

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DITERPENOS CLERODANOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Echinodorus macrophyllus*

Mariana Magalhães Borges e Edgard Antonio Ferreira

Apoio: PIBIC Mackpesquisa

RESUMO

A espécie *Echinodorus macrophyllus*, uma macrófita aquática, nativa do Brasil teve seu estudo fitoquímico realizado pela maceração das folhas secas moídas com hexano seguido por acetato de etila. Com base na análise de RMN de ^1H , o extrato em hexano foi selecionado para o fracionamento cromatográfico pela presença de um sinal em δ 6,80 ppm, característico para diterpenos clerodanos. Desta forma, vários procedimentos cromatográficos foram aplicados visando a obtenção de compostos purificados. O fracionamento inicial do extrato bruto em hexano foi realizado por cromatografia em coluna de sílica-gel e resultou em 10 frações (A-J), onde foi possível observar na fração C sinais característicos dos diterpenos do tipo clerodano em δ 6,80 ppm. Dando continuidade ao fracionamento, a fração C foi submetida a um novo fracionamento em sílica-gel onde foram geradas 5 subfrações (C1-C5) com observação do sinal em δ 6,80 ppm na subfração C4. Esta foi então fracionada em nova coluna de sílica-gel e finalmente chegou-se a uma massa de 150 mg para a subfração C4a, com a presença do sinal em δ 6,80 ppm. A partir da subfração C4a, foi isolado o ácido pagônico por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativo. A estrutura molecular foi elucidada por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e comparação com resultados da literatura. Ensaios sobre a atividade leishmanicida está em curso, uma vez que não há relatos na literatura para o referido composto.

Palavras-chave: Macrófita aquática. *Echinodorus*. Diterpenos clerodanos.

ABSTRACT

The phytochemical study of the species *Echinodorus macrophyllus*, an aquatic macrophyte, native from Brazil, was carried out by maceration of ground dried leaves with hexane followed by ethyl acetate. Based on ^1H NMR analysis, the hexane extract was selected for chromatographic fractionation due to the presence of a signal at δ 6.80 ppm, characteristic for clerodane diterpenes. Thus, several chromatographic procedures were applied in order to obtain purified compounds. The initial fractionation of the crude extract in hexane was carried out by silica gel column chromatography and resulted in 10 fractions (A-J), where it was possible to observe in fraction C characteristic signs of clerodane diterpenes at δ 6.80 ppm. Continuing the fractionation, fraction C was subjected to further fractionation on silica gel where 5 subfractions were generated (C1-C5) with observation of the signal at δ 6.80 ppm in the C4 subfraction. This was then fractionated on a new silica-gel column and finally a mass of 150 mg was obtained for the C4a subfraction, with the presence of a signal at δ 6.80 ppm. From subfraction C4a patagonic acid was isolated by semi-preparative HPLC analysis. The molecular structure was elucidated by spectroscopic analysis as ^1H and ^{13}C NMR, HSQC and HMBC, as well as comparison with literature data. Trials to measure the leishmanicidal activity are also underway, once no report is presented in literature.

Keywords: Aquatic macrophyte. *Echinodorus*. Clerodane diterpenes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problema de pesquisa

O Brasil apresenta em sua flora uma numerosa e ampla diversidade de espécies vegetais que formam uma rica fonte de compostos químicos. Entre as espécies vegetais que compõem flora brasileira, tem-se o grupo das macrófitas aquáticas, popularmente conhecidas como plantas aquáticas. No entanto, o estudo fitoquímico e a avaliação do potencial terapêutico para os compostos isolados deste grupo de vegetais é muito limitado quando se faz uma correlação entre a quantidade de espécies catalogadas na flora brasileira e os relatos encontrados na literatura. Com isto, há uma grande restrição do conhecimento acerca do potencial químico e terapêutico de compostos isolados de macrófitas aquáticas. Entre as demandas relacionadas como alvos terapêuticos, tem-se as doenças parasitárias. Como exemplo, tem-se a leishmaniose, uma doença tropical e negligenciada que atinge milhões de pessoas em países emergentes, incluindo o Brasil. Os recursos terapêuticos disponíveis para o tratamento são limitados e baseiam-se em compostos de antimônio pentavalentes (Sb^{+5}) e a Anfotericina B, no entanto apresentam muitos efeitos colaterais e elevado custo para o tratamento.

Estudos envolvendo a espécie nativa *Echinodorus macrophyllus*, quanto a sua composição química, revelou a presença de compostos pertencentes a classe dos diterpenos do tipo clerodano. Esta classe de compostos é amplamente encontrada em diversos gêneros de espécies vegetais e com ampla gama de aplicações terapêuticas. Contudo, os compostos isolados e identificados da espécie *Echinodorus macrophyllus* não foram avaliados quanto ao potencial terapêutico. Diante da grande diversidade de moléculas pertencentes a classe dos diterpenos do tipo clerodano e relatos sobre aplicações almejando aplicação como fármacos, torna-se interessante o isolamento, caracterização e avaliação da atividade leishmanicida de tais compostos. Tal demanda para novos fármacos e/ou protótipos moleculares visando o tratamento da leishmaniose se dá devido aos muitos efeitos colaterais e resistência do parasita aos medicamentos atualmente utilizados, além do baixo investimento em pesquisa para a busca de medicamentos com maior potencial de cura para as pessoas acometidas pelo parasita. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo geral a obtenção e caracterização molecular de diterpenos clerodanos isolados a partir das folhas da espécie *Echinodorus macrophyllus*, e avaliação da atividade leishmanicida das substâncias isoladas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

As macrófitas aquáticas são popularmente conhecidas como plantas aquáticas. Ao longo de seu processo evolutivo adaptaram-se ao ambiente aquático de forma muito eficiente.

Apresentam aproximadamente 2600 espécies distribuídas por mais de 450 gêneros e estão representadas por sete grandes grupos: cianobactérias, clorófitas, rodófitas, xantófitas, briófitas, pteridófitas e espematófitas (CHAMBERS *et al.*, 2008).

