade dos dados de E. Massas registrados para 7*R*-(*p*-metoxi-fenil)-3*S*-[ $\beta$ -(*p*-hidroxi-fenil)-etil]-tetra-hidropirano, centrolobina,<sup>112</sup> com as análises por E. Massas do fitoconstituente **EE-F1**, pode-se propor uma semelhança estrutural entre ambos.



**centrolobina**

A Figura AII.2 apresenta o espectro no Infravermelho do fitconstituente **EE-F1**, isolado do extrato etanol do cerne de *B. potabile*. As absorções intensas na região de  $3391\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às vibrações de estiramento de grupos hidroxilas. A absorção em  $646\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à deformação angular fora do plano do grupo O-H, corrobora com a proposição da presença de hidroxila na estrutura.

As absorções em  $3027$  e  $3060\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às vibrações de estiramento de C-H em estruturas aromáticas. As absorções em  $2947$  e  $2833\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas aos estiramentos de C-H de grupos metilas e metilenos.

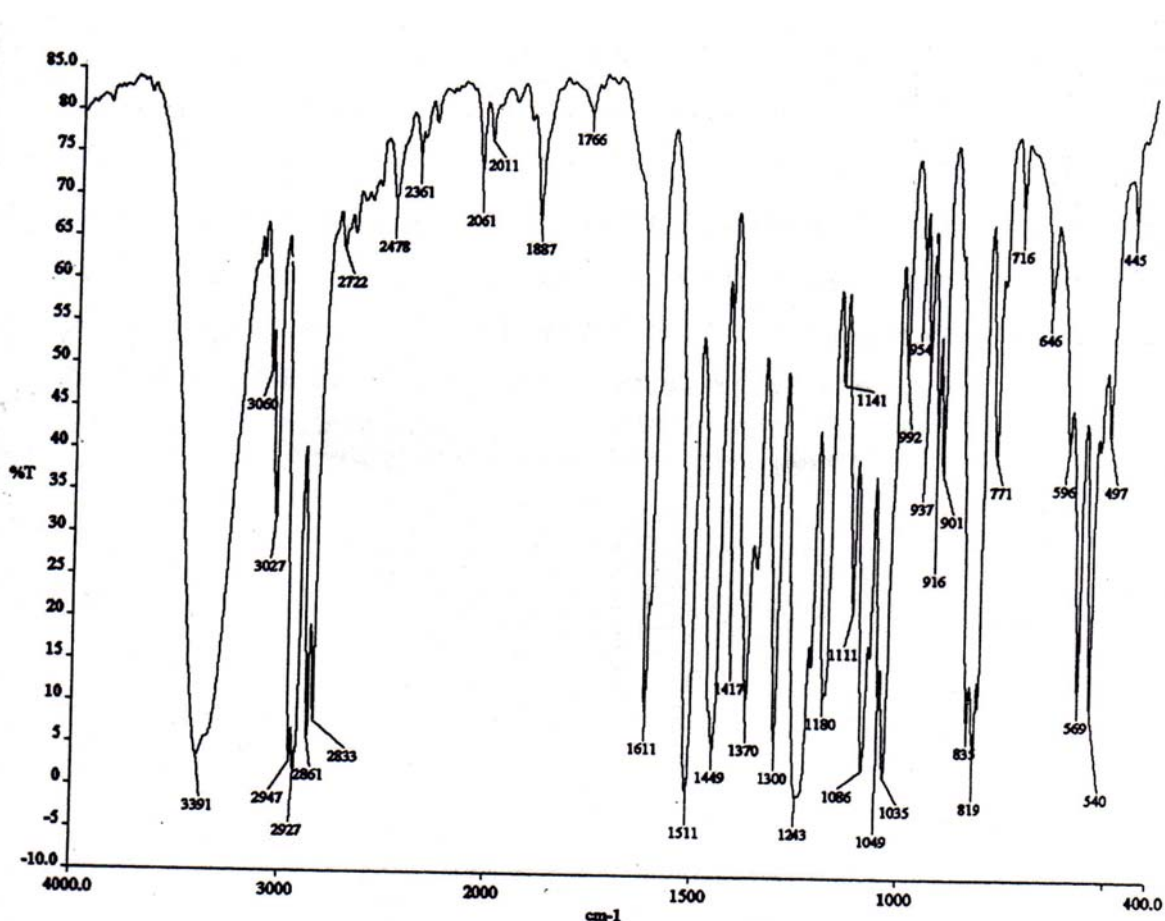
Na região entre  $2722$  e  $1766\text{ cm}^{-1}$ , são observadas absorções pouco intensas, indicando ausência de carbonilas na estrutura. Estas absorções podem ser atribuídas às harmônicas de frequência oriundas das absorções intensas na região entre  $1500$  a  $819\text{ cm}^{-1}$ .

A fim de confirmar a presença de grupos fenólicos na estrutura do fitconstituente **EE-F1**, foram feitas consultas na literatura sobre as principais características destes grupos registradas por espectroscopia no Infravermelho.<sup>113</sup> De um modo geral, os compostos fenólicos apresentam absorções de estiramento de C=C do anel próximos a  $1595$ ,  $1490$  e  $1470\text{ cm}^{-1}$ . Estas absorções são influenciadas pelo tipo de substituintes e as intensidades variáveis, sendo normalmente fortes quando aumenta-se o grau de conjugação. O estiramento de C-O na região entre  $1260$  e  $1180\text{ cm}^{-1}$  apresenta intensidades fortes e, normalmente, como dupletos. Além disto, a absorção mais intensa é aquela registrada em menor frequência. As deformações angulares no plano de C-H entre  $900$  e  $690\text{ cm}^{-1}$  são intensas. As absorções de deformação angular no



plano de C-C-C são de intensidades médias e próximas a  $690\text{ cm}^{-1}$ . Em relação ao grau de substituição no anel fenólico, a literatura registra que anéis fenólicos para-dissubstituídos apresentam absorções fortes na região entre  $860$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ .

Em relação ao grupo éter do anel pirano e do grupo metoxila no anel fenólico, a literatura registra que o sistema C-O-C apresenta estiramentos assimétricos na região entre  $1275$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ , podendo ocorrer desdobramentos (alargamento) da absorção quando há possibilidades de deslocalização eletrônica dos elétrons “n” do oxigênio. Por outro lado, as frequências do estiramento simétrico são registradas normalmente na região entre  $1075$  e  $1020\text{ cm}^{-1}$ . Assim, estas análises realizadas por espectroscopia no Infravermelho confirmam a proposição da estrutura do fitoconstituente **EE-F1** ser centrolobina.

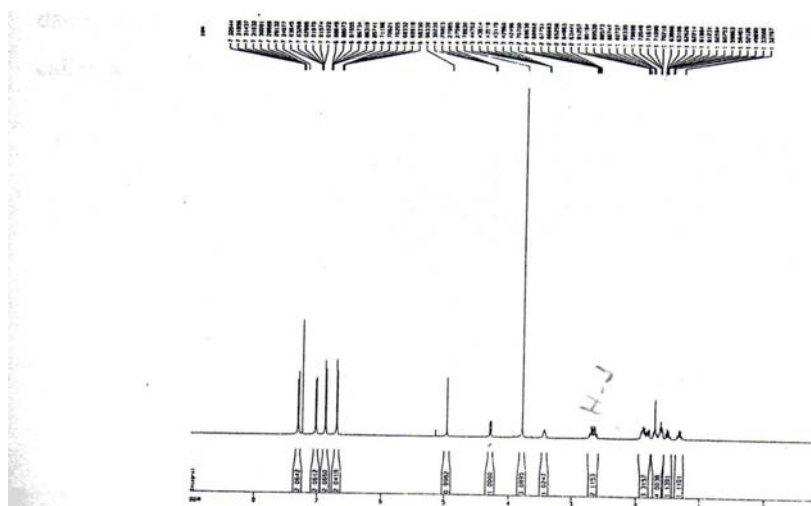


**Figura AII.2** – Espectro no Infravermelho do fitoconstituente **EE-F1**, isolado do extrato etanol do cerne de *B. potabile*.

### 3. Análises por Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$

A Figura AII.3 apresenta o espectro do fitoconstituente **EE-F1**, isolado do extrato etanol do cerne de *B. potabile*. O espectro registra quatro sinais dupletos entrados em  $\delta$  7,31 ( $J=8,8$  Hz), 7,02 ( $J=7,4$  Hz), 6,87 ( $J=8,8$  Hz) e 6,70 ( $J=7,4$  Hz) correspondentes à oito hidrogênios aromáticos. (Os valores das constantes de acoplamento, calculadas pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , são apresentados na Tabela AII.1). O sinal registrado em  $\delta$  4,96 pode ser atribuído a um hidrogênio hidroxílico. O sinal duplo-duplete centrado em  $\delta$  4,30 ( $J=11,5$  e  $2,4$  Hz), correspondendo a um hidrogênio, e o sinal multipletto registrado na região entre  $\delta$  3,46 e 3,41, correspondendo também a um hidrogênio, podem ser atribuídos aos hidrogênios dos carbonos ligados ao oxigênio do anel pirano. O sinal simpleto em  $\delta$  3,79, correspondendo a três hidrogênios, pode ser atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila ligado ao anel fenólico.

O sinal multipletto na região entre  $\delta$  2,74 e 2,61 pode ser atribuído à sobreposição parcial de dois sinais centrados respectivamente em  $\delta$  2,71 ( $J=11,9$ ,  $9,1$  e  $5,69$  Hz) e  $\delta$  2,64 ( $J=11,9$ ,  $9,1$  e  $7,2$  Hz) correspondendo a dois hidrogênios, pode ser atribuído ao metileno ligado a anel fenólico. Os demais sinais na região entre  $\delta$  1,91 e 1,32, correspondendo a oito hidrogênios, podem ser atribuídos à hidrogênios metilenos do anel pirano. Assim, pelos dados de RMN de  $^1\text{H}$  pode-se propor que a estrutura do fitoconstituente **EE-F1** está de acordo com a estrutura da centrolobina.