2.1. Gênero *Echinodorus*

A família Alistemataceae apresenta 80 espécies distribuídas por doze gêneros de macrófitas aquáticas. Entre os doze gêneros, apenas dois são de ocorrência natural na região neotropical: *Equinodorus* e *Sagittaria* (MATIAS, 2007). As espécies do gênero *Echinodorus* são encontradas desde os Estados Unidos até a Argentina com ocorrência predominante na América do Sul, com descrição de 27 espécies. (MATIAS, 2010)

Na medicina popular, espécies do gênero são usadas no tratamento de hepatite e reumatismo além de possuírem propriedades diuréticas e anti-inflamatórias (PINTO *et al.*, 2007; LESSA *et al.*, 2008).

Ensaios biológicos realizados com os extratos brutos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* apresentaram efeitos imunossupressores e anti-hipertensivo, respectivamente (PINTO *et al.*, 2007; LESSA *et al.*, 2008).

Os poucos relatos sobre a composição química de espécies do gênero *Echinodorus* envolvem as espécies *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*.

A partir de ambas as espécies foram isolados diterpenos do tipo clerodano e cembrano com variação estrutural das cadeias laterais ou grupos funcionais. No entanto, nenhuma atividade biológica foi atribuída aos compostos isolados (TANAKA *et al.*, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 2000a; KOBAYASHI *et al.*, 2000b; KOBAYASHI *et al.*, 2000c) (Figura 1 e 2).

Figura 1: Substâncias isoladas da espécie *E. grandiflorus*

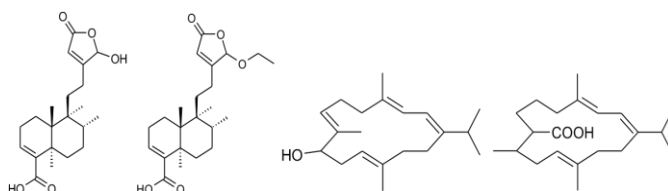


Figura 2: Substâncias isoladas da espécie *E. macrophyllus*

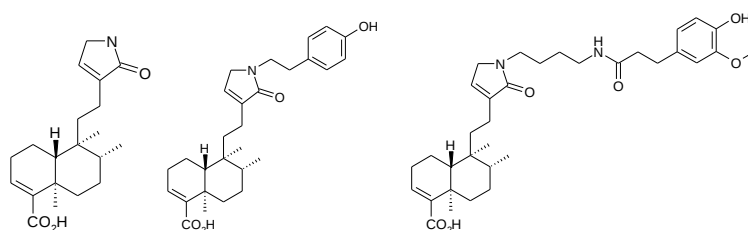
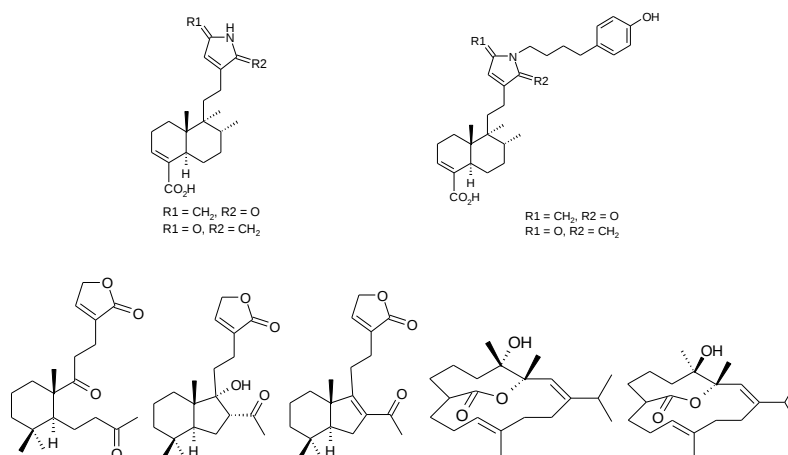
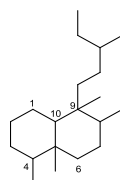


Figura 2: Substâncias isoladas da espécie *E. macrophyllus* (continuação)

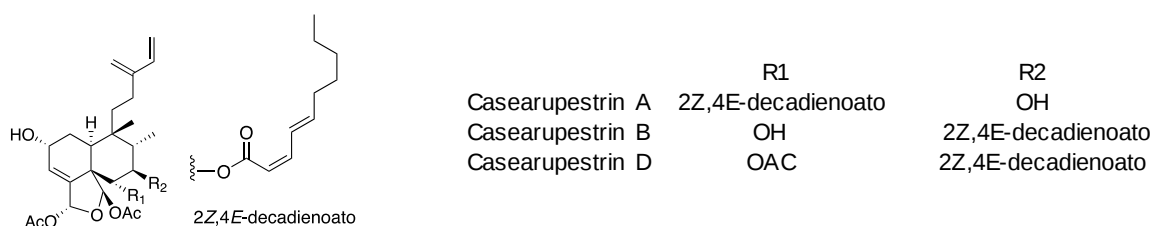
2.1.2. Diterpenos clerodanos

Os diterpenos clerodanos são um imenso grupo de metabolitos especiais encontrados em muitos organismos como plantas, fungos, bactérias e esponjas marinhas. A estrutura básica é formada por duas porções; um anel fundido do tipo decalina (C1-C10) e uma cadeia lateral formada por seis átomos de carbono ligada na posição C9 (Figura 3).

Figura 3: Estrutura básica de diterpenos clerodanos

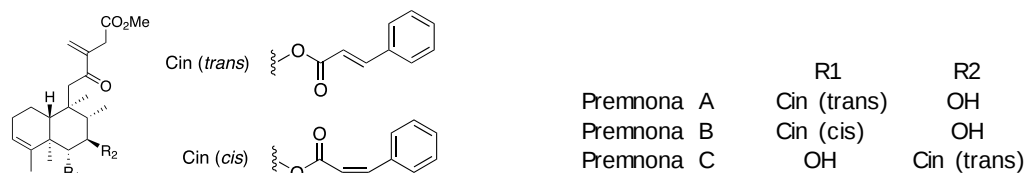
Esta classe de metabólitos atrai a atenção da comunidade científica devido aos mais diversos relatos de propriedades terapêuticas, como atividade citotóxica, antiinflamatória, antiparasitária, antifúngica, bactericida (LI, MORRIS-NATSCHKE E LEE, 2016).

Entre os compostos que pertencem a esta classe de compostos que apresentam destacada atividade terapêutica pode-se citar, a Casearupestrins A, B e D que apresentaram significativa atividade citotóxica frente a quatro linhagens celulares (HL-60, HCT-8, MDA/MB-435, e SF-295) com valores de IC_{50} de 0,10 a 1,3 μM (Figura 4) (VIEIRA-JUNIOR et. al, 2011).

Figura 4: Estruturas moleculares de Casearupestrins A, B e D

As Premnonas A-C isoladas das folhas de *Premna tomentosa* foram muito ativas frente a três linhagens celulares de câncer (Lu1, LNCaP, e MCF-7) com valores compreendidos de 0,7 a 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 5) (CHIN, et. al, 2006).

Figura 5: Estruturas moleculares de Premnonas



Quanto a atividade antiparasitária, estudos foram conduzidos com diterpenos clerodanos extraídos das cascas da espécie *Laetia procera* frente a *Leshmania falciparum* com valores de IC_{50} compreendidos entre 0,54 a 0,66 μM (Figura 6) (JULLIAN, et. al, 2005).

Figura 6: Estruturas moleculares dos diterpenos clerodanos extraídos das cascas de *L. procera*



2.2. Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças que estão distribuídas em 88 países e atingem 12 milhões de pessoas no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, entre 700 mil e 1 milhão de novos casos e entre 20 e 30 mil mortes são registradas por ano. (WHO, 2020).

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania* e a transmissão ocorre pela picada do inseto hematófago flebotomo fêmea. (ALEXANDER et. al, 1999).

As leishmanioses são caracterizadas por três formas de manifestação no corpo da pessoa infectada.

- Visceral:** Caracteriza-se por ataques irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e fígado e anemia. Em caso de não tratamento, em 95% dos casos pode resultar em morte;
- Cutânea:** é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes duradouras e deficiência grave;

- c) Monocultânea: leva a destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta.

Como forma de tratamento, tem-se os compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}); no entanto, estes apresentam uma grande diversidade de efeitos colaterais como mialgia, artralgia, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade (SUNDAR e OLLIARO, 2007)

Alternativamente, aos compostos antimoniais, tem-se a Anfotericina B, um antibiótico anfótero, eficaz de combater as cepas resistentes de *Leishmania* aos antimoniais. (MISHA, *et. al.*, 2004) No entanto, o custo é muito elevado, além da ocorrência de efeitos colaterais como febre, nefrotoxicidade, diminuição de potássio e magnésio. (BALAÑA-FOURCE *et. al.*, 1998).

Outra alternativa é a Miltefosina, único tratamento oral disponível para tratamento da leishmaniose. Como principais contraindicações, a miltefosina, apresenta riscos de dano ao feto em caso de gravidez do paciente. Em estudo realizado por Sindermann e Engel (2006) foi observado que uma dose de 1,3 mg/kg por um período de 10 dias de gestação em camundongos e coelhos causou efeitos teratogênicos.

A leishmaniose está dentro do grupo de doenças negligenciadas, que são aquelas causadas por parasitas ou agentes infecciosos em populações de baixa renda, como em países da África, América do Sul e Ásia. Diante do panorama atual relatado pela Organização Mundial de Saúde, e pelo elevado custo e efeitos colaterais a busca por novos fármacos ainda desperta atenção da comunidade científica.

3. METODOLOGIA

3.1. Procedimentos experimentais gerais

Os solventes utilizados nas extrações e partições líquido-líquido, hexano, acetato de etila, metanol e butanol, foram de grau PA da marca Synth utilizados sem prévio tratamento.

Para a concentração dos extratos, foi utilizado rotaevaporador BUCHI, sob pressão reduzida, equipado com bomba de vácuo BUCHI modelo V-700/710.

As amostras injetadas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram previamente filtradas em filtro de seringa Nylon (3 mm, 20 μm).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Infinity Series com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos (DAD-UV/VIS), modelo 1260 Infinity Series e módulo de tratamento de dados ChemStation Edition.

Como fase estacionária foi utilizada a coluna Supelco Ascentis fase reversa C18 (250 x 10,00 mm) e 5 μm de diâmetro de partícula.

Para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizado acetonitrila de grau cromatográfico (Merck).

Para as colunas cromatográficas abertas foi utilizado sílica-gel do tipo 60, com partículas 63-200 μm da Merck.

Os espectros de RMN de ^1H de 300 foram obtidos em um espectrômetro Bruker AIII 300, localizados na central analítica do Instituto de Química da USP/São Paulo. As amostras submetidas aos experimentos de RMN foram solubilizadas em CDCl_3 da Sigma-Aldrich.

3.2. Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

A espécie *Echinodorus macrophyllus* (Figura 7) foi coletada no município de Suzano/SP junto a um produtor de plantas ornamentais para lagos artificiais. As suas partes aéreas (galhos e folhas) foram submetidas a secagem em estufa sob ventilação a 40°C por 24 horas visando a eliminação de água. O material seco foi então moído em um liquidificador comercial e 336,0 g foi utilizado para a obtenção de extrato bruto.

Figura 7: Espécie *Echinodorus macrophyllus*



Fonte: <https://hortodidatico.ufsc.br/chapeu-de-couro/>

O extrato bruto foi obtido a partir da maceração com hexano (10 x 500 mL) gerando uma massa de 10,27 g após remoção do solvente por pressão reduzida. A torta residual foi então utilizada para a extração com acetato de etila (10 x 500 mL) gerando uma massa de 8,83 g de extratos seco após remoção do solvente por pressão reduzida. Uma alíquota dos extratos em hexano e acetato de etila foram submetidas a análise de RMN de ^1H visando verificar a presença de um simpleto em δ 6,80 ppm, indicativo da presença de uma ligação dupla entre as posições 3 e 4 da estrutura principal de diterpenos do tipo clerodano.