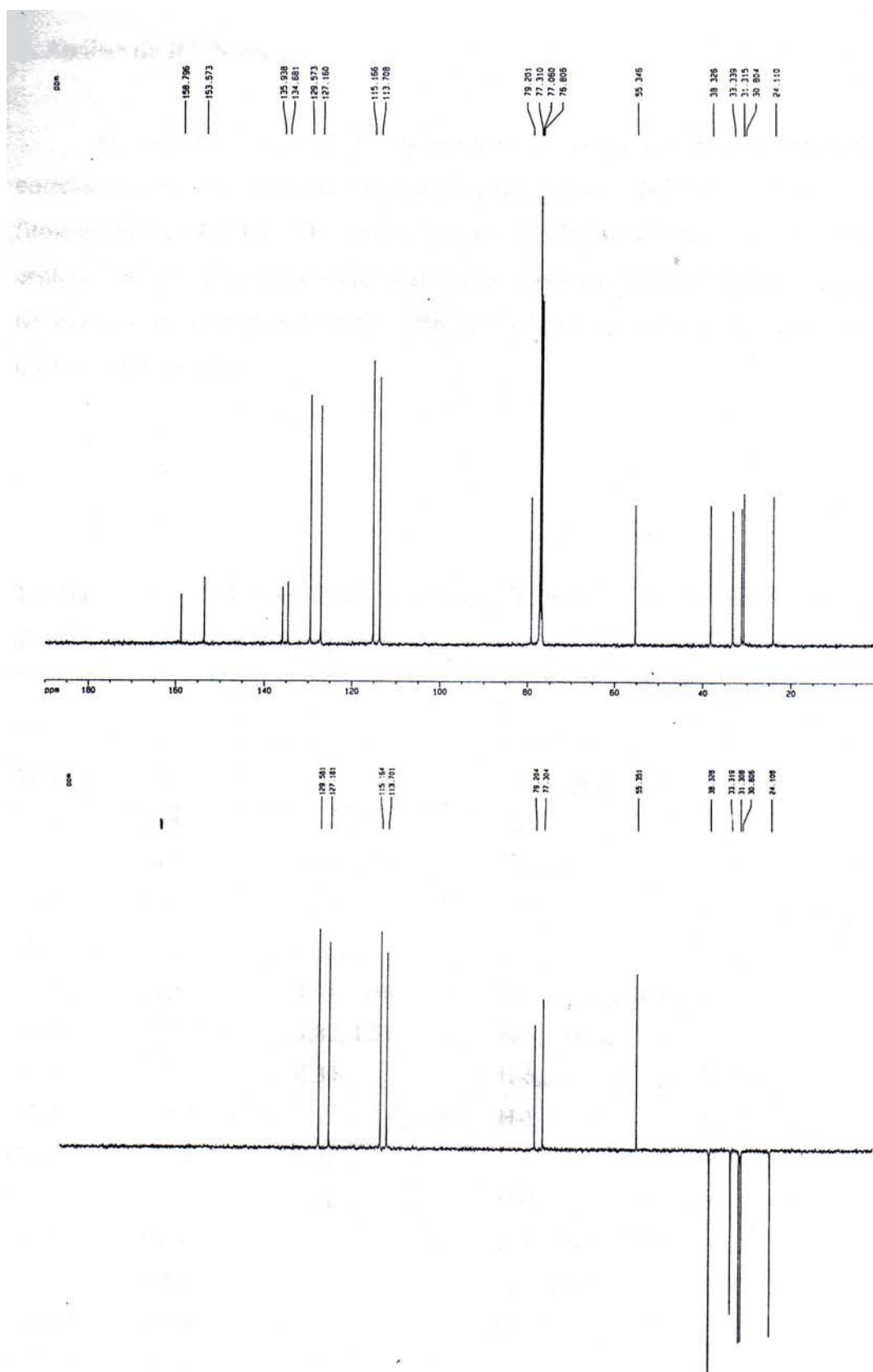


**Figura AII.3** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do fitoconstituente **EE-F1**, [ $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz].

#### 4. Análises por Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$

A Figura AII.4 apresenta os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DEPT-135° do fitoconstituente **EE-F1**. Pela análise comparativa entre estes espectros e com análises empregando técnicas em duas dimensões de HMBC, HMQC, NOESY e COSY (Tabelas AII.1 e AII.2), pode-se propor que os sinais em  $\delta$  158,80 e 153,57 correspondem aos carbonos aromáticos quaternários ligados respectivamente à metoxila e hidroxila dos anéis fenólicos. Os sinais registrados em  $\delta$  135,94 e 134,68 podem ser atribuídos aos outros carbonos aromáticos quaternários dos anéis fenólicos. Os sinais registrados em  $\delta$  129,57, 127,16, 115,57 e 113,71, correspondendo a carbonos aromáticos terciários, podem ser atribuídos àqueles localizados também nos anéis fenólicos.

Os sinais registrados em  $\delta$  79,20 e 77,30, correspondendo a carbonos metínicos, podem ser atribuídos àqueles ligados ao oxigênio do anel pirano. O sinal registrado em  $\delta$  55,35, correspondendo a um carbono metila, pode ser atribuído ao carbono do grupo metoxila. Finalmente, os cinco sinais registrados em  $\delta$  38,33, 33,32, 32,31, 30,81 e 24,11, correspondentes à carbonos metilenos, podem ser atribuídos aos demais carbonos presentes na estrutura da centrolobina, estando em concordância com dados de  $\delta\text{c}$  descritos para 5,6-des-hidro-4''-des-O-metilcentrolobina,<sup>114</sup> epicalixina e calixina<sup>115</sup>.



**Figura A11.4** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (superior) e DEPT-135° (inferior) do fitoconstituente **EE-F1**. [ $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz]

## 5. Análise de RMN em 2D

As Tabelas AII.1 e AII.2 apresentam os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  correlacionados com técnicas em 2D HMBC, HMQC, NOESY e COSY para o fitoconstituente **EE-F1**. Os dados destas tabelas confirmam a estrutura da centrolobina, proposta para o fitoconstituente. Além disto, as correlações verificadas no espectro de contorno NOESY entre os hidrogênios H-3 e H-7 indicam uma configuração 3S e 7R.

**Tabela AII.1** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para **EE-F1**, incluindo dados de  $\delta$  obtidos por correlação 2D de HMQC ( $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ), e HMBC ( $^n\text{J}_{\text{CH}}$ , n=2 e 3), em  $\text{CDCl}_3$ .

Átomo	HMQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C-1	30,8	2,64;2,71	H-2	H-3
C-2	38,3	1,86;1,71	H-3;H-1	H-4
C-3	77,3	3,44	H-2	H-7;H-1;H-5 <sub>eq</sub>
C-4	31,3	1,63;1,32	H-5 <sub>ax</sub>	
C-5	24,1	1,91;1,60	H-4 <sub>ax</sub> ;H-4 <sub>eq</sub> ;H-6 <sub>eq</sub>	H-7
C-6	33,3	1,82;1,51	H-5 <sub>ax</sub> ;H-5 <sub>eq</sub>	
C-7	79,2	4,30	H-6 <sub>ax</sub>	H-3;H-2''
C-1'	134,7		H-1	H-3';H-2 <sub>ax</sub> ;H-2 <sub>eq</sub>
C-2'/6'	129,6	7,02		H-1
C-3'/5'	115,2	6,70	H-2'	HO(C-4')
C-4'	153,6		H-3';HO(C-4')	H-2'
C-1''	135,9		H-1'';H-7''	H-3'';H-6 <sub>ax</sub>
C-4''	158,8		H-3''	H-2'';HO(C-4')
C-2''/6''	127,2	7,31		H-7
C-3''/5''	113,7	6,87	H-2'';H-6''	
CH <sub>3</sub> -O	55,3	3,85		

**Tabela AII.2** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , COSY-H/H e NOESY para **EE-F1** registrado em  $\text{CDCl}_3$ [500 MHz, TMS como referência interna].

Átomo	$\delta_{\text{H}}$	COSY-H/H	NOESY
H-1	2,71	1,71;1,86	1,71;1,86;2,64;3,44;7,02
H-1	2,64	1,71;1,86	1,71;1,86;2,71
H-2	1,71	1,86;2,64;2,71	1,86;2,71;4,30
H-2	1,86	1,71;2,64;3,44	1,71;4,30;7,02
H-3	3,44	1,32;1,86	1,63;2,71;4,30
H-4 <sub>eq</sub>	1,63	1,60;1,91	1,32
H-4 <sub>ax</sub>	1,32	1,86;1,91;3,44;1,63	1,63
H-5 <sub>eq</sub>	1,91	1,63	1,60
H-5 <sub>ax</sub>	1,60	1,91	1,91
H-6 <sub>eq</sub>	1,82	1,51	7,31
H-6 <sub>ax</sub>	1,51	1,82;1,63;4,30	1,82;7,31
H-7	4,30	1,51	1,82;3,44;7,31
H-2'/6'	7,02	6,70	1,63;1,71;1,86;2,71;6,70
H-3'/5'	6,70	7,02	7,02
HO-C-4'	4,99		6,70
H-2''/6''	7,31	6,87	1,63;1,82;4,30;6,87
H-3''/5''	6,87	7,31	1,51;3,85
CH <sub>3</sub> -O'	3,85		6,87

## 6. Identificação estrutural do fitoconstituente EE-F1.

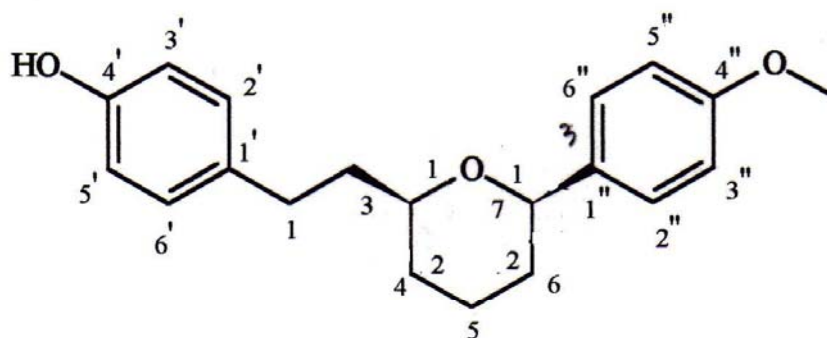
O espectro no IV de **EE-F1** mostra absorções em 3391 e 646  $\text{cm}^{-1}$  podendo ser atribuídas respectivamente às vibrações de estiramento e deformação angular fora do plano de hidroxilas. As absorções próximas a 3060  $\text{cm}^{-1}$ , combinadas com as registradas em 1595, 1490 e 1470  $\text{cm}^{-1}$ , sugerem a presença de sistemas aromáticos na estrutura. Desta forma, as absorções em 1260 e 1180  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a estiramentos C-O que, combinadas com as absorções fortes em 860 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , sugerem para-dissubstituição em anéis fenólicos.



O espectrograma de cromatografia gasosa mostra apenas um pico, indicando um alto grau de pureza. O espectro de Massas registra um pico intenso para o íon molecular em  $m/z$  312 u ( $C_{20}H_{24}O_3$ ). O pico  $[M-18]^+$ , em  $m/z$  294 u, e o pico em  $m/z$  93 u indicam a presença de hidroxila fenólica na estrutura. Por outro lado, os picos em  $m/z$  205 e  $m/z$  107 u sugerem a presença de metoxila fenólica. Assim, por estes resultados, pode-se propor que a estrutura apresenta dois grupos fenilas, sendo um hidroxilado e o outro metoxilado.