3.3. Fracionamento cromatográfico

A metodologia utilizada para o fracionamento cromatográfico visando a purificação das substâncias foi a cromatografia de adsorção em sílica gel e cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa. Para o primeiro método, as separações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e análise de RMN de ^1H .

Almejando o isolamento de compostos com base no sinal apresentado em δ 6,80 ppm, o extrato em hexano foi selecionado. Desta forma, 9,63 g do extrato foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna aberta (6,0 x 25,0 cm) com 400,0 g de sílica. A fase móvel utilizada foi constituída de uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade utilizando hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) nas seguintes proporções: Hex:AcOEt (1:1; 25:75), AcOEt 100%, AcOEt:MeOH (1:1) e MeOH 100%. Esse processo gerou 84 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), com reunião das frações de acordo com a similaridade que as substâncias eluíram na placa cromatográfica após revelação sob radiação ultravioleta ($\lambda = 425 \text{ nm}$). Com isto, foi obtido 10 grupos (A – J) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Grupos do fracionamento cromatográfico do extrato em hexano

Grupo	Fração	Massa (g)
A	1 – 22	6,6710
B	23 – 35	0,4784
C	36 – 50	0,5802
D	51 – 57	0,2019
E	58 – 67	0,0648
F	68	0,0171
G	69 – 71	0,0224
H	72 – 77	0,4028
I	78 – 79	0,1889
J	80 - 84	0,0736

Cada grupo foi analisado por ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ^1H) e assim, foi verificado a presença de sinais em δ 6,80 ppm, que corresponde a sinal característico de diterpenos clerodanos na fração C.

Desta forma, 560,0 mg da fração C foi submetida a um fracionamento em coluna aberta (4,0 x 19,0 cm) e 95,0 g de sílica.

A fase móvel utilizada foi constituída de uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade utilizando hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) nas seguintes proporções, Hex:AcOEt (1:1; 2:3; 1:3), AcOEt 100% e a mistura de solventes de AcOEt:MeOH (1:1).

Esse processo resultou em 53 frações que foram analisadas CCDA, onde as frações foram reunidas com base na similaridade em que as substâncias se deslocaram na placa cromatográfica após revelar sob radiação ultravioleta ($\lambda = 425$ nm). Assim, após a reunião das frações, foi obtido 5 grupos (C1 – C5) apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Fracionamento cromatográfico da fração C

Grupo	Subfração	Massa (g)
C1	1 – 6	0,0440
C2	7 – 14	0,0271
C3	15 – 25	0,1612
C4	26 – 41	0,2306
C5	42 – 53	0,0780

Após análise das subfrações por RMN de ^1H , foi constatado a presença dos sinais característicos de diterpenos clerodanos (δ 6,80 ppm) na fração C4.

Assim, a fração C4 foi submetida a novo procedimento cromatográfico.

Desta forma, 220,0 mg da fração C4 foi submetida a um fracionamento em coluna aberta (2,3 x 21,0 cm) e 32,5 g de sílica.

A fase móvel utilizada foi constituída de uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade utilizando Hex:AcOEt (1:1; 2:3; 1:3), AcOEt 100%, AcOEt:Me OH (1:1) e MeOH 100%.

O fracionamento resultou em 28 subfrações que foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD), onde as frações foram reunidas de acordo com a similaridade em que as substâncias se deslocaram na placa cromatográfica após revelar sob radiação ultravioleta ($\lambda = 425$ nm). Assim, após a reunião das frações foi obtido 4 grupos (C4a – C4d) (Tabela 3).

Tabela 3: Fracionamento cromatográfico da subfração C4

Grupo	Fração	Massa (g)
C4a	1 – 9	0,150
C4b	10 – 15	0,0155
C4c	16 – 19	0,0193
C4d	20 – 28	0,0400

Cada grupo foi analisado por ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ^1H) e assim, foi constatado a presença dos sinais característicos de diterpenos clerodanos na subfração C4a. Diante da observação da presença do sinal em δ 6,80 ppm uma alíquota da amostra foi submetida a análise cromatográfica.

A análise foi realizada com utilização de coluna de fase reversa C18, Supelco Ascentis (250 x 10 mm, 5,0 μm). A fase móvel utilizada foi ACN e água ultra pura com fluxo de 2,5 mL/min. A eluição ocorreu no modo gradiente conforme tabela 4. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 210 e 254 nm.

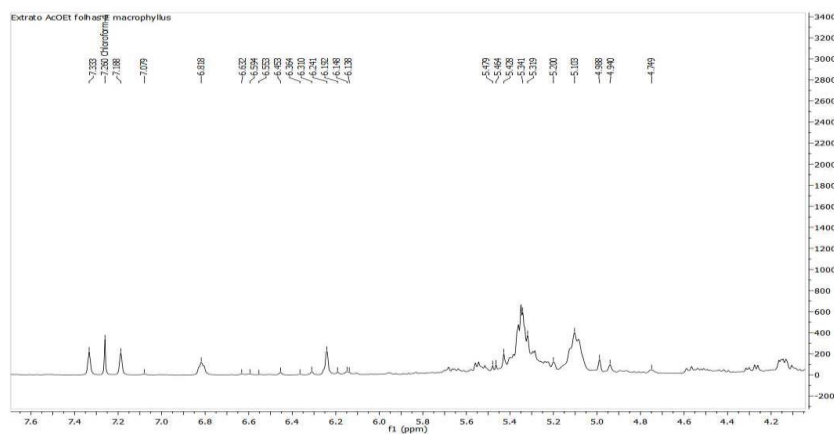
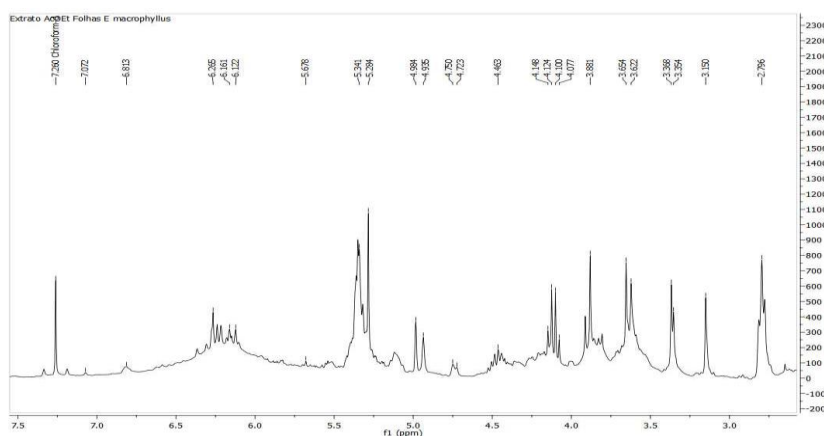
Tabela 4: Gradiente de eluição da fração C4a de *E. macrophyllus*