Os dados de RMN, combinando-se com os resultados anteriores, permitiram propor a estrutura da centrolobina, 3- $[\beta$ -(*para*-hidroxifenil)-etil]-7-(*para*-metoxifenil)-tetra-hidropirano, para o fitoconstituente. Entretanto, para elucidar qual geometria, dentre as possíveis configurações envolvendo C-3 e C-7, corresponde ao fitoconstituente, foram realizadas análises por correlação 2D. Por NOESY, o acoplamento entre H-3 e H-7 indicam que estes hidrogênios apresentam-se relativamente em posição *sin* no anel pirano.

Assim, por estes resultados pode-se concluir que o fitoconstituente apresenta a configuração 3*S* e 7*R* e pelos resultados de rotação ótica,  $[\alpha]_D = -92,15^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $1,0 \times 10^{-5}$  M), que corresponde à (-)-centrolobina. Esta substância da classe dos diarilheptanóides, é muito importante biologicamente como anti-inflamatório<sup>116</sup> e anti-HIV<sup>117</sup>, não sendo isolada ainda em espécies do gênero *Brosimum*.



**(-)-centrolobina**

## Conclusões

Pelo estudo fitoquímico de *Brosimum potabile*, pode-se isolar e identificar espectroscopicamente o fitoconstituente (-)-centrolobina, uma substância da classe dos diaril-heptanóides que, pela primeira vez, foi registrada em espécies do gênero *Brosimum*.

Apesar da variação da concentração relativa de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol em misturas esteroidais isoladas de espécies do gênero *Brosimum* e em diferentes partes das plantas estudadas sugere a possibilidade do feito tanto da presença de metais quanto do ar e da luz na biotransformação de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol, estes resultados não puderam ser relacionados com levantamento bibliográfico sobre a relação entre estes esteróides em misturas isoladas de espécies de diferentes gêneros e famílias taxonômicas.

Os estudos teóricos mostraram um efeito da estrutura dos grupos O-substituintes na conformação e nas propriedades e estéricas da ramificação esteroidal. Estes fatos são muito significativos, indicando que, para estudo do mecanismo da biotransformação de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol, torna-se importante considerar o efeito do grupo O-substituinte, mesmo este estando relativamente na outra extremidade da molécula.

Finalmente, pode-se propor também que a desidrogenação do  $\beta$ -sitosterol, durante a sua bioconversão em estigmasterol, torna-se mais favorecida no mecanismo *sin* em vez de desidrogenação *anti*.

## Referências Bibliográficas

1. Rohwer, J.G – Moraceae. In: Kubitz, K. et al. 'The families and Genera of vascular plants'. Vol.2: 438-453. Sprig-Velag. Berlin (1993).
2. Guia de Arboles de Bolivia editado por Timothy J. Killen, Emilia Garcia e Stephan G. Beck. Herbario Nacional da Bolivia e Missouri Botanical Garden (1993).
3. Berg, C. C, Some remarks on the classification Na differentiation of Moraceae.
4. V.H. Heywood, *Flowering Plants of the World. B.T. Batsford, London (1993)*
5. AB. Joly, *Introdução a Taxonomia Vegetal. 11ª Ed. (1993). Rio de Janeiro.*
6. C.C. Berg R.A.W.P. Akkermans & E.C.H. Van Heusden (1990). Cecropiaceae: Coussapoa and Pourouma, with an introduction to the family. *Flora Neotropica*, 51: 4-11.
7. M.G. Barroso, *Sistemática de Angiospermas Do Brasil*. Livros Técnicos e Científicos, São Paulo (1978).
8. Plant Form, Na Illustrated Guide. To flowering Plant Morphology. Adrian Bell – Oxford University Press (1991).
9. Anatomy of the dicotyledons, vol1. Systematic anatomy of the leaf and stem, C. R. Metcalfe e L. Chalk. Oxford Science publications. (1988).
10. Berg, C. C. 1977. Urticales y their differentiation and systematic position. *Pl. Syst. Evol. Suppl.* 1: 349-374.
11. C. C. Berg (1972). Alomideae e Brosimeae (Moraceae). *Flora Neotropica Monograph* 7. 173-178.
12. I. D. Gemtchujnicov, manual de taxonomia vegetal – plantas de interesse econômico, agrícola, Ornamentais e medicinais. (1972) Ed. Agronomica Ceres, São Paulo.
13. Carlos T. Rizzini; Walter B. Mors, *Botânica Econômica Brasileira* (1921) 2ª Edição – Ambito Cultural edições Ltda, Rio de Janeiro, PP 17.
14. Ribeiro, Jose Eduardo L. da S. ET AL , *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta da terra firme na Amazônia central – Manaus: IMPA, 1999. Editora Midas Printing Ltda.*
15. Identification of tropical Woody plants in the absence of flowers and fruits. A field Guide. Roland Keller – Birkhauser (1996).
16. S. L Torres, M. S. P. Arruda, A. C. Arruda e A. H. Muller, *Chalconas de Brosimum Acutifolium*. 20ª. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumo 2 (1997), PN-094. Poços de caldas, MG.
17. Topper, S. M. C. Koek-Noorman, J. (1980). The occurrence of axial latex tubes in the secondary xylem of some genus of Moraceae J. R. & G. Forster (Moraceae). *IAWA Bull.* 1; 113-119.
18. W. O. Foye. T. L. Lenke and D. A. Williams, *Principles of Medicinal Chemistry*, 4<sup>th</sup> Ed (1995). Williams & Wilkins, Media-USA, pp 800-801.
19. I.J. Viera; R.M Kuster,.; L. Martins,.; F. B. Filho, *Cumarinas de Brosimum gaudichaudii* XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil (1996), q-064, Florianópolis, SC.
20. Brás filho, R. Magalhães A. Farias, *Novas Cumarinas de Brosimum paraense*, *Chemistry abstract* vol. 75, 1971 (19)
21. O. R. Gottlieb; M. L. Silva; J. G. S. Maia *Phytochemistry*, 11 (1972), 3479.

22. (a) F. B. Filho, A. F. Magalhães, O. R. Gottlieb, *phytochemistry* 11 (1972), 3307.  
(b) G. L. Pozetti, *Rev. Fac. Farm. Odont. Ararquara Brasil Quim.* 26 (1967) 67.
23. S. L. Torres, M. S. P. Arruda A. C. Arruda e A. H. Muller, *Chalconas de Brosimum acutifolium*. 20ª Reunião Anual da sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos 2, PN-095. Poços de Calda.
24. J. F. Mello, *Revista do Inst. De Antibiótico, Recife* (1974), 14.
25. I. J. C. Viera.; L. Mathias .; R. B. Filho e E. R Filho, *Um Novo Fotossensibilizante de Brosimum Gaudichaudii* 20ª. Reunião Anual da sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumo 2 (1997), PN-064. Poços de Caldas, MG.
26. (a) R. E. Schultes and R. F. R. Foreword, *medicinal and toxic Plants of the Northwest Amazonia*, Dioscorides Press, Porthand, Oregon, 1992.  
(b) R. H. Garretan and C. M. Grisham, *Biochemistry*. Saunders College Publishing (1995) Orlando-USA.
27. –Raphael Ikan, *natural, A. Laboratory Guide, Second Edition*, Academic Press Limited, INC – San Diego, California (1991) Vol. 1 pp 27.
28. *Quimica Nova*, 19 (3) (1996).
29. P.M. Dey and J. B. Harbone, *methods in Plant Biochemistry*, Vol, 7 - Terpenoids, pgs 370 a 387. Edited by B. V. Charlwood and D. V Banthorpe – academic press Limited London (1991) pp 371.
30. G. W. Patterson, Ed., *physiology and Biochemistry of sterols*. American Oil Chemists' Society, Illinois, 1991.
31. L. G. Wade, Jr, *Quimica Organica*. 2ªEdicion, prentice-hall Hispanoamericana, S. A. (1993) pp 1228-1229.
32. E Heftmann, *Phytochemistry* 22 (1983), 1843-1860.
33. P.M. Dey and J. B. Harbone, *Methods en Plants Biochemistry*, vol. 7 – terpenoids pgs 370 a 383. Edited by B. V. Charlwood and D. V. Banthorpe – Academic press Limited London (1991) pp 379-381.
34. Blunden, G.; Culling, M. C.; Jewers , K. *Trop. Sci.*,1975, 17, 139.
35. G. W. Patterson, Ed., *Physiology and Biochemistry of Sterols*. American oil Chemists' Society, Illinois, 1991.
36. *Quimica Nova*, 19 (3) (1996).
37. *Toxicological Evalution of sambatum*, Mohanan, P. V.; Devi K. S. *Chemistry Abstract* 129: 12357(1998).
38. *Biological activies and Metabolites from trevoa trinervis Miers*; Delporte, Carla I.; Backhouse, C. Nadine.; Erazo, Silvia, Negrete, Rosa E.; Silva, Carolina; Hess, Andres, Munoz, Orland; Garcia Gravalos, M. Dolores; San Feliciano, Arturo. *Chemistry abstract* 129: 30053 (1998).
39. *Hypotensive constituents from thee pods of Moringa oleifera* . Faizi, shaheen; siddiqui, Bina shaheen; Saleem, Rubeena; Aftab, Khalid; shaheem, Farhana; Gilani, Anawr ul Hassan. *Chemistry abstract* 129: 45165 (1998).