Tempo (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
0,0	66,0	34,0
5,0	66,0	34,0
17,0	72,0	28,0
21,0	77,0	23,0

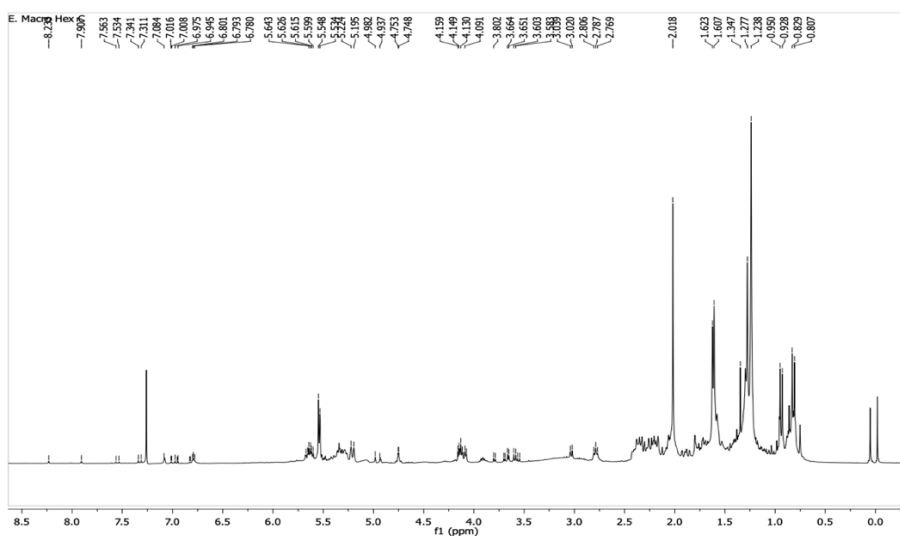
4. RESULTADO E DISCUSSÃO

O processo de extração dos constituintes químicos teve início com o método de maceração onde foi gerado os extratos secos em hexano (10,27 g) e acetato de etila (8,83 g) com percentual em massa de 3,0 % e 2,63% para hexano e acetato de etila, respectivamente em relação a massa de folhas secas e moídas.

Pela análise de RMN de ^1H dos extratos, optou-se por trabalhar inicialmente com o extrato em hexano tendo em vista a maior intensidade do sinal em δ 6,82 ppm e ausência de sinais de feofitinas (Figuras 8 e 9).

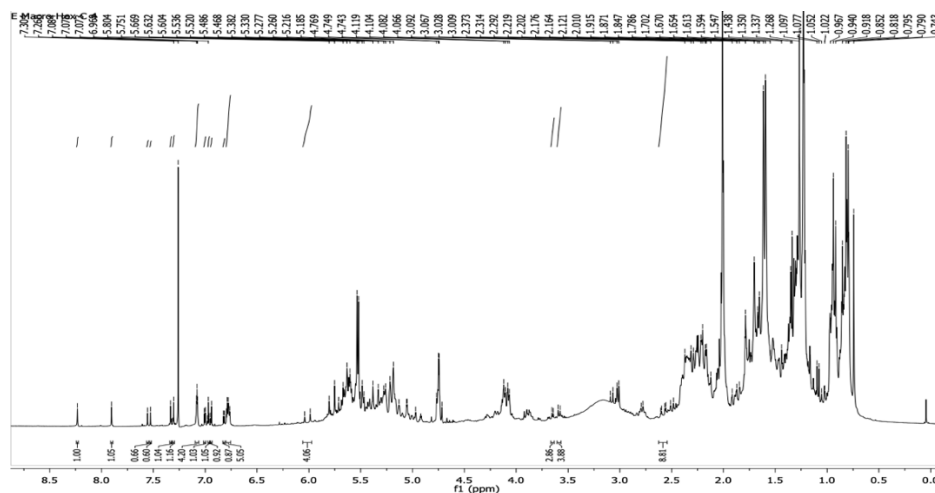
Figura 8: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato em hexano de *E. macrophyllus***Figura 9:** Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato em acetato de etila de *E. macrophyllus*

O primeiro fracionamento cromatográfico, foi bem sucedido do ponto de vista de aumentar a concentração dos compostos de interesse em uma única fração. Pelo espectro de RMN de ^1H , foi possível verificar a presença de tais compostos na fração C com base na região entre δ 6,75 e δ 7,60 ppm (Figura 10).

Figura 10: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração C

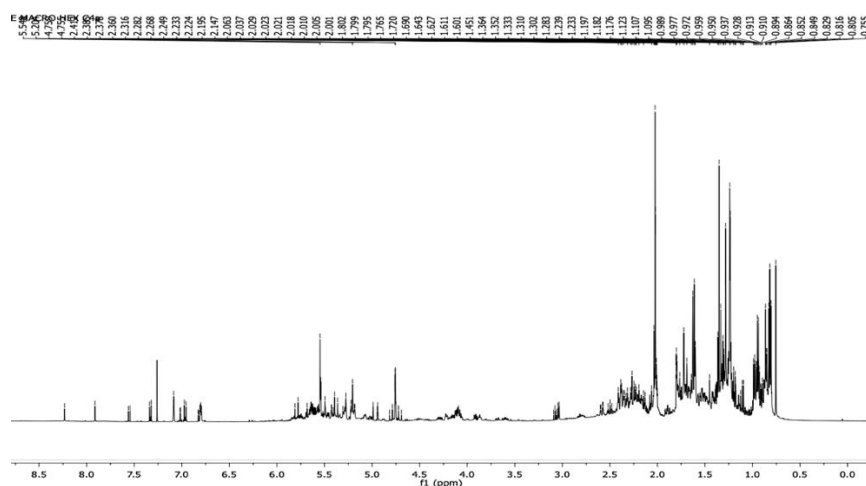
Assim, o fracionamento cromatográfico teve continuidade pela aplicação da fração C em nova coluna cromatográfica visando aumentar ainda mais a concentração dos compostos, o que foi possível com base na observação dos sinais na região entre δ 6,75 e δ 7,60 ppm fração C4 (Figura 11).

Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da subfração C4



Como a massa da fração C4 era elevada para a finalidade desejada, foi submetida a fracionamento com obtenção de nova fração C4a com massa de 140 mg e presença dos compostos de interesse em elevada concentração. Pela expansão do espectro de RMN de ^1H , pode-se verificar uma grande quantidade de sinais que podem ser atribuídos a prótons de anéis aromáticos além de sinais na região de δ 6,80 ppm (Figura 12).

Figura 12: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da subfração C4a

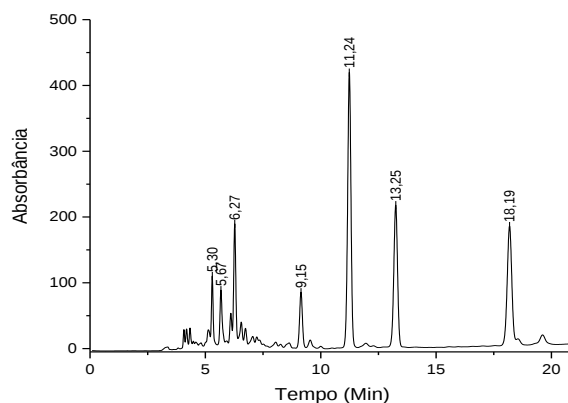


O espectro de RMN de ^1H da fração C4a na região de δ 6,75 a 8,3 ppm revelou a presença de grande quantidade de prótons conectados a anéis aromáticos. Também foi possível visualizar um conjunto de sinais em δ 6,80 ppm.

Assim, a fim de obter tais compostos de forma pura, a subfração foi fracionada por CLAE semi-preparativa.

Tal análise permitiu a observação de três picos de maior absorbância (Figura 13), além de compostos que apresentaram menor absorção.

Figura 13: Cromatograma da fração C4a de *E. macrophyllus*.



A condição cromatográfica utilizada foi satisfatória, uma vez que foi possível obter uma boa resolução para os compostos já utilizando coluna semi-preparativa visando o isolamento dos constituintes. Outro fator importante para o método desenvolvido foi o tempo total de análise, de apenas 20 minutos para que a eluição de todos os constituintes da mistura fosse concluída. Desta forma, pode-se obter os compostos por este processo um tempo muito curto de análise, mesmo tendo que repetir injeções da mistura. Com base no cromatograma, valores máximos de absorção, foram coletadas cinco subfrações, o solvente removido gerando cinco substâncias conforme na tabela 5.

Tabela 5: Fracionamento cromatográfico subfração C4a

Grupo	Massa (g)	Tempo de retenção (min)
C4a - 1	0,0026	5,49
C4a - 2	0,0106	11,17
C4a - 3	0,0014	11,88
C4a - 4	0,0117	13,1
C4a - 5	0,0041	18,0

Com base na análise de RMN de ^1H das cinco substâncias isolada verificou-se a presença do sinal característico de diterpeno cleronado em C4a-2 (figura 14). Desta forma

análises adicionais de RMN de ^{13}C (figura 15), HSQC e HMBC foram realizadas a fim de obter a identificação do composto, além da comparação com dados da literatura.

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da subfração C4a-2

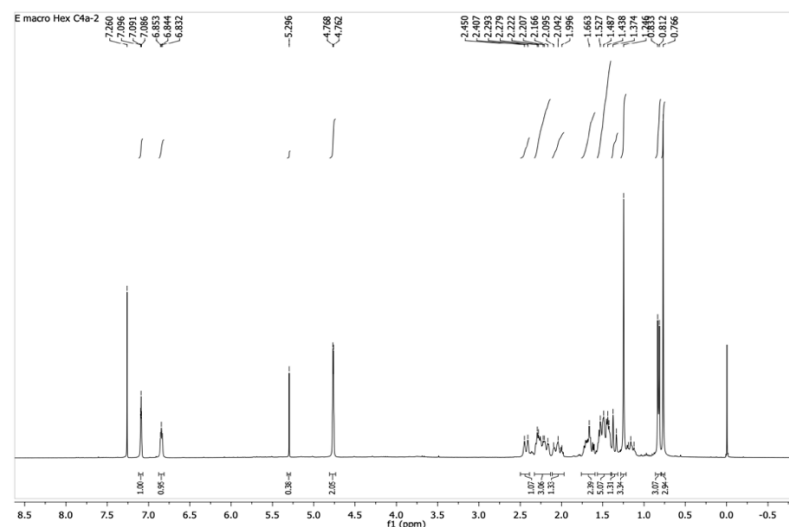
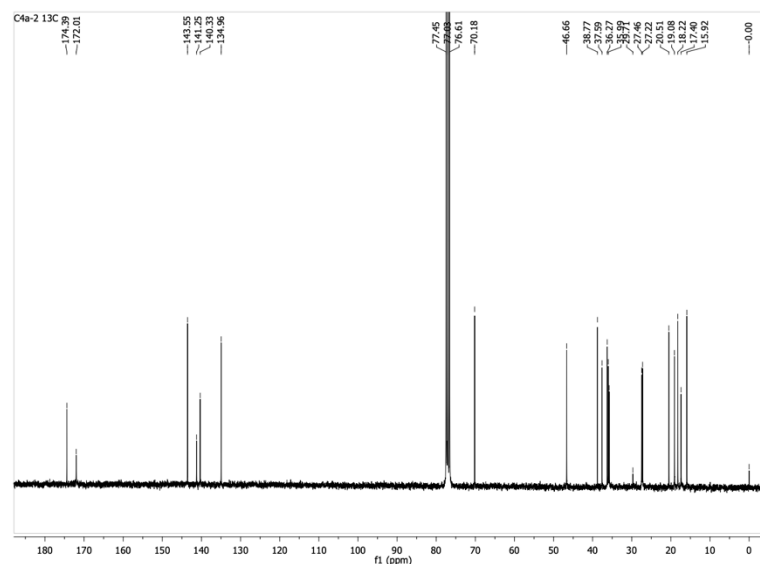