40. Antibacterial and Antihemolytic activity of triterpenes and B-sitosterol isolated from Chinese quince. Osawa, Kenji; Yasuda, Hideyuki; Morita, Hiroshi; Takeya, Koichi; Itokawa, Hideji. *Chemistry abstract* 128: 70376 (1998).
41. *Chemistry abstract* 128: 312801(1998).
42. *Chemistry abstract* 128: 340057(1998).
43. Martin, C. K. A., *Sterols in Biotechnology*, Ed. Rehm, H.-.; Reed, G., Verlag Chemie, Weinheim, 1984; vol 6<sup>a</sup>, pp 79-95.
44. F. J. Matos, *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Edições UFC, Fortaleza, (1997).
45. MOPACVersion 6.0: J. J. P. Stewart; Frank J. Seiler Research Laboratory, U. S. Air force Academy, Colorado Springs, CO 80840-6528, USA, 1990.
46. SPARTAN-Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman, Suite 370. Irvine, CA 92612, USA.
47. Gaussian 94, revision D.2: M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, W. M. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzales, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1995.
48. Eliel, E. L., Wilen, S. H., Mander, L. N. (1994) *Stereochemistry of organic Compounds*. John Wiley & sons, inc.
49. Feuer, H., Hossz, J. (1967). *The Chemistry of the ether Linkage*. New York: Interscience, P. 446-468.
50. Haslam, E. (1980) *Tetrahedron*, 36, 2409-2433.
51. *Physiology and biochemistry of sterols*. Edited by Glenn W. Patterson, University of Maryland.
52. C. Laezza, V. Di-Marzo, M. Bifulco, *Chem. Abstract* 130 (1999), 79148.
53. C. M. Shipman, P. I. Croucher, R. G. G. Russell, M. H. Helfrich, M. J. Michael, *Cancer Res.* 58 (1998), 5294-5297.
54. Delport, C.; Backhouse, N.; Negrete, R.; Salinas, P.; Calssels, B. K.; Feliciano, A. *San. Phytother. Res.*, 12(2), 118-122, 1998.
55. *Chemistry abstract* 128: 30053 (1998). Delport, Carla L.; Backhouse, C. Nadine; Erazo, Silvia; Negrete, Rosa E.; Silva, Carolina; Hess, Andres, Munoz, Orlando; Garcia-Gravalo, M. Dolores; San Feliciano, Arturo. *Phytother. Res.*, 11(7), 504-507, 1997.
56. Carmen Lane Gizi Zine, Anselmo Alpande Moraes. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de química, Livro de resumos 2 (1999), PN-190. Poços de Caldas, MG.
57. Andrey Moacyr do Rosario Marinho, Dav i do Socorro Barros Brasil, Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon, Adolfo Henrique Muller. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos 2 (1999), P187. Poços de caldas, MG.
58. Antonio Ernesti Frimmell, Juliana Luana Binheiro Peixoto, Gentil Jose Vidotti, Maria Helena Sarragiotto. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos 2 (1999),PN-111. Poços de Caldas, MG.



59. Chemistry Abstracty 128: 72947(1998).
60. Eliane de Oliveira Ferreira, Fabiana Oliveira, Diones Aparecida Dias. 22ª. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Quimica, livro de resumos 2 (1999), P187. Poços de Caldas.
61. Ester Hosana Soldan, Neuza Maria Ruiz Mateus. Benedito Prado Dia filho, Maria helena Sarragiotto. 22ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de resumos 2 (1999), PN-188. Poços de Caldas, MG.
62. Fitoterapia 69(1), 90-91, 1998.
63. Chemistry Abstracty 129: 45165(1998).
64. Francisco Eleodoro Machado Brito Junior, Antonia Maria das Graças Lopes Cito, Jose Arimateia Dantas Lopes e Marina Helena Chaves. 22ª. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumo 2 (1999), PN-199. Poços de Caldas, MG.
65. Chemistry Abstract 129; 25749(1998).
66. Chemistry Abstract 129: 94670(1998).
67. Chemistry Abstract 128: 125844(1998).
68. Chemistry Abstract 128: 203002(1998).
69. Luce Maura, Ibiapina Silva, Mariana H. Chaves e Nidia F. Roque. 22ª. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumos 2 (1999), PN-046 Poços de Caldas, MG.
70. Cassia Cristina Fernanda Alves, Daniela Carvalho Cranchi e Mario Geraldo de Carvalho. 22ª. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de resumo 2 (1999), PN-077. Poços de Caldas, MG.
71. Yasmin L. Zucaro, Reinaldo S. Compagnone, Sonia C. Hess, Franco Delle Monache. 22ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumos 2 (1999), PN-085. Poços de Caldas, MG.
72. Edneia Polato Domeles, Walter Vichneski, João Luis Collegari Lopes. 22ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumos.2 (1999), PN-083. Poços de Caldas. MG.
73. Chemistry Abstract 128: 312801 (1998).
74. Chemistry Abstract 128: 190406 (1998).
75. Carla Cardeal Mendes, Luciana Gottschald Ferreira, Nidia França Roque, Maria Lenise da Silva Guedes. 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumos. 2 (1999), PN-034. Poços de Caldas, MG.
76. Ana Cristina Silva Pinto, Antonio Carlos Siani, Anderson Cavalcante Guimarães, Tulio de Orleans Gadelha Costa. 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumos. 2 (1999), PN-034, Poços de Caldas, MG.
77. Pierre A. Dos Santos, Ana Maria S. Pereira, Suzelei C. França, Noberto P. Lopes. 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Livro de Resumos.2 (1999), PN-024. Poços de Caldas, MG.