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da subfração C4a-2



O composto C4a-2 foi isolado como sólido branco amorfo. O espectro de RMN de ^1H apresentou dois sinais de metilas quaternárias (δ_{H} 0,77 e 1,25 ppm), uma metila secundária em δ 0,82 ppm, além de sinais de dois prótons olefinicos em δ 7,10 ppm característico de γ -butenolideo α -substituído e o sinal em δ 6,85 ppm correspondente a um próton na posição β de ácido carboxílico α,β insaturado. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinal em 174,4 ppm referente a carbonila do butenolideo, 172,0 ao ácido carboxílico, além dos sinais de carbonos olefinicos em δ 143,6, 141,2, 140,3 e 134,7 ppm, além de um sinal em δ 70,2 ppm correspondente a um grupo metilênico oxigenado. A partir destes resultados, além da

comparação com dados da literatura (PINTO et. al, 2010) (Tabela 6) o composto foi atribuído como ácido patagônico (figura 16).

Figura 16: Estrutura molecular do ácido patagônico.

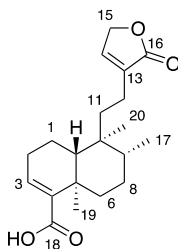


Tabela 6: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do composto C4a-2 (500 e 75 MHz, CDCl₃).

Posição	δ_H (multipl., J/Hz)	δ_H Lit. (multipl., J/Hz)	δ_C	δ_C Lit.
1	1,70 m	1.70 m	17.4	17.4
2	1,45 m	1.45 m	27.2	27.4
3	6.85 br t (3.6)	6.81 br s	140.3	140.1
4	-	-	141.3	141.1
5	-	-	37.6	37.4
6 eq	1,43 m	1.43 m	35.7	36.0
6 ax	2,40 m	2.40 m		
7	2,25 m	2.25 m	27.5	27.2
8	1,50	1.50 m	36.3	36.3
9	-	-	38.8	38.7
10	1,35 m	1.35 m	46.7	46.7
11 eq	1,19 m	1.19 m	36.0	35.7
11 ax	2,40 m	2.40 m		
12 eq	2,05 m	2.05 m	19.1	19.0
12 ax	2,20 m	2.20 m		
13	-	-	135.0	135.0
14	7.10 br t (1.7)	7.06 br s	143.5	143.4
15	4.77 d (1.5)	4.79 br s	70.2	70.1
16	-	-	174.4	174.3
17	0.82 d (6.0)	0.85 d	15.9	15.8
18	-	-	172.0	172.0
19	1.25 s	1.27 s	20.5	20.5
20	0.77 s	0.75 s	18.2	18.1

O composto C4a-5, a partir da análise de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e espectrometria de massas (figuras 17, 18 e 19) teve sua identidade estrutural revelada como difenoconazol (figura 20). A espécie vegetal estudada foi obtida a partir de produtor de plantas aquáticas que utiliza fungicida no

cultivo. Desta forma o composto C4a-5 não faz parte da via metabólica da espécie vegetal, mas sim incorporado.

Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da subfração C4a-5

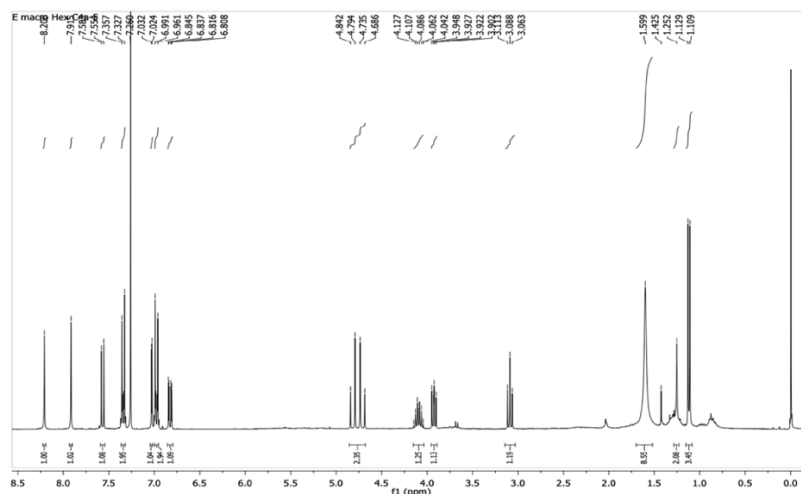


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (75 MHz, CDCl_3) da subfração C4a-5

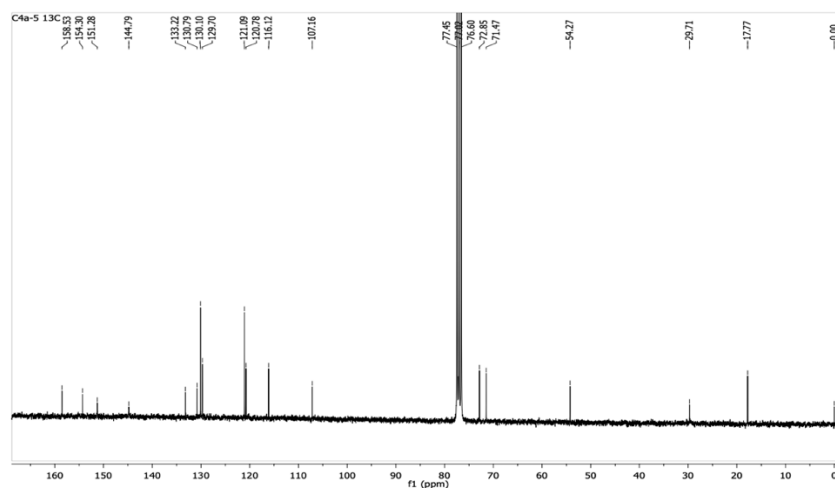


Figura 19: Espectro de massas de baixa resolução do composto C4a-5.