78. Anderson R. dos Santos, Daniela P. dos Santos, Silvana M. de Oliveira e Vilma Nurnberg. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos.2 (1999), PN-178. Poços de Caldas, MG.
79. Floricea Magalhães Araujo, M. Claudioa M. Young e Dirceu Martins. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-183. Poços de Caldas. MG.
80. Esther Maria Ferreira Lucas, Tanus Jorge Nagem, Tania Toledo de oliveira, Edimar Chartone de Souza, Maria das Dores Ferreira. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-171. Poços de Caldas, MG.
81. Jose Luis Pinto Ferreira, Eliane Souza Carvalho, Leandro Machado Rocha, Josiane Borges Nascimento, Maia Leila Albina Pereira Lopes. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-131. Poços de Caldas, MG.
82. João Oiano Neto, Maria Fatima da Graças Fernandes da Silva, João Batista Fernandes, Edson Rodrigues Filho, Paulo Cezar Vieira. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-105. Poços de Caldas, MG.
83. (a) Chemistry Abstract 129: 58676 (1998).  
(b) Peres, Adair R. S.; Beirith, Alessandra; Calixto, João B.; Yunes, Resendo A. Phytother. Res., 12(3), 209-211, 1998.
84. Patricia Alexandra De Souza Felix, Mario Geraldo de Carvalho, Javier Rincon Velandia e Raimundo Braz-Filho. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-110. Poços de Caldas. MG.
85. Walmior Silva Garcez, Fernanda Rodrigues Gacez, Edilene Delphino Rodrigues e Marlene Ovelar Solaliedres. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos.2 (1999), PN-113. Poços de Caldas, MG.
86. Frederico Guare Cruz, Vania Rastelly de Sousa, Maria Lenise S. Guede. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-140. Poços de Caldas, MG.
87. Chemistry Abstract 128: 72916 (1998).
88. Alcicley da S. Abreu, Patricia S. Barbosa; Davi do S. de B. Brasil; Giselle M. S. P. Guilhon; Adolfo H. Muller; Maria Aparecida M. Maciel; Ricardo Secco. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-016. Poços de Caldas, MG.
89. Suzimone de Jesus Correia, Jorge Mauricio David e Juceni Pereira David. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-140. Poços de Caldas. MG.
90. Chemistry Abstract 128: 125523 (1998).
91. Chemistry Abstract 128: 65557 (1998).
92. Chemistry Abstract 128: 65557 (1998).
93. Chemistry Abstract 128: 25178 (1998).

94. Maique W. Biavatti, Paulo C. Vieira, João B. Fernandes, M. Fatima G. F. da Silva Sergio Albuquerque. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-004. Poços de Caldas, MG.
95. Sebastião F. Palmeira Jr., Ana Paula F. da Silva, Lucia M. Conserva Micheline S. Correia, Giselle M. S. P. Guilhon, Eloisa H. A. Andrade. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-101. Poços de Caldas, MG.
96. Jeferson Chagas do Nascimento, Antonio Jacinto Demuner, Luiz Claudio de Almeida Barbosa e Maria Amelia dos Santos. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-012. Poço de Caldas, MG.
97. Patricia Fernandes da Silva, João Batista Fernandes, Edson Rodrigues Filho, Paulo Cezar Vieira. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-047. Poço de Caldas, MG.
98. Consuelo Yumiko das C. Yoshioka. Milton Nascimento da Silva, Alberto Cardoso Arruda, Maria Silva Pinheiro Arruda e Adolfo Henrique Muller. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-133. Poços de Caldas, MG.
99. Ana Claudia B. C. Sacilotto, Walter Vichneswki. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-166. Poços de Caldas, MG.
100. Chemistry abstract 128: 221505 (1998).
101. Gilmar Aires da Silva, Ligia Pereira Coelho, Luciano Moraes Lião. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-091. Poços de Caldas, MG.
102. Walter Luis Brasil Medeiros, Ivio. Jose Cursino Vieira, Leda Mathias, Raimundo Braz-Filho, Jan Schripsema. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Livro de Resumos. 2 (1999), PN-136. Poços de Caldas, MG.
103. Chemistry Abstract 128: 221505 (1998).
104. Ian Castro-gamboa, M. Fatima das G. F. da Silva, João B. Fernandes, Edson Rodrigues Filho, Paulo C. Vieira. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos 2 (1999), PN-179. Poços de Caldas, MG.
105. Esther Maria Ferreira Lucas, Tanus Jorge Nargem, Tania Toledo de Oliveira, Nagib Saadi. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos. 2 (1999), PN-185. Poços de Caldas, MG.
106. Phytochemistry 47 (5), 899-901 (1998).
107. Phytochemistry 47 (7), 1223-1226 (1998).
108. Chemistry abstract 129: 65540(1998).
109. Fabio Morais, Maria Claudia Marx Young, Edson Paulo Chu, Ossamu Shirota e. Mtsue Haraguchi. 22<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos. 2 (1999), PN-201. Poços de Caldas, MG.
110. Contribuição ao Estado Físico-Fitoquímico do gênero *Protium* p. *tenuifolium* (Engl) e *P. laxiflorum* Engl (Burseraceae). Jane B. G. Siqueira. Manaus – Amazonas (1991).

- 111.V. K. Garg & W. R. Nes, *Phytochemistry* 23 (12), 2925-2929, (1984).
- 112.L. J. Goad (1991). Phytosterols. In: B. G. Charlwood & D. V. (Eds). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, London. P. 399-434 .
- 113.A. Aragão Craveiro, A. da Costa Prado, O. R. Gottlieb and P. C. Welerson de Albuquerque, *Phytochemistry*, 9 1869-1875, (1870).
- 114.R. M. Silverstein, G. C. Bassler and T. C. Morrill, *Spectrometric Identification of organic Compounds*. 5 edition.(1991). John Wiley & Sons, inc Singapore.
- 115.J. K Prasain; Y. Tezuka; J. Xim Li; K.Tanaka ; P. basnet ; Hui Dong; T. Namba and Shigetoshi, *Planta Medica.*, 65 196, (1999).
116. M. B. Gewali; Y. Tezuka; A. H. Banskota; M. S. Ali; I. Saiki; Dong and kodota, *Org. Lett.*, 1 (11), 1733-1736, (1999).
117. H. T. P. Ammon, *planta Medica* 58, 226, (1992).
- 118.R. T. Burke, *J. Med. Chem.* 38, 4171, (1995).