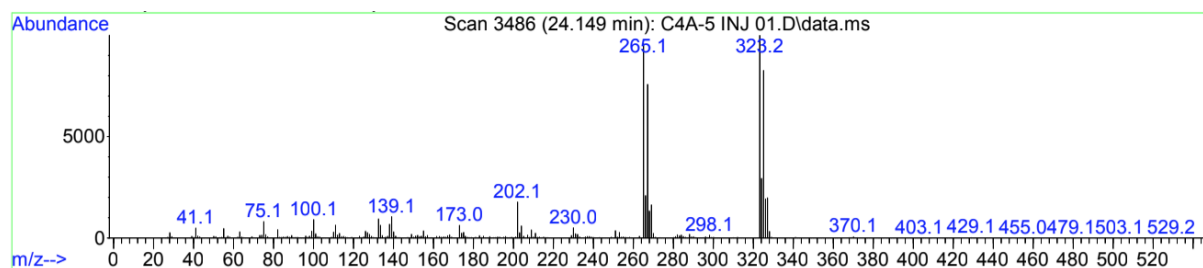
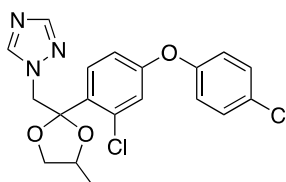


Figura 20: Estrutura molecular do difenoconazol.



Já os compostos C4a-1, C4a-3, C4a-4 não apresentaram sinais do espectro de RMN de ^1H que indiquem algum composto que deva ter sua estrutura química elucidada, pois representam apenas material graxo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procedimentos cromatográficos utilizados do trabalho foram muito eficientes tendo em vista a obtenção de dois compostos com alto grau de pureza, uma pertencente a classe dos diterpenos do tipo clerodano e outro composto que a espécie vegetal incorporou pela utilização de um fungicida. A fração em acetato de etila não estudada neste trabalho será também submetida a processos cromatográficos visando a obtenção de mais compostos para o enriquecimento do acervo de substâncias para o referido estudo. Tais substâncias tendem a ser análogas dos compostos isolados neste trabalho, tendo em vista as similaridades dos sinais dos espectros de RMN de ^1H para os extratos.

6. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leshmania species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, v. 112, p. 2993-3002, 1999.
- BALANÍA-FOURCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of Leishmaniasis. *General Pharmacology*, v. 30, p.435-443, 1998.
- CHAMBERS, P. A.; LACOUL, P.; MURPHY, K. J.; THOMAZ, S. M. Global diversity o aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 9-26, 2008.
- CHIN, YOUNG-WON; JONES, WILLIAM P.; MI, QIUWEN; RACHMAN, ISMAIL; RISWAN, SOEDARSONO; KARDONO, LEONARDUS B. S.; CHAI, HEE-BYUNG; FARNSWORTH, NORMAN R.; CORDELL, GEOFFREY A.; SWANSON, STEVEN M.; CASSADY, J. M.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves of *Premna tomentosa* *Phytochemistry*, v.67, 1243-1248, 2006.
- JULLIAN, V.; BONDUELLE, C.; VALENTIN, A.; ACEBEY, L.; DUIGOU, A.-G.; PREVOST, M.-F.; SAUVAIN, M. New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.15, 5065-5070, 2005.
- KOBAYASHI, J. I.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Tetrahedron Letters* v. 41, p. 2939-2943, 2000a.
- KOBAYASHI, J. I.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Echinophyllins C-F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1576-1579, 2000b.

KOBAYASHI, J. I.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Chapecoderins A-C, New Labdane Derivative Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 375-377, 2000c.

LESSA, M. A.; ARAÚJO, C. V.; KAPLAN, M. A.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M. R., TIBIRIÇÁ, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 22, p. 161-168, 2008.

LI, R.; MORRIS-NATSCHE S. L.; LEE, K.-H. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Natural Products Reports*, v.33, p.1166-1226, 2016.

MATIAS, L. Q. O gênero *Echinodorus* (Alismataceae) no domínio da caatinga brasileira. *Rodriguésia*. v. 58, n. 4, p. 743-774, 2007.

MATIAS, L. Q.. A synopsis of Alismataceae from the semi-arid region of northeastern Brazil. *Revista Caatinga*, 23, 2010.

MISHA, M.; BISWAS, U. K.; JHA, A. M.; KHAN, A. B. amphotericin versus stibogluconate in first line treatment of Indian Kala-Azar. *Lancet*, v. 344, p. 1599-1600, 1994.

PINTO, A. C.; REGO, G. C. G.; SIQUEIRA, A. M.; CARDOSO, C. C.; REIS, P. A.; MARQUES, E. A.; COELHO, M. G. P.; DE CARVALHO SABINO, K. C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 435-439, 2007.

PINTO, M. E. F.; SILVA, M. S.; SCHINDLER, E.; FILHO, J. M. B.; EL-BACHA, R. S.; CASTELO-BRANCO, M. V. S.; AGRA, M. F.; TAVARES, J. F. 3',8''-Biisokaempferide, a Cytotoxic Biflavonoid and Other Chemical Constituents of *Nanua plicata* (Velloziaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 1819-1824, 2010.

SINDERMAN H, ENGEL J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 100, p. 17-20, 2006.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and clinical Risk Management*, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. J. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, v. 44, p. 1547-1549, 1997.

VIEIRA-JUNIOR, G. M.; DUTRA, L. A.; FERREIRA, P. M. P.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; PESSOA, C.; TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Casearia rupestris*. *Journal of Natural Products*, v.74, 776-781, 2011.

World Health Organization (WHO). [Internet]. 2020. Fact sheet. Acesso: 25/05/2020. disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

Contatos: mari_borges@terra.com.br e edgard.ferreira@mackenzie.br